

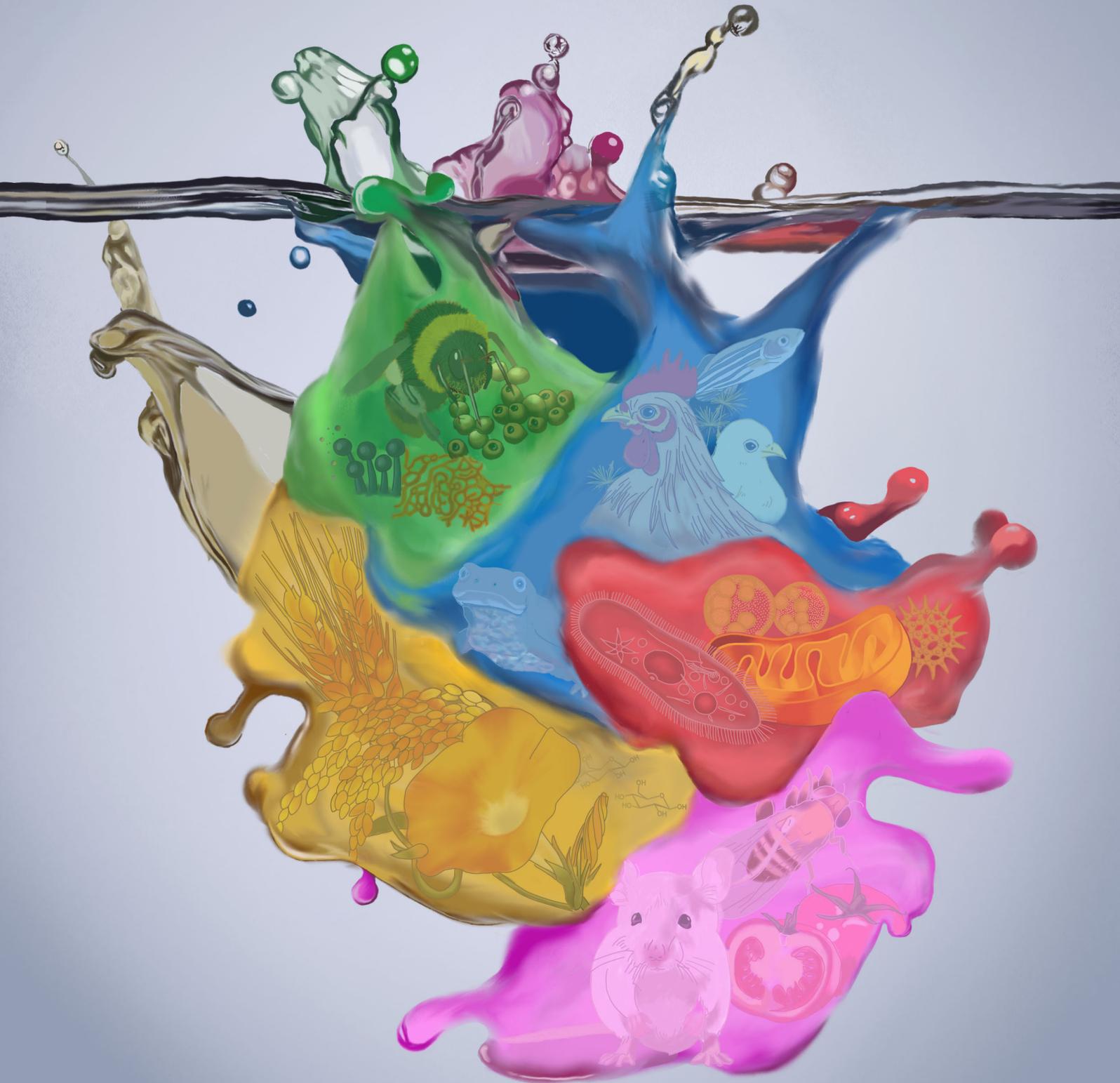
生物学類

つくば生物ジャーナル

Tsukuba Journal of Biology

Vol.23 No.1 January 2024

www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb



つくば生物ジャーナル

Tsukuba Journal of Biology

Vol.23 No.1 January 2024

www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb

令和 5 年度

生物学類卒業研究発表会要旨集

令和 6 年 2 月 19 日

筑波大学

生物学類

第一会場 (2B411)

9:40-	小西 陽巳 チョウ媒植物の花の向きが受粉効率に及ぼす影響 ~折り紙花による室内実験	2
9:55-	大西 礼 花は特殊化の産物か? : 送粉シンドロームを多様な訪花動物への適応として捉えなおす	3
10:10-	竹内 希海 せっかち派 vs. 慎重派 : マルハナバチの採餌戦術は学習能力の個体差で説明できるか?	4
10:25-	野口 隼人 チョウ目幼虫が摂取した農業用殺菌剤ベノミルは寄生バチの寄生を失敗させる : では寄生バエは?	5
10:40-	時村 飛鳥 屋外圃場において殺菌剤ベノミルがモンシロチョウに寄生するアオムシコマユバチに与える影響	6
休憩	(15分)	
11:10-	田中 優希奈 異なる植物群集における植物-送粉者ネットワークの時間的変化の比較	7
11:25-	大木 雅 モモ農園の害虫ハダニ類に対するトリコデルマ属菌の殺ダニ効果	8
11:40-	新藤 啓太 社会性ハダニにおける公共トイレの究極要因を探る	9
11:55-	田原 真夢 社会性ハダニはなぜ天敵の卵を転がすのか?	10
12:10-	谷野 彩奈 ハーレムをつくるハダニの雄は兄弟を殺さない?	11
昼食	(50分)	
13:15-	藤原 快稜 日本産ハエ目昆虫に寄生する <i>Stigmatomyces</i> 属	12
13:30-	飯田 和生 タカハシショウジョウバエの分布北上 : 在来近縁種キハダショウジョウバエとの混棲状況	13
13:45-	鍋倉 快晴 ノハラカオジロショウジョウバエ交尾器形態の地理的変	14
14:00-	佐久間 陽平 ミミズたちはどう生きるか	15
14:15-	稲垣 実香 立つ鳥の跡を用いたリザバーコンピューティング	16
休憩	(15分)	
14:45-	中山 友萌香 寄生蜂 <i>Asobara japonica</i> の感染に対する宿主ショウジョウバエ 10 種の応答性の比較	17
15:00-	皿海 琉 トネリコ類立枯病菌の胞子発芽を抑制する <i>Aureobasidium pullulans</i> のセイヨウトネリコ生葉上での挙動	18
15:15-	氷見 和裕 北茨城のスズタケに寄生する <i>Puccinia</i> 属サビキノの多様性調査	19
15:30-	浮田 桃子 東南アジア・オーストラレーシアに分布するブドウ葉さび病菌の分類学的検討	20
15:45-	黒崎 裕貴 日本産シジミタケ属の系統のおよび形態的多様性について	21
16:00-	寺嶋 悠人 歴史の古い草原は根茎根系量が多いか? -新しい草原、森林との比較	22

第二会場（2B412）

9:40-	高井 大樹 アサガオの開花時刻制御遺伝子の探索と機能解析	23
9:55-	平井 唯子 トマトを用いた細菌性食中毒に対する食べる3価ワクチンの開発	24
10:10-	安納 萌香 ベタレイン生合成経路遺伝子の導入による黄花アサガオの改良	25
10:25-	新田 佳奈美 アイスプラント由来 RNA binding protein による環境ストレス耐性ジャガイモの開発	26
10:40-	大森 圭悟 耐塩性遺伝子マンダリンを導入したジャガイモのストレス耐性と生産量についての評価	27
休憩	（15分）	
11:10-	高橋 陽菜 近縁野生種を用いた乾燥耐性を持つ育種系統の樹立	28
11:25-	深谷 夢夏 窒素固定にตอบสนองしてシュートで発現する miRNA の同定と機能解析	29
11:40-	落合 美智 硝酸にตอบสนองした根粒形成の抑制制御に関わる硝酸トランスポーター遺伝子の解析	30
11:55-	岡 佳穂 植物一過的タンパク質発現システムを用いた診断薬の生産可能性について	31
12:10-	五十嵐 咲季 <i>In planta</i> ゲノム編集法による青臭みを抑えたダイズの作出	32
昼食	（50分）	
13:15-	小寺 柚衣花 古茅由来のバイオ炭「茅炭」の炭素貯留及び土壌改良への応用に向けた性質評価	33
13:30-	植田 時 中立論 vs ニッチ理論～ササ優占型ブナ成熟林におけるギャップサイズが林床植生に及ぼす影響～	34
13:45-	加藤 智也 伊豆諸島の森林におけるセルロース分解性真菌類の多様性と地理的分布	35
14:00-	篠沢 俊介 葉レベルの炭素収支からみる植物病原菌 <i>Rhizyctis filamentosum</i> がイヌコリヤナギ個体に与える影響	36
14:15-	船橋 美月 筑波大学構内における鳥類相の解明：1970年代から2023年の比較から	37
休憩	（15分）	
14:45-	須賀 文香 魚の粘液が誘発するプルテウス幼生のクローニングの再現	38
15:00-	佐藤 紘歌 分子動力学計算で解明する TGF- β 受容体の多量体形成メカニズム	39
15:15-	森 凜太郎 二酸化炭素によるニホンウナギ精子の運動停止反応	40
15:30-	朝賀 伸一 サンゴの共生・白化に関連する褐虫藻の運動調節の研究	41
15:45-	福澤 航生 伊豆半島沖の砂泥底におけるメイオベントス群集：水深が異なる5地点の比較	42

第三会場 (2C404)

9:40-	佐渡友 光一 ミトコンドリア病モデルマウスを用いた生体内におけるオートファジーの重要性の検証	43
9:55-	齊藤 さくら がんの悪性化に寄与しうる新規ミトコンドリア DNA 突然変異の探索	44
10:10-	日比 保乃郁 マウス培養細胞を用いた病原性突然変異型ミトコンドリア DNA の濃縮の試み	45
10:25-	佐々木 悠馬 マウス卵母細胞から変異型ミトコンドリア DNA が消失する機構の検証	46
10:40-	青木 祐人 腸内細菌由来機能未知酵素に関する研究	47
休憩	(15分)	
11:10-	神谷 沙羅 発達期大脳皮質における IL-17 受容体の発現と ASD モデルにおけるその変化	48
11:25-	赤羽 勇唱 炎症老化にตอบสนองした内在性レトロウイルスの発現動態の解析	49
11:40-	沼尻 紘征 高タンパク質食摂取が筋損傷からの再生に及ぼす影響	50
11:55-	古川 愛海 機械学習によるメダカの遺伝子発現量の予測	51
12:10-	矢内 果穂 <i>Sleepy / Dreamless</i> ダブルヘテロ変異マウスの睡眠覚醒と脳波	52
昼食	(50分)	
13:15-	森橋 美月 哺乳動物の受精後刷り込みメチル化は種や遺伝子座をこえて保存されているか	53
13:30-	山下 直輝 老化因子が血管周囲のミクログリアに与える影響	54
13:45-	宇野 めぐみ 脳室周辺のアスタロチン細胞による脳実質の恒常性制御	55
14:00-	上田 健太郎 非定型カドヘリン Fat3 はプリン代謝と連携してミクログリアを制御する	56
14:15-	林 良祐 キイロショウジョウバエのメス生殖幹細胞に対する腸内細菌の影響	57
休憩	(15分)	
14:45-	神村 和音 ゴマ由来生理活性物質の微生物代謝に関する研究	58
15:00-	山本 一茶 腸内細菌による植物由来生理活性物質の分解に関する研究	59
15:15-	坂井 康平 抗真菌化合物の生合成に関する研究	60
15:30-	小島 優音 二枚貝における 2 枚目の貝殻獲得をもたらした分子機構の解明	61
15:45-	原田 理帆 ヌタウナギから探る大脳皮質の進化的起源	62

第四会場 (2C410)

9:40-	武 彩海 “新生”西之島から最初に発見された藻類：その同定と侵入種としての特性	63
9:55-	柳澤 花帆 霞ヶ浦の原生生物相：形態観察と環境 DNA 解析からのアプローチ	64
10:10-	大沼 万優子 筑波大学構内の淡水環境におけるウアブ系統群細菌の探索	65
10:25-	吉田 伊吹 DNA メタバーコーディングによる底生ワムシの食性解析	66
10:40-	豊島 克己 クロララクニオン藻の凍結保存法の開発	67
休憩	(15分)	
11:10-	藤代 彩花 光合成関連遺伝子から探る緑色渦鞭毛藻 TGD 株の共生藻痕跡核ゲノムの特徴	68
11:25-	児玉 悠佑 北極海で採集された円石藻 <i>Emiliana huxleyi</i> NIES-3366 株のゲノム情報の高精度化	69
11:40-	白吉 瑞綺 シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 の Mg^{2+} 輸送体ホモログの機能解析	70
11:55-	竹森 友哉 大腸菌の様々な DNA 損傷修復系の欠損変異株に対する変異原の影響	71
12:10-	山木 佳奈子 織毛虫テトラヒメナの細胞質分裂変異株に関する研究	72
昼食	(50分)	
13:15-	山口 幸大 高濃度鉄存在下における単細胞性紅藻 <i>Galdieria sulphuraria</i> の細胞表層の構造変化	73
13:30-	Belitz Alisa Marie Role of chlororespiration in the high CO ₂ tolerance of unicellular red alga <i>Galdieria sulphuraria</i>	74
13:45-	窪田 耀 海洋細菌は揮発性有機化合物の生産者となりうるか	75
14:00-	助川 太一 海洋細菌 <i>Paracoccus</i> sp.由来の溶存態有機物の定性評価	76
14:15-	上安 欣語 染色体置換システムを用いた貧栄養下におけるイネ祖先種の生育と元素蓄積の解析	77
休憩	(15分)	
14:45-	吉田 文哉 イネの根の細胞壁におけるストロンチウム応答機構に関する研究	78
15:00-	藤井 智代 細胞壁改変イネを用いた塩ストレス応答の解析	79
15:15-	佐野 舞桜 塩ストレス条件のトマト成熟過程におけるペクチン分解に伴うアスコルビン酸合成機構に関する研究	80

令和5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

及川 知穂

加藤 緑

滝 大斗

成田 紗由美

寶崎 文音

古橋 夢摘

松浦 由直

松永 啓汰

安田 千七

山野 虎太郎

吉本 賢一郎

表紙画

平井 唯子

表紙画の解説：

テーマ：「混」

水の中に数色の絵の具を落とすとそれぞれの色はやがて混ざり合い一様になります。一見するとそれは一色の色水ですが、複数の絵の具から構成されている事実は変わりません。様々な分野の研究から形成される科学も似ているなあと最近感じます。

表紙画作成にあたりご尽力いただきました吉本賢一郎くんをはじめ、卒業研究発表会準備委員の皆様がこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

令和 5 年度卒業研究発表会要旨の巻頭にあたって

氷見 和裕 (筑波大学 生物学類 4 年)

僕は、昨年度の卒業研究発表準備委員会で、総括を務めました。すると、いつの間にか今年度の卒業研究発表準備委員会の代表になっていました。なんと、3年生の時に代表を務めると自動的に4年生で代表になる、という仕組みだそうです。それを知ったときは、本当にびっくりしました。きっと去年も言われたのだと思いますが、まったく記憶に残っていませんでした。でも代表として、僕が巻頭言を書きます。ちなみに、つくば生物ジャーナル1月号の巻頭に書く、卒業研究ではない文章を、準備委員会では「巻頭言」と呼んでいます。

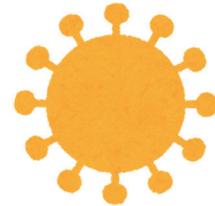
僕が筑波大学に入学した2020年度は、ちょうどコロナ禍が開始した直後でした。当時の世の中は、新型コロナウイルスの出現により大パニックになっていました。その影響で、残念なことに僕の高校と塾の卒業祝賀会が消滅してしまいました。入学後の筑波大学では、多くの授業がオンライン化し、例えば生物学類の基礎生物学実験の名物「ザ・タンポポ」が、送られてきたデータを使ってグラフを描くだけの授業になりました。僕たちはオンライン授業に備えてノートパソコンを購入し、Zoom や Microsoft Teams の使い方を学びました。なおこのとき僕は、せっかくだからとゲーミングPCを購入し、PCゲームに本格参加しました。それはともかくとして、筑波大学の学園祭である雙峰祭が消滅してしまったそぼ！悲しいそぼ… (そぼたんの声)。

2年次(2021年度)になっても、コロナは終わりませんでした。せっかく生物学類の専門科目・実験・実習を選択できるようなったのに、コロナ禍のせいで、実習内容が縮小してしまいました。例えば植物分類学臨海実習では、本来下田臨海実験センターに宿泊するはずなのに、その年は筑波大学日帰り×5日間に変わってしまったのです。でも3年次(2022年度)になると、ようやく対面授業が増えてきました。この年に履修した菌類分類学野外実習では、例年通り菅平高原実験センターに宿泊できました。そして4年次(2023年度)になると、ついに雙峰祭も完全復活して、活気を取り戻したそぼ！雙峰祭の日には、筑波大学の屋内も野外も、人々であふれかえっていたそぼ。僕は、お客様にそぼたん体験(塗り絵、プラバン、クイズ)を提供する企画団体「そぼっちゃん」の一員になりました。本来なら、1年生の時からこうして雙峰祭に参加できたはずなのに、コロナ禍のせいでなかなか参加できなかったと思うと悲しいです。

このように、僕たちの世代はこの4年間のほとんどの期間、コロナ禍と戦い続けてきました。しかし！その戦いの末、何とか卒業研究にまでたどり着くことができました。発表会では、専門分野が多岐にわたるため、中にはまったく理解できない研究もあるかもしれませんが、それでも、せめて自分が興味のある研究だけでも、見て、聞いて、そしてどしどし質問してください。質問を受けることは、僕たち4年生にとって、とても勉強になります。また、今年度の卒業研究発表会が終わった後は、ついに慰労会が解禁します。慰労会とは、卒業していく4年生達をねぎらいながら、ごちそうを食べる会です。コロナ禍で一時期消滅していま

したが、今年度、ようやく帰ってきました。卒業研究発表会が終わったら、ぜひ慰労会で歓談しましょう。

Communicated by Kazuharu Ohashi, Received December 26, 2023.



いらすとや より



そぼたん

雙峰祭は大学生活の大事な1ページそぼ。そぼも生物学類の魂であるキャンベル生物学を読んでみるそぼ。

チョウ媒植物の花の向きが受粉効率に及ぼす影響 ～折り紙花による室内実験

小西 陽巳 (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】

被子植物の花が咲く向きは、同じ分類群内でもしばしば高い多様性を示す。このことから、花の向きには、それぞれの種が暮らす環境において何らかの適応的意義があるのではないかと推察されてきた。しかし上向きの花、下向きの花には、それぞれ長所と短所がある。例えば下向きの花は、花粉や花蜜を紫外線や雨などの影響から護ることができる反面、ポリネーター (花粉媒介動物) には気づかれにくかったり、止まりにくく嫌われたりするだろう。実際多くの先行研究は、下向きの花が、これらの短所を補うような形質をあわせもつことを示唆している。しかし、下向きの花が抱える問題は、他にもあるかもしれない。例えば、訪れたポリネーターが止まる位置や姿勢を変えた場合、葯や柱頭に触れる機会が減ってしまう可能性もある。下向きの花がもつ形質の中には、こうした受粉効率の低下を防ぐ効果をつうじて進化したものもあるかもしれない。

本研究では、花の向きの多様性が高い分類群の1つ、ユリ科において、上～横向きの花にはラップ型の花冠をもつものが多いのに対し、下向きの花にはラップ型が少ない点に注目した。これは、下向きとラップ型の花冠という組合せが、ポリネーターによる受粉に何らかの不都合を生じるためかもしれない。そこで、大型の花をもつユリ科植物の主要なポリネーターであるアゲハチョウ類 (以下、アゲハ) と折り紙花を用いた室内実験系を確立し、上記の可能性を検証した。

【材料と方法】

人工花は、以下の方法で作成した。まず、アゲハが好む橙色の折り紙 (15 cm 四方) で「花冠」を折った。次に「蜜腺」として、1.5 mL マイクロチューブに紙粘土を詰め、その上に蜜 (10% ショ糖水溶液+少量のユリ精油) を含ませた脱脂綿を入れた。さらに、ソフトワイヤー (花糸) と先端部の両面テープ (柱頭) からなる「雌しべ」を、チューブ底の紙粘土に挿して固定した。最後に20個の人工花 (上向きと下向きが10個ずつ) を、8本の「株」 (木製の支柱、高さ約30 cm) の上端に、2個または4個ずつ針金とテープで固定した。これらの株を、2 m 四方のケージ内にほぼ40 cm 間隔で無作為に並べた。実験には、野外で採取したアゲハ類の卵または幼虫を飼育、羽化させた採餌未経験の成虫を用いた (ナミアゲハ15 [雄9, 雌6] 個体, クロアゲハ雌1個体)。羽化後、数日間は直接脱脂綿で蜜を与えた。

トレーニング 20個の株を並べたケージ内にアゲハ1～数個体を放し、自由に飛翔させた。1時間内に2回以上、人工花へ訪れて吸蜜した個体を、トレーニング完了個体としてテストに用いた。

テスト トレーニング完了から1日後のアゲハを1個体ずつケージに放した。1回の試行につき、テスト個体が止まった花 (#1～20)、止まった位置 (花冠の内側/外側)、吸蜜行動 (口吻伸展) の有無を記録した。10回の訪花が観察されるか、あるいはケージ内に個体を入れてから3時間が経過した時点で、試行を終了した。

試行が1回終了する度に、テスト個体が止まった人工花の柱頭の両面テープをすべて回収し、付着した鱗粉の数 (アゲハが柱頭に触れた頻度の指標) を、実体顕微鏡下で計数した。以上のデータをもとに、上向きの花と下向きの花で、(1) 訪花頻度、(2) アゲハが吸蜜時に止まった花冠上の位置、(3) 柱頭 (両面テープ) に付着したアゲハの鱗粉数に違いがみられるかどうかを、一般化線形混合モデル (GLMM) を用いて検討した。

【結果】

まず、下向きの花は、上向きよりもアゲハ1個体あたりの訪花頻度が有意に低かった (上向き: モデル調整済み平均 \pm SE = 4.88 ± 0.65 , 下向き: 1.81 ± 0.36 , $P < 0.001$, Type II Wald-chisquare test)。次に、アゲハの花冠への着地は、上向きの花では内側に多く下向きの花では外側に多い、という有意な差が見られた (図1a)。最後に、1回の訪花で柱頭に付着する鱗粉の数は、下向きの花の方が上向きより少ない、という有意な差が見られた (図1b)。

【考察】

従来言われてきたのと同様、下向きの花は、上向きにくらべて訪花が少なかった。さらに、訪れたアゲハは、花冠の開開口部から内側に潜るより、外側に止まったまま花冠の隙間から長い口吻を伸ばして吸蜜するケースが多かった。1回の訪花で柱頭に付着する鱗粉数が下向きの花で有意に少なかったことから、これは、柱頭に触れずに蜜だけ取る「蜜泥棒」的な行動と言える。つまり、上向きの花は花冠がアゲハの飛来する上空に開いており、容易に内側に止まれるのに対し、下向きの花は花冠の開開口部が地面を向いており、ぶら下がりが苦手なアゲハには利用しづらい。しかし、ラップ型の花冠には隙間があるため、外側 (上部) に止まったまま蜜だけ飲むことができってしまうのである。このように本研究は、ユリ科の花に下向きでラップ型の花冠をもつ種が少ないのは、チョウ類の蜜泥棒によって受粉効率が低下してしまうためである可能性を初めて示した。下向きの花に多い、隙間のない筒型の花冠、あるいは花卉が著しく反り返った花冠は、紫外線や雨から花粉を護りつつ、長い口吻をもつチョウ類による蜜泥棒をも防ぐことのできる、適応的な形質の組合せなのかもしれない。今後は、これらの形質の組合せが、蜜泥棒の頻度や花粉の受け渡しに及ぼす影響を、今回確立した室内実験系を用いて調べていく予定である。

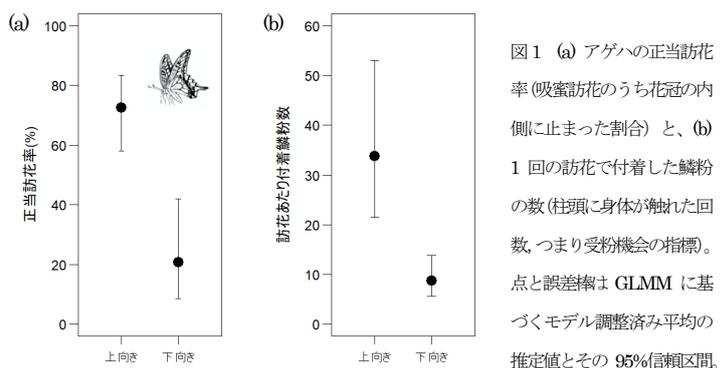


図1 (a) アゲハの正当訪花率 (吸蜜訪花のうち花冠の内側に止まった割合) と、(b) 1回の訪花で付着した鱗粉の数 (柱頭に身体が触れた回数、つまり受粉機会の指標)。点と誤差棒は GLMM に基づくモデル調整済み平均の推定値とその 95%信頼区間。

花は特殊化の産物か？：送粉シンドロームを多様な訪花動物への適応として捉えなおす

大西 礼 (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】

動物に花粉を運んでもらう多くの植物は、主要な訪花動物に対する適応的な花の形質セット=送粉シンドロームをもつと考えられてきた。このアイデアは、多様な訪花動物に対する同時適応はトレードオフによって妨げられるため、異なる形の花は、それぞれ別の訪花動物の形態や行動に対する「特殊化」の結果生じた、との仮定に基づいている。しかしながら、現実の植物は多様な動物によって送受粉されている。この矛盾を解決するには、送粉シンドロームを、特定の訪花者に対する特殊化ではなく、特定の訪花者の組合せつまり「訪花者相」への同時適応として捉え直す必要があるのかもしれない (Ohashi et al. 2021, *Biol. Rev.*)。

そこで本研究では、これまでの特殊化の枠組みではうまく説明できなかった送粉シンドロームを、複数タイプの動物からなる訪花者相と花の形質セットの対応関係として再定義することを目的としたデータ解析をおこなった。植物群集内の花を訪れる動物を網羅的に調べた先行研究のデータセットに、ネットワーク解析、機械学習、多変量解析という3つの手法を統合的に適用し、花と動物の対応関係に隠された進化的な結びつきを定量的に探った。

【方法】

解析には、日本(京都府芦生)とモーリシャス(Black River 峡谷自然公園)の植物群集で、それぞれ93種、74種の花を訪れた動物の種類と訪花数を記録した先行研究のデータを用いた。また、各植物種の花の形質情報(筒状度、対称性、大きさ、向き、密集度、葯の突出度、色、蜜標の有無の8つ)を、文献の記述や写真から抽出した。

はじめに、各群集内の植物種を、最も多く訪れた訪花者のタイプでいくつかの群に分けた。次に、二部ネットワーク解析で用いられるモジュール化の手法により、植物種を、結びつきの強い訪花者相に基づいていくつかの群に分けた。「送粉シンドロームは特定の訪花者相への適応」という考えが正しければ、各種の花の形質は、最も多く訪れた訪花者よりも、最も結びつきの強い訪花者相との対応関係が強いはずである。そこで次に、機械学習アルゴリズム Random Forest を用いたモデル構築をおこなった。そして、8つの花の形質情報を予測子としたとき、各植物種について2種の応答変数(1)最も多く訪れた動物、あるいは(2)強く結びついた訪花者相のどちらをより正確に予測できるかを、予測精度とその検定によって確かめた。

最後に、結びつきの強い訪花者相ごとにどのような花の形質セット(シンドローム)が共有されているかを明らかにするために、非計量多次元尺度法(NMDS)および環境傾度分析を用いて、花の形質セットの類似度に基づく2次元プロットを描き、プロット上の位置ごとの花の形質分布について調べた。

【結果】

最も多く訪れた動物には、6つの群(ハナバチ、ハエ、甲虫、カリバチ、アリ、カメムシ)が認められた。また、モジュール化に

よる訪花者相の分類では、3つの群(ハナバチ-チョウ、甲虫-ガ、各種ハエ類)が識別された。

最も多く訪れた動物を予測する Random Forest モデルの精度はさほど低くないものの、実質上ハナバチとそれ以外の動物を分けることしかできず、統計的には有意でなかった(平均正答率=53.9%, $P=0.34$, モンテカルロ無作為化検定)。一方、訪花者相を予測するモデルの精度は有意に高かった(60.4%, $P=0.024$)。

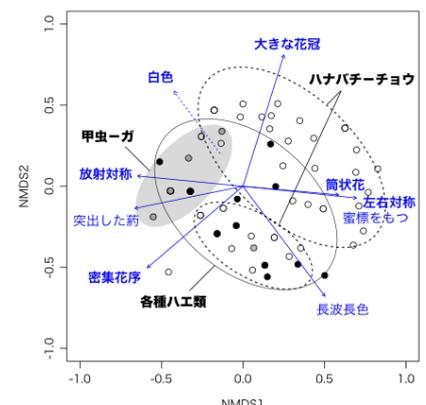
NMDSでは、3つの訪花者相ごとに、花の形質セットに違いがみられた(図1)。これらの違いを pairwise-PERMANOVA によって検定したところ、いずれの群間の違いについても、有意水準5%で帰無仮説が棄却された。まず、ハナバチ-チョウ媒花には、大まかに2つのタイプが認められた:1つは大きく筒状で左右対称性を持ち、葯が花冠に隠れ、蜜標をもつタイプ、もう1つは小さく浅い、葯が突出した花が密集するタイプである。一方、各種ハエ類媒花も小さく浅い、葯が突出した花を密集させる傾向があり、白い花をもつ種がやや多めに存在する点以外は、ハナバチ-チョウ媒花の2つ目のタイプとあまり変わらなかった。また、甲虫・ガ媒花は最もせまい範囲に分布し、白色、皿型の小さな放射対称花を密集させる傾向が強かった。

以上は日本のデータについての結果である。モーリシャスの予備解析でも同様の結果が得られており、詳細は発表会で報告する。

【考察】

主要な訪花者より訪花者「相」の方が、花の形質セットから正しく予測できるという Random Forest の結果は「送粉シンドロームは特定の訪花者への特殊化ではなく、特定の訪花者相への同時適応の産物ではないか」との予測を支持する。また NMDS の結果から、それぞれの訪花者相に対応するシンドロームの存在も示された。これらの形質の組み合わせは、長い口吻をもつハナバチやチョウが訪れる花で筒状形が多い、甲虫やガが訪れる花は白色が多いなど、いずれも自然に納得できるものが多い。一方で、モデルの予測力は60%強にとどまり、一部のハナバチ-チョウ媒花はハエ媒花と区別がつかないなど、シンドローム間における形質の重複も認められた。今後は、花香の強さなどの形質を加えることで重複を減らすと共に、複数の訪花者への同時適応で潜在的な問題となるはずのトレードオフが、これらの「多媒シンドローム」でどのように回避されているのか、さらに調べてゆく必要がある。

図1 花の形質と訪花者相の関係。各点は植物種を示す(白:ハナバチ-チョウ相、灰色:甲虫-ガ相、黒:各種ハエ類相)。形質が似た植物種ほど点が近い。円は各相に含まれる種のおおまかな形質セットの分布を示す。矢印は花の各形質の傾向を示しており、矢印の先端へ向かうほど、その傾向が強い。



せっかち派 vs. 慎重派：マルハナバチの採餌戦術は学習能力の個体差で説明できるか？

竹内 希海（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】

ヒトを含む多くの動物の意思決定では、速度と精度との間にしばしば負の相関関係が認められる。この「速度と精度のトレードオフ」は、訪花昆虫でも観察される。例えばマルハナバチでは、報酬花と無報酬花の色を学習した後の採餌において、採餌速度と報酬花を正しく選ぶ精度との間に、個体レベルで負の相関がみられる (Chittka et al. 2003, *Nature*)。つまり個体は速度と精度の両方を同時に高めるよりも、精度を犠牲にして速度を高める「せっかち派」から、速度を犠牲にして精度を高める「慎重派」まで、様々な戦術にわかれる。この関係は、たしかに速度と精度のトレードオフの存在を示唆する。しかし一方で、同一の採餌環境で、こうした採餌戦術のばらつきが生じる理由がよくわからない。

この疑問に対し本研究では、学習能力の個体差が採餌戦術のばらつきを生み出す、という仮説を立てた。例えば、学習能力の高い個体は、学習時間が短くても十分に正答率を高め「慎重派」になりやすい一方、学習能力が低い個体は、短い学習時間では正答率を十分に高めることができず、やむなく速度を上げて埋め合わせる「せっかち派」になりやすいのではないかと考えた。この考えが正しいならば、学習に十分な時間さえ与えれば、どの個体もゆっくり正確に報酬花を選ぶ「慎重派」になり、戦術の個体差は小さくなるはずである。この予測を検証するため、報酬花と無報酬花の色の識別しやすさ（＝学習に要する時間）が異なる課題をクロマルハナバチに与え、色が識別しやすいときほど個体の採餌戦術が慎重派に収束するかどうかを確かめる室内実験をおこなった。

【材料と方法】

実験は、クロマルハナバチのワーカー個体を用いて、室内に建てたケージ（幅 200×奥行き 350×高さ 200 cm）内でおこなった。

1回の試行は、トレーニングとテストの2段階で構成される。トレーニングでは、任意に選んだ1個体のハチに報酬の有無と色を連結学習させ、同時に各個体の学習能力（学習にかかる時間）も測定した。まず、色の見分けにくさのレベルが異なる3種類の色ペア（類似度：高・中・低）から任意に1つを選び、一方の色には報酬＝蜜（10 μ L の 30%スクロース溶液）を、他方の色には水を添加した。そして、報酬花と無報酬花を18個ずつ、6×6の格子状にランダムな位置関係で並べ、1個体ずつ採餌経験を積ませた。採餌中は観察者もケージ内に留まり、ハチが各報酬花から吸蜜して去る度に分注ピペットで蜜を再補充した。そして、個体が100%の正答率で報酬花を訪れる採餌飛行が2回連続するか、75%以上の正答率で報酬花を訪れる採餌飛行が5回連続したら「学習成立」としてトレーニングを終了した。また、学習が成立しないまま累積採餌飛行が12回に達した場合にも、同様に終了した。

続いて、トレーニングが済んだ個体について、上記と同じ36個の花を用い、意思決定の速度と精度を測るテストをおこなった。ただし、記憶の強化または減退を防ぐため、どの花にも報酬や水は添加せず、採餌飛行は1個体につき1回のみおこなった。各試行中のハチによる訪花は、すべてビデオカメラで記録した。これ

らの動画から、トレーニングで学習にかかった時間（訪花回数）と、テストで最初に訪れた31回の訪花中における正答率、および意思決定にかかる反応時間（花間移動時間の中央値）を求めた。

【結果と考察】

まず、報酬花と無報酬花の色が容易に識別できる条件（低・中類似度）では、すべての個体で学習が成立した。また高類似度でも、12個体中8個体で学習が成立した。ただしどの条件でも、学習にかかる時間には著しい個体差がみられた。

次に、高類似度におけるテストでは、先行研究と同様、正答率よりも反応速度を優先する個体（せっかち派）から反応速度より正答率を優先する個体（慎重派）まで、戦術の個体差がみられた（図1）。対照的に、低・中類似度におけるテストでは、予測通りすべての個体が正答率90%以上に達し、戦術の個体差は消失した。これは、課題の難易度に対して十分な学習時間さえ与えられれば、いずれの個体も「慎重派」に収束することを意味する。先行研究でみられた戦術の個体差は、学習が不十分な個体が「せっかち派」という代替戦術を採用するために現れる、一時的な現象なのかもしれない。ただしこれは、どんな個体も学習すれば、慎重で時間をかける採餌をおこなうようになる、という単純な話ではない。なぜなら、正答率がほぼ100%の個体の間にも、反応時間に著しいばらつきがみられたからである（図1）。

本研究は、速度と精度のトレードオフの証拠として示されてきた動物の採餌戦術の個体差が、部分的には、学習の成立度の違いで説明できる可能性を初めて示した。また十分な学習が成立した個体の間にも「精度とのトレードオフでは説明できない」反応速度のばらつきが残る、という興味深い現象を発見した。今後は、反応速度＝情報と記憶を照合する能力の個体差が、学習時間＝情報をすばやく記憶する能力の個体差とどのような関係にあるのかを探っていく予定である。

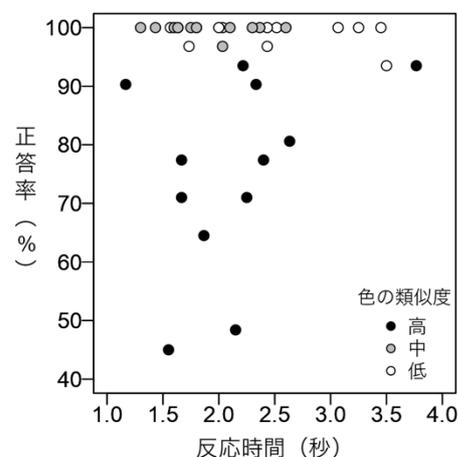


図1. テストにおける各個体の反応時間（中央値）と正答率。各点が個体のデータをあらわす。点の塗りつぶしの濃さは、用いた報酬花と無報酬花の色の類似度をあらわす（黒は高、グレーは中、白は低）。

チョウ目幼虫が摂取した農業用殺菌剤ベノミルは寄生バチの寄生を失敗させる：では寄生バエは？

野口 隼人（筑波大学 生物学類） 指導教員：藏満 司夢（筑波大学 生命環境系）

導入

近年、世界的な昆虫類の個体数の急激な減少が関心を集めており、化学合成農薬をはじめとする化学薬品の環境中への導入が原因の一つとして指摘されている。化学殺虫剤はもちろんのこと、本来昆虫を標的としていない除草剤や殺菌剤が昆虫に影響を与えるという事例も複数報告されており、様々な生態系サービスを提供する有益な種を含む非標的昆虫を化学農薬が減少させているという懸念が高まっている[1], [2]。

捕食寄生性昆虫は害虫種の個体数を抑制させる有益な昆虫の一つである。一部の国と地域では既に害虫管理に生物的防除剤として導入されており、人工的に導入・繁殖させた個体群を利用するだけでなく、持続可能な手法として農業土着天敵を活用する保全的防除も実施されている。一方で、そのような農地においても農薬が併用され続けており、農薬の使用に伴う生物的防除の効率の低下や生態系への影響が懸念されている[1], [2]。

捕食寄生性昆虫の中で最多の種数を誇る分類群はハチ目である。先行研究によって、捕食寄生性の寄生蜂アオムシコマユバチ (*Cotesia glomerata*) (ハチ目：コマユバチ科) が寄生しているモンシロチョウ (*Pieris rapae*) (チョウ目：シロチョウ科) の幼虫にベンゾイミダゾール系殺菌剤ベノミルを経口摂取させることで寄生が失敗する、という現象が報告されている[3], [4]。ベノミルとその代謝物カルベンダジムは広域殺菌剤であり、無脊椎動物や哺乳類に対する悪影響が懸念されるため欧米諸国では使用が禁止されているが、今でも日本を含む多くの国で様々な作物の植物真菌病を防除するために広く使用されている[5]。この研究では、カルベンダジムが細胞の微小管形成を抑制することで寄生蜂の胚発生を阻害した可能性や、宿主体内で寄生蜂の卵や胚が宿主の免疫を回避するための化学的機構をベノミルが阻害した可能性が指摘されている。また、同様の現象は他のいくつかの寄生蜂類でも検出されている。

殺菌剤は昆虫に対する毒性の評価例が少なく、特に寄主体内にいる捕食寄生者に対する影響はほとんど評価されていない。有用天敵としての捕食寄生者の役割とベノミルの汎用性の高さを鑑みると、捕食寄生性昆虫に対するベノミルの影響評価は、生態系の保全と農業の効率の改善という2つの観点で大きな意義があるものといえる。

本研究では、これまでに寄生蜂の寄生を失敗させる効果が知られているベノミルについて、寄生蜂と並んで重要な捕食寄生者であるハエ目のヤドリバエ科2種を対象に、その寄生に対するベノミルの影響を評価した。

研究方法

異なる寄生様式を持つ2種の捕食寄生性ヤドリバエ科昆虫、ブランコヤドリバエ (*Exorcist japonica*) とカイコノクロウジバエ (*Pales pavidus*) を対象とした。ブランコヤドリバエの卵は宿主の表皮に直接産卵され、約4日後に孵化し、幼虫期間を約8~9日、蛹期間を約8日経て羽化する[6]。一方で、カイコノクロウジ

バエの卵は寄主の餌植物上に産卵され、寄主の採餌に伴い経口摂取される。その後すぐに孵化し、幼虫期間を約16日、蛹期間を約15日経て羽化する[7]。本研究では寄主としてアワヨトウ (*Mythimna separata*) (チョウ目：ヤガ科) の6齢幼虫を使用し、ブランコヤドリバエは寄主1頭あたり2個、カイコノクロウジバエは寄主1頭あたり6個の卵を寄生させた[8]。

寄生後の寄主はベノミルを0.025%添加した人工飼料、または同量の蒸留水を添加した人工飼料 (コントロール) を与えて個別飼育した。その後、寄生成功率、寄主の生存率、寄主やヤドリバエの奇形率を比較した。

結果・考察

ブランコヤドリバエではベノミルによる有意な悪影響を確認できず、ベノミル処理群での寄生成功率 (87.x%) がコントロール群のそれ (60.x%) と比べて高くなる傾向が見られた。一方で、カイコノクロウジバエではコントロール群において寄主の約26.x%で寄生が成功したが、ベノミル処理群では寄生がすべて失敗するという結果になった。後者は、ハチ目捕食寄生昆虫での先行研究に続き、ハエ目捕食寄生者においてもベノミルの存在下で寄生が失敗する事例があることを示す初めての発見である。2種のヤドリバエで異なる結果が得られた理由は不明確なもの、寄生期間や寄生組織など両者の寄生様式の差異に由来する可能性が考えられる。ブランコヤドリバエでベノミル存在時に寄生成功率が増加した理由については、ベノミルが寄主の免疫機能に影響を与えた可能性などが考えられるが、今後の更なる検証が必要である。

参考文献

1. Sánchez-Bayo & Wyckhuys (2019). *Biol. Conserv.* 232, 8-27
2. David et al. (2021). *PNAS.* 118 (2) e2023989118
3. Arakawa (2020). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 64, 5-12
4. Arakawa (2021). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 64, 13-18
5. Pearson, & Miller (2014). *Encyclopedia of Toxicology*, third ed. pp. 411-412.
6. Nakamura (1994). *Appl. Entomol. Zool.* 29 (2), 133-140
7. Biliotti & Chenon (1971) *Ann. Zool. Ecol. Anim.* 3 (3), 361-371
8. Nakamura (2018). *Biocontrol Sci Technol.* 28, 509-520

屋外圃場において殺菌剤ベノミルがモンシロチョウに寄生するアオムシコマユバチに与える影響

時村 飛鳥 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 藏満 司夢 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

捕食寄生性昆虫の一種である寄生蜂類は、幼虫期を寄主の体内外に寄生することによって過ごし、一連の成長が完了すると最終的に寄主を食い殺して蛹化・羽化し成虫となる。寄生蜂類は鱗翅目や半翅目等の昆虫を主な寄主とし、それら寄主のうちには農業害虫とみなされる種も多く存在する。そのため、寄生蜂類は農業生態系における害虫の天敵として、害虫個体数の抑制、ひいては農業被害の抑制に重要な役割を果たす益虫とされている。近年は、農業現場において様々な手法を総合的に用いて病害虫の防除を実施する IPM (Integrated Pest Management) が世界的に推進されており、生物的防除としての寄生蜂類の役割はより重要視され、寄生蜂類の積極的な保護・利用が進んでいる。

しかしながら、農業現場における化学農薬の使用が寄生蜂類に負の影響を及ぼしているとする報告は多い。新川ら (2020) は屋内飼育実験にて、植物用殺菌剤として広く使用されるベンズイミダゾール系殺菌剤ベノミルを含む飼料を寄生蜂アオムシコマユバチによる産卵を受けたモンシロチョウ幼虫が経口摂取すると、寄主体内の寄生蜂が死亡することによって寄生が 100% 失敗し、一方の寄主はなんら影響を受けることなく成虫まで正常に発達することを報告した。もしこの現象が実際の圃場でも発生しているならば、ベノミルの使用によって寄生蜂類の個体数が減少し、農業における経済的損失を発生させている恐れがある。しかしながら、新川ら (2020) による検証は屋内飼育実験に留まっており、屋外圃場における検証はなされていない。

そこで本研究では、慣行農法においてベノミルがアオムシコマユバチに与える影響を、キャベツ圃場での屋外試験により検証した。

【材料・方法】

実験には主たる有効成分としてベノミルを含む「ベンレート水和剤」を使用し、散布時期・回数・方法は全てキャベツに対する規定通りに適用した。圃場内に、規定濃度とその 1/10、1/100 の濃度のベノミルを散布した処理区と、ベノミルを含まない薬液を散布する非処理区の 4 処理区を配置し、キャベツを栽培する実験を夏栽培と秋栽培の全 2 回実施した。各実験期間において、栽培中期に防虫ネットを外してから 3 日後に各処理区からランダムに選択した株上のモンシロチョウ卵を計数した。また定期的に、各処理区からランダムに選択した株上の鱗翅目幼虫を全て採集した。採集した鱗翅目幼虫は、種同定ののち、各個体が得られた処理区と同様の処理を施した区画のキャベツを給餌して個別飼育し、寄主生存率・寄生蜂出現率・寄主 1 個体あたりの寄生蜂出現数を調査した。なお個別飼育した鱗翅目幼虫から出現した寄生蜂も同様に種同定した。

【結果】

株あたりモンシロチョウ産卵数には、ベノミル散布濃度による差は見られず、ベノミルはモンシロチョウの産卵選好性に影響を

与えないことが示された。

個別飼育の結果、モンシロチョウからアオムシコマユバチが出現した例は夏栽培において採集された個体群のみでみられた。そこで、夏栽培において採集されたモンシロチョウ幼虫の飼育結果を分析したところ、モンシロチョウの生存率には有意差がみられず、ベノミルはモンシロチョウの生存率に影響を与えないことが示された。一方でアオムシコマユバチの出現率において、ベノミル非処理区と比較して規定濃度とその 1/10 濃度処理区では寄生蜂出現率が低下する傾向がみられた。

またベノミル散布濃度ごとの寄主 1 個体あたりのアオムシコマユバチ出現数について比較すると、規定濃度の 1/10、1/100 の濃度の処理区に対して規定濃度処理区において寄主 1 個体あたり寄生蜂出現数が有意に少なく、ベノミル高濃度処理によって寄主 1 個体から出現するアオムシコマユバチの個体数が減少することが示された。

【考察】

実験結果から、屋外圃場におけるベノミルの散布はモンシロチョウに対して影響を与えない一方で、アオムシコマユバチに致死的な影響を与えることが示唆された。このことから、圃場におけるベノミルの使用は、農業生態系中の寄生蜂個体数を減少させるとともに、アオムシコマユバチによるモンシロチョウ個体数の抑制効果に負の影響を与えていることが示唆される。

その一方で、本研究における屋外試験の結果と新川ら (2020) により行われた屋内飼育実験の結果を比較すると、屋外試験では屋内飼育実験ほど大きな影響はみられなかった。これは、散布された薬剤が長期間屋外環境に晒されたことにより、太陽光や雨水あるいは散水によって経時的に分解・流失したことで影響が弱まった可能性がある。

【今後の展望】

現時点では、ベノミルの影響はモンシロチョウ-アオムシコマユバチ系に対するものしか検証されていない。しかし、ベノミルはその他寄生蜂や寄生バエに対しても致死的な影響を与える可能性がある。今後はキャベツ以外の作物での評価を検討し、その他の寄主-捕食寄生者系に対するベノミルの影響を検証する必要がある。

また今回の実験期間を通してキャベツに植物病原菌由来の病気が発生することはなかった。寄生蜂類の保全と農業生産性を両立するためには寄生蜂類に負の影響を与えないベノミルの濃度等使用方法や代替薬剤を検討しなければならないが、そのためにはベノミルの殺菌剤としての有効性を評価する必要があり、その検証は今後の課題である。

【参考文献】

1. 新川 (2020) 応動昆 64: 5-12

異なる植物群集における植物—送粉者ネットワークの時間的変化の比較

田中 優希奈（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】

野生送粉者は、農耕地と自然生態系における送粉サービスに大きな役割を果たしている。しかし、近年、野生送粉者の減少が報告されている。また、送粉者の多様性が高いことは、攪乱に対する送粉サービスの回復力において重要である。そのため、従来通りの送粉サービスを維持するためには、送粉者の個体数だけでなく、種多様性についても把握する必要がある。

送粉系の保全には、送粉者と開花植物の関連性を知ることが重要である。異なる植物群集間で送粉者群集を比較することは、送粉者と開花植物の関連性の理解につながる。しかし植物群集による植物—送粉者ネットワークの違いを比較した研究は少ない。

ハナバチ類とハナアブ類は餌資源として花粉や花蜜を利用する、代表的な送粉者である。筑波大学キャンパス内には、年間を通じて多様な開花植物が生育しており、これらの昆虫類も多く訪花している。本キャンパスでは植物をはじめとした生物相に関する調査が行なわれたことはあったが、植物と送粉者の多様性に関する報告はほとんどない。

本研究では、キャンパス内の異なる植物群集における送粉者の個体数や多様性の通年変化、および調査地間での植物—送粉者ネットワークの違いを明らかにすることを目的とした。

【方法】

2023年4月から10月にかけて、筑波大学内の草地（駐車場裏）と筑波大学実験植物園の林床（実験林）にマレーゼトラップとファネルトラップ、パントラップ（白と黄、青）を設置した。トラップ内のサンプルは2週間に一度回収した。サンプル回収日に、それぞれの調査地内で30分間のルートセンサスを行なった。ルートセンサスではルート上の開花植物種を記録し、訪花中の昆虫を採集した。採集したサンプルは分類群ごとに分類し、ハナバチ類については属まで同定した。季節ごとの比較では4月から6月を春、7月から8月を夏、9月から10月を秋と定義した。

【結果】

駐車場裏で112個体、実験林で156個体のサンプルが得られた。最も多かったのはコハナバチ属で、年間を通して採集された。両調査地で4月から7月上旬にかけて訪花昆虫の個体数が多く、7月以降は個体数が減少する傾向があった。季節ごとに比較すると、駐車場裏では春はヒゲナガハナバチ属、夏はコハナバチ属、秋はハナアブの割合が最も多かった。実験林ではどの季節でもコハナバチ属の割合が最も多かった。トラップではハキリバチ属やキマダラハナバチ属など、ルートセンサスで採集できなかった種も採集された。

年間の開花植物種数の合計は駐車場裏で26種、実験林で52種だった。調査地間の植物相のJaccard係数は0.73だった。駐車場裏では幅広い分類群の昆虫がムラサキツメクサに訪花していた（図1）。林床においては、ハナアブ類とコハナバチ属は幅広い植物種に訪花する傾向が見られた（図2）。再配線によるネット

ワークの非類似性（OS）と送粉者と開花植物の種組成の変化によるネットワークの非類似性（ST）を季節間で計算すると、どちらの調査地でもSTのほうが高かった。

各調査日に採集した送粉者のShannon-Wienerの多様度指数は、駐車場裏が 1.12 ± 0.50 、実験林が 1.31 ± 0.40 という結果になった。実験林では開花植物種数が多いほど多様度が高くなったが、駐車場裏ではその傾向はみられなかった。

【考察】

夏季は開花植物種数が少ないため、訪花昆虫の個体数とその多様性は減少していると考えられる。ネットワーク解析により、筑波大学内の送粉者ネットワークの変化は草地でも林床でも訪花昆虫と植物の種組成の変化により起こっていることがわかった。両調査地の植物相はある程度類似していたが、訪花昆虫の多様性は実験林のほうが高くなった。その要因としては開花植物種数の違いが考えられる。駐車場裏では訪花昆虫の多様度と開花植物種数に相関がみられなかったことから、送粉者の多様性には開花植物種数以外にも、多くの送粉者が訪花する植物の存在など他の要因も影響している可能性がある。

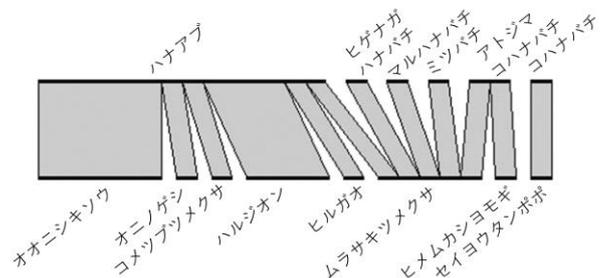


図1 筑波大（草地）の植物—送粉者ネットワーク

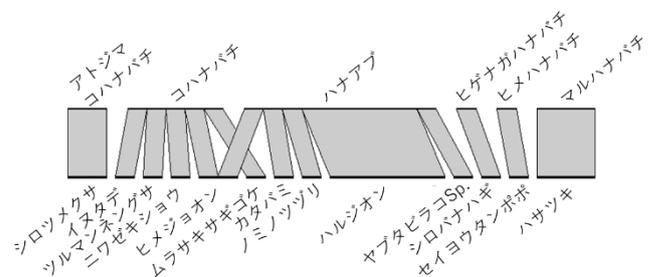


図2 筑波大（林床）の植物—送粉者ネットワーク

モモ農園の害虫ハダニ類に対するトリコデルマ属菌の殺ダニ効果

大木 雅 (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】

近年、病原菌や捕食者といった天敵を用いて、病害虫の防除を行う生物的防除が重要視されている。この他にも、防虫ネットやトラップを用いた物理的防除、栽培法や品種改良による耕種的防除などを総合的に組み合わせた「総合的病害虫管理 (Integrated Pest Management; IPM)」が世界的に推進されている。

扇状地が多い甲府盆地をもつ山梨県は、モモの生産量が日本一である。モモを生産する上での一番の難点は病害虫のつきやすさにある。そのため、多くのモモ生産者は定期的な薬剤散布や果実の袋掛けにより病害虫防除を行っている。その一方で、化学農薬の使用を 80%以上削減しているにも関わらず、高品質のモモ生産に成功している生産者がいる。モモの害虫としてナミハダニ黄緑型 *Tetranychus urticae* Green form (以降、ナミ) とカンザワハダニ *Tetranychus kanzawai* (以降、カンザワ) がいるが、これらハダニは葉の裏に寄生し、葉の組織から汁を吸うため、加害された部分は白っぽくかすり状になる。また、繁殖力が高いため大量に発生しやすく、葉を変色させ、最終的には葉を枯らせてしまう。しかし、この農園では、雑草が生い茂ることで、これらハダニを中心とした害虫はモモの木よりも雑草に留まり、モモの木に上がってきても温存された天敵に食べられるため、大発生しないと考えられている。また、土壌からはトリコデルマ属菌 *Trichoderma* が優占種として検出されている。この菌は、拮抗作用による病原菌排除や、植物における成長促進ならびに全身獲得抵抗性の誘導に寄与することから有用微生物として注目されている。さらには、近年の研究により、ダニ類を含む害虫を殺す効果も期待されている。

そこで本研究では、害虫ハダニ類のナミとカンザワに対する 3 種のトリコデルマ属菌の殺ダニ効果を明らかにすることを目的とした。

【材料・方法】

ナミ、カンザワは 2022 年 6 月に上述のモモ農園から採集し、室内でインゲンマメ *Phaseolus vulgaris* の葉を用いて継代飼育した個体群を使用した。飼育と下記実験は 25°C、60~100%R.H.、長日 (15L9D) 条件下で行った。

トリコデルマ属菌として、同じく上述のモモ農園から単離培養されたハージナム *T. harzianum* (以降、Th)、ハマタム *T. hamatum* (以降、Tm)、ヴィレンス *T. virens* (以降、Tv) の 3 種の株を用いた。また、ポジティブコントロールとして生物農薬として市販されているボーベリア・バシアーナ *Beauveria bassiana* (アリスラ ライフサイエンス株式会社、以降、PC)、ネガティブコントロールとして蒸留水(以降、NC)を用意した。NC 以外の溶液は全て 1.0×10^7 cells/ml に調整した。

実験は以下の手順で行った。①日齢をそろえるため、実験処理の 3 日前に、脱皮して雌成虫になる直前のステージである第 3 静止期雌を集めた。②ガラスシャーレ (φ90 mm、高さ 22 mm) に菌液を入れ、ピンセットを使って直径 25 mm のインゲンマメリ

ーフディスクを約 30 秒浸し、濡れたコットンを敷いた別の昆虫飼育用プラスチックシャーレ (φ55 mm、高さ 17 mm) に移した。③葉の表面が乾いた後、脱皮後 1~3 日の未交尾雌を 8 匹導入し、④10 日間ダニの生死を確認して記録した。ナミ、カンザワに対して、NC、PC、Th、Tm、Tv の 5 処理を行った。各処理区、ナミでは 8、8、8、6、8 シャーレずつ、カンザワでは 8、10、12、12、14 シャーレずつ実験を行った。

解析には統計ソフト R (version 4.3.1) を使用した。コックスハザード混合モデルを用いて、シャーレをランダム効果としてハダニの生存日数を処理区間および種間で比較した。

【結果・考察】

PC 処理区は NC 処理区に比べて、有意ではないものの生存率が低い傾向がみられた ($p=0.18$)。

また、一般的には、カンザワよりもナミの方で薬剤抵抗性の発達がみられ、防除が難しい種であると言われているが、全処理区において、カンザワに比べてナミの方が生存率が低かった ($p < 0.001$; 図)。

ナミ、カンザワの双方で、有意ではないものの、NC 処理区よりも Th 処理区の生存率が高い傾向がみられた ($p=0.50$; 図)。先行研究では Th には殺ダニ効果があると報告されている。そのため、同じ菌種でも株によってダニや害虫に対する効果が異なる可能性が考えられた。

また、こちらも有意ではないものの、ナミでは Tm 処理区が、カンザワでは Tv 処理区が PC 処理区、すなわち、生物農薬として市販されているボーベリア・バシアーナと同程度に低い生存率がみられた。そのため、ハマタムとヴィレンスは、殺ダニ効果が期待できるかもしれない。

今後は、試行回数を増やし、トリコデルマ属菌の殺ダニ効果を明確にしていきたい。

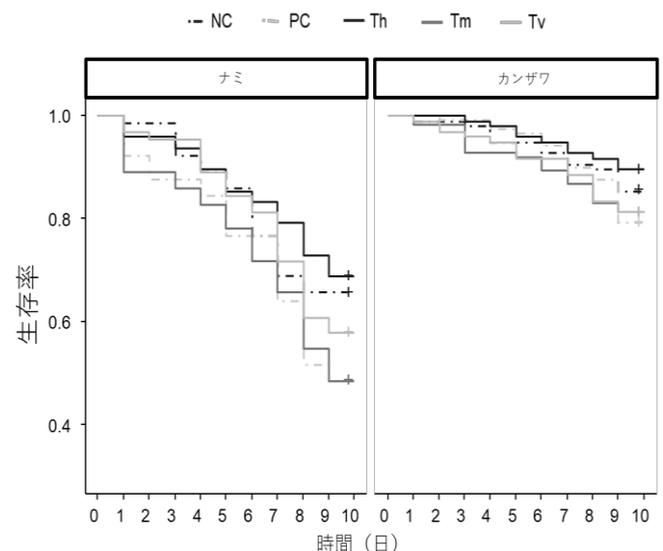


図. 各処理区におけるナミとカンザワの 10 日間の生存率

社会性ハダニにおける公共トイレの究極要因を探る

新藤 啓太 (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】

動物にとって、体内の老廃物の除去を目的とする排泄は非常に重要な行動である。しかし、排泄物である糞は病原体の温床であり、またそのにおいて捕食者や寄生者を誘引する可能性もあるため、動物の生存に悪影響を与え得る。特に巣を作り、そこで定住的に集団生活を送る社会性動物では、限られた生活空間への大量の糞の蓄積、病気の潜在的な広がりやすさなどの理由から、糞の影響はより大きいと言える。そこで社会性動物では、糞の蓄積や糞との接触を防ぐために様々な排泄物管理行動が進化してきた。

その一例が、ダニ目ハダニ科に属するケナガスゴモリハダニ *Stigmaeopsis longus* (以降、ケナガスゴモリ) である。体長1mm未満の本種はササ寄生性で、葉裏の主脈沿いに糸を張ってトンネル状の巣を形成し、そこで集団生活を送る。巣は入り口方向に増築を繰り返すことで大きくなり、集団は最大で数百、数千匹にもなるため大量の糞の処理が課題となるが、本種は巣の外(入り口付近)の1か所に「公共トイレ」を定め、そこでのみ排泄するという行動が見られる。本種は目が見えないが、トイレの場所の認識は次のようにして行われることが分かっている。①トイレがまだ無い場合、触覚刺激を利用して巣の入り口を探す。②トイレが既にある場合、糞に含まれるササの葉由来の揮発性物質(エーテル可溶性)を感知して、トイレの場所を把握する。

このように本種の排泄行動の至近メカニズムは解明されているが、この行動が果たして病気の予防、巣内スペースの活用などどのくらい有効であるかは明らかにされていない。そこで本研究では、本種の排泄行動の究極要因を探るため、トイレの場所や数を変更した場合の産子数や生存率、巣の増築回数を調査した。

【材料・方法】

材料 ケナガスゴモリは2020年8月に筑波大学山岳科学センター筑波実験林で採集され、室内で継代飼育したものを使用した。飼育はクマザサ *Sasa veitchii* (同実験林で採集) を長方形に切り取り、水に浸した綿の上に広げ、その葉上で飼育するリーフディスク法により行った。飼育及び下記実験は、25°C、40~80%RH、15L9Dの条件下で実施した。

方法

(1)揮発性物質の抽出

トイレの場所を操作するため、トイレの場所認識に利用されるエーテル可溶性揮発性物質の抽出を、先行研究に倣って行った。筑波実験林でクマザサの葉200gを採集し、水洗いして乾かした後1cm四方に切断し、ジエチルエーテル2Lに浸漬して室温で24時間放置した。その後濾過を行い、エバポレーターで100mlに濃縮した。最終的に、2g生葉相当量/mlの抽出液を得た。

(2)トイレの場所操作実験

以下の手順で行った。①クマザサの葉を3×1cmに切り取り、水に浸した綿の上に広げて実験アリーナを作成した。②実験アリーナにケナガスゴモリの既交尾雌成虫(2~4日齢)を5匹または7匹導入し、1つの巣を作らせた。③6時間後、操作区では(1)の抽

出液、対照区では溶媒であるジエチルエーテルに浸した1mm四方の濾紙片を巣の中央上に置いた。④3日後に濾紙片を除去し、濾紙片下のトイレの有無、産子数(卵と未成熟虫の数)、雌成虫と子(卵と未成熟虫)の生死、増築の有無を記録した。増築が見られた場合は③の操作を増築部分に対して行った。⑤5、7、10、12、14日目にも④の操作を行った。

この操作を、雌5匹、7匹ともに3回に分けて実施し、合計して雌5匹では各処理区28巣ずつ、雌7匹では26巣ずつ行った。**解析** 解析にはR(version 4.3.2)を使用した。一般化線形混合モデルを用いて、14日間の雌1匹当たりの産子数、雌成虫と子(卵と未成熟虫)の生存率、増築回数を処理区間で比較した。

【結果・考察】

対照区では濾紙片下への排泄はほとんど見られなかったが、操作区では80%以上の確率(雌5匹:84.7%、雌7匹:82.9%)で濾紙片下にトイレが形成された。その結果、操作区のトイレの数は有意に多かった($P<0.001$)。

産子数は、雌5匹と雌7匹で一定した傾向が見られず($P<0.01$)操作区でトイレの数が増えたからといって産子数が減少する現象は見られなかった。雌成虫及び子(卵と未成熟虫)の生存率においても、雌5匹と雌7匹で一定した傾向は見られず($P<0.01$)、操作区で生存率が低下するといった現象は見られなかった。一方、雌の数に関わらず、操作区では増築回数が有意に多かった($P<0.001$ 、図1)。つまり本種は、操作によりトイレを巣内に過剰に形成させられても、病気やスペースの減少といった影響を巣の増築により緩和していたのではないかと考えられる。そのため、今後はより小さい葉を使うなどして増築ができない状況をつくり、同様の実験を行うことにより、本種の特殊な排泄行動の適応的意義を検証したい。また、トイレの場所や個数が、捕食者の餌種の巣探索効率に影響を与えるのかについても探っていきたい。

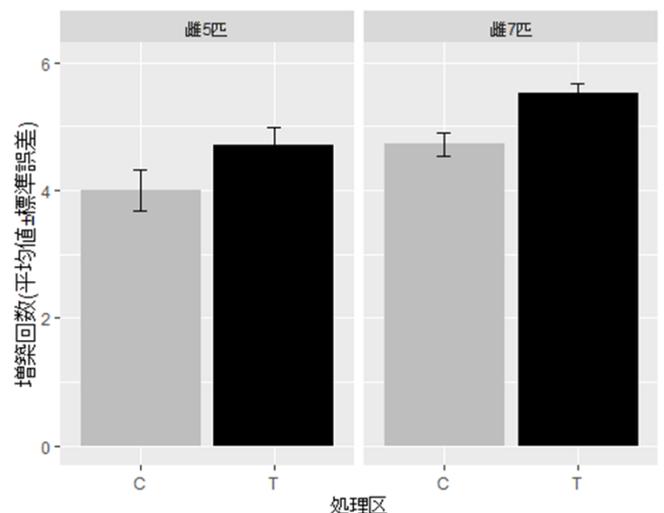


図1 14日間の増築回数 C: 対照区、T: 操作区

社会性ハダニはなぜ天敵の卵を転がすのか？

田原 真夢（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】

自然界では、食べるものである捕食者と、食べられるものである被食者との間で捕食-被食の関係性が成り立っており、この関係性が複雑に絡み合っただけで食物網が出来ている。一般的に、被食者は捕食者から逃げる、もしくはその他の回避行動を行うが、中には捕食者に対して反撃を行う被食者も存在し、そのような生物としてスゴモリハダニ類の一部の種が知られている。

スゴモリハダニ属はダニ目ハダニ科に属する体長1mm未満の植食性節足動物である。本属はササ・タケ類やススキなどのイネ科植物に寄生し、これら寄主植物の葉の裏に糸を張って巣をつくり、集団で共同営巣を行うという特徴がある。この巣網は天敵に対する防衛としての機能を持つことが分かっている。スゴモリハダニ属の天敵として捕食性ダニであるタケカブリダニ *Typhlodromus bumbusae* (以下タケカブリ) が知られているが、このタケカブリはスゴモリハダニ属の作った巣網を突破し、巣内に侵入することが出来る。巣の内部に侵入したタケカブリの雌成虫は、主にスゴモリハダニ属の卵などを捕食し、自身の卵も産み落とす。しかし、孵化したタケカブリの幼虫はスゴモリハダニ属によって体液を吸い取られ、殺されてしまうことがあるほか、スゴモリハダニ属の一部の種では、天敵を巣内から追い出す行動も見られる。また、本属の1種であるケナガスゴモリハダニ *Stigmaeopsis longus* (以下ケナガスゴモリ) の成虫では、巣内に産み落とされたタケカブリの卵を転がし、巣の出入り口や巣の外へ移動させる行動（以下卵転がし行動）が観察されている。しかし、この卵転がし行動の詳細や適応的意義は分かっていない。そこで、私はケナガスゴモリを対象に、卵を転がす頻度や卵の移動場所などこの行動の詳細を調査するとともに、卵を転がす前後のケナガスゴモリの行動を観察し、卵転がし行動の適応的意義を検討した。

【材料・方法】

ケナガスゴモリは、水で湿らせたコットン上に寄主植物であるクマザサ *Sasa veitchii* (筑波大学実験林より採集) の葉を長方形に切り取って広げ、その上で飼育した。タケカブリは、飼育したケナガスゴモリを餌として飼育した。飼育と実験は25°C、60~100%R.H.、長日条件(15L:9D)の条件下で行った。

2×3cmに切り取ったササ葉片にケナガスゴモリの雌成虫を10匹導入し、3日間巣を作らせ、産卵させた。このとき、巣が2つ以上作られていた場合はその都度昆虫針を用いて壊した。その後、タケカブリの雌成虫を1匹導入した。この雌が産卵したことを確認し、産卵場所を写真によって記録した後、タケカブリを除去した。このとき、巣内に産み落とされた捕食者の卵の数によってケナガスゴモリの行動が変わる可能性を考慮し、各シャーレにおけるタケカブリの卵の数は1、2、3個のいずれかにした。タケカブリは約8時間で1つの卵を産むため、設定したい卵の数に合わせて、タケカブリの導入時間を8~24時間で調整した。ここまでの操作を行った後、以下の2つの実験を行った。

- ① 卵転がし行動の詳細を実験によって把握するために、タケカブリの卵が孵化するまでの間（約2~3日）、24時間ごとに卵の場所を確認した。写真で記録した卵の場所から、卵2つ分以上動いていたら卵転がし行動があったと判定した。
- ② 卵転がし行動の適応的意義を検討するために、タケカブリの卵が孵化するまでの間、卵を転がす前後のハダニの行動を観察した。観察には顕微鏡カメラを使用し、タイムラプスで記録した。

【結果・考察】

タケカブリの産卵場所及び卵の移動先について、巣の入口付近(Entrance)、巣の端(Edge)、そのどちらでもない巣内葉面(Other)、天井の巣網(Nest ceiling)の4つに分類した。卵の移動の有無は産卵数の影響を受けなかったが(binomial GLM, $P=0.420$)、産卵場所の影響を有意に受け(binomial GLM, $P<0.001$; 図)、巣の天井や端よりも葉面に産み落とされた場合に多く動かされた(Tukey's test, Other vs. Nest ceiling: $P<0.001$, Other vs. Edge: $P<0.05$)。また、卵の移動先は産卵数により有意に異なっていたが(多項解析, $P<0.05$)、産卵場所による有意な影響は見られなかった(多項解析, $P=0.316$)。

行動観察から、ケナガスゴモリは巣内を歩き回る際にぶつかるとタケカブリの卵を認識し、第1脚で「触る」「転がす」などの行動を始めることが分かり、出入口の場所を確かめながらその方向へ動かす様子も確認できた。天井に産み付けられた卵に対しても、ぶつかった際に体の前半分を持ち上げてつつく様子が見られた。このことから、ケナガスゴモリは接触によりタケカブリの卵を認識しており、活動拠点である巣内葉面の卵に気づきやすいと考えられる。

さらに、天敵の卵にぶつかったらその卵を触るが、すぐにその場を離れ、卵転がし行動には至らない個体も多かった。同種卵に対してこのような行動は見られないため、異物であるという認識をしていると考えられるが、タケカブリの卵を単なる異物としてではなく天敵の卵であると認識できているのかは未だ不明である。今後は別種のアダニの卵に対しても卵転がし行動を行うのか調べるとともに、他のスゴモリハダニ種においても同様の行動が見られるか、調査を行いたい。

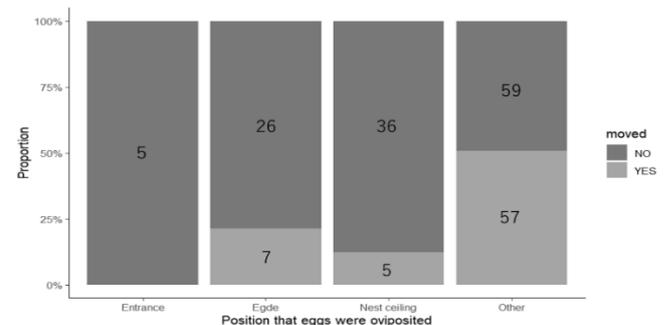


図 産卵場所と卵の移動の有無
数値は試行回数を示す。

ハーレムをつくるハダニの雄は兄弟を殺さない？

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

【背景・目的】

自然界では雌をめぐる雄間闘争がよくみられるが、その多くが殺し合いまで発展しない。それは、殺し合い行動には大きなリスクとコストが伴い、進化する条件が限られているためだと考えられている。しかし、一部の動物では致死性的雄間闘争がみられている。その進化の説明の一つに非血縁者を殺して血縁者の適応度を上げるといった血縁選択説があげられる。

ススキスゴモリハダニ種群 (*Stigmaeopsis miscanthi* species group) は致死性的雄間闘争を行い、ハーレムを形成することが知られている。本ハダニ種群における致死性的雄間闘争の進化を血縁選択説で説明するならば、非血縁者を選択的に殺すべく、血縁者と非血縁者を識別する能力が求められる。しかし先行研究では、雄が非血縁者を率先して殺害する行動は観察されなかった。一方、近年の研究により、実際の遺伝的な血縁度ではなく、ともに過ごしたかどうかの関係性に基いて血縁認識する行動がダニ類ではみられている。本ハダニ種群の雄においても、ともに過ごした関係性により血縁認識している可能性は十分に考えられる。

そこで本研究では、遺伝的な血縁関係に加えてともに過ごした関係性も操作し、それらが致死性的雄間闘争に与える影響を調査して、血縁認識能力を再検証することを目的として実験を行った。

【材料】

ススキスゴモリハダニ種群は、クモ綱ダニ目ハダニ科に属する体長 1mm 未満の植物寄生性節足動物であり、ススキの葉の裏に巣網を張って集団で共同営巣を行う。また、産雄単為生殖を行い、未受精卵からは雄が生まれ、受精卵からは雌が生まれる。

本研究では、本ハダニ種群の中でも最も激しい致死性的雄間闘争がみられるススキスゴモリハダニ HG 型を用いた。2022 年 7 月と 2023 年 8 月に沖縄県本島の金城ダムにて採集し、室内にてリーフディスク法で継代飼育した個体群を使用した。飼育と下記実験は 25°C、50~70%r.h.、15L9D の条件下で行った。

【方法】

実験は以下の手順で行った。

- ①ススキの葉を 2×1cm に切り取り、水に浸した綿で囲んでアリーナを作り、そこに未交尾雌 1 匹を導入し、巣網を張らせ産卵させる。
- ②未交尾雌の生んだ未受精卵から雄の幼虫が孵化したら、別のアリーナに雌 1 匹に巣網を張らせ、雌を追い出し、そこに 2 匹幼虫を移動させる。その際、同じ母親から生まれた遺伝的血縁関係のあるペアと、異なる母親から生まれた遺伝的血縁関係のないペアを作る。
- ③幼虫から成虫雄になるまで飼育し、毎日成長ステージを記録する。
- ④別のアリーナにあらかじめ 1 匹の雌に巣網を張らせ、卵を 3 個以上産ませて雌を除去する。そこに③の成虫雄を 2 匹ずつ移動させる。その際、遺伝的血縁関係の有無とともに過ごした関係性の有無に基づいて、図 1 のとおり 4 つの条件区に分ける。

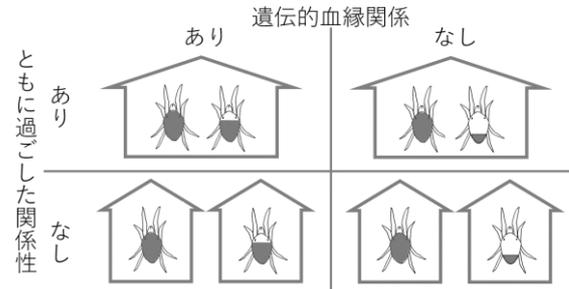


図 1. 闘争実験の条件区

ハダニ内の網掛けは血縁度を、家とともに過ごした関係性を表す。

⑤④の成虫雄 2 匹を 5 日間毎日観察し、生存を記録する。

雄が死亡した場合の死因が致死性的雄間闘争であるかどうかの判断は、本種の致死性的雄間闘争が共食い行動であることから、先行研究にならって死体の体液がなくなり干からびた状態であるかどうかを基準とした。①から⑤の操作を 1 シリーズとし、4 シリーズに分けて行った。

解析には統計解析ソフト R (version 4.3.0) を使用した。一般化線形混合モデルを用いて、致死性的雄間闘争の起こる確率に、遺伝的血縁関係、ともに過ごした関係性、それらの交互作用が与える影響をみた。混合効果には実験シリーズの違いを組み入れた。

【結果・考察】

遺伝的血縁関係の有無によって致死性的雄間闘争の起こる確率は有意に異なることから ($P < 0.05$)、血縁を認識していることが確かめられた。しかし、遺伝的非血縁者ではなく血縁者を殺す傾向がみられ、血縁選択説の予想とも、遺伝的血縁関係は影響しないとした先行研究の結果とも異なるものであった (図 2)。このような結果が得られた理由の一つに、発育環境や雄間闘争時の日齢といった、先行研究との条件の違いがあるかもしれない。一方、ともに過ごした関係性の有無については有意な差がみられなかった ($P = 0.45$; 図 2)。

これらのことより、今後は致死性的雄間闘争における発育環境や日齢、第三者の存在の影響に焦点を当て、致死性的雄間闘争が起こりやすい条件について詳細な調査を行っていく必要がある。

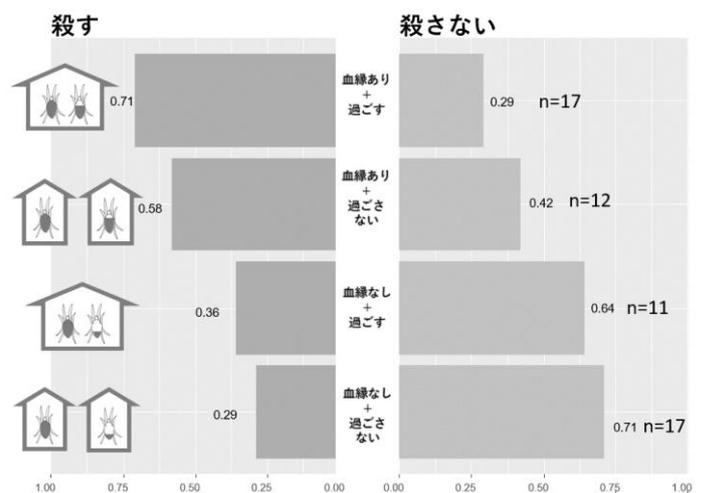


図 2. 雄間闘争の殺害頻度

日本産ハエ目昆虫に寄生する *Stigmatomyces* 属

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

【背景・目的】

子囊菌門に分類される絶対寄生菌のラブルベニアは節足動物の体表のみから見つかっている。このうち *Stigmatomyces* 属は主としてハエ目昆虫に寄生し、これまでに世界で約 200 種記載されている。しかし、2023 年に 3 種が報告されるまで、*Stigmatomyces* 属は日本では知られていなかった[1]。ラブルベニアと宿主の対応関係は重要であるが、日本では未解明である。そこで本研究では、野外で採集された日本産ハエ目昆虫を調査することにより、新たなラブルベニアやその宿主を見出した。

【材料・方法】

ショウジョウバエを中心とするハエ目昆虫はバナナトラップやスウィーピングによって日本各地で採集されたものを用いた。採集個体は 70 %エタノール中に保存またはトリエチルアミンで麻酔したのち、実体顕微鏡を用いて観察し、ラブルベニア感染の有無および感染部位を特定した。ラブルベニアは実体顕微鏡下で、ピンセットを用いて PBS 溶液に浸した宿主の体表から外し、99.9 %乳酸に浸してプレパラートを作製した。その後、光学顕微鏡や位相差顕微鏡を用いて、ラブルベニアの形態を観察し、種同定を試みた。

【結果・考察】

本研究では新たに 6 種のハエ目昆虫からラブルベニアの感染個体を発見することができた (表 1)。

形態的な特徴により (詳細は発表会にて)、*D. sternopleuralis* および *D. annulipes*, *D. angularis*, *D. unispina* より見つかったものは *St. majewskii* に同定した。ただし、*St. majewskii* とそれに近縁な *St. entomophilus* の区別点は軽微であり、*D. angularis* および *D. unispina* より見つかったものは後者の可能性もある。*St. majewskii* と *St. entomophilus* はともに *Drosophila* 属に感染するが、前者は *Sophophora* 亜属に、後者は *Drosophila* 亜属の種に特化しているとされてきた[2]。本研究では、*St. majewskii* の宿主特異性が弱く、*Drosophila* 亜属の種にも感染し得ることを示唆した。ただし、宿主が異なる *St. majewskii* は形態上区別ができないだけで、隠蔽種となっている可能性もある。

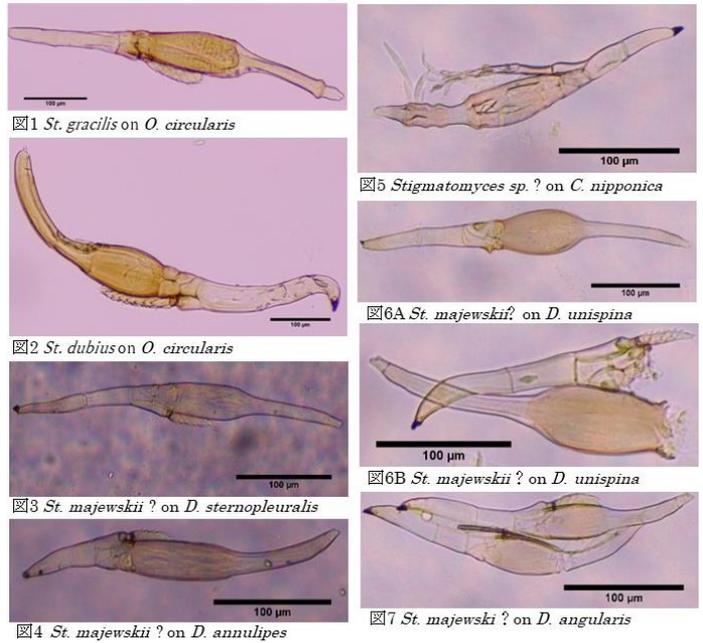
また、形態的な特徴により (詳細は発表会にて)、*O. circularis* より見つかったものは、*St. dubius* と *St. gracilis* に同定した。これら 2 種はパプアニューギニアのニューブリテン島で採集された *O. mantis* (文献[3][4]によると、*O. circularis* の可能性あり) の同一個体から記載されたものである[5]。基産地から遠く離れた日本からも *O. circularis* の同一個体からこれら 2 種が見つかったことは興味深い。ただし、他のラブルベニアでも知られているように[6]、2 種間で感染部位に違いが見られる可能性もある。

今後は日本産ハエ目昆虫に寄生するラブルベニアについて、その詳細を明らかにするとともに、感染実験を通してそのメカニズムや相互作用について明らかにしていきたい。

表1 ラブルベニア感染が見つかったハエ目昆虫

宿主	和名	ラブルベニア	採集日	採集地
<i>D. suzukii</i>	オウトウショウジョウバエ	<i>St. majewskii</i>	多数	日本各地
<i>Sd. subtilis</i>	ススパネショウジョウバエ	<i>St. scaptodrosophilae</i>	2022/4/6	京都府京都市
<i>Sd. coracina</i>	クロツヤショウジョウバエ	<i>St. scaptodrosophilae</i>	2022/5/20	京都府京都市
<i>O. circularis</i>	ミナミカマバエ	<i>St. gracilis</i> (図1) <i>St. dubius</i> (図2)	2022/9/20	岐阜県羽島市
<i>D. rufa</i>	ムナスジショウジョウバエ	<i>St. majewskii</i>	2022/10/22	京都府京都市
<i>Sc. graminum</i>	ナミヒメショウジョウバエ	<i>St. scaptomyzae</i>	2022/11/12	東京都八王子市
<i>D. sternopleuralis</i>	マガタマショウジョウバエ	<i>St. majewskii</i> ? (図3)	2023/6/3	埼玉県狭山市
<i>D. annulipes</i>	ダンガラショウジョウバエ	<i>St. majewskii</i> ? (図4)	2023/9/13	長野県上田市
<i>C. nipponica</i>	ヤマトオオフンコバエ	<i>Stigmatomyces</i> sp. ? (図5)	2023/10/22	岐阜県揖斐郡
<i>D. angularis</i>	ヒメホシショウジョウバエ	<i>St. majewskii</i> ? (図6A, B)	2023/11/5	京都府京都市
<i>D. unispina</i>	カクホシショウジョウバエ	<i>St. majewskii</i> ? (図7)	2023/11/6	京都府京都市

C = *Crumomyia*, D = *Drosophila*, O = *Ochthera*, Sc = *Scaptomyza*, Sd = *Scaptodrosophila*, St = *Stigmatomyces*
今回初出のものには行全体を灰色で示した。



【謝辞】

本研究を実施するにあたり、大宮悠様、小沼萌博士、川村康平様、神崎菜摘博士、澤村京一博士、出川洋介博士、山崎いづみ様、李知彦様にお世話になった。

【引用文献】

[1] Yamazaki I *et al.* (2023) *Fly* 17: 2234265.
 [2] Haelewaters D, De Kesel A (2020) *MycKeys* 71: 23-83.
 [3] Huldén L (1983) *Karstenia* 23: 31-136.
 [4] Clausen P J (1977) *Trans Amer Ent Soc* 103: 451-530.
 [5] Thaxter R (1901) *Proc Amer Acad Arts & Sci* 36: 397-414.
 [6] Sundberg H *et al.* (2018) *Fungal Syst Evol* 1: 217-228.

タカハシショウジョウバエの分布北上：在来近縁種キハダショウジョウバエとの混棲状況

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

はじめに

ショウジョウバエ属 (*Drosophila*) キイロショウジョウバエ群 (*melanogaster* group) のうち、タカハシショウジョウバエ亜群 (*takahashii* subgroup) には国内ではタカハシショウジョウバエ (*D. takahashii*) とキハダショウジョウバエ (*D. lutescens*) の2種が生息している。これら2種は実験室内での交配により妊性のある雑種メスと不妊の雑種オスが作製できる (竹下ら, 2023)。1980年代の報告では、国内では *D. lutescens* が北海道から奄美大島までの広域分布種で、*D. takahashii* は九州や四国の南部を北限とする南方系の種であった (Kimura, 1982; Fukatami, 1984) が、近年では *D. takahashii* の分布が北上しており、*D. lutescens* との混棲域が拡大している (新井健太・小沼萌, 未発表)。一般的に、近縁種間においては同様の資源をめぐる競争排除や繁殖干渉、雑種形成などにより、片方の種が淘汰されて共存できない場合があるとされる。しかし、*D. takahashii* と *D. lutescens* は同所的に安定して共存していることから、野外において2種が何らかの仕組みでそれらの問題を回避している可能性がある。本研究では、*D. takahashii* の現時点での分布の北限と2種の混棲状況を調査することを目的とした。

材料と方法

(1) 野外採集

2023年4~11月の期間に、東京都、千葉県、茨城県内の合計16地点で野外採集を行なった (図1)。採集方法は基本的にドライイーストで発酵させたバナナを用いたトラップ採集とした。トラップは主に落葉広葉樹で構成された雑木林の林内または林縁部の直射日光が当たらない場所に仕掛け、1~20日後に回収した。また、一部の調査地ではヤマボウシなどの果実に群がるショウジョウバエ類を視認できたため、捕虫網を用いた採集も行なった。採集で得られたショウジョウバエ類は70%エタノール内に浸けて保存した。



図1 調査地点の概要 (国土地理院標準地図をもとに作成)

野外採集は筑波大学構内・周辺、つくばエクスプレス (TX) 南流山駅~万博記念公園駅の各駅周辺 (9箇所)、JR 武蔵野線新八柱駅、市川大野駅、船橋法典駅の各駅周辺 (3箇所)、北総鉄道の松飛台駅と大町駅周辺 (2箇所)、葛西臨海公園の合計16地点で行なった。

(2) 種同定

まず、実体顕微鏡下で性櫛 (sex-comb) などの外部形態の特徴をもとにショウジョウバエ類から *takahashii* subgroup の雄を選別した。*D. takahashii* と *D. lutescens* は外見での区別は困難だが、雄交尾器内の1対の穂のような形をした構造をもとに同定することができる (Okada, 1954, 1955, 図2)。前者では aedeagal sheath の基部がそのように見えるが、後者では ventral postgonite と呼ばれる構造が長く伸びている (竹下ら, 2023)。交尾器を観察するため、雄成虫を1NのKOH溶液 (100°C、10分間) に入れた後、グリセリン内で解剖して交尾器を摘出し、光学顕微鏡下で観察した。

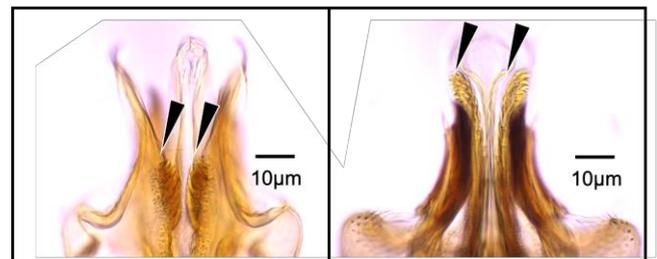


図2 *D. takahashii* の aedeagal sheath の基部 (左) と *D. lutescens* の ventral postgonite (右) の比較

結果と考察

東京都と千葉県内の9つの調査地点において *D. takahashii* が得られ、うち7地点では *D. lutescens* と混棲していた。茨城県内で採集したショウジョウバエ類については現在同定中のため、詳細な結果と考察については発表会で紹介予定である。

謝辞

実験指導および野外採集に協力していただいた研究室の皆様方、卒業生の新井健太博士と小沼萌博士に感謝申し上げます。

引用文献

- Fukatami, A. (1984) Cold temperature resistance in *Drosophila lutescens* and *D. takahashii*. Japanese Journal of Genetics 59, 61-70.
- Kimura, M. T. (1982) Cold hardiness and preimaginal period in two closely related species, *Drosophila takahashii* and *D. lutescens*. Kontyu 50, 638-648.
- Okada, T. (1954) Comparative morphology of the Drosophilid flies. I. Phallic organs of the *melanogaster* group. Kontyu 22, 36-46.
- Okada, T. (1955) *Drosophila*. In Kihara, H. (Ed). Fauna and Flora of Nepal Himalaya. Vol. 1. Fauna and Flora Research Society, Kyoto University, pp.387-391.
- 竹下瑛人, 大宮悠, 小沼萌, 澤村京一 (2023). タカハシショウジョウバエ亜群の近縁2種における交尾器形態および機能の比較. 昆虫DNA研究会ニュースレター 39, 24-26.

ノハラカオジロショウジョウバエ交尾器形態の地理的変異

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

【背景と目的】

分布の重複する2種の生物のある形質が、異所性の個体群では似た特徴を示すが、同所性の個体群では異なる特徴を示す場合、この形質の地理的変異パターンは形質置換と呼ばれる。繁殖に関わる形質の分化を指す生殖的形質置換と隔離の強化が相互作用することで種分化が起こる場合がある。昆虫の交尾器形態は、生殖的隔離に関わる形質であり、特に進化速度が速い。

日本に生息するショウジョウバエ属 (*Drosophila*) のカオジロショウジョウバエ類の1種であるノハラカオジロショウジョウバエ (*D. triauraria*) は、近縁種であるカオジロショウジョウバエ (*D. auraria*) と分布が広く重なっている (Kimura, 1987)。ノハラカオジロショウジョウバエのオス交尾器には、カオジロショウジョウバエと同所的に生息する九州以北の個体群と、カオジロショウジョウバエが生息していない南西諸島の個体群との間で形態的差異が見られることが知られている (Onuma *et al.*, 2022)。これは、ノハラカオジロショウジョウバエのオス交尾器で形質置換が起こったことを示唆している可能性がある。

また、カオジロショウジョウバエ類のメス交尾器には、オス交尾器に対応した構造が見られることが知られており、メス交尾器の形態も種特異的な多様性を示す。交尾の際にオスの交尾器がメス交尾器に付ける傷である交尾時創傷の位置も種特異的である (Onuma *et al.*, 2022)。しかし、オス交尾器の形態が異なる本土個体群と南西諸島個体群の間で、メス交尾器の形態の比較は行われていない。

そこで、本研究では、先行研究で示されたノハラカオジロショウジョウバエのオス交尾器の地理的変異を再確認すること、メス交尾器に何らかの地理的変異が見られるのかの2点を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

(1) 使用した系統

ノハラカオジロショウジョウバエの3系統を使用した。同所性である九州以北産の系統として、茨城県つくば市由来の T544 の1系統、異所性である南西諸島産の系統として、屋久島由来の YKS-MTK、沖縄本島由来の OKNG12-6 の2系統を使用した。

(2) オス交尾器の観察

ノハラカオジロショウジョウバエのオスを1NKOH中で10分間100℃で加熱した。これをグリセリン中で解剖し、取り出した交尾器を顕微鏡下で観察した。

(3) メス交尾器の観察

ノハラカオジロショウジョウバエを雌雄30匹ずつ飼育ビンに入れた。1週間後にメスを麻酔して取り出し、実体顕微鏡下で解剖して交尾器を取り出した。摘出した交尾器をスライドガラスに置き、PBSで封入してプレパラートを作製し、交尾器の構造と交尾時創傷の位置を顕微鏡下で観察した。また、雌雄1匹ずつで交尾させたメスをバイアル内で飼育し、1週間後に同様の手法で観察した。

【結果と考察】

観察の結果、ノハラカオジロショウジョウバエのオス交尾器には先行研究 (Onuma *et al.*, 2022) で報告されていたような地理的変異が見られた (図1)。エデアグス先端の形状 (図3-a ①) とエデアグスの突起 (図3-a ②) に差が見られた。

メス交尾器の生殖管には全ての系統で襞状構造と交尾時創傷が見られ、系統間には差は見られなかった (図2)。オスのエデアグスの突起の大小に関わらず、メス生殖管には傷が付くことが示された。先行研究で明らかにされた T544 の生殖管内の構造が図3-b である。生殖管内の構造の位置関係が不明である南西諸島産の2系統でも、生殖管を圧迫して反転させる手法を用いて立体的な観察を行う必要がある。

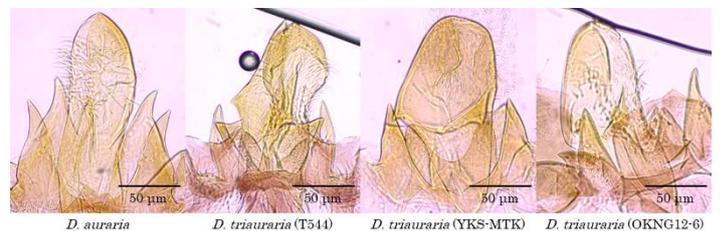


図1. カオジロショウジョウバエとノハラカオジロショウジョウバエ3系統のオス交尾器

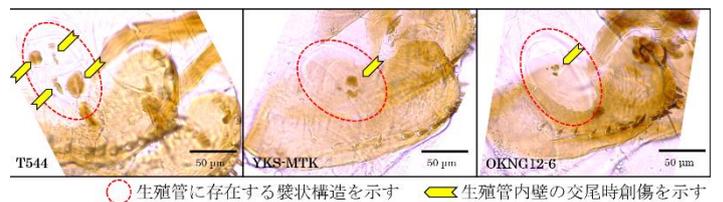


図2. ノハラカオジロショウジョウバエのメス生殖管に見られた襞状構造と交尾時創傷

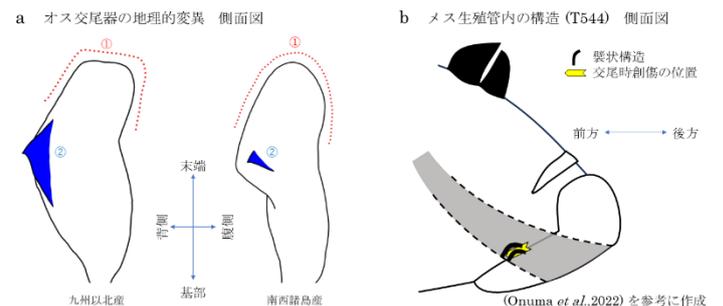


図3. ノハラカオジロショウジョウバエ雌雄交尾器の模式図

【謝辞】

本研究を行うにあたり、貴重な情報をいただいた木村正人博士 (北海道大学)、和多田正義博士 (愛媛大学)、ご指導いただいた小沼萌博士 (当研究室卒業生)、系統を提供していただいた KORIN-FLY の皆様に厚くお礼申し上げます。

【引用文献】

- Kimura, M. T., 1987. Kontyu 55: 429- 436.
- Onuma, M. *et al.*, 2022. Biol. J. Linn. Soc. 135: 195- 207.

ミミズたちはどう生きるか

佐久間 陽平 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 徳永 幸彦 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

陸棲ミミズ類は土壌生態系を代表する生物である。同時的雌雄同体であることがわかっているが生殖方式については未解明な部分が多い。

同時的雌雄同体の成体は雌雄両方の生殖器官をもつが繁殖は二個体で有性生殖を行い、単為生殖や自家受精を行わないことが一般に知られている。ツリミミズ科のシマミミズ(*Eisenia fetida* 以下 Ef)、アンドレッツリミミズ(*E.andrei* 以下 Ea)はどちらも同時的雌雄同体動物であるが通常二個体での交尾に加えて一個体だけでの繁殖が報告されている[1]。2種は生息地が重なる地域もあり、実験条件下で交雑も確認されておりそれらの子孫には不完全ながら妊性が見られる[2]。また交雑種はアンドレッツリミミズに近い特徴をもっていた。

本研究では2種にみられる一個体での繁殖が生態学的にどのような意味をもつか飼育観察に基づいた遺伝学的なモデルにより考察した。2種がどのような繁殖戦略を用いているのかを明らかにすることを目的とした。

【方法】

2種の飼育観察に戻った遺伝学的モデルの作成とそれに基づくRでのシミュレーションを行った。

はじめにモデル作成のために繁殖方法及び2種の生態について整理する。Ef、Eaの繁殖方法には一個体だけでの繁殖(以下、自家受精と仮定する)、と種内(種間)交尾があり繁殖方法は個体ごとにそれぞれの戦略に基づき決められるものとする。交雑種が実験条件下で確認されたことから他個体がEf、Eaのどちらなのかは判別ができていないものとする。以上の仮定のもとパラメータを次のように設定した。

N_t	時間 t における全個体数
F_t, A_t	時間 t における Ef, Ea の個体数
X_f, X_a	Ea, Ef の交尾を選択する割合(繁殖戦略)
M_f, M_a	Ea, Ef の種内交尾による産卵数
S_f, S_a	Ea, Ef の自家受精による産卵数
H_f, H_a	Ea, Ef の種間交尾による産卵数

これらのパラメータを用いて Ef, Ea それぞれの一個体が一度の交尾によって残す卵の数 R は次のように表すことができる。

$$R_f = (1 - X_f)S_f + X_f \left(\frac{F_t X_f}{F_t X_f + A_t X_a} M_f + \frac{A_t X_a}{F_t X_f + A_t X_a} H_f \right)$$

$$R_a = (1 - X_a)S_a + X_a \left(\frac{F_t X_f}{F_t X_f + A_t X_a} H_f + \frac{A_t X_a}{F_t X_f + A_t X_a} M_a \right)$$

これらに環境収容力による密度効果を加え、世代ごとの個体数の関係性を R を用いて次のように表すことができる。

$$F_{t+1} = F_t + F_t(R_f - 1) \left(1 - \frac{N_t}{K} \right) \dots (1)$$

$$A_{t+1} = A_t + A_t(R_a - 1) \left(1 - \frac{N_t}{K} \right) \dots (2)$$

(1),(2) をもとに R を用いて他の個体群から個体が移入しない場合と個体が移入する場合にわけてシミュレーションを行った。繁殖戦略はその条件下で最適なものに毎世代、変更するものとし交雑について Ef は子孫を残さず、Ea のみ子孫を残すものとした。

【結果】

個体群の平衡条件は次のようになる。

$$R_f = R_a = 1 \dots (3) \quad \text{または} \quad N_t = K$$

(3)の値は観察されているミミズの繁殖成績の範疇で取りうる値であった。ただし安定性解析の結果、2種が安定して共存することはなくどちらか一種のみになるとわかった。図1より平衡点からどちらかにずれるとそちら側に傾くことがわかる。

R によるシミュレーションでは移入しない場合には最終的にどちらか一方の種が残った。移入する場合には F_0 が A_0 に対して十分大きい場合に Ea:Ef の割合が安定した。そのとき、 X_f は 1、 X_a は 0 の値で安定した。つまり Ef は自家受精を行わず交尾のみを行い反対に Ea は交尾を行わず自家受精のみを行うようになった。

【考察】

平衡条件の結果と R によるシミュレーションの結果より Ea と Ef の2種が閉鎖的な条件で共存しつづけることは難しいと考えられる。ただし移入を含めたシミュレーションでは一定の比で安定したことから2種の生息地の境界では Ea が自家受精のみの繁殖戦略を取り交雑を避けることによって共存することが考えられる。これは割合が低い Ea が交雑を避け、自家受精を選択するために生じている。自家受精について異なる報告[1][2]は実験に用いた個体の生息環境で2種の比率が異なるためであると推察できる。

【参考文献】

- [1] Domínguez, J., et al. (2003). *Pedobiologia*, 47, 530-534.
- [2] Plytycz, B., et al. (2018). *PLOS ONE*, Sep 21; 13(9): e0204469.

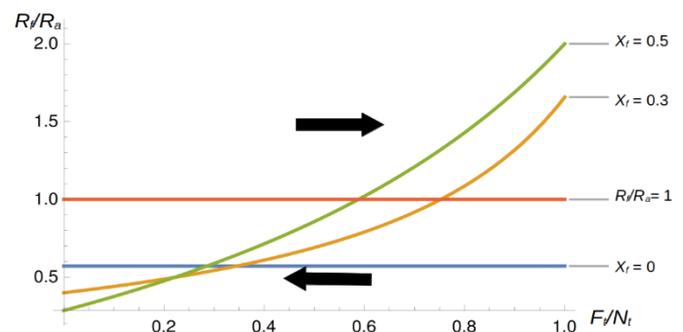


図1 Rf/Ra と Ft の割合の関係性

立つ鳥の跡を用いたリザバーコンピューティング

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

【背景・目的】

サギは、繁殖期にコロニー、繁殖期以外にねぐらという、複数の種から成る集合を作る。茨城県では、コロニーは主にアオサギ (*Ardea cinera*)、ダイサギ (*Ardea alba*)、チュウサギ (*Egretta intermeddia*)、コサギ (*E.garzetta*)、ゴイサギ (*Nycticorax nycticorax*)、アマサギ (*Bubulcus ibis*) により構成され、ねぐらは主に渡りを行うチュウサギ、アマサギを除く 4 種で構成される。本研究では、(A) サギの流動が距離と中心性によって決まると仮定し、複数の中心性指標を用いてサギの移動を表すネットワークを作った。また、(B) どの中心性指標がサギの動態を表すうえで最も適しているか調べるために、それぞれのネットワークのリザバーとしての性能を比較した。

ネットワークの中心性とは、ネットワークを構成する各ノード (頂点) が、どれだけ中心的な役割を果たすかを表す指標であり、ネットワーク分析の研究では、注目している性質ごとに異なる中心性指標が用いられている。本研究で用いた中心性指標と、それぞれのノードの評価方法について表 1 に示す。

表 1：7つの中心性指標の、ノードの評価方法

	ノードの評価方法
次数中心性	他のノードとのつながりが多いノードほど高い値を取る。
近接中心性	他のノードとの最短距離が小さいノードほど高い値を取る。
固有ベクトル中心性	つながりが多いノードとつながったノードほど高い値を取る。
ページランク中心性	つながりが多いノードとつながったノードほど高い値を取る。固有ベクトル中心性を改良した指標。
パワー中心性	つながりが少ないノードとつながったノードほど高い値を取る。
媒介中心性	2つのノードをつなぐ最短経路に含まれる回数が多いノードほど高い値を取る。
情報中心性	他のノードとの距離の合計が小さいノードほど高い値を取る。

リザバーコンピューティング (RC) は、時系列データの処理に適した機械学習技術である。一般的な RC は、時系列データを受け取りリザバーに入力する入力層、教師あり学習による学習を行う出力層、リザバー層から成る。リザバーとは、入力信号系列に駆動される力学系である。リザバーとして適した力学系の特性として、同一入力に対して同一の出力を返すこと、短期記憶容量が大きいこと、データを非線形変換できることがある (犬伏・吉村, 2019)。近年、生物の作るネットワークが高い計算能力を持つリザバーになっていることが報告されている。そこで、本研究では、リザバーとして高い性能を発揮するネットワークほど実際の生物ネットワークをよく表現しているのではないかと考え、(A) で作った各中心性指標に基づくネットワークについてリザバーとしての性能を比較することで、サギの動態を表すうえで最も適した中心性指標を推測した。

【材料・方法】

本研究では、2001 年から 2012 年までの、コロニーにおけるサギの個体数、ねぐらにおけるサギの個体数、それぞれのコロニー、ねぐらの座標を調べたデータを使わせていただいた。

(A) まず、上記の中心性指標と実際のデータを用いて、2001 年から 2012 年までの各年におけるコロニー、ねぐらにおけるサギの個体数を最もよく表現できるような、コロニー・ねぐら間のつながりを表すネットワークを作った。コロニーとねぐらのつながりは、二部グラフとして表現することができる (図 1)。二部グラフは、つながりがある部分を 1、ない部分を 0 とした行列で表現で

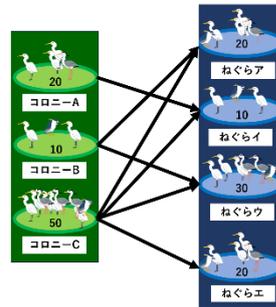


図 1：二部グラフ

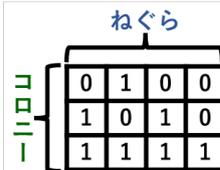


図 2：つながり行列

個体数データの相関が最も高くなるようなコロニーとねぐらのつながり (図 2) を遺伝的アルゴリズムにより求めた。遺伝的アルゴリズムは、生物の適応進化のメカニズムを応用した探索アルゴリズムである。本研究では、0/1 を「遺伝子」、つながり行列 (図 2) を「個体」と捉え、進化プロセス (組み換えや突然変異) を繰り返すことにより、個体数データとの相関が最も高くなるつながり行列を選択した。

(B) 次に、(A) で作ったネットワークから、年をまたいだねぐら間のつながりを表すネットワークを作り、これをリザバーとして用いた RC を作成した。本研究で用いた RC は、入力層 (Win)、リザバー層 (W)、リザバー間のデータ受け渡しを担う中間層 (Winner)、出力層 (Wout) から成る (図 3)。このような RC を各中心性指標について作り、いくつかの問題 (時系列予測問題、時系列分類問題) を解かせることで、リザバーとしての性能を比較した。

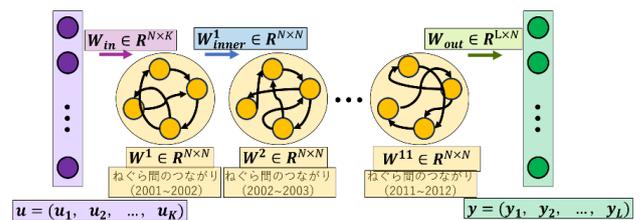


図 3：本研究で用いた RC の構造 (Chouikhi et al., 2018 を改変)

【結果、考察】

サギのリザバーは、NARMA モデルや簡単な時系列分類問題で高い精度を発揮したが、カオスモデルや複雑な時系列分類問題では精度が低くなった。詳しくは発表会にて報告する。

【参考文献】

1. 犬伏正信・吉村和之, 2019, 「リザバーコンピューティングに適した力学系の特性と構造」『電子情報通信学会誌』102(2):114-20.
2. Chouikhi et al. 2018, Genesis of Basic and Multi-Layer Echo State Network Recurrent Autoencoders for Efficient Data Representations, arXiv:1804.08996v2

寄生蜂 *Asobara japonica* の感染に対する宿主ショウジョウバエ 10 種の応答性の比較

中山 友萌香 (筑波大学 生物学類)

指導教員：上山 拓己 (筑波大学 生存ダイナミクス研究センター)

【背景・目的】

寄生蜂は、宿主となる植物や節足動物に卵を産み付け、栄養を搾取することによって成長するハチ目の昆虫である。寄生蜂は種ごとに特異的な宿主を有し、宿主とすることができる種の範囲(宿主範囲)が大きく異なる。宿主範囲の特徴から、広範囲の種に寄生ができる寄生蜂は *generalist*、ある限られた宿主種にのみ寄生する寄生蜂は *specialist* と呼ばれる¹。この寄生蜂が宿主範囲を決定するメカニズムについては不明な点が多い。

寄生蜂の一種である *Asobara japonica* (以下、*A. japonica*) はショウジョウバエ属の幅広い種を宿主とする *generalist* 的な寄生蜂である。*A. japonica* は宿主幼虫の体内に毒と卵を注入し(感染)、宿主体内で孵化する。*A. japonica* の幼虫は宿主体内で成長し、やがて宿主が蛹に達すると蛹の内部で宿主を食い殺し、宿主の蛹から *A. japonica* の成虫が羽化する。所属研究室の先行研究において、*A. japonica* の感染時に注入される毒が *Drosophila melanogaster* (以下、*D. mel*) 幼虫の成虫原基(成虫の前駆組織)で細胞死と細胞分裂の停止を誘導し、宿主の成長を制御し寄生を成功させることが見出された(島田ら、未発表)。この *A. japonica* の寄生戦略は *D. mel* 以外の宿主種に対しても共通しているのか、あるいは宿主種ごとに細分化された異なる寄生戦略を持つのだろうか。この疑問を明らかにするため、本研究では *A. japonica* 感染後の成虫原基の細胞死および細胞分裂活性を宿主ショウジョウバエ 10 種で比較した。

【方法】

実験 1. 寄生成功率の計測

A. japonica を 10 種のショウジョウバエ (*Drosophila simulans*, *melanogaster*, *yakuba*, *erecta*, *suzukii*, *ananasea*, *pseudoobscura*, *willistoni*, *mojavensis*, *virilis*) の 3 齢幼虫に感染させた。その後、感染個体から羽化した *A. japonica* もしくはショウジョウバエの成虫の個体数と蛹または幼虫で死亡した個体数を計測した。

実験 2. 感染後の翅原基の細胞死および細胞分裂活性の比較

A. japonica の感染 4 時間後に、成虫原基の一つである翅原基を宿主幼虫から解剖し、固定した。細胞死により断片化した DNA の末端を標識する TUNEL (Roche) 染色と、アポトーシス実行因子である切断型 death caspase (cDcp1, Cell Signalling Technology) 特異的抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。加えて、細胞分裂期の細胞を標識する pH3 (Cell Signalling Technology) 特異的抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。*D. moj* においては感染 6 時間後と 8 時間後の翅原基も同様の方法で染色を行った。その後、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss, LSM700) でこれらのシグナルの観察と撮影を行った。

【結果・考察】

実験 1 : 今回観察したショウジョウバエ (ハエ) 10 種すべてにおいて、*A. japonica* の感染を受けた個体から *A. japonica* 成虫が羽化した。ハエ成虫が羽化した割合は観察した個体の 1% 以下であった。従って、*A. japonica* は *D. sim*, *mel*, *yak*, *ere*, *suz*, *ana*,

pse, *wil*, *moj*, *vir* の幼虫に対して寄生を成立できることが示された。また、*D. moj* においては他の宿主種と比較して寄生成功率が低く、*A. japonica* 成虫が羽化した割合は感染個体の 20% 以下であった。

実験 2 : 感染 4 時間後の *D. sim*, *mel*, *yak*, *ere*, *suz*, *ana*, *pse*, *wil*, *moj*, *vir* の翅原基において、非感染個体の翅原基と比較して TUNEL 陽性細胞数と cDcp1 の蛍光面積が顕著に増加し、pH3 陽性細胞数が顕著に減少していた。これに対し、*D. moj* の翅原基では感染 4 時間後、TUNEL 陽性細胞数と cDcp1 の蛍光面積は顕著に増加していたものの、pH3 陽性細胞数の減少はみられなかった。しかし感染 6 時間後と 8 時間後の翅原基を観察すると、pH3 陽性細胞数は非感染個体の翅原基と比較して顕著に減少していた。よって、本研究で観察した *D. sim*, *mel*, *yak*, *ere*, *suz*, *ana*, *pse*, *wil*, *moj*, *vir* は、*A. japonica* の感染を受けると翅原基の細胞死と細胞分裂の停止が誘導されることが示された。また、*D. moj* では他の 9 種よりも *A. japonica* 感染後に細胞分裂の停止が起こるまでにかかる時間が長いことが示された。

本研究から、*A. japonica* は宿主成虫原基に対する細胞死と細胞分裂の停止の誘導を *D. mel* 以外の複数の宿主種で共通して引き起こすことが分かった。また、*D. moj* で観察されたように、寄生が可能な宿主種同士であっても細胞分裂が停止し始める時間には種ごとに差異があることが示唆された。*D. moj* の寄生成功率が低かったことから、宿主成虫原基で細胞分裂の停止が誘導されるまでのスピードが寄生成功率に影響する可能性が示唆された。

【今後の展望】

宿主成虫原基の細胞死および細胞分裂活性を観察し、寄生蜂 *A. japonica* が複数の宿主種に対し共通する生理反応を誘導することを示した。所属研究室の先行研究において、*D. mel* を宿主とした時、翅原基の細胞死と細胞分裂の停止の誘導に必須である 2 つの毒タンパク質が同定されている(上山ら、未発表)。この毒タンパク質遺伝子を RNA 干渉法によりノックダウンした *A. japonica* を作成し、細胞死と細胞分裂停止の誘導の有無を観察することで、同定された二つの毒タンパク質が *D. mel* 以外の宿主種の成虫原基に対する細胞死と細胞分裂の停止においても必須の役割を担うのかを検査することができる。この解析により、*A. japonica* と異なる複数の宿主種に対する寄生戦略の共通性と多様性の理解を分子レベルまで深めることが期待できる。

【参考文献】

- 1) Schlenke, T.A., Morales, J., Govind, S. and Clark, A.G. (2007). PLoS Pathogens, 3, e158.
- 2) Ideo, S., Watada, M., Mitsui, H. and Kimura, M.T. (2008). Entomol. Sci. 11, 1–6.

トネリコ類立枯病菌の孢子発芽を抑制する *Aureobasidium pullulans* の

セイヨウトネリコ生葉上での挙動

皿海 琉 (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】

近年、ヨーロッパにおいて“Ash dieback”というトネリコ属植物に立枯れ症状を引き起こす樹木病害が広く発生しており問題となっている。

この“Ash dieback”の原因菌である *Hymenoscyphus fraxineus* に感染しても“Ash dieback”が発病しない北海道大学札幌キャンパス内で生育するセイヨウトネリコの個体について内生菌相の調査が行われ *Aureobasidium pullulans* が分離された。この *A. pullulans* は、*H. fraxineus* の子嚢胞子の発芽を抑制することが報告されており生物防除剤としての活用が期待されている。

本研究では、セイヨウトネリコ上での *A. pullulans* の挙動を明らかにすることを目的として、本菌をセイヨウトネリコ生葉に接種および再分離試験を行うことで、本菌の宿主組織内外での定着の状態と、生葉上での挙動をズーム式顕微鏡 (実体顕微鏡) と卓上顕微鏡 Miniscope (簡易 SEM) で観察した。

【材料と方法】

(1) 供試植物および供試菌株

供試植物として北海道大学で採取、移送され本研究室で維持してきたセイヨウトネリコの若木を使用した。供試菌株として市村 (2021) によって北海道大学に生育するセイヨウトネリコ生葉から内生として分離された *A. pullulans* No.5029 を供試した。

(2) *Aureobasidium pullulans* の再分離試験

Aureobasidium pullulans の懸濁液を接種したセイヨウトネリコの小葉 (図1) を3日、1週間、2週間、3週間、4週間後に採取し、無処理葉の葉面を寒天培地上に押しつけた後、剥がすことで葉面菌の分離を試みた。その後、本葉を表面殺菌した後に切り出した葉片を寒天培地上において培養し、伸長してきた菌体をさらに分離培養して *A. pullulans* の生息を確認した。

(3) *Aureobasidium pullulans* の継時的観察

14×10cmの角形プラスチックシャーレ内で40ppmのジベレリン溶液を与えながら維持したセイヨウトネリコの小葉の切り葉上に (図2)、*A. pullulans* 懸濁液を滴下し、1週間継時的に実体顕微鏡または簡易 SEM で *A. pullulans* の細胞を観察した。

【結果および考察】

(1) *A. pullulans* の再分離試験

接種後3日～4週間後の表面殺菌をしていない小葉の葉面からは *A. pullulans* が分離された。一方で、表面殺菌後の小葉からは *A. pullulans* は分離されなかった。今回の条件では *A. pullulans* はセイヨウトネリコから内生菌としては分離されなかったが、葉面上で3～4週間ほど生存できることが確認された。

(2) *A. pullulans* の継時的観察

実体顕微鏡による観察では時間が経過しても *A. pullulans* の細胞は生葉上で増殖する様子は観察されなかった。一方で、簡易

SEMによる観察では時間が経つにつれて *A. pullulans* の酵母状細胞の出芽増殖と菌糸状の増殖の様子が確認された。また、酵母状細胞で増殖し小葉上でバイオフィーム状に定着していることを示唆させる様子も観察された (図3)。

【まとめ】

Aureobasidium pullulans はセイヨウトネリコ生葉上で少なくとも3～4週間生存する可能性が強く示唆された。葉面上では菌糸を伸長させ、また、バイオフィーム状に定着する様子が観察されたことにより、葉面上で菌糸状細胞や酵母状細胞など様々な形態で生存している可能性が示唆された。本菌はセイヨウトネリコから内生的に分離されたものであるが、今回の条件では内生菌として分離されなかった。葉表面上の定着形態によっては葉組織内に定着する可能性があるため、今後の調査が必要である。



図1 セイヨウトネリコへの *A. pullulans* の接種方法



図2 角形シャーレにおける切り葉の維持方法

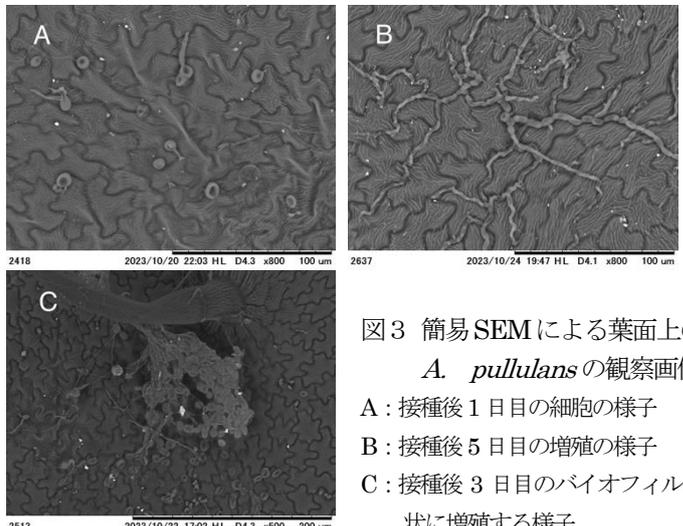


図3 簡易SEMによる葉面上の *A. pullulans* の観察画像
A: 接種後1日目の細胞の様子
B: 接種後5日目の増殖の様子
C: 接種後3日目のバイオフィーム状に増殖する様子

北茨城のスズタケに寄生する *Puccinia* 属サビキンの多様性調査

氷見 和裕 (筑波大学 生物学類)

指導教員：岡根 泉 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

サビキンは担子菌門 (*Basidiomycota*) サビキン綱 (*Pucciniomycetes*) サビキン目 (*Pucciniales*) に属する植物絶対寄生菌である。これまでにサビキンは世界で 14 科 166 属 7798 種が報告され、日本で 800 種が報告されている。サビキンは 1 種が最大で 4 つの形態的、機能的に異なる孢子世代と 5 種類の孢子(精子、さび孢子、夏孢子、冬孢子、担子孢子)を形成する。また、生活環を全うするのに系統的に異なる 2 種類の植物を必要とする異種寄生種と、1 種の植物で全うできる同種寄生種が存在する。

Puccinia 属サビキンの中にはタケ・ササ類を夏孢子・冬孢子世代宿主とするものがおり、スズタケ (*Sasamorpho borealis*) に寄生することが報告されているのは *P. aduncata*, *P. hikawaensis*, *P. longicornis*, *P. mitriformis*, *P. sasae*, *P. sasicola*, *P. suzutake* の 7 種である。筑波大学植物寄生菌学研究室は茨城県の菌類相調査プロジェクトに参加しており、その中で北茨城のスズタケには少なくとも 2 種の *Puccinia* 属サビキンの夏孢子・冬孢子世代が寄生していることを発見した。1 種は形態学的に *P. suzutake* と同定される種、もう 1 種は冬孢子的先端が長く湾曲し周辺のウツギ上のサビキン (*Aecidium*) と分子系統学的に一致する種 (*Puccinia* sp. 1) である。本研究では、北茨城のスズタケに寄生する *Puccinia* 属サビキンの種の多様性を解明することを目的として、分子系統解析、形態観察、接種試験による分類および生態学的検討を試みた。

【材料と方法】

(1) 分子系統解析…Rust2inv と LR6 をプライマーに用いた PCR で、2023 年に北茨城市花園溪谷で採取したスズタケに寄生する *Puccinia* 属サビキン 11 点の 5.8S rDNA-ITS2-28S rDNA 領域の約 1400 bp を増幅し塩基配列を決定した。それらに GenBank に登録されている ITS2 と 28S rDNA D1/D2 領域を含む 23 の塩基配列データを加え近隣結合法で分子系統解析を行った。

(2) 形態観察…2023 年に北茨城市花園溪谷で採取したスズタケに寄生する *Puccinia* 属サビキン 16 点の冬孢子的形態を光学顕微鏡で観察するとともに各部位の形態測定を行った。

(3) 接種試験…*Puccinia* sp. 1 の担子孢子をウツギ、ヤマアジサイ、コサジサイに接種し、精子・さび孢子世代の形成の有無を観察した。その後ウツギに発生したさび孢子をスズタケに接種し、夏孢子・冬孢子世代の形成の有無を観察した。

【結果】 (表も参照)

(1) 分子系統解析…2023 年に北茨城市花園溪谷で採取したスズタケに寄生する *Puccinia* 属サビキン 11 点は、2 つのクレードに分かれ、それぞれ *Puccinia* sp. 1 と *P. suzutake* の標本が含まれた。

(2) 形態観察 …2023 年に北茨城市花園溪谷で採取したスズタケに寄生する *Puccinia* 属サビキン 16 点の冬孢子的形態は次の 3 タイプに分かれた：①先端が突出せず、短く丸い *P. hikawaensis* 型、②先端が突出し、細長く湾曲する *Puccinia* sp. 1 型、③先端がまっすぐ突出する *P. kusanoi*, *P. longicornis*, *P. suzutake* 型(図 2)。

(3) 接種試験 …ウツギ上に接種 12 日後に精子器、接種 27 日後にさび孢子堆の形成を認めた。ヤマアジサイとコサジサイにはいずれの発生も認められなかった。なお、スズタケへのさび孢子接種の結果については、これまで夏孢子堆および冬孢子堆の発生は確認されていない(2024 年 1 月 19 日現在)。

【まとめ】

これまでに北茨城では *P. suzutake* と *Puccinia* sp. 1 が報告されていた。しかし、今回の分子系統解析と形態観察から、北茨城のスズタケには *P. hikawaensis*, *P. suzutake*, *Puccinia* sp. 1 の 3 種の *Puccinia* 属サビキンが寄生していることが明らかになった。

夏孢子・冬孢子世代でタケ・ササ類の植物に寄生する *Puccinia* 属サビキンのうち、精子・さび孢子世代でウツギに寄生する種は *P. kusanoi* と *P. longicornis* の 2 種のみである。*Puccinia* sp. 1 はウツギに寄生するが、分子系統学的に *P. kusanoi* および *P. longicornis* と異なる。*Puccinia* sp. 1 の冬孢子は、どのタケ・ササ類寄生 *Puccinia* 属サビキンとも形態が異なることから未記載種であると示唆された。

表 分子系統解析と冬孢子的形態に基づく同定結果

標本番号	分子系統解析	冬孢子的形態
TSH-R25489	—*	<i>P. hikawaensis</i>
TSH-R25783	—	<i>P. hikawaensis</i>
TSH-R26180	—	<i>P. suzutake</i>
TSH-R26183	—	<i>P. suzutake</i>
TSH-R26534	<i>Puccinia</i> sp. 1	—
HK-20230430-01	<i>Puccinia</i> sp. 1	<i>Puccinia</i> sp. 1
HK-20230430-02	<i>Puccinia</i> sp. 1	<i>Puccinia</i> sp. 1
HK-20230430-04	<i>Puccinia</i> sp. 1	<i>Puccinia</i> sp. 1
HK-20230430-06	<i>P. suzutake</i>	<i>P. suzutake</i>
HK-20230430-07	<i>Puccinia</i> sp. 1	<i>Puccinia</i> sp. 1
HK-20230430-08	<i>P. suzutake</i>	<i>P. suzutake</i>
HK-20230430-09	<i>P. suzutake</i>	<i>P. suzutake</i>
HK-20230430-12	<i>P. suzutake</i>	<i>P. suzutake</i>
HK-20230430-15	<i>Puccinia</i> sp. 1	<i>Puccinia</i> sp. 1
HK-20230605-02	<i>Puccinia</i> sp. 1	<i>Puccinia</i> sp. 1
HK-20230605-14	—	<i>Puccinia</i> sp. 1
HK-20230627-18	—	<i>Puccinia</i> sp. 1

* — : 未供試



図 2023 年に北茨城市花園溪谷で採取したスズタケに寄生する *Puccinia* 属サビキン 16 点の冬孢子的 3 タイプの形態

東南アジア・オーストラレーシアに分布するブドウ葉さび病菌の分類学的検討

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

【背景・目的】

サビキンは担子菌門サビキン亜門サビキン綱サビキン目を構成する絶対寄生菌である。サビキンは1種が最大で4つの形態的、機能的に異なる孢子世代と5種類の孢子(精子、さび孢子、夏孢子、冬孢子、担子孢子)を有する。サビキンはシダ類、裸子植物、被子植物等の絶対寄生菌であり、その中には経済的に重要な作物や樹木に病気を引き起こすものもある。そのため、植物病原菌としてのサビキンの防除を念頭に置いた、宿主範囲や生活環を中心とした研究も行われている。

サビキンの宿主植物の一つにブドウがある。ブドウ葉さび病は商業用ブドウ園でしばしば深刻化し、重度の感染では果実の収穫前または収穫時に落葉を引き起こし、果実の収量と品質を大幅に低下させる。rDNA ITS2 及び LSU D1/D2 領域に基づいた分子系統解析では、東南アジア・オーストラレーシアに分布するブドウ葉さび病菌 *Neophysopella tropicalis* は3つのサブグループからなる。それらはタイ・ベトナム、マレーシア・インドネシア、東ティモール・オーストラリアの3つの地域に対応する(図1)。

一方 *N. tropicalis* の形態形質に関しては、Pota et al. (2014) では、異なる地域個体群間での有意差は見られなかった。さらに、*N. tropicalis* の夏孢子表面についての詳細な観察はまだ行われていない。

本研究では、東南アジア・オーストラレーシアに分布するブドウ葉さび病菌の分類学的検討を行うことを目的とした。そこで光学顕微鏡と走査型電子顕微鏡を用いた形態観察を試みた。

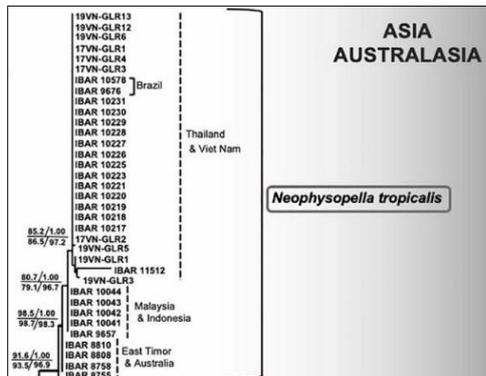


図 1. rDNA ITS2 及び LSU D1/D2 領域に基づいた *Neophysopella tropicalis* の ML 系統樹

【材料・方法】

筑波大学植物寄生菌学研究室標本庫 (TSH) 所蔵の東南アジア・オーストラレーシア産の *N. tropicalis* の乾燥標本を形態観察において 12 点供試した。

糸状体と夏孢子の形態観察及び形態測定

メスで標本から夏孢子堆をかきとりスライドガラス上の乳酸に懸濁し、カバーガラスで封入し、光学顕微鏡を用いて観察した。測定した項目は、糸状体の高さ、背側長さ、幅、背側及び先端の壁厚、夏孢子の長径、短径、壁厚である。各標本につき任意に 20 個の糸状体と夏孢子を選び測定した。そして、その測定値を用いて Tukey の多重比較検定を行った。

夏孢子の表面構造の観察

試料台に貼ったカーボンテープ上に標本の葉から切り取った 5 mm 角葉片と、メスでかきとった夏孢子を貼り付けた。次に、イオンスプッターを用いて白金パラジウムコーティングし、走査型電子顕微鏡を用いて観察を行った。各標本につき任意に 20 個以上の夏孢子を選び、表面 25 μm^2 あたりの刺の数を数えた。それを基にした刺の分布密度を用いて Tukey の多重比較検定を行った。

【結果・考察】

夏孢子堆を構成する糸状体は円筒状で湾曲していた(図2)。夏孢子の形状は楕円形、倒卵形であり、どの標本においても夏孢子表面の刺は一様に分布していた(図3)。

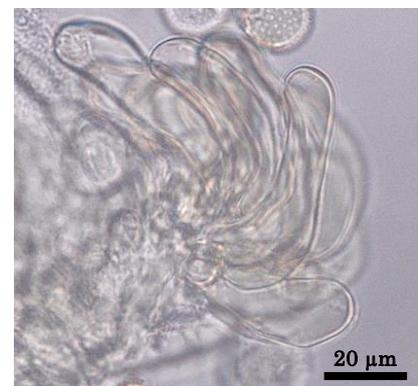


図 2. *Neophysopella tropicalis* の夏孢子堆を構成する糸状体 (TSH-R57597)

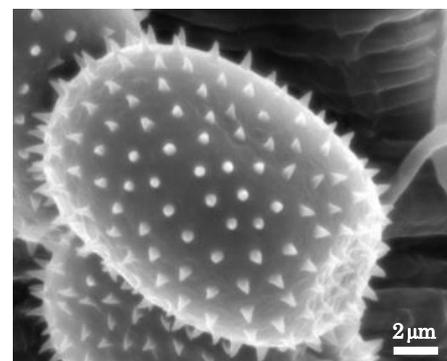


図 3. *Neophysopella tropicalis* の夏孢子の走査型電子顕微鏡写真 (TSH-R56745)

糸状体の高さ、背側長さ、背側及び先端の壁厚、夏孢子の短径、壁厚、刺の分布密度においては、標本間で有意差がみられた。有意差のない標本を同一集団としてまとめ、有意差のある各標本同士は異なる集団としてグループ分けした上で比較した。その結果、いずれの形態形質によるグループ分けにおいても3つの地域個体群と対応するものはなかった。また、同一集団としてグループ分けされた標本は計測した形態形質によって異なり、複数の形態形質の違いを反映したグループは形成されなかった。よって本研究では、*N. tropicalis* の各地域個体群を識別できる有効な分類指標となる形態形質は見出されなかった。

日本産シジミタケ属の系統のおよび形態的多様性について

黒崎 裕貴 (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】

シジミタケ属 (*Resupinatus*) は担子菌門ハラタケ目に分類される腐生菌であり、巨視的な子実体 (キノコ) を形成する。ハラタケ目では、子実体の形態は傘と柄を有するハラタケ型や、柄が発達しないヒラタケ型、椀型で子実層托が平滑なキフェロイド型など、いくつかの型にタイプ分けされており、属や科内で共通することが多い。しかし、シジミタケ属にはヒラタケ型やキフェロイド型など全く異なる形状の子実体を形成する種が含まれており、さらに他の属との肉眼的な識別が簡単なため野外での材料収集も容易であることから、属内での形態進化を考察するうえで適した材料であると考えられる。

属内の形態進化を考察するには、属内全体の多様性と系統関係の解明が不可欠である。現在、シジミタケ属には 33 種が知られており (He *et al.*, 2019)、欧米やオセアニアから多くの種が報告されてきた。一方、日本での分布はヒラタケ型の 5 種のみが報告されており (勝本, 2010)、キフェロイド型の種は含まれていない。また、菌類では 1990 年代以降の分子系統解析を加味した分類学的再検討により、日本産の材料が欧米産とは別種である事例が相次いで報告されている。日本産のシジミタケ属では分子系統解析の伴った研究が行われておらず、さらに網羅的な収集やその形態評価も行われていないことから、潜在的な多様性が正確に評価されていない可能性がある。

そこで本研究では日本に分布するシジミタケ属の種レベルの多様性を把握することを目的に、日本のシジミタケ属の試料を広く収集し形態観察を行うとともに、分子系統解析によって属内での系統関係を明らかにした。

【方法】

日本各地 17 地点からシジミタケ属の 48 標本を採集した。これらの子実体または分離株、および国立科学博物館の菌類標本庫にシジミタケ属として登録のある標本 24 点から DNA を抽出し、菌類のバーコード領域である核リボソーム DNA の ITS 領域を PCR で増幅後、配列を取得した。取得した配列と GenBank に登録されているシジミタケ属菌の配列、McDonald (2015) で使用された未公開配列から、IQ-TREE を用いて最尤系統樹を作成した。また子実体の形態観察を行い、既知種との比較を行った。肉眼的特徴は採集時の子実体、顕微鏡的特徴は乾燥標本に基づいて観察した。

【結果と考察】

系統解析の結果、日本産 63 標本由来の配列と GenBank 上の日本産の 3 配列は、末端で強く支持される 5 クレード (I - IV, VII) と 1 配列のみからなる 2 クレード (V, VI) に分けられた。クレード I - IV および VII に含まれる日本産の配列は 34 配列 (III)、23 配列 (I)、3 配列 (IV, VII)、1 配列 (II) であった。クレード I、II にはそれぞれ日本から既報告である *R. applicatus* (シジミタケ) と *R. striatulus* (ヒメシジミタケ) のタイプ標本由来の配列が含まれた。クレード III は最も多くの日本産の配列を含むとともに、タイプ標本由来ではない中国やアメリカ由来などの配列も含まれた。また、国立科学博物館に *R. applicatus* として登録されている

標本 21 点のうち、ITS 領域を取得できたほぼすべての標本は本クレードに含まれた。クレード IV - VII はタイプ標本由来の配列を含まず、日本産の配列のみが含まれた。クレード VII にはタイプ標本由来でない複数種の種名が認められた。また、既報告種である *R. dealbatus* (ヒメカワキタケ) と *R. meruloides* は標本が入手できず、*R. trichotis* (クロゲシジミタケ) は標本から ITS 領域を取得できなかったため、本研究では検討できなかった。

形態観察の結果、クレード I - III, VI, VII の子実体はヒラタケ型であり、クレード IV - V はキフェロイド型であった。7 クレード中、最も多くの標本数を得られ、未記載種であると考えられるクレード III について以下に詳述する。

主な特徴: 子実体はヒラタケ型または殻斗型で基物に背着から側生し、暗灰色で基部に白色から黒色の毛を有し、縁はヒダが透け条線様をなす。担子胞子は楕円形から長楕円形で表面は平滑、 $5.0 - 6.4 \times 2.8 - 3.8 \mu\text{m}$ (平均 $5.4 \times 3.4 \mu\text{m}$, $n = 30$)、シスチジアは円筒形や便腹型など、厚壁で被覆物を伴うことが多い。PDA と素寒天培地上で無性世代や hour-glass 細胞は確認されない。落枝や倒木上、5 - 11 月に採集。日本、中国、アメリカなど。

シジミタケ属内では、ヒラタケ型でかつ厚壁のシスチジアを持つ種は *R. niger* しか知られないが、クレード III と同種とは胞子サイズやその他の構造が異なり明瞭に区別できる。さらに ITS 領域に基づく系統解析の結果も踏まえると、クレード III は未記載種であると考えられ、今後新種記載を行う予定である。

国立科学博物館に *R. applicatus* として登録されている標本の多くはクレード III に含まれたが、両者は胞子やその他の構造から明瞭に区別できる。このような形態的な差異が明瞭である場合にも混同が生じており、国内における本属の多様性は過小評価されていることが示唆された。さらに 60 点の標本ですら 5 つの未知クレード (III - VII) が見いだされた。これは国内での既報告種数に匹敵し、これまで報告のないキフェロイド型や未記載種も含まれたことから、国内に分布するシジミタケ属の種数はより多いと考えられる。

本研究により、日本に分布するシジミタケ属は、これまで知られていたよりもはるかに多様性が高いことが示唆された。今後、未知系統であるクレード IV - VII について形態学的に検討するとともに、国内からさらなる網羅的な材料収集を行うことで、日本におけるシジミタケ属の多様性解明を目指したい。

【引用文献】

- He, M.Q. et al. (2019) Notes, outline and divergence times of Basidiomycota, *Fungal Diversity*, 99, 105-367.
 勝本謙 (2010) 日本産菌類集覧, 1177pp. 日本菌学会関東支部.
 McDonald, J. V. (2015) Morphological and Molecular Systematics of *Resupinatus* (Basidiomycota), *Electronic Thesis and Dissertation Repository*, 3135, 299pp. The University of Western Ontario.

歴史の古い草原は根茎根系量が多いか？—新しい草原、森林との比較

寺嶋 悠人 (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】

自然攪乱の抑制や人為管理の減少などにより、世界でも日本でも草原が近年急速に減少している。絶滅危惧の動植物の3~4割は草原性である。草原がこれほど減少したことは歴史上初めてであり、草原とともに社会が何を失ってしまうのか未知である。

これまでに、草原の継続期間とともに植物やチョウ類¹・微生物²の多様性が高い分かっている。

また歴史の古い草原は、生物多様性だけでなく、様々な生態系サービスが高い可能性がある。歴史の古い草原には根系が大きい植物種が多い³。そこで私は、歴史の古い草原は斜面防災の機能が高い可能性があることに着目した。本研究は、斜面防災機能と関連が深い根系量が歴史の古い草原で多いのかを、同一地域の新しい草原や森林との比較によって検証した。

【方法】

長野県・菅平高原に存在するスキー場周辺で、少なくとも300年以上継続している古い草原と、古い草原の管理放棄あるいは植林によって成立した林齢40~90年ほどの森林、そうした森林を伐採してから50~70年が経過した新しい草原、という3つの植生に対して、各8地点を調査地とした。7月~11月にかけて、各地点で20mのトランセクトを設け、直径5~8cm・深さ最大30cmの土壌コア試料を約5m間隔で5~6本採取した(合計24地点・140コア)。採取した土壌コアを深さ5cmごとに切り出して根系の乾重量を計測した。

【結果・考察】

土壌深ごとの平均根重量を全深度で合計すると、古草原・新草原・森林の値がそれぞれ10.0・3.2・4.7 mg/cm³であり、古草原は新草原や森林と比べて根量が多い傾向があり、新草原と森林は近い水準だった。深度ごとに見ると、土壌深15cmまでの浅層の根量は古草原>新草原>森林という傾向があり、土壌深15~30cmの深層では古草原と森林の根量が同水準で、新草原の根量が少ない傾向があった(図1・図2)。

これらの結果から、継続期間の長い古い草原は豊かな根茎が発達しているのに対して、そこが森林化したり、再草原化してからの継続期間が短い場合には、根量が少なくなると考えられる。今回の調査では、樹木の太い根に土壌コアが採集器が当たると採集そのものができず、樹木幹の直下または周辺の根量を評価できていない可能性がある。しかし、幹と幹の中間付近の根量が少ない場所が斜面崩壊の弱点になると考えられており⁴、そうした場所の根量が斜面崩壊抑止機能の指標となる。そのため、今回評価した根量の違いは、古草原の斜面崩壊抑止機能が森林や新草原よりも高いことを示唆している。

古草原の根量が新草原よりも多くなる機構として、草原を構成する植物種の組成が草原の継続期間とともに変化し、歴史の古い草原には根系が大きい植物種が多くなる³ことが考えられ

る。植物の群集生態学においては、遷移の進行とともに地下部への投資の大きいK淘汰種が増えると考えられている。こうした生態学的機構によって根量の時間的変化を説明できる。

現在、草原への植林を進める世界的キャンペーンが存在しているが、こうした取組は生物多様性保全に逆行すると、近年厳しく批判され始めている。今回の成果から、歴史の古い草原を森林化させることは生物多様性のみならず生態系機能を低下させる可能性があることを問題提起したい。

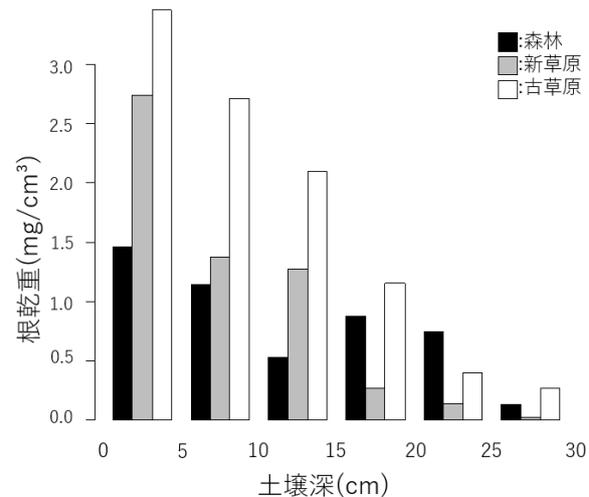


図1 歴史の古い草原の体積あたり根乾重は、新しい草原や森林と比べて多い傾向がある。森林・新草原・古草原について各5・2・4地点、11・5・14コアのデータに基づく。

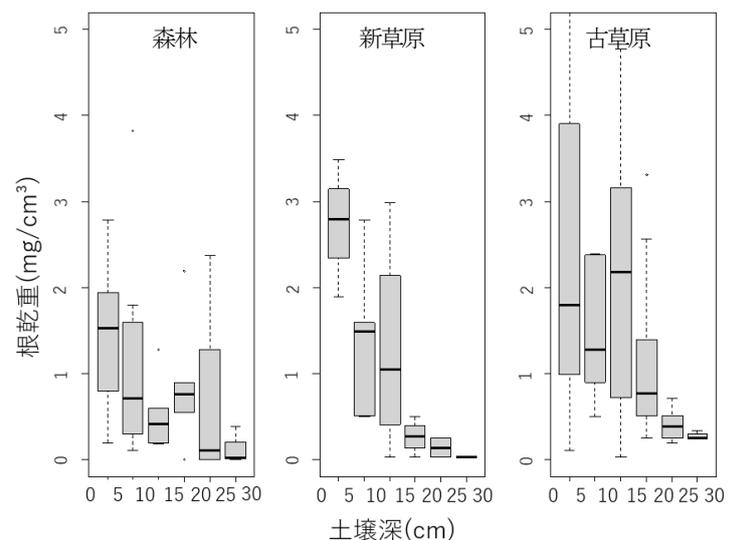


図2 根乾重は試料ごとに大きくばらつくものの、深度ごとの根乾重は植生間で異なる傾向がある。

【参考文献】

- 井上ほか. (2021) 保全生態学研究 26: 1-10
- Honnay et al. (2017) Biol. Cons. 212: 196-208
- Inoue, T. (2023). Doctoral dissertation, Univ. Tsukuba
- 北原 (2010) 水利科学 53. 6: 11-37

アサガオの開花時刻制御遺伝子の探索と機能解析

高井 大樹 (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】

植物の中には一日のうち一定の時刻に開花する種が多数知られている。この開花時刻の決定には植物自身の遺伝的要因のほか、光周期や温度といった環境要因、植物の成長や加齢といった内的要因が複雑に絡んでいると考えられている。

植物が繁殖のために行う開花という現象は農業においては収量に直結する問題である。実際、イネ科植物においては熱ストレスを受けて花粉管や葯の発達阻害が発生し不稔となる障害が知られており(Callens, *et al.* 2023), 開花時刻をずらすことで高温障害を回避する研究が行われているが、開花の詳細なメカニズムは殆ど解明されていない。

本研究の材料であるアサガオ *Ipomoea nil* は、日本産のモデル系統においては光シグナルを受けて暗期の開始後 10-12 時間後、朝方に開花するという暗期の開始に依存的な開花を示し、この開花時刻制御は約 24 時間周期の概日リズムの影響を受けていることが知られている。また、小野研究室は開花時刻に関する変異体系統である Evening Blue (EB) を保有しており、EB は Violet や TKS といった日本産系統と異なり、明期の開始 12 時間前後、つまり夕方から夜に開花するという明期の開始に依存的な開花を示すことが先行研究で明らかになっている。

EB と Violet を用いて先行研究で行われた QTL (Quantitative Trait Locus) 解析により、アサガオの開花時刻を決定する QTL は第 3, 4 染色体にあることが判明しており、詳細な解析により得た開花時刻決定遺伝子の候補は *EVF1* (evening-flower 1) と命名されている。

本研究では、この *EVF1* をゲノム編集技術によりノックアウトし、その後 Violet と EB の *EVF1* をそれぞれ導入することで、*EVF1* の開花時刻制御における機能を解析する。

また、イネにおいて開花時刻を制御する遺伝子として近年同定された *DFOT1* (diurnal flower-opening time 1, Wang, *et al.* 2022) のホモログをアサガオにおいて探索し、先行研究で同定された QTL との関連を調査した。

【材料と方法】

(1) *EVF1* のノックアウト

EVF1 のノックアウトには CRISPR-Cas9 を用いた。先行研究で設計された gRNA では large deletion が期待できないこと、ベクター作成に難航したことから、オンラインツール CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) を用いて gRNA を再設計し、TaKaRa DNA Ligation Kit <Mighty Mix> を用いてエンタリーベクターにクローニングした。これらと *ZsGreen* を導入したエンタリーベクターを用いて Overlap-Extension PCR により gRNA 発現カセットの全長フラグメントを作成し、Invitrogen™ LR Clonase™ II Plus enzyme mix を用いて LR 反応を実行しデスティネーションベクターにクローニングした。このノックアウトベクターは *Cas9*, 3 つの gRNA 発現カセット, 選択マーカー

として緑色蛍光タンパク質の一種である *ZsGreen* とカナマイシン耐性遺伝子 *NPTII* を含む。

(2) 組換え *EVF1* の導入

先行研究で作成された組換え *EVF1* 導入ベクターを用いて、アグロバクテリウム法を用いて Violet の EC (Embryogenic cell) を形質転換し、選択培養を行った。

(3) QTL-seq に向けた育成

先行研究で得られた第 4 染色体の QTL は極めて広く、この原因として内部に動原体を含み組換えが抑制された可能性がある。

より詳細な解析のために EB とメキシコ原産の系統である Mexico 及びギニア原産の Africa を用いた QTL-seq を行うことにし、解析に向けて交配を行った。

(4) *DFOT1* ホモログの探索

NCBI BLAST アルゴリズム及びアサガオのゲノムデータベースである Asagao genome project (<http://viewer.shigen.info/asagao/>), タンパク質立体構造予測を行う AlphaFold2 簡易版 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>) を用いて *DFOT1* の相同遺伝子を探索した。

【結果・考察】

詳細は発表会にて報告する。

【展望】

形質転換体の育成を継続し、*evf1* ノルセグリガントを得た後に、交配により組換え *EVF1* を導入し、開花時刻を計測する。

また、*DFOT1* ホモログのノックアウトを行い開花時刻を計測して機能解析を試みる。

以上のような実験から、植物に普遍的にみられる開花制御のメカニズムの解明を目指す。

【参考文献】

- Callens C, Fernandez-Gomez J, Tucker MR, Zhang D, Wilson ZA. Heat stress responses vary during floret development in European spring barley cultivars. *Front Plant Sci.* 2023;13:918730. doi:10.3389/fpls.2022.918730
- Wang M, Zhu X, Peng G, et al. Methylesterification of cell-wall pectin controls the diurnal flower-opening times in rice. *Mol Plant.* 2022;15(6):956-972. doi:10.1016/j.molp.2022.04.004

【謝辞】

本研究に際し、系統 Evening Blue を提供して頂いた故 米田芳秋先生 (静岡大学名誉教授) に感謝と哀悼の意を表すると共に、中村信雄先生 (函館白百合学園中学高等学校), 情報提供を頂いた遠藤真咲先生 (農研機構), 土屋亨先生 (三重大学准教授) に厚く御礼申し上げます。

トマトを用いた細菌性食中毒に対する食べる3価ワクチンの開発

平井 唯子 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小野 道之 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

「食べるワクチン」は本学の令和5年度「幸多き人生 100 年時代を創る『知』活用プログラム」に採用された研究プロジェクトの1つである。食用植物のゲノムにウイルスや細菌の抗原遺伝子を導入し、抗原タンパク質を可食部に蓄積させることで、その食物の摂取と共に粘膜免疫と全身免疫の両方を誘導しようというこの研究は、従来のワクチンよりも低コストで安全性の高いワクチンを実現することが可能であるとして多くの注目が寄せられている。特に途上国では製造・輸送・保存のコストや専門の医療従事者の不足などから、現行のワクチンが行き届いておらず、食中毒をはじめとした感染症が蔓延している現状がある。これに対して、収穫後の加工工程が最小限で、保存に極度の低温を必要とせず、摂取が容易である食べるワクチンは非常に有効な解決策になると考えられる。さらに、栄養価の高い植物を発現宿主に用いることで、紛争地域の難民キャンプや災害による被災地などで、栄養とワクチンの同時提供を可能にすることも期待されている。

コレラ毒素 (CT)、2型ペロ毒素 (VT2)、エンテロトキシン (CPE) の3種は、それぞれ細菌性食中毒の原因となるコレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*)、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) が産生する毒素である。これらは毒性を持つ病原性部位と、それ自体は毒性を持たず毒素の細胞内侵入などに役立つ非病原性部位の2つの部位に分けることができる。先行研究において3種の毒素の非病原性部位であるコレラ毒素Bサブユニット (CTB)、2型ペロ毒素Bサブユニット (VT2B)、エンテロトキシンC末端領域 (C-CPE) のうちの2つを組み合わせた CTB:C-CPE と VT2B:C-CPE の二価ワクチンが作製され、マウスに対し免疫原性を持つことが報告された^{1,2}。そこで本研究ではCTB、VT2B、C-CPEの3つの遺伝子を融合し (以下 CVC)、細菌性食中毒に対する三価の食べるワクチンを開発することを試みた。

【材料】

ナス科のモデル植物で矮性のトマトである、マイクロトム (*Lycopersicon esculentum*) をワクチンの発現系として使用した。

【方法】

(1) 導入ベクターのコンストラクト

トマト果実特異的に発現する E8 プロモーターの下流に植物にコドン最適化した CVC 遺伝子を組み込んだ T-DNA 配列を MultiSite Gateway Intermediary Vector の pK7m24GW に導入した (pE8::CVC)。また、この T-DNA 配列には選抜用にカナマイシン耐性遺伝子 (*NPTII*) 及び緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*ZsGreen*) を組み込み、これらのプロモーターにはそれぞれ NOS プロモーター及び CaMV35S プロモーターを用いた。

(2) アグロバクテリウム法によるマイクロトムへの目的遺伝子の導入と組織培養・個体再生

マイクロトムの種子を MS 固形培地に無菌播種し、播種後 7~10 日目の子葉切片を得た。この子葉切片を前述のベクターを持つアグロバクテリウム懸濁液に 10~20 分浸漬した後、共存培地 (MS + 40 μ M アセトシリゴン + 1.5 mg/l ゼアチン) 上で 2 日間暗条件に置き、形質転換を行った。形質転換後の子葉切片はカルス誘導培地 (MS + 1.5 mg/l ゼアチン + 100 mg/l カナマイシン) に植え、25°C, 16L/8D で 4 週以上培養した後、形成されたカルスから得たシュートを切り離して、シュート誘導培地 (MS + 1.0 mg/l ゼアチン + 100 mg/l カナマイシン) に移した。この時、青色光で蛍光観察を行い *ZsGreen* の蛍光がみられるシュートのみを選抜した。長さが 1~2 cm まで達したシュートを発根培地 (1/2MS + 50 mg/l カナマイシン) に移し、2 回に分けて発根選抜を行って形質転換体を得た。馴化した形質転換体を P1P 栽培室で結実させ、赤い果実 (stage Orange to Deep orange ~ Red Ripe) をサンプリングし、採種の後、分析に使用するまで 80°C で凍結保存した。

(3) CVC 発現量解析

果実からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティングで抗 CTB 抗体を用いて CVC の発現量を解析した。タンパク抽出には 2×IM buffer や CHAPS buffer など複数のバッファーを用い、抽出条件の検討も併せて行った。

【結果・考察】

感染させた約 400 片の子葉切片から 13 系統 25 個体の形質転換体を得た。果実からタンパク質を抽出して、抗 CTB 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行っているが、現在のところ目的の 40.2 kDa 付近に CVC タンパク質と思われるバンドは確認できていない。

CVC タンパク質の発現が検出できていないことについては、① CVC の転写が行われていない、または転写レベルが極めて低い、② CVC は発現しているが抽出方法に問題がある、③ トマトのプロテアーゼ活性によって、CVC タンパク質が発現後直ちに分解されている、などの可能性が考えられる。②について、CTB は多量体を形成し膜脂質に結合する性質を持つため、抽出の際に可溶化しにくく沈殿していることが考えられる。バッファー組成や pH など、抽出条件の更なる検討を行っていく。①・③については、コンストラクトを改良した新規ベクターの作成を現在行っているほか、今後、小胞体移行シグナル (KDEL) などを CVC 遺伝子に付加して細胞内局在を変える実験を行うことなどを検討している。詳細については発表会で報告する。

【参考文献】

- 1) Suzuki *et al.* 2018. *Front. Immunol.* 9: article 2320
- 2) Hosomi *et al.* 2018. *Inter. Immunol.* 31(2): 91-100

ベタレイン生合成経路遺伝子の導入による黄花アサガオの改良

安納 萌香 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小野 道之 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

花卉植物は永らく、より美しい花、より珍しい花を目指した色彩豊かな花々の作出が行われてきた。近年では遺伝子組換え技術による品種改良も盛んに行われており、モデル花卉植物の一つとしてアサガオ (*Ipomoea nil*) が使用されている。アサガオは日本独自に発展した園芸植物であり、江戸時代から多様な花色や模様、形をしたアサガオがつけられ現代まで保存されてきた、鑑賞価値の高い花である。一方で、江戸時代の図版には残されているが現存しないものもある。中でも黄花のアサガオは「幻のアサガオ」と呼ばれ育種家・愛好家の夢となっている。本研究最大の目標は、遺伝子組換え技術を用いた幻の黄花アサガオの再現である。植物色素であるフラボノイド、カロテノイド、ベタレインの3種は黄色の化合物を含む。アサガオはフラボノイドの一種であるアントシアニンを花卉で合成することで、赤や青、紫色を呈している。先行研究において、フラボノイドの一種であるオーロンやカロテノイドの蓄積による黄花アサガオの作出が行われたが、それらは淡黄色に留まっている。ベタレインは他2種の色素とは異なってアサガオが合成していない色素であり、ベタレインを用いた黄花アサガオは作出されていない。そこで本研究室では、ベタレイン生合成遺伝子導入による黄花アサガオの作出が試みられてきた。ベタレインは黄色のベタキサンチンと赤色のベタシアニンに大別される。これまでにベタキサンチン生合成経路遺伝子の導入により、明瞭な黄色を呈するが重篤な生育障害が生じる35S黄花系統 (異所的過剰発現するCaMV35Sプロモーターを使用) と、淡黄色に留まるが生育障害のない花卉特異的黄花系統 (花卉特異的発現プロモーターを使用) が得られている。生育障害はL-DOPAの意図しない代謝に伴う活性酸素種の発生によるもの、淡黄色はベタキサンチンの合成量が少ないためであり、共にL-DOPAからBetalamic acidへの代謝を行うDOPA 4,5-dioxygenase (DOD)の活性が弱いことが原因であると推察された。そこで本研究では、より強いDOD活性を持つDOD(A)を導入する (Sheehan *et al.*, 2019) などのベクターコンストラクトの改良を行うこと、生育障害を生じない濃黄色を呈する形質転換体の作出を目指した。

【材料】

植物材料として、AK77、35S黄花系統、花卉特異的黄花系統を用いた。AK77は、アントシアニン合成に関わる酵素 *DFR-B* (*dihydroflavonol 4-reductase*) 変異体で白花のアサガオ系統。35S黄花系統は、AK77を背景にビート (*Beta vulgaris*) 由来の *BvCYP76AD6* およびオシロイバナ (*Mirabilis jalapa*) 由来の *MjDOD* (*DOPA 4,5-dioxygenase*) をCaMV35Sプロモーターで発現させた形質転換体系統。花卉特異的黄花系統は、AK77を背景にビート由来の *BvADH α* (*alcohol dehydrogenase*)、*BvCYP76AD6* をCaMV35Sプロモーターで発現させ *BvDOD* (*DOPA 4,5-dioxygenase*) を花卉特異的プロモーターで発現させた形質転換体系統である。導入ベクターの改良にはベタキサンチン

生合成遺伝子として、*BvADH α* 、*BvCYP76AD6*、*BvDOD*、*MjDOD* を使用した。また、形質転換体選抜のためにカナマイシン耐性遺伝子、緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*ZsGreen*) を用いた。

【方法】

- ベクターコンストラクトの改良と形質転換
BvADH α 、*BvCYP76AD6*、*BvDOD*、*AmVT-MjDOD*、*ZsGreen* をCaMV35Sプロモーターで恒常的に発現させるベクターを設計した。それぞれIn-Fusion Cloningで各モジュールベクターを作成し、Golden Gate CloningでBinary Vectorに組み込んだ。アグロバクテリウムに形質転換し、アサガオの未熟胚由来の胚性カルスに形質転換した。
- 一過性発現による改良ベクター有効性の検証
改良ベクターをアグロバクテリウムに形質転換し、アグロインフィルトレーション法によりベンサムアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) の葉へ導入した。また、Particle Gunによりタマネギ (*Allium cepa*) の鱗葉表皮細胞へ導入し、顕微鏡下で蛍光観察を行なった。
- 交配による生育障害を回避した濃色化
35S黄花系統と花卉特異的黄花系統、薄色系のアサガオ品種との交配を行なった。

【結果・考察】

- 黄花ベクターの改良
改良ベクターを完成し、形質転換を進めている。
- 一過性発現による改良ベクター有効性の検証
詳細は発表会にて報告する。
- 交配による生育障害を回避した濃色化
現在、交配により得られた種子を播種してF1を栽培中。

【展望】

改良ベクターを導入した形質転換体の作出、花卉で合成されたベタキサンチンの構造決定を行う。また、交配によって得られた系統の生育障害の有無と花色を確認する。

【謝辞】

cDNAの提供を頂いたSamuel F. Brockington博士 (ケンブリッジ大学)、LC-MS/MSによるL-DOPA定量を行なっていただいた朝比奈雅志教授 (帝京大学) に深く御礼を申し上げます。

アイスプラント由来 RNA binding protein による環境ストレス耐性ジャガイモの開発

新田 佳奈美 (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】

塩害などの環境ストレスによって農作物はダメージを受け、その収量が低下する。食料と飼料の40%を生産している灌漑農地の50%が塩によるダメージを受けており^{*1}、世界人口の増加によって起こる食料問題解決にあたって重大な課題であると考えられる。

ジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) は世界4大作物にも数えられる主要な作物であるが、他の作物より根の分布が浅く、地下に可食部である塊茎が出来るという特徴から、土壌の環境条件の影響を受けやすい。そこで、塩ストレス耐性を持つジャガイモの作出に需要があると考えられる。

本研究では、塩生植物であるアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) から単離された RNA binding protein 遺伝子を、ジャガイモに導入し、環境ストレス耐性を向上させることを目的としている。

【材料】

ジャガイモ: *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree

古くから研究材料として使用され、耐塩性が比較的高いオランダ由来の品種である^{*2}。Murashige and Skoog (MS) 固形培地上で継代培養 (25°C、16 時間明期、8 時間暗期) し、維持している。導入遺伝子: RNA binding protein (*McRBP*)

東京農工大学山田研究室において大腸菌の耐塩性スクリーニングにより単離されたアイスプラント由来の遺伝子である。RNA シャペロンとしての機能が考えられており、RNA の転写を安定させ、塩耐性を付与すると考えられている^{*3}。

<1> アグロバクテリウム法による遺伝子導入

【方法】

- ジャガイモの葉切片に *McRBP* を保有するアグロバクテリウム LBA4404 株を感染させ、植物ホルモンを加えた MS 固形培地でカルス誘導、再分化誘導を行った。
- 得られた再分化体は選抜マーカーであるカナマイシンで選抜を行った。
- 植物ホルモンを加えていない培地に再分化体を移植し、発根した個体について、アグロバクテリウムの除去確認試験を行った。
- 除去確認した再分化体から簡易抽出した DNA を用いて PCR を行い、形質転換体であるかの確認を行った。

【結果・考察】

ジャガイモの葉切片へアグロバクテリウムを感染させ、複数の再分化体を得た。アグロバクテリウム除去確認後の再分化体 DNA において、PCR を行ったが *McRBP* のバンドは確認されなかった。再分化体のうち、発根が良い個体について検証を行うとカナマイシン耐性遺伝子のみが導入されていた。現在までに得られた再分化体は形質転換体ではないエスケープまたは、カナマイシン耐性遺伝子のみ導入されたものであった。そのため、再分化に悪

影響を与えず、かつ形質転換体と非形質転換体の区別がより容易になるカナマイシン濃度の検討をカナマイシン耐性系統の葉切片を用いて行っている。

<2> コンストラクトの作成と遺伝子導入

カナマイシン選抜では再分化体を得られてもエスケープが多いことから、エスケープ出現の可能性が低いグルホシネートを有効成分とする除草剤 Basta を選抜マーカーとする新しいコンストラクトを用いることとした。これに合わせ、アグロバクテリウムの菌株を LBA4404 株から同じナス科のトマト (*Solanum lycopersicum*) で形質転換効率が高い AGL1 株に変更した。

【方法】

- 全身長発現性の pGWB602、GFP 融合型全身長発現性の pGWB605 にそれぞれ *McRBP* を導入し、シークエンス解析によって遺伝子の導入を確認した。
- エレクトロポレーションによりベクターをアグロバクテリウムに導入し、コロニー PCR によってコンストラクトを保有するアグロバクテリウムを得た。
- ジャガイモの葉切片に得られたアグロバクテリウム AGL1 株を感染させ、植物ホルモンを加えた MS 固形培地でカルス誘導、再分化誘導を行った。
- 得られた再分化体は選抜マーカーである Basta で選抜を行った。

【結果・考察】

Basta を選抜マーカーとするコンストラクトの作成に成功した。このコンストラクトを保有するアグロバクテリウム AGL1 株を用いてジャガイモの葉切片に感染させたところ、再分化体を得られている。現在、Basta を培地に加えて選抜を進め、耐性系統の取得を進めている。今後、アグロバクテリウムの除去が完了した段階で、導入遺伝子の存在を確認し、形質転換体か否かの判定を行う予定である。

【展望】

今後も感染を継続し、形質転換体の取得を目指す。形質転換体を得られた際には、*in vitro* での耐塩性評価を行い、選抜系統を得る。選抜系統については実際の生育環境により近い環境の栽培室や特定網室において耐塩性評価を行いたい。また、発現量評価や、GFP 融合 *McRBP* の局在評価、ストレス環境下での生理的評価を行い、機能の一端を明らかにしたい。

【参考文献】

- Breeding Science 65: 85-102 (2015)
- ジャガイモ事典：財団法人いも類振興会(2012)
- Plant Biotechnology Journal 17: 801-811 (2019)

耐塩性遺伝子マンダリンを導入したジャガイモのストレス耐性と生産量についての評価

大森 圭悟 (筑波大学 生物学類)

指導教員：菊池 彰 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

過剰な塩を含む土壌で植物を生育させると、吸収された塩による浸透圧ストレスやイオンの恒常性の崩壊を引き起こし、その生育が著しく抑制される。近年、地球規模の気候変動や不適切な灌漑によって、世界中で塩害地が拡大しているが、これは作物の耕作に利用可能な農地が減少しているとも言換えられる。その一方で、現在、増え続ける世界人口に伴う食料需要の増加が発生しており、その需要を賄うための作物生産量の向上が必要とされている。

これらの背景から、対策の一つとして、主要作物の耐塩性を強化することが考えられている。本研究で扱うジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) は、世界中で広く栽培されている重要作物であるが、可食部が土中の塊茎であるため土壌からの塩ストレスに曝されやすい。本研究では、耐塩性遺伝子「マンダリン」を導入した新規系統の作出を目指すとともに、既存の組換え体を用いて、塩ストレス条件下での成長性と生産量、葉における活性酸素量を可視化し、マンダリン導入系統の耐塩性評価を試みた。

【材料】

・ジャガイモ：本研究では、古くから研究材料として使用され^{*1}、耐塩性が比較的高いオランダ由来の品種 Desiree を用いた。また、使用したマンダリン遺伝子組換え系統(114-1、144-6)は先行研究により Desiree を用いて作出された。非組換え体(NT)を含む系統は Murashige and Skoog (MS) 固形培地上で継代培養 (25°C、16 時間明期、8 時間暗期)し維持している。

・導入遺伝子：マンダリン遺伝子は熱帯および亜熱帯地域の河口汽水域で生育する塩生植物であるマンダリンの一種、オバナヒルギ (*Bruguiera sexangula*) から単離された耐塩性遺伝子である^{*2}。マンダリンタンパク質は葉緑体に局在し、分子シャペロン様の活性を持つことやマンダリン遺伝子の導入によってタバコ (*Nicotiana tabacum*) やユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis*) で耐塩性が向上したことが報告されている^{*3}。

【方法】

1. 組換え体作出：継代後 3~5 週間後の植物体の葉を用いて、アグロバクテリウム法によりジャガイモにマンダリン遺伝子を導入した。アグロバクテリウムを感染させた外植片を、植物ホルモンを加えた MS 固形培地の上で培養し、カルスの形成と再分化体の形成を誘導した。導入した遺伝子にはマンダリン遺伝子の他に除草剤 (グルホシネート) に対する耐性遺伝子も含まれており、適当な時期に再分化誘導用の培地に除草剤を加えることで、除草剤耐性をもつ組換え体のみ再分化体を誘導した。さらに、得られた再分化体を除草剤が含まれる MS 固形培地上で培養し、発根が確認できた個体を組換え体候補系統とした。

2. 成長・生産量評価：NT と組換え体について、約 1 ヶ月間の順化後、特定網室に移動し、0、50、150 mM NaCl の灌水処理区に分けて、13 週間の栽培評価を行った(2023.11.01~2024.01.31)。

評価項目は、成長量、光合成量子収量(QY)、葉緑素量の指標となる SPAD 値、生産量の 4 つである。前者 3 項目は 1 週間毎に計測を行い、QY は FluorPen 100 を、SPAD 値は葉緑素計 SPAD-502 を使用した。生産量は栽培終了後、地上部の乾燥重量、塊茎の個数、塊茎重量、塊茎比重を測定することで評価を行った。

3. 生理的耐性評価：通常、環境ストレスに曝された植物では体内の活性酸素(ROS)を除去しきれなくなり酸化障害を被るが、マンダリン導入系統では ROS による障害の抑制が期待される。そこで、ROS の 1 種である H₂O₂ により酸化重合し、茶褐色の沈殿を生じる 3, 3'-ジアミノベンジジン (DAB) を用いた染色を行い、組換え体の環境ストレス耐性を評価した。

継代後 4 週間の植物体の茎頂側から数えて 3 番目の葉をシャーレに乗せ、チャンバー内で 2 週間、低温下で光ストレスを与えた (10°C、150 μmol/m²/s)。ストレス期間終了後、取り出した葉に対して、10 mM MES バッファー(pH 6.5)を含む 1 mg/ml DAB を用いた 5 分おき 3 回の真空浸潤を行い、暗所で一晩浸した。その後、70°C の 90% エタノールで 3 時間インキュベートして反応を停止させ、70% エタノール中で観察、撮影を行った。さらに、撮影した写真を解析し、染色度合いを数値化した。

【結果と考察】

1. 組換え体作出：これまでに約 200 枚の葉切片に対し感染作業を行い、十数個体の再分化体を得ることができたが、いずれも除草剤を含む培地での発根が見られなかったことから組換え体ではないと考えられる。今後も新たな組換え体の獲得を目指すとともに、形質転換に用いるアグロバクテリウム株をより感染効率の高い株に変更することを検討している。

2. 成長・生産量評価：栽培 11 週目までの経過として、114-1、144-6 は NT と比較して塩ストレス下において有意に成長量が大きく、150 mM の塩ストレス下において有意に高い SPAD 値を維持している。また、葉の健全度の指標となる QY については系統間での差は見られていない。最終的な生育状況や収量については、栽培終了後に測定結果をまとめ、発表会にて報告する。

3. 生理的耐性評価：現在評価中であるため、詳細は発表会にて報告する。

【参考文献】

- *1 ジャガイモ辞典：財団法人いも類振興会 (2012)
- *2 Plant Cell Physiology 43: 903-910 (2002)
- *3 Journal of Plant Research 126: 141-150 (2013)

近縁野生種を用いた乾燥耐性を持つ育種系統の樹立

高橋 陽菜 (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】

昨今地球温暖化によって乾燥化が問題となっており、農作物の生育にも大きな影響を与えると考えられる。

世界四大作物であるジャガイモ(*Solanum tuberosum*)は、主食としてヒトの食生活を長きにわたり支えてきた植物である。その重要性からより安定した供給が必要とされている。その収量を安定させるためには乾燥ストレスに対しての耐性を持つことが重要である。

乾燥耐性を付与するために乾燥に強い野生種との交配をおこなうという方法がある。現在栽培されている品種も、近縁種との交配によって得られているものであるため、同様に近縁野生種との交配を通してその有利な性質である乾燥耐性を導入することで有用性が高まると考えられる。

本研究では、ポリエチレングリコール(Polyethyleneglycol、PEG8000)を用いて乾燥ストレスを模擬し、選抜を行うことで、乾燥耐性を獲得したジャガイモ育種系統を樹立することを目的とする。

【材料】

・ジャガイモ：栽培種と近縁野生種を掛け合わせた F1 世代を用いた。本研究での近縁野生種とは 11TA(*S. chillonanum*)、31TA(*S. okadae*)、27TA(*S. jamesii*)である。また、野生種は二倍体であり栽培系統は四倍体であるため、そのままでは交雑はできない。そのため野生種の倍加と栽培系統との交雑を長崎県農林技術開発センターに依頼し、得られた F1 世代を研究材料とした。先行研究で種子の乾燥耐性スクリーニングを行い、選抜された 88 系統を今回の研究に用いている。それらは 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。

・PEG8000：平均分子量が 8000 のポリエチレングリコールである。これを液体 MS 培地に溶かした PEG 溶液を培地として用いると植物体内に水が吸収されにくくなるため、それをジャガイモに対する乾燥ストレスとみなし実験に使用した。

【方法】

1. 植物体の調整

試験管で培養していたジャガイモから頂芽または腋芽をカットし、ボトル(直径 5.8 cm、高さ 11.0 cm のマヨネーズ瓶)に移した。ボトルには液体 MS 培地を使用した。一系統につき 3 ボトル、一つのボトルに 3 つの頂芽または腋芽を入れた。シェーカーで 3~4 週間振盪培養し、植物体がボトルの上部にまで到達する程度の大きさにした。

2. 乾燥ストレス処理

液体 MS 培地を抜き、共洗いの後に PEG 溶液を同量与えた。PEG 溶液で 9 日間振盪培養した。

親の野生種系統によって乾燥耐性の強度が異なると考えられたため、先行研究で行っていた予備試験の結果から、11TA 系統を親に持つものは 100 g/L、31TA、27TA 系統を親に持つものは 120 g/L の PEG 濃度とした。ジャガイモの生育に影響を与えない濃度は PEG に換算して約 37~52 g/L であることから、実験に使用した PEG 濃度はその 2~3 倍の濃度であり、ジャガイモにとって水を吸収しにくい疑似的な乾燥条件である。

3. 回復処理

PEG 溶液を抜き、共洗いの後に液体 MS 培地を同量与えた。液体 MS 培地で 3 日間振盪培養した。

4. 計測・解析

茎頂部分の上部についている葉から下に向かって全ての葉のダメージにスコアをつけた。ダメージがないものを 3、半分以上緑だが葉が丸まっているものを 2、半分以上枯れているものを 1、完全に枯死したものを 0 とした。全葉のスコアを使い、系統ごとの平均スコアを算出した。

ここで生育不良であったもの、カルス化してしまったもの、茎から枯死してしまったものなど、スコアをつけられないものを含む系統は再試験を実施した。

【結果、考察】

1. 親系統野生種に関する傾向について

88 系統の試験結果から平均スコア 2.0 以上の 16 系統をより強い乾燥耐性を持つものとして選抜した。そのうち親系統が 11TA のものが 11 系統、31TA のものが 5 系統となった。試験を行ったのは 11TA 由来が 34 系統、31TA 由来が 53 系統、27TA 由来が 1 系統であることから、1 系統のみである 27TA を除いて、それぞれ選抜されたのは上位 32.4%、9.3%であった。これは 11TA 由来の方が、ストレスを与える際の PEG 濃度を低くしていたからだと考えられる。

2. 評価方法について

また、評価方法に全葉を用いたのは 88 系統のジャガイモの生育の多様性におけるダメージを適切に評価するためである。親系統が異なるため根、茎、葉の伸び方や長さ、葉のつき方や枚数も様々であった。そのため、全ての葉を包括的に評価することによって系統の差をなるべく平均化できると考えた。

【展望】

本研究ではボトル、MS 培地を用いていたため今後はポット、土壌を用いてよりジャガイモの植物体を大きく生育させ、実際の栽培環境に近い条件で形質評価を行っていきたい。培地条件が土壌になることから、適切な評価のために植物体に与えるストレスの条件、方法を検討していく。

窒素固定にตอบสนองしてシュートで発現する miRNA の同定と機能解析

深谷 夢夏 (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・目的】

硝酸やアンモニアなどの窒素栄養は生体内で同化されタンパク質の合成に用いられる。特に植物ではクロロフィルの構成要素ともなり生育には欠かせないものである。ダイズやミヤコグサで知られるマメ科植物は、窒素固定を行う根粒菌と共生関係を築くことで低窒素土壌下でも生育に十分な窒素栄養を得ることができる。マメ科植物と根粒菌の間でみられるこの関係を根粒共生という。

植物は根粒菌から窒素栄養をもらう見返りとして、光合成で産生した炭素栄養を根粒菌に与えている。このギブアンドテイクの関係が植物にとって不利益に働かないよう、すなわち、窒素栄養が必要ない状況なのに根粒菌にむやみに炭素栄養を与えることがないよう、マメ科植物は窒素栄養にตอบสนองした根粒共生の制御機構を持つとされている[1]。根粒菌からの窒素栄養が必要でない状況とは、高窒素土壌下において植物自身で十分な窒素栄養を供給できる場合や根粒菌からもらう窒素栄養が十分に足りている場合などがあり、植物では体外と体内の窒素栄養にตอบสนองした制御が行われていると考えられる。

移動ができない陸上植物が変動する周りの環境にตอบสนองして生育するためには、地上部と根のコミュニケーションが必要不可欠である。植物体内では mRNA、転写因子や低分子ペプチドなどのシグナル因子が器官間を移動することで情報を共有しており、根粒形成においても遠距離シグナルによる根と葉を介した根粒共生制御システムが知られている。根粒菌感染にตอบสนองして働くシグナル因子の1つとして、miRNAである miR2111 が知られている[2]。miRNA の中には師管を介して全身へ輸送されるものがあり、移動先の器官や組織で標的とする遺伝子の発現を直接制御する。miR2111 はシュートで発現して根に移動し、根粒形成抑制因子 TML の発現を抑制することで、根粒形成を促進している。移動性低分子の miRNA はあらゆる生物で様々な生物学的プロセスを制御する機能が確認されており、miR2111 以外の miRNA が根粒共生の全身的な制御に関与している可能性は高い。

この研究では、体内の窒素栄養にตอบสนองしてシュートで発現し、根粒共生を制御する miRNA の発見を目指した。これにより、根粒共生における新たな遠距離シグナル制御機構を解明することを目的とした。

【材料・方法】

ミヤコグサ *Lotus japonicus* wild-type MG-20

根粒菌 ・ *Mesorhizobium loti* wild-type (以下 WT 株とする)

・ Fix-mutant Δ NifH (以下 Δ NifH 株とする)

Δ NifH 株はニトログナーゼが機能しないため、根粒は形成するが窒素固定を行わない根粒菌である。植物に WT 株を感染させたときと Δ NifH 株を感染させたときで、根粒形成に関与する因子はどちらの場合も働くが、根粒菌由来の窒素栄養にตอบสนองして共生を制御する因子は WT 株を感染させた場合でのみ働くと考えられる。

非感染、WT 株感染、 Δ NifH 株感染の3つの条件でミヤコグサを 11 日間栽培し、その後、地上部全体をサンプリングして RNAseq および Small RNAseq 解析を行った。3条件のうち WT 株感染でのみ発現が変化する miRNA を同定した。

RT-PCR

上記、解析によって同定した miRNA について、WT 株の根粒菌を感染させたミヤコグサを経過ごとにサンプリングして RT-PCR を行い、継続的な発現パターンを調べた。

また、根粒菌非感染で硝酸またはアンモニアを処理した土壌で栽培したミヤコグサをサンプリングして RT-PCR を行い、窒素栄養にตอบสนองした発現パターンを調べた。

過剰発現体の作成

解析候補の miRNA について毛状根形質転換法により過剰発現体を作成した。この過剰発現体を様々な条件で栽培し、根粒形成の様子や植物体の生育度合いなどの表現型を観察した。

機能喪失体の作成

解析候補の miRNA について CRISPR-Cas9 システムを用いた機能喪失体の作成を試みた。

【結果・考察】

RNAseq および Small RNAseq 解析の結果、WT 株感染でのみ発現が増加する miRNA と発現が減少する miRNA をそれぞれ同定した。そのうち1つについては、機能喪失体の作成に成功した。

結果の詳細は当日報告する。

【展望】

今後は、同定した miRNA の詳細な機能解析を進めるとともに、miRNA が直接制御する標的遺伝子の同定を行うことで、miRNA が関与する一連の制御機構を解明していきたい。さらに、miRNA の移動性や器官ごとの機能を調べるために接木実験を行っていきたい。また、今回解析対象としなかった miRNA の中にも、未知の遠距離シグナル機構に関わり共生を制御するものが存在するかもしれない。今回とは異なる指標から候補を絞り、根粒共生における miRNA の関与と機能を追究していきたい。

根粒共生は低窒素環境下での植物の生育を可能にすることから、幅広い植物に適用することができれば農業に大きな利益をもたらすと考えられる。共生の制御機構に関わる因子の発見は、農業利用の実現に向けた大切な1歩だと考えている。

【参考文献】

[1] Misawa et al. *The Plant Cell*, 34, 1844-1862(2022)

[2] Okuma et al. *Nature communications*, 11, 5192(2020)

硝酸に応答した根粒形成の抑制制御に関わる硝酸トランスポーター遺伝子の解析

落合 美智 (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】

マメ科植物は根粒菌と共生関係を築き、根粒を形成する。この共生関係において、根粒菌は大気中に存在する窒素を固定し、植物が利用可能な形で提供する。これに対して、植物は、根粒菌へ光合成産物を提供する。この相利的な共生関係により、植物は土壌の窒素源のみに依存せず、効率的に窒素栄養を獲得することができる。その一方で、土壌に硝酸などの窒素栄養が豊富に存在する環境下では、植物は土壌から直接窒素栄養を吸収できるため、根粒菌由来の窒素栄養は不要であり、光合成産物というコストのみを支払う関係となる。このような環境条件への対応として、植物では硝酸に反応して根粒形成を抑制することが知られている。

マメ科のモデル植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の、硝酸に反応した根粒形成抑制には、転写因子である NIN-LIKE PROTEIN 1 (LjNLP1)、LjNLP4 と硝酸トランスポーターの NITRATE TRANSPORTER 2.1 (LjNRT2.1) が機能していることが、先行研究より明らかになっている¹⁾。まず、細胞内の硝酸イオンに反応して、LjNLP1 が活性化し、*LjNRT2.1* の発現を誘導する。これによって、LjNRT2.1 が生成され、細胞膜に局在して硝酸トランスポーターとして機能することで、硝酸イオンの細胞内への取り込みが加速する。細胞内硝酸イオン濃度の上昇に反応して、LjNLP4 は細胞質基質から核へと移行し、根粒形成に関連するいくつかの遺伝子発現を制御する。このようなプロセスによって、ミヤコグサでは硝酸に反応した根粒形成の抑制が成り立っていると考えられている。その一方で、LjNLP1 は *LjNRT2.1* 以外の硝酸トランスポーター遺伝子の発現を制御する可能性も示唆されており、本制御系の分子機構の全容解明には至っていない。

シロイヌナズナなど他の植物では、NRT2.1 と同じく硝酸トランスポーターである NRT3.1 が NRT2.1 と相互作用し、協調的に機能するという知見がある^{2),3)}。その一方で、マメ科植物では、NRT3.1 の機能は未解明である。このような背景のもと、本研究では所属研究室で作出された、*Ljnr3.1* ノックアウト体の選抜を行い、ミヤコグサにおける *NRT3.1* 遺伝子の機能解析を行った。

【方法】

・ *Ljnr3.1* 変異体の選抜

CRISPR-Cas9 システムによって変異が導入された T₀ 世代の個体をシーケンスし、*Ljnr3.1* 変異体の探索を行った。そして、変異の入っている系統を継代し、T₁ 世代のシーケンス結果と種子形成量の観点から、*Ljnr3.1* 変異体の選抜を行った。

・ 硝酸応答に関する表現型観察

ミヤコグサの野生型系統である MG20、*Ljnr2.1* 変異体、*Ljnr3.1* 変異体と根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) を用いて実験を行った。

種子を滅菌処理後、一晚吸水させ、1%アガー培地に播種した。この培地を遮光し、2 日経過後、個体を根粒菌処理と硝酸処理をしたバーミキュライトに植え替え、栽培した。硝酸条件は、KNO₃ 0 mM と 10 mM の 2 条件を設定した。そして、ポットへの植え替えから 3 週間後、根粒と地上部の表現型の観察を行った。

・ トランスアクチベーションによる *LjNRT3.1* 発現制御における NLP 転写因子の関与の検討

MG20 の種子を、表現型観察と同様の方法で吸水、播種し、遮光条件で 2 日経過後、KNO₃ 10 mM の硝酸処理のみをしたバーミキュライトに植え替え、根粒菌非感染条件で 2 週間栽培した。この個体から、プロトプラストを抽出し、トランスアクチベーションに用いた。

トランスアクチベーションは、エフェクターとして、LjNLP1、LjNLP4、GFP (対照条件)、レポーターとして *LjNRT3.1*pro:NanoLUC を設計し、35Spro:GUS の結果でノーマライズを行った。

【結果・考察】

・ *Ljnr3.1* 変異体の選抜

T₀ 世代のシーケンスの結果、14 系統中 4 系統で変異が確認できた。これらの T₁ 世代のシーケンス結果と種子形成量から、変異がホモで保存されている 1065-10 と 2 種類の変異をヘテロで持つ 1065-5#3 の 2 系統を *Ljnr3.1* 変異体として選抜した。

硝酸応答に関する表現型観察とトランスアクチベーションの結果については、発表会にて報告する。

【展望】

Ljnr3.1 変異体として選抜した 1065-5#3 について、2 種類の変異をヘテロで持つ変異体であることから、次代の個体を用いて、変異がホモで固定された系統の探索を行う。また、*LjNRT3.1* の誘導メカニズムについて、さらなる実験を行い、LjNLP1、LjNLP4 と *LjNRT3.1* の関係を検討したい。

これに加えて、毛状根形質転換による遺伝子の過剰発現実験などを通して、LjNRT2.1 と LjNRT3.1 の相互作用や協調的な機能の有無についても調べていきたいと考えている。

【参考文献】

- (1) Misawa F. *et al.* The Plant Cell. 34, 1844-1862, (2022).
- (2) Krouk G. *et al.* Plant Physiology. 142, 1075-1086, (2006).
- (3) Okamoto M. *et al.* Plant Physiology. 140, 1036-1046, (2006).

植物一過的タンパク質発現システムを用いた診断薬の生産可能性について

岡 佳穂 (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)

1.背景・目的

診断薬には、特定のタンパク質が必要とされ、そのタンパク質には診断薬に応じて多くの種類がある。また、目的タンパク質の生産のために様々な生産方法が試みられている。

しかし、診断薬のなかには、発現に時間がかかるうえに、得られる量が少ないことから、非常に高価な診断薬が存在する。そのため、研究や医療コストの観点から、これらの生産コストの削減が望まれている。

現在、特定の目的タンパク質の生産方法として、組換えタンパク質の生産がある。本研究では、上記の問題点の克服のために、当研究室で開発された「つくばシステム」を利用した。つくばシステムとは、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で、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、より短期間で大量のタンパク質を一過的に発現させるシステムである。

組換えタンパク質の生産には、大腸菌、動物細胞、植物など多くのプラットフォームが利用されている。その中でも植物は、栽培が容易であり、植物に感染する病原体のほとんどは哺乳類に病原性を示さないといったことから、低コストかつ安全性が高い宿主として注目されている。

これらのことから本研究では、植物のベンサミアナタバコを用いて、診断薬に用いることができる医療用タンパク質を、短期間に大量に生産することを試みた。

2.材料・方法

材料として、ベンサミアナタバコを用いた。

(1) ベクター作製

つくばシステムに用いるプラスミドに、目的タンパク質遺伝子の発現カセット、解析及び精製に用いる His タグを組み込んだものを用いた。

(2) アグロインフィルトレーション

エレクトロポレーション法によってベクターをアグロバクテリウムに導入し、カナマイシン濃度を 50 $\mu\text{l/ml}$ 、ゲンタマイシン濃度を 30 $\mu\text{l/ml}$ 、リファンピシン濃度を 5 $\mu\text{l/ml}$ として、5 ml の LB 培地で 2 日、その後 800 ml の LB 培地で一晩、適切に培養した。この培養液の OD600 値を 0.5 に調製し、感染溶液とした。これをバキューム、もしくはシリンジを用いてベンサミアナタバコに感染させた。

(3) タンパク質精製

感染から 4 日後、植物体の葉の感染部位を切り取り液体窒素を用いて凍結させたのち、ミキサーで粉碎した。これにバッファーを加え液状にしたのち、濾過、遠心分離によって不溶性画分を取り除いた。次いで、硫酸分画を 30 %飽和の硫酸アンモニウムで

行い、上清と沈殿に分けた。その後、沈殿部分のフォールディングされていないタンパク質や凝集したタンパク質を除き、上清部分のみを透析チューブを用いて透析をかけ、タンパク質を精製した。続いて、TALON レジンを用いて目的タンパク質を取り出した。

(4) 目的タンパク質の四量体化

ビオチン、ストレプトアビジンを用いて目的タンパク質の四量体化を行った。詳細は発表会にて報告する。

3.結果

詳細は発表会にて報告する。

4.考察

詳細は発表会にて報告する。

In planta ゲノム編集法による青臭みを抑えたダイズの作出

五十嵐 咲季 (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】

ダイズ (*Glycine max*) は経済的価値の高い作物であり、人間の食糧、家畜の飼料、工業用材料として世界中で広く利用されている。したがって、時間やコストを省いた新品種作出法を開発することは、ダイズ生産に大きな利益をもたらす。従来は品種同士の掛け合わせにより新品種を獲得していたが、ゲノム編集技術を利用することにより大幅な効率性の向上が見込まれる。本研究で用いているゲノム編集技術は、CRISPR/Cas9 システムである。CRISPR/Cas9 システムとは、人工ヌクレアーゼである Cas9 と DNA 配列の標的部位を特異的に認識する gRNA によって二本鎖切断 (DSB) を誘導し、切断された遺伝子の修復エラーを利用して変異を導入する技術である。

従来、ダイズのゲノム編集は組織培養により形質転換体を得ることで行われてきた。半分に切断したダイズ種子にアグロバクテリウムを感染させることで、Cas9 や gRNA 遺伝子を植物ゲノム内に組み込む。これを植物体まで分化・再生させることで、形質転換体を高効率で獲得できる。しかし、組織培養は適用品種に限られることに加え、植物体獲得までに長い時間を要すること、滅菌環境下における頻繁な培地交換により労力やコストがかかること、カビやバクテリアなどのコンタミネーションによる植物体の枯死など、多くの課題を抱えている。そこで本研究では、より簡便かつ多様な品種に適用できるゲノム編集法として、*In planta* ゲノム編集法を利用する。*In planta* ゲノム編集法とは、組織培養を行わず、植物体に直接ゲノム編集による変異を導入する方法である。本研究では、この方法と一過的タンパク質発現系「つくばシステム」を組み合わせたゲノム編集を行なっている。これにより、形質転換体を作成することなく Cas9 や gRNA の一過的発現が可能であるため、時間やコストを削減できる。また、形質転換体を用いる場合、サイレンシングなどの抑制機構がはたらくが、一過的発現によりサイレンシングサプレッサーも共発現させているため、サイレンシングを防ぐことが可能である。

本研究において変異を導入する目的遺伝子は、*GmFAD2* と *GmFAD6* である。これらの遺伝子は、脂肪酸であるオレイン酸からリノール酸への変換で必要となる触媒酵素をコードしている。リノール酸は、ダイズの青臭みの原因となるヘキサナール生合成経路の出発物質である。そこで、出発物質であるリノール酸を減少させることで、ダイズの青臭みを抑えることができる。ダイズは私たちの身近な食品に多く利用され、近年では代替肉の主な原材料として注目されている。代替肉や豆乳製品の開発において、ダイズ特有の青臭みを抑えることは商業的に求められている形質である。

本研究では、ダイズにおける簡便で編集効率の高いゲノム編集方法 (*In planta* ゲノム編集法) を確立するとともに、この方法を用いた青臭みを抑えたダイズの作出を目的としている。ダイズにおいて確立されたゲノム編集方法は、他のマメ科植物への適用が期待される。

【方法】

1. アグロバクテリウムの準備
目的タンパク質をコードする遺伝子を導入したベクターを作製し、このベクターを用いてアグロバクテリウムに形質転換を行った。
2. 植物へのインフィルトレーション
播種後約 1~2 週間の野生型ダイズ植物に対し、バキュームとシリンジを用いてアグロバクテリウムの感染を行った。
3. 植物からのゲノム抽出
感染部位において新たに発生したシュートから 1 cm 四方の葉片を切り出し、ゲノム抽出に用いた。

【結果と考察】

In planta 法を用いることにより、組織培養よりも約 3 ヶ月早く次世代の種子を得られることが明らかとなった。組織培養の場合、カルスの形成や再分化など約 3 ヶ月が必要である。一方、*In planta* 法では、種を非滅菌環境下で土にまき、約 1~2 週間育てた後にアグロバクテリウムの感染を行う。その後、約 3 ヶ月間で次世代の種子を得ることができる。しかし、ゲノム編集効率は組織培養よりも低いため、感染方法の検討が必要である。

本研究では、2 種類の成長段階の野生型ダイズ植物を対象とした。いずれの方法においても感染部位で GFP の蛍光が観察されたため、これらの方法を *GmFAD2* と *GmFAD6* をターゲットとした感染に適用した。播種後約 2 週間の茎頂分裂組織にアグロバクテリウムの感染を行なった場合、新たに発生したシュートのうち複数のシュートにおいてターゲット配列上に変異が見られた。播種後約 1 週間の苗に対して子葉を 1 枚残して切断し、剥き出しになった分裂組織に感染を行なった場合も、新たに発生したシュートにおいてターゲット配列上に変異が見られており、早い成長段階における感染の方が高い編集効率を示した。これは、切断処理によりアグロバクテリウムが感染しやすい状態であることに加え、若い植物体は細胞分裂がより活発であるためだと考えられる。一方で、苗を用いた感染の場合は、植物体が弱く感染後に枯れてしまうことが多い。これを改善するためには、真空浸潤の時間や回数を減らす、シリンジによるアグロバクテリウムの注入回数を減らすなどを検討する必要がある。また、感染後には液体肥料を与え成長を促進させるといった対処法も考えられる。

今後は、感染方法を改善しながら、苗を対象とした感染を続けることでゲノム編集効率の向上を図る。また、現在 T₁ 種子を獲得した段階であるため、T₁ 世代の変異率を調べていきたいと考えている。

古茅由来のバイオ炭「茅炭」の炭素貯留及び土壌改良への応用に向けた性質評価

小寺 柚衣花 (筑波大学 生物学類) 指導教員：廣田 充 (筑波大学 生命環境系)

【背景】

茅葺き家屋では、茅と総称されるイネ科等の草本を高密度にして屋根に葺く。茅葺き屋根は数十年に一度葺き替えられ、その度に古い茅（以下、古茅）が発生する。大量に発生する古茅はかつて堆肥や敷き藁等として利用され、最終的に土に還るサイクルが維持されてきた。しかし、今日では古茅が利用されることなく廃棄されることが多い。廃棄には費用がかかり、茅葺き屋根の維持管理費増の一因にもなっている。古茅の有効利用は、茅葺きを中心とした資源の循環利用に不可欠である。

私達の研究室では、古茅の新たな利用方法として、炭素貯留や土壌改良効果が期待できるバイオ炭に着目した。様々な未利用・廃棄物バイオマスから生成されるバイオ炭の先行研究は多く（例えば、Kalemelawa et al. 2014）、農地などの土壌への散布により炭素隔離や保水力向上など様々な効果が期待できることも報告されている（Blanco-Canqui, 2021）。

古茅を素材とするバイオ炭（以下、茅炭）には、茅の循環利用だけでなく、炭素貯留によるCO₂排出量削減や土壌改良材、J-クレジット制度登録による収入確保などを期待する。茅炭の性質や機能の評価を行うことが、古茅の新しい利用方法の有用性を評価するうえで欠かせない。

【目的】

古茅を素材とするバイオ炭「茅炭」を生成し、茅炭の性質評価を目的とする。具体的には、茅炭の化学的性質を解明するとともに、古茅の素材の違いや炭化条件の違いが、茅炭の性質に与える影響について検証する。

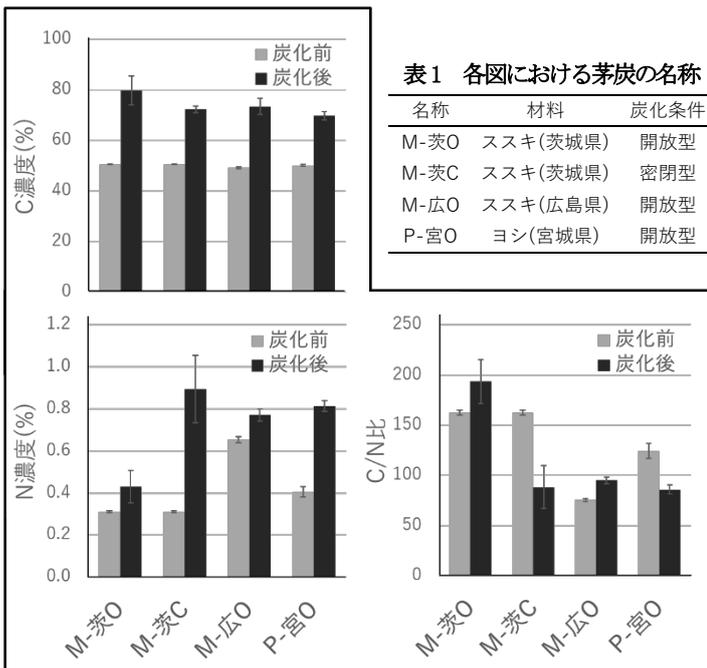


図1 各古茅のC濃度、N濃度、C/N比の変化

【方法】

材料はススキ（茨城県と広島県）、ヨシ（宮城県）の古茅を用いた。これらを開放型、密閉型、マッフル炉の3つの炭化炉で炭化した。作成した茅炭のC濃度、N濃度、pHを測定した。

【結果と考察】

いずれの茅炭も、C濃度は70-80%、N濃度は0.3-0.7%であった。全ての古茅において炭化前後でC、Nで濃度が増加した。C濃度の変化は1.4-1.6倍とあまり変わらないが、N濃度は1.2-2.9倍と幅があった。C/N比は炭化前後で増加あるいは減少したが、これはN濃度の変化の幅が影響したと考えられる。

素材の異なる茅炭の違いは、C濃度に有意差はないが、N濃度はM-炭Oが有意に低く（p<0.01）、C/N比も有意に高くなった（p<0.01）。炭化条件間での茅炭の違いは、C濃度に有意差はないが、N濃度に有意差はない（p=0.06）もののM-炭Cが高く、C/N比も有意に低くなった（p<0.05）。以上から、素材や炭化方法の違いが茅炭のN濃度に影響を与えたと考えられる。

全ての茅炭のpHは約9-10と強いアルカリ性であった。

17の論文から抽出した33のバイオ炭データと比較したところ、茅炭はCの割合が草本炭の中でも高かった。その理由として、茅は地上部が枯れた状態で収穫するため、セルロース等の高分子化合物の割合が高くなっていた可能性が示唆された。

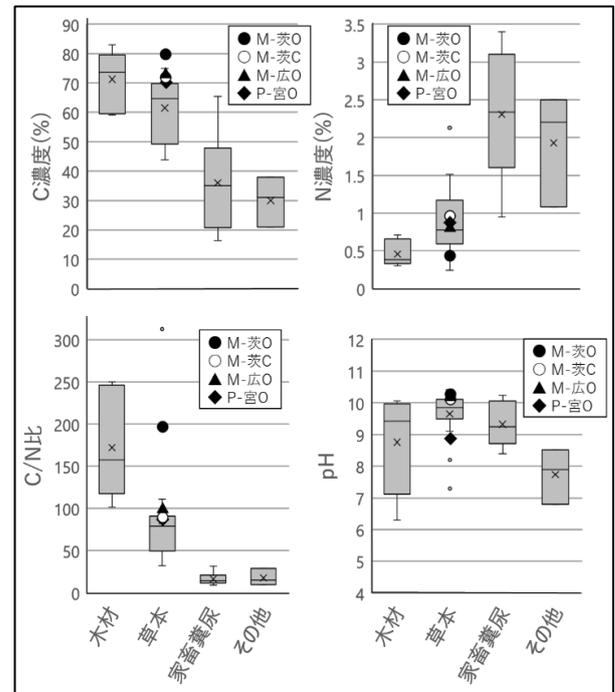


図2 原料別バイオ炭のC濃度、N濃度、pH
木材 n=6、草本 n=18 (pH は n=16)、家畜糞尿 n=6、その他 n=3

【引用文献】

- Blanco-Canqui (2021). GCB Bioenergy. 13, 291-304
- Frank et al. (2014). Wood Carbonization Research. 10-2, 63-73

中立論 vs ニッチ理論～ササ優占型ブナ成熟林におけるギャップサイズが林床植生に及ぼす影響～

植田 時 (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】

攪乱の結果生じるギャップは、森林動態の重要な原動力である。またギャップの規模は、その後の植生を決定する主要因である。このことから、複雑な森林動態の理解には、ギャップの規模と林床植生の関係性の把握が欠かせない。先行研究では、ギャップ面積の増加に伴って、林床植生の多様性が増加することが数多く報告されている(Eduardo et al. 2020 ほか)が、そのメカニズムについては未だ知見が不足している。本研究では環境要因に着目し、ギャップ面積の増加に伴うギャップ内の林床植生の変化メカニズムの解明を目的とした。

【調査地】

本研究では、ササ優占型の成熟林である、長野県カヤノ平ブナ林(以下、カヤノ平)と、岐阜県大白山ブナ林(以下、大白山)で2023年7月～8月に調査を実施した。両林分ともに標高約1400mに位置する林齢300年以上の落葉広葉樹林である。

【方法】

両林分において、ギャップを「樹冠高が調査地における最大樹冠高の1/3以下の領域」と定義し、ドローンによって撮影したUAV画像からその面積を算出した。カヤノ平では約20m²～370m²のギャップ15個、大白山では約16m²～360m²のギャップ5個を調査対象とした。各ギャップ内に大きさの異なる調査区を複数個設置し、樹木実生(高さ1m未満)と中低木(高さ1m以上かつ胸高直径5cm以下)の出現種数を記録し、ギャップ毎に種数-面積曲線を作成することでギャップ内の最大出現種数を推定した。同時に各ギャップにおいて、異なる高さでの相対光強度や土壌含水率、ササの最大長などの環境要因を計測し、各ギャップ内での平均値とCV(ばらつき)を算出した。

【結果】

ギャップ内の樹木実生と中低木の推定種数は、両林分でギャップ面積が大きいほど有意に増加した(図1)。

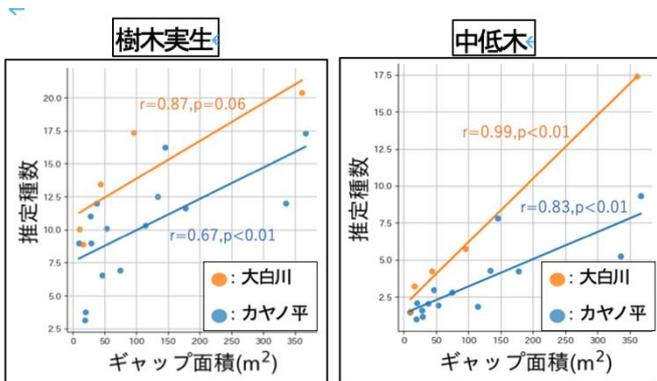


図1. ギャップ面積と植物種数の推定値の関係

両林分で共通して、ギャップ面積が大きいほど高さ1m以下の光強度のばらつきが大きく、ササの被度と最大長のばらつきも大きかった。また、ギャップ面積が大きいほど、リターの厚さは薄くなることがわかった。

共分散構造解析の結果、カヤノ平におけるギャップ面積の増加は、林床の樹木実生種数の増加を直接説明しなかった。一方で、ギャップ面積増加に伴う高さ1m以下の相対光強度のばらつきの増加や、リターの厚さの減少を介して、有意に樹木実生の種数を増加させていることがわかった(図2)。中低木の種数でも同様に、ギャップ面積の増加は、リターの厚さの減少を介して種数を増加させていた。

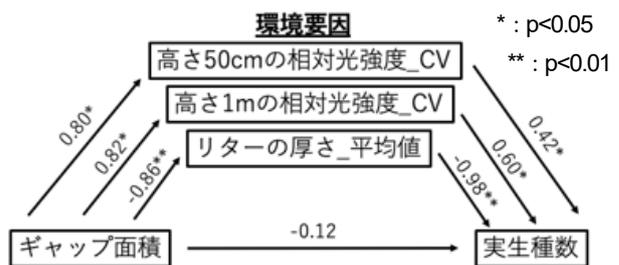


図2. カヤノ平におけるギャップ面積・環境要因・樹木実生種数の関係

【考察】

ギャップが大きいほど樹木実生および中低木種数が多いという結果は、先行研究と一致した(Menges et al. 2008)。ギャップが大きいほど樹木実生の種数が増加したことについては、ギャップが大きいほどササの最大長と被度のばらつきが大きくなることで、ササの下の光強度のばらつきが大きくなるのが原因であると考えられた。このように、ギャップ面積の増加に伴う植物種数の増加が、ササを介した光環境の制限によるものであることを示唆した研究例はなく、今回の結果はササが優占する冷温帯広葉樹林に特有のものである可能性が高い。

近年、森林動態の決定因子として、確率的浮動が重要であるとする“中立論”を支持する声が強まっている。一方で、本研究の結果では、ギャップ面積の増加は植物種数の増加を直接説明せず、環境要因のばらつきの増加を介して有意に説明した。このことは、環境条件に依存した競争力の種差が種構成を決定するという“ニッチ理論”を支持する結果であったと言える。

森林動態は、長い時間スケールで見ると、ランダムに生じる事象が多く、全体としては中立論で説明されうる安定した平衡状態が続くように見える。しかし、今回の結果から、少なくともササ優占型の冷温帯広葉樹林においては、攪乱とそれに伴う遷移という短い時間スケールで見ると、ニッチ理論に基づいた非平衡状態が常に維持されていると言える。このことが空間スケールを拡大しても適応されるのであれば、今回の結果は、森林動態における攪乱と遷移の流れに新たな視点を提供するものであると言える。

【引用文献】

- Eduardo et al. (2020) Ecology
- E S. Menges et al. (2008) Journal of Vegetation Science

伊豆諸島の森林におけるセルロース分解性真菌類の多様性と地理的分布

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

【背景・目的】

分解者として働く土壌菌類は、陸域生態系の根幹を成す生物群である。そのため土壌菌類の分布に関する知見は、各地域の生態系を理解する上で重要となる。一般的に菌類の分布は、定着制限や拡散制限を受けて決定されている。前者は、植生遷移 (Fujimaki 2017) や年平均気温 (Osono et al. 2020) などの要因がある。後者では、海洋島における地理的距離 (Hirose et al. 2022) などの要因が報告される一方で、風や海流により広範囲の拡散が可能な菌類は、拡散制限を受けないとする報告がある (Kivlin et al. 2014)。よって海洋島における菌類の拡散制限については、不確定な要素が多く、より多様な土壌菌類を対象とした研究が必要である。

そこで本研究では土壌中に豊富に含まれ、多様な土壌菌類が容易に分解できるセルロースに注目し、セルロース分解性真菌類の伊豆諸島における地理的分布を調べた。

【方法】

本研究は、伊豆諸島の伊豆大島 (IZ)、三宅島 (MYK)、八丈島 (HCJ) と本州の南伊豆 (MIZ) の極相林を調査地とした。各調査地において、調査区 (10m×10m) を約 5m 間隔で、3つ設置した。調査区内では、セルロースコットンを埋設し、セルロース分解性真菌類を採取した。また各調査区の環境調査も行った。

(1) セルロースコットンの設置から回収

コットンは、調査区内の土壌表層 0-5 cm に、約 2m 間隔で、10 地点で設置した。コットンは埋設から約 2 か月後に回収し、1 枚ごと袋に入れた状態で乾燥させた。

(2) 環境調査

調査区の毎木調査、表層 0-5 cm の土壌温度、土壌水分率、土壌 CN 比、土壌 pH、土壌 EC の測定を行った。

(3) 菌の単離と種推定

パンチを用いて作成したコットン片を、0.005% OT 溶液で洗浄し、抗生物質入りの麦芽寒天培地上に 1 枚ずつ置いた。暗室 20°C 下で培養し、数日後に観察した。見られた菌糸を斜面培地上に単離し、菌株とした。菌株をセロファン培地上で再培養し、DNA の抽出に用いた。抽出した DNA は PCR で増幅し、電気泳動で増幅を確認した後に、精製キットを用いて DNA の精製を行った。DNA シーケンス解析から得られた波形データを配列データに変換した。配列データから BLAST 検索を通じて、種の推定を行った。

【結果】

種推定の結果、MIZ で 7 種、IZ で 6 種、MYK, HCJ で 4 種が単離され、すべての地点で *Trichoderma* 属が優占していた。多様性指数は、最大値が MIZ の 1.73 で、最小値が HCJ の 1.07 であった。本州では多様性が高く、島嶼部では低い傾向が見られた。

MIZ, IZ, MYK で優占していた *T. spirale* が、HCJ では全く出現しなかったことや、*T. crassum* が HCJ でのみ出現したことから、伊豆諸島における *Trichoderma* 属についての地理的隔離が確認された。

面積と地理的距離が、調査地の菌類多様性に与える影響を調べるために回帰分析を行ったところ、面積と有意な関係が見られた。

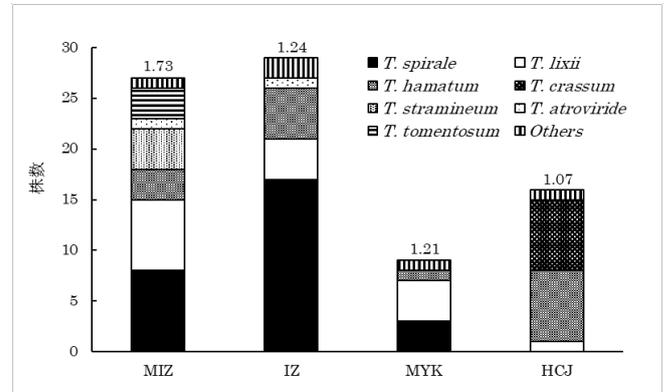


Fig. 1 各調査地の出現種の株数

数値は Shannon-Wiener の多様性指数 H' を示す。

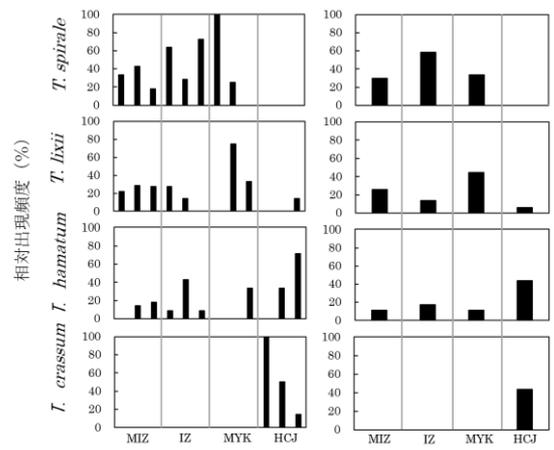


Fig. 2 主要種の相対出現頻度

【考察】

各種の優占状況から *T. spirale*, *T. lixii* は本州由来であるのに対して、*T. hamatum*, *T. crassum* は南方由来である可能性が考えられる。その場合、本州の MIZ を起点に定義した地理的距離だけでは、多様性への影響を正しく評価することはできない。

一方で、面積については有意な関係が認められたので、動植物だけではなく、菌類のような微小な生物についても MacArthur らの島嶼生物地理学の理論が適用されることがわかる。そのため伊豆諸島におけるセルロース分解性真菌類の分布は、拡散制限よりも環境要因に伴う定着制限の影響を受けると考えられる。また *Trichoderma* 属については、*T. spirale* と *T. crassum* の分布域の違いから、温度が定着制限として働いていることが考えられる。

【参考文献】

- D. Hirose et al. (2022). Med. Mycol. J. 63 (4), 99-107.
- M. Fujimaki (2017). 筑波大学大学院 修士論文.
- R.H. MacArthur and E.O. Wilson (1967). Princeton University press.
- S.N. Kivlin et al. (2014). Fungal Ecology. 12. 14-25.
- T. Osono et al. (2020). frontiers in Microbiology. 11.

葉レベルの炭素収支からみる植物病原菌 *Rhizoma filamentosum* がイヌコリヤナギ個体に与える影響

篠沢 俊介 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 増本 翔太 (筑波大学 生命環境系)

【背景】

葉に感染する植物病原菌は2つの効果により宿主植物の炭素収支を減少させる。

1. 病原菌が光合成を阻害することで、宿主植物の生産量(=炭素収入)を減少させる効果
2. 病原菌の成長・繁殖のために宿主植物から炭素を吸収し、宿主の炭素支出を増加させる効果

多くの研究では光合成阻害のみを評価しているが、病原菌の生存戦略を考えると、病原菌は炭素吸収を最大化することが最適である。そのため、本研究では、「病原菌が宿主植物の炭素収入の減少、炭素支出の増加に与える影響の評価」を目的とした。

一方で、個体レベルでの宿主植物の炭素収支は、光環境や葉枚数といった環境差・個体差によって変動する。病原菌の感染はそれらの環境差・個体差による宿主の炭素収支の変動とは独立して宿主の炭素収支に影響を与えると考えられる。そのため、異なるサイト間で、個葉レベルの炭素収支にもとづいた個体レベルの炭素収支を求め、「病原菌の感染が宿主の個体レベルの炭素収支の差に与える影響の評価」を目的とした。

【方法】

調査地: 長野県菅平高原

調査対象: イヌコリヤナギとそれに特異的に感染する *Rhizoma filamentosum* (*Rhizoma* 属菌)

s1, s2, s3 の3サイトにおいて5月から11月に調査を行った(以後それぞれのサイトの個体を s1, s2, s3 とする)。

葉レベルでの炭素収支を評価するために、健全葉の炭素収支(純光合成生産量)、病原菌の炭素収入への影響(光合成阻害量)、病原菌の炭素支出への影響(病原菌の呼吸量、炭素量)の推定を行った。次に個体木レベルでの炭素収支を評価するために、感染木の葉の総数、感染率の推定を行った。

・健全葉の純光合成生産量の推定

10, 11月に各地点の光量(PPFD)を測定し、菅平実験所のタワーを基準として年間のPPFDを求めた。5-11月において葉面積を測定し、着葉期間の葉面積の季節変動を求めた。5-11月に葉の光合成活性(ETR)を測定し、9月に測定した光合成速度とETRとの相関で光合成速度の季節変動を求めた。以上の項目により着葉期間の健全葉の純光合成生産量を推定した。

・病原菌の炭素収入への影響の推定

9-11月の病原菌の子嚢子座の表面積を測定した。子嚢子座の表面積あたりの純光合成生産量を求め、光合成阻害量とした。

・病原菌の炭素支出への影響の推定

病原菌の呼吸量は以前の研究の近似式を用いて、子嚢子座の表面積、気温をもとに推定した。病原菌の炭素量は表面積を測定した病原菌の重量・炭素含有量の測定により推定した。

・感染木の葉の総数、感染率の推定

リタートラップを設置し、1個体200枚の葉に目印をつけ、標識再補法を用いて、葉の総数、感染率を推定した。

【結果】

着葉期間の個葉レベルでの純光合成生産量は、s1で75.6 mgC leaf⁻¹、s2で16.8 mgC leaf⁻¹、s3で86.5 mgC leaf⁻¹と推定された(表1)。s1, s3は同程度であり、s2で明らかに純光合成生産量が小さかった要因は、PPFDとETRの差が反映されている

病原菌の炭素収入への影響は純光合成生産量に比してs1で1.2%、s2で1.7%、s3で0.7%であった(表1)。

炭素量は重量の約68%と推定した。病原菌の炭素支出への影響は純光合成生産量に比してs1で24%、s2で75%、s3で31%であった(表1)。

個体レベルでの純光合成生産量は、s1で最も大きく、5.2 kgCであった。感染率はs3で最も高く、7.8%であったが、感染による炭素収支の減少割合はs2で最も大きく、4.7%であった(表2)。

【考察】

病原菌による宿主の炭素収支に与える影響は病原菌による光合成阻害量、呼吸量、炭素量の順で大きくなった(表1)。この結果から、病原菌は炭素収入の減少より炭素支出の増加により宿主の炭素収支を減少させることが示唆された。

サイト間の個葉レベル、個体レベルの純光合成生産量を比較すると、どちらの場合もs2が最も小さかった。一方で、純光合成生産量は個葉レベルではs3で最も大きかったのに対して、個体レベルではs1で最も大きく、評価する生物学的組織レベルで結果が異なっていた(表1,2)。個葉レベルではs3の葉面積がs1の約1.6倍と大きく、個体レベルではs1の葉の総数がs3の約2.4倍であったことが、純光合成生産量の差の要因として挙げられる。

サイト間の健全木の純光合成生産量の違いに対して、病原菌の炭素収支への影響はs1で最も小さく、s2で最も大きかった(表2)。この結果から個体差・環境差による宿主の炭素収支の変動と病原菌の炭素収支の変動は独立しており、病原菌の感染は宿主の炭素収支の相対的な差異をさらに大きくすることが示唆された。

表1: 個葉レベルの炭素収支

純光合成生産量 (健全葉)	s1	s2	s3
純光合成生産量 (mgC leaf ⁻¹)	75.6	16.8	86.5
病原菌の炭素収入への影響	s1	s2	s3
光合成阻害量 (mgC leaf ⁻¹)	1.0	0.3	0.6
病原菌の炭素支出への影響	s1	s2	s3
呼吸量 (mgC leaf ⁻¹)	6.5	6.4	8.6
炭素量 (mgC leaf ⁻¹)	11.5	6.2	17.8
感染による炭素収支の減少 (感染葉)	s1	s2	s3
個葉レベルの炭素収支の減少率 (%)	25.1	76.8	31.2

表2: 個体レベルの炭素収支

感染率0%のとき (健全木)	s1	s2	s3
純光合成生産量 (kgC)	5.2	0.8	2.5
推定された感染率のとき (感染木)	s1	s2	s3
感染率 (%)	1.4	6.1	7.8
個体レベルの炭素収支の減少率 (%)	0.4	4.7	2.4

筑波大学構内における鳥類相の解明：1970年代から2023年の比較から

船橋 美月（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】

人間活動による生息環境の改変や外来種の導入は鳥類の生物多様性に脅威をもたらす。生息地の喪失や分断化は種の構成や生態系機能に悪影響を与え、外来種の導入も在来種の保全において重要な課題となっている。筑波大学とその周辺の環境は開学から50年つくば市の開発により大きく変化している。鳥類は生息地とその周辺の環境の影響を受けることから (Zhao et al., 2023)、筑波大学構内とその周辺の環境の変遷が鳥類に影響を与えている可能性がある。しかし、具体的な変化やその要因は不明であり、現状把握や保全・管理に必要な情報が不足している。

【目的】

本研究は、現在の筑波大学構内における鳥類相を明らかにし、50年前と比較して環境変化と鳥類相の変遷の関連性を検証することである。

【方法】

2023年4月から7月にかけて、筑波大学構内で早朝、夜間の鳥類調査を実施した。早朝調査では4月5月には農耕地・水域・草地・森林で計37地点を調査した。農耕地・水域・草地では地点から見える範囲すべて、森林は半径10mの調査区を設け、1地点10分間の調査を行った。6月以降は筑波大学構内全域をもれなく確認するために構内を143カ所に区画した。区画した調査エリアを時速2kmでエリア内を移動しながら10分間の調査を行った。夜間調査は、7月に3回に分けて学内全域を調査した。日没前1時間から約3時間程度、時速2kmで歩きながら、鳥類の種類を記録した。種ごとの生息地データはAVONET (Tobias et al., 2022)を参考にした。開学当初(1973-74)の筑波大学構内の鳥類相のデータは「筑波大学構内及びその周辺の鳥類観察目録(斎藤 et al., 1976)」を用いた。解析時、比較可能な情報を得るために、本研究では斎藤ら(1976)の文献からは筑波大学構内で記録された鳥類に限定し渡り区分は調査期間内で主に確認できる留鳥、夏鳥、旅鳥に絞った。渡り区分は「日本と北東アジアの野鳥(榛葉 et al., 2016)」のデータを用いた。

【結果】

鳥類調査は4月と5月で7回、6月と7月の調査においてはそれぞれ大学全域の調査を6月は12日、7月は13日に分けて大学全域の調査を1回行った。鳥類の出現種数は、1970年代が69種、2023年が45種であり、種を減少させていることがわかった。また、外来種について、1970年代はコジュケイのみだったのに対し、2023年はそれに加え、ドバトとソウシチョウが確認された。1970年代から2023年に各生息地グループにおける変化より、すべての生息地グループにおいて種を減少させていたが、特に湿地性鳥類(wetland)の種の減少が最も多かった。また、1970年に確認された鳥類の一部が2023年には確認されなくなったことに加え、2023年には1970年には確認されなかった鳥類が確認されるようになるといった種の入替えが起こっていたことがわかった(図1)。

【考察】

湿地性鳥類の減少は湿地面積の縮小に起因している可能性が高い。特に平砂宿舎周辺の湿地が埋め立てられ、道路や建造物の建設によって湿地が失われていたことが影響していると考えられる。

外来鳥類の出現に関して、ドバトは人工環境の増加が影響しており、ソウシチョウは筑波山における分布の変化による影響が考えられている。これらの外来鳥類の影響は生態系や社会・経済に及ぶ可能性があり、モニタリングが必要とされている。

種の入替わりが見られたことは都市環境への適応能力の差や競争的排除の影響を受けている可能性があると考えられるが、本研究では検証できていないため今後の課題である。

最後に、本研究で見られた筑波大学での鳥類相の変化は都市緑地の保全や改善において重要であり、在来環境の植生の維持や湿地の保全、外来鳥類のモニタリングなどが今後の施策に考慮されるべきである。

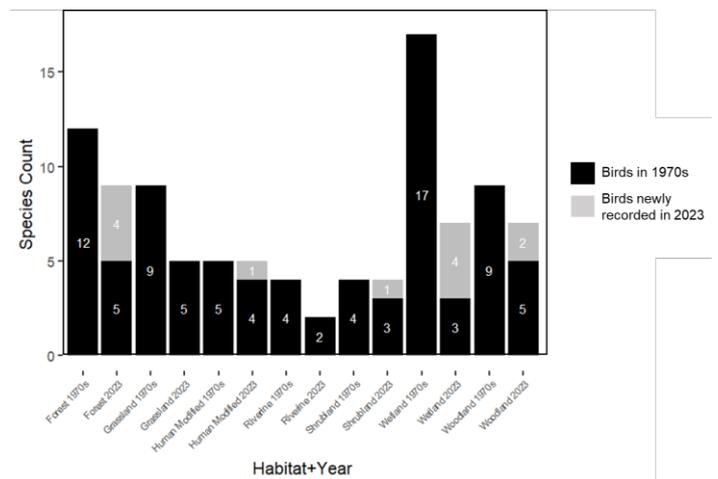


図1：1970年代から2023年にかけて起こった生息地ごとの鳥類種数の変化。縦軸とバー内の数値は種数を表し横軸のカテゴリーは1970年代と2023年のAVONET (Tobias et al., 2022)に記載された鳥類の生息地グループを表す。黒棒は1970年代に記録された鳥類種数を表し、グレー棒は2023年に新たに記録した鳥類種数を表す。

【文献】

Zhao et al. 2023. Urban Bird Community Assembly Mechanisms and Driving Factors in University Campuses in Nanjing, China.
 Tobias et al. 2022. AVONET: morphological, ecological and geographical data for all birds.
 斎藤 et al. 1976. 筑波大学構内およびその周辺の鳥類観察目録 (Vol. 1).
 榛葉 et al. 2016. 日本と北東アジアの野鳥

魚の粘液が誘発するプルテウス幼生のクローニングの再現

須賀 文香 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 谷口 俊介 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

生物の生存戦略の一つである個体や器官の再生が、プラナリアやイモリ、ベニクラゲといった数々の生物種で報告されている。ヒトデやクモヒトデなどの棘皮動物の成体もまた、高い再生能力をもつ生物として多くの研究が行われてきた。一方、棘皮動物の幼生も高い再生能力を持っており、それは“クローニング”という現象として報告されている。一般的に、クローニングは遺伝子の単離を指す分子生物学用語であるが、ここでは自分と遺伝的に同一な個体、すなわちクローンが形成される無性生殖の様式を示す言葉として用いる。棘皮動物の幼生において広く行われるクローニングでは、幼生の体から出芽のように新しい細胞塊が形成される。通常、発生初期の段階ではクローニングは観察されないが、幼生の成長に適した水温やエサ条件下で促進されることが示されている。近年、幼生の捕食者となる魚の粘液もまた、クローニングの促進要因となりうるということが、ウニの仲間であるアメリカハスノカシパンを用いた実験によって報告されている。受精後4日目のプルテウス幼生にろ過海水で希釈した0.01~1.0 mg/ml程度の粘液を暴露すると、24時間以内にクローニングが観察されたとのことである。魚の粘液によるクローニングの促進報告はこれまでアメリカハスノカシパンのみであり、自然条件下での誘発例もアメリカムラサキウニのみとなっている。つまり、我が国で実験材料として広く用いられているバフンウニにおける例はまだ報告されていない。

よって、今回は、魚の粘液が誘発するプルテウス幼生のクローニングをバフンウニにおいて再現することを目的に実験を行った。

【方法】

・魚の粘液の採取

タモ網で魚(シタビラメおよびヒラメ)を採取し、網から滴る粘液を採取した。0.45 µm フィルターにてゴミなどを除去した後、その粘液を1ml チューブに分注し、-20°Cで冷凍保存した。

・粘液の重さ算出

使用直前に冷凍保存した粘液チューブを解凍し、ボルテックスで攪拌後遠心した。粘液入りエッペンチューブと空のエッペンチューブの重さを比較することで重さを測定し、粘液1mlあたりの重さを算出した。

・バフンウニ幼生への粘液暴露

解凍した粘液を高、中、低濃度(5.0、1.0、0.1 mg/ml)になるようにろ過海水で希釈し、24穴シャーレに2mlずつ分注した。コントロールとしてはろ過海水を使用した。

実験1: 受精後3日目及び4日目の幼生を各濃度1穴につき5匹ずつ分注し、15°Cのインキュベーターで保存した。24時間ごとに9日間幼生の様子を観察した。

実験2: 受精後2日目及び3日目の胚を各濃度1穴につき、1、5、10匹ずつになるように分注した。15°Cのインキュベーターで保存し、24時間ごとに14日間観察を行った。

※両実験とも3日ごとに水替え及びえさやり(Chaetoceros calcitrans)を行った。

【結果】

・実験1(シタビラメの粘液を使用)

各粘液濃度及びコントロール共に、3日目及び4日目幼生ではクローニングは観察されなかった。

・実験2(シタビラメおよびヒラメの粘液を使用)

受精後3日目から中濃度のヒラメ粘液に暴露した、サンプル1匹において、クローニングと思われる細胞塊が幼生の肛門付近から出芽している様子が確認できた。経過観察を行うために同じ粘液条件下で個別飼育を行ったところ、出芽した細胞塊が本体から分離して遊泳している様子が観察できた。分離した細胞塊を詳細に観察したところ、繊毛と思われる構造物と共に僅かに個体が動く様子が確認できた。しかしながら、その後のハンドリングにミスをしたため、十分な経過観察ができなかった。



クローニングにより本体から出芽したと思われる細胞塊(矢印)

【考察・今後の展望】

実験2の結果より、バフンウニにおいてもクローニングが誘発されること及び魚の粘液がクローニングの促進剤となりうる可能性が示唆された。今回、シタビラメの粘液からヒラメの粘液に切替えて暴露した後にクローニングが観察されたことから、魚種の違いによってクローニングの誘発が左右されるのかが今後の検討事項である。しかしながら、実験で得られたクローニング個体はこれまで1匹のみであり、その後同じ粘液条件下で行った実験ではまだクローニングは観察されていないため、魚種の違いを論じる段階にない。そこで、まずはクローニングの再現性を高めるための条件検討を行い、その過程で魚種の違いによる粘液条件を検討事項に加えていく。

分子動力学計算で解明する TGF-β 受容体の多量体形成メカニズム

佐藤 紘歌 (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】

我々の生体は数多くの細胞から成り立っている。細胞が分化・増殖することで、さまざまな機能を有する細胞が産生され、生体内の組織は正常にはたらく、生体の恒常性が維持される。しかし、細胞増殖が無秩序に繰り返されると、いわゆる「がん化」と呼ばれる状態になり、腫瘍の形成など生体へ悪影響を及ぼす。そのため、細胞増殖は厳密に制御される必要がある。

形質転換増殖因子-β (TGF-β) は、細胞増殖の抑制にはたらく分泌性のタンパク質である。TGF-β は、リガンドとして細胞膜に存在する受容体に受容され、細胞内へシグナルが伝達されることで、その役割を果たす。この一連のシグナルの伝達を TGF-β シグナル伝達と呼ぶ。TGF-β は TGFBR1、TGFBR2 の二種類の

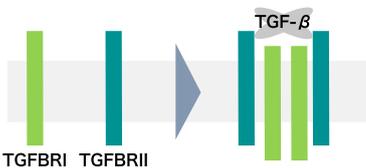


図 1. TGF-β /受容体多量体

受容体と結合することが知られている。TGF-β は二量体で活性をもち、TGFBR1:TGFBR2 = 2:2 の四量体 (以下、受容体四量体) と六量体を形成し、細胞内へシグナルを伝達する。(図 1)

BAMBI は、TGF-β シグナル伝達の阻害因子の一つである。細胞増殖の制御は、細胞増殖の促進と抑制のバランスで保たれている。TGF-β シグナル伝達を抑制し、細胞増殖を促進する因子もまた重要である。BAMBI は膜タンパク質であることから、TGF-β シグナル伝達において、同じく膜タンパク質である受容体に作用し、受容体多量体形成を阻害することでシグナル阻害をすることが考えられている。しかし、BAMBI が TGFBR1、TGFBR2 のどちらに作用しているのかといった阻害機序は未解明である。そこで、本研究では、BAMBI による受容体多量体形成の阻害機序の解明を目的とした。

TGF-β 受容体の構造は、細胞内および細胞外ドメインと細胞膜中に存在する膜貫通ドメインに分けられる。生物学的実験から、TGFBR1、TGFBR2 の膜貫通ドメインを他の受容体のものに置換するとシグナル伝達効率が変化することが示された。[1] これにより、受容体四量体の形成に膜貫通ドメインが寄与することが示唆される。したがって、TGFBR1、TGFBR2、BAMBI 間の結合について検討するには、膜貫通ドメインの結合親和性を比較する必要がある。そこで本研究では、膜貫通ドメインの結合・解離プロセスを観測できる分子動力学シミュレーション (MD) を用いて、膜貫通ドメインの結合親和性の比較および BAMBI による阻害機序の解明を進めた。

【方法】

本研究では、タンパク質の結合・解離プロセスを原子レベルで観測できる MD を使用した。MD は、原子間にはたらく力を計算しながら原子の位置と速度を更新することで、タンパク質の構造変化 (ダイナミクス) を時系列データ (トラジェクトリ) として観測できる。また、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。

はじめに、タンパク質の立体構造予測できるプログラムである AlphaFold 2 (AF2) を用いた。AF2 は、単量体の構造だけでなく複合体の構造も予測できる。そこで、TGFBR1 と各タンパク質からなる三種類について二量体構造を予測した。

TGFBR1 + {TGFBR1 / TGFBR2 / BAMBI}

次に、生成した三種類の二量体構造を膜環境に埋め込み、MD を実施することで、膜内における安定構造を入手した。(図 2)

最後に、三種類の二量体について以下の二段階の操作を実施した。

- (1) 各タンパク質間の距離を変更し、複合体が結合している状態から、解離している状態までの構造を均一に作成した。(図 3)
- (2) 作成した構造すべてに短時間の MD を実施した。

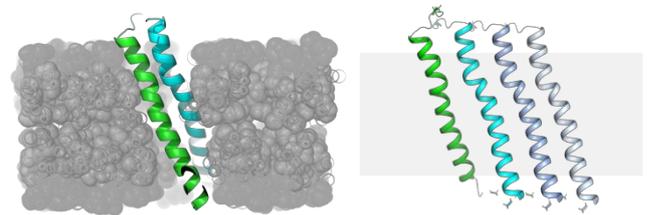


図 2. 膜内における安定構造

図 3. 複数距離の構造

【結果】

MD により得られたトラジェクトリの解析結果から、二量体の結合および解離状態のエネルギー差 (ΔW) を算出できる。三種の二量体について ΔW を比較し、どの二量体が優先的に結合するかを推察する。その結果、BAMBI と TGFBR2 の結合親和性は小さく、BAMBI は TGFBR1 と結合することが示唆された。また、TGFBR1 に対する BAMBI および TGFBR2 の結合親和性は同程度であることが示された。また、各二量体の膜内における安定構造を比較することで、二量体が膜貫通ドメインの α ヘリックスのどの面で結合しているか調べた。その結果、TGFBR1 の TGFBR2 および BAMBI に対する結合面が同じであることが示された。MD および結合面の解析から導かれる結論として、BAMBI は TGFBR1 と結合し、TGFBR1-TGFBR2 の結合面をブロックし結合を競合的に阻害することで、受容体四量体の形成を阻害し、シグナル伝達を阻害することが考えられる。(図 4)

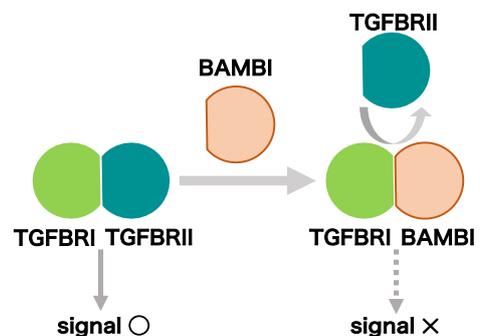


図 4. BAMBI による阻害機序仮説

【参考文献】

1. Onichtchouk D. et al., *Nature*, 401, 480-485(1999)

二酸化炭素によるニホンウナギ精子の運動停止反応

森 凜太郎 (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】

魚類の精子は、様々な受精環境に適応し、多様な進化を遂げてきた。特にカレイ類では、精子懸濁液に対してCO₂を噴射すると、すぐさま精子が停止するという特異な反応が知られている¹⁾。この反応は、精子に多量に含まれる炭酸脱水酵素 (CA) によって引き起こされる。CAはCO₂+H₂O ⇌ HCO₃⁻+H⁺の反応を触媒し、細胞内pHの維持に重要な役割を果たしている。カレイ類精子ではCAが高発現しており、CO₂噴射により産生されたHCO₃⁻が軸糸の運動を抑制すると考えられている。また、カレイ類は低pH溶液でも十分な精子運動が確認されており、CAとの関連が示唆される。先行研究により、ウナギ精子におけるNaHCO₃溶液中での運動抑制が報告されている²⁾。しかしながら、カレイ類精子と同様にCAによる精子運動停止メカニズムが存在するの否か、その詳細や意義は明らかになっていない。また、ウナギ精子の軸糸構造は「9+0」構造であり、多くの生物が持つ「9+2」構造とは異なる。すなわち、ウナギ精子の軸糸は中心対微小管、ラジアルスポーク、外腕ダイニンを欠いた構造しており、最も単純な軸糸構造を持つ生物だと考えられている。

本研究では、ニホンウナギ精子のCO₂による運動停止反応を詳細に調べることで、精子鞭毛軸糸のCO₂およびHCO₃⁻による運動調節メカニズムの解明を目的とした。

【材料】

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) (雄)

FRP製500L水槽を用いて、水温20℃、全暗条件にて飼育した。雄ウナギの性成熟は、ウナギ組換えLH (0.5 mg/ml, Repro Master rLH, アークリソース社) 200 µl を週1回、10週間注射して促した。成熟したウナギを2-フェノキシエタノールで麻酔し、腹部圧迫により精子を採取した。

【方法】

CO₂噴射時の精子鞭毛波形解析

BSAコートしたスライドガラス上にNaCl溶液を置き、少量の精子を滴下し、運動を活性化させた。その後、CO₂ボンベに接続したチューブを介してCO₂ガスを精子に噴射し、その様子を位相差顕微鏡で10倍の対物レンズを用いて観察し、高速カメラ (HAS-U2) により1000 fps で記録した。

精子運動率、遊泳速度の測定

BSAコートしたスライドガラス上に各溶液を20 µl 置き、50倍希釈した精子1 µl を滴下した。位相差顕微鏡で10倍の対物レンズを用いて観察を行い、精子運動解析ソフトウェアSMASにより精子運動率、遊泳速度を測定した。

実験溶液の組成

精子運動の活性化には、NaCl溶液 (450 mM NaCl, 0.5% BSA, 10 mM HEPES-NaOH, pH 8.0) を用いた。HCO₃⁻の影響は、運動活性化溶液に25-400 mM になるようにNaHCO₃を加えた溶液を用いて調べた。NaClとNaHCO₃の総濃度は450 mMとした。pHの影響については、溶液のpHをpH 3.0-9.0の範囲で変化させた。pH 3.0, 4.0はK⁺acetate、pH 5.0, 6.0はMESを用いて調

整した。Nigericinは10 mMストック水溶液、Ethoxzolamide (ETZ)は、0-40 mMストックDMSO溶液を適宜希釈して用いた。溶液中のDMSOの最終濃度は0.5%とした。

【結果】

ウナギ精子懸濁液にCO₂ガスを吹き付けた結果、運動中の精子はカレイ類精子と同様に直ちに停止した。また、CO₂噴射停止直後、すぐさま運動性が回復した。カレイ類精子がCO₂停止から回復する場合と異なり、ウナギ精子鞭毛の屈曲は鞭毛の先端から回復した。カレイ類精子は、25-100 mMのNaHCO₃で運動が抑制される。しかし、ウナギ精子をNaHCO₃溶液中で観察すると、400 mM NaHCO₃でも運動は全く停止せず、曲線速度にも顕著な違いはなかった。様々なpHでのウナギ精子の運動性を評価した結果、pH 4.0-9.0では運動性に変化がなかったが、pH 3.0では運動性が著しく低下した。Nigericinを用いて、細胞内外のpH差を無くしたところ、pH 6.0以下の溶液で精子運動性が低下した。CAの阻害剤であるETZの効果を低pH条件であるpH 5.0と、通常のpHであるpH 8.0と比較したところ、pH 5.0では精子の運動性が低下したが、pH 8.0では運動性に変化はなかった。

【考察】

カレイ類と同様に、ウナギ精子もCO₂の噴射による運動停止反応を示した。停止効果は非常に高く、吐息を吹きかけただけでもCO₂による速度低下が観察された。しかしながら、本研究では、カレイ類精子では停止反応を示したNaHCO₃溶液で、ウナギ精子が全く停止しないという結果を得た。この結果の相違は、ウナギの運動性を確保するために使用したBSAに原因がある可能性と、CO₂による運動停止メカニズムがカレイ類とウナギで異なる可能性が考えられる。また、CO₂停止後に運動を回復させる際の波形回復を観察した結果、ウナギ精子の波形は鞭毛の先端から回復した。それに対して、カレイ類では鞭毛基部から波形が回復し、両者では全く異なる反応を示した。この特殊な回復反応は、ウナギ精子が持つ「9+0」構造が寄与しているのではないかと考えられる。

一方、カレイ類精子と同様に、ウナギ精子も低pH溶液で高い運動性を持つことが示された。低pH条件下では、NigericinやETZの添加により運動性が低下したことから、CAが低pH溶液における運動に寄与していることが示唆された。これらのことから、CAはウナギ精子内のpH維持に寄与しており、これはカレイ類と同様の性質であることが明らかにされた。

本研究では、ウナギ精子がカレイ類と同様に多量のCAを持ち、低pH溶液における運動維持に寄与していることが示唆された。今後は、質量分析によるCAの特定や生化学的解析、さらに系統的に離れたカレイ類とウナギが、いかに同じ性質を獲得したのかを明らかにしていきたい。

【参考文献】

1. Inaba *et al.*, Cell Motility and the Cytoskeleton 55:174-187 (2003).
2. Tanaka *et al.*, Fisheries Science 70: 780-787 (2004).

サンゴの共生・白化に関連する褐虫藻の運動調節の研究

朝賀 伸一（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】

古生代から続くサンゴ-褐虫藻間の相利共生関係は、豊かな生物多様性を生み出すサンゴ礁生態系を支えている。褐虫藻は渦鞭毛藻類に属し、横鞭毛と縦鞭毛という2本の鞭毛を持つが、遊泳において横鞭毛は推進力、縦鞭毛は舵取りの役割を果たしていると考えられている。また、褐虫藻は鞭毛がある遊泳細胞と鞭毛のない球形細胞という2つの形態をとり、共生前後で変化する。

サンゴの白化は、温暖化や強光により光合成系が破壊された褐虫藻がサンゴから排出されることが原因で起こる。白化によりサンゴの増殖が抑えられ、サンゴ礁が縮小する結果、サンゴ礁域に住む多様な海洋生物種の生息地が奪われることになる。白化時のサンゴが緑色蛍光を発するという報告や、緑色蛍光に褐虫藻が誘引されるという報告¹から、褐虫藻の走光性はサンゴの共生や白化に密接に関わっていると考えられる。しかし、その運動調節機構の詳細は明らかになっていない。

本研究では、走光性を示す褐虫藻の鞭毛波形の変化を解析し、褐虫藻の運動調節機構を明らかにすることを目的とした。

【材料】

・褐虫藻

Breviolum minutum、*Breviolum psygmophilum*、*Cladocodium goreau*の

3種の株をIMK培地中、23°Cで維持した。冷白色蛍光灯を用い、14時間明期：10時間暗期（8:00点灯, 22:00消灯）で照明した。

【実験方法】

褐虫藻の24時間観察と解析

培養フラスコ内の褐虫藻を赤色LED光照射の下、4倍の対物レンズを用いて位相差顕微鏡で24時間観察し、15分毎に30秒の動画をカメラ（iDS, UI3240CP）により撮影した。撮影した動画を画像解析ソフトImageJで解析し、運動率・運動軌跡を求めた。

鞭毛運動の観察と解析

褐虫藻 *B. minutum* を赤色LED光照射の下、10倍の対物レンズを用いて位相差顕微鏡および微分干渉顕微鏡で観察し、ハイスピードカメラ（DITECT, HAS-U2）により1秒間に100フレーム撮影した。観察はBSAコートしたスライドガラスチャンバーで行った。

青色光への走光性の観察と解析

褐虫藻 *B. minutum* を赤色LED光照射の下、4倍の対物レンズを用いて位相差顕微鏡で9:00、13:00、17:00に観察し、ハイスピードカメラ（HAS-U2）により1秒間に100フレーム撮影した。青色光は5mm青色LED（465-475nm）を50ml角フラスコの横から照射した。

【結果】

褐虫藻の運動性を24時間観察した結果、*B. minutum* では、明期開始から数時間後に遊泳細胞が観察されはじめ、13:00から14:00の間で最大運動率が計測された。また、14:00以降は暗期に向けて運動率が下がった。*B. psygmophilum* の運動性は低かったが、*B. minutum* と同様に13:00から14:00の間で運動率が最も高

く、暗期に向けて運動率は下がった。*C. goreau* では、遊泳細胞が観察されなかった。

運動軌跡を解析した結果、運動率が低い時間帯では直進・らせん運動を示す褐虫藻が多かった。また、運動率が高くなるにつれて、回転運動を示す褐虫藻が増加した。以上の結果から、褐虫藻の運動率は種によって異なること、運動軌跡は光周期の時間帯によって変化することがわかった。

次に、直進・らせん運動と回転運動を起こす機構を明らかにするために、*B. minutum* を用いて鞭毛運動の観察を行った。本研究では、褐虫藻が持つ2本の鞭毛のうち、横鞭毛を明確に記録することができなかったため、縦鞭毛の波形解析を行った。褐虫藻が回転運動から直進運動に転換する際の縦鞭毛の波形を観察・解析した結果、回転運動では非対称波を描き、直進運動では対称波を描くことがわかった。さらに、機械刺激を受容した直後、鞭毛の打頻度が変化する様子を記録することができた。これらの鞭毛波形の変化は、運動軌跡の調節に深く関係していると考えられる。

さらに、*B. minutum* を用いて青色光に対する走光性を解析したところ、直進・らせん運動を示していた褐虫藻が、明期開始後の時間にかかわらず、負の走光性を示すことがわかった。

【考察・今後の展望】

遊泳細胞の増加に伴い、回転運動を示す細胞が増えたことは、褐虫藻の運動変化が光周期の時間帯だけでなく、細胞の運動率に依存する可能性を示す。本研究では、回転運動が培養容器の底で観察された。自然界においても、遊泳性の褐虫藻は海中よりもサンゴが生息している海底に多く存在するといわれている。サンゴの共生効率は、褐虫藻の密度が高いほど大きくなることから、サンゴの緑色蛍光²により誘引された褐虫藻が、回転運動によってサンゴ表面に留まることで、共生効率を高めている可能性がある。

本研究では、光照射開始4時間後から遊泳細胞が観察された。光照射開始前の細胞分裂のピーク直後に遊泳細胞が現れるという報告や³、12時間/12時間の明暗周期のうち、褐虫藻の走光性活性が明期開始4時間後に最も高いという報告⁴がある。したがって、褐虫藻の鞭毛形成、運動性の獲得、および運動調節は、細胞分裂や光受容の機構と深く関わっている可能性が示唆される。

本研究から、運動軌跡の変化に伴い縦鞭毛の対称性が変化することがわかった。褐虫藻の横鞭毛には、Ca²⁺により鞭毛の収縮や運動性を変化させるセントリンというタンパク質が存在する。運動調節の機構を明らかにするためには、縦鞭毛Ca²⁺調節を解析するとともに、横鞭毛が褐虫藻の運動調節にどのように関わるのかを明らかにする必要がある。さらに本研究では、褐虫藻が青色光への走光性を示すことがわかった。褐虫藻の鞭毛運動を制御する因子が、周囲の環境変化に応答する可能性が考えられる。褐虫藻の光受容機構を明らかにすると同時に、今後はサンゴ由来の物質に対する走化性の有無についても検証したい。

【参考文献】

1. Aihara *et al*, PNAS, 116: 2118-2123 (2019).
2. Yamashita *et al*, Galaxea, JCRS, 18: 13-19 (2016).

伊豆半島沖の砂泥底におけるメイオベントス群集：水深が異なる5地点の比較

福澤 航生（筑波大学 生物学類） 指導教員：中野 裕昭（筑波大学 生命環境系）

【背景および目的】

メイオベントス (meiobenthos) もしくはメイオフアウナ (meiofauna) とは約 1 mm の篩を通り抜け、32-63 μm の篩に残る小型の底生動物を指す。メイオベントスはあらゆる水圏に分布し、その活動は直接的もしくは間接的に堆積物の特性を変化させている。海洋生態系をより深く理解するためには、どのような特性の海底にどのようなメイオベントス群集が形成されているかを正確に把握し、評価することが重要である。しかし、日本近海においてメイオベントス群集を水深ごとに比較した研究は少なく、伊豆半島沖のメイオベントス群集を対象とした研究はほとんどない。以上の背景から本研究では、伊豆半島沖の砂泥底において水深の異なる5つの地点で底質のサンプリングを行い、メイオベントスの群集組成を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

1) 底質のサンプリング

2023年11月6日、静岡県下田市白浜沖水深40m、60m、80m、100m、120mの砂泥底5地点から、それぞれ3回ずつ計15回、底質のサンプリングを実施した。底質は船上からスミスマッキンタイヤ採泥器を投下し採取され、サンプリング毎に1Lの底質サンプルを標本瓶にて持ち帰った。

2) メイオベントスの抽出

基本的に山崎ほか(2019)に従って実施した。具体的には、底質サンプルを1.18 mmの篩で水道水を用いて洗浄して大型動物を除去し、篩を通過した堆積物を保持した。この堆積物を50 μmのプランクトンネットで水道水を用いて洗浄し、篩に残った堆積物を保持した。その後、堆積物からガラスコロイド溶液を用いた密度分離法によってメイオベントスを抽出した。抽出したメイオベントスは70%エタノール溶液で固定し、保存した。

3) ソーティングと計数

固定したメイオベントスを実体顕微鏡下で観察し、Schmidt-Rhaesa (2020)を参考に形態に基づいて分類し、撮影を行った。そして、高次分類群ごとに計数を行った。個体数データに対しては平方根変換を適用した。

4) 調査地点ごとの比較

調査地点ごとのメイオベントス群集を相互比較するために、nMDSおよび階層的クラスタ分析を実行した。これにはBray-Curtis指数が用いられた。またクラスタ分析にはWard法が用いられ、クラスタの数はシルエット分析に基づいて決定した。

【結果】

1) ソーティング

15個のサンプルからは合計20,042個体のメイオベントスが抽出された。実体顕微鏡下で観察した結果、以下の表1および図1に示した15のグループに分類された。

Nematoda A	Nematoda B	Copepoda A	Copepoda B	Copepoda C
Copepoda D	Halacaroida A	Amphipoda A	Isopoda A	Tanaidacea A
Priapulida A	Echinodermata A	Cnidaria A	Oligochaeta A	Kinorhyncha A

表1：メイオベントスの分類結果

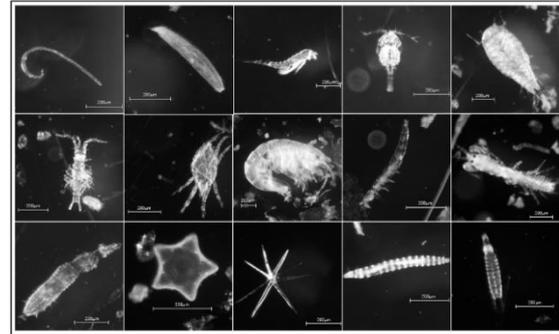


図1：分類された15グループ。並び順は表1に従う。スケールバー：200 μm。

2) 分類群ごとの計数

メイオベントスを分類群ごとに計数した結果、全体としてNematoda A(計17,361個体)が優占することがわかった。また、水深40mでは全体のメイオベントスに対してCopepoda Aや、Isopoda Aといったグループの占める割合が水深60m以深と比較すると大きいことが判明した。逆に水深60m以深ではそれらのグループの占める割合は小さく、Nematoda B(全個体を水深60m以深で採集)や、Priapulida A(全個体を水深80m以深で採集)などといった水深40mでは見られないグループが観察された。その他のグループの計数結果を含む詳細は発表会にて報告する。

3) 調査地点ごとの比較

地点ごとの群集組成がその類似度によって複数のグループに分割されるか確認するために、nMDSおよび階層的クラスタ分析を実行した。その結果、図2のような樹形図が得られた。この図においてシルエット分析を行い、シルエット値が最大となる2分割とするのが適切であると判断した。40mの全地点を含むグループをG1、60m以深の全地点を含むグループをG2とした。

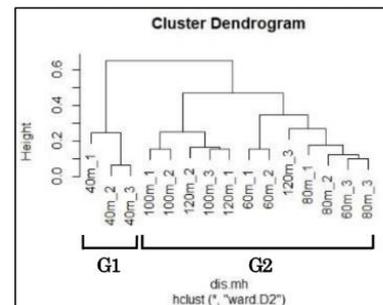


図2：クラスタ分析で得られた樹形図。水深40mの3地点を含むG1と水深60m以深の12地点を含むG2が示されている。

【考察】

下田市白浜沖水深40m~120mの海底では全体的にNematoda Aが優占していた。また、水深40mではCopepoda AやIsopoda Aが比較的大きな割合を占める一方で、水深60m以深ではその割合が小さくなり、Priapulida Aなどが出現することが明らかになった。この結果から、メイオベントス群集が水深40m-60mを境に大きく変わることを見出すことができた。このような変化が見られた背景には水温や底質粒度などの違いが存在する可能性があり、今後の研究では生物相と環境条件との関係を調べていきたい。

【参考文献】

Schmidt-Rhaesa, A., (2020). Guide to the Identification of Marine Meiofauna. Verlag Dr. Freiderich Pfeil, München.
山崎博史ほか (2019). タクサ: 日本動物分類学会誌, 46, 40-53.

ミトコンドリア病モデルマウスを用いた生体内におけるオートファジーの重要性の検証

佐渡友 光一（筑波大学 生物学類） 指導教員：中田 和人（筑波大学 生命環境系）

【背景・目的】

ミトコンドリアは細胞小器官の一つであり、内膜に存在する呼吸酵素複合体による酸化リン酸化を介して、生体内で必要とされる ATP の大部分を産生することが知られている。哺乳類において、ミトコンドリアには独自のゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) が 1 細胞当たり数百から数千コピー存在している。哺乳類の mtDNA には、呼吸酵素複合体を構成するサブユニットのうち、13 種類の構造遺伝子とそれらの翻訳に必要な 2 種類の rRNA 遺伝子と 22 種類の tRNA 遺伝子がコードされている。この mtDNA に病原性の突然変異が一定の割合で蓄積するとミトコンドリアの呼吸機能が低下し、ミトコンドリア病と称される多様な疾患群が引き起こされる。ミトコンドリア病を引き起こす病原性の変異のひとつに、mtDNA の全長の 3 分の 1 を欠失する大規模欠失突然変異がある。ヒトにおいて、大規模欠失突然変異型 mtDNA (Δ mtDNA) の蓄積は CPEO (Chronic progressive external ophthalmoplegia) や KSS (Kearns-Sayre syndrome) と呼ばれるミトコンドリア病を引き起こすことが知られている。

所属研究室では、ヒト Δ mtDNA とほぼ同じ位置が欠失した Δ mtDNA を全身の細胞に様々な割合で蓄積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。mito-mice Δ では、各組織・各臓器で Δ mtDNA が 70~80% 以上蓄積するとミトコンドリア呼吸機能の低下 (ATP 産生不全) が誘導され、低体重、高乳酸血症、貧血、腎不全、心伝導障害といったミトコンドリア病様の病状を呈する。また、mito-mice Δ では同一個体であっても Δ mtDNA の含有率 (Δ 率) が異なり、臓器特異的な病態を示すことが判明している。mito-mice Δ において、腎臓や心臓では Δ 率が 85% 以上を示し重篤な腎不全や心伝導障害を示す個体であっても、肝臓では Δ 率が 60% を超えず目立った病態を示さない。このように、臓器間で Δ 率の蓄積の差異が病態の臓器特異性を生み出す一因となっていることが考えられる。しかし、現状臓器間の Δ mtDNA の蓄積の差異を生み出す具体的な機構は明らかになっていない。

近年、機能不全のミトコンドリアがオートファジーによって選択的に排除されるミトコンドリアオートファジー (マイトファジー) が注目されている。マイトファジーは、ミトコンドリアの品質管理に寄与し、細胞内の恒常性を維持するうえで重要であることが示唆されている。このことから、mito-mice Δ における臓器間の Δ 率の蓄積やその最大値を制御する機構として、オートファジーやマイトファジーが考えられる。

そこで本研究では、 Δ mtDNA を様々な割合で蓄積する mito-mice Δ を用いて臓器ごとの Δ mtDNA とオートファジー活性の相関関係を検証することで、臓器間における Δ mtDNA の蓄積の差異にオートファジー及びマイトファジーの活性が寄与する可能性を検証した。

【材料】

5-7 か月齢の mito-mice Δ から摘出した高 Δ 率を許容し腎不全を発症する腎臓、高 Δ 率を許容し心伝導障害を発症する心臓、高 Δ 率を許容せず目立った病態を発症しない肝臓を用いた。

【方法】

摘出した各臓器の Δ 率を定量することで、 Δ 率が 0% (wt)、0~25% (low)、25~50% (middle)、50~75% (high)、75~100% (super high) の 5 群に分類した。さらに、各群におけるオートファジー関連タンパク質 (LC3、p62)、及びマイトファジー関連タンパク質 (BNIP3、Nix、PINK1、Parkin) の発現量をウエスタンブロッティングにより定量し比較解析した。

【結果・考察】

詳細な結果と考察については発表会にて報告する。

がんの悪性化に寄与しうる新規ミトコンドリア DNA 突然変異の探索

齊藤 さくら (筑波大学 生物学類)

指導教員：中田 和人 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

細胞小器官のひとつであるミトコンドリアは、呼吸酵素複合体を介した酸化リン酸化によって ATP を産生しており、独自のゲノム、ミトコンドリア DNA (mtDNA) を有する。mtDNA は細胞あたり数百～数千コピー存在し、呼吸酵素複合体 I、III、IV、V のサブユニットと、これらの翻訳に必要な tRNA や rRNA をコードしている。

一部の発がん性化学物質が核 DNA よりも mtDNA に結合しやすいとの報告等から、mtDNA に突然変異が蓄積することが、がん化の原因のひとつであるとする「がんミトコンドリア原因説」が提唱されている。しかし mtDNA は完全に母性遺伝するのに対し、がんは一般的に母性遺伝しない等の報告から、この説に対する異論も多く存在する。そこでこの説を検証するために、所属研究室の先行研究において、正常細胞とがん細胞との間で mtDNA を相互に置換したサイブリッド (cytoplasmic hybrid; 細胞質雑種) の作製が行われた。得られたサイブリッドの性質が評価された結果、mtDNA の由来に関係なく、がん細胞由来の核 DNA を有する細胞のみが造腫瘍性を示すことが明らかとなった。つまりこの実験により、用いた細胞におけるがん化の原因は mtDNA 変異ではなく核 DNA にあることが示唆された。しかし mtDNA 変異が、がんの悪性化へ関与している可能性が考えられたため、C57BL/6 (B6) 系統マウスのLewis肺癌由来細胞株である低転移性がん細胞 P29 および高転移性がん細胞 A11 との間で mtDNA を置換した実験が行われた。この実験では、A11 由来の mtDNA を有するサイブリッドは高転移性を示し、P29 由来の mtDNA を有するサイブリッドは低転移性を示した。そこで両者の mtDNA 配列の比較が行われた結果、mtDNA の点突然変異が、がん細胞の転移能を誘導するという、mtDNA 誘導性がん転移が提唱された。この先行研究でがん転移を誘導しようと報告されたのは、マウス mtDNA の G13997A 変異であったが、他にもがん細胞の性質に影響を及ぼす mtDNA 突然変異が存在する可能性は十分に考えられる。そこで、mtDNA mutator mice の+/mut マウスを代々かけ合わせて得た、生殖細胞系列にランダムな mtDNA 突然変異が蓄積している++マウスの血小板をマウス ρ^0 細胞に融合させて得たサイブリッドクローンを用いて、造腫瘍性と転移能が評価された。その結果、得られたサイブリッドクローンは、同一個体に由来する mtDNA を有しているにも関わらず、造腫瘍性や転移能において大きく異なる性質を示した。

そこで本研究では、がんの悪性化に関与する新規 mtDNA 突然変異を同定することを目的として、先行研究で得られたクローンの中で、特に造腫瘍性や転移能が著しく高いクローンを中心に、次世代シーケンサーによる mtDNA の塩基配列解析を行った。

【材料・方法】

先行研究で樹立されたサイブリッドクローンのうち、低度の造腫瘍性及び転移能を示した Clone1 (P29mt+/+1)、高度の造腫瘍性及び転移能を示した Clone5 (P29mt+/+5)、コントロールとし

て B6 系統のマウス由来の mtDNA を有する P29mtB6 を解析対象サンプルとした。Clone5 については、先行研究において転移能及び造腫瘍性が高いことが明らかとなったため、がんの悪性化に大きく関与する変異を有することが期待でき、これらの変異は腫瘍形成後や転移後に濃縮することが予想される。このことを検証するため、P29mt+/+5 の尾静脈注射によって肺転移を誘導し、その後肺結節から回収した P29mt+/+5iv を転移後サンプルとした。さらに P29mt+/+5 の背部皮下注射によって腫瘍形成を誘導し、そこから回収した P29mt+/+5sc を腫瘍形成後サンプルとした。これらのサンプルについて次世代シーケンサーによる mtDNA の塩基配列解析を行うことによって、がん細胞の悪性化に寄与しうる新規 mtDNA 変異の同定を試みた。

【結果・考察】

上記 5 種のサンプルについて解析を行った結果、変異含有率 50%以上の点突然変異を、呼吸酵素複合体や rRNA、tRNA 上など計 24 箇所見出した。そのうち Clone1 (P29mt+/+1) および Clone5 (P29mt+/+5, P29mt+/+5iv, P29mt+/+5sc1, P29mt+/+5sc2, P29mt+/+5sc3) に共通する変異が 12 個、Clone1 に特異的な変異が 7 個、Clone5 に特異的な変異が 5 個存在した。さらに Clone5 に特異的な変異については、転移後や腫瘍形成後に変異含有率が濃縮するという傾向が確認されたことから、特にこれらの変異はがんの悪性化に直接寄与しているのではないかと考えられる。その他、結果の詳細は発表会にて報告する。

【展望】

本研究では、がんの悪性化に寄与する可能性がある新規 mtDNA 点突然変異を複数見出したが、現時点ではサイブリッドを作製した際に、核 DNA にサイブリッドクローンおよび腫瘍の特性に影響を及ぼす突然変異が偶発的に起きた可能性を完全に排除することができない。そこで今後は、サイブリッドクローンの腫瘍形成能や転移能が、核 DNA 変異と mtDNA 変異のどちらによって誘導されたものであるかを明らかにすることを目的として、脱核融合およびサイブリッド作製を行う予定である。具体的には、サイブリッド P29mt+/+を脱核した細胞質体と、非転移性マウス繊維肉腫 B82 の mtDNA を除去した ρ^0 B82 を融合し、B82mt+/+を作製する。このサイブリッドを用いた検証実験やマウス生体における造腫瘍試験等を行うことによって、確認された点突然変異の性質を評価していきたいと考えている。

マウス培養細胞を用いた病原性突然変異型ミトコンドリア DNA の濃縮の試み

日比 保乃郁 (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】

ミトコンドリアは脂質二重膜構造を有する細胞小器官であり、内膜に存在する呼吸酵素複合体によって ATP を産生する。哺乳類のミトコンドリアには核 DNA とは異なる独自の環状二本鎖構造の DNA (mtDNA) が、細胞あたり数百から数千コピー含有されている。この mtDNA に病原性突然変異が生じ、そのような変異型 mtDNA が細胞や組織に高い割合で蓄積すると、ミトコンドリア呼吸機能 (ミトコンドリアにおける ATP 産生) が低下し、ミトコンドリア病と呼ばれる全身性の代謝疾患が発症する。

ミトコンドリア病の症例の中でも MELAS (Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) は最も罹患率が高い病型である。MELAS の症例では mtDNA にコードされた *tRNA^{Leu(UUR)}* 遺伝子領域に点突然変異が高頻度に生じていることが知られており、特に同遺伝子領域の A3243G 変異が MELAS の症例の約 80% で見出されている。近年、この A3243G 変異が糖尿病や難聴の症例でも見出されたことを受け、A3243G 変異による多様な発症機構の存在が注目されている。しかし、A3243G 変異を含有する病態モデルマウスが樹立されていないことから、有効な治療法の探索はもとより、A3243G 変異による多様な発症機構の理解は遅れている。

そこで本研究では、ヒト A3243G 変異と相同なマウス A2689G 変異を有する、病態モデルマウスの作製を最終目的とした。核 DNA と異なり、mtDNA にコードされた遺伝子の改変は極めて困難であり、CRISPR-Cas9 をはじめとした各種遺伝子改変手法をもってしても、未だに病態モデルマウスの作出には活用できていない。そこで本研究では、体細胞突然変異によって生じたわずかな変異型 mtDNA を濃縮し、その細胞質体をマウス ES 細胞に導入する細胞生物学的な手法を活用することにした。

【材料・方法】

A2689G 変異を有する病態モデルマウスの作製計画は以下の通りである。まず、A2689G 変異を高い割合で含有する培養細胞を脱核して得た細胞質体と、mtDNA を欠損させたマウス ES 細胞を融合させる。A2689G 変異を有する mtDNA をミトコンドリアごと導入したマウス ES 細胞を、マウス初期胚に移植してキメラマウスを作製する。雌のキメラマウスを野生型の雄と交配させ、全身に A2689G 変異を有する病態モデルマウスを誕生させる。

本研究では、この作製計画の出発材料である A2689G 変異を高い割合で含有する細胞の樹立を目指して、所属研究室の先行研究において作製された mutator mice の血小板と mtDNA 欠損培養細胞を融合させた細胞質雑種 (Cytoplasmic hybrid; Cybrid) を用いることにした。mutator mice とは mtDNA 複製酵素である DNA Polymerase γ (PolG) の校正機能を欠損させたマウスであり、加齢に伴って mtDNA にランダムに突然変異が生じることが知られている。先行研究で樹立された Cybrid には A2689G 変異を有する mtDNA が 0.0104% の割合で含有されていたため、本研

究ではこの Cybrid を出発材料として A2689G 変異を有する mtDNA を濃縮しようと考えた。

A2689G 変異を有する mtDNA を濃縮するために、mtDNA 複製阻害剤であるエチジウムブロマイド (EtBr) を用いた。Cybrid を 2.5 μ M の EtBr を添加した培地で 5 日間培養すると、mtDNA コピー数が減少し、その後、通常培地で 5 日間培養すると、mtDNA コピー数が回復する。このような mtDNA コピー数の減少と回復によるボトルネック効果を利用して、A2689G 変異を有する mtDNA の割合が増加したクローンを単離しようと考えた。mtDNA コピー数を回復させた後、シングルセルクローニングを行い、単離したクローンに含まれる A2689G 変異を有する mtDNA の割合を PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) によって解析した。

さらに本研究では、よりわずかな A2689G 変異を有する mtDNA の濃縮状態を検出するために dPCR の活用を検討した。dPCR の条件検討では、野生型と A2689G 変異のオリゴ DNA を用いて検出感度を検証した。

【結果】

これまでに (2024 年 1 月現在)、計 1,293 クローンを単離し、PCR-RFLP (検出感度 1.0% 程度) を行ったが、A2689G 変異を有する mtDNA の濃縮は確認できていない。

dPCR における A2689G 変異を有する mtDNA の検出のための実験では、少なくとも 0.3% 程度まで検出感度を向上させることに成功した。

【考察・展望】

所属研究室における別の変異型 mtDNA の濃縮研究において、1,728 クローンの単離を介して変異型 mtDNA の含有率を 0.4% から 95% 以上に濃縮することに成功している。本研究のように、極めて低含有率の変異型 mtDNA (A2689G 変異を有する mtDNA の含有率は 0.0104%) を濃縮させるためには、より多くのクローンの単離が必要であると考えられる。そこで今後は、クローン数を増やし、かつ、各クローンに含まれる A2689G 変異の含有率の解析に dPCR を用いることで、今までは検出できなかったよりわずかな A2689G 変異を有する mtDNA の濃縮状態を検出し、A2689G 変異を有する mtDNA を多含する Cybrid の樹立を成功させたいと考えている。

マウス卵母細胞から変異型ミトコンドリア DNA が消失する機構の検証

佐々木 悠馬 (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】

細胞内小器官の一つであるミトコンドリアは、内部にミトコンドリア DNA、通称 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 は体細胞で数百～数千コピー、成熟した卵で十万コピーほど存在するといわれている。また、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 が蓄積した場合、ミトコンドリアの呼吸機能が低下し、ミトコンドリア病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一種として、大規模欠失型突然変異がある。この欠失によって mtDNA 全長の約 1/3 が抜け落ちて短くなった mtDNA を Δ mtDNA と呼んでいる。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の樹立に成功しており、このマウスを Mito-mice Δ と呼んでいる。Mito-mice Δ は野生型 mtDNA と Δ mtDNA の両方を有しており、 Δ mtDNA の割合はマウスの個体ごとだけでなく、単一個体の臓器や細胞ごとにも異なる。

Mito-mice Δ では、 Δ mtDNA が母親から仔へ遺伝するため、系統維持することが可能である。雌の Δ mtDNA の割合が低すぎると、 Δ mtDNA はほとんど次世代に受け継がれず、高すぎると不妊になる。そのため、 Δ mtDNA の割合が 10~30% 程度の雌を野生型の雄と交配させることで Mito-mice Δ の系統維持を行なっている。この系統維持を通じ、「母親が若齢のときには、 Δ mtDNA を様々な割合で有する仔が得られるのに対して、母親が加齢すると、 Δ mtDNA が仔に伝わらなくなる」という現象が明らかになっている。

そこで、本研究では、「いつ Δ mtDNA が消失するのか」を検証した。この問いに関しては、「仔に Δ mtDNA が伝わらなくなる月齢はいつか (個体レベル)」と、「 Δ mtDNA が消失する卵胞のステージはいつか (細胞レベル)」という 2 つの意味合いがある。個体レベルの「いつ」に関して、先行研究により、「母親が 6 ヶ月齢を超えると、仔に Δ mtDNA がほとんど伝達されない」ということが明らかになっている。細胞レベルのいつに関して、卵が Δ mtDNA を含んでいる場合、①卵が排卵されない②受精できない③発生過程で致死に至るという 3 つの仮説が立てられるが、「母親が加齢しても、産仔数の減少はみられない」ため、②と③の仮説は棄却される。したがって、①の仮説を検証するため、排卵に至るまでの卵の形成過程に焦点を当てて解析した。

【方法】

・卵巣を用いた組織学的解析

野生型マウスと 10~30% の割合で Δ mtDNA を有する Mito-mice Δ の雌から、2 ヶ月、4 ヶ月、6 ヶ月時点で卵巣を採取し、連続切片を作製した。それらの切片に対してヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色を行い、卵巣の中心付近 260 μ m の範囲に含まれる原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞の数をカウントした。

・単一卵母細胞における Δ mtDNA の定量

生殖系列の細胞のみが GFP 陽性になる Stella-GFP マウスを、京都大学の斎藤通紀教授より提供して頂き、Mito-mice Δ の雌と交配させた。得られた産仔のうち、10~30% の割合で Δ mtDNA を有する雌に対して、様々な月齢で過排卵処理を行い、排卵した卵と、卵巣中に含まれる様々な発達段階の GFP 陽性卵母細胞を、顕微鏡下ハンドピックにより採取した。採取した卵と卵母細胞に含まれる Δ mtDNA の割合を定量した。

【結果・考察】

詳細な結果と考察については発表会にて報告する予定である。

腸内細菌由来機能未知酵素に関する研究

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

【背景・目的】

近年、腸内細菌が宿主の健康に対して大きな影響を与えることが明らかになってきている。その一つの要因は、食物に含まれる化合物を腸内細菌が代謝し、その代謝産物が宿主に対して生理活性を示すことである。したがって、腸内細菌がもつ代謝酵素機能の解明は、医療や製薬などの分野において重要な意義をもつと考えている。

カテキンはフラボノイドの一種であり、お茶、リンゴ、プラム、ココア、赤ワインなどの様々な食用植物に含まれており、血圧上昇の抑制や、血中コレステロールおよび血糖値の調節、抗酸化作用などヒトの健康に関わる様々な活性を示すことが知られている。カテキンの腸内細菌による分解・代謝に関する報告はいくつか存在するものの、代謝酵素についての報告はほとんどなされていない。

本研究室では、腸内細菌由来のカテキン代謝酵素の新規発見と機能解明のため、ヒト腸内細菌を対象に、候補となる遺伝子の絞り込みおよび同定を行ってきた。これまでに、(+)-カテキンから代謝産物 C1 が代謝されること、C1 から代謝産物 C2 が生成されることされることが明らかになっているが、C1 から C2 の反応を触媒する酵素は未だ特定されていない。

本研究では、カテキン代謝産物 C1 を代謝する酵素の同定を目的として、候補遺伝子 X の異種発現と機能解析を試みた。

【方法】

腸内細菌からの DNA 抽出

脱酸素剤で嫌気状態を保った密閉容器内で、GAM 培地で満たしたねじ口試験管に腸内細菌を植菌し 37°C で 2 日間培養した。培養した菌体を遠心分離し、キットを用いて DNA を抽出した。

目的遺伝子のクローニング

目的領域のプライマーを作成し、2 ステップ PCR でクローニングした。PCR 溶液をアガロースゲル電気泳動し、目的バンドの切り出しおよびゲル抽出を行った。得られたインサートを *Nde*I と *Xba*I によって制限酵素処理した大腸菌発現用プラスミドにクローニングした。

大腸菌での目的遺伝子の発現

構築したプラスミドを大腸菌コンピテントセルに形質転換し、培養した。集菌した菌体を破碎し、遠心して無細胞抽出液を得た。それを SDS-PAGE に供した。

C1 との反応

無細胞抽出液と休止菌体液（培養後の菌体を緩衝液で懸濁したもの）それぞれに C1 を添加し、37°C で一晩インキュベートしたのち、反応溶液を高速液体クロマトグラフィ (HPLC) に供した。

【結果・考察】

SDS-PAGE では、無細胞抽出液において目的遺伝子由来するタンパク質の明瞭なバンドは確認されなかった。また、HPLC の結果、無細胞抽出液、休止菌体どちらの反応についても C1 の減少は確認されなかった。可溶性画分の発現量増加を目的に、金属イオンの添加やエタノールの添加を行ったが、発現量は増加しなかった。

これらの結果から、宿主として大腸菌は目的遺伝子の発現に適していないことが示唆された。今回用いた腸内細菌はグラム陽性菌であり、さらにゲノム DNA が GC リッチである¹⁾。一方、大腸菌はグラム陰性菌であり、GC 含量も異なることから、腸内細菌の遺伝子を発現する宿主として、大腸菌は不適切である可能性が考えられた。そのため、今後はグラム陽性で GC リッチな放線菌を宿主にして酵素発現を試みる。

当研究室で開発された大腸菌 - 放線菌シャトルベクターを用いることで、プラスミド構築までを操作および培養が比較的容易な大腸菌で行い、酵素発現のステップを放線菌で行う予定である。

【参考】

- [1] 江崎孝行. (2006). 腸内に生息する細菌の系統. *腸内細菌学雑誌* 20: 237-244.
- [2] 藤澤倫彦. (2016). ヒト腸内グラム陽性細菌の分類の現状. *腸内細菌学雑誌* 30: 177-190.

発達期大脳皮質における IL-17 受容体の発現と ASD モデルにおけるその変化

神谷 沙羅 (筑波大学 生物学類)

指導教員：武井 陽介 (筑波大学 医学医療系)

【背景・目的】

精神疾患の原因と病態に免疫系の変調が関与しているという知見が集まっている。特にヘルパーT細胞17(Th17細胞)による免疫反応は、自閉スペクトラム症(ASD、自閉症)、統合失調症、うつ病などの精神疾患の病態に関与することが多くの臨床研究から示唆されている。これらの疾患患者の大脳皮質ではニューロンの配列や層構造の異常、シナプス密度・形態変化などが認められ、その機能異常の基盤となっていると考えられる。しかし、免疫反応がどのような過程で神経系に器質的变化を引き起こすのか不明な点が多く、Th17細胞の寄与については理解が十分に進んでいない。

炎症性サイトカインのインターロイキン(interleukin; IL-)17A産生細胞であるTh17細胞は、腸管の粘膜固有層に多く存在しており、細菌や真菌の感染に対する防御反応、関節リウマチや多発性硬化症などの炎症性自己免疫疾患に関与する。IL-17Aは、IL-17RAとIL-17RCのヘテロ二量体からなる受容体に結合し、NFκB、MAPK、C/EBPを含む下流経路を活性化させ、標的細胞の炎症応答を誘導する。

自閉症は、コミュニケーションの障害や常同的行動パターンが見られ、3歳までに発症する発達障害である。自閉症の環境要因のひとつに母体免疫活性化(maternal immune activation; MIA)がある。MIAは細菌・ウイルス感染によって母体免疫が一過性に活性化される現象である。MIAにより母体内で誘導されたIL-17Aが胎盤を通過し、胎仔脳に作用してASD病態を引き起こす可能性が示されている。また自閉症患者では血中IL-17A濃度が上昇しており、IL-17Aレベルと重症度が相関することが報告されている。しかし、血中IL-17Aの慢性的高値が中枢神経系に対してどのような影響を与えるかは不明である。中枢神経系におけるIL-17Aとその受容体の分布は複数の研究グループから報告されているが、一貫性がなく、現在も議論が続いている。本研究では、①発達期におけるマウス脳の*Il17ra*と*Il17rc*のmRNA発現を*in situ* hybridization(ISH)により調査し、②それぞれの分子を発現している細胞種を検討した。さらに③MIA自閉症モデルの中枢神経系で両者の発現・分布の変化が観察されるのか検討を行った。

【実験方法】

(1) 動物と脳切片作製

本実験には、生後(Postnatal day; P)0, 7, 14, 21, 28, 35日目、成体のC57BL/6Jマウス*Mus musculus*を用いた。所属研究室の先行研究に従い、MIA自閉症モデルは、妊娠12.5日目の雌マウスに20 mg/kgのポリイノシン酸ポリシチジル酸[poly(I:C)]を投与し、生まれた仔を自閉症モデルとした。コントロール群にはPBSを投与した。

マウスを開胸し、1×PBSで脱血後、4%PFA/0.1MPBで灌流固定した。抜脳後、4%PFA/0.1MPB中で一晚浸漬固定した。スライディングマイクロトームを使用して脳切片を作製した。

(2) *in situ* hybridization (ISH)

浮遊法でISHを行った。*Il17ra*と*Il17rc*のCDS内に2個ずつ(5'側と3'側)RNAプローブを設計した。シグナルを増強するため、

二つのプローブを混ぜて脳切片と反応させた。抗DIG抗体とNBT/BCIPでシグナルを検出した。

(3) 免疫組織化学染色

IL17受容体を発現する細胞種を同定するために、NeuN(ニューロン)、GFAP(アストロサイト)、IBA1(ミクログリア/マクロファージ)の抗体染色とISHの蛍光二重染色を行った。*mRNA*のシグナルはFastRed(赤色)で検出し、各細胞マーカーをAlexa488標識抗体(緑色)で検出した。

(4) 画像取得と統計解析

医学共通機器室に設置されているオールインワン型顕微鏡BZX-980(keyence)で写真撮影し、Photoshop(Adobe)を用いて画像処理を行った。JMP(SAS institute)で統計解析を行った。

【結果と考察】

P0, P7, P14, P21(離乳期), P28, P35, 成体の脳で*Il17ra*と*Il17rc*mRNAの発現を調査した。P7以降は、*Il17ra*は大脳皮質V-VI層、特にVIa, VIb層に強く発現していた。調査した発達段階の中ではP14でISHシグナルが最も強く、成体にかけて低下していた。一方、*Il17rc*は調査したすべての発達段階においてII-VI層に分布していた。*Il17rc*は新生仔期(P0~P7)で発現が高く、成体にかけてシグナルが低下する傾向を示した。*Il17ra*, *Il17rc*ともに明確な領野特異性は示さず、大脳皮質全体に分布していることが確認された。

IL17受容体を発現する細胞種を同定するために、各種細胞マーカーとの二重染色を行った。*Il17ra*はNeuN陽性の第VI層ニューロンの約60%に発現していることがわかった。Iba1陽性ミクログリアやGFAP陽性アストロサイトの一部の集団にも発現が観察された。*Il17rc*は、中枢神経系に広く分布していることや、IL17RA以外の複数種のIL17受容体とも複合体を形成するという報告を合わせて考えると、細胞種特異性は低く、多様なIL17シグナル経路に関与するのかもしれない。現在、*Il17ra*が皮質-視床投射ニューロンに特異的に発現しているのか検討するとともに、*Il17ra*と*Il17rc*のdouble ISHを実施し、両者を共発現する細胞の同定を行っている。

MIA自閉症モデルマウスでは、コントロール群と比較して、*Il17rc*の発現レベルおよびその分布パターンに大きな変化は認められなかった。一方、*Il17ra*はP14で顕著な発現低下が観察された。*Il17ra*は、生後の神経回路再編成が盛んな新生仔期から乳児期にかけて発現が強く、成体にかけて発現レベルが低下すること、自閉症モデルで乳児期に*Il17ra*の発現低下が顕著であることから、自閉症の顕在化に関与している可能性がある。

本研究では、予想に反してIL-17A受容体がニューロンに発現していることが明らかになり、IL-17Aとその受容体の中枢神経系における機能を理解する最初の手がかりを得ることができた。今後は、IL-17Aが大脳皮質形態形成にどのような影響を与えるかを直接調べるため、胎仔側脳室にIL-17Aを投与する実験を計画している。

炎症老化に応答した内在性レトロウイルスの発現動態の解析

赤羽 勇唱 (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】

炎症老化とは、DNA の損傷など、加齢に伴う様々なストレスを受けた細胞の形質が変化することによって、個体レベルで慢性的な炎症が引き起こされる現象である。老化形質を示す細胞からは、IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインをはじめとする種々の炎症応答関連物質が分泌されており、この現象は細胞老化関連分泌形質 (SASP ; Senescence-associated secretory phenotype) と呼ばれている。SASP による炎症性サイトカインの分泌は様々な加齢性疾患の発症に関連することから、加齢に応答した SASP 関連遺伝子の発現制御機構を理解することは、老化形質の進行を抑制する上で非常に重要である。

近年、加齢に応答してクロマチン動態や DNA 修飾によるエピジェネティックな転写制御が変化することにより、正常な細胞ではサイレンシングされている内在性レトロウイルス (ERV ; Endogenous retrovirus) の異常な発現が報告されている。ERV はレトロトランスポゾン的一种であり、太古のレトロウイルス感染の痕跡であると考えられている。ERV の異常発現は、自然免疫系を活性化することで炎症老化を誘導する可能性が示唆されているものの、その詳細なメカニズムは明らかではない。本研究では、ERV の発現制御に関わるエピジェネティックな要因として DNA のメチル化に焦点を当て、炎症老化に応答した ERV 発現動態の解析を目的とした。

【方法】

1. マウス由来培養細胞を用いた ERV の発現制御機構の解析
DNA のメチル化による ERV の発現制御機構を明らかにするため、NIH/3T3 細胞 (マウス胎児由来線維芽細胞)、および RAW264 細胞 (マウス腹水由来マクロファージ) に DNA メチル化阻害剤である 5-Aza-2'-deoxycytidine (5AzadC) を添加し、ERV の発現量を RT-qPCR 法により定量した。今回は先行研究に基づき、6 種類の ERV (MMERVK10D3, RLTR10D2, MERVL, ERVB5_1-I, ERVB5_1-ltr, MurERV4) を解析対象とした (Scheller M., *et al.*, *Nature Cancer*, 2021)。

2. RNA-seq 解析による ERV 発現量の比較

加齢に伴う ERV 発現量の変化を調べるため、28 週齢および 63 週齢の野生型マウスより末梢血単核細胞 (PBMC ; Peripheral blood mononuclear cells) を分離し、total RNA を抽出して RNA-seq 解析を行なった。また、DNA の脱メチル化に関わる *Tet2* 遺伝子を血球細胞特異的に欠損したマウス (*Vav1cre/Tet2flox* マウス ; 筑波大・坂田麻実子教授との共同研究) から分離した PBMC においても同様の解析を行なった。

【結果・考察】

1. マウス由来培養細胞を用いた ERV の発現制御機構の解析
本実験では、5AzadC を異なる濃度 (0, 30, 100, 300 nM) で NIH/3T3 細胞および RAW264 細胞に添加し、ERV 由来 mRNA の相対的な発現量を RT-qPCR 法により定量した (図 1)。また、

β -Actin 遺伝子を内在性コントロールとして用い、データを補正した。

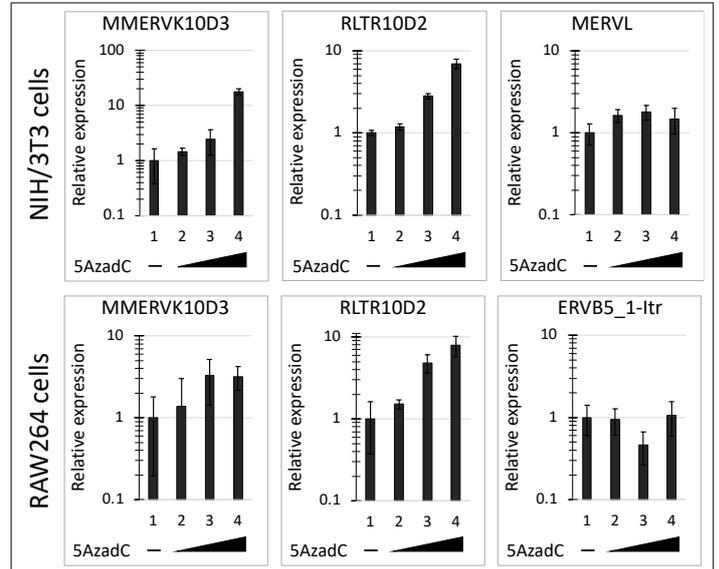


図 1. 5AzadC 処理による ERV 発現量の変化

実験の結果、MMERVK10D3 および RLTR10D2 は、線維芽細胞だけでなくマクロファージでも検出され、5AzadC の濃度依存的に発現量が増加した。よって、これらの ERV は免疫細胞を含む多くの細胞種において、DNA メチル化による発現抑制を受けている可能性が示唆された。一方、MERVL は線維芽細胞特異的に、ERVB5_1-ltr はマクロファージ特異的に検出され、5AzadC 処理によって発現量に顕著な差が見られなかった。よって、これらの ERV では DNA メチル化による発現抑制の影響が小さいと考えられた。

2. RNA-seq 解析による ERV 発現量の比較

現在解析を進めており、詳細は発表会にて報告する予定である。

【展望】

今後、RNA-seq 解析により得られたデータから、発現量の変化に基づいて ERV のクラスタリングを行う予定である。応答性の異なる各クラスターに対し、メチローム解析をはじめとしたエピゲノム解析を行うことで、炎症老化における ERV の発現制御機構を明らかにしていきたい。また、老化した個体の血球細胞では *Tet2* 遺伝子変異が頻繁に見られ、cGAS-STING 経路を介した慢性炎症を惹起することで加齢性疾患が誘導されることが報告されている (Xie J., *et al.*, *Leukemia*, 2023)。cGAS-STING 経路は細胞内二本鎖 DNA を認識することで炎症を惹起すると考えられているが、*Tet2* 遺伝子の変異により本経路が活性化されるメカニズムは明らかになっていない。したがって、ERV 発現の活性化に応答して cGAS-STING 経路が活性化される可能性についても検討していく予定である。

高タンパク質食摂取が筋損傷からの再生に及ぼす影響

沼尻 紘征 (筑波大学 生物学類)

指導教員：武政 徹 (筑波大学 体育系)

【背景・目的】

アスリートが受ける代表的な骨格筋の損傷として、肉離れがよく知られている。肉離れからの回復期間は通常の運動やトレーニングを行うことができず、期間が長引くほど脱トレーニング期間が長期化し、パフォーマンス低下を招くため、回復期間を短くすることはアスリートに限らず重要な課題である。

筋力トレーニングに対する栄養的介入として、タンパク質の積極的な摂取が一般的に推奨されている。トレーニング後のタンパク質摂取は筋タンパク合成の促進、筋力向上、ミトコンドリアタンパク質合成の促進など、骨格筋に対してポジティブな効果が報告されている (Camera, 2022)。筋損傷時は運動を継続することが困難なため、長期の不活動により筋萎縮や筋力低下が進んでしまうことになるが、タンパク質摂取は、筋タンパク質合成の促進により筋萎縮を抑制し、筋に対しポジティブな効果をもたらすことが報告されている (Fujita, 2015)。

筋損傷において、損傷した筋組織を結合組織が修復する過剰な筋線維化は問題であり、これにより再損傷を起こしやすい癒痕組織が残存してしまう。低タンパク食を継続摂取したマウスにコラーゲンペプチドを経口摂取させた実験では、組織内コラーゲン量が増加することが報告されている (Ito et al., 2013)。筋線維化に関与する組織はコラーゲン線維が主に占めているが、タンパク質の摂取量増加によって血漿アミノ酸濃度が上昇することが分かっており (Trommelen et al., 2023)、これが筋の線維化に関与すると私は予想した。高タンパク質食 (High protein diet; 以下 HPD) によって Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) シグナル経路が活性化することが報告されているが (Miyatake et al., 2020)、mTOR 活性化は線維芽細胞の肥大や分化促進にも寄与すると報告されている。また mTORC1 の阻害剤であるラパマイシンによる mTOR 阻害は線維芽細胞の増殖抑制を引き起こす (Alexander et al., 2015)。以上の点から、HPD は、筋損傷回復にネガティブな効果をもたらす効果があることが予想できる。

以上のことから、私は、HPD が筋損傷時の線維化を促進し、回復を遅延させることになるかと仮説を立てた。そこで、本実験では HPD が筋損傷からの再生に及ぼす影響について検討することを目的とする。

【方法】

7 週齢 C57BL/6 雄マウスを用いた。本実験では筋損傷モデルとして、前脛骨筋への Cardiotoxin (CTX) 注射を用いた。CON (通常餌) 群、HPD 群、CTX+通常餌群、CTX+HPD 群に分けた (各群 n=6)。1 週間の馴化飼育後、マウス左足前脛骨筋に CTX (10 μM) を 50 μL、右足に PBS を 50 μL 注射した。HPD 群は餌を HPD (オリエンタル酵母: 表 1) に変更した。4、7、14 日後に前脛骨筋を摘出した。摘出した筋サンプルは筋湿重量測定後、OCT コンパウンドで覆い、液体窒素で冷却したイソペンタン中で凍結させ、切片作成まで -80°C で保存した。

保存したサンプルは、クリオスタットを用いて厚さ 10 μm の切片を作成した。作成後、HE 染色を行った。切片を風乾させ、ヘマトキシリン溶液で 10 分染色した後、水道水で洗浄し、エオシン溶液で 30 秒染色し、水道水で洗浄後、100% エタノールで脱水した。

【結果・考察】

マウスのタンパク質総摂取量は、損傷後 4、7、14 日において、HPD 群が通常餌群と比較して有意に高値を示した。

前脛骨筋の筋湿重量は損傷後 4、7 日後において、PBS 注射群と比較して CTX 群で優位に低下していたが、通常餌群と HPD 群間で有意差は確認できなかった。

現在解析中の結果と考察については発表会で報告する。

表 1 通常餌、HPD の成分組成

成分	通常餌	HPD
水分(%)	8.1	9
粗タンパク質(%)	23.2	50
粗脂肪(%)	4.9	7
粗繊維(%)	5.9	5
粗灰分(%)	3.3	3.6
代謝エネルギー(kcal/100g)	355.7	364.6

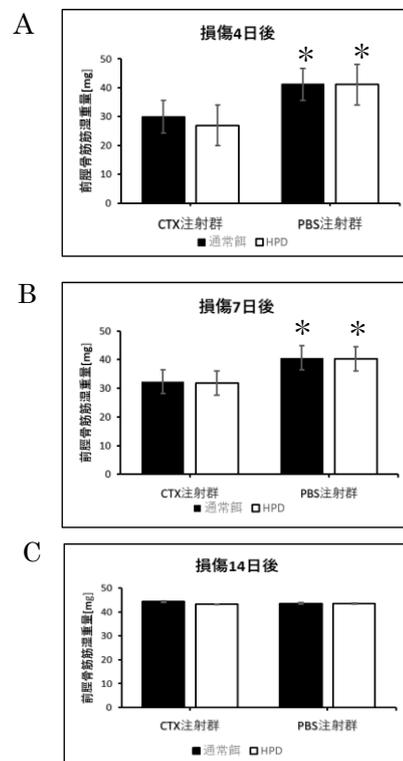


図 1 筋損傷後の筋湿重量の変化

A: 損傷 4 日後 B: 損傷 7 日後 C: 損傷 14 日後

機械学習によるメダカの遺伝子発現量の予測

古川 愛海 (筑波大学 生物学類)

指導教員：尾崎 遼 (筑波大学 医学医療系)

【背景・目的】

遺伝子が生体内において適切に機能を発現するために、時空間的な転写制御は不可欠である。特に真核生物においては、プロモーターやエンハンサーなどの転写制御領域によって遺伝子発現調節が行われる。遺伝子の転写制御領域と遺伝子発現に関する分野は情報科学を用いた研究がされており、深層学習や機械学習を用いた転写制御領域の予測モデルや、転写因子結合モチーフの研究開発が行われている。転写制御の先行研究は、ヒトやマウスなどのモデル生物に対しては盛んに行われている[1]のに対し、非モデル生物においてそのような研究はほとんど行われておらず、ゲノム配列やオミクスデータに関するデータベースが整備されていない。

そこで、非モデル生物のゲノム配列から転写制御領域を予測するモデルの構築を見据え、本研究では、非モデル生物の1種であるメダカの転写制御領域から遺伝子発現量を予測するモデルをメダカの転写制御領域の遺伝子配列から遺伝子発現量を予測する機械学習モデルを構築することを目的とした。

【材料】

メダカの転写制御領域配列(入力値)

メダカ(*oryzias latipes*)の転写開始点の上流 1000bp と下流 1000bp の合計 2000bp の塩基配列を転写制御領域の配列とし、遺伝子ごとに UCSC Table Browser からダウンロードした。

メダカの遺伝子発現量(予測値)

メダカの胚発生のステージごとの RNAseq データを用いた[2]。データの分散を減らすために、全てのデータに 1 を足し、10 で対数をとったステージ 11 とステージ 40 の数値を実験に用いた。

対象とした遺伝子

転写制御領域と発現量のデータの両者が揃っている遺伝子を用いた。また、対象遺伝子から Y 染色体およびミトコンドリアゲノムの遺伝子を除いた。さらに、適切な予測の検証を行うために、全てのサンプルでの発現量が 0 である遺伝子は除いた。最終的に 11203 の遺伝子を対照とした。

【方法】

データセットの作成

対象の遺伝子データのうち、8 割を訓練データ、2 割をテストデータとした。リーキング (テストデータの情報が訓練データに不適切に含まれること) を防ぐために、訓練データセットの遺伝子の中で、テストデータセットの遺伝子領域に重なるものは除いた。その上で、全ての遺伝子において発現量から対象サンプルの訓練データの平均値を引いた数値を実験用の遺伝子発現量とした。また、下記で用いるモデルには塩基配列をそのまま入力できないため、転写制御配列を長さ 3,4,5 の部分配列の数である 3,4,5-mer のカウントデータ、または、遺伝子配列のベクトル化処理である GENA-LM[3]による 1024 次元の数値ベクトルに変換した。

機械学習モデルによる計算機実験

機械学習モデルには、random forest (RF) と XGboost を用いた。訓練データで発現量の予測を行うことでモデルの訓練を行い、訓練を行ったモデルでテストデータの予測を行い、モデルの精度の

評価を行なった。ハイパーパラメータは、`n_estimators`, `random_state`, `max_depth` の 3 点について手動で調整した。結果の評価には、テストデータにおける実際の発現量の値と予測値の差の 2 乗である平均二乗誤差(MSE)と、実際の発現量の値と予測値の相関係数を利用した。MSE が低く、相関係数が高い予測が精度の高い予測であると言える。

【結果・考察】

入力処理とモデルの組み合わせにおいて、最も正確に予測できたのは GENA-LM のベクトル表現と RF の組み合わせであった。ステージ 11 のサンプルに関して相関係数 0.55、MSE 0.024 という精度で予測が可能であった。また、1 つの遺伝子配列入力から 2 つのサンプルの発現量を予測するモデル(multiple-output model)で最も精度が高くなった。

最も精度が高かったモデルを用い、野生型の転写制御配列に一塩基置換を入れた変異配列を入力とした際に遺伝子量の予測がどのように変化するかを調べる *in silico mutagenesis* 実験を、ステージ 11 で特異的に発現している上位 100 遺伝子に対して実施した。その結果、特に、G や C に置換した際に発現量が上昇するという傾向が見られた。

さらに転写開始点の付近では配列に変異が加わると発現量が下がるという既存知識から、特に転写開始点の付近において変異を加えた配列からの予測値が元の配列からの予測値よりも低下するという仮説を立てた。しかし、予想に反して変異を加えた配列の予測値の変化は転写開始点からの位置と関係ないということがわかった(図 1)。

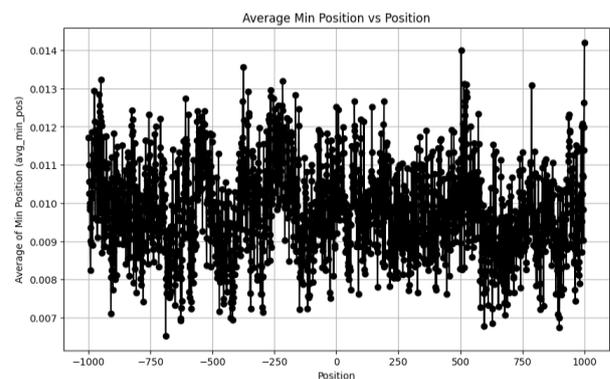


図 1 変異を加えた塩基の位置(x 軸の 0 が TSS)と変異による予測値変化の関係

【展望】

変異に対する予測値の変化を求め、転写制御配列の中で遺伝子発現量予測に対して影響力の高い部分配列を同定したい。そのような部分配列は転写調節領域である可能性が高いため、その部位を予測するモデルを作ることによって、メダカの転写調節領域を予測することができるのではないかと期待される。

【参考文献】

- [1] Eraslan et al., Net Rev Genet 20, 389-403, 2019
- [2] Li Y et al., Genome Res, 30(6) 924-937, 2020
- [3] Veniamin F et al., bioRxiv, 544592, 2023

Sleepy / Dreamless ダブルヘテロ変異マウスの睡眠覚醒と脳波

矢内 果穂 (筑波大学 生物学類)

指導教員：柳沢 正史 (筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構)

【背景と目的】

睡眠は、生存に不可欠な行動として、高等動物に広く保存されている現象である。しかし、睡眠のメカニズムに関しては、未だ不明な部分も多い。

マウスの睡眠は、脳波 (electroencephalogram; EEG) の状態によってレム (Rapid Eye Movement: REM) 睡眠とノンレム (non-REM) 睡眠という2つの睡眠段階がある。レム睡眠は覚醒時に似た高周波な脳波状態を特徴として持つ。ノンレム睡眠は0.5~4 Hzの高振幅、低周波の脳波によって特徴づけられる。いずれの睡眠段階においても、筋電は消失する。また、ノンレム睡眠時に見られるデルタ波のパワースペクトル (デルタパワー) の大きさは、睡眠要求を示す指標として有効とされている。

これまで、我々の研究室では、マウスを用いた大規模な睡眠遺伝子のスクリーニングを実施しており、これまでに睡眠制御に関わる遺伝子として *Sleepy* (*Slp*) 変異 *Sik3* と *Dreamless* (*Drl*) 変異 *Nalcn* を新たに同定した。

キナーゼタンパク質である SIK3 をコードしている *Ski3* 遺伝子に *Slp* 変異が生じているマウス個体では、覚醒時間の減少と、ノンレム睡眠時間の増加が見られるとともに、ノンレム睡眠時のデルタ波成分の増加も認められた。

電位依存的非選択的陽イオンチャネル NALCN をコードしている *Nalcn* 遺伝子に *Drl* 変異が生じているマウス個体では、レム睡眠時間の減少と、レム睡眠のエピソード継続時間の減少が見られた。

ノンレム睡眠とレム睡眠の、相互影響については、検討が無く、それらの関係性は解明されていない。そこで本研究では、ノンレム睡眠に量的変化を起こす *Slp* 変異とレム睡眠に質的变化を生じさせる *Drl* 変異を同時に持ったマウスの睡眠を調べることで、レム睡眠とノンレム睡眠の相互の関係の理解の一助となる知見が得られると考えられた。

【方法】

(1) *Sleepy/Dreamless* ダブルヘテロ変異マウスの作成

Slp ホモ変異個体の卵と *Drl* ヘテロ変異個体の精子を用いて、IVF (体外受精) を行った。得られた仔から *Slp* ヘテロ変異個体の雌と雄、*Sleepy/Dreamless* ダブルヘテロ変異個体の雄と雌から10匹の計40匹を実験材料に選んだ。

生後8~11週目に、マウスの頭部に脳波測定及び筋電測定用の電極を外科手術により取り付け、2週間以上の回復期間の後に睡眠測定を行った。睡眠測定では、生理的な睡眠状態と、6時間の断眠後に、脳波・筋電をベースとして、睡眠の記録を行った。

(2) *Sleepy/Dreamless* ダブルヘテロ変異マウスの睡眠の解析

マウスは自由飲水・採餌下で12hごとの明暗サイクルのもと飼育された。睡眠測定は48h実施した。記録された脳波と筋電は20秒ごとのエポックで区切り、脳波成分と筋電位の情報から覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠の3つの状態のいずれか判定を行った。なお、*Sleepy/Dreamless* ダブルヘテロ変異マウスに対しては、

抽出した2について、4秒ごとのエポックで区切る方法での解析も行った。

(3) ビデオ撮影

解析後、*Sleepy/Dreamless* ダブルヘテロ変異マウスの1個体において、脳波・筋電の再測定を行った。その際、測定に並行して無人のビデオ撮影を行い、マウスの行動を観察した。

【結果】

Slp ヘテロ変異マウスに比べて、*Sleepy/Dreamless* ダブルヘテロ変異マウスでは、レム睡眠のエピソード継続時間が優位に減少していることが確認された。

Sleepy/Dreamless ダブルヘテロ変異マウスにおいて、覚醒中に2秒前後、5~6 Hzほどの脳波が発現する脳波が頻発していることが、解析中に偶然発見された。その脳波の際、筋電は消失していた。(図1)

撮影されたビデオと、同時期の脳波・筋電を照合したところ、図1様の脳波・筋電で筋電が消失しているエポックでは、マウスの動きは止まっていることが明らかになった。この活動停止中、確認できたエポックにおいて目は開かれたままであることが確認できた。

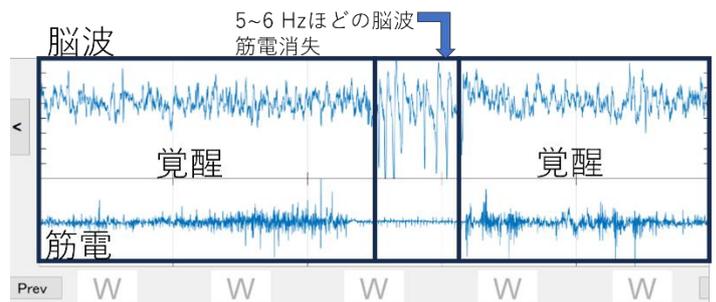


図1 *Sleepy/Dreamless* ダブルヘテロ変異マウスで特に頻発して見られる脳波と筋電

【考察・展望】

Sleepy/Dreamless ダブルヘテロ変異マウスの睡眠は、*Slp* 変異個体と *Drl* 変異個体の双方の睡眠の特徴を示すことが明らかになった。

図1様の脳波・筋電にはてんかん患者に見られる欠伸発作との共通点がいくつか見られる。よって図1に示される現象はてんかんに類似した状態である可能性が考えられる。今後、てんかんの治療に用いられる薬剤の1つであるパルプロ酸ナトリウムを *Sleepy/Dreamless* ダブルヘテロ変異マウスに投与し、図1様の脳波・筋電の発生回数の変化を調べることを計画している。

哺乳動物の受精後刷り込みメチル化は種や遺伝子座をこえて保存されているか

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

【背景】

ヒトを含む哺乳動物は、父親と母親からそれぞれ1セットずつゲノムを受け継ぎ、両アレルの遺伝子は仔で等しく発現する。しかし、一部の遺伝子は例外的に、由来する親の性に依存した片側アレル性の発現を示し、同現象は「ゲノム刷り込み」と呼ばれる。どちらの親由来の遺伝子が発現するかは、遺伝子周辺の刷り込み制御領域 (Imprinting control region; ICR) における DNA メチル化状態が両親由来で異なることで制御され、ヒトやマウスでは、母由来で高メチル化である ICR は 20 個程度、父由来で高メチル化である ICR は、*H19*ICR、IG-DMR、*Rasgrf1* の3つのみが知られる。刷り込み発現は胎児の成長を促進、または抑制する遺伝子によくみられるため、哺乳動物の正常な発生や成長に必須である。

受精後の初期発生胚は、ゲノム全体が DNA 脱メチル化されることで分化多能性を獲得する。しかし ICR では、一方の配偶子のみで獲得した DNA メチル化が、ゲノム全体の脱メチル化に抵抗して維持される。所属研究室では、*H19*ICR が精子でのみメチル化を獲得し、それが受精後も維持されるメカニズムを理解するために、マウス *H19*ICR の DNA 配列をもつトランスジェニックマウス (TgM) を作製した (図 1A)。その結果、予想外に、同配列は精子ではメチル化されず、受精後の初期胚でメチル化された (図 1B)。この現象は、内在 *H19*ICR の挙動とは異なっており、新たに「受精後刷り込みメチル化」と名付けられた。

*H19*ICR 配列内で受精後刷り込みメチル化に必要な DNA 配列を同定するためには、同配列を、共通の機能をもつ他の DNA 配列と比較することが有益だと考えられた。そこで、このような候補として、マウス *H19*ICR に相対性が高いラット *H19*ICR 配列、および、*H19*ICR と同様、父由来で高メチル化となるマウス IG-DMR について、それぞれ TgM を作製した (図 1A)。その結果、ラット *H19*ICR 配列 (2,809 bp) は、マウスで同定した受精後刷り込みメチル化に必要なとされる 118 bp 配列と相同な配列 (113 bp) を含むにも関わらず、受精後刷り込みメチル化が起らなかった。一方、父由来アレルでの高メチル化維持に必要なことが報告された 216 bp のリピート配列を含むマウス IG-DMR 配列 (2,674 bp) は、受精後に父由来アレルでのみ高メチル化された。ところが、同配列は胚盤胞期以降、低メチル化であるべき母由来アレルで高メチル化されてしまった。これらの結果より、両配列には、完全な受精後刷り込みメチル化に必要な配列が含まれていないことが考えられた。

そこで私の卒業研究では、以前の DNA 断片よりも塩基配列を伸長した新しい断片を用いて TgM を作製し、受精後刷り込みメチル化に必要な制御配列を同定することを目的とした (図 1A)。まずラット *H19*ICR 配列は、その後の研究から、新たにマウス *H19*ICR の受精後刷り込みメチル化に重要と考えられた配列を含むように伸長した。一方、マウス IG-DMR については、他研究グループによって最近報告された、母由来アレルでの低メチル化の維持に必要な配列を含めた。

【方法】

新たに作製した各配列は、巨大な酵母人工染色体 (Yeast Artificial Chromosome; YAC) の内部に挿入した。YAC への挿入には Tg を位置効果から保護する目的がある。位置効果とは、Tg がゲノム上に挿入された位置の違いによって、その活性や機能が変化する現象である。本研究では、研究対象の断片と、YAC 外側のマウスゲノム配列との距離が十分に離れることで、各配列が周囲のゲノムからの影響を受けにくくなることを期待した。また、両配列は異なる 2 種類の loxP 配列 (loxP5171 及び loxP2272) で交互に挟まれるように連結した上で、YAC に挿入した。酵母より YAC-DNA を精製した後、顕微注入法によりマウス受精卵に導入した。得られた仔マウスのうち、Tg を 1 コピーもつ個体を定量 PCR により同定した。その後、同 YAC-TgM と、卵でのみ Cre 酵素を発現する Zp3-Cre TgM との交配により、マウス生体内での Cre-loxP 組換え反応を誘導した。その結果、次世代で、ラット *H19*ICR 配列、または、マウス IG-DMR 配列どちらか一方のみをもつマウスが得られた。今後、これらの Tg を父由来、あるいは、母由来で受け継ぐマウスについて、bisulfite sequencing 法とメチル化感受性定量的 PCR 法を用いることで、そのメチル化状態を調べる計画である。

【結果・展望】

現在までに、ラット *H19*ICR、あるいは、マウス IG-DMR 配列をもつ TgM がそれぞれ 3 系統ずつ得られており、今後、父、または母から受け継がれた Tg のメチル化状態を調べる。

ラット *H19*ICR Tg で受精後刷り込みメチル化が起こる場合、伸長した配列内に重要な領域が含まれる可能性がある。また、マウス IG-DMR Tg で母由来の低メチル化状態が胚盤胞期以降も維持される場合、他研究グループが報告した配列が重要である可能性がある。種間での *H19*ICR 同士の比較や、異なる遺伝子座 (*H19*ICR と IG-DMR) 間の比較をすることで、受精後刷り込みメチル化に必要な配列の探索をおこなう。

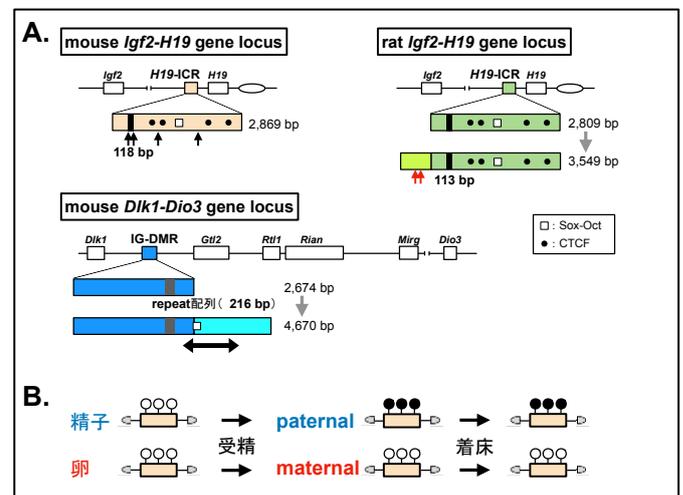


図 1 A. TgM 作製に用いた DNA 断片

B. マウス Tg *H19*ICR でみられた受精後刷り込みメチル化

老化因子が血管周囲のミクログリアに与える影響

山下 直輝 (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】

ヒトやマウスの脳では老化に伴って認知機能が低下することが知られており、その主な要因として神経炎症の亢進が挙げられる。神経炎症は脳内の免疫担当細胞であるミクログリアによって媒介されており、老化した脳ではミクログリアの活動が過剰になることで炎症が亢進している。先行研究では炎症に関わる老化促進因子として β 2-microglobulin (B2m) が同定されている。B2m は MHC クラス I 分子のサブユニットとしてほとんどの有核細胞表面に発現し、その一部は細胞外へ遊離している。脳内において B2m はミクログリアで多く発現しており、発現量は加齢とともに上昇する。また血中および脳脊髄液中の B2m 濃度が加齢に伴って上昇すると認知機能の低下が起こることが報告されている。しかし、ミクログリアの B2m 発現上昇と、ミクログリア周囲環境の B2m 濃度上昇のどちらが炎症の制御に重要であるかは明らかでない。そこで本研究では、B2m がミクログリアを制御し、老化表現型を引き起こす分子メカニズムの解明を目的とした。

【実験方法】

(1) プラスミド作製

B2m をマウス (C57BL/6) 脳 cDNA ライブラリからクローニングして、pCS4 ベクター (pCS4-mCherry) の BglIII の制限酵素サイトに組み込んだ。

(2) 遺伝子導入

ヒト胎児腎細胞 (HEK293T) とマウスのミクログリア細胞株 (BV2) を用いて実験を行った。HEK293T は DMEM、BV2 は DMEM/F12 を培地として用いた。リポフェクション法により B2m-mCherry を細胞に遺伝子導入した。トランスフェクション試薬には 1.0 mg/mL Polyethylenimine MAX (Polysciences) を用いた。

(3) ウェスタンブロッティング

サンプルとして培養上清と細胞抽出液を回収した。培養上清は、条件培地から 100 μ L 回収して 3000g で 5 分間遠心を行い、上清 90 μ L を回収した。細胞抽出液では、細胞を冷却した PBS で洗浄した後、Lysis Buffer を用いて細胞を溶解した。回収したサンプルに Sample buffer を添加し、3 分間ボイルを行った。サンプルはアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、Transfer buffer を用いて PVDF 膜へ 100V で 60 分間の転写を行った。PVDF 膜は、5% スキムミルク/TBS-T でブロッキングした後、5% BSA/TBS-T に希釈した一次抗体を 4°C で一晩反応させた。一次抗体には、抗 RFP 抗体 (1:1000, Rockland) 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。PVDF 膜を TBS-T で洗浄し、ケミルミワン Super (nacalai tesque) で検出した。

(4) RT-qPCR

total-RNA は Isogen II (Nippongene) を用いて抽出し、Revertra Ace (TOYOBO) と Random primer (TOYOBO) を用いて逆転写を行った。Thunderbird SYBR qPCR Mix

(TOYOBO) を用いて Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, 7900HT) で反応させ、5S をインターナルコントロールとして IL-1 β の mRNA の発現を定量した。

(5) 免疫細胞染色

カバーガラスに BV2 細胞を播種して遺伝子導入を行い、24 時間培養を行った後、PBS で洗浄してから 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/0.25% Triton X-100/PBS を添加して室温で 30 分間透過処理とブロッキングを行った。一次抗体として、抗 GFP 抗体 (1:1000, Abcam)、抗 RFP 抗体 (1:1000, Rockland) を用いて室温で 2 時間反応させた。PBS で洗浄した後、蛍光色素が結合した二次抗体を 30 分間反応させて染色した。核の染色には 1.0 μ g/mL DAPI (Dojindo) を用いた。得られたサンプルは蛍光顕微鏡 (Keyence, BIOREVO BZ-9000) を用いて観察した。得られた画像から、ImageJ を用いて共局在指数 (Pearson's value) を算出した。

【結果・考察】

まず、B2m と mCherry が融合したプラスミドを構築して HEK293T 細胞に導入し、ウェスタンブロッティングを行った。その結果、細胞だけでなく培養上清でも B2m が検出できた。以上の結果から、B2m が細胞外へ放出されていることが示唆された。

次に、細胞外へ遊離した B2m がミクログリアを活性化するかを検証するため、B2m を含んだ培養上清を BV2 細胞に添加して炎症反応を引き起こされるか解析した。B2m を加えてから 3 時間後に qPCR を行った結果、IL-1 β の mRNA 発現量がコントロールと比較して有意に増加していた。この結果から、細胞外に遊離した B2m がミクログリアの炎症反応を促進することが示唆された。

また、B2m の発現上昇がミクログリアの炎症反応を制御するか検証した。BV2 細胞に B2m を過剰発現させ、他の細胞小器官とともに免疫細胞染色を行って観察した。その結果、各細胞小器官と B2m の共局在指数を算出して比較したところ、リソソームのマーカーである LAMP 1 と顕著な共局在が観察された。マクロファージの研究では、B2m がリソソームに蓄積すると炎症反応が誘導されることが明らかにされており、ミクログリアでも同様の現象が起こっている可能性が考えられる。

以上の結果から、加齢に伴う B2m 濃度の上昇がミクログリアの炎症反応を促進する可能性が示唆された。今後は、外因性 B2m がどのような経路でミクログリアの炎症反応を促進しているのかを明らかにしていく。また、ミクログリアで発現上昇した B2m がリソソームに蓄積する可能性が示唆された。今後、内因性 B2m がリソソームに蓄積することで炎症の制御に関与しているか検証していく予定である。

脳室周辺のグリア細胞による脳実質の恒常性制御

宇野 めぐみ (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】

哺乳動物は、体温を一定の温度域に維持するために環境の変化に応じて体温制御を行っている。この体温制御機構は、脳の視床下部に存在する神経細胞によって制御されている。これまで当研究室では、体温制御に関わる候補因子として、RNA binding motif protein3 (RBM3) に着目してきた。RBM3は低温応答性のRNA結合タンパク質で、脳内では視床下部で強く発現することを見出している。また、このRBM3を全身で欠損させたRBM3ノックアウト (KO) マウスでは、低温刺激に対して体温が維持できなくなることから、RBM3は体温を一定に留めておく制御因子であることが示唆されている。しかしながら、脳内におけるRBM3発現制御機構の詳細は明らかになっていない。

先行研究から、哺乳動物におけるRBM3の発現は周期性を持ち、体温が低下する睡眠時に発現が上昇することが報告されている。興味深いことに、近年、睡眠時の哺乳動物の脳内では、脳と脊髄を循環する組織液である脳脊髄液 (CSF) の流量が増加することも報告されている。またCSFは様々な成長因子や栄養因子を含み、脳の恒常性維持に重要である。例えば、IGF1などの成長因子は、脳室壁の表面に存在する上衣細胞に取り込まれ、突起の先端に輸送される。上衣細胞は周辺のアストロサイトと相互作用することから、CSFから取り込まれた因子がアストロサイトを制御し、脳室近傍の神経細胞の機能を調節している可能性が考えられた。そこで本研究では、脳室のCSF流入に伴う上衣細胞とアストロサイト間の連絡が、神経細胞におけるRBM3発現を制御するかを解明することを目的とした。

【方法】

(1) 免疫組織染色

アストロサイトの解析は、アストロサイトをGFPで蛍光標識させた遺伝子改変マウス (ALDH1L1-GFPマウス) を使用した。P20のALDH1L1-GFPマウスを灌流し、脳を摘出した後に4% PFA/PBS溶液を用いて一晩浸透固定した。その後30%スクロース/PBS溶液で置換し、30%スクロース/OCT compound (1:1) で包埋した。その後クライオスタットを用いて厚さ30 μ mの冠状断面の切片を作製した。作製した凍結切片は、5%BSA/0.25%Triton X-100/PBS溶液を用いて室温で1時間処理した。染色は、アストロサイトを検出するため抗GFP抗体 (1:500) を、核を染色するためにDAPI (1:1000) およびHoechst33342 (1:1000) を用いた。染色画像は共焦点レーザー顕微鏡 (ZEISS, LSM710) でZ-stack画像を1 μ m間隔で30枚撮影した。

(2) エバンスブルーの局所投与

P20の野生型 (WT) マウスおよびRBM3 KO マウスに、CSF中のアルブミンを染色するエバンスブルーを局所投与した。はじめにイソフルランで麻酔し、脳定位固定装置 (Narishige, IMS-20, Narishige, SR-AM) に固定した。側脳室に注入するために、5 μ Lハミルトンシリンジ (Hamilton, 75N) をブレッグマからAP: +0.5

mm, ML: +1.0 mm, DV: -2.5 mmの位置に挿入した。その後エバンスブルーを0.2 μ L/minで1 μ L投与した。注入後、ハミルトンシリンジは逆流を防ぐために5分間静置した。注入後24時間後に灌流固定を行い、サンプルを作成した。

【結果】

はじめに、視床下部に位置する第三脳室周辺のアストロサイトの発現を観察するため、ALDH1L1-GFPマウスの免疫組織染色を行った。この際E18とP20という異なる発達段階のマウスを用いて、神経細胞やグリア細胞の分化が未完成な胎児期と、分化が完了した成熟期について比較実験を行った。その結果、E18ではALDH1L1陽性細胞は第三脳室周辺の上部で多く、下部ではほとんど観察されなかった。一方P20では一様な分布が観察された。このことから、成熟期と比べて胎児期ではアストロサイトが第三脳室周辺において特徴的な分布パターンを示すことが分かった。

次に、このような分布パターンとCSFの脳実質への流入場所に関係があるかを検証するため、P20のWTマウスにおいてエバンスブルーの局所投与を行った。その結果、エバンスブルーの脳実質への流入場所は各脳室で一様に観察された。P20のALDH1L1-GFPマウスではALDH1L1陽性細胞が一様に分布していることから、アストロサイトの分布とCSFの流入場所が一致していることが示された。

次に、CSFの脳実質への流入量がRBM3の発現の有無によって変化するかを検証するために、WTマウスとRBM3 KOマウスを用いて同様の実験を行った。その結果、RBM3 KOマウスの流入量はWTマウスと比べて減少していた。このことから、RBM3 KOマウスではCSFの脳実質への流入効率が低下している可能性が考えられた。

【展望】

本研究では、ALDH1L1-GFPマウスを用いて発達段階における第三脳室周辺のアストロサイトの異なる分布パターンを示した。今後は、P20のWTマウスにおける脳室周辺の上衣細胞や神経細胞の発現を観察するために、免疫組織染色を行いたいと考えている。また、TGF β やIGF1などの成長因子を導入したAAVを作成し各脳室に導入することで、上衣細胞とアストロサイト間の成長因子の連絡を観察したいと考えている。また、RBM3 KOマウスではCSFの流入量がWTマウスに比べて少なかったことから、CSF中の成長因子の透過性が低下している可能性が考えられる。RBM3は神経新生に働くことから、RBM3 KOマウスでも上記の実験を行うことで、CSFの流入に伴う成長因子の神経細胞への影響は、神経新生に関与するか明らかにしたいと考えている。

非定型カドヘリン Fat3 はプリン代謝と連携してミクログリアを制御する

上田 健太郎 (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】

脳は、多くの神経細胞とグリア細胞によって構成されている。グリア細胞はオリゴデンドロサイト、アストロサイト、ミクログリアの3つに大別される。中でもミクログリアは、脳内における免疫機能を担う常在型マクロファージとして知られている。近年、ミクログリアはシナプスの形成や刈り込み、神経細胞のアポトーシス誘導など、脳の発達に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。脳の発達過程においてミクログリアは著しく増殖し、その形態や機能を変化させていく。そして、互いに重なり合わないようにテリトリーを形成し、脳の恒常性維持に寄与している。これまで、所属研究室では、ミクログリア様細胞 BV2 において、プリン代謝産物であるヒポキサンチン刺激が細胞突起を安定化させることを発見し、その制御因子として非定型カドヘリンタンパク質 Fat3 を同定している。また、Fat3 ノックアウトマウスでは、ミクログリアの細胞突起が過剰形成されることも見出している。しかし、Fat3 がプリン代謝を介して成体ミクログリアを制御する分子メカニズムは不明であった。本研究では、Fat3 がプリン代謝と連携して、成体ミクログリアの状態変化に寄与する分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】

1. 免疫組織染色

野生型 (WT) マウスと Fat3 の C 末端に HA タグを挿入した Fat3-HA マウスをそれぞれ PBS で灌流し、脳を摘出した後に、4% PFA/PBS 溶液で浸透固定した。その後、30% Sucrose/PBS 溶液で置換し、凍結サンプルを作製した。凍結させた脳を、クライオスタットを用いて厚さ 50 μ m の凍結切片を作製した。作製した切片に 5% BSA/0.25% Triton X-100/PBS 溶液を添加し、室温で4時間、透過処理を行った。その後、抗 IBA1 抗体 (1:200) と抗 HA 抗体 (1:500) を用い、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。一次抗体反応後、蛍光色素が結合した二次抗体と核を染色する Hoechst (1:1000) を添加した。染色画像は、共焦点レーザー顕微鏡 (ZEISS, LSM710) を用いて取得した。

2. 共免疫沈降 (Co-IP)

HEK293T 細胞に Flag-Fat3 ICD と HA-HPRT の発現プラスミドを導入した。導入後、48 時間後に細胞を回収し、Lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) で溶解した。その後、十分に洗浄した Flag ビーズを加え、4 $^{\circ}$ C で3時間混和した。混和後、Flag ビーズを Lysis buffer で洗浄し、タンパク質をウエスタンブロットで検出した。

3. ウエスタンブロット

SDS-PAGE により、作製したサンプル中のタンパク質を分離し、PVDF 膜に転写した。その後、PVDF 膜を 5% スキムミルク/TBS-T を用いて blocking し、5% BSA/TBS-T で希釈した抗 HA

抗体 (1:1000)、抗 Flag 抗体 (1:1000) を用いて 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。一次抗体反応後、TBS-T で洗浄し、5% スキムミルク/TBS-T で希釈した二次抗体を室温で1時間反応させた。二次抗体反応後、化学発光検出試薬を用いて検出した。

【結果・考察】

Fat3 の細胞内ドメインは切断される

はじめに、Fat3-HA マウスを用いて、ミクログリアマーカーである IBA1 と HA の免疫組織染色を行った。その結果、Fat3 の C 末端はミクログリアの核近傍に局在していた。以上の結果から、脳内において Fat3 はミクログリア内で発現しており、細胞膜ではなく、切断されることで核近傍に局在する可能性が示唆された。

先行研究では、特定の膜タンパク質は切断されて断片化し、その断片が本来の機能とは異なる機能を持つことが報告されている。そこで、Fat3 も細胞内ドメイン (ICD) が切断されることで核近傍への局在が見られるのではないかと仮説を立てた。Fat3 ICD が切断されているかを検証するために、Fat3-HA マウス脳のウエスタンブロットを行った。その結果、Fat3 の完全長のバンドだけでなく、さらに分子量の小さいバンドが3つ検出された。最も分子量が小さいバンドは ICD よりも小さく、HA が ICD 側 (C 末端側) に存在していることから、Fat3 ICD は切断されることが推察された。

Fat3 ICD は HPRT と相互作用する

タンパク質間相互作用のデータベースにおいて、膜タンパク質である Fat3 が細胞質に存在している Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) と相互作用することが報告されている。HPRT はプリン代謝においてヒポキサンチン代謝反応を触媒する酵素である。また、所属研究室の先行研究で、ヒポキサンチン刺激によって Fat3 の発現量が上昇することを見出している。そこで、Fat3 は切断され、ICD は HPRT と相互作用すると仮説を立てた。これを検証するため、Co-IP を行ったところ、HA 抗体でブロットした Co-IP サンプルで HPRT のバンドが検出された。このことから、Fat3 ICD と HPRT が相互作用していることが示唆された。

本研究では、Fat3 がマウス脳内で切断され、断片化されることを見出した。さらに、Fat3 ICD がプリン代謝関連酵素である HPRT と相互作用することを見出した。これらの結果は、Fat3 断片が HPRT と複合体を形成し、ミクログリアの状態変化に寄与していることを示唆するものである。

【展望】

今後は、成体ミクログリアのテリトリー形成において、Fat3 の断片化がどのように関わるかについて検証を進めていく。また、以上の現象がプリン代謝を介して成体ミクログリアの維持に関与しているかについて明らかにしていく。

キイロショウジョウバエのメス生殖幹細胞に対する腸内細菌の影響

林 良祐 (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】

卵形成は、多くの生物にとって子孫を残すために重要な過程である。卵形成の活性は、季節や個体の栄養状態といった様々な外的・内的要因によって制御され、生物の生存と生殖のバランスを調節している。卵形成の制御機構の詳細を知ることは、生物の生存戦略を深く理解する上で重要である。その一方で、卵形成の制御に関わる分子経路や、経路同士の相互関係については未解明の部分も少なくない。

本研究ではキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、ショウジョウバエ) の卵巣に存在し、卵形成に必須である生殖幹細胞 (germline stem cell : GSC) に着目した。そして、GSC 制御に影響する新規因子の特定を試みた。ショウジョウバエのメス成虫において、GSC は卵巣を構成する管状の構造 (卵巣小管) の頭部側先端付近に存在し、非対称分裂によって将来卵に発達する娘細胞を産み出す。GSC の分裂頻度は、栄養状態によって変化する¹。また、交尾後に生じる GSC の増加は、腸由来のペプチドホルモンの作用を介する²。これらの報告から、私は GSC 制御に際して、腸のはたらきが重要であると考えた。他方、ショウジョウバエの腸内には宿主に様々な影響を与える腸内細菌が共生している。以上のことから、私は腸内細菌が宿主の GSC 制御に与える影響を明らかにしようと試みた。

【方法】

(1) 実験個体の飼育と腸内細菌の除去

ショウジョウバエの飼育に用いる餌に、抗生物質の amoxicillin (終濃度 100 µg/ml) および gentamicin (終濃度 50 µg/ml) の混合溶液を加えた。抗生物質添加あるいは未添加の餌を含むバイアルに、実験対象系統の未交尾のメス成虫 10~15 匹を移して、25°C で 4~7 日間飼育した。飼育期間の終了後にこれらのメス成虫を解剖して、卵巣を取り出し、GSC 数の計測や比較に用いた。

(2) 卵巣の免疫組織化学染色

各処理区で飼育したメス成虫の GSC 数を計測・比較するために、卵巣の免疫組織化学染色を行った。まず、1xPBS 中でショウジョウバエを解剖し、取り出した卵巣を 4%パラホルムアルデヒド in 1xPBS に加えて固定した。次に、1次抗体として抗 Hts 抗体、抗 Lamin-C 抗体、および抗 pMad 抗体を用いて、1次抗体反応を行った。さらに、Alexa 蛍光標識 2次抗体を用いて 2次抗体反応を行い、卵巣小管の頭部側先端の構造を可視化した。

(3) GSC 数の計測と比較

GSC 数の計測は、免疫組織化学染色を行ったサンプルを、蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss Axioplan2) 下で観察することで行った。抗 Hts 抗体、抗 Lamin-C 抗体、および抗 pMad 抗体は、それぞれ、生殖細胞特異的な細胞内構造体 (スペクトロソーム)、GSC に隣接する体細胞の一種 (キャップ細胞)、GSC の維持にはたらくシグナル経路中のタンパク質に結合する抗体である。これらの 1次抗体に対応した 2次抗体の蛍光を利用して、卵巣小管 1本ごとに

GSC を数え上げ、各処理区における GSC の平均個数を算出した。そして、ウィルコクソンの順位和検定によって処理区ごとの GSC 数の比較を行った。

【結果・考察】

まず、ショウジョウバエを用いた実験においてコントロール系統としてよく利用される *w¹¹¹⁸* について、実験を行った。一貫して抗生物質非処理の餌で飼育した群 (conventional : conv.)、幼虫期から解剖直前まで抗生物質処理した餌で飼育した群 (Antibiotics from Larva : ABL)、および幼虫期~蛹期は抗生物質非処理の餌で飼育し、羽化直後から 20 時間以内に抗生物質処理した餌に移して飼育した群 (Antibiotics from Adult : ABA) における GSC 数を比較した。その結果、conv. 群に対し、ABL、ABA 両群で GSC 数が有意に増加することが分かった。他方、ABL 群と ABA 群の間に GSC 数の有意な差は無かった。以上から、ショウジョウバエのメス成虫から腸内細菌を除去すると、何らかの経路を介して GSC が増加する、裏を返せば通常の餌による飼育条件下では、腸内細菌の存在が GSC を減少させる方向に影響していることが示された。また、成虫期以降のみの抗生物質処理でも GSC 数に影響することが分かったため、以降は conv. 群と ABA 群の比較を中心とした。

続いて、ABA 群における GSC 増加の原因となる宿主側因子の特定を目指し、交尾後の GSC 増加に必須である NPF (ペプチドホルモン) と OA (神経伝達物質) の受容体遺伝子変異系統について実験を行った。これらの分子が ABA 群における GSC 増加に関わっていれば、そのシグナルが機能しない系統では ABA 群における GSC 増加はキャンセルされる、という仮説のもと実験を行った結果、これらの系統においても ABA 群における GSC 増加は一貫して観察できた。したがって、交尾後の GSC 増加に関わるこれらの因子が、GSC に対する腸内細菌の影響の制御にも関わる可能性は低いと結論づけられる。

【展望】

現在、ショウジョウバエの神経ペプチド遺伝子変異系統を対象として、ABA 群における GSC 増加がキャンセルされる系統をとらえることを目的としたスクリーニングを進めている。一方で、ショウジョウバエの卵巣に共生する細胞内共生細菌である *Wolbachia pipientis* や、その感染除去に用いられる抗生物質のテトラサイクリンといった要因がショウジョウバエに与える影響を排せざにいる。そのため、今後はこれらの因子の影響を一つ一つ理解できる実験系の構築を目指したい。

【参考文献】

- [1] Lafever and Drummond-Barbosa (2005) *Science*, **309**, 1071-1073.
- [2] Ameku et al. (2018) *PLoS Biol.*, **16**, e2005004.

ゴマ由来生理活性物質の微生物代謝に関する研究

神村 和音 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小林 達彦 (筑波大学 生命環境系)

目的・背景

セサミンは抗酸化作用や血中コレステロール低下作用、脂質低下作用などの様々な生理活性作用を持つことで知られ、近年は機能性食品やサプリメントといった利用により注目を集めている。しかし、その代謝に関してヒトやマウスにおいては報告があるものの、微生物によるセサミン代謝や酵素が同定された例はなかった。よって本研究で微生物におけるセサミン代謝酵素の同定と精製が行われたところ、SesA という新規酵素によってセサミンがセサミンモノカテコール、ジカテコールへと変換されることが明らかとなった。さらにその後の研究によって、SesA 近傍遺伝子 ORF2, ORF3, ORFX, ORFXX によりセサミンジカテコールから段階的に化合物Dへと移行する一連の代謝経路が提案された。しかし、その中で化合物A, 化合物Bから化合物Cへの変換のために必要となる酵素、ORFXの詳細な働きについてはいまだ不明のままであった。そこで本研究ではORFXの諸性質解明を目的とした。

方法・結果

ORFX 諸性質解明のため、まず ORFX 反応の基質である化合物A, 化合物Bを大量に得ることを目的とした。化合物A, Bは安定性に欠け、研究室で長期間保存することは難しい。そのため、より安定なセサミンジカテコールから、ORF2, ORF3が触媒する反応によって化合物A, 化合物Bを手に入れることを考えた。そのために反応液の組成と反応条件を検討し、効率的に化合物A, 化合物Bを得る方法を調査した。結果的に、前任者が考案した組成では、セサミンジカテコールが過剰であったことが明らかとなった。前任者の組成に対してセサミンジカテコールを1/10量にしても、反応生成物量に大幅な差は見られなかった。よって、基質量をより削減できる効率的な組成であるとして、今後はセサミンジカテコール量を従来の1/10の量に変更してアッセイを行っていくこととした。また、反応液中のORF2の量を大幅に増やすことによって、単位時間中の基質から反応産物への変換がより活発になるのではないかと考えた。実際にORF2を10倍量添加することにより、反応時間中の基質減少速度および反応産物生成速度の大幅な増加という結果を得ることができた。しかし、その後の実験により2ステップ反応として働くORF2とORF3のバランスが乱れることにより、かえって非効率的な組成であったことが明らかとなった。さらに、その後の実験により、従来の組成においてもORF2が過剰であったことが判明したため、ORF2は従来の組成に対して1/5量添加することとした。

これまでの実験では前任者が精製し、-80℃保存されていた酵素を用いて実験を行っていた。酵素が残り少なくなっていたので、自分でもORF2, ORF3, ORFXXの精製を行った。各酵素遺伝子がクローニングされた発現用プラスミドを用いて大腸菌を形質転換し、培養した後に菌体を破碎して、遠心分離して得た無細胞抽出液を、2種類のカラムに供し分画した。各過程において得られたフラクションをSDS-PAGEに供することにより、目的タンパ

ク質の発現や精製の程度を確認した。最終的に精製に成功した酵素ORF2, ORF3を用いて同様のアッセイを行ったところ、セサミンジカテコールから化合物A, 化合物Bへの移行速度が飛躍的に上昇したことが明らかとなった。しかし、それから一か月半ほど経過した後に同じ組成でアッセイを行った場合、反応速度は約半分ほどに低下してしまった。このことから、ORF2, ORF3といった酵素は時間経過により比較的短時間で活性が低下してしまう可能性が示唆された。今後はこれらの酵素の再精製を行うとともに、活性を残したまま長期間保存する方法についても探していきたい。また、これまで先行研究から得られた知見と反し、ジカテコールからの代謝において化合物Dが観察できていなかったため、ORFXXの精製が不完全であると予想していた。しかし新たに精製したORFXXを用いた場合であっても同様に化合物Dは確認できなかった。いまだに先行研究で提案されたジカテコールから化合物Dまでの経路の観察ができていないため、これを目標としつつ、pH依存性や温度依存性、反応産物の同定といったORFXの諸性質解明を進めていきたい。

腸内細菌による植物由来生理活性物質の分解に関する研究

山本 一茶 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小林 達彦 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

カテキンはフラボノイド化合物の一種であり、緑茶などに多く含まれている。カテキンには抗酸化作用、抗腫瘍作用、抗菌作用などの生理活性があることが知られており、あらゆる疾患の予防に役立っている。経口摂取されたカテキンは、小腸ではほとんど吸収されず、大腸へと運ばれる。運ばれたカテキンは大腸内に生息する腸内細菌によって代謝される。腸内細菌によって産生される代謝産物の一部にも抗酸化作用や認知症予防といった生理活性が認められているものもあるため、カテキンを摂取することでもたらされる健康効果の発揮にはカテキンそのものだけでなく、その腸内細菌由来代謝産物も大きな貢献を果たしている可能性が考えられる。

先行研究により、カテキンはA細菌によってカテキンの環が開いたC-1およびC-2へと変換され、その後B細菌によりそれぞれ吉草酸やラクトンへと変換されることが明らかになっている。また、当研究室の先行研究により、C-1、C-2から吉草酸、ラクトンに変換されるまでの経路を解析するとともに、2つの中間産物(C-1-A, C-1-B/C-2-A, C-2-B)を同定している。

そこで私はB細菌により起こる反応の中でも、C-1-A/C-2-AからそれぞれC-1-B/C-2-Bへ加水分解される反応に着目した。この反応は酵素Xも酵素Yも触媒可能である。本研究ではこれらの酵素の諸性質解明を目的とした。

【方法】

酵素精製

目的遺伝子を導入した大腸菌を培養後、細胞破碎を行い、無細胞抽出液を調製した。その後、His trap カラムを用いて目的酵素を精製した。

基質の調製

反応液にC-1およびC-2と反応に必要な酵素と補酵素を加え、C-1-AおよびC-2-Aを生成した。その後、HPLCを用いて反応液の中からC-1-AおよびC-2-Aのみを分取した。

キネティックパラメーターの測定

さまざまな濃度の基質(C-1-A または C-2-A)と一定量の酵素を反応させることでできる生成物(C-1-B または C-2-B)をLC-MSで検出し、そこから得られるピーク面積から生成物量を求めた。求めた値からSV plotを作成し、 K_m , V_{max} , k_{cat} 等を算出した。

【結果・考察】

酵素精製

SDS-PAGEを行ったところ目的酵素の分子量付近に濃いバンドが見られ、精製に成功した。

基質の調製

分取したものをLC-MSを用いて分析したところ、目的化合物のみが大きなピークとして見られ、精製することができた。

キネティックパラメーターの測定

得られた K_m , k_{cat} の値から触媒効率を求めたところ、基質がC-1-Aのときは酵素Xの方が触媒効率が高かった。一方、基質がC-2-Aのときは酵素Yの方が触媒効率が高かった。このことより、腸内では酵素XがC-1-Aを生理的に代謝し、酵素YがC-2-Aを生理的に代謝していることが示唆された。

今後は酵素X、酵素Yの詳細な生化学的解析を行う予定である。

抗真菌化合物の生合成に関する研究

坂井 康平（筑波大学 生物学類） 指導教員：小林 達彦（筑波大学 生命環境系）

【背景・目的】

私は *Kitasatospora* 属の放線菌が生産するピエリシジン B1 Nオキシドとピエリシジン B5 Nオキシドという抗真菌化合物の生合成に関する研究を行っている。ピエリシジン類は殺虫作用をもつ化合物として発見された。その構造は、窒素を含む複素環に炭素鎖がついたような形をしている。また、Nオキシドという窒素に酸素が付加されている構造も有している。ピエリシジン類でNオキシドの構造をもつものはピエリシジン B1 Nオキシドとピエリシジン B5 Nオキシドの2種のみが確認されているが、ピエリシジンのNオキシド化酵素は未同定でその発見には新規性があると考えた。

よって、本研究室でスクリーニングされ単離・同定されたピエリシジン B1 Nオキシドとピエリシジン B5 Nオキシドを合成する *Kitasatospora* 属放線菌の1株に注目し、本株が持っていると考えているピエリシジン B1 とピエリシジン B5 を Nオキシド化する酵素の同定を目的とした。

【方法・結果】

まず、研究対象としている *Kitasatospora* 属の放線菌株がピエリシジン B1 を基質にピエリシジン B1 Nオキシドを合成していることを休止菌体を用いて検証した。標品として購入したピエリシジン B1 に本株の休止菌体を添加し Nオキシド化が進行するかを検討した。反応溶液を LC/MS を用いた質量分析法にかけることで、反応前には見られなかったピエリシジン B1 Nオキシドが反応後に見られるようになった。この結果から、本株によって、ピエリシジン B1 を基質としてピエリシジン B1 Nオキシドが生産されている可能性が示唆された。

また、基質であるピエリシジン B1 とピエリシジン B5 の大量精製および反応生成物であるピエリシジン B1 Nオキシドとピエリシジン B5 Nオキシドの定量のための検量線を作成しようと考えた。そのため、液体クロマトグラフィーを用いて基質と反応生成物を分取する方法について検討した。分取を試みるサンプルとしては菌体培養上清を選択した。液体クロマトグラフィーの条件検討も併せて行った結果、80%メタノール 20%0.05%ギ酸のアイソクラティックメソッドが充分分取したい化合物のピークを分離できており、このメソッドが適切であると判断した。結果的には、No.42 株培養上清を酢酸エチルで化合物抽出し、そこから反応生成物であるピエリシジン B1 Nオキシドとピエリシジン B5 Nオキシドの分取に成功した。一方で、同サンプルから基質であるピエリシジン B1 およびピエリシジン B5 は分取することができなかった。液体クロマトグラフィーでは基質を高い強度で検出することができず、単一のピークになっていなかったためである。

続いて、基質であるピエリシジン B1 とピエリシジン B5 は分取と並行して、ピエリシジン B1 Nオキシドとピエリシジン B5 Nオキシドから還元し獲得することができないかを検討した。結果として、(pinB)₂ と呼ばれる還元剤を用いることで比較的温和な条件でピエリシジン B1 Nオキシドとピエリシジン B5 Nオキシドをピエリシジン B1 とピエリシジン B5 へと還元することに成功した。

今後は調製した基質を用いて目的酵素の精製を行いたいと考えている。

二枚貝における2枚目の貝殻獲得をもたらした分子機構の解明

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

【導入】

軟体動物門は非常に多くの生物群を網羅する巨大な動物群であり、その外部形態は多様性に富んでいる。中でも二枚貝は2枚の貝殻を持ち、それらで柔らかい軟体部を覆うことで外敵から身を守り、繁栄してきた。二枚貝と比較的近縁で祖先形質である一枚の貝殻を持つ腹足類を比較すると、内部形態や発生初期の卵割パターン、割球運命などは似通っているが、貝殻の枚数は幼生の頃から既に違いが見られる。特に幼生期に背側に出現する貝殻腺領域の形態は大きく異なり、腹足類は楕円状である一方で、二枚貝はダンベル状であり、また、その正中線上にミネラリゼーションが起こらないと考えられる蝶番領域が存在する。このような貝殻腺形態、ひいては貝殻の形態の違いをもたらした分子発生プロセスの改変を解明するためには両者の貝殻腺の分子発生機構の丹念な比較が重要になってくる。二枚貝及び腹足類初期においては、貝殻腺領域は少なくとも3つの細胞領域に分かれることが知られている (Liu et al., 2020, Phuangphong et al., in prep; 図1)。しかし、腹足類・二枚貝類間におけるそれらの領域の対応関係は不明である。また、二枚貝の3つの細胞領域が貝殻形成後期におけるダンベル状の貝殻腺のどの領域を構成するののかも不明である。

本研究では、二枚貝・腹足類の貝殻腺形成初期における領域の比較、及び二枚貝における貝殻形成初期と後期における領域の対応関係の検証を目的とし、二枚貝における貝殻腺で発現する遺伝子群の発現パターンを観察し、その結果を腹足類の既知の細胞領域及び二枚貝の貝殻形成初期と後期間で比較した。

【材料と方法】

軟体動物二枚貝のムラサキインコガイ *Mytilisepta virgata* を茨城県平磯海岸で採集し、人工授精を行なった。受精によって得られた胚は、貝殻形成の初期 (12hpf) 及び後期 (16hpf) で固定した。これらの固定胚を用いて貝殻腺細胞で発現することが知られる遺伝子群の *in situ* hybridization を行ない、それぞれの遺伝子の発現パターンを観察した。具体的には転写因子として Hox1, Hox4, MIST, Engrailed2 (En2), GATA1/2/3、シグナル分子として Dpp, ミネラリゼーションに関わる遺伝子として CS, Tyrosinase (Tyr) の発現を観察した。

【結果】

まず、腹足類・二枚貝類間の初期の領域を比較するために上記遺伝子の初期における発現パターンを観察した。先行研究において二枚貝類マガキの貝殻腺領域では En2 が内側領域 (A/B) のマーカー、GATA1/2/3 及び Dpp が外側領域 (C) のマーカーとなっており、ムラサキインコガイにおいてもこれらのマーカー遺伝子の発現パターンを観察した結果、先行研究と同様にそれぞれ内側 (A/B) /外側 (C) の領域で発現していることが確認できた。続いて、上記遺伝子の発現を指標とし、腹足類の貝殻腺において内側 (A/B) で発現する Hox1, Hox4, MIST, Tyr 及び外側 (C) で発現する CS が二枚貝では内側/外側のどちらで発現しているのかを検証した。その結果、腹足類で外側の発現を示す CS は二枚貝でも外側 (C) で発現し、腹足類で内側の発現を示す遺伝子群は内側

(A/B) で発現していた。

次に二枚貝の初期と後期での領域の対応関係を検証するために上記遺伝子の 16hpf 胚の発現パターンの観察を行った。初期に外側で特異的に発現した遺伝子群 (CS, Dpp, GATA1/2/3) はいずれも貝殻腺を縁取る領域 (iii) での発現が見られ、CS, Dpp については蝶番領域 (i) での発現も観察された。また内側に特異的に発現した遺伝子群のうち、Hox1, Tyr も貝殻腺を縁取る領域 (iii) での発現が見られた。一方で MIST は貝殻腺内部の一部 (ii) のみで発現が観察された。En2, Hox4 は貝殻腺での発現が見られなかった。

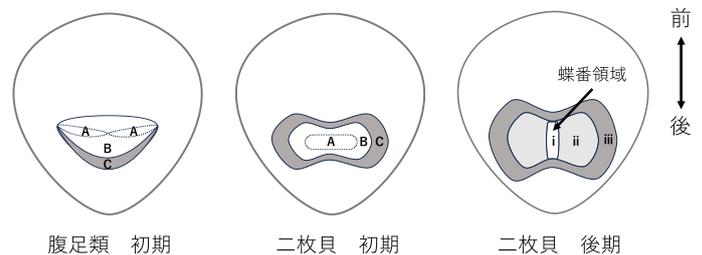


図1 腹足類初期及び二枚貝初期・後期における貝殻腺の形態

	Hox1	Hox4	MIST	En2	GATA1/2/3	Dpp	Tyr	CS
A/B	○	○	○	○	×	×	○	×
C	×	×	×	×	○	○	×	○
i	×	×	×	×	×	○	×	○
ii	×	×	○	×	○	×	×	×
iii	○	×	×	×	○	○	○	○

表1 二枚貝初期・後期における各遺伝子の発現パターン

【考察】

本研究の結果から、腹足類・二枚貝類の初期の貝殻腺領域において、いずれも CS は外側の領域、Hox1, Hox4, MIST, Tyr は内側の領域で発現していることが明らかとなった。このことは腹足類と二枚貝の発生初期の貝殻腺の内側 (A/B) と外側 (C) の領域には対応関係があることを示唆する。ただし内側領域に含まれる2つの領域 (A/B) が両者で対応しているかどうかについては不明であり、より多数のマーカー遺伝子の発現を観察する必要がある。今後、この対応関係を基盤として、二枚貝と腹足類の貝殻腺発生プロセスの相違点を解明していく。

また、二枚貝の発生後期においては初期の発現パターンに関わらず多くの遺伝子が貝殻腺を縁取る領域での発現を示した。しかしこれらの発現が同所的なのか、いずれかの遺伝子が貝殻腺周縁のより外側/内側で発現しているかは不明である。今後二重染色等の手法を用いてより詳細な観察を行い、発現領域の区別を行う。また、近年公開されたマガキのシングルセル RNA-seq データの解析も組み合わせることでより正確な領域分けと領域ごとの分子的特徴付けを行っていくことで、貝殻腺のそれぞれの領域、特に蝶番がどのような遺伝子発現によって特徴付けられるかを解明することを目指す。

【引用文献】

- Liu et al. (2020) Dev Genes Evol. Jan; 230(1), 39-45

ヌタウナギから探る大脳皮質の進化的起源

原田 理帆（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】

脊椎動物の脳進化において層構造の獲得は、機能のモジュール化と神経回路の配線整理を実現し、情報処理能力の効率化に貢献した。とりわけ哺乳類で顕著に発達している終脳背側の層構造、すなわち大脳皮質は、高度な知性の基盤であると考えられている。

大脳皮質の進化的起源に関しては、独立進化説と共通起源説というふたつの仮説が提起されている。以前は、終脳に層構造を有する脊椎動物は羊膜類（＝哺乳類と爬虫類）と、現生脊椎動物のなかで最初期に分岐した動物群である円口類のヌタウナギしか知られていなかったため、独立進化説が支配的であった。しかし最近、ヌタウナギの姉妹群であるヤツメウナギの終脳外套にも層構造が存在すると報告された[1]。このような背景から、羊膜類と円口類の共通祖先、すなわちすべての脊椎動物の共通祖先で大脳皮質が獲得されたとする共通起源説がにわかに浮上したのである。大脳皮質の進化的起源を明らかにするためには、円口類の終脳外套が羊膜類の大脳皮質と相同であるかを検証し、独立進化説と共通起源説の対立を解消する必要がある。

脊椎動物の祖先的な特徴を多く残すと考えられている円口類の脳研究は、ヤツメウナギを中心に進められている。しかし、ヤツメウナギは派生的な形質も多く有することから、脊椎動物の祖先状態を推定するためには、ヌタウナギとの比較が必要である。しかしながら、ヌタウナギの脳研究は組織学的知見にとどまっており、遺伝学的なアプローチは行われていない。

そこで本研究では、ヌタウナギの終脳外套における神経伝達物質マーカ―遺伝子と哺乳類の大脳皮質の層特異的マーカ―遺伝子の発現解析を実施した。

【方法】

Nissl 染色

ヌタウナギ(*Eptatretus burgeri*)成体の脳切片を Cresyl Violet 溶液で染色し、細胞体の密度や分布様式を観察した。

切片 *in situ* hybridization 法

神経伝達物質マーカ―遺伝子 (*VGluT* と *GAD*) と哺乳類の大脳皮質の層特異的マーカ―遺伝子 (*Rorb* と *FoxP2A*) について、切片 *in situ* hybridization を行い、ヌタウナギ成体の脳切片で mRNA を検出した。

【結果】

大脳皮質の組織学的観察

Nissl 染色により、5層構造のヌタウナギの終脳外套の第2層と第4層は大きな細胞体の密集する細胞層、第3層は小さな細胞体の散在する層であった。これは先行研究と一致していた。

神経伝達物質マーカ―遺伝子の発現解析

第2層と第4層にグルタミン酸作動性ニューロンのマーカ―遺伝子である *VGluT*、第3層に GABA 作動性ニューロンのマーカ―遺伝子である *GAD* が発現していた。

層特異的マーカ―遺伝子の発現解析

6層からなる哺乳類の大脳皮質において、*Rorb* は視床から入力を受ける第 IV 層のマーカ―遺伝子、*FoxP2A* は視床や脊髄へ出力する第 V/VI 層のマーカ―遺伝子である。ヌタウナギの第2層と第4層では、その両方が発現していた (図1)。

【考察と展望】

脊椎動物の中樞神経系は主に、グルタミン酸作動性投射ニューロンと GABA 作動性介在ニューロンから構成される。羊膜類とヤツメウナギの終脳の層構造は、*VGluT* 陽性の大きな細胞体の密集する層と、*GAD* 陽性の小さな細胞体の散在する層から構成されることが知られている。本研究におけるヌタウナギの *VGluT*、*GAD* の分布は、このような羊膜類とヤツメウナギでの分布と類似している。

ヌタウナギでは、哺乳類の第 IV 層および第 V/VI 層のマーカ―遺伝子が第2層と第4層で発現していた。また、羊膜類の共通祖先の大脳皮質は3層構造で、第2層に哺乳類の第 II~VI 層に対応するニューロンが混在していた可能性が指摘されている[2]。上述の神経伝達物質マーカ―遺伝子の発現結果と合わせると、本研究による遺伝子発現解析は、共通起源説を支持している。

以上から、次のような大脳皮質の進化シナリオが考えられる。脊椎動物の共通祖先は3層の大脳皮質を有しており、その第2層には、さまざまな機能をもったニューロンが混在していた。円口類において、ヤツメウナギは祖先的な3層構造を保持したが、他方ヌタウナギではそのような第2層から新たに第4層が出現し、5層構造の大脳皮質が獲得された。羊膜類においては、爬虫類は3層構造を保持し、哺乳類では一部が大脳新皮質として6層に拡大したのである。

今後は、各層の詳細な機能を調べるために、軸索トレースや電気生理学的解析を実施する予定である。加えて、ヤツメウナギの大脳皮質においても層特異的マーカ―遺伝子の発現解析を実施し、本研究成果との比較から大脳皮質の進化的起源の解明を目指す。

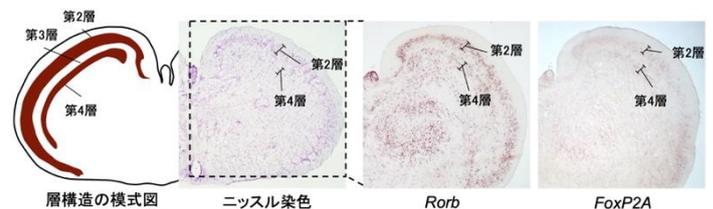


図1：ヌタウナギにおける層特異的マーカ―遺伝子の発現分布

【引用文献】

- [1] Suryanarayana *et al.* (2017) *Current Biology* 27, 3264-3277.
 [2] Tosches *et al.* (2018) *Science* 360, 881-888.

“新生”西之島から最初に発見された藻類：その同定と侵入種としての特性

武 彩海（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】

西之島は、小笠原諸島の火山島である。陸地から遠く離れた無人島（父島からおよそ 130 km）で、2019 年末からの火山活動により、島全体が溶岩や火山灰に覆われ、生物相がリセットされた。この“新生”西之島は、生態系の一次遷移を観察するのに適した島として、無人探査を中心としたモニタリングが継続的に行われている。このような島での生態系の遷移について、藻類に注目した研究はほとんど行われていない。

2022 年、“新生”西之島で初めて光合成生物のコロニーが発見された。コロニーは降雨時に水流が生じると思われる火山灰表面に生息しており、採取後に培養株（Handa-4259-d 株）として確立された。本研究では、Handa-4259-d 株の同定を行うとともに、侵入種としての特徴を明らかにすることを目的とした。

【方法】

<同定>

淡水培地 AF-6 で培養した Handa-4259-d 株から DNA を抽出し、18SrRNA 遺伝子を PCR で増幅して塩基配列を取得した。BLAST 検索の結果、緑藻 *Micractinium* の一種だと判明したため、*Micractinium* の同定に用いられる ITS1-5.8S-ITS2 領域の塩基配列から最尤系統樹を作成した。系統樹は IQtree (SYM+I+G4 モデル) を使用して作成した。

また、ITS 領域の二次構造も *Micractinium* 内の種の同定に用いられるため、ITS1,2 領域の二次構造を構築した。

<乾燥耐性>

ろ紙に細胞懸濁液を撒き、シャーレ内で 1、3、5、7 日間乾燥させてから液体培地を入れたチューブ内で濾紙を洗い、細胞を培地に懸濁した。その後 20°C、124 $\mu\text{mol photons} / \text{m}^2 / \text{s}^{-1}$ に静置し、培地に細胞を入れた直後と、7、28 日間培養した後に細胞数を計測した。細胞数を計測する際には 2.5% グルタルアルデヒドで固定した。また、乾燥後液体培地で 7 日間培養したものを 2.5% グルタルアルデヒドで固定し、蛍光顕微鏡を用いて葉緑体の自家蛍光を観察した。

<塩耐性>

淡水培地 AF-6 を構成する水の部分を、それぞれ 0,10,25,50,75,100% ろ過海水に置き換えた培地を用いた。6 穴プレートの穴にそれぞれの培地を入れ、 2.0×10^6 個 / mL の濃度になるように細胞を加えた。20°C、24 $\mu\text{mol photons} / \text{m}^2 / \text{s}^{-1}$ で 28 日間静置培養し、7 日間ごとに細胞数を計測した。細胞数を計測する際にはグルタルアルデヒドで固定した。

【結果】

<同定>

ITS1-5.8S-ITS2 領域の系統樹を作成した結果、Handa-4259-d 株は緑藻 *Micractinium thermotolerans* のクレードに位置した。

M. thermotolerans の記載論文 Krivina et al. (2023) を参考にして ITS 領域の二次構造を構築した結果、Handa-4259-d 株と *M. thermotolerans* の間には種の区別に用いられる CBC (二次構造において結合している 2 つの塩基の両方が変化すること) はなかったため、Handa-4259-d 株は *M. thermotolerans* だと同定した。

<乾燥耐性>
1 日以上乾燥させたサンプルでは、28 日間培養しても最大で初期細胞密度の 2.96 倍の増殖に留まり、対照区 (乾燥なし) の 18.51 倍と比較して明確な増殖はなかった。自家蛍光は全てのサンプルで観察できた。

<塩耐性>

対照区 (0% 海水) と比較すると増殖率は低いが、全ての海水濃度で Handa-4259-d 株の増殖がみられ、海水とほぼ同じ塩濃度の培地でも、21 日間で初期細胞密度の 9.67 倍にまで増殖した。

【考察と展望】

本研究の分子系統解析および ITS 領域の二次構造比較により、Handa-4259-d 株は最近新種記載された *M. thermotolerans* と同定された。これは、“新生”西之島において初期に侵入し生育した藻類の一つとして初めて同定されたものである。

“新生”西之島のような一次遷移初期に生物が侵入し定着するためには、ある程度厳しい環境への適応あるいは耐性が必要だと考えられる。*M. thermotolerans* はこれまでに温泉と砂漠で存在が確認されており、実験により熱耐性があることが報告されている (Krivina et al. 2023)。これは、太陽の光を遮るものがない一次遷移初期の環境で生き延びるのに適した性質だと考えられる。

また、塩耐性については、今回 Handa-4259-d 株が 100% 海水濃度の培地でもある程度増殖することが示されたことから、本藻は海水を介して、あるいは海水に晒される状態で“新生”西之島に侵入することが可能だと考えられる。したがって、*M. thermotolerans* は少なくとも、熱耐性と塩耐性の面で、“新生”西之島の一次遷移初期の侵入者として適した性質を有していると考えられる。

本研究ではもう一つ乾燥耐性についても検証を試みたが、葉緑体の自家蛍光は観察できたものの細胞の増殖は確認できなかった。これは、今回細胞を急激に乾燥させすぎたことが原因の可能性がある。

今後は、乾燥耐性について、より緩やかに乾燥させて再検証することに加えて、Handa-4259-d 株が西之島に定着するために重要であると考えられる他の特性についても検証していきたい。例えば、火山灰の上にコロニーを形成したことから低 pH への耐性、火山島であることから硫化水素や重金属への耐性などを調べ、Handa-4259-d 株の一次遷移における初期侵入種としての特性をさらに詳しく解明していきたい。

霞ヶ浦の原生生物相：形態観察と環境 DNA 解析からのアプローチ

柳澤 花帆（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】

原生生物は真核生物の系統的多様性のほとんどを占める生物群であり、土壌、海洋、湖沼といった地球上のあらゆる環境に存在する。水圏生態系においては重要な一次生産者、一次消費者、分解者として、微生物ループの一翼を担っているほか、主に底生性・付着性の原生生物は魚類や甲殻類などの直接的な餌として、生態系内の栄養循環に大きく貢献している。そのため原生生物相を把握することは、その環境における生態系全体のより深い理解のために重要である。原生生物相の詳しい解析は、深海や南極、海洋といった環境での報告が多く、陸域のいわゆる身近な普通の環境（普通環境）では、多くの生物群を網羅した詳しい解析の知見は少ない。霞ヶ浦は日本第2位の面積を有する平均水深が4mの海跡湖で、淡水の普通環境を代表する湖の一つと言える。1976年から国立環境研究所(NIES)により霞ヶ浦内の10地点で水質や生物群集の長期モニタリングが実施されている。しかし原生生物相の調査はその内2地点で光学顕微鏡による目視による同定しか行われておらず、DNAレベルの詳しい解析の報告はない。またサンプリングでは表層水を採集するのみであるため、底生性・付着性の原生生物については調査が不十分であると言える。

本研究では顕微鏡下での形態観察の他、環境DNA解析を用いて底生性・付着性も含めた原生生物相を調査し、霞ヶ浦の生態系理解のための基盤をさらに充実させることを目的とした。

【方法】

○ 調査地及びサンプリング方法

調査地としてNIESで原生生物相の調査が行われていない霞ヶ浦西岸の古渡地区を選択し、古渡地区の松川、古渡橋、鳩崎の3地点において2023年5月から12月にかけて毎月1回サンプリングを行った。各地点で表層水、湖底の泥、湖岸の人工物への付着藻類、水面に浮遊する枝や葉及びその付着藻類を採集し、プランクトンネットを用いた採集も行った。持ち帰ったサンプルをAF-6培地で粗培養し、顕微鏡下で形態観察を行った。プランクトンネットのサンプルは培養せず直接観察した。また古渡橋で採集した表層水サンプルと泥サンプルは、形態観察に加えて環境DNA解析にも使用した。

○ 形態観察

顕微鏡AXIO ImergerA2 (ZEISS)とCKX31 (OLYMPUS)を用いてサンプルの観察を行った。観察できた細胞は全てAXIO ImergerA2の顕微鏡カメラDP73 (OLYMPUS)で写真記録した。

○ 環境DNAの抽出

環境DNA解析には6月から10月の水サンプルと、7月から10月の泥サンプルを用いた。採集当日中に表層水サンプル約1LをGF/F filter (Whatman)で濾過し、泥サンプルと共に-80°Cで保存した。表層水サンプルはDneasy®Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いてフィルターからDNAを抽出し、泥サンプルはFastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals)を用いてDNA抽出を行った。抽出DNAは冷凍保存し、18S rRNA遺伝子のV8領域を標的としたプライマーを用いたPCR増幅断片のライブラリー作成、及び

MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina)を用いた18Sアンプリコンシーケンシング解析を株式会社生物技研に依頼した。

○ 環境DNAの解析

微生物相解析プラットフォームであるQIIME2 (ver.2022.11.1)を用いて分類群推定を行った。ペアエンドのクオリティを確認した後、DADA2プラグインにてシーケンスエラーの修正及びForward配列とReverse配列のマージ、Amplicon Sequence Variant (ASV)へのグルーピングを行った。得られたASV配列はSILVA (ver.138.1)を参照し、単純ベイズ分類器を利用して各分類群へ割り当てた。その後、得られたASV配列の分類をより正確なものにするため、BLAST検索で確認、修正を行った。

【結果・考察】

○ 形態観察

これまでに11門107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、34属を観察した。その他観察できたものは不等毛藻32属、シアノバクテリア13属、ユグレンゾア9属、ストレプト植物6属、繊毛虫4属、クリプト藻2属、コアナゾア1属、太陽虫1属、アメーバゾア1属であった。緑藻植物門は主に5月の水サンプルで多く見られ、特に*Gonium*属と*Lobomonas*属は5月サンプルでのみ観察されたほか、珪藻は水サンプルと泥サンプルで共通して見られたが、*Placoneis*属など泥サンプル及び付着物サンプルでのみ観察されるものもあるなど、季節間、サンプル間で出現原生生物の明確な違いが確認された。

○ 環境DNA解析

合計482,154リードから2305のASVを得ることができ、65門298属の配列を検出できた。原生生物相においては、水サンプル全体では不等毛藻が最も優勢であり、その内8月は不等毛藻が全体のリード数の50%以上を占めていた。泥サンプルでは繊毛虫が最も優勢であったが、クリプト藻の配列は水サンプルと比較してほとんど検出されなかった。データの詳細は卒業研究発表会にて報告する。

これらをもとに発表会では、形態観察と環境DNA解析で得られたデータを統合し霞ヶ浦の原生生物相について、NIESの霞ヶ浦データや他の普通環境における原生生物相との比較も含めて考察する。

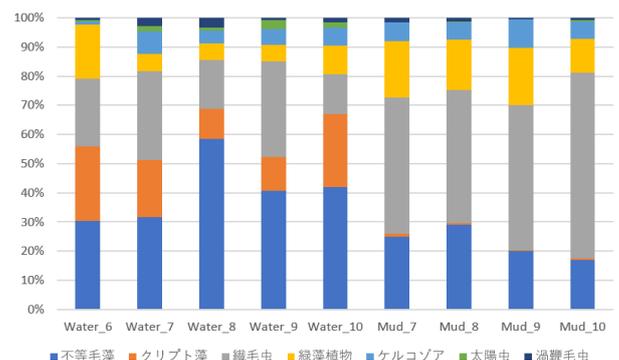


図 6-10月環境水及び7-10月泥における門レベルでの原生生物リード数占有率(上位分類群のみ抜粋)

筑波大学構内の淡水環境におけるウアブ系統群細菌の探索

大沼 万優子 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 石田 健一郎 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

生物進化の歴史の中で最も注目すべき出来事の一つは、真核生物の誕生である。真核生物と原核生物の間には、細胞やゲノムの複雑さという点で大きな差が存在する。一説には、真核生物の祖先が食作用によって α -プロテオバクテリアを取り込み、ミトコンドリアとしたことが、真核生物誕生の原動力であるとされている。しかし、原核生物が真核生物に似た食作用を示したという例は近年まで報告されていなかった。

Ca. Uabimicrobium amorphum (以下ウアブ) は2019年にパラオ共和国の海中から単離された細菌で、他の細菌や小さな真核生物を取り込む食食様行動を示すことが報告されている。ウアブは、真核生物の食作用関連遺伝子に相同な遺伝子はほとんど持たないことから、この食食様行動は真核生物とは独立に獲得されたことが示唆されている。そのため、ウアブは原核生物における食作用の進化を知る上で重要な生物だと考えられている。環境DNA解析からは、ウアブに近縁な細菌は海中だけでなく、淡水、土壌等の様々な環境に普遍的に存在していることがわかっている。ウアブ近縁系統に含まれる細菌の多様性を明らかにすることは、ウアブが食食様行動を得るに至った進化の過程を明らかにする上で重要である。

先行研究による大学構内の淡水環境の環境DNA解析から、9つのウアブに近縁なクレードの存在が明らかになった。それら淡水性ウアブ系統群のうちの一つ、天の川で検出されたクレード6に関しては、蛍光 *in situ* hybridization (FISH) による蛍光像の観察にも成功している。しかし、観察例が少なく形態的特徴を把握するには未だ不十分である。

本研究では、淡水性ウアブ系統群に含まれる細菌の形態的特徴を明らかにすることを目的として、クレード6を含めた複数のクレードに対してPCRによる各クレードに特異的な配列の検出及び、FISHによる細胞の可視化を行った。

【方法】

筑波大学構内の淡水環境(天の川、兵太郎池、松美池)において、堆積物サンプルを収集し、FastDNA Spin Kit For Soilを用いてそのDNAを抽出した。抽出したDNAに対して、特異的プライマーを用いたPCRを行い、サンプル中に淡水性ウアブ系統群細菌が存在しているかを確認した。淡水性ウアブ系統群細菌の存在を確認できたサンプルに対してFISHによる染色を行い、蛍光顕微鏡でその蛍光の様子を観察した。

【結果と考察】

淡水性ウアブ系統群に特異的なプライマーを用いたPCRの結果、クレード6は天の川の堆積物サンプルから特異的配列の増幅を確認することができた。これにより、先行研究と同様に、天の川では安定して淡水性ウアブ系統群細菌が生息していることを確

認した。先行研究において兵太郎池での存在が確認されていたクレード9では、今回兵太郎池の堆積物サンプルから配列の増幅が確認できず、淡水性ウアブ系統群細菌の数が減少したか、または現在は生息していないことが考えられる。松美池で検出されたクレード3、クレード4、クレード5については、新規のプライマーを作成しPCRを行ったが、こちらも松美池の堆積物サンプルから配列の増幅は確認できなかった。クレード9と同様に、それらに含まれる細菌の生息数が減少したか、または消失してしまった可能性が考えられる。

PCRにより淡水性ウアブ系統群細菌の存在が確認できたクレード6に関して、計14回のFISHを行いその蛍光の様子を観察した。その結果、新たに4例の蛍光像を得ることができた(Fig.1)。

得られた蛍光から、細胞の大きさは4-8 μm 程度と考えられ、これは4-5 μm のウアブよりやや大きい。またDAPI染色による蛍光は、細胞内に複数の局在が見られるウアブとは異なり、細胞内全体に観察された。これにより、淡水性ウアブ系統群細菌は、ウアブのように細胞内に仕切られた核様体構造を持たないことが示唆される。

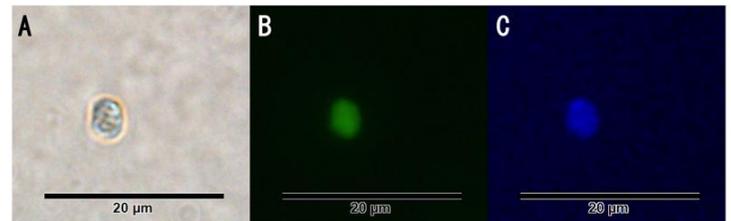


Fig 1. 天の川から採取した堆積物サンプルの蛍光顕微鏡写真。

Aは明視野像、Bは特異的プローブによる蛍光像、CはDAPI染色による蛍光像。

【今後の展望】

本研究から、淡水性ウアブ系統群細菌はウアブと異なる形態的特徴を持つことがわかった。今後は、得られた形態情報や蛍光シグナルを元に細胞を単離し、ゲノムシーケンスを行う予定である。得られたゲノム情報から、淡水性ウアブ系統群細菌の生態や代謝が明らかになることが期待される。また、代謝経路の推定によって培養条件の最適化を行うことで、クレード6の培養株確立を行っていく予定である。

クレード6以外においても、FISHによる蛍光の観察やゲノム解析を行うことで、ウアブに近縁な系統の多様性や食食様行動の獲得過程の解明につながることを期待される。

DNA メタバーコーディングによる底生ワムシの食性解析

吉田 伊吹 (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】

水圏の底生環境は様々な生態系機能を有していると考えられており、その一つが上層水と下層水間の栄養循環である。これは非生物学的なプロセスの他、底生生物による生物学的なプロセスが関わっているとされ、特にデトリタスや細菌、原生生物、藻類、メイオ/マクロベントスを含む食物網を介した栄養循環が考えられている (Covich et al., 1999)。従って底生生物の食性を調査することは底生環境の生態系機能を評価する上で重要である。

ワムシは体長 1 mm 以下の微小な動物であり、プランクトン性の種と底生性の種が含まれる。淡水環境中の存在量も多く、細菌や細菌食性原生生物からなる microbial loop と、より大型の動物による食物網間のエネルギー流を仲介する役割があるとされるなど (Moore et al., 2019; Schmid-Araya and Schmid, 2000)、水圏の生態系において重要な役割をもつと考えられる。しかし、現在のワムシに関する知見の多くはプランクトン性ワムシに関する研究によって得られたものであり (Ricci and Balsamo, 2000)、食性研究においても底生ワムシに関しては十分でない (Gilbert, 2022)。最近、プランクトン性ワムシの広範な食性を調査するために DNA メタバーコーディングが用いられるようになったが (Novotny et al., 2021 など)、底生ワムシではほとんど行われていない。

本研究では霞ヶ浦における 4 グループの底生ワムシの餌生物の種類を、DNA メタバーコーディングを用いて検出し、基礎的知見を得ることを目的とした。その結果から、底生ワムシの食性ニッチや底生環境での役割の理解を目指した。

【方法】

1) サンプリング

サンプリングは 6 月から 9 月の各月に 1 回ずつ、霞ヶ浦南の古渡橋と、6・7 月は鳩崎第一揚排水管、8・9 月は鳩崎第三揚排水管付近で行った。底生生物の採集は、まず鋤簾を用いて沿岸の河床の上層数 cm を、採集容器 (135 × 155 × 210 mm) に深さ 5 cm 程度採集した。そしてポンプで河床水を約 2L 注いで良く攪拌した後、上清をふるい (53 μm) にかけて、再び採集容器に河床水を入れた。これを 5 回繰り返した後、ふるいを河床水で洗い、45 ml の濃縮液を得た。濃縮液はその場でエタノール (終濃度 70%) で固定し、クーラーボックスで実験室へ持ち帰り、4°C で保存した。

2) ワムシの選別と DNA メタバーコーディング

実験にはヒルガタワムシ 2 種と *Lecane* spp.、*Monostyla* spp. を用いた。サンプルは光学顕微鏡下で選別し、個体をエタノールで 5 回洗った。6 月のサンプルはサンプル間のばらつきを確認とワムシ間の比較のため、各種 9-14 個体をそれぞれマイクロチューブに入れ、これを 3 回行った。7-9 月のサンプルは季節を経た全体の傾向を確認するため、各種 9-100 個体をそれぞれマイクロチューブに入れ、これを 1 回行った。

DNA は DNeasy blood & tissue kit (Qiagen) で製造元のプロトコルによって抽出した。また、環境中の潜在的な餌生物の確認のため、古渡橋同所の表層水からの抽出 DNA を同研究室の柳沢氏より提供してもらった。ワムシを標的としたブロッキングプラ

イマーの作成、及びこれらの抽出 DNA の 18S rRNA V8 領域を標的とした MiSeq によるシーケンシング解析を依頼した。

ヒルガタワムシ 2 種は固定した状態では種同定できないため、抽出 DNA の COI 領域を PCR で増幅して TA クローニングを行い、Seq-studio でシーケンシングした。その後ヒルガタワムシのデータセット (Fontaneto et al., 2007) を用いて最尤法系統樹を作成し、*Rotaria cf. neptunia* と *Rotaria cf. rotatoria* と同定した。

3) データの解析

配列データは QIIME2 パイプライン (Bolyen et al., 2019) を用いて解析した。配列は DADA2 プラグインを用いてノイズ除去し、Amplicon Sequence Variant (ASV) を取得した。そして feature-classifier プラグインを用い、Silva 18S データベース (Pruesse et al., 2007) を参照して単純ベイズ分類器により ASV 配列の分類群への割り当てを行った。また、ワムシサンプルにおいて、Eukaryote など分類学的解像度が低いものは NCBI ヌクレオチドデータベースを用いた Blast 検索によって手動で確認した。データの可視化前に、ワムシの配列は除去した。

【結果・考察】

合計 1,062,079 配列から 1,374 ASV が生成され、532 の Taxa が割り当てられた。その内、環境水からは 389、ワムシサンプルからは 227 の Taxa が割り当てられた。

6 月のワムシサンプルからは、輪形動物門と未分類の真核生物を除き 28 門 60 綱が検出された。全体的に、緑藻綱や黄金色藻綱、クリプト藻綱といった藻類も 5% 前後のリードが検出されたが、上位に多く検出されたのはユスリカのようなデトリタス由来と考えられるものと真菌、及びケルコゾアや繊毛虫、アーケアメーバ、襟鞭毛虫、パーキンサス類といった原生生物であった。7 月以降についても、概ね同じ傾向にあった。従って、これらの底生ワムシは底生環境において腐食連鎖的な食物網へより関与している可能性が示唆された。

卒業研究発表では検出された種について生態的な面も含め詳しく考察するとともに、ワムシ間の餌の重複について β 多様性解析を行った結果と合わせて底生ワムシ間の食性の相違も考察する予定である。

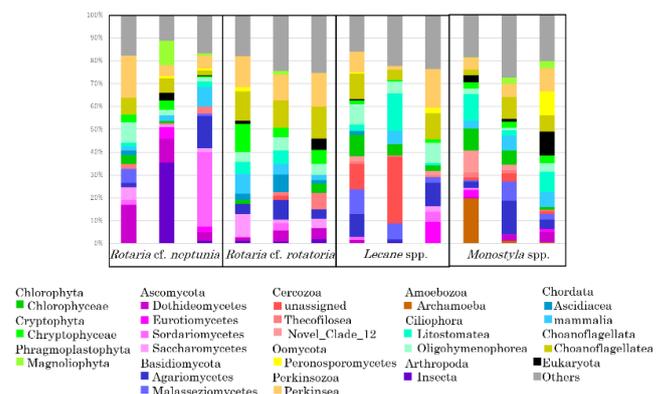


図 1:6 月の各ワムシサンプルから検出された綱レベルの 18S rRNA リードの占有率。各グラフにおける上位 5 綱を示す。

クロララクニオン藻の凍結保存法の開発

豊島 克己 (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】

微細藻類の培養株の多くは、定期的に植え継ぐことで維持されている。しかし継代培養には管理のための労力やコンタミネーションなどのリスクが伴う。

微細藻類の株保存施設などでは、液体窒素を用いた凍結保存も行われている。しかし、凍結保存が難しい微細藻類もあり、継代培養のみで維持されている株も多くある。

本研究では、形態の異なる2種類のクロララクニオン藻を用いて、凍結保存法の開発を試みた。クロララクニオン藻は海産の単細胞性藻類で、アメーバ細胞、球状細胞、遊走細胞などの形態を持つ(図1、2)。当研究室では複数のクロララクニオン藻株を継代培養しているが、凍結保存株は存在していない。本藻類を凍結保存するために、冷却及び解凍時の速度または温度条件に加え、凍結保護剤の種類や濃度、様々な条件を検討した。また、凍結保存から復帰させる際に使用する栄養リッチな培地の検討も行った。

【材料と方法】

実験に用いた2種のクロララクニオン藻はそれぞれ、*Amorphochlora amoebiformis* (図1)がアメーバ細胞で、*Lotharella globosa* (図2)が細胞壁を持つ球状細胞である。*L. globosa*は培養条件により遊走細胞へと変化する。継代培養には海水培地ESMを使用し、22°Cで12:12時間の明暗周期で行った。

i) 制御凍結法

前処理として、細胞懸濁液に最終濃度が0、3、5、10、15%になるように凍結保護剤(メタノールまたはDMSO)を添加して、室温で15分間静置した。細胞溶液の入ったチューブを凍結処理容器(BICELL)に入れて、冷凍庫内で30°Cまで緩慢冷却した後、液体窒素中で急速冷却した。その後、ディープフリーザーで24時間以上保存した。解凍は39°Cウォーターバスで迅速に行った。解凍後はESM培地で細胞を希釈し、暗めの光条件に1日置いて、通常の光条件に戻して培養した。

ii) 急速冷凍法

制御凍結法と同様の前処理を行った後、細胞溶液の入ったチューブを液体窒素で急速凍結した。以降は制御凍結法と同様の操作を行った。

iii) 栄養リッチな改良培地

ESM培地は有機物を含まない完全無機培地であるが、そこに1%から2%のグルコースを添加したESM+G培地、また4つの有機物(酢酸ナトリウム、グルコース、トリプトン、酵母エキス)を加えたESM+B-V培地を準備した。それぞれの培地で、クロララクニオン藻を通常の光条件と完全暗条件で培養し、細胞増殖を観察した。

【結果】

*L. globosa*においては、10% DMSOのもと急速冷凍法で凍結した場合に解凍後の生存が確認された。解凍後6から8日目に顕微鏡で観察したところ、10% DMSOを用いて凍結を行った細胞は緑色を維持しており、遊走細胞も確認された。他の条件で凍結した場合は、細胞の色素がなくなり、増殖した様子も観察されなかった。一方、*A. amoebiformis*では条件に関わらず解凍後の生存は確認できず、解凍直後、損傷した細胞が多く観察された。しかし、15%の凍結保護剤を用いた細胞では、それ以外のものと比較して、細胞形状を維持しているものが多く観察された。

有機物を添加した改良ESMでの培養実験では、いずれの培地でも、完全暗条件での細胞増殖は観察されなかった。一方、通常の光条件下での培養では、ESM+B-Vで、ESMを使用した場合よりも顕著な細胞増殖が観察された。

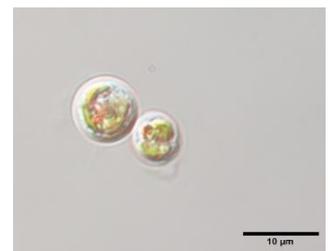
【考察】

凍結の際に細胞が損傷を受ける主な要因は、細胞内での氷晶形成による物理的損傷か、溶質濃度の上昇による生理的損傷のいずれかであると考えられている。

制御凍結法では、細胞外の水分が先に凍結し、浸透圧変化に伴う水分の放出で、溶質濃度が上昇し有害となった可能性があり、2種とも復活しなかった要因の一つと考えられる。

急速冷凍法では細胞内の水分が放出される前に凍結するため、氷晶形成による内部からの物理的な損傷が、細胞の生存を妨げると考えられている。*A. amoebiformis*は解凍後に細胞が破裂していたが、*L. globosa*は形状を維持していた。このことから、氷晶が形成されても、細胞壁によって細胞構造が維持され、解凍後も生存できる可能性が示唆された。

*A. amoebiformis*がESM+B-Vでより顕著な増殖を示したことから、いずれかの有機物を利用している可能性が示唆された。しかし、完全暗条件での培養はできなかったことから、光はクロララクニオン藻の増殖に必須であると考えられる。しかしながら、ESM+B-V培地は本藻を増殖させるのに有効な新規培地である。

図1 *Amorphochlora amoebiformis* 図2 *Lotharella globosa*

光合成関連遺伝子から探る緑色渦鞭毛藻 TGD 株の共生藻痕跡核ゲノムの特徴

藤代 彩花 (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)

【背景と目的】

葉緑体は、シアノバクテリアと真核生物の細胞内共生（一次共生）によって獲得された。また、一次共生により誕生した植物がさらに別の真核生物と細胞内共生進化を起し、様々な系統の真核生物が光合成能力を獲得した。この真核生物同士の細胞内共生進化は、二次共生と呼ばれる。

二次共生に由来する光合成生物では、多くの系統で共生藻の核は失われ、葉緑体のみが保持されている。一方、二次共生由来のクリプト藻とクロララクニオン藻は、葉緑体に加え、共生藻痕跡核（ヌクレオモルフ、以降 Nm）を持つ。よって、クリプト藻やクロララクニオン藻は二次共生の中間段階にあると考えられている。しかし、近年の研究から、これらの Nm ゲノムは進化の中間段階ではなく、既に進化が完了した状態にあるという見方も示されている。

近年、Sarai et al. (2020)¹ より、Nm を持つ新たな生物として、渦鞭毛藻 TGD 株（以降、TGD）が報告された。同研究¹から、TGD は緑藻（ペディノ藻）に由来する葉緑体を持ち、その Nm ゲノムには、既知の Nm ゲノムからは既に消失している遺伝子を含め、未だに多くの遺伝子が存在することが示唆されている。よって、TGD の Nm ゲノムの縮小進化は現在も進行中である可能性が示唆されている。しかし、TGD の Nm ゲノムに関する知見は主に RNA-seq データを根拠としており、Nm ゲノム配列は得られていなかった。よって、TGD の Nm ゲノムを直接調査した研究はこれまで行われておらず、本藻の Nm ゲノムの特徴や、そこにコードされる遺伝子の実態は不明なままである。

そこで本研究では、TGD の Nm ゲノム配列を探索し、得られた Nm ゲノム配列から TGD の Nm ゲノムコード遺伝子の特徴を調査した。具体的には、TGD の Nm ゲノム候補配列の抽出と一部遺伝子についてのアノテーションを行い、既知の Nm ゲノムや自由生活性のペディノ藻の核ゲノムと比較した。さらに、RNA エディティングが TGD の Nm ゲノムから発見されたため、TGD の Nm ゲノムにおける RNA エディティングの調査も行った。

【方法】

Nm ゲノムコンティグの抽出

先行研究¹の知見に基づいて得られた「Nm ゲノムコード遺伝子候補」の塩基配列をクエリとして、研究室内で作成されていた TGD のゲノムアセンブリに対して相同性検索を行うことで Nm ゲノムコンティグの抽出を行なった。相同性検索結果を精査し、identity が 90 以上かつ Bits score が 100 以上のヒットが 1 つ以上存在するコンティグを Nm ゲノムコンティグと判断した。

Nm ゲノム遺伝子のアノテーションとペディノ藻遺伝子との比較

既知の Nm ゲノムからは光合成関連遺伝子が消失しているのに対し、TGD の Nm ゲノムには複数残存していることが示唆されていた¹。よって本研究では、Nm ゲノム上の光合成関連遺伝子に着目して構造アノテーションを行なった。先行研究で得られた「Nm コード光合成関連遺伝子候補」をクエリとした相同性検索

を実施し、Nm ゲノムコンティグにコードされる遺伝子を探索した。検出された Nm ゲノム遺伝子については、手動による構造アノテーションを行い、遺伝子モデルを決定し、CDS 長、イントロン数、イントロン平均長を算出した。

今回アノテーションを行った Nm ゲノム遺伝子について、自由生活性ペディノ藻 *Pedinomonas minor* のゲノム情報から相同遺伝子を探索した。検出された *P. minor* の相同配列に対してそれぞれ CDS 長、イントロン数、イントロン平均長を算出し、TGD の光合成関連遺伝子と比較した。

Nm ゲノムにおける RNA エディティングの探索

TGD の RNA-seq リードを TGD ゲノムコンティグにマッピングしたデータをもとに、BCFtools を用いて、TGD の転写物と Nm ゲノムコンティグで相違が見られる座位を特定した。その後、Nm ゲノム遺伝子について、エディティング数およびエディティングの頻度（エディティングの数 / CDS 長）を算出した。

【結果と考察】

TGD の Nm ゲノムコンティグは 28 個存在し、その総塩基長は 1.80 Mbp と、クリプト藻の Nm ゲノムの総塩基長（約 0.45~0.87 Mbp）や、クロララクニオン藻の Nm ゲノムの総塩基長（約 0.33~1 Mbp）を上回った。TGD の光合成関連遺伝子は、宿主核ゲノムと Nm ゲノムで合わせて 109 個存在すると予想されているが、本研究では、そのうち 24 個が Nm ゲノムコンティグに存在することが示された。

TGD の Nm ゲノムコード光合成関連遺伝子と *P. minor* の相同配列の比較では、CDS 長において 2 つのゲノム間で大きな違いはほとんど見られなかった。一方、イントロン平均長では顕著な違いが見られ、*P. minor* では平均 231 bp なのに対し TGD では平均 93 bp と、*P. minor* の半分以下であった。既知の Nm ゲノムにおいて、クリプト藻はイントロンがほとんどなく、クロララクニオン藻はイントロン長が 18~23 nt であることが知られているが、今回 TGD の Nm ゲノム遺伝子に見られたイントロンはこれよりも顕著に長い。

上記の結果は、TGD では二次共生に伴い Nm ゲノムの縮退が進行しているが、既知の Nm ゲノムよりは縮退が進んでおらず、TGD が Nm ゲノム縮退の中間段階にあることを示唆する。

TGD の Nm ゲノムにおける RNA エディティングの調査では、1 つの遺伝子を除いてすべての Nm ゲノム遺伝子で RNA エディティングが確認された。特に、U から C への置換と A から G への置換が多数を占め、コード領域の 100 から 1000 bp に 1 つの頻度で RNA エディティングが起きていることが示唆された。

今後は、Nm ゲノムコンティグ全体でアノテーションを行い、同様に比較解析や RNA エディティングの調査を行う予定である。

【参考文献】

1. Sarai et al. (2020). *Proc Natl Acad Sci USA*, 117, 5364-5375

北極海で採集された円石藻 *Emiliania huxleyi* NIES-3366 株のゲノム情報の高精度化

児玉 悠佑 (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】

円石藻 *Emiliania huxleyi* は海洋に広く分布し、円石と呼ばれる炭酸カルシウムの結晶を細胞表面に保持する微細藻類である。そのため *E. huxleyi* は有機的と無機的な2つの炭素固定系を通して二酸化炭素の循環に関与し、地球環境に大きな影響を与える。また、*E. huxleyi* を含む一部の藻類はアルケノンという、化石燃料に代わる液体燃料としての利用が期待される長鎖不飽和炭化水素を生産する。このような特徴をもつ *E. huxleyi* の生育挙動の理解や産業利用のためには、ゲノム解読による *E. huxleyi* の遺伝学的な情報の解明が重要である。特に上述のアルケノンの合成機構には未知の部分が多く、アルケノン分子の修飾に関わるデサチュラーゼ遺伝子の同定、その発現メカニズムの解明は、アルケノンの産業利用のポテンシャルを高めることが期待される。

先行研究により北極海で採集された *E. huxleyi* NIES-3366 株は、他の北極海採集株 (NIES-3362, NIES-3365) とともに illumina Miseq のショートリードシーケンスによるゲノム解析が行われている。その結果 NIES-3366 株のゲノムサイズ・予測遺伝子数は、他の北極海採集株と比較して著しく増大していた。先行研究で用いられたショートリードシーケンスは DNA 断片に繰り返し配列が存在すると解析が難しく、正確性に劣る可能性がある。そのため、NIES-3366 株が他の北極海採集株より長いゲノム配列を示す原因を探るには、より精度の高いゲノムデータが望ましい。

そこで本研究では、PacBio Revio/Sequel II によるロングリードシーケンスを行い、NIES-3366 株のゲノム情報の高精度化を目指した。また、予測された遺伝子に illumina のデータで明らかになっていない新規アルケノンデサチュラーゼ遺伝子がないか探索した。

【材料・方法】

1. 微細藻類の培養

E. huxleyi NIES-3366 株は、Marine-art ESM 培地で 18°C、100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件で培養し、対数増殖期の細胞を得た。抗生物質 (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ アンピシリン、200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ カナマイシン、100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ スペクチノマイシン) を培地に加えた。

2. DNA シーケンス

CTAB 法により DNA を抽出し、ProNexBeads によって精製して、シーケンスに必要な品質と量の DNA を得た。シーケンスには HiFi Read を用いた PacBio Revio/Sequel II によるロングリードシーケンスを実施した。シーケンスで得られた raw read からアダプター配列を除去し、1,000 塩基対以下の HiFi Read を削除した後、Hifiasm を用いたアセンブリ、Purge Haplotigs による冗長なハプロティグを除去し、Tiara による真核生物由来 contig を分類した。これらの得られた contig について、RepeatModeler および RepeatMasker を用いて繰り返し配列の分類とマスキングをした。そして BRAKER を用いて遺伝子領域を予測した。予測された遺伝子は Funannotate を用いて、どのような機能をもつ遺伝子か推定する機能アノテーションを行った。ゲノムの品質確認は、配列の連続性を表す N50 値や BUSCO により解析した core gene set の含有率に基づいて評価した。

3. 新規アルケノンデサチュラーゼ遺伝子の探索

今回予測された遺伝子の中から機能ドメイン検索に基づきアルケノンデサチュラーゼ候補遺伝子を抽出し、illumina で予測されたアルケノンデサチュラーゼ遺伝子と照らし合わせた系統的解析を MEGA X を用いて行った。候補遺伝子を絞るため、アルケノンデサチュラーゼに特徴的なヒスチジンボックスの有無、膜貫通領域の予測、立体構造予測、シグナルペプチドを確認した。ヒスチジンボックスの確認ではアミノ酸配列のアライメントを行った。さらに、TMHMM、SOSUI を用いて2つ以上の膜貫通領域をもつ遺伝子を探した。加えて AlphaFold により立体構造モデルを作成した。SOSUSignal と iPSORT Prediction を用いてシグナルペプチドを検索し、アルケノンが存在しないミトコンドリアのシグナルペプチドが見つかった場合は候補から除外して最終的な新規アルケノンデサチュラーゼ候補遺伝子を決定した。

【結果・考察】

今回私が解析した PacBio のロングリードシーケンスと先行研究の illumina ショートリードシーケンスの解析結果の比較を表 1 に示す。N50 や BUSCO の値から、NIES-3366 株のゲノムデータの精度を高めることができた。ゲノムサイズはどちらも概ね同じ値を示した一方で、予測されたタンパク質コード遺伝子の数は illumina に比べて著しく減少した。PacBio のアセンブリに illumina で解析された scaffold および PacBio と illumina で予測された遺伝子配列をマッピングした。その結果、illumina では反復配列で scaffold が分かれ、scaffold を跨ぐ遺伝子が別々ものと予測された箇所があった。このことが PacBio の方が illumina に比べて予測遺伝子が減った原因の1つとして考えられた。

本研究では新たに2つの新規アルケノンデサチュラーゼ候補遺伝子を見出した。1つ目はアライメントによって *E. huxleyi* 北極海採集株では明らかになっていなかった $\Delta 7$ デサチュラーゼ遺伝子 (FUN_000956_T1) である。さらにアルケノンデサチュラーゼの条件を揃えた1つの遺伝子 (FUN_038130_T1) を新規アルケノンデサチュラーゼ候補遺伝子として決定した。

表 1 PacBio と illumina によるゲノムデータ比較

	PacBio	illumina
contig No.	937	229,924
genome size (Mbp)	209	216
protein coding gene No.	40,874	78,388
N50 (bp)	384,086	1,916
BUSCO (%)	66.7	41.2

【今後の展望】

今回ロングリードシーケンスによって明らかになったゲノムサイズの妥当性について、フローサイトメトリーを用いた異なるアプローチによっても検証する予定である。

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の Mg²⁺輸送体ホモログの機能解析

白吉 瑞綺 (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】

マグネシウムイオンは生物にとって必須なイオンのひとつであり、酵素反応の触媒や細胞内の構造的な役割を果たす他、ATP などの生体内で生じるアニオンの対イオンとしても機能する。シアノバクテリア等の光合成生物では、集光性色素のクロロフィルが光エネルギーを捕捉して光合成を行う。クロロフィルの中心にはマグネシウムが金属イオンとして配位している。したがって、シアノバクテリアにおいては、マグネシウムイオンは特に重要であり、多くのマグネシウムイオンを取り込む必要がある。しかし、シアノバクテリアではこのマグネシウムイオンの輸送機構はほとんど解明されていない(1)。また、マグネシウムイオンの輸送は光合成におけるチラコイド膜を通じた電気ポテンシャルの制御にも影響を与える可能性があるが、その仕組みも不明である。そのため、このメカニズムを明らかにすることは光合成機能のより詳細な理解に貢献できる。

一般的なバクテリアではマグネシウムイオン輸送体として CorA・MgtE・MgtA/B の3種が知られている(2)。CorA と MgtE は複数のマグネシウムイオン結合部位を有しており、これらの部位へのマグネシウムイオン結合により輸送活性が低下することによって、細胞内のマグネシウムイオン濃度が制御されていると考えられている。シアノバクテリアのゲノムにもこれらのホモログが存在するが、その局在性・機能は不明である。そこで、モデルシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いてマグネシウムイオンの輸送に関わると推定される CorA ホモログの遺伝子 (*sll0671*, *sll0507*)、MgtE ホモログの遺伝子 (*slr1216*)、MgtA/B の遺伝子 (*sll0672*, *slr0822*, *sll1614*) を単独または複合でノックアウトした破壊株を作製し、それらの株におけるマグネシウムの要求性の変化を調査することを目指した。

【材料・方法】

マグネシウムイオン輸送体候補遺伝子 *slr1216*, *sll0671*, *sll0507*, *sll0672*, *slr0822*, *sll1614* の単独破壊株の作出

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の染色体上の、*slr1216*, *sll1614* 遺伝子にはカナマイシン耐性遺伝子、*sll0671*, *sll0672* 遺伝子にはクロラムフェニコール耐性遺伝子、*sll0507* 遺伝子にはエリスロマイシン耐性遺伝子、*slr0822* 遺伝子にはゲンタマイシン耐性遺伝子を、それぞれ二重相同組み換えにより挿入することで変異株を作出した。それぞれの標的遺伝子のコード領域とその周辺を含む約 2~3 kbp の DNA 断片を PCR で増幅し、pMD19 ベクターにクローニングした。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ように逆向きに 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の上流および下流の相同領域の間にもつプラスミド DNA を得た。得られたプラスミド DNA を用いて *Synechocystis* 細胞への形質転換を行った。

【結果・考察】

$\Delta slr1216$ 株、 $\Delta sll0671$ 株、 $\Delta sll0507$ 株、 $\Delta sll0672$ 株は、それぞれの薬剤に耐性があるコロニーを複数得ることに成功し、作出した株由来の DNA を鋳型に耐性遺伝子を含む領域を増幅するプライマーで PCR することで、目的の位置に薬剤耐性遺伝子が挿入されていることを確認した。

通常の BG-11 培地は、0.3 mM の MgSO₄ を含む。MgSO₄ を 0.3 mM Na₂SO₄ と様々な濃度の MgCl₂ に置き換えた培地を作製し、野生型の細胞を培養したところ、0.1 mM 以下の MgCl₂ を含む培地で生育が抑制されることがわかった。これまでに作製した4種の遺伝子欠損株について、0.1 mM MgCl₂ を含む培地で培養したところ、3種の候補遺伝子の変異株は野生株と同様かそれ以上に生育したが、CorA ホモログをコードする *sll0507* の欠損株で生育が低下することがわかった (図)。

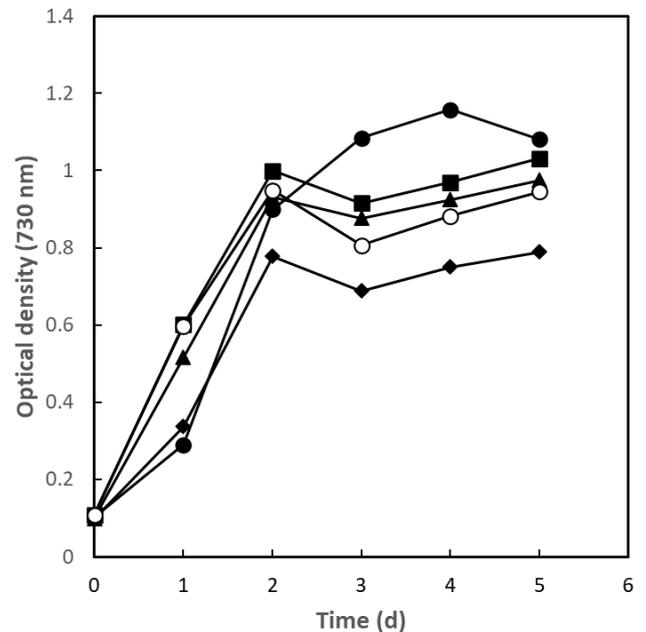


図. Mg²⁺制限条件下での細胞の増殖 0.1 mM Mg²⁺を含む培地での $\Delta slr1216$ (●), $\Delta sll0671$ (▲), $\Delta sll0507$ (◆), $\Delta sll0672$ (■) 遺伝子破壊株および野生型(○)の増殖曲線。培養液の 730 nm における光学密度(OD730)の変化を图示した。

【今後の展開】

作製の終わっていない *slr0822* と *sll1614* 遺伝子の欠損株を作製する。 $\Delta sll0507$ 株でその他の候補遺伝子の破壊を導入する。

【参考文献】

1. Pohland AC & Schneider D, *Biol. Chem.* 400, 1289-1301 (2019)
2. Maguire ME, *Front Biosci.* 11, 3149-3163 (2006)

大腸菌の様々な DNA 損傷修復系の欠損変異株に対する変異原の影響

竹森 友哉 (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】

窒素 N の安定同位体 ^{15}N で標識したプラスミドに陽子線を照射すると、非常に多くの変異が導入され、この変異の割合は ^{15}N の標識率によって高まった^[1]。しかし、この変異がどの様に DNA に損傷を与えているか、また大腸菌の DNA 損傷修復系で修復されているのかは不明であった。そこで、大腸菌の持つ DNA 損傷修復系を欠損させた変異株を入手した。陽子線の効果を調べるのに先立ち、UV を照射し、それらの生存率の変化を観察した。

大腸菌には大きく分けて、塩基除去修復・ヌクレオチド除去修復・ミスマッチ修復・相同組換え・DNA フォトリアーゼの 5 種の DNA 損傷修復系が存在する。塩基除去修復は、損傷塩基に特異的な酵素が損傷塩基を切り取ることで開始され、1 塩基分だけの DNA 合成を行い、DNA 鎖を結合して修復が完了する^[2]。ヌクレオチド除去修復は、大きな DNA 損傷に対して働く^[2]。塩基除去修復では 1 個の損傷塩基を切り出すのに対し、ヌクレオチド除去修復では DNA 損傷を含む 10 ヌクレオチド程度の DNA 断片が切り出される^[2]。ミスマッチ修復は複製エラーの修復に関与するため、この修復系の遺伝子に欠損が生じると、自然突然変異頻度が大幅に上昇する^[2]。相同組換えは、RecA タンパク質を中心に、タンパク質と一本鎖 DNA との複合体をつくり、相同鎖の対合を行う修復系である^[2]。DNA フォトリアーゼは、DNA の損傷を光エネルギーを用いて修復する。これらのうち、ヌクレオチド除去修復・ミスマッチ修復・相同組換えは、細胞内に変異が蓄積されると誘導される SOS 修復に関与する^[2]。

【材料・方法】

1. 遺伝子欠損変異株の作出

国立遺伝学研究所の大腸菌のバイオリソースの Keio コレクションの中から、DNA 修復に関連する遺伝子の欠損変異株を 13 株入手した。Keio コレクションの株では、カナマイシン耐性遺伝子の置換によって標的遺伝子が破壊されているが、将来的にカナマイシン耐性を持つプラスミドを ^{15}N で標識し、大腸菌に導入するため、染色体上のカナマイシン耐性遺伝子を外す必要があった。そこで組換え酵素遺伝子を含むプラスミド pBAD_Flp を形質転換し、アラビノースで相同組換え酵素を誘導し、カナマイシン耐性遺伝子を欠失した株を作出した。その後、温度感受性の複製起点を持つ pBAD_FLP は、37°C で培養し脱落させた。

耐性遺伝子を欠失した後の株と、耐性遺伝子を持つ Keio コレクション株と野生株から抽出した DNA を鋳型とし、標的遺伝子の両端から約 200 bp ずつ離れた位置に設計したプライマーを用いて PCR 反応を行って標的遺伝子領域を増幅させ、電気泳動により分離した。その結果、カナマイシン耐性遺伝子の脱落が確認できたもののうち、5 種類の修復系に関わる遺伝子の変異株を一つずつ選び、それらを以降の実験で用いた。

2. UV 照射

1. の実験で得られた 5 種の欠損変異株と、Keio コレクションの宿主株である BW25113 株に対し、クリーンベンチ内の UV 殺菌ランプ (波長 253.7 nm, UV 照射強度 $51 \mu\text{W cm}^{-2}$) を、LB 培地

で培養した培養液を $1.0 \times 10^8 \text{ cells mL}^{-1}$ に希釈し、直径 7 cm のシャーレに 5 mL 入れて UV 照射した。それらの細胞に 0, 1, 5, 10, 30, 60 分間 UV を照射し、それぞれを 10^5 倍あるいは 2×10^4 倍希釈し、50 μL ずつ 3 枚の LB 寒天プレートに植菌した。37°C で一晩培養し形成されたコロニーを数え、未照射のプレート上で形成されたコロニー数の平均を 100% としたときの、それぞれのプレートでのコロニー形成率を細胞生存率とし、照射時間と生存率、及び変異した遺伝子と生存率の関係を考察した。

【結果と考察】

1. 遺伝子欠損変異株の作出

13 の変異株のうち、7 つの変異株のカナマイシン耐性遺伝子が抜け落ちていることが確認できた。5 つの DNA 修復系全てについて少なくとも 1 つ以上の変異株で、想定された欠損株を得ることができた。

2. UV 照射による影響

変異株と野生型の生存率を比較すると、変異株の生存率は野生株に比べて低くなった (図)。また、野生株と DNA フォトリアーゼ欠損株では照射開始直後に顕著な生存率の低下が起こり、その後一旦回復し、その後は照射時間につれて生存率は低下した。一方でミスマッチ修復系を欠き SOS 修復の起こらない株では、照射時間が長くなるにつれて生存率が漸減した。

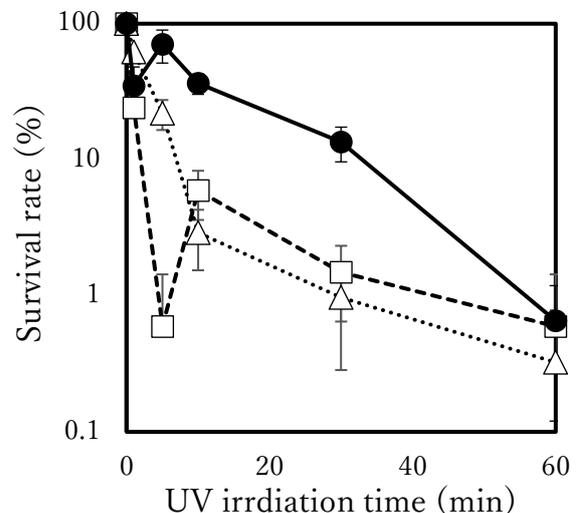


図. UV 照射時間と細胞生存率の関係 UV を野生型 (●), DNA フォトリアーゼ欠損株 (□), ミスマッチ修復欠損株 (△) に照射した時の各株の生存率の変化

【今後の展望】

今回は、変異原として UV のみを用いて実験を行ったが、将来的な ^{15}N 標識プラスミドの導入と陽子線照射を踏まえ、培養液を真空状態に封止し、その際の生存率の変化および損傷修復系による違いを観察したいと考えている。

【参考文献】

- [1] Yang T, University of Tsukuba, Ph.D. thesis (2023)
- [2] Katarzyna H M et al. Environ Mol. Biol. 60, 368-384 (2019)

織毛虫テトラヒメナの細胞質分裂変異株に関する研究

山木 佳奈子 (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】

テトラヒメナは、細胞表層に規則正しく並んだ多数の織毛を有し、その細胞の前方側には口部装置が、後方側には細胞肛門や収縮胞という特別な細胞構造が存在する。この生物では細胞質分裂時に、娘細胞が縦に並ぶように生じる。分裂面の前側の娘細胞では後方側に特有な細胞肛門や収縮胞が、分裂面の後ろ側の娘細胞では前方側に特有な口部装置が正しい位置に新生される。このように細胞の前後方向を維持しながら、正しい位置で分裂し、適切に細胞表層の構造を形成するため、テトラヒメナは精緻で特別な仕組みをもつと考えられる。私はこの仕組みを明らかにしたい。

これまでにテトラヒメナでは、細胞質分裂の異常な *cda* (cell division arrest) 変異株が複数単離されている。これらの変異株は、特定の温度で培養すると細胞分裂が停止し、変異株ごとに特徴的な細胞の形態異常を示す。私は、細胞質分裂が途中まで進行するが、娘細胞の分離には至らない *cdaC* 株について、その責任遺伝子とその機能について調べることにした。また、最近同定された *cdaA* 株の責任遺伝子は、サイクリン様タンパク質をコードする (Jiang et al., 2020)。サイクリンは、サイクリン依存性キナーゼ CDK と結合して、主に細胞周期を調節する因子である。これまでに私の所属する研究室では、テトラヒメナの CDK を同定し、その機能解析を進めてきた (村井, 2019)。そこで私は、CdaA がどの CDK と結合して働か明らかにするため、本研究に着手した。

【材料と方法】

細胞株と培養

テトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* の各細胞株は、Tetrahymena Stock Center より供与されたものを用いた。培養は、SPP 培地を用いて室温または 30°C で行った。

細胞の交雑

cdaC 株の責任遺伝子を同定するため、野生株 CU427.4 と変異株 IA119 (*cdaC-1*) 及び IA123 (*cdaC-2*) を交雑して得た F1 を、さらに B*VII 株と交雑して F2 を単離した。テトラヒメナは大核と小核を持ち、通常は大核の遺伝子のみを発現している。接合後に作られる大核と小核は、親株の小核由来のものであり、親株の大核は消滅する。F0 世代には、小核のみに cycloheximide (CHX) 耐性を持つ CU427.4 株 (*cy-r*; CHX 耐性) と *cdaC* 株 (*cy-s*; CHX 感受性) を用いた。これにより、F1 世代を CHX 耐性を持つ細胞を選ぶことにより選択できる。F1 細胞を phenotypic assortment により *cy-s* にし、B*VII 株と掛け合わせることで uniparental cytogamy を誘導し、全ゲノムホモの F2 細胞が得られる。F2 細胞集団を CHX 耐性によって選択した後、細胞ごとに表現型を調べ、*cdaC* について優性であるか劣性であるかを確認し、それぞれ 40 クローン程度プールした。

CdaA-eGFP 株の作成

CDAA の C 末端周辺領域の DNA 断片をクローニングし、その終始コドンの直前に eGFP-Neo4 カセットを挿入したコンストラクトを作製した。

CdaA の結合パートナーの探索

本目的のために 2 つのアプローチを進めた。一つ目は、CdaA-eGFP 株の抽出液から CdaA-eGFP をプルダウンして結合するタンパク質を調べる方法である。二つ目は、CdaA と結合する CDK を探す方法である。この方法では、テトラヒメナの各種 CDK に eGFP を結合した遺伝子産物を発現するコンストラクトを野生型細胞に形質転換し、この細胞からタンパク質を抽出し、GFP 抗体で免疫沈降を行う。その免疫沈降物に、CdaA が結合しているかを調べるために、CdaA のアミノ酸配列について抗原適性が高いと考えられる配列を選択し、抗体作製を外部委託で行った。

【結果と考察】

cdaC 株の責任遺伝子の同定

cdaC 株は、変異原処理により単離された劣性ホモ変異株である。そのゲノムには、細胞質分裂の異常とは無関係のランダムな変異が多数含まれる。そのため、野生株と交雑し、*cdaC* に関して優性ホモと劣性ホモの F2 世代細胞集団を取得する。それぞれの細胞集団からゲノムを抽出し、次世代シーケンス (NGS) による解析を行うことで、*cdaC* の責任遺伝子を決定する。現在、*cdaC-1* 株については、*cy-s* の F1 の取得を行っている。*cdaC-2* 株については、F2 集団の取得に成功し、米国の共同研究者に NGS 解析を依頼した。

CdaA の結合パートナーの探索

現在、制限酵素で処理したコンストラクトをパーティクルガンを用いてテトラヒメナ B2086.2 株の大核に遺伝子導入する実験を行っている。また、各種 CDK に eGFP を結合した遺伝子産物を発現するコンストラクトの形質転換を準備している。一方、作製した CdaA 抗血清の評価をウエスタンブロットにより行った。CdaA は約 170kDa のタンパク質であるが、その位置にバンドが見られなかった。そのため、CdaA-eGFP 株の抽出液を用いて、GFP 抗体をポジティブコントロールとして、この抗血清の再評価を行うこととした。

【今後の展望】

CdaA-eGFP 株の完成が確認できたら、この細胞からタンパク質を抽出し、GFP 抗体で免疫沈降を行う。そして、CdaA の共沈降物について調べる。同様に、eGFP-CDK 株についても免疫沈降実験を行う。*cdaA* 株は、制限温度条件下で培養すると細胞分裂初期に分裂が停止するため、細胞質分裂の開始に必要な CDK やその基質が判明するかもしれない。

一方、NGS 解析により *cdaC* 株の責任遺伝子の候補が同定されたら、その遺伝子破壊株を作製し、細胞質分裂に支障を示すか調べる。さらに、その遺伝子産物の細胞内局在や細胞機能について調べていきたい。

高濃度鉄存在下における単細胞性紅藻 *Galdieria sulphuraria* の細胞表層の構造変化

山口 幸大 (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】

単細胞性紅藻 *Galdieria sulphuraria* が属するイデユコゴメ綱 (Cyanidiophyceae) は、紅藻の進化の初期に分岐したと考えられているグループであり、世界各地の高温強酸性の環境に生息する。そのような環境中には高濃度の金属が溶出しやすく、*G. sulphuraria* は様々な金属に対して他の多くの生物よりも高い耐性をもつが、金属耐性のメカニズムについてはほとんど分かっていない。

当研究室の先行研究から、高濃度鉄存在下において細胞の凝集が起こるとともに、 α -Man 及び α -Glc を認識するレクチンである ConA-FITC により染色される構造が *G. sulphuraria* の細胞表層に生じることが観察された。RNA-seq 解析からは細胞表層のタンパク質修飾に関わる N-グリコシル化経路などの遺伝子群の発現上昇が確認された。N-グリコシル化はアスパラギンの窒素原子に糖鎖を転移することで、細胞表層のタンパク質の正しい立体構造の形成と機能発現に関与している。

これらの結果から、高濃度の鉄への耐性には細胞表層の構造変化が重要な役割を果たしていると考えられた。そのため、本研究では、高濃度鉄存在下において生じる細胞表層の構造変化が、*G. sulphuraria* の鉄耐性に与える影響を明らかにすることを目的に研究を行った。

細胞表層の糖鎖修飾は動物細胞において細胞間相互作用などと関係していることが知られているが、植物や藻類では糖鎖修飾の役割に関する知見は限られている。本研究結果は、植物や藻類における糖鎖修飾の新たな生物学的機能の一端を明らかにすることも期待される。

【材料・方法】

培養：

G. sulphuraria は 2×Allen's 培地 (pH 2.5) で 40°C、暗所で振盪培養した。

顕微鏡観察：

0 mM または 3 mM の FeSO₄ を含む培地を作製し、細胞を 24 時間培養した。ConA-FITC により細胞を染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

【結果・考察】

1. N-グリコシル化経路の遺伝子破壊株の作製

1-1. 1 倍体の単離

G. sulphuraria の細胞を 2×Allen's 培地 (pH 0.5) に加え、96 well plate に分注して数日間静置培養した。顕微鏡下で細胞をピペットで吸い取り、新しい培地へ単離した。単離した細胞を培養したところ、生活環の一部において 2 倍体とは形態的に異なるオタマジャクシ様の細胞を生じた。先行研究 (Hirooka et al. 2022) において報告されていた形態との類似性から、*G. sulphuraria* の 1 倍体であると考えられた。

1-2. 遺伝子破壊コンストラクトの作製

RNA-seq 解析で発現が上昇していた N-グリコシル化経路の遺伝子のうち OST2 (Gasu_19630)、STT3 (Gasu_35460)、MOGS (Gasu_23130)、MGAT3 (Gasu_38070) をコードする遺伝子を欠損させるためのコンストラクトを作製した。*G. sulphuraria* のゲノム DNA を鋳型として用いて、標的遺伝子とその上流と下流の約 1000 塩基対を含む 3000 塩基対程度の領域を PCR により増幅した。標的遺伝子の全部または大部分を欠損するように、プラストサイジン耐性遺伝子 (BSD) カセットと置き換えた。

1-3. PEG 法による形質転換

標的遺伝子の上流及び下流と相同な配列の間に BSD カセットを含む領域を PCR により増幅し、PEG 法による 1 倍体の形質転換を行った。これまでに数回プラストサイジン添加培地によるスクリーニングを行ったが、相同組換えにより標的遺伝子が欠損した遺伝子破壊株は得られていない。引き続き形質転換を行い、遺伝子破壊株のスクリーニングを試みている。遺伝子破壊株を単離でき次第、高濃度鉄存在下における表現型の解析を行う予定である。

2. 細胞表層構造の酵素処理

高濃度鉄存在下において細胞表層に形成される構造が高濃度鉄耐性に及ぼす影響を調べるために *endo*-1,4- β -Mannanase 処理を行った。その結果、Mannanase で細胞を処理した際に、3 mM 鉄添加 24 時間後における細胞表層の ConA-FITC の蛍光強度の減少が観察された。このことから、鉄添加 24 時間後に細胞表層に形成される構造にはマンノースからなる糖鎖が含まれており、Mannanase によって分解されたため ConA-FITC の蛍光強度の減少が見られたと考えられた。

今後、Mannanase 処理により ConA-FITC で染色される細胞表層の構造を除いたときの、細胞内への鉄の流入や活性酸素種の発生について調べる予定である。また、*G. sulphuraria* のもつ糖鎖の構造についても詳細な解析を行う。

【謝辞】

本研究を進めるにあたり、1 倍体を単離して頂いた平川泰久先生 (筑波大学)、BSD カセットの提供ならびに形質転換操作をご教授頂いた宮城島進也先生 (国立遺伝学研究所)、山下翔大先生 (国立遺伝学研究所) に深くお礼を申し上げます。

【参考文献】

1. S. Hirooka et al. 2022. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 119(41), e2210665119

Role of chlororespiration in the high CO₂ tolerance of unicellular red alga *Galdieria sulphuraria*

Belitz Alisa Marie (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

While CO₂ is essential for photosynthesis, the growth of most photosynthetic organisms is inhibited when CO₂ levels surpass 2-5 percent (Solovchenko and Khonzin-Goldberg 2013). A few algal species have been reported to tolerate higher CO₂ levels, including the unicellular red alga *Galdieria sulphuraria*. *G. sulphuraria* is isolated from acidic hot springs and has been reported to grow in up to 100% CO₂ conditions. However, the mechanism of high CO₂ tolerance in *G. sulphuraria* is unknown.

In a previous study by our group, *G. sulphuraria* was suggested to optimize the light-dependent reactions of photosynthesis by a novel process that prevents the overreduction of the plastoquinone pool under high CO₂ conditions (Ozeki 2021). Transcriptome analysis indicated the upregulation of a type II NADPH dehydrogenase (NDA2) and a plastid terminal oxidase (PTOX) under high CO₂ in *G. sulphuraria*. In green algae, NDA2 and PTOX have been reported to be involved in chlororespiration, the reduction of oxygen using electrons from the plastoquinone pool, which can serve as an alternative electron outlet for alleviating excess reducing power (Saroussi et al. 2023). Thus, NDA2 and PTOX were identified as candidate enzymes for optimizing electron transport in *G. sulphuraria* under high CO₂ conditions. This research aims to investigate the role of NDA2 and PTOX in the tolerance of *G. sulphuraria* to extremely high CO₂ levels.

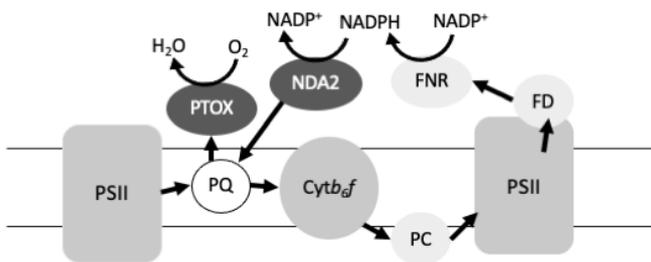


Fig.1 Schematic representation of the role of NDA2 and PTOX in the photosynthetic electron transport chain.

Materials and Methods

Culture: *G. sulphuraria* cells were grown at 40°C in 2 x Allen' s medium adjusted to pH 2.5 or pH 1 for diploid or haploid cells, respectively. Cells were bubbled with air or 100% CO₂ and exposed to continuous light (90 ± 3 μ mol photons m⁻² s⁻¹). Cell growth was evaluated by OD₇₅₀.

O₂ electrode: Respiration rate of cells was measured at 40°C using Oxytherm (Hansatech).

Results and discussion

1. Construction of NDA2 and PTOX knockout mutants

1.1 Isolation of haploid cells

Diploid *G. sulphuraria* are surrounded by a thick cell wall that prohibits genetic modification. Cell wall-less, haploid cells of *G. sulphuraria* were induced by decreasing the pH of culture media as described by Hirooka et al (2013). Isolated cells were used for transformation.

1.2 Genetic modification

The coding regions of the target NDA2 or PTOX genes along with the approximately 1 kbp upstream and downstream regions were amplified by PCR from genomic DNA. The coding regions were replaced by linear DNA containing a blasticidin S (BS) selectable marker. The resulting DNA was used for transformation by homologous recombination using a polyethylene glycol (PEG)-mediated method. As selection by BS has not yielded positive transformants, we are examining transformation and selection conditions. After successful transformation, we plan to evaluate the phenotype under high CO₂ conditions.

2. Effect of PTOX inhibition

Propyl gallate (PG) is known as a PTOX inhibitor. The effective concentration of PG for *G. sulphuraria* was determined due to a lack of previous reports. Growth rate of cells decreased in the presence of 1 mM PG in either air or 100% CO₂ conditions. This concentration had no immediate effect on respiration rate and was consistent with that used in studies of PTOX using green algae (Saroussi et al. 2023). We plan to measure the chlorophyll fluorescence of cells with and without the addition of PG using PAM to evaluate the effect on photosynthetic electron transport. Results will be discussed in the oral presentation.

References

- Hirooka et al. (2022), *PNAS* 119(41)
 Ozeki (2021), University of Tsukuba Thesis
 Saroussi et al. (2023), *Plant Phys.* 192, 789-804
 Seckbach et al. (1970), *Nature*. 227, 744-745
 Solovchenko and Khonzin-Goldberg (2013), *Biotechnol Lett.* 35(11), 1745-1752

Acknowledgements

We would like to thank Professor Yoshihisa Hirakawa for his assistance in isolating haploid cells and Professor Shinya Miyagishima and Dr Shota Yamashita for their guidance on the PEG-mediated transformation method.

海洋細菌は揮発性有機化合物の生産者となりうるか

窪田 耀 (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】

大気中には多種の揮発性有機化合物 (Volatile Organic Compounds; VOC) が、微量ながらも普遍的に分布している。アセトンやエタノールなどの含酸素 VOC は対流圏オゾンの生成に寄与し、ジメチルスルフィドといった含硫黄 VOC は雲凝結核の前駆体として雲の生成を促進することが知られている (Charlson et al., 1987)。このように、VOC は大気化学および地球の気候システムに重要な役割を果たす成分である。

海洋は、大気への VOC の放出源および吸収源としての役割を担っている。海洋表層における VOC の主な生成プロセスに、微生物の代謝産物として VOC が生成される生物学的プロセスと、溶存態有機物 (Dissolved Organic Matter; DOM) が紫外線を含む太陽光によって光化学的な分解を受けることで VOC が生成される光化学のプロセスの2つが知られている。海洋表層における VOC の生成および分解プロセスは、化合物ごとに異なるメカニズムで制御されていることが明らかになっている (Carpenter and Nightingale, 2015)。多様な VOC の生成および分解プロセスにおいて、海洋表層に分布する海洋細菌が VOC の分解者として働くことはよく知られている (Moore et al., 2020) が、一方で海洋細菌による VOC 生成に着目した研究は非常に限られている。しかし、細菌は VOC 生成を行う代謝経路をもつため VOC 生産者としての側面が存在することが予想され、さらに有する代謝経路の多様性から、その生成能は細菌種によって異なると考えられる。そこで、本研究では海洋の細菌種が放出する VOC が海洋大気に与える影響を議論するための基礎データを提供することを目的とし、海洋細菌 *Paracoccus aquimaris* に着目して生成する VOC の定性および定量評価を行った。細菌種単離株の培養実験では、単純な基質であるグルコースを与える画分と、実際の環境で細菌が利用できるものに近い基質として植物プランクトンを与える画分を設け、それぞれの条件下で生成された VOC の種類および生成量を把握した。

【方法】

1. グルコースを基質とした培養実験

静岡県下田市鍋田湾の自然海水 (2022年5月10日採水) から単離されたロドバクター科の海洋細菌 *Paracoccus aquimaris* を、寒天培地 (BD Difco Marine Agar) に植菌して培養を行い、十分に増殖した時点で Aquil 培地に植菌して前液体培養を行った。この培養液を 1 L の Aquil 培地を入れた 6 本の培養瓶に 9 mL ずつ添加し、うち 3 本には最終濃度 834 $\mu\text{mol C/L}$ となるようにグルコース溶液を加え、人工気象器を用いて 20 $^{\circ}\text{C}$ の暗所で培養を行った。培養開始から 0、12、24、42、60、84、132 時間後に、VOC 濃度の測定および試料分取を行った。また、Aquil 培地のみでの VOC 測定も同時に行い、コントロール画分とした。

2. 珪藻由来有機物を基質とした培養実験

国立環境研究所から入手した珪藻 *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex を f/2 培地 (Guillard and Ryther, 1962) を用いて 20 $^{\circ}\text{C}$ 、光強度 15-20 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、明暗周期 10L:14D で培養した。培養液を 1500 rpm で 5 分間遠心し、ペレットを回収したのち Aquil 培地で洗浄したものを有機物液として用意した。1. と同様に 1 L の Aquil 培地を入れた 6 本の培養瓶に有機物液を 28 mL ずつ加え、うち 3 本に *P. aquimaris* の前液体培養液を添加し、人工気象器を用いて 20 $^{\circ}\text{C}$ の暗所で培養を行った。培養開始から 0、1、2、3、6、10、16 日後に、VOC 濃度の測定および試料分取を行った。

3. 分析

培養試料水中の VOC 濃度は、プロトン移動反応質量分析計 (PTR-ToF-MS, Ionicon) を用いて測定した。純空気を培養試料に通気して、パージした VOC を含むガス試料を PTR-ToF-MS に直接導入し、分子量 21 から 160 までの VOC を検出した。分取した試料を用いて、細胞数、グルコース濃度およびクロロフィル a 濃度の測定を行った。

【結果と考察】

グルコースを基質とした実験では、アセトン、アセトアルデヒド濃度はグルコースの添加・非添加にかかわらず数十 nm まで増加し、細菌による生成が確認できた。ただし生成量は両画分で同程度であり、グルコース添加画分では炭素およびグルコース濃度の減少と細胞数の増加が確認できたため、生成量は細胞数や消費した炭素量によらなかった。この要因として、VOC 代謝経路の始点の一部が、今回の培地に含まれないアミノ酸やビタミンの代謝による生成物であったため、それらによって VOC 生産が制限を受け、初めに添加した培養液 9 mL ぶんの細胞内物質を利用して VOC を生成したことが考えられる。また、珪藻由来有機物を基質とした培養実験および VOC の測定、その他の測定項目についての結果に関しては、卒業研究発表会にてその詳細を報告する。

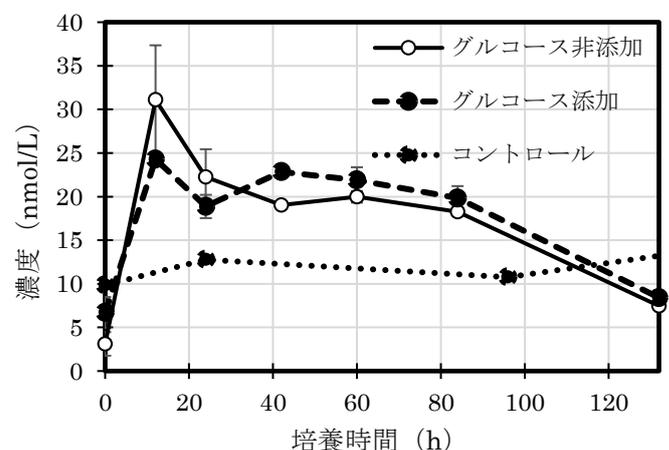


図1. アセトンの濃度変化
エラーバーは標準誤差を示す (n=3)

海洋細菌 *Paracoccus* sp.由来の溶存態有機物の定性評価

助川 太一（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】

海水中に溶けている有機物は溶存態有機物 (Dissolved Organic Matter: DOM) と呼ばれる。DOM は有機物のうち孔径 0.2~0.7 μm のフィルターを通過する画分として定義され、フィルターに保持される画分を粒子状有機物 (Particulate Organic Matter: POM) と呼ぶ。海洋 DOM の炭素量は 662 Pg C と推定されており (Hansell et al, 2009)、その炭素量は大気中の二酸化炭素量 770 Pg C、陸上植生 450 Pg C (IPCC, 2021) と匹敵するため、炭素循環における DOM の動態を理解することは重要である。

DOM を分解者は主に海洋細菌であり、細菌に対する分解性により DOM の挙動は大きく異なる。易分解な DOM は早いものでは数時間から数日で分解されてしまうが、分解に耐性をもつ難分解性 DOM (Recalcitrant DOM: RDOM) は数百年から数千年の間海洋中で安定して滞留する。DOM 全体の 90%以上を占める RDOM は、多量の炭素の海洋に長期隔離する重要な役割を担う (Carlson and Hansell, 2015)。しかし、RDOM の生成および分解過程は未だ明確になっていない。

海洋細菌は DOM 分解者であると同時に、RDOM の生産者としても注目されている (Jiao et al, 2010)。海洋細菌が易分解 DOM を利用し、その代謝産物として RDOM が放出されると示唆されている。そのため、海洋細菌が放出する DOM の組成や分解性の解明は、RDOM の生成過程の解明につながると期待される。

近年、蛍光 DOM (Fluorescent DOM: FDOM) を指標とした培養実験において、細菌の種ごとに生成する DOM の組成や生成プロセスが異なることが示唆された (Goto et al, 2020)。また、グルコースと藻類浸出液といった基質の違いにより細菌群集が生成する DOM の構成成分が大きく異なることが示された (Koch et al, 2014)。

細菌種ごとの DOM 循環における役割の理解が必要である。しかし、単離株を用いた実験による DOM 生成を評価した研究はわずかである。また、先行研究で用いられる基質はグルコースといった単一の基質であり、実際の環境に存在する多様な有機物とは異なる。そこで本研究では細菌の単離株培養を行い、その DOM を定性的に評価することで細菌種の DOM 動態における役割を明らかにする。さらに、グルコースと植物プランクトン由来有機物を基質とした培養実験を行い、基質の違いにより細菌から放出される DOM を比較する。

【方法】

細菌種は下田沿岸海水から単離されたロドバクター科の *Paracoccus aquimaris* を使用した。1 L の Aquil 培地 (Morel et al, 1979) に植菌し、以下の2つの基質をそれぞれ添加し、暗所にて 20°C で培養した。

基質はグルコース (最終濃度 834 μM C) と珪藻 *Skeletonema marinoi-dohrnii complex* を用いた。*S. marinoi-dohrnii complex* は f2 培地 (Gulillard and Ryther, 1962) で培養後、1,500 rpm、5分で遠心分離し Aquil 培地で洗浄した。

試料はガラスシリンジで分取を行い、DAPI により染色し、落射蛍光顕微鏡で細胞数を計測した。試料の一部を粒子保持径 0.3 μm のガラスフィルター (GF75, advantec) によりろ過し、ろ液を用いて溶存態有機炭素 (DOC) 濃度を全有機炭素計 (TOC-L, Shimadzu) で測定した。蛍光分光光度計 (F7500, Hitachi) で FDOM の励起蛍光マトリクスを測定し、FDOM の成分を分離するための PARAFAC 解析を行った。有色 DOM (CDOM) は紫外可視分光光度計 (1900i, Shimadzu) で吸光度を測定し、特定の波長間の傾きから分子量の変化を推測した。グルコースを基質とした実験ではグルコース濃度、*S. marinoi-dohrnii complex* を基質とした実験ではクロロフィル a 濃度と POC について測定を行った。

【結果と考察】

グルコースを添加した培養において、*P. aquimaris* の細胞数の増加が見られた。細胞数の変化から培養 12h から 60h を増殖期、60h 以降を定常期と定義した。DOC 濃度が 24h から 84h で 679 から 473 μM C まで減少したことから増殖期に DOC が積極的に利用されたと示唆される。DOC 濃度は 300h でグルコース濃度より 217 μM C 高かったことから、*P. aquimaris* 由来の DOM が水中に放出されたと考えられる。

FDOM は3つの要素に分けられた (図1)。その中でトリプトファン様 FDOM は 24h から 124h に大きく増加したことから、易分解なタンパク質様 FDOM は活発な増殖に伴って生産されると考えられる。難分解 DOM の指標となる腐植様 FDOM は 84h から 460h に比較的多く増加したことから、自身が出した DOM を分解することで生成されることが示唆された。CDOM の吸光スペクトルは特定の区間の傾きの比である SR 値が増加したことから、CDOM の分子量の低分子量化が起こったと考えられる。

珪藻を基質とした培養の結果については発表で報告する。

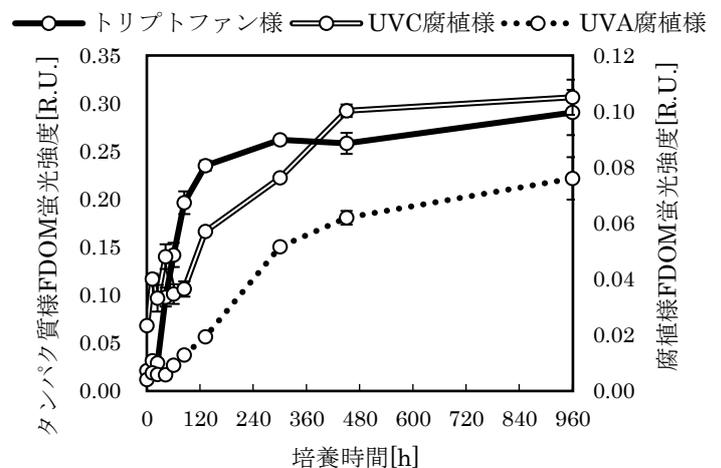


図1 FDOMの変化 (エラーバーは標準誤差、n=3)

染色体置換系統を用いた貧栄養下におけるイネ祖先種の生育と元素蓄積の解析

上安 欣語 (筑波大学 生物学類) 指導教員: Louis Irving (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

稲作が伝播していく過程において、栽培に向いている土地もあれば向いていない土地もあったはずであり、伝播してきたイネの栄養要求性に適した土地ではより稲作が盛んに行われたのではないかと考えた。そこで、イネ祖先種が持つ何らかの元素蓄積に関連する特徴がイネの栽培化に貢献した可能性を見出すことで、科学的・文化人類学的側面からもヒトと稲作の関係を認識したいと考えた。

イネの栽培化における選抜の過程では、祖先種が本来持っていた多様な遺伝的形質が失われていることが知られている (Bright G Adu *et al.* 2022)。著者らは現行品種であるコシヒカリと、祖先種 (*Oryza rufipogon*) を掛け合わせ、低窒素条件への応答を調査した。その結果、祖先種はコシヒカリよりも低窒素の影響を受けにくく、低窒素耐性が高い、もしくは非応答性であることが明らかになった。そこで、現行イネの染色体の一部が祖先種で置換された集団を古代の農業環境を想定した貧栄養下で栽培することで、現行品種よりも栄養獲得の面で優れた特徴を見つけることを目的として卒業研究を行った。

【材料】

日本型品種 T-65 を種子親、*O. rufipogon* (W1962) を花粉親として交雑 F₁ を育成し、T65 にて BC₄F₁ まで連続戻し交配を行った W1962IL の 44 系統をイネナショナルバイオリソースプロジェクトから入手し、実験に供した。これは、戻し交配を行い、ゲノムのほとんどが T-65 である中に、一部 *O. rufipogon* のゲノムが存在する染色体部分置換系統である。

【方法】

1. イネのサンプリング

イネの水耕栽培に一般的に用いられる木村氏 B 液の濃度を 1/10 まで低下させた溶液を用いて W1962IL の 44 系統と T-65 を第五葉期まで育てたのちに収穫し、地上部と地下部それぞれの長さ、新鮮重量、乾燥重量を測定した。

2. ICP-OES を用いた元素測定

各試料を硝酸分解したのち、本学の分析センターに設置されている ICP-OES (ICP-7300) を用いて、Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Zn の計 10 元素について測定を行った。

【結果】

地上部と地下部それぞれの長さ、新鮮重量、乾燥重量

地上部と地下部のいずれにおいても、長さ、新鮮重量、乾燥重量が T65 に比べて増加あるいは減少した系統が認められたが、図 1 に示す地上部の乾燥重量においては最大で T65 比 149% の重量を示した系統も認められた。

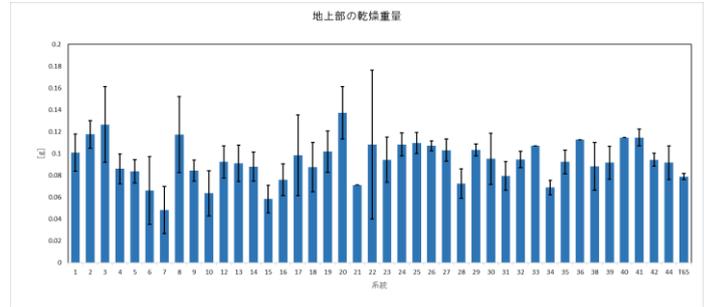


図 1: 染色体置換系統の地上部の乾燥重量。右端が T65。エラーバーは SE を表す。

地上部と地下部における元素蓄積

分析した 10 元素には系統間で様々な差異が認められたが、特に Ca と Mg において系統 9 と 10 で現行品種よりも約 200-300% 高濃度であるという特徴が認められた。

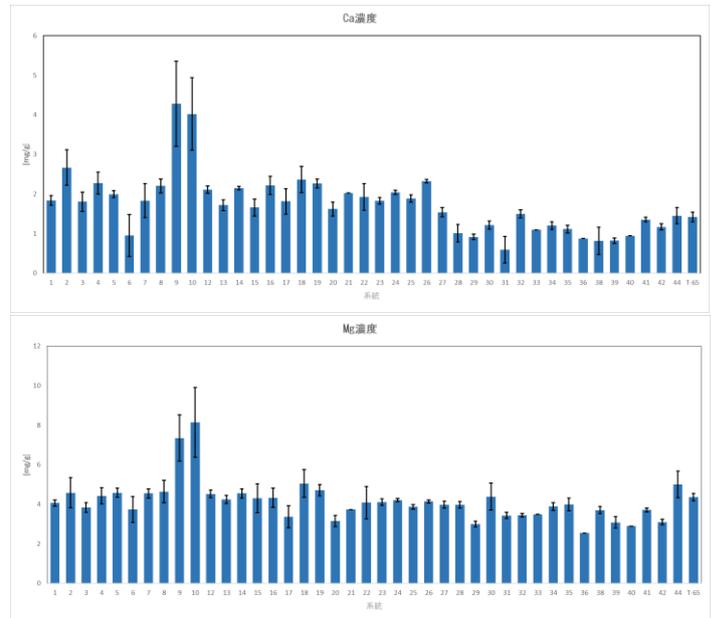


図 2: 染色体置換系統の元素濃度。右端が T65。エラーバーは SE を表す。

系統 9 と 10 では第二染色体の約 7 Mbp の領域が共通して祖先種に置換されており、この範囲に Ca と Mg の高蓄積を司る遺伝子が座乗している可能性が示された。

【考察】

二価の陽イオンとして植物体内で利用される Ca と Mg で同様の傾向が認められた点は興味深い。着目した領域には、細胞外カルシウムの受容体ホモログや、カルシウムを介して様々なストレス耐性に関与するアネキシン、そして Mg²⁺あるいは Ca²⁺の輸送体をコードする遺伝子などが存在していた。今後の研究により祖先種の持つ有用形質が明らかになることを期待したい。

イネの根の細胞壁におけるストロンチウム応答機構に関する研究

吉田 文哉 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 岩井 宏暁 (筑波大学 生命環境系)

<導入・目的>

ストロンチウム(Sr)はイネに取り込まれると根の伸長を阻害することが知られている。しかし、Sr 毒性のメカニズムは知られていない。その機構を知る手掛かりとして、根の細胞壁ペクチンによるアルミニウム毒性緩和が関係していると考えている。

アルミニウム(Al)はSrと同じく非必須元素で、根の伸長阻害を引き起こすことが知られている。イネは植物の中でもAl耐性が高いとされるが、これは根から多量のペクチンを分泌し、それが障壁となってAlの吸着を防ぐことにより、毒性を緩和することがわかっている。ペクチンが含まれる細胞壁は金属元素が細胞内に吸収される前に通過する最初の組織であり、重金属応答においてイオン隔離装置として機能していると言われている。Al毒性は、Caの置換に、効果的なSrやBaなどの元素の毒性と同じ傾向を示すとされており、SrもAlと同様な機構が存在することが考えられる。しかし、予備実験として、Sr処理したイネ(コシヒカリ)の根のペクチンをルテニウムレッド染色で観察したところ、他の重金属処理では見られなかった被膜状の構造が見られた。このことから、Srに対する細胞壁ペクチンの応答は、他の重金属イオンに対するものとは明らかに異なることが考えられた。このように、イネにおけるSr毒性のメカニズムや、それに対する根の細胞壁ペクチンの応答については不明な点が多いのが現状である。そこで本研究では、細胞壁のペクチンの量や質が変化したイネを用いてSrの植物体内での挙動や毒性に対する耐性の変化を調べることで、根の細胞壁およびペクチンのSr毒性への応答と毒性緩和における機能を明らかにすることを目的として実験を行った。

<材料・方法>

実験1. 伸長の測定

WT(品種:日本晴)の種子を3日間吸水させ、1.0 mMのCaCl₂水耕液(pH4.2)で3日間生育後、各濃度(0, 200, 500 μM)のSrCl₂を含んだCaCl₂水耕液で7日間処理した。Sr処理前と後に根との伸長量を測定した。

実験2. EGCG処理下での伸長の測定

WTの種子を3日間吸水させ、各濃度(0, 50 μM)のペクチンメチルエステルゼラチンEGCGを含んだ1.0 mM CaCl₂水耕液で3日間生育後、各濃度(0, 50 μM)のEGCGと各濃度(0, 200, 500 μM)のSrCl₂を含むCaCl₂水耕液で7日間処理した。Sr処理前と後に根の伸長量を測定した。

実験3. ルテニウムレッド(RR)による根のペクチン染色

実験1および実験2でサンプリングした根をRRで5分間染色し、脱メチル化ペクチンの観察を行なった。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分間染色し、メチル化ペクチンも含むペクチン全量の観察を行なった。

<結果>

伸長の測定

日本晴におけるSr処理による伸長量への影響を調べるため、各濃度のSrCl₂を処理し、Sr処理前と後の根の伸長量を測定した。Srの濃度が上昇するにつれ、根の伸長量は減少し、Sr 500 μMの伸長量は、Sr 0 μMの46%程度であった。

EGCG処理下での伸長の測定

当研究室の研究により、EGCGはイネのペクチン分泌量を増加させ、根の伸長を促進することがわかっている。そこで、EGCG処理下でのSr処理による伸長量への影響を調べるため、EGCGとSrを処理し、処理前と後の根の伸長量を測定した。EGCG未処理区では、実験1と同様にSr濃度が上昇するにつれ、根の伸長量は減少した。EGCG処理区においても、Sr処理によって根の伸長量は減少したが、EGCG未処理区と比較すると、伸長量の減少の程度は小さかった。

RRによる根のペクチン染色

日本晴において、Sr処理下での根のペクチンの様子を観察するために、RR染色を行った。Sr 200 μMとSr 500 μMでは、根の先端に被膜状の構造が観察されたが、Sr 0 μMでは観察されなかった。また、EGCG処理下では、Sr 200 μMとSr 500 μMだけでなく、Sr 0 μMにおいても被膜状の構造が見られた。また被膜状の構造には、多数の細胞構造が観察された。

<考察>

日本晴において、Srを処理することで根の伸長量は減少したが、EGCGを加えると減少の程度が小さくなったことから、EGCGはイネの根におけるSrの毒性を緩和することが分かった。また、EGCGはペクチンの分泌量を増加させることから、イネの根におけるSrに対する応答や毒性緩和にはやはりペクチンが関与していると考えられる。さらに、根のRR染色では、他の金属処理では見られない被膜状の構造の再現性が確認されたことから、イネの根におけるSrに対する応答は、他の金属に対するものとは異なることが示唆された。またこの被膜状構造には細胞層が観察されたことから、根の表面構造が分離したものである可能性が高い。また、EGCG処理下ではSr 0 μMであっても被膜状の構造が観察されたが、これはペクチンの分泌量が増加したことによるものと考えられ、Sr処理によるものとは異なると考えられる。

<今後の展望>

今後は、ペクチンによるSr応答について詳細に調べるためにポリガラクトソナーゼ過剰発現イネ *OsPG2-FOX* やペクチンメチルエステルゼラチン過剰発現イネ *OsPME1-FOX* を用いて、伸長の測定やRR染色を行う。また、Srの植物体内での輸送や挙動を調べるため放射性ストロンチウムを用いたトレーサー実験を計画している。

細胞壁改変イネを用いた塩ストレス応答の解析

藤井 智代 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 岩井 宏暁 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

植物は外界の環境から塩や乾燥といったストレスを受け、あらゆる生理・生化学的な反応を生じる。特に塩ストレスの場合、多くは植物の生長や成育に影響を及ぼし、塩害は現代の農業における脅威のひとつである。塩ストレスは、 Na^+ イオン毒性と浸透圧ストレスに分けることができる。植物はこれらのストレスを感知すると、様々な応答をすることによって、塩ストレス耐性を獲得する。塩ストレスにより細胞外の Na^+ 濃度が増加すると細胞内に Na^+ が流入し、細胞質における Na^+ 濃度が上昇する。高濃度の Na^+ は植物にとって有害であり、この Na^+ を細胞外へと排出または液胞内に隔離するため複数の Na^+ 輸送体が活性化される。この活性には、NHX 型遺伝子や SOS (Salt Overly Sensitive) 遺伝子といった特定の遺伝子の発現が必要であることがわかっている。特に SOS5 に関して、細胞表面に局在する GPI アンカータンパクをコードしていることが明らかにされ、細胞壁構造に重要な chitinase-like protein (AtCTL1) が塩ストレスに重要であることが示される。このように塩ストレス応答の一部が細胞壁構造と関係している可能性が示唆されているが、細胞壁構造と塩ストレスとの関係はほとんど理解されていないのが現状である。

植物の細胞壁はセルロース、ヘミセルロース、ペクチン、構造タンパク質、糖タンパク質、リグニンなどから構成される。塩ストレスの影響として、細胞壁中のペクチンを例に挙げると、通常ペクチンは Ca^{2+} で架橋しているが、細胞壁中の Na^+ が増加することによって、 Ca^{2+} の架橋が減少することが分かっている。また、近年の研究によって、細胞壁成分(リグニンやアラビノース)の生合成遺伝子が塩ストレス耐性に寄与していることが示された。

細胞壁組成は、生物・非生物ストレスへの応答において変化することが知られているが、その変化は種や細胞によって異なるため、不明な点が多い。そのため、本研究の目的は、イネにおける細胞壁組成の変化が塩ストレス耐性にどのような影響を及ぼすかについて理解することである。いくつかの細胞壁改変イネを用いて塩耐性を調べた予備実験の結果、ペクチン分解酵素である PG2 の過剰発現体において塩耐性に変化があった。PG2 の過剰発現体ではペクチン量が減少すると推測されるが、ペクチン量の変化とイネの塩ストレス耐性の関係を明らかにするために、*OsPG2-FOX* に着目して調査を行った。

【材料・方法】

・イネの生育

イネ (*Oryza sativa*) の日本晴、*OsPG2* の過剰発現体である *OsPG2-FOX*、自家交配により分離し、*OsPG2* を過剰発現するコンストラクトを含まないヌルセグリガント個体である *OsPG2-WT* の種子を 3 日間吸水させた後、2 週間の水耕栽培を行った。水耕栽培の最後の 3 日間は 100mM NaCl 条件で塩処理を行った。イネは根と地上部に分けてサンプリングし、生重量 (FW) を計測した。

・細胞壁組成の解析

サンプリングした *OsPG2-FOX* と *OsPG2-WT* の中で生育が揃っているものを選び、細胞壁を抽出した。TFA 処理によって、セルロースを含む TFA 不溶画分と、ペクチンとヘミセルロースを含む TFA 可溶画分に分けた。アンスロン硫酸法、カルバゾール硫酸法を用いて中性糖と酸性糖の量を測定し、ガスクロマトグラフィーを用いて、細胞壁を構成する糖の組成を解析することによって、TFA 可溶画分、不溶画分に含まれる単糖の定量を行った。

【結果・考察】

・イネの塩耐性

塩処理前から塩処理後の FW の増加量を比較すると、地上部と根の両方において、*OsPG2-FOX* の増加量が最も大きかった。

・細胞壁組成の解析

アンスロン硫酸法の結果、地上部においては、TFA 可溶、不可溶の両画分で *OsPG2-FOX* と *OsPG2-WT* の中性糖量は塩処理を行うことによって増加した。根においては、TFA 可溶画分では同様に増加したが、TFA 不可溶画分では、*OsPG2-WT* の中性糖量は減少したのに対し、*OsPG2-FOX* は変化しなかった。

カルバゾール硫酸法の結果、地上部においては、TFA 可溶画分と不可溶画分の両方で酸性糖量が増加したが、どちらにおいても *OsPG2-WT* でより大幅に増加した。一方、根においては、TFA 可溶画分ではどちらの系統でもあまり変化しなかったが、TFA 不可溶画分では両方で同様に減少した。

ガスクロマトグラフィーの結果については発表会にて報告する。

地上部と根で糖の変化が異なっていることから、塩ストレスに対する応答は部位によって異なる可能性が高い。

塩ストレス条件のトマト成熟過程におけるペクチン分解に伴うアスコルビン酸合成機構に関する研究

佐野 舞桜 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 岩井 宏暁 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

植物は動物と異なり移動ができないため、多くの環境ストレスに適応しながら生活している。その中でも塩ストレスは、浸透圧ストレスやイオン毒性を引き起こすことで植物の生育や代謝に支障をきたす。トマト果実においては、果実サイズや数の減少、果実硬度の増加といった生育・代謝阻害がおこる。一方で、グルコースやフルクトース等の糖類や、プロリン、GABA等のアミノ酸、そして一般的にビタミン C として知られているアスコルビン酸 (AsA) などの栄養成分が多く蓄積し、商品価値の高いトマト果実がつくられることも知られている。

植物において AsA は、体内の活性酸素種を取り除いてストレス応答や防御に役立つ物質である。植物の AsA 合成経路はいくつか知られており、主経路である D-マンノース/L-ガラクトース (D-Man/L-Gal) 経路は、植物で最初にシロイヌナズナで報告された (Wheeler *et al.*, 1998)。さらに、緑藻類の AsA 合成経路と考えられていた D-ガラクトツロン酸 (D-GalA) 経路が、イチゴ果実で D-GalA 還元酵素遺伝子 *GalUR* (*AKR2*) が単離されたことによりその存在が証明された (Agius *et al.*, 2003)。GalA は細胞壁多糖類であるペクチンの分解物である。つまり GalA 酸経路とはペクチン分解物を用いた AsA 酸合成の代替経路と言える。先行研究では、緑色のトマト果実から赤色のトマト果実へ成熟すると、AsA 合成経路は D-Man/L-Gal 経路から GalA 経路に切り替わることが示唆されている (Badejo *et al.*, 2011)。また、これまでに本研究室では、塩ストレス条件下でのトマト果実の前期の成熟ステージでペクチンの含有量が増加し、後期では分解が促進されることが示されている。このことから、成熟後期ではペクチン分解物である GalA の含有量も増加すると考えられる。本研究では、塩ストレス下の成熟後期では、GalA 経路が活性化し、AsA の合成に寄与しているのではと考え、GalA 経路関連遺伝子の発現解析と、塩ストレス条件のトマト果実中の AsA の局在を調査することにより、塩ストレス条件のトマト成熟過程におけるペクチン分解に伴う AsA 合成機構を明らかにすることを目的に実験を行った。

【材料・方法】

1. トマトの水耕栽培・塩ストレス処理

トマト (*Solanum lycopersicum* cv. "Micro Tom") を Yin *et al.*, 2010 の方法を用いて、24°C のインキュベーター内で水耕栽培した。水で濡らした濾紙に滅菌した種子を播種し、子葉が出た後ロックウールに植え替えた。塩ストレス処理は花が咲き始めた時点から開始し、NaCl 濃度を徐々に上昇させることで馴化させ、最終的に 150 mM になるように調整した。NaCl 濃度の調節は電気伝導率測定器を用いて行った。

2. サンプリング

トマト果実の成熟ステージのうち、緑色の Mature green、黄色の Breaker、オレンジ色の Turning、赤色の Red ripe の 4 ステージ別にサンプリングした。

3. 硝酸銀を用いたトマト果実の AsA 染色

Badejo *et al.*, 2012 と N.J. Chinoy, 1969 を参考に、コントロール、塩ストレス条件のトマト果実を 2-3 mm の切片にし、5% 硝酸銀溶液で AsA 染色した。

4. D-GalA 経路関連遺伝子の発現解析

コントロール、塩ストレス条件のトマト果実について、果実組織のうち、外果皮を用いて実験した。D-GalA 還元酵素遺伝子である *AKR* について、データベースより検索し、RT-PCR により発現解析を行った。

【結果・考察】

硝酸銀を用いたトマト果実の AsA 染色では、Mature green、Breaker、Turning、Red ripe 全てのステージで、塩ストレス条件下で生育させた果実が、より高いレベルで染色された。これは塩ストレス下では AsA が多く蓄積するという先行研究の結果と一致した。また、塩ストレス条件では、組織ごとに特徴的な AsA 染色性を示した。

トマトの発現データベースより検索した D-GalA 還元酵素遺伝子である *AKR* の発現解析では、コントロール、塩ストレスのどちらの条件でも、Breaker や Turning ステージで発現のピークを迎え、Red ripe ステージで発現が減少していく傾向が見られた。また、Turning ステージにおいて塩ストレス条件下で発現が強くなっていた。このことから、塩ストレスを与えて成熟前期で合成が促進されたペクチンは、Turning ステージには GalA 経路の *AKR* 酵素と反応し、Red ripe ステージでは AsA が蓄積すると考えられる。

【今後の展望】

硝酸銀を用いたトマト果実の AsA 染色では、塩ストレス条件下で与えた果実が高いレベルで特徴的に染色された。再現性を調査するためには、今後、サンプル数を増やす必要があると考えている。

今後は、塩ストレスに加え、水耕液中に GalA を処理し、その条件での AsA 量の測定や *AKR* の発現解析、AsA 染色を成熟ステージごとに行う予定である。