



生物学類

つくば生物ジャーナル

Tsukuba Journal of Biology

Vol.24 No.1 January 2025

www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb



THE WORLD

つくば生物ジャーナル

Tsukuba Journal of Biology

Vol.24 No.1 January 2025

www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb

令和 6 年度

生物学類卒業研究発表会要旨集

令和 7 年 2 月 18 日

筑波大学

生物学類

第一会場 (2B411)

9:40-	鈴木 郁恵 類はハチを呼ぶ? : マルハナバチの花選びにおける過去におぼえた色へのこだわり	2
9:55-	川口 拓真 サイズの形質に対するハナバチ類の訪花選好性	3
10:10-	小林 燦 Bee hotel とヨシ筒を用いた管住性ハチ類の多様性評価	4
10:25-	高野 葵 逃げるが勝ち? : ハダニ雄の繁殖戦術と捕食回避行動	5
10:40-	齊藤 温大 間違いの悲劇は避けられるのか? : ハダニにおける生殖的隔離の強化	6
休憩	(15分)	
11:10-	片岡 証人 揮発性抗カビ物質を産生するオカダンゴムシ腸内細菌の研究	7
11:25-	小出 夏生 腸内常在細菌 <i>Ruminococcus gnavus</i> の宿主の食餌に依存した腸内定着因子の同定	8
11:40-	鈴木 悠世 細菌が産生する膜小胞形成に関与する遺伝子の同定	9
11:55-	諏訪 怜音 セサミン代謝菌の分布に関する研究	10
12:10-	吉田 晴音 腸内細菌間の相互作用に関する研究	11
昼食	(50分)	
13:15-	宮田 将斗 キハダショウジョウバエとタカハシショウジョウバエの種間関係	12
13:30-	山野 虎太郎 双翅目に寄生する子囊菌ラブルベニアの研究	13
13:45-	平岩 伊武季 地衣生菌 <i>Cylindromonium dirinariae</i> の宿主の多様性調査	14
14:00-	安富 将吾 クモの網に捕集される菌類の多様性調査のための手法開発ージョロウグモを対象とした新手法の評価ー	15
14:15-	山野邊 裕樹 異なる植物種から分離された <i>Phyllosticta</i> 属菌の宿主特異性に関する研究	16
休憩	(15分)	
14:45-	松浦 眞子 Malawimonadida に近縁な未記載真核微生物 SRT706 株 と TS011B 株のミトコンドリアゲノム解析	17
15:00-	上西 慧莉紗 Thermoproteota 門古細菌における PCNA 進化	18
15:15-	稲葉 鴻基 分子シミュレーションでひもとく味覚受容体の味認識メカニズム	19
15:30-	渡邊 樹来 計算科学的に解明する核輸送受容体 Hikeshi と Hsc70 の熱依存的な結合メカニズム	20

第二会場 (2B412)

9:40-	岡野 美聡 トマト早期果実の維管束形成における塩ストレスの影響	21
9:55-	橘川 美怜 ペクチン分解酵素過剰発現イネを用いた側根形成における細胞壁機能に関する研究	22
10:10-	若月 采玖也 ジャカリン様レクチンによる傷害誘導性細胞分裂における細胞壁分布パターンに関する研究	23
10:25-	岡 夏実 エタノール散布によるトマト糖度上昇に関わる基盤研究	24
10:40-	渡邊 温太 トマトの形質転換と組織培養が不要なゲノム編集導入法の開発とその適応	25
休憩	(15分)	
11:10-	長嶋 玲 植物におけるタンパク質の一過的発現システム用いたヒノキ花粉アレルギーの生産	26
11:25-	田中 千裕 Evaluating nutrient effect on the <i>Orobanch</i> – red clover interaction	27
11:40-	古橋 夢摘 Competition mediates the host – hemiparasite relationship	28
11:55-	Jaychandar Niveda Deep root growth in response to nutrients and water in <i>Poa annua</i>	29
12:10-		
昼食	(50分)	
13:15-	今北 美穂 アイスプラント由来の RNA シャペロンの異所的発現がポプラの塩ストレス応答に与える影響	30
13:30-	野間 冬紗 シロイヌナズナ由来のガラクトキノール合成酵素の異所的発現がポプラの塩ストレス応答に与える影響	31
13:45-	長谷川 子龍 アイスプラント由来の RNA シャペロンの異所的発現がポプラの浸透圧ストレス応答に与える影響	32
14:00-	松本 真純 ポプラ SnRK2 プロテインキナーゼの異所的発現がシロイヌナズナの気孔調節に与える影響	33
14:15-	吉野 生萌 高温によるポプラの生育阻害の評価	34
休憩	(15分)	
14:45-	具志堅 芽生 ウニ幼生の発生における Wnt7 の機能解析	35
15:00-	神澤 由己 ヒドロ虫上にみられる未記載種を中心とした扁形動物門原卵黄目の系統分類学的研究	36
15:15-	山田 彩斗 伊豆半島沖水深 50m 以深の浅海域でのドレッジ採集による貝類相調査	37
15:30-	福井 涼士 Development of a method for the quantitative assessment of fish grazing pressure in temperate reefs	38

第三会場 (2C404)

9:40-	古平 真太郎 寄生蜂 <i>Asobara japonica</i> の毒がショウジョウバエ幼虫の成虫原基に作用するメカニズムの追究	39
9:55-	程 智浩 ショウジョウバエの形態形成に関わる神経分泌ペプチドに関する研究：インスリン様ペプチド Dilp8 との関連	40
10:10-	今野 花 社会的ストレスが脳脊髄液循環の恒常性に与える影響	41
10:25-	菊川 潤音 自閉症関連タンパク質 Hevin/Sparcl1 変異体の機能解析	42
10:40-	山田 淳真 ミクログリアにおける膜貫通型タンパク質 TREM2 の新規機能の解明	43
休憩	(15分)	
11:10-	玉城 孝 ミトコンドリア DNA 分子集団の制御に関する基礎研究	44
11:25-	中嶋 健 Nuclear mitochondrial DNA segments に関する基礎研究	45
11:40-	WILSON KAYE EMMA ミトコンドリア DNA の突然変異ががんの悪性化に及ぼす影響の解析	46
11:55-	照井 一葵 変異型ミトコンドリア DNA の蓄積におけるオートファジーの生物学的意義の検証	47
12:10-	板良敷 朝飛 錐体オプシンの分子特性が視覚に及ぼす影響	48
昼食	(50分)	
13:15-	松本 生成 死細胞貪食におけるフォスファチジルセリン結合タンパク質の機能解析	49
13:30-	日向寺 光洋 統合失調症関連キネシン KIF17 がミクログリア形態変化において果たす役割の解明	50
13:45-	久保 明澄 大脳皮質における <i>IL-17RA/RC</i> 発現の時空間分布：精神疾患モデルを用いた神経免疫関連の検討	51
14:00-	張 沁悦 ヒストンメチル化を介した睡眠要求の分子メカニズムの解明	52
14:15-	小嶺 大樹 SIK3-シャペロン結合の睡眠覚醒制御における役割の解明	53
休憩	(15分)	
14:45-	永井 一稀 REM 睡眠剥夺が恐怖記憶形成および文脈弁別に果たす役割	54
15:00-	滝 大斗 Target-AID による多重ノックアウト個体作製デザインを支援する KOnezumi-AID の開発	55
15:15-	関谷 来功 黄色ブドウ球菌における特定亜集団の分離法の開発	56
15:30-	石橋 遼 類似細胞検索のための Web アプリケーション「Cell similarity search」の開発	57

第四会場 (2C410)

9:40-	来間 太郎 オオタナゴ <i>Acheilognathus macropterus</i> の食性解析	58
9:55-	成田 紗由美 サンショウウオの卵に共生する緑藻の系統分類学的研究	59
10:10-	小野 つかさ 海洋細菌 <i>Alteromonas macleodii</i> が放出する膜小胞の定量評価	60
10:25-	斎木 穂歌 種分化後に核に移動した2つのミトコンドリア遺伝子	61
10:40-	高田 あかり クロララクニオン藻のルビスコリンカータンパク質の進化	62
休憩	(15分)	
11:10-	齋藤 亮佑 緑藻 <i>Tetratostichococcus</i> sp. P1 株のエレクトロポレーションを用いた形質転換法の検討	63
11:25-	及川 知穂 高濃度ケイ素存在下で生じる単細胞性紅藻 <i>Galdieria sulphuraria</i> のガラス化	64
11:40-	田中 萌子 硫酸性温泉紅藻 <i>Galdieria sulphuraria</i> による強酸性条件下でのレアアース回収	65
11:55-	引地 楓音 単細胞性紅藻 <i>Cyanidioschyzon merolae</i> における細胞外 pH 低下機構の解明	66
12:10-		
昼食	(50分)	
13:15-	荒木 聡太 遊水地の新規造成が水生植物の多様性に与える影響	67
13:30-	大下 愛恵 冷温帯二次林はどう遷移しているか? ~15年間の地上部バイオマス変化からの検証~	68
13:45-	宗像 優生 無毒へびとされてきたヒバカリが弱毒を有しているという仮説の予備的検証	69
14:00-	全 準浩 大腸菌で増幅したゲノム編集用プラスミドに生じた不明断片の解析	70
14:15-	須賀 敬海 親水性低分子に対する MA026 の上皮細胞層透過促進活性	71
休憩	(15分)	
14:45-	新井 冬結 分裂酵母形態形成変異株 <i>las11</i> の原因遺伝子の同定	72
15:00-	川端 倫太郎 繊毛虫テトラヒメナの飢餓時における細胞形態変化に関する研究	73
15:15-	加川 海来 <i>Tetrahymena thermophila</i> の繊毛に局在するアクチンアイソフォームの機能解析	74

令和6年度卒業研究発表会準備委員会

生物学類

成田 紗由美

石川 夏帆

伊原 さとみ

柿沼 陽菜美

黒田 陸斗

鈴木 晶博

谷口 元気

塚田 美空

長沢 叶生

中村 好文

野本 梨恵

萩野谷 光姫

服部 瑛心

吉本 賢一郎

表紙画

上西 慧莉紗

古橋 夢摘

表紙画の解説：

テーマは「世界」。生物は我々が住む世界を作り上げており、その学問である生物学はその世界について追及する学問になります。我々が学んでいる生物学の重要性を表現するためにタロットカードの「世界 (The World)」をモチーフに表紙画をデザインしました。四隅には情熱・理性・陸・水を示した、オルガネラ・実験器具・陸域生態・水圏生態を置き、円環は真核生物の大系統で表現しました。

令和6年度卒業研究発表会の巻頭にあたって

成田 紗由美 (筑波大学 生物学類 4年)

大学生生活の集大成ともいえる卒業研究発表会に際し、これまでの学生生活を振り返ってみます。

入学式の日、桜を濡らす雨は、まるで大学生生活への期待に影を落とす新型コロナウイルスの流行による不安や諦観を表しているようにみえました。入学以前からコロナ禍を経験していた私たちの胸中には、「きっと思い描くキャンパスライフはもう送れない」「もしかすると学生生活の間ずっと制限され続けるのかもしれない」といった思いがあったのではないのでしょうか。

しかし、桜は毎年咲き、それを見る私たちの心境も徐々に変わることとなりました。それはきっと入学以前には考えてもいなかったような、多くの経験を学生生活の中で送ってきたからこそその変化だと思えます。

生物学類に入ってすぐの私たちを出迎えたのは、基礎生物学実験でした。基礎生物学実験では、初めての実験やレポートに悪戦苦闘しながらも、滅多に会えない学類の仲間と協力し、励ましあって進めることができました。そして、何よりこれまでに教科書で習ってきたことを実際に目で見て、データを取り、整理することで、より深く習得して考察できることにこれまでになく感動していたことを覚えています。また、概論の講義でも、慣れないオンライン授業や課題の量、分厚い教科書に戸惑いつつ、自分の興味のある分野を探しながら、またこれまでに習ってきたことと結び付けながら、歩みを進めていきました。

2年生になるころには新型コロナウイルスによる制限も徐々に解除されていき、対面授業は増えていきました。毎日のように顔を合わせるうちに、交流の幅は広がり、より多くの生物学類の仲間と関わっていくことができたように思います。また、生物学類生にとって語らなくてはならないのが、専門の実験・実習です。菅平高原実験所や下田臨海実験センター、筑波キャンパスの自然に囲まれて調査を行ったり、時間を忘れて生物の観察に夢中になったりしたことは後にも先にもない貴重な経験となりました。

季節は巡り2025年2月18日、いよいよ春立つとき、私たちは卒業研究発表会を迎えます。私たちはこの1年間、各分野の最先端研究を目の当たりにし、その初めの一步を体験してきました。研究室に所属してからの日々はこれまでと大きく変わり、研究が中心の生活となりました。調査や実験を行い、失敗しては悩み、カラオケで歌って発散し、先生方や先輩方に背中を押される…この1年間、何度これを繰り返したかわかりません。しかし、最終的には、得られた成果にまた心が突き動かされることとなりました。

生き物や生物学に触れ、感動し、悩みながらまた感動したこの日々はきっとこれからの礎となると信じています。そうした意味で、この卒業研究発表会は「集大成」にして「通過点」なのだと思います。

そして、この卒業研究発表会は日々指導して下さる先生方や先輩方、学生生活についてあらゆる支援をして下さる生命環境エリア支援室や学類長室の職員の方々、準備・運営をして下さったり聴講して盛り上げてくれて下さったりする1~3年生の方々なしには成り立ちません。卒業研究や発表会に関わる全ての方々にこの場を借りて御礼申し上げます。

改めて振り返ると、生物学類生に助けられ、支えられてきた思い出が数多く蘇ってきました。多様な生物学類生の多様な研究が集う発表会、各々の思いや感動、情熱を胸に、臨んでいきましょう。

Communicated by Yoshihisa Hirakawa, Received January 16, 2025.

類はハチを呼ぶ? : マルハナバチの花選びにおける過去におぼえた色へのこだわり

鈴木 郁恵 (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】

野生の花は、近隣によく似た色の花が咲いている場合に、単独で咲いたときよりも多くのポリネーター (花粉媒介動物) に訪れてもらえることがある (Thomson 1978)。この促進効果の利益は、競争によるコストに打ち消されてしまう場合も多い。しかし、開花期が異なるため競争が起こらない植物の間では、マルハナバチのように学習能力が高く、同じ場所や過去におぼえた花色に固執するポリネーターのはたらかで、強い促進効果が生じる可能性がある (Ogilvie & Thomson 2016)。このような、促進プロセスの解明は、自然界における花色の多様性とその時空間的な分布を理解する上できわめて重要である。しかし従来の研究では、促進効果がどのような花色の間で生じやすいのか、といった基本的な知識すら、ほとんど明らかにされてこなかった。

動物は、複数の色受容体で捉えた光情報を神経信号に変換し、それらを脳内で統合して色を認識する。ハナバチの場合、3種類の色受容体に基づく色覚モデルで表される色空間 (色へキサゴン; Chittka 1992) における座標間の距離 (以下、色距離) が遠いほど、弁別学習 (報酬花の識別) の成績が悪くなる (Dyer 2006)。したがって、過去におぼえた色へのこだわりから生じる促進効果も、色距離が近い色の花間ほど起こりやすいかもしれない。そこで本研究では「ポリネーターは過去におぼえた花との色距離が最も近い花を好んで訪れる」という仮説を立て、クロマルハナバチを用いた室内実験で検証した。

【材料と方法】

実験は、クロマルハナバチのワーカー61 個体を対象に、65×102×65 cm のケージ内で実施した。人工花は、直径 35 mm に切り抜いた円形の色画用紙 (花卉) の中央に、20%または 30%のスクロース水溶液 (蜜) を含む皿を固定したものを用いた。

毎回の実験は、特定の花からの採餌をハチに事前学習させる「トレーニング」と、その後、事前学習とは異なる2色の花を提示し、訪花の偏りを調べる「テスト」からなる。

トレーニングでは、まず、背景と同じ緑色の花をケージの床に 8×8= 64 個並べ、ハチに採餌をおぼえさせた。続いて、黄・青・赤のいずれか1色の花 64 個を提示し、報酬と色の関連をおぼえさせた (事前学習)。テストでは、事前学習と異なる2色の花を32 個ずつ用意し、これらを16 個からなる2つのパッチに分けた。そして各色のパッチを市松模様になるように2×2 に交互に並べたものを、トレーニングから1日以上経った個体に提示し、20 訪花目までを記録した。

テスト用の花には、ハチの眼から見た色覚モデルを基に、事前学習した花との色距離が異なる2色を選んだ。さらに、これら2色が異なる色相に属するペア1 (レモン・そら) と、同じ色相に属するペア2 (オレンジ・だいだい) を用意した。ペア1に対する事前学習には黄もしくは青の花を、ペア2に対する事前学習には黄もしくは赤の花を用いた。仮説が正しければ、どちらのペアで

も、ハチは事前学習した花に色距離が近い方の花を好んで訪れるはずである。また対照実験として、事前学習させなかった個体でも、各ペアを用いたテストを実施した。

【結果】

訪花数 (1/0) を応答変数、事前学習した色を説明変数、個体をランダム効果とする一般化線形混合モデル (GLMM) をデータにあてはめた。すると予想どおり、ペア1 (色相が異なる2色) を提示した場合は、事前学習した花と近いほうの色を選ぶ傾向が有意に見られた (黄→レモンおよび青→そら; 図 1a)。ところが、ペア2 (同じ色相に属する2色) を提示した場合は、事前学習した花との色距離によらず、訪花はほぼ1対1であった (図 1b)。

【考察】

ペア1の結果では、過去におぼえた色へのこだわりから生じる促進効果は、仮説の通り、色距離が近い色の花間ほど生じやすいように見える。ところがペア2の結果では、ハチは事前学習した花との色距離が異なる花をほぼ均等に訪れており、これは仮説と一致しない。この違いの一因として、ペア1では2色うちの1色のみが学習した色と同じ色相だったのに対し、ペア2では両方とも学習した色と同じ色相だった点が考えられる。つまり、ハチは色距離ではなく、赤系や青系といった色相カテゴリーの共通性で花を選んでいるのかもしれない。これは、ハチが色弁別とは異なる基準で学習した色へのこだわりを発揮することを示唆する、興味深い知見である。今後はこの可能性を十分に検証するため、色距離と色相の類似度が一致しない2色を用いたテストが必要である。また野外では、局所的な空間スケールで、色相が同じ花の間でより強い促進が起こったり、色相が同じ花がシーズンを通して集中したりするかもしれない。これらの予測を自然環境下で確かめる研究も、今後の重要な課題である。

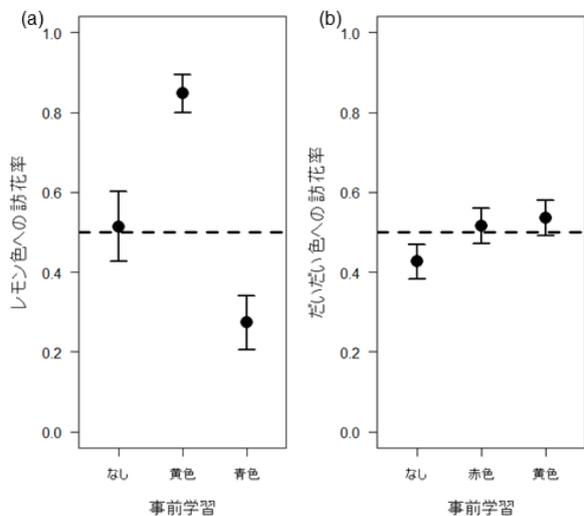


図1 事前学習した色とテストで選んだ花色の関係。(a)はペア1 (レモン・そら)、(b)はペア2 (オレンジ・だいだい)。黒丸と誤差棒は、GLMMモデル調整済み平均と95%信頼区間を示す。(a)では3点の全組み合わせ間には有意差が認められ ($P < 0.05$, 多重比較)、(b)では事前学習色の効果は有意でなかった ($P = 0.19$, Type II Wald chi-square test)。

ダイズの形質に対するハナバチ類の訪花選好性

川口 拓真 (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・目的】

ダイズ (*Glycine max*) は東アジア原産の作物で、世界的に重要な作物の一つとされており、世界の食用油の約4分の1、家畜用飼料の約3分の2の原料となっている。

日本では、味噌や醤油などの調味料や豆腐や納豆などの食料品の原料として使われ、ダイズの需要は高い。しかし、日本のダイズ収量は年間約24.3万トン、自給率は約6%と少なく、農林水産省は2030年までに収量34万トン、自給率10%を目標として、国内でのダイズ増産を進めている。

ダイズは自家受粉率が高い植物であるため、これまでポリネーターの積極的な利用はほとんどされてこなかったが、ダイズ増産のために新規の多収品種の作出が求められており、品種開発のためにポリネーターを利用した交配試験が行なわれている。しかし、ポリネーターが好むダイズの花形質については不明点が多い。

ダイズの品種間で違いがみられ、ポリネーターに影響を与える可能性がある形質として、外見から判断しやすい花色と毛じ色に着目した。標準品種でもユキホマレ (紫花×灰色毛じ) やくろこじろう (紫花×褐色毛じ)、いわいくろ (白花×褐色毛じ)、ゆめのつる (白花×灰色毛じ) など、花色が紫または白、毛じが灰色または褐色の系統がそれぞれ存在する。

以上のことから、本研究ではダイズの花形質として花色および植物体表面に存在する毛じの色に着目し、一般的なポリネーターであるクロマルハナバチ (*Bombus ignitus*) とセイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) のダイズ形質に対する選好性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

今回、花卉が紫色または白色の系統と、毛じが灰色または褐色の系統のダイズを筑波大学内のT-PIRC内の網室内で育成した(図1)。花色の異なる系統は褐色の毛じ、毛じ色の異なる系統は紫の花に統一されている。開花後、網室内にクロマルハナバチまたはセイヨウミツバチのコロニーを導入した。開花期間中(5日間)、1日2回(午前9時と12時)10分間の観察を行ない、網室内を飛び回る活動個体数と訪花個体数、ダイズ系統あたりの訪花回数を記録した。観察時に網室内の気温と湿度、照度を記録し、観察後に株あたりの開花数を調べた。調査後に種子を回収し、系統ごとの種子数を調査した。



図1 網室内の実験風景

【結果】

ハナバチ両種ともに、9時の観察で訪花回数が多かった。各時間帯の平均訪花回数は、クロマルハナバチでは9時に16.9回、12時に8.6回、セイヨウミツバチでは9時に22.2回、12時に7.3回であった。クロマルハナバチでは、ダイズ系統間で訪花回数に有意な差はみられなかった(図2, Mann-Whitney U-test, 花色 $p=0.282$, 毛じ色 $p=0.521$)。セイヨウミツバチでは、灰色毛じと褐色毛じの間では訪花回数に有意差はなかったが、白花よりも紫花への訪花回数が有意に多かった(図3, Mann-Whitney U-test, 花色 $p=0.023$, 毛じ色 $p=1.0$)。訪花回数に有意差があった紫花と白花の種子数はそれぞれ、 21.3 ± 13.1 (平均±SD) 個、 26.3 ± 12.2 個となり、有意な差はみられなかった(Mann-Whitney U-test, $p=0.340$)。

【考察】

ハナバチ両種ともに、午前中に活発にダイズへの訪花活動を行っていると考えられる。クロマルハナバチではダイズ系統間で訪花回数に差がみられなかったことから、ダイズ形質に対する選好性はなく、どのような形質の品種でもポリネーターとして利用できると考えられる。セイヨウミツバチでは、白花よりも紫花への訪花回数が多かったことから、セイヨウミツバチにはダイズの紫花への選好性があると考えられる。また、種子数に有意差がみられなかったことから、訪花回数が少なくても収穫量には影響を与えない可能性がある。

今回の結果から、ダイズの花の対する訪花選好性はハナバチ種間で差はあるが、ポリネーターとしての有用性には大きな違いがないことが明らかになった。

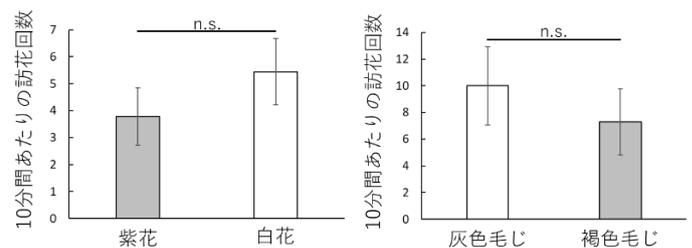


図2 クロマルハナバチにおけるダイズ系統ごとの平均訪花回数。エラーバーは標準誤差を示す。

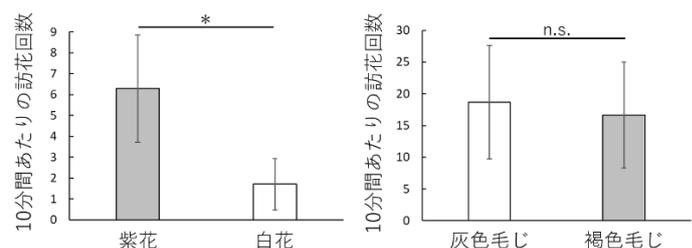


図3 セイヨウミツバチにおけるダイズ系統ごとの平均訪花回数。エラーバーは標準誤差を示す。

Bee hotel とヨシ筒を用いた管住性ハチ類の多様性評価

小林 燦（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】

Bee hotel は筒状の材に営巣するハチ類の調査や保全を行なうために使用する巣材であり、主に単独性のカリバチやハナバチが営巣する。Bee hotel は緑地が少ない都市部において、ハチ類の個体群維持に貢献すると考えられており、海外ではハチ類の保全活動や教育活動に利用されている。Bee hotel は設置や管理が容易である一方、管住性ハチ類の営巣に好適な条件は、周辺環境や巣材の状態などによって異なる。本研究では、Bee hotel を用いた管住性ハチ類の保全を目的として、以下の2点に着目した。

- ① 営巣基質の内径や材質の違いが、営巣するハチ類の多様性や選好性に与える影響
- ② Bee hotel 周辺の土地利用状況の違いが営巣するハチ類の多様性に与える影響

【方法】

筑波大学構内の4地点（山岳科学センター筑波実験林植物見本園、T-PIRC 農場、放射線・アイソトープ地球システム研究センター、理科系棟）とつくば市内の高校1地点にBee hotel とヨシ筒を設置した。Bee hotel には木板に溝を掘ったものを、ヨシ筒は50本を同じ長さで切り束ねたものを使用した。設置期間は筑波大学構内では5～10月、高校は7～10月とした。設置期間終了後、Bee hotel とヨシ筒を回収し、溝やヨシ筒内部にハチ類が活動した痕跡および繭がある場合には、使用されたものとして記録した。育房や前蛹の形態から、営巣したハチ類を科まで同定した。設置した地点周辺の土地利用状況を比較するために、設置地点を中心とした300m四方の航空写真を、25m×25mのブロックに分けた。土地利用を6つ（人工物、湖沼、森林、草原、畑、裸地）の 카테고リーに分類し、各地点においてこれらの占める割合を算出した。

【結果】

全地点において、管住性ハチ類が利用した痕跡が確認された（表1）。見本園や農場、アイソトープではBee hotel とヨシ筒の両方、高校ではヨシ筒のみにおいて、管住性ハチ類の営巣と前蛹が確認された。見本園では、他の4地点と比較して、使用された溝や筒が最も多かった。いずれの地点でもヨシ筒の使用割合が高かった。

営巣した管住性ハチ類は全部で4科が確認された。カリバチは3科（ベッコウバチ科、ドロバチ科、アナバチ科）、ハナバチは1科（ハキリバチ科）であった。Bee hotel の使用はアナバチ科が最も多く、3地点で確認された。見本園ではハキリバチ科、農場とアイソトープではドロバチ科の使用が確認された。ヨシ筒では、使用された割合はアナバチ科が最も大きく、次いでドロバチ科、ハキリバチ科、ベッコウバチ科であった。

使用されたBee hotel とヨシ筒を内径ごとに分類したところ、最も使用された内径は9～10mmであった（図1）。内径が大きくなるにつれて使用割合は増加し、内径が10mm以上になると使用割合は大きく減少した。

見本園および農場、アイソトープ周辺では人工物が占有する割合が小さく、それぞれ11%、15%、9%であった。また、森林、草原、畑を合計した面積の割合はそれぞれ81%、85%、91%であった。一方、理科系棟や高校では森林、草原、畑を合計した面積の割合はそれぞれ20%、4%であり、人工物の割合がそれぞれ80%、60%を占めていた。

【考察】

土地利用状況において植物が地表を占める割合が大きい地点は、管住性ハチ類がBee hotel とヨシ筒のどちらも使用することが多かった。植物体が多い環境が管住性ハチ類の個体数や活動に良い影響を与えていると考えられる。植物体が多い環境のうち、見本園が農場、アイソトープと比較して管住性ハチ類がBee hotel を利用した割合が大きくなった理由として、近くに池があり営巣に必要な土や泥を集めやすいこと、周辺の植物が多いことで、餌となる花蜜・花粉の採餌や餌昆虫の捕獲が容易になることが考えられる。一方、人工物が多く占有する環境では、管住性ハチ類の使用割合は低かった。これは、営巣に必要な材料や餌資源が少ないためと考えられる。ただし、人工物の割合が大きい理科系棟と高校において使用割合に差があるのは、高校の周辺に草原があったこと、グラウンドや植え込み等の植物が生育できる環境があったことで管住性ハチ類の活動が可能であったためだと考えられる。

本研究から、管住性ハチ類の保全にBee hotel を使用する場合、内径が5～10mmの内径の筒を複数用意し、周辺に植物体が多い環境に設置することで、多様な管住性ハチ類を営巣させることができると考える。

表1 各地点におけるBee hotel とヨシ筒の使用割合

	Bee hotel		ヨシ筒	
	溝の本数	使用された溝の本数 割合 (%)	本数	使用された本数 割合 (%)
見本園	350	79 22.6	200	107 53.5
農場	340	19 5.6	200	100 50
アイソトープ	340	20 5.9	200	94 47
理科系棟	340	0 0	200	30 15
竹園高校	280	0 0	200	80 40

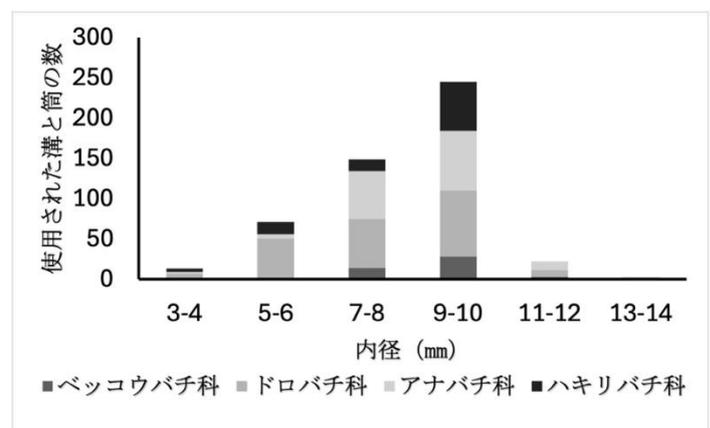


図1 内径ごとの溝と筒を利用したハチ類

逃げるが勝ち？：ハダニの繁殖戦術と捕食回避行動

高野 葵（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】

雄が雌に対する求愛や雌を巡る雄間闘争などで異なる繁殖戦術をとることは、多くの動物種で確認されている。少数の雄が用いる主流とは異なる戦術は、「代替繁殖戦術」と呼ばれる。繁殖戦術間では形態や行動なども異なることが多く、捕食リスクも異なると考えられる。実際、派手な色彩や警戒心が低下する闘争などの戦術は高リスクであり、捕食者の存在下では目立ちにくい戦術を用いる例も知られている。繁殖機会の確保と捕食回避はトレードオフの関係にあり、雄は両者を最大化する必要がある。その一例として、高リスクの捕食者からは即座に逃げ、低リスクの捕食者は逃げずにやり過ごす行動が様々な分類群で観察されている。この捕食者の危険度に応じた回避行動は、繁殖戦術間で異なる可能性がある。

ナミハダニ (*Tetranychus urticae*) の雄では、雄間闘争を行うファイターと戦わずにこっそり交尾を試みるスニーカーの2つの戦術が確認されている。両者とも第3静止期と呼ばれる脱皮して成虫になる直前のステージの雌の上に乗り繁殖相手を確保する「マウント行動」をとる。マウント中に捕食者のチリカブリダニ (*Phytoseiulus persimilis*) に遭遇すると雄は逃走するが、スニーカーはファイターより逃走開始が遅いことが分かっている。しかし、捕食リスクはチリカブリダニの成長ステージにより異なると考えられ、その危険度に応じた回避行動は調べられていない。

本研究では、マウント中のナミハダニの雄を異なる成長ステージのチリカブリダニに晒し、捕食者との接触から逃走開始までの時間を計測することで、雄が捕食リスクの危険度によって捕食回避行動を変えるか、そこに繁殖戦術間で差があるかを検証した。

【材料】

ナミハダニは実験室内でインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* var. Naga-Uzura) の葉上で継代飼育した Houten1 系統を使用した。チリカブリダニは2020年に Arysta LifeScience 社から入手し、ナミハダニを餌として継代飼育した飼育系統を使用した。両種の飼育と下記実験は25°C、60~100%RH、15L9Dの条件で行った。

(1) ナミハダニ雄の準備

未受精卵からは雄のみが生まれるため、数匹のナミハダニ未交尾雌を直径2.5cmのインゲンマメのリーフディスク上に導入し、3~4日間産卵させた。この卵を飼育し第3静止期まで成長した雄を直径1.5cmのリーフディスクに5匹ずつ移した。脱皮して成虫になるタイミングを合わせるため、一部の雄は1~3日間10°Cの冷蔵庫で管理し、実験前日に全ての雄を25°Cのインキュベーターに移して同時に脱皮させた。

(2) チリカブリダニの準備

各成長ステージ（幼虫、第1若虫、第2若虫、成虫）の絶食させた個体を用いた。マンジャーセルを用いて底面がインゲンマメの葉である密閉空間を作成し、そこに飼育コロニーから採集した卵を導入して孵化させることにより、幼虫や第1若虫の個体を手に入れた。第2若虫は実験前日、成虫は2日前にコロニーから採集してマイクロチューブに隔離し絶食させた。

【方法】

実験は次の手順で行った。ナミハダニの雄成虫5匹がいる直径1.5cmのリーフディスク中央に飼育コロニーから入手した第3静止期雌を1匹置いた。雄1匹が雌にマウントしたら、その雄の繁殖戦術を確認し、残りの雄は除去した。絶食させたチリカブリダニ1匹をそのディスク上に導入し、雄の逃走タイミングや捕食の有無を30分間観察した。逃走タイミングは、ハダニのペアにカブリダニが触れてから雄がマウントを止める、もしくは捕食されるまでの秒数を計測し、その秒数によって5つのグループに分類した（図を参照）。

解析はR (version 4.4.2) を使用した。順序ロジスティック回帰分析を行い、繁殖戦術、カブリダニの成長ステージ間で雄の逃走タイミングを比較した。

【結果・考察】

カブリダニの成長ステージが同じ場合は、先行研究と同様に、スニーカーの逃走タイミングはファイターより遅かった ($P < 0.05$; 図)。しかし、両者においてカブリダニの成長ステージが上がるほど逃走タイミングが早かった ($P < 0.001$; 図)。この結果から、ナミハダニの雄は捕食リスクの高さによって逃走タイミングを変えることで繁殖と捕食回避のバランスをとり、その回避行動の変化には繁殖戦術が影響すると考えられた。

また、一部の個体（ほぼファイター）でカブリダニに対して雄間闘争時のような威嚇・攻撃行動が見られた。本種では捕食者に対する反撃行動はこれまで確認されていない。本実験では一度カブリダニを追い払っても繰り返し狙われ、ペアの生存率が上がるわけではなかった。しかし、より広く他個体も存在する自然環境下での反撃は、捕食者を遠ざけ、捕食対象を自分以外に移させることで雄自身と雌を守る効果があるのではないかと考える。

今回は反復数の少なさから逃走タイミングごとの生存率を解析することが出来なかったため、今後は試行回数を増やす、または、隠れ家が存在する実験区を設定するなどして、早い逃走は本当に生存率を高めるのかなどを調査していきたい。

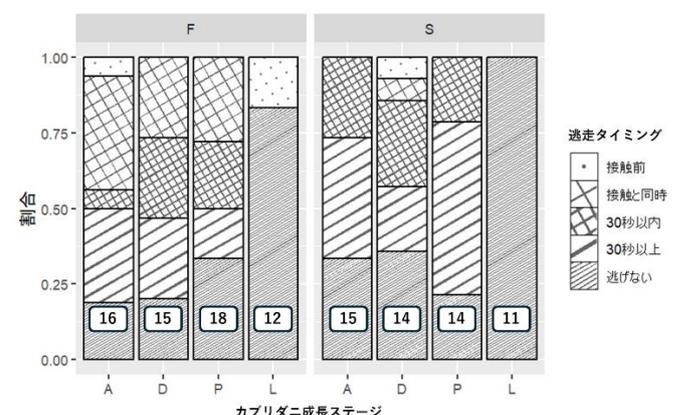


図 繁殖戦術・捕食者の成長ステージと逃走タイミングの関係

F:ファイター S:スニーカー

A:成虫 D:第2若虫 P:第1若虫 L:幼虫

図中の数字は反復数を示す。

間違いの悲劇は避けられるのか？：ハダニにおける生殖的隔離の強化

齊藤 温大（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】

種分化を促進するメカニズムの1つに、生殖的隔離の強化がある。生殖的隔離の強化とは、交配が適応度の低下を招く場合に、自然選択により接合前隔離が強くなることである。しかし、その研究では、主に二倍体生物が使用されている。生殖的隔離の強化について、より一般的な知見を得るには、二倍体以外の性決定様式をもつ生物を使用した研究が求められる。

ハダニの多くは、未受精卵から雄が、受精卵から雌が発生する半倍数性の性決定様式をもち、近縁2種のススキゴモリハダニHG型とトモゴモリハダニにおいても同様である。ススキゴモリハダニHG型は緯度や標高が低い、暖かい地域に生息している。トモゴモリハダニは、緯度や標高が高い、寒い地域に生息している。一部の山岳地域では、中程度の標高にてこれら2種の分布は重なる。2種間で交尾が起こることから、そこでは、異種との交配による適応度の低下が起こり、生殖的隔離の強化が生じる可能性がある。生殖的隔離の強化が生じているならば、異種との接触のある個体群(側所個体群)のほうが、接触のない個体群(異所個体群)よりも、生殖的隔離がより強くなっているはずである。

そこで、本研究では、ススキゴモリハダニHG型とトモゴモリハダニを対象に、側所個体群と異所個体群を用いて交配実験を行い、生殖的隔離の強さを調べ、比較した。

【材料・方法】

材料： ススキゴモリハダニHG型は、奄美(異所)、天城山・低標高(側所)から採集し、トモゴモリハダニは、いわき(異所)、天城山・高標高(側所)から採集し、飼育個体群を確立して実験に用いた。また、寄主植物のススキは山岳科学センター筑波実験林で栽培しているものを使用した。飼育と下記実験は、温度25℃、湿度40~80%、日長15L9Dの条件下で行った。

交配実験： 3×1 cmのススキの葉片に、成虫直前の発育ステージである第三静止期の雌を1匹導入し、脱皮させ、巣を作らせた。そこに、雄成虫を1匹導入し、産卵させた。雄導入後、10日目に成虫を取り除き、産卵数を記録した。卵が成虫になったら、性別を確認して取り除いた。

交配の組み合わせ： それぞれの個体群の雌に対し、同じ個体群、異種・異所個体群、異種・側所個体群の3種類の雄を導入した。また、未交尾産卵も確認するため、雄を導入しない区(雄なし区)も設けた。したがって、計16の組み合わせで交配実験を行った。

生殖的隔離の評価： 交尾をすると産卵数が多くなることから、産卵数を交尾前隔離の指標とした。未受精卵からは雄が、受精卵からは雌が発生することから、子の性比を交尾後接合前隔離の指標とした。また、接合後隔離による死亡は、受精卵から発生する雌のみで期待されるため、娘の死亡率を接合後隔離の指標とした。しかし、死亡した子の性別は分からないため、雄なし区での平均生存率で、成虫雄個体数を割ったものを死亡個体も含めた雄個体数とし、雌雄の個体数を推定して、その推定値でもって交尾後接合前隔離と接合後隔離の指標を計算した。

統計解析： 解析では、統計ソフトR(version4.4.1)を使用した。産卵数、子の性比、娘の死亡率の解析には一般化線形モデルを用い、雌個体群、雄の種類、それらの交互作用を説明変数とした。産卵数ではポアソン分布を、子の性比と娘の死亡率では疑似二項分布を誤差分布とした。

【結果・考察】

産卵数は、いずれの雌個体群でも導入した雄の種類に関わらず、雄あり区は雄なし区に比べて多かった($P < 0.001$)。そのため、交尾前隔離には生殖的隔離の強化が生じていないと考えられた。

子の性比(図1)は、いずれの雌個体群でも、同個体群雄に比べて、異種個体群雄を導入した場合、子の雌率が低下することが確認された。しかし、その低下パターンは雌個体群間で有意に異なっていた($P < 0.05$)。生殖的隔離の強化が生じている場合、異所個体群である奄美やいわきの雌個体群よりも、側所個体群である天城山・低標高および天城山・高標高の雌個体群で、子の雌率の低下が著しいと予想される。しかし、実際にはそのような傾向はみられなかった。

娘の死亡率(図2)は、上昇パターンが雌個体群間で有意に異なったものの($P < 0.05$)、いずれの雌個体群でも、同個体群雄よりも異種個体群雄を導入した方が高かった。特に、雑種が確認されなかった組み合わせ(いわき雌と異種・側所個体群雄、天城山・低標高雌と異種・異所個体群雄)以外では、その違いが有意だった($P < 0.01$)。つまり、雑種の生存率が低いため、生殖的隔離の強化が生じる条件はあると考えられた。

これらの結果は、生殖的隔離の強化を支持するものではなかった。しかし、接合前および接合後において、交配組み合わせごとに生殖的隔離の強さは異なっていた。この違いを引き起こす要因として、個体群間の遺伝距離や細胞質と核の相互作用、*Wolbachia*などの共生細菌の宿主操作の影響が考えられる。これらの要因については、今後検証する必要がある。

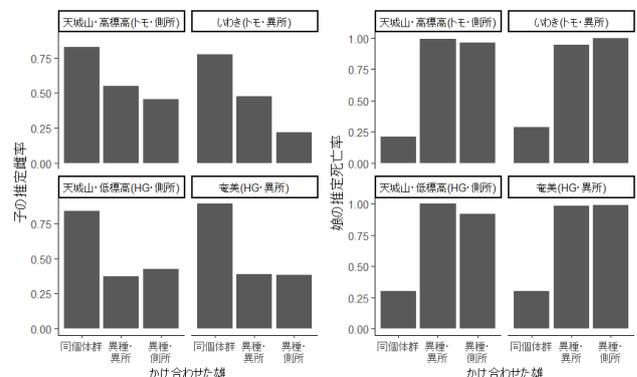


図1 各雌個体群における交配組み合わせごとの子の性比

図2 各雌個体群における交配組み合わせごとの子の死亡率

揮発性抗カビ物質を産生するオカダンゴムシ腸内細菌の研究

片岡 証人 (筑波大学生物学類)

指導教員：豊福 雅典 (筑波大学生命環境系)

【背景】

陸生の節足動物は様々な細菌と共生していることが知られており、共生細菌が宿主の発生や栄養獲得、免疫等に関する例が報告されている。オカダンゴムシ (*Armadillidium vulgare*) は、土壌中に生息し、動植物の枯死体を食べて分解・排出することで、生態系における分解者としての役割を担っている。このような生息環境や食性から、多くの微生物と接触し、相互作用していると考えられる。私はオカダンゴムシの糞便から、真菌の生育を抑制する細菌 *Brevibacterium sediminis* H4 株を単離した。そこで本研究は、この細菌株が産生する抗真菌物質を同定し、オカダンゴムシの腸内細菌として宿主に影響を与える可能性があるか検証することを目的とした。

【方法】

揮発性物質の抗真菌試験

H4 株が産生する物質の試験では、揮発性物質のみの影響を評価するため、2分割シャーレを用いて、プラスチック隔壁で分断され上部気相のみが交換される LB および PDA 寒天培地を作製した。LB 寒天培地側に H4 株を植菌して 30°C で 24 時間培養した後、PDA 培地側にカビ *Aspergillus niger* CBS513.88 株孢子懸濁液を滴下した。

ジメチルジスルフィド (DMDS) の試験では、ガラスシャーレ内のろ紙に DMDS を滴下し、*A. niger* を滴下した PDA 培地もしくは H4 株培養液を滴下した LB 寒天培地を入れた。

これらをビニールテープで密封し、*A. niger* は 48 時間、H4 株は 72 時間培養し、カビまたは H4 株の被覆面積を画像定量によって測定した。

H4 株が産生する揮発性物質の解析

H4 株を LB 寒天培地上で一晩培養した後、形成したコロニーを培地ごとくりぬいてバイアルに封入した。これをさらに 24 時間培養し、バイアル内の気相を採取しガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) によって解析した。

オカダンゴムシにおける H4 株の分布調査

調査に用いたオカダンゴムシは筑波実験林から採取された。糞便はオカダンゴムシを滅菌シャーレ内で数時間～1 日飼育することで回収し、DNA を抽出した。腸管サンプルは、採取後 1 日間無菌・無餌で飼育したオカダンゴムシを解剖して採取し、DNA を抽出した。

糞便内の細菌は、16S rRNA を標的としたユニバーサルプライマーおよび *Brevibacterium* 属特異的プライマーを用いたネステッド PCR 法によって検出した。腸管内の細菌は、16S rRNA の保存領域を標的としたプライマー¹ を内部標準に、可変領域を標的とした属特異的プライマー² を *Brevibacterium* 属の検出に用いて qPCR 法によって検出・定量した。

オカダンゴムシに対する H4 株の誘因性の試験

水で濡らしたろ紙を敷いたシャーレに、H4 株培養液を定着させたニンジン片とさせていないニンジン片を一つずつ配置し、そ

のシャーレ内にオカダンゴムシを 1 個体ずつ入れて 24 時間行動を撮影した。撮影された映像を解析し、各ニンジン片の周囲に滞在した累積時間を算出した。

【結果および考察】

同一シャーレ内にプラスチック壁で分断された 2 つの寒天培地を作製し、この細菌株と真菌を隔離培養したところ、真菌の生育抑制が抑制されたことから、揮発性の抗真菌物質を産生していることが示された。そこで本細菌株の培養容器内気相を GC-MS によって分析したところ、DMDS が検出された。DMDS は標品においても抗真菌活性が確認され、一方で H4 株自身の生育に対してはほとんど影響しなかった。これらのことから、H4 株が産生する揮発性抗真菌物質のひとつとして DMDS が同定された。

本細菌がオカダンゴムシの腸内に一般的に存在するか検証するため、*Brevibacterium* 属特異的プライマーを用いた PCR および定量 PCR を行った。その結果、調査したほとんどのオカダンゴムシ個体の糞便および後腸から同属細菌が検出された。このことから、本属の細菌はオカダンゴムシにおいて一般的に存在する腸内細菌であることが示唆された。

最後に、オカダンゴムシが利益を生じる可能性のある当細菌を積極的に取り込む行動をとるのか検証するため、H4 株を定着させた餌と定着させていない餌を置いた容器内におけるオカダンゴムシの行動トラッキング解析を行った。その結果、24 時間のトラッキング中における各餌周辺の累積滞在時間に明確な差異は認められず、オカダンゴムシに対する H4 株の誘因性は確認されなかった。

【考察】

以上の結果から、DMDS 等の揮発性抗真菌物質を産生する *Brevibacterium* 属細菌が、オカダンゴムシの一般的な腸内細菌であることが示唆された。宿主に対しての生態学的な機能に関してはさらに検証する必要があるが、本研究の成果は、揮発性物質が関与する細菌・真菌・動物の新たな相互作用モデルの提案につながる可能性がある。

【文献】

1. Muyzer, G *et al.* 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695-700.
2. Monnet, C. *et al.* 2013. Quantification of Yeast and Bacterial Gene Transcripts in Retail Cheeses by Reverse Transcription Quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**:469-477

腸内常在細菌 *Ruminococcus gnavus* の宿主の食餌に依存した腸内定着因子の同定

小出 夏生 (筑波大学生物学類) 指導教員: 豊福 雅典 (筑波大学生命環境系)

【背景と目的】

炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease : IBD) は、クローン病や潰瘍性大腸炎からなる慢性かつ再発性の腸炎であり、その病因はいまだ不明な点が多いものの、IBD 患者において腸内細菌叢の様々な変化が報告されている。炎症が悪化した活動性 IBD 患者腸内では健常者と比較して、グラム陽性の常在細菌である *Ruminococcus gnavus* (*Mediterraneibacter gnavus*) の相対存在量が多いことが報告されており、*R. gnavus* の定着量が IBD の病態に関与することが示唆されている。一方で、*R. gnavus* の腸管定着に寄与する遺伝子はほとんど同定されておらず、本菌と疾患との因果関係は不明なままである。

先行研究では、*R. gnavus* の腸管定着因子を特定することを目的とし、腸管定着に資する遺伝子変異を探索した。まず *R. gnavus* の野生株 (WT) と突然変異誘発株である *mutS* 破壊株を無菌マウス腸内に共定着させる競合定着試験を実施し、経時的に腸管内の *mutS* 破壊株の存在割合を測定した。次に、腸内で優占化した *mutS* 破壊株の全ゲノムを解析することで、腸管定着に有利な遺伝子変異の同定を目指した。また、微生物が利用可能な炭水化物群 (Microbiota-accessible carbohydrates : MACs) は腸内の栄養環境に影響を与えることで、腸内細菌のゲノムが適応変異することが報告されている^[1]。マウスに MACs の多い餌 (High-MAC) と少ない餌 (Low-MAC) を与え、食餌による腸管定着への影響についても比較した。腸管内で優占した *mutS* 破壊株の全ゲノム配列を解析したところ、Low-MAC 条件特異的に Phosphotransferase system (PTS) 輸送体をコードすると予測される *RGna_04445* 遺伝子にフレームシフト変異が蓄積していた。このことから、食餌特異的な腸管定着の促進には、特定の糖の輸送との関係が考えられた。本研究では、*RGna_04445* 遺伝子変異による Low-MAC 条件特異的な腸管定着優勢化メカニズムの解明を目的とした。

【材料と方法】

1. 供試菌株、供試マウス

菌株は *Ruminococcus gnavus* ATCC 29149 (WT)、*R. gnavus* ATCC 29149/pNORg10 (WT [Tm^R])、*R. gnavus* ATCC 29149 *RGna_04445::erm* (*RGna_04445* 破壊株 [Em^R])、*R. gnavus* ATCC29149 *RGna_04445::erm/pNORg12-mScarlet-I* (*RGna_04445* 破壊株 [Tm^REm^R]) を用いた。*R. gnavus* 各株は嫌気チャンバー内で 37°C の嫌気条件下で培養した。腸管定着試験には、8-10 週齢の BALB/c (雌) の無菌マウスを用いた。

2. マウス腸内競合定着試験

無菌アイソレーター内で無菌マウスに High-MAC または Low-MAC 食を与え飼育した。*R. gnavus* の WT [Tm^R] と *RGna_04445* 破壊株 [Em^R] の培養液を CFU が 1:1 になるように混合し、投与液とした。これをマウスに 10⁷ CFU / 200 μl で経口投与した。試験期間は 4 週間とし、菌液投与後 1 週間で、「High-MAC 食→Low-MAC 食」「Low-MAC 食→High-MAC 食」に食餌を切替え、腸管内の *RGna_04445* 破壊株の存在割合を CFU アッセイにて測定した。

3. *In vitro* 糖種類別生育曲線測定

R. gnavus ATCC29149 の WT と *RGna_04445* 破壊株をそれぞれ YCFAg 培地中で 37°C の嫌気条件下で増殖させた。腸管中に存在する糖のうち、17 種類を選抜し、糖を含まない YCFA 液体培地に各糖を終濃度 0.4% で添加した糖培地を作製した。各糖を含む培地に *R. gnavus* WT または *RGna_04445* 破壊株の前培養液を 1:50 で加え、37°C、48 h 培養し、生育曲線を測定した。

【結果と考察】

先行研究から、Low-MAC 条件特異的に腸管で優占化した *R. gnavus* のゲノム中には、*RGna_04445* の変異が蓄積することが明らかになった。そこで、*RGna_04445* 破壊株を野生株と共に無菌マウスに投与し、競合定着試験を実施することにより、本遺伝子の破壊が腸管定着に与える影響を評価した。High-MAC 食をマウスに与えている場合、細菌の投与後 1-2 週間で *RGna_04445* 破壊株の割合が野生株と比較して大きく減少した。その後、食餌を Low-MAC 食に変更すると、1 週間後には腸内で *RGna_04445* 破壊株が優占化した。このことから、Low-MAC 条件下では *RGna_04445* の破壊は腸管定着に有利であることが示唆された。

次に、*RGna_04445* は糖輸送を担う PTS 輸送体 EIIC、EIIB、EIIA と相同なドメインをコードすることから、*RGna_04445* 破壊株の競合定着能は糖輸送に関連すると予想した。そこで、17 種類の糖について、WT と破壊株のそれぞれの糖の利用性を生育曲線から評価した。その結果、破壊株は Xylose 培地で WT より生育が遅く、Arabinose 培地では WT より生育が速かった。マウス盲腸内容物のメタボローム解析の結果より、Low-MAC 食では腸管中のアラビノースの存在割合が高いことが明らかとなった。このことから、Low-MAC 食では *RGna_04445* 破壊株は腸内に豊富に存在するアラビノースを効率よく利用し、優占化している可能性が考えられた。

【今後の展望】

本研究によって *R. gnavus* の食餌特異的な腸管定着に寄与する遺伝子が同定された。*RGna_04445* は PTS 輸送体をコードすると予想したものの、様々な糖を唯一含む培地においても、遺伝子破壊によって顕著な生育阻害を示さなかった。この結果より、*RGna_04445* 破壊がどのような分子メカニズムで糖輸送に関与するかは不明のままであるが、*RGna_04445* がコードする PTS 輸送体は、カタボライト抑制機構を介して様々な代謝遺伝子群の発現制御に影響を及ぼしている可能性がある。そこで今後の研究では、Low-MAC 条件下で優占した破壊株の RNA-seq 解析を実施し、これらの予測を検証する予定である。*R. gnavus* の食餌特異的な定着制御は、本菌が関与する IBD の病態の制御に関与する可能性がある。本研究の成果が、ヒト常在細菌の腸管定着機構の一端を明する一助となり、本遺伝子と MAC を標的にした本菌の腸内定着量を制御する技術開発の基盤構築に繋がることに期待している。

【参考文献】

[1] Tsukimi T, et al. Genetic mutation in *Escherichia coli* genome during adaptation to the murine intestine is optimized for the host diet. *mSystems*. 2024 ;9(2) :e0112323

細菌が産生する膜小胞形成に関与する遺伝子の同定

鈴木 悠世 (筑波大学生物学類) 指導教員: 豊福 雅典 (筑波大学生命環境系)

背景・目的

多くの細菌は環境中で相互作用しながら存在しており、その一例としてシグナル物質を用いた細菌間コミュニケーションが挙げられる¹⁾。このうち、菌体密度依存的な細菌間コミュニケーションをクオラムセンシング(Quorum Sensing; QS)と呼ぶ。QSによって制御される集団的挙動として、毒素産生やバイオフィーム形成などが知られている²⁾。多くのグラム陰性細菌ではQSシグナル物質としてアシル化ホモセリンラクトン(N-acyl homoserine lactone; AHL)を利用することが報告されている^{3,4)}。AHLは化学修飾や側鎖長によって多様性が生み出されており、特にC12以上の長鎖AHLの多くは細菌が自身の膜から形成する膜小胞(Membrane Vesicle; MV)に内包されて伝達されることが明らかになっている⁵⁾。他にもMVは様々な生物学的機能をもつことが示されており、その例として遺伝子水平伝播やQS、毒素運搬、ファージに対するデコイなどが挙げられる⁶⁾。また、産業・医療の分野においても生体触媒やワクチンといった応用例がある⁶⁾。

*Paracoccus denitrificans*は土壌に存在する脱窒細菌として知られる、非運動性のグラム陰性細菌である。当研究室の先行研究によって、*P. denitrificans*はQSシグナル物質として長鎖AHLの一種であるC16-HSL(Homoserine lactone)をMVに内包していることが明らかになった⁷⁾。また、MV一粒にはQSを誘導するために十分なC16-HSLが内包されていることや、細胞指向性が存在することが報告されている⁷⁾。さらに、C16-HSLは細胞間の付着因子の発現を抑制することで凝集体形成を阻害することが明らかになった⁷⁾。これらのことから、*P. denitrificans*のQSによる集団制御においてMVがシグナル物質の送達を担う重要なキャリアーであることが示唆されている。このようにMVを介したシグナル伝達については知見が得られているが、MVの形成メカニズムは完全には解明されていない。そこで、本研究ではMVを介したQSのモデル菌として*P. denitrificans*を用いることでハイスループットなスクリーニング系を構築し、MV形成メカニズムの解明を目指した。

実験方法

1) 供試菌株

本研究で用いた株を以下の表にまとめた。

表1. 本研究で用いた菌株

Strains	Relevant characteristics
<i>P. denitrificans</i>	
Pd1222	野生株
<i>ΔpdnI</i>	Pd1222のシグナル産生遺伝子 <i>pdnI</i> の欠損株
<i>ΔPden_0684</i>	本研究のミュータントライブラリーの親株としたMV形成量が増加した株
<i>Chromobacterium violaceum</i>	
VIR24	自身ではC16-HSLを産生しないが受容することで紫色の色素を産生するレポーター株

2) MV形成に関わる因子のスクリーニング

MV高形成株に対してランダムに変異を入れたトランスポゾン(Tn)ミュータントライブラリーを作製した。得られたミュータントとシグナルレポーター株を1.5%の寒天培地上で8mm間隔で植菌し、48h、30°Cで培養し、親株と比較して伝達したシグナル量が異なるミュータントを選抜し、これを一次スクリーニングとした。二次スクリーニングとして一次スクリーニングで得られた株について同様の操作を行ない、再現性を確認した。

この後、選抜された株のMV形成量を定量した。定量に際しては、4ml TSB培地に植菌し、37°C、190rpmで一晩前培養し、新たな4ml TSB培地にO.D₆₀₀=0.01になるように植菌した。これを37°C、190rpm、24hで本培養し、培養後の濁度を測定した。培養上清を0.22 μmフィルターで滅菌し、4°C、1h、150,000 xgで遠心分離を行い、MVを回収した。回収したMVは脂質染色剤であるFM1-43FXで染色し、その蛍光強度を本培養後の濁度で除した値を算出した。これを親株と比較することで三次スクリーニングとした。

一連のスクリーニングによって選抜された株に対してシーケンス解析を行い、Tnが挿入された遺伝子を確認した。

結果・考察

合計で6716株のTnミュータントをスクリーニングし、37株が選抜された。これらの株をシーケンス解析した結果、LPSの合成に関わる遺伝子、鉄のキレートに関わるタンパク質やABCトランスポーター等の膜タンパク質をコードする遺伝子、好気呼吸に関わる遺伝子にTnが挿入されていることが明らかになった。このうち、31株においてMV形成量が低下したことから、MV形成を促進する遺伝子の存在が示唆された。

これまでの研究ではMV形成が膜の不安定化による受動的な現象であるとされている。しかし、本研究により、その他のMV形成メカニズムが存在する可能性も示された。

今後はこれらの遺伝子のノックアウト株を作製し、MV形成能やそのMVの特性について検証していく予定である。

参考文献

- Whiteley M. et al. (2017) *Nature* **551**: 313-320.
- Whitehead N.A. et al. (2001) *FEMS Microbiol Rev* **25**: 365-404.
- Wagner-Döbler, I. et al. (2005) *Chembiochem*, **6**: 2195-2206.
- Ochiai, S. et al. (2013) *Biosci Biotechnol Biochem*, **77**: 2436-2440.
- Morinaga, K., et al. (2020). *Environmental Microbiology Reports*, **12**: 355-360.
- Toyofuku, M., et al. (2019) *Nature Rev Microbiol*, **17**: 13-24.
- Toyofuku M. et al. (2017) *ISME J* **11**:1504-1509.

セサミン代謝菌の分布に関する研究

諏訪 怜音（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

ゴマに含まれるセサミンは抗酸化や血中コレステロール低下、脂質低下等、様々な生理活性作用をもっていることが知られており、多くの機能性食品やサプリメントに用いられている。このようにセサミンは利用され、ヒトの体内における代謝や機能が明らかにされつつある一方、微生物における代謝については明らかにされていなかった。そこで本研究においてセサミンを代謝する微生物の探索が行われ、ゴマ畑の土壌からセサミンを代謝する微生物を単離し、セサミンをセサミンモノカテコール、セサミンジカテコールへと変換する新規酵素の存在を明らかにすることが出来た。[1]

自然界においてセサミンはゴマ種子の他にもゴマの葉、モクレン（ハクモクレン）の葉に存在することが知られており、昆虫の幼虫による食害から葉を守る殺幼虫活性をもっていることが知られている。しかしセサミンの殺幼虫活性にもかかわらず、ゴマやモクレンの葉を専食する幼虫が存在する。それらの幼虫はセサミンの殺幼虫活性を回避するために、セサミン代謝能をもつ腸内細菌と共生している可能性がある。本研究では昆虫腸内におけるセサミン代謝細菌の同定及びその代謝経路の同定を目的とした。

方法

代謝細菌の単離

ゴマの葉を主餌とするシモフリスズメ、モクレンの葉を主餌とするコブシハバチの幼虫の腸サンプルをバッファーで懸濁後、スクリーニングを行った。

セサミン代謝活性の測定

単離した細菌を培養後集菌し、バッファー及び基質を加えて休止菌体反応を行った。反応は2倍量のメタノールで停止し、遠心後上清をHPLCに供することでセサミンの代謝活性を測定した。

セサミン代謝産物の構造推定

セサミンの代謝活性が見られたサンプルのうち、特に活性が高かったものにおいてタイムコースを作成して休止菌体反応を行った。反応を2倍量のメタノールで停止後遠心し、上清を質量分析計に供した。

セサミン代謝細菌の同定

セサミン代謝活性が見られた細菌について、培養後集菌しMagExtractor-Genome-を用いてゲノムDNAを抽出した。抽出したゲノムDNAの16S rRNA遺伝子配列をシーケンスし細菌の同定を行った。

結果

前任者によってコブシハバチ、シモフリスズメの腸内からスクリーニングされたサンプルにおいてセサミンの代謝活性を測定したところ、単離された全てのサンプルにおいてセサミンの代謝活

性が確認された。そこで、特に代謝活性の高かったシモフリスズメ由来の株において休止菌体反応を行い、経時的に代謝産物の解析を行った。その結果、代謝産物としてセサミンモノカテコール、セサミンジカテコールが順に生成したのち、他にいくつかの化合物が生成していることが示唆され、うち1つは本研究室で初めて同定された土壌細菌により生成するセサミンの代謝産物と同じ分子量をもつ化合物であることが示唆された。そこで今回用いた細菌を同定するためゲノム抽出を行い、16S rRNA配列を用いた解析を行った。その結果、本研究室で同定されていたセサミン代謝細菌と今回スクリーニングによって得られた昆虫の腸内細菌は異なる属・種であることが明らかとなり、これらの微生物は類似したセサミン代謝システムを保持していることが示唆された。従って、今後はより詳細な昆虫の腸内細菌によるセサミン代謝経路について明らかにすることを目標として研究を行う予定である。

参考文献

[1] Kumano T, Fujiki E, Hashimoto Y, Kobayashi M., “Discovery of a sesamin-metabolizing microorganism and a new enzyme.” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **113**, 9087-9092 (2016)

腸内細菌間の相互作用に関する研究

吉田 晴音（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）

【背景・目的】

腸内細菌は宿主である我々への様々な影響が示唆されており、栄養管理や生活習慣病の予防・治療、免疫機能や精神疾患との関連性、さらには身体能力の向上といった観点から今日研究が盛んに行われている。その一端として現在健康増進を目的とした食品やサプリメントとして、いわゆる「善玉菌」と呼ばれる乳酸菌や *Bifidobacterium* 属細菌が利用されている。

昨今のメタゲノム解析技術により腸内細菌が構成するフローラ（腸内細菌叢）を解析することができるようになったが、腸内細菌叢を構成する細菌間の相互作用については未だ解明されていない部分が多い。そこで本研究では複数の腸内細菌を共培養した際の発現量変化について解析が行われた。この研究により B 菌との共培養によって、C1 菌と C2 菌において生育阻害が確認され、いくつかの遺伝子において発現量増減がみられた。本研究ではこの発現量変化を誘発する因子の特定を目的として、異なる環境での培養による生育・培養後の様子や発現量について評価した。

【材料・方法】

培養・観察

嫌気性細菌用培地（GAM 培地）のほか、2 種の菌株に対しての生育阻害を示した B 菌の培養上清（以下 Bsup）を 50 % 置換した GAM 培地と、Bsup 50 % 置換培地と同様の pH となるよう調製した酸性 GAM 培地を用いて C1 菌と C2 菌を培養し、生育への影響や培養後の様子について観察を行った。培養後は生育阻害の程度を定量的に確認するために OD660 測定を行い、培養上清の pH 測定や目視での生育状態の確認も行った。

Total RNA 抽出と解析

前任者による実験で B 菌と共培養した際の C1 菌・C2 菌の RNA から、発現量解析が行われていた。そこで前項の培養菌体から total RNA を抽出し、RNA-seq 解析による単独培養・共培養・Bsup 添加培養・酸性環境培養時の発現量比較を行った。RNA-seq のデータは Geneious prime という解析ソフトを用いて比較した。Geneious prime での発現量比較では鋳型となる DNA が必要となるが、C2 菌については同一菌株のゲノム情報がデータベース上にみられなかったため、単独培養した菌体から DNA を抽出・シーケリングし、鋳型としてマッピングに用いた。

RT-qPCR を用いた発現量解析

生育阻害因子を同定する際の指標として、前項の実験を受け、C1 菌・C2 菌それぞれにおける Bsup 添加培養時に特異的な発現量変化を示す遺伝子を複数選んだ。それらの遺伝子発現量変化を確認するための RT-qPCR に用いるプライマーを設計した。また発現量変化がみられた遺伝子の他、各培地条件で顕著な変化がみられない遺伝子をリファレンス遺伝子として選出した。

【結果・考察】

培養・観察

Bsup 添加培養と酸性環境培養では、GAM 培地で培養した際と比較して OD660 の測定値が低くなっており、生育阻害が起こっていることが確認された。さらに Bsup 添加培養と酸性環境培養を比較すると、Bsup 添加培養時の測定値は酸性環境培養時よりも低かった。

培地の pH は培養前後で全体的に 0.3~0.5 ほど低下しており、培地の違いに依存する pH 変化はみられなかった。

目視での生育状態の確認では培地の違いによる気体産生への影響がみられ、C1 菌では Bsup 添加培養時、C2 菌では Bsup 添加培養時と酸性環境培養時で気体産生量が低下している様子が確認された。

Total RNA 抽出と解析

B 菌と共培養を行った際と Bsup 添加培養時、酸性環境培養時には、C1 菌・C2 菌両菌株ともに異なる遺伝子発現がみられることがわかった。Bsup 添加培養時と酸性環境培養時の比較でも発現量が異なっていたことから、pH 低下以外に Bsup には C 菌への生育阻害作用を示す何らかの因子が含まれていると考えられる。

RT-qPCR を用いた発現量解析

Bsup 添加培養時に顕著に増減する遺伝子各 7 個、リファレンス遺伝子として各 2 個を選定した。現在それぞれの遺伝子について RT-qPCR 用のプライマーを作製中である。

今後は Bsup に加熱処理を施したものやブタノール抽出を行ったもの、さらに共培養時の培養上清を用いて C 菌の培養を行い、Bsup に含まれる C 菌への生育阻害や発現量変化に影響する因子を同定するとともに、その因子の標的遺伝子の特定を試みる。

キハダシヨウジョウバエとタカハシシヨウジョウバエの種間関係

宮田 将斗 (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

キハダシヨウジョウバエ (*Drosophila lutescens*) とタカハシシヨウジョウバエ (*D. takahashii*) は、実験室で雑種の作製が可能であるほど近縁な2種である。1980年代には、*D. lutescens* は北海道から奄美大島まで、*D. takahashii* は九州や四国以南に分布していた^{[1][2]}。しかし近年、*D. lutescens* は沖縄本島でも記録されたほか^[3]、*D. takahashii* も分布が北上しつつあり(新井健太・小沼萌、未発表)、2023年秋の調査ではつくば市・石岡市まで記録が更新された^[4]。きわめて近縁なこれら2種が日本各地で安定的に共存していることから、これらの間には競争を避ける何らかの仕組みの存在が考えられる。その手掛かりとして本研究では、季節消長の種間差を検証することを目的とした。その過程で野外から種間雑種らしき個体が得られたため、あわせて報告する。

材料と方法

(1) 野外採集

2024年4月~12月の期間に、筑波大学構内でバナナトラップを用いた野外採集を行い、得られたシヨウジョウバエは70%エタノール中に保存した。

(2) 種同定

D. lutescens と *D. takahashii* は外部形態による識別が困難であるが、オス交尾器による識別が可能である。そのため種同定にはオスのみを用いた。解剖と同定は文献5の手法に従った。

結果

野外採集の結果、4月~10月の期間で、メス2397匹、オス2065匹を得た。個体数は雌雄ともに4月~5月に最も多く、その後夏季にかけて減少したが、10月に再度わずかに増加した(図1a)。2023年9月26日に大学構内で初めて採集された *D. takahashii* が、4月の時点で採集されたが、その割合は小さかった(約0.1%)。その後増加し、7月に *D. lutescens* を凌駕した(約82%)。8月には再び減少して *D. lutescens* が優占したが、10月にかけて再度徐々に *D. takahashii* の割合が増加した(図1b)。11月以降のデータは現在解析中のため、発表会で紹介する。両種の交尾器にはventral postgoniteと呼ばれる構造があり、*D. lutescens* では長く、*D. takahashii* では短い(図2a, b)。種間雑種では正逆交配いずれの組み合わせにおいても、この構造は両種の間隔的な長さとなっていた(図2c)。また5月14日に野外採集した個体の中には、この雑種と同様の特徴のある交尾器をもったものも1匹見つかった(図2d)。

考察

D. takahashii が4月25日に採集されたことから、昨年の秋までにつくばまで北上した集団が越冬していた可能性が示唆される。7月に80%以上が *D. takahashii* となったが、これは北方系である *D. lutescens* よりも高温耐性が高いためであると考えられる。また雑種と推定される個体も得られたことから、野外で種間交雑が起こっている可能性も考えられる。雑種オスは不妊だが雑種メスに

は妊性がある^[5]ため、野外で戻し交配を介した遺伝子浸透が起こっている可能性もある。

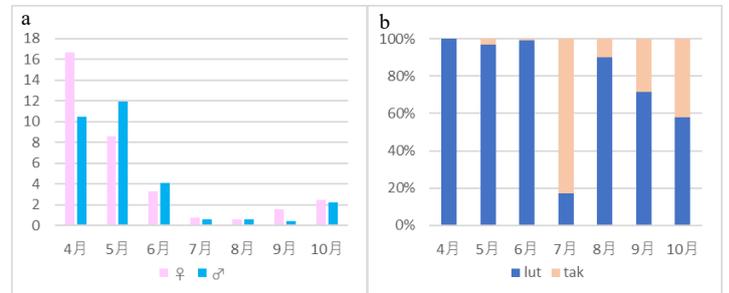


図1 *D. lutescens* と *D. takahashii* の季節消長

a: 雌雄別の2種合計個体数(1トラップあたり), b: オス個体における2種の割合

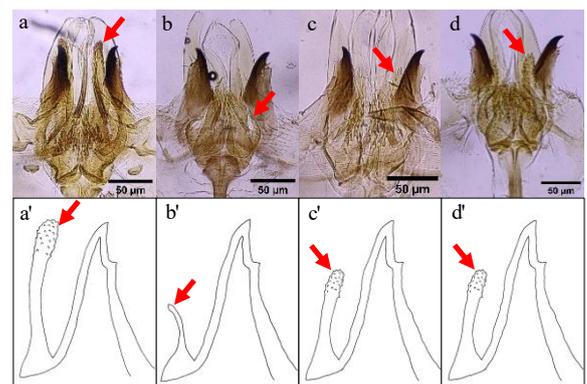


図2 *D. lutescens* と *D. takahashii* のオス交尾器

a: *D. lutescens*, b: *D. takahashii*, c: *lut*♀ × *tak*♂ 雑種, d: 野外の雑種らしき個体, a'~d': a~dの交尾器の模式図(写真の右半分に対応) 矢印は区別点となるventral postgoniteを指す。

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に感謝申し上げます。

引用文献

- [1] Kimura, M. T. (1982) Kontyu 50, 638-648.
- [2] Fukatami, A. (1984) Japanese Journal of Genetics 59, 61-70.
- [3] 阿久津純一, 大塚悠河 (2024) 昆虫. ニューシリーズ 27, 128-131.
- [4] 飯田和生 (2024) つくば生物ジャーナル, 23: 13.
- [5] 竹下瑛人, 大宮悠, 小沼萌, 澤村京一 (2023) 昆虫DNA研究会ニュースレター 39, 24-26.

双翅目に寄生する子囊菌ラブルベニアの研究

山野 虎太郎（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]

子囊菌門に属するラブルベニアは節足動物に外部寄生する絶対寄生菌であり、主に鞘翅目や双翅目に寄生している[1]。感染は宿主間での物理的接触によって生じると考えられている[2]。双翅目に関しては2023年に初めて日本で報告され、双翅目5種に3種のラブルベニアが確認された[3]。ラブルベニアの感染メカニズムや栄養摂取など未解明な点が多い。本研究では、日本産双翅目における宿主—ラブルベニアの種間関係を網羅することを目的にし、野外採集したサンプルからの新知見を得た。

[材料・方法]

採集された双翅目は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、実体顕微鏡下においてラブルベニア感染の有無および感染部位や宿主種を特定した。感染個体はリン酸緩衝液に浸し、宿主体表からラブルベニアを実体顕微鏡下で、ピンセットを用いて外した。その後、99.9%乳酸に浸してプレパラートを作製した。光学顕微鏡を用いて、ラブルベニアの形態を観察し、種同定を試みた。

[結果・考察]

10種の双翅目からラブルベニアが発見された(表1)。*Stigmatomyces majewskii* は *D. suzukii*, *D. rufa*, *D. sternopleuralis*, *D. bizonata* への感染が確認された。尚、*D. bizonata* に感染したラブルベニアは破損が大きく、別種の可能性もある。*Stigmatomyces scaptodrosophilae* は *Scaptodrosophila coracina*, *Sd. subtilis* への感染が確認された。これまで *Scaptomyza graminum* に感染しているラブルベニアは *St. scaptomyzae* として報告されていた[3]。しかし、*St. scaptomyzae* の本当の宿主は *Sc. plallida* であって、*Sc. graminum* に感染しているラブルベニアは *St. venetus* である[4]と Walter Rossi 氏からの指摘があった。今回採集されたものは幼菌であったため、同定には至っていないが、ここでは仮に *St. venetus* としておく。

今回の研究で *Ochthera circularis* に感染しているラブルベニアは広く分布していることが分かった。2022年には、1個体の *Ochthera circularis* から2つの形態のラブルベニアが見つかっており、*St. dubius* と *St. gracilis* に同定されてきた[5]。これらは感染部位の異なる別種、あるいは同種だが形態が異なるだけのどちらの可能性もあり、検討が必要である。今回採集された個体には *St. dubius* の寄生のみが確認された。しかしながら多くの成長段階の菌体が観察できた(図1)。付属体のサイズに対して、子囊殻の大きさが異なる菌が観察でき、付属体の形成が先行している可能性が示唆された。また筑波大学構内で、感染個体の採集ができたことは大きな成果である。これらを利用することで、ラブルベニアの成長過程や季節消長、感染メカニズムの解明につながると考える。

Psilopa polita に寄生していたものは、子囊殻にある縞模様、付属体の細胞数、首の先端部形態から *St. rugosus* [6]と同定した(図2)。*Homoneura* sp.からも未同定の *Stigmatomyces* が見ついている。

今後はDNA解析を通して、形態学以外の手法による同定や、宿主とラブルベニアの共進化に関する系統解析を進めたい。また、感染メカニズムや栄養摂取の解明に向けて、感染実験や電子顕微鏡観察を進める予定である。

表1 ラブルベニア感染が確認された双翅目の追加リスト (文献5以降)

宿主	ラブルベニア	採集地・採集日
<i>D. suzukii</i>	<i>St. majewskii</i>	筑波大学構内, 埼玉県入間市, 京都府京都市, 東京都福生市: 2024/04-11
<i>D. rufa</i>	<i>St. majewskii</i>	▲筑波大学構内: 2024/06/05
<i>D. sternopleuralis</i>	<i>St. majewskii</i>	埼玉県入間市: 2024/05/18, 06/01 ▲筑波大学構内: 2024/05/07
<i>Sd. coracina</i>	<i>St. scaptodrosophilae</i>	京都府京都市: 2024/10/06
<i>Sd. subtilis</i>	<i>St. scaptodrosophilae</i>	京都府京都市: 2024/10/10, 10/14
<i>Sc. graminum</i>	<i>St. venetus</i>	東京都八王子市: 2024/11/24
<i>O. circularis</i>	<i>St. dubius</i> (図1)	▲東京都八王子市, 多摩市: 2023/08-09 ▲神奈川県厚木市: 2024/11/07 ▲埼玉県戸田市: 2024/11/07 ▲筑波大学構内: 2024/11/11, 11/13
○ <i>D. bizonata</i>	<i>St. majewskii</i> ?	京都府京都市: 2024/12/02
○ <i>P. polita</i>	<i>St. rugosus</i> (図2)	筑波大学構内: 2024/06/14
○ <i>Homoneura</i> sp.	<i>Stigmatomyces</i> sp. (図3)	筑波大学構内: 2024/06/14

凡例 ○: 新規宿主 ▲: 新規採集地
D. = *Drosophila*, *Sd.* = *Scaptodrosophila*, *Sc.* = *Scaptomyza*, *O.* = *Ochthera*,
P. = *Psilopa*, *St.* = *Stigmatomyces*
 宿主の和名は上から オウトウジョウジョウバエ, ムナスジジョウジョウバエ, マガタマジョウジョウバエ,
 クロツヤジョウジョウバエ, スパネジョウジョウバエ, ナミヒメジョウジョウバエ, ミナミカマバエ,
 トキワクロツヤミギワバエ, シマバエ科の一種 (最後の2種は加藤大智博士による同定) である。



図1 *St. dubius* on *O. circularis*



図2 *St. rugosus* on *P. polita*

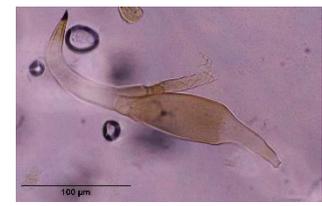


図3 *Stigmatomyces* sp. on *Homoneura* sp.

[謝辞]

本研究を実施するにあたり、小沼萌博士、加藤大智博士、神崎菜摘博士、藏満司夢博士、田中凌太様、出川洋介博士、平石拓海様、山崎いずみ様、研究室の皆様にお世話になりましたので、ここに深く感謝申し上げます。

[引用文献]

- [1] Weir, A. & Hammond, P.M. (1997) *Biodivers. Conserv.*, 6: 701-719.
- [2] Nalepa, C.A. & Weir, A. (2007) *J. Invertebr. Pathol.*, 94: 196-203.
- [3] Yamazaki, I. *et al.* (2023) *Fly* 17: 2234265.
- [4] Rossi, W. (1993) *Cryptogamic Botany*, 4: 34-39.
- [5] 藤原快稜 (2024) つくば生物ジャーナル, 23: 12.
- [6] Thaxter, R. (1901) *Proc. Am. Acad. Arts Sci.*, 36: 397-414.

地衣生菌 *Cylindromonium dirinariae* の宿主の多様性調査

平岩 伊武季 (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】

地衣類とは、菌類と藻類が共生し、地衣体と呼ばれる複合体を形成する生物のことである。地衣体は、形態によって葉状地衣、樹状地衣、痂状地衣に類別される。また、地衣体には菌類と藻類だけでなく様々な微生物が共生する。その一つが地衣生菌である。地衣生菌とは、地衣体上に生息し、地衣類を宿主として腐生的・寄生的に栄養摂取を行う菌類である。多くの地衣生菌は宿主範囲が狭いが、一部は宿主範囲が広い。地衣生菌の生理・生態的研究は発展途上であり、特に日本での研究例は少ない。大巻 (2023) により日本の地衣生菌の多様性調査が行われ、ボタタケ目ネクトリア科の *Cylindromonium dirinariae* Ohmaki, Okane, Crous & Verkley が新種として報告された (Ohmaki et al., 2023)。

Cylindromonium dirinariae はピンゴケ目ピンゴケ科のコフキメダルチイを宿主とし、地衣体を淡桃色に変色させる。大巻 (2023) により、地衣5種への本菌の接種試験と、地衣3種から分離した共生藻との共培養試験が実施された。その結果、ウメノキゴケの地衣体上でも無性世代を形成すること、本菌により共生藻細胞が変色・収縮することが明らかになった。しかし、この研究で用いられた地衣の種数は少なく、本菌が宿主として利用する地衣を解明するにはさらなる調査が必要である。

そこで本研究では、*C. dirinariae* の宿主の多様性を解明することを目的とした。本菌が宿主として利用可能な地衣を特定するために、地衣体への接種試験を実施した。また、本菌が栄養を摂取する共生藻の種を明らかにするために、地衣から分離した共生藻との共培養試験を実施した。

【材料と方法】

(1) 供試菌株および被接種地衣

2023年に大巻により分離された *C. dirinariae* の菌株 (NBRC 115852) を PDA 培地で継代培養し、供試菌株とした。つくば市内のケヤキおよびソメイヨシノの樹皮上に生育する地衣を採集し、被接種地衣とした。浸漬洗浄と超音波洗浄を行うことで、地衣体表面の付着物を除去した。

(2) 接種試験

洗浄した地衣体に供試菌株の含菌寒天片を接種し、ろ紙を敷いたガラスシャーレ内で維持した。適宜滅菌蒸留水を噴霧することで乾燥を防ぎ、2週間後に地衣生菌の無性世代および有性世代形成の有無、地衣体の変色の有無を観察した。

(3) 共培養試験

洗浄した地衣体の藻類層を削り取り、滅菌処理を行ったスライドガラスに挟んで滅菌蒸留水を添加し、すり潰すことで懸濁液を作製した。懸濁液を淡水緑藻の培養に適したBBM培地に滴下し、塗り広げた。インキュベーター内で20°C 明期14時間/暗期10時間の条件で培養し、共生藻の分離株を得た。得られた分離株の培養寒天片を *C. dirinariae* の含菌寒天片とともにPDA培地上に隣接移植し、共生藻の分離培養時と同条件で1週間培養した後、地衣生菌の挙動を観察した。

【結果と考察】

(1) 接種試験

宿主として報告されていたコフキメダルチイ以外にも、2綱3亜綱4目5科5属7種の地衣体の上で菌糸の伸長が確認された (表2、図1)。これにより、*C. dirinariae* は分類学的に幅広い種を宿主として利用することが示唆された。また、菌糸の伸長は葉状地衣、樹状地衣、痂状地衣全てで確認されたため、本菌は多様な形態の地衣を宿主として利用可能であることが示された。

(2) 共培養試験

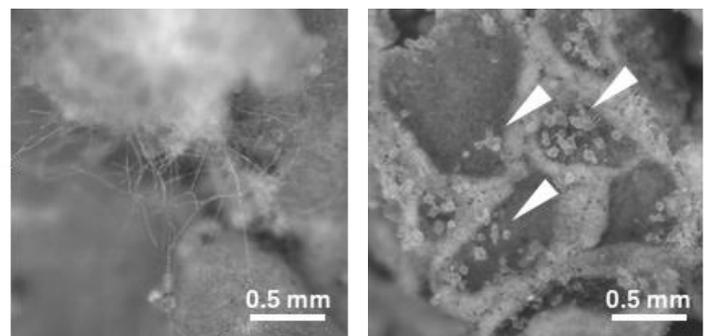
共生藻の分離培養の際に雑菌が混入していたため、全ての培地で雑菌のコロニーが形成された。そのため、共生藻と *C. dirinariae* との関係性を明らかにすることはできなかった。

【まとめ】

本研究によって、*C. dirinariae* は幅広い宿主範囲を持ち、宿主として利用可能な地衣の種は分類学的に多様であることが示された。

表1. 各地衣体への *Cylindromonium dirinariae* の接種結果

被接種地衣	菌糸伸長が見られた地衣体の数/ 接種した地衣体の数 (%)
コフキメダルチイ	9/9 (100)
キウメノキゴケ	0/3 (0)
クロムカデゴケ	0/3 (0)
コカゲチイ	0/9 (0)
コナアカムカデゴケ	0/3 (0)
コナイボゴケ	3/3 (100)
コナロゼットチイ	0/3 (0)
シロフチイボゴケ	5/6 (86)
シロムカデゴケ	0/3 (0)
チャシブゴケ属地衣	2/3 (67)
ナミガタウメノキゴケ	0/3 (0)
ハクテングケ	0/3 (0)
ヒメジョウゴゴケ	2/3 (67)
マツゲゴケ	0/3 (0)
モジゴケ属地衣	3/3 (100)
ロウソクゴケ	5/6 (86)

図1. *Cylindromonium dirinariae* を接種した地衣体上での *C. dirinariae* の菌糸 (左) と子囊殻 (右)

クモの網に捕集される菌類の多様性調査のための手法開発 — ジョロウグモを対象とした新手法の評価 —

安富 将吾 (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】

クモの網には様々なバイオエアロゾルが捕集されることが知られ、クモの網の捕集物を調べることで、生態系の理解やアレルギー対策などに繋がることを期待されている。

しかし、これまでの研究は調査対象として花粉に主眼を置いたものがほとんどであり、クモの網に捕集される菌類を調査する方法は確立に至っていないのが現状である。先行研究では、採集したクモの網を塩酸で溶かし、残った胞子を観察するという手法がとられているが (Bera et al., 2002)、この手法では菌が死滅し DNA も破壊されるため、菌の分離・培養やゲノム解析ができないという問題がある。

そこで本研究では、クモの網に捕集される菌類の多様性調査のための適正な手法の確立のために、「菌を死滅させずにクモの網だけを除去する手法」と「菌類の胞子がクモの網に付着している様子を観察する手法」を検討・開発することを目的とした。そして、これらの手法の適用の可否を評価するため、ジョロウグモ (*Trichonephila clavata*) の網を対象に、菌類相調査を行った。

【手法の開発】

○ 直接接種法

採集したクモの網を素寒天培地に直接接種し、発生したコロニーから菌を分離して PDA 培地に移植し培養する手法を検討した。

○ クモ網破砕法

クモの網を乳鉢に入れ、5%重曹水 1 ml を加えて乳棒を用いて約 15 分間すり潰すことで、クモの網を破砕し溶解させることに成功した。得られたサンプル溶液を培地に塗布したところ、コロニー発生が見られたことにより、溶液中の菌の生存が確認された。

○ クモ網プレパラート

クモの網とスライドガラスおよびカバーガラスをしっかりと接着させクモの網の破損を防ぐための接着剤兼緩衝材として、グリセリンとゼラチンを混合しマウントゼリーを作製した。プレパラートの作製については、マウントゼリーを塗布したカバーガラスとスライドガラスでクモの網を挟み込み、カバーガラスの外縁に沿って網からプレパラートを切り出した。

【調査方法】

筑波大学の実験排水処理施設の西側のクリ林にて、6 つのジョロウグモの網を対象にサンプリングを行った。まず、網の左右の半円からプレパラートを 1 枚ずつ切り出し、網の残りの部分は飲料用プラスチックストローで巻き取って採集した。

採集したクモ網サンプルについて、直接接種法で得られた胞子とクモ網破砕法のサンプル溶液からプレパラートを作製した。

3 通りの手法により得られたプレパラートを、光学顕微鏡を用いて観察した。観察できた胞子について、形態観察にもとづいて同定およびグループ分けを行った。

【結果】

全体として、*Alternaria* 属、*Cladosporium* 属、*Curvularia* 属、*Monochaetia* 属、*Nigrospora* 属、黒穂胞子に類似した 6 種類の菌と上記以外に 25 グループの菌の、合計 31 グループが確認された。

確認された菌類のグループ数について、3 通りの手法と 6 つの実験区の対応をまとめた (表 1)。直接接種法では、1 実験区あたり 1~3 グループの菌が分離されたが、一部では胞子形成が見られず、胞子を観察できた菌は合計 7 グループとなった。クモ網破砕法とクモ網プレパラートでは共に合計 28 グループの菌が確認されたが、クモ網プレパラートではクモ網破砕法に比べて、実験区ごとに見られた菌のグループ数の差異が大きい傾向があった。

表 1: ジョロウグモの網サンプル A~F および全体における 3 手法を用いた胞子形態観察によって確認された菌のグループ数

サンプル	直接接種法	クモ網破砕法	クモ網プレパラート
A	1	18	9
B	3	15	5
C	3	14	14
D	2	13	25
E	3	18	26
F	2	13	10
平均	2.33	15.17	14.83
全体	7	28	28

【考察・結論】

直接接種法は検出できる菌のグループ数が少なく形態観察に不適だが、実験操作は単純であり、ゲノム解析に使用する目的で、生きた菌体を確保するには有用であると考えられる。

クモ網破砕法は検出できる菌のグループ数が安定して多かった。サンプル作製も容易であり、クモの網に捕集される菌類の形態観察を行う上で、最も汎用且つ有用な手法と考えられる。また、サンプル溶液中の菌は生存しているため、単胞子分離や溶液の培地への直接塗布によって、菌を培養しゲノム解析を行うことが可能と予想される。さらに、サンプル溶液から菌体 DNA も直接抽出できることが確かめられれば、本手法の有用性がより高まることが期待される。

クモ網プレパラートはクモの網に付着した菌の胞子の観察に適する。しかし、検出できる菌のグループ数は不安定である点、マウントゼリーでプレパラートが密閉される点、プレパラート作製に技術を要する点から、本手法は多様性調査への適正は高くはないことが示唆された。

結論として、クモの網に捕集される菌類の多様性を調べるには、直接接種法とクモ網破砕法を用いて形態観察とゲノム解析を行うことが有効と考えられる。これにメタゲノム解析を組み合わせることで、より正確な多様性調査が行えると予想される。

異なる植物種から分離された *Phyllosticta* 属菌の宿主特異性に関する研究

山野邊 裕樹 (筑波大学生物学類)

指導教員：岡根 泉 (筑波大学生命環境系)

【背景と目的】

植物と菌類は様々な相互関係を持っている。植物と正の相互作用を持つ菌類の中には、内生菌が含まれる。内生菌とは、生活環のある時期において、明らかな病徴を引き起こさず宿主植物の生きた組織内に生息する菌類のことである。*Phyllosticta capitalensis* Henn.は、ラン科植物の壊死葉から発見された子嚢菌で、ラン科植物の褐斑病菌として記載され、その後多くの植物種の葉において内生菌として分離されることが明らかになった種である。病原菌として報告されている *Phyllosticta* 属菌の宿主範囲は、多犯性の種であってもおよそ1つの植物科内に収まるとされている。しかし、*P. capitalensis* は宿主範囲が広い内生菌として知られ、その宿主植物種は70以上の科にわたることが報告されている。これまで *P. capitalensis* は様々な宿主植物種からの分離報告があるが、それぞれの植物種から分離された本菌の菌株が宿主特異性を有するかについては不明である。

そこで本研究では、*P. capitalensis* の宿主特異性を明らかにすることを目的とした。まず、系統的に遠縁である異なる植物種の葉から分離された *P. capitalensis* の菌株、および本種との同一性が示唆されているネギ黒紋病菌 *P. alliacea* を対象に、分離源と異なる植物種へ接種した。そして、各供試菌株の内生菌としての定着と病原性発現における宿主特異性について調査した。さらに、異なる植物種から分離された *Phyllosticta* 属菌の菌株間の形態的および遺伝的差異について比較検討した。

【材料と方法】

供試菌株および供試植物

ヒラドツツジ葉から内生菌として分離された *P. capitalensis* RP1、同様にシランから分離された *P. capitalensis* BS1、ネギの病徴から分離された *P. alliacea* MUCC14 の3菌株を供試菌株として、それぞれの分離源の植物種であるヒラドツツジ(品種:オオムラサキ)、シラン、ネギ(品種:ホワイトスター)を供試植物として用いた。

交接種試験による定着能力・病原性の比較

供試菌株 RP1、BS1、MUCC14 のポテトデキストロース寒天(PDA)培地での培養コロニーから、滅菌蒸留水に分生子を懸濁してそれぞれ分生子懸濁液 (5.0×10^5 cells/ml) を作製した。作製した分生子懸濁液を各供試植物の葉にマイクロピペットを用いて滴下接種した。その後、病徴発生を継続観察すると同時に、接種2週間後と4週間後に接種点を含む葉を切り取り、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液による表面殺菌処理を行った。表面殺菌後の葉を、接種点を含む5 mm×5 mmの葉片に切り出してPDA培地に置き、形成されたコロニーを分離した。そして、分離株の形態学的特徴を観察し、接種菌株との同一性を確認した。

形態・塩基配列の比較

RP1、BS1、MUCC14 の培養コロニーからプレパラートを作製して光学顕微鏡による観察を行い、分生子、子嚢、子嚢胞子の長さおよび短径、付属糸の長さを測定した(n=25)。測定結果はTukey検定により、統計処理した。

RP1、BS1、MUCC14 の植物葉への侵入形態を比較するため、各菌株接種24時間後の葉をアルコールラクトフェノールトリパンブルー染色し、葉上での分生子形態を光学顕微鏡により観察した。

各供試菌株のコロニー端から菌体を掻き取り、DNAを抽出し、rDNA ITS(ITS1-5.8S rDNA-ITS2)、28S rDNA、*tefl-α* の3領域のPCR増幅およびシーケンス解析により各領域の塩基配列を決定し、菌株間の相同性を算出した。

【結果と考察】

接種試験では、ヒラドツツジとシランにそれぞれ内生する *P. capitalensis* の菌株 RP1、BS1、ネギ黒紋病菌 *P. alliacea* の菌株 MUCC14 において、ヒラドツツジおよびシランから接種後2週間と4週間で各接種菌株が内生菌として再分離された(表1)。また、全ての菌株において、接種後のネギで病徴の発生が確認されなかった。形態観察の結果、RP1、BS1、MUCC14 の分生子、付属糸、子嚢、子嚢胞子の測定値において、各菌株間で測定値に有意な差は確認されなかった。さらに、各菌株接種後の葉上における分生子の形態観察により、*P. capitalensis* が内生菌として定着する際に付着器形成することを明らかにした(図1)。RP1、BS1、MUCC14 において、ITS領域の塩基配列はそれぞれ99.6%以上、28S rDNA領域はそれぞれ99.7%以上、*tefl-α* 領域では100%の相同性を示した。

形態・分子データから、これら3菌株間に形態的、遺伝的分化が生じていないことが示唆された。さらに、*P. alliacea* は *P. capitalensis* と同一種であることが強く示唆された。また、接種試験の結果から、これらの菌株がヒラドツツジおよびシラン上で内生菌として定着することが確認された。本研究成果は、異植物種に内生する *P. capitalensis* が宿主特異性を持たず、系統的に広範な植物種に対して内生菌として定着できる可能性を示した。

表1 ヒラドツツジ、シランの各菌株接種後2、4週間での再分離結果。(+:再分離された処理区、括弧:再分離された葉片数/供試葉片数)

	ヒラドツツジ		シラン	
	2 wk	4 wk	2 wk	4 wk
RP1	+(2/6)	+(4/6)	+(4/6)	+(3/6)
BS1	+(4/6)	+(5/6)	+(3/6)	+(3/6)
MUCC14	+(1/6)	+(2/6)	+(2/6)	+(2/6)

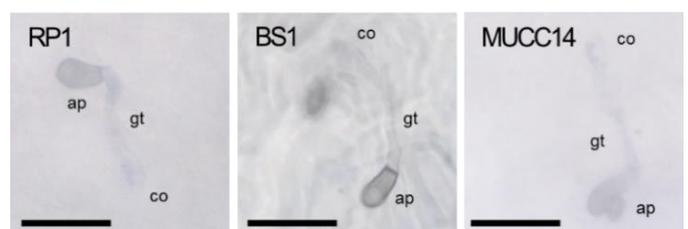


図1 アルコールラクトフェノールトリパンブルー染色後に観察した各菌株接種24時間後のヒラドツツジ葉上の分生子。(スケールバー20 μm、co:分生子、gt:発芽管、ap:付着器)

Malawimonadida に近縁な未記載真核微生物 SRT706 株と TS011B 株のミトコンドリアゲノム解析

松浦 眞子 (筑波大学生物学類)

指導教員：稲垣 祐司 (筑波大学計算科学研究センター)

【背景・目的】

ミトコンドリアは酸素呼吸を行う細胞小器官であり、現存真核生物系統の直近の共通祖先では既に確立していたと考えられている。ミトコンドリアは、真核生物進化のごく初期に細胞内共生したアルファプロテオバクテリアを起源とする。ほとんどの真核生物種のミトコンドリアでは、その進化的起源を反映し細菌型ゲノムを保持している。アルファプロテオバクテリアが宿主真核細胞内でオルガネラ化する過程と、それに続く真核生物進化中で、自由生活性生活に必要な機能を担う遺伝子は破棄され、オルガネラの機能とその維持に必要な遺伝子の大多数は宿主核へと転移した。その結果、現存真核生物のミトコンドリアゲノム (mtDNA) にコードされる遺伝子数は、アルファプロテオバクテリアのゲノムにコードされる遺伝子数と比べ極めて少なくなっている。これまでの研究により系統的に多様な真核生物種の mtDNA が解読された結果、系統間で mtDNA コードのタンパク質遺伝子レパートリーには、ある程度のばらつきがあることが分かっている。また少数の例外を除き、外来遺伝子が mtDNA に挿入されることは知られていない。従って、ある特定の真核生物が他の大多数の真核生物の mtDNA よりも大きなタンパク質遺伝子レパートリーをもつ場合、その真核生物は他の真核生物よりも初期に分岐したため mtDNA の縮退が進んでいないと解釈することができる。このロジックに従えば、系統的に多様な真核生物の mtDNA 遺伝子レパートリーを比較することで、真核生物の初期分岐系統について示唆を得ることも可能である。

所属研究室は白鳥峻志博士 (筑波大) と共同研究を進めており、白鳥博士が単離培養した 4 種の未記載真核微生物である TS010A 株、TS028 株、TS034 株および TS011B 株について RNA-seq データと DNA-seq データを既に取得している。さらに RNA-seq データから抽出した 328 種の核ゲノムコードタンパク質配列に基づく系統解析では、4 種の大まかな系統的位置が明らかとされた。その系統解析では TS010A 株と TS028 株は Metamonada クレードの基部から分岐する新奇系統、TS034 株は Breviatea の基部から分岐する新奇系統であると推測された。また TS011B 株は Malawimonadida と未記載真核微生物 SRT706 株との近縁性が強く支持された。このような背景のもと、本研究では上記 4 種を対象に mtDNA の解読とタンパク質遺伝子レパートリーの解明を試みた。

【材料と方法】

所属研究室の先行研究により、未記載真核微生物 4 種から、illumina NovaSeqX からの short reads として約 83-97 Mbp が取得されていた。本研究では mtDNA の解読を目指し、これらの short reads をアセンブルすることによりゲノム断片を復元した。まず、Fastp プログラム (<https://github.com/OpenGene/fastp.git>) を用いてアセンブルに適さないシーケンスクオリティが低い配列を取り除き、その後 unicycler プログラム (<https://github.com/rwick/Unicycler.git>) を用いてアセンブルを行った。アセンブルにより復元されたゲノム断片には、解析目的

の mtDNA 断片の他に、核ゲノム断片や培養液中に存在している細菌のゲノム断片が含まれるため、mtDNA 断片とそれ以外のゲノム断片を区別する必要がある。本研究では、tblastn を用いた相同性検索と、復元されたゲノム断片がどのように連結されているかを可視化するプログラムである Bandage (<https://github.com/rwick/Bandage>) を併用し、mtDNA 断片候補を抽出した。tblastn では、これまでに知られている最大のタンパク質遺伝子レパートリーをもつ Jakobida の mtDNA コードタンパク質配列 (67 種類) をクエリとし、復元したゲノム断片に対して相同性検索を実行した (bit score が 100 以下のヒットは破棄)。最終的に 50 Kbp 以下かつ GC 含量が 40% 以下であるものを mtDNA 断片候補とし、MFannot ウェブサイト (<https://megasun.bch.umontreal.ca/apps/mfannot/>) によりアノテーションを行った。

【結果と考察】

TS010A 株の DNA-seq データから、3 つの mtDNA 断片候補が抽出された。それぞれの断片長は、約 2.7、7.1、14.2 Kbp であった (GC 含量は 29-34%)。Bandage が作成した graph からは、この mtDNA は 7.1 Kbp 断片を 2 コピー含むと予測された。TS208 株のアセンブルデータからは mtDNA 断片として約 23.1、14.3、16.6 Kbp の 3 断片が発見され、いずれの断片も GC 含量は 31% 程度であった。TS208 株の mtDNA も、14.3 Kbp 断片を 2 コピー含む可能性が高い。TS034 株の DNA-seq データからは、約 30 Kbp 断片が 1 つだけ発見され、その GC 含量は 23.6% であった。TS011B 株からは、約 35.6 Kbp、GC 含量 23.6% の mtDNA 断片候補が発見された。

未記載真核微生物 4 種の mtDNA 断片候補を Mfannot でアノテーションした。TS028 株の 3 つの mtDNA 断片には、これまで報告された mtDNA コード遺伝子のレパートリーのほとんどが検出されたため、これらの断片により mtDNA が構成されている可能性が高い。TS010A 株と TS034 株の mtDNA 断片候補には、これまでに解読されたすべての mtDNA に発見されている遺伝子 (例えばチトクローム c オキシターゼのサブユニットやリボソーム RNA 遺伝子) の一部が同定されなかった。従って、本研究では見過ごした mtDNA 断片が存在すると思われる。同様な理由で、TS011B 株についても本解析で見過ごされた mtDNA 断片が存在すると思われる。特に TS010A 株、*Malawimonas jakobiformis*、SRT706 株間には明らかな近縁性があるため、3 種間での mtDNA コード遺伝子のレパートリーについて厳密な比較が可能である。*M. jakobiformis* の mtDNA は解読されており (<https://megasun.bch.umontreal.ca/ogmp/projects/mjako/gen.html>)、SRT706 株の mtDNA についても所属研究室の先行研究で完全解読されている (未発表)。TS011B 株 mtDNA の遺伝子レパートリーは完全に明らかとなっていないが、本発表では、TS011B 株、*M. jakobiformis* および SRT706 株の mtDNA の遺伝子レパートリーと比較し、議論を行う。

Thermoproteota 門古細菌における PCNA 進化

上西 慧莉紗 (筑波大学生物学類)

指導教員：稲垣 祐司 (筑波大学計算科学研究センター)

【背景・目的】

DNA 複製はセントラルドグマの一部を構成し、その分子機構は生命にとって必要不可欠である。その重要性ゆえに、DNA 複製機構に関わるタンパク質の多くは、生物界全般で共通している。広範な生物系統間で高度に保存された DNA 複製機構に関わるタンパク質の 1 つが、環状構造を持つ DNA クランプである。環状の DNA クランプは、その穴に複製中の DNA を通すことで DNA 分子を固定する。さらに DNA と結合した DNA クランプは、複数の DNA 複製関連タンパク質と結合することで DNA 複製の効率を上昇させる。DNA クランプは生物の系統により、環状構造を構成するサブユニットの数と種類が異なることが分かっている。

細菌類では単一の PCNA タンパク質の 2 量体が DNA クランプを形成するのに対し、真核生物では単一の PCNA タンパク質が 3 量体の環状構造を形成する。多くの古細菌 (例えばユーリ古細菌) は真核型 DNA クランプをもち、ホモ 3 量体が環状構造を形成する。一方、Thermoproteota 門古細菌の一部 (例えば *Sulfurisphaera tokodaii*) ではゲノム中に 3 種類の PCNA 遺伝子が同定されている。さらに、これら 3 種類の PCNA 遺伝子産物がヘテロ 3 量体 DNA クランプを形成することが実験的に明らかとなっている (Lu ら BBRC 2008 376 369-374)。しかし、古細菌 (特に Thermoproteota 門) でヘテロ 3 量体 DNA クランプが、いつ確立したのか、どの程度広い系統に分布しているのかなどは明らかにされていない。

本研究は Thermoproteota 門古細菌におけるヘテロ 3 量体 DNA クランプの起源と進化を考察するため、GTDB データベース (<https://gtdb.ecogenomic.org>) で公開されている古細菌ゲノムおよびメタゲノムデータ中の PCNA 遺伝子を探索し、ゲノム中に複数の PCNA 遺伝子をもつ Thermoproteota 門古細菌を探索した。また複数タンパク質配列に基づく最尤法系統解析によりゲノム間の系統関係を推測し、Thermoproteota 門古細菌においていつヘテロ 3 量体 DNA クランプが確立したのかを推測した。

【手法】

古細菌 PCNA 配列の取得と系統解析 GTDB データベースからメタゲノムを含む古細菌ゲノムデータをダウンロードし、データベースを作成した。あらかじめ入手した PCNA アミノ酸配列 (113 配列) をクエリとし、作成したデータベースに対して BLASTP を用いた相同性解析を行った。クエリ配列に E value が $1e^{-4}$ 以下でヒットした配列を PCNA 配列と見做し、後述する解析に用いた。本研究で取得した PCNA 配列とクエリ配列中の冗長性を CD-HIT プログラムを用いて冗長性を削除後、MAFFT プログラムによりアライメント座位の整列を行い、その後 trimAl プログラムによる系統解析に不適切だと考えられる座位の削除を行った。最終的に、619 配列 (228 アミノ酸座位) から構成される PCNA アライメントを、IQ-TREE プログラムを用いた最尤法系統解析に供した。置換モデルは LG+F+G4 を選択した。最尤系統樹の二分岐に対する信頼性評価は UFBoot2 を用いた。

Thermoproteota 門古細菌の系統解析 Thermoproteota 門古細菌において、いつヘテロ 3 量体 DNA クランプが確立したのかを精度よく推測するには、Thermoproteota 門古細菌の系統関係を正確に把握する必要がある。そこで GTDB が多遺伝子系統解析用に選別した単一コピータンパク質データのうち 48 種類を連結することで「arc48」アライメントを作成した (7952 アミノ酸座位)。このアライメントは 361 種/ゲノムから構成され、IQ-TREE プログラムを用いた最尤法系統解析に供した (置換モデル、LG+F+H+G4 ; 二分岐に対する信頼性評価、UFBoot2)。

【結果・考察】

これ以降 GTDB の古細菌分類体系を用いて議論する。本研究で行った PCNA 配列の探索の結果、Thermoproteota 門古細菌において Thermoprotei 綱および Thermoprotei_A 綱の一部の種で複数の PCNA 遺伝子が検出された。arc48 系統解析では上記 2 綱は姉妹群となったが、後述するように PCNA タンパク質の多様化は 2 綱間で独立に起こったと考えられる。それ以外の古細菌ゲノムからは PCNA 遺伝子は 1 種類のみ検出された。

Thermoprotei_A 綱に含まれる *S. tokodaii* など多様な古細菌ゲノムから 3 種類の PCNA 配列が検出された。3 種類の PCNA 配列はそれぞれ独立したクレードを形成し、それぞれの単系統性は UFBoot2 により強く支持された。Lu ら (BBRC 2008 376 369-374) の同定した *S. tokodaii* の PCNA 配列一すなわち *Sso* PCNA1、PCNA2 および PCNA3—は、それぞれ異なるクレードに包含されるため、本研究では「PCNA-1」、「PCNA-2」、「PCNA-3」クレードと呼称する。PCNA 系統解析では、上記 3 クレード間に強い近縁性は検出できなかった。従って、3 種類の PCNA タンパク質がどう形成されたかは不明であるが、この綱の共通祖先の DNA クランプは既にヘテロ 3 量体であったと推測できる。

Thermoprotei 綱古細菌では特定の PCNA タンパク質 (PCNA-X と呼称) が普遍的に分布していた。arc48 系統解析で、Thermoprotei 綱クレード中で Thermocladaceae 科と Thermoproteaceae 科は姉妹群になるが、両科に含まれる一部の種において PCNA-X に加え、系統的に独立した PCNA 配列 (PCNA-Y と呼称) も検出された。従って Thermocladaceae 科と Thermoproteaceae 科の共通祖先は PCNA-X に加え、PCNA-Y を追加獲得したと考えられる。またその後、一部の種では 2 次的に PCNA-X あるいは PCNA-Y を欠失した可能性がある。発表では、2 種類の PCNA タンパク質がどのような 3 量体を形成するかについても議論したい。

本研究の結果を総合すると、Thermoproteota 門古細菌の進化中で複数の PCNA タンパク質を保持する系統は独立に複数回確立したと考えられる。

分子シミュレーションでひもとく味覚受容体の味認識メカニズム

稲葉 鴻基 (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】

味覚は食物に含まれる化学物質 (味物質) を感知し、身体に必要な栄養素か有害物質かを判断する役割を担う。具体的には、基本五味

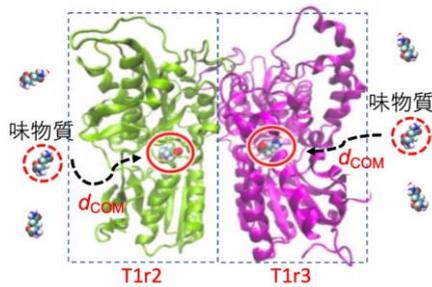


図 1. 味覚受容体の構造 (ヘテロ二量体)

を感知する「味覚受容体」によって味覚が見分けられており、生命を維持するために重要なはたらきをしている。例えば、甘味と旨味の受容体は T1r と呼ばれるタンパク質で構成されており、ヒト由来の場合、T1r1、T1r2、T1r3 の 3 種類が存在する。これらの単量体が結合することで二量体を形成し、T1r1-T1r3 ペアが旨味受容体、T1r2-T1r3 ペアが甘味受容体として機能する。現在までに、ヒトと同じタイプの味覚受容体を有する脊椎動物として、メダカ由来の甘味受容体 (T1r2-T1r3) にリガンド (グルタミン) が結合した複合体の結晶構造 [1] が決定されている (図 1)。そこで我々は、結晶構造をもとに分子動力学シミュレーション (MD) を実行し、味覚受容体の構造動態を調べ、味覚認識に重要なリガンド結合ポケットのダイナミクスや相互作用を解析した。[2] その結果、T1r1 および T1r3 の味覚認識ポケットの揺らぎに差が生じており、T1r2 と T1r3 のリガンド結合能に違いが見られた。具体的には、T1r2 と比較して T1r3 のリガンド結合ポケットは柔らかく、リガンドが外れやすいことが示唆された。つまり、T1r2 と T1r3 でリガンド結合能に違いが生じることにより、多様な味覚認識に対応していると考えられる。本研究では、メダカ由来の味覚受容体から得られた二量体化にともなう揺らぎの多様性に着目し、ヒト由来の味覚受容体においても同様な揺らぎ変化が観測されるのかを調べ、味覚認識メカニズムの普遍性を考察した。具体的には、ヒト由来の味覚受容体構造を作成して MD を実行し、味覚認識メカニズムを考察した。さらに、味覚受容体 (二量体) を構成する単量体 (T1r1、T1r2、T1r3) の組み合わせを考慮し、二量体を作成して MD を実行することで、味覚認識が揺らぎによりどのように制御されるのかを考察した。

【方法】

ヒト由来の味覚受容体の構造は実験的に決定されていないため、MD を実行する前にアミノ酸配列からモデル構造を予測した。タンパク質の構造予測は、深層学習に基づく予測器 (Alpha Fold) により、これまで極めて困難だった数百残基規模の構造予測がアミノ酸配列から可能となった。本研究では、AlphaFold に基づきヒト由来の味覚受容体 (天然構造) をアミノ酸配列から予測し、MD の初期構造として用い、MD を実行した。また、ヒト由来の味覚受

容体を構成する単量体 (T1r1、T1r2、T1r3) とその組み合わせ (二量体) を考慮し、初期条件を変えながら 400ns の MD を 6 セット実行して得られた原子座標トラジェクトリを解析した。以上により、二量体化にともなう揺らぎ変化を考察し、認識メカニズムにどのように影響するかを考察した。

【結果】

MD から得られた原子座標トラジェクトリをもとに自由エネルギーを計算し、味物質認識メカニズムを解析した。自由エネルギーは、各モノマーが味物質を認識する際に重要となるドメインに着目し、ドメイン間距離に沿って計算した (図 2)。自由エネルギー地形の形状と安定状態および準安定状態の数から、ヒト由来の味覚受容体は構成要素である各単量体 (T1r1、T1r2、T1r3) の組み合わせによって揺らぎを変化させ、多様な味覚認識に対応していることが示唆された。また、味覚受容体 (二量体) の形成において各単量体 (T1r1、T1r2、T1r3) の組み合わせにより、分子間相互作用と自由エネルギー地形が変化し、各単量体の揺らぎも二量体化と共に変化することが示唆された。以上の考察から導かれる結論として、ヒト味覚受容体は数少ない単量体を組み合わせることにより二量体としての揺らぎにバリエーションを生み出し、様々な味物質を効率的に認識するためのダイナミクスを巧妙に獲得かつ制御していることが示唆された。

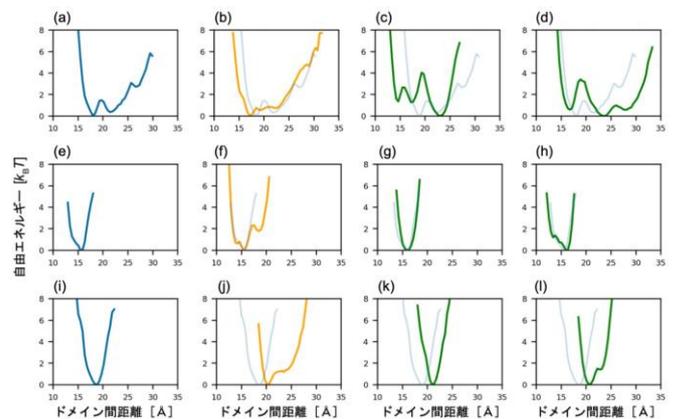


図 2. ヒト由来の味覚受容体を構成する各単量体 (T1r1、T1r2、T1r3) の自由エネルギー地形 (a, e, i)。ホモ二量体 (T1r1-T1r1、T1r2-T1r2、T1r3-T1r3) の自由エネルギー地形 (b, f, j)。ヘテロ二量体 (T1r1-T1r2、T1r1-T1r3、T1r2-T1r1、T1r2-T1r3、T1r3-T1r1、T1r3-T1r2) の自由エネルギー地形 (c, d, g, h, k, l)。各地形は各単量体における自由エネルギー。上段 (a, b, c, d)、中段 (e, f, g, h)、下段 (i, j, k, l) は、T1r1、T1r2、T1r3 に対応。二量体化の影響を調べるため、単量体 (T1r1、T1r2、T1r3) の自由エネルギー地形を重ねて表示。

【参考文献】

1. E. Nango et al., *Sci. Rep.*, **6**, 25745 (2016).
2. H. Aida et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **23**, 20398-20405 (2021).

計算科学的に解明する核輸送受容体 Hikeshi と Hsc70 の熱依存的な結合メカニズム

渡辺 樹来 (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)

【背景・目的】

ストレス応答は細胞の生存において必要不可欠の機能であり、シヤペロン Hsc70 は熱ショック応答を担うタンパク質の一つである。Hsc70 は定常状態で細胞質に存在するが、熱ショック時に核内に局在し、下流の熱ショック転写因子などに作用する。一般的に核内に輸送されるタンパク質の多くはインポーチンによって輸送されるが、インポーチンは熱ショック時にその機能が低下する。そのため Hikeshi と呼ばれる核輸送受容体が熱ショック時に Hsc70 を核内へ輸送する。[1]

Hsc70 の輸送体である Hikeshi は熱ショックからの回復に必要なタンパク質であり、Hikeshi が欠損した細胞では熱ショック後の生存率が低くなる。これまでの先行研究から、Hikeshi は単独で核内に移行可能であり、定常状態では核に局在している。Hikeshi は熱ショックで発現量が増えることが明らかにされており、Hsc70 の核局在は Hikeshi の量が増えることによって起こると考えられていた。しかし近年、Hikeshi は熱依存的に Hsc70 との結合活性が上昇することが報告された (図1)。[2] これにより、熱依存的に Hikeshi-Hsc70 が結合することが実験的に明らかとなったが、そのメカニズムは未解明である。そこで、本研究では Hikeshi が熱依存的に Hsc70 との結合活性が上昇するメカニズムの解明を目的とした。

Hikeshi は高温で Hsc70 との結合活性が上昇するが、変異体(F97A)では常温で結合活性が上昇することが実験的に明らかになっている。野生型 (WT) の結晶構造では E ループに位置する残基が疎水性ポケットに埋もれてループ領域がクローズド状態である。一方、F97A の結晶構造は E ループの構造が決定されていないため [3]、F97A の E ループはオープン状態であると考えられる。これらにより、Hikeshi-Hsc70 の結合活性の上昇は E ループの開閉が原因であるという仮説を立てた。本研究では、本仮説を立証するため分子動力学シミュレーション (MD) を用いて結合活性上昇のメカニズムを調査した。

【方法】

本研究ではタンパク質の構造変化を追跡できる計算科学的手法である MD を用いた。MD は分子構造を構成する原子座標を利用して、原子の位置や速度、原子に作用する力を計算する手順を繰り返すことで、分子構造の時間変化を追跡できる。

Hikeshi の結晶構造では一部の構造が欠損していたため、初期構造として AlphaFold2(AF2) を用いてヒト Hikeshi のアミノ酸配列から予測したモデル構造を用いた。F97A の初期構造は可視化ソフト (PyMOL) を用いて AF2 の予測モデルに変異を加え、作成した。最終的に、WT (300 K)、WT (400 K)、F97A (300 K) の計算条件でそれぞれ 1 μ s の MD を実行し、WT (常温、高温)、F97A において E ループが示す構造動態を調査し

た。ここで、E ループの開閉の判別には E ループに位置する残基 (F97) と疎水性ポケットに位置する残基 (W67) に着目し、それらの残基間距離を用いた。

次に E ループが Hsc70 と結合するかを調査した。先行研究より、Hsc70 が基質として認識する配列は 7 残基程度とされている。[4] そのため、7 残基になるよう E ループを 5 つの window に分割し、分割領域と Hsc70 の複合体を AF2 で予測した。また、E ループの結合性を比較するためそのコントロールとして、Hsc70 のモデル基質である NR ペプチド、ポリセリンとの複合体も同様に AF2 で予測した。

【結果・考察】

熱依存的な結合活性の上昇メカニズムを明らかにするため 2 つの調査を行なった。1 つ目は F97A と高温環境における WT がオープン状態を取りやすいかを、2 つ目は E ループは Hsc70 と結合するかを検証した。

1 つ目の調査では、WT と F97A について、常温、高温における E ループの開閉を比較した。その結果、常温における WT と比較して、高温と F97A では E ループと疎水性ポケットとの距離が大きくなることが分かった。この結果から、Hikeshi は高温、または F97A において E ループがオープン状態をとりやすいことが示唆された。

2 つ目の調査では、E ループ、NR ペプチド、ポリセリンと Hsc70 からなる複合体の妥当性を AF2 が出力する iPTM Score により評価した。予測精度を比較したところ、Hikeshi の E ループの後半部分と結合した複合体が高い精度 (0.84) を示し、NR ペプチドのスコア (0.85) と類似していた。これにより、E ループは Hsc70 と複合体を形成し、特に E ループの後半部分と結合しやすいということが示唆された。

以上の結果から、温度依存的な結合活性の上昇は Hikeshi の E ループがオープン状態に変化することで Hsc70 と結合し、複合体の形成が引き起こされると示唆される (図2)。

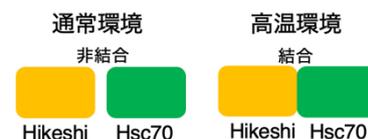


図1. Hikeshi-Hsc70 の結合様式



図2. 本研究から示唆される Hikeshi-Hsc70 結合メカニズム

【参考文献】

1. Kose S et al. *Cell*, **149**, 578-89 (2012).
2. Kose S et al. *Genes. Cells*, **29**, 782-791 (2024).
3. Song J et al. *Acta. Cryst. D*, **71**, 473-83 (2015).
4. Clerico EM et al. *J. Mol. Biol.*, **427**, 1575-88 (2015).

トマト早期果実の維管束形成における塩ストレスの影響

岡野 美聡 (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、移動することができないため、生育過程で環境による多くの脅威に直面する。植物の生育を阻害する非生物ストレスの一つである塩ストレスは、浸透圧ストレスとイオン毒性の二つの要因を引き起こす。浸透圧ストレスは水ポテンシャルの低下によって水利用効率が低下する現象であり、イオン毒性は塩のイオンが植物に有害な影響を及ぼすことである。これらの影響により、植物の生育や代謝に支障が生じる。トマト果実においては、塩ストレスが引き起こす浸透圧ストレスにより水分含有量が減少し、果実の拡大速度が低下することが報告されている。さらに、塩ストレス条件下で栽培されたトマト果実では、収量の低下や果実サイズの減少といった生育阻害が観察され、農業作物としての収穫量や品質に大きな弊害をもたらす。果実サイズの減少には、果実成長が維管束を通じて供給される水量などに依存していることが関係している。

トマト果実は被子植物であり、受粉を契機に子房が果実へと変化する。果実は果実形成過程と果実成熟過程を経て発達する。着果から成熟前段階 (Mature Green ステージ: MG) までを果実形成過程と呼び、この間に急激な細胞分裂と細胞肥大が進行し、果実サイズが増加する。MG以降は果実成熟過程とされ、色の変化や細胞壁分解による果実の軟化が起こる。この過程では果実の大きさは変化しないため、果実サイズの変化を理解するには、細胞分裂と細胞肥大が進行する果実初期形成過程における維管束の形成を解析する必要がある。

トマト果実に供給される水分の約 75%は維管束を通じて運ばれることが明らかになっている。塩ストレスは維管束の発達を阻害する要因として広く知られているが、一方で塩ストレス下において果実の頂端側で発達した維管束が観察されることや、塩ストレスが活性酸素を発生させ、それが維管束の発達を誘導する可能性が示唆されている。このように、塩ストレスは維管束の発達を抑制するだけでなく、促進する要因としても作用する可能性がある。しかし、果実初期形成過程における維管束の発達が塩ストレス下でどのように変化するのかについては、依然として十分に解明されていない。

本研究では、果実初期形成過程における維管束形成が塩ストレスによってどのように変化するかを明らかにすることを目的として研究を行った。

【材料・方法】

栽培・サンプリング方法

トマト (品種: Micro Tom) を 24°C のインキュベーター内で水耕栽培した。水に濡らした濾紙にトマト種子を滅菌播種し、子葉が出た後、ロックウールに植え替えた。塩処理は花が咲き始めた時点で花を全て落としてから開始した。徐々に濃度を上昇させることで馴化させ、最終的に塩濃度は 150 mM になるように水耕液を調整した。サンプリングは、開花直後の日数 (Days post anthesis

以下、DPA と略す) を、1 DPA、3 DPA、5 DPA、および開花直前の -1 DPA に着目して、実験に用いた。

BF-170 による道管細胞の二次細胞壁の可視化

BF-170 (Sigma-Aldrich) は、20 mM の濃度で DMSO に溶解し、ストック溶液を作成した後、-20°C で保管した。使用時には、このストック溶液を 1:2000 に希釈し、基部を切断した -1DPA、1DPA、3DPA、5DPA の果実の切断面に投与した。その後、GFP フィルターを用いて蛍光顕微鏡により観察を行った。

【結果・考察】

道管細胞の二次細胞壁を高感度に標識できる BF-170 (Nurani AM et al. 2020) を用い、果実初期形成過程における維管束形成の観察と塩ストレスの影響の調査を行った。

コントロール条件下では、受粉前の -1DPA において、果実の輪郭を形成する子房周縁部で二次細胞壁の強いシグナルが確認された。また、受粉直後の 1DPA では、子房周縁部に加え、内部で胚珠に伸びる網状のシグナルが強く観察された。これらの結果から、受粉前は果実の果皮となる子房周縁部の維管束形成が促進され、子房から果実へ転換する初期形成過程においてサイズ拡大の準備が整えられていることが示唆された。さらに、受粉直後には胚珠につながる維管束形成が促進され、これにより胚珠での種子形成に必要な無機栄養が供給されている可能性が考えられる。

一方、塩ストレス条件下では、受粉前の -1DPA および受粉直後の 1DPA において、コントロール条件で観察された子房周縁部および内部のシグナルが確認されなかった。塩ストレスによる浸透圧ストレスが引き起こす水分含有量の減少が、受粉前後という極初期段階から果実形成に強い影響を及ぼしていることが示唆された。

果実が肥大し始める 3DPA および 5DPA の観察では、コントロール条件下では内部の二次細胞壁のシグナル以外はほとんど観察されなかった。一方、塩ストレス条件下では、子房周縁部に二次細胞壁の強いシグナルが確認され、これはコントロール条件の -1DPA と類似したパターンであった。この結果から、果実の肥大が始まる時期において、コントロール条件下では新たな維管束形成が活発ではない一方、塩ストレス条件下では 3DPA 時点でコントロール条件より遅れて果実初期形成過程におけるサイズ拡大の準備が進行している可能性が示唆された。

本研究により、受粉前後における維管束形成の動態と塩ストレスによる維管束形成の遅延が明らかとなった。この結果は、果実形成過程における塩ストレスの影響が受粉前後という極初期段階から現れることを示している。

【引用文献】

Nurani AM et al. (2020) *Plant & cell physiology* 61(2) 255-264

ペクチン分解酵素過剰発現イネを用いた側根形成における細胞壁機能に関する研究

橋川 美怜 (筑波大学生物学類)

指導教員：岩井 宏暁 (筑波大学生命環境系)

【背景・目的】

植物の細胞壁は、細胞の形態を決定するとともに、器官形成や細胞の保護など多様な役割を担い、植物体全体の形態形成に深く関与している。細胞壁の主成分の1つであるペクチンは、その遺伝子発現量や性質の制御を通じて細胞壁の特性に影響を与え、器官形成や細胞接着に関与する。ペクチンの合成や性質の制御機構として、まずペクチンの主鎖となるホモガラクトuronanがゴルジ体で形成される。このホモガラクトuronanは、ペクチンをメチル化する酵素であるペクチンメチルトランスフェラーゼ (PMT) によって高度にメチル化されることで、流動性の高い状態となる。その後、細胞壁に輸送され、ペクチンを脱メチル化する酵素であるペクチンメチルエステラーゼ (PME) によって脱メチル化されることで、カルシウムイオンとの架橋構造が形成され、ゲル化が起こる。また、脱メチル化されたペクチンはペクチン分解酵素 (PG) の標的となり、低分子化される。このようにペクチンは、メチル化レベルや分子の大きさの制御を受け、性質が変化することで、細胞壁特性に変化を与えたと考えられている。しかし、ペクチンの器官形成に関する報告はまだ少なく、特に根におけるペクチンの機能は十分に解明されていない。一方で、根にはペクチンが豊富に含まれるとされ、根圏の形成や側根の形成などにおいて細胞壁の複雑な制御が必要と考えられる。先行研究では、イネの根における PMT と側根形成の関係が調査されており、*OsPMT* 遺伝子である *OsTSD2* や *OsPMT10* を欠損させた変異体では、野生型と比較して側根密度が高くなることが示されている。これは、PMT の欠損によりペクチンのメチル化が妨げられ、PG によって分解され低分子化が起こりやすい脱メチル化ペクチンが細胞壁に増加し、側根形成に影響を与えたと推測される。そこで本研究では、PG を過剰発現させたイネである *OsPG2-FOX* に着目し、その変異体の表現型を調査することで、ペクチン量の変化が根の器官形成や発達、特に側根の形成に及ぼす影響を評価し、ペクチンの根の器官形成における役割を明らかにすることを目的とした。

【材料・方法】

・実験 1. 根の伸長の測定

WT (品種: 日本晴)、PG を過剰発現させた変異体イネである *OsPG2-FOX* の種子を 3 日間吸水させ、1.0 mM の CaCl_2 水耕液で 3 日間水耕栽培を行った。また、根の長さを測定した。

・実験 2. ルテニウムレッド (RR) による根のペクチン染色

3 日間生育させた WT および *OsPG2-FOX* の根を 0.01%RR で 5 分間染色した。脱メチル化ペクチンを染色した。その後、0.1 N の NaOH で 1 分間けん化処理した後、再び 0.01%RR で 5 分間染色し、ペクチンの観察を行った。

・実験 3. 側根の計数

実験 2 で染色したサンプルの根における側根および側根原基の数を数えて、WT と *OsPG2-FOX* で比較した。

・実験 4. 免疫蛍光化学染色

3 日間生育させた WT および *OsPG2-FOX* の根の先端から 15~20 mm、25~30 mm の領域を切り出し、テクノビット樹脂に包埋した。ミクロトームを用いて、サンプルを包埋した樹脂から 5 μm の根の輪切り切片を作成した。この切片に対して抗 PG 抗体で免疫組織化学染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

【結果】

・根の伸長の測定

OsPG2-FOX では、WT と比較して根の伸長量が増加していた。WT に対して 126%の伸長量を示した。

また、*OsPG2-FOX* の根の先端領域で特徴的な根毛の形成が観察された。

・側根の表現型

OsPG2-FOX は、WT と比較して根に形成される側根の数が多かった。

・免疫組織化学染色

根の先端から 25~30 mm 領域の切片において、*OsPG2-FOX* の内鞘を含む中心柱部分では、PG の蛍光シグナルが WT よりも強く観察された。

【考察】

OsPG2-FOX では、WT と比較して根の伸長量が増加し、根毛の形成にも変化が見られた。*OsPG2-FOX* は、PG が過剰発現しているため、ペクチンの低分子化が進行することが報告されている。この結果から、ペクチンの低分子化により、ペクチン-カルシウムイオン架橋による構造強度の維持が困難になり、細胞壁強度が低下して根や根毛が伸長しやすくなったと考えられる。

また、側根の形成に関して、側根原基の形成が中心柱の内鞘細胞での細胞分裂によって開始し、その後、皮層や表皮を通過して発達することが知られている。本研究では、WT と比較して、*OsPG2-FOX* で側根数が増加していた。また、側根形成の開始する内鞘で PG の特異的な局在が見られた。この結果から、内鞘細胞の細胞壁におけるペクチンの分解や低分子化が活発になり、細胞壁が緩むことで側根の分化が促進された可能性が考えられる。

【今後の展望】

今後は、側根の分化とペクチンのメチル化レベルの制御の関係性を明らかにするため、PME を過剰発現させた *PME-FOX* を用いて根の伸長測定や側根形成の解析を行う予定である。

ジャカリン様レクチンによる傷害誘導性細胞分裂における細胞壁分布パターンに関する研究

若月 采玖也 (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】

植物は動くことができないため、様々な環境ストレスに対して応答、適応する能力を身につけている。特に傷害ストレスは、風や圧力、草食動物など多岐にわたり、植物体の発達の維持に甚大な影響を与える。このため、植物は傷害を受けると、傷ついた部位に傷害誘導性の植物ホルモンや転写因子を集め、細胞分裂を活性化させて傷を癒す能力を有している。この一連のプロセスは組織癒合と呼ばれ、植物の挿し木などにも応用されている。

組織癒合は植物に広くみられ、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の花茎では、傷害後3日で細胞増殖が確認され、7日後には完全な組織癒合が成立し、傷が回復することが報告されている^[1]。さらに、シロイヌナズナの組織癒合における細胞増殖に関わる因子として、At2-MMPとジャカリンが同定された。At2-MMPはメタロプロテアーゼの一種で、組織癒合において細胞増殖を負に制御する役割を果たす。傷害から5日後にかけて徐々に産生され、その後の組織の回復に重要な役割を担うことが報告されている^[2]。さらに、ジャカリンはAt2-MMPの分解ターゲットとして同定され、ジャカリンが欠損した変異体では傷口の細胞増殖が阻害される。このことから、ジャカリンは組織癒合における細胞増殖を正に制御する因子であると考えられる。しかし、ジャカリンによって誘導される細胞増殖の詳細な機構については、まだ解明されていない点が多く存在する。

そこで本研究では、ジャカリン処理後の組織がどのように増殖し、またどのようにその過程が誘導されるのかを明らかにするため、メチル化ペクチンの分布に着目することとした。ペクチンは細胞壁の主要成分であり、細胞壁の柔軟性や柔軟な細胞接着に必須である。ペクチンはゴルジ体でメチル化された状態で合成され、その後細胞壁に分泌される。このため、合成直後のペクチンはメチル化ペクチンであり、細胞増殖が盛んな領域では多く存在することが知られている。一方、メチル化ペクチンは細胞壁においてメチル基が除去され、脱メチル化ペクチンへと変化する。細胞増殖を伴う未分化な状態から分化へ転換する際には、脱メチル化ペクチンが多く分布するようになる。例えば、植物の分裂組織に近い部位ではメチル化ペクチンが多く、分裂組織から離れるにつれて脱メチル化ペクチンが多いことが報告されている^[3]。本研究では、メチル化および脱メチル化ペクチンの分布を可視化することで、ジャカリンによって誘導される細胞増殖過程における、増殖から分化への転換がどのように進行するのかについて考察した。

【材料・方法】

・シロイヌナズナの生育、切断処理およびジャカリン処理

シロイヌナズナの野生型 (WT Columbia-0) を用いて、インキュベーター内で栽培を行った。4~5週間後、20 cm程の長さに育った個体に切断処理を行った。茎の半分までマイクロナイフで切り込みを入れた後に、傷口にコントロールとして蒸留水 (DW)、または0.001%ジャカリンのどちらかを1 μ L塗布した。

・サンプリング

切断処理7日後に、コントロール処理とジャカリン処理のそれぞれのサンプルについて、Technovit 樹脂溶液を用いた樹脂サンプルの作成を行った。カルノフスキー固定液 (pH 7.0) で固定した後、0.1 M リン酸バッファーを用いた洗浄、エタノールによる脱水を行い、Technovit 7100 樹脂溶液に置換した。

・免疫組織化学染色による観察

樹脂サンプルをマイクロトームにより組織切片を作成し、それらに脱メチル化ペクチンを特異的に認識するモノクローナル抗体であるLM19と、メチル化ペクチンを特異的に認識するモノクローナル抗体であるLM20を用いて免疫染色化学染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

【結果・考察】

ジャカリン処理では傷口付近での顕著な細胞増殖が観察されたのに対し、コントロール処理では観察されなかったことから、ジャカリンによって、傷口付近の組織での細胞増殖が誘導されたことが示唆された。

LM20によって染色されたメチル化ペクチンのシグナルは、コントロールにおいては、傷口付近の組織では弱く、傷口奥の組織において比較的強いシグナルが観察された。また、ジャカリン処理においては、傷口付近の組織の顕著な細胞増殖が観察された部位において、LM20のシグナルが強く観察された。一方で、傷口奥においてはほとんどシグナルが観察されなかった。

次に、LM19によって染色された脱メチル化ペクチンのシグナルは、コントロールにおいては、傷口付近から全体的に弱く分布していた。一方、ジャカリン処理においては、ほとんどシグナルは観察されなかった。

以上の結果から、ジャカリン処理により傷口周辺で局所的な細胞増殖が誘導されていたことが確認されたこと、また、その増殖が起こっている組織はメチル化ペクチンが多く、未分化状態で細胞分裂を維持する傾向があることが示唆された。こういった未分化状態の細胞が多く存在することは、維管束組織への分化が多く起こることにつながるため、傷害部分を癒合し機能を回復する活着を促進する可能性がある。

【引用文献】

[1] Asahina *et al.* (2011) PNAS, 108, 16128-16132.

[2] Afifah Machfudzoh *et al.* (2023) Plant and Cell Physiology. 65, 1821-1832.

[3] Robert Palin *et al.* (2012) Biosystems, 109, 397-402.

エタノール散布によるトマト糖度上昇に関わる基盤研究

岡 夏実 (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】

トマトは野菜の中では生産量、消費量共に世界一で、世界における主要な野菜の一つである。トマトは、果実にビタミンA、ビタミンC、リコピンなど、人間にとって重要な栄養素が含まれているため、高付加価値のある作物である。トマトの食味は主にうまみ・酸味・甘みの3つの要素で構成されている。3大要素に甘みがあるように、糖度はトマトの食味に大きく影響している。また、糖分は作物の保存性を高める効果があるとされている。これらの理由も含めて糖度の高いトマトは需要があり、塩分を与えるといった方法などで高糖度トマトの栽培が試みられている。一方、塩分を投与する方法では、投与方法を適切に行わないと収量の減少や尻ぐさを引き起こす可能性がある。

微量の化合物を植物に添加することで、植物の代謝経路を活性化させることが知られており、栽培における新しい方法とされている。その化合物の一つとしてエタノールが注目されている。エタノールはストレスを感じた植物が体内に溜め込む天然産物として知られている。エタノールが熱耐性などさまざまな防御機構に関わるという先行研究も報告されている。しかし代謝経路が複雑なこともあり、植物内の代謝に対してエタノールがどのような影響を与えるかはあまり明らかになっていない。

先行研究では、エタノールをトマトに添加すると葉における糖度が上昇することが確認されている。この先行研究では、トマトの耐熱性が高まり、耐熱性を高める過程で葉における糖の蓄積が行われていることが見出されている。一方で、果実における糖度の蓄積は見られなかった。この研究では、Micro-Tomとよばれる矮性トマト品種を用いているため、栽培品種とは大きく異なること、栽培室での投与であるとともに、エタノールの投与がトレイにエタノール水を与えるといった実際の栽培環境とは異なることから、果実における状態を適切に反映していなかったと考えられる。

そこで、本研究では、トマトを実際の栽培環境に近い状態として、温室で生育させ、このトマトに微量のエタノールを散布し、糖度との関係を調べた。エタノールは比較的容易に入手可能であり、蒸発することから、環境にも優しいと考えられている。そのため微量のエタノールをトマトに散布する方法は、実際の栽培に適応しやすく、高糖度トマトの栽培方法の確立となりうると考えられる。

【材料・方法】

材料としてトマト (*Solanum lycopersicum*) A 品種を用いた。

・栽培

種をまいてから栽培室で1ヶ月育て、1ヶ月後に温室に移動した。温室では水耕栽培を用いてロックウールでトマトを育てた。

・エタノールの散布

第一花房の開花から実の成熟までエタノールを散布した。20 mLのエタノールを1個体につき植物全体に50 mL程度、週に1回スプレーによる噴霧で散布した。

・糖度の測定

成熟したトマトを収穫し、直径、重さ、糖度を測定した。

【結果と考察】

現在、遺伝子実験センター内の温室Jでトマトを育てている。現在は4か月齢である。



詳細は発表会にて報告する。

【今後の展望】

エタノールを添加したときの遺伝子の発現についても調べる予定である。RNAシーケンスを行い、網羅的に遺伝子の発現を調べ、エタノール処理後に発現が変化している遺伝子に着目する。着目した遺伝子をノックアウトするなどして、エタノールに対する反応系を明らかにしていく。トマトの遺伝子発現に対するエタノールの影響や、高糖度トマトを作るゲノム編集に役立つ遺伝子の解明を目指す。

トマトの形質転換と組織培養が不要なゲノム編集導入法の開発とその適応

渡邊 温太 (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】

生物は遺伝情報を保存する物質として DNA をもつ。DNA が構成する塩基配列が遺伝情報となり、それらが生物の体内で RNA へ転写、タンパク質に翻訳され、その個体の形質としてあらわれる。

ゲノム編集とは特定のターゲットとなる塩基配列で DNA の二本鎖切断を誘導し、切断面の修復の際に起こるエラーによって DNA の塩基配列に変異を導入する技術である。CRISPR/Cas9 タンパク質や TALEN のような人工ヌクレアーゼはそのターゲットとなる塩基配列を認識して DNA と結合し、DNA を二本鎖切断する活性をもっている。人工ヌクレアーゼを用いてゲノム編集を行うことで標的の塩基配列に変異を導入することが可能である。

ゲノム編集を行うメリットは、ゲノム編集によって狙った塩基配列に変異を導入することで生物の形質を変化させられることである。例えば、トマトにおいて有用物質である GABA の含有量を5倍に引き上げることができた (Nagamine and Ezura, 2022)。このようにゲノム編集を利用することで作物の商品価値を高めたり、有用物質の収量を増加させたりすることができる。ゲノム編集が一般に広がる以前の作物の品種改良は、交配や、放射線や化学物質によるランダムな変異導入によって行われていた。それぞれ有用な形質を持つ品種どうしを掛け合わせてお互いの有用な形質を併せもつ子孫を得ることで作物の価値を高めることができる。しかし、こうした交配による品種改良は多くの手間と長い年月がかかり、目的の形質だけを狙って改良することができないなどの難点がある。ゲノム編集技術は交配と異なり、目的の遺伝子を狙って変異を導入させることができるため、品種改良にかかる時間を大幅に短縮することができる。現在は様々な作物においてゲノム編集を利用した品種改良や研究が行われている。

一般的なゲノム編集方法としてアグロバクテリウムを介した形質転換法がある。この法ではアグロバクテリウムの感染、形質転換、組織培養の主に3つのステップから成る。まず、CRISPR/Cas9などのゲノム編集タンパク質を発現させるベクターをもったアグロバクテリウムを作製する。次に、植物から植物断片を切り出し、アグロバクテリウムを感染させる。感染したアグロバクテリウムにより、ベクターに存在する T-DNA 領域が植物細胞の核ゲノムへ挿入されて、形質転換される。その後、植物断片を組織培養してカルスの形成・再分化を経て形質転換植物を得る。そして、その形質転換体がゲノム編集タンパク質を発現し、ターゲットとなる配列に変異を導入することでゲノム編集体を獲得することができる。

しかし、現在広く使われているアグロバクテリウムを用いた形質転換法によるゲノム編集方法では大きく2つのステップで課題がある。一つ目は形質転換のステップである。アグロバクテリウムを用いて形質転換を行っているが、形質転換ができない植物には適用できないこと、ゲノム編集体から編集のために導入した外来遺伝子を除去する必要があることなどが課題として挙げられる。二つ目は組織培養のステップである。組織培養も適用可能な植物に限られていること、オーキシンやサイトカイニンといった植物

ホルモンの添加や、再生までに時間がかかることなどが課題として挙げられる。

従来のアグロバクテリウムを用いた形質転換法の課題点を解決するために、本研究では一過的発現とインプラント法を用いたゲノム編集法の開発を目指す。植物にゲノム編集にかかわる遺伝子を形質転換するのではなく、一過的にゲノム編集にかかわるタンパク質を発現させることで形質転換によるデメリットを解消する。先行研究によると一過的発現を用いても GFP タンパクを高発現させることが可能であることがわかっている。(Hoshikawa et al., 2018) また、他の先行研究から果実にアグロバクテリウムを感染させることによって編集体が得られることが知られている。(Yasmeen et al., 2008) これらの先行研究を踏まえて形質転換と組織培養が不要なゲノム編集導入法の開発を目指す。

【方法】

1 アグロバクテリウムの用意

アグロバクテリウム GV2260 に CRISPR/Cas9 の遺伝子と gRNA を含むベクターとスーパーアグロバクテリウムのベクターを形質転換した。

2 アグロバクテリウム感染液の作製

作製したアグロバクテリウムを培養して OD 調製し、感染液を作製した。

3 トマト栽培

16 時間明期の栽培室でトマト種子を播種した。およそ3か月後にトマト果実を得た。

4 トマトからの種子の回収および播種

果実が熟したタイミングで収穫し、種子を回収した。その後播種して生育した。

5 T₀ 世代の DNA 配列の解析とゲノム編集率の算出

生育した個体からゲノムを抽出して標的領域を PCR で増幅し、シーケンス解析を行った。

【結果と考察】

詳細は発表会にて報告する。

【出典】

Nagamine and Ezura (2022) “Genome Editing for Improving Crop Nutrition”

Hoshikawa et al. (2018) “Efficient transient protein expression in tomato cultivars and wild species using agroinfiltration-mediated high expression system”

Yasmeen et al. (2008) “In Planta Transformation of Tomato”

植物におけるタンパク質の一過的発現システム用いたヒノキ花粉アレルゲンの生産

長嶋 玲（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】

花粉症は植物の花粉が原因で発症するアレルギー疾患である。原因として最も知られているのはスギ花粉だが、スギ花粉とヒノキ花粉はアミノ酸配列が約 80 %一致し、相同性が高い。そのため、スギ花粉症患者の 7 割以上がヒノキ花粉にも反応することが知られている。現在、花粉症患者は 40 %を超え、生産性の低下や医療費の増大が深刻な社会問題となっている。さらに、罹患者数は年々増加しており、低コストかつ安全な治療法の開発が急務となっている。

一般的な花粉症治療は、抗ヒスタミン剤や抗ロイコトリエン剤を用いた対症療法が主流である。しかし、これらはアレルギー症状を一時的に緩和するに過ぎない。一方、アレルゲン免疫療法は、根本的な花粉症治療を可能にし、対症療法で生じる副作用を軽減する有効な手段として注目されている。この治療法は、少量の花粉尘アレルゲンを患者の体内に段階的に投与し、免疫寛容を誘導するものである。投与方法には皮下注射と舌下投与の 2 種類があるが、舌下投与は安全性が高く、効果的であると考えられ、主流となりつつある。ただし、舌下投与では皮下注射に比べて 5~10 倍のアレルゲンが必要となる。

現在、アレルゲン免疫療法に用いられる花粉アレルゲンは、主に花粉エキスから抽出されているが、治療に必要な量の花粉尘を樹木から直接集めることは困難である。この課題を解決するため、遺伝子組換えタンパク質を生産する方法が考えられる。スギやヒノキのアレルゲンは、大腸菌などではタンパク質の生産が困難であることが知られている。

そこで、本研究では花粉アレルゲンという植物由来のタンパク質であることから、植物を利用した大量タンパク質生産システム「つくばシステム」を用い、花粉アレルゲンの大量生産、精製を行うことを目的とした。「つくばシステム」は、ジェミニウイルス由来の複製システムとダブルターミネーターを組み合わせ、植物における一過的タンパク質発現システムであり、短期間で大量のタンパク質を生産可能である。特に、ベンサミアナタバコを宿主とした場合、GFP の収量は 4 mg/g 新鮮重であることが知られている。本研究により、植物を用いたタンパク質発現システムにより、アレルゲン免疫療法に必要な花粉アレルゲンの安定供給が可能となり、花粉症治療への貢献が期待される。

【材料・方法】

材料として、ベンサミアナタバコを用いた。

1. ベンサミアナタバコの栽培

N.benthamiana を栽培室において 25°C で 16 時間明期/8 時間暗期の光周期で 6-8 週間生育した。

2. ベクター作製

つくばシステムのベクターをもとに、目的タンパク質を発現する遺伝子発現カセットおよび精製に用いる His タグを組み込んだ。

3. 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りベクターをアグロバクテリウムに導入し、前培養を 2 日間行ったのち、本培養を一晚行った。この培養液の OD600 を 0.2 に調製し、感染液とした。この感染液をバキュームによりベンサミアナタバコに感染させた。

4. タンパク質精製

感染から 4 日後、植物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。その後、凍結した葉をミキサーで粉碎し、Lysis buffer に溶解した。次に、超音波処理を行い、不純物を除去するためにミラクロスでろ過し、遠心分離を実施した。続いて、30 %の硫酸分画を行い、得られた上清を Binding Buffer で透析した。透析後のサンプルを TARON レジンに流し込み、目的タンパク質を吸着させた。レジンを通した液体 (Flow Through) を回収した後、全サンプル液が通過した後にレジン洗浄し、目的タンパク質を溶出させるために Elution Buffer を加えた。溶出した液体はカラム下部から回収し、e1 から e5 の分画として得た。

最終的に、得られた FT および e1-e5 についてウエスタンブロットティングを実施し、目的タンパク質の存在を確認した。

【結果及び考察】

詳細は発表会にて報告する。

Evaluating nutrient effect on the *Orobanchae* - red clover interaction

Chihiro Tanaka (筑波大学生物学類)

指導教員 : Louis J. Irving (筑波大学生命環境系)

Introduction

Parasitic plants grow by abstracting carbon, water and nutrients from their host. They are divided into holoparasites, which are completely dependent on the host, and hemiparasites, which are photosynthetic, but derive a benefit from host attachment. Parasites reduce the biomass of agricultural plants. However, relatively few studies have been done on the host-parasite relationship. *Orobanchae minor*, the root holoparasitic angiosperm, is a strong resource sink for phloem resources. This study used *O. minor* as holoparasite and *Trifolium pratense* as a host plant.

A previous study in our group showed that host shoot mass was significantly reduced and parasite biomass increased approximately 2.5 times when nutrients were supplied to parasitized roots compared to when unparasitized roots were fed. This study aimed to investigate the effect of N supply to parasitized or unparasitized roots on the host-parasite relationship.

Material & Methods

T. pratense seeds were germinated for one week and then transplanted into split-root boxes (Fig. 1). In the left chamber, *O. minor* seeds were mixed into the vermiculite, while the right chamber was without parasites. After a six-week establishment and attachment period, plants were fed 20 ml of nutrient solution to one chamber, and 20 ml of water to the other. Three N conditions were set, 1 mM as Low, 3 mM as Medium, and 5 mM as High. After six weeks, plants with parasites were separated into shoots, tap root, left and right roots, and parasites. The samples were dried and weighed. Statistical analyses were conducted using ANOVA.

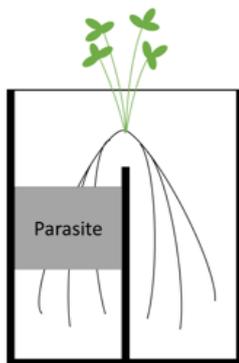


Fig. 1. Split-root box

Results

Host shoot mass increased with N supply (Fig. 2; $P < 0.01$), although there was no fed root effect. Parasite mass decreased with increasing N supply, with a significant difference between Low and High (Fig. 3; $P = 0.0092$). A negative relationship between parasite and host shoot mass was found.

At each N level, parasites on nutrient supplied roots were 1.2-1.3 times larger than those unfed roots. Fed roots were significantly heavier than the non-fed roots at all N levels ($P < 0.05$).

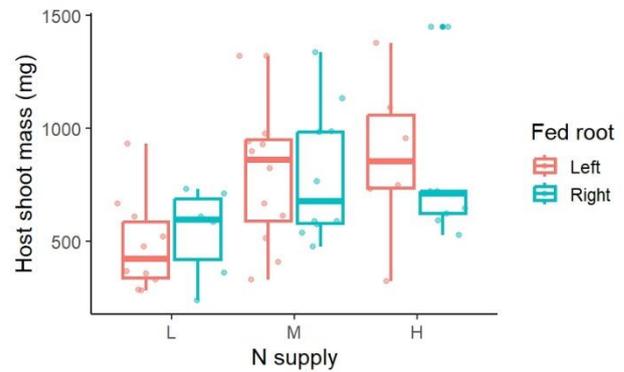


Fig 2. Host shoot mass with N supply

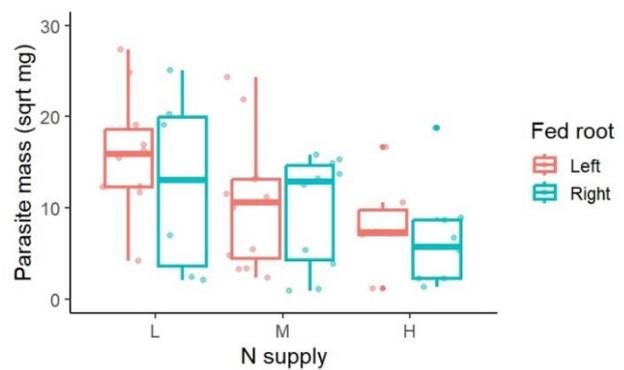


Fig. 3. *O. minor* biomass decreased as N supply increased.

Discussion

Hattori et al (2024) showed that nutrient supply to parasitized roots caused an increase in parasite mass, resulting in the suppression of host growth. However, in this study, the parasites became smaller and the hosts larger with increasing N supply, irrespective of whether the nutrients were supplied to parasitized or non-parasitized roots. This suggests that parasite growth may be limited by N supply, although the mechanism of this growth suppression is not clear.

Due to some issues with parasite establishment, both host and parasite mass data exhibit a high degree of variability. In future experiments, we aim to improve our plant establishment protocols and verify the results of this study.

Reference

Hattori et al. (2024). "Nutrient mediation of sink strength in the *Orobanchae minor* – Red clover association." *Environmental and Experimental Botany* Vol. 228, Part B, 106041

Competition mediates the host - hemiparasite relationship

古橋 夢摘 (筑波大学生物学類) 指導教員 : Louis J. Irving (筑波大学生命環境系)

Introduction

Phtheirospermum japonicum is a hemiparasitic plant which steals growth resources from a host but is also capable of growing autotrophically in the absence of a host. Hemiparasites may attach to multiple hosts in the wild, deriving greater benefits from some hosts than others (Sandner and Matthies, 2018). However, the physiological basis of differences in host quality are poorly understood. In this research, we observe the effects of host species on *P. japonicum* performance, with the aim of understanding the importance of competition on the host – parasite relationship.

Materials & methods

Pot experiment

One *Phtheirospermum japonicum* was planted with one of four host plant species *Trifolium repens* (white clover), *Trifolium pratense* (red clover), *Cynodon dactylon* (Bermuda grass), or *Agrostis palustris* (creeping bentgrass) in a pot. For the control, two parasites were planted in a single pot without a host. The plant was regularly supplied with water and nutrients. The plant was grown in the pot for 2 months, then harvested.

Root box experiment

Phtheirospermum japonicum was planted in the middle compartment of a root box (Fig. 1), with *Trifolium pratense*, and *Trifolium repens* planted in the left and right chambers respectively. The parasite was allowed to connect to neither, one, or both of the hosts. Plants were regularly supplied with water and nutrients and grown for two months then harvested.

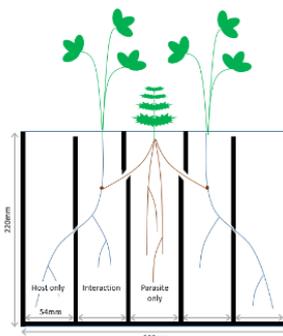


Fig 1. A root box system used in the root box experiment.

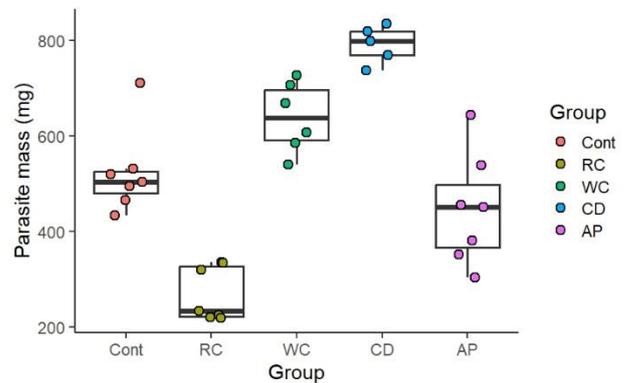


Fig 2. Graph of parasite mass and the host that they are grown with RC: red clover, WC: White clover, CD: *Cynodon dactylon*, AP: *Agrostis palustris*

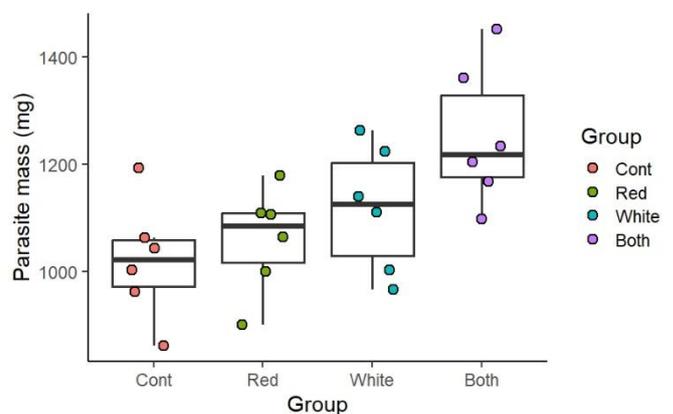


Fig 3. Root box experiment. Parasite mass in relation to host availability. Control: no host, Red: red clover, White: white clover, Both: both hosts.

Result

Pot experiment

The parasite grown with red clover (*Trifolium pratense*) and *Agrostis* (*Agrostis palustris*) has a decreased biomass compared to the controls. While the parasite grown with white clover (*Trifolium repens*) and cynodon (*Cynodon dactylon*) had an increased biomass. (Fig. 2)

Root box experiment

The parasite attached to both hosts had the largest biomass (Fig. 3; $P = 0.012$). Parasites attached to only the white or red clover had a larger biomass compared to the control, although this was not statistically significant.

Discussion

In the pot experiment, white clover and *Cynodon* were good hosts, with attachment benefiting parasite growth. While red clover and *Agrostis*

were poor hosts, with attachment causing a decrease in parasite biomass. However, in the root box experiment, the effect of red clover as a host was different, causing a slight increase in parasite growth. Our split root box controls for belowground competition, suggesting that the difference in the red clover – parasite relationship between experiments may be due to root competition. This implies that the poor performance of the parasite in the pot experiment was due to red clover acting as a strong competitor, rather than being an inherently bad host. This may suggest competition could mediate the host-parasite relationship. Similar to Frederica and Irving (2024), attachment to a second host caused an increase in parasite growth.

References

- Frederica, C. F., & Irving, L. J. (2024). “Hemiparasite *Phtheirospermum japonicum* growth benefits from a second host and inflicts greater host damage with Exogenous N Supply”. *Journal of Plant Physiology*, 296, 154238. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2024.154238>
- Sandner, T. M., & Matthies, D. (2018). “Multiple choice: Hemiparasite performance in multi-species mixtures”. *Oikos*, 127(9), 1291–1303. <https://doi.org/10.1111/oik.05148>

Deep root growth in response to nutrients and water in *Poa annua*

Niveda Jaychandar (筑波大学生物学類)

指導教員：Louis Irving (筑波大学生命環境系)

Introduction:

Climate change is causing longer and more intense droughts globally, with devastating impacts on agricultural production. Surface soil drought is especially common – where the top layers of the soil dry out due to evaporation, and there is a need for plants which are better able to use water resources from deeper soil layers. While plants are known to increase root growth in nutrient-rich soil patches, their root allocation strategies under varying local soil water concentrations remain understudied. This study aims to investigate the effects of surface drought and deep-soil water availability on plant root distribution in *Poa annua* plants, under high and low nutrient conditions.

Materials and Methods:

Poa annua plants were established for two weeks in 24cm long plastic tubes with holes drilled into the sides for watering. After establishment, two types of water treatments – Surface and Deep – where the plants were irrigated at the soil surface and at a deep soil layer respectively, were imposed (Figure 1a) under both high and low nutrient conditions. Plants were harvested after seven weeks of treatment. Roots were collected in four soil sections, separated vertically, as shown in Figure 1b.

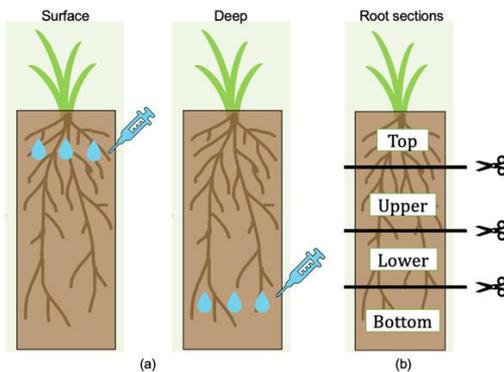


Figure 1 (a) Experimental setup of ‘Surface’ and ‘Deep’ water treatments. (b) Soil sections for root harvest.

Results:

Under high nutrient conditions, although the total root masses of Surface and Deep plants did not differ significantly, the root allocation significantly differed in all four soil sections. In the top two sections, Surface plants had a greater root mass. Conversely, in the bottom two sections, Deep plants had a greater root mass. The difference was more pronounced in the lower sections with Deep plants allocating nearly twice the amount of roots in the Lower and Bottom sections (18.1% and 16.7% of the total root mass) when compared to the Surface plants (9.3% and 7.5%). However, no significant differences in root distribution were observed between Surface and Deep plants under low nutrient conditions.

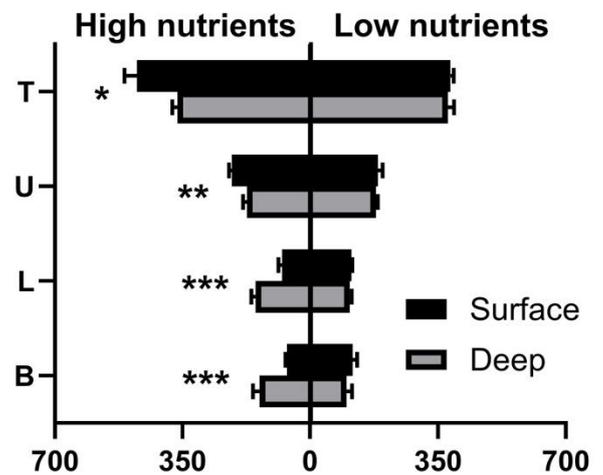


Figure 2 Dry weight of roots in Top (T), Upper (U), Lower (L), and Bottom (B) soil layers under high and low nutrient conditions. Error bars indicate standard error values (SEM).

Under high nutrient conditions, the shoot masses of Surface plants were, on average, 8.7% greater than the Deep plants. No differences in shoot mass were observed under low nutrient conditions.

Discussion:

Our results indicate that nutrient-replete plants under surface drought conditions allocate a larger portion of their roots to deeper soil sections compared to plants that only have access to water at surface layers. The increased root mass in the lower layers may be a result of either an increase in root growth or a decrease in root death, presumably due to increased carbon allocation. Given the significance of deep rooting strategies for drought survival, further research is required to understand the mechanisms behind plant root distribution in response to soil water availability.

However, it is important to note that this phenomenon was only observed under high nutrient conditions, suggesting that there is a nutritive effect on the ability of plants to allocate resources to increase deep root growth. Under nutrient limited conditions, the root distribution is comparatively more evenly distributed through the four soil layers. The reason for this difference is not clear and requires further study.

アイスプラント由来の RNA シャペロンの異所的発現がポプラの塩ストレス応答に与える影響

今北 美穂 (筑波大学生物学類)

指導教員：小口 太一 (筑波大学生命環境系)

【導入】

地球温暖化は人類共通の問題であり、大気中への二酸化炭素排出量の急激な増加が、その主な原因のひとつと考えられている¹。森林は陸上の炭素循環において重要な役割を果たしており、地球規模の炭素収支の改善のための解決策のひとつとなり得る。しかし、世界の森林面積は2010年から2020年までに470万ヘクタール失われた。そのため、植林面積を増やす必要がある。一方で、世界中で塩害地が拡大しており、このままでは2050年までに農業用地の50%以上が失われると推定されている²。そこで私は、塩ストレスに強い樹木の開発が植林地の拡大に貢献できると考えた。

ポプラは生長が早く、バイオマス生産能力が高いため、植林に広く利用されている³。また、樹木の中では研究が進んでいる種類であり、モデル樹木となっている⁴。*McRBP* は、塩生植物であるアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) から機能性スクリーニング法によって単離された新規の耐塩性遺伝子である。私の所属する研究室では *McRBP* を導入した組換えユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis*) において耐塩性が有意に向上することを報告している⁵。また、ポプラ (*Populus tremula*×*P. tremuloides*, T89 株) に *McRBP* が導入された組換えポプラも作出されているが、評価は未実施であった⁶。本研究では、*McRBP* 導入ポプラの塩ストレス耐性への評価を目的とした。

【植物材料】

ポプラ T89 株 (*Populus tremula*×*P. tremuloides*) の非組換え体 (NT) と、同 T89 株に対して *McRBP* を導入した組換え体システムを用いた。ポプラは、25°C、16h 明期/ 8h 暗期で制御された培養室において、0.5xMS 寒天培地 (組換えシステムについては 50 mg/L Kanamycin を含む) で無菌培養により維持された。

【方法】

1. 塩ストレス耐性評価に用いる *McRBP* 導入ポプラシステムの選抜

McRBP 導入組換え体 19 システムから、発現量解析などを行い塩ストレス耐性評価試験に用いる組換え体システムの選抜を行った。

まず、無菌栽培の各システムポプラから DNA を抽出し、定性 PCR により *McRBP* の発現を確認した。次に、RNA を抽出、cDNA の合成を行い、RT-qPCR により *McRBP* の発現量をポプラ内生遺伝子である *Ptelf4A* の発現量との比として定量、比較した。

2. 植物体の調整

寒天培地で無菌培養していたポプラを培土 (元気くん 1 号) が入ったスリット鉢 (ロング 6 号) に移植し、栽培室で約 1 カ月間の馴化を行った。鉢への灌水は、水道水を 1 cm ほど張ったプラスチック容器にポットを置き、底面給水により行った。

3. 塩ストレス処理

塩ストレス処理は、底面から 200 mM または 100 mM NaCl 水溶液を給水することで実施した。また、継続して水道水を給水した処理区を対象区とした。各システム・処理区の個体数は、6~7 であった。

4. 計測・解析

植物の健全度の指標として、光合成量子収量 (QY) を処理直前、処理開始から 2 日後、7 日後に Fluor Pen 100 を使用して計測を行った。7 日後、植物の上位および中位から葉を採取し、葉に含まれる Na⁺イオン及び K⁺イオンの量を LAOUAtwim (Na-11/K-11) を用いて計測した。

【結果・考察】

1. *McRBP* 導入ポプラシステムの選抜

ゲノム DNA 中の *McRBP* 遺伝子と内生 *elf4A* 遺伝子の存在比から導入遺伝子の数が 1,2,3 コピー以上のシステムは、それぞれ 13,5,1 システムと推定した (図 1 左)。また RT-qPCR により、全システムにおいて *McRBP* の発現が確認され、RBP2、8、10 システムで発現量が高い傾向があった (図 1 右)。以上の結果から、発現量が高く、またマルチコピーで遺伝子が入っていると考えられる RBP2 システムと、発現量が中程度であった RBP11 システムを組換えシステムとして選抜した。

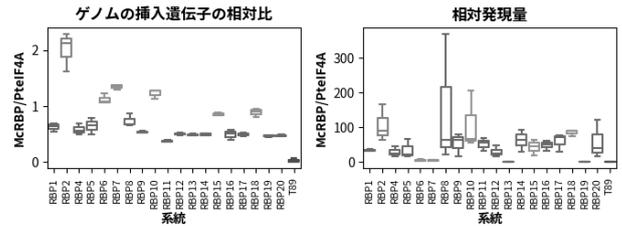


図 1 *McRBP* 組換えシステムの遺伝子挿入数と発現量の比較

2. 塩ストレス耐性評価

対照区と 100 mM NaCl 区では、処理期間中に QY の低下およびシステム間の比較は観察されなかった (図 2 左中)。200 mM NaCl 区では、T89 株および RBP2 システムでは 7 日目に QY の有意な低下が観察された一方、RBP11 システムでは低下が観察されなかった (図 2 右)。

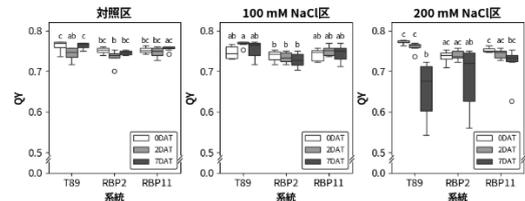


図 2 塩ストレス処理による QY の変化

3. 葉のイオン恒常性

塩処理終了後の葉に含まれる Na⁺イオンおよび K⁺イオンの比は、組換えシステムで T89 株よりも小さい傾向が観察された。

【考察と展望】

McRBP 組換えポプラ (RBP11 システム) で 200 mM NaCl 処理区における QY 低下の有意な抑制がみられたことから、*McRBP* は塩ストレスによる傷害を低減することが示唆された。また、塩ストレス処理後の、[Na⁺]/[K⁺]比が組換えシステムで T89 株よりも低い水準を維持していたことから、*McRBP* による塩ストレス耐性の向上には、イオンの恒常性の維持が関与すると推察された。

本研究では気温や光量が一定の栽培室での試験であった。今後は、より実際の生育環境に近い特定網室等の実験条件での塩ストレス耐性への影響を調べたい。

【参考文献】

- UNFCCC : 世界気象機関 (2021)
- Jamil et al. (2011) *Critical Reviews in Plant Sciences* 30:435-458.
- Fang et al. (2007) *J. Environmental Management* 85:672-679
- Polle & Douglas (2010) *Plant Biology* 12:239-241
- Tran NHT et al. (2019) *Plant Biotechnology J.* 17:801-811
- 鹿倉 (2023) 修士論文

シロイヌナズナ由来のガラクトキノール合成酵素の異所的発現がポプラの塩ストレス応答に与える影響

野間 冬紗 (筑波大学生物学類) 指導教員: 小口 太一 (筑波大学生命環境系)

【導入】

気候変動により植物の生育に影響を与える干ばつや塩害などの増加が懸念される。その対策として、環境ストレスに耐性を持つ植物の作出が有効であると考えられる。細胞の環境ストレスへの適応機序の一つとして、細胞毒性のない物質 (適合溶質) を高濃度に生産・蓄積し、細胞機能を保護する機構が知られている。ガラクトキノールから合成されるラフィノースファミリーオリゴ糖は、適合溶質の一つであり、ガラクトキノール合成酵素 (*GolS*) 遺伝子を高発現させることでシロイヌナズナ、イネ、ダイズ等の複数の植物において、環境ストレス耐性の向上が報告されている。

本本植物は、成長に伴う大気中の二酸化炭素固定やカーボンニュートラルな資源として、気候変動の抑止への活用が期待される。先行研究で、樹木研究のモデル植物であるポプラにシロイヌナズナ由来のガラクトキノール合成酵素遺伝子 (*AtGolS2*) を異所的に発現させた遺伝子組換えポプラが作出された¹。本組換えポプラは、干ばつストレスに対する耐性の向上が報告されている²が、塩ストレスに対する耐性評価は行われていない。そこで、本研究では、*AtGolS2* 遺伝子がポプラの塩ストレス応答に与える影響の調査を目的とし、特定網室で本組換えポプラの耐塩性試験を行った。

【植物材料】

ポプラは、交雑アスペン (*Populus tremula* × *P. tremuloides*, T89 株) を用いた。また、T89 株に *AtGolS2* 遺伝子を導入した組換え系統 (*GolS2-5*, *GolS2-14*) は、先行研究¹により作出された。非組換え体を含む系統は 0.5 × MS を基本培地とする寒天培地上で 25°C、16 時間明期/8 時間暗期の条件で継代・維持している。

【方法】

継代後約 1 か月のポプラを、培土 (元気くん 1 号) が入ったスリット鉢 (ロング 6 号) に植え替え、培養室 (25°C、16 時間明期/8 時間暗期) で約 1 か月馴化した後、特定網室に移動した。塩ストレス処理は、塩水 (200、100、0 mM NaCl) の底面給水によって行った (2024.06.24-2024.07.16)。塩ストレス処理期間中、ストレス傷害の指標として QY (光合成量子収量) および SPAD (葉緑素量) を 2 日に 1 度、樹高および基部直径を 1 週間ごとに計測した。QY は FluorPen100 を、SPAD は葉緑素計 SPAD-502 を使用して測定した。また、塩ストレス処理後、上から 4 枚目の葉から直径 7 mm のリーフディスクを 3 枚切り出し、MilliQ 水 1 mL 中で震とうし、溶出した Na⁺ と K⁺ の濃度を LAQUAtwin (Na-11/K-11) を用いて計測した。

【結果】

(1) 生育評価

樹高、基部直径ともに、200 mM 区では塩処理開始から 7 日目以降、100 mM 区では 11 日目以降すべての系統で成長が停止し、生育に関しては、系統間での有意差は見られなかった。

(2) QY を指標とした耐塩性評価

QY は、0 mM 区では試験期間を通じて大きな変化はなかった。200 mM 区では全系統ともに実験開始から 6 日目に低下し始め、

12 日目にはほぼ 0 となった。100 mM 区では、T89 株が塩処理開始から約 10 日目に低下し始めたのに対し、組換え 2 系統は約 14 日目から低下が始まった (図 1)。

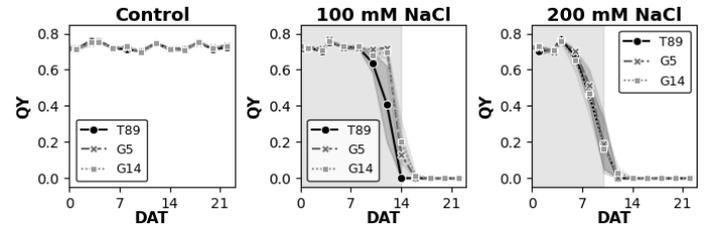


図 1 塩処理期間中の QY の変動

(3) SPAD を指標とした耐塩性評価

SPAD は、100 mM 区と 200 mM 区で QY が減少するタイミングで一過的に増加した後、減少する傾向が観察された。0 mM 区と 200 mM 区は 3 系統間の違いはなかったが、100 mM 区では T89 株と組換え 2 系統の変動に違いが見られた。

(4) [Na⁺]/[K⁺] 比

100 mM 区と 200 mM 区において、[Na⁺]/[K⁺] 比が T89 株に比べて組換え系統で低い傾向が観察され、特に 100 mM 区においては、T89 株と *GolS2-14* 系統の間では有意差が検出された ($\alpha = 0.05$) (図 2)。

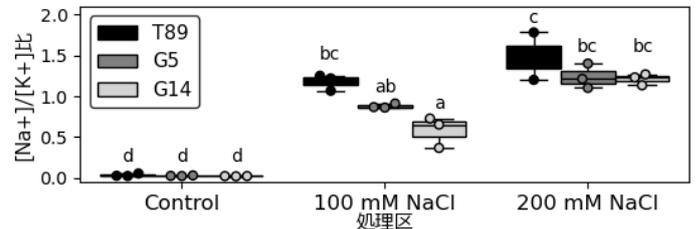


図 2 塩ストレス処理終了時の葉の [Na⁺]/[K⁺] 比

【考察】

特定網室での耐塩性評価の結果、*AtGolS2* 発現組換えポプラは、100 mM NaCl 処理による塩ストレスに対して、T89 株よりも高い耐性を示した。また組換え系統では、試験終了時の [Na⁺]/[K⁺] 比が、T89 株より低かったことから、*AtGolS2* の異所的発現は、塩ストレス下で細胞のイオン恒常性の維持を介して、ストレス耐性を向上したことが予想された。200 mM 区においても、[Na⁺]/[K⁺] 比では、T89 株と組換え体で違いがあるものの、100 mM 区で見られた違いよりも小さかったため、ストレス障害を緩和するには至らなかったものと考えられる。今後は、塩ストレス処理下でイオン恒常性に関わる遺伝子に着目し、ストレス耐性向上の機序を明らかにしたい。

【参考文献】

¹ Molecular Breeding 37:57(2017)

² Transgenic Research 31:579-591(2022)

アイスプラント由来の RNA シャペロンの異所的発現がポプラの浸透圧ストレス応答に与える影響

長谷川 子龍 (筑波大学生物学類)

指導教員：小口 太一 (筑波大学生命環境系)

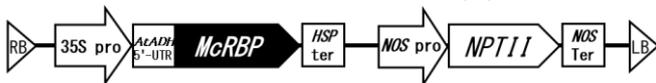
【導入】

乾燥は、植物の成長に影響を与える環境ストレスの1つであり、強い乾燥ストレス下では生育が抑制され、最終的には枯死する。地球温暖化の進行により、乾燥に晒されるリスクは増大しており、環境ストレス耐性の高い植物の需要が増している。ポプラは、商業的に利用されている木本植物の1種であるが、乾燥ストレスへの感受性が高いことが知られる。

McRBP 遺伝子は、塩生植物であるアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) から機能スクリーニング法によって単離された新規の耐塩性遺伝子である¹。*McRBP* 遺伝子は、RNA シャペロン活性をもつタンパク質をコードする。先行研究で *McRBP* 遺伝子を異所的に発現させたユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis*) は耐塩性が向上することが報告されている¹。一方、RNA シャペロンタンパク質は、多様な環境ストレス耐性に関わることが知られているが、*McRBP* のストレス以外の環境ストレス応答への関連はこれまで報告がない。そこで本研究では、*McRBP* 遺伝子を導入した組換えポプラを用い、*McRBP* と浸透圧ストレス耐性の関係性を評価した。

【植物材料】

交雑ポプラ (*Populus tremula* × *P. tremuloides*) T89 株の非組換え体と、同系統に対してアグロバクテリウム媒介法で以下の T-DNA を導入された組換え体系統 19 系統 (RBP1, 2, 4~20) を用いた。

図1 *McRBP*組換えポプラに導入されたT-DNAのポンチ絵

【方法】

(1) 組換えポプラの遺伝子型の確認

ゲノムDNAの遺伝子導入の確認は、ポプラ培養物の葉から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、qPCR法によって *RBP* 遺伝子の導入を確認した。また、ポプラ培養物から抽出した全RNAからRT-qPCRによって、*RBP* 遺伝子の発現レベルを確認した。

(2) 栽培評価

継代培養するポプラを培土(元気くん1号)が入ったスリット鉢(ロング6号)に植え替え、培養室(25°C、16時間明期/8時間暗期)で約1か月馴化した後、特定網室に移動した。特定網室に移動後、さらに2週間の馴化した後、1か月間(2024. 10. 22~11. 19)浸透圧ストレス処理を行った。浸透圧ストレス処理は、PEG600(以降、PEGと記す)20%、15%、0%(w/v)を隔日で底面給水処理することで行った。ストレス処理期間中、QYおよびSPADを週3回、樹高および基部直径を週1回計測した。

(3) イオン漏出量の測定

ストレス処理終了時の葉を採取、リーフディスクを各個体3枚ずつ作成し、MilliQ水中で振とうし、漏出するイオン量をコンダクタンスメーターで測定した。

(4) 遺伝子発現量解析

ストレス処理終了後の葉から、全RNA抽出し、RT-qPCRによって、ストレス応答性遺伝子の発現解析を行った。

【結果】

(1) 組換えポプラの確認

qPCRによる導入 *McRBP* 遺伝子と内生 *eIF4A* 遺伝子の定量比から導入遺伝子の数が1、2、3コピー以上の系統が、それぞれ13、5、1系統と推定された。また、RT-qPCRの結果、19系統全てから *McRBP* 遺伝子の発現が確認された。遺伝子導入数と発現量解析の

結果から、挿入遺伝子が3コピー以上で発現量の高いRBP2系統と1コピーで中程度の発現量のRBP11系統の2系統を以降の実験に供試することとした。

(2) 栽培評価

20%PEG区では、T89株では処理後9日目以降QYの低下がみられ、21日後には0.12(平均値、以降同じ)まで低下したので、21日目でストレス処理を停止した。一方、組換え系統ではQYの低下は14日目以降から観察されたが、21日後も0.31および0.34であった。15%処理区では、約2週間後からQYの低下がみられ、28日後NTでおおよそ0.20、組換え系統で0.35および0.34であった。対照区では、期間を通じてQYは0.65以上で高く保たれた。

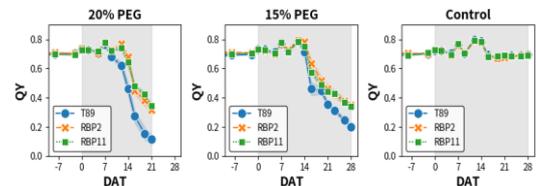


図2 PEG処理による浸透圧ストレス処理によるQYの変動

(3) イオン漏出量の測定

20%および15%PEG区では、組換え系統のI1は、T89株よりも低い傾向が観察された。

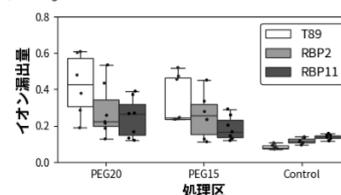


図3 塩ストレス処理終了時に計測した葉のイオン漏出

(4) 遺伝子発現量解析

卒業研究発表会にて報告する。

【考察・展望】

PEG処理による浸透圧ストレス試験の結果から、*McRBP* の発現がポプラの浸透圧ストレス耐性の向上に寄与することが示唆された。これは *McRBP* が塩ストレス以外の環境ストレス耐性に関わることを示した初めての報告となる。また、イオン漏出測定の結果からRNA結合タンパク質である *McRBP* がRNAシャペロンとして働くことでタンパク質の立体構造を維持し、遺伝子発現などの恒常性を保つことで浸透圧ストレスの影響を受けにくいと示唆される。そのため、現在、*McRBP* の恒常性への影響の確認として、PEG溶液処理による非組換え体と組換え体の乾燥・浸透圧ストレス耐性に関連する遺伝子の発現量評価を行っている。現在解析を進めているストレス関連遺伝子の発現解析等を通じ、*McRBP* による浸透圧ストレス耐性向上の作用機序の解明を進めたい。

今回の研究では、先行研究で確認されていた *McRBP* がユーカリの耐塩性向上に寄与することに加えて、浸透圧ストレス耐性向上にも影響することが示唆された。今後は、乾燥ストレスなどの他の環境ストレス耐性や屋外圃場でのストレス耐性等を検証したい。

【参考文献】

¹Tran NHT *et al.* (2019) Plant Biotech. J. 17: 801-811

ポプラ SnRK2 プロテインキナーゼの異所的発現がシロイヌナズナの気孔調節に与える影響

松本 真純 (筑波大学生物学類)

指導教員：小口 太一 (筑波大学生命環境系)

【背景】

Sucrose NonFermenting-1 (SNF1) - Related Kinase (SnRK) は、真核生物で広く保存されているキナーゼファミリーの一つである。SnRK ファミリーは大きく 3 グループに分類され、SnRK1 は真核生物で広く保存され、糖代謝の制御に関連する一方、SnRK2 及び SnRK3 は植物に特異的であり環境ストレス応答に関連することが知られる。さらに SnRK2 は、アブシジン酸 (ABA) 非依存的にはたらくサブクラス I とアブシジン酸 ABA 依存的にはたらくサブクラス II 及び III の 3 つに分類される。シロイヌナズナでは、サブクラス III SnRK2 が ABA に応答した気孔調節にそれぞれ関連することがわかっている (Fàbregas *et al.*, 2020)。一方、サブクラス II SnRK2 である *AtSnRK2.8* を過剰発現させたシロイヌナズナでは、ABA 応答性遺伝子ストレス応答性遺伝子の発現上昇により環境ストレス耐性が強化されたことから、ABA 応答性の転写制御因子の活性化を介してストレス応答に関与することが示唆されている (Umezawa *et al.* 2004)。

樹木のモデル生物のポプラにおいても、SnRK2 の 3 つのサブクラス全てが保存されている (Song *et al.*, 2015)。しかし、ポプラのサブクラス II SnRK2 を発現させた組換えシロイヌナズナでは、弱いストレス耐性向上はみられるものの *AtSnRK2.8* 過剰発現シロイヌナズナで発現変動がみられた遺伝子の発現に変化がないこと (Song *et al.*, 2016) や、シロイヌナズナのサブクラス II SnRK2 を過剰発現させた組換えポプラでも同様、弱いストレス上昇は観察されるものの *AtSnRK2.8* 過剰発現シロイヌナズナで発現変動がみられた遺伝子の相同遺伝子に発現の変化ないことが報告されている (Yu *et al.*, 2017) 一方で、私の所属する研究室では、シロイヌナズナのサブクラス II SnRK2 を過剰発現させた組換えポプラで気孔の数や開度に異常が生じていることを確認した (Horvat *et al.*, 2024)。これらの結果は、ポプラのサブクラス II SnRK2 の機能が ABA 応答性遺伝子発現を調整する転写因子の活性制御ではなく、気孔の調節に関連している可能性を示唆している。そこで本研究では、ポプラにおけるサブクラス II SnRK2 と気孔調節の関係を明らかにするため、ポプラ由来のサブクラス II SnRK2 をシロイヌナズナに導入し、気孔に現れる表現型を解析することで本仮説の検証を試みることにした。

【材料】

(1) 植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) Col-0 株を植物材料とした。

(2) TA プラスミドベクター構築

先行研究より、ポプラゲノムデータベース (Populus trichocarpa v4.1) には、SnRK2 のホモログが 11 遺伝子存在し、このうち 5 遺伝子がサブクラス II に分類されることが報告さ

れている (Song *et al.*, 2015)。本研究では、その中の PtriSnRK2.7 (Ptri.005G162500) をポプラのサブクラス II SnRK として選定した。同様に、ポプラゲノム中に 3 遺伝子あるサブクラス III の一つである PtriSnRK2.11 (Ptri.009G106900) を比較対照として選定した。植物への形質転換に用いるバイナリープラスミドベクターは、各標的遺伝子のコード配列の 3' 側に GFP 遺伝子のコード配列を結合した断片を人工合成し、pRI201-AN の NdeI/SalI サイトに導入することで調製した。

(3) 形質転換体の作成

調製したプラスミドベクターは、アグロバクテリウム (*Rhizobium radiobacter* EHA101 株) に形質転換し、シロイヌナズナの若い花序に感染させ、種子を採種した (T1 種子)。T1 種子は、カナマイシンを含む 0.5xMS 寒天培地上で発芽させ、耐性個体を示す個体を選抜した。耐性個体は鉢上げ、生育し、種子を採種した (T2 種子)。同様に選抜、採種を繰り返し、形質転換体を選抜した。

(4) 形質転換体の評価

得られた形質転換体について、まず、ゲノミック PCR 解析および逆転写 PCR 解析により、遺伝型の評価を行う。併せて、GFP 蛍光を観察し、導入遺伝子が発現していることの確認を進める。遺伝子の導入および発現が確認できた個体を用い、葉の気孔の数および開度を中心に表現型解析を行う。

【結果】

これまでに、PtriSnRK2.7 (サブクラス II SnRK2)、および PtriSnRK2.11 (サブクラス III SnRK2) を導入したカナマイシン耐性シロイヌナズナ T1 世代をそれぞれ 3、および 2 個体が得られた。さらに、選抜した T1 個体から採種した T2 種子が取得されている。現在、T2 植物の育成を進めている。これらの解析結果については、報告会で報告する。

【展望】

今後、これまでに得られた組換え体系統の選抜・世代更新を繰り返し、ホモ個体の取得を目指す。また、未だ選抜を行っていない T0 種子から新たな形質転換候補の取得も目指す。得られた形質転換体の気孔の数や開度やストレス応答性等について詳しく調査をすすめることで、ポプラの SnRK2 の機能評価や SnRK2 の植物進化における機能分化について考察したい。

【参考文献】

- Horvat, B. *et al.* (2024) *Life* (Basel) **14**: 161.
 Fàbregas, N. *et al.* (2020) *Nature Communications* **11**: 6184.
 Song, X. *et al.* (2015) *Plant Biotechnol.* **32**: 337-341.
 Song, X. *et al.* (2016) *Frontiers Plant Sci.* **7**: 612.
 Umezawa, T *et al.* (2004) *PNAS* **101**: 17306-17311
 Yu, X. *et al.* (2017) *Mol Breeding* **37**: 57.

高温によるポプラの生育阻害の評価

吉野 生萌 (筑波大学生物学類)

指導教員：小口 太一 (筑波大学生命環境系)

【背景と目的】

木本植物は二次木部の広範な形成、養分の季節的再配分、複雑な樹冠形態の反復的発達などの樹木特有の特徴があるため、草本研究のみでは得られない知見が期待されている。また、材木・薪炭等として、世界中で大量に消費され、経済的に重要な資源であるだけでなく、大気中の炭素固定(炭素隔離)、野生生物の生息地など、環境においても重要な役割を果たす。

一方で、近年観測される急激な地球温暖化は、木本植物の生育を制限する環境要因となる。とくにポプラ属林木は、比較的冷涼な気候を好み、日本の真夏の暑さでは成長が制限されることが知られる。このため、高温環境に耐性をもつポプラの育種は、カーボンニュートラルに向けての一助となることが期待される。

そこで本研究では、気温とポプラの生育の関係に着目し、今後行われ高温耐性に関わる研究の基盤整備の目的とし、当研究室で用いられている実験系統ポプラ (*Populus tremula* × *Populus tremuloides*, T89 株) について特定網室で栽培し、気温と生育速度の関係の科学的記述をするとともに、高温耐性評価のための実験系の提案を試みる。

【植物材料】

ポプラは、交雑アスペン (*Populus tremula* × *P. tremuloides*, T89 株) を用いた。また、T89 株に *AtGolS2* 遺伝子を導入した組換えポプラ 2 系統 (*GolS2-5*, *GolS2-14*) を比較対照として併せて用いた。非組換え体を含む系統は栽培室で 1/2MS を基本培地とする寒天培地上で 24.5°C、16 時間明期/8 時間暗期で継代・維持している。

【方法】

①特定網室における生育評価

(1). 実験個体の準備

寒天培地に継代後約 1 か月目のポプラを、四角推ポット(高さ 12.5cm、4cm 四方、培土:げんきくん)へ移植した。栽培室(温度、光条件は栽培室と同様)で 3 週間馴化を行った後、特定網室にて丸型スリットポット(高さ 13cm、直径 15cm、培土:花と野菜の園芸培土)に植え替えた。さらに 3 週間馴化した後に生育評価を開始した。最終的に T89 株 8 個体、*GolS2-5* 組換え系統 9 個体、*GolS2-14* 組換え系統 9 個体が供試された。

(3) 生育評価

生育の指標として樹高および基部直径、植物の健全度の指標として QY (光合成量子収量) および SPAD (葉緑素量の指標) を 1 週間毎に測定した。QY および SPAD の測定には FluorPen100 (PSI) および SPAD-502 (コニカミノルタ) を使用した。

(2) 気温測定

気温の測定には THERMO COLLECTOR RTC=21(espec) を使用し、20 分間隔で記録した。

②人工気象器を用いた高温耐性試験

(1) 実験個体の準備

①の(1)と同様に各系統 16 個体準備し、日長時間 16 時間、気温 25°C の人工気象器 (LH-240/410S) で 1 週間培養を行った。

(2) 高温耐性試験

各系統 8 個体ずつを、以下の 2 条件で 1 か月間生育させ、樹高を測定した。

通常条件：明期時間 16 時間、25°C で生育した。

高温条件：明期時間 16 時間のうち、6 時間は 35°C とし、それ以外の時間は 25°C で生育した。

【結果・考察】

(1) 特定網室における生育評価

観測した気温および各系統の樹高およびその成長速度の推移を図 1~3 に示した。樹高は 7 月下旬まで増加し、その後は停止した(図 2)。一方、成長速度は 6 月下旬まで増加がみられたが、T89 株では 7/2 頃、組換え系統では 7/7 頃から減少がみられた(図 3)。

QY、SPAD の変動については、発表会で報告する。

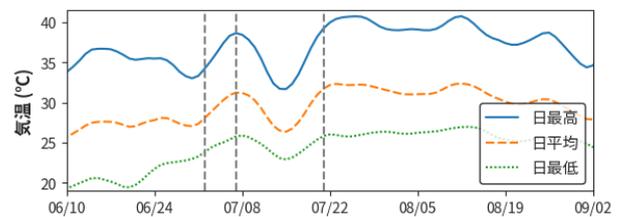


図 1 特定網室内の気温の推移 (lowess 平滑化)

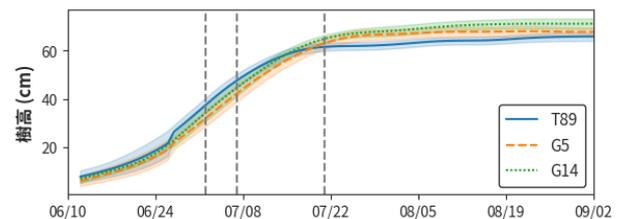


図 2 樹高の推移 (spline 平滑化)

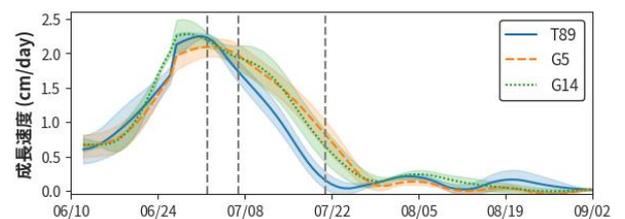


図 3 樹高の成長速度の推移

(2) 人工気象器を用いた高温耐性試験

現在実験継続中のため、詳細は卒業研究発表会にて報告する。

【考察】

8 月中旬までポプラの樹高成長は継続したが、成長速度に着目すると、7 月初旬以降、減少していることが分かった。成長速度が減少に転じた時期は、最高気温が 5 日間で 35.4°C から 39.4°C に急激に上昇した時期と一致した。このことから、高温耐性評価の指標として生育速度が指標となる可能性が示唆された。また、成長速度の減速が開始する時期には、T89 株と比べて組換え系統で 5 日程度の遅れていることから、*AtGolS2* 遺伝子の発現はポプラの高温耐性に関連する可能性が示唆された。現在、特定網室で生育速度の低下がみられた温度条件に基づく、人工気象器での高温耐性評価手法についても検討を進めている。

ウニ幼生の発生における Wnt7 の機能解析

具志堅 芽生 (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】

ウニ胚・幼生の発生過程にはさまざまなシグナル分子や転写因子のネットワークが関与している。その中で、他の動物種の発生過程において重要な細胞外シグナル分子として知られている Wnt グループに私は着目し、今回は Wnt7 の機能解析を試みた。ウニの受精卵に Wnt7 特異的なモルフォリノオリゴを用いたノックダウンを行うと、プルテウス幼生期にて明確な形態の変化が見られることが所属研究室のこれまでの成果で明らかになっている。具体的には、腕が短くなり体が後方側に伸びた状態となる (図 1)。この形態的差異だけでなく、本卒業研究では正常発生下のプルテウス幼生期に脳および繊毛帯の神経系が発達する点に着目し、それらがどのように変化しているのかを明らかにするため、神経および繊毛帯、繊毛そのものをマーカーとした染色と観察を行った。

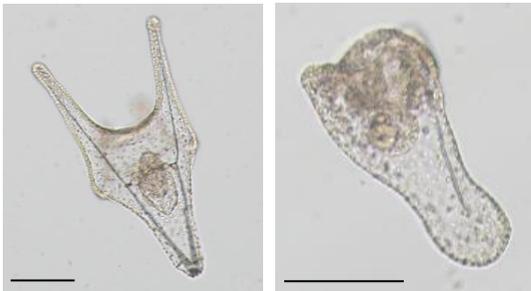


図 1. バフンウニのプルテウス幼生
コントロール胚 (左) と Wnt7 ノックダウン胚 (右)
スケールバー: 50 μ m

【方法】

・Wnt7 ノックダウン

バフンウニおよびエゾバフンウニの受精卵に対し、Wnt7 特異的なモルフォリノオリゴを用いたマイクロインジェクションを行った。コントロール胚にはインジェクションの際に溶媒として用いるグリセリンを注入した。それぞれ 15°C のインキュベーターで飼育し、受精後 24 時間にて水替えを行った。

実験 1: 受精後 40、48、72、96、120 時間が経過した胚・幼生をそれぞれホルマリンで固定し、神経系を特異的に認識するセロトニン抗体・SynB 抗体 (全神経マーカー) にて免疫染色し、観察した。

実験 2: 受精後 48、72 時間が経過した幼生をそれぞれホルマリンで固定し、繊毛帯のマーカーとして転写因子 Hnf6 の mRNA を、骨片細胞のマーカーとして SM50 の mRNA を *in situ* hybridization 法にて染色し、観察した。

実験 3: 受精後 72 時間が経過した胚をメタノールで固定し、繊毛そのもののマーカーとして acetylated tubulin 抗体にて免疫染色し、観察した。

【結果】

・実験 1 (神経系)

受精後 40 時間では、Wnt7 ノックダウン胚に発生の遅れが見られた。コントロール胚では一部がプルテウス幼生になっていたのに対し、Wnt7 ノックダウン胚は全てプリズム幼生のままであった。

受精後 48 時間では、コントロール胚のすべての個体がプルテウス幼生になり、9 割以上の胚で脳領域のセロトニン神経細胞が明確に見えた (14/15 匹)。一方 Wnt7 ノックダウン胚では、まだプリズム幼生のままの個体が存在し、セロトニン神経細胞が明確に観察できる個体はいなかった (0/11 匹)。

受精後 72 時間では、コントロール胚のすべての個体でセロトニン神経細胞を明確に観察することができた (17/17 匹)。一方で Wnt7 ノックダウン胚では、セロトニン神経細胞を明確に観察できる個体は全体の約 2 割だった (4/21 匹)。

受精後 96 時間では、コントロール胚のセロトニン神経細胞の個数は平均して 8.6 個であり、Wnt7 ノックダウン胚では 6.6 個であった (ともに n=10)。また、Wnt7 ノックダウン胚では、コントロール胚と比較してセロトニン神経細胞の分布域、つまり脳領域が明らかに狭まっており、SynB についても同様に、より狭い範囲でのみ観察された。

受精後 120 時間でも、コントロール胚と比較して Wnt7 ノックダウン胚で神経細胞の減少が見られた。

・実験 2 (繊毛帯、骨片細胞)

受精後 48 時間胚において、Wnt7 ノックダウン胚ではコントロール胚と比較して脳領域の Hnf6 の発現量が少ないように見えた。

骨片細胞は、Wnt7 ノックダウン胚でもコントロール胚と差異はそれほど見られなかった。

・実験 3 (繊毛)

コントロール胚と比較して、Wnt7 ノックダウン胚では脳領域の繊毛が明瞭でなかった。

【考察・今後の展望】

実験 1 の結果より、コントロール胚と比較して、Wnt7 ノックダウン胚では発生が遅れるように見え、Wnt7 ノックダウンの影響により正常な発生が阻害されている可能性が示唆された。さらに、発生が十分に進んだと思われる 120 時間の段階でも神経系が分布する領域に差が生じたことから、Wnt7 は特に神経の分化および脳領域のパターニングを制御していることが示唆された。今回の解析結果は、形態的に見られる劇的な差異の一部をより明確に説明することにつながったが、まだ十分ではないため、他の遺伝子マーカーや遺伝子の機能と組み合わせることで解析することによって、Wnt7 の機能をより明確にしてい

ヒドロ虫上にみられる未記載種を中心とした扁形動物門原卵黄目の系統分類学的研究

神澤 由己 (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】

扁形動物門原卵黄目 Prolecithophora は、全世界の海洋または汽水・淡水域から5科15属150種程度が知られ、主に体長3mm以下の小型種からなる分類群である。海藻類の植物体上や堆積物の間隙中などから主に見出されるが、ほとんどの種で詳しい生活史は判明していない。また、現在の原卵黄目の分類体系は、従来の形態的特徴に基づく分類と分子系統解析の結果から示唆される系統関係が一致せず、再検討を要する状況にある。

日本国内からは、現在までに2科5属7種と数種の未同定種の原因卵黄目が記録されているが、潜在的には全国各地にさらに多くの種が生息していると考えられる。近年、伊豆大島や静岡県下田市周辺海域における調査により、ヒドロ虫上に生息する原卵黄目の存在が明らかになったものの、これらの原卵黄目の詳細な系統分類学的研究は行われていなかった。

この背景を踏まえ、本研究では、ヒドロ虫上にみられる原卵黄目を中心として、伊豆大島と静岡県下田市周辺で採集された原卵黄目について分子系統解析や形態観察等の系統分類学的研究を行い、原卵黄目および扁形動物門の自然史研究の発展や日本列島周辺海域の生物多様性の解明に寄与することを目的とする。

【材料と方法】

2024年4月から2025年1月までの期間において、静岡県下田市の3地点の磯でヒドロ虫群体や海藻類を徒手で採集し、付着していた原卵黄目を肉眼での目視または顕微鏡下で単離した。また、下田市鍋田湾に設置されたロープからヒドロ虫群体やコケムシ群体を採集し、顕微鏡下でその枝上に付着していた原卵黄目を観察・採集した。伊豆大島周辺の原卵黄目の生体サンプルは、協力者の星野修氏が採集したものをご提供いただいた。これらのサンプルは顕微鏡下で観察・撮影を行った後、99.5%エタノールまたはブアン液で固定し、99.5%エタノール中で保存した。

分子系統解析は、99.5%エタノール固定サンプルからDNAを抽出し、原卵黄目の分子系統解析に広く用いられている18S rDNAおよび28S rDNA領域をPCR増幅し、その塩基配列を取得した。得られた配列とGenBankに登録されている原卵黄目の配列を用いて最尤法で系統樹を作成し、各種の系統関係を推定した。

【結果と考察】

本研究により採集された原卵黄目は、分子系統解析、および外部形態観察により以下の8種に分類された(図1)。

種	形態的特徴	採集地	採集状況	個体数	種	外形図
種1	円筒形 ベージュに赤褐色の斑紋 (無紋 or 斑状 or ライン状)	下田/伊豆大島	ヒドロ虫	> 50	<i>Cylindrostoma</i> sp. 1	図2A-C
種2	円筒形、ピンク	伊豆大島	ヒドロ虫	2	<i>Cylindrostoma</i> sp. 2	図2D
種3	円筒形、白	下田	海藻	7	<i>Cylindrostoma monotrochum</i>	図2E
種4	円筒形、白	伊豆大島	浮遊	3	<i>Pseudostomum</i> sp.	図2F
種5	円筒形、オレンジ	下田	コケムシ	> 50	<i>Monoophorum</i> sp.	図2G
種6	細長く扁平 頭部に長い1対の触手	下田	海藻	10	イジマナメクジムシ <i>Vorticeros ijimai</i>	図2H
種7	細長く扁平 頭部に短い2対の触手	下田	海藻	> 100	ツルギナメクジムシ <i>Vorticeros lobatum</i>	図2I
種8	細長く扁平、黄色	下田	海藻	5	<i>Plagiostomum</i> sp.	図2J

図1. 本研究で採集された原卵黄目の一覧

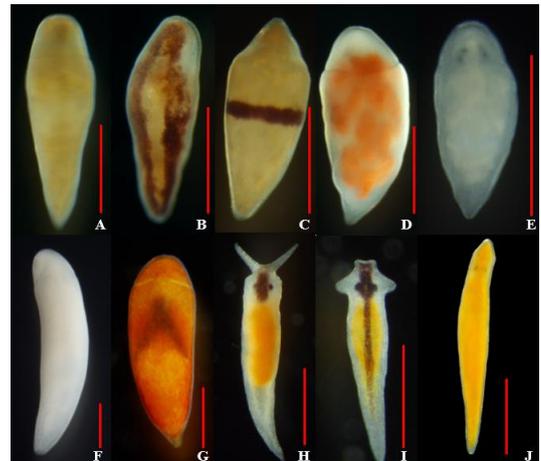


図2. 採集された原卵黄目の外形図 (スケールバーは500μm)
ベージュ色の体色の原卵黄目 (図2A) と同様の体色で斑状 (図2B) またはライン状の赤褐色の斑紋を有する原卵黄目 (図2C) は18S rDNA および28S rDNA 配列の差異がほとんどないため、色彩に個体変異のある単一種であると考えられる (種1)。また、種1の伊豆大島と下田市周辺の個体間でも、配列の差異はほとんどなかった。種1および種2 (図2D) はPseudostomidae 科 *Cylindrostoma* 属の別種であることが示唆されたが、いずれもGenBankに登録配列があるどの種とも一致しなかった。種3 (図2E) は、国内では利尻島から1例報告されている *Cylindrostoma monotrochum* であることが示唆された。種4 (図2F) は *Pseudostomum* 属、種5 (図2G) は *Monoophorum* 属と高い類縁性を示した。種6-8 はPlagiostomidae 科であることが示唆され、種6 (図2H) および種7 (図2I) はそれぞれイジマナメクジムシ *Vorticeros ijimai*、ツルギナメクジムシ *Vorticeros lobatum* と同定された。種8 (図2J) は *Plagiostomum* 属であると考えられた。なお、分子系統解析では複数の属の単系統性が支持されず、分子系統解析で推定される系統関係と現行の分類体系が一致しない結果となった。

【まとめと展望】

本研究により、伊豆大島や静岡県下田市周辺から8種の原卵黄目を確認した。また、それらの原卵黄目のrDNA配列を取得することにより、同地域、ひいては日本国内の原卵黄目のファウナ解明に寄与するとともに、原卵黄目の分類体系を再検討する必要性を改めて提示した。特に、種1および種2は、得られたrDNA配列や形態的特徴が既知種と一致せず、またヒドロ虫に依存した生態をもつ原卵黄目はこれまでに報告がないことなどから、未記載種である可能性が高い。今後は、サンプルの収集と連続切片標本の作製による内部形態の観察などを行いこれらの未記載種の新種記載を行うとともに、そのほかの未同定種についても研究を進め、原卵黄目の系統分類におけるさらなる情報の集積を目指したい。

末筆ながら、本研究に際し、伊豆大島周辺でのサンプル採集に多大なるご協力を賜ったダイビングサービス・チャップの星野修氏をはじめ、研究活動に様々な方面でご協力くださった皆様に厚く御礼申し上げます。

伊豆半島沖水深 50m 以深の浅海域でのドレッジ採集による貝類相調査

山田 彩斗 (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

軟体動物門はこれまでに報告されている種数が 2 番目に多い動物門であり、分類学的研究も進んでいる。これは、多くの種が炭酸カルシウムの殻を有することから死殻として残りやすく、研究試料の入手・保管がしやすいことが一つの要因である。

貝類において、伊豆半島の東西に接する相模湾や駿河湾を分布の境界とする種や、相模湾のみから記録がある種などが多数知られ、伊豆半島沿岸は日本近海の貝類の分布を調べる上で非常に重要な海域である。本海域の貝類相については、長谷川・堀・上島(2001)^[1]において、下田沖の浅海性有殻腹足類が調査され、50 回のドレッジ採集により 470 種以上が確認された(死殻のみのもを含む)。しかし、この先行研究では 50 回中 45 回が 60m 以浅の水深と浅い水深が中心の調査であった。よって、一般的に浅海とされる 200m 以浅全体における多様性を解明するには、より深い 60m-200m での調査が求められる。また、この先行研究は既に 20 年以上前の記録であり、近年の環境変化がこの深度の貝類相に影響を与えている可能性も考えられる。

本研究では、伊豆半島周辺各地の水深 60m 以深の海底におけるドレッジ調査により、本海域の水深 60m-200m での有殻腹足類の多様性を明らかにすること、また、先行研究での同一地点からの記録と比較することで、近年の環境変化がこの深度の貝類相に与える影響を検討することを目的とした。

方法

筑波大学下田臨海実験センターの海洋研究調査船「つくばⅡ」により、伊豆半島南部沖の各地でドレッジ採集を行なった。

- ・東伊豆町稲取沖 74~97m 深 (6 月 27 日)
- ・東伊豆町河津沖 71~93m 深 (12 月 9 日)
- ・下田市須崎東方沖 85~106m 深 (9 月 6 日)
- ・下田市下田沖 50~114m 深 (5 月 9 日、6 月 3 日、7 月 17 日)
- ・南伊豆町沖 73~148m 深 (6 月 5 日)

尚、下田沖の採集地点は長谷川・堀・上島(2001)^[1]の St. 41 (水深 98~83m) および St. 43 (水深 93~109m) と同一の地点を含む。

各日、採集は各地域内で 4 回(河津沖のみ 3 回)、計 27 回行なった。採取された海底の堆積物は船上で 3mm の篩にかけセンターに持ちかえり、目視によりソーティングを行い、生貝および腹足類と判別できる死殻(破片含む)をサンプルとした。

小型の生貝はシャーレ内にて熱湯に浸し、大型のものは鍋で煮沸し、肉抜きを行い、軟体部を無水エタノールにて保存した。形態的に肉抜きが困難なものについては加熱後に殻ごと無水エタノールにて保存した。肉抜き後の貝殻、および死殻は水道水で軽く濯いだのち、乾燥させて保存した。

種の同定は、肉眼および実体顕微鏡下にて形態を観察し、奥谷(2017)^[2]などに基づいて行った。また、採集地点ごとに、個体数の計数を行った。

結果と考察

採集された有殻腹足類は、死殻のみのもを含め、合計で 315 種であった。長谷川・堀・上島(2001)^[1]で採集されていなかった種は 127 種であった。本先行研究^[1]で採集されていた 188 種のうち、水深 50m 以深では採集されていなかった種が 64 種確認された。また、この先行研究^[1]では死殻のみが報告されており、今回の調査で新たに生貝が確認された種は 46 種であった。本先行研究^[1]で記録があるが本調査で確認されなかった種は 24 種であった。以下、本調査で採集された種のうち、特筆すべきものについて記載する。

Solariella segersi (Poppe, Tagaro & H. Dekker, 2006)・・・稲取沖で生貝 5 個体、および河津沖で生貝 8 個体。国内での正式な記録は確認できなかったものの、コシダカシタダミ *Minolia cf. punctata* A. Adams, 1860 と混同されていた例がみられ、本種は以前から日本沿岸に生息していた可能性がある。なお、コシダカシタダミも本調査で生貝が河津沖から 2 個体採集された。

マギレトゲニナ *Cerithium abditum* Houbriek, 1992・・・稲取沖で生貝 1 個体、河津沖で死殻 1 個体。国内では土佐湾沖および山口県北西沖から記録があり、本調査で北限を更新した。オニノツノ科の深場に生息する小型種は未だ不詳種が多く、分布が北上しているのか、今まで同定されてこなかったのか、検討が必要である。

コビトオトメフデ *Microvoluta hondana* (Yokoyama, 1922)・・・先行研究^[1]では死殻が計 43 個体見つかったが、本調査では稲取沖と下田沖において 1 個体ずつ、生貝が本地域で初めて確認された。三浦半島沖からも生貝が過去に報告されているが、本研究のものと殻の色彩が異なり、同種かどうか今後の確認が必要である。

ウスチャナワメグルマ *Heliacus cerdaleus* (Melville & Standen, 1903)・・・須崎沖 85m 深で生貝 1 個体。従来の分布は紀伊半島以南とされていたため、北限更新となる。本種は水深 7~31m に生息するとされており、生息水深も大きく更新された。

エミマクラ *Oliva lacanientai* Greifeneder & Blöcher, 1985 と

コトクサバイ *Phos varicosus* A. Gould, 1849・・・長谷川・堀・上島(2001)^[1]では死殻含めて報告されていないが、本研究では生貝が前者は 6 地点から 11 個体、後者は 10 地点から 22 個体記録された。これらの採集地点は先行研究^[1]と同一の地点も含むため、これら 2 種はこの 20 年間の環境の変化により本地域で定着・増加した可能性がある。

まとめと展望

本研究により、伊豆半島沖の浅海域で記録された有殻腹足類は 108 種増加し、採集回数と採集地点の追加を行うことで地域の種多様性の解像度を高めることに寄与した。今後は上記で特筆した各種で研究を続けるとともに、先行研究で採集された標本との比較を行い、不詳種を中心に同定を進めたい。

参考文献

1. 長谷川和範・堀成夫・上島 励 (2001) 国立科学博物館専報, 37, 203-228
2. 奥谷 喬司 (2017) 日本近海産貝類図鑑 第 2 版. 東海大学出版

Development of a method for the quantitative assessment of fish grazing pressure in temperate reefs

福井 涼士 (筑波大学生物学類) 指導教員 : Sylvain Agostini (筑波大学生命環境系)

Introduction

Kelps and other macroalgae are critical habitat-forming species in temperate reefs, creating underwater forests that support high biodiversity, contribute to carbon fixation, and provide vital ecological services. However, these ecosystems are increasingly threatened by global warming and other climate-driven changes, leading to their widespread decline. One of the key drivers for kelp loss is overgrazing by tropical fish, which rapidly expand their ranges polewards as sea temperatures rise. Although many studies have investigated the interactions between macroalgae and herbivorous fish, the methodologies applied vary significantly, making it challenging to obtain comparable quantitative data across different sites. Particularly, there is no standardized method to assess herbivory rates by fish, which is one of the main indexes showing the interactions between fish and macroalgae. Here, I review the methods for measuring fish grazing rates, highlighting their strengths and weaknesses, and propose a method to quantify fish grazing pressure in temperate reefs.

Method

Summarize existing methods

To identify and compare existing methods to assess fish grazing pressure, relevant studies published in the last 15 years were reviewed. Publications were collected from the Web of Science, using the following search terms: TS=(herbivor* fish* grazing*) AND TS=(pressure* OR rate*) AND TS=(marine* OR ocean*). All the articles were analyzed to understand each method of rating fish herbivory.

A longline-like assay of fish grazing pressure

We developed a simple and cost-effective method inspired by longline fishing techniques. One assay consists of macroalgae baits and a long line tied to a vertical line with a float and anchor. Floats are attached at each end of the long line to prevent an assay from being loose. Assays can be deployed and retrieved from a boat, excluding the need for diving. For broader accessibility, the method primarily uses widely available dried macrophytes, as bait, such as *Laminaria*, *Saccharina japonica* cutting into rectangles and *Undaria pinnatifida* were chosen for the bait of our assay due to their ease of preparation. Experiments on fish food selection using one of the range-extending tropical fish species *Calotomus japonicus* were also conducted to find suitable bait conditions. As a case study, the proposed method was applied in Shimoda (Japan) to investigate the grazing pressure by range-extending tropical fish and its contribution to the decline of the local kelp population.

Result and Discussion

A total of 89 papers were reviewed of which 35 did not assess herbivory. Four main types of experiments were highlighted: algae deployment (17), quadrat (11), exclusion (17), and Underwater Visual Census (13). Their strengths and weaknesses are shown in Table 1. Each method has its unique advantages, however, they require certain amounts of underwater work (all),

long deployment period (exclusion), and often taxonomical knowledge and literature availability on species grazing rates (Underwater Visual Census).

The proposed method has a simple design and does not require underwater procedures. Given that longline fishing is globally used, the simplicity and similarity enable local fishermen to incorporate the survey in management strategies, which allows for obtaining broader data across multiple sites. While algae deploying experiments are usually not used in kelp forests due to the low visibility of the assays affecting fish grazing rates, our method can tackle this issue with changeable bait depth.

Either bitemark presence or percentage of bait loss can be used for the quantitative assessment of herbivory. Although assessing bitemark presence allows for easier data collection, it can quickly reach the maximum value when the herbivory rate is high. Determining the score of each bait according to the percentage eaten can solve this. Even though the case study showed certain numbers of fish bitemarks, there is room for improvement, especially in the bait used. *S. japonica* is robust and it is easy to recognize bitemarks, however, it may not be the preferred bait of targeted fishes based on our case study and fish feeding selection experiments. While *U. pinnatifida* can be more palatable than *S. japonica*, its fragility makes rating more difficult. Combining *S. japonica* with glutamic acid, which is known to attract fish, can be a better option for bait. The shape of the bait may also influence herbivory rates, requiring adjustments to balance between ease of evaluating and impact on fish behavior. Baits located closer (0.5m) to the ground showed a higher bitemark count compared to bait 3m above ground. Further optimization of bait height for ecosystems such as kelp forest should be investigated too. However, 0.5m above ground or above canopy could allow a standardized assessment of fish herbivory in diverse ecosystems.

While certain challenges remain, this study provides a framework for collecting generalized data on fish grazing pressure that can be compared across locations and time periods. Such standardized datasets are crucial for advancing our understanding of ecosystem functions and informing effective ecological conservation and restoration strategies. The proposed method offers a valuable tool for protecting macroalgae-dominated ecosystems that are at risk of disappearing.

Table 1. General comparison of methods for rating fish herbivory

Experiment type	Strength	Weakness
Algae deployment	Direct measurement	Require underwater procedures Limited applicable ecosystem
Quadrat	Repeatability Detailed data on fish activity	Require underwater procedures Impact of non-fish herbivores Indirect measurement
Exclusion	Natural algal community direct measurement	Require underwater procedures Effects of cages on fish behavior
Underwater Visual Census	Data availability by species	Require underwater procedures Indirect measurement
Longline-like assay	Simple, standardized Direct measurement Applicable to diverse ecosystem	Non-natural bait No info on fish species

寄生蜂 *Asobara japonica* の毒がショウジョウバエ幼虫の成虫原基に作用するメカニズムの追究

古平 真太郎 (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】

寄生蜂とは、宿主である他種昆虫やクモ等の節足動物の栄養やエネルギーを利用して生活するハチ目昆虫の総称である。寄生蜂は宿主の体の内外に卵を産みつけ、孵化したハチの幼虫は成長し、宿主を食べて成虫へと成長する。このような独特の生活スタイルを持つ寄生蜂の種数は、現在の地球上で繁栄している昆虫類の約20%を占めるとされ、地球上で最も成功した戦略を持つ動物群の一つといっても過言ではない。こうした寄生蜂の巧みな生存戦略を分子レベルで解明することは、生物間相互作用の仕組みを理解する上で重要である。

寄生蜂の繁栄を支える基盤の一つは、寄生蜂が産生する毒にあると考えられている。特に、内部寄生蜂と呼ばれる一群の寄生蜂は、産卵（感染）時に宿主に毒のカクテルを注入することで、宿主の発生と生理を操作することで子ハチの成長と寄生の成立を助ける。

本研究で用いた寄生蜂 *Asobara japonica* はショウジョウバエ属に広く寄生する内部寄生蜂である^[1,2]。*A. japonica* はショウジョウバエ幼虫に卵と毒を注入する。感染された宿主の幼虫は成長を続けて蛹化するが、蛹化後に寄生蜂の幼虫が宿主本体を摂食し、最終的に宿主の蛹殻からは寄生蜂一匹が羽化する。

所属研究室の先行研究において、*A. japonica* の感染が、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* 幼虫が内包する将来の成虫組織（成虫原基, imaginal disc）を縮退させる現象「成虫原基退縮 imaginal disc degradation (IDD)」が見出された^[3]。IDD は、成虫原基でのアポトーシスの誘導、細胞分裂の停止、そしてオートファジーの誘導によって引き起こされる。IDD は、宿主ハエ幼虫を蛹にまで生かしつつも、宿主の成虫原基の成長を阻害することで *A. japonica* の寄生を成功させるために必須である^[3]。

所属研究室はさらに、全ゲノム配列解読と RNA 干渉法の開発を行い^[4]、IDD の誘導に必須の役割を果たす二つの分泌タンパク質、IDD factor-1 (IDDF-1) および IDDF-2 を同定した^[3]。IDDF-1 と IDDF-2 のどちらか一方を欠くと、宿主幼虫での IDD 誘導が抑制される。また、両分子は、”Domain of Unknown Function 4803 (DUF4803)” と名付けられた機能未知のドメイン構造を共有する^[3]。しかしながら、*A. japonica* の IDDF-1 と IDDF-2 が、宿主ショウジョウバエのどのような分子メカニズムを介して IDD を引き起こすのかは依然として不明である。

本研究ではこの問題へのアプローチとして私は、「宿主ショウジョウバエの成虫原基には IDDF-1 および IDDF-2 に対する受容体が存在している」と仮説を立て、候補受容体の遺伝学的スクリーニングを行った。具体的には、2つの受容体ファミリーに注目した。

1つは Nimrod ファミリーである。このファミリーに属する受容体の1つ Draper が、ショウジョウバエに内在する DUF4803 ドメインタンパク質 Orion と結合するという報告があり^[5]、IDDF-1 と IDDF-2 も Nimrod ファミリーのいずれかの分子に受容される可能性がある。もう1つは、ペプチドグリカン認識蛋白質 (PGRP) ファミリーの受容体である。PGRP ファミリーは寄生蜂を含む感染

性生物が有する分子に対する異物認識に関わることが広く知られており^[6]、IDDF-1 と IDDF-2 を寄生蜂由来の異物として認識する可能性がある。そこで、キイロショウジョウバエのゲノムにコードされているこれらの受容体遺伝子の機能欠失変異体、あるいは遺伝子ノックダウン個体を宿主として感染実験を行い、宿主の翅原基でアポトーシス、細胞分裂、オートファジーを可視化した。

【方法】

<実験 1>

Nimrod ファミリー (draper, Nimrod-A, Nimrod-B1, Nimrod-B3, Nimrod-B4, Nimrod-B5, Nimrod-C2, Nimrod-C3) の突然変異系統の3齢幼虫と *A. japonica* を用いて感染実験を行い、感染4時間後に翅原基を宿主幼虫から解剖し、3.7%ホルマリン溶液を用いて固定した。ついで、分裂期のヒストンを標識する pH3 に対する抗体とオートファゴソームの構成タンパク質 Atg8 に対する抗体を用いて免疫染色を行い、また DNA 断片の末端を標識し細胞死を検出する TUNEL 染色を行った。その後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて染色シグナルを観察した。

<実験 2>

PGRP ファミリー (PGRP-LA, PGRP-LB, PGRP-LC, PGRP-LE, PGRP-LF, PGRP-SB1, PGRP-SC1a, PGRP-SC1B, PGRP-SC2) をコードするそれぞれの遺伝子に対して RNA 干渉を誘導するためのトランスジェニック系統を、翅原基特異的に誘導させるための系統 (*WP-GALA*) と交配させた。この際、これらのハエにはオートファジーのレポーター (*GFP-Galectin*) を共に持たせた。得られたハエの3齢幼虫を用いて感染実験を行い、感染1.5時間後に翅原基を宿主幼虫から解剖して、上述と同様に固定した。その後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて *GFP-Galectin* の緑色シグナルの凝集の有無を観察することでオートファジーの誘導を評価した。

【結果・考察・今後の展望】

結果の詳細はすべて口頭発表にて報告する。

本研究では、用いるべきショウジョウバエ系統の飼育がうまくいかなかった、感染実験に十分な数のハエの幼虫が育たなかったなどの理由により、すべての候補遺伝子に対して十分な感染実験を行うことが出来なかった。今後、十分なハエの幼虫が得られ次第、未解析の遺伝子についても検討をする。

【参考文献】

- [1] Belokobylskij (1998) Key to the Insects of Russian Far East. *Tribe Alysiini*. In: Ler (ed.) 4: 163–298.
- [2] Mitsui et al. (2007) *J. Nat. Hist.* 41: 1731–1738.
- [3] Kamiyama et al. (2025) *Science Adv.* In press (*bioRxiv* preprint DOI: 10.1101/2024.06.13.598595).
- [4] Kamiyama et al. (2022) *DNA Res.* 29: 1–14.
- [5] Ji et al. (2023) *Proc. Acad. Natl. Sci. U. S. A.* 120: e2303392120.
- [6] Kurata (2014) *Dev. Comp. Immunol.* 42: 36–41.

ショウジョウバエの形態形成に関わる神経分泌ペプチドに関する研究： インスリン様ペプチド Dilp8 との関連

程 智浩（筑波大学生物学類）

指導教員：丹羽 隆介（筑波大学生存ダイナミクス研究センター）

【背景・目的】

多細胞生物は、発生過程において時期特異的な形態形成イベントを経て最終的なからだを作られる。特に完全変態昆虫は、変態過程に極めてダイナミックな変貌を遂げることから、古くから多くの研究者を魅了してきた。興味深いことに、ほとんどの完全変態昆虫は、変態開始時に細長い形状の幼虫が縦方向に収縮し、ずんぐりとした形状の蛹になる。しかしながら、変態開始時の全身の形状変化がどのような分子メカニズムによって誘導されるのかはほとんど明らかになっていない。

所属研究室における先行研究により、キイロショウジョウバエ（以下、ショウジョウバエ）を用いて、変態開始時の形状変化に関与するペプチドホルモンをコードする *pupal contraction-inducing hormone* (*PCH*) 遺伝子（未発表のため、仮称とする）が同定された⁽¹⁾。すなわち、脳の神経分泌細胞から分泌されるペプチドホルモン *PCH* が、変態開始時の形状変化を誘導することが明らかになった⁽¹⁾。さらに、他の研究グループにより、同じくショウジョウバエを用いて、表皮細胞で産生されるインスリン様ペプチド 8 (*Dilp8*) が変態開始時の形状変化を誘導することが報告されている⁽²⁾。*PCH* 及び *dilp8* 変異体では、いずれの変異体においても変態開始時の形状変化に異常をきたし、蛹が細長くなる^(1,2)。以上の結果から、脳神経系由来の *PCH* と表皮細胞由来の *Dilp8*、両ホルモンの間に何らかの上下関係が存在し、時期特異的な形状変化が誘導される可能性が強く示唆された。

そこで本研究では、変態開始時に全身の形状変化を誘導する 2 つのペプチドホルモン、*PCH* と *Dilp8* の関係性を明らかにすることを目的として、先行研究の結果を再検証するとともに、*PCH* 及び *dilp8* の変異体やノックダウン個体を用いた表現型の比較解析を行なった。さらに、*PCH* 変異体における *dilp8* の発現量の変化を解析した。

【方法】

(1) 蛹縦横比 (Pupal axis ratio: PAR) 解析

背側を上として両面テープで蛹をスライド上に貼り付け、実体顕微鏡下で撮影した。ImageJ により蛹の長径 (Hight)、短径 (Width) を測定し、各個体の縦横比 ($PAR = \text{Hight} / \text{Width}$) を算出した。

(2) 翅サイズのばらつき (Fluctuating Asymmetry index: FAi) 解析

羽化後 1~3 日の成虫を、2-プロパノール中において保存した。翅を phosphate buffer saline (PBS) 中で解剖・摘出し、乳酸とグリセロールを 6:5 で混合した溶液でスライドガラス上にマウントし、おもりを乗せてしばらく置いた。その後 Apotome 顕微鏡 (ZEISS) を用いて翅を撮影し、ImageJ を用いて面積計測を行った。FAi は、以下の式で算出した。Ri, Li はそれぞれ各個体の右、左の翅の面積を指す。FAi = $\text{var} [(Ri - Li) / \{ (Ri + Li) / 2 \}]$

(3) 定量 RT-PCR 法による遺伝子発現量の解析

コントロール個体及び *PCH* 変異体を用いて、蛹化前後 (±2 時間) 及び蛹化時の個体から RNA を抽出し、逆転写反応によって cDNA を作成した。*dilp8* に対する特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR を実施し、得られた定量値をハウスキーピング遺伝子 *rp49* で補正して遺伝子発現量を算出した。

【結果・考察】

(1) *PCH* 及び *dilp8* 変異体における表現型の比較

先行研究結果の再検証と、*PCH* 及び *dilp8* 変異体の表現型の比較を行うため、各変異体における蛹の縦横比 (PAR) を解析した。その結果、先行研究の結果通り、*PCH* 及び *dilp8* 変異体では、いずれもコントロールと比較して顕著に PAR が上昇した。また、それぞれの変異体の PAR の上昇率を比較した結果、その上昇率は同等であった。

以上の結果から、*PCH* 及び *dilp8* 変異体は、同様の蛹形状異常の表現型を示すことが確認された。

(2) *PCH* 変異体個体における翅サイズのばらつき

他の研究グループの研究により、*dilp8* 変異体では、蛹形状の異常だけでなく、成虫の翅サイズの左右差 (FAi) が大きくなることが報告されている⁽³⁾。一方、*PCH* 変異体における成虫の翅の FAi については明らかになっていない。そこで、*PCH* と *Dilp8* の関係性を明らかにするため、*PCH* 変異体を用いて、成虫の翅の FAi の解析を行なった。本結果と考察については、発表会にて報告する。

(3) *PCH* 変異体における *dilp8* 発現量の解析

脳神経系由来の *PCH* が、表皮細胞で産生される *Dilp8* の上流因子として機能するという仮説のもと、*PCH* 変異体における *dilp8* 発現量の解析を行なった。本結果と考察については、発表会にて報告する。

【参考文献】

- [1] 阿部奏人, 2022 年度 修士論文
- [2] F. Heredia et al (2021) *Nat Commun* 12, 3328
- [3] D. Blanco-Obregon et al (2022) *Nat Commun* 13, 5629

社会的ストレスが脳脊髄液循環の恒常性に与える影響

今野 花 (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】

社会的ストレスは他個体からの攻撃を受けることなどにより生じる精神的ストレスであり、うつ症状や認知機能の低下との関連が注目されている。社会的ストレスは複数の脳領域で神経炎症を引き起こすことが知られており、その要因として脳脊髄液(CSF)の関与が疑われている。CSFは脳室とくも膜下腔を循環し、その一部が脳室から脳実質へ浸透することで神経細胞への栄養供給や老廃物の除去を担う組織液である。CSFは免疫細胞や炎症性サイトカインの輸送においても重要な役割を果たす。先行研究では、ストレス条件下でマウスの脳室内を流れるCSFの流速が低下することが報告されている。また、ヒトのうつ病患者の死後脳においてCSF循環の制御因子である水チャネルタンパク質 Aquaporin 4 (AQP4)の発現量が低下していることが見出されている。AQP4は脳室壁を構成する上皮細胞とアストロサイトの細胞膜上に発現しており、CSF循環の形成において重要な役割を果たすとされている。しかしながら、社会的ストレス下でCSFの動態を制御する詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで、本研究では脳室-脳実質境界領域である脳室壁に着目し、社会的ストレス下でCSFの浸透を制御するメカニズムを解明することを目的とした。

【実験方法】

(1)社会的敗北ストレス

2-3ヶ月齢のC57BL/6マウス(B6)に対し、社会的敗北ストレスを与えた。攻撃者としてCrl:CD1マウス(ICR)を用いた。飼育ケージを透明な仕切り板で2等分し、片側の分画でICRを単独飼育した。1日あたり10分間B6をICRが存在する分画に導入して敗北経験を与えたのち、仕切り板を挟んだ隣の分画にB6を移動させ、24時間飼育した。24時間後、B6を異なるICRを飼育するケージに移動させ、同様の実験を行った。これを10日間繰り返し、10回目に敗北経験を与えてから1時間後にエバンスブルーを局所投与した。

(2)エバンスブルーの側脳室投与

社会的ストレスを与えたマウスおよび2-3ヶ月齢の野生型(WT)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をブreg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3時間後に灌流固定を行い、脳を摘出し、4%PFA/PBSを用いて一晚浸透固定した。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50 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を用いて室温で1時間処理した。Hoechst33342(1:1000)で核を染色した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いてエバンスブルーの浸潤を観察した。

(3)ウェスタンブロッティング

マウスの前脳と視床下部を摘出したのち氷上でホモジナイズして組織抽出液を作成し、Bradford法でサンプルのタンパク質濃度を測定した。その後、アクリルアミドゲル電気泳動で分離し、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、抗Tubulin抗体(1/5000)、抗Aqp4抗体(1/1000)を4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。その後、TBS-Tで洗浄し、HRP標識二次抗体(1/20000)を1時間反応させ、化学発光試薬で検出した。

(4)リアルタイムqPCR

マウスの前脳からISOGEN IIを用いてtotal RNAを回収した。回収したRNAをReverTra Aceを用いて逆転写し、cDNAを作成した。SYBR green qPCRを用いてqPCRを行い、M1-AQP4、M23-AQP4、PKA catalytic subunit β (PKAc β)のmRNA量を定量した。

【結果・考察】

はじめに、CSFの脳実質への浸透量が社会的ストレスによって変化するか検証した。その結果、社会的ストレスを与えたマウスにおいて第三脳室周辺領域に浸透するエバンスブルーの面積が減少する傾向が見られた。このことから、社会的ストレスによって脳室から脳実質へのCSFの浸透が減少する可能性が示唆された。

次に、AQP4の発現量が社会的ストレスの影響を受けるか検証するため、マウス前脳組織のリアルタイムqPCRを行い、AQP4の2つの主要なアイソフォーム(M1-AQP4, M23-AQP4)と、AQP4の細胞内輸送に関与するPKAc β のmRNA量を定量した。その結果、社会的ストレスを受けたマウスにおいてこれらmRNAがいずれも増加していた。そこで、社会的ストレスによってAQP4のタンパク質発現量が上昇するか明らかにするために、マウスの前脳と視床下部組織のウェスタンブロッティングを行い、AQP4のタンパク質を検出した。その結果、AQP4タンパク質の発現に大きな違いは見られなかった。

以上の結果から、社会的ストレスはAQP4の転写を促進するが、翻訳抑制あるいは分解促進など何らかのメカニズムによってAQP4タンパク質レベルの増加は抑制される可能性が示唆された。

【展望】

本研究では、社会的敗北ストレスモデルを用いて、社会的ストレスがCSFの浸透を減少させることを明らかにした。また、社会的ストレス条件下におけるCSF動態の制御にAQP4が関与している可能性があることを示した。今後は、脳室周辺の上皮細胞やアストロサイトにおけるAQP4の局在を観察するために免疫蛍光染色を行う予定である。また、PKAをはじめとするAQP4制御因子の発現量や活性を定量することで、社会的ストレス下でAQP4の発現や局在を通じてCSFの浸透を制御するメカニズムを明らかにしたいと考えている。

自閉症関連タンパク質 Hevin/Sparcl1 変異体の機能解析

菊川 潤音 (筑波大学生物学類) 指導教員: 鶴田 文憲 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

自閉症スペクトラム症候群 (ASD) は、コミュニケーション・対人関係における困難さや限局した興味・反復行動が見られる神経発達障害である。ASD 責任遺伝子として知られる Sparcl1 遺伝子は、細胞外マトリクスを構成する分泌タンパク質 Hevin をコードしており、リスク要因となる点変異が 12 種類報告されている。

Hevin はシナプス形成を増強することが知られており、N 末端の紐状の酸性ドメイン [amino acid(a.a.) 17-429]と C 末端の粒状構造にある FS ドメイン(a.a. 430-510)、EC ドメイン(a.a. 511-664)によって構成されている。FS ドメインはシナプス形成増強の際にシナプス前膜や後膜のタンパク質と相互作用することが知られている。EC ドメインはカルシウムイオン結合構造をとる EF ハンドモチーフを 2 つ(a.a. 586-618, 625-651)含有するドメインである。

これまでに当研究室では、報告された変異体の一つである W647R 変異の影響を培養細胞において検証し、W647R と相同なアミノ酸配列に同様な変異の入ったマウスタンパク質では、構造異常により小胞体ストレスが引き起こされることを突き止めている。一方で、他の Hevin 変異体における ASD の発症メカニズムは未検証である。また、ヒトとマウスの Hevin タンパク質のアミノ酸レベル相同性は 53%であるため、一塩基置換変異体の詳細なメカニズム解明にはヒトのタンパク質を用いた解析が必要である。

本研究では、それぞれのヒト Hevin 変異体における ASD 発症の分子メカニズムに着目し、それぞれの特性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

1. プラスミド構築

既存のヒト由来 Sparcl1 プラスミドに見られた二ヶ所の Natural Variant (c146a, c316g)の塩基置換に修正を加えるプライマーを作成した。これを用いて二ヶ所の Natural Variant に挟まれた配列を PCR により増幅し、アガロースゲル電気泳動後に Gilbert 法で精製し、Slice 法によって Ligation した。得られたプラスミドに対し、報告された点変異を加えるプライマーを作成した。その後、インバース PCR によりプラスミド全長を増幅し、Slice 法を用いて自閉症関連 Sparcl1 変異プラスミドを作成した。

2. ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE 及び Native-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 で blocking し、5%BSA/TBS-T で希釈した抗 hHevin 抗体、抗 Bip 抗体、抗 Tubulin 抗体を用いて 4°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。HRP 標識二次抗体反応後、化学発光検出試薬を用いて検出した。

3. qPCR

4 週齢の野生型 (Sparcl1^{+/+}) マウスと Hetero 変異型(Sparcl1^{ΔEF/+})マウスそれぞれの前頭前野皮質から total-RNA を ISOGEN II (Nippongene)を用いて抽出し、RevaTraAce qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO)を用いて逆転写を行った。その後 SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)を用いて Real-Time PCR System (Applied Biosystems, QuantStudio1) で反応させ、5S をインターナルコントロールとして Bip, Chop の mRNA の発現を定量した。

4. 行動実験 (Marble Burying test)

2 ヶ月齢の Sparcl1^{+/+} と Sparcl1^{ΔEF/+}マウスそれぞれに対し実験用フィールドで Habituation を 20 分間行った。その後、同一フィールドの床敷上に 15 個のビー玉を横 3 行、縦 5 列で等間隔に配置し、マウスに自由に行動を取らせた。その後 2/3 以上が床敷に埋められたビー玉をカウントした。

【結果・考察】

ASD リスク因子である変異体の分子特性を確認するために、作成したヒト Hevin 変異体 [E51 stop codon, S240C, T461I, N476S, H610Y, P651frame shift(fs)]を HEK293T 培養細胞に発現させ、ウェスタンブロッティングを行った。その結果、HevinP651fs を発現させた細胞においてのみ小胞体ストレスマーカーである Bip タンパク質の存在量上昇が認められた。この変異体は、先行研究において解析されたマウス由来 W647R 同様、C 末端側に存在するアミノ酸の変異体である。このことから、自閉症責任変異のうち小胞体ストレスを引き起こすものはアミノ酸配列の C 末端に集中していることが示唆された。特に、両者は共通して二つ目の EF ハンドモチーフ内部、及びそれ以降のアミノ酸配列を変化させていることから、EF ハンドモチーフの小胞体ストレスへの関与が示唆された。

EF ハンドモチーフの小胞体ストレス及び自閉症発症への影響を検証するため、一つ目の EF ハンドモチーフ以降の配列が欠落した Sparcl1^{ΔEF/+}マウスを用い、行動実験と前頭前野皮質の qPCR を行った。その結果、行動実験では自閉症様行動は認められず、qPCR でも小胞体ストレスマーカー (Bip, Chop) の上昇は認められなかった。これらのことから、特に二つ目の EF ハンドモチーフ以降に生じた変異が小胞体ストレスを誘導しうることがわかった。また、それ自体の欠損が直ちに小胞体ストレスの発生や自閉症の発症につながるわけではないことが示唆された。今後は、小胞体ストレスを引き起こす変異において Hevin の構造・性質がどの様に変化するのか、また、そのほかの変異についてどの様な経路で自閉症発症に至っているのかを解明していきたい。

ミクログリアにおける膜貫通型タンパク質 TREM2 の新規機能の解明

山田 淳真 (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】

中枢神経系の免疫担当細胞であるミクログリアは、神経変性疾患などの病態において、ダメージ関連分子パターンや凝集タンパク質など、様々な病態関連分子を感知して免疫応答や食食を行い、脳内環境を維持している。一方、ミクログリアの過剰な活性化は、慢性的な神経炎症や異常な食食によって、神経傷害を引き起こす。したがって、ミクログリアの厳密な制御は脳の恒常性維持のために重要である。ミクログリアに存在する膜貫通型タンパク質 Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) は、病態関連分子の受容体として機能し、食食や抗炎症反応、ミクログリアの増殖などの経路を活性化することが知られている。また TREM2 は、細胞外ドメインで切断されて可溶性の断片 (sTREM2) として放出され、病態から神経細胞を保護することが示唆されている。しかし、sTREM2 が神経保護作用を制御する正確なメカニズムは不明である。本研究では、細胞外に存在する sTREM2 がミクログリアに及ぼす影響とその分子メカニズムの解明を目的とした。

【実験方法】

1. 組換え体タンパク質の精製

HEK293T 細胞に sTREM2-His の発現プラスミドを導入し、48-72 時間培養した。細胞上清を回収し、Ni カラムを用いて sTREM2-His を精製した。その後、透析を行い、Bradford 法によって濃度を測定した。

2. ミクログリア細胞株 BV2 の刺激

マウスのミクログリア細胞株 (BV2) を、DMEM/F12 培地を用いて培養した。48 時間培養した後、精製した sTREM2-His (400 ng/mL) を混合した培地へ置換し、さらに 6 時間 (RT-qPCR 用) または 8 時間 (免疫細胞染色用) 培養した。

3. RT-qPCR

Isogen II (Nippongene) を用いて BV2 細胞から total-RNA を抽出した。その後、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて逆転写を行い、SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher) を用いて RT-qPCR を行った。5S を内部標準として、*Cd68*, *Iba1*, *Il1β*, *Trem2* の mRNA 量を定量した。

4. 免疫細胞染色

BV2 細胞を冷却した 4%PFA/PBS で 10 分間固定した。PBS で洗浄した後、5%BSA / 0.4% Triton X-100 / PBS で 30 分間透過処理を行った。その後、5%BSA / PBS に希釈した抗 CD68 抗体 (1:1000)、抗 Iba1 抗体 (1:1000) を用いて 4°C で一晩反応させた。一次抗体反応後、蛍光標識二次抗体 (1:1000) と核を染色する Hoechst (1:2000) を室温で 30 分間反応させた。染色画像は、蛍光顕微鏡 (Keyence, BIOREVO BZ-9000) を用いて取得し、Image J を用いて解析した。

5. 共免疫沈降

HEK293T 細胞に TREM2-His と sTREM2-HA の発現プラスミド

を導入した。48 時間後に細胞を回収し、Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 5 mM EDTA) に溶解した。その後、Lysis buffer で洗浄した Protein A ビーズと抗 HA 抗体を加え、4°C で 3 時間混和した。混和后、ビーズを Lysis buffer で洗浄し、タンパク質をウェスタンブロッティングで検出した。

6. ウェスタンブロッティング

作成したサンプル中のタンパク質を SDS-PAGE によって分離し、PVDF 膜に転写した。その後、5% スキムミルク / TBS-T でブロッキングし、抗 HA 抗体 (1:1000)、抗 His 抗体 (1:1000) を用いて 4°C にて一晩反応させた。一次抗体反応後、TBS-T で洗浄し、5% スキムミルク / TBS-T に希釈した二次抗体 (1:20000) を用いて室温にて 1 時間反応させた。二次抗体反応後の PVDF 膜を TBS-T で洗浄した後、化学発光検出試薬を用いて検出した。

【結果・考察】

sTREM2 は BV2 細胞の状態を変化させる

sTREM2 がミクログリアへ与える影響を調べるために、精製した sTREM2-His でミクログリア細胞株 BV2 を刺激し、RT-qPCR を行った。その結果、リソソームマーカーである *Cd68* およびアクチン細胞骨格の再編成に関与する *Iba1*、炎症性サイトカインである *Il1β* の mRNA 量が減少した。また、免疫細胞染色の結果から、CD68 の発現量が減少していた。以上の結果から、sTREM2 の刺激によって、BV2 細胞の活性が抑制されることが示唆された。アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患の初期段階では、過剰な食食や炎症が抑制されることが神経保護に寄与するとされている。今回の結果から、sTREM2 が病態の初期における神経保護的な役割を持つ可能性が考えられた。

sTREM2 は TREM2 と相互作用する

TREM2 が sTREM2 に対する受容体になるか検証するため、sTREM2 と TREM2 自身の相互作用を共免疫沈降によって確認した。その結果、両者が細胞外領域である N 末端側で相互作用することが示唆された。このことから、TREM2 が sTREM2 の受容体として働く可能性が示唆された。

sTREM2 は TREM2 の発現量を制御する

次に、sTREM2 によって TREM2 の発現が制御されるか検証した。BV2 細胞を sTREM2 で刺激した後に RT-qPCR を行った結果、*Trem2* の mRNA 量が減少した。よって、sTREM2 は、受容体として存在する TREM2 の量を減少させることで、ミクログリアの状態を変化させることが示唆された。

今後、細胞外の sTREM2 が実際にミクログリアの機能に変化を生じさせるか検証する。また、sTREM2 によるミクログリアの状態変化が TREM2 を介したものであるのか確認する。さらに、TREM2 の発現量や膜局在量を制御する仕組みを解明していく。

ミトコンドリア DNA 分子集団の制御に関する基礎研究

玉城 孝（筑波大学生物学類） 指導教員：中田 和人（筑波大学生命環境系）

【背景・目的】

細胞小器官の一つであるミトコンドリアには核DNAとは異なる独自のDNAであるミトコンドリアDNA (mtDNA) が存在している。哺乳類の細胞では、核DNAは2コピー内在されているのに対し、mtDNAは数百から数千コピーほど内在されている。この細胞に内在されている数百から数千コピーのmtDNAには、加齢などにより突然変異が起これ、変異型mtDNA分子種が生じることが知られている。このような変異型mtDNA分子種は、当初はミトコンドリア機能異常を伴うミトコンドリア病の患者集団から検出されたが、近年では、糖尿病、がん、神経変性疾患の患者、さらには、老化個体からも検出されることが相次いで報告されている。このようなことから現在、変異型mtDNA分子種による多様な病態発症機構が注目されている。

細胞や組織に野生型mtDNA分子種と変異型mtDNA分子種が共存した状態をヘテロプラスミーといい、ヘテロプラスミーの状態（野生型mtDNA分子種と変異型mtDNA分子種の含有割合）は細胞や組織間で異なり、また、経時的にも変動することが知られている。哺乳類のmtDNAにはミトコンドリア呼吸（酸化リン酸化によるATP産生）にのみ関与する37種の遺伝子群がコードされているため、mtDNAに生じた突然変異の病原性はミトコンドリア呼吸異常によるATP産生低下として表現される。しかしmtDNAは細胞あたり数百から数千コピーされるため、mtDNAに生じた突然変異の病原性はヘテロプラスミーの状態によって制御される。例えば、野生型mtDNAの割合が変異型mtDNAより優位な場合、細胞は正常な表現型を呈する。一方、変異型mtDNAの割合が70-80%を超えると、急激にミトコンドリア呼吸の低下が誘導されることが知られている。

このため、細胞に含まれる野生型と変異型のmtDNA分子種の割合（ヘテロプラスミーの状態）を変動させることができれば、変異型mtDNAの病原性の抑制や誘導を自在に制御できる可能性がある。そこで本研究では、細胞や組織においての特定のmtDNA分子種を増加させたり、減少させることに挑戦する。この挑戦を通して、変異型mtDNA分子種の蓄積によって発症する多様な病態の軽減や抑制を目指す。

【方法】 【結果・考察】 【今後の展望】

詳細は発表会にて報告する。

Nuclear mitochondrial DNA segments に関する基礎研究

中 篤 健（筑波大学生物学類） 指導教員：中田 和人（筑波大学生命環境系）

【背景・目的】

細胞内小器官の一つであるミトコンドリアは、内部に独自の DNA であるミトコンドリア DNA (mtDNA) と呼ばれる核 DNA とは異なる DNA を有している。核 DNA には、mtDNA と相同性の高い配列断片が複数認められ、これを Nuclear mitochondrial DNA segments (NUMT) と呼ぶ。NUMT は、何らかの原因によって mtDNA 配列断片が核 DNA に挿入されて生じたと考えられている。NUMT のサイズは 24 塩基対から mtDNA のほぼ全体を包括するものまで様々存在しており、ミトコンドリアを有するあらゆる真核生物の核ゲノムで認められる。

一般に、遺伝子の周辺領域はその遺伝子の発現制御に関わっていることが知られている。このため、NUMT の挿入位置によっては、核ゲノムにコードされた遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性がある。そこで、本研究では、NUMT の位置効果について検証することにした。NUMT には、生殖系列を通じて次世代に伝達され、その種の特長となっている進化的に保存されているものと、ある個体の生涯のうちに体細胞で偶発的に生じるその個体限りのものが存在すると考えられている。今回は、進化的に保存された NUMT について検証した。NUMT が遺伝子攪乱を生じさせている場合には、それが何らかの疾患の原因となったり、あるいは特定の遺伝子の発現を変化させたり機能を失わせたりすることを介して進化や種分化の原動力となっている可能性も考えられる。そこで、NUMT が遺伝子のイントロン中あるいは遺伝子上流 10kbp 内に存在している割合および NUMT が挿入されている位置を検証し、その影響について考察することを目的とした。

【方法】

NCBI にあるマウス、ラット、ヒトの核ゲノムに対して、それぞれの mtDNA 配列をクエリ配列とし、BLAST 検索による相同性比較を実施した。ヒットした相同配列を NUMT とし、それらが遺伝子のイントロン中あるいは遺伝子上流 10kbp 内に位置していた数をカウントし、イントロン全体に対してそれらが占める割合を種間で比較した。また、見出された NUMT のうち、特徴的な性質を有するものについては、その特性に基づいた考察を行った。

【結果・考察】

詳細な結果と考察については発表会にて報告する予定である。

ミトコンドリア DNA の突然変異ががんの悪性化に及ぼす影響の解析

WILSON KAYE EMMA (筑波大学生物学類)

指導教員：中田 和人 (筑波大学生命環境系)

【背景・目的】

ミトコンドリアは呼吸酵素複合体を介した酸化リン酸化によって ATP を産生する細胞小器官であり、独自の環状二本鎖 DNA (mtDNA) を有する。mtDNA は 1 細胞あたり数百から数千コピー存在し、その病原性突然変異の蓄積は、ミトコンドリアの機能を低下させ、ミトコンドリア病やがんなどの原因となりうるとされている。

所属研究室の先行研究において、mtDNA 突然変異の蓄積が細胞のがん化を誘発するという「がんミトコンドリア原因説」の検証が行われた結果、用いた細胞においては、がん化の原因は核 DNA 突然変異であることが示唆された。さらに、mtDNA 突然変異ががんの悪性化に関与する可能性を検証するため、C57BL/6(B6) 系統マウスのルイス肺がん由来細胞株である低転移性がん細胞 P29 と、高転移性がん細胞 A11 の mtDNA 置換によってサイブリッド (cytoplasmic hybrid; 細胞質雑種) が作製された。その結果、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ことから、用いた細胞においては mtDNA ががんの悪性化の原因であることが示唆された。両サイブリッドの mtDNA 塩基配列解析結果から、G13997A 突然変異ががんの転移を誘導しうると報告されたが、ほかにもがん細胞の悪性化に寄与しうる mtDNA の突然変異が存在する可能性は十分にあると考えられる。

そこで、がんの悪性化に寄与しうる新規 mtDNA 突然変異を同定するため、DNA polymerase gamma (POLG) の校正機能欠損によりランダムな mtDNA 突然変異が蓄積するとされている mtDNA mutator mice を用いた検証が行われた。この系統の+/mut マウスを代々掛け合わせて得た+/+ マウスは、生殖細胞系列を通じて mtDNA 突然変異が蓄積していくため、生まれながらに通常の野生型マウスより mtDNA の突然変異の頻度が高いと考えられる。この+/+ マウス血小板と ρ^0 P29 細胞を融合させて得たサイブリッドクローン (P29mt+/+) を用いて、増殖能、腫瘍形成能、転移能が評価された。その結果、得られた 5 つのクローンは、同じマウス由来の mtDNA を有するにもかかわらず、それぞれ大きく異なる特性を示した。Clone1 は、5 つのクローンのうち最も低い転移能を示したが、このクローンの核の由来である P29 細胞にはもともと転移能はほとんどなかったのに、低いながらも転移能を有することから、がん細胞が転移能を獲得するきっかけとなる突然変異を有している可能性があると考えられた。そこで、次世代シーケンサーによる mtDNA の塩基配列解析が行われた結果、変異含有率 50% 以上の Clone1 特有の点突然変異が 6 箇所発見された。これらの変異が、がん細胞の転移能獲得に寄与している可能性がある。しかし、サイブリッド樹立時に核 DNA に偶発的に生じた何らかの突然変異が、がん細胞の性質に影響を及ぼしている可能性も完全に否定することはできない。

そこで本研究では、先行研究で同定された mtDNA 突然変異が、がん細胞の悪性化に寄与しているかどうかを明確にすることを目的として検証を進めた。

【材料・方法】

Clone1 の特性の原因が mtDNA 突然変異であるかを明確にするために、核背景の異なるサイブリッドを作製し、その可能性を検証した。まず、P29mt+/+1 を脱核して得た P29mt+/+1 細胞質体と、非転移性マウス繊維肉腫 B82 細胞の mtDNA を除去した ρ^0 B82 を融合させ、B82mt+/+1 を作製した。次に、得られた 3 つのサイブリッドクローンについて、PCR-RFLP 法を用いた変異検出を行った。先行研究で同定された Clone1 に含まれる突然変異のうち、特にヒトとの保存性が高い 3 つの変異 (C8122T)、(T10465C)、(C13559T) に着目し、これらの変異の検出を試みた。さらに、4 種類のサイブリッド (P29mtB6、B82mtB6、P29mt+/+1、B82mt+/+1) を対象として COX/SDH 染色を行うことにより、mtDNA 突然変異のミトコンドリア呼吸活性への影響を評価した。

【結果・考察】

上記の脱核融合により、計 3 つのサイブリッドクローンを得ることに成功した。

その他、結果の詳細は発表会にて報告する予定である。

【展望】

今後は、Clone1 に特異な突然変異の導入に成功したサイブリッドを用いてマウス生体における造腫瘍試験や転移能を評価する試験等を行いながら、確認された突然変異のがん悪性化への影響を解析していきたいと考えている。

変異型ミトコンドリア DNA の蓄積におけるオートファジーの生物学的意義の検証

照井 一葵 (筑波大学生物学類) 指導教員: 石川 香 (筑波大学生命環境系)

【背景・目的】

ミトコンドリアは細胞内に存在する極めて重要な小器官であり、生体エネルギーの主な供給源となる ATP を産生している。その ATP 産生は、ミトコンドリア内膜に存在する呼吸酵素複合体が担う酸化リン酸化によって行われることが知られている。さらに、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) が存在し、哺乳類の1細胞あたりには数百から数千コピーもの mtDNA が含まれるとされる。mtDNA は、呼吸酵素複合体を構成する 13 種類のサブユニットをコードする構造遺伝子に加え、2 種類の rRNA 遺伝子および 22 種類の tRNA 遺伝子をもつため、その変異は呼吸機能をはじめとする多様な細胞機能に直接的な影響を及ぼす可能性があると考えられる。こうした影響の顕著な例として、病原性の突然変異が一定以上蓄積することで発症するミトコンドリア病が挙げられる。ミトコンドリア病では、低体重や腎不全、心伝導障害といったさまざまな症状が報告されており、その分子病態解明や治療法の確立が強く望まれている。

一方で、ミトコンドリア病の原因の一つとして、mtDNA に生じる大規模欠失突然変異 (Δ mtDNA) が知られている。ヒトにおいては、 Δ mtDNA が蓄積することで CPEO (Chronic progressive external ophthalmoplegia) や KSS (Keams-Sayre syndrome) などの深刻な症状を示すことが明らかになっている。また、所属研究室ではこのヒト Δ mtDNA と非常によく似た欠失領域をもつ Δ mtDNA を蓄積するモデルマウス (mito-mice Δ) の樹立に成功している。mito-mice Δ では、臓器ごとに Δ mtDNA の含有率 (Δ 率) が異なっており、心臓や腎臓では Δ 率が 60% を超えることが多いのに対し、膵臓や肝臓では Δ 率が 60% を超えることは少なく、顕著な障害が起りにくいという臓器間の差異が観察されている。この「臓器によって Δ mtDNA の蓄積の程度が異なる」という事実は、組織特異的なミトコンドリア病症状の発現メカニズムを理解する上で極めて重要であるが、その調節機構は依然として十分に解明されていない。

近年、細胞内において機能不全に陥ったミトコンドリアを選択的に分解するオートファジー機構、特にマイトファジーが注目を集めている。マイトファジーは、質的に損傷を受けたミトコンドリアを除去することで細胞環境の恒常性維持に貢献していると考えられる。この過程が各臓器でどの程度活性化されているかによって、 Δ mtDNA の蓄積パターンが変化し、結果として臓器ごとの病態発現に大きな影響を及ぼす可能性が示唆される。しかしながら、心臓や腎臓が高い Δ 率を示して重篤化しやすい一方、膵臓や肝臓では Δ 率があまり上昇せず顕著な障害を呈しにくいという現象が、具体的にどのようにマイトファジー (あるいはその他の機構) と関連しているのかは十分に理解されていない。

そこで本研究では、同一個体においても比較的 Δ 率が蓄積しにくい傾向を示す可能性がある臓器として「膵臓」に着目した。膵臓は、インスリンやグルカゴンなどのホルモン分泌を司る内分泌機能や、消化酵素を分泌する外分泌機能を同時に担っており、生体の代謝バランスを維持する上で重要な役割を果たしている。もし膵臓の Δ mtDNA の蓄積抑制メカニズムがマイトファジーと関連し

ていれば、それがミトコンドリア病の臓器特異的発現を理解する新たな手がかりとなる可能性が高い。本研究の目的は、mito-mice Δ を用いて膵臓における Δ 率やオートファジー活性を中心に解析し、心臓や腎臓とは異なる蓄積抑制様式の有無を明らかにすることである。さらに、これらの知見をもとに、肝臓・膵臓に共通する臓器特異的なマイトファジー活性やその他の調節経路について検証し、ミトコンドリア病の多様な病態発現メカニズムの解明に貢献することを目指す。

【材料】

5-7 か月齢の GFP-LC3/mito-mice Δ から摘出した、膵臓を用いた。摘出した膵臓の Δ 率を定量し、その値に基づいて 0%、0~29% (low)、30~49% (middle)、50%以上 (high) の 4 群に分類した。続いて、GFP で標識した LC3 トランスジェニックマウスと mito-mice Δ マウスを交配し、GFP-LC3/mito-mice Δ 二重トランスジェニックマウスを樹立して各群の解析に用いた。

【方法】

マウスの膵臓から作製した組織切片において、オートファジーに関与する LC3 の局在を GFP の蛍光として、かつ、ミトコンドリア外膜受容体 Tom20 を免疫染色による蛍光として、それぞれ検出することで、オートファジーおよびマイトファジーの発生頻度を腺房細胞とランゲルハンス島において評価した。

【結果・考察】

腺房細胞では、 Δ 率が 50% 以上 (High 群) の場合、他の群と比較してオートファジーおよびマイトファジーの蛍光シグナル (発生頻度) が有意に亢進していた。一方、ランゲルハンス島では、 Δ 率によるそれらの有意な差は認められなかった。これらの結果から、腺房細胞では Δ 率が 50% を超えるとオートファジーおよびマイトファジーの活性が増強され、 Δ mtDNA を多含するミトコンドリアが分解されることで、 Δ 率の更なる上昇 (蓄積) が抑制されている可能性が示唆された。

【展望】

腺房細胞とランゲルハンス島でオートファジーやマイトファジーの活性に差が認められたことから、両者における Δ 率を比較しつつ、これらの機構がどの程度関与しているかを検討したい。また、各群におけるオートファジー関連タンパク質 (LC3, p62) およ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、比較解析する計画である。

錐体オプシンの分子特性が視覚に及ぼす影響

板良敦 朝飛 (筑波大学生物学類) 指導教員: 櫻井 啓輔 (筑波大学生命環境系)

【背景と目的】

脊椎動物の視覚を担う視細胞には、桿体視細胞と錐体視細胞の機能の異なる2種類がある。暗所視を司る桿体視細胞は薄暗い光を感知できるのに対し、明所視を司る錐体視細胞は明るい光でも飽和することなく光受容できる。また暗順応は、桿体視細胞よりも錐体視細胞の方が速く起きることが知られている。

視細胞には光受容タンパク質であるオプシンが発現しており、これが発色団である11-*cis*レチナールと結合することによって、光を受容できる視物質になる。視物質は光を受容すると、11-*cis*レチナールがall-*trans*レチナールに光異性化され、メタ中間体と呼ばれる状態に変化する。このメタ中間体がGタンパク質を活性化し、光応答が起こる。その後、視物質からall-*trans*レチナールが解離し、レチナールを含まないオプシンとなるため光受容能は失われる。オプシンが再び光受容能をもつには、視覚サイクルによって供給される11-*cis*レチナールと再結合する必要がある。このような視物質が光異性化してからレチナールを再結合するまでの反応を「オプシンの光反応」と呼ぶ。

桿体視細胞にはロドプシン、錐体視細胞には錐体オプシンと呼ばれる異なるオプシンが発現しており、光反応の速度などの分子特性が異なることが知られている。すなわち、ロドプシンの光反応は約1時間と非常に遅いものに対して、錐体オプシンの光反応にかかる時間は1分未満と速い。錐体オプシンの特徴である速い光応答は、暗順応や明順応などの視覚の生理学的機能に関連していると考えられる。しかし分子特性が生体内で錐体視覚にどのような影響を与えるのかは依然として解明されていない。

本研究では、錐体オプシンの光反応速度に関わる200番目のアミノ残基に変異を加えることで、光反応速度がロドプシンに似た特性を示す錐体オプシンを発現するノックイン(KI)マウスを用いて、錐体オプシンの分子特性が錐体視細胞の視覚機能にどのような影響を与えるかを検証した。

【方法】

・遺伝子改変マウス

ゲノム編集法により当研究室で作出された、緑錐体オプシン遺伝子*OPN1mw*の200番目のアミノ酸であるプロリンをイソロイシンに置換したKIマウス、*OPN1mw*ノックアウトマウスを用いた。マウスの遺伝子型はPCR法により解析した。

・網膜電図 Electroretinogram (ERG)

生後4~6週齢のマウスを一晚暗順応させ、実験操作は赤色光または暗黒下で行った。測定前に三種混合麻酔薬(メドミジン、ミダゾラム、ブトルファノール)を腹腔内投与し麻酔した。緑色光(波長: 505 nm)を光ファイバーを介して麻酔下のマウスの左眼を刺激し、網膜で誘発される電位を記録した。網膜の電位は、それぞれ眼の角膜上と口腔内に配置された2つの電極間の電位差を差動増幅器で増幅し測定した。網膜の光応答の一般的な波形は二相性を示し、負方向の波形成分であるa-waveは桿体視細胞及び錐体視細胞由来に由来し、正方向の波形成分であるb-waveは双極細

胞に由来することが知られている。

(実験1) 桿体視細胞及び錐体視細胞の光感度を比較する為に、単発フラッシュ光(duration: 1 ms)の刺激強度を段階的に変化させ、各刺激強度における網膜の光応答の振幅を記録した。

(実験2) 桿体視細胞及び錐体視細胞の光応答速度を比較する為に、連続的なフラッシュ光刺激の間隔を様々に変化させることで得られる光応答(フリッカー応答)の振幅を記録した。一般的に、光応答速度が遅いほど、フリッカー応答の振幅はより低周波の条件下で減弱する。

(実験3) 暗順応の特性を調べるために、90%以上の視物質が反応する強い光を眼に与えた後、暗黒下において光応答の振幅の回復を記録した。

【結果・考察】

(実験1) 単発フラッシュ光によって誘発される網膜の光応答の振幅はa-wave、b-wave共にKIマウスの方がWTマウスよりも全体的に大きい値を示したが、様々な光強度領域における光感度に大きな差はみられなかった。この結果から、錐体オプシンの分子特性の違いは錐体の光感度に影響しないことが示唆される。ただ、マウスの視細胞全体のうち、錐体視細胞は3%と少ないためERGの桿体由来の成分が錐体由来の応答成分に影響を与えている可能性がある。そのため現在、パッチクランプ法により錐体視細胞の単一視細胞応答の測定を試みている。

(実験2) フリッカー光が5 Hzより低い周波数の条件においては、フリッカー応答はWTマウスとKIマウスで大きな違いは見られなかった。この条件下でのフリッカー応答は、主に桿体視細胞に由来することから、桿体視細胞の応答速度はWTマウスとKIマウスで違いがないと考えられる。

一方で、フリッカー光が高い周波数の条件においては、WTマウスに対して、KIマウスではフリッカー応答の振幅が顕著に小さくなった。高周波のフリッカー応答は錐体視細胞に由来することから、錐体視細胞の光応答速度はWTマウスに対して、KIマウスの方が遅いことを示唆される。この結果は、錐体オプシンのメタ中間体の持続時間は錐体視細胞の光応答速度に影響しないと考えられていたこれまでの知見からすると予想外の結果である。

(実験3) 90%以上視物質を光反応(退色)させた後の視細胞の光応答の回復を記録したところ、WTマウスでは退色から1分後から光応答が観察され回復がみられたのに対し、KIマウスでは、退色から20分ほど経ってから、光応答の回復が観察された。この結果から錐体オプシンの光応答速度は、錐体の暗順応の速度に影響することが示唆される。

本研究の実験結果から、錐体オプシン分子特性である速い光反応は、錐体視細胞の特徴である速い光応答速度や暗順応に関与することが明らかになった。

死細胞貪食におけるフォスファチジルセリン結合タンパク質の機能解析

松本 生成 (筑波大学生物学類) 指導教員: 渋谷 和子 (筑波大学医学医療系)

[背景]

動物の体内では組織のターンオーバーにより恒常的に細胞死が生じており、それらの死細胞は炎症性サイトカインや免疫の活性化を誘導するダメージ関連分子パターン (DAMPs) を放出する。したがって、組織の恒常性を維持するためには、貪食細胞による死細胞の適切なクリアランスが重要である。そのクリアランス過程において重要な役割を担っているのが、フォスファチジルセリン (Phosphatidylserine; PS) とその受容体である PS 受容体、あるいは PS と結合するアダプタータンパク質である[1]。PS は本来、形質膜の内側を裏うちし、細胞死に伴って死細胞表面に露出するようになるリン脂質であり、死細胞のマーカーとして機能する。本研究では、PS アダプタータンパク質として知られている MFG-E8 の変異型タンパク質を利用し、PS とその受容体の相互作用による死細胞貪食への関与を解析した。

[目的]

PS 結合タンパク質である MFG-E8 の変異型タンパク質を精製し、死細胞貪食に与える影響を解析する。

[方法]

(1) 変異型 MFG-E8 の精製

MFG-E8 は PS と貪食細胞上のインテグリンを架橋するアダプタータンパク質であるが、PS との結合部位を保ったまま、インテグリン結合ドメインの 1 アミノ酸置換によりインテグリンへの結合性を失った変異タンパク質を MFG-E8 D89E、PS 結合ドメインとインテグリン結合ドメインの両方に変異を持つタンパク質を MFG-E8 EPT と呼ぶ(図 1)、

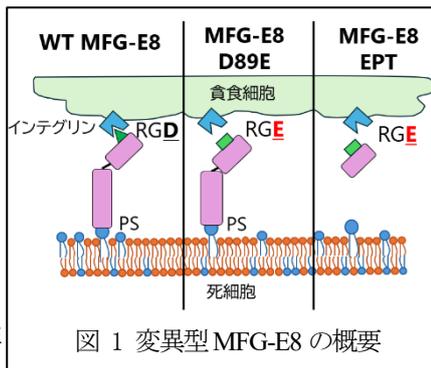


図 1 変異型 MFG-E8 の概要

本研究ではこの二つの変異型 MFG-E8 をそれぞれ含むベクターを用いタンパク質を精製した。Large Prep 法により目的のプラスミドを増幅し、それを 293F 細胞に導入し、培養上清を回収した。今回精製した D89E および EPT は N 末端末端に FLAG タグが融合しているため、抗 FLAG タグ抗体を用いたアフィニティゲルクロマトグラフィーによって培養上清から目的のタンパク質の精製を行い、目的のタンパク質が精製されていることを SDS-PAGE で確認した。

(2) MFG-E8-D89E の PS 結合能力の確認

Annexin V は死細胞上の PS と結合するタンパク質であり、MFG-E8 は PS との結合において競合することが明らかにされている[2]。Jurkat 細胞にスタウロスポリンを用いて細胞死を誘導し、細胞表面上の PS の発現を Annexin V によりフローサイトメトリー法で解析した。また、同時に D89E と PS の結合を、Annexin V との競合試験および抗 Flag タグ抗体による染色により解析した。

(3) MFG-E8-D89E が死細胞貪食に与える効果の検証

マウス骨髄由来マクロファージに Jurkat 細胞から誘導した死細胞を加え、死細胞貪食を共焦点顕微鏡、およびフローサイトメトリー法で解析した。死細胞貪食は、死細胞を pH 依存性に蛍光を発する色素 pHrodo で染色することで、死細胞が、貪食により細胞内に取り込まれたのち、ファゴサイト内の pH の低下によって蛍光を発するようになることを利用し、Phagocytic index
$$\left(\frac{\text{死細胞を貪食したマクロファージの数} \times \text{貪食された死細胞の数}}{(\text{マクロファージの総数})^2} \times 100 \right)$$
 [3] を指標として解析した。

(4) 統計解析

GraphPad Prism software を用い、有意水準を 5% として両側 Student-t 検定を行った。

[結果・考察]

(1) PS と MFG-E8 D89E の結合

精製した MFG-E8 D89E は生細胞には結合せず、死細胞に結合する一方で、PS 結合領域を欠損している MFG-E8 EPT は死細胞に結合しないことを認めた(図 2)。また、MFG-E8 D89E は Annexin V と死細胞への結合において競合することから、PS に結合することが明らかとなった。

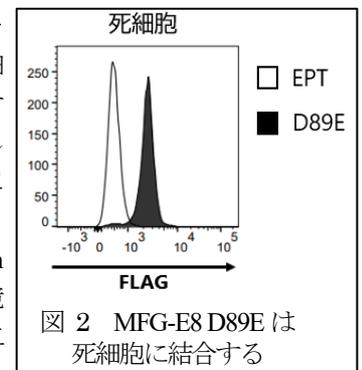


図 2 MFG-E8 D89E は死細胞に結合する

(2) MFG-E8 D89E によるマクロファージの死細胞貪食阻害

MFG-E8 D89E を与えた死細胞をマクロファージに貪食させた群は、MFG-E8 EPT を与えた群と比較して死細胞の貪食が有意に低下し(図 3)、Phagocytic index も MFG-E8 D89E を与えた群で有意に低下した。したがって、MFG-E8 D89E はマクロファージによる死細胞貪食を阻害することが明らかになった。これらの結果は、MFG-E8 D89E は PS と結合し、更に、PS をマスクすることによって、PS と PS 受容体を介した死細胞貪食シグナルを機能的に阻害していることを示唆する。

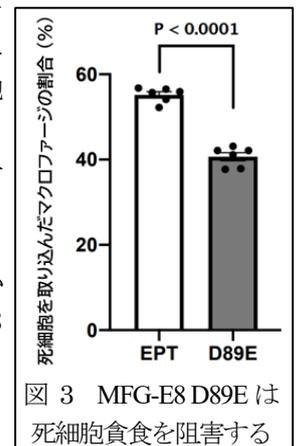


図 3 MFG-E8 D89E は死細胞貪食を阻害する

また、野生型 MFG-E8 は PS アダプタータンパク質として死細胞貪食を促進するという報告[4]から、MFG-E8 D89E で変異しているインテグリン結合部位が、本来の MFG-E8 のアダプター機能を介した死細胞貪食においてやはり重要であることを確認できた。

[参考文献]

[1] Byeongjin Moon et al. (2023) *Exp Mol Med* 55, 1644-1651
 [2] Rikinari Hanayama et al. (2002) *Nature* 417, 182-187
 [3] Hideki Sano et al. (2003) *J. Clin. Invest* 112(3), 389-397
 [4] Michael Miksa et al. (2009) *J. Immunol. Method* 342 (1-2), 71-77

統合失調症関連キネシン KIF17 がミクログリア形態変化において果たす役割の解明

日向寺 光洋 (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】

キネシンスーパーファミリータンパク質 (KIFs) は微小管に沿って積み荷 (カーゴ) を輸送するモータータンパク質であり、哺乳類において 45 種類の遺伝子が同定されており、15 のファミリーに分類される¹。

KIF17 は、kinesin-2 ファミリーに属する順行性キネシンであり、神経細胞の樹状突起において NMDA 受容体サブユニット 2B(NR2B)を輸送することで、シナプス可塑性に寄与することが知られている^{1,2}。また、KIF17 の機能障害は精神疾患と関連しており、先行研究では統合失調症患者一例において、KIF17 の遺伝子内にナンセンス変異を有することが確認されている³。この変異は KIF17 のカーゴ結合領域の欠失を引き起こすため、KIF17 による輸送が障害されると考えられる。

一方で、ミクログリアは中枢神経系の免疫機能を担うグリア細胞の一種であり、脳内環境の変化に応じて自身の形態を柔軟に変化させることが知られる。ミクログリアは *in vitro* において、恒常条件下では突起を伸ばした形態 (ramified shaped) を取るが、リポ多糖 (LPS) や IFN γ に代表される活性化刺激を受け取ると、アメーバ状の形態 (ameboid shaped) に変化して、炎症プロセスを亢進させる。また、抗炎症性サイトカインとして知られるインターロイキン 4 (IL-4) は、ミクログリアの代替活性化状態を誘発し、棍棒状の形態 (rod shaped) に変化して抗炎症プロセスを促進する⁴。このミクログリア形態変化による炎症・抗炎症バランスの制御は、脳の恒常性維持において重要な役割を果たすと考えられる。

近年、統合失調症患者のミクログリアが異常な活性化形態をとること⁵や、ミクログリアの形態変化には微小管のダイナミックなリモデリングが伴うことが報告されている⁴が、微小管をレールとして輸送する分子モーターの役割については未だ十分な議論がなされていない。

そこで本研究では、活性化刺激によるミクログリアの形態操作が可能な初代培養系を確立し、精神疾患との関連が示唆されるいくつかの *Kifs* mRNA (*Kif1a*, *Kif1b*, *Kif3a*, *Kif17*, *Kif13a*) が形態変化に伴って発現を変化させるかを明らかにするとともに先行研究³において報告された KIF17 の変異を持つマウス (KIF17 mut マウス) 由来ミクログリアと、野生型マウス (WT マウス) 由来ミクログリアの形態を比較することで、統合失調症関連キネシン KIF17 がミクログリア形態変化において果たす役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】

1. ミクログリア初代培養

生後 0-4 日までの WT および KIF17 mut 仔マウス (C57BL/6J) から大脳半球を取り出し、破碎した後に 0.25% トリプシン処理を 37°C で 40 分間行った。上清を丁寧に取り除き、HBSS による洗浄を 2 回行った後、10% BSA と GlutaMax I (Gibco) を含む DMEM 培地中で 13-15 日間培養した。コンフルエンスに達したのち、培養フラスコを数回叩いてミクログリアを単離し、先行研究⁶で示さ

れた生存因子を含む無血清培地に移した。単離 24 時間後に、100 ng/mL LPS と 20 ng/mL IFN γ もしくは 20 ng/mL IL-4 を加え、活性化形態および代替活性化形態を誘導した。刺激 48 時間後に溶出もしくは固定の操作を行った。

2. 逆転写定量 PCR (RT-qPCR)

細胞溶出物中の RNA を逆転写して cDNA を得た。cDNA サンプルは GeneAce SYBRTM qPCR Mix II (NIPPON GENE) を用い、QuantStudio 5 real-time PCR system (Applied Biosystems) で反応させ、恒常条件群 (Homeo 群) に対する LPS+IFN γ 投与群および IL-4 投与群での *Kifs* mRNA の相対発現量を定量した。

3. 免疫細胞化学染色 (ICC)

刺激 48 時間後の細胞を 4% PFA/PBS 中で 10 分間固定処理した。固定後の細胞を 0.1% Triton X-100 で透過処理し、5% BSA で 20 分間ブロッキングした後に、抗 Iba1 抗体 (Fujifilm) を加え、4°C で一晩反応させた。翌日、二次抗体として Alexa Fluor[®] 488 (Invitrogen) を加え 1 時間室温でインキュベートし、同時に DAPI によって核を染色した。画像取得は共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP8, Leica) で行った。形態学的解析には ImageJ Fiji を用い、細胞の面積や固体度 (=面積÷凸包面積) の定量を行った。

【結果・考察】

RT-qPCR の結果、LPS+IFN γ 投与群ではいずれの *Kifs* mRNA についても発現量の有意な変化は見られなかった (Fig1-a)。一方で、IL-4 投与群では、*Kifs* mRNA のうち *Kif3a*, *Kif17*, *Kif13a* に有意な発現上昇が確認された (Fig1-b)。この結果は、IL-4 投与により誘導された代替活性化ミクログリアの維持において KIF3A, KIF17, KIF13A が重要な働きを持つことを示唆している。

現在解析中の結果と考察については、発表会にて報告する。

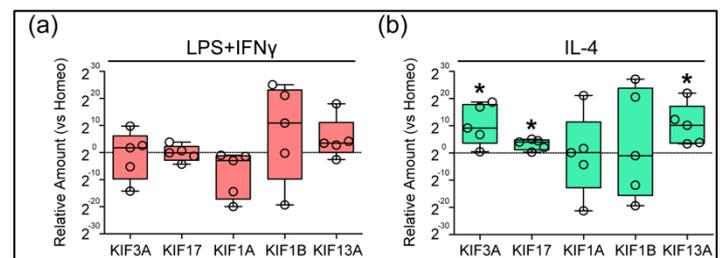


Fig. 1. RT-qPCR による *Kifs* mRNA 発現量の解析結果

Homeo 群に対する (a) LPS+IFN γ 投与群、(b) IL-4 投与群における *Kifs* mRNA の相対発現量

n = 5 independent cultures. *P < 0.05, Paired t-test versus Homeo.

【参考文献】

- Hirokawa et al. (2009) *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 682-696
- Yin et al. (2011) *Neuron* 70, 310-325
- Tarabeux et al. (2010) *Biol Psychiatry* 68, 649-656
- Rosito et al. (2023) *Cell Rep* 42, 112104
- Li et al. (2023) *Front Psychiatry* 14, 1126632
- Bohlen et al. (2017) *Neuron* 94, 759-773.e8.

大脳皮質における IL-17RA/RC 発現の時空間分布：精神疾患モデルを用いた神経免疫連関の検討

久保 明澄（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 (Debnath et al., 2014)。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 (Sanaka et al., 2024)。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 (Choi et al., 2016; Kubo et al., 2024)。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発生・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、それぞれの分子を発現している細胞種を検討した。②IL17RA タンパクの分布を免疫組織化学と免疫細胞染色法で調査した。さらに③MIA 自閉症モデルの大脳皮質で *Il17ra* と *Il17rc* 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、胚性(Embryonic day; E)14, 16, 18 日目、生後(Postnatal day; P)0, 7, 14, 21, 28, 35 日目、成体(P49)の C57BL/6J マウス *Mus musculus* を用いた。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。4% PFA/0.1MPB で灌流固定し、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)

Il17ra と *Il17rc* の CDS 内に 2 個ずつ(5'側と 3'側)RNA プロンプを設計した。シグナルを増強するため、二つのプロンプ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 (IHC)

浮遊法で抗 IL17RA 抗体(abcam)を脳切片と反応させた。IL17

受容体を発現する細胞種を同定するために、DCX(未成熟ニューロン)、NeuN(ニューロン)、CTIP2(5層ニューロン)、TBR1(6層ニューロン)、GFAP(アストロサイト)、IBA1(ミクログリア/マクロファージ)の抗体染色を行った。

(4) 免疫細胞染色 (ICC)

E17 胎仔から海馬を取り出し、ニューロンの初代培養を行った。抗 IL17RA 抗体と α -tubulin, MAP2 との共染色を行った。

(5) 画像取得と統計解析

オールインワン型顕微鏡 BZX-980(keyence)、共焦点レーザー顕微鏡 SP8(Leica)で写真撮影し、Photoshop(Adobe), ImageJ で画像処理を行った。JMP(SAS institute)で統計解析を行った。

【結果と考察】

E14~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。調査した発生・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* は胎生中期~新生仔期(E14~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。成体では *Il17ra* は感覚野で強く発現していた。*Il17rc* は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。胎生期は、IL17RA は DCX 陽性の未成熟ニューロンに発現していた。生後発達期には *Il17ra* は NeuN 陽性の第 VI 層ニューロンの約 90% に発現しており、中でも TBR1 陽性の皮質-視床投射ニューロンに優先的に発現していることが確認された。*Il17rc* もニューロンに発現していた。*Il17ra* と *Il17rc* は、ミクログリアやアストロサイトでは発現が観察されなかった。*Il17rc* は、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、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* と *Il17rc* の double ISH を実施し、両者を共発現する細胞の同定を行うとともに、分散培養系を用いて IL17 受容体の細胞内局在について検討を進めている。

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、IL-17A 受容体が免疫系の細胞ではなく、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。

ヒストンメチル化を介した睡眠要求の分子メカニズムの解明

張 沁悦 (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】

哺乳類の睡眠は、脳波 (electroencephalogram: EEG) および筋電図 (electromyography: EMG) に基づき、ノンレム睡眠 (non-rapid eye movement sleep: NREMS) とレム睡眠 (rapid eye movement sleep: REMS) に分類される。それぞれの特徴として、ノンレム睡眠は 4Hz 未満のデルタ波優位な EEG を示し、レム睡眠は 6~9Hz のシータ波優位な EEG と筋緊張消失を示す。

睡眠量が、覚醒時に蓄積する睡眠要求 (眠気) に応答して一定に保たれている仕組みを睡眠恒常性と呼ぶ。睡眠要求は覚醒時に増加し睡眠により解消される。一方で断眠後には、その反動で睡眠時間が長くなることが知られている。ノンレム睡眠時のデルタ波成分は、睡眠要求を反映する指標として考えられている。

これまで我々の研究室では、一細胞 RNA シーケンスを用いて、断眠マウスの大脳皮質における遺伝子発現変化を網羅的に解析し、睡眠要求の蓄積に応答する遺伝子群を同定した。そのうち、発現量が著明に増加する遺伝子群の上流エンリッチメント解析により、ポリコム抑制複合体 2 (PRC2) の中核を担う構成分子である *Ezh2* 遺伝子をマスター制御候補因子として同定した。PRC2 はヒストンタンパクのトリメチル化 (H3K27me3) を介して、エピジェネティックな転写抑制を行うことが知られている。

予備検討では、高効率な全脳感染を可能とする AAV-B10 と複数の shRNA を組み合わせ、神経細胞特異的な *Ezh2* の遺伝子発現抑制により、総覚醒時間減少とノンレム睡眠時のデルタ波成分の増加が誘導された。これらの予備検討の結果は、*Ezh2* 遺伝子がヒストンタンパクのトリメチル化を介して、睡眠要求の蓄積に応答する遺伝子群を制御し、睡眠恒常性の中核を担う可能性を示唆する。

本研究では、ヒストンタンパクのトリメチル化を亢進する変異型 *Ezh2* 遺伝子を神経細胞特異的に発現させることで、ヒストンメチル化の亢進による睡眠恒常性への影響を検討することを目的とする。

【方法】

1) プラスミド・AAV 作成

神経細胞特異的なプロモーター (hSyn) 下流で、野生型 *Ezh2* 遺伝子と P2A リンカー配列後に mScarlet 赤色蛍光タンパクを発現するプラスミドを用いた。PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit を用いて、トリメチル化を亢進する点突然変異である W113C 変異と Y641F 変異を *Ezh2* 遺伝子に導入した (pAAV-hSyn-3xflag-Ez (W113C/Y641F)-P2A-mScarlet3: Ez-DMT 群)。

対象群として、hSyn プロモーター下流で mScarlet のみを発現するプラスミドを作成した (pAAV-hSyn-3xflag-mScarlet3: mScarlet 群)。

作成した発現カセットを持つベクタープラスミドとカプシドプラスミド (pUC-mini-iCap-B10) とヘルパープラスミドの 3 種類のプラスミドを AAVpro 細胞にトランスフェクションを行った。AAV 粒子を産生する細胞を収穫後、超遠心機を用いた密度勾配遠心法により AAV を精製した。

2) 電極手術

野生型 C57BL/6N マウス (7 週齢) を用いて、睡眠測定用 EEG/EMG 電極埋め込み手術を行った。EEG 測定電極部を脳表面に留置し、EMG 測定電極を背側頸部の筋肉内に挿入した。(mScarlet 群: n=5, DMT 群: n=6)

3) 眼窩下静脈注射

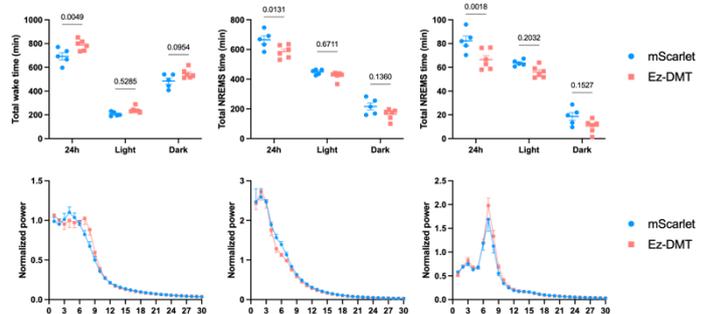
AAV-B10 カプシドの優れた特徴として、高効率に末梢静脈から血液脳関門を通過し、神経細胞への感染を可能とする。そのため、29 ゲージシリンジを用いて、眼窩下静脈叢から AAV 投与を行った。電極埋め込み手術からの回復期間として、1 週間後のマウスに対して、 5.0×10^{13} vg/ml に濃度を調節した AAV を一匹あたり $100 \mu\text{l}$ 投与した。

4) 睡眠計測・解析

AAV 眼窩下静脈叢投与から 2 週間後に、生理的条件下での睡眠・覚醒行動と、明期開始時から 6 時間の断眠後に、睡眠要求蓄積下での睡眠を測定した。20s エポックで睡眠判定を行い、解析した。

【結果】

図のように、mScarlet 群と比較して、Ez-DMT 群では総覚醒時間の増加を示し、総ノンレム睡眠時間と総レム睡眠時間の減少を示した。また、眠気の指標とされるノンレム睡眠時のデルタ波成分に著明な変化は見られなかった。



【考察・展望】

本実験では、*Ezh2* 遺伝子を介したヒストンメチル化の亢進により、総覚醒時間の増加が誘導されることが明らかになった。本結果は、予備検討での *Ezh2* の遺伝子発現抑制の結果と矛盾せず、*Ezh2* 遺伝子を介したヒストンメチルが睡眠制御に重要な役割を担う可能性が考えられる。

今後の展望として、免疫組織染色により AAV 由来の発現タンパクが広範な脳領域に発現が認められるか検証する必要がある。また、過去文献ではトリメチル化の亢進が報告されている W113C/Y641F 変異が、実際に神経細胞内 H3K27me3 を亢進しているかウェスタンブロッティング法により、検証を行う。

SIK3-シャペロン結合の睡眠覚醒制御における役割の解明

小嶺 大樹 (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】

睡眠は無脊椎動物から脊椎動物まで、広範な動物群に共通する生理現象であり、脳と身体の健康を維持するために不可欠な役割を果たしている。しかしながら、睡眠覚醒制御の分子メカニズムの多くが未解明である。

これまでに我々の研究室では、ランダム変異導入マウスを用いて脳波および筋電図に基づく大規模なフォワードジェネティクススクリーニングを実施しており、睡眠と覚醒に関与する新たな遺伝子として Salt-inducible kinase 3 (*Sik3*) を同定した。*Sik3* 遺伝子の機能獲得型 *Sleepy* (*Slp*) 変異は、SIK3 タンパク質のエキソン 13 の欠失を引き起こし、ノンレム (non-REM) 睡眠時間の増加、睡眠要求の指標であるノンレム睡眠時の脳波デルタ波成分の増加といった特徴的な表現型を呈する。

また先行研究において、熱ショックで誘導されるシャペロン分子として有名な HSP70s が、睡眠覚醒制御に関与する可能性が示唆されている。覚醒時の神経活動は ROS (活性酸素) の蓄積や小胞体への変性タンパク質の蓄積を引き起こすとされ[1]、シャペロン分子は変性タンパク質の正しいフォールディングを誘導する。実際、覚醒時間が延長される (断眠) につれて *Hsp70s* 発現量が増加し、これらは睡眠時間とともに減少するとされており[2]、シャペロンが睡眠中にタンパク質修復を行っていると考えられている。

所属研究室における予備実験によって、これら SIK3 と HSP70s が結合することが示された。しかしながら、HSP70s 自身や、SIK3 と HSP70s の相互作用の睡眠覚醒制御における役割は解明されていない。そこで本研究では、睡眠覚醒制御における SIK3-HSP70s 相互作用の役割を明らかにすることを目的とし、HSP70s のノックダウンが睡眠に与える影響を調べ、SIK3-HSP70s の結合部位の同定を行った。

【方法】

(1) 断眠による *HSP70s* の発現量の変化

マウス (C57BL/6N, 雄) は自由飲水・採餌下で 12 時間ごとの明暗サイクルで飼育された。マウスが頭を下げ始めたら、背中を筆で撫でて起こす断眠を、明期開始 (ZT0) から 6 時間にわたって行った。断眠実験終了後、自由睡眠個体と断眠個体の両方で頸椎脱臼、断頭し、大脳皮質を採取した (ZT6)。採取した大脳皮質から RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した。合成した cDNA を用いて RT-qPCR を行い、断眠による *HSP70s* (*Hspa1a1b*, *Hspa5*, *Hspa8*) と *Sik3* の発現量の変化を調べた。

(2) *HSP70s* ノックダウンと睡眠測定

HSP70s (*Hspa1a1b*, 5, 8) を shRNA による RNA 干渉法によりノックダウンした。配列は Vector builder 社のツールを用いて設計し、In-Fusion クローニングによりプラスミドを得た。プラスミド DNA を AAV pro 細胞にトランスフェクションすることで AAV を得た。マウスに注射する濃度に希釈した (5.0×10^{12} vg/mouse)。

8-9 週齢の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、1 週間後に 5.0×10^{13} vg/ μ L の濃度の AAV を

100 μ L 眼窩静脈叢注射した。注射後 2 週目から 5 週目まで睡眠測定を行った。睡眠測定は 24 時間実施し、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、レム睡眠の判定を行った。

(3) *HSP70s* と *Sik3* の結合箇所の同定

様々な SIK3 欠失変異体を作製し、HSP70s との結合箇所の同定を目指した。それぞれの変異体に対応するプライマーを作製し PCR を行うことで、目的のプラスミドを得た。HEK293T 細胞に得られたプラスミド (3xFLAG-SIK3 変異体) をトランスフェクションし、免疫沈降した後、抗 HSPA1A1B, HSPA5, HSPA8 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

【結果】

(1) 断眠による *Hsp70s* の発現量の変化 (図 1)

検討したシャペロン分子のうち、断眠により *Hspa1b* の発現量が統計学的に有意に増加した。これは先行研究における結果と一致した。一方、*Sik3* の発現量は short isoform で統計学的に有意に減少した。

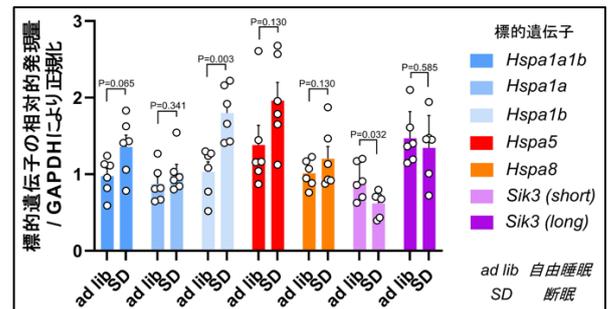


図 1：断眠による大脳皮質 *Hsp70s* と *Sik3* の発現量の変化

(2) *HSP70s* ノックダウンと睡眠測定

Hspa8 ノックダウン個体は注射後 2 週間経たずに死んでしまった。これは HSPA8 がハウスキーピング遺伝子であるからだと考えられる。また 2 週目・4 週目における HSPA1A1B, HSPA5 ノックダウン個体はコントロール個体に比べ、ノンレム睡眠時間・脳波デルタ成分ともに増加傾向だった。

(3) *HSP70s* と SIK3 の結合箇所の同定

現在解析中で、詳細は発表会にて報告する予定である。

【展望】

現在 (3) の実験を継続的に行っており、HSP70s と *Sik3* の結合箇所を数アミノ酸まで絞りたいと考えている。その後、ルシフェラーゼアッセイを用いて HSP70s が結合しない SIK3 変異体の機能特性 (機能獲得型変異か機能喪失型変異か) を判断し、最終的にこの変異が睡眠覚醒制御に与える影響を評価したい。

【参考文献】

- [1] Vyazovskiy et al. (2014) doi:10.1016/s0306-4522(02)00695-4
 [2] Terao et al. (2003) doi:10.1038/nrn3494

REM 睡眠剥奪が恐怖記憶形成および文脈弁別に果たす役割

永井 一稀 (筑波大学生物学類) 指導教員 : VOGT Kaspar Manuel (筑波大学生命環境系)

Target-AID による多重ノックアウト個体作製デザインを支援する KOnezumi-AID の開発

滝 大斗 (筑波大学生物学類) 指導教員: 水野 聖哉 (筑波大学医学医療系)

【背景・目的】

CRISPR-Cas9 がゲノム編集ツールとして確立されて以来、遺伝子改変マウスの作製速度は飛躍的に向上している。International Mouse Phenotyping Consortium の報告によれば、2021 年時点でタンパク質コード遺伝子のおよそ半数にあたる 11,241 の遺伝子において、ノックアウト (KO) マウスが作製されており [1]、その数は現在も増加を続けている。近い将来、マウスの単一遺伝子の KO 解析が完了すると予測されており、その後は複数遺伝子の同時 KO が重要な課題となると考えられる。

しかし、Cas9 による変異導入は、DNA の二本鎖切断が引き金となり、数千塩基対に及ぶ大規模な欠損が発生するリスクがある。複数遺伝子を標的とした場合、そのリスクはさらに増大する。この問題に対処するため、DNA の二本鎖を切断することなく塩基編集を行う塩基編集エフェクター、特に Target-AID に着目した。シトシン (C) をチミン (T) に置換することができる塩基編集エフェクターの一種である Target-AID は、プロトSpacer隣接配列 (Protospacer Adjacent Motif, PAM) 上流の 17-19 塩基対 (ターゲットウィンドウ) に特異的な C to T の点変異を導入できる [2]。また、他の塩基編集エフェクターには RNA を編集するオフターゲット効果が確認されているのに対し、Target-AID はそのリスクが低い。そのため、複数遺伝子の同時編集においてより安全性が高い。

しかし、CRISPR-Cas9 のように guide RNA (gRNA) 設計を支援するツールが充実していないため、Target-AID を用いた実験デザインには障壁があった。そこで本研究では、実験デザインの複雑さを軽減し、時間を短縮するために、KO したい遺伝子シンボルの入力で gRNA 設計が可能となるシステムである、KOnezumi-AID の開発を目的とした [3]。

【材料・方法】

1. データセット

本研究で使用したすべてのゲノムデータは UCSC Genome Browser からダウンロードした [4]。マウスおよびヒトのリファレンスゲノム配列と refFlat アノテーションデータは、GRCm39/mm39 (GCA_000001635.9) および GRCh38/hg38 (GCA_000001405.29) である。本研究では、RefSeq ID が 'NR' で始まる転写産物を非タンパク質コード転写産物、1 つの遺伝子シンボルに対して同じ RefSeq ID を持つ転写産物を重複転写産物、染色体情報列に '_alt'、'_random'、'_fix'、'_Un' の接尾辞を含む転写産物代替アセンブリと定義し、gRNA の設計対象から除いた。

2. KOnezumi-AID の KO 戦略

単一エクソン遺伝子に対してはコーディング領域 (coding sequence; CDS) 50% 以上の破壊を KO と定義し [5]、前半 50% 以内に未成熟終止コドン (premature termination codon; PTC) を誘導する gRNA を候補とした。複数エクソンを持つ遺伝子については、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (nonsense-mediated mRNA decay; NMD) を引き起こすことが可能な位置に PTC を誘導するような gRNA を候補とした。

3. KOnezumi-AID の gRNA 設計

KOnezumi-AID は 2 つの gRNA 設計戦略を持つ。1 つ目は CAG, CGA, CAA コドンの 'C'、または TGG コドンの 'G' の逆鎖の 'C' を編集することで PTC を誘導する。2 つ目はスプライシング部位に存在する高度に保存された GT-AG ルールに従う 2 塩基を破壊することによってスプライシング異常を引き起こし、フレームシフト変異を引き起こすことを目的とした gRNA の設計を行った。

【結果】

KOnezumi-AID の開発によって編集対象とする遺伝子シンボルを入力するだけで、KOnezumi-AID の KO 戦略に基づいた gRNA を設計することが可能となった。また、KOnezumi-AID の KO 戦略において、Target-AID が 83.2% のマウス遺伝子を標的とできることが示された。標的となった遺伝子と標的とならなかった遺伝子について比較したところ、CDS の長さやエクソンの個数が有意に少ないことがわかり、その特徴を持つ遺伝子が標的とできない遺伝子である可能性が高いことを示唆した。加えて、1 遺伝子あたりの実行時間は、KOnezumi-AID で検索対象となった遺伝子全体の 89.4% である 18,536 遺伝子に対して 2 秒未満で処理が完了した。一方、10 秒以上を要したのはわずか 113 遺伝子で、最も長い処理時間は 144 秒であった。また、実行時間とその遺伝子がつターゲットウィンドウに 'C' を含む配列の総数との間にはピアソン相関係数が 0.87 と高い相関が認められた。

さらに、KOnezumi-AID の gRNA 設計戦略はマウスに限らずヒトや植物など他の生物種への応用が可能である。これを踏まえ、ヒトゲノムを用いて KOnezumi-AID の KO 戦略に従った gRNA が設計可能な遺伝子数を検証した。その結果、マウスと同様の傾向が観測され、検索対象となった 19,073 遺伝子の内 81.6% が gRNA を設計できることが示された。これにより KOnezumi-AID のヒトゲノムデータへ適用できることが示された。

Target-AID の高い PTC 誘導性は Target-AID が多遺伝子同時 KO の有力な選択肢となることを示唆し、KOnezumi-AID の使用の容易さはその編集デザインを効率的に行えることが示された。

【展望】

KOnezumi-AID が対象とする塩基編集エフェクターは Target-AID のみであり、現状では 17% の遺伝子に対する gRNA の設計ができない。これに対して、他の塩基編集エフェクターを用いることや PAM 配列を NGG から NG を認識できるようにした Target-AID-NG を用いることで編集ができる可能性がある [6]。KOnezumi-AID はこれらの塩基編集エフェクターに対応するための更新が望まれる。

【参考文献】

- [1] Birling M.-C.; et.al. *Nat. Genet.* **2021**, 53, 416–419
- [2] Nishida K.; et.al. *Science* **2016**, 353, aaf8729
- [3] Taki T.; et.al. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25, 13500
- [4] Raney B.J.; et.al. *Nucleic Acids Res.* **2024**, 52, D1082–D1088
- [5] Skarnes W.C.; et.al. *Nature* **2011**, 474, 337–342
- [6] Nishimasu H.; et.al. *Science* **2018**, 361, 1259–1262

黄色ブドウ球菌における特定亜集団の分離法の開発

関谷 来功 (筑波大学生物学類)

指導教員: 森川 一也 (筑波大学医学医療系)

【背景・目的】

細菌の生存戦略の一つに集団の不均一性がある。例えば、急激な環境変化に対して生存可能な一部の細胞をあらかじめ存在させておくことで生き残りを図ったり (両賭け戦略)、分業したりする。このような生存戦略はまだ十分に理解されていないが、通常発現しておらず一部の亜集団でのみ発現する遺伝子 (限定的発現遺伝子) が重要な役割を果たす場合が幾つか知られている。

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、表皮粘膜の常在細菌であるが、病原因子を数多く持ちさまざまな感染症を引き起こす病原細菌としても知られている。所属研究室では、黄色ブドウ球菌において 20 種類の限定的発現遺伝子を発見し、*esp* (expression in minor subpopulation) 遺伝子と名付けた。*esp15* (*comGC*) は、亜集団で機能するシグマ因子 SigH の制御下にあり、*esp15* を含む一連の自然形質転換に関わる SigH レギュロンとともに発現して DNA 取り込みに寄与する [1]。また、*esp17* はそれ自身が転写因子であり、恐らく下流の関連遺伝子を亜集団で発現させることで乾燥耐性に寄与する。しかしながら、残りの 18 種類の *esp* 遺伝子については各 *esp* 遺伝子単独の強制発現や欠失による表現型の変化が見いだされておらず、役割は不明である。これら機能未知 *esp* 遺伝子と同時に発現する遺伝子を明らかにすることが出来れば、*esp* 遺伝子の機能に関する手がかりが得られる可能性がある。

所属研究室では既に、*esp17* 遺伝子と同時に発現する遺伝子群を決定することに成功している。これは、*esp17* 発現細胞をセルソーターで単離し、それを RNA-seq 解析に供することによる。しかし、セルソーターで十分な量の細胞を得るためには 10% 程度の発現が必要であり、*esp17* 以外の多くの *esp* の発現は数パーセント以下であるため適用できていない。そこで本研究では *esp* 発現細胞を効率的に単離または濃縮する方法の構築に取り組むこととした。

具体的には、各 *esp* 発現と同時にタグを細胞表面に発現させる形質転換体を作製し、タグを利用して細胞を回収することで各 *esp* 発現細胞を分離する (図)。

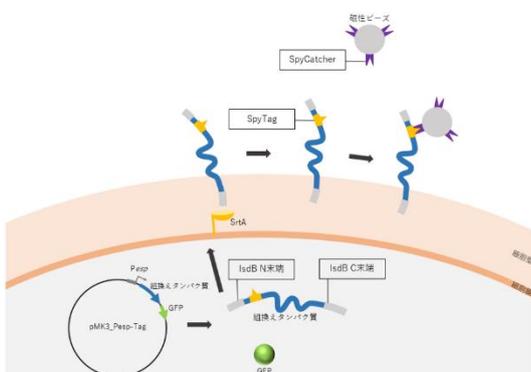


図: 本研究で構築しようとする各 *esp* 発現細胞の単離法

各 *esp* 発現と同時に SpyTag を発現する形質転換体を準備する。そこに SpyCatcher-磁性ビーズを加えると SpyTag と共有結合し、各 *esp* 発現細胞のみが回収できる。また、組換えタンパク質は FLAG-tag、8xHis-tag、HaloTag を含む。GFP 遺伝子は *esp* の発現を確認するために導入している。

【方法】

1) 形質転換体の作成

細胞表面に発現させるタグが機能するか確認するための予備実験として、*esp* プロモーターではなく構成的に発現する *sarA* プロモーターを組み込んだタグ発現プラスミドをもつ大腸菌をクローニングした。さらに黄色ブドウ球菌 RN4220 株に形質転換、Nef 株へ形質導入した。

2) 形質転換体における発現の確認

形質転換体において、GFP の蛍光を顕微鏡観察で検出した。組換えタンパク質については、SpyTag, FLAG-tag, His-tag の検出を細胞壁面からのウェスタンブロットによって、HaloTag の検出を蛍光リガンドを用いた顕微鏡観察によって試みた。

【結果・考察】

形質転換体 RN4220 pMK3_PsarA-Tag, Nef pMK3_PsarA-Tag の作製に成功した。また、これらの形質転換体において GFP による蛍光が確認できた。しかし、これらの形質転換体の細胞壁面において、組換えタンパク質を検出することはまだ出来ていない。今後さらに検討するが、発現量が低い、または細胞壁面分に局在していない可能性がある。

【今後の展望】

タンパク濃縮、他の画分における検出によって、組換えタンパク質の発現、細胞壁面分への局在を確認する。局在を確認できた際には、磁性ビーズによる細胞の回収を行う。さらに各 *Pesp* を用いた同様の実験を行い、各 *esp* 発現亜集団を分離する。一方、組換えタンパク質の発現・局在が確認できなかった場合にはベクターの再設計、もしくは別の亜集団分離法を検討する。

別の分離法として、細胞表面に発現する ComGC を利用する方法を考えている。His-tag もしくは Strep-tag が付加された ComGC を発現する株が既に構築されており、タグを付加しても自然形質転換能は正常であることが確認されている。また、黄色ブドウ球菌のもつ IgG 結合タンパク質を利用する方法も考えられる。IgG 結合タンパク質を欠失させた $\Delta spa \Delta sbi$ 株を作製し、ベクターによって各 *Pesp* 制御の下 Spa を発現する細胞を準備する。この細胞集団から IgG を利用して細胞を回収することで、各 *esp* 発現細胞を分離できると期待される。

【引用】

[1] Morikawa K *et al.* Expression of a Cryptic Secondary Sigma Factor Gene Unveils Natural Competence for DNA Transformation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 8, Article e1003003 (2012)

類似細胞検索のための Web アプリケーション「Cell similarity search」の開発

石橋 遼 (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】

1 細胞 RNA シーケンシング (scRNA-seq) は細胞集団・生体組織内における個々の細胞の遺伝子発現を計測でき、それらの遺伝子発現状態は細胞レベルの機能・表現型を反映していると期待される [1]。しかしながら、遺伝子発現状態から細胞レベルの機能・表現型を予測するのは一般に容易ではない [2]。

この問題に対し、公共データベースに蓄積されている大量の scRNA-seq データを参照データとし、新たに実験で得られた scRNA-seq データに含まれる細胞をクエリとして遺伝子発現状態が類似した細胞を検索することで、細胞レベルの機能・表現型を予測できることが期待される。類似細胞検索ツールとしては、scmap[3]、CellFishing.jl[4]、Cell BLAST[5]等が知られている。

そこで本研究では、実験系研究者が遺伝子発現に基づく類似細胞検索を簡便に行える Web アプリケーションである「Cell similarity search」の開発を目指した。

【材料】

検索対象のデータセット

本研究では概念実証として、米国 NCBI Gene Expression Omnibus に収載されている、マウス大脳皮質由来の Chromium 技術 (10x Genomics 社) を用いて取得された scRNA-seq データ 380 件を対象とした。所属研究室の井尻遥士氏によって Seurat object 形式に変換された scRNA-seq データおよびサンプル情報の提供を受けた。学習の前準備として、提供された Seurat object を AnnData に変換した。また、サンプル情報を、AnnData に含まれる細胞メタデータ (個々の細胞ごとの情報) に付加した。

【方法】

Cell similarity search の全体像

Cell similarity search は、Web UI、細胞検索エンジン、細胞メタデータ DB の3要素から構成される (図 1)。Web UI は、遺伝子発現データのアップロードと細胞検索の実行、検索結果としてメタデータの表示を行う。

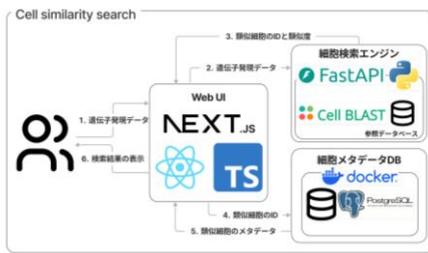


図 1. Cell similarity search の概要

細胞検索エンジンは遺伝子発現データをクエリとして受けとり、指定した参照データベースにおける類似細胞を探索する。細胞検索エンジンには、類似細胞検索ツールである Cell BLAST[5]の Python パッケージ (version 0.5.1) を用いた。細胞メタデータ DB は、細胞ごとのメタデータの保管・管理を行う。

Cell similarity search の性能検証

学習に使用した遺伝子発現量データを Cell similarity search の入力として類似細胞検索を行い、類似細胞検索の検索精度と、システムの応答性能を評価した。検索精度の評価には、参照データベースを検索先と指定し、対応する学習元 scRNA-seq データセットをクエリとして入力した際に、クエリに含まれる細胞と同一の細

胞が類似細胞として返される割合 (以下、自己検索成功率) を指標とした。また、システムの応答性能の評価には、参照データベース内で最も細胞数および遺伝子数が多い参照データベースに対して類似細胞検索を行った際の、ユーザが検索を実行してから結果が画面に表示されるまでの時間 (以下、ターンアラウンドタイム) について、5 回の実行の平均を取り、指標とした。

【結果】

Cell similarity search の実装状況

ユーザは、Web UI から細胞×遺伝子の発現量行列を、CSV、TSV、AnnData といった複数のファイル形式でアップロードできる。続いて、検索対象となる参照データベースを選択し、検索・実行することで、細胞検索エンジン

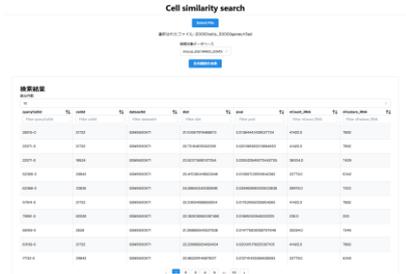


図 2. Cell similarity search の実行後画面

で類似細胞検索が行われ、類似細胞 ID と類似度のリストが返される。さらに、細胞メタデータ DB から類似細胞 ID によるメタデータの取得が行われ、Web UI に表示される。これにより、ユーザが Web UI を通じて scRNA-seq 由来の遺伝子発現データから簡便に類似細胞検索ができるシステムが実現された (図 2)。

性能検証

全参照データベース (380 件、細胞数最大 79,485 個、最低 153 個、平均 9,350 個) において自己検索成功率は 100% となり、類似細胞を正確に検索できることが確認された。ターンアラウンドタイムの検証では、最大細胞数 (79,485 細胞・32,245 遺伝子) および最大遺伝子数 (60,310 細胞・55,367 遺伝子) のデータベースに対して、クエリとして 20,000 細胞・30,000 遺伝子のデータセットを入力したところ、それぞれ平均 648.06 秒、483.21 秒の応答時間を達成した。これを細胞あたりの処理時間に換算すると、約 32.403 ms/細胞および 24.161 ms/細胞となり、Cell BLAST[5]の報告値 (10 ms/細胞) と比較し、ファイルのアップロードやメタデータ取得時間を含めた実運用条件下では同等の性能を実現した。

【展望】

現時点では、本システムはローカル環境でのみ使用可能であるが、今後は、一般公開に向けた調整を進める予定である。また、新しい参照データベースを容易に追加できるシステムを開発することで、継続的なデータの拡充とアプリケーションの機能向上を図ることが期待される。これにより、幅広い研究者が本アプリケーションを利用できる環境を構築することを目指す。

【参考文献】

[1] Jovic et al. (2022) Clin. Transl. Med., 12(3), e694.
 [2] Zeng et al. (2022) Cell, 185(15), 2739–2755.
 [3] Kiselev et al. (2018) Nat. Methods, 15, 359–362.
 [4] Sato et al. (2019) Genome Biol., 20, 31.
 [5] Cao et al. (2020) Nat. Commun., 11, 3458.

オオタナゴ *Acheilognathus macropterus* の食性解析

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

【背景・目的】

オオタナゴ *Acheilognathus macropterus* (Bleeker, 1871; 図1) はコイ科タナゴ属 (*Cyprinidae*: *Acheilognathus* Bleeker, 1859) に属する淡水魚であり、日本においては国外から人為的に持ち込まれた国外外来種である (北村・内山, 2020)。本種は2000年に霞ヶ浦流入河川の小野川で生息が確認され (萩原, 2002)、以降数年で霞ヶ浦全域に拡散したとされている (諸澤・藤岡, 2007)。本種の日本での繁殖生態や生活史に関しては萩原 (2011) で詳細に調査されているが、食性に関しては不明である。

外来種の食性に関する情報は、移入先の生態系へどのような影響を及ぼしているかを評価する際に重要となる。実際に Yasuno et al. (2024) は伊豆沼において、外来のタナゴ類が在来のタナゴ類と餌資源を巡って競合している可能性を、食性の解析によって示している。そこで本研究ではオオタナゴの食性を DNA メタバーコーディングによって解析し、検討を行った。

【方法】

本研究に用いたオオタナゴは投網 (26 節・1200 目) を用いて採集した。採集は霞ヶ浦南西部に流入する小野川の河口域で 2023 年の5月から9月にかけて、月1回行った。オオタナゴは特定外来生物に指定されており、生きたまま輸送をすることが法的に禁じられているので、その場で 70 %エタノールを用いて魚体を固定しクーラーボックス内で冷やしながら研究室へ持ち帰った。固定にエタノールを用いたのは DNA の解析用サンプルに最も適しているためである。固定の際、消化管内容物の消化が進まないように、シリンジとチューブを用いて口から直接 70 %エタノールを流し込んだ。

研究室へ持ち帰った採集サンプルは腹部を切開し消化管を抽出した。抽出した消化管の後半部は消化が進んでおり、DNA の解析には適さないと考えられたので腸全長の前半部 1/3 を 99.5 %エタノールで固定し、消化管内容物のサンプルとして冷凍庫内で保管した。

食性解析には最も多くの個体数が得られた9月のサンプルから10個体を用いた。DNA の抽出は Dneasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) を製造元のプロトコルに従って行った。DNA の抽出が適切に行われているかを確認するために、NanoPhotometer を用いて吸光度比・濃度を測定した。これらの抽出 DNA は冷凍庫内で保管した後、18SrRNA の V8 領域を標的として、Miseq を用いたアンプリコンシーケンスを株式会社生物技研に依頼した。得られた消化管内容物の配列データは QIIME2 を用いて解析した。DADA2 プラグインを用いて配列のノイズを除去し Amplicon Sequence Variant (ASV) を得た。その後 Silva 18S データベースを参照し、得られた ASV 配列を単純ベイズ分類器でそれぞれの分類群へ割り当てた。この割り当てた ASV 配列の正確性を高めるために、BLAST 検索を行った。



図1: オオタナゴの水槽写真 (現地で撮影したもの)

【結果と考察】

5月から8月までのサンプリングではオオタナゴはそれぞれ数個体しか得られなかったが、9月のサンプリングでは15個体採集された。消化管を抽出し DNA を抽出した10個体では、DNA 濃度が 690-885 ng/μl、吸光度比 (A260/A280, A260/A230) が 2.1-2.3 の範囲内であったため、研究用サンプルとして十分に使用可能であると判断した。

食性解析の結果と考察については卒業研究発表会にて報告する。

【謝辞】

サンプリング・解析にご協力いただいた同研究室の柳澤花帆氏と吉田伊吹氏、研究に関するご助言を下さった卒業生の高野季樹氏に感謝申し上げます。

【引用文献】

- ・北村淳一・内山りゅう. 2020. 日本のタナゴ 生態・保全・文化と図鑑. 山と溪谷社, 東京. 224 pp.
- ・萩原富司. 2002. 霞ヶ浦でオオタナゴが定着. 魚類自然史研究会会報「ボテジャコ」, 6: 19-22.
- ・萩原富司. 2011. 霞ヶ浦における国外外来種オオタナゴ *Acheilognathus macropterus* の繁殖生態と生活史. 魚類学雑誌, 58: 41-48.
- ・諸澤崇裕・藤岡正博. 2007. 霞ヶ浦における在来4種と外来3種のタナゴ類 (*Acheilognathinae*) の生息状況. 魚類学雑誌, 54: 129-137.
- ・Yasuno, N., Y. Fujimoto and K. Eisuke. 2024. Resource partitioning among endangered and non-native bitterling fishes in a small pond: insights from stable isotope and gut content analyses. *Environ Biol Fish*, 107:459-470

サンショウウオの卵に共生する緑藻の系統分類学的研究

成田 紗由美 (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】

一部の両生類の卵には緑藻が共生していることがある (図1)。いくつかの研究から、両者は相利共生の関係にあると考えられている。こうした両生類の卵に共生する緑藻は *Oophila amblystomatis* として記載された後、3属6種のサンショウウオ及びカエルの卵から発見された。このような共生緑藻の系統について、先行研究では、2つの異なる系統 (*Oophila* クレードA,B) に分かれるということが示唆されている (Nema et al. 2019)。このうち、日本ではクロサンショウウオ (*Hynobius nigrescens*) の卵から、クレードBの共生緑藻が報告されている (Muto et al. 2017, Vences et al. 2024)。

一方で、日本ではクロサンショウウオ以外からは、このような共生緑藻は報告されていない。また、クレードA,Bともに共生緑藻の形態に着目した詳細な研究はほとんどない。そこで、本研究では、クロサンショウウオ及びオオイタサンショウウオ (*Hynobius dunni*) の卵に共生する緑藻の系統及び形態を明らかにすることを目的とした。

【材料・方法】

＜卵塊の採集・形態観察・培養株の作成＞

クロサンショウウオの卵は2023年4月及び2024年5月に菅平高原実験所のトンボ池において採集されたものを用いた。また、オオイタサンショウウオの卵は、2024年4月に大分大学構内において孵化後に採集されたものを用いた。

卵は光学顕微鏡 (Zeiss, Imager.A2) を用いて共生緑藻の観察を行った。また、パスツールピペットを用いて共生緑藻を単離し、AF-6培地で培養した。得られた培養株についても、光学顕微鏡による形態観察を行った。

＜分子系統解析＞

まず、培養株から DNeasy® Plant Mini Kit を用いて DNA を抽出した後、18S rRNA 遺伝子の PCR 配列の増幅及びダイレクトシーケンスによる配列決定を行った。次に、Nakada et al. (2008) のデータセットをもとにクラミドモナス目全体の配列を GenBank から取得し、得られた配列を加えてデータセットを作成した。その後、MAFFT によるアライメント、TrimAl によるトリミングを行い、IQ-TREE 2 により最尤系統樹を作成した。

＜シングルセル解析＞

クロサンショウウオの卵共生藻について、パスツールピペットを用いて1細胞単離した後、倒立顕微鏡を用いて形態写真を撮影した。その後、PCR チューブに入れて冷凍保存した。得られた細胞について REPLI-g キットを用いた全ゲノム増幅を行った後、PCR により 18S rRNA 遺伝子を増幅した。その後、ダイレクトシーケンスにより 18S rRNA 遺伝子の配列決定を行い、培養株から得られた配列との比較を行った。

【結果・考察】

＜共生藻の形態観察・培養株の作成＞

2023年に採集したクロサンショウウオの卵においては、Muto et

al. (2017)の報告と同様に球形の緑藻や細胞壁に突起のある細胞が観察された。一方で、2024年に採集したクロサンショウウオの卵においては、球形の細胞の他に、等長または不等長の鞭毛をもつ細胞が観察された。また、クロサンショウウオの卵に共生する緑藻について単離したところ、各年で2株ずつ培養株が得られた。

オオイタサンショウウオの卵においては、クロサンショウウオで観察された細胞に類似した球形の細胞や突起のある細胞が観察された。そのほか、等長の鞭毛をもつ細胞も観察された。しかし、培養株は得られなかった。

＜分子系統解析＞

2023年と2024年にクロサンショウウオの卵から単離・培養した共生藻について分子系統解析を行ったところ、2023年に得られた培養株はクレードA、2024年に得られた培養株はクレードBに含まれることが分かった。同一の場所から異なる系統に属する共生緑藻が得られたのは初めての報告であり、このような共生緑藻の系統の差異は場所によるものではなく、宿主胚の発生段階などによるものである可能性がある。

＜シングルセル解析＞

クロサンショウウオの卵から単離した直後の細胞形態と培養株で観察される細胞形態を比較したところ、単離直後の細胞形態はクレードAとBの培養株で観察された細胞のどちらにも類似していなかった。一方で、得られた18S rRNA 遺伝子の部分配列はクレードBの配列とほぼ一致していた。このことから、少なくともクレードBの共生緑藻は共生時と自由生活時では異なる形態をもつと考えられる (図2)。

【今後の展望】

今後はクレードA、Bの形態的な比較を行うため、透過型電子顕微鏡による微細形態の観察を行っていく。

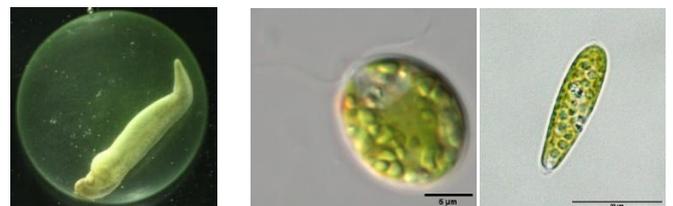


図1 緑藻が共生する卵 図2 クレードBの培養株の形態 (左) とシングルセル解析で観察された形態 (右)

【参考文献】

Muto et al. (2017) doi: <https://doi.org/10.1111/pre.12173>

Nema et al. (2019) doi: [10.1007/s13199-018-0564-1](https://doi.org/10.1007/s13199-018-0564-1)

Vences et al. (2024) doi: <https://doi.org/10.1016/j.ympcv.2024.108165>

【謝辞】

クロサンショウウオの卵のご提供や採集協力をしていただいた出川洋介博士、オオイタサンショウウオの卵をご提供していただいた永野昌博博士に感謝申し上げます。

海洋細菌 *Alteromonas macleodii* が放出する膜小胞の定量評価

小野 つかさ (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】

海洋中の溶存態有機物 (Dissolved Organic Matter: DOM) が持つ炭素量は 662 PgC と推定されており (Hansell et al., 2006)、大気中の二酸化炭素や陸上植物が持つ炭素量に匹敵する地球表層最大の有機炭素貯蔵庫の一つである (IPCC, 2021)。海洋 DOM の 90% 以上は生物分解に耐性を持ち、何百年から何千年と海洋に残存する難分解性 DOM が占めている (Carlson and Hansell, 2015)。海洋細菌は難分解性 DOM の主要な生産者であり、細菌由来 DOM は注目されている。

本研究で着目する細菌由来有機物は膜小胞 (Membrane Vesicle: MV) である。MV は直径 20~400 nm の微粒子であり、海洋細菌を含む多くの細菌から放出される (Toyofuku et al., 2019)。従来 MV は DOM として扱われていたため、海洋中での動態についてはわかっていなかった。近年、MV は沿岸表層水中に最大 10^6 particles/ml 存在し、放出後 2 週間残存することが報告されている (Billler et al., 2014)。さらに、細菌由来 DOM の最大 34% が MV 由来である可能性が示唆されており、細菌由来 DOM の主要な構成成分である可能性がある (野口, 2023)。しかし、海洋細菌から放出される MV の炭素ベースでの定量がされておらず、細菌由来 DOM に占める割合が分かっていない。また、細菌は成長段階によって放出する MV の性質が変化するという報告もある (野口, 2023)。

本研究では、海洋細菌単離株あたりの MV 放出量を炭素ベースで定量し、細菌由来 DOM に占める割合を評価することを目的とした。また、MV 直径や炭素量の変化から成長段階による MV の性質の変化を明らかにすることも目的とした。

【方法】

1. Marine Broth 培地を用いた培養実験

理化学研究所微生物材料開発室から入手した *Alteromonas macleodii* ATCC 27126 株 (*A. macleodii*) を 1 L の BD Difco Marine Broth 溶液に植菌し、暗所にて 20°C で 2 週間培養した (n=3)。培養各日、試料の分取を行い、細菌細胞数を計測した。また、培養開始から 0、2、4、7、10、14 日目に MV を分取した。

2. ^{13}C -グルコース/アミノ酸を基質とした培養実験

Aquil 培地 (Morel et al., 1979) 3.5 L に ^{13}C -グルコース (最終濃度 833 μM)、アミノ酸 10 種 (最終濃度 2.65 μM) を基質として添加し、*A. macleodii* を植菌した (n=3)。一方、基質を添加していない Aquil 培地に *A. macleodii* を植菌したものをコントロールとした (n=3)。培養は暗所にて 20°C で 2 週間行った。培養開始から 0、12、19、30、33.5、42、72、96、165、240、335 時間で試料の分取を行い、細菌数を計測した。MV は培養開始から 0、20、42、165、335 時間に分取した。

3. 分析

細菌細胞数は両培養実験で DAPI 染色を行い、落射蛍光顕微鏡で計測した。

遠心および濾過で細菌細胞を除去したろ液を超遠心 (150,000 g、1 時間) および Iodixanol の密度勾配遠心 (100,000 g、3 時間) にかけて MV を回収した。回収した MV は質量分析/元素分析計で有機炭素量を測定し、ナノ粒子システムで粒子数および粒径を測定した。 ^{13}C -グルコース・アミノ酸を基質とした培養実験では生死細胞の細菌数測定を行った。さらに、細菌炭素量の測定も行う予定である。

【結果と考察】

Marine Broth 培地を用いた培養実験で細菌数の増加がみられた。その経時変化から培養 4 日目までを増殖期、それ以降を定常期と定義した。細菌から放出される MV 粒子濃度および炭素濃度は培養後期にかけて増加した (図 1)。このことから MV は細菌が死滅するときに多く放出されると考えられる。

細菌炭素量を先行研究から細菌 1 細胞当たり 30 fgC (Fukuda et al., 1998) と仮定して算出した。細菌から放出される DOM の炭素量は細菌自身の炭素量の 14~31% であり (Kawasaki and Benner, 2006)、MV 炭素量は細菌由来 DOM の 1.1~2.5% を占めることが示唆された。このことから、MV が細菌由来 DOM に占める割合は非常に微量であった。

増殖期で最も炭素量が多く直径が大きい MV が放出され、培養後期にかけて直径は小さくなった。この結果は細菌の放出する MV の性質が成長段階によって変化するという報告を支持した。MV の性質の変化は、MV 形成メカニズムや膜組成の変化などが影響している可能性がある (Toyofuku et al., 2019; Billler et al., 2023)。しかし、今回得られた MV1 粒子あたりの炭素量はばらつきが大きく、夾雑物等の影響で炭素量が過大評価されている可能性がある。そこで細菌以外の有機物の影響を除去するため、 ^{13}C グルコースを用いたトレーサー実験を行い、細菌由来の MV を ^{13}C で標識した。その結果については発表会で報告する。

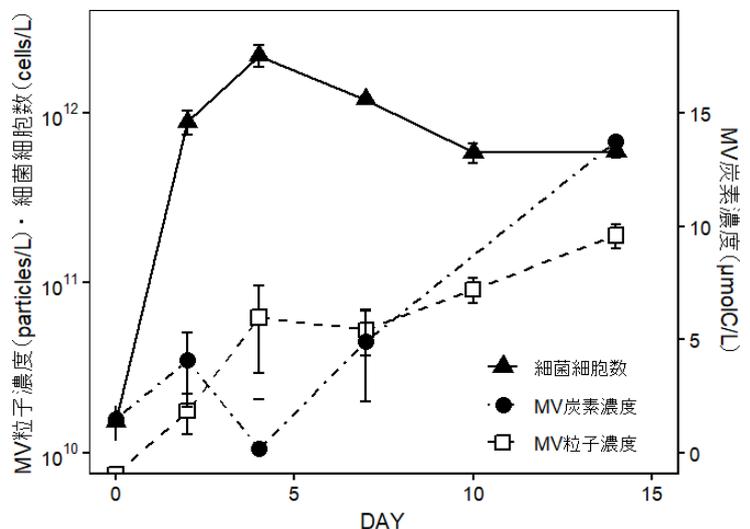


図 1 細菌細胞数と MV 粒子濃度および炭素濃度の経時変化 (エラーバーは標準誤差、n=3)

種分化後に核に移動した2つのミトコンドリア遺伝子

齋木 穂歌 (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】

ミトコンドリアは、好気性細菌の細胞内共生によって獲得された細胞内小器官で、共生細菌に由来する独自の DNA であるミトコンドリアゲノムをもっている。しかし、そのゲノムサイズは、現存する好気性細菌のものとは大きく縮小している。これは、細胞内共生の過程で、共生細菌のゲノムにあった遺伝子の多くが欠失したり、核ゲノムへと移動したりしたことに起因する。そのためミトコンドリアで機能するタンパク質は、ミトコンドリアゲノムと核ゲノムにコードされている。ミトコンドリアゲノムにコードされたタンパク質と異なり、核ゲノムにコードされたミトコンドリア標的タンパク質は、一般的にN末端側に伸長配列をもっている。その配列がミトコンドリアへの輸送シグナルとして働いており、標的の後に成熟タンパク質から切り離される。

細胞内共生における遺伝子の移動や輸送シグナル配列の獲得は、太古の昔に遡る事象で、その過程の詳細を知ることは困難である。しかし、ミトコンドリアゲノムから核ゲノムへの遺伝子の移動は断続的に起こっており、生物間で比較してみるとミトコンドリアゲノムに残っている遺伝子には多様性が見られる。本研究では近縁な生物種間でゲノムを比較することで、種分化が起こった後の最近にミトコンドリアから核ゲノムへと移動した遺伝子の探索を行い、オルガネラ遺伝子の進化過程を推定することを目的とした。

本研究で用いたクロララクニオン藻は、スーパーグループ・リザリアのケルコゾア門に属する原生物が緑藻を細胞内に取り込むことで葉緑体を獲得した海産の単細胞藻類である。その証拠として、共生緑藻の核の痕跡である「ヌクレオモルフ」が葉緑体に付随している。そのため本藻は、細胞内共生によるオルガネラ進化を研究するうえで、興味深い生物の一つである。これまでにクロララクニオン藻では *Bigelowiella natans*、*Lotharella oceanica*、*Amorphochlora amoebiformis* の三種のミトコンドリアゲノム配列が報告されている。核ゲノムにおいても、*B. natans* に加えて、*A. amoebiformis* での解読が所属研究室の先行研究で行われている。本研究では三種の中で唯一遺伝子導入技術が確立している *A. amoebiformis* において、ミトコンドリアゲノムから核ゲノムへと移動した可能性のある遺伝子を探した。

【方法】

1) 遺伝子探索

まずは、公開されているクロララクニオン藻三種のミトコンドリアゲノムにコードされている遺伝子の構成を比較することで、*A. amoebiformis* のミトコンドリアゲノムで欠失した遺伝子を探した。次にそれらの遺伝子が核ゲノムへと移動している可能性を検証するために、*A. amoebiformis* のドラフト株ゲノム配列に対して同源性検索を行った。

2) 分子系統解析

NCBI のデータベースから、該当遺伝子のホモログ配列を複数の系統群から収集し、MAFFT と trimAI を用いて配列のアライメントを行い IQ-TREE2 により最尤系統樹を構築した。トポロジーの信頼性は 300 回の Bootstrap 解析によって検証した。

3) 蛍光局在解析

核コードの該当遺伝子から翻訳されるタンパク質がミトコンドリアへ標的されているかを確かめるため、蛍光タンパク質を用いた細胞内局在解析を行った。該当遺伝子に yellow fluorescent protein (YFP) を連結したものを *A. amoebiformis* の細胞内で発現させ、その蛍光局在を共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 により観察した。ミトコンドリアの蛍光標識には、既知のミトコンドリア局在タンパク質と cyan fluorescent protein (CFP) の融合タンパク質を用いた。

【結果・考察】

A. amoebiformis と *B. natans*、*L. oceanica* のミトコンドリアゲノムを比較した結果、*A. amoebiformis* のミトコンドリアゲノムから2つの遺伝子が欠失しており、それらの遺伝子に相同な配列は本種の核ゲノム上に存在することがわかった。分子系統解析により、二つの核遺伝子は *B. natans* と *L. oceanica* のミトコンドリア遺伝子に近縁であることが示唆された。興味深いことに、どちらのタンパク質にも N 末端側に伸長した配列が見られなかった一方で、蛍光局在解析の結果、二つの核コードタンパク質はミトコンドリアへと輸送されることが示された。

以上より、*A. amoebiformis* の核ゲノムで見つかった二つの遺伝子は、種分化後にミトコンドリアゲノムから核ゲノムへと移動したものであることがわかった。つまり、クロララクニオン藻において、ミトコンドリアから核への遺伝子移動は現在進行形であると考えられる。実際、*L. oceanica* でも *A. amoebiformis* とは違う二つのミトコンドリア遺伝子が核へと移動していることが先行研究で報告されている。また、移動した核コードタンパク質は N 末端側に伸長配列をもたないにも関わらず、ミトコンドリアへと輸送されていることがわかった。おそらく、成熟タンパク質の一部が輸送シグナルとして働いていることが考えられる。これらの結果から、遺伝子移動の初期段階では、従来のミトコンドリア輸送シグナルの獲得はなく、既存の成熟タンパク質の一部を利用して可能性が示唆された。本研究は、オルガネラから核ゲノムへの遺伝子移動の過程や輸送シグナル配列の進化を理解するのに貢献するだろう。

【今後の研究の展望】

今後は、未だミトコンドリアゲノム・核ゲノムが解読されていないクロララクニオン藻や近縁のケルコゾア原生物のゲノムを解読し、同様の比較・検証を行う予定である。N 末端の伸長配列の獲得なしでのミトコンドリアゲノムから核ゲノムへの遺伝子移動が他のクロララクニオン藻でも起こっているのか、N 末端の伸長配列の獲得を伴う遺伝子移動はないのか、また、タンパク質がミトコンドリアを標的にしない遺伝子移動はあるのか、といった疑問に答えていきたい。

クロララクニオン藻のルビスコリンカータンパク質の進化

高田 あかり (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】

地球上の二酸化炭素は光合成生物のもつルビスコ酵素により有機炭素へと固定化されている。しかし、この酵素は基質との親和性が低い、効率が悪いことが知られている。二酸化炭素固定は陸上と水中の両方で行われているが、とりわけ海洋の二酸化炭素濃度は低く、溶存無機炭素の多くは重炭酸イオンの状態で存在している。こうした水中環境で効率的に二酸化炭素を固定するため、多くの藻類はルビスコ酵素を一か所に集約した構造体である「ピレノイド」を形成している。藻類は水中から吸収した重炭酸イオンを細胞内のピレノイド近傍で二酸化炭素に変換する機能を備えており、この機能は「二酸化炭素濃縮機構」と呼ばれている。これにより、ルビスコ酵素に基質である二酸化炭素を効率的に供給している。藻類の二酸化炭素濃縮機構の研究は、モデル緑藻クラミドモナスやモデル珪藻フェオダクチュラムで進められている。これらの先行研究から、ピレノイドがルビスコ酵素の液-液相分離（水と油のような関係）により形成されていることが明らかになっている。この現象はルビスコ酵素に結合する「ルビスコリンカータンパク質」により引き起こされていることが知られている。既知のルビスコリンカータンパク質には、立体構造をとらない天然変性領域やアミノ酸の繰り返し配列が共通して見られるが、一次配列の保存性は低く、遺伝的に無関係な分子であると考えられている。そのため、ピレノイドの形成機構は藻類系統群ごとに独立して進化した可能性が示唆されている。

わたしはピレノイドの収斂進化を理解するために、海洋の単細胞性藻類であるクロララクニオン藻を対象に、ピレノイドの形成に関わるルビスコリンカータンパク質の解明を目指して研究を進めた。クロララクニオン藻は緑藻を細胞内共生することで二次葉緑体を獲得した二次共生藻類であり、本藻のピレノイドは葉緑体からコブ様に突出している形状をとる。所属研究室の先行研究で、本藻の一種 *Amorphochlora amoebiformis* から単離したピレノイドを用いたプロテオーム解析が行われた。その結果、複数のピレノイドに局在するタンパク質が同定され、その中には、天然変性領域とアミノ酸の繰り返し配列をもつ機能未知のタンパク質も含まれていた。しかし、このタンパク質がルビスコリンカータンパク質として機能するかは不明である。そのため、*A. amoebiformis* のルビスコリンカータンパク質の解明に向けた第一歩として、ルビスコリンカー候補タンパク質がピレノイドに局在するために必要なアミノ酸配列を明らかにすることにした。

【材料と方法】

ルビスコリンカー候補タンパク質を断片化したものに、Green Fluorescent Protein (GFP) を融合させたタンパク質を藻類細胞内で発現させ、その蛍光局在を観察することで、ピレノイドに局在するために必要なアミノ酸領域を明らかにした。核コードのルビスコリンカー候補タンパク質は、全長が2209アミノ酸で、N末端から、葉緑体への輸送シグナル配列、立体構造領域、C末端に立体構造領域をもつことが予測されている (図1)。今回、C末端側からアミノ酸配列を段階的に欠失させた断片遺伝子に *gfp* 遺伝子を

融合した配列を発現用ベクターに組み込み、13種類のプラスミドを作製した。エレクトロポレーション法により *A. amoebiformis* 細胞に作製したプラスミドを遺伝子導入して、GFPを一過的に発現させた。その後、共焦点レーザー顕微鏡を用いてGFPの細胞内局在を観察した。

【結果と考察】

予想と異なり、繰り返し配列を含む天然変性領域を全て欠失させてもピレノイドへの局在は阻害されなかった。つまり、C末端側から段階的にアミノ酸を欠失させていき、全長の9割近くを欠失させても、ルビスコリンカー候補タンパク質はピレノイドに局在できた (図2)。一方、N末端の葉緑体への輸送シグナル配列のみをGFPに融合した場合、葉緑体ストロマ全体に局在した。このことから、ルビスコリンカー候補タンパク質のピレノイド局在に関わる配列は、葉緑体への輸送シグナル配列に加えてN末端側の立体構造領域を含む約300アミノ酸の中に存在していることが示され、この領域がルビスコ酵素と結合する可能性が考えられた。興味深いことに、この領域には複数の短い繰り返し配列が存在しており、この一部にモデル緑藻クラミドモナスのルビスコリンカータンパク質との配列保存性が見られた。今回わたしが発見した一次配列の保存性が、二次共生により緑藻から引き継がれたものであるのか、独立に類似した配列を獲得した結果であるのかはわからないが、系統的に離れた藻類群間でも共通するピレノイド形成機構がはたらいっている可能性を示唆している。

【今後の展望】

今回、*A. amoebiformis* がもつルビスコリンカー候補タンパク質のピレノイド局在に関する領域を特定することができた。今後は、ルビスコリンカー候補タンパク質の機能を明らかにするため、ルビスコ酵素の結合領域をアミノ酸レベルで特定し、組換えタンパク質を用いた *in vitro* でのピレノイド構築実験を進めていく。

図1 *A. amoebiformis* のルビスコリンカー候補タンパク質。葉緑体への輸送シグナル配列 (SP)、立体構造領域 (Order)、天然変性領域 (Disorder) を模式的に表す。

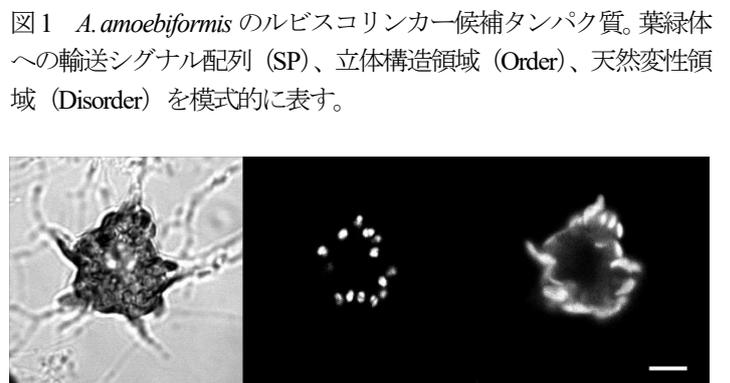


図2 GFP融合タンパク質を発現する *A. amoebiformis* の細胞。左から、微分干渉画像、ピレノイドに局在するGFP、葉緑体の自家蛍光。スケールバーは5µm

緑藻 *Tetrastichococcus* sp. P1 株のエレクトロポレーションを用いた形質転換法の検討

齋藤 亮佑 (筑波大学生物学類)

指導教員：前田 義昌 (筑波大学生命環境系)

【背景・目的】

緑藻 *Tetrastichococcus* sp. P1 株はマレーシア泥炭地から単離された微細藻類である。泥炭地とは、樹木等が分解しきらず、有機物が蓄積した環境のことを指し、強酸性を示す水を多く含むという特徴がある。*Tetrastichococcus* sp. P1 株は pH 7 よりも pH 3 における生育速度が早い好酸性藻類であり、カドミウムに強い耐性をもつことが示されている[1,2]。この好酸性の特徴は、大規模培養の際に、強酸性条件で培養することで、他の微生物によるコンタミネーションを防げるという利点につながる。一方、カドミウム耐性については、*Tetrastichococcus* sp. P1 株がカドミウムに汚染された水環境をバイオレメディエーションにより浄化できる可能性を示唆する。しかしながら、*Tetrastichococcus* sp. P1 株の好酸性、カドミウム耐性のメカニズムはまだ明らかになっていない。

特に、カドミウム耐性については、先行研究により *Tetrastichococcus* sp. P1 株がカドミウムに暴露された際に高発現する金属輸送体が特定された[2]。しかし、これらの輸送体が金属イオンを細胞外から細胞内へ取り込む importer なのか、細胞外へ排出する exporter なのかは分かっていない。この疑問を解明するためのアプローチの一つとして、候補輸送体の遺伝子を用いて *Tetrastichococcus* sp. P1 株を形質転換させ、カドミウムイオンの動態を調べる方法がある。だが、*Tetrastichococcus* sp. P1 株において形質転換法は未だ確立されていない。そのため、本研究では、*Tetrastichococcus* sp. P1 株のエレクトロポレーションを用いた形質転換法の検討を行った。

【材料・方法】

1. 微細藻類の培養

Tetrastichococcus sp. P1 株は、Modified BG-11 培地 (pH4) [1] を用い、25 °C、光量子束密度 70 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件下で 120 rpm の振盪培養により培養した。培地には、50 $\mu\text{g/mL}$ アンピシリンを添加した。形質転換体を選抜する際は、5 $\mu\text{g/mL}$ ハイグロマイシン B を添加した。

2. プラスミド構築

Tetrastichococcus sp. P1 株の細胞を超音波破碎した。細胞破碎液に含まれる DNA をテンプレートとして、PCR により RbcS プロモーター、及びグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) ターミナーターを増幅した。また、当研究室が保有していたプラスミド pTiso_Lhcf17-PyAph7 をテンプレートとして、アミノグリコシド 7'-リン酸基転移酵素遺伝子 (Aph7) を PCR で増幅した。Aph7 は抗生物質であるハイグロマイシン B の耐性遺伝子である。次に、pSP73 を *EcoR* V により制限酵素処理を行った。これら 4 つの DNA 断片を In-fusion 反応により結合させ、プラスミド pSP73-Aph7 を構築した。

3. エレクトロポレーション

対数増殖期の細胞を高張液 (0.3 M マンニトール、0.3 M ソルビトール) で処理した。その後、形質転換バッファー (0.2 M マンニトール、0.2 M ソルビトール、80 mM KCl、5 mM

CaCl₂、10 mM HEPES) に約 1×10^6 個の細胞及び *Pvu* II で線状化した pSP73-Aph7 (5 μg) を加え、電極間距離 2 mm のキューベットを用いて、エレクトロポレーションを行った。電圧が 100-1500 V の単一パルス、200-1000 V の二重パルスをそれぞれ細胞に印加した。パルス印加後の細胞を暗条件において回復培養をした後に、5 $\mu\text{g/mL}$ ハイグロマイシン B 含有 Modified BG-11 寒天培地 (pH7) に播種した。その後、25 °C、70 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ において培養した。

【結果・考察】

1. 高発現遺伝子のプロモーター、ターミナーターの探索

先行研究で取得されたトランスクリプトームデータを解析したところ、RbcS 遺伝子の RPKM は、酸性、及び中性条件下でそれぞれ 12,625 と 11,313 であった。GAPDH 遺伝子の RPKM は、酸性及び中性条件下でそれぞれ 2,652 と 2,799 であった。これらの遺伝子は両条件下において高発現していたため、RbcS 遺伝子の上流 440 bp と GAPDH 遺伝子の下流 400 bp を目的遺伝子の発現のためのプロモーター、及びターミナーターとして、それぞれ利用することとした。

2. 形質転換体の作出

1500 V のパルスを細胞に印加した際に、アーク放電が起こった。パルス印加後の細胞を寒天培地に播種した後、いずれの印加条件においても約 3 週間の培養を経てコロニーの形成が見られた。プラスミド非添加条件下と比較して、プラスミド有添加条件下では、多くのコロニーが形成された (Fig. 1)。

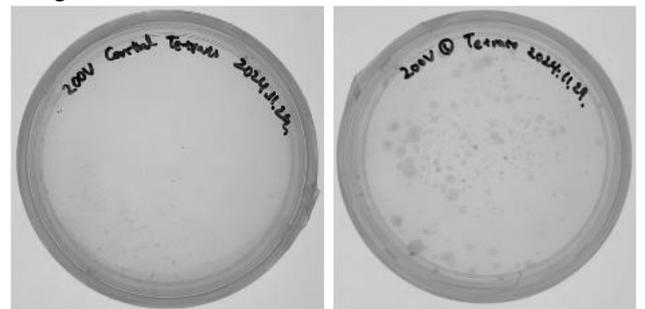


Fig. 1 エレクトロポレーション後の *Tetrastichococcus* sp. P1 株のコロニー形成 細胞に 200 V の単一パルスを印加し、ハイグロマイシン B 含有寒天培地に播種した後、3 週間後のコロニー形成の様子を示す。左はプラスミド非添加条件、右はプラスミド有添加条件を示す。

【今後の展望】

寒天培地上で生育している細胞に pSP73-Aph7 が維持されているかを PCR により確認する。

【参考文献】

- [1] Sahabudin et al. (2022) *J Appl Phycol*, 34, 1881 - 1892
 [2] Sahabudin et al. (2024) *Bioengineered*, 15, 2314888

高濃度ケイ素存在下で生じる単細胞性紅藻 *Galdieria Sulphuraria* のガラス化

及川 知穂 (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】

生物の中には、細胞の周囲にガラス状の構造を形成するものがある。例えば、ケイ藻や有孔虫は生物作用により微細構造を持つガラスの殻を形成する。他の生物にも、ストロマトライトに見られるようなガラス状構造を、細胞の周囲に形成するものがある。しかし、特に後者については、形成過程や生物学的意義などはほとんど分かっていない。実験室における細胞の周囲で生じるガラス化の再現は、これらを解明する手段となり得る。

単細胞性紅藻のイデユコゴメ綱でも、ガラス状構造の形成が知られており、イエローストーン国立公園や北海道のカムイワッカ滝などで観察例がある [1,2]。イデユコゴメ綱が生息する高温強酸性条件 (40°C、pH5 以下) では、一般に物質の溶解度が上昇する。ガラスの材料となる Si も、イエローストーンの温泉で数百～3400 ppm 程度の高濃度で存在することが報告されている [3]。Si の化学形態も酸性域と中性域で異なっている。したがって、イデユコゴメ綱では、中性で常温の環境下でガラス化を生じる生物とは、異なるガラス化機構が見出される可能性がある。

イデユコゴメ綱の中でも、*Galdieria sulphuraria* は実験室でガラス状構造を観察した報告がある種だ [4]。しかし、データの記載はなく、再現性についても不明である。本研究では、(1) 実験室で *G. sulphuraria* のガラス化を再現すること、(2) 高濃度の Si が *G. sulphuraria* の増殖に及ぼす影響について明らかにすること、を目的に高濃度の Si を含む培地での培養実験を行なった。

【方法】

培養

G. Sulphuraria を 40°C、独立栄養条件で 12 日間通気培養した。Si はメタケイ酸 ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) として添加した。Si 濃度が 0、1、10、35、70 mM の 2×Allen's (pH 2.5) を培地とした。対照実験として、細胞を含まない培地を入れた試験管を同条件で処理した。培養は濁度 (OD_{750}) を測定し、増殖を評価した。

顕微鏡観察

Si 濃度が 0 mM と 70 mM の培養で、光学顕微鏡での観察及びレクチン-FITC を用いた蛍光顕微鏡観察を行なった。

呼吸活性及び光合成活性の測定

Si 濃度が 0 mM、35 mM、70 mM の培養について、培養開始から 5 日後に、酸素電極 (Hansatech, Oxytherm) を用いて 40°C における呼吸活性及び光合成活性の測定を行なった。

【結果】

高濃度の Si は *G. sulphuraria* の増殖を阻害しなかった

Si 濃度によって培養の増殖速度と最終濁度に変化しなかったことから、高濃度の Si が *G. sulphuraria* の増殖を阻害しないことが示された。培養開始後 5 日目に、酸素電極を用いて呼吸活性及び光合成活性を測定すると、いずれも Si 濃度に応じて濁度あたりの

活性が上昇した。

高濃度 Si 存在下で細胞塊が付着したガラス様粒子が生じた

培養開始から 5～6 日目以降、10 mM 以上の Si を含む培養で、透明～白色の粒子と細胞塊が混ざったような砂状の沈殿の形成を目視で観察した。沈殿を光学顕微鏡で観察すると、細胞塊が付着したガラス様粒子がみとめられた。SEM-EDX による予備的な分析では、ガラス様粒子の部分に Si と O が含まれていた。沈殿は細胞無しの試験管でも生じたが、培地の濁度には影響を与えなかった。

細胞塊が付着したガラス様粒子に多糖が含まれていた

蛍光顕微鏡観察を行なうと、Si 濃度が 0 mM の培養では、細胞の周縁部がグルコースやマンノースを認識するレクチンである Con-A-FITC の蛍光を示した。対して、Si 濃度が 70 mM の培養では、ガラス様粒子と細胞塊の間の部分が Con-A-FITC と他の 4 種類のレクチン-FITC の蛍光を示した。細胞無しの試験管で生じたガラス様粒子は、レクチン-FITC の蛍光を示さなかった。これらの結果から、ガラス様粒子と細胞塊の間に細胞由来の多糖が分泌されていると考えられる。

【考察・展望】

本研究では、高濃度の Si が *G. sulphuraria* の増殖を阻害しないだけでなく、呼吸活性と光合成活性を上昇させることが示唆された。現在、高濃度の Si 存在下で、栄養欠乏条件でも通常培養と同等の増殖が維持される結果を得ており、今後、呼吸活性及び光合成活性の上昇との関連を調べていく。

さらに本研究では、高濃度 Si 存在下におけるガラス様粒子の形成と、多糖を含む物質を介した *G. sulphuraria* のガラス様粒子への付着も観察した。細胞無しの条件では、ガラス様粒子は非生物作用により形成された。得られた結果から、*G. sulphuraria* が付着したガラス様粒子の形成について、次の 2 つの可能性を考えている。

- (1) *G. sulphuraria* がガラス様粒子の形成に影響する可能性
- (2) 非生物作用により形成されたガラス様粒子に、多糖などを介して *G. sulphuraria* が付着する可能性

上記の可能性について検討を進めるため、細胞の有無による沈殿の量の差を調べている。ガラス様粒子の成分の詳細についても、顕微ラマン分光法や X 線結晶構造解析、SEM-EDX などを用いて分析する予定である。

【参考文献】

- [1] J. J. Walker et al. (2005) *NATURE*, 434, p.1011 - 1014
- [2] R. Asada et al. (2001) *THE CANADIAN MINERALOGIST*, 39, p.1 - 16
- [3] J. J. ROWE et al. (1973) *UNITED STATES DEPARTMENT OF THE INTERIOR, GEOLOGICAL SURVEY BULLETIN*
- [4] W. Gross et al. (1998) *European Journal of Phycology*, 33, p.25 - 31

硫酸性温泉紅藻 *Galdieria sulphuraria* による強酸性条件下でのレアアース回収

田中 萌子 (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】

レアアース (Rare Earth Elements, REEs) は、イットリウム、スカンジウム、ランタノイドを含む 17 種類の金属元素の総称である。REEs は永久磁石、充電電池、合金など最先端の製品に利用されている一方、需要に対して産出量が限られているうえ、採掘や精製の過程で生じる環境への悪影響が懸念されている。このような課題に対し、近年では環境負荷の小さい REEs 供給システムとして、微生物を用いた生物学的回収法が注目されている。

単細胞性紅藻イデニコゴメ綱 (Cyanidiophyceae) に属する *Galdieria sulphuraria* は、光合成で増殖する光独立栄養、糖などの有機物を利用する光混合栄養や従属栄養の栄養形態をとり、温泉をはじめとする高温強酸性の環境 (40 °C, pH5 以下) に生息する。こうした環境では高濃度の金属が溶出しやすく、*G. sulphuraria* は種々の金属に対して高い耐性を持つことが知られている。さらに、先行研究 (Minoda et al. 2015) では、従属栄養で培養した *G. sulphuraria* の細胞が、暗所 / N₂ 通気で Nd(III) などの REEs を回収することが報告されている。

高濃度の金属イオンに対して *G. sulphuraria* が応答するメカニズムは、「細胞外吸着」と「細胞内吸収」に大別される。吸着とは、微細藻類の細胞壁に存在する官能基が金属イオンと物理化学的に結合し、金属を回収するプロセスである。ただし、吸着には低 pH 条件下では吸着容量が低下するという制約がある。一方、吸収は細胞が能動的に金属イオンを取り込むプロセスである。吸収プロセスは pH 低下による影響を比較的受けにくいいため、特に強酸性かつ金属濃度が低いことが想定される金属廃液から効率的に REEs を回収するうえで有効であることが期待される。

本研究では、*G. sulphuraria* を用いて強酸性条件下で REEs 回収を実現することを目的とし、本種がより効率的に REEs を集めることのできる培養条件を検討した。さらに、細胞に回収された REEs の局在を観察することで、その回収メカニズムのさらなる理解を目指した。

【材料・方法】

前培養：

G. sulphuraria を、以下の 2 種類の栄養形態をとるよう、2×Allen's 培地 (pH2.5, 40 °C) で通気培養した。

- ・光混合栄養：25 mM のグルコースを添加し、100 μmol photons m⁻² s⁻¹ の白色光を当て培養した。
- ・従属栄養：25 mM のグルコースを添加し、暗所で培養した。

REEs 回収実験：

La, Pr, Nd, Eu, Tb, Dy, Tm の三塩化物を 1 種類ずつ含む pH2.5 の硫酸溶液に、OD₇₅₀=10 になるよう濃縮した細胞に曝露し、暗所 / N₂ 通気で 24 時間インキュベートした。遠心分離によって細胞画分を分け取り、硝酸分解により有機物を分解したのち、細胞に回収された金属濃度を誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) で測定した。

顕微鏡観察：

100 ppm Nd(III) と 24 時間インキュベートした細胞における Nd(III) の局在を走査型誘電率顕微鏡 (SE-ADM) で観察した。また、100 ppm Tb(III) と 24 時間インキュベートした細胞における Tb(III) の局在を蛍光顕微鏡 (545 nm) で観察した。

【結果】

前培養の栄養形態による金属回収量の比較：

光混合栄養、従属栄養で培養した細胞をそれぞれ 50 ppm Nd(III) と 24 時間インキュベートし、回収実験を行った。細胞当たりの Nd(III) 回収量を算出したところ、光混合栄養で培養した細胞は、従属栄養で培養した細胞の約 2 倍の Nd(III) を蓄積した。(下図) 現在、他の REEs でも、光混合栄養で培養した細胞を利用することで最大回収量が増加するのか検討している。

顕微鏡観察：

100 ppm Nd(III) と 24 時間インキュベートした細胞を SE-ADM で観察した結果、一部の細胞の内部に金属とみられる反射電子を放出する黒い粒子が確認された。Nd(III) を含まない硫酸を用いた対照群ではこのような粒子は見られなかった。

Tb(III) 蛍光観察の結果については、発表会にて報告する。

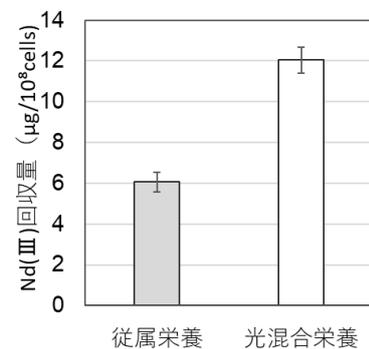


図. 前培養の栄養形態による Nd(III) 回収量の比較

【考察・今後の展望】

本研究では、光混合栄養で培養した細胞を用いることにより、Nd(III) の回収率を約 2 倍に高めることに成功した。顕微鏡観察からは、*G. sulphuraria* が細胞内に Nd(III) を吸収、蓄積していることが示唆された。

今後は透過型電子顕微鏡と元素分析を同時に行うことのできる TEM-EDS を用いて、細胞内の金属イオン局在をさらに詳細に観察したい。また、実際の金属廃液を想定した強酸性溶液を用いて同様の実験を行い、*G. sulphuraria* による REEs の回収についてさらに検討したい。

【参考文献】

1. Cao et al. Resources, Conservation and Recycling 169 (2021) 105519
2. Minoda et al. Applied Microbiology and Biotechnology (2015) 99:1513–1519

単細胞性紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における細胞外 pH 低下機構の解明

引地 楓音 (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】

単細胞性紅藻イデユコゴメ綱(Cyanidiophyceae)は、主に高温強酸性(56°C以下、pH5.0以下)の硫酸性温泉に生息している。温泉のような水圏では、溶解する物質の影響などにより環境中のpH変化が起こり得るが、イデユコゴメ綱は中性~アルカリ性の培地のpHを低下させることが先行研究により報告されている[1, 2]。また、同研究により、イデユコゴメ綱は至適培養pHであるpH2.5以外のpH4.0~7.0でも増殖が可能であることが報告されている。しかし、現在までにイデユコゴメ綱における細胞外pH低下と増殖の関連性、そして細胞外pH低下機構の詳細やその意義はわかっていない。

当研究室の先行研究により、イデユコゴメ綱に属する *Galdieria sulphuraria* と *Cyanidioschyzon merolae* をそれぞれpH2.5とpH6.0の培地で培養したところ、どちらも培養液のpHが低下したが、*G. sulphuraria* の増殖はpHによって変わらなかったのに対して、*C. merolae* の増殖はpH6.0の培地ではpH2.5の培地と比較して顕著に遅れた。この結果より、*C. merolae* はイデユコゴメ綱における細胞外pH低下と増殖の関連性を調べるのに適した実験材料であると考えられた。そこで、本研究では、全ゲノム配列が決定しており、破碎が容易であるため生化学的解析や分子生物学的解析にも適した *C. merolae* を用いて、イデユコゴメ綱における細胞外pH低下機構の解明を目的とした。

【材料・方法】

1. 培養

C. merolae の細胞を初期濁度 $OD_{750} = 0.05$ になるように調整し、初期培地pH0.5~8.0に調整した2×Allen's培地で12日間、40°C、光強度 $90 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、試験管にて通気培養した。pH6.0については、0 mM または 10 mM MES を含む培地で同様に培養した。

2. イオンクロマトグラフィー

pH2.5とpH6.0にて12日間培養した *C. merolae* の培養後上清を遠心分離により回収した。この培養後上清とコントロールとして実験に用いた培地(pH2.5、pH6.0)をそれぞれ分析した。

【結果・考察】

1. 細胞外pH低下と増殖の関連性

最初に、*C. merolae* を12日間培養した結果、*C. merolae* はpH2.5の培地と比較してpH4.0、pH5.0の培地では増殖は変わらず、pH0.5、pH6.0の培地では増殖が遅れ、pH8.0の培地では増殖できなかった。12日後の培養液のpHは、培養開始時のpHがpH0.5~2.5の培地では培養液のpHが大きく変わらなかったのに対し、培養開始時のpHがpH4.0~8.0の培地では培養液のpHが低下した。特に、*C. merolae* が増殖できたpH4.0~6.0の培地では12日後には

pH2.0付近まで培養液のpHが低下したが、*C. merolae* が増殖できなかったpH8.0の培地では培養液のpHはpH4.0付近だった。また、10 mM MES を含むpH6.0の培地では12日間で培養液のpHは低下せず、*C. merolae* は増殖できなかった。次に、pH6.0における *C. merolae* の増殖速度と培養液のpH低下速度を比較すると、培養液のpH3.0~4.0付近で増殖速度が上昇した。

これらの結果から、*C. merolae* はpH3.0~4.0付近に増殖が促進される閾値をもち、最初に細胞外pHを低下させてから効率よく増殖することがわかった。

2. 細胞外pH低下を引き起こす原因

C. merolae における細胞外pH低下の原因を探るために、イオンクロマトグラフィー分析により培養前後の細胞外の陰イオンと有機酸の分析を行った。その結果、pH6.0では培養後に培養液のpHがpH2.0付近まで低下していたが、培養前と比べて SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 、 Cl^- が減少していた。また、培養前と比べて NO_3^- が増加していたが、その増加量は僅かであった。これらの結果から、細胞外pH低下の原因は陰イオンの増加によるものではなかった。さらに、培養後に有機酸と考えられるピークが検出されたが、少量であり、有機酸も細胞外pH低下の原因ではないと考えられた。

今後、有機酸についてはメタボローム解析を行う予定であるが、これらの結果から、*C. merolae* における細胞外pH低下を引き起こす主な原因は、細胞外への陰イオンや有機酸の排出ではなく、細胞外への H^+ の排出である可能性が高いと考えられる。

3. 短期間の実験系の構築

細胞外pH低下機構を詳細に解析するために、*C. merolae* の細胞を初期濁度 $OD_{750} = 0.30, 0.45, 0.60$ に調整して培養を行い、新たに短期間の実験系の構築を試みた。しかし、これらの初期濁度では1日後には *C. merolae* が試験管に張り付き、測定ができないという問題が生じた。そこで、培養液組成について検討を行ったところ、*C. merolae* の試験管への張り付きは解消された。この方法で4日間 *C. merolae* を培養したところ、初期濁度 $OD_{750} = 0.45, 0.60$ では1日で培養液のpHがpH6.0からpH4.0付近まで低下しており、短期間の実験系の構築に成功した。

今後、この短期間の実験系を用いて、トランスクリプトーム解析などを行い、イデユコゴメ綱における細胞外pH低下機構のさらなる解明を目指す。

【参考文献】

- [1] Oesterhelt, C et al. 2007. The Plant Journal. 51. 500-511
- [2] Hirooka, S et al. 2020. Scientific Reports. 10. 13794

遊水地の新規造成が水生植物の多様性に与える影響

荒木 聡太 (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】

気候変動による豪雨の増加に伴い、流域全体で水害を防止する『流域治水』が進められている。こうした計画の一環として整備される遊水地は、河川増水時に水を一時的に貯蓄し下流域の洪水を防止する。遊水地には一部区画が常時湛水ないし湿地環境となる場合があり、水生植物群落の形成が期待できる。実際に、周辺環境では見られない希少な水生植物が多数生育する遊水地が確認されている一方で、陸生の侵略的外来種が優占する環境となることも多く、水生植物群落の形成やその構成は遊水地によって異なる。その要因として造成後の経過時間や環境が考えられるが、検証研究はない。

そこで本研究では、造成年が異なる複数の遊水地における植物の多様性を解析・評価することにより、遊水地の造成が水生植物群集の創出や多様性回復に与える影響を、その環境要因とともに明らかにすることを目的とした。

【調査地・方法】

造成年の異なる複数の遊水地とその周辺の湿地環境を対象とした。調査地域として利根川水系の遊水地6箇所(A~F)を選定した。うち遊水地A~Eは五行川河岸に、遊水地Fは姿川河岸に造成されており、前者の周辺水環境(水田、河川、水路)の調査も行った。各遊水地の造成年は、遊水地A:2022年、B:2017年、C:2007年、D:2011年、E:2019年、F:2023年である。

2022年には遊水地A,Bにて出現植物種の網羅的探索を行った。2023、2024年には各遊水地と周辺水環境にてコドラート調査を行った。この調査では各場所に5~40の調査地点を設定し、1×1 m範囲内に出現した植物種とその被度を記録した。2023年には各地点の水深を、2024年には水深・水温・水質(pH、EC、NO₃-濃度)を測定した。

コドラート調査に基づく多様性解析では、2023年、2024年の各調査地で確認された合計種数を γ 多様性、その調査地の1地点あたりで確認された平均種数を α 多様性とした。また、これを元にJaccard係数を算出し、これを β 多様性とした。これらの結果を各環境で比較した。また、植生が見られなかった地点を除いた各調査地点の出現種の被度を利用してbray指数に基づく序列化を行い、群集組成の解析を行った(NMDS(非計量多次元尺度法))。

【結果】

遊水地Aでは造成直後の2022年に、ガシヤモク(ヒルムシロ科)などの絶滅危惧種4種を含む、多数の水生植物(16科26属39種)が確認された。しかしその後2年間で種多様性は減少した。一方、川の対岸に位置する遊水地B(2017年造成)では、種数が少なく、調査期間内の年次変化は少なかった。

α 多様性、 γ 多様性が最も高いのは遊水地Dであった。また、遊水地の中で最も α 多様性、 γ 多様性が低いのは遊水地Cであった。

遊水地A~Eと同水系の周辺環境の群集解析の結果、各地点はそれぞれに異なる群集構造を持つことがわかった。

【考察】

新規造成された遊水地内で確認された水生植物は、造成地の過去の植生に由来する埋土種子群からの再生である可能性が高いと考えられた。このことは、遊水地の造成が水生植物の多様性を再生・向上させるポテンシャルを持つことを示している。

しかし、造成直後からの3年間で水生植物種数が減少したこと、より造成年が古い遊水地では水生植物種数が少ないことは、造成後の時間経過が群集や多様性を変化させる可能性も示唆している。

遊水地AがNMDSにおいて周辺環境の中央に位置したのは、遊水地Aが河川に隣接し、過去の土地利用が水田・水路であったことが埋土種子相を通して反映された結果と考えられた。

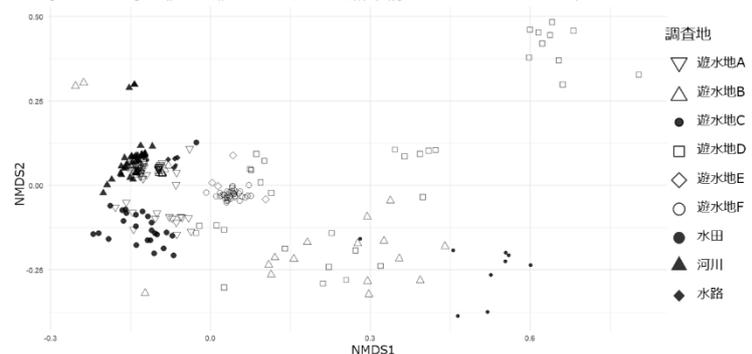
立地・水深条件が類似する遊水地Aと遊水地Bにおいて検出された異なる群集組成は、造成年後の経過における植生変化によって生じたものである可能性がある。

遊水地Dは、内部に湿潤~乾燥の多様な水条件の環境がみられ、それが高い α 多様性、 β 多様性を創出している要因の一つであると考えられる。遊水地Cは調査を行った遊水地の中で最も造成から時間が経過しており、内部は単調な植生が広がっている。この植生は年次変化に伴う遷移によって生じたもので、低い α 、 β 多様性もこれを反映したものである可能性がある。

【展望】

植生と環境変数・造成年数の関係に関して今後も調査・解析を進める。今後、遺伝的多様性に関する影響も検証する予定である。

遊水地と周辺水生植生の植物被度に基づく群集構造のNMDSによるプロット



冷温帯二次林はどう遷移しているか？～15年間の地上部バイオマス変化からの検証～

大下 愛恵 (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】

地球の陸地の30%を占める森林は、陸上における炭素固定の主要な場である。森林の炭素循環は、生物と環境の相互作用で成り立っている。光合成によって固定された全炭素量から吸収によって放出される炭素量を差し引いた残りは、純一次生産量として主に地上部の幹に貯留される。森林の純一次生産量の時間的・空間的な変化は非常に大きく、その把握が森林の炭素固定を正しく見積もるうえで重要な鍵となっている。これまでも数多くの研究が行われているが、森林による炭素固定量の時間変化の正確な把握、特に長期にわたって樹木の入れ替わりを伴う遷移による時間変化の知見は未だ不足している (Muraoka et al, 2019)。本研究では、同一平地に隣接する異なる遷移段階にある2つの二次林を対象としたクロノシーケンス・アプローチに基づいた長期観測によって、遷移に伴う森林の地上部現存量の時間的変化パターンとそのメカニズム解明を目的とした。

【方法】

私が所属する陸域生態学研究室では、2009年から冷温帯林に属する菅平高原実験所内の二次林において、2つの固定調査区(50x200m, 1ha)で毎年、毎木調査を行っている。具体的には、固定調査区内の胸高直径(DBH)5cm以上の樹木の種同定、位置、DBH、生存状態を記録した。生存状態については、2017年まではL/Dの2段階、2018年以降は0~3の4段階で記録した。樹種は目視で確認し、種が不明だった個体は、2024年の8月に生葉を採集し同定、記録した。この毎木データと冷温帯樹木の地上部乾燥重量に関する相対共通成長式(Komiyama 2011)を用いて、生存している1個体あたりの地上部現存量(バイオマス)と基底面積(BA)を計算した。用いた相対共通成長式は下記の通りである。

$$\text{地上部重の共通式： } W = 0.1853\rho \text{ DBH}^{2.491}$$

ここで、W(kg)は地上部乾燥重量、 ρ は種ごとの幹比重(kg m⁻³)である。幹比重等から引用したものを用いた。さらに、DBHのデータから50x50mの全サブプロットの全樹種と優占種であるアカマツの直径階分布を作成した(図)。また、バイオマスの変化の要因を検証するため、平均気温、降水量、積雪日数等の環境データを用いて相関関係を調べた。

【調査地】

本調査地を含む冷温帯二次林は、1970年頃まで継続していたススキ等の刈り取りの放棄によって形成されたアカマツ優占林で、隣接する林齢約60年と約90年の林分を含むように2つの固定調査区が設置されている。本研究では、これらの調査区のうち、60年と90年の林分でかつササの被度が異なる計4つのサブプロット(50x50m)を重点サブプロットとした。

【結果と考察】

調査区全体の総バイオマスは、2009年から2024年にかけて線形に約1.23倍に増加した一方で、生残幹数は減少していた。特に全体の優占種のアカマツの生存幹数は1089本から784本へ大きく減少した。全バイオマスに対して優占種であるアカマツの割合

が70%以上を占めているため、アカマツの変動がプロット全体のバイオマス変動に大きく影響を与えていた。

重点サブプロットにおける合計バイオマス(t ha⁻¹)は、A1区で261.9から303.2、A4区で248.9から290.5、B1区で278.9から357.7、B4区で193.3から284.6と、順に1.2倍、1.2倍、1.3倍、1.5倍と全サブプロットで増加していた。また、A1区とB1区の60林齢のサブプロットでは、陽樹であるミズキの個体数とバイオマスの増加が大きく、この15年間でBAから推定したミズキの優占度はそれぞれ1.9%、1.3%増加した。優占種であるアカマツとシラカンバ以外のバイオマスは全体の12%ほどで、その増加は少なかった。よって、アカマツが優占する60林齢のような遷移途中の森林では、未だミズキに代表とされる陽樹の増加が続いていると考えられる。

B4区のアカマツの優占度は、76.7%から79.5%へと約2.8%高くなり、4つのサブプロットで唯一増加した。B4区全体の生木密度が14.6%減少する一方、BAは他のプロットと同様に約12m²ha⁻¹の増加を示した。平均DBH(cm)は5.5cm増加し、これは全体の1.2cmよりも大きな変化だった。このことから、B区の90林齢は、1個体あたりのDBHが大きい安定した構造の森林となっていると考えられる。これは、林床を覆うササが新規個体の定着を阻害する効果や(岩本・佐野1998)、常緑のアカマツ大径木が林冠を占めることで形成される暗い光環境が影響している可能性がある。これらの結果から、遷移に伴って優占種が多く枯死していても、優占種自体のバイオマスと増加率の大きさ、または新しい個体の侵入とその成長が、森林全体のバイオマスが増加していることが明らかとなった。15年間のバイオマス変化と環境要因の関係については、当日報告予定である。

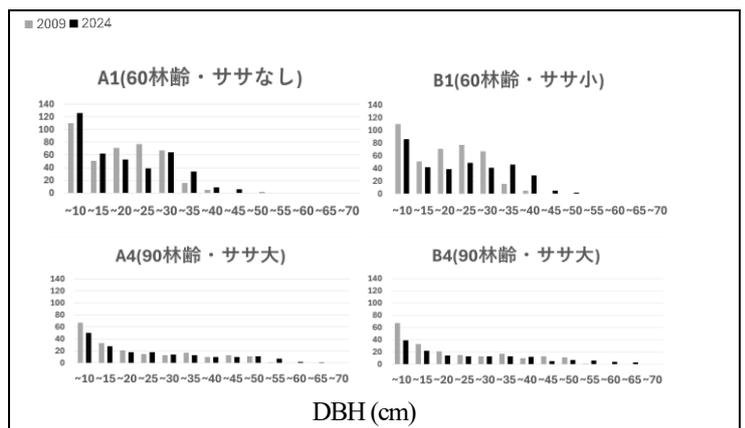


図. 重点サブプロットの直径階分布(本数)

【参考文献】

1. Muraoka et al. (2019). *Journal of Geography*. 128(1), 129-146
2. Komiyama et al. (2011). *日林誌*. 93, 220-225
3. 岩本・佐野. (1998). *日林誌*. 80, 311-318

無毒ヘビとされてきたヒバカリが弱毒を有しているという仮説の予備的検証

宗像 優生 (筑波大学生物学類) 指導教員: 澤田 聖人 (筑波大学生命環境系)

【背景】

ユウダ亜科には後牙を持つ毒ヘビである後牙類が含まれることが知られている。日本においても本亜科に属する *Rhabdophis* 属のヤマカガシや *Hebius* 属のガラスヒバアなどが後牙類であることが報告されている。一方で同様に本亜科に属し、*Hebius* 属のタイプ種であるヒバカリ *Hebius vibakari vibakari* は無毒であるとされてきた。しかしながら近年出版された図鑑では、本種に後牙と思われる牙がみられることやこの牙の付け根から白色の分泌液がみられること、そして本種に咬まれたカエルが動かなくなることが報告されている⁽¹⁾。このことからヒバカリが毒ヘビである可能性が示唆されるが、その可能性を科学的に検証した例はこれまでにない。本研究ではこの可能性を検証すべく形態に基づく観察と餌生物に対する咬傷実験を行った。

【方法】

サンプリング: ヒバカリ、アオダイショウ (無毒ヘビ)、ヤマカガシ (後牙類)、そして餌生物であるニホンアマガエル (以下アマガエル) を採取した。茨城県つくば市周辺で基本的に採取したが、ヤマカガシのみ研究室に冷凍保管されていた新潟県佐渡島のものを用いた。これらはロードキル、或いは生きていたものを冷凍庫において安楽死後、或いは生きてそのまま観察・実験に用いた。

形態観察: 解凍したヒバカリ (n=4)、アオダイショウ (n=2)、ヤマカガシ (n=3) を解剖し後牙の有無を顕微鏡下で観察した。

咬傷実験: ヒバカリ 1 個体にアマガエルを 3 個体連続で咬ませ、その後のアマガエルの経過観察により餌生物への有毒性を評価した。(ヒバカリ: n=16, アマガエル: n=48) 一度の咬傷は5分間とし、アマガエルの左後肢を咬ませた。咬傷翌日にアマガエルの生死を記録した後、症状を記録した。症状の評価はニホンマムシの咬傷に用いられる grade を参考に行われた⁽²⁾。具体的には0: 症状無し、1: 点状のわずかな内出血、2: 斑状に広がった内出血、3: 全体に広がった内出血の4段階で評価された。

統計処理: 咬傷実験の結果に対して、「アマガエルの生死」と「アマガエルの症状 grade」をそれぞれ目的変数として、説明変数を「アマガエルの咬まれた順番」と「ヒバカリとアマガエルの体重比」、ランダム効果を「ヒバカリの個体番号」として一般化線形混合モデル (GLMM) を構築した。全ての統計処理にはRを用いた。

【結果】

形態観察: ヤマカガシと、ヒバカリでは口内の後方に大型の牙が1あるいは2対みられたが、アオダイショウではみられなかった。ヒバカリの後牙と他の上顎骨小歯では前者の方がより大きく、緩やかに湾曲していた。生体ヒバカリの眼下後板の付近を圧迫した際には白い粘性を持った液体が後牙の根元から分泌された (図1)。



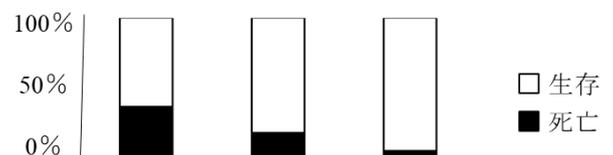
図1: ヒバカリ後牙。a) 圧迫前, b) 圧迫後, c) 後牙と分泌物

咬傷実験: ヒバカリに咬まれたアマガエルの死亡率と症状の重さは咬傷1番目から3番目にかけて減少した。また咬傷実験の際には後牙を複数回アマガエルの左後肢に対して打ち付ける動作がみられた。

アマガエルの生死を最もよく説明していた GLMM*は説明変数に「アマガエルの咬まれた順番」のみを含めたモデルであり、咬まれた順番が早い個体ほど有意に死亡率が高かった ($P<0.05$) (図2a) 一方、アマガエルの症状 grade をもっともよく説明していた GLMM*は「アマガエルの咬まれた順番」と「ヒバカリとアマガエルの体重比」の両方を含めたモデルであり、咬まれた順番が早い個体 ($P<0.001$) かつヒバカリに対してアマガエルが小さいほど ($P<0.05$) 症状が重くなった (図2b)。

*赤池情報量規準(AIC)に基づき最もその値が低かったモデル

a) 生死



b) 症状

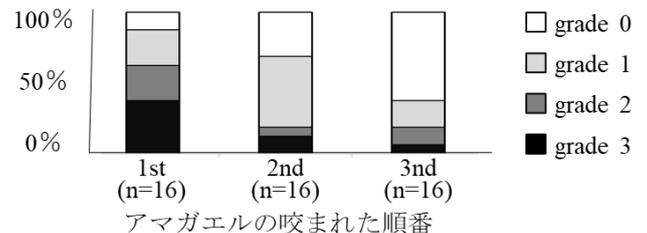


図2: 咬傷実験の結果

【考察】

形態観察よりヒバカリは同亜科の毒ヘビであるヤマカガシと同様に発達した後牙を持ち、さらにはその付け根に白い粘液を分泌する腺を持つことがわかった。また、咬傷実験ではアマガエルの死亡、そして出血毒に似た症状がみられた。以上の結果から、本種は毒ヘビであることが示唆された。

なお、死亡率や症状の軽減は毒の消費によるものであると考えられる。死亡率に至っては最初に咬まれたアマガエルであっても半分以下であったことから、毒は微弱であると考えられる。

今後はこの毒の捕食活動における役割のような生態学的視点や、成分分析のような化学的視点での検証が必要である。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり生命環境系の八畑謙介先生、森林生態環境学研究室の皆さまをはじめ、多くの方々にご助力頂きました。ここに深謝いたします。本研究は筑波大学動物実験委員会の許可を得て行いました(承認番号 24-417)。

【引用文献】

- (1) 田原 義太慶 et al. (2024) 『日本ヘビ類大全』
- (2) 崎尾 秀彦 et al. (1985) 当院におけるマムシ咬傷について, 臨外 40, 1295-7

大腸菌で増幅したゲノム編集用プラスミドに生じた不明断片の解析

全 準浩 (筑波大学生物学類) 指導教員: 臼井 健郎 (筑波大学生命環境系)

1. 背景・目的

遺伝子操作に用いるプラスミドの増幅は、変異が生じないように、*recA* などの相同組換え遺伝子を欠損した大腸菌株を用いることが一般的である。

pCAG-EGxxFP は、ゲノム編集に用いる Cas nuclease と設計した gRNA との複合体が、目的の標的配列を切断するかを調べるために用いられるプラスミドであり、EGFP 遺伝子がゲノム編集の標的配列 (Fig.1 Target) により前半と後半 (同、EG、FP) に分断され、それぞれに相同組換え用の重複配列 (同、x) を付加した構造をしている [1]。このプラスミドを動物細胞に導入しても EGFP 遺伝子は分断されているため発現せず、蛍光を発しないが、Cas nuclease/gRNA が標的配列を切断すると相同組換えが起こり、完全長の EGFP 遺伝子が再構成される。そのため、EGFP の蛍光を検出することで、設計した gRNA と Cas nuclease との複合体が標的配列を切断するか検討することができる。

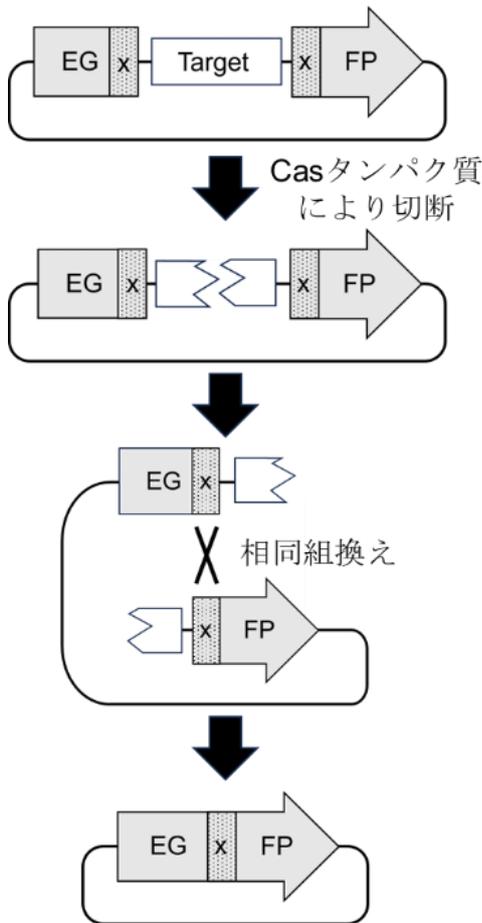


Fig. 1 pCAG-EGxxFP による Cas nuclease/gRNA 活性測定の概略

プラスミド調製によく用いられる大腸菌である DH5α を用いて pCAG-EGxxFP を増幅し、制限酵素で処理したところ、制限酵素マップからは予測できないバンドが確認された (Fig.2)。大腸菌での増幅時に別のプラスミドが増幅された可能性や他の制限酵素の混入を疑ったものの、追加実験によりその可能性は排除された。

そのため、pCAG-EGxxFP に何らかの変異や DNA 断片の挿入が生じた可能性が考えられる。そこで、本研究ではこの不明断片の性質を調べた。

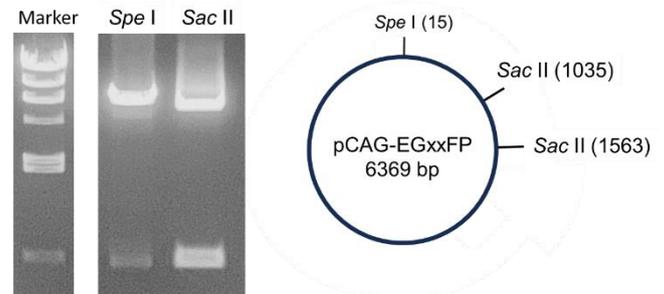


Fig. 2 pCAG-EGxxFP の制限酵素処理結果と制限酵素マップ

2. 材料と方法

2-1. 不明断片を生じるプラスミドの増幅

プラスミドの増幅は DH5α を用い、LB 培地で 37°C、一晩振盪培養することで行った。増幅したプラスミドは、アルカリ SDS 法、またはカラムを用いて精製した。

2-2. 不明断片が生じる培養条件の検討

培養温度、培養量、および培養時間を変えることで不明断片が生じなくなるか検討した。培養温度は 37°C の他、30°C、42°C で一晩振盪培養した。また 37°C で一晩培養した後、42°C に上げて培養した。培養量は 30、100、300、1,000 ml で 37°C で一晩から二晩震盪培養した。

2-3. プラスミドの増殖に用いる大腸菌株の検討

他の大腸菌の株を用いて増幅することで、不明断片が生じなくなるか検討した。大腸菌内の組換えを抑えるために組換え遺伝子を欠損させた TOP10、SURE、SURE 2、Stbl2、Stbl3、Stbl4 株、および複製回数を減らすことで変異を抑制するために ABLE K 株を用いた。これら的大腸菌を 30 ml の LB 培地で 37°C、一晩振盪培養することでプラスミドの増幅を行った。

3. 結果・考察

詳細は、発表会にて発表する。

参考文献

[1] Mashiko D., et al., Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep.* 3,3355 (2013)

謝辞

大腸菌株 ABLE K, SURE, SURE 2, Stbl 2, Stbl 3, Stbl 4 をご供与していただきました、筑波大学生命環境系 橋本 義輝 先生に感謝申し上げます。

親水性低分子に対する MA026 の上皮細胞層透過促進活性

須賀 敬海 (筑波大学生物学類)

指導教員：臼井 健郎 (筑波大学生命環境系)

背景・目的

上皮細胞にはタイトジャンクション (TJ) と呼ばれる細胞間接着構造が存在する。この構造は上皮を介した分子の移動を制限することで生体の恒常性維持を担っている一方で、親水性薬剤の吸収を妨げる原因ともなっている。そのため、TJ を開口させることで親水性薬剤の上皮を介した非侵襲的投与が可能になると考えられるが、生体にとって TJ は重要なバリア構造でもあるため、安全な薬剤投与のためには、「薬剤を透過させるときのみ TJ を開口させ、その後すみやかに閉じる」という可逆性が重要である。

MA026 (図 1) は微生物由来の環状デブシペプチドであり、TJ のバリア機能に最も重要な構成タンパク質である claudin-1 と結合することが示唆されている[1]。当研究室では、イヌ腎臓上皮細胞 MDCK II 細胞単層が形成する TJ に対して、MA026 が可逆的開口を誘導し、親水性高分子モデル物質である FD4 (4 kDa Dextran) の細胞層透過を促進することを明らかにしてきた[2]。このことから、バイオ医薬品を代表とする注射・点滴等の針を用いた投与方法に頼らざるを得ない親水性高分子薬剤を、MA026 は非侵襲的 (経口、経皮、経肺) で投与することを可能にすると考えられる。一方で、MA026 が低分子化合物 (分子量 500 Da 以下) に対して透過促進活性を示すかどうかは検討されていなかった。そこで本研究では、親水性、及び疎水性の低分子化合物を用いて MA026 による低分子物質透過促進活性を検討することを目的に行った。

または MA026 を添加して、0.5, 1, 2, 5 時間後に Transwell 下層の HBSS を回収した。

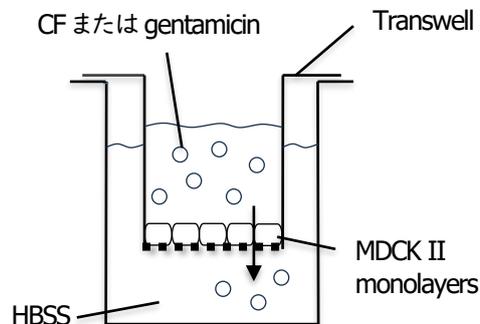


図 2 : Transwell を用いたアッセイの模式図

2. 透過物質量の定量

下層への透過した CF 量は、蛍光マルチプレートリーダー (Tecan, Spark) を用いて測定した蛍光強度 (Ex 490 nm, Em 520 nm) から定量した。Gentamicin の定量は、LC-MS (Shimadzu, 8045) を用いて以下のように行った。下層の溶液をフィルターでろ過した後、逆相カラム (Nacalai Tesque, Cosmosil 5C18-AR-II, 4.6 mm I. D, x 250 mm, Flow rate 1.0 mL/min) で分離し、分子量が 446.7, 463.6, 449.5 のピーク面積から、予め同様な方法で得た検量線を用いて算出した。

結果

詳細は発表会にて発表する。

参考文献

- [1] Shimura S., *et al.*, Total synthesis and anti-hepatitis C virus activity of MA026. *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 18949-18956 (2013).
- [2] Kanda Y., *et al.*, MA026, an anti-hepatitis C virus compound, opens tight junction of the epithelial cell membrane. *J. Antibiot.*, **70**, 691-694 (2017).

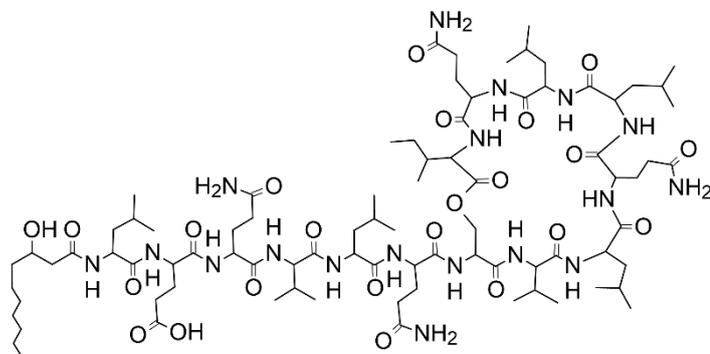


図 1 : MA026 の構造

材料

低分子化合物として、疎水性化合物の 5(6)-carboxyfluorescein (CF、分子量 376.3) と、親水性化合物の gentamicin C1、C2、C1a の混合物 (それぞれ分子量 446.7, 463.6, 449.5) を用いた。

方法

1. Transwell を用いた物質透過アッセイ

上皮細胞層透過促進活性は、Transwell (Corning Cat# 3413) を用いて測定した (図 2)。MDCKII 細胞を Transwell に播種し、毎日培地交換を行った。7 日目に Hank's 平衡塩溶 (HBSS Nacalai Tesque Cat# 09735-75) に置換して 1 時間おいた後、CF、または gentamicin を含む HBSS 溶液に置換した。続いて、細胞層に DMSO

分裂酵母形態形成変異株 *las11* の原因遺伝子の同定

新井 冬結 (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

生物の組織や器官を形成する細胞は、それぞれ特有の形状をとる。細胞の形は機能と密接に関係するため、細胞がその形状を決める仕組みの解明は、細胞生物学の大切な課題の1つである。細胞が形状を決める上で、細胞内に極性が生じる必要がある。その形成を制御し維持することは、生物が生命活動を行う上で重要である。ヒトにおいても細胞の極性形成の異常によって、様々な病気が引き起こされることが知られている。

本研究で用いた分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、円筒形の形状を呈する細胞である。分裂酵母は、細胞の長軸に沿った細胞極性を有し、その細胞端に細胞壁合成酵素や小胞等を局在化し、細胞が伸長する(図1)。一定の長さになると核分裂を引き起こし、続いて細胞中央に隔壁をつくり、2つの娘細胞に分裂する。これらの細胞成長と分裂が規則正しく行われることから、分裂酵母は細胞の極性形成や形態形成の分子機構を研究するためのモデル生物として広く知られている。

これまでに分裂酵母の分子遺伝学的研究により、いくつかの細胞極性の制御に関わる遺伝子が同定されている。例えば、分裂酵母の *orb6* は、細胞形態が球状になってしまう変異体である。その原因遺伝子がコードする Orb6 はタンパク質キナーゼであり、アクチン細胞骨格を細胞の先端に局在させることで細胞領域を規定し、エキソサイトーシスに関わる膜関連タンパク質や細胞壁合成酵素の輸送を促進することで細胞の伸長成長を制御すると考えられている。この研究成果は、分裂酵母の形態形成変異株の原因遺伝子の同定とその機能解析が、形態形成のメカニズムを解明する重要なアプローチとなることを示している。分裂酵母には、*orb6* 変異体の他にも、レモンのような形態を示す変異体や細胞体が屈曲する変異株など、様々な細胞形態の異常な変異株が存在する。

私が所属する研究室では、以前に細胞形態が球状になる *las11* という変異体が単離されている(図2)。*las11* は、野生株をニトログアニジンで処理し、変異を誘発した細胞の集団から、アクチン重合阻害剤(ラトランキュリン A)に対して超感受性を示す変異株として得られた株である。その原因遺伝子や形態異常を示す原因については未だ解明されていない。そこで私は、*las11* の原因遺伝子の表現型の解析を進めた。

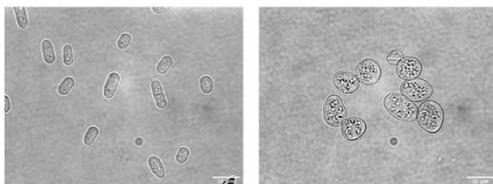


図2 野生株(左)および *las11*(右)の明視野画像

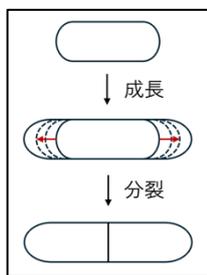


図1 分裂酵母の形状と成長パターン

雑実験を行った。分裂酵母には *h1* と *h2* という接合型があり、それらを栄養飢餓下に置くと、異なる接合型の細胞同士が接合し、減数分裂を経て4つの胞子を形成する。その過程で遺伝子の組換えが起きる。注目している遺伝子とマーカー遺伝子が連鎖していなければ、親株とは異なる遺伝子の組み合わせを持つ胞子が50%の確率で生じる。逆にこれらの遺伝子が完全に連鎖していれば、親株と同じ遺伝子の組み合わせの胞子だけができる。このことを利用し、胞子の遺伝子型の分離比を確認して遺伝子間の連鎖の程度を調べ、マーカー遺伝子に対する目的の遺伝子間の物理的距離を推測することを目指した。

MEA培地上で親株となる2種類の細胞株(*las11* と目的のマーカー遺伝子を持つ細胞)を混合し、30°Cで一晩培養した後、顕微鏡を用いて十分に接合したことを確認した。その数日後に、接合した細胞から生じた胞子嚢をβ-Glucuronidaseで処理し、細胞壁を破壊し胞子を取り出した。さらにエタノールを最終濃度30%になるように加えることで残存している親細胞を死滅させ、YE培地上に胞子を播種した。25°Cで5~6日間培養し、胞子が発芽して形成されたコロニーを複数単離した。そして各コロニーの表現型を確認し、遺伝子型の分離比を調べた。

② 表現型の解析

野生株と *las11* を25°Cと37°C(3時間及び一晩)で培養した細胞について、隔壁およびアクチン繊維を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。ホルマリン固定液で細胞を固定し、PBSで細胞を洗浄した後、隔壁にはカルコフルオールを、アクチン繊維には蛍光ファロイジンをを用いて染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

結果・考察

① ランダムスポア解析による原因遺伝子の同定

las11(las11⁺ade6M216 leu1-32) と JY336(*las11⁺ade6M210 leu1-32*) の接合により、第3染色体上にある *ade6* と *las11* が連鎖しているか否かを調べた。胞子の表現型から推察される遺伝子型の分離比は表1のようになった。

表1 *las11* と *ade6* の分離比

子の遺伝子型	1回目	2回目
	コロニーの数と割合	コロニーの数と割合
<i>las11⁺ade6M210 leu1-32</i>	59個(49.2%)	49個(40.8%)
<i>las11⁺ade6M216 leu1-32</i>	15個(12.5%)	9個(7.5%)
<i>las11⁻ade6M210 leu1-32</i>	7個(5.8%)	4個(3.3%)
<i>las11⁻ade6M216 leu1-32</i>	39個(32.5%)	58個(48.3%)

親株とは異なる遺伝子型の胞子が全体の約11~18%できたことから、*las11* は *ade6* と連鎖しており、第3染色体上に存在する可能性が高いと考えられる。今後、第3染色体上に存在する他のマーカー遺伝子を用いて交雑実験を行い、遺伝子座の位置をさらに絞り込んでいく計画である。

② 表現型の解析

隔壁およびアクチン繊維について、現在観察を続けている。

方法

① ランダムスポア解析による原因遺伝子の同定

分裂酵母の変異体の原因遺伝子を同定する方法として、原因遺伝子が染色体のどこに存在しているかを決定するために、細胞の交

繊毛虫テトラヒメナの飢餓時における細胞形態変化に関する研究

川端 倫太郎 (筑波大学生物学類)

指導教員：中野 賢太郎 (筑波大学生命環境系)

【背景・目的】

繊毛虫テトラヒメナは、飢餓状態に置かれると、細胞分裂周期を停止し、細胞の大きさが小さく、形態が細長く変化することが知られている[1]。一方で、この環境変化に応じる重要な現象がどのような機構によって起こるかはいまだ明らかにされていない。

テトラヒメナの細胞表面には微小管などの細胞骨格と膜構造がよく発達しており、繊毛列に沿って細胞の前後に伸びる縦行微小管と、それと直角方向に伸びる横行微小管が、格子状の構造を形成している。飢餓状態では細胞が小さく細長くなることから、細胞形態にあわせてこれらの細胞骨格構造が秩序だてて減少する仕組みをもつと考えられる。さらに、細胞形態の変化には、微小管細胞骨格の再編成に加えて、細胞内分解系も大きく関与すると考えられる。ここでは一般的によく知られているオートファジー系とユビキチン・プロテアソーム系の二つに着目し、飢餓時の細胞形態変化におけるそれぞれの働きについて調べることにした。

【材料と方法】

細胞株と培養

テトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* の野生株 B2086 は Tetrahymena Stock Center より供与されたものを用いた。各 ATG8 遺伝子シャットオフ株は本研究室で作成されたものを用いた。各細胞株は室温または 30°C で SPP 培地にて培養した。

飢餓時の細胞形態変化の観察

SPP 培養液中で対数増殖期にあるテトラヒメナを遠心分離により回収し、10 mM Tris HCl で一度洗浄した。その後再度遠心分離して 10 mM Tris HCl に懸濁することで飢餓状態に置いた。30°C で培養を続け、実験に供した。飢餓前後の細胞の縦と横の長さを計測し、そのアスペクト比 (横 : 縦) を細胞形態変化の度合いとして評価した。各阻害剤処理は飢餓状態の開始のタイミングで、培養液に薬剤を添加することで行った。阻害剤の対照群として、溶媒である DMSO を培養液に加えた。

【結果と考察】

野生株の飢餓時における細胞形態変化

テトラヒメナ野生株を飢餓前 (図 1A) と、飢餓 3、6、24 時間後 (図 1B) にそれぞれ観察した。その結果、細胞の縦の長さとの横の長さは飢餓 24 時間後に最も減少した。この時、そのアスペクト比も最も減少していたことから、細胞の形状が細長くなっていることが示された。さらにチューブリンの免疫蛍光染色像から、細胞表面の微小管からなる格子状構造は飢餓時においても整然と維持されていることが観察された。そのため、これらの微小管細胞骨格構造は細胞形状に応じて変化すると考えられた。

飢餓 24 時間後の細胞を再度 SPP 培地で培養すると、細胞の縦と横の長さ、およびアスペクト比は時間に応じて増加し、SPP 培養 24 時間後には飢餓状態の開始前と同様の水準に回復した。このことから、テトラヒメナの飢餓時における細胞形態変化は外的環境に応じた可塑的な現象であると言える。

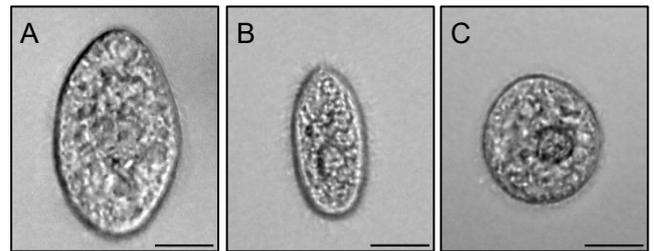


図1 各条件下での野生株の様子 (スケールバー: 20 μm)

(A) 飢餓前 (B) 飢餓 24 時間後 (C) Wortmannin 存在下での飢餓 24 時間後

微小管の重合阻害

前項の観察結果を踏まえて、細胞の栄養状態に応じて細胞表面の縦行微小管と横行微小管が調和して縮退していく可能性を考えた。もしかしたら、これらの微小管構造の間でサブユニット (チューブリン) の重合・脱重合を介してバランスがとられているのかもしれない。そこで、微小管の脱重合促進をする薬剤 Nocodazole で細胞を処理した。しかし、飢餓時に細胞の縦と横の長さ、およびアスペクト比について、対照群と目立った違いは観察されなかった。栄養増殖期の細胞と同様に、飢餓時においてもこれらの細胞表面の微小管は比較的安定な構造であると考えられた。そのため、細胞が細長く小型に形状変化する際には、積極的にこれらの微小管構造を縮退させる仕組みがある可能性が伺えた。

オートファジー系の阻害

オートファゴソームの形成誘導に必要な PI3 キナーゼの阻害剤 (Wortmannin) を用いて、飢餓後の細胞形態の様子を観察した。対照群に比べ Wortmannin 存在下では、飢餓時に細胞の縦の長さは減少したが、横の長さはあまり減少しなかった。細胞全体は丸い形状を取り、アスペクト比は増加していた (図 1C)。ATG8 遺伝子シャットオフ株を飢餓下においた場合も、同様の細胞形状の変化が観察された。これらの結果は、テトラヒメナにおいてオートファジー系は、特に飢餓時における細胞の横幅を縮める過程に大きく関与する可能性を示した。正常な細胞と比較して細胞の長さが短くなったのは、横幅が縮まらなかったことの副次的な結果か、またはオートファジーの阻害によりアミノ酸のリサイクリングが滞り細胞の縦の長さを適切に保つために必要なタンパク質の再合成が抑制された結果であると考えられた。

ユビキチン・プロテアソーム系の阻害

26S プロテアソームのキモトリプシン様活性の阻害剤 MG132 の存在下で、飢餓時に細胞の縦と横の長さ、およびアスペクト比を調べた。その結果、対照群と目立った違いは観察されなかった。しかし、テトラヒメナが MG132 に感受性を持つか不明な点は多く、現在、他の薬剤を用いるなど、さらなる検証を考えている。

【参考文献】

1. Junker AD, Jacob S, Philippe H, Legrand D, Pearson CG. Plastic cell morphology changes during dispersal. *iScience*. 2021 Jul 27;24 (8):102915.

Tetrahymena thermophila の繊毛に局在するアクチンアイソフォームの機能解析

加川 海来 (筑波大学生物学類) 指導教員: 中野 賢太郎 (筑波大学生命環境系)

【背景・目的】

アクチンはすべての真核生物に存在するタンパク質であり、細胞運動や細胞質分裂、細胞の形態形成などにおいて重要な役割を担っている。アクチンにはアクチン関連タンパク質(Arp)と呼ばれる一次配列が類似したタンパク質が存在する。Arp はさらに複数のサブファミリーに分けられ、それぞれが生体内で特有の機能を担っている。例えば、Arp2 と Arp3 は複合体を形成し、それがアクチンの重合核となることで細胞内におけるアクチンフィラメントの形成に重要なはたらきをしている。

興味深いことに、細胞の遊泳運動等に大切な繊毛・鞭毛の構成成分としてアクチンが含まれていることが、複数の生物種で知られている。さらに、繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* は、その繊毛内に tArp と呼ばれる Arp を有している[1]。この論文では、*T. thermophila* と当時ゲノムが解読されていたヒト *Homo sapiens*、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster*、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、及びシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* のアクチンと Arp のアミノ酸配列の情報を用いた系統解析が行われ、tArp は既知の Arp のサブファミリーに属さないという結果が示されている。そのため、tArp は *T. thermophila* の繊毛において何らかの特別な機能を有していると考えられた。しかし、tArp の細胞機能は不明である。そこで私は、tArp の機能を明らかにするため、tArp KO 株の表現型を調べた。さらにこの数年間に蓄積した様々な真核生物のゲノム情報を用いて、tArp が *T. thermophila* 以外の繊毛虫や近縁生物に保存されていないか調査した。

【方法】

tArp KO の表現型

野生型株 WT (B2086) と tArp KO 株の遊泳運動を撮影し、1秒間の軌跡をトレースすることで遊泳速度を計測した。繊毛運動は推進力を生み出す有効打と、次の有効打へと繊毛の位置を元に戻す回復打に分けられる (図1)。さらに、tArp KO 株の遊泳速度低下の要因を探るため、下田臨海実験センターの柴先生のご指導のもと高速カメラで撮影した画像を取得して、WT と tArp KO 株の繊毛打頻度と有効打の角度を調べた。

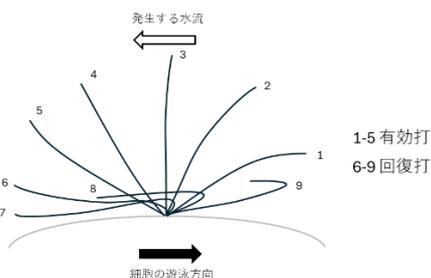


図1 繊毛運動の様式

1-9 の順に有効打と回復打を繰り返して運動することで、細胞の遊泳運動の推進力を生み出す。

tArp の系統解析

GenBank および真核生物のタンパク質データベース EukProt から、アルベオラータ Alveolata (繊毛虫類 Ciliate、

渦鞭毛藻類 Dinophyceae、及びアピコンプレクサ Apicomplexa から形成される真核生物のスーパーグループの一つ) に含まれる生物種を中心に、多様な系統の真核生物 63 種のアクチンと Arp の配列を収集した。配列の収集には BLASTp を用い、ヒト *H. sapiens* とテトラヒメナ *T. thermophila* のアクチンと全 Arp のアミノ酸配列をクエリ配列として利用した。得られた配列および tArp 配列について MAFFT を利用してマルチプルアライメントを作成した。TrimAL を用いてアライメント上のギャップを取り除いた後、IQ-Tree により最尤系統解析を行った。

【結果と考察】

tArp KO の表現型

tArp KO 株は WT と比較して平均遊泳速度が 50%程度低下していた。また、高速カメラで撮影した映像から、tArp KO 株は WT よりも繊毛打頻度と有効打の角度がそれぞれ 50%と 15% 程度低下しているのが分かった。これらの結果から、tArp KO 株は繊毛打頻度と有効打の角度に異常が生じたことで遊泳速度が低下している可能性が示唆された。tArp は軸糸内で繊毛打頻度や繊毛運動の波形を制御するのかもしれない。

tArp の系統解析

T. thermophila 以外の Ciliate, Apicomplexa, Dinophyceae の種から、tArp との単系統性が強く支持される Arp 配列が見出された。このことから、Alveolata の祖先は既に tArp を獲得していたと推測された。この単系統には、Alveolata に比較的近いストラメノパイル Stramenopiles やリザリア Rhizaria の一部の種の Arp 配列も含まれた。今後、さらに多くの系統の配列情報を解析に追加していき、真核生物の多様性の中で tArp と相同なタンパク質がどの程度存在しているのか調査したい。

【今後の展望】

tArp がどのように軸糸内で繊毛打頻度や繊毛運動の波形を制御しているか理解するため、tArp が軸糸のどの部分に局在しているか、またどのような分子と相互作用しているのか調べたい。これまで、tArp の N 末端側または C 末端側に eGFP タグをつけた株を作製しており、現在、GFP 抗体を用いた繊毛分画実験などの生化学実験に取り組んでいる。さらに、GFP 抗体を用いた免疫沈降実験を行い、tArp と結合する分子を探索したい。また、WT と tArp KO 株の軸糸タンパク質の電気泳動を行い、それぞれの軸糸タンパク質の違いを検討したい。

【参考文献】

- [1] Kuribara S., Kato M., Kato-Minoura T., and Numata O. 2006. Identification of a Novel Actin-Related Protein in *Tetrahymena* Cilia. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 63:437-446