私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（平成２４年度～平成２８年度）

オルガネラが駆動する真核細胞システムの高度化

研究成果報告書

学校法人名　　学校法人　立教学院

大学名　　立教大学

研究組織名　　生命理学研究センター

研究代表者　　関根靖彦（立教大学理学研究科教授）

はじめに

立教大学大学院理学研究科では、文部科学省の私立大学戦略的研究基盤形成支援事業の選定を受け、生命理学研究センターが母体となって、2012 年度から 2016 年度の 5 年間にわたり、研究プロジェクト「オルガネラが駆動する真核細胞システムの高度化」を推進してきました。このたび、研究期間が終了したことを受け、本研究プロジェクトの研究成果を本冊子にまとめました。

本研究プロジェクトは、「オルガネラ」をキーワードに、(A)オルガネラの誕生と維持機構の解明、(B)多細胞体制を支えるオルガネラの新機能の解明の 2 つの主題に沿って、本学生命理学専攻の教員および 3 名の学外の研究者がプロジェクトメンバーとして研究を進めてきました。各メンバーが得意とする材料を用いて、真核細胞というシステム構築にオルガネラが果たしてきた役割を多面的に追求することにより、多くの成果を上げることができました。研究成果の詳細については、本報告書をご覧ください。今後も、本成果を基盤に理学研究科における研究・教育の更なる発展を図っていく所存です。本研究プロジェクトに関しまして、ご意見・ご助言をお寄せいただけましたら幸いです。

最後に、本プロジェクト研究を遂行するにあたり、様々な形でご協力・ご支援いただいた立教大学の関連部署の皆様に深く感謝いたします。

2017 年 5 月

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
「オルガネラが駆動する真核細胞システムの高度化」
研究代表者 理学研究科教授 関根靖彦

目次

第１部：研究成果報告書の概要・・・・・・・・・・・・・・・・　１

第２部：研究成果報告・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　４８

１．研究プロジェクトの概要・・・・・・・・・・・・・・・・　４９

２．研究組織　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　５０

３．研究成果報告・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　５５

(A)オルガネラの誕生と維持機構の解明・・・・・・・　５６

(B)多細胞体制を支えるオルガネラの新機能の解明・・　９２

４．セミナー、成果報告会の実施・・・・・・・・・・・・１２９

第１部：　研究成果報告書の概要

「平成 24 年度～平成 28 年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」
研究成果報告書概要

1 学校法人名 立教学院 2 大学名 立教大学

3 研究組織名 生命理学研究センター

4 プロジェクト所在地 東京都豊島区西池袋 3-34-1

5 研究プロジェクト名 オルガネラが駆動する真核細胞システムの高度化

6 研究観点 研究拠点を形成する研究

7 研究代表者

研究代表者名	所属部局名	職名
関根 靖彦	理学研究科	教授

8 プロジェクト参加研究者数 14 名

9 該当審査区分 理工・情報 [生物・医歯] 人文・社会

10 研究プロジェクトに参加する主な研究者

研究者名	所属・職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
関根 靖彦 （研究統括・ グループ長）	理学研究科・教授	(A-1) オルガネラ移行シグナルの獲得機構 (A-2) オルガネラ DNA の安定維持機構 (A-3) 葉緑体特異的リボソームタンパク質の機能	（A）オルガネラの誕生と維持機構の解明
花井 亮	理学研究科・教授	(A-1) オルガネラ移行シグナルの獲得機構	
小田原 真樹	理学研究科・助教	(A-2) オルガネラ DNA の安定維持機構	
山田 康之	理学研究科・教授	(A-4) オルガネラ ATP 合成酵素の活性調節機構	
塩見 大輔	理学研究科・准教授	(A-6)外部シグナルによって葉緑体の分裂位置を制御する機構	
末次 正幸	理学研究科・准教授	(A-7)オルガネラ環状ゲノムの試験管内複製増幅技術の開発	
岡 敏彦 （グループ長）	理学研究科・教授	(B-1) ミトコンドリアの形態制御機構と損傷ミトコンドリア排除における役割	（B）多細胞体制を支えるオルガネラの新機能の解明

木下　勉	理学研究科・教授	(B-2) 始原生殖細胞の分化に重要な母性 mRNA 翻訳におけるミトコンドリアの機能	(B)多細胞体制を支えるオルガネラの新機能の解明
眞島　恵介	理学研究科・教授	(B-3) 接着細胞におけるミトコンドリアを中心としたアポトーシス誘導シグナルの制御	
後藤　聡	理学研究科・教授	(B-4) 多細胞化に伴う小胞体・ゴルジ体の機能分化の機構	
堀口　吾朗	理学研究科・准教授	(B-5) 根端分裂組織の幹細胞再生におけるプラスチドの機能	
(共同研究機関等)			
加藤　千明	海洋研究開発機構・主任研究員	(A-5) フリーリビング微生物から共生微生物への進化	(A)オルガネラの誕生と維持機構の解明
西村　芳樹	京都大学・理学研究科・助教	(B-6) オルガネラ DNA の維持機構の母性遺伝における機能	(B)多細胞体制を支えるオルガネラの新機能の解明
渡邉　信久	名古屋大学・工学研究科・教授	(A・B 共通) オルガネラ関連タンパク質の構造生物学的解析	(A・B 共通)構造生物学の視点からの真核細胞システム構築原理の解明

＜研究者の変更状況(研究代表者を含む)＞

旧

ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割

(変更の時期:平成 25 年 4 月 1 日)

新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
	理学研究科・助教	小田原　真樹	(A)オルガネラの誕生と維持機構の解明

旧

ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割

(変更の時期:平成 25 年　4 月1日)

新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
	理学研究科・准教授	塩見　大輔	(A)オルガネラの誕生と維持機構の解明

旧

ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
葉緑体特異的リボソームタンパク質の機能	理学研究科・教授	河村　富士夫	(A)オルガネラの誕生と維持機構の解明

(変更の時期:平成 25 年 3 月 31 日)

新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割

旧

ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
(A-4) オルガネラ ATP 合成酵素の活性調節機構	理学研究科・准教授	山田　康之	(A)オルガネラの誕生と維持機構の解明

(変更の時期:平成 27 年 4 月 1 日)

新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
理学研究科・准教授	理学研究科・教授	山田　康之	(A)オルガネラの誕生と維持機構の解明

旧

ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割

(変更の時期:平成 27 年　4 月　1 日)

新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
	理学研究科・准教授	末次　正幸	(A)オルガネラの誕生と維持機構の解明

11　研究の概要（※　項目全体を10枚以内で作成）

（1）研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

真核細胞は過去に（1）原始真核細胞とバクテリアの融合による複膜系オルガネラをもつ真核細胞システムの誕生、(2)多細胞化をうけた細胞の機能分化と組織化、の2度の飛躍的な「システム進化」を遂げてきた。本プロジェクトは、真核細胞「超システム」の形成においてオルガネラが主導的に果たした役割を解明することを目的とし、次の(A)と(B)の主題のもとにグループを組織して、研究を行う。

（A）オルガネラの誕生と維持機構の解明：バクテリアと原始真核細胞という異なるシステムに由来する要素の機能の変化・消失、新機能の獲得、および、クロストーク様式の変化などを解明する。

（B）多細胞体制を支えるオルガネラの新機能の解明：多細胞化に伴い、オルガネラがどのような新機能を獲得することで、細胞の機能分化と組織化を駆動したかを解明する。

「オルガネラが駆動する」という視点から、真核細胞超システムのもつ階層的な構築原理を解明することが最終的な目的である。そのために、(A)と(B)を総合した研究課題の設定を視野に、多角的な視点から研究を推進する。バクテリアから高等生物までの多様なモデル生物を用いることで、「オルガネラが駆動する真核細胞システムの高度化」の共通性や多様性を追究する。本プロジェクト終了後は、得られた成果を基盤として、分子実体をもつ階層的なシステム間の相互作用から生命現象を理解する分子細胞生物学の研究を展開する。

（2）研究組織

本プロジェクトは、立教大学生命理学研究センターのメンバー11 名と学外研究者 3 名で、上記の(A)と(B)を主題とする2つのグループを構成し、密接に協力しあって研究を行った。

研究代表者の関根がプロジェクト全体を統括し、プロジェクトの運営は、生命理学研究センター長兼(A)グループ長の関根、(B)グループ長の岡、副センター長の山田を含む、プロジェクトメンバー4名で構成する運営委員会を中心として実施した。また、研究を円滑に進めるために、ポストドクトラルフェロー（PD）3 名を任用し、さらに毎年、大学院生 25～36 名がプロジェクトに参加した。会計等の事務サポートのためにアルバイト 1 名を雇用し、実験技術員が機器のメンテナンス等で研究をサポートした。

各グループの進捗状況を的確に把握し、相互調整を図るために、各年度末に研究成果報告会を開催し、各研究課題の研究進捗状況をメンバー間で共有し、各課題相互の討論を行い、課題間の交流、相互評価を図った。平成 28 年 7 月に、オルガネラ研究で優れた業績をあげている 2 名の外部研究者による外部評価を受け、順調な成果をあげている、との評価を受けるとともに、今後の方向性について示唆に富んだ助言を受けた。

学外の共同研究機関との連携状況については、奈良先端科学技術大学院大学、前橋工科大学、東京工業大学、東京都医学総合研究所、慶應義塾大学医学部、東京都医学総合研究所、国立遺伝学研究所、大阪大学、東京大学理学系研究科、東京学芸大学自然科学系などと連携し、研究を行った。

（3）研究施設・設備等

研究施設の面積は 1185.6 ㎡であり、毎年 36～47 名が使用した。

整備を予定していた研究設備（次に下線で示す）は初年度に全ての立ち上げを完了し、プロジェクトの研究推進に利用している。主な研究設備と利用時間は次の通りである。共焦点スペクトルアナライザー顕微鏡（週 15 時間）、共焦点レーザー顕微鏡（週 12 時間）、DNA シークエンサー3500（週 15 時間）、DNA シークエンサー3130xl（週 30 時間）、レーザースキャナー方式蛍光画像解析装置（週 15 時間）、フローサイトメーター（週 4 時間）、リアルタイム PCR 装置（週 15 時間）。

（4）研究成果の概要　※下記、13及び14に対応する成果には下線及び＊を付すこと。

ほぼ計画通りに研究が進み、植物オルガネラ DNA を維持する新しい機構の発見、ミトコンドリアの形態維持にかかわる因子の同定、損傷ミトコンドリアの排除によるミトコンドリア機能の維持機構の解明、生殖細胞形成におけるミトコンドリアの新機能の発見、小胞体・ゴルジ体の機能の多様化の発見、葉緑体による側根形成制御機能の解明、などの成果があがった。詳細は以下の通りである。

(A)オルガネラの誕生と維持機構の解明

(A-1)「オルガネラ移行シグナルの獲得機構」：進化の過程で獲得された葉緑体移行シグナル（Transit Peptide; TP）は、その多くの起源は不明であり、またそのアミノ酸配列の特徴が不明確である。その原因として TP の進化が収斂的である可能性を考えた。つまり、共生したラン藻から遺伝子が

核に移行した際、ラン藻遺伝子の上流に位置する配列も翻訳され、葉緑体移行装置に認識されるものが選択されたというシナリオである。上流に位置する配列はラン藻由来もしくは共生宿主細胞由来であると考えられるが、いずれにせよ TP は多くの祖先をもつため配列が多様であり、それが TP の配列の特徴の少なさの要因になっていると予想できる。「ゲノム上には TP となり得る潜在的な配列が多数存在しており、TP 獲得は偶発的に起こり得た」という仮説を検証するために、葉緑体に移行した時にのみ機能するマーカー遺伝子の上流に様々な核ゲノム断片を融合させ、これを核ゲノムに挿入することにより得られたクラミドモナス形質転換体の中から、融合した断片が TP として機能するクローンを選択できる実験系の構築を目指した(*137a)。マーカー遺伝子として、crtI(グロエオバクターのリコペン合成系遺伝子)およびクラミドモナスの光合成関連遺伝子 petE を用いて解析を行ったが、いずれの遺伝子も発現のサイレンシングが起こってしまい、目的のクローンを選択できなかった。サイレンシング活性の低い株の利用や高い使用頻度のコドンへの変換などの方策を試みたが改善は見られなかった。

TP はそのアミノ酸配列の特徴が不明確であるが、その一方で、葉緑体移行装置である TOC 複合体のうち、細胞質側にある TOC34 や TOC159 の GTPase ドメインによって認識されると考えられており、構造生物学的に考えて、アミノ酸配列に一定の制約があることは当然である。そこで、TP と移行装置の相互作用の解析のために、クラミドモナスの TOC34 の GTPase ドメインを大腸菌で発現させ、精製した。このタンパク質標品の結晶化を試みたが、結晶は得られなかった。また、クラミドモナス由来の pre-ferredoxin、ferredoxin-TP、および、Rubisco Activase (RCA1)の N 末 100 アミノ酸の、3種のペプチドをそれぞれ GST の N 末側に融合したタンパク質を精製した。これらの GST 融合タンパク質と TOC34 GTPase ドメインの相互作用を構造解析によって調べることを目標とし、グルタチオンレジンを用いたプルダウンアッセイを行った。GTP、GMP-P(NH)P、GDP+Pi の存在下で実験を行ったが、結合は検出されなかった。以上のことから、調べた TP とクラミドモナス TOC34 との結合は弱く、構造解析による相互作用の解析は困難であろうことが分かった。

(A-2)「オルガネラ DNA の安定維持機構」:オルガネラ DNA には光合成や呼吸に関わる重要な遺伝子がコードされており、その維持は植物にとって重要である。ヒメツリガネゴケを用いたこれまでの研究から、バクテリアの相同組換え修復に関わるリコンビネース RecA のホモログである核コードの RECA1 が、オルガネラゲノム上に散在する短い反復配列間の異常な組換えを抑制することによりゲノムの安定性を維持していることが明らかになっている。バクテリアの相同組換え修復に関わる DNA ヘリケース RecG のホモログである RECG とミスマッチ修復に関わる MutS のホモログである MSH1 が、同様にオルガネラゲノムの安定性維持に関わる因子として見出された。これら遺伝子の破壊株の解析を行った結果、*RECG* 欠損株のミトコンドリアでは *RECA1* 破壊株と一部異なる短い反復配列間の組換えが原因となるゲノム不安定化が引き起こされていることが明らかになった。*RECG* 破壊株では葉緑体においても同様のゲノム不安定化が引き起こされており、RECG は両オルガネラのゲノム安定性を維持していることが明らかになった(*43,179,262)。*MSH1* 破壊株を解析した結果、MSH1 が反復配列間の組換え抑制によるオルガネラゲノム安定性維持に関わっており、その機能には C 末端側のエンドヌクレアーゼドメインが必須であることが明らかになった(*68, 192)。ヒメツリガネゴケには葉緑体に移行するもう一つの RecA ホモログ RECA2 が存在するが、その破壊株では、*RECG* 破壊株と同様の葉緑体ゲノム不安定化に加え、損傷を受けた葉緑体 DNA の回復において欠損を示した。このことから RECA2は組換えの抑制と損傷した DNA の修復という二重の役割によって葉緑体のゲノムを維持していることが明らかになった(*52,54,94,137)。一方、エピスタシス解析の結果、*RECG, RECA2, MSH1* の変異は組換え体の蓄積においてそれぞれに相乗的に作用することから、これら因子は遺伝的に相互作用をすることがわかった(*68, 192)。次世代シークエンシングとインフォマティクスによる各変異体オルガネラゲノムの網羅な解析を行った結果、両変異株におけ組換え様式の共通点と相違点を明らかにすることができた。また *RECA1*、*RECG* 各変異体ミトコンドリアゲノムには、大規模なゲノム構造の変化が起きていることが明らかになった(*355)。新規因子として同定した RECX はおそらく RECA1 を抑制的に制御することによって、ミトコンドリアゲノム安定性を維持していることが明らかになった(*247)。

(A-3)「葉緑体特異的リボソームタンパク質の機能」: 葉緑体特異的リボソームタンパク質(plastid specific ribosomal protein :PSRP)は葉緑体リボソームに結合しているタンパク質として同定され、7種類 (PSRP-1～7) が知られているが、いずれの PSRP に関してもその機能は不明の点が多い。他の PSRP とは異なり、PSRP-1 の類似タンパク質は、枯草菌や大腸菌などのバクテリアにも存在してい

る。これまでの研究により、枯草菌は、定常期や胞子形成期初期の細胞内において、休眠不活化状態であるダイマーリボソームを形成することを見出した。このダイマーリボソームの形成に PSRP-1 の類似タンパク質 YvyD の関与が示されていた。枯草菌の YvyD に関して解析を行い、以下のことが分かった。YvyD はリボソームの2量体化に必須であり、胞子形成期に活性化されるσH により転写されることを示し(*1,139,194)、YvyD の活性に重要な部位を同定した(*134)。YvyD によるダイマーリボソーム形成には YvyD の N 末付近のアルギニンリン酸化が関与していることが示唆された。枯草菌のリボソームタンパク質 S10 の変異株では2量体リボソームが減少することから、S10 のリボソーム2量体化への関与が示唆され(*146,154,155)、また L2 や S10 の変異株は胞子形成率が低下した(*2,16,42,89,97,136,138,193)。

ヒメツリガネゴケの PSRP1 に関して解析を行い、以下のことが分かった。PSRP-1 全長の C 末端に GFP を融合したタンパク質の細胞内局在を調べた結果、葉緑体に局在し、その局在様式は、[タイプ A] 葉緑体全体に分布、[タイプ B] 葉緑体内に複数のフォーカスを形成、に分類された。リボソームタンパク質 L1 の RFP 融合タンパク質の局在と比較すると、タイプ B はリボソームと共局在していることが示唆された。原糸体コロニーの周縁付近の細胞はタイプ A、コロニー内側の細胞ではタイプ B を示し、また、コロニーの周辺部の細胞と内側の細胞を別々に集め、リボソームプロファイリングを行った結果、周縁部の方がポリソームの量が多いことが分かった。以上の結果から、タイプ B は、PSRP1 がリボソームに結合し、おそらく翻訳活性を低下させている状況を示していると考えられる。また、高塩濃度ストレスや高温ストレスを与えると、PSRP1 はリボソームに結合することが分かった(*236)。GUS 融合法により、PSRP1 遺伝子は、原糸体細胞で強く発現し、特にコロニーの周縁部での発現が高く、また原糸体から茎葉体への分化過程の初期に生じる bud(芽)で特に強く発現していることが分かった。一方、茎葉体の葉ではほとんど発現が見られなかった(*305)。この結果は、PSRP1 が細胞増殖や細胞分化と関わっている可能性を示す。

(A-4)「オルガネラ ATP 合成酵素の活性調節機構」:ミトコンドリア ATP 合成酵素において、バクテリア型の活性調節機構が機能しうるのかを検証することで、オルガネラ化による機能の獲得・喪失についての知見を得ることを主な目的とした。そのため、バクテリア ATP 合成酵素では活性調節を行っている δサブユニットを調製した。精製した δサブユニットについて、ある種のバクテリア ATP 合成酵素で見られる δサブユニットに対する ATP 結合を検討した結果、生理的に意味のある ATP 結合は起こらないことが明らかとなった。また、δε複合体を調製し、これらとバクテリア ATP 合成酵素の $\alpha_3\beta_3\gamma$複合体を組み合わせることで、δサブユニットや εサブユニットの活性調節能を検討したが、この組み合わせでは活性に変化は見られなかった。この結果は、ミトコンドリア ATP 合成酵素の δサブユニットは、構造としてはバクテリア型の活性調節に必要な領域を持っていながらも、活性調節能は失っているということを示唆する。この他、全ての ATP 合成酵素に共通して見られる ADP 阻害について、ADP 阻害が特に強い枯草菌 ATP 合成酵素を材料とし、解析をすすめた(*19,99,130a)。強い ADP 阻害の原因については、ADP 阻害の解除に関わる非触媒部位へのヌクレオチド結合が弱いためである可能性は排除された(*35,205,130b)。非触媒部位へのヌクレオチド結合に伴う構造変化が触媒部位へ伝達される過程に問題があるものと結論づけた。

(A-5)「フリーリビング微生物から共生微生物への進化」:深海底には、湧水中に含まれるメタンや硫化水素といった化学物質に依存した化学合成生態系が存在する。こうした生態系を構築する生物は、その細胞内に共生細菌を住まわせており、共生細菌のエネルギー生産に依存して生きている。こうした共生状態にある微生物が、最終的にはミトコンドリアのようなオルガネラに進化したと考えられている。深海環境の高水圧下に適応して特徴的に生息するフリーリビングなバクテリア、好圧性細菌をモデルとして、いくつかの相同酵素の性質を共生細菌と比較することにより、フリーリビングから共生状態に移行する生理的なプロセスや進化について、構造生物学的な視点から探ることを目指した。フリーリビング微生物の蛋白質として、マリアナ海溝、深度約 11,000mの海底サンプルから分離された絶対好圧性細菌、*Shewanella benthica* DB21 MT-2 の生産する、イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(IPMDH)を精製し、陸上環境由来の近縁菌である、*Shewanella oneidensis* MR-1 の同酵素と比較した。その結果、活性中心の裏側のくぼみ部分に位置する第 266 位の 1 つのアミノ酸変換(Ala⇔Ser)によって耐圧酵素⇔圧力感受性酵素となることが確認された。高圧 X 線結晶構造解析の結果から、圧力感受性酵素は加圧下においてこのくぼみ部分に 3 分子の水分子が挿入されるのに対し、耐圧酵素では水分子の挿入が見られなかった。これが原因で、酵素の動きが圧力によって阻害を受けなか

ったことが想定され、こうした部分のたった 1 つのアミノ酸の性質によって圧力適応が構造的に規定されていることが示された(*57,157,158,174,175,217,229,309,327,345)。また、深海酵素における圧力耐性の一般的な構造特性を調べるために、異なる水深から分離された *Moritella* 属細菌のリンゴ酸脱水素酵素(MDH)について調べた。その結果、IPMDH の構造と合わせ、分子内空隙の大きさと生育深度の間に正の相関があることが分かり、深海酵素では、高圧力下で分子内空隙が圧縮され酵素の機能発現に必要な柔軟性や運動性が損なわれてしまうのを防ぐために分子内空隙が確保されていることが確認された(*213)。次に、オルガネラへの進化途上にあると考えられる共生微生物として、深海の種々の深度に生息するシロウリガイ(シマイシロウリガイ-1000m、ナギナタシロウリガイ-6000m など)の共生細菌に焦点を当て、これらの共生細菌ゲノムより確認された IPMDH 酵素について検討を行った。しかしながら本酵素の大腸菌における活性型としての発現の確認までには至らなかった(*310)。

(A-6)「外部シグナルによって葉緑体の分裂位置を制御する機構の解明」:葉緑体分裂装置はバクテリア由来のタンパク質と真核生物由来のタンパク質からなるハイブリッドである。本研究では、特に、バクテリア由来タンパク質複合体の構築および機能に焦点を当て、その解析を行った。バクテリアおよび葉緑体の分裂に中心的な役割を果たすタンパク質は FtsZ チューブリンであり、FtsZ とその関連タンパク質は、分裂面で Z リングと呼ばれる分裂環を形成し、これが内側へ陥入することにより分裂が起こる。Z リングの構築および機能に関しては、特に葉緑体において不明な点が多い。本研究では、葉緑体分裂装置を大腸菌内で再構成することにより、これらの点を明らかにしようとした。葉緑体 FtsZ を大腸菌内で発現させるだけでは、フィラメントは観察されたが、Z リングを形成することはできなかった。バクテリアでも、葉緑体でも、FtsZ は膜タンパク質または膜表在性タンパク質によって膜にアンカーされることがその機能に必須である。そこで、FtsZ を膜にアンカーさせるために FtsZ の C 末端に両親媒性ヘリックス(膜標的配列)を付加したところ、FtsZ は Z リングを形成した。すなわち、葉緑体 FtsZ は、本質的には、膜に局在すればそれ自身で Z リングを形成することを明らかにした(*74a, 359)。この再構成系に、葉緑体内で Z リングを負に制御する因子 ARC3 を共発現させると、Z リング形成は阻害された(*74a)。したがって、この再構成系は葉緑体分裂装置の構築を反映していると言える。そこで、Z リングを膜にアンカーすると推定されていた ARC6 タンパク質を、膜標的配列を付加していない FtsZ と共発現させると、ARC6 依存的に Z リングを形成した(*74a)。本研究で構築した大腸菌を用いた再構成系により、機能が証明されていなかったタンパク質の機能を証明することができた。これまでは、酵母を用いた葉緑体分裂装置の再構成が報告されていた (Yoshida et al., 2016) が、バクテリアを用いた再構成系の利点は、その生育が速いこと、遺伝子操作が簡便であること、バクテリアは葉緑体の祖先であり、これらのトポロジーが同一であることなどが挙げられる。酵母の実験系と大腸菌の実験系を補完的に使うことができれば、より深く葉緑体分裂を理解できると期待される。また、本研究では、バクテリアの分裂が外部環境によってどのように制御されているかの解析も行った。外部環境を受容し、そのシグナルを伝達し、遺伝子発現の制御を行う過程に変異が入ると、細胞が不等分裂を行う。その変異体では、分裂位置を決定する因子 MinC(上述の ARC3 のバクテリアでのホモログ)の発現が低下していることを示唆する結果を得た。

(A-7)「オルガネラ環状ゲノムの試験管内複製増幅技術の開発」:近年の DNA 操作技術および DNA シーケンス技術の急速な発展とともに、長大な DNA 領域を丸ごと取り出して操作する技術の開発が望まれるようになってきている。ミトコンドリアや葉緑体といったオルガネラは、核ゲノムとは別に、独自のゲノム DNA を有し、その構造はバクテリアゲノムと同様に環状をなしている。オルガネラ環状ゲノムの完全長を均一なクローンとして調製する技術は、オルガネラゲノムがコードする遺伝情報に基づいた分子生物学研究を展開する上で重要であるとともに、オルガネラ機能不全がもたらす様々な疾患の遺伝子治療法の提供にも繋がるものである。一方で、大腸菌などを宿主とした従来の生物学的クローニングではクローニングしようとするオルガネラ DNA 配列が宿主に毒性を示すことが問題として報告されている。最近我々は、大腸菌環状ゲノムの複製開始・終結・分離のサイクルについて、20 種以上の蛋白質を用いて試験管内で再構成した「複製サイクル再構成系」の構築に成功した(論文投稿中)。大腸菌ゲノムは 4.6 Mb の環状構造をしており、唯一の複製起点 *oriC* から両方向に複製が進行する。「複製サイクル再構成系」では複製後に絡み合った姉妹環状 DNA が分離された後、元の環状構造に戻った産物を鋳型として、複製サイクルが次々と何ラウンドも継続し、等温での環状 DNA 分子の指数増幅が実現される。本研究では、モデルオルガネラとしてマウスミトコンドリアを用い、その環状ゲノム DNA(16 kb)について、「複製サイクル再構成系」を利用して環状のまま、試験管内で全体を

増幅する技術の構築に成功した(*298,312,352)。試験管内でオルガネラ環状ゲノムを環状のまま丸ごと増幅してみせたのは本研究が世界的にも初めてである。この方法によれば、細胞毒性などの影響もなしに、非常に簡便な操作のみで長大なオルガネラ環状ゲノムを増幅調製可能である。

(B) 多細胞体制を支えるオルガネラの新機能の解明

(B-1)「ミトコンドリアの形態制御機構と損傷ミトコンドリア排除における役割」:ミトコンドリアは真核生物に取り込まれたことで、細胞外の環境やシグナルに応答し、その形態をダイナミックに変化させる。ミトコンドリア内膜はクリステ構造と呼ばれる膜陥入構造を形成しており、原核生物にはないミトコンドリアのユニークな膜構造である。このようなオルガネラの特徴は、真核細胞システムの高度化を推し進める大きな基盤となると考えられる。特に、クリステ構造は内膜の表面積を増加させ膜の区画化を進めることで、ATP 産生の増大と効率化に寄与していると考えられている。本研究において、LETM1と呼ばれるミトコンドリア内膜タンパク質がクリステ構造の形成を担うと予想し、遺伝子の過剰発現や発現抑制に加えて機能変異の同定と解析により、LETM1 機能とクリステ構造形成の強い関連性を示した(*45,123,176,238)。さらに、精製した LETM1 タンパク質と人工リポソームを用いた in vitro 膜陥入構造再構成系により、LETM1 だけで膜陥入構造が形成され、その陥入構造が LETM1 機能変異により減少することを明らかにした(*177)。この結果は、LETM1 がクリステ構造の構造タンパク質であることを示しており、細胞が分化に伴い多機能化し、必要となった莫大なエネルギー源を賄うためにミトコンドリア機能の効率を高めるために獲得したタンパク質だと推察できる。

真核細胞には百個以上のミトコンドリアが存在するが、障害を受けたミトコンドリアを積極的に排除することで、その機能を一定に保つ品質管理機構が知られている。これは、真核細胞が均一なオルガネラを維持・管理することで、オルガネラ機能をいつでも最大限に引き出すための機構だと考えられる。家族性パーキンソン病の原因遺伝子産物である PINK1 と Parkin はミトコンドリア品質管理の中心的な役割を果たす。私達は、PINK1 が障害ミトコンドリア上で自己リン酸化に伴い複合体を形成して活性化することを見出した(*5,22)。また、環状 AMP(cAMP)の細胞内濃度によりミトコンドリア排除機構を制御することで、ミトコンドリア品質管理の時空間的な調整が可能となることを明らかにした(*59,60,241,265,287,315,342,343)。さらに、PINK1 が活性化し続けることでプロテアソーム依存性細胞死を引き起こし、障害ミトコンドリアを細胞ごと排除する機構が存在することも見出した(*58,315)。これらの機構により生物個体は細胞と組織の両レベルで高品質なオルガネラ機能を積極的に維持することが可能となり、真核細胞システムの高度化を大きく推し進めたと考えられる。

(B-2)「始原生殖細胞の分化に重要な母性 mRNA 翻訳におけるミトコンドリアの機能」:始原生殖細胞(PGC)には、ミトコンドリアと細胞質因子を含む生殖細胞質が存在する。これまでの研究により、細胞質因子が PGC 形成に重要な役割を果たすことが明らかになっているが、ミトコンドリアの役割については不明のままである。本研究ではアフリカツメガエルを実験モデルとして、PGC 形成におけるミトコンドリアの役割を解析した。生殖細胞質に含まれる細胞質因子を調べた結果、アフリカツメガエルにおいても哺乳動物と同様に Oct60 と Xpat2 が母性因子として生殖細胞質に含まれることがわかった(*6,85,103,145,148)。PGC 形成過程におけるミトコンドリアの挙動を調べた結果、植物極表層に広がったミトコンドリアは卵割とともに再集合し、胞胚期の植物極近傍に複数の凝集塊を形成することがわかった。このミトコンドリアの再集合と重なるように Oct60、Xpat2 を含む生殖細胞質の凝集が認められた(*85)。Miro1 の欠損型分子 Miro1 ΔC を発現させてミトコンドリアの凝集阻害を誘導したところ、生殖細胞質の植物極への凝集も阻害されることがわかった(*61,252,325)。PGC 前駆細胞を単離・培養して、細胞内部におけるミトコンドリアの移動を解析した結果、Miro1 ΔC によりミトコンドリアと生殖細胞質の核への移動が阻害されることがわかった(*61, 277,290,325)。生殖細胞質はミトコンドリア凝集塊と同じ局在を示す。そこで、ミトコンドリアと生殖細胞質を物理的に結合する機構を調べるために、生殖系列特異的なタンパク質である GASZ を解析した。GASZ 遺伝子の全長を過剰発現させたところ、異所的なミトコンドリアの凝集塊が核近傍で観察された(*346)。このミトコンドリア凝集塊には多くの微小管が結合していた。GASZ の様々な欠損コンストラクトを作製して強制発現させ、ミトコンドリアの局在、生殖細胞質の局在に及ぼす影響を解析した。その結果、ミトコンドリアと生殖細胞質の細胞内凝集には GASZ タンパク質の SAM ドメインと MLS 配列が必須であることがわかった(*346)。欠損型分子を発現させて GASZ の機能阻害を行った個体では生殖隆起へ到達する PGC の数が有意に減少した。以上の結果より、ミトコンドリアは PGC 形成に必須の細胞質因子を集めて特定の細胞の核まで運搬するという重要な役割を果たすことが示唆された。

(B-3)「接着細胞におけるミトコンドリアを中心としたアポトーシス誘導シグナルの制御」:細胞質型チロシンホスファターゼの一つである PTP-PEST (PTPN12)をノックアウトさせた PTPN12-/- MEF 細胞(KO MEF 細胞)と、この KO MEF 細胞に wild type (WT) PTP-PEST を発現させた細胞 (WT MEF 細胞)について、非接着状態におけるアポトーシスの誘導を Caspase 3 の活性化を指標として検討した。その結果、WT MEF 細胞では非接着状態において Caspase 3 の活性化が見られ、アポトーシスが誘導されていることが分かった。しかし、KO MEF 細胞では、非接着において Caspase 3 の活性化が WT MEF 細胞に比べ抑制されていた。これらの結果は、足場を失った細胞でのアポトーシス誘導 (アノイキス)の制御に PTP-PEST が正の制御因子として関与していることを示している。KO MEF 細胞と WT MEF 細胞のアノイキス誘導とアポトーシス誘導剤であるスタウロスポリンによるアポトーシス誘導が同じであったことから、スタウロスポリンによるアポトーシス誘導における PTP-PEST の機能について研究を進めた。PTP-PEST の酵素活性を消失させた変異酵素を発現する MEF 細胞(CS MEF 細胞)と、リン酸化を受けて酵素活性が負に制御される 39 番目のセリン残基をアラニン残基に置換した PTP-PEST を発現する MEF 細胞(SA MEF 細胞)を作成し、これらの細胞をスタウロスポリンで処理し、アポトーシス誘導を検討した。スタウロスポリン(1 μM)で 12 時間処理した細胞のアポトーシスを調べたところ、CS MEF 細胞と SA MEF 細胞は WT MEF 細胞に比べて明らかにアポトーシスの誘導が抑制されていた。これらの結果は、T 細胞やマスト細胞と同様に、PTP-PEST によるアポトーシスの制御には、PTP-PEST の酵素活性の有無と酵素活性が 39 番目のセリン残基のリン酸化/脱リン酸化により酵素活性がコントロールされることが重要であることを示す(*38,104,292)。これらの細胞の細胞接着、生存シグナル、ミトコンドリアを中心としたアポトーシス誘導シグナルにおいて、重要な分子である FAK、AKT、Bad の活性化をウエスタンブロッティング法で検討したところ、現在、広く受け入れられている FAK-AKT-Bad 経路によるミトコンドリアを中心としてアポトーシスの制御とは異なった経路を通じて PTP-PEST はアポトーシスやアノイキス誘導を制御している可能性が示唆された(*186,234)。また、アポトーシスの新しい検出方法の開発するために、Caspase 3 認識部位を導入した変異蛍光タンパク質 EGFP を作成した。この変異蛍光タンパク質はアポトーシス誘導細胞で分解を受けて蛍光が減少することを示し、アポトーシス誘導細胞の検出に使えることを示すことができた。

(B-4)「多細胞化に伴う小胞体・ゴルジ体の機能分化の機構」:単細胞から多細胞体へと進化することで、生物の体制は高度に複雑化した。このような複雑化にともなって、細胞小器官、いわゆるオルガネラも多様化などの高次化を果たしたことは想像に難くない。しかし、オルガネラの多様化については研究が著しく遅れているのが現状である。私達は、今まで一様と考えられてきたゴルジ体が、実は多細胞生物では多様化して様々な種類が存在することを見出した(*49)。さらに、このゴルジ体の多様化メカニズムを解析する過程で、私達は、小胞体にも機能的に異なる領域が存在する可能性、すなわち小胞体も多様化している可能性を見出した。本研究では、その可能性について検討した。また、ゴルジ体の多細胞個体における生理機能についても検討し、オルガネラが多細胞生物の高度化をどのように駆動したかについて考察した。

ゴルジ体の主要な機能の1つは糖鎖修飾である(*7,48)。私達は、ゴルジ体において糖鎖修飾のために働く Senju を同定し、そのノックアウトショウジョウバエを作成した。その解析の結果、①Senju は Galactose を含む糖鎖修飾に必須であること、②この Galactose 糖鎖は、非感染時に自然免疫の Toll/TLR 経路を抑制することで、自己免疫疾患や慢性炎症を防いでいること、③一方、感染時には Galactose 糖鎖の量は有意に減少し、そのことが自然免疫を強めていることがわかった。以上の結果として、Galactose 糖鎖は非感染時には免疫系が暴走しないようにブレーキをかけているが、感染時には、その Galactose 糖鎖は減少し、免疫系を強く活性化することを示した。このような糖鎖による免疫系のダイナミックな制御は世界でも初めての発見であった(*49,86,115,116,189,202,208,210,211,270,293,333)。さらに、Toll のリガンドである Spätzle (Spz)を活性化する分子は、Spätzle-processing enzyme(SPE) という酵素だけだと考えられてきたが、SPE 以外に Spz を活性化する酵素の存在を示した(*63)。

次に、小胞体の多様化に着目し、GPI 結合タンパク質である Dally-like protein (Dlp)をモデル系に用い解析を行った。その結果、①dlp mRNA は核近傍の小胞体に局在しているので、Dlp タンパク質はその小胞体で翻訳されていること、②翻訳された Dlp に GPI を付加する酵素複合体 Transamidase complex (TAC)は核膜近傍の小胞体に多く局在していること、③GPI 合成酵素のひとつである PigB は、今までの報告とは異なり、核膜に局在していることを見出した。以上の結果は、核膜近傍の小胞

体で翻訳とそれに続く GPI の付加が行われており、このシステムが効率的なタンパク質合成・修飾を可能にしていることを示唆する(*294,320,334)。

(B-5)「根端分裂組織の幹細胞再生におけるプラスチドの機能」:植物の側根形成は、原生木部道管に接した内鞘細胞の一部が側根創始細胞へと運命決定を受けて開始される。その際、オーキシンがオーキシン応答性転写因子 ARF7・ARF19 を活性化し、その下流にある転写ネットワークが働くことで、内鞘の脱分化、細胞増殖の再開と幹細胞の再生が行われる。しかし、植物特有のオルガネラであるプラスチドと側根形成の関係は不明である。本研究ではプラスチド局在タンパク質である RFC3 の欠損が幹細胞を欠く側根を形成することに注目し、その機能と側根形成に至る遺伝子発現制御機構の解明を目的とした。RFC3 は原核型リボソームタンパク質 S6 ファミリーに属し、β/γプロテオバクテリアの S6 と最も近縁であり、実際にリボソーム画分に存在すること、野生型に対する原核型翻訳阻害剤処理は rfc3 変異株と同様の表現型を導くこと、rfc3 変異株において 18S 23S rRNA 量が激減することから、RFC3 タンパク質はリボソームの生合成、あるいは、翻訳に関与することが示唆された(*200,223,257,308)。また、rfc3 変異株の抑圧変異株の解析から、原因遺伝子候補としてプラスチド内で遺伝子発現制御に関わる因子が見出された。さらに rfc3 変異株では、根端分裂組織の形成に重要な3つの転写因子遺伝子、WOX5, PLT3, PLT7 の異所発現や過剰発現が生じており、異常な側根形成の一因となることが示唆された(*257)。野生型では RFC3 遺伝子は根の様々な組織で発現するが、とりわけ、原生木部道管に接した内鞘細胞での発現が重要なことが明らかになった。~~一方、予想外の成果として、h~~これらを総合すると、プラスチド内の翻訳異常により、プラスチドから何らかのシグナルが発せられ、それがプラスチド間、プラスチドと核、細胞間といった様々なレベルでの制御を行うと考えられる。今回得られた成果は、既知のオーキシン依存性の側根制御系とは異なる、全く新しい制御系の存在を示す。また、翻訳というプラスチド内の機構が、細胞内・細胞間で様々な現象と連動しつつ側根形成を制御する可能性が示唆され、オルガネラによる真核細胞システムの高度化の一端が明らかになった。

(B-6)「オルガネラ DNA の維持機構の母性遺伝における機能」:葉緑体はかつて独立した細菌が真核生物の祖先と共生関係を確立することで誕生した。その進化的背景を反映するように、葉緑体には独自の進化を遂げた DNA(葉緑体 DNA)、染色体構造(葉緑体核様体)とその遺伝子発現系を有している。本研究の結果、葉緑体 DNA の染色体構造(核様体)とその遺伝、遺伝子発現機構の進化について以下の点を明らかにした。母性遺伝の分子機構:葉緑体 DNA は多くの植物において母性遺伝するが、その分子機構は未知である。本研究では、葉緑体母性遺伝変異体 bp31 の単離に成功し、その解析を通して葉緑体母性遺伝のマスターレギュレーターとしてホメオボックス遺伝子 Gamete Specific 1 (GSP1)の同定に成功した(*14)。葉緑体ゲノムの細胞核移行:葉緑体ゲノムは植物の進化の過程でその大部分が細胞核に移行した。しかし基部陸上植物ゼニゴケにおいては、クロロフィル合成の経路を代謝する酵素が重複して細胞核と葉緑体ゲノムにコードされている。葉緑体ゲノムに取り残された“化石”と思われた chlB 遺伝子を破壊してその機能解析を行ったところ、それが未だに暗所適応において機能していることが分かった(*34)。葉緑体遺伝子発現を司るシグマ因子の進化:シグマ因子は細胞核にコードされ、葉緑体コードの原核生物型 RNA ポリメラーゼを制御する。被子植物シロイヌナズナでは SIG1-6 まで 6 種類が同定されているが、我々は基部陸上植物ゼニゴケにおいて SIG1 破壊株の単離に成功し、その機能分化過程を明らかにした(*33)。葉緑体核様体の進化:葉緑体核様体は、藻類から陸上植物に至るまで、普遍的に観察される。しかしそれを構成するタンパク質因子は多様であり、植物の進化に伴って原核型から真核型因子へと変遷してきたことを示した(*53,65)。また葉緑体核様体は静的な存在ではなく、その挙動は分化過程や細胞分裂においてダイナミックであるが、こうした核様体の形の“動き”を可能とする機構はわかっていなかった。本研究では、RECA の過剰発現や発現抑制により葉緑体核様体の形状が大きく変化することを明らかにした(*66)。

＜優れた成果が上がった点＞

(A) オルガネラの誕生と維持機構の解明

(A-1)多様な葉緑体移行シグナルに対する葉緑体タンパク質移行装置による認識は、比較的弱い相互作用に基づいている可能性を示した。

(A-2)RECG が RECA1 と同様にオルガネラゲノムの安定性維持に関わっていることから、RECA1 や RECG が関わる相同組換え修復経路が、オルガネラゲノム安定性維持に大きく寄与することを示し

た。また RECA, RECG, MSH1 がそれぞれ葉緑体とミトコンドリア両方で同様の役割を担っており、起源の異なる葉緑体とミトコンドリアにおけるゲノム安定性維持機構の共通性が示された。次世代シークエンシングによる解析では、初めてオルガネラゲノムにおける異常な組換え体を網羅的に同定した。
(A-3) 葉緑体特異的リボソームタンパク質 PSRP1 のリボソームとの結合が翻訳活性の低下を招くこと、リボソームとの結合様式が細胞の増殖能や外的ストレスにより変化することを示した。PSRP1 の転写が分化の初期段階の細胞で高いことを見出し、細胞分化における PSRP1 の関与を示唆した。PSRP1 の枯草菌ホモログである YvyD がリボソームの2量体化に必須であり、胞子形成期に活性化される σH により転写されることを示し、胞子形成とリボソームの2量体化との関連を示唆した。
(A-4) 出芽酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素の δサブユニットおよび δε複合体の調製に成功し、δ、εサブユニットの機能解析を進めた結果、出芽酵母の δサブユニットは、構造としてはバクテリア型の活性調節に必要な領域を持っていながらも、活性調節能は失っていることを示した。
(A-5)高水圧下に適応した深海微生物の酵素の耐圧性は、深海酵素中の分子内間隙の大きさに相関があることを解明して、その構造の可塑性に起因すること、また IPMDH 酵素では活性中心裏側のくぼみ部分に位置するたったひとつのアミノ酸の性質により耐圧性が規定されることを明らかにした。
(A-6)大腸菌細胞における葉緑体分裂装置の再構成実験系を構築し、これを用いて、葉緑体分裂面で分裂環を形成する FtsZ に膜標的配列を付加することにより、大腸菌内で分裂環が形成されることを示した。この知見は、FtsZ は膜に局在すれば、他のタンパク質無しに、分裂環を作ることを示す。また、同実験系において ARC6 を発現させると、ARC6 依存的に分裂環が形成されたことから、ARC6 は FtsZ を膜にアンカーさせ分裂環の形成に重要な役割を果たすタンパク質であることを示した。
(A-7)大腸菌ゲノム複製サイクルの試験管内再構成系により、マウス由来のミトコンドリア環状ゲノムの試験管内での丸ごとの増幅に成功した。さらにトランスポゾンを用いることで、極微量の試料からでも、簡便な操作のみで、環状 DNA に大腸菌ゲノム複製起点 oriC を導入し、その増幅を可能とする新技術を開発した。これらの成果はオルガネラゲノム操作の分野で有用なツールを提供する。

(B) 多細胞体制を支えるオルガネラの新機能の解明

(B-1)家族性パーキンソン病の原因遺伝子の一つである PINK1 が自己リン酸化に伴い PINK1 複合体を形成して、ユビキチンガーゼである Parkin を障害ミトコンドリアに標的化させることを明らかにした。さらに、この過程には cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素(PKA)がミトコンドリア内膜タンパク質 MIC60 をリン酸化することで PINK1 を障害ミトコンドリアに蓄積できないようにする制御機構が存在することを見出した。これにより、細胞内での様々な膜電位状態のミトコンドリアの中から障害ミトコンドリアだけを選択的に分解する機構の存在を示唆した。
(B-2)生殖細胞質中に豊富に含まれるミトコンドリアは PGC に十分なエネルギーを供給するために存在するものと考えられてきた。しかし本研究により、ミトコンドリアが GASZ と Miro1 を使って生殖細胞質を運搬し、PGC 形成に積極的な役割を果たす機構が明らかになった。ミトコンドリアが生殖細胞質の運搬役を演じることを示したのは本研究が初めてである。この分子機構はミトコンドリアが母性遺伝を示す仕組みの一端を明らかにした点においても優れた研究成果である。
(B-3)細胞質型のチロシンホスファターゼの PTP-PEST がアノイキス誘導およびスタウロスポリンによるアポトーシス誘導シグナルを制御に制御する分子であることに加え、PTP-PEST によるアポトーシス誘導シグナルの制御には、Ser39 のリン酸化/脱リン酸化による酵素活性の制御が重要である可能性を示した。また、FAK-AKT-Bad 経路を介さないアポトーシス制御機構の存在の可能性を示した。
(B-4)ゴルジ体の新しい生理機能として、「感染・非感染時に応じた自然免疫の動的調節」を明らかにした。非感染時の免疫システムの暴走は自己免疫疾患や慢性炎症を引き起こす一方、感染時に免疫システムが十分に活性化しなければ感染症で個体は死にいたってしまう。デリケートな免疫システムを感染・非感染時に応じて最適に保つ機能は、多細胞生物が複雑な体制へと進化するために必須であったに違いない。本成果は、オルガネラ機能の高度化が生物の進化を駆動した例ということができる。また、ゴルジ体の機能分化に加え、粗面小胞体上にも機能的に異なる領域が存在すること、核膜・小胞体・ゴルジ体が相互連関することによって効率的な翻訳後修飾を行っていることを見出した。これらは、オルガネラの高度化の一例として非常に興味深い発見である。
(B-5)プラスチドでの翻訳異常が核コードの発生制御遺伝子の発現に干渉することを示した。この結果は、根においてもレトログレードシグナリングが働き、しかもそれは側根形成を制御する新たな経路である可能性を示唆する。また、rfc3 変異は原形質連絡の開度の減少やプラスチド塊の形成を導くこ

とも示した。プラスチド内の正常な翻訳がプラスチド間、プラスチドと核、細胞間といった様々なレベルでの制御と密接な関わりを持つことで、真核細胞システムの高度化に貢献したと考えられる。
(B-6)葉緑体 DNA の母性遺伝のマスターレギュレーターの同定に成功した。また、藻類からシャジクモ、ゼニゴケ、被子植物に至る様々なモデル植物を対象とした葉緑体核様体構造進化過程に関する解析から、葉緑体核様体の動的挙動の制御因子を解明できた。

＜課題となった点＞
本研究計画の遂行において、明らかとなった課題点は以下の通りである。
(A-1)葉緑体移行シグナルの獲得の再現実験において、マーカー遺伝子として用いた遺伝子が予想外にサイレンシングを受けてしまい、シグナル獲得の再現に至らなかった。
(A-2) RECA や RECG が反復配列間の組換えを抑制するメカニズムの解明が課題である。
(A-3)PSRP1 遺伝子の発現の特徴等は判明したので、PSRP1 の生理的意義の解明が課題である。
(A-4) 活性のある出芽酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素の $\alpha_3\beta_3\gamma$複合体の調製が課題である。
(A-5) フリーリビングの絶対好圧性細菌の IPMDH 酵素の構造と比較するための深海生物の共生細菌の IPMDH 酵素を活性型として産生させることが課題である。
(B-2) GASZ の SAMドメインがどの様な分子と直接的な結合を示すのか、また核周辺へ移動した後の段階で、ミトコンドリアと生殖細胞質の連結が解除される機構の解明について、さらに研究を進める必要がある。
(B-3) PTP-PEST によるアポトーシス誘導のシグナル経路の制御機構は、よく知られている FAK-AKT-Bad 経路でない可能性を示したが、その機構の実体の解明までには至らなかった。
(B-4)多様な小胞体やゴルジ体が形成される分子機構の解析を進め、オルガネラの多様化の生理的意義について明らかにすることが今後の課題である。
(B-5) 正常な側根形成に重要な *RFC3* の発現部位をより詳細に特定する必要がある。また、原形質連絡やプラスチド塊に関する表現型が側根形成異常の原因となるのか、加えて、RFC3 のタンパク質としての機能についてもさらなる解析の必要がある。
(B-6) 葉緑体母性遺伝については、その制御因子を明らかにすることはできたが、実際のメカニズムの解明には至らなかった。また葉緑体核様体の構造制御因子として、葉緑体 DNA のトポロジー以外の因子についての解析は不十分であり、今後の課題である。
上記の課題点を解明、解決するためには、今後も継続してさらに研究を展開する必要がある。具体的な対応については、＜研究期間終了後の展望＞に示す。

＜自己評価の実施結果と対応状況＞
各年度末に研究成果報告会を開き、各研究課題の研究進捗状況をメンバー間で共有し、各課題相互の討論を行い、課題間の交流、相互評価を図った。計画通りに進捗している課題に関しては、論文発表までの道筋を確認するとともに、新たな展開の可能性について議論する一方、計画通りに進んでいない課題に関しては、様々な角度から問題点を検討し、進捗の改善を図った。予算の配分に関しては運営委員会が各メンバーの研究成果等にもとづいて判断し、研究の進展に必要な機器備品（卓上走査型電子顕微鏡、ルミノイメージアナライザー等）の整備を重点的に行った。3年次の研究進捗状況報告と5年次の研究成果報告書については、大学の部長会及び全学研究助成委員会に報告し、チェックを受けた。5年間を総括すると、両グループともおおよそ計画通りに研究が進捗し、ほぼ順調に成果をあげたと評価したが、課題毎に見ると達成度に差があったことは否めない。

＜外部（第三者）評価の実施結果と対応状況＞
平成 28 年 7 月に、オルガネラ研究で優れた業績をあげている吉田賢右氏（京都産業大学 シニアリサーチフェロー）、米田悦啓氏（医薬基盤・健康・栄養研究所 理事長）の 2 名の外部研究者に詳細な研究成果報告書等の書面を提出し、それに基づく外部評価を受けた。「ほぼ過不足のない成果をあげた」、「オルガネラを視点に、様々な生命現象を捉えるというユニークなアプローチから得られた研究成果」「本研究拠点ならではの成果と言え、高く評価できる」、との評価を受けるとともに、今後の方向性についても示唆に富んだ助言を受けたので、プロジェクト終了後の研究活動に活かしたい。

＜研究期間終了後の展望＞
本プロジェクト終了後もすべての研究を継続し、これまでに得られた成果を基盤に、生体構成分子―オルガネラ―細胞―組織・器官という階層的システム間の相互作用から生命現象を理解する分子細胞生物学の研究をさらに発展させていく。具体的には、研究課題毎に下述のような研究の展開を目指す。
(A-1) psbO をマーカー遺伝子とした進化実験により、葉緑体移行シグナルの獲得を再現する。
(A-2) 形質転換が可能なヒメツリガネゴケ葉緑体のゲノム改変により葉緑体ゲノムに人工的な相同配列導入し、RECA 等の因子による組換え抑制のメカニズム解明に挑む。
(A-3)PSRP1 破壊株の解析により、植物における PSRP1 の機能の生物学的意義の解明を目指す。
(A-4)出芽酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素 $\alpha\beta\gamma\delta\varepsilon$複合体を調製し、$\delta$、$\varepsilon$サブユニットの働きを明らかにする。
(A-5) 深海生物における共生細菌は、フリーリビング微生物から細胞内共生してオルガネラ化していく、細胞進化の途上に位置することが推定されている。今後、深海生物で発現し機能している蛋白質を詳細に調べ、その活性と構造との相関に関する知見を増やすことにより、オルガネラ化に伴うタンパク質の活性や構造の適応現象の原理の理解を目指す。
(A-6) 本研究で構築した葉緑体分裂装置の再構成系を用いて、機能未知因子の葉緑体分裂における機能を明らかにする。
(A-7) ミトコンドリアゲノム操作法の進んだ酵母をモデルとして、本成果技術によって試験管内人工増幅されたオルガネラゲノムの細胞への移植実験を進める。これにより不妊をはじめとする、ヒトのミトコンドリア関連疾患治療法の開発へとつなげていきたい。
(B-1) 本研究の成果をもとにミトコンドリアの形態制御と機能調節の分子メカニズムの解明を目指す。
(B-2) GASZ は PGC 形成とミトコンドリアの母性遺伝を理解するための鍵となる分子である。多様な生物種の間で GASZ 遺伝子の比較を行うことにより、ミトコンドリアが真核生物の細胞内において高次機能を獲得してきた進化過程を探る。
(B-3) PTP-PEST によるアポトーシス誘導の制御機構の解明を進め、ミトコンドリアを中心とする複雑かつ厳密に制御されているアポトーシス誘導システムの全体像の解明に寄与していく。
(B-4) 多様な小胞体やゴルジ体が形成されず一様なオルガネラになった場合、どのような異常が生じるかを調べることにより、オルガネラの多様化の生理的意義を明らかにする
(B-5) 本研究で蓄積したツールを活用し、RFC3 の生化学的機能の解析や、レトログレードシグナリングによる側根形成制御機構の解析を進め、*rfc3* の抑圧変異株の大規模収集と合わせ、側根形成の新たな制御系の全容を明らかにしていく。
(B-6)葉緑体 DNA の複製・修復機構や葉緑体母性遺伝の機構の解明を目指し、変異体解析を行う。

＜研究成果の副次的効果＞
(A-5)タンパク質の耐圧性がわずか１残基の変異で制御可能であることを示すことができたので、この知見は、耐圧性酵素の創生等のタンパク質工学に応用可能であると考えられる。
(B-1) 本研究により明らかになった細胞内 cAMP による時空間的なミトコンドリア品質管理機構の制御機構は、ミトコンドリア品質管理の低下に伴って起きると推定される後天性パーキンソン病の病態発症メカニズムを考える手がかりとなることが期待できる。
(B-2)ミトコンドリア病では、核 DNA とは別の治療技術が必要である。本研究で用いた Miro1 と GASZ は、ミトコンドリア再生のための分子ツールとしての利用が考えられる。
(B-3)本研究で開発した、変異 EGFP を用いたアポトーシス誘導を容易に蛍光観察や測定できるアッセイ系は、アポトーシス誘導細胞の簡便かつ高感度の検出法として利用が見込める。
(B-4)本研究により明らかになった Galactose を含む糖鎖修飾の自然免疫制御における重要性に関する知見は Galactose 糖鎖を利用した自然免疫システムを制御する薬剤の開発の礎の１つになろう。
(B-5) 有用植物を活用する上で組織培養は重要な技術であるが、カルスからの器官再生が困難である場合がある。本研究で得られた側根形成に関する知見はこの問題を改善する糸口となろう。
(B-6) 葉緑体核様体の構造や遺伝の制御において、葉緑体 DNA の複製や修復機構が重要であることを見出した。これらをさらに発展させれば、葉緑体 DNA の複製や修復を増強し、強光などのストレスに強い植物の作出につながる可能性がある。

12　キーワード（当該研究内容をよく表していると思われるものを8項目以内で記載。）

（1）　オルガネラ　　（2）　ミトコンドリア　　（3）　葉緑体（プラスチド）

（4）　ゴルジ体　　（5）　小胞体　　（6）　リボソーム

（7）　多細胞化　　（8）

13　研究発表の状況（研究論文等公表状況。印刷中も含む。）

上記、11(4)に記載した研究成果に対応するものには＊を付すこと。

＜雑誌論文＞

＊1. Expression of a small (p)ppGpp synthetase, YwaC, in the (p)ppGpp(0) mutant of Bacillus subtilis triggers YvyD-dependent dimerization of ribosome.
Tagami, K., Nanamiya, H., Kazo, Y., Maehashi, M., Suzuki, S., Namba, E., Hoshiya, M., Hanai, R., Tozawa, Y., Morimoto, T., Ogasawara, N., Kageyama, Y., Ara, K., Ozaki, K., Yoshida, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., Ohashi Y. and **Kawamura, F.**
Microbiology Open (2012) **1**, 115-134. （査読有）

＊2. Inactivation of ribosomal protein genes in Bacillus subtilis reveals importance of each ribosomal protein for cell proliferation and cell differentiation.
Akanuma, G., Nanamiya, H., Natori, Y., Yano, K., Suzuki, S., Omata, S., Ishizuka, M., **Sekine, Y.** and **Kawamura, F**.
J. Bacteriol. (2012)**194**, 6282-6291. （査読有）

3. High-pressure- induced water penetration into 3-isopropylmalate dehydrogenase.
Nagae, T., Kawamura, T., Chavas, L. M. G., Niwa, K., Hasegawa, M., **Kato, C.** and **Watanabe, N.**
Acta Cryst., (2012) **D68,** 300-309. （査読有）

4. Structural analysis of 3-isopropylmalate dehydrogenase from the obligate piezophile *Shewanella benthica* DB21MT-2 and the nonpiezophile *Shewanella oneidensis* MR-1.
Nagae, T., **Kato, C.** and **Watanabe, N.** （査読有）
Acta Cryst., (2012) **F48,** 265-268.

＊5. PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria.
Okatsu, K., **Oka, T**., Iguchi, M., Imamura, K., Kosako, H., Tani, N., Kimura, M., Go, E., Koyano, F., Funayama, M., Shiba-Fukushima, K., Sato, S., Shimizu, H., Fukunaga, Y., Taniguchi, H., Komatsu, M., Hattori, N., Mihara, K., Tanaka, K., and Matsuda, N.
Nat. Commun. (2012) DOI:10.1038/ncomms2016 （査読有）

＊6. Possible regulation of Oct60 transcription by a positive feedback loop in *Xenopus* oocytes.
Morichika, K., Sugimoto, M., Yasuda, K., and **Kinoshita, T**.
Zygote. (2012) , **20**, 1-9. （査読有）

＊7. Cisterna-specific localization of glycosylation-related proteins to the Golgi apparatus.
Yamamoto-Hino, M., Abe, M., Shibano, T., Setoguchi,Y., Awano,W., Ueda.R., Okano,H. and **Goto,S.**
Cell Struct. Funct. (2012) **37**, 55-63. （査読有）

8. Identification of proteasome components required for apical localization of Chaoptin using functional genomics.
Yano, H., Yamamoto-Hino, M., Awano,W., Aoki-Kinoshita,K.F., Tsuda-Sakurai,K., Okano,H. and **Goto,S.** （査読有）
J. Neurogenet. (2012) **26**, 53-63

9. AP-1 clathrin adaptor and CG8538/Aftiphilin are involved in Notch signaling during eye development in *Drosophila melanogaster*.
Kametaka, S., Kametaka,A., Yonekura,S., Haruta,M., Takenoshita,S., **Goto,S.** and Waguri,S. （査読有）
J. Cell Sci. (2012) **125**, 634-648

10. Balanced ubiquitination determines cellular responsiveness to extracellular stimuli.
Mukai, A., Yamamoto-Hino,M., Komada.M., Okano,H. and **Goto,S.** (査読有)
Cellular and Molecular Life Sciences (2012) **69**, 4007-4016

11. Berberine enhances defects in the establishment of leaf polarity in *asymmetric leaves1* and *asymmetric leaves2* of *Arabidopsis thaliana*.
Nakagawa, A., Takahashi, H., Kojima, S., Sato, N., Ohga, K., Cha, B.Y., Woo, J.T., Nagai, K., **Horiguchi, G.**, Tsukaya, H., Machida, Y. and Machida, C.
Plant Mol. Biol. (2012) **79**, 569-581. (査読有)

12. Stable establishment of cotyledon identity during embryogenesis in Arabidopsis by *ANGUSTIFOLIA3* and *HANABA TARANU*.
Kanei, M., **Horiguchi, G.** and Tsukaya, H.
Development (2012) **139**, 2436-2446. (査読有)

13. Ribosomes and translation in plant developmental control.
Horiguchi, G., Van Lijsebettens, M., Candela, H., Micol, J.L. and Tsukaya, H.
Plant Sci. (2012) **191-192**, 24-34. (査読有)

*14. The Gsp1 triggers sexual developmental program including inheritance of cpDNA and mtDNA in *Chlamydomonas reinhardtii.*
Nishimura, Y., Shikanai, Y., Nakamura, S., Kawai-Yamada, M., and Uchimiya, H.
Plant Cell (2012) **24,** 2401-2414. (査読有)

15. 緑藻クラミドモナスから母性遺伝の謎に挑む
西村芳樹
海洋と生物 (2012) **34**, 453-458

*16. Single mutations introduced in the essential ribosomal proteins L3 and S10 cause a sporulation defect in Bacillus subtilis.
Akanuma, G., Suzuki, S., Yano, K., Nanamiya, H., Natori, Y., Namba, E., Watanabe, K., Tagami, K., Takeda, T., Iizuka, Y., Kobayashi, A., Ishizuka, M., Yoshikawa, H. and **Kawamura, F.**
J. Gen. Appl. Microbiol. (2013) **59**, 105-117. (査読有)

17. rRNA (rrn) operon-engineered Bacillus subtilis as a feasible test organism for antibiotic discovery.
Tanaka, Y., Nanamiya, H., Yano, K., Kakugawa, K., **Kawamura, F.** and Ochi, K.
Antimicrob. Agents Chemother. (2013) **57**, 1948-1951. (査読有)

18. Multiple rRNA operons are essential for efficient cell growth and sporulation as well as outgrowth in *Bacillus subtilis*.
Yano, K., Wada, T., Suzuki, S., Tagami, K., Matsumoto, T., Shiwa, Y., Ishige, T., Kawaguchi, Y., Masuda, K., Akanuma, G., Nanamiya, H., Niki, H., Yoshikawa, H. and **Kawamura, F**.
Microbiology (2013) **159**, 2225-2236. (査読有)

*19. εSubunit of *Bacillus subtilis* F_1-ATPase relieves MgADP inhibition
Mizumoto, J., Kikuchi, Y., Nakanishi, Y., Mouri, N., Cai, A., Ohta, T., Haruyama, T. and **Kato-Yamada, Y.**
PLoS ONE (2013) **8**, e73888. (査読有)

20. A mutation in the promoter region of *zipA*, a component of the divisome, suppresses the shape defect of RodZ-deficient cells.
Shiomi, D and Niki, H.
MicrobiologyOpen (2013) **2**, 798-810. (査読有)

21. Fis1 acts as mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that involved in regulation of mitochondrial morphology.
Onoue, K., Jofuku, A., Ban-Ishihara, R., Ishihara, T., Maeda, M., Koshiba, T., Itoh, T., Fukuda, M., Otera, H., **Oka, T.**, Takano, H., Mizushima, N., Mihara, K. and Ishihara, N.
J. Cell Sci. (2013) **126**, 176-185. (査読有)

*22. A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment.
Okatsu, K., Uno, M., Koyano, F., Go, E., Kimura, M., **Oka, T.**, Tanaka, K. and Matsuda, N.

J. Biol. Chem. (2013) **288**, 36372–36384. DOI: 10.1074/jbc.M113.509653. （査読有）

*23. Regulation and physiologic functions of GTPases in mitochondrial fusion and fission in mammals.
Ishihara, N., Otera, H., **Oka, T.**, and Mihara, K.
Antioxid. Redox Signal. (2013) **19**, 389–399. DOI: 10.1089/ars.2012.4830.

24. The structure and development of *Xenopus laevis* cornea.
Hu W., Haamedi N., Lee J., **Kinoshita T.**, and Ohnuma S.
Exptl. Eye Res. (2013) **116**, 109–128. （査読有）

25. ユビキチン化による Frizzled のリソソーム分解を介した Wnt シグナル強度の制御
Daocharad Burana、**後藤聡**、駒田雅之
細胞工学 特集「Wnt 協奏曲」32, 396–400 (2013)

26. *In vivo* RNAi–based screens: studies in model organisms.
Yamamoto–Hino, M. and **Goto,S.**
Genes, (2013) 4, 646–665. （査読有）

27. Class III compensation, represented by KRP2 overexpression, depends on V–ATPase activity in proliferative cells.
Ferjani, A., Ishikawa, K, Asaoka, M., Ishida, M., **Horiguchi, G.**, Maeshima, M. and Tsukaya, H.
Plant Signal Behav. (2013) **8**, e27204. （査読有）

28. Promotion of chloroplast proliferation upon enhanced post–mitotic cell expansion in leaves.
Kawade, K., **Horiguchi, G.**, Ishikawa, N., Yokota Hirai, M., Tsukaya, H.
BMC Plant Biol. (2013) **13**, 143. （査読有）

29. Enhanced Cell Expansion in a KRP2 overexpressor is mediated by increased V–ATPase activity.
Ferjani, A., Ishikawa, K., Asaoka, M., Ishida, M. **Horiguchi, G.**, Maeshima, M., Tsukaya, H.
Plant Cell Physiol. (2013) **54**, 1989–1998. （査読有）

30. ATM–dependent DNA damage response acts as an upstream trigger for compensation in fas1 mutation during Arabidopsis leaf development.
Hisanaga, T., Ferjani, A., **Horiguchi, G.**, Ishikawa, N., Fujikura, U., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H., Ishida, T., Sugimoto, K., Tsukaya, H.
Plant Physiol. (2013) **162**, 831–841. （査読有）

31. ANGUSTIFOLIA3 signaling coordinates proliferation between clonally distinct cells in leaves.
Kawade, K., **Horiguchi, G.**, Usami, T., Yokota Hirai, M., Tsukaya, H.
Curr. Biol. (2013) **23**, 788–792. （査読有）

32. How do 'housekeeping' genes control organogenesis? –Unexpected new findings on the role of housekeeping genes in cell and organ.
Tsukaya, H., Byrne, M.E., **Horiguchi, G.**, Sugiyama, M., Van Lijsebettens and Lenhard, M.
J. Plant Res. (2013) **126**, 3–15. （査読有）

*33. Subfunctionalization of sigma factors during the evolution of land plants based on mutant abalysis of liverwort (*Marchantia polymorpha* L.) *MpSIG1*.
Ueda, M., Takami, T., Peng, L., Ishizaki, K., Kohchi, T., Shikanai, T., and ***Nishimura, Y.**
Genome Biol. Evol. (2013) **5,** 1836–1848. （査読有）

*34. Distribution of the sex–determining gene *MID* and molecular correspondence of mating types within the isogamous genus *Gonium* (*Volvocales, Chlorophyta*).
Hamaji, T., Ferris, P.J., Nishii, I., **Nishimura, Y.**, Nozaki, H.
PLoS One (2013) **8,** e64385. （査読有）

*35. Severe MgADP inhibition of *Bacillus subtilis* F_1–ATPase is not due to the absence of nucleotide binding to the noncatalytic nucleotide binding sites
Ishikawa, T. and **Kato–Yamada, Y.**
PLoS ONE (2014) **9**, e107197. （査読有）

36. Pressure effects on the chimeric 3–isopropyl malate dehydrogenases of the deep–sea piezophilic *Shewanella benthica* and the atmospheric pressure adapted *Shewanella oneidensis.*
Hamajima, Y., Nagae, T., **Watanabe, N.**, kato–Yamada, Y., Imai, T. and **Kato, C.**

Biosci. Biotechnol. Biochem., (2014) **78,** 469-471. (査読有)

37. 細菌形態形成制御機構に関する研究
塩見大輔
日本細菌学雑誌 (2014) **69 (4)**, 557-575

*38. Protein tyrosine phosphatase-PEST (PTP-PEST) regulates mast cell-activating signals in PTP activity-dependent and -independent manners.
Motohashi, S., Koizumi, K., Honda, R., Maruyama, A., Palmer, H. and **Mashima, K.**
Cellular Immunology (2014) **289**, 128-134. (査読有)

39. Nitrogen dioxide regulates organ growth by controlling cell proliferation and enlargement in Arabidopsis.
Takahashi, M., Furuhashi, T., Ishikawa, N., **Horiguchi, G.**, Sakamoto, A., Tsukaya, H., Morikawa, H.
New Phytol. (2014) **201**, 1304-1315. (査読有)

40. *chlB* requirement for Chlorophyll biosynthesis under short photoperiod in *Marchantia polymorpha*.
Ueda, M., Tanaka, A., Sugimoto, K., Shikanai, T., ***Nishimura, Y.**
Genome Biol. Evol. (2014) **6,** 620-628. (査読有)

41. Algae sense exact temperatures: small heat shock proteins are expressed at the survival threshold temperature in *Cyanidioschyzon merolae* and *Chlamydomonas reinhardtii.*
Kobayashi, Y., Harada, N., **Nishimura, Y.**, Saito, T., Nakamura, M., Fujiwara, T., Kuroiwa, T., Misumi, O.
Genome Biol. Evol. (2014) **6,** 2731-2740. (査読有)

*42 Enhanced expression of Bacillus subtilis yaaA can restore both the growth and the sporulation defects caused by mutation of rplB, encoding ribosomal protein L2.
Suzuki S, Tanigawa O, Akanuma G, Nanamiya H, **Kawamura F,** Tagami K, Nomura N, Kawabata T, **Sekine Y**
Microbiology (2014) **160**, 1040-53. (査読有)

*43. RECG maintains plastid and mitochondrial genome stability by suppressing extensive recombination between short dispersed repeats.
Odahara, M., Masuda, Y., Sato, M., Wakazaki, M., Harada, C., Toyooka, K., and **Sekine, Y.**
PLoS Genetics (2015) **11**, e1005080. (査読有)

44. Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment.
Okatsu, K., Kimura, M., **Oka, T.**, Tanaka, K. and Matsuda, N.
J. Cell Sci. (2015) **128**, 964-978. DOI: 10.1242/jcs.161000. (査読有)

*45. ミトコンドア形態異常と疾患
岡敏彦
医学のあゆみ (2015) **254**, 447-451

46. Protocadherin-9 involvement in retinal development in *Xenopus laevis*.
Izuta Y, Taira T, Asayama A, **Kinoshita T**., and Suzuki S.T.
J. Biochem. (2015), **156**, 235-249. (査読有)

47. Pou5f3.2-induced proliferative state of embryonic cells during gastrulation of *Xenopus laevis* embryo.
Nishitani E, Li C, Lee J, Hotta H, Katayama Y, Yamaguchi M, **Kinoshita T**.
Dev. Growth Diff. (2015), **57**,591-600. (査読有)

*48. Phenotype-based clustering of glycosylation-related genes by RNAi-mediated gene silencing.
Yamamoto-Hino, M., Yoshida,H., Ichimiya,T., Sakamura,S., Maeda,M., Kimura,Y., Sasaki,N., Aoki-Kinoshita,K.Y, Kinoshita-Toyoda,A., Toyoda,H., Ueda,R., Nishihara,S., and **Goto,S.**
Genes Cells, (2015) 20 (6), 521-542. (査読有)

*49. Dynamic regulation of innate immune responses in *Drosophila* by Senju-mediated glycosylation.
Yamamoto-Hino, M., Muraoka, M., Kondo, S., Ueda, R., Okano, H. and **Goto, S.**
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2015) 112 (18), 5809-5814. (査読有)

50. A cyan fluorescent reporter expressed from the chloroplast genome of *Marchantia polymorpha*.

Boehm, C., Ueda, M., **Nishimura, Y.**, Shikanai, T., Haseloff, J.
Plant Cell Physiol. (2015) **57,** 291–299. （査読有）

51. Development of Gateway binary vector series with four different selection markers for the liverwort *Marchantia polymorpha*.
Ishizaki, K., Nishihama, R., Ueda, M., Inoue, K., Ishida, S., **Nishimura., Y.**, Shikanai, T., *Kohchi, T.
PLoS One (2015) **10,** e0138876. （査読有）

*52. *RECA* plays a dual role in the maintenance of chloroplast genome stability in *Physcomitrella patens*.
Odahara, M., Inouye, T., **Nishimura, Y.**, ***Sekine, Y**.
Plant J., (2015) **84,** 516–526. （査読有）

*53. Eukaryotic components remodeled chloroplast nucleoid organization during the green plant evolution.
Kobayashi, Y., Takusagawa, M., Harada, N., Fukao, Y., Yamaoka, S., Kohchi, T., Hori, K., Ohta, H., Shikanai, T., ***Nishimura, Y.**
Genome Biol. Evol. (2015) **25,** 1–16. （査読有）

*54. PCR-based Assay for Genome Integrity after Methyl Methanesulfonate Damage in *Physcomitrella patens*.
Odahara, M., Inouye, T., **Nishimura, Y.,** and **Sekine, Y.**
Bio-protocol (2016) **6,** e1954. （査読有）

55. Dynamic interplay between nucleoid segregation and genome integrity in *Chlamydomonas* chloroplasts.
Odahara, M., Kobayashi, Y., Shikanai, T., **Nishimura, Y**.
Plant Physiology (2016) **172**, 2337–2346. （査読有）

56. High affinity nucleotide-binding mutant of the εsubunit of thermophilic F_1-ATPase
Kato-Yamada, Y.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (2016) **469**, 1129–1132. （査読有）

*57. Pressure adaptation of 3-isopropylmalate dehydrogenase from an extremely piezophilic Bacterium is attributed to a single amino acid substitution.
Hamajima, Y., Nagae, T., **Watanabe, N.**, Ohmae, E., Kato-Yamada, Y., and **Kato, C.**
Extremophiles, (2016) **20,** 177–186. （査読有）

*58. Constitutive activation of PINK1 protein leads to proteasome-mediated and non-apoptotic cell death independently of mitochondrial autophagy.
Akabane, S., Matsuzaki, K., Yamashita, S. I., Arai, K., Okatsu, K., Kanki, T., Matsuda, N. and **Oka, T.**
J. Biol. Chem. (2016) **291**, 16162–16174. DOI: 10.1074/jbc.M116.714923. （査読有）

*59. PKA regulates PINK1 stability and Parkin recruitment to damaged mitochondria through phosphorylation of MIC60.
Akabane, S., Uno, M., Tani, N., Shimazaki, S., Ebara, N., Kato, H., Kosako, H. and **Oka, T.**
Mol. Cell (2016) **62**, 371–384. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.03.037. （査読有）

*60. PKA は MIC60 のリン酸化を介して PINK1 と Parkin によるミトコンドリア品質管理を制御する.
赤羽しおり, 岡敏彦
実験医学 (2016) **34**, No.16, 2689–2692.

*61. Mitochondrial trafficking through Rhot1 is involved in the aggregation of germinal granule components during primordial germ cell formation in *Xenopus* embryos.
Tada H, Taira Y, Morichika K, **Kinoshita T**.
Dev. Growth Diff. (2016), **58**,641–650. （査読有）

62. Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*.
Session A, Uno Y, Kwon T(掲載順：73 人中 32 番目 **Kinoshita T**) .
Nature. (2016), **538**,336–343. （査読有）

*63. Spätzle-processing enzyme-independent activation of the Toll pathway in *Drosophila* innate immunity.

Yamamoto-Hino, M. and **Goto, S.**
Cell Struct. Funct., (2016) 41, 55-60. （査読有）

64. Sequence of the Gonium pectorale Mating Locus Reveals a Complex and Dynamic History of Changes in Volvocine Algal Mating Haplotypes.
Hamaji, T., Mogi, Y., Ferris, P.J., Mori, T., Miyagishima, S., Kabeya, Y., **Nishimura, Y.**, Toyoda, A., Noguchi, H., Fujiyama, A., Olson, B.J., Marriage, T.N., Nishii, I., Umen, J.G., Nozaki, H.
G3 (2016) **115,** e026229. （査読有）

*65. C-Terminal Region of Sulfite Reductase Is Important to Localize to Chloroplast Nucleoids in Land Plants.
Kobayashi, Y., Otani, T., Ishibashi, K., Shikanai, T., ***Nishimura, Y.**
Genome Biol. Evol. (2016) **22,** 1459-66. （査読有）

*66. Dynamic interplay between nucleoid segregation and genome integrity in *Chlamydomonas chloroplasts.*
Odahara, M., Kobayashi, Y., Shikanai, T., ***Nishimura, Y.**
Plant Physiol. (2016) 174, 2337-2346. （査読有）

67. 深海微生物の特徴と生産する酵素の高水圧適応メカニズム
加藤 千明
食品と容器 (2016) 第 57 巻第 5 号、pp. 282-288.

*68. MSH1 maintains organelle genome stability and genetically interacts with RECA and RECG in the moss *Physcomitrella patens.*
Odahara, M., Kishita, Y., and **Sekine, Y.**
Plant Journal (2017) in press. （査読有）

69. Overall shapes of the SMC-ScpAB complex are determined by balance between constraint and relaxation of its structural parts
Kamada, K., **Su' etsugu, M.**, Takada, H., Miyata, M. and Hirano, T.
Structure, (2017) 25, 603-616. （査読有）

70. Conservatism and variability of gene expression profiles among homeologous transcription factors in *Xenopus laevis*.
Watanabe M, Yasuoka Y, Mawaribuchi S, Kuretani A, Ito M, Kondo M, Ochi H, Ogino H, Fukui A, Taira M, **Kinoshita T**.
Dev. Biol. (2017), in press. （査読有）

71. High variability of expression profiles of homeologous genes for Wnt, Hh, Notch, and Hippo signaling pathways in *Xenopus laevis*.
Michiue T, Yamamoto T, Yasuoka Y, Goto T, Ikeda T, Nagura K, Nakayama T, Taira M, **Kinoshita T**.
Dev. Biol. (2017), in press. （査読有）

72. Double-stranded RNA-binding protein DRB3 negatively regulates anthocyanin biosynthesis by modulating *PAP1* expression in *Arabidopsis thaliana*.
Sawano, H., Matsuzaki, T., Usui, T., Tabara, M., Fukudome, A., Kanaya, A., Tanoue, D., Hiraguri, A., **Horiguchi, G.**, Ohtani, M., Demura, T., Kozaki, T., Ishii, K., Moriyama, H., Fukuhara, T.
J. Plant Res. (2017) **130**, 45-55. （査読有）

73. リボソームの生合成と植物の発生.
堀口吾朗
生物科学 (2017) 印刷中 （査読有）

74. 深海世界と高圧力下の生命。
加藤千明
高圧力の科学と技術(2017)第 27 巻 第 1 号 （査読有）

*74a. ARC6-mediated Z ring-like structure formation of prokaryote-descended chloroplast FtsZ in *Escherichia coli.*
Irieda, H and **Shiomi, D**.
Scientific Reports (2017) in press. （査読有）

＜図書＞

75. Structure, Function and Formation of Glycans in *Drosophila*.
Yamamoto-Hino, M., Okano, H., Kanie,O. and **Goto,S.**
In "Glycans: Biochemistry, Characterization and Applications." pp.165-188
Mora Montes, H. M. ed.
Nova Science publishers, Inc., NY (2012) (査読有)
76. Microbiology of piezophiles in deep-sea environments.
Kato, C.
In: "Extremophiles: Microbiology and Biotechnology" (Ed. Roberto P. Anitori), Caister Academic Press, Norfolk, UK, (2012) pp. 233-263. (査読有)
77. 深海微生物の圧力耐性機構。
加藤千明
「進化する食品高圧加工技術ー基礎から応用までー」(監修:重松亨、西海理之)第 1 編 基礎編、第 2 章第 4 節 株式会社エヌ・ティー・エス (2013) pp. 65-84。
78. 圧力と生命
加藤千明
「深海と地球の事典」(深海と地球の事典編集委員会編)第 1 章 深海を知る、1-2 節 丸善出版、(2014)pp. 7-16 (査読有)
79. Localization of glycosyl enzymes and nucleotide-sugar transporters in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus.
Yamamoto-Hino, M. and **Goto, S.**
In "***Glycoscience: Biology and Medicine***", Taniguchi, N. et al. ed., SpringerReference, Heidelberg (2014) (査読有)
80. Active digestion of paternal chloroplast DNA in a young zygote of *Chlamydomonas reinhardtii*: the basis for maternal inheritance.
Nishimura, Y.
Atlas in Plant Cell Structure, Chapter 3 (Springer, Heidelberg, Germany) (2014) (査読有)
81.高圧下蛋白質結晶構造解析法による蛋白質構造研究:加圧による 3-isopropylmalate dehydrogenase の水和構造変化の観測と深海微生物由来酵素の圧力適応機構の解明
永江峰幸、濱島裕輝、河村高志、丹羽健、長谷川正、**加藤千明**、**渡邊信久**
高圧バイオサイエンスとバイオテクノロジー(野村一樹、藤澤哲郎、岩橋均 編)、三恵社 (2015) pp. 145-152 (査読有)
82. 【学研まんが, 科学不思議クエスト】ブキミ生物出現、深海からの SOS ! (まんが:高田一郎)。
加藤千明(監修)
学研プラス(2016)
83. ゲノム複製サイクル再構成系とその展望
末次正幸
人工細胞の創製とその応用(植田充美 監修)、シーエムシー出版(2017)172-180
84. The sexual developmental program of *Chlamydomonas reinhardtii*
Nishimura, Y.
Chlamydomonas: Biotechnology and Biomedicine. Part 2 Chapter 22 (Springer, Heidelberg, Germany) (2017) in press, (査読有)

＜学会発表＞

*85. アフリカツメガエルの POU-V 型転写因子 Oct60 タンパク質の局在と機能解析
日本発生生物学会 2012 年度(第 45 回)年会(神戸国際会議場、2012 年 5 月 28-31 日)
高市佳尚、嶋田啓伍、杉浦美紗、久保英夫、森近恵祐、**木下勉**
*86. Novel Roles of Glycosylation in Drosophila Innate Immunity
日本発生・細胞生物学会合同大会・2012 年 5 月 31 日・神戸(ワークショップ(口頭発表)、ポスター発表)
山本(日野)美紀、芝野孝子、粟野若枝、村岡正敏、岡野栄之、**後藤聡**

87. Analysis of copy number effect of the rrn operon in Bacillus subtilis.
The 12th Asian Conference on Transcription. (Jeju Island, Korea, June 6-9, 2012)
Koichi Yano, Tetsuya Wada, Shota Suzuki, Yasuhiro Kawaguchi, Kenta Masuda, Hideaki Nanamiya, Genki Akanuma, **Yasuhiko Sekine**, and **Fujio Kawamura**

88. Construction of 16S rRNA mutants carrying altered RNase sites that are active during spore development.
The 12th Asian Conference on Transcription. (Jeju Island, Korea, June 6-9, 2012)
Eri Namba, Marie Maehashi, Shota Suzuki, Koichi Yano, Kazuya Watanabe, and **Fujio Kawamura**

*89. Expression of the Bacillus subtilis YaaA protein suppresses a mutation of the rplB gene, encoding the L2 ribosomal protein.
The 12th Asian Conference on Transcription. (Jeju Island, Korea, June 6-9, 2012)
Shota Suzuki, Osamu Tanigawa, Naofumi Nomura, Teppei Kawabata, Eri Namba, **Yasuhiko Sekine**, and **Fujio Kawamura**

90. Analysis of rRNA degradation during spore development in Bacillus subtilis. The 12th Asian Conference on Transcription.
The 12th Asian Conference on Transcription. (Jeju Island, Korea, June 6-9, 2012)
Kazuya Watanabe, Marie Maehashi, Koichi Yano, Eri Namba, and **Fujio Kawamura**

91. Gsp1 triggers a sexual developmental program including the cytoplasmic inheritance in *Chlamydomonas reinhardtii*.
15th International conference on the cell & molecular biology of *Chlamydomonas* (Potsdam, Germany, June 5-9, 2012)
Nishimura, Y., Shikanai, T., Nakamura, S., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H.

92.常圧菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 由来 IPMDH への水分子の侵入
日本蛋白質科学会年会(2012 年 6 月 20 日)
永江峰幸、河村高志、Leonard Chavas、丹羽健、長谷川正、**加藤千明**、**渡邊信久**

93.極限環境下の生命から共生・進化。
生命の起源及び進化学会・夏の学校(東京理科大学総合研究機構 **RNA** 科学総合研究センター、野田市、2012 年 7 月 14 日)
加藤千明(招待講演)

*94.RecA ホモログによる葉緑体ゲノム安定性の維持
第 84 回日本遺伝学会年会(福岡、2012 年 9 月 24-26 日)
小田原真樹、井上貴之、**西村芳樹**、**関根靖彦**

95.枯草菌 rRNA 機能の分子遺伝学的解析
日本遺伝学会 第 84 回大会 (九州大学医学部、2012 年 9 月 24-26 日)
矢野晃一, 難波恵理, 関根里恵, 鈴木祥太, 田上和美, **河村富士夫**

96.枯草菌の胞子形成初期における rRNA の分解に関する解析
日本遺伝学会 第 84 回大会 (九州大学医学部、2012 年 9 月 24-26 日)
渡辺和哉, 矢野晃一, 田上和美, 難波恵理, **河村富士夫**

*97. リボソームタンパク質変異による胞子形成欠損株の解析
日本遺伝学会 第 84 回大会 (九州大学医学部、2012 年 9 月 24-26 日)
鈴木祥太, 赤沼元気, 田上和美, 難波恵理, **関根靖彦**, **河村富士夫**

98. 枯草菌の SD 配列改変型リボソームを用いた高発現系の開発
日本遺伝学会 第 84 回大会 (九州大学医学部、2012 年 9 月 24-26 日)
武田拓也, 矢野晃一, 鈴木祥太, 難波恵理, **河村富士夫**

*99. epsilon Subunit suppresses ADP-inhibition of *Bacillus subtilis* F_1-ATPase
17th European Bioenergetics Conference (Freiburg im Breisgau, Germany, September 15-17, 2012)
Mizumoto, J., Kikuchi, Y. and **Kato-Yamada, Y.**

100.Properties of 3-Isopropylmalate dehydrogenase from the deep-sea and non deep-sea *Shewanella* strains.

9th International Congress of Extremophiles (Sevilla, Spain, Sep. 13, 2012)
Hamajima, Y., Nagae, T., **Watanabe, N.**, **Kato, C.**, kato-Yamada, Y. and Imai, T.

101.High-pressure-induced water penetration and pressure adaptation of IPMDH from deep-sea bacteria.
2012 Meeting of the American Crystallographic Association (Boston, USA, Sep. 30, 2012)
Watanabe, N., Nagae, T., Hamajima, Y., Kawamura, T., Chavas, L., Niwa, K., Hasegawa, M. and **Kato, C**.

102.High-pressure-induced water penetration into IPMDH and pressure-adaptation mechanism of the proteins from deep-sea bacteria.
日本生物物理学会年会(2012 年 9 月 23 日)
Nagae, T., Hamajima, Y., Kawamura, T., Niwa, K., Hasegawa, M., **Kato, C.** and **Watanabe, N.**

*103. Oct60 protein is involved in the PGC formation as a germplasm component.
14th International *Xenopus* Conference (France, September 9-11, 2012)
Morichika, K., Shimada, K., Kubo, H., **Kinoshita, T**.

*104. Identification of enzymes that dephosphorylate PTP-PEST Ser-39 in CD3/CD28-mediated Jurkat-T cells.
European Congress of Immunology, Glasgow, Scotland, 5-8 September, 2012
Palmer, H., Maruyama, A. Motohashi, S. and **Mashima, K.**

105. *rpl4d as2* の葉が背軸化する表現型を抑圧する *szk1-D* 変異株の解析
日本植物学会 2012 年度 (第 76 回) 大会(兵庫県立大学、2012 年 9 月 15-17 日)
島田 浩貴、渡辺 達矢、大林 祝、杉山 宗隆、塚谷 裕一、**堀口吾朗**

106. *rpl4d* が示す花序形態異常の解析
日本植物形態学会 2012 年度 (第 24 回) 大会(兵庫県立大学、2012 年 9 月 14 日)
尾内 紀之、塚谷 裕一、**堀口吾朗**

107. 母性遺伝を操る生殖プログラムの構造
日本植物学会第 76 回大会 (兵庫県立大学、2012 年 9 月 15-17 日)
西村芳樹、田中瞳、鹿内利治

108. 単細胞緑藻クラミドモナスにおいて細胞質遺伝は Gsp1 によって制御される
日本植物形態学会第 24 回大会 (兵庫県立大学、2012 年 9 月 14 日)
西村芳樹、田中瞳、鹿内利治

109. RecA ホモログによる葉緑体ゲノム安定性の維持
日本遺伝学会第 84 回大会 (九州大学、2012 年 9 月 24-26 日)
小田原真樹、井上貴之、**西村芳樹**、**関根靖彦**

110. Analysis of the piezophiles' enzymes under pressure conditions.
International Workshop on Deep Sea Microbiology (Shanghai Jiao Tong Univ., Shanghai, China, Oct. 26, 2012)
Kato, C. (Invitation Lecture)

111. Analysis of the enzymes from the deep-sea piezophilic bacteria under pressure conditions.
7th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (Ohtsu, Japan, Oct. 31, 2012)
Kato, C. (Keynote Lecture)

112.The effects of the mutations in 3-isopropylmalate dehydrogenase activity from the non piezophilic *Shewanella* strain, under pressure conditions.
7th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (Ohtsu, Japan, Oct. 31, 2012)
Hamajima, Y., Nagae, T., **Watanabe, N.**, Kato-Yamada, Y., Imai, T. and **Kato, C.**

113.Water penetration and pressure adaptation of 3-isopropylmalate dehydrogenase revealed by high-pressure protein crystallography.
7th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (Ohtsu, Japan, Oct. 31, 2012)

Nagae, T., Hamajima, Y., Kawamura, T., Niwa, K., Hasegawa, M., **Kato, C.** and **Watanabe, N.**

114. 深海における生命と環境。
第 7 回高圧バイオサイエンス国際会議　一般公開講演会。(ピアザ淡海、大津市、2012 年 10 月 28 日)
加藤千明(招待講演)

*115. Novel Roles of Glycosylation in Drosophila Innate Immunity
The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society (IEIIS) meeting, The Homeostatic Inflammation International Symposium, The 18th Japan Endotoxin and Innate Immunity Society meeting and the 11th Japanese Biochemical Society Bio-Frontier Symposium (Tokyo, Japan, October 24, 2012)
Yamamoto-Hino, M., Muraoka, M., Okano, H. and **Goto, S.**

*116.Novel Roles of Glycosylation in Drosophila Innate Immunity
日本ショウジョウバエ研究会・2012 年 10 月 13 日・東京
Miki Yamamoto-Hino, Takako Shibano, Wakae Awano, Masatoshi Muraoka, Hideyuki Okano and **Satoshi Goto**

117.(1) Microbial change at the Japan Trench after 3.11 Tohoku-Pacific ocean earthquake (M9.0).
(2) Analysis of the enzymes from the deep-sea piezophilic bacteria under pressure conditions.
Third Institute of Oceanography, SOA & Key Laboratory of Marine Biogenetic resources, SOA (Xiamen, China, Nov. 13, 2012).
Kato, C. (Invitation Lecture)

118. 加圧による 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素への水分子の侵入: 深海微生物の酵素の圧力適応。
第 53 回高圧討論会(大阪大学会館、2012 年 11 月 9 日)
永江峰幸、濱島裕輝、河村高志、丹羽健、長谷川正、**加藤千明**、**渡邊信久**

119.植物オルガネラゲノム安定性の維持に関わる諸因子
ワークショップ「植物資源の開発と利用」(東京、2012 年 11 月 27 日)
関根靖彦

120.枯草菌 rRNA 機能の分子遺伝学的解析
日本遺伝学会 第 84 回大会 (九州大学医学部、2012 年 9 月 24-26 日)
矢野晃一, 難波恵理, 関根里恵, 鈴木祥太, 田上和美, **河村富士夫**

121.枯草菌の胞子形成初期における rRNA の分解に関する解析
日本遺伝学会 第 84 回大会 (九州大学医学部、2012 年 9 月 24-26 日)
渡辺和哉, 矢野晃一, 田上和美, 難波恵理, **河村富士夫**

122.海由来絶対好圧菌由来のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の耐圧性は1アミノ酸に起因する
極限環境生物学会 2012 年度 (第 13 回) 年会(日本大学文理学部、2012 年 12 月 1、2 日)
濱島裕輝、永江峰幸、**渡邊信久**、牧野龍、山田康之、今井竹夫、**加藤千明**

*123.ミトコンドリア形態とクリステ膜構造の形成機構
第 85 回日本生化学会年会(福岡国際会議場, 2012 年 12 月 14, 15, 16 日)
岡敏彦

124.アフリカツメガエルの成体心臓における組織再生能の解析
日本分子生物学会 2012 年度(第 35 回)年会(マリンメッセ福岡、2012 年 12 月 11-14 日)
山浦貴史、久保英夫、森近恵祐、**木下勉**

125. アフリカツメガエルの成体血液中に存在する Oct60 発現細胞の解析
日本分子生物学会 2012 年度(第 35 回)年会(マリンメッセ福岡、2012 年 12 月 11-14 日)
河野芙巳香、森近恵祐、久保英夫、**木下勉**

126. アフリカツメガエルの後肢指骨形成過程における Oct25 発現細胞の解析
日本分子生物学会 2012 年度(第 35 回)年会(マリンメッセ福岡、2012 年 12 月 11-14 日)
庄子由衣、久保英夫、森近恵祐、**木下勉**

127. アフリカツメガエルの変態期における心臓の組織再構築に関する研究
日本分子生物学会 2012 年度(第 35 回)年会(マリンメッセ福岡、2012 年 12 月 11-14 日)

杉浦美紗、森近恵祐、**木下勉**

128. PKC-interacting cousin of thioredoxin (PICOT)/Grx3 はタンパク質チロシンホスファターゼ PTP-PEST と結合する
日本分子生物学会年会 2012 年度(第 35 回)(福岡国際会議場他、2012 年 12 月 11-14 日)
丸山敦子、本橋智、Helen Palmer、**眞島恵介**

129. 細胞質型タンパク質チロシンホスファターゼ PTP-PEST によるマスト細胞活性化シグナルの制御機構
日本分子生物学会年会 2012 年度(第 35 回) (福岡国際会議場他、2012 年 12 月 11-14 日)
本橋智、丸山敦子、Helen Palmer、**眞島恵介**

130. 母性遺伝の生殖プログラムによる制御
研究会"オルガネラと生殖:細胞質における遺伝情報の次世代への伝達・分配"(遺伝研、2012 年 11 月 30 日)
西村芳樹

*130a. 枯草菌 FoF_1-ATP 合成酵素の機能解析
日本生体エネルギー研究会 第 38 回討論会(岡山大学薬学部、2012 年 12 月 22-24 日)
多賀名智昭、鈴木祥太、河村富士夫、**山田康之**

*130b. 枯草菌 F_1-ATPase の非触媒部位と ADP 阻害の関係性
日本生体エネルギー研究会 第 38 回討論会(岡山大学薬学部、2012 年 12 月 22-24 日)
石川透、**山田康之**

131. RNAseq analysis on UV light-induced disturbance of the uniparental inheritance in *Chlamydomonas reinhardtii*.
2nd Kyoto-Bristol Symposium, Kyoto Univ., Kyoto, Japan, Jan 9-10, 2013, Kyoto, Japan)
Harada, N., Kobayashi, Y., Takusagawa, M., Suzuki, T., Higashiyama, T., Shikanai, T., **Nishimura, Y.**

132. 枯草菌において *rrn* オペロンのコピー数が prophage2 に与える影響の解析
第 7 回日本ゲノム微生物学会年会 (長浜バイオ大学、2013 年 3 月 8-10 日)
矢野 晃一, 和田 哲也, 増田 健太, 安藤 星次郎, 松本 貴嗣, 志波 優, 吉川 博文, **河村 富士夫**

133.枯草菌の antiSD 配列改変型リボソームを用いた大腸菌 *lacZ* 遺伝子高発現系の開発
第 7 回日本ゲノム微生物学会年会 (長浜バイオ大学、2013 年 3 月 8-10 日)
武田 拓也, 矢野 晃一, 鈴木 祥太, 難波 恵理, **河村 富士夫**

*134.枯草菌のダイマーリボソームにおける YvyD の活性部位解析.
第 7 回日本ゲノム微生物学会年会 (長浜バイオ大学、2013 年 3 月 8-10 日)
田上 和美, 小野寺 弘希, 花井 亮, **河村 富士夫**

135.枯草菌における異種微生物 16S rRNA 遺伝子導入株の作製と解析
第 7 回日本ゲノム微生物学会年会 (長浜バイオ大学、2013 年 3 月 8-10 日)
難波 恵理, 鈴木 祥太, 矢野 晃一, **河村 富士夫**

*136.胞子形成部分欠損を示す枯草菌 S10 リボソームタンパク質遺伝子変異体およびそのサプレッサーの単離と解析
第 7 回日本ゲノム微生物学会年会 (長浜バイオ大学、2013 年 3 月 8-10 日)
鈴木祥太, 青木剣人, 難波恵理, **関根靖彦**, **河村富士夫**

*137.RecA ホモログによる葉緑体ゲノム安定性の維持
第 54 回日本植物生理学会年会(岡山、2013 年 3 月 21-23 日)
小田原真樹、井上貴之、**関根靖彦**、**西村芳樹**

*137a トランジットペプチド獲得要因の解明 ～大腸菌内でのトランジットペプチドの不安定性からの予測～
第 54 回日本植物生理学会年会(岡山、2013 年 3 月 21—23 日)
堀孝一、養老瑛美子、 **関根靖彦**

*138.胞子形成欠損を示す枯草菌 S10 リボソームタンパク質遺伝子 *rpsJ* 変異体の単離と解析
日本農芸化学会 2013 年度大会 (東北大学川内北キャンパス、2013 年 3 月 24-28 日)
鈴木祥太, 難波恵理, 矢野晃一, 赤沼元気, 吉川博文, **関根靖彦**, **河村富士夫**

*139.枯草菌の緊縮応答時，定常期，胞子形成期の三期におけるダイマーリボソーム形成
日本農芸化学会 2013 年度大会 （東北大学川内北キャンパス、2013 年 3 月 24-28 日）
田上和美，渡辺和哉，尾崎克也，花井亮，**河村富士夫**
140.枯草菌の胞子形成期においてEndoAがrRNAの分解に関与する
日本農芸化学会 2013 年度大会 （東北大学川内北キャンパス、2013 年 3 月 24-28 日）
渡辺和哉，矢野晃一，田上和美，**河村富士夫**
141.常圧菌由来イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の耐圧性の獲得
日本農芸化学会 2013 年度大会（仙台市、2013 年 3 月 25 日）
濱島裕輝、永江峰幸、**渡邉信久**、牧野龍、山田康之、今井竹夫、**加藤千明**
142. NAC 転写因子の機能欠損による *as2 rpl4d* が示す葉の背軸化の抑制
日本植物生理学会 2012 年度（第 54 回）年会（岡山大学、2013 年 3 月 21-23 日）
堀口吾朗、島田浩貴、渡辺達矢、大林祝、杉山宗隆、塚谷裕一
143.緑藻クラミドモナスの生殖とオルガネラ遺伝をつなぐ遺伝子を探る
第 54 回日本植物生理学会年会（岡山大学、2013 年 3 月 22 日）
西村芳樹、田中瞳、鹿内利治
144. Regulation of red blood cell transition from larval to adult type during anuran metamorphosis, 46th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, (Shimane, May 28-31, 2013)
Yamabuchi, M., Kawaguchi, Y., Matsuda, I., **Kinoshita, T**.
*145. Oct60 is involved in the PGC formation as a germplasm component, 46th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, (Shimane, May 28-31, 2013)
Morichika, K., Shimada, K., Kubo, H., **Kinoshita, T**.
*146. 枯草菌 S10 リボソームタンパク質の解析
第 10 回 21 世紀大腸菌研究会 （静岡県修善寺、2013 年 6 月 20-21 日）
鈴木祥太、赤沼元気、**河村富士夫**、**関根靖彦**
147.深海由来好冷圧性細菌のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵の耐圧性の解明。
第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会（那覇市、2013 年 6 月 1 日）
濱島裕輝、永江峰幸、**渡邉信久**、牧野龍、今井竹夫、山田康之、**加藤千明**
*148. Oct60 is involved in the PGC formation as a germplasm component
17th International Congress of Developmental Biology (Mexico, June 16-20, 2013)
Morichika, K., Shimada, K., Kubo, H., **Kinoshita, T**.
149. 大腸菌形態形成因子複合体内の相互作用から見える RodZ の機能
第 10 回 21 世紀大腸菌研究会（伊豆、2013 年 6 月 20, 21 日）
塩見大輔、桑原友里、仁木宏典
150. 大腸菌形態形成因子 RodZ を中心とした複合体内の相互作用
第 7 回細菌学若手コロッセウム（広島、2013 年 8 月 7-9 日）
塩見大輔、仁木宏典
151. Mutations in a NAC-domain transcription factor gene, *SUZAKU1*, suppress leaf abaxialization caused by the defects of ribosomal proteins.
FASEB Conference: Mechanisms in Plant Development (Vermont, USA, August 11-16, 2013)
Horiguchi, G., Shimada, H., Watanabe, T., Tsukaya, H.
152. *Marchantia* plastid (chloroplast) transformation for the study of endosymbiosis.
12th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, August 18 -22, 2013, Halifax, Canada.
Ueda, M., Tanaka, A., Shikanai, T., **Nishimura, Y**.
153. 葉緑体の遺伝子発現制御と母性遺伝の基幹
植物細胞生物学若手の会 （東京大学、2013 年 8 月 26 日）
西村芳樹
*154. 枯草菌における胞子形成欠損を示す S10 リボソームタンパク質遺伝子変異体(*rpsJ52*)および

そのサプレッサーの解析
2013 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議（筑波、2013 年 9 月 7-8 日）
鈴木祥太、赤沼元気、**河村富士夫**、**関根靖彦**

*155. 枯草菌における S10 リボソームタンパク質遺伝子変異体の解析
第 7 回日本ゲノム微生物学会若手の会（静岡県駿東郡小山町、2013 年 9 月 19-20 日）
鈴木祥太、**河村富士夫**、**関根靖彦**

156.深海由来好冷圧性細菌のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵の耐圧性
第 18 回生物関連高圧研究会シンポジウム（岐阜大学、岐阜市、2013 年 9 月 5-6 日）
濱島裕輝、永江峰幸、**渡邉信久**、牧野龍、今井竹夫、山田康之、**加藤千明**

*157.高圧下結晶構造解析法による深海好圧菌由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の圧力適応機構の解明
第 18 回生物関連高圧研究会シンポジウム（岐阜大学サテライトキャンパス、2013 年 9 月 5 日）
永江峰幸、濱島裕輝、河村高志、丹羽健、長谷川正、**加藤千明**、**渡邉信久**

*158.深海由来好冷圧性細菌のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵の耐圧性は 1 アミノ酸に起因する
第 86 回日本生化学会大会（パシフィコ横浜、横浜市、2013 年 9 月 11 日）
濱島裕輝、永江峰幸、**渡邉信久**、牧野龍、今井竹夫、山田康之、**加藤千明**

159. アフリカツメガエルの心筋再生と心筋前駆細胞の起源について
日本ツメガエル研究集会 第 7 回大会（山口、2013 年 9 月 24 日）
杉浦美紗、山浦貴史、小林愛、森近恵祐、**木下勉**

160. アフリカツメガエルの変態期における成体型心筋形成に関する研究
日本動物学会 第 84 回大会（岡山、2013 年 9 月 26-28 日）
杉浦美紗、森近恵祐、**木下勉**

161. アフリカツメガエルの毛様体辺縁部における細胞の分裂能の解析
日本動物学会 第 84 回大会（岡山、2013 年 9 月 26-28 日）
李宰勲、森近恵祐、**木下勉**

162. アフリカツメガエルの成体型表皮形成における Oct25/91 の役割
日本動物学会 第 84 回大会（岡山、2013 年 9 月 26-28 日）
天川あや、山浦貴史、久保英夫、森近恵祐、**木下勉**

163. シロイヌナズナの器官サイズ異常変異株 *little prince* はミトコンドリア *nad6* mRNA の
エディティング異常を示す
日本植物形態学会 2013 年度（第 25 回）大会（北海道大学、2013 年 9 月 12 日）
石橋幸大、濱田ゆかり、中村崇裕、塚谷裕一、**堀口吾朗**

164. シロイヌナズナの WD40 リピートタンパク質をコードする *OLIGOCELLULA1* は異形葉性を通じて
葉のサイズ制御に関わる
日本植物学会 2013 年度（第 77 回）大会（北海道大学、2013 年 9 月 13-15 日）
篠塚奈々絵、平方智大、藤倉潮、出村拓、塚谷裕一、**堀口吾朗**

165. NAC 型転写因子をコードする *SZK1* 遺伝子の高発現が葉の背腹性に及ぼす効果の解析
日本植物学会 2013 年度（第 77 回）大会（北海道大学、2013 年 9 月 13-15 日）
堀口吾朗、塚谷裕一

166. 葉緑体、ミトコンドリアの遺伝子の機能、次世代への遺伝のしくみ
環境共生生物科学特別講義（山口大学、2013 年 9 月 2-3 日）
西村芳樹

167. 酵母様菌類クリプトコッカスのミトコンドリア母性遺伝機構
日本植物形態学会 25 回大会（北海道大学、2013 年 9 月 12 日）
西村芳樹、鹿内利治、東江昭夫

168. プロテオーム解析から紐解く核様体構造
日本植物形態学会 25 回大会（北海道大学、2013 年 9 月 12 日）
小林優介、田草川真理、原田尚実、深尾陽一朗、鹿内利治、**西村芳樹**

169. RNAseq でみえてきた UV による母性遺伝撹乱の機構
日本植物形態学会 25 回大会（北海道大学、2013 年 9 月 12 日）

原田尚実、小林優介、鈴木孝征、東山哲也、鹿内利治、**西村芳樹**

170. 母性遺伝における片親オルガネラの選択的排除機構
日本植物学会第77回大会（北海道大学、2013 年 9 月 13-15 日）
西村芳樹

171. オルガネラゲノム核様体の構造様式:その蛋白質構成、ダイナミズムに迫る
日本植物学会第77回大会（北海道大学、2013 年 9 月 13-15 日）
小林優介、原田尚実、小田原真樹、深尾陽一朗、鹿内利治、**西村芳樹**

172. 緑藻クラミドモナスを用いた UV 照射によるストレス応答と母性遺伝の撹乱に関する網羅的遺伝子発現解析
日本植物学会第77回大会（北海道大学、2013 年 9 月 13-15 日）
原田尚実、小林優介、鈴木孝征、東山哲也、鹿内利治、**西村芳樹**

173.特殊環境微生物のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵の耐圧性について
特殊環境微生物セミナー（広島大学、東広島市、2013 年 10 月 11 日）
濱島裕輝、永江峰幸、**渡邉信久**、牧野龍、今井竹夫、山田康之、**加藤千明**

*174.高圧下結晶構造解析による深海微生物由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の圧力適応機構の解明
日本結晶学会年会（熊本大学、2013 年 10 月 12 日）
永江峰幸、濱島裕輝、河村高志、丹羽健、長谷川正、**加藤千明**、**渡邉信久**

*175.深海由来好冷好圧性細菌のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の高圧適応
第 14 回極限環境生物学会年会（明治大学、川崎市、2013 年 10 月 26 日）
濱島裕輝、永江峰幸、**渡邉信久**、牧野龍、今井竹夫、山田康之、**加藤千明**

*176. Formation of Cristae Structure in Mammals.
The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria from Molecular Mechanisms to Physiological Functions and Diseases (Okinawa, Japan, October 28- November 1, 2013)
Oka, T.

*177. A direct role of LETM1 protein in the formation of cristae structure.
The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria from Molecular Mechanisms to Physiological Functions and Diseases (Okinawa, Japan, October 28- November 1, 2013)
Matsui, A., Hatano, A., Nakamura, S., Toyoda, A., Miyano, Y. and **Oka, T.**

178.The Devices for Sampling and Isolation of Piezophiles from the Deep-sea Environment, the DEEP BATH system.
Workshop on *In-situ* Enrichment of Marine Microbes, Key lab of Marine Biogenetic Resources, The Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen, China. (Nov. 5-6, 2013)
Kato, C. (Invitation Lecture)

*179. オルガネラゲノム安定性維持機構の解析
第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ（仙台、2013 年 11 月 20-22 日）
小田原真樹、西村芳樹、**関根靖彦**

180. ヒメツリガネゴケ葉緑体で機能する RECA 相同タンパク質の解析
第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ（仙台、2013 年 11 月 20-22 日）
鎌田美奈、井上貴之、**小田原真樹**、**関根靖彦**

181.バクテリア細胞形態の再構成に向けて
「細胞を創る」研究会 6.0（鶴岡、2013 年 11 月 14-15 日）
塩見大輔

182. RNAseq で解く紫外線による母性遺伝撹乱の分子機構
クラミドモナスワークショップ（基礎生物学研究所、2013 年 11 月 29 日）
原田尚実、小林優介、田草川真理、鈴木孝征、東山哲也、鹿内利治、**西村芳樹**

183. クラミドモナスの生殖と母性遺伝、四分子解析
クラミドモナスワークショップ（基礎生物学研究所、2013 年 11 月 29 日）
西村芳樹

184. オルガネラゲノム核様体の構造様式とその分子動態

クラミドモナスワークショップ（基礎生物学研究所、2013 年 11 月 29 日）
小林優介、田草川真理、原田尚実、深尾陽一朗、鹿内利治、**西村芳樹**

185. アフリカツメガエルの変態期における成体型心筋形成に関する研究
日本分子生物学会 2013 年度(第 36 回)大会(兵庫、2013 年 12 月 2-6 日)
杉浦美紗、森近恵祐、**木下勉**

*186. 細胞運動における Protein Tyrosine Phosphatase-PEST (PTP-PEST)の機能解析
日本分子生物学会年会 2013 年度(第 36 回)(神戸国際会議場他、2013 年 12 月 3-6 日)
本夛 礼圭、小泉 夏恋、本橋 智、Palmer Helen、**眞島 恵介**

187. マスト細胞において PTP-PEST の Ser39 は FcεRI の架橋によりリン酸化される
日本分子生物学会年会 2013 年度(第 36 回)(神戸国際会議場ポートピアホール、2013 年 12 月 3-6 日)
本橋智、小泉夏恋、本夛礼圭、Helen Palmer、**眞島恵介**

188. チロシンホスファターゼ PTP-εは脂質ラフトに局在しマスト細胞の活性化シグナルを制御する
日本分子生物学会年会 2013 年度(第 36 回)(神戸国際会議場ポートピアホール、2013 年 12 月 3-6 日)
小泉夏恋、本夛礼圭、本橋智、Helen Palmer、**眞島恵介**

*189.Dynamic regulation of innate immune responses in *Drosophila* by Senju-mediated glycosylation
第 36 回日本分子生物学会年会・2013 年 12 月 4 日・神戸(ワークショップ(口頭発表))
Miki Yamamoto-Hino, Masatoshi Muraoka, Hideyuki Okano, **Satoshi Goto**

190. Requirement of *chlB* (a subunit of DPOR) for chlorophyll synthesis under short photoperiod in liverwort (*Marchantia polymorpha* L.).
Marchantia IV (JSPS Bilateral Program), Dec 8-11, 2013, Melbourne, Australia.
Ueda, M., Tanaka, A., Sugimoto, K., Kohchi, T., Shikanai, T., **Nishimura, Y.**

191. 好熱菌 ATP 合成酵素における条件的脱共役状態の解明
日本生体エネルギー研究会 第 39 回討論会(静岡県コンベンションアーツセンターグランシップ、2013 年 12 月 18-20 日)
福石健太、稲沢悠、**山田康之**

*192. 葉緑体とミトコンドリアのゲノム安定性維持におけるヒメツリガネゴケ MSH1 の役割
第 55 回日本植物生理学会年会(富山、2014 年 3 月 18-20 日)
小田原真樹、木下善仁、勝田小夜子、原田千鶴、**関根靖彦**

*193. 枯草菌の *rplB142* 変異の表現型をサプレスする *yaaA* 遺伝子の解析
第 8 回ゲノム微生物学会年会(東京農業大学、2014 年 3 月 7-9 日)
鈴木祥太、**河村富士夫**、**関根靖彦**

*194. 枯草菌の 2 つの生活環におけるダイマーリボソームの運命
第 8 回ゲノム微生物学会年会(東京農業大学、2014 年 3 月 7-9 日)
田上 和美、前橋真利江、渡辺和哉、**河村富士夫**、**花井亮**

195.高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の耐熱化イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の圧力耐性について。
日本農芸化学会 2014 年度大会、明治大学、川崎市。(2014 年 3 月 28 日)
濱島裕輝、永江峰幸、**渡邊信久**、牧野龍、山田康之、今井竹夫、**加藤千明**

196.Determination of bacterial shape by the supramolecular machinery containing cytoskeletal proteins.
日本細菌学会 2013 年度 (第 87 回) 総会(東京、2014 年 3 月 26-28 日)
塩見大輔

197. オルガネラ形態の機能的意義
第1回生命分子科学研究会(ホテル甘露の森 ニセコ, 2014 年 3 月 17, 18, 19 日)
岡敏彦

198. アフリカツメガエルの変態期における心筋の組織再構築
XCIJ-MA 研究集会 第8回大会(横浜市立大学、2014 年 3 月 16 日)
小林愛、**木下勉**

199. リボソームタンパク質 RPL4D の GFP 標識とその機能性についての解析

日本植物生理学会 2013 年度 (第 55 回) 年会(富山大学、2014 年 3 月 18-20 日)
堀口吾朗、中田未友希、塚谷裕一

*200. 根の発生におけるプラスチドタンパク質 RFC3 の機能解析
日本植物生理学会 2013 年度 (第 55 回) 年会(富山大学、2014 年 3 月 18-20 日)
中田未友希、塚谷裕一、**堀口吾朗**

201.Microbial diversity of the deep-sea piezophilic microorganisms, and their pressure adapted mechanisms.
International Symposium: THINKING BIG ABOUT SMALL BEINGS: RECENT ADVANCES ON MICROBIAL DIVERSITY, ECOLOGY AND BIODISCOVERY, BIOTA+10, Sao Paulo, Brazil. (Apr. 29-30, 2014)
Kato, C. (Invitation Lecture)

*202.糖鎖修飾による自然免疫反応の恒常性維持
平成 26 年度日本生化学会九州支部例会(招待講演)・2014 年 5 月 17- 18 日九州大学(福岡)
山本(日野)美紀、村岡正敏、近藤周、岡野栄之、上田龍、**後藤聡**

203. アカハライモリの個体発生における POU ファミリークラス V 転写因子の発現プロファイルの解析
日本発生生物学会 第 47 回大会(名古屋、2014 年 5 月 27-30 日)
長谷川俊、大谷優樹、**木下勉**

204. アフリカツメガエルの変態期における心筋の組織再構築
日本発生生物学会 第 47 回大会(名古屋、2014 年 5 月 27-30 日)
小林愛、杉浦美紗、**木下勉**

*205. Role of Noncatalytic Sites of *Bacillus subtilis* F_1-ATPase
Tokyo ATPase Workshop (Tokyo, Japan, June 2-3, 2014)
Ishikawa, T. and **Kato-Yamada, Y.**

206.大腸菌の伸長に関わる超分子複合体構成因子間の相互作用解析
第 11 回 21 世紀大腸菌研究会(盛岡、2014 年 6 月 5、6 日)
塩見大輔、桑原友里、仁木宏典

207.MreB による大腸菌の極性決定機構の解析
第 11 回 21 世紀大腸菌研究会(盛岡、2014 年 6 月 5、6 日)
川面拓真、小島広樹、川井裕也、仁木宏典、**塩見大輔**

*208. Dynamic regulation of innate immue responses by Senju-mediated glycosylation in Drosophila
第 11 回 日本ショウジョウバエ研究会・2014 年 6 月 4- 6 日・金沢歌劇座(金沢)
Miki Yamamoto (Hino), Masatoshi Muraoka, Shu Kondo, Hedeyuki Okano, Ryu Ueda, **Satoshi Goto**

209. Deciphering the mechanisms underlying the uniparental inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA.
Gordon Research Conference, Mitochondria and Chloroplast, Lucca (Barga) Italy, July 6-11,2014
Nishimura, Y.

*210.糖鎖修飾による自然免疫反応の恒常性維持
第 66 回日本細胞生物学会・2014 年 6 月 11-13 日・東大寺総合文化センター(奈良)
山本(日野)美紀、村岡正敏、近藤周、岡野栄之、上田龍、**後藤聡**

*211.糖鎖修飾の変化による自然免疫反応のダイナミックな制御
第 25 回日本生体防御学会・2014 年 7 月 9- 11 日・東北大学(仙台)
山本(日野)美紀、村岡正敏、近藤周、岡野栄之、上田龍、**後藤聡**

212.*SUZAKU1*, a NAC-domain transcription factor gene promotes leaf abaxialization in response to *as2*-enhancer mutations.
25th International Conference on Arabidopsis Research (Vancouver, Canada, July 28- August 1, 2014)
Horiguchi, G., Inoue, M., Masuda, H., Nakata, M., Tsukaya, H.

*213. Structural study of the pressure adaptation of proteins from deep-sea bacteria.
XXIII Congress of the International Union of Crystallography, Montreal, Canada. (Aug. 5-12, 2014)
Watanabe, N. (Invitation Lecture)

214. Tissue reconstruction of myocardium during *Xenopus laevis* metamorphosis,
15th International *Xenopus* Conference (USA, August 24-28, 2014)
Kobayashi, M., Sugiura, M., **Kinoshita, T**.

215. Localization of Oct25-expressing cells during develoment and regeneration of hindlimb phalanges in *Xenopus laevis*,
15th International *Xenopus* Conference (USA, August 24-28, 2014)
Lee, J., Shoji, Y., **Kinoshita, T**.

216. Deep-sea enzymes and their structural features to the pressure adaptation.
10th International Congress on Extremophiles, Saint Petersburg, Russia. (Sep. 7-11, 2014)
Kato, C., Hamajima, Y., Nagae, T., **Watanabe, N.** and Kato-Yamada, Y.

*217. Cause of the pressure adaptation of 3-isopropylmalate dehydrogenase from obligatory Piezophile is attributed to just one amino acid substitution.
10th International Congress on Extremophiles, Saint Petersburg, Russia. (Sep. 7-11, 2014)
Hamajima, Y., Nagae, T., Makino, R., **Watanabe**, **N**., Imai, T., Kato-Yamada, Y. and **Kato, C.**

218. 細胞サイズが小型化するシロイヌナズナ *xs1* 変異株の原因遺伝子の同定と解析
日本植物形態学会 2014 年度（第 26 回）大会（明治大学、2014 年 9 月 11 日）
宮田和裕、依藤絵里、中田未友希、塚谷裕一、**堀口吾朗**

219. 葉の細胞数が減少するシロイヌナズナの *oligocellula6* 変異株の解析
日本植物形態学会 2014 年度（第 26 回）大会（明治大学、2014 年 9 月 11 日）
佐藤翔紀、塚谷裕一、**堀口吾朗**

220. シロイヌナズナおよびコケ植物における *AN3*, *GRF*, *SWI2* の分子的機能保存性の検討
日本植物形態学会 2014 年度（第 26 回）大会（明治大学、2014 年 9 月 11 日）
長野夏未、名和美聡、中田未友希、西浜竜一、河内孝之、塚谷裕一、**堀口吾朗**

221. リボソームタンパク質変異体で過剰発現する *SZK1* の解析
日本植物学会 2014 年度（第 78 回）大会（明治大学、2014 年 9 月 12-14 日）
井上幹人、中田未友希、塚谷裕一、**堀口吾朗**

222. 子葉における根の異所形成を抑制する AN3 と HAN の解析
日本植物学会 2014 年度（第 78 回）大会（明治大学、2014 年 9 月 12-14 日）
大池諒、秋間健太、塚谷裕一、**堀口吾朗**

*223. 原核型リボソーム阻害剤がシロイヌナズナの根の発生に与える影響
日本植物学会 2014 年度（第 78 回）大会（明治大学、2014 年 9 月 12-14 日）
中田未友希、塚谷裕一、**堀口吾朗**

224. リボソームタンパク質 RPL4 の質と量が葉の背腹性に及ぼす効果の解析
日本植物学会 2014 年度（第 78 回）大会（明治大学、2014 年 9 月 12-14 日）
増田英典、塚谷裕一、**堀口吾朗**

225. TALEN による遺伝子破壊個体を用いた Oct25 の器官形成における機能の解析
日本動物学会 第 85 回大会（仙台、2014 年 9 月 11-13 日）
李宰勲、佐久間哲史、山本卓、**木下勉**

226. *ATG8* 欠損変異体におけるミトコンドリア母性遺伝
日本植物形態学会第 26 回大会（明治大学、2014 年 9 月 11 日）
西村芳樹、鹿内利治、東江昭夫

227.クラミドモナスの葉緑体局在型 HMG タンパク質の機能解析
日本植物形態学会第 26 回大会（明治大学、2014 年 9 月 11 日）
田草川真理、小林優介、深尾陽一郎、**西村芳樹**、三角修己

228.母性遺伝を引き起こす片親ミトコンドリアの選択的排除機構
日本植物学会第 78 回大会（明治大学、2014 年 9 月 12-14 日）
西村芳樹、鹿内利治、東江昭夫

*229. Pressure adaptation of the deep-sea enzymes and discovery of the high-pressure X-ray systems.
4th International Workshop on Deep Sea Microbiology (DSM), Brest, France. (Sep. 15-17, 2014)

Kato, C., Hamajima, Y., Nagae, T., **Watanabe, N.** and Kato-Yamada, Y. (Invitation Lecture)

230.深海由来好冷好圧細菌のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の耐圧性と律速反応について。
特殊環境微生物セミナー2014、名古屋大学、名古屋市。(2014 年 10 月 1 日)
濱島裕輝, 永江峰幸, **渡邉信久**, 牧野龍, 今井竹夫, 山田康之, **加藤千明**

231.大腸菌はどのようにして極性を制御するか？
平成 26 年度　細菌細胞の増殖と代謝研究会～細菌細胞増殖の多様性～(三島、2014 年 10 月 24-25 日)
塩見大輔

232. マスト細胞におけるチロシンホスファターゼ PTP-εε受容体型アイソフォームは Fc εRI 架橋により誘導され、脂質ラフトに局在して活性化シグナルを制御する
日本生化学会大会 2014 年度(第 87 回)(国立京都国際会館、2014 年 10 月 15-18 日)
小泉夏恋、本夛礼圭、青木佳織、本橋智、Helen Palmer、**眞島恵介**

*234. Protein tyrosine phosphatase-PEST (PTP-PEST)による細胞移動の制御
日本生化学会大会 2014 年度(第 87 回)(国立京都国際会館、2014 年 10 月 15-18 日)
本夛礼圭、小泉夏恋、青木佳織、本橋智、Helen Palmer、**眞島恵介**

235. マスト細胞の Fc εRI 架橋により誘導される ROS 発生を PICOT/Grx3 は制御する
日本生化学会大会 2014 年度(第 87 回)(国立京都国際会館、2014 年 10 月 15-18 日)
青木佳織、小泉夏恋、本夛礼圭、本橋智、Helen Palmer、**眞島恵介**

*236. 葉緑体リボソーム結合タンパク質 PSRP1 の機能解析
第 37 回日本分子生物学会年会(パシフィコ横浜、2014 年 11 月 25-27 日)
鈴木大貴　境俊介　安藤博洲　原田千鶴　長岡敦子　堀孝一　**関根靖彦**

237.極限環境微生物のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の耐圧性
第 15 回極限環境生物学会年会、今帰仁村コミュニティーセンター、沖縄県。(2014 年 11 月 2 日)
濱島裕輝、永江峰幸、**渡邉信久**、牧野龍、今井竹夫、山田康之、**加藤千明**

*238. ミトコンドリア形態とクリステ構造の形成機構
第 25 回フォーラム・イン・ドージン(熊本ホテルキャッスル　熊本, 2014 年 11 月 14 日)
岡敏彦

239. Functional analysis of Oct60 in adult organ formation of *Xenopus laevis*
日本分子生物学会 2014 年度(第 37 回)大会(横浜、2014 年 11 月 25-27 日)
伊東直人、佐久間哲史、山本卓、**木下勉**

240. アフリカツメガエルの側線形成における Oct91 の遺伝子発現と機能の解析
日本分子生物学会　2014 年度(第 37 回)大会(横浜、2014 年 11 月 25-27 日)
天川あや、佐久間哲史、山本卓、**木下勉**

*241. Parkin のミトコンドリア外膜標的化に関わる MICOS 複合体の解析
第 14 回日本ミトコンドリア学会(九州大学百年講堂　福岡, 2014 年 12 月 3-5 日)
宇野碧, **岡敏彦**

242. PINK1/Parkin によるカスパーゼ非依存性細胞死の解析
第 14 回日本ミトコンドリア学会(九州大学百年講堂　福岡, 2014 年 12 月 3-5 日)
松崎航平, 荒井伽奈, 尾勝圭, 松田憲之, **岡敏彦**

243. F_1-ATPase の ATP 結合過程における εサブユニットの役割
日本生体エネルギー研究会　第 40 回討論会(愛媛大学城北キャンパス、2014 年 12 月 11-13 日)
源田真、渡邊力也、**山田康之**、野地博行

245. 枯草菌 F_1-ATPase に於ける DELSEED 領域の機能解析
日本生体エネルギー研究会　第 40 回討論会(愛媛大学城北キャンパス、2014 年 12 月 11-13 日)
高田浩志、**山田康之**

246.バクテリアアクチンによる細胞極性制御
生体運動合同班会議 2015(東京、2015 年 1 月 7-9 日)
塩見大輔

*247. RECX によるオルガネラゲノム安定性の維持
第 56 回日本植物生理学会年会(東京、2015 年 3 月 16-18 日)

小田原真樹、**関根靖彦**

248.膜貫通型タンパク質 RodZ の膜直下配列の重要性の検討

第 9 回日本ゲノム微生物学会（神戸、2015 年 3 月 6-8 日）

塩見大輔、仁木宏典

249.大腸菌が新たに極性を作り出す新奇の機構

2014 年度遺伝研研究会「単細胞の増殖メカニズムの先端的研究」（三島、2015 年 3 月 23-24 日）

塩見大輔

250.バクテリアアクチンによる大腸菌の極性制御

第 88 回日本細菌学会総会（岐阜、2015 年 3 月 25-28 日）

塩見大輔

251. 呼吸器系変換に伴う肺動脈形成について

日本動物学会 第 67 回関東支部大会（早稲田大学、2015 年 3 月 14 日）

古藤舞華、**木下勉**

*252. 始原生殖細胞形成におけるミトコンドリアの役割について

日本動物学会 第 67 回関東支部大会（早稲田大学、2015 年 3 月 14 日）

平裕也、**木下勉**

253. 消化管形成における Oct25 の発現と機能の解析

日本動物学会 第 67 回関東支部大会（早稲田大学、2015 年 3 月 14 日）

李宰勲、佐久間哲史、山本卓、**木下勉**

254. *as2 rpl4d* 背景での葉の裏側化を抑制する変異株の遺伝学および発生学的解析

日本植物生理学会 2014 年度（第 56 回）年会（東京農業大学、2015 年 3 月 16-18 日）

高原正裕、塚谷裕一、**堀口吾朗**

255. シロイヌナズナ OLIGOCELLULA1 による葉サイズ決定機構の解析

日本植物生理学会 2014 年度（第 56 回）年会（東京農業大学、2015 年 3 月 16-18 日）

篠塚奈々絵、平方智大、藤倉潮、出村拓、塚谷裕一、**堀口吾朗**

256. 葉の細胞数が減少するシロイヌナズナの *oligocellula6-D* 変異株の解析

日本植物生理学会 2014 年度（第 56 回）年会（東京農業大学、2015 年 3 月 16-18 日）

佐藤翔紀、塚谷裕一、**堀口吾朗**

*257. 根のプラスチドリボソームの損傷は側根の発生異常を引き起こす

日本植物生理学会 2014 年度（第 56 回）年会（東京農業大学、2015 年 3 月 16-18 日）

中田未友希、塚谷裕一、**堀口吾朗**

258. AN3, HAN, TPL が子葉の属性維持に果たす役割の解析

日本植物生理学会 2014 年度（第 56 回）年会（東京農業大学、2015 年 3 月 16-18 日）

堀口吾朗、大池諒、秋間健太、塚谷裕一

259. AN3, HAN, TPL が子葉の属性維持に果たす役割の解析

日本植物生理学会 2014 年度（第 56 回）年会（東京農業大学、2015 年 3 月 16-18 日）

堀口吾朗、大池諒、秋間健太、塚谷裕一

260.ミトコンドリア片親遺伝をつかさどる複層的分子機構

第 56 回日本植物生理学会年会（東京農業大学、2015 年 3 月 16-18 日）

西村芳樹、鹿内利治、東江昭夫

261. Microbial diversity of the piezophilic microorganisms and the pressure adaptation mechanisms of the deep-sea enzymes.

International Marine Microbiology Conference. Quindao, China. (May 24, 2015)

Kato, C. (Keynote Lecture)

*262. RECG Maintains Mitochondrial and Plastid Genome Stability by Suppressing Extensive Recombination between Short Dispersed Repeats.

9th International Conference for Plant Mitochondrial Biology (Poland, 17-22th May 2015).

Odahara, M., Sato, M., Wakazaki, M., Toyooka, K., and **Sekine, Y**.

263.大腸菌形態形成制御因子 RodZ の細胞内自己相互作用の解析

第 12 回 21 世紀大腸菌研究会（滋賀・琵琶湖グランドホテル）（滋賀、2015 年 6 月 4-5 日）

池邉涼介、桑原友里、仁木宏典、**塩見大輔**

264.Microbial diversity of the deep-sea piezophiles and their molecular mechanisms for pressure adaptation.
HAST-Work Shop, Hadal Science and Technology Research Center, Shanghai, China. (June 9, 2015)
Kato, C. (Invitation Lecture)

*265.MICOS 複合体による PINK1 のミトコンドリア標的化の制御機構
第 67 回日本細胞生物学会(タワーホール船堀　東京, 2015 年 6 月 30 日, 7 月 1- 2 日)
赤羽しおり, 宇野碧, 島崎俊太, **岡敏彦**

266. アフリカツメガエルの血液中における Oct60 発現細胞の解析
日本発生生物学会 第 48 回大会(筑波、2015 年 6 月 3 日)
佐藤伶奈、河野芙巳香、**木下勉**

267. *SUZAKU1*, a NAC-domain transcription factor gene promotes leaf abaxialization in response to *as2*-enhancer mutations in *Arabidopsis thaliana*.
日本発生生物学会 2015 年度 (第 48 回) 大会(つくば国際会議場、2015 年 6 月 2-5 日)
Horiguchi, G., Inoue, M., Masuda, H., Nakata, M., Tsukaya, H.

268. Inhibition of plastid translation disturbs stem-cell pattern of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*.
日本発生生物学会 2015 年度 (第 48 回) 大会(つくば国際会議場、2015 年 6 月 2-5 日)
Nakata, M., Tsukaya, H., **Horiguchi, G.**

269. The genetic and developmental characerization of suppressor mutants of *as2 rpl4d* that produces abaxialized leaves.
日本発生生物学会 2015 年度 (第 48 回) 大会(つくば国際会議場、2015 年 6 月 2-5 日)
Takahara, M., Tsukaya, H., **Horiguchi, G.**

*270.自然免疫を制御する糖転移酵素 Manju の検索
第 34 回日本糖質学会年会(ポスター発表)・2015 年 7 月 31 日-8 月 2 日・東京大学(東京)
加瀬彩和子、山本(日野)美紀、**後藤聡**

271. 葉緑体核様体コア因子の多様性と進化
日本植物学会第 79 回大会(朱鷺メッセ、2015 年 9 月 6 日-8 日)
小林優介、田草川真理、原田尚実、深尾陽一朗、山岡尚平、河内孝之、堀孝一、太田啓之、鹿内利治、**西村芳樹**

272. ミトコンドリア核様体構造からみた母性遺伝の分子機構
日本植物学会第 79 回大会(朱鷺メッセ、2015 年 9 月 6 日-8 日)
西村芳樹、田草川真理、鹿内利治、東江昭夫

273. *as2 rpl4d* で引き起こされる葉の背軸化に必要な *SZK1* の発現解析
日本植物学会 2015 年度 (第 79 回) 大会(朱鷺メッセ、2015 年 9 月 6-8 日)
井上幹人、中田未友希、塚谷裕一、**堀口吾朗**

274. 異なる *rpl4d* および *rpl4a* アリルで蓄積している変異型 mRNA の構造決定とその背腹性制御に及ぼす影響の解析
日本植物学会 2015 年度 (第 79 回) 大会(朱鷺メッセ、2015 年 9 月 6-8 日)
増田英典、塚谷裕一、**堀口吾朗**

275. F_1-ATPase における εサブユニットの活性制御因子としての役割
第 53 回 日本生物物理学会年会(金沢大学角間キャンパス、2015 年 9 月 13-15 日)
Makoto Genda, Rikiya Watanabe, **Yasuyuki Yamada**, Hiroyuki Noji

276. 枯草菌 F_1-ATPase に於ける DELSEED 領域の機能解析
第 53 回 日本生物物理学会年会(金沢大学角間キャンパス、2015 年 9 月 13-15 日)
Koji Takada, **Yasuyuki Kato-Yamada**

*277. アフリカツメガエルの PGC 形成におけるミトコンドリアの役割
日本ツメガエル研究集会 第 9 回大会(秋田、2015 年 9 月 15 日)
多田葉瑠、平裕也、森近恵祐、**木下勉**

278. アカハライモリにおける CpPOU5F3 の同定と遺伝子発現の解析

日本動物学会 第 86 回大会(新潟、2015 年 9 月 17 日)
長谷川俊、**木下勉**

279. アカハライモリの四肢形成における骨形成と遺伝子発現について
日本動物学会 第 86 回大会(新潟、2015 年 9 月 17 日)
中尾一石、高野美玖、**木下勉**

280. 水生及び陸生無尾類における赤血球転換機構の解析
日本動物学会 第 86 回大会(新潟、2015 年 9 月 17 日)
山川菜摘、川口唯、**木下勉**、山口雅裕

281. アフリカツメガエルの心臓形成に関与する細胞の起源
日本動物学会 第 86 回大会(新潟、2015 年 9 月 17 日)
花房玲奈、**木下勉**

282.複製開始・終結・分離サイクルの統合再構成系における環状染色体のふるまい
第 23 回 DNA 複製・組換え修復ワークショップ(広島、2015 年 10 月 19-21 日)
末次正幸、辻本寛子

283.バクテリアの形を決める分子メカニズム
第 98 回日本細菌学会関東支部総会(東京、2015 年 10 月 30 日)
川面拓真、池邉涼介、小島広樹、仁木宏典、**塩見大輔**

284. Enzymatic propagation of large DNA circles
ST CREST-PRESTO joint international symposium (Tokyo, 5-6 Nov. 2015)
Su'etsugu, M

285.大腸菌形態形成制御因子の RodZ の自己相互作用による細胞幅の制御
第 9 回細菌学若手コロッセウム(鹿児島、2015 年 11 月 23-25 日)
池邉涼介、桑原友里、仁木宏典、**塩見大輔**

286. PINK1 の活性化とカスパーゼ非依存性の細胞死
第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会(神戸ポートアイランド, 2015 年 12 月 1- 4 日)
岡敏彦

*287. リン酸化を介した MICOS 複合体による PINK1 の活性化の制御機構
第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会(神戸ポートアイランド, 2015 年 12 月 1- 4 日)
赤羽しおり, 宇野碧, 島崎俊太, **岡敏彦**

288. Xenopus laevis 全ゲノム解析:転写因子をコードする遺伝子群の初期発生および成体器官における発現パターンの解析
日本分子生物学会 第 38 回大会(神戸、2015 年 12 月 3 日)
渡部稔、回渕修治、安岡有理、伊藤道彦、近藤真理子、越智陽樹、荻野肇、福井彰雅、平良眞規、**木下勉**

289. Xenopus laevis 全ゲノム解析:異質四倍体の細胞内シグナル経路関連遺伝子におけるホメオログの保存性と機能分担
日本分子生物学会 第 38 回大会(神戸、2015 年 12 月 3 日)
道上達男、後藤利保、**木下勉**、山元孝佳、平良眞規、中山卓哉

*290. Aggregation of mitochondria during early blastula stage is essential for formation of primordial germ cells in *Xenopus* embryos
日本分子生物学会 第 38 回大会(神戸、2015 年 12 月 3 日)
Haru Tada, Yuya Taira, Keisuke Morichika, **Tsutomu Kinoshita**

291. 心臓の形成および再生における Pou5f1 と Pou5f3 の発現の比較解析
日本分子生物学会 第 38 回大会(神戸、2015 年 12 月 3 日)
長谷川俊、**木下勉**

*292. Protein tyrosine phosphatase PTP-PEST regulates RBL-2H3 cells activating signals in PTP activity-dependent and independent manners.
BMB2015 2015 年度 (神戸ポートアイランド、2015 年 12 月 1-4 日)

本橋智、青木佳織、小泉夏恋、本夛礼圭、Helen Palmer、**眞島恵介**

*293. 宿主の糖鎖修飾変化による自然免疫反応の制御

第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会（口頭発表、ワークショップ、オーガナイザー、山本（日野）美紀）2015 年 12 月 1- 4 日・神戸ポートピアアイランド（兵庫）

山本（日野）美紀、村岡正敏、近藤周、上田龍、岡野栄之、**後藤聡**

*294.GPI 修飾が行われる細胞内コンパートメント

第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会（口頭発表、ワークショップ、オーガナイザー、後藤聡）2015 年 12 月 1- 4 日・神戸ポートピアアイランド（兵庫）

後藤聡、山本（日野）美紀

295.バクテリアアクチンによる細胞幅制御機構の解析

生体運動合同班会議 2016（京都、2016 年 1 月 8-10 日）

池邉涼介、桑原友里、仁木宏典、**塩見大輔**

296.深海酵素の圧力適応メカニズム。

第 10 回長野ミーティング、ラフォーレ倶楽部白馬八方、長野県。（2016 年 1 月 25 日）

加藤千明

297.バクテリアアクチンが制御する細胞極性

第 10 回日本ゲノム微生物学会（東京、2016 年 3 月 3-4 日）

川面拓真、小島広樹、仁木宏典、**塩見大輔**

*298.ゲノム複製サイクルの in vitro 再構成による長鎖環状 DNA 増幅法

第 10 回日本ゲノム微生物学会年会（東京、2016 年 3 月 4 日）

末次正幸、辻本寛子

299. アフリカツメガエルの生殖腺形成過程における Pou5f3.3 発現細胞について

日本動物学会 第 68 回関東支部大会（神奈川大学、2016 年 3 月 12 日）

久野木悠仁、**木下勉**

300. *Pou5f3.1* ノックアウトが及ぼす心臓形成への影響

日本動物学会 第 68 回関東支部大会（神奈川大学、2016 年 3 月 12 日）

岩瀬晃康、**木下勉**

301. Active destruction of mitochondrial nucleoid as the driving force for uniparental inheritance in Cryptococcus

第 57 回日本植物生理学会年会 （岩手大学、2016 年 3 月 18 日-20 日）

Yoshiki Nishimura, Mari Takusagawa, Toshiharu Shikanai, Akio Toh-e

302. Genome instability in the Chlamydomonas chloroplasts impaired in nucleoid segregation

第 57 回日本植物生理学会年会 （岩手大学、2016 年 3 月 18 日-20 日）

Masaki Odahara, Yusuke Kobayashi, Osami Misumi, Yoshiki Nishimura

303. Remodeling of chloroplast nucleoid organization by eukaryotic components during the green plant evolution

第 57 回日本植物生理学会年会 （岩手大学、2016 年 3 月 18 日-20 日）

Yusuke Kobayashi, Mari Takusagawa, Naomi Harada, Yoichiro Fukao, Shohei Yamaoka, Takayuki Kohchi, Koichi Hori, Hiroyuki Ohta, Toshiharu Shikanai, Yoshiki Nishimura

304. 核様体分配欠損を示すクラミドモナス葉緑体におけるゲノム不安定化

第 57 回日本植物生理学会年会(盛岡、2016 年 3 月 18-20 日)

小田原真樹、小林優介、三角修巳、**西村芳樹**

*305. Functional analysis of plastid ribosome binding protein PSPR1

第 57 回日本植物生理学会（盛岡、2016 年 3 月 18-20 日）

鈴木大貴、安藤博洲、原田千鶴、高良美帆、**関根靖彦**

306.深海世界と生命ー高水圧の中のいのちー

未来を拓く高圧力科学技術セミナーシリーズ（41）「生命科学における高圧力研究の異分野融合」、青山学院大学青山キャンパス、渋谷区。（2016 年 3 月 17 日）

加藤千明（基調講演）

307. Leaf abaxialization in *rpl4 as2* mutants requires aberrant *rpl4* transcript accumulation, a RING

finger protein gene *SZK2*, and upregulation of a NAC transcription factor gene *SZK1*.
日本植物生理学会 2015 年度 (第 57 回) 年会(岩手大学、2016 年 3 月 18-20 日)
Horiguchi, G., Inoue, M., Masuda, H., Takahara, M., Nakata, M., Tsukaya, H.

*308. Importance of RFC3 function and plastid translation in root plastids.
日本植物生理学会 2015 年度 (第 57 回) 年会(岩手大学、2016 年 3 月 18-20 日)
Nakata, M. T., Sato, M., Wakazaki, M., Sato, N., Shikanai, T., Toyooka, K., Tsukaya, H., **Horiguchi, G.**

*309. 深海好圧性微生物由来酵素における高圧適応の分子・構造メカニズム。
日本農芸化学会 2016 年大会、札幌コンベンションセンター、札幌市。(2016 年 3 月 28 日)
加藤千明、濱島裕輝、永江峰幸、**渡邉信久**、大前英司、今井竹夫、山田康之

*310. シロウリガイ共生細菌由来イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の活性
日本農芸化学会 2016 年大会、札幌コンベンションセンター、札幌市。(2016 年 3 月 28 日)
濱島裕輝、山田康之、**加藤千明**

311.バクテリアの形態形成メカニズム
第 89 回日本細菌学会総会(大阪、2016 年 3 月 23 日)
川面拓真、小島広樹、仁木宏典、**塩見大輔**

*312.大腸菌染色体複製サイクルの試験管内再構成
第 89 回日本細菌学会総会ワークショップ「バクテリア細胞増殖プロセス研究の最前線」(大阪、2016 年 3 月 23 日)
末次正幸、辻本寛子

313.MreB アクチンが制御する大腸菌の細胞極性
2015 年度遺伝研研究会「単細胞の細胞構築・運動・増殖機構の研究」(三島、2016 年 3 月 25 日)
塩見大輔

314.複製サイクル再構成によるミニ染色体の指数増殖
生命動態システム科学四拠点合同シンポジウム「生命動態の分子メカニズムと数理」(広島、2016 年 3 月 25-26 日)
末次正幸

*315. MIC60 regulates PINK1 activation and Parkin recruitment through cAMP/PKA signaling pathway.
Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Mitochondrial Dynamics" (Steamboat Springs, CO, USA, Apr 3-7、2016)
Akabane, S., Uno, M., Shimazaki, S. and **Oka, T.**

316. Life in the High-Pressure World -High-pressure microbiology, it's advantage for future aspect-.
Marine Biodiversity Institute of Korea (MABIK), Korea. (May 9, 2016)
Kato, C. (Invitation Lecture)

317. バクテリアアクチンが制御する大腸菌の細胞極性
第 13 回 21 世紀大腸菌研究会(熊本県南阿蘇村、2016 年 6 月 2, 3 日)
川面拓真、仁木宏典、**塩見大輔**

318. 試験管内再構成された環状 DNA 複製の1分子観察にむけた検討
第 13 回 21 世紀大腸菌研究会(熊本、2016 年 6 月 2-3 日)
加納 巧希、**末次正幸**

319. ゲノム複製の試験管内再構成系とその合成生物学的展開
第 13 回原子・分子・光科学(AMO)討論会「合成生物学 ―試験管の中でゲノムや器官を創る―」(埼玉、2016 年 6 月 3 日)
末次正幸

*320.小胞体・ゴルジ体の翻訳後修飾局域
第 68 回日本細胞生物学会大会第 11 回日本ケミカルバイオロジー学会年会(口頭発表、シンポジウム、オーガナイザー、後藤聡、吉田秀郎)2016 年 6 月 15- 17 日・京都テルサ(京都)
後藤聡、山本(日野)美紀、近藤周、上田龍

321. Dynamic interplay between nucleoid segregation and genome integrity through the action of RECA and gyrases in *Chlamydomonas* chloroplasts

17th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas (Kyoto, 26th June–1st July 2016)
Odahara, M., Kobayashi, Y., Shikanai, T., Nishimura, Y.

322. Mutations in ribosomal protein genes induce the expression of NAC transcription factor gene, *SUZAKU1*, and promote leaf abaxialization in *asymmetric leaves2*.
27th International Conference on Arabidopsis Research (Gyeongju, Korea, June 29– July 3, 2016)
Horiguchi, G., Inoue, M., Masuda, H., Nakata, M., Tsukaya, H.

323. ゲノム情報を利用した POU ファミリー転写因子の解析
XCIJ-MA 研究集会 第 10 回大会（東京大学、2016 年 7 月 3 日）
木下勉

324. ゲノム複製サイクル試験管内再構成系における変異誘発と分子進化
日本進化学会第 18 回大会ワークショップ「再構築型進化学研究－人工細胞から原始生物まで－」（東京、2016 年 8 月 25 日）
末次正幸、徳永翼、高田啓、辻本寛子

*325. Mitochondrial transport protein Rhot1 is involved in the aggregation of germinal granule components
during primordial germ cell formation in *Xenopus laevis*,
16th International *Xenopus* Conference (Greece, August 28– September 1, 2016)
Tada, H., Taira, Y., Morichika, K., **Kinoshita, T**.

326. Restructuring of chloroplast nucleoids factor during the green plant evolution.
The 13th International Colloquium of Endocytobiology and Symbiosis (Sep 10–14, 2016 Kyoto).
Nishimura, Y.

*327. Pressure Adaptation of the Deep-sea Enzyme Is Attributed to a Single Amino Acid Substitution.
11th International Congress on Extremophiles, Kyoto, Japan. (Sep. 12–16, 2016)
Kato, C., Hamajima, Y., Nagae, T., **Watanabe, N.,** Ohmae, E. and Kato-Yamada, Y.

328. 葉の成長に多面的に関わるシロイヌナズナ *AN3* および *GRF* の制御機構の解析
日本植物学会 2016 年度（第 80 回）大会（沖縄コンベンションセンター、2016 年 9 月 16–18 日）
佐藤晃圭、皆吉彩、池田奨、塚谷裕一、**堀口吾朗**

329. シロイヌナズナにおける OLI1 と HDA9 による葉サイズ制御機構の解析
日本植物学会 2016 年度（第 80 回）大会（沖縄コンベンションセンター、2016 年 9 月 16–18 日）
鈴木真里奈、出村拓、塚谷裕一、**堀口吾朗**

330. リボソーム生合成関連因子 GDP1 と OLI2 が葉の発生に果たす役割の解析
日本植物学会 2016 年度（第 80 回）大会（沖縄コンベンションセンター、2016 年 9 月 16–18 日）
深田かなえ、塚谷裕一、**堀口吾朗**

331. シロイヌナズナの AN3-GRF システムの破綻がもたらす地上部・地下部の 境界異常
日本植物学会 2016 年度（第 80 回）大会（沖縄コンベンションセンター、2016 年 9 月 16–18 日）
堀口吾朗、塚谷裕一

332. 大腸菌染色体複製サイクルと転写翻訳反応との統合再構成
第 89 回日本生化学会大会シンポジウム「生化学の基盤戦略：試験管内再構成」（仙台、2016 年 9 月 27 日）
末次正幸, 辻本寛子, 高田啓

*333. Screening of glycosyltransferase involved in innate immunity in *Drosophila*
第 12 回日本ショウジョウバエ研究会（ポスター発表、大会世話役、後藤聡）2016 年 9 月 9 日から 2016 年 9 月 11 日・立教大学（東京）
Sawako Kase, Miki Yamamoto-Hino, **Satoshi Goto**

*334. 小胞体・核膜に存在する GPI 修飾局域
第 89 回日本生化学会大会（シンポジウム）2016 年 9 月 25–27 日・仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス（宮城）
後藤聡、山本（日野）美紀

335. 深海酵素における高圧力適応戦略

第 57 回高圧討論会、筑波大学大学会館、つくば市。(2016 年 10 月 28 日)
濱島裕輝, 永江峰幸, **渡邉信久**, 大前英司, 山田康之, **加藤千明**

336. Comparative analysis of two POU family class V genes in *Cynops pyrrogaster*
22nd International Congress of Zoology (Japan, November 17–18, 2016)
Kato, D., **Kinoshita, T**.

337. Role of pou5f3.1 in development and wound healing of *Xenopus laevis* skin,
22nd International Congress of Zoology (Japan, November 17–18, 2016)
Shimizu, M., **Kinoshita, T**.

338. Islet-1–expressing cardiac progenitor cells contributes to myocardial formation of adult heart in *Xenopus laevis*,
22nd International Congress of Zoology (Japan, November 17–18, 2016)
Umezawa, S., **Kinoshita, T**.

339. Role of pou5f3.1 in lateral line formation during *Xenopus laevis* development,
22nd International Congress of Zoology (Japan, November 17–18, 2016)
Tachikawa, Y., **Kinoshita, T**.

340.一細胞観察から見えてきたバクテリアの形態形成制御機構
日本顕微鏡学会第 59 回シンポジウム(東京都、2016 年 11 月 18–19 日)
塩見大輔

341. アフリカツメガエルの側線形成過程における POU5f3.1 機能の解析、
日本ツメガエル研究集会 第 10 回大会(沖縄、2016 年 11 月 19 日)
立川裕太郎、**木下勉**

*342. PINK1 と Parkin によるミトコンドリア品質管理機構は PKA を介した MIC60 のリン酸化により制御されている
第 54 回日本生物物理学会年会(つくば国際会議場, 2016 年 11 月 25–27 日)
赤羽しおり, 宇野碧, 島崎俊太, **岡敏彦**

*343. PINK1 stability and Parkin mitochondrial targeting are regulated by PKA-mediated phosphorylation of MIC60.
第 39 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜, 2016 年 11 月 30 日, 12 月 1– 2 日)
赤羽しおり, 宇野碧, 島崎俊太, **岡敏彦**

344. 2PS-14, New frontier of high-pressure life science.
第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜市。(2016 年 12 月 1 日)
加藤千明(シンポジウムオーガナイザー)

*345. How are the deep-sea enzymes adapted to the high-pressure environment?
第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜市。(2016 年 12 月 1 日)
加藤千明、濱島裕輝, 永江峰幸, **渡邉信久**, 大前英司, 山田康之

*346. アフリカツメガエル始原生殖細胞形成における GASZ の役割について
日本分子生物学会 第 39 回大会(横浜、2016 年 12 月 2 日)
多田葉瑠、**木下勉**

347. 分子内架橋による ATP 合成酵素の条件的脱共役状態の解析
日本生体エネルギー研究会 第 42 回討論会(名古屋工業大学、2016 年 12 月 19–21 日)
高田浩志、堀内由紀子、**山田康之**

348. 枯草菌 FoF_1 ATP 合成酵素の εサブユニットによる活性調節の生理的意義
日本生体エネルギー研究会 第 42 回討論会(名古屋工業大学、2016 年 12 月 19–21 日)
赤沼元気、澤田真帆、多賀名智昭、島田友裕、田中寛、河村富士夫、**山田康之**

349.最強の ATP 結合タンパク質の作製
日本生体エネルギー研究会 第 42 回討論会(名古屋工業大学、2016 年 12 月 19–21 日)
藤原美理亜、高田浩志、瀬沼美梨、**山田康之**

350. バクテリアアクチンによる細胞極性制御機構
生体運動合同班会議 2017(神戸、2017 年 1 月 6–8 日)
川面拓真、松本夏音、小島広樹、加藤郁也、金井友美、仁木宏典、**塩見大輔**

351. バクテリアクチンとリン脂質による細胞極性制御
第 11 回日本ゲノム微生物学会年会（藤沢、2017 年 3 月 2-4 日）
川面拓真、松本夏音、加藤郁也、金井友美、仁木宏典、**塩見大輔**
*352. 10 万塩基を超える長鎖環状 DNA の無細胞クローニング
第１１回ゲノム微生物学会年会（神奈川、2017 年 3 月 3 日）
末次正幸、平田 稜、倉田竜明、篠原 赳、辻本 寛子
353. アフリカツメガエルの心臓形成における外胚葉細胞の役割
XCIJ-MA 研究集会 第 11 回大会（慶応義塾大学、2017 年 3 月 4 日）
花房玲奈、**木下勉**
*355. ディープシークエンシングによって明らかになったRECAやRECG欠損のオルガネラゲノムへの影響
第 58 回日本植物生理学会年会(鹿児島、2017 年 3 月 16-18 日)
小田原真樹、中村健介、大島拓、**関根靖彦**
356. シロイヌナズナにおける *as2 rpl4d* の葉の背軸化には4つの NAC 型転写因子遺伝子が関わる
日本植物生理学会 2016 年度 （第 58 回） 年会（鹿児島大学、2017 年 3 月 16-18 日）
堀口吾朗、大林 祝、杉山 宗隆、塚谷 裕一
357. Regulation of subcellular localization of MreB actin in *Escherichia coli*
第 90 回日本細菌学会総会（仙台、2017 年 3 月 19-21 日）
川面拓真、松本夏音、小島広樹、加藤郁也、金井友美、仁木宏典、**塩見大輔**
358. Pou5f3.3 を発現する造血前駆細胞の起源に関する解析
日本動物学会 第 69 回関東支部大会（筑波大学、2017 年 3 月 22 日）
佐藤伶奈、**木下勉**
*359. MreB アクチンを中心とした細胞装置による形態制御機構
2016 年度遺伝研研究会「単細胞システム細胞装置のダイナミズム」（三島、2017 年 3 月 27,28 日）
塩見大輔

＜研究成果の公開状況＞（上記以外）

シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等
＜既に実施しているもの＞
平成 25 年 3 月 8 日、2012 年度 成果報告会
平成 26 年 3 月 13 日、2013 年度 成果報告会
平成 27 年 3 月 12 日、2014 年度 成果報告会
平成 28 年 3 月 14 日、2015 年度 成果報告会
平成 28 年 7 月 30 日、生命理学研究センター公開シンポジウム
「オルガネラが駆動する真核細胞システムの高度化」

研究プロジェクトホームページ http://www.rikkyo.ac.jp/life-sci/RCLS/
平成 24 年度の成果報告書 http://www.rikkyo.ac.jp/life-sci/RCLS/OrgRep12.pdf
平成 24-25 年度の成果報告書 http://www.rikkyo.ac.jp/life-sci/RCLS/OrgRep13.pdf
平成 24-26 年度の成果報告書 http://www.rikkyo.ac.jp/life-sci/RCLS/OrgRep14.pdf
平成 24-27 年度の成果報告書 http://www.rikkyo.ac.jp/life-sci/RCLS/OrgRep15.pdf
平成 24-28 年度の成果報告書 http://www.rikkyo.ac.jp/life-sci/RCLS/OrgRep16.pdf

14 その他の研究成果等

【受賞】

1. **極限環境生物学会** 2012 年度（第 13 回）年会 ポスター賞
   濱島裕輝、永江峰幸、**渡邉信久**、牧野龍、山田康之、今井竹夫、**加藤千明**
2. **日本結晶学会** 平成 25 年度(2013 年） 年会 ポスター賞
   永江峰幸、濱島裕輝、河村高志、丹羽健、長谷川正、**加藤千明**、**渡邉信久**
3. **日本細菌学会** 2013 年度（第 87 回）総会 黒屋奨学賞
   塩見大輔
4. **第 13 回 21 世紀大腸菌研究会** 優秀ポスター賞(修士部門）（2016 年 6 月 3 日）
   加納巧希、**末次正幸**

【マスコミでの発表】

1. プレスリリース 立教大学 （2015 年 4 月 17 日）
   「免疫力は糖によって調節される！免疫反応の新しい ON/OFF の仕組みを解明」
   後藤聡
2. 日経産業新聞(2015 年 4 月 23 日)朝刊
   「免疫反応 糖鎖が関与、立教大学」 **後藤聡**
3. 日刊工業新聞(2015 年 4 月 24 日)朝刊
   「免疫力の調整機能 解明、糖鎖の量で制御、立教大など」**後藤聡**
4. 朝日新聞(2015 年 4 月 24 日)朝刊
   「免疫の働き過ぎ 糖鎖が抑制 立教大など」**後藤聡**
5. プレスリリース 立教大学 （2016 年 2 月 19 日）
   「マリアナ海溝の底に生きる深海生物の酵素タンパク質の耐圧性のメカニズム～たった 1 個のアミノ酸の違いで酵素の耐圧性が変わる ～」
   加藤千明、**渡邉信久、山田康之**
6. 日刊工業新聞(2016 年 2 月 23 日)朝刊
   「立教大など、深海生物のタンパク質、高耐圧機構を解明、1 個のアミノ酸が関与」
   加藤千明、**渡邉信久、山田康之**

15 「選定時」及び「中間評価時」に付された留意事項及び対応

＜「選定時」に付された留意事項＞
該当なし

＜「選定時」に付された留意事項への対応＞
該当なし

＜「中間評価時」に付された留意事項＞
1.「それぞれのテーマで成果は出ていますが、筆頭・責任著者での学術論文発表は十分ではありません」
2.「基幹となるテーマ A)B)で各々一、二点の主要仮説にリソースを集中し、国際的に注目される成果を期待します。」

＜「中間評価時」に付された留意事項への対応＞
【1に関して】
事業期間中に筆頭・責任著者として、学術論文等の研究成果を積極的に発表することをメンバー間で確認した。その結果、平成 26 年度の中間評価以降、33報の論文を発表することができた。今後も研究成果を取りまとめ、学術論文を発表することを目指している。
【2 に関して】
平成 27(2015)年度からは、優れた成果が上がることが期待された 3 つの研究課題((A-2) オルガネラ DNA の安定維持機構、(B-2) 始原生殖細胞の分化に重要な母性 mRNA 翻訳におけるミトコンドリアの機能、(B-4) 多細胞化に伴う小胞体・ゴルジ体の機能分化の機構)に対して予算の配分割合を高めるとともに、国際的に注目される成果を目指して努力することをメンバー間で確認した。
その結果、PLoS Genetics 誌(成果番号 43)、PNAS 誌(同 49)、Mol Cell 誌(同 59)などの著名雑誌での論文発表、2 回の立教大学からのプレスリリース(2015 年後藤、2016 年山田・加藤・渡邉)などの成果をあげることができた。

（様式2）

法人番号	131095
プロジェクト番号	S1201003

16 施設・装置・設備・研究費の支出状況（実績概要） （千円）

年度・区分		支出額	内訳						
			法人負担	私学助成	共同研究機関負担	受託研究等	寄付金	その他（　　）	備考
平成24年度	施設	0	0	0	0	0	0	0	
	装置	0	0	0	0	0	0	0	
	設備	83,751	27,919	55,832	0	0	0	0	
	研究費	36,960	18,999	17,961	0	0	0	0	
平成25年度	施設	0	0	0	0	0	0	0	
	装置	0	0	0	0	0	0	0	
	設備	0	0	0	0	0	0	0	
	研究費	36,855	18,008	18,847	0	0	0	0	
平成26年度	施設	0	0	0	0	0	0	0	
	装置	0	0	0	0	0	0	0	
	設備	0	0	0	0	0	0	0	
	研究費	36,818	22,881	13,937	0	0	0	0	
平成27年度	施設	0	0	0	0	0	0	0	
	装置	0	0	0	0	0	0	0	
	設備	0	0	0	0	0	0	0	
	研究費	36,835	23,813	13,022	0	0	0	0	
平成28年度	施設	0	0	0	0	0	0	0	
	装置	0	0	0	0	0	0	0	
	設備	0	0	0	0	0	0	0	
	研究費	36,962	25,213	11,749	0	0	0	0	
総額	施設	0	0	0	0	0	0	0	
	装置	0	0	0	0	0	0	0	
	設備	83,751	27,919	55,832	0	0	0	0	
	研究費	184,430	108,914	75,516	0	0	0	0	
総計		268,181	136,833	131,348	0	0	0	0	

（様式2）

法人番号	131095
プロジェクト番号	S1201003

17

《施　設》（私学助成を受けていないものも含め、使用している施設をすべて記載してください。）　（千円）

施設の名称	整備年度	研究施設面積	研究室等数	使用者数	事業経費	補助金額	補助主体
立教大学池袋キャンパス4号館・13号館	―	1185.6 ㎡	33	40名	―	―	―

※　私学助成による補助事業として行った新増築により、整備前と比較して増加した面積

0　㎡

《装置・設備》（私学助成を受けていないものは、主なもののみを記載してください。）　（千円）

装置・設備の名称	整備年度	型　番	台　数	稼働時間数	事業経費	補助金額	補助主体
（研究装置）							
質量分析装置	H18	B型　島津製作所製	一式	週0.5 h	56,677	22,157	私学助成
				h			
（研究設備）							
共焦点レーザー顕微鏡	H13	LSM510	一式	週12 h	22,354	14,903	私学助成
超遠心分離機	H18	CP80WX	一式	週10 h	12,500	8,333	私学助成
高速冷却遠心機	H18	CR22GⅡ	一式	週10 h	5,376	3,584	私学助成
DNAシークエンサー	H18	Applied Biosystems3130x1	一式	週30 h	20,506	13,671	私学助成
核酸構造解析装置	H18	4300L-E2	一式	週1 h	13,230	8,820	私学助成
リアルタイムPCR装置	H18	7500-03	一式	週15 h	7,323	4,882	私学助成
共焦点スペクトルアナライザー顕微鏡	H24	LSM710	1	週15 h	39,961	26,640	私学助成
フローサイトメーター	H24	FACSVerseフローサイトメーター	1	週4 h	15,172	10,114	私学助成
DNAシークエンサー	H24	3500-150	1	週15 h	15,618	10,412	私学助成
レーザースキャナー方式蛍光画像解析装置	H24	Typhoon FLA 9500 BGRシステム	1	週15 h	13,000	8,666	私学助成
（情報処理関係設備）							
				h			
				h			

（様式2）

法人番号	131095
プロジェクト番号	S1201003

18 研究費の支出状況 （千円）

年度	平成 24 年度			
小科目	支出額	積算内訳		
		主な使途	金額	主な内容
教育研究経費支出				
消耗品費	13,813	消耗品費、用品費	13,813	試薬、実験器具、実験機器
光熱水費	0		0	
通信運搬費	2	郵便費	2	書類等郵送
印刷製本費	0		0	
旅費交通費	116	旅費交通費、海外出張費	116	旅費交通費、海外出張費
賃借料	0		0	
報酬・委託料	3,780	その他の委託費、報酬・手数料	3,780	実験機器移設、事務局委託料
（機器備品修繕費・保守料）	453	機器備品修繕費・保守料	453	実験機器修理
（ 雑費 ）	193	雑費	193	論文投稿料
（ その他 ）	58	損害保険料、その他の図書資料費	58	損害保険料、図書資料
計	18,415		18,415	
アルバイト関係支出				
人件費支出（兼務職員）	0		0	
教育研究経費支出	0		0	
計	0		0	
設備関係支出（1個又は1組の価格が500万円未満のもの）				
教育研究用機器備品	18,545	機器購入	18,545	卓上走査型電子顕微鏡、ルミノ・イメージアナライザー、サーマルサイクラー、等
図書	0		0	
計	18,545		18,545	
研究スタッフ関係支出				
リサーチ・アシスタント	0		0	
ポスト・ドクター	0		0	
研究支援推進経費	0		0	
計	0		0	

年度	平成 25 年度			
小科目	支出額	積算内訳		
		主な使途	金額	主な内容
教育研究経費支出				
消耗品費	21,704	消耗品費、用品費	21,704	試薬、実験器具、実験機器
光熱水費	0		0	
通信運搬費	0		0	
印刷製本費	0		0	
旅費交通費	1,149	旅費交通費、海外出張費	1,149	旅費交通費、海外出張費
賃借料	0		0	
報酬・委託料	1,221	その他の委託費、報酬・手数料	1,221	抗体作成、事務局委託料
（ 諸会費 ）	320	諸会費	320	学会参加登録費
（ 出版物費 ）	52	その他の図書資料費	52	図書資料
（ その他 ）	37	雑費	37	論文掲載料
計	24,483		24,483	
アルバイト関係支出				
人件費支出（兼務職員）	0		0	
教育研究経費支出	0		0	
計	0		0	
設備関係支出（1個又は1組の価格が500万円未満のもの）				
教育研究用機器備品	4,875	機器購入	4,875	冷却遠心機、正立蛍光顕微鏡、分取用PAGE電気泳動セル
図書	0		0	
計	4,875		4,875	
研究スタッフ関係支出				
リサーチ・アシスタント	0		0	
ポスト・ドクター	7,497		7,497	学内2人
研究支援推進経費	0		0	
計	7,497		7,497	学内2人

（様式2）

法人番号	131095
プロジェクト番号	S1201003

年　　度	平成　　26　　年度			
小 科 目	支 出 額	積　算　内　訳		
		主 な 使 途	金　額	主　な　内　容
		教　育　研　究　経　費　支　出		
消耗品費	14,166	消耗品費、用品費	14,166	試薬、実験器具、実験機器
光熱水費	0		0	
通信運搬費	0		0	
印刷製本費	0		0	
旅費交通費	668	旅費交通費、海外出張費	668	旅費交通費、海外出張費
賃借料	0		0	
報酬・委託料	357	その他の委託費、報酬・手数料	357	産廃処理費、講師謝礼
（ 諸会費 ）	81	諸会費	81	学会参加登録費
（ 出版物費 ）	3	その他の図書資料費	3	図書資料
計	15,275		15,275	
		ア　ル　バ　イ　ト　関　係　支　出		
人件費支出 （兼務職員）	416	アルバイト	416	時給1,000円、年間時間数346時間、交通費 実人数　1人
教育研究経費支出	0		0	
計	416		416	
		設 備 関 係 支 出（1個又は1組の価格が500万円未満のもの）		
教育研究用機器備品	9,110	機器購入	9,110	電動倒立顕微鏡、正立蛍光顕微鏡
図　　書	0		0	
計	9,110		9,110	
		研　究　ス　タ　ッ　フ　関　係　支　出		
リサーチ・アシスタント	0		0	
ポスト・ドクター	12,017		12,017	学内3人
研究支援推進経費	0		0	
計	12,017		12,017	学外3人

年　　度	平成　　27　　年度			
小 科 目	支 出 額	積　算　内　訳		
		主 な 使 途	金　額	主　な　内　容
		教　育　研　究　経　費　支　出		
消 耗 品 費	15,137	消耗品費、用品費	15,137	試薬、実験器具、実験機器
光 熱 水 費	0		0	
通信運搬費	0		0	
印刷製本費	0		0	
旅費交通費	414	旅費交通費	414	旅費交通費
報酬・委託料	298	その他委託費、報酬手数料	298	受託解析、講師謝礼
（機器備品修繕費）	41	機器備品修繕費	41	実験機器修理
（諸会費）	27	諸会費	27	学会参加登録費
計	15,917		15,917	
		ア　ル　バ　イ　ト　関　係　支　出		
人件費支出 （兼務職員）	1,620		1,620	時給　1,000円、年間時間数1,447時間、交通費 実人数　3人
教育研究経費支出	0		0	
計	1,620		1,620	
		設 備 関 係 支 出（1個又は1組の価格が500万円未満のもの）		
教育研究用機器備品	5,434		5,434	マルチモード・プレートリーダー、遺伝子導入装置、培養顕微鏡位相差観察エントリーセット
図　　書	0		0	
計	5,434		5,434	
		研　究　ス　タ　ッ　フ　関　係　支　出		
リサーチ・アシスタント				
ポスト・ドクター	13,864		13,864	学内3人
研究支援推進経費	0		0	
計	13,864		13,864	

（様式2）

法人番号	131095
プロジェクト番号	S1201003

年　　度	平成　　28　　年度			
小 科 目	支 出 額	積　算　内　訳		
		主 な 使 途	金　額	主　な　内　容
教　育　研　究　経　費　支　出				
消 耗 品 費	25,767	消耗品費、用品費	25,767	試薬、実験器具、実験機器
光 熱 水 費	0		0	
通信運搬費	3	郵便費	3	シンポジウムポスター郵送
印刷製本費	64	印刷費	64	シンポジウムポスター印刷
旅費交通費	461	旅費交通費、海外出張費	461	旅費交通費、海外出張費
報酬・委託料	902	その他委託費、報酬手数料	902	受託解析、講師謝礼
（機器備品修繕費保守料）	622	修繕費保守料	622	実験機器修理
（諸会費）	66	諸会費	66	学会参加登録費
（その他）	14	その他の図書資料費、雑費	14	図書資料
計	27,899		27,899	
ア　ル　バ　イ　ト　関　係　支　出				
人件費支出 （兼務職員）	1,672		1,672	時給1000円、年間時間数1450時間、交通費 実人数　3人
教育研究経費支出	0		0	
計	1,672		1,672	
設 備 関 係 支 出（1個又は1組の価格が500万円未満のもの）				
教育研究用機器備品	475		475	薬用冷蔵ショーケース
図　　書	0		0	
計	475		475	
研　究　ス　タ　ッ　フ　関　係　支　出				
リサーチ・アシスタント	0		0	
ポスト・ドクター	6,916		6,916	学内2人
研究支援推進経費	0		0	
計	6,916		6,916	

第２部：　研究成果報告

1．研究プロジェクトの概要

真核細胞は過去に2度の飛躍的進化を遂げた。第1は原始真核細胞とバクテリアの融合による複膜系オルガネラ(ミトコンドリア、葉緑体(プラスチド))をもつ真核細胞システムの誕生であり、第2は多細胞化をうけた細胞の機能分化と組織化である。私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「オルガネラが駆動する真核細胞システムの高度化」（平成24年度～28年度）は、真核細胞を異なるシステムの融合と高度化により生まれた超システムと捉えることを学術的特色とし、2度の「システム進化」においてオルガネラが主導的に果たした役割を解明することを目的とする。

本プロジェクトでは、立教大学生命理学研究センターに所属する立教大学大学院理学研究科教員を中心に、学外の研究者3名を加えて、次の(A)と(B)の2つの主題のもとにグループを組織して、研究を行う(資料 1 参照) 。

(A)オルガネラの誕生と維持機構の解明　バクテリアと原始真核細胞という全く異なる自立したシステムが融合して、安定的に維持される新しいシステムが構築された。そこで起こった、2つの異なるシステムに由来する要素の機能の変化・消失、新機能の獲得、および、要素間のクロストーク様式の変化などを解明する。

(B)多細胞体制を支えるオルガネラの新機能の解明　多細胞化により細胞極性が出現し、細胞の機能分化と組織化が起こった。複膜系オルガネラと単膜系オルガネラ(小胞体、ゴルジ体など)がどのような新機能を獲得することで、真核細胞システムの高度化を駆動したかを解明する。

(A)で対象とするオルガネラ機能が、(B)で対象とするシステムの高度化の基盤になっている。「オルガネラが駆動する」という視点から、真核細胞超システムのもつ階層的な構築原理を解明することが、本プロジェクトの最終的な目的である。 本プロジェクトでは、バクテリアから高等生物まで（大腸菌、枯草菌、クラミドモナス、ヒメツリガネゴケ、シロイヌナズナ、線虫、ショウジョウバエ、アフリカツメガエル、動物培養細胞）を用いた研究を展開する。多様なモデル生物を用いることで、「オルガネラが駆動する真核細胞システムの高度化」の共通性や多様性を容易に追究することができると期待される。

2. 研究組織 （平成24年度）

A グループ　オルガネラの誕生と維持機構の解明

関根　靖彦　（理学研究科・教授）「オルガネラ移行シグナルの獲得機構」
「オルガネラ DNA の安定維持機構」

花井　亮　（理学研究科・教授）「オルガネラ移行シグナルの獲得機構」

河村　富士夫 （理学研究科・教授）「葉緑体特異的リボソームタンパク質の機能」

山田　康之　（理学研究科・准教授）「オルガネラ ATP 合成酵素の活性調節機構」

加藤　千明　（海洋研究開発機構・主任研究員）
「フリーリビング微生物から共生微生物への進化」

渡邉　信久 （名古屋大学・工学研究科・教授）
「オルガネラ関連タンパク質の構造生物学的解析」

B グループ 「多細胞体制を支えるオルガネラの新機能の解明」

岡　敏彦　（理学研究科・教授）
「ミトコンドリアの形態制御機構とそのアポトーシスや損傷ミトコンドリア排除における役割」

木下　勉 （理学研究科・教授）　「生殖細胞形成におけるミトコンドリアの役割」

眞島　恵介（理学研究科・教授）
「ミトコンドリアを中心とした非接着細胞のアポトーシス誘導シグナルの解析」

後藤　聡 （理学研究科・教授）
「多細胞化に伴う小胞体・ゴルジ体の機能分化の機構」

堀口　吾朗（理学研究科・准教授）
「根端分裂組織の幹細胞再生におけるプラスチドの機能」

西村　芳樹 （京都大学・理学研究科・助教）
「オルガネラ DNA の維持機構の母性遺伝における機能」

（平成25年度）

平成 24 年度末に河村富士夫が定年退職し、担当プロジェクトは関根靖彦が継承した。平成 25 年度初に生命理学専攻に着任した塩見大輔と小田原真樹が新たにメンバーに加わった。また平成 25 年度初から 2 名の PD を任用した。

A グループ　オルガネラの誕生と維持機構の解明

関根　靖彦　（理学研究科・教授）「オルガネラ移行シグナルの獲得機構」
「オルガネラ DNA の安定維持機構」
「葉緑体特異的リボソームタンパク質の機能」

花井　亮　（理学研究科・教授）「オルガネラ移行シグナルの獲得機構」

山田　康之　（理学研究科・准教授）「オルガネラ ATP 合成酵素の活性調節機構」

塩見　大輔　（理学研究科・准教授）
「外部シグナルによって葉緑体の分裂位置を制御する機構」

小田原　真樹　（理学研究科・助教）「オルガネラ DNA の安定維持機構」

加藤　千明　（海洋研究開発機構・主任研究員）
「フリーリビング微生物から共生微生物への進化」

渡邉　信久　（名古屋大学・工学研究科・教授）
「オルガネラ関連タンパク質の構造生物学的解析」

B グループ「多細胞体制を支えるオルガネラの新機能の解明」

岡　敏彦　（理学研究科・教授）
「ミトコンドリアの形態制御機構とそのアポトーシスや損傷ミトコンドリア排除における役割」

木下　勉　（理学研究科・教授）　「生殖細胞形成におけるミトコンドリアの役割」

眞島　恵介（理学研究科・教授）
「ミトコンドリアを中心とした非接着細胞のアポトーシス誘導シグナルの解析」

後藤　聡　（理学研究科・教授）
「多細胞化に伴う小胞体・ゴルジ体の機能分化の機構」

堀口　吾朗（理学研究科・准教授）
「根端分裂組織の幹細胞再生におけるプラスチドの機能」

西村　芳樹　（京都大学・理学研究科・助教）
「オルガネラ DNA の維持機構の母性遺伝における機能」

（平成26年度）

平成 25 年度9月から、新たに1名の PD を任用した。

A グループ　オルガネラの誕生と維持機構の解明

関根　靖彦　（理学研究科・教授）「オルガネラ移行シグナルの獲得機構」
「オルガネラ DNA の安定維持機構」
「葉緑体特異的リボソームタンパク質の機能」

花井　亮　（理学研究科・教授）「オルガネラ移行シグナルの獲得機構」

山田　康之　（理学研究科・准教授）「オルガネラ ATP 合成酵素の活性調節機構」

塩見　大輔　（理学研究科・准教授）
「外部シグナルによって葉緑体の分裂位置を制御する機構」

小田原　真樹　（理学研究科・助教）「オルガネラ DNA の安定維持機構」

加藤　千明　（海洋研究開発機構・主任研究員）
「フリーリビング微生物から共生微生物への進化」

渡邉　信久　（名古屋大学・工学研究科・教授）
「オルガネラ関連タンパク質の構造生物学的解析」

B グループ「多細胞体制を支えるオルガネラの新機能の解明」

岡　敏彦　（理学研究科・教授）
「ミトコンドリアの形態制御機構とその細胞死や損傷ミトコンドリア排除における役割」

木下　勉　（理学研究科・教授）　「生殖細胞形成におけるミトコンドリアの役割」

眞島　恵介（理学研究科・教授）
「ミトコンドリアを中心とした非接着細胞のアポトーシス誘導シグナルの解析」

後藤　聡　（理学研究科・教授）
「多細胞化に伴う小胞体・ゴルジ体の機能分化の機構」

堀口　吾朗（理学研究科・准教授）
「根端分裂組織の幹細胞再生におけるプラスチドの機能」

西村　芳樹　（京都大学・理学研究科・助教）
「オルガネラ DNA の維持機構の母性遺伝における機能」

（平成27～28年度）

平成 27年度に生命理学専攻の末次正幸が新たにメンバーに加わった。

A グループ　オルガネラの誕生と維持機構の解明

関根　靖彦　（理学研究科・教授）「オルガネラ移行シグナルの獲得機構」
「オルガネラ DNA の安定維持機構」
「葉緑体特異的リボソームタンパク質の機能」

花井　亮　（理学研究科・教授）「オルガネラ移行シグナルの獲得機構」

山田　康之　（理学研究科・教授）「オルガネラ ATP 合成酵素の活性調節機構」

塩見　大輔　（理学研究科・准教授）
「外部シグナルによって葉緑体の分裂位置を制御する機構」

末次　正幸　（理学研究科・准教授）
「ゲノム複製サイクル再構成系によるオルガネラ環状ゲノムの試験管内増幅」

小田原　真樹　（理学研究科・助教）「オルガネラ DNA の安定維持機構」

加藤　千明　（海洋研究開発機構・主任研究員）
「フリーリビング微生物から共生微生物への進化」

渡邉　信久　（名古屋大学・工学研究科・教授）
「オルガネラ関連タンパク質の構造生物学的解析」

B グループ「多細胞体制を支えるオルガネラの新機能の解明」

岡　敏彦　（理学研究科・教授）
「ミトコンドリアの形態制御と損傷ミトコンドリア排除における細胞死の役割」

木下　勉　（理学研究科・教授）　「生殖細胞形成におけるミトコンドリアの役割」

眞島　恵介（理学研究科・教授）
「ミトコンドリアを中心とした非接着細胞のアポトーシス誘導シグナルの解析」

後藤　聡　（理学研究科・教授）
「多細胞化に伴う小胞体・ゴルジ体の機能分化の機構」

堀口　吾朗（理学研究科・准教授）
「根端分裂組織の幹細胞再生におけるプラスチドの機能」

西村　芳樹　（京都大学・理学研究科・助教）
「オルガネラ DNA の維持機構の母性遺伝における機能」

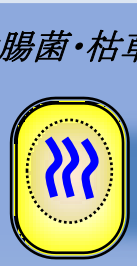
資料1

オルガネラが駆動する真核細胞システムの高度化

立教大学生命理学研究センター

(A) オルガネラの誕生と維持機構

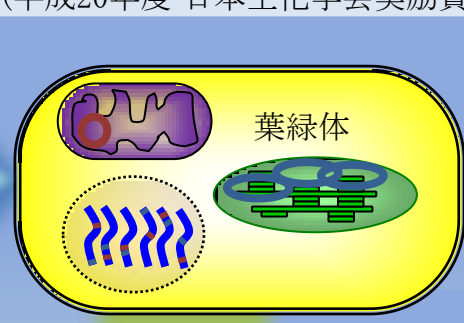
大腸菌・枯草菌



原始真核細胞

αプロテオバクテリア

シアノバクテリア



(A-4) オルガネラATP合成酵素の活性調節機構 **山田 康之**
(平成20年度 日本生化学会奨励賞 *Nature* 433, 773-777 (2005))

(A-3) 葉緑体特異的リボソームタンパク質の機能 **河村 富士夫**
(平成21年度 日本農芸化学会功績賞 *Science* 313, 1435-1438 (2006))

(A-1) オルガネラ移行シグナルの獲得機構 **関根 靖彦**
(平成14年度 日本遺伝学会奨励賞 *Science* 318, 450-453 (2007)) **花井 亮**

(A-2) オルガネラDNAの安定維持機構 **関根 靖彦**

(A-5) フリーリビング微生物から共生微生物への進化 **加藤 千明** (海洋研究開発機構)

(B) 多細胞体制を支えるオルガネラの新機能

(B-1) ミトコンドリアの形態制御機構と、そのアポトーシスや損傷ミトコンドリア排除における役割 **岡 敏彦**
(平成21年度 日本生化学会JB論文賞)

線虫

(B-4) 多細胞化に伴う小胞体・ゴルジ体の機能分化の機構 **後藤 聡**

ヒメツリガネゴケ

クラミドモナス

ショウジョウバエ

シロイヌナズナ

アフリカツメガエル

ヒト

(B-6) オルガネラDNAの維持機構の母性遺伝における機能 **西村 芳樹**
(京都大学、平成21年度 日本植物学会奨励賞、平成13年度 日本植物形態学会奨励賞)

(B-2) 始原生殖細胞の分化に重要な母性mRNA翻訳におけるミトコンドリアの機能 **木下 勉**

(B-3) 接着細胞におけるミトコンドリアを中心としたアポトーシス誘導シグナルの制御 **眞島 恵介**

(B-5) 根端分裂組織の幹細胞再生におけるプラスチドの機能 **堀口 吾朗** (平成20年度 日本植物学会奨励賞、平成18年度 日本植物形態学会奨励賞)

(A・B) オルガネラ関連タンパク質の構造生物学的解析 **渡邉 信行** (名古屋大学)

３．　研究成果報告

オルガネラ移行シグナルの獲得機構

立教大学大学院理学研究科・生命理学研究センター　関根靖彦

花井 亮

1. 背景と目的

葉緑体とミトコンドリアの起源は、真核細胞誕生の過程で原始真核細胞に共生したバクテリアであると考えられている。これらのオルガネラにおいて機能するタンパク質の遺伝子の大多数は核にコードされており、その多くは共生したバクテリアのゲノムから宿主の核ゲノムに移行した遺伝子が起源であると予想されている。葉緑体から核へ移行した遺伝子は N 末端に葉緑体移行のための Transit Peptide (TP) を付加した形で翻訳されている。TP は遺伝子によって多様で、コンセンサス配列はない。TP の獲得は、葉緑体をオルガネラとして持つ真核細胞システムの誕生のために不可欠の条件であるが、TP 獲得機構については不明な点が多く、TP の由来もほとんどわかっていない。我々は、細胞内共生菌から核に移行した遺伝子がどのような特性を持つ配列を、どのように TP として獲得したのかに関しての知見を得るために、ゲノム情報学的解析を行った。その結果、バクテリアや古細菌、植物に至る様々な生物のゲノム上には潜在的に TP となりうる配列が多数存在することが予想された。これに基づいて、我々は「ゲノム上には TP となり得る潜在的な配列が多数存在するため、TP 獲得は偶発的に起こり得た」という仮説を提唱した。本研究では、この仮説を立証することを目的に、クラミドモナスを用いて遺伝子の核移行を実験的に再現し、TP 獲得の実例を示すことを目指した。

細胞内に共生したバクテリア細胞が葉緑体になるにあたって、葉緑体の膜上で TP を識別して取り込む仕組みが構築された。真核植物とシアノバクテリアとを比較すると、Toc34、Toc159、Tic110 が葉緑体外膜に存在するタンパク質輸送装置に追加されており、GTPase 活性を持ち、互いに相同である Toc34 と Toc159 が初段の TP 認識に重要であるとされている。ミトコンドリアへの輸送のためのシグナルペプチドはアミノ酸配列に明確な特徴があるが、葉緑体への輸送のための TP には配列の特徴がみられない。本課題では、TP のどのような物理化学的な性質がシグナル情報を構成しているのかを解明することを目的とし、TP とタンパク質輸送装置複合体の立体構造決定を視野にいれ、Toc34、Toc159 と TP との相互作用を解析する。

2. 研究成果

(1) crtI 遺伝子を利用した葉緑体移行能の検出系の構築

葉緑体に移行した時にのみ機能するマーカー遺伝子の上流に様々な核ゲノム断片を融合させ、これを核ゲノムに挿入することにより得られたクラミドモナス形質転換体の中から、融合した断片が TP として機能するクローンを選択できる実験系の構築を目指した。選択マーカー遺伝子としてラン藻の一種グロエオバクターの crtI を採用した。crtI は非光合成バクテリア型リコペン合成系遺伝子であり、植物では crtI ではなく crtP と crtQ が機能している。除草剤ノルフルラゾン(以下 Nor とする)は crtP を阻害するが、crtI は阻害しない。クラミドモナスでは crtP, crtQ が機能しているため Nor 存在下ではリコペンが生じず、それを前駆体とするカロテノイドも合成できないため致死的に作用するが、もし crtI が葉緑体に運ばれ機能すれば Nor 耐性になると考えられた。

まず、crtI を用いた選抜系が有効に機能するかを検討するため、RbcS2 タンパク質の TP を上流に付加した crtI とハイグロマイシン耐性遺伝子 aph7 を持つ DNA コンストラクトをエレクトロポレーション法によりクラミドモナス細胞壁欠損株 CW15 へ導入し、Nor 存在下で生育させた。CW15 が Nor 感受性であることは確認できたが、DNA を導入した場合と DNA の代わりに水を用いたコントロール(no DNA)とでは生じた Nor 耐性コロニー数が同程度だった。クラミドモナスでは crtP 変異による Nor 耐性獲得が報告されている (Vartak et al.,1997) ため、生じた Nor 耐性コロニーは導入した crtI により生じたものではなく、染色体上の crtP 変異によると予想された。クラミドモナスは導入した外来遺伝子がサイレンシングを受けることが報告されているため、導入した crtI もサイレンシングによって発現抑制された可能性があると考えた。そこで外来遺伝子の発現が高く維持される変異株 UVM4・UVM11 (Neupart et al.,

2009) を用いて同様の実験を行った。UVM4 及び UVM11 に上述の DNA コンストラクトを導入しハイグロマイシン選抜を行ったところ、野生型の CW15 に同じ DNA コンストラクトを導入した場合よりも多くのハイグロマイシン耐性コロニーが生じ、UVM4 及び UVM11 では、導入遺伝子の発現は高く維持されることが確認された。しかし、同じ DNA コンストラクトを導入した細胞を Nor による選抜を行ったところ、いずれの株でも crtI 導入により生じた Nor 耐性コロニー数は no DNA コントロールと同程度であった。

クラミドモナスゲノムは GC 含量が高く、コドン使用頻度が偏っており、グロエオバクターの crtI の 564 コドン中、97 コドンがクラミドモナスではレアコドンであった。このことが crtI の翻訳効率を低下させている原因である可能性が考えられたため、crtI の N 末コード領域の 36 個のレアコドンをクラミドモナスで使用頻度の高いコドンに変換した改変 crtI を作製した。改変 crtI を含む DNA コンストラクトを UVM11 に導入したが、Nor 耐性コロニー数は no DNA コントロールと同程度であった。RT-PCR により、導入した改変 crtI が転写されていることは確認できたため、グロエオバクターの crtI は、クラミドモナスに Nor 耐性を付与することができないと考えられた。

(2) petE 遺伝子を利用した葉緑体移行能の検出系の構築

crtI に代わる選択マーカーとして、クラミドモナスの petE 遺伝子を採用した。クラミドモナスは、培地中に炭素源が存在すれば非光合成的に生育できる。非光合成的に生育している、光合成に関わる遺伝子の欠損株へ、TP を欠く当該遺伝子をマーカー遺伝子として導入する。マーカー遺伝子の上流に挿入したゲノム断片がコードするポリペプチドが TP として機能した場合、光合成能が回復し炭素源を含まない培地で光合成により生育することが期待される。petE はルーメン(チラコイド内腔)に局在し、シトクロム b6/f 複合体から光化学系 I へ電子伝達を行うプラストシアニンをコードする。petE の予想される TP 配列を除いたものをマーカー遺伝子として、その上流にランダムな DNA 断片を挿入したコンストラクトをクラミドモナスの petE 欠損株の核ゲノムへ導入し、これを炭素源を含まない培地で培養することでスクリーニングが可能であると考えられる。この検出系の構築のために、petE 欠損株に、本来の TP（もしくは rbcS 遺伝子の TP）をもつ petE 遺伝子を導入すると、光合成的に生育するようになることを確認した。今後は、TP を欠く petE 遺伝子の上流にランダムな DNA 断片を挿入して、光合成能が回復した形質転換体を得ることを目指す。

(3) YFP を用いた葉緑体移行能の検出系の構築

上の(1)と(2)においては、ランダムな DNA 断片から葉緑体移行能をもつペプチドを遺伝学的に選択することを目指している。別の方向として、ランダムな DNA 断片をマーカー遺伝子に接合したものを作成し、個別に移行能をテストする系を構築することにした。そのために、大腸菌、*Synechocystis*、*Pyrococcus* 由来の DNA 断片のそれぞれ 2、1、2種、合計5種を PCR 増幅し、*PsaD* を利用して発現される *yfp* 遺伝子の上流にクローンし、クラミドモナスに導入した。蛍光顕微鏡で観察したところ、5種のうち4種で YFP の細胞内での局在が認められた。葉緑体を分離してウェスタン解析をする等の方法と併用することで、葉緑体移行能を検出できると考えられる。

(4) TP と Toc34/Toc159 との相互作用の解析

TP と Toc34/Toc159 との相互作用に関する先行研究では、細胞内で TP として機能するペプチドが研究材料として使われてきた。そのようなペプチドは Toc34/Toc159 から解離して、輸送装置の別のコンポーネントと相互作用する必要があるため、Toc34/Toc159 との相互作用自体はオプティマルではないと考えられる。そこで、Toc34/Toc159 と強く相互作用するペプチドを、ファージディスプレーライブラリーのスクリーニングにより検索した。

まず、*Arabidopsis thaliana* の Toc33, Toc34, Toc159 の GTPase ドメイン（Toc33 [1-251]、Toc34 [1-253]、Toc159 [639-1092]）を、pET16 を用いて、N 末に His タグを付与したものとして、大腸菌 BL21(DE3) 株で発現した。精製は Ni カラムを用いて行った。

次に、ファージディスプレーライブラリーのスクリーニングを行った。NEB 社の Ph.D.-12 Phage Display Library を用い、Toc34 の GTPase ドメインを His タグにより Ni カラムに固定して、液層でのスクリーニングを 3 ラウンドを行った。GTP と Mg^{2+}の存在下でペプチドと Toc34/Toc159 の相互作用が安定化することが報告されているので、スクリーニングは 1 mM GTP と 5 mM $MgCl_2$ の存在下で行った。それぞれ 20 プラークのファージの塩基配列を決定した結果、Ni カラムだけのコントロールとは異なるペプチドが得られた。この TP 様ペプチドを、N 末に His タグをもつ SUMO タグと M13 ファージ gene3 タンパク質[19-235]の間にクローンして大腸菌で発現させた。Ni カラムで精製したタンパク質を Ulp1 プロテアーゼで切断することで、TP 様ペプチドを N 末に持つ gp3 の精製ができた。Toc34 との結合を調

べたところ、結合は検出されなかった。

一方、*Chlamidomonas reinhardtii* はゲノム構成が単純であるため、*in vitro* で得られた結果の *in vivo* での検討が容易である。このため、*C. reinhardtii* の Toc34 の GTPase ドメインを大腸菌で発現させた。第 59-第 420 アミノ酸部分は不溶で巻き戻りもできなかったが、第 1-第 420 アミノ酸部分は可溶であって、精製に成功した。そこで、このタンパク質を His タグと SUMO タグを付与して発現し、タグを Ulp1 プロテアーゼで切断後、ゲルろ過で精製して、結晶化を試みたが、今のところ、結晶は現れていない。また、クラミドモナス由来の pre-ferredoxin、ferredoxin-TP、および、Rubisco Activase (RCA1)の N 末 100 アミノ酸の、3種のペプチドをそれぞれ GST の N 末側に融合したタンパク質を精製した。これらの GST 融合タンパク質と TOC34 GTPase ドメインの相互作用を構造解析によって調べることを目標とし、グルタチオンレジンを用いたプルダウンアッセイを行った。GTP、GMP-P(NH)P、GDP+Pi の存在下で実験を行ったが、結合は検出されなかった。以上のことから、調べた TP とクラミドモナス TOC34 との結合は弱く、構造解析による相互作用の解析は困難であろうことが分かった。

3. 優れた成果が上がった点

各種の葉緑体移行シグナルをもつ GST と TOC34 GTPase との相互作用を解析した結果から、多様な葉緑体移行シグナルに対する葉緑体タンパク質移行装置による認識は、比較的弱い相互作用に基づいている可能性を示した。

4. 課題となった点

葉緑体移行シグナルの獲得の再現実験において、マーカー遺伝子として用いた遺伝子が予想外にサイレンシングを受けてしまい、シグナル獲得の再現に至らなかった。サイレンシングを受けにくいマーカー遺伝子の探索が必要である。葉緑体移行シグナルと葉緑体タンパク質移行装置との相互作用は、両者の複合体の構造解析という方法では追及できそうもないことが分かったので、別のアプローチによる解析が必要である。

5. 研究期間終了後の展望

petE をマーカー遺伝子とした進化実験により、葉緑体移行シグナルの獲得を再現する。また、petE の他にも、光合成に必須な遺伝子である psbP や psbO をマーカー遺伝子とする進化実験も行う。

オルガネラ DNA の安定維持機構

立教大学大学院理学研究科・生命理学研究センター　関根　靖彦
小田原　真樹

1. 背景と目的

植物細胞のオルガネラ(ミトコンドリアと葉緑体)の DNA にはオルガネラ内での転写や翻訳に必要な遺伝子やオルガネラの機能に関わる重要な遺伝子がコードされているが、呼吸や光合成反応の電子伝達系に由来する活性酸素や太陽光紫外線による損傷を受けていると考えられる。オルガネラにはそのような DNA 損傷に対する修復機構が備わっていると予想されるが、その実体は未解明の部分が多い。こうした損傷に対するオルガネラ DNA の維持機構にはバクテリア型の組換え修復因子が関与すると予想され、当研究室でゲノム改変が容易なヒメツリガネゴケを用いてレコンビナーゼ RecA のホモログ(RECA)の解析が行われた。RECA には、ミトコンドリアに移行する RECA1 と葉緑体に移行する RECA2 の2種が存在する。RECA1 は、DNA 損傷によりその産生が誘導され、また欠損株ではミトコンドリア DNA 損傷が修復されにくいことがわかり、RECA1 がバクテリアの RecA と同様に DNA 損傷の修復に関わっていることが強く示唆された。これに加えて、*RECA* の欠損株では、ミトコンドリア DNA 上の 100 塩基対以下の短い相同配列間での組換えが高頻度で誘発され、その結果、一部のミトコンドリアゲノムに再編成が引き起こされることがわかった。これは、RECA1 がミトコンドリアゲノム上の短い相同配列間の組換えを抑制する因子として機能していることを示す。これと同様のオルガネラゲノムの再編成は、DNA ヘリカーゼ RecG のホモログ(RECG)の欠損株、ミスマッチ修復においてミスマッチ塩基対の認識を担う MutS のホモログ(MSH1)の欠損株でも起こることわかり、これらのタンパク質もオルガネラゲノムの安定化に寄与していることが示された。これらのタンパク質がどのようにして短い相同配列間の組換えを抑制するのか、これら3つのタンパク質の機能的な関係はどうなっているのか、など未解明な問題が残されている。本プロジェクトでは主に3つのタンパク質の関係性に焦点を当てて解析を行った。また、オルガネラ DNA の変異を次世代シークエンシングによって網羅的に解析し、ゲノム維持における各因子の役割を明確にすることを試みた。一方、オルガネラゲノム維持機構にはまだ多くの因子が関与している事が予想され、このオルガネラ DNA 維持機構に関わる新たな因子の探索とその分子遺伝学的解析を行った。これらの解析により、オルガネラゲノムに生じる変異とそれを抑制するゲノム安定性維持機構全体像の解明を目指した。

2. 研究成果

(1)ミトコンドリアゲノム上のより短い反復配列における組換えへの RECA1 及び RECG の関与

これまでの解析では、ミトコンドリア上の 62～84 bp の長さの反復配列における組換えに着目してきたが、それよりも短い 8 組の反復配列(40~57 bp)に着目し、野生株、*RECA1* 破壊株、*RECG* 破壊株の全ゲノム DNA を用いて、リアルタイム PCR 法により核 DNA コピー数あたりの組換え体コピー数の定量を行った。その結果、着目した全ての反復配列において *RECA1* 破壊株、*RECG* 破壊株共に組換え体の著しい蓄積が見られた。8 組の反復配列のうち 5 組では *RECA1* 破壊株と *RECG* 破壊株における蓄積量に差は見られなかったが、3 組の反復配列において *RECG* 破壊株と比べ *RECA1* 破壊株においてより多くの組換え体の蓄積が見られた(図 1)。この結果は、*RECA1* 破壊株は *RECG* 破壊株よりも顕著な生育遅延を示すことと一致する。組換え部位の塩基配列を解析したところ、一部の反復配列においては、反復配列内の組換え部位が2つの破壊株で異なっていることが分かった。以上の結果から、RECA1 及び RECG は共に、50 bp 程度の短い反復配列における組換えを抑制し、ミトコンドリアゲノムの安定化に寄与していること、またその働きは RECG に比べ RECA1 の方が大きいことがわかった。

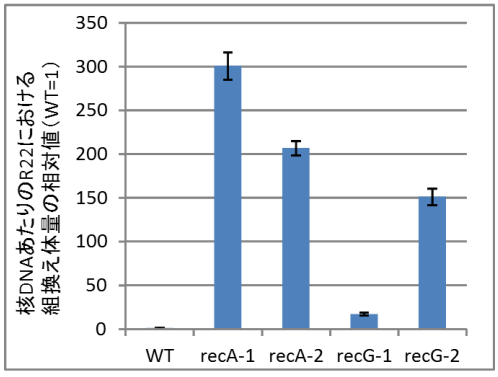


図1:リアルタイム PCR 法によるミトコンドリア反復配列 R22 における組換え体の定量

また同程度に組換え体が蓄積していても、反復配列内において RECA1 と RECG それぞれが認識している領域が

異なるケースが存在することが明らかになった（論文発表1）。

(2) RECA2 及び RECG の葉緑体ゲノム組換えへの関与

RECA2 が短い反復配列における組換えに如何に関与しているかは未だ明らかになっていない。そこで、RECA2 が RECA1 と同様に短い反復配列における組換えの抑制に関与しているかどうか解析した。その結果、*RECA2* 破壊株において、葉緑体ゲノム上に存在する 13-63 bp の反復配列における組換え体が野生株の最大 20 倍程度蓄積されていることが明らかになった。これは、RECA2 が葉緑体に散在する反復配列における異常な組換えを抑制する事により葉緑体ゲノムの安定性を維持している事を示唆する。この結果から、RECA2 は短い相同な配列間の組換えは抑制するという、一般的な RecA の機能である相同配列間の組換えの促進とは一見相反する役割を果たしているという解釈が導かれるが、これには組換えに関わる反復配列の長さが影響していると考えられる。今後は、RECA2 による組換えの制御と反復配列の長さの関係に関して明らかにする必要がある。一方、*RECA2* 破壊株は DNA 損傷剤に対して感受性を示し、また、DNA 損傷剤処理後の損傷した葉緑体 DNA の回復が遅延することが明らかになった。これらの結果から、RECA2 は短い反復配列間の組換えの抑制と、損傷した葉緑体 DNA の修復という二重の役割によって、葉緑体ゲノムの安定性に寄与していることが明らかになった（論文発表 2）。

RECG はミトコンドリアに加えて葉緑体にも移行することから、RECG がミトコンドリアと同様に葉緑体においても短い反復配列間の組換えを抑制しているかを検証した。その結果、RECG 破壊株の葉緑体では RECA2 破壊株と共通する 12-63 bp の反復配列間における組換え体が蓄積していること、そしてその蓄積量は野生株の最大 150 倍程度となることが明らかになった（論文発表1）。これらの結果は、RECG が短い反復配列間の組換えを抑制することにより葉緑体ゲノムの安定性を維持していること、またその抑制への貢献度は RECA2 のよりも大きいことを示唆している。

(3) MSH1a と MSH1b のミトコンドリアゲノム組換えへの関与

MSH1 は、通常の植物ではゲノムに 1 コピーで存在するが、ヒメツリガネゴケでは例外的に 2 コピー存在し（*MSH1a, MSH1b*）、いずれの遺伝子産物もミトコンドリアに移行すること、*MSH1b* 破壊株では *RECA1* 破壊株と同様のミトコンドリアゲノムの組換えが引き起こされているが、*MSH1a* 破壊株では引き起こされないこと、がこれまでの解析で明らかになっている。この2つのタンパク質の機能の関係性をさらに調べるために、*MSH1a, MSH1b* 二重破壊株を構築し、ミトコンドリアゲノム上の 63 bp の反復配列(IR-1)での組換え体の量をリアルタイム PCR により調べた。その結果、野生株における組換え体の量を1とした場合の組換え体の量は、*MSH1a* 破壊株：1、*MSH1b* 破壊株：4-5、*MSH1a, MSH1b* 二重破壊株：7-12 であった。この結果は、組換え抑制における貢献は MSH1b が大きく、MSH1a の貢献はあったとしても小さいことを示している。今後は、これらの破壊株における、IR-1 よりも短い反復配列での組換え頻度を調べる必要がある。

(4) *MSH1* の葉緑体ゲノム組換えへの関与

上述したように、ヒメツリガネゴケでは MSH1a と MSH1b はミトコンドリアに移行することが確認されているが、葉緑体に移行する証拠は得られていない。しかしながら、シロイヌナズナの MSH1 がミトコンドリアと葉緑体の両方に移行することが最近報告されたため、ヒメツリガネゴケでも MSH1 が葉緑体にも移行している可能性を考慮して MSH1 破壊株の葉緑体ゲノムにおける組換えを検証し、MSH1 の葉緑体における機能解析を行った。葉緑体ゲノム上に存在する逆向きの短い反復配列（IR-1; 63bp,相同性 95%）と順向きの反復配列（DR-1; 48bp, 相同性 94%）に着目し、リアルタイム PCR 法によって核 DNA コピー数あたりの IR-1 組換え体あるいは DR-1 組換え体コピー数の定量を行った。その結果、野生株における組換え体の量を 1 とした場合、*MSH1a* 破壊株における IR-1, DR-1 組換え体量はいずれも約 1 であるのに対し、*MSH1b* 破壊株では IR-1 組換え体量が約 10、DR-1 組換え体量が 20-30 であった。この結果は、MSH1b はミトコンドリアだけでなく、葉緑体へも移行して、葉緑体ゲノム上の反復配列間の組換えを抑制していることを示唆する。今後は、MSH1b が葉緑体への移行することの確認を行う必要がある。

(5) *MSH1b* と *RECA1*、*RECA2*、*RECG* との遺伝的関係性

MSH1b 破壊株の *RECA1*、*RECA2* あるいは *RECG* 遺伝子を破壊することにより、*MSH1b, RECA1* 二重破壊株、*MSH1b, RECA2* 二重破壊株、*MSH1b, RECG* 二重破壊株の作製を試みた。その結果、*MSH1b, RECA1* 二重破壊株のみ作製できず、*MSH1b* と *RECA1* の二重破壊は致死である可能性が高い。得られた破壊株において、ミトコンドリアゲノム上の 63 bp の反復配列(IR-1)での組換え体の量をリアルタイム PCR により調べた。その結果、野生株に

おける組換え体の量を 1 とした場合の組換え体の量は、*MSH1b* 破壊株：4-5、*RECG* 破壊株：16-64、*MSH1b, RECG* 二重破壊株：190-270 であった。組換えの抑制に関しては、MSH1b と RECG の変異は相乗的に作用することから、2つのタンパク質の抑制経路は異なっているものの1つに収束していることと考えられる。葉緑体ゲノム上の反復配列(DR-1)に関しても同様に組換え体量の解析を行った結果、野生株を 1 とした場合 *MSH1b* 破壊株：30-50、*RECG* 破壊株：15、*RECA2* 破壊株：5-10、*MSH1b, RECG* 二重破壊株：350-450、*MSH1b, RECA2* 二重破壊株：300-350 となり、各単独破壊株よりも二重破壊株で蓄積量が多くなる結果が得られた。この結果は、葉緑体においても MSH1b と RECG、MSH1b と RECA2 それぞれ抑制経路は異なっているものの1つに収束していることを示唆している。今後は、RECA2 と RECG の遺伝的関係性の解析、*MSH1b* と *RECA1* の二重破壊の致死性の確認を行う必要がある。

(6) オルガネラ DNA 安定性維持に関わる新規因子 RECX の同定

RecX タンパク質は RecA タンパク質の機能を制御する事によりバクテリアの相同組換えに関わる。我々はこの RecX のホモログをヒメツリガネゴケゲノムから見いだし、RECX と命名した。ヒメツリガネゴケ細胞内における RECX の局在解析を行った結果、RECX は葉緑体とミトコンドリア両方の核様体に局在する事が判明した。また、RECX は RECA1 とミトコンドリア核様体上で共局在することが確認できた。一方 RECA2 は、active form(核様体に局在している状態)では RECX と共局在したものの、inactive form(核様体外で1カ所に局在している状態)では共局在していなかった。RECX の遺伝子破壊株と過剰発現株を作製して解析を行ったところ、いずれの株においてもミトコンドリアにおける 100 bp 未満の短い反復配列間における組換え体量が増加していた。組換え体の増加は過剰発現株で顕著であり、組換えが誘導される反復配列の種類は *RECA1* 破壊株のそれと共通しており、*RECG* 破壊株のとは一部異なった。これらの結果は、RECX はミトコンドリアゲノムの安定性維持に、おそらく RECA1 の機能抑制を介して関わっている事を示唆している。意外なことに、RECA1 を過剰発現させることによってものミトコンドリアゲノムは不安定化された。これは、RECA1 の正常な機能には RECA1 と RECX の発現レベルのバランスが重要であることを示唆している。RECX のようなミトコンドリアゲノムを不安定化させることができる因子は、植物においてこれまで見つかっていない。一方、葉緑体 DNA における反復配列間の組換え体は RECX 破壊株と過剰発現株いずれにおいても僅かに増加する程度であった。今後は、RECX と RECA1, RECA2 の物理的、遺伝学的な相互作用を解析し、RECX が RECA1 や RECA2 の機能を制御する事によってオルガネラゲノム安定性の維持に関わっている事を明らかにする。

(7) 次世代シークエンシングによるオルガネラゲノム変異の網羅的な解析

RECA1、 *RECA2*、 *RECG* 各破壊株のオルガネラゲノムに生じる変異の全体像を明らかにする為、次世代シークエンシングによるゲノム異常の網羅的な解析を大島拓博士（奈良先端大）と中村健介博士（前橋工科大）との共同研究で行った。各変異体の全ゲノム DNA を Illumina HiSeq2000 ショートリードのペアエンド法によって解析を行った。既存のゲノム構造多型解析プログラム SVDetect にて得られた配列の解析を行ったところ、*RECA1*、*RECG* 各破壊株からは再編成したミトコンドリアゲノム断片が種類、数ともに多く検出され、これまでサザンブロット法やリアルタイム PCR 法で検出してきたミトコンドリアゲノムの再編成を確認することができた。またこれらに加えて、非常に近距離で再編成を引き起こしたミトコンドリア DNA 断片が野生株を含む全ての株から検出された。一方葉緑体 DNA 配列はリファレンス配列へのマッピングで難航しており、原因究明に取り組んでいる。オルガネラゲノムに生じているこれらの再編成を詳細に解析するため、新たなプログラムを開発し、解析を行った。このプログラムでは得られた配列データからオルガネラゲノムに生じた変異を 4 種類（反復配列間の組換え、パリンドロームにおける組換え、欠失、挿入）に分けて、それぞれの変異の位置情報と出現頻度を出力する。解析の結果、葉緑体とミトコンドリア DNA における変異の網羅的同定に成功し、その類似点と相違点を明らかにすることができた。葉緑体、ミトコンドリア両オルガネラ DNA の欠失と挿入に関しては野生株と変異株において大きな差は見られなかったものの、反復配列間の組換え体とパリンドロームの組換え体数が RECA1 破壊株と RECG 破壊株で有意に増加していた。反復配列間の組換え体は、我々がこれまでサザンブロット法やリアルタイム PCR 法で検出してきた組換え体に加えて多くの新たな組換え体を検出、比較することができ、RECA1, RECA2, RECG それぞれが組換えを抑制する反復配列の全体像が見えつつある。一方で全くの予想外の組換え体であるパリンドロームにおける組換え体は、この組換えによってゲノム全体が重複する可能性があり、ゲノムの構造維持という観点でインパクトがある。しかしな

がらパリンドロームにおける組換えによってゲノムの重複が確認できているのは 100 bp 程度の非常に狭い領域であるため、より広い領域を調べることにより、重複の範囲を知るとともに、パリンドロームにおける組換え体の存在を実験的に証明する必要がある。

3. 優れた成果が上がった点

RECG が RECA1 と同様にオルガネラゲノムの安定性維持に関わっていることから、RECA1 や RECG が関わる相同組換え修復経路が、オルガネラゲノム安定性維持に関わっていることが強く示唆された。また RECA, RECG, MSH1 がそれぞれ葉緑体とミトコンドリア両方で同様の役割を担っており、起源の異なる葉緑体とミトコンドリアにおけるゲノム安定性維持機構の共通性が示唆された。次世代シークエンシングによる解析では、世界で初めてオルガネラゲノムにおける異常な組換え体を網羅的に同定することができた。

4. 課題となった点

RECA や *RECG* 変異株オルガネラにおける異常な組換えを網羅的に同定できたが、それぞれの因子が組換えを抑制する反復配列の長さや位置等のルールは見出せていない。また、オルガネラゲノムにおける反復配列間の組換えを抑制するメカニズムにまでは踏み込めていない。

5. 研究期間終了後の展望

形質転換が可能な葉緑体のゲノム改変により葉緑体ゲノムに人工的な相同配列導入し、組換え抑制のメカニズム解明に挑む。また同時に RECA、RECG, MSH1 が相同組換え修復に関わっていることを証明する。

6. 研究成果公表

【論文発表】

1. RECG maintains plastid and mitochondrial genome stability by suppressing extensive recombination between short dispersed repeats.
   Odahara, M., Masuda, Y., Sato, M., Wakazaki, M., Harada, C., Toyooka, K., and **Sekine, Y.**
   PLoS Genetics (2015) **11**, e1005080
2. RECA plays a dual role in the maintenance of chloroplast genome stability in Physcomitrella patens.
   Odahara, M., Inouye, T., Nishimura, Y., and **Sekine, Y.**
   Plant Journal (2015) **84**, 516-526
3. PCR-based Assay for Genome Integrity after Methyl Methanesulfonate Damage in *Physcomitrella patens*.
   Odahara, M., Inouye, T., Nishimura, Y., and **Sekine, Y.**
   Bio-protocol (2016) **6,** e1954.
4. Dynamic interplay between nucleoid segregation and genome integrity in *Chlamydomonas* chloroplasts.
   Odahara, M., Kobayashi, Y., Shikanai, T., Nishimura, Y.
   Plant Physiology (2016) **172**, 2337-2346.
5. MSH1 maintains organelle genome stability and genetically interacts with RECA and RECG in the moss *Physcomitrella patens.*
   Odahara, M., Kishita, Y., and **Sekine, Y.**
   Plant Journal (in press)

【国際学会発表】

1. RECG Maintains Mitochondrial and Plastid Genome Stability by Suppressing Extensive Recombination between Short Dispersed Repeats.
   9th International Conference for Plant Mitochondrial Biology (Poland, 17-22th May 2015).
   Odahara, M., Sato, M., Wakazaki, M., Toyooka, K., and **Sekine, Y**.
2. Dynamic interplay between nucleoid segregation and genome integrity through the action of RECA and gyrases in *Chlamydomonas* chloroplasts
   17th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas (Kyoto, 26th June-1st July 2016)

Odahara, M., Kobayashi, Y., Shikanai, T., and Nishimura, Y.

【国内学会発表】

1. RecA ホモログによる葉緑体ゲノム安定性の維持
   第 84 回日本遺伝学会年会（福岡、2012 年 9 月 24-26 日）
   小田原真樹、井上貴之、西村芳樹、**関根靖彦**
2. 植物オルガネラゲノム安定性の維持に関わる諸因子
   ワークショップ「植物資源の開発と利用」（東京、2012 年 11 月 27 日）
   関根靖彦
3. RecA ホモログによる葉緑体ゲノム安定性の維持
   第 54 回日本植物生理学会年会（岡山、2013 年 3 月 21-23 日）
   小田原真樹、井上貴之、**関根靖彦**、西村芳樹
4. オルガネラゲノム安定性維持機構の解析
   第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ（仙台、2013 年 11 月 20-22 日）
   小田原真樹、西村芳樹、**関根靖彦**
5. ヒメツリガネゴケ葉緑体で機能する RECA 相同タンパク質の解析
   第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ（仙台、2013 年 11 月 20-22 日）
   鎌田美奈、井上貴之、**小田原真樹**、**関根靖彦**
6. 葉緑体とミトコンドリアのゲノム安定性維持におけるヒメツリガネゴケ MSH1 の役割
   第 55 回日本植物生理学会年会（富山、2014 年 3 月 18-20 日）
   小田原真樹、木下善仁、勝田小夜子、原田千鶴、**関根靖彦**
7. RECX によるオルガネラゲノム安定性の維持
   第 56 回日本植物生理学会年会(東京、2015 年 3 月 16-18 日)
   小田原真樹、**関根靖彦**
8. 核様体分配欠損を示すクラミドモナス葉緑体におけるゲノム不安定化
   第 57 回日本植物生理学会年会(盛岡、2016 年 3 月 18-20 日)
   小田原真樹、小林優介、三角修巳、西村芳樹
9. ディープシークエンシングによって明らかになった RECA や RECG 欠損のオルガネラゲノムへの影響
   第 58 回日本植物生理学会年会(鹿児島、2017 年 3 月 16-18 日)
   小田原真樹、中村健介、大島拓、**関根靖彦**

葉緑体特異的リボソームタンパク質の機能

立教大学大学院理学研究科・生命理学研究センター　関根　靖彦
河村　富士夫

1. 背景と目的

葉緑体は、シアノバクテリアが原始真核細胞内に共生することによって形成されたと考えられている。葉緑体ゲノムにコードされた遺伝子の翻訳を行うリボソームもシアノバクテリアが起源であるとされている。ホウレンソウ葉緑体から調製したリボソームを用いて、2次元電気泳動法で、その構成タンパク質を解析したところ、バクテリアのリボソームを構成するタンパク質とは異なるタンパク質が同定され、それらは葉緑体特異的リボソームタンパク質（plastid specific ribosomal protein :PSRP)と名付けられた(Yamaguchi et al., 2000)。PSRP は7種類 (PSRP-1～7) が知られているが、いずれの PSRP に関してもその機能は不明の点が多い。PSRP は、原始シアノバクテリアが葉緑体化する過程で起こったであろう翻訳制御システムの変容を反映していると考えられ、その機能を明らかにすることは葉緑体の成立には何が必要であったか、という問いに重要な示唆を与えると期待される。本研究では、PSRP の1つである PSRP-1 の機能解析を行う。他の PSRP とは異なり、PSRP-1 の類似タンパク質は、枯草菌や大腸菌などのバクテリアにも存在している。これまでの研究により、枯草菌は、定常期や胞子形成期初期の細胞内において、休眠不活化状態であるダイマーリボソームを形成することを見出した。このダイマーリボソームの形成に PSRP-1 の類似タンパク質 YvyD が必須であるが、YvyD のリボソームにおける局在やダイマーリボソーム形成における作用については明らかになっていない。

本研究では、PSRP-1 の機能の解明を目指す。具体的には、(A) 枯草菌 YvyD の活性部位の同定や、枯草菌におけるダイマーリボソームの形成機構の解析、(B) 遺伝子改変が容易なヒメツリガネゴケを用い、PSRP-1 の動態や PSRP-1 欠損の効果の解析を行った。

2. 研究成果

(1) 枯草菌 YvyD の活性部位の同定

189 アミノ酸から成る YvyD の N 末端側、C 末端側からそれぞれ 10 アミノ酸、30 アミノ酸を欠失させた変異株を構築し、定常期および胞子形成期初期におけるダイマーリボソーム形成への影響を調べた。ダイマーリボソームが最も多く形成される T2 の細胞を用いてリボソームのプロファイルを測定したところ、ダイマーリボソームに相当するピークの上昇は見られなかった。次に、YvyD 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った結果、C 末端側欠失変異株では YvyD の発現は認められたが野生株と比較すると非常に弱く、また N 末端側欠失変異株では検出できなかった。これらの結果は、欠失した部分が YvyD の安定性に重要であることを示しているが、この実験から N 末端側、C 末端側がタンパク質の安定性以外にどのような機能を持っているかについての知見を得ることはできなかった。

YvyD の N 末端側から 6 番目のアルギニンはリン酸化を受けるということが報告されている(Elsholz et al., 2012)。これを受けて、このリン酸化が YvyD のダイマーリボソーム形成に関与しているのではないかと予想し、アルギニンをアラニンに置換した改変株を構築し解析を行った。その結果、ダイマーリボソームの形成量は減少しており、YvyD の合成量も野生株と比べると低く早期に消失していたことから、YvyD のダイマーリボソーム形成にはアルギニンリン酸化が関与していることが示唆された。

(2) 枯草菌リボソーム不活性化因子の探索

大腸菌におけるダイマーリボソーム形成は、まず遷移期に合成された RMF が 70S リボソームに結合し 90S リボソームを形成することでリボソームを不活性化させ、それに HPF（枯草菌 YvyD のオーソログタンパク質）が結合することで 100S（ダイマー）リボソームになることが知られている（Wada et al.,1990）。しかし、枯草菌では RMF や 90S リボソームは見出されておらず、大腸菌とは別の不活性化機構を有しているものと予想される。そこで、70S リボソームにまず不活性化因子が結合することでリボソームの翻訳活性を抑制し、その因子が外れた後に YvyD が結合することでダイマーリボソームが形成すると仮説を立てた。*yvyD* 遺伝子と rRNA の分解酵素の一つと考えられる *ndoA* 遺伝子の二重欠失株では、ダイマーリボソームになることのできない不活性なリボソームが多く蓄積していると考えられる。そこで、この変異株を用いて不活性状態の 70S リボソームが多いとされる胞子形成期初期（T0.5）の細胞からリ

ボソームタンパク質を精製し、RFHR 二次元電気泳動にて展開した。その結果、野生株の対数増殖期やダイマーリボソーム形成期のリボソームと比較するといくつかの新たなスポットを見出すことができた。これらのスポットには、リボソームの不活性化因子が含まれていることが期待される。

(3) ヒメツリガネゴケ PSRP-1 の局在解析

ヒメツリガネゴケゲノムには PSRP-1 遺伝子が2コピー(PSRP-1a, PSRP-1b)存在する。両者のアミノ酸配列の相同性は、全長では91%、N 末のオルガネラ移行シグナルを除くと93%である。局在予測プログラム TargetP を用いると、両者とも葉緑体局在が強く予測された。これを確かめるために、PSRP-1 の N 末側のアミノ酸配列と GFP との融合タンパク質をヒメツリガネゴケ原糸体細胞で産生させたところ、両タンパク質共に葉緑体に局在することがわかった。次に、PSRP-1a、PSRP-1b の C 末端に GFP を融合したタンパク質 (PSRP1-GFP)を発現するプラスミドをそれぞれ構築した。これらをヒメツリガネゴケプロトプラストに導入し、一過的に発現させた場合と核ゲノムに組み込んで安定的に発現させた場合において PSRP1-GFP の細胞内局在を解析した。その結果、PSRP1a-GFP、PSRP1b-GFP ともに、次の3タイプの局在様式が観察された。[タイプ A] 葉緑体全体に分布、[タイプ B] 葉緑体内に複数のフォーカスを形成、[タイプ C] 葉緑体内に1つのフォーカスを形成。PSRP1-GFP のフォーカスと DAPI 染色による葉緑体核様体の局在比較を行った結果、タイプ B のフォーカスは核様体と共局在し、タイプ C のフォーカスは核様体とは離れた位置に観察された。

(4) ヒメツリガネゴケ PSRP-1 と葉緑体リボソームの相互作用

葉緑体のリボソームは核様体とストロマの両方に局在することが報告されており、PSRP1-GFP フォーカスの分布から PSRP1 とリボソームの相互作用を反映している可能性が考えられた。そこで、葉緑体リボソームタンパク質 RPL1 と RFP の融合タンパク質および PSRP1-GFP 融合タンパク質を同時に産生する株を構築した。この株の観察の結果、タイプ B とタイプ C の PSRP1-GFP のフォーカスは両方とも RPL1-RFP のフォーカスと一致していた。この結果は PSRP-1 が葉緑体リボソームと相互作用する可能性を強く示唆するとともに、葉緑体リボソームには複数種類の集合様式が存在することを示す。リボソームの集合様式とリボソームの活性の関係は不明であるが、葉緑体中の1か所に集合したリボソームは不活性であると予想され、PSRP1 がリボソームの凝集による翻訳の不活性化を誘導している可能性が示唆された。PSRP1-GFP のフォーカスは、原糸体コロニーの周縁付近の細胞ではタイプ A、コロニー内側の細胞ではタイプ B を示したので、コロニーの周辺部の細胞と内側の細胞を別々に集め、リボソームプロファイリングを行った結果、周縁部の方がポリソームの量が多いことが分かった。この結果から、タイプ B は、PSRP1 がリボソームに結合し、おそらく翻訳活性を低下させている状況を示していると考えられる。また、原糸体細胞に高塩濃度ストレスや高温ストレスを与えると、PSRP1-GFP がタイプ A を示す細胞の多くが、タイプ B の局在を示すようになることが分かった。この結果は、環境ストレスにより、PSRP1 はリボソームに結合するようになることを示す。

(5) ヒメツリガネゴケ PSRP-1 の破壊株の表現型解析

PSRP-1 の機能を解明するために、PSRP-1a, PSRP-1b 各遺伝子、及び両遺伝子の破壊株の構築を試みた。その結果、いずれの破壊株も取得できた。このことは、PSRP-1 は生育には非必須であることを示す。得られた破壊株の生育を調べたところ、いずれの破壊株とも、その表現型(細胞増殖速度、細胞形態)は野生株と変わらなかった。これまでの解析から、葉緑体の祖先とされるランソウの PSRP-1 破壊株は、高温や細胞密度過多のようなストレス条件で、その生育が不全になることが示されている。そこで、同様のストレスを与えた場合のヒメツリガネゴケ PSRP-1 破壊株の表現型を解析した。高塩濃度(100mM NaCl 添加)、高浸透圧(200mM マンニトール添加)、高温(33℃)、低温(15℃)、光合成阻害(2.5μM パラコート添加)条件下において、PSRP-1 破壊株の表現型は野生株のそれと変わらなかった。PSRP-1 は葉緑体内の翻訳に関与すると考えられるので、上記のストレスに加えて 100mg/L のクロラムフェニコールの添加で翻訳を部分的に阻害した条件において生育比較を行った。その結果、高温(33℃) + クロラムフェニコールの条件下において、PSRP-1 破壊株の生育速度が野生株よりも速いことが観察された。この結果は PSRP1 が葉緑体の翻訳に関与をして、高温環境下で生育を阻害していることを示唆する。

(6) ヒメツリガネゴケ PSRP1 の発現部位の解析

染色体上の PSRP1a(または PSRP1b)遺伝子の末端に GUS 遺伝子を翻訳融合させた形質転換体を得た。GUS の発現部位を解析したところ、原糸体コロニーの周縁部位、原糸体から茎葉体への分化過程の初期に生じる bud(芽)、仮根で特に強く発現していることが分かった。一方、茎葉体の葉ではほとんど発現が見られなかった。

強く発現していた部位は、分化の初期段階にある細胞が多いと考えられることから、PSRP1 が細胞の分化と関連している可能性が示唆された。

3. 優れた成果が上がった点

葉緑体特異的リボソームタンパク質 PSRP1 のリボソームとの結合が翻訳活性の低下を招くこと、リボソームとの結合様式が細胞の増殖能や外的ストレスにより変化することを示した。PSRP1 の転写が分化の初期段階の細胞で高いことを見出し、細胞分化における PSRP1 の関与を示唆した。PSRP1 の枯草菌ホモログである YvyD がリボソームの2量体化に必須であり、胞子形成期に活性化される σ H により転写されることを示し、胞子形成とリボソームの2量体化との関連を示唆した。

4. 課題となった点

枯草菌の yvyD 遺伝子と ndoA 遺伝子の二重欠失株の胞子形成期初期（T0.5）の細胞から精製したリボソームタンパク質の RFHR 二次元電気泳動で検出された野生株には見られないスポットの解析ができなかった。ヒメツリガネゴケの PSRP1 破壊株に関して、野生株と明瞭な表現型の差が見いだせていない。

5. 研究期間終了後の展望

RFHR 二次元電気泳動で検出された枯草菌野生株には見られないスポットの解析を行う。これらのスポットには、リボソームの不活性化因子が含まれていることが期待される。ヒメツリガネゴケ PSRP1 遺伝子の発現の特徴等は判明したので、PSRP1 の生理的意義の解明を目指す。

6. 研究成果公表

【原著論文】

1. Expression of a small (p)ppGpp synthetase, YwaC, in the (p)ppGpp0 mutant of Bacillus subtilis triggers YvyD-dependent dimerization of ribosome.
Tagami, K., Nanamiya, H., Kazo, Y., Maehashi, M., Suzuki, S., Namba, E., Hoshiya, M., Hanai, R., Tozawa, Y., Morimoto, T., Ogasawara, N., Kageyama, Y., Ara, K., Ozaki, K., Yoshida, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., Ohashi Y. and **Kawamura, F.**
Microbiology Open (2012) **1**, 115-134

2. Inactivation of ribosomal protein genes in Bacillus subtilis reveals importance of each ribosomal protein for cell proliferation and cell differentiation.
Akanuma, G., Nanamiya, H., Natori, Y., Yano, K., Suzuki, S., Omata, S., Ishizuka, M., **Sekine, Y.** and **Kawamura, F**.
J. Bacteriol. (2012)**194**, 6282-6291

3. Single mutations introduced in the essential ribosomal proteins L3 and S10 cause a sporulation defect in Bacillus subtilis.
Akanuma, G., Suzuki, S., Yano, K., Nanamiya, H., Natori, Y., Namba, E., Watanabe, K., Tagami, K., Takeda, T., Iizuka, Y., Kobayashi, A., Ishizuka, M., Yoshikawa, H. and **Kawamura, F.**
J. Gen. Appl. Microbiol. (2013) **59**, 105-117.

4. rRNA (rrn) operon-engineered Bacillus subtilis as a feasible test organism for antibiotic discovery.
Tanaka, Y., Nanamiya, H., Yano, K., Kakugawa, K., **Kawamura, F.** and Ochi, K.
Antimicrob. Agents Chemother. (2013) **57**, 1948-1951.

5. Multiple rRNA operons are essential for efficient cell growth and sporulation as well as outgrowth in *Bacillus subtilis*.
Yano, K., Wada, T., Suzuki, S., Tagami, K., Matsumoto, T., Shiwa, Y., Ishige, T., Kawaguchi, Y., Masuda, K., Akanuma, G., Nanamiya, H., Niki, H., Yoshikawa, H. and **Kawamura, F**.
Microbiology (2013) **159**, 2225-2236.

6. Enhanced expression of Bacillus subtilis yaaA can restore both the growth and sporulation defects caused by mutation of rplB, encoding ribosomal protein L2.
Suzuki S, Tanigawa O, Akanuma G, Nanamiya H, **Kawamura F,** Tagami K, Nomura N, Kawabata T, and **Sekine Y.**
Microbiology (2014) **160**, 1040–1053.

【国際学会発表】

1. Analysis of copy number effect of the rrn operon in Bacillus subtilis.
   The 12th Asian Conference on Transcription. (Jeju Island, Korea, June 6-9, 2012)
   Koichi Yano, Tetsuya Wada, Shota Suzuki, Yasuhiro Kawaguchi, Kenta Masuda, Hideaki Nanamiya, Genki Akanuma, **Yasuhiko Sekine**, and **Fujio Kawamura**
2. Construction of 16S rRNA mutants carrying altered RNase sites that are active during spore development.
   The 12th Asian Conference on Transcription. (Jeju Island, Korea, June 6-9, 2012)
   Eri Namba, Marie Maehashi, Shota Suzuki, Koichi Yano, Kazuya Watanabe, and **Fujio Kawamura**
3. Expression of the Bacillus subtilis YaaA protein suppresses a mutation of the rplB gene, encoding the L2 ribosomal protein.
   The 12th Asian Conference on Transcription. (Jeju Island, Korea, June 6-9, 2012)
   Shota Suzuki, Osamu Tanigawa, Naofumi Nomura, Teppei Kawabata, Eri Namba, **Yasuhiko Sekine**, and **Fujio Kawamura**
4. Analysis of rRNA degradation during spore development in Bacillus subtilis. The 12th Asian Conference on Transcription.
   The 12th Asian Conference on Transcription. (Jeju Island, Korea, June 6-9, 2012)
   Kazuya Watanabe, Marie Maehashi, Koichi Yano, Eri Namba, and **Fujio Kawamura**

【国内学会発表】

1. 枯草菌 rRNA 機能の分子遺伝学的解析
   日本遺伝学会 第 84 回大会 （九州大学医学部、2012 年 9 月 24-26 日）
   矢野 晃一, 難波 恵理, 関根 里恵, 鈴木 祥太, 田上 和美, **河村 富士夫**
2. 枯草菌の胞子形成初期における rRNA の分解に関する解析
   日本遺伝学会 第 84 回大会 （九州大学医学部、2012 年 9 月 24-26 日）
   渡辺 和哉, 矢野 晃一, 田上 和美, 難波 恵理, **河村 富士夫**
3. リボソームタンパク質変異による胞子形成欠損株の解析
   日本遺伝学会 第 84 回大会 （九州大学医学部、2012 年 9 月 24-26 日）
   鈴木 祥太, 赤沼 元気, 田上 和美, 難波 恵理, **関根 靖彦**, **河村 富士夫**
4. 枯草菌の SD 配列改変型リボソームを用いた高発現系の開発
   日本遺伝学会 第 84 回大会 （九州大学医学部、2012 年 9 月 24-26 日）
   武田 拓也, 矢野 晃一, 鈴木 祥太, 難波 恵理, **河村 富士夫**
5. 枯草菌において *rrn* オペロンのコピー数が prophage2 に与える影響の解析
   第 7 回日本ゲノム微生物学会年会（長浜バイオ大学、2013 年 3 月 8-10 日）
   矢野 晃一, 和田 哲也, 増田 健太, 安藤 星次郎, 松本 貴嗣, 志波 優, 吉川 博文, **河村 富士夫**
6. 枯草菌の antiSD 配列改変型リボソームを用いた大腸菌 *lacZ* 遺伝子高発現系の開発
   第 7 回日本ゲノム微生物学会年会（長浜バイオ大学、2013 年 3 月 8-10 日）
   武田 拓也, 矢野 晃一, 鈴木 祥太, 難波 恵理, **河村 富士夫**
7. 枯草菌のダイマーリボソームにおける YvyD の活性部位解析.
   第 7 回日本ゲノム微生物学会年会（長浜バイオ大学、2013 年 3 月 8-10 日）
   田上 和美, 小野寺 弘希, 花井 亮, **河村 富士夫**
8. 枯草菌における異種微生物 16S rRNA 遺伝子導入株の作製と解析
   第 7 回日本ゲノム微生物学会年会（長浜バイオ大学、2013 年 3 月 8-10 日）
   難波 恵理, 鈴木 祥太, 矢野 晃一, **河村 富士夫**
9. 胞子形成部分欠損を示す枯草菌 S10 リボソームタンパク質遺伝子変異体およびそのサプレッサーの単離と解析
   第 7 回日本ゲノム微生物学会年会（長浜バイオ大学、2013 年 3 月 8-10 日）
   鈴木 祥太, 青木 剣人, 難波 恵理, **関根 靖彦**, **河村 富士夫**

10. 胞子形成欠損を示す枯草菌 S10 リボソームタンパク質遺伝子 *rpsJ* 変異体の単離と解析
日本農芸化学会 2013 年度大会 （東北大学川内北キャンパス、2013 年 3 月 24-28 日）
鈴木 祥太，難波 恵理，矢野 晃一，赤沼 元気，吉川 博文，**関根 靖彦**，**河村 富士夫**

11. 枯草菌の緊縮応答時，定常期，胞子形成期の三期におけるダイマーリボソーム形成
日本農芸化学会 2013 年度大会 （東北大学川内北キャンパス、2013 年 3 月 24-28 日）
田上 和美，渡辺 和哉，尾崎 克也，花井 亮，**河村 富士夫**

12. 枯草菌の胞子形成期において EndoA が rRNA の分解に関与する
日本農芸化学会 2013 年度大会 （東北大学川内北キャンパス、2013 年 3 月 24-28 日）
渡辺 和哉，矢野 晃一，田上 和美，**河村 富士夫**

13. 枯草菌 S10 リボソームタンパク質の解析
第 10 回 21 世紀大腸菌研究会（静岡県修善寺、2013 年 6 月 20-21 日）
鈴木 祥太、赤沼 元気、**河村 富士夫**、**関根 靖彦**

14. 枯草菌における胞子形成欠損を示す S10 リボソームタンパク質遺伝子変異体(*rpsJ52*)およびそのサプレッサーの解析
2013 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議（筑波、2013 年 9 月 7-8 日）
鈴木 祥太、赤沼 元気、**河村 富士夫**、**関根 靖彦**

15. 枯草菌における S10 リボソームタンパク質遺伝子変異体の解析
第 7 回日本ゲノム微生物学会若手の会（静岡県駿東郡小山町、2013 年 9 月 19-20 日）
鈴木 祥太、**河村 富士夫**、**関根 靖彦**

16. 枯草菌の *rplB142* 変異の表現型をサプレスする *yaaA* 遺伝子の解析
第 8 回ゲノム微生物学会年会（東京農業大学、2014 年 3 月 7-9 日）
鈴木祥太、**河村富士夫**、**関根靖彦**

17. 葉緑体リボソーム結合タンパク質 PSRP1 の機能解析
第 37 回日本分子生物学会年会（パシフィコ横浜、2014 年 11 月 25-27 日）
鈴木大貴 境俊介 安藤博洲 原田千鶴 長岡敦子 堀孝一 **関根靖彦**

18. Functional analysis of plastid ribosome binding protein PSPR1
第 57 回日本植物生理学会（盛岡、2016 年 3 月 18-20 日）
鈴木大貴、安藤博洲、原田千鶴、高良美帆、**関根靖彦**

オルガネラ ATP 合成酵素の活性調節機構

立教大学大学院理学研究科・生命理学研究センター　山田 康之

1. 背景と目的

酸化的リン酸化、光リン酸化の最終段階である ATP 合成を担う ATP 合成酵素は、真核細胞のミトコンドリア内膜、葉緑体のチラコイド膜、原核細胞の形質膜等に広く普遍的に存在する。この酵素は膜を介した H^+の電気化学ポテンシャル差をエネルギー源とし、ADP と無機リン酸から ATP を合成する。

その活性は、高度に調節されており、生物種やオルガネラによる、それぞれの系に固有の調節の系が知られている。ミトコンドリア ATP 合成酵素には、ATPase インヒビタータンパク質と呼ばれる調節タンパク質があり、pH に依存した ATPase インヒビタータンパク質の結合によって ATPase 活性が阻害される事が知られている。一方、葉緑体 ATP 合成酵素は、γ サブユニット上に 2 つの Cys 残基を持ち、暗条件下において分子内ジスルフィド結合を形成し、活性が阻害されることが知られている。また、バクテリア及び葉緑体の ATP 合成酵素では、ε サブユニットによる活性調節が知られており、ε サブユニットの構造変化によって活性が変化することが知られている。この他にも全ての ATP 合成酵素に共通な ADP 阻害と呼ばれる現象が知られており、ADP 阻害も ATP 合成酵素の活性調節に関与していると考えられている。

我々はこのうち、主にバクテリア ATP 合成酵素の ε サブユニットによる活性調節について研究を行なってきた。その結果、ε サブユニットの β サンドイッチ構造からなる N 末端ドメインは Fo と F_1 をつなぐ役目を担うこと、α ヘリックス 2 本からなる C 末端ドメインは活性調節に必須であり、C 末端ドメインが伸びた構造をとった時に ATPase 活性を阻害すること、C 末端ドメインの構造変化によって阻害が解除されること、C 末端ドメインが無くても Fo と F_1 の共役は維持されることなどを明らかにしてきた。

一方、ミトコンドリア ATP 合成酵素は、上述のように ATPase インヒビタータンパク質による調節のしくみを持つため、ミトコンドリア ATP 合成酵素の δ サブユニット（バクテリア ATP 合成酵素の ε サブユニットに相当する）は活性調節の役割は持たないものと考えられている。しかしながら、ミトコンドリア ATP 合成酵素の δ サブユニットもまた、ATP 合成・加水分解と H^+輸送の共役そのものには不要な（バクテリアでは、活性調節を行う部分である）C 末端ドメインを持つことから、条件によっては δ サブユニットによる活性調節が行われるのではないかと考え、これを調べることにした。また、ある種のバクテリア由来の ATP 合成酵素 ε サブユニットは ATP 結合能を持ち、これが活性調節と関係することから、δ サブユニットの ATP 結合能についても調べることにした。バクテリア由来の ATP 合成酵素 ε サブユニットが持つこれらの機能を、ミトコンドリア ATP 合成酵素の δ サブユニットが痕跡として持つか否かを明らかにすることで、ほぼ全ての生物で保存されている ATP 合成酵素が、オルガネラ化に伴い、機能を失っていくなど、機能が変化していく過程を明らかにすることを目的とした。

2. 研究成果

(1) 出芽酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素 δ サブユニットの機能解析

ミトコンドリア ATP 合成酵素では、δ サブユニットの他に ε サブユニット（バクテリア ATP 合成酵素の ε サブユニットとは異なるもので、バクテリアではこれに対応するサブユニットは無い。）が存在し、X 線結晶構造解析の結果では、これが δ サブユニットの C 末端ドメインの構造変化を妨げているように見える。そこで「ε サブユニットは δ サブユニットによる活性調節を抑制する働きを持ち、ε サブユニットが存在しない場合には、δ サブユニットによる活性調節が起こる」という可能性を考え、$\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ 複合体を調製し、δ サブユニットによる活性調節について調べることとした。

まず、出芽酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素 δ サブユニットの大腸菌を宿主とした大量発現系、精製系を構築した。蛍光標識を目的として Arg119 を Cys に置換した変異体を作成し、更にこの変異体へ内在性の Cys（Cys85）を Ala に置換する変異を導入した。変異タンパク質は、変異体発現プラスミドを含む大腸菌から、DEAE-Toyopearl および Butyl-Toyopearl によるカラムクロマトグラフィーによって精製することができた。得られた変異体 δ サブユニット（C85A/R119C）の Cys119 に対して、Cy3-maleimide による蛍光標識を行い、蛍光強度の変化によって ATP 結合を

測定した。

ATP の添加に伴う蛍光の増加が見られたことから、出芽酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素の δ サブユニットは、ATP 結合能を持つ事が示唆された。しかしながら、蛍光変化の ATP 濃度依存性を求めたところ、ATP 結合の解離定数 K_d は 140 mM と見積もられ、ここで見られた ATP 結合には、生理的な機能は無いものと考えられた。ミトコンドリアの祖先のバクテリアでは、δ サブユニットへの生理的な ATP 結合があったものの痕跡かもしれない。

次に、出芽酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素の δ サブユニットによる活性調節が起こるか否かを調べるために、出芽酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素のコア部分の複合体（$\alpha_3\beta_3\gamma$）の大量発現系を作製することとした。出芽酵母ゲノムから、α、β、γ サブユニットの遺伝子を PCR 法により増幅し、それらの遺伝子をバクテリア ATP 合成酵素のオペロン状に連結した DNA 断片を作製した。得られた DNA 断片を大量発現用のプラスミドにクローニング、大腸菌に導入し、酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素の $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の発現を調べた。様々な培養条件を検討したが、活性を持った複合体の発現は確認できなかった。β サブユニットに導入した His-tag に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った結果、不溶性画分に β サブユニットの発現が認められた。しかしながら、可溶性画分への発現は認められなかった。ATP 合成酵素の立体構造形成を助ける分子シャペロンである、Atp11p、Atp12p との共発現を試みたが、活性のある $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の発現は確認できなかった。β サブユニット以外のサブユニットについては、発現を確認できなかったため、酵母遺伝子に含まれる大腸菌のレアコドンの影響でこれらのサブユニットが発現せず、$\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体が形成されない可能性を考えた。そこで、各サブユニットの遺伝子について、大腸菌に最適化したコドンに置き換えた人工遺伝子を作製し、発現を試みた。その結果、いずれのサブユニットについても発現量は大幅に向上し、CBB 染色によって容易に発現が確認できるようになった。しかし、可溶性画分への複合体やサブユニットの発現は見られず、すべて不溶性画分への発現であった。そこで、δ、ε サブユニットも共発現させることで、複合体が安定となり、可溶性画分への発現が改善することを期待し、これらの遺伝子も加えた、α、β、γ、δ、ε、Atp11p、Atp12p の共発現プラスミドを作製した。作製したプラスミドを BL21(DE3)に導入し、様々な培養条件で発現を検討したが、可溶性画分への発現は確認できなかった。宿主を大腸菌 ATP 合成酵素欠損株である、DK8 (DE3)株、および JM103 Δ(uncB-uncD) (DE3)株に変更し、更に検討を行った。その結果、JM103 Δ(uncB-uncD) (DE3)を宿主とし、37℃で 40 時間培養した菌体の可溶性画分に、抗 β 抗体によるウエスタンブロッティングにより、β サブユニットの発現が認められた。また、抗 α 抗体でも、α サブユニットと考えられるバンドが確認された。この条件で培養した菌体を用い、Ni アフィニティークロマトグラフィーによる精製を試みた。しかしながら、カラム吸着画分には、ウエスタンブロッティングでようやく確認できる程度のごく少量の β サブユニットは確認できたが、α サブユニットは確認できなかった。もともと複合体を形成せず、遊離のサブユニットの状態で細胞質画分に存在したか、複合体が不安定で、精製過程で解離してしまった可能性などが考えられた。出芽酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素の $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の調製ができなかったため、バクテリア ATP 合成酵素の $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の ATPase 活性への出芽酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素 δ サブユニットの影響を検討した。その結果、δ サブユニットについて、バクテリア ATP 合成酵素の ε サブユニットで見られるような阻害効果は見られなかった。この結果は、ミトコンドリア ATP 合成酵素の δ サブユニットは、構造としてはバクテリア型の活性調節に必要な領域を持っていながらも、活性調節能は失っているということを示唆するものである。

(2) 出芽酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素 ε サブユニットの機能解析

ε サブユニットについては、大腸菌を宿主とした大量発現系で、発現が見られたが培養スケールを大きくすると再現しなかった。そこで、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質の発現を試みたところ、可溶性の画分に融合タンパク質の発現を確認することができた。ここから精製を試みたが、グルタチオンカラム生成後の標品に含まれる遊離の GST が非常に多く、融合タンパク質を単離することができなかった。ε サブユニット単独ではなく、δ サブユニットとの共発現により、δε 複合体を調製することを試みた。その結果、可溶性画分に両サブユニットの発現が見られ、また常法により δε 複合体を精製することができた。これと δ サブユニット単独で精製した標品を比較することで、ε サブユニットの効果を検討することが可能となった。バクテリア ATP 合成酵素の $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の ATPase 活性への出芽酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素 δε 複合体の影響を検討したところ、δ サブユニットの場合と同様、バクテリア ATP 合成酵素の ε サブユニットで見られるような阻害効果は見られなかった。

(3) 枯草菌 ATP 合成酵素の機能解析

真核細胞由来の ATP 合成酵素との比較対象として、枯草菌由来の ATP 合成酵素の機能解析を進めた。我々のこれまでの研究から、枯草菌 ATP 合成酵素は、非常に強い ADP 阻害を受けている事が分かっている。この強い ADP 阻害の原因として、他の生物由来の ATP 合成酵素では ADP 阻害からの回復を促すとされる、非触媒ヌクレオチド結合部位(α サブユニット)へのヌクレオチド結合が弱いためである可能性を考え、これを検討した。

枯草菌 ATP 合成酵素の $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体(以下、BF_1)の非触媒部位にトリプトファンを導入し、蛍光の消光によって非触媒部位へのヌクレオチド結合をモニターできる変異体を作製した。得られた変異体により測定したところ、BF_1 の非触媒部位へのヌクレオチド結合は十分に強く、通常の活性測定条件下では、非触媒部位に ATP が結合していると考えられた。また、非触媒部位のヌクレオチド結合に必要な Walker モチーフの Lys、Thr を Ala に置換することで、ヌクレオチド結合能を無くした変異体では、反応開始直後には、野生型と同程度の活性を示したが、その後野生型よりも更に低い活性を示した。この結果から、BF_1 の強い ADP 阻害の原因は非触媒部位へのヌクレオチド結合が弱いためではないこと、BF_1 でも、非触媒部位へのヌクレオチド結合により ADP 阻害が一部解除されていることが分かった。

ADP 阻害は全ての ATP 合成酵素で見られる現象であるため、バクテリア、オルガネラを含めた、様々な ATP 合成酵素での ADP 阻害の異同を調べることで、ATP 合成酵素の機能進化についての知見が得られるものと期待できる。

この他、原核生物、真核生物を問わず、ATP 合成酵素に非常によく保存された領域である、β サブユニットの DELSEED 領域と呼ばれる領域の役割について、枯草菌 ATP 合成酵素を材料に調べた。DELSEED 領域の 4 番目の Ser は特によく保存されており、ほぼすべての生物で Ser となっている。しかしながら、枯草菌 ATP 合成酵素では、ほぼ唯一の例外として、Gly となっている。この違いが枯草菌 ATP 合成酵素に見られる特異な性質と関係があるのか、原核生物から真核生物への進化においても保存されているものが、なぜ枯草菌では保存されていないのか？これらの疑問にタンパク質の機能解析という観点から取り組んでいる。しかし、変異体を用いた解析では、ATP 加水分解活性には大きな差はなかった。このため、H^+輸送活性、ATP 合成活性の違いについて解析をする必要がある。

(4) その他

好熱菌 *Bacillus* PS3 由来の ATP 合成酵素で見られる、ATP 合成・加水分解と H^+輸送が条件によって脱共役する現象について、再構成リポソームを用いた実験により、この現象には、ATP 合成酵素以外の因子は不要であることが示された。この他、バクテリアやオルガネラ内エネルギー状態の測定範囲を広げることに応用可能な、ATP 結合能の変化した ε サブユニット変異体の作製に成功した。

3. 優れた成果が上がった点

出芽酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素の δ サブユニット、δε 複合体の調製に成功した。バクテリア ATP 合成酵素の $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体とのヘテロな組み合わせであるが、δ、ε サブユニットの機能解析を進めることができた。その結果出芽酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素の δ サブユニットは、構造としてはバクテリア型の活性調節に必要な領域を持っていながらも、活性調節能は失っているということが示唆された。

4. 課題となった点

活性のある出芽酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素の $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体を調製する事ができなかったため、出芽酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素における δ、ε サブユニットの機能について、調べることができなかった。

5. 研究期間終了後の展望

わずかではあるが、出芽酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素 β サブユニットの可溶性画分への発現が認められたことから、この条件を基に、更に培養・精製条件を検討することで、出芽酵母ミトコンドリア ATP 合成酵素 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ 複合体の調製を目指す。$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ 複合体を得ることができたら、δ、ε サブユニットに変異を導入することで、δ、ε サブユニットの働きを明らかにする。

6. 研究成果公表

【原著論文】

1. ε Subunit of *Bacillus subtilis* F_1-ATPase relieves MgADP inhibition
   Mizumoto, J., Kikuchi, Y., Nakanishi, Y., Mouri, N., Cai, A., Ohta, T., Haruyama, T. and **Kato-Yamada, Y.**
   PLoS ONE (2013) **8**, e73888
2. Severe MgADP inhibition of *Bacillus subtilis* F_1-ATPase is not due to the absence of nucleotide binding to the noncatalytic nucleotide binding sites
   Ishikawa, T. and **Kato-Yamada, Y.**
   PLoS ONE (2014) **9**, e107197
3. High affinity nucleotide-binding mutant of the ε subunit of thermophilic F_1-ATPase
   Kato-Yamada, Y.
   Biochem. Biophys. Res. Commun. (2016) **469**, 1129-1132

【国際学会発表】

1. epsilon Subunit suppresses ADP-inhibition of *Bacillus subtilis* F_1-ATPase
   17th European Bioenergetics Conference (Freiburg im Breisgau, Germany, September 15-17, 2012)
   Mizumoto, J., Kikuchi, Y. and **Kato-Yamada, Y.**
2. Role of Noncatalytic Sites of *Bacillus subtilis* F_1-ATPase
   Tokyo ATPase Workshop (Tokyo, Japan, June 2-3, 2014)
   Ishikawa, T. and **Kato-Yamada, Y.**

【国内学会発表】

1. 枯草菌 FoF_1-ATP 合成酵素の機能解析
   日本生体エネルギー研究会 第 38 回討論会（岡山大学薬学部、2012 年 12 月 22-24 日）
   多賀名智昭、鈴木祥太、河村富士夫、**山田康之**
2. 枯草菌 F_1-ATPase の非触媒部位と ADP 阻害の関係性
   日本生体エネルギー研究会 第 38 回討論会（岡山大学薬学部、2012 年 12 月 22-24 日）
   石川透、**山田康之**
3. 好熱菌 ATP 合成酵素における条件的脱共役状態の解明
   日本生体エネルギー研究会 第 39 回討論会（静岡県コンベンションアーツセンターグランシップ、2013 年 12 月 18-20 日）
   福石健太、稲沢悠、**山田康之**
4. F_1-ATPase の ATP 結合過程における ε サブユニットの役割
   日本生体エネルギー研究会 第 40 回討論会（愛媛大学城北キャンパス、2014 年 12 月 11-13 日）
   源田真、渡邊力也、**山田康之**、野地博行
5. 枯草菌 F_1-ATPase に於ける DELSEED 領域の機能解析
   日本生体エネルギー研究会 第 40 回討論会（愛媛大学城北キャンパス、2014 年 12 月 11-13 日）
   高田浩志、**山田康之**
6. F_1-ATPase における ε サブユニットの活性制御因子としての役割
   第 53 回 日本生物物理学会年会（金沢大学角間キャンパス、2015 年 9 月 13-15 日）
   Makoto Genda, Rikiya Watanabe, **Yasuyuki Yamada**, Hiroyuki Noji
7. 枯草菌 F_1-ATPase に於ける DELSEED 領域の機能解析
   第 53 回 日本生物物理学会年会（金沢大学角間キャンパス、2015 年 9 月 13-15 日）
   Koji Takada, **Yasuyuki Kato-Yamada**
8. 分子内架橋による ATP 合成酵素の条件的脱共役状態の解析
   日本生体エネルギー研究会 第 42 回討論会（名古屋工業大学、2016 年 12 月 19-21 日）
   高田浩志、堀内由紀子、**山田康之**

9. 枯草菌 FoF_1 ATP 合成酵素の ε サブユニットによる活性調節の生理的意義
   日本生体エネルギー研究会 第 42 回討論会（名古屋工業大学、2016 年 12 月 19-21 日）
   赤沼元気、澤田真帆、多賀名智昭、島田友裕、田中寛、河村富士夫、**山田康之**
10. 最強の ATP 結合タンパク質の作製
   日本生体エネルギー研究会 第 42 回討論会（名古屋工業大学、2016 年 12 月 19-21 日）
   藤原美理亜、高田浩志、瀬沼美梨、**山田康之**

外部シグナルによって葉緑体の分裂位置を制御する機構の解明

立教大学大学院理学研究科・生命理学研究センター　塩見　大輔

1. 背景と目的

植物の葉緑体の起源がバクテリアであることはよく知られている。葉緑体の分裂に関わるタンパク質をコードする遺伝子は核ゲノムにコードされているが、それらのうちの一部は、バクテリアを祖先に持つ。すなわち、バクテリアの細胞分裂に必須の因子 FtsZ チューブリンとそれを制御する MinD/MinE タンパク質を持つ。一方で、葉緑体の分裂には、バクテリアには存在しないダイナミン様タンパク質とそれを制御するタンパク質も関与する。つまり、葉緑体の分裂装置は、バクテリア型タンパク質と真核生物型タンパク質によるハイブリッド装置であると言える。FtsZ は Z リングというリング状の構造を作り、そこに様々な分裂関連タンパク質が集合し、バクテリアまたは葉緑体が分裂する。バクテリアや葉緑体が等しく分裂するためには、分裂装置（Z リング）が「中央」を認識するための機構を持つ。しかし、その正確な分子機構は未だに未解明である。バクテリアの細胞分裂においては、Z リングが極および染色体上で形成されることを阻害する因子が存在し、結果的に中央でのみ Z リングが形成され、中央で分裂する。一方、葉緑体においてもこれらの機構が働いていることが予想され、実際にそれに関与すると考えられるタンパク質も同定されている。これらのタンパク質の欠損により、葉緑体分裂異常や形態異常を引き起こすことが報告されているが、その詳細な分子機構の解明はこれからの課題である。また、一部の植物では、葉緑体の分裂と細胞の分裂を同調させており、相互になんらかのシグナルの交換を行っていると考えられる。このようなシグナルが、分裂や分裂位置の制御を行っている可能性も考えられる。我々は、バクテリア（大腸菌）において、中央を正しく認識できない変異株を取得済みである。これは、外部シグナルの認識・シグナル伝達機構に関わるタンパク質に変異を持つ。また、バクテリアにおいても、葉緑体においても、分裂と形態形成はカップルしている。本研究では、外部シグナルによる大腸菌の分裂制御機構および大腸菌の形態形成機構を解析し、そこから得られる知見を基に、外部シグナルによる葉緑体分裂制御機構、形態形成機構の解明を目指す。さらに、葉緑体分裂の再構成実験系を構築し、その制御機構の詳細を明らかにすることも目指す。

2. 研究成果

大腸菌は、細胞外の様々な環境を感知する二成分制御系（two-component system: TCS）を持つ。TCS は、細胞外環境を感知するヒスチジンキナーゼ（HK）と、HK からリン酸基を受け渡され様々な遺伝子の発現を調節するレスポンスレギュレーター（RR）からなる。CpxA(HK)/CpxR(RR)シグナル伝達系は、pH や分泌タンパク質の大量発現など表層ストレスに応答し、ペリプラズム領域のシャペロンタンパク質などの発現を制御する。我々は、CpxR の一アミノ酸変異体（CpxR*と呼ぶ）を発現すると、不等分裂する細胞が現れることを見出した（図 1）。これまでに、大腸菌において、細胞分裂面の制御は MinCDE と SlmA による2つの制御機構が知られており、これらと CpxR の関係についても調べる必要がある。野生株と *cpxR** 変異株の生育速度や細胞の形態の違いについて詳細に解析した。野生株と比べて *cpxR** 変異株は生育速度が遅かった。次に、顕微鏡観察を行い、Z-ring の位置や染色体の有無などを解析した。Z リングの位置と細胞長の詳細な解析から、およそ 15%の細胞で不等分裂を起こしていることが明らかになった。また、DAPI 染色により DNA の局在を調べたところ、不等分裂した小さい方には染色体が含まれているものと含まれていないものがあった（図1）。これまで大腸菌で単離されている細胞極で分裂を起こすミニセル変異体には DNA は含まれていないので、我々が見出したこの変異体は、新規の変異体であると言える。枯草菌は胞子形成をするときに不等分裂するが、その時 FtsZ の発現量が増加する。そこで、*cpxR** 株における FtsZ 量を野生株と比較した。野生株も変異株もタンパク量はほぼ同量であった。このことから、不等分裂の原因は FtsZ タンパク質の量の違いではない。そこで、細胞分裂位置を決定する既知のシステムである

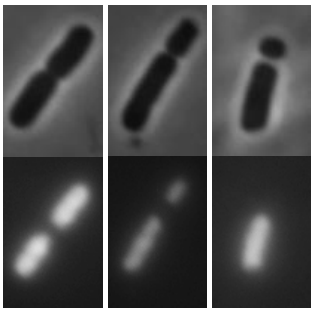


図１．野生株（左）と不等分裂する変異株（中央、右）の位相差顕微鏡像（上段）と DAPI 染色による蛍光像（下段）。

Min システムおよび SlmA との関連を調べるために、*cpxR**と *minC* および *cpxR**と *slmA* の各二重変異株を作成した。それぞれの生育速度は *cpxR** 単独変異株とほぼ同じであった。*minC* 欠損株も不等分裂をするので、*cpxR**Δ*minC* 株の形態解析は非常に困難であった。一方、興味深いことに、*cpxR**Δ*slmA* 株では不等分裂の割合は大幅に減少した。すなわち、*slmA* 遺伝子の欠損が *cpxR** 変異による不等分裂の出現を抑制していることを示している。さらに、*cpxR** による生育の遅延は、不等分裂の出現とは無関係であることも示唆された。次に、野生株、*cpxR** 変異株、*slmA* 欠損株および *cpxR**Δ*slmA* 株で CpxR または CpxR*を大量発現した。*cpxR** 変異株あるいは *cpxR**Δ*slmA* 株で CpxR を大量発現すると、不等分裂が抑制された。*cpxR** 株で CpxR*を大量発現すると不等分裂の割合が増加した。一方、野生株、またはΔ*slmA* 株で CpxR*を大量発現すると、わずかに不等分裂する細胞の割合が上昇した。*cpxR**Δ*slmA* 株で CpxR*を大量発現したところ、*cpxR** 株で CpxR*を大量発現したときほどの不等分裂の割合は増加しなかった。これらの結果は、*slmA* 欠損により CpxR*による不等分裂細胞の発生が抑制されていることと一致する。これまでに、Δ*minC* 株でも不等分裂する（ミニセルを放出する）ことが知られている。一方、Δ*minC*Δ*slmA* 二重欠損株では不等分裂の割合が大きく低下する。これは、本研究で得られた結果、すなわち、*cpxR** による不等分裂は *slmA* 欠損により抑圧されるという結果と一致する。また、CpxR は *minCDE* オペロンのプロモーターを制御するという報告もあり、*cpxR** 株において *minCDE* の発現量が低下している可能性が考えられた。そこで、*cpxR** 変異株で *minC* をプラスミドから発現させると、予想通り不等分裂する細胞の割合が低下した。*minC* の mRNA やタンパク質量を調べ、実際に MinC 量が低下していることを確認する必要がある。

また、CpxR は細胞表層ストレスに応答するので SDS 感受性を調べたところ、*cpxR** 変異によって 32˚C では感受性は変わらなかったが、42˚C では感受性が高くなった。さらに、アンピシリンに対する耐性が上昇していることを見出した。*cpxR** 変異ではアンピシリンの標的である PBP タンパク質の発現量の増加、あるいはペプチドグリカンの過剰な架橋などが起こっている可能性が考えられる。このような細胞表層の違いにより細胞分裂面の異常が引き起こされていると考えられる。今後は、*cpxR* のリン酸化状態と下流の遺伝子発現や、どのような細胞外環境が細胞分裂に関与しているかを明らかにし、CpxR による分裂制御機構を明らかにしていく。

また、シロイヌナズナ AtFtsZ による細胞分裂の再構成系を構築する準備をすすめた。酵母を用いた葉緑体分裂装置再構成系が構築されている (Yoshida, et al., 2016)。まず、大腸菌内でシロイヌナズナ葉緑体の AtFtsZ1, AtFtsZ2-1, AtFtsZ2-2 が Z リングを形成するかを調べた。蛍光タンパク質 sfGFP を付加した AtFtsZ1 および AtFtsZ2 を野生型の大腸菌細胞内で発現させた。AtFtsZ1 の蛍光は細胞質全体に拡散していた。一方で、AtFtsZ2 はときどき分裂面にドット状に局在していたが、それ以外の領域で短いフィラメントおよびドット状の局在パターンを示すことが多く、明らかに Z リングであると推定される局在パターンを示さなかった。FtsZ はバクテリアでも葉緑体でも他のタンパク質により内膜にアンカーされている。そこで、FtsZ-sfGFP の C 末端側に膜標的配列(*M*embrane-*t*argeting *s*equence, MTS) を付加した AtFtsZ2-GFP-2xMTS を作製した。その結果、野生型の大腸菌細胞内において多数のリング状局在が観察された(図2)。また、大腸菌の *ftsZ* 欠失株において、AtFtsZ2 のリング状局在が観察された。この結果は、植物由来の因子が存在しない大腸菌細胞内において、大腸菌膜へ局在させたシロイヌナズナの AtFtsZ2 タンパク質が Z リング様の構造体を形成する能力をもつことを示唆している。大腸菌 FtsZ とシロイヌナズナ AtFtsZ2 のコアドメイン（GTPase ドメイン）は非常に高い相同性を示す。しかし、バクテリア FtsZ とは異なり、AtFtsZ2 には FtsZ コアドメインの N 末端側にさらに約 60 アミノ酸からなる配列が付加されている。同じような N 末端領域の伸長は、他の植物およびシアノバクテリアでも確認され、進化の過程で発生したと推定される。この N 末伸長領域が AtFtsZ2 タンパク質の特性に関与している可能性を検証するため、本領域を欠失させた AtFtsZ2 を作製し、大腸菌内における局在を観察した。その結果、大腸菌の *ftsZ* 欠損株において、sfGFP を付加した AtFtsZ2 は長いフィラメントを形成し、また、MTS を 1 つ付加するだけで多数のリングおよびらせん状のパターンが観察された。この結果は、N 末伸長領域がフィラメント形成能を抑制している可能性を示唆している。

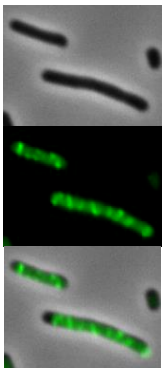


図２．AtFtsZ -GFP-MTS を発現する大腸菌。位相差像（上）、蛍光像（中央）、重ね合わせ像（下）。

このようにして構築した葉緑体分裂再構成系を評価するために以下の実験を行った。ARC3 は葉緑体内で Z リング形成に負の制御を引き起こすと考えられている。すなわち、その大量発現は、Z リング形成を阻害する。我々の再構

成系で ARC3 を同時に発現させたところ、Z リング形成が著しく阻害された。したがって、我々の再構成系は葉緑体分裂装置の機能を模していることが分かる。加えて、ARC6 タンパク質は Z リングを葉緑体内膜にアンカーすると推測されていたが、これまで実験的な証拠は無かった。本研究では、MTS を付加していない AtFtsZ2 と ARC6 を大腸菌内で共発現することで、AtFtsZ2 が正しく膜にアンカーされ、Z リングを形成することを示した。したがって、本研究で構築した再構成系を用いて、機能未知であったタンパク質の機能を明らかにすることができたと言える。この成果は論文にまとめ、現在投稿中である (Irieda and Shiomi, submitted)。

これまで異種細胞を用いた葉緑体分裂再構成には酵母が用いられてきた。しかし、本研究ではバクテリアを用いた葉緑体分裂再構築系を構築することができた。バクテリアは、より生育が早く、遺伝子操作も非常に簡便である。また、葉緑体の祖先はバクテリアであることから、Z リング形成のトポロジー（Z リングはバクテリアの細胞質と葉緑体のストロマでそれぞれ形成される）も同一である。本研究で構築した再構成系を用いて、酵母による再構成系と補完的に実験できれば、より詳細に分裂機構を明らかにできると考えられる。

3. 優れた成果が上がった点

葉緑体分裂装置はバクテリア由来タンパク質と、真核細胞由来タンパク質のハイブリッド装置である。バクテリア由来タンパク質は、FtsZ チューブリンが中心となって、Z リングと呼ばれるリング状の構造体を形成する。Z リングの構築過程とその制御機構を明らかにするために、本研究では、遺伝子操作が容易な大腸菌内でシロイヌナズナ葉緑体分裂装置の再構成に挑戦した。シロイヌナズナ葉緑体の FtsZ を大腸菌で発現させたところ、フィラメントを形成したが、リングを形成しなかった。FtsZ はバクテリアでも葉緑体でも別の膜タンパク質あるいは膜表在性タンパク質によって膜にアンカーされていると考えられている。そこで、FtsZ の C 末端に膜標的配列 MTS を付加したところ、FtsZ-MTS は大腸菌内でも Z リングを形成した。すなわち、他に葉緑体タンパク質が存在しなくても、FtsZ は膜にアンカーされるだけで、Z リングを形成しうることを示した。さらに、構築した再構成実験系が葉緑体分裂を再現しているかを確認するために、葉緑体内で Z リング形成を負に制御する因子 ARC3 を FtsZ-MTS と共発現させると、Z リング形成が阻害された。一方、FtsZ は葉緑体タンパク質 ARC6 によって膜にアンカーされていると考えられているが、その実験的証拠はこれまでなかった。そこで、本研究では、膜標的配列を持たない FtsZ と ARC6 を共発現したところ、FtsZ は Z リングを形成した。また、生化学的にも FtsZ は ARC6 と共に大腸菌の膜画分に含まれていた。このように、本研究で構築した再構成系を使って、これまで機能が分かっていなかった ARC6 タンパク質の機能を明らかにすることができた。以上の結果は、論文としてまとめ、現在投稿中である (Irieda and Shiomi, submitted)。

4. 課題となった点

バクテリアの FtsZ とシロイヌナズナ葉緑体 FtsZ のアミノ酸配列、特にコアドメインである GTPase ドメインは非常に相同性が高い。バクテリア FtsZ も葉緑体 FtsZ も C 末端配列により膜タンパク質と相互作用することにより、膜にアンカーされる。そこで、葉緑体 FtsZ の C 末端をバクテリア由来の C 末端と置き換えたキメラを作成したが、これは大腸菌では機能しなかった。GTPase ドメインの中に固有の種で機能するための配列や、構造的な特徴が隠されているかもしれないことを示唆している。これを解明することにより、FtsZ の機能、Z リングの構築制御機構等がより詳細に明らかになることが期待される。

5. 研究期間終了後の展望

シロイヌナズナの葉緑体分裂の詳細に迫るために、これまでに酵母を用いた葉緑体分裂の再構成系が構築されてきた。本研究では大腸菌を用いた再構成系を構築した。大腸菌を用いる利点は、その遺伝子操作が容易であり、生育がより速い点が挙げられる。加えて、葉緑体の祖先はバクテリアであり、バクテリアのトポロジーは葉緑体と同一である。したがって、より葉緑体に近い状態の再構成が可能となった。本研究で構築した再構成系を用いて、機能未知因子の機能を明らかにすることができると期待される。さらに、葉緑体 FtsZ とバクテリア FtsZ のキメラを用いて、これが大腸菌の FtsZ 変異を相補できるような条件を見いだせば、バクテリアの細胞分裂の理解にも繋がる。したがって、本研究で構築した再構成系は、今後、葉緑体分裂のみならず、バクテリアの細胞分裂の理解も深まると期待される。

6. 研究成果公表

【原著論文】

1. A mutation in the promoter region of *zipA*, a component of the divisome, suppresses the shape defect of RodZ-deficient cells.
   Shiomi, D and Niki, H.
   MicrobiologyOpen (2013) **2**, 798-810
2. ARC6-mediated Z ring-like structure formation of prokaryote-descended chloroplast FtsZ in Escherichia coli.
   Irieda, H and **Shiomi, D**.
   Scientific Reports (2017) in press.

【総説】

1. 細菌形態形成制御機構に関する研究
   塩見　大輔
   日本細菌学雑誌 (2014) **69 (4)**, 557-575

【国内学会発表】

1. 大腸菌形態形成因子複合体内の相互作用から見える RodZ の機能
   第 10 回 21 世紀大腸菌研究会（伊豆、2013 年 6 月 20, 21 日）
   塩見　大輔、桑原　友里、仁木　宏典
2. 大腸菌形態形成因子 RodZ を中心とした複合体内の相互作用
   第 7 回細菌学若手コロッセウム（広島、2013 年 8 月 7～9 日）
   塩見　大輔、仁木　宏典
3. バクテリア細胞形態の再構成に向けて
   「細胞を創る」研究会　6.0（鶴岡、2013 年 11 月 14、15 日）
   塩見　大輔
4. Determination of bacterial shape by the supramolecular machinery containing cytoskeletal proteins.
   日本細菌学会 2013 年度 (第 87 回) 総会（東京、2014 年 3 月 26~28 日）
   塩見　大輔
5. 大腸菌の伸長に関わる超分子複合体構成因子間の相互作用解析
   第 11 回 21 世紀大腸菌研究会（盛岡、2014 年 6 月 5、6 日）
   塩見　大輔、桑原　友里、仁木　宏典
6. MreB による大腸菌の極性決定機構の解析
   第 11 回 21 世紀大腸菌研究会（盛岡、2014 年 6 月 5、6 日）
   川面　拓真、小島　広樹、川井　裕也、仁木　宏典、**塩見　大輔**
7. 大腸菌はどのようにして極性を制御するか？
   平成 26 年度　細菌細胞の増殖と代謝研究会～細菌細胞増殖の多様性～（三島、2014 年 10 月 24、25 日）
   塩見　大輔
8. バクテリアアクチンによる細胞極性制御
   生体運動合同班会議 2015（東京、2015 年 1 月 7~9 日）
   塩見　大輔
9. 膜貫通型タンパク質 RodZ の膜直下配列の重要性の検討
   第 9 回日本ゲノム微生物学会（神戸、2015 年 3 月 6~8 日）
   塩見　大輔、仁木　宏典
10. 大腸菌が新たに極性を作り出す新奇の機構
    2014 年度遺伝研研究会「単細胞の増殖メカニズムの先端的研究」（三島、2015 年 3 月 23、24 日）
    塩見　大輔

11. バクテリアアクチンによる大腸菌の極性制御
第 88 回日本細菌学会総会(岐阜、2015 年 3 月 25~28 日)
塩見 大輔
12. 大腸菌形態形成制御因子 RodZ の細胞内自己相互作用の解析
第 12 回 21 世紀大腸菌研究会(滋賀・琵琶湖グランドホテル)(滋賀、2015 年 6 月 4、5 日)
池邉涼介、桑原友里、仁木宏典、**塩見大輔**
13. バクテリアの形を決める分子メカニズム
第 98 回日本細菌学会関東支部総会(東京、2015 年 10 月 30 日)
川面拓真、池邉涼介、小島広樹、仁木宏典、**塩見大輔**
14. 大腸菌形態形成制御因子の RodZ の自己相互作用による細胞幅の制御
第 9 回細菌学若手コロッセウム(鹿児島、2015 年 11 月 23~25 日)
池邉涼介、桑原友里、仁木宏典、**塩見大輔**
15. バクテリアアクチンによる細胞幅制御機構の解析
生体運動合同班会議 2016(京都、2016 年 1 月 8~10 日)
池邉涼介、桑原友里、仁木宏典、**塩見大輔**
16. バクテリアアクチンが制御する細胞極性
第 10 回日本ゲノム微生物学会(東京、2016 年 3 月 3、4 日)
川面拓真、小島広樹、仁木宏典、**塩見大輔**
17. バクテリアの形態形成メカニズム
第 89 回日本細菌学会総会(大阪、2016 年 3 月 23 日)
川面拓真、小島広樹、仁木宏典、**塩見大輔**
18. MreB アクチンが制御する大腸菌の細胞極性
2015 年度遺伝研研究会「単細胞の細胞構築・運動・増殖機構の研究」(三島、2016 年 3 月 25 日)
塩見大輔
19. バクテリアアクチンが制御する大腸菌の細胞極性
第 13 回 21 世紀大腸菌研究会(熊本県南阿蘇村、2016 年 6 月 2, 3 日)
川面拓真、仁木宏典、**塩見大輔**
20. 一細胞観察から見えてきたバクテリアの形態形成制御機構
日本顕微鏡学会第 59 回シンポジウム(東京都、2016 年 11 月 18, 19 日)
塩見大輔
21. バクテリアアクチンによる細胞極性制御機構
生体運動合同班会議 2017(神戸、2017 年 1 月 6~8 日)
川面拓真、松本夏音、小島広樹、加藤郁也、金井友美、仁木宏典、**塩見大輔**
22. バクテリアクチンとリン脂質による細胞極性制御
第 11 回日本ゲノム微生物学会年会(藤沢、2017 年 3 月 2~4 日)
川面拓真、松本夏音、加藤郁也、金井友美、仁木宏典、**塩見大輔**
23. Regulation of subcellular localization of MreB actin in *Escherichia coli*
第 90 回日本細菌学会総会(仙台、2017 年 3 月 19~21 日)
川面拓真、松本夏音、小島広樹、加藤郁也、金井友美、仁木宏典、**塩見大輔**
24. MreB アクチンを中心とした細胞装置による形態制御機構

2016 年度遺伝研研究会「単細胞システム細胞装置のダイナミズム」（三島、2017 年 3 月 27, 28 日）
塩見大輔

【受賞】

1. 日本細菌学会 2013 年度 (第 87 回) 総会　黒屋奨学賞「細菌形態形成制御機構に関する研究」
塩見　大輔

ゲノム複製サイクル再構成系によるオルガネラ環状ゲノムの試験管内増幅

立教大学大学院理学研究科・生命理学研究センター　末次　正幸

1. 背景と目的

ミトコンドリアや葉緑体といったオルガネラは、太古に共生したバクテリアが起源であると考えられており、独自のゲノム DNA を有する。オルガネラゲノム DNA は一般的なバクテリアゲノムと同様に環状構造をなしているものの、その複製のメカニズムは、バクテリア環状ゲノムの複製機構とはかなり異なっている。また、バクテリアと区別されるオルガネラゲノムの特徴として、細胞あたりに多くのゲノムコピーが含まれることが挙げられる。酸素呼吸や光合成が活発に行われる環境下では DNA 損傷が起こりやすく、頻繁に遺伝子変異が誘発される。このような状況においてオルガネラは、自身の環状ゲノムを多コピー用意することで、一部のゲノムコピーに対する遺伝子変異を許容する防御策をとっている。細胞内のミトコンドリアゲノムの DNA 配列の組成が均一である状態をホモプラスミーとよぶ。一方で加齢などによって遺伝子変異が蓄積してくると、ミトコンドリアゲノムの組成がコピー間で不均一なヘテロプラスミーな状態になっていく。ミトコンドリア環状ゲノムのヘテロプラスミー化は、ミトコンドリアの機能不全につながり、重篤な疾患と深く関わっており、また、神経や運動の機能が衰える原因とも考えられている。

オルガネラ環状 DNA の完全長を均一なクローンとして調製する技術は、オルガネラゲノムがコードする遺伝情報に基づいた分子生物学研究を展開する上で重要である。マウスやヒトなど哺乳動物のミトコンドア DNA はオルガネラ DNA のなかでは比較的サイズが小さく、約 16 kb である。これまでにマウスのミトコンドリア DNA について、大腸菌や枯草菌といった生物学的宿主を利用してクローニングして調製する手法が報告されている（Yonemura et al. 2007 Gene; Ginson et al. 2010 Nature Methods）。一方でこのような生物学的クローニングではクローニングしようとする DNA 配列が宿主に毒性を示すことがしばしば問題となってくる。実際、ヒトのミトコンドリア DNA のクローニングでは D-loop 形成領域と tRNA^{Thr}遺伝子領域が毒性を示し大腸菌を宿主とした手法ではクローニングができないといことが問題となっている(Bigger et al. 2011 Pharmaceutical Research)。

最近我々は、大腸菌環状ゲノムの複製開始・終結・分離のサイクルについて、20 種以上の蛋白質を用いて試験管内で再構成した「複製サイクル再構成系」の構築に成功している（論文投稿準備中）。大腸菌ゲノムは 4.6 Mb の環状構造をしており、唯一の複製起点 *oriC* から両方向に複製が進行する。「複製サイクル再構成系」では複製後に絡み合った姉妹環状 DNA が分離された後、元の環状構造に戻った産物を鋳型として、さらなるラウンドの複製サイクルが次々と何ラウンドも継続して導かれる。よって、等温での環状 DNA 分子の指数増幅が実現される。この反応液を用いると、わずか数分の倍加時間をもって、DNA 環状分子が自発的に増殖するようすが検出される。また、百 kb を超える長鎖な環状 DNA の増幅にも成功している。すでに反応液は全てのタンパク質が混ぜ合わされたキットとして調製、保存することができており、これに *oriC* 環状 DNA を加えて保温するという簡便な操作だけで、その増幅を達成することが可能となっている。そこで本研究では、オルガネラの環状ゲノム DNA について、「複製サイクル再構成系キット」をもちいて環状のまま、試験管内でまるごと増幅する技術の構築に挑戦する。この方法によれば、DNA 配列の細胞毒性などの影響もなしに、試験管内の非常に簡便な操作のみで、長大なオルガネラ環状ゲノムを増幅調製できるようになると期待される。

2. 研究成果

マウス肝臓よりミトコンドリア環状 DNA(mtDNA, 16 kb)を精製調製し、これを鋳型として用いた。複製サイクル再構成系によって増幅されるためには DNA が環状構造をとっているとともに、大腸菌複製開始配列 *oriC* を有している必要がある。mtDNA に *oriC* を導入するため、制限酵素 Eag I により mtDNA を一箇所切断し、この部位に *oriC* 断片 (0.36 kb)をライゲースにより連結した。*oriC* 断片は PCR により増幅調製した。その後、連結産物の一部をそのまま複製サイクル再構成系に加え 30°C で一晩反応させたところ、mtDNA の環状スーパーコイル構造と思われる増幅産物を得ることに成功した。この際、わずか 0.5 ng の mtDNA 断片を連結反応の鋳型にしても、その環状産物の増幅を行うことが可能であった。得られた増幅産物が実際に予想通りの mtDNA の構造を取っていることは、複数の制限酵素を用

いた切断マップ作成により確認された。以上の結果より、大腸菌ゲノム複製サイクル再構成系をもちいてオルガネラ環状ゲノムを増幅調製できることがわかった。試験管内でオルガネラ環状ゲノムを環状のままるごと増幅して見せたのは、本研究が世界的にも初めてである。

複製サイクル再構成系の「長鎖 DNA を増幅できる」という特性を踏まえると、より長大な、酵母のミトコンドリア環状ゲノム（80 kb）や葉緑体環状ゲノムなどのまるごと増幅をも可能とするものと期待される。一方で、このような長鎖 DNA を用いるとなると、ユニークな制限酵素サイト（クローニングサイト）の選択が困難となり、マウスミトコンドリア DNA のような制限酵素処理／ライゲーションを利用した *oriC* の導入法を適用できない。そこで本研究ではさらに、長鎖環状 DNA に oriC を導入するための2つの新規手法の構築を行なった。一つは CRISPR-Cas9 のシステムを利用するものである。このシステムを試験管内で望みの DNA 配列を切断する制限酵素のような形で用いることが可能である。精製した Cas9 タンパク質を用いて長鎖環状 DNA を sgRNA にコードさせた目的とする配列を標的に切断することに成功した。現在、この切断部位に oriC 断片を連結するため、数十塩基対の相同末端同士を連結させる反応系を構築しているところである。*oriC* を導入するためのもう一つの方法として、さらにトランスポゾンを利用する手法を構築した。両末端にトランスポゾン認識配列を持つ oriC 断片を精製したトランスポゼースと混合し保温することで oriC トランスポゾームとすることができる。そして、この *oriC* トランスポゾームを環状 DNA と反応させることで、oriC をランダムに環状 DNA 上に転移させることが可能である。実際、15 kb の環状プラスミドを標的にして、oriC トランスポゾン反応を行なったところ、トランスポゼースに依存して、環状プラスミドの複製サイクル再構成系における増幅が可能となった。さらに、この時もちいる標的 DNA は 0.5 pg と極微量でも良いことが分かった。よって oriC トランスポゾン法は、わずかなオルガネラ試料からでもその環状 DNA の丸ごと増幅を可能とする非常に有用な手法であるといえる。

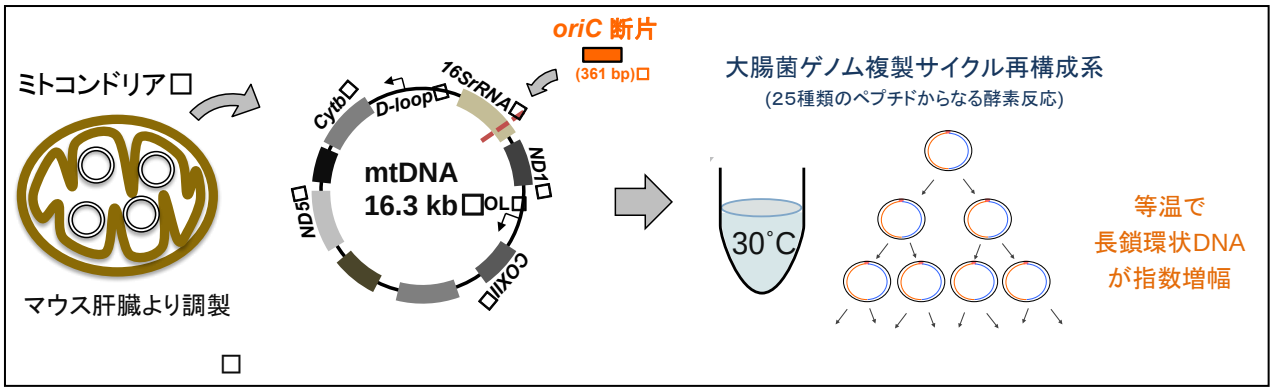


図1：大腸菌ゲノム複製サイクル再構成系をもちいたミトコンドリア環状ゲノムのまるごと増幅

3. 優れた成果が上がった点

本研究では、バクテリアとオルガネラが共に環状構造のゲノム DNA を持つことに着目し、大腸菌ゲノム複製サイクルの試験管内再構成系により、マウス由来のミトコンドリア環状ゲノムの試験管内での丸ごと増幅法構築に至った。さらにトランスポゾンを用いることで、極微量の試料からでも、非常に簡便な操作のみで、環状 DNA に大腸菌ゲノム複製起点 *oriC* を導入し、その増幅を可能とする新技術を開発した。これらの成果はオルガネラゲノム操作の分野で有用なツールを提供するものである。

4. 課題となった点

本技術による増幅のためには、オルガネラ環状 DNA に *oriC* を導入することが必要である。その簡便な方法開発が一つの課題であったが、最終年度において我々は、トランスポゾンの転移反応を試験管内に再現することにより、トランスポゾン化した *oriC* を環状 DNA に導入する簡便な手法を開発した。

5. 研究期間終了後の展望

今後は、本成果技術によって試験管内人工増幅されたオルガネラゲノムの細胞への移植実験を進めていく。そのためまずは、ミトコンドリアゲノム遺伝学的手法の進んだ酵母をモデルとした研究展開を考えている。これにより不妊をはじめとする、ヒトのミトコンドリア関連疾患治療法の開発へとつなげていきたい。

6. 研究成果公表

【原著論文】

1. Overall shapes of the SMC-ScpAB complex are determined by balance between constraint and relaxation of its structural parts
   Kamada, K., **Su'etsugu, M.**, Takada, H., Miyata, M. and Hirano, T.
   Structure, *in press*

【著書・総説・解説等】

1. ゲノム複製サイクル再構成系とその展望
   末次正幸
   人工細胞の創製とその応用(植田充美 監修)、シーエムシー出版(2004)172-180

【国内学会発表】

1. 複製開始・終結・分離サイクルの統合再構成系における環状染色体のふるまい
   第 23 回 DNA 複製・組換え修復ワークショップ(広島、2015 年 10 月 19-21 日)
   末次正幸、辻本寛子
2. ゲノム複製サイクルの in vitro 再構成による長鎖環状 DNA 増幅法
   第 10 回日本ゲノム微生物学会年会(東京、2016 年 3 月 4 日)
   末次正幸、辻本寛子
3. 大腸菌染色体複製サイクルの試験管内再構成
   第89回日本細菌学会総会ワークショップ「バクテリア細胞増殖プロセス研究の最前線」(大阪、2016年3月23日)
   末次正幸、辻本寛子
4. 複製サイクル再構成によるミニ染色体の指数増殖
   生命動態システム科学四拠点合同シンポジウム「生命動態の分子メカニズムと数理」(広島、2016 年 3 月 25-26 日)
   末次正幸
5. 試験管内再構成された環状 DNA 複製の1分子観察にむけた検討
   第 13 回 21 世紀大腸菌研究会(熊本、2016 年 6 月 2-3 日)
   加納 巧希、末次 正幸
6. ゲノム複製の試験管内再構成系とその合成生物学的展開
   第 13 回原子・分子・光科学 (AMO) 討論会「合成生物学 ―試験管の中でゲノムや器官を創る―」(埼玉、2016 年 6 月 3 日)
   末次 正幸
7. ゲノム複製サイクル試験管内再構成系における変異誘発と分子進化
   日本進化学会第 18 回大会ワークショップ「再構築型進化学研究－人工細胞から原始生物まで－」(東京、2016 年 8 月 25 日)
   末次正幸、徳永翼、高田啓、辻本寛子
8. 大腸菌染色体複製サイクルと転写翻訳反応との統合再構成
   第 89 回日本生化学会大会シンポジウム「生化学の基盤戦略:試験管内再構成」(仙台、2016 年 9 月 27 日)

末次 正幸, 辻本 寛子, 高田 啓

9. 10 万塩基を超える長鎖環状 DNA の無細胞クローニング
   第11回ゲノム微生物学会年会（神奈川、2017 年 3 月 3 日）
   末次 正幸、平田 稜、倉田竜明、篠原 赳、辻本 寛子

【国際学会発表】

1. Enzymatic propagation of large DNA circles
   ST CREST-PRESTO joint international symposium (Tokyo, 5-6 Nov. 2015)
   Su'etsugu, M

【受賞】

1. 第 13 回 21 世紀大腸菌研究会 優秀ポスター賞（修士部門）（2016 年 6 月 3 日）
   加納 巧希、末次 正幸

フリーリビング微生物から共生微生物への進化・オルガネラ関連蛋白質の構造生物学的解析

国立研究開発法人海洋研究開発機構　加藤　千明

名古屋大学大学院・工学研究科　渡邉　信久

1. 背景と目的

深海底におけるプレート境界域には、プレートの動きの圧力に相関して海底地殻内に断層帯が走り、その表層にシープ現象と呼ばれる湧水が起きている。こうした環境には、湧水中に含まれるメタンや硫化水素といった化学物質に依存した化学合成生態系が存在する。こうした生態系を構築する生物は、その細胞内に共生細菌を住まわせており、共生細菌のエネルギー生産に依存して生きている。こうした共生状態にある微生物が、最終的にはミトコンドリアのようなオルガネラに進化したと考えられている。本研究では、深海環境の高水圧下に適応して特徴的に生息するフリーリビングなバクテリア、好圧性細菌をモデルとして、いくつかの相同酵素の性質を共生細菌と比較することにより、フリーリビングから共生状態に移行する生理的なプロセスや進化について、構造生物学的な視点からメスを入れていくことを目的とする。

2. 研究成果

マリアナ海溝、深度約 11,000mの海底サンプルから分離された絶対好圧性細菌、*Shewanella benthica* DB21 MT-2 の生産する、イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(SbIPMDH)を精製し、陸上環境由来の近縁菌である、*Shewanella oneidensis* MR-1 の SoIPMDH と比較した結果、好圧菌酵素は、常圧菌酵素と比較して、顕著に高い耐圧性があることが明らかとなっている。そこで、両者のアミノ酸配列の違いから、活性中心近傍のアミノ酸に焦点を当て詳細に検討を行った結果、SoIPMDH の第 266 部位のアミノ酸、Ser を SbIPMDH における同部位のアミノ酸、Ala に変換したところ、SoIPMDH-S266A において、顕著な耐圧性を示した。さらに、SbIPMDH の第 266 番目のアミノ酸、Ala を SoIPMDH における同部位のアミノ酸、Ser に変換した逆の変異酵素 SbIPMDH-A266S を構築し、それらの酵素の諸性質を比較した。その結果、本変異酵素 SbIPMDH-A266S は顕著に加圧下での活性を失い、陸上酵素 SoIPMDH と近い圧力プロファイルを示した。図 1 に、これらの酵素の圧力活性プロファイルをまとめた。これらの酵素の、耐熱性を調べた結果、こうしたアミノ酸の変異が耐熱性に影響しないことが明らかとなり、第 266 部位における1アミノ酸変換は、酵素の加圧下での活性のみに影響を与えることが明らかとなった。

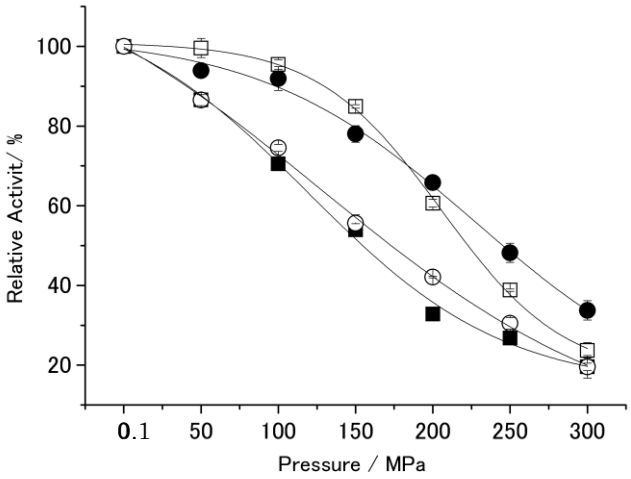


図 1. 各 IPMDH における活性の圧力プロファイル。○: SoIPMDH、●: SbIPMDH、□: SoIPMDH-S266A、■: SbIPMDH-A266S

好圧菌酵素 SbIPMDH を模して S266A 変異を常圧菌酵素 SoIPMDH に導入した SoIPMDH-S266A の高圧構造を解析することで、加圧による水の侵入に対する S266A 変異の効果を調べた。高圧下結晶構造解析法の圧力発生装置であるダイヤモンドアンビルセル（DAC）は設定圧力の再現性が低いため、野生型酵素 SoIPMDH 結晶と変異酵素 SoIPMDH-S266A 結晶を全く同じ圧力下で回折実験することが困難であった。そこでこれらの 2 つの結晶を同時に DAC 試料室にサンプリングし（図 2）、同一圧力下における回折データを収集する方法を考案した。この方法によって得られたデータを用いて両者の結晶構造を解析した結果、変異酵素 SoIPMDH-S266A は加圧による水分子の侵入が軽減されていることが明らかとなった（図 3）。これらの結果から、好圧菌酵素は分子表面の変異によって、高圧下に

おける水の侵入を防ぎ、耐圧性を獲得していることが示唆された。

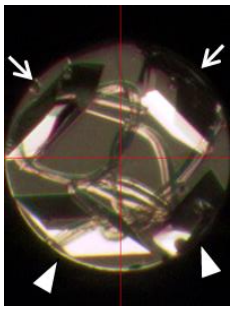


図 2. DAC 試料室内の写真。野生型酵素結晶（三角印）、変異酵素結晶（矢印）。試料室の直径は 0.7 mm。

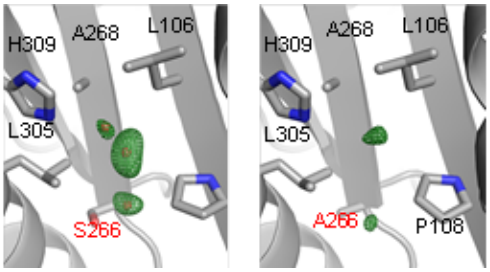
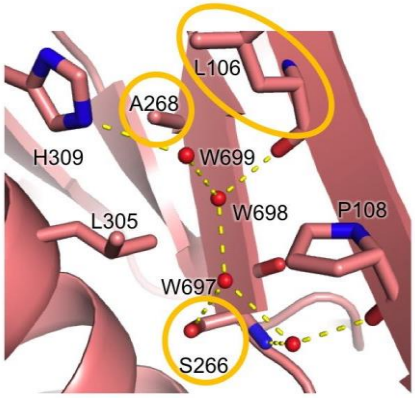


図 3. 580 MPa における水分子の侵入。野生型酵素（左）と変異酵素（右）。メッシュは差電子密度図（3σ）。メッシュ中の赤色の球

さらに検討を加えたところ、図4に示すように、深海生物の IPMDH は第 266 部位付近のくぼみ周辺に系統的な変異があることが分かった。これらの変異と耐圧性の関係を議論するため、L106M と A268I の変異体も作成して高圧結晶構造解析を行った（図5）。これらの結果、水分子の侵入防御には第 266 部位の変異が最も重要であることが確認された。



水深(m)		101 110		261 270
6	*S. oneidensis* MR-1	ELFCNLRPAK	---	SMGLLSSASM
5, 110	*S. violacea* DSS12	ELFCNMRPAK	---	SMGLLSSISM
6, 356	*S. benthica* DB6705	ELFCNMRPAK	---	SMGLLSSISM
10, 898	*S. benthica* DB21MT-2	ELFCNMRPAK	---	SMGLLASISM
		***** ****	---	***** *. **

図 4. 第 266 部位付近に侵入した水分子と *Shewanella* 族の IPMDH の水深とアミノ酸変異。

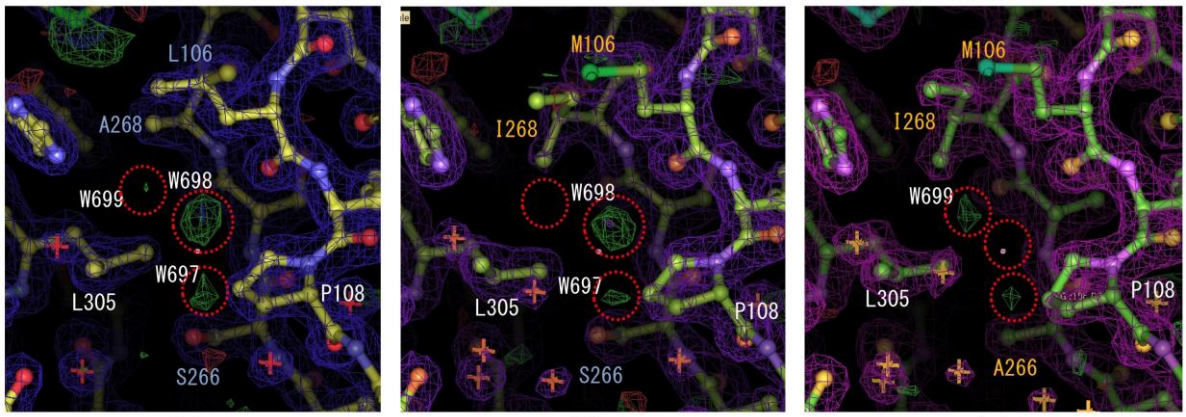


図 5. 第 266 部位付近の 3 箇所の変異と 630 MPa の高圧下での水分子の侵入。(a) 野生型 SoIPMDH, (b) L106M, A268I 変異体, (c) L106M, A268I, S266A 変異体。

こうした、微生物酵素の深海適応の分子メカニズムが、果たして深海生物の酵素に一般的な原理かどうかが興味がもたれる。そこで次の課題として、生育深度が異なるいくつかの *Moritella* 属のリンゴ酸脱水素酵素（MDH）を結晶構造解析・構造比較し，蛋白質の耐圧性と水和構造の関係を明らかにすることを試みている。まずは比較的生育深度が浅い *Moritella* sp. 5710 由来 MDH（M5710MDH）の結晶構造解析に取り組んだ。大腸菌組換発現系を用いて蛋白質を調製し複数の条件で結晶を得ることに成功した。得られた結晶構造を基に深海の *Moritella* 属由来 MDH の変異箇所の分布をマッピングしたところ、変異の多くは活性サイト近傍ではなく分子表面に散在していることが明らかにな

った(図6)。

これは IPMDH で見られたような圧力の変化に伴う水分子との相互作用の変化に対応するためと考えられる。M5710MDH の結晶構造を用いて深度 6,100m で採取された *Moritella* sp. 2D2 株由来の MDH(M2D2MDH)

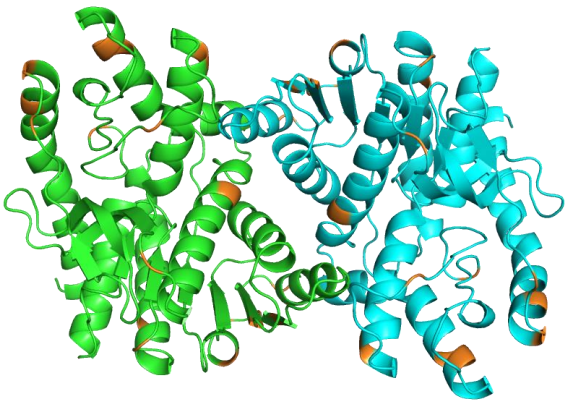


図 6．*Moritella* 属由来 MDH の変異箇所の分布 リボン表示，M5710MDH の結晶構造．緑，サブユニット A；シアン，サブユニット B；オレンジ，変異箇所．

と、深度 6,400m で採取された *Moritella. japonica* 由来の MDH（MjMDH）のホモロジーモデルを作成した。各ホモログと M5710MDH との相同性は各々96%と 94%と非常に高く、作成したホモロジーモデルの α 炭素原子間の平均二乗偏差は 0.60 Å と 0.64 Å と非常に小さい。次に M5710MDH、M2D2MDH、MjMDH の分子内空隙の大きさを算出した結果、各々7.2×10^3、7.4×10^3、8.2×10^3 Å^3 と、分子内空隙の大きさと生育深度の間に正の相関があることが分かった。同様のことは常圧菌酵素 SoIPMDH と好圧菌酵素 SbIPMDH の常圧下における結晶構造の比較においてもこれまでに示されている（原著論文 2)。これは深海の高圧力下で分子内空隙が圧縮され、酵素の機能発現に必要な柔軟性や運動性が損なわれてしまうのを防ぐために分子内空隙が確保されていることを反映していると考えられる。

また、深海環境に適応した生物の、オルガネラ進化前の共生細菌においても起こっているか確認するために、深度別(1000~7000m)に採取したシロウリガイ・エラ細胞より共生細菌の DNA を抽出し、各共生細菌 IPMDH 遺伝子の取得を行った。発現の検討を行った結果、最終的に pET-21b を利用した大腸菌の発現系に置いて目的タンパク質が発現していることが確認された(図7)。しかしながら酵素活性は確認できなかったことから、不活性型として沈殿に集積していることが推定された。不活性型からの活性の回復を試みたが、結果的には活性の回復は見られなかった。このことから、共生菌の本酵素は、細胞内において活性型としては存在していないことが示唆された。

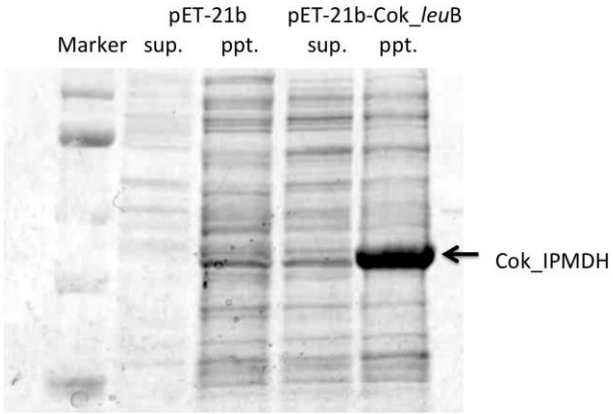


図 7．シロウリガイ酵素（Cok_IPMDH）の、発現ベクターの利用によるタンパク質発現の確認。

3. 優れた成果が上がった点

深海高水圧下に適応している絶対好圧菌 *Shewanella benthica* DB21MT-2 から、IPMDH 酵素遺伝子を取得し、本

酵素の加圧下における活性の安定性維持が、活性中心近傍に位置する 266 番目のたった 1 つのアミノ酸によって引き起こされることを明らかとした。すなわち、常圧菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 からの同酵素（圧力感受性）の 266 番目のアミノ酸残基が親水性のセリンであったのに対し絶対好圧菌では疎水性のアラニンであり、この位置のアミノ酸残基を交換することにより、"耐圧酵素 ⇄ 圧力感受性酵素"への変換が可能であることを明らかとした。酵素の立体構造解析により、深海酵素では一般的に分子内の間隙が有意に大きいことが見いだされ、こうした間隙の大きさと酵素の圧力耐性との相関性が示唆された。

4. 課題となった点

絶対好圧菌における環境圧力下への酵素の適応機構が明らかとなったので、つぎのステップとして細胞内でオルガネラ化しつある、シロウリガイ類の共生細菌（イオウ酸化細菌）の同酵素(IPMDH)の深度別比較の研究に取り組んだが、遺伝子の同定・クローニングまでうまくいったが、同酵素を大量に発現させる過程で行き詰まってしまった。このことから、共生菌の同酵素が大腸菌の大量発現系に於いてリーサルな方向に働いている可能性が示唆されたが、限られた研究期間内では問題を克服することはできなかった。今後は、IPMDH 以外の大腸菌の系で良好に発現しうる別の酵素をターゲットに、深度別比較の研究を進める必要があると考えられる。また、IPMDH で明らかとなったような分子レベルでの耐圧性の解明をオルガネラレベルでの耐圧性にどう繋いで行くかの議論は今後の課題である。

5. 研究期間終了後の展望

環境中に存在していた微生物が、共生細菌となり細胞内オルガネラへと進化していく過程に於いて、ゲノム縮小を始めとするおおくのダイナミックな変化をもたらしていく。今回の課題として残った点に関しては、環境微生物に於いてはその機能が必須であった酵素も、オルガネラ化していくともない、その機能が宿主側に移行もしくは代替され、その本来の機能を失っていた可能性も考えられる。今後の展開としては、そうした酵素の機能の変化について、ゲノム縮小進化の解析とリンクして、進めていくことが望まれる。

6. 研究成果公表

【原著論文】

1. High-pressure- induced water penetration into 3-isopropylmalate dehydrogenase.
   Nagae, T., Kawamura, T., Chavas, L. M. G., Niwa, K., Hasegawa, M., **Kato, C.** and **Watanabe, N.**
   Acta Cryst., (2012) **D68,** 300-309.
2. Structural analysis of 3-isopropylmalate dehydrogenase from the obligate piezophile *Shewanella benthica* DB21MT-2 and the nonpiezophile *Shewanella oneidensis* MR-1.
   Nagae, T., **Kato, C.** and **Watanabe, N.**
   Acta Cryst., (2012) **F48,** 265-268.
3. Pressure effects on the chimeric 3-isopropyl malate dehydrogenases of the deep-sea piezophilic *Shewanella benthica* and the atmospheric pressure adapted *Shewanella oneidensis*.
   Hamajima, Y., Nagae, T., **Watanabe, N.**, Yamada, Y., Imai, T. and **Kato, C.**
   Biosci. Biotechnol. Biochem., (2014) **78,** 469-471.
4. Pressure adaptation of 3-isopropylmalate dehydrogenase from an extremely piezophilic bacterium is attributed to a single amino acid substitution.
   Hamajima, Y., Nagae, T., **Watanabe, N.**, Ohmae, E., Kato-Yamada, Y., and **Kato, C.**
   Extremophiles, (2016) **20,** 177-186.

【著書・総説・解説等】

1. Microbiology of piezophiles in deep-sea environments.
   Kato, C.
   In: "Extremophiles: Microbiology and Biotechnology" (Ed. Roberto P. Anitori), Caister Academic Press, Norfolk, UK, (20012) pp. 233-263.
2. 深海微生物の圧力耐性機構。
   加藤 千明

「進化する食品高圧加工技術ー基礎から応用までー」(監修:重松亨、西海理之)第 1 編　基礎編、第 2 章第 4 節　株式会社エヌ・ティー・エス（2013）pp. 65-84。

3. 圧力と生命。
   加藤 千明
   「深海と地球の事典」(深海と地球の事典編集委員会編)第 1 章　深海を知る、1−2 節　丸善出版、(2014) pp. 7-16。
4. 高圧下蛋白質結晶構造解析法による蛋白質構造研究：加圧による 3-isopropylmalate dehydrogenase の水和構造変化の観測と深海微生物由来酵素の圧力適応機構の解明
   永江 峰幸、濱島 裕輝、河村 高志、丹羽 健、長谷川 正、**加藤 千明**、**渡邉 信久**
   高圧バイオサイエンスとバイオテクノロジー（野村一樹、藤澤哲郎、岩橋均　編）、三恵社 (2015) pp. 145-152。
5. 深海微生物の特徴と生産する酵素の高水圧適応メカニズム
   加藤 千明
   食品と容器 (2016) 第 57 巻第 5 号、pp. 282-288.
6. 【学研まんが，科学不思議クエスト】ブキミ生物出現、深海からの SOS！（まんが：高田慎一郎）。
   加藤 千明（監修）
   学研プラス（2016）。
7. 【解説】深海世界と高圧力下の生命。
   加藤 千明
   高圧力の科学と技術（2017）第 27 巻 第 1 号。

【国際学会発表】

1. Analysis of the piezophiles' enzymes under pressure conditions.
   International Workshop on Deep Sea Microbiology (Shanghai Jiao Tong Univ., Shanghai, China, Oct. 26, 2012)
   Kato, C. (Invitation Lecture)
2. Analysis of the enzymes from the deep-sea piezophilic bacteria under pressure conditions.
   7th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (Ohtsu, Japan, Oct. 31, 2012)
   Kato, C. (Keynote Lecture)
3. (1) Microbial change at the Japan Trench after 3.11 Tohoku-Pacific ocean earthquake (M9.0). (2) Analysis of the enzymes from the deep-sea piezophilic bacteria under pressure conditions.
   Third Institute of Oceanography, SOA & Key Laboratory of Marine Biogenetic resources, SOA (Xiamen, China, Nov. 13, 2012).
   Kato, C. (Invitation Lecture)
4. Properties of 3-Isopropylmalate dehydrogenase from the deep-sea and non deep-sea *Shewanella* strains.
   9th International Congress of Extremophiles (Sevilla, Spain, Sep. 13, 2012)
   Hamajima, Y., Nagae, T., **Watanabe, N.**, **Kato, C.**, Yamada, Y. and Imai, T.
5. High-pressure-induced water penetration and pressure adaptation of IPMDH from deep-sea bacteria.
   2012 Meeting of the American Crystallographic Association (Boston, USA, Sep. 30, 2012)
   Watanabe, N., Nagae, T., Hamajima, Y., Kawamura, T., Chavas, L., Niwa, K., Hasegawa, M. and **Kato, C**.
6. The effects of the mutations in 3-isopropylmalate dehydrogenase activity from the non piezophilic *Shewanella* strain, under pressure conditions.
   7th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (Ohtsu, Japan, Oct. 31, 2012)
   Hamajima, Y., Nagae, T., **Watanabe, N.,** Kato-Yamada, Y., Imai, T. and **Kato, C.**
7. Water penetration and pressure adaptation of 3-isopropylmalate dehydrogenase revealed by high-pressure protein crystallography.

7th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (Ohtsu, Japan, Oct. 31, 2012)
Nagae, T., Hamajima, Y., Kawamura, T., Niwa, K., Hasegawa, M., **Kato, C.** and **Watanabe, N.**

8. The Devices for Sampling and Isolation of Piezophiles from the Deep-sea Environment, the DEEP BATH system.
Workshop on *In-situ* Enrichment of Marine Microbes, Key lab of Marine Biogenetic Resources, The Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen, China. (Nov. 5-6, 2013)
Kato, C. (Invitation Lecture)
9. Microbial diversity of the deep-sea piezophilic microorganisms, and their pressure adapted mechanisms.
International Symposium: THINKING BIG ABOUT SMALL BEINGS: RECENT ADVANCES ON MICROBIAL DIVERSITY, ECOLOGY AND BIODISCOVERY, BIOTA+10, Sao Paulo, Brazil. (Apr. 29-30, 2014)
Kato, C. (Invitation Lecture)
10. Structural study of the pressure adaptation of proteins from deep-sea bacteria.
XXIII Congress of the International Union of Crystallography, Montreal, Canada. (Aug. 5-12, 2014)
Watanabe, N. (Invitation Lecture)
11. Deep-sea enzymes and their structural features to the pressure adaptation.
10th International Congress on Extremophiles, Saint Petersburg, Russia. (Sep. 7-11, 2014)
Kato, C., Hamajima, Y., Nagae, T., **Watanabe, N.** and Kato-Yamada, Y.
12. Cause of the pressure adaptation of 3-isopropylmalate dehydrogenase from obligatory piezophile is attributed to just one amino acid substitution.
10th International Congress on Extremophiles, Saint Petersburg, Russia. (Sep. 7-11, 2014)
Hamajima, Y., Nagae, T., Makino, R., **Watanabe, N**., Imai, T., Kato-Yamada, Y. and **Kato, C.**
13. Pressure adaptation of the deep-sea enzymes and discovery of the high-pressure X-ray systems.
4th International Workshop on Deep Sea Microbiology (DSM), Brest, France. (Sep. 15-17, 2014)
Kato, C., Hamajima, Y., Nagae, T., **Watanabe, N.** and Kato-Yamada, Y. (Invitation Lecture)
14. Microbial diversity of the piezophilic microorganisms and the pressure adaptation mechanisms of the deep-sea enzymes.
International Marine Microbiology Conference. Quindao, China. (May 24, 2015)
Kato, C. (Keynote Lecture)
15. Microbial diversity of the deep-sea piezophiles and their molecular mechanisms for pressure adaptation.
HAST-Work Shop, Hadal Science end Technology Research Center, Shanghai, China. (June 9, 2015)
Kato, C. (Invitation Lecture)
16. Life in the High-Pressure World –High-pressure microbiology, it's advantage for future aspect-.
Marine Biodiversity Institute of Korea (MABIK), Korea. (May 9, 2016)
Kato, C. (Invitation Lecture)
17. Pressure Adaptation of the Deep-sea Enzyme Is Attributed to a Single Amino Acid Substitution.
11th International Congress on Extremophiles, Kyoto, Japan. (Sep. 12-16, 2016)
Kato, C., Hamajima, Y., Nagae, T., **Watanabe, N.,** Ohmae, E. and Kato-Yamada, Y.

【国内学会発表】

1. 常圧菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 由来 IPMDH への水分子の侵入
日本蛋白質科学会年会（2012 年 6 月 20 日）
永江 峰幸、河村 高志、Leonard Chavas、丹羽 健、長谷川 正、**加藤 千明**、**渡邉 信久**
2. 極限環境下の生命から共生・進化。
生命の起源及び進化学会・夏の学校（東京理科大学総合研究機構 **RNA** 科学総合研究センター、野田市、2012 年 7 月 14 日）
加藤 千明（招待講演）
3. High-pressure-induced water penetration into IPMDH and pressure-adaptation mechanism of the proteins from deep-sea bacteria.
日本生物物理学会年会（2012 年 9 月 23 日）
Nagae, T., Hamajima, Y., Kawamura, T., Niwa, K., Hasegawa, M., **Kato, C.** and **Watanabe, N.**

4. 深海における生命と環境。
第 7 回高圧バイオサイエンス国際会議　一般公開講演会。（ピアザ淡海、大津市、2012 年 10 月 28 日）
加藤 千明（招待講演）
5. 加圧による 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素への水分子の侵入：深海微生物の酵素の圧力適応。
第 53 回高圧討論会（大阪大学会館、2012 年 11 月 9 日）
永江 峰幸、濱島 裕輝、河村 高志、丹羽 健、長谷川 正、**加藤 千明**、**渡邉 信久**
6. 深海由来絶対好圧菌由来のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の耐圧性は1アミノ酸に起因する
極限環境生物学会 2012 年度 (第 13 回) 年会（日本大学文理学部、2012 年 12 月 1、2 日）
濱島 裕輝、永江 峰幸、**渡邉 信久**、牧野 龍、山田 康之、今井 竹夫、**加藤 千明**
7. 常圧菌由来イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の耐圧性の獲得
日本農芸化学会 2013 年度大会（仙台市、2013 年 3 月 25 日）
濱島裕輝、永江峰幸、**渡邉信久**、牧野龍、山田康之、今井竹夫、**加藤千明**
8. 深海由来好冷圧性細菌のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵の耐圧性の解明。
第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会（那覇市、2013 年 6 月 1 日）
濱島裕輝、永江峰幸、**渡邉信久**、牧野龍、今井竹夫、山田康之、**加藤千明**
9. 深海由来好冷圧性細菌のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵の耐圧性
第 18 回生物関連高圧研究会シンポジウム（岐阜大学、岐阜市、2013 年 9 月 5-6 日）
濱島裕輝、永江峰幸、**渡邉信久**、牧野龍、今井竹夫、山田康之、**加藤千明**
10. 高圧下結晶構造解析法による深海好圧菌由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の圧力適応機構の解明
第 18 回生物関連高圧研究会シンポジウム（岐阜大学サテライトキャンパス、2013 年 9 月 5 日）
永江 峰幸、濱島 裕輝、河村 高志、丹羽 健、長谷川 正、**加藤 千明**、**渡邉 信久**
11. 深海由来好冷圧性細菌のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵の耐圧性は 1 アミノ酸に起因する
第 86 回日本生化学会大会（パシフィコ横浜、横浜市、2013 年 9 月 11 日）
濱島裕輝、永江峰幸、**渡邉信久**、牧野龍、今井竹夫、山田康之、**加藤千明**
12. 特殊環境微生物のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵の耐圧性について
特殊環境微生物セミナー（広島大学、東広島市、2013 年 10 月 11 日）
濱島裕輝、永江峰幸、**渡邉信久**、牧野龍、今井竹夫、山田康之、**加藤千明**
13. 高圧下結晶構造解析による深海微生物由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の圧力適応機構の解明
日本結晶学会年会（熊本大学、2013 年 10 月 12 日）
永江 峰幸、濱島 裕輝、河村 高志、丹羽 健、長谷川 正、**加藤 千明**、**渡邉 信久**
14. 深海由来好冷好圧性細菌のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の高圧適応
第 14 回極限環境生物学会年会（明治大学、川崎市、2013 年 10 月 26 日）
濱島裕輝、永江峰幸、**渡邉信久**、牧野龍、今井竹夫、山田康之、**加藤千明**
15. 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の耐熱化イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の圧力耐性について。
日本農芸化学会 2014 年度大会、明治大学、川崎市。（2014 年 3 月 28 日）
濱島裕輝、永江峰幸、**渡邉信久**、牧野龍、山田康之、今井竹夫、**加藤千明**
16. 深海由来好冷好圧細菌のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の耐圧性と律速反応について。
特殊環境微生物セミナー2014、名古屋大学、名古屋市。（2014 年 10 月 1 日）
濱島裕輝, 永江峰幸, **渡邉信久**, 牧野龍, 今井竹夫, 山田康之, **加藤千明**
17. 極限環境微生物のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の耐圧性。
第 15 回極限環境生物学会年会、今帰仁村コミュニティーセンター、沖縄県。（2014 年 11 月 2 日）
濱島裕輝、永江峰幸、**渡邉信久**、牧野龍、今井竹夫、山田康之、**加藤千明**
18. 深海酵素の圧力適応メカニズム。
第 10 回長野ミーティング、ラフォーレ倶楽部白馬八方、長野県。（2016 年 1 月 25 日）
加藤千明

19. 深海世界と生命ー高水圧の中のいのちー。
未来を拓く高圧力科学技術セミナーシリーズ(41)「生命科学における高圧力研究の異分野融合」、青山学院大学青山キャンパス、渋谷区。(2016 年 3 月 17 日)
加藤千明(基調講演)
20. 深海好圧性微生物由来酵素における高圧適応の分子・構造メカニズム。
日本農芸化学会 2016 年大会、札幌コンベンションセンター、札幌市。(2016 年 3 月 28 日)
加藤千明、濱島裕輝、永江峰幸、渡邉信久、大前英司、今井竹夫、山田康之
21. シロウリガイ共生細菌由来イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の活性。
日本農芸化学会 2016 年大会、札幌コンベンションセンター、札幌市。(2016 年 3 月 28 日)
濱島裕輝、山田康之、加藤千明
22. 深海酵素における高圧力適応戦略
第 57 回高圧討論会、筑波大学大学会館、つくば市。(2016 年 10 月 28 日)
濱島裕輝, 永江峰幸, 渡邉信久, 大前英司, 山田康之, 加藤千明
23. 2PS-14, New frontier of high-pressure life science.
第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜市。(2016 年 12 月 1 日)
加藤千明(シンポジウムオーガナイザー)
24. How are the deep-sea enzymes adapted to the high-pressure environment?
第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜市。(2016 年 12 月 1 日)
加藤千明、濱島裕輝, 永江峰幸, 渡邉信久, 大前英司, 山田康之

【受賞】

1. **極限環境生物学会** 2012 年度 (第 13 回) 年会 ポスター賞
濱島 裕輝、永江 峰幸、渡邉 信久、牧野 龍、山田 康之、今井 竹夫、加藤 千明
2. **日本結晶学会** 平成 25 年度(2013 年) 年会 ポスター賞
永江 峰幸、濱島 裕輝、河村 高志、丹羽 健、長谷川 正、加藤 千明、渡邉 信久

【マスコミでの発表】

1. 日刊工業新聞(2016 年 2 月 23 日)朝刊 29 面
立教大など、深海生物のタンパク質、高耐圧機構を解明、1 個のアミノ酸が関与。

ミトコンドリアの形態制御機構と損傷ミトコンドリア排除における役割

立教大学大学院理学研究科・生命理学研究センター　岡　敏彦

1. 背景と目的

ミトコンドリアは原核生物を起源に持つと考えられるオルガネラで，エネルギー産生の場として知られています。しかし原核生物と異なり，ミトコンドリアは真核生物に取り込まれたことで，細胞外の環境やシグナルに応答し，その形をダイナミックに変化させる。例えば，筋肉細胞のミトコンドリアは長く伸長し体積を増すことでエネルギー産生を増進している。また，神経細胞では，ミトコンドリアを断片化することで軸索輸送の効率化を促進している。では，この様なミトコンドリアの形態変化はどのような分子メカニズムで実行・制御されているのだろうか？私達は線虫を用いて，形態制御の係わるミトコンドリアタンパク質を網羅的にスクリーニングし，新規タンパク質を同定した。この中には，ミトコンドリア外膜の形態だけでなく，内膜の形状（特に，クリステ構造）を制御する因子が含まれていた。これらの因子の機能解析を進めることで，ミトコンドリア形態の分子機構を明らかにしたいと考えている。

私達は，線虫の筋細胞のミトコンドリア形態を維持するのに必要な因子としてPINK1という家族性パーキンソン病の原因遺伝子の一つを見出した。パーキンソン病は運動性ニューロンの変性や脱落などを伴う進行性の神経変性疾患で，日本人では65歳以上の約1%が発症することが知られている。分子生物学の進歩と共に，1990年代に家族性パーキンソン病の原因遺伝子が相次いで発見され，最近の様々な研究により，原因遺伝子産物の一つであるParkinが活性酸素などによりダメージを受けたミトコンドリアに特異的に結合し，それを排除するというモデルが提唱されている。つまり，パーキンソン病ではParkinが上手く働けず，ダメージを受けたミトコンドリアが蓄積し，最終的に神経細胞の死を引き起こすと考えられる。現在では，PINK1がミトコンドリアに最初に標的化することで，Parkinを呼び込むことが明らかになっている。ミトコンドリアの品質管理と細胞死という観点から，PINK1の生理的役割を明らかにすることで，パーキンソン病の発症の分子メカニズムに迫ることが出来ると考えている。

2. 研究成果

(1) PINK1の自己リン酸化によるタンパク質複合体形成とParkinのミトコンドリア標的化の制御

PINK1はSer/Thrキナーゼであり，Parkinのミトコンドリア標的化に必須の役割を果たしている。私達は，ミトコンドリア膜電位の低下伴ってPINK1が自己リン酸化することを見出した。質量分析および変異解析から，PINK1の自己リン酸化部位がSer228とSer402であり，これらの残基は構造的に非常に近接していた。これらの部位をAlaに置換した変異体では，PINK1の自己リン酸化が検出されず，また膜電位の低下に伴ったミトコンドリアへのParkinの移行が観察されなくなった。逆に，Asp置換変異体では，正常にParkinのミト コンドリアへの移行が観察された。以上の結果より，PINK1のSer228およびSer402残基の自己リン酸化は，Parkinのミトコンドリア標的化のために不可欠だと考えられた。そこで，ミトコンドリアに局在しているPINK1をBN-PAGEで解析したところ，タンパク質複合体を形成していることが明らかとなった。このタンパク質複合体の形成は，Ser402残基をAlaに置換した変異体では観察されないのに対して，Ser228残基のAla変異体では正常な大きさの複合体が観察された。また，Ser228およびSer402残基の二重Ala変異体では，やはり複合体形成は観察されなかった。以上の結果より，Ser228とSer402残基の自己リン酸化は異なる機能を有しており，Ser402残基のリン酸化はPINK1タンパク質複合体形成に重要である事が明らかとなった。

PINK1は膜電位のあるミトコンドリアではなく，膜電位の消失したミトコンドリアに集積する特異なミトコンドリアタンパク質である。この標的化機構を解析するため，PINK1のN末端にある典型的なミトコンドリア標的化配列(MTS)を欠損させると，PINK1は膜電位の有無に関係なくミトコンドリアに標的出来るようになった。さらにN末端を欠損させた変異体の解析により，典型的なMTS以外に2つ目のMTSがあり，この2つ目のMTSは典型的なMTSが機能する状態では，働かないことが明らかっとなった。膜電位依存性が異なるこれらの2つのMTSにより，PINK1は膜電位を消失したミトコンドリアに集積できると考えられる。（以上の結果は，東京都立医学総合研究所の田中啓二先生，松田憲之先生との共同研究による成果である。）

(2) PINK1とParkinを介した細胞死

PINK1 と Parkin は障害を受けたミトコンドリアの排除を担うタンパク質リン酸化酵素とユビキチン連結酵素であり，共同で働くことで効率よくミトコンドリアの品質を保持し，細胞全体の恒常性を維持している。PINK1 はダメージを受けたミトコンドリア上のみで活性化し，正常なミトコンドリアでは積極的に分解されている。私達は恒常的に活性化した PINK1 変異体を用いることで，継続的な PINK1 シグナルが細胞へ与える影響を検討した。その結果，PINK1 と Parkin に依存して細胞死が起こることを見出した。この細胞死はアポトーシス時に活性化するカスパーゼの切断・活性化は検出されなかった。そして，カスパーゼ阻害剤でもこの PINK1/Parkin 依存性細胞死を阻害できないことから，アポトーシスとは異なるコントロールされた細胞死であると結論付けた。また，死細胞の形態観察等から，ネクローシスに近い細胞死であることが裏付けられた。これまでプログラムされたネクローシスに関わる因子がいくつか報告されているが，ミトコンドリアに関連する因子として MLKL が知られている。そこで，PINK1/Parkin 依存性細胞死への MLKL の関与を，特異的阻害剤 necrosulfonamide と RNA 干渉法を用いて MLKL の機能を阻害することにより検討したが，継続的な PINK1 シグナルによる細胞死を阻害することはできなかった。つまり，PINK1/Parkin を介した細胞死は，新たなプログラムされたネクローシスであることが示唆された。

さらに，この細胞死は，ミトコンドリアの品質管理機構と同様に，PINK1 のリン酸化活性と Parkin のユビキチン連結活性を必要とした。しかし，経時変化を詳細に解析したとこと，障害ミトコンドリア分解が起きた後に活性化される細胞死であり，ミトコンドリアの選択的排除とは独立に起きることが示唆された。ミトコンドリア分解が本当に不要なのかを検証するため，オートファジー遺伝子の欠損 HeLa 細胞で PINK1/Parkin による細胞死を調べた結果，オートファジー活性を必要とせずに細胞死は起き，ミトコンドリア排除とは異なる機構であることが明らかとなった（神吉先生，山下先生[新潟大]との共同研究の結果）。また，死細胞の形態観察で，ミトコンドリアが残っていることが確認でき，ミトコンドリア排除とは別の機構であることを支持している。次に，プロテアソーム活性が細胞死に必要なのかを阻害剤を用いて検討したところ，プロテアソーム活性に依存して細胞死が起きた。これは，オートファジーが引き起こすミトコンドリアの選択的排除とは別に，プロテアソームを介した細胞死が PINK1/Parkin により制御されていることを示している。

(3) cAMP/PKA 経路によるミトコンドリア品質管理の制御機構

障害を受けたミトコンドリアの排除機構において，膜電位の低下が重要な引き金となり PINK1/Parkin の集積が起こる。しかし，細胞内では障害を受けていないが一時的に膜電位が低下したミトコンドリアが存在する。例えば，神経細胞ではシナプス末端で ATP 産生により低膜電位となったミトコンドリアが細胞体に戻ってくる。このような障害を受けていないミトコンドリアの排除機構からの保護メカニズムは未解明のままであった。私達は環状 AMP(cAMP) の細胞内濃度を上昇させることで，低膜電位のミトコンドリアに PINK1 が蓄積できずに Parkin が標的化されないことを見出した。この過程には，ミトコンドリア内膜タンパク質 MIC60 のリン酸化修飾が重要であり，擬似リン酸化型 MIC60 では低膜電位ミトコンドリアへの Parkin の標的化が完全に阻害された。これは，ミトコンドリアの排除機構がミトコンドリア自身の膜電位だけでなく，細胞内 cAMP 濃度という細胞からのシグナルでも調節される複雑な機構であることを示している。

(4) LETM1 機能欠損変異の同定と *in vitro* 人工膜陥入再構成系による機能解析

LETM1 の欠損は線虫や動物細胞においてミトコンドリアの膨張を引き起こすことから，LETM1 はミトコンドリア形態，特にミトコンドリア体積を制御していると考えられる。*LETM1* 遺伝子は常染色体欠損により引き起こされるヒト Wolf-Hirschhörn 症候群の原因遺伝子の一つでもあるため，これまでに欠損変異のみが報告されている。そこで，ヒト *LETM1* 遺伝子の酵母 *mdm38* 変異への相補能を用いて機能変異を同定した。その結果，単変異 D359A と三重変異 R382A/G383A/M384A が相補能を失うことを見出した。また，HeLa 細胞において，これらの変異体はミトコンドリアに正常に輸送されるが，LETM1 複合体の形成が著しく減少していることが明らかとなった。

LETM1 過剰発現はミトコンドリアのクリステ構造の変形をもたらし，その発現抑制はクリステ構造の消失を引き起こすため，LETM1 はクリステ構造形成に働くと考えられた。そこで，同定した変異体と野生型 LETM1 リコンビナントタンパク質を用いて，人工リポソーム上での膜陥入構造の形成能を検討した。まず始めに，膜陥入構造の電子顕微鏡観察での固定法を急速凍結や化学固定などの条件で試み，化学固定で巨大リポソームが安定して観察できる条件を見出した。この条件を用いて， LETM1 の野生型と変異タンパク質で *in vitro* 膜陥入再構成を行ったところ，野生型 LETM1 を含むリポソームの 26％が膜陥入を持っていたが，変異体ではほとんど陥入は観察されなか

った。この結果は，細胞の生育に影響を及ぼすLETM1変異は膜陥入能が低下していることを示しており，クリステ構造形成とLETM1機能の強い相関を示している。

3. 優れた成果が上がった点

私達は家族性パーキンソン病の原因遺伝子の一つであるPINK1が自己リン酸化することで活性化し，PINK1複合体をミトコンドリア外膜上に形成することで，ユビキチンガーゼであるParkinを障害ミトコンドリアに特異的に標的化させる分子機構を明らかにした（原著論文1）。さらに，この過程が細胞内cAMP濃度により調節されており，cAMP依存性タンパク質リン酸化酵素(PKA)がミトコンドリア内膜タンパク質MIC60をリン酸化することでPINK1を障害ミトコンドリアに蓄積できなくなるため，障害ミトコンドリアの排除が起きなくなる分子機構を解明した（原著論文6）。これは，細胞内での様々な膜電位状態のミトコンドリアの中から障害ミトコンドリアだけを選択的に分解できる機構を示唆している。しかし，様々な細胞の生育条件により障害ミトコンドリアの排除が進まない場合は，PINK1が活性化し続けることでプロテアソーム依存性細胞死を引き起こし，細胞ごと障害ミトコンドリアを排除する機構が存在することも見出した（原著論文5）。この機構により，生物個体はオルガネラと細胞の2つのレベルで積極的な障害ミトコンドリアの排除を行っていると考えられる。

4. 課題となった点

研究成果を論文や大学のホームページで紹介するだけでなく，重要な研究成果についてはプレスリリースにより多くの方の目に留まるように努力をしたが，期待したような反響は得られず，研究内容をより公に公開していく努力をさらに続ける必要性があり，今後の課題である。

5. 研究期間終了後の展望

本研究の課題である「PINK1/Parkinを介したミトコンドリア品質管理の制御機構」と「LETM1によるクリステ構造形成」から得られた成果をもとにしてさらなる研究を推し進め，ミトコンドリアの形態制御と機能調節の分子メカニズムの解明を目指す。

6. 研究成果公表

【原著論文】

1. PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria.
   Okatsu, K., **Oka, T**., Iguchi, M., Imamura, K., Kosako, H., Tani, N., Kimura, M., Go, E., Koyano, F., Funayama, M., Shiba-Fukushima, K., Sato, S., Shimizu, H., Fukunaga, Y., Taniguchi, H., Komatsu, M., Hattori, N., Mihara, K., Tanaka, K., and Matsuda, N.
   Nat. Commun. (2012) DOI:10.1038/ncomms2016
2. Fis1 acts as mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that involved in regulation of mitochondrial morphology.
   Onoue, K., Jofuku, A., Ban-Ishihara, R., Ishihara, T., Maeda, M., Koshiba, T., Itoh, T., Fukuda, M., Otera, H., **Oka, T.**, Takano, H., Mizushima, N., Mihara, K. and Ishihara, N.
   J. Cell Sci. (2013) **126**, 176-185.
3. A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment.
   Okatsu, K., Uno, M., Koyano, F., Go, E., Kimura, M., **Oka, T.**, Tanaka, K. and Matsuda, N.
   J. Biol. Chem. (2013) **288**, 36372-36384. DOI: 10.1074/jbc.M113.509653
4. Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment.
   Okatsu, K., Kimura, M., **Oka, T.**, Tanaka, K. and Matsuda, N.
   J. Cell Sci. (2015) **128**, 964-978. DOI: 10.1242/jcs.161000
5. Constitutive activation of PINK1 protein leads to proteasome-mediated and non-apoptotic cell death independently of mitochondrial autophagy.

Akabane, S., Matsuzaki, K., Yamashita, S. I., Arai, K., Okatsu, K., Kanki, T., Matsuda, N. and **Oka, T.**
J. Biol. Chem. (2016) **291**, 16162-16174. DOI: 10.1074/jbc.M116.714923

6. PKA regulates PINK1 stability and Parkin recruitment to damaged mitochondria through phosphorylation of MIC60.
Akabane, S., Uno, M., Tani, N., Shimazaki, S., Ebara, N., Kato, H., Kosako, H. and **Oka, T.**
Mol. Cell (2016) **62**, 371-384. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.03.037

【著書・総説・解説等】

1. Regulation and physiologic functions of GTPases in mitochondrial fusion and fission in mammals.
Ishihara, N., Otera, H., **Oka, T.,** and Mihara, K.
Antioxid. Redox Signal. (2013) **19**, 389-399. DOI: 10.1089/ars.2012.4830
2. ミトコンドア形態異常と疾患
岡　敏彦
医学のあゆみ (2015) **254**, 447-451.
3. PKA は MIC60 のリン酸化を介して PINK1 と Parkin によるミトコンドリア品質管理を制御する.
赤羽しおり, **岡　敏彦**
実験医学 (2016) **34**, No.16, 2689-2692.

【国際学会発表】

1. Formation of Cristae Structure in Mammals.
The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria from Molecular Mechanisms to Physiological Functions and Diseases (Okinawa, Japan, October 28- November 1, 2013)
Oka, T.
2. A direct role of LETM1 protein in the formation of cristae structure.
The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria from Molecular Mechanisms to Physiological Functions and Diseases (Okinawa, Japan, October 28- November 1, 2013)
Matsui, A., Hatano, A., Nakamura, S., Toyoda, A., Miyano, Y. and **Oka, T**.
3. MIC60 regulates PINK1 activation and Parkin recruitment through cAMP/PKA signaling pathway.
Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology “Mitochondrial Dynamics” (Steamboat Springs, CO, USA)
Akabane, S., Uno, M., Shimazaki, S. and **Oka, T.**

【国内学会発表】

1. ミトコンドリア形態とクリステ膜構造の形成機構
第 85 回日本生化学会年会（福岡国際会議場, 2012 年 12 月 14, 15, 16 日）
岡　敏彦
2. オルガネラ形態の機能的意義
第1回生命分子科学研究会（ホテル甘露の森　ニセコ, 2014 年 3 月 17, 18, 19 日）
岡　敏彦
3. ミトコンドリア形態とクリステ構造の形成機構
第 25 回フォーラム・イン・ドージン（熊本ホテルキャッスル　熊本, 2014 年 11 月 14 日）
岡　敏彦
4. Parkin のミトコンドリア外膜標的化に関わる MICOS 複合体の解析
第 14 回日本ミトコンドリア学会（九州大学百年講堂　福岡, 2014 年 12 月 3, 4, 5 日）
宇野碧, **岡　敏彦**
5. PINK1/Parkin によるカスパーゼ非依存性細胞死の解析
第 14 回日本ミトコンドリア学会（九州大学百年講堂　福岡, 2014 年 12 月 3, 4, 5 日）
松崎航平, 荒井伽奈, 尾勝圭, 松田憲之, 岡　敏彦
6. MICOS 複合体による PINK1 のミトコンドリア標的化の制御機構

第 67 回日本細胞生物学会(タワーホール船堀　東京, 2015 年 6 月 30 日, 7 月 1, 2 日)
赤羽しおり, 宇野碧, 島崎俊太, **岡　敏彦**

7. PINK1 の活性化とカスパーゼ非依存性の細胞死
第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会　合同大会(神戸ポートアイランド, 2015 月 12 月 1, 2, 3, 4 日)
岡　敏彦

8. リン酸化を介した MICOS 複合体による PINK1 の活性化の制御機構
第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会　合同大会(神戸ポートアイランド, 2015 月 12 月 1, 2, 3, 4 日)
赤羽しおり, 宇野碧, 島崎俊太, **岡　敏彦**

9. PINK1 と Parkin によるミトコンドリア品質管理機構は PKA を介した MIC60 のリン酸化により制御されている
第 54 回日本生物物理学会年会（つくば国際会議場, 2016 年 11 月 25, 26, 27 日）
赤羽しおり, 宇野碧, 島崎俊太, **岡　敏彦**

10. PINK1 stability and Parkin mitochondrial targeting are regulated by PKA-mediated phosphorylation of MIC60.
第 39 回日本分子生物学会年会　(パシフィコ横浜, 2016 年 11 月 30 日, 12 月 1, 2 日)
赤羽しおり, 宇野碧, 島崎俊太, **岡　敏彦**

【マスコミ等での発表】

1) 障害を受けた異常ミトコンドリアの排除には PINK1 の自己リン酸化が重要であり、パーキンソン病患者由来の変異 PINK1 では, そのリン酸化が起こらないために病態が生じると考えられた(原著論文 1)。これは、パーキンソン病の早期診断や治療につながる成果であり、共同研究先である東京都医学総合研究所からのプレスリリースをもとに新聞各紙(毎日新聞 2012 年 8 月 22 日、日本経済新聞 2012 年 8 月 25 日、朝日新聞 2012 年 8 月 27 日)で報道された。

2) 障害を受けた異常ミトコンドリアの排除に細胞内の環境(環状 AMP 濃度)が関与することを発見した。特に, 神経細胞においては, 障害は無いが活性が低下しているミトコンドリアの排除メカニズムからの保護機構が示唆された(原著論文 6)。これは, 神経発生やパーキンソン病の病態解明に繋がる成果であり, 立教大学と科学技術振興機構のプレスリリース(2016 年 5 月 6 日)をもとに新聞(化学工業日報 2016 年 5 月 9 日)で報道された。

ニュース

若年性パーキンソン病原因遺伝子産物（PINK1とParkin）によるミトコンドリア品質管理の調節機構の解明

2016.05.06
プレスリリース

私たちの体で使われるエネルギーの多くは、ミトコンドリアと呼ばれる細胞内の小器官で産生されます。ミトコンドリアはエネルギーを産生する際に生じた活性酸素種（ROS）で障害を受けることがあり、障害が蓄積したミトコンドリアは積極的に分解・排斥されます。このような機構をミトコンドリアの品質管理と呼び、若年性パーキンソン病原因遺伝子産物（PINK1とParkin）が重要な役割を果たしています。しかし、PINK1とParkinがどのように細胞内の環境に応答して調節されているかは分かっていませんでした。このたび、立教大学理学部の岡敏彦教授のグループは、徳島大学藤井節郎記念医科学センターの小迫英尊教授のグループと共に、環状AMP（cAMP）という低分子物質がタンパク質にリン酸を付加する修飾（リン酸化）を介してPINK1とParkinのミトコンドリアへの標的化を制御し、ミトコンドリア品質管理を抑制することを発見しました。

立教大学の赤羽しおりPD（ポストドクトラルフェロー）と宇野碧大学院生は、cAMPの細胞内濃度を上昇させるとPINK1とParkinが障害を受けたミトコンドリアに標的化しなくなることを発見しました。さらに、この現象は、cAMPがミトコンドリアタンパク質（MIC60とMIC19）をリン酸化修飾することで生じることを突き止めました。今回の研究成果はパーキンソン病の病態のさらなる理解に貢献するだけでなく、細胞内環境に応じた調節機構の発見により、環境が大きく変化する細胞分化の際にもミトコンドリア品質管理が新たな役割を果たすことを示唆しています。

本研究の成果は米国学術誌「Molecular Cell」に5月5日（米国東海岸時間）付にて発表されました。

生殖細胞形成におけるミトコンドリアの役割※

立教大学大学院理学研究科・生命理学研究センター　木 下　勉

1. 背景と目的

生殖細胞形成の元となる始原生殖細胞（PGC）は、次世代へ生命をつなぐ重要な細胞である。PGC の形成機構は動物種により大きく2種類に分類される。アフリカツメガエルやショウジョウバエでは、胚発生の初期に生殖細胞質が形成され、生殖細胞質を取り込んだ細胞が体細胞とは区別された PGC となる（前成型）。これに対し哺乳類では、胚発生の途中において、組織相互作用により PGC が誘導される（後成型）。いずれの場合でも、完成された PGC の細胞質中には、体細胞には見られない生殖顆粒と呼ばれる細胞質因子が存在し、この因子が PGC の多能性制御に関わることが知られている。生殖顆粒は多数のミトコンドリアに囲まれるように局在し、生殖顆粒の形成と輸送にミトコンドリアが重要な役割を果たしている可能性が指摘されている。ショウジョウバエではミトコンドリア外に存在するミトコンドリア・リボゾームが生殖顆粒形成に関わることが報告されている（Amikura et al., 2005）。アフリカツメガエルでは生殖細胞質と呼ばれる生殖顆粒とミトコンドリアを含む細胞質が存在する。アフリカツメガエルの卵形成過程では、卵核胞近傍に形成されたミトコンドリアの集団（ミトコンドリア・クラウドと呼ばれる）が卵母細胞の成熟とともに植物極側の卵表層へ移動する。このミトコンドリアの移動経路に沿って生殖細胞形成に関わる母性因子も植物極側の卵表層へ移動し生殖細胞質を形成することが知られている（Malgorzata and Etkin, 1998）。受精後の初期発生では、植物極側の表層に広がっていた生殖細胞質がミトコンドリアとともに植物極近傍へ凝集し、この細胞質を取り込んだ細胞が PGC へ分化する（Houston and King, 2000）。こうして PGC 形成の過程では生殖細胞質の近傍にミトコンドリアが局在することが知られているが、生殖細胞形成におけるミトコンドリアの役割には不明な点が多く残されている。

本研究ではアフリカツメガエルを実験モデルとして、始原生殖細胞の形成過程における生殖細胞質とミトコンドリアの関係を解析し、生殖細胞形成におけるミトコンドリアの役割を明らかにすることを目的とする。

（※本研究課題のタイトルは、申請当初は「始原生殖細胞の分化に重要な母性 mRNA 翻訳におけるミトコンドリアの機能」であったが、研究の進捗に伴い、研究内容とタイトルの間にずれが生じたため、タイトルを標記のものに変更した。）

2. 研究成果

生殖細胞形成におけるミトコンドリアの役割を明らかにするために、以下の研究を行った。

（1）PGC 形成過程における Oct60 とミトコンドリアの挙動

哺乳類では未分化性を制御する転写因子である Oct4 がPGCのマーカー遺伝子の1つとなっているが、アフリカツメガエルの生殖細胞では、Oct4 のホモログ遺伝子の発現は報告されていない。そこで、アフリカツメガエルの Oct4 ホモログである Oct60 が PGC 特異的な発現を示すか否かを明らかにするために、Oct60 に対するモノクローナル抗体を作製し、卵形成期から初期発生過程における Oct60 タンパク質の細胞内分布を解析した。その結果、卵形成の初期から Oct60 は転写、翻訳され、卵母細胞の卵核胞、ミトコンドリア集合体および細胞質全体に広く分布することがわかった。受精後の初期発生では Oct60 タンパク質が全ての割球の核内から検出されたが、胞胚期までに核内の Oct60 タンパク質は減少し、植物極側の表層においてのみ Oct60 が強く検出されるようになった。この植物極側表層には抗 GOT 抗体で染色されるミトコンドリアが凝集していることから、生殖細胞質であることが確認できた。PGC で特異的に保存・維持される DEADsouth3'UTR を Venus に連結し、このコンストラクトから合成した RNA を受精卵へ顕微注入したところ、PGC のみを Venus の緑色蛍光でラベルすることができた。この方法を用いて尾芽胚の腸管壁から PGC を単離し、PGC を取り巻く内胚葉細胞と PGC の間で Oct60 の発現を比較解析した結果、内胚葉細胞では検出されなかった Oct60 の mRNA とタンパク質が PGC から検出された。また、Oct60 の過剰発現および機能阻害は PGC の形成異常と生殖隆起への移動阻害を引き起こすことがわかった。これらの結果から、アフリカツメガエルにおいても哺乳動物と同様に、Oct4 のホモログである Oct60 が生殖細胞質の重要な構成因子の一つであり、PGC の形成に重要な役割を果たしていることがわかった。

(2)PGC形成におけるミトコンドリア・リボソームの役割

原核細胞型のミトコンドリア・リボゾームが生殖顆粒形成に関わる可能性を検討するために、PGC 形成におよぼす翻訳阻害の影響を検討した。動物細胞において、シクロヘキシミドは動物細胞のリボソームを、クロラムフェニコールはミトコンドリア・リボソームの特異的阻害を引き起こすことが知られている。そこで、神経胚期から尾芽胚期にかけて50uM のシクロヘキシミドまたはクロラムフェニコールを含む溶液中で胚を発生させ、これらの薬剤処理を行った個体における PGC 形成を、RFP-DEADsouth の赤色蛍光を用いて検出した。シクロヘキシミド溶液中では全ての個体が発生を停止し発生異常が現れるのに対し、クロラムフェニコール溶液中では見かけ上、尾芽胚まで正常に発生が進むことがわかった。これらのクロラムフェニコール処理を行った個体について PGC を検出したところ、st.46 になっても生殖隆起へ到達した PGC は全く検出されず、腹部内胚葉から検出される移動途中の PGC もごく僅かであることがわかった。これらの結果から、ミトコンドリア・リボソームは PGC 形成と密接に関わることが示唆される。

(3)植物極表層におけるミトコンドリアの局所的移動阻害

PGC 形成過程におけるミトコンドリアの挙動を調べるために、抗 GOT 抗体を用いて初期胚におけるミトコンドリアの分布を解析した。その結果、ミトコンドリアは卵母細胞の成熟とともに卵核胞近傍から植物極へ1つの集合体として移動する様子が観察された。その後、ミトコンドリアは小さな粒状に分かれて植物極表層に一旦広がった後、受精後の卵割とともに次第にドット状に再集合し、胞胚期になると植物極近傍に複数の小集団を再形成することがわかった。この時期のミトコンドリアの集合と一致して Oct60 タンパク質も植物極近傍へ集合し、胞胚後期にはミトコンドリアと Oct60 が集合した細胞質をもつ大形の細胞が形成されることがわかった。この細胞はその後、内胚葉の内層へ移動することから、形成初期の PGC であると判断される。胞胚期の植物極に見られる生殖細胞質の集合がミトコンドリアの細胞内輸送を利用しているのか否かを明らかにするために、ミトコンドリアの細胞内輸送を阻害する実験を行った。ミトコンドリアの分布をライブイメージでモニターできる Dria 系統の受精卵を使って、ノコダゾール処理により微小管の形成阻害を行ったところ、初期発生過程に起こるミトコンドリアの集合は完全に阻害されることがわかった。しかしノコダゾール処理胚は正常な卵割ができないため、薬剤処理後の PGC 形成に及ぼす影響を解析するには適していない。そこでミトコンドリアの細胞内輸送のみを特異的に阻害する実験を検討した。Miro1 タンパク質は C 末端にミトコンドリアと結合する膜貫通ドメインをもち、微小管上の Kinesin like protein1 とミトコンドリアを連結することにより、微小管依存的なミトコンドリア輸送に関わることが知られている。この C 末端領域を欠失させた Miro1 ΔC コンストラクトを作製し、得られた合成 RNA を Dria 系統の受精卵の植物極表層へ注入することにより、欠損型 Miro1 ΔC が正常な Miro1 タンパク質の拮抗阻害を通してミトコンドリアの細胞内移動を阻害するか否かを検討した。その結果、Miro1 ΔC の注入胚では原腸胚になっても植物半球の表層に広く分散したままのミトコンドリアが観察された。このミトコンドリアの移動阻害は野生型 Miro1 の共注入によりレスキューされたことから、Miro1 の特異的機能阻害により引き起こされたものと判断される。

(4)ミトコンドリアの移動阻害が及ぼす生殖細胞質の移動と PGC 形成への影響

Miro1 ΔC によるミトコンドリアの凝集阻害が生殖細胞質の移動に及ぼす影響を明らかにするために、生殖細胞質のマーカーの一つである Xpat2 の分布を in situ hybridization 法により調べた。Dria 系統を用いて GFP 蛍光によりミトコンドリアの分布を記録した後、同じ個体について Xpat2 の局在を検出して、両者の分布を比較検討した。その結果、Miro1 ΔC の注入により植物半球に広がったままのミトコンドリアの分布と Xpat2 の分布は極めてよく一致し、Miro1 ΔC はミトコンドリアの移動阻害を介して生殖細胞質の植物極への凝集を阻害することが明らかになった。次に、Miro1 ΔC 注入が PGC 形成に及ぼす影響を調べるために、Miro1 ΔC の合成 RNA と共に、DEADsouth3'UTR を連結した DS-Red2 の合成 RNA を受精卵の植物極表層へ顕微注入した。DEADsouth3'UTR を付加した DS-Red2 の RNA は生殖細胞質中で特異的に保存・翻訳されるため、初期胚中の PGC を赤色蛍光によって容易に検出することができる。そこで、Miro1 ΔC を注入した個体において DS-Red2 でラベルされた PGC の挙動を調べた結果、尾芽胚期の胴部側面に観察される PGC の数が正常胚より少ないことがわかった。幼生初期に背側の生殖隆起へ到達した PGC の数を比較解析した結果、Miro1 ΔC を注入した個体では正常個体に比べて生殖隆起へ到達した PGC の数が有意に減少していることがわかった。

(5)PGC 前駆細胞におけるミトコンドリアの細胞内移動と PGC 形成について

PGC 形成過程におけるミトコンドリアの挙動は、ミトコンドリアが植物極表層へ凝集して特定の細胞へ取り込まれる卵割期の過程と、細胞内に取り込まれたミトコンドリアが細胞膜周辺から核周辺へ移動する胞胚期以降の過程に分か

れる。これまでの研究では、卵割期のミトコンドリアの移動が生殖細胞質の分布と一致すること、Miro1 ΔC によるミトコンドリアの移動阻害が PGC 形成へ阻害的に働くことが明らかになった。そこで次に、PGC 前駆細胞に取り込まれた後のミトコンドリアの胞胚期以降の役割について解析した。卵割期後半に植物極側表層の細胞へ Miro1 ΔC の合成 RNA を顕微注入した後、細胞を解離して DEADsouth3'UTR-DS-Red2 の赤色蛍光でラベルされた PGC 前駆細胞を単離した。Dria 系統を使って蛍光標識されたミトコンドリアの分布をライブイメージとして検出し解析した。その結果、コントロール胚から単離した PGC 前駆細胞では、胞胚期の細胞膜直下に局在していたミトコンドリアが原腸胚期までに細胞中央の核周辺へ移動することが確かめられた。これに対して Miro1 ΔC を顕微注入した胚から単離した PGC 前駆細胞では、多くのミトコンドリアを取り込んだ細胞であっても、ミトコンドリアは細胞膜直下に留まり、核周辺への移行は見られないことがわかった。また、細胞によってはミトコンドリアが複数の集合塊に分かれて細胞膜直下に分散するケースも観察された。野生型 Miro1 を顕微注入した胚から単離した PGC 前駆細胞ではコントロールと同じミトコンドリアの核移行が観察された。Miro1 ΔC を注入した個体ではコントロール個体に比べて生殖隆起へ到達した PGC の数が有意に減少した。これらの結果は、PGC 前駆細胞へミトコンドリアが取り込まれた後にも、微小管を介したミトコンドリアの細胞内移動が行われること、またこのステップは PGC 形成に必須であることを示唆している。

(6)ミトコンドリアと生殖細胞質の連結機構について

これまでの研究より、Miro1 阻害がミトコンドリアの輸送阻害とともに生殖細胞質因子の輸送も阻害されることがわかった。この事は、ミトコンドリアの輸送機構が、生殖細胞質因子の輸送に関与していることを示唆している。そこで、ミトコンドリアと生殖顆粒の両者の相互作用を仲介し得る分子として GASZ に着目した。GASZ は、生殖系列特異的なタンパク質であり、ANK、SAM、ZIP ドメイン、ミトコンドリア局在化シグナル(MLS)を保有する。まず、GASZ の細胞内局在を調べるために赤色蛍光 Mcherry を付加した結果、ツメガエルの GASZ タンパク質は生殖細胞質に局在することが確かめられた。GASZ タンパク質が生殖細胞質へ局在する機構を調べるために、GASZ の様々な欠損コンストラクトを作製し、Mcherry を付加して細胞内局在を解析した。その結果、3種類のドメイン領域を欠損していても、MLS が存在すれば GASZ タンパク質は生殖細胞質へ局在する事がわかった。次に、GASZ の特性を調べるために GASZ タンパク質を内胚葉で過剰発現させ、ミトコンドリアの局在を解析した。 GASZ 全長を過剰発現させた細胞では、異所的なミトコンドリアの凝集体が核近傍で観察された。このミトコンドリア凝集体には、微小管が多く存在することも判明した。これに対して SAMドメインを欠損させた GASZ や MLS を欠損させた GASZ を過剰発現させても、ミトコンドリアの凝集体は観察出来なかった。次に GASZ タンパク質と生殖細胞質因子との関係を調べるために、生殖細胞質因子のひとつである DAZL と GASZ を内胚葉細胞で過剰に発現させる実験を行った。その結果、DAZL のみを過剰発現させた細胞では、DAZL タンパク質が核に局在するのに対し、GASZ と一緒に DAZL を過剰発現させると、DAZL タンパク質は核ではなくミトコンドリアの凝集体に局在する事が明らかになった。以上の事より、GASZ は核近傍にミトコンドリアと生殖細胞質因子を集積させる働きがある事が示唆された。次に、GASZ が PGC 形成に関与しているか調べた。GASZ 全長または、SAM ドメイン欠損コンストラクトを PGC でのみ過剰に発現させた場合、生殖隆起へ到達する PGC が減少した。GASZ を過剰発現した PGC では、ミトコンドリアが核周辺ではなく核とは離れた細胞質中に集積し、DAZL はミトコンドリア凝集体へトラップされて核移行しないことがわかった。これに対して、SAMドメイン欠損の GASZ を発現させた胚では、ミトコンドリアが核周辺へ凝集せず細胞全体へ分散したままとなった。以上の結果より、ツメガエルの GASZ タンパク質は SAM ドメインと MLS 配列を介して生殖細胞質因子とミトコンドリアを連結し、生殖細胞質因子を核周辺へ移動させることにより PGC 形成に関与する事が示唆された。

3. 優れた成果が上がった点

始原生殖細胞(PGC)の形成は生命誕生の鍵となる重要なイベントであり、その仕組みを理解するために多くの研究が行われてきた。その結果、PGC を形成・維持するために生殖細胞質因子が重要な役割を果たすことが明らかとなっている。しかし真核生物の細胞内には、核ゲノムではコードされない独自のゲノムをもつミトコンドリアが存在する。ミトコンドリアは呼吸に必須のオルガネラであり、次世代へ生命を繋ぐためには、核ゲノムとともにミトコンドリアゲノムを PGC へ間違い無く受け渡す仕組みが必要である。しかしこれまでは生殖細胞質を構成する分子の種類と機能に研究が集中しており、PGC 形成におけるミトコンドリアの役割については研究されてこなかった。本研究により、生殖細胞質因子を特定の細胞の核まで運搬する重要な役割をミトコンドリアが果たすことが明らかになった。ミトコンドリアが生殖

細胞質の運搬役を演じることを示したのは、本研究が初めてである。更に本研究では、ミトコンドリアが Miro1 を使って微小管上を移動すること、またミトコンドリアが GASZ を使って生殖細胞質因子を繋ぎ止めていることも明らかにすることができた。哺乳類の GASZ はニュアージュと呼ばれる生殖細胞質因子の形成に関与することが報告されている。また最近、 GASZ はニュアージュ内のミトコンドリアとニュアージュ構成因子の両方と相互作用する事が報告され、その分子機構の解明が注目されている。本研究の成果は、PGC 形成における GASZ の分子機能の一端を明らかにした点においても重要な研究成果といえる。これらの結果は、PGC 形成におけるミトコンドリアの重要な役割を示すとともに、ミトコンドリアが母性遺伝を示す仕組みを明らかにした点においても優れた研究成果である。

4. 課題となった点

本研究では解明できなかった課題が複数残されている。(1) Miro1 の機能阻害実験から、ミトコンドリアが Miro1(Kinesin like protein1) 依存的にミトコンドリアを核周辺へ移動させることが示された。しかし、微小管の極性は核側がマイナス極であり、一般的なキネシンと同様に Miro1 がプラス極に向けて微小管上を移動すると仮定すると、ミトコンドリアの核への凝集は説明できない。今後は Miro1 の詳細な作用機構を明らかにする必要がある。また Miro1 阻害を行った細胞では、凝集阻害を受けたミトコンドリアが細胞の分裂面に沿って広がる様子が観察された。この結果から推測すると、ミトコンドリアの凝集機構としてアクトミオシン系の細胞骨格も関与している可能性も考えられる。(2) 本研究では、ミトコンドリアと生殖細胞質因子を連結するタンパク質として GASZ の重要性を示すことができた。GASZ のドメイン欠損実験から、SAMドメインによって生殖細胞質因子と結合し、MLS 配列によりミトコンドリアと結合するものと予想される。生殖細胞質因子としては様々なタンパク質や RNA が報告されており、GASZ の SAMドメインがどの様な分子と直接的な結合を示すのか、今後の研究課題である。(3) PGC 前駆細胞の核周辺へ到達した生殖細胞質因子のうち、転写制御に関わる因子が GASZ の連結から解放されて核内へ移動し PGC 形成に関わるものと考えられる。また PGC としての性質を獲得した細胞では、核周辺に凝集していたミトコンドリアが細胞質内へ分散することから、ミトコンドリアと生殖細胞質因子を連結していた GASZ タンパク質は、原腸胚期から神経胚期にかけて積極的に分解されることが予想される。しかし今回の研究では、核周辺へミトコンドリアと共に移動した GASZ のその後の運命を追跡できなかった。今後は、ミトコンドリアの凝集解除と生殖細胞質因子の核内移動の機構を明らかにすることが重要な研究課題である。

5. 研究期間終了後の展望

本研究ではミトコンドリアと生殖細胞質因子を連結する GASZ の重要な役割が明らかとなった。有性生殖による世代交代の流れの中で、GASZ 遺伝子はミトコンドリアを次世代へ継承するための重要な遺伝子の1つと考えられる。しかし GASZ 遺伝子の研究はまだ始まったばかりであり、研究の更なる発展が期待される。GASZ 遺伝子の重要性を示す実験結果として、今回行った過剰発現実験を挙げることができる。GASZ タンパク質を過剰発現させた細胞では、ミトコンドリアと生殖細胞質因子の凝集塊が核の近傍で形成され、この凝集塊に微小管が多数集まることがわかった。これは両生類の卵形成過程において古くから知られているミトコンドリア・クラウドに酷似した構造である。ミトコンドリア・クラウドは卵形成初期に核近傍にミトコンドリアと生殖細胞質因子の凝集体として現れるが、その形成機構は不明のままである。核近傍に形成されたミトコンドリア・クラウドは、卵成熟とともに微小管に沿って細胞膜直下に運ばれ分散するが、受精後の PGC 形成に伴って特定の細胞内へ再集合する。この間、ミトコンドリアと生殖細胞質因子は行動を共にすることから、GASZ がミトコンドリアと生殖細胞質因子の移動の鍵を握っているものと予想される。今後は、様々な生物種において GASZ 遺伝子の存在と役割を比較解析することにより、原核生物を起源とするミトコンドリアが真核生物の細胞内において高次機能を獲得してきた経緯を明らかにすることができるものと思われる。

本研究の結果から、ミトコンドリアは PGC 形成において積極的な役割を果たすことにより、次世代への受け渡しを確実なものとしていることがわかった。しかし、PGC と共に生殖巣へ移動してからのミトコンドリアの運命は雌雄により異なっている。雌では PGC によって運ばれたミトコンドリアが卵形成のサイクルに戻り、ミトコンドリア・クラウド形成を経て次世代へ継承される。これに対して雄では、精子形成過程あるいは受精後の細胞内部において、ゲノム DNA の分解やミトコンドリアのユビキチン化により父性特異的なミトコンドリアの分解が行われる。この雌雄差はミトコンドリアの母性遺伝として広く知られているが、ミトコンドリアが雄特異的な分解反応を引き起こす機構については不明な点が多い。本研究で明らかになったミトコンドリアと細胞質因子の連結・輸送機構はミトコンドリアを排除するための仕組みとしても

働き得る細胞内機構であり、更なる研究の展開が期待される。

6. 研究成果公表

【原著論文】

1. Possible regulation of Oct60 transcription by a positive feedback loop in *Xenopus* oocytes.
   Morichika, K., Sugimoto, M., Yasuda, K., and **Kinoshita, T**.
   Zygote. (2012) , **20**, 1-9.
2. The structure and development of *Xenopus laevis* cornea.
   Hu W., Haamedi N., Lee J., **Kinoshita T**., and Ohnuma S.
   Exptl. Eye Res. (2013) , **116**, 109-128.
3. Protocadherin-9 involvement in retinal development in *Xenopus laevis*.
   Izuta Y, Taira T, Asayama A, **Kinoshita T**., and Suzuki S.T.
   J. Biochem. (2015), **156**, 235-249.
4. Pou5f3.2-induced proliferative state of embryonic cells during gastrulation of *Xenopus laevis* embryo.
   Nishitani E, Li C, Lee J, Hotta H, Katayama Y, Yamaguchi M, **Kinoshita T**.
   Dev. Growth Diff. (2015), **57**,591-600.
5. Mitochondrial trafficking through Rhot1 is involved in the aggregation of germinal granule components during primordial germ cell formation in *Xenopus* embryos.
   Tada H, Taira Y, Morichika K, **Kinoshita T**.
   Dev. Growth Diff. (2016), **58**,641-650.
6. Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*.
   Session A, Uno Y, Kwon T(掲載順：73 人中 32 番目 **Kinoshita T**) .
   Nature. (2016), **538**,336-343.
7. Conservatism and variability of gene expression profiles among homeologous transcription factors in *Xenopus laevis*.
   Watanabe M, Yasuoka Y, Mawaribuchi S, Kuretani A, Ito M, Kondo M, Ochi H, Ogino H, Fukui A, Taira M, **Kinoshita T**.
   Dev. Biol. (2017), in press.
8. High variability of expression profiles of homeologous genes for Wnt, Hh, Notch, and Hippo signaling pathways in *Xenopus laevis*.
   Michiue T, Yamamoto T, Yasuoka Y, Goto T, Ikeda T, Nagura K, Nakayama T, Taira M, **Kinoshita T**.
   Dev. Biol. (2017), in press.

【国際学会発表】

1 Oct60 protein is involved in the PGC formation as a germplasm component,.
   14th International *Xenopus* Conference (France, September 9-11, 2012)
   Morichika, K., Shimada, K., Kubo, H., **Kinoshita, T**.
2. Oct60 is involved in the PGC formation as a germplasm component,
   17th International Congress of Developmental Biology (Mexico, June 16-20, 2013)
   Morichika, K., Shimada, K., Kubo,H., **Kinoshita, T**.
3. Tissue reconstruction of myocardium during *Xenopus laevis* metamorphosis,
   15th International *Xenopus* Conference (USA, August 24-28, 2014)
   Kobayashi, M., Sugiura, M., **Kinoshita, T**.
4. Localization of Oct25-expressing cells during develoment and regeneration of hindlimb phalanges in *Xenopus laevis*,
   15th International *Xenopus* Conference (USA, August 24-28, 2014)
   Lee, J., Shoji, Y., **Kinoshita, T**.

5. Mitochondrial transport protein Rhot1 is involved in the aggregation of germinal granule components during primordial germ cell formation in *Xenopus laevis*,
16th International *Xenopus* Conference (Greece, August 28- September 1, 2016)
Tada,H., Taira, Y., Morichika, K., **Kinoshita, T**.
6. Comparative analysis of two POU family class V genes in *Cynops pyrrogaster*
22nd International Congress of Zoology (Japan, November 17-18, 2016)
Kato, D., **Kinoshita, T**.
7. Role of pou5f3.1 in development and wound healing of *Xenopus laevis* skin,
22nd International Congress of Zoology (Japan, November 17-18, 2016)
Shimizu, M., **Kinoshita, T**.
8. Islet-1-expressing cardiac progenitor cells contributes to myocardial formation of adult heart in *Xenopus laevis*,
22nd International Congress of Zoology (Japan, November 17-18, 2016)
Umezawa, S., **Kinoshita, T**.
9. Role of pou5f3.1 in lateral line formation during *Xenopus laevis* development,
22nd International Congress of Zoology (Japan, November 17-18, 2016)
Tachikawa, Y., **Kinoshita, T**.

【国内学会発表】

1. Protein localization and functional analysis of POU-V Oct60 transcription factor in *Xenopus laevis*
45th Annual meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (Kobe, May 28,-31 2012)
Takaichi,Y., Shimada, K., Sugiura, M., Kubo, H.,Morichika,K., Kinoshita, T.
2. アフリカツメガエルのPOU-V型転写因子Oct60タンパク質の局在と機能解析
日本発生生物学会 2012 年度(第 45 回)年会(神戸国際会議場、2012 年 5 月 28-31 日)
高市佳尚、嶋田啓伍、杉浦美紗、久保英夫、森近恵祐、木下勉
3. アフリカツメガエルの成体心臓における組織再生能の解析
日本分子生物学会 2012 年度(第 35 回)年会(マリンメッセ福岡、2012 年 12 月 11-14 日)
山浦貴史、久保英夫、森近恵祐、木下勉
4. アフリカツメガエルの成体血液中に存在する Oct60 発現細胞の解析
日本分子生物学会 2012 年度(第 35 回)年会(マリンメッセ福岡、2012 年 12 月 11-14 日)
河野芙巳香、森近恵祐、久保英夫、木下勉
5. アフリカツメガエルの後肢指骨形成過程における Oct25 発現細胞の解析
日本分子生物学会 2012 年度(第 35 回)年会(マリンメッセ福岡、2012 年 12 月 11-14 日)
庄子由衣、久保英夫、森近恵祐、木下勉
6. アフリカツメガエルの変態期における心臓の組織再構築に関する研究
日本分子生物学会 2012 年度(第 35 回)年会(マリンメッセ福岡、2012 年 12 月 11-14 日)
杉浦美紗、森近恵祐、木下勉
7. Regulation of red blood cell transition from larval to adult type during anuran metamorphosis,
46th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, (Shimane, May 28-31, 2013).
Yamabuchi,M., Kawaguchi,Y., Matsuda,I., Kinoshita, T.
8. Oct60 is involved in the PGC formation as a germplasm component,
46th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, (Shimane, May 28-31, 2013).
Morichika, K., Shimada, K., Kubo,H., Kinoshita, T.
9. アフリカツメガエルの心筋再生と心筋前駆細胞の起源について

日本ツメガエル研究集会 第7回大会（山口、2013年9月24日）
杉浦美紗、山浦貴史、小林愛、森近恵祐、**木下勉**

10. アフリカツメガエルの変態期における成体型心筋形成に関する研究
日本動物学会 第84回大会（岡山、2013年9月26-28日）
杉浦美紗、森近恵祐、**木下勉**

11. アフリカツメガエルの毛様体辺縁部における細胞の分裂能の解析
日本動物学会 第84回大会（岡山、2013年9月26-28日）
李宰勲、森近恵祐、**木下勉**

12. アフリカツメガエルの成体型表皮形成におけるOct25/91の役割
日本動物学会 第84回大会（岡山、2013年9月26-28日）
天川あや、山浦貴史、久保英夫、森近恵祐、**木下勉**

13. アフリカツメガエルの変態期における成体型心筋形成に関する研究
日本分子生物学会 2013 年度(第 36 回)大会（兵庫、2013 年 12 月 2-6 日）
杉浦美紗、森近恵祐、**木下勉**

14. アフリカツメガエルの変態期における心筋の組織再構築
XCIJ-MA研究集会 第8回大会（横浜市大、2014年3月16日）
小林愛、**木下勉**

15. アカハライモリの個体発生におけるPOUファミリークラスV転写因子の発現プロファイルの解析
日本発生生物学会 第 47 回大会（名古屋、2014 年 5 月 27-30 日）
長谷川俊、大谷優樹、**木下勉**

16. アフリカツメガエルの変態期における心筋の組織再構築
日本発生生物学会 第 47 回大会（名古屋、2014 年 5 月 27-30 日）
小林愛、杉浦美紗、**木下勉**

17. TALEN による遺伝子破壊個体を用いた Oct25 の器官形成における機能の解析
日本動物学会 第 85 回大会（仙台、2014 年 9 月 11-13 日）
李宰勲、佐久間哲史、山本卓、**木下勉**

18. Functional analysis of Oct60 in adult organ formation of *Xenopus laevis*
日本分子生物学会 2014 年度（第 37 回）大会（横浜、2014 年 11 月 25-27 日）
伊東直人、佐久間哲史、山本卓、**木下勉**

19. アフリカツメガエルの側線形成における Oct91 の遺伝子発現と機能の解析
日本分子生物学会 2014 年度（第 37 回）大会（横浜、2014 年 11 月 25-27 日）
天川あや、佐久間哲史、山本卓、**木下勉**

20. 呼吸器系変換に伴う肺動脈形成について
日本動物学会 第 67 回関東支部大会（早稲田大、2015 年 3 月 14 日）
古藤舞華、木下勉、**木下勉**

21. 始原生殖細胞形成におけるミトコンドリアの役割について
日本動物学会 第 67 回関東支部大会（早稲田大、2015 年 3 月 14 日）
平裕也、**木下勉**

22. 消化管形成における Oct25 の発現と機能の解析
日本動物学会 第 67 回関東支部大会（早稲田大、2015 年 3 月 14 日）
李宰勲、佐久間哲史、山本卓、**木下勉**

23. アフリカツメガエルの血液中における Oct60 発現細胞の解析
日本発生生物学会 第 48 回大会（筑波、2015 年 6 月 3 日）

佐藤伶奈、河野芙巳香、木下勉

24. アフリカツメガエルの PGC 形成におけるミトコンドリアの役割
日本ツメガエル研究集会 第 9 回大会（秋田、2015 年 9 月 15 日）
多田葉瑠、平裕也、森近恵祐、木下勉

25. アカハライモリにおける CpPOU5F3 の同定と遺伝子発現の解析
日本動物学会 第 86 回大会（新潟、2015 年 9 月 17 日）
長谷川俊、木下勉

26. アカハライモリの四肢形成における骨形成と遺伝子発現について
日本動物学会 第 86 回大会（新潟、2015 年 9 月 17 日）
中尾一石、高野美玖、木下勉

27. 水生及び陸生無尾類における赤血球転換機構の解析
日本動物学会 第 86 回大会（新潟、2015 年 9 月 17 日）
山川菜摘、川口唯、木下勉、山口雅裕

28. アフリカツメガエルの心臓形成に関与する細胞の起源
日本動物学会 第 86 回大会（新潟、2015 年 9 月 17 日）
花房玲奈、木下勉

29. Xenopus laevis 全ゲノム解析：転写因子をコードする遺伝子群の初期発生および成体器官における発現パターンの解析
日本分子生物学会 第 38 回大会（神戸、2015 年 12 月 3 日）
渡部稔、回渕修治、安岡有理、伊藤道彦、近藤真理子、越智陽樹、荻野肇、福井彰雅、平良眞規、木下勉

30. Xenopus laevis 全ゲノム解析：異質四倍体の細胞内シグナル経路関連遺伝子におけるホメオログの保存性と機能分担
日本分子生物学会 第 38 回大会（神戸、2015 年 12 月 3 日）
道上達男、後藤利保、木下勉、山元孝佳、平良眞規、中山卓哉

31. Aggregation of mitochondria during early blastula stage is essential for formation of primordial germ cells in *Xenopus* embryos
日本分子生物学会 第 38 回大会（神戸、2015 年 12 月 3 日）
Haru Tada, Yuya Taira, Keisuke Morichika, Tsutomu Kinoshita

32. 心臓の形成および再生における Pou5f1 と Pou5f3 の発現の比較解析
日本分子生物学会 第 38 回大会（神戸、2015 年 12 月 3 日）
長谷川俊、木下勉

33. アフリカツメガエルの生殖腺形成過程における Pou5f3.3 発現細胞について
日本動物学会 第 68 回関東支部大会（神奈川大、2016 年 3 月 12 日）
久野木悠仁、木下勉

34. *Pou5f3.1* ノックアウトが及ぼす心臓形成への影響
日本動物学会 第 68 回関東支部大会（神奈川大、2016 年 3 月 12 日）
岩瀬晃康、木下勉

35. ゲノム情報を利用した POU ファミリー転写因子の解析
XCIJ-MA研究集会 第10回大会（東大、2016年7月3日）
木下勉

36.アフリカツメガエルの側線形成過程における POU5f3.1 機能の解析、
日本ツメガエル研究集会 第 10 回大会（沖縄、2016 年 11 月 19 日）
立川裕太郎、木下勉

37.アフリカツメガエル始原生殖細胞形成における GASZ の役割について

日本分子生物学会 第 39 回大会(横浜、2016 年 12 月 2 日)

多田葉瑠、木下勉

38. アフリカツメガエルの心臓形成における外胚葉細胞の役割

XCIJ-MA研究集会 第11回大会(慶応大、2017年3月4日)

花房玲奈、木下勉

39. Pou5f3.3 を発現する造血前駆細胞の起源に関する解析

日本動物学会 第 69 回関東支部大会(筑波大、2017 年 3 月 22 日)

佐藤伶奈、木下勉

【国際共同研究】

日米国際コンソーシアム「*Xenopus laevis* のゲノム解読」

日本代表：東京大学・平良眞規、米国代表：カリフォルニア大学・ダニエル・ロクサー、

リチャード・ハーランド (2012 年～2016 年)

【マスコミでの発表】

ゲノム解読成果(Nature,2016,vol.538,336-343)のプレスリリース

「アフリカツメガエルの複雑なゲノムを解読:脊椎動物への進化の原動力「全ゲノム重複」の謎に迫る」

(日時・場所)

2016 年 10 月 18 日、東京大学理学部2号館

(参加メディア)

NHK 報道局、朝日新聞社、日経新聞社、日刊工業新聞社、時事通信社ほか

(内容)

日米国際コンソーシアムによりアフリカツメガエルのゲノム解読に成功した。異質四倍体の巨大なゲノムの中には、約 1800 万年前に全ゲノム重複を起こした2種類のサブゲノムが存在することが明らかになった。これは脊椎動物誕生の鍵となる「全ゲノム重複」の謎を解く鍵となる研究成果である。

ミトコンドリアを中心とした非接着細胞のアポトーシス誘導シグナルの解析 —チロシンホスファターゼ PTP-PEST に注目して—※

立教大学大学院理学研究科・生命理学研究センター　眞島　恵介

1. 背景と目的

繊維芽細胞や上皮細胞などの接着細胞において、細胞外マトリックス分子を介して基質等に接着することが、細胞の生存・増殖に重要であることが知られている。さらに、接着細胞の基質接着のシグナルは細胞運動などにおいても重要は役割を担っているが、接着細胞の基質接着のシグナルは、細胞外マトリックス分子の受容体であるインテグリンから発信される。基質に接着している時の細胞では、接着斑においてインテグリンの細胞内領域と複合体を形成しているタンパク質のチロシン残基のリン酸化するチロシンキナーゼ、Focal adhesion kinase (FAK) の活性化が細胞の生存や増殖に必須となっている。一方で、基質に接着していない細胞はミトコンドリアを中心とするシグナルによりアポトーシスが誘導されることが知られている。

私たちは、細胞質型チロシンホスファターゼの1つである Protein tyrosine phosphatase-PEST (PTP-PEST)に注目して研究を進めてきた。この PTP-PEST は細胞外基質との接着斑に局在する FAK や Cas などを脱リン酸化すると同時に、その非酵素領域は Cas、Paxillin family、Csk などの分子を結合させる足場として働いていると考えられている。細胞内において PTP-PEST は主に2箇所のセリン残基（Ser39 と Ser425）が Protein kinase C や Protein kinase A によってリン酸化され、Ser39 のリン酸化は PTP-PEST の酵素活性を負に制御することが報告されている。現在、PTP-PEST が細胞接着や細胞運動を制御していることは既に報告されているが、非接着状態でのアポトーシス誘導のシグナルの制御に PTP-PEST が関わっているかどうかは不明である。そこで、私たちはマウスの繊維芽細胞において PTP-PEST が非接着状態におけるアポトーシス誘導の制御に関与しているかどうかを検討する。

（※本研究課題のタイトルは、申請当初は「接着細胞におけるミトコンドリアを中心としたアポトーシス誘導シグナルの制御」であったが、研究の進捗に伴い、研究内容とタイトルの間にずれが生じたため、タイトルを標記のものに変更した。）

2. 研究成果

PTP-PEST (*PTPN12*)をノックアウトさせた *PTPN12*$^{-/-}$ MEF 細胞 (KO MEF 細胞)と、この KO MEF 細胞に wild type (WT) PTP-PEST を発現させた細胞 (WT MEF 細胞) について、非接着状態におけるアポトーシスの誘導を Caspase 3 の活性化を指標として検討した。その結果、WT MEF 細胞では非接着状態において Caspase 3 の活性化が見られ、アポトーシスが誘導されていることが分かった。しかし、KO MEF 細胞では、非接着において Caspase 3 の活性化が WT MEF 細胞に比べ抑制されていたことから、KO MEF 細胞では非接着時のアポトーシスの誘導が抑制されることが分かった。また、接着していない細胞の PTP-PEST の 39 番目のセリン残基は、接着している細胞の PTP-PEST に比べ強くリン酸化さていたことから、非接着細胞において PTP-PEST の酵素活性は抑制されていることが分かった。これらの結果は、足場を失った細胞でのアポトーシス誘導 (アノイキス) の制御に PTP-PEST が正の制御因子として関与している可能性を示している。

次に、PTP-PEST がアポトーシス誘導シグナルを制御しているかどうかを検討した。KO MEF 細胞と WT MEF 細胞を代表的なアポトーシス誘導剤であるスタウロスポリンで処理し、細胞のアポトーシス誘導を、核の凝集、Caspase 3 の活性化を指標として検討した。その結果、WT MEF 細胞はスタウロスポリンにより、強くアポトーシスが誘導されるのに対して、KO MEF 細胞のアポトーシスの誘導は WT MEF 細胞に比べ明らかに抑制されていた。これらの結果から PTP-PEST はスタウロスポリンによるアポトーシスやアノイキスの誘導に対して促進的に働く分子であることが分かった。そこで、PTP-PEST はアポトーシス誘導剤によるアポトーシスとアノイキス誘導において同様な機能を持っていると考え、最初に PTP-PEST によるアポトーシス誘導シグナルの制御の分子機構を明らかにすることにした。

PTP-PEST によるアポトーシス誘導シグナルの制御を検討するために、種々の変異 PTP-PEST を導入した MEF 細胞を使い実験を行った。PTP-PEST の酵素活性に必須な 231 番目のシステイン残基をセリン残基に置換することによ

って酵素活性を消失させた変異酵素を発現する MEF 細胞（CS MEF 細胞）と、リン酸化を受けて酵素活性が負に制御される39番目のセリン残基をアラニン残基に置換することによって常時活性状態にある PTP-PEST を発現する MEF 細胞（SA MEF 細胞）を作成し、これらの細胞をスタウロスポリンで処理し、アポトーシス誘導を検討した。スタウロスポリン(1 μM)で 12 時間処理した細胞のアポトーシスを調べたところ、酵素活性を持たない PTP-PEST を発現している CS MEF 細胞は、KO MEF 細胞と同様に WT MEF 細胞に対して明らかにアポトーシスの誘導が抑制されていた。これらの結果から、スタウロスポリンによるアポトーシス誘導の制御には PTP-PEST の酵素活性が重要な働きをしていることが分かった。これらの細胞のスタウロスポリン処理によるアポトーシス誘導を Caspase 3 の活性化をモニターできるバイオセンサー分子を使い検討したところ、WT MEF 細胞はスタウロスポリン処理後 1 時間 30 分頃に Caspase 3 の活性化が始まり、ほぼ 4 時間後に活性化が終了していた。KO MEF 細胞はスタウロスポリン処理後 8 時間過ぎてもほとんど Caspase 3 の活性化は見られなかった。また、CS MEF 細胞を同様に処理したところ、約 4 時間後にわずかではあるが Caspase 3 の活性化が始まり、KO MEF 細胞とは異なった Caspase 3 の活性化パターンを示した。この結果は PTP-PEST がアポトーシス誘導シグナルを正に制御するためには、酵素活性以外のファクターの存在を示唆している。また、スタウロスポリンで 12 時間処理した SA MEF 細胞は、KO MEF 細胞や CS MEF 細胞と同様に WT MEF 細胞と比べて明らかにアポトーシスの誘導が抑制されていた。これらの結果から、PTP-PEST によるアポトーシスの制御には、PTP-PEST の酵素活性が 39 番目のセリン残基のリン酸化/脱リン酸化により酵素活性がコントロールされることが重要であることを示している。PTP-PEST の 39 番目のセリン残基のリン酸化/脱リン酸化は、細胞移動時において制御されていること、さらに T 細胞やマスト細胞において抗原受容体 (TCR や FcεRI) からのシグナルによって制御されていることから、アポトーシス誘導シグナルにおいて PTP-PEST の Ser39 がリン酸化/脱リン酸化による酵素活性の制御を受けている可能性がある。

WT、KO および変異 PTP-PEST を発現する MEF 細胞のアノイキス誘導およびスタウロスポリンによるアポトーシス誘導の詳細な分子機構を明らかにするために、細胞接着、生存シグナル、ミトコンドリアを中心とするアポトーシス誘導シグナルにおいて、重要な分子である FAK、AKT、Bad の活性化をウエスタンブロッティング法で検討した。その結果、FAK の活性化は、KO MEF 細胞、CS MEF 細胞、SA MEF 細胞において、WT MEF 細胞に比べて強く活性化を受けていた。また、AKT の活性化は WT MEF 細胞、KO MEF 細胞、SA MEF 細胞において大きな差はないが、CS MEF 細胞において強く活性化を受けていた。また、Bad の活性化は 4 種の細胞において有意な差は見られなかった。これらの結果から、種々の PTP-PEST を持つ細胞のアポトーシス誘導の結果を説明できない。現在、広く受け入れられている FAK-AKT-Bad 経路によるミトコンドリアを中心としてアポトーシスの制御とは異なった経路を通じて PTP-PEST はアポトーシスやアノイキス誘導を制御している可能性が示唆された。

また、これらのアポトーシス誘導の研究を進める中で、癌細胞にアポトーシスを誘導する新規の化学物質 $(Mn(CO)_3$(1,3-ビス(ジフェニルホスフィノ)プロバン)Br を見いだした。また、アポトーシスの新しい検出方法の開発するために、Caspase 3 認識部位を導入した変異蛍光タンパク質 EGFP を作成した。この変異蛍光タンパク質はアポトーシス誘導細胞で分解を受けて蛍光が減少することを示し、アポトーシス誘導細胞の検出に使えることを示すことができた。

3. 優れた成果が上がった点

細胞質型のチロシンホスファターゼの PTP-PEST がアノイキス誘導およびスタウロスポリンによるアポトーシス誘導シグナルを制御に制御する分子であることに加え、PTP-PEST によるアポトーシス誘導シグナルの制御には、39 番目のセリン残基のリン酸化/脱リン酸化による酵素活性の制御が重要な役割を演じている可能性を示すことができた。さらに、PTP-PEST はミトコンドリアによるアポトーシス制御において重要なシグナル経路の一つである FAK-AKT-Bad 経路を介さないアポトーシス制御機構の存在の可能性を示すことができた。

4. 課題となった点

PTP-PEST はアノイキス誘導やスタウロスポリンによるアポトーシス誘導のシグナル経路を制御するが、その制御機構はよく知られている FAK-AKT-Bad 経路でない可能性を示すことができた。しかし、そのアポトーシス誘導シグナルの分子機構を明らかにすることができなかった。このアポトーシス誘導シグナルの分子機構の解明が、今後の課題とし

て残った。

5. 研究期間終了後の展望

アノイキス誘導およびスタウロスポリンによるアポトーシス誘導が、PTP-PEST の酵素活性の有無および酵素活性のオン・オフの制御によって調節されていることはとても興味深い。今後、これらの PTP-PEST によるアポトーシス誘導の制御機構の解明を進めることは、ミトコンドリアを中心とする複雑かつ厳密に制御されているアポトーシス誘導システムの解明に寄与できると考える。

6. 研究成果公表

【原著論文】

1. Protein tyrosine phosphatase-PEST (PTP-PEST) regulates mast cell-activating signals in PTP activity-dependent and -independent manners
   Motohashi, S., Koizumi, K., Honda, R., Maruyama, A., Palmer, H. and **Mashima, K.**
   Cellular Immunology (2014) **289**, 128-134

【国際学会発表】

1. Identification of enzymes that dephosphorylate PTP-PEST Ser-39 in CD3/CD28-mediated Jurkat-T cells.
   European Congress of Immunology, Glasgow, Scotland, 5-8 September, 2012
   Palmer, H., Maruyama, A. Motohashi, S. and **Mashima, K.**

【国内学会発表】

1. PKC-interacting cousin of thioredoxin (PICOT)/Grx3 はタンパク質チロシンホスファターゼ PTP-PEST と結合する
   日本分子生物学会年会 2012 年度（第 35 回）（福岡国際会議場他、2012 年 12 月 11-14 日）
   丸山敦子、本橋智、Helen Palmer、**眞島恵介**
2. 細胞質型タンパク質チロシンホスファターゼ PTP-PEST によるマスト細胞活性化シグナルの制御機構
   日本分子生物学会年会 2012 年度（第 35 回）（福岡国際会議場他、2012 年 12 月 11-14 日）
   本橋智、丸山敦子、Helen Palmer、**眞島恵介**
3. 細胞運動における Protein Tyrosine Phosphatase-PEST (PTP-PEST)の機能解析
   日本分子生物学会年会 2013 年度（第 36 回）（神戸国際会議場他、2013 年 12 月 3-6 日）
   本夛 礼圭、小泉 夏恋、本橋 智、Palmer Helen、**眞島 恵介**
4. マスト細胞において PTP-PEST の Ser39 は Fc ε RI の架橋によりリン酸化される
   日本分子生物学会年会 2013 年度（第 36 回）（神戸国際会議場ポートピアホール、2013 年 12 月 3-6 日）
   本橋智、小泉夏恋、本夛礼圭、Helen Palmer、**眞島恵介**
5. チロシンホスファターゼ PTP- ε は脂質ラフトに局在しマスト細胞の活性化シグナルを制御する
   日本分子生物学会年会 2013 年度（第 36 回）（神戸国際会議場ポートピアホール、2013 年 12 月 3-6 日）
   小泉夏恋、本夛礼圭、本橋智、Helen Palmer、**眞島恵介**
6. マスト細胞におけるチロシンホスファターゼ PTP- ε 受容体型アイソフォームは Fc ε RI 架橋により誘導され、脂質ラフトに局在して活性化シグナルを制御する
   日本生化学会大会 2014 年度（第 87 回）（国立京都国際会館、2014 年 10 月 15-18 日）
   小泉夏恋、本夛礼圭、青木佳織、本橋智、Helen Palmer、**眞島恵介**
7. Protein tyrosine phosphatase-PEST (PTP-PEST)による細胞移動の制御
   日本生化学会大会 2014 年度（第 87 回）（国立京都国際会館、2014 年 10 月 15-18 日）
   本夛礼圭、小泉夏恋、青木佳織、本橋智、Helen Palmer、**眞島恵介**
8. マスト細胞の Fc ε RI 架橋により誘導される ROS 発生を PICOT/Grx3 は制御する
   日本生化学会大会 2014 年度（第 87 回）（国立京都国際会館、2014 年 10 月 15-18 日）
   青木佳織、小泉夏恋、本夛礼圭、本橋智、Helen Palmer、**眞島恵介**
9. Protein tyrosine phosphatase PTP-PEST regulates RBL-2H3 cells activating signals in PTP activity-dependent

and independent manners.

BMB2015 2015 年度（神戸ポートアイランド、2015 年 12 月 1-4 日）

本橋智、青木佳織、小泉夏恋、本夛礼圭、Helen Palmer、**眞島恵介**

10. マスト細胞におけるチロシンホスファターゼ PTP-ε 受容体型アイソフォームは FcεRI 架橋により誘導され、脂質ラフトに局在して活性化シグナルを制御する

日本生化学会大会 1016 年度（第 89 回）（仙台国際センター他、9 月 25-27 日）

金井茜、小泉夏恋、**眞島恵介**

多細胞化に伴う小胞体・ゴルジ体の機能分化の機構

立教大学大学院理学研究科・生命理学研究センター　後藤　聡

1. 背景と目的

単細胞から多細胞体へと進化することで、生物の体制は高度に複雑化した。すなわち、細胞の種類が多様化するとともに、細胞自体の形態も大きく変化し、多種多様な形態と機能をもつ細胞群がうまれた。さらに、多様な細胞群が有機的に連絡しあうことで、個体として機能するようになった。このような多様化にともなって、細胞内小器官、いわゆるオルガネラも多様化などの高次化を果たしたことは想像に難くない。しかし、オルガネラの多様化については研究が著しく遅れているのが現状である。

脊椎動物を除いて、多くの生物のゴルジ体は分散型であり、細胞内に小さなゴルジ体が分散している。今までは、そのゴルジ体はすべて同じ機能をもつと考えられていた。しかし、私たちは、ショウジョウバエのゴルジ体について解析をおこない、細胞内に分散したゴルジ体は異なる機能をもつことを見出した。すなわち、ゴルジ体というオルガネラの多様化を見出すことができた。このゴルジ体の主たる機能は、膜タンパク質や分泌タンパク質の翻訳後修飾、すなわち糖鎖修飾と分泌経路の制御である。本研究では、そのゴルジ体の生理学的機能について明らかにする。

また、このゴルジ体の多様性がどのように形成されるのかということを解析する過程で、私たちは、小胞体に機能的に異なる領域が存在する可能性、すなわち小胞体の多様化の可能性を見出した。本研究では、その可能性についても検討する。

2. 研究成果

ゴルジ体の主要な機能として糖鎖修飾と分泌制御が挙げられるが、私たちは特に糖鎖修飾に着目し、その生理学的役割について解析をおこなった（原著論文4）。糖鎖修飾は、糖転移酵素、糖ヌクレオチド輸送体、糖加水分解酵素などによっておこなわれる。私達は、それらのうち糖ヌクレオチド輸送体のひとつである Senju を同定し、そのノックアウトショウジョウバエを作成した。その結果、senju 変異体では、感染がなくても自然免疫が活性化しており、一種の自己免疫疾患や慢性炎症のような症状を呈することがわかった。自然免疫のメカニズムは、まずショウジョウバエで明らかになり、その知見をもとに哺乳動物での解析が進んだという経緯があり、種をこえて保存されている。特に、Toll/TLR pathway の重要性はよく知られている。そこで、私たちは senju 変異体で Toll pathway が異常になっているかを調べたところ、感染がなくても活性化していることがわかった。このことは、自然免疫が宿主側の糖鎖で制御されていることを初めて示す結果であった。また、私達は Senju 分子が UDP-Galactose を輸送することを明らかにしたので、実際に senju 変異体で糖鎖修飾が異常になっているかを調べたところ、Galactose を含む糖鎖に異常が生じていた。この糖鎖構造が自然免疫に重要であるかを検討するために、Senju を過剰発現させたところ、Galactose を含む糖鎖が増加し、自然免疫の活性化が弱められていた。これらの結果から、私達は、Senju を介した Galactose による糖鎖修飾が、非感染時には自然免疫を抑制することで、自己免疫疾患や慢性炎症を防いでいると結論した。では、このような免疫系のブレーキになっている Galactose 糖鎖は、感染時にはどうなっているのだろうか。私達は、感染時における Galactose 糖鎖の量を測定したところ、有意に減少していることがわかった。さらに、Senju を過剰発現させて Galactose 糖鎖の量を増加させたところ、感染に対して脆弱になっていることがわかった。以上の結果をまとめると、Galactose 糖鎖は非感染時には免疫系が暴走しないようにブレーキをかけているが、いざ感染時になると、その Galactose 糖鎖は減少し、免疫系を強く活性化することがわかった。このような糖鎖による免疫系のダイナミックな制御は世界でも初めての発見であった。この成果は、PNAS 誌に掲載された（原著論文5）。さらに、Toll のリガンドである Spätzle (Spz) を活性化機構について新たな知見を得た。今まで、Spz を活性化する分子は、Spätzle-processing enzyme(SPE) という酵素だけだと考えられてきた。しかし、私達は CRISPR/Cas9 システムを用い SPE の null mutation を世界で初めて作成した。その SPE が完全に欠失している個体においても、Spz を介するシグナルは活性化していることを私達は見出し、SPE 以外に Spz を活性化する酵素の存在を示した（原著論文６）。

さて、二つ目の課題として、小胞体の多様化についての解析もおこなった。私達は、どのようにして異なる機能をもつゴルジ体が形成されるのかを明らかにしたいと考えている。そこで、異なる機能をもつゴルジ体が形成されるためには、小胞体で翻訳されたタンパク質が、その種類に応じて異なるゴルジ体に輸送される必要があると考えた。このことは、小胞体からゴルジ体にタンパク質が輸送されるときに、個々のタンパク質が選別される必要があることを示唆している。そのようなタンパク質がないかを文献的に検索したところ、酵母において、GPI 結合タンパク質は小胞体からゴルジ体に輸送されるときに、他のタンパク質とは異なる輸送小胞に格納されることがわかった。そこで、私たちは、ショウジョウバエの GPI 結合タンパク質である Dally-like protein (Dlp)をモデル系に用い解析をおこなった。

まず、*dlp* mRNA の局在を調べたところ、驚くべきことに、すべての小胞体に一様に分布しているのではなく、核近傍の小胞体に局在していることを見出した。では、なぜ、その核近傍の小胞体に局在しているのか。その問題にアプローチすべく、糖脂質である GPI の生合成に関わる酵素の局在を調べた。GPI 合成酵素のひとつである PigB に対する抗体を作成し、endogenous PigB の局在を調べたところ、今までの報告とは異なり、核膜に局在していた。このことは、核膜で合成された GPI は、その近傍の小胞体に拡散し、そこで翻訳されたタンパク質に付加されることで、GPI 修飾の効率を上げていると考えられた。では、実際に核膜近傍の小胞体で GPI 修飾がおこなわれているのだろうか？そのことを確かめるために、GPI をタンパク質に付加する酵素複合体 Transamidase complex (TA)に対する抗体を作製し、その局在を調べた。その結果、驚くべきことに TA は核膜近傍の小胞体に多く局在していた。この結果は、GPI 修飾は核膜近傍の小胞体で行われていることを示している。まとめると、GPI の生合成の一部は核膜で行われているので、合成された GPI は核膜近傍の小胞体に輸送または拡散していると考えられる。核膜近傍の小胞体では、GPI タンパク質が翻訳されており、その翻訳されたばかりのタンパク質に GPI が付加していると考えられる。非常に効率的なシステムを細胞は持っている可能性を見出した。

3. 優れた成果が上がった点

まず本研究では、高度化したオルガネラ、特にゴルジ体の新しい生理機能として、「感染・非感染時に応じた自然免疫の動的調節」を明らかにした。免疫システムは多細胞生物の個体を守る上で必須の役割を果たす。しかし、非感染時の免疫システムの暴走は自己免疫疾患や慢性炎症を引き起こす一方、感染時に免疫システムが十分に活性化しなければ感染症で個体は死にいたってしまう。そのようにデリケートな免疫システムを感染・非感染時に応じて最適に保つ機能は、多細胞生物が複雑な体制へと進化するために必須であったに違いない。本成果は、オルガネラ機能の高度化が生物の進化を駆動した例ということができるだろう。

また、ゴルジ体の機能分化に加え、粗面小胞体上にも機能的に異なる領域が存在することを見出した。今までに小胞体上に粗面小胞体と滑面小胞体の違いがあることは知られていたが、それ以上の違いがあることは知られていなかった。したがって、これはオルガネラ研究において重要な新規発見となった。また、核膜、小胞体、ゴルジ体が相互連関することによって、効率的な翻訳後修飾を行っていることは、オルガネラの高度化の一例として非常に興味深い発見であった。

4. 課題となった点

本研究で、多様な小胞体やゴルジ体が存在することは示すことができたが、どのようにして多様な小胞体やゴルジ体が形成されるか、その分子メカニズムはいまだ明らかではない。また、この多様な小胞体やゴルジ体が形成されず一様なオルガネラになった場合、どのような異常が生じるかを調べる必要がある。そのことでオルガネラの多様化の生理的意義が明らかになる。

5. 研究期間終了後の展望

このような単一オルガネラ内の機能的サブコンパートメントを、私達は「オルガネラ・ゾーン」と名付けた。現在の細胞生物学の最新の研究をみると、このオルガネラ・ゾーンと思われる領域・構造が散見される。おそらく、今後はオルガネラをゾーンの集合体としてとらえなおす研究領域「オルガネラ・ゾーン・バイオロジー」が生み出されるのではないかと考えている。

6. 研究成果公表

【原著論文】

1. Cisterna-specific localization of glycosylation-related proteins to the Golgi apparatus.
   Yamamoto-Hino,M., Abe,M., Shibano,T., Setoguchi,Y., Awano,W., Ueda.R., Okano,H. and **Goto,S.**
   Cell Struct. Funct. (2012) **37**, 55-63
2. Identification of proteasome components required for apical localization of Chaoptin using functional genomics.
   Yano,H., Yamamoto-Hino,M., Awano,W., Aoki-Kinoshita,K.F., Tsuda-Sakurai,K., Okano,H. and **Goto,S.**
   J. Neurogenet. (2012) **26**, 53-63
3. AP-1 clathrin adaptor and CG8538/Aftiphilin are involved in Notch signaling during eye development in *Drosophila melanogaster*.
   Kametaka,S., Kametaka,A., Yonekura,S., Haruta,M., Takenoshita,S., **Goto,S.** and Waguri,S.
   J. Cell Sci. (2012) **125**, 634-648
4. Phenotype-based clustering of glycosylation-related genes by RNAi-mediated gene silencing.
   Yamamoto-Hino,M., Yoshida,H., Ichimiya,T., Sakamura,S., Maeda,M., Kimura,Y., Sasaki,N., Aoki-Kinoshita,K.Y, Kinoshita-Toyoda,A., Toyoda,H., Ueda,R., Nishihara,S., and **Goto,S.**
   Genes Cells, 20 (6), 521-542 (2015)
5. Dynamic regulation of innate immune responses in *Drosophila* by Senju-mediated glycosylation.
   Yamamoto-Hino, M., Muraoka, M., Kondo, S., Ueda, R., Okano, H. and **Goto, S.**
   Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 112 (18), 5809-5814 (2015)
6. Spätzle-processing enzyme-independent activation of the Toll pathway in *Drosophila* innate immunity.
   Yamamoto-Hino, M. and **Goto, S.**
   Cell Struct. Funct., 41, 55-60 (2016)

【著書・総説・解説等】

1. Structure, Function and Formation of Glycans in *Drosophila*.
   Yamamoto-Hino,M., Okano,H., Kanie,O. and **Goto,S.**
   In “Glycans: Biochemistry, Characterization and Applications.” pp.165-188
   Mora Montes, H. M. ed.
   Nova Science publishers, Inc., NY (2012)
2. Balanced ubiquitination determines cellular responsiveness to extracellular stimuli.
   Mukai,A., Yamamoto-Hino,M., Komada.M., Okano,H. and **Goto,S.**
   Cellular and Molecular Life Sciences (2012) **69**, 4007-4016
3. ユビキチン化による Frizzled のリソソーム分解を介した Wnt シグナル強度の制御
   Daocharad Burana、**後藤聡**、駒田雅之
   細胞工学 特集 「Wnt 協奏曲」 32, 396-400 (2013)
4. *In vivo* RNAi-based screens: studies in model organisms.
   Yamamoto-Hino,M. and **Goto,S.**
   Genes, 4, 646-665 (2013)

5. Localization of glycosyl enzymes and nucleotide-sugar transporters in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus.
   Yamamoto-Hino,M. and **Goto,S.**
   In "***Glycoscience: Biology and Medicine***", Taniguchi, N. et al. ed., SpringerReference, Heidelberg (2014)

【国際学会発表】

1. Novel Roles of Glycosylation in Drosophila Innate Immunity
   The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society (IEIIS) meeting, The Homeostatic Inflammation International Symposium, The 18th Japan Endotoxin and Innate Immunity Society meeting and the 11th Japanese Biochemical Society Bio-Frontier Symposium (Tokyo, Japan, October 24, 2012)
   Yamamoto-Hino, M., Muraoka, M., Okano, H. and **Goto, S.**

【国内学会発表】

1. Novel Roles of Glycosylation in Drosophila Innate Immunity
   日本ショウジョウバエ研究会・2012 年 10 月 13 日・東京
   Miki Yamamoto-Hino, Takako Shibano, Wakae Awano, Masatoshi Muraoka, Hideyuki Okano and **Satoshi Goto**
2. Novel Roles of Glycosylation in Drosophila Innate Immunity
   日本発生・細胞生物学会合同大会・2012 年 5 月 31 日・神戸（ワークショップ（口頭発表)、ポスター発表）
   山本（日野）美紀、芝野孝子、粟野若枝、村岡正敏、岡野栄之、**後藤聡**
3. Dynamic regulation of innate immune responses in *Drosophila* by Senju-mediated glycosylation （口頭発表）
   第 36 回日本分子生物学会年会・2013 年 12 月 4 日・神戸（ワークショップ（口頭発表））
   Miki Yamamoto-Hino, Masatoshi Muraoka, Hideyuki Okano, **Satoshi Goto**
4. 糖鎖修飾による自然免疫反応の恒常性維持
   平成 26 年度日本生化学会九州支部例会（招待講演）・2014 年 5 月 17 日から 2014 年 5 月 18 日
   九州大学（福岡）
   山本（日野）美紀、村岡正敏、近藤周、岡野栄之、上田龍、**後藤聡**
5. Dynamic regulation of innate immue responses by Senju-mediated glycosylation in Drosophila
   第 11 回　日本ショウジョウバエ研究会・2014 年 6 月 4 日から 2014 年 6 月 6 日・金沢歌劇座（金沢）
   Miki Yamamoto (Hino), Masatoshi Muraoka, Shu Kondo, Hedeyuki Okano, Ryu Ueda, **Satoshi Goto**
6. 糖鎖修飾による自然免疫反応の恒常性維持
   第 66 回日本細胞生物学会・2014 年 6 月 11 日から 2014 年 6 月 13 日・東大寺総合文化センター（奈良）
   山本（日野）美紀、村岡正敏、近藤周、岡野栄之、上田龍、**後藤聡**
7. 糖鎖修飾の変化による自然免疫反応のダイナミックな制御
   第 25 回日本生体防御学会・2014 年 7 月 9 日から 2014 年 7 月 11 日・東北大学（仙台）
   山本（日野）美紀、村岡正敏、近藤周、岡野栄之、上田龍、**後藤聡**
8. 自然免疫を制御する糖転移酵素 Manju の検索
   第 34 回日本糖質学会年会（ポスター発表）・2015 年 7 月 31 日から 2015 年 8 月 2 日・東京大学（東京）
   加瀬彩和子、山本（日野）美紀、**後藤聡**

9. 宿主の糖鎖修飾変化による自然免疫反応の制御
   第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会（口頭発表、ワークショップ、オーガナイザー、山本（日野）美紀）2015 年 12 月 1 日から 2015 年 12 月 4 日・神戸ポートピアアイランド（兵庫）
   山本（日野）美紀、村岡正敏、近藤周、上田龍、岡野栄之、**後藤聡**
10. GPI 修飾が行われる細胞内コンパートメント
    第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会（口頭発表、ワークショップ、オーガナイザー、後藤聡）2015 年 12 月 1 日から 2015 年 12 月 4 日・神戸ポートピアアイランド（兵庫）
    後藤聡、山本（日野）美紀
11. 小胞体・ゴルジ体の翻訳後修飾局域
    第 68 回日本細胞生物学会大会第 11 回日本ケミカルバイオロジー学会年会（口頭発表、シンポジウム、オーガナイザー、後藤聡、吉田秀郎）2016 年 6 月 15 日から 2016 年 6 月 17 日・京都テルサ（京都）
    後藤聡、山本（日野）美紀、近藤周、上田龍
12. Screening of glycosyltransferase involved in innate immunity in *Drosophila*
    第 12 回日本ショウジョウバエ研究会（ポスター発表、大会世話役、後藤聡）2016 年 9 月 9 日から 2016 年 9 月 11 日・立教大学（東京）
    Sawako Kase, Miki Yamamoto-Hino, **Satoshi Goto**
13. 小胞体・核膜に存在する GPI 修飾局域
    第 89 回日本生化学会大会（シンポジウム）2016 年 9 月 25 日から 2016 年 9 月 27 日・仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス（宮城）
    後藤聡、山本（日野）美紀

【マスコミ等での発表】

ゴルジ体で合成される糖鎖が自然免疫をダイナミックに制御していることは世界でも初めての発見であり（原著論文５）、立教大学からのプレスリリースをもとに朝日新聞(2015/5/4)、日経産業新聞(2015/4/23)、日刊工業新聞(2015/4/24)で報道された。

立教大学
PRESS RELEASE

「免疫力は糖によって調節される！」
免疫反応の新しい ON/OFF の仕組みを解明

【研究成果の概要】

免疫は病原体から我々の身体を守るために必須です。しかし、その免疫反応は厳密に制御されなければなりません（図 1）。病原菌やウイルスが感染していない時に免疫反応が活性化してしまうと、自己免疫疾患や慢性炎症などが引き起こされ、身体は多大なるダメージを受けます（図 1B）。一方、病原体が感染した時に免疫反応が活性化しなければ、感染症などで死に至る場合もあります（図 1C）。従って免疫反応は、非感染時には抑制され、いったん感染が起こると速やかに活性化されなければなりません。このような免疫反応の抑制と活性化がどのようにして調節されているのか、その仕組みはよく分かっていませんでした。このたび、立教大学理学部の山本（日野）美紀 PD、後藤聡教授のチームは、慶應義塾大学医学部 岡野栄之教授らと共同で、「糖鎖」という物質がこのダイナミックな制御を行っていることを発見しました。

山本らはまず、過剰な免疫反応を抑制する活性をもつ「糖鎖」が存在することを明らかにし、これを合成する遺伝子を同定して「*senju*（センジュ）」と名付けました。さらに、感染が起きるとこの抑制的に働く「糖鎖」は減少して免疫反応の活性化を促進していることを見出しました。今回得られた知見は、免疫反応制御の基本的な理解を深めるとともに、過剰な免疫反応による病態の改善や、効率的な免疫反応の活性化を目指した医療への応用が期待されます。

本研究の成果は「米国科学アカデミー紀要（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America）」電子版 4 月 21 日（米国東海岸時間）付に発表されましたのでお知らせします。

根端分裂組織の幹細胞再生におけるプラスチドの機能

立教大学大学院理学研究科・生命理学研究センター　堀口　吾朗

1. 背景と目的

プラスチドやミトコンドリアといったオルガネラの研究は、光合成や呼吸など細胞内で完結する生化学反応や、オルガネラそれ自体の形成に注目して広く行われて来た。その一方、植物の発生におけるオルガネラの機能についての知見は限られている。本研究では、植物の根や葉の形成とオルガネラタンパク質の機能に注目した解析を行う。

植物個体は枝分かれを繰り返すことで複雑化しながら成長を行う。根においては既に存在する根から側根をつくることで複雑さを増してゆく。本研究の大きな柱の一つは、この側根形成とプラスチド機能の関係を明らかにすることである。側根形成は親となる根の内部にある内鞘と呼ばれる分化した組織で始まる。植物ホルモンのオーキシンが内鞘細胞に働きかけると、内鞘細胞は脱分化し、規則正しい細胞分裂を経て側根原基を形作る。やがて、側根原基が根端分裂組織へと成熟してゆく過程で、無限増殖能を持つ幹細胞が再生される。このように、側根形成は幹細胞の再生が容易に観察される優れた実験系である。側根形成の開始にはオーキシン応答性の転写因子である AUXIN RESPONSE FACOTR7 (ARF7), ARF19 などが重要であることが既に明らかにされており、その下流因子の探索と、機能解析が盛んに進められている。一方、側根形成開始後、いかにして幹細胞が再生するかについての知見は乏しい。当研究室では過去に側根形成の開始はできるが、側根原基における幹細胞の再生または維持ができない *regulator of fatty acid composition3* (*rfc3*)変異株を単離し、その原因遺伝子を特定していた。RFC3 はプラスチドに局在すると予想される機能未知タンパク質である。本研究では *RFC3* 遺伝子を中心に、その分子機能、プラスチドでの機能、側根形成における機能の解明を通じ、プラスチドが発生に果たす新たな役割の解明を目的とする。

一方、当研究室では根や葉の発生に異常を示す多数の変異株コレクションがあり、そのうちの幾つかについては、オルガネラタンパク質をコードする遺伝子に変異を見いだしている。これらの変異株・遺伝子についても解析を進めることで、オルガネラ機能による新たな発生制御機構の解明も目指す。

2. 研究成果

rfc3 の側根形成不全は培地中の糖（スクロース）濃度に影響を受ける。3%スクロース存在下で生育した *rfc3* の主根は、側根が瘤状になる異常を示すが、0.5%スクロース存在下では正常に側根が形成される。これまでに、このスクロース感受性を利用し、側根が形成されるときではなく、主根が伸長するときのスクロース濃度が側根形成能を左右していることが明らかになっている。このことは *RFC3* の機能は主根の伸長時に必要である可能性を示唆している。

まず *RFC3* が機能する組織や細胞を特定するため、*RFC3* 遺伝子の開始コドンの約 4 kbp 上流からコード領域の最終コドンまでを *GFP* 遺伝子に融合させたコンストラクトを *rfc3* 変異株に導入し、*rfc3* の側根形成異常を相補する系統を得た。また、種々のプロモーターやエンハンサートラップ系統で *RFC3* を発現させたところ、*rfc3* の側根形成異常は原生木部道管に接した内鞘細胞での発現により回復することが明らかになった。この位置にある内鞘細胞は側根形成の始原細胞を分化することが知られている。そこで、さらに内鞘のどの細胞で RFC3 が重要かを明らかにするため、熱ショック誘導性の Cre/*lox* システムを用いて、*rfc3* 背景でランダムに *RFC3-GFP* 発現細胞を誘導する実験系も確立した。

次に、*rfc3* の細胞レベル、分子レベルでの表現型を明らかにするため、プラスチドを GFP 標識した系統の観察や、根端分裂組織の形成に関わる遺伝子の発現解析を行った。野生型では、プラスチドは細胞質に分散している。ところが *rfc3* では、プラスチドが核に匹敵するサイズの巨大な塊状に集合していた。透過型電子顕微鏡観察によって、この塊は1つの巨大なプラスチドではなく、無数のプラスチドが密集したものであることが明らかになった。また、*rfc3* の側根原基では、根端分裂組織の中でも静止中心に特異的に発現する転写因子遺伝子 *WOX5* が、原基全体に広がった形で異所発現をしていた。さらに、*PLT3, PLT7* といった根端分裂組織形成のマスター転写因子遺伝子の発現が野生型に比べて数倍高発現していた。RFC3 は原核型リボソームタンパク質 S6 と相同性を持つため、プラスチドのリボソームの生合成について検討した。その結果、18S, 23S rRNA の蓄積量が激減していることが明らかになった。

一方、RFC3 の分子機能を推定するために、種々の生物種における RFC3 と相同性のあるタンパク質のアミノ酸配列を用いた系統解析を行った。RFC3 は原核型リボソームタンパク質 S6 と相同性を持つことが既に判明していたが、詳細な解析の結果、シロイヌナズナはシアノバクテリア型、ミトコンドリア型に加えプロテオバクテリア型に分類される3つの S6 様タンパク質を持つこと、RFC3 はプロテオバクテリア型に属することが明らかになった。そこで、RFC3 がプラスチドリボソームの構成因子として働くかを明らかにするため、RFC3-GFP 系統を用いてポリソーム解析を行った。予備的には、ポリソーム画分に RFC3-GFP が検出された。また、原核型リボソームの阻害剤（スペクチノマイシンなど）を野生型に投与することで *rfc3* と同様の側根形成異常が生じることも見出した。スペクチノマイシン処理した野生株の側根では、*rfc3* と同様の瘤状の側根形成、*WOX5* の異所発現、*PLT3, PLT7* の過剰発現、プラスチド塊の形成が観察された。根端分裂組織の構築には、転写因子類の細胞間移行が重要であることが知られている。この細胞間移行は、植物特有の細胞構造である原形質連絡を通じて行われている。原形質連絡の開度を可視化できるレポーター系統(pSUC2::GFP)を用いて観察を行ったところ、スペクチノマイシン処理した野生型の根端分裂組織では原形質連絡の開度が低下している可能性が示唆された。これらの結果は、*rfc3* あるいは翻訳阻害剤処理に起因するプラスチドの翻訳異常が、原形質連絡の異常や側根形成に必要な転写因子群の発現異常をもたらし、その結果、根端分裂組織の形成が異常異常になることを示唆する。

RFC3 がいかにして側根形成に関与するのかをより広い視点から解析するため、*rfc3* を変異原処理し、正常な側根を形成できるようになる抑圧変異株を3系統単離した。これらのうち、異なる遺伝子座に変異を持つ2系統のゲノムの塩基配列を次世代シーケンサーにより解析し、お互いに比較した。その結果、いずれかの系統に特異的な塩基置換を見出し、それを分子マーカーとした染色体マッピングを行うことで、抑圧変異の候補を見いだすことができた。そのうちの一つは、プラスチド内で遺伝子発現制御に関わる知見があることから、RFC3 の分子機能を知る上で重要な系統と考えられる。

一方、細胞伸長が抑制されることで葉が小型化する変異株のひとつ *little prince* (*lipc*)は、ミトコンドリア局在が予想されるペンタトリコリピートタンパク質(PPR タンパク質)をコードする遺伝子に変異を持つことが明らかになった。PPR タンパク質はオルガネラ RNA のプロセシングや RNA 編集に関わることが知られている。今回見いだされた PPR タンパク質は RNA 編集を行うことが知られているものが含まれるグループに属する。また、*lipc* と同様に細胞が小型化する *extra-small sisters1* (*xs1*)の原因遺伝子として機能未知タンパク質をコードするものを見出した。*XS1* promoer で *XS1*::*GFP* を発現させたところ、ミトコンドリアに XS1::GFP が局在した。また、*XS1* 遺伝子の T-DNA 挿入欠損変異株は胚致死であった。これらの結果は、葉の細胞サイズの制御にはなんらかのミトコンドリア機能が必要であることが示唆される。

3. 優れた成果が上がった点

RFC3 は原核型リボソームタンパク質 S6 ファミリーのメンバーであり、プラスチド内で翻訳あるいはリボソーム生合成に関与する可能性が示唆された。プラスチド内での遺伝子発現は核内の遺伝子発現と協調的に制御されている。その仕組みの一つに、プラスチドから核への情報伝達を担うレトログレードシグナリングの存在が知られている。レトログレードシグナリングは、光合成機能を持つ葉緑体と核との相互作用の面から主に解析されてきた。今回の *rfc3* の解析から、プラスチドでの翻訳異常が核コードの発生制御遺伝子の発現に干渉することが示された。この結果は、根においてもレトログレードシグナリングが働き、しかもそれは、これまで詳しく解析されてきた光合成制御のためのものではなく、側根形成という根の重要な発生プロセスを制御する新たな経路である可能性が示唆された。また、*rfc3* の新規の表現型として、原形質連絡の開度の減少や、プラスチド塊の形成が見出された。本研究プロジェクトの課題名である「オルガネラが駆動する真核細胞システムの高度化」という観点から考えると、*rfc3* の解析を通じて、プラスチド内の正常な翻訳がプラスチド間、プラスチドと核、細胞間といった様々なレベルでの制御と密接な関わりを持つことが明らかになったことは、研究課題に合致した成果といえる。

4. 課題となった点

本研究では、側根形成を正常に進めるために RFC3 が必要とされる細胞が、原生木部道管に接した内鞘細胞であ

ることが明らかになった。その一方、それが実際に側根へと分化する内鞘細胞か、それ以外の内鞘細胞も重要なのかの判別はできなかった。この点については、*RFC3* の発現を細胞単位で誘導可能な実験系が構築できたので、今後解明できると期待できる。また、原形質連絡の開度の低下やプラスチド塊といった表現型が側根形成異常の原因なのか、それとも側根形成には関係しない表現型なのかも不明である。これらの点については、*rfc3* の抑圧変異株の原因遺伝子の候補が見出されたので、その解析により解明が進むと期待できる。最後に、RFC3 は翻訳に関連する因子であることこそ明らかになったが、そのタンパク質としての機能は依然不明である。プラスチド内で RFC3 と相互作用する因子や、リボソーム生合成、翻訳との関係を生化学的に解析する必要がある。

5. 研究期間終了後の展望

今回の研究を通じて、側根形成における *RFC3* 遺伝子の機能を解析するツールがかなり整備できた。これらは、*rfc3* 変異株の分子レベルの表現型を可視化するレポーター系統や RFC3-GFP 系統、*rfc3* のサプレッサー変異株である。これらのツールを活用し、RFC3 タンパク質の生化学的機能の解析や、レトログレードシグナリングによる側根形成制御機構の解析といったより深い解析を進めていくことができる。とりわけ、*rfc3* の抑圧変異の原因遺伝子候補を容易に見つけられることが明らかになったため、抑圧変異の飽和スクリーニングを行うことで、レトログレードシグナリングの構成因子の収集を進めることにも見通しが立った。この研究をさらに押し進めることで、側根形成の新たな制御系の全容を明らかにしていく。

6. 研究成果公表

【原著論文】

1. Berberine enhances defects in the establishment of leaf polarity in *asymmetric leaves1* and *asymmetric leaves2* of *Arabidopsis thaliana*.
   Nakagawa, A., Takahashi, H., Kojima, S., Sato, N., Ohga, K., Cha, B.Y., Woo, J.T., Nagai, K., **Horiguchi, G.**, Tsukaya, H., Machida, Y. and Machida, C.
   Plant Mol. Biol. (2012) **79**, 569-581
2. Stable establishment of cotyledon identity during embryogenesis in Arabidopsis by *ANGUSTIFOLIA3* and *HANABA TARANU*.
   Kanei, M., **Horiguchi, G.** and Tsukaya, H.
   Development (2012) **139**, 2436-2446
3. Class III compensation, represented by KRP2 overexpression, depends on V-ATPase activity in proliferative cells.
   Ferjani, A., Ishikawa, K, Asaoka, M., Ishida, M., **Horiguchi, G.**, Maeshima, M. and Tsukaya, H.
   Plant Signal Behav. (2013) **8**, e27204
4. Promotion of chloroplast proliferation upon enhanced post-mitotic cell expansion in leaves.
   Kawade, K., **Horiguchi, G.**, Ishikawa, N., Yokota Hirai, M., Tsukaya, H.
   BMC Plant Biol. (2013) **13**, 143
5. Enhanced Cell Expansion in a KRP2 overexpressor is mediated by increased V-ATPase activity.
   Ferjani, A., Ishikawa, K., Asaoka, M., Ishida, M. **Horiguchi, G.**, Maeshima, M., Tsukaya, H.
   Plant Cell Physiol. (2013) **54**, 1989-1998
6. ATM-dependent DNA damage response acts as an upstream trigger for compensation in fas1 mutation during Arabidopsis leaf development.
   Hisanaga, T., Ferjani, A., **Horiguchi, G.**, Ishikawa, N., Fujikura, U., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H., Ishida, T., Sugimoto, K., Tsukaya, H.
   Plant Physiol. (2013) **162**, 831-841
7. ANGUSTIFOLIA3 signaling coordinates proliferation between clonally distinct cells in leaves.
   Kawade, K., **Horiguchi, G.**, Usami, T., Yokota Hirai, M., Tsukaya, H.
   Curr. Biol. (2013) **23**, 788-792
8. Nitrogen dioxide regulates organ growth by controlling cell proliferation and enlargement in Arabidopsis.
   Takahashi, M., Furuhashi, T., Ishikawa, N., **Horiguchi, G.**, Sakamoto, A., Tsukaya, H., Morikawa, H.

New Phytol. (2014) **201**, 1304-1315

9. Double-stranded RNA-binding protein DRB3 negatively regulates anthocyanin biosynthesis by modulating *PAP1* expression in *Arabidopsis thaliana*.
   Sawano, H., Matsuzaki, T., Usui, T., Tabara, M., Fukudome, A., Kanaya, A., Tanoue, D., Hiraguri, A., **Horiguchi, G.**, Ohtani, M., Demura, T., Kozaki, T., Ishii, K., Moriyama, H., Fukuhara, T.
   J. Plant Res. (2017) **130**, 45-55

【著書・総説・解説等】

1. Ribosomes and translation in plant developmental control.
   Horiguchi, G., Van Lijsebettens, M., Candela, H., Micol, J.L. and Tsukaya, H.
   Plant Sci. (2012) **191-192**, 24-34
2. How do 'housekeeping' genes control organogenesis? –Unexpected new findings on the role of housekeeping genes in cell and organ.
   Tsukaya, H., Byrne, M.E., **Horiguchi, G.**, Sugiyama, M., Van Lijsebettens and Lenhard, M.
   J. Plant Res. (2013) **126**, 3-15
3. リボソームの生合成と植物の発生.
   堀口　吾朗
   生物科学 (2017) 印刷中

【国際学会発表】

1. Mutations in a NAC-domain transcription factor gene, *SUZAKU1*, suppress leaf abaxialization caused by the defects of ribosomal proteins.
   FASEB Conference: Mechanisms in Plant Development (Vermont, USA, August 11-16, 2013)
   Horiguchi, G., Shimada, H., Watanabe, T., Tsukaya, H.
2. *SUZAKU1*, a NAC-domain transcription factor gene promotes leaf abaxialization in response to *as2*-enhancer mutations.
   25th International Conference on Arabidopsis Research (Vancouver, Canada, July 28- August 1, 2014)
   Horiguchi, G., Inoue, M., Masuda, H., Nakata, M., Tsukaya, H.
3. Mutations in ribosomal protein genes induce the expression of NAC transcription factor gene, *SUZAKU1*, and promote leaf abaxialization in *asymmetric leaves2*.
   27th International Conference on Arabidopsis Research (Gyeongju, Korea, June 29- July 3, 2016)
   Horiguchi, G., Inoue, M., Masuda, H., Nakata, M., Tsukaya, H.

【国内学会発表】

1. *rpl4d as2* の葉が背軸化する表現型を抑圧する *szk1-D* 変異株の解析
   日本植物学会 2012 年度 (第 76 回) 大会（兵庫県立大学、2012 年 9 月 15~17 日）
   島田　浩貴、渡辺　達矢、大林　祝、杉山　宗隆、塚谷　裕一、**堀口　吾朗**
2. *rpl4d* が示す花序形態異常の解析
   日本植物形態学会 2012 年度 (第 24 回) 大会（兵庫県立大学、2012 年 9 月 14 日）
   尾内　紀之、塚谷　裕一、**堀口　吾朗**
3. NAC 転写因子の機能欠損による *as2 rpl4d* が示す葉の背軸化の抑制
   日本植物生理学会 2012 年度 (第 54 回) 年会（岡山大学、2013 年 3 月 21~23 日）
   堀口　吾朗、島田　浩貴、渡辺　達矢、大林　祝、杉山　宗隆、塚谷　裕一
4. シロイヌナズナの器官サイズ異常変異株 *little prince* はミトコンドリア *nad6* mRNA のエディティング異常を示す
   日本植物形態学会 2013 年度 (第 25 回) 大会（北海道大学、2013 年 9 月 12 日）
   石橋　幸大、濱田　ゆかり、中村　崇裕、塚谷　裕一、**堀口　吾朗**
5. シロイヌナズナの WD40 リピートタンパク質をコードする *OLIGOCELLULA1* は異形葉性を通じて葉のサイズ制御に関わる

日本植物学会 2013 年度 (第 77 回) 大会(北海道大学、2013 年 9 月 13~15 日)
篠塚 奈々絵、平方 智大、藤倉 潮、出村 拓、塚谷 裕一、**堀口 吾朗**

6. NAC 型転写因子をコードする *SZK1* 遺伝子の高発現が葉の背腹性に及ぼす効果の解析
日本植物学会 2013 年度 (第 77 回) 大会(北海道大学、2013 年 9 月 13~15 日)
堀口 吾朗、塚谷 裕一
7. リボソームタンパク質 RPL4D の GFP 標識とその機能性についての解析
日本植物生理学会 2013 年度 (第 55 回) 年会(富山大学、2014 年 3 月 18~20 日)
堀口 吾朗、中田 未友希、塚谷 裕一
8. 根の発生におけるプラスチドタンパク質 RFC3 の機能解析
日本植物生理学会 2013 年度 (第 55 回) 年会(富山大学、2014 年 3 月 18~20 日)
中田 未友希、塚谷 裕一、**堀口 吾朗**
9. 細胞サイズが小型化するシロイヌナズナ *xs1* 変異株の原因遺伝子の同定と解析
日本植物形態学会 2014 年度 (第 26 回) 大会(明治大学、2014 年 9 月 11 日)
宮田 和裕、依藤 絵里、中田 未友希、塚谷 裕一、**堀口 吾朗**
10. 葉の細胞数が減少するシロイヌナズナの *oligocellula6* 変異株の解析
日本植物形態学会 2014 年度 (第 26 回) 大会(明治大学、2014 年 9 月 11 日)
佐藤 翔紀、塚谷 裕一、**堀口 吾朗**
11. シロイヌナズナおよびコケ植物における *AN3, GRF, SWI2* の分子的機能保存性の検討
日本植物形態学会 2014 年度 (第 26 回) 大会(明治大学、2014 年 9 月 11 日)
長野 夏未、名和 美聡、中田 未友希、西浜 竜一、河内 孝之、塚谷 裕一、**堀口 吾朗**
12. リボソームタンパク質変異体で過剰発現する *SZK1* の解析
日本植物学会 2014 年度 (第 78 回) 大会(明治大学、2014 年 9 月 12~14 日)
井上 幹人、中田 未友希、塚谷 裕一、**堀口 吾朗**
13. 子葉における根の異所形成を抑制する AN3 と HAN の解析
日本植物学会 2014 年度 (第 78 回) 大会(明治大学、2014 年 9 月 12~14 日)
大池 諒、秋間 健太、塚谷 裕一、**堀口 吾朗**
14. 原核型リボソーム阻害剤がシロイヌナズナの根の発生に与える影響
日本植物学会 2014 年度 (第 78 回) 大会(明治大学、2014 年 9 月 12~14 日)
中田 未友希、塚谷 裕一、**堀口 吾朗**
15. リボソームタンパク質 RPL4 の質と量が葉の背腹性に及ぼす効果の解析
日本植物学会 2014 年度 (第 78 回) 大会(明治大学、2014 年 9 月 12~14 日)
増田 英典、塚谷 裕一、**堀口 吾朗**
16. *as2 rpl4d* 背景での葉の裏側化を抑制する変異株の遺伝学および発生学的解析
日本植物生理学会 2014 年度 (第 56 回) 年会(東京農業大学、2015 年 3 月 16~18 日)
高原 正裕、塚谷 裕一、**堀口 吾朗**
17. シロイヌナズナ OLIGOCELLULA1 による葉サイズ決定機構の解析
日本植物生理学会 2014 年度 (第 56 回) 年会(東京農業大学、2015 年 3 月 16~18 日)
篠塚 奈々絵、平方 智大、藤倉 潮、出村 拓、塚谷 裕一、**堀口 吾朗**
18. 葉の細胞数が減少するシロイヌナズナの *oligocellula6-D* 変異株の解析
日本植物生理学会 2014 年度 (第 56 回) 年会(東京農業大学、2015 年 3 月 16~18 日)
佐藤 翔紀、塚谷 裕一、**堀口 吾朗**
19. 根のプラスチドリボソームの損傷は側根の発生異常を引き起こす
日本植物生理学会 2014 年度 (第 56 回) 年会(東京農業大学、2015 年 3 月 16~18 日)
中田 未友希、塚谷 裕一、**堀口 吾朗**
20. AN3, HAN, TPL が子葉の属性維持に果たす役割の解析

日本植物生理学会 2014 年度 (第 56 回) 年会(東京農業大学、2015 年 3 月 16~18 日)
堀口 吾朗、大池 諒、秋間 健太、塚谷 裕一

21. AN3, HAN, TPL が子葉の属性維持に果たす役割の解析
日本植物生理学会 2014 年度 (第 56 回) 年会(東京農業大学、2015 年 3 月 16~18 日)
堀口 吾朗、大池 諒、秋間 健太、塚谷 裕一
22. *as2 rpl4d* で引き起こされる葉の背軸化に必要な *SZK1* の発現解析
日本植物学会 2015 年度 (第 79 回) 大会(朱鷺メッセ、2015 年 9 月 6~8 日)
井上 幹人、中田 未友希、塚谷 裕一、**堀口 吾朗**
23. 異なる *rpl4d* および *rpl4a* アリルで蓄積している変異型 mRNA の構造決定とその背腹性制御に及ぼす影響の解析
日本植物学会 2015 年度 (第 79 回) 大会(朱鷺メッセ、2015 年 9 月 6~8 日)
増田 英典、塚谷 裕一、**堀口 吾朗**
24. *SUZAKU1*, a NAC-domain transcription factor gene promotes leaf abaxialization in response to *as2*-enhancer mutations in *Arabidopsis thaliana*.
日本発生生物学会 2015 年度 (第 48 回) 大会(つくば国際会議場、2015 年 6 月 2~5 日)
Horiguchi, G., Inoue, M., Masuda, H., Nakata, M., Tsukaya, H.
25. Inhibition of plastid translation disturbs stem-cell pattern of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*.
日本発生生物学会 2015 年度 (第 48 回) 大会(つくば国際会議場、2015 年 6 月 2~5 日)
Nakata, M., Tsukaya, H., **Horiguchi, G.**
26. The genetic and developmental characerization of suppressor mutants of *as2 rpl4d* that produces abaxialized leaves.
日本発生生物学会 2015 年度 (第 48 回) 大会(つくば国際会議場、2015 年 6 月 2~5 日)
Takahara, M., Tsukaya, H., **Horiguchi, G.**
27. Leaf abaxialization in *rpl4 as2* mutants requires aberrant *rpl4* transcript accumulation, a RING finger protein gene *SZK2*, and upregulation of a NAC transcription factor gene *SZK1*.
日本植物生理学会 2015 年度 (第 57 回) 年会(岩手大学、2016 年 3 月 18~20 日)
Horiguchi, G., Inoue, M., Masuda, H., Takahara, M., Nakata, M., Tsukaya, H.
28. Importance of RFC3 function and plastid translation in root plastids.
日本植物生理学会 2015 年度 (第 57 回) 年会(岩手大学、2016 年 3 月 18~20 日)
Nakata, M. T., Sato, M., Wakazaki, M., Sato, N., Shikanai, T., Toyooka, K., Tsukaya, H., **Horiguchi, G.**
29. 葉の成長に多面的に関わるシロイヌナズナ *AN3* および *GRF* の制御機構の解析
日本植物学会 2016 年度 (第 80 回) 大会(沖縄コンベンションセンター、2016 年 9 月 16~18 日)
佐藤 晃圭、皆吉 彩、池田 奨、塚谷 裕一、**堀口 吾朗**
30. シロイヌナズナにおける OLI1 と HDA9 による葉サイズ制御機構の解析
日本植物学会 2016 年度 (第 80 回) 大会(沖縄コンベンションセンター、2016 年 9 月 16~18 日)
鈴木 真里奈、出村 拓、塚谷 裕一、**堀口 吾朗**
31. リボソーム生合成関連因子 GDP1 と OLI2 が葉の発生に果たす役割の解析
日本植物学会 2016 年度 (第 80 回) 大会(沖縄コンベンションセンター、2016 年 9 月 16~18 日)
深田 かなえ、塚谷 裕一、**堀口 吾朗**
32. シロイヌナズナの AN3-GRF システムの破綻がもたらす地上部・地下部の 境界異常
日本植物学会 2016 年度 (第 80 回) 大会(沖縄コンベンションセンター、2016 年 9 月 16~18 日)
堀口 吾朗、塚谷 裕一
32. シロイヌナズナにおける *as2 rpl4d* の葉の背軸化には4つの NAC 型転写因子遺伝子が関わる
日本植物生理学会 2016 年度 (第 58 回) 年会(鹿児島大学、20176 年 3 月 16~18 日)
堀口 吾朗、大林 祝、杉山 宗隆、塚谷 裕一

オルガネラ DNA の維持機構の母性遺伝における機能

京都大学大学院理学研究科　植物分子遺伝学研究室　西村芳樹

1. 背景と目的

ミトコンドリアや葉緑体はそれぞれ独自のゲノムを持ち、これらは多くの真核生物で母親のみから次世代に遺伝する。母性遺伝とよばれるこの現象では、雄の葉緑体やミトコンドリア DNA の積極的破壊が一つの鍵となる。しかし、雄のミトコンドリアや葉緑体がいかにして認識され破壊されるのか、雌側はどのようにして保護されるのか、その具体的なしくみは未だに殆ど明らかではない。本研究では、葉緑体やミトコンドリアがタンパク質と結合することで構築される葉緑体（ミトコンドリア）核様体に焦点を当て、その構造とダイナミクスを明らかにしていくことで、オルガネラ DNA 遺伝において核様体が果たす役割を明らかにしていくことを目指す。

I. 母性遺伝変異体 *bp31* を起点とする母性遺伝機構の解析：単細胞緑藻クラミドモナスは母性遺伝研究のモデル生物の一つである。クラミドモナスは2つの性（接合型: mating type: *mt+*と *mt-*）を持ち、同型配偶子で生殖する。そのため、両親から等量のオルガネラ DNA が子孫に寄与されるが、それにもかかわらず葉緑体(cp)DNA は *mt+*のみから、ミトコンドリア(mt)DNA は *mt−*のみから片親遺伝する。そこには接合子において *mt-* cpDNA 及び *mt+* mtDNA を選択的に分解する機構の存在が示唆されている。我々はクラミドモナスにおける母性遺伝変異体(*biparental* (*bp)31*)の解析から、片親遺伝が *GAMETE SPECIFIC PLUS 1* (*GSP1*)によって制御されていることを示した (Nishimura et al., Plant Cell 2012)。Gsp1 は *mt+*特異的なホメオドメインタンパク質であり、*mt-*特異的ホメオドメインタンパク質 Gsm1 とヘテロダイマーを形成することで接合子成熟プログラムを開始する。Cp/mtDNA の片親遺伝もまた、この下流のプログラムの一つとして制御されていると考えらえる。Gsp1 が制御する遺伝子にはどのようなものがあるのか。片親遺伝に関わる遺伝子はそこに含まれているのか。また、オルガネラ DNA の片親遺伝の選択性を決めるものは何か。それを明らかにするために、野生型と *bp31* 接合子について、RNAseq 解析および逆遺伝学的解析を行った。

II. 「核様体」が葉緑体／ミトコンドリア DNA 遺伝において果たす役割：ミトコンドリア／葉緑体核様体は、オルガネラの持つ染色体ともいうべきDNA-タンパク質複合体で、DNA 複製、修復、遺伝子発現、遺伝の機能ユニットとして重要であると提唱されている。しかしその構造や遺伝を制御する詳細な機構や遺伝子は明らかでない。本研究では、緑藻クラミドモナスの葉緑体核様体について、そのコアを形成する遺伝子、形態を制御する遺伝子の探索、さらに生きた栄養細胞における葉緑体核様体の遺伝の機構を明らかにすることを目指した。

2. 研究成果

(1) 接合子における葉緑体・ミトコンドリア局在型 DNA 組換え・修復関連遺伝子群の急激な発現上昇が RNAseq により捉えられた

Gsp1 によって制御される遺伝子群のなかで、特徴的な遺伝子グループがあった。葉緑体やミトコンドリア移行型の DNA 組換え・修復蛋白質群である。これらの遺伝子群は、野生株では接合子形成とともに急速に発現上昇し、母性遺伝変異体 bp31 では全く発現上昇が観察されないことが、RNAseq 解析、そして定量的 RT-PCR 法でも確認された。これら葉緑体やミトコンドリア局在型 DNA 組換え・修復蛋白質群が、接合子成熟において何か重要な役割を担っていることが推察された。

これらの遺伝子群の機能を明らかにするために、まず代表例として RecA を選び、その局在を蛍光蛋白質 YFP との融合蛋白質を発現させることで検証した。YFP シグナルは葉緑体局在を示したが、さらにその局在を詳細に観察してみると、興味深いことに葉緑体 DNA-蛋白質複合体（核様体）、しかもその辺縁部に局在することが明らかになった。このことから、RecA は葉緑体核様体に局在し、その組換えや修復に関わっている可能性が示された。また RecA-YFP シグナルは葉緑体核様体全体に均質に検出される訳ではなく、その辺縁部に局在していたことから、葉緑体 DNA 組換え・修復活性のホットスポットの存在が示唆された。

(2) RecA は葉緑体核様体パターンの安定化に貢献する

RECA 遺伝子の機能を明らかにするため、artificial micro (ami) RNA 法による遺伝子抑制をおこない、その表現

型を詳細に観察した。まず細胞の増殖やサイズには大きな変化は見られなかったが、蛍光顕微鏡で葉緑体核様体の形状を調べてみると、通常5〜10個程度に分散して存在しているはずの葉緑体核様体が凝集し、中には1個にまとまってしまっている細胞も観察された。こうした葉緑体核様体の形状は、以前報告された *MOnokaryotic Chloroplast* (*moc*) 変異体に酷似していた。RecA 蛋白質は、核様体の形状パターンの安定化に重要な役割を果たしていることが推察された。

(3) RecA は緑藻において葉緑体ゲノム構造と核様体形状の安定化に貢献する

葉緑体ゲノム自体の安定性を解析してみた。葉緑体ゲノムには、多数のリピート配列が散在しており、それを介した相同組換えは、葉緑体ゲノム構造の不安定化につながる。緑藻クラミドモナスには、とりわけ多くの Short Dispersed Repeat (SDR)が存在しており、これを介した組換えを制御することは、葉緑体ゲノムの安定化に必須と考えられる。

RecA が葉緑体やミトコンドリアにおけるこうした組換えの制御に関わっていることは、ヒメツリガネゴケで報告されている。そこでクラミドモナスの葉緑体ゲノムにおける RecA についても検証してみた。その結果、RECA 抑制株では葉緑体ゲノムの安定性が著しく損なわれているらしいことが判明した。

以上より、(1)クラミドモナスでは、接合とともに葉緑体やミトコンドリアゲノムの組換え、修復に関わる遺伝子群が急激に上昇すること。(2)それらの代表例である RecA は、葉緑体核様体の辺縁部に局在し、葉緑体核様体のパターン制御、そして SDR を介した相同組替えの制御により葉緑体ゲノム構造の安定化に貢献していることがわかった。クラミドモナスにおいて、葉緑体ゲノムは母親から次世代に受け渡される。今回判明した葉緑体組換え・修復遺伝子群の接合子における急激な発現上昇は、次世代に受け渡す葉緑体やミトコンドリアゲノムの安定性、健全性を保障するための機構と考えられる。

(4) 葉緑体核様体の構造と葉緑体 DNA の遺伝制御

栄養細胞の分裂過程における葉緑体核様体の挙動を、生きた細胞で捉えることに初めて成功した。葉緑体核様体を可視化するため、葉緑体核様体タンパク質である HU に蛍光タンパク質を融合して導入し、生きたクラミドモナス細胞をトラップするためにマイクロ流体デバイスを導入した。その結果、間期では1葉緑体あたり5〜8個の球状構造として存在する葉緑体核様体が、分裂期に差し掛かると細かく拡散してネットワーク構造に変化し、葉緑体分裂の完了とともに葉緑体核様体は速やかに元の球状構造に戻るというダイナミックな挙動を示すことが明らかになった。これは娘葉緑体への均等な遺伝を実現させるためのメカニズムと考えられた。

3 優れた成果が上がった点

葉緑体ゲノムの進化に関して、ゲノムの細胞核転移、遺伝子発現機構、核様体構造といった広範な視点からの多角的アプローチを通し、その実像に迫ることができた。とりわけ、葉緑体DNAの母性遺伝のマスターレギュレーターの同定(論1)、藻類からシャジクモ、ゼニゴケ、被子植物に至る様々なモデル植物を対象とした葉緑体核様体構造進化過程に関する解析(論8)とその動的挙動の制御因子の解明(論11)はこれまで全く明らかでなかった問題解決に向けた鍵を提供できたと考えている。

4 課題となった点

葉緑体母性遺伝については、その制御因子を明らかにすることはできたが、実際のメカニズムの解明には至らなかった。また葉緑体核様体の構造制御因子として、葉緑体DNAのトポロジー以外の因子についての解析は不十分であり、今後の課題としてあげられる。

5 研究期間終了後の展望

葉緑体核様体の構造制御因子の探索から、葉緑体DNAの複製や修復機構の一端が見えてきた。葉緑体DNAは、光合成で発生する活性酸素種の攻撃に晒されており、その修復は生存に必須である。今後さらに変異体解析を行う

ことで、その全貌解明が期待できる。また、葉緑体母性遺伝については、変異体スクリーニングの系をさらに工夫することでメカニズムの全貌解明に取り組んでいきたい。

６ 研究成果公表

【原著論文】

1. The Gsp1 triggers sexual developmental program including inheritance of cpDNA and mtDNA in *Chlamydomonas reinhardtii.*
*__Nishimura, Y.__, Shikanai, Y., Nakamura, S., Kawai-Yamada, M., and Uchimiya, H.
Plant Cell (2012) **24,** 2401-2414.

2. Subfunctionalization of sigma factors during the evolution of land plants based on mutant abalysis of liverwort (*Marchantia polymorpha* L.) *MpSIG1*.
Ueda, M., Takami, T., Peng, L., Ishizaki, K., Kohchi, T., Shikanai, T., and *__Nishimura, Y.__
Genome Biol. Evol. (2013) **5,** 1836-1848.

3. Distribution of the sex-determining gene *MID* and molecular correspondence of mating types within the isogamous genus *Gonium* (*Volvocales, Chlorophyta*).
Hamaji, T., Ferris, P.J., Nishii, I., __Nishimura, Y.__, Nozaki, H.
PLoS One (2013) **8,** e64385

3. *chlB* requirement for Chlorophyll biosynthesis under short photoperiod in *Marchantia polymorpha*.
Ueda, M., Tanaka, A., Sugimoto, K., Shikanai, T., *__Nishimura, Y.__
Genome Biol. Evol. (2014) **6,** 620-628.

4. Algae sense exact temperatures: small heat shock proteins are expressed at the survival threshold temperature in *Cyanidioschyzon merolae* and *Chlamydomonas reinhardtii*.
Kobayashi, Y., Harada, N., __Nishimura, Y.__, Saito, T., Nakamura, M., Fujiwara, T., Kuroiwa, T., Misumi, O.
Genome Biol. Evol. (2014) **6,** 2731-2740

5. A cyan fluorescent reporter expressed from the chloroplast genome of *Marchantia polymorpha*.
Boehm, C., Ueda, M., __Nishimura, Y.__, Shikanai, T., *Haseloff, J.
Plant Cell Physiol. (2015) **57,** 291-299.

6. Development of Gateway binary vector series with four different selection markers for the liverwort *Marchantia polymorpha*.
Ishizaki, K., Nishihama, R., Ueda, M., Inoue, K., Ishida, S., __Nishimura., Y.__, Shikanai, T., *Kohchi, T.
PLoS One (2015) **10,** e0138876

7. *RECA* plays a dual role in the maintenance of chloroplast genome stability in *Physcomitrella patens*.
Odahara, M., Inouye, T., __Nishimura, Y.__, *Sekine, Y.
Plant J., (2015) **84,** 516-526

8. Eukaryotic components remodeled chloroplast nucleoid organization during the green plant evolution.
Kobayashi, Y., Takusagawa, M., Harada, N., Fukao, Y., Yamaoka, S., Kohchi, T., Hori, K., Ohta, H., Shikanai, T., *__Nishimura, Y.__
Genome Biol. Evol. (2015) **25,** 1-16

9. Sequence of the Gonium pectorale Mating Locus Reveals a Complex and Dynamic History of Changes in Volvocine Algal Mating Haplotypes.
Hamaji, T., Mogi, Y., Ferris, P.J., Mori, T., Miyagishima, S., Kabeya, Y., __Nishimura, Y.__, Toyoda, A., Noguchi, H., Fujiyama, A., Olson, B.J., Marriage, T.N., Nishii, I., Umen, J.G., Nozaki, H.
G3 (2016) **115,** e026229.

10. C-Terminal Region of Sulfite Reductase Is Important to Localize to Chloroplast Nucleoids in Land Plants.
Kobayashi, Y., Otani, T., Ishibashi, K., Shikanai, T., *__Nishimura, Y.__
Genome Biol. Evol. (2016) **22,** 1459-66.

11. Dynamic interplay between nucleoid segregation and genome integrity in *Chlamydomonas chloroplasts.*
Odahara, M., Kobayashi,Y., Shikanai, T., *__Nishimura, Y.__
Plant Physiol. (2016) in press.

*Corresponding author.

【著書・総説・解説等】

1. 緑藻クラミドモナスから母性遺伝の謎に挑む
   西村 芳樹
   海洋と生物 (2012) **34**, 453-458

2. Active digestion of paternal chloroplast DNA in a young zygote of *Chlamydomonas reinhardtii*: the basis for maternal inheritance.
   Nishimura, Y.
   Atlas in Plant Cell Structure, Chapter 3 (Springer, Heidelberg, Germany)

3. The sexual developmental program of *Chlamydomonas reinhardtii*
   Nishimura, Y.
   Chlamydomonas: Biotechnology and Biomedicine. Part 2 Chapter 22 in press. (Springer, Heidelberg, Germany)

【国際学会発表】

1. Gsp1 triggers a sexual developmental program including the cytoplasmic inheritance in *Chlamydomonas reinhardtii*.
   15th International conference on the cell & molecular biology of *Chlamydomonas* (Potsdam, Germany, June 5-9, 2012)
   Nishimura, Y., Shikanai, T., Nakamura, S., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H.
2. Requirement of *chlB* (a subunit of DPOR) for chlorophyll synthesis under short photoperiod in liverwort (*Marchantia polymorpha* L.).
   Marchantia IV (JSPS Bilateral Program), Dec 8-11, 2013, Melbourne, Australia.
   Ueda, M., Tanaka, A., Sugimoto, K., Kohchi, T., Shikanai, T., **Nishimura, Y.**
3. *Marchantia* plastid (chloroplast) transformation for the study of endosymbiosis.
   12th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, August 18 -22, 2013, Halifax, Canada.
   Ueda, M., Tanaka, A., Shikanai, T., **Nishimura, Y.**
4. RNAseq analysis on UV light-induced disturbance of the uniparental inheritance in *Chlamydomonas reinhardtii*.
   2nd Kyoto-Bristol Symposium, Kyoto Univ., Kyoto, Japan, Jan 9-10, 2013, Kyoto, Japan)
   Harada, N., Kobayashi, Y., Takusagawa, M., Suzuki, T., Higashiyama, T., Shikanai, T., **Nishimura, Y.**
5. Deciphering the mechanisms underlying the uniparental inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA.
   Gordon Research Conference, Mitochondria and Chloroplast, Lucca (Barga) Italy, July 6-11,2014
   Nishimura, Y.
6. Restructuring of chloroplast nucleoids factor during the green plant evolution.
   The 13th International Colloquium of Endocytobiology and Symbiosis (Sep 10-14, 2016 Kyoto).
   Nishimura, Y.

【国内学会発表】

1. 母性遺伝を操る生殖プログラムの構造
   日本植物学会第 76 回大会（兵庫県立大学、2012 年 9 月 15-17 日）
   西村芳樹、田中瞳、鹿内利治
2. 単細胞緑藻クラミドモナスにおいて細胞質遺伝は Gsp1 によって制御される
   日本植物形態学会第 24 回大会（兵庫県立大学、2012 年 9 月 14 日）
   西村芳樹、田中瞳、鹿内利治
3. RecA ホモログによる葉緑体ゲノム安定性の維持
   日本遺伝学会第 84 回大会（九州大学、2012 年 9 月 24-26 日）
   小田原真樹、井上貴之、**西村芳樹**、関根靖彦
4. 緑藻クラミドモナスの生殖とオルガネラ遺伝をつなぐ遺伝子を探る
   第 54 回日本植物生理学会年会（岡山大学、2013 年 3 月 22 日）
   西村芳樹、田中瞳、鹿内利治

5. RecA ホモログによる葉緑体ゲノム安定性の維持
第 54 回日本植物生理学会年会（岡山大学、2013 年 3 月 22 日）
小田原真樹、井上貴之、関根靖彦、**西村芳樹**
6. 母性遺伝の生殖プログラムによる制御
研究会"オルガネラと生殖:細胞質における遺伝情報の次世代への伝達・分配"（遺伝研、2012 年 11 月 30 日）
西村芳樹
7. 葉緑体の遺伝子発現制御と母性遺伝の基幹
植物細胞生物学若手の会（東京大学、2013 年 8 月 26 日）
西村芳樹
8. 葉緑体、ミトコンドリアの遺伝子の機能、次世代への遺伝のしくみ
環境共生生物科学特別講義（山口大学、2013 年 9 月 2-3 日）
西村芳樹
9. 酵母様菌類クリプトコッカスのミトコンドリア母性遺伝機構
日本植物形態学会 25 回大会 (北海道大学、2013 年 9 月 12 日)
西村芳樹、鹿内利治、東江昭夫
10. プロテオーム解析から紐解く核様体構造
日本植物形態学会 25 回大会 (北海道大学、2013 年 9 月 12 日)
小林優介、田草川真理、原田尚実、深尾陽一朗、鹿内利治、**西村芳樹**
11. RNAseq でみえてきた UV による母性遺伝撹乱の機構
日本植物形態学会 25 回大会 (北海道大学、2013 年 9 月 12 日)
原田尚実、小林優介、鈴木孝征、東山哲也、鹿内利治、**西村芳樹**
12. 母性遺伝における片親オルガネラの選択的排除機構
日本植物学会第77回大会 (北海道大学、2013 年 9 月 13~15 日）
西村芳樹
13. オルガネラゲノム核様体の構造様式：その蛋白質構成、ダイナミズムに迫る
日本植物学会第77回大会 (北海道大学、2013 年 9 月 13~15 日）
小林優介，原田尚実、小田原真樹、深尾陽一朗、鹿内利治、**西村芳樹**
14. 緑藻クラミドモナスを用いた UV 照射によるストレス応答と母性遺伝の撹乱に関する網羅的遺伝子発現解析
日本植物学会第77回大会 (北海道大学、2013 年 9 月 13~15 日）
原田尚実、小林優介、鈴木孝征、東山哲也、鹿内利治、**西村芳樹**
15. RNAseq で解く紫外線による母性遺伝撹乱の分子機構
クラミドモナスワークショップ（基礎生物学研究所、2013 年 11 月 29 日）
原田尚実、小林優介、田草川真理、鈴木孝征、東山哲也、鹿内利治、**西村芳樹**
16. クラミドモナスの生殖と母性遺伝、四分子解析
クラミドモナスワークショップ（基礎生物学研究所、2013 年 11 月 29 日）
西村芳樹
17. オルガネラゲノム核様体の構造様式とその分子動態
クラミドモナスワークショップ（基礎生物学研究所、2013 年 11 月 29 日）
小林優介、田草川真理、原田尚実、深尾陽一朗、鹿内利治、**西村芳樹**
18. *ATG8* 欠損変異体におけるミトコンドリア母性遺伝
日本植物形態学会第 26 回大会（明治大学、2014 年 9 月 11 日）
西村芳樹、鹿内利治、東江昭夫
19. クラミドモナスの葉緑体局在型 HMG タンパク質の機能解析
日本植物形態学会第 26 回大会（明治大学、2014 年 9 月 11 日）
田草川真理、小林優介、深尾陽一郎、**西村芳樹**、三角修己

20. 母性遺伝を引き起こす片親ミトコンドリアの選択的排除機構
日本植物学会第 78 回大会（明治大学、2014 年 9 月 12~14 日）
西村芳樹、鹿内利治、東江昭夫

21. ミトコンドリア片親遺伝をつかさどる複層的分子機構
第 56 回日本植物生理学会年会（東京農業大学、2015 年 3 月 16~18 日）
西村芳樹、鹿内利治、東江昭夫

22. 葉緑体核様体コア因子の多様性と進化
日本植物学会第 79 回大会（朱鷺メッセ、2015 年 9 月 6 日~8 日）
小林優介、田草川真理、原田尚実、深尾陽一朗、山岡尚平、河内孝之、堀孝一、太田啓之、鹿内利治、
西村芳樹

23. ミトコンドリア核様体構造からみた母性遺伝の分子機構
日本植物学会第 79 回大会（朱鷺メッセ、2015 年 9 月 6 日~8 日）
西村芳樹、田草川真理、鹿内利治、東江昭夫

24. Active destruction of mitochondrial nucleoid as the driving force for uniparental inheritance in Cryptococcus
第 57 回日本植物生理学会年会 （岩手大学、2016 年 3 月 18 日~20 日）
Yoshiki Nishimura, Mari Takusagawa, Toshiharu Shikanai, Akio Toh-e

25. Genome instability in the Chlamydomonas chloroplasts impaired in nucleoid segregation
第 57 回日本植物生理学会年会 （岩手大学、2016 年 3 月 18 日~20 日）
Masaki Odahara, Yusuke Kobayashi, Osami Misumi, **Yoshiki Nishimura**

26. Remodeling of chloroplast nucleoid organization by eukaryotic components during the green plant evolution
第 57 回日本植物生理学会年会 （岩手大学、2016 年 3 月 18 日~20 日）
Yusuke Kobayashi, Mari Takusagawa, Naomi Harada, Yoichiro Fukao, Shohei Yamaoka, Takayuki Kohchi, Koichi Hori, Hiroyuki Ohta, Toshiharu Shikanai, **Yoshiki Nishimura**

【国際共同研究】

bp31 のトランスクリプトーム解析を、鈴木孝征、東山哲也先生（名古屋大学）、Jae-Hyeok Lee 先生（Univ. of British Columbia）との共同研究として進行中。

4. セミナー、講演会、成果報告会の実施

平成 24 年度

(1) 生命理学研究センターセミナー

2013 年1月 18 日

中戸川 仁(東京工業大学 フロンティア研究機構 特任准教授)

「オートファジーにおける膜形成と分解標的認識の分子メカニズム」(資料 4-1)

2013 年 3 月 8 日

西村 芳樹(京都大学大学院・理学研究科・助教)

「葉緑体母性遺伝と葉緑体ゲノム安定性維持機構」 (資料 4-2)

(2) 成果報告会

2013 年 3 月 8 日 2012 年度成果報告会 (資料 4-3)

平成 25 年度

(1) 生命理学研究センターセミナー

2013 年 4 月 19 日

山本 慎也 (Baylor College of Medicine・Fellow)

「Novel insights into neuronal development, function and maintenance through forward genetic approaches in Drosophila」 (資料 4-4)

2013 年 7 月 19 日

阿部 洋志 (千葉大学大学院 融合科学研究科)

「Xenopus 卵成熟過程におけるアクチン繊維形成ダイナミクスと紡錘体形成」

(資料 4-5)

2013 年 11 月 20 日

石川裕之 (千葉大学大学院理学研究科生物学教室)

「ゴルジ体キナーゼによるタンパク質の細胞外領域のリン酸化と生体調節」

(資料 4-6)

2013 年 12 月 20 日

佐藤 健 (東京大学大学院総合文化研究科)

「細胞内の物流システム ～メンブレントラフィック(小胞輸送)の分子メカニズムに迫る～」

(資料 4-7)

(2) 立教大学講演会

2013 年 11 月 8 日

David J Sherratt (University of Oxford, Professor)

「Visualizing homologous recombination in live *E.coli*」 (資料 4-8)

(3) 成果報告会

2014 年 3 月 13 日　2013 年度成果報告会 (資料 4-9)

平成 26 年度

(1) 生命理学研究センターセミナー

2014 年 5 月 21 日

大野博司 (RIKEN IMS・粘膜システム研究グループディレクター)

「腸エコシステムと生体防御・免疫系　～統合オミクス手法による解析～」

(資料 4-10)

2014 年 6 月 18 日

野崎智義 (国立感染症研究所　寄生動物部・部長)

「嫌気環境でのオルガネラ進化　-寄生虫のミトコンドリアの驚くべき機能-」

(資料 4-11)

2014 年 12 月 2 日

出村 拓 (奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科・教授)

「植物の陸上繁栄の鍵　～通水細胞と支持細胞の分化～ 」 (資料 4-12)

2014 年 12 月 8 日

吉田 松生 (自然科学研究機構･基礎生物学研究所･生殖細胞研究部門 教授)

「マウス精子形成を支える幹細胞のダイナミクス」 (資料 4-13)

(2) 成果報告会

2015 年 3 月 12 日　2014 年度成果報告会 (資料 4-14)

平成 27 年度

(1) 生命理学研究センターセミナー

2015 年 6 月 25 日

林 茂生（理化学研究所、多細胞システム形成研究センター、チームリーダー）

「器官形成の発生学と力学」 （資料 4-15）

2016 年 2 月 22 日

吉田 秀郎（兵庫県立大学大学院生命理学研究科、教授）

「小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答」 （資料 4-16）

(2) 成果報告会

2016 年 3 月 14 日 2015 年度成果報告会 （資料 4-17）

平成 28 年度

(1) 生命理学研究センターセミナー

2016 年 11 月 29 日

倉石 貴透（金沢大学医薬保健研究域薬学系、准教授）

「ショウジョウバエモデルを用いた自然免疫シグナルの解析：
微生物感染依存的な自然免疫活性化から感染非依存的な
活性化メカニズムの解明へ」 （資料 4-18）

2016 年 12 月 7 日

尾崎 省吾（スイス・バーゼル大学バイオセンター感染生物学分野、ポスドク）

「バクテリアのサイクリン様低分子：
非対称分裂細菌カウロバクター・クレセンタスの細胞周期を制御する
環状ジグアニル酸のメカニズム」 （資料 4-19）

(2)公開シンポジウム

2016 年 7 月 30 日

立教大学生命理学研究センター主催 公開シンポジウム

「オルガネラが駆動する真核細胞システムの高度化」 （資料 4-20、4-21）

資料4－1

立教大学生命理学研究センター セミナー

日時　2013 年　1月　18 日　（金）　16時～17時

場所　立教大学（池袋キャンパス）　10号館　X107 教室

講演者　中戸川　仁

（東京工業大学 フロンティア研究機構 特任准教授）

オートファジーにおける膜形成と分解標的認識の分子メカニズム

要旨　オートファジーとは、リソソーム（動物細胞）あるいは液胞（酵母や植物細胞）を分解の場とする、真核細胞が備えている主要な分解経路の1つである。オートファジーが誘導されると、膜小胞を押しつぶしたような扁平な形の膜構造が細胞質に現れ、これが分解すべき標的を包み込むようにして伸展し、球状となって閉じ、二枚重ねの脂質膜胞「オートファゴソーム」が形成される。続いて、オートファゴソームの外膜がリソソーム／液胞の膜と融合し、オートファゴソームの内膜ごと、内包物の分解が達成される。栄養飢餓時には、オートファゴソームは細胞質の一部を無作為に一掬いし、分解産物を細胞が飢餓を凌ぐための栄養素として供給する。一方、オートファゴソームは、特定の標的を認識して選択的に取り囲む場合もある。標的は、神経変性疾患の原因ともなり得るタンパク質の凝集体、損傷したミトコンドリア、余剰となったペルオキシソーム、細胞内に侵入したバクテリア等、実に多岐に亘る。

私たちは、出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）を用いて、オートファジーの分子基盤の解明を目指して研究を進めている。オートファジーにおいて、「オートファゴソームの形成」と「分解標的の認識」は、特に重要なプロセスである。本セミナーでは、(1) オートファゴソームの形成を支える Atg タンパク質群の中から、特にユビキチン様タンパク質の結合反応系に焦点を当て、その作動原理と反応産物であるユビキチン様タンパク質結合体の機能について、(2) 分解標的の認識を制御する新たな因子の同定とその作用機序について、これまでに得られた成果を紹介し、それらの生物種を越えた普遍性についても議論したい。

学部・大学院の学生さんの参加も歓迎です。気軽に参加してください。

連絡先：理学部生命理学科　関根靖彦　(03-3985-3408, ysekine@rikkyo.ac.jp)

資料4－2

立教大学生命理学研究センター セミナー

日時　2013年　3月　8日　（金）　17:15～18:00

場所　立教大学(池袋キャンパス)　10号館　X102 教室

講演者　**西村　芳樹**　（京都大学大学院・理学研究科・助教）

葉緑体母性遺伝と葉緑体ゲノム安定性維持機構

要旨　ミトコンドリアや葉緑体は、細胞核とは異なる独自の遺伝子群を有する。それらはヒトを含む多くの動植物において母親のみから子孫に伝達されるが、この現象は雄のミトコンドリアや葉緑体を選択的に分解・除去する精巧なシステムに基づいていることが最近の研究により明らかになってきている。我々は、単細胞緑藻クラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)をモデルとしてこの現象の分子機構の解明を目指してきた。当研究室で単離された母性遺伝変異体 *biparental* (*bp*) *31* は、配偶子誘導や接合子形成は正常だが、雄葉緑体 DNA の積極的分解を含む接合子の生殖過程が完全に停止してしまう。この変異体の原因遺伝子を同定したところ、接合子特異的プログラムの開始に必須なホメオティック遺伝子 *Gamete Specific Plus* (*GSP*)*1* であったことから、母性遺伝は *GSP1* を起点とする生殖プログラムによって厳密に制御されていることがわかった。さらに野生株と *bp31* の RNAseq 解析をおこなったところ、野生型接合子のみで発現上昇する遺伝子群に、葉緑体／ミトコンドリア DNA の組換え・修復に関わるものが数多く含まれることが明らかになった。現在、その代表例として葉緑体型 *RECA* に注目し、その抑制株の単離、解析を進めており、葉緑体型 *RECA* の葉緑体ゲノムや核様体構造の安定化における重要性がみえてきている。

学部・大学院の学生さんの参加も歓迎です。気軽に参加してください。

連絡先:理学部生命理学科　関根靖彦　(03-3985-3408, ysekine@rikkyo.ac.jp)

資料4－3

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
「オルガネラが駆動する真核細胞システムの高度化」
2012年度成果報告会

日時　２０１３年　３月　８日　（金）１５：００～
会場　立教大学池袋キャンパス　１０号館　X102 室

プログラム

15:00-15:05　はじめに　関根　靖彦

15:05-15:50　A グループ
オルガネラの誕生と維持機構の解明
関根　靖彦
花井　亮
山田　康之

15:50-17:05　B グループ
多細胞体制を支えるオルガネラの新機能の解明
岡　敏彦
木下　勉
眞島　恵介
後藤　聡
堀口　吾朗

・どなたでも聴講を歓迎します。
・引き続き、１７：１５から同じ会場で生命理学研究センターセミナーを開催します。

連絡先：生命理学科・関根靖彦　03-3985-3409

資料4－4

立教大学生命理学研究センター セミナー

日時　2013年　4月　19日　（金）　13:30～15:00

場所　立教大学(池袋キャンパス)　10号館　X202 教室

講演者　**山本　慎也**　(Baylor College of Medicine・Fellow)

Novel insights into neuronal development, function and maintenance through forward genetic approaches in *Drosophila*

The fruit fly, *Drosophila melanogaster*, has greatly contributed to the advancement of basic biology and medicine over the last century. Forward genetic approaches in *Drosophila* have been a powerful method to identify novel genes in a genetic pathway of interest. In addition, isolation of new alleles of well-characterized genes from such screens can lead to unexpected and exciting findings. Over the last ten years, we, in Hugo Bellen's Laboratory, have been performing large scale screens by combining classical chemical mutagenesis with contemporary FLP/FRT-mediated mitotic recombination technique to isolate and characterize new mutations in essential genes in order to investigate their functions in the nervous system. In the past five years, we have been successful in applying this strategy to the fly X chromosome, a chromosome that has unique constrains when working with essential genes. From this recent screen, we have identified >150 genes that are involved in neuronal development, function and maintenance. Interestingly, a number of these genes have human homologs that have been linked to diverse developmental, neurological and/or metabolic diseases. One example of such gene is *Notch*.*Notch* encodes a large transmenbrane receptor of an evolutionarily conserved signaling pathway. Defects in Notch signaling are involved in diverse human diseases such as Alagille Syndrome, Tetralogy of Fallot, hereditary stroke disorder (CADASIL), and various types of cancer. Notch ligands are also transmembrane proteins and can be classified into two distinct subfamilies: Delta/Dll and Serrate/Jagged family. While Notch is known to be able to distinguish the two ligand subfamilies through changes in its sugar modification status, the exact domain involved in this molecular distinction has been obscure. Since Notch receptors and ligands have become promising drug targets over the last decade, understanding how these proteins work *in vivo* have direct clinical impact. From our screen, we generated 42 new mutations in *Notch* and utilized these alleles to obtain novel structure function information. One unique allele, which we named *jigsaw*, has given us a glimpse into an evolutionarily conserved domain in Notch that functions in ligand discrimination. Through this seminar, I hope to provide an overview of our recent screen in the Bellen lab, and further discuss our work on new *Notch* alleles to emphasize the power of *Drosophila* forward genetics in the modern era of molecular medicine.

1. **Yamamoto S**, Charng W-L, Rana NA, Kakuda S, Jaiswal M, Bayat V, Xiong B, Zhang K, Sandoval H, David G, Wang H, Haltiwanger RS, Bellen HJ (2012) A mutation in EGF repeat-8 of Notch discriminates between Serrate/Jagged and Delta family ligands. ***Science***, 338 (6111): 1229-1232.

学部・大学院の学生さんも、日本語講演ですので気軽に参加してください。

連絡先:理学部生命理学科　後藤聡　(03-3985-2387, stgoto@rikkyo.ac.jp)

資料4－5

立教大学生命理学研究センター セミナー

日　時:　2013年　7月　19日　（金）　16:00～17:30
場　所:　立教大学(池袋キャンパス)　4号館　4408教室

講演者　　阿部　洋志　（千葉大学大学院 融合科学研究科）

Xenopus 卵成熟過程におけるアクチン繊維形成ダイナミクスと紡錘体形成

卵巣内で十分に成長した卵母細胞は第一減数分裂前期(ProI)で停止しているが、ホルモン刺激等により減数分裂を再開し、卵母細胞に特徴的な巨大な核である卵核胞の崩壊(GVBD)の後、第一減数分裂を終了して極体を放出し、第二減数分裂中期で再び停止して受精を待つ。この過程を卵成熟過程と呼ぶが、減数分裂を再開後、どのタイミングで受精が起こるかという点を除けば、ほとんどすべての動物の卵母細胞の成熟に必要な過程であり、次世代を生み出すために必須の過程と言える。この過程の開始と再停止のトリガーを引くのは、Cdc2/cyclin B 複合体を本体とする卵成熟促進因子(MPF)と、c-Mos-MAPK 経路を実体とする分裂抑制因子(CSF)の活性化である。GVBD には、卵核胞を裏打ちする中間系繊維の一種であるラミンフィラメントの脱集合が、紡錘体の形成には微小管繊維形成の動的な制御が必須である。しかし、我々は、これらの現象にアクチン繊維形成のダイナミクスもまた必須であることを示す実験的証拠を Xenopus 卵成熟過程において見出した。発端は、アクチン繊維安定化剤 phalloidin を注入して卵母細胞内のアクチン繊維を安定化させてしまうと、MPF や CSF の活性化が起こっているにもかかわらず、GVBD が完全に抑制され、紡錘体形成が起こらなかったことである。本セミナーでは、卵成熟過程でのアクチン調節タンパク質 ADF/コフィリンの活性制御機構を介したアクチン繊維形成のダイナミクスと、紡錘体形成に至る微小管動態との関連について、我々の実験結果を紹介しながら考察したい。

学部・大学院の学生さんの参加も歓迎です。気軽に参加してください。

連絡先:理学部生命理学科　木下　勉　(03-3985-2388, tkinoshita@rikkyo.ac.jp)

資料4－6

立教大学生命理学研究センター セミナー

日時　2013年　11月　20日　（水）　18:30～20:00

場所　立教大学（池袋キャンパス）　10号館　X102 教室

講演者　　石川裕之　（千葉大学大学院理学研究科生物学教室）

ゴルジ体キナーゼによる タンパク質の細胞外領域のリン酸化と生体調節

分泌性のタンパク質や細胞膜上のタンパク質など、細胞の外側ではたらくタンパク質の機能は、小胞体・ゴルジ体における糖鎖修飾により調節されることがよく知られている。これに対して私たちは、ゴルジ体に存在するリン酸化酵素（ゴルジ体キナーゼ）による、タンパク質の細胞外領域のリン酸化の機能に着目して研究を行っている。

本セミナーでは、ショウジョウバエの発生において組織の成長と平面細胞極性を制御する非定型カドヘリン Fat と Dachsous の機能が、ゴルジ体キナーゼ Four-jointed による Fat と Dachsous のカドヘリンドメインのリン酸化により調節されるしくみについて紹介する。さらに、哺乳類において骨代謝に関わる細胞外基質タンパク質 SIBLINGs の機能が、ゴルジ体キナーゼ FAM20C による SIBLINGs のリン酸化により調節されるしくみについてもあわせて紹介する。

興味深い話なので、学部・大学院の学生さんもふるって参加してください。

連絡先：理学部生命理学科　後藤聡　(03-3985-2387, stgoto@rikkyo.ac.jp)

資料4－7

立教大学生命理学研究センター
セミナー

日時　2013年　12月　20日　（金）　17:30～18:30
場所　立教大学（池袋キャンパス）　本館　1203教室

講演者　**佐藤　健　（東京大学大学院総合文化研究科）**

「細胞内の物流システム
～メンブレントラフィック（小胞輸送）の
分子メカニズムに迫る～」

「メンブレントラフィック」（小胞輸送）が昨今、細胞生物学でホットな研究分野の一つとなっている。今年のノーベル医学生理学賞はこの分野の基礎を築いた研究に贈られることとなった。メンブレン（生体膜）とは、真核細胞内の細胞小器官を指し、トラフィックとは運び役の膜小胞によるタンパク質や脂質の物流である。タンパク質は合成された時から細胞内のどこへ運ばれるのかがきちんと指定されており、メンブレントラフィックによって指定通りの場所まで輸送される。また、この現象が関わるのは物質輸送だけではなく、一見安定して存在しているかのように見える細胞小器官は、実は絶え間なく行われているメンブレントラフィックの結果成立している動的平衡状態と見なすことができる。本講演では、メンブレントラフィックについて試験管内再構成系や蛍光イメージングを用いたアプローチによる我々の研究とともに最新の知見を紹介する。

学部・大学院の学生さんの参加も歓迎です。気軽に参加してください。

連絡先：理学部生命理学科　塩見　大輔　(03-3985-2401, dshiomi@rikkyo.ac.jp)

資料4－8

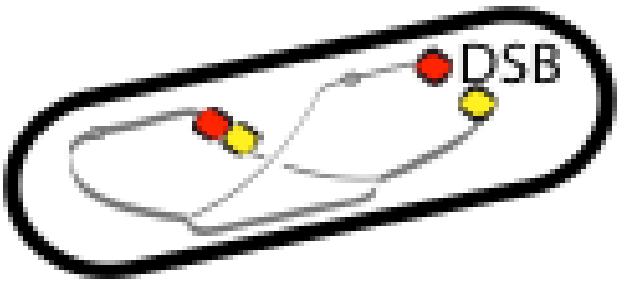
立教大学　公開講演会

日時　2013年　11月　8日　（金）　17:00～18:00
場所　立教大学(池袋キャンパス)　11号館　2階　A203教室

講演者　Professor David J Sherratt　(University of Oxford)

Visualizing homologous recombination in live *E. coli*

Double-strand break (DSB) repair by homologous recombination (HR) has evolved to maintain genetic integrity in all organisms. Although many reactions that occur during HR are known, understanding of where, when and how they occur in living cells is lacking. By using conventional and super-resolution microscopy we describe the progression of DSB repair in live *Escherichia coli*. In particular, we address the question of whether HR can occur efficiently between distant sister loci that have segregated to opposite halves of an *E. coli* cell. We show that a site-specific DSB in one sister can be repaired efficiently using distant sister homology. After RecBCD processing of the DSB, RecA is recruited to the cut locus, where it nucleates into a bundle that contains many more RecA molecules than can associate with the two ssDNA regions that form at the DSB. Mature bundles extend along the cell long axis in the space between the bulk nucleoid and the inner membrane. Bundle formation is followed by pairing in which the two ends of the cut locus relocate at the periphery of the nucleoid and move rapidly together towards the homology of the uncut sister. After sister locus pairing, RecA bundles disassemble and proteins that act late in HR are recruited to give viable recombinants 1-2 generation time equivalents after formation of the initial DSB. The work reveals an unanticipated role of a RecA bundle in channeling the movement of the DNA DSB ends thus facilitating the long-range homology search that occurs prior to the strand invasion and transfer reactions.



Sherratt 博士が来日する折に、東京で開催される唯一の講演会です。

聴講自由・無料です。多くの皆様のご来場をお待ちしています。

主催:立教大学生命理学研究センター

連絡先:理学部生命理学科　塩見　大輔

(03-3985-2401, dshiomi@rikkyo.ac.jp)

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
「オルガネラが駆動する真核細胞システムの高度化」
2013年度成果報告会

日時　2014 年　3 月 13 日（木）15:00 ～ 17:45
会場　立教大学池袋キャンパス　10 号館　X105 室

プログラム

15:00～15:05　はじめに　関根　靖彦

15:05～16:20
A グループ「オルガネラの誕生と維持機構の解明」
関根　靖彦
花井　亮
山田　康之
塩見　大輔
加藤　千明（JAMSTEC）

16:20～16:30　（休憩）

16:30～17:45
B グループ「多細胞体制を支えるオルガネラの新機能の解明」
岡　敏彦
木下　勉
眞島　恵介
後藤　聡
堀口　吾朗

・教職員・学生・院生の皆さん、どなたでも聴講を歓迎します。

連絡先：理学部生命理学科・関根靖彦　03-3985-3408

ysekine@rikkyo.ac.jp

立教大学生命理学研究センター セミナー

日時　2014年　5月　21日　（水）　17:00～18:30

場所　立教大学(池袋キャンパス)　10号館　X203教室

講演者　**大野博司**（RIKEN IMS・粘膜システム研究グループディレクター）

腸エコシステムと生体防御・免疫系

～統合オミクス手法による解析～

われわれの腸内には 100 兆個以上もの細菌が共生しており、宿主との相互作用によりユニークな生態系、「腸エコシステム」を構築している。腸エコシステムは宿主の生理や病理と密接に関係すると考えられるが、複雑な腸エコシステムを解析する手法はこれまで確立されていなかった。そこでわれわれは、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、メタボロミクスなどの網羅的解析を組み合わせた統合オミクス手法を考案・応用してきた。

無菌マウスにある種のビフィズス菌を定着させておくと、その後の腸管出血性大腸菌 O157 投与による感染死を予防できるがそのメカニズムは明らかではなかった。メタボローム解析および腸管上皮細胞株を用いた実験から、ビフィズス菌が産生する酢酸が O157 による細胞死を抑制することがマウス感染死予防に需要であることが明らかとなった。また、ビフィズス菌の全ゲノム比較解析から、O157 感染死を予防できるビフィズス菌にのみ存在する果糖トランスポーター遺伝子を同定した。この結果は、統合オミクス手法が複雑な宿主ー腸内細菌相互作用の解析に効果的であることを証明するとともに、ビフィズス菌のプロバイオティクス作用のメカニズムの一端を初めて明らかにしたものである。

また最近、クロストリジウム目に属する細菌群を無菌マウスに定着させると大腸の制御性 T 細胞（Treg）が増加することが示された。メタボロームならびに ChIP−seq によるヒストンアセチル化の網羅的解析から、クロストリジウム目細菌群が産生する酪酸のヒストンデアセチラーゼ阻害活性により、Treg への分化に必須の転写因子 Foxp3 のプロモーター領域のヒストンアセチル化が亢進することで Treg への分化が促進されることがわかった。

このように、統合オミクス手法は腸エコシステムを分子レベルで理解するえに有用と考えられる。

＜参考文献＞

Fukuda, S. et al., Nature 469: 543-547, 2011
Furusawa Y. et al.. Nature 504: 446-450, 2013

興味深い話なので、学部・大学院の学生さんもふるって参加してください。

連絡先:理学部生命理学科　後藤聡　(03-3985-2387, stgoto@rikkyo.ac.jp)

立教大学生命理学研究センター
セミナー

日時　2014年　6月　18日　（水）　17:00～18:30

場所　立教大学（池袋キャンパス）　11号館　A303教室

講演者　**野崎智義**（国立感染症研究所　寄生動物部・部長）

嫌気環境でのオルガネラ進化
－寄生虫のミトコンドリアの驚くべき機能－

オルガネラ進化の多方向性ベクトルは、細胞生物学・進化学の非常に興味深い一つのテーマである。ヒトや動物に病気を起こすことが知られる原生生物のうち、腸管などの低酸素環境ニッチェにおいて進化適応を果たした赤痢アメーバ・ジアルジア・トリコモナス・ミクロスポリジアに代表される俗にいう「嫌気的原虫」は、酸素のない（低い）環境での進化の過程で起こった代謝変化、更にオルガネラの機能転換（進化・縮退）のミステリアスな道筋の「一瞬」を垣間見せる極めて興味深い研究対象であると言える。

我々は主に大腸に寄生し、日本国内での感染症としても制圧の求められる赤痢アメーバ症の原因生物である赤痢アメーバの高度に機能分化したミトコンドリア（マイトソーム）を対象として、その代謝機能、タンパク輸送機構などを中心に解析を進めている。αプロテオバクテリアを祖先とするというパラダイムに疑義が生じるほど赤痢アメーバマイトソームの構成因子と生理機能には謎が多い。

本公演では近年明らかになりつつあるマイトソームの新しいタンパク質・代謝物輸送体や、マイトソームの細胞分化における役割など、寄生体のヒトへの感染や環境適応に不可欠な機能の縮退した「大人のへそ」ではなく、特殊機能を獲得したオルガネラとしてのマイトソームに関しての研究の知見を紹介したい。

興味深い話なので、学部・大学院の学生さんもふるって参加してください。

連絡先：理学部生命理学科　岡　敏彦　(03-3985-2400, toka@rikkyo.ac.jp)

立教大学生命理学研究センター セミナー

日時　2014年　12月　2日　（火）　17:00～18:30

場所　立教大学（池袋キャンパス）　10号館　X105教室

講演者　　出村　拓

（奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科・教授）

植物の陸上繁栄の鍵

～通水細胞と支持細胞の分化～

植物が陸上で繁栄することにつながった重要な進化上のイベントして、水を運ぶための通水細胞（道管など）と体を支えるための支持細胞（繊維細胞など）の発達が挙げられる。この 10 年ほどの間に、主にシロイヌナズナなどのモデル植物を用いた研究から、これら細胞の分化のしくみがかなり良くわかってきた。私たちはとくに、植物特異的な転写因子として知られている NAC 転写因子の一群のファミリー（VNS ファミリー）が道管と繊維細胞の分化の制御を担っていることを明らかにしてきた。さらに近年、コケのモデル植物「ヒメツリガネゴケ」を用いた分子遺伝学的研究から、植物進化の非常に早い段階で「VNS ファミリーを用いた通水細胞と支持細胞の分化」のしくみが成立していたことを明らかにした。本セミナーではこれらの研究成果をお話しするとともに、道管分化のしくみを明らかにするために取り組んでいるいくつかの新しい研究アプローチについても紹介したい。

（参考文献）

Xu et al., Science (2014), Ohtani et al., Plant Journal (2011), Yamaguchi et al., Plant Cell (2011)

Yamaguchi et al., Plant Physiology (2010), Endo et al., Plant Cell (2009),

Kubo et al., Genes & Development (2005)

興味深い話なので、学部・大学院の学生さんもふるって参加してください。

連絡先：理学部生命理学科　堀口吾朗　(03-3985-4146, ghori@rikkyo.ac.jp)

資料4－13

立教大学生命理学研究センター セミナー

日時　2014年　12月　8日　（月）　17:00～18:30

場所　立教大学（池袋キャンパス）　10号館　X107教室

講演者　吉田松生

自然科学研究機構･基礎生物学研究所･生殖細胞研究部門･教授

マウス精子形成を支える幹細胞のダイナミクス

マウスの精巣では、日々多数の精子が作られている。では、どの細胞がどう挙動することで長期間継続する精子形成を支えているのか？

これを先入観なく明らかにするために、生体ライブイメージングやパルス標識によって時間を越えた細胞のふるまいを観測し、数理統計学的に解析した。その結果、定説とは異なる細胞動態が見えて来た。組織を維持する「幹細胞」とは、いったいどういう存在なのだろうか？　本セミナーでは、明らかになりつつある細胞の集団動態に基づいてこの問題を改めて考えたい。

＜参考文献＞

1) Hara, K. et al., Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. Cell Stem Cell *14*, 658-672 (2014).

2) Nakagawa, T. et al., Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. Science 328, 62-67 (2010).

4) Yoshida, S. et al., A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. Science *317*, 1722-1726 (2007).

5) Nakagawa, T. et al., Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. Dev Cell *12*, 195-206 (2007).

興味深い話なので、学部・大学院の学生さんもふるって参加してください。

連絡先：理学部生命理学科　後藤聡　(03-3985-2387, stgoto@rikkyo.ac.jp)

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
「オルガネラが駆動する真核細胞システムの高度化」
2014年度成果報告会

日時　2015 年　3 月 12 日（木）14:00 ～ 17:10
会場　立教大学池袋キャンパス　10 号館　X103 室

プログラム

14:00～14:05　　はじめに　　関根　靖彦

14:05～15:30
A グループ「オルガネラの誕生と維持機構の解明」
関根　靖彦
花井　亮
山田　康之
塩見　大輔
加藤　千明（JAMSTEC）

15:30～15:40　　（休憩）

15:40～17:10
B グループ「多細胞体制を支えるオルガネラの新機能の解明」
岡　敏彦
木下　勉
眞島　恵介
後藤　聡
堀口　吾朗

・教職員・研究員・学生の皆さん、どなたでも聴講を歓迎します。

連絡先：理学部生命理学科・関根靖彦　03-3985-3408

ysekine@rikkyo.ac.jp

資料4－15

立教大学生命理学研究センター セミナー

日時　2015年　6月　25日　（木）　17:00～18:00

場所　立教大学(池袋キャンパス)　10号館　X203教室

講演者　林　茂生

理化学研究所、多細胞システム形成研究センター、チームリーダー

器官形成の発生学と力学

動物の発生は受精卵から細胞シートで覆われた球体(胞胚)が生じることから始まり、細胞シートの伸長、折りたたみ、潜り込みなどの過程を経て様々な形態の臓器からなる個体がつくられます。わたしたちはショウジョウバエ胚の気管系をモデルに上皮器官の形態形成における細胞動態の制御を遺伝学、形態学とバイオイメージングをもちいて解析し、数理／物理学者の協力を得てその背景にある原理を明らかにすることを目指しています。本セミナーでは材料工学の概念である座屈が発生プロセスに現れる例を紹介します。始めに上皮細胞シートが陥入して管となる際に上皮の座屈が利用されていることを示します。次に上皮の管が拡張と伸長を行う過程においては座屈を回避することにより適正な内径と長さが保たれることを示します。さらに管の形成においてみられる周期的な細胞骨格構造の形成の背景にある興味深い物理法則を紹介します。これらのしくみの普遍性についても考察します。

＜参考文献＞

Kondo T. and Hayashi S. Mitotic cell rounding accelerates epithelial invagination. Nature (2013)

興味深い話なので、学部・大学院の学生さんもふるって参加してください。

連絡先:理学部生命理学科　後藤聡　(03-3985-2387, stgoto@rikkyo.ac.jp)

資料4－16

立教大学生命理学研究センター セミナー

日時　2016年　2月　22日　（月）　11:00～12:00

場所　立教大学（池袋キャンパス）　4号館　4405教室

講演者　**吉田　秀郎**

兵庫県立大学大学院生命理学研究科、教授

小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答

真核生物の細胞には小胞体やゴルジ体といった様々な細胞小器官が存在し、細胞の機能を分担している。細胞が分裂するとこれらの細胞小器官の量は半分になるが、細胞の成長に伴ってほぼ 2 倍に増やされるために、各細胞小器官の量は常にほぼ一定に保たれている。細胞がゴルジ体だらけになったり、小胞体がなくなってしまうことはない。細胞に眼がついているわけでもないのに、どうやってこのような調節を行っているのか？　とても不思議である。更に、必要な時には必要な細胞小器官だけが必要な量だけ増強されることが知られている。例えば、抗体産生細胞では膨大な抗体産生を支えるために、細胞質全体が小胞体で埋め尽くされている。このような細胞小器官の量的調節機構の問題は細胞が自律的に機能するために必須な恒常性維持機構であり、細胞生物学の根本的命題であるが、これまでは核の量的調節機構（細胞周期）の研究しか行われてこなかった。本セミナーでは、小胞体とゴルジ体の量的調節機構である小胞体ストレス応答とゴルジ体ストレス応答について詳述する。

興味深い話なので、学部・大学院の学生さんもふるって参加してください。

連絡先：理学部生命理学科　後藤聡　(03-3985-2387, stgoto@rikkyo.ac.jp)

資料４－１７

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
「オルガネラが駆動する真核細胞システムの高度化」
2015年度成果報告会

日時　2016 年　3 月 14 日（月）14:00 ～ 16:45
会場　立教大学池袋キャンパス　4 号館　4408 室

プログラム

14:00～14:05　　はじめに　　関根　靖彦

14:05～15:20
A グループ「オルガネラの誕生と維持機構の解明」
関根　靖彦
山田　康之
加藤　千明（JAMSTEC）
塩見　大輔
末次　正幸

15:20～15:30　　（休憩）

15:30～16:45
B グループ「多細胞体制を支えるオルガネラの新機能の解明」
岡　敏彦
木下　勉
眞島　恵介
後藤　聡
堀口　吾朗

・教職員・研究員・学生の皆さん、どなたでも聴講を歓迎します。

連絡先：理学部生命理学科・関根靖彦　03-3985-3408

資料4－18

立教大学生命理学研究センター セミナー

日時　2016年　11月　29日　（火）　16:00～17:30

場所　立教大学(池袋キャンパス)　5号館　5301教室

講演者　倉石　貴透

金沢大学医薬保健研究域薬学系・准教授

ちょっと遠いけど
来てね！

タイトル

ショウジョウバエモデルを用いた自然免疫シグナルの解析：微生物感染依存的な自然免疫活性化から感染非依存的な活性化メカニズムの解明へ

要旨

微生物感染から身を守るための生体防御機構として、すべての多細胞生物は自然免疫系を有している。ショウジョウバエは自然免疫の分子機構を解析する上で優れたモデル生物であり、種を超えて保存された自然免疫に関わる遺伝子の同定と機能解析に貢献してきた。今回のセミナーでは、Toll 受容体のアダプター分子である MyD88 の局在制御に関与する新規 E3 リガーゼ Sherpa の同定と、微生物感染に依存しない新たな自然免疫誘導実験系について発表して議論を行いたい。

興味深い話なので、学部・大学院の学生さんもふるって参加してください。

連絡先：理学部生命理学科　後藤聡　(03-3985-2387, stgoto@rikkyo.ac.jp)

資料4－19

立教大学生命理学研究センター セミナー

日時　2016年　12月　7日　（水）　17:00～18:00

場所　立教大学（池袋キャンパス）　4号館　4405教室

講演者　**尾崎　省吾**

（スイス連邦バーゼル大学バイオセンター感染生物分野 ポスドク）

バクテリアのサイクリン様低分子：
非対称分裂細菌カウロバクター・クレセンタスの細胞周期を制御する環状ジグアニル酸のメカニズム

バクテリアは環境に応じて自己の増殖やふるまいを適宜調節しながら繁栄してきた。我々の腸内には100兆ものバクテリアがバランスよく生育しており、腸内バクテリアの活動は我々の代謝や免疫系を本質的に支えている。他方、いくつかの病原性バクテリアは宿主内で巧妙にふるまうことで、しばしば免疫応答や抗生物質などのリスクを回避する。抗生物質に依存する今日の医療体制において、出現する抗生物質耐性菌への対応は世界的に喫緊の課題である。このようにバクテリアの増殖やふるまいは正負の両面で人類の健康と密接につながっている。では、バクテリアは自己の増殖やふるまいをどのような分子機構で調節しているのだろうか。

バクテリアの環状ジグアニル酸(cyclic di-GMP)は細胞外の環境と連係して細胞内の遺伝子機能を調節するセカンドメッセンジャーである。cyclic di-GMP は細胞内の複数の受容体と結合し、バイオフィルム形成・鞭毛運動・細胞分化などのプロセスをグローバルに制御する。しかしながら、このセカンドメッセンジャーの細胞増殖における役割はよくわかっていない。ごく最近、我々はαプロテオバクテリアのカウロバクター・クレセンタスをモデルとし、cyclic di-GMP が細胞周期オシレーターとして、真核生物のサイクリンと同様のはたらきを担うことを明らかにした(Nature 2015)。本セミナーでは cyclic di-GMP による細胞増殖の時空間的な制御について発表する。

（文献）

Lori C, Ozaki S, et al., Cyclic di-GMP acts as a cell cycle oscillator to drive chromosome replication. *Nature*. 523, 236-9 (2015)

興味深い話なので、学部・大学院の学生さんもふるって参加してください。

連絡先：理学部生命理学科　末次正幸　(03-3985-2372，suetsugu@rikkyo.ac.jp)

資料４－２０

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

立教大学

「オルガネラが駆動する真核細胞システムの高度化」

～～公開シンポジウム～～

開催日時：２０１６年7月３０日（土）　１３：００−１７：００
会場：立教大学池袋キャンパス１５号館（マキムホール）M201 教室
（東京都豊島区西池袋 3-34-1）

＝特別講演＝
吉田賢右（京都産業大学 シニアリサーチフェロー）
「ATP 合成酵素の仕組み」
米田悦啓（医薬基盤・健康・栄養研究所 理事長）
「核輸送因子の多機能性」

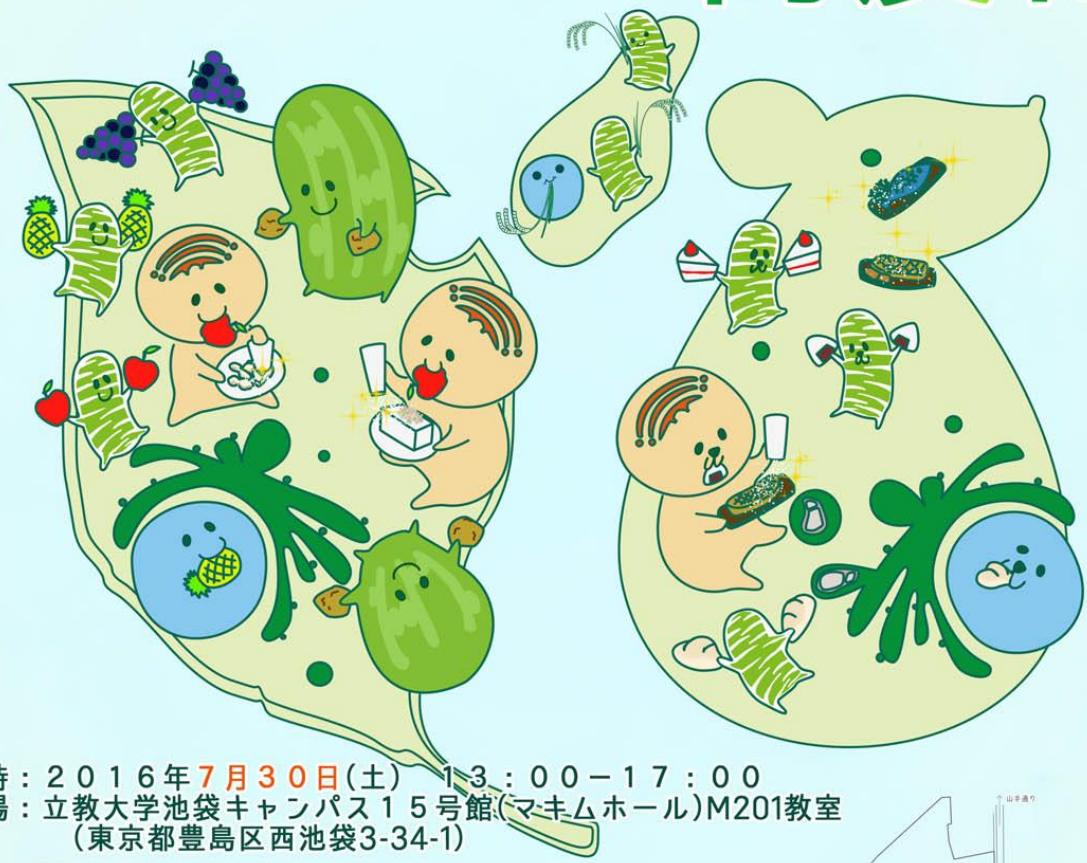
講演者：
関根靖彦（立教大学）
「バクテリア型相同組換え修復因子による植物オルガネラゲノム安定性の維持」
後藤　聡（立教大学）
「糖鎖修飾を司る小胞体・ゴルジ体の構造と生理機能」
岡　敏彦（立教大学）
「PINK1 を介したミトコンドリア品質管理と細胞死」
西村芳樹（京都大学）
「オルガネラ核様体のダイナミクス ～構造・進化・遺伝～」
堀口吾朗（立教大学）
「プラスチドにおける翻訳阻害は側根の幹細胞形成・維持の異常を引き起こす」

懇親会（１７：３０−１９：３０）
セントポールハウス２階　芙蓉

主催：立教大学生命理学研究センター

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業　立教大学　生命理学研究センター　公開シンポジウム

オルガネラが駆動する真核細胞システムの高度化



日時：２０１６年7月３０日(土)　13：００－１７：００
会場：立教大学池袋キャンパス１５号館(マキムホール)M201教室
(東京都豊島区西池袋3-34-1)

＝特別講演＝

・吉田賢右　(京都産業大学　シニアリサーチフェロー)
「ATP合成酵素の仕組み」
・米田悦啓　(医薬基盤・健康・栄養研究所　理事長)
「核輸送因子の多機能性」

講演者：

・関根靖彦(立教大学)
「バクテリア型相同組換え修復因子による植物オルガネラゲノム安定性の維持」
・後藤　聡(立教大学)
「糖鎖修飾を司る小胞体・ゴルジ体の構造と生理機能」
・岡　敏彦(立教大学)
「PINK1を介したミトコンドリア品質管理と細胞死」
・堀口吾朗(立教大学)
「プラスチドにおける翻訳阻害は側根の幹細胞形成・維持の異常を引き起こす」
・西村芳樹(京都大学)
「オルガネラ核様体のダイナミクス　～構造・進化・遺伝～」

主催：立教大学生命理学研究センター
連絡先：関根靖彦(ysekine@rikkyo.ac.jp)