

2019年度 ExCELLSレポート

Exploratory Research Center on Life and Living Systems
National Institutes of Natural Sciences



2019 年度 ExCELLS リポート

自然科学研究機構
生命創成探究センター

2019年度 ExCELLS リポートの刊行にあたって

生命創成探究センター (Exploratory Research Center on Life and Living Systems = ExCELLS) は、自然科学研究機構の更なる機能強化を目指すために、岡崎統合バイオサイエンスセンターを中核とし、新分野創成センターのブレインサイエンス研究分野とイメージングサイエンス研究分野を統合して 2018 年 4 月に設置された機構直轄の組織です。

本センターでは、「生きているとは何か?」という人類の根源的な問いの解明に向けて、生命の仕組みを観察する新たな技術を開発するとともに、蓄積されていく多様な情報の中に隠されている意味を読み解き、さらに合成・構成的アプローチを通じて生命の基本情報の重要性を検証する活動を行っています。こうした「みる・よむ・つくる」のアプローチを基軸に、極限環境生命の研究者とも協力しながら異分野融合型の研究を進め、生命の設計原理を探究しています。この目的のもとに、国内外の大学・研究機関の連携によりコミュニティ横断型の共同利用・共同研究を推進しています。

生命創成探究センターは創成研究領域と極限環境生命探査室から構成されています。創成研究領域は「みる・よむ・つくる」の3つのアプローチ法を開拓するとともに、それらを1つの流れとして捉え、生命のダイナミズムの本質に迫る研究を展開しています。

「みる」アプローチでは、革新的な計測手法を開発し、複雑な生命システム全体の中における各構成要素のダイナミックな振る舞いをありのままに観測します。さらに、その背景にある物理化学的諸量の変化の可視化を行います。

「よむ」アプローチでは、計測・観測を通じて蓄積されていく多様な生命情報の中に隠されている意味を解読し、理論体系化し、予測します。そのための情報科学・理論科学・計算科学的アプローチを発展させます。

「つくる」アプローチでは、生命システムを実験的に構成すること、あるいは計算機上で構築することを通じて、外部環境の変動の中で秩序創発していくロバストな生命の本質を統合的に理解することを目指します。

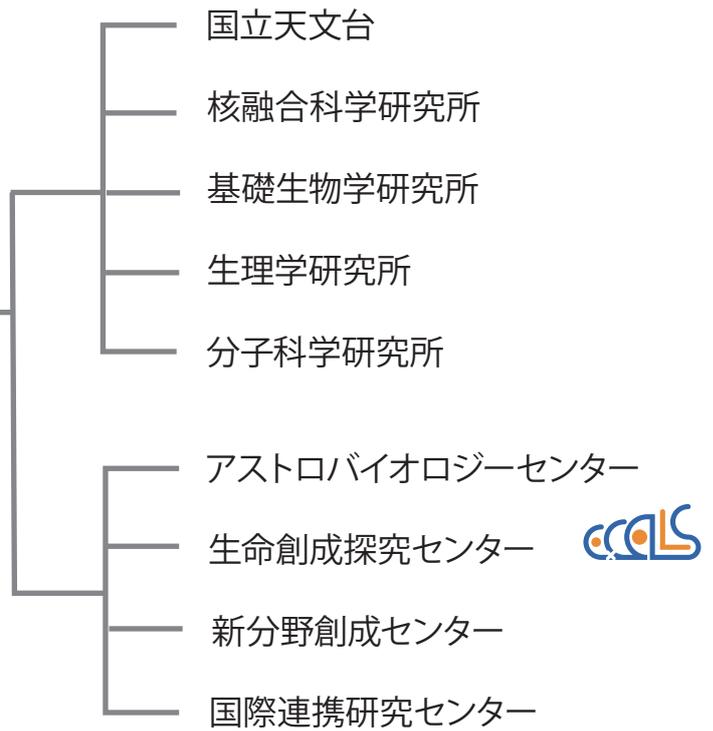
すなわち、「みる」ことで学ぶ生物研究から「よむ」さらには「つくる」ことで学ぶ生命科学への流れを実現し、上記の3つのアプローチを一体として研究を進めていくことで、ダイナミックな生命の設計原理の解明を目指しています。こうした研究の発展に資するため、多様な共同利用・共同研究が進んでいます。

2019年度は、創成研究領域に新たに根本知己教授、榎木亮介准教授を迎えてバイオフィトニクス研究グループを立ち上げるとともに、本田直樹客員准教授らによるプロジェクトを実施する理論生物学研究グループが ExCELLS 連携研究グループとして活動を開始しました。さらに、機構外の研究者がセンター内の複数のグループとともに分野融合的なアプローチを通じて取り組む ExCELLS 課題研究も着実に進展しています。ExCELLS 計画研究や ExCELLS 特別共同研究といった新たな研究プロジェクトも発動しています。

一方、極限環境生命探査室では、深海、地下などにおける生命体の活動を探査・解析することを目指して生命の始原形態と環境適応戦略を理解する研究を実施しています。2019年度は極限環境耐性研究グループを立ち上げ、荒川和晴客員准教授を中心としたプロジェクトが始動しています。

こうした異分野融合研究を推進するために、2019年度は台湾のアカデミアシニカ生物化学研究所と慶應義塾大学先端生命科学研究所と学術交流のための協定を締結するとともに、ExCELLS シンポジウムや Frontier Bioorganization Forum をはじめとするセミナーや研究会も活発に行っています。また、次代を担う若手が主体的に企画・運営した研究集會も盛況でした。

ExCELLS が設立されて2年が経過したところですが、共同利用研究を基軸とした優れた研究成果が次々と生み出されており、各種メディアを通じた成果発信も順調です。本リポートを通じて ExCELLS の活動をご高覧いただければ幸いです。



大学共同利用機関法人 自然科学研究機構

生命創成探究センター

Exploratory Research Center on Life and Living Systems

センター長

研究連携推進室

創成研究領域

- 温度生物学研究グループ
- 金属生命科学研究所グループ
- 神経ネットワーク創発研究グループ
- 神経分子動態生物学研究グループ
- 心循環ダイナミズム創発研究グループ
- 生物画像情報解析グループ
- 生命時空間制御研究グループ
- 生命分子創成研究グループ
- 生命分子動態シミュレーション研究グループ
- 生命分子動秩序創発研究グループ
- 定量生物学研究グループ
- 認知ゲノム研究グループ
- バイオフォトニクス研究グループ
- 発生シグナル創発研究グループ
- 植物発生生理研究グループ
- 生体分子相互作用計測グループ
- 核内ゲノム動態研究グループ
- 構成生物学研究グループ
- 生命システム構築研究グループ

連携研究グループ

- 生命分子動態計測グループ
- 理論生物学研究グループ

極限環境生命探査室

- 深海・地下生命研究グループ
- 極限環境生命分子研究グループ
- 極限環境耐性研究グループ

目 次

序 言

組織図

| | | |
|------|----------------------|----|
| 1 | 2019年度 構成員一覧 | 7 |
| 2 | 研究領域の現状 | |
| 1. | 創成研究領域 | |
| 1-1 | 温度生物学研究グループ | 11 |
| 1-2 | 金属生命科学研究グループ | 16 |
| 1-3 | 神経ネットワーク創発研究グループ | 19 |
| 1-4 | 神経分子動態生物学研究グループ | 21 |
| 1-5 | 心循環ダイナミズム創発研究グループ | 24 |
| 1-6 | 生物画像情報解析グループ | 29 |
| 1-7 | 生命時空間制御研究グループ | 31 |
| 1-8 | 生命分子創成研究グループ | 33 |
| 1-9 | 生命分子動態シミュレーション研究グループ | 37 |
| 1-10 | 生命分子動秩序創発研究グループ | 40 |
| 1-11 | 定量生物学研究グループ | 47 |
| 1-12 | 認知ゲノム研究グループ | 50 |
| 1-13 | バイオフィotonics研究グループ | 53 |
| 1-14 | 発生シグナル創発研究グループ | 58 |
| 1-15 | 植物発生生理研究グループ | 60 |
| 1-16 | 生体分子相互作用計測グループ | 62 |
| 1-17 | 核内ゲノム動態研究グループ | 64 |
| 1-18 | 構成生物学研究グループ | 65 |
| 1-19 | 生命システム構築研究グループ | 66 |
| | 連携研究グループ | |
| 1-20 | 生命分子動態計測グループ | 68 |
| 1-21 | 理論生物学研究グループ | 73 |
| 2. | 極限環境生命探査室 | |
| 2-1 | 深海・地下生命研究グループ | 75 |
| 2-2 | 極限環境生命分子研究グループ | 76 |
| 2-3 | 極限環境耐性研究グループ | 77 |
| 3 | ExCELLSイベント | 80 |
| 4 | 共同利用研究 | 83 |

1 2019 年度 構成員一覽

2019年度 構成員一覧

加藤晃一（生命創成探究センター センター長）
高田慎治（生命創成探究センター 副センター長）
富永真琴（生命創成探究センター 副センター長）

創成研究領域

温度生物学研究グループ

富永 真琴（教授）
曾我部隆彰（准教授）
齋藤 茂（助教）
Derouiche Sandra（特任助教）
福田 直美（技術職員）
宇治澤知代（日本学術振興会特別研究員）
Li Tianbang（博士研究員）
水藤 拓人（博士研究員）
齋藤くれあ（研究員）
Feng Xiaona（総研大生→博士研究員）
Nguyen Thi Hong Dung（総研大生）
Deng Xiangmei（総研大生）
Deveci Aykut（総研大生）
Lei Jing（総研大生）

Dong Mingyi（研究生）
福岡 慶子（技術支援員）
橋本 照美（技術支援員）
伊藤 嘉美（事務支援員）

金属生命科学グループ

青野 重利（教授）
村木 則文（助教）
村木めぐみ（技術支援員）
中根 香織（事務支援員）

神経ネットワーク創成研究グループ

東島 眞一（教授）
木村有希子（助教）
谷本 昌志（助教）
竹内 靖（技術職員）
島崎 宇史（研究員）
植村 悠人（大学院生(特別共同利用研究員)）

梶岡 拓己（総研大生）
川野 幸平（総研大生）
伊藤 浩子（技術補佐員）
寺澤 洋子（技術補佐員）
渡我部育子（技術補佐員）
竹内 芳子（技術補佐員）

神経分子動態生物学研究グループ

椎名 伸之（准教授）
中山 啓（助教）
中沢(片山)香織（総研大生）
山下 映（総研大生）
堀尾 朋世（総研大生）
芝 亜紀穂（技術補佐員）

心循環ダイナミズム創成研究グループ

西田 基宏（教授）
田中 智弘（新分野創成センター、特任助教）
小田紗矢香（総研大生）
下田 翔（総研大生）
石原 博美（技術職員）
藤森 仁美（技術支援員）
中西 綾乃（事務支援員）

生物画像情報解析グループ

高田 慎治（教授）[併任]
加藤 輝（特任助教）
太田 裕作（特任助教）
兵藤 美和（技術補佐員）

生命時空間制御研究グループ

野中 茂紀（准教授）
谷口 篤史（博士研究員）

石橋 知子 (技術補佐員)
近藤 晶子 (特別訪問研究員)

福富 幸代 (事務支援員)

生命分子創成研究グループ

古賀 信康 (准教授)
小杉 貴洋 (助教)
古賀 理恵 (特任研究員)
近藤未菜子 (特別協力研究員)
南 慎太郎 (博士研究員)
小林 直也 (特任研究員)
佐久間航也 (総研大生)
三本 齊也 (総研大生)
山田 寛子 (総研大生)
鈴木 博子 (事務補佐員)

定量生物学研究グループ

青木 一洋 (教授)
近藤 洋平 (助教)
後藤 祐平 (助教)
四宮 愛 (特任助教)
青木 玲奈 (博士研究員)
中村 彰伸 (博士研究員)
谷猪 遼介 (総研大生)
向井 正哉 (総研大生)
山本 啓 (総研大生)
海老根映美 (技術支援員)
後藤 瑤子 (技術支援員)
小野田香織 (技術支援員)

生命分子動態シミュレーション研究グループ

奥村 久士 (准教授)
伊藤 暁 (助教)
山内 仁喬 (総研大生)
宮澤 和久 (総研大生)
川口 律子 (事務補佐員)

認知ゲノム研究グループ

郷 康広 (特任准教授)
辰本 将司 (特任研究員)
臼井 千夏 (技術補佐員)
石川 裕恵 (技術補佐員)
木原まどか (事務補佐員)

生命分子動秩序創発研究グループ

加藤 晃一 (教授)
矢木 真穂 (助教)
谷中 冴子 (助教)
鈴木 達哉 (博士研究員)
Methanee Hiranyakorn (総研大生)
関口太一郎 (総研大生)
與語 理那 (大学院生(特別共同利用研究員))
柚木 康弘 (大学院生(特別共同利用研究員))
小藤 加奈 (大学院生(特別共同利用研究員))
齋藤 泰輝 (大学院生(特別共同利用研究員))
梅澤芙美子 (大学院生(特別共同利用研究員))
Vincent Schnapka (インターンシップ生
(IMS-ENSCPインターンシッププログラム))
Thunchanok Wilasri
(インターンシップ生(IMS-IIPAプログラム))
Ean Wai Goh
(インターンシップ生(IMS-IIPAプログラム))
磯野裕貴子 (技術支援員)
田中 景 (事務支援員)

バイオフィotonics研究グループ

根本 知己 (教授)
榎木 亮介 (准教授)
大友 康平 (助教)
堤 元佐 (特任助教)
石井 宏和 (特任助教)
山口 和志 (大学院生)
安宅 光倫 (大学院生)
高橋 泰伽 (大学院生)
鎌田 恭史 (大学院生)
中田 開人 (大学院生)
廣 蒼太 (大学院生)
土屋 加奈 (技術補佐員)

発生シグナル創発研究グループ

高田 慎治 (教授)
矢部泰二郎 (助教)
三井 優輔 (助教)
内海 秀子 (技術職員)

高田 律子 (博士研究員)
篠塚 琢磨 (NIBBリサーチフェロー)
島山 宙大 (総研大生)
Tran,Hong Nguyen (総研大生)
鈴木美奈子 (総研大生)
高代加代子 (技術支援員)
伊藤由紀子 (技術支援員)
野畑 竜子 (事務支援員)

植物発生生理研究グループ

川出 健介 (特任准教授)
友井 拓実 (大学院生(特別共同利用研究員))

生体分子相互作用計測グループ

内山 進 (客員教授)
兒玉 篤治 (博士研究員)

核内ゲノム動態研究グループ

宮成 悠介 (特任准教授)
栗原美寿々 (博士研究員)
田川 綾子 (専門員)
三宝 千秋 (技術補佐員)

構成生物学研究グループ

栗原 顕輔 (特任准教授)
松尾 宗征 (特任研究員)
夏目ゆうの (訪問研究員)

生命システム構築研究グループ

佐藤 幸治 (特任准教授)

生命分子動態計測グループ

内橋 貴之 (客員教授)
渡辺 大輝 (特任助教)
GANSER, Christian (特任助教)
西口 茂孝 (特任研究員)

理論生物学研究グループ

本田 直樹 (客員准教授)

その他

岡田 知 (事務支援員)

極限環境生命探査室

深海・地下生命研究グループ
高井 研 (客員教授)

極限環境生命分子研究グループ

加藤 晃一 (教授) [併任]
矢木 真穂 (助教) [併任]

他の構成員は創成研究領域 生命分子動秩序創発
研究グループを参照のこと。

極限環境耐性研究グループ

荒川 和晴 (客員准教授)
田中 冴 (特任助教)

研究連携推進室

佐藤 匡史
(特任准教授(研究連携コーディネータ))
白瀧千夏子
(特任助教(研究連携コーディネータ))
磯貝 知世 (特任専門員)
蜂須賀みどり (事務支援員)

2 研究領域の現状

1. 創成研究領域

1-1 温度生物学研究グループ

富永 真琴 (教授)

曾我部隆彰 (准教授)

齋藤 茂 (助教)

Sandra Derouiche (特任助教)

1) 専門領域：分子細胞生理学、神経科学

2) 研究課題：

- a) 温度感受性TRPチャンネルに関する研究
- b) 昆虫の感覚受容に関する研究
- c) 昆虫の忌避・殺虫剤に関する研究

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 温度感受性TRPチャンネルに関する研究

アフリカツメガエルとネッタイツメガエルだけでなく、涼しい環境に適応したキタアフリカツメガエルと暖かい環境に適応したミューラーツメガエルを新たに解析に加え4種の間でTRPV1を比較した。その結果、涼しい環境に適応したキタアフリカツメガエルだけでなく、暖かい環境に適応したミューラーツメガエルも、涼しい環境に適応したアフリカツメガエルと同じ応答を示したことから、TRPV1の繰り返しの高温刺激に対する温度応答特性の変化は生息地の温度環境とは必ずしも連動しないことが分かった。一方で、TRPA1の高温に対する反応を調べたところ、涼しい環境に生息する2種では高温の刺激に対する反応が大きく、暖かい環境に生息する2種のツメガエルの間では高温の刺激に対する反応が小さいことが明らかになった。この結果から、TRPA1の反応特性の変化は、ツメガエルの生息地の温度環境への適応と関係していると考えられた。涼しい環境に生息する種は、高温に鋭敏に応答するために、高温センサーであるTRPA1の反応性が高くなるように進化の過程で特性が変化すると推測される。(Molec. Eco., 2019)。

熱帯域を中心に生息する3種の蚊(ガンビエハマダラカ・ステフェンシハマダラカ・ネッタイシマカ)と温帯域に生息する1種の蚊(アカイエカ)のTRPA1の遺伝子クローニングを行い、機能解析を行った。いずれの蚊のTRPA1も温度刺激に感受性を示したが、熱帯域に生息する蚊(ガンビエハマダラカ・ステフェンシハマダラカ・ネッタイシマカ)のTRPA1が高温で活性化する温度は28度から32度で、温帯域に生息するアカイエカのTRPA1の約22度と10度近い差があった。蚊に22度と3度の2つの温度の場所を選ばせる行動実験を行ったところ、アカイエカは30度を避けたが、ネッタイシマカは2つの温度を区別しなかった。蚊は進化の過程で温度センサーTRPA1の機能を変化させて生息域の温度環境に適応してきたと考えられる。TRPA1は多くの動物種で侵害刺激(痛み感覚を引き起こす刺激)のセンサーとして機能しており、熱帯域の蚊はTRPA1の活性化温度閾値を高くして、暑い環境を不快と感じなくしてきたと想像できる。また、防虫剤として使われるシトロネラ油に対する感受性を4種の蚊のTRPA1で比較したところ、ガンビエハマダラカとステフェンシハマダラカに比べて、ネッタイシマカとアカイエカは感受性が高いことが分かった。

さらに、多くの化学物質をTRPA1に作用させたところ、TRPA1の活性化させる化学物質を新たに4つ発見した。忌避剤開発につながるものと期待される(Sci. Rep., 2019)。

b) 昆虫の感覚受容に関する研究

ショウジョウバエの温度受容に関わる脂質代謝遺伝子：大きく2つのアプローチで取り組んでいる。一つにはこれまでの研究結果から、ハエの温度受容には脂質代謝とその産物が関係していることから、既知のヒト遺伝子などから機能推測した複数の脂質代謝酵素遺伝子について、その変異体の温度走性を評価した。その結果、いくつかの遺伝子変異がハエ幼虫の温度嗜好性に変化をもたらすことを見出した。ある遺伝子変異体は野生型が好む涼しい温度(18°C)とそれより高い温度の区別がつかなくなっており、別の遺伝子の変異体は逆により涼しい温度を好むようになった。これらの行動をより定量的に解析する手法を確立し、現在はさらに行動中の幼虫の動きから複数のパラメータを自動取得するトラッキングシステムの構築を進めている。そしてもう一つのアプローチとして、特定の感覚神経に発現する脂質関連遺伝子のプロファイルを獲得し、温度受容に関わる候補をフォワードジェネティクス的に検索する手法を確立している。特定の感覚神経を神経特異的なプロモーターで標識し、磁気ビーズを用いた細胞単離方法を評価しており、これまでのところいくつかの課題が見つまっている。例えば、物理的な破碎による単離で目的の神経細胞もダメージを受けてしまうことや、酵素処理して単離した細胞が単離の過程で凝集して懸濁液への回収率が低くなるなどである。これらについては一つずつ改善が進んでおり、近いうちに単離細胞から抽出したRNAを元に、RNAseqによる遺伝子発現解析を実施する予定としている。これは認知ゲノム研究グループの郷康弘先生との共同研究として実施する。

ショウジョウバエの光受容に関わる脂質の機能解析：ハエの視細胞では光受容体ロドプシンの下流で脂質代謝とそれにともなうTRPチャンネルの活性化が起きるが、そのメカニズムはまだ不明な点が多い。そこで、光刺激によって生じる視細胞内での脂質代謝産物についてリポミクス解析を実施し、いくつかの新規代謝物の増加を認めた。これらの代謝産物は光応答に必須であるホスホリパーゼC(PLC)の変異体では増加しなかったことから、全てPLCの下流で産生されることが示唆された。各脂質成分は培養細胞においてTRPLチャンネルを濃度依存的に活性化することが明らかになった。さらに、単離した視細胞を活性化することも分かった。現在、これらのデータをまとめて、論文投稿する準備を進めている。

c) 昆虫の忌避・殺虫剤に関する研究

感染症害虫TRPチャンネルに作用する新規化合物：デング熱などを媒介するネッタイシマカから侵害刺激受容に関わるTRPチャンネルPainlessをクローニングし、新規の活性化薬剤を検索するために5万種におよぶ化合物ライブラリーを用いて機能的スクリーニングを実施した。その結果、チャンネル活性化を引き起こす複数の化合物を同定することができた。そこでネッタイシマカPainlessを異所性に発現するトランスジェニックショウジョウバエを作製し、これらの化合物が実際に個体レベルで忌避作用をもたらすかについて検討した。味覚神経にPainlessを発現したハエは、いくつかの化合物に対して有意に摂取量が低下する結果が得られた。同様の実験を、実際のネッタイシマカにおいて確認するため、UCSBのCraig Montell博士と連携し、Painlessを欠損したネッタイシマカの変異体を作製した。この変異体と野生型の化合物応答を比較したところ、野生型が化合物の摂取をより避ける傾向が得られた。現在、データ取得のための行動実験の最適化を進めており、結果が得られたら論文投稿の準備を進める予定である。ピメトロジンやピリフルキナゾンといった農薬は農業害虫の姿勢制御に関わるTRPVチャンネルに作用し、正常な運動や摂食行動を阻害して死に至らしめる。Zhejiang大学のJia Huang博士と連携し、稲作物に被害をもたらすいくつかの害虫のTRPVチャンネルに対するこれらの薬剤の作用をカルシウムイメージングにて評価したところ、トビイロウンカ(*Nilaparvata lugens*)のTRPVチャンネルを活性化することを明らかにした。さらに詳し

い解析を電気生理学的な手法で進めるために、パッチクランプに利用できる昆虫の培養細胞で発現系を確立しようとしている。これが立ち上がれば、共同研究先から学生を派遣してもらい、生理研のパッチクランプ装置を用いてデータを取得する予定である。

4) 学術論文

T. Shimada, K. Takahashi, M. Tominaga, T. Ohta, “Identification of molecular targets for toxic action by persulfate, an industrial sulfur compound.”, *Neurotoxicology* **72**: 29-37 (2019).

Y. Hirata, Y. Suzuki, M. Tominaga, Y. Oku, “TRPM8 channel is involved in the ventilatory response to CO₂ mediating hypercapnic Ca²⁺ responses.”, *Respir. Physiol. Neurobiol.* **263**: 20-25 (2019).

W. Ota, Y. Nakane, M. Kashio, Y. Suzuki, K. Nakamura, Y. Mori, M. Tominaga, T. Yoshimura, “Involvement of TRPM2 and TRPM8 in temperature-dependent temporal niche switching.”, *Sci. Rep.* **9 (1)**: 3706 (2019).

K. Uchida, N. Fukuta, J. Yamazaki, M. Tominaga, “Identification and classification of a new TRPM3 variant (g subtype).”, *J. Physiol. Sci.* **69 (4)**: 623-635 (2019).

K. Matsumoto, A. Ohishi, K. Iwatsuki, K. Yamazaki, S. Takayanagi, M. Tsuji, E. Aihara, D. Utsumi, T. Tsukahara, M. Tominaga, K. Nagasawa, S. Kato, “Transient receptor potential vanilloid 4 mediates sour taste sensing via type III taste cell differentiation.”, *Sci. Rep.* **9 (1)**: 6686 (2019).

S. Saito, TC. Saito, M. Nozawa, M. Tominaga, “Elucidating the functional evolution of heat sensors among *Xenopus* species adapted to different thermal niches by ancestral sequence reconstruction.”, *Molec. Eco.* **28**: 3561-3571 (2019).

K. Araki, A. Araki, D. Honda, T. Izumoto, A. Hashizume, Y. Hijikata, S. Yamada, Y. Iguchi, A. Hara, K. Ikumi, K. Kawai, S. Ishigaki, Y. Nakamichi, S. Tsunekawa, Y. Seino, A. Yamamoto, Y. Takayama, S. Hidaka, M. Tominaga, M. Ohara-Imaizumi, A. Suzuki, H. Ishiguro, A. Enomoto, M. Yoshida, H. Arima, S. Muramatsu, G. Sobue, M. Katsuno, “TDP-43 1 regulates early-phase insulin secretion via Cav1.2-mediated exocytosis in islets.”, *J. Clin. Invest.* **130**: 3578-3593 (2019).

TC. Fricke, F. Echtermeyer, J. Zielke, J. de la Roche, MR. Filipovic, S. Claverol, C. Herzog, M. Tominaga, RA. Pumroy, VY. Moiseenkova-Bell, PM, Zygmunt, A. Leffler, MJ. Eberhardt, “Oxidation of methionine residues activates the high-threshold heat-sensitive ion channel TRPV2.”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116** (48) (2019).

T. Li, CT. Saito, T. Hikitsuchi, Y. Inoguchi, H. Mitsuishi, S. Saito, M. Tominaga, “Diverse sensitivities of TRPA1 from different mosquito species to thermal and chemical stimuli.”, *Sci. Rep.* **9(1)**:20200 (2019).

K. Matsumoto, A. Deguchi, A. Motoyoshi, A. Morita, U. Maebashi, T. Nakamoto, S. Kawanishi, M. Sueyoshi, K. Nishimura, K. Takata, M. Tominaga, T. Nakahara, S. Kato, “Role of transient receptor potential vanilloid 4 in the regulation of azoymethane/dextran sulphate sodium-induced colitis-associated cancer in mice.”, *Eur. J. Pharmacol.* **867**:172853 (2020).

K. Shibasaki, K. Yamada, H. Miwa, Y. Yanagawa, M. Suzuki, M. Tominaga, Y. Ishizaki, “Temperature elevation in epileptogenic foci exacerbates epileptic discharge through TRPV4 activation.”, *Laboratory Investigation* **100**:274–284 (2020).

5) 著書、総説

H. Mihara, A. Boudaka, M. Tominaga, T. Sugiyama, “Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Regulation of Adenosine Triphosphate Release by the Adenosine Triphosphate Transporter Vesicular Nucleotide Transporter, a Novel Therapeutic Target for Gastrointestinal Baroreception and Chronic Inflammation.”, *Digestion*, **101 (1)**: 1-6 (2019).

Y. Takayama, S. Derouiche, K. Maruyama, M. Tominaga, “Emerging Perspectives on Pain Management by Modulation of TRP Channels and ANO1.”, *Int J Mol Sci.*, **20(14)** (2019).

富永真琴, “痛みと侵害受容器”, *ペインクリニック*, **401(1)**: 9-16 (2019).

齋藤 茂, 富永真琴, “温度センサーTRPチャンネルの生息環境に応じた機能変化とその構造基盤”, *生物物理*, **59(1)**: 5-8 (2019).

富永真琴, “温度を感じるメカニズム—TRPチャンネルの関与”, *脳神経外科*, **90(6)**: 603-608 (2019).

富永真琴, 曾我部隆彰, “TRPチャンネルによる昆虫の温度センシング”, *昆虫と自然*, **54(11)**: 30-33 (2019).

富永真琴, “TRPチャンネルと温度受容”, *Clinical Neuroscience*, **37(12)**: 1521-1523 (2019).

6) 国際会議発表リスト

M. Tominaga, “Physiological Function of Thermosensitive TRP Channel”, The 7th International Ion Channel Conference, Hangzhou (China), June 2019.

S. Derouiche, “Functional interaction between thermosensitive TRPV4 and Anoctamin 1 contributes to physiological fluid secretions”, Korea Univ., Yonsei Univ., NIPS International Joint Symposium, Seoul (Korea), July 2019.

X. Feng, “Physiological significance of TRPV4 channels in mouse Schwann cells”, Korea Univ., Yonsei Univ., NIPS International Joint Symposium, Seoul (Korea), July 2019.

T. H. D. Nguyen, “Identification of amino acid involved in the agonistic effect of menthol on TRP channel”, Korea Univ., Yonsei Univ., NIPS International Joint Symposium, Seoul (Korea), July 2019.

M. Tominaga, “Physiological Function of Thermosensitive TRP Channel”, Frontier Bioorganization Forum2019, Seoul (Korea), July 2019.

M. Tominaga, “Chemical Senses through TRP Channels”, 2019 Monell Annual Meeting, Philadelphia (USA), October 2019.

M. Tominaga, “Functional interaction between TRPV3 and anoctamin 1 in keratinocytes”, The 18th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, Fukuoka (Japan), November 2019.

M. Tominaga, “Mosquitoes and TRP channels”, 2019 8th Asian Pain Symposium, Incheon (Korea), December 2019.

M. Tominaga, “Functional interaction between Thermosensitive TRP Channel and Anoctamin 1”, International Symposium on TRP Ion Channel at Wakayama, Wakayama (Japan), January 2020.

7) 招待講演

富永真琴, “運動器疼痛メカニズム最前線：イオンチャンネル TRPを中心として”, 第92回日本整形外科学会学術大会, 横浜, 2019年5月.

富永真琴, “温度感受性TRPチャンネルの構造と機能”, 第84回日本温泉気候物理医学会総会・学術集会, 岡山, 2019年5月.

富永真琴, “細胞の感覚センサーTRPチャンネルについて”, マンダム研究技術発表会, 東京, 2019年5月.

M. Tominaga, “Physiological Function of Thermosensitive TRP Channel”, The 7th International Ion Channel Conference, Hangzhou (China), June 2019.

富永真琴, “Thermosensitive TRP channels and bone diseases”, 第16回Bone Biology Forum, 千葉, 2019年8月.

富永真琴, “温度感受性TRPチャンネルと脂肪細胞機能”, 第24回アディポサイエンス, 吹田, 2019年8月.

富永真琴, “温度感受性TRPチャンネルの生理機能-灸の効果メカニズムの可能性”, 予防医療臨床研究会, 東京, 2019年8月.

M. Tominaga, “Chemical Senses through TRP Channels”, 2019 Monell Annual Meeting, Philadelphia (USA), October 2019.

富永真琴, “温度感受性TRPチャネル”, 第149回温度計測部会講演会, 東京, 2019年11月.

富永真琴, “温度生物学とTRPチャネル”, 第14回中部大学ライフサイエンスフォーラム, 春日井, 2019年12月.

M. Tominaga, “Mosquitoes and TRP channels”, 2019 8th Asian Pain Symposium, Incheon (Korea), December 2019.

M. Tominaga, “Functional interaction between Thermosensitive TRP Channel and Anoctamin 1”, International Symposium on TRP Ion Channel at Wakayama, Wakayama (Japan), January 2020.

8) 学会および社会的活動

日本生理学会理事 (富永真琴)

日本生理学会FAOPS組織委員会委員 (富永真琴)

日本生理学会JPS編集委員会委員 (富永真琴)

日本疼痛学会理事 (富永真琴)

日本生理学会評議員 (曾我部隆彰)

日本生理学会教育委員会委員 (曾我部隆彰)

The Journal of Physiological Sciences, Deputy editor (M. Tominaga)

Journal of Neurochemistry, Editorial board member (handling editor) (M. Tominaga)

Pflüger Archiv European Journal of Physiology, Editorial board member (M. Tominaga)

Molecular Pain, Editorial board member (M. Tominaga)

Chemical Senses, Editorial board member (M. Tominaga)

9) 他大学での非常勤講師、客員教授

三重大学大学院医学研究科 非常勤講師 (富永真琴)

金沢大学医薬保健学域 非常勤講師 (富永真琴)

名古屋市立大学医学部 非常勤講師 (富永真琴)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 非常勤講師 (富永真琴)

順天堂大学環境医学研究所 客員教授 (富永真琴)

名古屋大学大学院理学研究科 非常勤講師 (曾我部隆彰)

芝浦工業大学システム理工学部生命科学科 非常勤講師 (曾我部隆彰)

10) 受賞、表彰

M. Tominaga, 2019 Monell Annual Meeting The 3rd Kunio Yamazaki Distinguished Lectureship Awards (2019年10月).

1-2 金属生命科学研究グループ

青野 重利 (教授)

村木 則文 (助教)

1) 専門領域： 生物無機化学

2) 研究課題：

- a) コリネバクテリアのヘム取込みに関与するヘム結合・輸送タンパク質の構造機能相関解明
- b) ヒドロゲナーゼ生合成に関与するタンパク質の構造機能相関解明

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) コリネバクテリア属細菌 *Corynebacterium glutamicum* のヘム取り込み系は、宿主からのヘム獲得、およびヘムトランスポーターへのヘム輸送に関与するタンパク質 HtaA、HtaB と細胞内にヘムを取り込むトランスポーターシステムである HmuT-HmuUV から構成されている。本研究では、本システムによるヘム取込み反応の詳細な分子機構を明らかにするため、HtaA、HtaB の結晶構造解析を行った。HtaA はリンカーでつながれた N 末端ドメイン (HtaA-N) と C 末端ドメイン (HtaA-C) から、HtaB は 1 つのドメインから構成されている。HtaA-N、HtaA-C、HtaB は、いずれもホロ型 (ヘム結合型) として単離精製された。本研究で決定した HtaA-C および HtaB の全体構造は、以前に構造決定した HtaA-N と高い相同性を示した。いずれの構造においても、Tyr が第 5 配位子としてヘム鉄に配位しており、Tyr は近傍の His と水素結合を形成していた。また、HtaA-N で観測されていた、ヘムプロピオン酸と Ser 間での水素結合、Phe とヘムピロール環の間の π - π スタッキングも、HtaA-N、HtaA-C、HtaB すべてで保存されており、これらの相互作用が、ヘム認識に重要な役割を果たしていることを示唆している。全体構造が高い相同性を示す一方、結合するヘムの配向やヘム結合部位周辺のループの長さには、違いが見られた。ヘム獲得・輸送反応において、ヘム軸配位子である Tyr と近傍の His 間での水素結合が果たす役割を明らかにするため、His を Ala に置換した HtaA-N、HtaA-C、HtaB の変異型タンパク質を調製した。いずれの変異体も、アポ型として単離精製されたことから、これら変異体ではヘムへの結合親和性が低下していることが分かった。これら変異体の結晶化条件のスクリーニングを行った結果、HtaA-C の H434A 変異体の結晶が得られ、その結晶構造を決定した。HtaA-C の H434A 変異体の結晶構造では、非対称単位中の 2 分子が N 末端の β -strand のドメインスワップによって二量体を形成していた。この二量体構造では、ヘムの軸配位子となる Tyr が隣り合う分子のヘム結合領域に入り込んでいることが分かった。これらの結果を基に、HtaA/HtaB 間でのヘム輸送反応において、タンパク質がダイナミックに構造変化 (ドメインスワッピングが起こる) することにより、ホロ型 HtaA とアポ型 HtaB 間で同様な二量体構造を過渡的に形成し、ヘム輸送反応が進行するという反応モデルを提唱した。

b) 水素ガスの酸化反応・プロトンの還元反応を触媒する酵素であるヒドロゲナーゼは、バクテリアなどによる水素代謝において中心的な役割を果たしている他、最近では燃料電池用触媒としての利用も期待されている金属酵素である。活性中心の構造の違いにより、[NiFe]型、[FeFe]型、[Fe]型の 3 種のヒドロゲナーゼが存在するが、いずれの場合も活性中心の Fe には、CO が配位している。この CO は、酵素反応により生合成されることが分かっているが、CO 生成反応の分子機構は不明な状況であった。本研究では、

[NiFe]型ヒドロゲナーゼが利用しているCOの生合成に関わる酵素(HypX)の結晶構造を決定し、HypXがこれまでに全く例の無い反応によりCOを合成していることを明らかにした。HypXは二つのドメイン(N末ドメインとC末ドメイン)から構成されており、分子内部にはこれら二つのドメインにまたがる形でキャビティーが存在している。また、C末ドメイン側のキャビティーには、補酵素A(coenzyme A: CoA)が結合していることが分かった。得られた結晶構造を基に、下記のようなCO生合成反応機構を提唱した。HypXのN末ドメインとC末ドメインでは、それぞれ異なる二つの化学反応が進行する。N末ドメインでは、反応基質としてN末ドメイン中のキャビティーに結合したホルミルテトラヒドロ葉酸からCoAへのホルミル基転移反応が進行する。この時、キャビティー中のCoAは直鎖状に伸びたコンフォメーションを取り、CoAの末端にある-SH基はN末ドメインに結合したホルミルテトラヒドロ葉酸中のホルミル基の側に位置し、CoAへのホルミル基転移反応によりホルミル-CoAが反応中間体として生成する。生成したホルミル-CoAは、CoA分子の末端部分に存在するホルミル基が、HypXのC末ドメイン中の酵素活性サイトに位置するよう、キャビティー中で大きくそのコンフォメーションが変化する。C末ドメインでは、ホルミル-CoAからのCO脱離反応が進行し、COとCoAが生成する。

4) 学術論文

N. Muraki, C. Kitatsuji, Y. Okamoto, T. Uchida, K. Ishimori, S. Aono, “Structural basis for heme transfer reaction in heme uptake machinery from *Corynebacteria*”, *Chemical Communications* **55**, 13864-13867 (2019).

N. Muraki, K. Ishii, S. Uchiyama, S.G. Itoh, H. Okumura, S. Aono, “Structural characterization of HypX responsible for CO biosynthesis in the maturation of NiFe-hydrogenase”, *Communications Biology* **2**, 385 (2019).

6) 国際会議発表リスト

N. Muraki, S. Aono, “Mechanism of CO biosynthesis for the maturation of [NiFe] hydrogenase revealed by crystal structure of HypX”, 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, Nara (Japan), June 2019.

S. Aono, N. Muraki, “Structural basis for the assembly of the NiFe-dinuclear active site in [NiFe]-Hydrogenases”, 7th International Symposium on Metallomics, Warsaw (Poland), July 2019.

H. Sawai, M. Nishinaga, S. Nagai, N. Muraki, S. Aono, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, H. Sugimoto, Y. Shiro, “Structural basis for the transcriptional regulation of heme detoxification involved in pathogenic bacterial iron acquisition”, 7th International Symposium on Metallomics Warsaw (Poland), July 2019.

S. Aono, “Structural Characterization of HypX Responsible for CO Biosynthesis in the Maturation of [NiFe]-Hydrogenases”, Frontier Bioorganization Forum 2019, Seoul (Korea), July 2019.

N. Muraki, S. Aono, “Structural analysis of HypX responsible for CO production in the maturation of a [NiFe]-hydrogenase”, 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Interlaken (Switzerland), August 2019.

D. Matsui, N. Muraki, C. Ke, T. Mori, S. Aono, and Y. Asano, “Crystal screening of aldoxime dehydratase from *Bacillus* sp. OxdB-1 for structural analysis”, 1st Japan-Germany-Switzerland Workshop for Enzyme Technology and Bioprocess Development, Toyama (Japan), September 2019.

S. Aono, “Structural Characterization of HypX Responsible for CO Biosynthesis to assemble the active site of [NiFe]-Hydrogenase”, 2019 Korea-Taiwan-Japan Biological Inorganic Chemistry Symposium, Taichung (Taiwan), November 2019.

7) 招待講演

青野重利, “ヘムが関与する生体内シグナルセンシングおよびシグナル伝達”, 同志社大学ナノ・バイオサ

イエンス研究センター 私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」2018年度成果報告会, 同志社大学(京田辺市), 2019年4月.

S. Aono, “Structural Characterization of HypX Responsible for CO Biosynthesis in the Maturation of [NiFe]-Hydrogenases”, Frontier Bioorganization Forum 2019, Seoul (Korea), July 2019.

S. Aono, “Structural Characterization of HypX Responsible for CO Biosynthesis to assemble the active site of [NiFe]-Hydrogenase”, 2019 Korea-Taiwan-Japan Biological Inorganic Chemistry Symposium, Taichung (Taiwan), November 2019.

8) 学会および社会的活動

学協会役員等

触媒学会生体関連触媒研究会世話人 (2002-). (青野重利)

学会誌編集委員

Chemistry Letters, Section Editor (2013-). (青野重利)

1-3 神経ネットワーク創発研究グループ

東島 眞一 (教授)

木村有希子 (助教)

谷本 昌志 (助教)

1) 専門領域： 神経科学

2) 研究課題：

a) ゼブラフィッシュを用いた、運動系神経回路の動作機構の解明

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 行動を作り出す際の中枢神経系神経回路の動作様式を、単一神経細胞レベルの解像度で明らかにすることは、神経科学の大きな目標の1つである。当研究部門は、シンプルな中枢神経系を持つ小型魚類ゼブラフィッシュ幼魚を用い、動物の行動が作り出される際の、脊髄・脳幹運動神経系の動作様式の解明を目指して研究を進めている。

シンプルなゼブラフィッシュ幼魚といえども、脊髄・脳幹には非常に多種多様の神経細胞が存在する。回路の動作様式を理解するためには神経細胞のタイプごとにその配線、および活動パターンを調べる必要がある。この目的のため、当部門は、特定の種類の神経細胞で蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製して、それら神経細胞を生きたまま可視化することを方法論の中心に据えて研究している。CRISPR-Cas9による高効率ノックイン法を独自に開発し、多数のトランスジェニックフィッシュを作製し、それらを用いて、神経回路の解析を進めてきた。2019年度は特に、(1)転写因子En1を発現する神経細胞に関する解析; (2)左右の協調的な運動を担う交叉型抑制性神経細胞の役割、の2つの課題を中心に研究を進めた。以下、それぞれの研究について記載する。

(1) 転写因子En1を発現する神経細胞に関する解析

脊髄En1ニューロンにジフテリア毒素を発現させることにより、神経回路中から除去した。得られた幼魚は、遊泳運動のスピードが全般的に遅くなっていることにより、En1ニューロンは、遊泳運動のスピード調節に関わっていることが明らかとなった。この表現型に加えて、運動の強弱を切り替える際に、活性化されるニューロン群の切り替えに重篤な異常をきたしていることが分かった。野性型では、強い(速い)運動を行う際に、遅い運動の際にもつばら活性化されるニューロン群の活動は抑えられている。一方、En1ニューロンを除去した幼魚では、強い運動を行う際に、遅い運動の際に活性化されるニューロン群も同時に活性化してしまっていた。この結果は、En1ニューロンが、強い運動の際には、遅い運動に関わるニューロン群の活動を積極的に抑制して、ギアを切り替えるのに重要な役割を果たしていることを示している。

(2) 左右の協調的な運動を担う交叉型抑制性神経細胞の役割

左右の協調は二足歩行動物、四足歩行動物、さらには足を持たない魚類においても、スムーズな行動を作るうえで、普遍的、かつ根源的に重要であり、その協調的な運動は脊髄神経回路によって作られていると考えられている。しかしながら、脊髄神経回路の中でも交叉型抑制性細胞が左右の協調に重要な役割を担っていることが示唆されていたが、その実態はよくわかっていなかった。以下に記すように、

我々は、dmrt3aという転写因子を発現する交叉型抑制性細胞とdbx1bという転写因子を発現する交叉型抑制性細胞に着目し、これらが協調して、左右の協調的な運動を生み出していることを明らかにした。

まず、dmrt3a陽性のdI6神経細胞(dmrt3a-dI6神経細胞)とdbx1b陽性のグリシン作動性の神経細胞(V0d神経細胞)をGFP(緑色蛍光タンパク質)を用いて可視化し、この2つのグループの神経細胞が両方とも、交叉型抑制性細胞であることを示した。次に、dmrt3a-dI6神経細胞とV0d神経細胞にチャンネルロドプシンという光によって発火が制御できるタンパクを発現させ、これらの細胞が反対側の様々な神経細胞に結合し、抑制をかけていることを明らかにした。ついで、これらの細胞群の魚の遊泳行動中に発火するタイミングを電気生理学的手法で解析した結果、これらの細胞は、同側の筋肉が屈曲するタイミングで活動していることを明らかにした。つまり、dmrt3a-dI6神経細胞とV0d神経細胞は、反対側の神経細胞群が活動しないように抑制をかけていることが明らかにした。さらに、dmrt3a-dI6細胞は普通の遊泳中により発火し、V0d神経細胞はより速い遊泳および逃避行動中に発火するということが明らかにした。さらに、ジフテリアアトキシン(神経細胞を破壊する毒素)をdmrt3a-dI6神経細胞に発現させることにより、遊泳行動におけるdmrt3a-dI6神経細胞の役割を明らかにした。dmrt3a-dI6神経細胞を破壊した魚の遊泳行動は、しばしば左右の協調性が失われ、筋肉の両収縮が頻繁に起こっていた。この結果より、dmrt3a-dI6神経細胞の遊泳行動における左右協調性への重要性が示された。

4) 学術論文

C. Satou, T. Sugioka, Y. Uemura, T. Shimazaki, P. Zmarz, Y. Kimura, S. Higashijima, “Functional diversity of glycinergic commissural inhibitory neurons in larval zebrafish”, *Cell Reports* **30**, 3036-3050 (2020).

R.A. Callahan, R. Roberts, M. Sengupta, Y. Kimura, S. Higashijima, M.W. Bagnall, “Spinal V2b neurons reveal a role for ipsilateral inhibition in speed control”, *eLife* **8**, e47837 (2019).

T. Frank, R.N. Moenig, C. Satou, S. Higashijima, R.W. Friedrich, “Associative conditioning remaps odor representations and modifies inhibition in a higher olfactory brain area”, *Nature Neuroscience* **11**, 1844-1856 (2019).

Y. Kimura, S. Higashijima, “Regulation of locomotor speed and selection of active sets of neurons by V1 neurons”, *Nature Communications* **10**, 2268 (2019).

8) 学会および社会的活動

日本神経科学会会員 (東島眞一)

日本発生生物学会会員 (東島眞一)

日本分子生物学会 (東島眞一)

Society for Neuroscience(SfN)会員 (東島眞一)

1-4 神経分子動態生物学研究グループ

椎名 伸之 (准教授)

中山 啓 (助教)

1) 専門領域：細胞生物学、神経科学

2) 研究課題：

- a) 翻訳制御因子NFAR2の天然変性領域(IDR)欠損マウスの学習・記憶行動解析
- b) 神経変性疾患原因タンパク質TDP-43及びFUSによるRNA顆粒ダイナミクス制御の解析
- c) マウスのレンズ分化におけるRNG140(*caprin2*)による翻訳制御機構の解析

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 三次元構造を持たない天然変性領域(IDR)を有するRNA結合タンパク質は、液-液相分離によりコンデンセート(RNP複合体)を形成して多様な遺伝子発現制御を担うことが明らかにされてきた。ではそのような制御により生物はどのような高次機能を獲得したのか。我々はその問題解明に取り組んでいる。NFAR1およびNFAR2は*Ifi3*遺伝子から転写されるスプライシングバリエーションであり、NFAR2のみがIDRを有してRNP複合体を形成する(Shiina and Nakayama, J. Biol. Chem., 2014)。そのIDRを欠損した*Ifi3*^{ΔIDR/ΔIDR}マウスでは恐怖条件付け学習が低下し、その低下は身体的ストレスによってさらに低下することを我々はすでに明らかにした。しかし、その表現型の原因がIDR欠損にあるとはまだ結論できなかった。IDRを欠損したNFAR2の全アミノ酸配列はNFAR1とほぼ同一になる。NFAR1及びIDR欠損型NFAR2を合わせてNFAR short formと呼ぶが、*Ifi3*^{ΔIDR/ΔIDR}マウスではこのNFAR short formが増加した。したがって、このマウスの学習・記憶の低下は、IDRの欠損あるいはNFAR short formの増加のどちらが原因なのか不明であった。そこで我々は*Ifi3*ノックアウトアليل(*Ifi3*⁻)を持った*Ifi3*^{ΔIDR/-}マウスを作成した。このマウスはNFAR2のIDRを欠損し、かつNFAR sort formの発現量は野生型マウスと同等であった。*Ifi3*^{ΔIDR/-}マウスの学習・記憶行動解析の結果、その表現型は*Ifi3*^{ΔIDR/ΔIDR}マウスと同様であった。故に、ストレス状況下における恐怖条件付け学習の低下をもたらしたのは、NFAR short formの増加ではなくIDRの欠損であると結論づけた。以上の結果は、NFAR2のIDRがストレス条件下での恐怖条件付け学習という特定の脳機能に関与することを示唆した。

b) すでに我々は、コンデンセート(RNA顆粒)の構成タンパク質をGFPやmRFP1蛍光タンパク質融合型としてアフリカツメガエル腎臓由来のA6培養細胞に発現し、そのダイナミクスをdigitonin処理やFRAP法によってイメージング解析する方法を開発している(Shiina, J. Biol. Chem., 2019)。そこでその方法をマウス大脳皮質由来の神経初代培養細胞に適用し、RNA顆粒の構成因子で学習・記憶に必須のRNG105(別名*caprin1*)、及び神経変性疾患の原因遺伝子産物であるTDP-43とFUSのダイナミクスを解析した。TDP-43及びFUSは通常核内に存在するが、筋萎縮性側索硬化症(ALS)や前頭側頭葉変性性認知症(FTLD)などの神経変性疾患では細胞質に移行し、RNA顆粒に集積・凝集化して神経変性を引き起こすことが明らかにされつつある。TDP-43及びFUSを神経細胞に過剰発現したところ、細胞体及び樹状突起のRNA顆粒に局在化した。さらにこの局在化は、RNA顆粒におけるRNG105の流動性を増加させた。その結果RNG105の安定的なRNA顆粒への局在化は失われ、顆粒外へ追い出された。このようなRNA顆粒構成因子のダイナミク

ス・局在変化は、RNA顆粒の機能変化につながる可能性がある。

c) 翻訳レベルでの遺伝子発現調節は、細胞の運命や機能を決定する鍵を握る。RNA結合タンパク質RNG140(別名caprin2)は眼のレンズで高発現し、レンズの発生に必要であることが知られている。RNG140は*in vitro*で翻訳を抑制する活性を持つが(Shiina and Tokunaga, *J. Bio. Chem.*, 2010)、その翻訳抑制の制御機構とレンズ発生への関与は不明だった。そこで我々はまず、CHO培養細胞に過剰発現したRNG140による翻訳抑制機構を解析した。その結果、RNG140は翻訳開始因子eIF3に結合し、eIF3依存的な翻訳を抑制することを明らかにした。さらにリボソームプロファイリングの結果、RNG140によって翻訳抑制されるmRNA群は、細胞増殖に関与するものを多く含み、長さが長いことが明らかになった。この翻訳抑制に伴い、RNG140を発現したCHO細胞の増殖速度は低下した。

さらにレンズでの翻訳への影響を解析する目的で、RNG140ノックアウトマウスを作成した。リボソームプロファイリングの結果、RNG140ノックアウトの影響はCHO細胞におけるRNG140の過剰発現とは逆に、細胞増殖に関連する長いmRNAの翻訳を上昇させた。クリスタリンなどのレンズ分化に関与するタンパク質をコードするmRNAの長さは短く、RNG140による翻訳抑制を回避することから、RNG140ノックアウトマウスのレンズにおけるこれらmRNAの翻訳効率は相対的に減少した。以上の結果は、レンズ細胞においてもCHO細胞と同様のRNG140による翻訳抑制機構が機能することを示した。さらに、RNG140による翻訳抑制が、増殖と分化に関与するmRNAの翻訳バランスを調節することによって、レンズ細胞の増殖から分化への切り替えを担うことが示唆された。

4) 学術論文

T. Nakayama, K. Okimura, J. Shen, Y. Guh, T.K. Tamai, A. Shimada, S. Minou, Y. Okushi, T. Shimmura, Y. Furukawa, N. Kadofusa, A. Sato, T. Nishimura, M. Tanaka, K. Nakayama, N. Shiina, N. Yamamoto, A.S. Loudon, T. Nishiwaki-Ohkawa, A. Shinomiya, T. Nabeshima, Y. Nakane, T. Yoshimura, “Seasonal changes in NRF2 antioxidant pathway regulates winter depression-like behavior” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, in press (2020).

5) 著書、総説

R. Roy, N. Shiina, D.O. Wang, “More dynamic, more quantitative, unexpectedly intricate: Advanced understanding on synaptic RNA localization in learning and memory,” *Neurobiol. Learn. Mem.*, **168**, 107149 – 107149 (2020).

R. Ohashi, N. Shiina, “Cataloguing and selection of mRNAs localized to dendrites in neurons and regulated by RNA-binding proteins in RNA granules” *Biomolecules.*, **10**, E167 (2020).

6) 国際会議発表リスト

N. Shiina, “Liquid- and solid-like RNA granule formation and its implications for neuronal functions” Frontier Bioorganization Forum 2019, Seoul (Korea), July 2019.

N. Shiina, “Regulation of the dynamics of RNA granule condensates and its implications for long-term memory” NIBB-Princeton Joint Symposium, Okazaki (Japan), October 2019.

7) 招待講演

N. Shiina, “Liquid- and solid-like RNA granule formation and its implications for neuronal functions” Frontier Bioorganization Forum 2019, Seoul (Korea), July 2019.

権名伸之, “RNG105 (caprin1) establishes dendritic mRNA localization and is essential for long-term memory

formation” 第42回日本神経科学大会, 新潟, 2019年7月

N. Shiina, “Regulation of the dynamics of RNA granule condensates and its implications for long-term memory”
NIBB-Princeton Joint Symposium, Okazaki (Japan), October 2019.

大橋りえ, 中山啓, 高雄啓三, 椎名伸之, “RNA granule protein RNG105 (caprin1) regulates dendritic mRNA localization and contributes to synaptic potentiation” 第42回日本分子生物学会年会, 福岡, 2019年12月

椎名伸之, “RNA顆粒足場タンパク質による液相・固相RNA顆粒の形成及びその長期記憶との関連” 第42回日本分子生物学会年会, 福岡, 2019年12月

8) 学会および社会的活動

日本分子生物学会会員 (椎名伸之)

日本神経科学学会会員 (椎名伸之)

Society for Neuroscience会員 (椎名伸之)

Biomolecules誌 Guest Editor (椎名伸之)

1-5 心循環ダイナミズム創発研究グループ

西田 基宏 (教授)

田中 智弘 (新分野創成センター、特任助教)

1) 専門領域：生理学、薬理学

2) 研究課題：

a) ミトコンドリアの質管理における細胞内イオウ代謝の重要性の解明

b) 筋細胞リモデリングにおける非選択的カチオンチャネルTRPCの重要性の解明

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 活性イオウによるミトコンドリア品質管理と心筋早期老化制御

食事や大気の中には微量の環境親電子物質が含まれており、日々摂取する環境親電子物質の総量が様々な病態・疾患発症のリスク要因となる可能性が指摘されている。水俣病の原因となった有機(メチル)水銀も、マグロや鯨などに微量に含まれている。この微量メチル水銀を含ませた飲水を1週間曝露させたマウスに横行大動脈狭窄による圧負荷を施した結果、急性心不全による突然死率が劇的に悪化した。メチル水銀曝露マウス心臓では、ミトコンドリアが著しく分裂していた。メチル水銀はミトコンドリア分裂促進Gタンパク質dynamamin-related protein 1(Drp1)のC端側に存在するCys624のポリイオウ鎖(Cys624-SS_(n)H; n≧1)からイオウを奪い取ることでfilaminとの相互作用を増強させ、その結果、心筋ミトコンドリア特異的に過剰分裂を引き起こすことがわかった。さらに、NaHS等のイオウ基質を少量ずつ持続的に投与することで、メチル水銀による心不全悪化がキャンセルされることも明らかとなった。以上より、タンパク質中に含まれるCysポリイオウ鎖が環境化学センサーとして働く新たな役割が示された(Science Signal., 2019)。

b) 心血管恒常性維持におけるTRPC3/C6チャネルの役割解析

(1) TRPC6チャネルによる血管平滑筋細胞の表現型変換制御機構の解明

平滑筋細胞は増殖型と収縮型の表現型を変換させることで血管恒常性を維持している。脂質活性化型TRPC6チャネルを欠損させた大動脈平滑筋細胞では、TGFβ刺激による筋分化が誘導されやすくなることを見出した。その機序として、TRPC6チャネルを介するカチオン流入が細胞膜電位の脱分極を誘導することで、TGFβ刺激によるPTENの膜局在を負に制御し、結果としてAktを介する筋分化誘導が抑制されることを明らかにした(FASEB J., 2019)。

(2) ドキソルビシン心筋症を仲介するTRPC3-Nox2複合体を阻害する既承認薬の同定

ドキソルビシン(DOX)は様々な悪性腫瘍に有効な抗腫瘍作用を示す一方で、食欲不振や吐き気、運動不足によって廃用性筋萎縮様症状も起こしうる。TRPC3とNox2がマクロファージに多く発現していることに着目し、Raw264.7細胞株のドキソルビシン誘発性細胞死を指標に、1280種類の既承認薬の中からTRPC3-Nox2機能共役を抑制する化合物の探索を行った。その結果、ヒットした8化合物のうち、イブジラスト(気管支拡張薬)が最も強く抑制することを見出した。イブジラストはドキソルビシン投与によるTRPC3-Nox2複合体形成とそれに伴うNox2タンパク質発現増加、酸化ストレス障害、マウス体重量・組織重量の低下を顕著に抑制した。以上の結果は、TRPC3-Nox2複合体が抗がん剤投与による筋組織萎縮の原

因となり、薬理的にこれを抑制することが個体機能低下を軽減する新たな治療戦略となることを示唆している(Br. J. Pharmacol., 2019)。

(3) 高濃度ATP曝露による心筋萎縮のメカニズム

筋肉の萎縮はサルコペニアやフレイルに見られる主症状であり、その予防・治療戦略の構築が求められている。ラット新生児心筋細胞に高濃度のATP刺激を行うと心筋は萎縮する。我々はATPがP2Y2受容体を介してTRPC3-Nox2複合体形成を誘発し、活性酸素生成依存的に筋萎縮マーカータンパク質MAFbxの発現を増加させることを見出した。生理的には、グルコースやアミノ酸除去、低酸素ストレスによってATPが心筋細胞から放出され、遊離したATPがP2Y2受容体を介してTRPC3-Nox2複合体形成を促進させることを明らかにした(Sci. Rep., 2019)。

4) 学術論文

T. Numaga-Tomita, T. Shimauchi, S. Oda, T. Tanaka, K. Nishiyama, A. Nishimura, L.A. Birnbaumer, Y. Mori, M. Nishida, “TRPC6 regulates phenotypic switching of vascular smooth muscle cells through plasma membrane potential-dependent coupling with PTEN”, *FASEB Journal* **33(9)**:9785-9796. (2019).

A. Nishimura, K. Shimoda, T. Tanaka, T. Toyama, K. Nishiyama, Y. Shinkai, T. Numaga-Tomita, D. Yamazaki, Y. Kanda, T. Akaike, Y. Kumagai, M. Nishida, “Depolysulfidation of Drp1 induced by low-dose methylmercury exposure increases cardiac vulnerability to hemodynamic overload”, *Science Signaling* **12(587)**. pii: eaaw1920 (2019).

K. Nishiyama, T. Numaga-Tomita, Y. Fujimoto, T. Tanaka, C. Toyama, A. Nishimura, T. Yamashita, N. Matsunaga, S. Koyanagi, Y. Azuma, Y. Ibuki, K. Uchida, S. Ohdo, M. Nishida, “Ibutilast attenuates doxorubicin-induced cytotoxicity by suppressing formation of TRPC3-Nox2 protein complex”, *British Journal of Pharmacology* **176(18)**:3723-3738 (2019).

S.B. Sudi, T. Tanaka, S. Oda, K. Nishiyama, A. Nishimura, C. Sunggip, S. Mangmool, T. Numaga-Tomita, M. Nishida, “TRPC3-Nox2 axis mediates nutritional deficiency-induced cardiomyocyte atrophy”, *Scientific Reports* **9(1)**:9785 (2019).

5) 著書、総説

M. Nishida, T. Tanaka, S. Mangmool, K. Nishiyama, A. Nishimura, “Canonical Transient Receptor Potential Channels and Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity”, *J. Lipid Atheroscler.* **9(1)**:e13 (2020).

K. Nishiyama, T. Tanaka, A. Nishimura, M. Nishida, “TRPC3-based protein signaling complex as a therapeutic target of myocardial atrophy”, *Curr. Mol.Pharmacol.*, in press (2020).

T. Numaga-Tomita, M. Nishida, “TRPC channels in cardiac plasticity”, *Cells* **9(2)**. pii: E454 (2020).

T. Numaga-Tomita, S. Oda, K. Nishiyama, T. Tanaka, A. Nishimura, M. Nishida, “TRPC channels in exercise-mimetic therapy”, *Pflugers Arch.*, **471(3)**:507-517 (2019).

T. Tanaka, A. Nishimura, K. Nishiyama, T. Goto, T. Numaga-Tomita, M. Nishida, “Mitochondrial dynamics in exercise physiology”, *Pflügers Archiv.*, **472(2)**:137-153 (2020).

西田基宏, “エレクトロンバイオダイナミクスが支える生命の生存戦略.”, *月刊 細胞.*, 51(8): 378-379 (2019).

西田基宏, 西山和宏, 田中智弘, 西村明幸, “酸化/還元ストレスと心臓”, *臨床免疫・アレルギー科*, 72(1): 29-35 (2019).

西田基宏, 田中智弘, 西村明幸, “ミトコンドリア品質管理と心筋老化制御”, *実験医学*, 37(12): 1959-1965 (2019).

西田基宏, 小田紗矢香, “TRPC3/C6蛋白質シグナル複合体形成の病態生理的意義”, *医学のあゆみ*, 270(10): 897-902 (2019).

6) 国際会議発表リスト

M. Nishida, “A novel strategy of drug repositioning for the maintenance of mitochondrial quality”, 2019 Korea-Yonsei-NIPS International Joint Symposium, Seoul (Korea), July 2019.

M. Nishida, “Protein-protein interaction (PPI) in cardiac tissue remodeling and metabolism”, Special seminar in Seoul National University, Seoul (Korea), July 2019.

M. Nishida, “Cardiac plasticity regulated by protein-protein interactions (PPIs)”, Frontier Bioorganization Forum 2019 in KIAS, Seoul (Korea), July 2019.

M. Nishida, “Targeting protein-protein interaction (PPI) as a new strategy for drug repositioning (Eco-Pharma)”, The 5th Japan-Taiwan Joint Symposium for Pharmaceutical Sciences, Taipei (China), August 2019.

M. Nishida, “Protein cysteine persulfide regulates mitochondrial quality and stress resistance of the heart against environmental stress”, The 1st International Conference on Persulfide and Sulfur Metabolism in Biology and Medicine, Sendai (Japan), September 2019.

M. Nishida, “Targeting protein-protein interaction (PPI) as a new strategy for drug repositioning”, Mini-Symposium: Current Topic in Pharmacology: Focusing on Receptor Signal Transduction, Mahidol (Thailand), October 2019.

A. Nishimura, K. Shimoda, T. Tanaka, K. Nishiyama, M. Nishida, “Pathology-dependent aberrant interaction between mitochondria and actin cytoskeleton causes cardiac fragility”, The 50th NIPS international Symposium on 'MIRACLES in Cardiovascular Physiology, Okazaki (Japan) December 2019.

A. Nishimura, K. Shimoda, T. Tanaka, K. Nishiyama, M. Nishida, “Depolysulfidation of Drp1 increases cardiac vulnerability to hemodynamic overload”, The 50th NIPS international Symposium on 'MIRACLES in Cardiovascular Physiology Okazaki (Japan), December 2019.

K. Nishiyama, T. Tanaka, C. Toyama, A. Nishimura, M. Nishida, “Identification of a novel TRPC3-Nox2 complex inhibitor that attenuates anthracycline-induced cytotoxicity”, The 50th NIPS international Symposium on 'MIRACLES in Cardiovascular Physiology, Okazaki (Japan) December 2019.

D. Tomokiyo, T. Goto, A. Nishimura, K. Nishiyama, T. Tanaka, M. Nishida, “Cigarette sidestream smoke induces mitochondrial fission-associated myocardial early senescence”, The 50th NIPS international Symposium on 'MIRACLES in Cardiovascular Physiology, Okazaki (Japan) December 2019.

K. Sakata, K. Nishiyama, T. tanaka, A. Inoue, J. Aoki, A. Nishimura, M. Nishida, “Identification of G protein-coupled receptors that induce ligand-independent calcium oscillations”, The 50th NIPS internationalSymposium on 'MIRACLES in Cardiovascular Physiology, Okazaki (Japan) December 2019.

T. Tanaka, S.B. Sudi, S. Oda, K. Nishiyama, A. Nishimura, C. Sunggip, S. Mangmool, T. Numaga-Tomita, M. Nishida, “TRPC3-Nox2 complex formation mediates nutritional deficiency-induced cardiomyocyte atrophy”, The 50th NIPS internationalSymposium on 'MIRACLES in Cardiovascular Physiology, Okazaki (Japan) December 2019.

T. Numaga-Tomita, H. Takahashi, M. Nishida, M. Yamada, “Analysis of the molecular mechanism underlying STIM1-dependent suppression of Cav1.2”, The 50th NIPS internationalSymposium on 'MIRACLES in Cardiovascular Physiology, Okazaki (Japan) December 2019.

S. Oda, S. Mangmool, T. Tanaka, K. Nishiyama, A. Nishimura, M. Nishida, “Physiological role of TRPC6 in regulation of cardiovascular system”, The 50th NIPS internationalSymposium on 'MIRACLES in Cardiovascular Physiology, Okazaki (Japan) December 2019.

K. Shimoda, K. Nishiyama, A. Nishimura, T. Tanaka, M. Nishida, “The role of P2Y6R in cardiovascular homeostasis”, The 50th NIPS international Symposium on 'MIRACLES in Cardiovascular Physiology, Okazaki (Japan) December 2019.

7) 招待講演

M. Nishida, “A novel strategy of drug repositioning for the maintenance of mitochondrial quality.”, 2019 Korea-Yonsei-NIPS International Joint Symposium, Seoul (Korea), July 4 (2019).

M. Nishida, “Protein-protein interaction (PPI) in cardiac tissue remodeling and metabolism.”, Special seminar in Seoul National University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Seoul (Korea), July 5th (2019).

M. Nishida, “Cardiac plasticity regulated by protein-protein interactions (PPIs).”, Frontier Bioorganization Forum 2019 in KIAS, Seoul (Korea), July 8 (2019).

M. Nishida, “Targeting protein-protein interaction (PPI) as a new strategy for drug repositioning (Eco-Pharma).”, The 5th Japan-Taiwan Joint Symposium for Pharmaceutical Sciences, Taipei (China), August 30 (2019).

M. Nishida, “Protein cysteine persulfide regulates mitochondrial quality and stress resistance of the heart against environmental stress.”, The 1st International Conference on Persulfide and Sulfur Metabolism in Biology and Medicine, Sendai (Japan), September 9-11 (2019).

M. Nishida, “Targeting protein-protein interaction (PPI) as a new strategy for drug repositioning.”, Mini-Symposium: Current Topic in Pharmacology: Focusing on Receptor Signal Transduction, Mahidol (Thailand), October 22 (2019).

8) 学会および社会的活動

日本NO学会(理事) (西田基宏)

日本酸化ストレス学会(理事・東海支部会幹事) (西田基宏)

日本薬理学会評議員 (西田基宏)

日本循環薬理学会幹事 (西田基宏)

心脈管作動物質学会幹事 (西田基宏)

日本生理学会評議員 (西田基宏)

日本薬学会会員(代議員、Biol. Pharm. Bull.誌Editor) (西田基宏)

日本毒性学会評議員 (西田基宏)

国際心臓研究学会(ISHR)日本部会評議員(U45委員) (西田基宏)

日本生化学会会員 (西田基宏)

9) 他大学での非常勤講師、客員教授

静岡県立大学薬学部・客員教授 (西田基宏)

京都大学大学院工学研究科・非常勤講師 (西田基宏)

自治医科大学・非常勤講師 (西田基宏)

金沢大学大学院医学研究科・非常勤講師 (西田基宏)

タイ・マヒドール大学大学院薬学系研究科・客員教授 (西田基宏)

10) 受賞、表彰

西田基宏, 2018年日本酸化ストレス学会学術奨励賞, (2019年6月).

西田基宏, 第12回 臨床薬理研究振興財団 研究大賞, (2019年11月).

西田基宏, 第29回 日本循環薬理学会／第55回高血圧関連疾患モデル学会合同学会Poster Award,(2019年11月).

11) 特許

国内出願番号：特願2019-103034

出願日： 2019年5月31日

発明の名称：Drp1-Filamin複合体形成阻害剤及び新規化合物

発明者：西田基宏、王子田彰夫、進藤直哉、西村明幸

出願人：九州大学、自然科学研究機構

国際出願番号：PCT/JP2019/018082

国際出願日： 2019年4月26日

発明の名称：ベンゾイソオキサゾール化合物

発明者：永田龍、森泰生、森誠之、西田基宏、富田拓郎

出願人：大阪大学、京都大学、自然科学研究機構

1-6 生物画像情報解析グループ

高田 慎治（教授）〔兼任〕

加藤 輝（特任助教）

太田 裕作（特任助教）

1) 専門領域： 発生生物学、病情報学

2) 研究課題：

a) 細胞外形および細胞核の定量的動態解析

b) 多重解像度(マルチスケール)を利用した口腔がん生存予測の深層学習モデルの開発

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 器官表面の定量的動態解析

生物の器官は、胚発生期において平面状の細胞群が巧みに折れ込む過程を経る事により、立体的かつ複雑な構造として構築される。このような劇的な細胞集団の形態変化は、器官原基細胞群のそれぞれの領域に特異的な運動が、適切な時点で誘起される一連の制御過程を経た結果によるものであると考えられる。これら細胞運動を記録した時系列顕微鏡画像から、個別の細胞の動態を抽出し解析する事で、器官形成の過程を担う個々の細胞の挙動へと還元し、理解する事が可能となる。細胞の形態変化について解析を行う上で、器官表面、特に上皮のアピカル領域を特異的に標識した標本の立体観察像から、細胞輪郭の細線化骨格モデルを構築、器官表面を構成する個別の細胞の立体的配置並びに動態を網羅的かつ定量的に解析可能とするシステムの開発を行っている。この系では、マウス卵管やショウジョウバエ上皮といった、観察面から完全に隠れた面を持つ標本からも細胞の外形を認識することが可能である。

生体を構成する細胞群には、多層を成し空間中に高い密度で存在する場合も多く、個別の細胞を峻別することが困難となる。そのような対象において、細胞核を選択的に標識し、識別することによりその立体的な配置について定量的な分析を施すことが可能となる。大量の画像を対象とし、分離が困難な核の位置・形状について比較的高速に抽出する系を開発・運用している。この処理系をMDCK細胞塊を撮影した大量のデータに適用し、細胞数計数ならびに形状の特徴の解析を行った。また、マウス胚性幹細胞群を対象に多視点顕微鏡を適用した結果得られた多数の核染色像から核領域を抽出し、それぞれの核内における核内分子の相互配置の関係について統計的解析を行う系についても開発している。

b) 多重解像度(マルチスケール)を利用した口腔がん生存予測の深層学習モデルの開発

がんの予後(生存期間)を正確に予測することは、患者のQuality of Life(QOL)の改善、治療方針の決定、疾患予防の向上に重要な役割を担っている。予後予測は従来、Kaplan-Meier法やCox比例ハザードモデルといった統計学的な解析手法を用いておこなわれてきた。しかし近年、人工知能(AI)によって、より精度の高い予測を目指した研究が盛んにおこなわれている。特に、がん病巣の組織切片の病理画像を用いて、深層学習によって患者の予後を予測する研究は、有効な手法として大きな注目を浴びている。しかしながら、この病理画像を用いた深層学習では3つの問題がボトルネックとなっている。1つ目は、深層学習に使用する画像領域を少数の医師が手動で設定している点である。これによって、効率性の低さ、公平

性の欠如が問題となっている。2つ目は、画像領域が小さい(0.25 μm^2)ことである。これによって、マクロ的な空間情報が失われていることである。さらに3つ目として、画像の欠乏による学習不足がある。これらの問題によって、精度の高いモデルを構築することが困難となっている。そこで私は、この3つの問題を克服する学習モデルを開発している。本年度は問題点1、手動による画像取得に関する問題の解決をおこなった。既存の物体検出モデル(VGG-16)やPCA、K-Means法といった統計学的手法によって、病理切片全体の画像をクラスタリングし、各クラスターを既存の予後予測モデルによって評価・選別し、画像取得の完全自動化を実現した。今後、問題点2、3の解決を目指し、従来の学習モデルを超える精度を持つ学習モデルを開発する。

4) 学術論文

I. Fujita, A. Shitamukai, F. Kusumoto, S. Mase, T. Suetsugu, A. Omori, K. Kato, T. Abe, G. Shioi, D. Konno, F. Matsuzaki, “Endfoot regeneration restricts radial glial state and prevents translocation into the outer subventricular zone in early mammalian brain development”, *Nature Cell Biology* **22**, 26-37 (2020).

M. Furutani, Y. Hirano, T. Nishimura, M. Nakamura, M. Taniguchi, K. Suzuki, R. Oshida, C. Kondo, S. Sun, K. Kato, Y. Fukao, T. Hakoshima, M. Terao Morita, “Polar recruitment of RLD by LAZY1-like protein during gravity signaling in root branch angle control”, *Nature Communications* **11**, 76 (2020).

H. Yagi, M. Yagi-Utsumi, R. Honda, Y. Ohta, T. Saito, M. Nishio, S. Ninagawa, K. Suzuki, T. Anzai, Y. Kamiya, K. Aoki, M. Nakanishi, T. Satoh, K. Kato, “Improved secretion of glycoproteins using an N-glycan-restricted passport sequence tag recognized by cargo receptor”, *Nature Communications* **11**, 1368 (2020).

5) 著書、総説

加藤輝, “イメージングデータ解析よろず相談所. 大量画像解析のための自動化手法・応用編”, 羊土社, **37(14)**, 2346-2353 (2019).

小山宏史, 加藤輝, “イメージングデータ解析よろず相談所. 顕微観察画像の定量的情報解析とその落とし穴”, 羊土社, **37(16)**, 2772-2777 (2019).

8) 学会および社会的活動

生物画像データ解析トレーニングコース 2019 代表 (加藤輝)

第2回 ExCELLSシンポジウム 2019年11月 口頭発表 (太田裕作)

1-7 生命時空間制御研究グループ

野中 茂紀 (准教授)

1) 専門領域： 発生学・顕微鏡学

2) 研究課題：

a) 哺乳類発生における左右性の初期決定機構の解析

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 哺乳類の発生においては、原腸陥入期の胚表面に一時的に現れる構造「ノード」表面において、運動する繊毛が胚体の左に向かう水流を作り、それが将来の左右非対称を決定することがわかっている。しかし、水流が組織に非対称な情報を与える具体的な機構はわかっていない。ひとつの有力な仮説は、自身は非運動性でありメカノセンサーとして働くタイプの繊毛が水流を検知して細胞内Ca²⁺上昇を引き起こす、水流の分布が左右非対称であるためにノードの左側と右側で異なる応答を引き起こすというものであり、その妥当性の検証を試みている。この目的のために高速なライトシート顕微鏡を構築し、マウス胚のノードにおける水流分布の3次元的解析を試みている。またこれとは別に、繊毛自身に構造的非対称が存在することがノードの水流生成や検知に大きく関わっているのではないかという仮説があるが、超解像顕微鏡を用いてその検証を試みている。

4) 学術論文

T. Serizawa, A. Isotani, T. Matsumura, K. Nakanishi, S. Nonaka, S. Shibata, M. Ikawa, H. Okano, “Developmental analyses of mouse embryos and adults using a non-overlapping tracing system for all three germ layers”, *Development* **146**, dev174938 (2019).

Y. Yoon, J. Park, A. Taniguchi, H. Kohsaka, K. Nakae, S. Nonaka, S. Ishii, A. Nose, “System level analysis of motor-related neural activities in larval *Drosophila*”, *Journal of Neurogenetics* **33**, 179-189 (2019).

K. Sasaki, K. Shiba, A. Nakamura, N. Kawano, Y. Satouh, H. Yamaguchi, M. Morikawa, D. Shibata, R. Yanase, K. Jokura, M. Nomura, M. Miyado, S. Takada, H. Ueno, S. Nonaka, T. Baba, M. Ikawa, M. Kikkawa, K. Miyado, K. Inaba, “Calaxin is required for cilia-driven determination of vertebrate laterality”, *Communications Biology* **2**, 226 (2019).

T. Kaji, C. Song, K. Murata, S. Nonaka, K. Ogawa, Y. Kondo, S. Ohtsuka, A.R. Palmer, “Evolutionary transformation of mouthparts from particle-feeding to piercing carnivory in Viper copepods: Review and 3D analyses of a key innovation using advanced imaging techniques”, *Frontiers in Zoology* **16**, 35 (2019).

K. Kishimoto, W. Sugano - Yasunaga, A. Taniguchi, K. Agata, S. Nonaka, N. Funayama, “Skeleton construction upon local regression of the sponge body”, *Development, Growth & Differentiation* **61**, 485-500 (2019).

5) 著書、総説

野中茂紀, “イメージングデータ解析よろず相談所 大量画像解析のための自動化手法・基礎編”, 羊土社, **37(13)**, 2208-2214 (2019).

沖村千夏、谷口篤史、野中茂紀、岩楯好昭, “車輪細胞見つけた!”, *日本生物物理学会*, **59(2)**, 94-96 (2019).

7) 招待講演

野中茂紀, “光シート顕微鏡の原理と近年の動向”, 日本学術振興会ナノプローブテクノロジー第167委員会第91回研究会, 東京, 2019年4月.

野中茂紀, “哺乳類発生における左右非対称性の初期決定”, 弘前大学農学生命科学部研究推進セミナー, 弘前, 2019年6月.

野中茂紀, “高速ライトシート顕微鏡の開発及びそれを用いた発生の左右初期決定機構の解析”, レーザー学会学術講演会第40回年次大会, 仙台, 2020年1月.

8) 学会および社会的活動

出張授業 愛知産業大学三河高等学校 「身体の左右を決める仕組み」 (野中茂紀)

9) 他大学での非常勤講師、客員教授

名古屋大学医学部 非常勤講師 (野中茂紀)

愛知教育大学 非常勤講師 (野中茂紀)

1-8 生命分子創成研究グループ

古賀 信康 (准教授)

小杉 貴洋 (助教)

- 1) 専門領域：生物物理学、タンパク質分子デザイン
- 2) 研究課題：
 - a) $\alpha\beta$ 型タンパク質構造のデザイン
 - b) α ヘリカルタンパク質構造のゼロからのデザイン
 - c) デザインタンパク質の安定化機構の解明
 - d) ATP結合タンパク質のゼロからのデザイン
 - e) 自然界のタンパク質構造を改造して創るヘム結合タンパク質
 - f) 動的機能を発現する自然界のタンパク質F-ATPaseおよびV-ATPaseの改造
 - g) 自然界に存在しないトポロジーのデザイン
 - h) タンパク質構造の合理安定化法の開発
- 3) 研究活動の概略と主な成果：
 - a) 「 $\alpha\beta$ 型タンパク質構造のデザイン」 これまでに2次構造パターンと3次構造モチーフの整合性に関するルールを発見し、これらのルールを用いることで100残基以下の様々な形状の $\alpha\beta$ 型タンパク質構造のデザインに成功してきた。これらのルールがより大きなサイズのタンパク質デザインにも適用可能かどうか検証するため、100残基以上のサイズのタンパク質構造のデザインに取り組んだ。その結果、これらルールに加えて、ルールを用いて描いた主鎖構造設計図と、実際に主鎖構造を組み立てたときの全体構造との整合性、すなわち、2次構造パターン-3次構造モチーフ-全体構造の間の整合性が重要であることを明らかにした。これらを考慮して5本ストランドの $\alpha\beta$ 型タンパク質を新たにデザインし、大腸菌に組み込み発現・精製し、生化学実験により折り畳み能を調べたところ、デザインは安定な構造を形成し、NMRにより決定された構造は、計算機モデルとよく一致していた。現在は、6本ストランドの $\alpha\beta$ 型タンパク質をデザインすることで、発見したデザイン原理の有効性を検証中である。
 - b) 「 α ヘリカルタンパク質構造のゼロからのデザイン」 複数の α ヘリックスが集まった α ヘリカル構造は、極めて多様な構造を生み出すことができ、加えてそれらの構造は柔軟であるため、機能発現に重要な役割を果たす。そこで様々な α ヘリカル構造を自在にデザインするための手法の開発を行った。まず自然界のタンパク質構造を解析することで、ヘリックス同士をつなぐループに典型的なループパターンが18種存在することを明らかにした。次に、これらのループパターンを組み合わせることで、計算機上で多様な形状の α ヘリカル構造の構築に成功した。計算機でデザインした典型的な全てのループパターンを網羅した5つの異なる形状の α ヘリカルタンパク質について、折り畳み能を生化学実験により調べたところ、これらデザインしたタンパク質は安定な構造を形成していた。これまでに、そのうちの3つに対してNMR構造解析を行ったところ、計算機モデルはNMR構造とよく一致していた。今後は、多様な α ヘリカル構造を用いることで、機能性タンパク質のデザインを行う。また、これら5つの異なる形状のデザインとは別に、計算機で長さ70残基、形状約800種類、配列約8000種類もの大量のデザイン配列を作り

出すことに成功した。今後は、これら大量のデザイン配列を折りたたみ能や機能でスクリーニングする。

c) 「デザインタンパク質の安定化機構の解明」 デザインしたタンパク質の多くは、100°Cでも変性しないという極めて興味深い特性を有する。この異常に高い安定性は、タンパク質の主鎖を局所的に制限することによって探索すべき構造空間を小さくしたことに起因するのか、あるいは、疎水性コアパッキングのような非局所相互作用によるものなのかを、疎水性コアのLeu, IleをValに変えてパッキングを損なうことにより調べた。その結果、全部で10残基のLeu, IleをValに変えても、タンパク質は同じトポロジーへと折りたたみ、かつ、まだ100°C以上の安定性を示したことから、タンパク質の主鎖を望みのトポロジーに折りたたみやすいように制限することがデザインタンパク質の極度な安定性を生み出していることが示唆された。

d) 「ATP結合タンパク質のゼロからのデザイン」 自然界にはATPを加水分解して動的機能を発現するタンパク質が存在する。タンパク質がATPを加水分解するためのミニマムな装置を明らかにすることを目的とし、まずATPを結合するタンパク質のゼロからのデザインを行った。これまでに発見した3つのルールとヌクレオチド結合に重要とされるP-loopモチーフを用いることで、計算機上でATP結合タンパク質のデザインを行った。続いて、生化学実験によりデザインタンパク質のATP結合親和性の測定を行ったが、ATPに対して高い結合親和性を示さなかった。現在は、b)でデザインした α ヘリカル構造を融合してアデニン環結合部位を作ることにより、高いATP結合親和性を示すタンパク質設計に取り組んでいる。

e) 「自然界のタンパク質構造を改造して創るヘム結合タンパク質」 ヘムを例としてこれに結合するタンパク質をデザインすることで、望みの小分子に結合するタンパク質分子をデザインする手法の開発を行った。自然界のタンパク質をベースとして、その構造に大きなポケットを持つように計算機デザインで改造し、生化学実験によりデザインタンパク質のヘム結合能を調べた。その結果、デザインはヘムに結合していることが明らかになった。現在は、結合の親和性を向上させるべく再設計を行っている。

f) 「動的機能を発現する自然界のタンパク質F-ATPaseおよびV-ATPaseの改造」 自然界には、ATP加水分解のエネルギーを利用して構造変化することで機能を発現するタンパク質が存在する。このようなタンパク質がどのようにして動的機能を発現しているのか、回転モータータンパク質であるF-ATPaseおよびV-ATPaseを改造することで、そのメカニズムに迫った。分子動力学シミュレーション、1分子観測、結晶構造解析等あらゆる手法を駆使して、構造変化のメカニズムに迫ったところ、F-ATPaseの構造変化に重要な部位を特定し、V-ATPaseの動的機能発現における非触媒部位のアロステリックな役割を明らかにした。

g) 「自然界に存在しないトポロジーのデザイン」 簡単な理論計算では考えることができるが、自然界には現存しないトポロジーが多数あることが示唆されている。本研究では、自然界に現存しない新規トポロジーを持つタンパク質分子を創ることで、新規トポロジーは物理化学的に立体構造形成することが困難なために存在していないのか、それとも偶然生物が見つけれ出していないだけなのか、これらの謎に迫る。網羅的なタンパク質立体構造データベース検索を行い、8つの新規トポロジーを同定した。これら新規トポロジーの計算機デザイン及び生化学実験による折りたたみ能の検証を行ったところ、デザインしたタンパク質は安定な構造を形成していた。そこで、NMR構造解析を行ったところ、計算機モデルはNMR構造とよく一致していた。とりわけ、8つのうちの1つのトポロジーは、両端を引っ張ったときに結び目を形成するという極めて特異な構造であり、折りたたみが難しそうな自然界に現存しない新規トポロジー

を持つタンパク質をも人工的に創り出すことに成功したという事実は、これら8つの新規トポロジーは偶然生物が見つけれなかった、あるいは、進化の過程で淘汰されたということを示唆している。

h) 「タンパク質構造の合理安定化法の開発」 タンパク質の耐熱性を向上させることは、タンパク質を産業利用する上で重要である。タンパク質をゼロからデザインする技術を応用して、自然界のタンパク質を合理的に安定化する手法の開発を行った。開発した手法を用いて、バイオマス糖化に重要なβグルコシダーゼ、PET製品のバイオリサイクルに重要なPET分解酵素、および創薬ターゲットの一つであるGPCRの耐熱化を行っている。また、デザインタンパク質が極めて安定であることを利用して、デザインタンパク質そのものを融合する手法を使ってGPCRの耐熱化も行っている。

4) 学術論文

H. Murakoshi, H. Horiuchi, T. Kosugi, M. Onda, A. Sato, N. Koga, J. Nabekura, “ShadowR: a novel chromoprotein with reduced non-specific binding and improved expression in living cells”, *Scientific Reports*, **9**:12072 (11 pages) (2019).

5) 著書、総説

R. Koga, N. Koga, “Consistency principle for protein design”, *Biophys. Physicobiol.*, **16**, 304-309 (2019)

小杉貴洋, 古賀理恵, 古賀信康, “合理デザインによる新規タンパク質の創出：現状とその可能性”, 羊土社, **37**(18)11月号, 3089-3095 (2019)

6) 国際会議発表リスト

T. Kosugi, “Design of Allosteric Site to Regulate Rotary Molecular Motor V1-ATPase”, Frontier Bioorganization Forum 2019, Seoul (Korea), July 2019.

T. Kosugi, “Allosteric Regulation of V1-ATPase by Designing Walker Motif in Non-catalytic Interface”, 2nd Tokyo ATPase Workshop, Tokyo (Japan), September 2019.

H. Yamada, K. Nakamura, T. Kosugi, N. Koga, “De novo design of ATP-binding protein with two-domain structure”, 2nd Tokyo ATPase Workshop, Tokyo (Japan), September 2019.

N. Kobayashi, N. Koga, “Toward creation of artificial proteins self-assembling into diverse symmetric structures: computational design and experimental”, The 1st International Symposium on Molecular Engine, Chiba (Japan), January 2020.

K. Sakuma, N. Kobayashi, T. Sugiki, K. Suzuki, N. Kobayashi, T. Murata, T. Kosugi, R. Koga, N. Koga, “DESIGN OF GLOBIN-LIKE COMPLICATED FOLDS”, The Biophysical Society Annual Meeting 2020, San Diego (USA), February 2020.

S. Minami, N. Kobayashi, T. Sugiki, R. Koga, G. Chikenji, N. Koga, “EXPLORATION OF NOVEL ALPHA-BETA PROTEIN FOLDS BY DE NOVO DESIGN”, The Biophysical Society Annual Meeting 2020, San Diego (USA), February 2020.

7) 招待講演

古賀信康, “タンパク質分子の合理設計：ゼロからの創成と天然物の改造”, 酵素工学研究会 第81回講演会, 京都大学北部総合教育研究棟益川ホール, 京都, 2019年4月.

古賀信康, “Generation of de novo designed protein structure library”, 沖縄科学技術大学院大学, 沖縄, 2019年7月.

古賀信康, “合理的設計による新規タンパク質配列空間の探索”, 理化学研究所, 横浜, 2019年7月.

古賀信康, “人工タンパク質構造ライブラリーの創出”, 第71回日本生物工学会大会シンポジウム「タンパク質工学におけるドライーウエット技術融合の新展開」, 岡山, 2019年9月.

古賀信康, “De novo design protein structure library”, 金沢大学ナノ生命科学研究所, 金沢, 2019年11月.

T. Kosugi, “Design of Allosteric Site to Regulate Rotary Molecular Motor V1-ATPase”, Frontier Bioorganization Forum 2019, Seoul (Korea), July 2019.

T. Kosugi, “Allosteric Regulation of V1-ATPase by Designing Walker Motif in Non-catalytic Interface”, 2nd Tokyo ATPase Workshop, Tokyo (Japan), September 2019.

8) 学会および社会的活動

日本生物物理学会 平成27-32年度分野別専門委員：タンパク質設計・ドラッグデザイン(2015-2020). (古賀信康)

分子研研究会「New Frontier in Protein Design & Engineering」オーガナイザー、座長(岡崎)(2019.3.15). (古賀信康)

第114回国研セミナー「合理設計で探索する広大なタンパク質配列空間」(岡崎市立小豆坂小学校)講師 (2019.7.30). (古賀信康)

情報機構「タンパク質のデザイン技術—現状と今後の展望」(東京) 講師 (2019.9.13). (古賀信康)

9) 他大学での非常勤講師、客員教授

京都大学理学部 客員准教授 (古賀信康)

10) 受賞、表彰

小林直也, 井上研究奨励賞 「分子間フォールディング二量体構造人工タンパク質を用いたタンパク質ナノブロック開発による自己組織化ナノ構造の創出」, (2020年2月).

1-9 生命分子動態シミュレーション研究グループ

奥村 久士 (准教授)

伊藤 暁 (助教)

1) 専門領域：理論生物物理、理論タンパク質科学

2) 研究課題：

- a) 全長のアミロイド β ペプチドの凝集シミュレーション
- b) 赤外自由電子レーザーによるA β アミロイド線維の破壊
- c) α シヌクレインフラグメントの2量体形成過程の分子動力学シミュレーション
- d) クマムシのタンパク質RvSAHS1の構造安定性の解明

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) アルツハイマー病はアミロイド β (A β)ペプチドが球状に凝集してできたオリゴマーあるいは線維状に凝集してできたアミロイド線維が原因で引き起こされると言われている。A β ペプチドのオリゴマー構造やその形成過程は明らかになっていない。そこで我々は42アミノ酸残基からなるA β ペプチドA β 42の凝集過程を大規模分子動力学シミュレーションにより調べた。陽的な水中に32本の全長A β ペプチドを入れ、そのダイナミクスと構造変化の過程を調べた。その結果、時間が経過するにつれ分子間 β シート構造を持つ凝集体が生成された。その構造を今後解析する予定である。

b) A β ペプチドのアミロイド線維に対し赤外自由電子レーザーを照射する非平衡分子動力学シミュレーションを行った。照射するレーザーの波数をA β アミロイド線維の主鎖におけるC=O二重結合の伸縮モードと共鳴させると水素結合を形成しているN-HとC=O間の距離が離れ、アミロイド線維が破壊された。さらに破壊された後のA β ペプチドの構造を調べたところ、ヘリックス構造が多く形成されていた。この現象はこれまでの実験と一致するものである。この理由を解明するため、種々の構造に対する共鳴波数を計算したところ、ヘリックス構造だけ共鳴波数がずれており、そのためヘリックス構造だけが形成されやすくなっていることを明らかにした。

c) α シヌクレインは水溶液中で特定の構造を持たない、140残基のアミノ酸で構成される天然変性タンパク質である。凝集して繊維を形成することでパーキンソン病を引き起こすと言われている。特に α シヌクレイン繊維形成の核となる領域のフラグメントに着目し、そのフラグメント2本に対して定温定圧レプリカ置換シミュレーションを実行した。その結果、分子間反平行 β シートを形成する構造が最も存在確率が高いこと、およびその凝集過程を明らかにした。

d) クマムシは乾燥に伴い樽のような形状に移行し乾眠状態に至る。乾眠状態のクマムシは高温や低温、放射線照射などの極限環境を生き抜く能力があるが、極限環境下でクマムシの細胞が保護される仕組みは明らかでない。クマムシに発現するタンパク質RvSAHS1の構造の揺らぎがその乾眠機構に関わると考えられているため、全原子分子動力学シミュレーションを用いてRvSAHS1の構造の安定性を調べた。その結果、RvSAHS1の β バレル構造が大きく揺らぐこと、RvSAHS1のN末端にある天然変性領域が大きく

揺らぐことなどの性質を発見した。一方、良く似た構造を取るヒトの肝臓にある脂肪酸結合タンパク質ではこれらの性質は確認されなかった。RvSAHS1のこれらの性質が果たす機能を今後考察する。

4) 学術論文

M. Yamauchi, H. Okumura, “Replica Sub-permutation Method for Molecular Dynamics and Monte Carlo Simulations”, *Journal of Computational Chemistry* **40** (31), 2694-2711 (2019).

Y. Tachi, Y. Okamoto, H. Okumura, “Conformational change of amyloid- β 40 in associated with binding to GM1-glycan cluster”, *Scientific Report* **9**, 6853 (11 pages) (2019).

S. Yanaka, R. Yogo, R. Inoue, M. Sugiyama, S. G. Itoh, H. Okumura, Y. Miyanoiri, H. Yagi, T. Satoh, T. Yamaguchi, K. Kato, “Dynamic views of the Fc region of immunoglobulin G provided by experimental and computational observations”, *Antibodies* **8**, 39 (13pages) (2019).

N. Muraki, K. Ishii, S. Uchiyama, S. G. Itoh, H. Okumura, S. Aono, “Structural characterization of HypX responsible for CO biosynthesis in the maturation of NiFe-hydrogenase”, *Commun. Biol.* **2**, 385 (12 pages) (2019).

H. Okumura, S.G. Itoh, “Molecular dynamics simulations of amyloid- β (16-22) peptide aggregation at air-water interfaces”, *Journal of Chemical Physics* **151**, 095101 (12 pages) (2020).

5) 著書、総説

M. Yamauchi, Y. Mori, H. Okumura, “Molecular simulations by generalized-ensemble algorithms in isothermal-isobaric ensemble”, *Biophysical Reviews* **11**, 457-469 (2019).

山内仁喬, “定温定圧レプリカ置換法の開発と高圧下でのシニョリンの特異な振る舞い”, *アンサンブル* **21**(2), 144-150 (2019).

6) 国際会議発表リスト

H. Okumura, “All-atom molecular dynamics simulations of amyloid- β aggregates”, International Conference of Computational Methods in Sciences and Engineering 2019, Rhodos (Greece), May 2019.

H. Okumura, “Molecular dynamics simulations of proteins”, Taiwan IBC-ExCELLS MOU Workshop 2019, Taipei (Taiwan), June 2019.

H. Okumura, “Molecular dynamics simulations of full-length amyloid- β peptides”, The 23rd International Annual Symposium on Computational Science and Engineering, Chiang Mai (Thailand), June 2019.

S.G. ITOH, “Aggregation process of amyloid- β peptides by the Coulomb replica-permutation method”, The 23rd International Annual Symposium on Computational Science and Engineering, Chiang Mai (Thailand), June 2019.

H. Okumura, S.G. Itoh, “Molecular dynamics simulations of amyloid- β fragments at hydrophilic/hydrophobic interface”, 12th EPSA and 10th ICBP-IUPAP Biophysics Congress, Madrid (Spain), July 2019.

M. Yamauchi, H. Okumura, “Replica sub-permutation molecular dynamics method for protein folding”, 12th EPSA and 10th ICBP-IUPAP Biophysics Congress, Madrid (Spain), July 2019.

S.G. ITOH, H. OKUMURA, “Structural difference of A β between at a solution surface and in bulk water using molecular dynamics”, 12th EPSA and 10th ICBP-IUPAP Biophysics Congress, Madrid (Spain), July 2019.

H. Okumura, “Molecular dynamics simulations for aggregation of amyloid- β peptides”, IMS-PCOSS Bilateral Symposium, Xiamen (China), December 2019.

H. Okumura, “Molecular insight into protein aggregation by computer simulation”, 2nd International Conference on Materials Research and Innovation, Bangkok (Thailand), December 2019.

M. Yamauchi, H. Okumura, “Replica-permutation methods in isothermal-isobaric ensemble and their applications

to investigate protein stability under high-pressure condition”, 64th Annual Meeting of Biophysical Society, San Diego (USA), February 2020.

7) 招待講演

奥村久士, “Development of replica-permutation method and molecular dynamics simulations of amyloid- β aggregates”, 東京工業大学第5回北尾研セミナー, 東京, 2019年5月.

H. Okumura, “All-atom molecular dynamics simulations of amyloid- β aggregates”, International Conference of Computational Methods in Sciences and Engineering 2019, Rhodos (Greece), May 2019.

H. Okumura, “Molecular dynamics simulations of full-length amyloid- β peptides”, The 23rd International Annual Symposium on Computational Science and Engineering, Chiang Mai (Thailand), June 2019.

H. Okumura, “Molecular dynamics simulations of proteins”, Taiwan IBC-ExCELLS MOU Workshop 2019, Taipei (Taiwan), June 2019.

S.G. ITOH, “Aggregation process of amyloid- β peptides by the Coulomb replica-permutation method”, The 23rd International Annual Symposium on Computational Science and Engineering, Chiang Mai (Thailand), June 2019.

奥村久士, “分子動力学シミュレーションで見るアルツハイマー病原因物質”, 九州大学公開講演会最新化学談話シリーズ令和元年度第1回談話会, 福岡, 2019年7月.

伊藤暁, “分子シミュレーションで解き明かすアルツハイマー病に関連する生体高分子の凝集過程”, 平成31年度九州地区高分子若手研究会・夏の講演会, 北九州, 2019年7月.

奥村久士, “ α β アミロイド線維の分子動力学シミュレーション”, 第9回高分子物理学研究会, 豊田, 2019年8月.

伊藤暁, “レプリカ置換分子動力学法の生体高分子への応用”, 第9回高分子物理学研究会, 豊田, 2019年8月.

奥村久士, “各種統計アンサンブルの生成法”, 第13回分子シミュレーションスクール基礎から応用まで一, 岡崎, 2019年9月.

奥村久士, “アルツハイマー病を引き起こすタンパク質凝集体の分子動力学シミュレーション”, 広島大学放射光科学研究センターHiSORセミナー, 広島, 2019年11月.

奥村久士, “分子動力学シミュレーションで見る生体分子の構造変化: アミロイド線維の形成と赤外自由電子レーザーによる破壊”, FEL-TUS医工融合シンポジウム, 東京, 2019年11月.

奥村久士, “タンパク質凝集の分子動力学シミュレーション”, 第2回 ExCELLSシンポジウム, 岡崎, 2019年11月.

H. Okumura, “Molecular dynamics simulations for aggregation of amyloid- β peptides”, IMS-PCOSS Bilateral Symposium, Xiamen (China), December 2019.

H. Okumura, “Molecular insight into protein aggregation by computer simulation”, 2nd International Conference on Materials Research and Innovation, Bangkok (Thailand), December 2019.

8) 学会および社会的活動

分子シミュレーション学会 幹事 (奥村久士)

日本物理学会 名古屋支部役員 (奥村久士)

9) 他大学での非常勤講師、客員教授

名古屋市立大学大学院薬学研究科 客員准教授 (奥村久士)

九州大学大学院理学研究院 非常勤講師 (奥村久士)

1-10 生命分子動秩序創発研究グループ

加藤 晃一 (教授)

矢木 真穂 (助教)

谷中 冴子 (助教)

1) 専門領域： 生物物理学、生命分子科学

2) 研究課題：

- a) 生命体を構成する多様な分子素子がダイナミックに秩序形成する仕組みの探究
- b) 生命分子ネットワークが創発する高次機能のメカニズム探査と設計と制御

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 本グループが擁する構造生物学的手法を基軸に、生命創成探究センター内外の共同研究ネットワークを強化発展して生命分子の動秩序創発の仕組みを探究した。具体的には、核磁気共鳴(NMR)法およびX線結晶構造解析法に加えて、X線・中性子小角散乱法、超分子質量分析、電子顕微鏡解析、高速原子間力顕微鏡解析、計算科学的手法を統合して、生命分子集団のダイナミックな離合集散を「みる」アプローチを推進してきた。これの手法を用いて、真核生物プロテアソームの中核をなすリング構造を構成する7種類の α サブユニットの集合状態の解析を実施し、それらがヘテロ多量体を形成する構造基盤を明らかにするとともに、それらの空間配置を定める集合シャペロンの3次元構造と分子認識様式を解明した。また、シアノバクテリアの時計タンパク質の中核をなすKaiC6量体がATP加水分解と共役してKaiAと相互作用する仕組みと、KaiC上におけるKaiBの6量体形成の協同性の構造基盤を明らかにすることができた。さらに、免疫系における主要な抗体である免疫グロブリンG(IgG)が膜上における抗原認識を契機として自発的に6量体を形成し、これによって補体系第一成分と相互作用する様子を捉えることに成功した。こうした研究を通じて、IgGがFc γ 受容体と相互作用する際に、Fab領域が関与していることも明らかとなり、免疫系エフェクター機能発動の分子メカニズムの理解の進展に貢献することができた。

b) 核酸とタンパク質とならぶ“第3の生命鎖”とよばれる糖鎖の構造・機能解析も推進してきた。NMRと分子動力学(MD)シミュレーションにより糖鎖のコンフォメーション空間を探索し、それを化学的にリモデリングすることを通じて標的レクチンに対する親和性を向上するアプローチ法を確立することに成功した。さらに、実験的に裏付けられたMD計算により、IgGのFc領域の3次元構造アンサンブルを精査し、分子内における糖鎖とタンパク質の動的な相互作用ネットワークを捉えることができた。糖鎖の機能研究においては糖タンパク質の細胞内輸送と品質管理の分子機構に関する理解を深める研究成果が得られた。例えば、血液凝固第V因子および第VIII因子の分泌初期過程において、これら糖タンパク質の選別輸送を司る積荷受容体(MCFD2/ERGIC-53複合体)が特異的に認識する10アミノ酸残基からなる配列を特定することができた。この配列をエリスロポエチンのような全く別の糖タンパク質に組み込んだところ、それらの細胞内の輸送効率が顕著に向上することが判明した。この結果は、積荷受容体が認識する配列が、分泌糖タンパク質が細胞内を選別輸送される際の“パスポート”として働いていることを示すものである。

4) 学術論文

- Y. Harada, Y. Kizuka, Y. Tokoro, K. Kondo, H. Yagi, K. Kato, H. Inoue, N. Taniguchi, I. Maruyama**, “N-glycome inheritance from cells to extracellular vesicles in B16 melanomas”, *FEBS Lett* **593**, 942-951 (2019).
- T. Satoh, M. Yagi-Utsumi, K. Okamoto, E. Kurimoto, K. Tanaka, K. Kato**, “Molecular and structural basis of the proteasome subunit assembly mechanism mediated by the proteasome-assembling chaperone PAC3-PAC4 heterodimer”, *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2231 (2019).
- T. Sekiguchi, T. Satoh, E. Kurimoto, C. Song, T. Kozai, H. Watanabe, K. Ishii, H. Yagi, S. Yanaka, S. Uchiyama, T. Uchihashi, K. Murata, K. Kato**, “Mutational and combinatorial control of self-assembling and disassembling of human proteasome α subunits”, *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2308 (2019).
- Y. Yunoki, K. Ishii, M. Yagi-Utsumi, R. Murakami, S. Uchiyama, H. Yagi, K. Kato**, “ATP hydrolysis by KaiC promotes its KaiA binding in the cyanobacterial circadian clock system”, *Life Sci. Alliance* **2**, e201900368 (2019).
- S. Yanaka, R. Yogo, R. Inoue, M. Sugiyama, S.G. Itoh, H. Okumura, Y. Miyanoiri, H. Yagi, T. Satoh, T. Yamaguchi, K. Kato**, “Dynamic views of the Fc region of immunoglobulin G provided by experimental and computational observations”, *Antibodies* **8**, 39 (2019).
- R. Yogo, Y. Yamaguchi, H. Watanabe, H. Yagi, T. Satoh, M. Nakanishi, M. Onitsuka, T. Omasa, M. Shimada, T. Maruno, T. Torisu, S. Watanabe, D. Higo, T. Uchihashi, S. Yanaka, S. Uchiyama, K. Kato**, “The Fab portion of immunoglobulin G contributes to its binding to Fc γ receptor III”, *Sci. Rep.* **9**, 11957 (2019).
- R. Inoue, T. Nakagawa, K. Morishima, N. Sato, A. Okuda, R. Urade, R. Yogo, S. Yanaka, M. Yagi-Utsumi, K. Kato, K. Omoto, K. Ito, M. Sugiyama**, “Newly developed Laboratory-based Size exclusion chromatography Small-angle x-ray scattering System (La-SSS)”, *Sci. Rep.* **9**, 12610 (2019).
- R. Murakami, Y. Yunoki, K. Ishii, K. Terauchi, S. Uchiyama, H. Yagi, K. Kato**, “Cooperative binding of KaiB to the KaiC hexamer ensures accurate circadian clock oscillation in cyanobacteria”, *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4550 (2019).
- C. Cho, J. Jang, Y. Kang, H. Watanabe, T. Uchihashi, S.J. Kim, K. Kato, J.Y. Lee, J.-J. Song**, “Structural basis of nucleosome assembly by the Abo1 AAA+ATPase histone chaperone”, *Nature Commun.* **10**, 5764 (2019).
- M.L.A. De Leoz, D.L. Duewer, A. Fung, L. Liu, H.K. Yau, O. Potter, G.O. Staples, K. Furuki, R. Frenkel, Y. Hu, Z. Susic, P. Zhang, F. Altmann, C. Gruber, C. Shao, J. Zaia, W. Evers, S. Pangelley, D. Suckau, A. Wiechmann, A. Resemann, W. Jabs, A. Beck, J.W. Froehlich, C. Huang, Y. Li, Y. Liu, S. Sun, Y. Wang, Y. Seo, H.J. An, N.-C. Reichardt, J.E. Ruiz, S. Archer-Hartmann, P. Azadi, L. Bell, Z. Lakos, Y. An, J.F. Cipollo, M. Pučić-Baković, J. Štambuk, G. Lauc, X. Li, P.G. Wang, A. Bock, R. Hennig, E. Rapp, M. Creskey, T. Cyr, M. Nakano, T. Sugiyama, P.-K.A. Leung, P. Link-Lenczowski, J. Jaworek, S.J. Yang, H. Zhang, T. Kelly, S. Klapoetke, R. Cao, J.Y. Kim, H.K. Lee, J. Lee, J.S. Yoo, S.R. Kim, S.K. Suh, N. de Haan, D. Falck, G.S.M. Lageveen-Kammeijer, M. Wuhrer, R.J. Emery, R.P. Kozak, L.P. Liew, L. Royle, P.A. Urbanowicz, N. Packer, X. Song, A. Everest-Dass, E. Lattová, S. Cajic, K. Alagesan, D. Kolarich, T. Kasali, V. Lindo, Y. Chen, K. Goswami, B. Gau, R. Amunugama, R. Jones, C.J.M. Stroop, K. Kato, H. Yagi, S. Kondo, C.T. Yuen, A. Harazono, X. Shi, P. Magnelli, B.T. Kasper, L.K. Mahal, D.J. Harvey, R.M. O’Flaherty, P.M. Rudd, R. Saldova, E.S. Hecht, D.C. Muddiman, J. Kang, P. Bhoskar, D. Menard, A. Saati, C. Merle, S. Mast, S. Tep, J. Truong, T. Nishikaze, S. Sekiya, A. Shafer, S. Funaoka, M. Toyoda, P. de Vreugd, C. Caron, P. Pradhan, N.C. Tan, Y. Mechref, S. Patil, J.S. Rohrer, R. Chakrabarti, D. Dadke, M. Lahori, C. Zou, C.W. Cairo, B. Reiz, R.M. Whittal, C. Lebrilla, L.D. Wu, A. Guttman, M. Szigeti, B.G. Kremkow, K. Lee, C. Sihlbom, B. Adamczyk, C. Jin, N.G. Karlsson, J. Örnros, G. Larson, J. Nilsson, B. Meyer, A. Wiegandt, E. Komatsu, H. Perreault, E.D. Bodnar, N. Said, Y.N. Francois, E. Leize-Wagner, S. Maier, A. Zeck, A.J.R. Heck, Y. Yang, R. Haselberg, Y.Q. Yu, W. Alley, J.W. Leone, H. Yuan, S.E. Stein**, “NIST interlaboratory study on glycosylation analysis of

monoclonal antibodies: Comparison of results from diverse analytical methods”, *Mol. Cell. Proteomics* **19**, 11-30 (2020).

S. Yanaka, R. Yogo, H. Watanabe, Y. Taniguchi, T. Satoh, N. Komura, H. Ando, H. Yagi, N. Yuki, T. Uchihashi, K. Kato, “On-Membrane Dynamic Interplay between Anti-GM1 IgG Antibodies and Complement Component C1q”, *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 147 (2020).

M. Yagi-Utsumi, A. Sikdar, C. Song, J. Park, R. Inoue, H. Watanabe, R.N. Burton-Smith, T. Kozai, T. Suzuki, A. Kodama, K. Ishii, H. Yagi, T. Satoh, S. Uchiyama, T. Uchihashi, K. Joo, J. Lee, M. Sugiyama, K. Murata K. Kato, “Supramolecular tholos-like architecture constituted by archaeal proteins without functional annotation”, *Sci. Rep.* **10**, 1540 (2020).

H. Yagi, M. Yagi-Utsumi, R. Honda, Y. Ohta, T. Saito, M. Nishio, S. Ninagawa, K. Suzuki, T. Anzai, Y. Kamiya, K. Aoki, M. Nakanishi, T. Satoh, K. Kato, “Improved secretion of glycoproteins using an N-glycan-restricted passport sequence tag recognized by cargo receptor”, *Nature Commun.* **11**, 1368 (2020).

G. George, S. Ninagawa, H. Yagi, T. Saito, T. Ishikawa, T. Sakuma, T. Yamamoto, K. Imami, Y. Ishihama, K. Kato, T. Okada, K. Mori, “EDEM2 stably disulfide-bonded to TXNDC11 catalyzes the first mannose trimming step in mammalian glycoprotein ERAD”, *eLife* **9**, e53455 (2020).

T. Suzuki, S. Yanaka, T. Watanabe, G. Yan, T. Satoh, H. Yagi, T. Yamaguchi, K. Kato, “Remodeling of the oligosaccharide conformational space in the prebound state to improve lectin-binding affinity”, *Biochemistry*, in press (2020).

5) 著書、総説

M. Yagi-Utsumi, “NMR Characterization of Conformational Dynamics and Molecular Assemblies of Proteins”, *Biol. Pharm. Bull.*, **42**, 867-872 (2019).

加藤晃一, 矢木真穂, 山口拓実, “糖鎖解析技術：核磁気共鳴(NMR)法”, *糖鎖分析(日本分析化学会編)*, 丸善出版, 209-214 (2019).

植草義徳, 加藤晃一, 矢木真穂, “NMRによる糖鎖-タンパク質相互作用の解析”, *糖鎖分析(日本分析化学会編)*, 丸善出版, 246-252 (2019).

矢木宏和, 鈴木達哉, 谷中冴子, 山口拓実, 加藤晃一, “核磁気共鳴分光法と分子動力学計算を通じて観る糖鎖の動的構造とレクチンの糖鎖認識の理解”, *医学のあゆみ*, **269**, 761-767 (2019).

C. Sato, K. Kato, Y. Yamaguchi, D. Kohda, R. Kato, K.G.N. Suzuki, K. Kikuchi, G. Hirai, Y. Kizuka, K. Tanaka, Y. Nakashima, M. Setou, “Structural Biology of Glycans”, *Glycoscience: Basic Science to Applications (N.Taniguchi, T.Endo, J.Hirabayashi, S.Nishihara, K.Kadomatsu, K.Akiyoshi, and K.F.Aoki-Kinoshita ed.)*, Springer, Singapore, 35-63 (2019).

矢木宏和, 加藤晃一, “バイオ・抗体医薬品における糖鎖解析技術”, *医薬品開発における創薬スクリーニング関連技術開発*, 情報機構, 41-56 (2019).

6) 国際会議発表リスト

K. Kato, “Determinants for Glycoprotein Fates in Cells”, International Symposium on Bio-CHAINS from Single Molecules to Highly Organized Systems, Gifu (Japan), June 2019.

K. Kato, “What is ExCELLS?”, ExCELLS visit talks, Taipei (Taiwan), June 2019.

M. Yagi-Utsumi, “Biophysical characterization of environment-dependent biomolecular assemblies”, ExCELLS visit talks, Taipei (Taiwan), June 2019.

K. Kato, “Experimental and Computational Approaches for Elucidating Glycofunctional Mechanisms”, The 23rd

International Annual Symposium on Computational Science and Engineering: Expanding Your Mind, Chiang Mai (Thai), June 2019.

K. Kato, T. Suzuki, R. Yogo, M. Yagi-Utsumi, H. Yagi, T. Satoh, T. Yamaguchi, S. Yanaka, “NMR characterization of dynamic conformations and interactions of functional oligosaccharides and antibody glycoproteins”, 8th Asia-Pacific NMR Symposium, Singapore, July 2019.

S. Yanaka, R. Yogo, R. Inoue, M. Sugiyama, S. G. Itoh, H. Okumura, Y. Miyanoiri, H. Yagi, T. Satoh, T. Yamaguchi, K. Kato, “Dynamic Views of the Fc Portion of Immunoglobulin G Provided by Experimental and Computational Observations”, Frontier Bioorganization Forum 2019, Seoul (Korea), July 2019.

M. Yagi-Utsumi, S.G. Itoh, H. Okumura, K. Nishimura, K. Kato, “NMR characterization of conformational transition of amyloid- β on ganglioside membrane”, Frontier Bioorganization Forum 2019, Seoul (Korea), July 2019.

K. Kato, T. Suzuki, T. Watanabe, T. Saito, G. Yan, T. Satoh, S. Yanaka, H. Yagi, T. Yamaguchi, “Biomolecular engineering of Lewis X-containing oligosaccharides”, Frontier Bioorganization Forum 2019, Seoul (Korea), July 2019.

T. Saito, H. Yagi, C. Kuo, K.H. Khoo, K. Kato, “Deciphering the molecular code for FUT9-dependent Lewis X modification”, 25th International Symposium on Glycoconjugates, Milano (Italy), August 2019.

K. Kato, R. Yogo, H. Yagi, S. Yanaka, “Dynamic Views of Structures and Interactions of Antibodies”, The 10th Toyota RIKEN International Workshop on Science of Life Phenomena Woven by Water and Biomolecules, Nagakute (Japan), September 2019.

M. Yagi-Utsumi, K. Kato, “NMR Study of Conformational Transition of Amyloid- β on Ganglioside Membrane”, The 10th Toyota RIKEN International Workshop on Science of Life Phenomena Woven by Water and Biomolecules, Nagakute (Japan), September 2019.

M. Hiranyakorn, S. Yanaka, M. Yagi-Utsumi, K. Kato, “NMR characterization of conformational dynamics of Lys48-linked ubiquitin chains”, The 10th Toyota RIKEN International Workshop on Science of Life Phenomena Woven by Water and Biomolecules, Nagakute (Japan), September 2019.

S. Yanaka, “Experimental and computational observations of the dynamics of the Fc region of immunoglobulin G”, Satellite meeting for PF Workshop “Marriage of Computational and Experimental Techniques for Solution Small-angle Scattering”, Kumatori (Osaka), September 2019.

K. Kato, T. Suzuki, T. Watanabe, T. Saito, G. Yan, T. Satoh, S. Yanaka, H. Yagi, T. Yamaguchi, “Glycoengineering based on biomolecular science”, 2nd International Conference on Materials Research and Innovation (ICMARI), Bangkok (Thai), December 2019.

K. Kato, “Biophysical insights into dynamical protein assembly systems”, IMS - PCOSS Bilateral Symposium, Xiamen (China), December 2019.

T. Saito, H. Yagi, C.W. Kuo, K.H. Khoo, K. Kato, “Mechanism of protein-specific glycosylation modified by fucosyltransferase 9”, The 9th ExCELLS/IMS-Yonsei University Joint Workshop: “Plasma Biology and Structural Biology”, Okazaki (Japan), January 2020.

F. Umezawa, H. Yagi, K. Kato, “Biosynthesis and functions of a novel glycerol phosphate modification on α -dystroglycan”, The 9th ExCELLS/IMS-Yonsei University Joint Workshop: “Plasma Biology and Structural Biology”, Okazaki (Japan), January 2020.

M. Yagi-Utsumi, K. Kato, “Plasma modification of Amyloid β (1-40)”, The 9th ExCELLS/IMS-Yonsei University Joint Workshop: “Plasma Biology and Structural Biology”, Okazaki (Japan), January 2020.

K. Kato, “Dynamic sugar codes that determine protein functions and fates”, SOKENDAI Asian Winter School “Challenges for New Frontiers in Molecular Science: From Basics to Advanced Researches”, Okazaki (Japan), January 2020.

W. Thunchanok, M. Hiranyakorn, M. Yagi-Utsumi, K. Kato, “NMR Studies for Conformation of Liner Lys48-linked Ubiquitin Chains in Solution”, SOKENDAI Asian Winter School "Challenges for New Frontiers in Molecular Science: From Basics to Advanced Researches", Okazaki (Japan), January 2020.

Ean Wai Goh, M. Yagi-Utsumi, K. Kato, “Biophysical characterization of Cytoplasmic Abundant Heat Soluble protein”, SOKENDAI Asian Winter School "Challenges for New Frontiers in Molecular Science: From Basics to Advanced Researches", Okazaki (Japan), January 2020.

M. Yagi-Utsumi, “NMR characterization of the conformations and interactions of amyloid- β on glycolipid membrane”, 7th International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences (iPOPS 2020), Chiba (Japan), February 2020.

7) 招待講演

K. Kato, “Determinants for Glycoprotein Fates in Cells”, International Symposium on Bio-CHAINS from Single Molecules to Highly Organized Systems, Gifu (Japan), June 2019.

K. Kato, “What is ExCELLS?”, ExCELLS visit talks, Taipei (Taiwan), June 2019.

M. Yagi-Utsumi, “Biophysical characterization of environment-dependent biomolecular assemblies”, ExCELLS visit talks, Taipei (Taiwan), June 2019.

加藤晃一, 白瀧千夏子, “生命創成探究センター(ExCELLS)の共同利用研究”, 第19回日本蛋白質科学会年会/第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会, 神戸, 2019年6月.

K. Kato, “Experimental and Computational Approaches for Elucidating Glycofunctional Mechanisms”, The 23rd International Annual Symposium on Computational Science and Engineering: Expanding Your Mind, Chiang Mai (Thai), June 2019.

K. Kato, T. Suzuki, R. Yogo, M. Yagi-Utsumi, H. Yagi, T. Satoh, T. Yamaguchi, S. Yanaka, “NMR characterization of dynamic conformations and interactions of functional oligosaccharides and antibody glycoproteins”, 8th Asia-Pacific NMR Symposium, Singapore, July 2019.

S. Yanaka, R. Yogo, R. Inoue, M. Sugiyama, S. G. Itoh, H. Okumura, Y. Miyanoiri, H. Yagi, T. Satoh, T. Yamaguchi, K. Kato, “Dynamic Views of the Fc Portion of Immunoglobulin G Provided by Experimental and Computational Observations”, Frontier Bioorganization Forum 2019, Seoul (Korea), July 2019.

M. Yagi-Utsumi, S.G. Itoh, H. Okumura, K. Nishimura, K. Kato, “NMR characterization of conformational transition of amyloid- β on ganglioside membrane”, Frontier Bioorganization Forum 2019, Seoul (Korea), July 2019.

K. Kato, T. Suzuki, T. Watanabe, T. Saito, G. Yan, T. Satoh, S. Yanaka, H. Yagi, T. Yamaguchi, “Biomolecular engineering of Lewis X-containing oligosaccharides”, Frontier Bioorganization Forum 2019, Seoul (Korea), July 2019.

加藤晃一, “令和初めての夏に想う、抗体のNMRから学んだこと”, 第20回若手NMR研究会, 蒲郡, 2019年8月.

谷中冴子, “抗体の構造研究から学ぶ、研究者ってどんな職業?”, 中高生のための未来教室 - ホンネで語るライフサイエンスの道!, 東京, 2019年9月.

K. Kato, R. Yogo, H. Yagi, S. Yanaka, “Dynamic Views of Structures and Interactions of Antibodies”, The 10th Toyota RIKEN International Workshop on Science of Life Phenomena Woven by Water and Biomolecules, Nagakute (Japan), September 2019.

S. Yanaka, “Experimental and computational observations of the dynamics of the Fc region of immunoglobulin G”, Satellite meeting for PF Workshop “Marriage of Computational and Experimental Techniques for Solution Small-angle Scattering”, Kumatori (Osaka), September 2019.

加藤晃一, “物質と生命をつなぐ分子のオーケストレーション”, 第3回 J-PARC国際シンポジウム「宇宙・物質・生命の起源を求めて」市民公開講座, つくば, 2019年9月.

M. Yagi-Utsumi and K. Kato, “Biophysical characterization of environment-dependent protein assemblies of physiological and pathological interest,” 第57回 日本生物物理学会年会, 宮崎, 2019年9月.

K. Kato, “Lessons Learned from Antibody NMR,” Prof. Yoji Arata memorial session, The 58th Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan, Kawasaki, 2019年11月.

矢木真穂, “アルツハイマー病の解明を目指したNMR構造研究”, 東京大学社会連携講座: 革新分子構造解析講座 公開シンポジウム —低分子からタンパク質まで, 統合分子構造解析—, 東京, 2019年11月.

矢木真穂, “古細菌タンパク質の高次構造多型の解析”, 2019年度 第1回 中性子構造生物学研究会, 東京, 2019年11月.

K. Kato, T. Suzuki, T. Watanabe, T. Saito, G. Yan, T. Satoh, S. Yanaka, H. Yagi, T. Yamaguchi, “Glycoengineering based on biomolecular science”, 2nd International Conference on Materials Research and Innovation (ICMARI), Bangkok (Thai), December 2019.

K. Kato, “Biophysical insights into dynamical protein assembly systems”, IMS - PCOSS Bilateral Symposium, Xiamen (China), December 2019.

K. Kato, “Dynamic sugar codes that determine protein functions and fates”, SOKENDAI Asian Winter School "Challenges for New Frontiers in Molecular Science: From Basics to Advanced Researches", Okazaki (Japan), January 2020.

M. Yagi-Utsumi, “NMR characterization of the conformations and interactions of amyloid- β on glycolipid membrane”, 7th International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences (iPOPS 2020), Chiba (Japan), February 2020.

8) 学会および社会的活動

学協会役員等

日本バイオイメーキング学会 理事 (2012-). (加藤晃一)

日本生化学学会 代議員 (2005-). (加藤晃一)

日本糖質学会 理事 (2013-). (加藤晃一)

日本核磁気共鳴学会 会長 (2018-). (加藤晃一)

日本蛋白質科学会 理事 (2015-). (加藤晃一)

日本糖鎖科学コンソーシアム 常任幹事 (2016-). (加藤晃一)

学会の組織委員等

国際磁気共鳴学会2021(ISMAR2021)実行委員 (2018-). (加藤晃一)

文部科学省、学術振興会、大学共同利用機関等の委員等

日本学術振興会 科学研究費委員会専門委員 (2009-). (加藤晃一)

大阪大学蛋白質研究所専門委員会委員 (2014-). (加藤晃一)

大阪大学蛋白質研究所「共同利用・共同研究」委員会超高磁場NMR共同利用・共同研究専門部会委員 (2012-). (加藤晃一)

公益財団法人水谷糖質科学振興財団 選考委員 (2016-). (加藤晃一)

日本学術会議 連携会員 (2017-). (加藤晃一)

先端科学(FoS)シンポジウム事業委員会委員 (2018-). (加藤晃一)

学会誌編集委員

Open Glycoscience, Editorial board member (2008-). (加藤晃一)

Glycoconjugate Journal, Editorial board member (2009-). (加藤晃一)

World Journal of Biological Chemistry, Editorial board member (2010-). (加藤晃一)

Glycobiology, Editorial board member (2011-). (加藤晃一)

Scientific Reports, Editorial board member (2015-). (加藤晃一)

International Journal of Molecular Sciences, Editorial board member (2017-). (加藤晃一)

産学連携

産業技術総合研究所 「酵母発現系での糖タンパク質の生産法」(加藤晃一)

大陽日酸株式会社 「タンパク質の安定同位体標識技術の開発」(加藤晃一)

東ソー株式会社 「単一糖鎖結合抗体のFcRへの結合性解析」(加藤晃一)

9) 他大学での非常勤講師、客員教授

名古屋市立大学薬学部, 大学院薬学研究科, 特任教授, 2008年4月-. (加藤晃一)

国立長寿医療研究センター認知症先進医療開発センター, 客員研究員, 2011年4月-. (加藤晃一)

10) 受賞、表彰

齋藤泰輝, 第1回日本糖質学会優秀講演賞 (2019年8月).

本田怜奈, 第21回日本糖質学会ポスター賞 (2019年8月).

柚木康弘, 第26回 日本時計生物学会学術大会 優秀ポスター賞 (2019年10月).

梅澤芙美子, 第3回 Glycolleague 優秀発表賞 (2019年11月).

齋藤泰輝, 令和元年度日本生化学会中部支部支部長賞 (2020年3月).

1-11 定量生物学研究グループ

青木 一洋 (教授)

近藤 洋平 (助教)

後藤 祐平 (助教)

四宮 愛 (特任助教)

1) 専門領域：細胞生物学、分子生物学、生化学、システム生物学、非平衡物理学

2) 研究課題：

a) 細胞内シグナル伝達系の可視化法の開発

b) 細胞内シグナル伝達系の定量法の開発

c) 細胞内シグナル伝達系の摂動技術の開発

3) 研究活動の概略と主な成果：

細胞は、細胞外からの刺激を感知し、「細胞内シグナル伝達系」と呼ばれるシステムによって情報処理し、適応的な表現型を出力することで恒常性を維持している。我々の研究グループは、細胞内シグナル伝達系を定量的に理解することを目的として研究している。哺乳類培養細胞や分裂酵母、線虫の細胞内シグナル伝達系を蛍光イメージングにより可視化、定量化、操作することで、細胞内シグナル伝達系の情報処理特性を理解し、悪性腫瘍といった病態を制御したいと考えている。

a) 【細胞内シグナル伝達系の可視化法の開発】

我々は蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の原理に基づくバイオセンサーを開発し(Komatsu, MBoc, 2011; Miura, Cell Struct Funct, 2014)、細胞内シグナル伝達系を可視化してきた。しかしながら、FRETバイオセンサーを用いた場合、2種類以上の分子の活性を可視化することは技術的に難しい。このような問題に対処するために、我々は単色でキナーゼ活性を測定することができるバイオセンサー、Kinase translocation reporter (KTR)と呼ばれるキナーゼバイオセンサーを開発してきた(Regot, Cell, 2014; Maryu, Cell Struct Funct, 2018)。これは、標的とするキナーゼによってリン酸化される配列にNES(核外移行シグナル)とNLS(核内移行シグナル)を付与し、リン酸化によってNESとNLSの活性のバランスが変化することでKTRセンサーの核内核外移行からキナーゼ活性を測定するという原理である。これを利用して、当研究グループの三浦は、ストレス活性化型MAPキナーゼであるp38とJNKの活性を多重可視化するシステムを開発した。これは、p38-KTRの開発に加えて既報のJNK-KTRを組み合わせ、1細胞レベルでp38からJNKへの強い負のフィードバックがあることを定量的に示した。さらにUV刺激による細胞死誘導の際、p38からJNKのフィードバックが強い細胞はアポトーシスから回避すること、このフィードバック反応が細胞の生死を決めるスイッチの役割をしていることを発見した(Miura, Cell Reports, 2018)。

b) 【細胞内シグナル伝達系の定量法の開発】

細胞内シグナル伝達系のシミュレーションモデルを作る上で、定量的な反応パラメーター(タンパク質濃度、解離定数、酵素反応速度など)の用いることは予測可能性を上げるためには必須である。しかしな

から、シグナル伝達系の反応パラメーターは現状ではほとんど測定されていない。そこで、CRISPR/Cas9を用いて蛍光タンパク質遺伝子をノックインし、内在性のタンパク質濃度や解離定数を測定するための手法を開発した。CRISPR/Cas9を用いて、蛍光タンパク質遺伝子を効率よくノックインするためのドナーベクターを開発した。さらにMAPK1遺伝子とRSK2遺伝子にそれぞれGFP、HaloTag遺伝子をノックインし、蛍光相関分光法(FCS)と蛍光相互相関分光法(FCCS)を用いてそれぞれの遺伝子産物の内在性のタンパク質濃度と解離定数を測定することに成功した(Komatsubara, JBC,2019)。

c) 【細胞内シグナル伝達系の摂動技術の開発】

細胞内シグナル伝達系の動態と表現型の因果関係を直接的に検証するためには、シグナル伝達系の操作や摂動技術が必要不可欠である。我々は化合物や光遺伝学の手法を用いてシグナル伝達系の操作・摂動技術の開発とその応用を行ってきた(Aoki, JCB, 2007; Aoki, Mol Cell, 2013)。とくに、赤色/近赤外光により細胞内シグナル伝達系を時空間的に制御する手法の開発に取り組んでいる。赤色/近赤外光に応答し、結合/乖離するPhytochrome B (PhyB) - PIF二量体化系は、Phycocyanobilin(PCB)などの発色団が必要であるが、光合成生物以外にPCBは細胞内に存在しないため、外部から添加する必要があった。最近、当研究グループでは、シアノバクテリア由来のPCB合成にかかわる4遺伝子を哺乳類培養細胞のミトコンドリア内に発現させると、PCBが合成できることを報告した(Uda, PNAS, 2017)。そこでこのPCB合成系をPCBが容易に浸透しない分裂酵母や線虫に適用した。どちらにおいてもPCB合成酵素遺伝子の導入によりPCB合成を確認している。また、分裂酵母においてPhyB-PIF系を利用したスピンドルアセンブリチェックポイントの光操作に成功している。線虫では、塩感受性神経においてシグナル伝達系を光操作し、可塑性を作り出すことができるか検討している。

4) 学術論文

A. Komatsubara, Y. Goto, Y. Kondo, M. Matsuda, K. Aoki, “Single-cell quantification of the concentrations and dissociation constants of endogenous proteins”, *The Journal of Biological Chemistry* **294**, 6062-6072 (2019).

H. Yagi, M. Yagi-Utsumi, R. Honda, Y. Ohta, T. Saito, M. Nishio, S. Ninagawa, K. Suzuki, T. Anzai, Y. Kamiya, K. Aoki, M. Nakanishi, T. Satoh, K. Kato, “Improved secretion of glycoproteins using an N-glycan-restricted passport sequence tag recognized by cargo receptor”, *Nature Communications* **11(1)**, 1368 (2020).

A. Nakamura, C. Oki, K. Kato, S. Fujinuma, G. Maryu, K. Kuwata, T. Yoshii, M. Matsuda, K. Aoki, S. Tsukiji, “Engineering orthogonal, plasma membrane-specific SLIPT systems for multiplexed chemical control of signaling pathways in living single cells”, *ACS Chemical Biology*, in press (2020).

5) 著書、総説

青木一洋, “ERK MAPキナーゼによる細胞増殖と細胞集団運動の制御”, *生化学* **91**, 73-80 (2019).

近藤洋平, “動く組織の力学特性を測る”, *生体の科学 特集 メカノバイオロジー* **70**, 284-289 (2019).

後藤祐平, 青木一洋, “赤色光/遠赤色光による哺乳類培養細胞のシグナル伝達系の光操作”, *生物物理* **59**, 327-329 (2019).

青木一洋, “フィトクロム B を用いた赤色光 / 遠赤色光による細胞内シグナル伝達系の光操作”, *光学* **49**, 14-19 (2020).

6) 国際会議発表リスト

K. Aoki, “Live-cell quantification of the concentration and dissociation constant of endogenous proteins by a combination of CRISPR/Cas9 genome editing and FCS/FCCS.”, *Interface between Immunology & Quantitative*

Biology, Tokyo (Japan), May 2019.

Y. Kondo, Y. Goto, K. Aoki, “Stochastic dynamics of expression of multidrug resistance transporter and growth at single-cell level”, EMBO Workshop on fission yeast 10th international meeting, Barcelona (Spain), September 2019.

K. Aoki, “Optical control of cell signaling in human cells, fission yeast, and worms”, International Conference for Systems Biology, Okinawa (Japan), October 2019.

K. Aoki, “Visualization and manipulation of cell signaling”, The 2nd NIBB-Princeton Joint Symposium Imaging and Quantitative Biology, Okazaki (Japan), October 2019.

7) 招待講演

K. Aoki, A. Komatsubara, Y. Goto, Y. Kondo, “Live-cell quantification of endogenous protein interactions by genome editing technique and fluorescence cross-cor”, 第71回細胞生物学会年次大会, 神戸, 2019年6月.

K. Aoki, “Live-cell quantification of the concentration and dissociation constant of endogenous proteins by a combination of CRISPR/Cas9 genome editing and FCS/FCCS.”, Interface between Immunology & Quantitative Biology, Tokyo (Japan), May 2019.

青木一洋, “細胞内シグナル伝達系の可視化、定量化、光操作”, 大阪大学蛋白質研究所セミナー がん研究の新機軸, 吹田, 2019年7月.

青木一洋, “生細胞イメージングによる細胞内シグナル伝達系の可視化、定量化、操作”, 第9回光科学異分野横断萌芽研究会, 京都, 2019年8月.

青木一洋, “生細胞イメージングによるJNK活性の細胞間不均一性と確率的な細胞死の可視化”, 第92回日本生化学会大会, 横浜, 2019年9月.

青木一洋, “遺伝子技術と生細胞イメージングによる内在性分子濃度と解離定数の定量化”, 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 神戸, 2019年9月.

青木一洋, “細胞内シグナル伝達系の可視化・定量化から見えてきた 分子夾雑の効果”, 新学術領域「分子夾雑の生命化学」第2回関東シンポジウム, 東京, 2019年10月.

K. Aoki, “Visualization and manipulation of cell signaling”, The 2nd NIBB-Princeton Joint Symposium Imaging and Quantitative Biology, Okazaki (Japan), October 2019.

A. Kazuhiro, “Quantification and manipulation of cell signaling by live cell imaging”, 第42回日本分子生物学会年会, 福岡, 2019年12月.

8) 学会および社会的活動

日本細胞生物学会(理事) (青木一洋)

日本生物物理学会(編集員) (青木一洋)

定量生物学の会(世話人) (青木一洋)

9) 他大学での非常勤講師、客員教授

名古屋大学大学院薬学研究科 客員教授(創薬生命科学特別講義II) (青木一洋)

1-12 認知ゲノム研究グループ

郷 康広 (特任准教授)

- 1) 専門領域：ゲノム科学、神経科学
- 2) 研究課題：
 - a) 医学研究に資する霊長類モデル動物開発にむけた実験動物学的研究
 - b) 「ヒトとは何か？」を明らかにする進化人類遺伝学的研究
 - c) ゲノムや細胞の「個性」を定量化する技術開発

3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) 医学研究に資する霊長類モデル動物開発にむけた実験動物学的研究

ヒト精神・神経疾患の霊長類モデル動物の開発のために、マカクザルとマーモセットを対象とした実験的認知ゲノミクス研究を行った。ヒト精神・神経疾患関連遺伝子(約500遺伝子)を解析対象とし、マカクザル831個体、マーモセット1,328個体を対象とした遺伝子機能喪失(Loss-of-Function:以下LoF)変異保有個体の同定を行った。その結果、マカクザルでは53遺伝子、マーモセットでは142遺伝子において、精神・神経疾患との関連性が非常に高い遺伝子において希な(集団アレル頻度5%以下)LoF変異を持つ可能性のある個体を同定した。

また、霊長類脳の構造・機能をささえる分子基盤解明にむけたマーモセットマイクロレベルの全脳遺伝子発現動態解析を行った。マーモセット新鮮凍結脳試料を用い、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法により微小領域からの細胞の回収を行った。大脳基底核、海馬体、扁桃核、前頭前野背外側部、前帯状皮質、中側頭回、一次運動野、一次体性感覚野、一次視覚野を対象領域とし、次世代シーケンサーによる比較トランスクリプトーム解析を行い、論文投稿準備中である。

また、認知ゲノミクス共同研究の一環としてマカクザルにおける高磁場MRIを用いた霊長類コネクトームに関する論文を発表した(Autio et al. 2020 NeuroImage, in press)。

- b) 「ヒトとは何か？」を明らかにする進化人類遺伝学的研究

「ヒトとは何か？」を明らかにするためにヒト以外の霊長類におけるゲノム・トランスクリプトーム解析を行った。

ゲノム解析としては、ヒト以外で未だゲノム配列未決定の霊長類種の新規ゲノム解読によるゲノム情報の整備を行った。具体的には、チンパンジーの亜種であるヒガシチンパンジー、テナガザル3種、ニホンザル、スローロリスの新規ゲノム解読、遺伝子情報の整備を行うとともに、それら大規模情報を公共データベースに登録・公開した。それらの成果の一部として、ヒトの染色体進化に関する論文を発表した(Hirai et al. 2019 Cytogenetic and Genome Research)。

トランスクリプトーム解析としては、ヒトと非ヒト霊長類の死後脳を用いた複数脳領域における比較遺伝子発現解析を行った。具体的には、一分子長鎖シーケンサーを用いたアイソフォームレベルの完全長転写産物の種間(ヒト、チンパンジー、ゴリラ)比較を行い、論文投稿準備中である。また、細胞の個性を単一細胞ごとに定量化するための技術開発を行った。数万の単一細胞の遺伝子発現情報を網羅的に取得できる技術開発を推進した。対象とする細胞種として、免疫系、神経系などを中心として、単一細胞レ

ベルでの遺伝子発現情報を取得する実験および解析系を構築することに成功した。

c) ゲノムや細胞の「個性」を定量化する技術開発

生物の個性や多様性創出のみなもとであるゲノムや細胞の差(個性)を定量化する技術開発を行った。具体的には、ヒト以外の霊長類、哺乳類、脊椎動物でゲノム情報が整備されていない非モデル生物に関して、新規ゲノム解読によるゲノム情報の整備を行った。

また、細胞の個性を単一細胞ごとに定量化するための技術開発を行った。数万の単一細胞の遺伝子発現情報を網羅的に取得できる技術開発を推進した。対象とする細胞種として、免疫系、神経系などを中心としてヒト、霊長類、マウス、鳥類などの動物を対象として、単一細胞レベルでの遺伝子発現情報を取得する実験および解析系を構築することに成功した。

4) 学術論文

H. Hirai, Y. Go, Y. Hirai, G. Rakotoarisoa, J. Pamungkas, S. Baicharoen, I. Jahan, D. Sajuthi, A.J. Tosi, “Considerable Synteny and Sequence Similarity of Primate Chromosomal Region VIIq31.”, *Cytogenet Genome Res* **158(2)**, 88-97 (2019).

T. Kishida, Y. Go, S. Tatsumoto, K. Tatsumi, S. Kuraku, M. Toda, “Loss of olfaction in sea snakes provides new perspectives on the aquatic adaptation of amniotes.”, *Proc Biol Sci* **286(1910)**, 20191828 (2019).

K. Hori, K. Yamashiro, T. Nagai, W. Shan, S. Egusa, K. Shimaoka, Y. Go, S. Tatsumoto, M. Yamada, R. Shiraishi, K. Kanno, S. Miyashita, A. Sakamoto, M. Abe, K. Sakimura, M. Sone, Ka. Sohya, H. Kunugi, K. Yamada, M. Hoshino, “AUTS2 regulation of synapses for proper synaptic inputs and social communication”, *bioRxiv* (2019).

J. Autio, M. Glasser, T. Ose, C. Donahue, M. Bastiani, M. Ohno, Y. Kawabata, Y. Urushibata, K. Murata, K. Nishigori, M. Yamaguchi, Y. Hori, A. Yoshida, Y. Go, T. Coalson, S. Jbabdi, S. Sotiropoulos, S. Smith, D. VanEssen, T. Hayashi, “Towards HCP-Style Macaque Connectomes: 24-Channel 3T Multi-Array Coil, MRI Sequences and Preprocessing”, *NeuroImage*, in press (2020).

5) 著書、総説

郷康広, “心の進化を語ろう : : 比較認知科学からの人間探究”, 松沢哲郎(編), 岩波書店, 200-201 (2019).

6) 国際会議発表リスト

T. Hayakawa, S. Tatsumoto, T. Kishida, H. Suzuki, H. Ishikawa, M. Nikaido, Y. Go, “Life slowly, life in the dark – insight from slow loris genome”, The 11th International Symposium on Primatology and Wildlife Science, Kyoto (Japan), April 2019.

Y. Go, “Spatiotemporal brain transcriptome architecture and application for disease model in primates”, Frontier Bioorganization Forum 2019, Seoul (Korea), July 2019.

Y. Go, “Quantitative assessment of brain transcriptome dynamics in primate neuropsychiatric disease model”, The 2nd NIBB-Princeton Joint Symposium "Imaging and Quantitative Biology, Okazaki (Japan), October 2019.

7) 招待講演

T. Hayakawa, S. Tatsumoto, T. Kishida, H. Suzuki, H. Ishikawa, M. Nikaido, Y. Go, “Life slowly, life in the dark – insight from slow loris genome”, The 11th International Symposium on Primatology and Wildlife Science, Kyoto (Japan), April 2019.

郷康広, “マーモセットにおける遺伝的多様性解析および精神・神経疾患関連遺伝子解析”, AMEDセミナー, 日本医療研究開発機構, 東京, 2019年6月.

Y. Go, “Spatiotemporal brain transcriptome architecture and application for disease model in primates”, Frontier Bioorganization Forum 2019, Seoul (Korea), July 2019.

Y. Go, “Quantitative assessment of brain transcriptome dynamics in primate neuropsychiatric disease model”, The 2nd NIBB-Princeton Joint Symposium "Imaging and Quantitative Biology, Okazaki (Japan), October 2019.

郷康広, “マーモセットにおける遺伝的多様性解析および精神・神経疾患関連遺伝子解析”, 第9回日本マーモセット研究会, 神戸, 2020年2月.

松本惇平, 西条寿夫, 三村喬生, 井上謙一, 郷康広, 柴田智広, “神経科学における動物用マーカーレスモーションキャプチャーの活用”, 第97回日本生理学会大会, 大分, 2020年3月.

8) 学会および社会的活動

日本神経科学学会将来計画委員 (郷康広)

日本霊長類学会会計監査 (郷康広)

日本霊長類学会評議員 (郷康広)

日本霊長類学会編集幹事 (郷康広)

1-13 バイオフォトンクス研究グループ

根本 知己 (教授)

榎木 亮介 (准教授)

大友 康平 (助教)

堤 元佐 (特任助教)

石井 宏和 (特任助教)

1) 専門領域： バイオイメーキング、神経科学、細胞生理学

2) 研究課題：

a) 非線形光学過程を用いた新規バイオイメーキングの高度化

b) 生物時計の神経基盤に関する研究

3) 研究活動の概略と主な成果：

本研究グループは本年度10月1日より、国立大学法人北海道大学電子科学研究所生命科学研究部門光細胞生理研究分野から、教授・根本知己、准教授・榎木亮介、助教・大友康平が、同所ニコンイメーキングセンターから、センター長(兼任)・根本知己、特任助教・堤元佐が異動し、生理学研究所・基盤神経科学研究領域・バイオフォトンクス研究部門を兼ね発足した。また、北海道大学において指導していた大学院生については、北海道大学大学院情報科学院・情報科学研究科研究指導委託を受け、生理学研究所特別共同利用研究員として6名の大学院生の研究指導に当たることとなった。現在、研究部門の立ち上げに注力しているが、今後速やかに研究を再開し、先端的な光レーザー技術や光学材料を駆使した独自のイメーキング手法の開発を通じ、世界最深部の断層観察が可能な多光子顕微鏡や超解像顕微鏡を用いた脳・神経回路、生体リズムなどの生命機能の創発原理と分子基盤の理解を目指す所存である。以下に、発足(10月1日)より3月31日までの主な成果について記す。

a) 非線形光学過程を用いた新規バイオイメーキングの高度化

現在早急に実験を再開すべく、北海道大学電子科学研究所より移設した機器のセットアップ作業を鋭意継続している。2光子励起過程を用いたバイオイメーキングの高度化については、*in vivo*イメーキングにおけるオープンスカル法の改善を目指し、東海大学工学部・岡村陽介准教授のグループと、新規ナノ薄膜材料「ナノシート」を用いて新規イメーキング手法の共同研究開発を実施した。特に、カバーガラスに代替しプレパラートを作成する手法を完成し、対物レンズの作動距離を著しく向上させることに成功した。原著論文としてその成果を報告した(*PLoS ONE*, 2020)。また、大友、石井、根本は「光アライアンス」誌に解説記事を執筆した(光アライアンス、2020)。

一方、2光子超解像顕微鏡に関する研究も継続し、大阪大学大学院薬学系研究科・有澤光弘教授らと、新規2光子STED顕微鏡法に適した新規有機小分子蛍光プローブの探索、開発評価を共同して実施した。その結果、2光子吸収断面積に優れたいくつかの有望な新規分子の宝庫の作成に成功し、その成果を原著論文として報告した(*ACS Omega*, 2020)。また、石井、大友、根本は「応用物理学会フォトンクスニュー

ス」および「光アライアンス」誌に解説記事を執筆した(応用物理学会フォトニクスニュース、2019 ; 光アライアンス、2019)。

また我々の開発したマルチビームスキャン型2光子共焦点顕微鏡を用いて、いくつかの共同研究の成果が原著論文として出版された(*Curr. Biol.*, 2019)。また蛍光の統計性を用いた超解像画像処理法の研究開発も進めており、共同研究の成果に繋がる(*J. Biochem.*, 2020)と共にその成果は国際的な顕微鏡画像のコンテストであるNikon Small Worldで受賞した(Nikon Small World)。

b) 生物時計の神経基盤に関する研究

北海道大学電子科学研究所より本研究課題を遂行するための蛍光イメージング顕微鏡4台、行動実験計測装置、電気生理計測装置などを移設した。そのうち実験の中心を成す長期タイムラプス計測システム2台のセットアップが完了した。並行して培養室、生化学室、動物飼育室を立ち上げが完了し、動物実験および遺伝子組換え実験計画書を作成し承認され、培養細胞からの長期カルシウムイメージングデータを取得するに至っている。

一方研究成果の取りまとめ作業も並行して行ってきた。哺乳類の概日リズム中枢である視交叉上核より神経細胞を単離し、微細加工技術を用いて作成したマイクロパターン基板上に作成したアイランド上に培養して、物理的に完全に孤立した神経細胞からカルシウム濃度、時計遺伝子発現を1週間にわたり蛍光/発光イメージング測定した。その結果、単一の神経細胞でも明瞭な概日リズムが観察され、さらにアストロサイトとの共培養により神経細胞の概日リズムが乱されることを見だし、その成果を原著論文として報告した(*Sci. Rep.*, 2019)。

4) 学術論文

H. Ishii, T. Tani, “Spatial organization of cortical actin alignments for the ooplasmic segregation of ascidian *Ciona* eggs”, *bioRxiv*, 849323 (2019).

T. Sasaki, M. Tsutsumi, K. Otomo, T. Murata, N. Yagi, M. Nakamura, T. Nemoto, M. Hasebe, Y. Oda, “A novel katanin-tethering machinery accelerates cytokinesis”, *Current Biology* **29(23)**, 4060-4070.e3 (2019).

A.R. Francisco, L. Qiao, Y. Fujii, K. Otomo, H. Ishii, T. Suzuki, H. Tsujino, T. Uno, Y. Tsutsumi, Y. Kawashima, T. Takagi, K. Murai, T. Nemoto, M. Arisawa, “Absorption, Fluorescence, and Two-photon Excitation Ability of 5-Phenylisolidolo[2,1-a]quinolines”, *ACS Omega* **5(5)**, 2473-2479 (2020).

H. Zhang, K. Yarinome, R. Kawakami, K. Otomo, T. Nemoto, Y. Okamura, “Nanosheet Wrapping-Assisted Coverslip-Free Imaging for Looking Deeper into a Tissue at High Resolution”, *PLoS ONE* **15(1)**, e0227650-1 - e0227650-16. (2020).

Y. Sato, K. Kamijo, M. Tsutsumi, Y. Murakami, M. Takahashi, “Nonmuscle myosin IIA and IIB differently suppress microtubule growth to stabilize cell morphology”, *Journal of Biochemistry* **167(1)**, 25-39 (2020).

5) 著書、総説

大友康平, 石井宏和, 根本知己, “透過型液晶素子を用いた二光子励起STED顕微鏡”, *応用物理学会フォトニクスニュース*, **5(4)**, 92-195 (2019).

石井宏和, 大友康平, 根本知己, “2光子励起顕微鏡法のナノイメージングへの展開”, *光アライアンス*, **38(11)**, 49-53 (2019).

大友康平, 石井宏和, 根本知己, “2光子顕微鏡法の技術開発と生物学応用”, *光アライアンス*, in press (2020).

6) 国際会議発表リスト

T. Nemoto, “Multi-photon microscopy innovated by cutting-edge light technologies”, The 2nd NIBB-Princeton Joint Symposium “Imaging and Quantitative Biology”, Okazaki (Japan), October 2019.

T. Nemoto, “Multi-photon Microscopy Improved by Resonance with Novel Optical Laser and Material Technologies”, Resonance Biology International Conference, Tokyo (Japan), October 2019.

T. Takahashi, H. Zhang, K. Yarinome, R. Kawakami, Y. Okamura, T. Nemoto, “In vivo two-photon deep and wide-field imaging utilizing novel fluoropolymer PEO-CYTOP nanosheet”, Resonance Biology International Conference, Tokyo (Japan), October 2019.

K. Yamaguchi, K. Otomo, Y. Kozawa, S. Sato, T. Nemoto, “In vivo visualization of dendritic spines in deep regions of the mouse prefrontal cortex with two-photon excitation adaptive optical microscopy”, Resonance Biology International Conference, Tokyo (Japan), October 2019.

H. Ishii, K. Otomo, T. Nemoto, “Two-photon pulsed STED nanoscopy utilizing electrically controllable components”, Resonance Biology International Conference, Tokyo (Japan), October 2019.

K. Otomo, T. Kamada, A. Goto, Y. Yamanaka, T. Nemoto, “Two-photon excitation spinning disk microscopy for multi-dimensional bioimaging”, Resonance Biology International Conference, Tokyo (Japan), October 2019.

T. Nemoto, “Multi-photon Microscopy Improved by Resonance with Novel Optical Laser and Material Technologies”, McGill – NIPS Collaborative Workshop on Multi-Scale Imaging, Physiology, and Analysis 2019, Montreal (Canada), November 2019.

T. Nemoto, “Novel Two-photon Microscopy, Utilizing Novel Optical Laser and Material Technologies”, Tohoku Forum for Creativity “Cancer – from Biology to Acceptance” International Symposium 2: New Technology for Diagnosis and Therapeutics of Cancer, Sendai (Japan), December 2019.

T. Nemoto, “Multi-Photon Microscopy Improved by Novel Optical Laser and Material Technologies”, The 13th International Symposium of Nanomedicine (ISNM2019), Kobe (Japan), December 2019.

H. Ishii, K. Otomo, J.H. Hung, M. Tsutsumi, Y. Kozawa, S. Sato, H. Yokoyama, T. Nemoto, “Two-photon nanoscopy with novel pulse laser system. UK-Japan Neuroscience Symposium”, UK-Japan Neuroscience Symposium, Edinburgh (UK), February 2020.

K. Otomo, T. Kamada, A. Goto, Y. Yamanaka, T. Nemoto, “Two-photon excitation spinning-disk confocal microscopy for visualizing higher-dimensional biological events”, ABiS International Symposium Forefront and Future of Electron Microscopic Imaging, Okazaki (Japan), February 2020.

K. Otomo, T. Nemoto, “Improvements of two-photon microscopy techniques for understanding intravital phenomena”, The 8th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer, Sendai (Japan), February 2020.

7) 招待講演

榎木亮介 「時を刻む脳～生物時計中枢を司る神経回路の光イメージング解析～」異分野融合による次世代光生物学(岡崎カンファレンスセンター) 2019年11月

根本知己 「生命機能の解明のための新規的な光・レーザー技術を用いた革新的なバイオイメージング」第2回ExCELLSシンポジウム、岡崎、2019年11月

根本知己 「最先端の顕微鏡と生体の機能」国研セミナー、岡崎、2020年1月

榎木亮介 「光計測で紐解く 生物時計中枢神経回路の作動原理」運動・行動から紐解く脳神経回路発達メカニズムの異分野融合研究による解明(生理学研究所、岡崎) 2020年2月

R. Enoki, “Visualizing Neuronal Circuits Controlling Circadian and Ultradian Rhythms in Mammals”, The 6th

International Symposium for Bioimaging, Tokyo (Japan), September 2019.

石井宏和, 谷知己, “ホヤ母性因子の極性輸送を司る細胞骨格ダイナミクス”, 日本動物学会 第90回大阪大会, 大阪, 2019年10月.

榎木亮介, “概日/超短カルシウムリズムを制御する神経回路の可視化解析”, 日本時間生物学会 (金沢大学)、シンポジウム「生物の多様な集団発振現象(共催:新学術領域研究オシロロジー)」, 札幌, 2019年10月.

根本知己, “2光子顕微鏡による生体イメージング”, JST さきがけ「光極限」領域第8回領域会議, 札幌, 2019年10月.

T. Nemoto, “Multi-photon microscopy innovated by cutting-edge light technologies”, The 2nd NIBB-Princeton Joint Symposium “Imaging and Quantitative Biology”, Okazaki (Japan), October 2019.

T. Nemoto, “Multi-photon Microscopy Improved by Resonance with Novel Optical Laser and Material Technologies”, Resonance Biology International Conference, Tokyo (Japan), October 2019.

T. Nemoto, “Multi-photon Microscopy Improved by Resonance with Novel Optical Laser and Material Technologies”, McGill – NIPS Collaborative Workshop on Multi-Scale Imaging, Physiology, and Analysis 2019, Montreal (Canada), November 2019.

大友康平, “生物イメージングのための多光子顕微技術開発”, 第7回糸状菌分子生物学研究会若手の会, 南幌町, 2019年11月.

大友康平, “レーザー走査型蛍光顕微鏡法の基礎, 光技術の応用による機能向上”, 定量生物学の会 北海道キャラバン2019, 札幌, 2019年11月.

根本知己, “新規レーザー光技術を用いた2光子顕微鏡による細胞機能イメージング”, 高分子・ハイブリッド材料研究センター2019 PHyM シンポジウム, 仙台, 2019年11月.

T. Nemoto, “Multi-Photon Microscopy Improved by Novel Optical Laser and Material Technologies”, The 13th International Symposium of Nanomedicine (ISNM2019), Kobe (Japan), December 2019.

大友康平, 根本知己, “生命現象の可視化のための二光子顕微技術開発”, 日本分光学会 令和元年度 生細胞分光部会シンポジウム, つくば, 2019年12月.

根本知己, “～時を刻む脳～ 生物時計中枢を司る 神経回路の光イメージング解析～”, 第3回医・理・工連携みらい会議, 蒲郡, 2019年12月.

根本知己, “生命機能の可視化解析に向けた多光子イメージングの展開”, The imaging frontier center symposium 2019, 野田, 2019年12月.

K. Otomo, T. Kamada, A. Goto, Y. Yamanaka, T. Nemoto, “Two-photon excitation spinning-disk confocal microscopy for visualizing higher-dimensional biological events”, ABiS International Symposium Forefront and Future of Electron Microscopic Imaging, Okazaki (Japan), February 2020.

K. Otomo, T. Nemoto, “Improvements of two-photon microscopy techniques for understanding intravital phenomena”, The 8th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer, Sendai (Japan), February 2020.

8) 学会および社会的活動

国研セミナー (根本知己)

日本バイオイメージング学会 評議委員 (根本知己)

日本分光学会生細胞分光部会 幹事 (根本知己)

国際複合医工学会、評議員 (根本知己)

日本ナノメデシン交流協会、理事・運営委員 (根本知己)

文部科学省学術調査官 (榎木亮介)

9) 他大学での非常勤講師、客員教授

北海道大学電子科学研究所 客員教授 (根本知己)

10) 受賞、表彰

S. Hiro, Y. Yamada, T. Nemoto, R. Enoki, 日本時間生物学会学術大会 優秀ポスター賞 (2019年10月).

堤元佐, Nikon Small World (2019年10月).

山口和志, 大友康平, 小澤祐市, 佐藤俊一, 根本知己, 定量生物学の会 Best Poster Award (2019年11月).

高橋泰伽, 張 宏, 川上良介, 鎗野目健二, 岡村陽介, 根本知己, 定量生物学の会 Best Poster Award (2019年11月).

1-14 発生シグナル創発研究グループ

高田 慎治 (教授)

矢部泰二郎 (助教)

三井 優輔 (助教)

1) 専門領域： 発生生物学、分子生物学

2) 研究課題：

a) 脊椎動物の形態形成を司る細胞間シグナルの空間制御に関する研究

b) 反復構造形成に着目した脊椎動物の形態形成の時空間的制御に関する研究

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 脊椎動物の組織や器官は特有の形や大きさを有する。そのような構造が秩序正しくできあがる上では、細胞間シグナルによる協調的な細胞間コミュニケーションが重要であると考えられる。組織の発生過程においては、細胞間シグナルが産生細胞から分泌され、周囲の細胞に対して働きかけるが、シグナルの拡散が如何にコントロールされるのか、またその制御機構の特性が組織や器官の形態形成にどのように反映されているのかといったことは興味深い問題であるが、未だに十分な理解が得られていない。

我々は、脊椎動物の形態形成に関わる代表的なシグナルの一つであるWntに着目し、Wntタンパク質の空間動態の解析と、それを制御する分子的要因について研究を進めている。今年度は、マウスの神経管において、Wntを産生する細胞がダイナミックに形態変化することに注目し、Wntシグナルによる細胞の形態変化の分子機構についての解析を進めた。また、産生細胞から分泌されるWntの機能のうち、オートクリン機能のみを有するマウスを作成することに成功し、その表現型の解析を進めた。

b) 脊椎動物の発生過程の初期においては、特徴的な反復構造が複数出現し、それらの持つ反復性はその後の器官形成に大きな影響を与えることが知られている。体節、鰓(咽頭弓)、脳の反復構造が代表的なものであり、本グループにおいては特に体節の反復構造の形成機構に着目して研究を進めている。

体節は動物の発生過程において中軸組織の側方部に一過的に形成される繰り返し構造であり、上皮細胞に包まれた細胞塊が数珠状に連なった構造をしている。個々の体節ユニットは、その前駆細胞である未分節中胚葉(PSM)が一定周期で区分されることにより逐次的に形成される。このような体節形成の周期性は、PSMの個々の細胞が持つ分節時計により作り出される時間情報がPSM前方部において体節の分節構造へと変換されることが知られているが、その変換機構の詳細については不明な点が多い。我々はこの変換過程において中心的な役割を果たすRipplyというタンパク質を同定し、Ripplyを中心とする遺伝子ネットワークにより如何にして分節構造が形成されるかを解明しようとしている。今年度は、ゲノム編集技術を用いた遺伝子ノックインにより蛍光タンパク質によりRipplyタンパク質を可視化できるゼブラフィッシュを作出することに成功した。このゼブラフィッシュを用いて、分節時計により作り出される時間情報が分節構造へと変換される過程の解析を進めている。

4) 学術論文

H. Ban, D. Yokota, S. Otsuka, M. Kikuchi, H. Kinoshita, Y. Fujino, T. Yabe, H. Ovara, A. Izuka, K. Akama, K. Yamasu, S. Takada, A. Kawamura, “Transcriptional autoregulation of zebrafish *tbx6* is required for somite segmentation”, *Development*, pii: dev177063 (2019).

6) 国際会議発表リスト

S. Takada, “Analysis of signaling proteins in the extracellular space”, ExCELLS Visit Talks in IBC Academia Sinica, Taipei (Taiwan), June 2019.

T. Yabe, S. Takada, “Molecular mechanisms for the positioning of somite boundaries in zebrafish”, 14th International Zebrafish Conference, Suzhou (China), June 2019.

Y. Mii, R. Takada, E. Krayukhina, C.G. Pack, Y. Sako, S. Uchiyama, M. Taira, S. Takada, “Quantitative analyses of Wnt protein dynamics in *Xenopus* embryos”, Gordon Conference “Wnt Signaling Networks in Development, Disease and Regeneration”, Mount Snow (USA), August 2019.

Y. Mii, “Two types of heparan sulfate clusters differently regulate Wnt distribution and signaling in *Xenopus* embryos”, 11th International Conference on Proteoglycans, Kanazawa (Japan), September - October 2019.

S. Takada, “Visualization and quantification of Wnt proteins in embryos”, The 2nd NIBB-Princeton Symposium “Imaging and Quantitative Biology”, Okazaki (Japan), October 2019.

T. Shinozuka, R. Takada, S. Takada, “Mechanism and significance of morphological change of Wnt-producing cells in the mouse spinal cord”, The 2nd NIBB-Princeton Symposium “Imaging and Quantitative Biology”, Okazaki (Japan), October 2019.

7) 招待講演

S. Takada, “Analysis of signaling proteins in the extracellular space”, ExCELLS Visit Talks in IBC Academia Sinica, Taipei (Taiwan), June 2019.

高田慎治, “Spatial patterns of Wnt proteins in embryonic tissues”, 理化学研究所・生命機能科学研究センター, 神戸, 2019年11月.

8) 学会および社会的活動

Wnt meeting 2020 運営委員会(オーガナイザー) (高田慎治)

日本発生生物学会会員(運営委員) (高田慎治)

1-15 植物発生生理研究グループ

川出 健介 (特任准教授)

1) 専門領域：植物発生学、植物生理学

2) 研究課題：

- a) 陸上植物の体制複雑化を促す代謝生理メカニズム
- b) 発生現象の研究にメタボローム分析を積極的に活用する共同研究活動

3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) 陸上植物の体制複雑化を促す代謝生理メカニズム

初期の陸上植物では、3次元的な組織をつくるという重要な形態進化が起こった。例えばヒメツリガネゴケでは、平面的に成長する原糸体から、茎や葉からなるシュート様の構造(茎葉体)をつくるように発生プログラムが転換する。以前の研究により、この転換を導く仕組みについてはよく調べられてきた。しかし、その後に茎葉体の形成を促す仕組みや、それを維持する、もしくは駆動する代謝生理的な基盤については、ほとんど研究されていない。これまで私たちは、シロイヌナズナにおいて細胞増殖を制御する転写コアクチベーターANGUSTIFOLIA3(AN3)のオルソログがヒメツリガネゴケで欠損した場合、茎葉体が矮化することを見いだしてきた。そこで遺伝子破壊株の茎葉体を詳細に解析したところ、細胞の増殖のみならず肥大も異常になっていることが分かった。このような発生全般への広い影響から、ヒメツリガネゴケAN3が一次代謝などの基礎的な代謝制御に関わっている可能性を考え、メタボローム分析に取り組んだ。その結果、遺伝子破壊株の茎葉体ではアルギニンの蓄積量が著しく増加していることが分かった。興味深いことに、アルギニン添加の培地で野生株を生育させた場合でも、遺伝子破壊株と同じように茎葉体が矮化する。そこで次に、アルギニン関連代謝と茎葉体形成のつながりを理解するため、RNA-seqによるトランスクリプトーム解析に取り組んだ。その結果、AN3遺伝子破壊株では、アルギニン関連代謝に関わる酵素遺伝子の発現自体は正常であることが分かった。これは、AN3による代謝制御が未知の相互作用を介してアルギニン代謝へとつながっていることを示唆する。本年度は、これら結果をまとめて論文として投稿した(Kawade et al., *submitted*)。

- b) 発生現象の研究にメタボローム分析を積極的に活用する共同研究活動

代謝制御の視点から発生現象を解明する研究を促進するため、国内外の研究グループと活発に共同研究を進めている。本年は、特に線虫における幹細胞制御に着目したメタボローム分析を行ない、特定の一次代謝産物に対する応答性の違いや、該当する変異株における代謝プロファイルを明らかにした。

4) 学術論文

T. Tomoi, K. Kawade, M. Kitagawa, Y. Sakata, H. Tsukaya, T. Fujita, “Quantitative Imaging Reveals Distinct Contributions of SnRK2 and ABI3 in Plasmodesmatal Permeability in *Physcomitrella Patens*”, *Plant and Cell Physiology*, in press (2020).

5) 著書、総説

川出健介, “代謝システムからみる植物の形づくり”, *北隆館* **5**, 49-53 (2019).

川出健介, “表皮細胞の大きさと核内倍加のサイコロゲーム”, *日本植物学会* (2019).

7) 招待講演

川出健介, “植物の幹細胞活性とアルギニン代謝を紐付ける仕組み”, 第42回 日本分子生物学会年会 (2019) ワークショップ「栄養素が支配する幹細胞」, 福岡, 2019年12月.

8) 学会および社会的活動

文部科学省科学技術政策研究所科学技術動向センター 専門調査員 (川出健介)

9) 他大学での非常勤講師、客員教授

理化学研究所 環境資源科学研究センター 代謝システム研究チーム 客員研究員 (川出健介)

1-16 生体分子相互作用計測グループ

内山 進 (客員教授)

1) 専門領域：生物物理化学(溶液物性、分子間相互作用)、構造生物学、蛋白質科学

2) 研究課題：

a) 超分子質量分析によるタンパク質複合体の解析

3) 研究活動の概略と主な成果：

超分子質量分析はタンパク質複合体のような弱い相互作用により形成された複合体の質量を正確に測ることができる手法であり、得られた複合体質量から化学量論を知ることができる。平成26年度8月の装置稼働以降、所内外の研究グループと様々な共同研究を進めてきた。令和1年度は3月27日現在、7つの研究機関と合計11件の共同研究を実施した。内訳は4件が所内、7件が所外(海外1件を含む)となっている。

4) 学術論文

Y. Yunoki, K. Ishii, M. Yagi-Utsumi, R. Murakami, S. Uchiyama, H. Yagi, K. Kato, “ATP Hydrolysis by KaiC Promotes Its KaiA Binding in the Cyanobacterial Circadian Clock System”, *Life Sci Alliance* **2(3)** (2019).

R. Murakami, K. Ishii, K. Terauchi, S. Uchiyama, H. Yagi, K. Kato, “Cooperative Binding of KaiB to the KaiC Hexamer Ensures Accurate Circadian Clock Oscillation in Cyanobacteria”, *Int J Mol Sci* **20 (18)**, 4550 (2019).

R. Yogo, Y. Yamaguchi, H. Watanabe, H. Yagi, T. Satoh, M. Nakanishi, M. Onitsuka, T. Omasa, M. Shimada, T. Maruno, T. Torisu, S. Watanabe, D. Higo, T. Uchihashi, S. Yanaka, S. Uchiyama, K. Kato, “The Fab portion of immunoglobulin G contributes to its binding to Fc gamma receptor III”, *Sci Rep* **9(1)**, 11957 (2019).

T. Uchihashi, Y. Watanabe, Y. Nakazaki, T. Yamasaki, H. Watanabe, T. Maruno, K. Ishii, S. Uchiyama, C. Song, K. Murata, R. Iino, T. Ando, “Dynamic structural states of ClpB involved in its disaggregation function”, *Nat Commun* **10(1)** 3079 (2019).

T. Sekiguchi, T. Satoh, E. Kurimoto, C. Song, T. Kozai, H. Watanabe, K. Ishii, H. Yagi, S. Yanaka, S. Uchiyama, T. Uchihashi, K. Murata, K. Kato, “Mutational and Combinatorial Control of Self-Assembling and Disassembling of Human Proteasome α Subunits”, *International Int J Mol Sci* **20(9)** (2019).

N. Muraki, K. Ishii, S. Uchiyama, S.G. Itoh, H. Okumura, S. Aono, “Structural characterization of HypX responsible for CO biosynthesis in the maturation of NiFe-hydrogenase”, *Commun Biol* **18 (2)** (2019).

A. Fujikawa, H. Sugawara, N. Tanga, K. Ishii, K. Kuboyama, S. Uchiyama, R. Suzuki, M. Noda, “A head-to-toe dimerization has physiological relevance for ligand-induced inactivation of protein tyrosine receptor type Z”, *J Biol Chem* **294(41)**, 14953 (2019).

Y.-Y. Zhan, T. Kojima, K. Ishii, S. Takahashi, Y. Haketa, H. Maeda, S. Uchiyama, S. Hiraoka, “Temperature-Controlled Repeatable Scrambling and Induced-fit Self-Sorting of Building Blocks Between Cubic Assemblies”, *Nat Commun* **10(1)**, 1440 (2019).

T. Matsui, S. Kamata, K. Ishii, T. Maruno, N. Ghanem, S. Uchiyama, K. Kato, A. Suzuki, N. Oda-Ueda, T. Ogawa, Y. Tanaka, “SDS-induced oligomerization of Lys49-phospholipase A2 from snake venom”, *Sci Rep*. **9(1)**, 2330 (2019).

M. Yagi-Utsumi, A. Sikdar, C. Song, J. Park, R. Inoue, H. Watanabe, R.N. Burton-Smith, T. Kozai, T. Suzuki, A. Kodama, K. Ishii, H. Yagi, T. Satoh, S. Uchiyama, T. Uchihashi, K. Joo, J. Lee, M. Sugiyama, K. Murata, K. Kato, “Supramolecular tholos-like architecture constituted by archaeal proteins without functional annotation”, *Sci Rep* **10(1)**, 1540 (2020).

Y. Kamiya, F. Sato, K. Murayama, A. Kodama, S. Uchiyama, H. Asanuma, “Incorporation of Pseudo-complementary Bases 2,6-Diaminopurine and 2-Thiouracil into Serinol Nucleic Acid (SNA) to Promote SNA/RNA Hybridization”, *Chem Asian J* (2020).

6) 国際会議発表リスト

S. Uchiyama, “Total design of biopharmaceuticals with high quality and safety”, 第9回AASP Conference "Impact of Rapid Changing Environment on Pharmacy Education, Practice and Pharmaceutical Sciences in Asia", Suwon (Korea), July 2019.

7) 招待講演

内山進, クラユヒナエレナ, 高田律子, 高田慎治, “蛍光超遠心分析による血清添加培地中での Wnt3a 蛋白質の相互作用解析”, 第19回蛋白質科学会WS 分子夾雑環境での蛋白質科学の新展開, 神戸, 2019年6月.

内山進, “HDX-MS”, 日本プロテオーム学会(JPrOS)/日本電気泳動学会(JES)サテライトワークショップ バイオ計測技術勉強会～実際にどうやって計測するの？プロがノウハウを教えます！～, 宮崎, 2019年7月.

S. Uchiyama, “Quantitative assessments of intermolecular protein mediated interactions in solution”, 第57回日本生物物理学会年会, 宮崎, September 2019.

8) 学会および社会的活動

日本蛋白質科学会, 理事, 編集委員 (2007年～) (内山進)

9) 他大学での非常勤講師、客員教授

徳島大学工学部 非常勤講師 (内山進)

東京大学薬学部 非常勤講師 (内山進)

1-17 核内ゲノム動態研究グループ

宮成 悠介（特任准教授）

1) 専門領域：クロマチン高次構造、転写制御、幹細胞

2) 研究課題：

- a) マウス胚発生過程におけるクロマチン動態の解析
- b) クロマチン高次構造を制御する因子の機能解析

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 精子と卵子が受精することによって、新たな生命が誕生する。生殖細胞から引き継いだゲノムDNAは機能的に同一ではなく、特に受精直後は、父方ゲノムからの遺伝子発現が活発である。その様なゲノム間の機能的な差異は、クロマチンの化学修飾や高次構造の違いによると考えられている。本研究室では、クロマチン高次構造を開発する独自の技術を開発してきた。現在、それらの技術を用いて、細胞運命決定時におけるクロマチン構造の変化を解析している。今年度は、オープンクロマチン構造を可視化する技術である *in situ* ATAC法の開発、および核内構造体とクロマチンの相互作用を解析する技術である APEX-ChIP法の開発をおこなってきた。

b) クロマチン高次構造は転写などのゲノム機能と制御する重要な因子であるが、その制御機構は明らかになっていない。本研究では、CRISPRゲノムワイドスクリーニングをおこなうことによって、クロマチン高次構造を制御する因子の同定をおこなった。その結果、新規遺伝子を複数同定することに成功しており、その遺伝子群の機能解析を網羅的におこなっている。さらに、それらの因子の発現レベルを制御することによって、細胞内のクロマチン高次構造を自在に制御し、細胞の可塑性を操作する技術を開発している。

4) 学術論文

M. Kurihara, K. Kato, C. Sanbo, S. Shigenobu, Y. Ohkawa, T. Fuchigami, Y. Miyanari, “Genomic profiling of PML bodies by ALaP-seq reveals transcriptional regulation by PML bodies through the DNMT3A exclusion”, *Molecular Cell* in press (2020).

1-18 構成生物学研究グループ

栗原 顕輔（特任准教授）

1) 専門領域： ソフトマター科学

2) 研究課題：

a) 生命起源の解明を志向した液滴型人工細胞モデルの構築

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 本研究課題は、生命起源解明の一助を担う原始細胞モデルの創成を目指し、単純な分子を出発物質としながらも化学反応の進行につれてマクロな構造体を形成する分子システムの構築を目的とした。本研究で合成した分子は、水中で還元するとペプチド生成反応を伴いながら、脱離基を主とする油滴が自発的に形成するよう設計されている。還元反応で生成した直径10マイクロメートルほどの液滴に、同じ分子を再添加した結果、液滴が繰り返し肥大・融合・分裂ダイナミクスを起こすことを共焦点顕微鏡で見いだした。この液滴型人工細胞の特徴として、液液相分離がある。実際に脂質や水溶性高分子であるRNAやDNAなどの核酸を外部より添加すると、脂質を液滴の内側領域に、核酸を液滴の外側領域に取り込み濃縮した。以上のことから、この液滴型人工細胞は、現在の細胞を構成する生体高分子を取り込み、成長と増殖が可能な原始細胞モデルと言えよう。

4) 学術論文

Y. Natsume, E. Noguchi, K. Kurihara, “Spontaneous localization of particles in giant vesicles owing to depletion force”, *Journal of the Physical Society of Japan*, **88**(3), 033001(5pages) (2019).

M. Matsuo, Y. Kan, K. Kurihara, T. Jimbo, M. Imai, T. Toyota, Y. Hirata, K. Suzuki, T. Sugawara, “DNA Length-dependent Division of a Giant Vesicle-based Model Protocell”, *Scientific Reports*, **9**, Article number: 6916 (2019).

6) 国際会議発表リスト

K. Kurihara, “Constructive biology approach to supramolecular artificial cell”, The 3rd UK-Japan Frontiers of Science Symposium (UK-Japan FoS 2019), Chiba (Japan), November 2019.

7) 招待講演

栗原顕輔, “物理学および化学的原始細胞モデルの構築”, H30年度アストロバイオロジーセンター若手分野間連携ワークショップ, 三鷹, 2019年2月.

栗原顕輔, “ペプチド合成系を内包する自己再生産分子集合体の構築”, 第19回油脂工業会館優秀論文賞受賞講演会, 品川, 2019年9月.

K. Kurihara, “Constructive biology approach to supramolecular artificial cell”, The 3rd UK-Japan Frontiers of Science Symposium (UK-Japan FoS 2019), Chiba (Japan), November 2019.

8) 学会および社会的活動

栗原顕輔, 夏目ゆうの, 松尾宗征, 岡崎市翔南中学校 職場体験学習(2019年)

1-19 生命システム構築研究グループ

佐藤 幸治（特任准教授）

1) 専門領域： 感覚生理学、細胞計測工学

2) 研究課題：

- a) 匂い受容における分子機構と、嗅粘液構成成分の機能解明
- b) 幹細胞から誘導される腸管オルガノイドのイメージング法の確立

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 嗅覚器の表面に分布する嗅神経細胞には嗅覚受容体が発現しており、匂い物質と結合した嗅覚受容体はその下流のシグナル伝達系を活性化することで、匂いの情報が高次神経中枢へと送られる。哺乳類の嗅覚受容体はGタンパク質共役型受容体に属し、ゲノム中で最大の遺伝子ファミリーを構成している。これらの受容体遺伝子や関連遺伝子を培養細胞に発現させると、人工的に嗅覚機能を再現できる。しかし、このような再構成系では受容体のリガンド選択性や感度が生体とは異なっており、生体の嗅覚器が持つ超感受性の再構成や、それらに関わる分子基盤の解明は大きな課題となっている。

そこで嗅覚器の持つ超感受性に関わる分子を明らかにし、その生理的機能を解明することを目指し、当研究部門では嗅粘液に着目し、気液界面を介した物質輸送と匂い応答に関与する物質を探索している。今年度は、生体と同様に培養細胞に気相匂い刺激を行い、その応答を測定する装置を開発した。開発した装置は微小流路と精密還流装置、パッチクランプ電流計測器と蛍光顕微鏡で構成され、ガラス電極で液層表面をスキャンすることで液厚を計測し、細胞応答をカルシウムイメージングで測定する。この装置でGPROR2という受容体の応答を測定したところ、液相と気相でメチルフェノールに対する感受性が異なることがわかり、これまでの液相刺激法では生体の感受性を再現できていないことが明らかになった。さらに液層の厚さが20 μm 増加すると匂い応答がおよそ半分になり、鼻粘液の物理的性質が匂い知覚に著しく影響することが示された。今後、気液界面を介した物質輸送に影響する細胞外物質を検討するため、本装置を利用した気液界面を介した物質移動の計測を試みている。

b) 細胞外マトリックスを用いた腸管幹細胞の三次元培養で得られる腸管オルガノイドは、生体の持つ腸管上皮細胞の機能を反映したモデル器官として注目されている。しかし細胞外マトリックスを介した薬物刺激が実現できていないため、その利用は分子生物学的な手法に留められていた。

オルガノイドを用いた細胞生理学的実験を行うためには、細胞外マトリックスを取り除いた状態で細胞を維持し、そこへ薬液投与する必要がある。これを実現するためには、オルガノイドに生体と同様な管腔構造を構築させることが有効であると考えられる。現在、微小流路を用いてオルガノイドの形態を制御する技術を開発し、オルガノイドが持つ管腔構造の内部に薬液還流を行う新規な3次元培養法の開発や、立体組織構築の制御に有用な細胞株の作製を試みている。

5) 著書、総説

佐藤幸治, “嗅覚受容体における匂い認識のメカニズム, 「においのセンシング、分析技術と可視化」”, 技術情報協会 (2020)

6) 国際会議発表リスト

S. Morinaga, K. Nagata, S. Ihara, Y. Niimura, K. Sato, K. Touhara, “A structural model for the channel pore and ligand binding sites of an insect gustatory receptor.”, European Symposium for Insect Taste and Olfaction, XVI, (Villasimius, Italy), September 2019.

7) 招待講演

佐藤 幸治, “トップダウンとボトムアップで迫る、嗅覚の分子機構”, 日本比較生理生化学会第41回東京大会, 2019年11月.

8) 学会および社会的活動

日本味と匂学会評議員 (佐藤幸治)

文部科学省科学技術・学術政策研究所専門調査員 (佐藤幸治)

1-20 生命分子動態計測グループ

内橋 貴之 (客員教授)

渡辺 大輝 (特任助教)

GANSER, Christian (特任助教)

1) 専門領域：生物物理学、原子間力顕微鏡、一分子計測

2) 研究課題：

連携課題研究

a) 高速AFM/二色蛍光顕微鏡 複合計測システムの開発

b) 生細胞観察プラットフォームの開発

c) 生細胞の機械特性マッピング機能の開発

d) 高速AFMの高解像化に向けた基盤技術開発

共同利用機器関連研究

e) 高速AFMを用いた生体分子の機能動態解析

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 高速AFM/二色蛍光顕微鏡 複合計測システムの開発

AFM単独では数種類以上のタンパク質が関与する複雑な系では目的とするタンパク質をAFM像から識別することは困難である。また、AFMでは分子全体の構造をイメージングするが、実際に動いている部分が分子構造上のどの部位に該当し得るのか特定することが困難な場合がある。一方、2種類の異なる蛍光色素でタンパク質内のアミノ酸残基を標識することで、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)により残基間の距離変化をリアルタイムで計測することが可能である。そこで、高速AFMと一分子FRETの同時計測が可能なシステムを構築し、タンパク質の構造変化の詳細を解析できる計測法を開発している。同時計測法を確立するために、プロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)や糖転移酵素LARGE等のマルチドメインタンパク質をテスト試料として、ドメイン間の距離変化の高速AFMおよびFRETでの同時観察を進めている。今年度は連携課題研究メンバーである矢木講師(名古屋市立大学)と連携し、PDI及びLARGEのFRET計測のための蛍光標識条件を検討し、FRET計測が可能な状態になった。また、高速AFMでこれらタンパク質のドメインダイナミクスを観察できることも確認した。現在、高速AFMとFRETの同時計測を進めている。

b,c) 生細胞観察プラットフォームの構築と機械特性マッピング法の開発

細胞の機械特性は細胞の様々な機能に密接に関わっていると考えられる。例えば、細胞は周辺の細胞外マトリックスの硬さを感じ、自身の増殖・分化など挙動をコントロールしている。また、細胞内部の細胞骨格タンパク質の重合・脱重合により、周囲の環境に応じて時々刻々と形態および機械特性を変えている。細胞の形態ダイナミクスに加えて細胞膜の硬さや粘弾性などの機械特性の経時変化を同時に定量化しマッピングすることができれば、細胞の機械特性ダイナミクスに基づくナノメカノバイオロジーを開拓できる。本年度は、探針走査型高速AFM/光学顕微鏡複合機で生細胞観察を行うための測定条件

の最適化を行った。連携課題研究メンバーである岡嶋教授(北海道大学)と協力し、AFM観察用基板上での細胞培養条件と細胞膜の蛍光標識の検討と蛍光顕微鏡観察のための測定条件を探索し、光学顕微鏡とステージスキャナーによるAFMで生細胞を観察できることを確認した。昨年度までに開発した“in-line-force-curve mode”を拡張し、高速AFMによる形態観察と力学特性マッピングの高速同時取得のための技術開発を行った。テスト試料としてマイカ基板上の脂質二重膜を用い、高速AFMによる膜形態と同時に、膜の硬さと凝着力などの機械特性を3秒程度の時間分解能でマッピングできるシステムを構築した。次年度に、この手法を生細胞観察に応用していく。

d) 高速AFMの高解像化に向けた基盤技術開発

高速AFMによる生体分子の高解像化は、より精細なタンパク質の構造ダイナミクス計測に不可欠である。このためには、より先鋭な探針作製方法の確立と制御回路の低ノイズ化が必須である。探針に関しては、電子ビーム堆積法で形成したカーボン探針のプラズマエッチングによる先鋭化条件及び導入ガス種の検討を行っている。現在のところ劇的な分解能の向上は未だ見られないが、従来に比べて高解像観察が可能な頻度(再現性)が向上した。また、電子回路の低ノイズ化に関しては、現在、連携課題研究メンバーである阿部教授(大阪大学)および共同研究を行っているハンガリー企業と回路の基本構成の見直しとデジタル振幅計測回路の試作機を製作中である。

e) 高速AFMを用いた生体分子の機能動態解析

ExCELLSの共同利用機器として、高速AFMを利用した生体試料系の機能動態観察に関して、国内外の研究グループとの共同研究により推進している。以下、項目ごとに個別に本年度の研究成果の概要を述べる。

i. Fc受容体と抗体Fab部分との動的相互作用解析(ExCELLS・加藤グループ)

抗体のFc部位と結合するFc受容体をマイカ基板上に固定し、溶液中にある全長抗体及びFc部位がFc受容体と結合解離する過程をリアルタイム観察した。結合解離のキネティクス解析を行った結果、Fc受容体に対する結合は、Fc部分のみに比べ、Fab部分を含む抗体全長の方が有意に強いことが明らかとなった。(論文発表済)

ii. ヘリオロドプシンの溶液中多量体構造解析(東大・濡木グループ、名工大・神取グループ)

2018年に今までのロドプシンとはアミノ酸配列が大きく異なるヘリオロドプシンが発見され、微生物由来のロドプシンと同様に7回膜貫通構造を持ち、膜に対しての向きが逆転していると予測されてきた。本共同研究では、濡木Gと神取Gがヘリオロドプシンの結晶構造解析が実施され、詳細な構造が明らかになった。高速AFMでは脂質膜に再構成したヘリオロドプシンの溶液中での多量体構造の解析を行い、生理環境に近い状態でも結晶構造と同様に二量体構造を形成し、脂質膜中を拡散している様子をあきらかにした。(論文発表済)

iii. クマムシ特異的関連タンパク質の動態観察(ExCELLS・加藤グループ、荒川グループ)

クマムシの乾眠に関与していると考えられているクマムシに特異的な可溶性タンパク質の濃度依存的な集合状態を高速AFMで解析し、CAHS(Cytoplasmic Abundant Heat Soluble)やSAHS(Secretory Abundant Heat Soluble)は溶液中濃度が臨界濃度に達すると繊維状構造を形成することが分かった。

iv. 抗細菌ペプチドによるモデル脂質膜との相互作用観察(Academia Sinica・Rita P.-Y. Chenグループ)

Chenグループで開発されている抗細菌ペプチドにより誘起される細菌表層膜の微細構造動態の観察に向けて、今年度はモデル脂質膜への作用を調べた。モデル脂質膜として大腸菌由来の基板支持脂質二重膜を用いた。脂質膜を高速AFM観察中に抗細菌ペプチドを観察溶液に添加すると、脂質膜が局所的に破壊されて穴が形成され、その穴の膜端部分から脂質膜の基板からの解離が進行していることが分かった。

次のステップとして、大腸菌表面のATP加水分解プロセスの可視化を実施する。次のステップとして、大腸菌表面の抗細菌ペプチドによる微細構造変化の観察を行う。

4) 学術論文

E. Krayukhina, M. Yokoyama, K. Kakuhou Hayashihara, T. Maruno, M. Noda, H. Watanabe, T. Uchihashi, S. Uchiyama, “An Assessment of the Ability of Submicron- and Micron-Size Silicone Oil Droplets in Dropped Prefillable Syringes to Invoke Early- and Late-Stage Immune Responses”, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **108**, 2278-2287 (2019).

K. Honda, Y. Sazuka, K. Iizuka, S. Matsui, T. Uchihashi, T. Kureha, M. Shibayama, T. Watanabe, D. Suzuki, “Hydrogel Microellipsoids that Form Robust String - Like Assemblies at the Air/Water Interface” , *Angewandte Chemie International Edition* **58**, 1-6 (2019).

T. Miyamoto, Y. Hayashi, K. Yoshida, H. Watanabe, T. Uchihashi, K. Yonezawa, N. Shimizu, H. Kamikubo, S. Hirota, “Construction of a quadrangular tetramer and a cage-like hexamer from three-helix bundle-linked fusion proteins”, *ACS Synthetic Biology* **8**, 1112-1120 (2019).

A. Sumino, T. Sumikama, T. Uchihashi, S. Oiki, “High-speed AFM reveals accelerated binding of Agitoxin-2 to K⁺ channel by induced-fit”, *Science Advances* **5**, eaax0495 (11 p) (2019).

Y. Nishizawa, S. Matsui, K. Urayama, T. Kureha, M. Shibayama, T. Uchihashi, D. Suzuki, “Non-Thermoresponsive Decanano-sized Domains in Thermoresponsive Hydrogel Microspheres Revealed by Temperature-Controlled High-Speed Atomic Force Microscopy”, *Angewandte Chemie International Edition* **58**, 8809-8813 (2019).

T. Sekiguchi, T. Satoh, E. Kurimoto, C. Son, T. Kozai, H. Watanabe, K. Ishii, H. Yagi, S. Yanaka S. Uchiyama, T. Uchihashi, K. Murata, K. Kato, “Mutational and combinatorial control of self-assembling and disassembling of human proteasome α -subunits”, *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 2608 (14 p) (2019).

S. Matsui, K. Hosho, H. Minato, T. Uchihashi, D. Suzuki, “Protein Uptake into Individual Hydrogel Microspheres Visualized by High-Speed Atomic Force Microscopy”, *Chemical Communications* **55**, 10064-10067 (2019).

R. Yogo, Y. Yamaguchi, H. Watanabe, H. Yagi, T. Satoh, M. Nakanishi, M. Onitsuka, T. Omasa, M. Shimada, T. Maruno, T. Torisu, S. Watanabe, D. Higo, T. Uchihashi, S. Yanaka, S. Uchiyama, K. Kato, “The Fab portion of immunoglobulin G contributes to its binding to Fc γ receptor III”, *Scientific Reports* **9** , 11957 (10 p) (2019).

W. Shihoya, K. Inoue, M. Singh, M. Konno, S. Hososhima, K. Yamashita, K. Ikeda, A. Higuchi, T. Izume, S. Okazaki, M. Hashimoto, R. Mizutori, S. Tomida, Y. Yamauchi, R. Abe-Yoshizumi, K. Katayama, S. P. Tsunoda, M. Shibata, Y. Furutani, A. Pushkarev, O. B  j  , T. Uchihashi, H. Kandori, O. Nureki, “Crystal structure of heliorhodopsin”, *Nature* **574**, 132-136 (2019).

C. Cho, J. Jang, Y. Kang, H. Watanabe, T. Uchihashi, S. J. Kim, K. Kato, J. Y. Lee, J. Song, “Structural basis of nucleosome assembly by the Abo1 AAA+ ATPase histone chaperone”, *Nature Communications* **10**, 5764 (13 p) (2019).

S. Yanaka, R. Yogo, H. Watanabe, Y. Taniguchi, T. Satoh, N. Komura, H. Ando, H. Yagi, N. Yuki, T. Uchihashi, K. Kato, “On-Membrane Dynamic Interplay between Anti-GM1 IgG Antibodies and Complement Component C1q”, *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 147 (12 p) (2020).

H. Tatebe, C. T. Lim, H. Konno, K. Shiozaki, A. Shinohara, T. Uchihashi, A. Furukohri, “Rad50 zinc hook functions as a constitutive dimerization module interchangeable with SMC hinge”, *Nature Communications* **11**, 370 (11 p) (2020).

M. Yagi-Utsumi, A. Sikdar, C. Song, J. Park, R. Inoue, H. Watanabe, R. N. Burton-Smith, T. Kozai, T. Suzuki,

A. Kodama, K. Ishii, H. Yagi, T. Satoh, S. Uchiyama, T. Uchihashi, K. Joo, J. Lee, M. Sugiyama, K. Murata, K. Kato, “Supramolecular tholos-like architecture constituted by archaeal proteins without functional annotation”, *Scientific Reports* **10**, 1540 (10 p) (2020).

K. Oohora, S. Hirayama, T. Uchihashi, T. Hayashi, “Construction of a Hexameric Hemoprotein Sheet and Direct Observation of Dynamic Process of its Formation”, *Chemistry Letters* **49**, 186-190 (2020).

S. Hirayama, K. Oohora, T. Uchihashi, T. Hayashi, “A Thermoresponsive Micellar Assembly Constructed from a Hexameric Hemoprotein Modified with Poly(N-isopropylacrylamide) toward an Artificial Light-harvesting System”, *Journal of American Chemical Society* **142**, 1822-1831 (2020).

A. Visootsat, A. Nakamura, P. Vignon, H. Watanabe, T. Uchihashi, R. Iino, “Single-molecule imaging analysis reveals the mechanism of a high-catalytic-activity mutant of chitinase A from *Serratia marcescens*”, *Journal of Biological Chemistry* **295**, 1915-1925 (2020).

T. Ueno, K. Niwase, D. Tsubokawa, K. Kikuchi, N. Takai, T. Furuta, R. Kawano, T. Uchihashi, “Dynamic behavior of an artificial protein needle contacting a membrane observed by high-speed atomic force microscopy”, *Nanoscale*, in press (2020).

H. Konno, T. Watanabe-Nakayama, T. Uchihashi, M. Okuda, L. Zhu, N. Kodera, Y. Kikuchi, T. Ando, H. Taguchi, “Dynamics of oligomer and amyloid fibril formation by yeast prion Sup35 observed by high-speed atomic force microscopy”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, in press (2020).

5) 著書、総説

T. Uchihashi, C. Ganser, “Recent advances in bioimaging with high-speed atomic force microscopy”, *Biophysical Review*, in press (2020).

内橋貴之, “「膜タンパク質工学ハンドブック」第1編第2章15「高速原子間力顕微鏡によるタンパク質の構造ダイナミクス解析」”, 株式会社 エヌ・ディー・エス (2020).

内橋貴之, “高速原子間力顕微鏡による生体・合成高分子の動態イメージング”, *高分子*, **68(10)**, 564-568 (2019).

6) 国際会議発表リスト

T. Uchihashi, “Nanoscale Dynamic Imaging of Biological Molecules with High-Speed Atomic Force Microscopy”, Frontier Bioorganization Forum 2019, Seoul (Korea), July 2019.

T. Uchihashi, “Real-Time Visualization of Biological Molecules at Work with High-Speed Atomic Force Microscopy”, IEEE International Conference on Manipulation, Manufacturing and Measurement on the Nanoscale 2019, Zhenjiang (China), August 2019.

T. Uchihashi, “Imaging of Single-Molecule Dynamics using High-Speed Atomic Force Microscopy”, The 2nd NIBB-Princeton Joint Symposium on Imaging and Quantitative Biology, Okazaki (Japan), October 2019.

C. Ganser, T. Uchihashi, “Kinesin transport on microtubules studied by HS-AFM”, The 2nd NIBB-Princeton Joint Symposium on Imaging and Quantitative Biology, Okazaki (Japan), October 2019.

T. Tokano, Y. Kato, S. Sugiyama, T. Noguchi, T. Uchihashi, “Dynamics of photosystem II protein complexes as observed by high-speed atomic force microscopy”, The 2nd NIBB-Princeton Joint Symposium on Imaging and Quantitative Biology, Okazaki (Japan), October 2019.

C. Ganser, K. Takeda, R. Iino, K. Kato, T. Uchihashi, “Defect creation in microtubules and kinesin motility studied by HS-AFM”, 27th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy, Shizuoka (Japan), December 2019.

7) 招待講演

内橋貴之, “高速原子間力顕微鏡と生体・人工分子のダイナミクス計測”, 第23回コロイド・界面技術者フォーラム～コロイド領域のイメージング・評価技術～, 神奈川, 2019年6月.

竹居孝二, 内橋貴之, “ダイナミンの動的分子イメージング: in vitro 再構成系×高速AFM”, ワークショップ「新しいコラボの在り方を探る～細胞生物学 x 蛋白質科学」 第19回 日本蛋白質科学会年会, 第71回 日本細胞生物学会大会 合同年次大会, 神戸, 2019年6月.

内橋貴之, “溶液中高速原子間力顕微鏡による生体・人工分子のダイナミクス解析”, シンポジウム「原子間力顕微鏡技術のパラダイムシフト～原子から細胞まで階層をまたぐ構造・機能解析～」日本顕微鏡学会 第75回学術講演会, 名古屋, 2019年6月.

内橋貴之, “高速原子間力顕微鏡の最近の生物・化学応用と技術の進展”, 生体分子計測研究所 MS-NEX発売記念セミナー, つくば, 2019年7月.

T. Uchihashi, “Nanoscale Dynamic Imaging of Biological Molecules with High-Speed Atomic Force Microscopy”, Frontier Bioorganization Forum 2019, Seoul (Korea), July 2019.

T. Uchihashi, “Real-Time Visualization of Biological Molecules at Work with High-Speed Atomic Force Microscopy”, IEEE International Conference on Manipulation, Manufacturing and Measurement on the Nanoscale 2019, Zhenjiang (China), August 2019.

T. Uchihashi, “Imaging of Single-Molecule Dynamics using High-Speed Atomic Force Microscopy”, The 2nd NIBB-Princeton Joint Symposium on Imaging and Quantitative Biology, Okazaki (Japan), October 2019.

8) 学会および社会的活動

International Journal of Molecular Sciences -Journal Editorial Board Member (Molecular Biophysics Section)

Scientific Reports, Scientific Editor (内橋貴之)

日本生物物理学会 専門委員 (内橋貴之)

日本表面真空科学会 フェロー (内橋貴之)

日本表面真空科学会中部支部 幹事 (内橋貴之)

大阪大学蛋白質研究所 外部専門委員 委員長 (内橋貴之)

9) 他大学での非常勤講師、客員教授

分子科学研究所 客員教授 (内橋貴之)

福岡大学 非常勤講師 (内橋貴之)

10) 受賞、表彰

内橋貴之, IEEE 3M Nano 2019, Best Conference Paper Award (2019年8月).

1-21 理論生物学研究グループ

本田 直樹（客員准教授）

1) 専門領域：理論生物学

2) 研究課題：

- a) 多細胞動態を司る法則のライブイメージングデータ駆動的解読
- b) ゲノムワイドな遺伝子発現の空間的パターンのscRNA-seqデータ駆動的解読
- c) 複数の行動戦略とスイッチングの行動データ駆動的解読

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) ライブイメージング技術の発展により、多細胞組織における細胞の移動や分子活性等を可視化できる時代となった。もし全ての細胞をトラッキングしつつ、それらの内部状態や外部入力を時系列として取得することができたならば、細胞が状況に応じてどのように応答することで、最終的に多細胞組織が機能しているのかを解き明かすことが原理的に可能である。しかしながら、多細胞組織動態は往々にして複雑で、イメージング動画を注意深く何度も眺めたとしても、生体内で一体何が起きているのかをヒトが認識するのは往々にして困難である。そもそもイメージングによって観測される「マクロな細胞集団レベルの現象」は、寄り集まった一つ一つの細胞が相互作用する「ミクロな細胞レベルの過程」から階層をまたいで創発されたものである。したがって、細胞集団レベルの観測結果から細胞レベルの原因を解読するためには、二つの階層をシームレスにつなぐ新しいアプローチが必要である。そこで本グループでは、細胞レベルと細胞集団レベルをつなぐ階層的モデリングの開発を行う。そして、機械学習との融合により、多細胞組織のイメージングデータから背後に存在する法則を解読することを目指す。

b) 1細胞RNAシーケンサー(scRNA-seq)の発展により、多細胞組織におけるゲノムワイドな遺伝子発現を一細胞解像度で定量するアプローチが旺盛となっている。多細胞組織に対してscRNA-seqを行うためには、組織を一つ一つの細胞に解離する必要があり、細胞の空間情報が失われてしまう問題があった。これまでの研究により、*in situ*ハイブリダイゼーション法によって既に定量化されている遺伝子の空間的発現パターンを参照することで、scRNA-seqデータから遺伝子発現の空間的パターンを再構築するアルゴリズムが提案されてきたが、実用に足る精度には至っていなかった。そこで本グループでは、scRNA-seqデータから遺伝子発現の時空間的パターンを高精度に再構成するための機械学習法の開発を行う。そして、様々な多細胞系を対象に全遺伝子の発現パターンを推定し、他のモダリティデータと比較解析することで、これまで未知であった遺伝子発現パターンが司る生命機能を明らかにすることを目指す。

c) 我々ヒトや動物は、より多くの報酬を得るため、状況に応じた行動戦略を持って生きている。特に、動的な環境において、複数の行動戦略を柔軟にスイッチングすることは環境適応にとって重要な役割を果たす。しかしながら、脳がどのように行動戦略のスイッチングを意思決定しているのかは、ほとんど分かっていない。このような行動戦略を司る神経メカニズムを明らかにするためには、神経活動の計測と同時に行動戦略を定量化することが必須である。これまで我々は、動物の行動時系列データから行動戦略を同定する機械学習法(逆強化学習)を開発してきた(Yamaguchi et al., PLoS Comput Biol, 2018)。しか

しながら、この手法では一つの行動戦略しか扱うことができなかった。そこで本グループでは、これまでの手法を拡張し、行動時系列データから、「複数の行動戦略の同定」や「戦略間の切り替わり」を推定する機械学習法の開発を行う。そして、行動戦略のスイッチングを司る神経基盤の解明を目指す。

2. 極限環境生命探査室

2-1 深海・地下生命研究グループ

高井 研（客員教授）

1) 専門領域：地球生物学、宇宙生物学

2) 研究課題：

a) 深海や海底下といった極限環境における生命(圏)の限界探査およびその条件下での生命機能のメカニズム解明

3) 研究活動の概略と主な成果：

今年度は、海洋研究開発機構の超先鋭研究開発部門の研究として、過去数年にわたる深海熱水域(Sakai et al., 2019; de Ronde et al., 2019)、マリアナ蛇紋岩海山超高アルカリ性海底下環境(Eickenbusch et al., 2019; Wheat et al., 2020; Fryer et al., 2020)、超深海海溝生命圏(Wang et al., 2019; Hiraoka et al., 2020)、および海底下堆積物環境(Pan et al., 2019; Imachi et al., 2019; Nakahara et al., 2019; Imachi et al., 2020)といった極限環境の探査を通じて、それぞれの環境条件に依存したウイルスを含む微生物生態系の組成・機能多様性についての成果を研究論文として発表した。なかでも、南海トラフ冷湧水域堆積物から12年の歳月をかけて集積培養を行い分離に成功したアスガルド古細菌は、真核生物誕生の鍵となった微生物共生のホストに最も近縁な現生古細菌であり、長らくその培養・分離に基づく形態・生理的特徴の解明が世界的な注目を集めていた研究対象であった。今回、培養・分離を通じて、細胞内小器官を持たないこと、触手のような形態的特徴を有すること、水素を介した異種微生物間共栄養性共生を必要とすることが明らかとなり、これらの性質に基づいた新しい真核生物誕生シナリオを提示することに至った(Imachi et al., 2020)。高井研は、海洋研究開発機構の超先鋭研究開発部門だけでなく、自然科学研究機構生命創成探究センター極限環境生命探査室の所属として本論文の共著者となっている。

その他、極限環境生命探査室深海・地下生命研究グループは、自然科学研究機構分野融合共同研究としての「深海生態系を織りなす生物間分子コミュニケーション:微生物生態学と生命分子構造学の融合」を進める母体ともなっている。共同研究の最終年度として、深海底熱水活動域に生息する共生微生物が有する糖鎖の特異な構造を詳細に決定することに成功したことに加え、海底下に生息する難培養性アーキアについて、生物進化学上の示唆に富む糖鎖を発見するなど、画期的な成果を得た。

4) 学術論文

H. Imachi, M.K Nobu, N. Nakahara, Y. Morono, M. Ogawara, Y. Takaki, Y. Takano, K. Uematsu, T. Ikuta, M. Ito, Y. Matsui, M. Miyazaki, K. Murata, Y. Saito, S. Sakai, C. Song, E. Tasumi, Y. Yamanaka, T. Yamaguchi, Y. Kamagata, H. Tamaki, K. Takai, “Isolation of an archaeon at the prokaryote–eukaryote interface”, *Nature* **577**, 519-525 (2020).

2-2 極限環境生命分子研究グループ

加藤 晃一（教授）〔兼任〕

矢木 真穂（助教）〔兼任〕

1) 専門領域：生物物理学、生命分子科学

2) 研究課題：

a) 極限環境において生命活動を司る分子集団の構造・動態・機能の解析

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 極限環境生命分子研究グループは、極限環境において生命活動を司る分子集団の構造・動態・機能の解析を通じて生命の環境適応の仕組みを理解するとともに、得られた知見に基づいた生物工学的な応用研究を展開することを目指している。2019年度は、超好熱古細菌の機能未知タンパク質に焦点をあてた構造研究に力を注いだ。古細菌のプロテアソームは、真核生物のものとは比べて単純な構造をしており、その形成は集合シャペロンの介助を必要としない。それにもかかわらず、古細菌は集合シャペロンとよく似たタンパク質を持っている。そうしたタンパク質の1つであるPbaAが、PF0014とよばれるやはり機能未知の古細菌タンパク質と相互作用することに着目し、超分子質量分析、中性子小角散乱、高速原子間力顕微鏡、クライオ電子顕微鏡を駆使して両者の複合体の構造を解析した。その結果、10個のPbaA分子と10個のPF0014分子が集まって、古代ギリシャ建築の“tholos”のような形状の複合体を形成していることが明らかとなった。興味深いことに、複合体の内部の空洞には他の分子を収納できそうな空間が用意されているが、その機能の解明は今後の課題である。一方、微小重力環境下で形成されたアミロイド線維の構造解析(宇宙航空研究開発機構との共同研究)、クマムシの乾眠の分子機構の解析(極限環境耐性研究グループとの共同研究)、深海微生物の糖鎖構造解析(深海・地下生命研究グループとの共同研究)も順調に進展している。

以下の各項については、創成研究領域 生命分子動秩序創発研究グループを参照のこと。

- 4) 学術論文
- 5) 著書、総説
- 6) 国際会議発表リスト
- 7) 招待講演
- 8) 学会および社会的活動
- 9) 他大学での非常勤講師、客員教授
- 10) 受賞、表彰

2-3 極限環境耐性研究グループ

荒川 和晴 (客員准教授)

田中 冨 (特任助教)

- 1) 専門領域： システム生物学、極限環境生物学
- 2) 研究課題：
 - a) マルチオミクス解析による極限環境生物の耐性機構の解明
 - b) クマムシの極限環境適応及び耐性機構の解明
- 3) 研究活動の概略と主な成果：
 - a) 南海トラフなど、太平洋深海の熱水噴出孔から単離された *Bacillus sp.* KH172YL63株、*Halomonas meridiana* Slthf1株及びEplume2株、*Halomonas hydrothermalis* Slthf2株などのゲノム解析を行った。ナノポアシーケンスとIlluminaシーケンスを組み合わせた手法により、いずれもコンプライートゲノムを得ることに成功した。これらのゲノム配列は全てDNA Databank of Japan(DDBJ)を通じてInternational Nucleotides Sequence Database(INSDC)への登録・公開が完了しており、これらの機能アノテーション及び比較ゲノム解析から、深海の熱水噴出域という極限環境に適応するために必要な遺伝子セットを探索する基盤データが構築できたとと言える。南極クマムシ *Acutuncus antarcticus* LSW系統も同様の手法によりゲノム解析を進めており、推定ゲノムサイズ100Mbpとなるドラフトゲノムは現在までに得られている。今後機能アノテーション及び詳細な解析を進めていく。
 - b) これまでクマムシの乾眠関連タンパク質は主に熱可溶性実験によって見出されてきたが、その多くが高発現で、誘導型の種で誘導を受け、天然変性領域が大部分を締め、乾眠するクマムシで広く保存されている、などの傾向が明らかになってきている。これらを利用して、網羅的に関連候補をスクリーニングするバイオインフォマティクス解析を行ったところ、既知のCAHS、MAHS、LEAMなどのタンパクが有意にエンリッチし、30個程度の新規乾眠での防御に関わると考えられる遺伝子の候補が得られた。これらの候補については次年度以降局在や構造を順次解析していく。
- 4) 学術論文
K. Sugiura, K. Arakawa, M. Matsumoto, “Distribution of *Macrobiotus shonaicus* Stec, Arakawa & Michalczyk, 2018 (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae) in Japan”, *Zootaxa* (2020).
- 8) 学会および社会的活動
日本RNA学会 組織委員 (荒川和晴)
オープンバイオ研究会 運営委員 (荒川和晴)
クマムシ学研究会 運営委員 (荒川和晴)
International Symposium on Tardigrada PC member (荒川和晴)
- 9) 他大学での非常勤講師、客員教授

慶應義塾大学環境情報学部・先端生命科学研究所 准教授 (本務) (荒川和晴)

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科 准教授 (兼務) (荒川和晴)

慶應義塾大学医学部・非常勤講師 (兼務) (荒川和晴)

独立研究開発法人理化学研究所 客員研究員 (兼務) (荒川和晴)

3 ExCELLS イベント

2019年度 シンポジウム

1) Frontier Bioorganization Forum 2019

Date: 6th July – 9th July, 2019

Venue: Rm. 1503, KIAS, Seoul

(85 Hoegiro, Dongdaemun-gu, Seoul 130-722, Korea)

Organizing Committee: Jooyoung Lee (KIAS), Koichi Kato (ExCELLS, IMS)

Co-organizers: Korea Institute for Advanced Study (KIAS), Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS), National Institutes of Natural Sciences

Invited speakers: Chien-Chih Yang (National Taiwan University), Chii-Shen Yang (National Taiwan University), Guang-Chao Chen (Academia Sinica), Koichi Kato (ExCELLS, IMS), Maho Yagi-Utsumi (ExCELLS, IMS), Makoto Tominaga (ExCELLS, NIPS), Ming-Daw Tsai (Academia Sinica), Motohiro Nishida (ExCELLS, NIPS), Nobuyuki Shiina (ExCELLS, NIBB), Po-Huang Liang (Academia Sinica), Rita Pei-Yeh Chen (Academia Sinica), Saeko Yanaka (ExCELLS, IMS), Shigetoshi Aono (ExCELLS, IMS), Shih-Hsiung Wu (Academia Sinica), Shin-ichi Higashijima (ExCELLS, NIBB), Susumu Uchiyama (ExCELLS, Osaka Univ.), Takahiro Kosugi (ExCELLS, IMS), Takayuki Uchihashi (ExCELLS, NAGOYA Univ.), Todd Lowary (Academia Sinica), Tsung-Lin Li (Academia Sinica), Yasuhiro Go (ExCELLS, NIPS)

2) 第2回ExCELLSシンポジウム

開催日：2019年11月18日～19日

会場：自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター

主催：自然科学研究機構 生命創成探究センター (ExCELLS)

世話人：富永真琴、青木一洋、古賀信康

口頭講演者：根本知己、柿澤茂行、荒川和晴、奥村久士、村田和義、井上圭一、本田直樹、木賀大介、島田奈央、太田裕作、鈴木志野、黒川洵子、広井賀子、石谷太、曾我部隆彰

3) ExCELLS Retreat for Young Scientists

Date: 7th February, 2020 – 8th February

Venue: Nishiura Onsen Hotel Tatsuki

Organizers: Masashi Tanimoto, Hiroki Watanabe, Yuri Miyazaki, Sayaka Oda, Masataka Yamauchi, Saeko Yanaka, Shigenori Nonaka, Yasuhiro Go

Invited speakers: Keiichi Inoue, Itaru Imayoshi, Tsuyoshi Terakawa, Ken Takai, Yusuke Hirabayashi, Sa Kan Yoo

※3) は若手啓発事業

2019年度 セミナー

1) 第5回ExCELLSセミナー 「Pulse kinetics of ERK MAPK controls epidermal stem cell states」

演者：Toru Hiratsuka (King's College London, Centre for Stem Cells and Regenerative Medicine)

日時：15th April, 2019 16:30～

場所：Yamate Large Meeting Room, 2F Bld. 3

2) 第6回ExCELLSセミナー「非線形光学過程を活用した新規光学顕微鏡によるバイオイメージングの展開」
「“光”で探る生物時計中枢の作動メカニズムの探求」

演者：根本知己（北海道大学電子科学研究所）、榎木亮介（北海道大学電子科学研究所）

日時：2019年5月29日10:00～

場所：自然科学研究機構 生命創成探究センター 山手地区 3号館2階 大会議室

3) 第7回ExCELLSセミナー「もやもや病責任遺伝子の生理・病態機能」

演者：森戸大介（昭和大学）

日時：2019年9月12日16:00～

場所：自然科学研究機構 生命創成探究センター 山手地区 3号館2階 大会議室

4) 第8回ExCELLSセミナー「ヒト/マウス人工染色体を用いたゲノムライティングと応用」

演者：香月康宏（鳥取大学染色体工学研究センター/とっとり創薬実証センター）

日時：2019年11月27日16:00～

場所：自然科学研究機構 生命創成探究センター 山手地区 3号館2階 大会議室

4 共同利用研究

ExCELLS 計画研究

加藤 晃一（生命創成探究センター・教授）

1) 研究課題： ゴルジアトラス：糖転移酵素の局在を指標としたゴルジ体の空間情報プログラムの解明

2) 共同研究者

| | | |
|-------|--------------------|------|
| 高田 慎治 | 発生シグナル創発研究グループ | 教授 |
| 青木 一洋 | 定量生物学研究グループ | 教授 |
| 太田 裕作 | 生物画像情報解析グループ | 特任助教 |
| 根本 知己 | バイオフィotonics研究グループ | 教授 |
| 後藤 稔 | 立教大学 | 教授 |
| 矢木 宏和 | 名古屋市立大学 | 講師 |

3) 研究概要

近年の細胞イメージング技術の進展により、これまで単一のオルガネラと考えられていた細胞内区画が実は異なる役割を担う場に細分化されており、オルガネラ機能はこれらの場のネットワークの総体として発揮されているという可能性が示唆されている。こうした新たなオルガネラ像が提唱されつつある状況をふまえて、オルガネラの空間配置やオルガネラの種類とネットワークがどのように決まっているかを解明することは、生命における空間情報のプログラムの設計原理を理解するうえで重要である。

ヒトではおよそ200種類の糖転移酵素がゴルジに局在しており、タンパク質の翻訳後修飾を担っている。本研究は、分子科学、細胞生物学、生化学を専門とする研究者に加えて、顕微鏡観察技術、画像解析技術を有する研究者が参画することで、糖転移酵素の局在を指標としたゴルジ体の空間情報プログラムの解明を目指すものである。

ExCELLS 計画研究

青木 一洋 (生命創成探究センター・教授)

1) 研究課題： 生物リズムと情報：情報理論による生物リズムの時間情報コードの理解

2) 共同研究者

| | | |
|-------|-------------------|-----|
| 吉村 崇 | 名古屋大学 | 教授 |
| 榎木 亮介 | バイオフィotonクス研究グループ | 准教授 |
| 矢部泰二郎 | 発生シグナル創発研究グループ | 助教 |
| 澤井 哲 | 東京大学 | 教授 |
| 西田 基宏 | 心循環ダイナミズム創発研究グループ | 教授 |
| 近藤 洋平 | 定量生物学研究グループ | 助教 |

3) 研究概要

生物は、秒単位の心臓の拍動から年単位の季節性のリズムまで、 10^9 もの時間スケールの異なるリズム現象を示している。分子生物学の発展に伴い、生物リズムの分子実体や環境に対するリズムの応答機構といった生物リズム現象の個々の理解は進んできた。一方で、「生命とは何か」を考えるうえで、生物とリズム現象の間にやり取りされる情報量の定量的な理解は進んでいない。例えば、生物の示すリズム(概日時計など)はどれくらいの情報量を含んでいて、そこからどれだけの情報量が機能の創発や恒常性の維持に貢献しているのかといった問いに対して十分にこたえられていない。そこで、本計画研究は、異なる時間スケールの生物リズム現象を扱う実験系研究者と情報理論に精通する理論系研究者とチームを組み、情報理論による生物リズムの時間情報コードを理解することを目指す。

新美 輝幸（基礎生物学研究所・教授）

1) 研究課題： カメノコテントウの翅色変化を生み出す低温馴化機構の解明

2) 共同研究者

| | | |
|-------|-------------|----|
| 富永 真琴 | 温度生物学研究グループ | 教授 |
| 大場 裕一 | 中部大学 | 教授 |

3) 研究概要

本研究は、提案代表者が発見した環境応答に関連した新規現象として、低温馴化によって翅の色が変化するカメノコテントウの休眠現象に着目する。全く未知の現象を解明するため、分子昆虫学を専門とする研究代表者、温度応答研究や有機化学を専門とする共同研究者との異分野間の有機的な共同研究により、遺伝子レベルだけでなくタンパク質や色素のレベルでの多角的なアプローチから解析を行う。本研究では、長期低温という環境依存的な翅色変化の分子メカニズムとして、低温馴化シグナルの受容から鞘翅色の変化に至る過程を解明することを目指す。

上野 直人 (基礎生物学研究所・教授)

1) 研究課題：細胞における液-液相分離(LLPS)の制御機構

2) 共同研究者

| | | |
|-------|-----------------|-----|
| 椎名 伸之 | 神経分子動態生物学研究グループ | 准教授 |
| 柳澤 実穂 | 東京大学 | 准教授 |

3) 研究概要

近年、生体膜に包まれていないタンパク質やRNAを含む凝集体(コンデンセート)の存在や機能に注目が集まっている。この「膜なしオルガネラ(membrane-less organelles)」の形成は発生や恒常性維持に必須の役割を担っている一方、その形成不全や異形成はさまざまな疾患の原因となることも明らかにされつつある。本研究ではコンデンセートを作り出す平衡状態の変化、液-液相分離(liquid-liquid phase separation, LLPS)の制御機構について、初期発生と神経活動の二つの場をモデルとし、それぞれ足場となるタンパク質に焦点を当て、ソフトマター研究を専門とする生物物理学者と共同研究を行った。その結果、細胞-細胞間接着に関わるタンパク質ZO-1のコンデンセートが力学刺激など細胞外刺激によるリン酸化経路の活性化によって崩壊する機構について、椎名らは神経変性疾患の原因遺伝子産物TDP-43及びFUSが神経細胞のコンデンセート(RNA顆粒)に集積した際、さまざまな動態をとりうる現象の背景となるメカニズムについて新たな知見を得た。柳澤らは、細胞に見られる多様な膜構造がLLPS制御に与える効果を細胞モデル実験から検証し、細胞サイズの膜閉じ込めがLLPS制御を制御する可能性を明らかにした。このようにRNAやタンパク質を含むコンデンセートが細胞内で形成される原理解明に向けた共同研究が進展した。

飯野 亮太 (分子科学研究所・教授)

1) 研究課題：微生物が進化で生み出したプラスチック分解酵素の仕組みを理解し改善する

2) 共同研究者

| | | |
|-------|--------------|---------|
| 古賀 信康 | 生命分子創成研究グループ | 准教授 |
| 藤田 克昌 | 大阪大学 | 教授 |
| 中村 彰彦 | 分子科学研究所 | 助教 (当時) |
| 安藤 潤 | 分子科学研究所 | 助教 (当時) |

3) 研究概要

本研究は、PETaseによるポリエチレンテレフタレート(PET)分解の仕組みを理解し、天然のPETaseよりも優れた耐熱性やPET分解活性をもつ改良型PETaseを創りだすことを目的とする。2019年度は、以下の結果を得た。

1. 共同研究者の古賀らが開発した合理設計法、および結晶構造や構造モデルに基づく部位特異的変異導入を併用し、海洋由来メタゲノムから同定された新規PETaseであるPET2の耐熱性を改善して変性温度を72.3°Cまで引き上げることに成功した。この耐熱化PET2を用い、67°CでPETの分解反応を行うことを可能にした。
2. SpyTag-SpyCatcherの系を適用し野生型IsPETaseを2量体化することに成功した。しかし残念ながら、単量体と比較してPET分解活性の向上はみられなかった。
3. 高速AFMを用い、PETase 1分子のPETフィルムへの結合やPETの形態変化を観察することに成功した。
4. 無標識ラマン分光イメージングを用い、結晶性と非晶性のPETを識別して観察することに成功した。

村田 和義 (生理学研究所・准教授)

1) 研究課題：正二十面体巨大ウイルスの構造基盤と形態形成機構の解明

2) 共同研究者

| | | |
|-------|----------------|-------|
| 武村 政春 | 東京理科大学 | 教授 |
| 加藤 晃一 | 極限環境生命分子研究グループ | 教授 |
| 宮成 悠介 | 核内ゲノム動態研究グループ | 特任准教授 |
| 宋 致弘 | 生理学研究所 | 特任助教 |

3) 研究概要

巨大ウイルスは、細胞性生物と同じ膜で覆われた二本鎖DNAをもち、その進化の痕跡とも言える自身以外の遺伝子も多く保存している。そしてさらに複雑な内部構造や触手のような外部突起を持つものもあり、一見細胞性生物に近いような形態の特徴を示す。そのような意味で、巨大ウイルスは一部の機能を欠いた細胞性生物であるとも言える。しかし、これら巨大ウイルスは、その大きさが光学顕微鏡と電子顕微鏡の観察範囲の境界に位置するため、ゲノム解析に比べて全体を通じた詳細な形態学的な研究があまり進んでいない。

本研究では、巨大ウイルスの中でも正二十面体の capsid を持つウイルスの形態形成機構とその構造基盤を、光学顕微鏡観察と電子顕微鏡観察を組み合わせることで解明する。研究対象としては、直径約 230nm の大きさを持つマルセイユ科ウイルスの一つトキョウウイルス(TkV)と直径約 260nm のメドゥーサウイルス(MedV)を用いる。まず、本ウイルスの宿主アメーバ内での動態を、FISH 解析を含む経時的な蛍光顕微鏡観察により詳細に追跡し、そこでのウイルスの形態形成の様子を電子顕微鏡により解析する。さらに、ウイルス粒子をクライオ電子顕微鏡により高分解能単粒子構造解析することにより、巨大なウイルス capsid の形成機構を明らかにする。本研究により、ExCELLS 特別共同研究が目指す生命の設計原理に迫る。

大坪 瑤子 (核融合科学研究所・特任助教)

1) 研究課題：酵母一細胞レベルでのTORC1活性測定法の開発と応用

2) 共同研究者

| | | |
|-------|-------------|-------|
| 青木 一洋 | 定量生物学研究グループ | 教授 |
| 鎌田 芳彰 | 基礎生物学研究所 | 助教 |
| 前田 達哉 | 浜松医科大学 | 教授 |
| 山下 朗 | 基礎生物学研究所 | 特任准教授 |

3) 研究概要

真核生物に広く保存されたTORキナーゼは、2種類の複合体TORC1、TORC2を構成し、環境の変化に対応して増殖に関わる様々な機構を制御している。我々は、進化的に大きく離れている2種類の酵母である出芽酵母と分裂酵母で、栄養状態に応答するTORC1の機能について解析を行ってきた。これまで、酵母でTORC1の活性を調べるには、細胞集団でTORC1の基質のリン酸化状態をウエスタンブロット法により検出するという手段がとられてきた。細胞集団は均一の状態であると見なされてきたが、細胞体積や老化状態といった細胞の来歴によって、個々の細胞でTORC1の活性状態が大きく異なる可能性も考えられる。本研究では、生きた酵母一細胞ごとに、TORC1活性を測定することを目標とし、出芽酵母、分裂酵母それぞれで利用可能なTORC1活性測定用のFRETバイオセンサーの開発を試みた。

重信 秀治（基礎生物学研究所・教授）

1) 研究課題：多細胞生命体の創成を可能にした遺伝子群の探索

2) 共同研究者

| | | |
|-------|-------------|-------|
| 郷 康広 | 認知ゲノム研究グループ | 特任准教授 |
| 牧野 能士 | 東北大学 | 教授 |
| 阿形 清和 | 基礎生物学研究所 | 所長 |

3) 研究概要

生命創成には、単細胞生命体の創成と多細胞生命体の創成といった大きく2つのステップがある。多細胞生命体の特徴は、単なる細胞の集塊を作っただけではなく、機能に合わせた一定の形態を構築しながら進化していった点にある。本研究では、単細胞からの形態と機能をもった多細胞生命体の構築を可能にした遺伝子群の同定をめざす。具体的には、多細胞体の起源と考えられている単細胞体と多細胞の多能性幹細胞を用いて、プラナリアECM body内で細胞集塊を作った時の細胞の振る舞いの違いを単一細胞遺伝子発現解析によって明らかにし、多細胞体の特性をもたらした遺伝子候補を同定する。最終的に、それらの候補遺伝子をゲノム編集により改変することで、単細胞から多細胞体を創成する分子機構の解明を目指す。ゲノムと細胞挙動の比較をするために、単細胞体として、現存する単細胞体の中で多細胞体の起源に最も近縁と考えられているフィラステラのカプサスポラに着目する。一方、多細胞体の細胞としては、成体多能性幹細胞であるプラナリアの新生細胞と胚性多能性幹細胞であるマウスのES細胞を用いる。

今年度は、ECM body移植実験を立ち上げることができた。プラナリアのECM body(脱細胞化処理した細胞外基質で構成されるプラナリア体)にマウスES細胞を移植し、ES細胞の増殖に成功した。さらに、プラナリアの単一細胞トランスクリプトーム(scRNAseq)の条件検討を重ね、予備実験に成功した。

井上 圭一 (東京大学物性研究所・准教授)

1) 研究課題: 理論と実験の融合による新規光遺伝学ツールの創成に向けたロドプシタンパク質の膜内配向制御

2) センター内共同研究者

| | | |
|-------|-------------------|-----|
| 古賀 信康 | 生命分子創成研究グループ | 准教授 |
| 西田 基宏 | 心循環ダイナミズム創発研究グループ | 教授 |

3) 研究概要

微生物型ロドプシンは細菌などの微生物が持つ、光受容型の膜タンパク質である。微生物型ロドプシンは分子内部にレチナール発色団を結合し、光吸収に伴うレチナールの異性化反応をトリガーとして、 H^+ や Na^+ 、 Cl^- など様々なイオンの輸送を行う。そして、これら微生物型ロドプシンは近年オプトジェネティクス分野で神経の光操作に広く用いられている。

本研究では、提案代表者の井上らが発見した外向き Na^+ ポンプ型ロドプシンの表面の電荷分布を変え、膜内の配向を逆転させることで、新たに内向き Na^+ ポンプ型ロドプシンの構築を目指す。これにより、現在の主要なオプトジェネティクスツールであるChR2で問題となっている、非特異的な陽イオン輸送に伴う副次反応を示さない、 Na^+ 選択的なオプトジェネティクスツールの実現が期待される。

本田 直樹 (京都大学・准教授)

1) 研究課題: 生体イメージングで観測される時空間ダイナミクスの階層的モデリング

2) センター内共同研究者

| | | |
|-------|-------------------|----|
| 西田 基宏 | 心循環ダイナミズム創発研究グループ | 教授 |
| 青木 一洋 | 定量生物学研究グループ | 教授 |

3) 研究概要

蛍光ライブイメージングにより、今や多細胞組織における細胞レベルの移動や分子活性等を生きたまま可視化できる時代となっている。イメージングによって観測される「細胞集団レベルの現象」は、寄り集まった一つ一つの細胞が相互作用する「細胞レベルの過程」から階層をまたいで創発されたものである。したがって、細胞集団レベルの観測結果から細胞レベルの原因を解読するためには、二つの階層をつなぐアプローチが必須である。そこで本研究では、細胞レベルと細胞集団レベルの階層をつなぐ数理的アプローチを提案し、多細胞組織のイメージングデータから細胞レベルのメカニズムの解読を目指す。

木賀 大介 (早稲田大学・教授)

1) 研究課題：細胞間通信を介した細胞種多様化におけるフィードバックが空間パターン形成に及ぼす影響の解明

2) センター内共同研究者

| | | |
|-------|--------------|------|
| 青木 一洋 | 定量生物学研究グループ | 教授 |
| 太田 裕作 | 生物画像情報解析グループ | 特任助教 |

3) 研究概要

本研究の目的は、生存競争を勝ち抜くための有効な戦略である細胞間相互作用による集団形成を、原始的な単細胞生物がどのように制御できるか、という疑問を解決することにある。とくに、細胞間相互作用による空間パターンの形成について、反応ゆらぎに起因するコロニーごとのパターン形成の差異に注目して、生細胞の観察と数理モデルを組み合わせるアプローチを行った。数理モデルに基づくシミュレーションについては、現実に即した反応モデルについて、ゆらぎの導入を行った。また、コロニー形成に関する顕微鏡観察を行った。さらに、パターン形成を行う遺伝子回路におけるフィードバックの有無によって、細胞の挙動がどのように変化するかについてのモデルによる予測を、培養実験によって確認した。

黒川 洵子 (静岡県立大学・教授)

1) 研究課題： 興奮性細胞創成に向けた膜電荷による組織分化誘導技術の開発

2) センター内共同研究者

| | | |
|-------|-------------------|----|
| 西田 基宏 | 心循環ダイナミズム創発研究グループ | 教授 |
| 青木 一洋 | 定量生物学研究グループ | 教授 |

3) 研究概要

生物の個体発生は非興奮性細胞である受精卵に始まり、分化・成熟を経て、細胞同士の情報を伝達する興奮性細胞が形成され、生体組織ネットワークが創成される。興奮性組織は潜在的に大量の電荷を保有し、刺激入力に対し、局所的に電荷が爆発的に増える現象(活動電位)によって応答することで、ネットワークを形成する。しかし、オンディッシュで化合物や小分子を添加して興奮性細胞を分化誘導しようとしても、保持電荷量が一定以上増えないので脆弱な活動電位しか持たず、刺激応答のネットワークを形成できない。

そこで、本研究では、いまだ未熟な性質を残す幹細胞由来興奮性細胞に対し、人工的に微弱電流を印加することで不足している膜電荷を補給し、刺激応答型の活動電位によって刺激応答ネットワークを形成することができる興奮性細胞を創成することを目指す。

澤井 哲 (東京大学・教授)

1) 研究課題：細胞遊走と極性操作による細胞集団の人工構築

2) センター内共同研究者

| | | |
|-------|---------------|-----|
| 青木 一洋 | 定量生物学研究グループ | 教授 |
| 野中 茂紀 | 生命時空間制御研究グループ | 准教授 |

3) 研究概要

細胞性粘菌キイロタマホコリカビ *Dictyostelium discoideum* は、自己組織的な細胞配置パターンの興味深い例を示している。本研究では、細胞型の選別パターンを自在に操作することを目的とし、細胞性粘菌の細胞膜上のIgドメインタンパク質TgrB1およびそのリガンドTgrC1に依存した、Scar複合体の膜局在と細胞極性運動を操作するための手法開発をおこなう。組織内の細胞の配置状況によって、オンザフライで個々の細胞を時空間的に操作するため、光遺伝学的ツールを構築し、局所的な摂動によって集団の大局的な再編成が生じる条件などが明らかになることで、細胞レベルの運動規則と集団レベルの秩序形成との関連を浮かび上がらせる。

広井 賀子 (山口東京理科大学・教授)

1) 研究課題: 温度環境操作で細胞ネットワーク形成を制御する

2) センター内共同研究者

| | | |
|-------|---------------|-------|
| 富永 真琴 | 温度生物学研究グループ | 教授 |
| 野中 茂紀 | 生命時空間制御研究グループ | 准教授 |
| 谷口 篤史 | 生命時空間制御研究グループ | 博士研究員 |

3) 研究概要

[背景・目的] 近年、生体内の微細な環境における温度差、温度勾配などが、生理的に意義のあるシグナルとして作用している可能性に注目が集まっている。本研究を通して、温度差・温度勾配をシグナルとして、細胞の動態を制御できるか明らかにする。またその背後で機能している分子機構を探索する。

[計画] 本研究を構成する柱は3つある。一つは時空間的に鋭い温度勾配を作り出して、細胞の動きを制御する制御系の構築、二つ目は、生体内の様々な状況下での応用を視野に入れた3次元細胞培養下での細胞動態制御系の構築、三つ目は、実際に操作を受けている細胞内で作用すると考えられる、細胞のセンサー、プロセッサに当たる機能分子は何で、どのように細胞の動きの制御を実現しているのかを突き止める、背後で機能している分子機構の解明である。

[方法] 人為的に細胞集団が生育する環境の温度を二段階に制御することで、特定の温度条件下で機能を持つ温度感受性カルシウムチャネルの活性を相対的に強調する。その条件下でシグナルとして作用しうる鋭い温度勾配を作り、効果を調べる。

荒川 和晴 (慶應義塾大学・准教授)

1) 研究課題： 乾眠の分子機構の探索

2) センター内共同研究者

| | | |
|-------|----------------------|-----|
| 加藤 晃一 | 極限環境生命分子研究グループ | 教授 |
| 奥村 久士 | 生命分子動態シミュレーション研究グループ | 准教授 |
| 青木 一洋 | 定量生物学研究グループ | 教授 |

3) 研究概要

昨年度に引き続き、極限環境に耐性を持つクマムシの耐性メカニズムを明らかにするため、乾眠に関連する遺伝子群の探索や解析を行い、乾眠の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。はじめに、クマムシの酸化ストレス応答・DNA損傷応答の交叉耐性のオミクス解析の実験系を立ち上げ、解析の基盤を構築した。また、CAHSおよびSAHSタンパク質の水溶液中の高次構造形成についてNMRおよび高速原子間力顕微鏡観察を通じて観察したところ、非構造領域の特異的ゆらぎが確認できたため、現在そのメカニズムを明らかにするために分子動力学シミュレーションによる分子動態解析によって解析を進めている。ヒト細胞への導入実験についても順調に進捗しており、複数の乾眠関連遺伝子の導入に成功している。

石谷 太 (大阪大学微生物病研究所 / 群馬大学生体調節研究所・教授)

1) 研究課題： 生命活動休止システム「休眠」の分子基盤と意義の解明

2) センター内共同研究者

| | | |
|-------|----------------|-------|
| 高田 慎治 | 発生シグナル創発研究グループ | 教授 |
| 富永 真琴 | 温度生物学研究グループ | 教授 |
| 加藤 輝 | 生物画像情報解析グループ | 特任助教 |
| 川出 健介 | 植物発生生理研究グループ | 特任准教授 |

3) 研究概要

生物の生命活動は受精から始まり、胚発生、成熟、老化、死に至るまで時間の流れに沿って不可逆的に進行する。一方で、一部の生物では、生命活動の時間の流れを一時的に休止し、状態を長期間安定に保存する現象、いわゆる「休眠(仮死)」が観察される。例えば、アカシカやアルマジロやネズミなどは、胚発生過程の胚盤胞の状態で発生を一旦休止し、出産時期が外部環境の良い春季になるタイミングで発生を再開する。このように、休眠は、生物が自身の生存に有利な環境で活動するための時間調節に利用されている。しかしながら、休眠がその後の生命活動にどのような影響を与えるのかなど、休眠の意義は未だ十分には理解されていない。また、休眠への移行にあたり全身の組織の活動を停止させるメカニズムや、休眠中に組織全体を低代謝状態のまま安定に保つシステム、生命活動を正常に再開させる仕組みは謎のままである。そこで本研究では、休眠を行う小型魚類ターコイズキリフィッシュをモデルとして休眠(仮死)の分子基盤と意義を解明する。

武村 政春（東京理科大学・教授）

1) 研究課題： 巨大ウイルス・宿主相互作用ならびに巨大ウイルス複製メカニズムの時空間ダイナミズムの解析

2) センター内共同研究者

加藤 晃一 極限環境生命分子研究グループ 教授

3) 研究概要

本研究では、マルセイユウイルス科ウイルスで筆者らが新潟から分離したホクトウイルスの宿主細胞凝集体形成能の解析を行った。ホクトウイルス感染時に、培養液にグルコース、マンノース、ガラクトース、ラクトースをそれぞれ添加し、細胞凝集体形成能を検討した。その結果、培養液にガラクトースを加えた場合にのみ、細胞凝集体形成の遅延が生じることが明らかとなった。マルセイユウイルス科ウイルスのゲノムにはガラクトース結合タンパク質遺伝子が存在することが明らかとなっており、これらことから、ホクトウイルスによる細胞凝集体形成には、ガラクトース結合タンパク質が関与していることが示唆された。現在、ウイルス感染時・非感染時におけるアカントアメーバ細胞表面糖鎖の網羅的解析を行っている。

山口 拓実 (北陸先端科学技術大学院大学・准教授)

1) 研究課題： 合成化学的アプローチを用いた糖鎖配座空間の探査と制御

2) センター内共同研究者

加藤 晃一 生命分子動秩序創発研究グループ 教授

3) 研究概要

本課題は、有機化学的アプローチを基盤とし、分子生物学、分子分光学、計算科学などの方法論を統合することで、糖鎖の動的な構造や相互作用様式を明らかにし、糖鎖の生物機能が発露するメカニズムに関する理解を深めることを目指している。糖鎖の配座空間を改変することで、レクチン親和性を制御することに成功した。NMR計測と分子シミュレーションによる解析を基に設計・合成した糖鎖は、対象レクチンに対する親和性が顕著に向上した。また、糖タンパク質まるごとの動的構造解析にも取り組み、糖鎖部分とタンパク質部分双方の構造ダイナミクスを明らかにした。さらに、人工設計に基づくネオ糖脂質の開発を通して、糖鎖構造によって細胞サイズのジャイアントベシクルの形態が制御されることを見出した。生体膜を模倣した人工脂質膜や、モデル細胞の開発において、糖鎖構造に由来する新たな機能の付与や制御を行うことも期待できる。

森 和俊 (京都大学・教授)

1) 研究課題： 小胞体関連分解における糖鎖構造の解析

2) センター内共同研究者

加藤 晃一 生命分子動秩序創発研究グループ 教授

3) 研究概要

小胞体関連分解における糖鎖依存分解経路では、糖タンパク質のN型糖鎖構造が重要な役割を果たしており、それが分解シグナルとなる。M9型からM8B型へ糖鎖構造をトリミングすることに中心的な役割を果たすEDEM2が、活性を持つためには、チオレドキシン様タンパク質TXNDC11と複合体を形成することが必要である。今回、*in vitro*においてEDEM2-TXNDC11複合体のM9型遊離糖鎖への活性を調べた。すると、Amideカラムを用いたHPLCにより、M9からM8への糖鎖のトリミングがはっきりと観察された。そして、そのM8をODSカラムを用いて、M8 isomer Bと同定できた。これにより、EDEM2の*in vitro*活性が確認された。本成果は、EDEM familyにおいて遊離糖鎖に対して強い*in vitro*トリミング活性が検出できた初めての例となった。

山田 浩司 (岡山大学・准教授)

1) 研究課題： 膜制御因子のアクチン骨格制御と細胞膜－細胞骨格間のクロストーク

2) センター内共同研究者

| | | |
|-------|-----------------|------|
| 加藤 晃一 | 生命分子動秩序創発研究グループ | 教授 |
| 内橋 貴之 | 生命分子動態計測グループ | 客員教授 |

3) 研究概要

ダイナミン関連分子は、膜切断に関わりエンドサイトーシスの際の小胞形成に働く。我々は、ダイナミンがアクチン線維の束化を制御する証拠を得た。ダイナミン単独もしくは他のアクチン制御分子とで形成するアクチン線維束構造の解析を進めている。本研究は、アクチン重合からアクチン線維形成に至る過程に、ダイナミンがどのように関与するのかをリアルタイムで観察することによって、その分子基盤を明らかにする。そのため、高速AFM及び全反射蛍光顕微鏡を組み合わせ、直接複合体の構造を観察する系の構築を目指した。

細田 直 (名古屋市立大学・准教授)

1) 研究課題： 真核生物におけるmRNA代謝調節メカニズムの解明

2) センター内共同研究者

西田 基宏 心循環ダイナミズム創発研究グループ 教授

3) 研究概要

mRNAの代謝調節は転写後の遺伝子発現制御において重要な役割を果たしている。mRNAの3'末端に存在するポリA鎖はmRNAの代謝調節に機能し、多様な生命現象に深く関与する。本研究では、脊髄小脳変性症原因因子ATX2が、標的mRNA特異的なポリA鎖伸長に機能し、その発現を正に制御することを見出した。さらに、ATX2についてポリA鎖伸長複合体の単離をおこない、その構成因子をショットガンプロテオミクスにより網羅的に同定することにより、複合体の全容の解明を試みた。

西村 明幸 (九州大学・講師)

1) 研究課題： ミトコンドリア過分裂を抑制する化合物を用いた慢性疾患治療への応用研究

2) センター内共同研究者

西田 基宏 心循環ダイナミズム創発研究グループ 教授

3) 研究概要

エネルギー産生を担うミトコンドリアの異常分裂(ダイナミクスの破綻)は様々な難治性疾患で確認されており、ミトコンドリアダイナミクスは新たな創薬標的として注目されている。我々はこれまでに、心筋梗塞時に起こる心筋ミトコンドリアの異常分裂に着目し、病態特異的に強まるミトコンドリア-アクチン骨格連携が心筋ミトコンドリアの異常分裂および心機能低下の引き金になることを見出した。また、この連携を阻害する化合物として既承認薬の中からシルニジピンを同定した。本研究では、様々なマウス慢性疾患モデルでのシルニジピンの薬理作用を評価することで、組織恒常性を維持する上でのミトコンドリア品質の重要性を明らかにするとともに、ミトコンドリア関連疾患に対する新しい創薬ストラテジーの構築を目指す。

澤 新一郎 (九州大学・教授)

1) 研究課題： 新生児消化器疾患の病態形成に関わる免疫細胞の網羅的解析

2) センター内共同研究者

郷 康広 認知ゲノム研究グループ 特任准教授

3) 研究概要

本研究はヒト新生児期の免疫細胞の構成と機能を明らかにし、新生児期の腸炎病態を免疫学的な側面から理解することを目的とする。本研究により、ヒト新生児腸炎という疾患スペクトラムに対し、「疾患特異的な免疫地図」を取得し、将来の治療開発にむけた基盤を構築する。本研究の遂行のために、生理学研究所内のセルソーターおよびシングルセル遺伝子ライブラリー作成装置を用いて組織中の免疫細胞における遺伝子発現を網羅的に検出後、多変量解析を行い、疾患特異的な免疫細胞の機能の解明を目指した。なお、本研究課題は生理学研究所倫理委員会において「新生児消化器疾患の病態形成に関わる免疫細胞の網羅的解析」(課題番号19B01、研究責任者 郷康広)として承認済みである。

また、研究手法の洗練化を目指し、マウス由来細胞を用いて網羅的一細胞遺伝子発現解析手法の改良、改善を目指すとともに胎仔骨に含まれる未分化細胞の機能解析も行った。

服部 光治 (名古屋市立大学・教授)

1) 研究課題： アミロイド β 凝集抑制に関わる分泌タンパク質の効果の検証

2) センター内共同研究者

矢木-内海 真穂 生命分子動秩序創発研究グループ 助教

3) 研究概要

分泌タンパク質リーリンはアミロイド β の凝集を直接抑制すると考えられ、実際に*vivo*の研究では効果が見られているが、その抑制機構には謎が多い。本研究では、リーリンの各種断片や変異体を調整し、チオフラビンアッセイを中心に用い、リーリンのアミロイド β 凝集に対する効果のメカニズムを解析した。全長のリーリンは一部アミロイド β 凝集を阻害する傾向が見られたが、その効果は既報ほどではなく、また変異体や断片には効果がほとんどなかった。

Kiattawee Choowongkomon (Kasetsart University • Associate Professor)

1) 研究課題 : Biophysical Characterization of Aptamers and their inhibitors Complexed with wild-type and mutant of HIV-1 Reverse Transcriptase

2) センター内共同研究者

| | | |
|------------------|--|---------------------|
| Koichi Kato | Biomolecular Organization Research Group | Professor |
| Maho Yagi-Utsumi | Biomolecular Organization Research Group | Assistant professor |
| Saeko Yanaka | Biomolecular Organization Research Group | Assistant professor |

3) 研究概要

The screening of a novel inhibitor against HIV-1 reverse transcriptase (RT) revealed a promising set of molecules; five new inhibitors and five DNA aptamers. Newly synthesized these molecules demonstrated an inhibitory effect against HIV-1 RT that correlated with binding mode results by using SPR. However, the interaction complexes have not been elucidated yet. Gaining of biophysical information would be useful to reveal enzyme-inhibitor complex machinery. Herein, HS-AFM, ITC, and NMR have been performed to investigate interactions of HIV-1 RT complexed with DNA aptamers and peptide inhibitors. HS-AFM deciphered the interaction between HIV-1 RT dimer and inhibitors but did not distinguish any dynamic conformational changes between subdomain when complexed with peptides. Interestingly, ITC, and NMR experiment results suggested that tripeptides, plant peptides, and DNA aptamers were able to bind to HIV-1 RT that related to IC_{50} results.

神谷由紀子（名古屋大学・准教授）

1) 研究課題：非環状骨格を持つ人工核酸の立体構造解明

2) センター内共同研究者

加藤 晃一 生命分子動秩序創発研究グループ 教授

3) 研究概要

近年RNAを標的とする核酸医薬の開発が急速に進められている。開発においては核酸医薬の酵素耐性の向上や標的RNA認識能向上のため、化学修飾核酸の活用が必須である。申請者らのグループではSerinolおよびL-Threoninolを骨格とする非環状型人工核酸SNA、L-aTNAを開発しており、これらが天然の核酸を認識する特長を有すること明らかにしている。これまでに、SNAやL-aTNAを用いて、モレキュラービーコンやアンチセンス核酸などの機能性核酸の開発を行ってきた。一方で、人工核酸の立体構造に関する情報は未だに得られていない。そこで本研究では、結晶構造解析を主体とし、超分子質量分析装置などの解析を組み合わせ、非環状型人工核酸の構造解明や機能向上に取り組む。

Caroline Sunggip (University of Malaysia Sabah • Senior Lecturer)

1) 研究課題 : Role of TRPC3 protein-Nox2 protein interaction i cardiac volume regulation

2) センター内共同研究者

Motohiro Nishida Cardiocirculatory Dynamism Research Group Professor

3) 研究概要

Maintenance of muscle cell quality is essential for prolonging healthy life expectancy. I the aging society, muscular atrophy phenotypically observed in frail and sarcopenia is a major risk factor of poor prognosis. Our collaborative study uncovers a new pathway in the development of cardiomyocyte atrophy, where extracellular ATP, acting as a “danger signal”, mediates the interaction between TRPC3 channel protein and NADPH oxidase (Nox) 2 protein. This TRPC3-Nox2 complex contributes to nutritional deficiency-induced atrophy through increased production of reactive oxygen species by escaping Nox2 from ER-associated degradation.

荒田 晶子（兵庫医科大学・准教授）

1) 研究課題： 生命の原始運動である胎動性活動の生成メカニズムの解明

2) センター内共同研究者

東島 眞一 神経ネットワーク創発研究グループ 教授

3) 研究概要

生命の原始運動である胎動が、どのようにして起こるのか、何故起きるのか、それが起きないとどのようなことが起こるのかについて探究する。げっ歯類や魚類においても、初期の運動として胎動が発生する。その胎動の生成メカニズムを解明し、その生成因子を操作する事で胎動が何と関連しているのかを発達過程を観察し、生命創成の原理の解明につなげる。ゼブラフィッシュの初期回転運動を抑制することにより、反射的な運動にはあまり影響を及ぼさなかったが、走行距離や刺激による遊泳運動の違いが見られ、運動力や運動の維持に変化が出てくることが分かってきた。一方、無麻酔ラット胎動性活動の超音波解析では、胎動性活動を減弱させる仕組みが分かってきた。さらに、ラット摘出脳幹-脊髄標本の研究により、胎動と呼吸をリンクさせて全身運動を制御している可能性を示唆した。

Panarat Arunrattiyakorn (Srinakharinwirot University • Assistant Professor)

1) 研究課題 : Structure modification of natural products to develop novel compounds with specific properties.

2) センター内共同研究者

| | | |
|------------------|--|---------------------|
| Koichi Kato | Biomolecular Organization Research Group | Professor |
| Maho Yagi-Utsumi | Biomolecular Organization Research Group | Assistant professor |
| Saeko Yanaka | Biomolecular Organization Research Group | Assistant professor |

3) 研究概要

The research group between researchers of ExCELLS, JAPAN and Chemistry Department, Srinakharinwirot University, THAILAND focused on the semisynthesis of new hydrodermin A derivatives for determination of their bioactivities. In this study, hyphodermin A, a bioactive compound from *Hyphoderma radula*, reacts with aniline as well as the halogenated aniline and leads to the formation of new derivatives. Hyphodermin A and its derivatives were assayed for their cytotoxicity against HepG2, A549 and SK-Hep-1 cell lines. The result shown that several derivatives possess the cytotoxic activity and the most potent compound showed a 30.5% survival of SK-Hep-1 cell line at 20 μ M of tested compound.

佐藤 匡史 (名古屋市立大学・准教授)

1) 研究課題： パスポート配列導入による糖タンパク質の細胞内輸送への影響

2) センター内共同研究者

| | | |
|-------|-----------------|------|
| 加藤 晃一 | 生命分子動秩序創発研究グループ | 教授 |
| 矢木 真穂 | 生命分子動秩序創発研究グループ | 助教 |
| 青木 一洋 | 定量生物学研究グループ | 教授 |
| 太田 裕作 | 生物画像情報解析グループ | 特任助教 |

3) 研究概要

血液凝固因子欠損症の原因遺伝子産物であるERGIC-53とMCFD2は積荷受容体として、糖タンパク質である血液凝固第V・第VIII因子の細胞内輸送に関わっている。これまでに我々は、これらの血液凝固因子中における約10残基からなるMCFD2との結合領域を同定し、そのペプチド配列が血液凝固因子の分泌経路における細胞内輸送を効率化する“パスポート”として機能する可能性を示してきた。そこで本研究では、本配列を組み込んだ糖タンパク質の細胞内輸送の実態解明を目指した。具体的には、エリスロポエチンをはじめとしたモデル糖タンパク質にパスポート配列を導入し、その蛍光イメージングを行うことで、配列導入が細胞内輸送に及ぼす効果を定量評価した。その結果、それらの糖タンパク質の細胞内の輸送効率が向上し、分泌量が2-3倍も上昇することを明らかにした。

富田 拓郎 (信州大学・准教授)

1) 研究課題： 下肢虚血後の末梢欠陥新生・組織機能修復のメカニズム

2) センター内共同研究者

西田 基宏 心循環ダイナミズム創発研究グループ 教授

3) 研究概要

血管組織の新生は生体組織形成において極めて重要な役割を担っている。組織が虚血ストレスにさらされると血管内皮細胞が既存血管から出芽し、新たな微小血管の形成が始まる。しかしながら、血管内皮細胞のみにより構成されるこれら血管は脆弱であり、機能的な血管網を形成しえない。そのため、機能的血管形成には、微小血管形成に引き続く、血管平滑筋細胞に被覆される血管成熟が重要であることが知られている。我々は、下肢虚血後の末梢血流回復において、非選択的カチオンチャネルであるTRPC6が血管成熟の負の制御因子として働くことをこれまでに報告してきた。本研究では、TRPC6チャネルがどのように血管成熟を制御するかの分子メカニズムについてさらなる研究を進め、新たなin vivoの血管形成解析モデルとして使用するマウスの作製を行った。

中島 洋 (大阪市立大学・教授)

1) 研究課題： プルシアンブルー内包フェリチンの結晶化スクリーニング

2) センター内共同研究者

青野 重利 金属生命科学研究グループ 教授

3) 研究概要

三次元架橋鉄シアノ錯体の一つであるプルシアンブルーは、高効率な近赤外光応答発熱素子、アルカリ金属イオンの包摂、過酸化物の除去触媒として注目される。他方、あらゆる溶媒に対する不溶性、配位性分子を含む溶媒、あるいはアルカリ性(pH>8)溶媒に対する不安定性は、その利用環境や応用分野を制限している。本研究では、上述の課題を克服し、特に生体内におけるプルシアンブルーの利用を目的として、フェリチンと呼ばれる中空球状タンパク質の内部空間($2.7 \times 10^{-25} \text{ m}^3$)内でプルシアンブルーを構築した複合体(PB@Fr)を創出し、その物性の理解と応用を目指す。

吉村 崇 (名古屋大学・教授)

1) 研究課題： 環境情報と動物の年周リズムの発振に関する研究

2) センター内共同研究者

青木 一洋 定量生物学研究グループ 教授

3) 研究概要

生物は、約1日周期の「概日リズム」や、約1年周期の「概年リズム」など、様々な周期のリズムを示す。生物の外部環境は、昼夜の1日のリズム、1年の季節変化など周期的なリズムを生物に与えているが、環境情報量と生物リズムの関係についての理解は進んでいない。本研究では、明瞭な1年のリズムを示すメダカの繁殖と遺伝子発現量の変化に着目し、日長、日射量、温度の環境情報が、年周リズムの発振に与える影響を定量的に理解することを目的として、統計・情報理論的な解析を行った。

饗場 浩文 (名古屋大学・教授)

1) 研究課題： 分裂酵母Ksg1による寿命制御機構の解析

2) センター内共同研究者

青木 一洋 定量生物学研究グループ 教授

3) 研究概要

寿命制御機構の解明は、ヒトの健康寿命の増進に繋がることが期待されるため重要な研究テーマである。近年までのモデル生物を用いた寿命研究から、酵母からヒトにまで保存された寿命延長機構が存在することが明らかになってきた。しかしながら、その他の寿命延長シグナルや寿命因子も含め、未だその全貌は明らかでない。ヒトに代表される多細胞高等生物の寿命を理解するために、単細胞モデル生物である分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)を用いた寿命研究を行っている。経時寿命のメカニズムの解明に向けて、提案代表者は「経時寿命が延長する変異株の解析」を行ってきた。その中で、Ksg1+というリン酸化酵素の変異株が分裂酵母の経時寿命を延長することが分かってきた。本共同研究では、ライブイメージングによりKsg1の細胞内局在と経時寿命の関係性を明らかにすることを旨とする。

後藤 聡 (立教大学・教授)

1) 研究課題：糖転移酵素をプローブとした哺乳動物細胞におけるゴルジ体ゾーンの解析

2) センター内共同研究者

| | | |
|-------|-----------------|------|
| 加藤 晃一 | 生命分子動秩序創発研究グループ | 教授 |
| 高田 慎治 | 発生シグナル創発研究グループ | 教授 |
| 青木 一洋 | 定量生物学研究グループ | 教授 |
| 太田 裕作 | 生物画像情報解析グループ | 特任助教 |

3) 研究概要

申請者は、これまでにショウジョウバエの細胞内で分散して存在するミニゴルジ体には、それぞれ異なる翻訳後修飾に関与するタンパク質が局在することを見出し、ゴルジ体が機能的に異なる領域(ゾーン)から形成されていることを明らかにしてきた(PNAS, 2005)。こうした結果から、哺乳動物においてもゴルジ体が異なるゾーン形成をしていることが予想される。そこで本研究では、ゴルジ体に局在する糖転移酵素をプローブとすることで、哺乳動物細胞におけるゴルジ体ゾーンの同定を行うことを試みた。

岡田眞里子（大阪大学蛋白質研究所・教授）

1) 研究課題： 数理モデルとイメージングによる細胞周期の動態解析

2) センター内共同研究者

青木 一洋 定量生物学研究グループ 教授

3) 研究概要

細胞の数理モデルは、異なる実験手法により得られた多様な計測データをひとつのモデルに入力することで、細胞のネットワークを統合的・定量的に理解し、その制御原理に迫れる点に利点がある。申請者は、実験計測と数理モデルを組み合わせ、細胞制御に関わるネットワーク構造を同定してきた。本共同研究では、細胞増殖の根幹を為す細胞周期動態に焦点を当て、数理モデルを用いて、シグナル依存的な細胞周期の定量的な制御を明らかにすることを目的とした。

中尾 新太郎 (九州大学病院・講師)

1) 研究課題： 網膜虚血性疾患におけるマクロファージの病態関与について

2) センター内共同研究者

郷 康広 認知ゲノム研究グループ 特任准教授

3) 研究概要

糖尿病患者増加に伴い糖尿病網膜症患者の増加が予想されている。若年者における糖尿病網膜症は重症化するため、その病態メカニズム解明が望まれている。今回、糖尿病網膜症重症化にマクロファージ関与という仮説を立て、重症化の病態解明のために、基本病態である網膜虚血に関与するマクロファージのプロファイリングを行う。また、ROCK阻害剤による網膜虚血の改善を報告しており、関与シグナルを明らかにする。

虚血性網膜疾患の病態解明のために汎用されている酸素誘導虚血網膜症モデルを用いる。同モデルは生後7日目のマウスを授乳マウスと共に5日間、75%高濃度酸素負荷(酸素監視装置付き保管箱内で1ケージ当たりマウス4匹と授乳マウス1匹を群飼育)することで、網膜血管閉塞を促す。生後12日目に大気中に戻すことで、血管閉塞部位の網膜が相対的虚血(低酸素)に陥ることにより、虚血誘導性の網膜血管新生が惹起される。生後17日目に病的新生血管の形成がピークとなる。高酸素負荷による疼痛出現などはないと考えられる。大気中に戻した12日目から17日目まで生理食塩水またはROCK阻害剤の点眼を行う。生後17日目にケタラール100mg/Kgとセラクタール10mg/Kgを腹腔内に投与し麻酔を行ったのちに頸椎脱臼により安楽死させる。眼球を摘出し網膜を採取する。網膜よりマクロファージをBD FACSAria セルソーターを用いてソーティングし回収する(ここまでは九州大学で行う。動物実験承認済み)。回収したマクロファージを生命創成探究センター・郷研究室まで運び10xGenomics社Chromiumシステムを用いて単一細胞発現解析用ライブラリの作製、シーケンス解析を行う。網膜虚血、血管新生に関与するマクロファージのプロファイリング、ROCK阻害剤の関与シグナルを解明する。

横井 佐織 (北海道大学・助教)

1) 研究課題： クローズドコロニー系統メダカにおける行動形質の差を生み出す分子機構解析

2) センター内共同研究者

郷 康広 認知ゲノム研究グループ 特任准教授

3) 研究概要

ヒトを含めた社会性を営む多くの動物において、個性は集団や各個体における適応度上昇に関与すると考えられているが、その分子メカニズムの多くはいまだ明らかになっていない。本研究では、比較的遺伝的バックグラウンドの近い、新規クローズドコロニー系統メダカを複数種比較し、新奇環境において「臆病」な振る舞いと「大胆」な振る舞いという、対象的な行動様式を示す2つの系統を発見した。これら2系統の全ゲノム配列を明らかにし、比較することで、行動形質の差を生み出す遺伝子の同定、ひいてはその分子機構について解析することを目的とする。

高岸 麻紀 (名古屋大学・特任助教)

1) 研究課題： Wnt/PCP経路による脳室の平面内極性化機構の解析

2) センター内共同研究者

高田 慎治 発生シグナル創発研究グループ 教授

3) 研究概要

脳室表面では、運動性多選毛が同一方向へ協調して波打つことで、脳脊髄液を一定方向へ送り出している。線毛細胞の協調した運動方向を決定するのは、脳室壁に並ぶ上衣細胞の平面内極性であり、Wntシグナル/PCP経路が上衣細胞で機能していると考えられる。

本研究では、Wntシグナル/PCP経路を制御する分子の、脳室内発現分布を検索する。

森戸 大介 (昭和大学・講師)

1) 研究課題： もやもや病責任遺伝子産物の構造解析

2) センター内共同研究者

加藤 晃一 生命分子動秩序創発研究グループ 教授

3) 研究概要

日本を初めとする東アジア圏に多い脳血管疾患もやもや病は17番染色体長腕末端領域に存在するミス
テリン遺伝子の変異により発病する。ミステリン遺伝子には巨大な細胞内AAA+ ATPアーゼ/ユビキチン
リガーゼがコードされており、AAA+ドメインの動的な構造変化にともなって細胞質ゾルと脂質貯蔵オ
ルガネラ脂肪滴の間をシャトルし、細胞内脂質代謝に寄与する。このプロセスを詳細に解析することで
ミステリンの生理・病態機能およびその詳しい分子メカニズムを明らかにすることを目的として、ミス
テリンおよびその部分領域の発現、精製、構造解析を行う。

菅原 正 (神奈川県大学・客員教授)

1) 研究課題: 多機能超解像顕微鏡を利用した異なるDNAを内封したベシクル型人工細胞の競争的自己増殖過程の統計的観察

2) センター内共同研究者

| | | |
|-------|-----------------|-------|
| 加藤 晃一 | 生命分子動秩序創発研究グループ | 教授 |
| 栗原 顕輔 | 構成生物学研究グループ | 特任准教授 |

3) 研究概要

本研究の目的は、それぞれ異なる鎖長のDNAを内包したベシクル型人工細胞内でDNAを増幅させた後、外部から添加したベシクル膜分子の前駆体からの膜分子生産に誘導される人工細胞の自己生産能の優劣を、自己生産前後のベシクル数を精密に数え上げることで判定することにある。本共同研究を通じて、異なるDNAを内包した人工細胞の自己生産能が評価できれば、ベシクル型人工細胞の自然淘汰ダイナミクスの可能性に迫ることになる。

矢木 宏和 (名古屋市立大学・講師)

1) 研究課題：概日リズム発信機構の解明に向けたKaiタンパク質複合体の構造基盤の解明

2) センター内共同研究者

| | | |
|-------|-----------------|------|
| 加藤 晃一 | 生命分子動秩序創発研究グループ | 教授 |
| 内山 進 | 生体分子相互作用計測グループ | 客員教授 |

3) 研究概要

生体内の概日リズムは生物時計によって制御されている。シアノバクテリアの生物時計システムは、3種類のタンパク質(KaiA、KaiB、KaiC)とアデノシン三リン酸(ATP)のみでKaiCのリン酸化状態が24時間周期を刻む系を構築できるというユニークな性質を有する。本研究では、超分子質量分析装置を利用することで、Kaiタンパク質の複合体形成をキャラクタライズすることにより、概日リズムの発振機構を解明することを目指した。特にKaiBとKaiCの協同的な相互作用に焦点を当て、KaiC 6量体上で起きるKaiB 同士の間での静電的な相互作用が概日リズムの形成に重要であることを示すことができた。本研究の成果は、*Int.J.Mol.Sci.*誌上で発表した(DOI: 10.3390/ijms20184550)。

Ji-Joon Song

(Korea Advanced Institute of Science and Technology • Associate Professor)

1) 研究課題 : Single-molecule Analysis of ATP-Dependent Abo1 Histone Chaperone Dynamics by Atomic Force Microscopy

2) センター内共同研究者

Koichi Kato Biomolecular Organization Research Group Professor

Hiroki Watanabe Biomolecular Dynamics Observation Group Assistant Professor

3) 研究概要

AAA+ ATPases hydrolyze ATP to perform work on various substrates. Although the hexameric ring structure of AAA+ ATPases are well characterized, the mechanism by which AAA+ proteins utilize ATP and bind substrates has been elusive. Using the yeast AAA+ histone chaperone Abo1 as a model system, we solve high-resolution structures by cryo-EM and visualize ATP-dependent structural changes by high-speed atomic force microscopy (HS-AFM). We find that Abo1 forms hexameric rings that undergo symmetry breaking in the presence of ATP. Furthermore, AAA+ subunits undergo ATP hydrolysis one subunit at a time with no determined order in which subunits hydrolyze ATP. This behavior is unchanged with the addition of the Abo1 substrates, histone and DNA. Thus, regardless of the absence or presence of substrate, Abo1 utilizes a stochastic mode of subunit activation where the AAA+ ring opens at random positions.

久富 理 (山梨大学・助教)

1) 研究課題： マウス精子形成・運動における新規鞭毛タンパク質DYBLUPの役割

2) センター内共同研究者

野中 茂紀 生命時空間制御研究グループ 准教授

3) 研究概要

提案代表者らは、海産脊索動物ホヤの精子鞭毛において、青色光受容ドメイン(BLUFドメイン)を持つ新規のタンパク質DYBLUPを同定した。このDYBLUPはマウスやヒトなどにおいても保存されており、主に精巢に発現している。そこで、マウスの個体や組織レベルにおけるDYBLUPの役割を明らかにすることを目的として、本共同利用研究では、マウス精子におけるDYBLUPの局在を決定する。

内田 邦敏 (福岡歯科大学・講師)

1) 研究課題： 温度感受性チャネル TRPV1 の動的構造解析

2) センター内共同研究者

| | | |
|-------|-----------------|------|
| 加藤 晃一 | 生命分子動秩序創発研究グループ | 教授 |
| 内橋 貴之 | 生命分子動態計測グループ | 客員教授 |
| 渡辺 大輝 | 生命分子動態計測グループ | 特任助教 |

3) 研究概要

TRPチャネルの11は温度感受性を持ち、細胞内外温度を感知して情報を電気信号に変換している。これら温度依存性を持ったチャネルが温度によって開口するメカニズムは未だ不明である。本研究は、その構造がcryo-EMのより明らかにされている温度センサー分子のTRPV1チャネルに焦点を当て、TRPチャネルが温度によって開口する姿を動的に捉えることを目的とした。今年度は、原子間力顕微鏡にて観察するための実験系の構築を行なった。これまでに、TRPV1チャネルを精製し、脂質ナノディスクに再構成する実験系を確立した。この系によって得られたTRPV1サンプルを高速原子間力顕微鏡にて観察した結果、cryo-EMの結果より予想されたTRPV1チャネルポアの像が得られた。

佐藤 匡史 (名古屋市立大学・准教授)

1) 研究課題：古細菌プロテアソーム集合シャペロン様タンパク質複合体の構造解析

2) センター内共同研究者

| | | |
|-------|----------------|------|
| 加藤 晃一 | 極限環境生命分子研究グループ | 教授 |
| 矢木 真穂 | 極限環境生命分子研究グループ | 助教 |
| 内橋 貴之 | 生命分子動態計測グループ | 客員教授 |
| 渡辺 大輝 | 生命分子動態計測グループ | 特任助教 |

3) 研究概要

超好熱古細菌がもつプロテアソームのサブユニット構成は、真核生物のものとは異なり単純で、それぞれのサブユニットが自発的に集合することが知られている。一方、真核生物においてはプロテアソームの形成を促す集合シャペロンの古細菌ホモログの存在が知られている。本研究では、機能未知のシャペロン様タンパク質PbaAおよびそのパートナータンパク質PF0014に着目し、超分子質量分析、中性子小角散乱、高速原子間力顕微鏡、クライオ電子顕微鏡を駆使した構造解析を通じて、これらのタンパク質の機能解明に迫った。その結果、本複合体は、あたかも古代ギリシャ建築の“tholos”のようであり、5本の柱で囲まれた内部の空洞には他の分子を収納できそうな空間が用意されていることが明らかとなった。

鈴木健太郎（神奈川大学・准教授）

1) 研究課題： ベシクル型人工細胞膜内に形成されるDNA-触媒分子複合体の多機能超解像顕微鏡による観察

2) センター内共同研究者

野中 茂紀 生命時空間制御研究グループ 准教授

3) 研究概要

申請者らが開発したベシクル型人工細胞では、ベシクル内水相での複製反応で増幅されたDNAが、ベシクル膜内に貫入し膜内に存在する酸触媒Cを静電的に集めることで複合体C@DNA形成する。この複合体が、ベシクル自己生産ダイナミクスにおいて重要な働きをすると考えられている。そこで本研究課題では、高感度かつ高い空間分解能を持った多機能超解像顕微鏡を利用して、ベシクル膜内におけるC@DNA形成を、直接観察することを目指した。蛍光標識したDNAや触媒Cを用いたベシクル型人工細胞の共焦点蛍光顕微鏡観察画像を共局在解析した結果、ベシクル膜内において、DNA近傍に酸触媒Cが局在していることを示す結果が得られた。この結果は、ベシクル膜内でのC@DNAの存在を、直接的に示す重要な成果といえる。

荒川 和晴 (慶應義塾大学・准教授)

1) 研究課題: 乾眼機構の解明を基軸とした生命の極限環境適応戦略の探究

2) センター内共同研究者

| | | |
|-------|----------------------|-----|
| 加藤 晃一 | 極限環境生命分子研究グループ | 教授 |
| 奥村 久士 | 生命分子動態シミュレーション研究グループ | 准教授 |
| 青木 一洋 | 定量生物学研究グループ | 教授 |

3) 研究概要

極限環境に耐性を持つクマムシの耐性メカニズムを明らかにするため、乾眼に関連する遺伝子群の探索や解析を行い、乾眼の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。新規要素の探索では、クマムシの酸化ストレス応答・DNA損傷応答の交叉耐性のオミクス解析を行った結果、放射線応答と乾眼後復帰に共通する高発現乾眼誘導型導遺伝子ファミリーが新規に2つ見出された。既知タンパクの機能解析では、CAHSおよびSAHSタンパク質の水溶液中の高次構造形成についてNMRおよび高速原子間力顕微鏡観察を通じて観察したところ、特にSAHSにおいて変性領域のゆらぎの度合いが分子動力学シミュレーションの予測と実測値が類似し、この領域と基質の相互作用の重要性が示唆された。ヒト細胞への導入実験についても順調に進捗しており、複数のCAHS遺伝子の導入に成功したが、これだけでは培養細胞に乾燥耐性を持たせるには至っていない。

2019 年度 ExCELLS リポート

2020 年 5 月発行

大学共同利用機関法人
自然科学研究機構
生命創成探究センター

愛知県岡崎市明大寺字東山 5-1

電話： 0564-59-5201

ホームページ： <http://www.excells.orion.ac.jp>

Exploratory Research Center on Life and Living Systems
National Institutes of Natural Sciences

大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 生命創成探究センター



〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山5-1

<http://www.excells.orion.ac.jp>