

3. プレスリリース

2020年4月7日 野村 ERATO プロジェクト

ナノサイズの細胞外膜小胞の物性イメージングに成功

～細菌は不均一な性質の膜小胞を放出する～

2020年4月23日 小林プロジェクト

次世代を生み出す生殖細胞の品質を保つ仕組みを解明

2020年4月24日 柳沢プロジェクト

細胞外マトリクスを介した新しいメカノトランスダクション機構を発見

～血管疾患への新たな治療法開発への期待～

2020年5月8日 丹羽プロジェクト

生物の個体サイズを決定するステロイドホルモン合成の制御メカニズムを発見

～成長を調節する神経内分泌メカニズム～

2020年5月18日 岩崎プロジェクト

進化すると色素タンパク質が増える？

珪藻の光化学系 I-集光性色素タンパク質複合体の立体構造解明

2020年6月3日 野村 ERATO プロジェクト

耐性菌を防ぎつつ人体や環境に有害な微生物集団を除去する方法を発見

～生物由来の界面活性剤を組み合わせることで除去効率が向上～

2020年7月3日 丹羽プロジェクト

ネオニコチノイド系殺虫剤に対するハナバチ類の感受性を解明

環境に優しい農薬や昆虫制御材の開発に期待

2020年7月21日 柳沢プロジェクト

皮膚が老化すると「幹細胞の顔」が変わる！

～加齢に伴う皮膚幹細胞の糖鎖変化の解析に成功～

2020年7月31日 野村 ERATO プロジェクト

温度に応答して自らを保護する食中毒細菌集団

2020年9月16日 深水プロジェクト

アルギニンメチル化酵素が正常な脳の発達を促す

～脳におけるタンパク質のメチル化の新しい意義を発見～

2020年9月24日 野村 ERATO プロジェクト

細菌は菌糸の「高速道路」を移動し「通行料」を払う

～細菌と糸状菌の知られざる共生関係を発見～

2020年10月19日 丹羽プロジェクト

交尾刺激に应答して卵子を作り出す過程を調節する新しい神経伝達メカニズム

を発見

2020年11月5日 丹羽プロジェクト

「DIAMonDS」でハエの一生を記録する

～ショウジョウバエの個体別活動測定システムを開発～

2021年1月15日 野村 ERATO プロジェクト

微生物が多様な膜小胞を作る仕組みを解明

2021年3月3日 小林プロジェクト

始原生殖細胞では性染色体上の遺伝子発現に性差がある

～性が決まる仕組みの解明へ～

2021年3月16日 深水プロジェクト

老いた脳の修復力を回復させるメカニズムを発見

2021年3月22日 岩崎プロジェクト

光化学系IIの立体構造をクライオ電顕で高精度に決定

～生体内環境に近い状態での分子構造決定に光明～

News Release



金沢大学
KANAZAWA
UNIVERSITY



World Premier International
Research Center Initiative



筑波大学
University of Tsukuba



令和2年4月7日

各報道機関文教担当記者 殿

ナノサイズの細胞外膜小胞の物性イメージングに成功 ～細菌は不均一な性質の膜小胞を放出する～

金沢大学理工研究域生命理工学系／ナノ生命科学研究所の田岡東准教授らと筑波大学生命環境系および微生物サステナビリティ研究センターの野村暢彦教授らの共同研究グループは、**細菌が環境中に放出する微小な袋状の膜構造体（メンブレンベシクル: MV（※1））の物理的性質を原子間力顕微鏡（※2）と呼ばれる顕微鏡技術を用いて調べる方法を開発しました。**

近年の国内外の研究で、MVは、細菌間の情報伝達やタンパク質の輸送、遺伝子の水平伝播に関与し、抗生物質やファージ（※3）への「おとり」として働いて細菌の生存を助けるなど、細菌の生存戦略に深く関わる重要な因子であることが報告されています。しかし、細菌が放出するMVの大きさは直径20～400ナノメートル（nm, ※4）程度と極めて小さいだけでなく、リン脂質膜（※5）という非常に柔らかくもろい構造でつくられていることから、MV粒子一つ一つの性質を個別に調べる方法は開発されておらず、MVの詳しい実態はこれまで明らかにされていませんでした。

本共同研究グループは、溶液中でMV1粒子の物理的性質を定量的に調べる方法を開発し、4種類の細菌が放出したMVの性質を比較しました。その結果、**1種類の細菌が物理的性質の異なる多様な性質のMVを放出すること、また細菌種ごとに放出するMVに種特異的な性質の違いがあることを見いだしました。**

MV1粒子の解析を可能にした本手法は、MVの実態解明や、MVを介した生命現象のメカニズムの解明に貢献することが期待されます。

本研究の成果は、2020年3月23日に国際学術雑誌『Nanoscale』のオンライン版に掲載されました。

本件配布先：金沢大学→石川県文教記者クラブ、文部科学記者会、科学記者会
筑波大学→筑波研究学園都市記者会

【研究の背景】

細菌は、細胞膜で構成された微小な袋状の膜構造体であるMVを環境中に放出します。このMVは、細菌の生存のためのさまざまな役割を持つことが、近年の研究により明らかになりました（図1）。例えば、MVは、情報伝達分子や遺伝物質を含み、細菌の細胞と細胞との間での情報伝達や遺伝子の伝播を仲介します。また、細菌による感染では、毒素因子の運搬や病巣でのバイオフィルムの形成など、細菌の病原性にも関わっています。さらに、抗生物質やファージへの「おとり」として細菌が生き抜くための防御に働くことが知られています。このようにMVは、細菌の生存戦略のための多様な役割を果たしています。また、細菌がMVを形成するメカニズムに、複数の経路が存在することが分かり、MVの機能や性質に多様性があるのではないかとこの仮説が提唱されました。

細菌の放出するMVの分子レベルの実態は不明な点が多く、MVが多様な機能を担う仕組みや、一つ一つのMVの性質については、よく分かっていません。MVは、直径200～400 nm程度と非常に小さく、また壊れやすい細胞膜できているため、MV 1粒子の性質を生理的環境下で詳細に調べることが困難でした。そのため、MVの性質を生理的環境に近い溶液中でナノメートルレベルの分解能で解析することができる新しい手法の開発が求められていました。

【研究成果の概要】

本共同研究グループは、原子間力顕微鏡の位相イメージング（※6）を用いて、MV 1粒子の物理的な性質を測定する手法を開発しました（図2）。原子間力顕微鏡の位相イメージングは、表面化学やマテリアルサイエンスの分野で、主に無機物の物性測定に用いられる方法です。本研究では、その手法を生体試料の観察に応用しました。しかし、従来の原子間力顕微鏡は、試料に与える力が強く、柔らかく壊れやすいMVを観察することは困難です。そこで、本研究では、タンパク質分子や細胞などの壊れやすい生体物質を生理的な溶液中で観察することに特化した高速原子間力顕微鏡（金沢大学ナノ生命科学研究所の安藤敏夫特任教授らが開発）を用いることで、ナノメートルサイズの小さかつ柔らかく壊れやすいMV 1粒子の物理的性質の測定に成功しました（図3）。

この高速原子間力顕微鏡の位相イメージングにより、3種類のグラム陰性細菌と1種類のグラム陽性細菌が放出したMVの物性分布を調べて比較しました。その結果、これらの細菌は、物性の異なる複数のタイプのMVを放出することを初めて実験的に確かめることができました。さらに、細菌が環境中に放つMVの物理的特性には細菌種ごとに特異性があることが明らかになりました。このようなMVの不均一性は、MVの形状や構造ではなく、MVを構成する物質組成に起因することが示唆されました。本研究により、MVの性質に多様性があることが初めて示されました。

【今後の展開】

本研究でMVの不均一性が実験的に確かめられたことは、MVの機能多様性やMVによる種特異的な情報伝達のメカニズムを検証するために重要な知見と考えられます。細胞外に膜小胞を放出する現象は、細菌だけでなく、動物やヒトの組織でもよく知られて

います。本研究で開発された1粒子の膜小胞の物性解析法は、多様な細胞外膜小胞の研究への応用が期待できます。

本研究は、科学技術振興機構（JST）の戦略的創造研究推進事業ERATO「野村集団微生物制御プロジェクト」（研究総括：野村暢彦）および文部科学省世界トップレベル研究拠点プログラム（WPI）の支援を受けて実施されました。

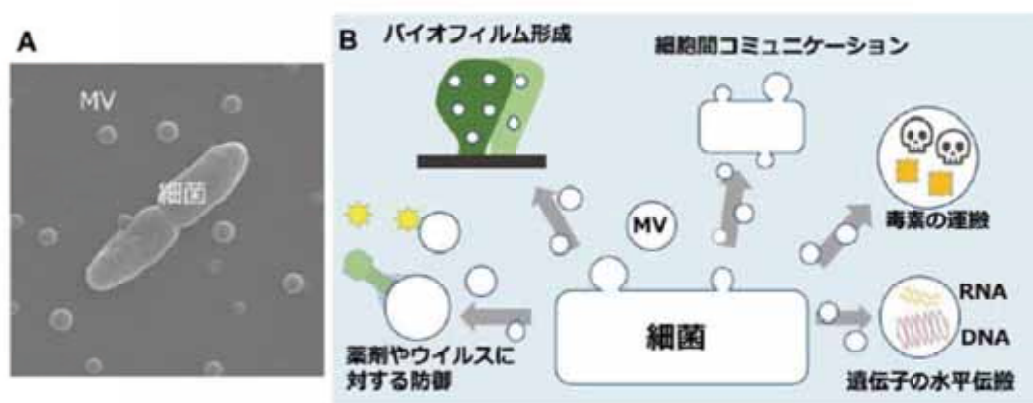


図1. メンブレンベシクル（MV）の多様な役割

MVは、細菌が細胞外に放出する細胞膜で構成された膜小胞である（A）。細菌が放出するMVにはさまざまな役割がある（B）。例えば、MVは、細菌をターゲットとする薬剤やウイルスから細菌を防御するおとりとしての役割や、バイオフィームと呼ばれる細菌集団が作るスライム状の構造体の材料を提供する。また、シグナル分子を介した細胞間コミュニケーション、毒素の運搬、さらに新しい形質を獲得するための遺伝子の水平伝播など物質の運び手として働く。



図2. 高速原子間力顕微鏡による位相イメージングの概要図

高速原子間力顕微鏡は、マイカ基板の上に固定された試料のイメージングを行う。プローブと呼ばれる非常に鋭い針が、振動しながら試料の上をなぞることで、試料の形を画像化する。このイメージング中に位相の遅れと呼ばれるプローブ振動の変化を検出し、位相遅れを画像化するのが位相イメージングである。この位相の遅れは、プローブがなぞっている試料表面の接着性や粘弾性などの物理的性質に依存する。本研究グループは、個々のMV粒子の物理的性質を、位相イメージングによって見える化した。

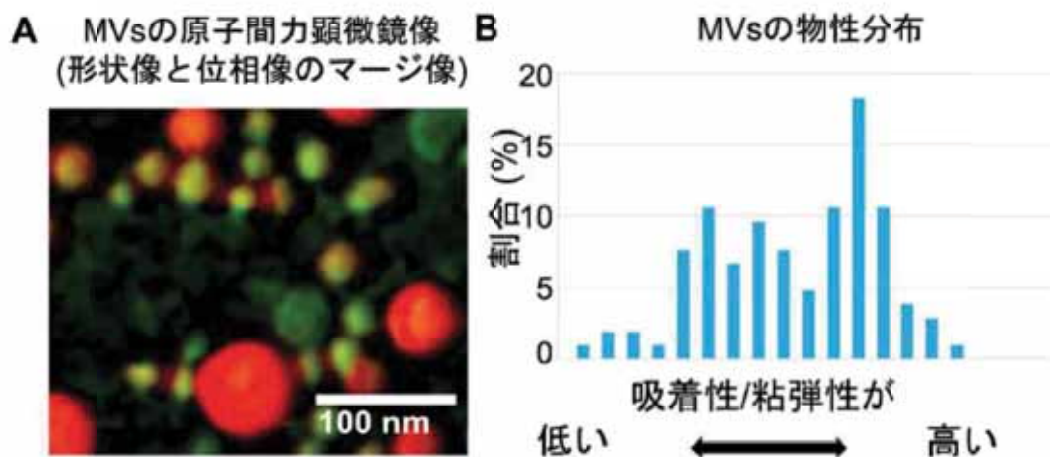


図3. 高速原子間力顕微鏡によるMV粒子の位相イメージング結果

高速原子間力顕微鏡の位相イメージングによって見える化された1種類の細菌から放出されたMV粒子の表面物性 (A)。位相イメージングでは、MV粒子ごとの物理的性質の違いが色で示される。赤いMV粒子は吸着性や粘弾性が低く、MV粒子の色がオレンジから黄色、緑となるにつれて吸着性や粘弾性が高いことを表す。このような高速原子間力顕微鏡像から、MVの物性分布を定量的に解析した (B)。その結果、1種類の細菌が分泌したMVは、物理的な性質が異なる粒子の集団であることが明らかになった。

【掲載論文】

雑誌名：Nanoscale

論文名：Diversity of physical properties of bacterial extracellular membrane vesicles revealed through atomic force microscopy phase imaging

(原子間力顕微鏡の位相イメージングによって明らかになった細菌の細胞外膜小胞の物性多様性)

著者名：Yousuke Kikuchi, Nozomu Obana, Masanori Toyofuku, Noriyuki Kodera, Takamitsu Soma, Toshio Ando, Yoshihiro Fukumori, Nobuhiko Nomura*, Azuma Taoka*

(* equal contribution)

(菊池 洋輔, 尾花 望, 豊福 雅典, 古寺 哲幸, 相馬 隆光, 安藤 敏夫, 福森 義宏, 野村 暢彦*, 田岡 東*) (*同等貢献)

掲載日時：2020年3月23日にオンライン版に掲載

DOI：10.1039/C9NR10850E

【用語解説】

※1 メンブレンベシクル：MV

細菌が環境中に放出する細胞膜によって構成される直径20～400nmの微小粒子のこと。ほとんどの細菌がMVを形成し、環境中の物質循環や生態系に大きな影響を及ぼすと考えられている。

※2 原子間力顕微鏡

走査型プローブ顕微鏡の一種であり、先端が極めて鋭い探針が試料表面を走査しながら試料の表面の凹凸の計測を行う。

※3 ファージ

細菌に感染するウイルスの総称。ファージが細胞膜に結合することで細菌は感染する。

※4 ナノメートル (nm)

長さの単位で100万分の1ミリメートル。

※5 リン脂質膜

親水性と親油性を併せ持つリン脂質が二層になった膜。生物の細胞膜を構成する基本構造として利用されている。

※6 位相イメージング

原子間力顕微鏡の測定モードの一つ。試料表面の物理的性質（吸着性や粘弾性など）がプローブ振動の位相遅れと呼ばれる物理量に影響を与える。位相イメージングは、この位相遅れを利用して、試料表面の物理的性質の違いを可視化する。

【本件に関するお問い合わせ先】

■研究内容に関すること

金沢大学理工研究域生命理工学系／ナノ生命科学研究所 准教授
田岡 東（たおか あずま）

筑波大学生命環境系／微生物サステナビリティ研究センター 教授
JST ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト 研究総括
野村 暢彦（のむら のぶひこ）

■広報担当

金沢大学総務部広報室広報係
上沼 孝平（かみぬま たかひら）
TEL：076-264-5024
E-mail：koho@adm.kanazawa-u.ac.jp

金沢大学ナノ生命科学研究所事務室
米田 洋恵（よねだ ひろえ）
TEL：076-234-4556
E-mail：nanolsi-office@adm.kanazawa-u.ac.jp

筑波大学広報室
TEL：029-853-2040
E-mail：kohositu@un.tsukuba.ac.jp

次世代を生み出す生殖細胞の品質を保つ仕組みを解明

研究成果のポイント

1. 生殖細胞(卵と精子)が作られる過程で、品質の悪い細胞を選択的に排除する仕組みが存在することを、ショウジョウバエにおいて、明らかにしました。
2. この仕組みに、Mycと呼ばれる遺伝子が関わることを発見しました。
3. 本研究成果は、他の動物における生殖細胞の品質管理機構を明らかにするための基盤になると考えられます。

国立大学法人筑波大学 生存ダイナミクス研究センター(TARA) 太田龍馬 研究員と小林 悟 教授は、生殖細胞(卵と精子)が作られる過程で品質の良い生殖細胞を選び出す仕組みを、ショウジョウバエを用いて明らかにしました。

有性生殖を行う動物は、生殖細胞(卵と精子)を作り、それらが受精することで次世代が生み出されます。従って、DNAに損傷を受けた異常な生殖細胞が作られてしまうと、正常な次世代を生み出すことができなくなってしまいます。これを防ぐために、生殖細胞が作られる過程で、異常な細胞を排除し、品質の良い生殖細胞のみを選び出す仕組みがあると考えられてきました。本研究では、この仕組みにMycと呼ばれる遺伝子が関わることを見出しました。

生殖細胞に分化することのできる細胞は、生殖系列細胞と呼ばれています。生殖系列細胞は、Myc遺伝子から合成されるMycタンパク質を発現していますが、異常が生じた生殖系列細胞は、Mycタンパク質の発現が低下し、それにより排除されることを発見しました。このことは、Mycタンパク質の発現の低下により、異常を起こした生殖系列細胞が選択的に排除され、品質の良い生殖系列細胞から次世代が生み出されることを示しています。有性生殖を行う動物において、正常な次世代を生み出すことは種を存続するために必要不可欠であり、本研究は、それを保証する生殖細胞の品質管理機構を明らかにするための第一歩になると期待されます。

本研究の成果は、2020年4月22日付「Communications Biology」で公開されました。

- * 本研究は、日本学術振興会が助成する科学研究費補助事業 新学術領域研究「PGCの形成を制御する遺伝子ネットワークの解明」(研究期間:平成25~29年度)、「生殖細胞発生過程における選択機構の解明」(研究期間:平成30~34年度)によって実施されました。

研究の背景

生殖細胞は、生物が連綿と生命を伝え続けるために必要不可欠な細胞です。私たちヒトを含め、有性生殖を行う動物は、生殖細胞(卵と精子)を作り出し、それらが受精することで次世代が誕生します。ですから、その生殖細胞に DNA 損傷などの異常が生じると、それが次世代に受け継がれ、生命の連続性が保てなくなる可能性があります。それを防ぐために、DNA に損傷を受けた異常な生殖細胞を排除し、品質の良い生殖細胞のみを選び出す品質管理の仕組みがあるのではないかと考えられてきました(参考文献 1)。しかし、どのような分子がこの仕組みに関わるのか、また、どのようにして品質の良い生殖細胞のみを選び出すのか、に関しては、明らかになっていませんでした。

本研究グループはこの問題に取り組むため、ショウジョウバエで知られている PM 雑種不稔(PM-hybrid dysgenesis)^{注1)}という現象に着目しました。PM 雑種不稔は、「動く遺伝子(トランスポゾン)」の一種である P 因子^{注2)}が、生殖系列細胞の DNA 上を動き回る(転移する)ことで引き起こされる現象です。P 因子の転移がおこると、生殖系列細胞が DNA に損傷を受け、発生の途中で消失して、不妊となります(参考文献 2)。そこで、この生殖系列細胞の消失が、DNA が損傷した異常な細胞を排除する仕組みによって引き起こされているのではないかと考え、この過程で動く遺伝子およびその機能を明らかにする研究を開始しました。

研究内容と成果

本研究では以下の点を明らかにしました。

- (1) 生殖系列細胞では、Myc と呼ばれる遺伝子から合成される Myc タンパク質が発現しています。しかし、P 因子の転移により、この Myc タンパク質の発現が低下することを発見しました。
- (2) 生殖系列細胞で強制的に Myc タンパク質を発現させると(Myc タンパク質の発現が低下しないようにすると)、P 因子の転移により引き起こされる生殖系列細胞の消失が抑制されることがわかりました。さらに、そのようにして生み出される生殖細胞には、DNA に損傷を持った細胞が多く含まれ、それらの生殖細胞に由来する次世代では致死率が増加することを見出しました。この結果は、Myc タンパク質の過剰発現により、DNA に損傷を受けた生殖系列細胞が排除されなくなることを示しています。

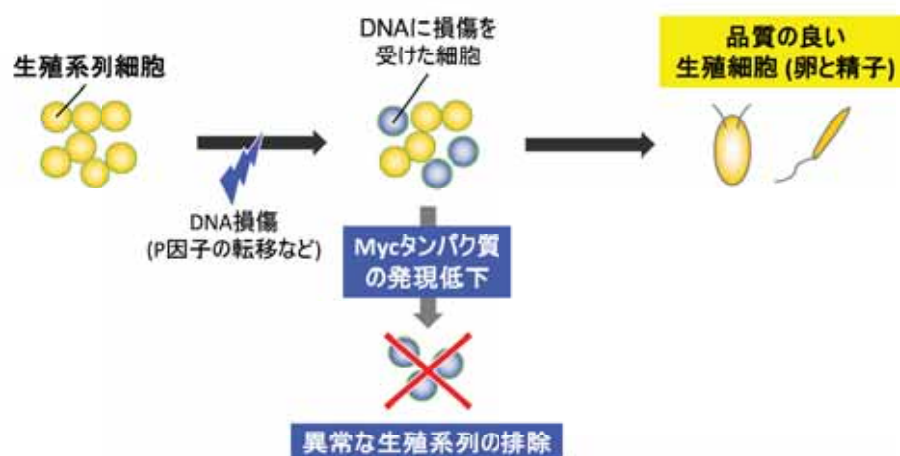
以上のことから、Myc タンパク質の発現低下により、DNA に損傷を受けた異常な生殖系列細胞が排除されることが明らかになりました。このような排除機構により、品質の良い生殖系列細胞のみを選び出し、その細胞から卵や精子を作らせることができます(図参照)。すなわち、生殖細胞の品質管理機構の一端が解明できたわけです。

今後の展開

有性生殖を行う動物において、正常な次世代を生み出すことは、種を存続させるために必要不可欠です。本研究では、それを保証する生殖細胞の品質管理の仕組みを、ショウジョウバエにおいて明らかにすることができました。このことは、他の動物における生殖細胞の品質管理機構を理解するための重要な基盤になると期待されます。

今後、Myc タンパク質の発現低下が誘導されるメカニズムや、Myc タンパク質の発現低下により生殖系列細胞が消失する理由などを解明し、生殖細胞の品質管理機構の全貌を明らかにする予定です。

参考図



図：生殖系列細胞の品質管理機構

用語解説

注1) PM 雑種不稔 (PM-hybrid dysgenesis)

P 因子を有する系統のオスと、P 因子を持たない系統のメスを交配すると、その子孫の生殖系列細胞で P 因子が転移し、不妊などが引き起こされる現象。

注2) P 因子 (P-element)

細胞の核内にある DNA の上を動くことができる遺伝子 (トランスポゾン) の一種。DNA に挿入されたり、逆に転出する過程で、DNA 上の遺伝子を傷つける。

参考文献

1. Sutovsky, P., Moreno R., Ramalho-Santos J., Domirko T., Winston E., Thompson W., and Schatten G. (2001) A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *J. Cell Sci.*, 114, 1665–1675
2. Engels, W. R. (1996) P elements in *Drosophila*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 204, 103–123.

掲載論文

【題名】 Myc plays an important role in *Drosophila* PM-hybrid dysgenesis to eliminate germline cells with genetic damage

(Myc はショウジョウバエ PM 雑種不稔により誘導される遺伝的損傷を有する生殖系列の排除に重要な役割を果たす)

【著者名】 Ryoma Ota and Satoru Kobayashi

【掲載誌】 *Communications Biology* (DOI: 10.1038/s42003-020-0923-3)

問い合わせ先

小林 悟 (こばやし さとる)

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 教授

2020年4月24日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学

国立大学法人熊本大学

国立大学法人茨城大学

細胞外マトリクスを介した新しいメカトランスダクション機構を発見

～血管疾患への新たな治療法開発への期待～

研究成果のポイント

1. 血管平滑筋細胞は、心拍出に伴う周期的伸展刺激^{*1}を常に受けています。本研究では、マトリセルラータンパク質^{*2}Thrombospondin-1 (Thbs1)が、周期的伸展刺激によって誘導されるシグナル伝達経路(メカトランスダクション^{*3}機構)の重要因子であることを明らかにしました。
2. 周期的伸展刺激により分泌されたThbs1が、細胞膜上の細胞接着分子 integrin $\alpha v \beta 1$ に結合して細胞接着斑分子^{*4}を活性化し、細胞骨格であるアクチンフィラメントの張力を制御することがわかりました。さらに、低分子量Gタンパク質 Rap2 を介して、転写調節制御因子 YAP^{*5}の核内移行(活性化)を制御することを明らかにしました。
3. Thbs1/integrin/YAPのシグナル伝達経路は、マウスの大動脈圧負荷応答や頸動脈狭窄による新生内膜形成といった血管リモデリング^{*6}時に重要な働きを担うことを明らかにしました。

国立大学法人筑波大学 生存ダイナミクス研究センター(TARA)の柳沢裕美教授、山城義人助教、国立大学法人熊本大学 大学院生命科学研究部微生物薬学分野の大槻純男教授、国立大学法人茨城大学 大学院理工学研究科マイクロナノバイオメカニクス研究室の長山和亮教授らの研究グループは、メカニカルストレス応答の中心を担う、転写調節因子 YAP (Yes-associated protein)の核内移行(活性化)を、細胞外マトリクス Thbs1 が制御し、血管のメカトランスダクション機構において、重要な働きを担うことを明らかにしました。

血管壁は絶えず血圧や血流による血行力学的応力にさらされており、その制御機構の破綻が血管疾患の根本原因ではないかと注目されていますが、その制御メカニズムの詳細は明らかになっていないのが現状です。本研究グループはまず、ラット血管平滑筋細胞を用いて、周期的伸展刺激によって分泌されるタンパク質を網羅的に解析し、Thbs1を同定しました。分泌されたThbs1は細胞膜上の integrin $\alpha v \beta 1$ に結合し、接着斑の活性化やアクチンフィラメントの配向といった伸展刺激応答を制御することを見出しました。加えて、伸展刺激におけるYAPの核内移行は、Thbs1/integrinに依存し、Rap2の不活性化を伴って制御されていること、さらに、Thbs1/integrin/YAPのシグナル伝達経路は、血管圧負荷や狭窄に伴う新生内膜形成時の血管リモデリングに重要な働きを示すことを明らかにしました。本研究は、メカニカルストレス応答に関与する細胞外マトリクスの役割とその制御が、様々な血管疾患の根本原因である可能性を示唆するものであり、今後、細胞外マトリクスを標的とした新たな治療法開発の展開が期待されます。

本研究は、2020年4月22日付 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 誌で先行公開されました。

*本研究は、日本学術振興会の科学研究費補助金(科研費):基盤研究B(課題番号17H04289:柳沢裕美)、および若手研究(課題番号15K20898:山城義人)、などの支援によって実施されました。

研究の背景

血管壁は絶えずメカニカルストレス(血圧や血流による血行力学的応力)にさらされており、その制御機構の破綻が血管疾患の根本原因ではないかと注目されています。細胞が外力を感知し、応答する仕組み(メカニカルストレス応答)とそのシグナル伝達(メカトランスダクション)は、細胞接着斑を介して、細胞と細胞間を繋ぐ細胞内に伝搬されますが、その制御メカニズムの詳細は明らかになっていません。とりわけ、メカトランスダクションを制御する「細胞内」の分子の役割については多くの報告がありますが、「細胞外」の分子の役割についてはほとんど不明であるのが現状です。本研究グループはこれまでに、大動脈瘤において、メカニカルストレス応答異常と細胞骨格のリモデリングが瘤の形成に重要な役割を担っていること[1]、大動脈瘤病変で細胞外マトリクスである Thbs1 タンパク質が過剰に発現していること、また Thbs1 の抑制が大動脈瘤発症の抑止に効果的であることを示してきましたが[2]、血管のメカトランスダクション機構における細胞外マトリクスの役割と、血管疾患発症の分子メカニズムの詳細は明らかにされていませんでした。

研究内容と成果

本研究ではまず、ラット血管平滑筋細胞を用いて周期的伸展刺激(20% strain, 1.0Hz, 20 時間)において分泌されるタンパク質を網羅的に解析し、Thrombospondin-1 (Thbs1)を含む、85 種類のタンパク質を同定しました。Thbs1 が大動脈瘤病変で過剰に発現している先行研究の結果から、Thbs1 の役割に注目し、Thbs1 が伸展刺激後に細胞辺縁部の細胞接着斑に局在することを観察しました(図 1)。次いで、伸展刺激により分泌された Thbs1 が、細胞-細胞外マトリクスの接着を制御する integrin $\alpha v \beta 1$ に結合することを、免疫染色、免疫沈降、近接ライゲーションアッセイを用いて明らかにしました。ゲノム編集により Thbs1 を欠損した細胞では、伸展刺激応答における接着斑の活性化が誘導されず、細胞骨格を形成するアクチンフィラメントの配向が崩れ、細胞張力が減少していることを、免疫染色、原子間力顕微鏡を用いた測定から明らかにしました。細胞の数や器官のサイズは Hippo-YAP 経路というシグナル伝達経路によって制御されています。遺伝子発現解析(RNA-seq)の結果、細胞増殖に関わる転写調節因子 YAP の標的遺伝子の発現が、Thbs1 欠損細胞では伸展刺激後も抑制されること、伸展刺激による YAP の核内移行(活性化)には Thbs1 が必要であることを見出しました(図 2)。また、YAP の核内移行は、Thbs1 の integrin $\alpha v \beta 1$ への結合と、低分子量 G タンパク質 Rap2 の不活性化を伴って、Hippo 経路依存的に制御されていることがわかりました。さらに、マウスを用いた解析において、Thbs1 欠損マウスは、横行大動脈縮窄術(TAC)による圧負荷により、血管の破裂・解離を引き起こす一方、頸動脈狭窄術による新生内膜の形成時に、新生内膜細胞の増殖を抑制することを明らかにしました。

これらの結果から、細胞のメカニカルストレス応答の中心を担う、転写調節因子 YAP の活性化を、細胞外マトリクス Thbs1 が制御することがわかりました。さらに、Thbs1 が制御する YAP 活性化のシグナル伝達経路は、血管壁の圧負荷応答や、狭窄に伴う新生内膜形成時の血管リモデリングに重要な働きを示すことを明らかにしました(図 3)。

今後の展開

今後、Thbs1 のみならず、他の細胞外マトリクスについても、そのメカトランスダクションへの関与と血管疾患への関与が明らかになると期待できます。また、細胞外マトリクスを標的とした新たな治療法開発の展開が期待されます。

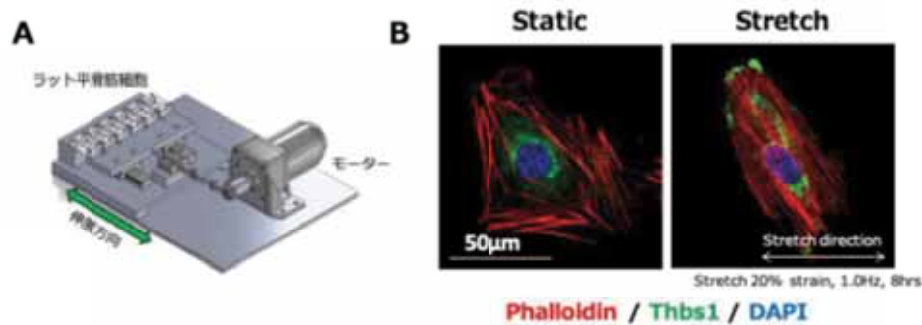


図1. 周期的伸展刺激後のThbs1の局在。A) 細胞伸展装置（筑波大学医学工作室制作）
 B) Static（伸展なし）条件下では、核の周辺部に局在するのに対して、Stretch後は、細胞辺縁部へ局在が変化する。

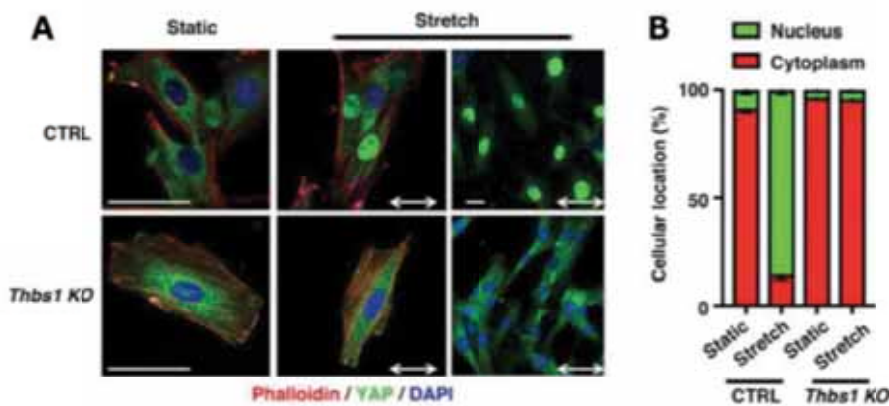


図2. 周期的伸展刺激後のYAPの局在。A) 野生型の細胞では、伸展後（Stretch）にYAPが核内移行するのに対して、Thbs1欠損細胞（Thbs1KO）では、YAPは細胞質に留まったままである。B) 細胞質（Cytoplasm）と核内（Nucleus）のYAPの割合。

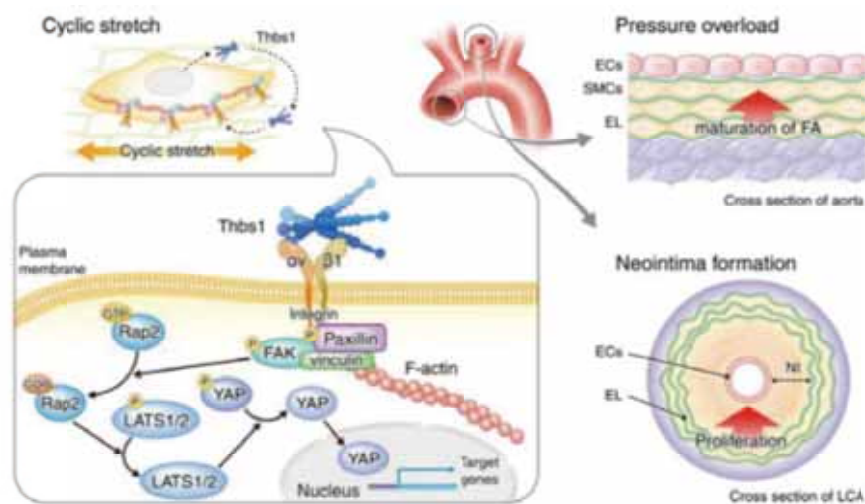


図3. Thbs1を介したYAP制御の概略。分泌されたThbs1はintegrin $\alpha\text{v}\beta\text{1}$ へ結合し、細胞接着斑を活性化する。Thbs1/ integrin $\alpha\text{v}\beta\text{1}$ の結合は、Rap2の不活性化とHippo経路のLATS1/2の脱リン酸化を伴って、YAPの核内移行を制御する（左図）。Thbs1/integrin/YAPのシグナル伝達経路は、血管圧負荷における応答と、狭窄に伴う新生内膜形成時の血管リモデリングにおける役割を担う（右図）。

用語解説

*1 周期的伸展刺激

メカニカルストレスの一つである、伸展張力。生理条件では、5-10%の伸展率。本実験では、高い伸展率(20%)のもと、伸展頻度は心臓の鼓動に合わせ、毎秒1回(60回/分:1Hz)に設定した。

*2 マトリセルラータンパク質(細胞外マトリクスタンパク質)

細胞の周りや細胞と細胞の間に存在する細胞外マトリクス的一种で、それ自身はマトリクスの構造を担っていないタンパク質。細胞とマトリクス間の相互作用を仲介し、細胞間シグナル伝達やマトリクス形成調節などを担う。

*3 メカトランスダクション

細胞が力刺激を感知し、細胞内シグナルへと変換すること。これにより、細胞の増殖、分化、運動などを制御する。

*4 細胞接着斑分子

細胞-基質間の接着を制御するタンパク質の総称。

*5 YAP (Yes-associated protein)

メカニカルストレス応答の中心を担う転写調節因子。DNAに直接結合する転写制御因子と基本転写因子の間を架橋する。器官サイズを規定するHippo経路の標的としても注目されている。

*6 血管リモデリング

種々の刺激に対する、血管を構成する内皮細胞・平滑筋細胞・線維芽細胞や細胞外マトリクスの変化を伴った、血管の構造及び機能変化。

参考文献

- [1] Yamashiro et al. *Sci. Signal.* 8.399:ra105, (2015)
- [2] Yamashiro et al. *Circ. Res.* 123(6):660-672 (2018)

掲載論文

- 【題名】 Matrix mechanotransduction mediated by thrombospondin-1/integrin/YAP in the vascular remodeling (トロンボスポンジン1を介した血管のメカトランスダクション機構の解明)
- 【著者】 Yoshito Yamashiro, Bui Quoc Thang, Karina Ramirez, Seung Jae Shin, Tomohiro Kohata, Shigeaki Ohata, Tram Anh Vu Nguyen, Sumio Ohtsuki, Kazuaki Nagayama, and Hiromi Yanagisawa
- 【掲載誌】 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, DOI: 10.1073/pnas.1919702117)

問い合わせ先

【研究に関すること】

柳沢 裕美 (やなぎさわ ひろみ)

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター(TARA) 教授

<http://sagymouse.tara.tsukuba.ac.jp/>

山城 義人 (やましろ よしと)

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター(TARA) 助教

【取材・報道に関すること】

筑波大学 広報室

Tel: 029-853-2040

Email: kohositu@un.tsukuba.ac.jp

熊本大学 総務部総務課広報戦略室

Tel: 096-342-3269

Email: sos-koho@jimu.kumamoto-u.ac.jp

茨城大学 広報室

Tel: 029-228-8008

Email: koho-prg@ml.ibaraki.ac.jp

2020年5月8日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学
国立研究開発法人理化学研究所

生物の個体サイズを決定するステロイドホルモン生合成の制御メカニズムを発見
～成長を調節する神経内分泌メカニズム～

研究成果のポイント

1. 個体サイズを決定する神経内分泌メカニズムを、キイロショウジョウバエにおいて、新たに発見しました。
2. コラゾニンというペプチドホルモンを産生する神経が、ステロイドホルモン生合成を制御し、個体の成長を調節することを明らかにしました。
3. 成長を調節する昆虫ステロイドホルモンの生合成を、発生段階特異的に制御する神経経路を同定した、初めての成果です。

国立大学法人筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 丹羽隆介教授、島田裕子助教、同大学院生命環境科学研究科 博士後期課程3年(日本学術振興会特別研究員、現同大博士研究員)井村英輔らの研究グループは、個体サイズを決定する神経内分泌メカニズムを、モデル生物であるキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* で新たに発見しました。

生物は、生育環境に応じて成長と成熟を調節し、体を適切なサイズにして繁殖を成功させます。こうした成長と成熟のバランスを調節する生体分子の一つが、ステロイドホルモンです。しかし、その生合成の分子機構には不明な点が多く残されています。本研究グループは、キイロショウジョウバエにおいて、コラゾニンというペプチドホルモンを産生する神経が、ステロイドホルモン生合成を制御し、個体の成長を調節することを明らかにしました。本研究は、昆虫ステロイドホルモン生合成を、発生段階特異的に制御する神経経路を同定した、初めての成果です。コラゾニンの働きは、進化的に幅広く保存されたものであると考えられていることから、今回の成果は、動物に共通したステロイドホルモン生合成の制御メカニズムの解明に貢献することが期待されます。

本研究は、理化学研究所生命機能科学研究センター 西村隆史博士、静岡県立大学食品栄養科学部食品生命科学科 大原裕也助教、大学共同利用機関法人情報システム研究機構国立遺伝学研究所 近藤周助教、および国立大学法人東北大学大学院生命科学研究科 谷本拓教授、ハワードヒューズ医学研究所(米国) Albert Cardona 博士(現ケンブリッジ大学)、ボン大学(ドイツ) Mike J. Pankratz らの研究グループとの国際的な共同研究によって行われました。

本研究の成果は、2020年5月7日付「*Current Biology*」で公開されました。

* 本研究は、文部科学省および日本学術振興会の科学研究費補助金の研究助成金、公益財団法人内藤記念科学振興財団、公益財団法人井上科学振興財団、日本分子生物学会富澤純一・桂子基金の支援によって実施されました。

研究の背景

多くの生物の成長過程には、ヒトの思春期や昆虫の変態に代表されるように、生殖能力を有さない幼若期から生殖能力を有する成体期へと移行する成熟ステップが設けられています。すなわち、生物には、繁殖を成功させるために、生育環境に応じて体を適切なサイズにまで成長させた上で性的に成熟する制御機構が備わっています。こうした、成長と成熟の制御を担う主要な生体分子の一つが、ステロイドホルモン^{注1)}です。ステロイドホルモンは、適切なタイミングで機能するために、個体内外の環境に応答して生合成されます。しかし、その分子機構には不明な点が多く残されています。

昆虫は、環境依存的な成長と成熟を研究する上で優れたモデル系です。古くから、昆虫ステロイドホルモン「エクジステロイド^{注2)}」が前胸腺という生合成器官で産生され、昆虫の成熟ステップである脱皮と変態を制御することが、研究されてきました。とりわけ、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* では、幼虫期において、エクジステロイドの体内濃度が上昇と下降を繰り返しており、高い濃度のエクジステロイド(以下、ピークエクジステロイド)が成熟を促進的に、低い濃度のエクジステロイド(以下、基底エクジステロイド)が体成長を抑制的に制御していることが知られています。また、脳から前胸腺に伸びる前胸腺刺激ホルモン産生神経(Prothoracicotropic hormone-producing neurons、以下 PTH 神経)が、両方のエクジステロイド生合成において重要な役割を持つことが報告されています(図 1)。PTH 神経の活動を調節する機構はいくつか報告されていますが、それらはいずれもピークエクジステロイドの生合成制御に関与するもので、基底エクジステロイドの生合成制御メカニズムについてはよくわかっていませんでした。

研究内容と成果

そこで本研究グループは、前胸腺と PTH 神経の両方との神経連絡を持つ、コラゾニン産生神経(Corazonin-producing neurons、以下 Crz 神経)に着目し、基底エクジステロイドの生合成制御メカニズムの解明を目指しました(図 2A)。コラゾニンは、様々な昆虫の生理機能を調節するペプチドホルモンの 1 つです。

初めに、Crz 神経のエクジステロイド生合成への関与を検証するために、Crz 神経の機能を阻害した際の発生への影響を観察しました。Crz 神経の機能を阻害すると、成熟には異常が見られませんでした。しかし、個体サイズが増大しました(図 2B)。さらに、体内のエクジステロイド濃度を計測したところ、Crz 神経の機能を阻害した個体では、個体サイズを決定づける 3 齢幼虫中期の基底エクジステロイド濃度の上昇が遅れることが判明しました(図 2C)。これらの結果から、Crz 神経が、基底エクジステロイド生合成の制御を介して体成長を調節することが示唆されました。

次に、Crz 神経から放出されるコラゾニンペプチドが、PTH 神経で実際に受容されているかを検証するために、コラゾニンの受容体(Corazonin receptor、以下 CrzR)が PTH 神経に存在しているかを調べました。興味深いことに、CrzR は PTH 神経に存在しており、その量が 3 齢幼虫中期に高いことがわかりました(図 2D)。また、脳培養系を用いた実験から、PTH 神経はこの時期特異的に Crz 神経に反応することがわかりました。加えて、PTH 神経特異的に CrzR の機能を阻害した個体の発育を観察したところ、Crz 神経の機能を阻害した個体同様に、個体サイズが増大しました。これらの結果は、CrzR が 3 齢幼虫中期特異的に PTH 神経で多く存在するために、Crz 神経が PTH 神経に作用することを示唆しています。

最後に、Crz 神経がどのようなシグナルを受け取ってエクジステロイド生合成を制御しているかを検証するために、Crz 神経に入力する神経の探索を行いました。生体アミンの 1 種であるオクトパミンの受容体が Crz 神経で発現していたことから、オクトパミンを産生する神経(以下、オクトパミン神経)に着目すると、食道の下方にある神経節で、オクトパミン神経と Crz 神経が神経連絡をもつことが明らかになりました。この神経節には口器からの感覚入力が入ることから、Crz 神経がオクトパミン神経を介して栄養や味覚シグナルを受容していることが予測されます。

キイロショウジョウバエは、ステロイドホルモン研究の優れたモデルとして、歴史的に重要な貢献をしてきました。これまで、ピークエクジステロイドが成熟を制御することが長く研究されてきた一方で、基底エクジステロイドの機能及び

その生合成制御メカニズムは近年になって着目されはじめたばかりです。そのような中、本研究は、基底エクジステロイドの生合成のみを発生段階特異的に制御する神経経路を同定することに初めて成功しました(図 3)。

今後の展開

生物は多種多様な環境の中で繁殖を成功させるために、生育環境に応じて成長と成熟を調節します。本研究では、Crz 神経が栄養の環境シグナルを受け取り、個体サイズを調節することが示唆されています。今後さらに、Crz 神経によるサイズの調節が、栄養条件によって変化するかを調べる必要があります。

初めにヒトの思春期を例に挙げましたが、興味深いことに、脊椎動物のステロイドホルモンの一種である性ホルモン^{注3)}の生合成において中心的な役割を果たす性腺刺激ホルモン放出ホルモン^{注4)}の受容体が、CrzR の類縁分子であると考えられています。Crz 神経と CrzR が、個体内外のどのようなシグナル入力を受けるかの解明は、幼若期から成虫期への成長及び成熟を制御する、進化的に保存された神経内分泌メカニズムを理解する上で重要な手がかりになり得ます。本研究成果は、哺乳類を含む幅広い動物における、ステロイドホルモンの生合成の制御メカニズムの解明に貢献することが期待されます。

参考図

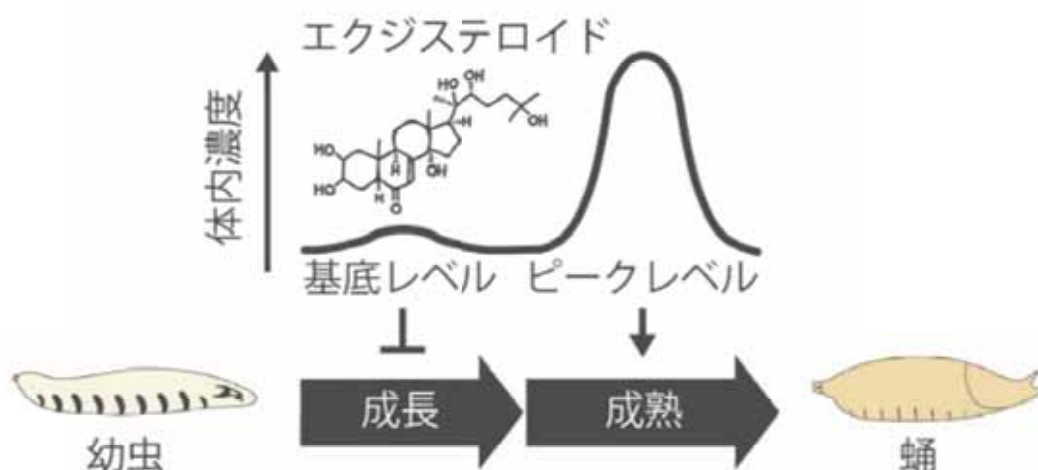


図1: エクジステロイドによる成長と成熟の制御

ショウジョウバエでは、幼虫期においてエクジステロイドの体内濃度が上昇と下降を繰り返しており、基底レベルのエクジステロイドが成長を抑制的に、ピークレベルのエクジステロイドが成熟を促進的に制御している。

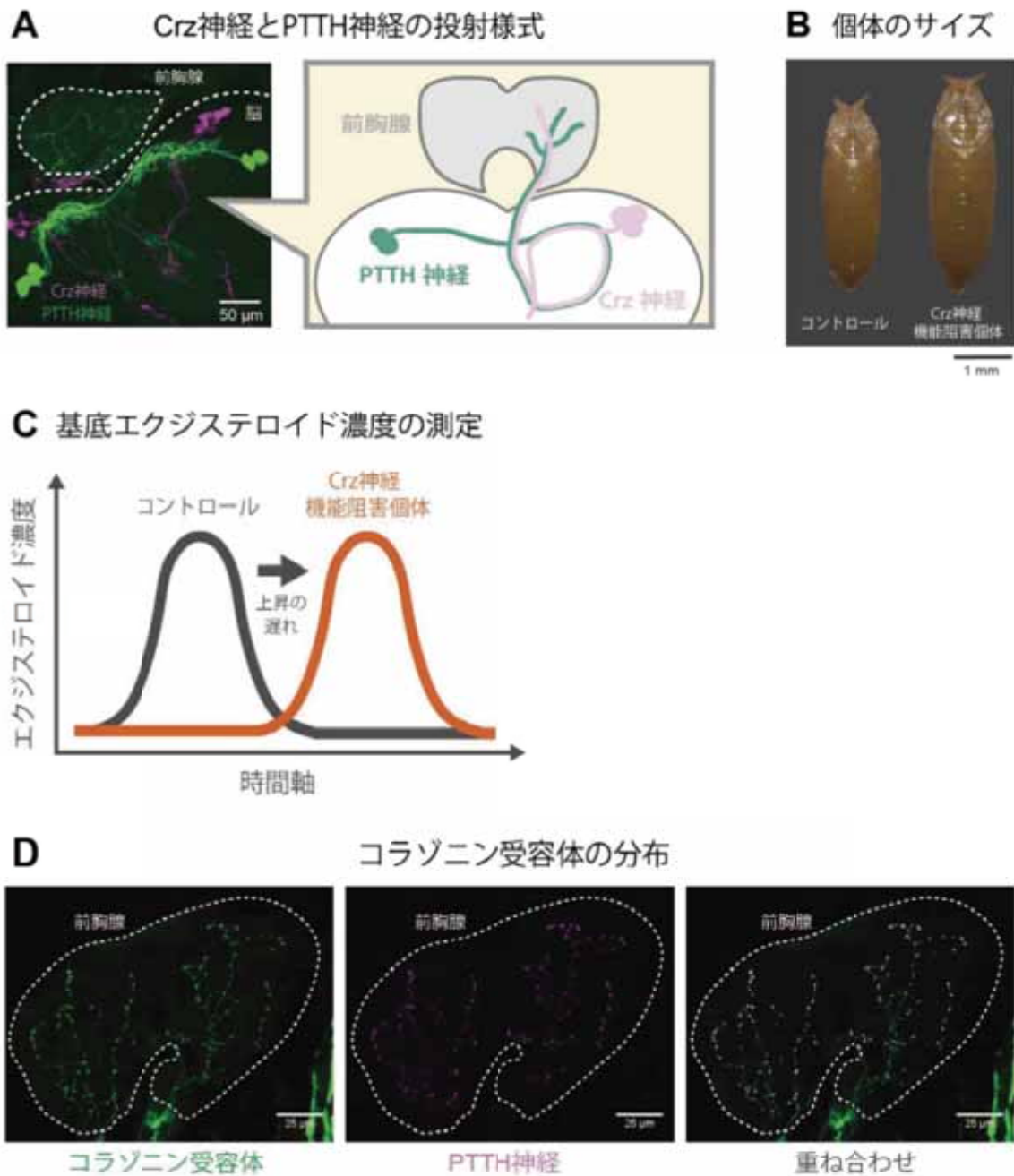


図2: コラゾニン産生神経による基底エクジステロイド生合成を介した体サイズの調節

- (A) コラゾニン産生神経(Crz 神経、紫)と前胸腺刺激ホルモン産生神経(PTTH 神経、緑)の投射様式の観察。Crz 神経は前胸腺とPTTH 神経の両方に神経連絡を持つ。
- (B) ショウジョウバエ蛹の体サイズ。Crz 神経の機能阻害個体ではコントロール個体に比べて体サイズが増大した。
- (C) 体サイズを決定づける3 齢幼虫中期のエクジステロイド濃度の測定。Crz 神経の機能阻害個体では、コントロール個体に比べて基底エクジステロイド濃度の上昇が遅れた。
- (D) コラゾニン受容体の分布の観察。コラゾニン受容体のシグナル(緑)はPTTH 神経のシグナル(紫)と重なった。

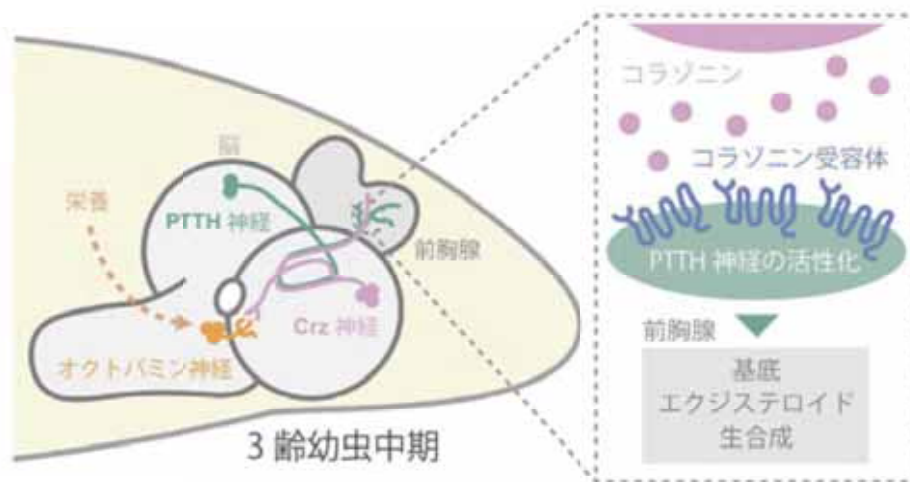


図3: 基底エクジステロイド生合成を制御する神経内分泌メカニズムのモデル図

個体サイズを決定づける 3 齢幼虫中期に、Crz 神経はオクトパミン神経を介して栄養シグナルを受け取る。Crz 神経から放出されるコラゾニンは、コラゾニン受容体に受け取られて PTTH 神経を活性化し、前胸腺での基底エクジステロイド生合成を制御する。

用語解説

注1) ステロイドホルモン

化学構造的にステロイド核を有するホルモンの総称。細胞膜を通過して細胞内での遺伝子の発現を直接制御する性質を持つ。

注2) エクジステロイド

昆虫における主要なステロイドホルモンの総称。幼虫期において前胸腺と呼ばれる内分泌器官で産生されて、個体全体の成長や脱皮・変態の誘導を司る。成虫では生殖や記憶学習を制御する。

注3) 性ホルモン

脊椎動物の生殖腺から分泌されるステロイドホルモン。生殖器の発育や機能維持などに関係する。雄性ホルモンと雌性ホルモンがあり、その分泌は下垂体の性腺刺激ホルモンにより調節される。

注4) 性腺刺激ホルモン放出ホルモン

視床下部で合成、分泌されるペプチドホルモン。下垂体に作用し、性腺刺激ホルモンを分泌させる。

掲載論文

【題名】The Corazonin-PTTH Neuronal Axis Controls Systemic Body Growth by Regulating Basal Ecdysteroid Biosynthesis in *Drosophila melanogaster*

(キイロショウジョウバエの Crz-PTTH 神経経路が基底エクジステロイド生合成を介して体成長を調節する)

【著者名】Eisuke Imura(井村英輔), Yuko Shimada-Niwa(島田裕子), Takashi Nishimura(西村隆史), Sebastian Hückesfeld, Philipp Schlegel, Yuya Ohhara(大原裕也), Shu Kondo(近藤周), Hiromu Tanimoto(谷本拓), Albert Cardona, Michael J Pankratz, Ryusuke Niwa(丹羽隆介)

【掲載誌】Current Biology (DOI: 10.1016/j.cub.2020.03.050)

問い合わせ先

島田 裕子 (しまだ ゆうこ)

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター(TARA) 助教

令和 2 年 5 月 18 日
岡 山 大 学
筑 波 大 学
理 化 学 研 究 所
京 都 大 学
兵 庫 県 立 大 学
基 礎 生 物 学 研 究 所
神 戸 大 学

進化すると色素タンパク質が増える？ 珪藻の光化学系 I-集光性色素タンパク質複合体の立体構造解明

◆発表のポイント

- ・ 光合成生物の特徴の一つである見た目の色の違いが存在する理由を解き明かすため、褐色を呈する海洋珪藻由来の光化学系 I-集光性色素タンパク質の立体構造をクライオ電子顕微鏡^(注1)により決定しました。
- ・ 珪藻の光化学系 I の周りに 16 個の集光性色素タンパク質^(注2) が結合していることが判明しました。紅藻の光化学系 I-集光性色素タンパク質構造と比較すると、珪藻では集光性タンパク質の増加および独特な結合様式であることがわかりました。
- ・ 光合成生物の進化において、集光性色素タンパク質の数の調節が環境応答や生存戦略として重要である可能性が示唆されました。

岡山大学異分野基礎科学研究所の長尾遼特任講師、加藤公児特任准教授、秋田総理准教授、沈建仁教授、筑波大学生存ダイナミクス研究センターの宮崎直幸助教らの共同研究グループは、理化学研究所堂前直ユニットリーダー、京都大学伊福健太郎准教授、兵庫県立大学菓子野康浩准教授、基礎生物学研究所内山郁夫准教授、神戸大学秋本誠志准教授との共同研究により、クライオ電子顕微鏡を用いて、海産性珪藻の光化学系 I-集光性色素タンパク質複合体の立体構造解析に成功しました。この結果から、光合成生物が多様な光環境に適応するために、集光性色素タンパク質の数や結合様式を調整することを明らかにしました。本研究成果は、日本時間 5 月 18 日（月）18:00（英国時間：18 日 10:00）、英国の科学雑誌「*Nature Communications*」に掲載されます。

本研究成果は、光合成生物がなぜ多様な色を持ち、生育の場所を拡大してきたのか？という問いに対する知見を与えるものです。色の多様性は光合成生物の生存戦略の一環です。生育の場所を拡大できたのは、珪藻が褐色を呈することで、水中を透過する限られた光エネルギーを効率よく利用しているからです。また、珪藻の光化学系 I タンパク質に結合する集光性色素タンパク質が比較的深い海中に生息する紅藻や陸上に生息する緑色植物と大きく異なることがわかりました。この成果は、光合成生物の集光性色素タンパク質の多様性を紐解く知見となり、なぜ光合成生物は見た目の色が異なるのか？という進化的な知見を提供するものです。

◆研究者からひとこと

光化学系 I に結合する集光性色素タンパク質の数や結合様式は、紅藻・緑藻・陸上植物とで異なることが知られていました。珪藻の光化学系 I に結合する集光性色素タンパク質の数や配置は異なるのか？と仮説を置き、研究に臨んだところ、明確な違いが見いだされました。その一方、なぜ数を増やす必要があったのか？機能的な利点は？など更なる疑問も出てきました。一難去ってまた一難、私の興味は尽きそうもありません。



長尾特任講師

■発表内容
<現状>

光合成とは、太陽の光エネルギーを利用して水・二酸化炭素から炭水化物や酸素を合成する反応です。光化学系 I・光化学系 II と呼ばれる膜タンパク質複合体が光合成反応の中心であり、光エネルギーを有用な化学エネルギーへと変換する役割を担います。光合成生物種は共通する光化学系タンパク質を有しています。一方で、光化学系タンパク質に結合し、光エネルギーを供給する集光性色素タンパク質は、極めて多様性に富んでいます。陸上に生息する植物や海中に生息する藻類など、光合成生物は多様な環境に適応しており、生存戦略の一環として、集光性色素タンパク質に結合した色素の種類やタンパク質の自体の組成を最適化していった結果です。つまり、光合成生物が多様な色を持つ理由は、集光性色素タンパク質にあるといえます。

珪藻や紅藻などの水域に存在する光合成生物は、陸上植物と異なる進化を遂げており、それぞれの生存環境に応じて異なる集光性色素タンパク質を持ちます。水中を透過する太陽光エネルギーは、青色から緑色の光であるため、陸上植物よりも限られた光エネルギー資源を確保するために多様性が生まれたと考えられています。淡水域、汽水域、海水域に広く分布する珪藻は、重要な一次生産生物です。紅藻を細胞内へ取り込んで進化した二次共生藻と考えられており、褐色を呈しています。その原因は集光性色素タンパク質であるフコキサンチン-クロロフィル a/c 結合タンパク質 (FCP) にあります。FCP は太陽光エネルギーの中の青色から緑色の光を吸収することに優れており、これは植物が持つ集光性色素タンパク質の吸収領域である赤色と青紫色と大きく異なります。

光化学系 I の周りに結合する集光性色素タンパク質は、その数や配置が紅藻・緑藻・陸上植物の間で異なります。しかし、珪藻の光化学系 I に FCP がどのように結合し、光エネルギーの供給に寄与しているのか、その詳細は不明でした。珪藻の FCP と光化学系 I の分子集合および光エネルギー供給機構の仕組みを明らかにすることは珪藻の光捕集戦略の解明だけでなく、なぜ光合成生物が色の多様性を持つようになったのか？という進化的な疑問を解明するうえでもとても重要です。

<研究成果の内容>

長尾特任講師、加藤特任准教授、秋田准教授、沈教授、宮崎助教らの共同研究グループは、理化学研究所堂前直ユニットリーダー（質量分析を用いた集光性色素タンパク質の同定・定量）、京都大学伊福健太郎准教授（集光性色素タンパク質の遺伝子解析、分子系統解析）、兵庫県立大学菓子野康浩准教授（珪藻ゲノムデータの提供）、基礎生物学研究所内山郁夫准教授（ゲノム解析支

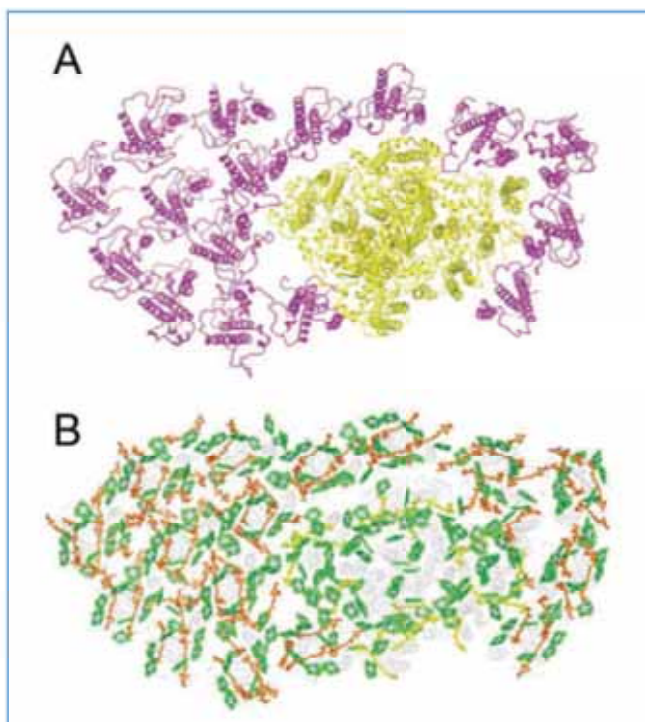
PRESS RELEASE

援)、神戸大学秋本誠志准教授(分光学的解析による構造の解釈)との共同研究により、珪藻から光化学系 I-FCP 複合体を精製し、クライオ電子顕微鏡により 2.4 Å (1 Å は 1 mm の 1 千万分の 1 の長さ) の解像度を持つ立体構造を解明しました。光化学系 I 当たり、16 個の FCP が光化学系 I を取り囲むように結合しており、多数の色素分子が配置していることがわかりました(下図)。これは、これまでに報告されている光化学系 I-集光性色素タンパク質複合体の中で最大のものです。珪藻は紅藻由来の葉緑体をもつと言われています。紅藻の光化学系 I には 5 個の集光性色素タンパク質が結合するため、珪藻は進化の過程で更に 11 個もの集光性色素タンパク質を追加で光化学系 I に結合させることがわかりました。また、陸上植物や緑藻の集光性色素タンパク質の光化学系 I に対する結合様式とも異なることもわかりました。光合成生物は進化の過程において、色素成分のみならず、タンパク質の結合や配置も変化させてきたことが示されました。

<社会的な意義>

太陽光を利用したクリーンエネルギーの活用は、エネルギー問題や環境問題の解決につながる、非常に重要な事柄です。光化学系 I-FCP 複合体は、植物とは異なる太陽光エネルギーの成分を効率よく吸収・利用しています。今回、我々が解明した構造は、太陽光エネルギーの成分を利用した電気エネルギーへの変換に必要な分子配置の設計に指針を提供することが期待されます。将来的には、得られた構造やこれまで解析された他の光合成装置の構造の知見を利用することで、太陽光エネルギーの成分の選択的利用に基づいたエネルギー利用デバイスの創出が期待されます。

図. 珪藻の光化学系 I-FCP 複合体の全体構造 (A) と色素分子の配置 (B)。(A) 黄色は光化学系 I、桃色は FCP。(B) 珪藻の光化学系 I-FCP 複合体中の色素分子の配置。緑色はクロロフィル、黄色・橙色はカロテノイド。



■論文情報

論文名: “Structural basis for assembly and function of a diatom photosystem I-light harvesting supercomplex”

「珪藻光化学系 I-FCP の分子集合と機能に関する構造基盤」

掲載紙: *Nature Communications*

著者: Ryo Nagao, Koji Kato, Kentaro Ifuku, Takehiro Suzuki, Minoru Kumazawa, Ikuo Uchiyama, Yasuhiro Kashino, Naoshi Dohmae, Seiji Akimoto, Jian-Ren Shen, Naoyuki Miyazaki and

Fusamichi Akita

DOI: 10.1038/s41467-020-16324-3.

■研究資金

本研究は、日本学術振興会・科学研究費補助金「基盤研究C」（課題番号：JP17K0744）、「新学術領域研究（研究領域提案型）」（課題番号：JP19H04726、JP17H06433、JP16H06553）、科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 個人型研究（さきがけ）（課題番号：JPMJPR16P1）、JST 先端的低炭素化技術開発（ALCA）（課題番号：JPMJAL1105）、大阪市立大学人工光合成研究センターにおける共同利用・共同研究、基礎生物学研究所共同利用研究（課題番号：19-455）の支援を受け実施しました。

■補足・用語説明

注1：クライオ電子顕微鏡

液体窒素温度でタンパク質粒子を観察する電子顕微鏡のことです。サンプルへの電子線ダメージを軽減するために液体窒素温度での測定を行います。多数のタンパク質粒子の形状を計測して平均化することで、当該タンパク質の立体構造を解析します。2017年にはノーベル化学賞を受賞した技術です。

注2：集光性色素タンパク質

クロロフィルやカロテノイドなどの色素を結合した、太陽光エネルギーを集める役割を持つタンパク質です。光合成生物の種類に応じて異なる集光性色素タンパク質が存在します。本報告で明らかにした、フコキサンチン-クロロフィル a/c 結合タンパク質（FCP）は珪藻や褐藻に特有であり、その名の通りクロロフィル a、クロロフィル c、フコキサンチンを結合しています。

<お問い合わせ>

岡山大学 異分野基礎科学研究所
特任講師 長尾 遼（ながお りょう）
（電話番号） 086-251-8630
（FAX） 086-251-8502

同上
准教授 秋田 総理（あきた ふさみち）
（電話番号） 086-251-8630
（FAX） 086-251-8502

耐性菌を防ぎつつ人体や環境に有害な微生物集団を除去する方法を発見
～生物由来の界面活性剤を組み合わせると除去効率が向上～

研究成果のポイント

1. 酵母由来の界面活性剤^{注1)}であるソホロ脂質が、細菌を死滅させることなく、細菌が形成する微生物集団(バイオフィルム)を除去できることを発見しました。
2. また、ソホロ脂質と一般的な界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウムを組み合わせることによって、その除去効率が100倍以上向上することも見いだしました。
3. 環境負荷の低い生物由来の界面活性剤と、石油化学製品である従来の界面活性剤との組み合わせによる相乗効果の発見は、人体や環境に有害なバイオフィルム除去におけるコストおよび界面活性剤使用量の削減に貢献することが期待されます。

国立大学法人筑波大学 生命環境系 Utada S. Andrew 准教授、野村暢彦教授らの研究グループは、細菌がバイオフィルムを形成しやすい環境を模倣したマイクロ流路デバイス^{注2)}を用いて、環境に優しい生物由来の界面活性剤と、バイオフィルム除去に一般的に使用されている石油化学製品の界面活性剤を組み合わせることで、除去効果が劇的に向上することを発見しました。

細菌はバイオフィルムを形成して生存していますが、人間にとってはさまざまな疾患をもたらす可能性があります。これを除去することが重要です。しかしながら、細菌を死滅させてしまうと、耐性菌の出現が問題になります。そのため、細菌を殺さずに、バイオフィルムを除去することが必要です。バイオフィルムを除去する方法の一つとして、界面活性剤の利用がありますが、ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate, SDS)などの一般的な界面活性剤は人工的に合成された石油化学製品であり、多量に使用すると環境に影響を及ぼします。そこで本研究グループは、環境に優しい生物由来界面活性剤として、酵母由来のソホロ脂質(SLx)の抗バイオフィルム活性に着目し、その緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)に対するバイオフィルム除去効果を調べました。その結果、SDSなどと比較して、SLxは優れたバイオフィルム除去効果を持つことを見いだしました。しかも、SLxは細菌を死滅させませんでした。そのメカニズムを詳細に解析したところ、SLxは、細胞とガラス表面との接着およびバイオフィルム内部の凝集性を減弱させることがわかりました。さらに、SLxとSDSを組み合わせると相乗効果によって、それぞれを個別に作用させた場合に比べて、100倍以上も向上することを発見しました。これらのことから、生物由来界面活性剤と石油化学製品の界面活性剤を併用することで、バイオフィルムを除去するためのコストおよび界面活性剤の使用量を削減できることが示唆されました。

本研究の成果は、2020年6月1日付「Langmuir」でオンライン先行公開されました。

*本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST) 戦略的創造研究推進事業 ERATO野村集団微生物制御プロジェクト(研究期間:2015～2020年度)の一環で実施されました。

研究の背景

細菌が、刻々と変化する環境下で生存するための生活様式の一つにバイオフィームがあります。細菌の集団からなるバイオフィームは、細菌が分泌する細胞外高分子物質(EPSs)による粘着性の高いマトリックスによって、水中の物質(固体)表面に強固に接着しています。EPS マトリックスは、バイオフィームにおいて、化学的・物理的攻撃から細菌を覆い保護するなどの役割を果たしており、この作用によって、抗生物質に対する耐性が、浮遊性細胞に比べて100倍以上高められています。一方、細菌は人間に深刻な慢性疾患を引き起こす可能性があるため、その集団であるバイオフィームを除去することが課題となっています。バイオフィームは機械的、化学的、あるいは抗生物質処理により破壊できますが、耐性菌の出現が問題となるため、細菌を殺さず除去することが求められます。一般的に、バイオフィーム除去に用いられる界面活性剤は、石油化学製品であり、ある程度の環境毒性を持っています。持続可能な社会の実現に向け、環境負荷の低い代替製品への需要が高まっており、生物由来の界面活性剤への注目が高まっています。

研究内容と成果

本研究では、生物由来の界面活性剤として、*Candida* 属の酵母が産生する糖脂質である SLx に着目し、既存の界面活性剤3種(SDS および Tween20、Tween80)を比較対象として、緑膿菌が形成するバイオフィームの除去効果を検証しました。バイオフィームの観察には、バイオフィームを形成しやすい多孔質構造環境を模倣したマイクロ流路デバイスを用いました(図1)。その結果、SLx は、既存の界面活性剤と比較して、比較的低い臨界ミセル濃度(CMC)^{注3)}でバイオフィームを除去することを見いだしました(図2)。

また、SLx は細菌を殺さずに短時間でバイオフィームを除去できることから、既存の界面活性剤とは異なるメカニズムで作用している可能性が考えられました。そこで、EPS を大量に作る株を用いて SLx の作用メカニズムを検証した結果、SLx は EPS とガラス表面の間の接着剤、および EPS 分子間の結合を弱めていることがわかりました。

さらに、SLx と SDS とを組み合わせることによる相乗効果が明らかとなりました(図3)。この組み合わせを用いると、バイオフィームの除去速度だけでなく、除去量も向上させるため、SDS の濃度を低くしても短時間で効率的に除去することができます。

今後の展開

SLx は、バイオフィームの細菌を殺すことなく、細菌の表面付着およびバイオフィームの高い粘着性を低下させる能力を持っていることがわかりました。また、SDS と組み合わせると、どちらかの界面活性剤の濃度を大幅に下げても、同様の相乗効果を示しました。これによって界面活性剤の使用量を削減できるため、界面活性剤の自然環境への流出による水生生物を始めとする生態系への負担を減らすなど、環境影響を低減する可能性があります。さらに、SDS と SLx を組み合わせれば、体内で使用するのに十分に低い濃度でもバイオフィームを破壊できるため、人体への投与に適用される可能性があります。

本研究により、生物由来界面活性剤の新たな産業的価値が明らかとなりました。今後さらに、有害な細菌バイオフィームを除去できる生物由来界面活性剤のスクリーニングを進めていく予定です。

参考図

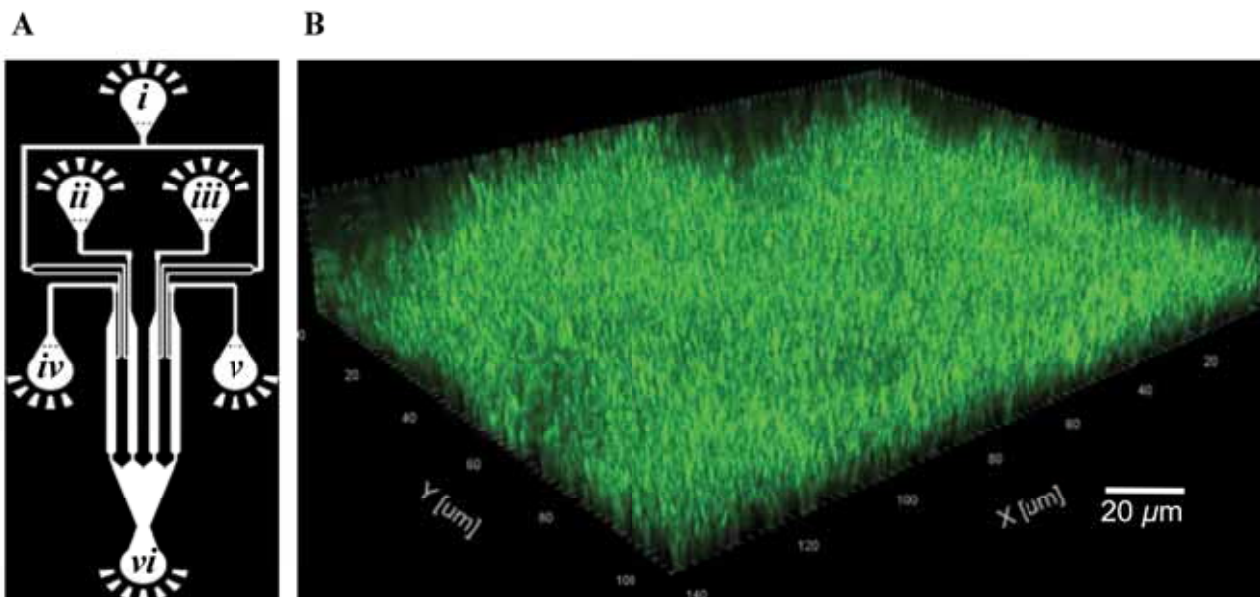


図1. マイクロ流路におけるバイオフィーム形成

(A) マイクロ流路のモデル図。(i)は細菌の植菌、(ii-v)は異なる濃度の界面活性剤の挿入口、(vi)は排出口を示す。
 (B) 培養開始から12時間後のバイオフィームの共焦点顕微鏡画像。蛍光染色したDNAを緑で表示。

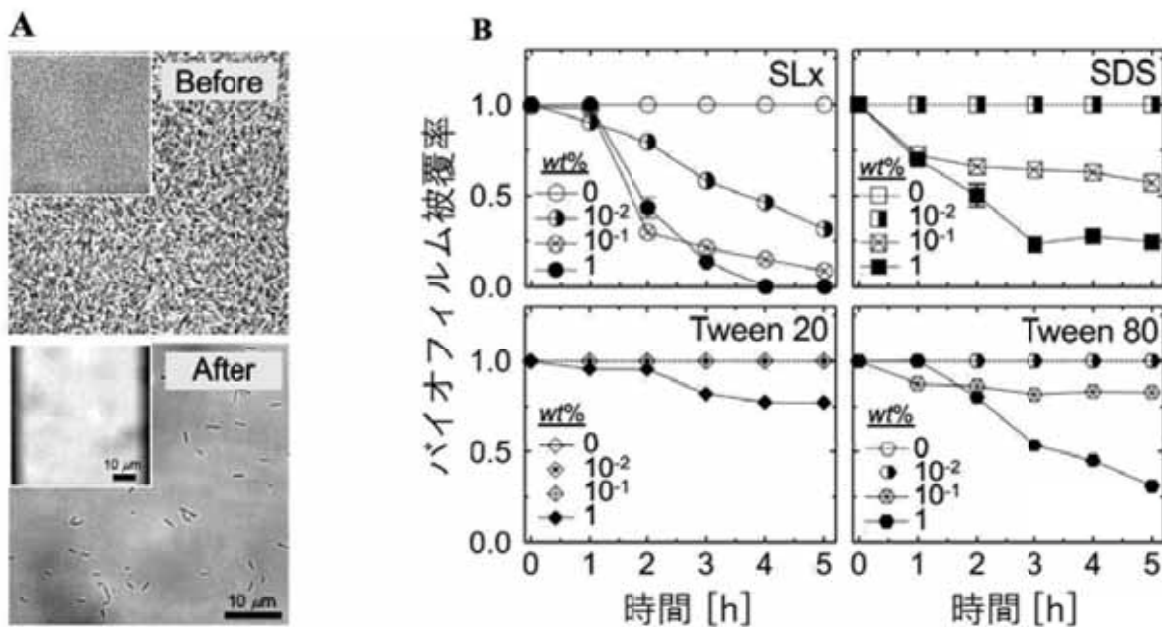


図2. 界面活性剤添加によるバイオフィームの変化

(A) SLx 添加前後のバイオフィーム画像。
 (B) 各界面活性剤の添加量と添加後のバイオフィーム表面積の時間変化。

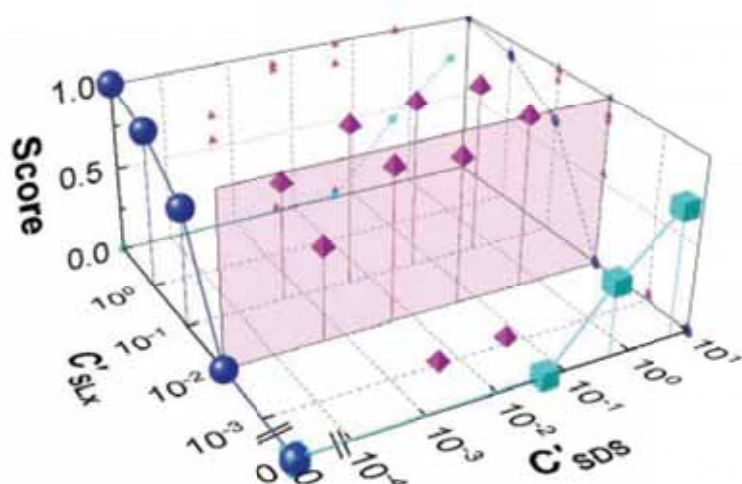


図3. SLx と SDS の組み合わせによるバイオフィルム除去効果。紫で表示した部分が高い相乗効果を示す。CMC で標準化した界面活性剤の濃度(X 軸:SLx, Y 軸:SDS)、バイオフィルム除去のスコア(Z 軸)を示す。青・水色・紫のプロットは、それぞれ SLx 単独、SDS 単独、SLx と SDS 混合(組み合わせ)で処理した結果を示す。

用語解説

注1) 界面活性剤

異なる物質が接する界面に集まりやすく、少量で界面張力を小さくする作用を持つ物質。例えば、石鹼(せっけん) 水は水よりも界面張力が小さいが、これは石鹼の分子中に疎水基と親水基があるため分子が界面に吸着され、界面を広げようとする作用が界面張力を弱めることによる。洗剤・乳化剤・帯電防止剤・起泡剤などに用いられる。表面活性剤ともいう。

注2) マイクロ流路デバイス

フォトリソグラフィーという技術を用いて基板を作り、微細切削加工、成形などの方法で作製した流路を持つデバイス。本研究では、細菌が接着し、バイオフィルム形成可能な多孔質環境を模倣したマイクロ流路デバイスを作製し、バイオフィルムの挙動を観察した。

注3) 臨界ミセル濃度(Critical Micelle Concentration, CMC)

例えば水中の石鹼分子は、親水性のカルボキシル基を外側に、親油性のアルキル基を内側にして配列し、球状のミセル(界面活性剤などの分子またはイオンが数十個から数百個集まったコロイド粒子)を作る。界面活性剤の濃度が高くなればなるほど表面張力が下がるが、界面活性剤が全てミセルとなり、それ以上表面張力が下がらなくなる時の界面活性剤の濃度を、臨界ミセル濃度という。

掲載論文

【題名】 Synergy between Sophorolipid Biosurfactant and SDS Increases Efficiency of *P. aeruginosa* Biofilm Disruption

(界面活性剤ソホロ脂質と SDS との相乗効果による緑膿菌バイオフィルムの効率的な破壊)

【著者名】 Bac V.G Nguyen, Toshiki Nagakubo, Masanori Toyofuku, Nobuhiko Nomura, Andrew S. Utada

【掲載誌】 Langmuir (DOI: 10.1021/acs.langmuir.0c00643)

問合わせ先

【研究に関すること】

Utada S. Andrew(ウタダ アンドリュウ)

筑波大学 生命環境系 准教授

野村 暢彦(ノムラ ノブヒコ)

筑波大学 生命環境系 教授

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

Tel: 029-853-2040

Email: kohositu@un.tsukuba.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

Tel: 03-5214-8404

Email: jstkoho@jst.go.jp

【JSTの事業に関すること】

内田 信裕(ウチダ ノブヒロ)

科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部

Tel: 03-3512-3528

Email: eratowww@jst.go.jp



報道関係者各位

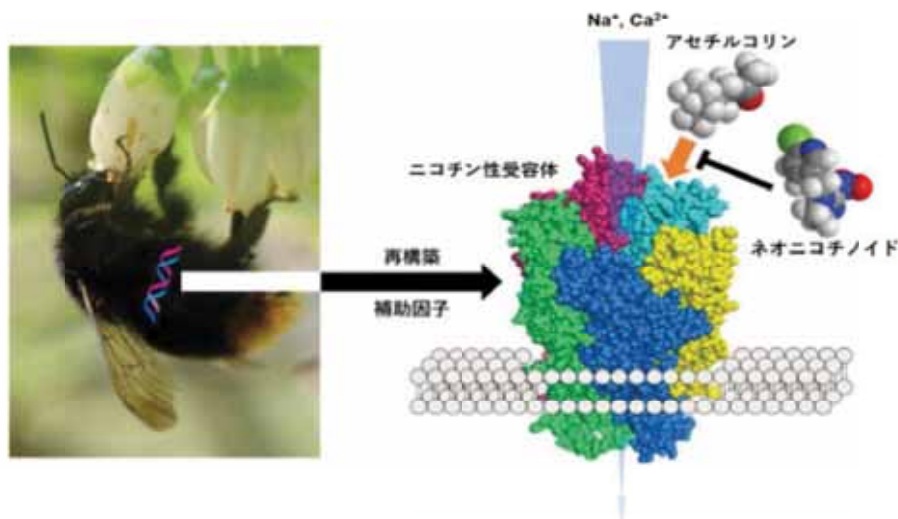
令和2年（2020年）7月3日

近畿大学

筑波大学

ネオニコチノイド系殺虫剤に対するハナバチ類の感受性を解明 環境に優しい農薬や昆虫制御材の開発に期待

近畿大学農学部応用生命化学科・アグリ技術革新研究所（奈良県奈良市）教授の松田一彦らの研究グループは、筑波大学（丹羽隆介教授）、東北大学（谷本拓教授）、国立遺伝学研究所（近藤周博士）、ロンドン大学（David B. Sattelle教授）との共同研究により、昆虫の中枢神経に存在し、殺虫剤の標的にもなっているニコチン性アセチルコリン受容体^{※1}（以下、ニコチン性受容体）を体外で神経細胞に存在したときと同様のはたらきを示すように組み立てなおすこと（再構築）に成功しました。また、その方法を用いて、ミツバチなどのハナバチ類のニコチン性受容体に対してどれくらい低い濃度からネオニコチノイド系殺虫剤が作用し始めるのかということも明らかにしました。本研究成果は、ハチなどの訪花昆虫には作用させずに害虫だけを駆除する環境に優しい農薬の開発や、世界の食料供給を脅かす農業害虫のみならず、マalariaやデング熱などの感染症を媒介する蚊にも応用でき、人体等には影響のない安全性に優れた昆虫制御剤で防除する技術の開発にも役立つと考えられます。本研究に関する論文は、令和2年（2020年）7月2日（木）4:00（日本時間）に米国科学アカデミー紀要Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America誌で公表されました。



NEWS RELEASE

1. 本件のポイント

- 昆虫のニコチン性受容体を昆虫体外で再構築することに世界で初めて成功
- ハナバチ類のニコチン性受容体が極めて高いネオニコチノイド感受性を示すことを発見
- 環境に優しい農薬の開発や、ニコチン性受容体を対象とする基礎科学の進展への貢献に期待

2. 本件の内容

今日使われている殺虫剤は効果を現す方法で分けると、昆虫の神経系に作用して効果を現す薬剤、脱皮や変態を妨げるなど昆虫の成長を制御する薬剤、昆虫の筋細胞に作用し、筋収縮を起こして摂食行動を停止させ死亡させる剤などに分類されます。なかでも、神経に作用する薬剤が数多く開発され使われています。世界で最も広く使用されているネオニコチノイド系殺虫剤は、昆虫の中枢神経に存在するニコチン性受容体の機能を阻害することで、昆虫を死に至らしめたり、行動に影響を与えたりする効果があります。

本研究では、ショウジョウバエを用いて昆虫のニコチン性受容体の複雑な立体構造を組み立てるために必要なタンパク質を探索し、本受容体の再構築に必要な補助因子を究明しました。さらに、この因子がミツバチなどの花粉媒介昆虫のニコチン性受容体の再構築でも必要であることを明らかにし、ショウジョウバエ、ミツバチおよびマルハナバチのニコチン性受容体に対するネオニコチノイド系殺虫剤への影響を比較検討しました。その結果、同系統の一部の殺虫剤が花粉に残留しているとされる濃度（数ppb）よりも低い濃度で、ミツバチやマルハナバチのニコチン性受容体を阻害することが初めて明らかになりました。

3. 研究の詳細

ニコチン性受容体はヒトを初めとする動物に普遍的に存在する神経伝達物質受容体^{*2}で、医薬やネオニコチノイド系殺虫剤を初めとする農薬の標的にもなっています。ヒトをはじめとする脊椎動物のニコチン性受容体が様々な細胞で再構築できるのとは対照的に、昆虫のニコチン性受容体については本受容体の遺伝子が単離されてから30年以上たっても再構築できていませんでした。そのため、ニコチン性受容体を標的とする殺虫剤の活性の強弱や、害虫－有益昆虫間における選択性の有無について詳しく調べることができませんでした。そこで近畿大学農学部応用生命化学科・教授の松田一彦と准教授の伊原誠らは筑波大学・丹羽隆介教授らにより得られたショウジョウバエ神経細胞内の受容体タンパク質の分布データをふまえてこの難問に果敢に挑戦した結果、補助因子を加えることによって、ショウジョウバエのニコチン性受容体をアフリカツメガエルの卵母細胞で再構築することに成功しました。この結果は、ネオニコチノイド系殺虫剤がミツバチなどの訪花昆虫に対して悪影響を及ぼしている可能性が指摘されていることをふまえて、本技術を用いてショウジョウバエ、ミツバチおよびマルハナバチのニコチン性受容体に対する同系統の殺虫剤の影響について調べました。その結果、試験した一部の殺虫剤が、農作物の花粉などに残留しているとされる数ppb（1ppbは10億分の1）よりも低い濃度で、ミツバチやマルハナバチのニコチン性受容体の機能を阻害することを解明しま

NEWS RELEASE

した。本研究成果は、筑波大学、東北大学、国立遺伝学研究所、ロンドン大学との共同研究により達成されたものであり、環境に優しい農薬の開発や、ニコチン性受容体を対象とする基礎科学の進展に広く貢献すると考えられます。

4. 今後の展開

今回報告した研究成果は、世界の食料供給を脅かす農業害虫のみならず、マラリアやデング熱などの感染症を媒介する蚊を安全性に優れた昆虫制御剤で防除する技術の開発にも役立つと考えられます。全世界には百万を超える種の昆虫が生息し、それぞれの昆虫種の神経系で多くの種類のニコチン性受容体が行動や学習に関与しています。したがって、本研究成果は昆虫科学、神経科学、農薬科学、環境科学などの分野の発展に大きく貢献すると期待されます。

5. 論文概要

雑誌名：Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (IF=9.35 (2019)、9.58 (2018))

論文名：Cofactor-enabled functional expression of fruitfly, honeybee and bumblebee nicotinic receptors reveals picomolar neonicotinoid actions (補助因子を利用したショウジョウバエ、ミツバチ、マルハナバチのニコチン性アセチルコリン受容体の機能発現によりpicomolarの濃度でのネオニコチノイドの作用が明らかに)

著者：Makoto Ihara¹, Shogo Furutani¹, Sho Shigetou¹, Shota Shimada¹, Kunihiro Niki¹, Yuma Komori¹, Masaki Kamiya¹, Wataru Koizumi¹, Leo Magara¹, Mai Hikida¹, Akira Noguchi¹, Daiki Okuhara¹, Yuto Yoshinari², Shu Kondo³, Hiromu Tanimoto⁴, Ryusuke Niwa⁵, David B. Sattelle⁶ and Kazuhiko Matsuda^{1,7}

著者の所属：¹Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Kindai University, 3327-204 Nakamachi, Nara 631-8505, Japan.

²Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan.

³Genetic Strains Research Center, National Institute of Genetics, 1111 Yata, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan.

⁴Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8577, Japan.

⁵Life Science Center for Survival Dynamics, Tsukuba Advanced Research Alliance, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577, Japan.

⁶Centre for Respiratory Biology, UCL Respiratory, University College London, Rayne Building, 5 University Street, London WC1E 6JF, UK.

⁷Agricultural Technology and Innovation Research Institute, Kindai University,
3327-204 Nakamachi, Nara 631-8505, Japan.

6. 用語解説

※1 ニコチン性アセチルコリン受容体

神経伝達物質の一つであるアセチルコリンが結合すると、自身もつナトリウムやカルシウムイオンを選択的に通すチャネル（イオンが通過するトンネル）を開くことで神経細胞の膜電位を調節するタンパク質。タバコに含まれるニコチンはアセチルコリンと同様に本受容体のイオンチャネルを開き、興奮作用などをひきおこす。ネオニコチノイドは昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体に特異的に結合し、アセチルコリンやニコチンと同様な作用を示すことで、昆虫の神経伝達機構をかく乱する。

※2 神経伝達物質受容体

神経細胞どうしは神経伝達物質と呼ばれる低分子によって連絡している。活動電位と呼ばれる電気信号が神経細胞末端に到達すると、神経伝達物質が細胞末端から放出される。この信号物質を、隣接する神経細胞で受け取るタンパク質が神経伝達物質受容体である。神経伝達物質受容体に神経伝達物質が結合し、受容体自身が持つイオンチャネルが開いたり、様々な代謝が引き起こされたりすることによって、神経の情報が調節を受けながら伝えられる。

7. 本資料の配布先

農林記者会、文部科学記者会、科学記者会、筑波研究学園都市記者会、大阪科学・大学記者クラブ、奈良県政・経済記者クラブ、奈良文化教育記者クラブ、奈良市政記者クラブ、東大阪市政記者クラブ

【本件に関するお問合せ先】

近畿大学農学部事務部 担当：吉川・本藤・松本

TEL：(0742) 43-1639 FAX：(0742) 43-5161

E-mail：nou_koho@ml.kindai.ac.jp

【関連画像の提供】



本件に関する画像を以下サイトでご提供します。

ご自由にお使いください。

<https://goo.gl/66nurK>

2020年7月21日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学
国立大学法人熊本大学

皮膚が老化すると「幹細胞の顔」が変わる！
～加齢に伴う皮膚幹細胞の糖鎖変化の解析に成功～

研究成果のポイント

1. 糖鎖の特徴的な構造を解析する新しい糖鎖プロファイリング技術を用い、皮膚の老化に伴って幹細胞の糖鎖修飾パターンが変化することを発見しました。
2. 老化型の糖鎖パターンを持つ皮膚幹細胞では、細胞の増殖が顕著に低下しました。
3. 糖鎖を標的にした皮膚幹細胞の老化状態の検出や老化の制御へとつながることが期待されます。

国立大学法人筑波大学 生存ダイナミクス研究センターの佐田亜衣子助教(研究当時、現 国立大学法人熊本大学 国際先端医学研究機構特任准教授)、柳沢裕美教授、国立研究開発法人産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門の館野浩章研究グループ長らの研究グループは、糖鎖プロファイリング技術を用いて、老化皮膚において、幹細胞表面の糖鎖構造(糖鎖修飾パターン)が変化することを見出しました。

細胞表面に存在する糖鎖は、「細胞の顔」とも呼ばれるように、細胞の種類や状態によって構造が劇的に変化することが知られています。血液型や腫瘍マーカーをはじめ、糖鎖の違いは優れたバイオマーカーとしても幅広く利用されてきました。しかし、細胞の中でも、分化細胞を生み出す組織幹細胞^{※1}は、成体組織の全細胞の1パーセント以下に過ぎず、微量のサンプルしか得られないため、糖鎖解析を行うことは困難でした。本研究は、「レクチンアレイ法」という新しい技術を使うことで、糖鎖構造を高感度かつ迅速に検出し、加齢に伴って起こる皮膚幹細胞の糖鎖変化を捉えることに成功しました。本成果は、幹細胞の糖鎖を標的とした新たな老化対策やバイオマーカーの創出へとつながることが期待されます。

本研究の成果は、Aging Cell誌に2020年7月18日付でオンライン公開されました。

* 本研究は、日本医療研究開発機構(AMED)の革新的先端研究開発支援事業(PRIME、研究期間:2018-2021年度、研究代表:佐田亜衣子)、科学技術人材育成のコンソーシアム構築事業「次世代研究者育成プログラム」Nanotech CUPAL N.R.Pコース(研究期間:2018-2019年度、研究代表:佐田亜衣子)、三菱財団自然科学研究助成(研究期間:2019年度、研究代表:佐田亜衣子)、中富健康科学振興財団研究助成金(研究期間:2018年度、研究代表:佐田亜衣子)、住友財団基礎科学研究助成(研究期間:2019年度、研究代表:佐田亜衣子)、ホーユー科学財団助成事業(研究期間:2018年度、研究代表:佐田亜衣子)の支援を受けて実施しました。

研究の背景

組織幹細胞は、生涯にわたって増殖しながら分化細胞を生み出す能力を持った細胞です。このような細胞が、私たちの体の中のいろいろな場所に存在するので、古い細胞が失われても、日々新しい細胞を作り出すことができます。例えば、皮膚の新陳代謝や髪の毛の生え替わりは、皮膚幹細胞によって支えられています。また、最近の研究では、身体に加齢変化の一因として、分化細胞の供給源である組織幹細胞の老化(ステムセルエイジング)^{注2}が提唱されています。しかし、その実態については未解明な部分が多くあります。皮膚においても、幹細胞老化の研究が進んでいますが、老化状態を検出するバイオマーカーが同定されておらず、老化制御のための標的因子についてもほとんど分かっていません。

一方、細胞の表面にあるタンパク質や脂質は、糖鎖^{注3}による修飾を受けています。糖鎖は、細胞が生体内のシグナルを受け取ったり、細胞同士がコミュニケーションをしたりするときに重要であると言われています。組織幹細胞においても、この糖鎖が重要な役割を果たすと考えられますが、皮膚から少数の幹細胞を単離し、複雑な糖鎖構造(糖鎖修飾パターン)を解析するのは技術的に困難とされていました。

研究内容と成果

本研究では、「レクチンアレイ法」という新しい技術を用いることで、若いマウス、歳をとったマウスの皮膚から単離した幹細胞の糖鎖修飾パターンを網羅的に解析しました。具体的には、糖結合タンパク質であるレクチン^{注4}をスライドガラス上に固定化し、幹細胞の膜タンパク質と結合させることで、幹細胞の糖鎖構造を高感度かつ迅速に検出します(図1)。

これにより、皮膚幹細胞における糖鎖のパターンをプロファイルしました。その結果、加齢に伴い、皮膚幹細胞の糖鎖修飾パターンがダイナミックに変化する「グリコームシフト」が起こることを発見しました(図2)。グリコームシフト後の老化型糖鎖パターンを持つ皮膚幹細胞では、細胞の増殖が顕著に低下することから、糖鎖の変化は機能的にも重要であることを示しました。また、加齢に伴って有意に変化する糖類(マンノース、 α 2-3シアル酸)をそれぞれ認識する糖結合タンパク質であるレクチン(rHeltuba、rGal8N)を同定し、これらが新たな老化バイオマーカーになり得る可能性を見出しました。

今後の展開

老化予防の観点から、老化状態を早い段階で予測できるようなバイオマーカーや、老化制御のための標的分子の同定が求められています。

なぜ老化した皮膚幹細胞で糖鎖が変化するのか？ その生物学的意義や分子機構には未だ不明な点が多く残されています。今後、糖鎖を介した幹細胞老化の原因を究明することで、糖鎖をターゲットとした老化制御へとつながっていくことが期待されます。

参考図



図1 レクチンアレイ法を用いた幹細胞の糖鎖プロファイリング

若齢・加齢マウスよりセルソーターを用いて皮膚幹細胞を単離し、レクチンアレイ法を用いた糖鎖解析を行う。糖結合タンパク質であるレクチンをスライドガラス上に固定化し、細胞から抽出、蛍光標識した膜タンパク質をガラス上の

レクチンと相互作用させることで、細胞表面に存在する糖鎖構造を高感度かつ迅速に検出することができる。この技術により加齢した皮膚幹細胞で有意に結合が変化するレクチンを同定した。

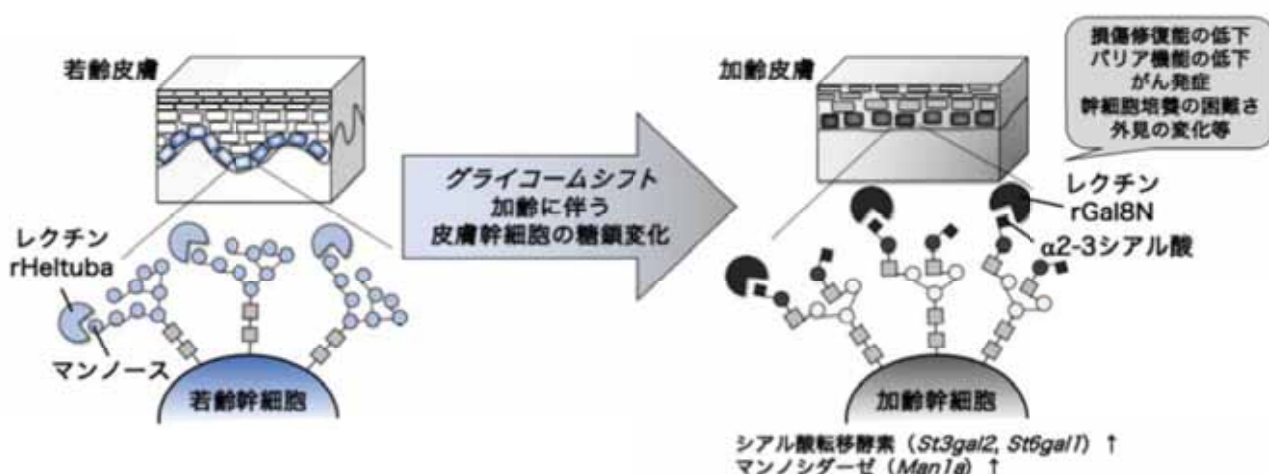


図2 皮膚幹細胞の加齢に伴う糖鎖変化に着目した老化の理解と制御

皮膚幹細胞の加齢に伴い、高マンノース型(図2左)からシアル酸に富んだ複合型(図2右)へと、糖鎖修飾パターンがダイナミックに変化する「グリコームシフト」が起こる。またシアル酸の付加に働く糖転移酵素^{注5}(St3gal2、St6gal1)、およびマンノースの分解に働く酵素(Man1a)は、加齢した皮膚幹細胞では有意に発現が上昇する。若齢幹細胞に存在するマンノース、および加齢幹細胞に存在する α 2-3 シアル酸をそれぞれ認識する糖結合タンパク質としてレクチン(rHeltuba、rGal8N)を同定し、新たな老化バイオマーカーとしての可能性を見出した。

用語解説

注1) 組織幹細胞

成体幹細胞とも呼ばれる。成体の臓器や組織において、自己複製能(自分自身を長期的に増やす能力)と分化能(分化・成熟した細胞を産生する能力)を兼ね備えた細胞。組織の再生や損傷修復を担う。このうち、皮膚の新陳代謝や毛の生えかわり、傷の修復を担う細胞が皮膚幹細胞。

注2) 幹細胞老化(ステムセルエイジング)

加齢に伴って、組織の大元の細胞である幹細胞自身が機能低下や破綻を起こし、老化の原因となっているという説。

注3) 糖鎖

糖が複雑に連なった鎖状の物質。細胞表面の糖鎖は、がんや免疫、幹細胞の機能などに重要である。解析が難しいため、未知の部分も多い。

注4) レクチン

糖鎖と結合するタンパク質。複雑な糖鎖構造を検出するバイオツールとして注目されている。

注5) 糖転移酵素

糖鎖の合成を行う酵素。糖の種類に特有な糖転移酵素の働きによって糖が付加され、複雑な糖鎖の構造が作られる。

掲載論文

【題名】 Glycome profiling by lectin microarray reveals dynamic glycan alterations during epidermal stem cell aging

(糖鎖プロファイリング技術を用いた加齢に伴う皮膚幹細胞の糖鎖変化の解明)

【著者名】 Lalhaba Oinam, Gopakumar Changarathil, Erna Raja, Yen Xuan Ngo, Hiroaki Tateno, Aiko Sada, Hiromi Yanagisawa

【掲載誌】 Aging Cell (DOI: 10.1111/ace.13190)

問合わせ先

佐田 亜衣子(さだ あいこ)

熊本大学 国際先端医学研究機構 特任准教授

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 客員准教授

URL: <https://www.aikosada.com>

柳沢 裕美(やなぎさわ ひろみ)

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 教授

URL: <http://saggymouse.tara.tsukuba.ac.jp/>

温度に応答して自らを保護する食中毒細菌集団

研究成果のポイント

1. 国内での患者数第3位の食中毒細菌であるウェルシュ菌が、宿主の体温より低い温度に応答して自らを繊維状タンパク質(細胞外マトリクス^{注1)})で覆い、酸素および抗生物質に対する耐性を向上させることで、強固な集団(バイオフィルム)を形成することを発見しました。
2. バイオフィルム中では、マトリクスを生産する細胞と生産しない細胞が役割分担して生存していることがわかりました。
3. バイオフィルムマトリクスに着目したバイオフィルム除去法および食中毒や感染症の予防・治療法の開発が期待されます。

国立大学法人筑波大学 医学医療系 尾花 望 助教と生命環境系 野村 暢彦 教授らの研究グループは、食中毒細菌であるウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)のバイオフィルム(集団)に抗生物質・酸素耐性をもたらす細胞外マトリクスタンパク質を発見しました。

細菌はバイオフィルムを形成して生存しています。これは細菌にとっては環境中を生き抜く生存戦略の一つですが、環境中に残存した病原細菌が人間に感染して疾患を引き起こす可能性があるため、バイオフィルムの性質を理解し防除することが重要です。本研究グループは、ウェルシュ菌が繊維状のタンパク質(マトリクス)を生産することによって、酸素や抗生物質に対する耐性を向上させ、強固なバイオフィルムを形成することを発見しました。また、繊維状タンパク質が生産できないウェルシュ菌は酸素や抗生物質に対する耐性が低くなることがわかりました。

一般的に病原細菌は、宿主(ヒト、動物)の体内温度(約 37℃)に応答して病原性を調節していることが知られています。しかしながらウェルシュ菌の場合、宿主体内よりも低い温度に応答して繊維状タンパク質を豊富に産生していることがわかりました。また、ウェルシュ菌のバイオフィルム中には、繊維状タンパク質を生産する細胞と生産しない細胞が共存していることを見いだしました。これらのことから、酸素があると生育できないウェルシュ菌は温度を介して、酸素が豊富な宿主の外部環境を認識し、バイオフィルム形成を調節していること、さらにバイオフィルム内で役割分担しつつ、集団として生存していることが示唆されました。

本研究の成果は、2020年7月31日付「npj Biofilms and Microbes」で公開されました。

* 本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST) 戦略的創造研究推進事業 ERATO野村集団微生物制御プロジェクト(研究期間:2015~2020年度)の一環で実施されました。

研究の背景

ウェルシュ菌は腸内悪玉細菌や食中毒の原因細菌として知られており、2019年度の日本国内の食中毒総患者数における原因の第3位にランクしています(厚生労働省食中毒統計資料)。ウェルシュ菌は酸素がある環境では生育できない偏性嫌気性細菌^{注2)}ですが、自然界に広く分布しています。刻々と変化する環境下で細菌が生存するための生活様式の一つにバイオフィームがあります。細菌の集団であるバイオフィームは、細菌が分泌する細胞外高分子物質(EPS)から成る細胞外マトリクスによって覆われて、化学的・物理的攻撃から保護されており、この作用によって、バイオフィームを形成していない浮遊性細胞に比べて、様々なストレスに対する耐性が100倍以上高められています。ウェルシュ菌のような腸内病原細菌が形成するバイオフィームは、疾患を引き起こす原因となる可能性があるため、そのEPSマトリクスを理解し制御することが課題となっています。

研究内容と成果

本研究では、ウェルシュ菌が25°Cで形成する弾性の高い膜状のバイオフィームに着目し、膜状のバイオフィームに必要な遺伝子を探索しました。その結果、細胞外に分泌されるタンパク質をコードする遺伝子が、バイオフィーム形成に必須であることを発見しました。BsaAと名付けたこのタンパク質は、細胞の外で重合(ポリマー化)しており、膜状のバイオフィーム形成に必須のEPSであることを明らかにしました。また、BsaAポリマーは界面活性剤や強酸に曝しても壊れない非常に強固な構造であることを発見しました(図1)。BsaAポリマーを作れないウェルシュ菌は膜状のバイオフィームを形成できず、酸素と抗生物質に対する耐性が低下しました(図2)。

また、BsaAポリマーは、宿主体内の温度である37°Cよりも低温の25°Cでウェルシュ菌が生育した場合に豊富に生産されることがわかりました。嫌気蛍光レポーター^{注3)}株を用いて、細菌1細胞あたりの*bsaA*遺伝子発現を解析したところ、その発現は不均一であり、ウェルシュ菌バイオフィーム中にはBsaAポリマーを生産する細胞と生産しない細胞が存在していました。また、共焦点レーザー顕微鏡によりバイオフィーム中の遺伝子発現の局在を可視化したところ、BsaAポリマー生産細胞がBsaAポリマー非生産細胞の上部を覆うように存在すること、繊維状BsaAポリマーマトリクスがバイオフィーム上部を覆っていることを見いだしました(図3)。宿主の腸管内は酸素がない嫌気的条件下である一方、宿主の外は嫌気性細菌の生育を阻害する酸素が豊富に存在する環境です。偏性嫌気性細菌であるウェルシュ菌は、宿主体内の37°Cより低い温度を認識することで、集団の内部で役割分担をしつつ、酸素が豊富な宿主の外部環境に適応するために、膜状のバイオフィームを形成していると考えられます。

今後の展開

本研究により、偏性嫌気性細菌であるウェルシュ菌が宿主の体外に排出されたときの生存戦略の一つが明らかになり、ウェルシュ菌が引き起こす食中毒の予防や、嫌気性細菌が形成するバイオフィームに関連した感染症の予防や治療に役立つと期待されます。また、嫌気性腸内細菌が、複数の特性を持った不均一な細胞集団から成るバイオフィームを形成することが明らかになりました。腸内細菌叢(腸内フローラ)を形成する細菌の多くは偏性嫌気性細菌ですが、嫌気性腸内細菌叢が体外に排出された後、どのように生存するのかはよくわかっていません。細胞集団の不均一性は感染症の難治化や耐性化と深く関わることから、本研究成果は、嫌気性の腸内細菌が関わるヒトの病気の理解や予防、治療にもつながる可能性があります。

参考図

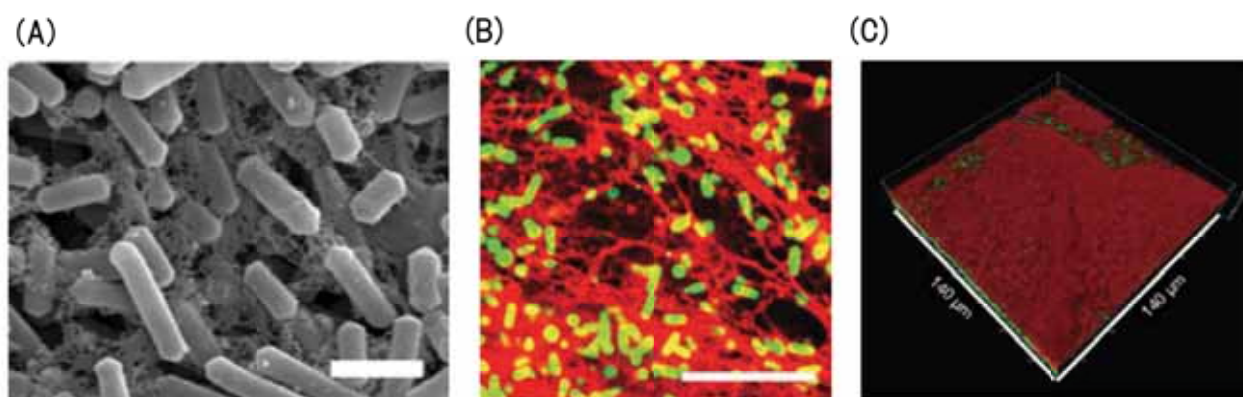


図1. ウェルシュ菌が生産する繊維状 EPS マトリクス(BsaA ポリマー)。(A)ウェルシュ菌が形成する膜状バイオフィルムの走査型電子顕微鏡画像。スケールバーは 2 μm を示す。(B, C)ウェルシュ菌が形成する膜状バイオフィルムの共焦点レーザー顕微鏡画像。2次元画像(B)と3次元画像(C)を示す。蛍光染色した細胞と BsaA タンパク質をそれぞれ緑と赤で表示。スケールバーは 20 μm を示す。

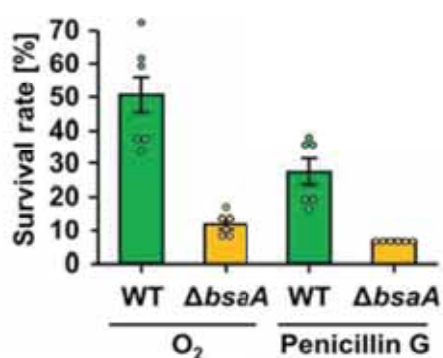


図2. 繊維状 EPS 遺伝子のストレス耐性に対する影響。酸素もしくは抗生物質(ペニシリン G)に 20 時間暴露した後の生存率の測定。BsaA ポリマーを作れないウェルシュ菌は膜状のバイオフィルムを形成できず、酸素と抗生物質に対する耐性が低下した。WT: 野生株。 $\Delta bsaA$: 繊維状 EPS 遺伝子欠損株。

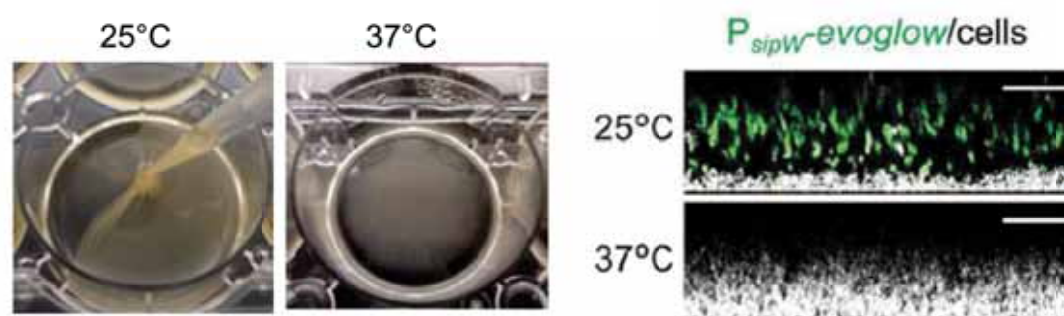


図3. バイオフィルム中の繊維状 EPS(BsaA ポリマー)生産細胞の空間分布。(左図)異なる温度で形成させたバイオフィルム。25°Cでは厚く弾性に富んだ膜状のバイオフィルムを形成する。(右図)異なる温度で形成したバイオフィルムの共焦点レーザー顕微鏡観察結果。横から見た断面図を示す。繊維状 EPS 生産細胞を緑、全細胞を白で表示。スケールバーは 20 μm を示す。

用語解説

注1) 細胞外マトリクス

バイオフィルム中の非細胞性の構成成分であり、細胞外高分子物質 (Extracellular polymeric substance: EPS) から成る。EPS は主にタンパク質、DNA および多糖から成り、バイオフィルムの構造維持や機能に重要な役割を果たす。

注2) 偏性嫌気性細菌

嫌気性細菌とは生育に酸素を必要としない細菌のことであり、さらに偏性嫌気性細菌とは大気レベルの酸素に暴露されると死滅する細菌のことを指す。

注3) 嫌気蛍光レポーター

発現を可視化したい目的遺伝子の下流に、蛍光タンパク質遺伝子 (例: 緑色蛍光タンパク質 GFP) をつなげることによって、その遺伝子の発現と同調して細胞が蛍光を発する。このようにして作製した細胞を蛍光レポーターと呼び、顕微鏡観察と組み合わせることによって 1 細胞レベルの遺伝子発現の解析が可能となる。しかし、GFP など、よく使われる蛍光タンパク質は、蛍光を発するために酸素を必要とするため、嫌気環境下では使用できない。本研究では嫌気条件でも蛍光を発する嫌気蛍光タンパク質を応用することによって、嫌氣的に形成されたバイオフィルム中の 1 細胞レベルでの遺伝子発現解析を可能とした。

掲載論文

【題名】 Temperature-regulated heterogeneous extracellular matrix gene expression defines biofilm morphology in *Clostridium perfringens*

(温度によって調節される不均一な細胞外マトリクス遺伝子発現がウェルシュ菌バイオフィルム形態を決定する)

【著者名】 Nozomu Obana, Kouji Nakamura, Nobuhiko Nomura

【掲載誌】 npj Biofilms and Microbes (DOI: 10.1038/s41522-020-00139-7)

問い合わせ先

【研究に関すること】

尾花 望 (オバナ ノゾム)

筑波大学 医学医療系 助教

野村 暢彦 (ノムラ ノブヒコ)

筑波大学 生命環境系 教授

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

Tel: 029-853-2040

Email: kohositu@un.tsukuba.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

Tel: 03-5214-8404

Email: jstkoho@jst.go.jp

【JSTの事業に関すること】

内田 信裕(ウチダ ノブヒロ)

科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部

Tel: 03-3512-3528

Email: eratowww@jst.go.jp

2020年9月16日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学
国立大学法人東海国立大学機構岐阜大学
国立大学法人神戸大学

アルギニンメチル化酵素が正常な脳の発達を促す
～脳におけるタンパク質のメチル化の新しい意義を発見～

研究成果のポイント

1. 脳の発達におけるタンパク質翻訳後修飾「アルギニンメチル化^{注1)}」の役割を解明しました。
2. アルギニンメチル化の主要酵素 PRMT1^{注2)}は脳の炎症誘導を抑え、正常な脳の発達を促している可能性が示されました。
3. 本研究グループが開発した PRMT1 の脳特異的欠損マウスが、脳の炎症と発達の関係を知る有用なモデルとなり得ることがわかりました。

国立大学法人筑波大学 生存ダイナミクス研究センター(TARA) 深水昭吉教授、同 橋本美涼博士(現 国立大学法人東海国立大学機構岐阜大学 応用生物科学部助教)の研究グループは、マウスを使った解析により、発達中の脳において、生合成されたタンパク質に生じる様々な化学修飾(翻訳後修飾)の一つである「アルギニンメチル化」が炎症状態の誘導に関与することを見出しました。

発達期の脳の炎症は、損傷や胎児期の母体の感染等によって引き起こされ、脳の発達に深刻なダメージを与えます。アルギニンメチル化酵素 PRMT1 の脳特異的欠損マウス(KO マウス)では、ミエリン(神経細胞の髄鞘)^{注3)}がうまく作られないなど脳が正常に発達せず、生後約2週間で致死となることがわかっていました。本研究では、その原因を調べるため、誕生直後の KO マウス脳の遺伝子発現パターンを網羅的に解析しました(図1)。その結果、KO マウスは炎症関連遺伝子の増加など、既存の脳内炎症モデルと類似したパターンを示しました。さらに、KO マウス脳ではグリア細胞^{注4)}のアストロサイトやミクログリアの異常増加も認められ(図2)、これらは炎症シグナルを介していることが示唆されました。今後、KO マウスが脳の炎症と発達の関係を知る有用なモデルとなることが期待されます。

本研究の成果は、2020年9月12日付「Journal of Neurochemistry」で公開されました。

- * 本研究は、筑波大学 生存ダイナミクス研究センター(TARA)、岐阜大学、英国 エジンバラ大学医学研究評議会(MRC)再生医療センター、神戸大学による共同研究として行われました。
- * 本研究は、日本学術振興会の科学研究費補助金(科研費):スタート支援(17H06730:橋本美涼)、若手研究(20K15913:橋本美涼)、基盤研究(C)(18K05429:金俊達)、基盤研究(A)(17H01519:深水昭吉)、稲盛財団、および、三菱財団によって実施されました。

研究の背景

私たちの体で働く2万種類以上のタンパク質は、様々な化学修飾を受けることで、その機能をスムーズに発揮したり機能を変化させたりしています。化学修飾の一つであるアルギニンメチル化は、まだ不明な点が多いものの、細胞増殖や老化への関与が示されており、近年その重要性が注目されています。

アルギニンメチル化を触媒する酵素PRMT1を全身で欠損したマウスは、胎生期に致死となることから、PRMT1が個体発生に必須であることが知られていました(参考文献1)。本研究グループは、脳の発達におけるPRMT1の機能解析に着手すべく、脳の神経幹細胞^{注5)}において特異的にPRMT1を欠損したマウス(KOマウス)を作製し、解析してきました。これまでの研究で、KOマウスが生後1週間で、ミエリン形成不全を起こし、生後約2週間で致死となることから、PRMT1が脳の発達に必須の酵素であることを見つけていました(参考文献2)。

しかし、PRMT1がどのように脳の発達を制御しているのか、詳しい仕組みは不明でした。また、PRMT1がミエリン以外の脳細胞の発達に与える影響も十分に分かりませんでした。

研究内容と成果

本研究では、KOマウスが生後1-2週間の脳発達に顕著な異常を示すことから、より早期(生後0日目=脳の発達途中)のKOマウスを解析対象としました。

まず、KOマウス大脳皮質で起きる分子レベルの変化を捉えるため、RNAシーケンシング解析によって遺伝子発現を網羅的に調べたところ、野生型マウスに比べてKOマウスでは、炎症性サイトカインや炎症を伝達する受容体(ケモカイン受容体)の遺伝子発現が顕著に増加していました(図1)。変化した遺伝子群を詳しく調べると、既存の脳内炎症モデルに類似した発現パターンを示していることから、KOマウス脳では炎症シグナルが誘導されていることが判明しました。さらに遺伝子発現レベルの経時的変化を見ていくと、炎症状態が生後の脳発達に伴って徐々に強まっていくことも明らかになりました(図1)。

次に、脳組織の解析などから、KOマウス大脳皮質では、活性化^{注6)}型のアストロサイトやミクログリアが異常に増加していることがわかりました(図2)。これらはいずれもグリア細胞に分類され、脳損傷をはじめ自閉症や神経変性疾患において活性化型に変化して細胞数も増加し、病態の悪化に関与することが知られています。

以上より、PRMT1欠損によってグリア細胞が活性化し、炎症シグナルを誘導していることが明らかとなりました。脳内の炎症は、ミエリンや脳自体の発達を阻害する一要因とも言われています。そのため、KOマウスでは、脳の発達中にアストロサイトやミクログリアが活性化して脳内炎症時と同じような環境となり、ミエリンなどの発達に不利な状況を生み出したと考えられます(図3)。

今後の展開

本研究から、PRMT1を欠損すると、神経幹細胞がアストロサイトなどを生み出すステップのどこかで炎症状態を誘導することがわかりました(図3)。今後は、その変化をもたらすメチル化ターゲットの同定により、PRMT1の機能をさらに深く理解できると考えています。

今回用いたKOマウスは、たった一つの酵素の欠損で、グリア細胞活性化を伴う脳内炎症誘導とミエリン形成不全・脳発達異常の特徴を併せ持ち、炎症シグナルが脳の発達に及ぼす影響について調べる有用なモデルとして貢献することが期待されます。

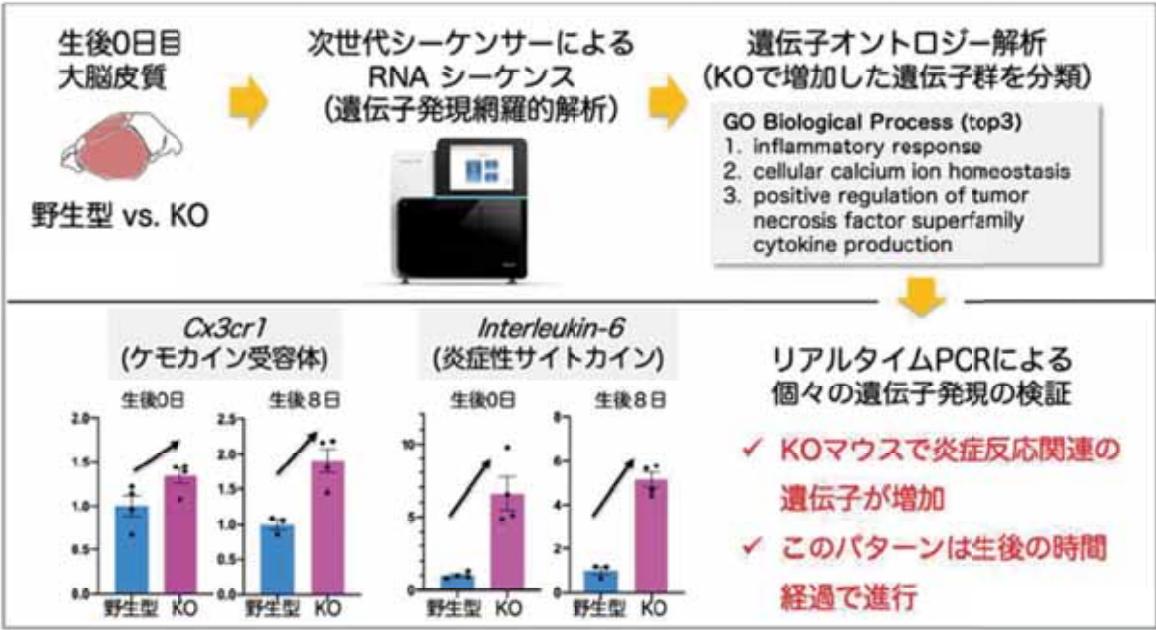


図1. PRMT1欠損脳における遺伝子発現網羅的解析の流れ

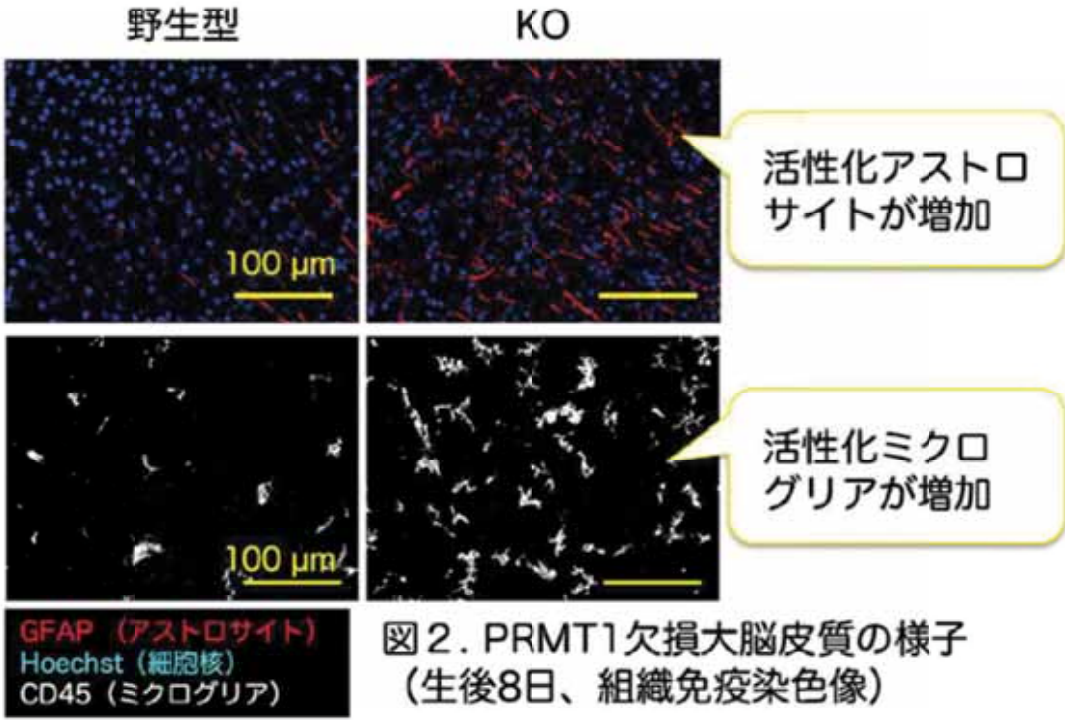


図2. PRMT1欠損大脳皮質の様子 (生後8日、組織免疫染色像)

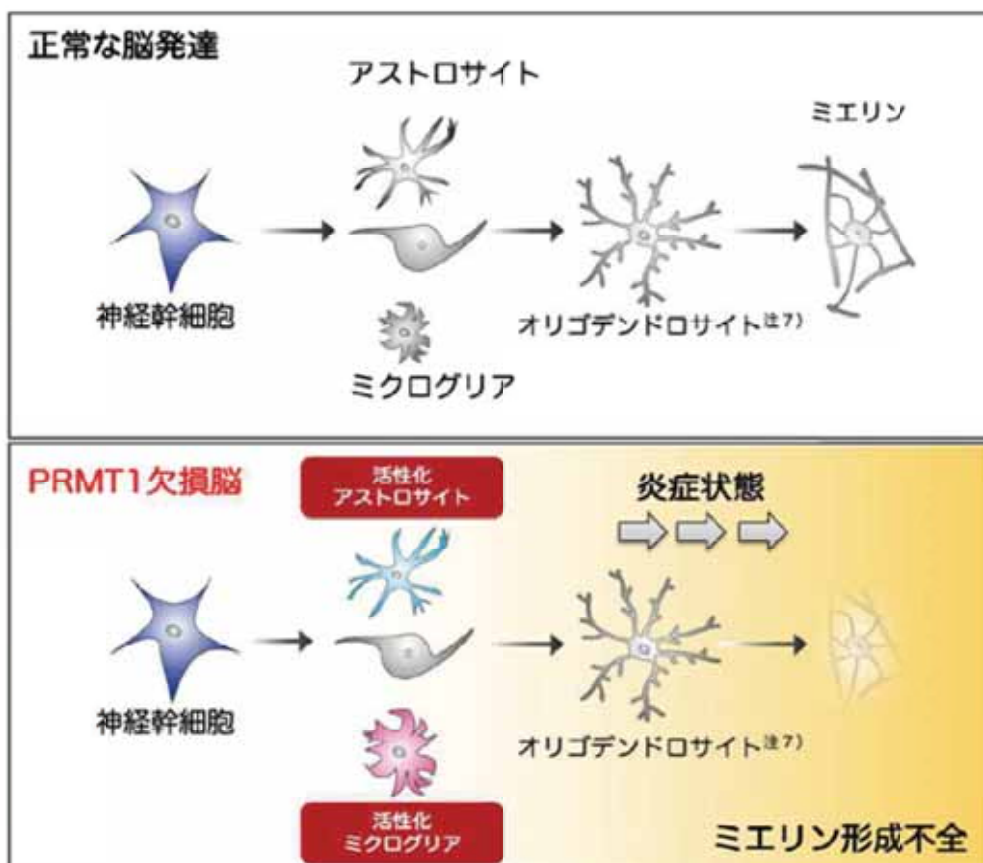


図3. PRMT1欠損による脳の発達への影響

用語解説

注1) アルギニンメチル化

タンパク質の翻訳後修飾の一つ。タンパク質を構成するアミノ酸配列のアルギニンに、メチル基を付加する化学修飾。酵素 PRMT ファミリー (PRMT1-9) が触媒する。

注2) PRMT1

アルギニンメチル化反応を触媒する主要な酵素。protein arginine methyltransferase 1 の略。

注3) ミエリン

髄鞘。神経の軸索に巻きついて絶縁体としてはたらき、素早い神経伝達を可能にする。グリア細胞の1つであるオリゴデンドロサイトの一部がつくる構造。

注4) グリア細胞

脳そのものに豊富に存在する細胞。神経を構造的・機能的に支える役割をもつ。神経幹細胞から生まれるアストロサイトとオリゴデンドロサイト、卵黄嚢から生まれるミクログリアとに大別される。

注5) 神経幹細胞

胎児の脳に豊富に存在し、成長するにつれて神経やグリア細胞を生み出すことで脳が発達する。

注6) 活性化

アストロサイトやミクログリアなどのグリア細胞の性質の変化。細胞体や細胞数が増大し、炎症性サイトカインなどを多く出すようになった状態。脳の疾患や損傷で広く認められる。

注7) オリゴデンドロサイト

グリア細胞の1つ。生後の脳でミエリンを形成することで、神経伝達機能に貢献したり、神経細胞を保護したりする。

参考文献

- 1) Pawlak, M.R., *et al.* Mol. Cell. Biol. 20: 4859–4869 (2000)
- 2) Hashimoto, M., *et al.* J. Biol. Chem. 291: 2237–2245 (2016)

掲載論文

【題名】 Loss of PRMT1 in the CNS induces reactive astrocytes and microglia during postnatal brain development

(中枢神経系における PRMT1 欠損は生後の脳発達においてアストロサイトとミクログリアの活性化を誘導する)

【著者名】 Misuzu Hashimoto, Ayako Kumabe, Jun-Dal Kim, Kazuya Murata, Sowmya Sekizar, Anna Williams, Weizhe Lu, Junji Ishida, Tsutomu Nakagawa, Mitsuharu Endo, Yasuhiro Minami, and Akiyoshi Fukamizu

【掲載誌】 *Journal of Neurochemistry* (DOI: 10.1111/jnc.15149)

問合わせ先

【研究に関すること】

深水 昭吉(ふかみず あきよし)

筑波大学生存ダイナミクス研究センター(TARA) 教授

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

Email: kohositu@un.tsukuba.ac.jp

Tel: 029-853-2040

岐阜大学管理部総務課広報係

Email: kohositu@gifu-u.ac.jp

Tel: 058-293-3377

神戸大学総務部広報課

Tel: 078-803-6678

Email: ppr-kouhousitsu@office.kobe-u.ac.jp

2020年9月24日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学
国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST)

細菌は菌糸の「高速道路」を移動し「通行料」を払う ～細菌と糸状菌の知られざる共生関係を発見～

細菌と糸状菌はいずれも、自然界に広く存在する主要な微生物で、互いに作用して、それぞれの特徴的な機能を発揮していることが明らかとなってきました。また、菌糸ネットワークが、細菌の増殖と移動に重要であることも分かってきました。そこで本研究では、細菌と糸状菌のモデル生物である *Bacillus subtilis* (枯草菌) と *Aspergillus nidulans* を共培養し、これらの相互作用を解析しました。

その結果、寒天培地上で、細菌が自身の鞭毛を使って糸状菌の菌糸上を秒速30マイクロメートルという速度で素早く移動する様子が観察されました。また、糸状菌の菌糸ネットワークの生長を利用して細菌がその生存空間を拡大している様子を、タイムラプス撮影により可視化しました。細菌は、菌糸を高速道路のように利用して、より速くより遠くへ移動することができます。一方、菌糸の先端まで移動した細菌から、糸状菌にビタミン B1(チアミン)が供給され、菌糸の生長を促進していることが分かりました。すなわち、細菌は菌糸の「高速道路」を移動し、糸状菌は「通行料」としてチアミンを受け取り、互いにメリットを得ています。このことは、空間的相互作用と代謝的相互作用の組み合わせにより、細菌と糸状菌が共同体として生存空間を拡大するという、これまで知られていなかった相利共生の仕組みを示しています。

細菌と糸状菌の相互作用を理解することは、これら微生物が関わるバイオマス分解、動物植物への感染、植物共生と植物生育促進、発酵食品の生産などの制御につながると考えられます。

研究代表者

筑波大学 生命環境系/微生物サステナビリティ研究センター(MiCS)

JST ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト ゲノム生化学グループ グループリーダー

竹下 典男 准教授

筑波大学 医学医療系/トランスポーター医学研究センター/微生物サステナビリティ研究センター (MiCS)

JST ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト 不均一性グループ グループリーダー

尾花 望 助教

研究の背景

細菌や糸状菌（カビ）は、自然界に広く存在する主要な微生物です。細菌は通常1個の細胞からできている単細胞生物（大きさ1マイクロメートル程度、1ミリメートルの1/1000）で、細胞の分裂を繰り返して増殖します。また糸状菌は、菌糸と呼ばれる管状の細胞の先端を伸ばしながら分岐してネットワーク構造を形成します。近年、細菌と糸状菌が相互に作用してそれぞれ特徴的な機能を発揮していることが明らかになってきています。森林の土1グラム中には細菌が1億個以上も存在し、菌糸の総距離は数百メートルにもなるという試算があり、菌糸ネットワークが、細菌の増殖と移動に重要であることも分かってきました。これら多種多様な微生物が相互に作用して機能し、炭素・窒素などの物質循環に関わり、地球や生態系の成り立ちに大きく影響しています。

研究内容と成果

本研究では、細菌と糸状菌のモデル生物である *Bacillus subtilis* (枯草菌)¹⁾ と *Aspergillus nidulans*²⁾ を共培養し、これらの相互作用を解析しました。その結果、寒天培地上で、細菌が自身の鞭毛³⁾ を使って、糸状菌の菌糸上を秒速30マイクロメートルという速度で素早く移動する様子を、蛍光顕微鏡によるライブイメージングで観察することができました。細菌だけだと、このような運動性は見られません。また、糸状菌の菌糸ネットワークの生長を利用して、細菌がその生存空間を拡大している様子を、タイムラプス撮影により可視化しました。細菌が、菌糸を高速道路のように利用し、より速くより遠くへ移動することは、細菌にとってメリットです。さらに、遺伝子発現、遺伝子破壊、イメージング、質量分析などの解析から、細菌が菌糸の先端まで移動し、ビタミンB1(チアミン)⁴⁾ を糸状菌に供給することで、菌糸の生長が促進されていることが明らかとなり、糸状菌もメリットを得ていることが分かりました。これらことから、空間的相互作用と代謝的相互作用の組み合わせにより、細菌と糸状菌が共同体として生存空間を拡大するという、これまで知られていなかった相利共生⁵⁾ の仕組みが明らかになりました(図1)。このモデルは、細菌が菌糸の「高速道路」を移動し、その「通行料」としてチアミンを糸状菌に払う様子に例えることができます。本研究グループは、実際の環境中から、このような相利共生を示す細菌(パントエア属)と糸状菌(トリコデルマ属)の組み合わせを単離することにも成功しており、空間的・代謝的相互作用による相利共生が、現実の生態系内で機能していることが示されました。

今後の展開

今回は1種ずつの細菌と糸状菌を研究対象としましたが、様々な組み合わせで検証したところ、その親和性に種の特異性があることが分かってきました。今後、相互作用の特異性に関わる分子機構の解明を目指します。糸状菌が基質や動植物の宿主に入り込み、その菌糸生長と菌糸ネットワークが細菌群の局在分布、機能分化に関わっていることが予想されます。このような細菌と糸状菌の相互作用を理解することは、これらの微生物が関わるバイオマス分解、動物植物への感染、植物共生と植物生育促進、発酵食品の生産などの制御につながります。それぞれの場面に合った細菌と糸状菌の相互作用、異なる微生物達の生き様を理解することは、環境、健康、農業、食といった幅広い分野に重要です。

参考図

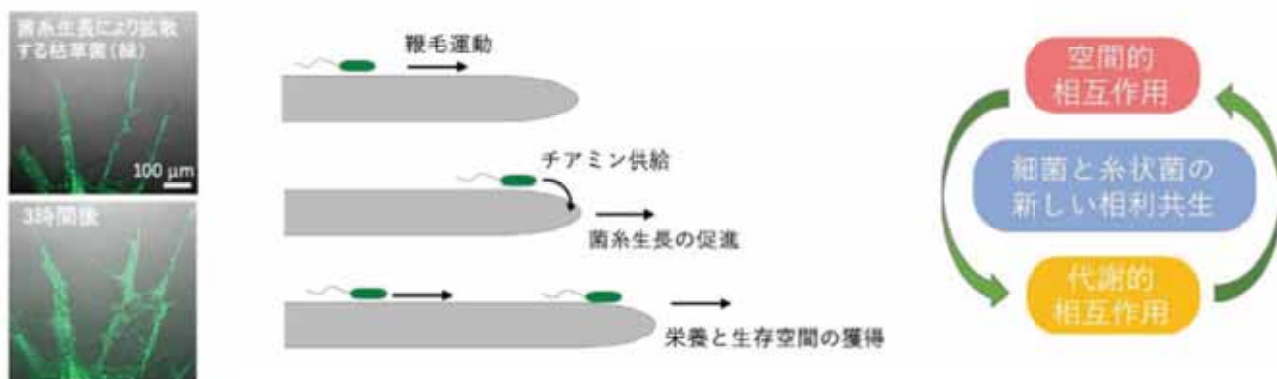


図1 空間的・代謝的相互作用による細菌と糸状菌の相利共生の仕組み

用語解説

1) *Bacillus subtilis* (枯草菌)

土壌中や空气中、植物体に普遍的に存在する細菌です。納豆の製造に用いられる納豆菌は、枯草菌の一種です。

2) *Aspergillus nidulans* (アスペルギルス ニドゥランス)

古くから遺伝学の研究対象とされ、分子生物学的手法が整備された糸状菌のモデル生物です。この糸状菌は、産業上重要なコウジカビなどの近縁種です。

3) (細菌) 鞭毛

細菌の表面に見られる繊維で、遊泳に必要な推進力を生み出します。細菌鞭毛は、フラジェリンというタンパク質が重合して伸びた繊維でできています。

4) ビタミン B1 (チアミン)

水溶性ビタミンに分類される生理活性物質、栄養素の一つです。ヒトでは、糖質および分岐脂肪酸の代謝に用いられ、不足すると脚気や神経炎などの症状を生じます。微生物を含むほぼ全ての生物にとって必要な微量栄養素で、保存されたエネルギー代謝の中核の反応の補酵素として機能します。

5) 相利共生

異なる生物種が同所的に生存することで、互いに利益を得ることができる共生関係のことです。

研究資金

本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 総括実施型研究 (ERATO) 「野村集団微生物制御プロジェクト」の一環で行われました。

掲載論文

【題名】 Fungal mycelia and bacterial thiamine establish a mutualistic growth mechanism (糸状菌の菌糸と細菌のチアミンがもたらす相利共生的生長機構)

【著者名】 Gayan Abeysinghe[#], Momoka Kuchira[#], Gamon Kudo, Shunsuke Masuo, Akihiro Ninomiya, Kohei Takahashi, Andrew S. Utada, Daisuke Hagiwara, Nobuhiko Nomura, Naoki Takaya, Nozomu Obana^{†*}, Norio Takeshita^{*}

Microbiology Research Center for Sustainability (MiCS), Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

[#]Equal contribution, [†]Current position, MiCS and Transborder Medical Research Center,
Faculty of Medicine, University of Tsukuba, * Corresponding author

【掲載誌】 Life Science Alliance

【掲載日】 2020年9月23日

【DOI】 10.26508/lsa.202000878

問合わせ先

【研究に関すること】

竹下 典男 (たけした のりお)

筑波大学 生命環境系/微生物サステナビリティ研究センター(MiCS) 准教授

JST ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト ゲノム生化学グループ グループリーダー

Web: <https://fungalcell.com>

尾花 望 (おばな のぞむ)

筑波大学 医学医療系/トランスボーダー医学研究センター/微生物サステナビリティ研究センター
(MiCS) 助教

JST ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト 不均一性グループ グループリーダー

【取材・報道に関すること】

筑波大学 広報室

Tel : 029-853-2040

E-mail : kohositu@un.tsukuba.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

〒102-8666 東京都千代田区四番町5番地3

Tel : 03-5214-8404 Fax : 03-5214-8432

E-mail : jstkoho@jst.go.jp

【JSTの事業に関すること】

内田 信裕 (うちだ のぶひろ)

科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部

〒102-0076 東京都千代田区五番町7 K's 五番町

Tel: 03-3512-3528

E-mail: eratowww@jst.go.jp

2020年10月19日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学
国立研究開発法人日本医療研究開発機構

交尾刺激に应答して卵子を作り出す過程を調節する 新しい神経伝達メカニズムを発見

あらゆる生物の体は、各々の役割に特化した細胞の集まりでできています。それらの細胞を生み出す元となるものが幹細胞であり、その働きは、幹細胞が局在する場所から伝達されるシグナルによって制御されています。ところが近年の研究により、そのシグナルが、ホルモンや神経伝達物質といった外部からのシグナルによって調節されることが明らかになってきました。ホルモンや神経伝達物質による幹細胞の制御は、傷害やストレスに対する応答、発生過程で見られ、需要に応じた幹細胞の増殖を可能にしています。

モデル動物であるキイロショウジョウバエにおいては、生殖幹細胞は交尾後に増加します。従って、交尾が生殖幹細胞の増殖を引き起こす外部シグナルであると考えられます。本研究では、キイロショウジョウバエの卵子の元となる生殖幹細胞が交尾刺激に应答して増殖するプロセスが、卵巣へと伸びる神経によって調節されていることを明らかにしました。この神経はオクトパミンと呼ばれる神経伝達物質を産生・放出し、卵巣に存在するオクトパミン受容体に受け取られることが、交尾に伴う生殖幹細胞の増殖に必須であることを解明しました。本研究は、動物の生殖を支える生殖幹細胞の調節に、卵巣へと伸びる神経による直接的な支配が関わることを示した初めての成果です。オクトパミンは哺乳動物のノルアドレナリンに相当し、進化的に幅広く保存された神経伝達物質であると考えられていることから、今回の成果は動物に共通した神経による幹細胞の制御メカニズムの解明に貢献することが期待されます。

研究代表者

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター
丹羽 隆介 教授

研究の背景

あらゆる生物の体は、各々の役割に特化した細胞の集まりでできています。それらの細胞を生み出す元となるものが幹細胞であり、幹細胞の動態は幹細胞ニッチ^{注1)}から伝達されるシグナルによって制御されています。ところが近年の研究により、その幹細胞ニッチから伝達されるシグナルが、ホルモンや神経伝達物質といった外部からのシグナルによって調節されることが明らかになってきました。それらホルモンや神経伝達物質による幹細胞の制御は、傷害やストレスに対する応答、発生過程で見られ、需要に応じた幹細胞の増殖を可能にしています。

このような外部からのシグナルによる幹細胞制御の一例として、2016年に本研究チームは、モデル生物であるキョウジョウバエを用いて、卵子をつくる元となる生殖幹細胞^{注2)}が、交尾後に増加することを報告しています。しかし、産卵の需要に応えるために、どのようにして交尾という外部からのシグナルが生殖幹細胞の増殖を引き起こすのかは明らかではありませんでした。

研究内容と成果

本研究グループは、様々な遺伝子を導入したショウジョウバエを用いた遺伝学的研究を出発点として、交尾によって引き起こされる生殖幹細胞の増殖に必要な生体分子および遺伝子を探索しました。その結果、候補因子として「オクトパミン^{注3)}」と呼ばれる神経伝達物質と、その受容体であるオクトパミン受容体を同定しました。オクトパミンは神経系で産生されることが知られており、オクトパミン産生神経は、中枢神経系から卵巣へと軸索を伸ばしてシナプスを形成しています。そのオクトパミン産生神経を活性化したところ、未交尾のショウジョウバエにおいても生殖幹細胞の増殖を引き起こすことができました。一方で、オクトパミンの産生を阻害すると、交尾後の生殖幹細胞の増加は起こりませんでした。さらに、卵巣につながるオクトパミン産生神経は、子宮で交尾刺激を受容する神経と中枢神経系内で直接シナプスを形成しており、交尾刺激が、子宮—交尾刺激受容神経—オクトパミン産生神経—卵巣という経路で伝達されることが明らかになりました（参考図左）。

オクトパミン産生神経が卵巣へと伸びていることから、卵巣においてオクトパミン受容体が機能していると考えられます。そこで、卵巣の様々な細胞集団に対してオクトパミン受容体の機能阻害を行ったところ、交尾後の生殖幹細胞増加には、生殖幹細胞に接しているエスコート細胞（ニッチ細胞の一種）におけるオクトパミン受容体が必須であることが分かりました。さらに、オクトパミン受容体の下流で、タンパク質分解酵素のマトリックスメタロプロテアーゼ（Mmp2）^{注4)}が機能することで、生殖幹細胞の増殖に重要なニッチシグナルである骨形成タンパク質（BMP）^{注5)}シグナルが強くなりました。これらのことから、中枢神経系から卵巣へと伸びるオクトパミン産生神経が生殖幹細胞ニッチにおけるオクトパミン受容体を活性化し、細胞外プロテアーゼ Mmp2 を介して生殖幹細胞ニッチからの BMP シグナルを増強させる、という一連のメカニズムが明らかになりました（参考図右）。

今後の展開

今回の研究で、卵巣につながる神経が生殖幹細胞ニッチを刺激して、産卵をもたらす生殖幹細胞の増殖に影響を及ぼすことが分かりました。しかしながら、細胞外プロテアーゼ Mmp2 が生殖幹細胞ニッチのシグナルを調節する仕組みは未解明です。Mmp2 には細胞外に存在するコラーゲンなどのタンパク質を切断する働きがあり、Mmp2 が何らかのタンパク質を切断することでシグナルが伝えられると考えられます。今後、このシグナル伝達経路上で Mmp2 が作用するタンパク質の探索を行っていきます。

オクトパミンは、哺乳動物の神経伝達物質として有名なノルアドレナリンに似た物質であり、また Mmp2 もヒトを含むあらゆる動物が持っている分子です。よって、ノルアドレナリン産生神経を含む神

経系や Mmp が、ショウジョウバエ以外の生物での幹細胞の動態制御に与える影響が明らかになれば、幅広い動物において、神経系による幹細胞の調節メカニズムが解明されることが期待されます。

参考図

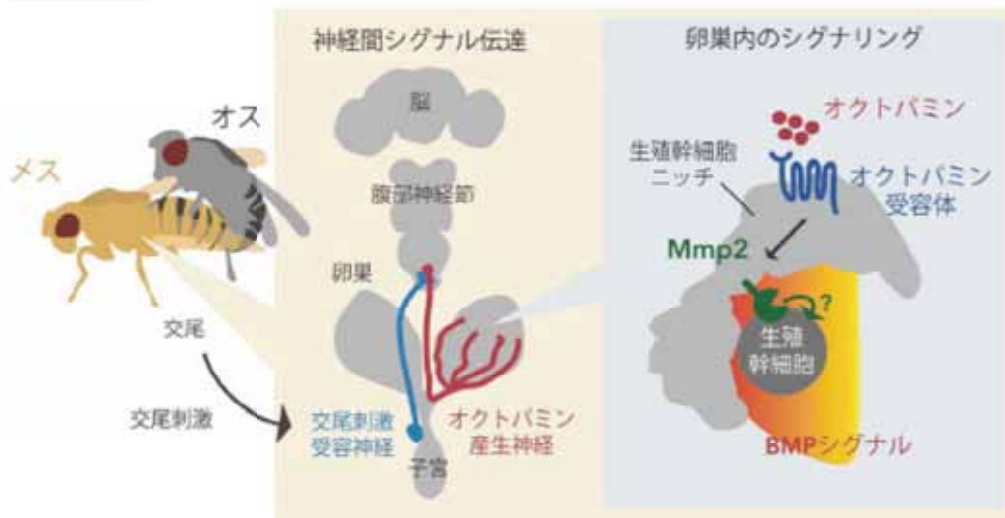


図 交尾により引き起こされる生殖幹細胞の増殖を促すシグナル伝達経路

雌キイロショウジョウバエでは、交尾後に中枢神経系（腹部神経節）から卵巢へと伸びるオクトパミン産生神経が活性化することが分かりました（図左）。さらに、その神経から放出されたオクトパミンが生殖幹細胞ニッチにおいてオクトパミン受容体に受け取られると、Mmp2 が何らかの働きを行い、これによって生殖幹細胞ニッチから産生される BMP シグナルが増強されて、生殖幹細胞の増殖を促すことが明らかになりました（図右）。

用語解説

注1) 幹細胞ニッチ

幹細胞に接着し、幹細胞の増殖・分化を調節する細胞集団。

注2) 生殖幹細胞

卵巢または精巣に存在し、配偶子へと分化する能力を持つ幹細胞。

注3) オクトパミン

アミノ酸であるチロシンから生合成されるモノアミン神経伝達物質。ノルアドレナリンの類縁分子。

注4) マトリックスメタロプロテアーゼ (Mmp : Matrix metalloproteinase)

細胞内外の基質を切断するタンパク質分解酵素。キイロショウジョウバエゲノム上には Mmp1、Mmp2 の2つが存在する。

注5) 骨形成タンパク質 (BMP : Bone Morphogenetic Protein)

骨の形成を誘導する生理活性物質で、多彩な生理機能を持つことが知られている。キイロショウジョウバエにおいても初期発生や幹細胞制御において重要な働きを持つ。

研究資金

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）革新的先端研究開発支援事業（AMED-CREST）「全ライフコースを対象とした個体の機能低下機構の解明」研究開発領域における研究開発課題「成長期の栄養履歴が後期ライフステージに与える機能低下のメカニズム」（研究期間：平成 29 年度～令和 4 年度）、日本学術振興会科学研究費助成事業 新学術領域研究「生殖幹細胞インテグリティ制御に

おけるホルモンと神経伝達物質の役割の解明」(平成31年度～令和2年度)、日本学術振興会科学研究費助成事業 基盤研究(A)(研究期間:平成26～28年度、平成29年度～令和元年度)、特別研究員奨励費(研究期間:平成27～29年度、平成30年度～令和2年度)、科学技術振興機構(JST)戦略的創造研究推進事業さきがけ「慢性炎症」における研究課題「内因性リガンドによる進化的に保存された自然免疫活性化機構の解明」(研究期間:平成24～27年度)、および公益財団法人武田科学振興財団・ライフサイエンス研究助成の支援により実施されました。

掲載論文

【題名】 Neuronal octopamine signaling regulates mating-induced germline stem cell increase in female *Drosophila melanogaster*

(神経由来のオクトパミンシグナリングが雌ショウジョウバエにおいて交尾依存的な生殖幹細胞の増加を引き起こす)

【著者名】 Yuto Yoshinari (吉成 祐人・筑波大学大学院生命環境科学研究科・日本学術振興会特別研究員)、Tomotsune Ameku (天久 朝恒・筑波大学大学院生命環境科学研究科(当時)・日本学術振興会特別研究員)、Shu Kondo (近藤 周・国立遺伝学研究所・助教)、Hiromu Tanimoto (谷本 拓・東北大学大学院生命科学研究科・教授)、Takayuki Kuraishi (倉石 貴透・金沢大学医薬保健研究域薬学系・准教授)、Yuko Shimada-Niwa (島田 裕子・筑波大学生存ダイナミクス研究センター・助教)、Ryusuke Niwa (丹羽 隆介・筑波大学生存ダイナミクス研究センター・教授)

【掲載誌】 *eLife*

【掲載日】 2020年10月20日

【DOI】 10.7554/eLife.57101

問合わせ先

【研究に関すること】

丹羽隆介(にわ りゅうすけ)

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 教授

URL: <https://sites.google.com/view/niwa-lab-tsukuba/home>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp

【AMEDに関すること】

日本医療研究開発機構(AMED)

シーズ開発・研究基盤事業部 革新的先端研究開発課

TEL: 03-6870-2224

E-mail: kenkyuk-ask@amed.go.jp

PRESS RELEASE

2020年11月5日

理化学研究所

山形大学

筑波大学

日本医療研究開発機構

「DIAMonDS」でハエの一生を記録する

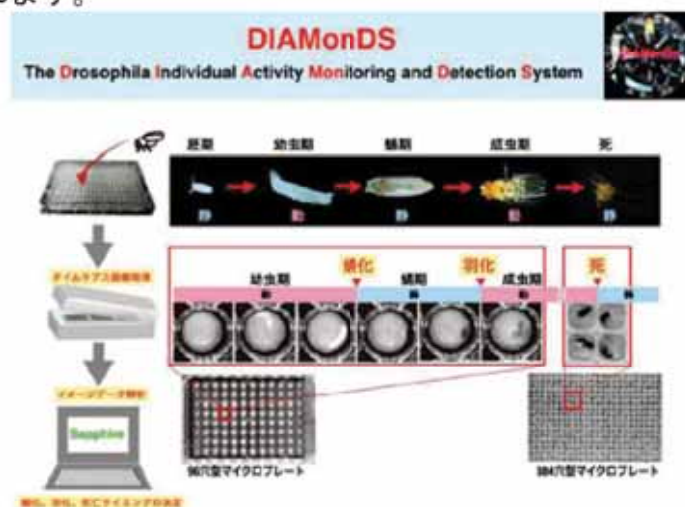
— ショウジョウバエの個体別活動測定システムを開発 —

理化学研究所（理研）開拓研究本部真貝細胞記憶研究室の成者鉉協力研究員（研究当時）、山形大学の姜時友助教、松村泰志博士研究員（研究当時）、筑波大学の丹羽隆介教授、島田裕子助教の共同研究グループは、ショウジョウバエの一生で起こる蛹化・羽化・死亡のタイミングを、個体別に自動で大量に測定できる新しいシステムを開発しました。

本研究成果は、モデル生物であるショウジョウバエを用いたさまざまな研究の進展だけでなく、毒性実験や創薬など医学・農学分野への応用に貢献すると期待できます。

生物の各成長段階の期間の長さは、個体内外のさまざまな要因の影響を受け、その結果として決まります。そのため、各成長段階の転換時点を詳細に測定できれば、遺伝子や環境因子、複合的な相互作用の解析など、さまざまな研究に利用できます。今回、共同研究グループは、ショウジョウバエの蛹化・羽化・死亡のタイミングを個体別に測定するシステム「*Drosophila* Individual Activity Monitoring and Detection System ; DIAMonDS（ダイヤモンド）」を開発しました。DIAMonDSは市販の比較的安価な商品で構築され、独自に開発したソフトウェア Sapphire（サファイア）を導入したことで、低コストかつ高精度に測定できるという利点があります。

本研究は、オンライン科学雑誌『*eLife*』（11月10日付：日本時間11月10日）に掲載されます。



ショウジョウバエの個体別活動測定システム「DIAMonDS」の概要

研究支援

本研究は、日本医療研究開発機構 (AMED) 革新的先端研究開発支援事業 AMED-CREST 「全ライフコースを対象とした個体の機能低下機構の解明」研究開発領域における研究開発課題「成長期の栄養履歴が後期ライフステージに与える機能低下のメカニズム (研究開発代表者: 上村匡)」および科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業さきがけ「生体における動的恒常性維持変容機構の解明と制御 (研究総括: 春日雅人)」の研究課題「胎児プログラミング仮説の分子機構の解明と医療への応用 (研究代表者: 成耆鉉)」による支援を受けて行われました。

1. 背景

生物は、受精卵から発生し、発達段階を経て成熟し、やがて死を迎えます。例えば、ヒトでは、出生から乳幼児期、思春期、成人期、更年期、老年期、そして死というように、その特徴から成長段階を区分けできます。各成長段階の期間の長さは、個体内外のさまざまな要因の影響により決まってくる (図 1)。ヒトなどでは、各成長段階の時間間隔は非常に長く、これらの時間を扱うことは現実的ではありません。また、多くの動物では、発生、発達が連続的に進むため、たとえ短い生活環^[1] (ライフサイクル) の動物でも、成長段階の転換時点の厳密な測定は極めて難しい作業です。

一方、完全変態昆虫^[2]は、卵、幼虫、蛹、成虫というように発生が進むにつれて、その形態や行動が劇的に変化するため、各成長段階の転換時点を厳密に測定できません (図 1)。しかし、生活環が短い昆虫を扱っても、孵化、蛹化、羽化、死亡など転換時点を個体別に厳密に目視測定することは、非常に大変な作業でした。

キイロショウジョウバエ^[3] (以下、ショウジョウバエ) は完全変態昆虫であり、生活環も約 10 日間と非常に短く、優れたモデル生物の一つです。これまでにショウジョウバエを用いた研究成果が、基礎生物学から医療分野まで多岐にわたり大きく貢献しています。そこで、共同研究グループは、今回「ショウジョウバエの一生の全てを測定し、自動記録するシステムの開発」を目指し、研究を開始しました。

生体内外の様々な環境と生活環

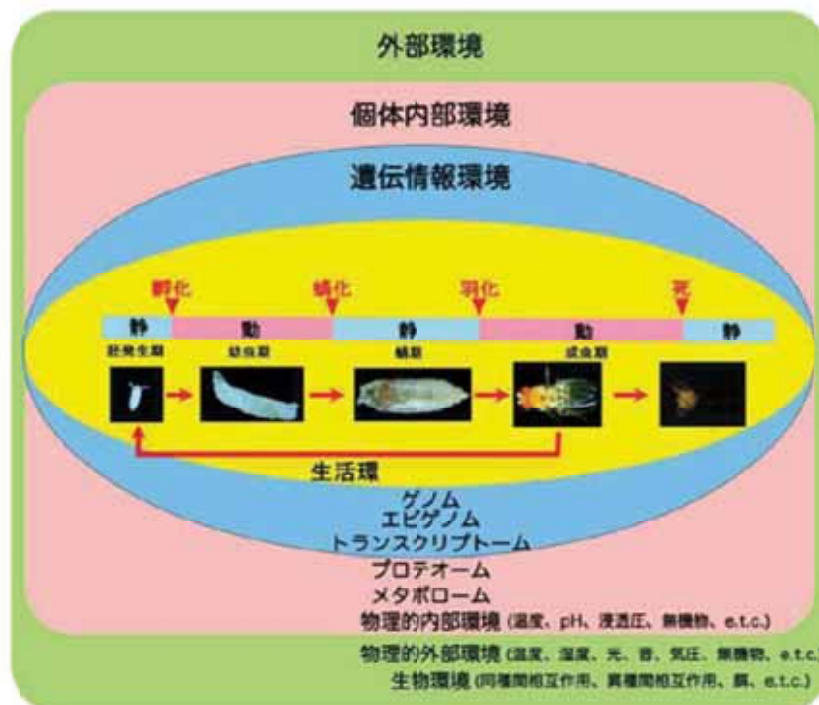


図1 ショウジョウバエの一生と個体に与える外部・内部環境の影響

生物の各成長段階の期間の長さは、個体内外のさまざまな要因の影響を受け、その結果として決まってくる。つまり、各成長段階の転換時点や期間を詳細に測定できれば、遺伝子や環境因子、または複合的な相互作用の解析など、さまざまな研究に利用できる。

2. 研究手法と成果

今回、共同研究グループは、ショウジョウバエの蛹化・羽化・死亡のタイミングを個体別に測定するシステム「*Drosophila* Individual Activity Monitor and Detection System ; DIAMonDS (ダイヤモンド)」を開発しました。

開発にあたって最初に、ショウジョウバエの一生にわたる活動状態に着目しました。すると、胚期は静的状態、幼虫期は動的状態、蛹期は静的状態、成虫期は動的状態、死亡は静的状態にあることから、ショウジョウバエの一生は、静的状態と動的状態の繰り返しであることが分かりました。これを利用し、静・動の活動状態を正確に測ることができれば、成長段階の転換時点である蛹化・羽化・死亡のタイミングを厳密に測定できると考えました。

まず、システムのハード面では、個体別に一連の成長段階の活動を測定でき、ハイスループットで対応できる比較的安価な汎用製品や素材によって構築することにしました。そこで、市販のスクャナーを用いて、ショウジョウバエを1個体ずつ穴(ウェル)に入れたマイクロプレートを、短い時間間隔(1、5、15分など)で自動的に連続スクャンすることで、タイムラプス画像データを取得する

方法を採用しました。例えば、蛹化・羽化測定ではそれぞれ2週間、寿命測定では3カ月間、自動でスキャン画像を撮り続けます。

さらに、得られたタイムラプス画像データを解析し、蛹化・羽化・死亡のタイミングを検出するソフトウェア「Sapphire（サファイア）」を開発しました。Sapphireの開発では、生きている昆虫だからこそここる、個体が入ったマイクロプレートの穴ごとのさまざまな状態変化によるノイズをいかに軽減させられるかが課題でしたが、それは機械学習^[4]を用いることで解決しました（図2）。

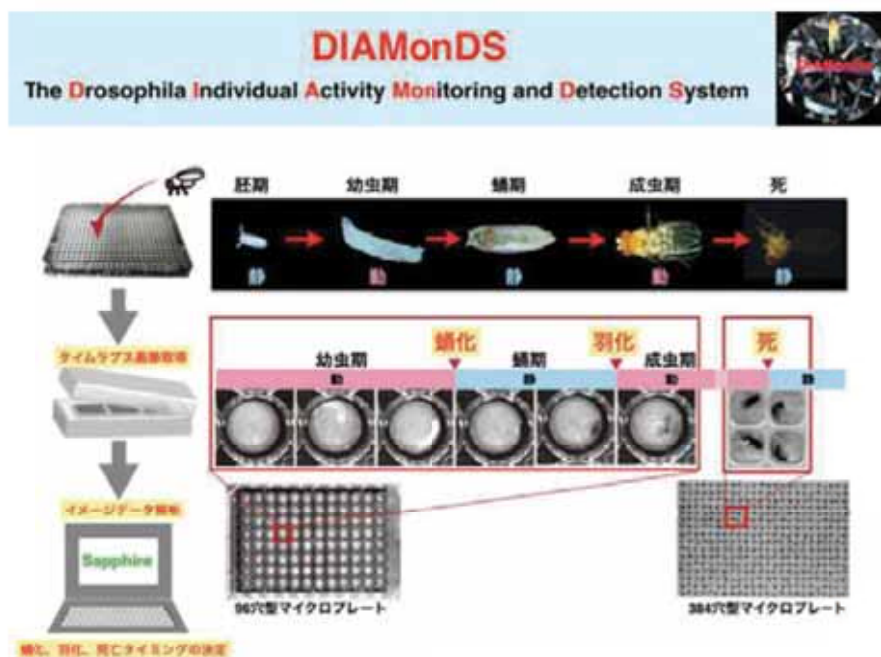


図2 ショウジョウバエの個体別活動測定システム「DIAMonDS」の概要

まず、ショウジョウバエをマイクロプレートの穴に1個体ずつ入れ、それをスキャナーにセットし、連続スキャンによりタイムラプス画像を取得する。そして、得られたタイムラプス画像を独自に開発した画像データ解析ソフト Sapphire で解析し、ショウジョウバエの蛹化、羽化、死亡のタイミングを自動検出する。蛹化、羽化の測定には96穴型マイクロプレート、死亡の測定には96穴型と384穴型マイクロプレートが使用できる。

DIAMonDSでは、目視測定と比較して、蛹化・羽化のタイミングは74～85%、死亡のタイミングは92%の測定精度を達成しました（図3）。この測定精度は、ハイスループットスクリーニングや、予備実験段階では十分に評価できる値です。さらに、Sapphireはグラフィカルユーザーインターフェース^[5]を備えており、集団データの可視化やイレギュラーな個体の確認と除外、要約のファイル出力など一連のデータ管理作業を容易に行えることから、解析結果を少ない労力と時間で得られます。

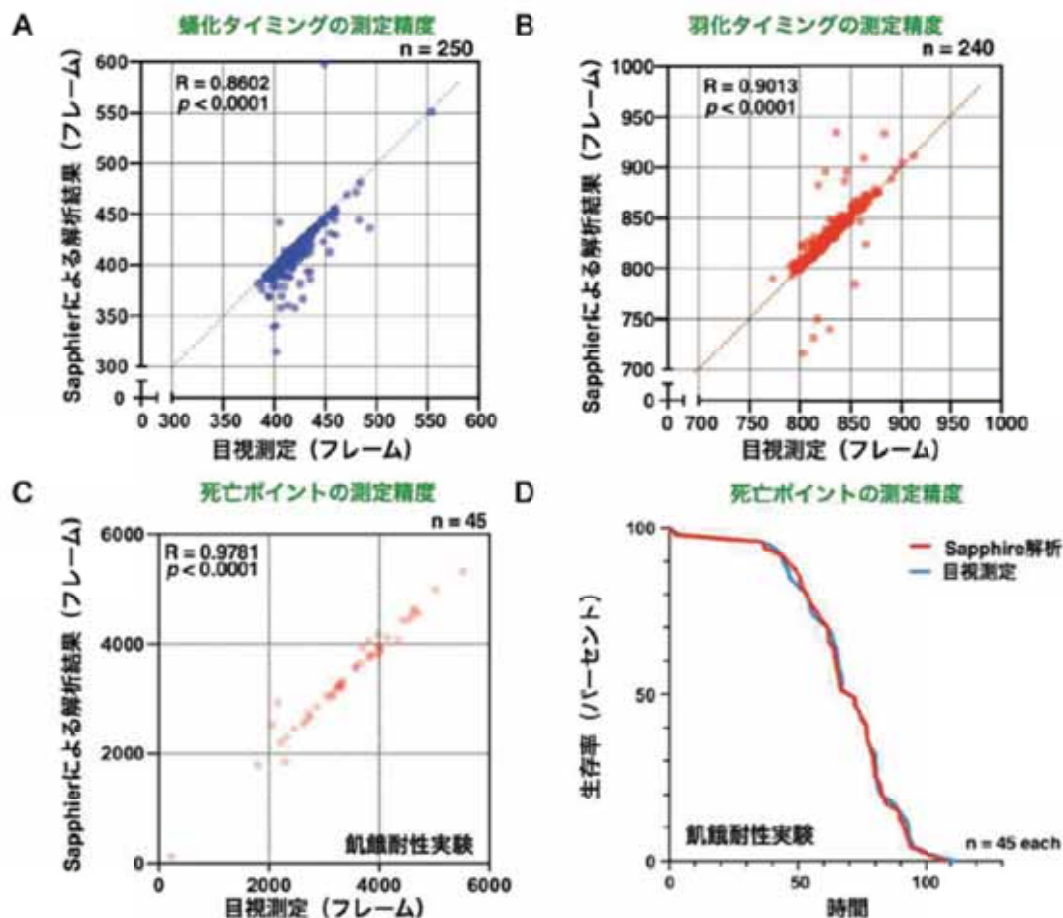


図3 DIAMonDS-Sapphire で得られた解析結果の精度評価

- A: 蛹化タイミングの測定精度（測定数 250 個体）を表すグラフ。縦軸・横軸のフレームとは静止画 1 枚分（コマ）のこと。R は相関係数（Sapphire による解析結果と目視測定の直線的な関係の強さを表す指標）、 p は有意確率を示す。
- B: 羽化タイミングの測定精度（測定数 240 個体）。
- C: 成虫期に飢餓状態にした場合の死亡ポイント測定精度（測定数 45 個体）。
- D: 成虫期に飢餓状態にした場合の生存率（パーセント）と経過時間を示すグラフ。

3. 今後の期待

DIAMonDS は、従来多大な労力を要したショウジョウバエの蛹化・羽化・死亡のタイミングを個体ごとに低コスト・低労力で簡単に測定できます。さらに、ハイスループットな解析にも十分対応できるため、生命科学における基礎的研究のみならず、毒性実験、農薬・医薬スクリーニングなど創薬にも応用できる可能性があります。例えば、化粧品や薬品などの細胞毒性を見るために、これまで多用されていた哺乳類を用いた動物実験の施行が困難な現在、その代替法として、本システムは有効利用できます。また、さまざまな疾患モデルショウジョウバエを使って、ハイスループットな化合物スクリーニングをすることにより、創薬のための新薬一次スクリーニングにも利用できます。さらに、ショウジョウバエ以

外の動物（マイクロプレートサイズに収まる程度の動物）にも対応可能で、害虫に対する農薬開発など、さまざまな応用が期待できます（図4）。

今後は、蛹化・羽化・死亡だけでなく「個体一生の全てを自動記録する装置」の開発に向けて、DIAMonDS をさらに改良し、新しい挑戦を行っていきたいと考えています。



図4 DIAMonDS の利点と利用

赤枠は DIAMonDS の解析実施例、青枠は DIAMonDS の利点を、黄枠では対象をショウジョウバエ以外の動物にも広げられることを示している。緑枠は、DIAMonDS が多くの研究分野へ貢献できる可能性を持つことを示す。

4. 論文情報

<タイトル>

The *Drosophila* Individual Activity Monitoring and Detection System (DIAMonDS)

<著者名>

Ki-Hyeon Seong, Taishi Matsumura, Yuko Shimada-Niwa, Ryusuke Niwa, and Siu Kang

<雑誌>

eLife

<DOI>

10.7554/eLife.58630

5. 補足説明

[1] 生活環

生物において、前世代の生殖細胞から受精後の発生、発達、成熟期を経て、次世代の生殖細胞へとつながる過程が繰り返される様を、環状に捉えて表現した言葉。

[2] 完全変態昆虫

昆虫における変態の一形式で、幼虫が極端に不活動状態になる蛹期を経て、成虫になる変態様式のことを完全変態といい、完全変態する昆虫を完全変態昆虫と呼ぶ。

[3] キイロショウジョウバエ

ハエ目ショウジョウバエ科の昆虫で、さまざまな研究分野でモデル生物として用いられている。体長 2~3mm 前後の大きさで、飼育が容易であり、遺伝学的な解析に適する。

[4] 機械学習

膨大なデータをコンピュータに入力し、その中にある既知の特徴を繰り返しコンピュータに学習させるか、もしくはデータそのものからコンピュータに規則性を発見させることで、未知のデータに対する解答を自動で得る手法。

[5] グラフィカルユーザーインターフェース

コンピュータのユーザーインターフェースの一つで、ユーザーにとっての使いやすさを重視し、情報の提示において、マウスなどによる画面上の簡単な操作によって指示を送ることができるようにした手法。

6. 発表者・機関窓口

* 今般の新型コロナウイルス感染症対策として、理化学研究所では在宅勤務を実施しておりますので、メールにてお問い合わせ願います。

<発表者> ※研究内容については発表者にお問い合わせください。

理化学研究所 開拓研究本部 眞貝細胞記憶研究室

協力研究員（研究当時） 成 耆鉉（そん きひょん）

E-mail : ki-hyeon.seong[at]riken.jp

山形大学学術研究院 大学院理工学研究科担当

助教 姜 時友（かん しゅう）

博士研究員（研究当時） 松村 泰志（まつむら たいし）

E-mail : siu[at]yz.yamagata-u.ac.jp（姜）

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター

教授 丹羽 隆介（にわ りゅうすけ）

助教 島田 裕子（しまだ ゆうこ）

E-mail : ryusuke-niwa[at]tara.tsukuba.ac.jp（丹羽）



左から、姜 時友、島田 裕子、成 耆鉉、松村 泰志、丹羽 隆介

<機関窓口>

理化学研究所 広報室 報道担当

E-mail : ex-press[at]riken.jp

山形大学 エンロールメント・マネジメント部 EM・広報課 広報室

E-mail : koho[at]jm.kj.yamagata-u.ac.jp

筑波大学 広報室

E-mail : kohositu[at]un.tsukuba.ac.jp

<AMED 事業に関すること>

国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)

シーズ開発・研究基盤事業部 革新的先端研究開発課

E-mail : kenkyuk-ask[at]amed.go.jp

※上記の[at]は@に置き換えてください。

2021年1月15日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学
大阪市立大学
国立研究開発法人科学技術振興機構

微生物が多様な膜小胞を作る仕組みを解明

微生物は、細胞膜と同じ成分からなる多様な小胞(膜小胞)を細胞外に放出することが知られており、近年、それらの膜小胞が、医療やバイオテクノロジーをはじめとする様々な分野に応用できる可能性を秘めていることが明らかになっています。しかし、膜小胞の多様性が生じる仕組みについては、いまだに多くの謎が残されています。特に、病原性の高い結核菌などが含まれる「ミコール酸含有細菌」と呼ばれる菌群が作る膜小胞は、病原性に関わる重要な機能を持つことが報告されていますが、それらの膜小胞ができる仕組みは未解明のままです。

本研究では、ミコール酸含有細菌が、自らの置かれた状況に応じて、様々な組成の膜小胞を作り分ける仕組みを明らかにしました。ミコール酸含有細菌の中でも無毒株として知られるコリネ菌に、いくつかの異なるストレスを与えたところ、①DNAの複製が阻害された時、②細胞壁の合成が阻害された時、③細胞膜の合成に必須なビオチン(ビタミンの一種)が少なくなった時、の三つの場合に膜小胞が放出されることが明らかになりました。それぞれの場合で、作られる膜小胞の構造や化学的な組成は異なっており、かつ微生物由来の膜小胞としては非常にユニークな特徴(入れ子構造や鎖状構造)を有していました。また、同様の仕組みは、コリネ菌以外のミコール酸含有細菌にも保存されていることが分かりました。

このような、微生物が膜小胞を作り分ける仕組みに関する知見は、膜小胞由来の安全なワクチン開発などにも役立つことが期待されます。

研究代表者

筑波大学 生命環境系

豊福 雅典 准教授

野村 暢彦 教授

大阪市立大学 理学研究科

宮田 真人 教授

研究の背景

生物膜に由来する小胞(膜小胞)は、生体内で重要な役割を果たすことが知られています。例えば、ヒトなどの動物の神経細胞が形成する膜小胞は、神経伝達を担う重要な物質です。単細胞の微生物も、同様に、膜小胞を形成・放出することが明らかにされており、これらの膜小胞には、外部環境からの栄養獲得や細胞間のコミュニケーションの仲介といった、様々な機能があることも分かってきました。さらに、微生物が作る膜小胞の機能を、医療やバイオテクノロジーに応用するための研究も盛んに行われています。中でも、病原性の微生物が放出する膜小胞は、ヒトなどの宿主の免疫系を効果的に活性化する機能を持ちながらも、細胞のように増殖することがなく、新たなワクチン基盤としての有用性が注目されています。

一方、一つの微生物は、様々な機能や組成の膜小胞を作ります。その多様性を生む仕組みが分かれば、目的に応じた膜小胞を微生物に作らせることができるようになり、さらなる応用研究が期待できますが、これについてはいまだ多くの謎が残されています。本研究グループでは、これまでに、グラム陽性菌とグラム陰性菌という二つの主な微生物群で、細胞死を伴って膜小胞が放出される仕組みを発見しています。しかし、病原性の高い結核菌などを含む「ミコール酸含有細菌^{注1)}」という菌群については、他の微生物と比べて細胞表層の構造が複雑であることから(図1)、どのように膜小胞が形成・放出されるのか、よく分かっていませんでした。

研究内容と成果

そこで本研究グループは、最先端の観察技術を用いて、ミコール酸含有細菌の中でも無毒株として知られる *Corynebacterium glutamicum* (コリネ菌) が、膜小胞を形成・放出する様子を詳細に観察することに成功しました。その結果、コリネ菌は、① DNA の複製が阻害された時に、細胞が死んでいく過程で膜小胞を放出する、② 細胞壁の合成が阻害された時に、増殖しなくなった(明らかな生死の区別がつかない)細胞の特定の部位から膜小胞を放出する、③ ビタミン B₇としても知られるビオチン^{注2)} が少なくなった時に、増殖可能な生きている細胞から膜小胞を放出する、という三つの経路があることを発見しました(図2)。また、細胞の微細構造を高分解能で観察したところ、それぞれの経路で放出された膜小胞は、ユニークな構造(入れ子構造、鎖状構造)を持っていました(図3)。さらに、ミコール酸含有細菌の細胞を構成する二種類の膜(図1)のうち、どちらから膜小胞が生じるかを明らかにするため、膜小胞の構成成分を詳細に解析し、②と③の経路では細胞の外側の膜から膜小胞が形成されている一方で、①の経路では主に内側の膜から形成されていることを見いだしました。また、結核菌の近縁種である *Mycobacterium smegmatis* を含む他のミコール酸含有細菌においても、上記の三つの放出経路が保存されていることが分かりました。ミコール酸含有細菌が膜小胞を放出する現象自体は、以前から知られていましたが、本研究は、その形成メカニズムと多様さを明らかにした初めての例です。

今後の展開

過去、コリネ菌と同じミコール酸含有細菌に属する結核菌が、膜小胞を放出し、それがヒト免疫を誘導することが発見され、新たなワクチン基盤として注目を集めてきました。しかし、これまでは、その膜小胞が作られる仕組みが分かっておらず、膜小胞の「質」をコントロールすることが困難でした。本研究成果を応用することで、結核菌のような病原菌の膜小胞の組成を変えることが可能になり、より安全・効果的なワクチン基盤を構築できると期待されます。

参考図

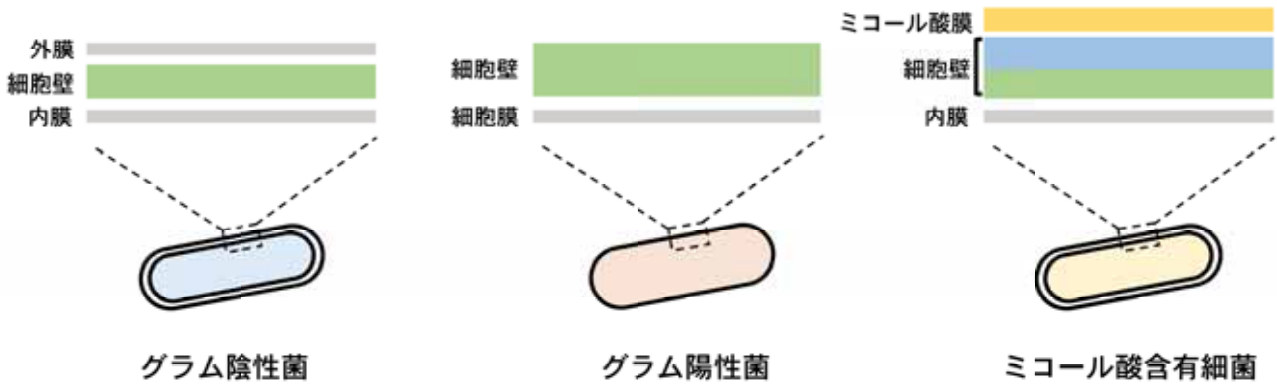


図1 代表的な微生物の細胞表層の構造

大腸菌などのグラム陰性菌の細胞には、内膜と外膜があり、その間に薄い細胞壁を有している。枯草菌などのグラム陽性菌は、細胞膜の外側に厚い細胞壁を有している。ミコール酸含有細菌は、グラム陽性菌と同様に厚い細胞壁を有し、さらにその外側にミコール酸を主成分とする外膜構造がある。

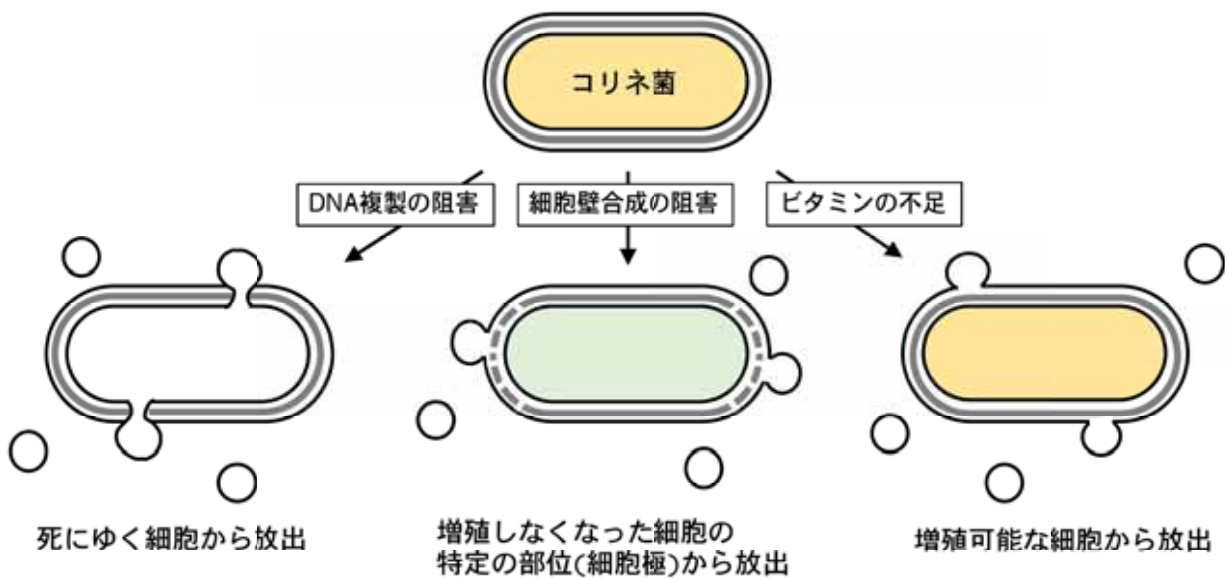


図2 コリネ菌が有する三つの膜小胞放出経路

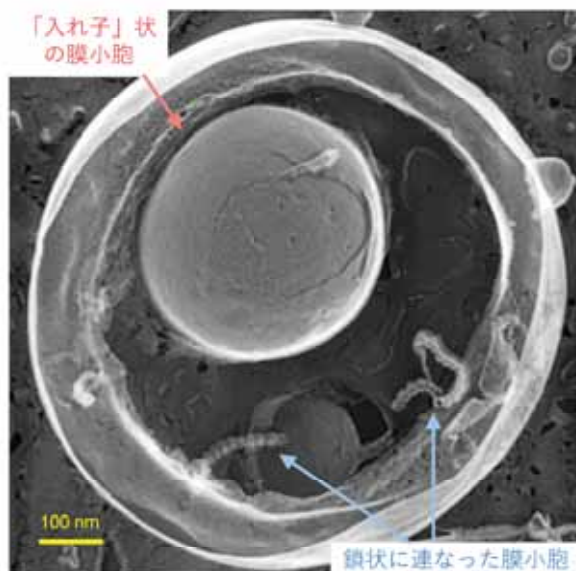


図3 コリネ菌が作る膜小胞のユニークな構造

多くの細菌の膜小胞は一層の膜によって形成されるが、コリネ菌の場合は、膜小胞の内側に、さらに小さな膜小胞と鎖状に連なった膜小胞を有する、複雑な膜構造が観察された。この膜小胞構造は、急速凍結レプリカ電子顕微鏡法という特殊な電子顕微鏡技術を用いることにより、初めて明らかになった。

用語解説

注1) ミコール酸含有細菌

他の微生物には見られない「ミコール酸」という特徴的な脂肪酸を合成する微生物群。細胞の表層に、主にミコール酸から構成される脂質膜(ミコール酸膜)を有する。よく知られている種としては、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)や、ジフテリア菌(*Corynebacterium diphtheriae*)などが挙げられる。

注2) ビオチン

ヒトを含む多くの生物にとって重要なビタミンの一種。コリネ菌が脂肪酸を合成する過程において必須の物質だが、コリネ菌自身はビオチンを合成することができないため、細胞の外から取り込む必要がある。

研究資金

本研究は、科学技術振興機構(JST) 戦略的創造研究推進事業 ERATO 野村集団微生物制御プロジェクトおよび科学研究費助成事業の一環として実施されました。

掲載論文

【題名】 Mycolic acid-containing bacteria trigger distinct types of membrane vesicles through different routes.

(ミコール酸含有細菌は異なる経路で性質の異なる膜小胞を形成する)

【著者名】 Toshiki Nagakubo, Yuhei O Tahara, Makoto Miyata, Nobuhiko Nomura, Masanori Toyofuku

【掲載誌】 iScience

【掲載日】 2021年1月14日

【DOI】 10.1016/j.isci.2020.102015

問合わせ先

【研究に関すること】

豊福 雅典（とよふく まさのり）

筑波大学生命環境系／微生物サステイナビリティ研究センター 准教授

URL: <http://www.envr.tsukuba.ac.jp/~microbio/>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp

大阪市立大学 広報課

TEL: 06-6605-3411

E-mail: t-koho@ado.osaka-cu.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

TEL: 03-5214-8404

E-mail: jstkoho@jst.go.jp

【JST事業に関すること】

科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部

内田 信裕（うちだ のぶひろ）

TEL: 03-3152-3528

E-mail: eratowww@jst.go.jp

帝京大学本部広報課

TEL: 03-3964-4162

E-mail: kouhou@teikyo-u.ac.jp

2021年3月3日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学
学校法人帝京大学

始原生殖細胞では性染色体上の遺伝子発現に性差がある ～性が決まる仕組みの解明へ～

ショウジョウバエは、ヒトと同じように、X染色体を一本だけ持てばオス(XY)に、二本持つとメス(XX)になります。従って、X染色体上に存在する遺伝子の総数は、メスはオスの2倍となります。オスの体を作る体細胞では、Male-specific lethal (MSL)複合体と呼ばれる分子群の働きにより、X染色体上の遺伝子の発現量をメスの2倍とすることで、X染色体上の遺伝子の発現量をオスとメスで等しくします。この機構は遺伝子量補償と呼ばれています。しかし、生殖細胞のもとになる始原生殖細胞でも、体細胞と同様に遺伝子量補償が働いているのかは、明らかになっていませんでした。

本研究では、ショウジョウバエの胚(卵)からオスとメスの始原生殖細胞をそれぞれ採取し、そこで発現している遺伝子を、RNAシーケンシング法により網羅的に同定しました。また、MSL複合体の遺伝子を強制的に発現させる実験を行いました。これらの結果から、ショウジョウバエにおいて、オスの始原生殖細胞でMSL複合体が形成されず、遺伝子量補償が、始原生殖細胞では働かないことを発見しました。X染色体上には、始原生殖細胞のメス化に関わる遺伝子が複数存在しています。オスの始原生殖細胞では、遺伝子量補償が働かないために、メス化に関わる遺伝子の発現量が、メスの半分になり、そのためにメス化が抑制されると考えられます。本研究成果は、生殖細胞の性を決める仕組みの解明に貢献すると期待できます。

研究代表者

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター (TARA)

小林 悟 教授

帝京大学 理工学部バイオサイエンス学科

太田 龍馬 講師

研究の背景

有性生殖を行う多くの動物は、生殖細胞である精子と卵を作り出し、それらが受精することで次世代を生み出します。ショウジョウバエの性は、細胞内の X 染色体の数によって決定され、X 染色体が 1 本であればオス(XY)、2 本であればメス(XX)になります。従って、X 染色体上に存在する遺伝子の総数は、メスはオスの 2 倍となります。オスの体を作る体細胞では、5 つのタンパク質と 2 つのノンコーディング RNA^{注1)}から構成される分子群 Male-specific lethal (MSL)複合体の働きにより、X 染色体上の遺伝子の発現量を 2 倍とすることで、メスと等しくします。この機構は、遺伝子量補償^{注2)}と呼ばれています。しかし、生殖細胞のもとになる始原生殖細胞^{注3)}においても、体細胞と同様に遺伝子量補償が働くのかは、これまで明らかになっていませんでした。そこで、本研究グループは、オスとメスの始原生殖細胞における、X 染色体上の遺伝子の発現量を調べる研究に取り組みました。

研究内容と成果

本研究では、ショウジョウバエの胚(卵)から、セルソーターという装置を用いて、オスとメスの始原生殖細胞をそれぞれ採取し、それらの始原生殖細胞中で発現している遺伝子を、RNA シーケンシング法により網羅的に同定しました。このデータから、①始原生殖細胞における X 染色体上の遺伝子の発現量は、オスに比べメスで 2 倍高いこと、②オスの始原生殖細胞において、MSL 複合体を構成する複数の因子の発現が非常に低いこと、を見いだしました。さらに、MSL 複合体の遺伝子を強制的に発現させる実験により、③オスの始原生殖細胞において、MSL 複合体の構成因子を強制的に発現させると、X 染色体上の遺伝子の発現が上昇すること、が分かりました。

以上のことから、オスの始原生殖細胞では、MSL 複合体が形成されないため、体細胞では機能する遺伝子量補償が働かないということが明らかになりました(参考図)。

今後の展開

ショウジョウバエの X 染色体上には、始原生殖細胞のメス化に関わる遺伝子が複数存在することが分かっています。オスの始原生殖細胞では、遺伝子量補償が働かないことで、メス化に関わる遺伝子の発現量がメスの半分になり、始原生殖細胞のメス化が抑えられると考えられます。今後、これを確かめるために、X 染色体上にある遺伝子の発現量を上昇させた場合に、オス始原生殖細胞がメス化するのかを調べる予定です。本研究成果は、あらゆる生物種において未だ十分に分かっていない、生殖細胞の性を決める機構の解明につながると期待できます。

参考図

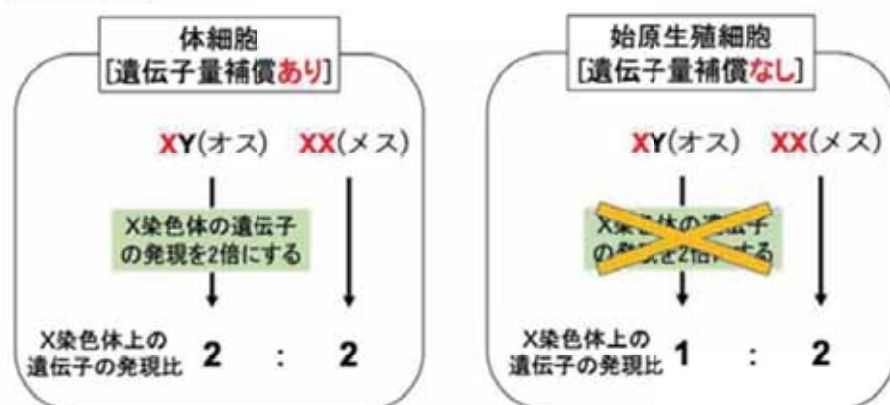


図 遺伝子量補償の有無による X 染色体上の遺伝子発現の変化

用語解説

注1) ノンコーディング RNA

タンパク質のアミノ酸配列情報をコード（翻訳）しない RNA。生物の複雑さをもたらす隠れた機能があると考えられている。

注2) 遺伝子量補償

性染色体（ショウジョウバエの場合は X 染色体）上の遺伝子の発現が等しくなるように調節される現象。

注3) 始原生殖細胞

胚発生の初期に形成される、精子あるいは卵のもとになる細胞。

研究資金

本研究は、科学研究費補助金 新学術領域研究「配偶子産生制御」（研究期間：平成 25～29 年度）、「配偶子インテグリティの構築」（研究期間：平成 30～34 年度）、基盤研究(A)（研究期間：平成 24～28 年度）、若手研究（研究期間：平成 30～31 年度）、基盤研究(B)（研究期間：令和 2～4 年度）、および TARA プロジェクト(研究期間：令和 2 年度)によって実施されました。

掲載論文

【題名】 Absence of X-chromosome dosage compensation in the primordial germ cells of *Drosophila* embryos

(ショウジョウバエ始原生殖細胞における X 染色体遺伝子量補償の欠如)

【著者名】 Ryoma Ota, Makoto Hayashi, Shumpei Morita, Hiroki Miura, and Satoru Kobayashi

【掲載誌】 Scientific Reports

【掲載日】 2021 年 3 月 1 日

【DOI】 10.1038/s41598-021-84402-7

問い合わせ先

【研究に関すること】

小林 悟 (こばやし さとる)

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 教授

URL: <http://skob.tara.tsukuba.ac.jp/Top/index.html>

太田 龍馬 (おおた りょうま)

帝京大学 理工学部バイオサイエンス学科 講師

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 客員研究員

URL : https://www.teikyo-u.ac.jp/faculties/science_tech/labo/bio_science_ota

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp



2021年3月16日

国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター (NCNP)
 国立大学法人 大阪大学
 国立大学法人 筑波大学
 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)

報道関係者各位

老いた脳の修復力を回復させるメカニズムを発見

【研究成果のポイント】

- ◇ 加齢により衰えた、脳の神経回路の修復力を回復させるメカニズムを発見しました。
- ◇ APJ 受容体^{*1}の活性化により、脳内の組織幹細胞、オリゴデンドロサイトの発達が促進されることを明らかにしました。
- ◇ APJ 受容体の活性化による神経回路の修復促進が、多発性硬化症などの疾患に対する治療に有効である可能性が示されました。

■ 概要

国立精神・神経医療研究センター (NCNP) 神経研究所の村松里衣子部長 (神経薬理研究部) らの研究グループは、大阪大学大学院医学系研究科の山下俊英教授、筑波大学生存ダイナミクス研究センター深水昭吉教授らと共同で、加齢に伴って低下した脳の修復力が、APJ 受容体の働きによって回復することを明らかにしました (図1)。

様々な脳脊髄疾患で、脳や脊髄の神経回路が傷つきますが、傷ついた神経回路はしばしば自然に修復します。ところが加齢に伴い、神経回路は修復しにくくなります。その原因の一つに、神経回路そのものの修復能力の劣化が指摘されていますが、その分子メカニズムは十分解明されていませんでした。

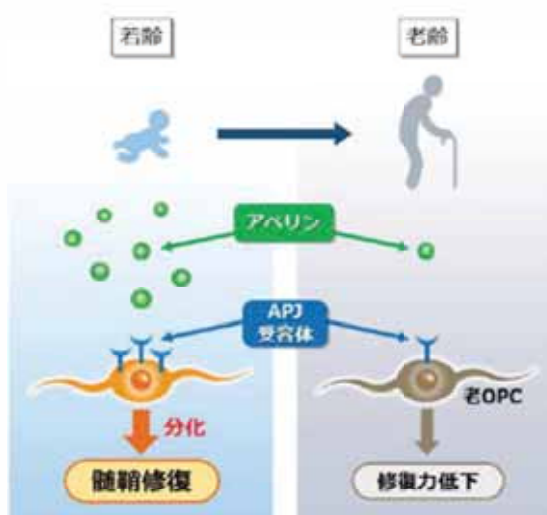


図1. 老化による髄鞘修復力低下のメカニズム

今回、研究グループは、アペリン^{※2} (Apelin) と APJ 受容体の働きによって、脳や脊髄の神経回路を構成する髄鞘^{※3} という構造が修復することを発見しました。髄鞘の脱落は、指定難病の多発性硬化症^{※4} などの病変に認められる特徴であり、健常な高齢者の脳でも観察される変化で、病態や老化による神経機能との関連が指摘されています。本研究成果から、APJ 受容体の活性化が高齢者の脳機能の向上や多発性硬化症などの疾患の治療に有効である可能性が考えられます。

■ 研究の背景

髄鞘は神経機能の発揮に重要な役割を担う構造物です。髄鞘の修復には、オリゴデンドロサイト前駆細胞^{※5} を分化させる必要がありますが、加齢にともない自然に分化することが難しくなります。加齢に伴うオリゴデンドロサイトの分化能力の低下には、オリゴデンドロサイト内の分子発現の変化が関わると報告されていましたが、キーとなる分子はわかっていませんでした。

■ 研究の概要

研究グループは、マウスを用いた実験から、髄鞘が修復しやすい条件のオリゴデンドロサイトに豊富に発現する分子として、APJ 受容体を見出しました。オリゴデンドロサイトに発現する APJ 受容体を欠損したマウスでは、髄鞘形成や運動機能の不良が顕著でした。(図 2)。

また、老齢マウスを用いた実験から、老齢マウスでは体内の apelin 量が低下していること、APJ 受容体を活性化させると傷ついた髄鞘の修復が促進されることを突き止めました(図 3)。さらに、多発性硬化症患者の脳内のオリゴデンドロサイトにも APJ 受容体が発現していること、また、培養細胞を用いた実験から、APJ 受容体の活性化がヒトのオリゴデンドロサイトの分化も促すことを見出しました。

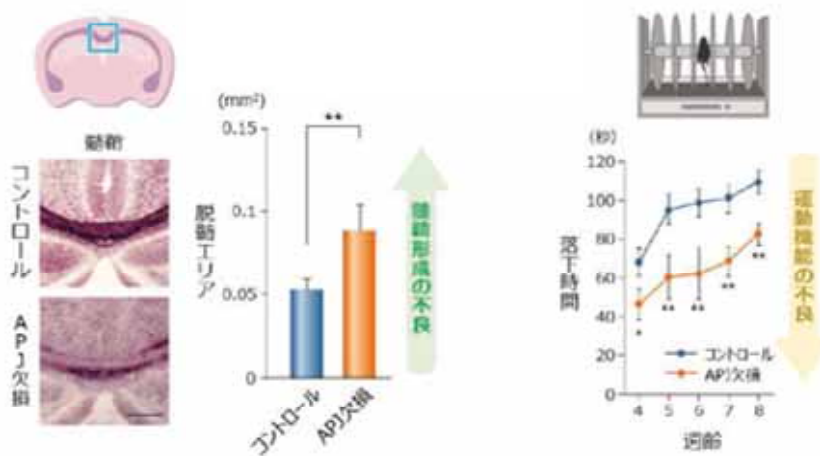


図 2. APJ 受容体欠損マウスでの髄鞘形成と運動機能の不良

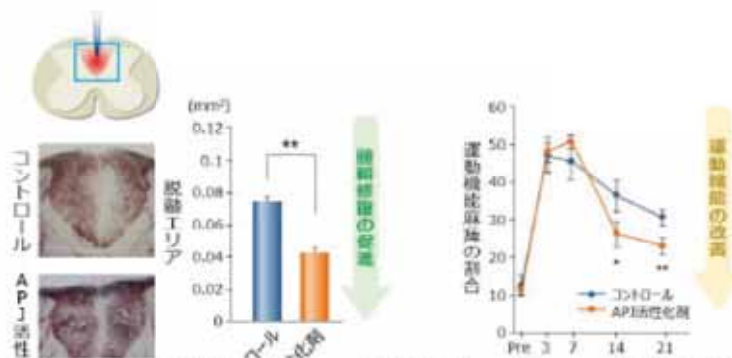


図3. APJ 活性化剤による老齢脱髄マウスでの髄鞘修復・運動機能の改善効果

■今後の展望

本成果により、老化脳を修復させるメカニズムの一端がわかりました。今後、apelin と APJ 受容体がどのような脳機能の改善作用を持つかについて更に研究を進めることにより、多発性硬化症など、髄鞘の傷害が見られる疾患に対する治療薬の開発につながることを期待されます。

■用語の説明

1) APJ 受容体

脳や血管内皮細胞など全身に広く発現する受容体。APJ 受容体の内因性のリガンドの一つとして、アペリンが報告されている。

2) アペリン

様々な臓器から産生される生理活性ペプチド。これまでに、心血管機能や筋機能との関連が知られている。

3) 髄鞘

神経活動の伝達に関わる構造物。脳や脊髄の様々な疾患の病変で、髄鞘の脱落が観察される。髄鞘が脱落した部位が担っていた神経機能が障害されるため、髄鞘の脱落が関わる疾患の症状の悪化と関連すると認識されている。

4) 多発性硬化症

希少疾患で、難病指定されている。免疫系の異常により髄鞘が傷つくと考えられている。現時点で、髄鞘を修復させる治療薬はない。

5) オリゴデンドロサイト

髄鞘を構成する細胞で、脳内のグリア細胞の一種である。オリゴデンドロサイトの前駆細胞は脳や脊髄の広い範囲に存在している。

■原著論文情報

・雑誌名：Nature Aging

・論文タイトル：

Age-dependent decline in remyelination capacity is mediated by apelin-APJ signaling

・著者：

Masumi Ito, Rieko Muramatsu[†], Yuki Kato, Bikram Sharma, Akiko Uyeda, Shogo Tanabe, Harutoshi Fujimura, Hiroyasu Kidoya, Nobuyuki Takakura, Yukio Kawahara, Masaki Takao, Hideki Mochizuki, Akiyoshi Fukamizu, Toshihide Yamashita

([†]責任著者)

・DOI：10.1038/s43587-021-00041-7

■研究経費

本研究は日本学術振興会・科学研究費補助金基盤研究（19H03554, 17H06178）や、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の革新的先端研究開発支援事業（PRIME）「生体組織の適応・修復機構の時空間的解析による生命現象の理解と医療技術シーズの創出」研究開発領域における研究開発課題「劣化した神経組織修復システムの復旧」（研究開発代表者：村松里衣子）の支援を受けて行われました。

■お問い合わせ先

【研究に関するお問い合わせ】

国立精神・神経医療研究センター

神経研究所 神経薬理研究部

村松 里衣子

〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1

042-346-1725

Email: muramatsu(a)ncnp.go.jp

【報道に関するお問い合わせ】

国立精神・神経医療研究センター 総務課広報係

〒187-8551 東京都小平市小川東町 4-1-1

TEL: 042-341-2711（代表） FAX: 042-344-6745

E-mail: ncnp-kouhou(a)ncnp.go.jp

大阪大学 大学院医学系研究科 広報室

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2

TEL: 06-6879-3388 FAX: 06-6879-3399

E-mail: medpr(a)office.med.osaka-u.ac.jp

筑波大学 広報室

〒305-8577 茨城県つくば市天王台 1-1-1

TEL: 029-853-2040 FAX: 029-853-2014

E-mail: kohositu(a)un.tsukuba.ac.jp

【AMED に関するお問い合わせ】

国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）

シーズ開発・研究基盤事業部 革新的先端研究開発課

〒100-0004 東京都千代田区大手町 1-7-1

Tel: 03-6870-2224 Fax: 03-6870-2246

Email: kenkyuk-ask(a)amed.go.jp

※E-mail は上記アドレス(a)の部分を変えてください。

PRESS RELEASE

本リリースは以下の宛先に配信しています。

岡山大学記者クラブ、文部科学記者会、科学記者会、
筑波研究学園都市記者会、大阪科学・大学記者クラブ、
兵庫県政記者クラブ

令和3年3月22日
岡山大学
筑波大学
理化学研究所

光化学系 II の立体構造をクライオ電顕で高精度に決定 ～生体内環境に近い状態での分子構造決定に光明～

◆発表のポイント

- ・光合成過程で水分子を分解して酸素分子を放出する反応を触媒する光化学系 II の立体構造を、クライオ電子顕微鏡（電顕、注1）で高精度に決定しました。
- ・その構造から、タンパク質分子はクライオ電顕観察の際に照射される電子線により損傷を受けるが、電子線量を調節することで損傷を大幅に減少できることが明らかになりました。
- ・これらの研究結果は、すべての生体分子の損傷の無いクライオ電顕構造を決定するための指標となります。

岡山大学異分野基礎科学研究所の加藤公児特任准教授、中島芳樹特任助教、秋田総理准教授、沈建仁教授、筑波大学の宮崎直幸助教、理化学研究所の濱口祐研究員、米倉功治グループディレクター（東北大学 多元物質科学研究所を兼任）らの共同研究グループは、クライオ電子顕微鏡を用いて、シアノバクテリア由来光化学系 II の構造を 1.95 Å (1 Å = 1 × 10⁻¹⁰ m) の解像度で高精度に決定しました。得られた構造は、クライオ電顕観察の際に照射される電子線により、損傷を受けていました。そこで注意深く電子線量を調節することで、損傷を大幅に減少させ、且つ高精度を保った構造が得られました。この構造は X 線結晶構造解析で解析されたものと類似していましたが、より生体内に近い状態を反映する特徴を持っていました。本研究成果は、日本時間 3 月 22 日（月）19:00（英国時間：22 日 10:00）、英国の科学雑誌「*Communications Biology*」に掲載されます。

この研究成果は、クライオ電顕観察の際に用いられる通常の電子線量ではタンパク質に損傷を与えており、損傷を回避するためには電子線量をどのくらい減少させる必要があるかを決定するための指標となります。

PRESS RELEASE

■発表内容

<現状>

光合成は藻類や植物が太陽からの光エネルギーを使って、空気中の二酸化炭素と水からほぼ全ての生物にとって必要な炭水化物と酸素を作り出す反応です。この光合成反応の中心的な役割を担うのが、光化学系Ⅰ・光化学系Ⅱと呼ばれる膜タンパク質複合体です。これら光化学系タンパク質のうち、光化学系Ⅱは単量体あたり20種類のサブユニットが二量体を形成する大きな複合体として存在し、水を分解して酸素を作り出すと同時に、光エネルギーを生物が利用可能な化学エネルギーに変換する働きをしています。この光化学系Ⅱは生物にとって極めて重要なタンパク質であるために古くから研究されており、その構造はX線を利用した結晶構造解析により高解像度で解析されました。しかし、結晶構造解析法ではタンパク質を結晶という特殊な状態にしなければならず、その状態では水を分解する反応の効率は低下することが報告されていました。また、結晶状態の構造が溶液の構造と同じであるかどうか不明でした。

一方で、クライオ電顕による単粒子構造解析法は近年急速に発展し、X線結晶構造解析と並んで高精度で構造を決定できる手法となってきました。クライオ電顕による構造解析法では、タンパク質を結晶にすることなく、溶液の状態を試料を急速に凍結して観察できるため、より生体内に近い状態の構造を決定できることが期待されます。

<研究成果の内容>

加藤特任准教授、沈教授、米倉功治グループディレクターらの共同研究グループは、これまで長年にわたり培った技術を利用して、シアノバクテリアから高純度の光化学系Ⅱを精製しました。その光化学系Ⅱをクライオ電子顕微鏡装置（日本電子社 CRYO ARM 300）で観察することにより、1.95 Åの解像度で立体構造を解明しました。これまでにX線結晶構造解析で決定された光化学系Ⅱの構造の最高解像度が1.90 Åなので、ほぼ同じ精度の構造を決定することができました。これは、同クライオ電子顕微鏡の冷陰極電界放射型電子銃から発生する干渉性の高い電子ビームを活用した結果となります。しかしながら、クライオ電顕観察の際に一般的に用いられる電子線量で観察したにもかかわらず、光化学系Ⅱの一部の領域に電子線による損傷が見られました（図1）。そこで段階的に電子線量を変えて構造解析することで、電子線による損傷を大幅に減少させ、尚且つ、高い精度を保った構造（2.08 Åの解像度）が得られました（図1）。この構造はこれまでに報告されていたX線による結晶構造と類似していましたが、結晶構造では一部しか確認されていなかったPsbYというサブユニットを完全な状態で確認することができました（図2）。これはクライオ電顕で決定された構造が、より生体内に近い状態を反映していることを示しています。

<社会的な意義>

シアノバクテリア、藻類、植物などによる光合成のメカニズムを解明することは、人工光合成によるエネルギー生産技術の基礎となり、私たちが抱えている環境問題やエネルギー問題を解決する可能性があるため、世界中で注目されています。今回の研究成果は、太陽光エネルギー有効利用のための技術開発に重要な知見を与えると期待できます。また、クライオ電顕による構造解析では、

PRESS RELEASE

電子線による試料への損傷が問題になっていますが、今回の成果は、電子線損傷のない状態での構造決定の指標にもなります。

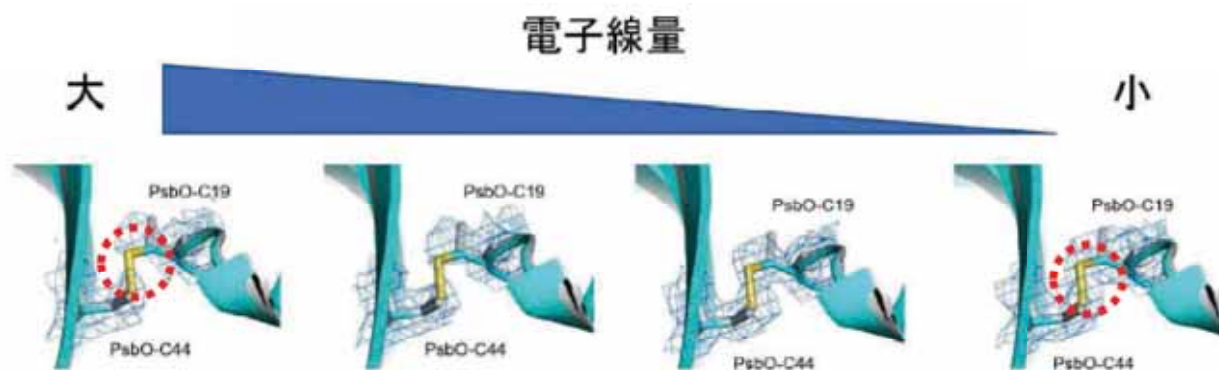


図 1. 光化学系 II の電子線による損傷の様子。

段階的に電子線量を変えて、解析されたクライオ電顕マップと構造モデルを示す。PsbO サブユニットの 2 つのシステイン残基はジスルフィド結合を形成するが、高線量の電子線による損傷を受けた部分は還元されて結合が切断される。青色のメッシュはクライオ電顕マップ、灰色と水色のモデルは、それぞれ高線量と低線量の構造モデル、ジスルフィド結合を黄色で表す。高線量データでは結合が切断されているが、低線量データでは結合が形成されている。どの程度の電子線量で、損傷の少ない構造が得られるかがわかった。

PRESS RELEASE

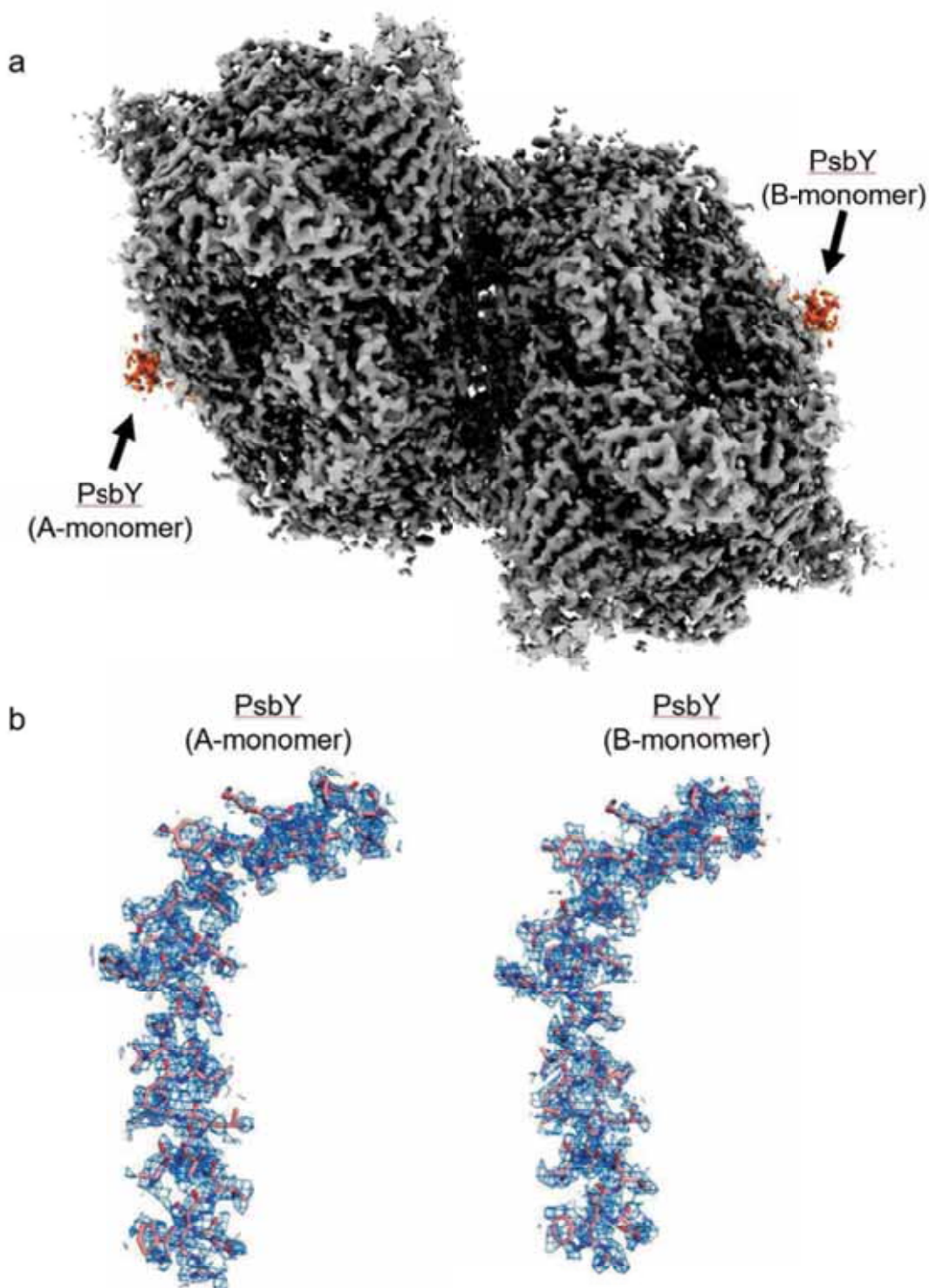


図 2. 光化学系 II の全体構造 (a) とサブユニット PsbY の構造 (b)。

(a) 光化学系 II 全体のクライオ電顕マップを示す。橙色はサブユニット PsbY を示す。(b) PsbY のクライオ電顕マップと構造モデルを示す。水色のメッシュはクライオ電顕マップ、橙色のモデルは PsbY の構造モデルを表す。結晶構造では一部しか確認されていなかった PsbY というサブユニットを完全な状態で確認することができた。

PRESS RELEASE

■論文情報

論文名：“High-resolution cryo-EM structure of photosystem II reveals damage from high-dose electron beams”

「光化学系 II の高精度クライオ電顕構造が高線量電子ビームによる損傷を明らかにする」

掲載紙：*Communications Biology*

著者：Koji Kato, Naoyuki Miyazaki, Tasuku Hamaguchi, Yoshiki Nakajima, Fusamichi Akita, Koji Yonekura and Jian-Ren Shen

DOI：10.1038/s42003-021-01919-3

■研究資金

本研究は、科研費基盤研究 B（課題番号：JP20H02914、JP20H03194）、挑戦的研究（萌芽）（課題番号：JP19K22396）、新学術領域研究（課題番号：JP20H05087、JP17H06434）、科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業 個人型研究（さきがけ）（課題番号：JPMJPR16P1）、日本医療研究開発機構（AMED）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（(BINDS)「創薬等ライフサイエンス研究のための相関構造解析プラットフォームによる支援と高度化」（課題番号：JP18am0101072）、日本医療研究開発機構（AMED）医療研究開発革新基盤創成事業（CiCLE）、JST 未来社会創造事業（課題番号：JPMJMI20G5）の支援を受け実施しました。

■補足・用語説明

注 1：クライオ電子顕微鏡

液体窒素温度でタンパク質粒子を観察する透過型電子顕微鏡のことです。サンプルへの電子線ダメージを軽減するために液体窒素温度での測定を行います。多数のタンパク質粒子の形状を計測して平均化することで、当該タンパク質の立体構造を解析します。2017年にノーベル化学賞の受賞対象となった技術です。

PRESS RELEASE

<お問い合わせ>

岡山大学 異分野基礎科学研究所

特任准教授 加藤 公児 (かとう こうじ)

(電話番号) 086-251-8630

(FAX) 086-251-8502

(メール) kkato@okayama-u.ac.jp

同上

教授 沈 建仁 (しん けんじん)

(電話番号) 086-251-8630

(FAX) 086-251-8502

(メール) shen@cc.okayama-u.ac.jp

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター

助教 宮崎 直幸 (みやざき なおゆき)

(メール) naomiyazaki@tara.tsukuba.ac.jp

理化学研究所 放射光科学研究センター 利用技術開拓研究部門 生体機構研究グループ

グループディレクター 米倉 功治 (よねくら こうじ)

(理化学研究所 科技ハブ産連本部 バトンゾーン研究推進プログラム

理研-JEOL連携センター 次世代電子顕微鏡開発連携ユニット ユニットリーダー

東北大学 多元物質科学研究所 教授)

(メール) yone@spring8.or.jp

