

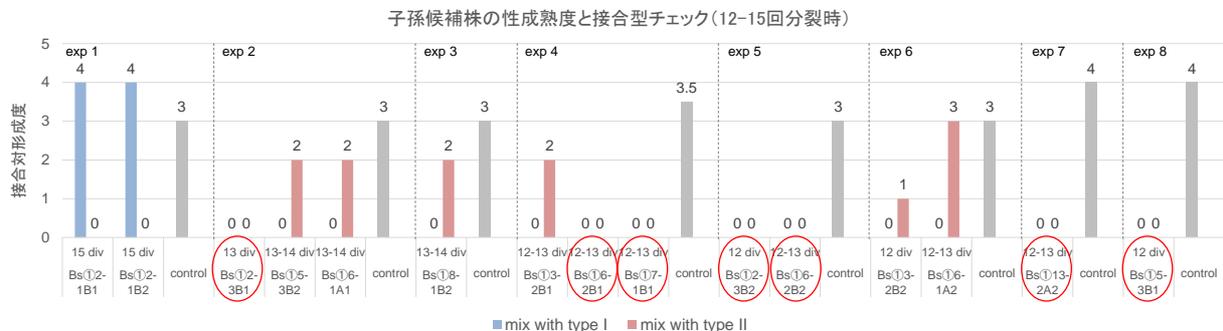
「原生生物繊毛虫における接合開始機構・接合型決定機構の解明」  
 —子孫株の樹立および性的未熟期と成熟期細胞間の網羅的遺伝子発現解析—

研究院 自然科学系 生物科学領域 杉浦 真由美

本年度は、「原生生物繊毛虫における接合開始機構・接合型決定機構の解明」を目指し、主に交配実験による子孫株の樹立と性的成熟過程の観察、および性的未熟期細胞と成熟期細胞間の遺伝子発現解析を行なった。

(1) 交配実験による子孫株の樹立と性的成熟過程の観察

繊毛虫ブレファリズマはI型、II型の二種類の接合型をもつ。掛け合わせを行い、子孫株を樹立するため、これまでに複数の種において交配実験を行い、より高い確立で接合過程を完了できる組み合わせを検討した。その結果、*Blepharisma stoltei* の ATCC30299 株 (I型) と HT-IV 株 (II型) の掛け合わせにより、高い確率で子孫候補株を樹立できることがわかった。樹立した子孫候補株 (65 株) は単離培養を行ない、各株の増殖能をみた。その後、増殖能の高かった 24 株中 17 株については、フラスコ培養系へと移し培養を継続した。子孫候補株は全体的に分裂速度が遅いという特徴があり、「接合対が離れるまでにかかった時間」や「接合完了体 (exconjugant) が分裂し子孫候補株である caryonidal clone になるまでにかかった時間」は、各子孫候補株の分裂能等にとくに影響しないことがわかった。ブレファリズマは、接合後、分裂を繰り返すことによって性成熟過程を進行させていくと考えられている。そこで、培養を継続した 17 株の子孫候補株の中で初期定常期に達した 15 株について、その時点における分裂齢 (分裂回数) のカウントと性成熟度、接合型チェックを行なった (図)。その結果、15 株中 2 株 (Bs①2-1B1、Bs①2-1B2) は、約 15 回分裂時にすでに高い接合活性を示したことから、これら 2 株は接合を正常に完了していない、つまり子孫株ではないと考えられた (図、青グラフ)。残りの 13 株のうち 6 株は、約 12-14 回分裂時にコントロール (成熟期にある細胞同士の接合能) に比べて低い接合活性を示し、全ての株が接合型 I 型を示した (図、赤グラフ)。さらに、残りの 7 株 (赤丸) は、約 12-13 回分裂時には、接合活性がほとんどみられず性的未熟期が確認された。以上の結果より、少なくともこれらの 7 株は子孫株であることが確認された。



(図) 12-15 回分裂時の子孫候補株の性成熟度および接合型チェック。青：接合能をもち II 型を発現。赤：接合能をもち I 型を発現。各グラフの上に接合対形成度の値を示す。

## (2) 性的未熟期細胞と成熟期細胞間の遺伝子発現解析

ブレファリズマの子孫株が性的に未熟期の状態から分裂回数を重ねて成熟期へと達するまでの間には「接合に関連する因子（交配フェロモン、交配フェロモン受容体）」や「接合型発現に関与する因子」など有性生殖に関与する多くの因子が発現されてくると考えられる。これらの遺伝子を網羅的に解析するため、性的未熟期にある細胞と成熟期にある細胞において発現している遺伝子を同定し比較することを計画した。樹立したブレファリズマ子孫株の未熟期の段階にある細胞と性的に成熟期にある I 型細胞、II 型細胞の 3 株から RNA を抽出し、現在、次世代シーケンサー (HiSeq、イルミナ社) によって *de novo* RNA-seq 解析を行なっている。今後、得られた配列データを元に発現されている遺伝子を網羅的に解析し、それらの各サンプルにおける発現量を比較することによって、未熟期細胞と成熟期細胞 (I 型および II 型) において、ある特定条件下でのみ特異的に発現上昇または低下している遺伝子の同定を行なう予定である。

### 【2014 年度研究業績】

[原著論文 (査読あり)]

- 1) M Kobayashi, M Miura, M Takusagawa, M Sugiura and T Harumoto. Two possible barriers blocking conjugation between different megakaryotypes of *Blepharisma*. *Zoological Science* (2015) 32, in press

[国際学会・国内学会発表]

- 1) R Araki, Y Hoki, M Sugiura, Y Kasama, M Uda, M Nakamura and M Abe. Lineage conversion step in iPS cell generation involves highly mutagenic process. International Society for Stem Cell Research-ISSCR 12th Annual meeting, Vancouver, Canada, June 18-21, 2014
- 2) Y Hoki, M Sugiura, Y Kasama, M Sunayama, M Uda, M Nakamura, S Ando, R Araki and M Abe. ES cells vs. iPS cells: Lineage conversion-associated point mutations. International Society for Stem Cell Research-ISSCR 12th Annual meeting, Vancouver, Canada, June 18-21, 2014

- 3) 杉浦真由美

Molecular mechanism of induction of sexual reproduction in the ciliates

第 37 回日本分子生物学会年会、ワークショップ (原生生物～モデル生物としての大いなる可能性を探る～) 招待講演、横浜市、2014 年 11 月 25 日～27 日

- 4) 藤森(法喜)ゆう子・杉浦真由美・笠間康次・砂山美里・宇田昌広・中村美樹・荒木良子・安倍真澄

iPS 樹立初期過程には多くの point mutation が生じる

第 37 回日本分子生物学会年会、横浜市、2014 年 11 月 25 日～27 日

- 5) 春本晃江・山岸由和・岩崎祥子・杉浦真由美・小林真弓・飯尾英夫  
ブレファリズマの交配フェロモン (ガモン 1) の糖鎖構造とその役割  
日本原生生物学会第 47 回大会、仙台市、2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日

- 6) 小林真弓・田草川真理・杉浦真由美・春本晃江  
織毛虫 *Blepharisma* 属における交配フェロモン *gamone1* の多様性と種分化  
日本原生生物学会第 47 回大会、仙台市、2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日
- 7) 亀岡里江子・篠原きよの・杉浦真由美・春本晃江  
織毛虫 *Blepharisma* における交配フェロモンの生合成に **IDO** は関与するか  
日本動物学会第 85 回大会、仙台市、2014 年 9 月 11 日～13 日
- 8) 小林真弓・杉浦真由美・春本晃江  
織毛虫ブレファリズマの分類の再検討  
日本動物学会第 85 回大会、仙台市、2014 年 9 月 11 日～13 日
- 9) 尾野優奈・杉浦真由美・春本晃江  
ブレファリズマにおけるジャイアント形成要因の検討と口部構造の観察  
日本動物学会第 85 回大会、仙台市、2014 年 9 月 11 日～13 日

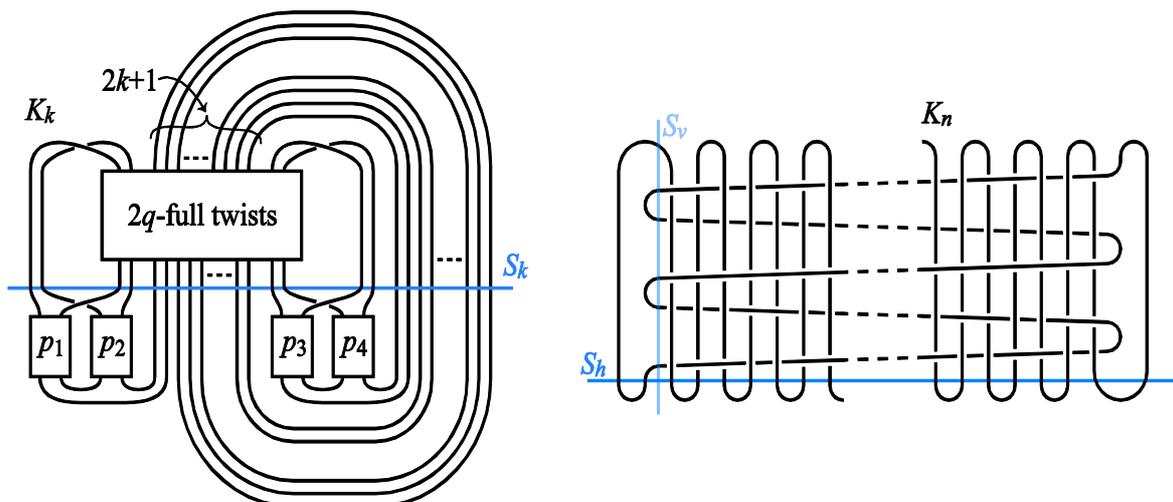
## 絡み目の橋分解に関する研究

研究院 自然科学系 数学領域 張 娟姫

[今年度の研究成果・活動報告]

今年度の研究成果の一つは、奈良女子大学の小林毅先生と井戸絢子氏との共同研究により、任意に与えられた自然数  $n$  に対して、ヘンペル距離が丁度  $n$  である絡み目の橋分解が存在することを証明したことです。昨年度には任意の自然数が 3 次元多様体のヘガード分解のヘンペル距離として実現できることを証明し、その成果をまとめた論文が国際学術誌「Algebraic and Geometric Topology」に掲載されましたが、そこで使われた議論を精密化し、結び目理論に応用することで、絡み目の橋分解に関しても同様の結果を得ることが出来ました。今年度の 8 月には釜山で開かれた国際会議においてこの研究成果について発表しており、この成果をまとめた論文が国際学術誌「Topology and Its Applications」に掲載されることが決定しています。

二つ目の研究成果は、奈良女子大学の小林毅先生、駒澤大学の小沢誠先生、九州大学の高尾和人氏との共同研究により、いくらでも大きい橋数を持つ絡み目の橋分解でヘンペル距離が 2 以上のものを構成することができたことです。橋数の大きい橋分解は他の橋分解から「安定化」という操作を行うことで得られることが多く、その結果ヘンペル距離が 1 以下になることが多いことが知られており、それに反する例はこれまで知られていませんでしたが、今回の結果はこの問題に関する興味深い反例を与えています。今年度の 7 月には韓国大田で開かれた国際会議においてこの研究成果について発表しており、この成果をまとめた論文を国際学術誌へ投稿中です。



三つ目の研究成果は、エクス・マルセイユ大学の Michel Boileau 先生、キール大学の Richard Weidmann 先生との共同研究により、絡み目の橋数という絡み目の位相的・幾何的不変量と絡み目群のメリディアン階数という代数的不変量の関係を問う問題に対する部分的解決を与えたことです。この共同研究は前から続けていたもので、昨年度はある種の絡み目に対してこの問題を肯定的に解決することができました。今年度はその結果を発展させるために、5月にマルセイユを訪問した際に Boileau 先生と議論し、その後も Weidmann 先生も含めてメールによる議論を続けました。その結果、より広い範囲の絡み目に対してこの二つの不変量が一致することを証明できました。また、その応用として、絡み目の補空間の間の写像を使って定義される絡み目に対する「順序」と絡み目の橋数の大小関係が深く関係していることを示すことができました。この研究成果については、国際学術誌への掲載を目指して共著論文を執筆中です。共著論文の完成及びこの結果の更なる発展を目指して、2月下旬には両先生を奈良女子大学にお招きし、セミナーを行うことを予定しています。

[今後の予定]

これまでの研究成果を踏まえ、今後もヘンペル距離の観点からヘガード分解や橋分解への理解をより深めるための研究を続けると共に、その応用にも取り組んでいきたいと考えています。それに加えて、絡み目のもつ様々な性質や不変量等の関係をより明確にすることを中心に、3次元多様体のヘガード分解及び絡み目の橋分解に関する様々な問題の解決にチャレンジしていきたいと考えています。

[文献]

- 1) Ayako Ido, Yeonhee Jang and Tsuyoshi Kobayashi, Heegaard splittings of distance exactly  $n$ , *Algebr. Geom. Topol.*, 14, 1395-1411, (2014).
- 2) Ayako Ido, Yeonhee Jang and Tsuyoshi Kobayashi, Bridge splittings of links with distance exactly  $n$ , *Topology Appl.*, 掲載決定.
- 3) Yeonhee Jang, Tsuyoshi Kobayashi, Makoto Ozawa and Kazuto Takao, A knot with destabilized bridge spheres of arbitrarily high bridge number, 投稿中.
- 4) Yeonhee Jang, Knots with non-minimal destabilized bridge spheres, The 6<sup>th</sup> KOOK-TAPU Joint Seminar on Knots and Related Topics (NIMS, Korea), (2014).
- 5) Yeonhee Jang, Bridge splittings of links with Hempel distance  $n$ , A Satellite Conference of Seoul ICM 2014: Knots and Low Dimensional Manifolds (Busan, Korea), (2014).

# QOLを向上させる機能性材料に関する研究

研究院 生活環境科学系 衣環境学領域 橋本 朋子

## 1. 研究活動報告

一般的にシルクと呼ばれるシルクフィブロイン（以下フィブロイン）は優れた風合いや強度、また医療分野では高い生体親和性を示すことが知られている。形状記憶性能や抗菌性能、創傷治癒能といった生活の質（QOL）を向上させるような、更なる機能をもつフィブロイン材料開発を目指し、元来の優れた性質を損なわずかつ環境への負荷が少ない機能性分子固定化法の確立・評価に取り組んでいる。

これまでに、オートクレーブという高温高压の水が存在する加熱処理が布帛内フィブロインタンパク質二次構造（図1）、ならびに物性の変化に与える影響について評価してきた。得られた結果をまとめ、学術雑誌へ投稿・受理された（1）。現在は、未だ詳細が明らかになっていないシルク III 型構造への構造変化メカニズムについて解析を行っている。

フィブロインへの塩基性抗菌分子固定化に関し、昨年度から行っているモデル系を利用した固定化条件検討を引き続き進めた。共存水溶性分子はフィブロイン分子の非晶領域に固定化されると考えられ、非晶部分

に固着する塩基性染料をモデル分子として選択し固定化の条件検討を行った。様々な条件でモデル分子の固定化実験を行った結果、室温または常圧下での加熱処理（60～90度）に比べ、オートクレーブ処理（121度、0.11MPa）がモデル分子を最も均一に多く固定化でき、また陽性対照のトリアジン系縮合剤を用いた固定化条件と同程度の固定が達成されることが示された。オートクレーブ処理による固定化の促進は、処理系中の各分子の運動性向上に起因しているのではないかと考察している。なお、フィブロインと同じ繊維状タンパク質である羊毛を用いて同様のモデル分子固定化実験を行ったが、いずれの固定化条件においても十分な固定化が認められなかった。フィブロイン分子が特徴的な結晶/非晶ブロック構造をとること、そしてオートクレーブによる構造の変化がモデル分子の固定を促進すると考えられる。今後、固定化メカニズムの解明を進め、また、モデル実験で得られた条件をもとに抗菌性分子の固定化、ならびに機能性評価を行っていく予定である。

さらに、創傷治癒を促進するフィブロイン基材の開発を目指し、フィブロインへの特異的接着配列を有する創傷治癒ペプチドの設計と合成、ならびにフィブロイン基材への固定化に関して実験を行っている。

## 2. 学会への参加

高分子学会年次大会、繊維学会年次大会、高分子討論会、ISF2014、日本バイオマテリア

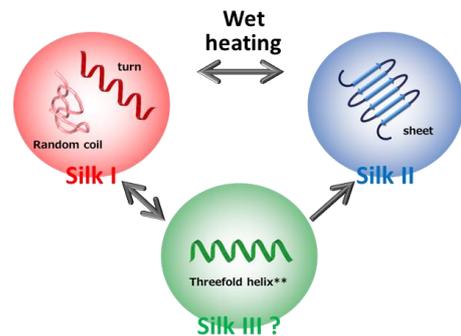


図1. 予想されるフィブロイン分子の湿潤加熱による二次構造変化

ル学会大会 (2-6)、また、その他の材料系の学会において、これまでに得られた研究結果について発表・講演し、議論を行った。また、スキルアップ経費の支援を受け、インド・バンガロールにて開催された the 23rd International Congress on Sericulture に参加し、テキスタイルを越えた養蚕 (Sericulture in Non-Textile Industries) セッションにて口頭発表を行った (7)。様々なセッションを有する分野の異なる各学会にて発表を行い、様々な角度からの議論・討論を行うことができた。

支援いただいたスタートアップ経費は、上記国内学会参加・発表 (2-6) の旅費の他、投稿論文の英文校正 (1)、ならびに様々な試薬、実験用器具・消耗品の購入に充てた。またスキルアップ経費の支援を受け、上述のとおり the 23rd International Congress on Sericulture (7)へ参加し、発表を行った。

### 3. 今後の予定

今後は、現在行っている研究をさらに発展させていくとともに、幅広い視点からの指摘、討論の機会を得るため、国内外の関連学会にて研究発表を積極的に行う。また得られた研究成果を学術雑誌へ投稿していく。

#### [文献]

- 1) Tomoko Hashimoto, Yuki Taniguchi, Tsunenori Kameda, Yasushi Tamada, and Hiromichi Kurosu, Changes in the properties and protein structure of silk fibroin molecules in autoclaved fabrics, *Polymer Degradation and Stability* **112**, 20-26 (2015)
- 2) 橋本朋子、吉川梨佳、谷口由樹、亀田恒徳、玉田靖、黒子弘道、シルクフィブロインへの機能性分子固定化に関する検討、第 63 回高分子学会年次大会、(愛知県) (2014)
- 3) 橋本朋子、吉川梨佳、谷口由樹、亀田恒徳、玉田靖、黒子弘道、抗菌材料創出のためのシルクフィブロインへの分子固定、平成 26 年度繊維学会年次大会 (東京都) (2014)
- 4) 橋本朋子、吉川梨佳、亀田恒徳、玉田靖、黒子弘道、湿潤加熱処理によるシルクフィブロイン構造変化と機能分子固定、第 63 回高分子学会討論会 (長崎県) (2014)
- 5) Tomoko Hashimoto, Rika Yoshikawa, Tsunenori Kameda, Yasushi Tamada, and Hiromichi Kurosu, Fixation of the functional molecules to silk fibroin materials, International Symposium on Fiber Science and Technology (ISF2014) (Tokyo) (2014)
- 6) Tomoko Hashimoto, Katsura Kojima, Akihisa Otaka, Yuji S. Takeda, Naohide Tomita and Yasushi Tamada, Quantitative analysis of cell migration and ECM-related gene expression on silk fibroin-based biomaterials, 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (東京都) (2014)
- 7) Tomoko Hashimoto, Rika Yoshikawa, Tsunenori Kameda, Yasushi Tamada and Hiromichi Kurosu, Immobilization of the functional molecules on to silk fibroin materials by wet-heating treatments, the 23rd International Congress on Sericulture (Bangalore, India) (2014)