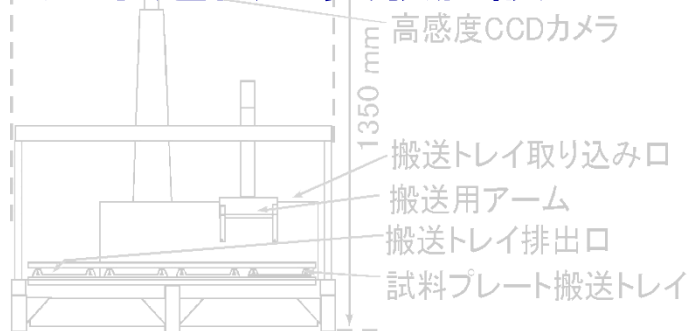


生物時計に魅せられて



石浦正寛

名古屋大学遺伝子実験施設



略歴

- 1967年 京都府立北桑田高等学校卒業
- 1971年 金沢大学理学部生物学科卒業
- 1973年 大阪大学理学研究科修士課程生理学専攻修了
- 1976年 大阪大学理学研究科博士課程生理学専攻単位取得退学
- 1977年 大阪大学微生物病研究所助手(岡田善雄教授)
- 1979年 基礎生物学研究所細胞融合部門助手(岡田善雄教授)
- 1995年 名古屋大学理学部生物学科助教授(近藤孝男教授)
- 1999年 名古屋大学遺伝子実験施設教授

金沢大学理学部生物学科卒業研究生

梅鉢幸重教授(故人) キアゲハの色素合成

「トリプトファンオキシゲナーゼの酵素
キネティックス」

酵素学

研究室には昼前に出て深夜に帰る

大阪大学修士課程院生

巖佐耕三助教授（後に教授） 藻類の生理学
「クラミドモナスの配偶子形成に関する生
理学的研究」

一から系の立ち上げ

関連論文をすべて読む。生物時計の関与？

生物材料の取扱い、生理学

一通りやれることをやり尽くすとできること
がなくなってしまった。

大阪大学博士課程院生、微生物学研究所助手



岡田善雄教授(微生物学研究所;故人)
HVJによる細胞融合機構の研究と応用
、細胞工学

内田驍助教授(後に教授;故人) ジフ
テリア毒素の研究、アイデアマン

山泉克助手(後に助教授、熊大教授:故人) 実験の名人
「HVJによる細胞融合機構の研究:非筋細胞におけるアク
チン機能の生化学的研究

「ゲリラ戦(ニッチ?)」、「ひとの論文ばかり読んでる奴は
あほだ」、「人のまねをするな、人のやってないことを
やれ」

「一座建立」トラウマ

方法論に傾きがちで生物現象に欠けるところがあった。

徹夜実験

大阪大学博士課程院生 (岡田研から出向)

殿村雄治教授(故人)、柴田和子助手

「非筋細胞におけるアクチン機能の生化学的研究」

酵素キネティクス

「自分の専門分野のことは全てを知っているべき」

タンパク質を調製したら全ての測定が終わるまで
実験を続ける。

効率の良い工場の趣

基礎生物学研究所助手(岡田善雄教授)

HVJによる細胞融合機構の研究

培養細胞への遺伝子移入の研究

高等生物遺伝子のクローニングに関する

研究:コスミドクローニング系の開発と応用

鈴木義昭教授、広瀬進助教授(後に遺伝
研教授)(細胞分化部門)

遺伝子操作

基礎生物学研究所助手

太田行人教授、中島秀明助教授(後に岡大教授)、近藤孝男助手(後に名大教授)(計時機構部門)

生物時計(アカパンカビ、藍色細菌)の分子遺伝学的研究

近藤さんと話したこと:

研究目標「時計遺伝子のクローニング」

優位性のある新しい研究手法「ルシフェラーゼ遺伝子を利用した生物発光リアルタイム測定」を確立する。

研究材料「優位性のある生物材料」を探す。

近藤さんの生理学のセンス、自動計測のための装置開発・プログラミング技術
遺伝子クローニング技術の藍色細菌への応用: ターゲティングライブラリーの
考案、遺伝子操作のツールの整備

Susan Golden (Texas A&M Univ.), Carl Johnson (Vanderbilt Univ.)

Peter Wolk, Jeff Elfai (Michigan State Univ.)

青木摂之さん(博士課程; 現名古屋大学准教授)、沓名伸介さん(修士課程;
現横浜市立大学准教授)

基礎生物学研究所助手

神谷宣郎教授(故人)

黒岩常祥助教授(後に教授、東大教授;細胞機構部門)

金谷晴夫教授(後に所長)

伊藤繁助教授(後に名大教授)

「素晴らしい**共同利用システム**、**元気な仲間**、**自由な研究環境**、**精神的支援**」

名古屋大学理学部生物学科助教授 (近藤孝男教授)

「藍色細菌の生物時計の分子遺伝学的研究」

名古屋大学遺伝子実験施設教授

新しい実験系で研究する

1. **好熱性藍色細菌**「生物時計分子装置(タンパク質複合体)の原子レベルでの研究」
2. **クラミドモナス**「生物時計の分子遺伝学的研究」
3. **シロイヌナズナ**「生物時計の分子遺伝学的研究」
4. **生物発光リアルタイム測定系**のさらなる開発

生物時計の研究法

どのように研究するのか？

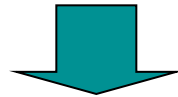
生理学

時計現象(リズム)の測定、解析



分子遺伝学

突然変異体の分離、時計遺伝子の同定・クローニング



タンパク質科学、生物物理学(新しい時計研究)

時計タンパク質、時計分子装置の構造と機能の解明

生物界と時計遺伝子

植物界



PCL1

LHY

TOC1

CCA1

高等植物

菌界

frq

wc-1

wc-2

動物界

Per

Tim

Clock

Bmal/Cyc

Cry

原生生物界

?

?

?

?

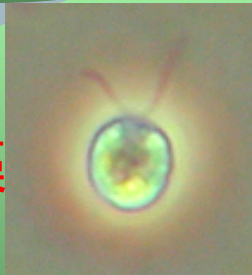
?

?

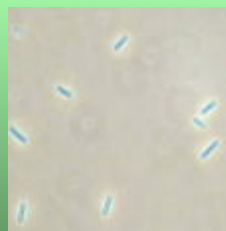
Cry?

葉緑体化

緑藻



藍藻



kaiA

kaiC

kaiB

モネラ界

陸上化
多細胞化

時計の進化、多様性、普遍性

1. 全ての生物に**共通な時計因子**（時計遺伝子、時計タンパク質）は見つかっていない。
2. 進化の過程で生物は時計を獲得したが、ある段階で古い時計を捨てて、新しい時計を再獲得してきたらしい。
3. 時計の進化、多様性、普遍性。
4. 不思議なことに共通な因子がなくても生理的に普遍的な時計機能が実現されている。

私の興味:

植物系細胞の生物時計(植物時計)

1. 生物時計(分子装置)の働くしくみを原子レベルで解明したい。
2. 藍色細菌、藻類、コケ、シダ、高等植物に共通の時計因子は存在するか？
3. 植物時計の進化。

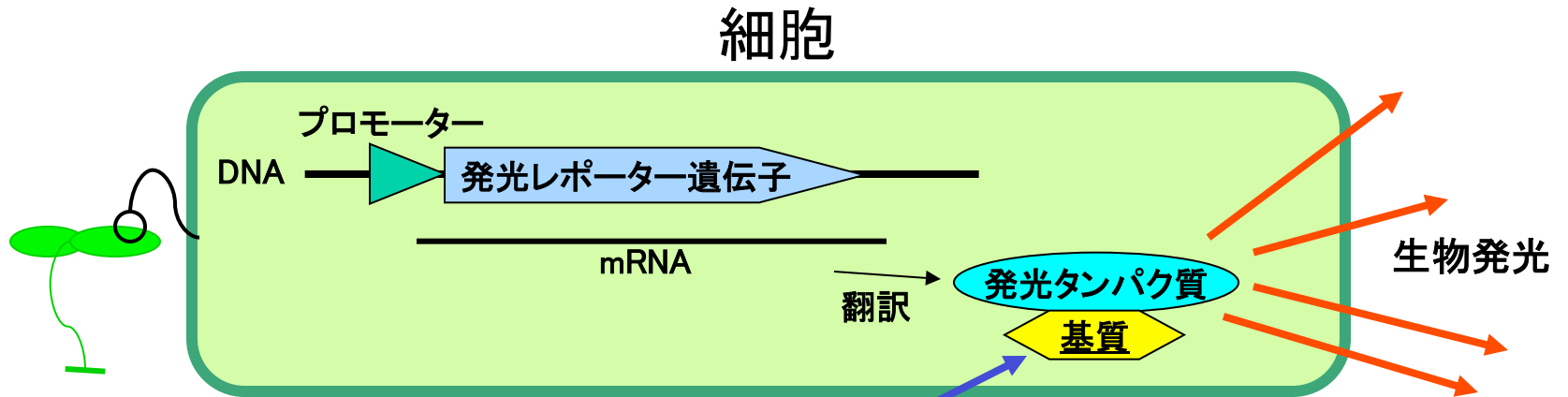
波打ち際での夜光虫の生物発光

(著作権の都合により削除)

生物発光リアルタイム測定法を開発する

1. リズムを自動測定したい。
2. 精度の高い自動測定には光が一番である。
正確な光計測法がある。
3. **夜光虫**はほぼ24時間周期で発光する
(**生物発光リズム**)。
4. 夜光虫は遺伝子の研究には適していない。
5. なければ、遺伝子の実験に便利な他の細胞で「**人工的な夜光虫**」を自分で作ろう。

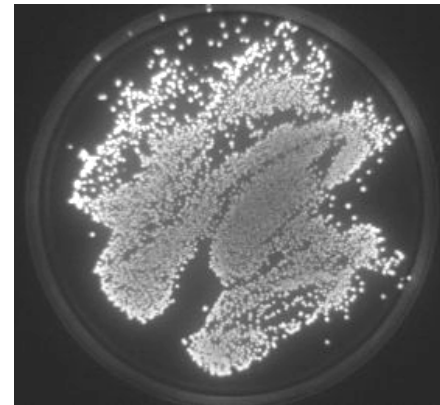
人工生物発光細胞(人工夜光虫)のしくみ



発光基質の投与



シロイヌナズナの
発光レポーター株



藍色細菌の
発光レポーター株

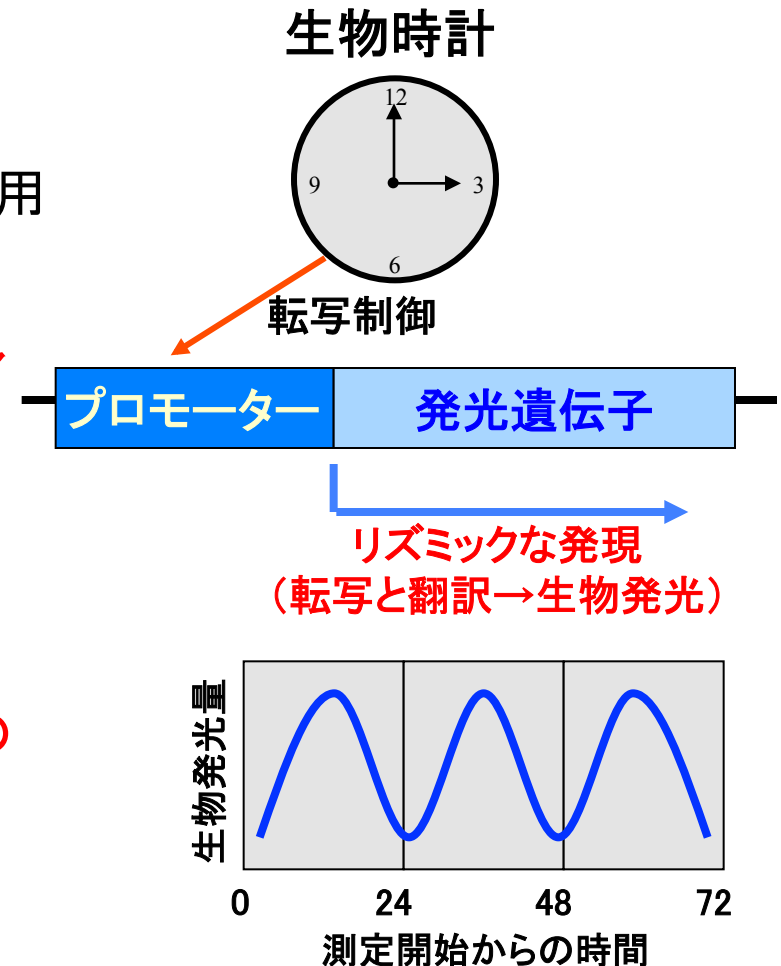
人工生物発光細胞を用いた概日リズムのリアルタイム測定

特徴

- ・ 生物発光を人工的な「時計の針」として利用

利点

- ・ 生きたままの細胞での連続自動測定(リアルタイム測定)
- ・ 高感度、高精度、高時間分解能
- ・ 多くの試料の全自動測定
- ・ リズム変異体の大規模スクリーニング
- ・ 時計遺伝子(リズム変異の原因遺伝子)の迅速なクローニング



新しい生物材料のための生物
発光自動測定装置を作ろう
(近藤さんに学ぶ)

作った生物発光自動測定装置

- 平板型試料交換機付生物発光測定装置

- 1,920試料が同時に測定できる。
- 大きくて高価なのが欠点である。



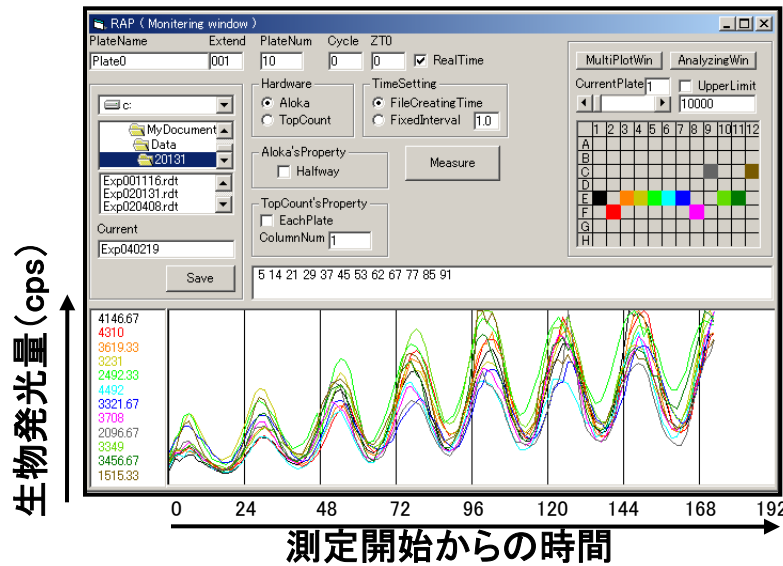
- 巡回型試料交換機付生物発光測定装置

- 960試料が同時に測定できる。
- 小型、軽量で安い。
- 50°Cまでの高温条件下で測定可能である。



リズムの自動表示・解析プログラムを作ろう (近藤さんに学ぶ)

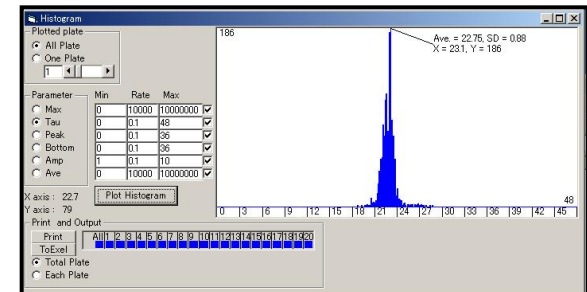
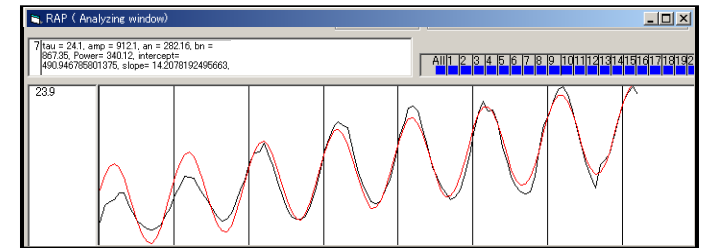
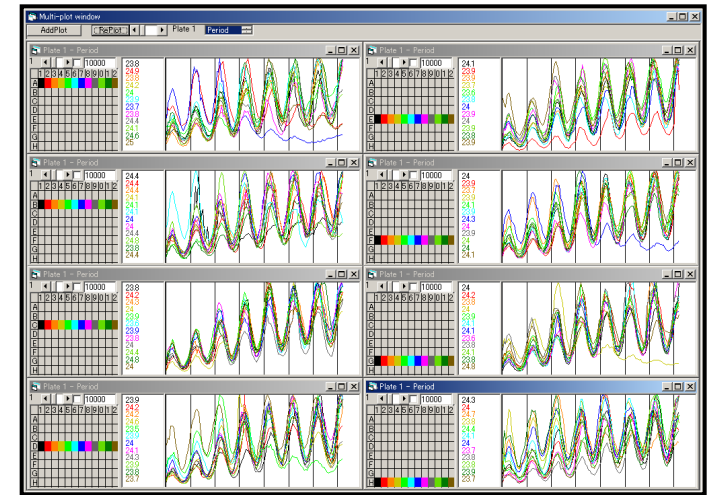
生物発光リアルタイム測定・リズム解析プログラムの開発



多検体の同時
モニタリング

測定データ
の解析

- 測定データのリアルタイム表示と自動記録
- 様々なアルゴリズムによるリズム成分の解析
- データベース機能と統計処理機能を内蔵
- 他のプログラムのファイル形式の入出力
- 強力な表示・印刷機能
- 発光測定以外のデータも解析できる汎用性



新たな生物発光リアルタイム測定解析 システムの開発

— 有用生物株や有用遺伝子の網羅的な
高速探索のための新システムの開発 —

新システムの開発目標

従来のシステムと比較して、「より迅速な大規模スクリーニング」や「より高精度(高感度)な遺伝子発現の解析」を実現し、次世代シーケンサと連携運用することで、有用遺伝子を高速探索するためのインフラを整備する。

- ・ 従来システムよりも10倍の大規模化

➡ ハイスループット生物発光測定装置

- ・ 従来システムよりも10倍の高感度化

➡ 高感度生物発光測定装置

- ・ 大規模な試料調製の全自動化

➡ 自動試料調製装置

「ハイスループット生物発光測定装置」、「自動試料調製装置」

- ・ ある特定の表現型を示す突然変異体を網羅的に大規模スクリーニングする(例えば100株以上)。



「高感度発光測定装置」

- ・ 表現型を詳細に解析して、突然変異体を分類する。



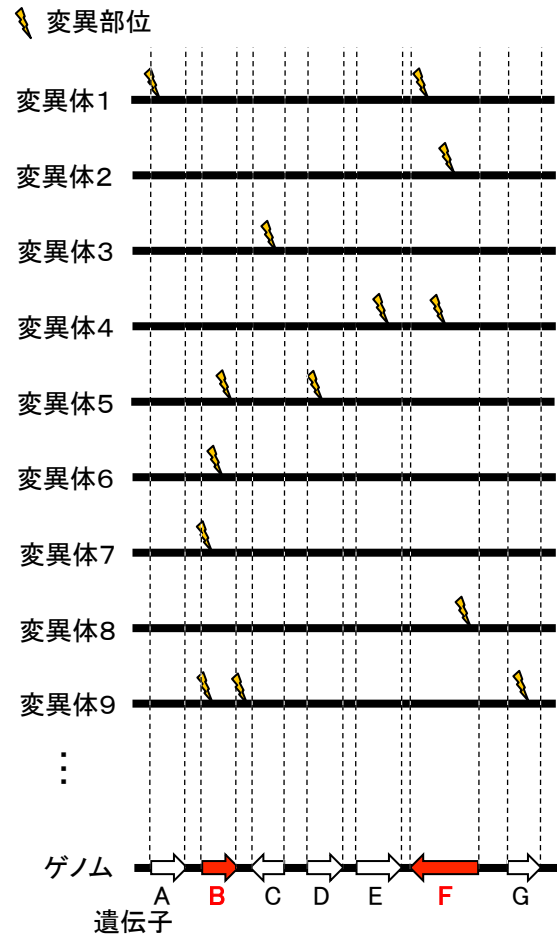
「次世代DNAシーケンサー」

- ・ 変異体をグループごとにプールしてゲノム配列を決定し、変異部位をゲノムワイドに特定する。
- ・ 変異が集中する幾つかの遺伝子座が候補遺伝子群である。



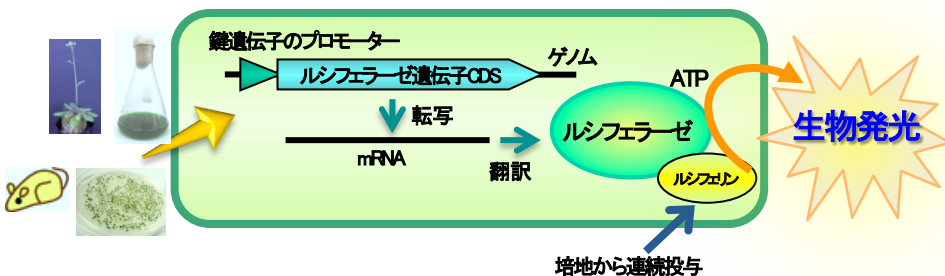
- ・ 遺伝子移入や操作によって、目的遺伝子であることを確認する。変異体は有用株として利用できるか検討する。
- ・ 遺伝子操作やTILLING法によって有用形質を創出する。

次世代DNAシーケンサーによる 変異体の原因遺伝子の探索方法

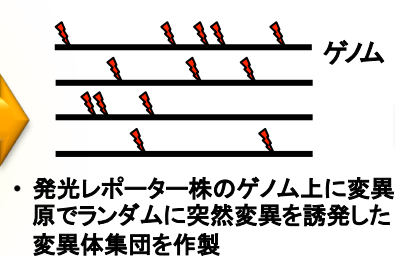


- ある特定の表現型を示す突然変異体を網羅的に分離収集する。
- 分離した変異体の全ゲノム塩基配列を次世代DNAシーケンサーで解析して変異部位を網羅的に同定する。
- 突然変異が集中する幾つかの特定の遺伝子座が変異形質に関係する遺伝子(左図の場合ならば遺伝子Bと遺伝子Fが該当)であると推測できる。
- 同じタイプの変異体が多数あれば、有用遺伝子が精度良く網羅的に探索できる。

① 生物発光レポーター株の作製



② 生物発光レポーター株の変異原処理



③ 試料の自動調製



「生物発光リアルタイム測定解析システム」と「次世代シーケンサ」の連携運用の概要

⑦ 変異体の原因遺伝子のクローニング (有用遺伝子のクローニング)

- ゲノム配列の比較による変異部位の網羅的特定と原因遺伝子の迅速なクローニング

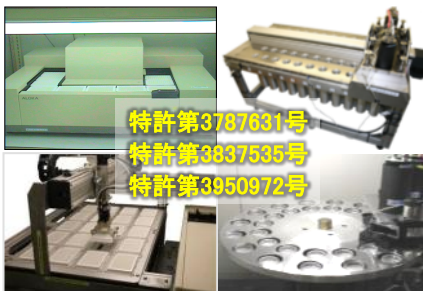


次世代DNAシーケンサ

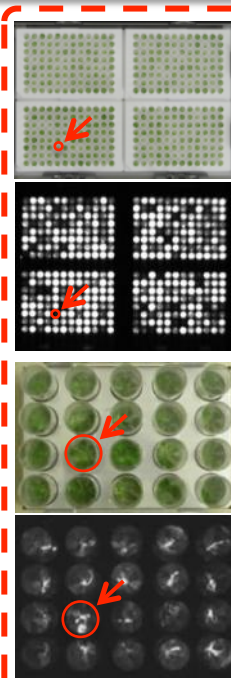
⑧ 表現型の確認と有用株の作出

- クローニングした遺伝子が目的の遺伝子であることを遺伝子移入で確認
- 変異体が有用株として利用できるか検討
- 遺伝子操作によって有用形質を創出

⑥ 詳細な生物発光リアルタイム測定 (2ndスクリーニング)



⑤ 変異体候補の回収と培養



④ 大規模な生物発光リアルタイム測定 (1stスクリーニング)



ハイスループット生物発光リアルタイム測定装置

特願2010-070074

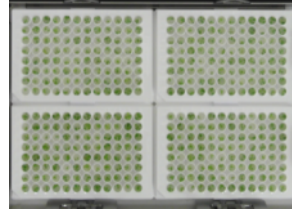
装置の写真



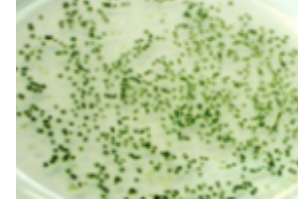
測定例

マルチウェルプレートで培養した植物体、藻類、動物細胞など

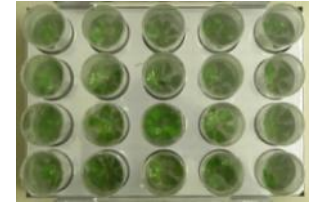
発光試料



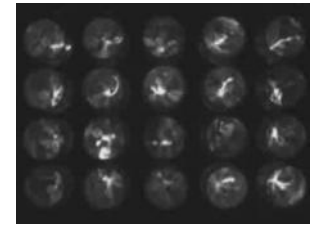
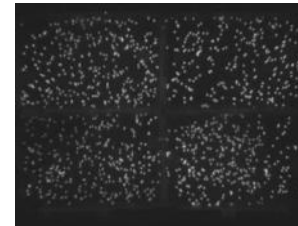
藻類やバクテリアのコロニー



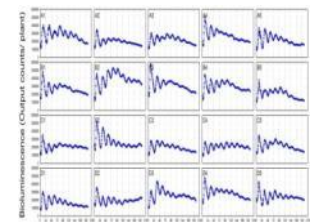
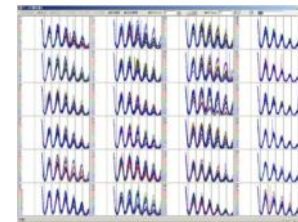
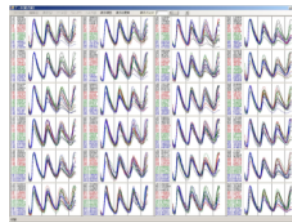
試験管で培養した植物体や藻類



発光画像



測定結果



特長

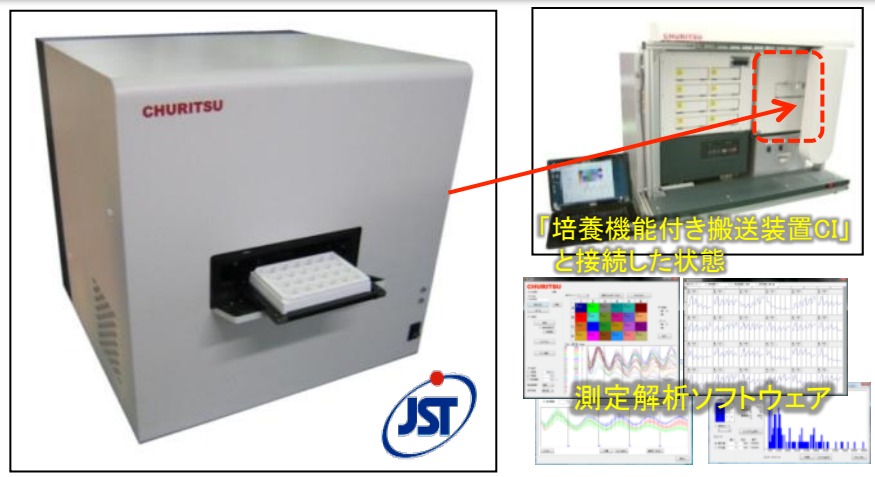
● 様々な容態や形状(A4の面積×高さ13cm まで)の生物試料(例えばイネの苗、バクテリアや藻類のコロニー、培養細胞、動植物の個体など)の生物発光がリアルタイム測定できる。

● 多検体(19,200試料(96ウェルプレート×200枚)または40万コロニー)が一度の実験で測定できる。

● 独自の高速処理方法を搭載することで、上記の試料数を最短107分間隔で自動測定できる。

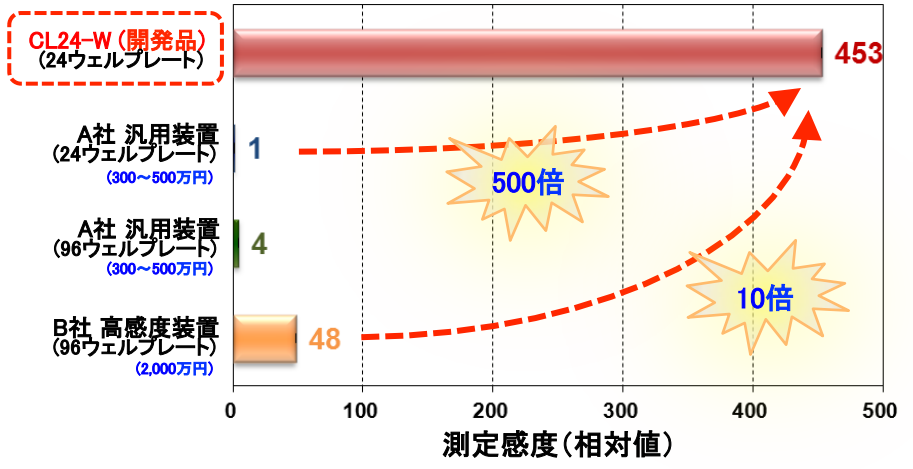
高感度生物発光測定装置 CL24

特願2010-070075

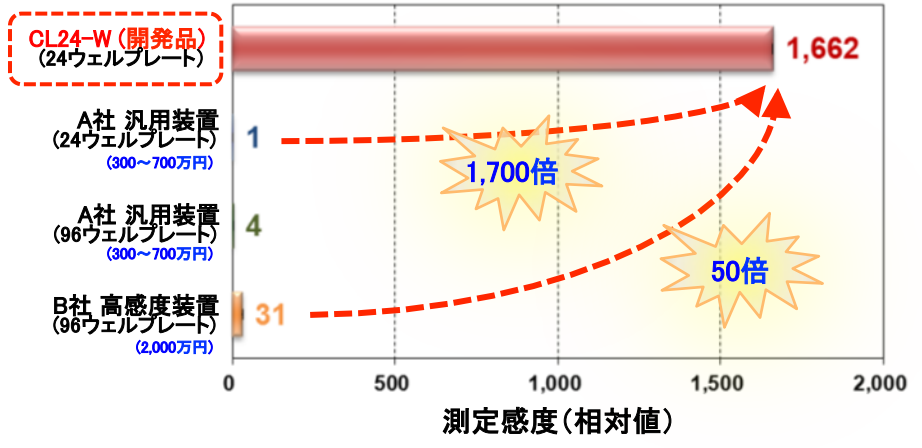


測定感度の比較

ホタルルシフェラーゼLUC(ピーク波長565nm)



赤色発光ルシフェラーゼSLR(ピーク波長630nm)



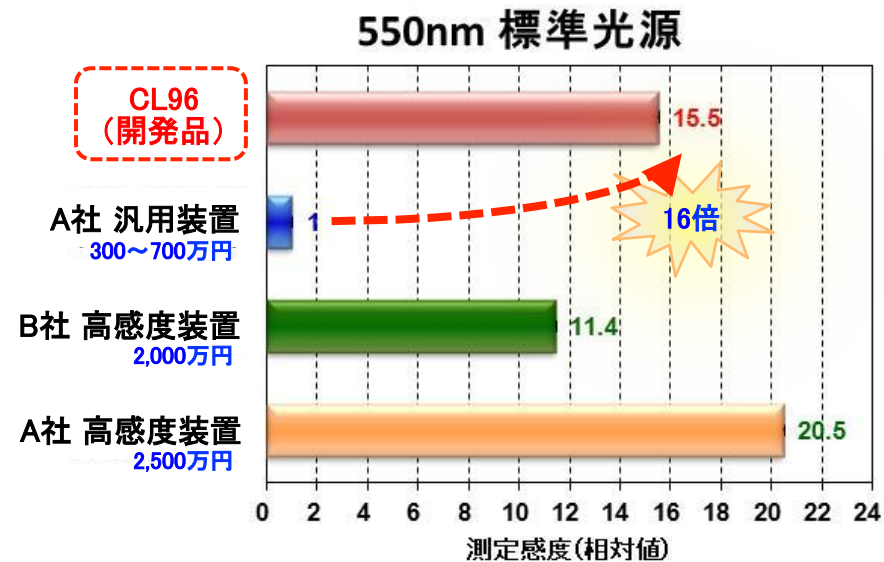
- 24ウェルプレートの測定に最適化した。
- 新開発の超高感度光電子増倍管(浜松ホトニクスおよび中立電機との共同開発品)を搭載して光学系を最適化した。
- 従来の高感度装置に比べ、ホタルルシフェラーゼ(黄緑色, ピーク波長565nm)に対して10倍(汎用装置の500倍)、赤色発光ルシフェラーゼ(ピーク波長630nm)に対して50倍(汎用装置の1,700倍)の超高感度を達成した。
- 「培養機能付き搬送装置CI」を接続することで、最大16枚(384試料)が全自動測定できる。

※市販化

高感度生物発光測定装置 CL96



検出感度の比較



※ 96ウェルプレートを使用して試験を実施

- 96ウェルプレートに最適化した小型高感度生物発光測定装置である。
- 従来の高感度装置と比べ、550nmの光(ホタルルシフェラーゼとほぼ同じ波長)に対して同程度の感度(同価格帯の汎用装置の16倍高感度)を達成した。
- 「培養機能付き搬送装置CI」を接続することで、最大16枚(1,536試料)が全自動測定できる。

※市販化

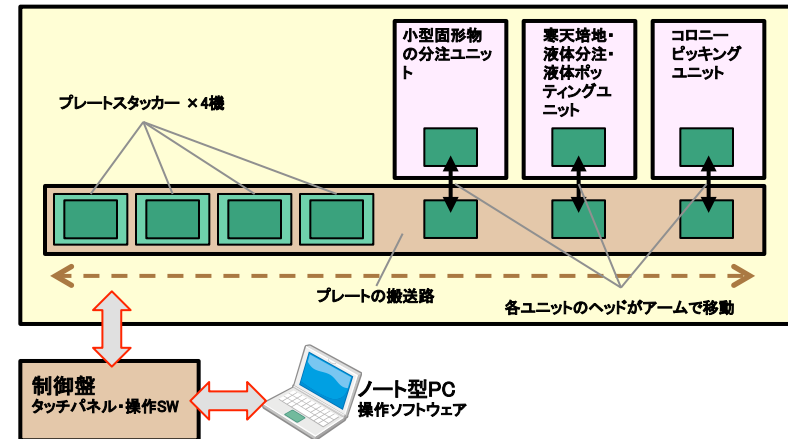
自動試料調製装置

特願2010-095985

装置の写真



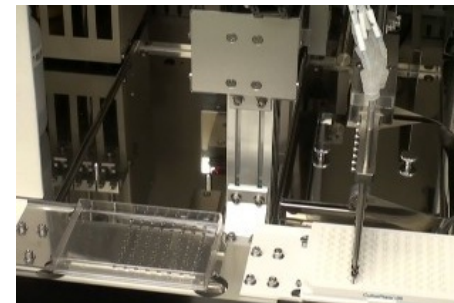
模式図



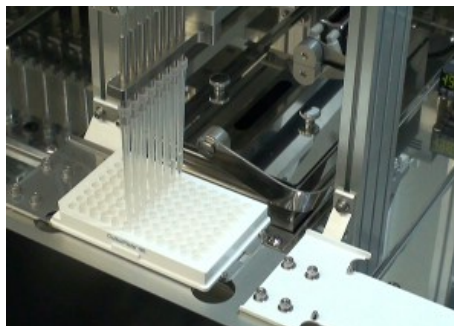
機能



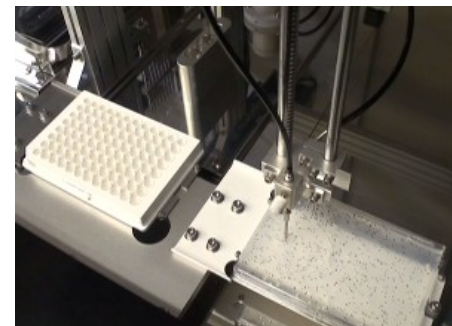
- ・種子の播種機能
- 処理速度：
96種子/2分間
(新規開発)



- ・液体スポットティング機能

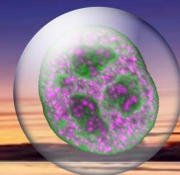
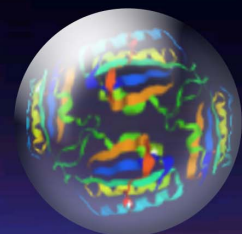
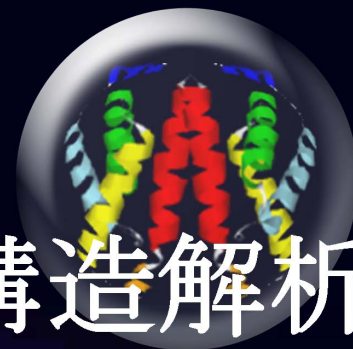


- ・寒天培地分注機能
(新規開発)
- ・液体分注機能



- ・非粘着性コロニー対応のコロニーピッキング機能
(新規開発)

好熱性藍色細菌 時計タンパク質のX線結晶構造解析



名古屋大学遺伝子実験施設
石浦 正寛

Synechococcus sp. PCC 7942 と *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 の比較

	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	<i>Thermosynechococcus</i> <i>elongatus</i> BP-1
至適生育温度	30℃	57℃
生化学的研究	可能	容易
X線構造学的研究	可能	比較的容易
ゲノムサイズ	2.7Mbp	2.6Mbp
ゲノムプロジェクト	完了(2007年, JGI)	完了(2002年, Kazusa)
遺伝子移入・操作	可能	可能
概日リズム	存在	存在
生物発光リズム系	構築済み	構築済み
時計遺伝子	<i>kaiABC</i>	<i>kaiABC</i>

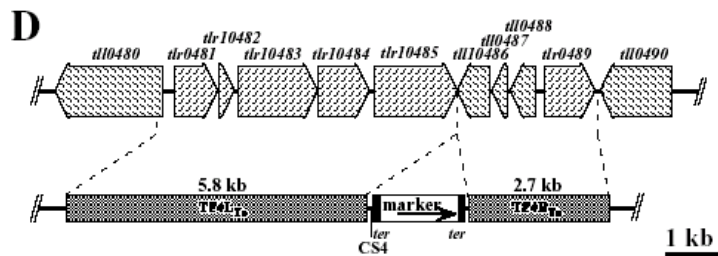
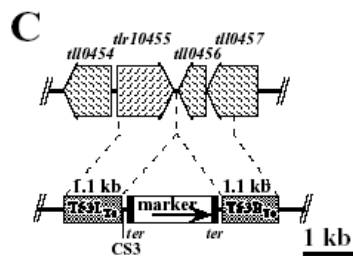
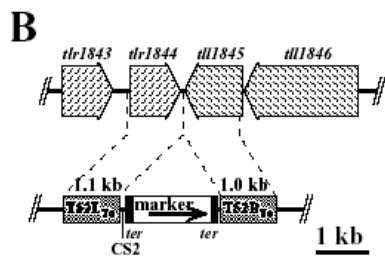
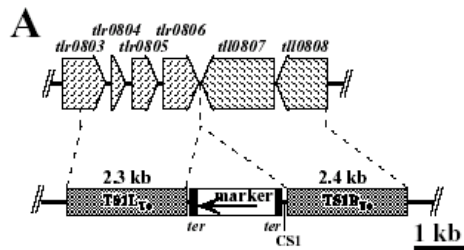


T. elongatus の顕微鏡写真

- 好熱性藍色細菌 *T. elongatus* は、概日時計の分子メカニズムを原子レベルで解明するための最適なモデル生物である。

T. elongatus における遺伝子移入系の開発

・ 遺伝子移入部位と遺伝子移入ベクター



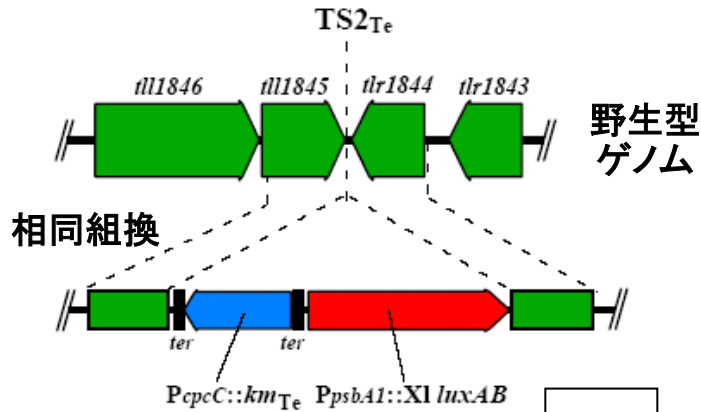
・ 遺伝子移入ベクターと遺伝子移入効率

遺伝子移入ベクター	遺伝子移入標的的部位	選択マーカー遺伝子	遺伝子移入株の選択培養と維持培養に用いる抗生物質	固体培地上の選択培養温度(℃)	遺伝子移入株を得るために要する日数	遺伝子移入効率 [(コロニー/μg DNA)±標準偏差]	遺伝子移入株の維持培養温度(℃)
pTS1 _{Te} /km _e	TS1 _{Te}	km _e	カナマイシン	45	10	1187 ± 64	55~60
pTS2 _{Te} /km _e	TS2 _{Te}	km _e	カナマイシン	45	10	17 ± 2	55~60
pTS3 _{Te} /km _e	TS3 _{Te}	km _e	カナマイシン	45	10	65 ± 14	55~60
pTS4 _{Te} /km _e	TS4 _{Te}	km _e	カナマイシン	45	10	1687 ± 35	55~60
pTS1 _{Te} /km _e	TS1 _{Te}	km _e	カナマイシン	52	8	28 ± 7	55~60
pTS1 _{Te} /cm	TS1 _{Te}	cm	クロラムフェニコール	45	10	120 ± 8	45
pTS2 _{Te} /cm	TS2 _{Te}	cm	クロラムフェニコール	45	10	2 ± 1	45
pTS3 _{Te} /cm	TS3 _{Te}	cm	クロラムフェニコール	45	10	1 ± 1	45
pTS4 _{Te} /cm	TS4 _{Te}	cm	クロラムフェニコール	45	10	142 ± 13	45
pTS1 _{Te} /Ω	TS1 _{Te}	aadA	ストربتマイシン	45	11	250 ± 70	45
pTS2 _{Te} /Ω	TS2 _{Te}	aadA	ストربتマイシン	45	11	5 ± 2	45
pTS3 _{Te} /Ω	TS3 _{Te}	aadA	ストربتマイシン	45	11	10 ± 5	45
pTS4 _{Te} /Ω	TS4 _{Te}	aadA	ストربتマイシン	45	11	330 ± 50	45

- ・ 4カ所の遺伝子移入部位と12種類の遺伝子移入ベクターを開発し、遺伝子移入法を最適化した。
- ・ *T. elongatus* に最適化した耐熱性カナマイシン耐性遺伝子 *km_{Te}* を開発した。最近、耐熱性クロラムフェニコール耐性遺伝子 *cm_{Te}* も開発した(未発表)。
- ・ これらによって、*T. elongatus* の遺伝子操作が自在に行えるようになった。

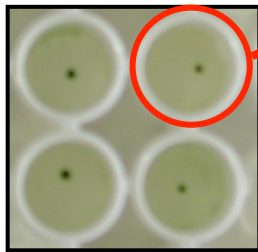
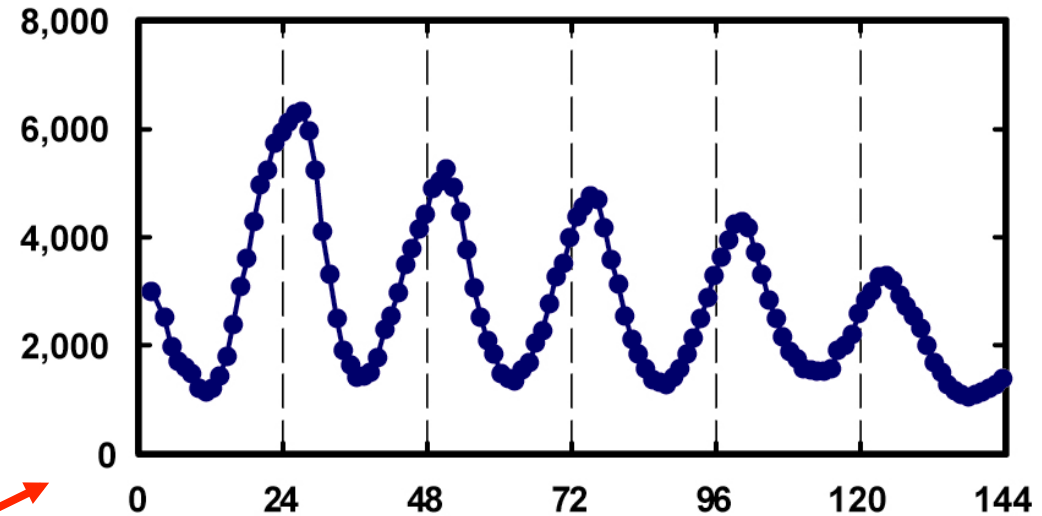
T. elongatus における生物発光リズム系の開発

発光レポーター株の作製



XI *luxAB*: *Xenorhabdus luminescens*
由来の耐熱性バクテリアルシフェラーゼオペロン

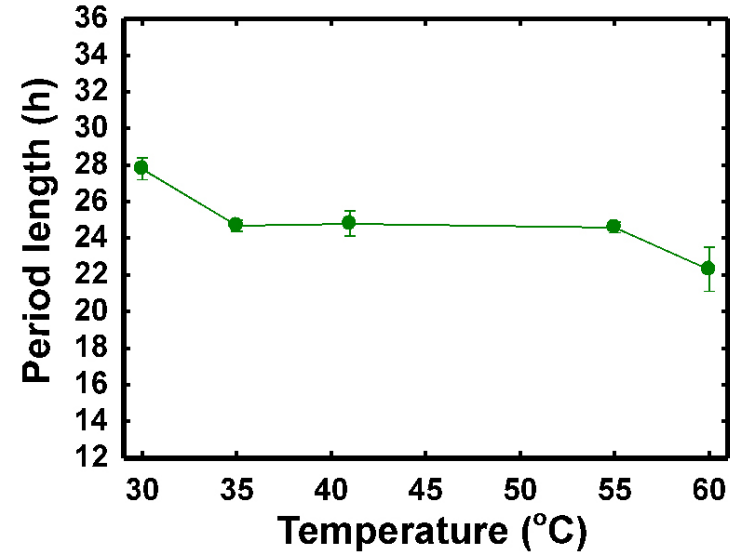
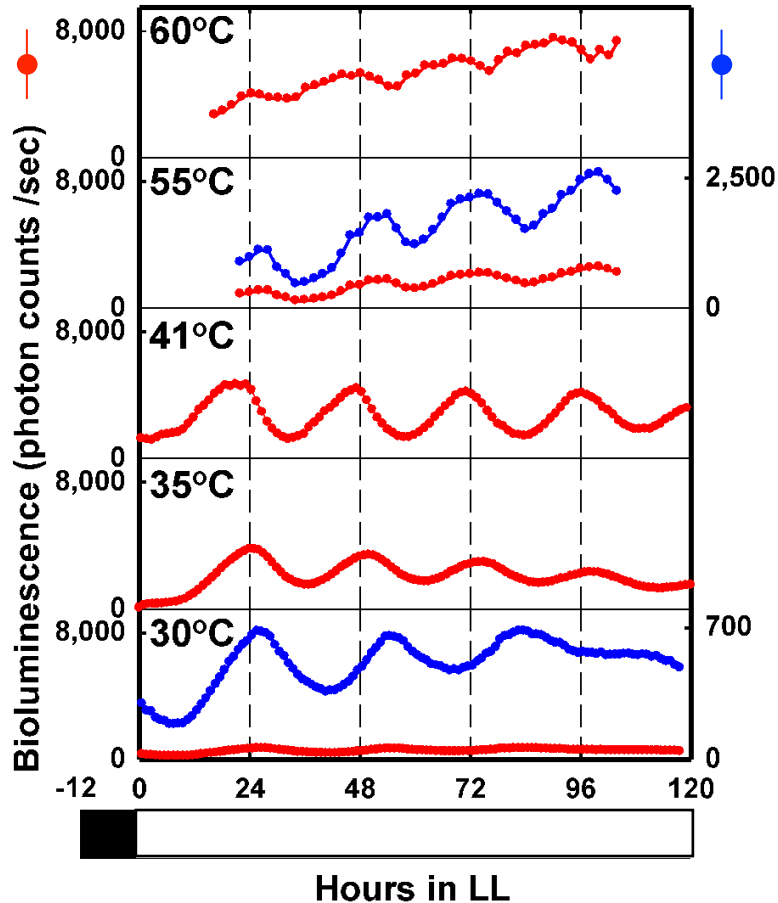
測定温度: 41°C



96ウェルプレートに入れた
シングルコロニー

耐熱性バクテリアルシフェラーゼ遺伝子
や耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子を
レポーターに使用して、*T. elongatus* にお
ける生物発光リズム系を開発した。

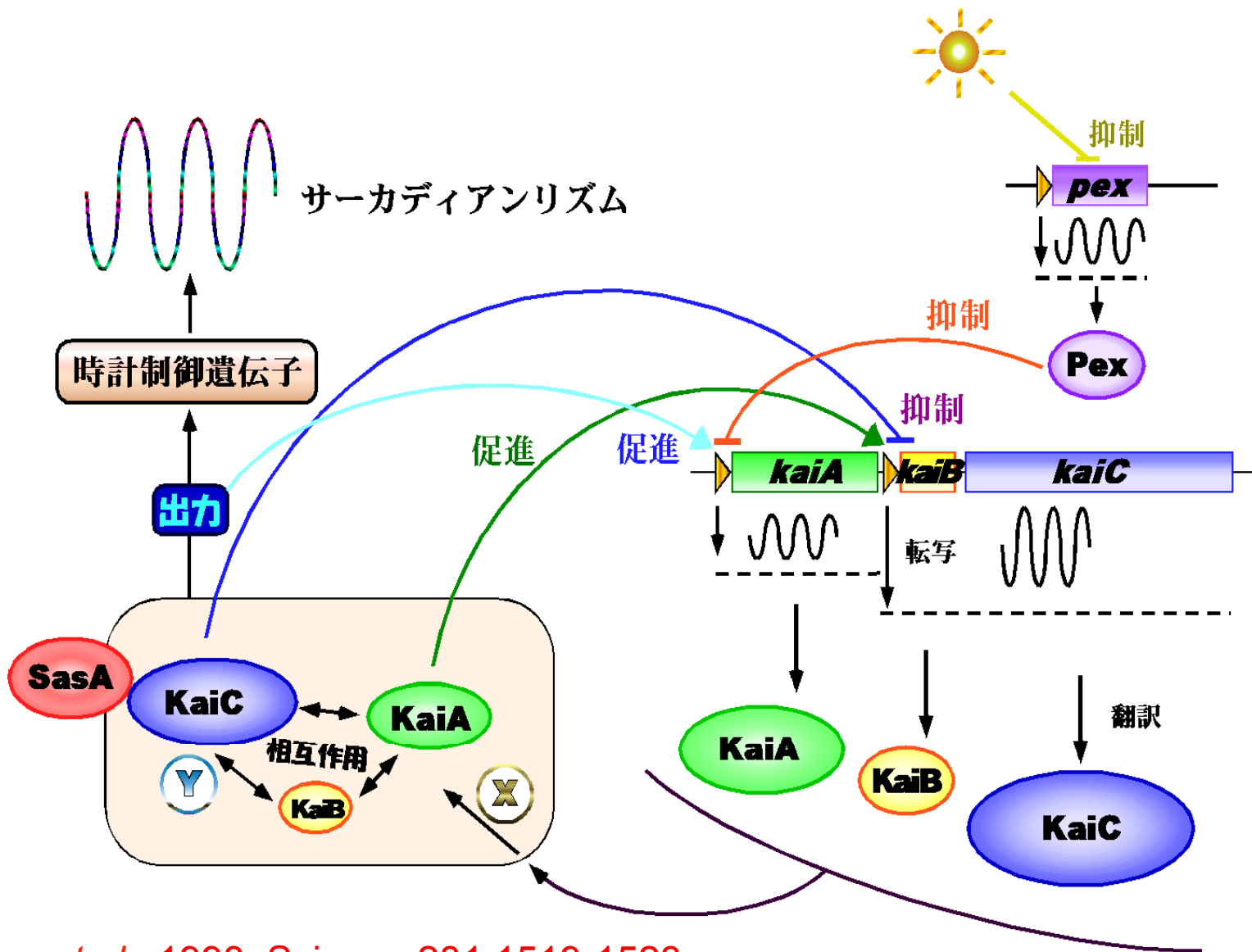
T. elongatus におけるリズム周期の温度補償性



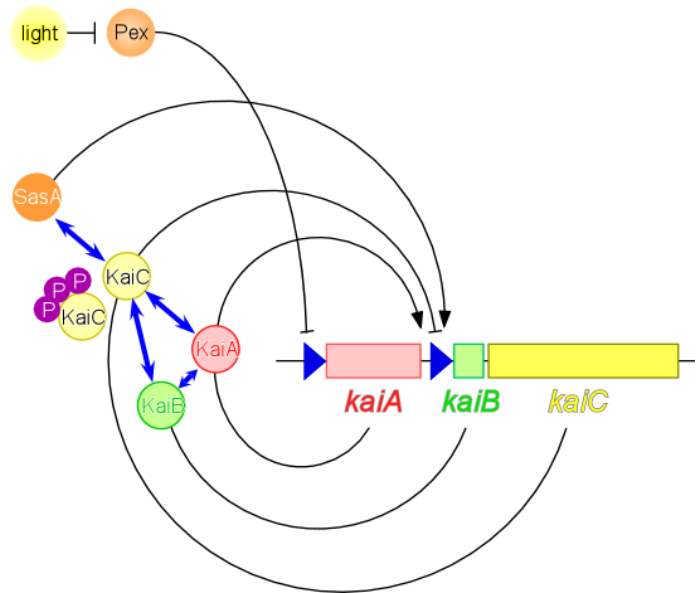
温度 (°C)	周期 (時間)	<i>n</i>
30	27.4 ± 1.0	14
35	24.7 ± 0.3	6
41	24.8 ± 0.7	32
55	24.6 ± 0.3	7
60	22.3 ± 1.2	5

・ 温度係数: $Q_{10} = 1.08$

- ・ *T. elongatus* の生物発光リズムの周期は、30°Cから60°Cという幅広い温度範囲において温度補償された。



分子遺伝学から構造生物学・生化学へ

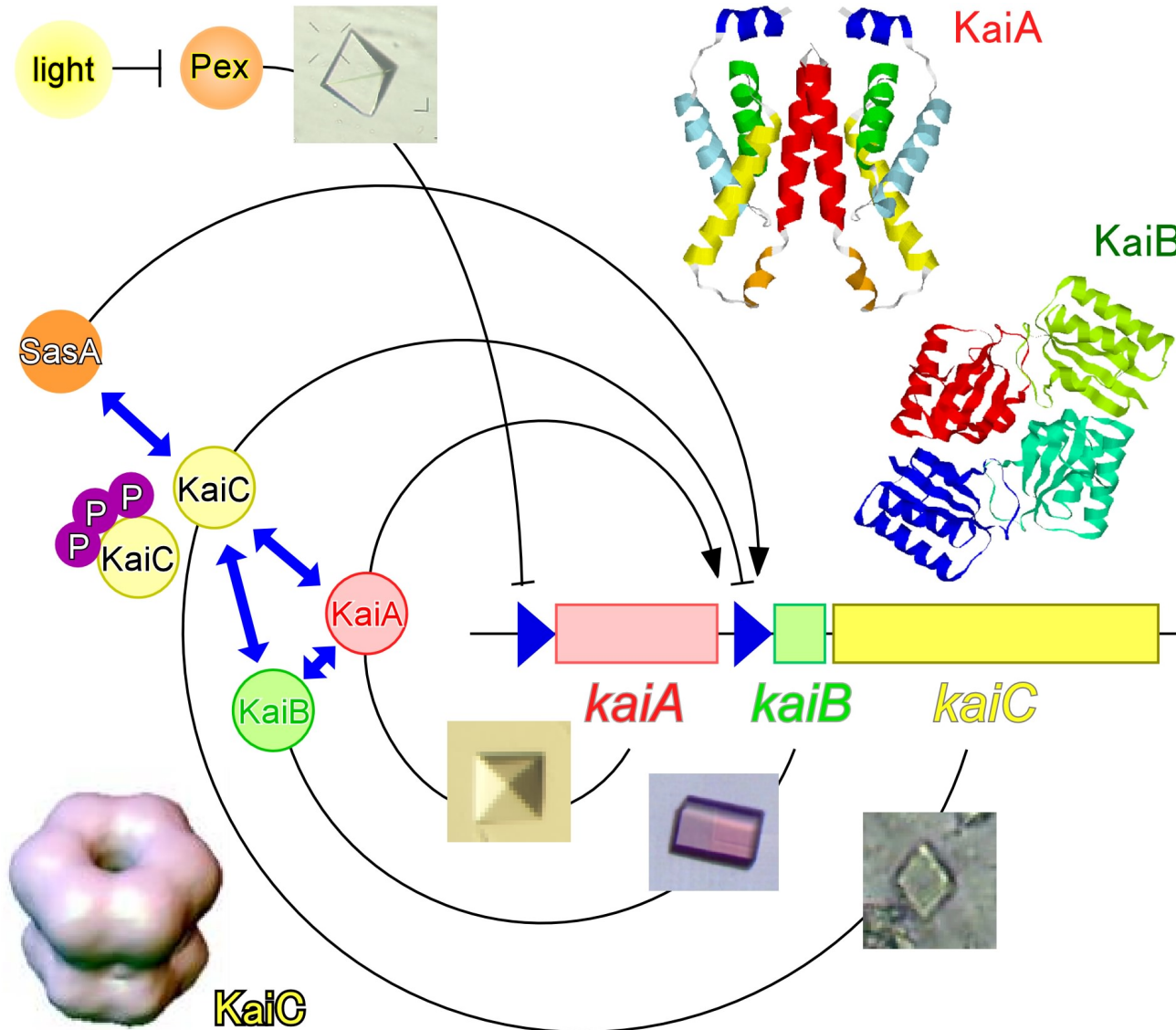


生物時計を「精巧な分子装置」として捉えて、 原子レベルで解明したい

発振の継続性、周期の安定性(正確で温度に影響されない、24-h、時計の時刻合わせ(リセット))

- ・時計タンパク質、時計関連タンパク質は時計の部品
- ・構造の解明＝部品の形状(大きさ、歯の数など)、種類(振り子、歯車など)の決定
- ・機能の解明＝歯車と歯車の相互作用、針が動く仕組みの決定

藍色細菌の時計分子装置



生物時計を精巧な分子装置(タンパク質複合体)と捉えて、時計発振を原子レベルで解明したい(構造解析と機能解析)。

3つの時計タンパク質 KaiA、KaiB、KaiCを Mg^{2+} -ATP存在下で反応させると、24時間周期のリン酸化リズムが生じる(名古屋大近藤グループ、2005)。

結晶構造解析、NMR解析

1. タンパク質の研究に適した**耐熱性タンパク質**が利用できる別府温泉産の**好熱性藍色細菌**で人工生物発光リズム細胞をつくる。
2. **時計タンパク質**を大腸菌で大量生産し、結晶化し、**X線結晶構造解析**でタンパク質の**原子構造**を解明する。
3. **NMR解析**でタンパク質間相互作用を解明する。

ターゲットとするタンパク質

時計タンパク質

- KaiA (終了)
- KaiB (終了)
- KaiC (アメリカの研究グループが決定)

時計タンパク質複合体

- 種々の存在状態のKaiC
- KaiA-KaiC
- KaiA-KaiC-KaiB、経時変化
- KaiC-SasA

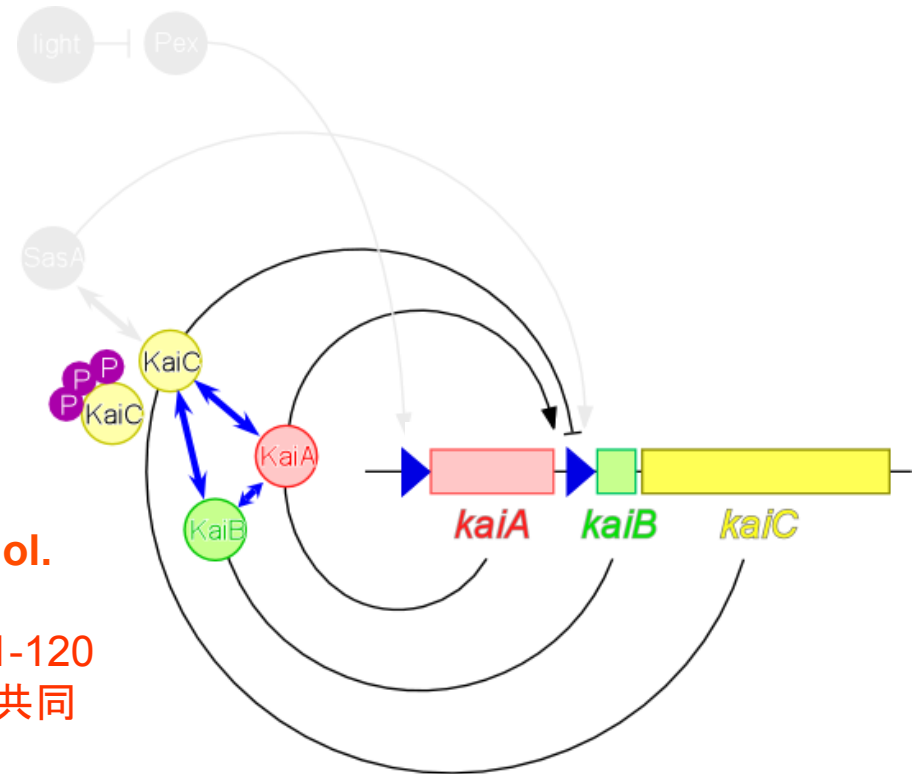
時計関連タンパク質

- Pex (終了)
- SasA

The clock: **KaiA, KaiB, KaiC**

- ・振動子
- ・リズム発振に不可欠

1. Uzumaki *et al.*, 2004, **Nature Struct. Mol. Biol.**, 11:623- 631
2. 宇津巻等, 2005, 蛋白質核酸酵素 50:111-120
(京都大学薬学研究科加藤博章研究室との共同研究)



KaiAのアライメント解析

```

Thermosynechococcus elongatus BP-1 -----MAQSTALITICGLVYSPAIGQELVRLHTSDIDELVYFSSEREFNCYLEARRNSVACLILEWGGEGTPQIITYLHHSATLLPAI
Thermosynechococcus vulcanus -----MAQSTALITICGLVYSPAIGQELVRLHTSDIDELVYFSSEREFNCYLEARRNSVACLILEWGGEGTPQIITYLHHSATLLPAI
Synechococcus sp. strain PCC 7942 -----MLSQIAICIVVESTAILQDCQRALSADR---YQLQVCE---SGEMLLYEAQTHRDQIDCLILVAANPSFR---AVVQQLCFEGVVVPAI
Synechococcus sp. strain WH 8102 -----MARPGLTIALLLTTPNLVDACQQWLPDTR---YHSIVLSGPHGQEQQLDVLVSTLEAQEEIDAVVVVEQQLDASSRDQLLGRGLLPAV
Synechococcus sp. strain PCC 7002 -----MQSPSLSLCLFAPEHVAHRLRSIFQGGDRHYLSTFQA-----LDDFCAPLEDKPERIDCLLVYEANSLPVLNRLYEQGRLLPII
Acaryochloris marina MBIC 11017 -----M-----MLLQVE
Trichodesmium erythraeum IMS101 MKISRITDSQINPDLPVTKFLSTKLFICITYLHDDKFAVSTVKLLSQDRYLVALTKSDREFVQLIEENTN-IDCLLFQEDPELTSIHKLHHSRILLPAV
Nostoc punctiforme strain ATCC 29133 -----M-----MLLPIL
Nostoc cycadae -----M-----MLLPIL
Anabaena sp. strain PCC 7120 -----M-----MLLPIL
    
```

```

Thermosynechococcus elongatus BP-1 LIFP-----AAPAPPPAGPHYHIAEVLITTDQLDQINRQIEEAITGCFVKLCPGCAVPPPHVLFRLPALKESSNVDP-----QHRLSQ
Thermosynechococcus vulcanus LIFP-----AAPAPPPAGPHYHIAEVLITTDQLDQINRQIEEAITGCFVKLCPGCAVPPPHVLFRLPALKESSNVDP-----QHRLSQ
Synechococcus sp. strain PCC 7942 VVGDRDSEDPD--EPAKEQLKXSAELHGIHQLEQLPYQVDAALAEFLRLAPVETMADHIMMGANHDPE-----LSSQORLQA
Synechococcus sp. strain WH 8102 VVGEMK-----HVDYHAELELAEDELQAQLGYTVDAAISRFLRQGRAD-----GRSDDDG-----LASVDK--LSR
Synechococcus sp. strain PCC 7002 FLGP--TTACEISQEDVSEQLYHSAEKYLDFAENLESLTIDQAIQQLHAPSCALSDKPDQPHHSDPKTHQAF-----LLLQORLAE
Synechococcus sp. strain PCC 6803 LLESPSALAKTDEHPTIVYNAEIHLPESQWSELPVTVDRRAIAHYLHGPICLTPNQETIIPAPIVDESSQSF-----LLLQORLAD
Acaryochloris marina MBIC 11017 ESVEKTSQPNASDRDPQDSEYHIAEVIYVDHQDEILSSIDCAIAQELQLSKACRLPTRLQKKYADEAIDQNLATQ-----QORLSQ
Trichodesmium erythraeum IMS101 IIKSESENLENQQLTDDNNFTIYTHQHNQPFYHQAEASLLINQLGRIDFYVEQAIQKFLKLSPASSSKDKSQISSQATTIYTKNILHQORLYA
Nostoc punctiforme strain ATCC 29133 ILRP-----DVKCLDNLVDLAKQKGNISWVVKFIDAIVAQFCYLPVTATTSATINYLPMWQQNPSKA
Nostoc cycadae FFQP-----NVKILDNLDLGIQIPLNPNNGYIILQSNFAQESTSTLVAATTARLYLLNWLPA NLQN
Anabaena sp. strain PCC 7120
    
```

```

Thermosynechococcus elongatus BP-1 KLKERLGYLGVIYKRIIAFFFRMSPADKRRKLDLRSIYRTIVLEYNTDAKVNERIDEVSKAFFADISVSQLVEIHVELMDFSKQLKLEGRSEDI
Thermosynechococcus vulcanus KLKERLGYLGVIYKRIIAFFFRMSPADKRRKLDLRSIYRTIVLEYNTDAKVNERIDEVSKAFFADISVSQLVEIHVELMDFSKQLKLEGRSEDI
Synechococcus sp. strain PCC 7942 RLQERLGYLGVIYKRIIDRFLNLPAYESQKHQAMQTSYREIVLSYFSPNSNLQSIQNFVMAFFADVPTKVVEIHVELMDFAKKRVBGRSEDI
Synechococcus sp. strain WH 8102 RLQERLGYLGVIYKRIISRLGSLPTEERRELESQRTYRDLISYSDPAASQALESFVNTAFSGLIIRTRVDLHVQDIPDFWKLRLKLEGRSEDI
Synechococcus sp. strain PCC 7002 KLKERLGYLGVIYKRIIKYFYHSLSPESQEFREQFVADYRDVLSYFSGLEPTMQALQFVQVQAFFADVSYIILETHKIMDFAQFKLEGRSEI
Synechococcus sp. strain PCC 6803 KLKERLGYLGVIYKRIISHFYRNFSPQKQEYLEDLSSQYREIILSYRSDRGTVNDLLQFVQVQAFFADLAISQILEIHVELMDFSKQLKLEGRSEI
Acaryochloris marina MBIC 11017 KLKERLGYLGVIYKRIIPQDFPHKLTETEQTDYLVITKRRYRDIILMYRQNSVNHQETDDFVTOIFFADISILKILEIHVELMDFAKKRVBGRSEDI
Trichodesmium erythraeum IMS101 KLKERLGYLGVIYKRIITNFIINMAPGRDKFVDQKLEVRHIVLKYRQNSLIRNINDFVMLCFSDIPIVQVVEIHMDFADIRLEGRSEI
Nostoc punctiforme strain ATCC 29133 -YTSKYVYVFASQMQRSQHFNEMNPAKRCQLRQKLDLGLLNYITTKLKEIKKFIITIFYANNIPQIIEIRHVEIEFSIQKLEGRSMTL
Nostoc cycadae -FIDQYVVFACQQQRFQVYQQMTQVDRVLLQKIKSDIRQLLIDITTKLKEIKKFIINTVFCANIPVQIIEIRHVEIEFSIQKLEGRSMTL
Anabaena sp. strain PCC 7120 -----MTQEVDQIILQQLKSDIRQLLESYITTKALKEIKKFIITAVFCANIPVPEIIEIRHVEIEFSIQKLEGRSMTL
    
```

```

Thermosynechococcus elongatus BP-1 LDYRLTLDIVIAHLCEMYRRSIPREV 283
Thermosynechococcus vulcanus LDYRLTLDIVIAHLCEMYRRSIPREV 283
Synechococcus sp. strain PCC 7942 LDYRLTLDIVIAHLCEMYRRSIPRET 284
Synechococcus sp. strain WH 8102 QDYRLALLDVMAHLCEMYRRSIPEDIPLSGLASGRHRREADLPDAFEVSS 296
Synechococcus sp. strain PCC 7002 IDYRLTLDIVIAHLCEMYRRSIPREDLPFELLFRID 232
Synechocystis sp. strain PCC 6803 LDYRLVLDILAHLCMYRRSIPREDIPFDVYYQTD 299
Acaryochloris marina MBIC 11017 LDYRLTLDIMAHLCMYRRSIPRTR 214
Trichodesmium erythraeum IMS101 LDYRLTLDITIAHLCEMYRRSIPRES 325
Nostoc punctiforme strain ATCC 29133 LDYRLTLDILAHLCMYRRSISK 193
Nostoc cycadae LDYRLTLDVLAHLCEMYRRSISK 193
Anabaena sp. strain PCC 7120 MDYRLTLDITIAHLCEMYRRSIFK 102
    
```

N末端ドメイン 中央ドメイン C末端ドメイン



KaiAドメイン欠失変異体のリズム

kaiA genotypes
(KaiA expressed)

kaiA-null strain (host strain)
(None)

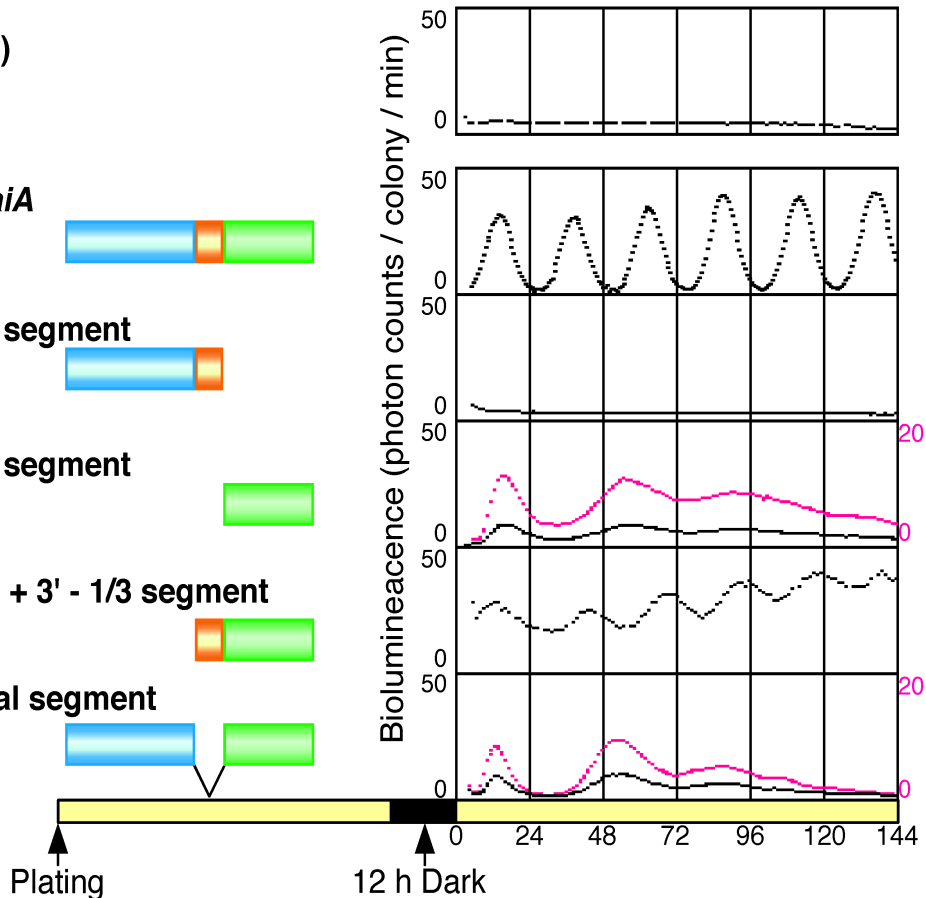
Synechococcus wild-type *kaiA*
(*SynKaiA*₁₋₂₈₄ [full-length])

Synechococcus kaiA 5' - 2/3 segment
(*SynKaiA*₁₋₁₇₄)

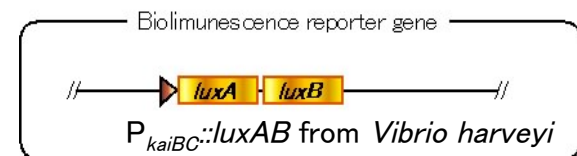
Synechococcus kaiA 3' - 1/3 segment
(*SynKaiA*₁₇₅₋₂₈₄)

Synechococcus kaiA central + 3' - 1/3 segment
(*SynKaiA*₁₄₀₋₂₈₄)

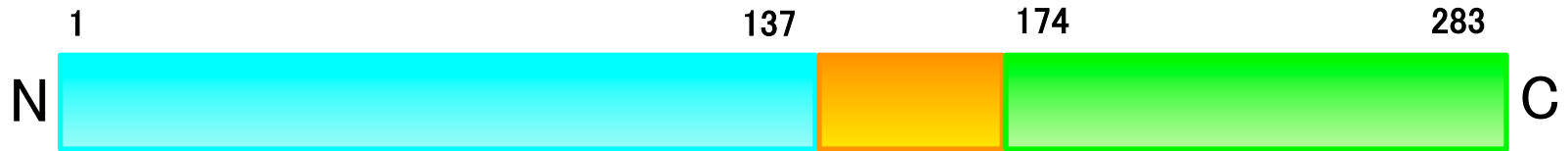
Synechococcus kaiA Δcentral segment
(*SynKaiA*_{1-139 + 175-284})



- C末端ドメイン:リズムを発振
- 中央ドメイン: 周期を24時間に調節
- N末端ドメイン: 振幅を増幅



KaiAの3つの機能ドメイン



N末端ドメイン

振幅の増幅

(Amplitude amplifier)

中央ドメイン

周期の調節

(Period adjuster)

C末端ドメイン

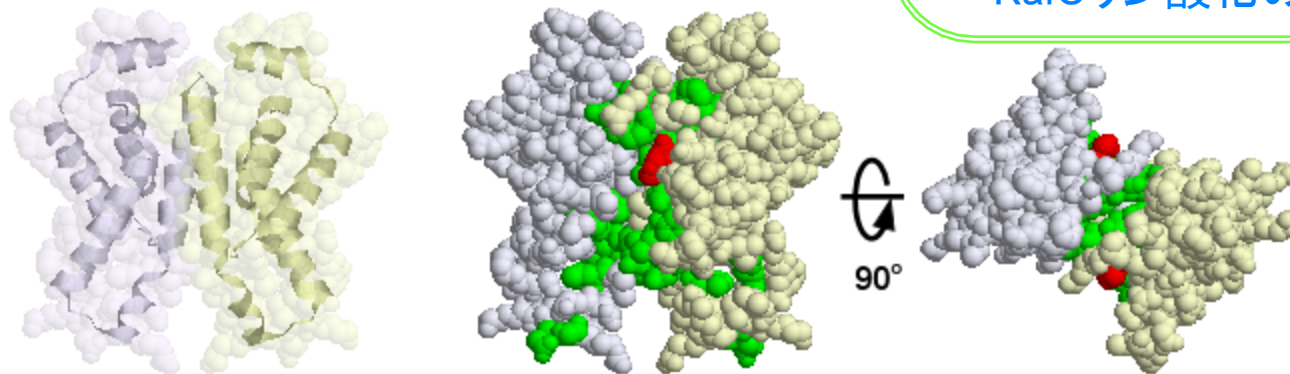
リズムの発振

(Clock oscillator)

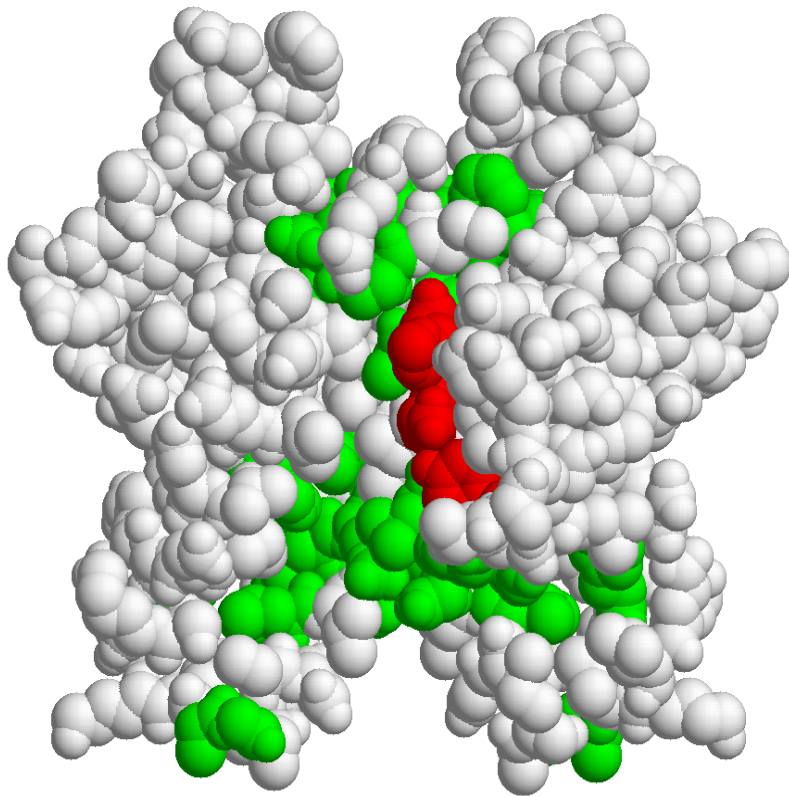
二量体形成

KaiCとの結合

KaiCリン酸化の促進



保存残基のマッピング

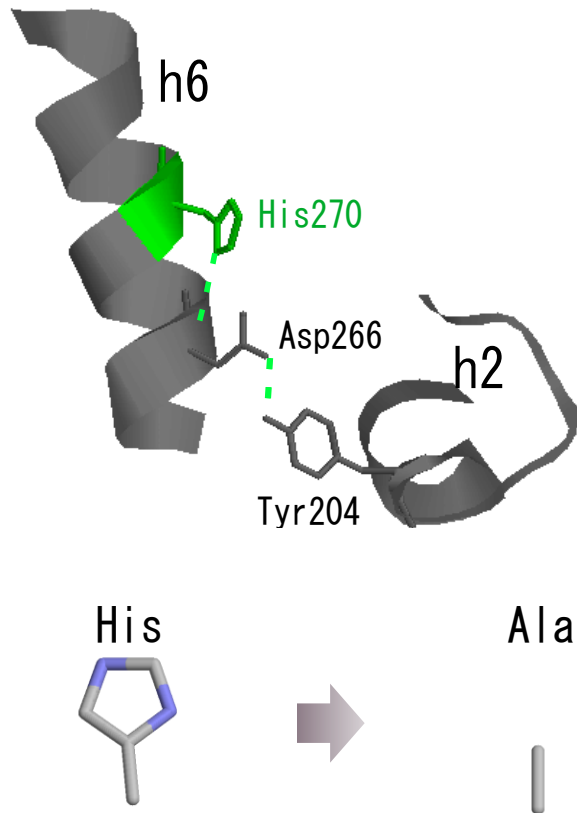


赤と緑は保存残基

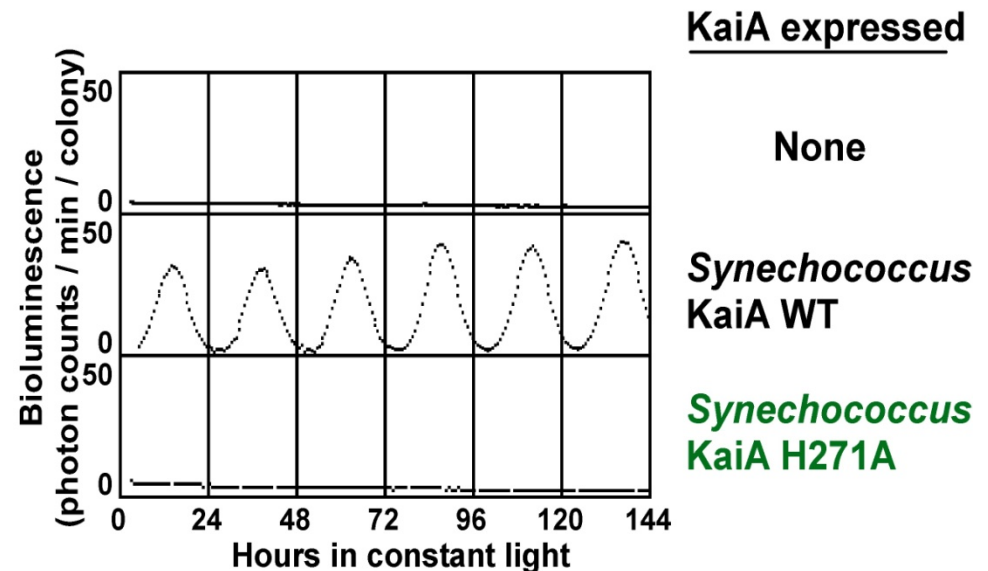
- 保存残基の多くは、二量体形成面に並んでいる。
- Tyr204、Asp266、His270は、二量体によって形成される曲面の最深部に位置し、水素結合で連結されている。
- Asp266、His270は、KaiA分子の外側（溶媒側）に側鎖を伸ばしている。
- Tyr204は、Asp266、His270の位置を固定している。
- これらの残基は何らかの機能を担っていると予想される。

His270Ala変異タンパク質の解析

リズム測定は測定が容易な*Synechococcus* を宿主細胞を用いて行った。



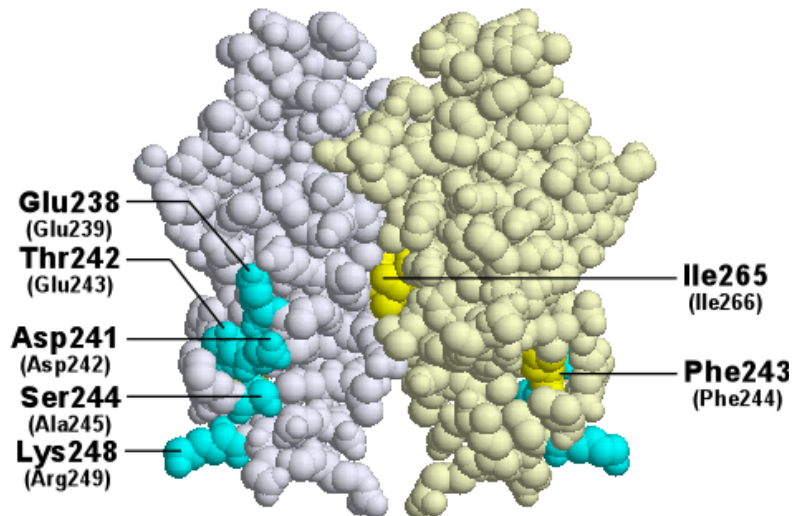
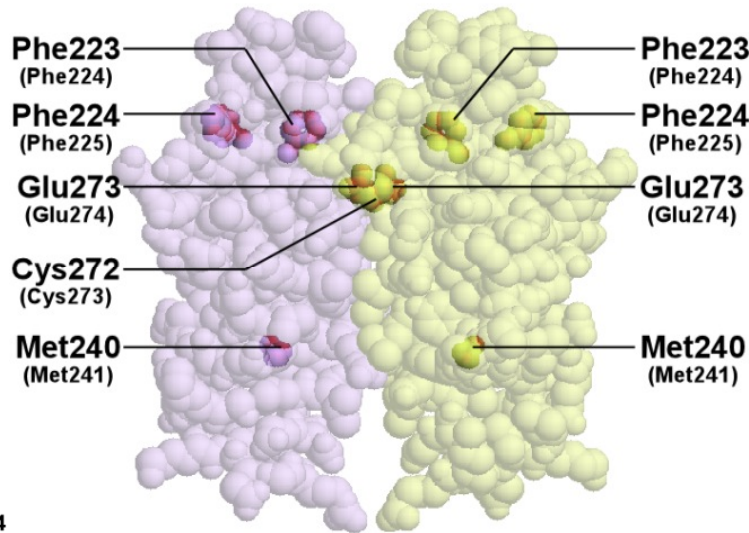
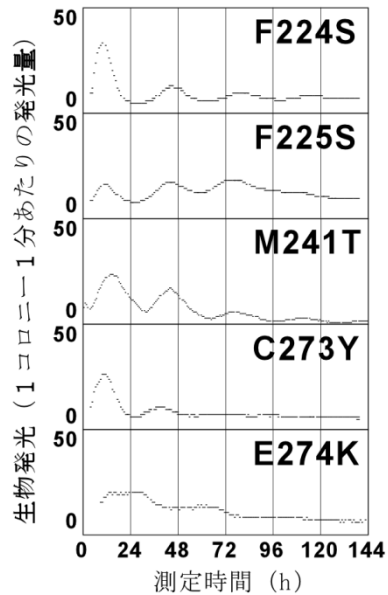
Synechococcus KaiA
His271Ala変異株のリズム



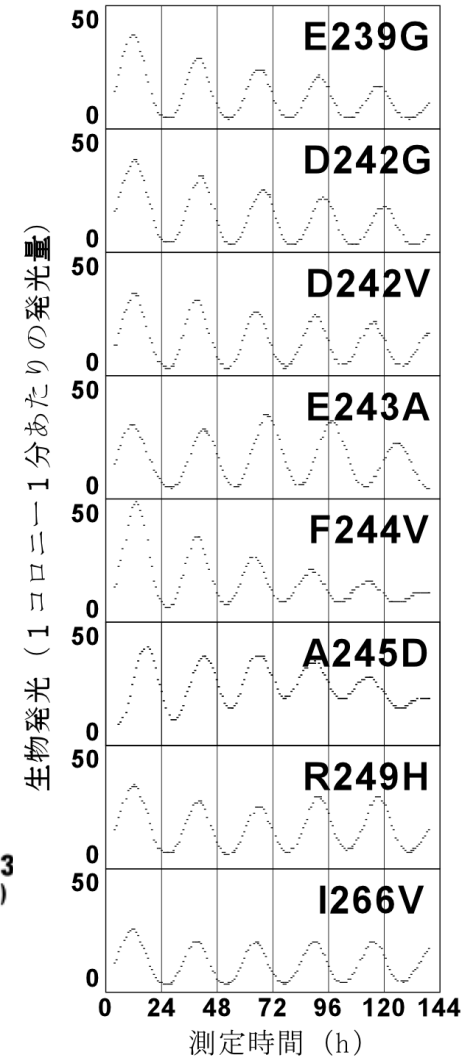
Synechococcus KaiA His271Ala変異株では、リズム発振は全く認められなかった。

時計発振ドメインの機能-構造相関

長周期・低振幅



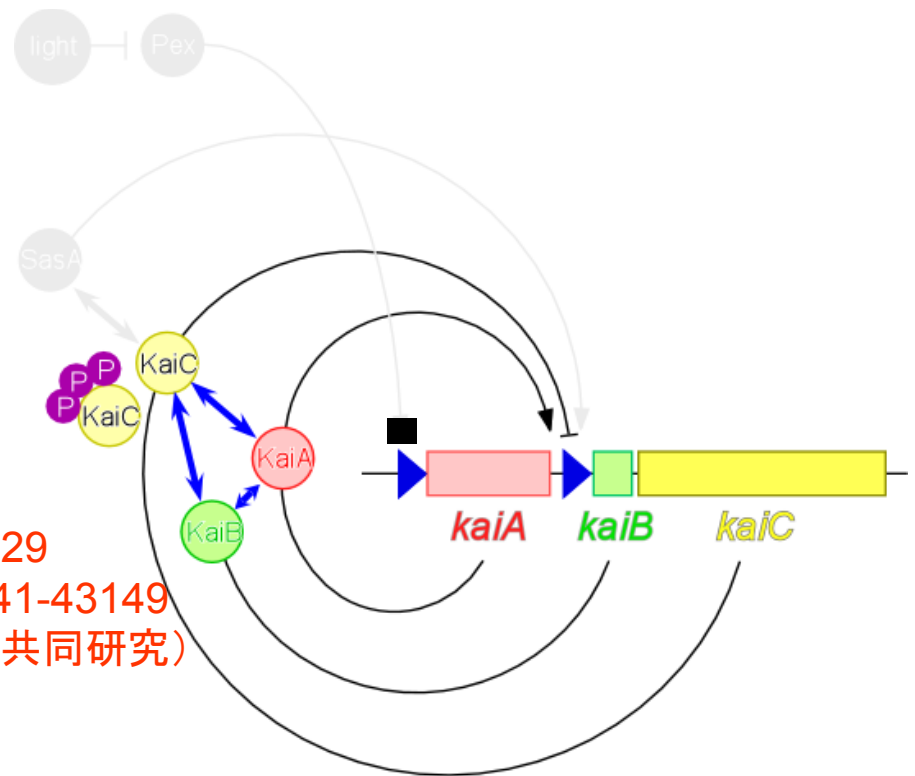
軽微な周期伸長



The clock: KaiA, KaiB, KaiC

- ・振動子
- ・リズム発振に不可欠

1. Iwase *et al.*, 2004, *Acta Crysta.* D60:727-729
2. Iwase *et al.*, 2005, *J. Biol. Chem.* 280:43141-43149
(大阪大学生命機能研究科難波啓一研究室との共同研究)



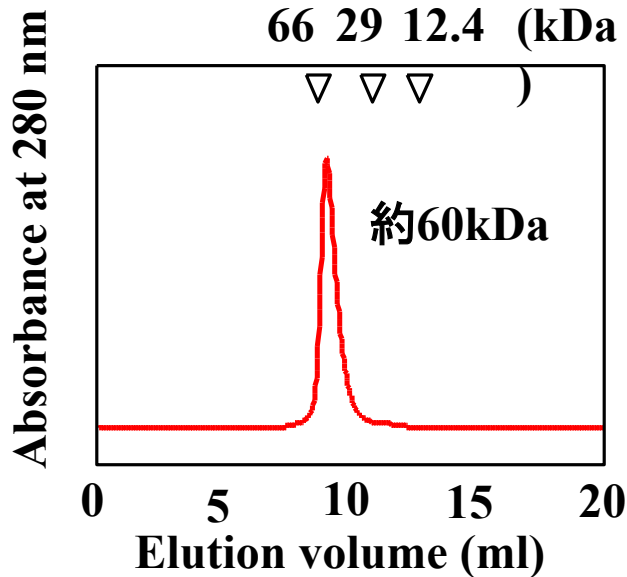
KaiB重合体

KaiB サブユニットの計算上の分子量は 12,026 Da

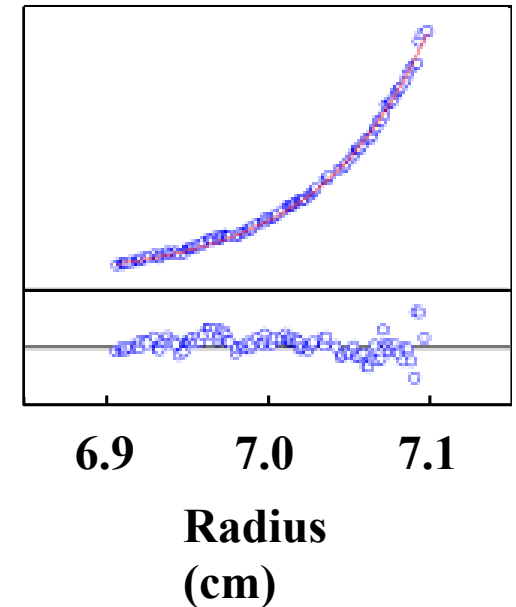
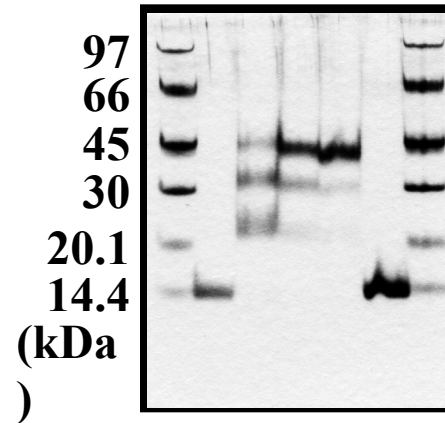
ゲルろ過クロマトグラフィー

化学架橋/SDS-PAGE

分析超遠心

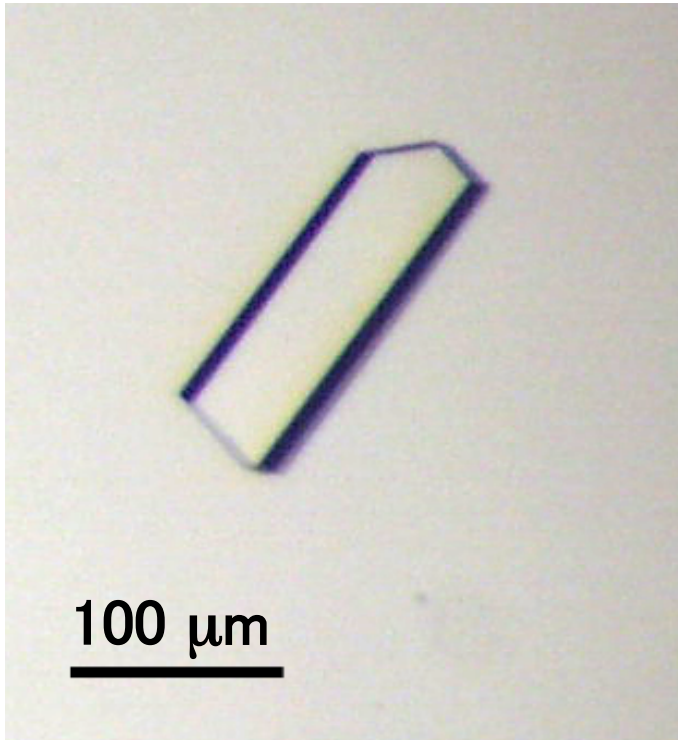


Linker+ + + + -
min 1 15 60 120



KaiB は四量体で存在する

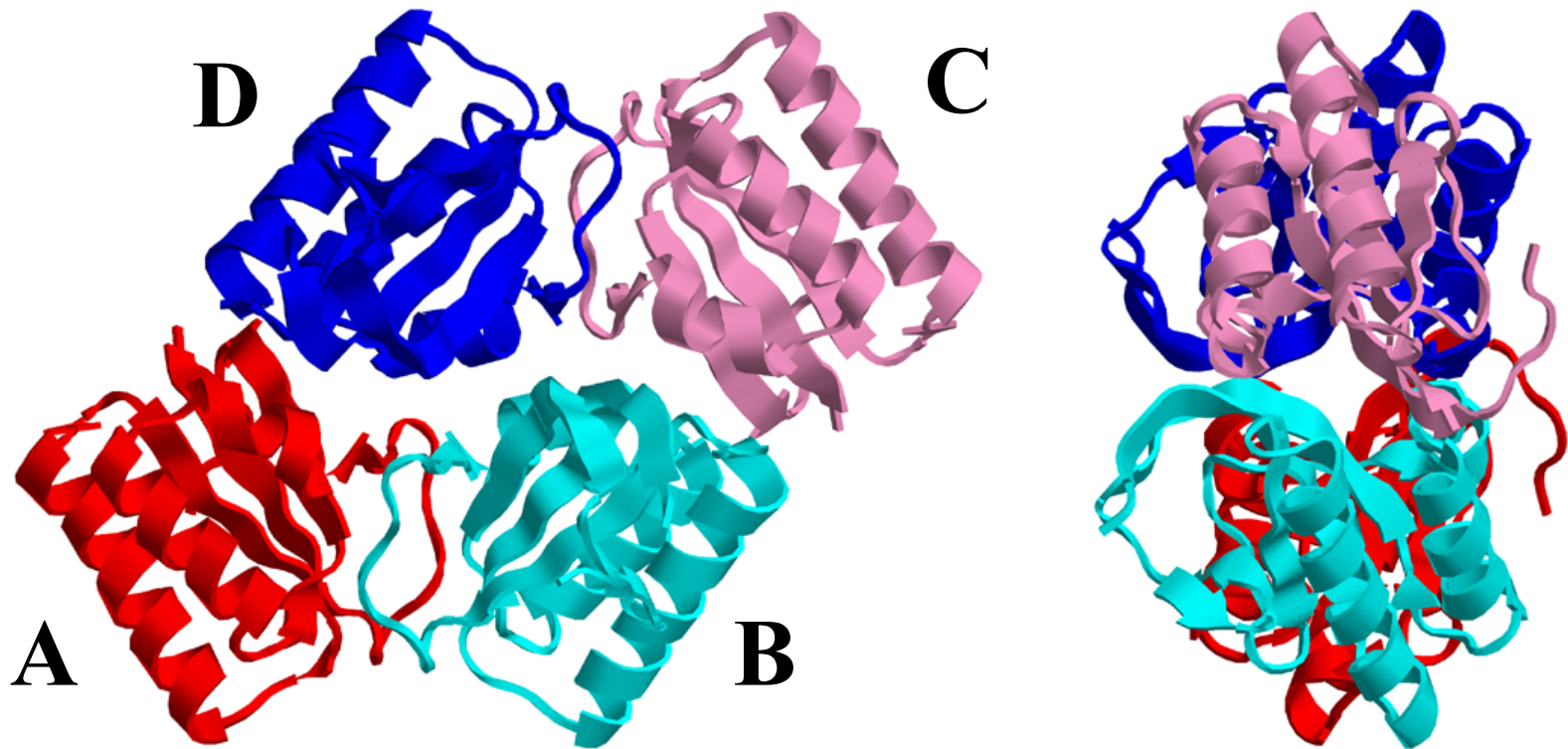
結晶化、構造解析



KaiB 結晶の一例

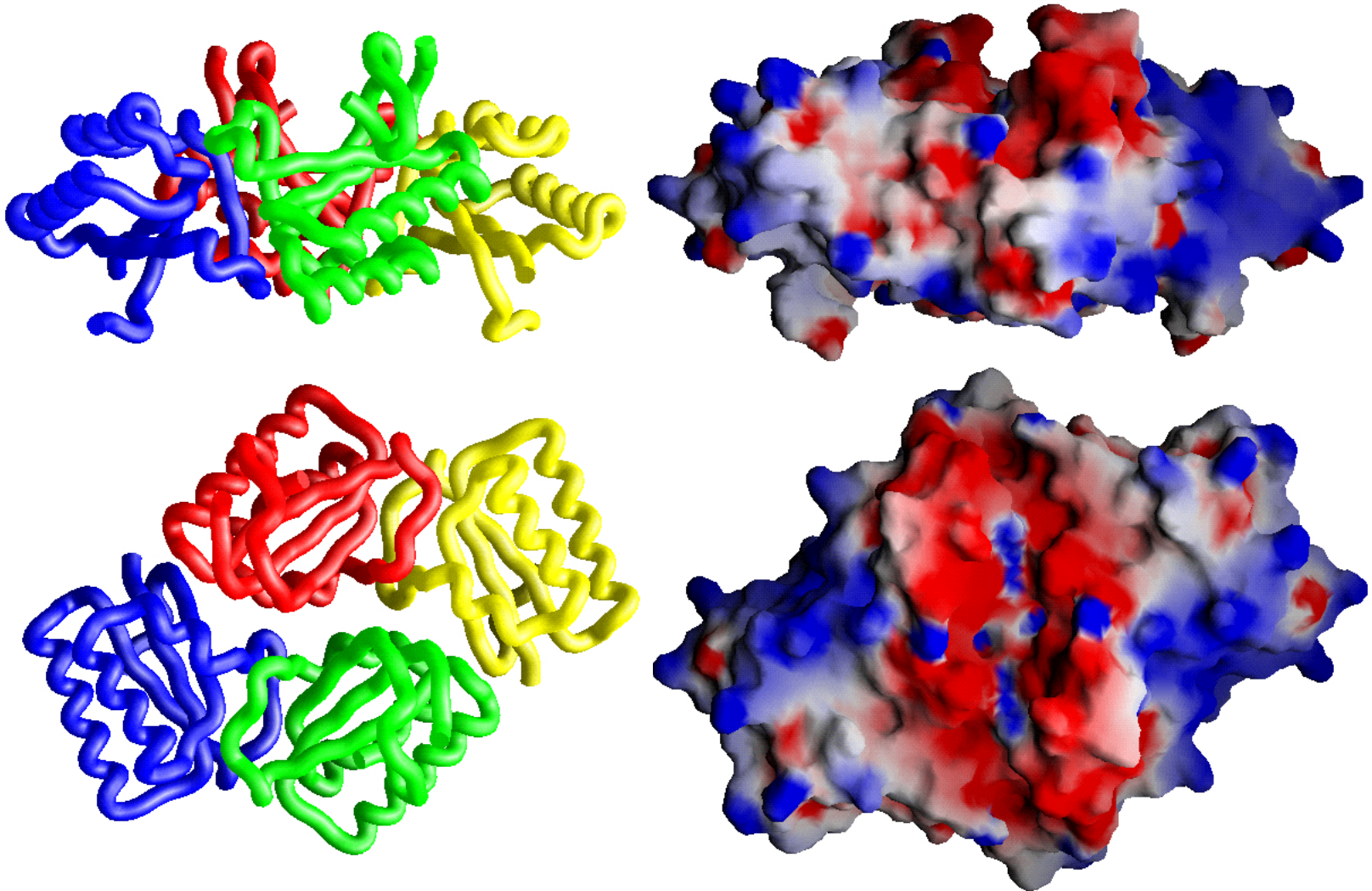
- 最大約 0.5 mm の結晶が得られた
- SPring-8 (BL38B1、BL41XU) でデータ収集
- Osを付加した結晶を作製し、MAD法を利用して位相決定
- 2.6Åの解像度で構造解析

KaiB 分子モデル



KaiB は、AB、CD がそれぞれ密に結合して 2量体を形成し、それらが少しずれて結合し 4量体構造 を形成している。

表面電荷分布



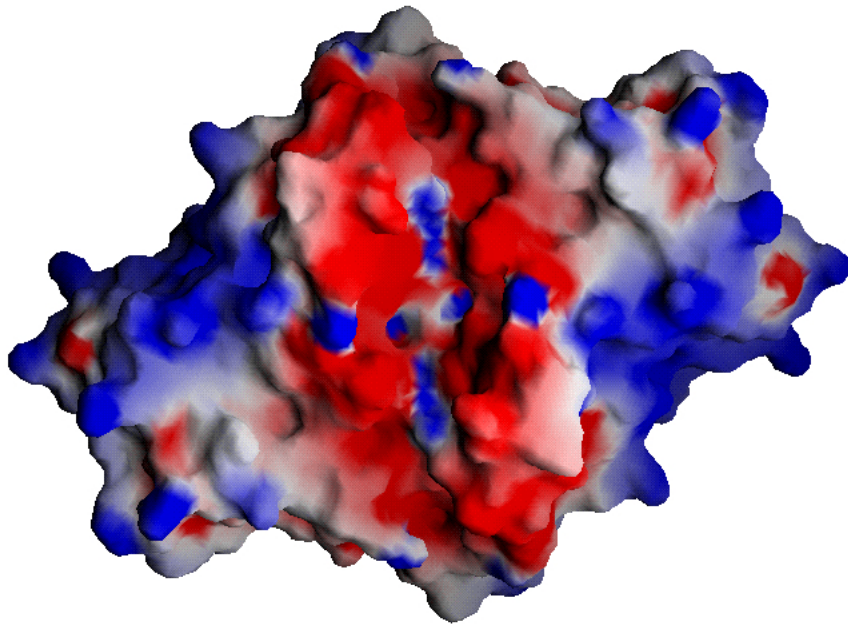
red : negative

blue : positive

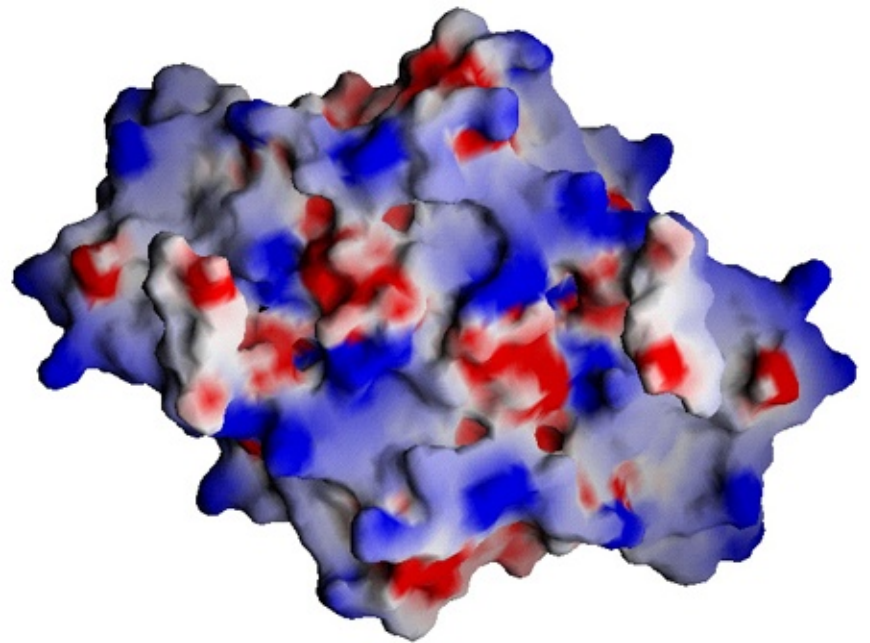
表面電荷分布

表面側に比べ、裏面側には特徴が乏しい。

表面



裏面



red : negative

blue : positive

部分構造

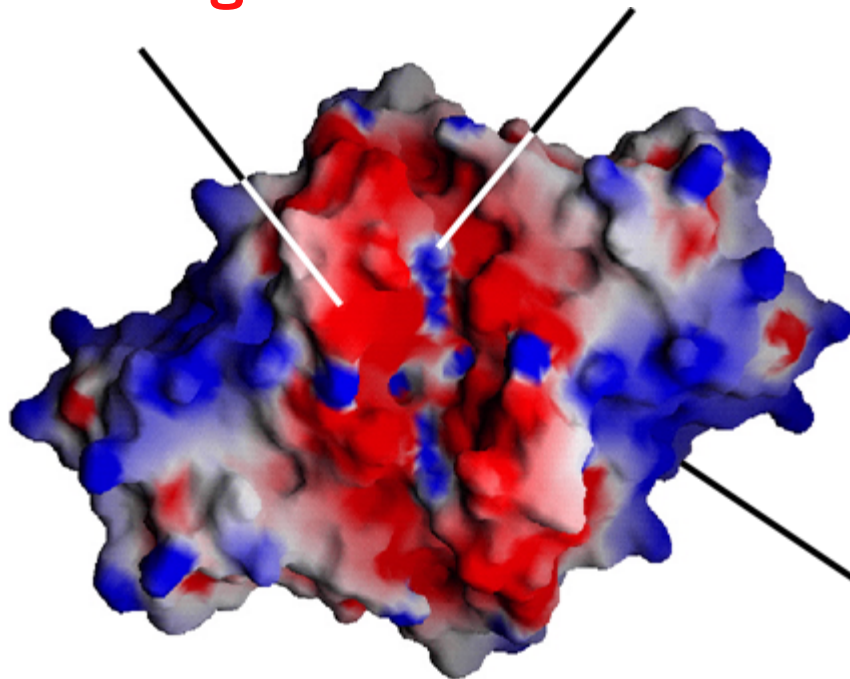
KaiB 四量体上の部分構造を以下のように命名した。

負電荷の尾根状構造

Negative ridge

正電荷の溝状構造

Positive cleft



正電荷の窪み構造

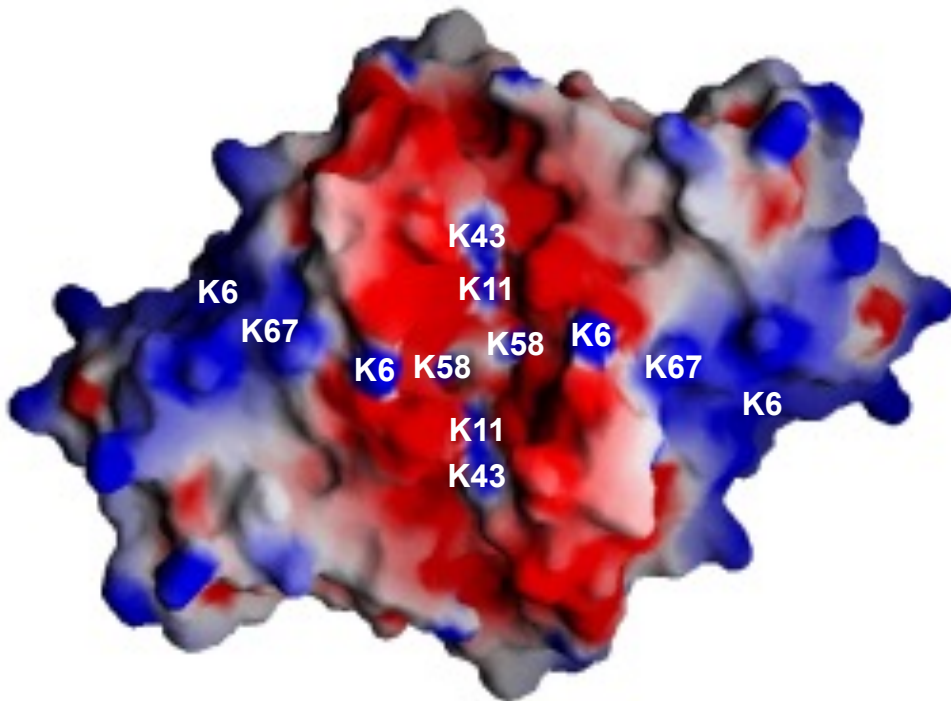
Positive hollow

Positive cleft の変異

- K11、K43 に変異を入れるとリズムが検出できなくなった。
- K58 に変異を入れるとリズムは不安定化。



positive cleft は KaiB の機能部位と考えられる。

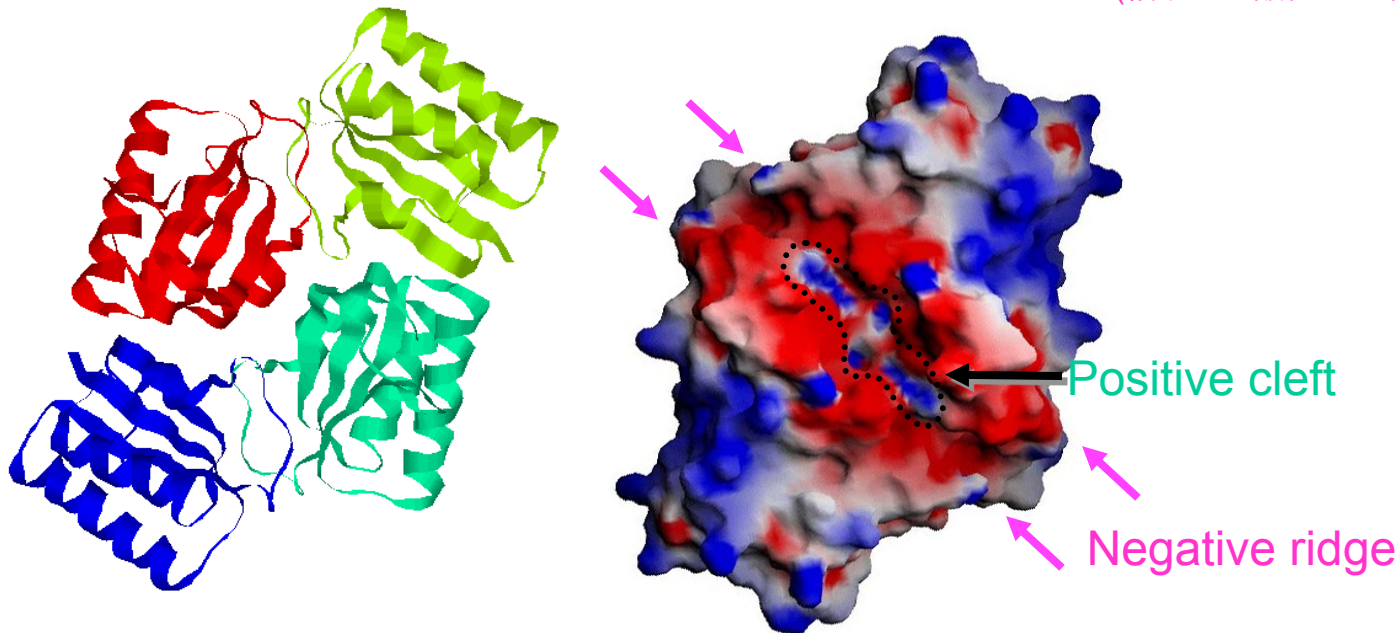


KaiBの特徴的な表面電荷分布: 活性部位の推測

<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	MAPLRKTYVLKLYVAGNTPNSVRALKTLNINILEKEFKGVYALKVIDVLKPNQLAEEDKILATPTLAKVLPVPVRRRIIGDLSNREKVLIGLDLLYEIGDQAEDDLGLE*	108
<i>Synechococcus</i> sp. strain PCC 7942	-MSPRKTYILKLYVAGNTPNSVRALKTLKKNILEVEFQGVYALKVIDVLKPNQLAEEDKILATPTLAKVLPVPVRRRIIGDLSNREKVLIGLDLLYEGELQDSDDF*	102
<i>Synechocystis</i> sp. strain PCC 6803	MSFFKTTYVLKLYVAGNTPNSVRALKMLKNILEQEFQGVYALKVIDVLKPNQLAEEDKILATPTLAKILPPPVRKIIIGDLSNREKVLIGLDLLYDEIREREAEQD*	105
<i>Synechococcus</i> sp. strain WH 8102	-MSPRKTYILKLYVAGNTPNSMRALKTLRNILETEFRGVYALKVIDVLKPNQLAEEDKILATPTLSKILPPPVRRIIGDLSNREKVLIGLDLLYDELADNAFSSG*	104
<i>Cyanothece</i> sp. strain PCC 8801	MVNFKTTYVLKLYVAGNTPNSVRALKTLKKNILEDEFKGVYALKVIDVLKPNQLAEEDKILATPTLSKILPPPVRKIIIGDLSNREKVLIGLDLLYEEIRERESEL*	104
<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS101	MSPLKTTYVLKLYVAGNTPNSVRALKTLKEILEQEFQGVYALKVIDVLKPNQLAEEDKILATPTLSKILPPPVRKIIIGDLSNREKVLIGLDLLYEEELNEDEYNL*	104
<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC 29133	MIKAKTTYVLKLYVAGNTPNSVRALKTLKKNILEQEFQGVYALKVIDVLKSPQLAEEDKILATPTLSKILPPPVRKIIIGDLSNREKVLIGLDLLYEEELSEGDFEE*	104
<i>Anabaena</i> sp. strain PCC 7120	MNKARKTYVLKLYVAGNTPNSVRALKTLKKNILEQEFQGIYALKVIDVLKPNQLAEEDKILATPTLSKILPPPVRKIIIGDLSNREKVLIGLDLLYEEELTEEDWEAQSNL*	108
<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313	-MSPRKTYILKLYVAGNTPNSMRALKTLRDLIENEFRGVYALKVIDVLKPNQLAEADKILATPTLAKILPPPVRRIIGDLSNREKVLIGLDLLYDEISEEMLGSAELDTLADDDIASPDS*	119
<i>Prochlorococcus marinus</i> MED4	-MVARKTYILKLYVAGNTPNSMRALNTLKEILENEFRGVYALKVIDVLKPNQLAEEDKILATPTLAKILPPPVRRIIGDLSNREKVLIGLDLLFDELSEYSGGTKN*	107

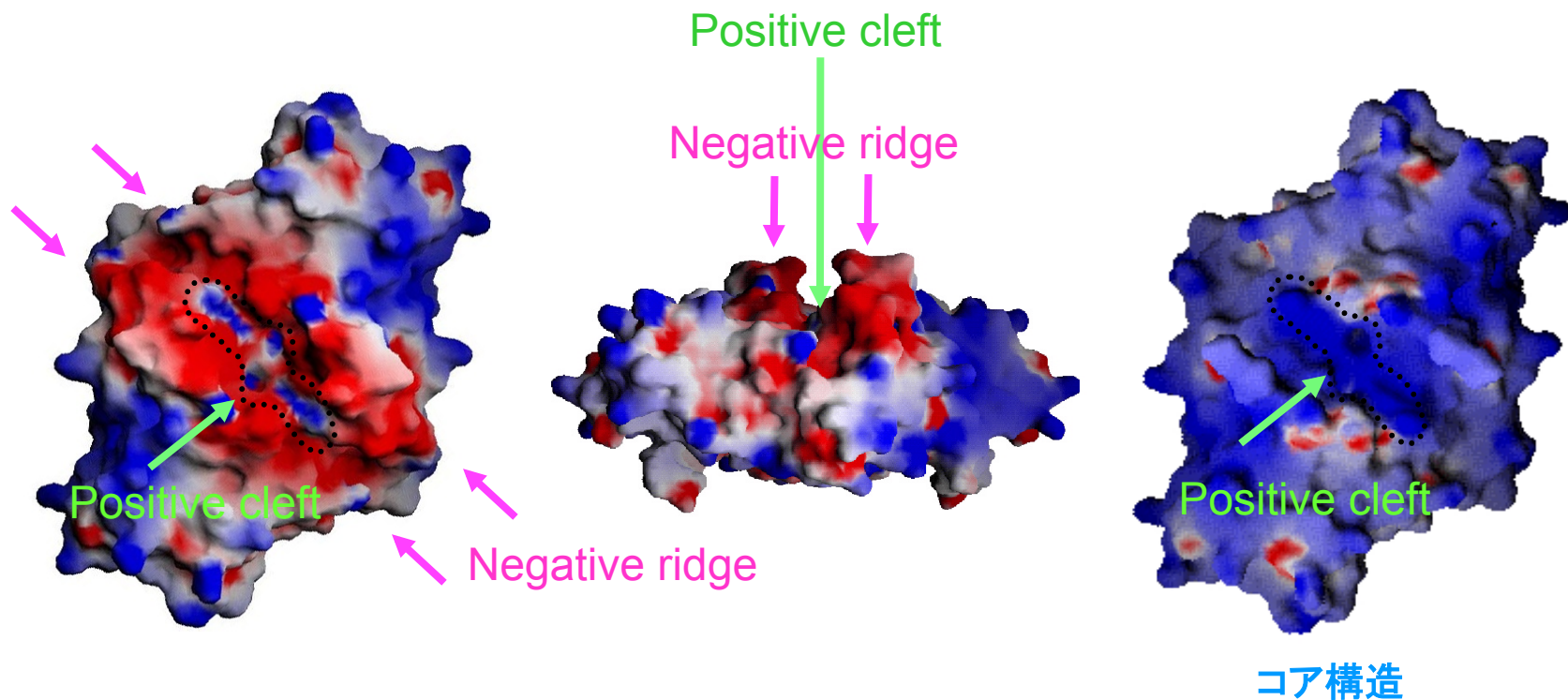
コア構造領域

identity = 100 %
C末端酸性アミノ酸領域
 (領域内の酸性アミノ酸残基: 30~50%)



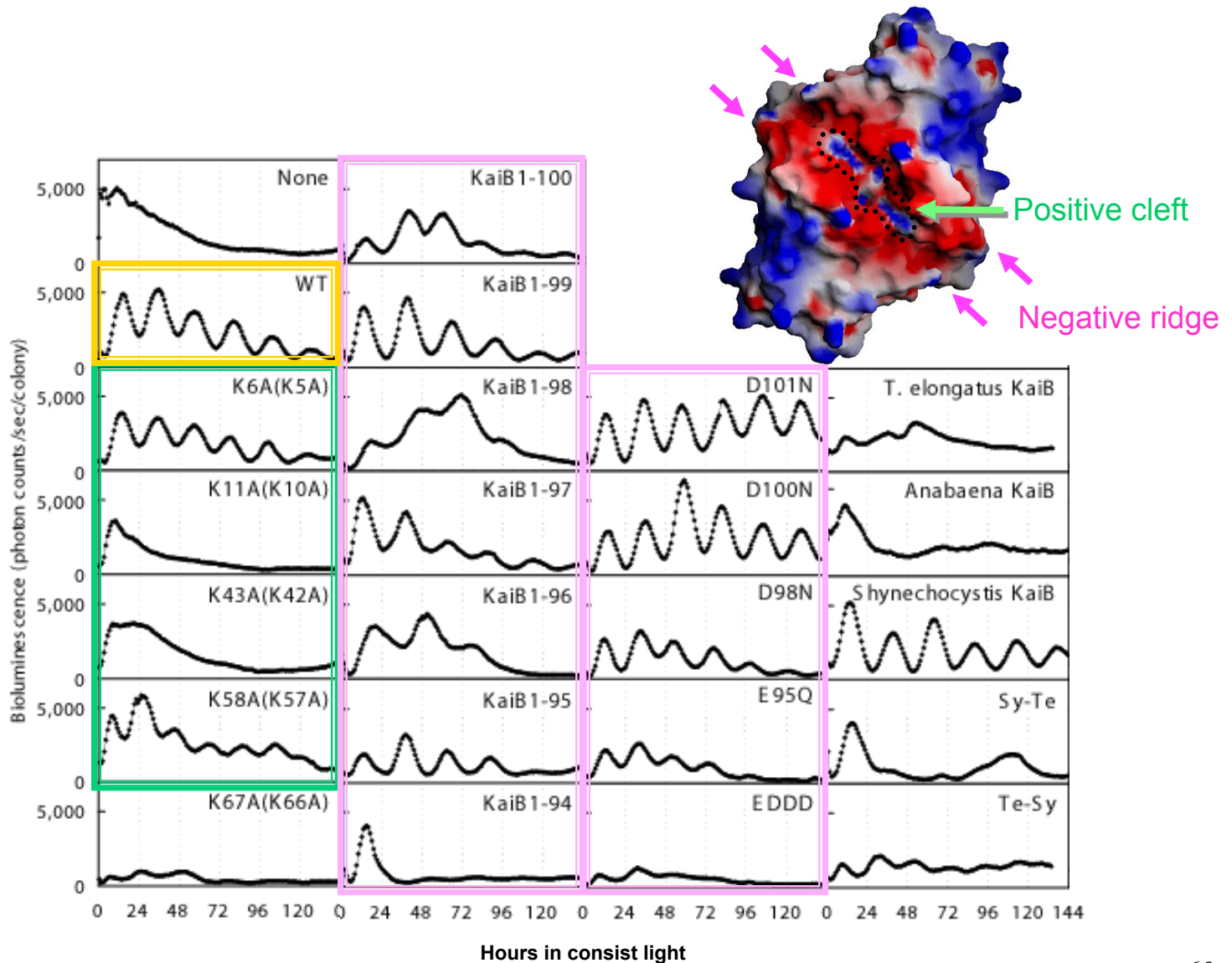
- 酸性アミノ酸領域(Negative ridge)、その奥に位置する正電荷領域(Positive cleft)が機能に関与してる可能性が高い。

Positive cleft はNegative ridgeに隠されている



- C末端酸性アミノ酸領域はコア構造の上に局在し、Positive cleftを囲んでいる。
- Negative ridgeは蝶番のように動くのではないか。

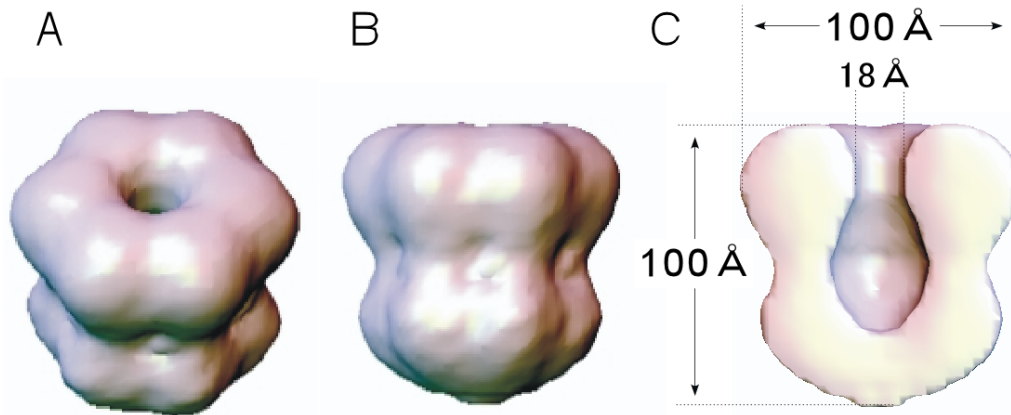
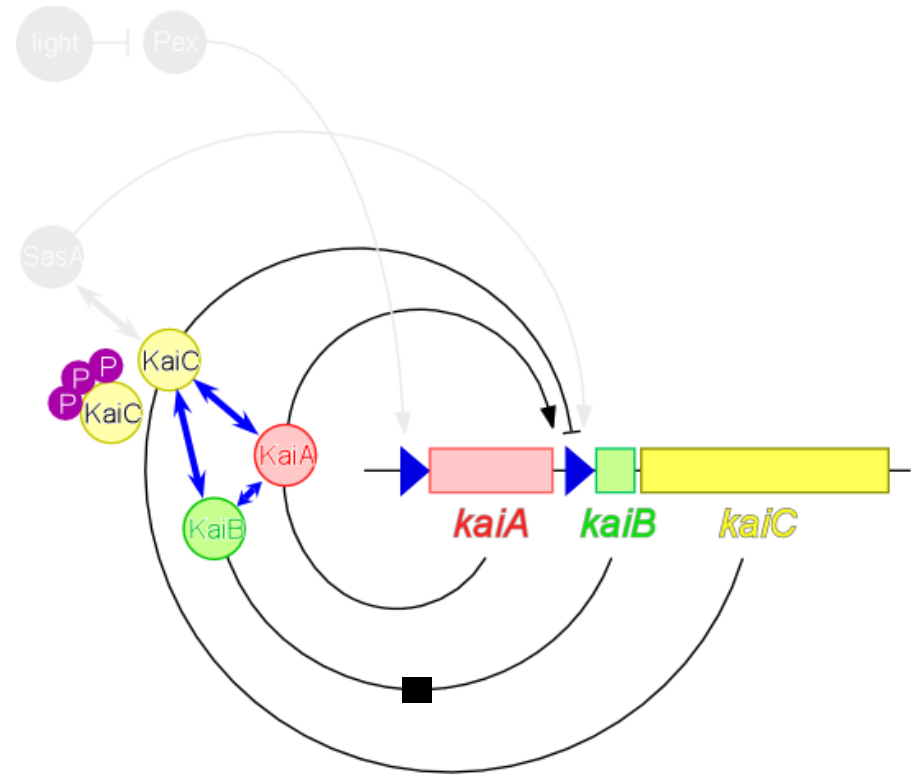
サブ構造のリズム発振機能の解析



The clock: KaiA, KaiB, KaiC

- ・振動子
- ・リズム発振に不可欠

1. Hayasi *et al.*, 2003, **Genes Cells** 8:287-296
2. Hayashi *et al.*, 2004, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 316:195-202
3. Hayashi *et al.*, 2004, **J. Biol. Chem.** 279:52331-52337
4. Hayashi *et al.*, 2006, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 348:864-872



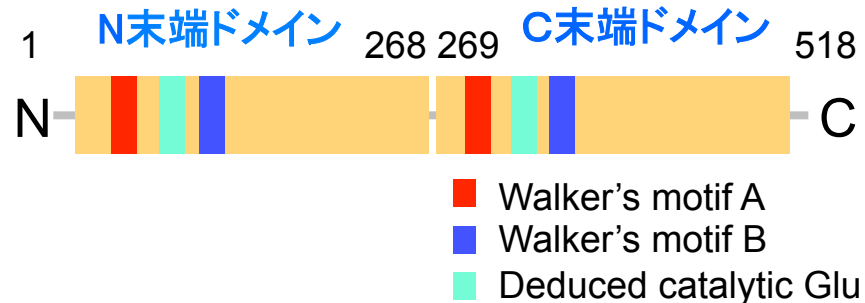
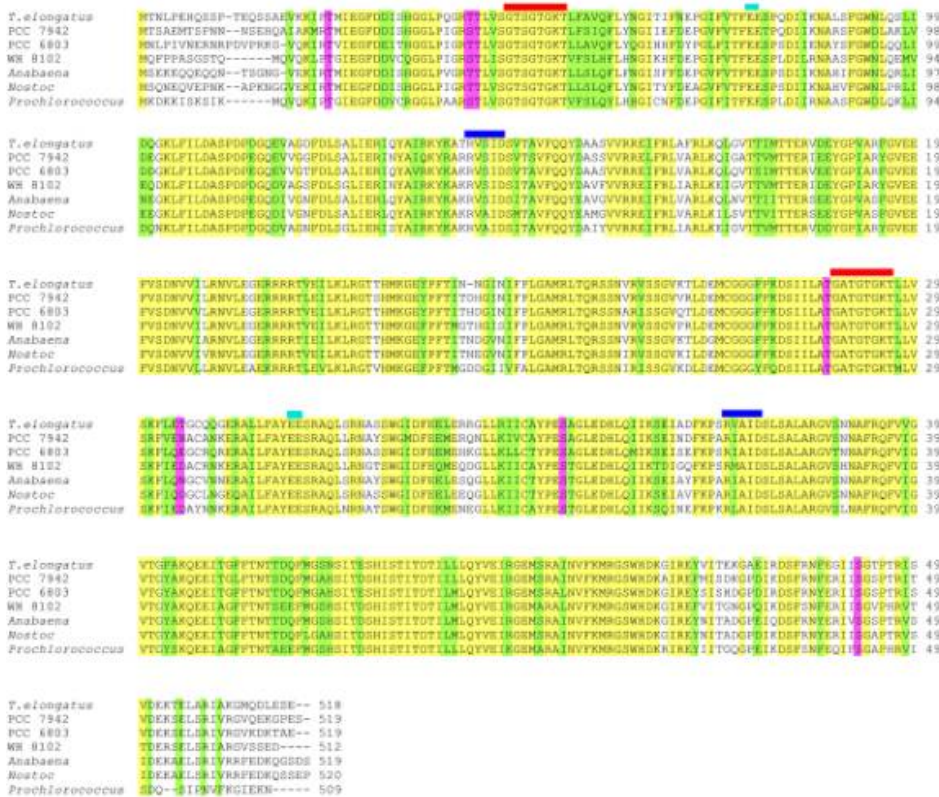
N末端ドメイン: 高親和性ATP結合部位
六量体形成

C末端ドメイン: 低親和性ATP結合部位
熱安定性、リン酸化

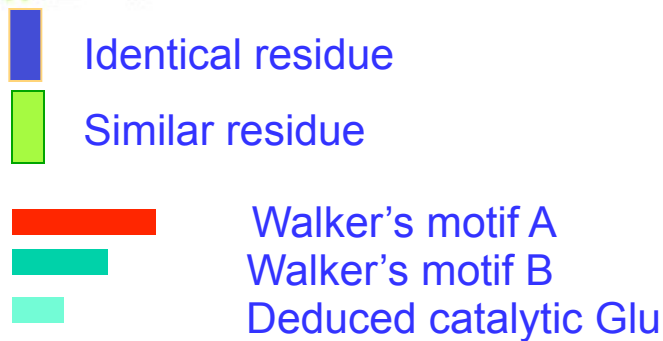
電子顕微鏡像の単粒子解析による立体構造モデル

(大阪大学生命機能研究科難波研究室との共同研究)

藍色細菌に高度に保存されている重複構造のKaiC

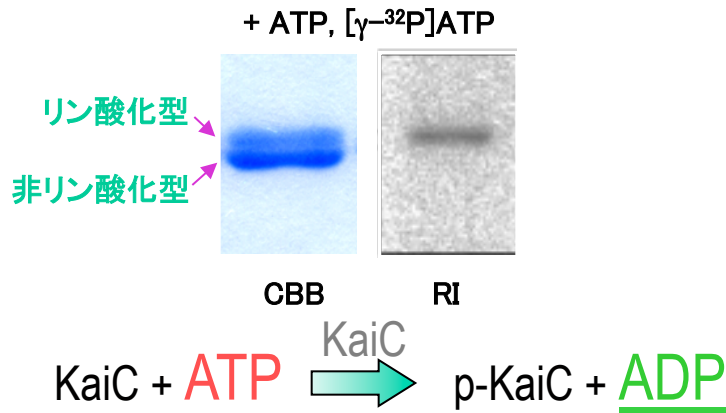


- ゲノム配列が明らかになっている7種の藍色細菌全てにKaiCは高度に保存されていた。
- KaiC (1-518)のN末端ドメイン(1-268)とC末端ドメイン(269-518)のアライメント解析: アミノ酸配列の同一性は23%、相同性は58%であった。
- N末端ドメインとC末端ドメインにそれぞれWalker's motif A, Walker's motif B, Deduced catalytic Glu (CatE)が存在する。
- KaiCは重複構造をとっている。



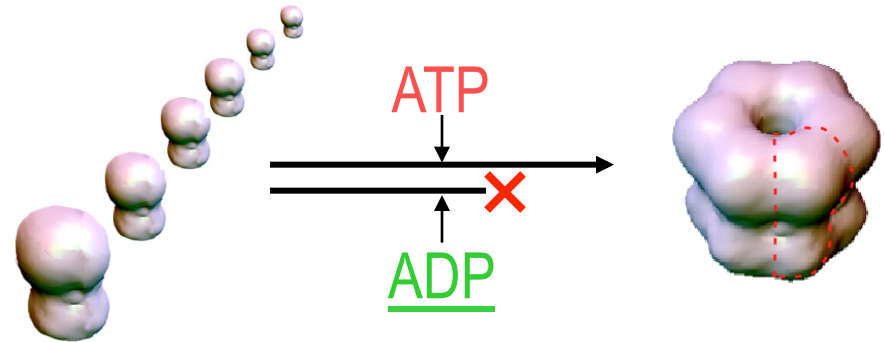
KaiCのATP依存的反応

① KaiCのリン酸化活性



ATPはADPに分解される。

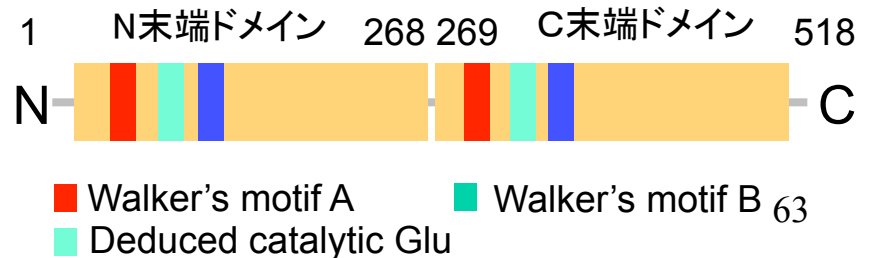
② 六量体ポット状構造の形成



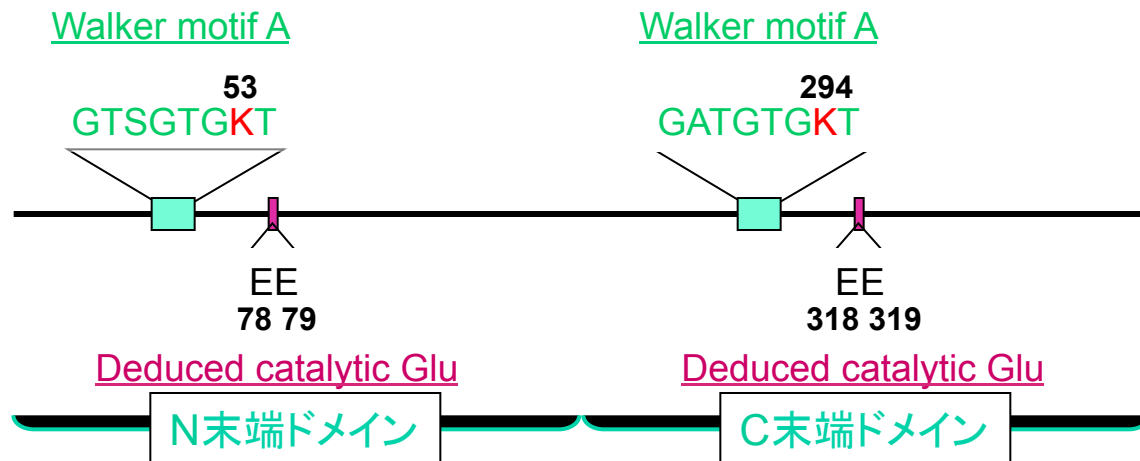
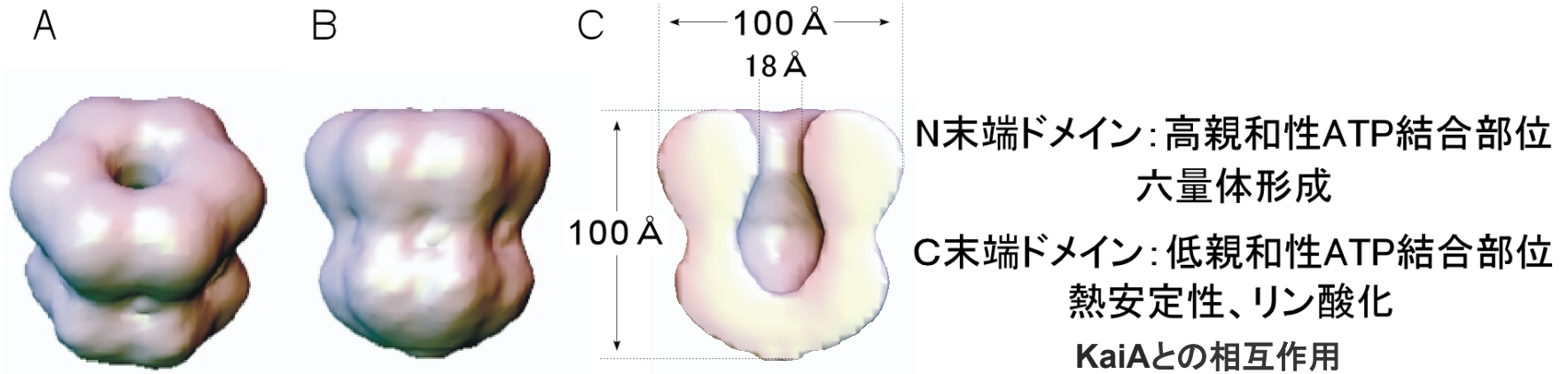
ADPは六量体形成を誘導しない。

ATPが関与する相反する二つの反応はどのようにして両立できているのか？

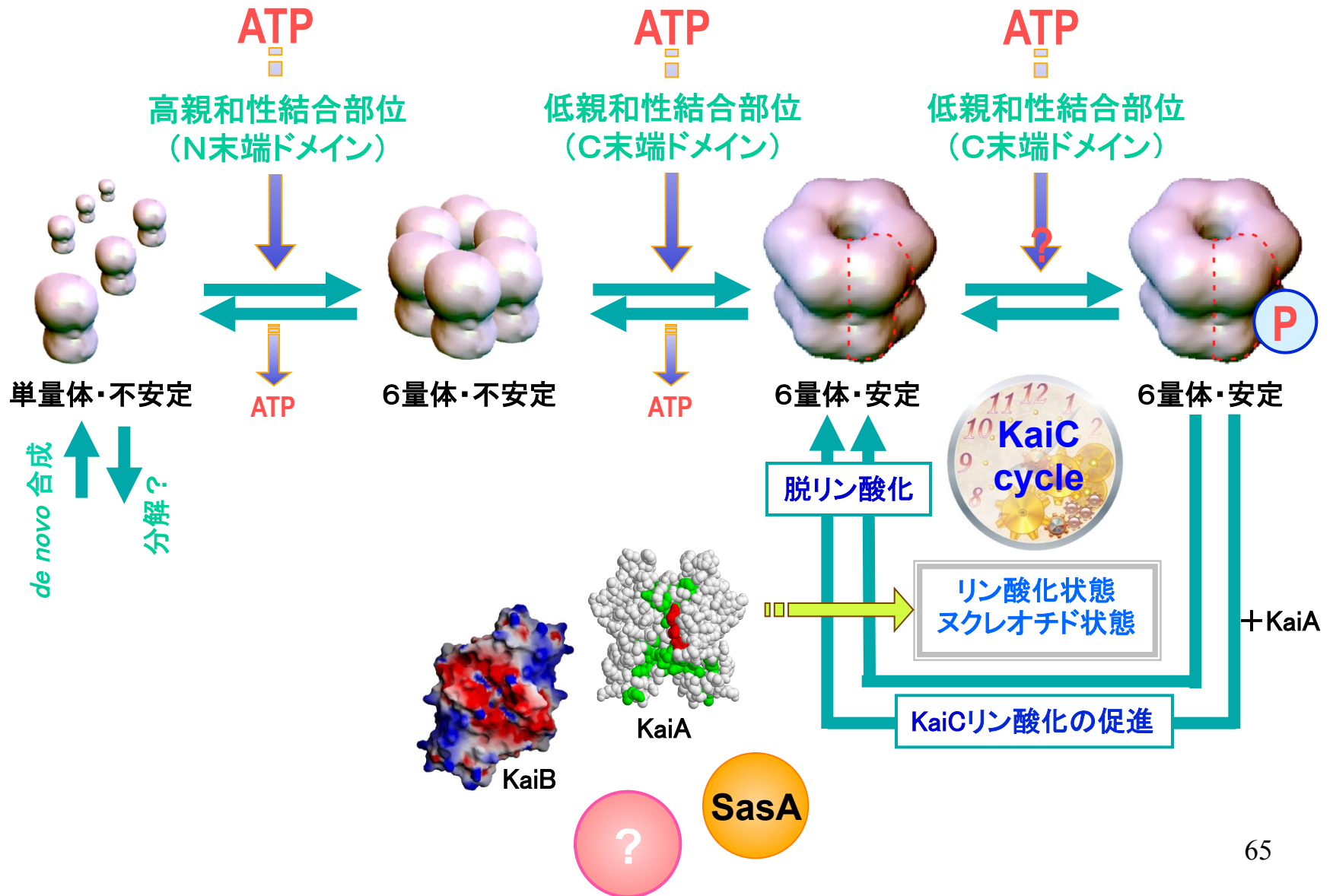
二つのATPase motifには機能分担があるのではないか。



二つのATPase motif の役割



KaiCから見た時計装置

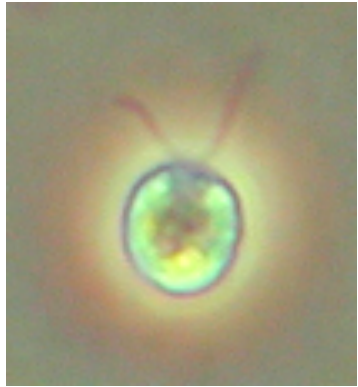


クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*)

1. 概日リズムを示す。
2. 核相が単相(一倍体)である。
3. 寒天培地上でコロニーを形成する。
4. 遺伝子操作が可能であり、核・葉緑体・ミトコンドリアの各ゲノムに遺伝子移入ができる。
5. 高効率な核ゲノムへの遺伝子移入法が開発されており、遺伝子相補を利用した遺伝子クローニングが可能である。
6. 核ゲノム(GC rich)と葉緑体ゲノム(AT rich)におけるコドン使用頻度が特有である。
7. 全ゲノム配列(~100 Mbp)が決定されている。



クラミドモナスの概日リズム研究の歴史



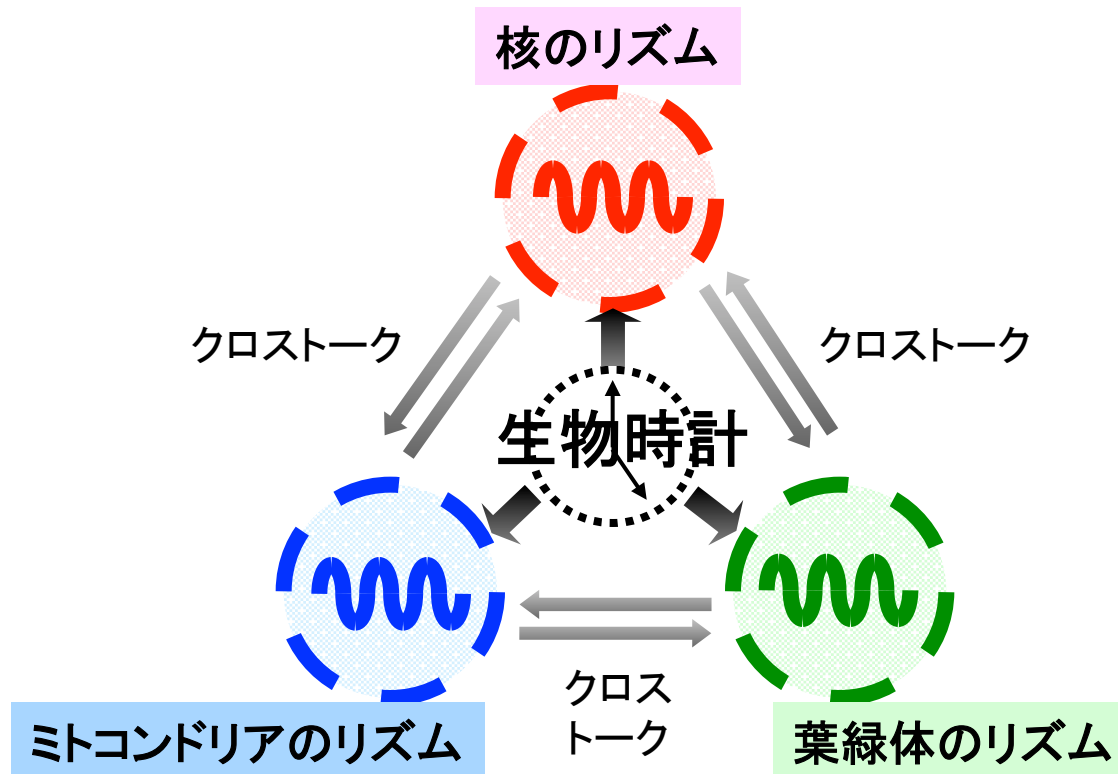
単細胞性緑藻
クラミドモナス
Chlamydomonas

“Green Yeast”
「緑の酵母」

- 1970 走光性と細胞分裂のリズム発見(Victor Bruce)
- 1973 接合活性リズムの発見(石浦ら)
- 1972 リズム突然変異体の分離(Victor Bruce)
↓
per-1, per-2, per-3, per-4,
per-5, per-6, S
- 1979 ガラスへの粘着性のリズムを発見
- 1987 微小重力下での走光性リズム測定
- 1991 走光性リズム位相変異の作用スペクトル解析
- 1992 走化性リズムの発見
- 1994 核遺伝子の発現リズムの発見
- 1996 葉緑体遺伝子の発現リズムの発見
- 2000 紫外線感受性リズムの発見

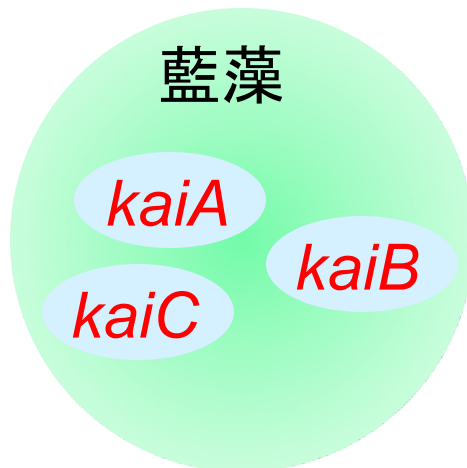
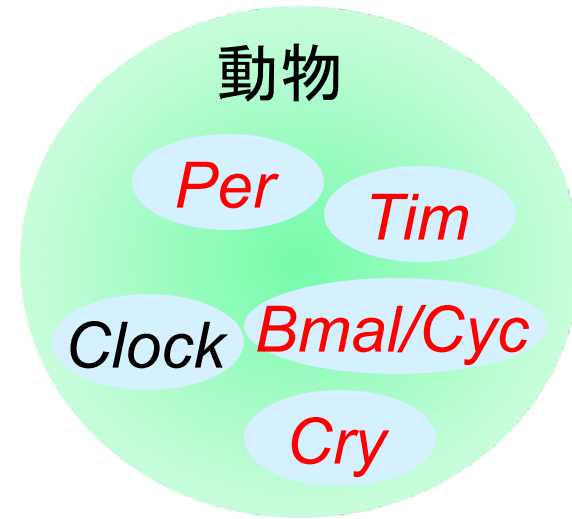
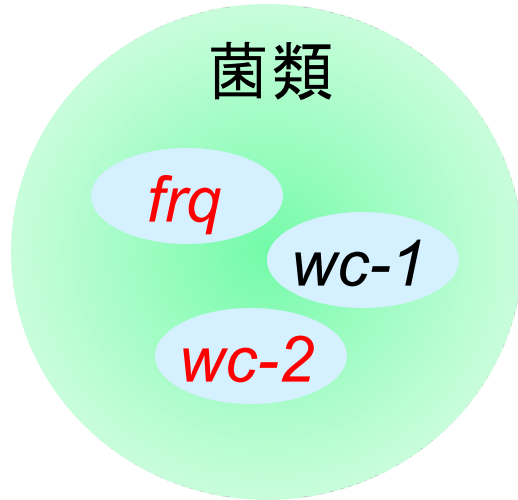
なぜクラミドモナスをモデルとして使うのか1

1. 3つのオルガネラ(核、葉緑体、ミトコンドリア)ゲノムの全てが**形質転換可能**である(クラミドモナスのみ)。
2. オルガネラ間の時間情報の流れを、発光レポーターを用いて詳細に解析できる(ようにした)。



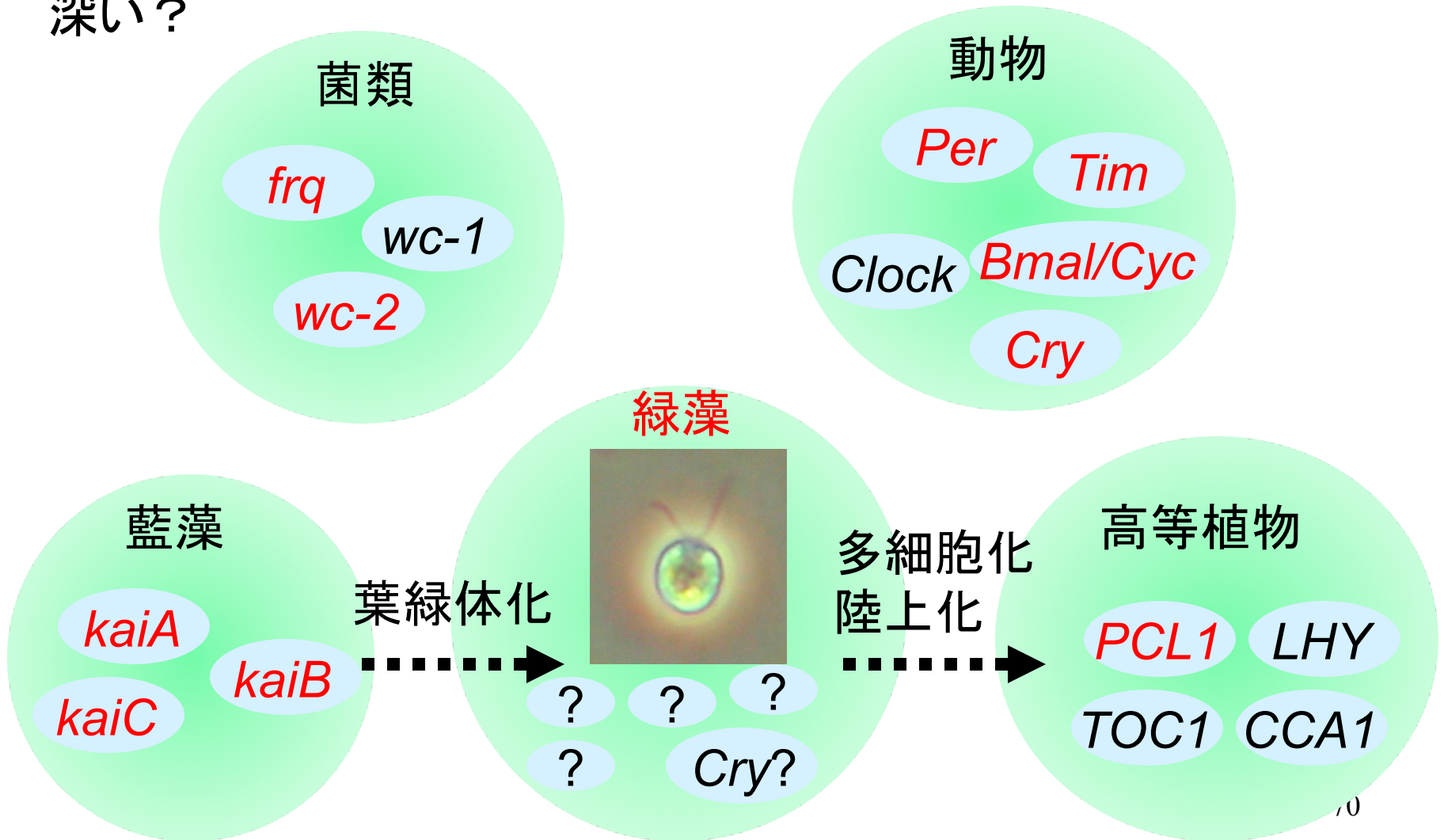
時計遺伝子

生物時計を構成する遺伝子(時計遺伝子)は進化の過程で保存されていない。

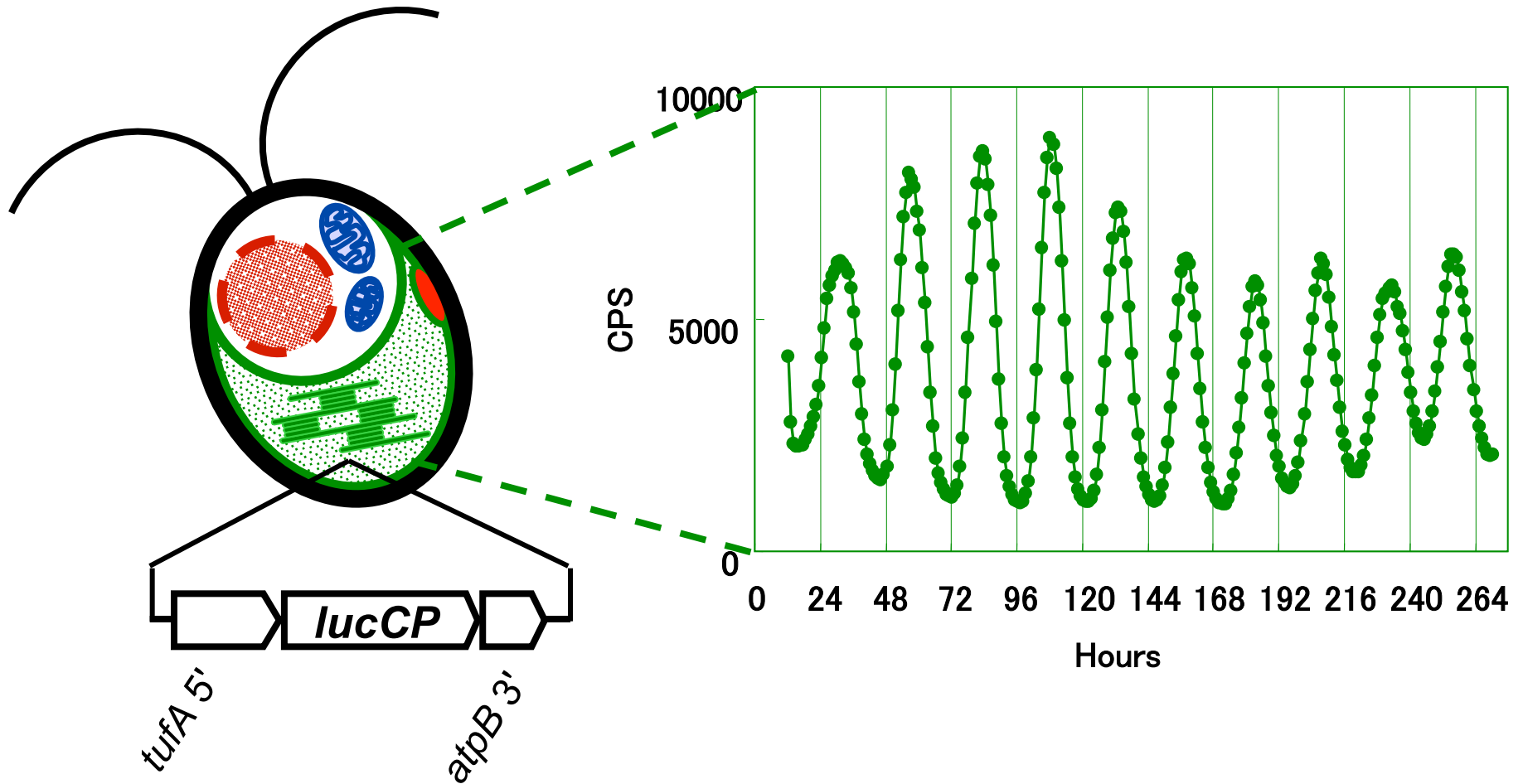


緑藻の時計遺伝子

緑藻の生物時計遺伝子は未だに同定されていない。
どのような時計を持っているのかは、植物時計の進化上大変興味深い？



葉緑体生物発光レポーター株

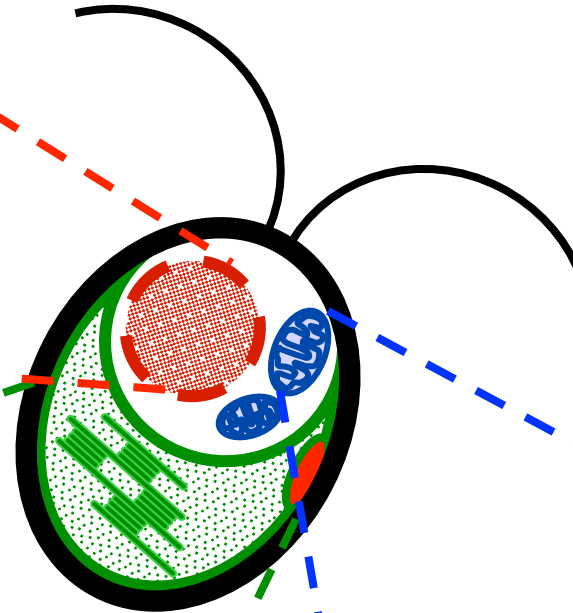
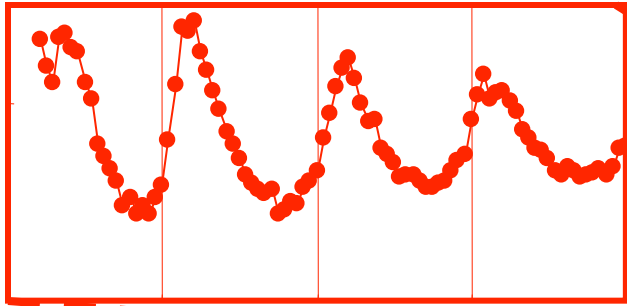


葉緑体ルシフェラーゼ遺伝子

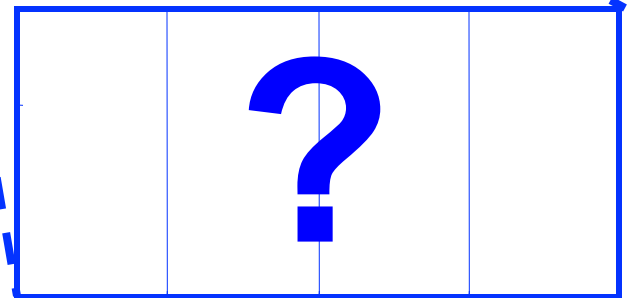
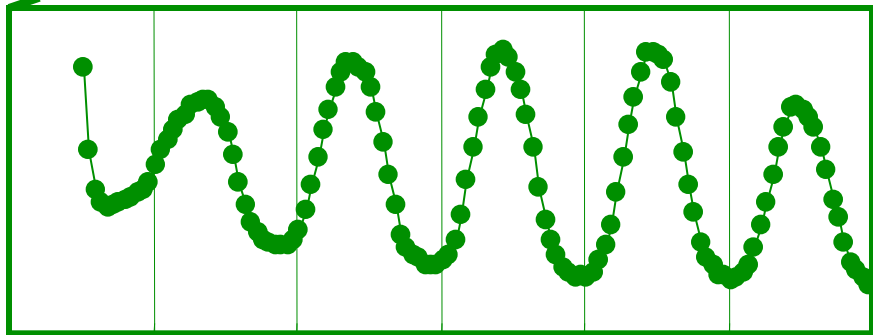
核レポーター株の作製 (松尾ら、未発表)

細胞内3ゲノムの概日リズムモニタリング

核レポーター

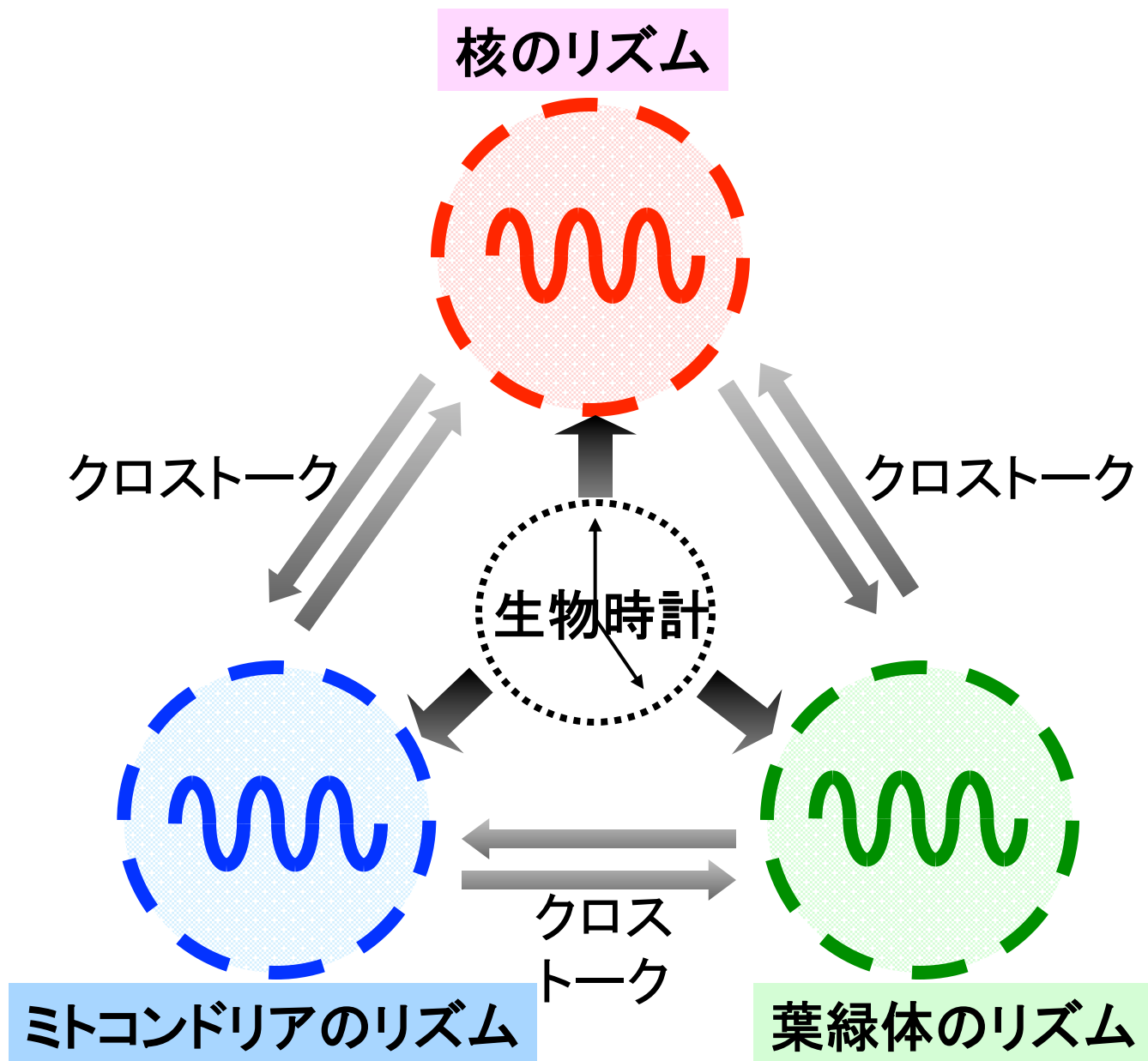


葉緑体レポーター



ミトコンドリアレポーター

オルガネラ間の時間情報のクロストーク



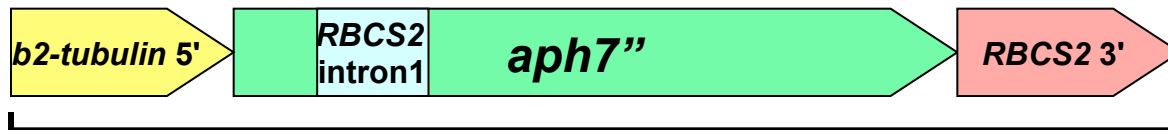
葉緑体発光株を用いた概日リズム変異体の網羅的スクリーニングと原因遺伝子の網羅的同定

(Matuo *et al.*, 2008, *Gene & Dev.* ; 松尾ら、進行中)

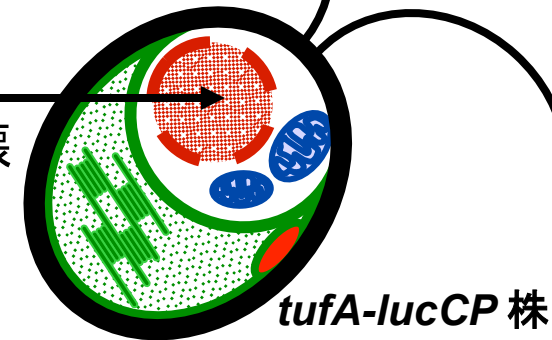
遺伝子タグ配列のゲノム挿入部位の塩基配列を決定することにより、原因遺伝子を同定し、**全ての変異体の原因遺伝子をクローニングする。**

概日リズム変異体のスクリーニング

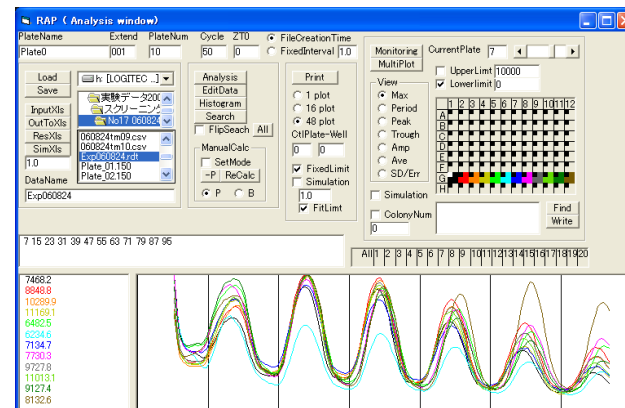
葉緑体レポーター株の核ゲノムにハイグロマイシン耐性遺伝子を移入



ランダムに核ゲノムに挿入され遺伝子破壊
(遺伝子タギング)



~16000のハイグロマイシン耐性クローンの葉緑体リズムを測定



115の概日リズム変異体を単離

遺伝子座数およびGene model

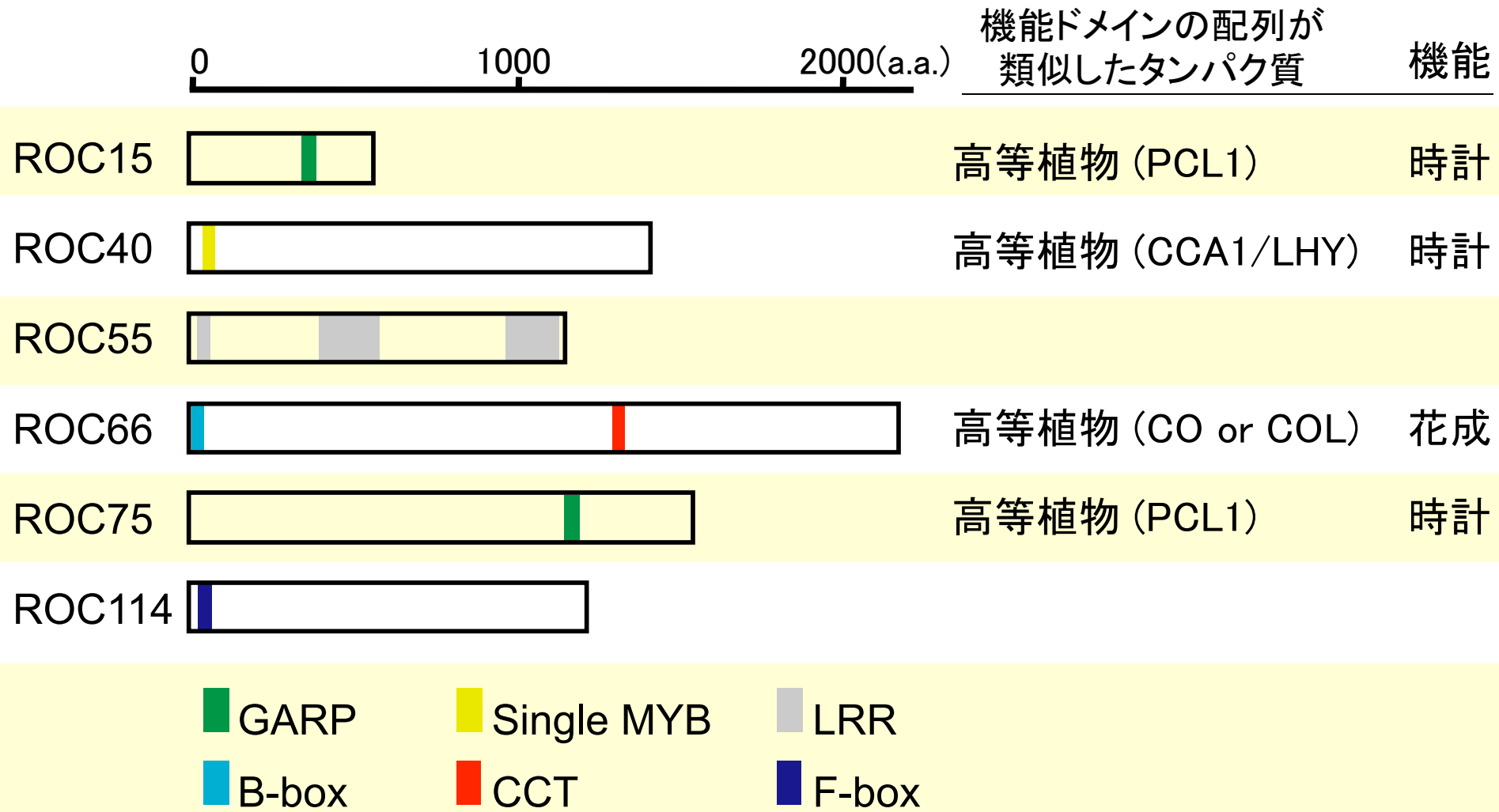
挿入位置を決定できた変異体 (片側のみ決定の場合を含む)	37
遺伝子座	30

▪ Gene modelあり	28
(既知及びアノテーション済遺伝子)	(16)
(未知遺伝子)	(12)

Rhythm of Chloroplast xx

ROCxx

クラミドモナスの時計タンパク質



GARP, Single MYB, B-box, タンパク質がDNAに結合する際に必要なDNA結合ドメインの一種

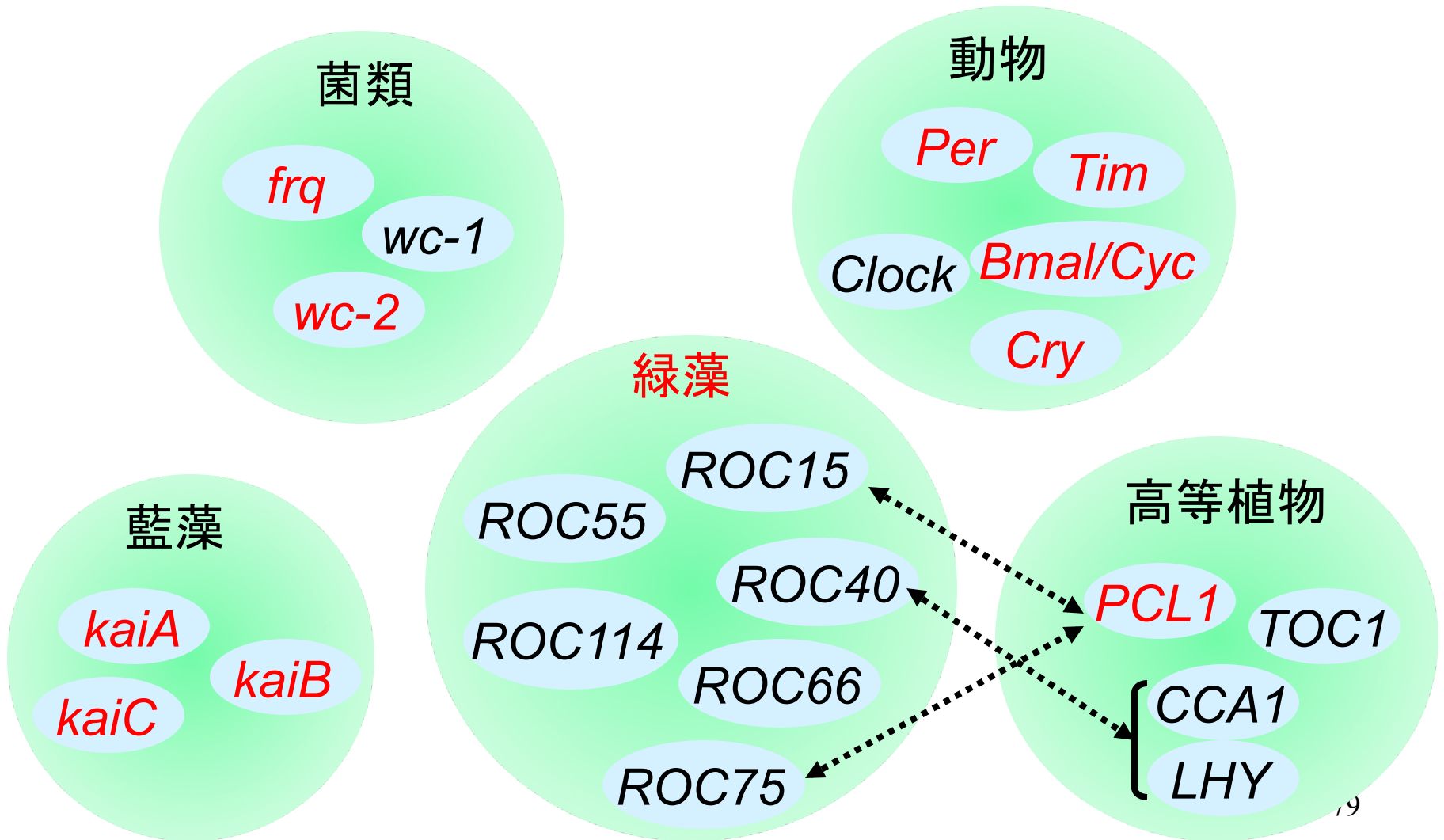
LRR, ロイシンリッチリピート。ロイシン残基が繰り返す特徴的な配列。

CCT, 植物の花成制御遺伝子や時計遺伝子に見られる配列でタンパク質間相互作用に関与する。

F-box, :これを持つタンパク質はF-boxタンパク質と呼ばれ、タンパク質分解に関わるユビキチンリガーゼの構成因子と予想される。

クラミドモナスの時計遺伝子

クラミドモナスの概日時計は、独自の部品と植物的な部品から成る。

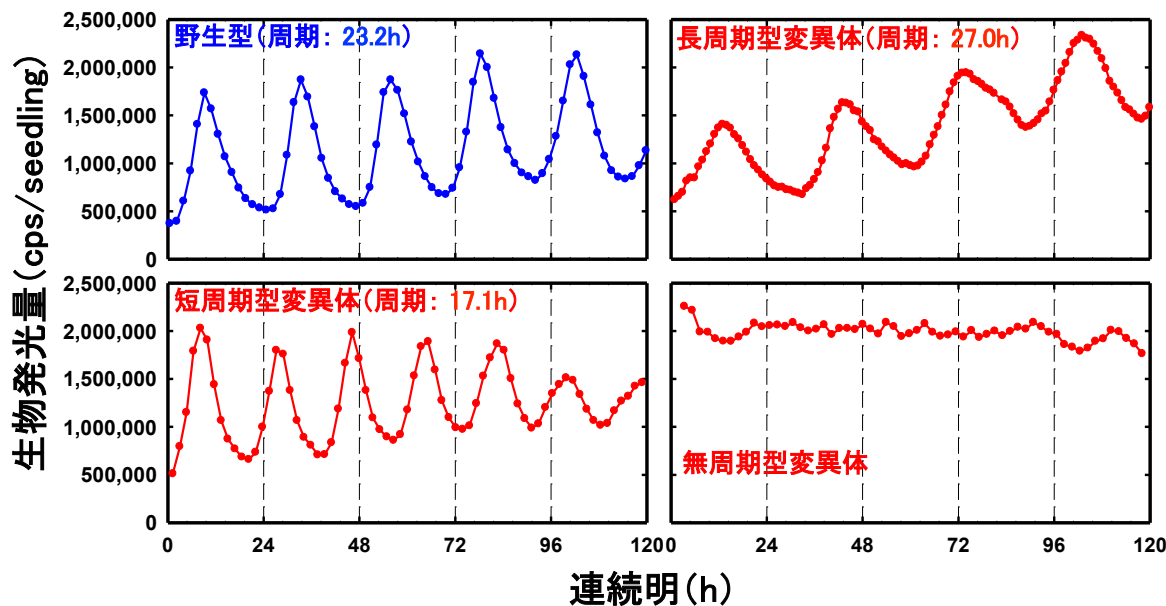


シロイヌナズナの時計遺伝子 *PCL1*のクローニング (小内ら)

1. 生物発光リズム系の開発
2. 突然変異体の分離
3. 時計遺伝子のクローニング

リズム変異体の大規模スクリーニング

代表的なリズム変異体の生物発光パターン

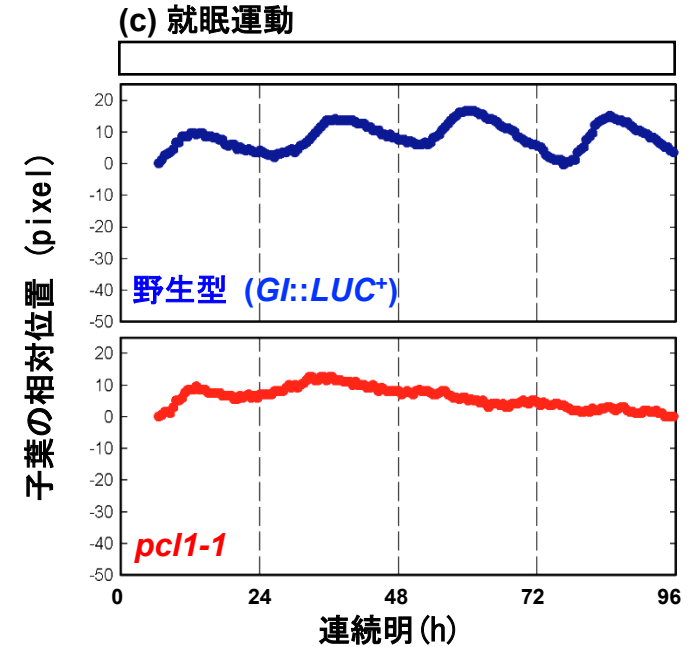
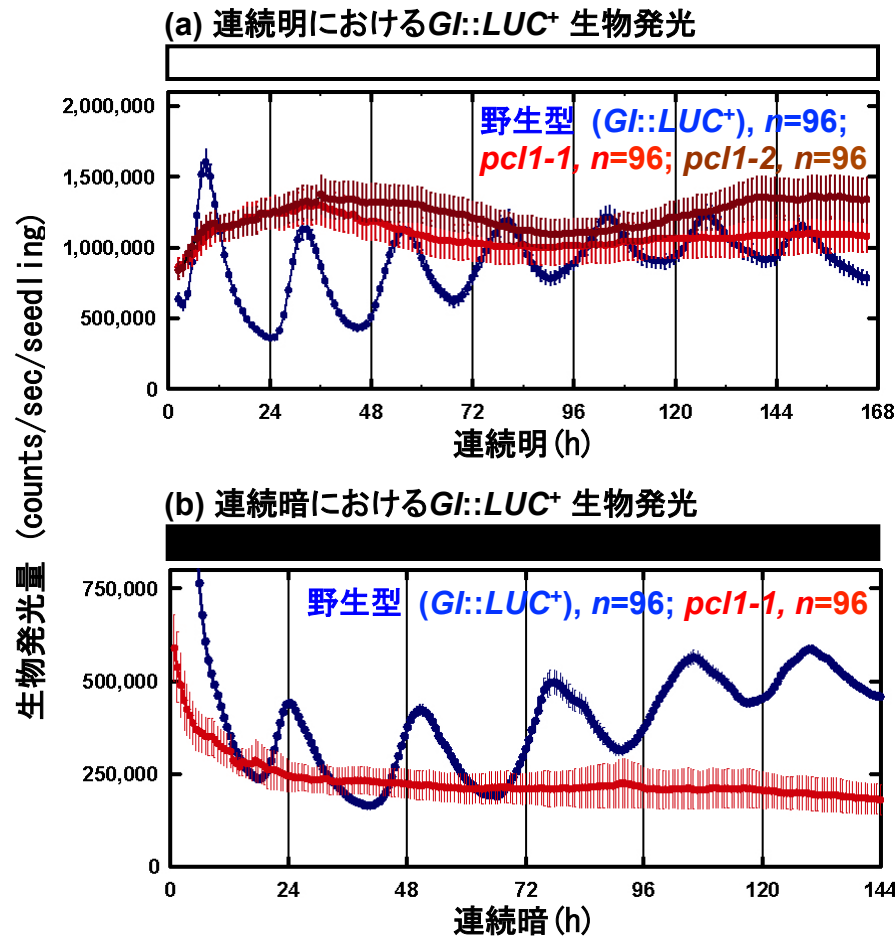


分離したリズム変異体の分類

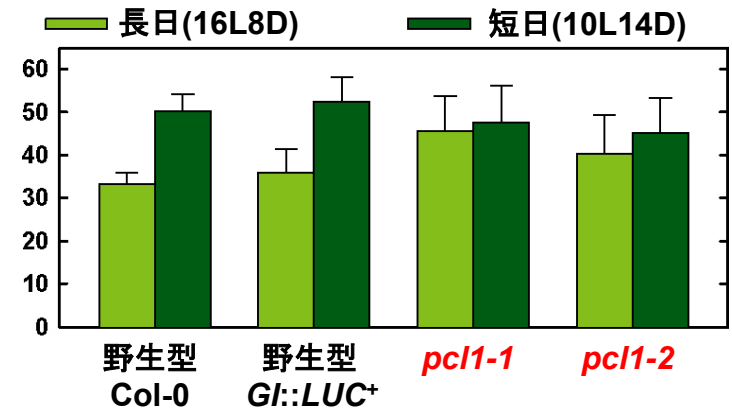
レポーター	分類					計
	無周期型	短周期型	長周期型	長周期位相異常型	位相異常型	
$P_{GI}::LUC^+$	5	9	1	5	0	20
$P_{FT}::LUC^+$	1	5	2	6	1	15
計	6	14	3	11	1	35

- 極めて再現良くきれいな発光リズムを示すレポーター株 ($P_{GI}::LUC^+$ と $P_{FT}::LUC^+$) を作製した。そして、EMSで突然変異を誘発し、**10万個体の M_2 植物体**をスクリーニングした。
- 周期や位相が3時間以上異なる、または無周期である**35個のリズム変異体を分離**し、5グループに分類した。
- **無周期変異体**は3つの相補性群、***PHYTOCLOCK 1* (*PCL1*)**、*PCL2*、*PCL3*、に分類できた。

無周期変異体 *pcl1-1* と *pcl1-2* の表現型



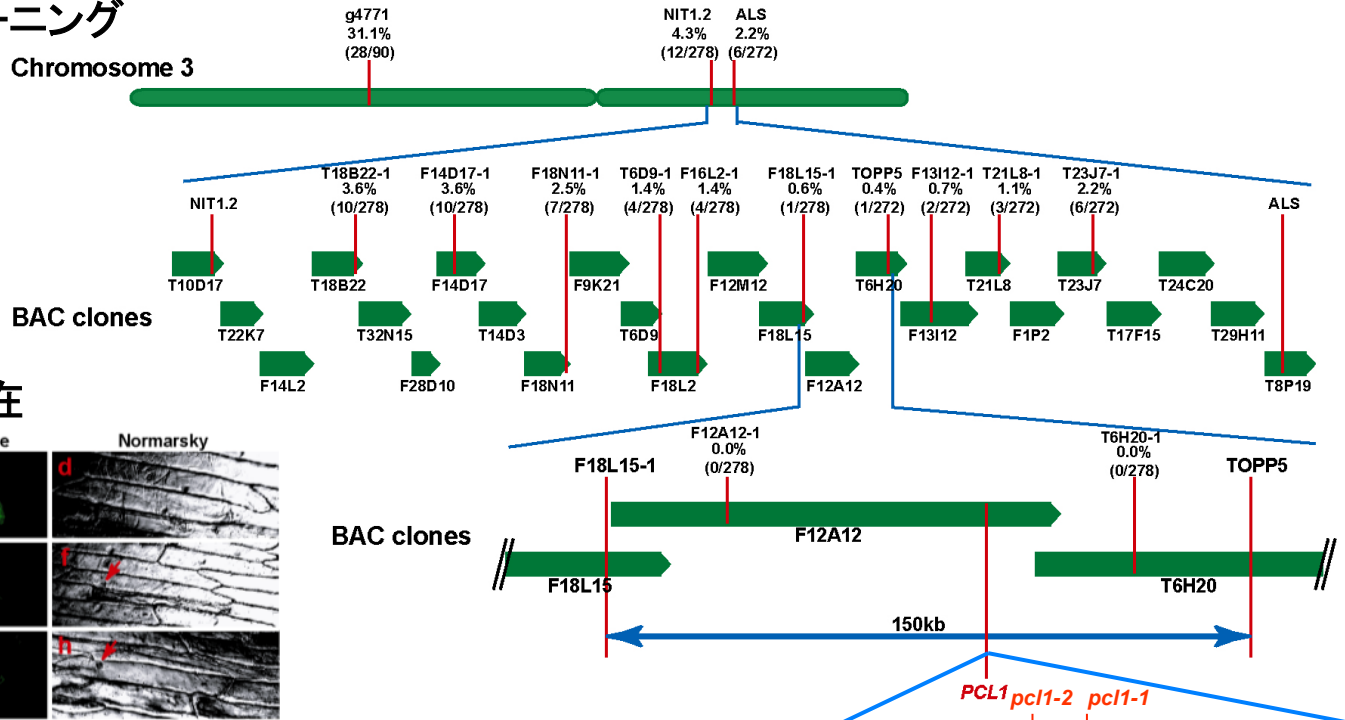
(d) 光周的花成



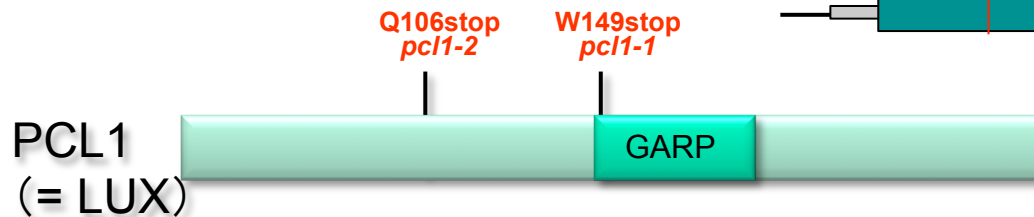
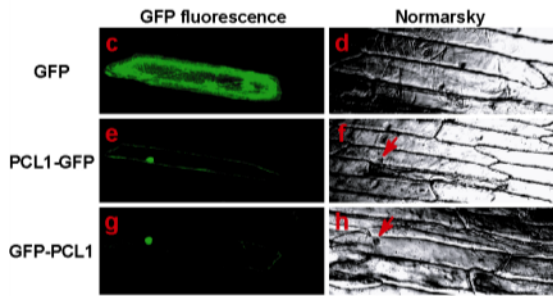
- ・ 概日リズムが**無周期**であった。
- ・ 光周性が**日長不感受性**であった。

PCL1 のマップベーススクローニング

・PCL1 のクローニング



・PCL1の核局在



- PCL1はMyb様DNA結合モチーフである**GARP**を持つ**転写因子**である。
- GARPモチーフ以外では既知のタンパク質との類似性が無かったが、植物一般に広く存在していた。
- PCL1は核に局在する。

課題：時計分子装置の発振機構

1. 時計分子装置(タンパク質複合体)の存在状態ごとの構造解明
2. 素反応の解明とパラメーターの解析
3. 定量的記載とシミュレーション

課題：真核生物の時計分子装置のモデル

1. より単純な真核生物時計分子装置の解明
2. 試験管内モデルの構築

課題：生物発光リアルタイム測定系の応用

様々な生物種、様々な生物現象への応用
ほとんどの生物に応用可能である。

人のやらないことをやる

1. 自分が「面白い」と思えることをやる。
2. 「特殊から普遍へ」
3. 人とは異なる「概念(発想)、材料、方法」を持つ。
4. 必要なものは「自分で作る」。
5. 必要なことは「自分でやる」。
6. 徹底的に「まねる」
7. 足りないものは人に「助けてもらう」(共同は楽しい)。
8. 認められなくても「孤立に耐える」(簡単には認めてもらえない、ずっと無視されるかも)。
9. 「5年間」努力すれば道は拓ける(新しいことができる、ずっとできないかも)。
10. 理学は「自由」、でも自由は苦しい。
11. 「無駄なこと」は一つもない、すべてがどこかでつながる。

理学(研究)の心

1. 役に立つことは尊い。しかし「**直ぐに役に立つことは直ぐに役に立たなくなる**」。
2. 直ぐに役に立つことより、「**面白いこと、のめり込めること、物事の本質**」を究める。
3. 何んの役にも立たない真理はない。「**いずれ必ず何かの役に立つ**」。

生きる力

熱(狂)、情、知、理

謝辞（敬称略）

藍色細菌の研究

近藤孝男さんと近藤研究室の皆さん

Susan Golden

Carl Johnson

Peter Wolk

タンパク質の研究

京都大学薬学研究科

加藤博章、中津亨

大阪大学生命機能研究科

難波敬一、今田勝巳、鈴木博文、古川進朗

柳田敏雄

大阪大学蛋白質研究所

池上貴久

武藤梨沙・栗栖源嗣

大阪大学理学研究科

荒田敏昭

松本卓也

大阪大学産業科学研究所

鉾之原瞳・川合知二

タンパク質の研究

九州大学農学研究科

石野良純

岡山大学理学部

沈健仁

農業生物資源研究所

山崎俊正

愛媛大学総合科学研究支援センター

森田勇人

理学研究科物質理学

神山勉、坂田宗平、長谷川大祐

伊藤繁、青木一洋、小村理行、山川壽伯

三野広幸、田鹿良介

黒澤俊介

榎亙介

遺伝子実験施設

高林厚史

装置・プログラム開発

パーキンエルマー・ジャパン

日立アロカ

古澤孝義、宮本義章、山本晃生

浜松ホトニクス

長谷川寛、岡田晃行

中立電機

白木央、大久保充宏、中村隆司、神谷聡、太田武司、伊藤英樹、
川角康之、梶浦博志

コーネット

鈴木正敏、布施一幸

千葉大学園芸学部

高橋広夫

マイクロニクス株式会社

椿本興業株式会社名古屋支店置

ツジコー株式会社明

生物発光リアルタイム測定など

田畑哲之(かずさDNA研究所)、渡辺正勝(基礎生物学研究所)、福澤秀哉(京都大学大学院生命科学研究科)、下河原浩介(帝京大学医学部)、皆川純(基礎生物学研究所)、オリエンタル酵母工業株式会社、北海道システムサイエンス、MKリサーチ、科学技術交流財団・日本レーザ電子・モリテックス、西本行男(愛知医科大学)、南後守(名古屋工業大学大学院工学研究科)、寺内良平(岩手バイオテクノロジー研究センター)、丸山明子(理化学研究所植物科学研究センター)、長谷あきら(京都大学理学研究科生物科学専攻植物系)、井澤毅(農業生物資源研究所)、魚住信之(東北大学工学研究科)、住斉(筑波大学数理物質科学研究科)、石原健吾(椛山女学院大学)、中西徹(就実大学薬学部)、目加田英輔(大阪大学微生物病研究所)、若松祐子(名古屋大学生物機能開発センター)、木下政人(京都大学大学院農学研究科)、小保方潤一(京都府立大学)、藤堂剛(大阪大学医学研究科)、八木田和弘(京都府立大学)、中村研三(中部大学応用生物学部)、西村芳樹(京都大学理学研究科)、青木摂之(名古屋大学人間情報科学科)、黒岩常祥(立教大学理学部極限生命情報研究センター)、タイテック株式会社、マイクロニクス株式会社、椿本興業株式会社名古屋支店(名古屋市)、塙優(産業技術総合研究所特許生物寄託センター)、伊藤素行(千葉大学薬学研究科)、石黒澄衛(名古屋大学生命農学研究科)、小俣達男(名古屋大学生命農学研究科)、九町健一(鹿児島大学理工学研究科)、矢崎一史(京都大学生存圏研究所)、村中俊哉・池澤 信博(大阪大学工学研究科)、大音徳・米倉円佳(トヨタ自動車株式会社FP)、青木直大(東京大学農学生命科学研究科)、廣瀬竜郎(農研機構中央農業総合研究センター)

植物ゲノム解析分野の皆さん

スタッフ: 杉山康雄、井原邦夫、松尾拓哉

博士研究員: 小内清、林史夫、北島智美、伊関峰生、九町健一、上池伸徳、松尾拓哉、村上怜子

大学院生: 宇津巻竜也(以下博士)、岡本和久、岩瀬亮、立川誠、赤井政郎(生物機能開発センター)、劉致穹、武藤梨沙、Jonathan Valencia Swain、石井健太郎、飯田高広、丹羽由実、坂口誠二(以下修士)、山本晋玄、藤田真康、伊藤紫野、伊藤典代、土屋ゆか、三宅歩、和田ちひろ、尾藤恭平、長谷川大祐(物質理学)、加藤大策、西村篤人、安井聡、石黒彩由奈

卒業研究生: 三宅麻子、杉浦知雄、西本伸、青木一洋(物理)、小村理行(物理)、山川壽伯(物理)、野村聡司(名工大応用化学)、黒澤俊介(物理)、南正大、小松賢司、佐藤洋志、國井雄大、広瀬健太郎、田鹿良介(物理)、木下亜由美、岩田慶太

技術補佐員: 森下めぐみ、西本治美、森岡千里、田中久美子、小川仁子、横田はるみ

学生技術補佐員: 澤田俊介、田邊剛士、野口直洋、中村真知子、稲田博、中岡由貴、児島俊貴、林真一、三木麻莉子、中村有美子、三井浩嗣、佐々木妙子、山内康久

事務補佐員: 浅井晶子、森川環、小坂井ふじ江、山村佳美

杉浦昌弘遺伝子実験施設長
小林猛遺伝子実験施設長
遺伝子実験施設の皆さん
生命理学専攻の皆さん
理学研究科の皆さん
名古屋大学の皆さん

楽しい研究者人生を送らせて
いただきまして本当に有難う
ございました。

皆様のご健康とご
多幸を祈ります。