

## 形とはたらき」研究領域 領域活動 評価報告書

- 平成 14年度終了研究課題 -

研究総括 丸山 工作

### 1. 研究領域の概要

生物、無生物などに見られる多様な形とその意義、できかた、相互作用、系の形成、環境への適応などの「はたらき」を研究する。例えば、「形」を利用した分子認識、分子集合体の構築、それら集合体による高次構造の形成、できあがった高次構造の機能、高次構造の究極な「形」である生命、動植物でみられる寄生、共生、擬態などによる系の形成、環境への適応に関する研究などを含む。

### 2. 研究課題、研究者名

別紙一覧表参照

### 3. 選考方針

選考は「形とはたらき」領域に設けた選考会議でおこなう。会議は研究総括および選考アドバイザー（領域アドバイザー、7名）により構成し、研究総括が統括する。

基本方針は以下の通りとする。

選考方法は、書類選考、面接選考および総合選考とする。

(1) 独創的な発想に恵まれ、活力に富み、自ら研究を実施するものを優先する。より具体的には、実績がなくてもアイデアが素晴らしい人、チャレンジする人に優先して機会を与える。

(2) 基礎的な研究（理論的研究を含む）を対象とする。

### 4. 選考の経緯

1応募課題につき担当選考アドバイザー2名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選定した。続いて面接選考および総合選考により、採用候補者を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採用者数
対象数	236人	21人	8人

### 5. 研究実施期間

平成 11年 10月～平成 14年 9月

### 6. 領域の活動状況

領域会議 10回、さきがけ研究報告会 3回（東京）を開催し、研究進捗状況の報告と討論、研究交流を図った。また研究総括は研究者を訪問し、研究実施場所の調査と研究進捗状況の把握を行った。

### 7. 評価の手続き

研究総括が個人研究者からの報告を基に必要なに応じて領域アドバイザーの協力を得て行った。また、一般公開の研究報告会において産官学の参加研究者から研究成果に対する意見、評価を

受け、それらを参考にした。

(評価の流れ)

平成 14年 9月	研究終了
平成 14年 11月	研究報告会開催
平成 15年 1月まで	研究報告書及び自己評価提出
平成 15年 2月	研究総括による評価

## 8. 評価項目

- (1) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献

## 9. 研究結果

限られた時間の中で成し遂げられた8人の研究成果は、それぞれ刮目すべきものがあり、3年間の援助が有効であったことは明白である。なかでも小林 一也のプラナリア有性生殖誘導因子は物質同定寸前にあり、決定されれば、その作用の解明から遺伝子同定が可能となり、性と生殖に関して新しい分野を開拓すると期待される。橋本 主税の頭部形成に関わる遺伝子群の発見も、これまでの定見を打ち破って新しいアプローチへと発展しよう。浅見 崇比呂(巻貝の左右性)、細谷 浩史(ミドリゾウリムシに寄生する共生藻)と西中 太郎(DNAを回転させるRecA)の研究はそれぞれさきがけ研究にふさわしい萌芽的研究で、これからの展開が大いに期待される。小田 洋一(脳のセグメント構造)と片山 栄作(1分子3次元像再構成法)は注目される発展的研究を成し遂げた。また徳永 信の新有機化学合成法はすでに「役に立つ」基礎化学のモデルになっており、医薬中間体などの合成への応用が期待される。

以上概観したように、大部分の研究はきわめて基礎的な命題に取り組み、これまでの常識を覆すような、あるいは世界にさきがけた知見を得ている。まさにさきがけ的研究で、これからの発展により生命の理解を深める力となっていくであろう。

しかしながらこの8人の中から、研究費の使途において、伝票記載と異なる物品が納入されるなど、一部について不正経理を行なった研究者を出してしまったことは、まことに遺憾であり、研究総括として責任を痛感している。

## 10. 評価者

研究総括 丸山 工作 独立行政法人 大学入試センター 理事長

### 領域アドバイザー氏名

岩槻 邦男	放送大学 教授
佐藤 矩行	京都大学大学院理学研究科 教授
鈴木 正昭	岐阜大学工学部 教授
瀬高 信雄	独立行政法人 物質・材料研究機構 非常勤顧問
星 元紀	慶應義塾大学理工学部 教授
柳田 敏雄	大阪大学大学院医学系研究科 教授
吉里 勝利	広島大学大学院理学研究科 教授

・ 参考)

(1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	0	28	28
口頭	33	17	50
出版物	4	0	4
合計	37	45	82

(2) 特許出願件数

国内	外国	計
2	3	5

(3) 受賞等  
なし

(4) 招待講演  
国際 2件  
国内 14件

## 形とはたらき」領域 研究課題名及び研究者名

研究者名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (応募時所属)	研究費 (百万円)
浅見 崇比呂 (兼任)	<u>巻貝の左右性とはたらき</u> (信州大学理学部)	信州大学理学部 助教授 (同上)	52
小田 洋一 (兼任)	<u>脳のセグメント構造に見られるパラレルプロセッシング</u> (大阪大学大学院基礎工学研究科)	大阪大学大学院基礎工学研究科 助教授 (同上)	45
片山 栄作 (兼任)	<u>1分子の3次元像再構成法に基づく分子モーター作動機構の探索</u> (東京大学医科学研究所)	東京大学医科学研究所 助教授 (同上)	40
小林 一也 (専任)	<u>プラナリアにおける生殖戦略転換機構</u> (慶應義塾大学理工学部)	科学技術振興事業団さきがけ研究21 研究者 (東京工業大学生命理工学部研究生)	43
徳永 信 (兼任)	<u>人工触媒で水が付加する反応の位置や立体を制御する</u> (北海道大学触媒化学研究センター)	北海道大学触媒化学研究センター 助教授 (理化学研究所有機金属化学研究室 基礎科学特別研究員)	37
西中 太郎 (専任)	<u>相同組換え時に DNA を回転させる蛋白質 RecA</u> (東京大学生産技術研究所 野地研究室)	科学技術振興事業団さきがけ研究21 研究者 (理化学研究所遺伝生化学研究室 基礎科学特別研究員)	55
橋本 主税 (兼任)	<u>頭部の形成に関わる分子機構</u> (JT 生命誌研究館)	JT 生命誌研究館主任研究員 (京都大学大学院生命科学研究所 助手)	49
細谷 浩史 (兼任)	<u>共生藻を利用した原生動物の生存戦略の多様化</u> (広島大学大学院理学研究科)	広島大学大学院理学研究科 教授 (広島大学理学部 教授)	59

## 研究課題別評価

1. 研究課題名：巻貝の左右性とはたらき

2. 研究者氏名：浅見崇比呂

3. 研究の狙い：動物は、内臓の形にあきらかなとおり、左右が非対称な形をしている。このからだの左右軸（極性）が反転した鏡像体は一般に進化していない。対照的に巻貝では、巻き方向だけではなく、体中の左右がすべて反転した左巻と右巻の鏡像体がくりかえし進化した。しかし左巻は、約7万種の巻貝のうち1割にみえない。この巻貝の左右進化には、左右の生態（はたらき）をめぐる疑問が累積するものの、実証的な研究は皆無に等しい。本研究の究極目的は、野生の集団にみつける鏡像遺伝子に着目し、その生態（はたらき）と進化プロセスを追究し、鏡像体の進化を妨げる、または促進する原因を検証することにある。この目的を遂行するために、(1) 遺伝システム、(2) 発生システム、(3) 行動生態、(4) 左右二型の時空動態、の4つの問題にアプローチした。

4. 研究結果：

(1) 遺伝システム 通常は右巻のオナジマイマイで、左巻を産む変異系統では、同一個体の母親が左巻と右巻の子どもを産むことを明らかにした。これは、古典的な遅滞遺伝モデルの予測とは反する。左巻と右巻を産む変異形質は、単一の劣性の対立遺伝子により決定される。この変異遺伝子は、極性決定能の欠失により生じたと考えられる。類似の現象を、通常は左巻のスグヒダギセルでも発見した。右巻を産む変異系統からは、大多数の左巻と少数の右巻が産まれる。ソトモノアラガイでは、ほとんどの系統では、その例外的な逆巻が産まれることがない。タケノコモノアラガイの場合、同一の母親から右巻と左巻が産まれる現象は観察されていない。これまで単純な遅滞遺伝モデルで説明されてきた左右極性の遺伝システムは決して一様ではなく、左右反転の遺伝的変異それ自体に複数のシステムが存在することが明らかである。

(2) 発生システム 右巻のタケノコモノアラガイで発見し左巻遺伝子が極性決定能を欠いていることを、受精卵を卵殻から摘出する実験で確認した。受精卵は、卵殻内の高張液の高い浸透圧のもとで発生する。受精卵をとりだし、等張液で培養すると、左巻予定胚はほぼ半数が右型に卵割した。右巻予定胚は、卵殻内外で通常の右型に卵割した。第一卵割より後に卵殻から摘出すると、左巻予定胚で右型卵割をするものは25%に減少した。左巻予定胚は、左右極性を維持する力が右巻予定胚よりも著しく弱いことがあきらかである。

同時雌雄同体の、左巻遺伝子のホモ接合体と右巻遺伝子のホモ接合体を交配すると、前者の産む子供は左巻に、後者が産む子供は右巻に成長する。だが、成長の左右極性にかかわらず、左巻と右巻の子供はすべてヘテロ接合体であり、ゲノム組成が平均して同じである。したがって、殻の形をきめるポリジーンも、左巻と右巻の子供の間で異なる。ところが、左巻と右巻とでは、殻のサイズも形 (shape) も異なり、たがいに鏡像対称には成長しないことが判明した。すなわち、発生の左右極性しだい、核ゲノムに決定された殻の形が異なって発現する発生拘束を実験的に検出した。

自然集団の左右二型に着眼し、ハワイマイマイ種群の右巻と左巻の殻の形を比較した。母性効果による左右極性の遅滞遺伝に起因して、共存する左右二型の個体群は、生殖的には隔離されず、同一の遺伝子プールを共有する。にもかかわらず、同一地点で採集された左右二型の殻は、互いに鏡像対称から有意にずれた形をしていること、および左右二型の異なり方は一様では

なく、どう異なるかが集団により異なることを証明した。左右極性の遺伝的決定システムと集団間で分化した殻形態の遺伝的決定システムの間で交互作用 (エピスタシス) が生じていることが明らかである。

(3) 行動生態 : タケノコモノアラガイは、鏡像型 (左巻) と実像型 (右巻) の間で、従来の予想に反する体位により交尾を実現することが判明した。すなわち、通常の求愛・交尾行動では物理的な交尾が達成できない場合に、水棲のモノアラガイが通常とは大きく異なる交尾体位を実現することにより自分とは鏡像の相手との交尾を達成する。しかし、左巻 × 右巻の求愛・交尾の相対成功率は、同じ巻型同士の交尾と比べ統計的に有意に低い。ゆえに、鏡像型に対する正の頻度依存淘汰が生じている。この淘汰に加え、鏡像対称の形態形成を妨げる発生拘束に起因して、鏡像型に対する安定化淘汰が生じていることは、発生システムに関する前述の結果が強く示唆しているが、その実証は今後の課題である。

(4) 左右二型の時空動態 : ドイツの池で 2000 年にタケノコモノアラガイの左巻変異を発見し、左右巻型の遺伝子頻度の変動パターンを追跡した。左巻遺伝子の頻度は、1 年間で 0.051 から 0.156 に上昇した。これは、たとえ正の頻度依存淘汰が生じていても、集団サイズの減少によるランダムな遺伝子頻度の変動が、淘汰の効果を消して上回ることが容易に生じることを示している。岡山大学農学部構内で、スグヒダギセルの右巻変異をもとに、左右巻型の遺伝子頻度の変動パターンを追跡した。交雑実験によりスグヒダギセルでは左巻が優性であることが判明した。この遺伝様式をもとに、集団の遺伝的構造を解析した。Hardy-Weinberg の平衡を仮定した場合と、採集個体すべてに繁殖させ直接に右巻遺伝子のホモ接合体を検出した場合とで、右巻遺伝子頻度を比較することにより、右巻ホモ接合体に対する淘汰圧を検出することに成功した。淘汰圧は 0.468 と推定され、この値は、対面交尾するオナジマイマイで実測された淘汰圧 0.90 と比べ大きく緩和されており、背面交尾するスグヒダギセルでは左巻 × 右巻の交尾が相対的に容易であることに起因すると考えられる。

## 5. 自己評価 :

現在、脊椎動物の左右極性については、発生の分子機構の理解が進んでいる。しかし、なぜ鏡像進化が抑制されているのか、この問題は手つかずの状態にある。本研究の 3 年間の最も大きな成果は、この鏡像体の進化を抑制または促進する究極要因に直接にかつ実験的にアプローチする基盤を確立できたことである。

具体的には、オナジマイマイ、タケノコモノアラガイ、スグヒダギセルの 3 種の鏡像システムを用いる実験系を確立した。いずれの系も、野生集団で検出された遺伝的変異をもとにした巻貝の鏡像システムであり、世界で類がない。ゆえに、これら 3 種の間で、左右極性の遺伝様式が異なるという常識に反する結果も、世界にさきがけて立証することができた。これらの実験系は、左右性の分子機構それ自体と、その進化プロセスの分子機構の追究を可能にするものである。さらに、左右二型が共存するマレイマイマイ、およびタケノコモノアラガイの野生集団を対象とした進化学の *in vivo* 研究を可能にした。あくまでも実験的アプローチによるものでありながら、長期にわたる野生集団の動態追跡なしには答が得られない。野生集団を対象としたこれらの研究の著しい特色は、世界にさきがけた実証研究であり、かつ鏡像進化の実験的研究であることである。

本プロジェクトにより、自然の集団に実在する遺伝資源を、進化の実験的研究のために実用化できたのは、遺伝資源の系統維持を可能にする設備投資が実現したからにほかならない。実験室そのものの建設工事に追われた 3 年間であったが、世界にさきがけたエボエコデバ (evolutionary ecology and developmental biology) の研究基盤・実験系を整備することができたこ

とは大きな成果であると確信している。しかし、これまでの成果の国際誌での publication が現時点で実現していないのは大変に遺憾である。論文発表により世界を驚かせ、左右非対称性の進化学の流れを創ること、それが最も重要な緊急の責務であると認識している。

#### 6. 研究総括の見解：

貝の左巻きと右巻きは、体のつくりが鏡像の関係にあり、その遺伝子とその発生中の作用は生物学の謎のひとつにとどまっている。この研究では3種類の淡水貝で左巻き純系を世界で始めて確立した。これから遺伝解析と遺伝子同定の研究が始まる。その成果が大いに期待される。さきがけ研究の3年としては典型的な成功例といえよう。できるだけ早い機会にしかるべき国際誌に掲載して世界に知らしめることが肝要である。

#### 7. 主な論文等：

##### (1) 論文

Hiroshi Fukuda, Takahiro Asami, Hiroyoshi Yamashita, Masanori Sato, Shigeo Hori and Yasuhiro Nakamura, "Marine molluscan and brachiopod fauna of Tanoura, Nagashima Island, Kaminoseki-cho, Yamaguchi Prefecture, Japan," *Yuriyagai* 2000, 7, 115-196.

Keiichi Seki, Shin-ichi Inoue and Takahiro Asami, "Geographical distributions of sibling species of land snails *Bradybaena pellucida* and *B. similaris* in the Boso Peninsula." *Venus* 2002, 61, 41-48.

##### (2) 総説

浅見崇比呂、「らせんと体軸の鏡像進化 - 個体群の中の左右性」、*遺伝*、1999、53、12:43-46.

浅見崇比呂、「カタツムリのメス化」、*環境ホルモンの社会* (吉村仁他編)、2002、pp.92-98、三学出版。

浅見崇比呂、「カタツムリ・モノアラガイ (有肺類 Pulmonata)」、*細胞工学*、2002、21、2-3.

##### (3) 口頭発表

###### 国際会議

Takahiro Asami, Robert Cowie and Kako Ohbayashi, Evolution of left-right asymmetry in snails: pattern & process, 44th NIBB Conference, Okazaki, March 21-23, 2000.

Takahiro Asami, Evolution of left-right asymmetry: why isn't the snail mirror flat? World Congress of Malacology 2001, Vienna, August 19-25, 2001.

###### 国内学会 (招待講演)

浅見崇比呂、「鏡像体が進化する - 巻貝にみる左右の多様な進化」、第2回「生物多様性」懇談会、京都、2000年3月。

浅見崇比呂、「巻貝における鏡像進化のパターンとプロセス」、日本発生生物学会第35回大会シンポジウム、横浜、2002年5月。

浅見崇比呂、「巻貝における鏡像体の変異と種分化」、日本進化学会第4回大会シンポジウム、東京、2002年8月。

##### (4) 一般講演発表 17件

## 研究課題別評価

1. 研究課題名：脳のセグメント構造に基づくパラレルプロセッシング
2. 研究者氏名：小田 洋一
3. 研究の狙い：

生物が進化の過程で脳(集中神経系)を獲得したときから、脳は分節(セグメント)構造をなしている。最も原始的なホヤ幼生の単体節神経系からナメクジウオの多体節神経系になったときに起こった基本構造の重複と変異こそが、脳の進化の出発点であり、このプロセスは哺乳動物まで保存される。脳が分節構造をとったことが、脳の機能原理にも重要な方向を与えたのではないだろうか？

硬骨魚の後脳にある網様体脊髄路(RS)ニューロン群は明確な分節構造を保ち、ゼブラフィッシュやキンギョでは約30種のRSニューロンが総数約200個存在する。さらに、形態学的によく似た相同RSニューロンが隣接する分節に繰り返されるといふ、興味深い配列を示す。最大の大きさをもつマウスナー(M)細胞が魚の逃避運動をトリガーすることが古くから知られていた。本研究では、M細胞と相同RSニューロンが互いにどのような電気生理学的特性を持つか、どのような入力投射を受けるか、相互にどのような結合をつくっているか、つくられた後脳RSニューロン回路は魚の逃避運動の制御にどのような役割を果たすかを調べて、脳の分節構造が脳の機能獲得に果たす役割を理解しようとした。

### 4. 研究結果：

#### (1) 分節構造を反映した脳ニューロンの機能分化と機能結合

キンギョの後脳第4-6分節に存在する形態学的に相同のRSニューロンが、共通の感覚神経投射を受けながら異なる電気特性を示し、さらに分節構造を反映した相互結合を持つことを見出した。

#### (a) 聴神経(VIII 神経)から分節への投射

聴神経から第4分節のM細胞と第5 - 6分節の相同RSニューロンへの興奮性結合を電気生理学的に明らかにした。さらにOregon Green Dextranで逆行性ラベルしたRNニューロンとDilで順行性にラベルした聴神経の蛍光像から、聴神経がこれらのニューロン群へ投射することを形態学的にも確かめた。興味深いことに、聴神経が脳幹に一樣に投射するのではなく、聴神経の求心線維束も分節をなし、各分節のRSニューロンの樹状突起近傍に局在していた。

#### (b) M細胞と相同ニューロンの異なる発火特性

魚の逃避運動をトリガーするM細胞は単発の活動電位しか発生しない。この特異的な興奮性は、M細胞の膜の電位依存性カリウムチャネルとM細胞特有の反回性抑制によって達成されていることを示した。一方、第5 - 6分節のRNニューロンは膜電位に対応した発火周波数でバースト放電することが明らかにされた。すなわち、入力に対してM細胞は全無的、相同RSニューロンはアナログ的に応答すると解釈された。

#### (c) 分節に繰り返される相同ニューロン間の機能結合

M細胞とRSニューロンの同時記録から、相同ニューロン間の機能結合を見出した。結合は第4分節のM細胞から第5 - 6分節の相同ニューロンへ一方向のみで、逆方向の結合は存在



しない。さらに、結合のパターンが形態学的分類にしたがうことを明らかにした。すなわち背側の存在するMiD群へはM細胞から抑制性結合、腹側に存在するMiV群には興奮性結合であった。しかもM細胞から第5分節のMiDやMiVへの結合様式は第6分節でも保たれており、分節構造とその中で起こる細胞分化を反映した投射様式が浮かび上がってきた。脳の分節構造は発生学的な研究が数多くなされているが、機能的な結合様式に踏み込んだものは初めてである。

## (2) 抑制性シナプス応答のカルシウム・イメージング

生体内での抑制性シナプス応答を世界にさきがけて光学計測することに成功した。分節にまたがって形成された脳回路の動態を調べるには従来の微小電極法に加えて、ニューロン群の並列活動をイメージングする光学計測が有力な手段である。しかし、従来のイメージングは興奮性応答のみに限られており、脳回路の制御に重要な役割を果たす抑制性シナプス応答を計測した例はなかった。われわれはM細胞では抑制性シナプスコンダクタンスによって活動電位の振幅が小さくなる点に着目し、活動電位の振幅にしたがったカルシウム流入を共焦点レーザー顕微鏡を用いて抑制性シナプス応答を初めて光学計測した。このシステムによって、抑制性結合も含めたニューロン間の相互作用を無傷の動物から記録(非侵襲計測)する道が開かれた。

## 5. 自己評価：

硬骨魚の後脳分節に繰り返される網様体脊髄路ニューロンを研究対象にして、脳の分節構造に基づいた機能構築を研究しようとした本研究計画は、脳の基本構造を見据えて脳の機能発現を理解しようとするものであると自負している。分節間相同ニューロンの相互結合に関しては、複数のニューロンからの同時細胞内記録と形態学的同定を地道におこない当初の目的をほぼ達成した。機能分化の典型としてとらえたマウスナー(M)細胞の独特の発火特性がM細胞特有の反回性(フィードバック)抑制のほか電位感受性低閾値型カリウムチャネルによることまでつきとめられ、機能分化に関して予想を超える成果を得た。また、今まで取り組まなかった形態学的な解析を積極的に取り入れることによって、分節構造を反映した感覚神経投射をはじめて見出せた成果も予想を超えていた。

分節に従って機能分化し相互に機能結合している網様体脊髄路ニューロンの並列活動を観察できる光学計測システムを当初の計画通り完成した。従来のイメージングシステムではニューロンの興奮だけを計測しているが、本研究ではニューロンの動特性の制御に重要な抑制性シナプス応答をも光学計測でき、発表論文は国際的に評価された。逃避運動中のニューロン群の活動に関しては、魚の運動と脳内ニューロン活動を同時計測するシステムの構築までを達成できた。

以上のように、研究全般にわたって独自に計画し実行したために他に例を見ないユニークな成果を得られた反面、機能分化の分子生物学的解析など共同研究をすれば進むであろう側面に関しては展開されなかった。しかしながら、私は自分自身の興味と地に足が付いた理解を好むので、この3年間の研究成果を喜んでいる。

## 6. 研究総括の見解：

金魚の巨大なマウスナー神経細胞を用いて、脳神経系の原始的な分節構造と機能を独自の的方法論を駆使して解明した生理学的研究として大いに評価される。独創的なよき考え抜か

れた研究で、海外からも基礎的な貢献として注目されている。

## 7. 主な論文等：

### (1) 論文

- Komatsu H., Murayama Y., Iwaki T., Tsukamoto I., Ogli K. and Oda Y. Effects of enflurane on the long-term potentiation in the hippocampus. *Prog. Anesth. Mech.*, 6: 515-518, 2000
- Takahashi M., Narushima M. and Oda Y. In vivo imaging of functional inhibitory networks on the Mauthner cell of larval zebrafish. *J. Neurosci.* 22: 3929-3939, 2002
- Nakayama, H. and Oda, Y. Functional organization of segmentally homologous reticulospinal neurons in goldfish hindbrain (submitted)
- Nakayama, H. and Oda, Y. Common synaptic drive from the Mauthner cell to segmentally homologous reticulospinal neurons in the teleost hindbrain (submitted)

### (2) 総説 解説

- Oda, Y. LTP *Clinical Neuroscience*, 17(7): 107, 1999
- 小田洋一 LTP解析法 (シリーズ 論文理解のためのニューロサイエンス研究法) *脳の科学*, 21(7): 743-749, 1999
- 小田洋一 日本の脳研究者たち 塚原仲晃」 *Brain Medical*, 11: 102-105, 1999
- 小田洋一 学習を担うシナプス伝達の長期増強 蛋白質 核酸 酵素 増刊号 神経回路形成と機能発達」464-473, 2000
- 小田洋一 記憶のメカニズム *脳21*, 3(2): 258-264, 2000
- 小田洋一 学習を担うシナプス伝達の長期増強 蛋白質 核酸 酵素 増刊号 神経回路形成と機能発達」464-473, 2000
- 小田洋一 脳の可塑性のメカニズム 認知科学の新展開 (乾敏郎 安西祐一郎編) 第1 巻 認知発達と進化」 pp.144-163 ,岩波書店, 2001
- 小田洋一 学習 記憶を担うシナプス長期増強 *生物物理* 41:80-85, 2001
- 小田洋一 ,中山寿子 逃避運動の制御と可塑性のメカニズム *魚のニューロサイエンス*」(植松一真 岡良隆 伊藤博信編) pp. 22-37, 恒星社厚生閣, 2002
- 小田洋一 ,中山寿子 聴覚 脳 神経科学入門講座 (渡辺雅彦編) pp. 117-130, 羊土社, 2002

### (3) 口頭発表

#### 国際会議

- Oda, Y. Inhibitory long-term potentiation underlies auditory conditioning of goldfish escape behavior. *Interface between System Brain Science and Neuroethology* September 23-26, 1999, Sendai
- Oda, Y., Nakayama, H., Matsui, H. and Murakami, Y. Functional organization of segmentally homologous reticulospinal neurons in teleost hindbrain. 29th Annual Meeting of the Society for Neuroscience October 23-28, 1999, Miami (U.S.A.)
- Oda, Y. Inhibitory Networks of the Mauthner Cell in Goldfish and Zebrafish. *Interface between System Brain Science and Neuroethology.* October 30-November 1, 2001, Okazaki

国内学会

招待講演

小田洋一 逃避運動の学習をになう後脳ニューロンの LTP 第 22 回神経科学学会 イブニングフォーラム 記憶学習のシナプス可塑性と脳内システムの接点」1999 年 7 月 6～8 日 (大阪)

小田洋一 魚の逃避運動を制御する後脳セグメント間相同ニューロンの機能分化と機能結合 第 78 回日本生理学会 シンポジウム 神経回路による特徴抽出のメカニズム」2001 年 3 月 29～31 日 (京都)

小田洋一 逃避運動の学習をになう抑制性シナプスの長期増強 第 24 回日本分子生物学会 シンポジウム 神経可塑性の分子的基盤」2001 年 12 月 9～12 日 (横浜)

一般講演発表 8 件

## 研究課題別評価

1. 研究課題名 : 1分子の3次元像再構成法に基づく分子モーター作動機構の探索

2. 研究者氏名 : 片山 栄作

3. 研究の狙い :

動くこと、は生命の最も重要な属性の1つであり、多くの場合、その動きは生物分子モーターが担う。そのような「分子機械」の働く仕組みを調べることは大変魅力的な研究課題であるが、永年にわたる多くの研究者の努力にもかかわらず、未だに十分な理解ができていない。本研究は、急速凍結ディープエッチ・レプリカ電子顕微鏡法を用いて蛋白質分子が働く現場を直接観察することを目指すとともに、われわれが新たに開発した3次元画像解析法を駆使して、ATPをエネルギー源に、アクチン・フィラメントに沿って滑る分子モーター、ミオシンが、機能中にどのような構造変化を起こしているかを探り、その分子メカニズムの解明に迫る試みである。

アクトミオシン滑り運動の分子機構として世界に最も広く受け入れられた仮説は「レバーアーム首振り説」である。その根拠は構造生物学の結果によるところが大きい。1993年にミオシン頭部S1の結晶構造 (Rayment et al.) が、引き続いてヌクレオチド結合状態のS1の構造 (Fisher et al., 1995; Dominguez et al., 1998) が解かれた結果、ATP結合により、S1のモーター部分とそれに連なる長いヘリックス部分 (レバーアーム) の間で分子が強く折れ曲がることが明らかになった。他のさまざまな状況証拠と併せて、ATP結合によるレバーアームの折れ曲がりこそが滑り運動の力の源と信じられるようになったが、実際に滑り運動が起きている現場を直接見る手段はなかった。一方、分子モーターの機能の解析は、日本と米国でほぼ同時に開発された「1分子生理学」の手法の導入により、ここ10数年、著しい進歩を遂げた。蛍光顕微鏡を用いて1個1々の蛋白質分子やリガンドを直接観察し、操作し、分子の各種の物理量を一切平均化することなく測定するという斬新な発想により、従来のやり方では想像もつかなかった多くの重要な、そして驚くべき実験事実が次々に明らかになった。そのような画期的な方法論は、生命の基本原則を調べるための重要な手法としてすくなくも定着し、他の研究領域にも急速に波及しつつある。

蛋白質の立体構造を調べるには、X線結晶回折法と多次元NMR解析法が多用される。しかし構造を知りたい蛋白質を何でも解析できる訳ではなく、それぞれ特有の条件を満たさなければ構造を解くことはできない。さらに、これらの方法により得られる構造情報は空間的にも時間的にも膨大な数の分子を平均化したものであり、揺れの大きい部分の構造は決まらない。それに対して、電子顕微鏡による直接観察法は、空間分解能こそそれらには及ばないものの、ほとんど任意の材料を対象として、個々の蛋白質粒子を直接観察できる、つまり「見たいものを見る」ことができる点で強力である。その一つ「急速凍結ディープエッチ・レプリカ法」は、あらゆる生命現象を1ミクロ秒以内に凍結固定し、その切断面にロータリー・シャドウイングを施して写し取った材料の表面構造を透過型電子顕微鏡で観察する方法である。適切な処理が施されれば、溶液中あるいは細胞内における個々の蛋白質粒子の高コントラストの実像を1.5 - 2 nmにおよぶ空間分解能で得ることも可能である。これは、蛋白質分子内のサブドメイン構造の配置が識別できるほどの分解能であるが、レプリカ試料は金属とカーボンのみから成るので、生の材料とは異なり、電子線に対して非常に安定であるという別の利点がある。われわれは、そのようなレプリカ試料中に含まれる個々の粒子の姿を、電子顕微鏡内で広い角度範囲にわたって傾斜撮影し、それら一連の像の間の立体視差から算出した試料面上各点の高さの連続的な値を出発点として、対象粒子の3次元表面プロファイルを精密に再構成する画期的な手法を開発した。また、3次元構造既知の蛋白質に関

しては、それがレプリカ試料中ではどのような像を与えるべきかをコンピュータ・シミュレーションで予測する方法を併せて考案し、それらを相補的に用いることで蛋白質の動的な立体構造を探る新たな手法を画策している。これら一連の手法が、「1分子生理学」に対応するユニークな構造解析法として使えるであろうとの期待のもと、3年間の「さきがけ研究」に携わることとなった。

#### 4. 研究結果：

滑り運動中のアクチン・ミオシンの構造を急速凍結・ディープエッチ・レプリカ法で観察するため、1分子生理学の基本となる「*in vitro* アクチン滑り運動アッセイ法」を改変して用いた。アクチン・フィラメントに骨格筋重メロミオシン(HMM)を結合させて硬直複合体を作り、それを細かく砕いたマイカと混合した。硬直複合体中のHMMはその尾部でマイカ表面に吸着してアクチンの軌道を作り、そこにATPを加えると、アクチン・フィラメントは一方向に滑り出す。この時、液体ヘリウムで冷却した純銅ブロック表面に材料を押し付けると、一瞬のうちに全てを凍結固定することができる。得られた試料をフリーズ・フラクチャーして蛋白質周囲の氷を昇華させた後に白金/カーボンでロータリー・シャドウイングを施し、そのカーボン・レプリカを電子顕微鏡で観察した。この結果、滑り運動を始める前の硬直複合体と滑り運動中のミオシン頭部の構造には大きな違いが見出された。その違いに関しては既に発表済みである(Katayama, 1998)ので詳述しないが、硬直複合体中のミオシン頭部は比較的均一な構造を取っているのに対し、滑り運動中には様々な形状が見られ、平均化を要する従来の方法により構造解析ができないことは一見して明らかであった。そこでアクチンに結合したミオシン頭部クロスブリッジを1分子ずつ構造解析する方針で研究を開始した。

まず、レプリカ試料が大量の電子線照射に耐えることを利用して、各粒子の高倍率像をできる限り広い傾斜範囲で多数撮影した。これらの画像を、われわれ自身が開発した3次元再構成ソフトウェア(工学院大学・馬場則男教授チームとの共同研究)により処理して対象の3次元像を得た。3次元再構成は以下の手順に従って行った。1) 先ず、傾斜撮影した多数の画像の回転軸の方向とそれに沿った位置を画像相関法を用いて検索し、一連の画像の相対位置を精密に揃える。それに並行して各画像の精密な傾斜角を決定する。2) 各画像を、軸に垂直な断層面に分割し、それぞれの面内で相関法により見つけた対応点の高さを、立体視差を用いて精密計測する。これにより、後の処理の基本となる各点の高さのプロファイルが得られる。3) 傾斜角0度の画像の断層面における輝度分布を、シャドウイングによる金属膜の厚さに比例するものと仮定し、前項で決めた高さのプロファイルの上に重ねて、断層面中の密度分布の初期近似とする。4) 仮定した高さプロファイル上の密度分布をそのまま別の角度に傾斜投影し、その角度における実際の画像のデータと比較する。異なっていれば、それらが合致するように元の密度分布を修正する。5) すべての傾斜画像にわたってこれらの処理を実行し、逐次近似法により連立方程式を解いて全体の誤差が最小となるようにする。6) 画像中のすべての断層面に関して以上の処理を実行し、それらを再配置することにより3次元像が再構成される。

一方、蛋白質の原子座標データが得られている場合には、その表面の凹凸のプロファイルが推定できるので、電子顕微鏡で観察されるべきレプリカ像を予測できると考えられる。蛋白質分子のモデルを任意の方向に置き、座標データ中の各原子に適当な半径を与えて太らせた後、市販のレイ・トレーシング・ソフトウェアで多方向から影付けしてロータリー・シャドウイングの効果を得る。さらに電子顕微鏡の球面収差の影響を表

わすために、像を少々ぼかす。この方法を用いれば、推定される蛋白質の構造変化に応じて原子座標に修正を加え、そのシミュレーションで得られた像を実際のレプリカの電子顕微鏡像と比較して、推定した構造変化の信憑性を検証できる。

まず、われわれの方法自体の妥当性を検定するための対照材料として、構造解析が進んでいる単独のHMM頭部とアクトHMM硬直複合体の構造を解析した。ミオシン頭部にATPが結合するとレバーアーム部分が強く屈曲することを述べたが、ATPまたはそのアナログADP/バナジン酸を結合したHMMの急速凍結レプリカでも同様の像が得られる(Katayama, 1998)。3次元再構成されたそれらのレバーアーム部分はX線結晶回折による骨格筋S1の構造とATPを結合した平滑筋S1の構造の中間の屈曲を示した。後者は、レバーアーム先端部分を人為的に付加したデータであり、屈曲角度は任意性を含む。われわれのレプリカ像は、結晶解析の結果と良く合致していると思なされるであろう。

Milligan (1996) による硬直複合体のモデルは、結晶から直接解かれた訳ではなく、アクチン・モノマーから想定されたアクチン・フィラメントの構造に骨格筋S1の構造をコンピュータ上でフィットさせて作った人為的なドッキング・モデルである。しかしそのモデルは、さまざまな生化学的実験データを良く説明することから、信頼性はかなり高いと考えられている。われわれは、アクトHMMのフリーズ・レプリカ像からその3次元再構成を行うとともに、アクトS1の原子モデルから、そのレプリカ像のシミュレーションを行い、アクトHMMの実際のレプリカ像との比較を行った。その結果、以下のことが判明した。レプリカ像に見るアクトHMM硬直複合体の構造は、アクチンとS1の結晶データから推定されたドッキング・モデルに近い。アクチン結合部に近いモーター領域では、上位50Kドメインが少し下方に回転している以外はほぼ完全に一致する。それに対し、レバーアーム部分は微妙に異なっていた。HMMでは2個のS1がS2でつながっており、アクチンと頭部の結合様式の違いによってそれぞれのレバーアームが色々なコンフォメーションを取るためであろう。これらはいずれも妥当な結果であり、われわれが考案した新たな手法は、構造解析の手段として十分に役立つものと思われる。そこで、無負荷条件で滑り運動中のHMMのクロスブリッジを、1粒子ごとに広範囲に傾斜して連続撮影し、それらのコンフォメーションの解析を行った。

滑り運動中のクロスブリッジのモーター領域は、アクチンと、少なくとも3種類以上の様式で結合していた。3種類とは、1)上位50Kドメインのみで結合する場合、2)下位50Kドメインのみで結合する場合、そして、3)それらの両方で結合する場合である。3次元再構成まで終った粒子の数はまだ少なく、あくまで予備的な結果ではあるが、アクトミオシンの境界部分の構造は硬直複合体とは異なっている場合が多い。一方、欧米を中心に世界の大多数の研究者が正しいと信じてきた「レバーアーム首振り説」においては、アクトミオシンの境界部分の構造は常に保持され、ATP結合によるミオシン頭部内の大きな構造変化こそが滑り運動を引き起こす張力の源であると想定している。実際に観察された粒子のうちのかなりのものは境界部分の構造が異なっており既に大前提との隔たりがある。レバーアーム部分は硬直複合体中とは異なるさまざまな向きにあり、滑り運動により動いていることは間違いないが、その方向は、ATP結合型S1の原子モデルとは必ずしも一致しない。結晶中では見られない構造も実現されているようである。しかし、最終結論を下すには、少なくとも数100個の粒子のコンフォメーションを解析して統計的に処理することが必要であろう。次々に解析を続けてはいるが、1分子づつ構造解析する都合上、個々の演算に相当な時間を要し、未だ十分な例数には達し

ていない。これまでに観察されたレプリカ試料中での構造のそれぞれがクロスブリッジ構造の時間経過を表わすと仮定すれば、ミオシン頭部はアクチン上を揺れながら前進するような状況が想定される。その意味で、柳田教授らの研究チームが提唱する「方向性を持つブラウン運動」(“Biased Brownian Motion”) なら説明可能である。

ごく最近、アクチンを巻き込むように結合しているミオシン頭部のコンフォメーションが、これまでに X 線回折で解かれていない新たな構造を表わしている可能性が浮上した。この構造は、ミオシン頭部中心近くの 2 個の高反応性システイン残基を化学架橋して調製した産物の構造に酷似しており、そのシステイン残基を含むヘリックスが壊れている反応中間体を観察しているものと解釈される。このような構造が観察できたことは、急速凍結固定法の優位性を強く示唆しているものと考えられる。いずれにせよ、高性能のコンピュータを導入して演算処理を格段に高速化することにより、できるだけ多くの粒子の 3次元画像解析を進めることが必須である。

ミオシン・ファミリーは、現在知られているだけでも 20種類近くのメンバーを含む大きなグループであり、構造的にも機能的にも微妙に異なるさまざまな分子種が見出されている。われわれは、外部の研究チームとの協力により、それら天然の分子種やその変異種を材料として「レバーアーム首振り説」の信憑性を検証している。

まず、粘菌ミオシン-II の変異種を用いた研究を行った(産業技術総合研究所・上田太郎博士との共同研究)。G680V S1はレバーアームの屈曲点にあるグリシンがバリンに置換したため、ADP/Pi 結合状態の活性中間体が異常に安定化されるS1である。ATP存在下でこれをアクチンに加え、複合体の構造をネガティブ染色により観察した。この変異S1は予想通り、通常のS1ならほぼ完全に解離する条件でもかなり強くアクチンに結合していたが、興味深いことに、比較的高温では硬直複合体に似た、伸びた構造を取るのに対し、低温では小さく丸まった構造に変換することが判明した。このような構造は、われわれがずっと以前に、化学架橋したアクトS1で見出した構造(Katayama, 1989)に酷似するが、その解釈については現在検討中である。

ミオシン-V は非常に長いレバーアーム部位を有する特徴的な分子である。1分子だけで、長距離にわたって解離することなくアクチン・フィラメント上を滑る「プロセスシブな運動」で知られている。その理由として、アクチン・フィラメントの長周期らせんに沿って同一位相の位置にあるモノマーに、2個の頭部が 35 nm 間隔で交互に結合し、レバーアーム部分の屈曲によってあたかも歩くように進むためであり、それはレバーアーム首振り説の強い証拠として主張されてきた。大阪大学の柳田敏雄教授、マサチューセッツ大学の池辺光男教授のチームに協力して、そのレバーアームを元の6分の1にまで短縮させた変異種の行動を調べたところ、元のミオシンと全く同様に 35 nm のステップサイズで動くことが分かった。電子顕微鏡により構造を調べても、レバーアーム部分は短く、2個の頭部の間隔が運動時に広がる可能性も否定された。レバーアームの首振りでは全く説明不可能な現象である。

ミオシン-VI は、アクチン上を逆方向に進むモーターとして、ミオシン・ファミリーの中でも特異な存在である。このミオシンは野生型の状態で既にレバーアームが短く、上記の変異ミオシン-V と同じ長さである。ところが、このミオシンも、ミオシン-V と同じくアクチン上を「プロセスシブ」に、しかも 35 nm のステップサイズで動くことが判明した。電子顕微鏡で観察した構造は変異ミオシン-V と類似しており、S2部分がほどけてミオシン頭部の間隔が広がるような現象も見られなかった(柳田教授、池辺教授のチームとの共同研究)。

以上の通り、われわれの実験結果はいずれも、従来の「レバーアーム首振り」説とは相容れないものであった。

#### 5. 自己評価：

以下は研究を開始して第2年度目に入る前の時点で設定した研究計画と展望である。

- 1) 実際に張力を発生しているミオシンの構造を観察する。その3次元再構成像を得る。
- 2) さまざまな機能的特徴を持つ、別種類あるいは変異種ミオシンの構造を探索し、従来のミオシンと比較検討する。
- 3) 原子モデルを再構成像に合わせて変形させ、不安定な反応中間体のコンフォメーションのモデルを作る。安定なコンフォメーションとのエネルギー状態の差、あるいはその差が分子内のどの部位に由来するかを検討する。
- 4) 現在の3次元再構成過程を自動化、高速化する。
- 5) 限られた条件の下で、より高精度の3次元像を得るための新たな再構成法を開発する。
- 6) 急速凍結レプリカ法は材料を問わず、組織・細胞中の蛋白質複合体も扱えるので、それらの3次元再構成像を得る可能性を探る。

当初設定した以上の研究計画のうち、3年間の期限内に達成できなかった項目は、1)および3)の後半のみである。その意味では、目標の75%程度は達成したと言えるであろう。当研究は解析のために必要な技術の開発が研究内容のかなりの部分を占めることが大きな特徴であるが、その技術は世界に前例がないものであり、他の目的にも幅広く応用できる。究極の目標である「分子モーターの作動機構の解明」にはまだまだ遠く得られた内容の論文化も見通しが立っていないが、総合的には80%以上の目標達成率と自己評価している。

#### 6. 研究総括の見解：

ミオシン分子のダイナミックな微細構造を急速凍結デープエッチ・レプリカ法を用いて電子顕微鏡像を得て、その3次元再構成により解明した。その結果はX線結晶解析から得られた知見を補完するもので、さらなる解析が大いに期待される。この方法は他の蛋白質にも応用可能である。世界に前例のない技術を確立して、その幅広い応用展開で成果をあげられたい。

#### 7. 主な論文等：

##### (1) 論文

- K. Tamano, S.-I. Aizawa, E. Katayama, T. Nonaka, S. Imajoh-Ohmi, A. Kuwae, S. Nagai & C. Sasakawa: Supramolecular structure of Shigella type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J.* 19: 3876-3887. 2000
- N. Utsunomiya-Tate, K.-I. Kubo, S.-I. Tate, M. Kainosho, E. Katayama, K. Nakajima, & K. Mikoshiba: Reelin molecules assemble together to form a large protein complex, which is inhibited by the function-blocking CR-50 antibody. *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 97: 9729-9734. 2000
- K. Yamane, E. Katayama, & T. Tsuruo: The BRCT Regions of Tumor Suppressor BRCA1 and of XRCC1 show DNA end binding activity with a multimerizing feature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279: 678-684. 2000
- K. Yamane, E. Katayama, & T. Tsuruo: p53 contains a DNA break-binding motif similar to the functional part of BRCT-related region of Rb. *Oncogene*, 20: 2859-2867. 2001



H. Tanaka, K. Homma, A. Hikkoshi-Iwane, E. Katayama, R. Ikebe, J. Saito, T. Yanagida, & M. Ikebe: The motor domain, not a long neck domain, determines the large step of myosin-V: Nature, 415: 192-195. 2002

S. Nishikawa, K. Homma, Y. Komori, M. Iwaki, T. Wazawa, A. Hikkoshi Iwane, J. Saito, R. Ikebe, E. Katayama, T. Yanagida, & M. Ikebe. Class VI myosin moves processively along actin filaments backward with large steps. Biochem Biophys Res Commun. 290: :311-317. 2002

K. Tamano, E. Katayama, T. Toyotome, & C. Sasakawa : Shigella Spa32 is an essential secretory protein for functional type III secretion machinery and uniformity of its needle length. J Bacteriol. 184: 1244-1252. 2002

M. Fukuda, E. Katayama & K. Mikoshiba: The calcium-binding loops of the tandem C2 domains of synaptotagmin VII cooperatively mediate calcium-dependent oligomerization. J Biol Chem. 2002 May 28 [epub ahead of print]

S. Yoshida, E. Katayama, A. Kuwae, H. Mimuro, T. Suzuki & C. Sasakawa: Shigella deliver an effector protein to trigger host microtubule destabilization, which promotes Rac1 activity and efficient bacterial internalization. EMBO J. 21: :2923-2935. 2002

(2) 口頭発表 (招待講演のみ)

E. Katayama: Three-dimensional subdomain architecture of myosin head during in vitro actin sliding movement. The 11<sup>th</sup> Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience/COE International Conference. "Frontiers in Molecular Motors Research: From Gene, Structure, Dynamics to Functions". Hyogo Japan. Nov. 2000

片山栄作 :機能中の蛋白質 1分子の構造を探る: 第45回日本電子顕微鏡学会シンポジウム「見る限界を越えて」: 岡崎 2000年11月

片山栄作 :遺伝子発現制御と立体構造: 「1分子生理学と立体構造」:シグナル伝達研究とゲノム 医科学の最先端と医薬品への応用 コース (ゲノム医科学編):東京 2000年12月

片山栄作、市瀬紀彦、馬場則男 :分子機械の働くしくみを電子顕微鏡で探る:日本電子顕微鏡学会第57回学術講演会シンポジウム「凍結技法 ?生体の真の姿を求めて-」:福岡 2001年5月

片山栄作、馬場則男、白石知子、相沢慎一 :急速凍結 フリ-ズレプリカ法による細菌べん毛基部の立体構造解析 :日本電子顕微鏡学会第57回学術講演会シンポジウム「微生物 :見なければならぬもの、皆で積極的に探しましょう」:福岡 2001年5月

片山栄作 :機能中の蛋白質 1分子の立体構造解析シグナル伝達研究とゲノム 医科学の最先端と医薬品への応用 コース (ゲノム医科学編)東京 2001年11月

片山栄作 :新たな原理に基づく蛋白質分子複合体の3次元構造解析 :日本電子顕微鏡学会関西支部電子顕微鏡技術研究会「細胞、分子の3-Dイメージング」:岡崎 2001年12月

E. Katayama Three-dimensional image analysis of protein molecules in function. International Symposium on "Emerging Fields of Biomedical Research and New Industry by Integrating Biotechnology, Information Technology and Nanotechnology". Tokyo Japan Mar. 2002 .

片山栄作、市瀬紀彦、宮林信治、高橋透友、馬場則男 :作動中の蛋白質の一瞬の3次元構造を捉える :日本電子顕微鏡学会第58回学術講演会シンポジウム「凍結技法 -動的形態解析への応用-」:大阪 2002年5月

永山国昭、片山栄作 :「タンパク質の働きを観る新手法-構造生物学と細胞生物学のインタ-フェイス」-形態と機能の新しい結合 :第2回日本蛋白質科学会年会ワークショップ :名古屋 2002年6月

片山栄作 :滑り運動中のミオシンクロスブリッジの構造観察から分子メカニズムに迫る :第2回日本蛋白質科学会年会ワークショップ :名古屋 2002年6月

その他、一般口頭発表 18件

## 研究課題別評価

### 1. 研究課題名 : プラナリアにおける生殖戦略転換機構

### 2. 研究者氏名 : 小林一也

### 3. 研究の狙い :

ほとんどの動物群で無性生殖と有性生殖とを転換する種が知られているにもかかわらずこの機構に関する研究がほとんど行われておらず、未だに転換にかかわる化学物質は見つかっていない。扁形動物プラナリアのいくつかの種では、自然界で水温の変化が大きな要因となって生殖様式を転換するが、研究室内でも無性個体は有性個体を餌として摂食すると有性化することが古くから知られている。この実験的有性化は有性個体に有性生殖誘導因子が含まれていることを意味している。私はさきがけ研究採用以前にリュウキュウナミウズムシ *Dugesia ryukyuensis* OH株(無性生殖で増殖したクローン集団)に有性生殖のみを行うイズミオオウズムシ *Bdellocephala brunnea* を餌として与えることによる有性化系を確立していた。

本研究は第1に生殖戦略転換現象の一般的理解を深めることを目的に有性生殖誘導因子の同定を目指し、生殖戦略転換機構における因子の生物学的意義を検討した( )。

有性化系は無性個体では全く観察されない複雑な生殖器官が全能性幹細胞から分化してくるといふ発生生物学的に興味深い現象を含んでおり、因子の投与によって発現する遺伝子群は生殖器官分化に関与している可能性が高いといえる。そこで第2の目的として有性化特異的遺伝子の探索を行った( )。また、全能性幹細胞から生殖器官へ分化の実験的解析を実現させるために全能性幹細胞の培養・ラベル化を試み、移植実験の条件検討を行った( )。

プラナリアでは有性生殖しか行わない種はいわゆる二倍体種がほとんどであるが、生殖戦略を転換するタイプの種では倍数体・異数体がしばしば観察され、生殖戦略転換現象との関連を想像させる。予備的調査からOH株の無性個体は三倍体種であることが示唆されており、有性化に伴う核型解析を行った( )。

### 4. 研究結果 :

#### - 1有性化不可逆状態と有性生殖誘導因子の関係

有性化過程(形態的变化をもとに5段階のステージにわけてある)には有性化回避不能点と名付けた特異点がステージ2と3の間にある。この点を超えるまではイズミオオウズムシの投与をやめると無性状態に戻ってしまう。一方、有性化回避不能点を越えると、もはやその投与は必要なく、いわば自律的に有性化が進行するようになる。有性化個体中の有性生殖誘導因子の存在を調査したところ、頭部を除く領域に多く含まれていることがわかった。この結果をふまえて有性化個体を人為的に切断したところ、唯一、頭部断片由来の再生個体だけが再生して無性個体になった。この無性化頭部再生体は因子をあたえると再び有性化された。これらの結果は、有性化の不可逆状態がリュウキュウナミウズムシ自身で産生しはじめた有性生殖誘導因子に依存していることを意味している。一方、無性生殖の能力はステージ4まで維持されていることから、この因子の発現の下流機構によって無性生殖は停止させられると考えられる。以上のことから、たとえイズミオオウズムシのような有性生殖しか行わない非転換種に含まれている化学物質がこの実験的有性化の引き金ではあっても、自己生産されるようになった有性生殖誘導因子そのものがプラナリアにおける無性生殖から有性生殖への転換という現象の鍵物質である断言できる。

#### - 2有性生殖誘導因子の精製

- 1の結果から、材料として有性化個体を用いて有性生殖誘導因子を単離することにした。有性化個体をPBS中でホモジナイズし、それに16,000 x g, 30 minの遠心処理を施した。その上清画分に含まれている不溶性の浮遊物を除去するために、0.2 μm フィルターを通し、さらに超遠心100,000 x g, 1 hrを行った。この超遠心上清をSep-pak (C18)の逆相カラムで分画した。有性化活性は、10%メタノール溶出画分に認められることから有性生殖誘導因子は若干の疎水的性質をもつことがわかった。このM 1画分を陽性対照として以下の実験を行った。

a. 限外濾過 (5kDa)を行ったところ、有性生殖誘導因子の活性は5kDa以下の画分に認められた。

b. パパイン (タンパク質分解酵素)処理を行ったところ、有性生殖誘導因子の活性は全く低下しないことがわかった。

c. 透析 (500Da)を行ったところ、透析内液 (500Da?5kDa)画分には有性生殖誘導因子の十分な活性は認められないことから因子は500Da以下の低分子であることが示唆された。

d. 中性条件下で陰イオン交換樹脂に吸着することから酸性物質であることがわかった。

現在、M 1画分に対して Smart System (Pharmacia Biotech)を用いて、逆相クロマトグラフィー (C18) および陰イオン交換逆相クロマトグラフィーを行っており、精製は最終段階にある。

#### 有性化特異的遺伝子群の探索

有性化現象では無性個体では全く観察されない複雑な生殖器官が全能性幹細胞から分化してくる。それゆえに有性生殖誘導因子の投与によって発現する遺伝子群は生殖器官分化に関与している可能性が高いといえる。Differential Screening法によって、プラナリアに特有な分泌腺である卵黄腺に発現する遺伝子 Dryg (ホモロジーはない)を単離した。Drygは組織学的にその原基さえ認められないステージ3から、いくつかの全能性幹細胞に発現しはじめることから、卵黄腺の分化決定に重要な役割をしていることが考えられる。

本研究ではまた、有性化という点で劇的な変化が起こっているステージ3以降に注目し、有性化の不可逆状態を遺伝子発現のレベルで解析し、プラナリア有性化現象の一般的理解を目指した。Drygはステージ3以降のマーカーとしても利用できるが、さらにステージングに利用できる遺伝子を必要とした。そこで、無性個体と有性化個体を用いて Differential Displayを行ったところ、ステージ4以降に発現するクローンが2つ (D80とD92)、ステージ5以降に発現するクローンが4つ (D38、D72、D95、D104)得られた。ホモロジーに関しては、D80がアミノ酸レベルで Tubulin alpha chain, testis-specific (Rainbow trout)と56%、D104が Ribose-phosphate pyrophosphokinase (Human)と60%の相同性があった。それ以外に関しては相同性のある遺伝子はなかった。結果的にDrygも含めてこれらの遺伝子を組み合わせることで、不可逆状態を形態だけでなくステージングすることが可能になった。

最近、Differential Display法によって有性化をかけた4日目に発現しはじめる遺伝子 E4-8を単離した。この遺伝子の発現のレベルは有性化4日目に比べて弱い但有性化個体でも発現している。E4-8の塩基配列は1080塩基対であり、そのアミノ酸配列にはHSP20のモチーフが存在している。この遺伝子の発現は - 2で述べた有性化活性を示す画分と一致している。HSP20はいわゆる分子シャペロンとして機能するHSP70や90といった Large HSPと区別され、Small HSPと呼ばれその機能もほとんど明らかにされていない。興味深いことにショウジョウバエでは Ecdysone の影響で直接的にHSP20の発現が生殖巣や神経系に誘導され、胚発生時に重要な役割を示すという報告がある。Ecdysoneは昆虫の脱皮ホルモンとして有名だが、化学物質としては Ecdysteroid に分類される。Ecdysteroidは動物のみならず植物にも広く含まれているもので、動物では腔腸動物や線形動物といった下等動物でもその存在の報告がある。 - 1で述べた有性生

殖誘導因子の特徴は Ecdysteroid の可能性を否定するものではない。有性生殖誘導因子の候補として哺乳類の性ステロイドホルモンの調査は過去にも行われているが（すべてネガティブ）、Ecdysteroid の場合はない。今後、有性生殖誘導因子の候補として考慮してゆく。

#### 生殖始原細胞の実験的解析

全能性幹細胞の培養に関しては過去の知見をこえることは結果的にできなかった。GFP導入全能性幹細胞の作製も試みたがこちらとも思うように進展しなかった。今のところベクターのプロモーターとしてハウスキープ遺伝子 EF2 の上流解析を行っている。一方、生殖始原細胞の実験的解析を行うにあたって、全能性幹細胞を多く含む集団の移植系を確立した。X線を照射し即死はしないもののいずれ死滅する運命となった無性個体に、X線照射を施していない無性個体由来のネオプラスト分画を移植することによって引き続き生存可能にするもので、約 50% の確率で X線照射無性個体を生存可能にできた。

#### 有性化に伴う核学的研究

OH株の無性個体は異質三倍体種であることを示した。有性化後、雄性・雌性生殖系列において同質二倍体性の減数分裂像が確認された。この結果は、配偶子が同質の一倍体であることを示唆しているが、有性化個体同士の交配によって得られるF1世代には異質二倍体種と異質三倍体種が存在することがわかった。F1世代には有性仔虫と無性仔虫とが 1 : 2 の割合いで出現する（で述べる）が、染色体数やその形態という点では生殖戦略とは関係がなかった。

#### 有性化個体と有性個体に関する研究（採用時には提出しなかったテーマ）

有性化個体同士の交配で、無性仔虫と有性仔虫が 2 : 1 の割合いで出現することに気づき、有性生殖誘導因子の外部投与を行わなくとも生殖器官を発達するこの有性仔虫に注目した。この有性仔虫は、本来は無性仔虫であったものが、親由来の有性生殖誘導因子にさらされて有性化したものなのか、それとも、生まれながらに有性系統として決定されているのか？という疑問が生じた。この生まれながらの有性個体は通常形態的に有性化個体と区別することができない。しかし、有性生殖誘導因子を投与しつづけると、有性化個体では過剰対の卵巣が誘導されてくるのに対し有性個体では決して起こらないことがわかった。ここでは評価のしやすい（カウントしやすい）卵巣で表現しているが、有性化個体では卵巣以外の生殖器官も過剰に発達してくる。これらの結果は、有性化個体と有性個体の間に、有性生殖誘導因子に対する応答や生殖器官の分化・発達に関して異なる制御が行われていることを示唆している。さらに、-1で説明したような切断による有性化個体の無性化実験が有性個体には適応しないことが分かった。有性化個体の有性化状態は有性生殖誘導因子によって維持されているため、この因子の含有量の乏しい頭部再生体は無性化した。ところが、有性個体の場合、たとえ頭部再生体であっても無性化しないのである。有性個体における有性生殖誘導因子の局在は有性化個体の場合と変わらないことから、有性個体の全能性幹細胞は、外部投与の有性生殖誘導因子の刺激を受けなくとも自立的に因子を発現し有性状態を再現したと考えられる。

リュウキュウナミウズムシのようなプラナリアでは、すべての個体が無性生殖と有性生殖を転換しているという印象を与えるが、実際のところ、同一種内でも、水温の変化に応じて生殖様式を季節的に転換する個体が確かに存在している一方で、無性生殖のみ、あるいは有性生殖のみで繁殖する個体も存在することが古くから観察されている。もちろん実験的根拠はないが、無性生殖のみを行う個体は無性系統、そして有性生殖のみを行う個体は有性系統とよばれ、彼らの生殖様式は遺伝的に限定されていると信じられている。それに対して、季節的に転換する個体は生理学

的系統と呼ばれている。私は、「有性化個体と有性個体に関する研究」の結果から、これらの系統に関して次のようなモデルをたてることができた。

**無性系統** :有性生殖誘導因子の発現に至るカスケードのどこかに異常があり「オフ」の状態、結果的に生殖細胞や生殖器官が形成されない。本研究の実験動物OH株がこの系統に該当する。OH株では、外部からの有性生殖誘導因子の刺激によって、その異常を回避して自己の因子を発現しはじめることが可能になったと説明できる。

**有性系統** :有性生殖誘導因子の発現が常に「オン」になる。

**生理学的系統** :有性生殖誘導因子の発現が温度変化などで「スイッチ」する。

5. 自己評価： ～ 、 は上記の研究テーマをあらわし、カッコ内の数字は独断で5段階評価したものである。

有性生殖誘導因子の同定には至らなかったが、実現可能な段階にまで発展することができた。

(4)

有性化現象を評価する遺伝子群を得ることができた。とくに Dryg は幹細胞から卵黄腺への分化初期に責任がある遺伝子であり、プラナリアの分化全能性細胞の能力を探究するという点で興味深い。そして当初の目的でもあった有性生殖誘導因子の投与直後に発現する遺伝子も単離することができた。卵巣 (卵子) 精巣 (精子) といった動物に共通する生殖器官 (生殖細胞) にかかわる重要な遺伝子が単離できなかったことは残念である。研究上のポリシーもあって、いわゆる「ホモログトリ」を行わなかったが、やはり馴染みの薄い生殖戦略転換機構を一般化するためにも、また単離した新規遺伝子に意味付けするためにもそれは必要であったと反省している。(3)

最も進展しなかったテーマである。戦略としては問題ないがラベル化にはもう少し時間がかかりそう。しかし、移植系や交配系はもはや確立しておりGFP導入全能性幹細胞の作製は現実的な段階にはいっていると判断している。(1)

プラナリアにおいて生殖戦略を転換するタイプの種では倍数体・異数体がしばしば観察されることから生殖戦略転換現象との関連を想像し調査をはじめたが、結果的に染色体数やその核型という点で生殖戦略とは関係がなかった。しかし、異質三倍体種であるOH株の生殖系列は同質二倍体性の減数分裂を示す事実や有性化個体同士の交配によって得られるF1世代には異質二倍体種と異質三倍体種が存在するものの、その生殖系列でも同質二倍体性の減数分裂像が観察されたことから、転換種では同質二倍体細胞が生殖細胞として維持され、次世代において倍数・異質化した細胞が体細胞となるという生殖生物学的に興味深いモデルがたてられた。(2)

観察上信じられてきたプラナリアの系統が実験的に証明できた初めての例である。見かけ上、区別のできない有性化個体と有性個体との本質的な差は有性生殖誘導因子の発現の制御という点で説明可能であり、彼等を比較することで将来的に無性生殖とは？有性生殖とは？という問題、そしてその転換機構が解明されていくと考えている。採用時には提出しなかったテーマであるが将来性ありとの独断で研究を行った。(3)

6. 研究総括の見解：

生物が無性生殖から有性生殖に進化した仕組みはまったく不明である。本研究では、両方の生殖をおこなうプラナリアを用いて、無性生殖体を有性生殖体に変える因子を発見し、物質の同

定寸前まで進展している。有性生殖誘導因子が同定されればビッグ・ニュースとなろう。その意味で、本研究はさきがけ研究 21 の支持があって可能となったもので、高く評価したい。これからの発展を大いに期待する。

## 7. 主な論文等：

### (1) 論文

1. Kobayashi, K. and Hoshi, M. Switching from asexual to sexual reproduction in the planarian *Dugesia ryukyuensis* Change of the fissiparous capacity along with the sexualizing process. *Zool. Sci.* 19, 661-666, 2002
2. Kobayashi, K., Arioka, S., Hase, S. and Hoshi, M. Signification of the sexualizing substance produced by the sexualized planarians. *Zool. Sci.* 19: 667-672, 2002
3. Kobayashi, K., Arioka, and Hoshi, M. Seasonal changes in the sexualization of the planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Zool. Sci.* 19, 1267-1278, 2002
4. Hase, S., Kobayashi, K., Koyanagi, R., Matsumoto, M. and Hoshi, M. Transcriptional pattern of a novel gene, expressing specifically after the point-of-no-return during sexualization, in planaria. *Dev. Gen. Evo.* 212, 585-592, 2003

### (2) 総解説

1. Hoshi, M., Kobayashi, K., Arioka, S., Hase, S. and Matsumoto, M. Switch from asexual to sexual reproduction in the planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Amer. Zool.* in press

### (3) 口頭発表

- ・ 小林一也、有岡幸子、星元紀：「3倍体種有性化プラナリアに由来する F1 世代の倍数性について」日本動物学会第 73 回大会 (2002 年 9 月) 金沢
- ・ 宮下仁志、小林一也、松本緑、星元紀：「プラナリア生殖器官における内分泌攪乱物質ビスフェノール A の及ぼす影響」日本動物学会第 73 回大会 (2002 年 9 月) 金沢 小林一也：「プラナリアにおける無性生殖から有性生殖への転換」岡山大生物学教室セミナー (2002 年 3 月) 岡山
- ・ 小林一也：「プラナリアにおける無性生殖から有性生殖への転換」岡山大生物学教室セミナー (2002 年 3 月) 岡山
- ・ Hoshi, M., Kobayashi, K., Arioka, S., Hase, S. and Matsumoto, M.: "Switch from asexual to sexual reproduction" Symposium on "The Promise of Integrative Biology", The Annual Meeting of the Society for Integrative and Comparative Biology (Jan. 2002) California
- ・ 小林一也、有岡幸子、星元紀：無性系リュウキュウナミウズムシ (OH 株) の核型解析」日本動物学会第 72 回大会 (2001 年 10 月) 福岡
- ・ 小林一也、有岡幸子、星元紀：「プラナリアにおける有性生殖誘導因子について」日本動物学会第 72 回大会 (2001 年 10 月) 福岡
- ・ Kobayashi, K.: "Transition between asexuals and sexuals in the planarians" IIAS Symposium on "Conflict and Compromise between Parent and Offspring" in Conjunction with The IIAS Project "Friction and Cooperation of Germ with Soma in The Individual" (Sep. 2001) Nara
- ・ Hoshi, M., Kobayashi, K., Arioka, S., Hase, S. and Matsumoto, M.: "Switching from asexuals to sexuals in the planarian *Dugesia ryukyuensis* (Jul. 2001) South Africa
- ・ Kobayashi, K., Arioka, S. and Hoshi, M.: "A sexualizing substance in the planarians" 14<sup>th</sup> International Congress of Developmental Biology (Jul. 2001) Kyoto
- ・ 小林一也：「プラナリアにおける無性個体の実験的有性化」第 4 回岡崎機構セミナー統合バイオサイエンス (2001 年 2 月) 岡崎

- ・ 小林一也、有岡幸子、星元紀：「プラナリアの有性化個体と有性個体の違い」日本動物学会第71回大会 (2000年9月)東京
  - ・ 小林一也、有岡幸子、星元紀：「プラナリア有性化個体に観察される過剰卵巣の意味」日本動物学会第71回大会 (2000年9月)東京
  - ・ 長谷純崇、松本緑、小林一也、星元紀：「プラナリアの性誘導に伴い発現する遺伝子の解析」第22回日本分子生物学会 (1999年12月)福岡
  - ・ Kobayashi, K. and Hoshi, M.: "Switching from asexual to sexual reproduction in the planaria" Symposium on "Alternative Reproductive Strategies" (Nov. 1999) Hayama
  - ・ Hase, S., Matsumoto, M., Kobayashi, K. and Hoshi, M.: "A gene expressed specifically in sexualized planaria" Symposium on "Alternative Reproductive Strategies" (Nov. 1999) Hayama
- (招待講演 4件)



## 研究課題別評価

1. 研究課題名 :人工触媒で水が付加する反応の位置や立体を制御する

2. 研究者氏名 徳永 信

3. 研究の狙い :

本研究では「水」や「アミン」などの単純な物質を反応剤として活用することを目標に(1)アルキンの水和反応、(2)アルキンのアミノ化反応、(3)エステルの加水分解反応の、3つのテーマで研究を展開した。

(1)においては、採用時点で既に開発していた末端アルキンの水和反応の、選択性改良、収率改良、触媒回転数の改良、また反応機構の解明などを目標においた。

(2)においては、採用時点で既に開発していた末端アルキンのヒドロアミノ化反応の有機合成的応用や反応機構解明などを目標にした。

(3)においては、高濃度でエステルなどの加水分解反応を行うことができる触媒反応の開発を目標にした。

4. 研究結果 :

(1)においては、選択性改良、収率改良、触媒回転数の改良に成功した。具体的には、選択性は、最高でアルデヒド:ケトンが16:1程度だったものが100:1に、また収率も70%前後から100%に、また触媒回転数は7回程度から100回以上へと改良できた。基質適用範囲も大幅に広がった。また反応機構研究も進み、一般的で安定なルテニウム2価ピニリデン錯体ではなくルテニウム4価ヒドリドピニリデン錯体を經由することが分かった。

(2)においては、合成的応用としてインドール類のワンポット合成法を開発した。アリニン類とプロパルギルアルコール類から1段階でインドール類が合成できる実用的な反応である。アミノ化の機構研究は速度論実験を行いデータは出たが、論文発表には至っていない。

(3)においては、当初目標とした高濃度でエステルやエーテルなどの加水分解反応を行うことができる触媒反応が開発できた。具体的には、ビニルエステルなどのアルケニルエステルやビニルエーテルなどのアルケニルエーテルの加水分解をパラジウム、白金などの金属を用いて行うことができることを見出した。基質の濃度は50%前後でも問題ない。

5. 自己評価 :

(1) アルキンの水和反応 : 100点

(2) アルキンのアミノ化反応 : 90点

(3) 加水分解反応 : 60点

総合 70点

(3)の加水分解反応は、良い触媒系もみつきり継続研究課題のメインテーマとして採択されるに至ったので、最も重要な成果である。またさきがけ採用時にゼロから始めたテーマでもある。しかし、不斉反応化までは行えなかった点で少し減点し60点とした。継続研究課題でこれを補いたい。欲をいえば、課題(3)に対して今後3年で100点分くらい上乗せして160点くらいにして丸山先生に成果をお返しできればと考えている。

## 6. 研究総括の見解：

アルキンの水和反応では収率の高い方法を開発し、アルキンのアミノ化反応ではインドール誘導体のワンポット合成法を開発し、エステル加水分解ではパラジウム、白金を触媒としてアルケニルエーテルの加水分解法を見出した。いずれも反応機作で新知見が明らかにされ、権威あるJACS誌などに発表されている。また実用面では複数の特許を申請中である。まさに「力量ある有機合成」をめざして研究を展開しており、基礎、実用両面での発展が期待される。

## 7. 主な論文等：

### 論文 7 報

- (1) ルテニウム触媒によるアルキンへの付加反応  
Tokunaga, M.; Wakatsuki, Y.  
*有機合成化学協会誌*, 2000, 58, 587-596.
- (2) Ruthenium Complex-Catalyzed anti-Markovnikov Hydration of Terminal Alkynes.  
Suzuki, T.; Tokunaga, M.; Wakatsuki, Y.  
*Org. Lett.*, 2001, 3, 735-737.
- (3) 単純な反応剤による実用反応の可能性  
Tokunaga, M.  
*有機合成化学協会誌*, 2001, 59, 486-487.
- (4) A Practical One-pot Synthesis of 2,3-Disubstituted Indoles from Unactivated Anilines.  
Tokunaga, M.; Ota, M.; Haga, M.; Wakatsuki, Y.  
*Tetrahedron Lett.*, 2001, 42, 3865-3868.
- (5) Ruthenium Catalyzed Hydration of 1-Alkynes to Give Aldehydes: The insight into the anti-Markovnikov Regiochemistry.  
Tokunaga, M.; Suzuki, T.; Koga, N.; Fukushima, T.; Horiuchi, A.; Wakatsuki, Y.  
*J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 11917-11924.
- (6) Efficient Transformation of Propargylic Alcohols to  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Aldehydes Catalyzed by Ruthenium/water under Neutral Conditions.  
Suzuki, T.; Tokunaga, M.; Wakatsuki, Y.  
*Tetrahedron Lett.*, 2002, 42, 7531-7533.
- (7) Hydration and Hydroamination of 1-Alkynes with Ruthenium Catalysts.  
Tokunaga, M.; Suzuki, T.; Koga, N.; Fukushima, T.; Horiuchi, A.; Eckert, M.; Ota, M.; Haga, M.; Honda, T.; Wakatsuki, Y.  
*RIKEN Review*, 2001, 42, 53-56.

### 特許 3 件

- (1) 特願 2000-216457、2000 年 7 月 17 日  
特開 2002-30069、2002 年 1 月 29 日  
国際出願番号 PCT/JP01/05691 (米、英、独、仏、スイス) 2001 年 7 月 2 日  
縮合ピロール類の製造法  
徳永 信、若槻康雄、科学技術振興事業団、理化学研究所
- (2) 特願 2000-307464、2000 年 10 月 6 日  
特開 2002-114730、2002 年 4 月 16 日  
アルデヒドの製造方法

- 鈴木俊彰、若槻康雄、徳永 信、理化学研究所  
(3) 特願 2002-320703、2002 年 11 月 5 日  
含酸素化合物の製造方法  
徳永 信、堀 容嗣、科学技術振興事業団、高砂香料工業 (株)

アルキン水和反応に関するものが(1)、アミノ化に関するものが(2)、加水分解反応に関するものが(3)である。

学会発表 11 件

- (1) Ruthenium Catalyzed Intermolecular Hydroamination of Terminal Alkynes: A Practical Synthesis of Aromatic Ketimines  
Makoto Tokunaga, Markus Eckert, Yasuo Wakatsuki  
名古屋 COE-RCMS コンファレンス、名古屋、1 月 7 日 (2000)
- (2) ルテニウム触媒を用いた分子間ヒドロアミノ化に基づくインドール類の合成  
徳永 信、太田 充、芳賀正明、若槻 康雄  
第 47 回有機金属化学討論会、名古屋、10 月 2 日 (2000)
- (3) Highly Efficient Synthesis of Indoles from Anilines and Propargyl Alcohols via Ruthenium Catalyzed Intermolecular Hydroamination.  
Makoto Tokunaga, Mitsuru Ota, Masa-aki Haga, Yasuo Wakatsuki  
2000 環太平洋化学国際会議、Honolulu, Hawaii, USA 12 月 15 日 (2000)
- (4) ルテニウム触媒による分子間ヒドロアミノ化反応を利用した含窒素複素環化合物の合成  
徳永 信、太田 充、鈴木俊彰、芳賀正明、若槻 康雄  
日本化学会第 79 春季年会、神戸、3 月 30 日 (2001)
- (5) ルテニウム触媒を用いた反マルコフニコフ水和による 1-アルキンの直鎖アルデヒドへの変換反応  
鈴木俊彰、徳永 信、若槻 康雄  
日本化学会第 79 春季年会、神戸、3 月 28 日 (2001)
- (6) ルテニウム触媒を用いる 1-アルキンの水和によるアルデヒドの合成 :反マルコフニコフ選択性の発現機構  
徳永 信、鈴木俊彰、古賀伸明、若槻 康雄  
第 48 回有機金属化学討論会、横浜、9 月 18 日 (2001)
- (7) ルテニウム触媒によるアルキン類への付加反応 (依頼講演)  
徳永 信  
若手研究者のための有機化学札幌セミナー、有機合成化学協会東北・北海道支部主催、札幌、11 月 9 日 (2001)
- (8) 水やアミンを反応剤として利用する合成反応 (依頼講演)  
徳永 信  
平成 13 年度後期有機合成化学講習会、有機合成化学協会主催、東京、11 月 16 日 (2001)
- (9) ルテニウム触媒によるアルキン類への水和およびアミノ化反応 (依頼講演)  
徳永 信  
化学セミナー「21 世紀の基礎有機化学」、日本化学会北海道支部主催、札幌、11 月 17

- 日 (2001 )
- (10) シリカゲルに吸着された Pd-BINAP 錯体の不斉認識現象  
徳永 信、本田智子、若槻 康雄  
日本化学会第 81 春季年会、東京、3 月 26 日 (2002 )
- (11) Hydrolysis of Alkenyl Esters and Ethers Catalyzed by Metal Complexes  
M. Tokunaga, S. Hiraiwa, Y. Shirogane, Y. Obora, Y. Tsuji  
蓼科有機化学国際会議、長野、11 月 16 日 (2002 )

## 研究課題別評価

1. 研究課題名： 相同組換え時に DNA を回転させる蛋白質 RecA

2. 研究者氏名： 西中太郎

3. 研究の狙い：

大腸菌 RecA は相同組換えに必須の役割を果たすタンパク質で、単鎖 DNA と二重鎖 DNA との間の塩基配列相同性を探索し、相同鎖を交換する反応を促進させる。この反応を効率よく遂行させるためには ATP が必要であり、ATP の加水分解が伴うことによって平衡を生成物（ヘテロ二重鎖）に進めることができる。一方、DNA はらせん構造体であるから、単鎖 DNA と二重鎖 DNA との間の鎖を交換するためには DNA 分子が互いに回転する必要がある。RecA が DNA を回転させる分子モーターであるというアイデアは昔からあったが、これまでのところ数例の生化学実験による状況証拠しかなく、RecA 研究者には懐疑的な意見を持つものも少なくない。この問題を解決するためには、相同組換え反応に伴う RecA、DNA の回転運動を直接観測できる実験系を確立することが必須である。

本研究の狙いは、相同組換え反応における RecA フィラメント、(三重鎖) DNA の両らせん構造体の ATP 加水分解を伴って行われる回転機構を、1分子観察により検証することである。らせん構造は生物をかたちづくる際に非常に頻繁に出現する規則である。与えられた構成単位をある角度だけ回転させて積み上げる操作によって、らせん構造を形成することができる。そのらせん構造が実際に働いている「現場」には、その周期性をうまくいかした仕組みがあるに違いない。二重らせん構造を持つ DNA に、もう一本の鎖が加わって三重らせんとなり、塩基対の組み合わせを交換して新しい二重らせんが生じる。この仕事を円滑に進めるためには、「らせん」という構造をうまく動かせるための機構があると考えられる。

4. 研究結果：

RecA 単鎖 DNA 複合体フィラメントが外部の DNA を回転させながらフィラメント内部へ取り込んでゆく様子を 1 分子観測により初めて示した。

上の結果に基づき、RecA フィラメントが ATP 加水分解の流れとともに伸縮しながら DNA を回転させてゆく分子機構のモデルを創出した。(相同組換え反応の「ねじとナット」説)

RecA フィラメントおよび DNA を抗体二重染色法により光学顕微鏡下で可視化した。

RecA フィラメントを蛍光標識することによって RecA がフィラメントの末端から解離してゆく様子を実時間観測した。

5. 自己評価：

私がこの研究を始めたきっかけは、大学院生期間に私が手がけた RecA 蛋白質に結合した DNA の分子構造解析であった。相同組換え反応において DNA は RecA と結合することによって引き伸ばされ、巻き戻った極めて特殊な構造をとり、単鎖 DNA と二重鎖 DNA の相同鎖を交換する反応を行う。私は NMR でその単鎖 DNA の構造を決定し、それに基づいて単鎖 DNA と二重鎖 DNA が絡み合いながら鎖を交換する分子構造モデルを組み上げた。そのモデルは DNA 同士がねじれ、回転しながら鎖を交換してゆくことを暗示していた。このモデルが組みあがったのは 1996 年 5 月初頭の休日の夜の夜のことだった。その日以降、私はらせんが回るという不思議な魅力に憑かれ、これを何とかして見てみたいと思うようになった。そのようにして、さき

がけ研究に採用していただいたのだが、その時、具体的にどのような機構で RecA が DNA を回しているかきちんと説明できるわけではなかった。

私の行っている研究に対して、評価される方の意見は全く2つに分かれている。同じように私の中の自己評価も2面性がある。心を引き裂かれそうな思いでもある。1つの意見は実験的に回転の直接証拠を世界で初めて提示したことに対する賞賛にも近い好意的なものである。また、その回転のメカニズムに対してメカニカルなモデルを提出したが、その新規的かつ、明快さに対する驚きの感である。さきがけ研究の当初は私自身、1分子観測実験に対する経験、技量もなかったが、さきがけ研究のサポートと慶応大学の木下教授のグループの皆さんと研究を進めさせていただくことで、野心的、冒険的な実験に専心することができた。その結果、多くの方が RecA が力を出して DNA を回そうとしているのは事実かもしれないと感じるであろう。実験結果を得ることができた。(変な言い回しだが現時点ではこれしか言いようがない。) また、回転メカニズムのモデルについては主に電子顕微鏡での研究から得られた RecA フィラメントの構造パラメーターと生化学的実験から得られた ATP 加水分解活性の特徴、先の NMR による DNA 分子構造モデルに基づいているので、その独創性と正当性に対しては自信を持っている。これほどまでらせん構造の動的な特質を生かした反応機構は今まで考えられたことはなかった。一方で否定的な批判をする方は全く批判的である。私は回転の活性を見出したかも知れないが、それは回転ブラウン運動と同等ぐらいの活性でしかなかった。とすると、正味の回転をすべての人が納得するように証明することは非常に難しいということになる。実験に対して厳しい方は私の実験結果に対して冷淡でもあろう。また、いくら簡潔に美しく表現できようともモデルはモデルである。生物学の発展の歴史はモデルを提示されては否定されの繰り返しであった。私の提示した分子機構モデルは堅固な実験事実に基づいているわけでは決していない。いつどこで覆るとも限らない。私の研究はまだ中途半端な状態であることを認めないわけにはいかない。

私は私自身が科学的に真実の側に居るのか虚構の側に居るのか未だわからないのである。説得力にあふれる実験結果には誰もあこがれるし、実験というものはそのように計画されるべきなのかもしれない。私のような玉虫色からなかなか抜け出せないような実験を、しつこく続けているのは愚の骨頂であるかもしれない。しかし、分子機構モデルを導いた今はそれに基づいて実験系を組み上げ、議論することによって、少し前に進むことができるだろう。ほとんどの場合 1つの実験から明らかになることはこれっぽっちもない。私の研究は RecA の反応機構に対する大きな問題提起となるはずである。後世に DNA 相同組換え研究のブレークスルー的な扱いをされないとも限らない。あいまいな解釈を残していてもパイオニア的な実験はいつかはなされなければならないとも思う。私のやっていることは決して無駄ではない、そのような信念をもって実験を続けてきた。

それでも私は、明快さ、説得力のある実験結果を求めて、さきがけ研究の後期、RecA フィラメントの蛍光ラベルの実験に取り組んだ。RecA および DNA の運動を蛍光標識法によって実時間で追うことが可能になれば間接的に回転機構を証明することができるかもしれない。その結果、RecA フィラメントが時間とともに末端から乖離してゆくことを実時間で観測し、DNA を蛍光標識し、DNA が RecA フィラメントから抜け出てゆくことを観察できた。これらは 1分子実験の本領ともいえるべき一目瞭然、説得力のある成果である。しかし、私にとっては一種の妥協の産物ともいえる。私の最終目標は DNA が RecA フィラメントの周りをらせん状に回転しながら鎖を交換する現場を押さえ、その機構を明らかにするということである。

生命現象を研究している私達は太古の時代から流れてきている悠久なリズムを想起しないわけにはいかない。特に私はあらゆる生物を通して生命の糸を紡いできた DNA という歴史

書に畏敬の念すら覚える。そこには、生物学、化学、物理学、幾何学そういった学問が混沌として生命の関数をなし、原始の法則に同化していく。そういうものに自ら触れることに生命科学者としての喜びがあるのではないかと思う。

最後に領域総括を始め私の研究に関わったすべての方々にはこのような仕事をさせていただく機会を与えていただき、ただひたすら感謝している。私の研究生生活でこれほど実験に集中できたことはなかった。発表論文は多くないが、実験の結論に慎重にならざるを得ず、現在執筆中のものが多い。今後はこの3年間に培ってきたものを充実させまとめることとともに、それを基にして新しい分野へ発展させてゆきたい。

#### 6. 研究総括の見解：

単鎖DNAと二重らせんDNA間で相同鎖を交換して相同組換えを可能とする大腸菌 RecAがDNAを回転させる分子モーターであることを1分子可視法を駆使して証明しようとした。本人は必ずしも十分納得してないようだが、仮説は実証されたと見られる。分子生物学上価値ある知見と考えられる。

#### 7. 主な論文等：

##### 論文

“DNA rotation by a coordinated conformational change of RecA filaments”,  
T. Nishinaka, Nucl. Acid Res. Suppl. 1, 113-114 (2001)

“Homologous genetic recombination as an intrinsic dynamic property of a DNA structure induced by RecA/Rad51-family proteins: A possible advantage of DNA over RNA as genomic material”,

T. Shibata, T. Nishinaka, T. Mikawa, H. Aihara, H. Kurumizaka, S. Yokoyama, Y. Ito, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98, 8425-8432 (2001)

##### 口頭発表

(国際学会)

Taro Nishinaka, Kengo Adachi, Megumu Shio, Shukuko Ikawa<sup>3</sup>, Takehiko Shibata, Yoshie Harada, Kazuhiko Kinosita Jr, “Microscope observation of the rotation of DNA driven by RecA protein.”, 4th International Conference of Biological Physics 2001, Kyoto, July 30-August 3, 2001.

Taro Nishinaka, “Visualization of RecA filament under an optical microscope”, Biophysical Society 46th Annual Meeting, San Francisco, February 23-27, 2002.

(国内学会)

西中 太郎, “RecA フィラメントの協同的構造変化によるDNAの回転機構”, 第28回核酸化学シンポジウム, 横浜, 2001年11月7日-9日

西中太郎, “RecA反応の可視化”, 日本生化学会, 京都, 2002年10月14日-17日

西中太郎, “RecA フィラメントおよびDNA運動の可視化”, 日本生物物理学学会第40回年会, 名古屋, 2002年11月2日-4日

西中太郎, “RecA フィラメントのダイナミクスの顕微鏡観察”, 第25回日本分子生物学会, 横浜, 2002年12月11日-14日

## 研究課題別評価

### 1. 研究課題名 頭部の形成に関わる分子機構

### 2. 研究者氏名 橋本主税

### 3. 研究の狙い：

本研究のねらいは、脊椎動物において「頭部構造」が成立する機構を個体発生学および系統発生学的に解析することにある。脊椎動物の頭部構造は、頭部神経系に見られる特異的な分節構造やその形成過程など、基本的には見た目にも種を越えてよく保存されていることが分かる。さらに、頭部形成を支配する遺伝子も相同の遺伝子が使われており、魚類からヒトに至るまで進化的に共通の機構によって頭部の形成はなされていると考えられている。しかし、基本構造は保存されているものの、例えば魚類とヒトの脳を比較すると実際の大きさや、形、あるいは各部の大きさの比率など明らかに異なっていることも事実である。これら、頭部構造の形成を制御する機構のうち、どのような共通性によって脊椎動物間での類似性が保たれ、またどのような相違点によって種間における差異が生じるのかについて明確な足掛かりを得ることが本研究のねらいでもある。この目的を達成するために両生類であるアフリカツメガエル(以下ツメガエル)の頭部形成機構を形態学と分子生物学の両面から詳細に解析した。両生類も含めて脊椎動物における頭部形成制御の分子機構は基本的に共通であると信じられているが、現在までに知られている両生類の頭部形成過程は形態学的に見て他の脊椎動物種と比べてその発生様式が大きく異なっているために、「相同の分子が相異なる発生様式の中でどのように働き相同の構造を規定するのか?」という疑問が生じる。この疑問の解答を明確にすることで脊椎動物種間での分子機構と発生機構との関係を解析するのに良い材料と考えられる。さらに両生類は、頭部形成過程の研究の歴史的な蓄積がある上に、他の種と比べ発生研究の材料としての数々の利点があるために、他種の頭部形成制御機構との相似性・相違性を明確にすることによって、種間における共通点と相違点を組織レベルと分子レベルにおいて明らかにできることが期待される。

### 4. 研究結果：

#### 1) 頭部領域の決定。

脊椎動物の頭部領域は原腸形成期に決定される。原腸形成過程における頭部領域の特異化には、内胚葉組織である頭部オーガナイザーと予定頭部神経外胚葉組織の物理的相互作用が重要な役割を担っている。両生類以外の脊椎動物種においては、頭部オーガナイザー組織は初期原腸胚で予定頭部神経外胚葉領域と物理的に接して存在することが知られているが、両生類では頭部オーガナイザー組織と予定頭部神経外胚葉が物理的に接触するのは原腸形成の中期から後期にかけてであると言われている。しかし、その正確な時期は全く解明されておらず、このような発生様式の違いを起こさせる機構を明らかにすることによって脊椎動物の頭部形成を制御する普遍的な機構を求めることが重要である。

そこでまず、ツメガエル胚において頭部神経と頭部オーガナイザーの物理的な相互作用が起こる正確な時期を明らかにした。未分化外胚葉組織と頭部オーガナイザー組織が接する領域を生体染色することにより詳細に解析したところ、他の脊椎動物と同様に物理的相互作用は原腸形成期の非常に初期(ステージ10.25)にはすでに確立していることが示された。この結果はケラーサンドイッチと呼ばれる外植体を用いた詳細な解析からも支持され、これまで予定神経外胚葉組織であると信じられてきた組織は将来の表皮であるということが明確に示された。これらの結果から、



オーガナイザー組織はこれまで言われているように尾部から頭部へと胚内部を遡りながら体軸を形作るのではなく、まず頭部が決まった後に尾部方向へと体軸を形成させるモデルが示された。この視点に立つと、脊椎動物間での頭部体軸形成過程に組織運動のレベルで大きな共通点が見いだされる。見かけ上全く異なる運動様式によって頭部が決まるとされていた両生類が他の脊椎動物種と共通の機構によって頭部形成がなされることが明らかとなったことは、初期発生学の実験材料として最も使いやすいツメガエルの知見を基に脊椎動物一般に適応可能な統一機構の研究が進むことを意味する。

## 2 頭部オーガナイザーと体幹部オーガナイザーの形成と維持の機構

ツメガエルにおいて、頭部形成に重要な働きをする「頭部オーガナイザー」と、体軸形成に重要である「体幹部オーガナイザー」は、初期原腸胚において非常に近い領域に形成された後、それぞれ将来の頭部と体幹部の領域へと移動することが知られている。また、それぞれの領域を誘導する機構はかなり解析が進んでいるが、隣り合う細胞が頭部オーガナイザーとなり体幹部オーガナイザーとなる差別化の機構や、いったん誘導されたそれぞれの組織が他方の組織を誘導するシグナルによって分化転換を起こさない「維持」の機構については全く解析が進んでいない。

今回、体幹部オーガナイザー特異的に発現する bHLH 型の転写因子 Xhairy2b を新規に単離した。この遺伝子産物はショウジョウバエの hairy やマウスの HES の相同遺伝子であり、カルボキシル末端に特徴的な 4 アミノ酸モチーフ (WRPW) を有する。この遺伝子は体幹部オーガナイザーを誘導するシグナルによって発現が誘導され、またこの遺伝子の強制発現によって体幹部オーガナイザー遺伝子である chordin・follistatin の発現が誘導されることから、実際の発生過程でも Xhairy2b は体幹部オーガナイザー因子として機能することが示唆された。Xhairy2b をツメガエル腹側領域で強制的に発現させたところ、体幹部オーガナイザー因子として期待されるように頭部を有さない二次体軸の形成を誘導した。驚いた事に、予定頭部オーガナイザー領域に Xhairy2b を強制発現させることによって頭部オーガナイザーの形成を阻害し頭部形成を抑制した。ここで非常に興味深いことは、二次体軸の形成にはカルボキシル末端にある WRPW モチーフのみで十分であり、頭部形成の抑制には転写因子としての Xhairy2b が必須であったことである。これらの結果から、Xhairy2b は体幹部オーガナイザーに発現して体幹部オーガナイザーの機能の維持と共に、頭部オーガナイザーへの分化転換の抑制に関与することが示された。

## 3 頭部神経系のパターン形成機構

脳の領域化に関わる転写因子群の多くが転写補助因子 Groucho と相互作用する事実に着目して解析を進めた。まず、Groucho の機能を生体内で特異的に阻害するペプチド配列の同定を試みたところ、hairy 関連遺伝子産物のカルボキシル末端に存在する WRPW モチーフが生体内の Groucho の機能を特異的に阻害することを突き止めた。このペプチドを用いた Groucho の機能阻害が脳の領域化に、前脳・中脳の領域化の変化、神経堤細胞の分化パターンの異常や三叉神経節形成異常など多岐にわたる莫大な影響を及ぼす事を見いだした。

このような総合的な異常を一分子の機能阻害が引き起こす例は国内外を問わず他に報告がなく、現在もこの研究をさらに継続している。事実として、現在までに単離・解析がなされている脳形成に関与する転写因子において、そのほとんどに Groucho 結合モチーフが存在し、Groucho によるグローバルな調節が行なわれていることは強く示唆されるにも関わらず、転写因子は全て単独の分子機構としてのみ解析が進んでいるために、同時期に同領域で起こる転写制御機構の全体像の解明には至っていない。今回見いだされた Groucho の機能阻害による総合的な異常は、グローバルな調節を全体的に阻害したことを示している。したがってこの現象に関わる分子機構をそれ

それ素過程として抽出し解析した後、再度統合することで脳が形作られる過程に働く転写制御機構の全体像が見えてくると期待できる。

#### 4) 神経外胚葉組織によるオーガナイザーのパターン形成

頭部から尾部へと至る体軸の形成とその部域化にはオーガナイザー組織が一義的に制御していることが現在までに知られている。「魔法の領域」であるオーガナイザー組織が予定神経外胚葉を神経へと誘導し、また接しているオーガナイザーの領域に応じたパターン形成を受けるわけである。しかし今回、予定頭部神経外胚葉のパターンを人為的に乱すことにより、オーガナイザー自身のパターンに変異を与えることが分かった。この発見は、オーガナイザーによりパターン化された予定神経外胚葉組織が、自己のパターンをフィードバック的にオーガナイザー組織へと伝達し、その情報を元にオーガナイザー組織が再パターン化されるという新しいモデルを与える。

#### 5. 自己評価：

研究室の教授の逝去に伴い、学生の移動の面倒を見たり、研究室の後かたづけをしたりと、物理的には研究自体に取り組む余裕がなく、得られた成果自体には全く満足できていない。特に、研究の進展に伴って見えてきた新しい研究領域への萌芽を全く花開かせることができなかったことは残念の極みである。

唯一納得できる成果としてあげられるのは、研究終了直前によろしく受取された論文に関することであろう。この趣旨は、これまで80年間信じられてきた両生類における頭部形成機構の根幹に疑問を投げかけるもので、私の主張を研究の成果とともに世に問うことができたのは良かったと考える。

研究内容に関して言えば、転写補助因子に着目することで頭部神経形成の根本のしくみに迫る可能性を見いだせたことは今後につながる成果であろうと考える。また、現在までの発生学においては、組織の誘導・分化にばかり研究の中心があり、分化誘導を受けた組織や細胞がその性質を維持するしくみに関して分子レベルで解析された例はほとんどないが、本研究において「頭部」と「体幹部」の性質を維持する分子機構について明確に示すことができたと考えている。この段階までは納得できる成果である。

#### 6. 研究総括の見解：

これまで定説としてツメガエル胚で尾部から頭部へと中胚葉が移動しながら体軸が決まるといわれていたのに対して、まず頭部が決まったあとに尾部へ体軸が決定されることを実証した。ついで、体幹部オーガナイザーの新しい遺伝子(転写因子) X hairy2 b の作用を発見、さらに頭部脳の分化に関与する転写補助因子の Groucho の作用を明らかにした。これらの新しい知見はこれまでの定説に見直しを迫り、発生分化の新たな発展に大いに貢献するものと期待される。

#### 7. 主な論文等：

##### (1) 論文

Tetsuya Koide, Kazuhiko Umesono and Chikara Hashimoto, "When does the anterior endomesoderm meet the anterior-most neuroectoderm during *Xenopus* gastrulation?" Int J Dev Biol, In Press

##### (2) 総解説

なし

(3)口頭発表

国際会議

Chikara Hashimoto, "The establishment of a head field in the early *Xenopus* gastrula." 3rd Aso Meeting on Vertebrate Body Plan, Kumamoto, November 3-4, 1999.

国内学会

辻咲織 橋本主税、『特異的アミノ酸モチーフがどのように脳の領域化を制御するのか』第35回日本発生生物学会大会、パシフィコ横浜、2002年5月

## 研究課題別評価

1. 研究課題名 :共生藻を利用した原生動物の生存戦略の多様化

2. 研究者氏名 細谷浩史

3. 研究の狙い 本研究のねらいは、ミドリゾウリムシへの共生を可能にする共生藻由来の因子を、蛋白質レベル・遺伝子レベルで解析することを通じて、共生藻を利用した原生動物の生存戦略の多様化を議論できる科学的素地を確立することにある。

本研究の3年間の期間に、体内から共生藻を取り除いた「共生藻除去ミドリゾウリムシ」に共生可能な共生藻(以下、Aとする)および共生不可能な共生藻(以下、Bとする)両者の比較を行って、蛋白質レベル・遺伝子レベルの双方で、例えばAにのみ存在する因子、Bにのみ存在する因子を網羅的にピックアップし、その後、これらの候補因子の中から、共生に不可欠な因子、あるいは共生を不可能にする因子の同定を行っていく作業を行う。実験に使用する共生藻は、ミドリゾウリムシ体内から取り出され、既に複数クローン化されたものを準備済みであるので、これらの複数のクローン化共生藻を用いて、2次元電気泳動による構成蛋白質の比較を行う。また、mRNAをもとにした differential Display の方法による構成遺伝子の比較を行い、Northern 解析によって A、B 両者で発現量に差のある遺伝子の選別・絞り込みを行っていく。

この絞り込みを行うために必要な作業として、クローン化共生藻(以下、Cとする)と、それを共生藻除去ミドリゾウリムシに再共生させたあと、その再共生ミドリゾウリムシから再び単離・精製した共生藻(以下、Dとする)それぞれを、蛋白質レベル・遺伝子レベル双方で比較し、CにあってDにない因子またはDにあってCにない因子を複数同定するという実験を、同時に進行させる。これらの実験から得られた因子と、上記 A・B の比較により得られた因子を比較することにより、共生に関与する因子の絞り込みを行っていく。

以上の方法で実験を進行させていく段階で、本研究期間中に大きな問題が生じた。これは、「1996年ころにクローン化され、寒天培地上または液体培地上で保存されてきた複数の共生藻の、共生藻除去ミドリゾウリムシへの再共生能が、保存期間中に徐々に変化してきた」という点である。具体的には、これらの複数のクローン化共生藻は、以前は共生藻除去ミドリゾウリムシへ再共生可能であったが、本研究期間中に徐々にその共生能力を失い、大半が再共生不可能になった。従って、本研究申請時に、複数のクローン化共生藻の rRNA small subunit 配列を用いて分類系統樹を作成し、それぞれの共生藻の再共生能を比較したところ、再共生可能な共生藻(自由生活生のクロレラを含む)および不可能な共生藻がそれぞれ近縁のグループにまとまるという結果を提出したが、これらの大半の共生藻は、現在共生藻除去ミドリゾウリムシへの共生能を失っている、という状況にある。このため、新たにクローン化共生藻を作成し、共生藻除去ミドリゾウリムシへの再共生能を測定し、再共生可能なもの・不可能なもの(上記の A・B)を分類するという新たな作業を行う必要が生じた。

4. 研究結果：

ミドリゾウリムシより、複数の共生藻を新たにクローン化した。

これらのクローン化共生藻の、共生藻除去ミドリゾウリムシへの再共生能を全て測定した。

これらのクローン化共生藻および自由生活性のクロレラ(30種)の構成蛋白質を二次元電気泳動法を用いて解析し、泳動パターンにより六種類に分類できることを明らかにした。そのうち、二種の分類群は、A,B 一種類ずつの共生藻・クロレラから構成されており、それぞれの蛋白質を比較して、A にあって B にないもの、または B にあって A にないものそれぞれの蛋白質を単離し、現在プロテオーム解析によりそのアミノ酸配列を網羅的に解析して、因子の同定を行っているところである。

上記のクローン化共生藻および自由生活性のクロレラから mRNA を単離し、Differential Display の方法を用いて、A にあって B にない遺伝子、および B にあって A にない遺伝子を同定し、これらを順次 Northern 解析にまわして、AB それぞれで発現量に差のある遺伝子を逐次同定しているところである。現在までに、Differential Display のレベルで差のある因子を 35種類ピックアップし、これらの中から Northern 解析で差の見られた4因子を同定し、そのうちの3種類の遺伝子について遺伝子配列を解析した。これらの遺伝子は、human や chlamydomonas 由来の遺伝子に約 60%の相同性を示した。

上記、C、Dの比較を行うため、まず、ミドリゾウリムシから、細胞内小胞や膜デブリスなどを除いて共生藻を純粋に単離する方法を検討した(density gradient で約 60? 80%の sucrose 濃度で精製されてくることがわかった)。現在、CD それぞれの共生藻の蛋白質レベル、遺伝子レベルでの比較を、上記と同様の方法で行っている。

共生藻の遺伝子・蛋白質の比較を行っていく段階で、培養している共生藻それぞれの細胞周期各期における、(共生藻の形態および構成蛋白質・遺伝子に差が見られるか(あるいは、みられないか)という問題が浮かび上がってきた(つまり、同じ種の、同じ時期の共生藻でも、その増殖時期によってミドリゾウリムシへの共生能が異なる可能性があるのではないか、ということ)。そのために、FACS を使用して、培養開始後経時的に共生藻の形態(大きさや扁平度など)、DNA 量、クロロフィル量を調べているところである。また、これらをソーティングし、それぞれの(ミドリゾウリムシへの)再共生能を現在詳査しているところである。

## 5. 自己評価 :

3年の研究期間中に、共生に関与する共生藻由来の蛋白質・遺伝子の絞り込みを完了させることができなかった。

一方、研究期間中に、今後参考にすべき以下のような事実を新たに明らかにした。

培養期間中に、共生藻の共生藻除去ミドリゾウリムシへの再共生能が変化(低下する)という事実が起こり、また実験進行中に、共生藻自身の細胞周期を考慮にいれなくてはならないという事実気づいた。前者の原因として、クローン化共生藻自身のエイジングあるいは、共生藻に共生している新たな因子(クロレラウイルスなど)が存在して、その有無が共生に重要であり、培養中にこれらの因子が離脱したりして共生能に変化が生じたことなどが考えられる。今まで「クローン化されていた」と考えられていた共生藻に、新たに共生体(=クロレラウイルスやバクテリアなど)が共生している可能性があり、その点について今後検討を加えて行かなくてはならない。後者に関連して、クローン化し維持している共生藻自身の「同調培養」を行うことが今後急務である。

また、共生藻を捕食する側の「ミドリゾウリムシ」が、まだ純粋培養されていないため、宿主側の条件の不安定さを克服するため、今後、ミドリゾウリムシの無菌培養などの検討も視野に入れる必要がある。

## 6. 研究総括の見解：

葉緑体は光合成細菌が細胞に寄生しているうちに分化したと考えられている。本研究ではミドリゾウリムシに寄生するクロレラ藻に着目、非寄生のクロレラ藻との遺伝子の違いに着目して、目下4種類の遺伝子が見られた。野心的な研究であり、3年間の成果としては評価すべきである。進化との関連づけには長期間の研究を要するが、さきがけ研究21によって、その端緒が開かれたといえる。

## 7. 主な論文等：

- (1) B.I. Gerashchenko, N.Nishihara, T.Ohara, H.Tosuji, T.Kosaka and H.Hosoya (2000)  
Flow cytometry as a strategy for study of host-symbiont cellular interactions: Symbiotic algae in light of flow cytometry. *Cytometry*, 41, 209-215
- (2) 細谷浩史 (2000) 太陽エネルギーで生きる動物 **岩波 科学** 70, 636-641
- (3) B.I. Gerashchenko, T. Koaska and H.Hosoya (2001)  
Growth kinetics of algal populations exsymbiotic from *Paramecium bursaria* by flow cytometry measurements. *Cytometry*, 44, 257-263
- (4) B.I. Gerashchenko, T. Koaska and H.Hosoya (2001)  
New horizons for endosymbiosis of algae in *Paramecium bursaria* in light of flow cytometry.  
In: Recent Research Developments in Biophysics and Biochemistry.  
Managing editor S.G. Pandalai. Research Signpost. T.C. 36/248(1),  
Trivandrum-695 008, India, 1, 145-160
- (5) B.I.Gerashchenko, T. Kosaka and H. Hosoya (2002)  
Optical compartmentation of vegetating algae species as a basis for their growth-specific characterization. *Cytometry*, 48, 153-158
- (6) M. Tanaka, M. Murata-Hori, T. Kadono, T. Kawano, T. Kosaka and H. Hosoya (2002)  
Complete elimination of endosymbiotic algae from *Paramecium bursaria* and its confirmation by diagnostic PCR. *Acta Protozool.*, 41, 255-261

## 国際学会

- (1) B.I. Gerashchenko, T. Ohara, Y. Ishizaka, H. Tosuji, N. Nishihara and H. Hosoya  
Flow cytometry as a strategy for study of relationship between endosymbiotic algae and *Paramecium bursaria*.  
XX International Congress of the International Society for Analytical Cytology (Montpellier, France, 2000. 5)
- (2) B. I. Gerashchenko, M. Hino and H. Hosoya  
Enrichment for late telophase cell populations using flow cytometry.  
13<sup>th</sup> Heidelberg Cytometry Symposium (Heidelberg, Germany, 2000. 10)
- (3) M. Tanaka, M. Murata-Hori, T. Kadono, T. Kosaka and H. Hosoya  
Elimination of endosymbiotic algae in *Paramecium bursaria* confirmed by diagnostic PCR  
Endocytobiology VIII (Nagoya, Japan, 2001. 10)
- (4) T. Kawano, T. Kosaka and H. Hosoya

Impact of a sulfonylurea herbicide on growth of photosynthetic protozoa  
2<sup>nd</sup> European meeting on environmental chemistry (France, 2001.12)

(5) M. Tanaka, H. Hosoya, Y. Ishizaka, H. Tosuji, M. Kunimoto, N. Nishihara, T.  
Kosaka and N Hosoya

A new bioassay system of chemical substances in environment using green  
paramecia, *Paramecium bursaria*

2<sup>nd</sup> European meeting on environmental chemistry (France, 2001.12)

#### 国内シンポジウム等

(1) 細谷 浩史

日本動物学会中国四国支部シンポジウム 共生藻を利用したミドリゾウリムシの生存戦略の多  
様化」(広島 2000.5.20)

(2) 細谷浩史

日本原生動物学会シンポジウム 不思議な動物? 原生動物」  
(東京、2001.8.3)