（独）科学技術振興機構
創造科学技術推進事業
追跡評価用資料

ERATO
黒田カイロモルフォロジープロジェクト
(1999-2004)

2010．4．20

目次

目次 1
要旨 2
黒田カイロモルフォロジープロジェクトの展開状況（まとめ図） 5
第 1 章 プロジェクトの概要 6
1.1 スタート時の背景とプロジェクトの狙い 6
1.2 研究成果の概要 7
1.2.1 分子カイロモルフォロジー 8
1.2.2 生物カイロモルフォロジー 13
第 2 章 プロジェクト終了から現在に至る状況 16
2.1 各研究テーマの現在の状況 16
2.1.1 分子カイロモルフォロジー：新規な CD 分光計の開発 16
2.1.2 分子カイロモルフォロジー：新規な固体キラル化学の研究 17
2.1.3 生物カイロモルフォロジー 22
2.2 プロジェクトメンバーの活動状況 23
第 3 章 プロジェクト成果の波及と展望 25
3.1 科学技術への波及と展望 25
3.1.1 分子カイロモルフォロジー 25
3.1.2 生物カイロモルフォロジー 27
3.2 社会経済への波及と展望 29
3.3 参考事項 31
本文中で引用した参考文献 34
添付資料 ..... エラー! ブックマークが定義されていません。
A. 論文リスト ..... エラー! ブックマークが定義されていません。
B. 特許リスト ..... エラー! ブックマークが定義されていません。
C. 招待講演リスト ..... エラー! ブックマークが定義されていません。
D. 受賞リスト ..... エラー! ブックマークが定義されていません。
E. プロジェクトメンバーの動静 ..... エラー! ブックマークが定義されていません。

要旨

自然界においては、ミクロの分子からマクロな生物個体に到るまで、形のキラリティが普遍的に観察される。非生物世界では右手･左手型分子はほぼ同数存在し、ラセミ型や鏡像的な配置が一般的であるが、生物世界では L-アミノ酸或いは D-リボ核酸などのように、完全にホモキラルな世界が現出している。分子から構築される結晶や生物個体などマクロなものにもキラリティがある。本プロジェクトは、ミクロからマクロへの形態形成のプロセスをキラリティという切り口で探るという新しい概念をカイロモルフォロジー(Chiromorphology)と称することを提唱し、ミクロとマクロのつながりを非生物界および生物界の両方で明らかにすることを目指した。

プロジェクトは、分子と生物を対象とする 2 つの研究グループで構成された。分子カイロモルフォロジーグループは、主として固体状態における分子のキラリティについて研究を行った。一般に、キラリティの主たる偏光指標である円二色性(Circular dichroism: CD)の測定は、溶液や気体状態の自由な分子を対象としており、固体状態では分子間の相互作用が強く、固有の巨視的異方性が重なるため測定が困難であった。そこで、本プロジェクトではまず測定方法の開発を試み、全偏光成分の中から“真の円二色性”スペクトルの測定が可能な新たな CD 分光計 Universal Chiroptical Spectrometer(UCS)を世界で初めて開発した。

同グループは、この新しい測定法を用いて固体状態の分子におけるキラリティの研究に取り組み、今まで未開拓であった固相反応の分野で多くの基礎的知見を得た。まず、固体同士の粉末結晶を混合し、乳鉢で一緒に擦ると結晶の断裂と分子拡散による反応が起こり、溶液中とは異なる新しい結晶形が生成する現象を見出した。また、アキラルなポルフィリンがキラルなアミンの添加によって、固相中でキラルな超分子会合体を形成すること、或いは 2 種類の金属錯体結晶を粉砕混合すると、錯体間でキラリティの転写が起こること、コバルトと配位子の金属錯体は 2 つの核からなる複核錯体の構造を有することなど、固体状態での分子のキラリティの認識、転写、増幅に関する様々な現象を観察した。

一方、生物カイロモルフォロジーグループは、巻貝の 1 種、左右のヨーロッパモノアラガイを研究材料に選んだ。一般に巻貝の巻型は種によって決まっていて、両者がいるものは珍しい。ヨーロッパモノアラガイは右巻きが優性で自然界における数も多く、劣性の左巻きは少数である。巻型は遺伝的に決まり、母親の遺伝子型によって支配される遅滞遺伝の典型例である。また、巻型の左右性は初期胚の段階で決定されるが、左右性のキラリティを決定する因子や遺伝子などは未知であった。

そこで、これらの仕組みの解明のため、左右の巻貝の初期胚や母貝の生殖巣において発現するタンパク質成分や mRNA の同定、細胞成分のマイクロインジェクション法の確立、巻型決定遺伝子の純化のため戻し交配によるコンジェニック個体の作成など、基礎的な研究手法の確立を行った。また、左右巻貝胚のらせん卵割過程における細胞骨格系の視覚化を試み、抗チュブリンモノクローナル抗体を用いて間接蛍光法で胚の中の微小管を、蛍光ファロイジンで重合アクチンを染色して観察を行った。その結果、第 3 卵割（4 から 8 細胞へ）での細胞の分裂過程は、今までの常識であった鏡像対称ではなく、優性右巻き胚にのみ観察される細胞形態変化と紡錘体の傾きがあることを発見した。また、その形成にはアクチンが関わっていることを細胞骨格系に特異的に作用する薬剤処理により見出した。この研究結果は、2004 年 *Current Biology* 誌[1]に掲載されて高い評価をあたえられ、海外の生物の教科書"*Developmental Biology*"[2]にも収載された。

ERATO での基礎的成果は、2004 年より SORST[3]での研究、研究課題「カイロモルフォロジー：物質界･生物界における分子から分子集合体の構築」に引き継がれ、平成 22 年 3 月に終了の予定である。

分子カイロモルフォロジーグループが開発した UCS 分光計には更に改良が加えられ、感度が約 20 倍向上するなど、タンパク質試料などが測定できるよう装置の改良が行われた。さらに、UCS とはまったく異なる新しい概念のマルチチャンネル方式の装置の開発に着手し、光源や部品の大幅な簡略化と電子化が図られた結果、小型で高速な CD 分光計 MC-CD が開発され特許出願がなされた[4]。この実用化が達成されれば、汎用化に繋がり、キラル化学の研究の発展や化学製品の測定技術への応用などで、大きな波及効果が期待される。

固体反応に関する研究は、ERATO での基礎的な知見を更に発展深化させ、固体キラル反応の応用可能性を探究している。例えば、アキラルな物質とキラルな配位子により形成される自己凝集体の超分子や、金属錯体の超分子ヘリケートの研究などで多くの知見を得ており、その応用として、偏光機能を備えた柔構造体を形成させ、テレビなどの膜面に塗布するなど、電子光学への応用も検討されている。また、今まで困難であった 2 級アルキルアルコールの光学分割を、キラル複合体を使って成功させている。さらに、アルツハイマーの原因タンパクである β-アミロイドの立体構造の変化を、CD 測定によってリアルタイムに捉えることにより凝集プロセスの解明を試みている。或いは人工ペ

---

[1] Shibazaki Y et al., *Curr Biol*, 14, 1462-1467, 2004(参考文献 1)

[2] Sctott F Gilbert "Developmental Biology"8 ed., 231, 2006(参考文献 2)

[3] 科学技術振興機構　戦略的創造研究推進事業　発展研究(Solution-Oriented Research for Scinece and Technology　の略称)

[4] 特開 2001-311684、特許 4010760、特許 3940376(WO2004104563)

プチドのヘリックス構造への、システイン側鎖の導入によるキラル方向性の誘導などは、分子キラリティ研究の生物への応用として今後の発展が期待される。

生物カイロモルフォロジーグループは、ERATO 後も引き続き巻貝の左右の巻型決定遺伝子の特定を目指した分子遺伝学的研究を行い、決定遺伝子の遺伝的純化のためコンジェニック巻貝系統の作製をつづけ、F_{10}(RG 系統)および F_7(ADS 系統)段階へと来ている。また、ポジショナルクローニングによる巻型決定遺伝子の同定を集中的に進めている。染色体の中から決定遺伝子の座位領域を AFLP 連鎖マーカーと組換え個体により特定し、マッピングを行った。さらに BAC ライブラリー[5]を作製して染色体歩行を行なうことにより非組換え領域をカバーするクローンの同定を行い、塩基配列解析と遺伝子予測を行った。遺伝子候補の絞り込みと機能解析を行なっている。一方、発生初期段階における胚の形態観察から、左右の巻型が最初に顕在化する第 3 卵割期において、胚の小割球を人為的に逆方向へ動かすとその後の旋性方向や内臓の配置が逆転する現象をみつけた。脊椎動物と共通の Nodal シグナルが 8 細胞期のキラルな割球配置の下流にあることも世界で初めて明らかにし、2009 年に *Nature* 誌[6]に発表した。そのなかで、左右性を決定する遺伝子の機能についても推論している。

本プロジェクト及び後継プロジェクトでの研究から、新規な CD 測定法及び測定機が世界で始めて開発され、実用化へ向けた改良が行われたほか、固体状態の分子のキラリティの研究では、反応あるいは凝集による新規キラル構造体や超分子複合体の形成など、新たな光化学や固相化学の分野が開拓された。また、生物分野では、巻貝の巻型の旋性方式の機構解明が行われ、巻型決定遺伝子の特定があと一歩のところまできているなど、個別の研究項目については先駆的な優れた成果が出ている。

その一方で、成果についての見解が識者の間で一定していない。固体反応については、多くが現象の観察に止まって定量性が不明確であり、凝集体である生成物の物性に疑問があって応用が限られる。また、巻貝のキラリティの研究についても、すでに 10 年近い研究期間の割にはその進捗が遅く、他の材料での同様な研究に追い越されているなどの見方もある。しかし、線虫やショウジョウバエ、マウスなどのモデル生物と違ってゲノム情報、発現遺伝子情報がほとんどなく、分子・細胞・発生生物学的手法もまったく開発されていなかった巻貝を、動物の左右形成メカニズム解明のためのモデル生物の域にまで達成させた功績は大きいとする声が海外では高い。なお、分子と生物のキラリティの関連性を探ることをプロジェクトの達成目標に掲げてはいないが、同一プロジェクトにある分子・生物カイロモルフォロジーグループの関係が明確ではないという見方もある。SORST の研究が間もなく終了時期を迎える現在、これらの見解については、その終了と成果の報告を待って判断されるべきと思われる。

---

[5] BAC ライブラリー：バクテリア人工染色体ライブラリーの略

[6] Kuroda R et al., *Nature*, 462, 790-794, 2009(参考文献 3)

黒田カイロモルフォロジープロジェクトの展開状況 (まとめ図)

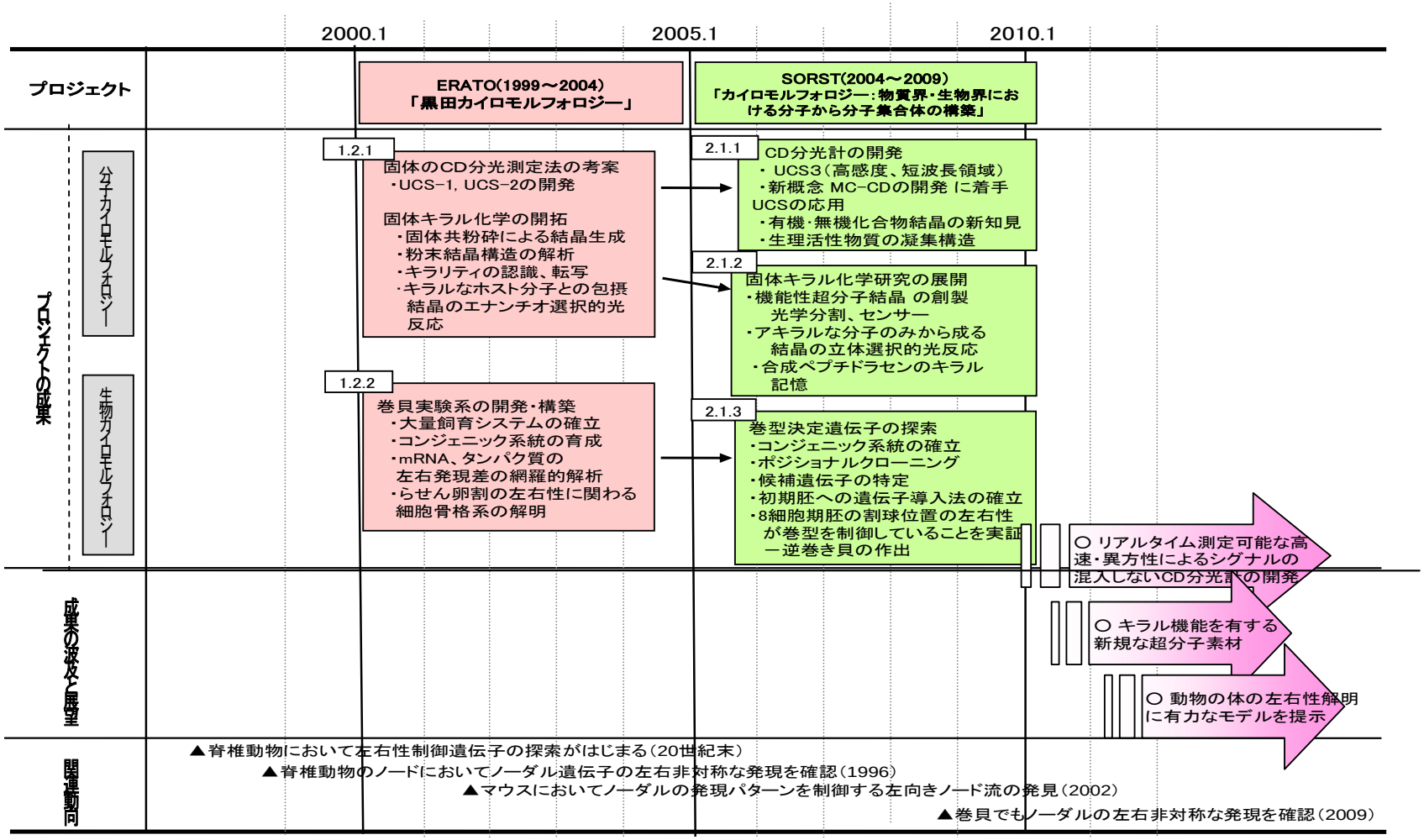


図　プロジェクトの展開状況（まとめ図）　（注）図中、枠内の数字は本文の章番号

第1章　プロジェクトの概要

1.1　スタート時の背景とプロジェクトの狙い

自然界においては、ミクロの分子から、マクロな生物個体に到るまで、形のキラリティが普遍的に観察される(図１参照)。非生物世界では、右手･左手型分子はほぼ同数存在し、結晶のようなマクロな物体でも、鏡像的な配置がみられる。これに対して生物世界では、完全にホモキラルな世界がみられ、核酸は D－(デオキシ)リボース、タンパク質は L－アミノ酸のみから構成されている。「カイロモルフォロジー(Chiromorphology)」は、chiral(左右非対称性)と morphology(形態)を融合させた造語で、ミクロからマクロへの形態形成のプロセスをキラリティという切り口で探るという新しい概念を表現している。“ミクロの分子は、どのようにして隣接分子のキラリティを認識・識別してマクロな結晶などの固体、そして生物体を形成していくのだろうか。”　本プロジェクトは、分子のキラリティと生物のキラリティの接点、遺伝情報と個体の形態にみられるキラリティの接点、換言すればキラリティから見たミクロとマクロの接点を解明しようとするものである。

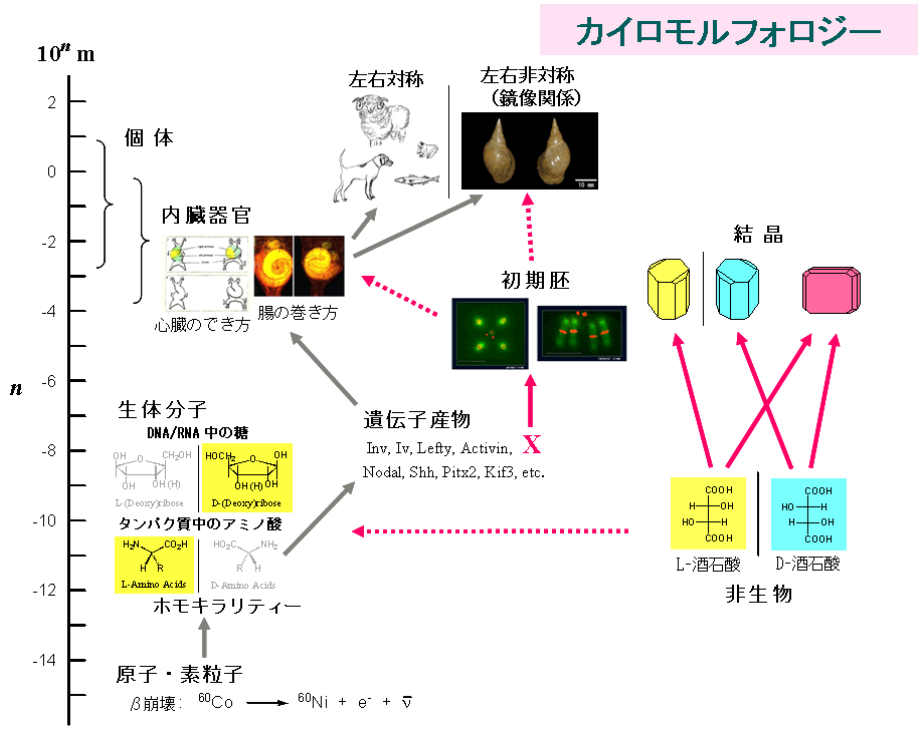


図 1　カイロモルフォロジー：分子からマクロの世界の形のキラリティ[7]

[7] 黒田研究室より提供資料

分子が属性としてもつ“キラリティ”の研究は、溶液状態や気体状態にある自由な分子を対象として発展してきた。これに対して、分子が密度高く充填されている固体状態では、分子はどのようにして隣接分子のキラリティを認識・識別してマクロな相を形成しているのか、まだ十分に解明されていない。例として、原始地球上に出現した生体分子のキラリティの選択が、固体状態において或いは固体表面において起こった可能性があると思われる[8]。

このような、分子から結晶、さらにはマクロな固体相におけるキラル化学の研究は未開拓な分野であり、研究手法および測定装置の開発からはじめる必要があった。結晶においては分子間の相互作用が溶液よりもはるかに強く、その絶対的分子構造はX線構造解析を主体に進められてきた。しかし、キラリティの認識、転写、増幅などのダイナミックな反応の研究にはキラリティの直接的観察が必要である。そこで、プロジェクトではまず固体試料を対象とした、円二色性(CD)など全ての偏光現象の測定が可能な新たな分光計の開発をめざした。さらに、その測定器を用いた種々の固体反応の研究に挑戦した。

一方、生物世界においては、多くの動物は外観においてほぼ左右対称性であるが、臓器など体内構造は左右非対称的であることが多い。本プロジェクトの構想時点で、脊椎動物の体内構造の左右の決定過程に関する研究が盛んになり、発生初期の後半の段階で非対称的に発現する幾つかの遺伝子が同定されていた[9,10]。しかし、胚発生の“ごく初期”における左右決定の仕組みや分子機構はまだ明らかになっていなかった。プロジェクトでは左右巻型の両方が天然に存在する巻貝を研究材料に選んだ。巻貝は体の外観も内部の構造も逆対称な、ユニークなシステムをもつ。一般に巻型は種によって決まっており、両巻がいるものは珍しい。ヨーロッパモノアラガイ(*Lymnaea stagnalis*)では右巻き型が優性で、左巻きは少数である。巻型は遺伝的にきまり、遅滞遺伝の典型例で、発生の初期に母親が有する遺伝子によって支配され、単一或いは連鎖した近接座位にある複数遺伝子により決定されていることがわかっているが、遺伝子はまだ解明されていない。巻型決定因子の同定が今回の大きな目標である。

1.2　研究成果の概要

---

[8] ERATO「黒田カイロモルフォロジー」プロジェクト終了報告書

[9] Burdine RD. et al. *Genes Dev* 14, 763, 2000(参考文献 4)

[10] Nonaka S. et.al., Nature, 418, 96-99, 2002(参考文献 5)

1.2.1　分子カイロモルフォロジー

分子カイロモルフォロジーグループは、固体状態の分子のキラリティの研究を行うため、従来不可能だった固体状態での偏光現象を測定できる、新たな分光計の設計と開発を行った。その結果、UCS-1 及び改良型の UCS-2 が開発された。また、これを駆使して結晶状態における様々な反応やキラル現象を新たに発見し、一部ではその機構を解明した。

(1)　固体専用 CD 測定装置の開発

固体試料の円二色性(CD)スペクトルの測定においては、偏光成分 CD だけでなく、固体特有な巨視的異方性の偏光成分である LB[11]、LD[12]、CB[13]、ORD[14]などがかぶってくる。それらの値は CD の 1000 倍にも達するときがあり、測定を困難にしている。そこで分光計の開発は、まず全ての偏光成分(universal)を測定したのち、その中から Stokes-Mueller matrix 法による計算プログラムを用い、LB などの異方性成分を除去して“真の CD”を得る方法の確立を試みた。波長は 190-800nm の可視紫外光の範囲で 50kHz、100kHz の二つのロックインアンプを搭載している。その結果、世界で初めて、溶液の CD に加えて固体 CD も測定できる分光計の開発に成功し、UCS-1(型番 J-800KCF)と命名した[15]。

さらに、測定対象を生体タンパク質やゲルなどのキラリティの測定に適用できるよう、重力の影響を考慮して平置きサンプル台にした UCS-2(型番 J-800KCMF)（図 2）を開発した。光路はプリズムを使って 90°垂直方向に曲げた。さらに、異方性の大きい微細粉末結晶を測定できるよう、積分球を導入した拡散反射光による CD スペクトルの測定機を考案した。これらの方式も世界で初めてのものである。化学や材料分野の研究では透過光の使えないものが多いことから、粉末を対象とした *in situ* の CD測定はニーズが大きい。また応用として、非破壊分析も可能である。

なお、これらの測定システムに関する基本特許の出願も行っている[4]。

---

[11] Linear Dichroism 直線二色性

[12] Linear Birefringence 直線複屈折

[13] Circular Birefringence 円複屈折

[14] Optical Rotatory Dispersion 旋光分散

[15] Kuroda R et al. *Rev Sci Instrum*, 72, 3802-3810, 2001(参考文献 6)

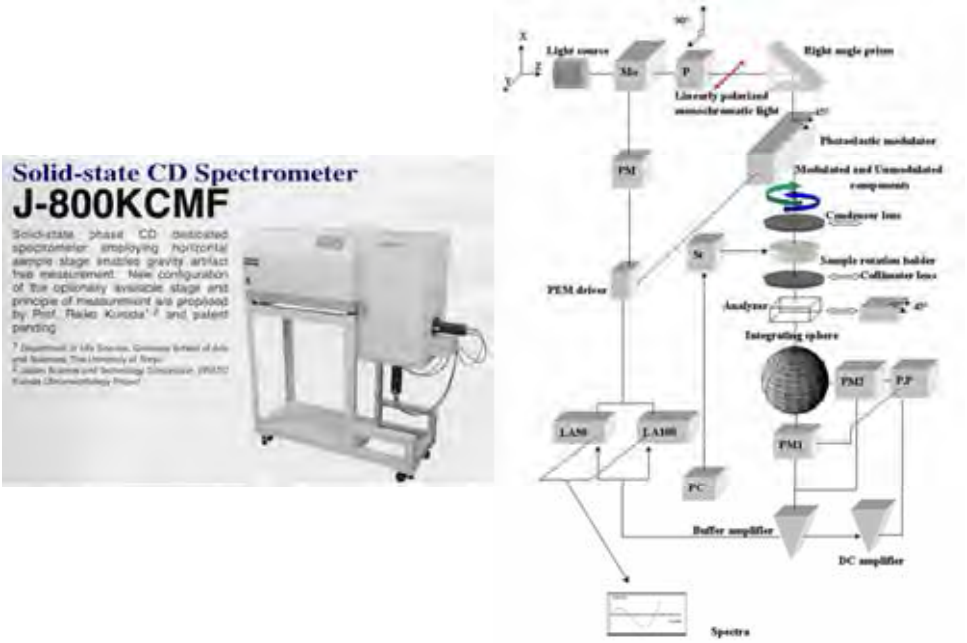


図 2　固体専用 CD 分光光度計 UCS-2 の機構図[16]

(2)　固体粉砕混合によって生成する電荷移動錯体結晶

固体同士の粉末結晶を混合し、乳鉢で一緒に擦ると結晶の断裂と分子拡散による固相反応が起こり、溶液或いは溶融とは異なる新しい結晶形が生成する現象を見出した。

白色でラセミ体のビナフトール(1,1'-Bis-2-naphthol: BN)と、黄色のベンゾキノン(1,4-benzoquinone: BQ)の粉末とを、1：2.5 のモル比で擦り合わせると、色調が徐々に変化し、薄い黄色からピンク、さらに赤色へと変って、新たな電荷移動錯体を形成し結晶化した。固体から生成した結晶 I は、溶液から生成した結晶 II 或いは溶融状態で生成した結晶 III とは、同じ赤色でありながら異なる新しい結晶構造を持っていた。即ち、結晶 I は *R*-BN： *S*-BN： BQ = 1：1：3 のモル比からなり、一方、結晶 II は 1：1：2 のモル比からなっていることを粉末X線回折により証明した。また、キラリティの認識様式も全く異なっていた。

次いで、固体反応による電荷移動錯体結晶の生成プロセスについては、反応が固体の表面からおこり、表層の脱離をしながら内部へ進行することを確認した。光照射、酸素、電界などの条件は反応に影響を与えなかった。また、反応エネルギーに関する考察を行った。さらに、上記の反応において、第 3 の成分としてビフェニール、アントラセンを用いる場合についても同様な検討を行った。その結果、電荷移動錯体結晶の生成に際し

[16] http://bio.c.u-tokyo.ac.jp/labs/kuroda/research_topic_top_molecular_group_j.html(黒田研究室 HP)

ては、固体粉砕混合の過程でキラリティの認識が起きていると推定した[17]。

このように固体粉末結晶同志の混合と擦り合わせによる反応が、溶液からとは異なる新たな結晶形を生じるという発見は、固相化学の発展における重要な契機になっている[18]。

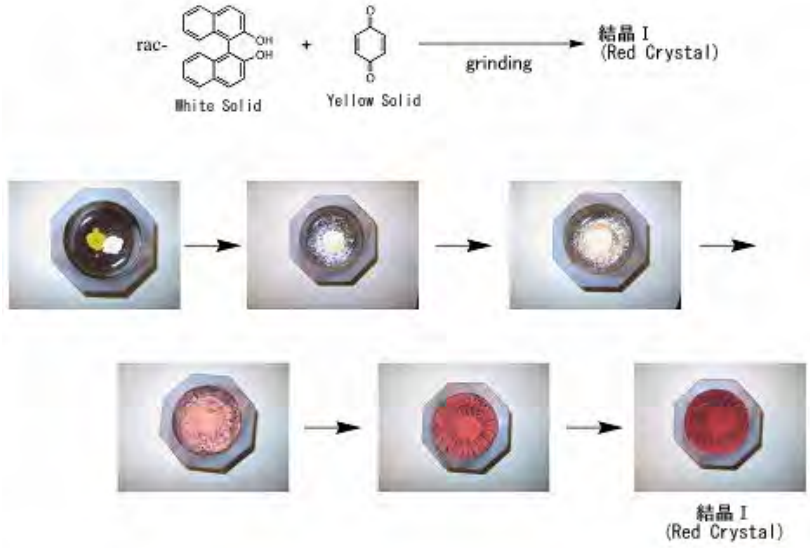


図 3　ラセミ体ビナフトール(白色)とベンゾキノン(黄色)の結晶の粉砕混合による反応物の色調変化 [16]

(3)　粉末X線回折パターンに基づく結晶構造解析

固体粉砕混合による結晶化は、得られる結晶が微細であるため、通常の単結晶構造解析の手法が使えない。英国バーミンガム大　K.D.M. Harris のグループが新たな粉末X線解析法を開発したことから、共同研究を行った。

ビナフトール、ベンゾキノン、アントラセンからなる粉末状3成分錯体結晶について、粉末X線回折データにより解析し、キラル選択的なトリプレット及びカルテット構造体が形成されることを見出した。これらの構造体ユニットが繰り返してネットワークを形成した新たな結晶体ができるが、これは固相での擦りあわせによってのみ形成され、溶液からのキラル非選択的な結晶構造とは異なるものであった[19]。

(4)　固体状態におけるキラリティの転写現象

2 種類の金属錯体結晶を粉砕混合すると、一方の錯体が光学的に不安定で容易にラセ

---

[17] Harada Y et al., *Dev Genes Evol*, 214, 159-169, 2004(参考文献 7)

[18] Kuroda R et al., *Chem Commun*, 2002, 2848－2849, 2002(参考文献 8)

[19] Cheung EY et al., *J Am Chem Soc*, 125, 14658-14659, 2003(参考文献 9)

ミ化する場合、錯体間でキラリティの転写が起こることを見出した。

キラルなルテニウム錯体の一方のエナンチオマーの結晶と、ニッケル錯体のラセミ化合物を乳鉢で粉砕混合し、250℃に加熱すると、ニッケル錯体が脱ラセミ化し、固体中でキラリティの転写が起こっていることを示した。この現象は、一連の遷移金属同志の間で、錯体結晶を持つ場合に観察される[20]。図 4 はルテニウム錯体の右手型結晶と左手型結晶を共粉砕－加熱すると、Δ–型錯イオンとΛ-型錯イオンがキラリティを認識して再配列し、ラセミ化合物結晶を生成することを示している。

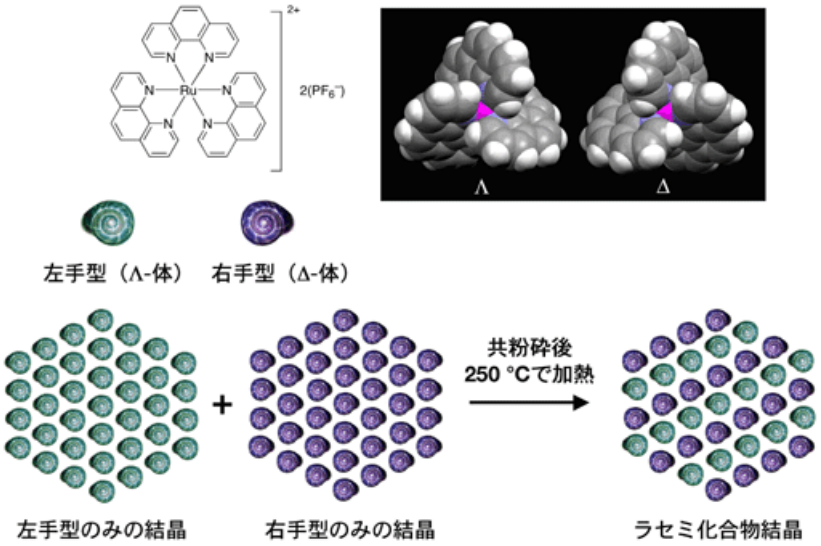


図 4　ルテニウム錯体の右手型結晶と左手型結晶の共粉砕-加熱によるラセミ化合物結晶の生成[21]

(5) 固体に特異的な分子構造を反映した光反応

一連の 2-arylthio-3-methyl-2-cyclohexen-1-one 誘導体は、溶液中と固体状態の結晶中では、異なった光環化反応によるキラルな結晶生成物を与えることがわかった。溶液反応ではほぼ *trans* 体のみが生成するのに対して、固相反応では *cis* 体のみが生成し、選択的な光反応が起こっていることを見出した。このような、固体特異的な分子構造を反映した位置･立体選択的な光反応の機作について解明した。

(6)　キラルな錯体の形成

アキラルなポルフィリンが固相中でキラルな超分子凝集体を形成することを見出した。亜鉛オクタエチルポルフィリン（図 5）を、ゲスト分子としてキラルな 1-シクロヘ

---

[20] Nakamura A et al., *Chem Commun*, 24, 2858-2859, 2004(参考文献 10)

Kuroda R et al., *CrystEngCommun*, 11, 427-432, 2009(参考文献 31)

[21] http://www.jst.go.jp/erato/project/kkm_P/kkm_g/01-4.html(科学技術振興機構　ERATO 成果集)

キシルーエチルアミンとともに、乳鉢で粉砕混合して CD スペクトルを測定した。反応は 4 日間にわたりゆっくりと進み、キラルなゲスト分子の影響で、固体内での分子の再配列が起こり大きならせん状錯体の会合体を形成することがわかった[22]。

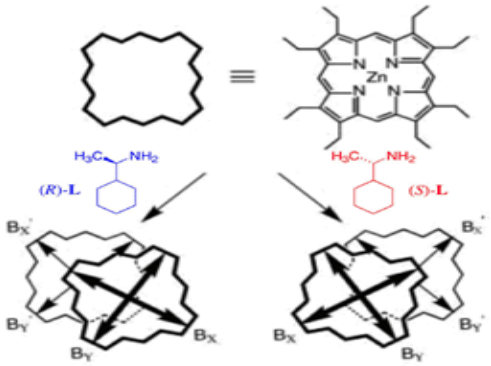


図 5　キラルリガンド（L）による ZnOEP の会合体形成の誘起 [21]

また、Co や Ni などの遷移金属とキラルな配位子の間で生成される金属錯体は、ヘリケートと称され、ヘリカルな構造を有する超分子であり、中心の金属の触媒活性を生かした不斉反応の触媒として注目されている。Co と配位子から調製した金属錯体は 2 つの核からなる複核錯体の構造を有することがわかった。このキラルな複核錯体（図 6）は水素結合で安定化し、8 つの構成要素が集ってヘリケート構造をとっていることを明らかにした[23,24,25]。

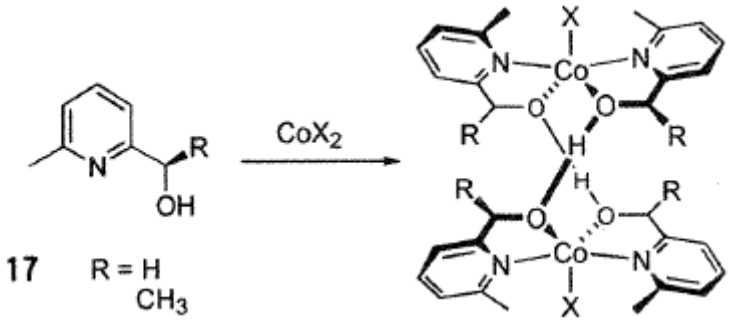


図 6　配位子間の水素結合によって安定化された遷移金属ヘリケート [7]

---

[22] Borovkov VV et al., *Angew Chem Int Ed*, 42, 1746-1749, 2003(参考文献 11)

[23] Telfer SG et al., *Chem Commun*, 9, 1064-1065, 2003(参考文献 12)

[24] Telfer SG et al., *J Am Chem Soc*, 126, 1408-1418, 2004(参考文献 13)

[25] Telfer SG et al., *Angew Chem Int Ed*, 43, 581-584, 2004(参考文献 14)

1.2.2　生物カイロモルフォロジー

生物カイロモルフォロジーグループは、キラリティの実験材料として選んだ巻貝の飼育方法の確立や、発生期の構造タンパク質或いは遺伝子を対象とする研究方法の確立に努めた。さらに、左右の巻貝の発生初期らせん卵割過程における細胞骨格動態の鏡像関係について、従来とは異なる新たな現象を観察し、その機構について研究した。

(1)　実験材料としての巻貝飼育システムの開発

好適な実験材料として北ヨーロッパを原産とするヨーロッパモノアラガイ(図 7)を選んだ。この貝は天然では右巻きが優性で、左巻きは非常に稀にしか存在しない。左右巻貝間での交配が可能で、遺伝学的アプローチを駆使することができることからこの種を採用した。元の系統は、ライデン大(Gitterberger 教授)、信州大(浅見助教授)、東京都立大(黒川助教授)より供与された。（注：肩書きは当時）

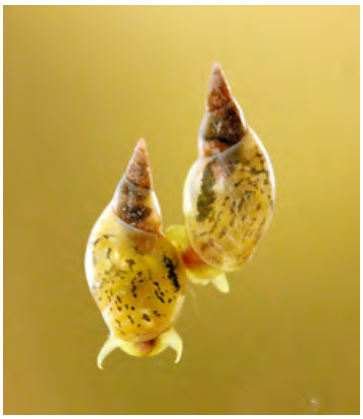


図 7　ヨーロッパモノアラガイの左右の巻型[26]

(2)　巻型決定因子の活性を評価するアッセイ系の確立

A. 受精卵へのマイクロインジェクションの手法の開発

ソトモノアラガイ(*Lymnaea peregra*) で観察されていた、左巻き型胚の卵割方向が、右巻き型の細胞質の注入によって右旋性へと逆転する現象の再現のため、マイクロインジェクション（物質顕微注入）の技術を確立した。逆転活性のある分子はすでに 1 細胞期胚に発現していると報告されている。

マイクロインジェクション技術は、卵及び卵割中の胚を対照に種々の遺伝物質或いはタンパク質などを注入し、その機能を検証する方法として応用範囲が広い。また、特定の遺伝子の注入による、巻型などの機能の制御方法となる可能性がある。

---

[26] http://www.asahi.com/science/update/1126/TKY200911260214.html(asahi.com 2009/11/29)

B.　遺伝学的手法による巻型決定遺伝子候補の評価システムの構築

左巻貝の遺伝的背景をもち、右巻き優性対立遺伝子のみを保持するコンジェニック個体を作成することをめざして戻し交配を続けており、巻型決定遺伝子の純化を目指しRG 系統Ｆ$_5$世代の作成に成功した[27]。

(3)　左右巻貝での差次的遺伝子発現比較からの決定遺伝子候補の単離

A.　細胞期胚におけるタンパク質の発現比較

左右巻型の胚に発現するタンパク質の相違を検出するため、1 細胞期の細胞質に含まれるタンパク質の二次元電気泳動（2-DE)、 微量スポットタンパク質の LC-MS/MS による分離と同定を行った。しかし、2-DE パターンは、左右巻型でほとんど差が無く酷似していた。東京農工大　柳田光昭（現 順天堂大）との共同研究により、MS/MS チャートから直接に部分アミノ酸配列情報を得ることができる de novo sequence 法という最新の手法を用いて、右巻きに多く発現するタンパク質 3 種の同定に成功した。

B.　母貝の生殖巣における mRNA の発現比較

巻型決定因子をコードする遺伝子の転写産物を、右巻きの母貝で高レベルに発現する mRNA から探索するため、生殖巣・肝臓サンプルより poly(A)+RNA を抽出し、ディファレンシャル、サブトラクションスクリーニングにより 8 種の候補遺伝子を得た。しかし、1 細胞期に発現しているのは 1 種のみで、遺伝学的な評価の結果目的遺伝子ではなかった [17]。

(4)　胚のらせん卵割過程における細胞骨格系の視覚化

A.　第 3 卵割のプロセスは、右巻き胚、左巻き胚で互いに鏡像対称ではない

抗チュブリンモノクローナル抗体を用いた間接蛍光法で胚の中の微小管を、蛍光ファロイジン染色で重合アクチンを染色し、共焦点レーザー顕微鏡による観察と 3 次元立体化を行った。その結果、第 3 卵割（4 から 8 細胞へ）では今までの常識であった鏡像対称ではなく、右巻き胚、左巻き胚で差があることを発見した。即ち、右巻き胚では、分裂中期に SD(spiral deformation)と呼ばれる細胞形態の変化が起き、各紡錘体は右旋的に配向した SI(spindle inclination)を示し、その後、分裂期には同じ大きさの 4 細胞から各々生じる小割球は右旋的に回転する。これに対して左巻き胚では SD/SI が見られず、小割球の左旋的な回転は第 3 卵割分裂後期に起こった（図 8）。また、右巻き胚に特徴的な SD/SI にはアクチン細胞骨格が関わっていること、また、左右決定遺伝子が第 3 卵割期の細胞骨格のダイナミックスを支配していることを突き止めた。

---

[27] Hosoiri Y et.al., *Dev Genes Evol*, 213, 193-198, 2003(参考文献 15)

この研究結果は、2004 年、*Current Biology* 誌(前出：報告書要旨参照)[1] に掲載されて表紙を飾り、*Science Now*(オンラインニュース)[28]も解説記事を掲げたほか、生物の教科書"*Developmental Biology*"[2] にも収載された。

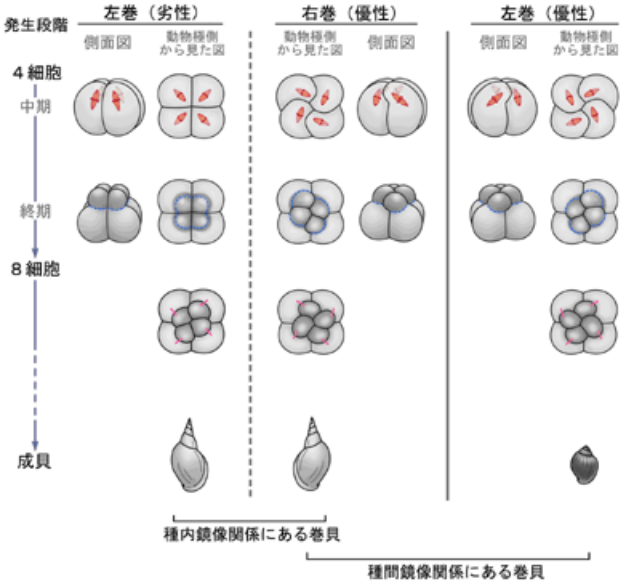


図 8　左右巻き貝胚の第 3 卵割期における細胞骨格動態 [16]

B.　優性種間では、細胞骨格動態は互いに鏡像対称的である

ヨーロッパモノアラガイの右巻きとサカマキガイ（*Physa acuta*）の左巻きという、種間で右巻きと左巻きがそれぞれ優性の場合には、その細胞骨格動態は互いに鏡像関係にあった。

[28] http://sciencenow.sciencemag.org/cgi/content/full/2004/827/4

第2章　プロジェクト終了から現在に至る状況

ERATO プロジェクトの終了後、研究は JST の SORST プロジェクトとして継続され、新たに 5 年間（平成 16 年 10 月から 22 年 3 月）実施された。研究体制としては、予算、人員においてやや縮小されたが、分子カイロモルフォロジーと生物カイロモルフォロジーの 2 つのグループ体制を継続し、個別のサブテーマでの目標を再設定した。現在、その 5 年間の研究成果の取りまとめが行なわれているところである。今回の調査報告は ERATO プロジェクト終了後に報告された文献や資料、面談調査で得られた情報、或いは共同研究を行っている関係先などの情報をもとに作成している。

2.1　各研究テーマの現在の状況

2.1.1　分子カイロモルフォロジー：新規な CD 分光計の開発

このグループは、ERATO で開発した UCS-1、UCS-2 の改良を行い、測定感度の大幅な上昇および生体試料への応用を試みた。さらに、白色光と 2 次元検出による測定装置を着想し、小型化を図るとともに、高速・高感度のまったく新しい概念の CD 分光計を開発した。

(1)　高感度・拡散反射 UCS の開発

原田拓典らは、UCS-1、UCS-2 の改良をめざして、拡散反射 CD の導入による直線複屈折(LB)測定と、感度のアップを優先した CD 分光計 UCS-2'の開発を行った。

集光率アップのため、積分球の径を従来の 12φから 6.5φへの最適変更、積分球反射材料を反射効率の高いテフロン系への変更、さらに分光系の高感度化などを行った結果、可視から紫外の全領域において従前機種の約 3 倍の検出感度を得ることができた。また、ビナフチル誘導体でのキラル拡散反射 CD の測定では同じく約 20 倍の感度上昇を示した。

さらに、測定波長範囲を 190nm～800nm と紫外領域へ拡大したことにより、有機化合物や、生体関連試料のキラルスペクトルの測定が可能となった[29]。

(2)　MC-CD 分光計の開発

いままで開発してきた UCS 分光計は装置が複雑であり、行列計算など特別な数値処理を必要とすることが普及のための障害となっていた。そこでこれらを大幅に改良した新機種を開発した。

---

[29] Harada T et.al., *Rev Sci Instrum*, 79, 073103, 2008(参考文献 16)

新方式は全波長の光を用いて測定試料を照射し、出力される透過または拡散光の偏光を走査分光して CD を測定する。従来は光を分光して単色光をつくり、波長ごとに左右の CD を測定していくため時間がかかったが、新方式では試料へ照射後の出力光を分光し、その強度を CCD 電子検出器で高速でスキャンすることで、従来の所要時間数分から、数秒ないし秒以下での測定時間となった。これにより生体反応などのリアルタイム測定が可能となる。

また、従来は入力光を単色光に分光するため光のロスが大きかったが、新方式では全波長を用いるので光源が小さくて済み、従来の 450Wから 150W、さらには 75Wになり、光源の熱冷却系も必要なくなって装置が大幅に小型化された。また、サンプル設置面を全反射界面とし、エバネッセント光を用いて CD 測定する方式なので、液体、固体（粉末を含む）、気体成分などどのようなサンプルも測定できるとともに、少量のサンプルで可能である。さらに、今までの異方性に関する修正計算が必要なくなり、プログラムが簡単になる。機器のサイズも卓上サイズとなる。

この方式をマルチチャンネル方式 CD 分光計(MC-CD)と名づけ、2008 年に特許出願した[30]。

2.1.2　分子カイロモルフォロジー：新規な固体キラル化学の研究

このグループは、固相反応におけるキラル現象の観察を進め、種々の超分子凝集体や超分子錯体を創製し、その構造解析や光学分割への応用を検討した。さらに、アルツハイマー病などの原因タンパク質の凝集動態などの研究に取り組んだ。

(1)　特徴的な化合物のキラリティ解析

A.　ポルフィリン誘導体の超分子構造

アキラルなポルフィリン誘導体が自己凝集して生成する超分子は、キラルな構造に変化するが(1.2.1(6)参照)、そのキラリティ反転の機構は不明であった。その過程を UCS-2' と AMF(原子間力顕微鏡)を用いて詳細に観測した。その結果、この反応には水が介在する水素結合による凝集反応があり、超分子が形成されキラルの反転が起こったことを明らかにした。

B.　キラルな等軸単結晶の直線複屈折の測定

UCS 分光装置及び Stokes-Mueller matrix 法による解析プログラムを用いて、塩素酸ナトリウム、臭素酸ナトリウムなどの等軸結晶の直線複屈折(LB)の測定を試みた結果、等軸結晶における巨視的異方性を世界で初めて実験的に検証することができた。

---

[30]　特開 2009-250765、WO2009123307

(2)　固体中或いは固体表面での分子の再配列機構とキラリティの伝播と増幅

A.　キラリティの認識による分子の再配列と新たな構造体の形成

固体同士、或いは固相と気相間の界面で起きている分子の再配列とキラリティの認識について、ベンゾキノンと、ラセミ体の 1,1'-ビナフトール誘導体（**1**）或いはπ電子系がより大きいラセミ体のフェナンスロール誘導体（**2**）を用いて、固体擦り合わせによる結晶化を検討した。その結果、**2** の場合、(*R*)-**2** と(*S*)-**2** の 2 分子のフェナンスロール誘導体と 2 分子のベンゾキノンから、図 9 のような新規な結晶形を有する"triplet"或いは"拡張 triplet"構造が形成された。

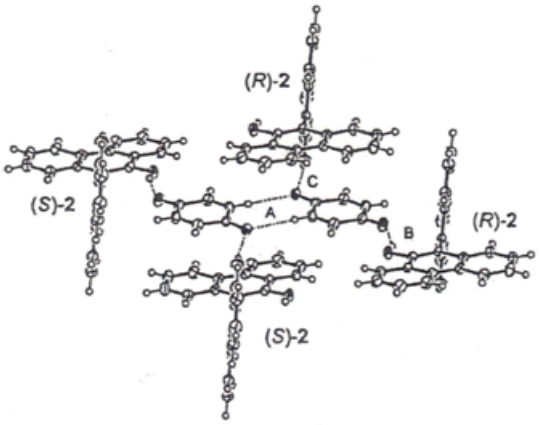


図 9　(*R*)-2 と(*S*)-2 と 2 分子の BQ からなる拡張 triplet 構造 [7]

B.　キラリティの伝播の事例

2-(2-Bromophenylthio)-3-methylcyclohexa-2-ene-1-one (I) は、$P2_12_12_1$, $P2_1$, *Pbca*, $P2_1/n$ の 4 つの異なる結晶系を生成することを見出した。溶媒の種類によっては、異なる多形が得られる。結晶化溶液に scaffolding 化合物(II)を添加すると(I)及び(II)化合物両方の晶癖が変わり、結晶表面を認識して $P2_1$ 結晶が成長し、その上に $P2_12_12_1$ の結晶が成長した。その際、$P2_1$ と $P2_12_12_1$ の結晶間でキラリティの伝播が起きていた [7]。

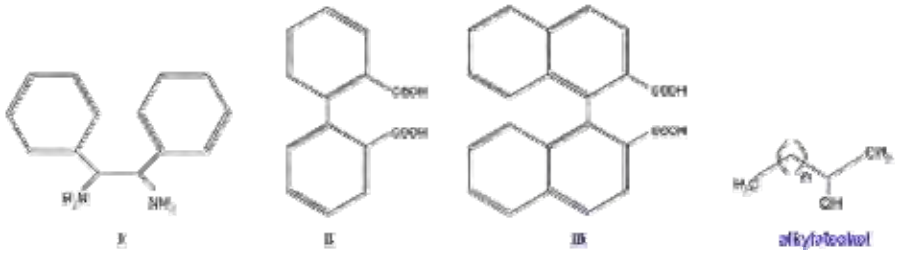
(3)　キラル超分子構造体の創製と光学分割への応用

近畿大へ移籍した今井喜胤は黒田との共同研究を継続し、2 種類の分子を組み合わせて、光学分割機能を備えた超分子錯体を開発し、光学分割への応用を試みた。2 級アルキルアルコールは光学分割が大変難しく、通常の分割法では高々0.2%*ee* (enantiomeric excess)しか達成できない。

光学活性な(*1R, 2R*)-diphenylethylenediamine (Ⅰ)と、キラルではないが軸不斉をもつ 2,2'-biphenic acid (II) を、2 級アルキルアルコールを溶媒として溶解すると、新たな

超分子構造を有する結晶体が形成され、そのキラルな結晶空間に、高いエナンチオ選択性を持って 2 級アルキルアルコールが包摂されることを見出した（図 10）。2 級ブタノールの場合には、91%*ee* という高い光学純度で*(S)*-2-ブタノールが得られた。

さらに、カルボン酸化合物として、アキラルな 1,1'-binaphthyl-2,2'- dicarboxylic acid (III)を用いると、(*S*)-2-ヘキサノール及び(*S*)-2-ヘプタノールが、それぞれ 71%*ee* と 70%*ee* の光学純度で取得された。このように、従来の方法では難しかった 2 級アルキルアルコールの光学的分割が可能となった[31]。



ところで、III の binaphtyl 化合物はキラル化学では重要な試薬であるが、その光学分割は今まで困難であった。そこで、上記の I とラセミ体の III を 2 級ヘキサノールに溶解し、最初にできた結晶を回収した。この結晶から回収された *aS* 体－III の光学純度は 99%*ee* であった。さらに、濾過液から結晶が回収され、これには *aR* 体－III が光学純度 98%*ee*、溶媒として用いた 2 級ヘキサノールも光学純度 62%*ee* で取り込まれていた[32]。

このように光学分割が難しい 2 種類の化合物の光学分割が、ひとつのバッチで連続的に、超分子化合物の結晶化によって達成できた。この研究報告は英国の *Chem Commun* 誌の内表紙を飾り注目を浴びた [32]。

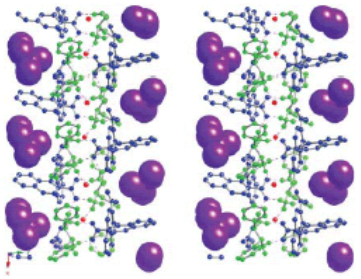


図 10　超分子構造体のポケットに包摂されるキラルな 2 級アルコール [32]

(4) 溶液中での超分子錯体生成によるキラル認識

金属錯体の超分子構造（ヘリケート、或いはメタロヘリケート）は、最近最も活発に

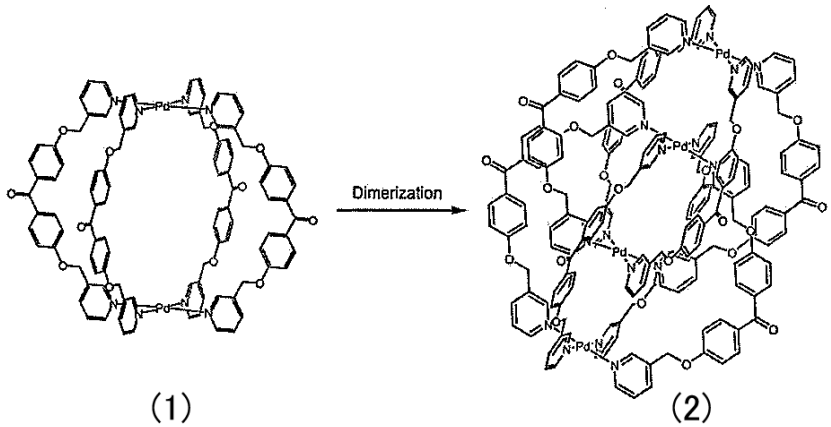
---

[31] Imai Y et al., *Chem Commun*, 26, 3289-3291, 2005(参考文献 17)

[32] Imai Y et al., *Chem Commun*, 10, 1070 -1072, 2006(参考文献 18)

研究されている分野である。今まで単環、二重鎖、三重鎖の構造はつくられていたが、四重鎖は稀であった。福田らは、新たな方法を用いて四重鎖の調製を試みた。

その結果、遷移金属の Pd^{2+}(パラジウム)と、ベンゾフェノンを二座架橋配位子(ligand：L）に用いてねじれを調節することにより、四重鎖ヘリケート$[Pd_2L_4]^{4+}$ (1)を自己凝集により調製することに成功した。さらに、NO_3^-または BF_4^-の存在下、2 つの四重鎖ヘリケート(1)が自発的に二量化して、定量的にインターロック型四重鎖錯体$[Pd_2L_4]_2^{8+}$ (2)を与えることを見出した。(2)は、熱的に安定であり、高温(>80℃)で長時間加熱しても殆ど単量化せず、二量化はアニオンテンプレート効果により駆動されることがわかった[33]。四重鎖ヘリケートの調製と二量化の新たな知見として注目される成果である。



(5) 合成らせんプチドへのキラル側鎖の導入と選択的らせん性の制御

タンパク質や DNA のらせん構造は生体中で重要な役割を演じている。タンパク質の中の α-らせんや 3_{10}-構造は、いつも右巻き(*P*)らせんであるが、これは L-アミノ酸中の α-炭素の非対称性により支配されている。逢坂直樹らは、3_{10}-らせんペプチドにおいて、分子内架橋が、片方向の巻き方を優先的に誘起するとの結果を初めて示した。

8 個のアミノ酸からなる人工ペプチド Cbz-$[Aib_2$-Api(Boc)$]_2$-Aib_2-OMe を合成して用いた。これは、結晶中或いは溶液中で 3_{10}-らせん構造をとるアキラルな主鎖である。らせん構造には右巻き(*P*)と左巻き(*M*)がある。これに対してキラルな側鎖として、2 個のシステイン(Cys) 残基を、Api の位置 2 箇所に導入した。次いで、これを酸化して Cys 分子間に *cis* 位でジスルフィド結合(*SS* 体)を形成させた。*SS* 体を有する合成ペプチドは、3_{10}-らせん構造には変化はないが、その向きは右巻き(*P*)特異的であった。*cis*(*P*)- *SS* 体は静的で安定ならせん構造をとることがわかった。

[33] Fukuda M et al., *Angew Chem Int Ed*, 47, 706-710, 2008(参考文献 19)

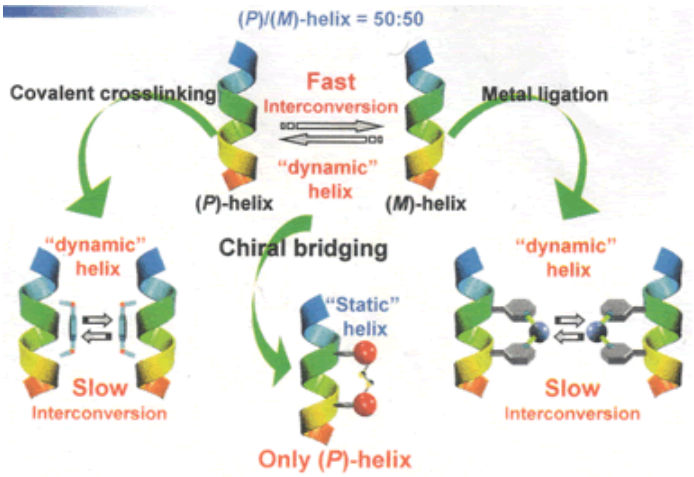


図 11 らせん構造の右巻き(*P*)と左巻き(*M*)の変換の模式図[7]

合成ペプチドのらせん(helix)構造に関する一連の研究から、その機構が模式的に図 11 にまとめられている。右巻き(*P*)と左巻き(*M*)が動的平衡状態にあるアキラルな主鎖に対して、側鎖に分子間共有結合[34]或いは金属錯体結合[35]を導入することにより、ペプチドはアキラルなままで緩徐に安定化する。これに対して、アミノ酸 Cys 側鎖を導入して側鎖間での *S*-*S* 結合による *cis* 架橋を形成させると、アキラルであったペプチドを、右巻き(*P*)のらせん構造 (*P*)-helix へと、選択的に導くことができる[36]。

この研究成果はキラル化学における新たな知見であり、分子と生物を結ぶ 1 つの形を示していると思われる。即ち、キラルな分子の凝集反応によって形成される超分子構造は、水素結合を介してらせん構造(ヘリケート)をとり安定化する。一方、生物の構成体であるタンパク質、核酸、澱粉にはらせん構造が存在し、今回の研究により、合成ペプチドではあるがキラルならせん旋性が誘導される機構が示された。このことは、分子と生物の両方向からの研究が、らせん構造のキラリティにおいてつながる可能性を示唆している。

(6) 生理活性物質の凝集構造と動態の解析

従来の CD 測定法では、生体膜のような光学的異方性のある分子集合体について、既に述べた理由から正しい測定ができなかった。

そこで、本研究で開発した UCS の透過測定モードを使用して、生体膜を含む系の CD スペクトルのリアルタイム測定を行った。まず、アミロイド前駆体タンパク質(APP)の中の、*β*-アミロイド(1-40)及び(1-42)の 2 次構造を構成する *α*-ヘリックスと *β*-シート

---

[34] Ousaka N et al., *J Am Chem Soc*, 130, 463-465, 2008(参考文献 20)

[35] Ousaka N et al., *Chem Commun*, 25, 2894-2896, 2008(参考文献 21)

[36] Ousaka N et al., *J Am Chem Soc*, 131 , 3820–3821, 2009(参考文献 22)

の構成比を測定した。次いで、経時的にα-ヘリックスからβ-シートへの構造変化と凝集が起きる過程を、CD(LD,HD)スペクトルを用いて観測し、β-アミロイドの凝集過程と中間体に関する種々の知見を得た。同様なアミロイドーシスを示すパーキンソン病の原因タンパク質であるα-シヌクレインについても、米国 NIH との共同研究を行って凝集過程を研究している[37]。

2.1.3　生物カイロモルフォロジー

生物カイロモルフォロジーグループは、巻型決定遺伝子の同定を目標に掲げて分子遺伝学的な研究を展開した。また、ERATO で見出した第 3 卵割期における可視的な構造において、人為的な巻型の誘導を試み、巻型決定方式と遺伝子の関与に関する新たな知見を得た。

(1) コンジェニック巻貝系統の作製と利用

ERATO において確立した実験材料のヨーロッパモノアラガイ について、コンジェニック巻貝系統の作出をおこなっている。左巻き系統をバックグラウンド系統とし、右巻き系統のみが持つ巻型決定遺伝子（優性右巻き決定アレル）をもった巻貝系統の作出を、右巻き系統をドナー系統とし、左巻き系統に対する連続戻し交配(backcross)により行っている。巻型決定遺伝子の純化のため続けてきた作出は、2009 年 11 月現在でF_7まで来ている。これについて純化の度合いを計算すると、右型遺伝子を 0.8% 、左型遺伝子を 99.2%含むことになる。ここまできても、巻型決定遺伝子を受け継いでいる母貝は必ず右巻き卵を産み、初期発生第 3 卵割では優性右巻きに特徴的な細胞骨格動態が見られ、それが遺伝子と連鎖していることが示されている。

(2) 母貝の生殖巣における mRNA の発現比較

遅延型遺伝方式を示す巻型決定因子の探索を目的として、母貝の卵母細胞より mRNA を調製し、右巻きと左巻きのサブトラクション cDNA プローブを作製し、別途作製した右巻貝の生殖腺 cDNA ライブラリーに対してディファレンシャルスクリーニングを行った。しかし、左右間で有意な発現差のある遺伝子は確認できなかった。

次いで、左右の巻型の違いが現われはじめる 1 細胞期胚に関して同様のスクリーニングを行った。右巻きに有意に多く発現しているクローンの同定には至っていない。

(3)ポジショナルクローニングによる巻型決定遺伝子の同定

この巻貝はモデル生物ではないのでゲノム情報がほとんどない。そこでそのような情

---

[37] 総括責任者談

報がなくても目的とする遺伝子に到達することができるポジショナルクローニングに戦略をしぼり、巻型決定遺伝子の同定に向けたアプローチを行っている。まず優性巻型（右巻き）と連鎖する AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)遺伝マーカーの同定を行い、巻型決定遺伝子近傍の遺伝マップを作成した。その後、BAC ライブラリーの作製、染色体歩行、多数の組換え個体の探索を行ない、複数の BAC クローンでカバーされる非組換え領域（巻型決定遺伝子を含む）を同定した。クローンのショットガンシーケンスとコンティグ作成、遺伝子予測を行ない、候補遺伝子の絞り込みまで進んでいる。

(4) らせん卵割でのキラリティの決定と制御

ERATO の研究において見出した、第 3 卵割期胚にみられる左右巻貝の旋性の違いに関連して、旋性を物理的に逆転させるとその後の発生過程のキラリティがどうなるかを実験した。

ヨーロッパモノアラガイを用いて、第 3 卵割期（4 から 8 への細胞期）の胚の小割球を微小なガラス棒を使って人為的に左右逆旋回の方向に動かし観察したところ、殻の巻型のみならず、内臓の配置も逆転して成長した。また、巻貝でも発見された臓器の左右性に関係する遺伝子 *nodal* や *Pitx*（後記 3.1.2(1)B 参照）の発現部位も、左右逆転していることを示した [6]。一方、第 2 卵割期に同様な操作をしても、逆向きにはならなかった。実験には、Guss Smit（オランダ・アムステルダム自由大）より 2004 年に供与された左右巻貝系統の子孫、およびそれらを純系化したのちに作成した戻し交配 F_7 コンジェニック巻貝を用いている。

この結果は、巻型を決定する母性の遺伝子が第 3 卵割期に機能し、その時期の旋性が巻貝の形態形成のキラリティの決定に重要であることを世界で初めて実証したことになる。ただし、物理的に逆旋したこれらの貝を親貝として、産卵を経て生育した子貝は全てもとの巻型であったことから、遺伝子レベルでは逆旋は記憶されていないことになる。この結果は、*nodal*、*Pitx* などの脊椎動物と共通する分子が関わることから、巻貝のみならず様々な生物種の左右決定方式にとっても重要な知見を与えることが期待される。また、キラリティ実験方法としても簡便な方法を提供している。これらの成果は 2009 年 11 月に *Nature* 誌 [6] に発表され、国内外新聞各誌・学術専門誌が大きく報じた。

2.2 プロジェクトメンバーの活動状況

総括責任者の黒田玲子は、上記 SORST プロジェクトの研究総括を勤めているほか、東京農工大、京都大[38]、米国 NIH, 英国バーミンガム大など、国内外の多くの研究施設

[38] Sue D et al., *J Org Chem*, 74, 3940-3943, 2009(参考文献 32)

との共同研究を実施している。また、日本学術会議会員、ICSU 副会長、スエーデン王立アカデミー会員、チャルマース工科大学名誉博士として、公職においても幅広く活躍している。このほか、2004 年第 4 回山崎貞一賞（計測評価部門）、2009 年度文部科学大臣表彰科学技術賞を受賞した。

分子カイロモルフォロジーグループのグループリーダーであった中村朝夫は、芝浦工業大学工学部物質系共通化学超分子化学研究室の教授に就任した。

同グループの研究員であった今井喜胤は、2004 年近畿大学理工学部応用化学科に移籍し、2009 年に講師に就任した。超分子化合物について活発に研究を行い、発表報文数は 2005-2009 年の間に 40 報と非常に多い。

同じグループの研究員であった Telfer Shane は、Institute of Fundamental Science Massey University（ニュージーランド）に移籍し、錯体の合成研究を続けている。

生物カイロモルフォロジーグループの研究員であった原田淑人は、名古屋大学大学院理学研究科附属菅島臨海実験所助教として研究を続けている。

本プロジェクトからの学位取得者は、生物で 3 名、分子で 2 名の計 5 名であった。

第3章　プロジェクト成果の波及と展望

3.1　科学技術への波及と展望

3.1.1　分子カイロモルフォロジー

UCS の開発と新たな固相反応の開拓による、固体状態におけるキラル化学の展開と応用の可能性、並びに波及効果について考察した。

(1)　UCS の開発

本プロジェクトが開発した UCS 装置は、固体を対象とするキラリティの測定が可能な世界で最初の装置である。1 号機、2 号機、2'号機と改良に努めた結果、有機･無機化合物や生体系物質など測定対象も多岐にわたって適用可能となり、新しい分光計測装置として確立された。

この装置は、今まで測定が不可能であった異方性の高い固体のキラリティを検出し、真の CD の測定を可能とした。その原理の考案は、キラル分光計の測定対象を固体試料にまで拡大したこと、その結果、固体を対象としたキラル化学分野の現象と原理の解明に寄与することが期待される。

装置が世界唯一のものであることから、多くの研究者から測定依頼がきており、共同研究も行われている。測定依頼は新たに合成された化合物やタンパク質試料が多い。自前及び共同研究先からの報文が年 10 報ほどの割合で出ている。

しかし今後は、より多くの研究者が使用できるよう、装置、使用法の簡便化などを図り、更に利用範囲が広がることを目指すべきと思われる。その意味で、現在開発が進められている MC-CD 分光計は、新たな測定原理と最新の電子光学技術に基づくものであり、汎用化が期待できる。それにより当初めざした CD 測定対象の固体への拡大だけでなく、キラル化学の全領域にわたって研究の活発化が促進されるとみられ、大きな波及効果につながる可能性がある。

(2)　新しい固体化学の発展のため未開拓の領域を先導

ERATO から SORST へと継続して実施された本プロジェクトは、分子や結晶レベルのキラリティに関して様々な現象を新たに発見し、その機構を解明するなど、大きな成果を上げた。固体の粉末結晶を混合して乳鉢で一緒に擦るという、技術的には一見原始的な手法であるが、結晶の断裂と分子拡散による固相反応が起こり、溶液或いは溶融状態での反応とは異なる新しい結晶形が生成する現象を見出した。その中には、キラルの認識、伝播、増幅、転移など、固体状態の分子特有の未知なる現象が数多く含まれ、本

プロジェクトではそれらの機構を解明して、固体化学の発展に貢献している。なお、固相での反応の場合、混合の均一性や粒子径のばらつきに基づく定量性などの問題があってきれいなデータになりにくく、科学的な研究として評価しない研究者もある。現象の観察から、いかにして理論科学へと発展させるかが課題であると思われる。

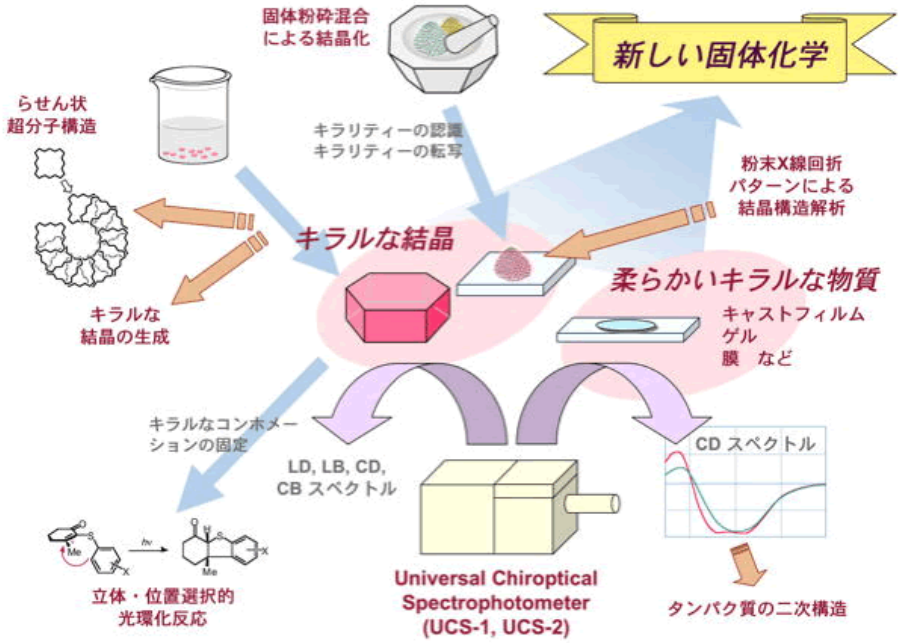


図 12　キラルな反応の測定と応用による固相化学の新たな展開[7]

図 12 に、UCS によるキラルな反応の測定と、固相反応によるキラルな分子集合体の生成による、新たな固体化学の展開図を示した。

その中での応用的展開としては、金属錯体などキラル機能性物質材料やキラル超分子構造体の創製、光学分割などがあり、その領域はさらに増えていくと思われる。次項にそれらの事例を掲げた。また、柔らかいキラル物質の CD スペクトル測定が可能となったことから、キラル機能をもったゲル状物質のフィルムや膜の調製、更にはタンパク質の 2 次構造の動態変化などへの応用が期待される。

(3)　キラル超分子構造体の創製

2 種類以上のキラル或いはアキラルな化合物をすり鉢で混合して、超分子化合物或いは錯体複合体ができるが、これは化学反応ではなく、水素結合を介して自己集合(self-assembly)し凝集している結晶体である。したがって反応に必要とするエネルギーは少なく、反応時間も短い。組み合わせる化合物の種類によって様々な複合結晶ができる。例えば、キラルなジアミン化合物とジカルボン酸化合物から、新たな光学活性超分子錯体が生成される。超分子錯体を構成する化合物や、ホスト分子とゲスト分子との組合せによっては種々の光学活性反応への応用が可能とみられ、その範囲は極

めて広い。最近の研究においては、(11*R*,12*R*)-9,10-ethanoanthracene-11,12-diamine を用いて構造体の強固なものも得られ、実用性が増してきた[39]。

その中でも、らせん構造をとる金属錯体超分子（ヘリケート）は、最も活発に研究されている分野で、中心の遷移金属の触媒活性を生かして機能性を備えた新素材や不斉触媒、医学的診断などの応用分野が開拓されている。遷移金属を含む数種類の成分の自己凝集で、低エネルギーで製造することができる。本グループが研究をしてきた、Co や Ni、Ru など遷移金属を核とキラルな複核錯体、Zn ポルフィリン化合物、或いは Pd の四重鎖ヘリケートとその二量体の形成とキラル機能の付与など、この分野では世界の研究をリードしており、新たなる発展が期待できる。

(4)　光学分割

2 級アルキルアルコールはキラルの分離が難しく、純粋な *R* あるいは *S* の試薬は 1mg 数万円もする。キラルカラム(HPLC)による分離(ダイセル)や、選択的結晶化などの製法があるが、収量は低い。

本研究では、キラルとアキラルの 2 種類の分子を組み合わせて、光学分割機能を備えた超分子錯体を形成させ、これを用いて光学純度 91%*ee* に達する 2 級ブタノールを選択的に取得することに成功した。ブタノール以外のペンタノール、ヘキサノールなどのアルキルアルコールでも同様なことが可能である。

ただ、これらの製法を光学的に純粋な 2 級アルコールの製造に持っていくには、光学純度 *ee* %をもっと上げる必要がある。製薬メーカーなどは 100%近い純度を要求している。1 回の結晶化だけで 91%*ee* という高い光学純度が得られたので、再結晶・蒸留で 100%に近い光学純度が簡単に得られるはずである。ここでは基本原理に関する特許出願をしていないので、あとは企業などの関心を待つということで、これ以上の工業的な製法検討はしていない。

3.1.2　生物カイロモルフォロジー

巻貝における巻型決定遺伝子の研究に関連して、生物におけるキラル制御遺伝子の研究動向を調査し、この研究の位置づけや意義について述べる。

(1) 巻型決定遺伝子に関する研究動向

A. 動物におけるキラリティ制御遺伝子の研究例

動物では、発生段階の胚では左右対称であったものが、分化の過程で左右非対称になり、臓器の配置などがきまる。左右性に関与する遺伝子として *nodal*、*lefty*、*cerl* など

---

[39] Imai Y et al., *Cryst Growth Des*, 9, 602-605, 2009(参考文献 23)

の機能が研究されている。*Nodal* は細胞分裂を促進する TGF-β ファミリーの 1 つでシグナル因子であり、臓側内胚様(DVE)の細胞分裂を上昇させる。これに対して、*cerl* や *lefty* が *nodal* の発現を抑制する作用をもっていることから、*nodal* と *lefty* とは左右逆の配置へと誘導すると考えられている。

大阪大　濱田博司らは、科学技術振興機構の CREST「生命活動のプログラム」の研究課題を推進する中で、マウスの胚の中心部にあるノード細胞に存在する絨毛が回転運動することにより左向きの水流（ノード流）が発生し、その方向で臓器の配置が決まることを見出した。そこで、人工的に水流を逆転させたところ左右逆向きの配置になった。ノード流を失った変異マウスではランダムな配向になったと報告している[9]。

そのほか、モデル生物である線虫やウニでも同様の研究が行われている。ショウジョウバエでは左右の逆転に関与する遺伝子としてミオシン 31DF 遺伝子（Myo31DF)が同定された。この遺伝子は非定型ミオシン MyoIA をコードしており、アクチン上を動くモータータンパク質が左右性に関与していると報告した初めての例である[40,41]。

B.　巻貝におけるキラリティ制御機構の研究例

多くの生物種において、左右の非対称性に関係する遺伝子 *nodal* の存在が調べられているが、巻貝が属する lophotrochozoa 冠輪動物では、*nodal* と同じ働きをする因子は今まで見つかっていなかった。2009 年 Grande らは、左右の 2 種類の巻貝ではじめて *nodal* 及び *Pitx*（Nodal シグナルの標的の 1 つ）を発見した。右巻きの貝では両遺伝子とも胚の右側で発現し、左巻貝では左側で発現していた。*nodal* 及び *Pitx* の発現は、32 から 64 細胞期に始まる。しかし、その細胞期には左右の方向性は既に決まっている。巻貝の最初の巻型キラリティは 4-8 細胞分裂胚において決定され、そのあと、*nodal* などが発現するようである[42]。

巻貝の巻型の進化様式については、上島らのカタツムリにおける研究が 2003 年に報告されている[43]。国内のカタツムリ 20 種について、ミトコンドリア遺伝子の系統樹を作製し、右巻き(優性種)と左巻きの遺伝様式について解析した結果、全ての左巻き種は単一遺伝子の変異により右巻きから進化していること、及び、優性種は交尾形式の上で有利に働いていることが明らかにされた。

---

[40] Hozumi S et al., *Nature*, 440, 798, 2006(参考文献 24)

[41] Speder P et al, *Nature*, 440, 803, 2006(参考文献 25)

[42] Grande C et.al., *Nature*, 457, 1007-1011, 2009 (参考文献 26)

[43] Ueshima R et al., *Nature*, 425, 679, 2003 (参考文献 27)

C. 植物におけるキラリティ制御遺伝子の研究例[44]

奈良先端大の橋本隆らは、アサガオのつるやヘチマの巻ひげなどでみられる、巻きの左右性を決定する遺伝子群についての研究を行っている。左巻きが優性のアラビドプシスを用いて、右巻きのねじれ変異株を取得し、原因遺伝子をクローニングしたところ、これらは細胞の伸張方向を決める表層微小管結合タンパク質をコードしていた。変異は微小管構成成分である α-と β-チュブリン・サブユニットの構成遺伝子の中の、主として GTP-ase activating region にマップされるアミノ酸の置換や欠失であった。これらの変異がチュブリンタンパク質の立体構造や重合方式を変え、巻型配向を制御する分子機構を明らかにした。

(2) 発生生物学分野へのインパクト

黒田カイロモルフォロジープロジェクトの提唱した発生生物学でのキラリティの研究は、さまざまな生物の左右非対称性を決定するメカニズム研究の新しい契機となった。特に、2004 年に *Current Biology* に発表した論文 [1] で、モノアラガイの左右の巻き胚の発生過程が鏡像関係にないとの発見が、今までの常識を覆すものとして大きな反響を呼んだ。*Science* 誌 [28] が解説記事を掲載し、「初期胚にみられる左右非鏡像性の細胞骨格タンパク質が関与」と世界的な発生学の教科書 [2] で紹介され、その波及効果は大きかった。

上記の動向で述べたように動物では *nodal* 遺伝子を中心として機構の解明が進み、植物では標的分子の立体構造の制御が解明され、キラリティ研究で先行しつつある。これらの研究は、生物の発生から、分化の制御、臓器の配置など、さらには将来の再生工学へのつながりを視野に入れている。

また、前述のように、2009 年、巻貝でも *nodal* と *Pitx* の存在が確認され、同様な機構が存在すると考えられる。ただし *nodal* の発現は 32-64 細胞期と遅い段階であるため、黒田グループのめざす 4-8 細胞期での左右配行性因子、遺伝子が解明されれば発生学分野での新たな発見となる。その意味で、最近 *Nature* 誌に報告された 4-8 細胞期での人為的逆旋の実験は、大きな成果をもたらした [6]。母性に由来する巻型決定遺伝子の働きが、初期胚の物理的配置を決めていること、そのあとの Nodal カスケードをも支配していることなどが示された。さらに決定遺伝子の同定により、その仕組みの全容が明かされることが期待される。

3.2 社会経済への波及と展望

研究成果の中で、新たな CD 分光計の実用化や超分子錯体の応用への可能性、並びに

---

[44] Ishida T et al., *PNAS*, 104, 8544-8549, 2007 (参考文献 28)

生体内タンパク質の測定と診断応用への可能性などについて考察した。

(1)　UCS 及び MC-CD 分光計の開発と実用化への動き

本プロジェクトで開発した UCS 測定機に関しては、数件の特許出願を行い知的所有権の確保とその製品化を目指している。もしこれが実現すれば国産の科学技術、産業の創製に寄与するものと思われる。UCS は固体以外にも市販の装置と同様に溶液状態も測定できる。これらの開発は某企業の支援を得て行ったが、プロトタイプの装置は東大のラボにあり、同社は今のところこれを商業化する考えはないようだ。その理由は明らかではないが、おそらく、測定方法や計算プログラムが複雑で特殊技能が必要であること、製品化コストと販売台数などの採算の見込みがもてないなどがあるとみられる。因みに同社は溶液状態での測定を主とする CD 分光計を販売し、世界で圧倒的なシェアーを誇っている。

これに対して、現在開発中の MC-CD 分光計は、UCS の問題点を改良した機種であり、商業化の意味では大いに期待が持てる。すでに 2008 年に国内、海外に特許申請を提出している [30]。その特長は、光源ほか装置全般がコンパクトで卓上設置できること。測定対象が固体のみならず、液状を含め広範囲な試料を対象としていること。測定時間が極めて短く、計算プログラムも簡単なことなどである。それゆえ価格も大幅に安くなり、上記の汎用分光計の 3 分の 1 程度になるとの見方もあり、性能的にも価格的にも対抗できる可能性がある。勿論まだ試作段階のことであり、実用化のための開発が必要である。また、上記の汎用機に関しても、改良と価格ダウンによる対抗策は可能であろう。

CD 測定については、1992 年に FDA は全ての化学物質製品について DL の分割を求めており、簡易な CD 測定法が必要となっている。MC-CD 分光計はこの測定需要に対応でき、標準化も狙える可能性があることから、商業化が実現すれば産業的にも大きな波及効果があるとみられる。

(2)　超分子化合物の応用の可能性

基礎的な原理の研究が主体であった固相化学の研究の中で、キラル超分子複合体や金属錯体などは産業的な応用が期待できる。

その例として、今井ら(2.1.2(3)参照)が考えているのは、テレビ用の円偏光フィルターの開発である。テレビがテカテカ反射する現象を解消するため、現状では偏光フィルターを用いて入光させている。入光した光が画面で反射してまたフィルターを通って出てくるとき、波長の方向が逆向きになるため光がフィルターで遮断されて暗くなる。そこで、反射面にキラルを反転させる錯体の塗料を塗っておけば、反転した光はロスなくフィルターを通過し、テレビは暗くならない。これは光の利用効率を上げ、エコにも適う。また、同じようにしてどこから見ても見える立体テレビをつくることもできるかもしれない。キラル反転の機能にはいろいろ使い道があり、変色機能を持たせたりすることも

できよう。錯体の重合を利用して凝集ポリマーを作製し、ホストやゲストのキラル化合物を選択していけば、実用性のあるものができるのではないかと考えている。

(3)　生体内タンパク質の動態観察への応用の可能性

近年注目の集っている難病にフォールディング病がある。その代表的なものが遺伝的痴呆病アルツハイマーで、原因タンパク質であるアミロイドには現在約 20 種類が知られている。また、プリオン、パーキンソン病なども大きな問題になっている。凝集して組織に沈着するアミロイド繊維と生体膜との相互作用を直接観測することができれば、病気の進行の過程を診断し、その機構を解明する手段になると期待される。しかし、従来の CD 測定法では、生体膜のような光学的異方性のある分子集合体について、正しい測定ができなかった。

そこで、本研究で開発した UCS の透過測定モードを使用して、生体膜を含む系の CD スペクトルの測定ができる。アルツハイマー病の前駆体(APP)タンパク質の中の、β-アミロイド(1-40)及び(1-42)の α-ヘリックスと β-シートの構成比を測定し、次いで、経時的に α-ヘリックスから β-シートへの構造変化と凝集が起きる過程を測定して、β-アミロイドの凝集過程と中間体に関する種々の知見を得ている。黒田らは、同様なアミロイドーシスを示すパーキンソン病の原因タンパク質である α-シヌクレインについても、米国 NIH との共同研究を行って凝集過程を研究している。

これら生体内タンパク質の立体構造の変化を、CD を含めた偏光測定で観察する方法は、タンパク質の動態研究や医学的診断に応用することができ、特に難病などで有用である。生体内での生理的タンパク質の立体構造の変化や凝集などは速い速度で連続的に起こり、その過程を観察することは難しい。今度開発された MC-CD 分光計は高速であり、リアルタイムでの観察が可能であると思われ、今後生化学や医学研究への応用が期待できる[45]。

3.3 参考事項

1. 論文発表

本プロジェクトからの発表論文数は 34 報(分子系：25 報、生物系 9 報)であった。その後の発展研究からの論文数は 90 報(分子系：86 報、生物系：4 報)であった。

2. 主要論文及び被引用件数の推移

本プロジェクト及びその後の追加研究から発表された論文の中で、総括責任者が選定した主要論文 10 編を掲げた。また、それらの被引用件数の推移を下図に示した。被引

[45] 総括責任者談

用件数の年次推移は着実に増加しているが、件数そのものはあまり多くない。その理由として固体キラル化学分野の研究やCD分光計或いは巻貝がやや特殊な研究テーマであり、研究者が少ないことが影響していると思われる。

表 1　主要論文リスト（総括責任者選出）

No.	書誌事項
1	Kuroda R,et al., *Rev Sci Instrum*, 72, 3802-3810, 2001 (参考文献 6)
2	Kuroda R　et al., *Chem Commun*, 2002, 2848－2849, 2002 (参考文献　8)
3	Borovkov VV et al., *Angew Chem Int-Ed*, 42, 1746-1749, 2003　(参考文献 11)
4	Shibazaki Y　et al., *Curr Biol*, 14, 1462-1467, 2004 (参考文献　1)
5	Imai Y et al., *Chem Commun*, 26, 3289-3291, 2005 (参考文献　17)
6	Harada T et al., *Rev Sci Instr*, 79, 073103, 2008 (参考文献　16)
7	Fukuda M et al., *Angew Chem Int-Ed*, 47, 706-710, 2008 (参考文献　19)
8	Harada T et al., *Chem Phys Lett*, 456, 268-271, 2008 (参考文献　29)
9	Ousaka N et al., *J Am Chem Soc*, 130, 12266, 2008 (参考文献　30)
10	Kuroda R et al., *Nature*, 462, 790-794, 2009 (参考文献　3)

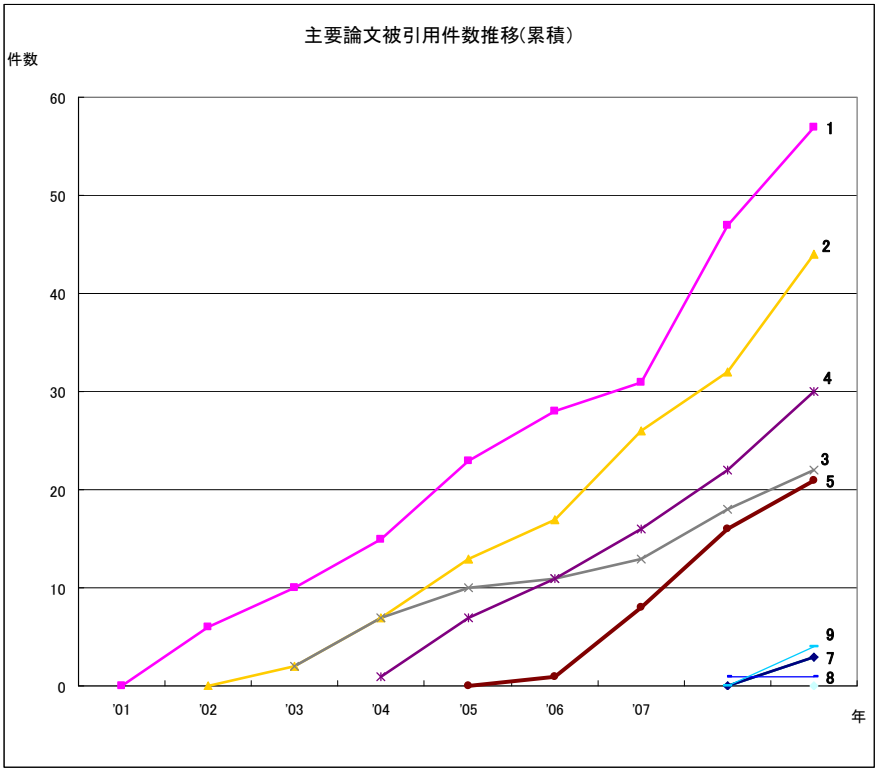


図 13　主要論文の被引用件数の年次推移（累積）（注）図中の番号は、表 1 の主要論文番号

3.　特許出願

本プロジェクト及び発展研究からの特許出願数は、9 件であり、うち海外出願されたものは 2 件で、いずれも新規な CD 測定装置に関するものであった。

4.　国内および国際招待講演

主な国内招待講演は、本プロジェクト期間中(2000-2004)が 4 回、それ以後が 9 回、また、主な国際招待講演は、それぞれ 18 回および 12 回で、とくに国際的な活躍が目立っている。

本文中で引用した参考文献

No	書誌事項
1	Shibazaki Y, Shimizu M, Kuroda R Body handedness is directed by genetically determined cytoskeletal dynamics in the early embryo *Curr Biol*, 14, 1462-1467, 2004
2	Sctott F Gilbert *"Developmental Biology"8 ed.*, 231, 2006
3	Kuroda R, Endo B, Abe M, Shimizu M Chiral blastomere arrangement dictates zygotic left-right asymmetry pathway in snails *Nature*, 462, 790-794, 2009
4	Burdine RD, Schier AF Conserved and divergent mechanisms in left–right axis formation *Genes Dev.* 14, 763-776, 2000
5	Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y, Hamada H Determination of left–right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow *Nature*, 418, 96-99, 2002
6	Kuroda R, Harada T, Shindo Y A solid-state dedicated circular dichroism spectrophotometer: Development and application *Rev Sci Instrum*, 72, 3802-3810, 2001
7	Harada Y, Hosoiri Y, Kuroda R Isolation and evaluation of dextral-specific and dextral-enriched cDNA clones as candidates for the handedness-determining gene in a freshwater gastropod, Lymnaea stagnalis *Dev Genes Evol*, 214, 159-169, 2004
8	Kuroda R, Imai Y, Tajima N Generation of a co-crystal phase with novel coloristic properties via solid state grinding procedures *Chem Commun*, 2002, 2848－2849, 2002
9	Cheung E.Y, Kitchin SJ, Harris KDM, Imai Y, Tajima N, Kuroda R Direct structure determination of a multicomponent molecular crystal prepared by a solid-state grinding procedure *J Am Chem Soc*, 125, 14658-14659, 2003

10	Nakamura A, Sato T, Kuroda R Formation of racemic crystals of transition metal complexes by grinding 1:1mixtures of enantiomeric crystals *Chem Commun*, 24, 2858-2859, 2004
11	Borovkov VV, Harada T, Hembury GA, Inoue Y, Kuorda R Solid-state supramolecular chirogenesis: High optical activity and gradual development of zinc octaethylporphyrin aggregates *Angew Chem Int Ed*, 42, 1746-1749, 2003
12	Telfer SG, Kuroda R, Sato T Stereoselective formation of dinuclear complexes with anomalous CD spectra *Chem Commun*, 9, 1064-1065, 2003
13	Telfer SG, Tajima, N, Kuroda R CD spectra of polynuclear complexes of diimine ligands: Theoretical and experimental evidence for the importance of internuclear exciton coupling *J Am Chem Soc*, 126, 1408-1418, 2004
14	Telfer SG, Sato T, Kuroda R Noncovalent ligand strands for transition-metal helicates: The straightforward and stereoselective self-assebly of dinuclear double-stranded helicates using hydrogen bonding *Angew Chem Int Ed*, 43, 581-584, 2004
15	Hosoiri Y, Harada Y, Kuroda R Construction of a backcross progeny collection of dextral and sinistral individuals of a freshwater gastropod, Lymnaea stagnalis *Dev Genes Evol*, 213, 193-198, 2003
16	Harada T, Hayakawa H, Kuroda R Vertical-type chiroptical spectrophotometer (I): Instrumentation and application to diffuse reflectance circular dichroism measurement *Rev Sci Instrum*, 79, 073103, 2008
17	Imai Y, Sato T, Kuroda R Efficient optical resolution of secondary alkyl alchols by chiral supramolecular hosts *Chem Commun*, 26, 3289-3291, 2005
18	Imai Y, Takeshita M, Sato T, Kuroda R Successive optical resolution of two compounds by one enantiopure compound *Chem Commun*, 10, 1070 -1072, 2006

19	Fukuda M, Sekiya R, Kuroda R A quadruply-stranded metallohelicate and its spontaneous and complete dimerization to an unprecedented interlocked metallohelicate, *Angew Chem Int Ed*, 47, 706-710, 2008
20	Ousaka N, Sato T, Kuroda R Intramolecular crosslinking of an optically inactive 3(10)-helical peptide: Stabilization of structure and helix sense *J Am Chem Soc*, 130, 463-465, 2008
21	Ousaka N, Tani N, Sekiya R, Kuroda R Decelerated chirality interconversion of an optically inactive 3(10)-helical peptide by metal chelation *Chem Commun*, 25, 2894-2896, 2008
22	Ousaka N, Sato T, Kuroda R Total Helical-Sense Bias of an Achiral Peptide Main-Chain Induced by a Chiral Side-Chain Bridge *J Am Chem Soc*, 131 , 3820–3821, 2009
23	Imai Y, Murata K, Kamon K, Kinuta T, Sato T, Kuroda R, Matsubara Y Formation and crystal structure of two-component host system having helical chirality and comprising 9,10-dihydro-9,10- ethanoanthracene-11,12-diamine and 1,1'-binaphthyl-2,2'-dicarboxylic acid *Cryst Growth Des*, 9, 602-605, 2009
24	Hozumi S, Maeda R, Taniguchi K, Kanai M, Shirakabe S, Sasamura T, Spéder P, Noselli S, Toshiro Aigaki T, Murakami R, Matsuno K An unconventional myosin in Drosophila reverses the default handedness in visceral organs *Nature*, 440, 798, 2006
25	Spéder P, Ádámand G, Noselli S Type ID unconventional myosin controls left–right asymmetry in Drosophila *Nature*, 440, 803, 2006
26	Grande C, Patel NH Nodal signalling is involved in left-right asymmetry in snails *Nature*, 457, 1007-1011, 2009
27	Ueshima R, Asami T Evolution: Single-gene speciation by left–right reversal A land-snail species of polyphyletic origin results from chirality constraints on mating *Nature*, 425, 679, 2003

28	Ishida T, Kaneko Y, Iwano M, Hashimoto T Helical microtubule arrays in a collection of twisting tubulin mutants of Arabidopsis thaliana *PNAS*, 104, 8544-8549, 2007
29	Harada T , Sato T, Kuroda R Inversion of the sign of the solid-state circular dichroism at low temperature *Chem Phys Lett*, 456, 268-271, 2008
30	Ousaka N, Inai Y, Kuroda R Chain-terminus triggered chiral memory in an optically inactive 3(10)-helical peptide *J Am Chem Soc*, 130, 12266, 2008
31	Kuroda R, Yoshida J, Nakamura A, Nishikiori S Annealing assisted mechanochemical syntheses of transition-metal coordination compounds and co-crystal formation. Selected as a Hot Article, selected for inside cover. *Crystengcomm*, 11, 427-432, 2009
32	Sue D, Takaishi K, Kawabata T, Harada T, Kuroda R, Tsubaki K Synthesis of chiral dotriacontanaphthalenes: How many naphthalene units are we able to elaborately connect? *J Org Chem*, 74, 3940-3943, 2009