

# 黒田カイロモルフォロジープロジェクトの研究成果

## 目次

1. 分子カイロモルフォロジーグループ	2
(1) Universal Chiroptical Spectrophotometer (UCS) 1号機の開発	
(2) Universal Chiroptical Spectrophotometer (UCS) 2号機の開発	
(3) 固体の粉碎混合による結晶生成とキラリティー認識	
(4) 固体状態における金属錯体分子の再配列とキラリティー認識	
2. 生物カイロモルフォロジーグループ	11
(1) 巻貝左右巻型のタンパク質および遺伝子の発現比較	
(2) 遺伝学的手法による巻貝左右巻型関与遺伝子評価システムの構築	
(3) 巻貝の左右巻型決定プロセスに細胞骨格ダイナミクスが関わっていることを発見	

## 1. 分子カイロモルフォロジーグループ

### (1) Universal Chiroptical Spectrophotometer (UCS) 1号機の開発

#### 研究成果の概要

固体状態での分子構造、反応、分子再配列等におけるキラリティー創成・認識機構解明のためには、固体のキラリティー測定が必須であるが、従来のCD（円二色性）計では、装置の不完全な光学素子、窓板効果、光変調素子の残留複屈折、ミスアライメント、光電子増倍管の偏光特性、ロックインアンプの高調波応答性等に起因する系統的誤差が必ず存在し、溶液では考慮することのなかった固体状態特有の巨視的異方性とのカップリングにより、得られるシグナルは求めるシグナルにそれらが重畳したシグナルとなり分離が困難なため固体状態でのキラリティー測定は不可能であった。この問題を解決し、液体、結晶、更に、膜、ゲルなどの、すべての偏光現象を測定できる分光計を開発した(図1)。我々はさらにミューラー行列法に基づく解析法を考案し、アキラルなポリビニルアルコール (PVA) フィルムのキラリティー測定を行った。延伸したPVAにアキラルなコンゴレッドで染色したサンプルの巨視的異方性による見かけのCDを取り除くことに成功し(図2)、さらに生体高分子膜のキラリティー測定を行い、CDスペクトルの正しい帰属を行った(図3)。

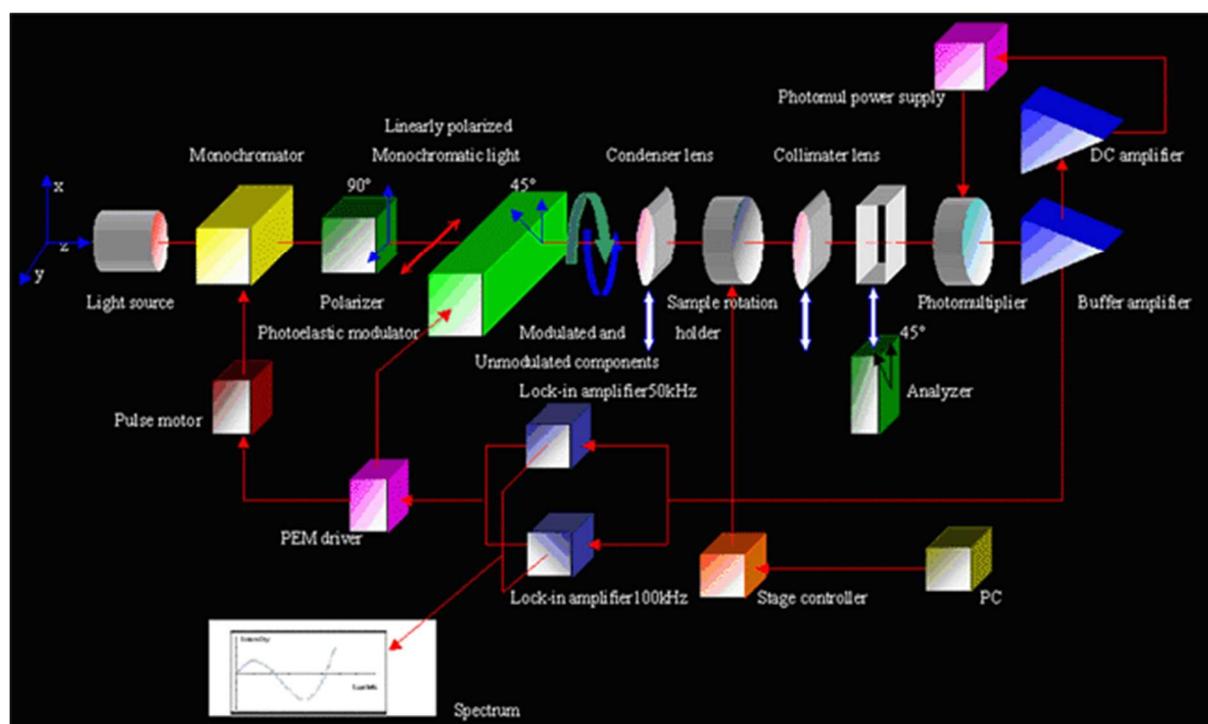


図1. Universal Chiroptical Spectrophotometer (UCS-1)のブロックダイアグラム

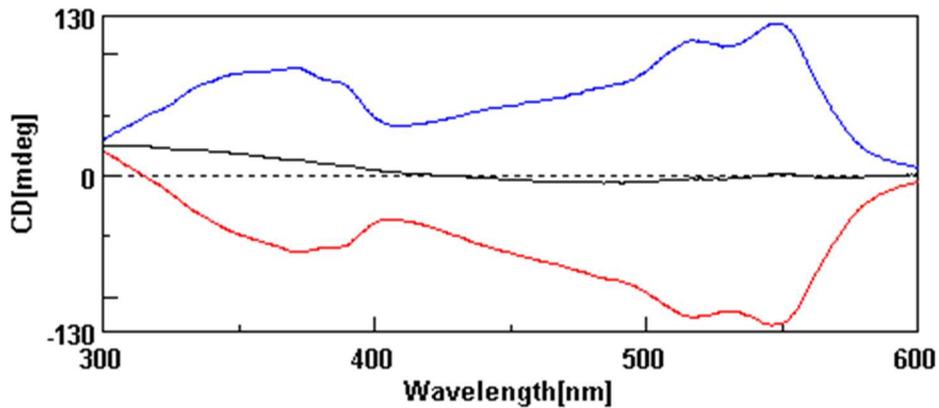


図2. 青：コンゴレッドで染色した延伸ポリビニルアルコール(PVA)フィルム（表）の見かけの CD スペクトル、赤：コンゴレッドで染色した延伸ポリビニルアルコール(PVA)フィルム（裏）、黒：ミューラー行列解析法を用いて得られた真の CD スペクトル。

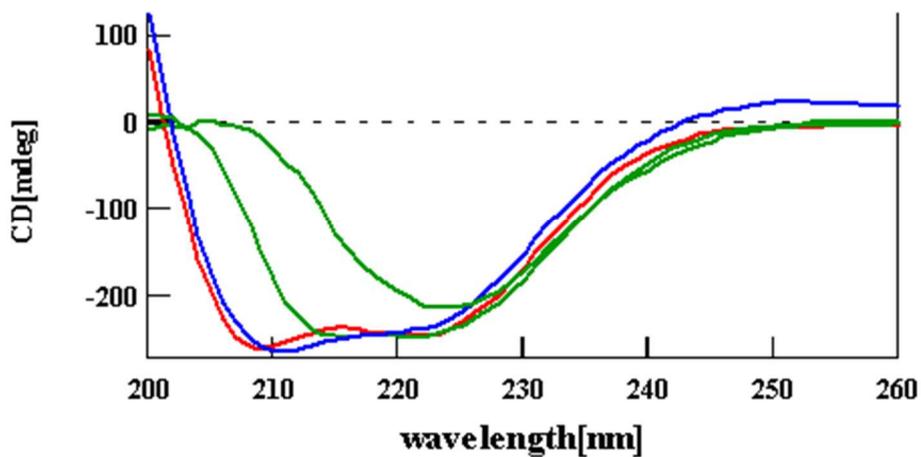


図3. 牛血清アルブミン (BSA) のキャストフィルムの CD スペクトル キャストフィルムの真の CD スペクトル(青)は水溶液の CD スペクトル(赤)によく似ているが、光学的な異方性の大きいフィルムでは、サンプルの向きによって得られるスペクトルが大きく異なる。

### 成果展開可能な分野、用途等

- 1) 固体キラル化学、固体分光学、高分子化学

### 特許出願

- 1) 黒田玲子、神藤洋爾「測定装置」 平成 12 年 4 月 28 日 特願 2000-128667
- 2) 黒田玲子、深沢知行「試料保持装置」平成 12 年 4 月 28 日 特願 2000-128668
- 3) 黒田玲子、神藤洋爾「測定装置」 平成 12 年 5 月 30 日 特願 2000-161288
- 4) 黒田玲子、神藤洋爾「測定装置」 平成 12 年 10 月 13 日 特願 2000-313024

## 報告書他

- 1) R. Kuroda. "Solid-State CD: Application to Inorganic and Organic Chemistry," in "Circular Dichroism: Principles and Applications," Second Edition, Edited by N. Berova, K. Nakanishi and R. W. Woody, John Wiley and Sons. Inc., 2000, Chapter 6, p. 159-184.
- 2) Y. Shindo, K. Kani, J. Horinaka, R. Kuroda and T. Harada, "The application of polarization modulation method to investigate the optical homogeneity of polymer films" J. Plast. Film Sheeting, 17(2), 164-183 (2001)
- 3) R. Kuroda, T. Harada and Y. Shindo, "A solid-state dedicated circular dichroism spectrophotometer: Development and application" Rev. Sci. Inst., 72, 3802 (2001)
- 4) T. Harada, Y. Shindo, R. Kuroda, "Crystal chirality of the non-chiral inorganic salt,  $\alpha$ -Ni(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>·SO<sub>4</sub>" Chem. Phys. Lett., 360, 217-222 (2002)
- 5) T. Harada, R. Kuroda, "Circular dichroism measurement of a protein in dried films" Chem. Lett., 3, 326-327 (2002)
- 6) 黒田玲子. 固体状態におけるキラリティー. 応用物理 72(3), 311-317 (2003).

研究者名：黒田 玲子、原田 拓典

## (2) Universal Chiroptical Spectrophotometer (UCS) 2号機の開発

### 研究成果の概要

UCS1号機を含め、従来の分光光度計では、水平光を垂直に配置された試料に照射する方式を用いており、ゲル状試料等の長時間測定、相転移なども含めた実時間測定等を行うことは全く不可能である。そこで、光路を90°曲げて鉛直光とし、水平配置した試料に照射する光学系を有するUCS2号機を開発した(図1)。積分球も内蔵させ、粉体試料の拡散反射測定も可能とした。CDキャリブレーション標準物質であるカンファースルホン酸アンモニウム(ACS)の拡散反射CD測定の結果を示す(図2)。

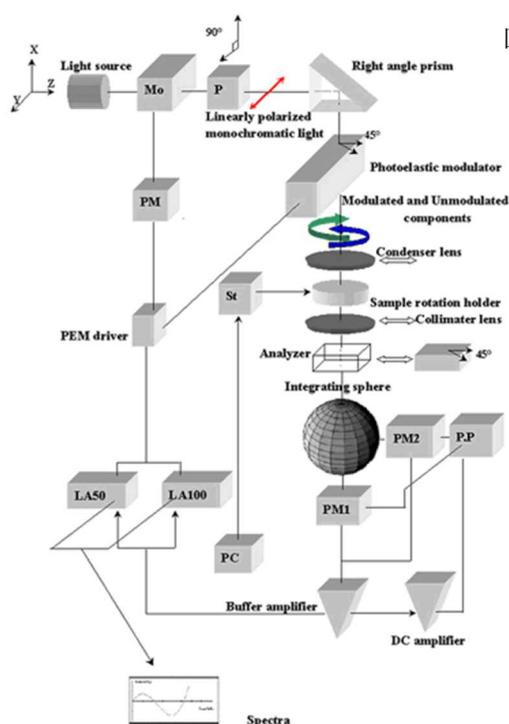


図1. Universal Chiroptical Spectrophotometer (UCS-2)のブロックダイアグラム

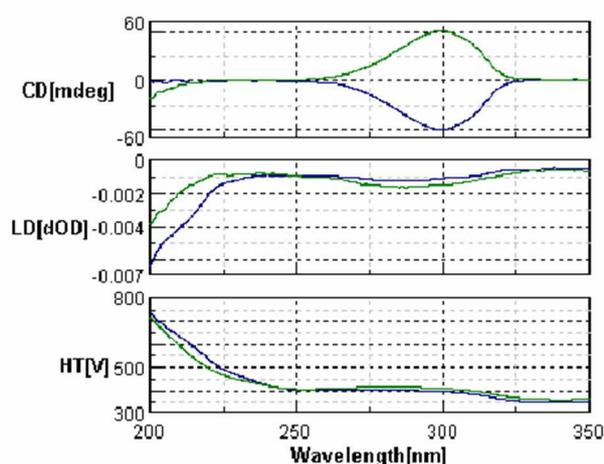


図2. d-, l-ACS 微粉末結晶の拡散反射 CD スペクトル

### 成果展開可能な分野、用途等

- 1) 拡散反射 CD、固体表面解析、生体分子のリアルタイム測定

### 特許出願

- 1) 黒田玲子、真砂央、早川宏志「分光測定装置」平成15年5月21日 特願2003-143476

### 報告書他

- 1) I. Biolotti, P. Biscarini, E. Castiglioni, F. Ferranti, R. Kuroda, "Reflectance circular dichroism of solid state chiral coordination compounds" Chirality 14, 750-756 (2002).

研究者名：黒田 玲子、原田 拓典

### (3) 固体の粉碎混合による結晶生成とキラリティー認識

#### 研究成果の概要

2種類以上の固体の粉碎混合により、溶液からの結晶とも、溶融による結晶とも異なる、新しい構造を有する結晶が得られた。例えば、ビナフトールとベンゾキノンは、固相での共粉碎により、赤色の電荷移動錯体結晶を生成する(図1)。この電荷移動錯体結晶は、他の化合物をゲストとして取り込み、ゲスト化合物によって異なる色調の電荷移動錯体結晶を生成するが(表1)、溶液から得られたものと固相で得られたものとは、結晶の構造がまったく異なっていた。図2に、アントラセンを包接した結晶の例を示す。

また、この固相での電荷移動錯体結晶生成の過程においては、ビナフトールがキララルか、ラセミ体かによって結晶生成の有無が生じるなど(表2)、キラリティーの認識が行われることも明らかにした。

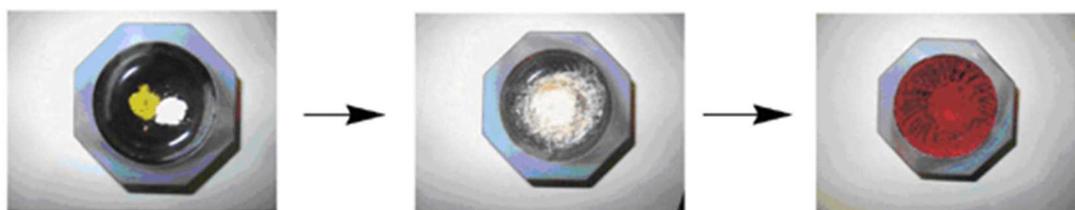
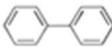
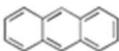
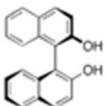
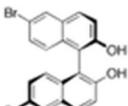
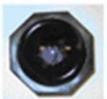
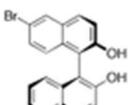
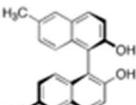


図1. ビナフトール結晶(白色)とベンゾキノロン結晶(黄色)の共粉碎による固相での電荷移動錯体結晶(赤色)の生成

表1. 第三の化合物(ゲスト)を取り込んだビナフトール誘導体-ベンゾキノロン電荷移動錯体結晶のさまざまな呈色

	Binaphthol	Guest		
				
				
				
				
				

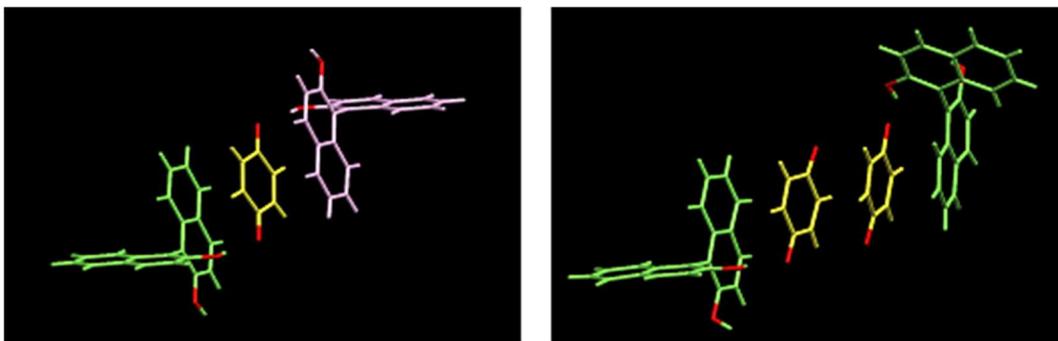
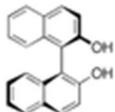
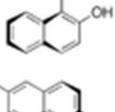
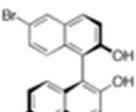
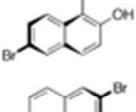
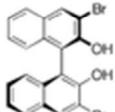
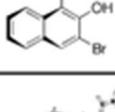
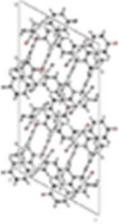
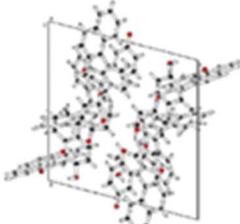
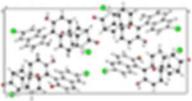
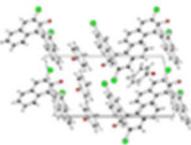


図2. アントラセンを包接したビナフトール-ベンゾキノン電荷移動錯体結晶中の分子配列。溶液から生成したものと固相での共粉碎によって生成したものとは、分子配列が違う。左は、溶液から生成したもの。右は、結晶の共粉碎によって生成したもの。ピンク色は右手型のビナフトール分子、緑色は左手型のビナフトール分子。黄色はベンゾキノン分子。アントラセン分子は省略。

表2. ビナフトール誘導体-ベンゾキノン電荷移動錯体結晶生成におけるキラリティーの認識。ラセミ体のビナフトール誘導体とエナンチオピュアな(R体の)ビナフトール誘導体のどちらか一方だけが、ベンゾキノンと共結晶を生成する。

		Crystals obtained		
		by Co-grinding	from Solution	
		<i>rac</i> -	I	II
		( <i>R</i> )-	—	—
		<i>rac</i> -	—	—
		( <i>R</i> )-	III	III
		<i>rac</i> -	—	—
		( <i>R</i> )-	IV	IV
	I			
	II			
	III			
	IV			

## 報告書他

- 1) Kuroda, R.; Imai, Y.; Sato, T. Chirality recognition in solvent-free solid-state crystallization: Chiral adduct formation by bis-*o*-naphthol derivatives and benzoquinone crystals. *Chirality* 13, 588-594 (2001).
- 2) Imai, Y.; Tajima, N.; Sato, T.; Kuroda, R. Molecular recognition in solid-state crystallization: Coloured chiral adduct formations of 1,1'-bi-2-naphthol derivatives and benzoquinone with a third component. *Chirality* 14, 604-609 (2002).
- 3) 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).

研究者名：黒田 玲子、今井 喜胤、田島 暢夫、佐藤 友宏

#### (4) 固体状態における金属錯体分子の再配列とキラリティー認識

##### 研究成果の概要

アキラルな亜鉛ポルフィリン錯体がキララルなアミンの存在下、固体中でゆっくりと再配列し、キララルな分子会合体を形成することを見出した(図1)。キララルな分子会合体の成長は、円二色性スペクトル(図1右上)における470 nm付近のバンドのシグナル強度の増加によって検出できる。このバンドの符号は、会合体のらせんの向きを示すが、加えたアミンのキラリティーを反転すると符号が反転した。

また、これとは別に、キララルなルテニウム錯体の右手型鏡像体 ( $\Delta$  体) の結晶と左手型鏡像体 ( $\Lambda$  体) の結晶を粉碎混合し加熱すると、固体状態を保ったままで、右手型鏡像体と左手型鏡像体が交互に配列したラセミ化合物結晶を生成することを見出した(図2)。このように、固体中で金属錯体分子がキラリティーを認識して再配列することを明らかにした。

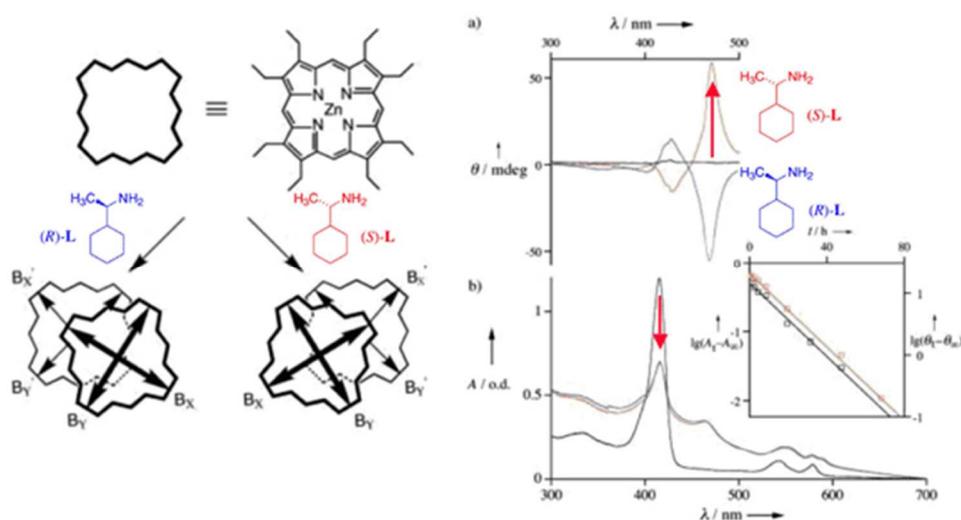


図1. 亜鉛ポルフィリンにキララルなアミンを加えたときの固相中でのキララルな分子会合体の成長。

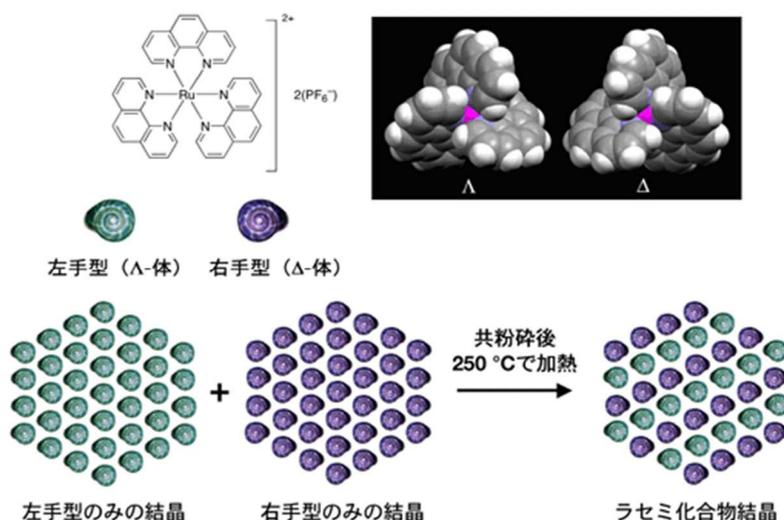


図2. ルテニウム錯体の右手型結晶と左手型結晶の共粉碎-加熱によるラセミ化合物結晶の生成

## 報告書他

- 1) Borovkov, V.V.; Harada, T.; Inoue, Y.; Kuroda, R. Phase-sensitive supramolecular chirogenesis in bis-porphyrin systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 1378-1381 (2002).
- 2) Borovkov, V.V.; Harada, T.; Hembury, G.A.; 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).
- 3) Nakamura, A.; Sato, T.; Kuroda, R. Formation of racemic crystals of transition metal complexes by grinding 1 : 1 mixtures of enantiomeric crystals. *Chem. Commun.* 2858-2859 (2004)

研究者名：黒田 玲子、Victor V. Borovkov、原田 拓典、中村 朝夫、佐藤 友宏

## 2. 生物カイロモルフォロジーグループ

### (1) 巻貝左右巻型のタンパク質および遺伝子の発現比較

#### 研究成果の概要

巻貝 *L. stagnalis* の巻型決定因子は、右巻初期胚および右巻を産む母貝に発現していることが予想される。それを同定するために各種のアプローチを行ってきた。有力手法の一つとして、1細胞期胚中のタンパク質(図1)および卵母細胞を含む生殖巣/肝臓の mRNA を探索し(図2)、優性な右巻型に特異的に発現する遺伝子を数種見出した。

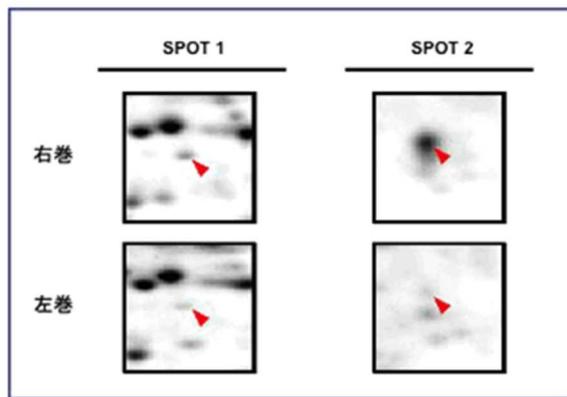


図1 右巻に多く発現するスポットタンパクの例

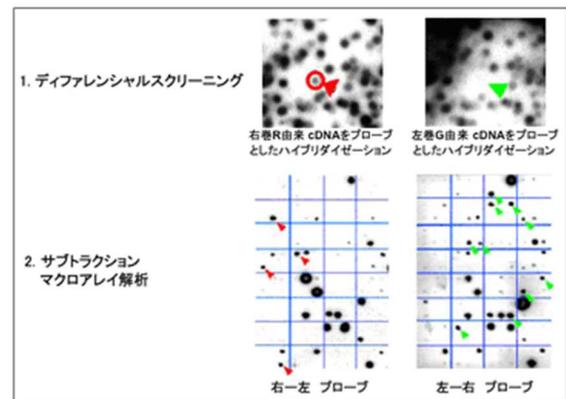


図2 右巻特異的もしくは右巻に多く発現する遺伝子候補の探索

#### 報告書他

- 1) 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).

研究者名：黒田 玲子、原田 淑人、細入 勇二、遠藤 文志郎

## (2) 遺伝学的手法による巻貝左右巻型関与遺伝子評価システムの構築

### 研究成果の概要

各種スクリーニングなどで得られる候補遺伝子が巻型決定因子であるか否かを、右巻という表現型との遺伝学的連鎖で迅速に評価する戻し交配 F<sub>2</sub> 個体群によるシステムを構築した (図 1)。このシステムは、調べたい遺伝子が右巻決定遺伝子そのものであるならば、右巻の優性対立遺伝子が分離する F<sub>2</sub> 世代の一方、すなわち右巻決定遺伝子を受け継いだ右巻を産む個体群にのみ発現するという事を利用したものである。F<sub>2</sub> 世代の育成法はつぎの通り。L. stagnalis は雌雄同体であるが、複数個体での飼育状況下では交配により子世代が得られる。まず右巻と左巻の間で交配を行い、左巻母貝が産んだ F<sub>1</sub> 世代を得る。この個体群は優性右巻決定遺伝子を右巻父貝よりヘテロで受け継いでおり全て右巻の子を産むが、それは巻貝の巻型がそれを産んだ母貝の遺伝型によって決定されるためである (母性遺伝)。これを、さらに別の左巻個体に戻し交配すると、その子世代 (F<sub>2</sub>) では右巻の優性対立遺伝子が分離し、右巻を産む個体と左巻を産む個体とが 1 : 1 の比率であらわれる。このようにして戻し交配 F<sub>2</sub> 個体群約 200 個体の DNA/RNA のコレクションを構築した。

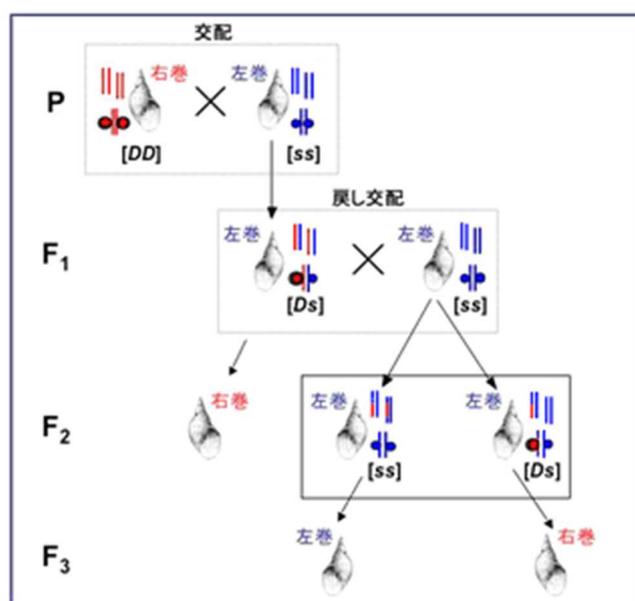


図 1 右巻の優性対立遺伝子が分離する戻し交配 F<sub>2</sub> 個体群 (実線で囲んだ F<sub>2</sub> 世代) の育成。貝殻の隣には、その個体ごとのゲノムを模式的に示した。赤い線は右巻由来の、青い線は左巻由来の染色体を示す。赤丸は巻型決定座位の右巻対立遺伝子である。

### 報告書他

- 1) 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).

研究者名：黒田 玲子、原田 淑人、細入 勇二

### (3) 巻貝の左右巻型決定プロセスに細胞骨格ダイナミクスが関わっていることを発見

#### 研究成果の概要

L. stagnalis 卵の細胞骨格を可視化し、特に第3らせん卵割(4→8細胞)において、同一種の左巻胚、右巻胚ではダイナミクスが互いに鏡像対称ではないという、従来の定説を覆す発見をした(図1)。これが巻型決定遺伝子と遺伝学的に強く連鎖することも実証した。更に、ともに優性な別種の左右巻貝では鏡像関係が保たれていることも示し、種内と種間では鏡像異性化メカニズムに差異があることを示唆する結果も得た(図2)。

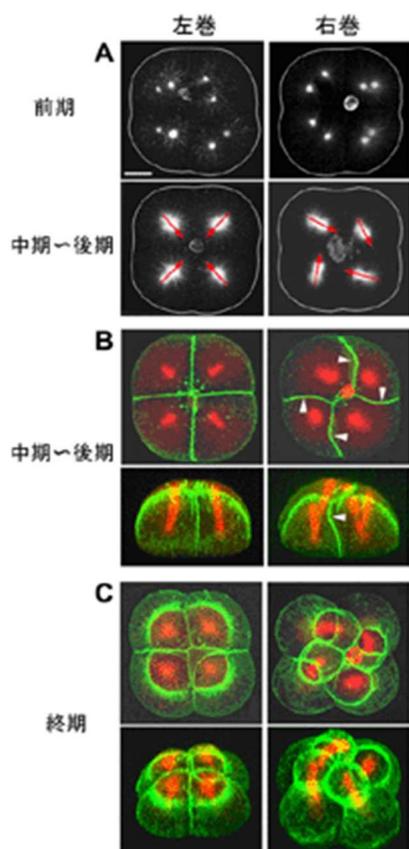


図1. 第3卵割期における左右 L. stagnalis 胚の紡錘体およびアクチン繊維のダイナミクス。分裂中期～後期において、右巻胚特異的なSI(らせん配向をもつ赤の矢印)およびSD(白い矢)が見られた。

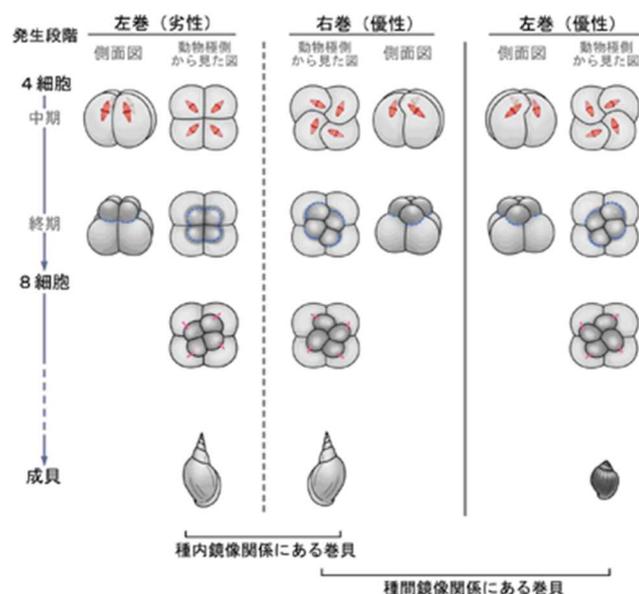


図2. 鏡像関係にある左右巻貝胚の第3卵割期における細胞骨格動態が種内と種間で異なる

#### 報告書他

- 1) Shibasaki, Y.; Shimizu, M.; Kuroda, R. Body handedness is directed by genetically determined cytoskeletal dynamics in the early embryo. *Current Biology* 14, 1462-1467(2004).

研究者名：黒田 玲子、柴崎 友一朗、清水 美穂