

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究終了報告書

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」

研究期間：平成16年10月1日～
平成22年3月31日



黒田 玲子
(東京大学大学院総合文化研究科、教授)

1. 研究課題名

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

2. 研究実施の概要

カイロモルフォロジー(chiromorphology)は、chiral (左右非対称性) と morphology (形態) という言葉を融合させて新しく作った造語で、物質界や生物界、例えば、分子、結晶や多細胞生物など様々なレベルで自然界に普遍的に現われる形のキラリティーの概念を包括的に表現している。本研究は、キラリティーに着目して、分子から超分子や結晶の構築、遺伝情報から生物個体の形態の構築の仕組みを探るもので、換言すれば、ミクロとマクロの接点をキラリティーを切り口に解明するものである。下にカイロモルフォロジーの概念図を載せてある。左端の縦軸は対数スケールで大きさ(10^nm)をプロットし、右側の図の左半分は生物界、右半分は物質界の例を描いている。マクロの観点では、動物はおおむね左右相称でキラリティーのない外観をとっているが、体内構造はキラルであり、心臓が左にあるなど一方に偏っている。巻貝は例外で、外観も体内構造もキラルである。しかも、殻も内部構造も互いに鏡像関係にある右巻貝と左巻貝の両方が自然界に存在する珍しい例である。一般にこれら生物の体は遺伝子にかかれた設計図に則って作られていくが、このような遺伝子や生体を構成しているタンパク質は、全生物に共通した一方のキラリティーをとっている。近年、心臓の位置や腸の巻く方向等のボディプランの左右性に関連した発生後期にはたらく幾つかの遺伝子とそのカスケードが明らかになってきている。しかし、発生過程における最初の左右対称性の破れはすべての生物においていまだ明らかになっていない。いったい、いつどのようにして遺伝子情報を出発点として個体レベルで左右非対称な体内構造を持つ生物個体が作り上げられていくのだろうか？

一方、物質界においても、ミクロな分子からマクロな構造が構築されていく。パズル、スカッチの酒石酸アンモニウムナトリウム塩の例のように、膨大な数のキラルな分子が集合してキラルな結晶やラセミ体結晶を構築していく。このとき、どのようにして分子は隣接した分子のキラリティーを認識しているのだろうか？キラルでない分子にキラリティーを導入させたり、増幅させたり、分子間でキラリティーを転写させたりすることが可能だろうか？

この図で赤の実線矢印で記したところが、本プロジェクトで扱っているテーマである。なお、原始地球において、左右ほぼ同数存在する物質世界からホモキラルな最初の生命が誕生した謎も、本研究の直接のテーマではないが、深く関連した興味深いテーマである。

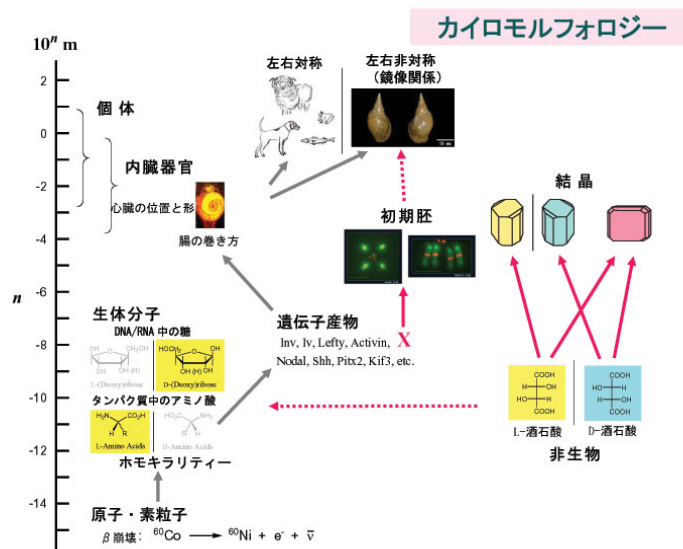


図 カイロモルフォロジーの概念図

生命世界のホモキラリティー（蛋白は L-アミノ酸、核酸は D-（デオキシ）リボースから成り、逆のキラリティーの分子からできた生物は地球上に存在しない）は自然界の一大謎であり、生命の起源を解明する重要な鍵である。一方で、生命世界がホモキラルであるために、分子のキラリティー（右型か左型か）に依存して、生物との相互作用が異なることがあり、これは薬の効き方・副作用や味の違いとして現れてくる。FDA は 1992 年にすべての化学物質製品について、光学分割(右型と左型を分別)を求めている。このため、安価で簡便な新しい光学分割法、キラリティー測定法の開発が待たれている。また、タンパク質や核酸がキラルな分子であることを利用して、キラリティーを測定することで、タンパク質や核酸の構造変化を追跡することも可能である。タンパク質の中には、高齢化社会で問題となってきたアルツハイマー病のように凝集により神経疾患の原因となるものがあり、これに対してもキラリティーの観点からのアプローチはユニークな情報を提供できるはずである。更に、人においても、心臓の位置が逆転しているなど異常が起きる例が知られており、分子レベルでの体の構造の左右性決定のメカニズムの研究は医学、健康にもかかわってくる。

このように、キラリティーは学問的興味にとどまらず、製薬、食品、病気など実生活に深くかかわり、産業への波及効果も大きい。我々は、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 つの世界からアプローチしてきた。

分子カイロモルフォロジーグループでは、固体状態におけるキラリティーの誘導・識別・転写・増幅・測定を研究テーマとした。キラル識別エネルギーは液体・気体より分子が密に詰った固体中で圧倒的に大きいので、キラリティーの誘導・識別・転写・増幅は特に固体状態・固体表面で起きると考えた。さらに、固体化学は環境に悪い有機溶媒が不要であることから産業としても注目を集めている。しかし、固体化学は歴史の長い溶液化学とは異なり未開拓の化学である。また、固体状態のキラリティー研究には固体状態におけるキラリティー測定が不可欠であるが、固体状態特有の巨視的異方性のために市販の装置では一般に測定が不可能であった。そこで、測定原理に立ち戻って、これを可能とする装置の開発に挑戦した。

SORST では、ERATO の成果の上に、固体状態のキラリティーを測定する分光計と測定法の開発に注力した。そのほかに、キラリティー計測をツールとした生理活性物質の集合構造とダイナミックスの研究へ応用、固層光反応によるキラリティーの創製と増幅、結晶の共粉碎/*annealing*、結晶表面および溶液からの結晶化過程におけるキラリティーの識別・転写などの重点項目を設けて研究を実施した。

ERATO 研究では、これまで不可能と考えられていた異方性存在下でのキラリティー計測を可能とする全偏光対応型分光計 UCS-1(UCS = Universal Chiroptical Spectrophotometer)システムと、その理論解析法を開発してきた。SORST では更なる進化を遂げ、粉末試料の *in-situ* 測定を可能にした UCS-2 をさらに改良、波長領域を紫外領域まで拡張、感度が 20 倍程度になる装置 UCS-3 の作成に成功した(下図)。UCS シリーズの分光計を用い、新しい物性の知見を数多く得ることができた。UCS-2、UCS-3 は 1 台で拡散反射 CD と透過 CD の両方の測定が可能であるようにデザインしてある。拡散反射 CD は試料を破壊することなく、構造解析で明らかになった結晶構造そのものによるキラリティーの *in situ* 測定が可能であり、透過測定においても試料を水平に置くように設計したので、分子の凝集過程のリアルタイム追跡が可能である。実際、アルツハイマー病、パーキンソン病などのフォールディング病の原因たんぱく質の凝集過程や生体膜モデルとなる気液界面でのフォールディング変化を初めて検出できた。UCS-1, -2, -3 は固体状態のキラリティーが測定できる世界で唯一の装置であるために、国内外から共同研究の依頼も多い。

また更に飛躍して、モノクロメーターにより分光して波長スキャンするというこれまでの分光計とは異なり、白色光を試料に照射し 2 次元検出を行なうというまったく新規概念に基づく第二世代のキラリティー分光計、MC-CD の開発に新たに着手し、ほぼ開発の目処が立つところまで持っていくことができた。国内、国際特許の出願もすませた (図)。スペクトル取得スピードが約二桁上がり(5 分から 7 秒など)、リアルタイム測定に最適であるし、固体状態固有の巨視的異方性による偽のシグナルの混入も避けることができる点で、画期

的である。これら固体キラリティー測定装置は世界で唯一の装置であり他の追随はない。産業化を進めたいと考えている。

装置開発のみならず、我々は固体状態でのキラリティーの認識・増幅・転写に成功した。結晶を共粉砕/**annealing**すると、キラリティー認識も構造も溶液からの結晶化とは異なるアダクト結晶が得られること、隣接分子にキラリティーを転写できることなどを見出した。柔軟なアキラルな分子をキラルな結晶に結晶化させ、固層光反応をおこなうことでキラルな分子に変換することができたが、この際反応経路が溶液反応とは異なることも見出した。また、性質の異なる二種類の分子（ドナー＋アクセプター、酸＋塩基）からなる結晶では、個々の分子の結晶では実現不可能な物性・機能を創製できた。さらに、光学分割が困難なことで有名な第二級アルキルアルコールを、直接に反応のターゲットとするのではなく発想を変えて溶媒として用い、溶液から酸－塩基対による超分子結晶を作るだけでその **cavity** 内に取り込まれ高い光学収率(91%ee)で分割される現象を発見した。これ以外にも、同一バッチの2段階の結晶化で、2種の化合物の光学分割に成功しており、従来光学分割が困難とされてきた化合物でも、固体化学を利用することで、簡便かつ安価にそして迅速に光学分割が可能であることを示すことができた。論文のひとつは国際誌(*Chem. Commun.*)のカバーを飾った。実用面での応用展開が期待される。

固体状態のキラリティー物理量（円二色性、円複屈折）の信頼できる測定が可能な分光計を開発したのは世界中で我々だけであり、その適用範囲は有機化合物、無機化合物、生体物質など多岐にわたる。共同研究の依頼と装置の問い合わせが国内外から数多く来ており、世界のキラル計測サイエンスのセンターと位置づけられつつある。今後、既に着手しているリアルタイムに特化した次世代分光計の改良を続け、その製品化を目指すと同時に、固体キラル科学研究も推し進めていきたいと考えている。日本発の科学技術、産業として世界に広げていきたい。研究総括は固体キラリティー分光装置開発に関する長年の研究に対し、山崎貞一賞(2004)、文部科学大臣表彰研究部門(2009)を受賞した。固体化学研究全般の研究成果が認められ、数多くの国内国外学会の基調・招待講演を行っており、Royal Society of Chemistry 発行の学術専門誌 *CrystEngComm* の International Advisory board、世界的なケンブリッジ結晶学データベースのボードも務めている。2009年には、チャルマース工科大学（スウェーデン）より名誉博士号を授与、王立スウェーデン科学アカデミー外国人会員（化学部門）に選出されたことから、ERATO/SORST 研究が世界で高い評価を受けていることが窺える。

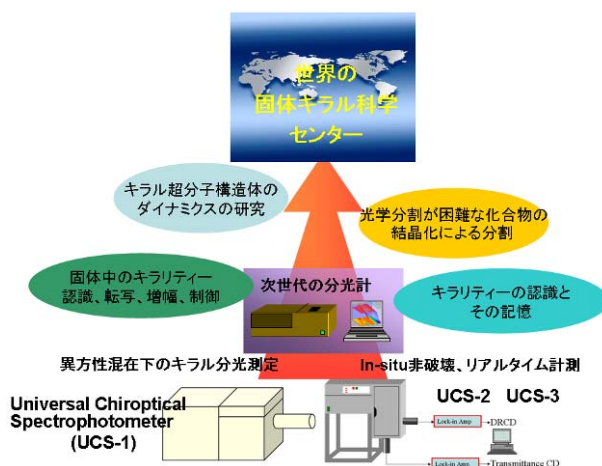


図 固体試料(ゲル・膜も含む)のキラリティーを測定できる装置開発

生物カイロモルフォロジーグループでは、生物個体のカイロモルフォロジー研究として左右両系統のいる淡水性巻貝 *Lymnaea stagnalis* (*L. stagnalis*)を実験材料に用い、巻型決定因子の同定と機構解明を目指してきた。我々が巻貝を研究材料として用いてきたのは次

のような理由による。巻型が一個の遺伝子座により決定されていること、巻型は母貝の遺伝子により発生の極初期に決定されること、自家受精および（集団飼育条件下では）他家受精もするため遺伝学的アプローチが可能なこと、一つの種内に右と左が正常型として存在することである。これらの特徴は、線虫やショウジョウバエ、マウス、ヒトなどと違ってゲノム情報がほとんどなく、分子生物学的手法も確立されていないという欠点を補って余りあり、また ERATO/SORST でしか挑戦できない研究テーマであると判断した。

脊椎動物の個体レベルでの左右非対称性は体内構造において見られ、遺伝子レベルで決定されている。逆位は異常であり、不完全逆位の場合は通常生存が困難である。近年、脊椎動物においては、ノーダルフローによって左右非対称に発現するようになる遺伝子が同定されてきているが、それらは胚発生の原腸期以降の知見であり、いかなる生物胚においても最も初期の左右対称性の破れについてはモデルの域を出ていない。巻貝においては、右巻と左巻の違いはらせん卵割過程という個体発生の極く初期から現れることが古くから知られていた。我々は、SORST 研究開始の直前に、淡水性巻貝 *L. stagnalis* の第 3 卵割においてアクチン細胞骨格系が関与した特異的な紡錘体の傾き (SI) および小割球が生じる方向へのらせん的な細胞形態の変化 (SD) が細胞質分裂以前に右巻胚のみに観察され、それまで知られていなかった非鏡像過程がらせん卵割にあることを新たに発見、それが遺伝学的に巻型決定遺伝子と連鎖していることを戻し交配 F₄ 世代の解析により明らかにし報告した (Shibazaki, Shimizu and Kuroda; *Current Biology*, 2004, **14**, 1462)。

SORST 研究では、ERATO 研究で蓄積した経験と成果を基に、左右両系統および当研究プロジェクトで 5 年以上の歳月をかけて作出しているコンジェニック系統の巻貝を実験材料に用い、80 年以上謎に包まれている未知の巻型決定因子の同定とそのメカニズム解明の挑戦を続けた。巻貝の初期胚がキラリティーを獲得するプロセスの分子レベルでの理解、およびポジショナルクロニングによる巻型決定遺伝子の同定を目指した。この生物種においてポジショナルクロニングが試みられた事は未だ無く、実験手法や技術の確立など、研究解析基盤の整理から始め、多くの試行錯誤を繰り返しながら進めた。巻型連鎖マーカーの作出と組換え個体の解析によりゲノム上の巻型決定遺伝子領域を同定し、BAC ライブラリーの作製、染色体歩行、BAC コンティグのショットガンシーケンスを行い、わずかな 1 ヶ所のギャップを残すが、巻型決定遺伝子領域の配列情報を得ることができた。この巻型決定遺伝子領域について遺伝子予測を行い、予測されたものの中から巻型決定遺伝子としての判定条件を満たしている、母性発現しているものだけを候補遺伝子として絞り込んだ。左右巻型系統間での配列比較、発現量比較などによって更なる絞り込みを行った結果、最有力候補遺伝子 A にたどり着いた。発現パターンの解析や局在解析などからも、遺伝子 A が巻型決定遺伝子の最有力候補であることを裏付けられた。最終的には個体レベルでの機能解析により証明される必要があるが、遺伝子機能解析の実験手法は当巻貝および近縁種に対してまったく報告されていない。そこで、蛍光タンパク質をレポーターに利用して外来遺伝子の導入手法の開発から行った。その結果、mRNA のかたちで外来遺伝子を導入し、そのインジェクション量とタイミングで翻訳をコントロールする系を立ち上げることに成功した。現在、この系を用いて遺伝子 A による機能復帰（右巻表現型復帰）実験を行なっている。Morpholino および RNAi による機能阻害実験も試みたが、期待した結果は今のところ得られていない。様々なモデル生物で採用されている機能解析手法を大きく変えずに適用することはできないため、今後もこの巻貝種に適した手法の開発を行っていく必要がある。このように、はなはだ残念ながら SORST 期間中に、巻型決定遺伝子の同定には到達できなかったが、発生生物学の未解明の謎のひとつである巻型決定遺伝子同定に今一步のところまで近づくことはできた。分子生物学的手法がまったく確立していない系であるために、機能解析による結果が出るまでには更に種々の手法の開発・改善が必要と考えられる。候補遺伝子を絞り込んだという段階で一端公表論文にまとめることを検討している。

一方で、巻型決定遺伝子の役割を、別のアプローチから示すことに成功した。つまり、卵割を人為的にマニピュレーションすることにより遺伝情報とは逆のキラリティーを持った生物に成長させることに成功し、第 3 卵割期のキララな物理的割球配置が巻貝個体のキラリティーを決定すること（つまり、巻型決定遺伝子はその配置を決めていること）、脊椎動物の原腸期以降に見られる左右非対称形態形成に関わる遺伝子 *Nodal-Pitx* が巻貝にも共

通して存在し、この物理的操作によりその発現部位までも逆転することを世界で初めて実証した(図)。この成果はoutstanding contributionというレフェリーの評価をいただき平成21年11月26日のNatureオンライン速報版に掲載され、12月10日の本誌版にはNews & Viewsも同時掲載された。この研究は、第3卵割期に、巻型決定遺伝子と遺伝学的に連鎖した鏡像非対称な細胞骨格ダイナミクスがあるというERATO研究最後の発見から着想を得たものである。100 μ m程度の大きさの卵への物理的操作、卵カプセルから取り出し操作を施した胚の培養、成貝までの飼育、産卵に成功するまで、類似実験はまったくないのですべてゼロから始め、長期間にわたる試行錯誤実験の結果、はじめて成功することができた。

第3卵割後の8細胞期における小割球と大割球との物理的位置関係がどのようにして左右性形成につながるのか、割球間のねじれなどによる機械的な作用によるものなのか、化学物質を介した伝達が行われているのか、根源的に興味深い問題を提起することができた。この実験は物理・化学・生物学にまたがる幅広い知識と思考に基づくものであり、黒田カイロモルフォロジーチームにしか達成できなかったオリジナリティーの高い成果である。我々の結果は他の生物の左右性研究の分野にも大きなインパクトを与え、巻貝が生物のキラリティーの初期シグナルを研究する上で優れた研究材料(モデル生物)であることを示したとNews & ViewsおよびThe Scientistオンラインニュースなどで言及されており、今後の展開が期待されている。

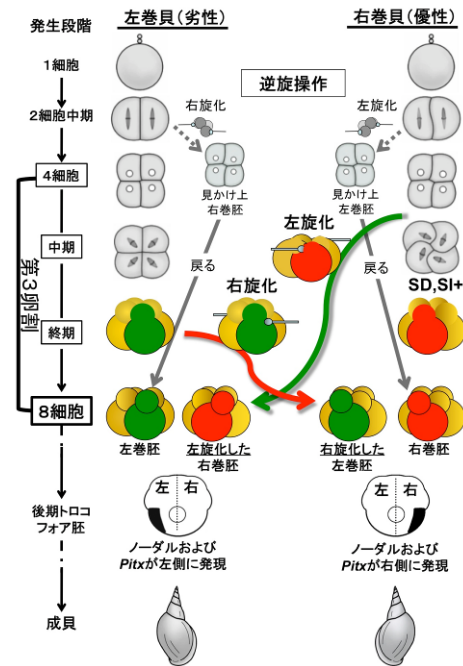
遺伝情報や分子生物学的手法がまったく確立されていない巻貝を研究材料に選んだために、それらの確立している線虫、ショウジョウバエ、マウスなどと比べると、はるかに多くの時間と努力が必要であった。しかし、多くの生物にも重要であるが、他のモデル生物を対象にした研究では得ることのできなかつた根本的な成果を得ることができたと思っている。

3. 研究構想

カイロモルフォロジー(chiromorphology)は、chiral (左右非対称性)と morphology (形態)という言葉を融合させて新しく作った造語で、物質界や生物界において、例えば、分子、結晶や多細胞生物など様々なレベルで自然界に普遍的に現われる形のキラリティーの概念を包括的に表現している。当研究は、キラリティーに着目し、分子のキラリティーと超分子構造や結晶のキラリティーの接点、遺伝情報と生物個体の形態に見られるキラリティーの接点、換言すれば、ミクロとマクロの接点の解明を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グループの2つの世界からめざすものである。

生命世界がホモキラル(蛋白はL-アミノ酸、核酸はD- (デオキシ) リボースから成る)であるために、分子の右型と左型では、薬効や味が大きく異なることがあるため、左右の識別は製薬、食品など産業・社会との関連が深い。1992年FDAによる医薬品のラセミ体使用に関する勧告が出されたために、安価で簡便な新しい光学分割法、キラリティー測定法の開発が待たれている。キラル識別エネルギーは液体・気体より固体表面・固体中で圧倒的に大きい。固体化学は環境に悪い有機溶媒が不要であることから産業として注目を集めているが、歴史の長い溶液化学とは異なり未開拓の分野である。固体状態におけるキラリティーの誘導・識別・転写・増幅と、固体状態でのキラリティー測定のための新装置の開発は、カイロモルフォロジー研究の必須のテーマである。

分子カイロモルフォロジーグループでは、当初、以下の5つを主要テーマとして掲げ、おおむねこれに沿って研究の展開を計画した。



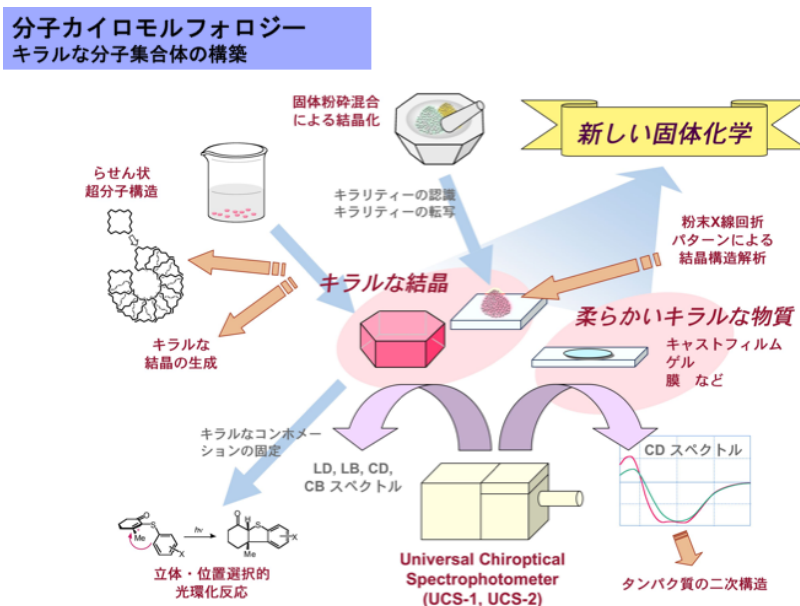
- 1) 高感度拡散反射・透過測定兼用全偏光対応型分光計 (UCS-3) の開発と応用
- 2) キラリティー計測をツールとする生理活性物質の集合構造とダイナミクス
- 3) 固体状態における光反応機構の検討とキララル増幅
- 4) 生体模倣骨格で構成されるポリペプチドを用いたキラリティーの認識とその記憶
- 5) 固体中におけるキラリティーの転写、増幅、伝播、制御

1 の装置開発に関しては、拡散反射測定が透過測定と比べて感度がかなり低く、広い応用測定に供するためにもまず感度を上げることが緊急の課題と考えた。UCS-2 の感度を大幅に改善した装置、UCS-3 を作製することを当面の目標とした。また拡散反射法での LB 測定に関する装置改良は、当初の予定を変更し解析法を考案することに変更した。なお、これまでの UCS 装置とはまったく異なる、迅速測定、異方性による偽のシグナル混入問題を解決できる新しい概念の次世代装置 MC-CD の開発にも新しく着手し、開発の目途が立つところまで来た。

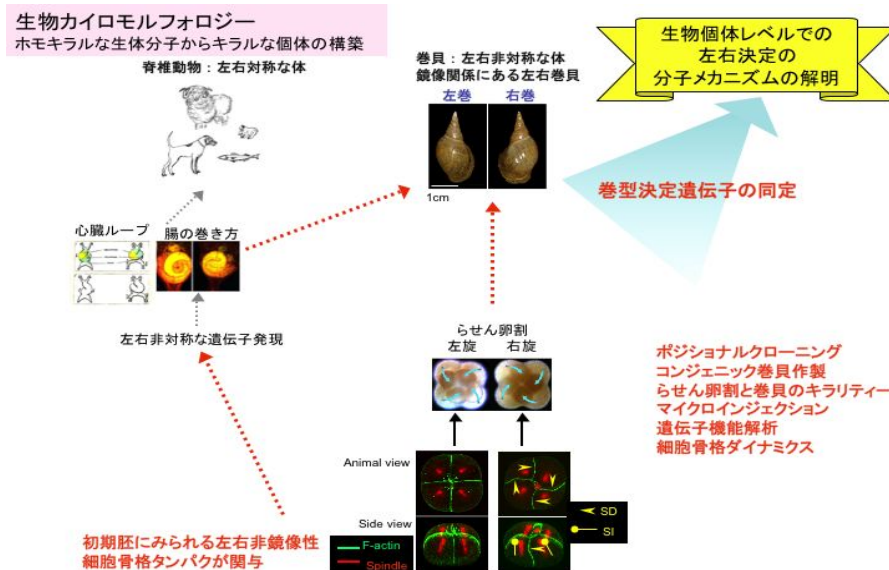
2 の生体関連物質も重要なテーマで、われわれが開発した世界にひとつしかない UCS 装置を用いて展開している。

3, 4, 5 の研究テーマを通して、これまで固体状態では分子が固定されて動かないと思われていた常識に反して、拡散が起こり、分子の再配列やキラリティー転写が起こるなど多くの面白い現象を見出した。また、固体、熔融状態だけではなく、溶液から超分子構造を形成し結晶化するときにもキラリティー認識が強く起こる系を見つけ、溶液からの結晶化も 5 の目標の一つに付け加えた。新しい簡便な光分割の手法の開発が目的である。

以下に研究戦略を図示する。



生物カイロモルフォロジーグループでは、ERATO の研究成果に基づき、天然に左右の巻型系統が存在する淡水産巻貝 *L. stagnalis* 初期胚が、からだのキラリティーを獲得するプロセスの分子レベルでの理解、および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目指した。右巻と左巻貝では、貝殻の巻型も内臓の位置・向きも互いに鏡像対称になっている。これは発生の極く初期に現れる左右非対称性に起因し、その後の形態形成が鏡像対称に進行したためであると考えられる。つまりこの研究により、生物の分子(遺伝子)による原因からマクロの生物個体にいたるプロセスが、キラリティーをキーワードに解明される。



研究戦略として研究開始当初設定したテーマのうち、**3**と**5**の研究とくに重点をおいて展開した。

1. 各種巻貝系統の維持・飼育とコンジェニック巻貝系統の作製
2. 左右巻貝卵に差次発現する mRNA のスクリーニング
3. ポジショナルクローニングによる巻型決定遺伝子候補の同定
4. 初期胚における外来遺伝子発現系および母性遺伝子の機能阻害実験系の開発
5. らせん卵割のキラリティーが巻貝のキラリティーを決定/制御していることの実証
6. 遺伝的に決まる初期胚の細胞骨格ダイナミクスをもたらし機構の解明及び関連する因子の同定

目標に向かって邁進するために、項目**3**については、正攻法ではあるが時間と手間がかかるので人員を集中させることにした。巻型決定遺伝子は遺伝学的な解析から単一遺伝子座にあることが分かっており、巻型連鎖マーカーを利用した連鎖解析から巻型決定遺伝子領域の連鎖地図を作成した。右巻 *L. stagnalis* の高品質ゲノム BAC ライブラリーを作成し、染色体歩行により BAC クローンで巻型決定遺伝子領域をカバーすることに成功し、さらにその BAC クローンのショットガンシーケンスを行うことで、この領域の配列情報が1カ所の短いギャップを除く2つのコンティグのかたちで得ることができた。この領域内にコードされる遺伝子を予測プログラムから推定し、実際に母性発現遺伝子として発現確認されたものを候補遺伝子として絞り込むところまで研究が進捗した。とくに発現パターンが巻型決定遺伝子としてのクライテリアを全て満たしている候補遺伝子 **A** に着目し、機能解析をすすめた。なお、効率的に成果を出していくために平成18年度初頭に項目**2**は中止、項目**6**については予備的な検討程度に止めた。

項目**4**の遺伝子機能解析技術の開発は遺伝子同定には必須であるが、これまでそのような報告は皆無であるため迅速に立ち上げる必要があった。そこで平成18年度末に重点項目としてあらたに追加した。平成20年度末までに mRNA の1細胞期へのマイクロインジェクションにより外来遺伝子を初期胚に発現させる系が完成、論文として公表することができた[発表論文10]。

5は、特に注力した項目である。左巻胚に対して第3卵割期に人為的な逆旋操作を施したところ、遺伝情報のはたらきを上書きして右巻の貝に発生させることができたことを SORST 中間評価会で報告、その知見の重要性については評価していただいた。その後、物理的に逆旋操作が困難な右巻胚についても同様に人為的に操作して左巻貝を作ることに成功、そ

れらを成貝まで育成し次世代の巻型を確認する実験も行なった。公表論文を準備している最中の平成 20 年末、*Nature* オンライン版に別種の左右巻貝においてヒトをはじめとする脊椎動物と共通の Nodal シグナルが保存されているという報告が Glande & Patel によってなされた。我々の研究材料である *L. stagnalis* においても、発生が進んだ段階で *Nodal-Pitx* が左右決定に関与していることが予測されたので、発生の極く初期の胚操作が、その後の発生が進んでから現れる Nodal シグナルの発現パターンに実際に影響を与えるのかを調べるべく、この実験を追加する体制に切り替えた。その結果、尽力した甲斐あって比較的短時間で良好な結果を得ることができ、この結果をふくめた論文を投稿した。outstanding contribution というレフリーの評価をいただき平成 21 年 11 月 26 日の *Nature* オンライン速報版に掲載された (雑誌への掲載は 12 月 10 日号で News and Views も出た)。国内外での反響は大きく、すべての全国紙 (朝日、読売、日経、産経、毎日) からフランスのルモンド紙に至るまで、広く国内外の一般メディアでも注目され、インパクトのある成果であったことが証明された。現在は遺伝子の同定に向けてラストスパートをかけている。

4. 研究実施内容

4. 1 固体状態のキラリティー測定装置の開発とキラリティーの識別・創製・転写・増幅に関する研究 (分子カイロモルフォロジーグループ)

(1) 実施の内容

重点研究項目

- 1) 高感度拡散反射・透過測定兼用全偏光対応型分光計 (UCS-3) の開発と応用および新規概念に基づく次世代キラリティー分光計の開発
- 2) キラリティー計測をツールとする生理活性物質の集合構造とダイナミクス
- 3) 固体状態における光反応によるキラリティーの創製とキラル増幅
- 4) 生体模倣骨格で構成されるポリペプチドを用いたキラリティーの認識とその記憶
- 5) 固体中・固体表面および溶液からの結晶化過程におけるキラリティーの転写、増幅、伝播、制御

1) 高感度拡散反射、透過測定兼用全偏光対応型 (UCS-3) の開発と応用および新規概念に基づく次世代キラリティー分光計の開発

A) UCS-3 の開発と拡散反射法を用いた微粉末結晶の *in-situ* キラリティー測定

ERATO プロジェクトで開発した UCS-2 (拡散反射型 CD 分光計 (J-800KCMF)) は、直角プリズムを用い入射光を鉛直方向にすることにより、生体関連物質のゲルなどの重力の影響を受けやすい試料のキラリティー測定を可能とし、さらに積分球を導入した拡散反射法によって、これまで測定が非常に困難であった微粉末結晶も特別なサンプル調整をすることなく測定可能とした。特に粉碎によって容易に結晶構造が破壊されたり、マトリックスと相互作用したりする等のために KBr ディスク法・ヌジョール法が使えない微粉末キラル結晶のキラリティー測定に有用であり、UCS-2 は固体キラル化学の発展に大いに貢献することが期待されている。しかし UCS-2 の拡散反射法によるキラリティー測定は拡散反射光を積分球で集光する機構のため、シグナル強度は透過検出と比較して十分感度が得られない場合がしばしば生じる。そこで SORST では、分光装置に使用されている各光学素子の再構築を行い、高感度拡散反射 CD 分光計 (UCS-3) の開発を行った。図 1-1 に UCS-3 のブロックダイアグラムを示す。光集効率アップのため、最適積分球径に変更し、積分球反射材料を紫外領域で反射効率が高いテフロン系材料へ変更した。さらに集光系の改良を行い、高感度化に成功した。これらの改善により UCS-3 は、単位面積当たりのエネルギーを上げ高感度検出が可能となった。結果として図 1-2(A) に示すように、UCS-2 と比較して可視紫外全領域に渡って 3 倍の検出感度を得ることに成功した。キラルなビナフチル誘導体の拡散反射 CD 測定の結果も図 1-2(B) に示す。UCS-2 と比較しおよそ 20 倍の感度を示し、高感度 CD 分光計として応用が期待できる。

また、拡散反射モードでの測定波長領域をUCS-2の250～800 nmに対し、190～800 nmへ紫外領域のスループット拡大を達成した。生体関連（DNA、タンパク質等）、有機化合物試料のスペクトルが集中している紫外短波長領域の拡散反射キラリティー測定が可能になったことは装置の有用性が増し、特筆されるべき点である。

高感度型UCS-3の拡散反射法を用いたCD測定で、マトリックスとの反応や試料の揮発性のため、これまでキラリティー測定が困難であった*p*-benzoquinoneとpyreneから形成されるキラリ結晶の測定を行い、超分子構造由来のキラリティー測定に成功し、開発した拡散反射CD装置の有用性を証明した。[発表論文 9,17,49]

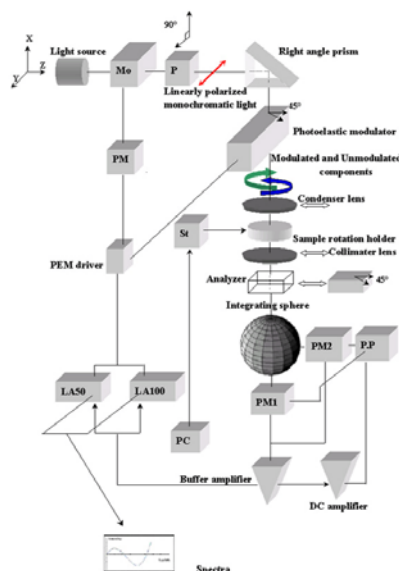


図1-1. Block diagram of UCS-3.

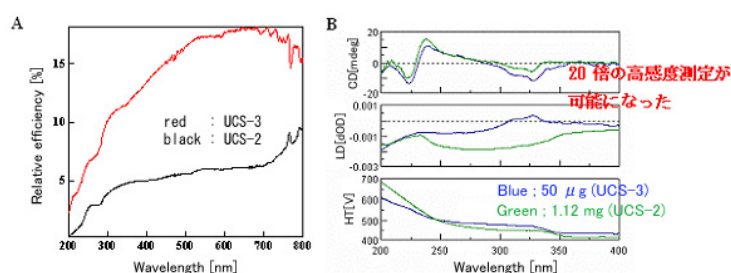


図1-2.(A) Efficiency curve calculated from DC voltages for transmission and diffuse reflectance (DR) modes at constant high tension (HT) voltage (250 V) applied to the photomultiplier tube. (B) DRCD measurements of microcrystalline of an optical active binaphthyl derivative measured by UCS-2 and UCS-3. For the UCS-2 measurement, 1.12 mg sample was used, while for the UCS-3 measurement, only 50 μ g was enough to provide similar quality spectrum.

B) 種々の試料に対応した拡散反射CD分光計及び蛍光円偏光分光計の測定法構築

開発したUCS-2、UCS-3の拡散反射測定では装置の機構上の制約によって、試料の巨視的異方性が関与する直線複屈折(LB)の測定が困難である。しかし大きな巨視的異方性を持つ光学活性試料のキラリティー測定には直線偏光現象を測定し、シグナル評価、解析を行う必要がある。そこでStokes-Mueller matrix解析法を用い、検出器の偏光特性および実測直線二色性から試料のLBを見積もり、CDシグナルに重畳するサンプルのLBの寄与の情報を得ることで、真のキラリティー測定を行う方法を開発した。また蛍光円偏光測定は光学的異方性を持つ試料の場合、装置の機構上、CD測定よりも異方性の影響を受けやすく真のキラリティー由来のシグナルを得ることは困難であったが、Stokes-Mueller解析より、集光レンズまたは試料セルの静的残留複屈折及びその光軸がスペクトルに大きく影響してくることを明らかにし、光軸を調整することで正しい真のシグナルを得ることが可能となった。

[投稿準備中: T. Harada, T. Konno, R. Kuroda, "Separation of supramolecular and molecular

chirality measured by diffuse reflectance circular dichroism”]

C) 新規概念に基づく次世代キラリティー分光計の開発

固体キラリティー解析法を含む UCS システムが有用であることは多くの研究者から認められてきた。しかし、UCS を含む既存のキラリティー分光計は、求める全波長領域を測定するには光源からの白色光をプリズムモノクロメーターで単色化し、波長スキャンをしてモノクロメーターと連動した 1 次元検出器である光電子増倍管を用いて測定を行うために、測定に多くの時間を要する。速い (～msec) 相転移などの反応や経時変化に対応したリアルタイム測定は不可能である。また、UCS では巨視的異方性を持つ試料も扱えるが、それを取り除く操作はやや複雑である。そこで白色光を試料に照射し、固体 2 次元検出器でスペクトルを波長スキャンすることなく CD 測定するという斬新なアイディアに基づいた、既存の CD 分光計とまったく異なる装置を考案した (特許 1, 2)。新規概念に基づくキラリティー分光計はスペクトル取得スピードがこれまでより約 2 桁早い高速キラリティー測定を可能とした。リアルタイム測定によりこれまでの測定では得られなかった、分子レベルの動的変化測定など、生体物質の生理活性作用のプロセスのダイナミックなコンフォメーション変化の測定などに適応可能と期待される。さらに特筆すべきことは、固体試料であっても、異方性が観測にかからないような工夫をしてあるために、UCS 装置に必要な複雑な操作が不要であり、画期的な装置になると期待される。(投稿準備中: T. Harada, R. Kuroda, ”Direct solid-state circular dichroism (CD) measurements using multichannel-CD spectrophotometer”)

2) キラリティー計測をツールとする生理活性物質の集合構造とダイナミクス

A) アミロイド凝集機構メカニズムの解明

近年注目の集まっているフォールディング病はタンパクの native な構造が壊れたり、ミスフォールディングをしたりすることが原因で引き起こされると言われている。その代表がアミロイドーシスでありヒトでは現在約 20 種類のアミロイドーシスが知られている。その中にはプリオン、アルツハイマー、パーキンソン病など今日、社会問題になっている疾病も含まれる。アミロイドーシスは関連タンパク質が凝集してアミロイド繊維を形成し組織に沈着する病気であり、このタンパク質凝集は、生体膜との相互作用が関与していると言及されている。これら生体膜との相互作用を直接観測することが可能ならば多くの情報を得ることが出来ると期待される。しかし、従来の CD 測定法では、生体膜のような光学異方性をもつ分子集合体を含む系については、正しい測定ができなかった。しかしながら、我々が開発した UCS-1、UCS-2、UCS-3 の透過測定モードを使用すれば、生体膜を含む系でも真の CD スペクトルが測定でき、タンパク質の二次構造解析が可能である。これまでに生体膜をミミックした脂質膜との相互作用を非溶液状態 (キャストフィルム、Langmuir-Blodgett 膜) で測定を行い、予備的知見を得ている。Alzheimer 病の原因とされる β -amyloid タンパク質の凝集過程をリアルタイムで測定し、中間体に関する新たな情報を得ることに成功した。これまでの測定技術、方法などの蓄積したノウハウを利用し、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 -synuclein についても、NIH のバックス教授との共同研究を行い、生体膜をミミックした脂質膜との相互作用におけるタンパク質凝集状態に関する研究も進行中である。[T. Harada and R. Kuroda, ”CD measurements of β -amyloid (1-40) and (1-42) in the condensed phase”, *Biopolymers*, in press; 投稿準備中: T. Harada and R. Kuroda, ”Dynamic transformation of β -amyloid peptides monitored by vertical type Universal Chiroptical Spectrophotometer (UCS)”]

B) アキラルなポルフィリン誘導体のキラリティー超分子構造の機構解明

アキラルなポルフィリン誘導体の自己会合体が supramolecular chirality をもつことは既に知られており、それらキラリティーは種々の外的な要因に依存することが報告されている。しかしそれら自己会合のメカニズムの詳細は明らかにされていない。垂直型 UCS-2 及び UCS-3 はサンプルを水平に設置できることから、相転移のリアルタイムキラリティー測定、つまりキラリティーが反転していく過程を追跡でき、これまで得られなかった中間体等の情

報を得ることが可能となる。アキラルなポルフィリン自己会合のリアルタイム測定や、AFM（原子間力顕微鏡）を用いた morphology 観測による結果から、humidity が超分子構造のキラリティーを決定する因子の一つであり、凝集体の形成やキラリティーの決定は、複数の因子が拮抗しコントロールされていることを明らかにした。[発表論文 43]

C) キラルな等軸単結晶の固有複屈折

生体物質ではないが、等軸晶系に属する結晶にもキラリティー測定において無視できない巨視的異方性を持つことを実験的に明らかにした。等軸晶系に属する結晶は3つの光学軸に対して同じ原子配置を持ち、すべての光学的性質（吸収、屈折率等）がどの方向から光が入射しても同じであり、光学的に等方であると信じられてきた。しかしリソグラフィー分野の科学技術の進歩をきっかけとして、キラルではない等軸晶系結晶の異方性が最近になって紫外領域で実験的に証明された。このことは固体のキラリティー化学の分野でも重要な問題である。キラリティー測定に用いる分光計の波長領域は可視から紫外領域に渡る。長波長では波数ベクトルが微量となり、光学的に等方として取り扱えるが、短波長ではその影響を無視できない異方性が生じることになる。SORST では、偽のシグナルの入らない真の直線複屈折 (LB) 測定法を Stokes-Mueller matrix 法に基づいて開発した。我々が開発した分光装置及び解析法を用いることで、キラルな等軸晶系の単結晶（塩素酸ナトリウム、臭素酸ナトリウム: space group $P2_13$ ）の真の CB 及び LB 測定を可能とした。その結果、キラルな等軸結晶の通説を破り、intrinsic な巨視的異方性を持っていることを世界で初めて実験的に明らかにした。(図 2-1) [発表論文 84]

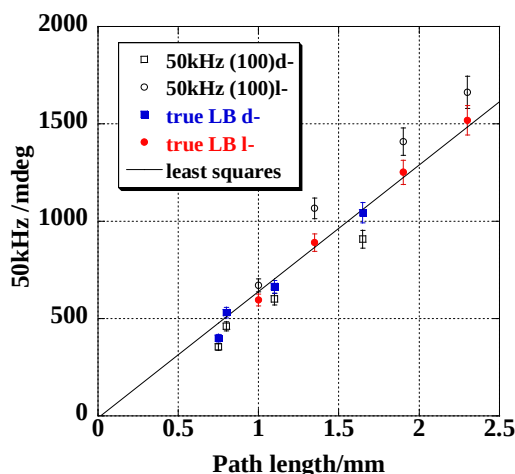


図 2-1. Plots of true LB (shown in blue) and observed 50kHz signals (shown in red) for the (d)- (O) and for the (l)- (□) sodium chlorate single crystals, at 250 nm, against the path length of the crystals polished parallel to the (100) face. Linear relationship holds only with the true LB.

3) 固体状態における光反応機構の検討とキラル増幅

溶液中の分子は、許容される範囲内で立体配座を変化できるが、結晶化すれば立体配座は固定される。この違いが固相（無溶媒）反応の優れた特徴(位置・立体選択性、高収率等)である。しかし、溶液反応では、触媒の添加・反応温度の調節・溶媒の性質等の諸条件を調整することで反応経路及び位置・立体選択性を比較的柔軟に制御できるが、固相反応では、それらは反応原系の結晶中での立体配座と結晶構造に束縛されるため、一般に制御が困難である。我々は、2-(アリルチオ)-3-メチル-2-シクロヘキセン-1-オンの中でオルト位に置換基を有する化合物の結晶に光照射して起きる分子内環化反応の立体選択性 (trans体、cis体) 及び反応効率が、興味深いことに、置換基により異なり、また温度にも影響を受けることを見出した。X線構造解析の結果から、結晶内で隣接分子間の重原子効果(外部重原子効果)により光環化反応が促進され、重原子効果が大きいほど cis体 が選択的に生成することが推測された。その他の誘導体について

も研究を行ったところ、“混晶”を利用することで、キラル増幅が起こる可能性が示唆された。

[投稿準備中: R. Sekiya, S. Hasebe, R. Kuroda “Switching of Stereochemistry in the Solid State Photocyclization: Heavy Atom Effect and Temperature Effect”, R. Sekiya, K. Sugino, T. Harada, R. Kuroda “Chiral Amplification through Cocrystallization: Sergeants-and-soldiers Principle and Majority Rule”]

4) 生体模倣骨格で構成されるポリペプチドを用いたキラリティーの認識とその記憶

溶液中におけるキラリティーの認識・増幅・転写は、各種分光法で追跡可能であり、固体中における同様な現象を理解するためにも溶液中での研究は必要不可欠である。そこで、生体分子により近いモデル化合物としてアキラルアミノ酸のみからなる螺旋ペプチドを用い、溶液中におけるキラリティーの増幅・転写に関する研究を行った。このペプチドは、螺旋反転に要する活性化エネルギーが低いため、溶液中では右巻きと左巻きが素早く反転し、等量存在するためアキラルである。我々は、 $i \leftrightarrow i+3$ 残基間を分子内架橋あるいは金属錯体を形成することで螺旋反転速度を著しく低下させることに成功した。[発表論文 32,40] 架橋部をキラルにすると片方の巻き方向のみとなり、dynamic helicity を static helicity に変換できた。[発表論文 11]さらに、螺旋反転速度を低下させた上で外部キラル源と非共有結合させると、一方の巻き方向が選択されるが、このキラル源を取り除いてもしばらくはキラリティーをメモリーとして持続させることに成功した。[発表論文 53] (図 4-1)

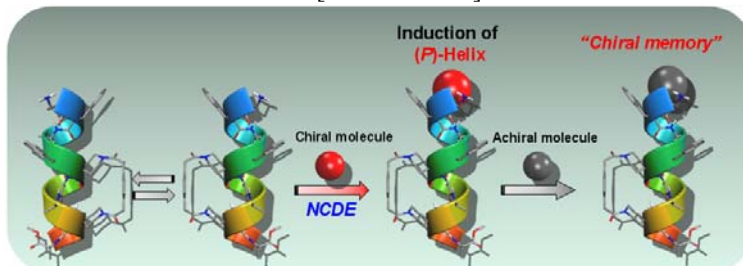


図 4-1 光学不活性らせんペプチド(3_{10} -helical peptide)のキラルメモリー

5) 固体中・固体表面および溶液からの結晶化過程におけるキラリティーの転写、増幅、伝播、制御

本領域では、複数成分からなる結晶を設計・合成することで、単体の結晶では得られない機能性（分子包接・キラル認識・発光特性等）を創製することを目的としている。ERATO プロジェクトでの成果に基づき、SORSTでは、本領域のさらなる発展・応用を目指した。

5-1) 二成分からなるホストの設計とその分子認識

5-1-1) Binaphthol 誘導体と benzoquinone 誘導体からなる電荷移動錯体結晶の分子認識

binaphthol 及びその誘導体をドナー、benzoquinone 及びその誘導体をアクセプターとして用い、これらを溶液から結晶化させると、電荷移動錯体結晶が析出する。その際、ドナーとアクセプターの組み合わせによっては、これらの成分だけでは充填構造が形成できず、第三成分（溶媒分子等）がゲストとして包接される可能性がある。この背景に基づき、様々な binaphthol 誘導体と benzoquinone 誘導体の組み合わせからなる電荷移動錯体結晶の包接能を調べた。

図 5-1-1 に示す組み合わせからなるホストに、benzene、toluene、tetrafluorobenzoquinone、ethanol が包接されることを見出した。[発表論文 52] **2Cl-5Me-BQ** 以外のアクセプターを用いても包接体結晶を得ることができた。[発表論文 18] しかし、組み合わせによっては、ドナーとアクセプターのみからなる電荷移動錯体結晶が形成された。[発表論文 12,16]

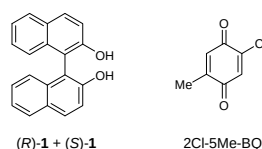


図 5-1-1.

包接体結晶は、溶液からの結晶化だけではなく、固体共粉碎でも得られた。包接されたゲストの種類の違いや、結晶化方法（溶液からの結晶化・固体共粉碎）の違いによって包接体結晶（粉末）の色調が異なるという興味深い結果を得た。[発表論文 77] 図 5-1-2 に 6,6'-dibromo-1,1-bi-2-naphthol と benzoquinone と第三成分（naphthalene もしくは anthracene）の結晶を固体共粉碎することで得られた包接体結晶の拡散反射スペクトル及び結晶粉末の写真を示す。Naphthalene を用いた場合は赤色になり、anthracene を用いた時は青色となった。分子構造の若干の違いで、包接体結晶の色調が異なることから、分子センサーとしての応用が期待される。

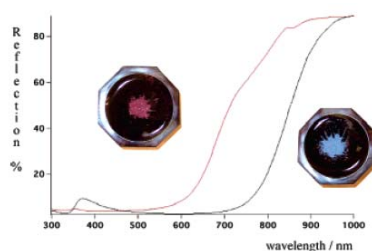


図 5-1-2. 第三成分に依存する包接体結晶の色調の一例。(左) ナフタレンを包接した包接体結晶、(右) アントラセンを包接した包接体結晶。共に固体共粉碎によって得られた。

5-1-2) Binaphthol 誘導体と viologen 誘導体からなる電荷移動錯体結晶の分子認識

5-1-1 の benzoquinone の代わりに 4,4'-bipyridine の窒素部位に様々な置換基を組み込むことが可能な methylviologen もしくはその誘導体を用いた。嵩高い置換基を組み込めば、必然的に充填構造が形成されにくくなり、様々なゲストを包接できるホストとして機能する事が期待された。

図 5-1-3 に示す組み合わせにおいて、(R)-2 と **1a** 若しくは **1c** を用いた時は包接体結晶が得られなかったが、**1b** を用いた時は、methanol、ethanol、*n*-propanol、*n*-butanol が包接された。[発表論文 69,75]

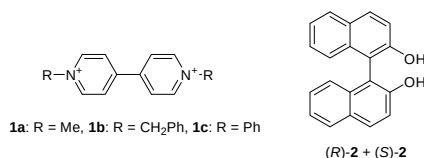


図 5-1-3.

興味深いことに、**1a** とラセミ体の **2** を結晶化させたところ、**1a** と(R)-2 若しくは(S)-2 からなるキラルな電荷移動錯体結晶が析出することを発見した。これは、電荷移動錯体形成を利用することでラセミ混合物の光学分割が達成できたことを示す。[発表論文 75]

Binaphthol 上にも様々な置換基を組み込むことが可能である。この様な binaphthol 誘導体と viologen 誘導体を用いたホストでは、水酸基を有する benzene 誘導体を包接できることを見出した。[発表論文 23,24]. 10,10-dihydroxy-9,9'-bipheanthryl のドナーと viologen 誘導体の組み合わせでも、アルコール分子を包接した包接体結晶が得られた。[発表論文 15,50,71] 包接されたアルコール分子の違いによって包接体結晶の色調に顕著な相違が生じることを見出した (図 5-1-4)。ゲストの僅かな分子構造の違いが色調の違いとして現れることから、分子センサーへの応用が期待される。[発表論文 71]

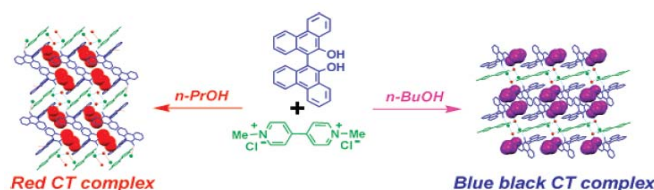


図 5-1-4.

5-1-3) binaphthyl ジカルボン酸誘導体とキラルアミンからなる酸-塩基対結晶の分子認識

ホストを構成する二成分として芳香族カルボン酸と芳香族キラルアミン（塩基）を用いた。芳香族カルボン酸と芳香族キラルアミンは、それらを結びつける相互作用が水素結合（静電的相互作用）であることに加え芳香環の存在が立体構造を規定すると予想した。様々な芳香族カルボン酸と芳香族キラルアミンが市販されていることから、多様な組み合わせが可能である。包接体結晶の生成、特にホストのキラリティーを利用したラセミ混合物の光学分割が可能と期待した。

光学分割が非常に難しい第二級アルキルアルコールを単に溶媒として用い、図 5-1-5 に示す組み合わせのホストの超分子結晶を作ることによって、光学分割に成功した。(1*R*,2*R*)-**3** + **1** の組み合わせでは、(*S*)-2-butanol を 91 %ee、(*S*)-2-pentanol を 61 %ee、(*R*)-2-hexanol を 22 %ee で光学分割することができた。鎖長の長い第二級アルコール分子の光学分割の高効率化を目指し、より大きな π 平面を有する **2** と(1*R*,2*R*)-**3** の組み合わせを用いた。その結果、(*S*)-hexanol を 71 %ee、(*S*)-2-heptanol を 70 %ee で光学分割することができた。このように、ジカルボン酸とジアミンの組み合わせにより光学分割が可能であり、キラリティー転写を含む超分子結晶性生成法の有効性が実証された。[発表論文 83]

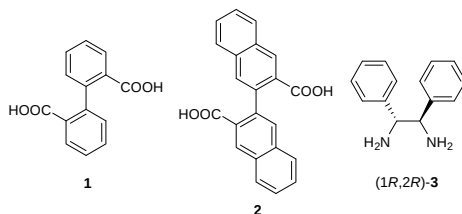


図 5-1-5.

図 5-1-6a に示す組み合わせでは、一つのバッチから 2 回結晶化することで、ともに光学分割の難しい化合物 **2** と 2 級アルキルアルコールの両方を光学分割できるという興味深い結果を得た。(1*R*,2*R*)-**1** が、まず溶液中の(*S*)-**2** を認識し、結晶 (**I**) が析出した(図 5-1-6b)。これを濾別した後、(1*R*,2*R*)-**1** が溶液中に残存している(*R*)-**2** を認識し、結晶化したが、この際溶媒として用いた第二級アルコールがエナンチオ選択的に包接された。(*S*)-2-butanol が 21 %ee, (*S*)-methyl-3-butanol が 43 %ee, (*S*)-2-pentanol が 41 %ee, (*R*)-2-hexanol が 62 %ee。[発表論文 72] この成果は高く評価され、*Chem Comm.* の inside cover に採用された。他の第二級アルコールの光学分割にも成功した。[発表論文 79]

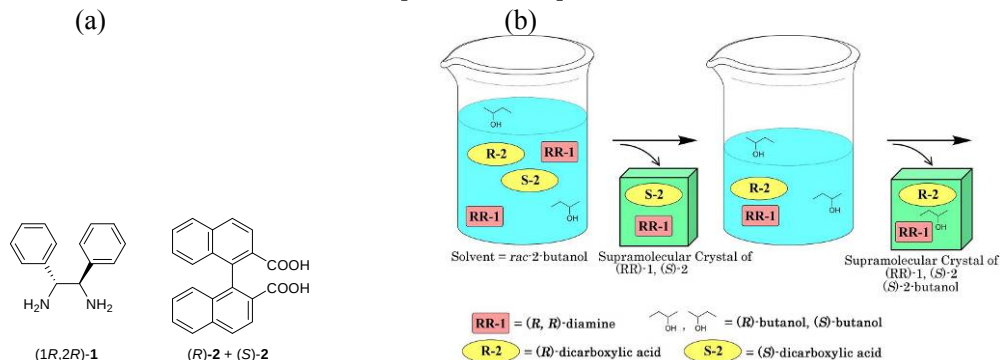


図 5-1-6.

キラルアミンが、binaphthyl-dicarboxylic acid のキラリティーを認識するという実験事実に基づき、ラセミ混合物同士を結晶化させることによる光学分割を試みた。その結果、水分子を介在させることで、それが可能であることを発見した (図 5-1-7)。[発表論文 33]

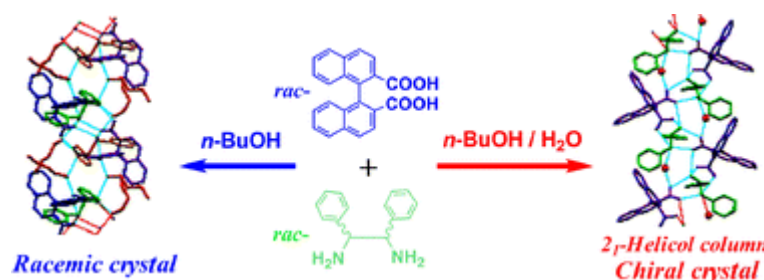


図 5-1-7.

更に、図 5-1-7 で用いた酸-塩基の組み合わせからなるホストの第一級アルコール分子に対する包接能や、[発表論文 36] 上記以外のキラルアミンと芳香族カルボン酸の組み合わせについてもその包接能を明らかにした。[発表論文 7,37,39,62,63,68]

5-2) 蛍光性を有する芳香族カルボン酸とキラルアミンからなる酸-塩基対の蛍光特性

蛍光性を有する芳香族カルボン酸とキラルアミンを結晶化させることで、蛍光性を有する分子錯体の結晶が析出する。この時、芳香族カルボン酸にキラルアミンのキラリティーが転写されれば、円二色性を有する発光性の機能性結晶を創成することが可能である。さらに、第三成分が取り込まれることで結晶構造が変化し、蛍光特性が変化する可能性がある。これらの背景に基づき、様々な芳香族カルボン酸とキラルアミンからなる結晶を作製し、それらが持つ蛍光特性を検討した。[発表論文 59]

図 5-2-1 に示す(1*R*,2*R*)-**1** と **2** を結晶化させたところ、二成分結晶 (**I**) が得られた。**I** の CD スペクトルを測定したところ、anthracene 由来の CD シグナルが観測された。(1*R*,2*R*)-**1** の代わりに(1*S*,2*S*)-**1** を用いた二成分結晶 (**II**) では、CD の符号が逆転した。これらは、固体中で **1** のキラリティーが **2** へ転写されたことを示している。固体状態で circular polarized luminescence (CPL) が得られた。(1*R*,2*R*)-**1** と **3** の組み合わせでも二成分結晶 (**III**) が得られ、結晶 **III** 中の **3** は、原料とは異なる蛍光特性を持つことが判明した。

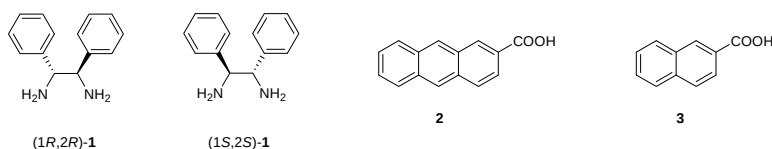


図 5-2-1

蛍光性を持つその他の芳香族カルボン酸もしくは芳香族スルホン酸とキラルアミンとの組み合わせについても結晶化を行い、得られた結晶の蛍光特性を調べた。幾つかの組み合わせでは、溶媒分子などが第三成分として包接され、ゲストの種類によって蛍光特性 (蛍光強度や最大発光波長等) が異なることを見出した。[発表論文 8, 19, 27, 34, 41, 44, 45, 47, 67]

5-3) 固体中・表面でのキラリティー伝播と増幅

5-3-1) 溶媒による結晶の多型制御

2-methyl-3-(2-naphthalenylthio)-1,4-naphthalenedione (**1**)は、結晶化に用いる溶媒によって析出する結晶が異なることを見出した。ヘキサンから結晶化させるとオレンジ色の結晶 (結晶 **IA**) が、ジクロロメタンから結晶化させるとあずき色の結晶 (結晶 **IB**) が析出した (図 5-3-1)。**IA**、**IB** 共に、**1** のみで構成されていた。つまり結晶化に用いた溶媒と **1** との間の何らかの相互作用によって多型が生じたことを示す。興味深いことに、**1** を 130 度まで加熱し

て融解させ、その後冷却すると溶液からの結晶化では得られない新しい結晶（結晶 **IC**）が得られた。これらの結果は、結晶化方法を変えることによって、多型制御が実現できたことを示すものであり、とくに **IB** はキラル結晶である点でいっそう興味深い。[発表論文 20]



図 5-3-1. 溶媒・結晶化法の違いによる多型制御。IA: ヘキサンから結晶化、IB: ジクロロメタンから結晶化、IC: **1** を 130 度まで加熱して溶解させ、その後冷却させて結晶化。

5-3-2) 溶媒による多型制御と固体表面を介するキラリティーの伝播

2-(2-bromophenylthio)-3-methylcyclohexa-2-ene-1-one (**1**)は、 $P2_12_12_1$, $P2_1$, $Pbca$, $P2_1/n$ の 4 つの多型を溶媒の種類によって生成することを見出した。結晶化溶液に scaffolding 化合物を添加すると、**1** および scaffolding 化合物両方の晶癖が変わり、新しく生じた結晶表面を認識して $P2_1$ 結晶が成長する。その表面に、キラリティーの伝播を伴って $P2_12_12_1$ の結晶が成長する興味深い現象を発見し、scaffolding chiral crystallization と命名した。また、多型間の変換が可能であることも明らかとなった。

5-3-3) 固体および溶液・熔融状態におけるキラリティーの転写と増幅 [発表論文 6]

キラルなルテニウム錯体の Δ 体と Λ 体とを 1:1 の混合比で粉碎混合し、融点・熱分解点よりはるかに低い 250°C に加熱すると、金属錯体が再配列してラセミ体の結晶を作ることを見出した[発表論文 86]。興味深いことに、ルテニウム錯体の一方のエナンチオマーの結晶とキラルなニッケル錯体の結晶を粉碎混合し 250°C に加熱すると、光学的に不安定なニッケル錯体が脱ラセミ化し、出発の結晶のキラリティー(ラセミ結晶も含め)にかかわらず、ルテニウム錯体と反対のキラリティーを持つエナンチオマーが富化されることを発見した。これは、固体中でキラル転写が起こったことを示している。[発表論文 6]

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

分子カイロモルフォロジーグループは、これまで不可能であると考えられていた異方性存在下でのキラリティー計測を可能とする全偏光対応型分光計 UCS-1 システムと、その理論解析法を開発してきた。SORST では更なる進化を遂げ、粉末試料の *in-situ* 測定を可能にした UCS-2 をさらに改良、波長領域を拡張、感度が 20 倍程度になる装置 UCS-3 の作成に成功した。(下図) この装置は拡散反射 CD のみならず、透過測定においても、生体物質の凝集過程のリアルタイム追跡にも応用でき、フォールディング病の原因たんぱく質の凝集過程や生体膜モデルとなる気液界面でのフォールディング変化を初めて検出できた。また白色光を用いた 2 次元検出という新規概念に基づく新たな第二世代のキラリティー分光計の開発にもほぼ成功し、国内、国際特許の出願もすませている(下図)。これら固体キラリティー測定装置は世界で唯一の装置であり他の追随はない。このため、国内外の多くの研究者らアプローチを受け、固体キラリティーに関する共同研究を行ってきている。

装置開発のみならず、分子レベルにおけるキラリティーの認識・増幅・転写に成功した。溶液中においては、アキラルなペプチドからなる螺旋のキラリティーの制御、および記憶化に成功した。固体中においては、性質の異なる二種類の分子（ドナー＋アクセプター、酸＋塩基）からなる結晶を作成し、個々の分子からなる結晶では実現不可能な物性・機能性の創製に成功した。中でも、酸－塩基対を利用した第二級アルキルアルコールの光学分割に成功したことは、従来光学分割が困難とされてきた化合物でも、固体化学を利用することで、簡便かつ安価にそして迅速に光学分割が可能であることを示す結果であり、特に実用面での応用展開が期待される。

今後、既に着手したリアルタイムに特化した次世代分光計の改良を続け、それと同時にさらなる固体キラル科学研究を推し進め、世界の固体キラル科学センターとして定着させ

ていきたい。

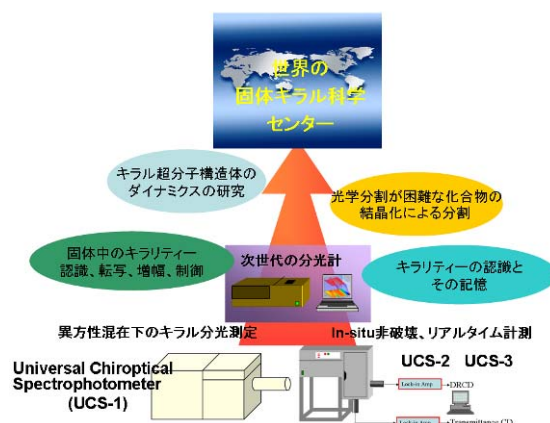


図 研究成果および今後の展望

4. 2 生物個体レベルでのキラリティー形成メカニズムの解明（生物カイロモルフォロジーグループ）

生物カイロモルフォロジーグループでは、生物個体のカイロモルフォロジー研究として左右両系統の淡水性巻貝 *L. stagnalis* を実験材料に使い、巻型決定因子の同定と機構解明を目指してきた。我々が巻貝を研究材料として用いてきたのは次のような理由による。巻型が一個の遺伝子座により決定されていること、巻型は母貝の遺伝子により発生の極初期に決定されること、自家受精および（集団飼育条件下では）他家受精もするため遺伝学的アプローチが可能なこと、一つの種内に右と左が正常型として存在することである。これらの特徴は、線虫やショウジョウバエ、マウスなどと違ってゲノム情報がほとんどなく、分子生物学的手法も確立されていないという欠点を補って余りあると判断した。脊椎動物の個体レベルでの左右非対称性は体内構造において見られ、遺伝子レベルで決定されている。逆位は異常であり、不完全逆位の場合は通常生存が困難である。*L. stagnalis* の右巻と左巻貝では貝殻の巻型も内臓の位置・向きも全て互いに鏡像対称になっており、その違いはらせん卵割過程という個体発生の極初期、特に4から8細胞への細胞分裂が起こる第3卵割時に最も顕著に現れ、第1卵割以降の形態形成はすべて鏡像対称に進行するというきわめて単純かつユニークな系である。ただし、この通説は厳密には正しくないこと、対称性の破れが巻型決定遺伝子の働きと強く関連していることを我々はERATOプロジェクトの最後で発見し報告した。



近年、脊椎動物においては、ノーダルフローの向きが左右非対称な遺伝子発現のメカニズムに関与することが報告されてきているが、それらは胚発生の原腸期以降の知見であり、いかなる動物胚においても最も初期の左右対称性の破れについてはモデルの域を出ていない。一方、巻貝の左右性に関わる研究は、その遺伝様式を調べた1930年代のBoycottとDiverの研究に遡ることができる。しかし、その後は1982年にFreemanとLundeliusが*L. stagnalis*の近縁種*L. peregra*に対して、優性巻型を決める活性物質が1細胞期の右巻胚に存在する可能性を顕微注入という古典的な発生生物学的手法によって示した報告があるだけで、その分子の本体などについては研究報告が皆無であった。巻貝の実験室での大量飼育法もゲノム情報も未知、卵への顕微注入も困難という状況であったが、我々はERATO

プロジェクトにおいて、全くのゼロから挑戦し、“巻貝”を生物のキラリティー創生メカニズムを遺伝子レベルから研究するモデル生物とすべく、細胞生物学・分子生物学的手法を駆使して新たな領域を開拓してきた。

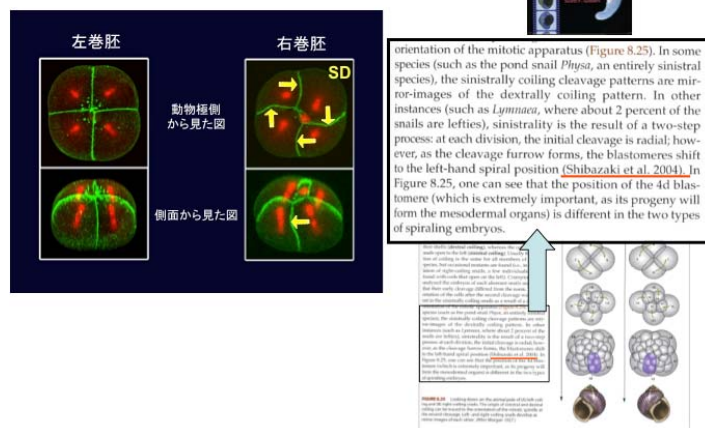


図 右巻胚では細胞質分裂前から SD という形態変化が起こることを発見し 2004 年に報告した (左図)。この成果はその後、世界で使われている発生学の教科書の最新版で引用された (右図)

SORST 研究開始直前に淡水性巻貝 *L. stagnalis* の第 3 卵割においてアクチン細胞骨格系が関与した小割球が生じる方向へのらせん的な細胞形態の変化 (SD) およびその結果としての紡錘体の傾き (SI) が右巻胚特異的に起こり、左右巻貝胚のらせん卵割にそれまで知られていなかった非鏡像過程があることを新たに発見、それが遺伝学的に巻型決定遺伝子と連鎖していることを戻し交配 F₄ 世代の解析により明らかにし報告した (Shibazaki, Shimizu and Kuroda; *Current Biology*, 2004, **14**, 1462-1467)。SORST 研究では、蓄積した経験と成果を基に、左右両系統および当研究プロジェクトで 5 年以上の歳月をかけて作出しつつあるコンジェニック系統を実験材料に用い、80 年以上謎に包まれた未知の巻型決定因子の同定とそのメカニズム解明に挑戦した。

(1) 実施の内容

研究項目 (項目 3 と 5 を重点的に実施した)

- 1) 各種巻貝系統の維持・飼育とコンジェニック巻貝系統の作製
- 2) 左右巻貝卵に差次発現する mRNA のスクリーニング
- 3) ポジショナルクローニングによる巻型決定遺伝子候補の同定
- 4) 初期胚における外来遺伝子発現系および母性遺伝子の機能阻害実験系の開発
- 5) 初期胚における巻貝の巻型決定遺伝子の役割
- 6) 遺伝的に決まる初期胚の細胞骨格ダイナミクスをもたらし機構の解明及び関連する因子の同定

1) 各種巻貝系統の維持・飼育とコンジェニック巻貝系統の作製

1-1) 維持・飼育している巻貝系統

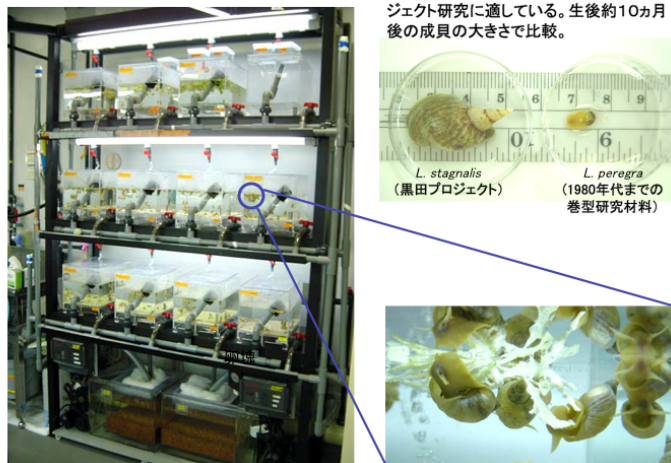
グループでは、北ヨーロッパを原産とする複数の左右 *L. stagnalis* 系統を約 10 年前から維持・飼育している。*L. stagnalis* は、軟体動物 貝殻亜門 腹足綱 有肺亜綱 基眼目 モノアラガイ科に属する淡水産巻貝であり、右巻が優性である。天然に存在する大部分が右巻系統であり、左巻は非常に稀にしか存在しない。この巻貝は雌雄同体であるが、集団飼育条件では他家受精が優先するとされている。左右巻貝間での交配が可能で、遺伝学を使ったアプローチが駆使できる。歴史的に巻型の研究に用いられて来たのは近縁の *L. peregra* であるが、*L. stagnalis* の方が体も大きく一度に多くの卵を産むので、分子生物学・遺伝学を基礎とする研究を目的とした実験生物として、より優れていると考えた。

人工的に産卵を促進する方法が無いために、通年、コンスタントに卵を実験に供給するためには産卵期にある巻貝を多く維持する必要がある。また、黴などにより短期間に絶滅する危険が常にあり、飼育環境を常時クリーンに保っておくことが重要で、そのために巻貝の飼育・維持に多くの人材が必要であった。

ERATOプロジェクトで開発した巻貝大量飼育システム。
SORST研究においても活用された。

*L. stagnalis*は*L. peregra*と比較してはるかに大きく生物材料を沢山必要とするプロジェクト研究に適している。生後約10ヵ月後の成貝の大きさを比較。

図 プロジェクトで改良を重ねてきた巻貝飼育システム（左図）と生物グループの研究材料である *Lymnaea stagnalis*（拡大写真は左巻貝）。歴史的に巻型研究に使われてきた小さな *Lymnaea peregra* と *L. stagnalis* の大きさ比較（右図。いずれも右巻貝）。



1-2) コンジェニック巻貝系統の作製と利用

これまでに、右巻系統がもつ巻型決定遺伝子（優性右巻決定アレル）を左巻系統に連続もどし交配によって導入し、左巻系統の遺伝的バックグラウンドの中に優性の右巻決定遺伝子のみをもっているコンジェニック系統の作出を行ってきた。この交配実験を通じて、左右の巻貝系統間で巻型を決定している遺伝的要因が、単一の遺伝子座によってのみ引き起こされていることが確実に証明された。また、このコンジェニック系統と左巻系統の間では、染色体上のわずかな領域にしか差は無く、今後の巻型決定遺伝子による巻型決定機構の解明に向けた分子レベルでの比較解析を行う上で、理想的な系を作ることができたとと言える。

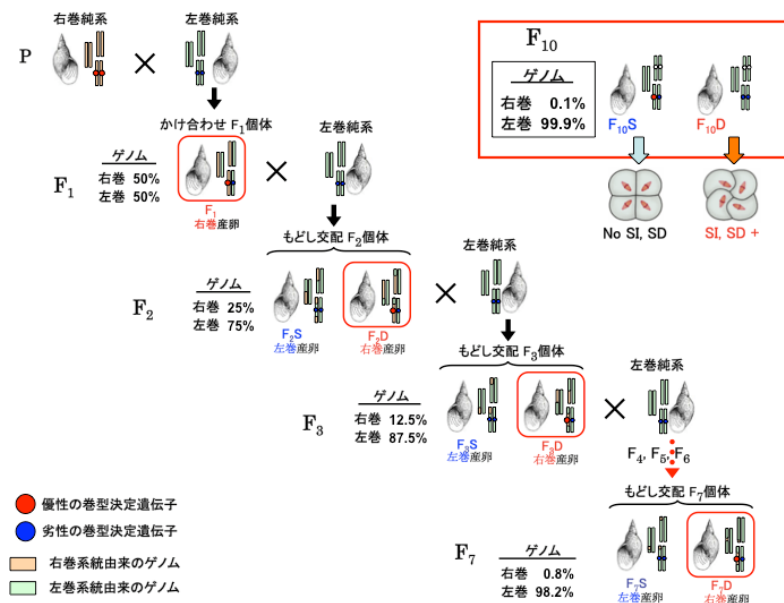


図 連続戻し交配によるコンジェニック巻貝の作成

ERATO 後半よりはじめた、右巻 R 系統を右巻ドナー系統とし、左巻 G 系統をバックグラウンド系統とする戻し交配 R x G は、目標の右巻 F₁₀ 世代（右巻ゲノム 0.1%、左巻ゲノム 99.9%）の巻貝個体を得るところまで無事にすんだ。F₁₀ 右巻については巻型に関して遺伝型がヘテロ[Dd]なので、次世代以降を展開して右巻[DD]個体を単離した。平成 18 年度に後発でスタートさせた別の左右系統（左巻 VAS と右巻 VAD）を用いたコンジェニック巻貝の作出では、より遺伝的背景の均一な系統作成を意識した連続もどし交配で行われ、現在

F₉ 世代を育成中であり F₁₀ 世代まであと一歩である。これらの戻し交配個体群は巻型決定遺伝子を受け継いで右巻の子を産むものと受け継がずに左巻を産むものに分類し（パネル化）、巻型と連鎖する遺伝マーカーの探索と巻型決定遺伝子を含むゲノム領域を特定するために利用した。その詳細については項目 3 で述べる。また、RxG F₁₀ コンジェニックおよび ADS 戻し交配 F₇ 世代においても優性右巻と右巻に特徴的な細胞骨格ダイナミクスとは必ず連鎖しており、巻型決定遺伝子の機能と深く関係しているのではないかと考えられた。

2) 左右巻貝卵に差次発現する mRNA のスクリーニング

先に述べたように、左右巻貝胚の相違は胚発生のごく初期にあらわれ、母性因子によって決定されることがわかっている。母貝ゲノムにコードされる巻型決定遺伝子産物は、遅くとも卵母細胞形成と成熟の間に転写され、1 細胞期には既に機能性タンパク質として翻訳されているか、貯蔵型の母性 mRNA として存在していると予想される。SORST ではまず、巻型決定遺伝子およびその下流にある因子が、右巻に存在するが左巻には存在しないと想定し、左右巻貝に差次的に発現する mRNA の比較を行うことにより、目的とする遺伝子を探索するアプローチを行った。維持していた左右巻貝系統のなかで遺伝的バックグラウンドが近いことがわかっていた左右系統を用い、卵母細胞を含む両性生殖巣を左右成貝より単離、mRNA を調製し、右巻-左巻（実験群）および左巻-右巻（コントロール）のサブトラクション cDNA プロブを作成、別途作成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。候補遺伝子について戻し交配 RG-F₆ 世代で連鎖解析を行った結果、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。次に発現遺伝子の均一性がより高いことが期待された左右の 1 細胞期胚に関して cDNA サブトラクションを行い、類似のディファレンシャルスクリーニングをおこなったが、それでも右巻に有意に多く発現しているクローンの同定には至らなかった。見つからなかった理由として、左右キラリティーの差をもたらす遺伝的背景が単純に遺伝子の発現の有無や差ではないということ、もしくは 1 細胞期にはすでに全てタンパクに翻訳されてしまっていること等が考えられた。また、別途、他生物で左右軸や細胞極性決定、アクチン細胞骨格系の再構築に関係している遺伝子の巻貝ホモログのクローニングと左右でのシーケンス比較も行ったが、この実験からも同定することができなかった。そこでより確実性の高いポジショナルクローニング法に集中すべく平成 18 年までに中止した。

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

ポジショナルクローニングは目的の責任遺伝子を、染色体上の位置情報を手がかりとしてクローニングする方法である。責任遺伝子の機能や発現情報が無くとも、遺伝学的に形質に着目して、連鎖マーカーにより追跡出来るならば、どのような遺伝子にも適用することが可能である。この方法を用いれば機能未知の巻型決定遺伝子を確実に同定することができると考えられる。ポジショナルクローニングは大きく分けて 3 つのステップから成り、第 1 に巻型決定遺伝子のゲノム上の位置を特定するための遺伝学的連鎖地図の作成、第 2 に染色体歩行による物理地図の作成と候補遺伝子の絞りこみ、第 3 に機能解析による巻型決定遺伝子の同定である。

3-1) 巻型決定遺伝子近傍の連鎖地図の作成

連鎖地図を描く上で最も重要なのが、より巻型決定遺伝子の近傍で組み換えを起こしている組み換え個体を得ることと、組み換え位置の情報を正確に知ることができる連鎖マーカーを作成することである。そのための連鎖解析をコンジェニック系統作成も兼ねた連続戻し交配実験と、AFLP 法による巻型連鎖マーカーの作成で行った。連続戻し交配の各世代のパネルを用いた連鎖解析から、巻型決定遺伝子と連鎖する複数の AFLP 連鎖マーカーが作出され、多数の組み換え個体を見出すことができた。それにより、巻型決定遺伝子の存在するゲノム領域の詳細な連鎖地図が作成された。この連鎖地図と得られた組み換え個体を基に、染色体歩行を行い、物理地図を得ることにつながった。また、現在もコンジェニック系統作出のための連続もどし交配が行われており、そこから得られたパネルを解析する

ことで、非組み換え領域の幅を狭めることに努めている。

3-2) 染色体歩行による巻型決定遺伝子領域の物理地図の作成および候補遺伝子の予測
ポジショナルクローニングには全ゲノムを網羅するゲノム DNA ライブラリーが必要である。そこで、優性の巻型決定遺伝子を保持する右巻系統の個体を材料に BAC ライブラリーを作製した。BAC ライブラリーの作製には慶応大学医学部分子生物学教室 清水信義教授、浅川修一講師に御指導いただいた。次に、先に述べた連鎖地図で同定された AFLP 連鎖マーカーを出発点として、BAC クローンを利用した染色体歩行を行い、BAC クローンのコンティグで巻型決定遺伝子の存在する非組み換え領域をすべてカバーすることができた。これらの BAC クローンの塩基配列はショットガンシーケンシング法により解読され、非組み換え領域は 1 カ所の短いギャップを残し、全ての配列が 2 つのコンティグのかたちで得られた。巻型決定遺伝子はその非組み換え領域内に存在する遺伝子であり、遺伝子予測プログラムを用いて遺伝子の探索を行った結果、複数の候補遺伝子が挙げられてきた。

3-3) 候補遺伝子の絞り込みと巻型決定遺伝子同定に向けた機能解析の取り組み

巻型決定遺伝子が決めている“右巻”形質は遅滞遺伝するので、母貝の遺伝子型によって決まっている。したがって、巻型決定遺伝子は母性発現し、卵母細胞を含む右巻の生殖巣および 1 細胞期胚に発現している可能性がきわめて高い。多くのモデル生物における知見からも、初期卵割過程で体軸や細胞の極性決定に関わる母性因子は受精卵に蓄積している例がほとんどである。そこで、予測された遺伝子について、実際に生殖巣や 1 細胞期胚で母性発現しているものを探し出すことで、候補遺伝子を絞り込んだ。さらに、その中から左右系統間における配列比較や発現量比較などを通して、最も有力な候補遺伝子 A にたどり着いた。候補遺伝子 A について抗体を作製し、タンパク質レベルでの比較解析を行った結果においても、巻型決定遺伝子である可能性が強められた。しかしながら、遺伝子 A を巻型決定遺伝子と同定するためには、個体レベルでの機能解析により証明しなくてはならない。すでに mRNA インジェクションによる初期発生胚での外来遺伝子発現系を立ち上げていたので（後述する項目 4）、それを適用した機能解析を進めている。また、より確実な機能解析手法を確立する必要性もあり、トランスジェニック巻貝作製法やノックアウト巻貝作製法の開発も進めている

4) 初期胚における外来遺伝子発現系および母性遺伝子の機能阻害実験系の開発[発表論文 10]

巻型決定遺伝子を同定するためには、左巻卵への優性（右巻）巻型決定遺伝子の導入によるレスキュー実験（右巻化）、もしくは右巻卵での巻型決定遺伝子の機能阻害実験（左巻化）が必須である。後述する項目 5 の研究から、第 3 卵割期のらせん卵割のキラリティーが巻貝個体のキラリティーと一致することが実証できているので、巻型決定遺伝子の機能解析には第 3 卵割期のキラリティー反転の有無で評価すればよい。しかし、これまで我々が実験材料に用いている淡水産巻貝 *L. stagnalis* に関しては、近縁種も含めて分子レベルの遺伝子機能解析は全く報告されていなかった。巻型決定遺伝子は母性発現遺伝子であるため、トランスジェニック巻貝を作製してその子世代の巻型への影響を調べるのが理想的である。しかしゲノム配列も未知で、かつ発現ベクターによる遺伝子導入も検討されていなかった系であるため、トランスジェニック巻貝作成法の開発には多大な時間が必要で SORST 期間内での実現は困難であることが予想された。そこで、迅速に巻型決定遺伝子候補の機能解析を可能とする方法として、初期胚に外来遺伝子を mRNA のかたちでマイクロインジェクションにより導入することで、第 3 卵割前での外来遺伝子発現系の構築を考案した。レポーターには蛍光タンパク質（EGFP、DsRed-Express、mCherry）を用いた。マイクロインジェクションにより導入された mRNA の翻訳は、導入後すぐに開始され、その後は胚の発生ステージに無関係に時間経過とともに一定レベルで行なわれる。また、翻訳量は導入された mRNA の量に依存する。従って、インジェクションのタイミングと mRNA 濃度を適度を選択することにより、外来遺伝子の翻訳量と発現時期をコントロール

することが可能であることがわかった。なお、この手法が他の淡水産巻貝(*L. peregra*、サカマキガイ、インドヒラマキガイ)にも適用可能であることも合わせて報告、今後、発生生物学的研究に広く利用されることが期待される。

また、この実験系を応用して、アンチセンスモルフォリノの導入によって母性遺伝子の発現を抑制する遺伝子機能阻害実験系も構築しており、“Gain of function”と“Loss of function”の両方から、発生過程ではたらく母性遺伝子の機能解析が行える実験系も同時に立ち上げている。

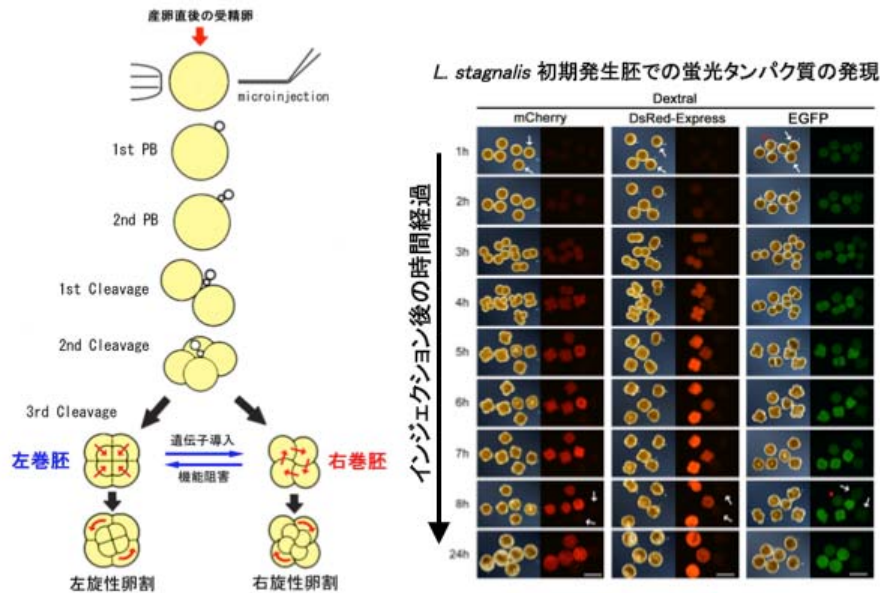


図 巻型決定遺伝子同定のための外来遺伝子発現系の構築

5) 初期胚における巻貝の巻型決定遺伝子の役割[発表論文 29]

巻貝では、左右初期胚の卵割パターンの比較観察より、初期らせん卵割の旋性と殻の巻型との間に対応関係があることが右巻きと左巻きの別種の貝で観察されており(Crampton 1894)、らせん卵割の旋性が巻型を制御している可能性が以前から指摘されていた。しかし、この仮説は未だ実験的に証明されてはおらず、単に対応関係が見られるに過ぎない可能性

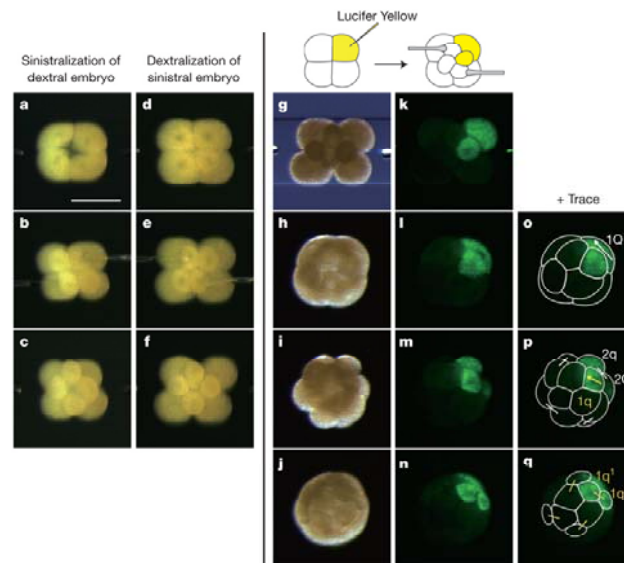


図 マニピュレーションによる第3卵割の人為的な逆転操作(右巻胚の左旋化 a-c と右巻胚の右旋化 e-f) とその後の第4卵割(右旋化した左巻胚の例 g-q)

もあった。我々は、ERATO プロジェクトの最後に、*L. stagnalis* 初期胚の第3卵割期(4から8細胞へ)に右巻き貝に特有に見られる細胞骨格ダイナミクス SD とその結果の紡錘体の傾き SI が巻型決定遺伝子と強くリンクしていることを明らかにしている。そこで、第3卵割の旋性をメカニカルに逆旋させると、内臓も殻の巻型も左右逆転するのかどうか調べることにした。第3卵割において微細なガラス棒を使って人為的に右旋化させた左巻胚は、興味深いことにその後、右巻胚タイプの第4卵割パターンを見せた。一方、右巻胚を左旋化した場合は左巻胚タイプのパターンだった。

なお、この逆転操作は第3卵割で行なうことが重要で、それ以前の第1や第2卵割で逆旋操作しても第3卵割パターンはもとに戻ってしまうことも判明し、8細胞の割球配置が重要であることが明らかになった。

第3卵割で人為的に右旋化させた左巻胚は、その後、形態形成期を経て右巻の稚貝になり、数ヶ月を経て成貝まで生育した。この貝は、殻の巻型のみならず、内臓の配置も右巻貝様に逆転していたが、産卵した卵はすべて左巻稚貝になった。この結果は、巻型を決定している母親の遺伝子にかかわらず、また強制的に導入されたキラリティーであっても、第3卵割期の旋性が巻貝の形態形成期におけるキラリティー決定に重要であること、未知の巻型決定遺伝子は8細胞期の細胞の位置関係を決めているということを世界で初めて実証したことになる。

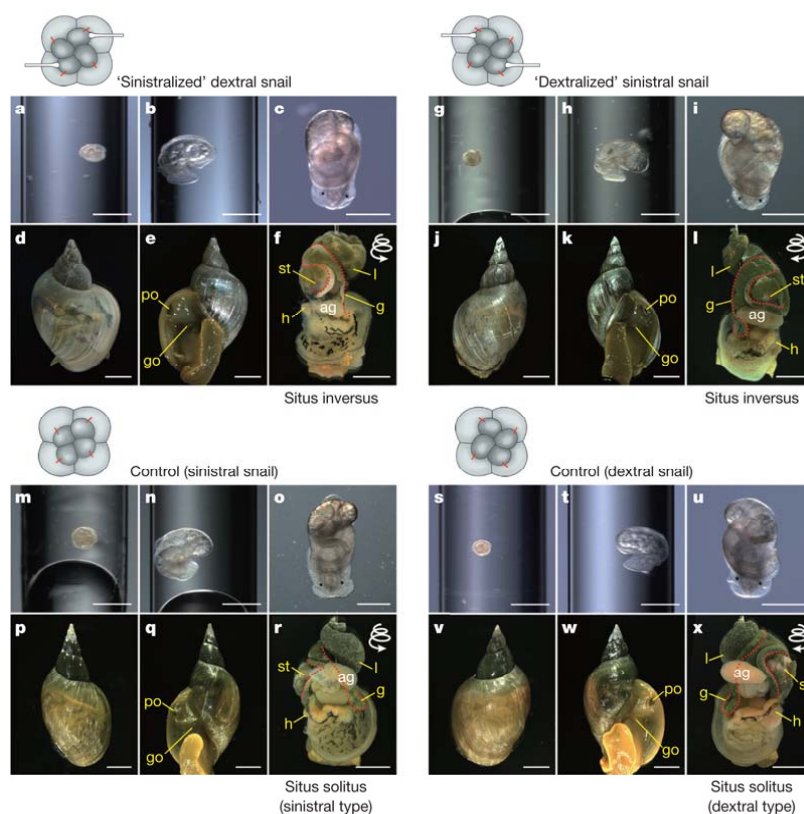


図 逆旋操作した卵は内臓配置も逆のキラリティーの巻貝に成長する

さらに、最近、脊椎動物からウニに至るまで保存されている左右非対称な形態形成に関与している遺伝子 *Nodal-Pitx* が巻貝にも存在し、別種の左巻貝、右巻貝では左右非対称に発現することが報告された。そこで、*L. stagnalis* ホモログをクローニングし、その mRNA の発現パターンを左右純系巻貝、逆旋操作を加えた胚について *in situ* ハイブリダイゼーションにより調べた。その結果、同じ種の左右巻貝胚においても *Nodal-Pitx* 発現は非対称なパターンを示し、右巻貝では右側に、左巻貝では左巻に発現していることが分かった。このパターンは第3卵割の人為的な操作により8細胞期のキラリティーを逆転した胚では左右逆転し、この時期の割球配置が *Nodal* シグナル伝達経路の上流で働くことを明らかにし

た。*Nodal-Pitx* の左右非対称発現のキラリティーについては、戻し交配 F₇ コンジェニック系統を用いた解析により、優性巻型決定遺伝子を受け継いでいる母貝が産む右巻胚は全て第3卵割における特徴的な細胞骨格動態 SD (Spiral deformation、らせん的な細胞形態変化) 及び SI (Spindle inclination、紡錘体の傾き) を有し、かつ *Nodal-Pitx* 発現も右側に偏っていることが明らかとなり、単一遺伝子座にコードされている優性巻型決定遺伝子が *Nodal* シグナルの上流で機能していることも合わせ示すことができた。この発見は巻貝のみならず、脊椎動物あるいは新口動物での左右形成においても、キララな割球配置によるキラリティー決定機構が種を超えて保存された *Nodal* 経路の上流で機能しているかも知れないという新たな示唆を与えている。

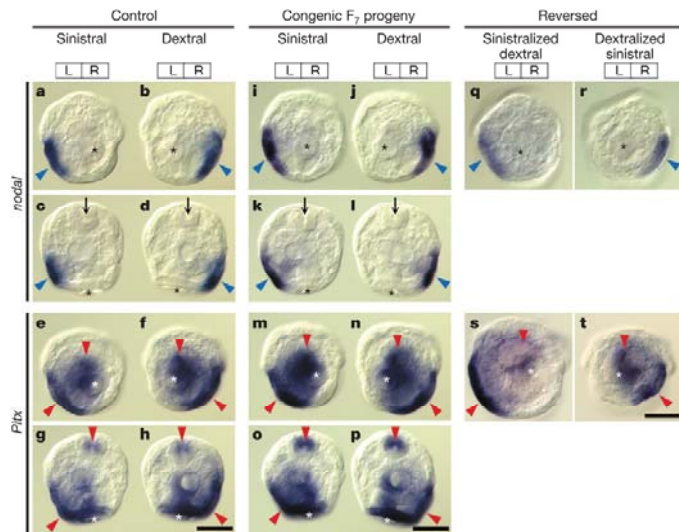


図 純系巻貝胚、コンジェニック F₇ 巻貝が産卵した胚、8細胞期で人為的にキラリティーを操作して培養した胚のトロコフォア期における *Nodal* および *Pitx* 発現 (in situ ハイブリダイゼーション)

巻型決定遺伝子の同定には、候補遺伝子の活性を迅速にバイオアッセイできるシステムの構築が必要である。ここで述べた研究成果から、遺伝子機能復帰・阻害実験において第3卵割—8細胞における割球配置の左右性を確認することで、候補遺伝子が巻型決定遺伝子であるか否かを判定できることが明らかになった。[発表論文 29]

6) 遺伝的に決まる初期胚の細胞骨格ダイナミクスをもたらし機構の解明及び関連する因子の同定

巻貝の左右は発生の極初期、第3卵割の小割球の回転方向で決まり、それには母貝由来の単一遺伝子が働いている。その後の発生は、細胞分化、遺伝子発現、器官形成まですべてほぼ鏡像対称にすすむというシンプルかつユニークな系である。第3卵割の細胞分裂に先んじて、優性右巻のみにみられる割球形態変化 (SD) と紡錘体の傾き (SI) があり、それが巻型決定遺伝子の機能と密接に関わっていることを遺伝学的・分子生物学的にも SORST 研究の基盤として ERATO の成果として報告してきたことは既に述べた通りである。また、第3卵割は、この巻貝胚が最初の非対称分裂おこなう時期でもあるため、非対称分裂に関与する分子のはたらきを調べることで、旋性メカニズムの解明に向けた足がかりが得られる可能性が期待される。そこで代表的な極性にかかわる因子のホモログクローニングと局在解析を行なったところ、線虫やショウジョウバエの報告例とは異なる結果も得ており、この分子のはたらきが第3卵割期の旋性に影響を与えている可能性についても研究している。一方、巻貝の初期卵割では、繰り返してみられる Cleavage cavity (CC) と呼ばれるユニークなオルガネラが存在することが知られている。CC の形成と消失は細胞周期と完全にカップルしておこり、細胞形態変化をもたらしため SD/SI と密接に関わっている可能性についても研究している。今後、らせん卵割期の細胞骨格ダイナミクスに関与する分子のさらなる発現解析や機能解析を行うことで、初期卵割の下流にあって胚の左右決定を担う *Nodal* シグナル伝達までの分子背景が明らかにされることが期待される。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

生物カイロモルフォロジーグループでは、ERATO の研究成果に基づき、巻貝の初期胚がキラリティーを獲得するプロセスの分子レベルでの理解および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目指した。巻型連鎖マーカーと組み換え個体の解析によるゲノム上の巻型決定遺伝子領域の同定、BAC ライブラリーの作製、染色体歩行、巻型決定遺伝子領域のシーケンス（1 ヲ所のギャップをのぞいて全配列が2つのコンティグに繋がった）、ゲノム配列に基づく遺伝子予測、発現解析による母性発現遺伝子の選択を経て候補遺伝子を絞り込んだ。この中で、左右巻型系統間の配列比較、発現量比較などから、最有力候補の遺伝子 A にたどり着いた。タンパク質レベルでの発現解析結果からも、巻型決定遺伝子の最有力候補であることが強く示唆された。現在、左巻1細胞期胚への mRNA 発現による右巻化を期待して機能解析を行なっている。今後は Zinc-finger Nuclease (ZFN) テクノロジーを利用した右巻貝ゲノムを直接改変したノックアウト巻貝の作製なども検討している。機能解析実験には困難が予想されるので、次世代シーケンサーを用いた異なる系統間の巻型決定遺伝子領域全体の配列比較解析も同時に進めている。このように、はなはだ残念ながら SORST 期間中に、巻型決定遺伝子の同定までには到達できなかったが、発生生物学の未解明の謎のひとつである巻型決定遺伝子同定に今一步のところまで近づくことはできた。分子生物学的手法がまったく確立していない系であるために、機能解析による結果が出るまでには更に種々の手法の開発・改善が必要と考えられる。候補遺伝子を絞り込んだという段階で一端公表論文にまとめることを検討している。

一方で、発生生物学全般に貢献する大きな成果を得ることもできた。卵割を人為的にマニピュレーションすることにより遺伝情報とは逆のキラリティーを持った生物に成長させることに成功し、第3卵割期のキラルな物理的割球配置が巻貝個体のキラリティーを決定すること、その下流で脊椎動物の左右性決定と共通のノーダルシグナルが関与していることを世界で初めて実証することに成功した。この左右性決定メカニズムの中心的役割を果たしている小割球と大割球の位置関係という情報は如何なる仕組みでその後の発生過程に伝わっていき、左右非対称な遺伝子発現を導いているのであろうか、物理的位置関係が機械的に作用しているのか、それともシグナル分子を介した情報伝達を行っているのか、非常に興味深い課題であり、今後このメカニズムの解明にもつながっていきたいと考えている。この実験は物理・化学・生物学にまたがるものであり、黒田カイロモルフォロジーチームにしか達成できなかったオリジナリティーの高い成果である。

ヒトにおいては、臓器の左右性が完全に逆転している内臓逆位や、部分的左右性異常のヘテロタキシスなど臓器の左右性に異常が発生することがあり、後者においては先天性の心疾患を引き起こすなど重篤な症状につながるケースがある。正常な体内構造が左右非対称であることは、各臓器が正常に機能するためにも重要であることが分かる。この体内構造の左右非対称性は胚発生初期に決定した左右軸に従って、左右非対称な形態形成が行われた結果であり、その重要性からも多くの脊椎動物で、左右軸形成の分子機構が研究されており、多くの知見が得られている。

近年、脊椎動物においては、ノーダルフローの向きによって左右非対称性が獲得されることが明らかとなっているが、それらは胚発生の原腸期以降の知見である。他にはウニやカエルなどのモデル生物においても発生初期における左右軸形成機構の研究が進められているが、いかなる動物胚においても最も初期の左右対称性の破れについてはモデルの域を出ていない。

我々の結果は胚発生の最も初期に決定する左右軸形成メカニズムについて、実験によってシンプルで明確なモデルを提示した。これは従来の生物の左右性研究の分野にも大きなインパクトを与え、巻貝が生物レベルでのキラリティーの初期シグナルを研究する上で優れた研究材料であることを示したと News & Views および The Scientist オンラインニュースで言及されている。左右巻型決定遺伝子による巻型決定メカニズムの解明は初期発生で決定する左右軸形成メカニズムの重要な知見を与えるものであり、これからの展開が期待されている。

5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

固体キラル化学の研究は新しい研究領域であり、世界的にも我々が先立って研究を行ってきた分野である。最近、国内外でも固体キラル化学に関する研究が活性化してきている。結晶共粉砕により共結晶ができる際のキラリティー認識、超分子構造構築におけるキラリティー認識と転写、それを利用した、光学分割が困難な化合物の単なる結晶化による分割など、面白い成果を得ており、*J. Ame. Chem. Soc.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, *Chem. Eur. J*, *Chem. Commn*, 等トップレベルの学術雑誌を含む国際誌に多くの成果を発表することができた。*Chem. Eur. J*, *Chem. Commun.*, *CrystEngComm* の表紙を飾ったものもある。研究総括は数多くの国際学会で招待講演も行っている。

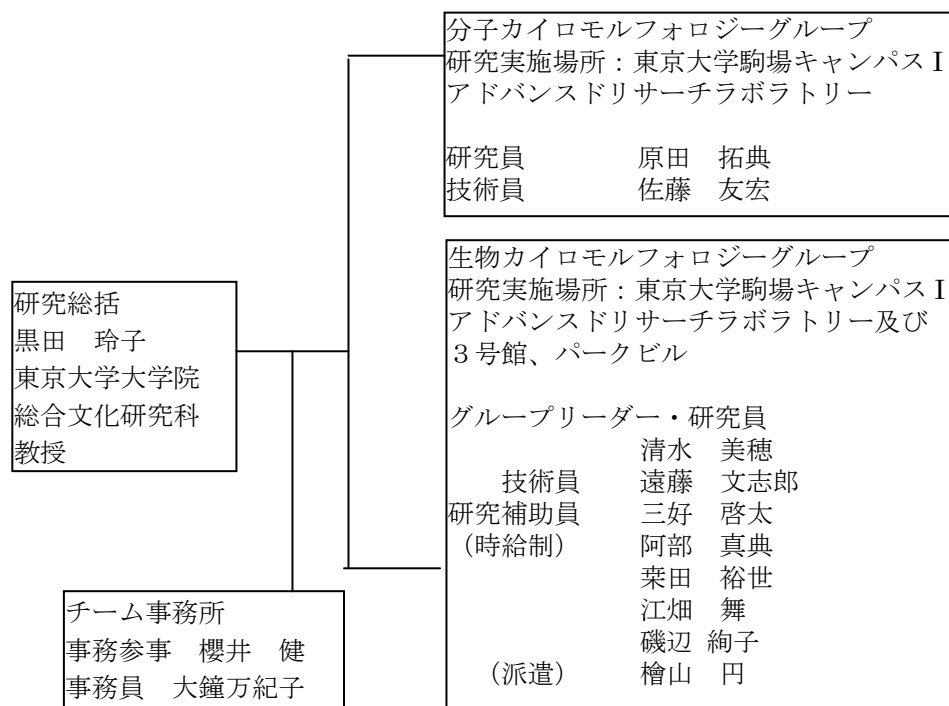
特に、固体キラリティー計測の分野では世界に追従を許さない先駆的研究をおこなっている。固体状態のキラリティー物理量（円二色性、円複屈折）の信頼できる測定が可能な分光計を開発したのは世界中で我々だけであり、固体(膜・結晶・ジェル等)固有の巨視的異方性を除いた真のキラリティー測定、拡散反射CDによる *in situ* 測定、サンプルを水平に置き、相転移・凝集状態の変化などのリアルタイム測定が可能になった。その適用範囲は有機化合物、無機化合物、生体物質など多岐にわたる。共同研究の依頼と装置の問い合わせが国内外（国外：インド、ポーランド、ドイツ、スペイン、ニュージーランド、国内：東大、京大、名古屋大、中央大、岡山理科大、東邦大など）から数多く来ており、世界のキラル計測サイエンスのセンターと位置づけられつつある。また、リアルタイム測定に最適である、白色光を試料に照射し2次元検出を行なうというまったく新規概念に基づく第二世代のキラリティー分光計、MC-CDの開発の目処も立ち、国内、国際特許の出願もすませた。製品化を目指すと同時に、固体キラル科学研究も推進し、日本発の科学技術、産業として世界に広げていきたい。

さまざまな生物の左右非対称性の決定メカニズムの研究は、いまや脊椎動物のみならず植物から無脊椎動物にまで展開されている。しかし、これらの多くは発生が進んだ段階での研究であり、最初の左右対称性の破れについてはいまだ分っていないことばかりである。SORST研究により、非組み換え領域内にある母性発現遺伝子である遺伝子Aを現段階での最有力候補に絞ることができた。さらに、巻型決定遺伝子は、第3卵割の割球の物理的配置を決定しており、これが個体の左右性を決めていることを世界で初めて明らかにした。また、この下流で脊椎動物にも共通の、左右非対称な形態形成に関わるノーダルシグナルが関与していることも示すことができた。線虫、ショウジョウバエ、マウスなどと比べゲノム情報がなく分子生物学的手法がまったく確立されていないために、すべての段階で、はるかに多くの時間と努力が必要であった。しかし、巻貝というユニークな特徴を持つ生物を研究材料に選んだがゆえに、多くの生物でも重要であるが、他のモデル生物を対象にした研究では得ることのできなかつた成果を得ることができたと考えている。巻貝というシンプルな生物を使うことで、マウス、ヒトなどの脊椎動物の左右決定機構を解明する道が開けたということができる。

ERATO研究の最後に得られた成果は生物の左右性のレビューには必ず取り上げられ、世界中で広く使われている大学の教科書にも掲載されている。昨年末にNews& Views付でNature誌に載ったSORST研究の成果も、既に多くの反響を得ている。だれもとりかからなかった生物をいわば左右性研究のモデル生物にまで確立したわけで、世界のトップを走っていることは確かである。今後、より多くの研究者が巻貝の研究に参入してくると思われる。

6. 研究実施体制

(1) 体制（平成 21 年 2 月現在）JST メンバーのみ記す



(2) メンバー表

①分子カイロモルフォロジーグループ

氏 名	役 職	研究項目	参加時期
原田 拓典	JST 研究員	キラリティー計測をツールとする 生体関連物質の作用機構の解明・ 拡散反射、透過測定兼用全偏光対 応型UCS (UCS-3) の開発	平成 16 年 10 月～ 現在
佐藤 友宏	JST 技術員	固体中での分子の再配列機構の解 明とキラリティー制御	平成 16 年 10 月～ 現在
逢坂 直樹	JST 研究員	生体に関連したキラル超分子化合 物の構築、固体表面を介するキラ リティーの伝播と増幅	平成 19 年 4 月～ 平成 21 年 3 月
中村 朝夫	JST グループリ ーダー・研究員	固体および熔融状態におけるキラ リティーの転写と増幅	平成 16 年 10 月～ 平成 17 年 3 月
滝川 幸雄	JST 技術員（連 絡招聘担当）	チーム運営管理、JST 本部連絡業務	平成 16 年 10 月～ 平成 18 年 11 月
関谷 亮	東大院・総合文 化・特任助教		平成 年 4 月～ 現在
朝野 夏世	東大院総合文化 修士・博士	固体状態におけるキラリティー測 定法の検討と応用	平成 16 年 10 月～ 平成 21 年 3 月
長谷部 三養 子	東大院総合文 化・修士	2-(2-Bromophenylthio)-3-methyl -2-cyclohexene-1-one の多形制御	平成 16 年 10 月～ 平成 18 年 3 月

竹下 昌利	東大院総合文化・修士	固体状態におけるキラリティー転写	平成16年10月～ 平成17年3月
キョウ ヘキ エイ	東大院総合文化・修士	固体共粉砕法による電荷移動錯体結晶の生成	平成17年4月～ 平成19年3月
福田 森彦	東大院理学系・修士・博士	キラリティーを導入した超分子構造の構築	平成19年4月～ 現在

共同研究

今井 喜胤 (ERATO OB)	近畿大・理工・講師		平成16年10月～ 現在
田島 暢夫 (ERATO OB)	物質・材料研究機構 計算材料科学研究セ)		平成16年10月～ 現在

②生物カイロモルフォロジーグループ

氏 名	役 職	研究項目	参加時期
清水 美穂	JST グループリーダー・研究員	巻型決定遺伝子同定および機構解明、生物カイロモルフォロジーグループの運営管理、JST本部連絡業務	平成16年10月～ 現在
細入 勇二	JST 研究員	巻型決定遺伝子の同定	平成16年10月～ 平成21年 3月
遠藤 文志郎	JST 技術員	巻型決定機構解明、遺伝子機能解析	平成16年10月～ 現在
吉澤 有生	JST 技術員	巻貝各系統の維持・飼育管理	平成16年10月～ 平成18年 8月
阿部 真典	JST 技術員	巻型決定遺伝子の同定、遺伝子機能解析	平成18年4月～ 平成20年 3月
	JST 研究補助員 (時給制)		平成21年4月～ 現在
藤倉 航平	JST 技術員	巻型決定遺伝子の同定	平成17年4月～ 平成21年 3月
三好 啓太	JST 研究補助員	コンジェニック巻貝系統の作成、巻貝各系統の維持	平成16年10月～ 現在
岡田 昌子	JST 研究補助員	巻貝飼育補助	平成16年10月～ 平成18年 3月
小澤 容子	JST 研究補助員	巻貝各系統の維持・飼育管理	平成17年2月～ 平成21年 3月
	JST 研究補助員 (時給制)		平成21年4月～ 平成21年 9月
栗田 裕世	JST 研究補助員 (時給制)	卵割観察、巻貝飼育補助	平成16年10月～ 現在
杉山 友子	JST 研究補助員 (時給制)	巻貝飼育補助	平成17年1月～ 平成17年 3月
江畑 舞	JST 研究補助員 (時給制))	巻貝飼育補助	平成18年4月～ 平成20年 3月
			平成21年4月～

			現在
大橋 美香	JST 研究補助員 (時給制)	巻貝飼育補助	平成 18 年 7 月～ 平成 21 年 4 月
磯辺 絢子	JST 研究補助員 (時給制)	巻貝飼育補助	平成 19 年 1 月～ 現在
小野塚 博之	JST 研究補助員 (時給制)	巻貝飼育補助	平成 20 年 3 月～ 平成 21 年 3 月
森高 みどり	JST 研究補助員 (派遣)	巻貝飼育補助	平成 16 年 11 月～ 平成 19 年 9 月
檜山 円	JST 研究補助員 (派遣)	巻貝飼育補助	平成 21 年 7 月～ 現在
藤倉 航平	東大院総合文化・修士	巻型決定遺伝子の探索	平成 16 年 10 月～ 平成 17 年 3 月
草井 寛之	東大総合文化卒 研・院総合文化 修士・博士	巻貝螺旋卵割における細胞骨格動態の研究	平成 16 年 10 月～ 現在
杉山 知子	東大総合文化卒 研・院総合文化 修士	遺伝子発現系構築の試み	平成 17 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
本間 泰平	東大院理学系・ 修士・博士	巻貝初期胚における極性タンパク質の機能解析	平成 18 年 4 月～ 現在
大久保 亜伊子	東大院総合文化・修士	巻貝における in situ hybridization 法を用いた遺伝子発現解析	平成 19 年 4 月～ 平成 21 年 3 月
中 嘉子	東大院理学系・ 修士	巻貝初期胚における遺伝子機能解析手法の開発	平成 19 年 4 月～ 平成 21 年 3 月
阿部 真典	東大院理学系・ 博士	巻貝 <i>Lymnaea stagnalis</i> の巻型決定遺伝子同定を目指した遺伝マーカーの探索と外来遺伝子発現系の構築	平成 20 年 4 月～ 平成 21 年 3 月

7. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等
なし

(2) 招聘した研究者等
なし

8. 発展研究による主な研究成果

(1) 論文発表 (英文論文 8 6 件 邦文論文 2 件) 2010 年 3 月 4 日現在。

その後、2010 年 9 月半ばまでに、SORST の研究成果に基づいた英文原著論文が更に 7 報受理され、そのうち 1 報は印刷され、残り 5 報は web で公開されている。それらを加えれば 93 件。総説論文も 1 報追加される。

原著論文

2010

1. Development of novel thioether compound for spontaneous chiral crystallization
T. Kinuta, E. Yokoyama, T. Sato, N. Tajima, R. Kuroda, Y. Matsubara and Y. Imai
CrystEngComm, 2010, 12, 1394-1396.
2. Preparation of Supramolecular Host Complex Composed of 1D Charge-Transfer Column-like Structure Using 6,6'-Disubstituted-1,1'-bi-2-naphthol and Methylviologen
T. Kinuta, N. Tajima, T. Sato, R. Kuroda, Y. Matsubara, Y. Imai
J. Mol. Structres, 2010, 964, 27-30.
3. Two-dimensional Layered Chiral Supramolecular Organic Fluorophore composed of 1-Amino-2-indanol and Carboxylic Acid Derivatives
Y. Imai, N. Shiota, T. Kinuta, T. Okuno, Y. Nakano, T. Harada, T. Sato, M. Fujiki, R. Kuroda and Y. Matsubara,
Eur. J. Org. Chem., 2010, 7, 1353-1357.
4. Control of crystal structure and solid-state chiral optical properties of chiral supramolecular organic fluorophore consisting of 1-pyrenesulfonic acid and chiral amine molecules
Y. Imai, K. Murata, Y. Nakano, T. Harada, T. Kinuta, N. Tajima, T. Sato, M. Fujiki, R. Kuroda, Y. Matsubara,
CrystEngComm, 2010, 12, 1688-1692.
5. Preparation of Supramolecular Thiophene Host System Showing Solid-state Fluorescence by Using Chiral (1R,2S)-2-Amino-1,2-diphenylethanol
N. Shiota, T. Kinuta, T. Sato, N. Tajima, R. Kuroda, Y. Matsubara and Y. Imai
Cryst. Growth Des., 2010, 10(3), 1341-1345.

2009

6. ○Annealing assisted mechanochemical syntheses of transition-metal coordination compounds and co-crystal formation. Selected as a Hot Article, selected for inside cover.
R. Kuroda, J. Yoshida, A. Nakamura and S. Nishikiori,
CrystEngComm, 2009, 11, 427-432. (Selected for inside cover and hot article).
7. 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.
Y. Imai, K. Murata, K. Kamon, T. Kinuta, T. Sato, R. Kuroda, Y. Matsubara,
Cryst. Growth Des., 2009, 9, 602-605.
8. Complexation behavior of supramolecular organic fluorophore by solid-state co-grinding crystallization using 2-anthracenecarboxylic acid and (R)-1-(2-naphthyl)-ethylamine and its optical property.
Y. Imai, K. Kamon, T. Kinuta, T. Sato, R. Kuroda, Y. Matsubara,
Eur. J. Org. Chem. 2009, 1335-1339. (Selected for cover).
9. Supramolecular chirality measured by diffuse reflectance circular dichroism spectroscopy.
N. Asano, T. Harada, T. Sato, N. Tajima and R. Kuroda,
Chem. Commun., 2009, 899-901.
10. Expression of Exogenous Fluorescent Proteins in Early Freshwater Pond Snail Embryos.
M. Abe, M. Shimizu and R. Kuroda,
Dev. Genes Evol., 2009, 219, 167-173.
11. Total Helical-Sense Bias of an Achiral Peptide Main-Chain Induced by a Chiral Side-Chain Bridge.

- N. Ousaka, T. Sato, and R. Kuroda,
J. Am. Chem. Soc., 2009, 131, 3820-3821.
12. Formation and crystal structure of the chiral charge-transfer complex with axially chiral 1,1'-Bi-2-naphthol derivatives and tetracyanobenzene.
Y. Imai, K. Kamon, S. Kido, T. Harada, N. Tajima, T. Sato, R. Kuroda and Y. Matsubara,
CrystEngComm, 2009, 11, 620-624.
 13. Syntheses and Photophysical Properties of Optical-active Blue-Phosphorescent Iridium Complexes Bearing Asymmetric Tridentate Ligand.
M. Ashizawa, K. Kobayashi, H. Sato, A. Yamagishi, F. Okuda, T. Harada, R. Kuroda, and M. Haga,
Dalton Trans., 2009, 1700-1702.
 14. Biochemical analysis of oligomerization of expanded polyalanine repeat proteins
J. Nojima, Y. Oma, E. Futai, N. Sasagawa, R. Kuroda, B. Turk, and S. Ishiura,
J. Neurosci. Res., 2009, 87, 2290-2296.
 15. Charge-transfer host system composed of 9,10-bis(3,5-dihydroxyphenyl)anthracene and mehtyviologen.
Y. Imai, T. Kinuta, K. Kinuta, K. Kamon, N. Tajima, T. Sato, R. Kuroda, and Y. Matsubara,
Tetrahedron, 2009, 65, 3740-3744.
 16. Complexation Behavior of Binaphthol/Tetrafluoro-1,4-benzoquinone Charge-transfer Complex.
Y. Imai, T. Kinuta, K. Kamon, N. Tajima, T. Sato, R. Kuroda, and Y. Matsubara,
Cryst. Growth Des., 2009, 9, 2393-2397.
 17. ○High performance diffuse reflectance circular dichroism spectrophotometer.
T. Harada, Y. Miyoshi and R. Kuroda,
Rev. Sci. Instruments, 2009, 80, 046101.
 18. Colored Supramolecular Host System Using a Charge-Transfer Complex Composed of 1,1'-Bi-2-naphthol and 2,5-Disubstituted-1,4-benzoquinone.
Y. Imai, T. Kinuta, K. Kamon, T. Sato, R. Kuroda, and Y. Matsubara,
Eur. J. Org. Chem., 2009, 2519-2525.
 19. Solid-state Optical Properties of Chiral Supramolecular Organic Fluorophore Consisting of Fluorescent 1-Pyrenesulfonic Acid and Amine molecules.
Y. Imai, K. Murata, Y. Naoko, T. Harada, T. Sato, N. Tajima, M. Fujiki, R. Kuroda, Y. Matsubara,
Eur. J. Org. Chem., 2009, 3244-3248.
 20. Conformational and color polymorphism of achiral 2-methyl-3-(2-naphthalenylthio)-1,4-naphthalenedione.
Y. Imai, K. Kamon, T. Kinuta, T. Sato, R. Kuroda, Y. Matsubara,
CrystEngComm, 2009, 11, 1223-1226.
 21. Synthesis of chiral dotriacontanaphthalenes:How many naphthalene units can be elaborately connected?
D. Sue, K. Takahashi, T. Harada, R. Kuroda, T. Kawabata and K. Tsubaki,
J. Org. Chem., 2009, 74, 3940-3943.
 22. Quantum chemical CD calculations of dioncophylline A in the solid state.
G. Bringmann, K. Maksimenka, T. Bruhn, M. Reichert, T. Harada and R. Kuroda,
Tetrahedron, 2009, 65, 5720-5728.

23. Charge-Transfer Host Complex with Channel-like Cavity Using Disubstituted-1,1'-bi-2-naphthol and Benzylviologen, K. Kinuta, Y. Kise, K. Kamon, N. Tajima, T. Sato, R. Kuroda, Y. Matsubara and Y. Imai, *Tetrahedron Lett.*, 2009, 50, 5786-5789.
24. Multiple Molecular Recognition Host System using Charge transfer Complex of 3,3'-Disubstituted-1,1'-bi-2-naphthol and Methylviologen. Y. Imai, K. Kamon, T. Kinuta, N. Tajima, T. Sato, R. Kuroda, Y. Matsubara, *Cryst.Growth Des.*, 2009, 9, 4096-4101 (2009).
25. Combination between metal-ligand coordination and hydrogen bond interaction: a facile route for the construction of 3D coordination networks with the ability to include relatively large aromatic molecules. R. Sekiya, S. Nishikiori and R. Kuroda, *CrystEngComm.*, 2009, 11, 2251-2253.
26. Formation of a Chiral Host with Axially Chiral Cationic 1D Coordination Polymers Composed of Achiral Building Blocks and Inclusion of Anionic Tris-chelate Complexes in an Unbalanced delta/lambda Ratio. J. Yoshida, S. Nishikiori and R. Kuroda, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 2009, 82, 1377-1385.
27. Solid-state Chiral Supramolecular Organic Fluorophore having a π -Conjugated Phenylene Ethynylene Unit. T. Kinuta, K. Kamon, T. Harada, Y. Nakano, N. Tajima, T. Sato, M. Fujiki, R. Kuroda, Y. Matsubara, Y. Imai, *Eur. J. Org. Chem.*, 2009, 5760-5764.
28. Crystal Structure of 9,10-Dipentafluorophenylanthracene Host System. Y. Imai, K. Kamon, K. Kawaguchi, N. Tajima, T. Sato, R. Kuroda and Y. Matsubara, *Letters in Org. Chem.*, 2009, 6, 588-592.
29. ○Chiral blastomere arrangement dictates zygotic left-right asymmetry pathway in snails. R. Kuroda, B. Endo, M. Abe and M. Shimizu, *Nature*, 2009, 462, 790-794.

2008

30. A Quadruply-Stranded Metallohelicate and Its Spontaneous and Complete Dimerization to an Interlocked Metallohelicate. M. Fukuda, R. Sekiya and R. Kuroda, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47, 706-710.
31. Helicates, boxes, and polymers from simple pyridine-alcohol ligands: The impact of the identity of the transition metal ion. S. Telfer, N. Parker, T. Harada, R. Kuroda, J. Lefebvre and D. Lenzoff, *Inorg. Chem.*, 2008, 47, 209-218.
32. Intramolecular Crosslinking of an Optically Inactive 310-Helical Peptide: Stabilization of Structure and Helix Sense. N. Ousaka, T. Sato, R. Kuroda, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 463-465.
33. A coincident spontaneous resolution system for racemic 1,1'-binaphthyl-2,2'-dicarboxylic acid and 1,2-diphenylethylenediamine induced by water. Y. Imai, K. Kawaguchi, N. Tajima, T. Sato, R. Kuroda and Y. Matsubara, *Chem. Commun.*, 2008, 362-364.

34. A Solid-State Fluorescence Host System Using a 21-Helical Column Consisting of Chiral (1R,2S)-2-Amino-1,2-diphenylethanol and Fluorescent 1-Pyrenecarboxylic Acid.
Y. Imai, S. Kido, T. Sato, R. Kuroda, and Y. Matsubara,
Chem. Asia. J., 2008, 3, 625-629.
35. Study of the nanoscopic deformation of an annealed nafion film by using atomic force microscopy and a patterned substrate.
Y. Maeda, Y. Gao, M. Nagai, Y. Nakayama, T. Ichinose, R. Kuroda, K. Umemura,
Ultramicroscopy, 2008, 108, 529-535.
36. Tuning Mechanism in a Two-Component Columnar Host System Composed of 1,2-Diphenylethylenediamine and 1,1'-Binaphthyl-2,2'-dicarboxylic acid.
Y. Imai, K. Kawaguchi, K. Murata, T. Sato, R. Kuroda and Y. Matsubara,
Org. Lett., 2008, 3, 469-471.
37. Formation of chiral 21-helical columnar host system with phenylacetylene unit by using (1R,2S)-2-amino-1,2-diphenylethanol.
Y. Imai, K. Kawaguchi, H. Matsuno, T. Sato, R. Kuroda and Y. Matsubara,
Tetrahedron, 2008, 64, 4585-4589.
38. Inversion of the sign of the solid-state circular dichroism at low temperature.
T. Harada, T. Sato and R. Kuroda,
Chem. Phys. Lett., 2008, 456, 268-271.
39. Formation of Supramolecular Host System with Multiple Chiral Points (Central, Axial, and Helical) by using (1R,2S)-2-Amino-1,2-diphenylethanol.
Y. Imai, K. Murata, H. Matsuno, T. Sato, R. Kuroda and Y. Matsubara,
CrystEngComm., 2008, 10, 947-950.
40. Decelerated chirality interconversion of an optically inactive 310-helical peptide by metal chelation.
N. Ousaka, N. Tani, R. Sekiya and R. Kuroda,
Chem Commun., 2008, 2894-2896.
41. Multiple Molecular Response Columnar Host System Composed of Rac-2-Amino-1,2-diphenylethanol and 1-Fluorenicarboxylic Acid.
Y. Imai, K. Nagasaki, K. Murata, K. Kawaguchi, T. Harada, Y. Nakano, T. Sato, M. Fujiki, R. Kuroda and Y. Matsubara,
CrystEngComm., 2008, 10, 951-953.
42. Direct observation of deformation of nafion surfaces induced by methanol treatment by using atomic force microscopy.
K. Umemura, R. Kuroda, Y. Gao, M. Nagai and Y. Maeda,
Appl. Surf. Sci., 2008, 254, 7980-7984.
43. On the mechano-chiral effect of vertical flows on the dichroic spectra of 5-phenyl-10,15,20-tris(4-sulfonatophenyl)porphyrin J-aggregates.
Z. E-Hachemi, O. Arteaga, A. Canillas, J. Crusats, C. Escudero, R. Kuroda, T. Harada, M. Rosa and J. M. Ribo,
Chem. Eur. J, 2008, 14, 6438-6443.
44. Control of circularly polarized luminescence (CPL) property by supramolecular complexation.
Y. Imai, M. Fujiki, T. Harada, R. Kuroda and Y. Matsubara,
New J. Chem., 2008, 32, 1110-1112.

45. A Solid-state Chiral Fluorophore Obtained from Achiral Fluorescent 4-Biphenylcarboxylic Acid and rac-Phenylmethylaniline Derivatives.
Y. Imai, K. Murata, H. Matsuno, K. Kamon, T. Sato, R. Kuroda and Y. Matsubara,
Chem. Lett., 2008, 37, 726-727.
46. Diatom cells grown and baked on a functionalized mica surface.
K. Umemura, Y. Noguchi, Takuya Ichinose, Y. Hirose, R. Kuroda, and S. Mayama,
J Biol. Phys., 2008, 34, 189-196.
47. Selective Formation and Optical Property of a 21-Helical Columnar Fluorophore Composed of Achiral 2-Anthracenecarboxylic Acid and Benzylamine.
Y. Imai, K. Murata, N. Asano, Y. Nakano, K. Kawaguchi, T. Harada, T. Sato, M. Fujiki, R. Kuroda, Y. Matsubara,
Cryst. Growth Des., 2008, 8, 3376-3379.
48. Preparation of spontaneous resolution chiral fluorescent system using 2-anthracenecarboxylic acid.
Y. Imai, K. Kamon, K. Murata, T. Harada, Y. Nakano, T. Sato, M. Fujiki, R. Kuroda and Y. Matsubara
Org. Bio. Chem., 2008, 6, 3471-3475.
49. Vertical-type chiroptical spectrophotometer (I): Instrumentation and application to diffuse reflectance circular dichroism measurement.
T. Harada, H. Hayakawa, and R. Kuroda,
Rev. Sci. Instruments, 2008, 79, 073103
50. Molecular Recognition Property of Charge-transfer Host System Composed of 10,10'-Dihydroxy-9,9'-biphenanthryl and Viologen Derivatives.
Y. Imai, K. Kamon, S. Kido, T. Sato, N. Tajima, R. Kuroda and Y. Matsubara,
Eur. J. Org. Chem., 2008, 4784-4789.
51. 2D layered supramolecular host system derived from 21-helical column, composed of 1,2-diphenylethylenediamine and N-phenyliminodiacetic acid.
Y. Imai, K. Murata, T. Sato, R. Kuroda and Y. Matsubara,
Org. Lett., 2008, 10, 3821-3824.
52. Preparation and Crystal Structure of Guest-Dependent Charge-Transfer Host System Using 1,1'-Bi-2-naphthol and 2-Chloro-5-methyl-benzoquinone.
Y. Imai, K. Kamon, T. Kinuta, N. Tajima, T. Sato, R. Kuroda, Y. Matsubara,
Cryst. Growth Des., 2008, 8, 3493-3496.
53. α -Chain-Terminus Triggered Chiral Memory in an Optically Inactive 3_{10} Helical Peptide.
N. Ousaka, Y. Inai, R. Kuroda,
J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 12266-12267.
54. Varied Charge-Transfer Complex Crystals Formed between diols and benzoquinone in the Solid and Solution States.
R. Kuroda, T. Sato, and Y. Imai,
CrystEngComm, 2008, 10, 1881-1890.
55. Formation of 1D and 3D coordination polymers in the solid state induced by mechanochemical and annealing treatments: bis 3-cyano-pentane-2,4-dionato metal complexes.
J. Yoshida, S. Nishikiori and R. Kuroda,
Chem. Eur. J., 2008, 14, 10570-10578.

56. Nano-Characterization of a Nafion Thin Film in Air and in Water by Atomic Force Microscopy.
K. Umemura, T. Wang, M. Hara, R. Kuroda, O. Uchida and M. Nagai,
J. Phys.: Conf. Ser., 2007, 61, 1202-1206 .
57. Axial structures of biphenyl compounds linked by diethyl ether chains.
Y. Imai, J. Kitazawa, T. Sato, N. Tajima, R. Kuroda, Y. Matsubara and Z. Yoshida,
Tetrahedron, 2007, 63, 1995-1999.
58. Regulated Growth of Diatom Cells on Self-Assembled Monolayers.
K. Umemura, T. Yamada, Y. Maeda, K. Kobayashi, R. Kuroda and S. Mayama,
J. of Nanobiotechnology, 2007, 5, 1-14.
59. Solid-state optical properties of a chiral supramolecular fluorophore consisting of chiral (1R,2R)-1,2-diphenylethylenediamine and fluorescent carboxylic acid derivatives.
Y. Imai, K. Kawaguchi, T. Harada, T. Sato, M. Ishikawa, M. Fujiki, R. Kuroda and Y. Matsubara,
Tetrahedron Lett., 2007, 48, 2927-2930 .
60. Construction of Supramolecular Complexes by Use of Planar Bis(β -diketonato)cobalt(II) Complexes as Building Blocks.
J. Yoshida, S. Nishikiori and R. Kuroda,
Chem. Lett., 2007, 36, 678-679.
61. Lanthanide Class of a Trinuclear, Enantiopure, Helical Architecture Containing Chiral Ligands: Synthesis, Structure and Properties.
M. Lama, O. Mamula, G. Kottas, L. D. Cola, A. Nakamura, R. Kuroda, H. Stoeckli-Evans,
Chem. Eur. J., 2007, 13, 7358-7373
62. Chiral Channel-like cavity which is tunable via changes in 2D-column packing structure.
Y. Imai, K. Kawaguchi, K. Asai, T. Sato, R. Kuroda, and Y. Matsubara,
CrystEngComm., 2007, 9, 467-470.
63. Formation of a Chiral 2D-Layered Host System Composed of (1R, 2R)-1,2-Diphenylethylenediamine and Benzenediacetic Acid Derivatives.
Y. Imai, K. Kawaguchi, K. Murata, T. Sato, R. Kuroda, and Y. Matsubara,
Chem. Lett., 2007, 36, 812-813 .
64. Solvent Dependent Assembly and Disassembly of a Hydrogen Bonded Helical Structure in a Co - Mo Bimetallic Complex.
S. Khatua, T. Harada, R. Kuroda and M. Bhattacharjee,
Chem. Commun., 2007, 3927-3929 .
65. An Isoselective and Visual Inclusion Host System using Charge-Transfer Complexes of 3,3'-Disubstituted-1,1'-bi-2-naphthol and Methylviologen.
Y. Imai, K. Kamon, T. Kinuta, N. Tajima, T. Sato, R. Kuroda, and Y. Matsubara,
Tetrahedron Lett., 2007, 48, 6321-6325.
66. A solid-state fluorescence sensing system consisting of chiral (1R,2S)-2-amino-1,2-diphenylethanol and fluorescent 2-anthracenecarboxylic acid.
Y. Imai, K. Murata, K. Kawaguchi, T. Sato, R. Kuroda and Y. Matsubara,
Org. Lett., 2007, 9, 3457-3460.
67. Tunable two-component host system with multiple chiral points composed of cyclohexanediamine and 1,1'-binaphthyl-2,2'-dicarboxylic acid.
Y. Imai, K. Kawaguchi, K. Murata, T. Sato, R. Kuroda, Y. Matsubara,
Cryst. Growth Des., 2007, 7, 1676-1678.

68. A charge-transfer host system composed of a chiral 1,1'-bi-2-naphthol cluster and benzylviologen.
Y. Imai, K. Kamon, T. Kinuta, N. Tajima, T. Sato, R. Kuroda, and Y. Matsubara,
Tetrahedron, 2007, 63, 11928-11932.
69. Endoplasmic reticulum stress caused by aggregate-prone proteins containing homopolymeric amino acids.
N. Uchino, Y. Oma, K. Toriumi, N. Sasagawa, I. Tanida, E. Fujita, Y. Kouroku, R. Kuroda, T. Momoi, and S. Ishiura,
FEBS Journal, 2007, 274, 5619-5627.

2006

70. A charge-transfer complex of 10,10'-dihydroxy-9,9'-biphenanthryl and methylviologen as a visual inclusion host system.
Y. Imai, S. Kido, K. Kano, T. Kinuta, T. Sato, R. Kuroda, and Y. Matsubara,
Org. Lett., 2007, 9, 5047-5050.
71. ○ Successive optical resolution of two compounds by one enantiopure compound.
Y. Imai, M. Takeshita, T. Sato and R. Kuroda,
Chem. Commun., 2006, 1070 -1072.
72. Quantitative analysis of DNA-porphyrin interactions.
Y. Nitta and R. Kuroda,
Biopolymers, 2006, 81, 376 - 391 .
73. Nano-characterization and nona-fabrication of nafion thin film in liquids by atomic force microscopy.
K. Umemura, T. Wnag, T. Hara, R. Kuroda, O. Uchida, M. Nagai,
Langmuir, 2006, 22, 3306-3312 .
74. Formation of chiral charge-transfer complex with axially chiral 1,1'-bi-2-naphthol and viologen derivatives.
Y. Imai, T. Kinuta, T. Sato, R. Kuroda, Y. Matsubara and Y. Yoshida,
Tet. Letters, 2006, 47, 3603-3606.
75. Boxes, Helicates, and Coordination Polymers: A Structural and Magnetochemical Investigation of the Diverse Coordination Chemistry of Simple Pyridine-Alcohol Ligands.
S. G. Telfer, R. Kuroda, J. Lefebvre, and D. B. Leznoff,
Inorg Chem., 2006, 45, 4592-601.
76. Visualization of Molecular Recognition: A Novel System Based on Charge-transfer Complexes Composed of 1,1' -Bi-2-naphthol Derivatives and p-Benzoquinone.
Y. Imai, N. Tajima, T. Sato and R. Kuroda,
Org. Lett., 2006, 8, 2941-2944.
77. Transfer of Chirality in Complexes with D3 Symmetry. Kinetics of the Formation Reaction of Chiral tris{O,O' -bis[2-methylbutyl] Dithiophosphato} Chromium (III) Complexes: (L,D){Cr[(±)Mebdtp]3}, D-(+)-589 ? and L-(-)-589 {Cr[(+)(S)(S)Mebdtp]3} .
P. Biscarini, M. Benedetti, R. Kuroda, and F. Ferranti,
Eur. J. Inorg. Chem., 2006, 16, 3167-3176 .
78. Development of a Chiral System Tunable via Changes in a 21-Column Packing Structure.
Y. Imai, K. Kawaguchi, T. Sato, R. Kuroda and Y. Matsubara,
Tet. Letters, 2006, 7885-7888.

79. Helicity Induction through Hydrogen Bonding and Spontaneous Resolution of a Bimetallic nickel Complex Coordinated to an Octahedral Metalloligand.
S. Khatua, H. Stoeckli-Evans, T. Harada, R. Kuroda and M. Bhattacharjee,
Inorg. Chem., 2006, 45, 9619-9621.

2005

80. The Versatile, Efficient, and Stereoselective Self-Assembly of Transition Metal Helicates by Using Hydrogen-Bonds.
S. G. Telfer and R. Kuroda,
Chem. -Eur. J., 2005, 11, 57-68.
81. A Trinuclear Eu (III) Array within a Diastereoselectively Self-Assembled Helix Formed by Chiral Bipyridine-Carboxylate Ligands.
O. Mamula, M. Lama, S. G. Telfer, A. Nakamura, R. Kuroda, H. Stoeckli-Evans, and R. Scopelitti,
Angew. Chem. Int. Ed., 2005, 17, 2527-2531.
82. Efficient optical resolution of secondary alkyl alcohols by chiral supramolecular hosts.
Y. Imai, T. Sato, and R. Kuroda,
Chem. Commun., 2005, 3289-3291.
83. Intrinsic birefringence of a chiral sodium chlorate crystal: Is cubic crystal truly optically neutral?
T. Harada, T. Sato, and R. Kuroda,
Chemical Physics Letters, 2005, 413, 445-449.

2004

84. Crystal to crystal transformation in the solid state.
R. Kuroda, K. Higashiguchi, S. Hasebe, and Y. Imai,
CrystEngComm., 2004, 6, 463-468.
85. Formation of racemic crystals of transition metal complexes by grinding 1:1 mixtures of enantiomeric crystals.
A. Nakamura, T. Sato, and R. Kuroda,
Chem. Commun., 2004, 2858-2859.
86. Mono- and Dinuclear Complexes of Chiral Tri- and Tetradentate Schiff-base Ligands Derived from 1,1'-Binaphthyl-2,2'-Diamine.
S. G. Telfer, T. Sato, T. Harada, R. Kuroda, J. Lefebvre, D. B. Leznoff,
Inorg. Chem., 2004, 43, 6168-6176

総説論文

1. 清水美穂、遠藤文志郎、黒田玲子. 巻貝の左右は母貝の単一遺伝子が左右する.
生物の科学 遺伝 (財団法人 遺伝学普及会編集、NTS 発行) Vol. 61, No. 2, p. 16-17 (2007).
2. R. Kuroda, Chirality in Crystals in Engineering of Crystalline Materials Properties: State of the Art in Modeling, Design and Applications (Nato Science for Peace and Security), 251-270, J.J. Novoa et al (eds.) Springer-Verlag (2008).
3. 黒田玲子. キラリティーに魅せられて 固体状態におけるキラリティーの識別・創製・転写、測定から巻貝の巻型研究まで. 化学と工業 (日本化学会) 2009年5月号

(2) 口頭発表

①学会

国内 55件(招待10), 海外11件(招待8)

②その他

国内 30件(招待28), 海外 9件(招待9)

(3) 特許出願 (SORST 研究の成果に関わる特許 (出願人が JST 以外のものを含む))

	件数
国内出願	1
海外出願	1
計	2

(4) その他特記事項

①プレス発表 平成21年11月26日 (東大&JST 共同)

「遺伝子を上書きし逆巻きの巻貝を作成」

②報道

プレス発表を行なった *Nature* 論文に関するもの

年月日	媒体	見出し等
平成21年 11月26日	日経新聞 (朝刊およびオンライン)	逆巻きの巻き貝、東大教授ら作製 左右決定の構造解明へ
11月26日	産経新聞 (朝刊およびオンライン)	胚配置転換で貝の巻き逆に 東大グループが成功 →Yahoo ニュースが引用
11月26日	共同通信 (オンライン)	巻き貝の殻、自由自在に方向操作 東大研究グループが成功 →goo ニュースが引用
11月26日	CBS Newsオンライン (米国)	Snails given mirror-image shells
11月26日	The Scientistオンライン ニュース (米国、Magazine of the Life Sciences)	Scientists have found a new way to manipulate the direction of snail shell coiling, altering the animal's left-right asymmetry.
11月26日	Science News オンラインニュース (米国、Magazine of the Society for Science & Public)	LITTLE PUSH TURNS SNAIL LEFTIES TO RIGHTIES Bumping an embryo's cells can switch the direction of its spiral
11月26日	New Scientist オンライン ニュース (米国)	How to wind snail shells up the wrong way
11月26日	Physics world.com -A website from the institute of Physics	Snail shell spiral switched
11月28日	読売新聞 (朝刊およびオンライン)	巻き貝、発生初期の細胞押さえたら逆巻きに
11月28日	毎日新聞 (朝刊およびオンライン)	巻き貝：巻き方の左右 受精卵段階の物理的刺激で逆転
11月29日	朝日新聞 (夕刊およびオンライン)	卵の時にガラス棒で押したら…巻き貝の左右、変わります

11 月 30 日	PhysOrg.com オンラインニュース (英国)	Right/left handedness of snails changed in the lab
12 月 2 日	Fuji Sankei Business i. on the web	成長企業・VB : 貝の巻き方、「左右」自在に 東大・黒田玲子教授ら成功
12 月 4 日	LeMonde.fr	Le sens d'enroulement de l'escargot peut être manipulé
12 月 8 日	東京大学新聞	養・黒田教授ら 巻貝を逆巻きに
12 月 8 日	科学オリンピックを目指す創造性の育成塾 (NPO 法人ネットジャーナリスト協会)	創造性の育成塾 塾日より 夏合宿講師・黒田玲子東大教授 貝の巻き方操作実験成功 ネイチャーに掲載
12 月 10 日	Nature 462 (10Dec2009 号) ※論文掲載号	Nature 今週のハイライト: 発生:巻貝の巻型を逆転させる News and Views (727-728) 発生生物学: つつかれて変わる非対称性 (Nipam H. Patel)
12 月 25 日	日経サイエンス 2010 年 2 月号	NEWS SCAN 左巻き貝を右巻きにする方法
平成 22 年 2 月 1 日	JST ニュース 2010 年 2 月号	JST FrontLine news: 受精卵をガラス棒で押したら逆巻きの貝に! 生物の左右性を決定する新たなメカニズムの解明へ期待 ※参考資料として報告書最後に添付
平成 22 年 2 月 1 日	月刊科学雑誌 現代化学 3 月号	FLASH 巻貝の左右を反転させる
平成 22 年 3 月 1 日	The Journal of Experimental Biology	HANDEDNESS How the snail shell got its twist (Matthew Cobb)
平成 22 年 3 月 1 日	月刊科学雑誌 Newton 4 月号	p9 Science Sensor 「右巻きを左巻きに! 細胞分裂の際に細胞の位置を変えて、貝の巻き方を逆にすることに成功した」

※ウェブを検索すると世界中でニュースになっていたことがわかる。記事は入手できていないが、BBC World News (英国)、Discovery Channel (米国)、Die Zeit (独) の記者からの取材も受けた。

その他、研究に関するもの

平成 21 年 1 月	日経 BP 大学ムック編集室 編	「変革する大学」シリーズ 東京大学大学院総合文化研究科 広域科学専攻にて、黒田教授と研究内容が紹介された。 「キラリティーの選択は偶然だったのか、それとも必然だったのか」
平成 21 年 2 月 6 日	ニッポン放送 JOLF AM1242 中川翔子の G (ギザ) サイエンス	東京大学大学院 理学系研究科 生物化学専攻 黒田 玲子 研究室の紹介ということで、巻貝グループの大学院生 3 人 (阿部真典、本間泰平、中嘉子) がラジオ出演

③受賞

平成 21 年 4 月 黒田玲子教授が文部科学大臣表彰科学技術賞 (研究部門) を「固体状態等におけるキラリティー測定の研究」により受賞。

④名誉

平成 21 年 5 月 黒田玲子教授がスウェーデン チャルマーズ工科大学より名誉博士号を授与された。

④平成21年6月 黒田玲子教授が王立スウェーデン科学アカデミー外国人会員（化学部門）に選出された。

9. 結び

SORSTでは「物質界・生物界における分子から分子集合体の構築—ミクロとマクロのリンクを探る」というおおきなテーマにチャレンジしてきた。分子カイロモルフォロジーグループでは固体キラル科学を展開し、その中で光学分割の簡便かつ安価な手法を発見でき、固体化学のユニークさを利用したエナンチオ選択的反応などにも展開できた。特に固体キラル科学研究に不可欠の固体状態のキラリティーを測定する装置の開発においては大きな成果を上げることができた。ERATO研究で作成したUCS-2をベースに、感度を20倍程度上げ、紫外領域まではかれるようにしたUCS-3は、より産業への応用の道が広まった。更に、リアルタイム測定に最適である、白色光を試料に照射し2次元検出を行なうという新規概念に基づく第二世代のキラリティー分光計、MC-CDの開発に新たに着手し、国内、国際特許の出願もすませることができた。今後、製品化を目指すと同時に、固体キラル科学研究も推進し、日本発の科学技術、産業として世界に広げていきたいと考えている。

生物カイロモルフォロジーグループにおいても、巻型決定遺伝子の現段階での最有力候補を絞ることができた。しかし、最終段階での機能復帰・阻害実験による確認は予想どおり困難であった。種々の可能性を考え、次世代シーケンサーを用いた異なる系統間の巻型決定遺伝子領域全体の配列比較解析も同時に進めている。このように、はなはだ残念ながらSORST期間中に、巻型決定遺伝子の同定までには到達できなかったが、発生物学の未解明の謎のひとつである巻型決定遺伝子同定に今一步のところまで近づくことはできた。

一方で、発生物学全般に貢献する大きな成果を得ることもできた。卵割を人為的にマニピュレーションすることにより遺伝情報とは逆のキラリティーを持った生物に成長させることに成功し、第3卵割期のキラルな物理的割球配置が巻貝個体のキラリティーを決定すること、還元すれば、巻型決定遺伝子はこの割球配置をとらせる役割をはたしていること、その下流で脊椎動物にも共通の、左右非対称な形態形成に関わるノーダルシグナルが関与していることを世界で初めて実証することに成功した。小割球と大割球との位置関係がどのようにして左右性決定につながっているのか、ねじれといった物理作用なのか、あるいは化学物質を介した情報伝達を通してしているのか、根源的に興味深い問題を提起することができた。

遺伝子同定に今一步でありながら、期間中に達することができなかったのも、非難は甘んじて受けなくてはならない。その主な理由は、線虫、ショウジョウバエ、マウスなどと比べゲノム情報がなく分子生物学的手法、細胞生物学的手法、培養方法などがまったく確立されていない生物であるが故に、すべての段階で、はるかに多くの時間と努力が必要であったためと考えている。巻貝というユニークな特徴を持つ生物を研究材料に選んだことで、多くの生物にも重要であるが、他のモデル生物を対象とした研究からは得ることのできなかった大きな成果を得ることができたと考えている。

本来、化学と生物を結びつけることをテーマとしているわけではないが、二つのグループがばらばらだという誇りも受けている。遺伝子の働きが割球の物理的配置を決めていることから、時間が許せば得意とする物理化学的手法での研究も展開したかった。今後の面白いテーマである。

*in situ*測定やタンパク質凝集ダイナミクスなどを追えるキラリティー測定装置開発、簡便な光学分割法の開発ができたことで、産業・医療への応用の道も開けると考えている。巻貝の研究も、巻型決定遺伝子が、人の左右形態形成にも関与している遺伝子の上流で働くことが判明したので、この研究を進展させることで、医療・健康分野にも貢献できることが明らかとなった。

研究総括は教養学部がベースであり、講座制をとらない部局に所属しているので、実験スペースも狭く、準教授も助教も（任期付き特任助教以外）いない、大学院生もあまり多

くなく、逆に、1, 2, 3, 4 年生、大学院生への講義のコマ数が多い。このような環境で多くの成果を挙げた研究を行なうことができたのは、JSTの戦略的創造研究推進事業のおかげさまであり、深く感謝している。我々は、研究費の多くを実験スペース費と人件費に払う必要があり、準教授、助教、大学院生のたくさんおられる講座制の研究室を主催する先生がプロジェクトを総括したのとくらべ、おおきなハンディキャップであった。それどころか、SROST が終わると、スペースも研究・技術員も予算もなくなり、この制度で長年かかって構築した貴重な生物資源もたちどころに死滅する運命にあり、また、自ら開発した世界唯一の分光計(UCS-1, -2, -3, MC-CD)、ERATO/SORST で購入し現在フル稼働している種々の装置を置く場所すら失うことになる。現在、規模を約半分にまで縮小し、スペースの一部を継続借用させていただき何とか続ける努力をしているが、条件付の 1 年間の猶予措置にすぎない。さらに、我々以外他のどこでも研究をしていないテーマであるがために、本プロジェクトで育まれた若い人材が新たな勤務先で当該研究テーマを引き継いで展開するには、巻貝飼育施設をあらたに設営したり、世界唯一の固体キラリティー測定装置を設置したりする必要がある、独立した上のポストでないと、なかなか困難であるという問題も抱えている。これまでの成果、育んできた人材および知識、購入したり開発したりした生物資源・装置を無駄にせずに、今後も研究費を獲得し研究仲間を増やして研究を続行・展開したいと切に願っている。

誰も研究していない 2 つのチャレンジングなテーマに取り組んだがゆえに、おおきな苦労があったが、ERATO/SORST でなければできない根源的・壮大な研究をしてきたと考えている。100%達成とは行かなかったテーマもあるが、それでもかなりの成果を挙げたつもりであるし、また、100%以上の成果の出たテーマもあったと考えている。分子、生物グループどちらも、新しい道を開拓したと思っており、海外での認知度も高く、日本の科学技術を visible にする点でも貢献できたと思う。ERATO/SORST でなければできなかったテーマにチャレンジさせていただけたことに、心から感謝している。

以下は、恒例の春の集合写真、学会発表風景、開発した装置の紹介ポスターである。



参考



SPECIAL ISSUE
'Survival in a Changing World'

QUICK SEARCH:		[advanced]
Author:	Keyword(s):	
Go		

[Home](#) [Help](#) [Feedback](#) [Subscriptions](#) [Archive](#) [Search](#) [Table of Contents](#)

Institution: University of Tokyo | [Sign In as Individual](#)

First published online February 12, 2010

Journal of Experimental Biology 213, v–a (2010)

Copyright © 2010 [The Company of Biologists Limited](#)

doi: 10.1242/jeb.036426

Outside JEB

HOW THE SNAIL SHELL GOT ITS TWIST

Matthew Cobb

University of Manchester

cobb@manchester.ac.uk



Handedness — asymmetrical anatomy or behaviour — is a fundamental feature of many animals, but how it occurs remains a mystery. Snails can also show ‘handedness’ — some individuals have shells that spiral in a right-handed direction, others have left-handed shells. Scientists call this twisted form of handedness ‘chirality’. Differences in shell twist can help produce new species, as individuals of opposite chirality cannot mate.

The genetic basis of this variability can be remarkably simple — in *Lymnaea stagnalis* chirality is determined by a single gene or a small set of genes that is inherited from the mother, with the right-hand twist form of the gene being dominant. However, neither the gene involved nor its developmental pathways are known.

In an astonishing piece of experimental dexterity, a group of Japanese scientists, led by chirality chemist Reiko Kuroda, have used a combination of genetics and physical manipulation to reveal exactly how the snail shell gets its twist.

In its first stages, the snail embryo shows no sign of chirality; however, after the embryo's third cleavage, when it grows from four to eight cells, information about the future shell twist is present. Kuroda and her colleagues demonstrated this by literally poking about in the embryo.

They used minute glass rods to push around cells in the eight-cell embryo, making the cells establish new connections typical of embryos with the opposite twist to that expected from the embryo's genes. In over 75% of cases, they were able to successfully 're-programme' snail embryos, from right-handed to left-handed twist, and *vice versa*. If they carried out the same experiment at an earlier stage, when there were only two cells, it had no effect.

To see whether successfully manipulated embryos would produce re-twisted snails, they reared the embryos to adulthood and studied their external and internal anatomy. In every case, the snails were fully reversed in every respect compared with the handedness expected from their genes.

The key developmental change, which takes place as the embryo grows from four to eight cells, involves the twist-determining gene, which affects the way the protein Nodal is expressed, leading to handedness in the way the snail is organized.

Exactly how this happens and above all how cells 'remember' exactly which way they are supposed to be twisting remain unknown. The delicate micromanipulation at the heart of this elegant study provides a vital tool for investigating the origins and nature of handedness, not only in spiral organisms like snails but also in other animals.

References

Kuroda, R., Endo, B., Abe, M. and Shimizu, M. (2009). Chiral blastomere arrangement dictates zygotic left-right asymmetry pathway in snails. *Nature* **462**, 790–794. [\[CrossRef\]](#) [\[Medline\]](#)



戦略的創造研究推進事業 発展研究 (ERATO-SORST) /
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」
受精卵をガラス棒で押したら逆巻きの貝に!
生物の左右性を決定する新たなメカニズムの解明へ期待

NEWS **01** 研究成果

東京大学大学院総合文化研究科の黒田玲子教授らの研究チームが、巻貝を使って生物の体の左右を決定するメカニズムを解明しました。

私たちの心臓は体の左側にあったり、それぞれ利き手があったりするように、一般的に、生物の体は左右非対称になっています。しかし、たった1個の細胞からなる受精卵から発生する過程で、なぜこのような左右性が生じるのか、その詳細なメカニズムについては、いまだわかっていません。

巻貝は、左右性が非常に顕著な生物種の1つで、左巻型と右巻型では、まるで鏡の関係のように、内臓の構造なども対称になっています。この巻型の違いについては古くから研究が行われていて、1894年にはすでに、巻型の決定は発生のかかなり早い段階で決まっていることが示されています。そして、1920年代になると、左右を決定づけるのは母親から受け継いだ1個の遺伝子であるということも示されていました。しかし、実際、その遺伝子がどのような遺伝子で、どのようなはたらきを持つのかなどはまったくわかっていませんでした。

黒田教授らは、左巻型と右巻型の両方が自然界に存在する淡水性巻貝「ヨーロッパモノアラガイ」に注目。まず、ヨーロッパモノアラガイの受精卵を観察し、発生の初期の胚において、左巻型は左巻きに、右巻型は右巻きになるように、それぞれらせん卵割が生じていることを確認しました。さらに右巻型の胚にのみ、胚が4細胞から8細胞になる第3卵割期中に「小さなねじれた突出 (SD)」と「紡錘体の傾き (SI)」という特徴的な形態が見られることを発見しました。これは、左巻型と右巻型が、完全に左右対称に発生するとしていた従来の定説を覆すものでした。

続いて、黒田教授らは、より詳細な左右決定のメカニズム解明のため、左巻型、右巻型で異なる特徴が見られる第3卵割期に着目。下図に示すように、胚を左右から微小なガラス棒で押し、本来の巻型とは逆の方向、つまり、右巻きの胚は左巻胚様の、左巻きの胚は右巻胚様の細胞配置パターンになるように物理的に変化させ、培養するという実験を行いました。その結果、これらの胚は生育すると、殻の巻型から内臓の形態まで、左右逆転した逆巻き貝になったのです。

また、形態だけでなく、遺伝子にも注目したところ、生物の左右性にかかわる代表的な *nodal* 遺伝子や *Pitx* 遺伝子が、本来はたらく部位とは左右逆転した部位ではたらいていることも確認しました。第3卵割期の胚の細胞の配置を人工的に変えることで、本来ヨーロッパモノアラガイの胚に書かれていた遺伝子を上書きすることに成功したのです。この逆巻き貝は正常に成長し、産卵することが可能ですが、生まれた子を育てると本来の巻型、つまり、遺伝的に決まっていた巻型になるということも明らかになりました。

一方、第3卵割期の前、胚が4細胞になる第2卵割期で同様の操作を行っても、発生の過程で本来の巻型に戻ってしまい、逆巻き貝にはなりません。

ここから、巻型を決定づけるのにもっとも重要な1つの遺伝子は、第3卵割期に細胞の配置を決めているのだと推論できます。

巻貝の左右を決める遺伝子の下流にある遺伝子と、ヒトなどの左右を決める *nodal* 遺伝子の上流にある遺伝子は、共通する可能性が考えられます。さらに研究が進めば、生物の左右決定メカニズムを完全に解き明かせるかもしれません。

第3卵割期に細胞配置パターンを物理的に操作し、逆巻きの貝を作る

