



# つくば生物ジャーナル

生物学類

## Tsukuba Journal of Biology

Vol.10 No.1 January 2011

[www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb](http://www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb)





# つくば生物ジャーナル

---

Tsukuba Journal of Biology

Vol.10 No.1 January 2011

[www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb](http://www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb)

平成 22 年度

## 生物学類卒業研究発表会要旨集

平成 23 年 3 月 9 日

筑波大学  
生物学類

## 第一会場 2B406

8:55 - 9:10	伊藤 薫平	Thaustochytrids 培養株の増殖および脂質産生の基本特性に関する研究	2
9:10 - 9:25	片岡 伸彦	<i>Botryococcus braunii</i> の褐色株 (Bot-105) におけるカロテノイド色素の分析に関する研究	3
9:25 - 9:40	庄司 秀亮	Growth and oil production of freshwater green alga, <i>Chlorococcum</i> sp.	4
9:40 - 9:55	米田 広平	複数の <i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCAP 株における増殖と脂質含量の比較	5
10:10 - 10:25	白鳥 峻志	新規ケルコゾア鞭毛虫 YPF708 株の分類学的研究	6
10:25 - 10:40	鈴木 重勝	クロララクニオン藻 <i>Lotharella vacuolata</i> におけるヌクレオモルフゲノムの比較解析	7
10:40 - 10:55	藤田 咲也	クロララクニオン藻 <i>Bigelowiella natans</i> における同調培養系の確立と細胞分裂過程の観察	8
10:55 - 11:10	後藤 春佳	海産緑藻の同形、異形配偶子の接合過程における鞭毛装置の挙動	9
11:10 - 11:25	横田 真吾	緑藻 <i>Gonium pectorale</i> の配偶子における細胞融合部位の解明	10
	酒井 香苗	円石藻 <i>Emiliana huxleyi</i> のココリス多糖合成系のエピメラーゼ阻害剤による制御	11
12:30 - 12:45	鈴木 裕理奈	海洋酸性化に対する円石藻 <i>Emiliana huxleyi</i> の応答に関する研究	12
12:45 - 13:00	矢崎 裕規	機能的に重複した遺伝子の転写量は異なるか?: 渦鞭毛藻類の葉緑体型 GAPDH の場合	13
13:00 - 13:15	西村 祐貴	カタブレファリス類 <i>Leucocryptos marina</i> のミトコンドリアゲノム解析	14
13:15 - 13:30	福士 路花	トキソプラズマにおけるプリマキンの作用機序の解明	15
13:45 - 14:00	近藤 陸	PCR-RFLP 法による <i>Drosophila ananassae</i> と <i>Drosophila parapallidosa</i> の見分け方	16
14:00 - 14:15	島根 康如	ヤスデを見分ける —新たな同定法の探索—	17
14:15 - 14:30	松井 彰宏	唇脚類における歩肢の自切構造	18
14:30 - 14:45	藤田 麻里	ルリゴキブリ <i>Eucorydia yasumatsui</i> Asahina の発生学的研究に向けて (昆虫綱・ゴキブリ目・ムカシゴキブリ科) —累代飼育系の確立と後胚発生の解明—	19
14:45 - 15:00	中山 智生	オウム類の顎複合体発生 —堅果食適応を促した大規模な形態変化とそれが生まれた仕組み	20
15:15 - 15:30	越智 恵理子	棘皮動物における骨片形成機構の探究 ~間充織化との関連、発生と再生の比較から~	21
15:30 - 15:45	鈴木 大地	脊椎動物形態視の進化的起源 —ナメクジウオ・ヤツメウナギの神経発生から—	22
15:45 - 16:00	村上 佳菜	二枚貝はどのように 2 枚の殻を獲得したか? ~二枚貝特有の卵割パターンを誘導する極性因子~	23
16:00 - 16:15	守野 孔明	VEGF・FGF シグナリングから見る棘皮動物幼生の形態進化	24

## 第二会場 2B409

8:55 - 9:10	太田 優	薬剤標的分子同定に向けた多剤超感受性酵母の作成	25
9:10 - 9:25	塩原 智子	カプサイシンによる腸管上皮タイトジャンクション開放メカニズムの解析	26
9:25 - 9:40	高橋 卓人	微小管-MAPs 結合を阻害する薬剤の探索	27
9:40 - 9:55	高須 祐輔	放線菌由来新奇オキシドレダクターゼの機能構造解析に向けて —大量発現と精製の試み—	28
10:10 - 10:25	千野 貴裕	アミノ酸新規変換経路の探索	29
10:25 - 10:40	土居 志織	ニトリルヒドラーゼ活性化機構の解析	30
10:40 - 10:55	鷲澤 結実	高分子量型ニトリルヒドラーゼに関する研究	31
10:55 - 11:10	上田 真也	ユビキチン様タンパク質 NEDD8 を制御する新奇タンパク質の機能解析	32
11:10 - 11:25	海老名 真度	複合体型ユビキチンリガーゼ SCF を制御する新奇腫瘍関連タンパク質の機能解析	33
12:15 - 12:30	門脇 良太	スルクス ( <i>Suncus murinus</i> ) における老化による“配偶行動”の変質とその影響	34
12:30 - 12:45	瀧ヶ崎 一弥	スルクス ( <i>Suncus murinus</i> ) における雌の存在下での雄同士の係わり合い—PEA (post-ejaculatory attack) を中心とした雄間競争の検討—	35
12:45 - 13:00	高柳 美也子	成体イモリの網膜再生関連遺伝子の探索	36
13:00 - 13:15	松本 美貴子	成体イモリ網膜再生過程における FGF 受容体の発現に関する研究	37
13:15 - 13:30	安室 博文	成体イモリ網膜色素上皮細胞の細胞周期進入に関わる因子の探索	38
13:45 - 14:00	森 麻衣	視細胞における CNG チャネルの電気的特性の解析	39
14:00 - 14:15	下山 せいら	プラナリアの摂食行動の解析; 摂食を誘起する化学物質の探索と定量的投与	40
14:15 - 14:30	森田 望美	ヒラムシのプランクトン幼生の形態と行動	41
14:30 - 14:45	大澤 祐美子	サラサエビの繁殖システムについての個体群動態解析に基づく探求	42
14:45 - 15:00	鈴木 莉紗	海洋酸性化が一次生産過程に与える影響 —下田沿岸海域における実験的解析—	43
15:15 - 15:30	長谷川 卓郎	多様性が高いほど生産性は高い? 人工草地における生産構造からみた多様性 - 生産性仮説の検証	44
15:30 - 15:45	早川 恵里奈	減圧チャンバーを用いた低圧環境が高山植物の生理特性に及ぼす影響の評価と実験系の構築	45
15:45 - 16:00	吉田 沙織	林床植生に着目した冷温帯二次林の遷移パターンと炭素固定量の違い	46
	内堀 そよみ	Baldwin Effect on the Learning Curve	47

### 第三会場 2B411

8:55 - 9:10	芝 勇人	シロイヌナズナの栄養成長相転換に関わるヒストン修飾関連タンパク質の探索	48
9:10 - 9:25	金井 啓介	葉緑体形質転換を用いた食べるワクチンの開発に関する研究	49
9:25 - 9:40	川辺 寛太	トマトを用いた食べる新型インフルエンザワクチンの開発に関する研究	50
9:40 - 9:55	山田 遊太	アサガオ <i>Pharbitis nil</i> 光周性花成誘導に関わる制御因子の研究	51
10:10 - 10:25	大澤 聡志	アサガオにおける誘導プロモーターを用いた導入遺伝子の発現制御の研究	52
10:25 - 10:40	緒方 辰悟	キメラリプレッサーによる花型改変に関する研究	53
10:40 - 10:55	鈴木 寛人	耐乾燥性遺伝子組換えユーカリ ( <i>Eucalyptus globulus</i> ) の耐性、及び、生物多様性影響評価試験	54
10:55 - 11:10	坪山 有理	遺伝資源のアクセスと利益配分に関する非商業利用の取り扱いの考察	55
12:15 - 12:30	清水 美甫	シロイヌナズナ花茎の組織癒合における植物ホルモンと AP2 型転写因子の働き	56
12:30 - 12:45	和田 加奈子	トマト果実成熟過程におけるアスコルビン酸可溶細胞壁の組織別生化学的解析	57
12:45 - 13:00	内田 千尋	<i>m</i> -チロシンによる植物成育抑制作用の解析	58
13:00 - 13:15	草薙 彩可	植物ミトコンドリアにおける活性酸素発生機序の解析	59
13:15 - 13:30	蝶野 博紀	5-アミノレブリン酸による植物の乾燥耐性の誘導	60
13:45 - 14:00	吉原 希	細胞性粘菌 <i>Dictyostelium discoideum</i> における走化性シグナル関連遺伝子の機能解析	61
14:00 - 14:15	岡本 真里奈	細胞性粘菌 <i>Dictyostelium discoideum</i> における自己認識メカニズムの解析	62
14:15 - 14:30	福原 健輔	細胞性粘菌のゲノム比較による分化関連遺伝子の解析	63
14:30 - 14:45	大西 慶	細胞性粘菌 <i>Acytostelium subglobosum</i> における柄細胞分化関	64
15:15 - 15:30	岡部 幸恵	イチジク株枯病菌 <i>Ceratocystis fimbriata</i> f. sp. <i>carica</i> の分類学的再検討	65
15:30 - 15:45	床田 真理	ダイズさび病菌レース判別品種のリーフカルチャーによる感染型変化の原因	66
15:45 - 16:00	黒田 公平	<i>Ophiostoma neglectum</i> に類似する日本産オフィオストマ様菌類の分類学的所属の決定	67
16:00 - 16:15	中島 淳志	マツカサキノコ属菌の生態 —その針葉樹球果に限られた発生から菌類多様化の要因に迫る—	68

## 第四会場 2B412

8:55 - 9:10	加藤 由季菜	モデルマウスにおける老化ミトコンドリア原因説の検証	69
9:10 - 9:25	清水 章文	多様な病態モデルマウス作出のための病原性ミトコンドリア DNA の探索	70
9:25 - 9:40	和田 怜子	ミトコンドリア DNA 突然変異によるヒトがん細胞悪性化の検証	71
9:40 - 9:55	榎 俊慧	異種 mtDNA 導入によるミトコンドリア呼吸欠損モデルマウスの作製	72
10:10 - 10:25	菊地 絢子	発酵茶高分子ポリフェノール MAF はマウス精子鞭毛運動を活性化させるか?	73
10:25 - 10:40	佐藤 海斗	非アルコール性脂肪肝に対する紅茶高分子ポリフェノール MAF の効果の検証	74
10:40 - 10:55	清水 祐太	<i>Tetrahymena thermophila</i> のアクチン重合阻害剤抵抗性の研究	75
10:55 - 11:10	石川 翔一	リボソーム合成に着目した筋萎縮のメカニズム	76
11:10 - 11:25	駒形 康文	強度の違うトレーニングが異なるタイプの骨格筋の乳酸脱水素酵素の発現に及ぼす影響	77
12:15 - 12:30	勝又 斗紀夫	膵β細胞における転写因子 MafA の機能解析	78
12:30 - 12:45	全 孝静	多能性幹細胞の機能制御における KLF の役割	79
12:45 - 13:00	松岡 侑里	マクロファージによる炎症性サイトカイン産生への Fcα/μR の関与	80
13:00 - 13:15	矢澤 亜季	細胞内親電子修飾の制御を司るタンパク質 UCH-L1	81
13:15 - 13:30	岡田 奈月	動脈硬化の発症・進展における脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の機能解析	82
13:45 - 14:00	竹下 薫	花粉症の治療を目的とした遺伝子の機能解析	83
14:00 - 14:15	坂口 龍太	ゲノム刷り込み遺伝子座における転写因子結合配列の機能解析	84
14:15 - 14:30	高橋 拓也	ゲノム刷り込みにおける卵子内低分子 RNA の機能解析	85
14:30 - 14:45	菊地 琢哉	新規膜結合型転写因子 CREB-H の小腸での役割	86
14:45 - 15:00	黒須 愛	アイスプラント抽出物による脂肪細胞の分化抑制作用の解析～メタボリックシンドローム予防効果の評価～	87
15:15 - 15:30	武田 浩平	ショウジョウバエの連合学習における optogenetics を用いた手法の開発	88
15:30 - 15:45	田中 大介	ショウジョウバエを用いた統合失調症原因候補遺伝子 DISC1 の解析	89
15:45 - 16:00	車崎 祐介	ハスモンヨトウに加害されたトウモロコシに誘引されるブランコヤドリバエの行動	90

平成 22 年度卒業研究発表会準備委員会

生物学類 4 年

石川 翔一

生物学類 3 年

加藤 一輝

中村 慎吾

西村 貴皓

松原 陽祐

村岡 祐輔

山崎 将俊

表紙画

藤田 咲也

表紙画の解説：

絵のタイトルは「Nature」。様々な生き物が互いに関わり合い、影響を与えたり受けたりしながら生きている自然の姿をイメージしてデザインしました。

絵の中の動物モチーフは花札から取っています。日本の季節の美的要素をちょっとでも感じてもらえたら嬉しく思います。

---

## 平成 22 年度卒業研究発表会要旨集の巻頭にあたって

石川翔一 (筑波大学 生物学類 4 年)

---

卒業研究発表会は、もはや生物学類にとって欠くことのできない行事として認識されていると思います。また、四年生にとっては生物学類で学んだことの集大成を披露する場でもあります。そのような卒業研究発表会の主役として、多くの方々の前で研究内容を発表できるということに、大きな喜びを感じております。

一年生の時に初めて見学した卒業研究発表会を振り返ってみますと、自身の知識不足のために先輩方の研究内容を理解することが難しかったことを覚えております。それでも、一連の研究を構築し、そこで得られた知見を堂々と発表する先輩方を目前にし、漠然とした凄さを感じました。同時に、そのような立派な研究を遂行するだけの能力を自分も習得できるのだろうかという不安も抱きました。二年生、三年生となるにつれて研究内容を理解する能力は向上しましたが、それでも前述の不安は依然として抱いたままでした。

そのような心持ちのまま気付けば四年生となり、卒業研究を行う身となりました。私にとってのこの一年間はまさに失敗ばかりの日々で、研究の難しさを痛感させられる一年間でした。上手くいくことはほんの時々でして、一つのデータを導き出すことにいかに多大な労力を費やさなくてはならないかを思い知りました。

そんな試行錯誤の日々を送る中で、「研究とは特別な人にもみ開かれているものではない」ということに気付きました。自身で問題点を見抜き、対処していく内に「自分にも研究が出来ている」と実感しました。未だ至らない点ばかりの私ですが、このようなことに気付いてから、かつて抱いていた研究を遂行することに対する不安が払拭されたように思います。

私事ばかり書き連ねてしまいましたが、とにもかくにも私たちが無事に生物学類での四年間を過ごし、このような素晴らしい卒業研究発表会を迎えることが出来たことは、偏に生物学類の先生方の篤い御指導の賜物であると実感しております。この場を借りまして深く御礼申し上げます。また、卒業研究発表会の準備・運営に尽力して下さった三年生をはじめとする皆様、本当にありがとうございました。最後に、一・二年生の皆様につきましては、今後研究室を選択する際に、私たちの発表がその一助となれば幸いです。

Communicated by Kensuke Yahata, Received February 9, 2011

## Thaustochytrids 培養株の増殖および脂質産生の基本特性に関する研究

伊藤 薫平 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中山 剛 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

近年、石油などの化石燃料の枯渇が叫ばれる中、再生可能なエネルギー資源としてバイオマスが注目を集めている。ストラメノパイルに属する *S. limacinum* は、その高いオイル生産能力と極めて速い増殖能力で、将来のバイオ燃料生産を担う可能性を期待されている。しかしながら、実用化の為にさらにはポテンシャルの高い株が求められており、現在の状況ではコスト面において石油に代替できるエネルギーではない。そのため、本研究では *S. limacinum* が属し、オイル生産に優れるスラウトキトリッドの中から新たに有望な株を見つける為に、主に石垣島で採取されたスラウトキトリッド株 10 株に関して、増殖速度と乾燥重量あたりのオイル含量、およびオイルの組成に関してスクリーニングを行った。

## 材料および方法

1. サンプル 石垣島、およびベトナムで採取されたスラウトキトリッド株を用いた。

2. グロースカーブの観察 初期濃度 1000 cell/ml に調整し、GPY 培地上で 25°C、130 rpm で浸透培養し、660 nm における濁度を吸光度計を用いて測定した。その結果を用いて、増殖速度、および培養過程における濃度の最大値を記録した。

3. 脂質の抽出 初期濃度 1000 cell/ml に調整し、GPY 培地上で 25°C、130 rpm で 4 日間および 8 日間浸透培養したものを凍結乾燥させた。その後クロロホルム・メタノール (2:1) を溶媒として用い、超音波破碎によって総脂質を抽出し、その重量を測定した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて、ヘキサン画分、クロロホルム画分、クロロホルム・メタノール (1:1) 画分、クロロホルム・メタノール (1:3) 画分に分けその重量比を記録した。

4. GC-FID によるオイル組成の解析 脂質の抽出時に得られたクロロホルム画分、クロロホルム・メタノール (1:1) 画分に含まれる脂質を GC-FID につけ、脂質組成の分析を行った。

## 結果

実験の結果、4W-1b 株が非常に高いポテンシャルを持つ事が分かった。乾重量が、現在の有望株である *S. limacinum* が 5.47 g/L (172 h) であったのに対し、4W-1b は 9.81 g/L (172 h) と約 2 倍量生産した。また脂質量をみた場合、*S. limacinum* が 0.927 g/L であったのに対し、4W-1b は 3.753 g/L と約 4 倍にもなり、4W-1b は *S. limacinum* に比べ、バイオマス量も多く、かつ脂質含有量も高い事が分かった。

## 考察および今後の展望

4W-1b 株はバイオマスエネルギー生産において非常に注目すべき株である。培地あたりの乾燥重量、脂質量において高いポテンシャルを保有している。今回の実験では *S. limacinum* の結果が先行研究で報告されていた結果よりも低い値であった。これはスクリーニングの為に小規模実験系で培養を行った事、また炭素源、および振盪速度が不十分であった事が考えられる。その点を踏まえた上で今後は 4W-1b の脂質生産性を高める条件を検討していきたい。

## *Botryococcus braunii* の褐色株 (Bot-105) における カロテノイド色素の分析に関する研究

片岡 伸彦 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渡邊 信 (生命環境科学研究科)

### 背景および目的

淡水産緑藻 *Botryococcus braunii* は優れた炭化水素合成・貯留能力を持ち、産生する炭化水素によって少なくとも三つの系統、A, B, L に分類されている。B 系統、L 系統は生育段階によってコロニーの変色が見られ、対数増殖期においては緑色を呈し、定常期に達すると赤色を呈することが知られている。この変色はコロニーにケトカロテノイドを主とした二次カロテノイドが蓄積することが主な原因である。

*B. braunii* BOT-105 株は B 系統に属する日本産の株である。しかし、本株は生育段階にかかわらずコロニーが常に赤色を呈す。このことから、本株のカロテノイド組成はこれまで先行研究で報告されてきた株とはカロテノイドの組成や蓄積量が異なる可能性があり、また新規物質が含まれることが期待される。

本研究では、BOT-105 株の増殖特性とカロテノイド量の変化および定常期において蓄積されるカロテノイドの主成分を分析した。

### 方法

1. 培養方法 AF-6 培地を用いて、1% CO<sub>2</sub> を含む除菌空気を通気攪拌して、温度 25°C、連続光条件で光強度を約 70 μmol photon/m<sup>2</sup>/s とし、初期藻体濃度を 100 mg/L とし定常期に達するまで培養を行った。

2. 増殖特性測定 週に 2 度藻体を採取し、分光光度計を用い 750 nm での吸光度を測定したのち、予め作成した検量線を用いて乾燥重量を算出した。

3. 色素含有量測定 増殖特性測定と同時に、培養液 1 mL を吸引し過した藻体にエタノール 1 mL を添加し、70 °C で 5 分間インキュベートした後に遮光して 48 時間室温で静置し、色素の抽出を行った。色素の定量は、分光光度計を用いて吸光度計測 (350 - 750 nm) を行い、吸光度からクロロフィル a、クロロフィル b、全カロテノイド量を以下の計算式によって求めた。

$$\text{クロロフィル a: CHI a} = 13.95\text{OD}_{665} - 6.88\text{OD}_{649}$$

$$\text{クロロフィル b: CHI b} = 24.96\text{OD}_{649} - 7.32\text{OD}_{665}$$

$$\text{全カロテノイド: CAR} = (1000\text{OD}_{470} - 2.05\text{CHI a} - 114.8\text{CHI b})/245$$

4. カロテノイド成分分析 定常期の培養細胞を凍結乾燥させ、ヘキサン・クロロホルム (4:1) でカロテノイドを抽出した。抽出物をアセトンに溶解し、逆相 HPLC で主成分を分取した。分取した各画分を分光光度計を用いて吸光度を計測し (波長 350 - 750 nm)、得られた情報 ( $\lambda_{\max}$ 、スペクトルの形状) を先行研究と比較して同定を行った。

### 結果および考察

x 藻体は培養 35 日目に定常期に達し、56 日目における最終的な濃度は約 1.3 g/L だった。カロテノイド量は定常期まではクロロフィル a, b と同様に増加し、その含有量の差は大きく変化しなかったが、生育が定常期に達するのとほぼ同時にカロテノイド量が急激に増加した。培養 28 日目から

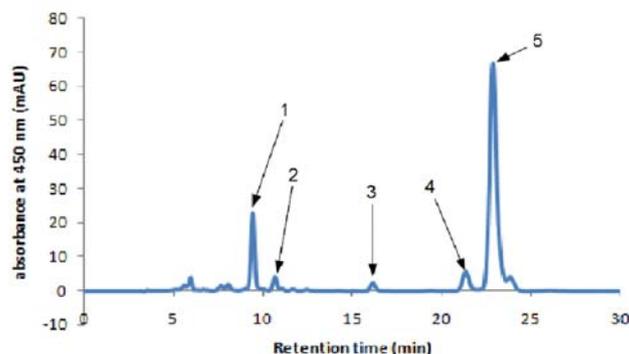


Figure 1: *Botryococcus braunii* BOT-105 株から抽出されたカロテノイドの HPLC 分析によるクロマトグラム。図中に矢印で示したピーク上の番号 1~5 は分取した画分を示す。

32 日目にかけて、クロロフィル a は 10.9 μg/mL から 11.3 μg/mL、クロロフィル b は 4.2 μg/mL から 4.8 μg/mL、カロテノイドは 10.9 μg/mL から 16.1 μg/mL に増加した。定常期の細胞から抽出され、HPLC で分析されたカロテノイドのうち相対量の多い 5 つの画分を得た (Fig.1)。それらのうち 3 つの画分については  $\lambda_{\max}$  より、ネオキササンチン、ゼアキササンチン、エキネノンとして同定されたが、他のひとつは  $\lambda_{\max}$  が一致するカロテノイドが複数存在し、もうひとつは  $\lambda_{\max}$  が一致するカロテノイドが先行研究においても報告されていないために同定ができなかった。蓄積されたカロテノイドの主成分はエキネノンであった。ケトカロテノイドの特徴的なスペクトルの形状もこの結果を支持した。エキネノンの相対量は全カロテノイド量に対して 68.4% だった。定常期に入る際にカロテノイド量が増加すること、その主成分がエキネノンであることから、定常期におけるケトカロテノイドの蓄積は BOT-105 株においても起こっていることが示唆された。

### 今後の展望

カロテノイドには抗酸化作用や、光傷害の防御・補助アンテナなどの光合成に関与する機能などといった様々な生理作用があることが知られている。BOT-105 株のカロテノイドが生育に与える影響の検証などにより、常に赤いコロニーであることの意義が何であるかを検証する。現在は検証の第一歩として、本株のカロテノイドの光合成生理への関与を調査するため、異なる光強度照射下での増殖とカロテノイド含有量の変化を確認する培養実験を実施している。また、カロテノイドの成分分析に関して、対数増殖期に含まれるカロテノイドの主成分を分析し、定常期と変わらないかどうか明らかにすることも必要である。

## Growth and oil production of freshwater green alga, *Chlorococcum* sp.

庄司 秀亮 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渡邊 信 (生命環境科学研究科)

### Introduction

Most of energy resources are derived from fossil fuels such as petroleum. But using fossil fuels caused two serious issues; global warming by emission of carbon dioxide and depletion of energy resources. Using biomass as energy source is one of promising ways for solving these issues. Since plants fix atmospheric CO<sub>2</sub> by photosynthesis, concentration of CO<sub>2</sub> in the air isn't increasing by burning plant biomass. However, using corn or sugarcane as energy resource competes with use for food happen. Microalgae photosynthetically grow as well as terrestrial plants and don't cause a competition with food usage. Including undescribed algal species, there are hundred thousand ten million species in algae. But, quite a few of them were discussed about their growth and lipid content and their oil productivities were too low for their industrial use. So it is important to survey a large variety of excellent algal strains and species in terms of oil productivity. In the course of surveying oil-rich microalgae, freshwater strains of *Chlorococcum* were isolated and cultured and some strains were assumed to be oil rich from fluorescent microscopy of Nile-red stained cells. Marine *Chlorococcum* was intensively investigated on growth and oil content. But little is known about freshwater *Chlorococcum*. In this study, freshwater strains of *Chlorococcum* were investigated on their growth and lipid content.

### Materials and Methods

- Strain: In this study, 12 strains (TIR 14 – 25) of *Chlorococcum* were isolated from Onuki pond, Ibaraki Prefecture, Japan. A strain TIR22 was mainly used in this study, because it has so relatively weak adhesiveness that its growth can be easily measured.
- Sterilization: Since all of the strains were contaminated by bacteria, they were sterilized by micropipette-washing method. Whether axenic cultures were established or not was checked by using bacteria-free check medium, YT and B-V media. In this case, each of the washed cells was inoculated and grown in MG medium, and then the cells from sub-strain established by growing of an inoculated cell were inoculated to bacteria-free check medium. A few days after inoculation into bacteria-free check medium, it was observed whether the bacteria-free check medium is muddy or not. In addition, non-muddy culture was checked about the presence or absence of bacteria by microscopic observation.
- 18S rDNA molecular phylogenetic analysis: To confirm whether TIR can be assigned to *Chlorococcum* phylogenetically, Molecular phylogenetic analysis for TIR20 and TIR22 was performed based on 18S rDNA sequences.
- Culture condition: The axenic strain was grown in 500 ml MG medium aerated using sterile-air containing 1% CO<sub>2</sub> with flow rate of 100 mL/min, at 25±0.5°C of temperature under continuous illumination with 100 μmol photon/m<sup>2</sup>/sec. Initial cell concentration was adjusted 2 mg/l.

N-depleted medium was prepared by replacing Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O and KNO<sub>3</sub> with CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O and KCl.

- Measure oil content: The samples were taken from 9-days culture (logarithmic growth phase) and from 37-days culture (stationary phase), respectively, and were freeze-dried. Chloroform-methanol (2:1, v/v) was used as solvent for extracting oil from freeze-dried samples. The weights of freeze-dried samples and extracted oil were measured using microbalance.

### Results

All of the strains (TIR14 – 25) were sterilized using micropipette washing method. As a result from 18S rDNA phylogenetic analysis, TIR20 and TIR 22 belonged to the cluster of genus *Chlorococcum* but were assigned to the separate sub-cluster, respectively, with high bootstrap value. The strain (TIR 22) grew slowly from initial concentration 2 mg/L to 1.6 g/L at 37 days (stationary phase). Oil content per culture volume increased with increasing cell concentration, but oil content per dry cell weight was almost constant, about 8.9 – 11%. When the logarithmic growth phased cells (9 days-culture) were transferred into N-deficient medium and kept for 7 days, oil content increased to about 15%. However, when the same treatment was done for stationary phased cell (37 days culture), the oil content did not changed.

### Discussion

From 18S rDNA analysis, it is suggested that the strains TIR20 and TIR 22 belong to the genus *Chlorococcum*, but they are possibly assigned as an independent species, respectively, because they are located in the different sub-cluster. The cell concentration at stationary phase was 800-fold of initial cell concentration. But the stationary-phased cells contained low oil content, 8.9 – 11%, even in the N-depleted medium. When the logarithmic-phased cells were transferred into N-depleted, the oil content increased to about 15% per dry weight. It has been reported that N-depletion enhanced oil accumulation. However, in this study, N-depletion enhanced oil accumulation only in logarithmic-phased cells. This phenomenon has never been found so far in microalgae. The further study will be needed to know the details of oil accumulation mechanism. According to Kokubun (personal communication), oil content of TIR21 was approximately 40%, being much higher than that of TIR22. Although TIR21 was not used in this study because of its strong cohesive nature, it is needed to investigate phylogeny, taxonomy, growth characteristics and oil production of TIR21.

# 複数の *Phaeodactylum tricornutum* CCAP 株における増殖と脂質含量の比較

米田 広平 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渡邊 信 (生命環境科学研究科)

## 背景・目的

藻類バイオマスを生産資源として利用する試みが近年注目されている。その利用目的としては、健康食品や燃料が主である。藻類が注目されている理由として、光と水、二酸化炭素、微量のミネラル分で基本的には生育でき、高等植物よりも成長がはやく、単位面積当たりの生産量に優れることなどが挙げられる。では、どのような藻類を持ち出せばよいのだろうか。どの藻類が生産に適しているかの指標は、単純に考えれば、成長速度が速く、たくさんの生産物を含有していることである。将来的には、屋外での培養を考えて、生産性が高く、かつコンタミネーションのリスクを下げるために特殊な環境 (pH が高いなど) で生育できる株を選択してきたり、工場からの有機廃液を成長に利用できる株を選択してきたり、含有する特定の化学物質の純度が高い株を選択してくる必要があるだろう。しかしながら、数多くある藻類株の生産性評価は現在不十分である。そこで、生産に適した藻類をスクリーニングすることは重要な課題となる。

海産珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* は、Eicosapentaenoic acid (EPA) を生産する藻類として知られている。EPA とは、DHA と同様に  $\omega$ -3 脂肪酸の一種で、脳や網膜に多く存在している。また血中の中性脂質を抑える働きもあり、高脂血症薬やサプリメントとして利用されている。同種の複数の UTEX (The Culture Collection of Algae at University of Texas, Austin) 株では既に生産性評価がなされており、そこで見出された UTEX 640 という株が EPA 生産性の高い株として研究されてきた。先行研究では、*P. tricornutum* UTEX 640 はグリセロールを有機炭素源として添加した時、EPA 生産性が向上するという報告がなされた。しかし、問題なのは *P. tricornutum* には UTEX 株以外の未評価の株が存在することである。それらは、CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, UK) に保存されており、その中には、全ゲノムが明らかにされている CCAP 1055/1 株も存在する。本研究では、CCAP に保存されている未評価株の生産性、全ゲノム解読がなされた CCAP 1055/1 株のグリセロール添加条件での生産性の評価を行う。

## 方法

### 1. 培養株とバクテリアチェック

使用した株は *P. tricornutum* CCAP 1052/1B (UTEX 640), 1052/6 (UTEX 646), 1055/1, 1055/2, 1055/4, 1055/5, 1055/6, 1055/7, 1055/8 である。それぞれの無菌株を実験に用いた。バクテリアなどのコンタミネーションのチェックとして、Bf/2 と MM23 の寒天培地を使用した。

### 2. 培養

実験は、f/2 培地 500 mL を含んだ 1L の三角フラスコを用い、温度 20°C、200  $\mu$ mol photon/m<sup>2</sup>/s の連続光、0.48% CO<sub>2</sub> を 100~150 mL/min で通気という条件で行った。初期濃度が OD<sub>600</sub> = 0.1 となるように前培養 5 日目のものを播種した。培養期間は 10 日で、24 時間ごとに OD<sub>600</sub> 値を測定し、3, 6, 10 日目に細胞の乾重量を計測し検量線を作成した。乾重量は、30 mL の培養液を GF/C フィルターで回収することにより計測し

た。10 日目の回収時、Bf/2 と MM23 でバクテリアが混入していないか再確認を行った。今回の実験ではバクテリアの混入は見られなかった。10 日間培養した細胞は、GF/C で回収され、-22°C で保存された。

### 3. 脂質抽出、精製

細胞は、Chloroform-Methanol (2:1, v/v) で抽出し、抽出量を計測した。その後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、脂質を精製し、各溶出画分を計量した。

### 4. 脂肪酸の組成

精製された脂質のうち、トリアシルグリセロール (TAG) が得られる画分の脂質をメチルエステル化し GC で分析した。

## 結果

### 1. 1055/1 株のグリセロール添加条件での生産性評価

グリセロール添加時、培地あたりの脂質量と TAG に含まれる EPA 量に有意さは認められなかったが、乾重量、TAG 量の有意な増加がみられた。結果的に、1055/1 株は、グリセロールを添加することで 1052/1B (UTEX 640) 株に匹敵する生産性を示した。

### 2. 未評価株の生産性評価

特に 1055/2, 1055/8 株で乾重量、脂質量、TAG 量とも 1052/1B 株を上回る結果となった。培地あたりの脂質量をみた場合、1052/1B の 0.296 g lipid/L とくらべて、1055/2, 1055/8 でそれぞれ 0.342, 0.362 g lipid/L と上回っており、貯蔵脂質である TAG の量で比較してみると、1052/1B が 0.202 g TAG/L に対し、1055/2, 1055/8 でそれぞれ、0.306, 0.245 g TAG/L となっている。1055/2の方が TAG をより蓄積することが示唆される。TAG 中の EPA 量では、唯一 1055/2 のみが 1052/1B を上回る結果となった。未評価株の 1055/2 株で、生産性が最良であるという結果となった。

## 考察と今後の展望

1055/1 株は、今回の実験で、グリセロール添加時に、現行の 1052/1B 株に匹敵する程度の生産性向上がみられたことから、解読されているゲノムを手掛かりとした遺伝子修飾により、特徴のある株を作成し利用するという可能性を残した。

1055/2 株は注目すべき株である。培地あたりの藻体乾重量、脂質量も高いが、特に TAG を蓄積するポテンシャルが高いことが特徴である。

今回の実験において、成長曲線がほとんど変化なく、総脂肪酸に含まれる EPA 割合が、先行研究で報告されているものより少なかった。これは、培地の栄養条件 (無機栄養分の組成) によるものではないかと思われる。先行研究では、*P. tricornutum* は g/L オーダーまで成長するが、今回は 500 mg/L 程度にとどまった。最大限成長できる培地を用いての再評価が必要である。

## 新規ケルコゾア鞭毛虫 YPF708 株の分類学的研究

白鳥 峻志 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 石田 健一郎 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

ケルコゾア門は 1998 年に分子系統解析の結果をもとに設立された分類群であり、光合成性、或は捕食性の鞭毛虫 (藻) やアメーバ、動植物の寄生虫といった様々な形態・栄養様式の原生生物によって構成されている。ケルコゾア門全体および各下位分類群内の分類体系に関する研究は近年盛んに行われており、現在までに少なくとも 13 綱 34 目が提唱されている。その一方で環境 DNA 解析によってケルコゾア門内には多くの未発見生物が存在することが示唆されており、現在認識されているケルコゾアの多様性は氷山の一角に過ぎないと認識されている。

ケルコゾア門の 1 つの綱であるインブリカテア綱に属するサウマトモナディダ目は、細胞表面が楕円形または三角形の鱗片によって覆われることで特徴付けられるグループである。また水圏生態系において普遍的に存在し、バクテリア捕食性であることから底性微生物群集の重要な一次消費者としても認識されている。現在、サウマトモナディダ目には 4 属 (*Thaumatomonas*, *Thaumatomastix*, *Allas*, *Gyromitus*) が分類されており、これらは鱗片の構造、細胞の形によって区別されている。その一方で、分子系統解析においてサウマトモナディダ目のクレードには多くの環境 DNA 配列が含まれることも示されており、それら未知の系統を含めたサウマトモナディダ目の真の多様性の把握と分類体系の整理・構築が求められている。

YPF708 株は 2007 年に宮城県志津川町の砂浜から単離された従属栄養性の鞭毛虫の培養株である。予備的な形態観察によって本生物はケルコゾア類に特徴的な糸状仮足をもつことが観察された。しかしながら既知種/グループとは明確な形態的類似性は観察されず、本生物はこれまでに報告のない新規ケルコゾア生物であることが示唆された。そこで本研究では 1) SSU rDNA 及び LSU rDNA を用いた分子系統解析、2) 光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、電子顕微鏡を用いた詳細な形態観察を行い、これらの情報を基に本生物の分類学的位置の決定を行った。

## 方法

YPF708 株の SSU rDNA 及び LSU rDNA の塩基配列を決定し、RAxML による最尤系統樹の作成及び最尤法、ベイズ法に基づく検定を行った。透過型電子顕微鏡 (TEM) による超薄切片の観察では、グルタルアルデヒドと四酸化オスミウムで二重固定を行った細胞を包埋し、超薄切片を作製後に酢酸ウランとクエン酸鉛で染色した試料を用いた。ホールマウント観察では四酸化オスミウムで固定し酢酸ウランで染色した試料を用いた。蛍光顕微鏡観察では YPF708 株に加え各種コントロールとしてケルコゾア門に属する *Thaumatomastix* sp., *Paulinella chromatophora*, *Cercomonas* sp. の 3 株についても PDMPO を用いたシリカ蛍光染色を行った。

## 結果

SSU rDNA 配列を用いた分子系統解析の結果、本株はサウマトモナディダ目に属する *Gyromitus* sp. と強い支持 (ブートストラップ値 100%、ベイズ事後確率 1.00) で単系統群を形成することが明らかとなった。その一方、YPF708 株を含めたサウマトモナディダ目の単系統性に対する支持

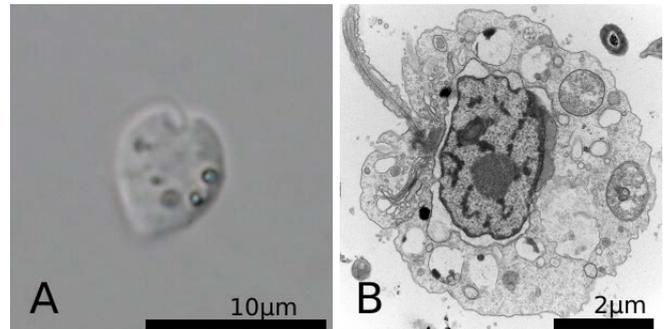


Figure 1: YPF708 株 (A) 光学顕微鏡写真 (B) 透過型電子顕微鏡写真

は低かった。そこで SSU rDNA 及び LSU rDNA 配列を用いた連結解析を行ったところ、YPF708 株は *Gyromitus* sp. と単系統群を形成するとともに YPF708 株を含んだサウマトモナディダ目の単系統性も強く支持された。

光学顕微鏡による形態観察から、YPF708 株は涙滴型の細胞概形で 2 本の不等長鞭毛や腹溝を持つことが明らかとなった。しかし、サウマトモナディダ目の特徴である珪酸質の鱗片は観察されなかった。PDMPO によるシリカ蛍光染色においても YPF708 株からは珪酸質の鱗片の蛍光は検出されず、電子顕微鏡を用いたホールマウント観察でも鱗片は観察されなかった。細胞は匍匐性であった。匍匐細胞は短鞭毛を前に、長鞭毛を後ろに伸ばし移動していた。シストなどの壁を持った細胞は観察されなかった。

TEM による微細構造観察から、YPF708 は細胞前端部に核が位置し、核と基底小体の間に 2 個のゴルジ体を有することが観察された。細胞外には鱗片やテカなどの修飾構造は観察されなかった。多くの細胞において核の後端部にマイクロボディーが観察された。マイクロボディーの形は変化に富んでおり、核に貫入し入り組んでいるものも観察された。細胞膜直下には長さ約 2 µm のシリンダー型の射出装置が外向きに存在していた。射出装置は細胞内に複数観察された。

## 考察

YPF708 は分子系統解析によってサウマトモナディダ目に含まれ、特に *Gyromitus* sp. と近縁であることが強く示された。その一方で、YPF708 株はサウマトモナディダ目の特徴である珪酸質の鱗片を持たず、またこれまで本目では報告のなかったマイクロボディーやシリンダー型の射出装置を持つことが確認された。これらの結果から、YPF708 は形態的に大きく異なる新たなサウマトモナディダ目のメンバーであり、分類学的にはサウマトモナディダ目に属する新属新種として扱うのが妥当であると結論した。本生物の発見によって、サウマトモナディダ目におけるケイ酸質鱗片の二次的消失等のこれまで知られていなかった形態的進化が明らかとなった。

ククラクニオン藻 *Lotharella vacuolata* におけるヌクレオモルフゲノムの比較解析

鈴木 重勝 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 石田 健一郎 (生命環境科学研究科)

## 背景と目的

光合成真核生物はシアノバクテリアを共生者とする一次共生と、一次植物を共生者とする二次共生によって葉緑体を獲得した。このような細胞内共生の過程において共生者ゲノムが極端に縮小あるいは消失したことが知られている。このときの共生者ゲノムの進化の解明は、細胞内共生による葉緑体獲得に伴う細胞進化を理解する上で重要である。

しかし、不等毛藻やハプト藻など二次植物の多くは共生者核が完全に消失した葉緑体をもっており、共生者核ゲノムの進化を知ることは非常に困難である。ところが、ククラクニオン藻とクリプト藻では、痕跡的な共生者核(ヌクレオモルフ)が各葉緑体に付随しており、高度に縮小したゲノムを含むことが知られている。これらのヌクレオモルフは二次共生における共生者核消失の途中段階にあると考えられている。そのため、ヌクレオモルフゲノムの理解は二次共生過程を明らかにするために重要である。

ククラクニオン藻は、緑藻を起源とする葉緑体を持ち、そのヌクレオモルフは最も縮小した真核型ゲノムを有することが知られている。先行研究の全ヌクレオモルフゲノム配列の解読では、*Bigeloviella natans* においてゲノムサイズが約 373 kbp であることが明らかになっている。このゲノムは両末端に rDNA 遺伝子群を持つ 3 本の直鎖状染色体で構成され、17 個の葉緑体タンパク質を含む 331 個のタンパク質遺伝子、18 個の rRNA 遺伝子、20 個の tRNA 遺伝子をコードしている。さらに、18、19、20、21 ヌクレオチド(nt) からなる多数の微小イントロンの存在が示されている。

本研究では、ククラクニオン藻の進化においてヌクレオモルフゲノムがどのように変化したかを理解することを目的とし、*B. natans* よりも大きなヌクレオモルフゲノム(約 450 kbp)をもつと推定され、系統的にも遠い関係にあるククラクニオン藻の一種 *Lotharella vacuolata* のヌクレオモルフゲノム配列について、*B. natans* との間で比較解析を行った。

## 方法

ゲノム解析には、*Lotharella vacuolata* CCMP240 株よりバルスフィールドゲル電気泳動法を用いて選択的に精製されたヌクレオモルフ染色体 DNA について、文部科学省特定領域研究(比較ゲノム)支援班に委託してショットガン法で得られた配列(62 fold、33256 reads)を利用した。私はこの配列を Sequencher v.4.5 (GeneCodes 社)を用いてアセンブリし、Blast 検索 (NCBI <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) によりヌクレオモルフ DNA を選択した。アノテーションには Blast 検索などを用い、ゲノムブラウザ Artemis v.12.0 (Wellcome Trust Sanger Institute) 上で相溶性、ORF、5'-GT-AG-3' の共通モチーフを持つ微小イントロンなどを考慮しつつ、最大サイズをとる遺伝子モデルを予測した。

## 結果と考察

**ゲノムの構造** 配列のアセンブリと相溶性検索の結果、ヌクレオモルフゲノムに相溶性があると思われる 16 本の大きなコンティグ (> 5 kbp) と多数の小さな DNA 断片を得た。これらは *L. vacuolata* の推定ヌクレオモルフゲノムサイズの約 83% (約 374 kbp) をカバーするものである。得

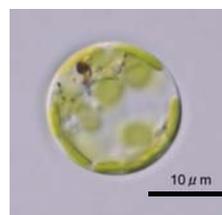
られた配列は、単一遺伝子コード領域の A + T 含量が非常に高く(約 79%)、アミノ酸組成にもフェニルアラニンやリシン残基が多いといった偏りがみられた。また、その遺伝子密度も高い値(約 1.18 kb/gene)を示した。また、染色体の末端には 5'-18S rDNA-5.8S rDNA-23S rDNA-3' の順番で rRNA 遺伝子がコードされていた。これは、既に報告のある *B. natans* の染色体とは遺伝子の並び順が逆である。

上記 16 本のコンティグについて 185 個の遺伝子を予測した。そのうち 115 個の遺伝子に *B. natans* のヌクレオモルフゲノムとの相溶性がみられ、RNA 代謝関連遺伝子が 27 個、翻訳関連遺伝子が 22 個と多く、*B. natans* と同様の傾向を示した。また *B. natans* と相溶性がみられない 70 遺伝子のうち 4 遺伝子について緑色植物との間で相溶性がみられ、これらの遺伝子は *B. natans* のヌクレオモルフゲノムでは消失したと推測される。また、2 種間のシテニーは一部を除き保存的ではないことから、2 種の種分化後に大規模なゲノムの再編成が起こったことが考えられる。

**微小イントロン** 今回推定できた 185 遺伝子から、250 個の微小イントロンが予測された。イントロンのサイズは 18 nt ~ 23 nt であり、サイズごとの出現割合を比較すると、20 nt イントロンが最も多い(37%)のに対し 18nt のものは 1%しかなく、*B. natans* の 19 nt イントロンが最多で 18 nt のものも多数存在する分布傾向とは異なっていた。また、*L. vacuolata* で予測された 22 nt、23 nt イントロンは、これまでククラクニオン藻では知られていなかったサイズのイントロンだが、それぞれ全イントロンの 12%、3%と比較的大きな割合を占めた。*B. natans* と比べて *L. vacuolata* のほうがヌクレオモルフゲノムサイズが大きい一因は、サイズの大きなイントロンの割合が高いことにあると考えられる。

## 今後に向けて

*L. vacuolata* のヌクレオモルフゲノムについて残りの配列を取得し、他のククラクニオン藻と比較することで、ククラクニオン藻全体のヌクレオモルフゲノムの進化について論じる予定である。

*L. vacuolata*の光学顕微鏡像

## クロララクニオン藻 *Bigelowiella natans* における 同調培養系の確立と細胞分裂過程の観察

藤田 咲也 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 石田 健一郎 (生命環境科学研究科)

### 背景および目的

クロララクニオン藻は単細胞で自由生活性の海産藻類であり、リザリア界ケルコゾアに属する無色原生生物に緑色植物が共生した二次植物である。多くの二次植物が葉緑体獲得の過程で共生者の核遺伝子を宿主核へと移行させ共生者核は消失しているのに対し、クロララクニオン藻とクリプト藻は共生者核の痕跡核ヌクレオモルフを葉緑体内部に持つ。このことから共生者のオルガネラ化の中間段階にある生物として、二次植物の葉緑体獲得過程を明らかにする上で重要な研究材料となっている。葉緑体を獲得する上で共生者と宿主細胞の分裂同調やオルガネラ分配の協調は重要な要素の一つであり、細胞分裂過程を明らかにすることは二次葉緑体の進化過程の解明につながると考えられる。しかしクロララクニオン藻内の細胞分裂に関する先行研究では、核分裂・オルガネラ分裂が断片的に観察されるのみで細胞分裂の全体像はわかっていない。遊泳性クロララクニオン藻 *Bigelowiella natans* は核・葉緑体・ヌクレオモルフのゲノムが解読されているクロララクニオン藻のモデル生物となりうる種である。細胞分裂の観察には細胞が同調的に分裂していることが望ましいため、本研究では *B. natans* の同調培養系を確立することを第一の目的とし、その結果得られた同調培養系で分裂中の細胞を観察し、細胞分裂の全体像をつかむことを第二の目的とした。

### 材料および方法

材料である *Bigelowiella natans* を ESM 培地、20°C L(明期):D(暗期) = 14 h:10 h で培養した。二週間～一ヶ月培養して定常期をむかえた細胞を、新しい培地に約  $1.0 \times 10^5$  cell/ml の濃度で植え継ぎ、暗期処理の後、再び L:D = 14 h:10 h で培養した。培養した細胞を 0.2% グルタルアルデヒドで固定し、血球計測板を用いて一定時間ごとに細胞数の計測を行い、成長曲線を作成して増殖率を算出した。どの培養条件・時間帯で最も良い増殖率が得られるかを調べた。比較のために約  $1.0 \times 10^5$  cell/ml と約  $1.0 \times 10^6$  cell/ml の細胞濃度で植え継いだものについても、一週間培養し細胞数計測を行った。また、*B. natans* の核分裂・葉緑体分裂の過程を観察するため、DAPI もしくは SYBER Green I により核 DNA の蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

### 結果

植え継ぎ細胞の初期濃度を変えて一週間培養し、細胞数の変化を計測した結果、植え継いでから 1 日目と、3 日目で増殖率が高かった。また、初期濃度が濃いと細胞の増殖率が鈍くなる傾向が見られた。増殖率の高さと、細胞分裂中の細胞の回収の容易さの観点から、長時間暗期処理の実験の初期濃度は約  $1.0 \times 10^5$  cell/ml で植え継ぐことが妥当と判断した。定常期をむかえた細胞を約  $1.0 \times 10^5$  cell/ml の濃度で植え継ぎ、暗期処理時間を変えて細胞増殖率を計測した結果、暗期処理 48 時間がその後の細胞増殖の同調率が高いことがわかった。細胞を植え継ぎ、直後に 48 時間の長時間暗期処理後再び L:D = 14 h:10 h で培養したところ、処理後 2 回目の暗期で最も良い細胞数増加率が得られた。約  $1.0 \times 10^5$  cell/ml の濃度で植え継ぎ、通常培養時と、長時間

処理後培養時の 4 日間の合計細胞数を比較したところほぼ同じ結果であった。しかし、長時間暗期処理を行ったものの方が同調率が高かった。また暗期の中で、2 時間おきに細胞数を計測した結果、暗期開始から 2 ~ 4 時間で増殖率が最大である事を示唆する結果が得られた。蛍光顕微鏡観察では、核分裂・葉緑体分裂のほぼ全ての段階を観察することができた。細胞の大きさ、核や葉緑体の数や位置から、細胞周期の進行を予測した。間期の細胞は球形で、二葉性の葉緑体、核が 1 つずつあった。細胞分裂は葉緑体分裂から行われた。次に葉緑体の分裂軸と同じ軸に沿って、核が分裂した。近接している 2 つの娘核が細胞の両端に移動し、続いて葉緑体も細胞の両端に移動した。最後に細胞質分裂が引きちぎれるように起こり、細胞分裂が完了した。

### 考察

酵母や培養細胞の細胞周期同調には、ノコダゾールなどの細胞周期阻害剤を用いて細胞周期を特定の段階で停止させ、後に阻害剤を除去することで一斉に細胞周期を再開させるという方法が用いられる。光合成を行う生物の場合、光周期の調節が細胞周期の停止要因となり、薬剤処理と同様に細胞分裂を同調させる事が単細胞の藻類でわかっている。珪藻の *Phaeodactylum tricornutum* や *Seminavis robusta* では L:D = 12 h:12 h で培養した後、20 時間の長時間暗期処理を行い再び明期を与えた際に細胞分裂が同調することが知られている (Huysman *et al.* 2010, Gillard *et al.* 2008)。このケースでは長時間暗期の中に細胞周期が G1 期で停止しその後の明期によって細胞周期が再開することから、光周期によって細胞周期を調節していることが明らかであり、明期を感知して G1 期から M 期に進行すると考えられる。*B. natans* では長時間暗期処理後により増殖率が得られていることから、珪藻と同様に長時間暗期で細胞周期がある段階で停止し、次に明暗周期が与えられた事によって分裂周期進行が再開したため、分裂の同調が得られたと考えられる。珪藻は長時間暗期後の明期が分裂再開の要因となっているが、*B. natans* では明期・暗期どちらが要因であるかは未だ明らかではない。単細胞性紅藻 *Cyanidioschyzon merorae* でも同様に光周期を用いた細胞分裂周期同調が可能となっている。定常期をむかえた細胞を新たな培地に植え継ぎ、L:D = 12 h:12 h で培養すると暗期開始から分裂が始まり、その同調率は植え継ぎ後二回目の暗期に於いて最も高いことがわかっている (Kuroiwa 1995)。*C. merorae* の研究で用いられる同調培養方法は、分裂期が暗期である点と二度目の暗期で最も高い分裂同調率が得られる点が、今回筆者が *B. natans* で確立した同調培養方法と共通である。以上より、*B. natans* は主に暗期に分裂するが、長時間の暗期を与えると細胞周期がある段階で停止し、その後明暗周期が与えられることで細胞周期進行が再開するため、分裂の同調が得られたと考えられる。

### 参考文献

- Gillard *et al.* 2008. *Plant Physiol.*, **148**:1394–1411.  
Huysman *et al.* 2010. *Genome Biology*, **11**:R17.  
Kuroiwa, T. 1995. *J. Phycol.*, **31**:958–961.

## 海産緑藻の同形、異形配偶子の接合過程における鞭毛装置の挙動

後藤 春佳 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 宮村 新一 (生命環境科学研究科)

## 目的および背景

海産緑藻（緑藻植物、アオサ藻綱）には2つの配偶子の大きさと形がおなじ同形配偶と雌雄配偶子の大きさに違いがみられる異形配偶が知られており、雌雄の進化を研究するのに適した生物群である。アオサ藻綱の配偶子は細胞先端から生じた2本の鞭毛によって遊泳する涙滴形の細胞であり、鞭毛基部には基底小体、基底小体から細胞後方に伸長した微小管性の鞭毛根、繊維構造等から構成される鞭毛装置が存在する。これまでの研究によって、海産緑藻の2つの性は、配偶子の細胞融合装置である接合装置の位置の違いによって同形、異形配偶に関わらず区別することができることが明らかになってきている。接合装置は配偶子の細胞先端部の側面に位置し、その位置は基底小体から細胞後方に伸長した微小管性の鞭毛根の一つによって決定されていると考えられている。

このような接合装置と鞭毛装置構造について同形、異形配偶子の間で比較すると同形配偶と異形配偶の間での違いや2つの性の間での違いが見られることがこれまでの電子顕微鏡を使った研究から明らかになっている。なかでも大きな違いは基底小体から細胞後方へと伸長する system II 繊維の有無やその分布である。例えば、system II 繊維は、接合装置をもつ同形配偶子には存在するが、接合装置が退化した異形配偶子には存在しない場合がある。また、system II 繊維が存在する場合でも雌雄の配偶子でその数、大きさ、分布に性特異的な違いが認められることもある。

system II 繊維を構成する主要なタンパクは  $Ca^{2+}$  結合タンパク質であるセントリンであるが、セントリンはこの繊維構造以外にも基底小体や基底小体どうしを連結する結合繊維などにも存在する。配偶子におけるセントリンの分布については、アオノリなどの配偶子では system II 以外に2つの基底小体を連結する結合繊維などにも存在することが明らかになっているが、同形配偶子と異形配偶子の間でのセントリンの分布の違いやその性差、および受精から着生過程における挙動については不明な点が多い。

そこで、本研究では同形配偶子を形成するヒラアオノリ *Ulva compressa* と異形配偶子を形成するオオハネモ *Bryopsis maxima* をもちいて配偶子の受精から着生に至る過程におけるセントリンの挙動を鞭毛装置とあわせて解析した。

## 材料および方法

*Ulva compressa* は EC1 株 (交配型 +) と EC2 株 (交配型 -) を長崎大から取り寄せて実験に用いた。培養は ESS2 培地で 15°C、明期 10 時間、暗期 14 時間で行った。配偶子形成の誘導は、配偶体を細かく切り刻んだ後、多量の海水で洗浄し、新しい ESS2 培地で 14 時間明期、10 時間暗期で培養することで行なった。*Bryopsis maxima* は茨城県、大洗海岸で採集したものをを使用した。

セントリンの挙動は、抗セントリン抗体を用いた蛍光抗体法によって観察した。また、配偶子および接合子における鞭毛の挙動については走査型電子顕微鏡で観察した。

## 結果

ヒラアオノリの交配型 + と - の配偶子は基底小体から細胞後方へと伸長した2つ繊維構造と基底小体を連結する

キャッピングプレートが抗セントリン抗体で染色された。これに対してオオハネモでは system II 繊維に対応する構造は認められなかったが、ヒラアオノリと共通してキャッピングプレートに相当する部分が抗セントリン抗体で染色された。

また、ヒラアオノリは接合の際に2つの配偶子が接合装置部分で融合し、その際 system II 繊維が平行に並んでいた状態から、基底小体部分で接近し、4本の system II 繊維が十文字状になることが、時間を追って観察できた。そして、最終段階の着生時には、system II 繊維が消失していく様が観察できた。

## 今後の予定

透過型電子顕微鏡を使用し、鞭毛装置部分、また接合装置などの微細構造も明らかにしていきたい。

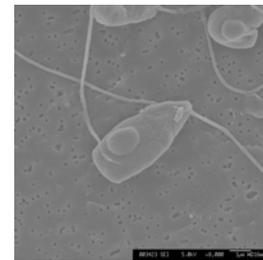


Figure 1: ヒラアオノリ EC1 の配偶子の SEM 画像

## 緑藻 *Gonium pectorale* の配偶子における細胞融合部位の解明

横田 真吾 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 宮村 新一 (生命環境科学研究科)

### 目的および背景

多くの真核生物においてオス・メスという二つの性は同型配偶子の交配型 +・- から進化したと考えられている。しかし、同型配偶子の交配型 +・- それぞれがオス・メスのどちらに対応する性であるのか不明なことが多い。もしも交配型 +・- とオス・メスを結びつける共通性質がわかれば、同型配偶からオス・メスが生じた進化を明らかにできると考えられる。その性質の一つとして、緑藻植物 (アオサ藻綱、ブラシノ藻綱、緑藻綱) において受精する二つの配偶子間の細胞融合部位の違いが研究されている。緑藻綱の *Chlamydomonas reinhardtii* では、二本の等長鞭毛をもつ交配型 + の同型配偶子は鞭毛の運動面に平行な眼点と反対側の部位で融合し、交配型 - の同型配偶子は鞭毛の運動面に平行な眼点と同じ側の部位で融合する。結果生じる接合子は二つの配偶子の鞭毛が平行に並び、二つの眼点が同じ側にそろおうという性質がある (Figure 1)。このように鞭毛および眼点の位置を基準にすると、細胞融合部位の違いには一定のパターンが見られる。この細胞融合部位に見られる一定のパターンは主にアオサ藻綱で同型配偶から異型配偶を行う種まで確認されており、緑藻植物における二つの性を区別する性質であることが示唆されている。

細胞融合部位の違いに見られる一定のパターンは緑藻綱では前述の *C. reinhardtii* においてしか確認されていない。緑藻綱におけるこのパターンの普遍性を確かめるためには、緑藻綱の *C. reinhardtii* 以外の種でその細胞融合部位を明らかにしていく必要がある。そこで、*C. reinhardtii* と近縁な緑藻綱ボルボックス目に属する *Gonium pectorale* を研究対象とした。ボルボックス目では二つの性を区別する性質の一つと考えられる性決定遺伝子 *MID* (minus-dominance gene) の研究が進められており、*C. reinhardtii* と *G. pectorale* はともに交配型 - の配偶子に *MID* が特異的に存在することがわかっている。そのため、*G. pectorale* の細胞融合部位の違いが今まで確認されてきたパターンと同一だった場合は *MID* というもう一つの性を区別する性質との対応関係を考察することができる。*G. pectorale* は 8,16 細胞からなる平らな群体を形成するという特徴をもち、その受精については Nozaki (1984) によって光学顕微鏡を用いて観察されている。その観察により、*G. pectorale* は *C. reinhardtii* と同様な二本の等長鞭毛と一つの眼点をもつ同型配偶子により受精を行うことがわかっている。また、その配偶子は両交配型ともに管状の細胞融合装置 (受精管) を生じ、その細胞融合は受精管同士の融合から始まることが観察されている。本研究では電子顕微鏡を用いて *G. pectorale* の同型配偶子における受精時の細胞融合を観察し、その細胞融合部位を明らかにすることを目的とした。

### 材料および方法

材料として国立環境研究所に保存されている NIES-1712 株 (交配型 +) と NIES-1713 株 (交配型 -) の 2 株を用いた。培養は AF-6 培地で 20°C、明期 14 時間・暗期 10 時間で行った。受精の誘導は Hamaji (2007) の方法を元に検討を行った。受精時の細胞融合部位を明らかにするためにまず走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察を行った。両株を混合し 1~2 時間経ったものを SEM 観察の試料として用い、1~2% グルタルアルデヒドによる固定、タンニン・

オスミウム法による導電染色、脱水後に臨界点乾燥させ観察した。また、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた細胞融合の観察も行った。TEM の試料では 1~2% グルタルアルデヒドによる固定、1% オスミウムによる後固定、脱水、樹脂包埋後に切片を作成して観察した。

### 結果

*G. pectorale* の配偶子と細胞融合後の接合子を SEM によって観察することに成功した。この観察により、両交配型ともに配偶子のもつ受精管は鞭毛基部の下側から生じその配置は鞭毛運動面と平行であること、配偶子は鞭毛運動面と平行な面で融合し接合子における二つの配偶子の鞭毛は平行に並ぶことがわかった (Figure 2)。配偶子における受精管の位置は TEM による観察結果とも一致した。しかし、SEM では眼点を観察することができなかったため、接合子における眼点の配置についてはわからなかった。また、それぞれの株単独で受精管を生じさせることができなかったため、SEM では交配型による細胞融合部位の違いを確認することができなかった。

### 今後の予定

今までの観察により TEM では眼点、鞭毛装置、細胞融合装置の配置をそれぞれの株単独で確認できることが予測される。そのため、今後はそれぞれの株単独で TEM 観察を行い細胞融合部位の違いを確認する予定である。



Figure 1: *C. reinhardtii* の接合子の模式図



Figure 2: *G. pectorale* の接合子の SEM 写真

円石藻 *Emiliania huxleyi* のココリス多糖合成系のエピメラーゼ阻害剤による制御

酒井 香苗 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 白岩 善博 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

円石藻 *Emiliania huxleyi* は海洋性の植物プランクトンであり、炭酸カルシウムからなる特徴的な円盤状のプレート(円石)によってその細胞表面が覆われている。この円石はココリスと呼ばれ、炭酸カルシウム結晶を主成分としている。このココリスは一般の炭酸カルシウム結晶には見られないユニークな構造をしており、その形成過程は細胞内で高度に制御されている。結晶形成の詳しい分子機構ははっきりとわかっていないが、*E. huxleyi* のココリスからは大量の酸性の多糖類が見つかったことや、*in vitro* での結晶形成の先行研究から、ココリス多糖 (coccolith polysaccharide; CP) という特殊な酸性多糖が結晶成長方向の制御に関わると推測されている。

*E. huxleyi* から単離されるココリス多糖は、少なくとも13種類の単糖類から構成されており、 $\alpha$  1,3-D-Mannose を主鎖として、硫酸エステルやガラクトuron酸を含む側鎖と、メチル化糖を含む複雑な構造の側鎖をもつ。

この構造骨格から考えられる合成経路を検討し、その経路ではたらくと推定された UDP-glucose 4-epimerase の阻害剤を検索した。そして阻害剤が CP の構造に影響を及ぼすのか、また糖量の合成に影響を及ぼすのかどうかを検証した。

本研究の結果、CP 合成系を阻害し、中間代謝産物を同定することによって、CP 合成代謝の流れを推測できれば、CP 合成系を解明できるだけでなく、それらの中間代謝産物を用いた *in vitro* 炭酸カルシウム結晶形成実験の結果、CP がどのような仕組みで炭酸カルシウム結晶形成を制御するのかについても解明の糸口をつかむことが可能となる。

## 手法および結果

材料と培養条件 本研究では筑波大学生物科学系、井上勲教授によって採集・単離され、譲渡された株である *Emiliania huxleyi* (NIES837) 株を使用した。培養液には人工海水 Marine art SF に ESM 栄養塩および、10nM の  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  を添加した培地 (MA-ESM) を用いた。約 500mL の MA-ESM に 50mL の細胞懸濁液を添加し 1.0mL 容扁平培養瓶中で 20、 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  片面連続照射、 $150\text{mL min}^{-1}$  通気条件下で培養を行った。5日間培養を行った後、10mL ずつ L 字管へ細胞懸濁液を移し、20、光強度  $20 \sim 30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の条件下で静置培養を行った。このときに阻害剤を加え(この時点を培養 0 日目とした)、0 日目と 2 日目、4 日目の細胞を回収し、実験に用いた。

阻害剤の検索 酵母での先行研究の結果から、UDP-glucose 4-epimerase の阻害剤として Butandione(0.3, 1, 2mM)、cyclohexanedione(0.5, 1, 2mM)、phenylglyoxal(0.1, 0.2, 0.3mM) を選択し、それぞれ濃度を変えて使用した。回収した細胞に 5%トリクロロ酢酸を添加し、超音波破碎を行い、細胞およびココリスに含まれる酸性多糖を抽出した。破碎液は遠心 ( $15000 \times g$ , 4、1h) し、細胞由来のタンパク質を沈殿させ、上清として多糖画分を得た。これをエタノールで沈殿させ、SDS-PAGE を行った。泳動終了後、ゲルを Alcian Blue と Stains all で染色して多糖を検出した。阻害剤を加えた細胞の増殖曲線、ゲル染色の結果からこの3種類のうち最も適した阻害剤として cyclohexanedione を選択した。

phenylglyoxal では低濃度で強く増殖が抑えられてしまうこと、Butanedione の場合は高い濃度にしなければ増殖に影響を及ぼさないことや、阻害剤を加えていないコントロールと比較して電気泳動の結果で違いが見られなかったことから候補から除外した。

阻害剤 cyclohexanedione の CP 合成への影響の検証 阻害剤 cyclohexanedione(0.5, 1, 2mM) を用いて、カルバゾール硫酸法(酸性糖の定量)とフェノール硫酸法(中性糖と酸性糖の定量)による糖の定量と SDS-PAGE を行った。培養 2 日目の細胞で、阻害剤 cyclohexanedione を加えると濃度依存的に酸性糖と中性糖の合成量が減少するという結果が得られた。電気泳動の結果ではコントロールとの違いがみられなかったことから、この薬剤が糖の組成の変化を引き起こしているとはいえないことがわかった。

## 今後の課題

定量結果から、CP を構成する糖のうち、どのような種類の糖が減少しているのかを検証する必要がある。阻害剤 cyclohexanedione を添加した条件下で合成されたココリス多糖を加水分解し、HPLC を行うことによって糖の組成が阻害剤を加えると変化するのかどうかを確認しなければならない。

# 海洋酸性化に対する円石藻 *Emiliania huxleyi* の応答に関する研究

鈴木 裕理奈 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 白岩 善博 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

海洋酸性化とは、大気中の二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) 濃度の上昇によって、海洋への CO<sub>2</sub> 溶け込みが増加し、海洋 pH の低下を引き起こす現象である。産業革命以降、海洋 pH は約 0.1 低下しており、今世紀末までにさらに 0.3~0.5 の pH 低下が予想される。一般に海洋 pH が低下すると炭酸カルシウムの飽和度が低下する<sup>[1]</sup> ため、海洋生物の中でも特に炭酸カルシウムの殻や骨格を作る石灰化生物への悪影響が懸念されている。円石藻 *E. huxleyi* はハプト藻綱に属する海産性単細胞藻類で、光合成と炭酸カルシウムの殻 (ココリス) を作る石灰化を行う。*E. huxleyi* は円石藻の中でもブルーム形成種として世界中の海洋において莫大なバイオマスを有し、深海へ炭素とカルシウムを運びバイオポンプとして重要である。これまでの研究で、本藻の石灰化は海洋酸性化によって阻害される<sup>[2]</sup> とも促進される<sup>[3]</sup> とも報告されており、いまだに議論が続いているが、海洋酸性化が円石藻に及ぼす影響の原因やメカニズムは不明である。

本研究では、海洋酸性化を「CO<sub>2</sub> 濃度増加」と「海水 pH の低下」の二つの現象に分離し、培養実験と顕微鏡観察を通して解析し、その影響と原因を解明することを目的とした。

## 材料および方法

グレートバリアリーフにて 1990 年に筑波大学・井上勲教授により採集・単離された *Emiliania huxleyi* (Lohmann) Hay and Mohler (NIES837) 株を用いた。

**実験 1. 低 pH の影響を調べる実験** HEPES-buffer を加え pH 8.2, 7.7, 7.2 に調整した MA-ESM 培地を用いて、*E. huxleyi* の培養株を 20°C、100 μmol photons m<sup>-2</sup> m<sup>-1</sup> の条件で空気を通しながら 7 日間培養した。培養期間中毎日サンプリングを行い、細胞濁度 (OD<sub>750</sub>) の測定及び細胞数のカウント、光学顕微鏡によるココリス形成の観察を行った。また細胞数の変化から、対数増殖期における比増殖速度を求めた。

**実験 2. 高 CO<sub>2</sub> 濃度の影響を調べる実験** *E. huxleyi* の培養株を CO<sub>2</sub> 濃度 400 ppm、800 ppm、1200 ppm の調整空気を通しながら実験 1 と同じ条件下で培養及び測定、観察した。実験に先立ち、成分の Tris-buffer を除いた MA-ESM に CO<sub>2</sub> 濃度 400、800、1200 ppm の調整空気を通し、気相 液相平衡を達成し、その結果、それぞれの pH が 8.1, 7.8, および 7.7 の培地を調整した。その後、それぞれの pH に調整した HEPES-buffer を加えて、再び気相 液相平衡状態を得た。この処理は、緩衝液なしでは培養中の pH がアルカリ側に大きくシフトし、pH の設定が大きく変化することを回避するためのものである。

## 結果および考察

**実験 1. 低 pH の影響を調べる実験** CO<sub>2</sub> 濃度を一定に保ち、pH を変化させてその影響を調べた。pH 8.2 に比べ、pH 7.7 は有意に増殖の減少が見られ、pH 7.2 ではほとんど増殖しなかった。また、ココリス形成は pH 7.7 以下で著しく阻害された (Fig. 1)。一方、pH 7.7 および 7.2 では、光合成活性は上昇したため (福田・白岩 未発表) 細胞増殖の抑制は光合成の減少以外の要因で生じると考えられる。さら

に、石灰化に伴う Ca<sup>2+</sup> の取り込みは HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 濃度に依存するとの結果も得ており、ココリスの減少は、pH 低下による培地中の HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 濃度の減少が原因であると推測した。



Fig.1 *E. huxleyi* におけるココリス形成の pH 依存性  
培養 2 日目の細胞の偏光顕微鏡写真 (ココリスは白く光る部分)

**実験 2. 高 CO<sub>2</sub> 濃度の影響を調べる実験** 3 種類の濃度の CO<sub>2</sub> を含む空気を通気して培養を行い、高 CO<sub>2</sub> の影響を調べた結果、CO<sub>2</sub> 濃度が高いほど増殖の減少が見られた。しかし、ココリス形成は変化せず、光合成活性は高 CO<sub>2</sub> 条件ほど高いレベルを維持した (Fig. 2)。その為、高 CO<sub>2</sub> 実験においても、実験 1 と同様、pH 低下が細胞増殖を抑制したと判断できる。pH 7.7 であっても CO<sub>2</sub> 濃度が高ければ石灰化が阻害されない理由は、石灰化の基質となる HCO<sub>3</sub><sup>-</sup><sup>[4]</sup> が十分供給されたためと推測した。

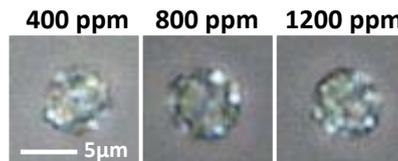


Fig.2 *E. huxleyi* におけるココリス形成の CO<sub>2</sub> 濃度依存性  
培養 2 日目の細胞の偏光顕微鏡写真

## 結論

pH の低下は *E. huxleyi* の増殖と石灰化に負の影響を及ぼすが、CO<sub>2</sub> が多量に供給されることによって石灰化のダメージは回復する。

## 今後の課題

実際に海洋で想定される海洋酸性化の影響を考えるためには、全アルカリ度を意識しなければならないが、バッファーを加えると全アルカリ度が変化してしまう。その為、今後はバッファーを加えずに pH をコントロールする実験系を組み立てていく必要がある。他にも、*E. huxleyi* 以外の円石藻、特に日本沿岸で多く見られる *Gephyrocapsa oceanica* は海洋酸性化に対してどのような応答を示すのか調べ、*E. huxleyi* と比較していきたい。また、顕微鏡観察の結果、低 pH で細胞内の貯蔵脂質が増えるように見えたので、pH 低下と脂質合成の関連を調べ、海洋酸性化と物質生産の関連を解明することも重要である。

## 参考文献

- [1] O. Hoegh-Guldberg *et al.* (2007) *Science* **318**:1737–1742
- [2] U. Riebesell *et al.* (2000) *Nature* **407**:364–367
- [3] M. Debora Iglesias-Rodriguez *et al.* (2008) *Science* **320**:336–340
- [4] K. Sekino, Y. Shiraiwa (1994) *Plant Cell Physiol.* **35**:353–361

## 機能的に重複した遺伝子の転写量は異なるか?: 渦鞭毛藻類の葉緑体型 GAPDH の場合

矢崎 裕規 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 稲垣 祐司 (生命環境科学研究科)

### 背景および目的

光合成性真核生物の葉緑体は細胞内共生したシアノバクテリアを起源とすることが知られている。さらに微細藻類において葉緑体の細胞内共生は何度も起こっているためその進化は予想されていた以上に複雑である。細胞内共生したシアノバクテリアを直接起源とする葉緑体(一次葉緑体)をもつ分類群を一次植物類と呼び、これには緑藻類と陸上植物をふくむ緑色植物、灰色藻類、紅藻類が含まれる。さらに従属栄養性真核生物が、緑藻類あるいは紅藻類を細胞内共生させることで葉緑体を獲得した二次共生が複数回起こり、真核生物内に光合成能が水平的に伝播してきた。ユーグレナ類、クロララクニオン藻類は緑藻類を起源とする二次葉緑体を、そしてクリプト藻類、ハプト藻類、不等毛植物類、光合成性アルベオラータ類は紅藻類を起源とする二次葉緑体をもつ。細胞内共生体から葉緑体に進化する過程で、細胞内共生体として不必要となった共生体遺伝子は消失し、葉緑体の機能や維持に必要な遺伝子のいくつかは宿主細胞の核ゲノムへ転移している。宿主核に転移した葉緑体関連遺伝子は宿主核から転写、細胞質で翻訳後、葉緑体へ輸送される。渦鞭毛藻類はアルベオラータ類に属し、典型的渦鞭毛藻類葉緑体(ペリディニン葉緑体)は紅藻由来二次葉緑体である。一般に渦鞭毛藻類核ゲノムには、少なくとも2種類のGAPDH(グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素)遺伝子がコードされている。GapC2遺伝子は細胞質で機能するGAPDHタンパク質をコードする一方、GapC1-p遺伝子産物は葉緑体に輸送される「葉緑体型」GAPDHである。本研究の研究材料である *Lepidodinium* 属渦鞭毛藻類は、元々もっていたペリディニン葉緑体を緑藻葉緑体と置換したことが分かっている (Takishita et al. 2007 Gene 410:26-36; Matsumoto et al. 2011 *Protist* in press)。Takishitaら(2007)は、*Lepidodinium chlorophorum* 核ゲノムから、細胞質型 *LmGapC2*、ペリディニン葉緑体型 *LmGapC1-p*、ハプト藻類の葉緑体型 GAPDH (*LmGapC1-fd*) の各遺伝子を単離した。*LmGapC1-p* は葉緑体置換を越えて葉緑体型 GAPDH が垂直的に伝播したものであり、*LmGapC1-fd* はハプト藻葉緑体型 GAPDH 遺伝子が水平伝播した結果だと解釈できる。2種類の葉緑体型 GAPDH 遺伝子は転写されているが、そのコピー数に違いがあるのか否か、違いがあるならどちらの遺伝子の転写活性が高いのか興味深い。今回、この2種類の GapC1 遺伝子の転写量を比較するため、逆転写リアルタイム PCR を行った。

### 方法および材料

2004年に東シナ海で採取された *Lepidodinium chlorophorum* 1868株を、20、明時間14時間、暗時間10時間の環境下において MNK 培地で培養した。

- 培養細胞から QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit を使用して total RNA を抽出した。抽出した total RNA は invitrogen 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends および TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) を使用し逆転写を行い、cDNA を合成した。

- 既知の GapC1-fd、GapC1-p、に基づき、それぞれの遺伝子に作成した特異的プライマーと cDNA を用いて PCR を行い、増幅産物をプラスミドにクローニングした。
- それぞれ生成したプラスミドについて TaKaRa SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>II を使用して定量 PCR を行い、検量線を作成した。
- 作成した検量線を基準に cDNA をテンプレートとして各遺伝子の転写量【 $1 \mu\text{l cDNA}$  中のコピー数: $6.02 \times 10^{14} \times \text{濃度} (\mu\text{g/ml}) \div (660 \times \text{塩基配列数})$ 】を計測した。その計測結果をもとに2遺伝子において転写量比較検討を行った。

### 結果および考察

*L. chlorophorum* 1868株に関して、定量的逆転写 PCR を12回繰り返し、3種類の GAPDH 遺伝子転写物数の平均値と標準偏差を計算した。*LmGapC1-p* と *LmGapC1-fd* の転写したコピー数は(平均値)それぞれ  $7.3 \times 10^4$  と  $2.5 \times 10^4$  であり、有意差は見られなかった。今回の定量的逆転写 PCR では、2種類の GapC1 遺伝子は *L. chlorophorum* 細胞内で同程度転写されていると考えられる。*Lepidodinium chlorophorum* の2種類の GapC1 遺伝子は共に葉緑体へ輸送されているのか、輸送されているとしたらその機能に違いがあるのか等を検証する必要がある。

### 今後

*Lepidodinium* 属渦鞭毛藻類とは系統的に離れた *Karenia* 属渦鞭毛藻類も、2種類の「葉緑体型」GapC1 遺伝子(GapC1-fd と GapC1-p) をもつことが分かっている。今後 *Karenia* 属において2種類の GapC1 遺伝子コピー数を定量し、今回の *L. chlorophorum* データとの比較を行う予定である。

# カタブレファリス類 *Leucocryptos marina* のミトコンドリアゲノム解析

西村 祐貴 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 橋本 哲男 (生命環境科学研究科)

## 背景と目的

これまでの研究では、光合成性真核生物がどのように光合成能を獲得したのか十分に理解されているとは言えない。クリプト藻類、ハプト藻類、不等毛植物類、光合成性アルベオラータ類は、細胞内共生した紅藻を起源とする葉緑体をもつが、これらの葉緑体が単一起源なのか否かは未だに解決されていない重要な問題である。従属栄養性真核微生物であるカタブレファリス類は、光合成性のクリプト藻類とハプト藻類を始め、幾つかの従属栄養性生物群(ゴニオモナス類、テロネマ類、有中心粒太陽虫類)と「ハクロビア」なる単系統群を形成すると提唱されている。核コード rRNA 遺伝子を用いた系統解析ではカタブレファリス類とクリプト藻類と強い近縁性を示す一方、タンパク質配列に基づく系統解析ではカタブレファリス類 - クリプト藻類間の近縁性は積極的に支持されない。真核生物大系統の中でカタブレファリス類の系統的位置を確定することは、ハクロビア単系統性の検証と紅藻由来葉緑体の進化を理解するために必須である。そこで本研究では、カタブレファリス類の系統的位置をより深く検討することを目的として、カタブレファリス類 *Leucocryptos marina* のミトコンドリア (mt) ゲノムの一部を決定し、複数 mt 遺伝子を用いた系統解析を行った。

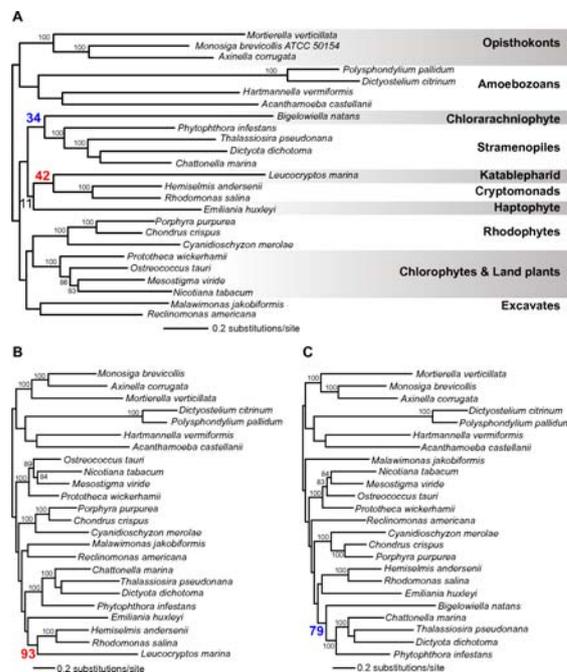
## 方法と材料

- 国立環境研究所から購入した *L. marina* (NIES1335 株) は f/2 培地、14 時間/10 時間明暗周期、20 °C にてハプト藻類 *Chrysochromulina sp.* (NIES-1333) を餌として培養された。 *L. marina* からのゲノム DNA (gDNA) 抽出は Plant DNA Isolation Reagent (TaKaRa) を、RNA 抽出には RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いた。RNA の逆転写反応には SuperScriptII およびランダムヘキサマーを用いた。gDNA および cDNA を鋳型として縮重プライマーを用いた PCR による cytochrome b (cob)、cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1)、cox3、NADH dehydrogenase subunit 1 (nad1)、nad7、nad11 遺伝子配列増幅を行ない、得られた産物はクローニング後塩基配列を決定した。得られた配列が *L. marina* 由来であることは餌であるハプト藻類ミトコンドリア遺伝子で用いられている遺伝暗号を基準に判断した。得られた遺伝子配列の両末端付近に遺伝子特異的プライマーを設計し、gDNA を鋳型にして遺伝子間領域の増幅を行った。

- L. marina* をふくむ真核生物 25 種から 7 種類のミトコンドリアゲノムコード遺伝子、即ち cob、cox1、cox2、cox3、(nad1)、nad6、ATP syntase F0 subunit 6 (atp6) を集め、1992 アミノ酸残基からなるアライメントデータを作成した。この 7 遺伝子アライメントの最尤法による系統解析には RAxML 7.2.8 を使用した。置換モデルは aminosan によって選択された MtZoa+ +F モデルを使用した。最尤法によるブートストラップ (BP) 解析は 100 回行った。

## 結果と考察

本研究により *L. marina* の mt 部分配列 12kb を決定することに成功した。この配列断片には cob、cox2、cox3、nad1、nad6、nad7、atp6 の全配列と、cox1、nad11 の部分配列が含まれていたが、構造 RNA 遺伝子は含まれていなかった。このうち cox1、cob には LAGLIDADG モチーフを有するエンドヌクレアーゼを有したグループ I イントロンがそれぞれ 1 つずつ確認された。7 遺伝子アライメントの最尤法による系統解析では、これまで提唱されてきた真核生物内の系統関係が再現された。 *L. marina* はクリプト藻類と単系統性を示したが、それを支持するブートストラップ (BP) 値は 42% と低かった (A)。100 以上の核コード遺伝子以上を含むアライメントに基づく系統解析ではクロララクニオン藻類を含むリザリアと不等毛植物類の近縁性が強く支持されている。本研究の 7 ミトコンドリア遺伝子解析でも、クロララクニオン藻類 *Bigelowiella natans* と不等毛藻類とは単系統群を形成したが、その支持は低かった (BP = 34%)。 *L. marina* および *B. natans* 配列の進化速度が他の配列よりも上昇していることから、誤って 2 つの配列が互いに引き寄せあうロングランチアトラクション (LBA) が働いていることが予想された。そこで *B. natans* を除いた解析を行ったところ、カタブレファリス類とクリプト藻類の単系統性を支持する BP 値が 93% に上昇した (B)。逆に *L. marina* を除くと、 *B. natans* と不等毛植物類との単系統性は 79% に上昇した (C)。これらのミトコンドリア遺伝子系統解析は、LBA アーティファクトを取り除けばカタブレファリス類 - クリプト藻類間の近縁性を復元できること示唆する。また、LAGLIDADG モチーフを持つエンドヌクレアーゼの系統解析を行った結果、cob と cox1 に挿入されているグループ I イントロンは、それぞれ緑藻類配列と真菌類配列と明らかな近縁性を示した。これまでクリプト藻類や他の近縁種の cob、cox1 遺伝子においてイントロンは報告されていないことから、 *L. marina* ミトコンドリアの 2 つのイントロンは水平伝播したと考えられる。



## トキソプラズマにおけるプリマキンの作用機序の解明

福士 路花 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 橋本 哲男 (生命環境科学研究科)

### 背景および目的

マラリアはマラリア原虫 (*Plasmodium spp.*) によって引き起こされる感染症で、2009 年の WHO の報告によると現在約 33 億人が感染の可能性に晒されている。ヒトに感染するマラリア原虫は現在 4 種あり、それぞれ致死率や重症度、再発性などが異なる。その中で三日熱マラリアは、比較的軽いが治療後数ヶ月～数年後に再発するという特徴をもつ。この再発は肝臓に形成される休眠芽によって引き起こされると考えられている。プリマキンは三日熱マラリアの再発を根絶する唯一の薬として半世紀以上前から使用され続けている。しかし三日熱マラリア原虫は連続培養系が確立されていないこと、マラリア原虫の中で最も研究が進んでいる熱帯熱マラリアではプリマキンが作用する休眠芽ステージがないこと、熱帯熱マラリアのメインステージである赤血球ステージにはプリマキンは効かないことなどから、プリマキンの原虫に対する作用機序は殆ど解明されていない。

そこで本研究ではマラリア原虫に近縁な寄生原虫であるトキソプラズマを用いて、プリマキンが作用するメカニズムを解明することを目的とした。トキソプラズマは有核細胞を宿主として無性生殖を行うという点で三日熱マラリアとの共通点があり、さらに分子生物学的、細胞生物学的な手法も整備されており、またマラリア原虫に比べ大型であり形態観察に適しているなどマラリア研究のモデルとして非常に適していると考えられる。

プリマキンはこれまで多細胞動物細胞において、酸性オルガネラを中性化することで、プロテアーゼや小胞輸送の機能を阻害することがわかっている。そこで本研究ではトキソプラズマのリソソーム様オルガネラである PLV (plant like vacuole) に注目した。PLV は近年発見された、植物の液胞様のオルガネラで、宿主細胞外トキソプラズマ内のみ存在する。PLV 膜上には数種のイオンポンプやアクアポリン、プロテアーゼが局在しており、イオンの貯蔵、浸透圧の制御、タンパク質分解の場としての機能があると考えられている。

### 材料および方法

材料: *Toxoplasma gondii* RH 株、Vero 細胞 (宿主細胞)

#### ● トキソプラズマのプリマキン感受性と選択性の確認

大腸菌由来  $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現クローンをを用い、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素活性を指標としてトキソプラズマの増殖を測定することによりプリマキンの効果濃度を計測した。

#### ● トキソプラズマの侵入・分裂への影響

GFP 発現クローンを蛍光顕微鏡により観察し、トキソプラズマの Vero 細胞への侵入、細胞内での分裂に及ぼすプリマキンの影響を解析した。侵入は、可溶化処理なしで抗トキソプラズマ抗体による免疫染色を行うことで宿主細胞への侵入の有無を区別して侵入率を計算した。分裂の観察は、宿主細胞内に形成される小胞あたりの原虫数を 12 時間おきに計測することにより行った。

#### ● 酸性オルガネラの観察

LysoTracker を用いてプリマキンによる酸性オルガネラの形態変化を観察した。

### 結果および考察

プリマキンはトキソプラズマの増殖を有意に抑制した ( $IC_{50}=33.55 \mu M$ )。一方で、プリマキンは宿主細胞として用いた Vero 細胞にも影響を及ぼしたが、その感受性はトキソプラズマより有意に低かった ( $IC_{50}=194.66 \mu M$ ,  $p<0.01$ )。そこでこの増殖抑制が増殖のどの時点で起こっているのかを解析するため、原虫の宿主細胞への侵入率および分裂回数を経時的な観察を行った。その結果、原虫の侵入率はプリマキン処理によりむしろ上昇していたが、一方で侵入後の原虫の経時的な観察から、プリマキンで処理したトキソプラズマでは、通常分裂が起こっているはずの播種後 12 時間が経っても殆どの虫体で分裂が起こらず、更に播種後 36 時間以降になると異常な形態をとる虫体が多く見られることが明らかとなった。以上のことから、プリマキンはトキソプラズマの宿主細胞への侵入ではなく、分裂の開始を抑制し、増殖を阻害することがわかった。

プリマキン処理により、LysoTracker での染色パターンに変化があることから、プリマキンはトキソプラズマの酸性オルガネラに影響を及ぼしていると考えられる。現在、PLV 特異的な抗体を使用し、影響を受けているオルガネラを特定中である。

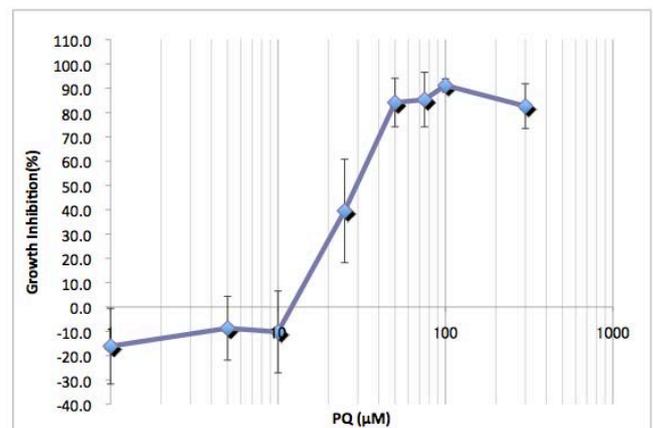


Figure 1: プリマキンは濃度依存的にトキソプラズマの増殖を抑制する。

PCR-RFLP 法による *Drosophila ananassae* と *Drosophila parapallidosa* の見分け方

近藤 陸 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 澤村 京一 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

アナナスショウジョウバエ (*Drosophila ananassae*) は世界中の熱帯に広く分布しており、他の 12 種とあわせてアナナスショウジョウバエ類を形成している。1971 年に戸張博士によってコタキナバル(マレーシア)から採集された集団の中に、生殖的に隔離された系統が見つかった (Tobari, 1993)。近年では八重山諸島(沖縄)や蘭嶼島(台湾)からも採集されており、*D. parapallidosa* として記載された (Matsuda et al., 2009)。しかし、形態からこれら 2 種を見分けることは困難であった。そこで、4 つの遺伝子が比較されたが、種特異性は確認されなかった (Sawamura et al., 2010)。今のところシトクローム c オキシダーゼ・サブユニット偽遺伝子 (COI) 以外に明確な種特異性のあるものは見つからない (Sawamura et al., 2008)。そこで、COI を基に、これら 2 種を PCR-RFLP 法を用いて見分ける方法を確立するために本実験を行った。

## 材料および方法

*D. ananassae*

- ・台湾 1 系統、沖縄 2 系統、マレーシア 4 系統

*D. parapallidosa*

- ・台湾 3 系統、沖縄 7 系統、マレーシア 4 系統

ハプロタイプの決定 各系統の遺伝子を PCR により増幅、塩基配列を決定した。

PCR-RFLP 法 プライマー、PCR 条件及び制限酵素は以下に示す。

- プライマー...
  - 5' -CAAGCGGACTGCGACTCAAC-3'
  - 5' -GTGGTTGGCCACTGGATAGG-3'
- PCR 条件 ...
  - 95 4分、(95 30秒、60 30秒、72 30秒)
  - × 30回、72 7分
- 制限酵素 ...
  - Ssp* I, *Xsp* I, *Mfi* I

## 結果

今回使用した制限酵素 3 種類の全てで 2 種を区別することができた。

## 考察および展望

本実験によって形態での判別が容易ではないショウジョウバエ 2 種を分子的に見分けることができた。これによって野外採集したハエの判別法が確立した。今後は種や遺伝子の範囲を広げ、野外採集したアナナスショウジョウバエ類を形態によらず判別できるようにフローチャート化する予定である。



Figure 1: Fig.1 PCR-RFLP の結果: *Ssp* I で切断 1-7, *D. ananassae*, 8-15, *D. parapallidosa*.

## 参考文献

- Matsuda M., Ng C. S., Doi M., Kopp A., Tobari Y. N., (2009) Evolution in the *Drosophila ananassae* species subgroup. *Fly* 3: 157-169
- Sawamura K., Koganebuchi K., Sato H., Kamiya K., Matsuda M., Oguma Y., (2008) Potential gene flow in natural populations of the *Drosophila ananassae* species cluster inferred from a nuclear mitochondrial pseudogene. *Mol. Phylogenet. Evol.* 48: 1087-1093
- Sawamura K., Kamiya K., Sato H., Tomimura Y., Matsuda M., Oguma Y., (2010) Evolutionary relationships in the *Drosophila ananassae* species cluster based on introns of multiple nuclear loci. *Zool. Sci.* 27: 303-312
- Tobari Y.N., (1993) *Drosophila ananassae*: Genetical and Biological Aspects. Japan Scientific Societies Press Tokyo

## ヤスデを見分ける —新たな同定法の探索—

島根 康如 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 八畑 謙介 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

ヤスデ類の種レベルの同定においては、雄の交尾器である生殖肢の形態が非常に重要な形質として用いられている。一方で、生殖肢形態以外に決定的な同定形質に関する知見は多くはない。従って、現時点では生殖肢を持たない雌個体および生殖肢を欠損した個体の同定は困難を極める。また、種によっては背板色彩が同定に有効な形質となることもあるが、長期保存したアルコール液浸標本では色素が脱落してしまう。このように、現在のヤスデ類の同定法は非常に多くの問題を抱えている。この問題を解決するためには、生殖肢形態や色彩に依存しない新たな同定法が必要である。

ホルストアマビコヤスデ *Riukiaria holstii* (Pocock, 1895)、オキナワアマビコヤスデ *Riukiaria pugionifera* (Verhoeff, 1936)、ポコックヤエタケヤスデ *Yaetakaria neptuna* (Pocock, 1895) および *Riukiaria* sp. はいずれも倍脚綱唇顎亜綱オビヤスデ目ババヤスデ科に属するヤスデであり、沖縄島にのみ生息する。また、沖縄島に生息するアマビコヤスデ類はこの4種のみである。これらのヤスデ類は一部を除き生殖肢形態による同定が可能である。また、これら4種の背板色彩が種ごとに明瞭に異なるため、色彩も種同定の際に重要な形質となりうる。このように、沖縄島のアマビコヤスデ類4種は明瞭に種同定が可能である。そのため、生殖肢や色彩以外の量的な形態データが種同定に有効であるかを調べるよい材料であるといえる。

そこで本研究では、沖縄島のアマビコヤスデ類を例とした新たな同定法の確立を目的とし、量的形態データの採取および分析を行った。

## 材料および方法

本研究では、2006年7月から2010年7月にかけて沖縄島で採集された *Riukiaria holstii*, *Riukiaria pugionifera*, *Yaetakaria neptuna* および *Riukiaria* sp. の成体標本をそれぞれ144個体(うち雌68個体、雄76個体)、41個体(うち雌22個体、雄19個体)、45個体(うち雌15個体、雄30個体)、92個体(うち雌39個体、雄53個体)用いた。虫体サイズの測定にはアルコール液浸標本を用いた。頸板幅、頸板長、第10胸節側底後突起内幅、同節全体節幅、同節後体節長、同節高、第19胸節側底後突起内幅、左右肛門板幅、上唇突起長、上唇突起幅、上唇突起全体幅の合計11部位について、実体顕微鏡、マイクロメーター、電子ノギスおよび描画装置を用いてサイズデータを採取した。いずれの各種にも雌雄間に有意なサイズ差が見られたため(t検定:  $P < 0.01$ )、データの分析は雌雄別に行った。分析はすべて JMP 7.0.1にて行った。

## 結果および考察

採取した11部位のサイズデータについて分散分析および多重比較(Tukey-KramerのHSD検定:  $P < 0.01$ )を行い、各測定部位に有意な種間差が見られるか否かを調べた。分散分析の結果、多くの測定部位において有意な種間差が見られたので、測定によって得たサイズデータを用いて種同定が可能であると判断し、どの形質でどの程度同定可能かを調べるため判別分析を行った。判別分析の結果、雌は第

19胸節側底後突起内幅、第10胸節後体節長、第10胸節高および上唇突起長の合計4部位を用いると、誤判別率4.196%で4種の判別が可能であった。また、雄は第19胸節側底後突起内幅、上唇突起長、頸板長、第10胸節高、同節後体節長、頸板幅および上唇突起全体幅の合計7部位を用いると、誤判別率1.807%で4種の判別が可能であった。

以上のように、生殖肢形態や色彩情報に依存せず、量的形態データを用いても高確率で沖縄島のアマビコヤスデ類の同定が高確率で可能であることがわかった。ただし、この手法は従来の質的差異の明瞭な形質による同定法とは異なり、事前に正確な同定がなされた多数の標本からのデータの蓄積が前提となる。また、データの蓄積のない未知の種には対応不可能である。

本研究によって、量的形態データを用いてヤスデ類の同定が可能であることの一例を示すことができた。他のヤスデ類においてもデータが蓄積されれば、同様の方法により種の同定が可能になると期待される。今後は多くの種において生殖肢の形態だけではなく、それ以外の量的形態データの蓄積が望まれる。

## 唇脚類における歩肢の自切構造

松井 彰宏 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 八畑 謙介 (生命環境科学研究科)

### 背景および目的

トカゲの尻尾を捕まえると、本体は尻尾を切り捨てて逃げて行ってしまふ。このように動物が危険から身を守るために体の一部分を犠牲にする現象は自切と呼ばれる。これは脊椎動物の他、節足動物や棘皮動物など動物界の様々な系統群で見られる生存戦略である。

自切する動物では切断によるリスクを軽減するため、適切に切断したり治癒を早めたりするための構造があらかじめ特定の位置に備わっている。系統ごとに切り捨てる部位や関わる構造に違いが見られ、それぞれの系統群で独立に進化した機構とされている。しかし、詳しい研究がされているのは一部の系統群に限られる。

日本に生息する唇脚類は4目に分けられる。そのうち自切が見られるのは頻度の高い順にゲジ目、イシムカデ目、オオムカデ目、いずれも歩肢の転節付近で切断が起こる。残るジムカデ目では自切は起こらない。最も自切頻度の高いゲジ目では、転節が結合組織による隔壁で隔てられている。この隔壁を貫通しているのは神経と血管のみであり、隔壁の遠位側で自切することにより、むやみな体液の流出を防いでいると考えられている (Herbst, 1891)。しかし、これは飽くまで治癒に関わる構造と考えられ、切断に関わる構造は未だ明らかになっていない。またイシムカデ目やオオムカデ目に至っては、自切部位に特別な構造が存在するのかわからず知られていないのが現状である。

そこで、唇脚類の自切に関わる構造の詳細を明らかにし、自切構造の多様性について理解を深めることを目的として本研究を行なった。

### 材料および手法

ゲジ目のゲジ *Thereuonema tuberculata*、イシムカデ目のイシムカデ *Bothropolys rugosus*、ヤマイシムカデ *B. montanus*、ダレイシムカデ *B. acutidens*、コマイシムカデ *B. richthofeni*、ホルストヒトフシムカデ *Monotarsobius crassipes*、オオムカデ目のセスジアカムカデ *Scolopocryptops rubiginosus*、ヨスジアカムカデ *S. quadristriatus* およびジムカデ目のヨコジムカデ属 *sp. Pleurogeophilus* sp. を材料とし、それぞれについて自切前後の歩肢の外部構造及び内部構造を観察した。

1) 骨格標本

1%水酸化カリウム水溶液を用いて内部組織を溶かし、クチクラ外骨格の構造を実体顕微鏡で観察した。

2) 組織切片

材料をブアン氏液で固定し、常法によりパラフィン連続切片を作製した。切片はヘマトキシリン エオシン法で染色し、光学顕微鏡で観察した。

### 結果

ゲジ類の骨格標本を観察すると、転節を1周するように褐色のラインが見られた。自切後のものではこのラインを境界に歩肢の遠位部分が失われていた。組織切片では、転節にある隔壁のすぐ前腿節側にクチクラの不連続構造(切れ目)が観察できた(図1)。切れ目の縁が濃色を呈していたことから、これは骨格標本で見られた褐色のラインと一致し、すなわち自切面であることが分かる。

イシムカデ類とオオムカデ類(図2)の組織切片では、ゲジ類のもので見られたような隔壁は観察されなかった。これらの種でも転節にクチクラの切れ目が見られたものの、歩肢を1周してはならず、半周~3/4周程度にとどまっていた。また、自切面をまたいで筋肉や気管が配置されていた。自切面は自切後の切片から判断した。

自切を行なわないとされるジムカデ類では、歩肢に損傷を受けた場合も、歩肢が切断される箇所は一定でなかった。歩肢の内外部を観察しても、隔壁やクチクラの切れ目といった構造は見られなかった。

### 考察

本研究において、自切を行なう目では自切頻度に関わらずクチクラの不連続構造が共通して見られた。また、自切前後の比較により、切れ目が自切面と重なることが分かった。自切の研究が盛んなカニ類では、歩肢の基部で外骨格が溝状に入り込み二重膜を形成しており、それを剥離させることによって歩肢を切断する。唇脚類においてもクチクラの切れ目から外骨格に裂け目が広がることで、自切が引き起こされると考えられる。

結合組織による隔壁は、最も自切頻度の高いゲジ目でのみ観察された。また、クチクラの切れ目の長さには目ごとで違いが見られ、自切頻度の低い目ではそれが短くなる傾向にあった。さらに、イシムカデ目とオオムカデ目はゲジ目と異なり、筋肉や気管の切断なしには自切できないことが分かった。このように諸器官の構造や配置は唇脚類内における自切頻度の多様性と相関があると考えられる。

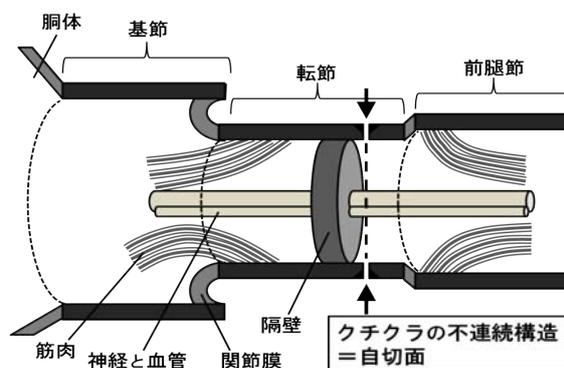


図1: ゲジ目の自切構造

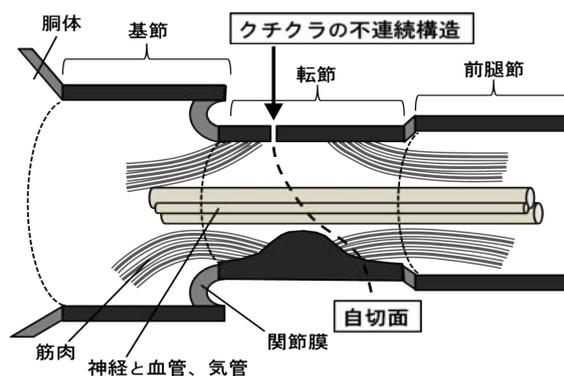


図2: オオムカデ目の自切構造

# ルリゴキブリ *Eucorydia yasumatsui* Asahina の発生学的研究に向けて (昆虫綱・ゴキブリ目・ムカシゴキブリ科) —累代飼育系の確立と後胚発生の解明—

藤田 麻里 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 町田 龍一郎 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

ゴキブリ目は 11 目からなる多新翅類の一群である。多新翅類内の系統学的議論は定まっていないが、その中のゴキブリ目、カマキリ目、シロアリ目の類縁性は広く支持されており、網翅類としてまとめられる。しかしながら、これまで網翅類の多新翅類内での位置づけや網翅類 3 目間の系統関係に関するコンセンサスは得られていないばかりか、近年の分子系統解析は、シロアリ目とゴキブリ目キゴキブリ科との姉妹群関係を示唆し、ゴキブリ目の単系統性を棄却している。したがって、網翅類、多新翅類の系統学的議論をするうえで、ゴキブリ目の本質的理解は不可欠であり、グラウンドプランの構築と系統学的理解が大変重要である。このような議論において、比較発生学的検討は、非常に有効である。ゴキブリ目の発生は比較的よく調べられているものの、衛生害虫として知られる派生的な科、チャバネゴキブリ科とゴキブリ科に知見が集中しており、原始的な科における発生学的研究は皆無であること、そして知見のある両科において胚帯形成、胚運動という重要な発生形質において大きな違いがあることから、ゴキブリ目の発生学的理解は未だ十分とは言えない状況にある。そこで、私たちはゴキブリ目のグラウンドプランを構築し、系統学的議論を展開することを目的として、本目の比較発生学的研究に着手した。

まずゴキブリ目の原始系統群と目されるムカシゴキブリ科の発生を明らかにすべく、ルリゴキブリ *Eucorydia yasumatsui* を材料に研究を開始した。発生学的研究を行うにあたり、材料の採集、飼育法から、飼育下で定常的に採卵する方法の確立は必要不可欠である。しかし、本種は、生息地が沖縄県の八重山諸島と奄美諸島に限定されるうえ、発見情報が少なく希少であり、生物学的知見も乏しい。そこで、まずルリゴキブリの発生学的研究の第一歩として本種の累代飼育系の確立を試みた。本研究では、確立に成功したルリゴキブリの飼育系、およびその過程で明らかになった後胚発生過程について報告する。

## 材料および方法

材料のルリゴキブリは、成虫の体長はおよそ 10 mm で、背面全体が構造色によって金属光沢を放つ青藍色である(図 1)。雄の腹部腹板数は 9、第 9 腹板の末端には尾突起と呼ばれる一対の突起状構造物がある。雌の腹板数は 7 で、尾突起はない(図 2)。

2008 年 4 月に沖縄県八重山郡西表島の古見にて、ルリゴキブリ幼虫 11 個体を採集した。採集した個体は底に土を押し固めておいた丸型のプラスチックケース(直径 14 cm)内で集団飼育し、18 - 24 °C の温度下で配合飼料(金魚の餌、クロレラ、エビオス、バランス栄養食品を 9 : 3 : 3 : 1 の割合で配合したもの)を定期的に与えた。雌が産下した卵鞘(卵を包んでいるカプセル状の構造物)は別容器に集め 23.5 °C でインキュベートした。

孵化した幼虫のうち、およそ 100 個体を角型のプラスチックケース(8 cm × 5 cm × 2 cm)内で個別飼育し、後胚発生の観察に用いた。観察では齢数の記録と、各齢期の標本

を作製し、実体顕微鏡下で観察とスケッチを行うことで幼虫形態の変化を記載した。

## 結果および考察

飼育の結果、採集した個体(第一世代)から、2009 年 2 月までに雌 7 個体雄 3 個体が羽化し、交配後、81 個の卵鞘を得て、2009 年 6 月までにおよそ 450 個体の幼虫(第二世代)を孵化させることに成功した。第二世代でも交配と採卵を行った結果、2010 年 11 月までに 412 個体の幼虫(第三世代)が孵化した。以上のような結果から、ルリゴキブリの累代飼育系の確立に成功した。また、これまでの 31 卵鞘(卵数=184)の観察結果から、本種の平均卵期は 64.1 ± 11.9 (日)であることが明らかとなった。

後胚発生の観察の結果、ルリゴキブリの幼虫の全齢数は、雄で 8 もしくは 9 齢、雌においては 9 もしくは 10 齢であった。これはムカシゴキブリ科における後胚発生の初知見である。また、これまでの観察で、幼虫期に尾突起をもつ個体ともたない個体の 2 タイプを確認した。そこで、尾突起をもたない個体をタイプ 1、もつ個体をタイプ 2 とし、各タイプの腹部構造の変化をドキュメントしたところ、タイプ 1 と 2 の形態的差異は 3 齢期から生じることが明らかとなった。さらに、タイプ 1 の幼虫は全て雌、タイプ 2 は雄へと羽化したことから、幼虫期に現れる 2 タイプの腹部構造は雌雄二形と関連づけられる。本研究で、ルリゴキブリの発生学的研究の基盤となる累代飼育系が確立でき、さらに本種の後胚発生も初めて明らかになった。来年度より、所期のルリゴキブリの発生学的研究を開始する。

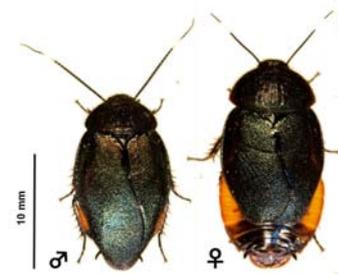


図1. ルリゴキブリの成虫

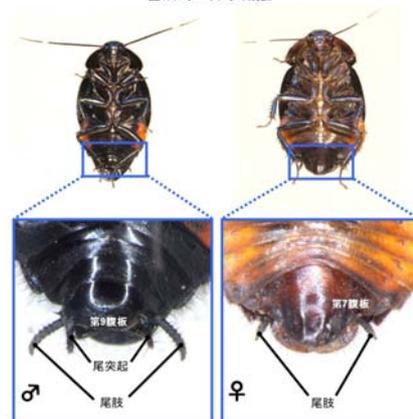


図2. ルリゴキブリ成虫の腹部腹面

# オウム類の顎複合体発生 —堅果食適応を促した大規模な形態改変とそれが生まれた仕組み

中山 智生 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 町田 龍一郎 (生命環境科学研究科)

## 背景

脊椎動物は地球上でもっとも繁栄している生物群の一つである。脊椎動物が様々な環境に適応するにあたって、考慮すべき要因の一つに摂食器官形態の多様化が挙げられる。脊椎動物の摂食器官の形態は非常に多様であり、それぞれの種がおかれている環境や餌資源に適応した形態となっている。そのため摂食器官の進化様式を考察する事は、脊椎動物の今日の繁栄を考える上で不可欠であると言える。

その脊椎動物の中でも、鳥類は摂食器官形態の多様性が低いグループであるとされている。鳥類の全ての種は角質で覆われた嘴(くちばし)をもっており、顎を構成する筋などの周辺組織の形態も他の系統に比べ画一的である。ところが、今回の研究対象であるオウム目 (Order Psittaciformes) は鳥類の中にあって極めて特異な摂食器官形態を有している。オウム類は他の鳥類では栄養源に出来ない堅い外皮をもつ食物を破碎して摂食する事が出来る。このためにオウム類では嘴が湾曲した鉤状になっている(図1)。それだけでなく、頭部正中近傍と下顎内面を結ぶ長大な筋肉である篩骨下顎筋がみられる。また、一部のオウム類の頭蓋骨には眼窩下弓と呼ばれる新規な骨性構造が存在し、眼窩下弓と下顎を結ぶ顎内転筋である擬咬筋が発達する。さらに、口蓋骨の外側部に起始し、下顎の腹側から回り込むようにして下顎の外側部に達する外側腹側翼状筋も備え、独自の顎運動システムを有している。これらの筋はオウム類でのみ見られるものであり、これにより下顎を強力に閉じることによって堅果食を可能にしている。そのためこれらの筋はオウム類独自の進化を象徴していると言える。

このような大規模な形態改変はどのようなプロセスによって達成されるのだろうか。本研究ではオウム目オカメインコ (*Nymphicus hollandicus*) および比較対象である一般的な摂食器官形態を持つキジ目ウズラ (*Coturnix japonica*) の顎を構成するの骨組織、筋組織、そしてその支配神経の発生を詳細に記述する事により、形態発生的な観点から新奇な顎運動システムの発生要因を探索した。

## 材料および方法

オカメインコとウズラを用い、顎周辺組織が発達する発生段階の胚(それぞれステージ 28,30,32,34,36,38 各 2 個体ずつ)をパラフィン包埋したのち、ミクロトームを用いて頭部の連続組織切片を作成した。その連続組織切片に対して抗アセチル化チューブリンモノクローナル抗体による免疫染色を行い神経組織を染色した。骨、軟骨、筋の識別はヘマトキシリンを用いた核染色により行った。そして三次元立体モデル(3Dモデル)構築ソフトの Amira5 を用いて顎周辺組織の 3D モデルを作成した。

## 結果

ステージ 30 では、オカメインコ胚とウズラ胚の顎複合体の形態に大きな違いは見られなかった。この時点ではオウム類特有の筋の分化は認められなかった。ステージ 32 のオカメインコ胚において篩骨下顎筋へと分化する筋細胞集合が翼状筋の原基から分離、伸長を始めていた。その時点で篩骨下顎筋を支配する神経の軸索はすでに筋内部まで到達して

達しており、その神経軸索の経路は他の筋のそれとは独立したものだった。ステージ 36 のオカメインコ胚において擬咬筋が外下顎内転筋から、外側腹側翼状筋が翼状筋群からそれぞれ分離を開始している様子が確認できた。これらの筋の内部には神経軸索はまだ見られなかった。ステージ 38 のオカメインコ胚において擬咬筋、外側腹側翼状筋の内部に神経軸索の侵入が確認された。これらの新奇な筋を支配する神経軸索は母体となる筋組織の内部を走行していた。

## 考察

オカメインコ胚ステージ 36 において、すでに母体となる筋集合からの分離が進んでいる筋(篩骨下顎筋)の内部には運動神経の軸索が分布していたが、分離開始直後の筋内部(擬咬筋、外側腹側翼状筋)には分布していなかった。このことから新奇な筋の形成はその支配神経の到達に先立って起こる可能性が示唆された。また、オウム類の新奇な筋への軸索の伸長パターンが篩骨下顎筋とその他の筋で異なっていたことから、新奇な筋を支配する運動神経軸索の誘導様式は一樣ではないことが推察された。これらのことから、オウム類における新奇な顎運動システムは構成する機能ユニットごとに異なる機序によって構築されると考えられる。



図 1: オウム目の頭部筋骨格系の模式図

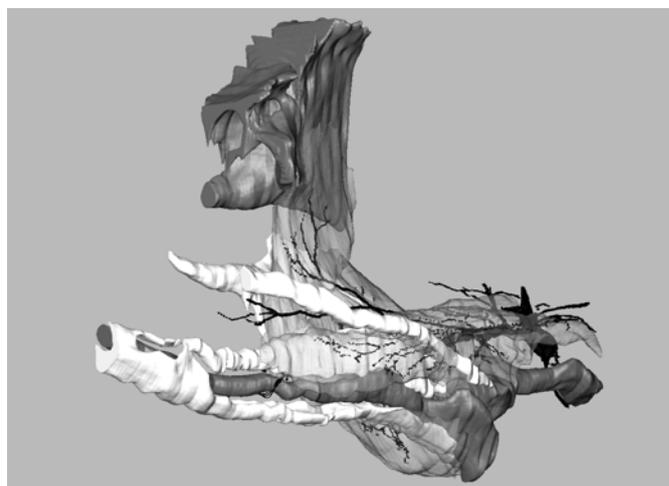


図 2: オカメインコの顎周辺組織の 3D モデル

## 棘皮動物における骨片形成機構の探究 ～ 間充織化との関連、発生と再生の比較から～

越智 恵理子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 和田 洋 (生命環境科学研究科)

### 背景および目的

棘皮動物門には、ウミユリ綱、ヒトデ綱、クモヒトデ綱、ナマコ綱、ウニ綱の五綱が属する。成体形態は非常に異なるが、水管系と炭酸カルシウムを主成分とする骨片を共通してもつ。骨片は多孔質で、独自のキャッチ結合組織等により支持されている。また成体骨片は全てで形成されるのに対し、幼生骨片 (Fig1 左、矢印) はクモヒトデ・ウニでのみ形成される。これらの幼生形態は非常に類似するが、系統関係から、幼生骨片は独立に獲得されたと考えられる (Fig1 右)。以上から、棘皮動物の骨片は独自の進化を続けてきたと推察できる。だが骨片形成機構の研究はウニ幼生において盛んであるのに対し、ウニ成体、その他の棘皮動物では進んでいない。本研究では以下の二点に着目し、棘皮動物全体における骨片形成機構の比較を行った。

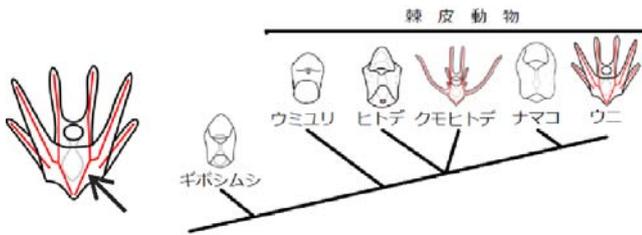


Figure 1: (左) 幼生骨片 (右) 棘皮動物の系統樹

一つは、「間充織化と骨片形成の関連」である。棘皮動物の骨片形成には、間充織細胞が関与している。間充織細胞は形成時期によって、原腸陥入の前に形成されるものは一次間充織細胞 (PMC, Fig2 矢印) 原腸陥入の後に形成されるものは二次間充織細胞 (SMC, Fig2 矢尻) と呼ばれる。PMC はクモヒトデ・ウニ幼生でのみ形成され、骨片形成マトリックスタンパク質を分泌する。一方で SMC は全ての棘皮動物で形成されるが、骨片形成には関与しない。PMC の形成の有無、それによる骨片形成との関連の有無を解明するために、ウニにおいて間充織細胞の形成、骨片形成マトリックスタンパク質の分泌を制御する、*snail* 遺伝子の発現パターンをクモヒトデ、ヒトデで解析し、ウニの発現パターンと比較した。

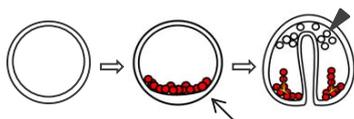


Figure 2: PMC と SMC

もう一つは、「再生」である。成体骨片が形成される変態期の胚は、幼生期に比べ入手が容易ではない。棘皮動物は高い再生力をもつことから、再生における骨片形成に着目した。成体骨片の形成・再生を比較し、共通の機構を発見することで、形成機構の研究への道標になる可能性がある。幼生骨片形成において遺伝子制御ネットワークの活性化に不可欠であり、成体骨片形成にも関与していると考え

られている *alx1* 遺伝子の発現解析を、再生中のヒトデ腕で行った。

### 材料

ヒトデ綱のイトマキヒトデ *Asterina pectinifera* は青森県浅虫、千葉県館山、茨城県鹿嶋で、クモヒトデ綱のスナクモヒトデ *Amphipholis kochii* は北海道虻田、富山県氷見で採集した。

### 結果および考察

(1) 間充織化と骨片形成の関連 *Aksnail* をスナクモヒトデから、*Apsnail* をイトマキヒトデから単離し、最尤法を用いた系統解析から、ウニの *snail* のオーソログであることが証明された。幼生骨片形成が始まる後期原腸胚において、Whole-mount in situ hybridization (WISH) によって遺伝子発現解析を行ったところ、*Aksnail* は PMC での発現が確認された。これはウニにおいて、骨片形成マトリックスタンパク質の分泌が始まる時期である。このことから、クモヒトデにおいても *snail* が骨片形成に関与していることが示唆された。ヒトデにおける発現は現在確認されていない。今後は、PMC や SMC の形成時における *snail* の発現を解析することで、間充織細胞の形成機構の違いを考察する。

(2) 再生 まず処理後何日で骨片の再生が起こるかを確認するために、再生芽を切りだし、光学顕微鏡で再生の様子を観察した。イトマキヒトデ成体の腕先端を切断し、生物顕微鏡で再生の様子を観察した。処理後 1 日で腕先端のみで筋肉の収縮が観察され、処理後 3 日で切断面が表皮に覆われた。その後一週間観察を続けたが、腕内部は白い組織に満ち骨片が見えず、表皮周辺では再生部と未処理部の区別が困難であった。そのため、処理方法を反口側の表皮・表皮下の骨片を削ぎ落とす方法に変更した。この変更により、再生芽の切りだしが容易になった。処理後 1 3 日で再生部を切り出し光学顕微鏡で観察したところ、処理後すぐには見られなかったはしご状の骨片が確認された。ヒトデ腕先端においてははしご状の骨片が存在するのは表皮下のみであるため、再生により生じた骨片であることが示された。処理後 1 3 日で骨片の再生が起こることが確認されたため、腕先端を切断し、WISH により遺伝子発現解析を行った。まず再生部を含まない切断片において、骨片形成マーカである *carbonic anhydrase* が発現していた。よって成体骨片の形成がおこっていると考えられたが、*alx1* の発現は観察されなかった。次に処理後一週間、二週間の再生部を含む切断片において *alx1* の発現を確認したが、観察されなかった。以上から、成体骨片には代謝、形成、再生の三つの系が存在することが示唆された。

# 脊椎動物形態視の進化的起源 —ナメクジウオ・ヤツメウナギの神経発生から—

鈴木 大地 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 和田 洋 (生命環境科学研究所)

## 背景および目的

形態視、すなわち物体の形状を認識する視覚機能の獲得は、カンブリア紀における動物形態の爆発的多様化の引き金になったと言われている(光スイッチ説)。脊椎動物の系統においても、形態視の獲得と、捕食者としてのボディプランや脳機能との関連が議論されてきた。

形態視の実現には、レンズを備えたカメラ眼のような目の構造や、網膜から特定の脳領域への位置特異的な神経投射等が必要である。脊椎動物の主要動物群であり、形態視をもつ我々顎口類では、胚発生期にカメラ眼を形成し、網膜と中脳視蓋領域で Eph/ephrin 等の軸策誘導分子が発現勾配を形成して、網膜から伸長する視神経が位置特異的に視蓋へ投射する。

ヤツメウナギは脊椎動物で最初期に分岐した無顎類に属し、顎や対鰭を欠き一生脊索を保持する等の祖先的な特徴を有する。またアンモシート幼生から成体へと変態するが、この幼生は濾過摂餌・内柱・脊椎を欠く等の祖先的な特徴をより多く残している。眼も同様に、胚発生期は形態視のできない眼点様であるが成長・変態と共にカメラ眼に発達する。視神経もまた変態直前に、顎口類と同様の中脳視蓋への位置特異的な投射を形成することが先行研究で判明している。しかしながら、ヤツメウナギでの Eph/ephrin の発現、また胚発生期での視神経発生の詳細については未報告である。

また脊椎動物成立以前に分岐し、脊索動物共通祖先の形態に最も近いと言われている原索動物ナメクジウオは、カメラ眼をもたない。眼点様の前方眼が脊椎動物の眼の相同器官とされており、光感知程度の機能しか無いと考えられている。このナメクジウオの視神経投射部位は脊椎動物の中脳視蓋と相同であるとされてきたが、分子発生的見地からは中脳の存在が疑問視されており、視神経投射部位の脳領域化について詳細な解析が必要である。

本研究では、ナメクジウオ・ヤツメウナギにおける神経発生・Eph/ephrin の発現・脳領域化を調べ、顎口類と比較することにより脊椎動物形態視の獲得と視覚系の進化の解明を試みた。

## 材料および方法

サンプル: ヤツメウナギ胚はカワヤツメ *Lethenteron japonicum* を人工授精させ、Tahara (1988) に従いステージングした。変態直前のサンプルはスナヤツメ *L. reissneri* を採集して得た。ナメクジウオ幼生はヒガシナメクジウオ *Branichiostoma belcheri* を人工授精させたものを用いた。

神経トレース: ヤツメウナギ胚の眼胞領域を rhodamin-dextran により標識して視神経をトレースし、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

免疫染色・in situ hybridization: 既存のプロトコルを用い、適宜 Whole-mount および切片で標的タンパク・mRNA を検出した。

## 結果および考察

ヤツメウナギ胚のアセチル化チューブリンに対する免疫染色の結果、視神経形成は st.25 から st.26 にかけて開始されることがわかった。これは神経トレース実験によっても

確認された。また他の神経線維との位置関係から、この視神経の投射部位は中脳視蓋ではなく、間脳の視蓋前域と呼ばれる別の領域であることが判明した。中脳視蓋への投射は、st.30 以降のアンモシート幼生でも確認されなかった。

ヤツメウナギの Eph/ephrin の発現は、胚発生期では EphC のみが眼胞と間脳で見られ、勾配は見られなかった。一方変態直前期では、網膜で EphB が背腹、EphC が前後に勾配をもって発現していた。この発現勾配は、顎口類の初期発生での発現様式と類似していた。また中脳視蓋での EphB および EphC の発現も確認された。以上の結果と先行研究の知見から、ヤツメウナギの視神経は、胚発生期では間脳視蓋前域にのみ投射し、変態直前に網膜や中脳視蓋で Eph/ephrin が勾配をもって発現することで、顎口類と同様に、中脳視蓋へ位置特異的に投射することが示唆される。

ナメクジウオでは、アセチル化チューブリンに対する免疫染色と前脳マーカー遺伝子である Pax6 の発現の比較から、視神経投射部位が Pax6 発現部位と重なることが判明した。Pax6 は前脳(終脳・間脳)でのみ発現し、中脳では発現しないことから、ナメクジウオ視神経は、脊椎動物の間脳と相同な部位に投射していると考えられる。

以上から次のような形態視獲得のシナリオが推測される。脊索動物の共通祖先では、光感知を行う眼点様の眼から間脳相同領域への視神経のみを有していた。ナメクジウオ分岐後、脊椎動物の共通祖先で中脳という新しい脳領域を獲得した。ヤツメウナギ型の生活史をとるこの祖先は、胚・幼生期での視神経の投射は間脳視蓋前域に限られていた。しかし変態直前にカメラ眼と中脳視蓋を発達させ、網膜や中脳視蓋で Eph/ephrin 等の軸策誘導分子の発現勾配を形成し、新生した視神経を中脳視蓋へ誘導するようになった。これにより中脳という新規脳領域での位置特異的な視神経投射を実現し、形態視を獲得したのである。

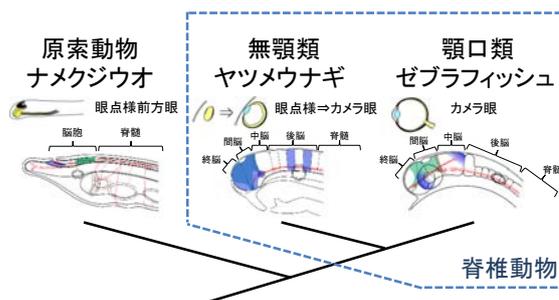


Figure 1: 系統関係と眼・脳の形態

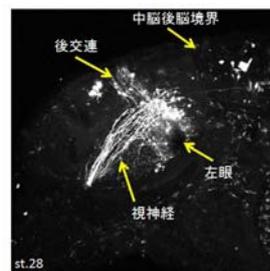


Figure 2: ヤツメウナギ胚右眼の視神経トレース

## 二枚貝はどのように2枚の殻を獲得したか? ~二枚貝特有の卵割パターンを誘導する極性因子~

村上 佳菜 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 和田 洋 (生命環境科学研究科)

### 背景および目的

ホタテにカキ、ムール貝。これらは軟体動物門のなかの二枚貝綱に含まれ、背側に2枚の貝殻をもっている。一方、軟体動物の多くは背側に貝殻を1枚しかもっておらず、これが祖先的形質であると考えられている。では、二枚貝はどのようにして新たに2枚の貝殻を獲得したのだろうか?

軟体動物は初期発生においてらせん卵割を行う。一般的に、らせん卵割は不等分裂で、その方向は一定である。そしてこの分裂で生じる植物極側の娘割球は、動物極側のそれよりも大きくなる。例えば殻が1枚のサザエやアワビなどの腹足綱では、割球1Dの分裂の結果、植物極側の2Dが最大となる (Figure1 左)。しかし二枚貝では、動物極側の2d (X) が最大となることがわかっている (Figure1 右)。また、このXは、この後らせん卵割とは方向の異なる不等分裂をし、その後、左右に等分裂する。こうしてできた2つの細胞それぞれが左右の貝殻をつくる貝殻腺に分化することが確認されている。つまり、祖先的には1つだった貝殻腺に分化する細胞が、二枚貝では特徴的な細胞分裂によって2つになったため、二枚貝は新たに2枚の殻を獲得したのである。

そこで、本研究では、後に貝殻腺に分化するD系譜割球における二枚貝特有の細胞分裂の仕組みを明らかにすることを目的とした。

### 方法

サンプル・・・二枚貝の一種ムラサキイコガイ *Septifer virgatus* の成熟個体から人工授精によって受精卵を採取し、以下の実験に使用した。

割球単離実験・・・二枚貝特有の卵割は、その割球に内在的なものによって引き起こされるのか、それとも他の周りの割球からの外在的なものによって引き起こされるのか調べるために、割球DとXを単離し、その後の分裂パターンを観察した。

aPKC 抗体染色・・・ホヤやショウジョウバエなど多くの生物において極性タンパク質 aPKC は、紡錘体を引き寄せることなどを通して、不等分裂を制御している。本研究では、aPKC を、紡錘体を構成するβチューブリンとともに抗体染色することにより、二枚貝における卵割時の aPKC の局在と分裂の方向の関わりを調べた。

βカテニンアゴニストの処理・・・ゴカイや線虫などの前口動物においてβカテニンは、不等分裂で植物極側に生じる大きい娘割球には核に局在するが、動物極側に生じる小さい娘割球では分解されるため少ないことがわかっている。本研究では二枚貝の受精卵にβカテニンのアゴニストである Alsterpaullone、1-Azakenpaullone を処理して、その後の表現型を観察した。

### 結果および考察

割球単離実験・・・割球Dのみを単離しても、1Dの分裂で動物極側に生じるXが、植物極側に生じる2Dより

大きくなるという分裂パターンが再現された。また、Xのみを単離した場合も、X<sup>2</sup>が生じるところまではX特有の分裂パターンを再現することができた。これらは、二枚貝特有の分裂パターンを決める機構は、それらの割球に内在的に存在するという可能性を示している。しかし単離によるダメージのせいか、途中で発生が停止してしまったため、今後は実験条件を改善する必要がある。

aPKC 抗体染色・・・二枚貝では、2細胞期になる前に極葉が生じる。このとき、aPKC は極葉が生じる場所に局在していた。第三卵割時の割球Dでは、aPKC は紡錘体の傾きより、小さい割球1dが生じる側に局在していた。第4卵割時の割球1Dでは、紡錘体の傾きより、小さい割球2Dが生じる面に局在していた。これらより、aPKC は不等分裂時に小さい方の娘割球が生じる面に局在しているといえる。

βカテニンアゴニストの処理・・・8~32細胞期の間、正常胚では不等分裂する割球の一部が、処理胚では等分裂していた。受精から15時間後、正常胚はトロコフォア幼生になり、発達した繊毛環をもっていた。一方処理胚では、繊毛環の位置が正常胚に比べ、動物極側にシフトしており、繊毛細胞の数が減少していた。これはβカテニンが動物極側にも局在したことで、動物極的な運命をもっていた細胞が植物極的な運命に変更されたことを示唆する。これらより、二枚貝においてもβカテニンの局在が不等分裂に関わっており、さらにβカテニンは植物極的な運命を導くということが示唆された。

本研究により、二枚貝特有の分裂パターンは、割球1DやXに内在的に存在する因子によって引き起こされており、極性因子 aPKC とβカテニンの局在が二枚貝においても不等分裂に関係していることが示唆された。殻が1枚の種では共通であるこれら極性因子の局在パターンが、二枚貝においては変更されたため、分裂パターンに変化が生じ、その結果貝殻腺に分化する細胞が2つになったと考えられる。

現在は、Xの分裂方向とaPKCの局在の関係についてまだはっきりした結果がでていないため、今後はそちらを重点的に調査するつもりである。また阻害実験などにより、これら極性因子のはたらきをさらに詳細に調べたり、aPKCとは拮抗的に働くことが知られている PAR1、PAR2 といった極性因子についても同様の調査を行い、二枚貝特有の分裂パターンの仕組みを明らかにする必要がある。

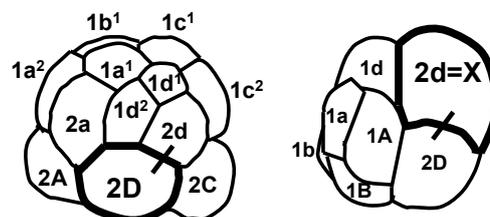


Figure 1: らせん卵割 左、腹足綱 右、二枚貝綱

## VEGF・FGF シグナリングから見る棘皮動物幼生の形態進化

守野 孔明 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 和田 洋 (生命環境科学研究科)

### 背景

棘皮動物は後口動物の一群で、ウニ・ヒトデ・ナマコ・クモヒトデ等の動物からなる。その幼生形態は、大きく分けると骨片を持たないオーリクラリア幼生と、骨片に支えられて長く伸びた腕を持つプルテウス幼生の2種類に分けられる。ウニとクモヒトデがプルテウス型の幼生を持ち、非常に類似した形態を持つ。しかし、ウニとクモヒトデが姉妹群でないと考えられることから、それぞれ独立にオーリクラリア型の幼生から類似したプルテウス型幼生を進化させてきたことが示唆されている。オーリクラリア型からプルテウス型への進化には幼生骨片を形成し、それを腕と協調して伸長させることが必要である。幼生骨片の獲得を引き起こした分子進化のシナリオとして、成体骨片で発現する *Alx1* という遺伝子が、幼生期にも発現するようになり、幼生骨片を形成する間充細胞を獲得した、という説が有力である。しかし、ウニにおいて骨片形成間充細胞は、それ自身では骨片を形成、伸長させる事が出来ず、外胚葉からのシグナルを必要とする。つまり、骨片形成間充細胞の獲得だけではプルテウス形態の獲得には不十分であった可能性がある。ウニでは、骨片の形成と伸長を担うシグナルとして VEGF 及び FGF シグナリングが知られている。しかし、このシグナル経路に関して、収斂進化のメカニズムを考える上で、ウニのプルテウスとの比較対象になるクモヒトデや、祖先的な状態を考えるのに重要なヒトデ、ナマコ等他の棘皮動物での知見はない。

そこで本研究では、スナクモヒトデ *Amphipholis kochii*、イトマキヒトデ *Asterina pectinifera*、ニセクロナマコ *Holothuria leucospilota* における VEGF、及び FGF シグナリング関連遺伝子を単離し、その時空間的な発現パターンを解析し、それぞれを比較した。これにより、棘皮動物幼生に見られるプルテウス幼生の収斂進化の背景に、どのような分子進化があったかということを考察する。

### 手法

イトマキヒトデから VEGF、VEGF レセプター (VEGFR)、FGF レセプター 1 (FGFR1) を、ニセクロナマコから VEGFR、FGFR1 を、スナクモヒトデから VEGFR を、それぞれの cDNA から単離し、それを鋳型として RNA プロンプを作成し、in situ hybridization 法により発現パターンを確認した。また、イトマキヒトデの VEGF は、Real-Time qPCR 法により、発現量を計測した。

### 結果

1. VEGF イトマキヒトデにおいて、in situ hybridization による VEGF の発現は確認されていない。RealTime-qPCR によって、未受精卵から変態までの各発生段階の発現量を測定したところ、初期発生頃の発現はほとんど検出できず、5日胚 (ピピンナリア幼生) 以降で安定して検出可能な発現量が確認された。以降は、発生段階が進むにつれて、発現量は増加して行き、変態間近の後期ブラキオラリア幼生で最大となった。すなわち、発生初期から強い発現が見られるウニと異なり、イトマキヒトデにおいて、VEGF は初期胚では発現が検出できないほど弱く、成体骨片が形成される後期の幼生で強くなるという事が明らかになった。

2. VEGFR イトマキヒトデにおいて VEGFR は発生の初期には発現は確認されず、ブラキオラリア幼生で、成体の骨片が形成される成体原基及び水腔葉での発現が確認された。ニセクロナマコの VEGFR は、原口付近の数個の成体骨片を形成する間充細胞での発現が見られた。スナクモヒトデの VEGFR は、初期胚の骨片形成間充細胞で発現が観察された。よって、プルテウスでは VEGFR は幼生骨片間充細胞で初期から発現があるのに対し、オーリクラリア型の幼生を示す種では成体骨片の形成時期まで発現がない事が明らかになった。

3. FGFR1 イトマキヒトデにおいて、初期胚では植物極板で、ピピンナリア幼生では、右体腔と咽頭内胚葉での発現が見られた。ニセクロナマコにおいては、原腸の先端での発現が確認された。いずれの骨片形成や腕の伸長に関係すると考えられる場所での発現は観察されなかった。

### 考察

イトマキヒトデの VEGF/VEGFR が初期の幼生期には発現しないのに対して、クモヒトデの VEGFR は骨形成間充細胞で初期から発現するという結果が本研究より得られた。これをウニのプルテウスでも VEGF/VEGFR が発生初期から骨形成間充細胞で発現することとあわせて考えると、プルテウス形態の獲得に VEGF/VEGFR の発現の初期発生への移行が必要であったことが推測される。先行研究により、VEGFR はウニにおいて *Alx1* の下流であること、ヒトデ、クモヒトデ、ナマコでも *Alx1* の発現部位は今回得られた VEGFR の発現パターンと同じく骨形成間充細胞で発現している事が明らかになっている。このことから、棘皮動物幼生で VEGFR は *Alx1* の下流という制御関係は保存されていることが示唆される。よって、受容体側の発現の移行は、先行研究で示されていた *Alx1* の発現の移行に伴って起こったものであることが推測される。しかし、外胚葉で発現する VEGF リガンドは、ウニではレセプター側とは別に制御されている。よって発現の移行も、独立に起こったであろう。つまり、従来考えられていた、「*Alx1* の発現の移行」だけでは骨片の形成と伸長、ひいてはプルテウス形態の進化には十分でなく、それに加えて外胚葉のシグナル分子の発現が後期の幼生から初期幼生に移行することが必要であったことが本研究から示唆される。

FGF シグナリングについては、少なくとも FGFR1 は、オーリクラリア型幼生において骨片の形成に働いていないことが推察される。今後は、FGF リガンド及びウニでリガンドと協調した発現パターンを示す FGFR2 の発現と機能を他の棘皮動物で解析して行く。

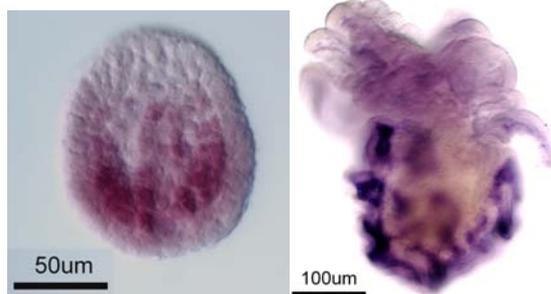


Fig1: VEGFR の発現 (左:スナクモヒトデ, 右:イトマキヒトデ)

## 薬剤標的分子同定に向けた多剤超感受性酵母の作成

太田 優 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 白井 健郎 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

酵母は遺伝解析が容易な真核生物のモデルであり、薬剤の作用機構解析や標的分子同定においても広く用いられている。しかし動物細胞と比べて、酵母は多くの薬剤に耐性を示し、このことが解析を行なう上で大きな障害となる。そのため薬剤排出ポンプの転写因子である *PDR1*、*PDR3*、及びエルゴステロール合成遺伝子である *ERG6* (または *ERG3*) 遺伝子を破壊した三重遺伝子破壊株がよく用いられている。しかしながら、一般に *erg6* (または *erg3*) 遺伝子破壊株では多くの薬剤に対して感受性の増加が見られる一方で、増殖速度の低下や形質転換効率の低下など様々な弊害が見られ、遺伝学的解析を用いた薬剤の標的分子同定などを行うには適していない。

そこで当研究室では遺伝学的解析に適した多剤超感受性酵母の作成を目指し、これまでに細胞膜上に存在する薬剤排出ポンプ 8 つ、及びそれらの主要な転写因子 4 つを破壊した 12 遺伝子破壊株を作成した。

今回、作成した 12 遺伝子破壊株の増殖速度、薬剤感受性及び、遺伝学的解析を行う上で必須となる孢子形成能の検討を行い、作成した株の有用性を検討した。

## 材料および方法

## 材料:

野生株、及び *erg6* 破壊株

- BY4741  
*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*
- BY4742  
*MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*
- dTC079  
BY4741 *erg6Δ::CgURA3*

## 12 遺伝子破壊株

- dTC061  
BY4741 *pdr1Δ0 pdr3Δ0 pdr8Δ0 yrr1Δ0 pdr5Δ0 snq2Δ0 yor1Δ0 pdr10Δ0 pdr11Δ0 pdr12Δ0 pdr15Δ0 aus1Δ0*
- dTC062  
BY4742 *pdr1Δ0 pdr3Δ0 pdr8Δ0 yrr1Δ0 pdr5Δ0 snq2Δ0 yor1Δ0 pdr10Δ0 pdr11Δ0 pdr12Δ0 pdr15Δ0 aus1Δ0*

## 方法 1 : 細胞増殖試験

それぞれの株を YPD 液体培地で対数増殖期まで培養し、1 時間毎に OD<sub>600</sub> を測定した。

## 方法 2 : 薬剤感受性の検討

0.004% SDS を含む寒天中に、酵母を OD<sub>600</sub>=0.05 となるようにまき込んだ YPD 固体培地を作成し、その上に様々な薬剤を浸みこませたペーパーディスクを置いて薬剤感受性を観察した。また、OD<sub>600</sub>=0.1 となるように YPD 液体培養した細胞に薬剤を 1% 処理し、様々な薬剤の IC<sub>50</sub> を測定した。

## 方法 3 : 形質転換効率の測定

酵母を OD<sub>600</sub>=0.4 となるように YPD 液体培養した細胞にリチウムアセテート法を用いて 1 μg のプラスミド pRS313 を形質転換した。30 °C で二日間培養後、生えてきたコロニー数を計測した。

## 方法 4 : 孢子形成効率の検討

2 倍体細胞を孢子形成培地に広げ、30 °C で二日、25 °C で五日培養した後、孢子形成効率を測定した。

方法 5 : *MKT1*、*RME1* 遺伝子への変異導入

遺伝子破壊用プラスミド pFA6a-CgURA3 を鋳型に PCR を行い、目的遺伝子の破壊 DNA 断片 (*CgURA3* マーカーを含む) を作製した。作製した断片をリチウムアセテート法により変異導入部位の近くに挿入し、ウラシルを含まない選択培地上で選択した後、Colony PCR によってマーカー遺伝子の導入を確認した。

次に、PCR によって作製した変異導入断片を用いてマーカーの抜き出しを行い、5-FOA を含む培地上で選択した。その後、Colony PCR によってマーカーの抜き出しを確認し、シークエンスにより変異の導入を確認した。

## 結果および今後の展望

最初に薬剤感受性、及び増殖速度について検討した。*erg6* 遺伝子破壊株では様々な薬剤に対して感受性の増加が見られたが、増殖速度の低下や様々な弊害が見られた。一方、12 遺伝子破壊株では増殖速度や形質転換効率などにほとんど影響を与えず、様々な薬剤に対して感受性の増加が見られた。

次に遺伝学的解析を行う上で必須となる孢子形成能について検討した。親株の二倍体 (BY4741 × BY4742) においても孢子形成能が低いことが報告されていたが、12 遺伝子破壊株の二倍体 (dTC061 × dTC062) ではさらに孢子形成効率の低下が見られ、遺伝学的解析を行うことが困難であることがわかった。そこで孢子形成能に関与することが報告されている *MKT1*、*RME1* 遺伝子<sup>1)</sup> に変異を導入して、孢子形成能の改善を行ったところ、12 遺伝子破壊株の二倍体においても遺伝学解析に十分な孢子形成が確認できた。

以上の結果から、今回作成した高い孢子形成能を持つ多剤超感受性酵母は、薬剤の標的分子同定における有用なツールになるだろうと考えられる。

## 参考文献

- 1) A. M. Deutschbauer, and R. W. Davis. "Quantitative trait loci mapped to single-nucleotide resolution in yeast." *Nature Genetics*, **37**, 1333 – 1340 (2005)

# カプサイシンによる腸管上皮タイトジャンクション開放メカニズムの解析

塩原 智子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 臼井 健郎 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

核酸・ペプチド・抗体などのバイオ医薬品の開発は、昨今のゲノム・プロテオーム創薬の進歩に伴って飛躍的に進んでおり、既に新薬の30%を占めるとともに、ますます増加傾向にある。しかしバイオ医薬品は生体膜透過性に乏しい等の問題をはらんでおり、患者に対して注射などの侵襲的投与方法が用いられている。このような方法は肉体的にも経済的にも患者の負担が大きく、QOL (Quality of Life) の低下につながるため、経口・経皮・経肺といった、患者に苦痛を強いることのない非侵襲的投与方法の開発が待望されている。

バイオ医薬品の経口・経皮・経肺での投与方法開発において解決すべき問題の一つに、消化管・皮膚・肺の最外部の細胞層である上皮細胞層での低吸収率が挙げられる。上皮細胞はタイトジャンクション (Tight Junction: TJ) と呼ばれる隣接した細胞間隙を接着する構造によって互いに密着したシート状の構造をとり、上皮細胞間の隙間を介した物質の自由な移動を防ぐ、いわゆるバリア機能を担っている。このようなバリア機能は体外からの異物の侵入を防ぐとともにバイオ医薬品の吸収の妨げとなっているが、一方でTJの開閉を制御することができれば、上皮細胞間隙からのバイオ医薬品吸収が可能になると考えられる (下図)。

このような状況の下、筑波大の磯田らはCaco-2細胞 (ヒト大腸がん由来の上皮細胞) を用いた腸管上皮モデルにおいて、トウガラシ辛味成分であるカプサイシンがTJを開放し、物質透過性を亢進させることを見いだした<sup>1)</sup>。この透過性亢進は可逆的であることから、カプサイシンはバイオ医薬品の非侵襲的投与方法を可能にする吸収エンハンサーとしての応用が期待できる。

そこで我々はカプサイシンによるTJ開放機構の解析を進めている。これまでの解析により、カプサイシンによる

TJ解放には細胞内のカルシウム濃度の上昇や、アクチン脱重合タンパク質であるコフィリンの活性化、TJ構造を細胞内から支持するアクチンの変動が関与することが明らかとなっている<sup>2)</sup>。今回、これらの先行研究結果を踏まえ、カプサイシンによるTJ開放の、より詳細なメカニズムの解明を目的として研究を行った。

## 材料および方法

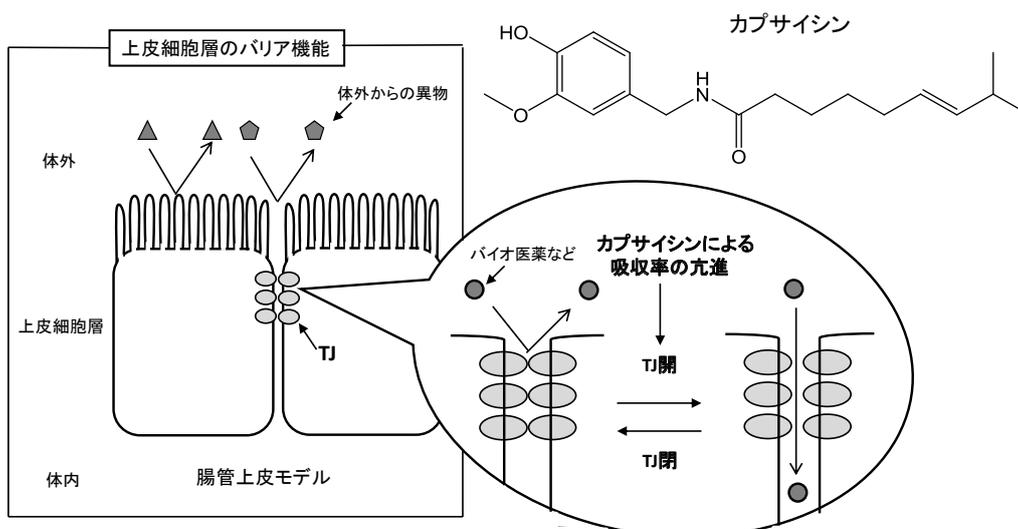
Caco-2細胞よりも単層形成し易く、遺伝子導入効率が良いMDCK細胞 (イヌ腎臓尿細管上皮細胞) を上皮細胞層のモデルとして用いて解析を行なった。まずMDCK細胞に単層を形成させ、カプサイシン刺激後に細胞固定、蛍光染色を行ない、TJやアクチンの構造変化を検討した。次にウエスタンブロットによって関連タンパク質の量的変化を検討した。

## 結果および今後の展望

詳細は発表会にて紹介する。

## 参考文献

- 1) H. Isoda, J. Han, M. Tominaga and T. Maekawa. "Effect of capsaicin on human intestinal cell line Caco-2." *Cytotechnology*, **36**, 155 – 161 (2001)
- 2) Y. Nagumo, J. K. Han, A. Bellila, H. Isoda and T. Tanaka. "Cofilin mediates tight-junction opening by redistributing actin and tight-junction proteins." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **377**, 921 – 925 (2008)



## 微小管-MAPs 結合を阻害する薬剤の探索

高橋 卓人 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 臼井 健郎 (生命環境科学研究科)

### 背景および目的

微小管は細胞骨格の一種であり、チューブリンと呼ばれる蛋白質が常に重合・脱重合を繰り返して形作られる非常に動的な構造体である。微小管は、間期では細胞質内で網目状の構造をとっており、細胞内における小胞輸送等を担っている。また、細胞分裂の際には網目状構造が崩壊して紡錘体を形成し、染色体の移動に重要な役割を果たすなど、様々な生命現象に関与している。

このような激的な構造変化は微小管の活性のみで行われているわけではなく、MAPs (Microtubule-associated proteins) と呼ばれる多くの蛋白質が関与していることが知られている。細胞内における微小管の重合・脱重合の制御に関わる MAPs として、微小管の安定化を行なっている Tau や MAP1、MAP2、MAP4 などが、逆に微小管を不安定化する MAPs として stathmin や KCM などが挙げられる。このような MAPs と微小管との結合を阻害または安定化など、結合状態に影響を与える小分子化合物は微小管構造を不安定にし、細胞分裂阻害を引き起こす可能性が考えられる。実際このような活性を持つ化合物として、現在までに BisANS (5,5'-Bis[8-(phenylamino)-1-naphthalenesulphonate]) や Discodermolide が報告されており、それぞれ MAPs 依存的微小管重合を阻害したり<sup>1)</sup>、チューブリン上の Tau と同一の結合部位に結合することで、Tau とチューブリンとの結合を阻害することが報告されている<sup>2)</sup>。また、微小管モーター蛋白質も広い意味では MAPs にあたり、細胞内での物質輸送などに関与している。特に Eg5 (KSP) は微小管上を+端方向に移動するキネシンモーター蛋白質の一つであり、二つの中心体から伸びる微小管上を移動することで紡錘体形成に関わっている。Eg5 阻害剤は単極紡錘体形成を引き起こすことにより細胞分裂を停止させるため、新しいタイプの抗癌剤として世界中で開発が進められている<sup>3)</sup>。

以上の薬剤のように、MAPs と微小管の結合を阻害する新たな薬剤は抗癌剤となる可能性がある。そこで新たなシード化合物探索を目的に、微小管-MAPs 結合を阻害する薬剤のスクリーニング系構築、及び化合物スクリーニングを行なった。

### 材料および方法

#### 1. GFP 融合 Tau 蛋白質 (GFP-Tau) の精製

GFP-Tau (EGFP 融合 Tau 微小管結合ドメイン) を eXact タグ融合蛋白質として大腸菌発現させ、eXact カラムを用いてタグの無い形で精製した。

#### 2. Eg5 の精製および蛍光標識 Eg5 の作成

ヒト Eg5 モータードメイン (HsEg5(1-368)) を eXact タグ融合蛋白質として大腸菌発現させ、eXact カラムを用いてタグの無い形で精製した。次に精製した Eg5 と CF405M succinimidyl ester (Biotium 社) を混合後、室温で 1 時間攪拌し、蛍光標識を行なった。反応を Lysine を加えて停止させた後、PD-10 カラムを用いて未反応の蛍光色素を除去することで、蛍光標識 Eg5 を分離した。

#### 3. 微小管-GFP-Tau および蛍光標識 Eg5 共沈実験

Taxol を用いて重合させた微小管と GTP、GFP-Tau および蛍光標識 Eg5 を混合し、37 °C で静置した。30 分後、超遠心により重合した微小管を含む沈殿と上清とに分け、SDS-PAGE により GFP-Tau および Eg5 が微小管との結合能を維持しているかを検討した。

#### 4. ビオチン化チューブリンの作成

チューブリンを GTP 存在下、37 °C で重合させたのち、Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific 社) と反応させた。Sodium glutamate を加えて反応を停止させた後、重合・脱重合を繰り返し、活性のあるビオチン化チューブリンを作成した。

#### 5. アビジン-ビオチン結合を利用したスクリーニング系の構築

96-well プレートにアビジンを固着させ、そこに taxol を用いて重合させた微小管 (100 μg; ビオチン化チューブリン: チューブリン = 1 : 200) を加え、プレートに微小管を結合させた。各 well の溶液を除いた後、GFP-Tau と蛍光標識 Eg5 および薬剤を加えた。各 well を wash した後、測定用の buffer を 100 μl/well 加えマルチラベルプレートカウンター (Perkin Elmer, Wallac 1420 ARVO MX) を用いて蛍光強度を測定した。

### 結果および今後の展望

詳細は発表会にて紹介する。

### Reference

- 1) M. Mazumdar, P. K. Parrack, K. Mukhopadhyay, and B. Bhattacharyya. "Bis-ANS as a specific inhibitor for microtubule-associated protein induced assembly of tubulin." *Biochemistry*, **31**, 6470-6474 (1992).
- 2) S. Kar, G. J. Florence, I. Paterson, and L. A. Amos. "Discodermolide interferes with the binding of tau protein to microtubules." *FEBS Lett.*, **539**, 34-36 (2003)
- 3) D. M. Duhl, and P.A. Renhowe. "Inhibitors of kinesin motor proteins—research and clinical progress." *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **8**, 431-436 (2005)

# 放線菌由来新奇オキシドレダクターゼの機能構造解析に向けて —大量発現と精製の試み—

高須 祐輔 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 田中 俊之 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

オキシドレダクターゼは、酸化還元反応によって物質代謝やエネルギー生産を担う酵素の総称で、機能や構造は生物種によって大きく異なる。今回ターゲットとしているオキシドレダクターゼは、ある放線菌が産生する生理活性物質の生合成経路に関与しており、アミノ酸配列の相同性検索を行った結果、FADを補酵素とするオキシドレダクターゼの一種であるコレステロールオキシダーゼと比較的近縁で、似たような機能を持つ可能性があることが分かった。本研究では、この新奇オキシドレダクターゼの機能と構造を解析し、関与している生合成経路を解明することをテーマとしている。今回、このタンパク質の大量発現系と精製方法の確立を試みた。

## 方法および結果

### 1. 目的タンパク質のクローニングと大量発現

放線菌ゲノム DNA から、PCR によって目的タンパク質をコードする DNA 断片を得た。この際、制限酵素サイトを両末端に導入した。この DNA 断片を、CloneSmart LCamp Blunt Cloning Kit(Lucigen)を用いて、pSMART LCamp vector に挿入し、クローニングした。このプラスミドを制限酵素で切断し、目的の DNA 断片を pET-15b vector(Novagen) に挿入した。これを用いて形質転換した大腸菌 (BL21-CodonPlus(DE3)-RIL(Stratagene)) を培養し、十分に増殖した後、IPTG を加えて目的のタグ融合タンパク質を大量発現させた。回収した大腸菌を破碎し、超遠心によって上清と沈殿に分け、それぞれを SDS-PAGE にかけたところ、目的のタグ融合タンパク質が可溶化していないことが分かった。目的タンパク質の DNA 断片を、低温での発現が可能で、シャペロンを可溶化タグとする pCold TF vector(Takara Bio) に挿入し直し、大量発現させたところ、可溶化することが確認できた。

### 2. 目的タンパク質の精製

シャペロンの上流に存在する His タグが Ni イオンに吸着する性質を利用し、Ni-NTA superflow(QIAGEN) カラムを用いて、上清から目的のタグ融合タンパク質を分離した。しかし、樹脂への結合力が弱かったため、素通り画分を同カラムに供する操作を、さらに 3 回行う必要があった。目的物を含む溶出画分のバッファを、透析によって、タグを切断するプロテアーゼの反応に適したものに交換し、Thrombin あるいは Factor a でタグの切断を試みた。その結果、予想される目的タンパク質あるいはタグより小さい分子量のものが時間の経過と共に出現したこと、また目的タンパク質とタグタンパク質の分子量が近く、その後の分離の確認が難しいことから、発現系を変更することにした。

### 3. 発現系の変更と精製の検討

pET-41b vector(Novagen) は、GST との融合により目的タンパク質を可溶化する可能性がある、切断後のタグタンパク質と目的タンパク質の分子量の差が大きい、GST を特異的に結合するカラムを用いることにより精製効率が上がる可能性がある、他のプロテアーゼで切断することがで

きるといった利点があることから、このベクターに目的タンパク質を挿入し、タンパク質発現を試みたが、可溶化しなかった。そこで、上流の GST 配列と共に目的タンパク質の配列を切り出し、pCold TF vector に挿入した。その結果、予想した通り、可溶化したタグ融合タンパク質が得られたため、これを今後の精製実験に用いることにした。大量発現し、GST を特異的に結合するカラムを用いて精製を行ったが、この場合も樹脂への結合力が弱く、同操作をもう一度行う必要があった。目的物を含む溶出画分のバッファを交換し、Thrombin あるいは Factor a でタグの切断を試みたが、目的タンパク質そのものが分解されていることが分かった。より特異性の高い Enterokinase でも同じ結果となった。

次に、目的タンパク質のみを pCold TF vector に挿入した発現系に戻って、HRV 3C protease によるタグの切断を試みた。その結果、目的タンパク質が分解されることなく、タグを切断することができた。しかし、このプロテアーゼによる切断では、還元剤が切断を促進するものの、速度が遅く切断に数日を要し、加えるプロテアーゼの量や添加する回数を増やしても、約 1~2 割のタグ融合タンパク質が切断されずに残った。

タグの切断後、His タグと Ni イオンの結合性、タンパク質の pI や分子量の違いに着目し、Ni-NTA superflow カラム、陰イオン交換カラムやゲル濾過カラムを用いて精製を試みたが、目的タンパク質をきれいに精製することができなかった。pCold TF vector の説明書には、目的タンパク質の可溶性を改善することで、タグタンパク質と目的タンパク質の分離が促進されるとあったため、界面活性剤を添加して精製を試みたが、成功には至っていない。また、タグを切断した目的タンパク質が徐々に沈殿すること、ゲル濾過カラムでは目的タンパク質が計算上の分子量より大きいタンパク質として挙動することが分かった。

## 考察および今後の展望

目的タンパク質は、可溶性が低く、また多量体として存在する可能性が高いと考えられる。また、His タグの有無や pI と分子量の違いを利用して、タグ融合タンパク質とタグタンパク質を目的タンパク質から分離できないことから、これらの間に何らかの相互作用が存在する可能性が否定できない。今後、以下のように問題点を解決し、大量発現系と精製方法を確立する予定である。

### 問題点 1. タグの切断

プロテアーゼの量や添加する回数を増やしても、未切断のタグ融合タンパク質が残ることから、一部のタグ融合タンパク質が正しくフォールディングしていない可能性がある。したがって、ジスルフィド結合の形成を助け、正しいフォールディングを促進する大腸菌でタンパク質を発現させる。

### 問題点 2. タグタンパク質の分離

目的タンパク質の可溶性を改善するために、界面活性剤の種類や濃度、添加するタイミングを変更する。また、ハイドロキシアパタイトや陽イオン交換樹脂など、これまで用いたカラムと性質が異なるカラムでの分離を試みる。

## アミノ酸新規変換経路の探索

千野 貴裕 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小林 達彦 (生命環境科学研究科)

### 背景と目的

全ての生物はアミノ酸を用い遺伝子産物であるタンパク質を作っている。そのためアミノ酸は人体の約20%を構成するタンパク質をつくる基本要素となっている。20種の基本アミノ酸以外のアミノ酸異性体の存在も報告され、ほ乳類においてはペプチド性ホルモンの構成成分として使われている。また、アミノ酸及びその誘導体はサプリメントとして注目されている有用物質でもあり、これらの多くは微生物を利用した発酵法でつくられている。本研究では、新規のアミノ酸変換産物及び新たな変換経路を探索し、解析することを目的とする。

### 方法と結果

微生物を培養し、遠心分離を行い上清を除去し、得られた菌体をリン酸緩衝液で洗浄した。再度遠心分離を行い、得られた菌体をビーズ式細胞破碎装置で破碎することにより調製した無細胞抽出液を用いて、アミノ酸を基質として反応を行った。その後、アミノ酸誘導体の生成の有無を簡易的な呈色反応により確認した。その結果、呈色を示すサンプルがいくつか確認された。現在、この呈色がアミノ酸誘導体によるものかどうかを種々の方法で解析中である。

### 今後の予定

アミノ酸誘導体の生成が示唆された場合には、本化合物を同定するとともに、本化合物への変換活性を有する酵素をタンパク質レベル、遺伝子レベルで解析する。その結果、新規酵素および新規変換経路の発見が期待できる。

## ニトリルヒドラターゼ活性化機構の解析

土居 志織 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小林 達彦 (生命環境科学研究科)

### 背景および目的

当研究室では以前よりニトリルの代謝に関して研究を行っている。ニトリルはシアノ基を持つ有機シアノ化合物の総称であり、一般的に高い毒性を有し、難分解性の化合物である。しかし、自然界にはニトリルを分解解毒できる微生物が存在する。微生物のニトリル代謝系には2種類存在することが知られている。1つ目は、ニトリラーゼによりニトリルを直接対応する酸とアンモニアにする系であり、2つ目はニトリルヒドラターゼにより、まず、ニトリルを水和してアミドに変換し、さらにアミダーゼによりアミドを加水分解し、酸とアンモニアに変換する系である。ニトリルヒドラターゼは、 $\text{Zn}$  のヘテロなサブユニットから構成されており、活性中心に金属を含む。鉄型とコバルト型の2種類のニトリルヒドラターゼが存在し、いずれの金属原子もサブユニットに存在する。どちらのニトリルヒドラターゼも培地中に金属を添加しなければ活性を示さないアポ酵素として生成し、「サブユニット中の(金属との配位に関わる)システイン残基のシステインスルフィン酸・システインスルフェン酸への酸化」、および「鉄あるいはコバルトの配位」という2つの翻訳後修飾を受け成熟化し、活性型のホロ酵素となる。コバルト型ニトリルヒドラターゼの成熟化に関しては、極く最近、当研究室において全く新しい翻訳後修飾機構であるセルフサブユニットスワッピングが発見された。これまで報告されている翻訳後修飾では、アポ酵素のサブユニットが直接翻訳後修飾を受けてホロ酵素が生成するが、セルフサブユニットスワッピングでは、修飾されたサブユニットがアポ酵素のサブユニットと置換することでホロ酵素が生成する。一方、鉄型ニトリルヒドラターゼの翻訳後成熟化機構は、コバルト型ニトリルヒドラターゼ翻訳後成熟化と全く別の機構と示唆されるが、未解明のままである。

### 方法および結果

本研究で用いる *Pseudomonas chlororaphis* B23 株は鉄型ニトリルヒドラターゼを持つ。遺伝子構造上、 $\text{Zn}$  サブユニットの順で構造遺伝子が並び、 $\text{Co}$  サブユニット遺伝子のすぐ下流に存在する約 50 kDa 以下のタンパク質がアポ酵素をホロ酵素に変換する能力を持つことが分かっている。しかし、本タンパク質は、コバルト型ニトリルヒドラターゼの成熟化に関わるタンパク質とは大きさが異なりアミノ酸レベルでの相同性も認められない。本タンパク質がどのように作用しているかを調べるために、DEAE-Sephacel などの各種クロマトグラフィー操作により現在精製しているところである。

### 今後の予定

本タンパク質は非常に不安定であり、大量に精製することが困難である。しかし、安定な状態で精製できるように様々な検討を行い、本タンパク質の諸性質を明らかにしていく予定である。

## 高分子量型ニトリルヒドラーゼに関する研究

鷲澤 結実 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小林 達彦 (生命環境科学研究科)

### 背景および目的

ロドコッカス・ロドクロウス J1 菌は、毒性の高いニトリル化合物を分解できる微生物である。本菌のニトリル分解代謝には二つの系が存在する。一つは、ニトリラーゼによりニトリルが直接カルボン酸とアンモニアに分解される系である。もう一つは、ニトリルヒドラーゼによりニトリルがアミドに加水分解され、さらにアミダーゼの働きによってカルボン酸とアンモニアに分解される系である。本菌のニトリルヒドラーゼには、高分子量型と低分子量型の二種類が存在している。どちらもこの二種類のサブユニットから構成されており、コバルトイオンを活性中心とする金属酵素である。低分子量型ニトリルヒドラーゼでは、遺伝子構造上、サブユニットの順で構造遺伝子が並び、サブユニット遺伝子のすぐ下流に存在する約 20 kDa 以下のタンパク質が翻訳後成熟化に関与する。極く最近、低分子量型ニトリルヒドラーゼの成熟化に関わる本アクセサリータンパク質は、翻訳後修飾されているサブユニットと複合体を形成し、この複合体中のサブユニットがアポ酵素のサブユニットと置換することでホロ酵素が生成することを本研究室で発見した。アポ酵素のサブユニットが修飾されるのではなく、修飾された同一サブユニットとの置換により翻訳後成熟化する報告例はなく、新規な翻訳後修飾機構であることからセルフサブユニットスワッピングと命名された。本研究では、本菌の高分子量型ニトリルヒドラーゼの生成機構を解明することを最終的な目的とした。

### 方法および結果

高分子量型ニトリルヒドラーゼ構造遺伝子のみ保持する発現プラスミドを (ニトリルヒドラーゼを生産しない) 他のロドコッカス属宿主に導入した場合には、高分子量型ニトリルヒドラーゼはコバルトをほとんど含まないアポ酵素として生成された。一方、構造遺伝子と (構造遺伝子下流の) アクセサリータンパク質遺伝子を一緒に保持する発現プラスミドを他のロドコッカス宿主に導入した場合、コバルトを含むホロ酵素が生成された。高分子量型ニトリルヒドラーゼも低分子量型ニトリルヒドラーゼと同様の (アクセサリータンパク質が重要な役割を果たす) セルフサブユニットスワッピング機構により翻訳後成熟化することが示唆された。

### 今後の予定

部位特異的変異法により変異体を構築し、本酵素の生成機構を明らかにしていく予定である。

# ユビキチン様タンパク質 NEDD8 を制御する新奇タンパク質の機能解析

上田 真也 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 智樹 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

タンパク質の翻訳後修飾にはリン酸化、アセチル化やメチル化などの官能基修飾反応以外に、タンパク質のユビキチン化というペプチド結合反応も知られている。ユビキチンは76個のアミノ酸から構成されるタンパク質で、ユビキチン-プロテアソーム分解系において、タンパク質翻訳後修飾因子として働き、環境ストレスやシグナル伝達に応じて細胞をダイナミックに制御する作用がある。ユビキチン化を触媒する酵素は、ユビキチン活性化酵素 (activating enzyme, E1)、ユビキチン結合酵素 (conjugating enzyme, E2)、ユビキチンリガーゼ (ubiquitin ligase, E3) から構成されている。このようなタンパク質のユビキチン化、あるいはユビキチン様タンパク質の付加はほぼ全ての細胞プロセスに関わっている。

E3 酵素には多くの種類があることが分かっており、特に Cullin 型の SCF 複合体は標的とする基質の多様性が高く、広く研究されている。そのような SCF 複合体の活性化には NEDD8 というタンパク質が必要であり、NEDD8 が SCF 複合体中の Cullin タンパク質と結合することで、基質のユビキチン化が促進されることが知られている。NEDD8 はユビキチン様タンパク質であり、ユビキチンとの相同性は57%と非常に高く、ユビキチン同様にタンパク質と共有結合する。NEDD8 経路の KO マウスでは胎生致死となること、更に、NEDD8 の反応経路が抗がん剤の標的となると最近の研究から、NEDD8 による SCF 複合体の活性制御が生体内において重要な機能をもつと推測される。しかし、その NEDD8 付加反応についてはまだ詳しい制御機構が明らかにされていない。近年では、NEDD8 を Cullin タンパク質から解離させる反応にシグナロソームというタンパク質複合体が関わっている報告されているが、その制御機構等に関して詳細な分子メカニズムはまだ明らかにされていない。更に、ユビキチンを認識するタンパク質が多く知られているのに対し、NEDD8 を認識するタンパク質はまだ多く知られていないことから、NEDD8 化の生理的意義についてはまだ謎が多く残されている。

当研究室では、これまでに NEDD8 と相互作用するタンパク質をスクリーニングし、その結果 PNBP1 及び PNBP2 という2種類のタンパク質を同定している。本研究では、PNBP2 に焦点を当てて、NEDD8 との関係及びその生理的機能を分子生物学的な手法を用いて解析した。また、Cullin 型ユビキチンリガーゼの活性化は炎症応答を仲介する NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路の制御に関わっているため、PNBP2 と NF- $\kappa$ B シグナルとの関連性を検証した。

## 材料および方法

**1. 相互作用解析** PNBP2 と NEDD8 タンパク質との細胞内における相互作用を検討するために、FLAG 及び HA タグ付きの PNBP2 プラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、FLAG 及び HA 抗体を用いた免疫沈降を行った。その免疫沈降産物を NEDD8 や Cullin、Cullin を制御する様々な因子に対する抗体でウェスタンブロット解析した。

**2. Reporter gene assay** NF- $\kappa$ B の活性依存性に Luciferase を発現するレポータープラスミドを PNBP2 発現ベ

クターと共に HeLa 細胞にトランスフェクションし、TNF $\alpha$  処理後に NF- $\kappa$ B 活性をルシフェリンの化学発光で測定した。

## 結果および考察

細胞内で発現した PNBP2 は、SCF 複合体中の Cullin1、NEDD8、及びシグナロソーム複合体中の CSN5 サブユニットと相互作用することが分かった。また、Reporter gene assay の結果から、PNBP2 が NF- $\kappa$ B の活性を下げることも分かった。

以上のことから、PNBP2 はユビキチンリガーゼである SCF 複合体の活性を制御する NEDD8 及び Cullin1 に働きかけて、結果的に生体内で NF- $\kappa$ B 経路に影響を与えることが示唆された。これからは、PNBP2 をノックダウンした細胞系列を作成することで、その生体内における機能及び重要性を検討する。これらの解析によって NEDD8 化反応に関して更なる詳しい分子機能の解明に繋がることを期待している。

## 複合体型ユビキチンリガーゼ SCF を制御する新奇腫瘍関連タンパク質の機能解析

海老名 真度 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 智樹 (生命環境科学研究科)

## 背景

ユビキチンは真核生物に於いて高度に保存された 76 アミノ酸からなる小さなタンパク質で、他のタンパク質に共有結合して働くユニークな修飾因子である。ユビキチン化反応はユビキチン活性化酵素 E1, ユビキチン結合酵素 E2, ユビキチンリガーゼ E3 の 3 種類の複合酵素系によって行われ、ユビキチン C 末端のグリシン残基がもつカルボキシル基と、標的タンパク質内のリジン残基がもつアミノ基とのイソペプチド結合が形成される。ユビキチンにユビキチンがさらに付加された場合にはポリユビキチン鎖が形成される。

48 番目のリジン残基を介したポリユビキチン鎖が付加されたタンパク質は、プロテアソームによって認識・分解され、63 番目のリジン残基を介したポリユビキチン鎖はエンドサイトーシスや DNA 修復, キナーゼ活性化 (シグナル伝達) などに関与することが知られている。

基質の選択性は E3 が担っており、その中で最もよく知られているのが SCF 複合体型ユビキチンリガーゼである。SCF は Skp1, Cullin, F-box ドメインタンパク、RING フィンガータンパクからなる 4 量体で、基質認識アダプターサブユニットを変えることで選択性を得ている。また、SCF は Cullin がユビキチン様タンパク質 Nedd8 により修飾されることで活性が上昇することも知られている。

Nedd8 とはユビキチンとの相同性が高いタンパク質で、ユビキチン同様、Nedd8E1, Nedd8E2, Nedd8E3 のカスケード反応により基質に付加される。この Nedd8 修飾を負に制御する因子として COP9 シグナロソーム (CSN) が存在する。CSN は 8 つのサブユニット (CSN1-8) からなる複合体型酵素であり、Cullin は CSN と結合すると Nedd8 が外れ、逆に CSN が解離すると Nedd8 修飾が起こる。

本研究では、生体内における SCF の新たな制御機構を明らかにすることを目的として新奇腫瘍関連タンパク質の解析を行った。

## 方法

- 培養細胞にタグ付のプラスミドを Transfection した後、免疫沈降を行い、SCF 制御に関わる因子との相互作用や細胞内 N8 量に対する影響を解析。
- グリセロール密度勾配遠心法によってタンパク質を大きさによって画分分けし、CSN の複合体形成を解析。

## 結果、考察

本研究により、この新奇タンパク質が CSN の全サブユニットと相互作用し、細胞内 Nedd8 の減少に関わるということが明らかになった。

過剰発現では複合体形成に影響がなさそうなので、活性を制御している可能性が考えられる。

## 展望

今後の研究に於いては、以下のことを行い、この新奇タンパク質が SCF に及ぼす影響を検証していく予定である。

- 精製タンパク質を用いて CSN の脱 Nedd8 化活性の測定
- ノックダウンを用いた実験
- ノックアウトマウスを作成し解析

# スunks (*Suncus murinus*) における老化による“配偶行動”の変質とその影響

門脇 良太 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 松崎 治 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

スunks (*Suncus murinus*) は熱帯・亜熱帯に生息するトガリネズミ目に属するジャコウネズミを家畜化した実験動物である。生理学的特徴として、性周期を見せない交尾刺激排卵であることが挙げられる (Dryden, 1969)。さらに、行動学的特徴として、個体同士の遭遇の際に相互確認の後、追隨行動を形成し交尾に至るといった定型的行動が展開されることが挙げられる (Matsuzaki, 2002)。このようにスunks では交尾が一連の定型的行動の間に存在していることから、定型的行動が展開されなければ交尾が成立しない。そのため、スunks にとって定型的行動の円滑な展開は極めて重要である。この定型的行動の中核をなす追隨の形成・維持には、一定の運動性が必要と考えられる。

本研究では、加齢による運動性の低下 (老化) がスunks の定型的行動の展開を阻害し、その結果、交尾の成立率が低下するという予測のもと観察を行い、スunks の“配偶行動”と老化の関係について考察した。

## 材料および方法

実験動物は実験動物中央研究所が開発した Jic: Sun-Ler Line を基に継代飼育した筑波大学コロニーのスunks を用いた。観察に使用した雌は日齢に応じて、900 日齢以上 (超高齢)、690~730 日齢 (高齢)、200 日齢前後 (繁殖適齢) に 3 区分し、それぞれ 2 頭ずつ使用した。雄は、交尾経験のある成熟個体から無作為に 4 頭選び使用した。

観察はガラス製水槽 (60W × 30D × 45Hcm) 内での雌雄 1 対 1 対面テストにより、全 24 通りの組み合わせを 2 サイクル行った。各試行はそれぞれビデオカメラで撮影・記録し、以下の項目について解析した。

1. 交尾の成否: 実験計画上、同じ雌を複数回使用するため受精が起こらないように、雄のマウントが生じた段階で交尾成立とし、テストを終了した。30 分経過して追隨形成が起こらない場合は交尾不成立とした。
2. 運動性: 観察中の雌個体の単位時間当たりの移動距離を測定し、運動性の指標とした。
3. 追隨形成とマウントまでの時間: 相互確認から最初の追隨形成、マウントまでの時間を測定した。

データの解析には統計解析ソフトウェア SPSS 用い、Mann-Whitney の U 検定、Kruskal-Wallis 検定、Bonferroni 法による多重比較、Kendall 順位相関検定を行った。

## 結果

交尾成立率  
超高齢群で低く (5/16)、高齢群・繁殖適齢群では高かった (16/16, 15/16)。

### 交尾の成否と運動性

交尾成立群の中央値は 8.57、不成立群は 1.28 であり、有意水準 0.001 で両群の中央値に有意差が認められた (Mann-Whitney の U 検定,  $|z| = 4.70, p < 0.001$ )。

### 各日齢群と運動性

超高齢群の運動性の中央値は 1.99、高齢群は 8.22、繁殖適齢群は 10.9 であり、有意水準 0.001 で 3 群の中央値に有意差が認められた (Kruskal-Wallis 検定,  $H = 31.1, p < 0.001$ )。さらに、Bonferroni 補正した有意確率 0.0033 (0.01/3) を用い

て多重比較を行った結果、有意水準 0.01 で 3 群それぞれに有意差が認められた。

### 日齢と運動性

個体の日齢と運動性には負の相関が認められた (Kendall 順位相関検定,  $r = -0.61, p < 0.001$ )。

### 各日齢群と追隨形成・マウントまでの時間

各日齢群による中央値の有意差は認められなかった (Kruskal-Wallis 検定)。

### 追隨形成・マウントまでの時間と運動性

追隨形成までの経過時間と運動性に負の相関が認められた (Kendall 順位相関検定,  $r = -0.278, p < 0.05$ )。マウントまでの時間と運動性には有意な相関は認められなかった。

## 考察

今回の観察では、交尾不成立群の運動性が成立群に比べて著しく低下していることから、定型的行動が展開して交尾が成立するには一定以上の運動性が必要と考えられる。また、日齢と運動性に負の相関があることから、加齢によって運動性が低下するということが示された。この 2 点から、高齢のスunks において加齢による運動性の低下が定型的行動の展開を阻害し、その結果交尾の成立が減少するという予測が妥当なものであるとみなせる。これは、超高齢群の交尾成立率が低いという観察結果とも合致する。つまり、定型的行動に交尾が含まれているというスunks の行動学的特徴が、老化により交尾が成立しにくくなるという、行動学的な繁殖 (供用) 限界を規定している可能性が示唆される。

先行研究によると、スunks の雌では 20 ヶ月齢を超えると、分娩後の授乳放棄や仔の食殺が起こりやすくなるため、18~20 ヶ月齢が雌の繁殖供用限界であるとされている (Furumura et al., 1985)。この報告が出産後の事故が増加するという交尾後の問題による繁殖供用限界であるのに対し、行動学的な繁殖 (供用) 限界は交尾が成立しなくなるという交尾前の問題であるという点で異なる。今回の観察から行動学的な繁殖 (供用) 限界がみられたのが 900 日齢以上の超高齢群であり、繁殖供用としての観点からは先行研究にある 600 日齢前後が限界であるといえる。しかしながら、スunks の視点からみれば 600 日齢以降でも事故が増加するものの妊娠・出産は可能であり、スunks が繁殖不能になるのは行動学的に交尾が成立しなくなる 900 日齢前後であるといえる。このような行動学的な繁殖 (供用) 限界の存在は、スunks の行動特性を反映した興味深い事象であるといえよう。

ところで、今回の観察で交尾成立率が低下したのは超高齢群のみであり、高齢群では繁殖適齢群に比べて運動性は低下したものの、交尾成立率では繁殖適齢群と差が無かった。このことから、スunks の定型的行動の展開には一定以上の運動性が必要であるが、その運動性には幅がある、もしくは運動性以外にも展開に必要な要素があることが示唆される。また、追隨形成・マウントまでの時間には、各日齢群による差はみられなかったが、追隨形成までの時間と運動性に負の相関がみられたことから、運動性の高さが定型的行動の展開する速度に影響を与えている可能性が示唆される。スunks の定型的行動が展開するメカニズムの解明には、さらに詳細な観察と解析が必要である。

# スunks (*Suncus murinus*) における雌の存在下での雄同士の係わり合い —PEA (post-ejaculatory attack) を中心とした雄間競争の検討—

瀧ヶ崎 一弥 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 松崎 治 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

トガリネズミ目に属するスunks (*Suncus murinus*) は、周年繁殖可能な交尾刺激排卵動物で、発情・排卵周期を見せない (Furumura *et al.*, 1985)。その配偶行動は、触覚・聴覚・化学感覚による一連の定型的行動を示す (Matsuzaki, 2002)。雄同士の係わり合いの中でも、異性配偶行動と大差ない経過を辿り、射精に至る (Matsuzaki, 2004)。性周期を見せない代わりに、性別を問わず出会い頭に展開する定型化された行動パターンの中で交尾を完了する。

配偶行動においては、出会い後初期の雌や交尾成立後の雄に代表されるように、攻撃的行動を容易に観察することができる (Kawano, 1992)。特に、交尾を完了した雄には、その直後に一変し、雌の尾を咬み引っ張る、身体を吻で突く、上体でのしかかるといった顕著な攻撃的行動 (射精後攻撃 PEA; post-ejaculatory attack) が見られる (Tsuji, 1993)。

スunksの同性配偶や PEA は、上述の通り報告されているが、多くは 1 対 1 の対面テストにより明らかにされてきたものである。本研究では、雄 2 頭雌 1 頭の対面テストを通して、雌の存在下での同性配偶や雄間競争といった雄同士の係わり合いを明らかにすることを目的とした。

## 材料および方法

全ての実験には、実験動物中央研究所が開発した Jic:SUN-Ler Line を基に継代飼育した筑波大学コロニーのスunks (雄 12 頭、雌 14 頭) を使用した。

観察は、ガラス製の水槽 (60W × 30D × 45H cm) とオーバルアリーナ (長径約 300、短径約 250、高さ 45 cm) で行った。(但し、両者には有意差が無く、両データを統合して扱った。) 各試行、雄 2 頭と雌 1 頭のスunksを用いて、全 29 試行の対面テストを行った。全ての行動はビデオカメラで記録し、全試行に対して交尾の対象となった性別 (雄 or 雌) を調べた。さらに、少なくとも片方の雄が雌と交尾を行った 10 試行に対して、以下の項目に注目して解析した。  
1. 雄が示す攻撃行動の種類と対象 2. 交尾の優先順位 (雄の体重差に依存するか否か) 3. マウントの対象と頻度

## 結果

### 1) PEA を中心とした雄間の攻撃行動

Table1 は、交尾を完了した雄 10 頭が PEA として示した行動項目と各行動の対象 (雄 or 雌) を表わしたものである。PEA の各行動項目は、Kawano (*op. cit.*) を参考にした。PEA は、雌に対して特異的に見られるものではなく、雄に対しても観察された。PEA を受けた雄の半数 (5/10) では、その後マウントを起こさなくなった。この場合、PEA を受けて起こる威嚇行動 (警戒発声や咬みつき) やレスリングを示した後、他個体への接近が急速に減り、外界を気にするように吻を立てて上を嗅ぐ姿勢を多く観察することができた。マウントが継続して起こった残りの半数の雄では、異性配偶が 3 例、同性配偶が 1 例観察された。PEA 以外には、目に見える雄間の攻撃行動は確認できなかった。2) 雌の存在下での同性配偶の存在

全 29 試行のうち、異性配偶が 15 例、同性配偶が 2 例観察され、異性配偶の方が圧倒的に多く見られた。また、交

尾に至るまでのマウントでは、先に雌と交尾した雄 (以下、M1) と先に雌と交尾できなかった雄 (以下、M2) との間で、質と量について、ともに差が見られた (Fig. 1)。マウントの対象としては、M2 では雌雄に有意差が無かったが、M1 は有意に多く雌を選んだ (Wilcoxon の符号付順位と検定, \*:  $p < 0.05$ )。

PEA の行動項目	♂	♀
尾咬み/身体咬み	7	5
レスリング	3	0
のしかかり	7	4
体側部への突き	5	4

Table1: PEA で示した行動一覧 (10 頭中各行動を示した個体数と対象)

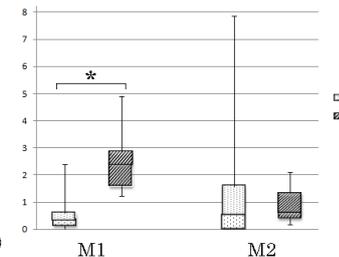


Fig. 1: 交尾前のマウント頻度 (回/分)

## 考察

### 1) PEA を中心とした雄間の攻撃行動

PEA を受けた雄の半数が、その後マウントを起こさなくなったことから、PEA には、交尾を完了した雌が他の雄に再交尾されるのを妨げる効果があることが示唆された。多回交尾を行う種で雌の再交尾を阻止するための手段として見られる交尾後ガードでは、雄はしばしば同種他個体に対する攻撃行動を示す (Parga, 2010)。スunksにおいても、PEA が雌の性的受容性を抑制し、他雄による再交尾の可能性を低下させるとする Tsuji (*op. cit.*) の指摘と併せて、本研究で改めて PEA のもつ交尾後ガードとしての可能性が提示された。この可能性を検証するためには、野生環境下での生態的特性の把握やそれを踏まえた行動観察が必要であろう。また、スunksでは、先に交尾した雄の残した交尾栓を、後に交尾する雄が除去する仕組みがあり (Kosaka, 2007)、後に交尾した方が父性を獲得することを考えると、PEA の交尾後ガードとしての意義の大きさが推定される。

### 2) 雌の存在下での同性配偶の存在

雌雄いずれの個体も選択可能な状況下で、大部分の雄が配偶相手として雌を選択する。さらに、M1 は圧倒的に多く雌をマウントの対象として選択し、雌への選好の高さが明瞭であった。1 対 1 の対面テストでは、性別に関係なく種固有の接触パターンを展開することで、マウント・射精に至るため、雄は雌雄無差別に交尾を試みているように見えるが、今回の結果は、雌雄を見分ける何らかの指標があることを示唆している。一方、有意差は無かったが、M2 では雄への選好が窺えた。また、雌の存在下での同性配偶も僅かではあるが観察された。雌への選好を示さなかった個体について、選好の継時変化や M1 との潜在的競争の存在を詳細に検討していく必要がある。

スunksは、体サイズに顕著な性的二型が見られるが、雌を巡る目立った雄間競争は PEA を除いて見られない。M1 と M2 に体重差は見られず、父性を獲得するために体サイズの大きい方が“優位”であるという結果は得られなかった。今後、性的二型を生み出すその他の可能性を探る必要がある。

## 成体イモリの網膜再生関連遺伝子の探索

高柳 美也子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 親文 (生命環境科学研究科)

イモリを含む有尾両生類は脊椎動物の中でも際立って高い再生能力をもち、手足から心臓、脳の一部までさまざまな器官を再生することができる。脊椎動物においては、成体でこのような高い再生能力をもつのは有尾両生類のみで、古くから再生のモデル生物として研究に用いられてきた。しかしいまだにそのメカニズムには多くの謎が残されている。

イモリの再生の特徴として、再生開始時に体細胞の初期化現象を伴うことが知られている。体細胞初期化を制御する技術は iPS に代表されるように再生医療の根幹をなす技術であるが、近年の研究からイモリにおける体細胞初期化現象では、iPS のように発生時計を受精卵の時期まで巻き戻すのではなく、発生の履歴を少し残していると考えられている。再生における主幹分子メカニズムは体各部に共通であると考えられるため、イモリの再生メカニズム解明は再生医療にさらなる展開をもたらす可能性がある。

所属する研究室では、イモリの再生の中でもアカハライモリ成体の網膜再生系をモデルとして体細胞初期化を誘導するシグナル経路の同定と遺伝子発現制御に関して研究を進めている。イモリは手術によって神経性網膜を除去すると RPE 細胞 (網膜色素上皮細胞) という 1 種類の細胞から神経性網膜を完全に再生することができる。RPE 細胞の分化マーカーの 1 つである RPE65 遺伝子の発現が再生 10 日 (RPE 細胞が細胞質分裂を始めるころ) までに減少することや、眼形成のマスターコントロール遺伝子である Pax6 はこのころまでに発現してくることなどから、RPE を初期化し発生の遺伝子プログラムを再起動する細胞の変化は再生 10 日までに起こると推測される。

ニワトリやアフリカツメガエルでの先行研究から、胚や幼生期においては FGF シグナルが再生誘導シグナルであることが分かっており、成体イモリでも同じように FGF シグナルが再生誘導シグナル経路ではないかと考えられていた。しかしこれまでの研究から、成体イモリの網膜再生においては RPE の FGF に対する感受性はもともと低く、FGFR は分化転換にともない数日かけて増えることが分かってきた。このことから、FGF シグナルは再生の一番最初のトリガーではなく、外傷をうけてからの最初のシグナルは何か別に存在するのではないかと推測される。そこで、網膜再生誘導後に細胞が幹細胞のような分化多能性をもつ細胞に変わるまでの仕組みの一端を明らかにしていくために、再生誘導シグナル経路の直下で新たに発現してくる即初期遺伝子 (immediate early genes) に注目した。正常時には発現していないが、傷害を受けて網膜再生誘導されたときに経路の直下で発現する遺伝子を探索するために、手術後 1-2 時間生きたまま静置し再生シグナル経路を活性化させた組織と、網膜除去手術直後の RPE を含む組織において、発現する遺伝子のスクリーニングを行った。

方法、結果に関しては発表会にて報告します。

## 成体イモリ網膜再生過程における FGF 受容体の発現に関する研究

松本 美貴子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 親文 (生命環境科学研究科)

### 背景

眼球は光を受容し、その信号が脳に伝えられることで生物は「見る」ことができる。まず光は角膜を通り前房、水晶体、硝子体を経て網膜にて結像する。光を受容する最後の組織である網膜は層状構造をとっており、光は視細胞によって受容されると双極細胞、次に網膜神経節細胞へと信号を伝え情報は脳へと送られていく。

外傷によって角膜・水晶体が濁ると視力は低下するものの、角膜移植手術や水晶体を取り除き人工のレンズを埋め込むことで視力の回復が見込める場合もある。しかしながら網膜が損傷を受けてしまうと視力の回復は難しい。この理由としては網膜には先に述べたように多くの神経細胞が層となって整然と並んでおり、「脳の出先機関」と呼ばれるほど繊細な構造であるため一度壊れてしまうと手の施しようがないことがあげられる。先進国における網膜変性により視覚障害を引き起こす疾患では網膜色素変性症・糖尿病性網膜症・緑内障・加齢黄斑変性症がありいずれも失明の原因となっている。

一方、同じ脊椎動物でも両生類であるイモリでは神経性網膜組織を取り除いてもまた元の状態まで再生することができる。この過程においては網膜色素上皮が増殖し、新しい網膜原基を生み出しつつ網膜色素上皮層を再構築することが分かっている。そしてこの網膜原基は増殖を続け、ニューロンやグリア細胞となり新しい神経性網膜組織を構築する。

一世紀以上もの間多くの研究者がこのイモリ特異的再生の分子メカニズムの解明に取り組んできたが、いまだ何がイモリとヒトを隔てているのかはわかっていない。しかし手掛かりはある。

成体では網膜色素上皮は分化転換能をもたないが胚においては一概にそうとはいえない。1989年のHollenbergらの実験では神経性網膜を取り除いたニワトリ胚に繊維芽細胞増殖因子 (FGF) を添加したところ網膜色素上皮から神経性網膜への分化転換がみられたとの報告がある。この研究やそれに続く研究によって他の脊椎動物の網膜色素上皮に分化転換能があることが示された。

一方、当研究室の先行研究ではFGF2やその受容体 (FGFR-2) の発現量が神経性網膜組織除去後10日あたりから上昇することが分かっている。このことからFGFs・FGFRsは再生に関与する分子であることが示唆されるものの、実際に再生を引き起こす因子かどうか、また再生のどのイベントにかかわっているのかはいまだに不明である。

よって本研究ではFGFsの作用点であるFGFRsに注目し、網膜とその再生系で発現するアイソフォームの同定および発現様式について調べた。

### 方法

本研究ではイモリの網膜における再生能力とFGFRsに注目し、イモリの正常網膜と再生過程におけるFGFR1と2の発現についてPCR、免疫組織化学、ウェスタンブロットで解析した。

### 結果と考察

結果の詳細は発表会で報告する。

## 成体イモリ網膜色素上皮細胞の細胞周期進入に関わる因子の探索

安室 博文 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 親文 (生命環境科学研究科)

イモリ (有尾両生類) は成体においても高い再性能を有しており、その範囲は四肢や尾 (脊髄) だけでなく、顎、眼組織 (水晶体と網膜)、また脳組織や心臓組織などでも完全に再生することが可能であり、古くから再生研究のモデルとして扱われてきた。しかし、そのメカニズムはいまだ謎に包まれている。

イモリのボディ・パーツ再生の大きな特徴は、再生開始時に体細胞の初期化 (発生時計の巻き戻し) が起こることである。体細胞の初期化 / リプログラミングに関わる技術は、iPS に代表されるように現在の再生医療の根幹を成すものである。近年の研究により、イモリの体細胞初期化現象は、iPS 細胞のように受精卵の時期まで発生段階を戻すのではなく、発生の履歴を残したまま必要なだけ戻すものであると考えられている。また、その主たる分子メカニズムは体各部に共通であると考えられるため、このメカニズムを解明することは再生医療のさらなる展開に寄与する可能性を持っている。

所属する研究室では網膜再生系をモデルとして、成体アカハライモリの体細胞初期化や増殖を誘導するシグナル経路に関して研究を進めている。イモリは手術などによって神経性網膜を除去しても、網膜色素上皮細胞を主要な起源としてその再生を行うことができる。この再生系は再生の起源となる細胞が限定されており、イモリの再生機構の研究に適していると言える。

成体イモリの再生時には、傷害部位における体細胞の細胞周期への再突入が必須である。これまでの研究の中でも、体細胞の細胞周期再突入に関わるメカニズムについての研究や報告はなされているが、いまだその解明には至っていない。そこで本研究では、成体アカハライモリの網膜再生系における外傷後の細胞周期再突入に関わる因子の探索を組織培養系で行った。

この研究によって、成体アカハライモリの細胞周期再突入をトリガーするメカニズムと、また再生初期過程における細胞内シグナルを明らかにすることを目指した

### 方法と結果

発表会にて報告いたします。

## 視細胞における CNG チャネルの電気的特性の解析

森 麻衣 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中谷 敬 (生命環境科学研究科)

## 導入

動物は、外界からの情報を五感を通じて得る。五感のうち視覚は、網膜上に存在する視細胞が光刺激を電気信号に変換し、中枢へとトランスダクションすることで得られる。「感覚」とは、外部からの刺激を電気信号に変換することであるのだ。

今回注目したのは、網膜視細胞膜上に存在するサイクリックヌクレオチド依存性チャネル (CNG channel) の電気的特性である。暗所では、細胞内に存在する cGMP が CNG チャネルを開き、細胞外から内向き方向に陽イオンが流れ込んでいる。この陽イオンの流れ込みは「暗電流」と呼ばれる。一方、明所では、細胞中にある視物質 (ロドプシン) が光子を吸収し、活性化されたロドプシンは G タンパク質 (トランスデュシン) を介して cGMP 分解酵素であるホスホジエステラーゼ (PDE) を活性化する。その結果、細胞内 cGMP 濃度が低下し、CNG チャネルが閉じることによって光応答が生じる。

本研究では、光感受性チャネルである CNG チャネルの性質を調べる目的で、パッチクランプ法の一つである inside-out パッチ法を用いて cGMP 依存性電流の電気的特性の解析を行った。

## 材料と方法

業者より購入したアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を用いた。頭部を切断し、眼球を取り出した。眼球より網膜を摘出し、シルガードコートしたディッシュ上で細かくチョップすることにより、視細胞外節を単離した。

単離した視細胞外節は生理的塩類溶液に浸し、顕微鏡下にセットした。パッチ用ガラス管電極は Micropipette puller (Sutter instrument, P-57) を用いて作製した。ピペット抵抗が 5~15MΩ であるものを使用した。細胞膜へ電極の先端を接触させ、電極に陰圧を与えることにより、細胞膜と電極を強くシールさせた (この状態をギガシールと呼ぶ)。ギガシール状態から、電極を上方向に引き上げることで、inside-out patch 状態の切り取った細胞膜を得ることができる。このような標本を用いて cGMP によって誘起される電流を記録・解析し、2 価イオンに対する効果を調べた。

実験には電極内液、かん流液ともに 150 mM KCl 溶液を用いた。cGMP 溶液および各種テスト溶液は膜の細胞質側から FastStep (Warner Instruments) と三連管を用いて投与した。その時の溶液交換速度は 50 ms 以内であった。

## 結果と考察

膜電位を -40mV に固定し、0.2 mM の cGMP を投与した際に流れる電流を記録した。(Figure 1) cGMP 投与前は電流は 0 であったが、cGMP を細胞膜内側に与えると内向き電流が観察された。次にかん流液から cGMP を除去するとおよそ 400ms の遅れ (delay) の後に電流は 0 に戻った。

この結果から、CNG チャネルは細胞膜内側に cGMP を受容する箇所があり、cGMP をリガンドとして受容することにより直接開くことが明らかになった。回復時の遅れ (delay) は CNG チャネルより cGMP が離れる際に時間がかかるためと考えられる。

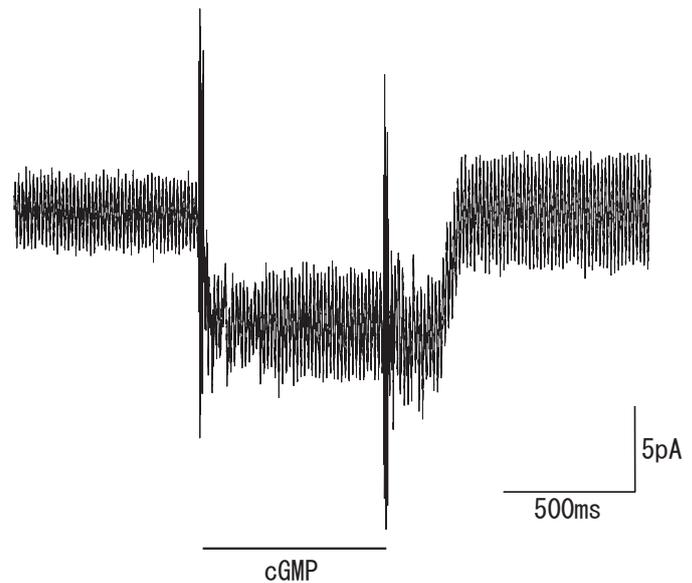


Figure 1: cGMP 依存性電流

次に cGMP に誘起された電流に対する 2 価イオンの効果を調べたところ、1 mM  $Ca^{2+}$  投与によって電流の著しい減少が観察された。この結果から、2 価イオンが存在する生理的条件下では CNG チャネルのコンダクタンスが常に抑えられていることがわかる。このことは、生理的条件下での CNG チャネルのユニット・コンダクタンスが他のチャネルに比べて極端に低いという報告と一致する。

# プラナリアの摂食行動の解析; 摂食を誘起する化学物質の探索と定量的投与

下山 せいら (筑波大学 生物学類)

指導教員: 大網 一則 (生命環境科学研究科)

## 導入

扁形動物門渦虫綱のプラナリアは、淡水に生息する原始的な肉食動物である。この動物は、5~30mmほどの細長く扁平な体をしており、体表面の繊毛を用いて這うように移動する。プラナリアの口は、体の中央部腹側にあり「咽頭」と呼ばれる白い管である。咽頭は通常は体内に収納されているが、摂食の際に伸長し、餌を取り込むために使われる。

プラナリアの摂食行動は、一連の定型的な動きの連続からなる。すなわち、(1) 餌へ向かう移動、(2) 餌に対する咽頭伸長、(3) 餌の取り込みである。プラナリアの摂食行動には、化学刺激が重要な鍵となっていると考えられるが、どのような化学物質が、どのようにしてプラナリアの摂食行動を引き起こすのかは明らかになっていない部分が多い。

私は、プラナリアの摂食行動に興味を持ち、これまでに、グリコーゲンの滴下によりプラナリアの摂食行動が誘起されることを明らかにしている。しかし、さらに様々な化学物質を検討し、詳細にプラナリアの摂食行動を解析するには化学物質の濃度や投与時間の制御が不可欠である。

この様な背景から、本研究では、プラナリアの摂食行動を引き起こす化学物質の探索と、その定量的投与、プラナリアの行動の詳細な解析を目的とした。

## 方法

プラナリア (ナミウズムシ *Dugesia japonica*) は、18 °C のインキュベータ内で鶏のレバーを餌として飼育した。実験に使用する場合、プラナリアは7日~20日絶食させた。実験には標準溶液 (NaCl  $6.4 \times 10^{-4}$ M, KOH  $6.6 \times 10^{-5}$ M,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $7.7 \times 10^{-4}$ M,  $\text{NaHCO}_3$   $1.7 \times 10^{-4}$ M) を用い、調べた化学物質は、この標準溶液に溶かして投与した。

化学物質の投与は、実験槽 (76 × 16mm、水深約 3mm) 内の溶液を置換することにより行った。溶液の置換は実験槽の長軸の一端から標準溶液や被験物質を含んだ溶液 (試験液) を流し、他端から吸い上げることにより行った。この実験槽に1頭のプラナリアを移し入れ、実験槽の中の1か所に停止した後、実験槽中に流している溶液を標準溶液から試験液に切り替え、それに伴うプラナリアの行動反応を観察・記録した。プラナリアの行動は実験槽の下側からビデオカメラで記録した。実験槽中のプラナリアに試験液が到着するまでには、溶液の切り替えから、およそ5秒かかり、実験槽中の溶液がすべて置換するまでには、およそ30秒かかった。これに続く30秒間は、被験物質濃度は実験槽中のどの部分でも一定の濃度に保たれた。

## 結果

はじめにレバー抽出液 (1/100 希釈) をプラナリアに投与し、それに対するプラナリアの行動反応を調べた。停止していたプラナリアは、レバー抽出液を投与すると動き始めた。プラナリアははじめ頭部を動かし、続いて、体全体の移動に移行した。移動の方向について調べると、調べた4頭すべてが、溶液を灌流している実験槽の上流に向かっていった。プラナリアの移動は試験液の投与と中継し、実験槽の上流側の端に到達するとそこに留まった。試験液の投与を終えて標準液を再び流すと、プラナリアは頭を振る行動

を示し、移動と頭を振る行動を繰り返した後、上流側から離れていった。

希釈倍率の異なるレバー抽出液をプラナリアに与え、その行動を観察、比較した。1/50 希釈から 1/5000 倍希釈のレバー抽出液を投与すると、すべてのプラナリアが上流に移動した。試験液を投与してからプラナリアが移動を開始するまでの時間に着目すると、レバー抽出液の濃度が低いほど、長くなった。さらに低濃度の試験液では、プラナリアは動きを見せなかった。

グリコーゲン (0.1%) を投与すると、プラナリアは移動を開始し、上流に向かった。この行動はレバーの抽出液を与えた時のものと同様であった。グリコーゲン濃度を増して 1% にすると、プラナリアは上流に向かい移動し、調べた5頭中の1頭は摂食行動の次の段階である咽頭の伸長を示した。逆に、与えたグリコーゲンの濃度を低くすると (0.01%、0.001%)、プラナリアは移動をしないか、移動を始めてもすぐに停止した。プラナリアが移動を開始するまでの時間について計測すると、グリコーゲンの濃度が低いほど、長かった。

ペプトン溶液 (Bacto Proteose Peptone 0.1%) を与えると、プラナリアは移動を開始し上流に向かった。グルコース (10mM) を与えると、5頭中4頭プラナリアは行動反応を示さなかった。アミノ酸ではL-ロイシンを与えると、すべてのプラナリアが移動をはじめたが、この移動は短時間で終了した。残りのアミノ酸については14種類が、一部の個体の移動を促したが、移動は短時間に限られた。また、6種類については、プラナリアは行動反応を示さなかった。

## 考察

今回の実験でレバー抽出液やグリコーゲンに対して生じたプラナリアの行動反応は、一連の摂食行動のうち、初期の行動である餌のある場所への移動に対応すると考えられる。注目すべき点は、実験槽の被験物質濃度が一定に保たれているにも関わらず、プラナリアが方向性のある行動を続けたことである。この結果は、プラナリアが濃度差を手掛かりとせず餌にたどりつくことができる可能性を強く示唆する。これは化学物質の濃度勾配に依存する走化性や、化学物質の存在、非存在部分における動物の運動活性の違いに依存する化学集合のメカニズムとは全く異なる。今回の実験系では、化学物質の濃度は時間的、空間的に均一であるが、方向性を持つ環境としては、唯一、溶液の流れが指摘できる。これらの結果を総合的に判断すると、プラナリアの餌に到達する移動行動の方向は水流の方向により決定される可能性が強く示唆される。ただし、水流のみではプラナリアの移動は生じないので、移動の開始は、化学刺激に依存していると考えられる。これは、自然界において、プラナリアは流れの上流に存在する餌を化学刺激と水流により探知し移動、到達することを示唆している。

今回の実験で、化学物質の定量的投与が可能となったが、単一、あるいは、比較的単純な化学物質の組み合わせにより、プラナリアの摂食行動全体を誘起することはできていない。今後、他の化学物質の更なる検討、また、他の外部要因、例えば機械的接触が関与する可能性等について調べる必要がある。

## ヒラムシのプランクトン幼生の形態と行動

森田 望美 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 齋藤 康典 (生命環境科学研究科)

## はじめに

ヒラムシとは、扁形動物門渦虫綱に属する自由生活性海産種の一般名称である。その大きさ、色、形、食性、生殖行動などは多様で、磯でも一般的に見られる生物の一種である。

同じ扁形動物門渦虫綱に属する淡水産種のプラナリアは再生研究の代表的生物であるが、ヒラムシも同様に、再生に関与するとされる新生細胞を持つことが知られており、その機能性や挙動などの研究に利用されている。また、モデル的ならせん卵割をすることから、発生についても調べられているほか、生理学や神経系などの研究にも利用されている。しかしながら、ヒラムシの個体レベルでの知見はまだ乏しく、特に生活史についてはわかっていないことが多い。

ヒラムシはプランクトン性幼生を経て成体になるが、ミユラー幼生、ゲッテ幼生、加藤幼生、ルーサー幼生、直接発生型幼生と、大きく5種類の幼生タイプが知られている。ミユラー幼生では8本、ゲッテ幼生では4本、加藤幼生では二分岐するものを含め7本の突起状構造が特徴的で、ルーサー幼生はひも状で長細く、直接発生型はやや平たい洋ナシ型をしている。だが、大部分の幼生で、着底から成体になるまでのプロセスは明らかになっていない。

本研究では、ヒラムシの生活史を解明することを目的として、プランクトン性幼生を飼育し、形態と行動について観察を行った。

## 方法

今回の研究では *Notoplana humilis* と *Pseudostylochus obscurus* の2種の幼生を対象とした。この2種は、1. 成体の採集が容易である 2. 成体の飼育・卵の回収が容易である 3. 幼生の餌がわかっている という3点から使用した。

成体は下田臨海実験センター付近の磯場にて徒手で採集した。ヒラムシは雌雄同体のため、水温が十分に高く、生殖巣が発達した状態であれば、2個体以上を同じ容器にて飼育することで容易に卵を回収することができた。

卵は、ゼラチン質の層に無数に埋め込まれた「卵板」という構造で、基質（まれに水面）に産みつけられた。卵板は、成体と同じ容器にて水温約25℃で維持されると、産みつけられてから約10日後に幼生が孵化した。幼生は親とは別の容器に小分けにし、餌やりの頻度、飼育環境、同じ容器で飼育する個体数などを変えて成長の様子を観察した。餌は親と同様に肉食性で、貝類や甲殻類を与えた。

## 結果

*N. humilis* の幼生と *P. obscurus* の幼生はどちらも洋ナシを逆さにしたような形状で、背側がなだらかに膨らんでいるが、扁平である。それぞれの幼生は、孵化して1日目では *N. humilis* が体長250 μm前後、*P. obscurus* が体長340 μm前後と、*P. obscurus* の幼生の方が若干大きめであるが、それ以外に特筆した違いはない。どちらの幼生も、光に対して正の走行性が確認され、水面近くまで泳いでいる様子が観察された。

採餌の際は、まず餌の周りを探るように円を描いて泳ぎ回り、更に餌の上を探るように動き回った後に咽頭で吸

いつくように食いつく。咽頭は体の後ろ半分に位置し、筋肉質で管状をしており、少なくとも体長の1/5~1/4程度は伸ばすことができる。

採餌は幼生の成長に特に重要なファクターの1つと考えられ、その頻度によって成長は大きく変化した。*P. obscurus* では、餌やりが1日1回または2回の場合、体サイズはあまり大きくならないまま幼生は死滅したが、1日3回餌を与えた場合、約1ヶ月で500 μmにまで成長した。更に、幼生を、常に採餌可能な状態におくと、約5日間で体サイズが500 μmに達し、かつ1ヶ月かけて飼育したもの比べて活発に遊泳していた。このときの幼生は、孵化後の幼生をそのまま大きくし、背腹に厚みをもたせたような、全体に丸みを帯びた形態であった。

また、体表面の繊毛運動は生命維持にかなり重要であると考えられる。幼生が数μm程度の粒子（藻類など）が密集する中に入り込むと、繊毛運動が止まり、死んでしまうことが観察された。これは餌から出るわずかなカスやゴミでも同様であり、飼育環境の水質が重要であると考えられる。

## 今後の展望

今回飼育を試みた2種のうち、*P. obscurus* は体サイズの成長はみられたが、成体のような扁平な形態にはならなかった。これには、体を扁平にする何かしらの刺激が必要なのか、あるいは十分な栄養分と時間が与えられれば扁平化のプロセスが始まるのか、など、いくつか可能性が考えられる。従って、引き続き実験室内での飼育を試みると同時に、幼生の切片などをつくり、外部形態以外の点からも成長過程を追求していきたい。

また、下田臨海実験センターが面する鍋田湾内でのプランクトンネットでは、ミユラー幼生は度々観察されるものの、直接発生型幼生は見られない。このことから、直接発生型幼生は、既に成長過程が明らかになっているプランクトン性幼生とは異なる生活をし、着底している可能性がある。そこで、直接発生型幼生、あるいは着底直後と考えられる幼体をフィールドで探索することにより、生活の様子や、着底・成長に必要な条件などを探っていきたい。



Figure 1: *Pseudostylochus obscurus* の幼生。Scale = 100 μm.

## サラサエビの繁殖システムについての個体群動態解析に基づく探求

大澤 祐美子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 青木 優和 (生命環境科学研究科)

### 背景

十脚目コエビ下目サラサエビ科サラサエビ属のサラサエビ *Rhynchocinetes uritai* Kubo, 1942 は、日本産サラサエビ属 3 種のうち最も普通種で、日中は潮下帯域の岩礁の割れ目や転石下などに高い密度で潜む夜行性である。日本海側では秋田県以南、太平洋側では千葉県以南で分布が確認されている。本種については初記載以降、生態に関する研究は行われていない。近年浅海域に生息するコエビ下目の繁殖システムについてその多様性が示唆されつつある。雄性先熟型同時的雌雄同体種や雄性先熟種が見出され、その繁殖システムとの関連についての研究が進められている。しかし、まだ研究例に乏しい状態である。チリに生息する *Rhynchocinetes typus* は雌雄異体であることが知られ、形態研究のほか、行動研究や個体群動態解析もなされている。そこでこの全く生息海域の異なる同属種との対比を行うため、サラサエビを材料とし、その繁殖システムを解明することを目的として研究を行った。

### 方法

静岡県下田市大浦湾の狼煙崎東岸において 2010 年 6 月から 2011 年 2 月まで、1 カ月に 2 回のトラップ採集を行った。トラップは長さ 78 cm、直径 10 cm のプラスチック製ウツボ籠を改良して開口部を 2.2 cm に固定したもので、餌には解凍した生のマイワシを各籠に 3 尾ずつ入れた。このトラップを水深 4 - 6 m に毎回 4 個設置し、20 - 28 時間後に引き上げた。回収した籠は研究室に持ち帰り、取り出したエビは種同定の後サラサエビのみを選び出し、10% 海水中和ホルマリン液にて固定作業を行った。固定後には、まず性別判定を行った。雄性附属器の有無、そして Breeding dress という抱卵に特化した腹肢原節部の形状により性を判別した (Figure 1)。両性の特徴が確認されない個体については、未成熟個体と判別した。両性の特徴をもつ個体については計測後、解剖にて生殖器官を確認した。また、頭胸甲長、第 1 歩脚の鉗、第 3 脚の前節と指節、雄性附属器の長さ、側甲、Breeding dress の幅も計測した (Figure 2)。

### 結果

これまでの個体群動態解析の結果、全月における雌の頭胸甲は 8.3 ~ 12.0 mm ( $9.9 \pm 0.8$  mm: Mean  $\pm$  SD)、雄は 4.3 ~ 10.0 mm ( $7.3 \pm 1.0$  mm: Mean  $\pm$  SD) で雌が全体的に大きかった。また、8.3 mm 以下の個体は全て雄であった。8.3 ~ 10.0 mm の間でのみ雄と雌が双方とも出現する。このサイズ領域の個体 8.0 ~ 9.1 mm ( $8.7 \pm 0.4$  mm: Mean  $\pm$  SD) では、両性の特徴を有する個体が 17 個体確認された。これらの個体の生殖器官を調べたところ、本来の雄では精巣が存在している位置に卵巣の発達が見られ、その脇には精管の存在が確認された。*R. typus* において雄で特に発達されているとされる鉗、前節、指節の発達速度には、雄と雌で違いはなかった。一方、側甲と Breeding dress は雌では成長に伴う変化が著しかった。また、雄では雄性附属器の退化は見られなかった。

### 考察

サラサエビはサラサエビ属の中でも稀な性システムである雄性先熟型の雌雄同体であることが判明した。雄から雌への形態変化は少数回の脱皮で起こっていることが示唆された。Ghiselin (1969) の体長有利性説によれば、雄性先熟型雌雄同体の生物はランダム配偶を行うことが期待される。このことから、雄性先熟型の雌雄同体であるサラサエビでもランダム配偶が示唆される。今後はサラサエビのもつ配偶システムのほか性転換のタイミングに影響する要因などについて、個体群動態解析に加え、室内飼育実験や行動解析なども併せて検討していく。

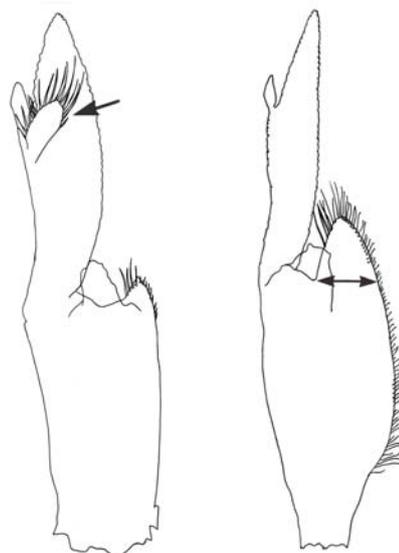


Figure 1: 左: 雄の第 2 腹肢と雄性附属器 右: 雌の第 2 腹肢と Breeding dress

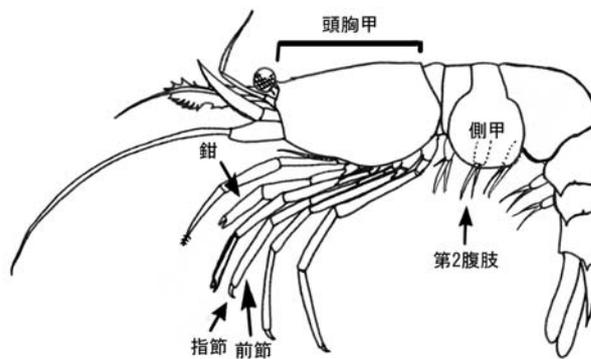


Figure 2: サラサエビの側面図と計測部位名称

# 海洋酸性化が一次生産過程に与える影響—下田沿岸海域における実験的解析—

鈴木 莉紗 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 濱 健夫 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

近年地球温暖化が大きな問題となっているが、二酸化炭素の影響が及ぶのは地上だけではない。大気中の二酸化炭素が海中に溶け込み、海中の二酸化炭素濃度も上昇する。すると海水の pH が低下し、海洋酸性化を招くことになる。

酸性化の影響を受ける生物は多数存在すると考えられている。よって二酸化炭素濃度が上昇することで、海洋生態系に様々な変化が起こることが予想される。しかし現在は単一の種を対象にした実験が多く、海洋生態系の群集組成全体にどのような変化が起きるかはまだ正確にはわかっていない。そこで私は海洋生態系の基礎をなす一次生産過程に着目し、大型水槽を用いたメソコスム実験を行った。微生物群集を含む海水を長期間培養し、水槽内の物質循環の推移を調査した。培養期間中は水槽の二酸化炭素濃度を3段階に設定し、植物プランクトンの生産量や海水試料中の有機炭素量、窒素量などを測定した。これにより海洋酸性化が微生物群集の組成や物質循環に与える影響を明らかにする。

## 方法

### ● 大型水槽での培養

実験は筑波大学下田臨海実験センターにおいて実施した。400 リットル水槽を6基準備し、沿岸から採取した海水試料を各水槽に移した。その際、捕食による影響を少なくするため、100 $\mu$ m メッシュを用いて大型プランクトンを除外した。水槽の二酸化炭素濃度をそれぞれ400ppm、800ppm、1200ppm に調整し、2シリーズで培養を行った。設置後2日間にわたるバブリングで二酸化炭素濃度と pH を安定させた後、植物プランクトンの増殖を促進するために必要な栄養塩を添加し、約1ヶ月間培養を行った。二酸化炭素濃度と pH を維持するため、毎日同時刻に水槽底面から6時間バブリングを行った。

栄養塩を添加した日を Day1 とし、Day-1 から Day26 まで12回のサンプリングを行った。その際、水槽内において粒子が鉛直的に不均一に分布している可能性があるため、円筒状の容器を用いて、培養器の表面から底までの試水を採取した。

### ● トレーサー実験

サンプリングした海水 600ml にトレーサー ( $^{13}\text{C}$ - $\text{NaHCO}_3$ ) を添加し、400 リットル水槽の隣で更に日中6時間培養した。

### ● 濾過

サンプリングした海水を27mm GF/F フィルター(孔径0.7 $\mu$ m)で濾過し、POM(懸濁態有機物)とDOM(溶存態有機物)に分けた。

### ● 分析

POM が乗った GF/F フィルターは HCl にかざして DIC(無機炭素)を除去した後、五酸化リンと水酸化ナトリウム(粒状)と共にデシケーターに入れ、中和、

乾燥させた。乾燥させた GF/F フィルターをスズ箔で包み、元素分析計と質量分析計を用いて POC、PON の濃度、および POC 中の  $^{13}\text{C}$ -atom% を測定した。

濾液を TOC 計で分析することにより DOC 濃度を、分光光度計によりケイ酸塩とアンモニウム塩、硝酸塩、亜硝酸塩、リン塩濃度を測定した。

## 結果および考察

各培養器の二酸化炭素濃度、pH は実験期間を通してほぼ設定通り維持されていた。

Day2 にブルームが生じた。異なった二酸化炭素濃度の培養器間で生産量は異なり、400ppm の培養器で 929 $\mu\text{g C/L/day}$  と最大であり、1200ppm の培養器で 779 $\mu\text{g C/L/day}$  と最低であった。Chl.a あたりの生産量は Day1 で最大となり、400ppm の培養器で 125.3 $\mu\text{g Chl.a/day}$ 、1200ppm の培養器で 71.2 $\mu\text{g Chl.a/day}$  と生産量と同様の傾向を示した (Fig.1)。

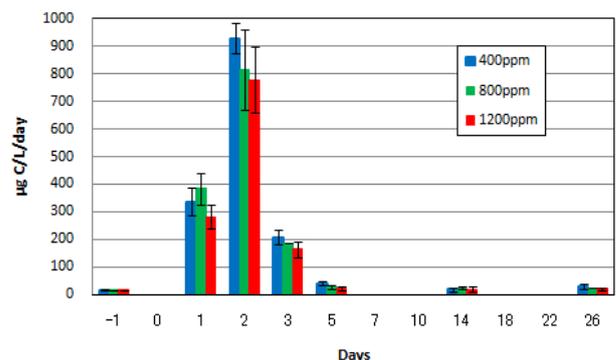


Figure 1: 実験期間中の生産量の変化

また、POC/PON、DOC 濃度も 400ppm の培養器で高く、1200ppm の培養器で低い傾向にあった。POC/PON は実験期間の後半にこの傾向が見られた。DOC 濃度は Day10 に最大となり、400ppm、800ppm および 1200ppm の培養器で、それぞれ 1510、1330、1235 $\mu\text{g C/L}$  であった。この傾向は Day10 以降実験期間が終了するまで見られた。

以上のことから、二酸化炭素濃度が上昇することによって、植物プランクトンの光合成活性が低下する傾向が認められた。

## 今後の展望

4年生では夏季に一度しか実験を行っていないため、大学院でも同様の実験を他の季節においても実施し、海洋酸性化が海洋の物質循環に与える影響について研究を継続したい。

# 多様性が高いほど生産性は高い? 人工草地における生産構造からみた多様性 - 生産性仮説の検証

長谷川 卓郎 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 廣田 充 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

生物多様性の損失は現代社会において大きな問題である。そこには我々を含んだ生物が享受する生態系機能は生物多様性により維持される、という背景がある。すなわち、生物多様性と生態系機能には何らかの関係があり、一般には多様性が高いほど生態系機能も高いと考えられている。実際に、人工草地における野外操作実験により、植物の多様性と生産性に正の関係があると数多く報告されている(多様性 - 生産性仮説, Tilman et al. 1994)。一方、この関係のメカニズムについては、いくつかの説が考えられている。その1つにニッチ相補説があり、多様性が高いと異なる資源を利用する種が増えて生態系全体の資源利用効率も増加し、結果的に生産性が増加するというものである。しかし、この説は論理的研究を除いてはほとんど実証されておらず、多様性 - 生産性仮説も解明には至っていない。

植物群落の生産性を決定する要因として、群落構造がある。特に、生産器官や非生産器官の垂直分布パターン(生産構造)は、広葉型とイネ科型が知られており、種構成や多様性によって変化すると考えられる。そこで本研究では、群落の生産構造が多様性 - 生産性仮説のメカニズムを解くカギと考え、群落の生産構造に着目して多様性 - 生産性仮説に関する研究を行った。

## 方法

調査は、筑波大学陸域環境研究センター円形圃場内で行った。圃場内に40m x 40mの調査区を設定し、その中に50cm x 50cmのコドラートを無作為に72個設置した。地上部の現存量が最大となる8月と9月に生産性の指標としてバイオマスを、多様性の指標として出現種数を調べた。さらに各群落の生産構造を調べるため、層別刈り取りを行った。この際、群落高の異なるコドラート間で比較ができるように、最大群落高を基準に4等分して刈り取り、それぞれの層で生産器官(葉)と非生産器官(葉以外)に分別、その後乾燥重量を秤量した。また植生以外の要因によるコドラート間の生産性の違いを排除するため、土壌を採取し、土壌硬度と固相率を調べた。その結果から、危険率5%で危険域に含まれるコドラートのデータを除外して、解析を行った。

## 結果

種数と地上部バイオマスの間にはこれまでの多くの知見とは異なり、有意な相関は見られなかった(Figure 1)。群落構造に関しては、種数が多いほど群落の最大高が低くなる傾向がみられた。多様性と群落構造に関しては、生産器官の垂直分布の均等度を示すpielouの均衡度指数と種数の間に正の相関がみられた。すなわち、種数が多いほど生産器官の垂直分布が一様化する傾向がみられた。さらに各層における種数とバイオマスの関係でみると、群落上層部でバイオマスが減少する一方で、下層部では増加する傾向がみられた。さらに、各層の生産器官量に着目すると、バイオマスの変化と同様に上層から中層で減少傾向が(Figure 2の層2)、下層では増加傾向が(Figure 2の層4)みられた。

## 考察

種数と地上部バイオマスの間に相関がみられないことから、この草原では多様性 - 生産性仮説が成立しないことが明らかになった。この背景には何があるのだろうか。本研究の結果から、種数の増加にともなう群落構造の変化の関与が示唆される。群落下層部では弱光環境でも生育可能な種が増えて、植物の生産器官・非生産器官がともに増加した。一方で、下層での種の増加によって、光以外の資源をめぐる競争が激しくなり、上層の植物量を相対的に減少したと考えられる。資源の獲得競争の激化は、種数の増加にともなう群落高の変化からも示唆される。このように多様性の増加による群落の構造変化は、植物群落の多様性と生産性の関係を理解するための重要なメカニズムである可能性が高く、今後も更なる研究が必要である。

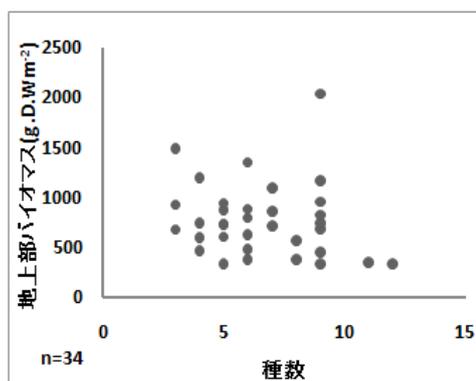


Figure 1: 8月における種数とバイオマスの関係

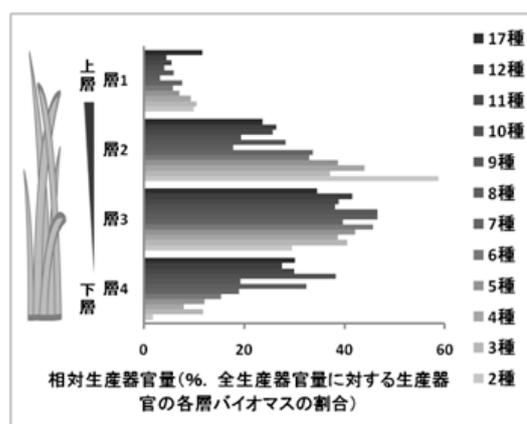


Figure 2: 各群落の生産器官の垂直分布

## 参考文献

Tilman, D. and Downing, J. A. (1994) Biodiversity and stability in grasslands. *Nature* 367, 363 - 365.

Loreau, M., Naeem, S. and Inchausti, P. (eds.) (2002) *Biodiversity and Ecosystem Functioning: Synthesis and Perspectives*, Oxford University Press. Oxford

## 減圧チャンバーを用いた低圧環境が 高山植物の生理特性に及ぼす影響の評価と実験系の構築

早川 恵里奈 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 廣田 充 (生命環境科学研究科)

### 背景と目的

高山特有の環境に適応している高山植物は、近年の環境変動によってその存在が危ぶまれている (Körner 2007)。高山植物の環境変動に対する影響を明らかにするには、個々の環境要因に対する植物の応答機構を解明することが重要である。ところが、高山では温度や気圧などの様々な環境要因が標高とともに変化しているため、個々の環境要因の影響を分けて評価することは難しい。特に高標高域に特徴的な低圧環境は、温度と連動して変化するためその影響はほとんど理解されていない。低圧環境は大気質量の低下だけでなく光合成の基質である CO<sub>2</sub> 分圧が低下するため、CO<sub>2</sub> が不足しがちになり光合成に多大な影響を与えている可能性がある。そのため、CO<sub>2</sub> の取り込み口である気孔は、低圧環境で光合成を制御する要素の一つとして重要であると考えられる。そこで、気孔の挙動が低圧環境に適応して変化するという仮説を立て、この仮説検証を目的として、減圧チャンバーを用いた研究を開始した。本研究では、低圧環境が植物の気孔に及ぼす影響を検証するため、気孔の開閉応答が異なる 2 種のポプラを用いて低圧環境下での栽培実験を行っている。今回は、減圧実験に使用する植物の気孔応答と光合成特性の把握、および今後の実験で植物を栽培する減圧チャンバーの検討結果について報告する。

### 方法

使用した植物は 2 種のポプラ (*Populus euramericana* cv. I-214, *P. koreana* × *P. trichocarpa* cv. Peace) である。このうち Peace は気孔が常にやや開いており、光や ABA に対して気孔が応答しない種である (Tang & Liang 2000)。

実験室の環境は、光が 800 - 0 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、湿度が 65 - 75%、気温が 20 - 25 °C である。生育気圧は、減圧チャンバーで 0.7 気圧 (標高 3000m を想定)、対照チャンバーで 1.0 気圧 (標高 0m を想定) である。各グロースチャンバーは直径 60cm × 高さ 1m の円筒形で、毎分 10L 実験室内の空気を流している。減圧チャンバーはポンプでチャンバー内の空気を引きつつ、外部の空気を導入するといった半閉鎖システムであり、低圧環境での長期間栽培が可能になっている。約 60 日間の栽培後、携帯型光合成蒸散測定装置 (LI-6400, Li-Cor 社) で展葉後の一番若い葉における大気圧下の光合成速度を測定した。同時にスンプ法による気孔の密度や大きさの測定、寒天切片による葉の解剖構造の測定、さらに同じ葉の窒素含有率を NC コーダー (Sumigraph NC-900, 住友化学) で分析した。

### 結果と考察

**2 種のポプラの気孔と光合成特性** I-214 と Peace では、光強度に対する気孔コンダクタンス (g<sub>s</sub>: 気孔における CO<sub>2</sub> の通りやすさ) の応答が著しく異なった (Fig 1)。両種の光 光合成曲線はほぼ同じであり、両種の g<sub>s</sub> と光合成の関係は大きく異なっていた。一方、葉内細胞間隙 CO<sub>2</sub> 濃度 (C<sub>i</sub>) の応答は 2 種ともに光強度の増加とともに C<sub>i</sub> が減少し、ある値で一定になったが、強光下での Peace の C<sub>i</sub> は低くなる傾向がみられた (Fig 2)。また、CO<sub>2</sub> 固定酵素

(RubisCO) 量の指標である窒素含有率は、両種の間有意差はなかった。

この結果から、I-214 は光に対して g<sub>s</sub> が変化する一方で Peace では気孔が常に閉じ気味で g<sub>s</sub> が変化しないことが再確認できた。しかし、両種の光合成速度と光に対する応答は同じだったことから、Peace は葉内外での CO<sub>2</sub> 濃度差が大きくなることで、I-214 と同程度の光合成速度を保っていることが示唆された。今後は、このような光に対する気孔の応答特性が異なる 2 種を用いて、低圧環境の影響を明らかにしていく。

**減圧チャンバーの環境要因と課題** 減圧チャンバーでは対照用チャンバーに比べて光合成有効放射量 (PAR) が約 15% 減少しており、これは今後の改善点の一つである (Table 1)。また、両チャンバー内は植物の蒸散によって高温多湿となっており、植物の生育に適した環境ではなかった。そのため、用いる植物の蒸散速度から適切なサンプル数を検討し、より多く外気を取り込むことで、温度や湿度を適切な値に制御する必要がある。

### 引用文献

- Körner C (2007) The use of 'altitude' in ecological research, *TRENDS IN ECOLOGY & EVOLUTION*, 22, 569-574
- Tang YH, Liang NS (2000) Characterization of the photosynthetic induction response in a *Populus* species with stomata barely responding to light changes, *TREE PHYSIOLOGY*, 20, 969-976

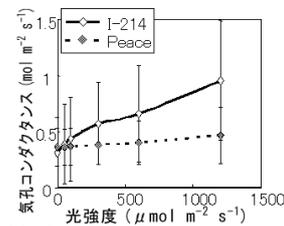


Fig 1 光強度と気孔コンダクタンスの関係

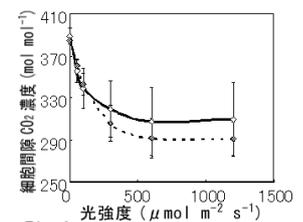


Fig 2 光強度と細胞間隙 CO<sub>2</sub> 濃度の関係

	減圧チャンバー	対照チャンバー
PAR (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	487.7	570.3
湿度 (%)	84.2	93.5
温度 (°C)	29.1	29.1

Table 1: チャンバー内の光と温湿度

# 林床植生に着目した冷温帯二次林の遷移パターンと炭素固定量の違い

吉田 沙織 (筑波大学 生物学類)

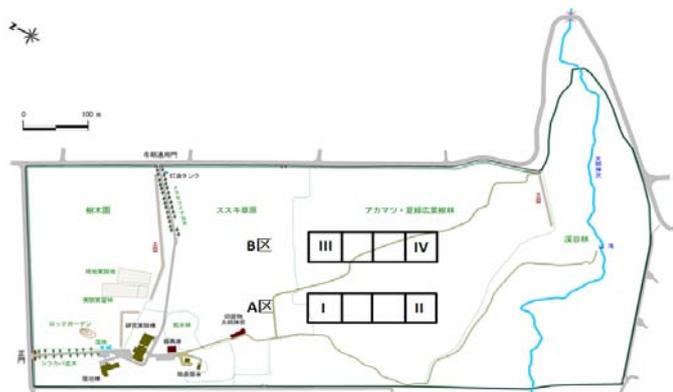
指導教員: 廣田 充 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

近年、大気中のCO<sub>2</sub>濃度上昇による地球温暖化が大きな問題となっている。そのため、大気CO<sub>2</sub>濃度を調節する機能が大きい森林生態系の炭素動態の正確な把握が必要である。炭素動態は、生態系内の炭素蓄積量やその分配によって表されるが、その中で最も大きな役割を持つのが植物である。よって、炭素動態を把握するうえで、植生構造や種の時間的入れ替わりである遷移プロセスを考慮することが肝要である (Chapin et al. 2002)。森林生態系の林床植生が、全植物量に占める割合は小さい。しかし、森林の更新に関する実生の成長に影響を及ぼすだけでなく、日本の代表的な林床植生であるササのように炭素循環にも多大な影響を及ぼすことが知られている。そこで本研究では、林床植生に着目し、林床植生の違いが1. 遷移の進み方や植生構造にどのような影響を与えるか、2. 森林生態系の炭素蓄積量とその分配にどのような影響を及ぼすか、という2点を解明すべく研究を行った。

## 方法

筑波大学菅平高原実験センター内のアカマツ・ミズナラ針広混交林内に200 m × 50 mの調査区を2つ設置した。(林床植生がツツジ: A区 ササ: B区 [A区の草原側50 m × 50 mのエリアをI、森林側50 m × 50 mのエリアをIIとする。B区も同様に草原側をIII、森林側をIVとする。])



調査区内の全立木の胸高直径 (DBH、今回は5cm以上のものを対象) と樹木の位置、主要な林床植生であるササとツツジの地際直径を測定した。落葉落枝量はセンターにて毎月測定したデータを用いた。植物の炭素量は、炭素含有率を50%として算出した。

## 結果および考察

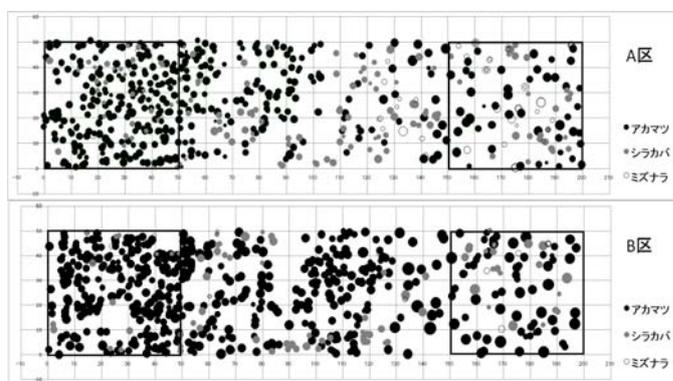
それぞれの調査区における樹木の分布を Figure1 に示す。位置が樹木の位置を、サイズがDBHを表している。次にA・B区内のアカマツ林、針広混交林それぞれの森林構造を Table1 に示す。最後にA・B区内のアカマツ林、針広混交林それぞれの炭素量を Table2 に示す。林床植生の違いに注目しつつ、遷移初期林のアカマツ林 (I と III)、とその後続く遷移途上林の針広混交林 (II と IV) を比較すると、Figure1 と Table1 から遷移が進むとDBHが大きくなって

樹木密度が小さくなる傾向があるが、A区に比べB区ではあまり差が見られない。また、どのエリアもアカマツが最大優占種だが、優占度を示す相対断面積の違いから、B区のほうが遷移速度 (アカマツ林 混交林に移る速度) が遅いことを示している。その原因は、落葉低木樹のツツジに対して常緑性のササが林床を覆うことで遷移途中から侵入する樹木の生育が遅くなったことにあると考えられる。

## 引用文献

Chapin FS et al. (2002) Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology. Springer, p436

Figure 1: 樹木散布図



太枠で囲まれているエリアが左上からI、II(A区)、III、IV(B区)である。

Table 2: 森林構造

	A区		B区	
	I	II	III	IV
推定平均樹齢 (年)	39.6	49.7	39.9	43.2
密度 (本 ha <sup>-1</sup> )	1480	708	1588	704
優占種 上位5種 (相対胸高断面積を元に算出)	アカマツ (86%) シラカバ (5%) カラマツ (2%) ヤマナラシ (2%) ミズナラ (1%)	アカマツ (58%) ミズナラ (17%) シラカバ (11%) ミズキ (5%) ヤマハンノキ (2%)	アカマツ (88%) カラマツ (3%) シラカバ (3%) ミズキ (1%) ヤマナラシ (1%)	アカマツ (78%) シラカバ (13%) ミヤマザクラ (3%) ヤマハンノキ (2%) ミズナラ (1%)
DBH (平均 / 最大) (cm)	23.1 / 38.9	34.5 / 55.5	23.3 / 40.7	31.8 / 58.3
アカマツ	12.7 / 26.8	21.6 / 41.8	12.8 / 22.8	20.2 / 44.7
シラカバ	10.6 / 29.2	20.8 / 48.3	8.5 / 12.6	12.9 / 18.3
ミズナラ	9.3 / 38.9	12.0 / 40.7	8.9 / 45.6	8.9 / 21.2
その他				
バイオマス (t DW ha <sup>-1</sup> )	103.1	115.7	111.2	72.1
アカマツ	73.0	43.4	81.6	42.6
シラカバ	10.1	44.9	7.0	20.0
ミズナラ	1.9	34.1	1.2	1.8
その他	18.2	25.3	21.4	4.5

Table 3: 炭素蓄積量

		A区		B区	
		I	II	III	IV
炭素蓄積量 (t C ha <sup>-1</sup> )	全樹木	44.42	49.82	47.86	31.01
	落葉落枝	0.02	0.01	0.02	0.01
	林床 (ササ)	0.00	1.69	2.29	4.29
	(ツツジ)	0.37	1.18	0.00	0.00

## Baldwin Effect on the Learning Curve

内堀 そよみ (筑波大学 生物学類)

指導教員: 徳永 幸彦 (生命環境科学研究科)

Baldwin (1896) は、生殖細胞系列におきた変異のみが自然選択の対象になるという neo-Darwinism の考え方に、学習という過程を組み込む事で、集団がより環境に素早く適応できるという考えを提唱した。これを Baldwin 効果と言う。しかし、Baldwin 効果は、学習しなければ生き残れないような非常に厳しい環境でしか起こりえないという事と、一見したところ、Lamarck の語った獲得形質の遺伝に見えるという事が原因で、生物学の分野ではあまり検討されてこなかった。数少ない実験の代表例は、ショウジョウバエを用いた Waddington による実験 (e.g., 1952, 1956) とタバコスズメガを用いた Suzuki and Nijhout による実験 (2006) である。どちらの実験も、非常に厳しい起こりにくい環境を何代にもわたって設定し、その環境の与える刺激に対して特定の形質を持つ個体のみを選抜していくという実験を行った。Waddington (1952) の実験結果では、環境の影響によって生じた形質が固定された (Genetic Assimilation)。Suzuki and Nijhout (2006) の実験結果では、環境の影響によって生じた形質がより少ない刺激でも生じるようになった (Genetic Accommodation)。一方、多くの理論的研究も行われてきており、Baldwin 効果の存在を肯定するモデルがいくつか提案されている。しかし、これらのどのモデルも内容が非常に抽象的であるため、前述した 2 つの実験例を十分に説明できない。本研究では、Kawecki (2010) の提案した学習曲線に学習要素を遺伝要素に転換する階段上りを組み込むことによって、これらの実験結果を説明できる新しいモデルを提案する。今回提出するモデルは、特殊な進化状況を考える Baldwin 効果だけでなく、siRNA や miRNA の存在で活気づく epigenetic の分野や広く生物の共生現象を考える場合にも応用できると考えられる。

## シロイヌナズナの栄養成長相転換に関わるヒストン修飾関連タンパク質の探索

芝 勇人 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 鎌田 博 (生命環境科学研究科)

## 背景

ゲノム全体にわたるグローバルな遺伝子発現制御に関わるクロマチンリモデリング機構に関する研究が近年飛躍的に進展している。高等植物においては、シロイヌナズナを中心に、発生・分化を制御する重要な因子であることが明らかにされつつある。クロマチンリモデリング機構において重要な役割を果たすヒストンタンパク質のアセチル化/脱アセチル化は、植物の生活環の中で成長相の転換に大きな役割を果たしている。胚発生から栄養成長への相転換時には、それまで維持されてきた胚発生の遺伝的プログラムを強制的に抑制し、栄養成長へと円滑に移行させることが必須である。私の所属する研究室では、その過程に異常を示すヒストン脱アセチル化因子の変異体が単離され、その解析が進められている。

シロイヌナズナでは、現在、18種類のヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) が同定されている。当研究室の先行研究により、タイプ I の RPD3 ファミリーに属する HDA6、HDA19 が胚発生から栄養成長相への相転換時に重要な役割を果たしていることが示された。HDA6、HDA19 の発現抑制体を掛け合わせた二重変異体 (HDA6/19:RNAi) は、発芽後の子葉の展開と緑化といった発芽後成長の進行が遅延するとともに、LEAFY CLTYLEDON1、LEAFY COTYLEDON2、ABSCISIC ACID INSENSITIVE3、FUSCA3 といった、胚発生特異的転写制御因子の発現が、適切に抑制されず、発現し続けていた。また、HDA6/19:RNAi では、地上部器官において胚様組織の形成が見られた。このことから、HDA6、HDA19 は、胚発生から栄養成長への相転換時において、ヒストンの脱アセチル化を介して、胚発生特異的転写制御因子の発現を抑制することで、適切な発生・分化に寄与しているものと考えられている。しかし、HDA6、HDA19 は特異的な塩基配列を認識するドメインを有しておらず、標的となる遺伝子領域のヒストンへとリクルートされるためには、他の転写因子の媒介が必須であると考えられる。

そこで本研究においては、胚発生から栄養成長への相転換時において、HDA6、HDA19 と相互作用を示す因子を yeast two hybrid 法 (Y2H) を用いて探索し、当該因子の相転換時における詳細な役割、リクルート機構を解明することを目的としている。

## 材料および方法

モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana Columbia*) を用いた。GAL4 を基にした Y2H のシステムを採用した。これは GAL4 タンパク質の DNA 結合ドメインと、転写活性ドメインが分離可能であることを利用したものであり、タンパク質の相互作用がある時のみ、DNA 結合ドメインと転写活性ドメインが近接可能になり、それによってレポーター遺伝子の発現が誘導される。菌株には *Saccharomyces cerevisiae* Y2HGold を用いた。

## 結果

Bait として、GAL4 タンパク質の DNA 結合領域をコードする pGBKT7 DNA-BD クローニングベクターに HDA6 (1-258 aa, 209-478 aa)、HDA19 (1-278 aa, 218-501 aa) を導入したコンストラクトを作成した。Y2HGold に Bait のプ

ラスミドを導入し、SD-WHA+X- $\alpha$ GAL 選択培地で生育させ、青白判定により、自律活性が起こらないことを確認した。Prey として、(1)GAL4 タンパク質の活性化ドメインをコードする pGADT7 AD クローニングベクターに、吸水後 12h のシロイヌナズナ種子から調整した cDNA を導入したライブラリーと、(2)GAL4 タンパク質の活性化ドメインをコードする pACT(pSE107) に花芽や花芽分裂組織等を含む花序から調整した cDNA を導入したライブラリーを用いた。そのライブラリーから、Gigaprep を用いてプラスミドの調整を行った。Bait プラスミド導入酵母に Prey プラスミドを導入し、SD-LW 選択培地で生育させ、形質転換効率を測定する一方で、SD-LWHA 選択培地で生育させ、陰性を排除し、相互作用を示すプラスミドが導入された酵母を選抜した。SD-LWHA 選択培地で生えてきたコロニーを SD-LWHA+X- $\alpha$ GAL 選択培地に植菌し生育させ、青白判定により、擬陽性を排除し、真の陽性と考えられるものを選抜した。

## 今後の展望

今後は、得られた相互作用因子の配列を決定し、胚発生での関りについて明らかにする。

## 葉緑体形質転換を用いた食べるワクチンの開発に関する研究

金井 啓介 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 鎌田 博 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

近年、色素体形質転換は植物バイオテクノロジーにとって重要なものの一つとなっている。核 DNA に遺伝子を組み込んだ従来の形質転換植物に比べ、色素体の DNA に遺伝子を組み込む形質転換植物における導入遺伝子の形質発現は数多くの利点を持ち、特に色素体中の外来タンパク質の蓄積量の高さが指摘されている (De Cosa *et al.*, 2001)。また色素体形質転換にはジーンサイレンシングや位置効果などのエピジェネティック効果がないことや、色素体は母性遺伝するために組換え遺伝子が環境中に拡散する可能性が低いことなどからも、色素体形質転換の利便性を認識することができる (Bock, 2001; Ruf *et al.*, 2007; Svab and Maliga, 2007)。

したがって植物の色素体形質転換には、生物製剤を大量に合成するための手段としての期待が寄せられている。色素体は細胞中に多コピー存在するため、導入遺伝子の高発現により生化学的な合成に比べ生産コストダウンにつながるからである。このことから過去数年に渡り、破傷風菌 (TetC; Tregoning *et al.*, 2003) や炭疽菌 (PA; Watson *et al.*, 2004)、ライム病菌 (Lyme disease; Glenz *et al.*, 2004; Chebolu and Daniell, 2007) 等の抗原タンパクの遺伝子導入がタバコを用いて行われ、安定的に発現していることが報告されている。動物を用いた免疫学的研究からも、色素体が生産した抗原 (ワクチン) は安定的な活性を持ち、免疫応答を引き起こすことが示されている。また得られたワクチンの経口投与を考える際、消化酵素による分解を避ける必要がある。この問題を克服するため、消化酵素により分解されにくく、かつ腸管上皮 (免疫系の中心となる部位) に吸収されやすい、ウイルス由来の中空状コートタンパク質 (VLP, Virus-Like Particle) で包んだ抗原を用いる。VLP は核酸を欠くため、それ自体には病原性、感染性、毒性は無い。そのため、主たる免疫系が成立する場である腸管粘膜まで抗原タンパクを運搬する、理想的なキャリアータンパクとなり得る。

本研究では、葉緑体形質転換のモデル植物として知見が豊富なタバコを用いて、これまでには研究がなされていなかった「葉緑体中における VLP の安定的な発現」に関して調査を行い、将来的に実際食することが可能な他の植物への応用、すなわち、農作物を用いた食べるワクチン実用化への知見を得ることを目指した。

## 材料および方法

材料としてタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*, 及び cv. *Bright Yellow 2*) を用いた。本研究室では形質転換体の作製、VLP 遺伝子の発現解析までを行い、サル、マウスを用いた免疫学的研究は、それぞれ (独) 医薬基盤研究所霊長類医学科学研究センター、筑波大学人間総合科学研究科にて行う予定である。

1. パーティクルガン法を用いて、タバコ葉中の葉緑体 DNA に対して VLP 遺伝子 [E 型肝炎ウイルス (HEV) の VLP、インフルエンザウイルスの抗原をコードする塩基配列、更に免疫沈降実験用の tag を融合したもの] を導入し、葉緑体形質転換を行った。VLP 遺伝子のプロモーターには、葉緑体 *psbA* プロモーターを用いた。また、VLP 遺伝子の部分を GFP 遺伝子に変えたものも葉緑体形質転換に用い、コントロールとした。

2. 形質転換後のタバコ葉はリーフディスク法により抗生物質 (スペクチノマイシン) 含有培地で選抜を行った。徐々にスペクチノマイシン濃度を高めて選抜したことで、形質転換した葉緑体と、野生型葉緑体を併せもつ状態 (heteroplasmy) から、形質転換した葉緑体だけをもつ状態 (homoplasmy) に近づけ、個体再生を図った。

3. 形質転換した DNA 塩基配列の一部と相補性をもつプライマーを設計し、再生個体の葉緑体 DNA を PCR で増幅した。

4. PCR で確認された DNA 断片のうち、VLP 遺伝子と見込まれる断片のシーケンスを解読し、それが VLP をコードする配列かどうかを検証した。

## 結果および考察

1. , 及び 2. について、まだ homoplasmy な個体は得られていない。これはスペクチノマイシン (500 mg/l) で選抜中、野生型葉緑体の全てを除去しきれないことに起因すると考えられる。よって選抜マーカーのスペクチノマイシン濃度を徐々に高くし、選択圧を増大させて選抜を行っている。これにより個体を homoplasmy に近づけることができると期待される。

3. について、葉緑体形質転換を行った個体の一部の葉の葉緑体 DNA 中に、VLP 遺伝子と同じサイズ断片を確認した。しかしながら、今回 VLP 遺伝子と同じサイズ断片を確認したサンプルでも形質転換効率は低く、選抜を繰り返しても homoplasmy にはならなかった。原因として、形質転換した葉緑体を含む細胞を積極的に選抜できなかったことが考えられる。そこで、Pal Maliga 博士からの供与である新型の形質転換ベクターを改変し、スペクチノマイシン耐性遺伝子と GFP 遺伝子をコードする配列を融合させた選抜マーカーと、VLP 遺伝子を含む形質転換ベクターの作製を行った。これにより、スペクチノマイシン耐性の葉緑体を含む細胞を、GFP の蛍光で可視化することができる。したがって、形質転換効率及び選抜効率の向上が期待される。今後はこの新型形質転換ベクターを用いて形質転換を行っていく予定である。

4. について、現在、塩基配列を解読中。

## 謝辞

本研究に際し、VLP 遺伝子は (独) 医薬基盤研究所 霊長類医学科学研究センター長 保富康宏 博士に提供していただき、形質転換ベクター pRV112A ' は京都府立大学 椎名 隆 博士、中平洋一 博士に提供していただきました。コンストラクトは筑波大学人間総合科学研究科 竹内 薫 博士に、これらを用いて作製したものをいただきました。厚く御礼申し上げます。

また、実際に葉緑体形質転換をご指導くださいました森川一也 博士、林 敬子 博士の両氏に心から感謝いたします。新型の植物形質転換ベクターを快く提供して下さった米国ラトガース大学 ワクスマン研究所の Pal Maliga 博士に心から感謝いたします。

## トマトを用いた食べる新型インフルエンザワクチンの開発に関する研究

川辺 寛太 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小野 道之 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

今、食べるワクチンが注目されている。コメやジャガイモ、レタス、トマトなどの食物にワクチンの機能を持たせ、それを食べることによって病気を予防する。食べるワクチンは、食物に含まれている免疫誘導物質が腸管粘膜に直接届く為、現行の注射型ワクチンでは誘導できなかった粘膜免疫を誘導することができる。また、保存・運搬するのに特殊な冷蔵保存(コールドチェーン)を必要としないので、そのような技術に乏しい発展途上国にも食べるワクチンを供給することが出来る。しかし、このワクチンは加熱処理には弱く、ジャガイモなど加熱が必要な食物ではワクチンの効果を失ってしまう。

本研究では、弱点を克服するため、トマトにインフルエンザの抗原ペプチドの発現遺伝子とワクチンの運び屋(キャリアー)となる HEV-VLP(E 型肝炎ウイルス)(Virus-Like Particle) の発現遺伝子を導入することにより、将来、流行が予測される新型インフルエンザに対しても効果のあるワクチンの開発を試みた。

## 材料および方法

材料はトマト (*Solanum lycopersicum*) の品種マイクロトムを用いた。矮性の品種で、背丈は 15 cm 程であり、蛍光灯下でも生育可、播種から結実まで約 4 ヶ月と早い。また、トマトは生食が可能であり、VLP の弱点である熱処理が必要ない為、本研究の材料としては最適である。

## (1) HEV-VLP 及び抗原ペプチドを導入した形質転換体の作製

トマト由来の果実特異的に発現する E8 プロモーターに、HEV-VLP と HSV-tag を連結させたコンストラクト、これにインフルエンザウイルスの抗原ペプチド遺伝子を加えたコンストラクト、コントロールとして ZsGreen のみを連結させたコンストラクトの 3 種類のコンストラクトを作製した。ZsGreen は蛍光タンパクを発現する遺伝子であり、この果実を観察することによって、導入遺伝子の発現部位を視覚的に分析することが可能である。

これらのコンストラクトを導入したアグロバクテリウムを、発芽後 6~10 日後のマイクロトムの子葉に感染・導入した。再分化個体は抗生物質カナマイシンの薬剤耐性により選抜し、馴化させる事で形質転換体を作製した。

## (2) タンパク質の発現解析

採取した果実を、液体窒素を使用して凍結粉末状にし、タンパクを抽出した。その後、Western blotting を用いて発現解析を行った。

## (3) ZsGreen 導入果実の蛍光タンパクの観察

採取した果実を赤道面に沿って 2~5 mm 程度にスライスしたものを、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

## 結果および考察

## (1) HEV-VLP、抗原ペプチドを導入した形質転換体の作成

HEV-VLP と、抗原ペプチド、HSV-tag を連結したコンストラクトを導入したもの(抗原ペプチド株)が 11 系統、HEV-VLP と HSV-tag を連結したコンストラクトを導入し

たもの(HEV 株)が 24 系統、ZsGreen と HSV-tag を連結したコンストラクトを導入したもの(ZsGreen 株)が 30 系統得ることができた。得られた形質転換体のうち果実における導入遺伝子の転写レベルの発現について、RT-PCR 法により解析したところ、採取した果実の全てにおいて転写レベルでの発現が見られた。

## (2) タンパク質の発現解析

上述の RT-PCR 法の解析により転写レベルでの発現が認められた果実のうち、抗原ペプチド株について、Western blotting を行ったところ、一つの個体でバンドが検出された。また、一次抗体として anti-HEV と anti-HSV-tag の二つを用いた結果、両者ともバンドを確認することができた。

## (3) ZsGreen 導入果実の蛍光タンパクの観察

蛍光顕微鏡による観察の結果、Wild Type (WT) の果実と比較して、ZsGreen 導入果実は、果肉の部分に顕著な蛍光を観察することができた。また、果実のゼリー状の部分には、蛍光を観察することができなかった。このことから、E8 プロモーターにより目的遺伝子は果実、特に、果肉部分で発現することが確認された。

## 今後の展望

Western blotting における解析結果が出た果実は、果実をすりつぶして電子顕微鏡で観察することで、VLP の存在を確認することを計画している。また、実際にマウスに経口投与することで、インフルエンザウイルスに対する免疫原性を確認する予定である。

同時に、現在、実った果実から種を採取・播種し T2 世代を育成中であり、それらの果実についても同様の分析を行っていく予定である。

## 謝辞

本研究のご指導また、試料の提供をしていただいた筑波大学人間総合科学研究科の竹内薫准教授、内藤忠相助教授、霊長類医科学研究センターの保富康宏先生にここで感謝申し上げます。また、植物発生生理学研究室の鎌田博教授、小野道之准教授、小野公代博士をはじめ、研究室の方々にご挨拶を申し上げます。

アサガオ *Pharbitis nil* 光周性花成誘導に関わる制御因子の研究

山田 遊太 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小野 道之 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

植物は成長がある段階に達すると栄養成長から生殖成長への移行を行い、生殖成長の過程において子孫を残すために花を咲かせる。植物の花成とはこの成長相の移行を指す。花成は温度条件や光といった外的要因、自身が生産する植物ホルモンなど内的要因に至るまで、さまざまな要素による複雑な制御を受けているが、この中で光周期(日長)より制御される花成を光周性花成誘導と呼んでいる。

光周性花成誘導の分子生物学的研究においてはシロイヌナズナやイネがよく用いられる。しかし、これらの植物は条件的日長要求性植物であり、適した光周期になくとも(遅延はするものの)花成が誘導されてしまう。本研究で用いたアサガオ品種ムラサキ *Pharbitis nil* cv. Violet は絶対的短日植物であり、適した光周期条件下でのみ花成が誘導され、不適切な光周期条件下においてはまったく花成が誘導されない。またムラサキには、ただ1回の短日処理のみで確実に花成が誘導される性質があり、このような特徴から光周性花成誘導の解析には特に有用となっている。

光周性花成誘導に関わる遺伝子は現在、数多く単離されている。シロイヌナズナから単離された遺伝子 *FLOWERING LOCUS T (FT)* は花成ホルモンの正体であると考えられており、さらに *FT* 上流の *CONSTANS (CO)* や *GIGANTEA (GI)* といった制御因子も多数が単離・解析されている。長日植物であるシロイヌナズナでは *GI* は *CO* の転写を、*CO* は *FT* の転写を、それぞれ促進する。しかし一方、短日植物のイネやアサガオにおいては、*CO* の相同遺伝子が *FT* の相同遺伝子の発現を抑制していることがわかっており、この違いが長日植物と短日植物の光周期応答の特徴を分子レベルで与えているものと考えられる。

シロイヌナズナで *CO* が担っていた *FT* を直接促進的に制御する働きは、アサガオにおいては *Pharbitis nil TARGET OF EAT 1 (PnTOE1)* が担うとする可能性が示唆されている。*PnTOE1* はシロイヌナズナにおいて *FT* の転写を抑制する AP2 ドメイン転写制御因子をコードするが、アサガオにおいては *CO* 同様機能に変化が起こり花成ホルモンの本体である *Pharbitis nil FLOWERING LOCUS T LEAF-TYPE (PnFTL / PnFT1)* の転写を促進している可能性が考えられる。

また、アサガオにおける *CO* の相同遺伝子は花成を抑制する働きをしていることから、シロイヌナズナで *CO* の発現を抑制している転写制御因子が、アサガオでは結果的に花成誘導を促進している可能性が考えられる。シロイヌナズナの遺伝子 *CYCLING DOF FACTOR1 (CDF1)* は暗期に発現が上昇し *CO* の転写を抑制することで花成を遅延させる転写制御因子であり、そのアサガオにおける相同遺伝子として得られたものが *Pharbitis nil CDFs (PnCDFs)* である。これら遺伝子は暗期の後半・*PnFTL* が発現する前に発現が上昇する遺伝子群であり、中でも *PnCDFd* は光周期に対する反応は特にはっきりしている。

そこで本研究ではこれらの遺伝子 *PnTOE1* や *PnCDFd* の解析による花成促進機構の解明を目的とし、発現パターンの解析、形質転換体の作出による *PnFTL* 発現や花成に与える影響の調査などを行う。また、成長相の移行に広く重要な microRNA miR172 による *PnTOE1* mRNA の分解機構があることから、この分解に耐性を持つ miR172-resistant *PnTOE1* 形質転換体植物の作出と解析も行う。

## 材料および方法

- 植物材料にアサガオ品種ムラサキ (*Pharbitis nil* cv. Violet) を用いた。ムラサキは10時間以上の暗期を1回与えるだけで花成が誘導されることが明らかとなっている。
- 発現解析には RT-PCR 法を用いた。
- アサガオの形質転換には本研究室にて確立された方法を用いている。目的に応じて作製した各コンストラクトを *Agrobacterium* に導入し、アサガオの不定胚に感染させた後カナマイシンによる選抜を行い、再分化を誘導する。再分化した個体をさらに発根誘導培地に移し、目的遺伝子の導入が確認された個体を馴化する。

## 結果

## 1. 形質転換体の作出

先行研究の配列データを元にプライマーを設計し、*PnTOE1* について全長・RNAi・microRNA resistant の、*PnCDFd* について RNAi の各配列を PCR を用いて単離した。miR172-resistant *PnTOE1* については miR172 の結合部位となっている塩基配列に変異を導入したプライマーを設計し、これを用いた PCR を行うことにより、miR172 による分解に耐性を持つ *PnTOE1* の全長 DNA を得た。続いてこれらの遺伝子を Gateway 法の Entry vector にサブクローニングし、さらに LR 組み換え反応を用いて Destination vector を作製した。このプラスミドベクターを *Agrobacterium* に導入し形質転換を行い、アサガオの不定胚に感染させ形質転換体アサガオを作出した。*PnTOE1* 全長、*PnCDFd* RNAi については感染を終え、*PnTOE1* RNAi, miR172-resistant については Entry vector へのサブクローニングまでを完了している。

## 2. 発現解析

野生型のアサガオを人工的に調節された光周期条件下に置き、*PnTOE1*, *PnCDFd* の時間的発現パターンを RT-PCR 法を用いて解析した。発現解析により、これらの遺伝子が先行研究に報告されているような誘導暗期後半に上昇する発現パターンを示すことを確認した。

## 今後の予定

現在進めているアサガオの形質転換体作出を完了させ、*PnTOE1* や *PnFTL* 遺伝子発現レベルの解析、生理実験(花成調査)などを実施する。発現解析についても今回扱った以外の光周期条件や器官ごとの発現パターンなどといった、より詳細な解析を実施、また発現している microRNA の定量なども視野に入れている。加えて *PnTOE1* の制御による *PnFTL* プロモーター活性の変化を確認するため、*pPnFTL::LUC+* を用いた発光測定を行う。

これらの解析により得られた知見は、アサガオにおける光周性花成誘導の制御機構へのより詳細な理解へとつながる。また、シロイヌナズナを始めとする長日植物との差異を明確とすることで、長日・短日植物双方に特徴を与える分子的要因を示すことができるものと考えられる。

## アサガオにおける誘導プロモーターを用いた導入遺伝子の発現制御の研究

大澤 聡志 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小野 道之 (生命環境科学研究科)

## 背景と目的

従来の一般的な品種改良は長期的でかつ手間のかかるものであり、さらには異なる種間での交配が不可能であるなどの問題があった。これらの問題はRNAi法などの遺伝子組換え技術の開発により改善されてきている。しかし、植物には一つの形質に対して、機能が重複する転写制御因子が存在しているために、RNAi法などにより特定の遺伝子の発現を制御しても表現型にまで反映されないことがある。この問題の回避のために開発された方法がCRES-T(Chimeric REpressor gene-Silencing Technology)法である。この方法では、シロイヌナズナから同定された転写抑制ドメインであるSRDXを任意の転写活性因子に結合させることで、転写抑制因子(キメラリプレッサー)に変えることが可能である。また同時に、機能重複している複数の転写活性因子を同時に抑制することができるため、より効率的に任意の発現を抑制することが可能となる。本研究の材料にはアサガオを用いた。アサガオは今から約1200年前の奈良時代に薬草として渡来したと考えられており、それ以来日本人に愛され、次第に鑑賞用としても栽培されるようになった。また、現在では文科省のナショナルバイオリソースに選定されていることから、優れた材料であるといえる。先行研究では、アサガオの雄蕊・雌蕊の形成に関わる遺伝子*DUPLICATED(DP)*のキメラリプレッサーである*DPSRDX*をつくり不定胚に導入した。これにより、理論上は雄蕊と雌蕊の代わりに花弁とがくが形成される「八重咲き」の花を咲かせると考えられた。しかし、これらの殆どは成長の初期段階で枯死してしまい、いくつかの系統は花芽形成まで成長したものの、開花したものはなかった。この原因が、不定胚の再分化の際に*DPSRDX*が発現してしまったことにあると考え、*DPSRDX*の発現する時期を制御するために誘導プロモーターを用いることにした。本研究では、「熱ショック」と「エタノール」という異なる条件によってそれぞれ発現を誘導する二種類の誘導プロモーターを用いて、その最も強く誘導のかかる最適な条件を特定しようと試みた。

## 材料と方法

本研究で用いるアサガオには先行研究で使われていたものを用いた。これらは、ルシフェリンを分解して発光させるレポータータンパクであるルシフェラーゼの遺伝子に、それぞれ二種類の誘導プロモーターをつなげたコンストラクトを導入した系統を引き継ぎ使用した。ルシフェラーゼの測定は非破壊的であり、高感度でかつ定量性に優れている。また、二種類の誘導プロモーターにはそれぞれシロイヌナズナ由来の熱ショックプロモーター(HSP)と糸状菌の*Aspergillus nidulans*に由来するアルコールプロモーター(*alcA*)を用いた。測定では、形質転換アサガオの新鮮な葉を用いて、それぞれ熱もしくはエタノールによる誘導処理をかけ、ARGUS(ARGUS20(株)浜松フォトニクス)により発光の経時変化を測定した。この作業を、誘導条件の数値を変えて測定し、最も強く発現を誘導する条件を特定した。

## 結果と考察

熱ショックプロモーターでは、35 から40 まで1 ずつ変化させて測定したところ、39 で最も強く発現量が増加した。アルコールプロモーターでは、0.01 から1.0%まで濃度を変えたエタノールで誘導をかけ測定したが、濃度と発現量に相関が見られなかった。これは、エタノールが処理中に気化してしまい、処理の途中で濃度が変化してしまったためと考えられる。これらの結果から、より簡単にかつ効果的に誘導をかけるためには、熱ショックプロモーターの方が良いという結論に達した。シロイヌナズナ由来の熱ショックプロモーターを用いて誘導をかける際の最適条件は39 であるということが判明した。

## 謝辞

本研究を行うに当たりまして、終始ご指導を頂きました、本大学院生命環境科学研究科の鎌田博教授、小野道之准教授、小野公代博士に深く感謝の意を表します。また、共同研究グループ「CRES-T法による新規花卉作出研究プロジェクト」として本研究を支えてくださいました、(独)産業技術総合研究所生物プロセス研究部門、(独)農業・食品産業技術総合研究機構花き研究所、(財)岩手生物工学研究センター、北興化学工業(株)、サントリーホールディングス(株)関係者の方々に深く感謝の意を表します。ベクターを提供して頂きました、(独)産業技術総合研究所生物プロセス研究部門の高木優博士、熱ショックプロモーターを提供して頂いた岡山大学の高橋卓博士、アルコールプロモーターを提供して頂いたシンジェンタ・バイオテクノロジーに深く感謝の意を表します。

## キメラリプレッサーによる花型改変に関する研究

緒方 辰悟 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小野 道之 (生命環境科学研究科)

## 背景と目的

従来の育種には、品種改良に時間や手間がかかることや他種生物間で交雑できないこと等の問題があった。RNAi法やアンチセンス法などの遺伝子組換え技術の発達と様々な生物種におけるゲノム解読の進歩はこれらの問題は改善してきた。しかし植物には、機能が重複した転写活性化因子が存在しており、特定の遺伝子の発現を抑制しても、表現型に反映されないことがある。この問題を改善するために、CRES-T法 (Chimeric REpressor gene-Silencing Technology) が開発された。CRES-T法は、シロイヌナズナの転写抑制因子から同定された抑制ドメイン (SRDX) を任意の転写活性化因子に融合することで、転写活性化因子を転写抑制因子 (キメラリプレッサー) に変換するという手法である。同時に、機能が重複している転写活性化因子の活性を阻害することで、標的遺伝子の発現を抑制する。この方法により、機能が重複する転写因子を複数持つ目的遺伝子の発現を抑制することができる。本研究では、このCRES-T法の実証的研究を目的として、形質転換体作出をアサガオ (*Pharbitis nil*) で試みた。

アサガオ (*Pharbitis nil*) は、文部科学省のナショナルバイオリソースプロジェクトの1つに選定されている花卉のモデル植物である。日本では古来より盛んに栽培され、多くの図譜や論文が存在する。そのため、古典遺伝学・生理学における知見が多く集積しており、現在でも花形の改変に関する変異や遺伝学的解析が進められている。加えて、江戸時代には花の形態が特殊で観賞価値の高いアサガオ品種が多く作出、栽培されており、今日では「変化朝顔」として大学や国内の愛好家によって保存がなされている。

花は、がく・花弁・雄蕊・雌蕊の4器官からなり、これらの原基形成を司る転写因子は発現の時期や場所により3つのクラス (class-A, B, C) に分類することができる。これら転写因子の発現の組み合わせによって、花序分裂組織が将来どの器官に形態形成するかが決定される。アサガオでは、九州大学の仁田坂らにより class-C 遺伝子として *DUPLICATED(DP)* と *PEONY(PN)* が同定、単離されており、*DP* は花弁、雄蕊、雌蕊で発現し、*PN* は雄蕊、雌蕊で発現しているという報告がなされている (Nitasaka, 2003)。また、「八重咲き」という、雄蕊が花弁に、雌蕊ががくになる形質の変異体は、*DP* へのトランスポゾンの挿入による機能欠損によるものであることが報告されている (Nitasaka, 2003)。

本研究では、*DP* のキメラリプレッサーをアサガオに導入し、形質転換体作出を目指した。この研究は、前述のCRES-T法の実証的研究であると同時に、現代のバイオテクノロジーによる、人為的で予測可能な花形改変の可能性を検証する研究である。

## 方法

アサガオの栽培品種であるムラサキ (*Pharbitis nil* cv. *Violet*) を用いた。未熟胚から不定胚を誘導し、目的のコンストラクトを組み込んだベクターを持つアグロバクテリウムを感染させた。組み込んだコンストラクトは、*HSP18.2::DPSRDX* および *PnAPI::DPSRDX* の二つである。

*HSP18.2* はシロイヌナズナ由来の熱ショックプロモーターであり、先行研究によりアサガオでは 39 前後で発現を引

き起こす (大関ら 未発表)。また、*PnAPI* はアサガオ内生の花芽特異的プロモーターであり、花成誘導がなされることによって発現を引き起こす (佐々木 2008)。

*HSP::DPSRDX* 形質転換体 (以下、*HD*) は、十分に成長させた 31 個体内、23 個体を網室で太陽光による熱処理を行い、残りの 8 個体をチャンバーによる安定的な熱処理 (39 °C、4h) を行い、それぞれ花の形態を観察した。*PnAPI::DPSRDX* 形質転換体 (以下、*AD*) は、十分に成長させた 12 個体を、長日条件 (LD) 下から短日条件 (SD) 下へと移動させ花成誘導を引き起こし、花の形態を観察した。

## 結果と考察

特定網室に移動させた *HD* では、31 個体内 18 個体が花の形態に変化が見られた。その内、7 個体で雄蕊と花弁が癒着しているもの、3 個体で雄蕊が完全に花弁化しているものが見られた。チャンバーに移動させた *HD* では、雄蕊と花弁が癒着しているものが 1 個体見られた。どちらも雄蕊が花弁へと変化していることから、class-C 下流遺伝子が抑制されていることが示唆することができる。変化が起これないもの、穏やかなもの、著しいものに分かれたのは、発現量の差によるものと考えられる。

*AD* では、12 個体内 7 個体で雌蕊が花弁化し、その内 2 個体が雄蕊と雌蕊のどちらも花弁化した。*AD* では *HD* でよく見られた雄蕊と花弁の癒着は見られず、雄蕊と雌蕊どちらも単独で花弁化し、元の花弁とは独立して伸長していた。

どちらも、*DPSRDX* を発現量は調べておらず、今後は顕著に表現型が変化した個体や、それらの次世代での発現量と表現型の関係性を検証する。

## 謝辞

本研究を行うに当たり、終始ご指導を頂きました、本学大学院生命環境科学研究科の鎌田博教授、小野道之准教授、小野公代博士に深く感謝の意を表します。また、共同研究グループ「CRES-T法による新規形質花卉作出研究プロジェクト」として本研究を支えてくださいました、(独) 産業技術総合研究所生物プロセス研究部門、(独) 農業・食品産業技術総合研究機構花き研究所、(財) 岩手生物工学研究センター、北興化学工業 (株)、サントリーホールディングス (株) 関係者の方々、そして *HSP* プロモーターを提供して頂いた岡山大学の高橋卓教授、*DP* cDNA を提供していただいた九州大学の仁田坂英二助教に深く感謝の意を表します。

本研究は、「イノベーション創出基礎的研究推進事業：CRES-T法を基盤とした花きの高度形質抑制技術の実用化」によるものです。

# 耐乾燥性遺伝子組換えユーカリ (*Eucalyptus globulus*) の耐性、及び、生物多様性影響評価試験

鈴木 寛人 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 菊池 彰 (生命環境科学研究科)

## 背景と目的

現在、地球規模での砂漠化進行によって森林面積の減少、地球の温暖化、植物の生育が不可能な地域の拡大、農作物の収穫量の減少、それに伴う食糧不足など様々な問題が引き起こされると考えられている。これに対して、半乾燥地においても生育可能な植物を作出し、植栽することが有効な手段の一つとして考えられる。このための基礎研究として、植物の乾燥ストレス応答機構の解明や、乾燥ストレス耐性遺伝子の探索に関する研究が盛んに行われている。シロイヌナズナ由来のガラクトシノール合成酵素 *AtGals2* 遺伝子は、適合溶質として知られるラフィノース属オリゴ糖の基質であるガラクトシノールの合成酵素をコードする遺伝子の一つで、シロイヌナズナやイネに過剰発現させることで環境ストレス耐性を付与されることが報告されている。

私が所属する研究室では、CaMV35S プロモーターの下流に *AtGals2* 遺伝子を連結したコンストラクトを導入した遺伝子組換えユーカリ (*Eucalyptus globulus*) の開発を進めている。しかし、未だその乾燥ストレス耐性や生物多様性影響に対する評価は行われていない。そこで本研究では、実用化に適した遺伝子組換え系統の選抜を目的とし、特定網室における乾燥ストレス耐性評価系の検討および実施、導入遺伝子の発現解析、及び、生物多様性影響評価試験を行なった。

## 材料と方法

### 1. 植物材料

発根幼苗の遺伝子組換えユーカリ (*E. globulus*) 7 系統 (268-5、270-10、270-18、274-1、274-9、290-3、301-1) 及び、非組換え体 5 系統 (No.1、No.8-7、No.8-8、Au1、L047) を植物材料とした。共同研究先である日本製紙 (株) により作出されたユーカリ発根苗を、四角すいポットに移植し、栽培室にて馴化させた (Fig.1)。馴化後特定網室に移し、4 週間以上馴化させたものを乾燥ストレス耐性試験実験に供した。また、一部は、直径 10 cm のポットに移し、成長評価の栽培試験を実施した。

### 2. 乾燥ストレス耐性評価試験

乾燥ストレス耐性を評価する方法として、植物体にマンニトール水溶液処理する方法を採用した。マンニトール水溶液処理後、3 週間の再給水処理を経たのちに生存率を算出し、乾燥ストレス耐性を評価する。

### 3. *AtGals* 遺伝子の発現解析試験

発現解析は、定量 RT-RCR 法により行った。栽培試験中の個体から葉数枚を採取し、RNAqueous<sup>TM</sup> kit Small Scale RNA isolation (Applied Biosystems) を用いて全 RNA を抽出した。cDNA 合成は TaKaRa RNA PCR<sup>TM</sup> Kit (AMV) Ver.3.0 (タカラバイオ) を用いた。定量 RT-RCR に用いたプライマーは、*AtGals2* 遺伝子の配列を元に設計したものを使用した。

### 4. 生物多様性影響評価試験 (土壌微生物相への影響評価試験)

特定網室で 4 ヶ月間栽培した植物の栽培土 30 g を採取し、平板培養法にて糸状菌、放線菌、及び細菌のコロニー数を計測、乾燥土 1 g 当たりの菌数を比較した。

## 結果と考察

まず、市販の種子から発芽させた非組換え体を用いて、乾燥ストレス耐性評価に適切なマンニトール濃度の条件検討を行い、500 mM のマンニトール水溶液を用いることとした。本条件で、組換え体 3 系統 (274-1、274-9、290-3)、非組換え体 3 系統 (No.1、No.8-7、L047) の耐性試験を実施したところ、274-1 系統が優れた乾燥ストレス耐性を有することが示唆された (Fig.2)。残りの系統、及び、追試験を現在実施中である。また、発現解析試験の準備を進めており、乾燥耐性と導入遺伝子の発現量の関係を考察したい。あわせて生物多様性影響評価試験も実施し、実用化に有望な系統を選抜する。

## 参考文献

菊池ら (2006) 耐塩性ユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.codA 12-5B,12-5C,20-C) の形質安定性と環境影響評価試験. 育種学研究 8:17-26

Yu.et al.(2008)Establishment of the evaluation system of salt tolerance on transgenic woody plants in the special netted-house.Plant Biotechnology 26,135-141

Taji, T. et al. (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 29(4), 417-426



Fig.1:栽培の様子



Fig.2:乾燥ストレス耐性評価試験の結果

# 遺伝資源のアクセスと利益配分に関する非商業利用の取り扱いの考察

坪山 有理 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渡邊 和男 (生命環境科学研究科)

## 用語 生物多様性条約第 2 条より

「遺伝素材」とは、遺伝の機能的な単位を有する植物、動物、微生物その他の由来する素材をいう。

「遺伝資源」とは、現実の又は潜在的な価値を有する遺伝素材をいう。

## 背景および目的

2010 年 10 月に行われた生物多様性条約第 10 回締約国会議で名古屋議定書が採択された。名古屋議定書では遺伝資源への適切なアクセスを利益配分のための手段として扱い、利益配分が保証される形でのアクセスを実施するための手続き要件、システムの構築について言及している。遺伝資源のアクセスと利益配分 (Access and Benefit Sharing, ABS) については、1993 年の生物多様性条約 (Convention on Biological Diversity, CBD) 発効、2002 年のボン・ガイドライン採択、2010 年の名古屋議定書採択と議論が進められてきた。現在では、遺伝資源提供国の同意・許可を得てから遺伝資源を利用することになっている。ABS は、製薬企業が創薬に遺伝資源を利用して、利益を得た際の利益配分を遺伝資源提供国が求めるなど、企業による遺伝資源の利用に焦点が当てられることが多い。しかし、大学や公的機関でも遺伝資源を利用した研究は行われており、同じく ABS の対象となる。CBD 発効以前は外国の遺伝資源へのアクセスや、研究者同士での遺伝資源の交換が自由に行われ、それを背景に生命科学分野の研究は発展してきた。既にフィリピン、マレーシアなど、ABS 規制によって遺伝資源を用いた研究が難しくなった例もある。遺伝資源アクセスの難しさには、提供国の ABS 法が厳しすぎる場合があることと、研究者のアクセス手続きに対する認識不足の両方が原因としてあげられる。研究者の ABS に対するリテラシー向上によってアクセス促進を図るにしても、ABS 法の整備状況は大まかな把握しかされていない。本研究では、ABS 国内法の整備状況に加え、学術研究や非商業的研究の取り扱いについて調査・考察を行った。

## 調査

CBD 事務局の web サイト等の ABS 国内法のデータベースを利用。

### 1. ABS の要素を含むかどうか

CBD、ボン・ガイドライン、名古屋議定書によれば、アクセス手続きには PIC (Prior Informed Consent), MAT (Mutually Agreed Term), NCA (National Competent Authority) の要素が必要である。この 3 点に関する条項の有無を調べた。

### 2. 学術研究・非商業利用への配慮

利益追求を目的としない遺伝資源の利用に対し、何らかの配慮があるかどうかの調査を行った。配慮の例として、ABS 法の適用除外、簡素なアクセス手続きの適用などがある。

## 結果

### 1. ABS 国内法の整備状況

ABS 国内法を持つ国は計 35 カ国と 2 カ国 6 州、他に 4 カ国で ABS 法の草案が作られていた。

### 2. 学術研究・非商業利用への配慮

上記 35 カ国のうち、17 カ国に関しては非商業利用への配慮が見られた。具体的には非商業利用への ABS 法の適用除外、商業目的利用とは別に ABS の手続きを定める、自国の研究機関・大学への適用除外、調査・研究許可でアクセスした後に、商業利用したい場合は商業利用許可を取りなおす段階的なアクセス許可などがある。

## 考察

ABS 国内法を持つ国は CBD 締約国の約 2 割と少ない。名古屋議定書で ABS の国際的枠組みが定まったが、ABS 法の立法と実施にあたっていくつかの懸念事項がある。その一つが遺伝資源を巡る複数の議場の存在である。遺伝資源は、作物としての食料遺伝資源、遺伝資源に関連する伝統的知識、知的財産にも渡っていて、WIPO (World Intellectual Property Organization), WTO-TRIPs (World Trade Organization-Treaty on Agreement on Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights), FAO (Food and Agriculture Organization), UPOV (The International Union for the Protection of New Varieties of Plants), CBD と複数の国際機関、国際協定で議論されている。例えば、遺伝資源に関わる特許、知的財産に関して、本来ならば WIPO で議論されるのが適している。しかし、WTO-TRIPs 第 27 条、UPOV の品種育成者権、FAO の農民の権利など複数の国際協定があり、整合性を見出すのが難しい現状である。二点目に、いくつかの国で ABS 法を制定しながら NCA が明示されていないことがあげられる。NCA はアクセス許可、証明に権限を持つので、NCA の承認を受けずには安心してアクセスを行うことができない。三点目に、ABS で二者間契約での取り決めを推進する主張があることである。CBD、名古屋議定書の ABS は基本的に二者間契約で行われるものなので、商法等の私法に基づいて個別に取り決めていくことも可能である。ただ、二者間契約で ABS が遵守されるとは限らないため、モデル契約条項作成や、契約履行の監視が必要になる。他にも諸々の実務的課題が山積しているため、ABS 法の整備には時間がかかると予想される。ABS 法を持つ国の約半数で学術研究・非商業利用への配慮が見られるが、実効性が明らかになっていない。よって実効性の検証が急務である。検証には提供国と利用者間のアクセス申請・許可に関する情報をはじめとして多くの情報が必要である。しかし、インドの NCA web サイトで公開されている他は、ほとんど非公開で、情報を得ることが難しい。研究を進めながら、商業目的のアクセスと学術・非商業利用の区別は難しいと感じている。将来的には、非商業利用への配慮がされるとしても、分野、利用する遺伝資源が極めて限定されると考えられる。従って、アクセスを促進するために最も重要なのは ABS に関する研究を進め、どう対応していくべきかを遺伝資源の利用者に広く知らせていくことではないだろうか。なお、本課題案件については本報告と平行して Nature (14 Oct 2010, vol. 467, pp779-781) に発表があり、時勢を考慮した価値ある研究であることを確認したい。

# シロイヌナズナ花茎の組織癒合における植物ホルモンと AP2 型転写因子の働き

清水 美甫 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 佐藤 忍 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

植物は環境応答の一つとして、傷害を受けた際に組織の再生・癒合を行うことが知られている。これまでに維管束組織の再生・癒合については多くの研究がなされているが、皮層や髄などの基本組織系における組織癒合の分子機構についてはあまり知られていない。先行研究から、シロイヌナズナ花茎の第一節間を水平方向に直径の半分まで切断した花茎の組織癒合では、切断後3日後から髄組織の細胞分裂が開始し、7日後にほぼ組織が回復していることが明らかになった。さらに、地上部器官を切除した植物体では組織癒合が起こらなかったが、そこに植物ホルモンであるオーキシンを処理したところ、細胞分裂が再開することが分かり、癒合部組織での細胞分裂にはオーキシンが必須であることが明らかになった。また、マイクロアレイ法による遺伝子発現の網羅的解析から、癒合部は切断1日後から3日後において、植物ホルモン関連遺伝子や転写制御因子関連遺伝子、細胞分裂関連遺伝子の発現が特異的に上昇することが示された。その中でも組織癒合部特異的に発現が上昇する AP2 型転写制御因子 (RAP) は、ERF/AP2 型転写因子ファミリーという AP2 型 DNA 結合領域を持つ植物特有の巨大な転写因子ファミリーの一員であり、防御応答や形態形成に関与することが知られている。また RAP は、オーキシンによって発現が抑制され、ジャスモン酸によって促進されることが分かっている。

このように、RAP は組織癒合において植物ホルモンによって制御され、組織癒合に関与していることが示唆されているが、その働きについては、まだ明らかになっていない。そこで本研究では、癒合過程における植物ホルモンと RAP の機能を明らかにすることを目的として実験を行った。

## 材料および方法

材料にはモデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*, Col) を使い、インキュベーター内 (22℃、連続光) で生育を行った。

### 1) 変異体の組織癒合過程の観察

抽台後、約一週間のシロイヌナズナの第一節間の花茎をマイクロナイフ用いて、実体顕微鏡下にて、直径の約半分程度水平方向に切断処理を行い、切断処理後 (切断後5、7日目) の切断部周辺をサンプリングし、テクノピット 7100 に包埋して切片を作製し、トルイジンブルーで染色した。

### 2) 組織癒合時の RAP 下流遺伝子の発現解析

切断処理後 (1, 3, 5, 7 日) の WT の切断箇所上部、下部から作製した cDNA を用いて発現量の調査を行った。調査した遺伝子は組織癒合時のマイクロアレイデータから特徴的なものを選んだ。

### 3) pRAP::GUS 形質転換体コンストラクトの作製

シロイヌナズナ野生株の DNA から RAP プロモーター領域を PCR 法を用いてクローニングし、pENTR/D-TOPO (エンタリーベクター) に挿入し、*E. coli* に形質転換した。目的遺伝子が導入されていたコロニーを培養し、プラスミド抽出後、pKGWFS7 (GUS ベクター) に挿入し、*E. coli* コンピテントセルに形質転換した。

## 結果および考察

### 1) 変異体の組織癒合過程の観察

切断処理後7日目の *jar1* 変異体 (ジャスモン酸情報伝達欠損) では WT と比較して組織癒合に異常が生じており、切断箇所上部、下部とも髄組織での細胞分裂が見られなかった。切断処理後7日目の *rap* 変異体では組織癒合がみられたが、WT と比較して切断箇所下部での細胞分裂が減少していた。

以上より、ジャスモン酸や AP2 型転写制御因子 (RAP) の組織癒合への関与が示唆された。*aos* 変異体 (ジャスモン酸合成欠損) RAP-SRDX 形質転換体 (RAP の機能抑制) での組織癒合の観察も現在進行している。

### 2) 組織癒合時の RAP 下流遺伝子の発現解析

現在進行中である。

### 3) pRAP::GUS 形質転換体コンストラクトの作製

目的遺伝子を pKGWFS7 (GUS ベクター) に導入し、*E. coli* に形質転換した際に目的遺伝子が導入されたコロニーを選抜し、配列を確認した。

以上の結果より、オーキシン、ジャスモン酸などの植物ホルモンと AP2 型転写制御因子はシロイヌナズナ花茎の組織癒合過程において重要な働きを有する可能性が示唆された。組織癒合においてオーキシンの局在量の差によって、切断部上部、下部で異なる転写因子が働き、組織癒合を制御していると考えている。今後は切断箇所下部に着目し、RAP プロモーター-GUS 形質転換体を用いた RAP の組織レベルでの発現解析、RAP の機能を欠損した植物を用いた組織癒合時のマイクロアレイ法による下流遺伝子の発現解析などを行い、AP2 型転写制御因子の組織癒合時の働きをより詳細に調査していきたいと計画している。

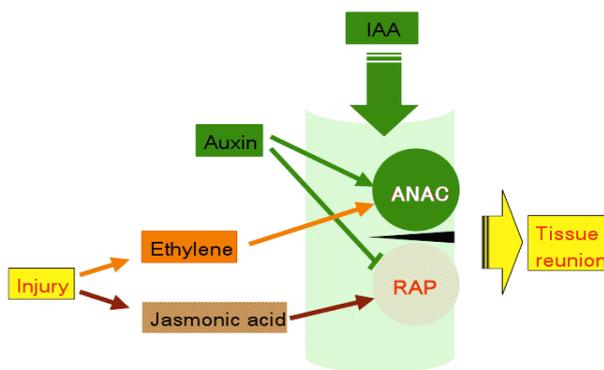


図) 組織癒合初期過程における植物ホルモン作用モデル

# トマト果実成熟過程におけるアスコルビン酸可溶細胞壁の組織別生化学的解析

和田 加奈子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 岩井 宏暁 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

果実は炭水化物やアスコルビン酸 (ビタミン C) をはじめとしたビタミン類などを豊富に含む需要の高い食物である。一方、植物にとって果実は種子の保護および散布のための重要な生殖器官である。食用として利用される果実の多くは成熟に伴い栄養分の蓄積と軟化が同時に生じる。現在までに果実の成熟・軟化過程について、モデル植物であるトマトを用い、特に可食部である果皮の細胞壁に豊富に含まれるペクチン成分のペクチン分解酵素による低分子化に着目して研究が行われてきた。しかし、トマト果実の果皮細胞壁において、ペクチン分解抑制および促進を行っても軟化を決定的には制御させることができなかった。そのため、果皮細胞壁のペクチンの低分子化だけが果実軟化の直接的な原因ではなく、他の果実軟化に関わる細胞壁分解システムの存在が示唆されている。本研究では、その候補として 2003 年に SC Fry により報告されたアスコルビン酸が金属イオンと協調することで発生するヒドロキシラジカルによって、非酵素的に細胞壁からペクチンを可溶化するシステムに注目した。植物の細胞内でのアスコルビン酸はアスコルビン酸ペルオキシダーゼによる活性酸素の除去が主な役割として知られている。しかし、細胞外環境においては、活性酸素は成長中の細胞壁同士の架橋などの反応にむしろ必要であり活性酸素消去系に乏しいとされている。したがって成長が終わり軟化の方向に進む果実の細胞壁では、発生したヒドロキシラジカルによって細胞壁の分解が行われると考えた。

また、これまでの研究では、果実全体を材料としたり、果皮のみに注目したりする実験が多く行われてきた。しかし、果皮だけではなく、種子をとりまくローキュラーや隔壁、芯などといった各組織の構造やその細胞壁の架橋形成を伴う強度こそが果実軟化に重要であることが示唆された (兵頭 2011)。そこで、こういった様々な組織におけるトマト果実の細胞壁から、内在物質であるアスコルビン酸により可溶化される細胞壁量とその組成について、各成熟段階別に比較を行った。本研究ではトマト果実の成熟に伴う各組織でのアスコルビン酸の非酵素的細胞壁可溶化システムの果実軟化における役割について明らかにすることを目的としている。

## 試料および方法

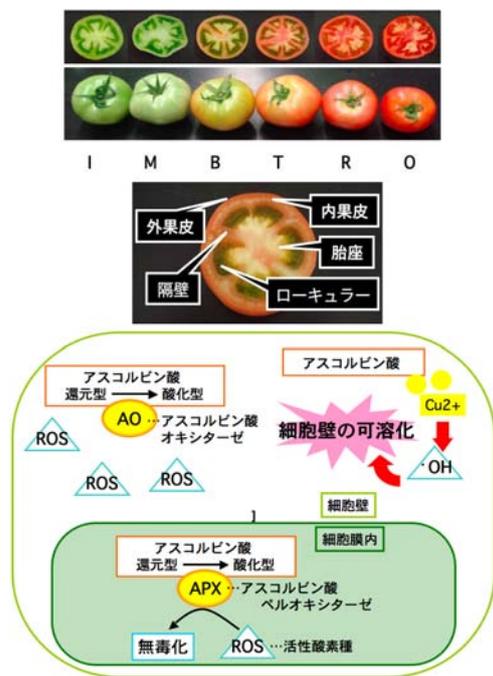
研究材料にはトマト (*Solanum lycopersicum*) 用い、品種は日本で食用トマトとして広く栽培されている大玉トマト品種の桃太郎とトマト果実研究のモデル品種であるミニトマト MicroTom を用いた。これを Immature Green (I)、Mature Green (M)、Breaker (B)、Turning (T)、Red Ripe (R)、Over Ripe (O) の各成熟ステージで、外果皮、内果皮、隔壁、ローキュラー、胎座、種子と組織ごとに分けサンプリングを行い、RQ フレックスを用いてそれぞれのアスコルビン酸含量と pH 値を測定した。また、各サンプルから抽出した細胞壁に 1.5 mM のアスコルビン酸を加え 18 h 抽出を行った。抽出物に対して、カルバゾール硫酸法を用いて、可溶物質中に含まれる酸性糖のウロン酸を定量し、アンスロン硫酸法を用いて中性糖の定量を行った上で、ガスクロマトグラフィーにより構成糖の分析を行った。

## 結果および考察

桃太郎では成熟段階や組織によってアスコルビン酸含量と pH 値に大きな変化は見られなかった。一方、MicroTom ではステージ I から B にかけてアスコルビン酸量は大きく増加し、それと同時期に pH 値は低下した。以上より、トマトの品種によって各成熟段階・各組織でアスコルビン酸含量や pH 値は異なる変化が見られることが分かった。

次に各細胞壁に十分量のアスコルビン酸を与え抽出を行った可溶物質の構成糖分析を行った結果、トマト果実細胞壁ではアスコルビン酸による細胞壁可溶システムが機能し得ることが確認された。カルバゾール硫酸法による定量を行った結果、化学的な抽出と同レベルの酸性糖が検出されたことから、以前に報告のあった通りペクチンが、全ての果実組織の細胞壁からアスコルビン酸によって可溶化されることが示された。また、アンスロン硫酸法の結果、中性糖も同レベルで検出されたことから、アスコルビン酸がペクチン以外の細胞壁多糖も同様に可溶化できることが新たに示された。また、成熟段階や組織によって抽出されてきた糖の質と量には差が見られた。以上の結果から、アスコルビン酸によって可溶化されてくる細胞壁多糖および、その可溶レベルは成熟段階・組織ごとに異なるということが示唆された。また、ガスクロマトグラフィーによる糖組成の分析結果から、ガラクトuron酸が検出されたことからペクチンが、キシロース、マンノース、グルコースが検出されたことから、キシログルカンやマンナンなどのヘミセルロースが可溶化されてきたと考えられた。

今後、アスコルビン酸関連変異体を用いての実験を行うとともに、実際に細胞壁の分解に関わる活性酸素種のヒドロキシラジカル量を測定し、細胞壁で働くアスコルビン酸オキシダーゼや細胞内で働いているとされているアスコルビン酸ペルオキシダーゼの動態を調査し、果実成熟過程におけるアスコルビン酸による細胞壁可溶化システムの機能についてさらに詳しく解析を行う予定である。



## *m*-チロシンによる植物成育抑制作用の解析

内田 千尋 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 松本 宏 (生命環境科学研究科)

### 背景および目的

環境への影響と生物への安全性を考慮した持続可能な農業のために、低薬量で効果が大きく、高選択性かつ高分解性の除草剤が求められている。天然に存在する物質は環境で容易に分解されることが期待されるため、除草剤の開発で注目されており、その候補物質群として1つの植物が離れて生活している他の植物に影響を与える現象の原因物質、アレロケミカルがある。本研究室において、植物毒性をもつアレロケミカルである *L*-DOPA と類似の構造をもつ化合物について検討した結果、*m*-チロシンにも植物毒性があることが示された。後に、*m*-チロシンは fescue という植物の根から滲出し、他の植物に影響することがわかり、アレロケミカルであると認識されるようになった。また、*m*-チロシンの植物毒性の作用機構は、*L*-DOPA と異なる可能性も示されている。これまでに *L*-DOPA による植物毒性がアスコルビン酸によって軽減されることが確認され、*L*-DOPA の植物毒性には活性酸素が関与している可能性が示されている。

本研究では、先行研究で *m*-チロシンに耐性とされたトウモロコシ、比較的影響を受けにくいとされたコムギ、感受性とされたイネ、レタスを用い、*m*-チロシンによる植物毒性への活性酸素の関与の検討、また *m*-チロシン処理植物における植物体内の物質、特にタンパク質やアミノ酸の変動を観察することで植物毒性作用の発現機構に迫ることを目的とした。

### 材料

#### 供試植物

- イネ (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare)
- レタス (*Lactuca sativa* L. cv. Great Lakes 366)
- コムギ (*Triticum aestivum* L. cv. Norin 61)
- トウモロコシ (*Zea mays* L. cv. Honey Bantam)

#### 供試薬剤

- m*-チロシン (3-hydroxy-*L*-phenylalanine)
- L*-DOPA (3,4-dihydroxy-*L*-phenylalanine)
- フェニルアラニン

### 実験方法

#### ・生物試験

発芽させた種子を、プラントボックスに作成した 0.5% 寒天培地、0.1mM *m*-チロシンを含む 0.5% 寒天培地、0.1mM *m*-チロシンと 1mM フェニルアラニンを含む 0.5% 寒天培地、0.1mM *L*-DOPA を含む 0.5% 寒天培地、0.1mM *L*-DOPA と 1mM フェニルアラニンを含む 0.5% 寒天培地にそれぞれ移植し、グロースチャンパー (昼/夜: 12h/12h, 25 /20 ) において成育させ、処理後 1、3、5 日目の茎葉部長および根部長を測定した。

#### ・TBARS 試験

薬剤処理後 1、3 日目の植物の根を採取し、液体窒素を用いて磨砕した。これに 0.1% TCA を加えホモジナイズ後、10,000 × g・4 で 20 分間遠心し、上清 500μl に 0.5% TBA を含む 20% TCA 1ml を加え、98 で 30 分間静置した。その後氷上で 5 分間静置し、再度 10,000 × g・4 で 5 分間遠心した後、532nm と 600nm の吸光度から TBARS 量を算出した。

### 結果および考察

#### ・生物試験

イネ、レタス、コムギ、トウモロコシは全て *m*-チロシン処理により根の成育が抑制され、特にイネ、レタスで強い抑制が見られた。またフェニルアラニンの同時処理により成育抑制の軽減作用が見られた。トウモロコシを除く 3 種で茎葉部の成育抑制が見られ、イネにおいてフェニルアラニンの同時処理による成育抑制の軽減作用が見られた。また、*L*-DOPA 処理では、特にイネ茎葉部、レタス根において成育抑制作用が見られ、フェニルアラニンの同時処理で成育抑制の軽減作用が見られた。コムギ、トウモロコシでは、*L*-DOPA 処理による明確な成育抑制作用は見られなかった。*m*-チロシン、*L*-DOPA 処理による成育抑制の程度が植物種間で異なることから、*m*-チロシンと *L*-DOPA の植物毒性の作用機構が異なる、もしくは各植物の抵抗性機構に違いがある可能性が考えられる。生物試験の結果から、今後の実験では *m*-チロシンによる影響を受けやすい植物としてイネ、レタスを、受けにくい植物としてトウモロコシを使用することとした。

#### ・TBARS 試験

*m*-チロシンに耐性とされたトウモロコシでは *m*-チロシン処理による TBARS 量の増加は見られなかったが、感受性とされたレタスでは、*m*-チロシン処理後 3 日目に TBARS 量の増加が見られた。一方で、レタスにフェニルアラニンを同時処理すると TBARS 量にコントロールとの差が見られなくなった。

### 今後の予定

*m*-チロシン処理したイネ、トウモロコシについて細胞分裂、細胞死の測定を行う。さらに *m*-チロシン処理植物体内の物質、特にタンパク質やアミノ酸の変動を観察、比較することで、*m*-チロシンの植物毒性作用の解明に迫る。

## 植物ミトコンドリアにおける活性酸素発生機序の解析

草薙 彩可 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 松本 宏 (生命環境科学研究科)

## 背景

生体内で発生する活性酸素種 (ROS) は、生体分子と反応することで酸化障害を引き起こし、発癌や老化の原因となる。こうした ROS は反応性が非常に高く不安定であるため、直接検出するのが困難である。ROS の検出を可能にする方法としてフリーラジカルに特異性の高い ESR (電子スピン共鳴) 法がある。ESR は対象とする物質中の不対電子の動作をマイクロ波を使って観測し、フリーラジカルを同定する装置である。同じ磁気共鳴法を原理とする NMR (核磁気共鳴) 法では、対象物中に核スピンを有する核があれば共鳴が観測できるのに対し、ESR 法では不対電子を有する物質のみを対象とする。不対電子を持つ物質は、持たない物質に比べて圧倒的に数が少ない。したがって対象となる物質が制限されることで、ESR 法は選択性の高さを有している。近年スピントラップ法の開発応用が盛んになるにつれ医学および薬学分野で ESR 装置が使われ始めた。スピントラップ法では DMPO のようなスピントラップ剤がスーパーオキシドアニオンやヒドロキシルラジカルなどの不安定なフリーラジカルに優れた反応性を有し、安定したラジカル付加体を形成するため、そのスペクトルを解析することが可能となる。

これまで研究室において ESR で葉緑体での ROS 発生と抗酸化物質による減少を捕らえてきた。本研究ではさらに植物のミトコンドリア区画分での ROS 発生を ESR で測定するとともに、さらに呼吸阻害剤共存下での発生を検討しその影響を調べる。また、非破壊細胞でのラジカル発生の測定が可能かについても検討する。

## 材料

## 供試植物:

- インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.)

## 供試薬剤:

## トラップ剤

- DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide)

## 呼吸基質

- コハク酸 (succinate)
- NADH (還元型 nicotinamide adenine dinucleotide)
- ADP (adenosine diphosphate)

## 実験方法

## 実験 1. ミトコンドリアの呼吸機能の確認

暗所で 10 日間育成したインゲンマメの胚軸 200g を抽出 buffer 100ml とともに乳鉢で磨砕した。磨砕液を濾過後 1500 × g で遠心分離し上澄を得る。さらに 10000 × g で得られたミトコンドリア沈殿を洗浄用 buffer で洗浄し、ミトコンドリア調整 buffer 中に懸濁させミトコンドリア試料とした。ミトコンドリアの単離作業はすべて 4℃ 以下で行った。ミトコンドリア試料 3ml を 25℃ でインキュベートし

ながら、酸素電極を用いて呼吸機能を測定した。その際、呼吸基質としてコハク酸/NADH、ADP を順次加え酸素濃度の減少を記した。

## 実験 2. チトクロム c オキシターゼの活性の確認

ミトコンドリア試料 2ml と還元型チトクロム c 1ml を混合し、595nm の吸光度で還元型チトクロム c の減少を測定した。また、コハク酸や NADH の添加による吸光度の減少の変化を測定した。

## 実験 3. ミトコンドリア試料を用いた ROS 発生の ESR による確認

ミトコンドリア試料に、コハク酸/NADH、ADP、DMPO を順次加え攪拌し、ESR 用扁平セルで吸い上げ、速やかに ESR 装置によりシグナルを測定した。また、試料と試薬を攪拌後、時間を置いてから測定し、時間経過によるシグナルの変化を追った。(測定条件: Microwave power/4.0m W、Magnetic field/336.5mT、Amplitude/2.5 × 100、Modulation width/0.2 × 0.1mT、Time constant/0.1s、Sweep time/2min)

## 結果および考察

## 実験 1

ミトコンドリア試料にコハク酸/NADH を添加直後、急激な酸素消費が観測された。ADP の添加は酸素消費に大きな影響を与えなかった。ミトコンドリアの電子伝達系が機能していることがわかった。

## 実験 2

ミトコンドリア試料との混合により還元型チトクロム c の減少がみられた。ミトコンドリアの電子伝達系のチトクロム c オキシターゼの活性により、還元型チトクロム c が消費されていることがわかった。また、呼吸基質であるコハク酸、NADH の添加で吸光度の増加がみられたことから、基質のとりこみを行う電子伝達系複合体の活性があることがわかった。

## 実験 3

ミトコンドリア試料と試薬を混合直後では、ESR 装置によるシグナルの発生は確認できなかった。試薬添加後時間経過とともにシグナルが観測され、ROS の発生が確認できた。ミトコンドリアの ROS 発生は時間依存的であることがわかった。

## 今後の展望

今回の実験と比較して、除草剤の添加を行いミトコンドリアの呼吸阻害と ROS 発生の影響を確認する。また、除草剤がミトコンドリア電子伝達系のどの部位に影響しているかを検討する。

## 5-アミノレブリン酸による植物の乾燥耐性の誘導

蝶野 博紀 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 松本 宏 (生命環境科学研究科)

### 背景および目的

土壌中の水分欠乏は作物の成長を阻害し、収穫量を減少させる大きな要因の一つである。そのため、乾燥地域では作物の生産性が低い。現在起こっている飢餓問題や、近い将来に予想される、人口増加に伴う世界的な食糧不足問題の解決に、乾燥地域における作物の生産性向上が大きく貢献する可能性がある。生産性を向上させる方法の一つとして、植物に成長調整剤を加えるという方法が考えられる。

5-アミノレブリン酸 (5-ALA) は、近年注目されている植物成長調整剤の一つである。5-ALA はすべての生物の体内に存在する天然アミノ酸で、クロロフィルやヘム等のテトラピロール化合物の前駆体である。植物に対して外部から高濃度で5-ALA を処理すると枯殺作用を示すが、逆に低濃度で処理した場合、成育促進作用や種々の環境ストレス耐性誘導 (塩ストレス、低温ストレスなど) を示す。1990 年代後半から5-ALA の大量生産が可能になり、現在5-ALA が配合された植物の成育促進剤が市販されている。また、アブダビでの緑化試験において、5-ALA の増収効果が確認できたという報告がある。しかしながら、乾燥条件下における5-ALA の成育促進についての詳細な研究結果は報告されていない。本研究は5-ALA の乾燥耐性誘導についての知見を得ることを目的とした。

### 材料および方法

#### 供試植物

イネ (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare)  
コムギ (*Triticum aestivum* L.)  
タイヌビエ (*Echinochloa oryzicola* Vasing)  
トウモロコシ (*Zea mays* L. cv. Honey Bantam)

#### 供試薬剤

5-アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid)  
ポリエチレングリコール 6000 (浸透圧調整剤)

#### 実験 1 以降の実験で用いるポリエチレングリコール (PEG) 溶液濃度の決定

グロースチャンパー内で2~3葉期まで水耕法 (イネ、コムギ、タイヌビエ)、またはパーミキュライト (トウモロコシ) を用いて育てた植物体を、PEG 溶液 (0~15 mM) の入った200 ml ポット (イネ、コムギ、タイヌビエ)、またはアルミホイルで包んだ500 ml ビーカー (トウモロコシ) に移し、PEG 処理後0、3、6、9、12日目の新鮮重を測定した。

#### 実験 2 乾燥条件下における5-ALA の効果の検証

実験1と同様に2~3葉期まで育てた植物体を、5-ALA (0~100  $\mu$ M) とPEG 溶液 (実験1において成育阻害が確認できた濃度) の入った200 ml ポット、またはアルミホイルで包んだ500 ml ビーカーに移し、PEG 処理後0、3、6、9、12日目の新鮮重、および12日目の乾燥重を測定した。

### 結果および考察

実験1では、PEG 処理により濃度依存的な新鮮重の減少が確認された。また、PEG 処理による葉の先端部分の枯れが、使用した4つの植物種全てで見られた。

実験2では、5-ALA を比較的高濃度で処理 (3~10  $\mu$ M 以上) したときに、新鮮重、乾燥重の減少や、根の顕著な成育阻害が確認された。これは既に報告されている通り、5-ALA から作られるプロトポルフィリン IX が大量に蓄積し、その結果として活性酸素が大量に発生したためだと考えられる。しかし使用した4つの植物種では、PEG 処理によって引き起こされる成育阻害の抑制効果は、どの処理区においてもまだ確認できていない。

### 今後の予定

現在、PEG 処理と植物体内の酸化ストレスとの関係について検証中である。今後は5-ALA の処理方法の検討を行うとともに、使用する植物種の数を増やし、5-ALA による乾燥耐性誘導を検証する。乾燥耐性誘導が確認できた場合、誘導のメカニズム (クロロフィルや活性酸素除去酵素の関与等) を調べる。

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* における走化性シグナル関連遺伝子の機能解析

吉原 希 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 桑山 秀一 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は土壌中に生息している単細胞真核生物である。環境中から餌であるバクテリアが無くなると、細胞自身から cAMP を分泌し、その cAMP を走化性物質として細胞が集まる。集まった細胞塊はマウンドを形成し、その後 1 つの個体として活動して胞子と柄の 2 種類の細胞からなる子実体を形成する。

走化性運動は、細菌の移動からヒトのリンパ球、生殖細胞の遊走に渡るまで広くみられる普遍的かつ必須な生物現象である。細胞性粘菌 *D. discoideum* においては、走化性物質である cAMP が細胞表面に存在する特異的受容体に結合すると、三量体型 G タンパク質が活性化され、 $G\alpha 2$  サブユニット ( $G\alpha 2$ ) と  $G\beta\gamma$  サブユニットに分離することによって細胞運動や発生に関わる走化性シグナルが細胞内で伝達されていくことが知られている。これまでに、この細胞内シグナル伝達経路において、 $G\alpha 2$  と直接相互作用し下流に情報を伝達する分子は明らかになっていない。

現在までに所属研究室の先行研究から、Yeast Two Hybrid 法により  $G\alpha 2$  と直接相互作用するタンパク質の候補として 14 個の遺伝子が見つかった。本研究では、この候補遺伝子のうち遺伝子破壊株が得られている *yelA* (initiation factor eIF-4 gamma middle domain containing protein) と *pitB* (phosphatidylinositol transfer protein2) の 2 つの遺伝子に注目し、その機能解析を行うことを目的としている。

## 方法および結果

## 1. 形質転換

細胞性粘菌 *D. discoideum* の標準株である AX2 株から調整した cDNA mixture より PCR によって *yelA*, *pitB* をそれぞれ増幅し、シークエンシングによって配列が正しいことを確認した。この遺伝子の発現ベクターは、*D. discoideum* の Extra Chromosomal 型発現ベクターである pHK12neo の *actin15* promoter の下流に、*yelA*, *pitB* それぞれの N 末または C 末に YFP 改変型蛍光タンパク質 Venus を融合させた遺伝子を組み込むことにより作製した。作製した発現ベクターは、所属研究室の先行研究によって作製されていた CFP 改変型蛍光タンパク質 Cerulean を融合させた  $G\alpha 2$ -Cerulean 発現変異体に *D. discoideum* の形質転換で一般的な方法である Electroporation 法によって導入した。この結果、 $G\alpha 2$ -Cerulean と *yelA*-Venus、 $G\alpha 2$ -Cerulean と *pitB*-Venus をそれぞれ共発現する変異体を得た。

## 2. FRET による相互作用解析

FRET 法とは異なる蛍光特性を持つ蛍光タンパク質間のエネルギー転移による蛍光色調の変調を観察することで、相互作用の時空間的变化を解析する手法である。上述の形質転換で得られた変異体をリン酸バッファーで 1h 振盪培養し、30nM cAMP で 11~13h 処理した細胞を準備した。この細胞に 460nm で励起した光を当て、520nm の蛍光強度の時間的変化を記録した。この時、観察開始から 30sec の時点で  $3 \times 10^{-5} \sim 10^{-6}$  M cAMP を加え、cAMP 応答を観察した。この結果、*yelA*, *pitB* どちらについても cAMP 依存的な  $G\alpha 2$  との相互作用が確認された。

3. *yelA*、*PitB* 細胞内局在の観察

上述の形質転換で得られた変異体を、核を染める蛍光色素である DAPI で染色し、*yelA*、*PitB* の細胞内局在を調べた。その結果、*yelA* は増殖期において核に局在していることがわかった。また、*PitB* は飢餓状態において細胞質で強い発現があることが観察された。

4. *pitA* 遺伝子破壊株、*pitA*, *B2* 重遺伝子破壊株の作製

所属研究室の先行研究により *pitB* 遺伝子破壊株は発生や増殖において野生株との違いがないことが判明している。これには相同遺伝子である *pitA* が *pitB* の機能を補っている可能性が示唆された。そこで、*pitA* 遺伝子破壊株、*pitA*, *B* の 2 重遺伝子破壊株の作製を試みた。破壊株作製のためのコンストラクトは Blastocidin S 耐性遺伝子発現カセットを対象遺伝子の相同領域 (それぞれ約 2kbp) に挟み込むように設計し、遺伝子の接合は FusionPCR 法により行った。作製した *pitA* 遺伝子破壊コンストラクトを AX2 株、*pitB* 破壊株それぞれに Electroporation 法によって導入し、形質転換を行った。相同組換えが正しい位置で行われたかどうかは、遺伝子破壊コンストラクトのアーム部分に設計したプライマーを用いたゲノミック PCR 法により判断した。その結果、*pitA* 破壊株は 2 クローン得られた。*pitA*, *B* の 2 重破壊株は得ることができなかった。

## 考察

- FRET 解析の結果から *yelA*、*PitB* 共に細胞内で cAMP 依存的に  $G\alpha 2$  と相互作用することがわかった。また先行研究より、*yelA* 破壊株ではマウンドから子実体形成時に表現型の異常が見られること、cAMP は胞子形成の際にも放出されていることがわかっている。このことから *yelA* は、胞子形成の際に放出される cAMP 依存的に  $G\alpha 2$  と相互作用し、胞子形成に関わっていると考えられる。また、*PitB* が飢餓状態で細胞質に局在していることから、飢餓状態になると *yelA* は核から細胞質へと移動し、 $G\alpha 2$  と相互作用している可能性が推測できる。
- *pitA*, *pitB* の 2 重破壊株が作製できなかったことから、*pitA*, *pitB* のどちらか一方が存在していることが、*D. discoideum* 生存のための必須条件であると考えられる。

## 今後の展望

- 飢餓状態における *yelA* の細胞内局在を観察することで、 $G\alpha 2$  との相互作用が細胞内のどこで起きているかを推測、その機能の一端を明らかにする。
- *yelA*, *pitB* 遺伝子産物それぞれと  $G\alpha 2$  が相互作用しているかを免疫共沈降法によって生化学的に確認する。
- *yelA*, *pitB* 遺伝子産物が、 $G\alpha 2$  と相互作用することによってどのように活性が変調しているのかを解析する。

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* における自己認識メカニズムの解析

岡本 真里奈 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 漆原 秀子 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

有性生殖は多くの生物で見られる生殖方法であり、その際どのようにして自家不和合性を示すのか強く関心がもたれる。そのため、配偶子の融合において自己・非自己の認識メカニズムの解明が求められている。

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は通常単細胞アメーバとして分裂増殖しているが、環境の変化に応じて無性生殖あるいは有性生殖を行う。飢餓状態になると、乾燥条件下では無性生殖を行い子実体とよばれる多細胞体を形成する。一方、水分過剰な条件下では有性生殖を行う。有性生殖における交配様式は他家接合型と自家接合型とがある。他家接合型の株の交配型には3種 (*typeI*, *typeII*, *typeIII*) あり、異なる交配型の組み合わせで交配が可能である。細胞融合によって形成された接合子は、遺伝子の組み換えを経てマクロシストと呼ばれる休眠構造を形成する。*D. discoideum* は全ゲノム解読がされており、分子生物学的手法も確立されていることに加えて、細胞融合の人為的誘導が容易であることなど有性生殖における優れたモデル生物であると考えられる。また有性生殖に関わる遺伝子として、細胞融合に関わる *macA* と、交配型特異的配列の *matA* の2遺伝子が同定されている。

先行研究により、*typeIII* の株をトリプシン処理することで自己との融合が誘導されることがわかっている。このことから、細胞膜上の自己認識分子の存在が強く支持される。また、ニトロソグアニジン処理により細胞融合能のない変異体2株の取得に成功している。本研究では、これら2つの手掛かりから、細胞性粘菌を用いて有性生殖における細胞融合の部分に注目し、自己認識メカニズムの解析することを目的としている。

## 方法および結果

1. *typeI* における自己との融合を誘導する条件の検討

*typeIII* と同様に *typeI* においても自己認識分子が存在する可能性がある。全ゲノム解読がされている *typeI* において自己との融合を誘導することができれば、より効率良く解析を進めることができると期待される。そこで、非自己との融合を阻害しない条件下でトリプシン、キモトリプシン、酸を用いた処理によって自己との融合率を評価したが、いずれの処理においても自己との融合を誘導することができなかった。

2. *typeIII* における自己認識分子の精製

*typeIII* の株をトリプシン処理することで自己との融合が誘導されることから、この処理によって遊離するペプチド断片を自己認識分子候補として以下の2つのアプローチから解析した。

(i) 処理上清から自己認識分子を精製するための準備として、自己との融合が誘導される処理の上清に含まれるペプチド断片の解析を試みた。はじめに処理の最適な条件を決定し、その条件下で回収した処理上清をトリプシン除去、透析、凍結乾燥後濃縮し、SDS-PAGEによって解析した。その結果特異的なバンドがいくつか見られた。

(ii) 処理前後の細胞膜タンパクを SDS-PAGE、質量分析によって解析することで、自己との融合が誘導され

る処理によって失われる細胞膜タンパクの特定を試みた。網羅的に解析するために、*typeI*, *typeII*, *typeIII* 全ての株を用いて以下の条件の細胞を回収した。

- (1) IC 細胞 (細胞融合能をもたない細胞)
- (2) FC 細胞 (細胞融合能をもつ細胞)
- (3) FC 細胞をトリプシン 0mg/ml で処理した細胞
- (4) FC 細胞をトリプシン 0.5mg/ml で処理した細胞 (*typeIII* の4でのみ自己との融合がみられる。)

質量分析は、共同研究として名古屋大学の澤井研究室に依頼した。

## 3. 細胞融合能のない変異体における原因遺伝子の同定

ニトロソグアニジン処理により得た細胞融合能のない変異体2株における、原因遺伝子の同定を試みた。はじめに有性生殖に関わる既知の2遺伝子 (*macA*, *matA*) について配列決定を行ったところ、野生型の配列と完全に一致した。また、RT-PCR により発現にも異常がないことも確認した。

## 考察および今後の展望

1. *typeI* における自己との融合を誘導する条件検討

*typeIII* と同様の処理では *typeI* において自己との融合を誘導できないことがわかった。また、他の処理でも誘導できなかったが、これについては条件の再検討が必要である。

2. *typeIII* における自己認識分子の精製

(i) 処理上清中のタンパク量が少ないと考えられるため、大量の細胞の処理上清を濃縮・分画させる必要がある。さらに処理上清中の活性の検出を試みる。

(ii) 自己との融合がみられる細胞で失われている細胞膜タンパクの特定はできなかったが、まず FC 細胞のプロテオーム解析を試みる。

## 3. 細胞融合能のない変異体における原因遺伝子の同定

細胞融合能のない変異体2株における、有性生殖に関わる既知の2遺伝子は正常であることが確認されたため、有性生殖に関わる新奇遺伝子に変異が生じていると考え、相補性クローニングによって原因遺伝子の同定をすることにより新奇遺伝子の探索を試みる。

## 細胞性粘菌のゲノム比較による分化関連遺伝子の解析

福原 健輔 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 漆原 秀子 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

細胞性粘菌は森林等の土壤中でバクテリアを貪食し増殖する単細胞アメーバである。飢餓状態に陥ると走化性物質を分泌して集積し、多細胞化し最終的には子実体を形成する。この子実体は孢子塊とそれを支持する柄によって構成されている。モデル生物として知られている *Dictyostelium discoideum* (以下 *Dd*) をはじめとする多くの細胞性粘菌では柄が細胞性である。一方、今回比較解析する細胞性粘菌 *Acytostelium subglobosum* (以下 *As*) は柄が非細胞性である。また、*As* は進化的に *Dd* より古いことが細胞性粘菌の分子系統解析の結果から明らかになっている。

これまで本研究室では、細胞性粘菌の進化の中で柄細胞分化機構獲得に重要となった遺伝情報を明らかにすべく *As* のゲノム解析、個々の遺伝子の機能解析を行ってきた。そこで行われた大まかな遺伝子比較の結果、*Dd* で柄細胞分化に関わる遺伝子のほとんどについては *As* に相同な遺伝子が存在していると報告された。本研究では *Dd* と *As* 間で厳密な遺伝子レパートリーの比較を行い、柄細胞分化に重要な遺伝情報を明らかにすることを目標とした。

## 材料および方法

## (相同性検索)

*As* の遺伝子解析は *Acytostelium genome consortium* によって行われ、これらの成果は本研究室より公開されている<sup>\*1</sup>。今回比較に使った配列はそこから入手した。*Dd* 全遺伝子配列は dictyBase<sup>\*2</sup> より入手した。これらを利用して BLAST<sup>\*3</sup> を用いて 2 種間の全遺伝子を相同性検索 (cutoff 1E-20) した。

## (遺伝子ファミリー)

*Dd* 遺伝子のファミリー分けはクラスタリングアルゴリズムを用いて配列相同性から遺伝子をグループ分けする orthoMCLDB<sup>\*4</sup> を利用して行った。

## (柄細胞分化の有無と関連した遺伝子の抽出)

他種細胞性粘菌 *Polysphondylium pallidum* (以下 *Pp*) の全遺伝子配列を SACGB<sup>\*5</sup> から入手し、*Pp* にも相同遺伝子が存在する *Dd* 遺伝子 (ファミリー) を 2 種間の相同性検索 (cutoff 1E-20) を行い選び出した。

## (ドメイン検索)

既知の *Dd* 柄細胞分化関連遺伝子を選び出し、遺伝子の機能ドメインを InterProScan<sup>\*6</sup> によって明らかにした。選び出した遺伝子と *As* 全遺伝子間でドメインの種類を比較し、同じ種類のドメインを持っている遺伝子が *As* に存在しない場合、*Dd* 特異的遺伝子であるとされた。

## 結果および考察

## (相同性検索・遺伝子ファミリー)

*Dd* 全遺伝子 13,213 個について *As* での相同遺伝子の有無を調べた結果、6,963 個 (約 53%) は *Dd* のみに存在する遺伝子であったが、*Dd* で既知の柄細胞分化関連遺伝子のほとんどは *As* に相同性の高い遺伝子が存

在していることが改めて確認された。*Dd* では遺伝子ファミリーが多く、同一ファミリー内の遺伝子は *As*、*Dd* 間での相同遺伝子の対応付けが難しいことから遺伝子ファミリー単位で遺伝子の有無を評価した。これによって *Dd* 特異的遺伝子は 4,829 個とされた。

## (柄細胞分化の有無と関連した遺伝子の抽出)

*Pp* は細胞性粘菌の系統分類において *As* と同じグループに属する種でありながら細胞性の柄を持っている。よって *As* に存在せず *Dd*、*Pp* で共通な遺伝子を選ぶことで柄細胞分化の有無に関連した *Dd* 遺伝子を選び出したことになり、その数は 484 個 (13,213 個中約 4%) であった。

## (ドメイン検索)

上の 484 個の遺伝子に対しドメイン検索を行った。ドメインを詳細に比較することで、*Dd* 特異的であることがより確からしい 20 個の遺伝子が選抜された。

選抜されたこれらの遺伝子が細胞性粘菌の柄細胞形成においてどのように関わっているかは不明だが、保有する遺伝子の明らかな違いが見出されたことは非常に興味深い。また、本研究室では *As*、*Dd* 間で発現部位、発現時期が異なる柄形成に関わる遺伝子の存在も示されている。これらのことから、保有する遺伝子の違いを含め転写調節機構、転写産物局在の違いなど、複合的な要因が柄細胞分化の違いに結びついていると現段階では考えられる。

## 今後の課題

今回、相同遺伝子の対応付けが難しいことから遺伝子をファミリー単位に分け選別を進めたが、これは同じ遺伝子ファミリー内で機能が分かれている遺伝子を無視していることになる。従って今後は *As*、*Dd* 間でファミリー内の遺伝子の対応関係を明らかにすることが不可欠だと考えられる。また、今回選抜された遺伝子の詳細な機能解析を行うことが必要である。

1. <http://acytodb.biol.tsukuba.ac.jp>
2. <http://dictybase.org/>
3. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
4. <http://www.orthomcl.org/cgi-bin/OrthoMclWeb.cgi>
5. <http://sacgb.fli-leibniz.de/cgi/index.pl?ssi=free>
6. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>

細胞性粘菌 *Acytostelium subglobosum* における柄細胞分化関

大西 慶 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 漆原 秀子 (生命環境科学研究科)

## 背景と目的

細胞性粘菌は単細胞アメーバとして土壤中に生息し、細菌等を餌とする。しかし飢餓環境に陥ると集合して多細胞体を形成し、最終的に柄と胞子から成る子実体へと分化する。細胞性粘菌の研究でよく用いられる、*Dictyostelium discoideum* (以下 *Dd*) は多細胞体を形成したのち、予定柄細胞と予定胞子細胞の段階を経て、子実体形成時に細胞が柄と胞子に分化する。この柄分化に関わる遺伝子のシグナル伝達の概要は明らかにされている。一方、今回実験に用いた *Acytostelium subglobosum* (以下 *As*) は子実体形成時に非細胞性の柄を形成し、細胞は全て胞子になる。また系統解析から *As* は *Dd* よりも進化的に古いと考えられている。比較ゲノムの研究も進められており、*As* はゲノム解読がなされ、遺伝子モデルの構築がされている。また発生期における mRNA からこれらのモデルの発現量の変化が分かっている。*As* の遺伝子モデルの中には、*Dd* において柄細胞分化に関わっている遺伝子と相溶性のあるものが多く見つかっている。この *Dd* の柄細胞分化関連遺伝子の 1 つに *dstA* がある。*dstA* は STATa (signal transducer and activator a) をコードしており、柄細胞分化のマーカーの一つである *ecmB* (extracellular matrix B) を抑制していることが知られている。また *dstA* は子実体形成時に予定柄細胞領域の先端 (tip) で発現し、最終的に集合体が柄と胞子に分化することに必要であることが知られている。*As* は柄細胞分化しないにも関わらず、ゲノム解読の結果、*dstA* に相同な遺伝子 (*astA*) が複数存在すると予測されている。この *astA* の局在と機能を調べることで柄細胞分化獲得の仕組みを調べるのが今回の研究の目的である。

## 方法

遺伝子モデルから *astA* の決定

*As* に複数ある *astA* のゲノム配列から予想された遺伝子モデルの確かさを検証した。これには *Dd* のアミノ酸配列を用いた BLAST 検索による相溶性と、ClustalW による系統解析を行った。その結果、4 つの予測されていた *astA* の遺伝子モデルのうち、2 つは確実性が高いと考えられた (*astA1*、*astA2*)。 *astA1* は *astA2* よりも発現量が明らかに多いため、今回は *astA1* を研究の対象とした。

WISH による *astA1* の発現の局在確認

RNA プローブを用いた Whole mount in situ hybridization で *As* の発生期における *astA1* の局在を調べた。まず RNA プローブを作製するために、*As* の totalRNA からランダムプライマーを用いて cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として *astA1* に特異的な部位を PCR で増幅し、プラスミドである pBluescript に組み込んだ。最後に RNA ポリメラーゼを使ってインサートから RNA プローブを作製した。サンプルとなる *As* は増殖期の細胞をフィルター上で発生させた。16 時間後にパラホルムアルデヒドで固定し、プロテアーゼ K で処理し、RNA プローブを反応させ、DIG 標識した。この DIG 標識にアルカリフォスファターゼを結合させ、基質である NBT/BCIP の発色によって局在を確認した。

*astA1* KO 株の作製

*astA1* の機能を明らかにするために相同組換えによる KO を試みた。アームは *As* のゲノム DNA から *astA1* の上流と下流それぞれ 1.5kb とした。これらのを PCR でそれぞれ増幅し、ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットと FusionPCR で繋げて KO コンストラクトを作製した。そしてエレクトロポレーション法で KO コンストラクトを導入し、形質転換体をネオマイシン (60  $\mu$ g/ml) とシクロスポリン (90  $\mu$ g/ml) 存在下で選択した。

## 結果と考察

## WISH による発現の局在確認

*astA1* の発現が *As* の発生に従って、tip (集合体から形体形成が開始する部位) から集合体全体へと広がっていくことが観察され、これは *Dd* とは異なる。発生初期に *astA1* の局在が tip に限られることは集合体の中に 2 つ以上の種類の細胞が生じていることを意味する。*astA1* の局在が tip から集合体全体に広がることは、発生の初期では細胞に複数の種類がありそれぞれが子実体形成に対して異なった役割を担っているが、最終的には細胞が全て胞子になるために、1 種類の細胞のみになると考えられる。この現象は、Hohlらによる形態の観察による発生過程の記述 (1968) と一致する。また *Dd* と共通して、tip で発現することから、子実体形成の決定に関わる重要な役割をしていると考えられる。*As* の *ecmB* に関しては、発生初期に *astA1* と tip で発現箇所が重なるが、発生が進んで集合体が伸長すると発現箇所は重ならない。このことから *astA1* は *ecmB* の発現を抑制している可能性がある。しかし発生初期で発現が重なることに関して WISH では個々の細胞の発現まではわからないため、今後詳しく調べる必要がある。

## KO 株の作製

セレクションの結果、1 千万個の細胞から 31 株を得ることができたが、PCR の結果、相同組換えは確認できなかった。現時点では、試行回数がまだ不十分であると考えられる。

## 今後の課題

- *As* での形質転換の成功例はあるが、KO の成功例はないため、今後は *astA1* の機能を明らかにするために KO の条件検討や RNAi 法も視野に入れたい。
- WISH で *As* の他の STAT 相同遺伝子の発生期の局在を調べ、*Dd* と比較することで *As* の発生を明らかにし、柄細胞分化のカギとなる現象を見つけたい。また WISH の撮影をより鮮明に行えるよう改善したい。

# イチジク株枯病菌 *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *carica* の分類学的再検討

岡部 幸恵 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 山岡 裕一 (生命環境科学研究科)

## 背景及び目的

*Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted は、サツマイモ黒斑病菌として初めに記載され、また、*Ceratocystis* 属の基準種とされている。その後様々な植物にがん種病や萎凋病を起こす形態学的に非常に類似した菌が報告され、*Ceratocystis fimbriata* と同定された (*C. fimbriata* sensu lato)。近年 *C. fimbriata* s.l. に属するいくつかの菌群は詳細な形態観察、分子系統解析、交配試験や宿主範囲に基づき分類学的再検討が行われ、別種として分割された。しかし *C. fimbriata* s.l. には、分類学的検討を必要とする菌群がまだ残っている。

イチジク株枯病菌もその1つで本菌は加藤らによって1981年に、*C. fimbriata* と同定された。しかし1993年、梶谷・工藤はイチジク株枯病菌とサツマイモ黒斑病菌 (*C. fimbriata* sensu stricto) を比較し、両者は形態に若干の違いはあるものの同種とし、病原性の差に基づいてイチジク株枯病菌を *C. fimbriata* f.sp. *carica* Kajitani et Kudo とした。

本研究では、日本各地で分離されたイチジク株枯病菌について形態観察及び分子系統解析を行い、イチジク株枯病菌の分類学的位置付けを再検討することを目的とした。

## 材料及び方法

供試菌株として、愛知県 (菌株番号 ncf0801, Cfm)、大阪府 (Osaka)、岡山県 (06OH-1)、広島県 (CFH)、愛媛県 (AmEH-1, AmEH-2)、福岡県 (FFCF9001) 産のイチジク株枯病菌 8 菌株及び長崎県 (NICF)、鹿児島県 (KICF) 産のサツマイモ黒斑病菌 2 菌株を用いた。これらの菌株は各府県の農業試験場で分離され、分与されたものである。

各菌株はジャガイモ・ブドウ糖寒天 (PDA) 平板培地上で培養し、形成された構造を光学顕微鏡下で観察した。テレオモルフについては、子囊殻基部の幅と高さ、子囊殻頸部の長さ、頸部の基部および先端の幅、孔口毛の長さ数、子囊胞子正面と側面の長径・短径を各菌株で 30 個測定した。アナモルフについては分生子形成細胞と分生子柄の長さ数と幅、分生子と厚膜胞子の長径・短径を各菌株で 30 個測定した。

また、全ての供試菌株から DNA を抽出し、PCR 法でプライマー ITS5 / ITS4 を用いて 5.8S rRNA を含む r DNA ITS 領域を増幅した。塩基配列決定後、GenBank から得た *C. fimbriata* s.l. とされていた種及び BLAST 検索で近縁とされた種の塩基配列データとアライメントを行い、近隣結合法、最大節約法で系統樹を構築した。外群には *C. albifundus* M.J. Wingf., De Beer et M.J. Morris を用いた。

## 結果及び考察

イチジク株枯病菌、サツマイモ黒斑病菌とも、子囊殻は黒色で基部は球形～亜球形、飾毛を持ち、子囊殻頸部は先に行くにつれて細くなり、孔口毛は散開状、子囊胞子は帽子形、アナモルフは *Thielaviopsis* と、*C. fimbriata* s.l. に典型的な形態が共通して見られた。しかし、イチジク株枯病菌はサツマイモ黒斑病菌に比べ、著しく大型の子囊殻を形成した (表 1)。その他の形態的形質に両者に差は無かった。またイチジク株枯病菌 8 菌株の間では、著しい違いは見られなかった。

近隣結合法で構築した系統樹で、イチジク株枯病菌 8 菌株はサツマイモ黒斑病菌 2 菌株とも他の *C. fimbriata* s.l. とも離れ、100%の高いブートストラップ値で支持されるクレードを形成した (図 1)。最大節約法を用いた場合でもこの関係性が崩れることは無かった。

系統解析の結果比較的近縁と考えられた *C. polychroma* M. van Wyk, M.J. Wingf. et E.C.Y. Liew も含め他の *C. fimbriata* s.l. にはイチジク株枯病菌と類似する種の報告は無い。また、分子系統解析の結果他の菌群と明瞭に識別できることから、イチジク株枯病菌は *C. fimbriata* s.s. とは別種とすべきであると結論した。

表1: イチジク株枯病菌と近縁種の形態学的特徴

形態学的特徴	イチジク株枯病菌	サツマイモ黒斑病菌	<i>C. polychroma</i>
子囊殻基部の色	黒色	黒色	暗褐色～黒色
子囊殻基部の形状	球形～亜球形	球形～亜球形	球形
子囊殻基部の直径(μm)	218-556	139-228	217-261
子囊殻頸部の長さ(μm)	1012-3295	535-903	849-1071
孔口毛の長さ(μm)	99-377	24-67	33-43
樽形の分生子	無し	無し	有
厚膜胞子の形	球形～卵形	球形～卵形	卵形

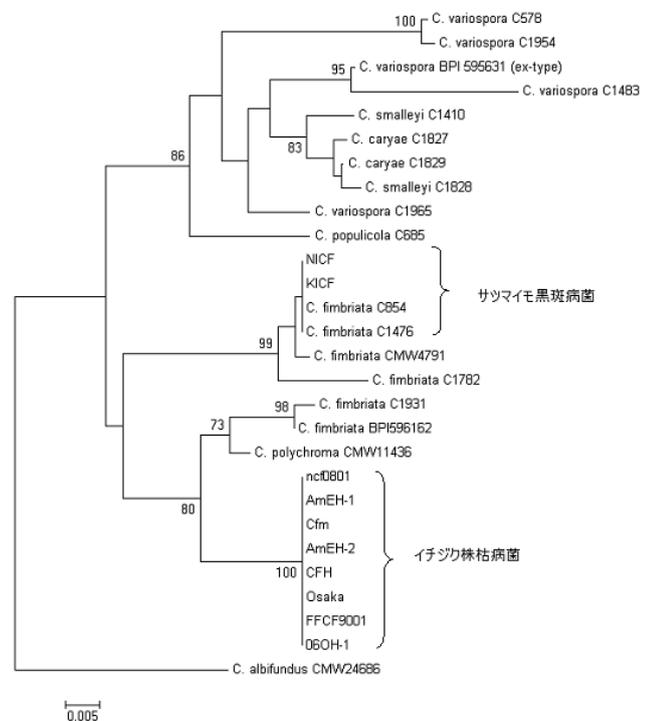


図 1: 近隣結合法で描かれた系統樹

# ダイズさび病菌レース判別品種のリーフカルチャーによる感染型変化の原因

床田 真理 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 山岡 裕一 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

ダイズさび病はダイズ [*Glycine max* (L.) Merr.] 栽培上重要な病害のひとつである。本病の病原菌である *Phakopsora pachirizi* H. Sydow & Sydow は担子菌類サビキン目に属する植物寄生菌である。本菌には、種内に病原性が異なる個体群(以下「レース」と略記)が存在することが知られている。レースは、抵抗性が異なる判別品種セット上での感染型の違いにより判定されてきた。レース判定には通常ポット植えの植物を使用するが、植物体から切り離された葉を用いるリーフカルチャー法を用いれば省スペース化が可能となるため、実験効率の向上に有効である。ところが、先行研究で、一部の判別品種において、感染型がリーフカルチャーでポット植えの植物体と変わることが示された。

そこで、本研究では、リーフカルチャーでポット植えの植物上とは感染型が変化することの原因を明らかにすることを目的とした。

## 材料および方法

*P.pachirizi* 夏孢子世代の単病斑分離株 T1-4 を供試した。この菌株は 2007 年 9 月 20 日に独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所(茨城県つくば市観音台)の圃場で栽培されていたダイズ栽培品種タチナガ八上で採集し、同じ品種上で単病斑分離したものである。

### 実験 1

リーフカルチャーすることにより感染型が変わる判別品種を特定するために、以下の実験を行った。13 判別品種の種子を、赤玉土と腐葉土を 3:1 に混合した土で満たした直径 12cm × 高さ 7.7cm のポットに 5 粒ずつ播種し、グロースチャンパー内(24、14 時間明期、10 時間暗期)で 3 週間栽培した。

0.04% Tween80 水溶液を用い、10000~50000 個/ml の夏孢子懸濁液を調整した。栽培した植物の最初の複葉から小葉を 1 枚切り取り、リーフカルチャーに用いた。植物体に付いている残りの小葉に、調整した夏孢子懸濁液をオートクレーブで滅菌した絵筆を用いて接種し、20 暗黒下湿室に一晩保った。その後、植物は同じ条件のグロースチャンパー内で生育させた。切り取った小葉は 25cm × 25cm のプラスチックトレーに入れ、同様の方法で接種した。その後、40ppm のジベレリン水溶液で湿らせたキムワイブで葉の切り口を挟み、培養棚(22、14 時間明期、10 時間暗期)で培養した。接種 14 日後に 1 病斑あたりの孢子堆数と夏孢子生産レベルを記録した。1 病斑あたりの孢子堆数は 30 病斑をランダムに選び、その平均値を算出し、夏孢子生産レベルは山中(2010)に従い 0~3 の 4 段階に類別した。夏孢子堆数が 1.5 未満でかつ夏孢子生産レベルが 0~1 のものを抵抗性、孢子堆数が 1.5 以上でかつ夏孢子生産レベルが 2~3 のものを感受性の感染型と判定した。

### 実験 2

リーフカルチャーにより、感染型が変わった 3 品種(PI417125、PI459025、PI587886) 感染型が変わらず、T1-4 菌株に対して抵抗性(PI416764)及び感受性を示す品種(TK # 5)について、接種後の侵入過程の観察を行った。実験 1 と同様の方法で接種し、接種 6、9、12、18、24、48 時間後に接種葉から小片を切り取り、ラクトフェノールトリパンブルーで染色して、光学顕微鏡で観察した。48 時間のサ

ンプルについては、植物組織内の菌のコロニーの長径と短径の平均値を算出した。また、病斑出現、孢子堆出現、孢子生産に要する接種後の日数を調査した。接種 14 日目の病斑を個体毎にランダムに 10 個選び、長径と短径の平均値を算出した。

## 結果および考察

実験 1 で 13 判別品種に接種したところ、PI417125、PI459025、PI587886 の 3 品種において、ポット植えの植物上とリーフカルチャーで感染型が異なった。これらの品種では、リーフカルチャーした小葉間で 1 病斑あたりの孢子堆数に著しい変異が見られた。実験 2 で、感染型が異なった 3 品種及び感染型が変わらなかった PI416764、TK # 5 について、接種後 48 時間までの菌の動態及び植物の反応の観察をしたところ、ポット植えの植物上とリーフカルチャーとの間で差が見られなかった。さらに、病徴進展過程を観察したところ、リーフカルチャーにより小葉間で感染型に差が生じた品種のうち PI417125 及び PI459025 については、リーフカルチャーの方がポット植えの植物に比べて孢子形成が遅れた。また、接種 14 日後の病斑の大きさを測定したところ、リーフカルチャーの方が小さかった。

以上の結果により、リーフカルチャーによって、感染初期段階では菌の動態に影響がないものの、培養中に生育不良となることにより、感染型が変わると考えられる。その要因については、今後検討する必要がある。

## *Ophiostoma neglectum* に類似する日本産オフィオストマ様菌類の分類学的所属の決定

黒田 公平 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 山岡 裕一 (生命環境科学研究科)

### 背景および目的

*Ophiostoma* 属、*Ceratocystiopsis* 属、*Grosmannia* 属などに代表されるオフィオストマ様菌類は、樹木に加害する樹皮下穿孔虫と強く関係する子囊菌類であり、樹木病原菌としても知られている。これらの菌群の分類学的研究は、生態学や植物病理学などの基礎につながる意義深い研究である。

2005 年から 2007 年に筑波大学菅平高原実験センターを対象地域として菌類インベントリー調査が行われた。オフィオストマ様菌類も調査対象に含まれ、4 属 8 種の樹種に穿孔していた 5 属 13 種の樹皮下穿孔虫から、オフィオストマ様菌類 5 属 30 種が分離された。しかし、その中には *Ophiostoma* 属の未記載種や分類学的所属を決定できなかった菌株も含まれた。このうち 1 種、ヨーロッパで報告例のある *O. neglectum* と形態が類似していたが、同一種とまでは同定できなかった。

本研究では、*O. neglectum* と形態が類似する日本産オフィオストマ様菌類について、形態学および分子系統学的観点から、分類学的所属を決定することを目的とした。

### 材料および方法

供試菌株として、菅平高原実験センター樹木園内のシラビソやグローカトウヒに穿孔していたキクイムシから分離した 4 菌株を用いた。加えて、日本産菌株との比較のため CBS(Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands) から *O. neglectum* CBS100596(タイプ由来) と CBS100597 の 2 菌株を入手した。

供試菌株はプラスチックシャーレ内の 2% 麦芽エキス寒天培地 (2%MEA)、2% 玄米フレーク寒天培地 (2%GFA)、2% 麦芽エキス・エピオス寒天培地 (2%MEBA) の平板培地を用い、暗黒下、15 °C で培養した。培養開始から 2 週間後、子囊殻形成促進のためオートクレーブ処理したアカマツの樹皮片をそれぞれの培地上に静置した。培養開始から 2~3 週間後、コロニーの一部を切り出し、アナモルフの形態を光学顕微鏡にて観察した。また、培養開始から 2~3 ヶ月後に子囊殻を取り出し、光学顕微鏡にて観察した。

培養 2~3 週間後に 2%MEA のコロニーから菌糸を少量切り出し、DNA を抽出し 5.8S rDNA を含む ITS1 と ITS2 領域および rDNA LSU D1/D2 領域の 5' 末端側の塩基配列データを得た。複数領域の配列データを結合し、分子系統解析を行った。

### 結果および考察

テレオモルフの形態観察の結果、菅平で得られた 4 菌株は、子囊殻が褐色、子囊殻頸部が直線状あるいは湾曲し、孔口毛は先細で、平行あるいは収束していた。子囊胞子は帽子形であった。子囊殻頸部の長さや孔口毛の形態については変異が多く見られた。アナモルフの形態観察の結果、菅平で得られた 4 菌株はすべて *Hyalorhinocladiella* 型であったが、一部の菌株で分生子形成細胞が分岐し、ほうき状の構造をつくることもあった。形態学的特徴は、本菌の子囊殻が褐色である点を除いて *O. neglectum* とほぼ同一であった。

分子系統解析の結果、本菌と *O. neglectum* は塩基配列にほとんど差が無く、同一のクレードを形成した。形態学

的、分子系統学的解析結果から、本菌はヨーロッパ産の *O. neglectum* と同種であると結論した。

*O. neglectum* のクレードは、オフィオストマ様菌類のうち *Ceratocystiopsis* 属の系統に含まれた。オフィオストマ様菌類の分類において子囊胞子の形態は非常に重視され、*Ceratocystiopsis* 属は鎌形の子囊胞子をもつ種がまとめられて設立された経緯がある。*O. neglectum* は子囊殻やアナモルフの形態が *Ceratocystiopsis* 属に類似するが、帽子形の子囊胞子は *Grosmannia* 属に見られる特徴である。近年の分子系統学的研究により *Ceratocystiopsis* 属、*Grosmannia* 属、*Ophiostoma* 属はそれぞれ異なる系統であることが支持されている。*Grosmannia* 属、*Ophiostoma* 属は子囊胞子の形態に著しい変異が見られ、子囊胞子の形態は必ずしも系統関係を反映していない。

*O. neglectum* はこれまでの *Ceratocystiopsis* 属の鎌形の子囊胞子を有するという定義に当てはまらない。したがって、*Ceratocystiopsis* 属の定義を修正し、*O. neglectum* を転属させる必要があると考えられる。

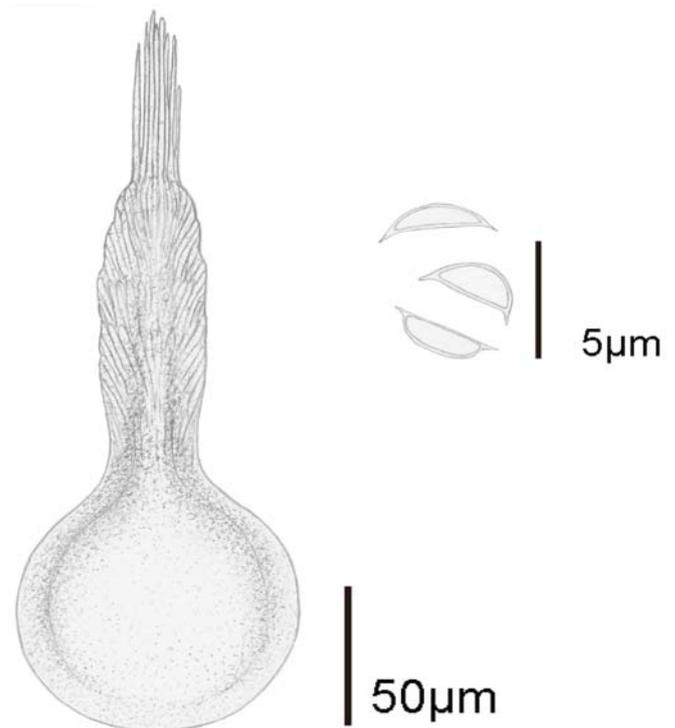


Figure 1: *Ophiostoma neglectum* と同定された菅平株 左：子囊殻 右：子囊胞子

## マツカサキノコ属菌の生態

—その針葉樹球果に限られた発生から菌類多様化の要因に迫る—

中島 淳志 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 出川 洋介 (生命環境科学研究科)

### 背景・目的

菌類は陸上における進化の過程で極めて多様化してきたグループであるが、それらが生息している基質もまた様々であり、菌類の種分化においては異なる基質への進出が特に重要な要因になると考えられている (Cannon and Sutton, 2004)。基質嗜好性 (substrate preference) とはある菌が特定の基質に偏って頻りに検出される性質であり、この性質の要因を明らかにできれば、菌類の多様化の過程を説明する強い論拠になるだろう。しかし、基質嗜好性に関する研究例はほぼ皆無であり、それが実証された例すら少ない (McMullan-Fisher, 2008)。そこで、マツカサキノコ属 (*Strobilurus*) 菌は針葉樹球果に対する基質嗜好性を持つことが一般に認識されており、かつ属内の種ごとに異なる針葉樹種の球果に嗜好性が分化している (マツカサキノコモドキ *S. stephanocystis* はマツ属の球果に、マツカサキノコ *S. esculentus* はトウヒ属の球果に発生することから、基質嗜好性研究の材料として有望である。本研究ではマツカサキノコ属菌の基質嗜好性の決定要因を明らかにすることを目的とし、3つのアプローチを試みた。

### フィールドにおける基質嗜好性

材料・方法: 2010年12月から翌1月にかけて、関東・甲信・関西の計24か所において一定面積のコドラートを設置し、アカマツ球果293個、クロマツ球果219個を採集した。そのうちアカマツでは22個、クロマツでは51個にマツカサキノコモドキの子実体が発生していた。また、その他に子実体の発生しているアカマツ球果を46個採集した。球果の含水率・サイズ・深度を測定し、発生球果と非発生球果を比較した。また、調査地点ごとに、上層(0-5cm)と下層(5-10cm)のリターの含水率を測定した。

結果・考察: 全ての調査地点において、マツカサキノコモドキの子実体は球果から発生しており、本種の基質嗜好性が厳密であることが実証された。発生球果と非発生球果では、前者で含水率が高く、サイズが大きく、深度が深くなっており、そのいずれにも有意な差 ( $P < 0.001-0.05$ ) が認められた。球果とその周囲のリターでは含水率にほとんど差がないため、球果の含水率が周囲の環境と異なることが基質嗜好性を決定しているとはいえなかった。しかし、子実体発生においては球果の含水率が高いことが重要だと考えられる。また、アカマツとクロマツの両方で極端に小さい球果からの発生が全く見られなかったことから、本種の子実体発生は球果が一定のサイズを超えていることが条件になると考えられた。

### in vitro における基質嗜好性

材料・方法: 2010年4月に長野県菅平で採集したマツカサキノコモドキとマツカサキノコを分離培養した。その菌株を針葉樹の球果・葉・材など8種類の基質に接種して70日間培養し、菌糸の蔓延度と基質の質量残存率を測定した。

結果・考察: 70日間の培養による質量減少は定量的に測定できないほどに小さく、基質の分解を検出できなかった。しかし、両種ともに天然では子実体発生の見られない葉や材などの基質に菌糸が蔓延し、生育活性が認められた。こ

このことから、天然において本属菌は子実体発生の段階には球果に嗜好性を示すものの、栄養菌糸は生育が必ずしも球果に制限されるわけではないという可能性が考えられた。

### 他の球果生息菌との相互作用

材料・方法: 長野県菅平で2010年9-11月に、アカマツとドイツトウヒの球果を樹上・地上・地中から5つずつ採集し、計80枚の種鱗を洗浄法・表面殺菌法で処理してMA培地またはCMA培地に置床した。これを1か月間継続的に観察し、出現した菌を分離同定して各菌種の出現頻度を求め、両球果の菌類相を比較した。次に、アカマツ球果で出現頻度上位13種の菌株とマツカサキノコモドキをMA培地上で対峙培養し、5日後に球果生息菌に対する生長阻害率と阻止帯の有無を記録した。また、本属菌が産生する抗真菌物質、ストロビルリン (アゾキシストロピン) を200ppm添加したCMA・MA・球果鱗片抽出液寒天 (PSEA) の各培地で、出現頻度上位8種の菌を培養し、非添加対照区に対する阻害率を求めて比較した。

結果・考察: アカマツ球果から計42株が、ドイツトウヒ球果から計52株が分離され、それぞれ28株、29株が少なくとも属まで同定された。両球果に共通して分離された菌は7種のみであり、両者の菌類相には大きな違いが見られた。特定基質上での菌類相の決定要因として種間競争が重要だと考えられている (Gochenaur, 1978; Shearer and Zare-Maivan, 1988) ことから、マツカサキノコモドキとマツカサキノコの異なる樹種の球果に対する嗜好性は、基質間での種間競争の違いに由来する可能性がある。

マツカサキノコモドキを13種の球果生息菌と対峙培養した結果、11種で球果生息菌の生長阻害が見られ、7種で阻止帯が形成された。このことから、本種が他菌の侵入を阻止する能力を持つことと、この時に抗生物質が効果を発揮していることが示唆された。球果生息菌は本種の潜在的な競争者と考えられるが、本種は球果中で競争者を排除し、長期間定着した上で子実体を形成すると推察される。

次に、ストロビルリン添加培地上での球果生息菌の生長阻害率を調べたところ、培地の違いによって球果生息菌の阻害程度は大きく異なり、天然の生育環境に近いPSEA培地で最も阻害率が高くなった。このことから、本属菌が産生するストロビルリンが球果において特に高い効果を発揮し、本属菌の競争力を高めていることが示唆された。

### 結論

本属菌の基質嗜好性は、従来は子実体の存在によってのみ認識されてきたが、栄養菌糸は球果以外の基質にも生育できることが明らかになった。しかし、本属菌が産生するストロビルリンは特に球果上で効力を発揮することから、本属菌は天然では種間競争に有利な球果上に局在して生育していると推定される。すなわち、抗生物質という化学要因、種間競争という生物要因が本属の基質嗜好性の主要な決定要因だと考えられる。また、本属菌の子実体は一定の物理条件を満たす球果上に発生することが分かった。子実体形成に必要な物理要因も含め、本属菌の基質嗜好性はこれらの3要因が複合的に影響し合って決定されているものと結論づけられる。

## モデルマウスにおける老化ミトコンドリア原因説の検証

加藤 由季菜 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 林 純一 (生命環境科学研究科)

### 背景および目的

哺乳類細胞のミトコンドリアは核外ゲノム (ミトコンドリア DNA : mtDNA) を含有する唯一の細胞小器官であり、酸化的リン酸化によって生命活動に必要な大部分の ATP 産生を担っている。この mtDNA には酸化的リン酸化に寄与する呼吸酵素複合体のサブユニットの一部 (13 種) と、これらを翻訳するために必要な rRNA (2 種) と tRNA (22 種) がコードされており、細胞当たり数百から数千コピー程度含有されている。したがって、このような mtDNA に病原性の突然変異が生じそのような分子種が蓄積すると、ミトコンドリア呼吸機能が低下し、多様な病態を発症する可能性がある。事実、全身性のミトコンドリア機能異常を呈するミトコンドリア病 (脳筋症) 、さらには糖尿病やがん、神経変性疾患の一部の症例においても、変異型 mtDNA が検出され、ミトコンドリア呼吸機能低下も散見されるに至っている。このような状況を受け、mtDNA の突然変異を起点とした多様な病態発症機構の存在が広く注目を集めるようになった。生物が必ず体験することになる老化においても、mtDNA の多様な突然変異とミトコンドリア呼吸機能不全が関与するという「老化ミトコンドリア原因説」が提唱されている。この仮説では、1) 老化と共に mtDNA 分子に多様な突然変異が蓄積し、2) このような多様な変異型 mtDNA から転写・翻訳された異常なタンパク質群がミトコンドリア呼吸酵素複合体からの活性酸素種の漏出を増加させるとともに、ミトコンドリア呼吸機能も低下させ、3) さらにこの漏出した活性酸素種によって mtDNA 分子に多様な突然変異が再誘発されるという悪循環に陥ること、結果として老化が進行すると想定されている。

一方、所属研究室の先行研究では、細胞内の個々のミトコンドリアは融合・分裂を介して遺伝子産物の交換を行うというミトコンドリア間相互作用の存在を証明している (Nature Genet., 2001; Nature Med., 2001; PNAS, 2005) 。このミトコンドリア間相互作用は、例えば老化とともに mtDNA 分子に多様な突然変異が生じたとしても、その突然変異が生じていない他の mtDNA 分子由来の遺伝子産物がミトコンドリアの分裂・融合を介して供給・相補されることを意味している。したがって、老化とともに mtDNA 分子集団に多様な突然変異が生じたとしても、このミトコンドリア間相互作用によって細胞内の個々のミトコンドリアの呼吸機能は正常に維持されるのである。事実、所属研究室では、特定 (単一) の病原性突然変異型 mtDNA が極めて優位に蓄積しない限り、ミトコンドリア呼吸機能は正常に保たれることを培養細胞やマウス個体において立証している。

このような状況の中、「老化ミトコンドリア原因説」を支持するモデルマウス (mtDNA mutator mouse) の作製と解析結果が報告された (Nature, 2004; Science, 2005) 。このマウスでは、ミトコンドリア唯一のポリメラーゼであるポリメラーゼ (Pol ) の校正機能のみを機能破壊することで、mtDNA の複製において後天的な突然変異が生じるように遺伝子操作されている。注目すべきは、このマウスでは 1) 多様な変異型 mtDNA 分子種の蓄積、2) ミトコンドリア呼吸機能の低下、3) 細胞死の増加、4) 早期老化表現型 (寿命短縮、脱毛、脊柱彎曲など) を呈する点である。しかし、これら 4 者の因果関係は明確にされていないことはもとより、ミトコンドリア間相互作用によって打ち消されると思われるミトコンドリア呼吸機能の低下がな

ぜ誘導されるのか、という根源的な疑問も解決されていない。そこで本研究では突然変異型 mtDNA を含有するモデルマウスを駆使して、ミトコンドリア呼吸機能の低下と細胞死、さらにはそれらによる老化表現型誘導の因果関係について解明することを目的とした。

### 方法および結果

突然変異型 mtDNA を含有するモデルマウスの各組織におけるミトコンドリア呼吸機能と細胞死に関する結果を提示し、突然変異型 mtDNA を起点とした老化関連病態について発表する予定である。また、それらをもとに「老化ミトコンドリア原因説」について考察したい。

## 多様な病態モデルマウス作出のための病原性ミトコンドリア DNA の探索

清水 章文 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 林 純一 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

ミトコンドリアはほぼ全ての真核生物にみられる脂質二重膜構造の細胞小器官で、酸化的リン酸化により生体内エネルギー物質である ATP の合成を行っている。ミトコンドリアの内部には呼吸酵素複合体のサブユニット及びそれらの翻訳に必要な tRNA と rRNA をコードしているミトコンドリア DNA (mtDNA) が一細胞あたり数千コピー存在している。その mtDNA に欠失突然変異や点突然変異などの変異型 mtDNA が一定の割合以上蓄積することで呼吸機能の低下を引き起こし、ミトコンドリア病と総称される多様な病態を呈することが知られている。しかし、ミトコンドリア病は mtDNA の突然変異部位によって呼吸機能という共通の過程を経ながらも異なる病態を示すことが知られており、病態発症機構や治療法に関しては未だ不明な点が多い。また、mtDNA の突然変異はミトコンドリア病だけでなくがん化や老化などにも関与しているのではないかということも示唆されているが、本当に mtDNA の突然変異が原因になっているということを示す証拠は得られていない。従って、mtDNA 突然変異に起因する多様な病態について明らかにするために、mtDNA に突然変異を有する様々な病態モデルマウスを作出し、その表現型の解析を行う必要がある。しかし、mtDNA は脂質二重膜によって囲まれており、人為的な突然変異型 mtDNA の導入や遺伝子組換えを行うことができない。従って、1) 異種 mtDNA による核とミトコンドリアの不和合性の利用 もしくは 2) 培養細胞の mtDNA 体細胞突然変異の中から呼吸機能低下を引き起こすような病原性突然変異の探索 が考えられる。そこで、私は後者の方法を用いて病態モデルマウスの作出へとつなげることを本研究の目的とした。

## 方法および結果

病原性 mtDNA の探索として今回 1) 目的の変異型 mtDNA の細胞内濃縮、2) 悪性化したマウス肺がん細胞株からの体細胞突然変異の利用 という二つの方法により行うこととした。

1) 目的の突然変異の細胞内濃縮 しかし、マウスの作出のためには変異型 mtDNA を高率に濃縮する必要がある。なぜなら、数千コピーの mtDNA のうち野生型 mtDNA が高率に存在する場合、野生型 mtDNA からの遺伝産物が変異型 mtDNA による呼吸機能の低下を補うというミトコンドリア間相互作用により、突然変異の影響を打ち消してしまうためである。そこで、目的の病原性突然変異をより効率的に且つ高率に蓄積させるために、ミトコンドリアを消失させるローダミン 6G (R6G) を添加した培地で培養を行うことで細胞内の mtDNA のコピー数を減少させ、その後の培養で mtDNA コピー数を回復させることにより mtDNA に人為的にボトルネックを誘導し、クローニングを繰り返すことにより、クローニングの中で目的の突然変異を高率に有する細胞を選んだ。所属研究室が先行研究としてマウス培養細胞である C57BL/6 の肺がん由来の低転移性細胞株 (P29) の mtDNA の配列を決定しており、目的の突然変異はその配列を元に呼吸機能に影響すると思われるフレームシフトやストップコドンに変化するような突然変異を 5 種類選出した。

結果として、クローニングを 7 回行い、292 クローンを得たが、現在まだ突然変異を高率に持つ株は得られていない。

2) 悪性化したマウス肺がん細胞株からの体細胞突然変異の利用 所属研究室の先行研究により、mtDNA の突然変異ががんの悪性化に関与することを明らかにした。このことから反対に、悪性化したがん細胞の中において特定の病原性突然変異を高率に蓄積した mtDNA を有する細胞が取れるのではないかと考えた。マウス肺がんの低転移性細胞株である P29 をマウスの尾静脈に注射し、その中で転移能を獲得した腫瘍を培養系に移して細胞株を作製した。それぞれの細胞株の酸素消費量を測定することによりミトコンドリア呼吸機能を評価し、その中からミトコンドリア呼吸機能の低下した細胞株を選択した。

## 考察および展望

目的の変異型 mtDNA の細胞内濃縮に関して、現段階において未だ病原性突然変異の十分な濃縮はできていない。R6G の処理条件についても改善を加えながら引き続きクローニングを行い、病原性 mtDNA 突然変異の濃縮を試みる。

悪性化したマウス肺がん細胞の体細胞突然変異の利用に関して、悪性化した細胞の中から呼吸活性が低下しているクローンが得られた。今後、その呼吸活性の低下が核 DNA の突然変異によるものであるか mtDNA の突然変異によるものであるかを検証する必要がある。そこでこれらのミトコンドリアを、mtDNA を消去した細胞へ細胞質移植法により導入することで、細胞の核を統一して mtDNA による影響を検証していく予定である。

これらの方法により病原性突然変異が濃縮でき次第、ES 細胞への細胞質移植法を用いてアグリゲーションを行い、病態モデルマウスの作出・解析へとつなげていく。

## ミトコンドリア DNA 突然変異によるヒトがん細胞悪性化の検証

和田 怜子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 林 純一 (生命環境科学研究科)

### 背景および目的

ミトコンドリアは酸化的リン酸化によって生体エネルギーである ATP を産生している細胞内小器官である。その構造は外膜と内膜の二重膜からなり、内膜上には ATP 産生を行う呼吸酵素複合体が存在する。また、マトリックスに独自の環状二本鎖 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) を数百~数千コピー有しており、これは動物細胞では唯一の核外ゲノムである。mtDNA には呼吸酵素複合体を構成するサブユニットの一部である、13 種のタンパク質と、その合成に必要な 2 種の rRNA、22 種の tRNA がコードされている。mtDNA は発がん性物質に影響を受けやすいという、酸化的リン酸化に伴って発生する活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) に常にさらされており、また核に比べ修復機能も不完全であることから、突然変異が起こりやすいと考えられている。近年では、様々なヒトがん細胞から mtDNA の突然変異が報告されており、このことから mtDNA 突然変異が細胞のがん化を引き起こすといった、『がんミトコンドリア原因説』が提唱されている。しかし、mtDNA は母性遺伝するのに対し、母性遺伝するがんは未だ報告されておらず、そのうえ mtDNA 突然変異のほとんどはアミノ酸置換を伴う病原性ではなく、多型突然変異であることから、この説に疑問を呈する声もあがっている。様々な議論は交わされているが、直接的な証拠が得られないため、この説は仮説のまま留まっている。

この説の検証が困難な要因として、まず mtDNA に人為的に変異を導入する技術が確立されていないということが挙げられる。その理由として、mtDNA は二重膜に覆われており、核膜孔のような物質の通り道が無いいため、遺伝子導入などは非常に困難であるということが言える。また、呼吸酵素複合体の遺伝子が mtDNA と核 DNA の両方にコードされている、二重支配下であるということも大きな要因である。これらの理由から、仮にミトコンドリア呼吸活性の低下が細胞のがん化に関わるとしても、厳密にがん化の起因が mtDNA の突然変異であると立証するのは困難である。

しかし所属研究室は、細胞質移植法という手法によって、これらの問題を解決した。これは、mtDNA 欠損細胞 (0 細胞) に、脱核により核 DNA を含まず、mtDNA だけとなった細胞質体を融合することで、細胞質雑種 (サイブリッド) を作製する手法である。このサイブリッド作製により、核のバックグラウンドが統一され、純粋に mtDNA だけの影響を評価することが可能となる。この手法を用いて正常細胞とがん細胞の mtDNA を置換することによって、正常細胞のがん化が病原性 mtDNA 突然変異に起因しないことを立証した。さらに、転移性が異なる 2 つのマウスがん細胞を用いて同様の実験を行ったところ、病原性 mtDNA 突然変異ががん細胞の転移能に関わっていることを示した。これは以下の一連の経路によるものであった。高転移のがん細胞の mtDNA の呼吸酵素複合体 I サブユニットをコードする領域に病原性 DNA 突然変異が存在したため、複合体 I の活性低下を起こっていた。それにより漏出した電子が ROS を発生させることによって、核 DNA にコードされている転移関連遺伝子の発現が変化し、がん細胞の転移性を高めたのである。

この結果に対し、「ヒトがん細胞においても一般化が可能であるか」「呼吸酵素複合体 I の活性低下を伴うような病原性 mtDNA 突然変異を有するミトコンドリア病患者では、

がんは転移しやすいのか」という 2 つの疑問が挙げられる。今回私は、後者に注目し、ミトコンドリア病患者さんの病原性変異型 mtDNA をがん細胞に導入し、がんの悪性化との相関性を検証することにした。

### 結果および展望

核のバックグラウンドを統一し、病原性 mtDNA 突然変異によるミトコンドリア呼吸活性を確認するため、実際に病原性突然変異を有する mtDNA を HeLa 核の 0 細胞に導入した。この病原性 mtDNA 突然変異を検出するプライマーを設計し、PCR-RFLP 法を用いてサイブリッドに病原性変異型 mtDNA が導入できたことを確認した。また、コントロールとして、病原性突然変異を持たない健常者の mtDNA を導入したサイブリッドと、すでにミトコンドリア呼吸活性を低下させることがわかっている、他のコード領域の病原性突然変異を有する mtDNA を導入したサイブリッドを使用した。

これらの細胞を用いて、病原性 mtDNA 突然変異による、ミトコンドリア呼吸活性の低下、またそれに伴う ROS、乳酸の過剰産生等が引き起こされているか、解析中である。今後は、呼吸酵素複合体 I の活性低下を引き起こすことが確認できた病原性変異型 mtDNA を、転移能を有するがん細胞に導入する。これらを用いてミトコンドリア呼吸活性の低下を引き起こすような病原性 mtDNA 突然変異がヒトがん細胞の悪性化に与える影響を検証したいと考えている。また、今回は先行研究をうけ、呼吸酵素複合体 I の活性が低下するような病原性 mtDNA 突然変異に注目したが、それ以外の病原性 mtDNA 突然変異にも注目し、mtDNA とヒトがん悪性化の検証を進めていきたい。

## 異種 mtDNA 導入によるミトコンドリア呼吸欠損モデルマウスの作製

榎 俊慧 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中田 和人 (生命環境科学研究科)

### 背景

ミトコンドリアは酸化リン酸化により生体エネルギーである ATP を合成する細胞小器官で、その内部には独自のゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) が数百から数千コピー存在している。哺乳類の mtDNA には 13 種類の呼吸酵素複合体サブユニットと、それらの翻訳に必須な 2 種類の rRNA、22 種類の tRNA がコードされている。一方、mtDNA の複製・転写・翻訳に必要なその他の因子群は核 DNA にコードされている。また、呼吸酵素複合体は核 DNA 由来サブユニットと mtDNA 由来サブユニットの両方が集合して機能的な複合体を形成する。これらのことから、ATP 産生の中核を担うミトコンドリアの呼吸機能は核 DNA と mtDNA の二重支配を受けていることになる。

mtDNA は核 DNA に比べて塩基置換の起こる速度、すなわち進化速度が速いことが知られている。このため、生物種間の分子系統解析に mtDNA の塩基置換が広く利用されている。一方近年、このような mtDNA に病原性突然変異が生じ、そのような分子種が蓄積すると全身性のミトコンドリア呼吸機能低下が誘発され、結果として多様な病態を伴うミトコンドリア病や糖尿病、神経変性疾患、がんの原因になる可能性が多く、患者研究から示唆されている。しかしながら、mtDNA の病原性突然変異とミトコンドリア病や多様な病態との直接的な因果関係だけではなく、その詳細な病態発症機構は明らかにされていないのが現状である。このような問題を解決し、さらに病原性の変異型 mtDNA によって引き起こされる多様な病態に対する治療法の探索には、病原性を示す変異型 mtDNA を導入したモデルマウスの作出が最も有効な研究戦略となる。ところが、核 DNA の場合とは異なり、mtDNA の遺伝子を人工的に改変する技術は未だに確立されていない。このような技術的な問題を解決する方法としては、1) 体細胞突然変異によって病原性の突然変異を有する mtDNA 分子種を細胞内で濃縮し、そのミトコンドリアを細胞質移植法によってマウス個体に導入する方法、2) 進化的に多様な塩基置換を生じた異種の mtDNA 分子種を含有するミトコンドリアを細胞質移植法によってマウス個体 (ドナー mtDNA 分子種の由来とは異なるマウス種) に導入する方法が考えられる。

所属研究室のげっ歯類を用いた先行研究において、系統関係の離れた核 DNA と mtDNA を単一細胞内に共存させた場合、双方の DNA から転写・翻訳されたタンパク質群が呼吸酵素複合体を形成する際に構造的で且つ機能的な不和合性が生じ、ミトコンドリア呼吸機能低下が誘導されることが明らかにされた。そこで本研究では、mtDNA の塩基置換によって構築されたげっ歯類の系統関係をもとに、核 DNA と mtDNA との不和合性によるミトコンドリア呼吸機能低下を誘導する mtDNA 分子種を探索し、そのような mtDNA 分子種を含有するマウスモデルの作製を目的とした。さらに、核 DNA と mtDNA との不和合性という高次生体機能表現型が、mtDNA の塩基置換によって構築されたげっ歯類の系統関係を反映するか否か、すなわち、系統関係におけるミトコンドリア呼吸機能の二重支配の不和合性が評価系として有効か否かも検討した。

### 方法および目的

核 DNA と mtDNA とのミトコンドリア呼吸機能における不和合性を検証し、さらに不和合性を生じる mtDNA 分子種を特定するためには、核 DNA を統一して系統的に離れたげっ歯類の mtDNA 分子種を細胞内に導入しなくてはならない。そこで、*Mus musculus domesticus* の核 DNA を有するが mtDNA を完全に欠損させた培養細胞株に系統関係の異なる、すなわち異種のげっ歯類の血小板を融合させ、サイブリッド群を作製した。

これらのサイブリッド群のミトコンドリア呼吸機能を比較解析するとともに、ミトコンドリア呼吸機能低下を示したサイブリットを用いて、異種 mtDNA 分子を導入したモデルマウスの作製を試みた。

### 結果および展望

現在、系統的に離れた複数のげっ歯類由来の mtDNA を導入したサイブリッド群の作製に成功し、げっ歯類の系統関係におけるミトコンドリア呼吸機能の二重支配の不和合性を検証している。今後、これらのサイブリッド群のミトコンドリア呼吸機能を比較解析した結果をもとに、モデルマウス作製の可能性について考察及び検証する予定である。

# 発酵茶高分子ポリフェノール MAF はマウス精子鞭毛運動を活性化させるか?

菊地 絢子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 沼田 治 (生命環境科学研究科)

## 目的および背景

紅茶から抽出された MAF(Mitochondrial Activation Factor) は、ミトコンドリアの機能を活性化させる高分子ポリフェノールである。本研究室の先行研究より、MAF が繊毛虫テトラヒメナの ATP 産生、酸素消費量、遊泳速度を上昇させること、またマウス精子においてもそのミトコンドリア膜電位を上昇させ、グルコース欠乏下での遊泳速度を回復させることが調べられている。

精子の運動に必要な ATP の産生方法は生物種ごとに異なり、図 1 に示すように、中片でのミトコンドリアの呼吸、あるいは軸系全長で行われる解糖系から供給される。ミトコンドリアでの呼吸系は、解糖系に比べて効率的に ATP を産生することができる一方で、その ATP が尾部から離れた中片で産生されるため、それを軸系まで運ばなければならないという欠点を有する。マウスを含む多くの哺乳動物では、ミトコンドリアでの ATP を効率的に軸系へと供給するよう系が見つかっておらず、運動に必要な ATP は解糖系に依存していると考えられている。これはミトコンドリア阻害剤を用いた研究からも示されており、マウス精子のミトコンドリア活性を抑制した場合でも解糖系が機能している限りはその運動性は保たれることが報告されている。(Mukai et al. 2004)

そのため、MAF による精子の遊泳運動の回復がミトコンドリアの活性化に起因しているのかを明らかにすることを目的とし、詳細な検討を行った。また、MAF 以外のポリフェノールであるレスベラトロールやエピガロカテキンガレート (EGCG) のマウス精子への影響を検証し、MAF と比較した。レスベラトロールは赤ブドウ由来の、EGCG は緑茶由来のポリフェノールであり、抗酸化作用・抗肥満作用・抗ガン作用・寿命延伸などの効果が知られている。

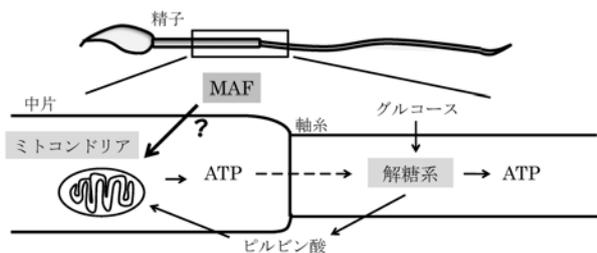


図 1. 精子における ATP 産生経路

## 方法

### 1) サンプルの採取

9~14 週齢の雄のマウス (ICR) の精巢上体尾部から精子を採取し、スクロース液 (300 mM sucrose, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4) に懸濁し、実験に用いた。

### 2) ミトコンドリア膜電位の測定

各ポリフェノールを最終濃度が 0, 0.1, 0.5, 1, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (0.1% DMSO) になるように精子に添加し、ミトコンドリア膜電位依存的に強い蛍光を示す Rhodamine 123 を用いて膜電位を測定した。

## 3) 運動性の評価

マウス精子が活発に運動する 37 °C の条件下で、運動活性溶液 (150 mM NaCl, 5.5 mM KCl, 0.4 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4) に精子を懸濁し、120 Hz の高速カメラで運動を記録した。その画像から、鞭毛の振動数・屈曲角・微小管の滑り速度を計測し運動性の評価とした。解糖系に必要な糖 (glucose) の有無による精子の運動の変化を測定し、それに対する各ポリフェノールの効果を検証した。

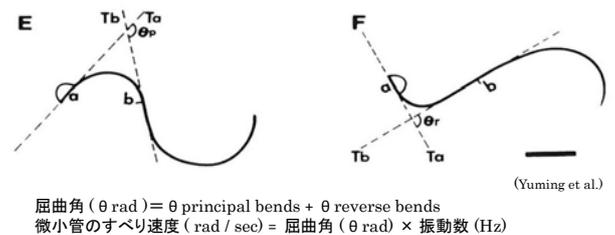


図 2. 運動性の評価の方法

## 結果および考察

マウス精子において運動に必要な ATP は解糖系から供給されるという Mukai らの実験を追検証した。マウス精子が解糖系に必須であるグルコース存在下では 30 分以上にわたり十分な運動を維持するのにに対し、グルコース欠乏下においては運動開始後すぐに遊泳速度が減少し 10 分後にはほとんど動かなくなることを、またグルコース存在下ではミトコンドリア阻害剤 (CCCP) を添加しても、運動は損なわれないことを確認した。

解糖系が機能し、十分な運動が維持されているグルコース存在下の精子において各ポリフェノールの効果の検証を行った。MAF が 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で約 1.4 倍にミトコンドリア膜電位を上昇させたのに対し、レスベラトロールと EGCG は影響を与えなかった。また、精子の運動においても、レスベラトロールと EGCG は影響を与えないことが示された。現在、精子の運動への MAF の影響についての実験を進めている。

## 今後の展望

グルコース欠乏下における各ポリフェノールのマウス精子への効果を検証するとともに、細胞内 ATP 濃度を計測し、各ポリフェノールの ATP 産生量に対する影響を検討する予定である。

## 参考文献

- Mukai C et al. Glycolysis Plays a Major Role for Adenosine Triphosphate Supplementation in Mouse Sperm Flagellar Movement. Biol Reprod (2004) 71, 540-547
- Yuming S et al. Activation of Mammalian Sperm Motility by Regulation of Microtubule Sliding Via Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate-Dependent Phosphorylation. Biol Reprod (1995) 53, 1081-1087

## 非アルコール性脂肪肝に対する紅茶高分子ポリフェノール MAF の効果の検証

佐藤 海斗 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 沼田 治 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

紅茶より抽出された高分子ポリフェノール MAF (Mitochondria Activation Factor) は、テトラヒメナやマウス精子に作用させるとミトコンドリアを活性化することが本研究室の先行研究で明らかにされている<sup>1)</sup>。また、MAF を 2 型糖尿病モデルマウスへ経口投与すると、内臓脂肪重量の低下、肝臓重量の低下、脂肪肝の改善を引き起こすことが確認されている。MAF の調製は時間と労力がかかるため、トヨパールと DW と 80%エタノールを用いた新たな調製法が開発された。大量に迅速かつ安価に得られた MAF 含量 25%の抽出物は E80 と名付けられた。E80 配合緑茶を 2 型糖尿病モデルマウスに経口投与すると、顕著な内臓脂肪蓄積抑制作用、肝臓脂肪蓄積作用を示すことが判った。

近年、非アルコール性脂肪肝への関心が高まっている。非アルコール性脂肪肝は肥満や糖尿病などの生活習慣病があると発症しやすい疾患であり、この状態が続くと肝臓が繊維化や炎症を起こし、肝機能が低下して肝炎や肝硬変へと移行する。E80 は 2 型糖尿病モデルマウスの脂肪肝を改善することが確認されたため、正常マウスを用いた検証が望まれた。そこで、正常マウスにおいて非アルコール性脂肪肝を発症させる方法を確立するために、高脂肪・高シヨ糖食と DW、高脂肪・高シヨ糖食と 30%フルクトース水を与えた実験を行った。その結果、両方の飼育方法で非アルコール性脂肪肝の発症を確認した。現在、高脂肪・高シヨ糖食を給餌し、飲料として 30%フルクトース水を与えて非アルコール性脂肪肝を発症させる方法を使って、E80 の非アルコール性脂肪肝に対する効果の検証を行っている。

## 方法

正常マウスにおける非アルコール性脂肪肝発症条件の探索

8 週齢の雄性マウス (C57BL/6J) を無作為に 3 群 (各群 n=8) に分けて、1 週間の予備飼育の後、8 週間の飼育実験を行った。予備飼育期間を 0 週として、各群とも DW を給水し、コントロール食を給餌した。実験群は以下のように設定した。

- 1-1. コントロール食+DW 群
- 1-2. 高脂肪・高シヨ糖食+DW 群
- 1-3. 高脂肪・高シヨ糖食+30%フルクトース水群

飼育期間中、各個体について摂餌量と摂水量を毎日、体重を 1 週間毎に測定した。また、1 週間毎の摂取カロリーを算出した。摂取カロリーは、コントロール食は 3.62 kcal/g、高脂肪・高シヨ糖食は 4.81 kcal/g、30%フルクトース水は 1.2 kcal/g として算出した。0 週及び偶数週の最終日に半日の絶食を行い、空腹時血糖値を測定した。4 週終了時及び 6 週終了時に各群 2 匹ずつ、8 週終了時に各群 4 匹ずつ解剖を行った。心臓からの全採血によってマウスを安楽死させた後、肝臓及び内臓脂肪を摘出し、重量を測定した。摘出した肝臓から切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、Oil Red O 染色を行い、光学顕微鏡で観察を行った。

非アルコール性脂肪肝に対する E80 の効果の検証 非アルコール性脂肪肝に対する E80 の効果を調べるため、8 週齢の雄性マウス (C57BL/6J) を無作為に以下の 4 群 (各群 n=8) に分けて実験を行っている。

- 2-1. コントロール食+DW 群
- 2-2. コントロール食+0.08%E80 水群
- 2-3. 高脂肪・高シヨ糖食+30%フルクトース水群
- 2-4. 高脂肪・高シヨ糖食+30%フルクトース,0.08%E80 水群

8 週間の飼育実験期間終了後、マウスを解剖し、採血及び肝臓重量、内臓脂肪重量を測定する。肝臓から切片を作成し、染色を行う。採取した血液からは、遊離脂肪酸、コレステロール、中性脂肪の濃度を測定する。

## 結果と考察

正常マウスにおける非アルコール性脂肪肝発症条件の探索 1-2.,1-3. の 2 群において体重、肝臓脂肪重量及び内臓脂肪重量の増加傾向がみられた。内臓脂肪重量の増加は 4 週終了時から、肝臓重量の増加は 6 週終了時からみられた。肝臓切片の染色像は、4 週終了時ではすべての群に大きな差は見られなかった。6 週終了時では 1-2. 群と 1-3. 群で脂肪滴が確認されたが、2 つの群の間に大きな差は見られなかった。8 週終了時における肝臓切片の染色像では、1-2. 群よりも 1-3. 群において肝臓への脂肪蓄積が多くみられた。高脂肪・高シヨ糖食の給餌だけでも肝臓への脂肪蓄積は起こるが、飲料として 30%フルクトース水を与えることで非アルコール性脂肪肝の進行が加速されることがわかった。

非アルコール性脂肪肝に対する E80 の効果の検証 現在、高脂肪・高シヨ糖食+30%フルクトース水による非アルコール性脂肪肝に対する E80 の効果を方法 2. に記述した方法で検証している。2 月 11 日に飼育実験期間が終了し、その後解析を行う予定である。

## 参考

- 1)High-Molecular-Weight Polyphenols from Oolong Tea and Black Tea: Purification, Some Properties, and Role in Increasing Mitochondrial Membrane Potential  
Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol. 71, 711-719 (2007)

## Tetrahymena thermophila のアクチン重合阻害剤抵抗性の研究

清水 祐太 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 沼田 治 (生命環境科学研究科)

### 背景

生物が増殖して遺伝子を子孫に伝搬するための重要な基盤の一つに、細胞質分裂があげられる。私は、繊毛虫テトラヒメナを用いて、細胞質分裂におけるアクチン重合の役割を調べていく中で、大変に不思議な現象を見出した。そこで、卒業研究としてその現象の解明に取り組んだ。

細胞質分裂は、娘核に分配された遺伝子と細胞体を完全に分離するプロセスであり、細胞中央部の原形質膜の陥入(分裂溝)が進行することで生じる。分裂溝の膜直下に形成される収縮環は、主にアクチン繊維とモータータンパク質(II型ミオシン)から構成されており、これらのタンパク質の相互作用により収縮力が発生する。繊毛虫テトラヒメナの分裂溝にもアクチンやその調節タンパク質が局在することが知られており、動物細胞と同様の仕組みで分裂していると考えられている。しかし、この生物ではアクチン細胞骨格の機能を阻害して分裂溝の形成が抑制されるという実験報告はない。そこで、私はアクチン重合阻害剤(ラトランキュリン A)でテトラヒメナを処理して細胞質分裂への影響を調べた。テトラヒメナを細胞質分裂の研究に用いるのは、*Tetrahymena pyriformis* を用いて大量の同調分裂細胞が得られること、*Tetrahymena thermophila* を用いて遺伝子の機能阻害実験ができるからである。

### 方法

#### 1. 同調培養

$1.0 \times 10^5$  cells/ml 以下の *T. pyriformis* (W 株) の培養液を 34 と 26 で 30 分ずつ交互に 8 回インキュベートした。この同調処理の後、26 で培養を続け、55 分が経過したところで、ラトランキュリン A (終濃度  $10 \mu\text{M}$ ) を加えた。その後、5 分おきに細胞を回収して、ホルマリン固定を施し、分裂細胞の割合を調べた。

#### 2. 食胞形成能の測定実験

対数増殖期まで培養した *T. thermophila* (B2086 株) と *T. pyriformis* (W 株) を  $1.0 \times 10^5$  cells/ml に調整し、ラトランキュリン A (終濃度  $10 \mu\text{M}$ ) を加え、培養を続けた。継時的に分取した培養液に墨汁を加えて食胞を形成する細胞の割合と 1 細胞あたりの食胞数を調べた。

#### 3. ウェスタンブロッティング

*T. thermophila* および *T. pyriformis* の抽出液を SDS-10%PAGE で分画後、ゲルを PVDF 膜に転写した。ブロッキング後、膜を 1 次抗体と反応させた。次に、アルカリフォスファターゼで標識した 2 次抗体と反応させて、BCIP/NBT を基質として発色反応を行った。

### 結果と考察

同調処理した *T. pyriformis* は、55 分後から細胞質分裂を始め、75 分後には 70% 以上の細胞が分裂中であった。ラトランキュリン A で処理した細胞は全体的に分裂が 5 分遅れた。*T. pyriformis* の細胞質分裂に要する時間は 20 分程度である。この結果は、*T. pyriformis* の細胞質分裂にアクチン重合が必要な可能性を示唆した。しかし、動物細胞や分裂酵母などでは、同様の薬剤処理により完全に細胞質分裂は

抑制される。この違いは、テトラヒメナと他の生物でのラトランキュリン A に対する感受性の違いに起因する可能性を考えた。テトラヒメナの食胞形成にはアクチン重合が必須である。これまでに Zackroff らは分子構造が異なる別のアクチン重合阻害剤(ラトランキュリン B)で処理した *T. thermophila* が 24 時間後には食胞形成能を回復することを報告している。そこで、同調処理した細胞がラトランキュリン A に対する耐性を短時間のうちに獲得した可能性を検討した。

*T. pyriformis* および *T. thermophila* をラトランキュリン A で処理すると、その直後に食胞の形成能を失う。さらに継時的に観察していくと、*T. thermophila* は約 1 時間後から食胞を形成する細胞が出現し、3 時間後にはほぼすべての細胞が食胞形成能を回復していた。*T. pyriformis* は 1.5 時間後から食胞を形成する細胞が現れた。これより、ラトランキュリン A に対する耐性は薬剤処理後、1 時間以降に獲得されると結論した。上述した、同調処理細胞を用いた細胞質分裂のラトランキュリン A による遅延効果については、薬剤耐性機能が発現したことよりも、テトラヒメナの細胞質分裂にアクチン重合が必須でない可能性を支持した。

それでは、どのようにしてテトラヒメナはラトランキュリン A に対する耐性を獲得したのだろうか。まず、このラトランキュリン A の耐性能力が、アクチン細胞骨格の性状の変化に起因するのか、あるいは、別の薬剤に対しても耐性であるのかを検討した。ラトランキュリン A 処理細胞にシクロヘキシミド(タンパク質合成阻害剤)を投与してみると、コントロールと比べて特に薬剤に対する感受性に差は認められなかった。次に、アクチンの発現量の増大によりラトランキュリン A に対する耐性能が獲得された可能性を考え、ウェスタンブロッティングを行った。通常の培養条件下では、テトラヒメナのアクチンのバンドは 42 kD 付近に 1 本だけ検出される。*T. pyriformis* では薬剤処理 3 時間後にはアクチンのバンドの移動度がシフトした。一方、*T. thermophila* では、処理後 1 時間まではバンドが 1 本であったが、2 時間後には 42 kD のバンドの下にもう一つのバンドが検出された。この結果より、ラトランキュリン A 耐性能の獲得に伴い、アクチンに分子修飾が起きている可能性がある。全ゲノムが解読されている *T. thermophila* は主要なアクチン (*ACT1*) のほかに 3 つのアイソフォーム (*ACT2*, *ACT3*, *ACT4*) の遺伝子があることが分かっている。その中に、ラトランキュリン非感受性のアクチンが含まれていて、その発現量が増大することで耐性を獲得した可能性もある。そこで現在、定量 PCR 法を用いて、各アクチンアイソフォームの転写量の変動について調べている。

### 参考文献

Zackroff RV and Hufnagel LA. Induction of anti-actin drug resistance in *Tetrahymena*. J Eukaryot Microbiol. 2002 ;49(6):475-477.

## リボソーム合成に着目した筋萎縮のメカニズム

石川 翔一 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 沼田 治 (生命環境科学研究科)

### 背景および目的

骨格筋は外部からの刺激によって、形態的・機能的な適応を示す。例えば、大きな負荷のかかるトレーニングは筋肥大を、持久的トレーニングは遅筋化による筋持久力の向上を、ギブス固定やベッドレストなどによる除負荷は筋萎縮を引き起こす。このように、骨格筋は非常に可塑性に富む組織であると言える。

筋量の維持には、骨格筋の神経支配が大きな役割を果たすことはよく知られている。神経からのシグナルを受け取ることによって骨格筋は興奮し、収縮する。これによって骨格筋に機械的な刺激が加わり、それが筋量の維持に貢献する。すなわち、骨格筋への神経支配の解除は筋量の維持を不可能にし、その結果として筋萎縮を引き起こされる。

多くの先行研究から、除神経は筋萎縮を誘発することが知られている。除神経モデルとしてよく用いられる方法は、下腿の骨格筋を支配する坐骨神経を切除するものであり、これによって下腿の骨格筋は顕著な萎縮を引き起こす。除神経による筋萎縮のメカニズムは解明されつつあるものの、未だ不明な点が多い。このメカニズムを探る為に、本学人間総合科学研究科武政研究室にて行なわれた除神経-筋萎縮モデルマウスを用いた研究では、その要因のひとつとして「骨格筋におけるリボソーム合成量の低下」が示唆された。

そこで本研究では、47S pre ribosomal RNA の転写において重要な役割を果たすと考えられている転写関連因子の一つである Taf-1a (TATAbox binding protein associated factor 1) を RNAi によってノックダウンし、それに伴うリボソーム合成量の低下と筋萎縮への影響を検討することによって、除神経による筋萎縮のメカニズム解明の一端を明らかにすることを目的とした。「Taf-1a のノックダウンにより、47S pre ribosomal RNA の転写量が低下し、その結果リボソーム合成量の低下が生じ、筋萎縮が引き起こされる」という仮説を立て、その検証を行った。

### 方法

#### 1 プラスミドの精製

計 4 種類のプラスミド (Taf-1a の mRNA を分解する shRNA をインサートしたプラスミドを 2 種類 (si-1, si-2)、ベクター骨格のみを持つプラスミド (mock) を 1 種類、LacZ を発現するプラスミドを 1 種類) を各々大腸菌に導入した後、大量培養した。その後大腸菌からプラスミドを精製し、濃度が  $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  となるように生理食塩水に溶解し、 $-20$  下にて保存した。

#### 2 プラスミドによる RNAi 効果の検討

マウス骨格筋由来培養細胞 C2C12 を 6 well plate に播種し、10% FBS を培地として 5%  $\text{CO}_2$ 、60% コンフルエントに達した時点で精製したプラスミドをリポフェクション法により、C2C12 へ導入した。その後 5%  $\text{CO}_2$ 、37 環境下にて培養し、12 時間後にサンプリングし、解析を行い、プラスミドによる RNAi 効果を検討した。解析項目は以下の通りである。

#### qRT-PCR

- ・ Taf-1a mRNA 発現量
- ・ 47S pre ribosomal RNA 発現量

#### 3 マウス生体に対するプラスミドの導入

マウスは 8 週齢の C57BL/6 雄性マウスを用いた。ペントバルビタールナトリウム水溶液 (10 mg/ml) を  $85 \mu\text{g}/\text{g}$  体重の濃度で腹腔内投与し、マウスを麻酔した。麻酔後、前脛骨筋 (TA) 周辺を剃毛し、TA に対して  $100 \mu\text{g}$  のプラスミドをエレクトロポレーション法にて導入した。その後 2 週間通常飼育し、TA をサンプリングした。解析項目は以下の通りである。

- (1) 体重の測定
- (2) 筋湿重量の測定
- (3) 筋繊維径の測定
- (4) qRT-PCR
  - ・ Taf-1a mRNA 発現量
  - ・ 47S pre ribosomal RNA mRNA 発現量
- (5) Western blotting
  - ・ Taf-1a タンパク発現量

### 結果

C2C12 へ導入したプラスミドによる RNAi 効果として、si-2 プラスミドを用いた際に mock に比べて有意な減少を示した (Fig.1)。すなわち、設計したプラスミドは十分に RNAi 効果を有することが示唆された。現在、マウス生体を使った実験について解析中である。

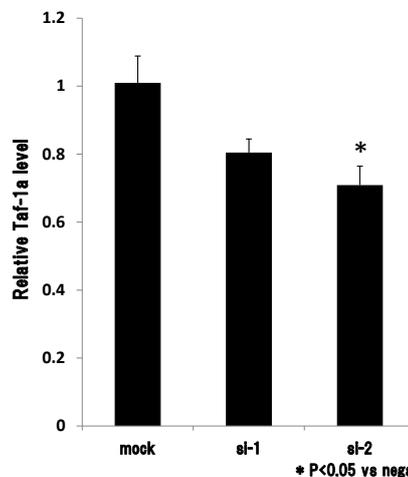


Fig.1 プラスミドによる RNAi 効果の検討



Fig.2 マウス下腿前脛骨筋へのエレクトロポレーションの様子

## 強度の違うトレーニングが異なるタイプの骨格筋の 乳酸脱水素酵素の発現に及ぼす影響

駒形 康文 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 武政 徹 (人間総合科学研究科)

### 背景および目的

乳酸は一般に、運動後に筋内に蓄積される疲労物質として考えられている。特に短距離をダッシュするような、一般に無酸素運動と呼ばれる高強度の運動後に乳酸は大量に蓄積される。一方、乳酸はエネルギー物質であるグルコースを完全に利用する途中で一時的に作り出される中間代謝産物であり、動物の体内では乳酸を再びエネルギーを産生する経路に戻し、エネルギー源として利用されることも分かっている。乳酸をエネルギー源とする反応には、乳酸脱水素酵素 (Lactate dehydrogenase: LDH) が関係する。乳酸脱水素酵素には、ピルビン酸から乳酸を作るときに働く muscle 型乳酸脱水素酵素 (M-LDH) と、乳酸をピルビン酸に作り直すときに働く heart 型乳酸脱水素酵素 (H-LDH) の二種類がある。乳酸は主に速筋で作られるので、M-LDH は速筋線維に多く存在し、乳酸排出に特異的な乳酸トランスポーターを介して速筋線維外へ移動する。そして、その乳酸は遅筋線維、心筋でエネルギーとして使われるために、乳酸取り込みに特異的な乳酸トランスポーターを介して、そこへと移動する。そのため H-LDH は遅筋線維内、心筋内に多く存在する (Fig.1)。

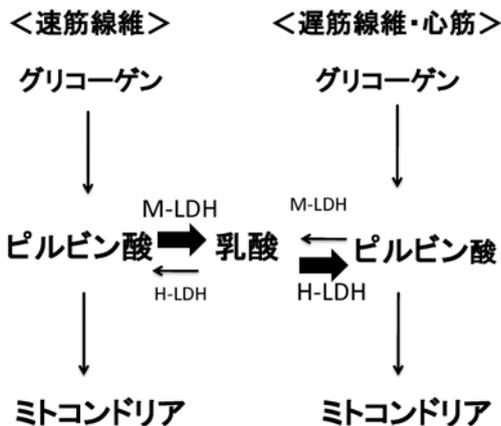


Fig.1 筋線維でのLDHの働き

私は強度の異なるトレーニングをマウスに行わせた際、骨格筋における M-LDH と H-LDH の動態について解析したいと考えた。持久性トレーニングのような低強度トレーニングをさせたマウスの骨格筋は、遅筋線維細胞の割合が多くなり、H-LDH が増えると考えられる。一方、スプリントトレーニングのような高強度トレーニングをさせたマウスの骨格筋は速筋線維細胞の割合が多くなり、M-LDH の割合が増えることが予想される。この仮説により LDH が運動様式により異なる適応を行い、効率よく乳酸を代謝出来るようになることが証明できると考えたので、動物実験によりこの検証を行った。

### 方法

#### 1) 実験動物

実験動物は ICR 系 8 週齢雄性マウスを用いた。

#### 2) 実験群とトレーニングプロトコル

マウスを 6 週間飼育し、その間、強度と時間の異なるトレーニングをトレッドミルで強制負荷した。トレーニングは週 5 日行った。群分けを以下に記す。

(a) Control (Con) 群 (安静飼育群): n=6

(b) Endurance Training (ET) 群 (低強度運動群): n=8

走行 speed: 15m/min,

運動時間: 60min

(c) Sprint Training (ST) 群 (高強度運動群): n=8

走行 speed: 25m/min,

運動時間: 2min Running 5min Rest × 10set

### 3) 解析項目

トレーニング期間終了の翌日に下腿のヒラメ筋

(soleus: Sol)、足底筋 (plantaris: Pla)、腓腹筋

(gastrocnemius)、長指伸筋 (extensor digitorum longus)、前

脛骨筋 (tibialis anterior) をサンプリングし、筋湿重量の測定を行った。実験に使用した Sol と Pla の筋湿重量のグラフを Fig.2 に示した。

遅筋線維の割合の高い Sol と速筋線維の割合の高い Pla について Western blotting で M-LDH と H-LDH の量の増減を解析した。またそれぞれの筋の Citrate synthase: CS 活性測定、Phosphofructokinase: PFK 活性測定を行った。

### 結果および考察

#### 1) 筋湿重量

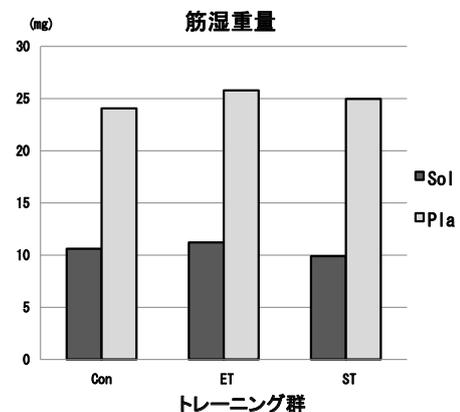


Fig.2 Con群、ET群、ST群のSolとPlaの筋湿重量を測ったが、トレーニング群ごとの差はみられなかった。

#### 2) ウエスタンブロット解析

現在解析中である。

#### 3) CS 活性測定、PFK 活性測定

現在解析中である。

### 参考文献

Training-induced alterations in lactate dehydrogenase reaction kinetics in rats: a re-examination

Exp Physiol, 84 (5) 989-998, 1999

## 膵β細胞における転写因子 MafA の機能解析

勝又 斗紀夫 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 高橋 智 (人間総合科学研究科)

### 背景および目的

大 Maf 群転写因子はレトロウイルス AS42 から単離された癌遺伝子 v-maf の細胞関連遺伝子であり、マウスでは、現在までに c-Maf, MafB, MafA, Nrl の 4 種類が同定されている。そして大 Maf 群転写因子は、C 末端側の塩基性ドメインとロイシンジッパードメインからなる bZIP ドメインを介してホモダイマーやヘテロダイマーを形成し、ゲノム DNA 上の Maf 認識配列へと結合することで、標的遺伝子の発現を正に制御している。MafA は、その遺伝子欠損マウスの解析から、膵β細胞に特異的に発現し、主にインスリンやその分泌に関わる遺伝子の制御を介して、血糖調節に重要な役割を有することが明らかになっている。また最新の研究では、mafA は膵外分泌細胞や肝細胞からインスリン産生細胞への分化転換に必要な遺伝子群の一つであることが示唆されている。本実験では、mafA 遺伝子欠損マウスの組織所見において膵β/α細胞比が減少していることに着目し、MafA が膵β細胞の細胞増殖に促進的な役割を有すると考え、MafA の膵β細胞の増殖に対する役割を明らかにすることを目的とした。

### 方法

1) 膵ランゲルハンス島の免疫組織化学的解析 膵β細胞増殖能を調べるために、8 週齢の野生型マウス (n=6) 及び mafA 遺伝子欠損マウス (n=7) を用いて、細胞増殖のマーカーである Ki67 陽性細胞数と BrdU の取り込み量を免疫組織学的に評価を行った。BrdU の取り込み量は、0.1 mg/g (BW) 腹腔内投与後 6 時間に評価を行った。抗インスリン抗体と抗 Ki67 抗体、抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色学的解析により、β細胞に占める Ki67, BrdU 陽性細胞数の割合を算出した。解析において、3,000 以上のβ細胞の解析を行った。

2) インスリン含有量測定 マウス膵臓全体のインスリン含有量を調べるために、1, 2, 4 週齢の野生型マウス (n=7, 6, 3) 及び mafA 遺伝子欠損マウス (n=5, 5, 3) の膵臓を摘出し、酸エタノール処理後、全膵臓中のインスリン含有量を ELISA 法によって測定した。

実験結果は平均 ± 標準誤差で表し、各群の有意差検定にはマン・ホイットニーの U 検定を用いた。

### 結果および考察

免疫染色の結果、β細胞中の Ki67 陽性細胞の割合は野生型マウスで  $0.97 \pm 0.10\%$ 、mafA 遺伝子欠損マウスでは  $0.58 \pm 0.12\%$  となり、mafA 遺伝子欠損マウスで有意に減少していた。(p=0.038) (Fig.1) 同様に、β細胞中の BrdU 陽性細胞の割合は野生型マウスで  $0.43 \pm 0.18\%$ 、mafA 遺伝子欠損マウスでは  $0.12 \pm 0.06\%$  となり、mafA 遺伝子欠損マウスで有意に減少していた。(p=0.042) (Fig.1) また、インスリン含有量は、1 週齢、2 週齢では差が見られなかったが、4 週齢において野生型マウスで  $18 \pm 3.1\mu\text{g}$ 、mafA 遺伝子欠損マウスでは  $6.4 \pm 1.8\mu\text{g}$  となり、mafA 遺伝子欠損マウスで有意に減少していた。(p = 0.029)(Fig.2)

これらの結果から、MafA は膵β細胞において細胞増殖に促進的な役割を果たしていることが明らかとなった。また、mafA 遺伝子欠損マウスに認められる膵β/α細胞比の減少はβ細胞の増殖不全が一因である可能性が示唆された。さらに、mafA 遺伝子欠損マウスにおける耐糖能異常等の病態は、インスリン発現の低下に加え、膵β細胞の増殖能の減退によるインスリン含有量の減少も原因であると考えられる。

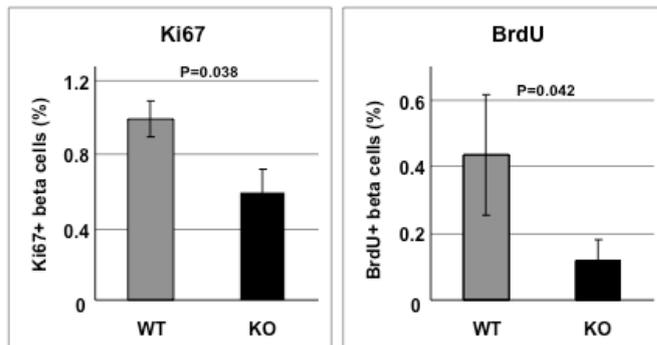


Figure 1: 8 週齢の野生型マウス (n=6) と mafA 遺伝子欠損マウス (n=7) におけるインスリン陽性細胞中の Ki67 陽性細胞の割合 (左)、インスリン陽性細胞中の BrdU 陽性細胞の割合 (右)

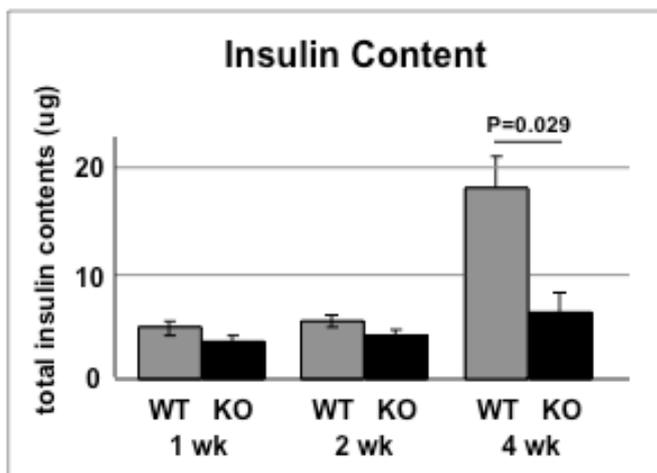


Figure 2: 1, 2, 4 週齢の野生型マウス (n=7, 6, 3) と mafA 遺伝子欠損マウス (n=5, 5, 3) におけるインスリン含有量

## 多能性幹細胞の機能制御における KLF の役割

全 孝静 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 高橋 智 (人間総合科学研究科)

### 背景および目的

内部細胞塊 (Inner Cell Mass ; ICM) 由来の胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cells ; ESCs) は、身体を構成するほぼ全ての細胞に分化できる「多能性」と分化多能性を維持したまま無限に増殖する「自己増殖能」を併せ持つ。その性質を活かすことで、神経や膵β細胞などの様々な細胞を *in vitro* で得ることが可能になり、従来は治療が困難であった疾患の根本的治療法の開発や、創薬スクリーニングに応用できる利点がある。しかし、ヒト ESCs は受精卵を壊して樹立するため、それに対する倫理的な反対意見も根強い。

2007年、京都大学の山中教授らの研究グループが体細胞に Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc の4つの因子 (山中因子) を導入することにより、あらゆる組織や臓器の細胞に分化する可能性を持つ人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell ; iPSCs) を樹立して以来、ESCs が抱えていた倫理的問題を回避し、加えて免疫拒絶反応の軽減が可能になったことなどから、iPSCs は再生医学における有用な細胞源として期待を集めている。しかしながら、4つの山中因子により体細胞から iPSCs が誘導される詳しい分子機構は不明なところが多く残されている。

本研究では、山中因子の一つである Klf4 及びそのファミリー (Krüppel-like factor family) に焦点を絞り、マウス ESCs の未分化性維持におけるその役割と ESCs や Epiplasm stem cells (EpiSCs)<sup>1</sup>、Trophoblast stem cells (TSCs)<sup>2</sup> などの多能性幹細胞間の関係を KLF を主眼として理解することを本研究の最終目的とする。

### 方法

#### 1. KLF 過剰発現 ESCs の樹立

Oct3/4 遺伝子座に薬剤 (zeocin) 耐性遺伝子が組み込まれた野生型 ESCs (E14/129Sv マウス由来) に Electroporation 法により KLF 及びその下流に薬剤 (puromycin) 耐性遺伝子を繋いだプラスミド DNA を導入した。遺伝子導入後、一週間以上 puromycin 入りの ESCs 用培地で薬剤セレクションを行い、形成されたコロニーをマイクロピペットで単離し 0.25% Trypsin/EDTA 処理によって細胞を分散させフィーダー細胞に播種して細胞を増殖させた後、凍結保存した。また、Western blotting にて新しく樹立したこの ESCs の KLF 発現量の解析を行った。

#### 2. ESCs の分化誘導実験

まず、野生型 ESCs から EpiSCs への分化誘導が可能であるかを、過去の報告 (Guo et al., 2009) を参考にして行った。LIF や zeocin 存在下で培養した ESCs (Oct4 を発現し未分化性が維持されている) の培養条件から bFGF や Activin、JAK inhibitor などの分化刺激因子を添加し LIF を排除した培地へ切り替え継代培養を行った。続いて、当研究室で樹立した3種類の KLF 過剰発現 ESCs も同く、分化刺激を与えた条件で培養した。様々な因子による刺激によって形成

<sup>1</sup>5.75dpc のマウス胚から取り出したエピプラストを bFGF、Activin の存在下で培養し樹立した幹細胞 (Brons et al., 2007)

<sup>2</sup>3.5dpc のマウス胚盤胞期胚を FGF4 やマウス胎仔線維芽細胞上清 (MEF-CM) の存在下で培養し樹立した幹細胞 (Tanaka et al., 1998)

された細胞の性質を調べるため、免疫染色やリアルタイム RT-PCR 法を使い遺伝子の発現を調べた。

#### 3. 遺伝子発現パターンの解析

##### ● 免疫染色

数日間分化誘導した細胞は、4% Paraformaldehyde で固定し、0.3% Triton-X 処理、ブロッキング過程を経て、一次抗体は anti-CD31 (Pharmingen, 1:300) anti-CDX2 (Pharmingen, 1:300) anti-Oct3/4 (Abcam, 1:300) で一晚反応させた。二次抗体は Alexa Fluor 488 anti-rabbit (Invitrogen, 1:400) や Cy3 anti-rat (Jackson IR 1:400) Cy3 anti-mouse (Jackson IR 1:400) を使用し、蛍光顕微鏡 BIOREVO (Keyence) で観察を行った。

##### ● リアルタイム RT-PCR

細胞のペレットから、RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いて抽出した RNA を、Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用いて cDNA 化し、SYBR Premix EX Taq™ II (TaKaRa) を蛍光色素として、Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa) によって標的遺伝子の発現を比較した。標準化には HPRT を使用した。

### 結果および考察

#### 1. KLF 過剰発現 ESCs の樹立

Western blotting の結果を元に、各 KLF 遺伝子ごとに様々な発現量をもつ細胞株が 20 ライン以上得られたことを確認した。

#### 2. ESCs の分化誘導実験

#### 3. 遺伝子発現パターンの解析

分化刺激を与えて培養した野生型 ESCs を使って免疫染色を行った結果、EpiSCs 特異的マーカーの発現が観察された。また、リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現量の解析でも EpiSCs 特異的マーカーが検出できた。3種類の KLF 過剰発現 ESCs の中で2種類においては、数日間分化刺激を与えたにもかかわらず未分化性を維持していることを免疫染色やリアルタイム RT-PCR で確認した。一方、別の KLF 過剰発現 ESCs は、zeocin 存在下では死滅したため、zeocin を除去し分化培養を行った結果、ESCs や EpiSCs とは全く別の性質を持つ Trophoblast-like cell に分化したことが観察できた。

### 今後の展開

分化刺激によって誘導された細胞が真の EpiSCs/TSCs であるかを検討する予定である。加えて、現在 Doxycycline 存在下で KLF の発現誘導が可能 (Tet-on system) 細胞を樹立している。この系を用い、多能性幹細胞の間を可逆的に変換できる実験系を確立し、その分化過程における KLF をメインとした転写因子ネットワークの動態を検討していく予定である。

## マクロファージによる炎症性サイトカイン産生への Fc $\alpha$ / $\mu$ R の関与

松岡 侑里 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渋谷 彰 (人間総合科学研究科)

### 背景および目的

免疫系細胞上に発現する Fc 受容体は抗体の Fc 部分との結合を介して貪食、細胞傷害やサイトカイン産生など、抗体による免疫応答に必須の働きをしている。当研究室で同定された Fc $\alpha$ / $\mu$ R は IgA および IgM 抗体に対する Fc 受容体であるが B 細胞やマクロファージに発現が認められる。

グラム陰性菌の主要な菌体成分である Lipopolysaccharide (LPS) の投与による敗血症モデルにおいて Fc $\alpha$ / $\mu$ R 欠損マウスは LPS 投与後の血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  の炎症性サイトカインの産生が野生型マウスと比較して低下しており、生存率も改善していた。このモデルはマクロファージが炎症性サイトカインの主要な産生細胞として知られており、Fc $\alpha$ / $\mu$ R が LPS に対するマクロファージからの炎症性サイトカイン産生を亢進させている可能性が示唆された。本研究ではマクロファージからの炎症性サイトカイン産生における Fc $\alpha$ / $\mu$ R の関与を明らかにすることを目的とする。

### 方法

#### ● マクロファージ上の Fc $\alpha$ / $\mu$ R の発現解析

野生型マウスの大腿骨から骨髓細胞を回収し、M-CSF を含むコンプリート RPMI 培地で 4-6 日間培養してマクロファージを誘導した。誘導されたマクロファージを LPS を含む RPMI 培地で 24 時間刺激した後 Fc $\alpha$ / $\mu$ R 特異的モノクローナル抗体を用いて染色を行い、フローサイトメトリー法にて解析を行った。

#### ● マクロファージからのサイトカイン産生の検討

野生型マウスおよび Fc $\alpha$ / $\mu$ R 欠損マウスから上記の方法でマクロファージを誘導し、LPS を含む RPMI 培地で 24 時間刺激した。刺激後培養上清を回収し、ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 法を用いて培養上清中の IL-6 及び TNF- $\alpha$  の濃度を検討した。

### 結果および考察

フローサイトメトリー法による解析の結果、マクロファージ上の Fc $\alpha$ / $\mu$ R は刺激に用いた LPS の濃度依存的に発現増加が認められた。ELISA 法による解析の結果、LPS 刺激に対する IL-6 及び TNF- $\alpha$  の産生は野生型マクロファージと Fc $\alpha$ / $\mu$ R 欠損マクロファージの間に差は認められなかった。

ナイーブマウスの血中には生体が本来有する IgM 自然抗体が存在するが、IgM 自然抗体の中には LPS に反応するものがあることも報告されている。よって、マクロファージ上の Fc $\alpha$ / $\mu$ R は LPS と免疫複合体を形成した IgM 自然抗体との会合を介してその炎症性サイトカイン産生を調整している可能性が考えられる。現在 LPS と IgM との複合体を用いた場合の炎症性サイトカイン産生を検討することによって、その産生における Fc $\alpha$ / $\mu$ R の関与を検討している。

## 細胞内親電子修飾の制御を司るタンパク質 UCH-L1

矢澤 亜季 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 熊谷 嘉人 (人間総合科学研究科)

## 背景および目的

我々を取り巻く環境中には、様々な親電子物質が存在している。親電子物質はタンパク質の求核置換基と共有結合を形成し、その機能障害を引き起こす。これまで我々は、大気中の親電子物質として1,2-ナフトキノン(1,2-NQ)を同定し、本物質の共有結合によりPTP1B、CREBなどのシグナル分子を攪乱することを示してきた。しかし、これらの被修飾タンパク質の細胞内運命は不明であった。

一方、近年の複数の内在性親電子物質の発見により、生体内には親電子修飾を制御するシステムが存在することが予想される。親電子修飾に起因する“親電子シグナル”を解除するシステムとしては、生体内求核剤であるグルタチオン(GSH)によるS-トランスアシル化が示唆されているが、実際にこの反応を触媒する酵素は未だに同定されていない。そこで本研究では、1,2-NQを親電子物質のモデル化合物として用い、S-トランスアシル化により親電子修飾を解除することができるタンパク質を同定することを目的とした。

## 方法

## 1. 1,2-NQ 修飾タンパク質の同定及び修飾部位の決定

二次元電気泳動/1,2-NQ を特異的に認識する抗体を用いたウェスタンブロット分析及びMALDI-TOF/MS 解析を行った。

## 2. タンパク質の精製

大腸菌高発現系を用いた。

## 3. 加水分解活性の測定

Ub-AMC を気質として用い、蛍光検出器による測定を行った。

## 4. 1,2-NQ のグルタチオン結合体 (GS-NQ) の検出

高速液体クロマトグラフィー法により検出した。

## 5. UCH-L1 ノックダウンによる検討

RNAiMAX による siRNA のリポフェクション法により行った。

## 結果

1,2-NQ を A549 細胞に曝露したところ、様々な細胞内タンパク質への1,2-NQの化学修飾が観察されたが、その修飾レベルは経時的に減少した。この親電子修飾の減少は、GSH 枯渇剤であるBSOの前処理によって抑制されたことから、GSHが細胞内タンパク質からの親電子修飾の解除に関与していることが示唆された。

次に、1,2-NQの結合量が経時的に減少したタンパク質を同定した結果、その1つは分子量25.7 kDa および等電点5.7を示すユビキチンC末端加水分解酵素 Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) であった。非細胞系において、精製したヒトUCH-L1と1,2-NQ(100 μM)を反応させると、本酵素活性は36%阻害された。同条件下において、1分子当たり2つの1,2-NQが結合しており、その結合部位はCys152とCys220であった。そこで、1,2-NQを

あらかじめ結合させたUCH-L1にGSH(5 mM)を反応させたところ、濃度・時間依存的に1,2-NQの結合量は減少し、消失した本活性は有意に回復した。さらに、反応上清中には1,2-NQのGSH結合体であるGS-NQの生成が認められた。

以上より、UCH-L1は自身への親電子修飾を生理的濃度のGSHを利用してS-トランスアシル化を触媒するタンパク質であることが明らかとなった。

興味深いことに、UCH-L1をノックダウンすると、1,2-NQによる細胞内タンパク質の化学修飾は増強した。このことから、UCH-L1はユビキチンC末端加水分解以外に、細胞内親電子修飾を制御している多機能タンパク質であることが示唆された。

## 考察

本研究において、UCH-L1への1,2-NQの共有結合とそれに伴う活性阻害は可逆的であった。さらに、GSHを利用した自浄作用のみならず、他のタンパク質に対する親電子修飾をも制御することが示唆された。生体内ではドーパミンキノン、エストロゲンキノン、4-HNEなどの親電子物質が代謝の過程で産生される。そのためUCH-L1は、1,2-NQのような外因性の親電子物質のみならず、内在性の親電子シグナルをも制御している可能性が考えられる。

UCH-L1の親電子修飾制御能に関して、1)モノユビキチンプールの維持による親電子修飾タンパク質の分解、2)ユビキチン-GSHのプロセッシングによる細胞内GSH量の保持が考えられるので、現在検討中である。

また、UCH-L1は別名PARK5と言い、パーキンソン病の原因遺伝子の一つであり、本酵素活性の破綻がパーキンソン病につながる事がわかっている。パーキンソン病の発症機序は多数報告されており、家族性パーキンソン病と孤発性パーキンソン病に大別されるが、その中でも孤発性パーキンソン病の原因の一つとして麻薬や殺虫剤などに含まれる親電子物質があることがわかっている。本研究において、過剰の1,2-NQ修飾によりUCH-L1の酵素活性は消失した。このことから、孤発性パーキンソン病の発症機序に関して、UCH-L1が過剰に親電子修飾を受けたことによる機能破綻が、生体内親電子シグナル制御系の破綻に繋がっており、パーキンソン病を引き起こす、という新たな見解の提示を目標に今後検討を続けたい。

## 動脈硬化の発症・進展における脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の機能解析

岡田 奈月 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 島野 仁 (人間総合科学研究科)

## 背景および目的

近年、メタボリックシンドロームをはじめとする生活習慣病は増加の一途をたどっており、これを基盤とする心疾患、脳血管疾患は、日本人の死因においてそれぞれ第2位、第3位を占めており、癌に匹敵する。メタボリックシンドロームは肥満、インスリン抵抗性、脂質異常症、高血圧などが、一つ一つが重篤でなくとも併発している状態であり、これら冠危険因子の重積状態が重症になればなるほど、急速にコレステロールに富む不安定な動脈硬化プラークを形成することになる。生活習慣病の増加原因は、糖質よりも脂質の過剰摂取と運動不足が主な原因であることが疫学調査により明らかにされつつあるが、食生活の改善や運動は必ずしも簡単ではない。したがって、生活習慣病の予防や治療に、これまでの考え方のみから脱却した新しい方法が求められている。

本研究室では、脂質合成転写因子 Sterol regulatory element-binding protein (SREBP) の標的遺伝子として脂肪酸伸長酵素 Elongation of very long chain fatty acids member 6 (Elovl6) をクローニングし、本酵素が炭素数 12-16 の飽和・一価不飽和脂肪酸を基質とする長鎖脂肪酸伸長酵素であり、炭素数 18 以上の長鎖脂肪酸の合成に重要なリポジェニック酵素であることを明らかにした (J Lipid Res. 43:911, 2002)。さらに Elovl6 欠損マウスの作製・解析により、Elovl6 欠損マウスでは炭素数 16 の脂肪酸の増加、炭素数 18 以上の脂肪酸の減少、不飽和/飽和脂肪酸比の増加など、種々の脂肪酸組成の変化が起こり、その結果、エネルギー代謝関連遺伝子の発現が変化し、食餌性および遺伝性肥満によるインスリン抵抗性が抑制されることを明らかにした (Nat Med. 13:1193, 2007)。したがって、本酵素が生活習慣病の発症に重要な役割を果たしていることが示唆されるが、生活習慣病の終末像である動脈硬化症の発症・進展に Elovl6 がどのような役割を持つのかについてはこれまでに検討されていない。そこで本研究では、動脈硬化の発症および進展過程における Elovl6 の生理的・病態生理的意義を解明し、脂肪酸組成の制御による新しい動脈硬化の予防法・治療法の開発を目指した。

## 方法

通常、マウスは低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein: LDL) コレステロール値がヒトと比較すると低く、動脈硬化になりにくい。そのため、動脈硬化モデル動物である LDL 受容体欠損マウス (LDLRKO) と Elovl6 欠損マウスを交配して LDL 受容体/Elovl6 二重欠損マウス (LDLRKO/Elovl6KO) を作製した。9 週齢の雄性 LDLRKO および LDLRKO/Elovl6KO マウスにウエスタンダイエット (0.15% コレステロール、20% 乳脂肪、34% ショ糖) を負荷し、動脈硬化を誘発した。14 週間後にエーテル麻酔下で採血し、その直後に開胸し PBS で灌流した後に大動脈、心臓、および肝臓を摘出した。血液は遠心 (3000rpm, 15min, 4 °C) した後、上清を回収し、総コレステロール、高比重リポ蛋白 (high density lipoprotein: HDL) コレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸の測定を行った。大動脈は切り開いてゴムシートに固定し、10% 中性緩衝ホルマリン液で 1~2 晩固定後、病変部を SudanIV で脂質染色した。大動脈全体の染色像を写真撮影し、Adobe Photoshop を用いて染色され

た病変部の面積を解析し、動脈硬化病変を評価した。また摘出した心臓は PBS で洗浄し、同様の 10% 中性緩衝ホルマリン液で 2 晩固定した。その後、動脈起始部の大動脈弁を OCT コンパウンドを用いて包埋し、クリオスタットにより凍結切片を作製した。その切片に Oil-Red O / Hematoxylin 二重染色を施し、大動脈での解析と同様に Photoshop を用いて病変部位を解析し、大動脈起始部の動脈硬化病変を評価した。

## 結果および考察

ウエスタンダイエットを負荷したところ、LDLRKO マウスに比べて LDLRKO/Elovl6KO マウスでは体重が大きく増加した。これは主に摂食量の増加によるものであった。血中脂質を測定すると、総コレステロール値は 950mg/dL 以上を両群とも示したが、差は認められなかった。トリグリセリド値は LDLRKO/Elovl6KO の方が LDLRKO よりも有意に高値を示した。大動脈の SudanIV 染色による解析の結果、LDLRKO と比較して LDLRKO/Elovl6KO では動脈硬化巣形成が有意に減少していた。本研究の結果から、Elovl6 の欠損が動脈硬化の発症・進展を抑制する可能性が示唆された。LDLRKO と LDLRKO/Elovl6KO の血中総コレステロール値には差が認められなかったことから、Elovl6 欠損による動脈硬化抑制機序として脂質の量的変化ではなく、リポ蛋白プロファイルや構成脂肪酸組成などの質的な変化が示唆される。動脈硬化の発症を促す危険因子としては高コレステロール血症や高中性脂肪血症、高血糖、高血圧、感染などが考えられており、マクロファージの泡沫化、血管内皮障害、肝臓での脂質代謝、脂肪組織からの炎症性サイトカイン分泌など様々な組織・細胞に起因する要因が複雑に相互作用しながら発症・進展する。今後、これらの要因を考慮しながら本モデルマウスでの検討を追加することや、組織特異的 Elovl6 欠損マウスを用いた解析をしてゆくことが必要である。また LDLRKO/Elovl6KO マウスにウエスタンダイエットを与えると LDLRKO マウスに比べて摂食量が増加してしまい、体重に差がつくことが動脈硬化形成に影響を与える可能性が考えられる。今後、LDLRKO/Elovl6KO マウスの摂食量を LDLRKO マウスの摂食量に合わせる pair-feeding を行い、動脈硬化巣の形成を検討することも必要だと考えられる。

## 花粉症の治療を目的とした遺伝子の機能解析

竹下 薫 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 有波 忠雄 (人間総合科学研究科)

### 背景および目的

アレルギー反応は、肥満細胞上に存在する高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) にアレルギー特異的な IgE 抗体が結合し、アレルギーによる架橋が起こることにより、肥満細胞内に蓄積していたヒスタミンなどの物質が放出され、アレルギー性炎症が起こる。

最近アレルギーの新規抑制性レセプターとして Allergin-1 が同定された (Hitomi K. et al. Nature Immunol, 2010)。Allergin-1 は膜型受容体であり、抑制シグナルを伝達する Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif (ITIM) 様ドメインを細胞内に 2 つ、細胞外に Ig 様ドメインを 1 つ有し、FcεRI を介した上記の活性シグナルを抑制することでアレルギー反応を抑制する。ヒトにおいては肥満細胞や好塩基球、樹状細胞などで発現している。Hitomi らは Allergin-1 ノックアウトマウスを作製し、野生型との比較を行った結果、野生型と比較してノックアウト型において強いアレルギー性炎症が認められたことを報告した。

以上のことから、この遺伝子の発現が花粉症をはじめとするアレルギー性疾患と関連があると考えられる。Allergin-1 は 10 個の exon から構成されるが、exon4 を欠損したスプライスバリエーション Allergin-1-S1、exon3 を欠損した Allergin-1-S2 が知られている (Figure 1)。また、マウスにおいて膜貫通領域に該当する exon5 を欠損した可溶性の Allergin-1-S3 の存在が確認されている。しかし、ヒトにおける同様のスプライスバリエーションは知られていない。

本研究では、ヒトにおける Allergin-1 のアレルギー性疾患における役割を解明する目的として、1. アレルギーに關与する遺伝子多型の同定 2. ヒトにおける新規スプライスバリエーションの同定 3. 各スプライスバリエーションとアレルギー性疾患サンプルにおける発現についての検討を行う。

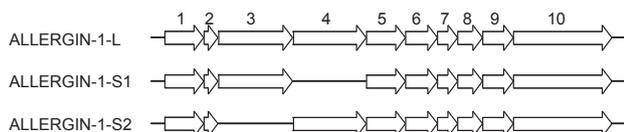


Figure 1: ヒトの Allergin-1 の構造とスプライスバリエーション (Hitomi K. et al. Nature Immunol, 2010 より引用)

### 方法

#### 1. 遺伝子多型解析

低 IgE (5 ~ 8 IU/ml) 集団 50 名、高 IgE (>2000 IU/ml) 集団 55 名のゲノムサンプルを使用して、exon1-10 のリシーケンスを行った。

#### 2. ヒトにおける Allergin-1-S3 の存在の確認

Exon5 を欠損した Allergin-1-S3 がヒトにおいても存在するか研究するために、S3 のみが増幅されるプライマーを設計した。末梢血単核球 (Peripheral Blood Mononuclear Cell: PBMC) 7 サンプル、CD4、CD14 各 10 サンプルを PCR で増幅し、2 % TAE アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。

### 3. 各スプライスバリエーション (L, S1, S2, S3) の発現量測定

サンプル	数	対象	状態
PBMC	35 ペア	SAR	花粉暴露前後
CD14	24 ペア	非患者	花粉暴露前後
	27 ペア	SAR	花粉暴露前後
CD4	25 ペア	非患者	花粉暴露前後
	28 ペア	SAR	花粉暴露前後

各スプライスバリエーションに特異的なプライマーとプローブのセットを作成し、ABI PRISM 7900HT (Life Technologies) を用いて定量的 PCR を行った。解析には比較 Ct 法を用い、季節性アレルギー性鼻炎 (Seasonal Allergic Rhinitis: SAR) 患者と非患者、花粉の暴露前後、舌下免疫療法 (Sublingual Immunotherapy: SLIT) の有無について Allergin-1 の各スプライスバリエーションの発現量に有意差が見られるかを検討した。

### 結果

1. リシーケンスの結果、いくつかのミスセンス変異、ナンセンス変異が検出された。詳細については、当日会場において発表する。

2. PBMC、CD14、CD4 それぞれのサンプルにおいて、設計したプライマーから予想されるサイズのバンドが検出され、さらに PCR 産物を用いたダイレクトリシーケンスを行い、exon5 の欠損したスプライスバリエーションが確認された。

3. 各細胞分画ごとの発現では CD14 が最も強く、PBMC、CD4 の順であった。CD4 では CD14 に比べ、発現量は 10 分の 1 以下であった。花粉の暴露の有無による発現量の変化においては、Allergin-1-L では PBMC と CD4 で暴露後に発現が有意に上昇しているのに対し、CD14 では有意に減少していた ( $p < 0.05$ )。一方、Allergin-1-S2 は SAR 患者 CD14 では暴露後の発現が有意に上昇していた ( $p < 0.05$ )。スプライスバリエーションごとの発現は  $L > S1 > S3 > S2$  の順で、Allergin-1 の発現に最も大きな影響を及ぼすものは Allergin-1-L であることが分かった。

### 考察および今後の展望

1. 今後、ゲノムサンプルの数や対象を拡大し、今回と同様のリシーケンスを行い、Allergin-1 上にある新たな変異の同定および臨床的意義について検討する。

2. 今回、マウスのみで存在が確認されていた Allergin-1-S3 がヒトにおいても発現していることが明らかになった。今後、この可溶性 Allergin-1-S3 が疾患とどのような関連があるのかについて検討する予定である。

3. 花粉の暴露による発現量の変化において、Allergin-1-L では PBMC と CD4 で暴露後に発現が有意に上昇しているのに対し、CD14 では有意に減少していた。今後は好塩基球や樹状細胞など他の分画について Allergin-1 の発現を調べていく予定である。さらに、SAR 患者の CD14 では Allergin-1-S2 が暴露後に有意に上昇していることから、SAR と Allergin-1-S2 の関連性についても明らかにしていく予定である。

# ゲノム刷り込み遺伝子座における転写因子結合配列の機能解析

坂口 龍太 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 谷本 啓司 (生命環境科学研究科)

## 背景

哺乳類の細胞は、父親と母親由来のゲノムを保持する 2 倍体であり、一般的な遺伝子は、2つの対立遺伝子（アレル）が同等に発現する。しかし、片方の親由来アレルのみが発現する特徴的な遺伝子も存在し、この現象は、アレルが由来する親の性を記憶する様に見えることから「ゲノム刷り込み」と呼ばれている。ゲノム刷り込み発現の異常は、発生の停止や重篤な疾患の原因となることが明らかになっており、その制御は生体内において非常に重要であると考えられている。

マウス 7 番染色体に存在する *Igf2/H19* 遺伝子座は、代表的なゲノム刷り込み遺伝子座である。インスリン様成長因子をコードする *Igf2* 遺伝子は、父親由来アレルのみ発現する。一方、non-coding RNA をコードする *H19* 遺伝子は、母親由来アレルのみ発現する。遺伝子座全体に渡る DNA メチル化解析の結果、*H19* 遺伝子上流に、父親由来アレル特異的にメチル化される CpG アイランドが見出され、両親由来アレルを区別するための「印」となる可能性が示唆された。実際に、同領域を欠失したノックアウトマウスでは、両遺伝子の刷り込み発現が破綻する。このため、同領域は刷り込み発現を制御する領域として、*H19-ICR* (imprinting control region) と呼ばれている (Figure 1)。

さて、現在このアレル特異的なメチル化（刷り込みメチル化）が確立するメカニズムは、ほとんど明らかになっていない。これまでの解析により、内在性 *H19-ICR* の父親由来アレル特異的なメチル化は、精子の形成過程で確立され、受精後、発生段階を通じて維持されることが示された。このため、精子前駆細胞中で特異的に発現し、DNA メチル化を誘導する転写因子の存在が予想されたが、その様な因子は未だ見つかっていない。

## 目的

当研究室の先行研究では、*H19-ICR* 断片内に刷り込みメチル化の確立に十分な情報が存在するのかを検討するため、同断片を、本来ゲノム刷り込みを示さないヒト・グロビン遺伝子座に挿入した酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome: YAC) を構築した。この YAC を保持するトランスジェニックマウス (TgM) の解析の結果、体細胞において導入 *H19-ICR* は、刷り込みメチル化を呈することが示された。ところが意外なことに、精子細胞内では導入 *H19-ICR* のメチル化は認められなかった。このことから、*H19-ICR* の刷り込みメチル化は、受精後の体細胞においても確立し得ることが明らかになった。

そこで、本研究では受精後刷り込みメチル化の確立メカニズムを明らかにするため、同制御に関わる転写因子の同定を目指した。私は、*H19-ICR* 断片中に結合配列が存在する転写因子に着目し、受精後刷り込みメチル化の評価が可能である YAC-TgM の解析系を用いてその機能を検討することにした。

## 方法

同転写因子結合配列の受精後刷り込みメチル化に対する必要・十分性を検討するため、以下に示す 2 種類の DNA 断片を作製した。

- 断片 1 : 転写因子結合配列を欠失した *H19-ICR* 断片
- 断片 2 : ゲノム刷り込み遺伝子座由来ではない CpG rich な配列に、転写因子結合配列を人工的に導入した断片

これらの断片をヒト・グロビン遺伝子座内に保持する YAC-TgM をそれぞれ作製し、受精後刷り込みメチル化が確立するか否かの検討を行うこととした。

## 結果

ターゲットベクターを構築後、相同組換え法 (Pop-in-pop-out 法) により、酵母内にて YAC に保持されたヒト・グロビン遺伝子座の改変を行った。この酵母から DNA を抽出後、サザンブロット法により、適切に遺伝子座が改変されたことを確認した。その後、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を用いて、YAC DNA を酵母染色体 DNA と分離後、精製した。この DNA をマウス受精卵前核に顕微注入し、YAC-TgM を作製した。得られた複数系統の TgM の内、導入遺伝子座を 1 コピーのみ保持する系統を、Real-time PCR 法により選別した。次いで、同 TgM の胸腺細胞由来 DNA を PFGE 法により展開後、サザンブロット法により導入遺伝子座全体の構造を確認した。

現在、TgM の交配により、導入遺伝子座を父親、あるいは母親から受け継ぐ個体を作出しているところである。これらの個体が得られ次第、サザンブロット法やバイサルファイトシーケンシング法により DNA メチル化解析を行う予定である。

## 考察および展望

「断片 1」を保持する TgM において、アレル間で DNA メチル化の差が認められなくなる場合、対象の転写因子が受精後刷り込みメチル化の確立・維持に必要であることが示される。また、「断片 2」を保持する TgM において、アレル間で DNA メチル化の差が認められるようになる場合、転写因子が受精後刷り込みメチル化の確立に十分な活性を有することが示唆される。以上、本研究によって、受精後刷り込みメチル化に対する転写因子機能の検証が可能であり、その分子メカニズムの理解につながる事が期待される。

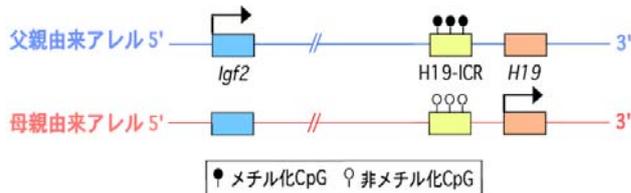


Figure 1: マウス *Igf2/H19* 遺伝子座の構造、及び、刷り込み発現と刷り込みメチル化の様子

## ゲノム刷り込みにおける卵子内低分子 RNA の機能解析

高橋 拓也 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 谷本 啓司 (生命環境科学研究科)

### 背景

ゲノム刷り込みは、ヒトやマウスなどの哺乳動物にみられる遺伝子発現制御機構である。大部分の遺伝子が父親由来アリルと母親由来アリルの両者から同等に発現するのに対して、ゲノム刷り込み制御を受ける遺伝子（刷り込み遺伝子）は、予め決まった一方の親由来のアリルのみから発現する。この片親性遺伝子発現は、多くの場合、刷り込み遺伝子座内の刷り込み制御領域 (Imprinting Control Region; ICR) における、アリル間の DNA メチル化状態の差によって規定される。

ICR における DNA メチル化は、始原生殖細胞において消去された後、生殖細胞形成過程で精子、あるいは卵子特異的に確立されることが一般的に知られている。また、そのメチル化状態は、受精後の体細胞において DNA 複製を越えて各アリル上で維持され、片親性遺伝子発現を制御する。

刷り込み遺伝子は、胚発生に重要な役割を担っているものが多く、ヒトではその発現異常が疾患の原因となる場合もある。したがって、発現制御の中心となる ICR の DNA メチル化が正しく確立・維持されることが重要であるが、その分子メカニズムの多くは解明されていない。

マウス *Igf2/H19* 遺伝子座は、ごく初期に発見され、ヒトにおいても保存された刷り込み遺伝子座である。同遺伝子座の ICR (*H19-ICR*) が高度に DNA メチル化されている父親由来アリルでは、成長因子をコードする *Igf2* 遺伝子が発現し、メチル化されていない母親由来アリルでは、ノンコーディング RNA をコードする *H19* 遺伝子が発現する (図 1)。

当研究室では以前、通常はゲノム刷り込みを受けないヒト グロビン遺伝子座に *H19-ICR* DNA 断片を挿入した酵母人工染色体 (Yeast Artificial Chromosome; YAC) を作製し、同 YAC を用いてトランスジェニックマウス (TgM) を作製することで、*H19-ICR* の活性を検証した (PNAS, 102: 10250-10255, 2005)。同 TgM の体細胞ゲノム DNA の解析により、*H19-ICR* 断片のみでアリルの親の由来に特異的な DNA メチル化が自律的に確立されることが示された (図 2)。しかしながら、同 TgM の精子ゲノムを解析した結果、導入 *H19-ICR* は内在性 *H19-ICR* とは異なり、メチル化されていなかったことから、導入 *H19-ICR* では、受精後のアリル特異的な DNA メチル化の確立に、精子におけるメチル化が必要ではないと考えられた。すなわち、生殖細胞において、DNA メチル化以外の何らかのエピジェネティックな情報が *H19-ICR* に付加され、それが受精後の体細胞において由来する親を示す「標識」として機能し、アリル特異的な DNA メチル化が確立する可能性が示唆された。

### 目的

*H19-ICR* を導入した TgM で見出された、親の由来を示す DNA メチル化以外の「標識」の実体や、それをもとにアリル特異的に DNA をメチル化する分子機構は明らかになっていない。この制御に関与する要素の候補として、本研究では「転写」とその産物の一種である「ノンコーディング RNA」に注目した。これは、複数の刷り込み遺伝子座において、転写やノンコーディング RNA がクロマチンの修飾状態に影響を与え得ることが報告されているからである。*Igf2r* 遺伝子座、及び *Kcnq1* 遺伝子座においては、父

親由来アリル特異的にノンコーディング RNA が発現することで、同アリル上の構成遺伝子のクロマチン修飾状態が変化し、アリル特異的に発現が抑制されると考えられている。また、*Gnas* 遺伝子座においては、ICR を含む遺伝子座全体にわたる転写が、卵子における ICR の DNA 刷り込みメチル化の確立に必要なことが示唆されている。さらに、最近、*H19-ICR* の配列を持つ RNA がマウスの卵子の中に存在することが報告された。これは、*Igf2/H19* 遺伝子座においても ICR を含む領域が転写されていることを示唆する。これらのことから、同領域の転写、あるいはその RNA 産物が、卵子の *H19-ICR* のクロマチン修飾状態に影響を与え、それが「標識」となり、*H19-ICR* におけるアリル特異的な DNA メチル化に寄与しているという仮説が考えられた。そこで、この仮説を検証することを本研究の目的とした。

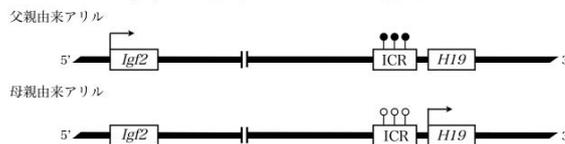
### 方法

まず、*H19-ICR* 領域の転写を欠損することが予想される変異を導入した変異型 *H19-ICR* 断片を作製し、これを YAC に保持されたヒト グロビン遺伝子座に対して、Pop-in-pop-out 法を用いてターゲティングを行うことにより挿入した。次に、同 YAC DNA をパルスフィールドゲル電気泳動により分離後、精製した。これをマウスの受精卵前核に顕微注入し、YAC TgM を作製した。TgM 系統を複数確立し、導入した YAC 遺伝子座の全体の構造が保たれていることを Southern blot 法により確認した。さらに導入遺伝子を父親、または母親から受け継ぐ TgM をそれぞれ得た後、ゲノム DNA を抽出し、DNA メチル化解析に用いた。

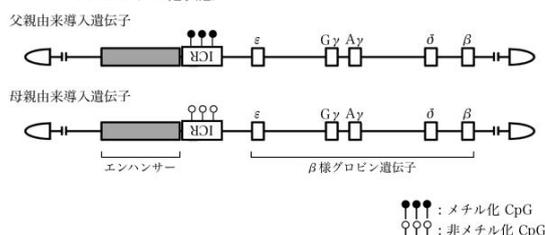
### 結果および考察

現在、メチル化感受性制限酵素を用いた Southern blot 法によって、変異型 *H19-ICR* の DNA メチル化状態の解析を進めている。その結果から、アリル特異的な DNA メチル化の制御における *H19-ICR* 由来 RNA の機能について考察する。

(図 1) マウス *Igf2/H19* 遺伝子座におけるゲノム刷り込み



(図 2) β グロビン遺伝子座 YAC TgM の体細胞における導入 *H19-ICR* の DNA メチル化状態



●●● : メチル化 CpG  
○●○ : 非メチル化 CpG

## 新規膜結合型転写因子 CREB-H の小腸での役割

菊地 琢哉 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 坂本 和一 (生命環境科学研究科)

### 背景および目的

近年、ライフスタイルの欧米化に伴い、糖尿病、高血圧、肥満、高脂血症などの生活習慣病になる人が著しく増加している。現在では、成人の約6分の1が糖尿病あるいは糖尿病予備軍であるとされ、肥満やそれに基づくメタボリックシンドロームは深刻な社会問題となっている。生活習慣病の原因として、糖・脂質代謝に関与する遺伝子発現調節の破綻が提唱され、長期的な遺伝子発現の変化が、病態形成に重要であると推測されることから、エネルギー代謝関連遺伝子の発現制御に関わる新たな転写因子の同定は、生活習慣病の新たな予防や治療の確立に極めて重要であると考えられる。本研究の対象となる CREB-H は主に肝臓と小腸に発現し、生活習慣病に関与する転写因子と考えられている。これまで CREB-H の機能解析のほとんどは肝臓で行われており、栄養状態により HNF4 $\alpha$  や PPAR $\alpha$  の制御下で発現量を変化させ、FGF21 等を介して脂肪組織、非脂肪組織、肝臓などの組織重量や血糖値、摂食量に影響を与えることが分かってきている。しかしながら小腸での CREB-H の機能に関してはシグナル伝達経路も含め、現在までほとんど分かっていない。そこで本研究目標は、小腸 CREB-H の発現機序や関連因子の発現解析を行い、CREB-H の小腸における機能を明らかにすることで全身のエネルギー代謝への影響を解明することである。

### 方法

マウスは C57B/J 8 週齢雄性を用い、栄養状態変化として、絶食 24 時間および再摂食 12 時間行った。その後解剖し、肝臓・空腸・回腸（胃の幽門から盲腸体までの腸管の、先端 5 cm を十二指腸として廃棄し残った腸管の先端 25% を空腸、末端 25% を回腸とする）から mRNA を抽出し、リアルタイム PCR や Northern Blotting を行い各因子の発現量変化を検討した。

### 結果および考察ならびに今後の予定

小腸 CREB-H は回腸よりも空腸で多く発現していることが判明した。加えて小腸 CREB-H は肝臓 CREB-H とは異なり、栄養条件により発現量が大きく変化しないこと、したがって HNF4 $\alpha$  や PPAR $\alpha$  の制御を受けず、また FGF21 を制御しないことが明らかとなった。今後 PEPCK プロモーター hCREB-H トランスジェニックマウス（肝臓高発現型および小腸高発現型）や CREB-H ノックアウトマウスを用いて、小腸における CREB-H のさらなる機能解析を進めていく予定である。

# アイスプラント抽出物による脂肪細胞の分化抑制作用の解析 ～メタボリックシンドローム予防効果の評価～

黒須 愛 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 坂本 和一 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪の蓄積により、高血圧や高血糖、高脂血症などの複数の生活習慣病が誘導された状態と定義される。その状態が続くと動脈硬化が進行し、心筋梗塞など命にかかわる病気を発症するリスクが高まる。現在、メタボリックシンドローム人口の増加・若年化が社会問題となっている。

メタボリックシンドロームの予防には、主原因である肥満の予防・改善が重要である。肥満は、脂肪細胞の増加や肥大化によって引き起こされる。従って、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化制御が肥満研究の鍵となる。本研究室では、かねてより、赤ぶどうに含まれるレスベラトロールやお茶に含まれるカテキンをはじめとする植物由来の生理活性物質の脂肪細胞分化抑制作用に着目した研究を行っており、肥満抑制・メタボリックシンドローム予防につながる物質の探求を進めている。

南アフリカ原産の植物アイスプラントは、近年、メタボリックシンドローム予防効果をもつ健康野菜として注目されている。これは、アイスプラントが、血糖値降下作用や抗酸化作用、中性脂肪抑制作用のある物質を豊富に含むと考えられているためである。しかし、このアイスプラントのメタボリックシンドローム予防効果に関する科学的な検証はほとんど行われていない。

そこで本研究では、マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を用いて、アイスプラント抽出物が脂肪細胞の分化に及ぼす作用を調べ、アイスプラントのメタボリックシンドローム予防効果を科学的に評価することを目的とし、実験を行った。

## 方法

### アイスプラント試料

日本アドバンスアグリ株式会社の所有する室内栽培植物工場で栽培されたアイスプラントを試料とした。筑波大学内でエタノール抽出および粗抽出液の乾燥を行い、水に溶かして実験に用いた。

### 使用した細胞と分化誘導法

マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を材料として用いた。培養した前駆脂肪細胞に、Dexamethasone, Isobutylmethylxanthine, Insulin 刺激 (DMI 法) を与え分化を誘導した。分化誘導後 2 日目に、誘導時の半量の Insulin を添加し、以降 2 日毎に培地交換を行った。

#### 1. Oil-red-O 染色

DMI 法を用いて細胞を分化誘導し、時期別 (分化誘導開始 0-2/ 2-4/ 4-6/ 0-8/ 8-14 日目)・濃度別 (0, 1.0, 2.5, 5.0 mg/ml) にアイスプラント抽出物を添加し、Oil-red-O 染色法により脂肪蓄積量の変化を調べた。

#### 2. MTT assay

ミトコンドリア内脱水素酵素により MTT から生成されるホルマゼンを検出し、アイスプラント抽出物による細胞生存率の変化を調べた。

#### 3. Cell count

アイスプラント抽出物による、分化誘導開始 0-2 日目にみられる細胞増殖 (clonal expansion) の変化を調べるため、分化誘導開始 0, 24, 48 時間後に細胞数を計数した。

#### 4. Luciferase assay

sterol regulatory element (SRE) および catalase プロモーター/ルシフェラーゼ発現ベクターを導入した細胞を用いて、アイスプラント抽出物による、SRE-binding protein 1c (SREBP-1c) と forkhead box protein O1 (FoxO1) の転写因子活性の変化を調べた。SREBP-1c は脂質代謝を、FoxO1 は糖・脂質代謝や分化を調節する転写因子である。

#### 5. GPDH activity assay

グリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (GPDH) の活性を測定し、アイスプラント抽出物による脂肪合成活性の変化を調べた。

#### 6. qRT-PCR

アイスプラント抽出物による、脂肪細胞分化に関わる遺伝子発現の変化を調べた。

#### 7. Western blotting

アイスプラント抽出物による、分化誘導直後に発現する脂肪細胞分化に必須の転写因子 C/EBP $\beta$  のタンパク量の変化を調べた。

## 結果

- 0-2, 0-8 日目にアイスプラント抽出物を添加した細胞では、脂肪蓄積量が減少した。一方、それ以外の時期に添加した細胞では、脂肪蓄積量は変化しなかった。
  - 細胞生存率は、アイスプラント抽出物の添加により変化しなかった。
  - 分化初期にみられる細胞増殖 (clonal expansion) は、アイスプラント抽出物の添加により変化しなかった。
  - アイスプラント抽出物により、SREBP-1c の転写因子活性は濃度依存的に低下した。一方、FoxO1 の転写因子活性は変化しなかった。
- 5 ~ 7 の実験は現在進行中である。

## 考察

これまでの結果から、アイスプラント抽出物は、脂肪細胞の分化初期に作用し、脂肪蓄積量を減少させることがわかった。しかし、この抑制的な作用は、分化初期にみられる細胞増殖 (clonal expansion) とは関係がなかった。

一方、アイスプラント抽出物により、SREBP-1c の転写因子活性は減少したため、SREBP-1c の下流にある脂肪酸合成関連遺伝子の発現に影響する可能性が示唆された。引き続き、関連する遺伝子の発現やタンパク量の変化を調べ、作用機序を明らかにする予定である。

# ショウジョウバエの連合学習における optogenetics を用いた手法の開発

武田 浩平 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 古久保-徳永 克男 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

optogenetics (光遺伝学) とは、分子遺伝学的手法を使って、光で特定のニューロンの活動を操作する新しい技術の分野で、近年、神経科学で注目を集めている。例えば、青色光に反応するイオンチャネル channelrhodopsin-2 (ChR2) を特定のニューロンで発現するような遺伝子組換え体を作製する事により、可逆的に標的ニューロンを興奮させることを可能にする。本研究では、この技術を使用した新たな行動実験系の開発を行い、ショウジョウバエの学習に関わる神経ネットワーク解析の基礎を確立する事を目的としている。

ショウジョウバエ幼虫の脳は、成虫に比べ単純で、解析しやすい。しかし学習・記憶を支える神経レベルの機構については、未知の部分が多く存在する。嗅覚連合学習において、報酬記憶 (餌を無条件刺激とする記憶) の形成にはオクトパミン神経の出力が必要であり、そのシグナルはキノコ体で嗅覚情報と統合されて記憶が定着する。また、嗅覚受容体 (Or) の全容はほぼ明らかにされ、それぞれどの匂いに反応するか分かっている。そのため、餌刺激の代わりにオクトパミン神経を興奮させ、特定の匂いの代わりに Or ニューロンを興奮させることで、記憶が定着できると期待される。そこで、当研究室で確立している学習実験系に、上記 2 種類の神経を温度刺激と光でそれぞれ操作できるようにした幼虫を使って、記憶が定着するかどうかを本研究の目的とする。

## 手法

当研究室の吉田により、以下の遺伝子組換え体を作成された。匂い刺激から青色光の刺激に置きかえるために、Or 遺伝子のプロモーター調節下で ChR2 を発現させるコンストラクトを導入した系統 (Or-ChR2)。Or の種類は、幼虫が学習できる匂いに反応するもの (Or82a, Or42b, Or47a, Or24a) とすべての Or ニューロンで発現するもの (Or83b) を選んだ。一方、餌刺激を温度刺激に置きかえるために、オクトパミン神経で特異的に発現する TDC2 遺伝子のプロモーター調節下で温度依存性チャネル dTrpA1 を発現させるコンストラクトを導入した系統 (TDC2-dTrpA1)。

標準系統である Canton S (CS) に対して 5 回の戻し交配によりこれらの系統の遺伝的背景をそろえた。実験には 3 齢前半 (産卵後 72-76 時間) の幼虫を使用した。反応の指標として、RI (response index) を以下の様に算出した。

$$RI = (Nx - Ny) / (Nx + Ny)$$

Nx: 刺激下 (白色光、青色光、高い温度) にいる幼虫数

Ny: 非刺激下 (無光、赤色光、低い温度) にいる幼虫数

## 実験 1: Or-ChR2 幼虫の走光性試験

Or-ChR2 幼虫で、光に対する反応を調べた。

a. 光に対して正常な負の走性を示すかどうかを調べた。面積の半分だけ下から白色光をあてた実験プレートに、数十匹の幼虫をおく。3 分後に RI を測定し、系統間や、コントロールで違いがないかどうかを比較した。

b. 導入した ChR2 が機能しているかどうかを調べた。匂いに対して正の走性をもっているため、機能しているならばコントロールに比べて青色光へ行く傾向を示すはずだ。そこで、面積の半分を下から青色光を、もう半分を赤色光を

あてた実験プレート (図.1 左) を用意した。その上に数十匹の幼虫をおき、3 分後に RI を測定して、比較した。

## 実験 2: DC2-dTrpA1 幼虫の温度走性試験

TDC2-dTrpA1 幼虫で、高い温度に対する負の走性を調べた。ホットプレートに一部だけ実験プレートを乗せることで、約 22 から 27 の温度勾配を作り出し、その中心に数十匹の幼虫を置いた。3、6、9 分後にそれぞれ RI を測定して、TDC2-dTrpA1 幼虫とコントロールを比較した。

## 実験 3: 連合学習テスト

かけ合わせにより TDC2-dTrpA1 と Or-ChR2 の両方をもつ幼虫を作成して、学習が成立するかどうかを解析する。温度刺激と青色光を同時に経験させた場合 (trained 群) と、青色光のみを経験させた場合 (naive 群) で、経験後の青色光に対する RI を測定する。もし記憶が定着しているならば、trained 群の方がより青色光による傾向を示すだろう。

## 結果および考察

### 実験 1

a. Or-ChR2 の系統間で RI に有意な違いがみられず、コントロールとほぼ同じ値を示したことから、光に対して正常に反応している。

b. 多くの Or-ChR2 幼虫はコントロールに比べ、有意に青色光の方へよる傾向を示した (例: 図.1 右)。このことから、導入した ChR2 は機能していることが確かめられた。

### 実験 2

TDC2-dTrpA1 幼虫はコントロールに比べ、有意に高い温度の方へよる傾向を示した。このことから、導入した dTrpA1 は機能していることが確かめられた。

### 実験 3

現在、実験が進行中であり、できれば発表時には何らかの結果を示したい。

もし実験 3 が成功すれば、Ca<sup>2+</sup> イメージングにより、摘出した脳の神経回路を可視化して、顕微鏡下で温度と光で記憶を定着させ、その仕組みを解析していく予定である。

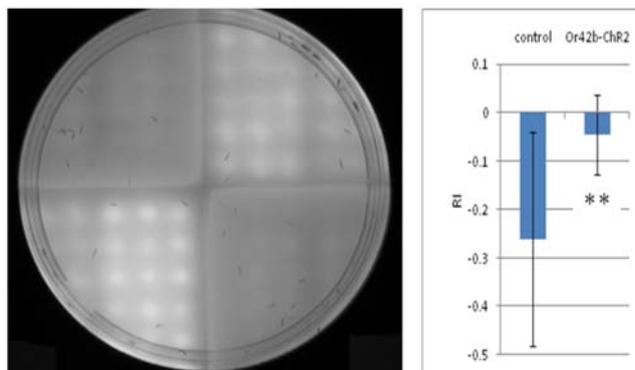


図.1 赤色光と青色光をあてた Or42b-ChR2 幼虫について  
左: 実験の様子 (明るい面が青色光) 右: RI の結果 (n = 10 回)

## ショウジョウバエを用いた統合失調症原因候補遺伝子 DISC1 の解析

田中 大介 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 古久保-徳永 克男 (生命環境科学研究科)

## 背景および目的

統合失調症は全人口の約1%が罹患する精神疾患である。主な症状は妄想、幻覚といった陽性症状と、情動反応の平板化や自発性の欠如といった陰性症状に分けられる。その発症には遺伝的要因と環境的要因の両方が関わると考えられているものの、具体的な発症機序についてはほとんど解明されていない。Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) は精神疾患を頻発するスコットランド家系の研究から発見された原因候補遺伝子で、他のタンパク質と相互作用するドメインが多数発見されている。相互作用するタンパク質の機能から、DISC1 が脳発生や脳機能に関係することが予想されているが、生体内でどのように機能するかは不明な点が多い。

当研究室ではショウジョウバエをモデルとして生体内での DISC1 の機能解析を進めてきた。ハエには DISC1 相同遺伝子は存在しないが、DISC1 と相互作用するタンパク質の多くが保存されていることが分かっている。そのため、ハエで DISC1 を強制発現させると何らかの表現型が表れることが期待される。当研究室の先行研究において、ハエに DISC1 を強制発現させることで学習記憶、睡眠恒常性、キノコ体神経軸索、神経筋接合部シナプスに異常が引き起こされることが明らかになっている。

本研究では、特定の相互作用部位を欠いた様々な欠失型 DISC1 をハエのキノコ体神経細胞で発現させ、その形態的な変化を観察することで、その変化に関わる DISC1 上のドメインを明らかにすることを目的としている。

## 方法

## MARCM 法を用いたキノコ体単一神経細胞の形態観察

MARCM 法は生体内の特定の細胞のみで特定の遺伝子を発現させることのできる方法である。本研究ではこの方法を用いてキノコ体の単一神経細胞 (ニューロン) のみで DISC1 と mCD8::GFP を発現させ、共焦点レーザー顕微鏡でその神経を撮影し、画像解析ソフトを用いて DISC1 を発現させた神経の形態的な変化を観察した。解析は軸索側鎖の長さ、軸索の分岐点の数を測り行った。

## 使用したハエの遺伝型

- hs-FLP UAS-mCD8::GFP;FRT82B Gal80/TM3 Sb Ser;OK107
- w;FRT82B
- w;UAS-DISC1(291-C);FRT82B  
(DISC1 の N 末端から 290 番目までのアミノ酸を欠いたもの。核移行シグナル、PDE4 結合部位を欠く)
- w;UAS-DISC1( $\Delta$ 349-402);FRT82B  
(DISC1 の Kal7 結合部位を欠く)

## 結果および考察

DISC1(291-C) を発現させたところ、軸索側鎖の長さ、軸索側鎖分岐点の 2 つで、コントロールと比べて有意な減少がみられた。

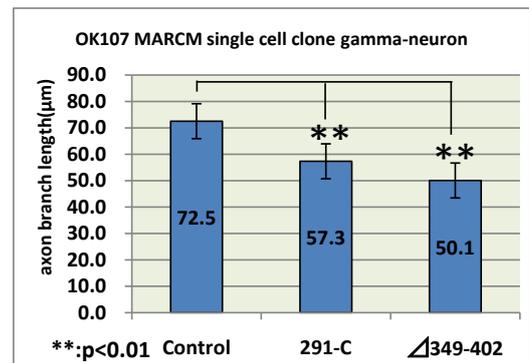
DISC1( $\Delta$ 349-402) を発現させたところ、軸索側鎖の長さ、コントロールと比べて有意な減少がみられた。軸索側鎖分岐点はコントロールと比べて有意差がみられなかった。

291-C と  $\Delta$ 349-402 の両方で軸索側鎖伸長が抑制されたことから 291-348、403-854 の領域に軸索伸長に効く領域があると考えられる。一方で軸索分岐は 291-C の方でのみ有意な減少が観察されたことから、このアミノ酸領域に軸索分岐に効く領域が存在すると考えられる。

291-C は核移行シグナルを欠き、DISC1 は細胞質に存在していた。そのため、神経軸索側鎖伸長と分岐において DISC1 は細胞質で作用していると考えられる。

## 今後の予定

さらに異なる欠失型 DISC1 を発現させたハエを用いて DISC1 のドメイン上の機能を絞り込んでいくとともに、キノコ体神経に比べてより観察が簡便な幼虫の神経筋接合部を観察することで、シナプス形成に関わるドメインを解析するとともに DISC1 と相互作用する新たな遺伝子を探索する予定でいる。



## ハスモンヨトウに加害されたトウモロコシに誘引されるブランコヤドリバエの行動

車崎 祐介 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 戒能 洋一 (生命環境科学研究科)

## 背景・目的

捕食寄生者はさまざまな情報を手がかりに寄主探索をする。寄主昆虫由来の手がかりはもちろんであるが、その植食者によって加害を受けた植物のにおいも手がかりにしていることが知られてきている。先行研究では植食者の加害を受けた植物は、特有の揮発性物質 (Herbivore-Induced Plant Volatiles; HIPV) の生産を始め、特定の HIPV が捕食寄生者を誘引するという結果が報告されている。このような 3 者系の研究は寄生蜂については進んでいるが、寄生バエについてはあまり進んでいない。

寄生バエの 1 種であるブランコヤドリバエ (*Exorista japonica*) はアワヨトウ (*Mythimna separata*)、ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*)、アメリカシロヒトリ (*Hyphantria cunea*)、マイマイガ (*Lymantria dispar*) など幅広い種のチョウ目を寄主とすることが知られている捕食寄生者である。幼虫の体表に卵が産みつけられ、孵化後体内に入り込んで捕食する。ブランコヤドリバエの産卵を引き起こす視覚的要因として「寄主の動き」もあることがダミーを用いた研究により示唆されている。また、アワヨトウに加害されたトウモロコシからの特有のにおいによっても誘引されることが明らかになっている。しかし、他の寄主昆虫による HIPV についての研究は未だ詳しくは行われていない。

ハスモンヨトウはアワヨトウと同様に、トウモロコシの害虫であり、その他野菜、花卉、果樹、大豆、綿など幅広く食害する農作物害虫である。この種はアワヨトウと同じヨトウガ亜科 (Hadeninae) に属している。

このような共通点もあることから、ブランコヤドリバエが、ハスモンヨトウによる加害によっても誘引されるのか否かを明らかにすること、また天敵としてのブランコヤドリバエの生物的防除資材としての可能性を考察することを目的として本研究を行った。

## 材料・方法

トウモロコシの葉を実験日前日から終齢 (6 齢) のハスモンヨトウに一夜加害させておき、加害されたトウモロコシ、およびその対照株に対してのブランコヤドリバエの飛翔行動を風洞実験にて観察した。実験の際にはハスモンヨトウ、およびその排泄物をトウモロコシから取り除いた。角砂糖をトウモロコシから 1 m 離れた風下の台の上に置き、ブランコヤドリバエを角砂糖の上に放した。その後、各ブランコヤドリバエに対して最大 5 分間、飛び立つ行動の有無を観察した。飛び立ってからは最大 5 分間、トウモロコシの葉上にたどり着くか否かを観察した。これらの行動のうち、ブランコヤドリバエが角砂糖の上に置かれてから飛び立つ割合、飛び立ってからトウモロコシに到達する割合、角砂糖の上からトウモロコシまで到達する割合について加害株と未加害株での比較をおこなった。なお、各実験生物の飼育および実験は温度  $25 \pm 1$ 、湿度  $50 \pm 10\%$  にておこなった。

## 結果

加害されたトウモロコシに対して、約 9 割のブランコヤドリバエが制限時間内に飛び立ち、その後制限時間内に葉上に到達したのは全体の約半数であった。

一方、加害されていないトウモロコシについておこなった実験では、制限時間に飛び立つのは約 4 割であり、最終的に葉上に到達した個体はほとんど見られなかった。

## 考察

加害されたトウモロコシと対照株との実験結果を比べると、最初の角砂糖の場所から動く個体の割合に有意差が見られ、また、最終的にトウモロコシ葉上に到達する個体の割合にも有意差が見られた。これらのことから、少なくとも食物摂取行動をあきらめてトウモロコシへの接近に切り替わる過程での誘引が起こっていることが示唆された。また結果的に、ハスモンヨトウに加害されたトウモロコシは、未加害のトウモロコシに比べ、より多くのブランコヤドリバエを誘引することが示唆された。