



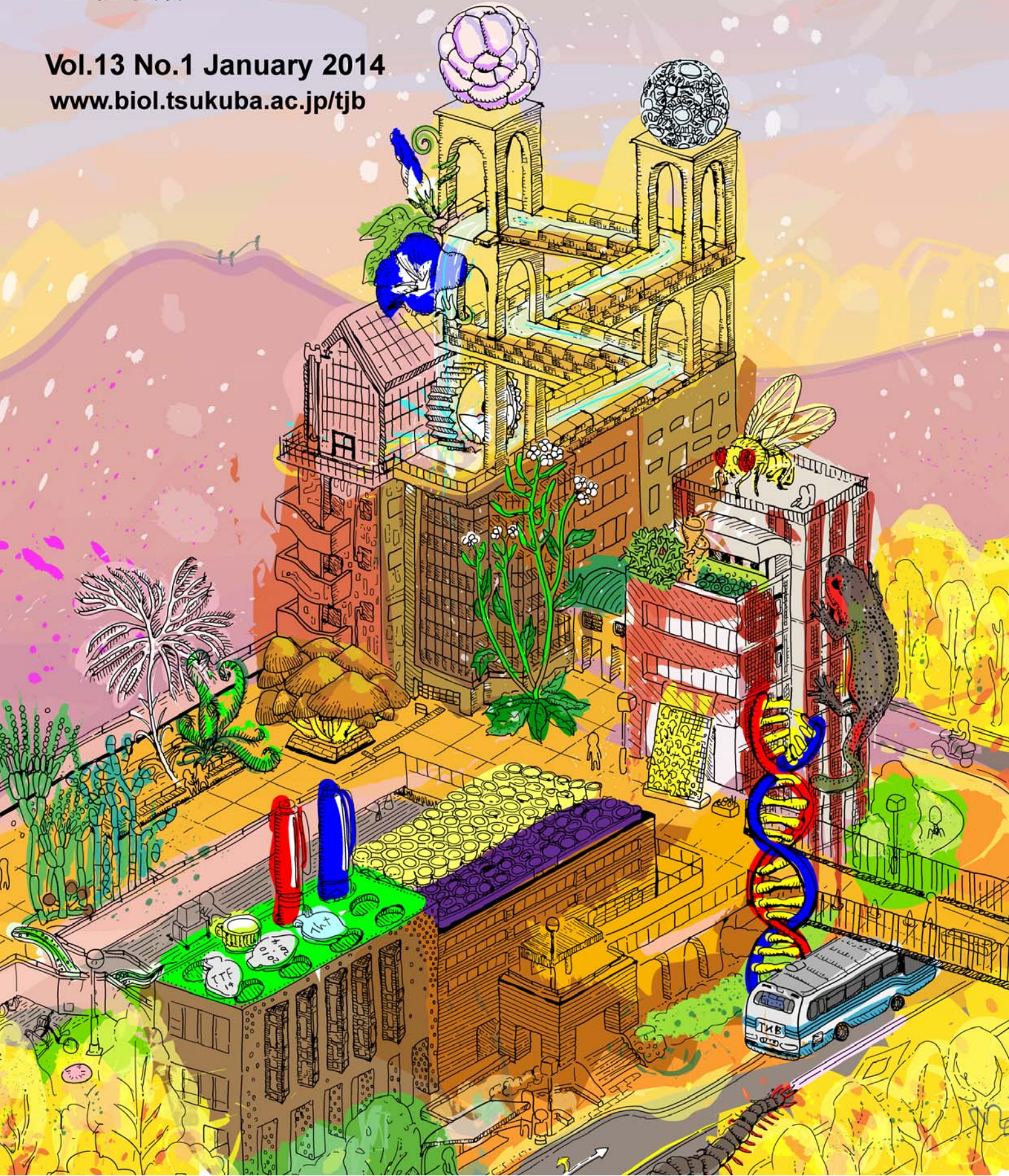
つくば生物ジャーナル

生物学類

Tsukuba Journal of Biology

Vol.13 No.1 January 2014

www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb



つくば生物ジャーナル

Tsukuba Journal of Biology

Vol.13 No.1 January 2014
www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb

平成 25 年度

生物学類卒業研究発表会要旨集

平成 26 年 2 月 8 日

筑波大学
生物学類

第一会場 2C410教室

8:55 - 9:10	持齋 峻矢	ナメクジウオの体節形質を基に脊椎の発生起源を探る	2
9:10 - 9:25	澤田 朋実	軟体動物腹足類における <i>brachyury</i> 遺伝子の発現・機能の解析	3
9:25 - 9:40	生田 将之	日本産ナミコムカデ <i>Hanseniella caldaria</i> (Hansen, 1903) の分類学的研究	4
9:40 - 9:55	遠藤 愛	ヨツアナカシパン自然集団に見る、進化のプロセス	5
10:10 - 10:25	吉村 光司	脊索起源の探索-ギボシムシのpygochordからの考察-	6
10:25 - 10:40	飯尾 直子	唇脚類における歩脚の自切構造	7
10:40 - 10:55	梅谷 絵梨香	コムカデ類における卵巣の形態学的研究	8
10:55 - 11:10	木村 翔	真正クモ類における歩脚の自切位置	9
11:10 - 11:25	時安 紘平	日本産アカムカデ類の系統地理学的研究	10
12:15 - 12:30	阿閉 耕平	ハプト藻特有のオルガネラ、ハプトネマの生理学的研究	11
12:30 - 12:45	加藤 孝一朗	新規寄生性ミドリムシの系統分類学的研究及び寄生様式の解明	12
12:45 - 13:00	福田 あずみ	新奇 <i>Heliozoa</i> SRT127株の分類学的研究	13
13:00 - 13:15	村山 拓未	パラオ産無色ストラメノパイルSRT167株の分類学的研究	14
13:15 - 13:30	岩本 祥明	菅平高原におけるプロトステリウム類の分布と餌資源の嗜好性	15
13:45 - 14:00	大沢 和広	キクセラ目菌類の昆虫腸内への適応と進化に迫る	16
14:00 - 14:15	山田 宗樹	シロキクラゲ目における菌寄生性の解明に向けて - <i>Sirobasidium</i> 属の分類学的再検討と培養系の確立	17
14:15 - 14:30	沈 茹菁	腸管寄生虫 <i>Giardia intestinalis</i> のスプライソソーム構成因子同定の試み	18
14:30 - 14:45	内山 珠希	ペディノ藻におけるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子の探索	19
14:45 - 15:00	森田 幸之介	新奇緑色渦鞭毛藻TRD株の葉緑体ゲノムシーケンス	20
15:15 - 15:30	伊藤 清香	ユーグレノゾア生物群におけるピリミジン生合成酵素の進化と多様性	21
15:30 - 15:45	高林 舜	<i>Carpediemonas</i> -like Organisms と培地中細菌 <i>Shewanella</i> sp. との二者培養系の確立	22
15:45 - 16:00	松橋 潤哉	アナナスショウジョウバエ類における異種由来染色体の分離比	23
16:00 - 16:15	坪田 康平	下田鍋田湾に生息するヨコエビ類の分類学的研究	24

第二会場 2C404教室

8:55 - 9:10	高橋 果歩	アサガオ花成ホルモン遺伝子 <i>PnFT1</i> の発現制御機構の解析	25
9:10 - 9:25	山本 高広	アサガオにおける光周性花成誘導の分子基盤に関する研究	26
9:25 - 9:40	遠藤 司	酵母ワンハイブリッド法によるジャガイモ環境ストレス応答性転写因子 <i>StDREB1</i> の単離	27
9:40 - 9:55	増田 崇人	コリンオキシダーゼ遺伝子導入ユーカリ (<i>E.globulus</i>) の特定網室における耐塩性評価と生物多様性影響評価	28
10:10 - 10:25	岡澤 梨沙	花粉症治療に向けたスギ・ブタクサ花粉アレルゲン生産系に関する研究	29
10:25 - 10:40	三村 琢磨	南米アンデス山系の氷河後退域における微地形に着目した植生の発達	30
10:40 - 10:55	上原 明菜	高山植物ガンコウランの温暖化処理による生理特性の変化	31
10:55 - 11:10	神谷 なつみ	死んだ木はいつなくなる？—三宅島噴火後の枯死木分解に関する研究—	32
11:10 - 11:25	杉山 涼太	温度条件に着目した共生菌の有無によるレンゲツツジの成長の違い	33
12:15 - 12:30	萱苗 友梨	カジメ (<i>Ecklonia cava</i>) 起源溶存態有機物の光化学的反応特性	34
12:30 - 12:45	小嶋 佑果	海洋表層における蛍光性溶存態有機物の動態に関する実験的研究	35
12:45 - 13:00	市川 雄太	渡りを行なうウスバキトンボの産卵戦略と我が国への定着可能性	36
13:00 - 13:15	高橋 玄	ナミアメンボに出現する短翅型雌と長翅型雌の卵生産と産卵パターン	37
13:15 - 13:30	得田 奈央子	ムラサキツメクサの花茎屈曲による送粉者への見せ花効果	38
13:45 - 14:00	朝山 寛太郎	新天地では鶏口となるな、牛後となれ～インゲンマメゾウムシの場合～	39
14:00 - 14:15	佐藤 まどか	肉食系女子は草食系男子の何に魅せられるのか？ ～インゲンマメゾウムシの場合～	40
14:15 - 14:30	鈴木 萌	長すぎたるは及ばざるがごとし？：花形態の組み合わせが口吻長の異なるマルハナバチの採餌効率におよぼす影響	41
14:30 - 14:45	岸野 友子	漂着海藻は餌資源として砂浜生物の群集構造に影響するのか？	42
14:45 - 15:00	玉川 茜	イソクズガニ <i>Tiarinia cornigera</i> のデコレイティング行動による藻類への影響	43
15:15 - 15:30	戸祭 森彦	イボニシ <i>Thais (Reishia) clavigera</i> の食性から食物網の持続性を探る	44

第三会場 2B411教室

8:55 - 9:10	鎌田 志保美	イネの発達過程におけるペクチンメチルエステル化制御に関する研究	45
9:10 - 9:25	菊田 遼	ヘミセルロース改変イネを用いた塩ストレス応答に関する研究	46
9:25 - 9:40	齋藤 史織	シロイヌナズナのXTH過剰発現株を用いたサリチル酸応答と細胞壁構造変化に関する研究	47
9:40 - 9:55	高見 るり子	塩ストレス条件下のトマト果実成熟過程におけるペクチン分解酵素の解析	48
10:10 - 10:25	HU QING	Ca欠乏条件下のトマト果実成熟過程における細胞壁合成遺伝子の組織別発現解析	49
10:25 - 10:40	土屋 結実	トマトの落花と落果で異なる離層細胞壁の制御メカニズムに関する研究	50
10:40 - 10:55	河野 裕之	キンクロラックと合成オーキシシン剤のシロイヌナズナでの作用性比較	51
10:55 - 11:10	中村 真之	メタチロシンによるレタス根部における活性酸素発生機構	52
11:10 - 11:25	西村 彰紘	オクチルアセテートによる植物生育抑制機構の解析	53
12:15 - 12:30	神田 祐輔	Tight junction開口物質のスクリーニング系の構築と探索	54
12:30 - 12:45	佐藤 功宗	Terpendole EのKSP阻害機構解析	55
12:45 - 13:00	吉田 圭佑	AID systemを用いたミトコンドリア分裂阻害剤のスクリーニング	56
13:00 - 13:15	山宮 大幹	新規酵素のスクリーニング研究	57
13:15 - 13:30	栗崎 誠	微生物による芳香環化合物の分解に関する研究	58
13:45 - 14:00	瀧下 友理	植物生理活性物質代謝微生物の探索	59
14:00 - 14:15	森谷 直輝	多環化合物変換酵素に関する研究	60
14:15 - 14:30	細山田 舜	枯草菌においてファージ不稔感染経路に関与するNonAの解析	61
14:30 - 14:45	櫻澤 遼太	老化モデルマウスのミトコンドリア DNA 多型が造腫瘍性に与える影響	62
14:45 - 15:00	三井 祥宏	代謝ストレスによるマウス多型突然変異型mtDNAの病原性誘導	63
15:15 - 15:30	DANAPORN SARAPRUG	Effect of the fermented-bean product on anti-aging and health	64
15:30 - 15:45	栗野 智帆	線虫の寿命及びストレス耐性に対する生理活性物質の作用の研究	65
15:45 - 16:00	劉 笑舒	マウスcryptdin4遺伝子プロモーター配列のdefensin14ノックアウトと野生型マウスでの比較	66
16:00 - 16:15	福本 隼平	赤ぶどう抽出物とレスベラトロールによるアンチエイジング作用の比較解析	67

第四会場 2B412教室

8:55 - 9:10	大津 拓紘	イモリ松果体におけるレチナール代謝経路の解析	68
9:10 - 9:25	小池 紫央里	イモリ桿体・錐体視細胞の電気生理学的解析	69
9:25 - 9:40	靄田 奈津希	イモリ嗅細胞における匂い応答の電気生理学的解析	70
9:40 - 9:55	荒木 広大	ゾウリムシの個体間相互作用を引き起こす要因；機械刺激により放出される化学物質の検討	71
10:10 - 10:25	佐賀 友則	ゾウリムシのイオン刺激受容機構に関する行動学的研究	72
10:25 - 10:40	座小田 俊亮	ショウジョウバエを使用した統合失調症リスク因子の遺伝学的解析	73
10:40 - 10:55	吉村 由祐子	ショウジョウバエを用いた統合失調症脆弱遺伝子のスクリーニング： DISC1とNrx-1の遺伝的相互作用による神経発生異常	74
10:55 - 11:10	平野 陽太	母親から子に伝播されるステロール類が初期発生過程に与える影響： ショウジョウバエを用いた研究	75
11:10 - 11:25	諸橋 香奈	線虫 <i>C. elegans</i> の寿命の制御におけるグルタチオンS-転移酵素ファミリー の関与の検討	76
12:15 - 12:30	藤澤 空見子	Large Maf群転写因子MafB臓器特異的遺伝子欠損マウスの作製； 膵内分泌細胞における機能解析	77
12:30 - 12:45	板倉 晃希	骨格筋における脂肪酸伸長酵素Elovl6の役割	78
12:45 - 13:00	石井 亮	蛍光live imagingによる睡眠覚醒機構の解明	79
13:00 - 13:15	本田 拓之	喘息を抑制するAllergy Inhibitory Receptor (Allergin-1)の抗原提示細胞に おける機能の解明	80
13:15 - 13:30	北條 梢	高温環境下におけるペパーミントの香りがラットのストレス応答に 与える影響	81
13:45 - 14:00	葛西 裕亮	ヒト乳腺上皮細胞シートでのイオン透過性に対するヒスタミン受容体 阻害剤の影響	82
14:00 - 14:15	村上 生馬	筋損傷後の早期運動介入が治癒過程に及ぼす影響	83
14:15 - 14:30	安田 剛	細胞質分裂の分子機構の異種間分裂酵母における相違性とその考察	84
14:30 - 14:45	遠藤 智之	網膜色素変性症原因遺伝子産物KLHL7の標的分子の探索	85
14:45 - 15:00	前野 優太	神経系における脱ユビキチン化酵素の機能解析	86

平成 25 年度卒業研究発表会準備委員会

生物学類

戸祭 森彦

阿保 賢二

岡島 智美

小黒 和也

倉持 大地

斉藤 美佳

森田 陸離

表紙画

遠藤 愛

表紙画の解説：

私たちが薬剤処理したり、データに変換したりして、いじくりまわしている生物。
毎日食べているのも、その辺に咲いているのも、私たち自身だって生物。
そんなすぐ隣の“研究のはじまるところ”を、エッセイの「滝」をモチーフに描きました。
日常と地続きの“ちょっと不思議”と日々向き合っていることを忘れないでいたいものです。

平成 25 年度卒業研究発表会要旨集の巻頭にあって

戸祭 森彦（筑波大学 生物学類 4 年）

思えば初めて筑波山に登ったのは高校 1 年生の時でした。まだ生き物に触る経験もそう多くなかった私は一心不乱に山に登り、頂上から見る景色にただ圧倒されていました。

筑波大学に入学してからは、生物学にどっぷり浸かった 4 年間でした。1 年生から研究室に出入りして寄生蜂の研究に没頭し、4 年生の卒研ではつくばの地を離れ、下田臨海実験センターの美しい海洋生物の世界に触れました。

1 年生のころは全てが手探りでした。指導していただいた先輩から「まずは虫を飼育する事から始めよう」と言われた時にはどうなる事かと不安になったものです。それから 2 年生、3 年生と経験を重ねるうちに研究にも肉がつき、徐々に自分からどんな実験が必要なかを考えられるようになっていきました。これこそ研究の醍醐味だと思うのですが、仮説を立てて「どうやらそれらしい」結果を導くような実験をしている時には、毎日ワクワクしていました。仮説を裏切るような結果も出ましたが、生物の営みの奥深さを感じるいい機会となりました。3 年生の終わりに海洋生態学に魅せられて研究室を離れる際には自分がしてきた研究が名残惜しく、なんとか論文にしようと奔走したのを覚えています。卒研もまた、期間半ばまでは慌ただしく過ぎていきました。実験そのものが立ち消えになった事もあり、データが出そろうた時の感激はひとしおでした。

そんな研究に月日を捧げた生物学類生の汗と涙の結晶がこの要旨集です。ばらばらとめくってみると、卒研生の苦悩と喜びの声聞こえてくるかもしれません。そして、卒研発表会は先輩の

みなさんにとって多様な生物分野の話聞く事ができるまたとない機会です。是非たくさんの方の発表を聞いて、深淵な生物学の一端を覗いてみてください。その後の研究室選択に影響するような、刺激的な発表が聞けることと思います。

卒研発表会を用意する立場の 2・3 年生には、授業などで忙しい中、準備・運営への尽力に感謝しています。また、私を含め多くの学生が 1 年生から各研究室で生物学に触れる機会を得、4 年生では一年間という短い期間で発表に足る研究ができたのはひとえにご指導いただいた生物学類の先生方と先輩方のおかげです。本当にありがとうございました。

それから、その陰には毎日のように愚痴にも近い話を聞いてくれた友人たちや事あるごとに私を頼ってくれたかわいい後輩たちの協力がありました。言い尽くせぬ心からの感謝を送ります。

卒研発表という大学生活の最も大きな山を超えようとしている今、改めて筑波山を思います。山道を埋め尽くす草本類やコケ類、菌類の数々。ふと視線をあげるとひらひらと目の前を舞う鱗翅目。高校生の時は躍起になって踏みしめた道の片隅にも、生物はひっそり、時に優雅にダイナミックな生態系を形成しています。再び足を踏み入れた山中で、あの時は気がつかなかった生き物たちの小宇宙に目を奪われました。このような時、生物学を学んでいて本当によかったと実感できます。

講義を聞いて知識を得るだけでなく、折角緑の多い筑波大学、是非虫取り網を片手に外へ出かけてみてください。

Communicated by Mitsuru Hirota, Received January 5, 2014.

ナメクジウオの体節形質を基に脊椎の発生起源を探る

持齋 峻矢 (筑波大学 生物学類)

指導教員：和田 洋 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

脊椎動物の最も特徴的な形質は脊椎骨(以下、椎骨)である。椎骨の獲得により脊椎動物はより複雑な体制を得ることができ、椎骨を取り囲む筋肉を発達させることで高い運動能力を得ることができた。しかし、この椎骨獲得の背景にある分子的变化は不明な点が多い¹⁾。

ヌタウナギ類を除く脊椎動物では発生過程で脊索を発達させる。成長とともに脊索の周りに軟骨性あるいは硬骨性の椎骨が発達して、脊索はその中に取り込まれる。椎骨が発達した動物では、脊索は椎間板の髄核と呼ばれる痕跡的な構造としてとどまるのみで、成体ではそれも消失する²⁾。

今回実験で使用したナメクジウオ類は外見こそ魚類に似ているが、脊椎動物には存在する頭部の主要感覚器である鼻・眼・耳に対応する構造、そして椎骨を持たないため魚類ではない²⁾。ナメクジウオ類は現在の分類体系では、脊索動物門の中の頭索動物亜門に分類される。脊椎動物門を構成する動物に共通する形態的特徴は、生涯もしくは一時的に保有される脊索と脊索の背側に位置する中空の神経索であり、これらは構造として非常に安定している。ナメクジウオ類の脊索は体の前端まで伸びているのが特徴的で、そのことから頭索動物と呼ばれる。脊索は発生の非常に早い時期に体の前端まで達するが、これは他の動物にはみられない特徴である。

椎骨の発生メカニズムについての研究には、現生の脊椎動物の大半を占める顎口類が用いられている。脊椎動物は大きく2つのグループ、顎口類と無顎類に分けられる。顎口類の胚発生において、体節は表皮側から脊索に向かって、皮節、筋節、硬節に分化する。このうち、体節中胚葉から生じた硬節細胞群が脊索や神経管を覆い、それらが軟骨に分化し最終的に硬骨に置き換わる。この軟骨は軟骨基質(コラーゲン)をコードする *Col2a1* 遺伝子の発現により形成される。無顎類のヤツメウナギにおける椎骨発生は、発生時期こそずれているものの、顎口類と同様のメカニズムであった。つまり、顎口類と無顎類が分岐する以前に椎骨発生のメカニズムを獲得していたと推測されている¹⁾。しかし、脊椎動物に近縁な無脊椎動物のナメクジウオでは、コラーゲンをコードする *Fcol1* の発現が体節表皮側で見られるが、これは高等な脊椎動物である顎口類と比較するとその発生メカニズムが著しく異なっている。そのため、無脊椎動物と脊椎動物の間で比較発生的アプローチから椎骨の初期進化を探るのは困難であると考えられる。

本研究ではナメクジウオの体節分化の様子を組織学的手法により観察する。先行研究により、脊椎動物であるヤツメウナギのアンモナイト幼生においてコラーゲン遺伝子が皮節でのみ発現し、硬節は変態期にしかできないことが確認されている¹⁾。一方、無脊椎動物であるナメクジウオでは体節分化がどのように起こっているか不明な点が多い。これを解明することが本研究の目的である。ナメクジウオの体節においてもコラーゲンが発現していることは判明しているため、筋肉との相対的な位置関係を詳細に

調べる。ナメクジウオにおけるコラーゲンと筋肉の位置関係が、よく似た体節構造をもつヤツメウナギのそれと比較することで、椎骨の発生起源を探る。

材料・方法

Branchiostoma belcheli Gray, 1847 ヒガシナメクジウオ
(受精後 18,22,24,26,36 時間胚)

In situ hybridization により、ナメクジウオ胚での *Fcol1* (線維性コラーゲン遺伝子)ならびに *MHC*(ミオシン重鎖遺伝子)の発現を観察した。

In situ hybridization の方法

前処理として、固定済みのヒガシナメクジウオ胚を PBST で洗浄し、ProK 処理により結合組織を分解した。その後、4% パラホルムアルデヒドで固定し、0.1M トリエタノールアミンでアセチル化し内在性の AP の活性を失くした。次にプローブの浸透性を高めるために 55°C で胚をバッファーに慣らした後、ヒートショック処理で RNA 分子をほどこき、hybridization を行った。プローブの入ったバッファーを胚に加え 55°C で 1 晩置いた。プローブを洗浄した後、抗体の非特異的結合を減らすためにブロッキング処理を行った。Anti-Dig 抗体 AP を加えて 4°C で 1 晩置いた。PBST で洗浄後、NBT/BCIP で発色させた。

結果・考察

受精後 18,22,24,26,36 時間胚における *Fcol1* 及び *MHC* の発現を調べた。それを凍結切片にして、発現を比較した。詳細は研究発表会にて紹介する。

参考文献

- 1) 原田敬士(2012)
『ヤツメウナギの脊椎骨形成に関する進化発生的研究』
筑波大学大学院生命環境科学研究科生物科学専攻
修士(理学)学位論文
- 2) 安井金也・窪川かおる(2005)
『ナメクジウオ～頭索動物の生物学』東京大学出版会

軟体動物腹足類における *brachyury* 遺伝子の発現・機能の解析

澤田 朋実 (筑波大学 生物学類)

指導教員：和田 洋 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

brachyury 遺伝子は1927年にマウスの突然変異の遺伝子座として発見され、1990年に初めてクローニングされた。以降、様々な動物でホモログが単離され、発現パターンや機能、関連遺伝子について研究されて来た。脊椎動物において、*brachyury* は脊索前駆細胞で発現が維持され、脊索や後方中胚葉の分化に重要な役割を担うことが知られている。頭索動物であるナメクジウオでも、脊椎動物と同じような *brachyury* の発現パターンが確認されている。また、尾索動物であるホヤで単離された *brachyury* のホモログは、脊索細胞のみで発現し、脊索を分化させる際のマスターコントロール遺伝子であると考えられている[1]。

脊椎動物を含む新口動物と旧口動物を比較すると、体制や形態形成に関わるいくつかの遺伝子発現が背腹軸で逆転していることが知られている。旧口動物の1グループである軟体動物では、腹足類の *Patella vulgata* において、腹側表皮の正中線上で *brachyury* の発現が観察されている[2]。この発現領域が陥入するとすれば、丁度脊椎動物の脊索と背腹軸で逆転した位置関係にある。軟体動物の *brachyury* 発現領域でどのような構造が形成されるのか、軟体動物の *brachyury* にどのような機能があるか調べることで、*brachyury* 遺伝子の機能的な進化の手がかりを得ることができる。そこで今回の研究では、腹足類であるクサイロアオガイ *Nipponacmea fuscoviridis* を用いて、軟体動物における *brachyury* の発現とその機能を解析することを目的とした。

材料と方法

○実験材料：クサイロアオガイ *Nipponacmea fuscoviridis* を用い、人工授精によって胚を得た。

○実験内容

1. *brachyury* の発現パターンの調査

受精から2.5時間後、8時間後、10時間後、12時間後、14時間後にそれぞれ固定した胚を用いて、*in situ* hybridization を行い、*brachyury* の発現パターンを調べた。

2. *brachyury* の機能解析：RNAi 法

二本鎖RNAを合成し、未受精卵にインジェクションすることで *brachyury* の機能阻害実験を行った。control として、GFP の二本鎖RNAを用いた。

受精から24~27時間後に胚を固定し、control と比較して特異的な外部形態の変化が見られないか観察した。また、足の筋繊維を phalloidin で染色することにより、筋繊維の発達具合や配置の様子を可視化し、*brachyury* の機能阻害の影響で筋繊維の様子に異常がでないか観察した。

結果

1. *brachyury* の発現パターンの調査

受精から2.5時間の胚では、シグナルが観察されなかった。受精後8時間、10時間の胚では、腹側上皮の正中線上、口の周辺細胞後部、尾部の細胞でシグナルが観察された(図1)。また、

12時間、14時間後の胚でも、口の周囲細胞のシグナルが強く維持されることが確認できた。

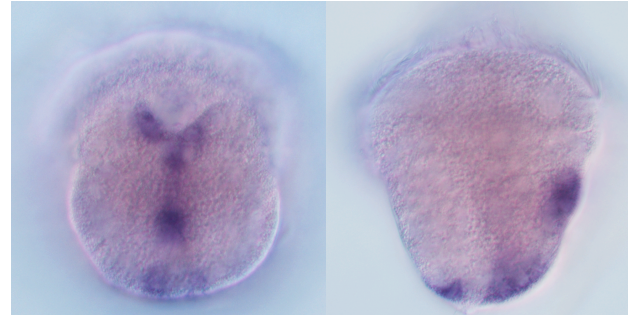


図1：受精から10時間後の胚の *brachyury* の発現

2. *brachyury* の機能解析

1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 二本鎖RNAで機能阻害した胚において、発現阻害の効果を *in situ* hybridization で確かめたところ、全体の3割程度で、*brachyury* の発現レベルが落ちる事が確認された。

外部形態の観察では、1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 二本鎖RNAで機能阻害した胚を観察した。受精後16時間で固定した胚を23個体、18時間で固定した胚を33個体、25時間で固定した胚を80個体観察したが、それぞれのcontrol胚と比べてところ、機能阻害胚特有の外部形態の異常を見つけることはできなかった。

Phalloidin染色では、1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 二本鎖RNAで機能阻害した胚を受精後27.5時間で固定・染色した。31個体を観察したが、正常な筋繊維を持った胚が確認され、割合もcontrolと変わらなかった。さらに、1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 二本鎖RNAでも機能阻害を行い、24時間後に固定・染色して観察した。32個体を観察した所、この場合でも正常な筋繊維を持った胚が確認され、割合もcontrolと変わらなかった。よって筋繊維の発達・配置に関しても、*brachyury* の機能阻害に関連した発生異常を見つけることはできなかった。

今後の課題

今回の実験において、*N. fuscoviridis* の *brachyury* の発現パターンは、*P. vulgata* で報告された発現パターンと一致することが確認された。*brachyury* の機能阻害実験に関しては、外部形態・筋組織の観点から特異的な形質の変化を発見することはできなかった。このことから、軟体動物において *brachyury* は原腸陥入時の形態形成運動、筋繊維の配置には影響を及ぼさない可能性が示唆される。しかし、*brachyury* の機能阻害効果が低く、発現を完全に落とせない胚の割合が多いことが、今回の実験における課題である。今後はより後期のステージで固定した胚で *brachyury* の発現パターンを調査し、発現の維持される細胞によってどのような器官が構成されるのか調べて行きたいと思う。

参考文献

- [1] Peter W. H. Holland et al (1995) Development 121:4283-91
[2] Lartillot N. et al. (2002) Development 129(6): 1411-12

日本産ナミコムカデ *Hanseniella caldaria* (Hansen, 1903) の分類学的研究

生田 将之 (筑波大学 生物学類)

指導教員：和田 洋 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

コムカデは、節足動物門多足亜門結合綱の土壌動物で、歩脚数と背板数が対応していないこと、尾部に1対の出糸突起を持っていることによって特徴づけられる。全世界に広く分布するとされ、14属およそ200種が記載されている。日本においては、Rochaix (1954) により、ナミコムカデ科のナミコムカデとミゾコムカデ、ヤサコムカデ科のヤサコムカデの計2科3属3種が分布するとされた。

しかし、日本産コムカデの分類には多数の問題点が挙げられる。唯一の研究である Rochaix (1954) では主にヨーロッパの既知種をもとに同定を行っており、それ以降分類学的研究が全く行われていない。また、原記載論文が古く、標徴形質の記述が曖昧であるばかりでなく、種内の変異についても殆ど言及されていない。さらに種の分布という基本的な事項でさえ、論文として殆ど公表されていない。

そこで、日本産のコムカデのうち、ナミコムカデ科のナミコムカデ *Hanseniella caldaria* (Hansen 1903) を対象として、同定の妥当性を評価し、これまで評価されていなかった形態的変異やそれらの分布を調べることで、日本産ナミコムカデの多様性を明らかにすることを目的に研究を行った。

材料・方法

日本各地で採集した *Hanseniella* 属のコムカデのうち、東北から九州までの27地点80個体を実体顕微鏡及び光学顕微鏡を用いて観察した。

観察は、まず現行の属分類の確認を行うため、属の表徴形質として、第2背板、第15背板の形状を観察した。次に、種の表徴形質として、出糸突起の形と棘数、触角の節数、触角第13節の棘、第1歩脚先端の爪、第12歩脚の爪及び付近の棘の計7形質を観察した。

結果・考察

属の同定を行った結果、第2背板の後縁が丸く、前側部の長い棘が斜め前に生える、第15背板の後縁に溝はないという特徴が今回観察した全ての個体で共通して見られた。これらの形質は *Hanseniella* 属の標徴形質であるので、全ての個体は本属に属すると判断した。

種分類については、今回調べた全ての個体は、第1歩脚の爪の形質状態がデンマークを基準産地とする *H. caldaria* とは異なり、むしろインドネシアを基準産地とする *H. orientalis* に類似していた。さらに、他の形質の組み合わせによって、3タイプが観察された。

各タイプの分布を調べたところ、単一のタイプのみ分布する産地と同所的に複数のタイプが分布する産地があった。単一タイプのみが分布する地点では、タイプ2またはタイプ3が確認されたが、タイプ1のみの産地は確認されなかった。

したがって、日本のナミコムカデの分類に関する Rochaix (1954) の見解については、再検討の必要性が強く示唆された。いずれにせよ、今回の結果は国内での *Hanseniella* 属は従来考えられていたよりも多様性があると考えられる。今後のさらなる検証のため、より多くの産地からのより多くの個体に対する形態観察と同時に、系統遺伝学的な分析が必要だと考えられる。

<分類学的な見解を含むため、詳細については当日発表する。>

ヨツアナカシパン自然集団に見る、進化のプロセス

遠藤 愛 (筑波大学 生物学類)

指導教員：和田 洋 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

現在多様な形態の生物があるのは、進化のプロセスで新奇形態を獲得してきたからである。ではこの新奇形態はどのようにして生まれるのだろうか。その重要な機構の一つとして、「発生のゆらぎ」が鍵であると考えられている。発生過程には多少の遺伝的変異や環境変動などの攪乱には動じず正常な形態を作り出す、緩衝作用が知られている。そのため発生過程は、成体の適応度に影響を及ぼさず、かえって変異が蓄積することを許容しているといえる。この緩衝作用の副産物として発生過程はゆらぎ、この内から新奇形態を創り出す発生機構の変化が生じるという進化のプロセスが、これまで考えられてきた。

そこで本研究は、「発生のゆらぎ」は存在するか、あるとすればその実態はどんなものかを検証することを目的とし、ヨツアナカシパン *Peronella japonica* に着目する。ウニの仲間は胚操作が行いやすいことから、発生学的研究を牽引してきた。本種はウニでの発生学的知見を利用できるのに加え、中間型直接発生という独特の生活史に由来する二つの点で、「発生のゆらぎ」の検証に適している。

一つは、プランクトン性で生息域を広げる段階である幼生期が、近縁種に比べて短いことである。間接発生型のウニの幼生期が数カ月であるのに対し、本種の直接発生型幼生は 3 日もあれば変態してしまう。よって同種内での長距離の交流が制限されるため、地域集団の存在が期待される。

二つには、幼生形態にかかる選択圧が比較的低いと考えられることである。本種は 2 腕のプルテウス幼生 (図) をつくるが、幼生期に摂餌することは無い。主に採餌効率を上げるための器官であるプルテウス腕を、摂餌しないにも関わらず痕跡的に形成しているのだと考えられている。よって幼生腕の存在意義は低いと考えられ、特に幼生腕形成に関わる遺伝子発現などに変異を蓄積しているのではないかと期待される。



ヨツアナカシパンの成体 (左) と、受精後 48 時間の 2 腕のプルテウス幼生、scale bar 200 μm (右)。

本研究の目的は、「発生のゆらぎ」を定量的に検証することである。卒業研究では主に、今後発生過程を比較するのに適している、遺伝的隔離が生じている地域集団の選定を試みた。

方法

棘皮動物門ウニ綱のヨツアナカシパン (*Peronella japonica*) を用いて以下の研究を行った。

1. 野外集団の採集

日本沿岸 5 地点 (石川県能登島、千葉県館山、静岡県下田、広島県向島、沖縄県本島) において、シュノーケリング又は調査船でのドレッジ採集を行った。

2. ヨツアナカシパンの地域集団の探索

上記の 5 地域のごとく個体群について、①ミトコンドリア核ゲノムの COI、②核ゲノムの幼生骨形成に関わる遺伝子 *alx1* のイントロン領域を用いて分子系統解析を行い、国内のヨツアナカシパンの集団構造の把握を試みた。

3. 地域集団間での発生過程の変異の探索

各地域集団のヨツアナカシパンを実験室内で飼育することで発生環境を揃えた。地域ごとに人工授精を行い、幼生骨形成に重要な時期を中心に受精後数時間おきに固定胚を作製・観察した。

結果・考察

ミトコンドリアゲノム COI は種内で高度に保存されていた。*alx1* イントロンにはハプロタイプと見られる 2 型 (S/L) が存在していた。ハプロタイプ比は沖縄では L 型しか見られず、他地域は沖縄に近いほど L 型の割合が大きい傾向が見られた。

発生過程の観察から、本種の幼生形態はひどく奔放であることが分かってきた。腕の数が増減するような変異体が見つかってきている。これはヨツアナカシパン幼生形態への選択圧が低く、「発生のゆらぎ」の検証に適していることを示唆するものである。

今後の課題・展望

今後ミトコンドリアの非コード領域を対象に加えて、分子系統解析を進めていく。

遺伝的隔離が生じている地域集団を選定し次第、これらの固定胚について幼生骨形成に関わる遺伝子の発現パターンを調べる。幼生骨形成遺伝子はアメリカムラサキウニで主に研究が進められ、約 30 もの遺伝子からなるネットワークが明らかになり各遺伝子の機能が解析されている。本研究ではヨツアナカシパンでこれらと相同な遺伝子の発現パターンを地域集団間で比較する。遺伝子の時空間的発現パターンについては *In situ hybridization* 法を用い、mRNA の分布を染色し観察する。遺伝子の発現量についてはトランスクリプトーム解析を行い、幼生骨形成に重要な各ステージで発現している RNA を網羅的に比較する。

脊索起源の探索-ギボシムシの pygochord からの考察-

吉村 光司 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 和田 洋 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

脊索動物を特徴づける共有形質として、神経管、脊索、鰓裂などが挙げられる。我々ヒトも含まれる脊索動物の起源において、これらの構造がどのように進化してきたのかは古くから興味をもたれてきた。なかでも、中枢神経系として機能する神経管と、それを誘導する脊索の進化的起源は高い関心を集めてきた。しかし、その詳細は今日でも明らかにされていない。

これらの形質がどのように獲得されてきたかを知るためには、それをもたない最も近縁な動物と脊索動物とを比較する必要がある。近年の分子系統学の発展により、半索動物と棘皮動物が姉妹群を形成し、これが脊索動物に最も近縁なサブグループである事が明らかとなった。なかでも半索動物のギボシムシは、成体も左右相称性を維持した蠕虫様の体制で、脊索動物の進化的起源を探るうえで重要な位置を占めている。半索動物は上記で挙げた脊索動物の共有形質のうち、鰓裂はもっているが、神経管および脊索と比較可能な構造をもつかについては議論が続いている。

半索動物の体は大きく3つの部位に分けられ前方から吻、襟、体幹とよばれる。襟の背側には、口盲管とよばれる液胞に富み神経索と腸管の間に存在する構造がある。脊索動物の背側にある脊索は、神経管と腸管の間に存在し液胞に富んでいるため、口盲管と脊索の類似性が古くから指摘されてきた。しかし口盲管は、脊索のマスターコントロール遺伝子である *brachyury* の発現がないことやトポロジーの点で、脊索の直接的な起源とは考えられていない。左右相称動物における背腹軸パターンニング遺伝子の発現比較などにより、脊索動物系統の根元で背腹軸の逆転が起こったという説が有力視されてきているため、もし半索動物に脊索の起源と考えられる部位があるとすれば、それは腸管の背側でなく腹側に位置するであろう。

そのような条件を満たすものとして、ギボシムシの pygochord がある。pygochord は、ギボシムシの体幹の中でも後方の尾域において、腸管と腹側神経索の間にあるとされ、液胞に富む索状構造といわれてきたものである。しかし pygochord に関しては、遺伝子発現はおろか、発生学的、組織学的知見がほとんどないのが現状である。そこで本研究では、pygochord が存在する明確な領域や、その構造の特徴をより明瞭にする事を目的として、組織学的手法によるアプローチを行った。

また、形成時に発現する遺伝子を調べるために、人工授精によってギボシムシの胚を入手し飼育した。しかし得られた胚が少数だったため、同時並行で成体の組織再生能力を利用して研究を行い、胚発生においてどのように pygochord ができてくるのか手掛かりを得られればと考えている。

手法

沖縄県備瀬でヒメギボシムシ *Ptychodera flava* を採集し、これからパラフィン切片を作製した。染色は一般的な HE 染色の他、EVG 染色を行い組織の観察をした。

また、*P. flava* に対して温度変化による放卵放精誘起、人工授精を行い、胚を飼育した。再生は体幹を切断する事によって人工的に誘導した。

結果・考察

連続切片の作製により、*P. flava* の pygochord が存在する領域は、尾域のなかでもかなり後方の末端に近い範囲のみに限定される事がわかった。従来の記述では、尾域の後方という不明瞭な範囲しか記されていないが、存在領域を絞り込めたことで、発生過程を観察する際に着手しやすくなった。また、pygochord と同様に腸管と神経索の間に存在する他の構造との組織学的違いもより明瞭となった。体幹のより前方では、腸管と背腹の神経索の間の正中領域に血管があるとされてきた。pygochord が液胞に富んだ細胞集団から成るのに対し、血管ではそのような細胞は全くみられず両者の違いが鮮明となった。pygochord の機能的側面は未だ不明なので今後明らかにしていきたい。

P. flava は3~6ヶ月の幼生期間の後、変態を経て成体に成長する事が知られている。2013年9月末に受精させた個体の飼育を継続しているが、未だに変態していない。餌となる藻類を変えると幼生期間が短縮した先行研究があるため、国立環境研究所へ藻類の分譲依頼をし、現在大量培養に取り組んでいる。

ギボシムシの再生に関しては、前方への再生は安定しているが、後方への再生については不安定で、その成否は扱う種や研究者によって分かれている。今回 *P. flava* を用いた実験で、先行研究同様前方の再生はよく観察できた。しかし後方への再生は、体幹自体が前後への伸縮性に富む性質があるため、長さによる再生成否の評価が困難であった。体表の粘液に阻まれ生体染色も行えなかったため、表皮の色や外観を指標にして慎重に検討する事とした。

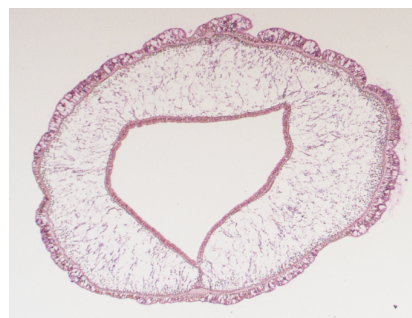
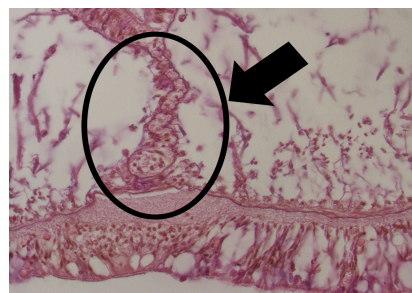
図1. *P. flava* 尾域の横断面

図2. 上図の下部、pygochord の拡大

唇脚類における歩脚の自切構造

飯尾 直子 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 八畑 謙介 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

自切は、トカゲなどの脊椎動物の他、節足動物や棘皮動物などいくつかの分類群で独立に進化した生存戦略である。Frédéricq (1883) によると、自切は特定の部位に存在する自切構造で起こり、防御効果があるとされる。Fleming (2007) によると、自切頻度は自切構造や自切部位の大きさなどの要因に影響を受ける。

例えば唇脚類 (ムカデ類) においては、Matsui and Yahata (2012) による先行研究によって自切頻度と自切構造との関連が報告されている。この先行研究では、(1) 歩脚の転節内にクチクラの不連続構造 (図 1) が存在すること、(2) クチクラの不連続構造の範囲が、ゲジ目>イシムカデ目>オオムカデ目のように目ごとの自切頻度と対応していることが報告された。しかし、イシムカデ目とオオムカデ目においては、後方の歩脚における観察がなされていない。

また Fleming (2007) は、大きくて目立ち、狙われやすい歩脚ほど自切頻度が高いことを示唆している。唇脚類においても、後方の歩脚のみを失った野生の個体がしばしばみられ (図 2)、後方の太くて長い歩脚ほど自切頻度が高いように思われる。そこで、唇脚類では個体における前後の歩脚の自切頻度とクチクラの不連続構造の範囲にも関連があるのではないかと予想した。本研究では、イシムカデ目とオオムカデ目における後方の歩脚の自切構造を解明し前方の歩脚と比較することで、自切頻度とクチクラの不連続構造の範囲との関連を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

イシムカデ目のイッスムカデ属数種 *Bothropolys* spp.、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* を材料とした。

材料をブアン氏液で固定し、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、光学顕微鏡を用いて観察した。

結果と考察

イシムカデ目、オオムカデ目の自切前の後方の歩脚の組織切片を観察したところ、両目において転節内にクチクラの不連続構造がみられた (図 1)。また、自切後の歩脚の組織切片を観察したところ、両目においてクチクラの不連続構造に沿って自切が起きていることが分かった。つまり、後方の歩脚でも、クチクラの不連続構造が自切面となっていることが示された。

本研究の結果、両目におけるクチクラの不連続構造の範囲は以下のようにまとめられる (表 1)。

- イシムカデ目 (歩脚: 全 15 対)
 - 第 2, 3 歩脚: 2/3 周 (Matsui and Yahata, 2012)
 - 第 11-13 歩脚: 3/4 周 (本研究)
 - 第 14, 15 歩脚: 4/5 周 (本研究)
- オオムカデ目 (アカムカデ類の歩脚: 全 23 対)
 - 第 4, 11 歩脚: 1/2 周 (Matsui and Yahata, 2012)

第 21 歩脚: 1/2 周 (本研究)

第 22, 23 歩脚: 1 周 (本研究)

イシムカデ目、オオムカデ目ともに自切は歩脚の転節内で起こり、前方の歩脚と後方の歩脚で自切部位には違いが見られなかった。自切構造については、敵に狙われやすいと推測される後方の歩脚の方がクチクラの不連続構造の範囲が大きいことが本研究によって初めて明らかになった。

本研究では自切構造のみに注目して研究を行ったが、自切構造が作られる過程や、歩脚の再生後にも同じ自切構造が作られるのか、また幼体も自切構造をもつのかなどを調べることによって、唇脚類の自切に関する理解が深まると期待される。

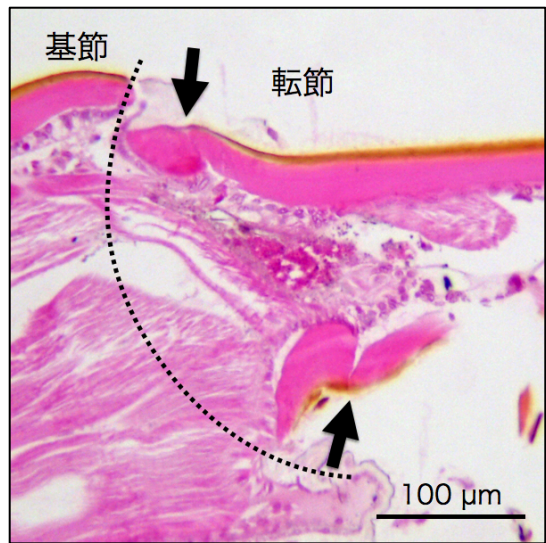


図 1. クチクラの不連続構造 (矢印)。

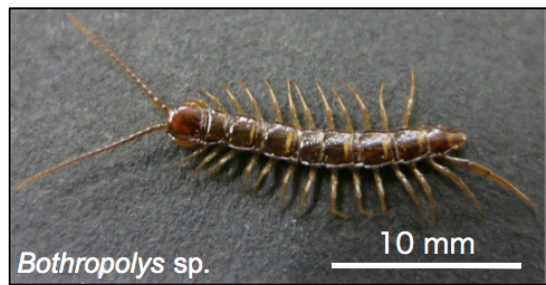


図 2. 後方の歩脚を自切していたイシムカデ類。

表 1. クチクラの不連続構造の範囲。

	前方	後方
ゲジ目	1	1
イシムカデ目	2/3 (2, 3rd)	3/4, 4/5 (11-13th) (14, 15th)
オオムカデ目	1/2 (4, 11th)	1/2, 1 (21st) (22, 23rd)

点線枠内が本研究で解明された部分。

コムカデ類における卵巢構造の形態学的研究

梅谷 絵梨香 (筑波大学 生物学類)

指導教員：八畑 謙介 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

卵巢は異なる動物において同じ起源をもった相同器官であり、比較形態学的な議論に適した器官のひとつである。節足動物の卵巢は卵母細胞の成長位置の特徴から 2 つのタイプに大別されてきた (Makioka 1988)。鉗角類タイプ (図 1a) では、卵母細胞は卵巢壁とそれを裏打ちする基底膜に挟まれた状態で成長し、発達が進むと卵巢腔内に排卵される。大顎類タイプ (図 1b) では、卵母細胞は終始卵巢腔内で成長する。しかし近年、以前は大顎類タイプと考えられていた多足類の卵巢に第 3 のタイプ (図 1c) があることが報告された (Miyachi & Yahata 2012)。このタイプでは、卵母細胞は成長の途中で卵巢上皮と連続した濾胞上皮に包まれ、濾胞の内部は卵巢の外側、つまり血体腔につながっている点で他の 2 タイプとは異なる。なお、この卵母細胞がどのようにして卵巢の外側に出るのか、またどのようにして卵巢内に排卵されるのかはわかっていない。

多足類はヤスデ類、コムカデ類、エダヒゲムシ類、ムカデ類の 4 つの綱で構成されている。ヤスデ類とムカデ類では前述の第 3 のタイプが確認されている (Kubrakiewicz 1991, Miyachi & Yahata 2012)。コムカデ類とエダヒゲムシ類の一部でも濾胞上皮と卵巢上皮の接着が報告されており (Tiegs 1940, 1947)、ヤスデ類とムカデ類の卵巢構造に近い形態と推測される。もし、第 3 の卵巢タイプが多足類のグラウンドプランであれば、他の鉗角類タイプや大顎類タイプの卵巢と比較することで、節足動物の卵巢の進化的変遷の議論が可能になる。

本研究ではエダヒゲムシ類よりもサイズが大きく、採集しやすいコムカデ類を対象にして研究を行った。コムカデ類の卵巢構造については、これまでに Tiegs (1940) による *Hanseniella agilis* に関する報告があるが、この報告には図や写真がほとんどなく、また 1 種のみを対象としているため、コムカデ類に広く共通した特徴は未だ不明である。そこで本研究では、別の種で同様の観察を行い、コムカデ類に共通した卵巢構造を明らかにしたいと考えた。本研究ではコムカデ類の卵巢構造を組織学的に解明するとともに、今後必要となる電子顕微鏡での観察にどのようなサンプルが適しているかを検討した。

材料と方法

本研究では 2013 年 4 月から 11 月にかけて茨城県内で採集したナミコムカデ *Hanseniella caldaria* を材料として使用した。採集したナミコムカデの成体雌を酢酸エチルで麻酔し、頭部と尾部を切除してブアン氏液で固定した。標本はエタノールブタノールシリーズで脱水および透徹を行った後、パラフィンに包埋した。厚さ 5 μm の連続切片を作成し、Haematoxylin and Eosin 染色、Alcian Blue-Periodic Acid-SCHIFF reaction (PAS)-Haematoxylin 染色を施し、光学顕微鏡で観察を行った。

結果と考察

ナミコムカデの卵巢は背側にある消化管と腹側神経索の間に 1 対存在した。左右それぞれの卵巢は細長い袋状で、末端はそのまま輸卵管につながっていた。卵巢内には複数の形成細胞巢が背側の卵巢上皮に接着して存在していた。形成細胞巢には卵原細胞が多数存在していた。若い卵母細胞は濾胞上皮に包まれていた。濾胞上皮は一部で卵巢上皮と結合しており、その部分は少し厚くなっていた。卵巢にはさまざまな発達段階の卵母細胞が観察されたが、最も発達した卵母細胞では濾胞上皮は消失していた。

また、発達段階の異なる卵母細胞は、成長順ではなく、ランダムに存在していた。季節ごとの比較から、春から夏にかけて採集された個体は発達した卵母細胞を持ち、秋には若い卵母細胞のみを持つ個体の多いことが明らかになった。

本研究で得られた結果は、多くの点で Tiegs (1940) が *Hanseniella agilis* で記載した特徴と一致した。これらはコムカデ類に共通した特徴かもしれない。一方、形成細胞巢の位置、成長後の卵母細胞が濾胞上皮を失うこと、卵形成の季節消長は、本研究で得られたコムカデ類の新たな知見である。

本研究の結果を節足動物の 3 つのタイプの卵巢と比較すると、濾胞上皮が卵巢上皮に接着している点では第 3 のタイプに類似している。しかし、この接着面が血体腔に開口していなければむしろ大顎類タイプに類似していることになり、コムカデ類の卵巢は両タイプの間中間的な特徴を残している可能性もある。

本研究ではコムカデ類の卵母細胞の成長位置について決定的な結論を得るに至らなかったが、今回の結果をふまえて今後は電子顕微鏡による観察を行いたい。

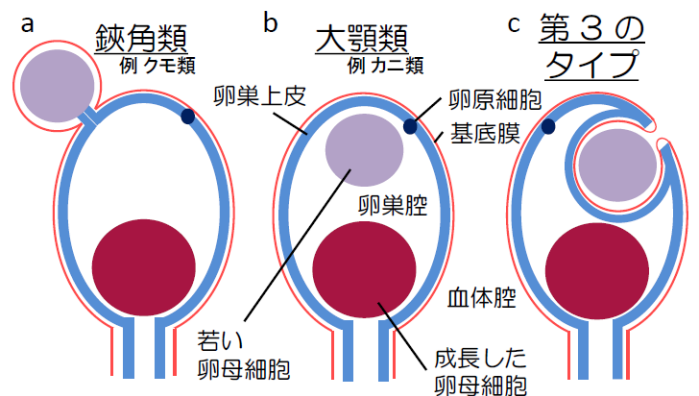


図 1. 節足動物の卵巢模式図。

鉗角類タイプおよび大顎類タイプ: Makioka (1988) を改変。
第 3 のタイプ: Kubrakiewicz (1991) および Miyachi & Yahata (2012) を改変。

真正クモ類における歩脚の自切位置

木村 翔 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 八畑 謙介 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

トカゲを捕まえようとする、トカゲは尻尾を切り捨てて逃げた。このように動物が危険から身を守るために体の一部を犠牲にする現象は自切と呼ばれる (Frederick 1883)。これは脊椎動物のほか、節足動物や軟体動物など、動物界のさまざまな系統群で見られる生存戦略である。

自切をする動物は、切断によるリスクを軽減するため、適切な位置で切断をしたり、治癒を早めたりするための特別な構造をもつことが知られている (Fleming et al. 2007)。系統群ごとに切り捨てる部位や自切に関わる構造には違いが見られ、自切はそれぞれの系統群で独立に進化した機構と考えられている (McVean 1975)。しかし詳しい研究がなされているのは一部の系統群に限られている。本研究で対象とした真正クモ類においても古くから歩脚を自切することが知られている。しかし、その位置や構造に関する知見はまだ不十分であり、数少ない先行研究の記述には矛盾が見られる。

真正クモ類の歩脚は、基部側から基節、転節、腿節、膝節、脛節、蹠節、跗節に分節している (図 1)。自切は基節と転節の間で起こると報告されている (Bonnet 1930; Parry 1957)。Parry (1957) によれば、タナグモ科の *Tegenaria atrica* では、基節から転節に向かう 9 本の筋肉のうち、1 本のみが転節を横断しており、残りの 8 本は転節の基節側の末端に接着している。この先行研究では、自切によって基節と転節を横断する 1 本の筋肉のみが切れると記述されているが、基節と転節の間で自切が起こるとすれば、基節からの 9 本の筋肉の全てが切断されるはずであり、この点に矛盾がある。

本研究では、先行研究に見られる矛盾を解決し、真正クモ類における歩脚の自切位置を組織学的方法によって解明した。

材料と手法

2013 年 6 月から 11 月にかけて茨城県つくば市内で採集したコモリグモ科のカラコモリグモ *Pardosa hedini* を材料として用いた。本種は、九州と四国を除く日本全国の里山から山地にかけて分布する普通種であり、野外でも歩脚を自切した個体が多く観察されることから、本研究の材料として適していると考えた。

本種の自切前後の個体を、以下の 2 つの手法を用いて観察し、比較した。

1) 骨格標本法

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

2) 組織切片法

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成した。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。

結果と考察

骨格標本の観察では、先行研究と同様に、基節と転節の間で自切が起きているように見えた。しかし、転節は歩脚の中でも最も細く、かつ短い節であるため、骨格標本の観察のみに基づいて自切位置を正確に断定することは難しいと判断された。

次に、自切をしていない歩脚と自切後の歩脚のそれぞれの組織切片の比較観察をおこなった。転節の腹側には、基節側と腿節側の 2 箇所に、筋肉の付着点となる外骨格の陥入構造が存在していた。自切後の歩脚では、これら 2 つの陥入構造のうち、基節側の 1 つが切断部より体側に残っていることがわかった。このことから、自切は転節で起こり、転節に見られる基節側の陥入構造よりも末端側に自切位置があることが明らかになった (図 2)。この位置で自切が起きた場合、転節基部側に接着する多くの筋肉は切断されることはなく、Parry (1957) の筋肉に関する記述と整合する。Parry (1957) は自切の位置を見誤っていた可能性がある。

今後の展望

真正クモ類でも、種によって自切頻度が異なることが知られている。今後、他の種においても同様な観察を行い、比較することで、真正クモ類の歩脚の自切におけるグラウンドプランを解明できるだろう。

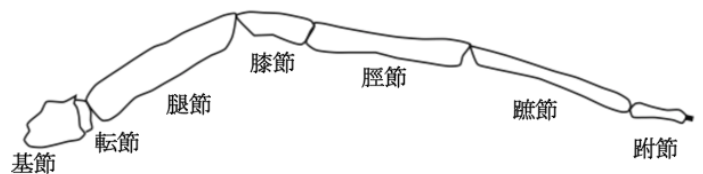


図 1. 真正クモ類の歩脚の分節を示す模式図。

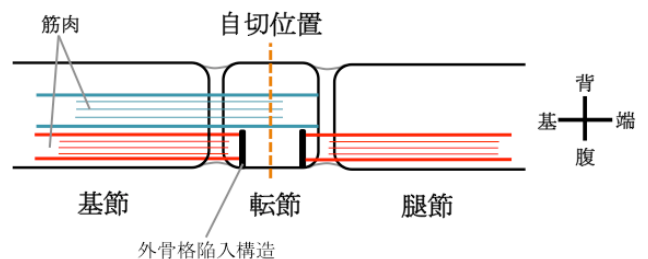


図 2. 本研究で明らかになったカラコモリグモにおける歩脚の自切位置を示す模式図。

日本産アカムカデ類の系統地理学的研究

時安 紘平 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 八畑 謙介 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

土壌などの間隙に生活する動物は一般に移動能力が低いことが知られている。そのため、地域間の遺伝的交流の頻度が低くなり、遺伝的分化が生じやすいと考えられる。この遺伝的分化は生物の移動能力に加え、山の隆起や河川形成などの地理的イベントにも影響を受けるため、遺伝的に分化した集団とその地理的關係を明らかにすることで、対象とする生物の分布拡大や多様化の歴史を知ることができる。しかし近年まで土壌動物を対象とした系統地理学的研究はあまり進んでいない。

アカムカデ類は、節足動物門、唇脚綱、オオムカデ目、アカムカデ属に分類される土壌動物で、体長は 4~7 cm で 23 対の歩脚を持つ。アジアや北米などの環太平洋地帯に分布し、日本では本州、四国、中国、九州、沖縄の平地から山地までの、広い範囲に生息している。林の土壌中や朽木の中、植木鉢の下やリターの溜まった側溝などで間隙性の生活をしていることから、このアカムカデ類もまた、移動能力が低いと考えられる。実際に、アカムカデ類数種において、種内に核型の地理的多型が報告されている (Ogawa 1966)。この先行研究からも、アカムカデ類には遺伝的な地理的分化が存在すると予想される。

本研究では、アカムカデ類を用いて系統地理学的研究を行うための第一段階として、日本に生息するアカムカデ類の遺伝的集団がどのように分布しているのかを検証した。

材料と方法

本研究では、アカムカデ類の中でも本州、四国、九州、の広い範囲に生息する 3 種、アカムカデ *Scolopocryptops sexspinosus* (21 地点 62 個体)、セスジアムカデ *S. rubiginosus* (33 地点 64 個体)、ヨスジアムカデ *S. quadristriatus* (7 地点 14 個体) を材料として用いた (図)。

ミトコンドリア 16S rDNA の部分配列 523 塩基を決定し、系統解析ソフト MEGA を用いて最尤法 (ML 法) による系統解析を行った。

結果と考察

ML 法による系統解析の結果、3 種のアカムカデ類それぞれの単系統性が強く支持された。種内の遺伝的距離の大きさ (P -distance) を計算した結果、アカムカデが約 0.05、ヨスジアムカデとセスジアムカデはそれぞれ約 0.01 となった。この結果より、アカムカデの種内の遺伝的分化の程度は他の 2 種に比べて大きいことがわかった。

以下に 3 種それぞれについて、種内の遺伝的集団とその分布について示す。

アカムカデ

鹿児島・高知集団、兵庫集団、東京・山梨集団、徳島集団、韓国集団、広島集団、高知 I 集団、島根・香川集団、高知 II 集団の 9 つの遺伝的集団が認められた。日本で最初に集団の分岐が生じたのは、九州と本州および四国の間であることが示唆された。四国と中国地方には複数の集団が存在しており、この地域に高い多様性のあることが明らかになった。

ヨスジアムカデ

解析した個体数が少ないため、地域ごとの遺伝的なまとまりについて議論するのに十分な結果を得ることができなかった。

セスジアムカデ

九州南部集団と、関東と岐阜県、愛知県、愛媛県を含む太平洋側集団の 2 つの集団が認められた。集団の単系統性を支持するブートストラップ値は低いが、日本海側と九州北部にそれぞれ別の集団の存在が示唆された。この結果から、本州と四国においては太平洋側と日本海側、九州においては北部と南部に遺伝的に分化した集団が存在することが示唆された。

本研究より、アカムカデとセスジアムカデには地域ごとに遺伝的に分化した集団が存在することが明らかになった。また、遺伝的分化の程度が異なることから、それぞれの種の分布拡大の歴史的背景は異なることが示唆された。

今後の展望

今後、個体数と採集地数を増やすと同時に、核 DNA 領域の解析を進め、種内の遺伝的集団の地理的構造と集団間の関係を明らかにしたい。その結果から分岐年代推定を行い、アカムカデ類の分布拡大と日本列島形成の歴史の關係について考察したい。

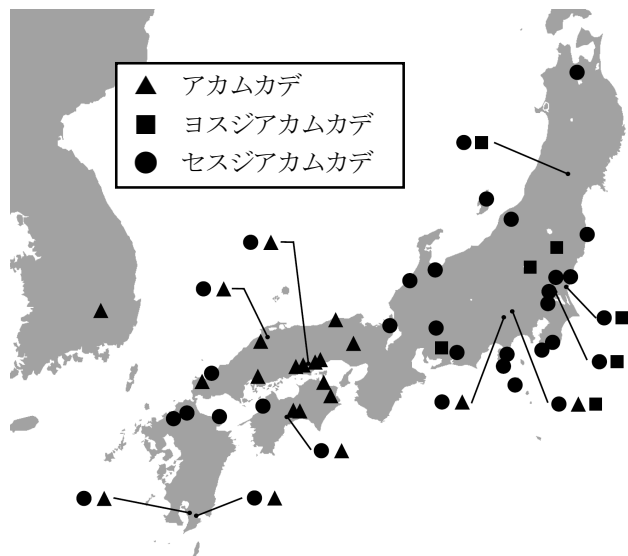


図. 本研究に用いたアカムカデ類 3 種の採集地

ハプト藻特有のオルガネラ、ハプトネマの生理学的研究

阿閉 耕平 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中山 剛 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

ハプト藻は主に海洋に生息する微細藻類で、80属300種程が知られている (Jordan et al. 2004; Worden et al. 2004)。海洋、特に外洋における重要な生産者であることが多くの研究により示唆されてきた (Liu et al. 2009)。ハプト藻にはハプトネマと呼ばれる、複数の単管微小管とそれを取り囲む小胞体から構成される特異的な鞭毛様オルガネラが存在する。ハプトネマには細胞長の10倍以上の長さのものがある一方、数 μm のこん棒状のものや完全に退化して痕跡的なものまである。ハプトネマがもつ機能については次のようなものが挙げられる。(1) 付着：ハプトネマは基部に付着することができる。(2) コイリング：伸長した状態のハプトネマは5~10 ms という非常に短い時間のうちにコイル状に巻き縮めることができる。(3) 食作用補助：ハプトネマにより捕集された餌粒子が食胞に運ばれる様子が撮影されている (Kawachi and Inouye 1991; 1995)。

先行研究によりハプトネマの運動制御には Ca^{2+} が関係していること、また calcium-induced calcium release (CICR) と呼ばれる Ca^{2+} のシグナルを増幅させる機構がハプトネマに存在していることが示唆されている (Kawachi and Inouye 1994)。実際にハプト藻にはCICRに関係する2種類の受容体 (RYR, IP3R) の遺伝子が存在することが確認されている (Gerald 2013)。また、RYR 阻害剤であるプロカインをハプト藻に添加するとハプトネマのコイリングが一時的に抑制され、しばらく後にハプトネマのみが外れるという現象が報告されている (Kawachi and Inouye 1994)。その後、ハプトネマに注目した研究はほとんどなされておらず、付着、コイリングそして食作用といった過程でみられるハプトネマの様々な運動メカニズムの理解は進んでいない。このため本研究では、 Ca^{2+} および CICR に影響を与える試薬を添加し、ハプトネマや細胞の様子を観察することでハプトネマがもつ機構およびその生理学的特性についての知見を増やすことを目的とする。

材料・方法

本研究を行うにあたり、NISE-741 株 (*Haptolina hirta*) を国立環境研究所より、NISE-1333 株 (*Chrysochromulina* sp.) を横山 亜紀子博士より提供していただいた。また東京湾でサンプリングを行い粗培養とマイクロピペット法により確立した10株のハプト藻単離株のうち、特に長いハプトネマをもっていた A8 株と D1 株を合わせて計4株を用いて研究を行った。実験に用いる株間の系統関係を調べるため、18S rDNA 配列のシーケンシングにより得た配列をもとに RAxML を用いて最尤系統樹を作成した。ハプトネマの CICR に関する生理学的特性を調べるため、 Ca^{2+} と選択的にキレートを生成する EGTA、CICR の RYR 阻害剤のプロカイン、リアノジン、IP3R 阻害剤の 2-APB を添加した後、倒立顕微鏡によりハプトネマの状態およびハプトネマをもつ細胞の割合の変化を観察した。

結果・考察

18S rDNA 配列のシーケンシングにより得た配列を用いて作成した系統樹により、野外採集した株はそれぞれ、A8 株が *Chrysochromulina simplex*、D1 株が *Haptolina* sp. であり、NISE-1333 株と A8 株、NISE-741 株と D1 株が同属別種の関係であるということが分かった。*Chrysochromulina* 属と *Haptolina* 属は系統的にやや離れていた。

各試薬を添加する実験の結果、EGTA ではコイリングの抑制がみられたが、ハプトネマのみが外れる反応はみられなかった。RYR 阻害剤のプロカイン、リアノジンではともにコイリングの抑制の後、ハプトネマのみが外れる反応がみられた。IP3R 阻害剤の 2-APB ではほぼ全ての細胞のハプトネマがコイリングしたまま固定された。ハプトネマのみが外れる反応は 2-APB でも引き起こされたが *Chrysochromulina* 属、*Haptolina* 属で反応の程度に差がみられた。この原因として考えられる1つに2属間のハプトネマの長さの違いがあげられる。それぞれの長さにあわせ、ハプトネマを維持する IP3R のはたらきが異なるかもしれない。RYR 阻害剤と IP3R 阻害剤の両方でハプトネマの状態に変化があったことから、これまで遺伝子の存在によってのみ示唆されていた RYR と IP3R が実際に機能していることが示された。RYR 阻害剤と IP3R 阻害剤でコイリングやハプトネマが外れる反応の違いがあったことから、2つの受容体において反応に関わる経路の違いが存在することが考えられる。ハプトネマのみが外れる反応は溶液中の Ca^{2+} の減少ではなく、CICR の阻害と関係していること、またハプトネマの維持には CICR が必要であることが示唆された。今後の展望としては、2つの受容体のハプトネマが外れる反応経路の違い、2-APB での反応にみられた違いの原因、ハプトネマが切れる原動力を突き止めたい。

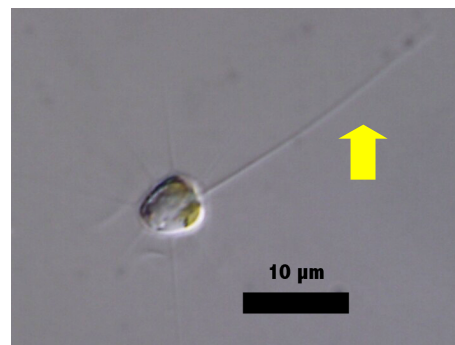


図1 D1 株の光学顕微鏡写真 (矢印：ハプトネマ)

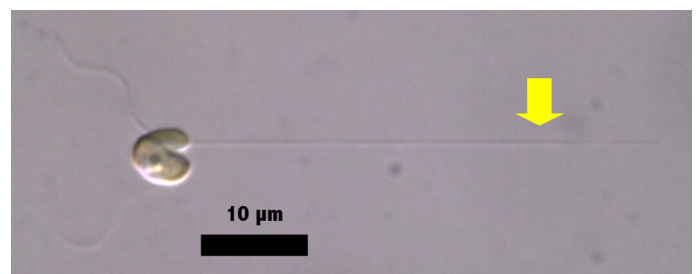


図2 A8 株の光学顕微鏡写真 (矢印：ハプトネマ)

新規寄生性ミドリムシの系統分類学的研究及び寄生様式の解明

加藤 孝一郎 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中山 剛 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

藻類といえば、水界の食物連鎖における生産者であり、一次消費者に捕食されるもの、という認識が一般的であろう。しかし実際は、藻類の中には独立栄養性種だけではなく、光合成と捕食どちらも行い混合栄養性種や、一度獲得した光合成能を二次的に失った捕食性や寄生性の従属栄養性種まで存在する。

寄生性の藻類は甲殻類や魚類、ヒトからも見つかっている。しかしながらこのような藻類は一般に宿主の体内で生活しているため見過ごされがちであり、未だに発見されていない種も数多く存在していると考えられる。藻類の多様性を明らかにしていく上で、動物の体内という環境に着目して新奇の藻類を探索していくことは非常に大切である。

本研究において、光学顕微鏡を用いてさまざまな水生動物を観察して着生・寄生藻類を探索したところ、大学近郊の水田に生息するカイミジンコ的一种から寄生性ミドリムシと思われる藻類を発見した。そこで、本藻類の系統分類学的位置及びカイミジンコへの寄生様式の解明を目的とした研究を行った。

方法

水田 (つくば市天王台 2 丁目) より採集してきたカイミジンコから感染個体を選別、一部は破碎して本藻類を採取した。光学顕微鏡により本種の形態を観察するとともに、カイミジンコへの寄生時の様子を連続で 60 時間観察した。また、本種の寄生が宿主特異的であるかを確かめるため、同所に生活する他の水生動物の体内からも本種の探索を行った。さらに、走査型電子顕微鏡 (SEM) と透過型電子顕微鏡 (TEM) により本種の形態及び微細構造の観察を行った。この際 SEM 試料及び TEM 試料作製では 5% グルタルアルデヒドと 1% 四酸化オスミウムによる二重固定を行った。また、本種の寄生場所を明らかにするため、本種が多量に寄生しているカイミジンコ体内の微細構造観察を行った。この際には、ブアン固定液 (ピクリン酸 : ホルマリン : 酢酸 = 15 : 5 : 1) と 1% 四酸化オスミウムの二重固定により TEM 試料を作製し、観察を行った。一次固定でブアン固定液を使用したのは硬いカイミジンコの殻を柔らかくし、超薄切片を作りやすくするためである。

分子系統解析では、採取した本種 1 細胞をマイクロピペット法により単離し、そこから 18S rDNA 配列の全長、28S rDNA 配列の一部を増幅し、配列を決定した。そして 18S rDNA、28S rDNA の複数遺伝子データセットを作成し、RAxML (ver.7.2.6) により最尤系統樹を作成、ブートストラップ解析も行った。

結果と考察

○系統分類学的研究

光学顕微鏡による形態観察、SEM・TEM による微細構造観

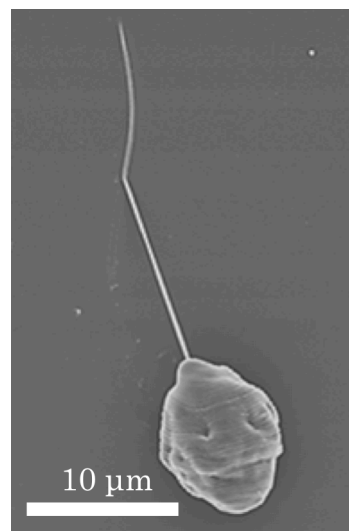
察により、一本の鞭毛・体表のペリクル・内部構造のパラミロン粒・すじりもじり運動など明らかなユーグレナ藻の特徴が観察された。眼点の確認されたこと、明瞭な葉緑体を持たないことから二次的に葉緑体を失い、寄生による吸収栄養生活を営んでいる生物であることが示唆された。また、分子系統解析の結果においても光合成性であるユーグレナ目内に位置することが示され、高いブートストラップ値により支持された。しかし、ユーグレナ目内においてはいずれの種とも高い支持の単系統群を形成しなかった。過去の寄生性ユーグレナ類の記載において今回のようなカイミジンコに寄生する種は報告されておらず、形態的特徴からも一致する既知種は存在しない。以上の結果から本種はユーグレナ目の新種であると結論づける。

○寄生様式の解明

カイミジンコの体内での生育・明らかな個体数の増加が確認できたこと、TEM による観察から本種はカイミジンコの殻の内部や体内の組織中にも存在するという驚くべき事実から本種はカイミジンコに寄生していることが明らかになった。一方で、カイミジンコの卵の中に存在しなかったこと、体外では鞭毛による遊泳行動が見られたことから、本種は垂直的な伝播ではなく、宿主の体内で増殖した後に体外へ出て水中を泳ぎ他のカイミジンコの体内へ侵入することが示唆された。また、他種のカイミジンコ・水生動物からは発見されなかったことから、本種は特定の種のカイミジンコに寄生して生活している可能性がある。

今後の展望

本研究ではミドリムシがカイミジンコに寄生するという、全く新しい寄生関係が発見できた。これからも動物の体内に注目して藻類を探索していくことが重要である。また、本種の株の確立、宿主特異性の有無に関する詳細な研究、寄生による宿主への影響の検討が望まれる。



新規寄生性ミドリムシの走査型電子顕微鏡(SEM)画像

新奇 Heliozoa SRT127 株の分類学的研究

福田 あずみ (筑波大学 生物学類) 指導教員: 石田 健一郎 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

Heliozoa はかつて、細胞が放射状に伸びた微小管性の長い axopodium (軸糸) を複数有するという形態的特徴を持つ原生生物を含む分類群であった。しかし電子顕微鏡観察技術が発達し、分子系統学的解析が導入された結果、Heliozoa はストラメノパイルやケルコゾアなど他の分類群に入るものと既存の分類群に属さない独立の単系統群から構成されていたことが明らかとなった。現在はこの独立の系統群のみが Heliozoa (太陽虫門) として認識されている。Heliozoa は extrusome (射出装置) を持つ axopodium を有し、特徴的な構造として細胞の中心に存在する球形の centrosome (中心粒) を持つことで定義される。現在 2 綱 4 目 9 科 19 属が記載されているが、その多くは形態形質のみに基づいたものであり、分子系統学的な知見を反映させた分類の再検討が必要である。よって分類の正確な検討のためには分子、形態両方に関してより詳細なデータが求められる。Heliozoa の 2 綱のうちの 1 つが Centrohelea 綱である。この綱はミトコンドリアクリステが板状で、細胞外被の特徴及び axopodium を構成する微小管の構造によって下位分類群の分類が行われている。

SRT127 株は 2011 年に東京都港区台場沿岸から筑波大学生命環境科学研究科生物科学専攻の白鳥峻志氏によって単離された従属栄養性原生生物の培養株である。予備的な形態観察により、本生物は Heliozoa に特徴的な axopodium を持ち、さらに Centrohelea 綱に特徴的な centrosome が細胞の中心に存在することが確認された。しかし、既知種との明確な類似性は確認されなかったことから、本生物は新奇の有中心粒太陽虫であることが推測された。本研究では、SRT127 株の分類学的位置の決定を目的として、18S rDNA を用いた分子系統解析及び光学顕微鏡、電子顕微鏡、蛍光顕微鏡を用いた詳細な形態観察を行った。

方法

分子系統解析は、まず SRT127 株の 18S rDNA 塩基配列を決定し、置換モデルに GTRGAMMA を用いた RAxML による最尤法系統樹の作成及び最尤法に基づくブートストラップ検定を行った。光学顕微鏡観察は、ZEISS AXIO Imager. A2 を用いて、培養 5-10 日目の細胞の外部形態の観察を行った。観察された鱗片の成分を調べるためのシリカ蛍光染色は Lyso Tracker Yellow-HCK-123 を投与した培地で、SRT127 株と対称生物として珪藻 *Coscinodiscus* sp. と緑藻 *Cosmarium* sp. を 48 時間培養した試料を用いて行った。より詳細な鱗片形態の観察を行うための走査型電子顕微 (SEM) 観察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にブチル凍結乾燥を施し、白金パラジウムを蒸着させた試料を用いて行った。また、蛍光顕微鏡観察の結果を踏まえ、パイプユニッシュを用いて有機質を溶解した試料の観察も行った。透過型電子顕微鏡 (TEM) による超薄切片観察は、グルタルアルデヒドと四酸化オスミウムによる二重固定を行った細胞を樹脂包埋し、超薄切片を作成、それらを酢酸ウランとクエン酸鉛で染色した試料を用いて行った。

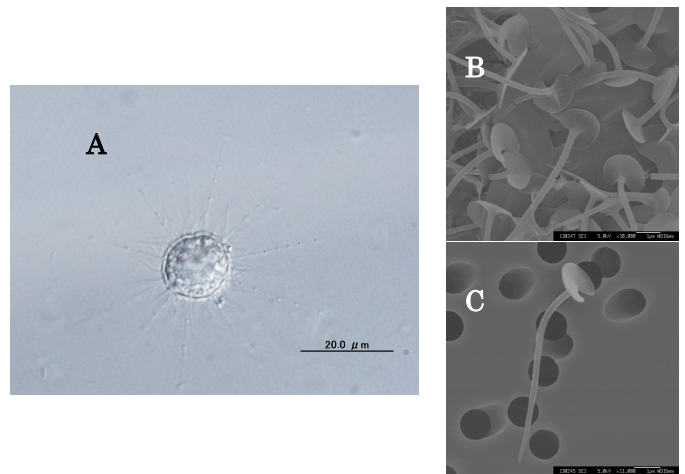


Figure 1: SRT127 株

(A) 光学顕微鏡写真 (B),(C) 走査型電子顕微鏡写真(鱗片)

結果

18S rDNA 配列を用いた系統解析の結果、本株は Centrohelea 綱 Acanthocystida 目に属する *Marophrys marina* とブートストラップ値 100 % という強い支持で単系統群を形成した。また、本株を含めた Acanthocystida 目の単系統性はブートストラップ値 79 % と完全ではないものの比較的高い支持を得られた。

続く光学顕微鏡観察及びシリカ蛍光染色の結果、SRT127 株は細胞外被として珪酸質の鱗片を持つことが明らかとなった。この鱗片について SEM を用いた詳細な形態観察を行ったところ、2 種類の鱗片の存在が明らかとなった。1 つはハート型の基部と先端に向けて細くなる刺状の軸部からなる鱗片で、もう 1 つはその下層で細胞に接するように存在する楕円形の板状鱗片であった。刺状の軸部は長さ約 3 μm で中空であった。また板状鱗片は中央に凹みがあり、周囲を細い縁で囲まれていた。

TEM による細胞内部の超微細構造観察の結果、細胞の中心に球形の centrosome が 1 つ確認された。また、ミトコンドリアクリステは板状で、細胞内で新たな鱗片が形成されている様子が観察された。

考察

18S rDNA 配列による系統解析から SRT127 株は *Marophrys marina* に最も近縁であることが示唆された。また TEM を用いた観察から板状のミトコンドリアクリステや centrosome といった特徴的な構造が確認された。一方、*M. marina* の鱗片は珪酸質ではなく、その形状も真っ直ぐな針状であることが先行研究より明らかになっており、本株の特徴とは明らかに異なる。以上を踏まえ、SRT127 株は Heliozoa Centrohelea 綱 Acanthocystida 目の *Marophrys* 属に近縁な新属新種として扱うことが妥当であると結論した。

また、これらの結果から分類形質の 1 つである珪酸質鱗片は、Acanthocystida 目の共通祖先で獲得され、*M. marina* で独立して欠失したことが推察された。

パラオ産無色ストラメノパイル SRT167 株の分類学的研究

村山 拓未 (筑波大学 生物学類) 指導教員:石田 健一郎 (筑波大学 生命環境系)

<背景・目的>

ストラメノパイルは、褐藻や珪藻などの光合成を営む藻類や捕食性の鞭毛虫、動植物の寄生虫などといった多様な栄養形態の生物を含む真核生物の主要系統群の一つである。光合成性や腐生性のストラメノパイルの多様性は研究が進んでいる一方で、捕食性の生物群の多様性は不明瞭な点が多い。ストラメノパイル全体の分子系統樹を見ると、捕食性の生物群はより根本付近で見られ、光合成性の生物群に比べ、より祖先的であると考えられるため、捕食性のストラメノパイルの多様性を理解することは光合成性のストラメノパイルの進化を理解する上で重要である。

SRT167 株は、筑波大学生命環境科学研究科の白鳥峻志氏によりパラオの海水湖から単離された捕食性の鞭毛虫の培養株である。18S rDNA の部分配列を用いた BLAST 検索の結果、本株はストラメノパイルに属することが示唆された。

本研究では 18S rDNA 配列を用いた分子系統解析と、光学顕微鏡及び電子顕微鏡を用いた形態観察により、SRT167 株の系統・分類学的位置を明らかにすることを目的とした。

<方法>

SRT167 株を、20°C、明期 14 時間、暗期 10 時間の環境下におき、50%海水の ESM 培地で培養したものを研究に用いた。本株の DNA を抽出し、PCR 法によって 18S rDNA を増幅し、大腸菌に形質転換させた。これを PCR 法によって更に増幅した後、シーケンシングを行うことで本株の 18S rDNA の部分配列を取得した。18S rDNA は一度のシーケンシングでは全長を読み取れないため、抜けている中間部分の配列を、プライマーを変えてさらにシーケンシングを行い、得られた全配列を繋げることで本株の 18S rDNA 配列とし、分子系統解析に用いた。分子系統解析では RAxML を使用し、最尤法を用いた系統樹作成を行うとともにブートストラップ(BP)解析を行った。透過型電子顕微鏡による観察では、グルタルアルデヒドと四酸化オスmiumで二重固定を行った細胞を用い、酢酸ウランで染色した試料をホルマウント観察した。また、二重固定を行った細胞を樹脂包埋し、超薄切片を作成後に酢酸ウランとクエン酸鉛で染色した試料を観察した。

<結果>

・分子系統解析

ストラメノパイル内での SRT167 株の系統的位置を知るため、18S rDNA 配列を用いた分子系統解析を行った結果、SRT167 株はプラシディア綱の 2 属 2 種 *Placidia cafeteriopsis* と *Wobblia lunata* 及びそれらに近縁な配列と BP 値 100 で単系統を形成した。

・顕微鏡観察

光学顕微鏡による形態観察の結果、SRT167 株の細胞は直径 2 - 8 μm 、球形で鞭毛基部が突出した形態をしていた(図 1)。 unequal 鞭毛を 2 本有していた。基本的に遊泳性に主に回転遊泳を行い、匍匐運動は見られなかった。遊泳時は両鞭毛を後方に伸ばしていた。

ホルマウントでの透過型電子顕微鏡観察の結果、SRT167 株にストラメノパイル特有の管状小毛は観察できなかった(図 2)。また、鞭毛先端にアクロネマ構造が観察された。超薄切片による微細構造観察では、一つの核とその内部に明瞭な核小体、管状クリステのミトコンドリアが観察された(図 2)。

<考察>

18S rDNA 配列に基づく分子系統解析から、SRT167 株はストラメノパイルのプラシディア綱と単系統群を形成する一方、同綱の既知の 2 種との遺伝的距離は大きいことが示された。

プラシディア綱は、2 属 2 種 *Placidia cafeteriopsis* と *Wobblia lunata* が記載されている、海産の捕食性鞭毛虫である。2 本の不等長鞭毛を持ち、前鞭毛にはストラメノパイル特有の管状小毛がある。後鞭毛を用いて基質の上を匍匐運動する。回転遊泳を行う際は前鞭毛を前に伸ばす。今回観察された本株の形態的特徴(運動様式、管状小毛の有無、アクロネマ構造など)はプラシディア綱の形態的特徴と大きく異なるものであった。2 本の equal 鞭毛でアクロネマ構造を持ち、管状小毛を持たないという点で類似しているストラメノパイルとして *Adriamonas peritocrescens* と *Cyathobodo petersen* が挙げられる。*A. peritocrescens* は、分子系統解析によりピコエカ綱に属することが示され、細胞の大きさが長さ 7 - 9 μm 、幅 3 - 5 μm と本株より大きいこと、遊泳時に前鞭毛を前方に伸ばすこと、鱗片を持つことといった特徴から本株とは異なる。*C. petersen* は、多核体が存在するという点で本株と異なる。

以上の分子系統解析、顕微鏡観察の結果から SRT167 株はプラシディア綱の既知の属には当てはまらず、また無色ストラメノパイルとして記載されている他の生物にも該当する種がないことから、プラシディア綱の新属新種として扱うことが妥当であると結論した。

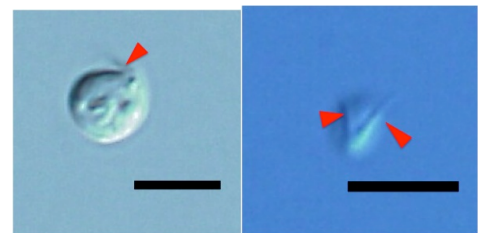


Fig. 1. SRT167 株の光学顕微鏡写真
スケールバー：10 μm 、矢頭：鞭毛

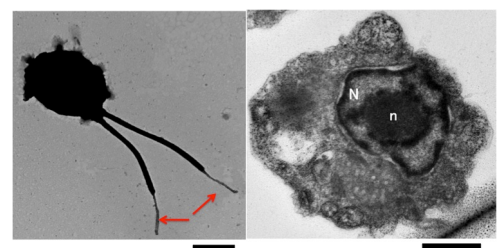


Fig. 2. SRT167 株の電子顕微鏡写真
スケールバー：500 nm、矢印：アクロネマ構造
N：核、n：核小体

菅平高原におけるプロトステリウム類の分布と餌資源の嗜好性

岩本 祥明 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 出川 洋介 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

粘菌とは生活環の中で子実体を作るアメーバの総称で、巨大な多核単細胞の変形体を作る変形菌類や、アメーバが集合して多細胞の偽変形体や子実体を作るタマホコリカビ類に代表される。プロトステリウム類はその中でも最も原始的な粘菌だと考えられており、柄と1~4個の胞子からなる単純な子実体を作る。変形菌類、タマホコリカビ類、プロトステリウム類はアメーボゾアに所属し、その中で最も原始的な子実体を作るプロトステリウム類は粘菌の進化を理解する上で重要な生物群である。プロトステリウム類には現在プロトステリウム綱として、1目4科16属36種が知られており、生活環における遊泳細胞や変形体の有無、子実体やアメーバの形態に基づいて分類されている。

日本では変形菌類やタマホコリカビ類の多様性についての調査は行われてきたが、プロトステリウム類についてのまとまった調査は行われてこなかった。また、一部の変形菌類やプロトステリウム類、エクスカバータに所属する細胞性粘菌のアクラシス類では餌となるバクテリアや酵母に嗜好性があることが知られている。しかし、プロトステリウム類に関する餌資源の嗜好性は、培養下での限られた材料について検討されたに過ぎず、生態的な調査は行われてこなかった。本研究では、菅平高原におけるプロトステリウム類の多様性を解明するとともに、それらの生息地と餌資源の関係を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

1) 温室培養法

野外から採集した植物遺体を蒸留水に40分間浸し、wMY 寒天培地 (0.02 g malt extract, 0.02 g yeast extract 0.75 g K_2HPO_4 , 15.0 g agar, 1.0 L deionized water) に接種し、2週間、長焦点顕微鏡で観察を続けた。

2) 釣菌法

菅平高原実験センター内で採取した3種類の基質 (ススキ稈、アカマツ樹皮、ミズナラ樹皮) の2 mm 四方の断片を8個ずつネットに入れ、センター内4地点 (ススキ草原、アカマツ林、ミズナラ林、大明神の滝) のリター上に設置した。サンプルは8月7日、10月18日の2回設置し、3週間後に回収した。回収したサンプルは蒸留水に40分間浸し、wMY 寒天培地に接種し、2週間長焦点顕微鏡で観察を続け、それぞれの地点、基質についてプロトステリウム類の子実体が出現した基質の断片数を記録した。

3) 培養株の確立と餌資源の嗜好性試験

1) 温室培養法と 2) 釣菌法で出現したプロトステリウム類の子実体を培地上のバクテリアと共に分離し、粗培養した。粗培養上で形成した子実体から胞子を分離し、それぞれの粗培養から分離して純粋培養したバクテリアと共に二員培養を行い、胞子の発芽と子実体形成を指標とし、プロトステリウム類の餌資源の嗜好性を観察した。また、分離したバクテリアについて16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を決定し、遺伝子解析により同定した。

結果

1) 温室培養法

アジサイ、未同定の双子葉草本、ワラビの空中リターよりプロトステリウム類の二員培養株を確立した。そのうち、前二者から得られた株は継代できなかつた。ワラビの空中リターから得られた1株は子実体の形態的特徴および生活環に変形体を持つことから *Schizoplasmodiopsis pseudoendospora* と同定された。

2) 釣菌法

各地点に設置した基質上に出現したプロトステリウム類の頻度はススキ草原において他の3地点よりも有意に高く、ススキ稈上ではミズナラ樹皮上よりも有意に低かつた (Fisher の正確確率検定 ; $p < 0.05$; Table 1)。

釣菌法により4培養株が確立し、うちススキ草原に設置したミズナラ樹皮より得られた2株は *Protostelium arachisporum*、大明神の滝に設置したミズナラ樹皮より得られた1株は *S. pseudoendospora* と同定された。大明神の滝に設置したアカマツ樹皮より得られた1株は十分な量の菌体を得られず同定できなかった。

3) 培養株の確立と餌資源の嗜好性試験

温室培養法で得られた1株、釣菌法で得られた4株中3株は、ススキ草原に設置したミズナラ樹皮より得られたバクテリア *Rhizobium* sp.により、釣菌法で得られた4中1株は大明神の滝より得られたバクテリア *Sphingobium* sp.により二員培養できた。餌資源の嗜好性試験の結果については目下調査中である。

考察

釣菌法による基質・生息地別の頻度算出の結果、ススキ草原でのプロトステリウム類の出現頻度が最も高かつた。これは、ススキ草原より得られた *Rhizobium* sp.により培養できた株が多かつたことと一致するため、即ちススキ草原にはプロトステリウム類が好むバクテリアが多いと解釈される。今後、各地点に生息する餌資源がプロトステリウム類の分布に与える影響を、餌資源に対する嗜好性を通して明らかにしていきたい。また、ススキ稈からの出現頻度はミズナラ樹皮よりも多かつた。餌資源となるバクテリアの基質の嗜好性についても今後調査が必要である。

Table 1. 菅平高原実験センター内4か所に設置した3種類の基質のうちプロトステリウム類の子実体が出現した基質断片数

場所	基質			計
	ススキ稈	アカマツ樹皮	ミズナラ樹皮	
ススキ草原	3	6	12	21 a
アカマツ林	1	0	1	2 b
ミズナラ林	0	2	1	3 b
大明神の滝	0	2	2	4 b
計	4 b	10 ab	16 a	30

異なるアルファベット間、基質間、場所間で有意に出現頻度に差がある事をそれぞれ示す (Fisher の正確確率検定 ; $p < 0.05$)

キクセラ目菌類の昆虫腸内への適応と進化に迫る

大沢 和広 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 出川 洋介 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的) キクセラ目の分類学的背景

菌類は水中で誕生し陸上に進出して大繁栄を遂げた。接合菌門は、陸上に進出して最初に成立した原始的な菌群で、水生昆虫の腸内に共生するトリコミクス綱とその他接合菌綱との2綱に分けられてきた。近年の分子系統解析により、後者に属すキクセラ目と前者に属すハルペラ目とは単系統群を成すことが判明し、現在ではこれらはキクセラ亜門として一つに統合された。しかし、片や水生昆虫腸内共生菌であるのに対し、キクセラ目菌のほとんどは土壤腐生菌であり、その生活様式は全く異なる。これらはどのように進化し成立してきたのだろうか? 予備調査により、2種のキクセラ目の菌類が、ハサミムシ目昆虫の糞より高頻度に出現することを発見した。検討の結果、これらはキクセラ目の進化過程を解く鍵を握っていることが判明したので、ここに報告する。

方法と結果)

①ハサミムシ目昆虫の採集と培養株の確立

二種のハサミムシ目昆虫(ハマベハサミムシ、ヒゲジロハサミムシ)を茨城県で採集した。糞を回収し素寒天培地(抗生物質入り)に接種し、室温で約1週間培養した。糞上で孢子嚢柄形成が確認された場合には、孢子をMEYE培地(富栄養培地)に単離して、培養株を確立し、顕微鏡を用いて観察して同定した。

②昆虫の解剖・消化管内の観察

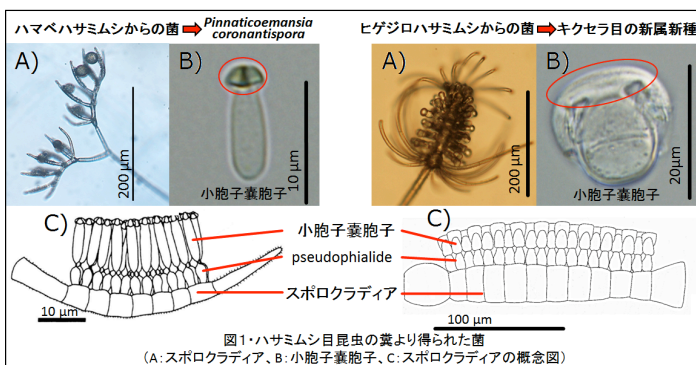
これらの菌が昆虫の消化管内に生息する可能性が予想されたことから、昆虫を解剖して、消化管を摘出し、内壁を光学顕微鏡およびSEMにより精査して、消化管のどの部位(前腸・中腸・後腸)に菌が存在し、どのように挙動しているのかを観察した。

③分子系統解析

分離菌株についてSSU、LSU(D1/D2) rDNA領域の塩基配列を決定し、分子系統解析(最尤法)によりハルペラ目、キクセラ目の他種と比較して、これらの系統分類学的位置を明らかにした。

結果)

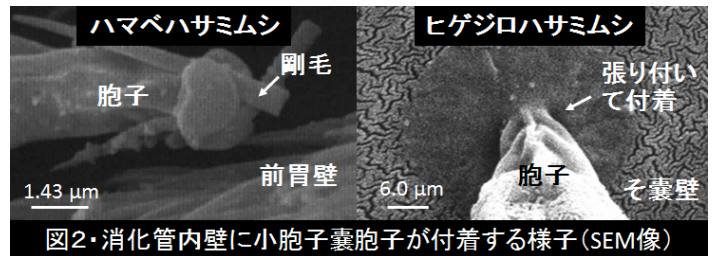
①ハサミムシ目昆虫の糞より得られたキクセラ目菌類



各ハサミムシ目昆虫の糞より単離されたキクセラ目菌類を図1に示した。いずれの菌もキクセラ目菌類の定義を満たす基本的な構造(図1C)を有していた。ハマベハサミムシの糞からの菌は、スポロクラディアが羽状に配列し、小孢子嚢胞子の末端部に特徴的な冠状構造を持つことから、既知種 *Pinnaticoemansia coronantispora* と同定された。ヒゲジロハサミムシの糞からの

菌は、スポロクラディアの両端より放射状に伸びた附属枝、小孢子嚢胞子の末端部に膜状構造を持つ点で、キクセラ目のいずれの既知種にも該当せず、新属新種であると判断された。両者の小孢子嚢胞子に見られる修飾構造は他のキクセラ目菌には知られない注目すべき構造である(図1B)。

②小孢子嚢胞子は修飾構造により前腸に付着して増殖していた



消化管内壁を観察した結果、いずれの菌も、小孢子嚢胞子とその修飾構造の部分により、各ハサミムシ目昆虫の前腸(食道・そ嚢・前胃)壁面に頑強に付着することが判明した。ハマベハサミムシの腸内では三稜形の修飾構造の溝部分で前胃壁に密生する剛毛を挟むようにして付着していたのに対し、ヒゲジロハサミムシでは膜状の修飾構造が展開してそ嚢壁表面に円盤状に張り付いていた(図2)。また両種ともに付着した小孢子嚢胞子は、腸内で発芽成長し、大型の腸内孢子を形成する様子が確認された。この腸内孢子が糞とともに排出されることで、糞上で新たな小孢子嚢胞子を生じるという生活環が明らかになった。

③ハサミムシ目昆虫二種からの菌はキクセラ目の基部に位置

分子系統解析の結果、これら二種はキクセラ目内の基部にそれぞれ独立のクレードをなした。即ち、同目内で最も初期に分化して成立した分類群と判断される。

考察)

水生昆虫共生性のハルペラ目菌は宿主の後腸・中腸に付着する。しかし、本研究で明らかになったハサミムシ目昆虫のキクセラ目菌は、前腸に付着していた。土壤腐生性と考えられてきたキクセラ目菌の中に、昆虫の前腸に付着し、増殖するステージを持つ種が存在していたという事実は全くの新知見である。また系統解析により、これらの菌はキクセラ目内で最も原始的な分類群であることが判明した。以上のことから、キクセラ目菌は、ハルペラ目菌より、腸内と陸上双方での生育ステージを有する種群を経て、次第に陸上での生活に適応して成立してきたと解釈できる。

本研究で解明された2目の中間的な性質を有すキクセラ目菌は消化管内壁への付着のために小孢子嚢胞子末端部の構造を特殊に分化させていたが、これらの菌群と、水生昆虫の腸管壁に付着生活をするハルペラ目の小孢子嚢胞子の内部の微細構造を比較検討することで、更に詳細な進化プロセスを解明することが可能だと考え、現在TEMを用いて検討中である。

シロキクラゲ目における菌寄生性の解明に向けて—*Sirobasidium* 属の分類学的再検討と培養系の確立

山田 宗樹 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 出川 洋介 (筑波大学 生命環境系)

【背景および目的】

担子菌門ハラタケ亜門はいわゆる“キノコ”(大型の子実体)を形成する菌類の中でも最も代表的なグループである。その栄養摂取様式は菌根形成や地衣化等の共生の他に、他生物の遺体を分解する腐生や他生物への寄生等極めて多様であり、生態系において重要な役割を担っている。本亜門の中ではシロキクラゲ綱が系統的に最も基部に位置するとされており(Hibbett et al., 2007)、亜門中で唯一単相世代が酵母状のグループである。本綱の大部分を占めるシロキクラゲ目やフィロバシジウム目菌は吸器状分枝(haustorial filament)という構造で他菌に寄生する菌寄生菌だと考えられている。また菌寄生菌は担子菌門サビキン亜門でも各クレードの比較的基部に位置するため、担子菌門では菌寄生菌から現在見られる多様な栄養摂取様式が生じたのではという仮説が立てられている(Weiss et al., 2004; Oberwinkler, 2012)。この仮説の検証にあたり、シロキクラゲ目の菌寄生に関する詳細な知見が必要だが、先行研究例が少なく、またその分類も混乱している。

そこで本研究では Flegel(1976, 1981) により実験室内で生活環を完遂できることが示された *Sirobasidium magnum* を用い、菌寄生がどのように起きているかを調べるために、交配による菌糸形成および宿主候補菌との二員培養を行った。また本属菌として記載されたが 1962 年の記載以降、報告例、分離培養例ともになく、キクラゲ目に属すのではと疑われてきた *S. japonicum* について分類学的再検討を行い、培養系の確立を目指した。

【材料と方法】

(1)採集と同定

S. magnum は神奈川県足柄下郡真鶴町および同県鎌倉市で 2013 年 6 月 23 日に子実体を採集した。*S. japonicum* は基準標本産地である鹿児島県屋久島町永田を 10 月 5、6 日に、また沖縄県国頭郡国頭村与那覇岳と同村西銘岳をそれぞれ 10 月 13、14 日に調査した。子実体は風乾させて持ち帰り、光学顕微鏡で観察、種同定を行った。

(2)菌株の確立と菌糸形成

子実体を滅菌水で再度湿らせ、孢子落下法により麦芽エキス培地(MEA)上に単担子孢子由来の菌株を複数確立した。得られた酵母状の菌株を 2 株ずつソイトン・ブドウ糖培地(SGA)上で混合し、交配による菌糸形成誘導を試みた。また、試料を DAPI で染色し蛍光顕微鏡観察により菌糸の核相を検討した。

(3)宿主候補の菌の分離と二員培養

各々の菌と同所的に発生していた宿主と推定される子囊菌を同定し、子囊果内の子囊胞子を分離して菌株を得た。各菌株をそれぞれ(2)で得た菌糸体とともに、SGA、コーンミール培地(CMA)、弱麦芽エキス培地(wMYA)上で二員培養し、両者の接触時の挙動を光学顕微鏡観察した。

(4)*S. japonicum* の系統学的位置決定

(2)で得られた菌株を用いて、28S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を決定し、最尤法により系統樹を構築した。

【結果】

得られた *S. magnum* の酵母状の菌株を交配した結果、いくつかの組み合わせでクランプを有し、各細胞中に 2 つの核を含む二核菌糸の形成が認められた。培地中から空中に伸びた菌糸は、本属に典型的な連鎖した担子器、落下性の epibasidia、担子胞子を形成したが、単独培養下での吸器状分枝の形成は見られなかった。また形成された担子胞子は発芽して酵母状に増殖した。同所的に発生していた子囊菌はフンタマカビ綱クロサイワイタケ目の *Whalleya microplaca* (クスノアザコブタケ)と同定された。両者の二員培養を試みたが、現在までに典型的なシロキクラゲ型の吸器状分枝は観察されていない。

S. japonicum に関しては基準標本産地(屋久島)では得られなかったが、沖縄県の 2 箇所で採集された標本の子実体および担子胞子、担子器の形態が原記載(Kobayasi, 1962)と一致し、本種と同定された。本種の単担子孢子由来の菌株も酵母状であったが、得られた 32 菌株全てが交配を経ずにクランプのある二核菌糸を形成した。この菌糸は SGA 上では担子器を形成しなかったが、菌糸を切り出して CMA、wMYA に移植した結果、wMYA 上で担子器、epibasidia、担子胞子の形成が見られ、この担子胞子は酵母状発芽を示した。また原記載時には言及されていなかったが本菌も子囊菌の一種と同所的に発生している様子が観察され、これはクロサイワイタケ目の *Biscogniauxia capnodes* と同定された。現在までに両者の二員培養下での吸器状分枝の形成は観察されていない。分子系統解析の結果、本種はシロキクラゲ目に属したが、目内での分類学的位置については更なる検討を要す。

【考察】

S. magnum の酵母状菌株の交配により、菌糸形成および次世代の誘導ができ、Flegel(1976, 1981)の結果が再現された。一方 *S. japonicum* は Kobayasi(1962)による原記載以降約 50 年ぶりの再発見となり、本研究により初めて培養下で菌糸形成が誘導された。担子胞子が酵母状に発芽するという培養所見や分子系統解析の結果から本種はシロキクラゲ目であることが判明し、キクラゲ目に近縁(Dämon & Hausknecht, 2002)との説は否定された。

S. japonicum は *S. magnum* に比べ貧栄養な wMYA 上でのみ担子胞子を形成したため、両菌で担子胞子形成のトリガーとなる栄養条件が異なる可能性がある。今後培地の条件と担子胞子形成の有無を比較して、この違いを生む要因の検討を進めたい。

本目の *Tremella mesenterica* は単独培養、あるいは宿主との二員培養下でも吸器状分枝を形成するが(Wong et al., 1985; Zugmaier et al., 1994)、本研究では両菌とも、いずれの培養条件下でもその形成は認められなかった。今後は培養条件の改良等により引き続きその形成誘導を試みるとともに、吸器状分枝を伴わない寄生の可能性も視野に入れ、両菌の接触部分で吸器状分枝に見られるような原形質連絡が起きているかを、微細構造の観察により確かめたい。

腸管寄生虫 *Giardia intestinalis* のスプライソソーム構成因子同定の試み

沈 茹菁 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 稲垣 祐司 (筑波大学 生命環境系)

要旨

寄生性真核生物 *Giardia intestinalis* (以下 *Giardia* と称す) では、他の真核生物にはみられない特殊なトランススプライシングによって一部の遺伝子の成熟 mRNA が生成されることが知られている。このトランススプライシングを行うために、*Giardia* のスプライソソームには特異的な構成因子が存在すると考えられる。しかしながら、スプライソソームの構成成分については、*in silico* 解析によって同定された一部の因子以外はほとんど不明である。そこで、*Giardia* のスプライソソームを精製しその構成成分を明らかにすることを目的として研究を行っている。真核生物のスプライソソームに広く保存されている 3 種類のタンパク質、SmD1, SmD3, Lsm3 に注目し、これらにタグを付けて *Giardia* 細胞内に発現させ、それぞれと相互作用をする因子を網羅的に同定するための実験を計画した。現在、これら 3 種類の遺伝子を発現プラスミドに導入したコンストラクトの作成を完了し、*Giardia* の形質転換を行っている。

1. はじめに

寄生性真核生物 *Giardia* において、HSP90 やダイニン α 鎖などの遺伝子のエクソン領域は染色体上の非常に離れた領域に分割されてコードされており、それに伴ってイントロンも分割されている (1)。成熟 mRNA を生成するために、分割イントロンを介したトランススプライシングが行われているが、その分子機構の詳細は未だ不明である。他の真核生物では見いだされないこの特殊なトランススプライシングを行うために、*Giardia* のスプライソソームには特異的な構成因子が存在すると考えられる。真核生物全体で広く保存されているスプライソソーム構成因子については、すでに *in silico* 解析によってそれらのホモログが特定されているが (2)、トランススプライシング特異的因子を含め *Giardia* スプライソソームの全体像は不明である。それを明らかにし、トランススプライシングの分子機構を解明するためには、タンパク質・RNA 複合体であるスプライセオソームを生化学的に精製しその構成成分を解析する必要がある。これにより、*Giardia* が持つトランススプライシングとシススプライシング両方を行うスプライソソームを、ヒトや酵母などが持つシススプライシングを主に行うスプライソソーム、トリパノソーマ (3) などが持つほぼトランススプライシングを行うスプライソソームと比較することが可能になり、スプライソソームの進化的意義の解明や構成タンパク質の働きを更に精査することができるものと期待される。これまで *Giardia* においてはリボソーム (4)、プロテアソーム (5) などの超分子複合体が精製されている。とくに後者では、*Giardia* にタンパク質を発現させるプラスミドベクターを用いて構成成分の特定のタンパク質にタグを付けることにより、プロテアソーム全体を精製し、MS 解析によってその構成成分を明らかにしている。本研究ではこのプロテアソームの精製に成功したプラスミドベクター (AN ベクター) を用いて、スプライソソームの精製と構成成分の解析を試みることにした。

ANベクターには小さなタグである SF TAP tag がクローニングサイトの 5' 側についている。このタグを用いると短い時間かつマイルドな条件でジメチル化の必要のない精製が可能であるので、タグを付加したタンパク質と相互作用する因子を網羅的に精製することができる。

2. 材料と方法

常法に従って *Giardia* を培養し (4)、ゲノム DNA を抽出し、PCR の鋳型とした。スプライソソームを構成する Small nuclear ribonucleo proteins (SnRNPs) の中心部に位置し真核生物全体で広く保存されている Sm proteins のうち、SmD1, SmD3, Lsm3 にタグをつけることとした。SmD1, SmD3, Lsm3 の各遺伝子 (ORF) の全長の 5' 末側に BamHI、3' 末側に NotI の配列を付加した DNA 断片を PCR により増幅・精製した。それを BamHI と NotI で切断した AN ベクターにライゲーションすることにより 3 種類のコンストラクトを作成し、挿入断片の塩基配列を確認した。

3. 結果

正しい挿入断片をもつ 3 種類のコンストラクトの作成に成功した。塩基配列を確認した結果、間違いが見いだされなかったため、現在、これらのコンストラクトを用いて *Giardia* を形質転換しタグ付きタンパク質を発現させるために、エレクトロポレーションの実験を進めている。

参考文献

- (1) Kamikawa et al. (2011) *Curr. Biol.* 21: 311-315
- (2) Bujnicki et al. (2012) *Nucleic Acids Res.* 40(15): 7046-7065
- (3) Shulamit et al. (2010) *J. Biol. Chem.* 285: 27982-27999
- (4) Shirakura et al. (2001) *Mol. Biochem. Parasitol.* 112: 153-156
- (5) Svärd et al. (2012) *Eukaryot Cell.* Jul;11(7): 864-73

ペディノ藻におけるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子の探索

内山 珠希 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 稲垣 祐司 (筑波大学 生命環境系)

背景

渦鞭毛藻類は、2本の鞭毛を持つ単細胞藻類であり、多様な形態や生活様式を持つ。多くの渦鞭毛藻類は、細胞内共生した紅藻類に由来する褐色の葉緑体(ペリディニン型葉緑体)を持つが、中にはさらに緑藻を細胞内共生させ、ペリディニン型葉緑体を緑藻由来の葉緑体に置換した緑色渦鞭毛藻も存在する。これまでの研究において、緑藻由来葉緑体への置換は渦鞭毛藻の系統内で複数回起きたことが示唆されているが、これらの葉緑体の起源となったのは、単細胞緑藻ペディノ藻に近縁な生物であるという共通点を持つ。

ペリディニン型葉緑体を持つ典型的な渦鞭毛藻類のゲノムには、細胞質型および葉緑体型の GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) がコードされており、それぞれ GapC2、GapC1-p と呼ばれる。対して、これまでの研究から複数の系統の緑色渦鞭毛藻類が、細胞質型 GAPDH (GapC2) の他にハプト藻類に見られる葉緑体型 GAPDH (GapC1-fd) に類似したタンパク質を持つことが明らかとなっており、この GapC1-fd が葉緑体で機能していると考えられている。このことは、これら複数の緑色渦鞭毛藻において葉緑体の由来となった緑藻が GapC1-fd を持ち合わせていた可能性を示す。

一般に緑藻類は、シアノバクテリアに由来する GAPDH (GapA) を葉緑体型 GAPDH として使用しており、GapC1-fd をもつ緑藻類は報告されていない。しかし、緑色渦鞭毛藻類の葉緑体の祖先に近縁とされるペディノ藻がどのような GAPDH を持っているかは未知である。本研究では、ペディノ藻ゲノムにおける GAPDH 遺伝子の探索を行い、緑色渦鞭毛藻に見られるような GapC1-fd が存在するか否かを検証した。

材料・方法

ペディノ藻 *Pedinomonas minor* [NIES-363] 細胞から全 RNA を抽出し、アダプター付オリゴ (dT) プライマーを用いた逆転写を行った。得られた cDNA をテンプレートとし、GAPDH のユニバーサルプライマーセット (Fast et al., 2001)、GapC1 に特異的なプライマーセット、および細胞質型 GapC2 に特異的なプライマーセットそれぞれを用いて PCR を行い、GAPDH 遺伝子配列の増幅を試みた。目的の長さの DNA 断片が増幅された場合、この産物をクローニングし、シーケンスを行なった。

結果と考察

ペディノ藻 *P. minor* の細胞から全 RNA を抽出し、オリゴ (dT) プライマーを用いて逆転写を行うことで cDNA を得た。この cDNA を鋳型として、様々な GAPDH 遺伝子配列を増幅するために、まず GAPDH のユニバーサルプライマーセットを用いて PCR を行なった。目的の長さの DNA 断片が増幅されたため、この産物のクローニングを行い、23 クロウンをシーケンスした。得られた配列をクエリとして BlastX による相同性検索を行ったところ、このうち 1 クロウンが緑藻類の GapA に高い相同性を示した。しかし残り 22 クロウンは培養株にコンタミしたバクテリアの GAPDH や、まったく異なるタンパク質のコード領域であることが示唆された。

次に、意図しない配列の増幅を避け、効率的に GAPDH 遺伝子を探索するため GapC1 に特異的なプライマーセット、および GapC2 に特異的なプライマーセットそれぞれを用いて PCR を行なった。その結果、GapC1 に特異的なプライマーセットによる PCR では DNA 断片の増幅が認められなかった一方、GapC2 特異的なプライマーセットを用いた PCR では予想される長さの DNA 断片が増幅された。この産物の塩基配列を決定したところ、2 種類の配列が得られた。得られた 2 種類の配列を用いて BlastX による相同性検索を行なった結果、一方の配列は真核生物の細胞質型 GAPDH (GapC2) と高い相同性を示した。もう一方の配列は既に取得されていた GapA に類似した配列と同一であり、これはプライマーのミスアニーリングによって増幅されたものと考えられる。これらの結果から、*P. minor* のゲノムには、一般的な緑藻と同様に葉緑体型 GapA 遺伝子および細胞質型 GapC2 遺伝子がコードされていると考えられる。加えて、GapC1 特異的なプライマーセットを用いた PCR において DNA の増幅が起こらなかったことから、*P. minor* は GapC1-fd を持たないことが予想される。もし、複数の緑色渦鞭毛藻系統の葉緑体となった祖先生物が *P. minor* のように GapC1-fd を持たなかったと仮定すると、現存の緑色渦鞭毛藻系統は、独立に GapC1-fd を獲得した事となる。しかし、GapC1-fd を持つペディノ藻が *P. minor* 以外に存在し、そのような系統が緑色渦鞭毛藻の葉緑体祖先となった可能性もある。このため、今後の研究においては *P. minor* のみならず他のペディノ藻における GAPDH 探索が必要であると考えられる。

新奇緑色渦鞭毛藻 TRD 株の葉緑体ゲノムシーケンス

森田 幸之介 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 稲垣 祐司 (筑波大学 生命環境系)

背景

渦鞭毛藻は単細胞性の真核生物で、多くのものは紅藻由来の葉緑体 (ペリディニン型葉緑体) を持つ。また、葉緑体を持つ渦鞭毛藻の中にはハプト藻や緑藻に由来する葉緑体を持つものも存在する。これらはペリディニン型葉緑体を持つ渦鞭毛藻が、更にハプト藻や緑藻を細胞内共生させ、これらをオルガネラ化することにより、葉緑体を置き換えたものと考えられている。この現象は三次共生と呼ばれ、この三次共生のメカニズムを解明することは、現在多様な真核光合成微生物が持つ葉緑体の進化と多様性を研究する上で非常に重要である。

近年確立された渦鞭毛藻 TRD 株は緑色の葉緑体を持つ。これまでの研究において、TRD 株の葉緑体ゲノムにコードされた PsaA 遺伝子および少サブユニットリボソーム RNA 遺伝子を用いた系統解析が行われ、本渦鞭毛藻の葉緑体は単細胞緑藻ペディノ藻に近縁であることが明らかになった。このことから、TRD 株はペディノ藻との三次共生によって葉緑体を置換したものと考えられている。本研究においては、渦鞭毛藻 TRD 株の葉緑体ゲノムシーケンスを行い、すでに配列が決定されているペディノ藻の *Pedinomonas minor* の葉緑体ゲノムと比較解析を行うことによって、三次共生のメカニズムを葉緑体ゲノムの観点から解明することを目標とした。

実験方法

私が研究を開始する以前に、所属研究室では渦鞭毛藻 TRD 株の mRNA を網羅的に配列決定したトランスクリプトームデータを取得していた。これまで解析された多種生物のトランスクリプトーム解析から、データ中には mRNA だけでなくミトコンドリアや葉緑体ゲノム断片も混在することがわかっている。そこで、まずそのトランスクリプトームに対して Blastx による相同性検索を行い、緑藻の葉緑体ゲノムコードタンパク質またはシアノバクテリアのタンパク質に高い相同性を示した配列を選出し、これらを TRD 株における葉緑体ゲノム断片であるとした。得られた配列について既知の緑藻遺伝子と比較解析を行い、遺伝子領域を推定した。トランスクリプトームデータから取得した葉緑体ゲノムの部分配列がミスアセンブリに起因するものではないことを確かめるために、その配列からプライマーを作成し、TRD 株から抽出した total-DNA を鋳型として PCR を行い、PCR 産物のシーケンスを行った。また、得られた葉緑体ゲノム部分配列でプライマーを設計し、部分配列間の PCR 増幅を試みた。

結果と考察

相同性検索の結果、渦鞭毛藻 TRD 株のトランスクリプトームデータの中から 33 個の葉緑体ゲノム部分配列 (総塩基数約 45.7 kbp) が検出された。現在のところ、これら葉緑体ゲノム配列のうち、約 15 kbp については TRD 株から抽出した total-DNA を用いて PCR およびシーケンスすることで確認している。トランスクリプトームデータから発見された葉緑体ゲノム部分配列における配列間領域の一部は PCR によって取得され、最終的に 30 個の葉緑体ゲノム部分配列を得た。解析した結果、これらの部分配列上には 55 個の遺伝子がコードされていることが示唆された。検出された遺伝子はリボソームタンパク質遺伝子、光化学系 I および II サブユニット遺伝子、ATP 合成酵素遺伝子、大サブユニットおよび少サブユニットリボソーム RNA 遺伝子などであり、これらはすべてペディノ藻 *Pedinomonas minor* の葉緑体ゲノムにもコードされている遺伝子であった。葉緑体ゲノムにおける最大のシンテニー領域であるリボソームタンパク質遺伝子クラスターを *P. minor* 葉緑体ゲノムと比較したところ、TRD 株においてのみ、複数の遺伝子においてコーディング領域のオーバーラップが認められ、また *rps8* については終止コドンが見られず、下流の *rpl36* と融合していることが示唆された。さらに、この遺伝子クラスターにおける遺伝子間領域は *P. minor* において 30~320 bp ほどであるのに対し、TRD 株では 10~50 bp 程度と比較的短いことが示された。

また、3 つの光化学系 II サブユニット遺伝子 *psbT*、*psbN*、*psbH* は TRD 株の葉緑体ゲノム上にこの順番でコードされていたが、このうち、*psbT* および *psbH* の産物は同一の読み枠にコードされており、*psbT* には明確なストップコドンは確認されなかった。そのため、これら 2 つの遺伝子は *rps8-rpl36* と同様に融合遺伝子となっていると考えられる。

現在のところ、TRD 株の葉緑体全ゲノム配列の解読には至っておらず、ゲノムサイズ・ゲノム全体における GC 含量・コードされる遺伝子数など全体的な特徴は明らかではない。しかし、今回解析した領域に見られる、コーディング領域のオーバーラップや融合タンパク質の存在、比較的短い遺伝子間領域などの特徴は、TRD 株の葉緑体ゲノムが縮退していることを示唆している。これは TRD 株にペディノ藻が三次共生したことによって、葉緑体ゲノムに縮小圧がかかったためだと考えられる。引き続き、葉緑体ゲノムのシーケンス、解析を続けていき、TRD 株の葉緑体ゲノムに特有の特徴または TRD 株の葉緑体ゲノムの全体的な傾向を明らかにしていく。

Euglenozoa 生物におけるピリミジン生合成第 5, 第 6 酵素の高次構造と多様性

伊藤 清香 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 橋本 哲男 (筑波大学 生命環境系)

導入

ピリミジンは DNA や RNA の前駆体として必須の生体成分であり、サルベージ経路と生合成経路によって供給される。ピリミジン生合成経路は 6 段階の酵素反応を介してウリジル酸 (UMP) を生成する経路である。真核生物では本経路の初段 3 酵素および最終 2 酵素に遺伝子融合が認められ、生じた融合酵素は基質のチャネリング等に有利に機能すると考えられる。

第 5 酵素 orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) , 第 6 酵素 orotidine 5'-monophosphate decarboxylase (OMPDC) の分子進化に関するこれまでの研究から, OPRT-OMPDC 融合は真核生物の共通祖先で生じ, その後個々の生物系統で独立に遺伝子再編成が起きた結果, 独立型酵素や逆融合 (OMPDC-OPRT) が二次的に生じたことが明らかとなった¹。また, 融合遺伝子の再編成は全て遺伝子水平転移 (LGT) を伴うことから遺伝子融合の進化の原動力として LGT がクローズアップされている。

真核生物のスーパーグループ Excavata は単系統の生物群 Euglenozoa を含み, これは分岐順にユーグレナ類, ディプロネマ類, およびキネトプラスチダ類で構成される (図)。Euglenozoa における OMPDC, OPRT 遺伝子の構造は著しく多様性に富み, ユーグレナ類では OPRT-OMPDC が, ディプロネマ類では独立型 OMPDC が, キネトプラスチダ類では逆融合 OMPDC-OPRT が存在する²。そこで本研究では, これまで未同定であったディプロネマ類の OPRT をクローニングしその起原を明らかにするとともに, 融合酵素成立の前段階として複合体構造をとる可能性について検討した。

RAxML プログラムを使用し最尤法による系統解析を行った。10 個の最節約系統樹を初期樹形として探索し, 尤度が最大となるものを最尤系統樹として採用した。アミノ酸置換モデルとしては LG+Γ+F を用いた。最尤系統樹の信頼性を評価するために, 100 回分のリサンプリングデータにもとづくブートストラップ解析を行った。

免疫沈降を用いたタンパク質相互作用の検出

D. papillatum OPRT cDNA を発現用プラスミド pET28a (Novagen) に, *D. papillatum* OMPDC cDNA を pET151 (Invitrogen) にそれぞれ組換え, 両プラスミドを用いて大腸菌 BL21 (DE3) Star を形質転換し二重発現系を構築した。発現誘導は 37°C で OD₆₀₀=1.0 まで培養した菌液に IPTG を終濃度 0.5mM で加え, 25°C で 1 時間行なった。集菌後, 超音波処理を行なって得られた上清 (可溶性画分) について, 組換え OPRT に付加された T7・tag に特異的なマウスモノクローナル抗体またはウサギ抗 OMPDC 抗体を反応させ, プロテイン G 結合磁気ビーズを用いて抗体複合体を回収した。回収されたタンパク質を SDS-PAGE で分離し, 特異抗体を用いてウエスタンブロットを行った³。

結果および考察

OPRT の分子系統解析の結果, ディプロネマ類とキネトプラスチダ類が異なる系統群に位置し, ディプロネマ OPRT が LGT 起原であることが強く示唆された。ディプロネマ OMPDC がユーグレナ類 OPRT-OMPDC の OMPDC ドメインと単系統を形成する²ことと合わせると, ディプロネマ類の分岐後に LGT を介して OPRT を獲得し, その後 OPRT-OMPDC の分離および OPRT の置換が起きたと考えられる。また, キネトプラスチダ類は BP 値の高いサポートを受けて原核生物である *Chloroflexi* と姉妹群であることが示され, *Chloroflexi* からキネトプラスチダ類に OMPDC-OPRT の LGT が起きた可能性が示唆された。

大腸菌で共発現させたディプロネマ両酵素の相互作用について, 各酵素の特異抗体を用いてウエスタンブロットを行なったところ OPRT の免疫沈降物中に OMPDC が検出された。また, OMPDC の沈降物中に OPRT が検出された。OPRT および OMPDC の予想分子量はそれぞれ 24kDa および 44kDa であり, 免疫沈降物の SDS-PAGE においても両タンパクに相当する分子量のバンドが確認できた。これらの結果は, 独立型酵素である *D. papillatum* の OPRT および OMPDC が複合体として機能していることを強く示唆している。独立型のピリミジン生合成初段 3 酵素も相互作用を持つ³ことを合わせて考えると, 遺伝子融合の進化において独立型酵素間の機能的な複合体形成が融合酵素の成立の必要条件となっている可能性が示唆された。

参考文献

1. Makiuchi T, et al., *Gene* 394: 78–86, 2007
2. Makiuchi T, et al., *Protist* 159: 459–470, 2008
3. Nara T, et al., *BBRC* 418: 140–143, 2012

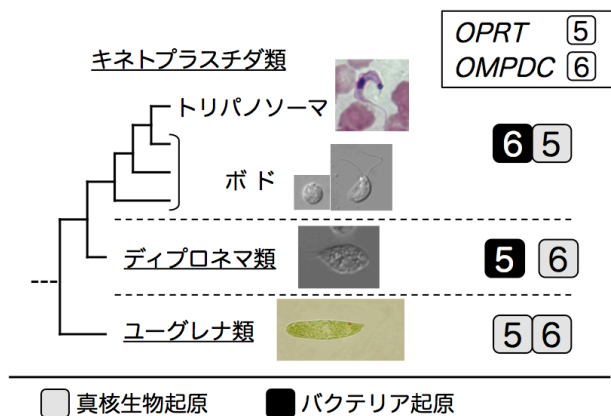


図. Euglenozoa 生物とピリミジン生合成第 5, 第 6 酵素の構造。

材料および方法

Diplonema papillatum の OPRT 遺伝子の同定

ディプロネマ *Diplonema papillatum* のドラフトゲノムに対して BLAST 検索を行ない, OPRT 遺伝子を得た。無菌培養した *D. papillatum* より TRIZOL®試薬を用いて RNA を抽出し, cDNA を合成後, ゲノム配列を元に設計した 5'-端および 3'-端特異的なプライマーを用いて PCR を行ない, cDNA の全長を得た。

分子系統解析

D. papillatum OPRT のアミノ酸配列をクエリとして BLAST 検索を実施し, 得られた配列のアライメントを MUSCLE プログラム及び手動で行ないデータセットを作成した。これをもとに

Carpedemonas-like organisms と培地中バクテリア *Shewanella* sp. との二者培養系の確立

高林 舜 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 橋本 哲男 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

フォルニカータ (Fornicata) は真核生物の分類群のひとつである。この分類群は哺乳類の腸管寄生虫である *Giardia* 属 (ジアルジア) を含む diplomonads や retortamonads、そして *Carpedemonas*-like organisms (CLOs) から構成される単系統群である。フォルニカータに属する生物はクエン酸回路や電子伝達系に関わる典型的なミトコンドリアを失っており、その代わりにミトコンドリアが縮退したと考えられるミトコンドリア関連オルガネラ (mitochondrion-related organelle, MRO) をもつ。MRO はフォルニカータだけに見られるものではなく真核生物の幅広い系統で発見されており、フォルニカータと姉妹群を形成しているパラバサリア (Parabasalina) でも寄生虫である trichomonads (トリコモナス) に存在する。ジアルジアの MRO はマイトソーム、トリコモナスの MRO はハイドロジェノソームと呼ばれる。近年これらの分子細胞生物学的研究は大きく進展しており、マイトソームはハイドロジェノソームよりも機能的、形態的に縮退の度合いが強いということが明らかになっている。

フォルニカータに属する CLOs の多くにも MRO と考えられるオルガネラが確認されておりそれらの大きさはマイトソームより大きいことがわかっている。さらに CLOs が系統的にトリコモナスの分岐とジアルジアの分岐の中間に位置づけられるということが大規模分子系統解析により支持されている。これらのことから CLOs の持つ MRO はマイトソームとハイドロジェノソームの中間的な縮退段階にあると予想され、CLOs はオルガネラの縮退進化の過程を研究する上で重要な生物であると考えられる。

今回研究対象としている CLOs の一種である *Kipferlia bialata* の培養液中には複数種のバクテリアが存在するため各種解析で得られるデータにはバクテリアのものが多量に含まれてしまい問題となる。しかし *K. bialata* はバクテリアを捕食しているため単独での培養は不可能である。そこで本研究では、これらの解析の精度と効率を向上させるために、一種類のバクテリアとの二者培養系を確立させることを目的とした。

材料と方法

K. bialata NY0173 株を 20°C で培養し、800 g、20°C、15 min の遠心分離により細胞を回収した。回収した細胞を密度勾配作成用試薬である Optiprep™ (Axis-Shield 社) を用いて懸濁し 0%、10%、20% からなる段階的な密度勾配をファルコンチューブ内に作成し、20% フラクシオンの底部に 40% に濃度調整したサンプルを注入した。これを 800 g、20°C、20 min 遠心し、各濃度内部および境界面の計 7 フラクシオンからサンプリングし、光学顕微鏡を用いて観察した。*K. bialata* が含まれるフラクシオンを回収後 75% Optiprep で濃度調整し、再び同一の密度勾配を用いて同条件で遠心した。計 3 回の密度勾配遠心を行い最終的に

得られた *K. bialata* のフラクシオンを培地中に存在するバクテリアの一種である *Shewanella* sp. の培養液に混入した。

以上の操作を数回繰り返した。

結果

細胞回収前の培養液 1 L 中に *K. bialata* は 3.1×10^8 cells 存在したのに対しバクテリアは 1.3×10^{11} cells であった。このサンプルを細胞回収のための遠心分離にかけたところ *K. bialata* を 2.2×10^8 cells、バクテリアを 2.2×10^{10} cells 回収することができた。

Optiprep を用いた密度勾配遠心ではそれぞれの濃度の境界面にバンドが見られた。0% と 10% の境界面には *K. bialata* の死骸と少数のバクテリア、10% と 20% の境界面では活発に運動する *K. bialata* が多く見られ、20% と 40% の境界面にはバクテリアが主に見られた。生きている状態の *K. bialata* を回収する必要があるため 10% と 20% の境界面のバンドを回収し次の遠心に用いた。

密度勾配遠心の 1 回目では *K. bialata* を 1.9×10^8 cells 回収することができ、バクテリアは 7.2×10^8 cells であった。2 回目では *K. bialata* を 7.8×10^7 cells 回収したのに対しバクテリアは 3.6×10^7 cells であった。2 回目を終えた時点で *K. bialata* の細胞数がバクテリアの数を上回るという結果になった。3 回目の遠心分離後は *K. bialata* が 5.9×10^7 cells でありバクテリアは 2.2×10^7 cells であった。

最終的に回収できた *K. bialata* の細胞数は開始時の約 19% であった。一方でバクテリアの数を開始時の約 0.017% にまで減らすことに成功し *K. bialata* とバクテリアの比率をおよそ 1 : 1 にまでにすることができた。

今後、実際に培養液中に含まれるバクテリアが *Shewanella* sp. だけになっているかどうかを 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析によって確認する予定である。

アナナスショウジョウバエ類における異種由来染色体の分離比

松橋 潤哉 (筑波大学 生物学類)

指導教員：澤村 京一 (筑波大学 生命環境科学研究科)

【背景と目的】

アナナスショウジョウバエ類の *Drosophila ananassae* は東南アジアが起源とされ、アジア・オセアニアにはこの種に交配可能な近縁種がいくつか存在している。近縁種の一つである *Drosophila parapallidosa* は、1971 年以降ボルネオ島のコタキナバル (マレーシア) で *D. ananassae* と同所的に見つかっている (Matsuda *et al.*, 2009)。*D. ananassae* と *D. parapallidosa* は形態的には雄の性櫛の剛毛数によって区別が可能であるが、類似する点も多く識別が難しい。しかし、第 4 染色体 (組換えが起こらない) に位置するミトコンドリア由来の偽遺伝子 ϕ *COI* により、種の区別が可能である (Sawamura *et al.*, 2008)。

2012 年から 2013 年に、マレーシアのペナン島において採集されたアナナスショウジョウバエ類の大部分は形態的に *D. parapallidosa* であったが、その多くが *D. ananassae* の第 4 染色体を有していた (416 個体)。そして、採集個体およびそれらから作製した単一雌系統には、第 4 染色体が *D. parapallidosa* のホモ (para/para) であるものは 1 個体も見つからず、一部ヘテロ (ana/para) の個体が存在するだけであった (野外採集において 10 個体)。ペナン島では雑種形成を通じて *D. ananassae* から *D. parapallidosa* へと第 4 染色体が浸透していると考えられる。そこで、なぜ para/para ホモ個体が見つからなかったのかを議論するため、第 4 染色体の ana/para の分離比および para/para の生存力を調べた。

【材料と方法】

ペナン島において採集された *D. parapallidosa* の単一雌系統から、第 4 染色体が ana/para の多型であるものを選んだ。その中から雌雄 1 匹ずつを交配させた。産卵後に、掛け合わせた雌雄 (P) の第 4 染色体を調べた。また、次世代 (F1) の第 4 染色体も調べた。この方法により、分離比のデータを集めた。P の組み合わせは以下の 3 パターンで検討した。

- 交配 1 : (ana/ana) ♀ × (ana/para) ♂
 交配 2 : (ana/para) ♀ × (ana/ana) ♂
 交配 3 : (ana/para) ♀ × (ana/para) ♂

第 4 染色体の由来は以下の PCR-RFLP 法により調べた。

• プライマー

5'-CAAGCGGACTGCGACTCAAC-3'

5'-GTGGTTGGCCACTGGATAGG-3'

• PCR 条件

95°C4 分、(95°C30 秒、60°C30 秒、72°C30 秒) × 30 回、
72°C7 分

• 制限酵素 *Ssp* I、*Xsp* I、*Mfl* I

【結果】

データを表 1 に示す。交配 1 より、雄における ana/para の分離比は正常であった。交配 2 より、雌における分離比も正常であった。交配 3 より、para/para ホモ個体の生存力は正常であった。

表 1 : 次世代における第 4 染色体の分離比

交配	ana/ana	ana/para	para/para	合計	χ^2 検定
1	19	29	-	48	n.s.
2	21	27	-	48	n.s.
3	12	24	12	48	n.s.

※n.s.は有意差なし

【考察と展望】

第 4 染色体の分離比および para/para ホモ個体の生存力は正常であり、para/para が見つからなかった理由とはならない。したがって、野外において para/para が少ない理由として、ana に対して para の頻度が少ないため、確率的に para/para は生じにくくなっているということが考えられる。採集データから頻度を算出すると、ana=0.988、para=0.012 となる。よって、para/para の出現頻度は、426 匹採集した場合 0.06 匹と非常に少なく、1 匹見つけることが困難であることが分かる。このように、第 4 染色体において ana から para への遺伝子浸透が見られるが、なぜここまで para が減少してしまったのかは不明であり、今後の研究課題である。

【引用文献】

- 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

下田鍋田湾内に生息するヨコエビ類の分類学的研究

坪田 康平 (筑波大学 生物学類)

指導教員：齊藤 康典 (筑波大学 生命環境系)

〈背景〉

ヨコエビとは甲殻亜門・軟甲綱・端脚目・ヨコエビ亜目に属する生物の総称である。陸域、陸水から深海層にいたるまで広く棲息しており、デトリタス食者が主で体長は多くが数 mm から 1cm 前後である。世界的には端脚目全体で 7000 種超の種が記載されているが、その分類に関しては系統分類学的なアプローチがほとんどされておらず、スーパーグループの設定などにおいて研究者たちの意見が分かれており、早急に分類体系の再検討をする必要がある。

日本においては 300 種以上が記載・報告されているが、主に瀬戸内海、九州北部の沿岸域、陸水などが中心でその他の地域はほぼ手付かずの状態であり、地域特異性の強いヨコエビ相はほぼ解明されていないと言える。

本研究はヨコエビ相の分類学的報告がほとんどなされていない筑波大学下田臨海実験センター付近の鍋田湾内においてヨコエビ類の採集・調査を行ったものである。また、それらの中に未記載種と思われるものもあったため 1 種について記載のためのデータを集めた。

〈材料と方法〉

(1) 磯に生えるヒジキ (*Sargassum fusiforme*) を海水で洗い、落ちたヨコエビを採集 (2) 磯の砂を採取し、ふるいで砂中のヨコエビを採集 (3) 海底からドレッジ及びエクマンバージ採泥器で採取した砂泥中からの採集の 3 通りの方法で採集を行った。採集したヨコエビは 70% エタノールで固定した後、実体顕微鏡下でソーティングした。(1) の方法により得られたサンプルの中に、未記載種である可能性が高いものが 2 種得られた。内 1 種は、実体顕微鏡下で解剖して、生物顕微鏡に取り付けたデジタルカメラでパーツごとの写真を撮影し、それを元にスケッチした。

〈結果と考察〉

正確な分類が出来なかったものも含めると約 32 種が記録され、その内種同定まで済んだものが 8 科 12 種、未記載種の可能性が高いものは 2 種見つけた。未記載種の可能性が高いものの内 1 種 (図 1) は Phliantidae (ミノガサヨコエビ) 科 *Iphiplateia* 属の特徴を備える一方、日本でも報告のある *Iphiplateia whiteleggi* (ミノガサヨコエビ) とは異なる特徴をいくつかもつが、参考文献入手の困難さから記載は見合わせている。もう 1 種、*Protohyale (Boreohyale) shimodensis* (和名：ワキゲモクズ) と仮に命名したもの (図 2) については、25 節以上の第 2 触角、5-6 本の歯状突起をもつ左大顎可動葉、3 つに分枝する右大顎可動葉、基節・坐節に葉状構造をもたない雄第 1 咬脚、後方縁に歯状突起をもたない第 1 腹節側板、外枝の 3 分の 1 ほどの長さの第 1 尾肢柄部末端棘などの形質が Hyalidae (モクズヨコエビ) 科 *Protohyale* 属 *Boreohyale* 亜属の定義と一致する (Bousfield & Hendrycks, 2002)。加えて、(1) 第 1 小

顎の櫛状刺毛列が 2 列 (2) 第 5 胸肢の基節前方縁の基部寄りに 2-4 本の長い刺毛が生える (3) 覆卵葉の縁上刺毛の先端が鉤爪状でなくまっすぐと言った形質が特徴的である。(2) の形質は Tae & Seong (2013) の記録した *P. (B.) triangulata* にもあるが、(1)、(3) の形質はもたないことや、*P. (B.) shimodensis* にはない形質として左大顎可動葉の歯状突起 7 本、尾節板の側方短刺毛などをもつことにより判別が可能である。

その他、既知の *Boreohyale* はいずれも (1)、(2)、(3) の形質をもたないため、*P. (B.) shimodensis* が新種である可能性は高いと言える。

図 1 *Iphiplateia* sp.図 2 *Protohyale (Boreohyale) shimodensis* (仮)

アサガオ花成ホルモン遺伝子 *PnFT1* の発現制御機構の解析

高橋 果歩 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小野 道之 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

植物は自身が成長する栄養成長から子孫を残す生殖成長へと移行する。この成長相の移行を花成と呼ぶ。花成は様々な内生、外生の環境刺激からの複雑なシグナル伝達経路を経て制御されている。花成を誘導する外的環境要因の一つとして光周期(日長)があり、光周期により制御される花成を光周性花成と呼ぶ。今日、光周性花成が最も明らかとなっているのはシロイヌナズナであるが、条件的長日植物として知られている。本研究で用いたアサガオ (*Pharbitis nil*) は、1回の12時間以上の暗期を与えることで花成を誘導し、適さない光周期では花成を誘導しない絶対的短日植物として知られている。この特性から光周性花成研究において有用な植物である。

シロイヌナズナにおける光周性花成では葉で光周期を感受し、花成促進因子である *GIGANTIA (Gd)*、*CONSTANS (CO)* が順に発現し、花成ホルモン遺伝子である *FLOWERING LOCUS T (FT)* の発現が促進される。*FT* は葉において篩部維管束鞘に特異的に発現し、生じた *FT* タンパク質が篩管を通り茎頂へ移動し、花芽形成遺伝子の転写因子 *FLOWERING LOCUS D (FD)* を活性化することで花成を引き起こす。*FT* は光周期以外にも様々な要因により発現するため、花成のシグナル伝達経路における統合遺伝子としても機能する。*FT* プロモーターは花成の決定機構の最重要ポイントとなっている。

シロイヌナズナ *FT* プロモーターと直接相互作用する転写抑制因子 *TARGET OF EAT1 (TOE1)*、*CYCLING DOF FACTOR1 (CDF1)* のアサガオ相同遺伝子 *PnTOE1*、*PnCDF1* は、花成を促進する日長条件で発現が上昇することから花成促進因子として機能すると考えられている。またシロイヌナズナ *TOE1* mRNA は成長相の移行において発現する microRNA172 (*miR172*) の標的部位を持ち、*miR172* により分解が誘発された結果、花成が促進される。*miR172* は植物において保存性が高く、アサガオにおいても *miR172* は *PnTOE1* mRNA の分解を誘発すると考えられる。

本研究ではアサガオ花成ホルモン遺伝子 *PnFT1* の発現制御機構の解析を目的とし、発現領域および発現制御因子を調べるための一連の実験を行った。

【材料】

(1) アサガオ *PnFT1* プロモーター塩基配列の解析

日本の在来品種の中から光周性の実験系統として選ばれたムラサキ (Violet) とメキシコ原産の野生系統である Y031。さらに、アメリカ原産で早咲きを示す近縁種、アメリカアサガオの帰化系統 Q65 (*Ipomoea hederacea*) を用いた。

(2) *PnFT1* pro:: *GUS-GFP* 形質転換体の GFP 蛍光と GUS 染色の観察

Violet の *PnFT1* プロモーターにレポーター遺伝子である *GUS* (β -glucuronidase) に *GFP* (Green Fluorescent Protein) を付加した形質転換体 (*PnFT1* pro:: *GUS-GFP*) を用いた。この形質転換体は *PnFT1* の発現領域を GUS 染色および GFP 蛍光観察で確認することが出来る。

(3) *PnCDF1*-RNAi 形質転換体における花芽形成数調査

Violet の *CDF1* 発現抑制の形質転換体 (*PnCDF1*-RNAi) を用いた。

(4) *PnTOE1* 形質転換体の作製

Violet の不定胚を用いて形質転換体の作製を行った。

【方法・結果】

(1) アサガオ *PnFT1* プロモーター塩基配列の解析

Violet の *PnFT1* プライマーより、Violet、Y031、Q65 のゲノム DNA を用いて PCR 増幅し、増幅した DNA 断片のシーケンスを行い、比較した。

シーケンスの結果、3 系統の *PnFT1* プロモーター塩基配列は全域で相同性が高かった。しかし、Violet において CA 繰り返し配列の数が多く、Y031 において TA 繰り返し配列の数が多くなるなどの違いが見られた。

また、3 系統に 16 時間の暗期処理を 1 回を行い、*PnFT1* の発現リズムを調べる RT-PCR を行うと共に花芽形成数の調査を行った。

(2) *PnFT1* pro:: *GUS-GFP* 形質転換体の GFP 蛍光と GUS 染色の観察

PnFT1 pro:: *GUS-GFP* 形質転換体に 16 時間の暗期処理を 3 回を行い、*PnFT1* の発現を誘導した。GFP 蛍光観察では、子葉の葉脈、葉柄の維管束において蛍光が観察された。GUS 染色では子葉全体が青く染まると共に葉脈、葉柄の維管束で強く染色が観察された。

(3) *PnCDF1*-RNAi 形質転換体における花芽形成数調査

PnCDF1-RNAi 形質転換体と非形質転換体 (Violet) に 12 時間の暗期処理を 1 回を行い、花芽形成数の調査を行った。

(4) *PnTOE1* 形質転換体の作製

miR172 の *PnTOE1* 結合領域の塩基配列に変異を導入したプライマーを用いて PCR を行い、*miR172* 分解耐性を持つ *PnTOE1* の cDNA をクローニングした。また *PnTOE1* の相互作用遺伝子領域を調べるために、免疫沈降に用いるタグ 3×FLAG を *PnTOE1* に付加した cDNA もクローニングした。これらをアグロバクテリウムに導入し、Violet の不定胚に感染させた。

【今後の展望】

(1) アサガオ *PnFT1* プロモーター塩基配列の解析

PnFT1 プロモーター塩基配列の解析から 3 系統における花芽形成数、開花時期などの関係を調べる。

(2) *PnFT1* pro:: *GUS-GFP* の GFP 蛍光と GUS 染色の観察

引き続き GFP 蛍光と GUS 染色の観察を行う。

(3) *PnCDF1*-RNAi 形質転換体における花芽形成数調査

引き続き実験を行うと共に、RT-PCR を行い *PnCDF1* の発現を調べる。

(4) *PnTOE1* 形質転換体の作製

引き続き形質転換体の獲得のため、感染および培養を進める。

【謝辞】

本研究を行うにあたりまして終始ご指導頂きました、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、研究室の皆様へ深く感謝の意を表します。

アサガオにおける光周性花成誘導の分子基盤に関する研究

山本 高広 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小野 道之 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

植物は適切な時期や条件を満たすと栄養成長から生殖成長へ移行し、子孫繁栄のために花を形成する。この成長相の移行を花成と呼び、日長の変化の感知による花成の誘導を特に、光周性花成誘導と呼ぶ。

本研究では、絶対的短日植物であるアサガオ(*Pharbitis nil*)を研究材料として主に用いた。植物学の研究で広く用いられるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)は条件的長日植物であり、光以外の要因も花成に影響しやすい。これに対してアサガオは、長日条件ではほぼ花成を行わず、1回の短日処理によって花成が誘導できることから、光周性花成誘導の解析により適している。本研究では、アサガオの分子基盤を司ると予想される遺伝子について解析し、光周性花成誘導の基本的な理解と新たな知見を得ることを目的とし、(1)概日時計の主要因子である *PnLHY* 及び *PnTOC1* の逆遺伝学的な機能検証、(2)花成の中心的制御因子である *PnCO* の野生種及び近縁種における差異の解析、(3) *PnCO* の分解を行うと予想される *PnCOPI* の機能検証のためのシロイヌナズナ変異体の相補性試験、についての解析を試みた。

(1)光周性花成を行う植物は、概日時計を制御する因子による内生の時間情報と外界からの光の有無の情報を組み合わせ、適切な時期での花成誘導を行う。シロイヌナズナでは朝方遺伝子 *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* と、夕方遺伝子 *TIMING OF CAB EXPRESSION1 (TOC1)* が、遺伝子発現のネガティブフィードバックループを形成し、一日の周期を刻む概日時計の中心とされている。本研究では、これらの相同遺伝子である *PnLHY* 及び *PnTOC1* について過剰発現体(over-expression: OX)と抑制体(RNAi)の形質転換体を作製し、時計の振動を止めた場合に、花芽形成数や花成制御遺伝子の周期的転写発現の変化を調べることで、1回の短日処理による花成誘導がどのような影響を受けるかについて解析することを目的とする。

(2)*CONSTANS (CO)* は、概日時計から花成制御経路へ情報を出力する主要な因子であり、花成ホルモン遺伝子 *FLOWERING LOCUS T (FT)* の発現を制御する。本研究では、*PnCO* 遺伝子の塩基配列や転写発現のパターンの違いと、1回の短日処理による花芽形成数の違いなどを野生種と近縁種を用いて比較解析することを目的とする。

(3)*CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS1 (COP1)* は、E3 ユビキチンリガーゼとして CO タンパク質を分解することで *FT* の発現を調節する。COP1 は、光シグナル伝達においても中心的な抑制の調節因子であり、胚軸伸長などの適切な光形態形成に重要な因子となっている。本研究では、*PnCOP1* cDNA を用いたシロイヌナズナの *cop1-4* 変異体の相補性試験を行い、*PnCOP1* の機能を明らかにすることを目的とする。

【材料・方法】

材料:

アサガオ品種ムラサキ(cv. Violet) 及びメキシコ野生種 Y031、近縁種 Q65(*Ipomoea hederacea*)。シロイヌナズナ野生型(WT: ecotype Columbia)及び *cop1-4* 変異体、*cop1-4* に *PnCOP1*-OX を導入した形質転換体 (近藤 2012)。

方法:

(1)*PnLHY*-OX、*PnLHY*-RNAi、*PnTOC1*-OX、*PnTOC1*-RNAi のコンストラクトを作製した。塩基配列を確認の後、これらのコンストラクトをアグロバクテリウムを用いてアサガオ未熟胚へ遺伝子導入を行った。その後、選抜培地上で不定胚の誘導、選抜、培養を行った。

(2)Violet、Y031、Q65 のゲノム DNA を鋳型として用いて *CO* 遺伝子を PCR 増幅し、塩基配列を比較した。また、3系統の芽生えに1回の16時間暗期を1回与え、*PnCO* の発現リズムを調べる RT-PCR を行うとともに花芽形成数の調査を行った。

(3)先行研究で得られた種子を用いて、選抜培地上で相補体の選抜を行い、*PnCOP1* が相補したと思われるホモラインを得た。この相補体のホモライン、WT、*cop1-4* 変異体を用いて、7日間暗所に置き、胚軸伸長を測定した。その後、3日間明所に置き、緑化を観察した。相補体での *PnCOP1* の発現量を確認するために RT-PCR による発現解析を行った。さらに、相補体ホモライン、WT、*cop1-4* 変異体を用いて、花成時期を調査した。

【結果・考察・今後の展望】

(1)コンストラクトを作製し、塩基配列を確認した。コンストラクトをアグロバクテリウムを用いてアサガオ未熟胚へ遺伝子導入を行った。選抜培地上で不定胚を誘導し、選抜培養中である。得られた形質転換植物体を用いて1回の短日処理による花芽形成数の調査や RT-PCR による各種遺伝子の発現解析を行う計画である。そして、これらの遺伝子の機能解明とアサガオにおける短日性花成の概日時計の様式について解析する計画である。

(2)Violet、Y031、Q65 について *PnCO* の塩基配列を確認した結果、その相同性は3系統間で高かった。1回の16時間暗期処理後の *PnCO* の RT-PCR による発現解析及び花芽形成数の調査を行う計画である。

(3)暗所発芽実験を行った結果、相補体が WT と同様の胚軸伸長や緑化反応を示すことがわかった。このことから光形態形成において *PnCOP1* は *COP1* と同等の機能を持つことが確認された。RT-PCR による *PnCOP1* の発現量解析の結果と、花成時期との関連を解析する計画である。

【謝辞】

シロイヌナズナ *cop1-4* 変異体を分譲いただきました京都大学の拓殖知彦准教授に御礼申し上げます。本研究を行うにあたり終始ご指導頂きました、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、研究室の方々に深く感謝の意を表します。

酵母ワンハイブリッド法によるジャガイモ環境ストレス応答性転写因子 *StDREB1* の単離

遠藤 司 (筑波大学 生物学類)

指導教員：菊池 彰 (筑波大学 生命環境系)

§ 背景と目的

近年、塩害や気候変動による農作物の生産量の減少が深刻な問題となっている。農作物の効率的な生産は食糧問題の根本を支えている重要な課題である。ジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) はイネ、コムギ、トウモロコシに並んで重要な農作物であり、優れた栄養価から、食糧問題緩和への貢献が強く期待される。また、ジャガイモは食糧としてだけではなく、澱粉原料としても利用されるため、大きな需要がある。しかし、塩害や霜害はジャガイモの生育に大きな影響を与え、収量の低下を招くため、環境ストレス下での生産量の維持が課題である。そこで、生産力の向上やジャガイモの栽培が可能となる面積を拡大するために、環境ストレスに強いジャガイモの作出が望まれる。

効果的に目的形質を付与するには、対象作物の遺伝的、生理的特性に関する情報が必要である。植物は環境ストレスに対して遺伝子発現レベルで応答しており、ストレスによって誘導される遺伝子の多くはストレス応答性転写因子によって制御される。多くの高等植物種で保存されている環境ストレス応答性転写因子として、Dehydration Responsive Element Binding protein 1 (DREB1) ファミリーが知られている。DREB1 はシス因子である Dehydration Responsive Element (DRE) と相互作用して下流遺伝子の発現を制御することが明らかとなっており、これら下流遺伝子は、環境ストレス耐性の発揮に関わる機能を持つものが数多く報告されている。また、*DREB1* 過剰発現植物では環境ストレス耐性の向上が報告されており、ジャガイモにおいても *DREB1* 過剰発現による環境ストレス耐性の向上が確認されている。そこで、ジャガイモ内在性の *DREB1* (*StDREB1*) の存在が示唆される。*StDREB1* の単離と機能解析は、ジャガイモの環境ストレス応答機構の解明につながるとともに、より効率的な品種改良における重要なヒントとなり得る。しかし、DRE 結合性が示された *StDREB1* の単離例は無い。

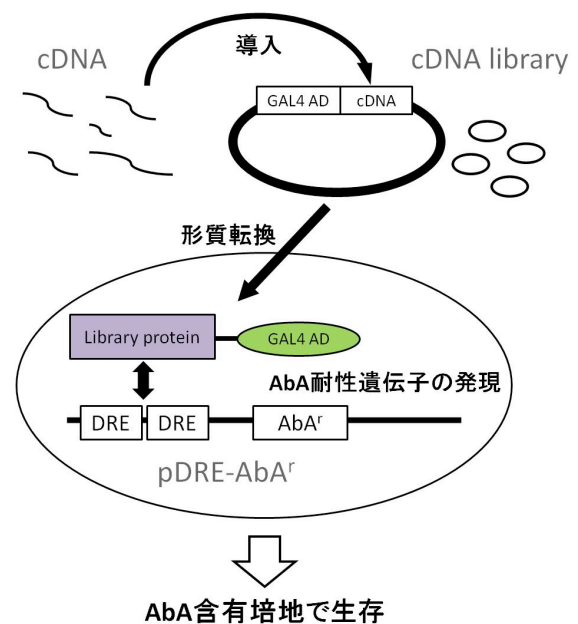
本研究では、環境ストレス下で誘導される *StDREB1* の単離を目的としている。

§ 材料と方法

酵母ワンハイブリッド法により、DRE と相互作用するタンパク質をコードする cDNA の選抜を行うため、まず、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に DRE と Aureobasidin A (AbA) 抵抗性遺伝子を含む選抜ベクター (pDRE-AbA^r) を導入し、DRE 結合因子を選抜するための菌株を作製した。

一方で、ジャガイモの品種 Desiree に乾燥 (-1.8 MPa PEG)、低温 (4°C)、塩ストレス (200 mM NaCl) 処理をそれぞれ 4 個体ずつ施し、2 時間後に茎頂付近の葉から RNA を抽出した。さらに、逆転写反応により cDNA を合成し、GAL4 転写活性領域を含むベクターに導入することで cDNA library を作製し、これらを選抜用菌株に導入した。Library 形質転換株では Library タンパク質と GAL4 転写活性領域との融合タンパク質が生産される。

導入された cDNA によって選抜用菌株内で DRE 結合因子が生産された場合、その菌株は GAL4 転写活性領域の働きにより AbA 抵抗性遺伝子の発現が誘導され、AbA 耐性を獲得する。したがって、AbA を含む培地で Library 形質転換株を培養することにより候補遺伝子のスクリーニングが可能となる。選抜により得られた菌株に導入された cDNA の塩基配列を解析し、BRAST 検索によりデータベース上の配列情報との相同性を評価し、転写因子の候補を得た。



図：酵母ワンハイブリッド法

§ 結果と考察

AbA (100 ng/ml, 150 ng/ml) を含む培地に Library 形質転換株を播き、得られた菌株のうち、562 サンプルの cDNA インサートチェックを行い、導入された cDNA の長さから配列解析を行うサンプルを決定した。200 bp 以上の cDNA が挿入された 61 サンプルの cDNA 配列をダイレクトシーケンスにより解析し、得られた配列を BRAST 検索にかけた。

その結果、乾燥ストレス応答性因子や、核酸結合活性を持つ配列が得られた。このことから、今回用いた cDNA library は環境ストレスによって誘導された遺伝子が含まれていることが示される。

導入された cDNA によって酵母内で生産されるタンパク質は、GAL4 転写活性領域との融合タンパク質であるため、発現したタンパク質が物理的に pDRE-AbA^r に結合すると AbA 耐性遺伝子が発現し、選抜用菌株は AbA 耐性を獲得する。したがって、転写活性領域の有無に関係なく、pDRE-AbA^r への結合性を持つ cDNA が単離されたと考えられる。

本発表にて、研究の詳細と引続き Library 形質転換株の cDNA インサートチェックと配列解析を行った結果を報告する。

コリンオキシダーゼ遺伝子導入ユーカリ (*E. globulus*) の特定網室における耐塩性評価と 生物多様性影響評価

増田 崇人 (筑波大学 生物学類)

指導教員：菊池 彰 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

近年、地球規模の環境変動や環境破壊により植物が生育できない土地が拡大している。人類活動による土壌の塩類集積もその一例で、さらなる砂漠化の原因にもなっている。そこで、環境悪化に歯止めをかける手段の一つとして塩類集積地でも生育可能な耐塩性植物の環境植林が挙げられる。本研究では遺伝子組換え技術を用いた耐塩性ユーカリの開発、および評価手法に関する研究に取り組んでいる。塩生土壌微生物 (*Arthrobacter globiformis*) 由来のコリンオキシダーゼ遺伝子 (*codA*) の植物への導入は、適合溶質として知られるグリシンベタイン (GB) を増加させることで耐塩性に寄与することが知られており、本研究でも既にユビキチンプロモーターで *codA* を発現誘導した組換え *Eucalyptus globulus* (*Ubi-p::codA*)、および *Eucalyptus camaldulensis* における耐塩性向上を確認している。本研究では、新たに作出した CaMV35S プロモーターで *codA* を発現誘導した *E. globulus* (*35S-p::codA*) について、特定網室における耐塩性および生物多様性影響に関する評価試験を実施した。

材料と方法

1. 植物材料： 宿主植物はユーカリ (*E. globulus*) とした。*35S-p::codA* 4 系統 (N3-1, N3-15, N3-26, N6-9)、*Ubi-p::codA* 5 系統 (P1-12, P1-9, P2-1, P12-1, P105-2)、および非組換え体 2 系統 (Au1, M001) の培養苗は共同研究先の日本製紙 (株) から提供された。培養苗は、四角錐ポットに移植して栽培室で馴化した後、特定網室で直径 10.5 cm の黒丸ポットに移植し、10 週間の馴化を行った。馴化後、高さを基準に通常灌水と塩水処理の 2 つのグループに分け、耐塩性評価試験に供した。

2. 耐塩性評価試験： 塩処理は、昨年度石川が *E. camaldulensis* を用いて開発した方法 (75 mM NaCl 水溶液を週 3 回ポット底面から吸水) に従った。水道水を底面吸水したものを対照区とした。試験には各系統 4~15 個体を供した。塩処理は、2013 年 5 月 21 日から 2013 年 7 月 19 日まで 9 週間実施した。処理期間終了後、さらに 7 週間、水道水による通常灌水に切り替え観察を継続した。試験期間中は、およそ 1 週間毎に植物の外形観察、樹高および基部直径の計測、吸水毎に土壌の電気伝導度 (EC 値) の測定をした。

3. 生物多様性影響評価： サンドイッチ法によるアレロパシー検定と、平板培養法による土壌微生物調査を実施した。サンドイッチ法は 6 穴プレートの各穴に乾燥ユーカリ葉および寒天を入れ、各穴の各培地表面に検定植物としてレタス種子 5 粒を播種、室温暗所で培養し、3 日後の発芽率、胚軸長および根長から評価した。平板培養法は、ユーカリを栽培したポット中の土壌を採取し、リン酸バッファーに懸濁し、懸濁液を OGYE 培地および PTYG 培地に塗布し、それぞれ 3 日および 5 日間室温暗所で培養し、生菌数を計測することで評価した。

結果と考察

1. 耐塩性試験： 塩処理開始後 2 週間で EC 値 8 mS/cm に達し、その後試験期間中 EC 値 8~10 mS/cm の範囲で保持された。このことから本処理方法は長期間にわたり一定の塩ストレス条件の土壌環境を模すのに適することが確認された。塩処理開始から 7 週後で非組換え系統はすべて枯死したが、組換え系統では生存するものが認められ、特に *35S-p::codA* 系統では多くの系統が生存した (図)。*35S-p::codA* 系統の高い生存率は *codA* の高発現により、*Ubi-p::codA* 系統よりも GB が多く蓄積したためと考えられる。しかし、対照非組換え系統がすべて枯死したのをはじめ、多くの個体が枯死したため、成長量による比較はできなかった。これは、本処理方法が別種のユーカリの結果に基づいて設計されたものであり本試験に用いた *E. globulus* への塩ストレスとしては強かったことが考察され、*E. globulus* に対して塩ストレス下の成長量による耐塩性評価を行うには、より低濃度の塩水による試験が有効と考えられる。

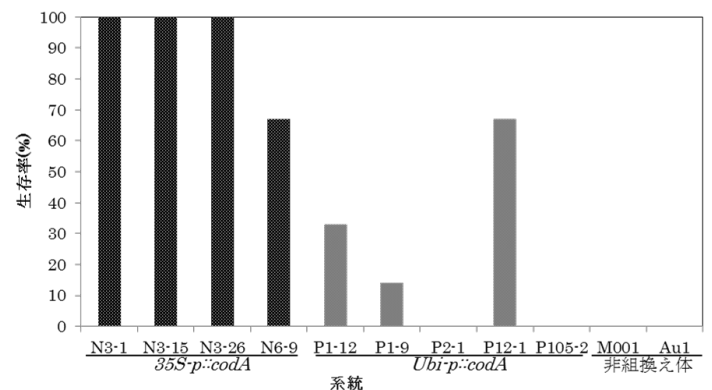


図 塩処理終了時の生存率

2. 生物多様性影響評価： アレロパシー検定および土壌微生物への影響は、組換え体 (*35S-p::codA*) と非組換え体の間で有意な差は認められなかった。一方、アレロパシー検定では、塩処理区と対照区の間で有意な差がみられた。そこで、検定に用いた葉の Na⁺イオン含量を測定したところ、塩処理区の葉の含塩量が対照区より高かったことから、葉に含まれる塩が検定植物の生育に影響したものと推察した。

まとめ

CaMV35Sプロモーターにより従来型系統よりも *codA* を高発現することでより多くの GB を蓄積した新たな系統は、従来型 *codA* 発現系統よりも優れた耐塩性を示した。また、生物多様性に対する影響は対照非組換え体と同等であることを確認した。今後、本研究の結果をもとに詳細な耐塩性評価や隔離ほ場試験等が実施され、将来の本組換えユーカリの塩類集積地への環境植林へとつながることを期待する。

花粉症治療に向けたスギ・ブタクサ花粉アレルゲン生産系に関する研究

岡澤 梨沙 (筑波大学 生物学類)

指導教員：三浦 謙治 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

アレルギー疾患の中でも花粉症はメジャーである。特に日本で最も多いスギ花粉の花粉症患者は2500万人にも及ぶ。抗ヒスタミン剤や抗ロイコトリエン剤などの薬があるが、これらは一時的に症状を緩和するにすぎない。そこで近年、減感作による根治治療が提案されている。減感作療法とはアレルギーの原因物質(アレルゲン)を体に徐々に与え、免疫グロブリンの反応性を弱めていく免疫寛容という方法である。花粉症の場合、花粉アレルゲンを投与する。この方法では従来注射によってアレルゲンエキスが投与されてきたが、何年も投与し続けなくてはならず痛みを伴う注射は患者への負担が大きく副作用などの問題もあった。そこで舌下減感作療法という方法が提案された。この方法では花粉アレルゲンを直接舌下に投与するため、注射よりも患者への負担も少ない。また舌下はリンパ腺に近い部位であり、粘膜への効率的な吸収が可能となる。WHO(世界保健機関)もこの舌下減感作療法が有効かつ安全な治療法として推奨している。

しかし、この方法を適用するには、注射に比べて5~10倍のアレルゲンを必要とする。現在の治療法では花粉エキスをを用いている。治療に必要な花粉アレルゲンを計算すると、患者10万人に対して1年間処方する場合、花粉量に換算して2tも必要とする。しかし実際にその量の花粉を集めるのは難しい。

この問題を解決するため、花粉アレルゲンの大量調製はこれまでも研究されてきた。しかし、大腸菌や酵母などから得られたタンパク質はアレルギー活性がなく、不溶化してしまい、精製が困難であった。そこでタンパク修飾が植物由来であればアレルギー性をもつ花粉アレルゲンの大量調製が可能となるのではないかと考えられた。植物体での花粉アレルゲンの調整の研究はすでにイネで行われている。ただし、イネの場合植物の上層部にしか米が実らないため、全体のバイオマスを考慮すると効率が悪い。またイネ由来のアレルギーが発生する可能性がある。これに対しレタスは植物工場で大量に生産することが可能であり、レタス由来のアレルギー症状はほとんどない。そこで本研究ではレタスを使ってアレルゲンを調製していくことを目的とした。

【材料・方法】

本研究では花粉アレルゲンを発現するレタス形質転換体の作製、レタスでの花粉アレルゲンの一過性発現と精製方法の検討を行った。

形質転換体の作製では、まず標的タンパク質を発現する導入ベクターを作製し、アグロバクテリウムに形質転換を行った。アグロバクテリウムを含む培地を作製し、発芽したレタスの子葉の先端を切って培地に入れて感染させた。子葉切片を約1ヶ月培養し続け、カルスが出たものを選抜し、次に不定芽・不定根が出るまで培養を継続した。不定芽や不定根が大きくなったものは土に植え替え、低湿度の環境にゆっくりと馴らした。その後も種子が採取できるまで形質転換体の育成を続けた。

レタスでの花粉アレルゲンの一過性発現の方法は、まず同様に標的タンパク質を発現する導入ベクターを作製し、アグロバクテリウムへの形質転換を行った。アグロバクテリウムを含む培地にレタスを漬け、バキュームで減圧し感染させ、3日間培養した。このレタスの葉をすりつぶして硫酸沈殿を行い、透析にかけた。その後、各種クロマトグラフィーによるタンパク質の精製を行った。

【今後の予定】

スギ・ブタクサ由来花粉アレルゲンの精製純度を上げるため、様々なクロマトグラフィーを組み合わせる予定である。

南米アンデス山系の氷河後退域における微地形に着目した植生の変化

三村 琢磨 (筑波大学 生物学類) 指導教員：廣田 充 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

今日の地球温暖化の影響として、熱帯高山帯における急激な氷河後退があげられ(IPCC AR5, 2013)、氷河後退の実態が分かりつつある(A. Rabatel *et al.* 2013)。しかし、氷河後退が周辺の生態系に及ぼす影響については、十分に分かっていない。氷河後退は植生を中心とした生態系全体を大きく改変する可能性が高く、これを明らかにすることは極めて重要である。昨年から日本チームによる熱帯高山である南米アンデス山系の氷河後退域における調査を開始した。これまでの調査から、対象地域における植物の出現種や氷河後退後に最初に出現する先駆種(*Senecio rufescens*)の大まかな分布状況などが、明らかになっている。しかし、未だに詳細な分布状況はよく分かっていない。そこで私は、それを明らかにすべく、氷河後退域に特有のモレーン(氷河移動によって形成される大小の凹凸地形、右図参照)に着目して、(1)急速に氷河が後退している南米アンデス山系の植生の現状把握とその特徴、(2)先駆種 *S. rufescens* の詳細な分布の把握を目的として研究をおこなった。特に、それらモレーン付近の凹んだ地点(モレーン底部)を対象として、微地形と植生の関係について調べた。

方法

調査はボリビアのアンデス山系のチャルキニ峰(5392m)西カールで行った(右図)。調査地は主に礫地で、氷河地形であるモレーンが多数(13個)存在している。以下に項目を挙げる。

1. モレーン底部での植生調査

西カール内の標高と成立年代が異なる計13個のモレーンから、そのモレーン底部に並行する方向に長さ40mのラインを5本設置した(T1: 4530m、T2: 4570m、T3: 4612m、T4: 4650m、T5: 4889m)。次に、それぞれのラインにそって2m置きに2m x 2mの方形枠を設置し、枠内の各パラメータを測定した。パラメータ内容は以下のものである(植被率(%)、裸地率(%)、出現種、最大礫サイズ(cm)、傾度(南-北、西-東))。

2. *S. rufescens* の植生分布調査

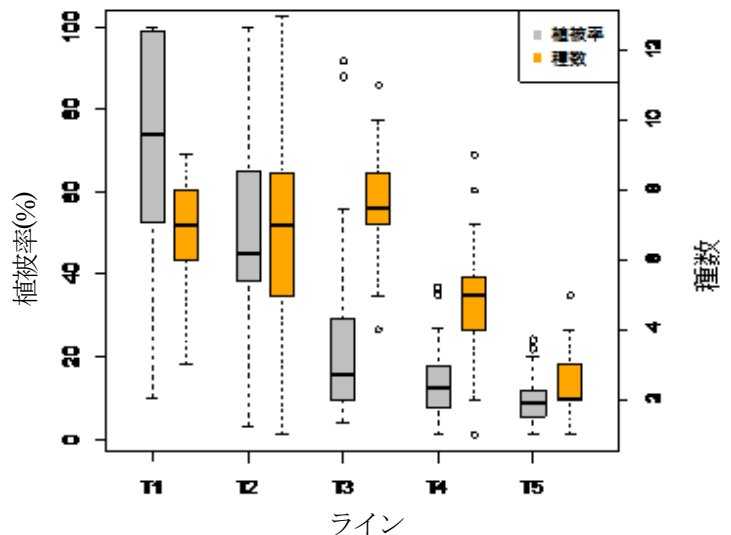
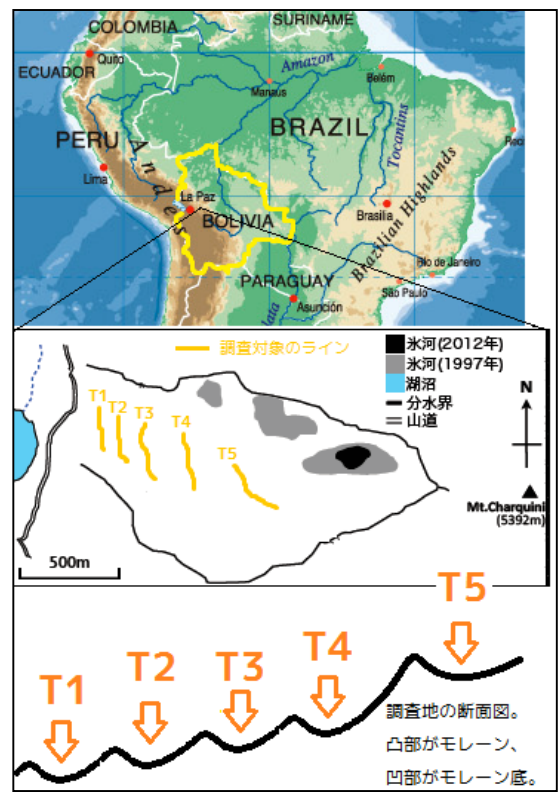
西カール内の異なる標高のモレーン上(礫地)の10箇所、モレーンの間(砂地)の6箇所に半径10m(一部半径5m)の円形区を設置し、調査区内に出現した先駆種 *S. rufescens* の個体数と草丈(cm)を測定した。また、西カール内の異なる標高5箇所(4300m-4900m)でサンプリングを行い、十分に成長した葉の断面構造の観察と、葉緑体DNAを用いた系統分析を行った。

結果・考察

植被率は標高の高いほうへ向かって減少していく傾向がみられた(グラフ)。ただし、T3ライン(4600m)をこえると植被率はあまり減少しなくなっていた。種数も標高の高い地点ほど少なくなる傾向がみられたが、その減少は植被率よりも高標高のラインでみられた。また昨年行われたモレーン上部の調査結果と比較すると、各モレーンでの植被率や種数の変化には大きな差が見ら

れなかったことから、植生の発達においてはモレーンの上部底部という環境差より標高の影響が大きいことが分かった。また更にミクロな視点で見た場合、傾度が大きい場所(≧10度)は植被率が2倍以上高い傾向が見られた。これは植生がさらに小さな地形の影響も受けている可能性を示唆している。

初年度の調査でモレーン上で頻繁に確認され優占種でもあった *S. rufescens* は、今回の調査ではほとんど発見できなかった。このことから、*S. rufescens* はモレーン上部の環境を好む植物であることが示唆された。その個体サイズについては、標高があがるとともに草丈が70cmから20cmほどに減少する傾向がみられた。残りの項目については、発表時に報告する予定である。



上：調査地の概要。 下：ラインごとの植被率、種数の推移。

高山植物ガンコウランの温暖化処理による生理特性の変化

上原 明葉 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 廣田 充 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

近年進行している地球温暖化により、次の 100 年で世界の平均気温が 1.0 から 3.5 °C 上昇すると報告されている (Houghton *et al.* 1996)。特に、高山帯や高緯度地域は温暖化の影響が早期に顕著化しやすいと考えられているため、そこで生きる植物の応答の変化について関心が高まっている。先行研究により温暖化処理によって、最大光合成量が減少する (Shen *et al.* 2009)、種によって成長やガス交換速度の応答が異なる (Shi *et al.* 2010)、強い光阻害を示し呼吸量が増加する (Heskel *et al.* 2013) ということが報告されている。しかしながら、それらの結果は、長くても数年程度の温暖化処理によるものがほとんどであるうえに、処理年数によって応答が異なることも報告されている。そのため、植物の温暖化への応答をするには、長期的な温暖化処理実験処理による植物の応答の把握も不可欠である。

本研究の調査地である長野県木曾駒ヶ岳山頂付近には、オープントップチャンパー (以下 OTC) を用いた温暖化処理区が設けられている。1995 年から現在に至るまで継続して維持管理されているため、長期的な温暖化処理による影響を観察するのに最適なサイトといえる。今回着目した高山植物のガンコウラン科ガンコウラン *Empetrum nigrum* は OTC 設置後に増加し優占している。このことから、*E. nigrum* を対象植物とした。本研究は高山植物ガンコウランの長期温暖化処理への適応、特に成長過程について知見を蓄積することを目的とし、対照区と温暖化処理区の異なる環境で生きる植物の生理特性の比較を行なった。

方法と調査地

調査は、長野県木曾駒ヶ岳山頂付近 (2960 m) で行なった。温暖化効果をもたらす OTC は、その内部の気温が外部よりも約 2 °C 高くなるように設計された半閉鎖系の小型温室である。高山植物の主な生育期間である 2013 年 8 月に OTC 内で優占しているガンコウラン *E. nigrum* を対象として、光合成および蒸散速度、さらに OTC 内外の微環境を測定した。*E. nigrum* は葉のサイズが極めて小さく、通常の光合成・蒸散速度測定装置で測定を行うことが出来なかったため、私は高山環境でも使用可能な小型の測定装置を製作した。2013 年 8 月 4 日の日の出前から日没までの間に同装置を用いて、*E. nigrum* の光合成および蒸散速度を測定した。基本的には自然光下で測定を行い、光 - 光合成曲線を得るために必要に応じて寒冷紗や暗幕を利用して光条件を変えながら測定を行った。微環境の測定は、温湿度ロガーと小型の光子センサーを用いた。

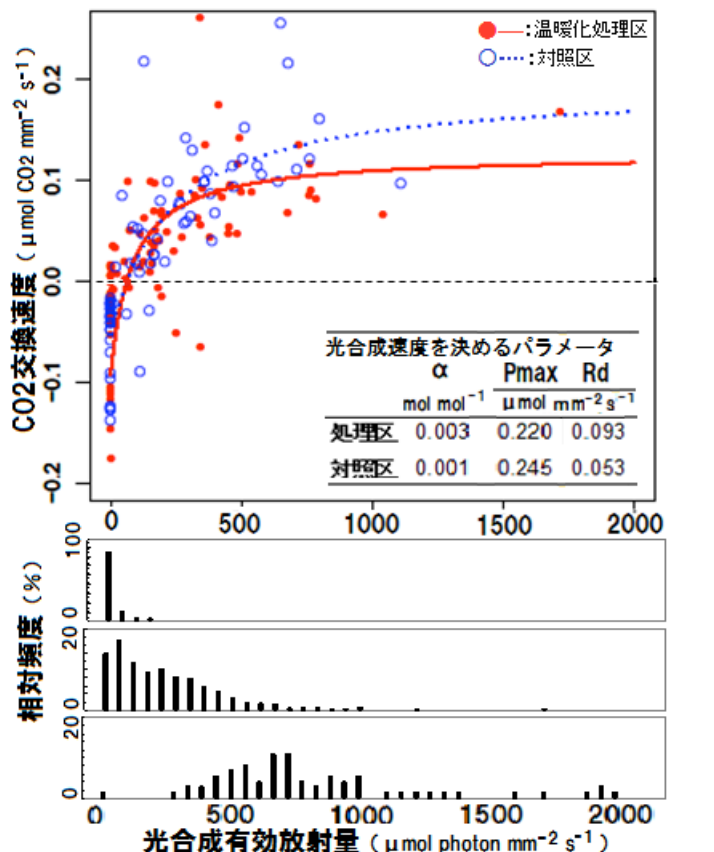
調査後、現地で *E. nigrum* の葉を採取し速やかに固定して、実験室に持ち帰った。いくつかの操作を経た後、葉の断面観察と成分 (炭素・窒素濃度) 分析を行った。

結果・考察

調査地付近の 8 月平均気温は 14 °C (駒ヶ岳ロープウェイ HP より) である。したがって測定時の平均的な光条件は、光頻度を

表した 3 つのグラフ (図 1 下) の内、中央のヒストグラムに近いと予想される。このとき、温暖化処理区と対照区の光合成速度に顕著な差は見られなかった。一方、平均気温よりも高温条件では強光の頻度が高くなっているため、強光下でも光合成速度が大きい対照区の植物が有利であることが示された。また、処理区内の初期勾配は対照区の 3 倍あったことから、光を無駄なく利用しているということが分かった。

図1 光 - 光合成曲線と光頻度分布



α : 光利用効率 (初期勾配)、 P_{max} : 光飽和状態での最大光合成速度、 R_d : 暗呼吸速度。ヒストグラムは上から順に、低温・中温・高温の3つの温度帯に対応。

一般的な植物は、純生産量 (Gross) の約半分を呼吸 (R_d) として消費していると考えられている。対照区は一般的な植物と同様の特性があることが示された (表 1)。総生産量 (Net) を Gross で除した生産効率をみると、処理区は対照区の約 1/6 程度と極めて低い効率であることが明らかになった。これは高い呼吸量に起因するものである。温暖化処理に適応したガンコウランは、光を無駄なく利用することができ、対照区と同程度の生産物を生み出すことができるが、高い呼吸量を示すために成長への分配が非常に小さくなる傾向があると示された。

表1 測定日 (2013/08/04) の推定炭素収支

	Net	R_d	Gross
	$\text{m mol mm}^{-2} \text{ day}^{-1}$		
温暖化処理区	0.4	4.6	5.0
対照区	2.4	2.7	5.1

死んだ木はいつなくなる？ —三宅島噴火後の枯死木分解に関する研究—

神谷 なつみ（筑波大学 生物学類） 指導教員：廣田 充（筑波大学 生命環境系）

背景・目的

枯死木は直径 10 cm 以上の倒木、根株、立ち枯れを指し、森林生態系に特有のものといえる。この枯死木は、現存量が多いうえに、他の有機物に比べて枯死してから分解されるまでに非常に長い時間を要する。したがって、森林生態系の物質循環において有機物の貯蔵庫として高い炭素貯留機能を果たしていると考えられている (Maser et al. 1988)。また、枯死木は山火事や地滑り等の巨大な攪乱後に大量発生し、そういった荒廃地で生息する生物にとっての貴重な生育場所あるいは資源となっている (Harmon et al. 1986)。さらに、土壌の水分環境にも多大な影響を与えている。噴火もそういった巨大な攪乱の一つであり、2000 年に噴火した三宅島には大量の枯死木が存在するが、その枯死木の動態についてはわかっていない。

そこで本研究では、そういった現状の三宅島において、枯死木の分解速度およびその制限要因の解明、さらには枯死木の変化量の推定、つまり”今存在する枯死木はいつなくなるか？”を目的とした。

方法

本研究は、東京都三宅島三宅村を調査地とした。ここに噴火被害程度が異なる 8 つの固定調査区 (10 m×10 m) を設置して、下記 4 項目の調査を行った。

1. 固定調査内の枯死木の調査

・切り出し枯死木サンプルの設置と測定

2012 年 4 月各調査区内に存在していた枯死木の一部を長さ 20cm 程度に切り出して、初期重量およびサイズを計測したのち、現場に設置した。一年後の 2013 年 4 月に再計測し、その減少率を用いて枯死木の分解速度定数を算出した。

・固定調査区内に存在する全枯死木のサイズ測定

2012 年 10 月と 2013 年 10 月に、各調査区内に存在する全枯死木の直径と長さを測定した。2 回分の計測結果から、枯死木の全体的な変化量と、その調査区内における全枯死木の質量の総量を算出した。

2. 固定調査区の調査

・土壌水分率の測定

各調査区の中心に土壌水分計を埋設し、表層土壌の含水率を 2012 年 4 月から 2013 年 4 月まで、15 分に 1 回の間隔で測定した。

・調査区外にある林冠木の胸高直径の測定

噴火前の植生状況を推定するために、各調査区外の周辺に存在する林冠木からランダムに 20 本選び、胸高直径を測定した。

結果・考察

1. 枯死木の存在量について

2012 年における枯死木存在量は、Y1 が最も多く、N1 が最も少なかった。一方、調査区外にある林冠木

の胸高直径の最大直径と相関性がみられた (Figure1)。このことから、枯死木の存在量はその森がどれだけの攪乱を受けたかではなく、そもそもの森の規模や林齢によって決まる可能性が示唆された。

2. 枯死木の分解速度について

各調査区間で大きさのばらつきはあったものの、全体として腐朽段階が上がるほど分解速度が速くなる傾向が見られた。また各調査区の平均分解速度は、土壌含水率と相関性が見られた (Figure2)。このことから、分解速度はその場所の土壌含水率の影響を強く受けていることが示唆された。

3. 枯死木の変化量について

2012 年の枯死木存在量と分解速度定数を用いて、計算上の 2013 年当時の枯死木存在量を試算した。その試算値と 2013 年の実測値を比較した結果、Y1 が最も新規の枯死木が多く、最も少なかったのは IG7 であった。さらに、2012 年に存在した枯死木がすべて分解されるまでにかかる時間を調べた結果、最も長い時間を必要とする調査区の枯死木は OY8 の 112.5 年、最も短い時間で分解されるものは IG8 の 19.2 年であった。

以上の結果より、三宅島における枯死木は、速いもので 20 年程度、遅いもので 110 年程度で分解されることが分かった。今回の結果は概算値ではあるものの、“今存在する枯死木はいつなくなるか？”を明確に出来たことは、森林の物質循環や森林管理の一助になると思われる。

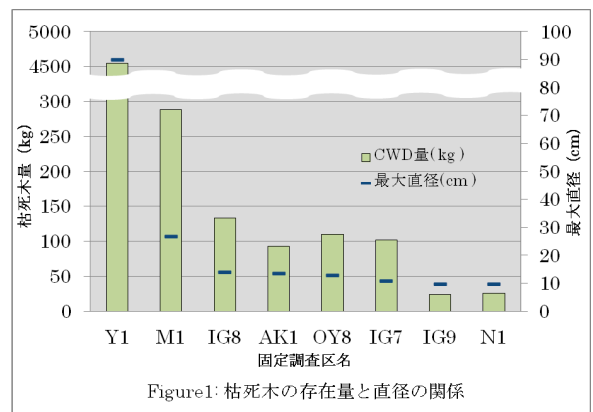


Figure1: 枯死木の存在量と直径の関係

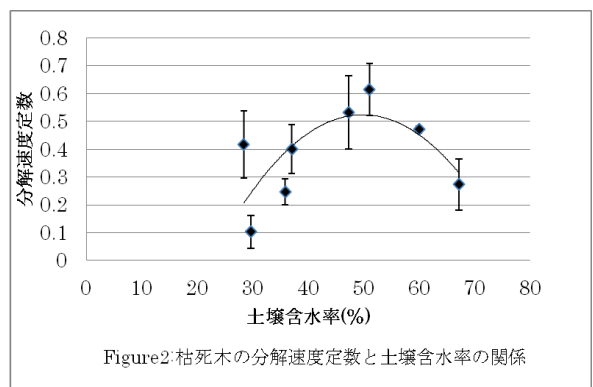


Figure2: 枯死木の分解速度定数と土壌含水率の関係

温度条件に着目した共生菌の有無によるレンゲツツジの成長の違い

杉山 涼太 (筑波大学 生物学類)

指導教員：廣田 充 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

菌類の一部は、植物の根に共生することで菌根を形成し、植物と共生関係を築いている。多くの場合、野外環境では複数種の菌が植物と共生している。この共生関係は、多くの植物で確認されており、植物にとって成長促進効果等があると考えられている。この共生関係は、高山等の厳しい環境に生育するツツジ科植物においても例外ではない。ツツジ科植物の場合、細根に感染するエリコイド菌根菌と密接な共生関係にあると考えられている。これらのツツジ科植物が厳しい環境下で生育していることを考えると、菌根菌との共生関係は極めて重要な役割がある可能性が高い。実際に、レンゲツツジ(*Rhododendron japonicum*)とその細根に感染するエリコイド菌根群集の関係について調べた先行研究によると、エリコイド菌根群集の存在によって、*R. japonicum* の実生の成長が増加することが明らかになった (高橋, 2012)。その研究では、比較的低標高の種子と土壌を用いた培養実験を行っており、より高い標高におけるエリコイド菌根群集の効果は明らかにされていない。より高い標高、つまり低温環境下では、それらの効果が異なる可能性も考えられる。そこで、私は生育限界 (標高約 2000m) 付近の *R. japonicum* の実生と同地点の土壌を用いた培養実験を行うことで、低温環境下でのエリコイド菌 (共生菌) 群集が *R. japonicum* の成長に与える影響について調べた。

方法

長野県上田市菅平高原に位置する根子岳では、*R. japonicum* は、標高 2000m 付近を上限に分布している。本研究では、2013 年 4 月に根子岳における生育限界付近の *R. japonicum* の種子とその周辺土壌を採取した。採取した種子は、発芽前に無菌処理を施した。採取した土壌の一部にも無菌処理を施し、それに鹿沼土を加えたものを培養実験に用いた。培養実験では、遺伝子実験センターにある温度調整型培養器を用いて、15°C、20°C、25°C、30°C の 4 つの温度条件を設定した。各温度条件に菌がある土壌と無菌土壌を用いた培養チャンバーを各 3 つずつ計 6 つ設置した。チャンバーに *R. japonicum* の実生を 9 個体ずつ植えて培養を開始した。

2013 年 6 月 17 日に開始し、12 月 2 日までの 168 日間培養した。培養開始から約 100 日目までの間、1 週間に 1 回程度の頻度で目視による葉の枚数を数えた。また、2 週間に 1 回程度の頻度で各チャンバーの撮影を行い、画像処理ソフトを用いて各個体の最大葉面積を推定した。培養 100 日目には、閉鎖チャンバーを用いて光合成および蒸散速度を測定した。光合成および蒸散速度測定の後、一部の個体を回収して、地上部と地下部に分けて乾燥重量を計測した。さらに、葉の炭素と窒素含有量を分析した。培養終了後には残りの個体の回収を行い、再度乾燥重量を測定した。

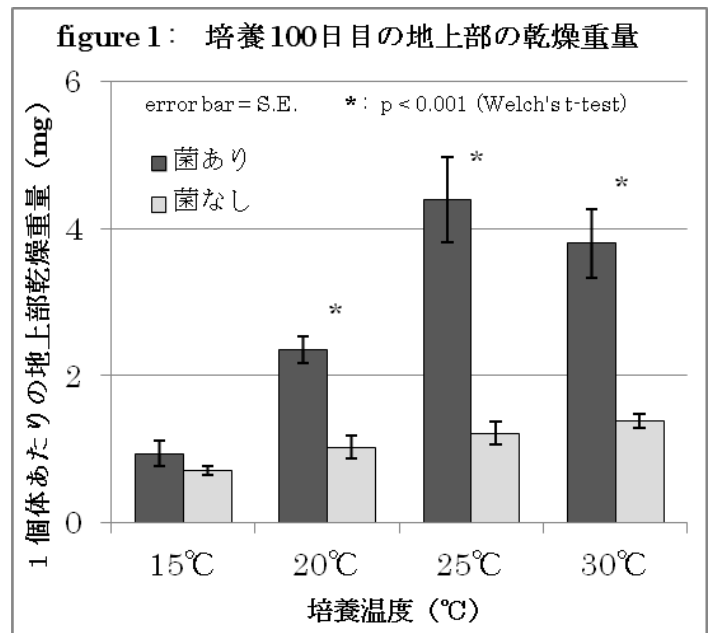
結果・考察

100 日目の地上部の乾燥重量に関して、20°C 以上では共生菌存在下では成長増加が確認されたが、15°C では共生菌の有無による差異はみられなかった (figure 1)。地下部に関しては、全ての温度条件において共生菌の有無による差が見られなかった。168 日目の地上部の乾燥重量も、100 日目段階と同様の結果が得られた。一方、地下部の乾燥重量に関しては 100 日目の結果と異なり、20°C 以上の条件において共生菌存在下で成長の増加が確認された。

葉の炭素と窒素の含有量に関して、葉内の窒素および炭素濃度は、共生菌の存在下でいずれも減少する傾向がみられた。葉の炭素と窒素の比率、CN 比でみると、20°C 以外の温度で、いずれも共生菌の存在下で大きくなっていった。共生菌存在下でのバイオマスの著しい増加と合わせて考えると、光合成によって固定された炭水化物の量に対し、相対的に窒素の量が少なくなったことがその要因と考えられる。

光合成速度に関して、25°C と 30°C の比較的高い温度条件において共生菌の存在下で光合成速度が大きくなる傾向がみられた。一方、蒸散速度は、共生菌が存在する方が小さくなる傾向がみられた。このことから、共生菌の存在下では、より少ない量の水で光合成を行うことができ、水を節約できていると考えられる。

以上の結果より、低温環境下に生育する *R. japonicum* も培養温度によってその程度は異なるものの、共生菌群集の存在によって成長が促進されることがわかった。本研究において、共生菌の有無によって最も成長の度合いに差がみられたのは 25°C 条件であった。低温条件 (15°C) では、CN 測定の結果において共生菌の有無による違いがみられたものの、成長に関しては大きな違いはみられなかった。



カジメ (*Ecklonia cava*) 起源溶存態有機物の光化学的反応特性

萱苗 友梨 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 濱 健夫 (筑波大学 生命環境系)

背景

海洋の溶存態有機物(Dissolved organic matter: DOM)は地球表層上における最大級の有機炭素リザーバーである。その炭素量はおよそ 685GtC と推定され、これは大気中の二酸化炭素濃度にも匹敵する。さらに、沿岸域生態系においても DOM は紫外線の吸収や、微生物への栄養供給といった様々な役割を持つことが知られている。

大型藻類は沿岸域において主要な一次生産者であり、光合成生産物のおよそ 20~40% を DOM として放出していることが知られている。大型藻類の生成する DOM の特徴として有色画分(Colored DOM: CDOM)を多く含むことが挙げられる。また、微生物による分解に対して高い耐性をもつことが明らかにされており、大型藻類起源 DOM が長期にわたり炭素を保持することが示唆されている。しかしながら、光化学的反応に関する情報は知られていない。

本研究では、大型藻類起源の CDOM の中でも特に光感受性が高い蛍光性 DOM(Fluorescent DOM: FDOM)に着目し、カジメ (*Ecklonia cava*) が生成した DOM に対する光照射実験を実施した。この際の蛍光特性の変化と、溶存態有機炭素(DOC)濃度の変化から、大型藻類起源 DOM の海洋中での動態について考察した。

方法

(1) DOM 採集実験

2013年5月27日から28日にかけて、静岡県下田市大浦湾に生息する褐藻類コンブ目カジメ (*Ecklonia cava*) から DOM を採集した。ダイバーが潜水してカジメ個体に採水口付きビニール袋を被せ、その直後と1日経過後に注射筒を用いて袋内の試水を採取した。採取した試水は熱処理したガラス繊維ろ紙(Whatman, GF/F)でろ過した後、ポリカーボネートボトルに入れ、光照射実験まで暗所で-20℃で冷凍保存した。

(2) 光照射実験

まず試水を 0.2 μm 孔径の Polycap 150TC(Whatman)でろ過し、バクテリアを除いた。その後、ろ液を石英ビンに移し、人工光照射装置を用いて光を照射した。照射光の強度は 765Wm² に設定した。照射時間は 0, 2, 4, 7, 12, 24 時間とし、時間ごとに試料を回収した。対照実験としてそれぞれの時間で暗条件試料も用意した。

DOC 濃度は、全有機炭素計(Shimadzu, TOC-V)を用いて測定した。蛍光特性は蛍光分光光度計(Hitachi, F-4500)を用いて測定した。測定範囲は励起波長(Ex)240~500nm、蛍光波長(Em)280~550nm とし、Milli-Q 水をブランクとした。吸光特性は可視紫外近赤外分光光度計(Shimadzu, UV-3100PC)を用いて波長範囲 200~700nm で測定した。さらに吸光度 275-296nm, 350-400nm 間のスペクトル勾配をそれぞれ求め、その比 S_R を算出した。

結果・考察

(1) DOC 濃度

光照射時間が長くなるにつれ DOC 濃度は減少を示し、24 時間の光照射後には、DOC 濃度は実験開始時の約 23% まで減少した。このことから、光によって DOM の無機化が生ずるが、減少率が低いことからカジメが生成する DIC の一部のみが光に対し易分解であり、残りの大部分は難分解性であると考えられる。

(2) 蛍光特性

光照射前後で蛍光組成が大きく異なった。(Fig.1, 2)照射前はピークが Ex/Em=280/355, 400/500, 280/500 の 3 か所に存在していたが、照射後は Ex/Em=250/450, 355/465 の 2 か所になった。途中の時間変異の様子から Ex/Em=280/355 のピークの消失、光照射前のピーク Ex/Em=400/500, 280/500 のシフト及び蛍光強度の増加が起こっており、光照射によって FDOM の組成が変わったことを示している。

(3) 吸光特性

分子量の指標となる S_R の値は照射時間が長いほど大きくなった。これは光照射により DOM の低分子量化が進んだことを示唆している。

(4) カジメ起源の DOM の残存性

カジメが生成する DOM は、光照射により一部の易分解性画分が分解されるが、光を吸収することによりその組成が変化し、有機物の多くは海水中に保持される可能性を示唆している。

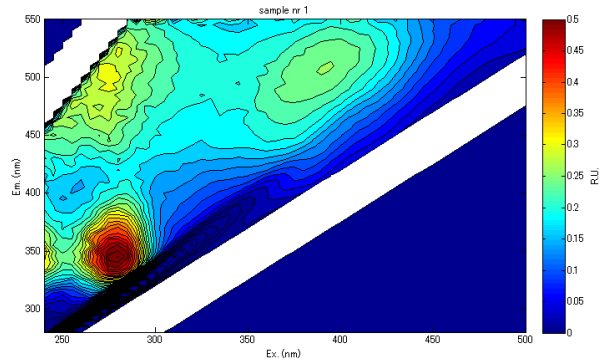


Figure 1 光照射前の蛍光特性 (横軸は励起波長、縦軸は蛍光波長)

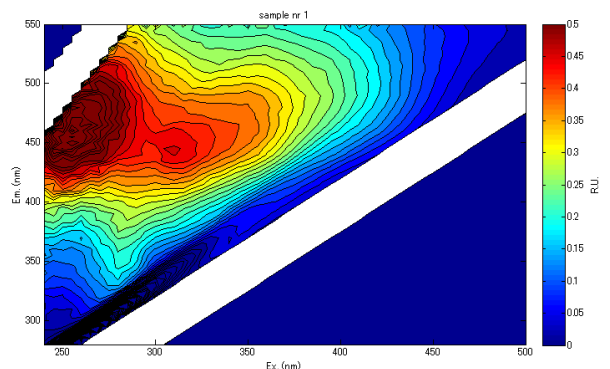


Figure 2 光照射 24 時間後の蛍光特性

海洋表層における蛍光性溶存態有機物の動態に関する実験的研究

小嶋 佑果 (筑波大学 生物学類)

指導教員：濱 健夫 (筑波大学 生命環境系)

背景

海洋中の溶存態有機物(DOM)は陸上植生と並ぶ地球表層最大の炭素リザーバーであるため、DOMが有する炭素(DOC)は地球表層炭素循環に大きな重要性を持つ。この海洋DOMの5-25%を占めるとされる蛍光性溶存態有機物(FDOM)は難分解性であり、海洋の炭素隔離機能に大きく関与していると考えられる。このFDOMの蛍光強度は海洋の表層になるほど弱くなっている。これはFDOMの蛍光が太陽光照射により消光する「光退色」という特徴を有するからである。このため海洋表層DOMプールにおけるFDOMの寄与は小さいと考えられてきたが、実際の海洋において、生物活動に伴うFDOMの蛍光の生成や、光照射による消光に関する実験的研究は行われていない。

そこで本研究では海水の培養実験により海洋腐植様FDOMの蛍光強度の変化を追跡し、FDOM生成速度、FDOM蛍光の消光速度の算出を試みた。

方法

本実験ではUV透過率約20%のポリカーボネート容器(PC)と、ほぼ100%のUV透過率を有する石英瓶(QU)を使用した。

1. 20 L 培養実験

試料採取は2013年5月13日から19日に静岡県下田沖に行なった。100 μ メッシュを通した下田沖表面水を20Lのポリカーボネート容器(PC)に導入し、栄養塩添加後、筑波大学下田臨海実験センター内の屋外実験池において培養した。なお、野外での試料採取は日の出と日没を目安に、毎日6:00と18:00に行なった。

2. FDOM生成実験

20L培養開始後3日目(実験I)と5日目(実験II)の培養海水を、250mlのPCとQUそれぞれ8本ずつに分注した。各容器の半数をアルミ箔で遮光し暗瓶、残りは明瓶とした後、全ての瓶を18:00に実験池に設置した。翌日の6:00と18:00に各容器の明瓶と暗瓶を2本ずつ回収した。

回収した各瓶から取り出した試料は一部をガラス繊維ろ紙で濾過し、ろ紙に残ったクロロフィルa濃度と、ろ液中のFDOM蛍光強度及びDOC濃度を測定し、FDOM蛍光強度の結果を多変量解析(PARAFAC)を行った。残りは原液のままグルタルアルデヒドで固定し細菌細胞数計数に使用した。

また実験期間中の可視光、UVの照射量を計測した。

結果・考察

(1) 溶存態有機炭素(DOC)濃度の経時的変化

20L培養実験とFDOM生成実験の試料についてDOC濃度の測定したところ、時間経過に伴う濃度の変動はほぼ横ばいであった。このことから、1週間程度のタイムスケールではDOC濃度に大きな変動がないことが考えられる。

(2) FDOMのコンポーネント毎の動態

PARAFACにより、FDOMの蛍光強度のピークが3つの

コンポーネント(c)に分けられた。20L培養実験の試料のc1とc2については大きな蛍光強度の変化は見られなかったが、c3は昼間に平均して0.00179 R.U./12hの速度で増加していた。このことから、紫外線の影響が少ない環境ではc3は1週間程度のタイムスケールでも増加する傾向にあると考えられる。

(3) 光照射の影響

蛍光の特徴から、c1は海洋腐植様物質と考えられ、バクテリアによる生成が主体である。c2は陸上起源の腐植様物質と考えられていたが、近年バクテリアが生成することが確認された。c3はチロシン様タンパク質である。

・c1について

c1は昼間の明瓶において、消光が見られた。よってc1に含まれるバクテリアにより生成されている海洋腐植様物質は光退色を起こしやすいと考えられる。さらにPCにおける消光速度は0.0012 R.U./12h、QUにおける消光速度は0.0024 R.U./12hであった。この消光速度の差はUVの照射の有無によるものと考えられる。また、実際の海洋では夜間における生成と昼間における消光によってc1の濃度はほぼ一定量に保たれていることが推測される。

・c2とc3について

光による退色はみられなかった。c2を構成する腐植様物質、及びc3のチロシン様タンパク質は光退色しにくいと考えられる。

(4) FDOMの光退色後の構造

消光が見られた試料と暗瓶のDOM濃度を比較しても大きな差は見られなかった。これは消光したFDOMは無機物レベルまで分解されるのではなく、蛍光を失っただけで有機物としての構造を保っていることが要因と推測される。したがって、蛍光強度を有機物量の指標としていた従来の研究は、蛍光を失った状態で海水中に残存する有機物を評価できていないことが示唆される。したがって、海洋表層にはFDOMが日光の影響で蛍光を失った形で存在していると考えられる。

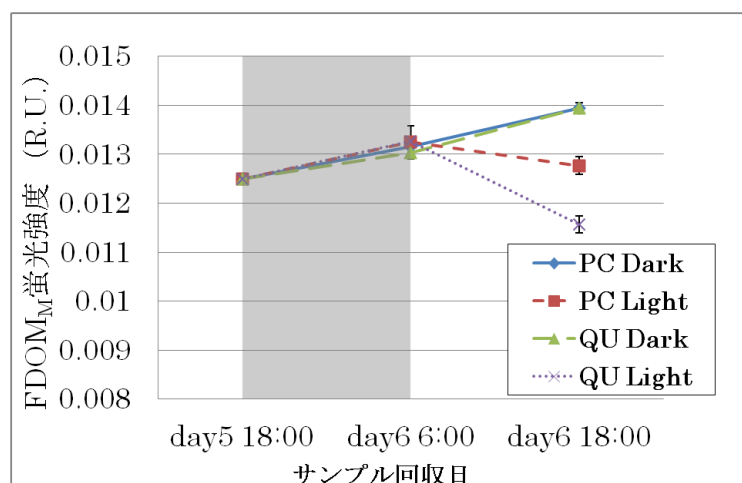


Figure 1. FDOM生成実験II(day5-6)におけるc1蛍光強度の変化

渡りを行なうウスバキトンボの産卵戦略と我が国への定着可能性

市川 雄太 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渡辺 守 (筑波大学 生命環境系)

序論

世界の熱帯に広く分布し、渡りを行なう種として知られてきたウスバキトンボは、我が国において、春になると南方から渡ってきた成虫が観察され始め、世代を繰り返しながら北上し、秋には稚内にまで達している。しかし、本種は寒さに弱いため、秋が深まるにつれて全滅し、我が国では冬を越すことができない。それにもかかわらず、毎年同じように渡りを行ない、夏から秋にかけて個体数は急増し、様々な水域で産卵している。現在の地球温暖化を考えると、本種の分布域は北へ拡大し、いずれは我が国にも定着してしまうかもしれない。本研究では、本種が夏から秋にかけて個体数を急増させる基礎的要因として考えられる産卵戦略と卵発生に関わる水温を調べ、我が国への定着の可能性を考察した。

方法

7月から10月にかけて、三重県や愛知県、千葉県、茨城県など、日本各地で雌成虫を捕獲した。ウスバキトンボのように連結打水産卵という産卵様式を採用している蜻蛉目は、腹部の末端を瓶に入れた水にリズムカルに打ちつけてやると、体内の成熟卵を強制的に放出させることができる。捕獲した雌に対して、この方法で直ちに卵を放出させ、卵の数や放出継続時間を調べた。その後、これらの雌を室内に持ち帰り、実体顕微鏡下で解剖し、卵巣内の卵巣小管を数えた。卵巣小管上には、卵黄形成前や卵黄形成途中の卵細胞が1列に並んでいるので、卵黄が充填されていない卵を未熟卵、卵黄が充填されているが卵殻の形成されていない卵を亜成熟卵、産下卵とほぼ同じ大きさや形で卵殻に包まれている卵を成熟卵と定義し、それぞれの卵を数えた。放卵した卵の体積を測定した後、35°Cから15°Cまでの5段階に設定した水温下で飼育し、卵期間や孵化率を調べた。一般に、羽化直後の蜻蛉目は繁殖活動を行わず、性的に成熟すると体色が婚姻色へと変化して、交尾や産卵などを行なうようになる。そこで、捕獲した雌成虫の体色や翅の汚損状態から、未熟期をT、I、II、Pの4段階、成熟期をM、MM、MMMの3段階と、成熟段階を7段階に分類して、産卵数を検討した。

結果

羽化直後のTの段階の雌は約450本の卵巣小管を保有していたが、成熟するにつれて卵巣小管の数は増加し、成熟すると約1100本の卵巣小管を保有していた。この卵巣小管に、羽化直後はそれぞれ約14個の未熟卵が観察されたが、成熟段階の進行と共にその数は増加し、成熟した雌は卵巣小管あたり約22個の未熟卵を保有するようになった。亜成熟卵はPという成熟直前の段階になってから認められるようになり、その後、卵巣小管あたり約4個の亜成熟卵を常に保有していた。成熟卵はMの成熟段階になってから認められ、平均520個を数えたが、MMの雌で約220個、MMMの雌で6個と、成熟段階の進行と共に減少した。それぞれの保有成熟卵数の平均値の分散は大きかった。捕獲

時の雌の状態、すなわち、雌が産卵前で体内に多くの成熟卵を保有していたか、産卵直後で保有している成熟卵が少なかったか、によって保有卵数が大きく異なっていたからであろう。これらの結果から、成熟直後のMの段階の雌は、未熟卵と亜成熟卵、成熟卵を合わせて、約30000個の卵を保有していることが分かった。

捕獲直後のMの成熟段階の雌を放卵させると、約2分間に640個の卵を放出した。放卵後の雌を解剖したところ、保有している成熟卵のほとんど全てを放出していた。卵の放出継続時間から卵放出速度を算出し、保有していた成熟卵数との関係を調べたところ、保有成熟卵の多い雌ほど放出速度は速くなっていた。すなわち、成熟卵を多くもっていた雌ほど、産卵衝動は高かったといえよう。

蜻蛉目の雌の産卵に日周性が認められる場合、野外で捕獲した雌の時刻別保有成熟卵数に産卵時間帯が反映される。すなわち、産卵時間帯より前なら多く、後なら少なく、両者の差によって日あたり産下卵数を推定できることもある。しかし、ウスバキトンボの捕獲した時刻と保有成熟卵数には何の傾向も認められなかった。すなわち、ウスバキトンボは、日中、いつでも産卵を行っていた可能性が高いと考えられた。

産下された卵はラグビーボール状で、長径が0.5 mm、短径が0.38 mmで、体積は0.038 mm³と計算された。これらの卵は、35°Cや30°Cといった水温では5日以内で孵化したが、水温の低下と共に卵期間は長くなり、15°Cの水温では、卵発生が進まず、卵は孵化しなかった。

考察

今回明らかになった本種の産卵戦略を、産卵戦略が明らかになっている不均翅亜目のノシメトンボと比較すると、ウスバキトンボは小卵多産傾向の強い種であることが分かった。保有成熟卵数に日周変化の見られない本種は、決まった産卵時間帯をもたず、適当な水域に達すればいつでも産卵できるように準備をしていたと考えられる。産下卵が高水温下で速い発生を示したことは、我が国の夏から初秋にかけての環境に適応的であり、羽化個体数を急増させることができたといえよう。しかし秋の深まりと共に水温は低下するので、これらの個体の産下した卵の発生は遅延し、孵化できなかつたり、孵化幼虫が死亡したりする。これらの結果から、例年通りの冬がやってくる限り、我が国への本種の定着は難しいと考えられた。



ナミアメンボに出現する短翅型雌と長翅型雌の卵生産と産卵パターン

高橋 玄 (筑波大学 生物学類)

指導教員：渡辺 守 (筑波大学 生命環境系)

序 論

夏季の止水域に生活しているナミアメンボにおいて、短翅型と長翅型という翅二型が同時に同一の群れの中に生じることがある。長翅型は水域間を移動でき、群れの密度が高かったり、水域が産卵に適さなかったりした場合、他の水域へ移動して産卵をするといわれてきた。このような飛翔を行なうためには、前翅と後翅の存在のみならず、飛翔筋を発達させ維持していなければならず、そのエネルギー源として、幼虫期に得た栄養と成虫期に得た栄養が利用されている。一方、短翅型の雌は飛翔のための器官形成やその維持を必要としないだけ、摂取した栄養を卵生産に振り分けることが可能である。しかし、短翅型と長翅型がそれぞれどのような過程で卵を生産し、産下しているのかは十分に調べられていなかった。

本研究では、室内で両型の雌を羽化させ、未交尾のまま様々な日齢で解剖を行ない、保有卵数の経時変化を調べた。また、未交尾の雌が交尾を受け入れる日齢を調べ、性的成熟の指標とした。交尾した雌は個別に飼育して産卵させ、日当たり産下卵数を測定した。

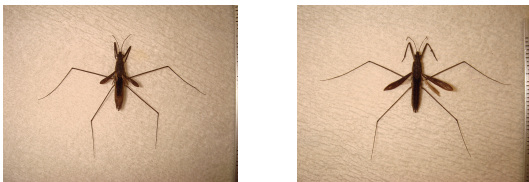


図1. ナミアメンボの短翅型雌(左)と長翅型雌(右)

方 法

実験 I

短翅型と長翅型の両方を羽化させる目的で、室内で孵化させたナミアメンボの幼虫を 14L10D で飼育した。羽化した雌は、ただちにイチゴパックに入れて個別飼育を開始した。餌として、どの個体にも 0 日齢から 1 日に 1 頭のヒツジキンバエを与え続けた。0 日齢と 1 日齢、3 日齢、5 日齢、7 日齢、9 日齢、13 日齢、17 日齢、21 日齢、29 日齢の未交尾の雌を解剖し、保有していた卵を数えた。保有していた卵は、成熟卵と亜成熟卵、未成熟卵の 3 段階に分けた。

実験 II

雌の交尾受容日齢を調べるために、5 頭の性的に成熟した雄の入った直径 30 cm の円形プラスチック容器内に、未交尾の雌を 1 頭ずつ入れた。5 分以内に雄が雌にマウントして交尾した場合、交尾終了まで放置して、交尾時間を記録した。雌を入れてから 5 分の間に、雄が雌を無視し続けたり、雌が交尾拒否行動を示したりした場合、その雌は取り出した。この操作を、羽化翌日から雌が交尾を受け入れるようになるまで、毎日繰り返した。交尾をした個体は個別に飼育して、自由に産卵させ、日当たり産下卵数を数えた。

結 果

実験 I

両型の雌とも、羽化直後にわずかな未熟卵を見い出せ、5 日齢になる頃には 50 個ほどを数えるようになった。その後、日齢が進んでも両型の未熟卵数に大きな変化はなかった。短翅型の雌は 1 日齢から亜成熟卵の生産が認められたが、長翅型の雌は 3 日齢を過ぎないと生産は開始されなかったようである。短翅型では 5 日齢から、長翅型では 9 日齢から保有している亜成熟卵が 30 個程度になり、その数が上限となった。短翅型の雌は、1 日齢から成熟卵の生産を開始しており、13 日齢には 70 個近くまで蓄積された。一方、長翅型は 5 日齢にならないと成熟卵が観察できず、13 日齢になっても 25 卵程度しか蓄積していなかった。したがって、短翅型は長翅型と比べて、早くから産下できる卵をもっていたといえる。

実験 II

交尾を受容するようになったのは、短翅型も長翅型も 10 日齢であった。それまでは両型の雌とも、交尾を試みる雄から逃げたり、雄に乗りかかられても宙返りをして雄を振りほどいた。雄によるマウントを受容した雌は、背中に乗った雄の交尾器の挿入を受け入れた。交尾時間は両型とも、30~40 分だった。産卵は 13 日齢から始まるのがふつうで、交尾後 3 日目からといえる。交尾から産卵を開始するまでの期間で、両型に差はなかった。しかし、初期に産下された卵塊サイズは、短翅型の方が有意に大きかった。両型とも交尾直後の 5 日間に 2 卵塊産下したので、最初の 5 日間の産下卵数は、短翅型で約 60 個、長翅型で約 30 個になる。その後の卵塊の産下頻度は両型ともほぼ同様で、卵塊サイズにも大きな違いは認められなかった。

考 察

夏季におけるナミアメンボの繁殖戦略には、長日であっても翅二型が生じている。一般に、翅二型を出現させる戦略をもつ昆虫類では、生息環境が快適であった場合に短翅型や無翅型を生じ、悪化すると長翅型や有翅型に切り替えている種が多い。すなわち、悪化した生息環境からの脱出という目的が強く、この時の環境とは、種内の密度の増加や餌資源の減少、季節変化などである。長翅型が飛翔後に卵生産を開始するのはそのためであり、本研究でも卵生産の遅延が認められている。しかし、ナミアメンボの場合、明らかな環境の悪化による長翅型の出現ではなかった。生息地である開放水域の存在は、移動を試みるナミアメンボにとっては予測不可能といえ、夏季における長翅型の移動には新たな生息地を発見できないという危険が伴っている。一方、その水域に留まっている短翅型には、いずれ密度の増加という悪条件がやってくる。したがって、夏季の本種に出現する翅二型は、単純な密度依存によるものではなく、雌親による子孫の分散という保険的な意味合いが強いと考えられた。卵生産もそれに対応して、短翅型は環境条件が良いうちに産卵できるように早くから生産を開始し、長翅型は移動後に産卵するために卵生産を遅らせていたといえよう。

ムラサキツメクサの開花戦略 花茎屈曲による見せ花効果

得田 奈央子 (筑波大学 生物学類)

指導教員：渡辺 守 (筑波大学 生命環境系)

序論

頭花植物にとって、送粉者は繁殖成功を高める上で重要な存在であり、彼らを誘引する適応戦略の結果として、種ごとの花の形態や色、大きさの多様性が生じると考えられてきた。小花が集合して大きな花序を形成する事で、送粉者への誘引効果を高めるのもその一例である。通常、花序内の小花は徐々に開花してゆくため、開花した小花数の少ない開花初期の段階は、送粉者にとっては魅力的ではないかもしれない。マメ科の帰化植物であるムラサキツメクサ、*Trifolium pratense*, では、花序の基部の小花から徐々に開花が始まるものの、開花初期から多くの昆虫が訪花している。この時、上空から花序の基部付近の小花が見えていなければ、誘引効果は低下するだろう。したがって、ムラサキツメクサは開花初期の小花を目立たせるために何らかの戦略を用いている可能性がある。本研究では、開花期間における花序の誘引効果を明らかにするため、開花段階に伴う花序の傾きの変化と、開花段階ごとの開花した小花の花筒長の違い、開花小花数および花序上の赤い部分の面積の変化を計測した。

材料と方法

ムラサキツメクサには、花序の基部に大小1枚ずつの小葉があり、小花の開花は大きい小葉側から開始される。花序の開花段階が進むにつれて、小さい小葉側の小花が開花し、最後に花序の中央付近の小花が開花することで、花序内全ての小花が開花し満開となる。開花段階は、花序を真上から見た時に開花した小花と、赤く色づいたつぼみの部分の割合によって、7つのステージに分けた。花序内の小花がすべてつぼみの状態をステージⅠからⅡ、開花した小花の割合によってⅢからⅣ、満開の状態をⅤとし、枯死した小花の割合でⅥからⅦに分けた。このうち、ステージⅢからⅤまでを開花期間とした。

花序の傾き(屈曲度)をステージ間で比較するために、日当りの良い場所で開花していた花序を採取後、縦方向に2つに切り、花茎の長さと同花序先端から補助線までの長さを測り、補助線に対する角度を算出した(図1)。

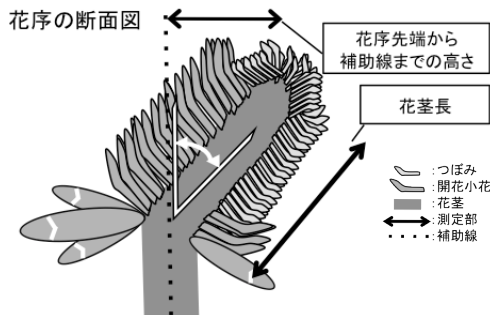


図1：花序の角度測定

開花ステージごとの花序の開花小花数と、花序上の赤い部分の面積変化を調べるため、花序内の小花がつぼみの状態から徐々に開花する過程を連続観察し、各ステージの期間、開花小花数を記録した。また、上空から飛来する昆虫に対して呈示している花序

の大きさを測定するために、各ステージで開花した小花の花筒長と、花序を真上から見た時に赤く色づいたつぼみと開花小花をあわせた赤い部分の面積を測定した。

結果

花序の屈曲度は、ステージⅠからⅢの間は強く、花序自体がかなり傾いていた。しかし開花段階が進むにつれて屈曲は弱くなり、Ⅴの段階では花序がほぼ垂直になった(図2上段)。この屈曲によって、ステージⅢで開花した小花と赤く色づいたつぼみは、花序の基部近くにあるにもかかわらず、花序の見かけの上部に位置していた(図2下段)。

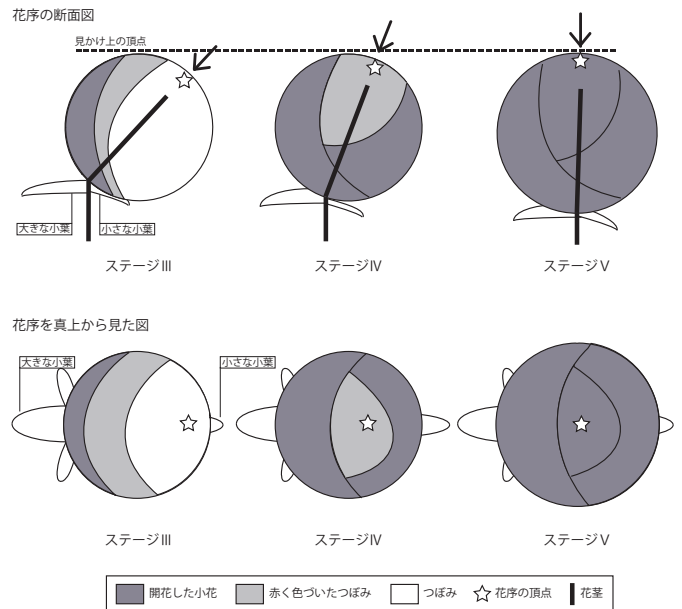


図2：開花ステージごとの花序の傾きと花上の赤い部分の面積の変化

開花段階のなかで最も期間が長いのはステージⅤで4日間であり、ステージⅢとⅣの期間はあまり変わらず2日から3日であった。各ステージで開花した小花の花筒長には、ステージ間で有意な差はみられなかった。各ステージで開花した小花数は、ステージⅣの時に最も多く、ステージⅢとⅤは少なかった。しかし、つぼみと開花小花をあわせた赤い部分の面積は、ステージⅢとⅣの間で大きな違いはなかった。

考察

ステージⅢでは開花小花数が少ないが、色づいたつぼみもあわせると、ステージⅣでの増加分と同等の赤い面積が花序上に存在することが明らかになった。さらに、開花初期に花茎が強く屈曲することで、真上から花序を見た時には、花序の基部に位置している赤い部分が大きく目立っていた。これにより、開花段階に伴って、開花小花数が増加し、花序全体は赤く色づくが、花序の上部には開花期間を通して常に赤い部分が存在することになる。すなわちムラサキツメクサは、開花初期から長期間にわたって、赤い「花」を訪花昆虫に見せつける戦略をとっていると考えられる。

新天地では鶏口となるな、牛後となれ～インゲンマメゾウムシの場合～

朝山 寛太郎（筑波大学 生物学類） 指導教員：徳永 幸彦（筑波大学 生命環境系）

肉食系女子は草食系男子の何に魅せられるのか？ ～インゲンマメゾウムシの場合～

佐藤 まどか（筑波大学 生物学類） 指導教員：徳永 幸彦（筑波大学 生命環境系）

背景と目的

有性生殖を行う動物において配偶相手の獲得は、繁殖成功にとって重要である。多くの種では精子数が卵数をはるかに上回るため、雄同士で雌をめぐる競争が起き、雄は雌に対し積極的に求愛行動を行う。逆に雌が積極的な求愛行動を示す種もあるが、これらの種で雌からの求愛行動が生じる直接的な要因として、雄からの何らかの働きかけがあると考えた。性フェロモンは配偶行動において、配偶相手を引きつけたり同種異性の認識に用いられたり重要な役割を果たすことから、雄の性フェロモンが雌の求愛行動を引き起こす要因になると予想し、これを検証した。

実験材料としてコウチュウ目ハムシ科マメゾウムシ亜科インゲンマメゾウムシ (*Acanthoscedius obtectus*) を用いた。インゲンマメゾウムシでは雄が性フェロモンを持ち未交尾雌を誘引することが知られているが、配偶行動について先行研究は行われていない。そこで、第一に配偶行動全体の流れを明らかにし、雌からの積極的な求愛行動が見られるかを調べた(実験1)。次に、雌の求愛行動が雄の性フェロモンによって引き起こされていることを検証した(実験2)。

材料と方法

実験1 羽化後1-10日の未交尾雄と未交尾雌1匹ずつを30x30x10mmのプラスチックケースに入れ、2匹の接触が起こってから10分間の雌雄各々の行動を観察し、雄と雌の求愛行動の有無と交尾に至るまでの行動を記録した。

実験2 性フェロモンが雌の求愛行動に影響を与えるのであれば、性フェロモンを除去した雄に対して雌が求愛行動を行わなくなると予想される。マメゾウムシは性フェロモンだけでなく体表に接触フェロモンを持つ。他種において接触フェロモンは求愛行動に重要であることがわかっているため、性フェロモンと接触フェロモンの影響を分けて考えた。実験には冷凍処理によって得た雄の死体(図2:灰色)と、その死体を溶液処理しフェロモンを洗い流したもの(図2:白)、未交尾雄(図2:黒)を用いた。これらの雄をシルクテープで覆い、その上に雄の死体(灰色/白)を置き、シルクテープ上の雄の死体に体する雌の求愛行動を観察した。雌はシルクテープ下の雄とは接触しないためシルクテープ下の雄の接触フェロモンの影響は無視できるが、揮発性の性フェロモンはシルクテープを通じて伝わる。羽化後3日目の未交尾雌12匹について、シルクテープ上下の雄の4通りの組み合わせの実験を行い、雌が求愛行動を行った合計時間を計測した。

結果

実験1 雌雄ともに、交尾前に触角を上下させ相手の体表をたたく行動(antenna-tapping)が頻繁に見られ、以下これを求愛行動とみなした。54ペアのうち50ペアで雌雄の接触が生じ、うち38ペアでは雌が初めに求愛行動を行った。雌の求愛行動を受けた雄の多くは直ちに雌に反応し求愛行動を始め(図1①)、雌の背後にまわりマウンティングし、交尾を試みる。しかし交尾に至

る割合は低く(図1②)、多くの場合雌は後脚を蹴り上げる、走り去るなどして雄から離れる(図1③)。その後雄が再び求愛行動を始める場合もあるが(図1④)、雄が雌を追いかけなくなると、再び雌が雄に近づき求愛行動を行い(図1⑤)、雌の求愛行動を受けた雄は再び求愛行動を開始するという行動(図1①)を繰り返した。最終的に23ペアで時間内に交尾に至った。

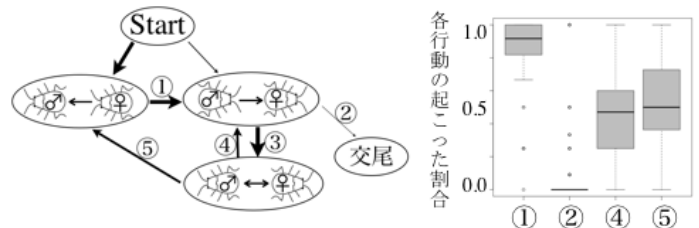


図1：配偶行動の模式図。ある行動から次の行動に至る矢印(①～⑤)の太さは、右の箱ひげ図の中央値の値を示す。(③は④と⑤の合計)

実験2 雌が雄の死体に求愛行動を行った時間をクラスカル・ウォリス検定の多重比較によって解析した結果、求愛行動の時間は接触フェロモンがある場合有意に長かったが、性フェロモンの有無によっては有意な差が見られなかった。そこで、このデータには雌が求愛行動を全く行わないデータが多く含まれることから、ゼロ過剰ポワソンモデルを用いて求愛行動の有無と継続時間という二つの要因に分離して解析を行った。雌の求愛行動の有無についての結果を図2に示した。図2の1と2の比較により雌の求愛行動開始には接触フェロモンが効いていること、2と3の比較より生体から出る性フェロモンの方がより効果的であること、3と4の比較より死体から出る性フェロモンであっても求愛行動を開始させる効果を持つことが明らかになった。さらに、1と2の差に比べ2と4、3と4の差が大きいことから、求愛行動の開始には接触フェロモンより性フェロモンの効果が大きいと考えられる。求愛行動が生じた場合の継続時間については、クラスカル・ウォリス検定と同様に接触フェロモンが存在する

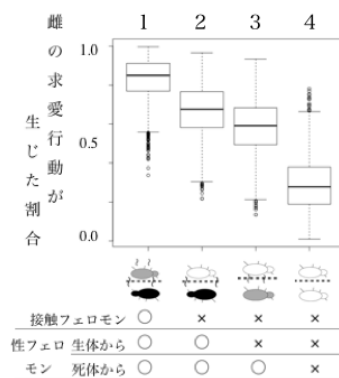


図2：雌の求愛行動が生じた割合を示した箱ひげ図。下の表は、各フェロモンの存在有無を○×で表す。

る場合に比べて、1と2の差に比べ2と4、3と4の差が大きいことから、求愛行動の開始には接触フェロモンより性フェロモンの効果が大きいと考えられる。求愛行動が生じた場合の継続時間については、クラスカル・ウォリス検定と同様に接触フェロモンが存在する場合のみ優位に長くなった。

考察

これらの結果から、雄の性フェロモンは雌を誘引し雌の求愛行動を引き起こし、さらに雄の接触フェロモンが雌の求愛行動を継続させること、雌の求愛行動が雄の求愛行動を引き起こすことがわかった。雄の性フェロモンが雌の求愛行動を引き起こすという仮説が、インゲンマメゾウムシにおいては当てはまることが証明された。この仮説が、雌が求愛行動を指導する他種にもあてはまるか、さらに検証を進めたい。

長すぎたるは及ばざるがごとし？

：花形態の組み合わせが口吻長の異なるマルハナバチの採餌効率におよぼす影響

鈴木 萌（筑波大学 生物学類） 指導教員：大橋 一晴（筑波大学 生命環境系）

背景・目的

花の蜜を吸うハチの仲間には、さまざまな長さの口吻を持つ種類がいる。同様に、ハチが訪れる花もさまざまな深さの花筒をもつ。長い口吻をもつハチは、浅い花からも深い花からも蜜を吸うことができるが、短い口吻をもつハチは、深い花から蜜を吸うときにはより多くの時間がかかる (Ranta and Lundberg 1980, Harder 1983)。よって、一般的には、長い口吻のハチの方が短い口吻のハチよりも採餌に有利であると予測される。しかし、長い口吻のハチが浅い花で採餌するときでは、花あたりの採餌にかかる時間が長くなるため、短い口吻のハチよりも採餌効率が悪くなるという報告もある (Plowright & Plowright 1997)。このような長い口吻によるデメリットがなぜ生じるのか、またどのようなときに生じるのかを明らかにした先行研究は存在しない。

そこで、本研究では、長い口吻をもつことによる採餌のデメリットが、どのような形態の花において、また訪花から吸蜜までのどの段階で生じるかを明らかにすることを目的とした。特に、長い口吻は、花の形態によって口吻を挿し入れやすさが変わること、採餌効率が変わるのではないかと考えた。例えば、花の開口部の幅が広い花では、長い口吻でも簡単に挿入できるため、口吻が長いハチでも採餌効率は悪くならないと考えられる。対して、開口部の幅が狭い花では、長い口吻では花に挿入するときに扱いづらいため、採餌効率が悪くならないと考えられる。

方法

長野県上田市菅平高原、須坂市峰ノ原高原および諏訪郡富士見町入笠山において、野外調査を行った。対象として、口吻長の種内変異および種間変異の大きいマルハナバチ属を用いた。植物種は、開口部の広い花としてオオバギボウシ、開口部の狭い花としてアカツメクサを用いた。それぞれの花種について、以下の調査を行った。

1) 採餌にかかる時間

訪花するハチを追いかけ、ビデオカメラを用いて撮影した。その後、映像をパソコンに取り込み、スローモーション再生によって、一花あたりの採餌にかかる時間 (採餌時間) をストップウォッチを用いて計測した。採餌時間は、ハチが花に降り立ってから、①花に口吻を入れて蜜源に到達するまでの時間 (到達時間)、②蜜を吸う時間 (吸蜜時間)、③口吻を引き抜いて花から飛び立つまでの時間 (離脱時間) の3段階に分けて計測した。

2) 口吻長

撮影後にその個体を捕獲し、CO₂ 麻酔によって眠らせ、①ハチの口吻長 (中舌長+下唇前基節長)、②その他の部位 (頭長、頭幅、胸幅など) をデジタルノギスを用いて計測した。一度計測した個体は、同個体の観察重複を避けるため、マーキングをしてから放した。

3) 花形態

花の各部位について、①花筒長 (太い筒の長さ+狭い筒の長さ)、②開口部の幅、③花筒の幅 (太い筒の幅および狭い筒の幅)、④めしべ・おしべの長さをデジタルノギスで計測した。

結果・考察

開口部が広いオオバギボウシの花では、口吻が長い個体ほど採餌時間が短くなる傾向があった。採餌時間のうち、到達時間、吸蜜時間、離脱時間のそれぞれについても、口吻が長くなるほど短くなる傾向があった。

これらの結果は、オオバギボウシでは、花の開口部が広い上、足場がしっかりしていて花につかまりやすいため、長い口吻でも花に口吻を挿し入れやすいことを示唆する。このような花では、口吻が長い方が花に深くもぐりこまずに吸蜜し、離脱できるため、採餌時間が短くて済むというメリットのみがあると言える。

一方、開口部が狭いアカツメクサの花においては、口吻の長さによる採餌時間の違いは見られなかった。しかし、採餌時間のうち、吸蜜時間は、口吻が長くなるほど短くなる一方、到達時間は、口吻が長くなるほど長くなる傾向があった。これは、長い口吻のハチが口吻を花に挿し入れるときに、口吻を入れ損ねたり体勢を崩したりしていたためであった。離脱時間は、口吻の長さによる違いは見られなかった。

これらの結果は、アカツメクサでは、口吻が長い方が吸蜜時間が短くて済むというメリットがある一方、花の開口部が狭い上、花につかまりにくいいため、長い口吻を花に挿し入れるときに手間取り、到達時間がより長くなるというデメリットが生じていることを示唆する。このように、アカツメクサでは、長い口吻のデメリットがメリットによって相殺されていると考えられる。

以上から、先行研究で報告されていた長い口吻をもつことによる採餌のデメリットは、口吻を花に挿し入れるときに長い口吻が扱いづらくなるため、蜜源に到達するまでにより時間がかかることで生じることが明らかになった。さらに、長い口吻によるこのようなデメリットは、長い口吻でも口吻を挿し入れやすい、開口部の広い形態をした花では生じないことが明らかになった。



図：(左) 開口部が狭い花の場合。(右) 開口部が広い花の場合

漂着海藻は餌資源として砂浜生物の群集構造に影響するのか？

岸野 友子（筑波大学 生物学類） 指導教員：今 孝悦（筑波大学 生命環境系）

背景・目的

地球上に存在する様々な生態系は、物質や生物の移動を介して密接に連環している。このような異なる生態系からの物質や生物の移動は一般に異地性流入と呼ばれ、しばしば受け手側の生態系に大きな影響を及ぼす。近年では、異地性流入が生物群集の構造や動態を決定し得ることが指摘され、生態学的に重要な現象であると認識されている。

異地性流入の影響は生態系同士の境界にあたる移行帯で顕著に表れることが多い。陸域と海域の移行帯である砂浜域潮間帯はその好例であり、様々な他生性資源が漂着する。そのうえ、砂浜域は一般に自生性資源の生産量が乏しいとされるため、一次生産の大部分を漂着海藻の有機物に依存することが示唆されている。しかし、先行研究では海藻が周期的に大量漂着する特異な砂浜域を主な対象としており、そのような大量漂着が見られない多くの砂浜域での知見は極めて乏しい。

そこで、本研究では海藻漂着の大量漂着が通常見られない砂浜域において、1) 漂着海藻の有無で砂浜生物の群集構造を比較し、2) 集合性実験にて資源利用様式を検討し、さらに、3) 安定同位体分析によって砂浜生物の食物源を推定することで、漂着海藻が砂浜生物の群集構造に与える影響を評価することを目的とした。

材料と方法

I. コアサンプラー調査

漂着海藻の有無による砂浜生物群集構造の相違を検討するため、2013年5月および9-10月にそれぞれ2回ずつ、計4回のコアサンプラー調査を行った。調査地は静岡県下田市の4か所の砂浜域（鍋田、白浜、田牛、外浦）とし、各調査地の潮間帯上部において、漂着海藻の存在する地点（以下、海藻地）と存在しない地点（以下、裸地）を調査定点として選定した。各定点でコアサンプラー（直径10 cm）を用いて深さ10 cmの砂および砂上の漂着海藻を採集し、篩い分け法にて砂浜生物を収集した（n=10）。得られた生物は、種ごとに個体数と乾重量を計測した。計測後、種組成についてクラスター解析をし、砂浜生物の個体数について定点間で分散分析を行った。

II. 集合性実験

砂浜生物による漂着海藻の利用様式（餌資源または空間資源としての利用）を検討するため、集合性実験を行った。鍋田において、採集した海藻を設置した漂着海藻区、海藻を模した黒色ビニールを設置した模擬海藻区、およびコントロールとして裸地区を設けた。設置後1、3、5、7日後にそれぞれの実験区において、砂浜生物を採集し（n=5）、個体数と乾重量の計測を行った。計測後、砂浜生物の個体数について実験区間で分散分析を行った。

III. 安定同位体分析

砂浜生物の食物源を推定するため、炭素・窒素安定同位体分析

を行った。5月および9-10月に各調査地で採集された砂浜生物、堆積有機物、懸濁有機物、底生微細藻類および、漂着海藻を炭素・窒素安定同位体分析に供し、それらの値を比較した。その際、炭素安定同位体比は食物源の指標、窒素安定同位体比は栄養段階の指標として利用した。

結果

I. コアサンプラー調査

クラスター解析の結果、種組成の類似度は裸地と海藻地間で明瞭に異なっていた。海藻地ではニッポンスナハマトビムシが優占し、ハネカクシ科やガムシ科などの昆虫類も確認された。一方、裸地においてはニッポンスナハマトビムシに次いでヒメスナホリムシが優占していた。また、分散分析の結果、砂浜生物の個体数は裸地に比して海藻地で有意に多い傾向が認められた。

II. 集合性実験

分散分析の結果、砂浜生物の個体数は模擬海藻区・裸地区に比べ漂着海藻区で有意に多かった。

III. 安定同位体分析

全ての調査地において、調査期間を通じてほぼ全ての砂浜生物と漂着海藻の炭素安定同位体比は類似していた。ただし、ヒメスナホリムシでは大きく異なる値を示し、漂着海藻に比して低くなる傾向が認められた。窒素安定同位体比については、砂浜生物が漂着海藻より高く、特にハネカクシ科が最も高い値を示した。

考察

コアサンプラー調査の結果、ヒメスナホリムシを除く砂浜生物が漂着海藻に蝟集することが示唆された。とりわけ、幼虫とさなぎ以外の昆虫類は海藻地のみで確認され、海藻地と裸地間の種組成の相違は、海藻地で個体数が多いことに加えて、昆虫類の移入に起因すると考えられる。

集合性実験の結果、漂着海藻区が砂浜生物に選好されており、砂浜生物は餌資源として漂着海藻を利用していることが推察された。実際に、炭素安定同位体比の結果から多くの砂浜生物が漂着海藻を餌資源として利用していることが示唆されており、集合性実験の結果が支持されている。一方、ヒメスナホリムシでは漂着海藻に依存する傾向は認められず、このため裸地の優占種に成り得たと考えられる。また、窒素安定同位体比の結果、砂浜生物の多くは漂着海藻を直接摂餌し、ハネカクシ科はその捕食者であることが推察される。すなわち、高次消費者も漂着海藻に依存した食物網に属しており、漂着海藻の影響は多様な生物に及んでいると言える。

以上のことから、漂着海藻は餌資源として機能することで、砂浜生物の群集構造に大きな影響を与えていることが示唆された。

イソクズガニ *Tiarinia cornigera* のデコレーティング行動による藻類への影響

玉川 茜 (筑波大学 生物学類)

指導教員：今 孝悦 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

デコレーティング行動とは、体表に生物片などを付着させる行動で、節足動物や棘皮動物などによく見られる。これには、自身の姿を擬装し、被食を免れる機能などがあるとされる。

デコレーティング行動は、とりわけクモガニ科で発達してきたと考えられている。本科に属する多くのカニ類は、背甲や歩脚に鉤状の剛毛を密生させ、それに藻類やホヤ、カイメンなどの固着生物を付着させる。これらの行動は典型的な対捕食者戦略であるとされ、先行研究では、捕食者の存在下でデコレーション量を増大させることや、デコレーションに用いる生物種に対して特定の選好性を示すことが報告されている。他方、こうしたデコレーティング行動は、デコレーションされる生物へも影響を及ぼし得ることが予測される。すなわち、クモガニ科は捕食者に応じてデコレーティング行動を可塑的に変化させ、さらに、そうした行動変化は、デコレーション対象生物への影響をも変更することが予想されるが、そのような検証はなされていない。

そこで本研究では、①捕食者存在下でのデコレーション対象生物への選好性の変化、および②デコレーティング行動による対象生物への影響を検証することを目的とした。

材料・方法

実験には、クモガニ科のイソクズガニ *Tiarinia cornigera* を用いた。デコレーションに使用する固着生物には、本種が頻繁に利用する2種の藻類、ピリヒバ *Corallina pilulifera* およびアオモグサ *Boodlea coacta* を用いた。また捕食者には、本種を捕食するとされるカサゴ *Sebastiscus marmoratus* を使用した。なお、イソクズガニ、藻類、および捕食者はいずれも静岡県下田市大浦湾の岩礁域で採集した。

実験1. 捕食者存在下でのデコレーティング行動の変化

捕食者の有無でデコレーションに用いる藻類への選好性が変化するか否かを検証するため、室内実験を行った。実験には、流水孔を設けたパネルで半分に区切った4つのアクリル水槽 (34×45×30 cm) を用いた。これらは、一方から海水を導入し(上流)、他方から排出する(下流)、流海水下に置いた。それぞれの上流に1) カサゴ、2) イソクズガニのつぶし、3) なし、4) カサゴとイソクズガニのつぶしを入れ、計4つの実験区を設定した。下流には藻類2種と、デコレーションを全て取り除いたイソクズガニを1個体収容した。それらを収容してから48時間後、カニの背甲と歩脚に付着している藻類を剥がし、藻類の種ごとに湿重量を測定した。そしてデコレーションされた藻類の割合を比較し、イソクズガニが選好した藻類を求めた。

実験2. 藻類の光合成速度と湿重量変化

デコレーティング行動による藻類への影響を検証するため、実験1でカニの背甲と歩脚から剥がした藻類(デコレーション藻類)と、デコレーションされずに水槽に残った藻類(残存藻類)の光合成速度および湿重量の変化を測定した。残存藻類に関して、

実験1の試行時に、コントロールとして藻類のみの実験区を設定し、比較に用いた。

光合成速度の測定には酸素法を用いた。広口T型ビンに濾過海水とともにそれぞれの藻類を収容し、3時間の明条件(3L)後、3時間の暗条件(3D)で培養した。その際、実験前、3L後、3D後の濾過海水の溶存酸素量を測定することで、光合成速度を算出した。測定は実験1の開始前日、実験1の終了翌日、7日後、以降1週間ごとに5週間後まで行った。

湿重量の測定に関して、残存藻類は、実験1の開始前日、実験1の終了後、光合成速度測定最終日に評量した。デコレーション藻類については、実験1終了後、光合成速度測定最終日に評量を行った。

結果

実験1において、イソクズガニは全実験区でアオモグサを選好し、ピリヒバを付着させている個体は僅かであった。また、デコレーションの量に、実験区間で有意な差は認められなかった。

実験2について、光合成速度は、ピリヒバ残存藻類は実験区間で有意差はなく、経時変化も見られなかった。一方、アオモグサ残存藻類は、全実験区間で時間経過に従って減少した。デコレーション藻類については、期間中の経時変化は認められなかった。

湿重量は、ピリヒバ残存藻類では実験区間・日数間で差異は認められなかった。アオモグサについて、残存藻類はいずれの実験区でも5週間後に減少していた一方で、デコレーション藻類は5週間後に増加していた。

考察

実験1の結果、イソクズガニは捕食者の有無に関わらずアオモグサを選好した。これは、イソクズガニが室内飼育環境下でピリヒバよりアオモグサを好むという Sato et al, 2000 の報告と一致する。先行研究は捕食者を含まない環境下での検討であったが、本研究により、アオモグサに対する選好性は捕食者の影響を受けにくいことが示唆された。

実験2の結果、アオモグサの残存藻類は、全実験区間で光合成速度と湿重量がともに減少していた。しかしコントロール区でも同様の減少が生じていたため、残存藻類に対してデコレーティング行動はあまり影響を及ぼさないと考えられる。一方で、アオモグサのデコレーション藻類は、時間経過とともに湿重量が増加していた。このことは、デコレーション藻類が枯死することなく生長し続けることを示しており、デコレーティング行動によって藻類がカニの背甲という新たな成長基質を獲得し得ることを示唆している。これまで当該行動に関する研究は、行動の変化や機能等に焦点を当てており、デコレーションとなる生物種に対する影響は議論されて来なかった。しかし、本種のように擬装を目的としてデコレーティングする種では、藻類に正の影響を与え得ることが示唆された。

イボニシ *Thais (Reishia) clavigera* の食性から食物網の持続性を探る

戸祭 森彦 (筑波大学 生物学類)

指導教員：今 孝悦 (筑波大学 生命環境系)

1 背景

食物網は生物間の捕食-被食関係を網状に示した相関図であり、生物群集の種組成に応じた形態を成す。近年では、大規模攪乱による種の欠損 (Wootton et al. 1996) や、上位捕食者となる外来種の侵入による種の置換 (Arayama 2012, Morton 2008) などが頻発することで種組成が変更され、しばしば捕食-被食関係に変化が生じている。そうした食物網の変化によって、例えばヒトデのような捕食者が取り除かれ続けると、特定の被食者が優占する単純な群集構造へ改変される (Pain 1966)。しかし、改変された食物網がどのような遷移を経て安定化するのかが詳細な研究が行われておらず、そのメカニズムの解明が求められている。

イボニシ *Thais (Reishia) clavigera* は岩礁潮間帯に広く生息する汎食性の上位捕食者である。本種は単一餌種で長期飼育される事でその餌種への選好性を高める事が知られており (Abe 1994)、このことは周辺環境の種組成に応じて柔軟に食性を変化させ得る事を予見させる。さらにそのような応答は、先述の種組成の改変が生じた際、食性を変える事で捕食-被食関係を再構築し、食物網を安定化・持続させる機能を持ち得る事も同時に示唆している。すなわち、食物網の持続性はイボニシの食性変化を介して維持されている可能性が高いが、そのような検証例はない。

本研究では、食物網の持続性の前提となる食性変化に焦点を定め、「岩礁潮間帯ではイボニシの食性が生息地の種組成によって変化する」という仮説を検証することを目的とした。

2 材料と方法

2.1 フィールド調査

調査地として、伊豆半島南部に位置する 3 か所 (白浜・鍋田・須崎) の岩礁潮間帯を選定し、それぞれの調査地において 1×1 m の方形区を用いて種組成を算出した。

2.2 対象生物

実験には、捕食者としてイボニシを、餌種としてムラサキイガイ *Mytilus galloprovincialis* (以下イガイ)、カメノテ *Capitulum mitella* およびクロフジツボ *Tetraclita japonica* (以下フジツボ) を用いた。尚、須崎ではムラサキイガイに代わって優占していた同科のホトトギスガイ *Musculista senhousia* を用いた。

2.3 捕食実験

本実験では、調査地間でのイボニシによる捕食率の相違を検討した。実験には、流水孔を設けた円形プラスチック容器 (クリーンカップ PAPM385、4 cm×φ8 cm) を飼育ケースとして用い、これをバットに収容して海水を掛け流した。イボニシと任意の餌種 2 種を 1 個体ずつ飼育ケースに入れて 2 日間静置し、捕食された種を記録した。

2.4 選択実験

本実験では、調査地間でイボニシの餌種に対する選択行動の相違を検討した。実験には、プラスチック製 Y 字型実験装置を用いた。海水を掛け流した上端 2 か所へ異なる餌種を 1 種ずつ配

置し、下端へ配置したイボニシがいずれの餌種を設置した分岐へ移動したのかを記録した。

2.5 安定同位体分析

本分析では、鍋田における対象生物について、実際の捕食-被食関係を検討した。鍋田で採集した各種について、安定同位体分析装置 (Flash 2000, ConFlo IV, DELTA V Advantage) を使用して炭素・窒素安定同位体比を求め、イボニシの食物源を推定した。

3 結果

フィールド調査の結果、鍋田と白浜は、須崎に比べ種組成が類似していた。しかし、個体数の多寡では、白浜でのみフジツボが他の餌種に比べ有意に多い事が確認された。捕食実験では全ての調査地でカメノテへの選好性が最も高く、選択実験では全ての調査地でイガイへの選好性が最も高かった。ただし、白浜では双方の実験において、フジツボへの選好性がそれらと同等に高かった。鍋田における安定同位体の分析から、イボニシはイガイと比べて栄養段階の指標となる窒素安定同位体比が高く、炭素安定同位体比は同等であった。

4 考察

種組成の異なる鍋田と須崎、白浜と須崎を比較すると、捕食実験・選択実験において餌種への選好性に大差は認められなかった。このことから、生息地の種組成によらず、イボニシの食性には生得的な選好性が存在することが示唆される。しかしフジツボの個体数が有意に多い白浜では、フジツボへの選好性が高まる事が確認されたため、餌種の個体数の多寡によって選好性が変化する可能性は否定できない。

このことから、イボニシの食性変化が相対的な種組成の相違ではなく、餌種の多寡によって引き起こされることが示唆される。

安定同位体分析の結果から、イボニシはイガイを専食していることが推察された。これは選択実験で得られた選好性と一致しており、天然状態での選好性を反映しているのは選択実験の結果といえる。

本研究の結果から、イボニシの食性には生得的な選好性があるものの、生息地の多寡種によって変化し得ることが示唆された。このことから、岩礁潮間帯において構成種の増減が生じた場合、イボニシの食性変化を介して食物網が持続的に存続する可能性が示唆される。

イネの発達過程におけるペクチンメチルエステル化制御に関する研究

鎌田 志保美 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 岩井 宏暁 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

高等植物において細胞壁は物理的構造の維持だけでなく分裂組織の維持や花器官形成といった発生に重要な役割を担っている。細胞壁に含まれる多糖類のひとつであるペクチンは、栄養成長や生殖成長の細胞接着にも関与していることが示唆されている。ペクチンはそのメチルエステル化度を変化させることで細胞壁特性に対して大きく影響する。高メチル化状態のペクチンは流動性が高いが、低メチル化状態のペクチンはカルシウムと結合することが可能となりゲル化し粘度を持つようになる。ペクチンはゴルジ体で生合成される際に、ペクチンメチルトランスフェラーゼ (PMT) によりメチル化された状態で細胞壁に放出される。細胞壁中では、ペクチンメチルエステラーゼ (PME) によって脱メチル化され、カルシウム架橋を形成することで知られている。双子葉植物では、ペクチンのメチル化度の調節によって細胞壁の性質を制御し、細胞壁の硬度や接着性に大きく影響することが知られている。シロイヌナズナの変異体を用いた研究では PME が花粉の発達において重要な働きをすることや PMT の細胞接着への関与が示唆されている。しかし、全身に多量のペクチンを含む双子葉植物ではペクチンの機能欠損により大きな影響を及ぼして致死になることが多い点が問題点である。そこで、植物体全体の割合としては、ほとんどペクチンを含まないが、分裂組織や生殖組織といった植物の発達に重要な組織に局所的に多量のペクチンを含む単子葉植物のイネを用いて、各発達過程におけるペクチンのメチル化制御機能に注目して実験を行った。本研究では分化の開始点である分裂組織や受粉・受精過程における柱頭と花粉、花粉と伝達組織などの細胞接着を求められる生殖組織において、これら組織の形成や発達におけるメチル化度調節の機能の一端を明らかにすることを目的としている。

材料と方法

・材料

イネ (*Oryza sativa* 品種: Hwayoung, Dongjin, Nipponbare) を用いた。日本の主要な穀物であるイネは全ゲノム配列が解読されており、リソースが豊富などのメリットがあるため単子葉のモデル植物として研究によく利用されている。

・方法

本研究室では現在までに相同性検索により T-DNA 挿入変異株 (T-DNA KO) よりスクリーニングした *ospmt10*、*ospmt16* についてペクチンのメチル化度の低下が確認されており、これらは全ての植物種において未同定である PMT 遺伝子の候補であると考えている。そこで、これら2つの遺伝子についてピキア酵母 (*Phicia pastoris*) を用いて組換えタンパク質を作成し、PMT 活性を調査するために、コンストラクトの作成を行った。

また、近年 PME の阻害剤であることが報告された EGCG ((-)-Epigallocatechin gallate) をイネの花と根に投与した。花は、500 μM の EGCG を含む 0.2% 寒天を、開花前の花の内部に直接投与した。投与は毎日行い、2週間後に花の形態と稔実

率を調査した。根は 50 μM の EGCG を含む 1% の寒天培地において発芽率を調べた。また、50 μM の EGCG を含む KIMURA B 培地を用いて水耕栽培を行い、2週間後に地上部や地下部の生長量を調査した。

結果

PMT10、PMT16 の活性測定用組換えタンパク質を発現するためにピキア酵母に導入する用のコンストラクトを作成した。現在、組換えタンパク質の発現を行っている。

EGCG を添加した水耕液を用いて栽培した結果、地上部の生長量が抑制されたが、地下部には差がみられなかった。花に EGCG を 1~2 週間投与したところ、稔実率の違いは確認されなかった。

考察

メチル化度が低い状態である PME-OX や PMT-KO では栄養成長への影響はみられなかったが、生殖成長を抑制することが分かっている。本研究で用いた PME 阻害剤である EGCG の投与は、メチル化度を高く維持する効果があると考えられる。WT を高メチル化状態にすると栄養成長を抑制するが生殖成長への影響はみられなかった。ペクチンのメチル化度が低く流動性が小さい状態では生殖成長に異常をもたらし、メチル化度が高く流動性が大きい状態では栄養成長に影響をもたらすことがいえる。栄養成長期においてペクチンが豊富である分裂組織においては、脱メチル化することで、ペクチンとカルシウムの架橋を促し、高い細胞接着性を維持することで発生発達に寄与していると考えられる。また、生殖成長期においてペクチンが多い花組織では、メチル化度を高く維持することで流動性のある細胞壁空間を調節し、雌しべの中を花粉管が伸長するなどの機能に貢献している可能性があると考えられる。今後は作成したコンストラクトを用いて PMT のタンパク質を発現させて活性を測定することと EGCG による PME 抑制実験を進めていく予定である。

ヘミセルロース改変イネを用いた塩ストレス応答に関する研究

菊田 遼 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 岩井 宏暁 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

植物は外界の環境から塩や乾燥といったストレスを受け、あらゆる生理・生化学的な反応を生じる。特に塩ストレスの場合、多くは植物の生長や成育に影響を及ぼし、農業の現場においても減産を引き起こす深刻な要因となっている。塩ストレスにより細胞外の Na^+ 濃度が増加すると細胞内に Na^+ が流入し、細胞質における Na^+ 濃度が上昇する。高濃度の Na^+ は植物にとって有害であり、この Na^+ を細胞外へと排出または液胞内に隔離するため複数の Na^+ 輸送体が活性化される。この活性化には、NHX 型遺伝子や SOS (Salt Overly Sensitive) 遺伝子といった特定の遺伝子の発現が必要であることがわかっている。特に SOS5 に関して、細胞表層に局在する GPI アンカータンパクをコードしていることが明らかにされ、細胞壁構造に重要な chitinase-like protein (AtCTL1) が塩ストレスに重要であることが示される。また、細胞壁中のペクチンとカルシウムイオンの結合が塩ストレスにより妨げられ、細胞壁構造に変化が生じるという報告もされている。このように塩ストレス応答の一部が細胞壁構造と関係している可能性が示唆されているが、細胞壁構造と塩ストレスとの関係はほとんど理解されていないのが現状である。

そこで本研究では、塩ストレス条件下で細胞壁構造の変化を調査するのではなく、細胞壁改変植物を用いて塩ストレス条件下での生理学的解析を行うことで、細胞壁構造が塩ストレス応答において果たす役割を調査することをを行った。そして、細胞壁の主骨格であるセルロース微繊維の間を架橋する多糖類の中で、最も主要であるヘミセルロースに注目して研究を行った。ヘミセルロースとは、セルロース微繊維やペクチンとともに細胞壁を構成する主要な多糖類であり、単子葉植物のモデル植物であるイネの細胞壁のヘミセルロースは、キシログルカンや 1,3- β -D-グルカン、キシランにより構成される。特にキシランがセルロース微繊維を架橋し細胞壁の強度に関係していると考えられている。現在までに、本研究室においてヘミセルロース改変イネにおいて、細胞壁構成が変化することで、物理的強度や病害応答性が変化することがわかっている。これらのヘミセルロース改変イネを用いて、塩ストレス条件下での応答を調査することで、細胞壁構造が塩ストレスに対して果たす役割を明らかにすることを本研究の目的としている。

試料および方法

研究材料には、モデル植物であるイネ (*Oryza sativa*: 品種 日本晴) を用いて水耕栽培における塩ストレス条件の検討を行った。水耕栽培はインキュベーター内で 17 日間行い、うち 3 日間塩ストレス処理を行った。塩ストレス処理前後のイネをサンプリングし地上部と地下部の生重量 (fresh weight: FW) と乾燥重量 (dry weight: DW) の測定を行った。50, 80, 100, 120 mM の塩スト

レスで条件検討を行った。次にヘミセルロース改変イネを用いて、条件検討で得られた濃度の塩ストレス条件で同様に水耕栽培を行った。ヘミセルロース改変イネには、キシラナーゼ過剰発現体、キシロシダーゼ過剰発現体、アラビノフラノシダーゼ過剰発現体を用いた。

結果および考察

水耕栽培による塩ストレス処理を行うにあたって、耐塩性の変化したものをスクリーニングする濃度の調査を行った。50 mM NaCl では、0 mM のものと大きく変わらない生長量を示し、100 mM 以上になるとほぼ致死性になってしまった。そのため、塩ストレスに対して耐性を持つ、持たないとされる系統の生育の違いを調査する塩濃度として 80 mM NaCl を設定した。

キシラナーゼ過剰発現体において、野生型の地上部では、葉先が水分を失い色も淡くなり、生重量がストレス処理前と比較して 90% 前後であった。これは脱水などの生理傷害が塩ストレスによりおこり、成長が阻害されていることが示された。

一方で、キシラナーゼ過剰発現体の地上部ではやや成長が見られ、第 2, 3 葉は水分を失っているものの、一番新しい第 4 葉は成長している様子が見られた。地下部に関しては、野生型は生重量がストレス処理前と比較して成長がほぼ見られないが、過剰発現体では塩ストレス条件下であっても約 30% の成長増加が見られた。同じく、キシロシダーゼ過剰発現体においても、塩ストレス条件下でも水分が失われることなくよく成長し、約 30% の成長増加が見られた。地下部についても同様の結果が得られた。アラビノフラノシダーゼ過剰発現体に関しては、野生型と比較して耐塩性が上がるといえる有意な差は得られなかった。

本研究により、ヘミセルロース改変による細胞壁構造の変化したイネでは、耐塩性が向上するということが明らかとなった。細胞壁構造が耐塩性に対して機能を有している可能性が考えられる。キシラナーゼ、キシロシダーゼ、アラビノフラノシダーゼはヘミセルロースを構成しているキシランを分解する酵素である。ヘミセルロース改変イネであるこれらの過剰発現体では、共通してヘミセルロース量が減少し、一方でセルロース量が増加していることがわかっている。しかし、本研究の結果からセルロース量だけが耐塩性を向上させるとは言えないことが示唆された。今後は、①耐塩性が向上したサンプル、特に根の分裂組織の細胞形態観察、②染色による Na^+ の細胞質内あるいは液胞内への取り込みの可視化、③耐塩性に重要である Na^+ 輸送体などの発現解析を行っていきたいと考えている。

シロイヌナズナの XTH 過剰発現株を用いたサリチル酸応答と細胞壁構造変化に関する研究

齋藤 史織 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 岩井宏暁 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

植物は一生を通じて乾燥ストレスや塩ストレス、低温ストレスなどの環境変化によるストレス、そして動物・昆虫による食害および病原菌の侵入によるストレスなど、多くのストレスにさらされる。このとき植物は様々な応答をすることにより、それらへの抵抗性を示す。その一例として植物は病原菌に感染すると、微生物感染部位の周りの細胞をすぐさま死なせることによって病原菌への栄養補給を断ち切り、さらに他の部位への侵入を防ぐ。そしてこの防御機構の作動がきっかけとなってその植物は植物体全体を通して多種類の病原菌に対する抵抗性を持つようになり、これを数日間持続させることができる。全身獲得抵抗性と呼ばれるこの現象は植物ホルモンの一種であるサリチル酸のシグナルによって引き起こされると考えられている。このサリチル酸の蓄積は植物に病原菌に対する抵抗性というメリットをもたらす一方で、植物の成長および発達の遅れを生じさせる。植物の成長には植物特有の構造である細胞壁が関わっていると考えられるが、これまでのところ細胞壁の変化とサリチル酸などの病害応答性ホルモンとの関係についてはほとんどわかっていない。

サリチル酸を蓄積することで萎縮するシロイヌナズナ変異株の1つに *siz1* がある。この *siz1* では *XTH8* および *XTH31* の発現が減少していた。エンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (XTH) は細胞壁伸展性を制御する重要な酵素であり、シロイヌナズナにおいては33個の遺伝子ファミリーが存在している。この酵素は加水分解活性(XEH)とつなぎかえ活性(XET)の2つの活性を持つことが知られているが、*siz1* において発現が減少していた *XTH31* は、このうち XEH 活性のみを持つ特殊な酵素であることが近年の研究で示唆されている(Kaewthai N et al. 2013)。さらに、この *XTH31* をシロイヌナズナにおいて過剰発現させた変異株を作製すると、その植物体が大きくなることが示されている。そこで、本研究ではこの *XTH31* 過剰発現株を用いて解剖学的観察および生理学的解析を行うことで XTH と細胞壁構造変化の関係およびサリチル酸の蓄積がもたらす細胞壁構造変化を明らかにすることを目的としている。

【材料・方法】

モデル植物として知られているシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生株 (WT: *Columbia*)、およびこれに *XTH31* を過剰発現させた変異株を用いて実験を行った。

1. *XTH31* 過剰発現株の形態学的観察

4週目の WT および *XTH31* 過剰発現株の第5葉の表と裏の表皮細胞を、デジタルマイクロスコブを用いて観察した。また、同条件の葉を FAA (ホルマリン:氷酢酸:50%エタノール=5:5:90) で固定し、テクノビット樹脂に包埋し組織切片を作成した。トルイジンブルーにより染色し、葉断面の組織観察を行った。

2. WT および *XTH31* 過剰発現株の細胞壁構成糖分析

4週目の WT および *XTH31* 過剰発現株 (各20個体) の乾燥細胞壁を調製した。この乾燥細胞壁を、2M TFA で加水分解し、

細胞壁マトリックス画分を得た。また、乾燥細胞壁に対して 50 mM Na₂CO₃, 1M KOH, 4M KOH による分別抽出を行い、ペクチン性画分、ヘミセルロース画分1および2、セルロース画分に分け、ガスクロマトグラフィーを用いて構成糖分析を行った。

3. SA 噴霧時の *XTH31* 発現部位

XTH31::GUS を用いて4週目にサリチル酸 (1mM, 1week) 噴霧した個体としていない個体の GUS 染色性の違いについて観察を行った。

【結果】

1. *XTH31* 過剰発現株の形態学的観察

表皮細胞を観察すると、WT と比べて明らかに *XTH31* 過剰発現株ではその細胞サイズが大きいことが分かった。葉断面の組織観察については現在進行中である。

2. WT および *XTH31* 過剰発現株の細胞壁構成糖分析

WT に比べて *XTH31* 過剰発現株では乾燥細胞壁量が生重量に対して約 60% 少ないことが明らかになった。また、細胞壁マトリックス画分における中性糖量が約 60% 多いことも明らかになった。さらにヘミセルロース性画分に注目すると、特にグルコースが約 81%、キシロースが約 77% 多かった。

3. SA 噴霧時の *XTH31* 発現部位

現在進行中である。

【考察】

・*XTH31* 過剰発現株の表現系

XTH31 過剰発現株は WT に比べて細胞サイズが大きくなるにもかかわらず、その生重量に対する乾燥細胞壁量は少なかったことから、*XTH31* 過剰発現株の細胞は水分含量が非常に高いと考えられる。

・*XTH31* の過剰発現がもたらす影響について

XTH31 過剰発現株は WT に比べてヘミセルロース中のキシロースとグルコース量が非常に多かった。XTH のターゲットとなるキシログルカンが増えていると推測される。*XTH31* はキシログルカンを加水分解する酵素であるにもかかわらず、キシログルカン量が増大していたことは、フィードバックによるキシログルカン合成が生じたためでないかと考えている。今後、キシログルカン合成遺伝子の発現を確認する予定である。

塩ストレス条件下のトマト果実成熟過程におけるペクチン分解酵素の解析

高見 るり子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 岩井宏暁 (筑波大学 生命環境系)

【背景及び目的】

塩ストレスは浸透圧ストレス、イオン毒性を引き起こし、植物の生育や代謝に支障をきたす場合が多い。しかし、塩ストレス条件下で栽培したトマトでは、グルコースやフルコース等の糖類やプロリン、 γ アミノ酪酸等のアミノ酸の蓄積が起きることで、商品価値の高い果実が生産できることが知られている。しかしその一方で、塩ストレス条件下での栽培は、果実サイズの減少と硬度の上昇が見られ、また果実数が減少するデメリットも生じている。果実のサイズと硬度には、細胞壁の構造が大きく関わっていることが知られている。しかし、塩ストレス下における細胞壁構造に着目して研究された報告はほとんどない。

果実成熟過程における果実軟化は、果実細胞壁中に約50%と多く含まれることから、細胞壁成分の中でもペクチンの分解に注目した研究が行われてきた。ペクチンの分解はまずペクチンを脱メチル化するペクチンメチルエステラーゼ (PME) が働き、その次に脱メチル化ペクチンを分解し、ポリガラクトツロナーゼ (PG) が働くことで、ペクチンは低分子化が進行する。この PME は植物ホルモンであるエチレンによって誘導されることが知られている。現在までに私達の研究室では、トマト果実の成熟/軟化過程において、組織ごとに異なる細胞壁の分解と再構成が生じること (Hyodo H et al. 2013)、そして、果実サイズが決定する果実形成過程ではペクチンの蓄積と脱メチル化が重要であること

(Terao A et al. 2013) を報告してきた。そこで、これらを踏まえ本研究では、塩ストレス条件下におけるトマト果実の大きさと硬度の変化が、ペクチンのメチル化調節と分解とどのような関係にあるのかを明らかにすることを目的に研究を行った。そのことを通して、塩ストレスによってトマト果実の食感に変化が起る仕組みの一端が明らかにできることを期待している。

【方法】

1. トマトの水耕栽培および塩ストレス処理

試料: トマト (品種: Micro Tom) を、25°C のインキュベーター内で Yin et al. 2010, JXB の方法を用いて水耕栽培を行った。水に濡らしたろ紙にトマト種子を播種し、子葉が出た後ロックウールに植え替えを行った。塩ストレスは花が咲きそろった時点で行われ、NaCl 濃度の調節は電気伝導率測定器を用いて徐々に濃度を上昇させ最終的に 150 mM で栽培を行った。

2. サンプルング

1 によって育てたトマト果実を成熟段階で 6 ステージ (Immature green, Mature green, Breaker, Turning, Red ripe, Over ripe)、果実の組織を 5 つ (外果皮、内果皮、隔壁、ローキュラー、種子) に分けて実験を行った。

3. 果実の生重量・果径・果高の測定

塩ストレス処理、コントロール条件下の Over ripe ステージの果実を無作為に複数個体について収穫し、その生重量、果径、そして果高の測定を行った。

4. PME 活性測定

酵素液として、89%メチル化ペクチンを基質とし 10 秒間あたりに低下する吸光度を PME 活性として測定した。

5. PG 活性測定

2 のサンプルから抽出した細胞壁中のタンパク質を酵素液として、ペクチンを基質に用い 1 分間あたりに放出されるガラクトツロン酸量を PG 活性として測定を行った。

【結果と考察】

●果実の生重量・果径・果高の測定

コントロールと比較し、塩ストレス処理をした Over ripe ステージの果実では、生重量は約 3.7%、果径は 1.8%、果高は 1.6% の減少が確認された。この特徴は、塩ストレス条件下で生育させた種々のトマト果実に共通に生じている表現型である。したがって本実験系のトマト果実が、確かに塩ストレスによる症状を示していることが示唆された。

●ペクチン分解酵素活性

コントロールと比較し、塩処理をした果実では、Immature green, Mature green といった果実の大きさを決定する成熟初期のステージにおいて、外果皮、内果皮、隔壁の PME 活性の上昇が見られた。活性のピークは Mature Green で観察され、特に外果皮においては、コントロールと比較し約 15.5% 上昇していた。ローキュラーと種子については、コントロールと塩ストレス処理のもので、ステージ全体を通して活性低く、大きな差は見られなかった。PG 活性については、現在進行中である。活性の上昇については、塩ストレスによるストレス応答でエチレンが多く発生し、このエチレンが PME を活性化させた可能性がある。

一方、特に果実の硬さの変化が生じ軟化が進行する Turning ステージ以降において、塩ストレス処理による組織におけるペクチン分解酵素活性の違いが見られた。外果皮においては、特に軟化が進行する Red ripe, Over ripe ステージにおける PME 活性が、塩ストレス処理により約 50% 減少していた。さらに、実際に低分子化を行う PG の活性も約 40% 程度減少していた。しかし、内果皮においては、PME、PG の両方のペクチン分解酵素活性が上昇する傾向が確認された。この結果から、果実成熟の後期では外果皮においては、ペクチンの分解および低分子化が抑制され、内果皮においては促進されていることが示唆された。外果皮は、フレームとして果実を支え、果実硬度に関連する組織であるため、塩ストレス条件下における果実硬度の上昇は、外果皮におけるペクチン分解の抑制が寄与している可能性が考えられる。一方、内果皮における軟化は、むしろ促進されている可能性が示された。

Ca 欠乏条件下のトマト果実成熟過程における細胞壁合成遺伝子の組織別発現解析

HU QING (筑波大学 生物学類)

指導教員：佐藤 忍 (筑波大学 生命環境系)

【背景および目的】

果実は、植物にとっては種子の保護や散布のために重要な生殖器官である。多くの果実では成熟に伴い、果実が軟らかくなることが知られている。この果実軟化の現象は細胞壁の分解が関係していると考えられている。しかし、その果実内部では種子形成が同時に進行していることから、細胞壁の分解のみでなく合成や架橋形成も必要であり、細胞壁の変化は組織ごとに異なるのではないかと考えられる。現在までに、トマト果実成熟過程において、果実の細胞壁の主成分であるペクチン代謝は組織ごとに異なる調節がなされていること、また、Caがペクチンと他の細胞壁多糖との間の結合性に重要であることを示されている。また果実が軟らかくなくても、その球状の形態を保つためには分解のみでなく合成や架橋形成も必要であると考えられる。細胞壁骨格であるセルロースとの架橋成分であるヘミセルロース性多糖類のキシログルカン、キシランは、ともに果実の軟化過程において、分解のみでなく合成もされていることが示唆され、外果皮と内果皮の輪郭部分では果実の形状を保つため細胞壁の特徴的な再構築が行われていることが示唆されている。また、このヘミセルロース性多糖類と架橋を行うペクチンでは、特に、外果皮において、ペクチン-Ca架橋や側鎖を持つペクチンが高密度に存在していたことから、これらのペクチンが外果皮の細胞間、組織間の接着に重要であると考えられている。本研究では、Ca欠乏条件下で栽培したトマト (品種Micro Tom) を用いて、Ca欠乏が果実成熟に伴う特徴的な細胞壁の再構築にどのように影響するのかに注目し、果皮組織 (外果皮、中果皮、内果皮) におけるキシログルカン、キシラン、そしてペクチンの合成遺伝子の発現解析を行う。このことにより、果実成熟過程の細胞壁再構築過程におけるCaと細胞壁との架橋のはたらきの一端を明らかとすることを目的としている。

【試料】

研究材料には、トマト (*Solanum lycopersicum* 品種:MicroTom) を用いて、25°Cのインキュベーターで水耕栽培により栽培した。通常栽培条件であるコントロールとCa欠乏条件下で生育した果実を4つの成熟段階 (Mature Green, Breaker, Turning, Red Ripe) に分けてサンプリングを行い、各果実を4つの組織 (外果皮、中果皮、内果皮、子室組織) に分けて、計32サンプルで2回の反復実験を行った。

【方法】

各サンプルのRNAを抽出し、cDNAに合成後、ペクチン合成遺伝子のGAUT family、キシログルカン合成遺伝子のXXTのプライ

マーを用いて、コントロールとCa欠乏条件下におけるトマトの組織ごとの発現解析をRT-PCRにより行った。

【結果および考察】

・ペクチン合成遺伝子：GAUT family

コントロールと比較して、カルシウム欠乏条件において、果実成熟過程における発現パターンには、大きな違いは見られなかった。しかし、特に内果皮や子室組織において、発現量の減少が確認された。これは、カルシウム欠乏条件下で細胞壁中のペクチン量が減少している結果を支持している。以上の結果から、カルシウム欠乏条件下では、ペクチン合成が抑制されることが、ペクチン量の減少に寄与しているものと考えられる。

・キシログルカン合成遺伝子：XXT

コントロールが、果実サイズの決定が行われるステージであるMature Greenと果実軟化の重要なステージであるTurningにおいて、外果皮と内果皮で二つの発現ピークを示していた。一方、カルシウム欠乏条件では、外果皮においては発現のピークが早いステージにずれてBreakerでの1つのピークを示した。内果皮においては、発現量が減少しており、一定の発現パターンを示した。以上の結果から、カルシウム欠乏条件下では、ヘミセルロース合成が外果皮で異なっており、特に内果皮において抑制されていることが示された。

【今後の展開】

本研究により、カルシウム欠乏条件下における細胞壁合成が、組織ごとに異なった制御を受け、特に内果皮においてペクチン、ヘミセルロースともに抑制されていることがわかった。今後は、もっと早い成熟段階であるImmature Greenと軟化が進行したステージであるOver Ripeのステージのサンプリングを行うとともに、キシラン等の他の細胞壁成分の発現解析も行う予定である。

トマトの落花と落果で異なる離層細胞壁の制御メカニズムに関する研究

土屋 結実 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 古川 純 (筑波大学 生命環境系)

背景及び目的

植物個体において細胞同士が離れる現象の代表に、器官脱離があげられる。特に落花や落果を代表とする器官脱離は農業や園芸学において非常に重要な現象の一つである。多くの植物では、葉柄や花柄の基部に離層の形成を伴う。離層部には特殊に分化した小さな分裂組織細胞が存在し、繊維が存在していないため、機械的にも弱いことが知られている。受粉が成功しなかったとき、花は離層から落花する。この時、花は離層から脱離することが知られている。トマトでは受粉成功後の果実形成過程で離層を含む小花柄を発達させ落果を防ぐ一方、完熟した果実では離層に簡単な刺激を与えるだけで落果する事が観察されている。このようにトマトでは受粉及び果実成熟を介した二段階の器官脱離制御が行われていることが示唆されているが、現在までにその制御機構の違いはよくわかっていない。そして、この二段階の脱離で、細胞壁構成多糖に分布的・量的変化が起こっている事が、免疫組織化学染色で明らかになっている (Iwai H et al. 2013)。花の脱離において、離層を形成する細胞層は基部側で、キャップ構造を構成する。このキャップ構造には、キシログルカンとアラビノガラクトンが蓄積し、新しい細胞壁の再編成が確認されている。果実の脱離においても、このキャップ構造が確認されているが、落果ではリグニンによる細胞壁再編がされることが分かっている。

このように器官脱離では細胞壁再編が行われ、また落花と落果で異なる細胞壁制御がされる事が示唆されている。しかし現在までは脱離前、脱離が生じる2ステージのみの観察が行われただけで、受粉が行われなかった直後から脱離が生じるステージまでの過程において、どのように細胞壁再編の変化が生じているかについて全くわかっていない。また、その細胞壁再編に関わる細胞壁関連酵素の動態についても未知である。そこで本研究では、落花と落果の離層における細胞壁多糖類と細胞壁関連酵素の経時的变化を観察し、その制御メカニズムについて明らかとすることを目的に実験を行った。

細胞壁再編に関わる酵素として、キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (XTH) とエクспанシン、二次細胞壁合成に関わるセルロース合成酵素 (CesA7) に注目した。XTHはキシログルカンのつなぎかえ/加水分解を行う酵素であり、細胞伸長をはじめとした細胞壁再編に大きく関わっていることが知られている。エクспанシンはキシログルカンとセルロース間の結合の切断をするとともに、器官脱離時の離層細胞の膨張に関与しているとされている。また、CesA7は維管束分化・発達のマーカー遺伝子である。これら関連酵素を調べることで、細胞壁再編のメカニズムについて調査を行った。

材料及び方法

研究材料にはトマト (*Solanum lycopersicum*) を用い、品種はトマト果実研究のモデル品種である Micro Tom を用いた。花のステージを開花後日数として Day Post Anthesis: DPA で表した。花においては、-1DPA の離層、受粉した花 (脱離しない) の 1, 2, 3DPA、受粉していない花 (脱離する) の受粉阻止後 1, 2, 3 DPA の離層をサンプリングした。また、受粉阻止した花の器官脱離が容易に生じるステージである小花柄が黄色くなっている離層の8つをサンプリングした。この8つのサンプルで抗 XTH 抗体、抗エクспанシン抗体、抗キシログルカン抗体 (LM15)、抗アラビナン抗体 (LM6) を用いた免疫組織化学染色を行い、それぞれの蓄積の経時的变化を観察した。果実においては、現在進行中であるが、未熟な果実 (脱離しない) と、完熟した果実 (脱離する) の離層をサンプリングし、抗 XTH 抗体、抗エクспанシン抗体、抗 CesA 抗体を用いてドットプロットによるシグナル強度の同定を行う予定である。

結果と考察

落花の際の離層部では、開花後から3日目にかけて、ヘミセルロース性多糖類であるキシログルカン、アラビナンが、脱離するステージをピークに受粉阻止直後から徐々に蓄積していく様子が観察された。また、細胞壁のゆるみに重要なエクспанシンは、このヘミセルロース性多糖類とほぼ同様のパターンでシグナルの増加が観察された。

しかし、XTHは受粉阻止した直後から増え始め、一日目で蓄積のピークを迎え、その後シグナルは減少した。一方、このようなヘミセルロースとエクспанシン、XTHの増加は、落花が生じない受粉を行った場合は観察されなかったことから、これらの変化は器官脱離が起こる花の離層に特有であることが示唆された。XTHは受粉阻止した直後からキシログルカンの合成や代謝に関わり、このXTHの細胞壁再編の働きが、その後のキシログルカンの増加を促進していると考えられたことから、器官脱離時のキャップ構造の構築は、受粉が生じなかった直後から行われていることが示唆された。またエクспанシンが日数の経過につれ増加し、脱離が行われるタイミングでピークを迎えるのは、エクспанシンによる細胞の膨張が、器官脱離の実行の段階で必要であるためだと考えられる。またエクспанシンの働きでキシログルカンがセルロースから切断されたことが、抗体により認識されるキシログルカンの増加に繋がったと考えられる。このように落花の際には、細胞壁関連酵素が働き、その結果細胞壁多糖類の分布にも変化が現れていることが示された。果実での免疫組織化学染色は現在進行中であるが、抗 CesA7 抗体による染色で、二次細胞壁合成過程を今後見ていく予定である。

キンクロラククと合成オーキシンのシロイヌナズナにおける作用性比較

氏名：河野 裕之（筑波大学 生物学類）

指導教員：松本 宏（筑波大学 生命環境系）

背景・目的

キンクロラククは、オーキシン型除草剤に分類されている水稲・芝地用の薬剤である。本剤を広葉植物に処理すると、オーキシンと同様の症状が観察されることから、オーキシン剤として分類されている。しかしながら、イネ科植物での症状や作用は他の合成オーキシン剤と同一でないことや、他のオーキシン剤とは異なりイネ科植物間に非常に高い選択性を有することから、キンクロラククのイネ科植物での作用機構はオーキシン剤と同一でない可能性が考えられる。

オーキシンは、transport inhibitor response 1 (TIR1)/auxin-related F-box proteins (AFB)、およびオーキシン結合タンパク質 1 (ABP1) によって受容される。TIR1/AFB 受容体では、オーキシンが結合するとユビキチンリガーゼ複合体が転写抑制因子 auxin/indole-3-acetic acid (AUX/IAA) の分解を促進して、オーキシン応答が現れる。

合成オーキシン剤が TIR1/AFB 受容体群の中のいずれと親和性が高いかは、化合物ごとに異なっていることが次第に明らかとなってきた。シロイヌナズナを用いた試験では、ピクロラム（オーキシン型除草剤）は AFB4 や AFB5 との結合が除草活性の作用発現に関係していることが報告されている。しかし、キンクロラククについては、作用発現における TIR1/AFB 受容体の役割については不明であった。

また、本研究の先行研究において、2,4-D（オーキシン型除草剤）はトウモロコシのオーキシン結合タンパク質 (ABPs) と結合活性が高いのに対して、キンクロラククはほとんど結合活性がなかったことから、キンクロラククのオーキシン受容体との親和性は他の合成オーキシン剤と異なることが考えられた。

そこで本研究では、まずシロイヌナズナを用いて、キンクロラククの作用特性と作用発現における TIR1/AFB 受容体の役割について、代表的な合成オーキシン剤である 2,4-D と比較しながら検討することを目的とした。

材料

供試植物：

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh)

供試薬剤：

キンクロラクク (3,7-Dichloro-8-quinolinecarboxylic acid)
2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)

実験方法

1. 薬剤の生育阻害活性

MS 寒天培地にキンクロラククおよび 2,4-D 溶液を添加し、シロイヌナズナを播種後 10 日間生育させた後、根長を測定し、各薬剤の 50% 生育阻害濃度 (GR₅₀ 値) を算出した。

2. 生育阻害作用における TIR1/AFB 受容体アンタゴニストの添加効果

MS 寒天培地で発芽させたシロイヌナズナを、GR₅₀ 濃度のキンクロラククおよび 2,4-D 溶液、さらに PEO-IAA (TIR1/AFB 受容体アンタゴニスト) を添加した MS 寒天培地に移植し、7 日間生育させた。その後、根長を薬剤単独処理区とアンタゴニスト混合処理区で比較した。

3. オーキシン誘導性レポーター遺伝子 (*DR5::GUS* および *BA3::GUS*) を導入したシロイヌナズナ形質転換体での薬剤処理後の GUS 染色

それぞれのシロイヌナズナ形質転換体を MS 培地で 10 日間生育させ、キンクロラクク溶液 (0, 5, 50, 100, 500 μM) および 2,4-D 溶液 (0, 5, 50 μM) に根部を 7h 浸漬する処理を行った。その後、GUS 染色液に一晩浸漬し、70% エタノールで植物体の色素を取り除き、顕微鏡を用いて *DR5::GUS* および *BA3::GUS* の発現パターンを観察した。

結果・考察

1. 薬剤の生育阻害活性とアンタゴニストの添加効果

薬剤を添加した MS 寒天培地にて生育させたシロイヌナズナでの GR₅₀ 値は、キンクロラククで 25 μM、2,4-D で 0.05 μM であり、感受性に大きな違いが認められた。

また、キンクロラククおよび 2,4-D のいずれでも、単独処理区で認められた根部での生育抑制が、TIR1/AFB 受容体アンタゴニストの添加によって回復したことから、キンクロラククと 2,4-D の両薬剤のシロイヌナズナでの作用発現には、TIR1/AFB 受容体への結合が関与しているものと考えられた。

2. オーキシン誘導性レポーター遺伝子を導入したシロイヌナズナ形質転換体での薬剤処理後の GUS 染色

DR5::GUS を導入したシロイヌナズナ形質転換体では、2,4-D 処理では 5 μM 以上で、根部全体および第 2 葉において GUS の発現が見られたが、キンクロラクク処理では 500 μM の高濃度でようやく第 2 葉のみに GUS の発現が見られた。このことから、キンクロラククのオーキシンとしての主な作用部位は、2,4-D とは異なり、根部ではなく葉部であると考えられ、それが 2,4-D との大きな感受性差に繋がっているものと考えられた。また、*BA3::GUS* を導入したシロイヌナズナ形質転換体では、2,4-D は 5 μM 以上で、茎葉部において GUS の発現が見られたが、キンクロラクク処理では 500 μM の高濃度でも GUS の発現誘導は見られなかった。このことから両薬剤で結合する受容体が同一ではない可能性も考えられたが、さらなる検討が必要である。

今後の展望

キンクロラククの除草活性の作用発現に関与している TIR1/AFB 受容体の詳細の検討と、ABP1 の関与についても検討する。

メタチロシンによるレタス根部における活性酸素発生機構

中村 真之 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 松本 宏 (筑波大学 生命環境系)

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一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物について検討した結果、メタチロシンにも植物毒性があることが示された。後に、メタチロシンは 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、メタ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、メラニン合成中間体 (ドーパキノンドーパミンキノン) 生成時に発生する活性酸素が L-DOPA による植物毒性に関与している可能性が示されている。なお、植物体におけるドーパキノンドーパミンキノン生成にはポリフェノールオキシダーゼ(PPO)が深く関与していることが知られている。

本研究では、先行研究でメタチロシンに感受性とされたレタスを用い、メタチロシンによる植物毒性への活性酸素の関与を検討し、さらに活性酸素の発生機構に迫ることを目的とした。

材料

供試植物

レタス (*Lactuca sativa* L. cv. Great Lakes 366)

供試薬剤

メタチロシン(3-hydroxy-L-phenylalanine)

L-DOPA(3,4-dihydroxy-L-phenylalanine)

フェニルアラニン

アスコルビン酸

ケイ皮酸(3-phenyl-2-propenoic acid)

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、0.1 mM メタチロシンを含む 0.5%寒天培地、0.1 mM メタチロシンと 1 mM フェニルアラニンを含む 0.5%寒天培地、0.1 mM L-DOPA を含む 0.5%寒天培地、0.1 mM L-DOPA と 1 mM 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、グロースチャンバー(昼/夜: 12h/12h, 25°C/20°C)において生育させ、処理後 3 日目の根部長を測定した。

・TBARS 試験

薬剤処理後 3 日目の植物の根部を採取し、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°C で 20 分間遠心し、上清 500 μl に 0.5% TBA を含む 20% TCA 1 ml を加え、98°C 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°C で 5 分間遠心した後、532 nm と 600 nm の吸光度から TBARS 量を算出した。

・ポリフェノールオキシダーゼ阻害剤の添加

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、0.1 mM メタチロシンを含む 0.5%寒天培地、0.1 mM メタチロシンと 100 μM アスコルビン酸を含む 0.5%寒天培地、0.1 mM メタチロシンとケイ皮酸を含む 0.5%寒天培地にそれぞれ移植し、グロースチャンバー(昼/夜: 12h/12h, 25°C/20°C)において生育させ、処理後 3 日目の根部長を測定した。

結果および考察

・生物試験

レタスの根部はメタチロシン、L-DOPA 処理により生育が抑制された。またメタチロシンとフェニルアラニンを同時処理すると根長にコントロールとの差が見られなくなった。この結果はフェニルアラニンがメタチロシン処理時における生育抑制の軽減させる作用をもつことを示している。一方で L-DOPA とフェニルアラニンを同時処理してもフェニルアラニンを同時処理しなかった場合と根長に差は見られなかった。

・TBSRS 試験

メタチロシンに感受性とされたレタスにおいて、メタチロシン処理後 3 日目に TBARS 量の増加が見られた。また、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。この結果はメタチロシン処理によってレタス根部における過酸化脂質が増加していること、フェニルアラニンがメタチロシン処理時における過酸化脂質の増加を抑制していることを示している。

・ポリフェノールオキシダーゼ阻害剤の添加

メタチロシンとアスコルビン酸およびメタチロシンとケイ皮酸を同時処理しても、これらを同時処理しなかった場合と根長に差は見られなかった。この結果はメタチロシンによる活性酸素発生がメラニン合成中間体生成と関与していない可能性を示している。

今後の予定

L-DOPA とポリフェノールオキシダーゼ阻害剤を同時処理した場合における、メタチロシンとの作用性比較を行う。さらにメラニン合成中間体生成以外の活性酸素発生機構の検討を行うことで、メタチロシンの植物毒性作用の解明に迫る。

オクチルアセテートによる植物生育抑制機構の解析

西村 彰紘 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 松本 宏 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

除草剤は雑草の防除を通して作物の生産性を向上させることに大きな貢献をしている。しかし、単一の除草剤を繰り返し使用し続けるとその剤に対して抵抗性を持った雑草が出現することがあるため、新規の除草剤開発の必要性は高い。一方で、環境への影響を考えると、新規の除草剤には環境中での易分解性も重要であり、近年、この観点からアレロケミカルが注目されている。

アレロケミカルとは、植物が生産し、他の生物に阻害的あるいは促進的な作用を示す物質で、天然物であるために環境中での分解性が高いものが多く、除草剤への応用が期待されている。アレロケミカルを生産する植物体からの放出経路には主に、根からの滲出、葉やリターからの溶脱、葉などからの揮散の3つがあるが、揮散によって放出される物質にはあまり着目されていなかったため、その研究例も比較的少ない。しかし、近年、揮発性物質が植物の生育に影響を与えることが示されるようになり、また、植物由来の揮発性物質である d-リモネンなどは実際に除草剤として製品化されている。

そこで本研究では、植物生育抑制や促進活性を有する揮発性物質の探索とその活性物質の作用機構を解明することを目的とする。また、乾燥させた植物体では検出できる揮発性物質の数や量が減少することから本研究では未乾燥の新鮮植物体も使用する。

材料

検定植物: レタス (*Lactuca sativa* L. cv. Great Lakes)

対象植物:

イトヒメハギ、ウツボグサ、エンジュ、オミナエシ、カミツレ、カヤツリグサ、カンナ、キハダ、ギムネマ・シルベスタ、キャッサバ、キョウオウ、クマコケモモ、クミスクチン、コノテガシワ、ジンコウ、ソメイヨシノ、タイサンボク、タンジン、トウジュロ、ニュウコウジュ、ニラ、ノアザミ、ハス、ミズヒキ、ヤーコン、木クレオソート、

方法

1. 植物の生育阻害や促進活性を有する揮発性物質を放出する植物種のスクリーニング

対象植物の根または葉を破碎し、一定量 (乾物: 1g、新鮮植物体: 10g) をマルチディッシュの一つの穴に添加した。残りの穴にはレタスの発芽種子を入れ、蓋をして密閉した。25°C 暗条件で3日間生育させ、幼根長、胚軸長を測定し、コントロールと比較して成長率を算出した。

2. 生育阻害や促進活性を有する揮発性物質の同定

1. と同様に、生育抑制効果の見られた対象植物を破碎し、5 ml バイアル瓶中で密封し、25°C 暗条件で24時間静置した。バイアル瓶のヘッドスペースからガスタイトシリンジを用いて気体を採取し、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)で分析し、揮発性物質を同定した。

3. 同定された物質の標準物質を用いた植物生育抑制活性試験

30 ml バイアル瓶にレタスの発芽種子5粒を添加し、任意の濃度に調製した揮発性物質を封入した。25°C 暗条件で3日間生育させ、幼根長、胚軸長を測定した。コントロールと比較して成長率、GR₅₀を算出した。

4. オクチルアセテートによる死細胞と活性酸素発生の誘導作用の検討

30 ml バイアル瓶に生育2日目のレタスの植物体を5個体静置し、GR₃₀、GR₅₀、GR₈₀の濃度のオクチルアセテートを封入し、25°C 暗条件で24時間生育させた。その後植物体の根部の先端から5mmを切り取り、フルオロセイン・ジアセテートとプロピジウムイオダイド (FDA-PI) の混合溶液、または、ジヒドロエチジウム (DHE) 溶液に浸漬させ、蛍光顕微鏡を用いて根部を観察した。

結果・考察・今後の予定

26種の植物種のうち、カヤツリグサ、カンナ、キャッサバ、コノテガシワ、ニュウコウジュ、ニラ、ハス、ヤーコン、木クレオソートの9種でレタスの生育抑制効果が認められた。

上記9種の中から既に研究報告のあったニラ、ヤーコンを除く7種についてGC-MSにて分析を行った結果、20種の揮発性物質が同定された。また、ニュウコウジュから α -ピネン、リモネン、オクチルホルメート、オクチルアセテートが検出された。

また、標準物質を用いた試験において、オクチルアセテートやフェノール系の化合物は、レタスに対して生育抑制効果を示すことが確認された。オクチルアセテートは植物の生育に対する影響が報告されていないため、次に、オクチルアセテートの植物に対する作用性を調べた。その結果、オクチルアセテート処理後のレタス根部では、死細胞数の増大とO₂発生誘導が引き起こされている可能性が示唆された。そのためオクチルアセテートのレタスに対する生育抑制作用にはO₂の発生が関係している可能性があるが、これを結論づけるためには更なる検討が必要であると考えている。

今後は、オクチルアセテートの植物生育抑制の作用機構の詳細の検討を行うとともに、オクチルアセテートの選択作用性の検討や構造類似体との作用性比較を行う予定である。

Tight Junction 開口物質のスクリーニング系構築と探索

神田 祐輔 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 臼井 健郎 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

高等真核生物は、常に外界から微生物やウイルス、毒性化合物などの進入により生命が脅かされている。そのため、危険な物質の生体内への進入を阻止する様々なバリア機構が存在する。その一つに Tight Junction (TJ) と呼ばれる細胞間接着構造がある。TJ は互いに密着したシート状の構造を形成して隣接した細胞間を強く接着することで、上皮細胞間の隙間を介した物質の自由な移動を防ぎ、外界の有害物質の侵入を阻止している。

一方、医療分野では抗体やサイトカインなど、タンパク質主体のバイオ医薬品の開発・使用が盛んになってきている。こうしたバイオ医薬品は一般に生体膜透過性が低く、注射といった侵襲的投与法に頼らざるを得ない。そこで TJ を可逆的に開口し、上皮細胞間隙を介した非侵襲的薬剤投与 (Figure 1) が可能になれば、患者の QOL (Quality of Life; 生活の質) が改善すると考えられる。よって TJ 開口物質の探索を行うこととした。

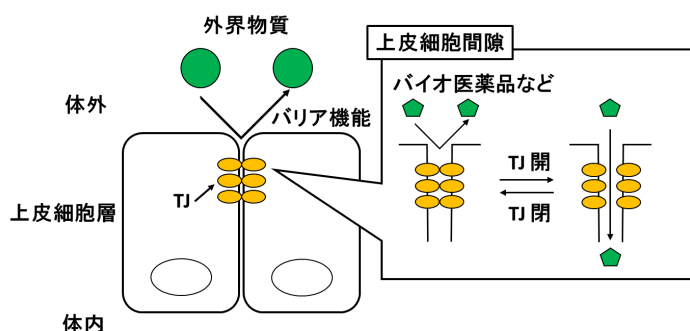


Figure 1. 可逆的 TJ 開口による薬剤投与模式図

材料および方法

新規可逆的 TJ 開口物質をスクリーニングするに当たり、以下の二種類のアプローチを用いた。

アプローチ 1. Aggregation assay

TJ のバリア機能には、主に claudin と呼ばれる一群の 4 回貫通膜タンパク質が隣接する細胞の claudin と結合し密着することが重要である。特に claudin-1 は皮膚や腸粘膜など薬剤吸収に重要な部位での発現が確認されている。よって claudin-1 同士を結合を阻害する化合物が TJ 開口物質になり得ると考え、claudin-1 の結合活性を阻害する化合物を探索する。

【方法】 TJ 構造を持たないマウス L 細胞に claudin-1 を導入し、claudin-1 安定発現細胞を作製した。この細胞を弱く trypsin 処理し、緩衝液中で浮遊させ穏やかに攪拌すると、claudin-1 発現依存的な細胞凝集ができる。この claudin-1 依存的細胞凝集形成の阻害を指標に化合物スクリーニングを行った。

アプローチ 2. Ca²⁺ assay

我々は唐辛子の辛み成分として知られているカプサイシンが、腸管上皮細胞モデル系において TJ を可逆的に開口することを見出し、その機構を明らかにしてきた。これまでの解析から、カプサイシンによる可逆的 TJ 開口に細胞内への Ca²⁺ 流入が重要であることが明らかになっている²⁾。そこで上皮細胞に Ca²⁺ 流入を引き起こす化合物を探索する。

【方法】 単層形成させた MDCKII 細胞 (イヌ腎臓尿管上皮細胞) に Ca²⁺ indicator の Fluo-8 を取りこませ、薬剤添加とともに Fluo-8 の蛍光を経時計測した。Capsaicin と同程度の Ca²⁺ 流入を引き起こす活性を指標に化合物スクリーニングを行った。

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) K. Kubota, M. Furuse, H. Sasaki, N. Sonoda, K. Fujita, A. Nagafuchi, and S. Tsukita. "Ca²⁺-independent cell adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions" *Curr Biol.*, **9**, 1035–1038 (1999)
- 2) T. Shiobara, T. Usui, J. Han, H. Isoda and Y. Nagumo. "The reversible increase in tight junction permeability induced by capsaicin is mediated via cofilin-actin cytoskeletal dynamics and decreased level of occludin" *PLoS ONE*, **8**, e79954 (2013)

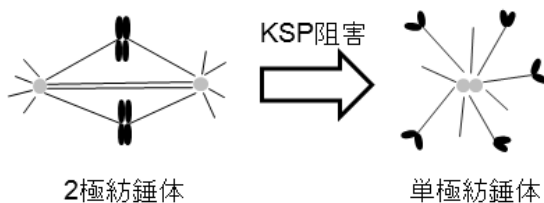
Terpendole E の KSP 阻害機構解析

佐藤 功宗 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 臼井 健郎 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

現在臨床でよく使われる抗がん剤として微小管作用薬がある。その標的分子である微小管は細胞分裂期に紡錘体を形成するが、微小管作用薬により紡錘体形成に異常が生じた場合、紡錘体チェックポイントが活性化し、細胞周期の進行が停止する。この時、正常細胞では細胞周期進行が停止したままであるが、多くの腫瘍細胞では、紡錘体チェックポイントは活性化するものの細胞分裂は進行し、やがてアポトーシスにより腫瘍細胞特異的な細胞死が誘導される。一方、微小管作用薬は細胞内物質輸送など、間期の微小管機能も阻害してしまうため、末梢神経痛といった副作用を引き起こすことが知られている。そのため分裂期特異的な微小管阻害剤の開発が求められている。

KSP (Kinesin Spindle Protein、別名 Eg5) は、2つの中心体から逆平行に伸びる微小管を架橋し、+端方向へ移動するキネシンタイプのモータータンパク質である。分裂期に中心体(一端)から、微小管先端(+端)へ微小管上を移動することにより、2つの中心体を分離し、正常な2極の紡錘体を形成させる。そのためKSPを阻害すると中心体は分離出来ず、極を1つしか持たない異常な紡錘体(単極紡錘体)が作られる。



単極紡錘体は、微小管阻害剤を処理した細胞の紡錘体と同様、紡錘体チェックポイントを活性化し、腫瘍細胞特異的なアポトーシスを誘導する²⁾。さらにKSPは分裂期特異的に活性化するため、間期の微小管機能にはほとんど影響を与えないと考えられている。以上のことからKSP阻害剤は既存の微小管作用薬と比較して副作用の少ない抗がん剤になると考えられており、盛んに開発が行われている。

Terpendole Eは天然物由来のKSP阻害剤として初めて発見された化合物である³⁾。しかしながら、薬剤結合部位や阻害機構に関しては不明のままである。そこでterpendole EのKSP阻害機構を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

1. KSP モータードメイン の精製

GST タグを融合した KSP のモータードメインを大腸菌発現し、Glutathione Sepharose を用いて精製した。

2. KSP の ATPase 活性測定

KSP は ATP の加水分解によるエネルギーを用いて微小管上を+端方向へと移動する。そのため KSP のモーター活性は ATP 分解によって生じたリン酸量を定量化することで測定することができる。そこで、薬剤存在下、KSP、ATP、微小管を 30°C

で6分間反応させ、放出されたリン酸量を Malachite Green を用いて定量することで、KSP の微小管依存的 ATPase 活性に対する薬剤の阻害効果を検討した。

結果および今後の展望

詳細は発表会にて紹介する。

Reference

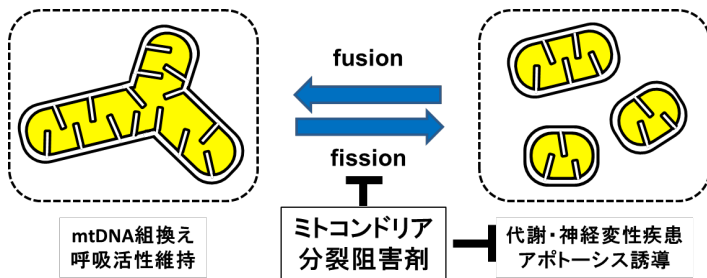
- 1) LC. Kapitein, EJ. Peterman, BH. Kwok, JH. Kim, TM. Kapoor and CF. Schmidt "The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks." *Nature*, **435**, 114-118 (2005)
- 2) W. Tao, VJ. South, Y. Zhang, JP. Davide, L. Farrell, NE. Kohl, L. Sepp-Lorenzino and RB. Lobell "Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage." *Cancer Cell*, **8**, 49-59 (2005)
- 3) J. Nakazawa, J. Yajima, T. Usui, M. Ueki, A. Takatsuki, M. Imoto, YY. Toyoshima and H. Osada "A novel action of terpendole E on the motor activity of mitotic kinesin Eg5." *Chem. Biol.*, **10**, 131-137 (2003)

AID system を用いたミトコンドリア分裂阻害剤のスクリーニング

吉田 圭佑 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 臼井 健郎 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

ミトコンドリアは常に融合と分裂を繰り返す極めて動的なオルガネラであり、ATP 産生を始めとする細胞内の様々な機能に関わっている。ミトコンドリアの形態は融合と分裂のバランスによって維持されており、融合が活性化するとネットワーク様のミトコンドリアが、分裂が活性化すると断片化したミトコンドリアが形成される。この融合と分裂のバランスが崩壊し、分裂に偏ると好気呼吸に伴う活性酸素によって障害を受けたミトコンドリア DNA を修復することが出来なくなる。そのため好気呼吸機能が低下し、代謝疾患や神経変性疾患などの様々な疾患を引き起こすことが知られている。このことからミトコンドリア分裂阻害剤は、未だ不明な点の多いミトコンドリア分裂の分子機構の解明への糸口を与えるばかりでなく、代謝疾患や神経変性疾患の治療薬となることが期待される。



酵母ミトコンドリア融合に関わるタンパク質の一つに Fzo1p がある。fzo1 遺伝子を破壊した酵母のミトコンドリアは融合が出来ず、好気呼吸活性を失う。そのため解糖系を利用できる醗酵性培地 (グルコース) で生育できるものの、グリセロールなどの非醗酵性炭素源の培地では生育が出来なくなる。一方、ミトコンドリア分裂に関わる Fis1p の遺伝子を、fzo1 遺伝子と同時に破壊すると、ミトコンドリアの融合と分裂のバランスが回復し、好気呼吸活性が維持され、非醗酵性培地で生育出来るようになることが知られている¹⁾。このことから非醗酵性培地では生育出来ない Fzo1p 破壊株も、ミトコンドリア分裂阻害剤を添加すると生育が回復することが予想される。

以上の背景の元、Fzo1p が条件依存的に破壊・分解される変異株を用いてミトコンドリア分裂阻害剤のスクリーニングを行うことにした。今回、Fzo1p を特定の条件下に分解する方法として AID system²⁾を用いた。この system は植物のオーキシシンシグナル伝達経路を利用したタンパク質分解系であり、植物由来の F-box タンパク質 TIR1p とインドール酢酸 (IAA) 存在下、AID タグを融合した目的タンパク質はポリユビキチン化され、プロテアソーム系で速やかに分解される。本研究では薬剤探索を行うことから、当研究室で開発した多剤超感受性酵母³⁾を親株として用い、ミトコンドリア分裂阻害剤の探索を行った。

材料

TIR1p 発現多剤超感受性酵母 dTC090 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 pdr3Δ0 pdr8Δ0 pdr1Δ0 yrr1Δ0 snq2Δ0 pdr5Δ0 pdr10Δ0 yor1Δ0 pdr15Δ0 pdr11Δ0 pdr12Δ0 aus1Δ0 RME1(ins-308A) tub3Δ::OsTIR1*)

方法

1. FZO1-AID 株の作製

TIR1p 発現多剤超感受性酵母を親株とし、Fzo1p の C 末端に AID タグが融合した FZO1-AID 株を cassette PCR 法にて作製した。作製した株では IAA 依存的に FZO1-AIDp が分解され、グリセロール培地での生育が阻害されることを確認した。

2. 薬剤スクリーニング

FZO1-AID 株を、化合物を含む IAA 含有、または不含のグリセロール培地で 3 日間振盪培養した。IAA 含有グリセロール培地での生育を指標に、ミトコンドリア分裂阻害活性を示す化合物を探索した。

3. ミトコンドリア形態観察

ミトコンドリア分裂阻害剤存在下ではミトコンドリアが分裂する条件下でも分裂が起こらないと考えられる。そこでミトコンドリア形態が観察しやすい HeLa 細胞を用い、候補化合物の分裂阻害活性を検討した。候補薬剤を 1 時間前処理後、ミトコンドリア分裂を誘導する過酸化水素を 4 時間処理した。ミトコンドリアは MitoRed を用いて染色し、蛍光顕微鏡で形態を観察した。

結果・考察

詳細は発表会にて報告する。

参考文献

- 1) AD. Mozdy, JM. McCaffery, JM. Shaw. "Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p." *J. Cell Biol.*, **151**, 367-380 (2000)
- 2) K. Nishimura, T. Fukagawa, H. Takisawa, T. Kakimoto, M. Kanemaki. "An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells." *Nature Methods*, **6**, 917-922 (2009)
- 3) T. Chinen, Y. Ota, Y. Nagumo, H. Masumoto, T. Usui. "Construction of multidrug sensitive yeast with high sporulation efficiency." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1588-1593 (2011)

新規酵素のスクリーニング研究

山宮 大幹 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 熊野 匠人 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

微生物から動物に至るまで、生物は様々な酵素を生産しており、それらによって生体内で起きる多種多様で複雑な化学反応が触媒されている。人類はこれまでに、それらの中から多くの有用な酵素を探索し、その諸性質を解明するとともに、幅広い分野で利用してきた歴史がある。例として、プロテアーゼの一種であるレンニンは、その凝乳作用からチーズの製造に用いられている。また、真正細菌の細胞壁を構成する多糖を加水分解するリゾチームは、殺菌・消炎作用を示すため、トローチや歯磨き粉に配合されている。

これまでに同定されてきた酵素は数千種にも及び、生化学の発展とともにその数は増加し続けている。しかし、既知の酵素以外にも、未だ性質が明らかでない酵素が数多く存在することは、ゲノムプロジェクトの結果から明らかである。そうした未知の酵素を探索し、特性を評価していくことで、新規の優れた酵素を獲得できる可能性がある。

このような背景の下、本研究では、動物由来の新規酵素をスクリーニングし、その機能を解析することを目的としている。

方法・結果

動物由来の数種類の臓器をポリトロンにより低温で破碎処理し、遠心後の上清を粗酵素液サンプルとした。この粗酵素液に化合物を添加し 37°C でインキュベートした。添加した種々の化合物のうち、粗酵素液との反応が検出されたものを基質の候補とした。現在、それらの化合物と粗酵素液の反応産物を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) やマススペクトロメトリーなどを用いて、詳細に解析している。

今後の予定

粗酵素液から、反応を触媒している酵素を精製し、酵素学的諸性質を解析する。

微生物による芳香環化合物の分解に関する研究

栗崎 誠 (筑波大学 生物学類) 指導教員：小林 達彦 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

植物はフラボノイドなど多種多様な芳香環化合物を生産する。そのような物質の中には抗菌作用、抗酸化作用、または抗ガン作用など疾病予防・治療への効果が認められ、機能性食品や医薬品等に利用されているものも一部ある。しかし、これらの物質の中には明確な作用機序はもとより、それらの代謝・分解機構は未だに明らかにされていないものも少なくない。

本研究では、植物由来芳香環化合物を分解する微生物を広く自然界よりスクリーニングし、芳香環化合物の分解産物や分解経路を解明するとともに分解に関わる酵素および遺伝子を同定することを目的とした。

方法・結果

植物由来芳香環化合物を単一炭素源、または単一窒素源とした液体培地を用意し、各所から採取した土壌サンプルを加え、振とう培養を行った。菌体の増殖が見られたものについては同一の新しい培地に植え継ぐことで集積培養を行った。さらに液体培地と同組成の寒天培地上に塗布し、生育してきたコロニーを新しい寒天培地に植え継ぐことで、菌株を単離し、植物由来芳香環化合物を分解できる微生物のスクリーニングを行った。

次に単離した菌株毎に代謝活性を比較する実験を行った。単離した各菌株を培養し、超音波破碎して無細胞抽出液を調製した。それらの無細胞抽出液と基質である植物由来芳香環化合物を混合し、28℃でインキュベートした。インキュベート後、反応溶液をHPLCにより分析し、基質の減少量を確認した。スクリーニングした菌株の中から、特に植物由来芳香環化合物に対する分解能が高い菌を選択した。

今後の予定

選抜した植物由来芳香環化合物の分解能の高い菌株を用いて培養条件を検討し、分解活性をさらに向上させる。次に、植物由来芳香環化合物の分解に関わる酵素の精製を行い、本酵素の諸性質を解明する。

植物生理活性物質代謝微生物の探索

瀧下 友理 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小林 達彦 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

植物には多種多様な構造を有する生理活性物質が存在する。食品中の生理活性物質は、人にとってはエネルギーとして使われたり、身体の構成成分となったりするような、生きていくために必須な栄養素ではないが、抗酸化作用をはじめとする生理機能が注目を集め、近年サプリメントなどに使われているものもある。しかし、これらの物質の中には代謝・分解機構に関する知識の不足から明確な作用機序が明らかになっていないものも多い。

そこで、本研究では、植物由来の生理活性物質の代謝を担っている微生物を広く自然界よりスクリーニングし、生理活性物質の代謝産物や代謝経路を解明するとともに、代謝に関わる酵素および遺伝子を同定することを目的とした。

方法・結果

植物由来の生理活性物質を単一炭素源とした液体培地に、各所から採取した土壌サンプルを加え、振とう培養を行った。さらに液体培地と同組成の寒天培地上に塗布し、生育してきたコロニーを新しい寒天培地に植え継ぐことで、菌株を単離し、植物由来の生理活性物質を代謝できる微生物のスクリーニングを行った。

次に単離した菌株毎に代謝活性を比較する実験を行った。単離した各菌株を培養し、超音波破碎して無細胞抽出液を調製した。それらの無細胞抽出液と基質である植物由来生理活性物質を混合し、28°Cでインキュベートした。インキュベート後、反応溶液をHPLCにより基質の定量を行った。スクリーニングした菌株の中から特に基質の代謝能力の高い菌、または異なった代謝を行う菌を選択し、今後の実験に用いる。

本研究により、植物由来生理活性物質に対するこれまでに知られていなかった代謝酵素をもつ菌株を得ることができると考えられる。

今後の予定

スクリーニングによって選択した菌株を大量培養し、目的の生理活性物質の代謝に関わる酵素の同定・機能解析を行う。

多環化合物変換酵素に関する研究

森谷 直輝（筑波大学 生物学類） 指導教員：小林 達彦（筑波大学 生命環境系）

背景・目的

植物由来の生理活性物質は多種多様な構造を有しており、その中には多環構造を有するものも存在する。これらの化合物には抗菌作用、抗酸化作用、抗ガン作用など疾病予防・治療への効果が認められ、機能性食品や医薬品等に利用されているものもある。しかし、これらの化合物の明確な作用機序はもとより、それらの代謝・分解機構が未だに明らかにされていないものも少なくない。

そこで、本研究では、植物由来の生理活性を持つ多環化合物の代謝産物や代謝経路を解明するとともに、代謝に関わる酵素の諸性質を解析することを目的とした。

方法・結果

植物由来の多環構造を持つ化合物を単一炭素源とした液体培地に、各所から採取した土壌サンプルを加え、培養を行った。得られた菌体培養液を液体培地と同組成の寒天培地上に塗布し、生育してきたコロニーを新しい寒天培地に植え継ぐことで、菌株を単離し、多環化合物を代謝できる微生物のスクリーニングを行った。

次に、単離した各菌株を用いて休止菌体反応や無細胞抽出液による反応を行い、反応溶液を HPLC に供することで、基質として用いた多環化合物の減少量を定量した。その中から特に多環化合物の代謝能力の高い菌株を選抜した。

さらに、多環化合物変換能を持つ菌株を特定の培養条件下で大量に培養して得られた菌体から、現在、本化合物の代謝に関わる酵素を各種クロマトグラフィー操作により精製している。

今後の予定

精製した多環化合物の代謝に関わる酵素について、諸性質を調べる計画である。

枯草菌においてファージ不稔感染経路に関与する NonA の解析

細山田 舜 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 中村 幸治 (筑波大学 生命環境系)

(背景・目的)

バクテリアはファージ感染に抵抗する機構として、制限修飾系、CRISPR/Cas システム、不稔感染機構などを持つことが知られている。制限修飾系や CRISPR/Cas システムは、ファージ感染直後に、ファージゲノムを切断することで、ファージの増殖を開始されるのを防いでいる。一方、ファージが感染し、ファージの増殖サイクルが開始されるにも関わらず、ファージの増殖・拡散を抑制している機構が不稔感染機構である。不稔感染機構では、ファージの増殖サイクルにおける複製、転写、翻訳における特定のサイクルを阻害するタンパク質の発現により、菌体内におけるファージの増殖を抑えたり、菌体に対し毒性を持つタンパク質が発現することで、感染細胞の細胞死を引き起こし、溶菌によるファージの拡散を抑制したりしている。本研究においては、枯草菌の不稔感染に関与する NonA の研究を行った。

枯草菌 Marburg 株は SP10 ファージに対し、抵抗性を持つ。(Saito *et al*, Mol Gen Genet, 1979)。Marburg 株に抵抗性をもたらす遺伝子として、SP β プロファージ領域に存在する *nonA* 遺伝子がある。また *nonA* 遺伝子の転写に際し、SP10 ファージのシグマ因子が *nonA* 遺伝子の転写に必要であるため、SP10 ファージ感染時のみ NonA の発現が起きる。(Yamamoto *et al*, J Bacteriol, in press)

SPP1 ファージ及び ϕ 29 ファージは、SP10 ファージの σ 因子のホモログを持たないため、これらのファージの感染により NonA は発現しない。また、SPO1 ファージは、SP10 ファージの σ 因子のホモログを持つが、相同性が低く、同様に NonA を発現しない。また、ファージ非感染時に IPTG 誘導により、NonA の発現を誘導すると、枯草菌の生育を阻害し、呼吸活性が低下することが明らかとなっている。この点から、1つの仮説として、SP10 ファージ感染時に NonA が発現し、枯草菌の増殖を阻害することにより、SP10 ファージの増殖を抑制しているのではないかということが考えられる。そこで、NonA の発現により、SP10 ファージの増殖を抑制できるのか検証した。

(方法・結果)

nonA 遺伝子は SP10 ファージ感染時しか発現しないため、SPO1、SPP1、 ϕ 29 ファージが感染した際に NonA の発現により、どのような影響が生じるかを観察することはできない。そこで、*nonA* 遺伝子の ORF 上流に存在するプロモーター部位を、感染後期に発現するファージ遺伝子のプロモーター部位に置き換えた株を作成することにより、SP10 ファージ以外のファージが感染した際にも、NonA の発現が可能になると考えた。これまでに推定されている SPO1、SPP1 の感染時に発現するプロモーター(Stewart *et al*, J Mol Biol, 2009, Juan C. Alonso *et al*, Gene, 2004)の下流に His タグ付き *nonA* 遺伝子を連結した。その断片を SP β プロファージ領域と制限修飾系を欠損させた枯草菌 ASK3002 株の *amyE* 遺伝子座に導入した。また、 ϕ 29 ファージに関しては、すでに以前 ϕ 29 プロモーターと *nonA* 遺伝子を連結した断片を挿入した株の作成が行われているため、今回は行

わなかった。プロモーターと *nonA* 遺伝子の DNA 配列をシーケンシングした結果、ファージプロモーター推定部位や *nonA* の ORF、His タグ部分にいずれも、点変異やアミノ酸のフレームシフト変異が生じた。*nonA* 遺伝子は枯草菌にとって毒性を持つことから、ファージ非感染時においても、このプロモーターが機能することにより、変異が生じている可能性が考えられた。そこで、SP10 ファージを SPO1 ファージと同時に感染させることにより、NonA が SP10 ファージだけでなく、SPO1 ファージの増殖も阻害するのか検証した。

対数増殖期中期まで培養した ASK3002 株の *amyE* 遺伝子座に *nonA* 遺伝子を導入した TAY3210 株に対し、SP10 ファージ及び SPO1 ファージを異なる混合比で、同時に感染させた。感染後 5 時間までの OD₆₀₀ を、それぞれ計測した。SP10 ファージのみを感染させた場合には、枯草菌の溶菌は起きなかった。一方、ファージ感染後 30 分と 90 分の OD₆₀₀ の変化を比較すると、SP10 ファージと SPO1 ファージを多重感染させた場合には、感染後 21 %の減少が見られたのに対し、SPO1 ファージのみを感染させた場合、89 %の減少が見られた。この結果より、SP10 と SPO1 を多重感染させた時には、SPO1 のみ感染させた時に比べ、枯草菌の溶菌率が減少したことから、SP10 ファージ感染時に発現する NonA により、SP10 ファージだけでなく、SPO1 ファージの増殖を阻害し得ることが示唆された。この結果に関し、現在、再現性を得るために実験を続けている。

(展望)

今後、ファージの多重感染実験においては、SPO1 ファージと SP10 ファージが実際に多重感染しているのかという点を検討する必要があり、また、ファージ多重感染時における OD₆₀₀ の変化が NonA の発現によることを明らかにするため、NonA 非発現株を用い、同様の実験を行いたいと考えている。SPO1 と SP10 の同時感染では、溶菌率での違いが見られたが、SPP1、 ϕ 29 といった別のファージを用いた際に、どのような変化が見られるか、今後検討する予定である。それに続き、OD₆₀₀ の変化に関し、ファージ遺伝子の mRNA やタンパク質の発現量の変化を確認し、ファージ多重感染により、遺伝子発現レベルでどのような変化が生じているのかについて解析していきたいと考えている。また、今回行った多重感染実験は、2種のファージを同時感染させたが、ファージ間の感染時期に差を与える実験により、生じる変化についても解析していきたいと考えている。

老化モデルマウスのミトコンドリア DNA 多型が造腫瘍性に与える影響

櫻澤 遼太 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 林 純一 (筑波大学 生命環境系)

背景・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 の産生を行う細胞小器官であり、内膜・外膜の二重膜から構成されている。ミトコンドリアは、核 DNA とは独立した環状二本鎖 DNA (mtDNA) を一細胞あたり数百~数千コピー有している。

mtDNA には、呼吸酵素複合体を構成する 13 種のタンパク質、及びその翻訳に必要な 2 種の rRNA と 22 種の tRNA がコードされており、これらの遺伝子に突然変異が生じると、呼吸機能を担うタンパク質に異常が生じ、呼吸機能低下や活性酸素種 (ROS) の過剰産生の原因となることが判明している。

呼吸機能低下を惹起する mtDNA の突然変異(病原性突然変異)は、ミトコンドリア病などの多様な病態を引き起こすことが報告されている。一方、呼吸機能低下を惹起しない mtDNA の突然変異(多型突然変異)の生理的意義は、不明な点が多く、更なる検証が必要とされている。

呼吸酵素複合体は核 DNA 由来のタンパク質と mtDNA 由来のタンパク質から構成されている。したがって、mtDNA の突然変異の影響を純粋に検証する為には、核 DNA の影響を排除する必要がある。

所属研究室は、mtDNA を消失させた細胞 (ρ^0 細胞)と脱核操作を行った細胞質体を融合することにより、核を統一して、mtDNA のみを置換した細胞 (サイブリッド)を作成する技術を確立することにより、前述の問題を解決している。

所属研究室の先行研究では、がん細胞の核に、同種異系統のマウスの mtDNA を導入したサイブリッドを作成し、造腫瘍性を検証している。その結果、mtDNA の多型突然変異は腫瘍表現型を変化させることが明らかとなっている。

本研究では、早期老化モデルマウスに着目し、その mtDNA の多型突然変異が造腫瘍性に与える影響と、詳細なメカニズムの解明を目的として、検証を行った。

方法・結果

1) サイブリッドの作製および造腫瘍性の確認

がん細胞の核に、早期老化モデルマウスの mtDNA を導入したサイブリッドを作成し、性質評価を行った。その結果、早期老化モデルマウスの mtDNA を導入したサイブリッドは ROS を過剰産生していた。加えて、野生型マウスにサイブリッドを打ち込むことにより、腫瘍表現型を検証したところ、早期老化モデルマウスの mtDNA を導入したサイブリッドは造腫瘍性が失われていることが判明した。

2) 免疫機能の関与の検証

早期老化モデルマウスの mtDNA を導入したサイブリッドが、造腫瘍性を失っている原因として、宿主である野生型マウスの免疫機能によって排除されている可能性が考えられた。そこで、免

疫機能を欠損させたマウスを用いて検証を行った結果、自然免疫が造腫瘍性の消失に関与していることが明らかとなった。

3) 詳細なメカニズムの解明

腫瘍形成が抑制されるメカニズムを明らかにするため、自然免疫応答の因子である、NK 細胞と樹状細胞の関与を検証した。その結果、早期老化モデルマウスの mtDNA を導入したサイブリッドに対して NK 細胞は細胞傷害性を示し、樹状細胞はサイトカインを過剰に産生したことから、これらの細胞が関与していることが明らかとなった。

考察・展望

所属研究室の先行研究において ROS を過剰産生するがん細胞の転移能が高いことが報告されていたが、今回の研究で ROS を過剰産生していても mtDNA の多型突然変異によっては、腫瘍形成が抑制されることが明らかとなった。

本研究では自然免疫系による認識のメカニズムについて完全に解明できていないため、今後更なる検証を行ってきたい。

代謝ストレスによるマウス多型突然変異型 mtDNA の病原性誘導

三井 祥宏 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 中田 和人 (筑波大学 生命環境系/医学医療系)

背景

ミトコンドリアは我々の細胞に存在する細胞小器官であり、細胞が必要とするエネルギーの大部分を産生している。ミトコンドリアには、核ゲノムとは異なる独自のゲノム (ミトコンドリア DNA : mtDNA) が存在し、エネルギー産生に必須な 13 種の構造遺伝子とそれを翻訳するのに必要な 22 種の tRNA、2 種の mRNA をコードしている。このため、mtDNA に何らかの突然変異が生じると、エネルギー産生が不全となり、結果的に多様な病態を引き起こすことが知られている。事実、特定の病原性突然変異 (エネルギー産生不全を引き起こす突然変異) を有する mtDNA の蓄積は、ミトコンドリア病をはじめ、糖尿病、神経変性疾患、がん、老化などの原因になるといわれている。

一方、野生型 mtDNA には、病原性を発揮しない、すなわち、ミトコンドリアのエネルギー産生不全を誘導しない多型突然変異が生じており、これらによって複数のハプロタイプに分類することができる。興味深いことに、特定の mtDNA のハプロタイプをもつヒトの集団が糖尿病や不妊症の発症と強く関連することが報告されている。現状、このようなヒトの mtDNA のハプロタイプ間に生じている多型突然変異がどのように病態を誘導するのかは分かっていない。

このような状況の中、所属研究室のモデルマウスを用いた基礎研究において、糖尿病環境が病原性欠失型 mtDNA の病原性をさらに増悪させることが分かった。この結果をうけ、本研究では、糖尿病という生体内ストレス環境によって多型突然変異型 mtDNA が病原性を発揮するのか、否かを検証した。

実験方法・結果

野生型マウス (B6 核/B6mtDNA) に対し、多型マウス (B6 核/多型 mtDNA) を作製した。つぎに、野生型マウスと多型マウスモデルに高脂肪食を与え、糖尿病を誘導した。この両者のミトコンドリア機能を比較解析するとともに、野生型マウスと多型マウスに通常食を与えた群との比較解析も行った。

本発表では、高脂肪食を与えた多型マウスの組織におけるミトコンドリア呼吸活性に関する結果について提示する予定である。

Effect of fermented-bean product on anti-aging and health

ダナポーン サラブルック (筑波大学 生物学類)

指導教員：坂本 和一 (筑波大学 生命環境系)

Introduction

Fermented foods are made by taking advantage of the workings of microorganisms and enzymes in food ingredients. The Japanese have a long history of making fermented foods and this become Japan's unique food culture.

Not only delicious flavor that came out but also the rich in health benefits nutrition. The functional effects of Japanese style fermented-bean product have been studied. It possesses antimicrobial activity against bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*. It also contains an angiotensin I-converting enzyme inhibitor having antihypertensive effects. The active compound is identified as nicotianamine, which comes from soybeans.

The fermented-bean also product exhibits anti cancer effects. The flavor components of the product, such as 4-hydroxy-2-ethyl-5-methyl-3-furanone, which is a characteristic flavor component of Japanese style fermented-bean product and 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3-furanone and 4-hydroxy-5-methyl-3-furanone exhibit antioxidant activities and anticarcinogenic effects. Fermented-bean product contains three tartaric isoflavone derivatives called shoyuflavones. These shoyuflavones inhibit histidine decarboxylase, which produces histamine, a mediator of inflammation, allergy and gastric acid secretion.

There were many studies about benefit of fermented-bean product. However, little is known about whether and how it promotes longevity and health in any organism.

Materials and Method

Strains and growth conditions

All strains were maintained at 20 °C on nematode growth medium (NGM) seeded with *Escherichia coli* OP50 feeding strain. One hundred microliters of OP50 was dropped on the center of the 60-mm NGM plates, which were allowed to dry overnight before the culture assays were carried out. Strains used in this study were: N2.

Lifespan assay

All lifespan assays were carried out at 20 °C. The eggs were obtained by using NaClO treatment. The eggs were allowed to hatch and 30 L4/young adult worms per

plate(NGM plate containing 50 µg/mL FUDR to prevent

the growth of progeny) were used for each assay. All the assays were carried out in triplicates, and a minimum of three independent trials were performed. The dead worms were counted every 2 days and exploding, protruding, bagging or contaminated worms were censored if applicable. The day L4/young adult worms were transferred was defined as day 0 of adult age.

Heat stress assay

Adult worms were put into 37 °C for 3 hrs in incubator and using same method as life span assay to get the result.

Gene expression assay

Total RNA was extracted from adult worms. And cDNA was produced with reverse transcriptase and Real-time PCR was performed.

Result and discussion

The result showed increasing of longevity in *C. elegans* and also increased tolerance of *C. elegans* to heat stress. In addition, hsp12.6 and SOD-3 gene expression level in fermented-bean product given *C. elegans* also higher than control group. To study involved gene and mechanism, further experiments and discussions are need to be made.

References

- Sujay, G., Min, C., Ryan, M.K., Anthony, M.S., Sige, Z. (2013). The longevity effect of cranberry extract in *Caenorhabditis elegans* is modulated by *daf-16* and *osr-1*. *Age* 35, 1559-1574.
- Kataoka, S. (2005). Functional effects of Japanese style fermented soy sauce (shoyu) and its components. *Journal of bioscience and bioengineering* 100, 227-234

線虫の寿命及びストレス耐性に対する生理活性物質の作用の研究

栗野 智帆 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 坂本 和一 (筑波大学 生命環境系)

○ 背景・目的

ファイトケミカルは植物中に存在する天然の生理活性物質である。その多くは抗酸化作用を通じて肥満や糖尿病などの予防・改善に生理的効果があるとされている。近年では様々なファイトケミカルがサプリメントや健康機能食品として市場に出ており、生活習慣病の予防や老化の防止といった点で期待が高まっている。しかし、ファイトケミカルの数は膨大であり、その効果が解明されたのはごく一部にしかすぎず、さらなるファイトケミカルの機能解析が求められている。

線虫(*C.elegans*)が持つ *Daf-16* は *FoxO* のホモログである。これは進化的に保存された転写因子で、細胞周期、DNA 修復、糖代謝など様々な作用に関わっていることが知られており、ファイトケミカルの一部はこの *FoxO* を活性化することで生理活性機能をもたらすことが明らかになっている。

本研究の先行研究において、植物抽出物ライブラリーの中から *Daf-16* を活性化するものをスクリーニングした結果、マンゴスチンと呼ばれる東南アジア原産のオトギリソウ科クギ属に属する常緑高木の実が最も効果を示した。*Daf-16* 転写因子が活性化し標的遺伝子を発現させるためには、*Daf-16* が核に移動・局在することが必要となる。マンゴスチンを投与した線虫では、他の植物抽出物を投与したものと比較して二倍程度の核局在が確認され、また各抽出物を投与した個体に対して体長測定を行ったところ、マンゴスチン及び α -マンゴスチン投与の個体で伸びが抑制される傾向が示された¹。*Daf-16* が活性化すると成長の遅延が起こることが明らかになっており、体長の伸びの抑制は *Daf-16* の活性化からくるものだと考えられる。また、マウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いた解析では、マンゴスチン果皮抽出物により脂肪蓄積が顕著に抑制された¹。

本研究では、マンゴスチンの果皮抽出物のさらなる生理作用の解析と機能成分の同定を目的として線虫を用いた実験を行った。

○ 方法

マンゴスチン果皮抽出物及び、抽出物中最大含有物質である α -マンゴスチンを線虫に添加し、発現した形質について解析を行った。いずれの試薬も DMSO (解析(1)(2)) またはエタノール (解析(1)(3)) に溶かして実験に用いた。

線虫は基本的に 20°C で培養し、同調処理から 72h 後に FUDR を添加することで同世代の線虫のみを実験に用いた。同調処理から 94h は、NGM プレートに試薬と大腸菌の混合液を塗布したもので培養し成虫まで飼育した。また用いた線虫は全て N2 系統である。

(2)熱ストレス後の寿命測定に関しては、試薬を投与し解析を行いながら、実験系の立ち上げを行った。

(1) 寿命測定

線虫を同調処理後 94h 培養し、NGM プレートに試薬と大腸菌の混合液を塗布したもので一ヶ月程度培養、プレートを 1 日置きに交換しつつ測定した。ピッキングを行った際、もしくは生理食塩水に浸した際に動くかどうかを指標として生死判定を行った。

(2) 熱ストレス後の寿命測定

線虫を同調処理後 94h 培養し、各試薬に対し同数の線虫を NGM プレートに試薬と大腸菌の混合液を塗布したものに移し 35°C の熱ストレスを 3.5h 与え、この日を 0 日目として寿命の測定を行った。プレートは 3 日置きに交換した。指標は(1)と同様である。

(3) 熱ストレス後の運動性の変化

線虫を同調処理後 94h 培養し、その時点で線虫を生理食塩水に浮かべて実体顕微鏡下で観察し、15sec あたりの thrashing 運動回数を測定した。その後、35°C の熱ストレスを 1h 与えて同じく thrashing 運動回数を測定し、熱ストレスを与えた前後での運動性について比較した。

○ 結果

- (1) マンゴスチン抽出物及び α -マンゴスチンの寿命延長傾向は見られなかった。
- (2) マンゴスチン抽出物及び α -マンゴスチンの熱ストレス耐性による寿命延長の傾向は見られなかった。
- (3) α -マンゴスチン投与個体において運動性の維持が示された。

○ 考察及び課題

結果から、マンゴスチン抽出物は寿命延長作用を持つものではないことが示された。一方で、熱ストレス耐性による運動性の変化では有意な差がみられたことから、 α -マンゴスチンには運動性低下抑制作用があることが期待される。

今後は、遺伝子発現の解析などにより作用機構の解明を行っていく。また、マウス前駆脂肪細胞において脂肪蓄積が抑制されることから、線虫においても脂肪蓄積量の測定を行いその効果を明らかにしていく予定である。

○ Reference

1. Eri Obata (2013) Tsukuba Journal of Biology 12, 55

Comparison of the promoter sequence of cryptdin4 from defensin14 knock out mice with wild type mice

劉 笑舒 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 坂本 和一 (筑波大学 生命環境系)

Introduction

Vertebrate animals' epithelial cells secrete several kind of antimicrobial peptides, which are effective molecules against invading pathogens and this ability belongs to innate immune system. Among all the antimicrobial peptide, beta defensin family is most well known. It has antimicrobial ability against Gram-negative bacteria but not Gram positive ones.

Mouse beta defensin14 (mBD14) is an ortholog of human beta defensin3 because they share structural and functional similarities. Like defensin14, most of these antimicrobial molecules are similar in mice and human, including cryptdin family which resemble human alpha defensins. Cryptdin4 belongs to the family and is expressed by paneth cells of the small intestine. Cryptdin4 gene has two exons, transcriptional start site, intron, and 3' flanking sequences, which is very similar to other paneth cell alpha defensin genes and only has a repeated 130 bp unique region of itself.

Recent study by W.Muller's group (unpublished data) suggested that the expression of gene cryptdin4 has a tendency to increase in the beta defensin14 knock out mouse compared to wild type mice.

To identify any regulative relationship between the two genes, I compared of the cryptdin4 promoter sequence of defensin14 knock out mice with wild type mice and found the find possible mutation site in defensin14 knock out mice, which may occurred on transcriptional binding site on the promoter of cryptdin4. The mBD14 knock out mouse is generated from 129 background mouse and back crossed several generations with C57BL6 mouse, which is used as the wild type mouse in this study. Here I sequenced the promoter region of mice gene cryptdin4 of both wild type and defensin14 knock out mouse and compared them with published sequence data to examine the possible mutation.

Method

Mouse DNA extraction

DNA is extracted from mouse ear using Extract-N-Amp™ Tissue PCR Kit.

Primer design

Two sets of primers(set one: forward primer 5'-GCAGCCTAGCATACGACTCA-3' and reverse primer

5'-GGCAGAGAGGAGGACAAGTG-3', set two: forward primer 5'-GGTCCACACTAGAGAAGGC-3' and reverse primer 5'-TGTGTGTGTGTGTGTGTAGT-3') for Cryptdin4 DNA amplification are designed using primer3 website (<http://primer3.ut.ee/>)

Cryptdin4 DNA amplification and selection

Using mouse ear punch DNA extraction and amplify cryptin4 gene region by PCR, select desired DNA by electrophoresis and extract from gel.

Ligation to the vector

Ligate cryptidin4 DNA product to PgemT-vector which including an A-tailing procedure.

Transformation

Introduce vector to alpha select chemically competent cells (bacteria), and identify the success of transformation by Blue-white selection using X-gal and IPTG.

Colony PCR

Pick the positive colony from blue-white selection using T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') and SP6 (5'-TAATTAGGTGACACTATAG-3') primers. Examine positive colonies by electrophoresis.

Mini prep and sequencing

Mini prep the positive colony using QIAprep Spin Miniprep Kit and send to sequencing.

Sequence analysis

Compare the obtained WT and defensin14 KO cryptdin4 sequence with database using blast website (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)

Search transcriptional factor binding site inside the sequence that include possible mutation using website TFSEARCH(<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

Result and discussion

Through the comparison of defensin14 KO and WT DNA sequences, transcriptional factors which bind to transcriptional binding sites that contain possible mutations are CdxA, Skn-1, and HSF. Direct relationship between these factors and Cryptdin4 gene is still not clear and further discussions should be made.

赤ぶどう抽出物とレスベラトロールによるアンチエイジング作用の比較解析

福本 隼平 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 坂本 和一 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

「赤ぶどう」の果皮にはポリフェノールの一種であるレスベラトロールが豊富に含まれている。先行研究により、レスベラトロールは線虫やショウジョウバエなどのモデル生物に対し SIR2(silent information regulator 2)ファミリー (サーチュイン) を介して寿命延伸などのアンチエイジング効果があることが明らかになっている¹⁾。しかし、その生理活性作用については不確かな点が多く、安定した結果が得られないことが問題視されている²⁾。我々は精製レスベラトロールと、レスベラトロールを含む赤ぶどうの抽出物 (GE: redgrape extract) をそれぞれ線虫に投与してそれらのアンチエイジング作用の比較解析を行った。

材料・方法**モデル生物**

本実験では *C.elegans* var. Bristol (N2 株) を使用した。線虫は大腸菌 OP50 株を播種した NGM(Nematod Growth Medium) プレートで飼育した。飼育温度は 20°C で行った。

同調処理

線虫の表皮を次亜塩素酸ナトリウム溶液で破壊して虫卵のみを回収し、18 時間・20°C でインキュベートを行い、齢の揃った幼虫(L1: larvae 1) 集団を得た。

経時的な運動性の変化

同調処理から 18 時間後の線虫を OP50 を播種した NGM プレートに移し、72 時間飼育した。その後、UV 照射で殺した OP50 とレスベラトロールまたは GE を添加した NGM プレートに線虫を移し、3 日ごとに線虫の 15 秒間の波打ち運動回数を計測した。

熱ストレス耐性

同調処理から 18 時間後の線虫を UV 照射で殺した OP50 と各試薬を添加した NGM プレートに移し 72 時間飼育。熱回復実験では、成虫に 35°C・4 時間の熱ストレスを与えた後、12 時間ごとに線虫の波打運動回数を計測し、熱ストレスを与えなかったグループと比較した。

寿命測定

同調処理から 18 時間後の線虫を OP50 を播種した NGM プレートに移し、72 時間飼育した。その後、UV 照射した OP50 と各試薬を添加した NGM プレートに線虫を移し、二日ごとに線虫の生存個体数を計測した。

遺伝子発現解析

同調処理から 18 時間後の線虫を OP50 を播種した NGM プレートに移し、72 時間飼育した。その後、UV 照射した OP50 と各試薬を添加した NGM プレートに線虫を移し、3 日間飼育した。飼育した線虫を乳鉢に移し液体窒素により凍結破砕した。破砕片より、RNA 抽出キット(iso-PLUS TAKARA)を用いて RNA を

抽出し、逆転写 RT-PCR によって各種ストレス耐性遺伝子の発現量を調べた。

結果

レスベラトロールと GE は、線虫の老化や熱ストレスによる運動性の低下を抑制する作用を示したが、両者に有意な違いはみられなかった。一方、寿命測定においては、GE を与えたグループの方が精製レスベラトロールを与えたグループに比べ、線虫の寿命が延伸した。

考察

寿命測定の結果より、GE にはレスベラトロールの他に未同定の抗老化物質が含まれている可能性が示唆される。今後は進行中の遺伝子発現解析の結果をもとに遺伝子欠損型の変異体を用いて、GE のアンチエイジング作用のメカニズムの解明を進める。

参考文献

1. Wood, G.J. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* **430**, 686-689 (2004)
2. Kenyon, J.C. The genetics of ageing. *Nature* **464**, 504-512(2010)

イモリ松果体におけるレチナール代謝経路の解析

大津 拓紘 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中谷 敬 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

脊椎動物の間脳の背側に位置する小器官である松果体はホルモンを分泌する内分泌器官であるが、哺乳類以外の脊椎動物では、光受容能を有する器官でもあり、光によってメラトニン分泌を制御し概日リズムに関与すると考えられている。光受容能を有する松果体には微絨毛型の視細胞が存在しており、そこに発現している光受容体が光受容能を担っている。光受容体は、タンパク質部であるオプシンと発色団レチナール (ビタミン A のアルデヒド誘導体) で構成されている。多くの光受容体の発色団は 11 シス型で、光吸収により全トランス型に異性化されると光受容能を失う。光受容体が再び光受容能を獲得するには、全トランス型を 11 シス型に異性化させる反応経路が必要であるが、側眼においては色素上皮細胞やミュラーグリア細胞にその経路が存在すると報告されている。

松果体の発生過程は側眼と同じく間脳の壁が隆起して形成されることや、光受容細胞も側眼と同様の構造を持つことから、松果体にも側眼に存在するレチナール代謝経路と同様の機構が存在することが示唆される。しかし、側眼に比べ松果体の光受容のメカニズムやレチナールの代謝系はよく分かっていない。そこで本研究では、イモリ松果体を用いてレチナール代謝経路に関連する分子の同定と局在について解析を行った。

実験方法

・免疫組織化学

成体イモリを氷上で低温麻酔し断頭後、眼球、脳、舌を単離した。各組織は、4%パラホルムアルデヒド/PBS で 4°C 終夜固定し、15%及び 30%スクロース/PBS で順次置換した後、Tissue-Tek に包埋し 80°C で凍結させた。クリオスタットを用いて凍結切片を作成した。切片は、メタノール処理を施した後、5%スキムミルク/PBS でブロッキングし、一次抗体液、二次抗体液で反応させた。一次抗体は抗体原液を 5%スキムミルク/PBS で 300 もしくは 1000 倍希釈、二次抗体液は 200 倍希釈したものを使用した。抗体液で反応後カバーガラスに封入し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

・ウェスタンブロッティング

イモリを低温麻酔し断頭後、眼球、脳、舌を単離し、組織破砕液に入れ超音波破砕した。試料は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、PVDF メンブレンに転写させた。メンブレンを 2%ウシ血清アルブミン/PBS でブロッキングした後、一次抗体・二次抗体反応を行い、化学発光によりシグナルを検出した。

結果・考察

レチナール代謝関連タンパク質に対する抗体を用いて脳切片の組織染色を行ったところ、松果体の下部に位置する第三脳室の一部にシグナルが観察された。また、光受容に関連するタンパク質である Transducin と Gustducin に対する抗体を用いたところ松果体および脳領域においてシグナルは検出されなかった。また、ウェスタンブロッティングした結果、眼球、脳の抽出物においてレチナール代謝関連タンパク質のバンドが検出された。以上の結果から、松果体においても側眼と同様のレチナール代謝経路の存在が示唆された。

イモリ桿体・錐体細胞の電気生理学的解析

小池 紫央里 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中谷 敬 (筑波大学 生命環境系)

導入

光を眼で受容することによって、私たちは物を見ることが出来る。眼は様々な組織で成り立っているが、脊椎動物では、神経細胞である網膜の視細胞(桿体細胞・錐体細胞)が、光を受容し電気信号に変換する役割を担っている(光応答)。視細胞で変換された電気信号は、網膜内の高次神経で情報処理され、脳中枢神経系に伝達される。このような重要な働きを担う視細胞の桿体細胞は暗所で主に働き、錐体細胞は明所で主に働いている。働きの異なるこれら2つの細胞の電気生理学的研究では、細胞のサイズが大きく、網膜に占める錐体細胞の割合が比較的多いため測定が容易であるという理由から、サラマンダーが実験動物としてよく用いられている。

サラマンダーと同じ有尾両生類に属するイモリの視細胞は、桿体細胞の大きさが他の動物よりも大きく、錐体細胞の割合も大きいため、電気生理学的研究に適している。さらに、近年アカハライモリ(*Cynops pyrrhogaster*)において遺伝子導入技術が確立されたことから、今後、この動物が視細胞の研究にとって欠かせない実験動物となると考えられる。しかしながら、イモリの桿体・錐体細胞の電気生理学的解析はこれまで行われていない。そこで、本研究では、実験動物としてアカハライモリを用い、一細胞単位で桿体細胞と錐体細胞の電気生理学的解析を行って、その特性を明らかにすることを試みた。

材料・方法

動物業者から購入したアカハライモリ(*Cynops pyrrhogaster*)を雌雄区別せず用いた。一晩暗順応させたイモリを氷上で低温麻酔させ、断頭した後、弱赤光下で両眼を摘出した。次に、赤外線イメージコンバーターを備えた実顕顕微鏡下で、0.7×PBS(リン酸緩衝生理食塩水)に浸した眼球の角膜とレンズを取り除いてeyecup状にし、ピンセットで網膜を摘出した。摘出した網膜はイモリRinger液(組成:NaCl 110 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 1.6 mM, CaCl₂ 1.0 mM, Na-HEPES 5.0 mM, D-Glucose 10 mM, EDTA 0.02 mM, BSA 0.1 mg/ml, pH: 7.8)中で記録に至るまで暗所で保存した。各記録では、1/8網膜片を細かく切り刻んだのち、倒立顕微鏡ステージ上のチャンバーに移した。細胞はCMOSカメラを通して観察し、吸引電極法[※]により、光応答を測定した。刺激は桿体細胞の場合は520 nm、赤錐体細胞の場合は620 nmの単色光を、刺激時間を10 msの条件で与えた。実験中はチャンバーにイモリRinger溶液を還流した。記録は室温で行った。なお、イモリの解剖から実際の細胞応答記録に至る一連の過程は、全て暗室内で行った。

※吸引電極法とは、ガラス製のマイクロピペット中に細胞を吸引し、細胞膜を流れる電流変化を記録する手法のことである。今

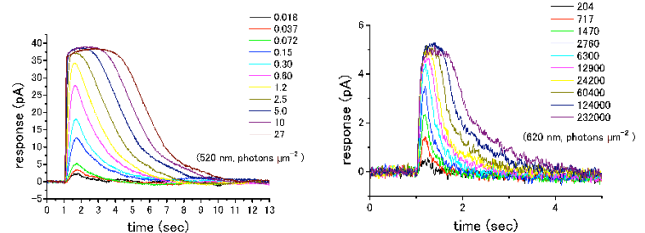
回吸引した細胞は、桿体細胞の外節と錐体細胞の外節である。なお、マイクロピペットの内径は、桿体細胞では7.3~8.7 μm、錐体細胞では4.0~5.3 μmのものを使用した。

結果・考察

イモリ桿体細胞とイモリ赤錐体細胞に光刺激を与えると、電流が発生した(電気的応答が観察された)。応答の大きさは、飽和電流 R_{max} (各細胞における最大応答値)に達するまで、刺激光の強度(1フラッシュあたりの光子数、単位は $\text{photons } \mu\text{m}^{-2}$)に依存して増大した。観察されたそれぞれの細胞の R_{max} の平均値は、イモリ桿体細胞 ($n=11$) では21.6 pA、イモリ赤錐体細胞 ($n=12$) では3.68 pAであった。図1、2に、観察したイモリ桿体細胞の光応答とイモリ赤錐体細胞の光応答の一例を示した。

次に各細胞の光感度を計算した。光感度は各細胞における応答の最大値の半分 ($1/2 R_{max}$) を与える光強度 (I_0) を指標とした。刺激光強度 ($\text{photons } \mu\text{m}^{-2}$) が横軸、応答の大きさ (pA) が縦軸のグラフにプロットした測定値に対し、関数 $y = a(1 - e^{-bx})$ [$a: R_{max}$, b : 定数]を用いた近似曲線から、応答の最大値が半分になる時の光強度 (I_0) を求めた。その結果、 I_0 の平均値は、イモリ桿体細胞 ($n=11$) では $0.34 \text{ photons } \mu\text{m}^{-2}$ 、イモリ赤錐体細胞 ($n=12$) では $2010 \text{ photons } \mu\text{m}^{-2}$ となった。この結果は、イモリ桿体細胞のほうがイモリ錐体細胞に比べて、約5900倍光感度が高いことを示している。

桿体細胞は主に暗所で、錐体細胞は主に明所で働くと言われていたが、イモリの電気生理学的にもこのことが言える。また、イモリの桿体細胞は他の動物よりも感度が高い。これには、イモリの細胞の大きさなどが関係していると考えられるが、詳しい考察は発表会にて報告する。



(左) 図1 イモリ桿体細胞の光応答 ($R_{max} : 39.0$, $I_0 : 0.31$)

(右) 図2 イモリ赤錐体細胞の光応答 ($R_{max} : 5.29$, $I_0 : 1640$)

※図1、2: 縦軸はそれぞれの刺激光強度における応答(流れる電流)の大きさを示す。横軸は経過時間であり、光刺激は時間1秒の時与えた。各線はそれぞれ同じ刺激光強度で約10回記録した応答を平均化したもの。凡例は刺激光の強度。

イモリ嗅細胞における匂い応答の電気生理学的解析

轟田 奈津希 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中谷 敬 (筑波大学 生命環境系)

導入

嗅覚は化学物質を受容し、感知する感覚である。脊椎動物の嗅上皮に存在する嗅細胞 (olfactory cell neuron) では、1つの嗅細胞に1種類の嗅覚受容体 (olfactory receptor) が発現しているといわれており、匂い物質が結合することにより嗅細胞で電気的応答が生じる。

脊椎動物では一般的に、陸上生活を行う哺乳類などでは空気中の揮発性化学物質を、水中生活を行う魚類などは水溶性物質 (アミノ酸など) を受容している。両生類であり陸上でも水中でも生活するイモリは、これら両方を受容することが先行研究により明らかにされたが、アミノ酸受容における嗅細胞でのシグナル伝達機構の詳細はまだわかっていない。そこで今回はイモリ嗅細胞でのアミノ酸受容の仕組みを明らかにする目的で、単離した嗅細胞の電気応答および電気的特性について解析を行った。

材料と方法

動物業者から購入したイモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を雌雄区別することなく使用した。まず低温麻酔したイモリを断頭し、2価イオン (Ca^{2+} , Mg^{2+}) free Ringer で満たしたチャンバーに切り落とした頭を移し、実体顕微鏡下ではさみを使用して鼻孔から切り込みを入れ、嗅上皮を露出させた後、それを摘出した。摘出した嗅上皮はカミソリで細かい切片にし、0.1% コラゲナーゼを含んだ2価イオン free Ringer 中に移し、室温で10分間放置した。その後 Ringer 溶液で3回リンスし、パストールピペットで30~50回程ピペッティングすることによって嗅細胞を単離した。この時気泡が入って細胞を壊さないように注意した。単離した嗅細胞を含む溶液をコンカナバリン A でコートした記録用ディッシュに分け入れ、しばらく放置して底に定着させた後、ディッシュ全体を Ringer 液で満たし、それを倒立顕微鏡ステージに設置した。

嗅細胞からの電気シグナルの記録は、ホールセルパッチクランプ法を用いて顕微鏡下で行った。パッチ用ガラス電極は micropipette puller (Sutter instrument, P-97) を用いて作製し、電極内には K^+ pipette solution を充填した。実験には電極抵抗が8~15 Ω ほどの電極を使用した。顕微鏡をのぞきながら電極の先端を嗅細胞に近づけた後、陰圧を与えて細胞膜と電極を密着させ、膜抵抗値がギガオーム以上になった状態 (ギガ・シール) で強い陰圧やパルスを与え、細胞膜に穴を開けてホールセルを形成した。

ホールセルパッチでは、細胞全体を流れる電流の測定が可能である。ホールセルを形成した後、-70 mV から +70 mV まで 10 mV ステップの脱分極パルスを与えて、匂い刺激がない状態でのイモリ単離嗅細胞の電気的特性を調べた。また、ステップ電位を与えて電位依存性の応答を確認した後、匂い物質をピコスプリッターを用いて投与し、電位固定下 (-60 mV) での応答を解析した。

結果と考察

ホールセルを形成した嗅細胞に -70 mV から +70 mV まで 10 mV ずつ段階的にステップ電位を与え、電流を記録した。図1は各電位に対する電流を示す。電位を上昇させると、一過性の内向き電流の後に持続性の外向き電流が観察された。このような一過性の内向き電流と持続性の外向き電流について、与えた電圧に対して生じた電流の大きさをプロットし、I-Vカーブを作成した (data not shown)。内向き電流の大きさは電圧の上昇に伴い増加し、0 mV 付近でピークに達した後減少した。+70 mV で電流が0に近づいたが、反転電位には達しなかった。外向き電流は -40 mV 付近から、電圧の上昇と共に増加した。このことから、一過性の内向き電流は電位依存性 Na^+ 電流であり、持続性の外向き電流は電位依存性 K^+ 電流であると推測される。

続いて、嗅細胞における匂い応答についての解析を行った。本実験は現在進行中であり、結果の詳細及び考察については卒業研究発表会で報告する。

今後の展望

揮発性の匂い物質の受容は、アデニル酸シクラーゼが関与するシグナル経路によって行われていることが明らかになっているが、アミノ酸受容についてはまだ分かっていない。今後はイモリ嗅細胞のアミノ酸に対する応答の、細胞内シグナル伝達経路を明らかにすることが目標である。そのために、アミノ酸に対する電気応答および電気的特性について解析を行い、さらに各種阻害剤を作用させた時の変化について検証していく。

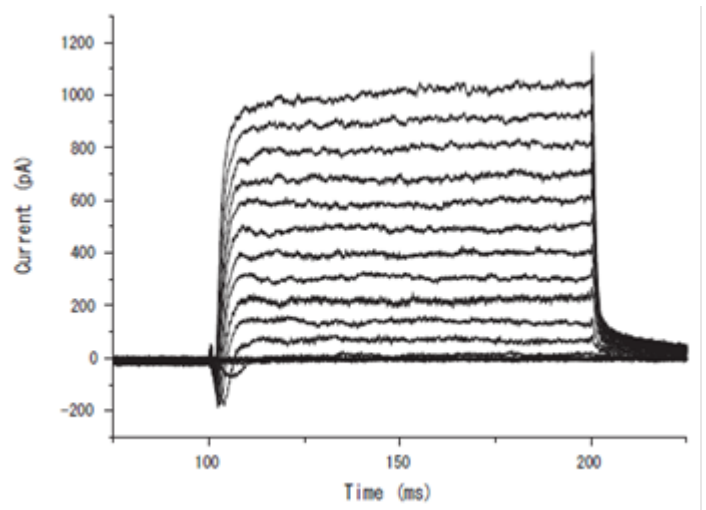


図1. イモリ単離嗅細胞の電位依存性電流

ゾウリムシの個体間相互作用を引き起こす要因；機械刺激により放出される化学物質の検討

荒木 広大（筑波大学 生物学類） 指導教員：大網 一則（筑波大学 生命環境系）

導入

生物は種間、個体間などで様々な相互作用を示す。生物の相互作用は細胞レベルでも広く認められ、多細胞動物のホルモンや神経伝達物質などの化学的な手段を使った細胞間のコミュニケーションは動物にとって極めて重要な役割を持つ。

私は個体間や細胞間のコミュニケーションについて興味を持った。この研究では、単純な体制をもつ単細胞生物の同種内での個体間相互作用を明らかにすることを目的とした。高等動物に比べ、単細胞生物による個体間、細胞間相互作用の詳細は明らかにされていない。これまでに、私の研究室の先行研究により、集団で遊泳するゾウリムシが、前方に存在する障害物を事前に察知して、回避する行動が明らかにされている。この行動は、ゾウリムシが同種の他個体に対して何らかの信号を出した結果であると解釈されており、化学物質の存在が想定されているが、その実体は明らかではない。このような背景から、私はゾウリムシの個体間相互作用の一端を明らかにするために、他個体の行動を制御しうる信号の存在に着目して実験を行った。

材料・方法

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は麦藁の抽出液を用いて培養し、標準溶液 (1mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM Tris-HCl, pH7.4) で洗った後、実験に用いた。

ゾウリムシが他個体に対する信号を放出する要因として考えられるのは、障害物に衝突した際の機械的な刺激である。自由遊泳しているゾウリムシに定量的に制御された機械刺激を与えることは困難である。そこで、この実験では、ゾウリムシの集団にマグネチックスターラーの攪拌子を用いて定量的な機械刺激を与えた。ピーカーにゾウリムシの密度を調整した標準溶液を入れ、攪拌子を回転させて機械刺激とし、攪拌子の回転速度を変えることにより刺激強度を変化させた。機械的な刺激を与えた後、溶液中のゾウリムシは遠心処理により、この溶液から除外した。残った溶液を以下に示す化学集合のアクセシ系で検定した。このアクセシ系は2種類の液槽、標準槽と試験槽が接する実験槽からなっている。2液槽ははじめ離して用意しておき、ゾウリムシは標準槽中にのみに入れた。試験槽には試験液を満した。これらの液槽を接触させて両実験槽が一線で相接する実験槽とした。

結果

(1) はじめにシャーレの中にゾウリムシと障害物を入れ、障害物付近におけるゾウリムシの遊泳行動を観察した。障害物を入れた直後は、ほとんどのゾウリムシが障害物に衝突して回避反応を示した。障害物を入れて数分すると、実際には障害物に衝突せず、障害物の手前で回避反応を示す個体が現れた。この回避行動(無衝突)を示す個体の割合は時間とともに増え、およそ30分で最大となった。これは先行研究の結果を支持する。

(2) 次に、ゾウリムシ集団に機械的的刺激を与えた後、ゾウリムシを取り除いた溶液が、ゾウリムシの行動にどのような効果を

持つかを2液槽からなる実験槽で調べた。ゾウリムシを400匹/ml入れて機械刺激を与えた後の溶液に対して、ゾウリムシは負の集合を示した。この結果は、ゾウリムシを取り除いたあとでも、ゾウリムシが機械刺激を受けた溶液中に、負の集合をもたらす効果があることを示す。

(3) 試験液調整時のゾウリムシの密度を変え、その効果を調べた。ゾウリムシの負の集合はその密度が高い程、強くなった。

(4) 機械刺激を与える強さとゾウリムシの集合の関係について調べた。機械刺激を与えないとき、ゾウリムシの分布には2液槽間で偏りは見られなかった。機械刺激を与える攪拌子の回転を1回/秒にすると、ゾウリムシは負の集合を示した。より強い機械刺激を加えると、ゾウリムシの負の集合の割合は低くなった。

(5) 標準槽と試験槽でのゾウリムシの遊泳速度について調べた。いずれの液槽でも、ゾウリムシの密度が上がると、遊泳速度が増した。試験液調整時のゾウリムシの密度が高い時には、標準槽中のゾウリムシに比べ、ゾウリムシの遊泳速度が低かった。

(6) 標準槽と試験槽の境界でのゾウリムシの回避反応の頻度を調べた。ゾウリムシは標準槽から試験槽に向かう時に回避反応を頻繁に示した(最大で50%)。一方、試験槽から標準槽に向かうゾウリムシは回避反応をほとんど示さなかった。また、試験液調整時のゾウリムシの個体数が多いほど、回避反応の頻度が上昇した。ゾウリムシに機械刺激を与えた溶液に対する、ゾウリムシの負の集合は、境界で生じる回避反応が主な原因と考えられる。

考察

今回の実験で取り上げた、回避反応(無衝突)は、単純な体制の生物が、障害物の存在を予見して、衝突以前に避ける事実を示している。ゾウリムシはこの行動反応により障害物に衝突する際に生じる細胞の物理的な損傷を減らし、集団としての生存の可能性を上げていると考えられる。このような、機械刺激によらない物理的障害物の回避は、ゾウリムシ個体間の相互作用によることが示唆されてきたが、その詳細は明らかではなかった。

今回の実験から、ゾウリムシに実際に機械刺激を与えた溶液に対して、ゾウリムシが負の集合を示すことが示された。負の集合は、主に溶液の境界で生じる回避反応に起因している。この負の集合は、ゾウリムシの密度が高くなるに従って強くなった。これらの結果は、障害物に衝突したゾウリムシが、機械的的刺激に応じて何らかの信号を出し、その信号に他個体が行動反応を起こしている事を示唆している。信号の正体としては、残存、蓄積する性質や、局所的に作用する点から化学物質であることが予想される。従って、溶液の境界で生じるゾウリムシの回避反応は、自由に遊泳するゾウリムシの回避反応(無衝突)に対応すると考えられる。想定される化学物質の実体については今後の課題である。

ゾウリムシが集団として障害物を事前に察知して、それを回避する行動は、実際に衝突を経験したゾウリムシから後続の個体に対する化学物質を介したコミュニケーションを示していると考えられる。

ゾウリムシのイオン刺激受容機構に関する行動学的研究

佐賀 友則 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 大網 一則 (筑波大学 生命環境系)

<導入>

単細胞生物のゾウリムシは体表に多数存在する繊毛により活発な遊泳行動をする。ゾウリムシの遊泳行動は様々な外界の刺激により変化することが知られている。例えば、前進遊泳中のゾウリムシが障害物にぶつかり細胞前端部分に機械刺激を受けると活動電位によって仲介された繊毛逆転が生じ、後退遊泳を行う。このような行動反応により、ゾウリムシは生存に適した環境を選択することが可能になる。淡水に生息するゾウリムシにとって外液中の化学環境はきわめて重要な環境要因である。ゾウリムシは K^+ や Ca^{2+} などをはじめとする外液イオン、とりわけ陽イオン濃度の変化に対して顕著な行動反応を示すことが知られており、それらの反応は生理的な受容機構を介して生じている。

私は水棲の単純な生き物が外界の環境として重要な各種イオンをどのようにして受容して反応するかについて興味を持った。これまでに各種陽イオンに対する検討に比べ、陰イオンの効果に関する記載は少ない。この実験では、初めに外界の化学環境としての陰イオンの効果について検証し、さらに、複雑な構造をもつイオン種やその他各種イオンがゾウリムシのどのような行動反応を引き起こすかについて検討した。

<方法>

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) はライ麦の抽出液を用いて培養した。実験に用いた標準溶液の組成は 1 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM Tris-HCl (pH 7.4) である。ゾウリムシは4°Cの標準溶液で4回洗い、30分以上放置した後、実験に用いた。ゾウリムシの行動反応は実体顕微鏡下で観察した。

今回用いた陽イオンは K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} の4種類である。それぞれ塩化物と硝酸化物を用意し、その効果を比較した。

他に NH_4Cl 、 K_2HPO_4 、比較的複雑な有機イオンとして塩化コリンを選びゾウリムシの行動に対する効果を調べた。

<結果>

これまでに、ゾウリムシは外液中の陽イオンに対して様々な行動反応を示すことが知られている。実験的には、各種陽イオンは刺激を与える溶液に塩の形で溶解するため、陽イオンの濃度を単独で変えることはできず、対になる陰イオンの濃度も変化させていることになる。外液中のCl⁻の効果を調べるため、刺激液中のCl⁻を NO_3^- で置換してその効果を調べた。

ゾウリムシを標準溶液 (1mM KCl) から 20mM KCl を含む刺激液に移すと、持続的な後退遊泳が速やかに生じた。この後退遊泳はおおよそ 30 秒続き、ゾウリムシは移動を伴わない回転運動に移行した。さらに時間が経つと、ゾウリムシは緩やかに前進遊泳に戻っていった。刺激液中の 20mM KCl を 20mM KNO_3 に変えて同様の実験を行うと、ゾウリムシは KCl を用いた場合とほぼ同様の行動反応を示した。後退遊泳の持続時間はおよそ 30 秒であった。後退遊泳速度、回転運動の持続時間についても、大きく変わらなかった。

ゾウリムシを標準溶液から 20mM NaCl を含む刺激液に移すと、前進遊泳中に繰り返し方向転換する行動反応が生じた。ゾウ

リムシの Na^+ に対する行動反応は Na^+ をNaClの形で与えた時でも、 KNO_3 の形で与えた時でも同様であった。

ゾウリムシを 5 mM $BaCl_2$ を含む刺激液に入れると、くり返し後退遊泳を行った。この反応は一過性ではなく、長時間持続した。くり返し生じる後退遊泳の頻度や持続時間は、 $BaCl_2$ を $Ba(NO_3)_2$ に置き換えて実験しても変化しなかった。

ゾウリムシを標準溶液から 20mM $CaCl_2$ を含む刺激液に移すと前進遊泳速度の増加が見られた。刺激液中の $CaCl_2$ を同濃度の $Ca(NO_3)_2$ で置き換えると、ゾウリムシの行動反応は、 $CaCl_2$ 中で見られたものとはほとんど変わらなかった。

以上、行動反応の特徴が異なる数種類の無機陽イオンに対するゾウリムシの行動反応は対になる陰イオンとして、Cl⁻を用いた時と、 NO_3^- を用いた時で、大きな違いがなかった。この結果は、ゾウリムシの行動反応に対して、陰イオンは大きな影響をもたないというこれまでの定説を支持している。今後さらに、異なる陰イオン種についても検討し、その効果を調べる必要がある。

次に、膜を透過しない有機イオンとして知られる塩化コリンに対するゾウリムシの行動反応を検討した。ゾウリムシを標準溶液から塩化コリン (10 mM, 20 mM) を含む刺激液に移した。ゾウリムシは刺激液中で顕著な後退遊泳は示さなかったが、10 秒に1回程度の方向転換を示した。

また、 NH_4Cl を含む溶液にゾウリムシを入れ、行動反応を見た。ゾウリムシは NH_4Cl を含む刺激液中で標準溶液中と同様の前進遊泳を続けた。

同様にゾウリムシを K_2HPO_4 を含む刺激液に入れた時の行動反応を調べた。ここでは、刺激に伴い K^+ に対する行動反応が生じるため、20 mM KCl の場合をコントロールとして、10 mM K_2HPO_4 を含む刺激液での反応と比較した。ゾウリムシは K_2HPO_4 を含む刺激液に移すと、持続的な後退遊泳のあと回転運動をし、その後、前進遊泳に戻った。これらの行動反応は KCl の場合と同様だが、後退遊泳の持続時間は若干短い傾向があった。

<考察>

今回の実験から、ゾウリムシは敏感に応答する陽イオンに比べ、陰イオンに対してはほとんど応答しないことがわかった。ゾウリムシの遊泳行動は膜電位により制御されていることがわかっており、膜電位は膜を介したイオンの濃度勾配と各種イオンチャネルのゲーティングにより制御されている。これまでに知られている膜電位発生に関わるイオン種はほとんどが陽イオンである。このように、ゾウリムシの行動制御に重要な無機陽イオンに対して、ゾウリムシが敏感な受容系をもつことはゾウリムシの生存のために合目的である。一方で、ゾウリムシが陰イオンに対して顕著な反応を示さない事実は、陰イオンが膜電気現象に関わっていない事実に起因するかもしれない。

さらに多様なイオン種に対する行動反応を調べ、ゾウリムシがもつイオン受容系の実態を解明する必要がある。

ショウジョウバエを使用した統合失調症リスク因子の遺伝学的解析

座小田 俊亮 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 古久保-徳永 克男 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

統合失調症は全人口の約 1%が罹患すると言われる精神疾患である。その症状は大きく陽性症状と陰性症状に分けられる。陽性症状には幻覚や妄想、陰性症状には意欲や思考力の低下などが含まれる。また過去に一卵性双生児を対象に行われた研究により、統合失調症の発症には遺伝的要因と環境的要因の両方が関与していることがわかっており、さらに遺伝的要因については近年統合失調症患者を対象としたGWASなどの遺伝学的調査により多数のリスク遺伝子が候補としてリストアップされている。

最も有力なリスク遺伝子のひとつとして *DISC1* (*Disrupted in Schizophrenia 1*) が挙げられる。*DISC1* はスコットランドの統合失調症患者が現れやすい家系の遺伝学的解析により発見された遺伝子であり、様々なタンパク質と相互作用する可能性が示唆されている。

当研究室ではヒト *DISC1* を強制発現させたショウジョウバエを用いてその行動や形態の解析を行っている。ショウジョウバエはその全ゲノム塩基配列が解読されており、またヒトの間にも多くの相同な遺伝子を持つことが知られている。さらに、過去の研究からショウジョウバエの脳で *DISC1* を発現させると、学習や記憶、行動に異常が現れるということが明らかになった。

ショウジョウバエの NMJ (Neuromuscular Junction) において *DISC1* を発現させると、シナプス面積が減少することがわかっている。本研究では *DISC1* と相互作用するリスク遺伝子の特定を目的とし、変異遺伝子のもとに *DISC1* を発現させたショウジョウバエにおいてその NMJ の形態を観察、解析した。

材料と方法

1. 変異体のバランス化

♂: mutant / mutant or mutant / balancer (III)

♀: w / w ; Sp / CyO Act-GFP ; Pr Dr / TM6B Ubi-GFP

-w / Y ; + / CyO Act-GFP ; mutant / TM6B Ubi-GFP

2. 変異体と *DISC1* の二重変異体の作成*DISC1* in heterozygous mutant background

♂: w / Y ; + / CyO Act-GFP ; mutant / TM6B Ubi-GFP

♀: w / w ; UAS-DISC1(CS10)6-6(II)

; tubP-GAL4 / TM6B ubi-GFP

-w / w or w / Y ; + / UAS-DISC1(CS10)6-6(II)

; mutant / tubP-GAL4

Control

♂: w / Y ; + / CyO Act-GFP ; mutant / TM6B Ubi-GFP

♀: w / w ; +(CS10) ; tubP-GAL4 / TM6B ubi-GFP

-w / w or w / Y ; + / +(CS10) ; mutant / tubP-GAL4

3. 抗体染色

2 で採卵した後 116-120 時間後の 3 齢幼虫を解剖し、以下の抗体を用いて染色した。

Primary Antibody

Mouse anti-Synaptotagmin 1 : 3

Secondary Antibody

anti-HRP FITC 1 : 50

anti-mouse 633 1 : 50

4. 観察と解析

染色したサンプルを共焦点顕微鏡において観察、撮影した。撮影した写真を画像解析ソフト、Image J を用いて NMJ のシナプス領域の面積を計測した。

今後の展望

本研究ではリストアップされた遺伝子のうち第三染色体上のものからいくつか選んでスクリーニングを行った。今後は残りの候補遺伝子のスクリーニングを進めつつ、過去の研究とあわせて *DISC1* と強く相互作用する遺伝子についてはその機能や影響を研究していく予定である。

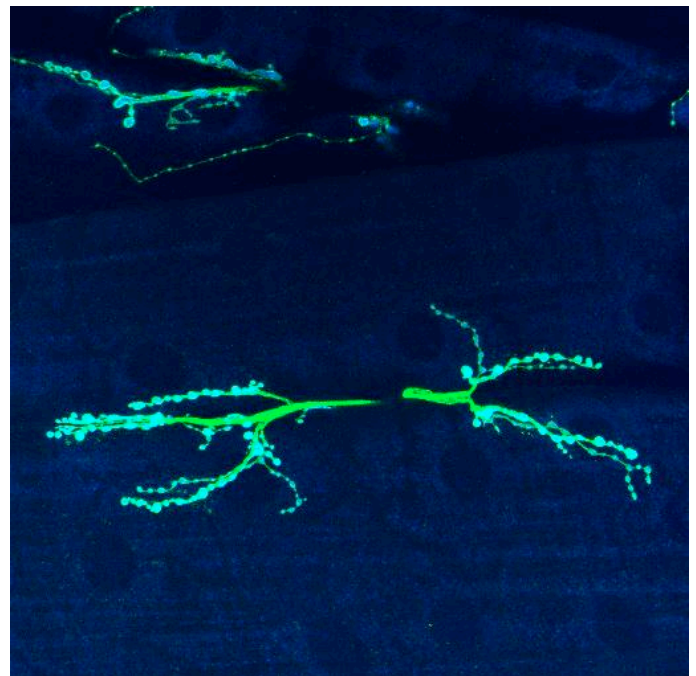


Figure 1. 共焦点顕微鏡によるショウジョウバエ幼虫の NMJ 撮影画像。anti-HRP(緑)。anti-Synaptotagmin(青)。

ショウジョウバエを用いた統合失調症脆弱遺伝子のスクリーニング

: DISC1 と Nr_x-1 の遺伝的相互作用による神経発生異常

吉村 由祐子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 古久保-徳永 克男 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

統合失調症は、全人口の約 1% に発症する精神疾患である。主な症状として、幻覚や妄想などの陽性症状と、意欲減退などの陰性症状に大別される。環境要因と遺伝的要因の双方が関与すると考えられているが、発症過程のメカニズムについては多くが未解明である。

近年、ヒトゲノムワイド遺伝子解析といった遺伝学的研究により、統合失調症脆弱遺伝子が多数リストアップされている。なかでも、DISC1 (Disrupted in Schizophrenia 1) はスコットランドの統合失調症多発家系の遺伝学的解析により見つかった遺伝子で、統合失調症発症に強い影響力をもち、多数のタンパク質と相互作用し神経発生を調節することが分かっている。当研究室ではショウジョウバエを用い、神経発生や記憶学習における DISC1 の機能を解析してきた。ハエの脳にヒト DISC1 を強制発現させると、学習や睡眠に異常が現れることが明らかになっている。

統合失調症をはじめとした精神疾患は複数の遺伝的要因が関与すると考えられており、複数の脆弱遺伝子間の相互作用を解明する必要がある。本研究では、統合失調症リスク因子間の遺伝的相互作用を解明することを目的に、統合失調症脆弱遺伝子として名前が挙がっているヒト遺伝子と相対的なハエ遺伝子をリストアップし、DISC1 と相互作用する遺伝子のスクリーニングを行った。そこで、ショウジョウバエの神経筋接合部 (NMJ) の形態的変化を指標とし、DISC1 とリスク遺伝子の変異が NMJ 形成にどのような影響を及ぼすか観察した。

さらに、当研究室の先行研究により、自閉症脆弱遺伝子のホモログのひとつが DISC1 と強い遺伝的相互作用を示し、NMJ に形態的変化を及ぼすことが明らかにされた。これは統合失調症の発症メカニズムに、自閉症をはじめとする他の精神疾患のリスク因子が関与している可能性を示唆している。そこでわたしは、本研究でスクリーニングした遺伝子のうち、Nr_x-1 (Neurexin-1) に着目した。ショウジョウバエがもつ Nr_x-1 は、自閉症脆弱遺伝子として知られているヒト NRXN1 の相同遺伝子であり、Nr_x-1 変異体では学習障害が引き起こされることがわかっている。Nr_x-1 変異体の観察を足掛かりとして、さまざまな精神疾患の発症機序に共通するメカニズムを探ることを試みた。

方法

1. 解析用変異体の作製

まず、リスク候補遺伝子の変異をもつ個体をダブルバランスサーシステムと掛け合わせ、変異体をバランス化した。

次に、ハエの染色体にヒト DISC1 と変異が導入されている二重変異体を作製し、DISC1 との遺伝的相互作用を解析するための変異体として使用した。

2. 採卵・解剖・抗体染色

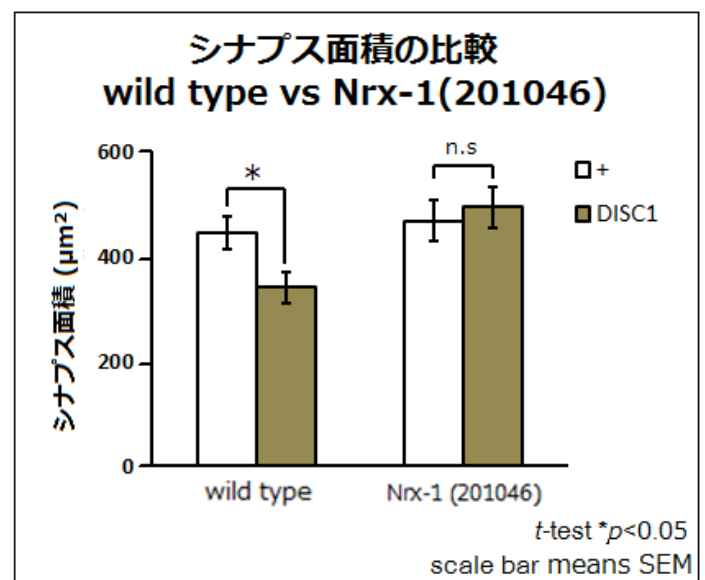
採卵から 116-120 時間後の 3 齢幼虫を解剖した。免疫抗体を使用し、NMJ を特異的に染色した。

3. 観察・画像解析

共焦点レーザー顕微鏡でサンプルを撮影し、画像解析ソフト ImageJ を用いて NMJ の形態的変化を観察した。解析ではシナプス面積、シナプス数、軸索の分岐数を測定した。

結果・考察

ハエの第 2 染色体にヒト DISC1 を強制発現させたところ、シナプス面積が減少した。これを野生型として、DISC1 と候補遺伝子の二重変異体と比較した結果、野生型と同様にシナプス面積の減少がみられた Neutral Type と、シナプス面積の減少が抑制された Suppressor Type の 2 タイプに大別された。DISC1 と Nr_x-1 の二重変異体は後者に分類されたことから (グラフ参照)、DISC1 と Nr_x-1 による遺伝的相互作用がシナプス形成過程に働いたと考えられる。



今後の展望

さらなる候補遺伝子のスクリーニングを進めていく。同時に、複数の Nr_x-1 変異体に DISC1 を強制発現させた二重変異体における NMJ の形態的変化の観察を継続することで、Nr_x-1 と DISC1 の遺伝的相互作用を解析する予定である。現在、様々な Nr_x-1 の変異体をリストアップし、解析用変異体を作製中である。

母親から子に伝播されるステロール類が初期発生過程に与える影響：ショウジョウバエを用いた研究

平野 陽太（筑波大学 生物学類） 指導教員：丹羽 隆介（筑波大学 生命環境系）

背景・目的

全ての多細胞生物は受精卵から発生が始まる。受精卵が適切に胚発生を遂行するためには、「母性因子」と呼ばれる様々な物質が母親から子（受精卵）に供給されることが重要である。従来の研究から、母性因子としては、転写因子やそれらをコードする mRNA などの発生調節因子がよく知られている。しかし、生命活動においてより根本的な栄養分がいかに母親から供給されるのか、またその母親由来の栄養分が次世代の発生においてどのような重要性をもつのかについては、未解明な部分が多い。

この疑問に答えるために私は、発生生物学的知見が豊富なキロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、ショウジョウバエ) を材料として、母親から供給される栄養成分の 1 つであるステロールに着目した研究を行った。ショウジョウバエを含む昆虫において、ステロールは、発生過程の進行を調節するステロイドホルモンであるエクジステロイドの前駆物質である^[1]。エクジステロイドは胚発生に必須であるが、胚エクジステロイド生合成における母性ステロールの意義はこれまでほとんど検討されていない。一方で、イエバエ *Musca domestica* を用いた先行研究において、ステロールを摂取させていない成虫が産んだ卵の孵化率が著しく低いという報告がある^[2]。この結果から、親のステロール栄養状態が子の発生に影響を与えることが示唆される。本研究では、ショウジョウバエを用いてこの先行研究の内容を再検討しつつ、母親から子へ供給される母性ステロールの胚発生および胚エクジステロイド生合成における重要性を追究した。

方法

(1) エサの調製とショウジョウバエの飼育

本研究では、メス成虫に与えるエサ中のステロール量を操作することが重要となる。そこで私は、微量のステロールしか含まない酵母粉末 (Sigma Yeast Autolysate) ^[3] で作ったエサおよびそれにステロールを添加したエサを実験に用いた。羽化直後のメス成虫を集め、同一のステロール量を含むエサしか摂食できない環境で未交尾状態のまま 7 日間飼育した後、オスと交尾させ受精卵の回収を始めた。交尾後もステロール環境は維持した。ステロールとして、コレステロールおよび 7-デヒドロコレステロール (いずれも Sigma 製)、また練り酵母にそれぞれを混ぜたものを用いた。

(2) 産卵数、孵化率の計測

オスとの交尾後 24 時間周期で受精卵を回収し、それぞれのエサで飼育したメス成虫の産卵数を計測した。採卵後 24 時間以上経ってから孵化した幼虫の数を計測し、孵化率を計算した。

(3) 胚の発生段階の観察

交尾済みメスに 3 時間産卵させて受精卵を回収し、その受精卵に対して抗 FasIII モノクローナル抗体 7G10 (Developmental Studies Hybridoma Bank より入手) による免疫組織化学染色を行った。FasIII とは上皮構造に局在するタンパク質である^[4]。これにより胚の外形観察を容易にし、胚の発生段階の割合を計測

した。また、活性型エクジステロイドである 20-ヒドロキシエクジソン (20E; Enzo 製) は、正常発生時にその胚内の濃度がピークとなる時期に投与した。

(4) 各種ステロールを摂取したメス成虫が産んだ子の発生の観察
交尾済みメス成虫が産んだ受精卵を 24 時間周期で回収し、微量のステロールしか含まないエサで飼育して、発生を観察した。

結果

メス成虫の産卵数に関してはエサ中のコレステロールの有無によって著しい差は見られなかった一方で、孵化率に関しては劇的な差が見られた。コレステロールを与えたメス成虫の産んだ受精卵の孵化率は 90%前後であったが、コレステロールを与えていないメス成虫の産んだ受精卵の孵化率は交尾後 2 日目以降で 10%以下であった。

コレステロールを与えていないメス成虫が産んだ交尾後 3~5 日の受精卵の胚発生過程を観察したところ、胚性致死を示した胚 (N=315) の約 40%はエクジステロイド生合成酵素遺伝子の突然変異株と酷似した形態異常を示した。これらの胚に 20E を投与することによって、形態異常を示す胚の割合は大きく減少した。この結果は、母親から卵に供給されるステロールは、胚発生過程におけるエクジステロイド生合成に重要であることを示唆する。

また私は、各種ステロールを十分に与えたメス成虫が産んだ受精卵を、低ステロール環境で飼育し、その後の発生過程を調べた。その結果、孵化後にステロールを十分に摂取していないにもかかわらず、一部の個体が 2 齢幼虫まで進行し、さらにごく一部は蛹や成虫まで進行することが明らかになった。この結果は、母親から供給されるステロールは、子の発生を胚発生過程以降においてもある程度保証することを示唆する。

考察

今回の結果から、母親から子へと供給されるコレステロールがエクジステロイドの材料となり、胚発生を進行させるのに必要であると考えられる。今後は、コレステロールを与えた成虫と与えていない成虫のそれぞれが産んだ受精卵に、実際にどの程度のコレステロールが蓄積しているのかを調べる必要がある。

また、今回の私の研究から、ショウジョウバエは、母親から供給されるステロールのみで、胚発生のみならず孵化後の発生をもある程度進行させることが確認された。このことは、母性因子としての栄養は、発生過程を通じて広範な発生段階に影響を及ぼすことを示している。この発見は、母性因子の新たな一面を明らかにしたものであり、発生生物学的に重要である。

参考文献

- [1] Spindler et al. (2009) *Cell Mol Life Sci* 66: 3837-3850.
- [2] Monroe R.E. (1959) *Nature* 4697: 1213.
- [3] Carvalho et al. (2010) *Development* 137: 3675-3685.
- [4] Patel et al. (1987) *Cell* 48: 975-988

線虫 *C. elegans* の寿命の制御におけるグルタチオン S-転移酵素ファミリーの関与の検討

諸橋 香奈 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 丹羽 隆介 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

我々ヒトを含むほとんどすべての動物の発生と成長、そして代謝の調節や恒常性の維持に深く関係している生理活性物質として、ステロイドホルモンがよく知られている。ステロイドホルモンは、コレステロールを出発材料として、様々な酵素による多段階反応を経て生合成される。最近、私が所属する研究室において、グルタチオン-S-転移酵素 (GST) ファミリーに属する分子 Noppera-bo が、昆虫ステロイドホルモン生合成に必須の酵素として同定された[1]。GST は、グルタチオンというトリペプチドを基質に付加する活性を持つ酵素であり、昆虫だけでなく、哺乳動物のステロイドホルモン生合成過程においても内在性中間体の生成に関与することが報告されている[2]。

一方、過去 10 年間の研究から、ステロイドホルモン生合成に関わる酵素ファミリーの多くは、動物界を通じて共通していることが明らかにされている。このことから私は、GST ファミリーも動物界で保存されており、昆虫と哺乳動物以外の動物においてもステロイドホルモン生合成過程に関与するという可能性に関心を持った。そこで私は、線虫 *Caenorhabditis elegans* を実験材料として、線虫ステロイドホルモンであるダファクロン酸 (DA) の生合成経路にも GST が関与するのかを追求した (図 1)。

先行研究において、DA は線虫の寿命に関与することが知られている。また DA による寿命の制御においては、生殖細胞系列の組織が重要な関与をすることが報告されている[3][4]。生殖細胞を失った線虫は、野生型と比較して寿命の延伸が見られるが、この延伸は DA 生合成経路で働く遺伝子を欠損させると打ち消される。こうした先行研究の結果は、生殖細胞からの寿命延伸シグナルの効果が線虫体内で生合成される DA を必要とすることを意味する。私はこの事実を踏まえ、ある特定の *gst* 遺伝子の機能を低下させたときに、生殖細胞を失った線虫の寿命の延伸が打ち消されれば、この *gst* 遺伝子が DA の生合成経路に関わる候補遺伝子と言えると考えた。そこで、制限温度下で生殖腺が正常に発生できない系統である温度感受性変異株 *glp-1(ts)* を用い、DA 依存的な寿命の調節に影響を与える *gst* 遺伝子のスクリーニングを行った。

材料・方法

(1)RNAi 処理

RNAi の誘導には、線虫実験で広く用いられているフィーディング RNAi 法を利用した[5]。RNAi のターゲット遺伝子を選択する際に、ブートストラップ法によってショウジョウバエとヒト、そして線虫の GST タンパク質のアミノ酸配列で系統樹を作成したところ、明瞭なオーソログが存在しなかった。そこで私は、DA 生合成経路に関わる *gst* 遺伝子の候補を探索するために、すべての線虫 *gst* 遺伝子を対象とした、網羅的な表現型解析を行うことにした。線虫ゲノムに存在する 49 個の *gst* 遺伝子のうち、34 個の遺伝子に対する二重鎖 RNA 発現用プラスミドは、本学 TARA センターの深水昭吉教授から分与いただいた。残り 15 個

の遺伝子のうち、12 個の遺伝子に対する二重鎖 RNA プラスミドは新たに作製した。二重鎖 RNA を発現させるための大腸菌株として、HT115 を用いた。

(2)寿命測定

線虫を同調処理した後、46 個の *gst* 遺伝子に対する二重鎖 RNA プラスミドを導入したそれぞれの HT115 を、Ampicilin と IPTG を加えた LB プレートの表面に塗り、その上で *glp-1(ts)* を 1 齢幼虫から飼育した。この際、制限温度である 25°C で 36 時間飼育した後、20°C で 15 時間飼育して成虫にし、2 日に 1 回生存数をカウントした。ネガティブコントロールとして、空ベクター (L4440) 導入大腸菌を摂食させた *glp-1(ts)* の寿命を測定した。ポジティブコントロールとしては、DA 生合成酵素遺伝子 *daf-9* に対する RNAi を誘導した *glp-1(ts)* の寿命を測定した。

結果・考察

線虫の生存経路を使った RNAi での寿命アッセイは世界でもあまり例がない。今回私は、寿命アッセイに適した条件を検証し、RNAi 処理をし始めるタイミングを 1 齢幼虫からと統一することで、非常に安定した再現性のよい寿命曲線が得られることを明らかにした。そして、線虫のゲノムに存在する独立した 49 個の *gst* 遺伝子のうち、46 個の *gst* 遺伝子に関する寿命アッセイを実施し、DA 生合成経路に関わる有力な候補遺伝子を見出した。この他に見つかった、*daf-9* の機能低下個体と挙動は異なるが、機能低下によって寿命に変化が見られた *gst* 遺伝子と共に、今後更なる検討を重ねる予定である。

今回 DA 生合成経路に関わる有力な候補遺伝子が得られたことにより、ステロイドホルモン生合成経路において、GST ファミリーも動物界を通じて進化的に保存されていることが強く期待される。また私の研究成果は、ステロイドホルモン生合成に関わる酵素ファミリーの新たな進化的保存性を明らかにし、生体内で機能するホルモンの機能と進化に対し、新たな視点を与えるものである。

参考文献

- [1] 塩谷(2012) 修士論文
- [2] Johansson et al. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 33061-33065
- [3] Hsin et al. (1999) *Nature*, 399, 362-366
- [4] Rottiers et al. (2006) *Dev. Cell*, 10, 473-482
- [5] Fraser et al. (2000) *Nature*, 408, 325-330

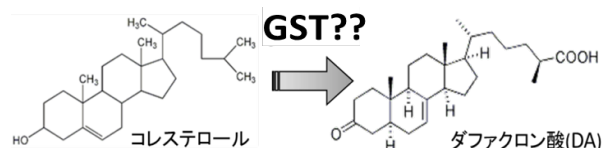


図 1. ダファクロン酸 (DA) 生合成経路

Large Maf 群転写因子 MafB 臓器特異的遺伝子欠損マウスの作製；膵内分泌細胞における機能解析

藤澤 空見子 (筑波大学 生物学類) 指導教員：高橋 智 (筑波大学 医学医療系)

背景・目的

今日、日本における糖尿病患者数は約 250 万人程度と見積もられている。糖尿病は主に 1 型と 2 型に分けられ、それぞれの原因は、1 型では免疫機序による膵島β細胞の破壊・消失、2 型ではインスリン分泌や抵抗性に関わる複数の遺伝因子に肥満やストレス、生活習慣等の環境要因が加わることでされている。患者数は 2 型が圧倒的に多い。治療としては、食事療法、運動療法に加え、様々な経口血糖降下薬、インスリン注射、時に膵島移植が用いられている。しかし、体内の血糖値状態に応じたインスリン量の調節を外部から適切に行うことは難しく、また、移植も拒絶反応という欠点があり、治療として改善の余地が残されている現状である。

本研究では、Large Maf 群転写因子の 1 つである *MafB* に着目した。*MafB* は様々な組織で発現しているが、内分泌細胞分化においても重要な役割を果たし、β細胞形成になくなくてはならない遺伝子の 1 つである。このβ細胞の分化成熟メカニズムは未だ完全には分かっておらず、解明が進めば糖尿病治療法開発に繋がる可能性がある。これまでの解析により、全身性の *MafB* 遺伝子欠損マウスは、呼吸障害により生後数時間で死亡する事が明らかになっており、成獣における *MafB* 遺伝子の機能解析は困難であった。本研究では、成獣におけるβ細胞機能の解析を行うために、*MafB* を膵β細胞特異的に欠損する条件付き遺伝子欠損マウスの作製を試みた。

材料・方法

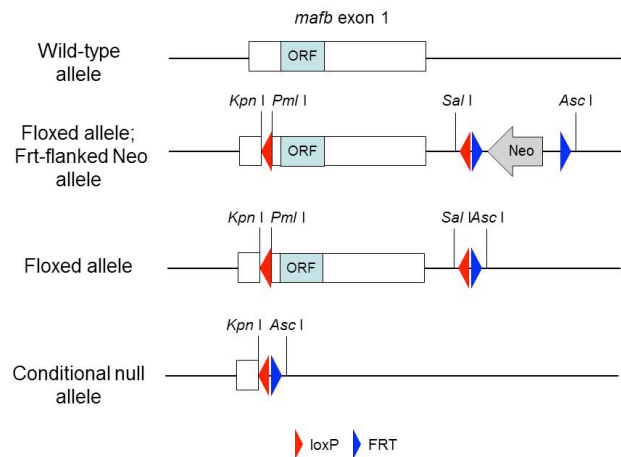
(1)キメラマウスの作製。相同組み換えによって、*MafB* 遺伝子領域を loxP 配列で挟んだ遺伝子改変 ES 細胞 (C57BL/6J マウス由来) を作製した。この ES 細胞と ICR マウスの 8 細胞期胚とのアグリゲーションキメラ胚を作製し、その後仮親の子宮に移植した。

(2)flox/+マウスの作製。得られたキメラマウスを野生型 C57BL/6 マウスと交配することで、生殖系列への移行を確認し、flox/+マウスの作製を行った。その後、Flpe マウスと交配し、ネオマイシン耐性遺伝子の排除を行った。

(3)Cre 組換え酵素による flox *MafB* アレルの切り出し。得られた flox/+マウスの floxed *MafB* アレルが Cre 組換え酵素によって、有効に切り出されるか確認を行った。flox/+; *Ayu1-Cre* マウスを作製し、マウスゲノムを抽出、MafB 欠損アレルを特異的に認識可能なプライマーを用いた PCR を行って、*MafB* 遺伝子が欠損するか判定を行った。

(4) flox/+; *Ins1-Cre* マウスの作製。一方でβ細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現可能な *Ins1-Cre* マウスと flox/+マウスを交配することで、β細胞特異的 *MafB* 遺伝子欠損マウスが効率良く得られる交配に必要なマウスを用意した。

これらのマウス交配には、全て C57BL/6J マウスを用いた。また、各交配で生まれたマウスは、PCR によって、遺伝子型の判定を行い、該当するもののみを次の交配に用いた。

mafB (chromosome 2)

結果

PCR 法によって、キメラマウスと野生型マウスの F1 世代に、floxed *MafB* 遺伝子型を有する事を確認し、生殖系列への移行を確認した。さらに、この F1 マウスを ES 細胞の選択の際に用いたネオマイシン耐性遺伝子を除去するために、Flpe マウスと交配する事で、F2 世代を作製し、ネオマイシン耐性遺伝子除去した。F2 世代はネオマイシン耐性遺伝子の欠損、ネオマイシン耐性遺伝子除去のために挿入した *Flp* 遺伝子、そして floxed *MafB* の確認によって、ヘテロマウス (Flox/+マウス)であることを確認した。さらに、flox/+; *Ayu1-Cre* マウスを作製し、*MafB* 遺伝子欠損アレル特異的 PCR によって、*MafB* 遺伝子がヘテロ接合性であることを確認し、loxP 配列が有効に Cre 組換え酵素による認識を受けることが明らかとなった。現在、さらにヘテロマウス同士の交配を行って floxed allele をホモとして持つマウス (flox/flox マウス)を作製中である。

一方で、β細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現可能な *Ins1-Cre* マウスと flox/+マウスを交配する事で、flox/+; *Ins1-Cre* マウスを得た。

考察

F1 マウスの解析から、改変 ES 細胞は、生殖系列に移行しており、ネオマイシン耐性遺伝子の除去も可能であったことから、flox/flox マウスの作製可能な事が確実となった。Flox/+; *Ayu1-Cre* マウスの解析から、挿入した loxP 配列は、Cre 酵素に適切に認識、切断を受けており、デザイン通りに機能することが明らかとなった。今後、flox/flox マウスおよび flox/+; *Ins1-Cre* マウスの交配を行って、β細胞特異的 *MafB* 遺伝子欠損マウスを得る予定である。

これまでの全身性 *MafB* 遺伝子欠損マウスの解析によって、*MafB* 遺伝子がβ細胞分化に重要な役割を有する事が明らかとなっている。今後、β細胞特異的 *MafB* 遺伝子欠損マウスの解析を行う事で、β細胞成熟への関与、また糖尿病発症の有無を検討する。

骨格筋における脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の役割

板倉 晃希 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 島野 仁 (筑波大学 医学医療系)

背景および目的

近年、生活習慣病患者数は増加の一途をたどっており、早急に有効な予防・治療法が求められている。生活習慣病の多くにインスリン抵抗性が見られ、この原因としては脂肪の過剰蓄積による脂肪毒性が引き金となり、インスリンシグナルを阻害すると考えられている。これらのことから、生活習慣病の改善には蓄積する脂質の「量」の変化が着目されてきたが、脂質の「質」の変化にはあまり着目されてこなかった。

本研究室では脂肪酸、トリグリセリド(TG)、コレステロール(Cho)の合成を制御する転写因子である 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 member6 (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張酵素であり、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^[1]。

そして Elovl6 全身欠損マウスの作製・解析により、欠損マウスでは炭素数 16 以下の脂肪酸の増加、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、様々な脂肪酸組成の変化が見られ、その結果、エネルギー代謝関連遺伝子の発現が変化し、食事負荷や肥満モデルマウス (ob/ob マウス) との交配により肥満や脂肪肝が生じるが、良好な耐糖能・インスリン感受性が示されることを明らかにした^[2]。しかし肝臓特異的 Elovl6 欠損マウスの作製・解析により、欠損マウスでは炭素数 16 以下の脂肪酸の増加、炭素数 18 以上の脂肪酸の減少など、脂肪酸組成の変化は見られるが、食事負荷によるインスリン抵抗性の改善が示されないことから、他の組織における Elovl6 の働きがインスリン抵抗性の改善に関わっている可能性が示唆された。

そこで本研究ではインスリン抵抗性に大きく関わる主な組織の脳・肝臓・骨格筋の中でも骨格筋に着目し、骨格筋における Elovl6 の働きを解明することを目的として解析を行った。

材料および方法

マウス

Human alpha skeletal actin (Acta1) をプロモーターとして Cre recombinase を発現する Acta1-Cre Tg マウスと Elovl6 floxed マウスを交配し、骨格筋特異的に Elovl6 が欠損した Elovl6^{flox/flox}, Acta1-Cre^{+/+}マウス(以降 MKO マウス)を作製し、その対照として Elovl6^{flox/flox}, Acta1-Cre^{-/-}マウス(以降 flox マウス)を用い、実験を行った。

1. Elovl6 による筋障害の確認

6 週齢および 6 ヶ月齢の flox および MKO マウス(雌雄両方)で眼窩採血を行い、得られた全血から血清を分離し CPK 測定(富士ドライケム)を行った。そして雄マウスのみ解剖し前脛骨筋を摘出しホルマリン溶液で固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE 染色)を施し、顕微鏡で観察を行った。

2. 血清パラメーターの測定

7~9 週齢の flox および MKO マウス(雌雄両方)で眼窩採血を行い、得られた全血から血清を分離し、血糖値・TG・総コレステロール(T-Cho)・HDL コレステロール(HDL-Cho)・GOT・GPT の測定(和光純薬キット)を行った。

3. ①インスリン負荷試験 ②経口グルコース負荷試験

①8~10 週齢の flox および MKO マウス(雌雄両方)にインスリンを腹腔内投与し、0, 15, 30, 60, 90, 120 分に尾静脈から血液を採取し簡易血糖測定器で測定を行った。

②12 週齢の flox および MKO マウス(雌雄両方)にグルコースを経口投与し、0, 15, 30, 60, 90, 120 分で眼窩採血を行い、得られた血清を用いて 2 と同様に血糖値を測定した。

4. ①ロータロッドテスト ②トレッドミルテスト

①8 週齢の flox および MKO マウス(雌雄両方)を加速するロッドの上に乗せ、落下するまでの時間を測定した。これを 1 試行とし、1 日 3 試行を 3 日間行い、計 9 試行の測定を行った。

②8~10 週齢の flox および MKO マウス(雌雄両方)を加速するベルトコンベアの上に乗せ、スピードに追い付けなくなるまでの時間を測定し、走行距離を算出した。雄に関しては 16 週齢の flox および MKO マウスでも測定を行った。

結果および考察

1. 血清測定および病理診断からも Elovl6 による筋障害は確認されず、加齢に伴う筋障害も確認されなかった。

2. 雌雄両方の全ての血清パラメーターにおいて flox-MKO マウス間で有意差は確認されなかった(t 検定法による)。

3. ①・②雌雄両方の全ての測定時間において flox-MKO マウス間で有意差は確認されなかった(t 検定法による)。

4. ①雌雄両方の全ての試行において flox-MKO マウス間で有意差は確認されなかった(t 検定法による)。

②雌雄両方の走行距離において flox-MKO マウス間で有意差は確認されなかった(t 検定法による)。

これらのことから骨格筋において Elovl6 が関与している可能性は大変低いと示唆され、他の組織での Elovl6 の働きが重要であると考えられる。

引用文献

[1] Matsuzaka et al. (2002) *J Lipid Res.* 43:911-920

[2] Matsuzaka et al. (2007) *Nat Med.* 13:1193-1202

蛍光 live imaging による睡眠覚醒機構の解明

石井 亮 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 柳沢 正史 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

睡眠はすべての動物に見られる普遍的な生理現象であり、身体の休息のみならず記憶の形成や神経系の機能の維持にも関わることが示唆されている。しかし、その機能的意義や根本的なメカニズムは依然未解明な点が多い。現在、皮質下に局在する睡眠・覚醒の調節に関与する神経核の機能は明らかになりつつあるものの、それらの神経核のニューロンの投射先であり、睡眠の発生要因でもあり最大の受益者でもある大脳新皮質における睡眠覚醒に伴う神経活動は不明なままである。そもそも睡眠は大脳皮質の神経活動を反映する脳波により定義されており、その脳波により脳の状態は覚醒、rapid eye movement (REM)睡眠、non-REM (NREM)睡眠に分類される。睡眠とは何かという根源的な問題の解決には、睡眠・覚醒に伴う大脳新皮質の神経活動を詳細に調べることが必要不可欠である。

睡眠・覚醒は脳全体の状態遷移であり、多数のニューロンの振る舞いを同時計測する必要がある。さらに大脳新皮質は多種多様なニューロンが層構造を成し、非ニューロン細胞であるアストロサイトも多く存在する。このため研究にはセルタイプの同定と複数の細胞の同時記録が必要である。加えて、睡眠は麻酔とは似て異なるものであり、自然な睡眠と覚醒サイクルで計測を行うことが望ましい。事実、麻酔下では神経活動がREM/NREM睡眠の特徴をもたず自然状態の睡眠とは大きく異なる。それにも関わらず大脳新皮質の神経活動の研究は麻酔下のものがほとんどであり、自然な睡眠時における広範囲の大脳新皮質のセルタイプを同定した状態での神経活動の記録はこれまでに報告がない。

本研究では、二光子励起顕微鏡下でのマウスの自然な睡眠・覚醒を実現し、脳波/筋電図を同時測定しながら、自然な睡眠時のニューロンとアストロサイトの活動を、蛍光 Ca²⁺イメージングによって観察することを可能とする独自の計測システムの立ち上げを目的とした。二光子励起顕微鏡は長波長の近赤外光を用いるため細胞へのダメージを軽減でき、また細胞を構成するたんぱく質や水による吸収が少ないため、皮質深層まで低侵襲かつ低光毒性条件で長時間観察することができる。さらに遺伝子コード型蛍光 Ca²⁺インジケーターを採用することでセルタイプを同定して *in vivo* での活動をリアルタイムイメージングすることが可能である。本研究では、これらを用いて自然睡眠時及び覚醒時の皮質の活動を高精度でイメージングした。

【研究手法】

1. Cranial window 及び EEG/EMG 手術

1-1. Ca²⁺感受性色素

睡眠覚醒の判断基準となる脳波/筋電図(EEG/EMG)測定を行うため、野生型マウス(C57BL/6J)の頭皮を切開し、硬膜に EEG 用電極を、項部筋に EMG 用電極を取り付け、さらに二光子励起顕微鏡下で頭部を固定するためのヘッドプレートを頭蓋骨に設置した。このマウスを球形トレッドミル上で 1 日 6 時間 1 週間に渡って慣らし、トレッドミル上で自然状態に近い睡眠を観察できるようにした。観察日に歯科用ドリルで頭蓋骨

に直径 2 mm の穴 (Cranial window)をあげ、皮質の 200~400 μm (第 2/3 層) 部位のニューロンとアストロサイトを同定するために、アストロサイト特異的マーカーである蛍光色素 (sulforhodamine 101, SR101) と Ca²⁺感受性色素 (oregon green-488 BAPTA-1 AM, OGB1) を大脳新皮質一次運動野に微量注入し、Cranial window をカバーガラスで覆った。

1-2. Ca²⁺感受性たんぱく質

マウス頭蓋骨に直径 0.2 mm の穴をあげ、大脳新皮質の 100~400 μm の部位に、Ca²⁺感受性たんぱく質 (GCaMP5G) を発現させるアデノ随伴ウイルス(AAV-EF1 α -GCaMP5G)を微量注入し、EEG/EMG 手術を行った。マウスの回復とウイルスの発現期間を考慮し、手術後 2 週間以上経過したマウスを用いて、1-1 と同様に Cranial window を作成した。

2. Ca²⁺ imaging

Ca²⁺感受性色素を注入または Ca²⁺感受性たんぱく質を発現させたマウスを二光子励起顕微鏡下の球形トレッドミルに乗せ、ヘッドプレートで頭部を固定し、EEG/EMG の電極を測定機器に接続した後、大脳新皮質第 2/3 層を二光子イメージングした。EEG/EMG とともにニューロンとアストロサイトの OGB1 及び GCaMP5G の蛍光強度を経時記録し、活動をモニターした。

【結果】

実験系の確認のため、錐体細胞に YFP が発現した遺伝子改変マウス Thy1-YFP マウスの皮質の覚醒時の二光子イメージングを行った。表層の樹状突起やスパイン、大脳新皮質 5 層の細胞体が蛍光観察でき、大きな懸念であった視野ブレもほぼ見られなかった。次に SR101 と OGB1 の同時注入マウスの二光子イメージングを行った。アストロサイトとニューロンを SR101 で明確に区別することが出来たが、OGB1 の取り込み効率が悪いという問題があった。さらに AAV 注入による GCaMP5G でのニューロンの Ca²⁺イメージングを行った。OGB1 と異なり、細胞体だけでなく微細構造にまで蛍光たんぱく質を満たすことが出来るためニューロンの樹状突起の Ca²⁺変化が観察可能となった。

【考察と展望】

本研究は世界に類を見ない計測系の立ち上げに多くの時間を割いた。技術的問題であった対物レンズ下での自然な睡眠と覚醒の実現を球形トレッドミルの採用により達成し、覚醒時にも関わらず視野ブレの少ない高精細の画像を取得することができた。OGB1 注入に関しては注入方法を改善し、効率良く細胞を観察する必要がある。AAV-EF1 α -GCaMP5G では注入領域の細胞に非特異的にあまりに高密に発現してしまうため、細胞体を正確に検出できない問題があった。今後はプロモータを synapsin や CaMKII α に変更した AAV を試行する。現状は覚醒時の神経活動を確認できた段階であり、今後は自然な睡眠時の神経活動を観察する予定である。ニューロンとアストロサイト、錐体細胞と介在神経など多種多様な細胞群の活動が覚醒~NREM 睡眠~REM 睡眠という脳状態の遷移時にどのように変化するかを詳細に光学計測し、大脳新皮質における睡眠の重要性に迫る。

喘息を抑制する Allergy Inhibitory Receptor (Allergin-1)の抗原提示細胞における機能の解明

本田 拓之 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 澁谷 彰 (筑波大学 医学医療系)

背景・目的

喘息は、慢性的な気道炎症、気流制限、気道過敏性の亢進を病態の基盤とし、発作性の呼吸困難、喘鳴、咳などの呼吸器症状を繰り返す疾患のことであり、重症の急性増悪では死に至ることもある。喘息の病態に関連する因子は多岐にわたるが、特にアレルギー反応による喘息は一般的である。アレルギー反応には T 細胞が深く関わっており、アレルギー性の喘息は抗原提示細胞がナイーブ T 細胞に抗原を提示することにより、Th2 細胞に分化することによって発症する。しかし、そのメカニズムはいまだ不明な点も多く、詳細なメカニズムの解明は急務である。

当研究室は肥満細胞に強く発現し、アナフィラキシーを抑制する分子である Allergy inhibitory receptor (Allergin-1) を同定した。これは分子量~60kDa の膜型受容体で細胞内領域に Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) を有しており、Allergin-1 は SHP-1、SHP-2 といったチロシン脱リン酸化酵素と会合する。肥満細胞において、Allergin-1 は IgE 受容体のシグナルを介した脱顆粒を抑制することでアナフィラキシーを抑制する (Hitomi K *et al. Nat Immunol* 2010)。

Allergin-1 は肥満細胞の他にも樹状細胞やマクロファージ、好中球などに発現することが報告されている。当研究室の先の実験で Allergin-1 遺伝子欠損マウスにダニ抗原 (HDM) を用いて喘息を誘導すると野生型のマウスに比べて気道抵抗の上昇、また好酸球の増加や IgE 抗体価の増悪がみられ、アレルギー性の喘息の悪化を確認した。また、HDM で刺激した Allergin-1 遺伝子欠損マウスの骨髄由来樹状細胞 (Bone Marrow-derived Dendritic Cells, BMDCs) を野生型マウスに鼻腔内投与すると同様に野生型マウス由来の BMDCs を投与したマウスに比べてアレルギー性の喘息が悪化した。樹状細胞は抗原提示細胞として機能する免疫細胞の一種である。抗原を取り込んだ樹状細胞は活性化し、抗原特異的なナイーブ T 細胞に抗原を提示する。これらのことから、Allergin-1 は HDM による樹状細胞の活性を抑制することで Th2 応答を抑制していることが示唆された。以上のことから Allergin-1 の樹状細胞における機能の詳細を明らかにするために、Allergin-1 遺伝子欠損マウスを用いて *in vitro* の系で BMDCs を誘導、刺激し、解析を行うこととした。

方法

樹状細胞における Allergin-1 の機能解明のために骨髄細胞から BMDCs を誘導し、HDM 刺激による Allergin-1 遺伝子欠損マウス、および野生型マウス由来の BMDCs の活性を比較、検討した。また HDM 抗原の一つである Der p2 は TLR4 を介して活性化シグナルを伝達することが報告されている (Trompette A *et al. Nature* 2009)。このことから TLR4 のリガンドである LPS でも刺激し、BMDCs の活性を測定した。

1. サイトカイン産生能の比較

野生型マウス (n=3) と Allergin-1 遺伝子欠損マウス (n=3) 由来の骨髄を採取し、骨髄細胞 1×10^7 個を GM-CSF 10 ng/ml、IL-4 10 ng/ml を加えた培養液 10 ml で培養し、樹状細胞へと分

化誘導させた。培養 2 日目に 70%、5 日目に 100% の培養液を入れ替え、7 日目に細胞を回収し、この細胞を BMDCs とした。それぞれのマウス由来の BMDCs を抗 CD11c 抗体で染色し、誘導能をフローサイトメトリー法を用いて検討した。そして、HDM 100 μ g/ml、または LPS 1 μ g/ml で刺激して 16 時間培養し、BMDCs の培養上清中に産生された炎症性サイトカイン (TNF、IL-6) の産生量を ELISA 法を用いて測定し、野生型マウスおよび Allergin-1 遺伝子欠損マウス由来の BMDCs における炎症性サイトカイン産生能を比較した。

2. c-Kit の発現の比較

1. と同様に誘導した野生型マウスおよび Allergin-1 遺伝子欠損マウス由来の BMDCs を HDM 100 μ g/ml、または LPS 1 μ g/ml で刺激し、14 時間培養した細胞における細胞表面上の c-Kit の発現をフローサイトメトリー法により解析した。

結果

1. Allergin-1 遺伝子欠損マウス、および野生型マウス由来の BMDCs は CD11c⁺細胞がともにおよそ 70% であり、誘導効率に差はなかった。これらの細胞を LPS または HDM 刺激した際の TNF、IL-6 の産生能はそれぞれ亢進した。しかし、産生量は TNF、IL-6 ともに Allergin-1 遺伝子欠損マウスの方が野生型のマウスに比べて有意に亢進した。

2. 現在解析中

考察と展望

HDM、または LPS 刺激に対して Allergin-1 遺伝子欠損マウス由来の BMDCs が野生型マウス由来の BMDCs に比べて炎症性サイトカインである TNF、IL-6 の産生を亢進した。炎症性サイトカインとは、病原体が浸潤した際に生じる生体防御反応である炎症反応を促進させる細胞間の情報伝達に関わるたんぱく質の一つである。樹状細胞の活性を示す指標として、炎症性サイトカインの産生を亢進することが報告されている。そのため、この結果は Allergin-1 が BMDCs の活性を抑制していることを示唆している。

HDM 刺激は樹状細胞において、c-Kit とそのリガンドである SCF の発現を促進することが報告されており、c-Kit からのシグナルは IL-6 の分泌を促進する。また IL-6 は Th2 応答を促進することや、c-Kit に変異を持つマウスは野生型のマウスに比べて HDM 刺激による Th2 分化が抑制されることも報告されており、樹状細胞上の c-Kit は T 細胞応答の制御に重要である (Krishnamoorthy N *et al. Nat Med* 2008)。

サイトカイン産生能の比較の実験から Allergin-1 が IL-6 の産生を抑制することが示された。c-Kit は IL-6 の産生を促進していることから Allergin-1 は c-Kit の発現、もしくは c-Kit からのシグナルに対して抑制的に働くのではないかと推測される。そのため、HDM、および LPS 刺激による Allergin-1 遺伝子欠損マウスと野生型のマウス由来の BMDCs 上の c-Kit の発現を比較、検討する予定である。

高温環境下におけるペパーミントの香りがラットのストレス応答に与える影響

北條 梢 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 久野 節二 (筑波大学 医学医療系)

背景・目的

特定の嗅覚刺激(レモン、ラベンダー、お茶などの香り)の受容が拘束ストレスを負荷されたラットのストレス応答を抑制することが報告されている。また、高温環境下の拘束ストレス負荷では、局所性の低温刺激提示によりストレス応答が減弱することが示されている。これらの事実をもとに、本研究では、ペパーミント香を心地よい香り(嗅覚)および冷感刺激(体性感覚)として捉え、その受容が高温環境下でのストレスを和らげるのではないかと考え、実験を行った。

ストレス応答を表出する中枢機構は、視床下部-下垂体-副腎皮質軸(HPA)である。生体はストレスを受けると、視床下部の室傍核ニューロンが正中隆起から副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンを放出し、下垂体前葉の副腎皮質刺激ホルモンの分泌を促進させ、最終的に、副腎皮質から糖質コルチコイド(ラットではコルチコステロン)が放出される。室傍核は、神経構築的には大細胞性垂核(pm)と小細胞性垂核に大別され、後者は正中隆起に投射し、HPAの制御に関わる内側小細胞性垂核背側部(mpd)と脳幹および脊髄に投射して自律神経活動を制御する内側小細胞性垂核腹側部(mpv)と背側小細胞性垂核(dp)に細区分される。また、拘束ストレス負荷により室傍核ニューロンが興奮し、ストレス誘導性神経活性マーカータンパク質のc-Fosを発現することがよく知られている。本研究では、ストレス応答に対するペパーミント香の提示効果について、室傍核全域と各垂核におけるc-Fos発現ニューロン数を計測し、定量形態学的に解析した。

方法

Sprague-Dawley系成熟雄ラット(7週齢、日本クレア)を購入し、約1週間、通常の飼育環境(室温約23°C、12/12時間明暗周期(08:00点灯、20:00消灯)、自由摂食・飲水)に順化させたあと、本実験に用いた。実験時の体重は270-310gであった。

○拘束ストレス下での香り提示実験

ラットを2群に分け、各個体に室温33.0±1.0°Cの環境で30分間拘束ストレスを負荷すると同時に、空気ポンベから気流(流速4L/min)を提示した。嗅覚刺激提示群(n=5)にはペパーミント(50µl水溶液)の香りを含む空気を、対照群(n=5)には空気のみを提示し、実験終了後、飼育ゲージに戻した。実験は、08:00-10:00の間に行った。拘束ストレス負荷は、Sanadaら(2013)の方法を参考に、簡詰め方式で行った。

○組織の固定と切片作成

拘束ストレス開始120分後にザンボニ変法液による経心性灌流固定を行い、脳を採取した。視床下部を切り出し、脱水・透徹後、パラフィン包埋し、室傍核を含む5µm厚の前頭断連続切片を作成した。

○免疫組織化学染色

ウサギポリクロナール抗体(Biologend San Diego, CA)を用いて、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法によりc-Fosの免疫染色を行った。室傍核組織の顕微鏡画像を撮影し、Photoshopを用いてバックグラウンドを標準化したあと、Image J(National Institutes of Health, Bethesda, MD)を用いてc-Fos陽性細胞数を自動計測した。1個体当たり隣接切片2枚を計測し、平均値を評価に用いた。

結果

対照群(Fig.1左)と嗅覚刺激提示群(Fig.1右)の両者で、室傍核小細胞性垂核のdp、mpdおよびmpvにおいてc-Fos陽性細胞が認められたが、細胞数は前者の方が少ない印象があった。形態計測により、室傍核全体およびmpdの陽性細胞が対照群より嗅覚刺激提示群で有意に多いことが示された(Fig.2)。

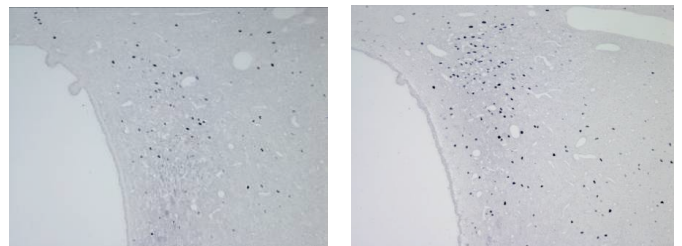


Figure 1: 室傍核におけるc-Fosの免疫染色 (左:対照群、右:嗅覚刺激提示群)

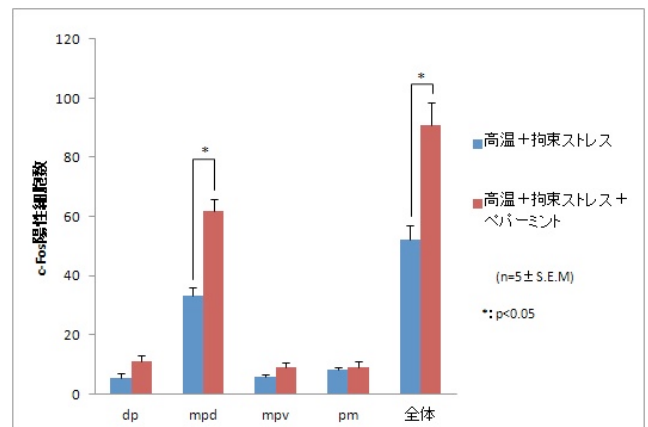


Figure 2: 室傍核におけるc-Fos陽性細胞数

考察

ペパーミント香の提示による陽性細胞数の増加は、この香りがラットでストレス応答を増強させる効果を持つことを示唆している。また、室傍核には拘束ストレスとは異なる種類のストレス要因に応答するニューロンが存在することを示している。今回の実験では、香りが強すぎたことで、ラットが「清涼感」を感じることなく、嗅覚刺激が逆にストレス要因として作用した可能性も考えられる。今後は、提示する匂い物質の濃度に関して、より詳細な検討を行い、同様の実験を行う必要がある。

ヒト乳腺上皮細胞シートのイオン透過性に対するヒスタミン受容体阻害剤の影響

葛西 裕亮 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 岡村 直道 (筑波大学 医学医療系)

背景と目的

仔の数や成長に応じた泌乳量の調節は、哺乳動物の生殖戦略の根幹となる仕組みのひとつである。このオン・デマンドなミルクスタシス (泌乳維持機構) は、搾乳刺激への神経内分泌的な応答である射乳反射機構によって説明されることが多い。しかし、乳腺局所における情報処理もミルクスタシスに重要な働きを担っている^{文献1}。

ヒスタミンはそうした乳腺局所で働く情報因子の有効候補のひとつである^{文献2}。ヒスタミン合成を担うヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) の遺伝子欠損マウスでは母親の泌乳不全が原因で仔に著しい成長不良を生じる。いくつかの証拠から乳腺自体のHDCおよびヒスタミンが、ミルクスタシス (泌乳維持機構) に関与している可能性が示唆されている。一方、HDC欠損マウスの乳汁成分の解析から、K/Naイオン比が小さいことがわかった。通常は出産後に乳腺上皮の密着結合 (TJ) の緊結に伴い、乳汁中 K/Naイオン比の増大と乳腺上皮の分泌活性化が起こる。TJはイオンの透過性を調節することから、HDC欠損乳腺ではTJ形成不全が泌乳不全の原因となっている可能性が考えられる。初代培養系を用いた研究では、ヒスタミン受容体の阻害により、乳腺上皮のイオン透過性が上昇することがわかり、乳腺自体のヒスタミン情報伝達が乳腺生理に重要な働きを担っている可能性が示唆された。しかし、この実験系では混入した乳腺上皮以外の細胞の影響を否定できなかった。

そこで本研究では、(1) 乳腺上皮にヒスタミンの自己傍分泌に必要な分子が発現しているか、(2) このヒスタミン情報伝達系が乳腺上皮TJの機能調節に影響力を持っているか、を確かめることを主な目的として、他の細胞成分の影響を無視できる株化されたヒト乳腺上皮由来細胞 (hMEC) を用いた実験系でヒスタミン受容体の発現やイオン透過性やTJ形成に対するヒスタミン受容体阻害剤の影響を調べた。

材料と方法

[細胞培養と膜透過性の測定]

hMECを12穴Transwell™プレート内、5%CO₂、37°C環境下で極性培養した。上皮細胞シートのイオン透過性は、EVOM2を用いて測定した上皮膜電気抵抗 (TEER) を指標とした。

[阻害剤]

1型ヒスタミン受容体 (H₁) 阻害剤 trans-triprolidine, H₂阻害剤 rantidine, H₃/H₄阻害剤 thioperamide, ヒスタミン細胞内受容体 (H_{1c}) 阻害剤 DPPE を、終濃度 100 μM で基底側培地に添加した。p38MAPK 阻害 SB203580 は終濃度 3 μM で基底側培地に添加して行なった。

[TJ タンパク質の検出]

培養細胞に SDS 溶液を加えて細胞を溶解し、タンパク質を5%または15%ゲルの SDS-PAGE で分画、PVDF膜への転写し、TJ関連タンパク質を免疫ブロッティング法により検出した。ウサギ抗 hCldn1 抗体 (1:1000) などの一次抗体と反応後、アルカリホスファターゼ標識二次抗体および BM Purple により発色検出した。

[定量的PCR]

培養細胞を Isogen に懸濁し、全 RNA を抽出した。ReverTra Ace および Thunderbird SYBR qPCR Kit を用いて cDNA 合成およびその増幅をし、Rps15 遺伝子産物を基準とした ΔΔCT 法により mRNA 発現量を推定した。

結果と考察

hMEC を極性培養した結果、培養開始から2週間程でTEERが増加し始め、4週間程でTJが形成されたhMECシートを得ることができた。この細胞を用いてまず、4種類のヒスタミン細胞膜受容体 mRNA について、hMEC における発現の有無をqPCR法で調べた。その結果、すべての種類の受容体の発現が確認された。HDCのmRNAの発現も認められ、乳腺上皮におけるヒスタミン自己傍分泌系の存在を支持する結果が得られた。

次にhMECを4種類の選択的ヒスタミン受容体阻害剤で72時間処理して、TEERの変化を調べた。その結果、H₁およびH_{1c}阻害剤によりTEERが有意に低下した。さらに、この阻害剤処理後、阻害剤非添加の培地で培養を続けるとTEERは回復した。このことから、H₁およびH_{1c}はhMECシートのイオン透過性の低下に寄与していることが示唆された。

ここで観察されたイオン透過性の変化は、TJの構成などが変化したためではないかと考え、TJ形成及びその調節に関与する報告のある約50種類のタンパク質 mRNA の発現について、H_{1c}阻害剤処理による変化を調べた。その結果、Tjp1 mRNA の発現量増加とCldn1 mRNA の発現量低下が認められるなど、H_{1c}阻害による影響が認められた。このことは、TJ関連遺伝子の発現にH_{1c}を介したヒスタミンシグナルが影響力をもっていることを示すものである。

さらに、代表的なTJ構成タンパク質であるCldn1, Ocldn, Tjp1について、タンパク質レベルでの発現に対するH_{1c}阻害剤処理の影響を調べた。その結果、Tjp1とCldn1の発現低下が認められた。この結果は、H_{1c}機能がTjp1とCldn1の発現維持に貢献していることを示唆している。さらには、ヒスタミンがそれを通じてTJによる上皮イオン透過性の減少に寄与しているものと期待される。Tjp1では、H_{1c}阻害によるmRNAの増加とタンパク質の減少が同時に観察されたことからTjp1タンパク質の代謝回転が速くなっている可能性が考えられる。

乳腺Tjp1タンパク質の発現にはp38MAPKが関与しているとの報告があるため、今回のH_{1c}阻害剤によるTjp1タンパク質の発現低下とTEER低下へのp38MAPKの関与を調べた。まず、H_{1c}阻害剤処理によりp38MAPKのリン酸化が亢進することを明らかにした。次に、p38MAPKの阻害剤存在下では、H_{1c}阻害剤がTjp1タンパク質の発現量に影響を与えないことがわかった。さらに、p38MAPKの阻害剤存在下では、H_{1c}阻害剤はTEER低下作用を示さないことが判明した。これらの結果は、H_{1c}阻害剤がp38MAPKの活性化を介してTjp1タンパク質の量を減少させ、hMECシートのイオン透過性を増大させることを示唆するものである。

本研究から、ヒスタミンがH₁およびH_{1c}受容体を介して乳腺上皮細胞に直接作用し、TJの形成とイオン透過性の調節に関与していることが、強く示唆された。また、H_{1c}受容体を介したヒスタミンシグナルが、Cldn1やTjp1のタンパク質の発現を支えていることと、その発現調節の仕組みの一端が明らかとなった。乳腺上皮には、ヒスタミンによる局所シグナル伝達機構が機能しており、TJ形成を通じてミルクスタシスを支えているものと期待される。

参考文献:

¹Matsuda M., et al. (2004) *Dev Cell* 6:193-203.

²Matsuda M., et al. (2007) *J Reprod Dev* 53:60-61.

筋損傷後の早期運動介入が治癒過程に及ぼす影響

村上 生馬 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 沼田 治 (筑波大学 生命環境系)

背景及び目的

打撲や肉離れに代表される筋損傷は最も頻度の高い外傷の1つで、スポーツ現場でおこりうる外傷である。この損傷に続いて生じる機能的傷害、再損傷、骨格筋萎縮、拘縮、疼痛のような病的な症状は、結果としてその後の私生活やスポーツの競技生活に悪影響を引き起こす事となる。また、一度、骨格筋の損傷が生じると、その完全な回復は困難であり、かつ再発の頻度が高いと言われており、打撲と比較して、肉離れは再発の頻度が特に高いことが知られている。

損傷した骨格筋は、炎症、変性、再生の3つの段階を順次重複しながら治癒が進行する。また重度の筋損傷の場合は線維化 (fibrosis) が生じることが知られている。筋損傷後に損傷された筋が筋組織により復元されることを再生といい、結合組織、主にI型コラーゲンにより修復されることを線維化という。この線維化は、通常損傷組織の解剖学的連続は回復するが、機能の回復は不完全で理想的な治癒とは言えない。つまり、この線維化の結果として生じた結合組織は、損傷した筋繊維を支えるために存在するが、この組織の過剰増殖は、筋繊維の再生成長を制限することや、密度の高い線維性組織が筋の弾性力不足を招き、再損傷が起こりやすいことが知られている。そのため、筋損傷後の治療に関する研究は、いかに線維化を抑え、再生を促進するかという視点で研究が進んでいる。

臨床現場で使用可能な筋損傷後の治療例として、早期運動介入がある。筋損傷後に電気刺激による早期運動介入を行うと、線維化が抑えられるという先行研究が存在する一方で (Ji Hye Hwang et al., 2006)、実際の運動による早期運動介入が治癒過程に及ぼす影響は明らかになっていない。

そこで本実験では、肉離れ実験モデルを用いて臨床現場に使用可能な早期運動介入 (水泳) が損傷した筋の治癒過程に及ぼす影響について検討を行った。

方法

1. 実験動物

ICR系マウス雄7週齢

2. 実験群

- Control群 (n=8) : 筋損傷なし
- Sedentary群 (n=10) : 筋損傷後運動介入なし
- Exercise群 (n=10) : 筋損傷後運動介入あり

3. 筋損傷方法

電気刺激① (周波数: 150 Hz、電流: 10 mA、刺激時間: 1時間) により下腿後面の筋肉を疲労させた5分後に電気刺激② (周波数: 200 Hz、電流: 10 mA、収縮回数 100回) により遠心性収縮をさせ、収縮性の筋損傷 (肉離れ) を誘発させた (図1)。

4. 運動プロトコル

運動介入として筋損傷後1週間後から泳運動1時間 (低強度運動) を行わせた。

5. 解析

・ 組織切片染色

凍結切片を作成し、切片をHE染色とマッソントリクローム染色により染色し、染色画像を用いて形態観察と再生筋の筋繊維面積測定、線維化面積の測定をおこなった。

・ 定量RT-PCR

定量RT-PCRにより、線維化の指標としてcollagen1 α 2とcollagen5 α 3の発現を、再生の指標としてmyogeninの発現を調べた。

結果

線維化の評価として、切片をマッソントリクローム染色した画像解析を行った (図2)。その結果、Control群に比べ筋損傷群は有意に線維化面積が増加していた (図3)。また損傷後早期運動介入を行ったExercise群と介入を行わなかったSedentary群を比較した場合、Exercise群の線維化面積は有意に減少していた。

再生の評価として、切片をHE染色した画像を解析し、再生筋の筋繊維面積を測定した結果、Sedentary群に比べExercise群の筋繊維面積は有意に増加していた。

現在、定量RT-PCRによりmRNAの発現レベルの解析中である。

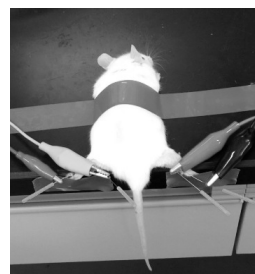
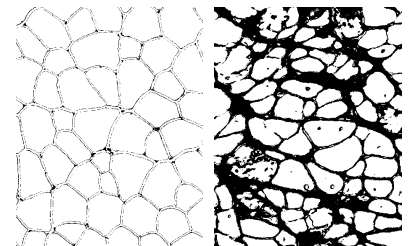
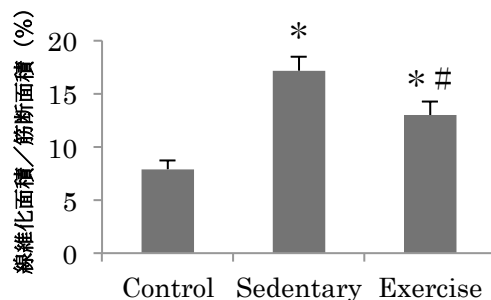


図1: 肉離れ実験のため電気刺激を与えている様子



control fibrosis

図2: 筋損傷後に線維化している筋組織 (黒い部分が線維化を表す)



*:p<0.05 vs Con, #:p<0.05 vs Sed

図3: 筋損傷後の運動介入が線維化面積に与える影響

細胞質分裂の分子機構の異種間分裂酵母における相違性とその考察

安田 剛 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中野 賢太郎 (筑波大学 生命環境系)

研究の目的と背景

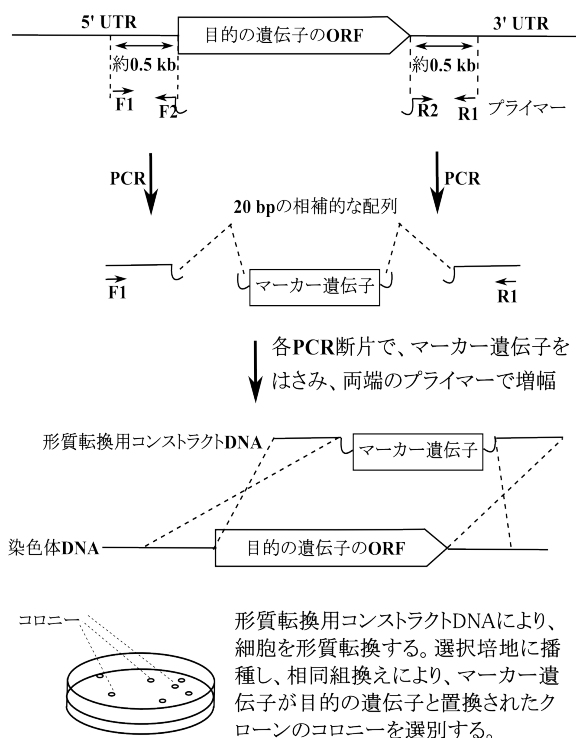
細胞質分裂に必要なアクチンとミオシンの相互作用とその時間的な制御は、それらを仲介する別の蛋白質の働きを必要とする。私が着目したアニリンは、C末端側にプレクストリン相同ドメイン (PH)を有し、それ以外の領域を介してアクチン繊維やミオシンと直接に結合する。その機能を抑制した動物細胞は分裂溝の貫入が不安定であり、細胞質分裂に失敗しやすい。多くの菌類はアニリン様蛋白質の遺伝子をもたないが、分裂酵母はそれを有する。この遺伝子を破壊した分裂酵母 (P種)では、染色体分配以前の分裂中期に形成されるアクトミオシンリングの形成が分裂後期へと遅れ、さらにその形成位置や配向性に異常が生じる。先行研究から、P種のアニリン様蛋白質は他の蛋白質を介し、アクチン繊維やミオシンを予定分裂面に集積させるモデルが提唱されている。今回、同属他種の分裂酵母 (J種)を用いて、アニリン様蛋白質の細胞機能を研究した。P種の研究成果と較べることで、種間の細胞質分裂の分子機構の保存性と相違性について考察した。

実験方法

細胞の培養と遺伝子導入: 培養には、栄養培地 YE または最少培地 SD を用いた。SD には必要に応じてアミノ酸や塩基を添加し、栄養要求性株の性質を利用して外来遺伝子を栄養マーカーと共に保持させるために使用した。

遺伝子導入は、エレクトロポレーション法により行った。P種については酢酸リチウム法も用いた。

遺伝子破壊株の作製: 下図のように、マーカー遺伝子を目的の遺伝子と相同組換えすることで遺伝子破壊株を作製した。遺伝子のタギングにも同様の手法を用いた。



結果

異種間分裂酵母のアニリン様遺伝子の機能相補性について

P種のアニリン様遺伝子破壊株は 25 °Cでは生育可能だが、36 °Cでは細胞質分裂の異常がシビアになり生育できない。この細胞を、J種のアニリン様遺伝子の cDNA を発現ベクターに組み込んだもので形質転換し、機能相補性を調べた。その結果、P種のアニリン様遺伝子破壊株の温度感受性増殖は、J種のアニリン様遺伝子の発現によっては補われないことがわかった。蛍光タグを融合したJ種のアニリン様タンパク質のP種における細胞内局在については現在調べている。J種の細胞内で、蛍光タグを融合したアニリン様タンパク質は、核内や細胞質に局在した。この局在性は、P種のアニリン様蛋白質の細胞内局在と類似していた。以上より、P種とJ種のアニリン様タンパク質の細胞内挙動は似通っているが、機能は完全には保存されていないと考えられた。



図: 細胞表面に集積したアニリン様タンパク質が分裂面を決定する

アニリン様遺伝子の機能破壊について

アニリン様遺伝子を破壊したJ種の細胞では、有意に隔壁形成完了後に分離しない細胞の割合が増加した。DNA とアクチン繊維、及び微小管を3重染色して詳細に観察した結果、J種の細胞では通常、染色体分配の後期に分裂面に形成されるアクチンのリング構造の形状が、この遺伝子破壊株で異常になるのがしばしば認められた。

考察

予定分裂面へのアクトミオシンリングの形成はP種では染色体分配前であるのに対し、J種では動物細胞と同様に、染色体分離後である。このタイミングの相違は、アニリン様蛋白質の機能の違いに起因する可能性がある。つまりP種では、アニリン様蛋白質がミオシンを分裂面に集積するのと並行し、アクチン重合因子の働きを促す。一方、J種のアニリン様蛋白質では、この早期のアクチン重合を促す能力が欠如しているのかもしれない。細胞が小型のP種では、より制限された空間内 (= 予定分裂面) にアクチンリングの構成成分を効率的に集積させるため、分子進化によりアニリン様蛋白質が高いアクチン重合促進作用を得た可能性が考えられる。今後、これらのアニリン様蛋白質の機能ドメインの探索と比較を行うことで、これらの差異を生み出す分子基盤が理解できると思われる。

網膜色素変性症原因遺伝子産物 KLHL7 の標的分子の探索

遠藤 智之 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 千葉 智樹 (筑波大学 生命環境系)

背景及び目的

ユビキチンは真核生物に高度に保存されたタンパク質であり、標的タンパク質に共有結合する翻訳後修飾分子である。ユビキチン修飾系は細胞周期や DNA 修復、小胞輸送など広範な生命現象に関与することが知られている。ユビキチンによる翻訳後修飾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つの酵素が担い、ユビキチンリガーゼが基質と E2-ユビキチンの両方に結合することで基質選択性を示す。

ユビキチン修飾系の破綻はパーキンソン病やアルツハイマー病など様々な神経変性疾患の原因となることが報告されている。網膜色素変性症は視細胞の脱落により徐々に視力が失われる神経変性疾患であり、これまで多くの原因遺伝子が見つかった。近年、BTB タンパク質である KLHL7 の変異が優性変異型の網膜色素変性症の原因となることが報告された。BTB タンパク質ファミリーは Cul3 型ユビキチンリガーゼ複合体において基質をリクルートするアダプターとして機能することが知られている。当研究室の先行研究により、KLHL7 が他の BTB タンパク質と同様に Cul3 型ユビキチンリガーゼ複合体を形成しており、その病原性変異がユビキチンリガーゼ活性をドミナントネガティブに抑制することが示された。これらのことから、KLHL7 の変異は、標的タンパク質のユビキチン化を抑制することにより、網膜色素変性症の一因となることが考えられた。しかし、KLHL7 によりユビキチン化される基質は未だに明らかになっていない。本研究では、KLHL7 によるユビキチン化の標的となるタンパク質を同定することを目的として、KLHL7 と結合するタンパク質の探索を行った。

1. 酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニング

ヒト胎児脳由来の cDNA ライブラリー(Dualsystems biotech)を用いた酵母ツーハイブリッド法により KLHL7 と相互作用するタンパク質のスクリーニングを行った。

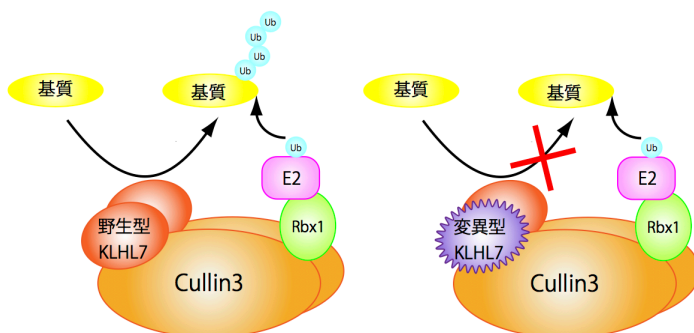
2. 酵母ツーハイブリッド法による結合ドメインの解析

スクリーニングで得られた因子が KLHL7 のどのドメインと結合するかを検証するため、酵母ツーハイブリッド法による解析を行った。

結果及び展望

酵母ツーハイブリッド法を用いたスクリーニングの結果、KLHL7 と相互作用する因子を取得した。酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングで得られた因子には偽陽性が含まれる。従って、他の生化学的解析を行うことでその相互作用を検証する必要がある。現在、哺乳類培養細胞(HEK293T)においてスクリーニングで得られた因子と KLHL7 を発現させ、免疫沈降法により相互作用を検証している。また、免疫染色法により細胞内における局在を観察している。

今後は、KLHL7 との結合が確認されたタンパク質が Cul3-KLHL7 複合体によりユビキチン化されるかを検証する。また、そのユビキチン化の生理学的意義について明らかにする予定である。KLHL7 によるユビキチン修飾系の解析は網膜色素変性症の疾患機序の解明につながると期待される。



[図 1] Cul3-KLHL7 複合体のモデル図

方法

酵母の形質転換と陽性クローンの選択

酢酸リチウム法により、PJ69-4a 株に Bait と Prey の各発現プラスミドを導入することで形質転換体を取得した。さらに、SC-LWA 平板培地で Ade2 レポーター遺伝子を発現している形質転換体を選択した。

神経系における脱ユビキチン化酵素の機能解析

前野 優太 (筑波大学 生物学類) 指導教員：千葉 智樹 (筑波大学 生命環境系)

導入・背景

ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis：筋萎縮性側索硬化症)は、成人の脳から脊髄を通して筋肉に至るまでの上下位の、SMA (Spinal Muscular Atrophy：脊髄性筋萎縮症)は、乳幼児期の子供の脊髄から筋肉にいたるまでの下位の運動ニューロンを変性・脱落することが共通の症状として知られている。また、ALS においては TDP-43 と FUS、SMA においては SMN1 と呼ばれる遺伝子が原因遺伝子としてあげられる。これらの原因遺伝子の発現タンパク質は、いずれも核内の gem と呼ばれる構造体に局在しており、RNA スプライシングに関わる可能性が示唆されている。

gem とは、gemin1(SMN1)タンパク質を中心とする gemin family タンパク質(gemin2-8)と機能分子である snRNA が結合した snRNP 複合体が集合している構造体である。さらに、種々のタンパク質が集まることで、snRNA が修飾を受け、スプライソソームへ発展していくことが知られている。スプライソソームとは、mRNA 前駆体からイントロンを除き、成熟 RNA にする機能を担っており、スプライシング反応の中心となっている構造体である。

USP15 タンパク質は分子量約 110KDa の脱ユビキチン化酵素であり、ユビキチン化酵素であるユビキチンリガーゼと拮抗して働くことが知られている (図1 参照)。ユビキチン化は選択的タンパク質分解の認識マーカーであるユビキチンを標的タンパク質に結合させる反応であり、近年、DNA 修復、転写因子の核内移行、翻訳調節、細胞周期、ガン化、神経変性疾患など、様々な生命現象に関わっていることが明らかになってきた。

当研究室の先行研究で、USP15 ノックアウトマウスが運動神経失調様の症状を示すことが明らかとなった。また、USP15 と相互作用するタンパク質をプロテオーム解析したところ、RNA スプライシング関連タンパク質を含んでいることが判明した。これまでの成果で、ALS、SMA などの運動神経疾患の原因遺伝子産物が RNA スプライシングに関わっていること、USP15 ノックアウトマウスの運動失調様の症状および、USP15 と RNA スプライシング関連タンパクが相互作用することから、USP15 が RNA スプライシングを介して、運動神経疾患に関わる可能性が考えられる。しかし、USP15 と運動神経疾患の原因遺伝子産物がどのように関わるか、USP15 がどのようにスプライシングに関わるかというメカニズムは、明らかになっていない。そこで、本研究では、TDP-43、FUS と SMN が局在する gem に着目し、USP15 が gem に及ぼす作用を gem 構成タンパク質である gemin1 (SMN1) をマーカーとして、培養細胞を用いて解析した。

方法

1.USP15 過剰発現時の細胞内での gem の数の変化

Hela 細胞、SHSY5Y 細胞において、USP15 の WT、または、その変異体を GFP と共にトランスフェクションした。24 時間後に、gemin1、GFP の一次抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、核内の gem の数に変化がないか比較した。

2.USP15 と gemin1 のタンパク質相互作用の解析

HEK293T 細胞に FLAG タグの付いた USP15 をトランスフェクションした。24 時間後に細胞を回収し、タンパク質を溶出させた後、FLAG 抗体を用いて、免疫沈降をした。その後、一次抗体として gemin1 抗体を用いたウェスタンブロットにより、gemin1 の検出を行い、USP15 と gemin1 との相互作用の有無を検討した。

結果・考察

詳細な結果は発表会において、報告予定である。

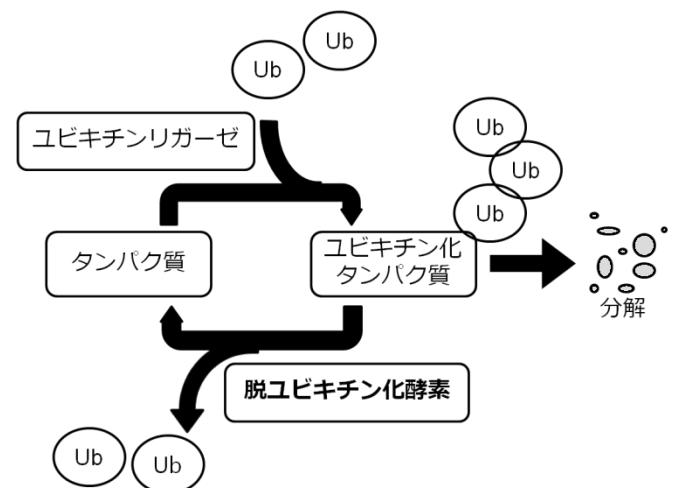


図1.ユビキチン化の可逆性