

つくば生物ジャーナル

Tsukuba Journal of Biology

Vol.9 No.1 January 2010

www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb

平成 21 年度

生物学類卒業研究発表会要旨集

平成 22 年 3 月 9 日

**筑波大学
生物学類**

第一会場 2B406

8:55 - 9:10	武部 愛	ユビキチンリガーゼ Fb112 の新たな基質とそのユビキチン化制御	2
9:10 - 9:25	木越 悠	Analysis of Cul-10: a component of a putative ubiquitin ligase complex.	3
9:25 - 9:40	阿部 光	ユビキチン様タンパク質 NEDD8 と E2 酵素 Ubc4 の相互作用解析	4
9:40 - 9:55	宇田 静葉	プロテアソーム活性化因子 Ecm29 の抗原提示における役割の検討	5
10:10 - 10:25	原武 光輔	プロテアソーム活性化因子 Ecm29 の機能解析	6
10:25 - 10:40	高垣 香菜	細胞膜分子二量体形成における分子機構の解析	7
10:40 - 10:55	高瀬 春華	新規血管内皮細胞特異的遺伝子群の解析	8
10:55 - 11:10	新保 未来	ポリスチレンビーズを用いた培養下での軸索ガイダンスの検討: コンドロイチン硫酸のニワトリ網膜神経節細胞軸索への影響	9
11:10 - 11:25	大住 貴之	粥状動脈硬化症の発症に重要なヒトマクロファージのアポトーシス阻害への転写因子 MAFB の機能的貢献	10
12:15 - 12:30	白石 章	原発性乳がんの機能解析	11
12:30 - 12:45	赤星 渚	自己免疫疾患発症制御における Allergin-1 の機能解明	12
12:45 - 13:00	竹中 江里	移植片対宿主病に対する抗 DNAM-1 モノクローナル抗体を用いた予防法の確立	13
13:00 - 13:15	新谷 浩章	線虫 <i>C. elegans</i> に対する鮭白子抽出物の生理作用と作用メカニズムの解析	14
13:15 - 13:30	藤田 圭子	ヒト肝癌細胞 HepG2 における NAD の脂肪蓄積促進作用の解析	15
13:45 - 14:00	谷口 由佳	機能性ポリフェノール・カルダモニンが代償性筋肥大に及ぼす影響 — mTOR シグナル経路の解析 —	16
14:00 - 14:15	福田 麦穂	炎症で引き起こされた骨格筋の萎縮は免疫賦活剤物質で抑制できるか?	17
14:15 - 14:30	柳澤 佐保子	テトラヒメナのアクチン重合システムの機能解析	18
14:30 - 14:45	菊地デイル万次郎	ミオスタチンノックダウンマウスからの導入遺伝子検出の試み — ロンドン五輪に向けた遺伝子ドーピング検出への挑戦 —	19
14:45 - 15:00	望月 康子	A 型肝炎ウイルスに対する免疫応答並びに免疫記憶解析技術に関する研究	20
15:15 - 15:30	服部 桂祐	ヒトがん細胞の悪性化における mtDNA の関与	21
15:30 - 15:45	木場 隆介	新たなミトコンドリア遺伝子疾患モデルマウスの作製	22
15:45 - 16:00	浅井 庸子	癌細胞上の細胞膜分子の発現解析	23
16:00 - 16:15	田淵 紗和子	Orexin activates orexin neurons via the OX2R	24
16:15 - 16:30	三藤 崇行	ミトコンドリア呼吸機能が骨格筋繊維の機能分化に与える影響の解析	25

第二会場 2B409

8:55 - 9:10	中西 洋介	<i>Botryococcus braunii</i> BOT 88-2 株の成長とオイル生産へのグルコースの影響	26
9:10 - 9:25	石松 純	<i>Botryococcus</i> B レースにおける炭化水素合成経路の探求	27
9:25 - 9:40	澤田 洋平	奥日光湯ノ湖に優占する沈水植物の分布	28
9:40 - 9:55	塚田 早紀	湯の湖におけるヒメフラスコモの分布と埋土卵胞子の動態	29
10:10 - 10:25	小暮 はるか	湯ノ湖におけるカタシャジクモの生態に関する研究	30
10:25 - 10:40	工藤 敦子	クロララクニオン藻 P314 株における巨大多核細胞の分裂過程の解明	31
10:40 - 10:55	白戸 秀	クロララクニオン藻 <i>Lotharella amoebiformis</i> のヌクレオモルフゲノムに関する比較解析	32
10:55 - 11:10	野村 真未	有殻アメーバ <i>Paulinella chromatophora</i> における新規殻の構築様式	33
12:15 - 12:30	FAJARDO CASTRO ROSSY JOHANA	Analysis of the relationship between crystalization and coccolith polysaccharide production in the marine calcifying coccolithophorid <i>Emiliana huxleyi</i>	34
12:30 - 12:45	四谷 紗和子	イネの生殖過程におけるペクチンホウ素架橋関連遺伝子の変異体表現型と発現解析	35
12:45 - 13:00	市川 愛	単子葉植物イネの生殖過程におけるペクチンの動態と機能解析	36
13:00 - 13:15	武部 尚美	単子葉植物イネの器官発達に重要な細胞壁タンパク質・グリシンリッチプロテインの解析	37
13:15 - 13:30	稲村 拓也	単子葉植物イネにおけるアラビノース糖鎖合成関連遺伝子の発現解析	38
13:45 - 14:00	恩田 和幸	カロテノイド生合成酵素遺伝子導入による黄花アサガオ作出に関する研究	39
14:00 - 14:15	紙谷 幸子	遺伝・遺伝子について分子レベルで理解するための教材の開発	40
14:15 - 14:30	島田 尚久	シロイヌナズナ近縁種を用いたヒストン脱アセチル化による胚的形質抑制機構の共通性の検証	41
14:30 - 14:45	川崎 真澄	CRES-T 法を用いた極性遺伝子導入によるアサガオの花形改変に関する研究	42
14:45 - 15:00	北野 紀子	アサガオの光周性花成誘導における <i>PnCOPI</i> の解析	43
15:15 - 15:30	小林 万純	アグロバクテリウム法によるサツマイモの効率的な形質転換方法の確認と塩ストレス耐性を持つ組換え体の作成	44
15:30 - 15:45	檜村 友子	遺伝子組換え植物が土壌機能に及ぼす影響の分子レベルでの評価方法の開発	45
15:45 - 16:00	細井 智美	除草剤により発生する活性酸素分子種および抗酸化物質ラジカル種の ESR による解析	46

第三会場 2B411

8:55 - 9:10	酒井 典之	微生物による植物由来生理活性物質の代謝	47
9:10 - 9:25	前田 邦博	微生物酵素に探索研究	48
9:25 - 9:40	中倉 啓介	微生物による含窒素化合物分解に関する研究	49
9:40 - 9:55	井口 悠也	放線菌の誘導発現機構に関する研究	50
10:10 - 10:25	大道 智広	ホスファチジルイノシトール類定量法の検討	51
10:25 - 10:40	樽井 弓佳	KSP 阻害剤の作用機構解析	52
10:40 - 10:55	知念 拓実	酵母マーカーレス遺伝子破壊法の開発と多重遺伝子破壊株の作成	53
10:55 - 11:10	竹内 美穂	アクチン - アクチン結合蛋白質間相互作用を阻害する薬剤の解析	54
11:10 - 11:25	五十嵐 健輔	<i>Thermosipho globiformans</i> と <i>Methanocaldococcus jannaschii</i> との水素共役栄養共生	55
12:15 - 12:30	杉原 怜納	枯草菌におけるタンパク質分泌機構の解析	56
12:30 - 12:45	野木 友加里	<i>in vivo</i> における枯草菌 Hfq と相互作用する sRNA の同定	57
12:45 - 13:00	石川 奏太	文字列の冷たい罫 — OTU に特異的な配列組成の変化が分子系統解析に与える影響 —	58
13:00 - 13:15	阿久津 翠	タチヤナギに寄生する同種寄生性 <i>Melampsora</i> sp. の分類	59
13:15 - 13:30	青山 哲也	<i>Fusarium solani</i> のトベラ苗に対する病原性	60
13:45 - 14:00	加藤 賢太	里山林のギャップ内を主たる生活の場とするノシメトンボの採餌活性と餌獲得量	61
14:00 - 14:15	高橋 弘明	冷温帯のスギ林における地表徘徊性昆虫の種組成	62
14:15 - 14:30	堀 翔	イヌガラシにやって来た昆虫類の種組成	63
14:30 - 14:45	鈴木 美季	花色変化は何のシグナル?: ハコネウツギ (変化型) とタニウツギ (不変型) における繁殖形質の比較	64
14:45 - 15:00	田中 弘毅	スゲ属 2 種の種子形質がアリ種ごとの種子の持ち去り行動におよぼす影響	65
15:15 - 15:30	安達 大輝	海洋酸性化が沿岸微生物群集と物質循環に及ぼす影響に関する実験的解析	66
15:30 - 15:45	阿久津 崇	砂底表在性端脚類 <i>Siphonocetes</i> sp. の造巣特性	67
15:45 - 16:00	吉見 仁志	藻食性巻貝バテイラが褐藻類カジメに与える影響の解析	68

第四会場 2B412

8:55 - 9:10	新井 健太	ショウジョウバエの曲翅突然変異をかくす遺伝子	69
9:10 - 9:25	前原 一慶	ショウジョウバエ雑種雌不妊遺伝子 <i>Nup160</i> の変異体作製	70
9:25 - 9:40	村田 孝順	ショウジョウバエ雑種致死遺伝子の 32C1-D1 領域におけるマッピング	71
9:40 - 9:55	北村 満彦	ショウジョウバエの翅振る行動の種間比較	72
10:10 - 10:25	塩谷 天	ステロイド生合成に関わるコレステロール代謝酵素 <i>Neverland</i> の後口動物における解析	73
10:25 - 10:40	高山 幸次郎	ショウジョウバエを使用した統合失調症の遺伝学的解析	74
10:40 - 10:55	新行内 隆明	寄生蜂 <i>Chelonus inanitus</i> の産卵行動における化学的・物理的刺激の役割	75
10:55 - 11:10	赤坂 泰基	ハマキコウラコマユバチの人工培地中での発育	76
11:10 - 11:25	田中 彩	クワゴヤドリバエの寄主探索行動における植物揮発性成分の役割	77
12:15 - 12:30	橋本 直樹	Evolutionary Innovation 軟体動物巻貝における蓋の獲得	78
12:30 - 12:45	原田 敬士	Evolutionary Innovation ヤツメウナギの硬節と脊椎骨獲得	79
12:45 - 13:00	藤谷 晴香	Evolutionary Innovation 棘皮動物ブルテウス幼生の進化と中胚葉分化	80
13:00 - 13:15	宮地 結	多足類の卵巣構造 — 本当に卵細胞は卵巣外に位置するのか —	81
13:15 - 13:30	真下 雄太	絶翅目 (ジュズヒゲムシ目) の発生学的研究に向けて (昆虫綱)	82
14:00 - 14:15	奥山 晴香	スンクス (<i>Suncus murinus</i>) は近親交配を回避するか?	83
14:15 - 14:30	佐藤 杏奈	スンクス (<i>Suncus murinus</i>) における個体識別と知覚の関係	84
14:30 - 14:45	林 奈々子	同胞の存在がスンクス (<i>Suncus murinus</i>) の社会行動に及ぼす影響	85
14:45 - 15:00	中島 駿一	ゾウリムシの温度変化に対する遊泳行動反応と培養温度の効果	86
15:15 - 15:30	仲川 枝里	フナムシ心臓促進神経の神経伝達物質に関する研究	87
15:30 - 15:45	山田 祥太	再生メカニズム解明に向けたラボ・イモリの生産と遺伝子改変イモリ系統の作製技術の開発 (Part1)	88
15:45 - 16:00	倉持 麻衣子	再生メカニズム解明に向けたラボ・イモリの生産と遺伝子改変イモリ系統の作製技術の開発 (Part2)	89

平成 21 年度卒業研究発表会準備委員会

生物学類 4 年

白戸 秀

藤田 圭子

生物学類 3 年

石川 翔一

川辺 寛太

菊地 琢哉

中島 淳志

福士 路花

藤田 咲也

表紙画

赤坂 泰基

表紙画の解説：

チルチルとミチルの兄妹は、クリスマスの前夜、魔法使いの老婆から病気の娘のために青い鳥を探してきてくれと頼まれる。魔法の帽子を受け取った兄妹は、犬やネコ、妖精たちを連れて、様々な国を訪ね歩く。しかし青い鳥は見つからない。気がつくともうクリスマスの朝、二人はベッドの上にいた。見ると自分たちの飼っていた鳥が青いことに気づく。とうとう青い鳥を見つけた二人であったが、その鳥もどこかへ飛んで行ってしまふ。

メーテルリンク「青い鳥」

児童文学としてはすっきりしない結末ですね。「幸せは身近にある、だけどすぐどこかに行ってしまふものでもある。」と言ったところでしょうか？大学を卒業する我々も、これから青い鳥を探しに社会へと出ていくことでしょう。そんな気持ちを込めてこの表紙となりました。……嘘です。実際は単に美麗で近隣でも見られる動物を検討した結果がこのルリビタキ、というのは言わぬが花。

ルリビタキ (*Tarsiger cyanurus*)

スズメ目ツグミ科。全長約 14cm で、オスは青い羽毛で覆われ美麗。夏期は北部や山地で暮すが、冬場は温暖な地域へ降り越冬する。

平成 21 年度卒業研究発表会要旨集の巻頭にあって

白戸 秀 (筑波大学生物学類 4 年)

思い返せば、四年間、随分早く過ぎ去ったように感じます。

初めての筑波、春霞の彼方に筑波山を眺め、思わず登ってしまった一年生の頃を懐かしく思い出します。思わず登ってしまうのは今でも相変わらずです。私の筑波での思い出は、春風のそよそよ吹く筑波山や、冬の夜空に真っ黒にそびえる筑波山と切り離せないものです。

ところで、私は生物学類の交換留学制度を利用し、三年生の夏から四年生の夏まで約一年間、イギリスに留学をしました。一年を経て帰国してみると、まさに「浦島太郎」状態。私の知らないうちに四年生は既にすっかり卒業研究を始めており、それぞれのテーマを持って研究をしていました。驚いたことは、私が出発した三年生の夏までには考えられなかったような、「研究の話」が、それとない会話にしばしば登場するようになったことです。些細なことではありますが、私が日本を離れた三年生から四年生の間に、友人たちはしっかりステップアップを遂げたものだと感じました。私たちは、少しずつ確実に進歩しているのだと思います。

さて、そんな風に少しずつ進歩している私たちの、表紙が素敵な卒業研究要旨集をばらばらとめくれば、ずらりと並んだ卒業研究タイトルは実に多様です。卒業研究発表会は、全体として見たとき、筑波大学生物学類における研究分野の広さを象徴するものでしょう。そして、一つ一つの発表はそれぞれの卒業研究の成果であり、同時に、筑波大学で私たちが学んだことの集大成でもあります。私たち四年生の、華麗なる有終の美を目撃し、雄姿を心に深く焼き付けてください。

また、生物学類生にとってこの発表会は、研究室の研究内容を直接知ることができるよい機会です。興味のある発表はもちろん、自分の興味と違う発表も見に行くことをお勧めします。思いがけない発見や出会いがあることでしょう。

最後に、卒業研究発表会の準備、運営に力を尽くしてくださった皆様に感謝します。ありがとうございました。生物学類が一堂に会する場で、研究発表を行えることを嬉しく、そして、誇りに思います。

Communicated by Kensuke Yahata, Received February 5, 2010.

ユビキチンリガーゼ Fbl12 の新たな基質とそのユビキチン化制御

武部 愛 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 智樹 (生命環境科学研究科)

背景・目的

ユビキチンプロテアソーム系とは、特定のタンパク質を特定の時期に分解するために存在する生体内システムの一つであり、生物が生存していく上で非常に重要である。ユビキチンは、標的タンパク質へと結合することにより、分解へ導く目印となり、それをプロテアソームが認識し、分解を実行する。目印となるユビキチンは、3種の酵素群・E1(ユビキチン活性化酵素)・E2(ユビキチン結合酵素)・E3(ユビキチンリガーゼ)によるカスケード反応で標的タンパク質へと結合される。この酵素群は下流になるにつれ、その多様性を増していく。つまり、主にE3が標的タンパク質の多様性に対応していると考えられる。数あるE3の一つにSCF複合体型(Skp1・Cullin1・F-box complex)E3が存在する。SCF複合体は、Rbx1・Skp1・Cullin-1、そして基質認識部位サブユニットであるF-boxタンパク質が結合した四者複合体の形をとっている。その中でもF-boxドメインを持つF-boxタンパク質は、現在100種類以上が報告されており、E3の多様性に非常に重要なものとなっている。その一つであるFbl12は、CKI(Cyclin dependent Kinase Inhibitor)の一員であるp57の分解を誘導するF-boxタンパク質として当研究室の先行研究により同定され、p57の分解を介して骨芽細胞分化を促進することが報告された。Fbl12は、同じF-boxタンパク質であるSkp2と構造的に高い相同性を持ち、また、Fbl12の基質であるp57はSkp2によってもユビキチン化されることが知られている。そのため、p57分解は細胞内においてFbl12とSkp2の両者によって冗長的に制御されると考えられる。また、前者のFbl12が細胞周期を通じて一定に発現するのに対して、後者のSkp2はS期に特異的に発現が上昇することや、さらに、サイトカインや栄養状態によってもその転写制御が異なることが知られている。以上から、細胞は両F-boxタンパク質を使い分けてCKI分解の果たす多彩な生理作用を制御していると考えられる。Fbl12はCKI分解を通じて細胞分化のみならず、細胞増殖をも制御する可能性があり、さらに骨芽細胞以外の様々な組織でも発現することからも、何らかの新たな生理的機能を持っていると考えられる。本研究では、Fbl12の新たな生理的機能を解明する目的で、他のCKIファミリーを含めたFbl12の新たな基質の探索と、細胞内におけるユビキチン化制御の検証を行った。

材料・方法

Fbl12とCKIファミリーを含む新たな基質候補との相互作用を検討するため、ヒト腎臓由来細胞株HEK293、ヒト結腸癌細胞株HCT116細胞やマウス胎児繊維芽細胞MEFにFbl12発現プラスミドとCKI発現プラスミド等を共トランスフェクションし、免疫染色実験や免疫沈降実験を行った。さらに、培養細胞にプロテアソーム阻害剤や翻訳阻害剤などを処理して、CKIファミリーを含む基質候補のユビキチン化制御、タンパク質分解、半減期の制御などを検討した。

結果・考察

発表会にて報告する。

Analysis of Cul-10: a component of a putative ubiquitin ligase complex.

木越 悠 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 智樹 (生命環境科学研究科)

Introduction

Protein degradation mediated by the ubiquitin proteasome system is essential for the regulation of cellular functions such as the cell cycle, apoptosis, differentiation etc. Substrates specifically labeled with ubiquitin (Ub) are recognized by the proteasome, leading to its degradation. The ubiquitination process is mediated by the Ub activating enzyme (E1), the Ub conjugating enzyme (E2) and the Ub ligase (E3), and high specificity of Ub conjugation relies on the numerous E3s. Cullin-based multi-subunit E3 complexes are the largest group among various E3s. Cullin acts as the scaffold and recruits one of the diverse substrate recognition subunits to its N terminus via adaptor subunits. When a substrate is recognized, it is then structurally directed to the C terminus of Cullin where a Ring finger protein Roc1 resides and recruits E2s, and the substrate is ubiquitinated. Cul10 is a new member of this Cullin family, which has not yet been characterized. In this study, I analyzed the components and the ubiquitination activity of Cul10 complexes.

Materials and Methods

Cell culture and transfection

HCT116 cells were cultured in D-MEM(low glucose) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% NEAA and 1% penicillin streptomycin in a 37°C incubator with 5% CO₂. The cells were transfected with various expression plasmids using FuGENE 6 (Roche) transfection reagent and lysed with 0.5%CHAPS lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% CHAPS, 1 mM dithiothreitol (DTT)). The cell lysates were then immunoprecipitated with anti Flag or anti HA agarose beads and subjected to immunoblot analyses with antibodies to Flag, HA, Myc and other proteins to confirm protein-protein interactions.

Immunofluorescence analyses

HCT116 cells were cultured as above, and Hela cells were cultured in D-MEM (low glucose) supplemented with 10% fetal bovine serum, and 1% penicillin streptomycin in a 37°C incubator with 5% CO₂. The cells, cultured on coverslips and transfected with various expression plasmids, were fixed in 4%formaldehyde PBS for 10 min, permeabilized and blocked in 0.5% Triton X-100, 5% BSA PBS for 30 min. Coverslips were then immersed in primary antibodies followed by secondary immunofluorescent antibodies. Nuclei was stained with DAPI. The Coverslips were mounted onto slides and images were obtained on fluorescent microscope.

In vitro assays

Each component of Cul10 complexes, Cul1, Cul3, Ub conjugating enzyme Ubc4 (E2), Nedd8, Nedd8 activating enzyme APP-BP1/Uba3 and Nedd8 conjugating enzyme Ubc12 were expressed in *E. Coli* and purified by affinity column. Ub activating enzyme (E1) and bovine ubiquitin

were purchased. Assays were performed in 30 µl reaction mixture (5 mM Tris-HCl pH7.5, 12 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 5 mM ATP) incubated in 30°C. The reaction mixture was then subjected to immunoblot analyses.

Results and Conclusions

Subunits constituting the Cul10 complex were determined and their interactions were confirmed. By analyzing the deletion mutants of each component, the interacting domains were also identified. The subcellular localization of the partner protein of Cul10 relocalized with co-transfection of Cul10, suggesting that their localization is regulated by protein-protein interaction *in vivo*. The activity of the Cul10 complex was assessed in *in vitro* assays. The results and conclusions will be discussed in further detail in the presentation.

ユビキチン様タンパク質 NEDD8 と E2 酵素 Ubc4 の相互作用解析

阿部 光 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 智樹 (生命環境科学研究科)

背景・目的

ユビキチンプロテアソーム系によるタンパク質分解は、すべての真核生物において保存されており、アポトーシス、がん化、細胞周期調節のプロセスなど、生体内で重要な役割を果たしている。この分解系にはユビキチンと呼ばれる 76 のアミノ酸からなるタンパク質が関わっており、標的タンパク質にユビキチンを修飾し、タンパク質分解酵素であるプロテアソームが基質タンパク質上のユビキチンポリ鎖を認識することにより、タンパク質を特異的に分解する。基質タンパク質がユビキチンにより修飾を受けるプロセスは E1 酵素 (ユビキチン活性化酵素)、E2 酵素 (ユビキチン運搬酵素)、E3 酵素 (ユビキチン結合酵素; ユビキチンリガーゼ) とよばれる 3 つの酵素によって動かされている。まず、E1 酵素がユビキチンを活性化し E2 酵素が E3 酵素に活性化ユビキチンを E3 酵素に運搬し、そして E3 酵素において基質にユビキチンが修飾される。E3 酵素には多くの種類があることが分かっており、特に Cullin 型の SCF 複合体は標的とするタンパク質の多様性が高く、広く研究がなされている。Ubc4 は SCF 複合体とともに働く E2 酵素の 1 つである。SCF 複合体は数種類のタンパク質の複合体であり、Cullin1 が基盤となり、E2 酵素をリクルートする Roc1 が結合し、また Skp1 と呼ばれるアダプタータンパク質を介して、基質タンパク質結合部位である F-box タンパク質が結合している構造をとる。SCF 複合体が活性化されるにはユビキチンと相同性が 57% の NEDD8 が必要不可欠である。当研究室の先行研究により、NEDD8 は SCF 複合体に E2 を動員してユビキチンリガーゼ活性を促進していることを支持する結果が出ており、Ubc4 と NEDD8 の直接結合が NMR 法によって明らかにされている。また蛍光偏光法によって Ubc4、NEDD8 の相互作用を定量的に測定すべく、解析が行われてきた。本研究では、Lumio Green と呼ばれる色素を用いて Ubc4 を標識し、同じく蛍光偏光法により Ubc4 と NEDD8 の相互作用の解析を行い、その結合定数を測定することを目的とした。Lumio Green は特定のアミノ配列 (TC 配列) を認識し結合する色素であり、TC 配列をタンパク質に組み込めば特定の位置をラベルすることができるため、より特異的な解析ができるという利点がある。また、違ったアプローチとして、免疫沈降法によって Ubc4 と NEDD8 の相互作用実験を行った。

方法

1. 組み換え Ubc4 Vector の作成

Ubc4 の配列に PCR 法により Lumio Green 認識配列を組み込み、ライゲーションによりプラスミドに組み込んで Vector を作成した。

2. Ubc4、NEDD8 の発現、精製、透析

大腸菌発現系により Ubc4、NEDD8 を発現させ、ニッケルビーズ、グルタチオンビーズにより精製し、その後透析を行った。

3. Ubc4 への蛍光色素ラベリング

組み換え Ubc4 に蛍光色素 Lumio Green を標識し、標識されたか否かを SDS-PAGE 後、紫外線カメラにより確認した。

4. Ubc4、NEDD8 の相互作用解析 (蛍光偏光法)

蛍光色素でラベリングした Ubc4 と NEDD8 を Buffer 中でインキュベートし、蛍光光度計で測定した蛍光強度から偏光度を算出した。偏光度から Ubc4 と NEDD8 の相互作用の蛍光を解析した。

5. Ubc4、NEDD8 の相互作用解析 (免疫沈降法)

同溶液中にて His-Ubc4 と NEDD8 をインキュベートし、抗 His-tag 抗体によって Ubc4 と NEDD8 が共沈するか解析した。

結果・展望

蛍光偏光法による実験系にて、Ubc4、NEDD8 の相互作用を示唆する結果は得られず、結合親和定数の測定はできなかった。免疫沈降法においても Ubc4 とともに共沈してきたとみられる NEDD8 のバンドは認められなかった。このことから、Ubc4、NEDD8 単独での結合親和性は弱いものと思われる。しかし、先行研究によって Ubc4、NEDD8 の直接結合が確認されており、今後、より生体内に近い条件で解析するなど、条件検討が必要であると考えられる。

プロテアソーム活性化因子 Ecm29 の抗原提示における役割の検討

宇田 静葉 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 智樹 (生命環境科学研究科)

背景

20S プロテアソームは細胞質及び核に存在し、タンパク質の切断を行っている。20S プロテアソームは制御ユニットと結合して複合体を形成しており、複合体には複数の種類が存在することがわかっている。この内 26S プロテアソームは多くの真核生物において高度に保存されており、20S 複合体と制御ユニットである 19S 複合体から構成されている。19S 複合体は、ユビキチン化タンパク質の識別、アンフォールディング、脱ユビキチン化、20S プロテアソーム入口の開口などの機能をもち、20S プロテアソーム内腔に基質を送り込んで分解する。

プロテアソームの結合タンパク質である Ecm29 は酵母の実験系においてアフィニティ精製された 26S プロテアソームと共沈するタンパク質として同定された。酵母 ecm29 破壊株では 20S 複合体と 19S 複合体が解離しやすくなっていたことから、Ecm29 は 20S 複合体に 19S 複合体をつなぎ止める 26S プロテアソームを安定化する役割を担っており、26S プロテアソームの活性化に関与していると考えられている。またマウス及びヒトの細胞を用いた実験系において Ecm29 は 20S プロテアソームの活性化因子として同定され、小胞体からゴルジ中間体区画に局在することから、これらの区画で小胞体関連分解に類似の分解経路に関与していると考えられている。しかし Ecm29 の細胞内における役割は未解明な部分が多く残されており、またその機能についても十分に明らかにされていない。

免疫において、一般的に内在性抗原は MHC クラス I に、外来性抗原は MHC クラス II に提示されることが知られている。この MHC クラス I へ提示される内在性抗原は細胞質や核で分解された抗原タンパク質であり、この抗原ペプチドの切り出しにプロテアソームは必須である。近年、免疫応答において、抗原提示を専門とする樹状細胞 (Dendritic cell: DC) が、司令塔的な役割を果たすことで注目されている。DC は古典的な抗原提示経路に加えて、外来性抗原を MHC クラス I に提示することが可能な特殊な細胞である。このクロスプレゼンテーション (cross-presentation) と呼ばれる経路では、エンドソーム/ファゴソームに取り込まれた外来性抗原が一度細胞質へ移行し、そこで内在性抗原と同様にプロテアソーム分解を受け、小胞体内に輸送されて MHC クラス I に提示されることが考えられている。しかし、プロテアソームがどのように DC のクロスプレゼンテーションを制御しているかは不明である。

そこで、Ecm29 が抗原提示において、26S プロテアソームの抗原切り出しや外来性抗原のエンドソームから細胞質への移行に関与する可能性を *in vitro* の実験系で検討した。

方法

Ecm29 ノックアウトマウス及び同腹のコントロールマウスの大腿骨と下腿骨から骨髓細胞を取り出し GM-CSF を含むコンブリート RPMI 培地で培養し (1×10^6 cells/ml)、DC を誘導した。5 - 6 日間に DC を回収して、外来性抗原の MHC クラス I への提示を見る *in vitro* クロスプレゼンテーションアッセイを行った。モデル抗原として卵白アルブミン (Ovalbumin: OVA) を RPMI に添加して 1 時間 37°C 5%CO₂ でインキュベートし DC に取り込ませた。続いて抗原を除去し 2 時間 37°C 5%CO₂ でインキュベートし抗原提示させ

た。抗原提示させた DC は 0.5% パラホルムアルデヒドで固定した。96 穴 U 底プレートに固定した DC と MHC クラス I に提示された OVA 抗原を特異的に識別する CD8 陽性 T 細胞をコンブリート RPMI 培地で共培養して培養上清を回収し IFN- γ 量を測定した。Ecm29 ノックアウトとコントロールマウス由来 DC で IFN- γ 量を比較し、Ecm29 の抗原提示への関与を検討した。

結果

今回行った実験では Ecm29 ノックアウトマウス由来 DC を用いても T 細胞からの IFN- γ 生産が確認された。これはコントロールマウス由来 DC を用いた場合と比較して減少しているように見えたが、有意差は認められなかった。コントロールとして同腹の Ecm29 ヘテロマウスと野生型マウスの 3 者間で比較したがやはり顕著な差は見られなかった。今後解析数を増やして統計的に有意であるかどうか検討したい。

考察

この実験から Ecm29 はクロスプレゼンテーションに必要な分子であると考えられる結果は得られなかったが、Ecm29 が抗原提示に影響している可能性はまだ否定できない。Ecm29 は抗原提示の効率に影響しているが、今回の実験では DC の抗原提示及び T 細胞の IFN- γ の生産がすでにプラトーに達し、ノックアウトとコントロールで差が見づらいた状態にあったと考えられる。Ecm29 が抗原提示の効率に影響しているのならば IFN- γ の生産量をもっと低い値での検出を行うことで Ecm29 ノックアウトとコントロールで優位差を見出すことができる可能性がある。IFN- γ の生産量を減少させるために、複数回独立して行った実験において抗原である OVA を低濃度にしたが差を見ることはできなかった。この課題に対して今後改善可能な要素として抗原量を抑える他に、インキュベーション時間の短縮、共培養における well あたりの DC 量を少なくする等が挙げられる。加えて OVA を一度別の細胞へ取り込ませたものを抗原として用いた場合の実験方法も検討する必要があると考えている。

プロテアソーム活性化因子 Ecm29 の機能解析

原武 光輔 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 智樹 (生命環境科学研究科)

背景

生体内では常にタンパク質の合成及び分解が行われており、生体の恒常性が維持されている。そしてその分解の機構においては、適正な時期に適正なタンパク質を特異的に分解する経路としてユビキチン-プロテアソーム系が知られている。この経路は分解される基質タンパク質に対し、ユビキチンが付加されることによりプロテアソームにより認識され、プロテアソームが分解を実行するという機序である。プロテアソームとは 60 以上のサブユニットによって構成される巨大な複合体型プロテアーゼであり、プロテアーゼ活性を有する複合体である 20S プロテアソームと、その両端に制御因子である 19S regulatory particle が会合することによって 26S プロテアソームとなってその機能を担っている。20S プロテアソームとはそれぞれ 7 種類のサブユニットによって構成される α リングと β リングが $\alpha\beta\beta\alpha$ の順で会合した円筒型の分子である。20S プロテアソームの中でプロテアーゼ活性を有するサブユニットは β リングの内表面に存在しているが、通常は α リングが閉じられた状態であるため、不活性型の状態として存在している。そのため、タンパク質の分解を実行する際には α リングの開口が行われる必然性があるが、その機能を担う制御因子が存在し、プロテアソーム活性化因子として現在までに数種類が同定されている。その内の 1 つに Ecm29 というタンパク質が知られているが、その機能に関しては不明な点が多い。本研究では、Ecm29 の基礎的なデータを得るとともに、Ecm29KO マウスにおいて基質の違いにより分解の活性に差が生じているのか、また他のプロテアソーム活性化因子の結合に対して差が生じているのかに着目して解析を行った。

方法

1. マウスより肝臓を摘出し、その細胞をミトコンドリア膜画分、ミトコンドリア可溶性画分、細胞質画分、ミクロソーム画分、核可溶性画分、DNA と強く結合した画分の 6 つに分画し、Ecm29 がどの画分に存在するかをウェスタンブロット法により確認した。
2. Ecm29 の WT と KO のマウスより摘出した精巢のライセートに対し、グリセロール密度勾配遠心法によってタンパク質を分画した後に、20S プロテアソームが有するカスパーゼ様活性、トリプシン様活性、キモトリプシン様活性の 3 種類のプロテアーゼ活性に対応する基質を反応させ、WT と KO でのペプチダーゼ活性の比較を行った。また、この画分に対してウェスタンブロットを行い、他のプロテアソーム活性化因子に変化が生じているかを解析した。

結果

詳細は発表会にて報告する。

細胞膜分子二量体形成における分子機構の解析

高垣 香菜 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 智樹 (生命環境科学研究科)

背景

細胞膜上に発現する分子の多量体形成のメカニズムは、必ずしも十分に明らかになっていない。IgA/IgM に対する Fc 受容体、Fcα/μR は二量体形成をするが、還元下状態においても物理的会合が維持される。しかしながら、Fcα/μR は細胞表面上では二量体で発現しているものの、細胞内領域を欠損した Fcα/μR は単量体として細胞表面上に発現することが明らかにされている。すなわち Fcα/μR の細胞表面上での二量体形成には細胞内領域が重要であることが明らかにされている。

目的

Fcα/μR の二量体形成が細胞表面上での発現に及ぼす影響、および二量体形成に関わる細胞内領域の責任部位を明らかにする。

材料・方法

1. プラスミドの作製

Fcα/μR の全長は 535 アミノ酸からなり、細胞内領域は 476 番目から 535 番目のアミノ酸である。

- ・ Fcα/μR 全長アミノ酸配列 (WT)
- ・ 480 番目以下のアミノ酸配列欠損体 (Δ480)
- ・ 503 番目以下のアミノ酸配列欠損体 (Δ503)
- ・ 523 番目以下のアミノ酸配列欠損体 (Δ523)

以上の 4 種類の遺伝子を作製し、これらをインサートとして、IRES-GFP 配列 (IG) を持つレトロウイルスベクター (Flag-pMXs-IG) に組み込み、各プラスミドを作製した。

2. 遺伝子導入細胞

作製した各プラスミドとエンベローププラスミド (VSV-G) をパッケージング細胞 (293GP) にトランスフェクションし、ウイルスを産生させ、マウス胸腺腫細胞株 (BW5147) に感染させることで、遺伝子導入細胞を作製した。

3. フローサイトメトリー法を用いた解析

細胞を Alexa647 標識化 Fcα/μR 特異的抗体 (TX61) を使用して染色し、FACS Calibur を用いてフローサイトメトリー法にて解析した。

結果・考察

1. Fcα/μR の二量体形成が細胞表面上での発現に及ぼす影響の検討

細胞表面上において WT は二量体を形成し、Δ480 は単量体を形成し発現している。そこで、WT-pMXs-IG および Δ480-pMXs-IG の遺伝子導入細胞を用いてフローサイトメトリー法にて解析を行った結果、GFP の蛍光強度を指標とした遺伝子導入効率は WT と Δ480 で同程度であったにも関わらず、細胞表面上の Fcα/μR の発現量は Δ480 では WT の約 10% に減少していた。よっ

て、Fcα/μR の二量体形成は細胞表面上における発現の安定化に関与している可能性が示唆された。

2. Fcα/μR の細胞表面上での発現に関わる細胞内領域の同定

Δ503-pMXs-IG および Δ523-pMXs-IG の遺伝子導入細胞を用いて同様の解析を行った結果、GFP の蛍光強度を指標とした遺伝子導入効率は同程度であったにも関わらず、細胞表面上の Fcα/μR の発現量は Δ503 では Δ480 と同様に WT の約 10% に減少していたが、Δ523 は WT と同程度の発現量であった。これらの結果から、Fcα/μR の細胞表面上での安定的な発現には細胞内 504 番目から 523 番目のアミノ酸領域が関与していることが示唆された。

今後の予定

今回作製した 4 種類の遺伝子導入細胞を用いてウエスタンブロット法を行い、細胞表面上での二量体形成の有無を確認する。また、細胞内 504 番目から 523 番目のアミノ酸領域の種々の変異体を作製し、同様にウエスタンブロット法およびフローサイトメトリー法を用いて、Fcα/μR の細胞表面上での二量体形成および発現安定化に関与する責任部位を同定する予定である。

新規血管内皮細胞特異的遺伝子群の解析

高瀬 春華 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 高橋 智 (人間総合科学研究科)

背景

血管内皮細胞の発生は、中胚葉から形成されるヘマンジオブラストに由来すると考えられている。ヘマンジオブラストは血球前駆細胞と血管内皮前駆細胞の共通の祖先細胞であり、血島と呼ばれる細胞群へ分化する。その後、血島は血球細胞と血管内皮細胞へと分化し、原始血管叢が形成される。さらに、この原始血管叢から血管内皮細胞が発芽することで、新たな血管を形成し、血管のネットワークが形成される。このような一連の血管系の形成過程は、VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor: 血管内皮細胞増殖因子) をはじめとする、様々な制御因子によって調節されるが、血管形成を制御する詳細な機構は未だ不明な点が多い^{1,2,3,4)}。そこで、当研究室では、胚発生時において血管形成に関与する機能未知の血管内皮細胞特異的遺伝子を、血管内皮細胞を制御する VEGFR2 欠損マウスを用いたマイクロアレイ解析により網羅的に探索することで、現在までに 22 遺伝子を同定した。

固形腫瘍の増殖には腫瘍血管新生が重要である⁵⁾。この腫瘍血管新生に重要な遺伝子としては、VEGF/VEGFR 系、FGF/FGFR 系、Angiopoietin/ Tie-2 系などが挙げられるが、まだ多くの未同定な分子機構が存在することが想定され、腫瘍血管新生時に腫瘍血管内皮細胞・腫瘍細胞にどのような遺伝子が作用しているのか包括的に探索することが極めて重要である⁶⁾。私は、胚発生時の盛んな血管新生と、癌細胞の増殖中に誘導される血管新生の類似性に着目することにより、腫瘍血管に対する新たな知見と治療法を確立できるのではないかと考えた。実際にヒト抗腫瘍血管新生薬の対象遺伝子となっている VEGF、FGF シグナル伝達系が、胚発生時の血管新生にも関与しており、有効性が高いと考えられる⁷⁾。そこで、本研究では、現在までに同定した 22 遺伝子に関して、マウス胚の血管内皮細胞における発現確認に加えて、ヒト神経膠腫組織の血管内皮細胞での発現を確認した。

方法

1. 新規血管内皮細胞特異的遺伝子の発現解析 (Quantitative RT-PCR 法, in situ hybridization 法)

(1) Quantitative RT-PCR 法

Quantitative RT-PCR 法を用いて、マイクロアレイ解析の再現性を確認した。Flk1 (Fetal liver kinase 1) は VEGF (vascular endothelial growth factor: 血管内皮増殖因子) に対するレセプターである。Flk1 の第一エキソンに GFP を導入した Flk1^{+/GFP} マウスの 8.5 日胚をトリプシン処理し、細胞を解離させた後、フローサイトメトリーを用いて GFP 強陽性細胞を回収することで、Flk1 高発現細胞を単離した。また、血球細胞は野生型マウスの 9 日胚から回収した。Flk1 高発現の細胞群、血球細胞、野生型マウス、Flk1 欠損マウスの 8.5 日胚から、RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いて抽出した RNA を、Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用いて cDNA 化し、SYBR Premix EX Taq™ II (TaKaRa) を蛍光色素として、Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa) によって標的遺伝子の発現を比較した。標準化には HPRT を用いた。

(2) in situ hybridization 法

800bp 程度の標的遺伝子断片を T7, T3 プロモーターを持

つプラスミドに組み込み、digoxigenin (Roche) を用いて標識した cRNA を作製し、プローブとした。このプローブを Paraformaldehyde で固定した野生型マウスの 8.5 日胚と 9.5 日胚において結合させ、その後、NBT/BCIP (Roche) を含む発色反応液中で発色させた。

2. ヒト神経膠腫組織における新規血管内皮細胞特異的遺伝子の発現解析 (Semi-Quantitative RT-PCR 法)

ヒト神経膠腫組織、ヒト神経膠腫細胞株 U251, U87, ヒト腎臓癌細胞株 293T, 正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC の RNA を Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用いて cDNA 化した。この cDNA を PCR によって増幅し、これをアガロースゲルにて泳動、比較した。

結果と考察

1. 新規血管内皮細胞特異的遺伝子の発現解析

(1) Quantitative RT-PCR 法

22 遺伝子は全て、Quantitative RT-PCR 法によって、Flk1 高発現の細胞群で野生型マウス胚に対して 4 倍以上の発現が確認され、マイクロアレイ解析の再現をとることができた。

(2) in situ hybridization 法

22 遺伝子のうち 3 遺伝子に関して、8.5 日胚と 9.5 日胚における血管内皮細胞での発現を確認した。今後、残り 19 遺伝子に関しても同様に確認する予定である。

2. ヒト神経膠腫組織における新規血管内皮細胞特異的遺伝子の発現解析

22 遺伝子のうち 13 遺伝子が、293T 細胞や U251 細胞、U87 細胞での発現がなく、HUVEC やヒト神経膠腫組織において発現が確認された。このうち、5 遺伝子が HUVEC に対して、ヒト神経膠腫組織で強く発現していた。このことから、これらの 5 遺伝子は腫瘍血管内皮細胞で強く発現している可能性が示唆された。今後、in situ hybridization 法を用いて、同定した候補遺伝子がヒト神経膠腫組織内の血管内皮細胞において発現しているか否かを確認していく予定である。

参考文献

1. Ferrara, N., Davis-Smyth, T. et al., Endocrine Rev., 18: 4-25, 1997
2. Shibuya, M. et al. Curr. Topics Microbiol. Immunol., 237: 59-83, 1999
3. Shibuya, M. et al., Cancer Sci., 94: 751-756, 2003
4. Saharinen, P. et al., Trend Immunol., 25: 387-395, 2004
5. Folkman, J. et al., New. Engl. J. Med., 285: 1182-1187, 1971
6. Oliner, J. et al., Cancer Cell, 6: 507-516, 2004
7. Hurwitz, H. et al., New Engl. J. Med., 350: 2335-2342, 2004

ポリスチレンビーズを用いた培養下での軸索ガイダンスの検討: コンドロイチン硫酸のニワトリ網膜神経節細胞軸索への影響

新保 未来 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 高橋 智 (人間総合科学研究科)

背景と目的

正確な神経回路の形成はガイダンス因子が神経軸索の走行を時間的・空間的に調節することで行われる。この神経回路網形成メカニズム解明のためのモデルシステムのひとつとして、ニワトリ胚の網膜視蓋投射が古くから利用されてきた。

網膜や視索において、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) が軸索の走行を規定するように分布している。CSPG は二糖ユニットの反復であるコンドロイチン硫酸 (CS) がコアタンパク質に共有結合している。CSPG は軸索伸長を抑制する因子のひとつと考えられており、その効果には糖鎖である CS の機能が示唆されている。

CS は硫酸基の位置と数の異なるユニットが様々な配列をすることによって構造多様性をもつ。この CS の構造多様性とガイダンス効果の違いについてはこれまでに検討されておらず、また CS が直接に効果を及ぼすのか、それとも別の物質を介してガイダンスを調節しているのかということも検討されていない。これは CS とコアタンパク質を個別に検討する実験系がなかったためである。

本研究では、コンドロイチン硫酸リン脂質誘導体 (Chondroitin Sulfate Phosphatidylethanolamine:CS-PE) をポリスチレンビーズに疎水結合させた CS-PE coated beads (CS-PE ビーズ) を用い、成長円錐に対する CS の直接の効果を検討する *in vitro* 実験系を作成した。疎水結合させる CS の種類を変えることで、構造多様性がもたらすガイダンス効果の違いについて検討を行った。

方法

CS-PE ビーズの作成: 直径 $6\mu\text{m}$ のポリスチレンビーズ懸濁液に CS-PE を加え、 37.5°C で一晩インキュベーションした。このとき CS 鎖の還元側末端に結合したリン脂質がビーズ表面と疎水結合することが期待される。CS を構成する二糖ユニットの組成が異なる CSA-PE、CSC-PE、CSD-PE、CSE-PE の 4 種類を用いた。これらは杉浦信夫博士 (愛知医科大学) より供与された。また培養中に網膜由来のタンパク質がビーズに非特異的に吸着するのを防ぐため、CS-PE コート処理後に Bovine Serum Albumin (BSA) でブロッキング処理を行った。CS 鎖の分解には Chondroitinase ABC を用いた。CS 結合の程度は、ビーズを抗 CS モノクローナル抗体で免疫染色し、フローサイトメトリー (FACS) 解析を行うことで確認した。

網膜の培養: 卵卵 6 日目のニワトリ胚から網膜を剖出し、網膜外植片を作成した (Halfter, 1983)。これを Poly-D-Lysine と Natural Mouse Laminin でコートしたディッシュ上に静置し、L-Glutamine、N-2 Supplement、HEPES (pH7.5) を含む Ham's F-12 培地で 37.5°C で培養した。培養基質上に上述のビーズを均一に広がるようにまいた。

タイムラプス観察: ビーズと接触した際の成長円錐の反応を個々に観察するため、培養開始後約 2 - 12 時間の間で 30 秒間隔のタイムラプス観察を行った。成長円錐の反応がビーズの接触によることを明確にするため、成長円錐がビーズに接触する前後 5 分間で他のビーズや軸索に接触していない事例のみを解析対象とした。

結果

CS-PE をコートせず BSA ブロッキング処理のみ行ったビーズ ((-) ビーズ) を抗 CS モノクローナル抗体で免疫染色し、FACS によって蛍光強度を計測すると、蛍光はほとんどみられなかった。一方 CS-PE ビーズでは (-) ビーズと比べて強く均一な蛍光強度がみられた。Chondroitinase ABC で処理した CS-PE ビーズでは、未処理の CS-PE ビーズと比べて蛍光強度は著しく低下し、その程度は (-) ビーズと同程度となった。o 網膜外植片を培養中の培地に (-) ビーズを加え、このビーズと接触した成長円錐の反応についてタイムラプス観察を行った。成長円錐の反応は「伸長方向を変えずに通るもの (No Change)」、「伸長方向を変えるもの (Turn)」、「退縮を起こすもの (Retraction)」の 3 種類が観察された。

次に、CSA-PE と CSE-PE でコートしたビーズに接触した成長円錐の反応を観察すると、CSE-PE ビーズで CSA-PE ビーズよりも Turn の割合が有意に多かった ($p < 0.05$)。Chondroitinase ABC で処理した CSE-PE ビーズの Turn の割合は CSE-PE ビーズよりも有意に少なく ($p < 0.05$)、CSA-PE ビーズと同程度だった。

考察

CS-PE をビーズに疎水結合させ、CS が局所的に存在する環境中で神経細胞を培養する本実験系は、CS の接触作動性のガイダンス効果について検討するのに非常に有効である。ただし成長円錐とビーズの接触は 5 分程度であるため、観察できるのは急性の効果のみだと考えられる。

CSA-PE と CSE-PE でコートしたビーズと接触した成長円錐の反応を比較すると、CSE-PE ビーズで Turn の割合が有意に多かった。CSE-PE ビーズを Chondroitinase ABC 処理することでこの割合は CSA-PE ビーズと同程度になったことから、E ユニットを多く含む CS (CS-E) が成長円錐に対して伸長方向の変化を引き起こすことが示唆される。

この効果は既知の反発性因子である Semaphorin のように成長円錐の退縮誘因を示すものではない。しかし *in vitro* において軸索は基質上に CSPG をコートした領域の周縁を退縮することなく伸長すること、*in vivo* において網膜神経節細胞はある種の CS に富む終脳と接しながら走行することから、CS のガイダンス効果は退縮を起こすものではなく、伸長方向を変化させるものであるのかもしれない。

CS-E と軸索の反応の作用機序はまだ解明されていない。CSPG の受容体である PTP σ は結合に CS 鎖を必要とし、かつ CS 単体とも結合する。このとき PTP σ 中のプラスチャージを持つリジンドメインが必須であることから、軸索は高硫酸化された CS-E のマイナスチャージを認識しているのかもしれない。また、別種のプロテオグリカンであるヘパラン硫酸プロテオグリカンでは、糖鎖であるヘパラン硫酸の硫酸基の位置の違いが異なるガイダンス効果をもたらすことから、CS においても軸索は硫酸基の位置の違いを認識しているのかもしれない。

粥状動脈硬化症の発症に重要なヒトマクロファージのアポトーシス阻害への転写因子 MAFB の機能的貢献

大住 貴之 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 高橋 智 (人間総合科学研究科)

背景・目的

「動脈硬化症」。実は日本人の死亡原因「実質的第1位」。よく耳にする病気の素顔はとんでもない地獄の病魔であったのをご存知だろうか。息を殺し、静かに我々の血管を蝕み続ける。「心筋梗塞」「脳梗塞」もこの病魔によるものが殆ど。今回、この病魔を呼び起こす「マクロファージ (Mφ)」という貪食細胞に焦点を当て、機能解析に臨んだ。動脈硬化症の新たな治療方法開発に向けた、希望への光の一筋をご覧頂きたい。

動脈硬化は、酸化されたコレステロール (酸化 LDL) を取り込んだ Mφ が血管内膜に蓄積することで生じる。この Mφ は、細胞内で溜まり過ぎた酸化 LDL が泡のように見えるため泡沫細胞と呼ばれる (図 1)。この泡沫細胞はアポトーシスを阻害する因子である AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) が働くことにより、死なずに蓄積する。驚くべきことに、AIM 遺伝子を欠損させたマウスでは、泡沫細胞が次々にアポトーシスを起こし、動脈硬化の病変部が劇的に減少する。これは、AIM が動脈硬化治療のターゲットであることを意味している。しかし、AIM 遺伝子の発現の詳しい仕組みについては未解明な部分が多く、これらを明らかにしなければ、治療の際、思わぬ副作用が現れることもあり得る。

当研究室では、この問題を解決するために、AIM 遺伝子の発現の仕組みの解明を試みている。過去の報告や当研究室のマウスモデルを用いた解析から、AIM の発現制御は、核内受容体型転写因子である LXR (liver X receptor) /RXR (retinoid X receptor) のヘテロ二量体および、大 Maf 群転写因子 MafB (Musculoaponeurotic fibrosarcoma B) によって行われることが明らかとなった。具体的には、動脈硬化病変部の泡沫細胞において、酸化 LDL の分解物質によって LXR/RXR が活性化されて MafB を転写し、さらに MafB が AIM を転写するという流れが存在することが考えられる (図 2)。

しかし、上記の解析はマウスの実験で留まっており、直接人間の動脈硬化の治療にはまだ結びつけられない。未来の動脈硬化の治療のためには、ヒトでも解明する必要がある。従って、本研究では、AIM を制御する LXR/RXR、MAFB がヒト Mφ において、マウスと同様のメカニズムで働くのか、ヒトでの機能解明を目的とした。

方法

(1) ヒト Mφ の分化誘導法の確立 当研究室の医師により、健常者 8 人から 10 ml の採血を行った。この血液に、目的以外の血液細胞を抗体によって巨大な複合体を形成させることのできる RosetteSep 試薬を混ぜた。さらに比重液を加えて遠心分離することで複合体を除去し、Mφ に分化する単球を濃縮分離した。単球の濃縮率については、単球の表面タンパク質で指標となる CD14 の発現をフローサイトメトリーで測定した。そして、この単球を M-CSF (Mφ コロニー刺激因子) 存在下で 7 日間培養し、Mφ に分化させた。その後 LPS と IFN- γ 、または IL-10 を加えて刺激を行い、MAFB の発現をリアルタイム RT-PCR により検討した。尚、今回の実験に関しては筑波大学による医の倫理委員会の承認を得ている。

(2) ヒト Mφ における遺伝子の発現解析

分化させたヒト Mφ に、LXR の刺激物質である T0901317 (T1317) と RXR に結合し刺激する 9-*cis*-Retinoic Acid (9cRA)、また、酸化 LDL による刺激を 24 時間行い、MAFB の発現量をリアルタイム RT-PCR により検討した。

結果・考察

当研究室ではヒト Mφ を誘導する実験系が存在しないため、実験系の確立から行った。まずヒト全血液中に含まれる単球の割合が少ないことから、RosetteSep を用いて単球の濃縮分離を行い、濃縮率をフローサイトメトリー解析にて確認した。その結果、試薬を用いる前では約 20% だった単球を、70-80% 前後まで濃縮して取り出すことができた。また、Mφ にはいくつかのタイプが存在することから、LPS と IFN- γ 、または IL-10 を加えて刺激を行い、MAFB の発現をリアルタイム RT-PCR により検討した。その結果、M-CSF と IL-10 で培養した Mφ で MAFB の発現が高いことが分かった。

次に、ヒト Mφ においてもマウス同様の AIM の発現制御機構が働いているか検討した。先程の MAFB の発現が高かった M-CSF、IL-10 で培養した Mφ に LXR/RXR の刺激物質である T1317、9cRA、または酸化 LDL による刺激を行ったところ、刺激を行っていない Mφ に比べて MAFB の発現が有意に上昇していた。

今回の研究で、ヒト Mφ の分化培養法を確立することができた。さらに、LXR/RXR の刺激物質、および酸化 LDL による実験結果から、マウスのみならず、ヒト泡沫細胞においても LXR/RXR によって MAFB が誘導されることが示唆された。また、ヒトの動脈硬化病変部では AIM の発現が見られることから、ヒト動脈硬化病変部においてもマウスと同様の AIM の発現制御が行われている可能性が示唆される。

今回の研究は、動脈硬化症の新治療方法の可能性を秘めている。将来、MAFB の制御で、動脈硬化症という恐ろしい病魔を撲滅することができるかもしれない。

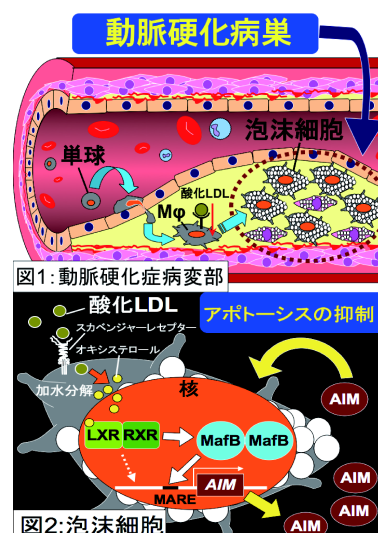


図1: 動脈硬化症病変部

図2: 泡沫細胞

原発性乳がんの機能解析

白石 章 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 大根田 修 (人間総合科学研究科)

背景・目的

乳がん患者数は年々増加の一途をたどり、2006年度の国立がんセンターの統計では女性のがん罹患率で第一位となっている。最近ではマンモグラフィなどの検診法および効果的な化学療法、放射線治療、ホルモン療法による集学的治療が開発されたことにより、乳がんの早期発見・早期治療が可能になってきている。しかし、再発例や転移を有する症例の予後は悪い。がん細胞は均一の細胞集団ではなく、その中に含まれている増殖性の高いがん細胞が治療を困難にしている原因として考えられている。近年、がん細胞を Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 活性の違いを用いて分離し、ALDH 活性が高い細胞群が、高い細胞増殖能・浸潤能・転移能を有することが報告された。乳がんに関する研究においても、ALDH を用いて解析が行われているが、その多くは樹立された細胞株を用いて行われている。

がん細胞株を用いた解析では、生体内での挙動を正確に反映しているかは疑問が残るところである。以上の状況をふまえ、本研究ではより生体内に近い環境下におけるがん細胞の挙動を検証するため、乳がん初代培養細胞を用いて、その機能解析を行った。

方法・結果

1. 乳がん細胞初代培養 乳がん細胞は、筑波大学附属病院において乳腺・甲状腺・内分泌外科の協力の下、乳がん患者さんへのインフォームドコンセントの後に提供していただいた。胸水中の細胞は、比重遠心して乳がん細胞を含む単核球分画を採取し、DMEM/10% FBS 培地にて培養した。播種後2週間ほどでいくつかの接着性コロニーが観察された。さらに乳がん細胞以外を取り除くためにCD31陰性かつCD45陰性の細胞集団をセルソーターによって分取した。この細胞をBC#1とした。

2. 乳がん細胞の解析

・RT-PCR法を用いた発現解析

通常酸素条件下 (20% O₂) および低酸素条件下 (1% O₂) において、BC#1におけるホルモン受容体および増殖因子の発現をRT-PCR法にて解析中である。

・接着培養法

BC#1と細胞株MDA-MB-231の増殖能を比較するため、通常酸素条件 (20% O₂) および低酸素条件 (5% O₂) において増殖能の違いを検討した。BC#1はMDA-MB-231と同様な増殖能を示した。また、BC#1とMDA-MB-231は共に通常酸素条件下に比べて低酸素条件下で増殖が促進された。

・足場非依存性培養法

そこで、BC#1の足場非依存性を検証するために、MammoCult assayによって形成されたスフェロイド数をカウントした。BC#1はスフェロイドを形成したが、MDA-MB-453はスフェロイドではなく凝集体を形成した。

3. 乳がん細胞の転移能に対する解析

BC#1の *in vivo* における転移能を検討するために、マウスの尾静脈よりBC#1細胞を注射し、3週間後に肺への転移巣数を比較検討した。BC#1はMDA-MB-453と同様に肺に転移巣を形成したことからBC#1は血行性転移能を持つことが明らかとなった。

4. ALDH活性を指標とした乳がん細胞の解析

次にBC#1をALDH活性の違いによって分離し、ALDH活性を持つ細胞群 (以下 Alde⁺ 細胞) と持たない細胞群 (以下 Alde⁻ 細胞) を比較検討した。ALDH活性を持つ細胞群は全体の10%弱で接着細胞の中にも浮遊細胞も観察した。一方、残りの90%はALDH活性を持たず、接着細胞を多く含んでいた。

・細胞増殖能の比較

ALDH活性によって分離した細胞の低酸素応答性を解析した。通常酸素条件下 (20% O₂) および低酸素条件下 (5% O₂) において増殖能の違いを検討した。その結果、Alde⁺ 細胞は Alde⁻ 細胞に比べて有意に高い細胞増殖能を示した。

・血行性転移能の比較解析

ALDH活性の違いによる血行性転移能に対する影響を調べるため、血行性転移モデルマウスを用いて解析を行った。その結果、Alde⁺ 細胞は Alde⁻ 細胞と比較して、有意に多くの肺転移巣を形成することが分かった。これにより、ALDH活性を持つ細胞群は高い血行性転移能を持つことが明らかとなった。

・RT-PCRを用いた発現解析

ALDH活性によって分離した細胞の遺伝子発現の違いについてRT-PCR法にて解析した。通常酸素条件下 (20% O₂) および低酸素条件下 (1% O₂) にて培養した細胞のVEGF、CXCR4、TGF-βの発現について比較検討した。その結果、Alde⁺ 細胞は Alde⁻ 細胞に比べてVEGF、CXCR4、TGF-βを高発現していた。また、これらの因子は低酸素条件下において発現が上誘導されることが分かった。

・低酸素応答性の検討

低酸素応答転写因子であるHIF-1α、HIF-2αの発現変化をウエスタンブロッティングにて解析した。HIF-1αはいずれの細胞群でも低酸素により発現が誘導され、中でもAlde⁺ 細胞はより高い低酸素応答性を示した。一方、HIF-2αはAlde⁺ 細胞・Alde⁻ 細胞ともに恒常的に発現しており、低酸素応答性は見られなかった。

考察

今回用いた胸水由来の乳がん初代培養細胞は、がん細胞に特徴的な足場非依存性を持つだけでなく、がん細胞株と同様に増殖能および転移能を有していることが明らかとなった。さらに、BC#1はALDH活性を指標として分取することで、少なくとも2種類の細胞群に分離できることが明らかとなった。これらの細胞群はそれぞれ異なる細胞形態を示しており、ALDH活性を持つ細胞群は低酸素応答性が高く、HIF-1αの標的遺伝子であるVEGFやCXCR4、TGF-βを高発現することが示された。以上から、ALDH活性を持つ細胞群は、血管新生を促進し、腫瘍の増大に正に作用するだけでなく、遊走能を介してがん転移にも影響することが示唆された。

今後の展開

HIF-1αをノックダウンした細胞を用いて増殖能や転移能に対する影響を検討する。加えて、RT-PCR法を用いて原因遺伝子を明らかにする。また、ALDH活性が原発腫瘍形成/再発・リンパ行性転移に対してどのように影響するのかについて、モデルマウスを用いて解析することを計画している。

自己免疫疾患発症制御における Allergin-1 の機能解明

赤星 渚 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渋谷 彰 (人間総合科学研究科)

背景・目的

自己免疫疾患は、自己抗原に対して通常働く自己寛容機構が正常に機能せず、自己反応性の免疫細胞が活性化することで自身の組織が傷害されることにより発症する。骨髄球系細胞が過剰に活性化すると、自己免疫疾患やアレルギーの発症を誘導することから、骨髄球系細胞の活性化制御が生体恒常性維持に関与していると考えられる。この活性化抑制機構の一つに、受容体を持つ immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) を介した抑制性シグナルの伝達が知られている。自己免疫疾患の詳細な発症機構は未だ不明な点が多く、骨髄球系細胞の活性化制御機構における免疫抑制受容体の役割の解明は疾患の治療につながることも重要である。

Allergin-1 は本研究室が新たに同定した膜型受容体で、細胞内に ITIM 様ドメインを 2 つ、細胞外に免疫グロブリン様ドメインを 1 つ持つ。また、マウスの肥満細胞、マクロファージ、樹状細胞といった骨髄球系細胞において発現が認められる。*in vivo* 及び *in vitro* の解析から、Allergin-1 は肥満細胞において FcεRI を介した活性化シグナルを抑制する免疫抑制受容体であることが明らかとなった。Allergin-1 は骨髄球系細胞の活性化を抑制する機能を有することが考えられることから、自己免疫疾患発症機構における Allergin-1 の機能を明らかにすることを目的として本研究を行った。

方法

自己抗体価の測定

自己免疫疾患では自己の抗原に対する自己抗体価の上昇が見られることから、加齢マウスにおける自己抗体価を C57BL/6 野生型マウス及び Allergin-1 遺伝子欠損マウスで比較した。76–98 週齢の野生型マウス (n = 41; 雄 23, 雌 18) 及び Allergin-1 遺伝子欠損マウス (n=33; 雄 17, 雌 16) から血清を採取し、抗核抗体である抗 dsDNA 抗体価、抗 histone 抗体価及び抗リン脂質抗体である抗カルジオリピン抗体価を ELISA 法にて測定し、t 検定法により有意差検定を行った。

結果

自己抗体価の測定

抗カルジオリピン抗体価は、野生型マウスに比べ Allergin-1 遺伝子欠損マウスで有意に抗体価の亢進が認められ ($p < 0.01$) (Figure 1)、この有意差は雄間 ($p < 0.01$)、雌間 ($p < 0.01$) においても見られた。また、抗 dsDNA 抗体価は、雌間で Allergin-1 遺伝子欠損マウスの抗体価亢進が有意に認められたが ($p < 0.01$)、雄間での有意差はなかった ($p = 0.0585$)。一方、抗 histone 抗体価では野生型マウス、Allergin-1 遺伝子欠損マウス間で有意な差は見られなかった ($p = 0.2033$)。

考察

本研究では、抗カルジオリピン抗体価及び雌間での抗 dsDNA 抗体価が野生型マウスと比較して Allergin-1 遺伝子欠損マウスで有意な亢進が認められたことから、Allergin-1 は生体内で自己抗体産生に対して抑制的に働くことが示唆された。

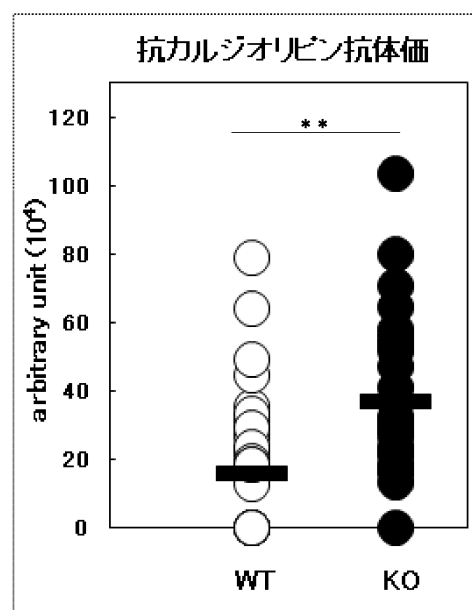


Figure 1: 抗カルジオリピン抗体価．野生型 (WT, n=41) または Allergin-1 遺伝子欠損マウス (KO, n=33) の血清を採取し、抗カルジオリピン抗体価を ELISA 法にて測定した。
** $p < 0.01$

自己抗体の産生には B 細胞が関与し、その活性化には T 細胞からのサイトカイン産生といった補助が必要であり、T 細胞は樹状細胞からの抗原提示を受けることで活性化される。樹状細胞は自然免疫応答に関わる白血球であり、樹状細胞の活性化には骨髄球系細胞が働く自然免疫応答の活性化が必須である。Allergin-1 遺伝子欠損マウスで自己抗体が亢進した現象における活性化シグナルは不明であるが、Toll-like receptor (TLR) 遺伝子欠損マウスでは自己免疫疾患の発症が改善されることから、TLR が活性化シグナルの一つとして挙げられる。このことから、Allergin-1 は骨髄球系細胞に発現する TLR を介した活性化シグナルを抑制し、自己抗体産生を抑制している可能性が考えられる。自己抗体産生が亢進した Allergin-1 遺伝子欠損加齢マウスでは、骨髄球系細胞の活性化が亢進しているかを明らかにするため、Allergin-1 が発現している樹状細胞、マクロファージ及び肥満細胞の、末梢血及び脾臓における細胞数の増加や CD40, CD80, CD86 を始めとした活性化マーカーの発現亢進を解析する予定である。また、自己免疫疾患自然発症モデルである lpr マウスと Allergin-1 遺伝子欠損マウスを合わせて Allergin-1^{-/-}lpr/lpr マウスを作製し、自己免疫疾患発症が増悪するか検討を行う。さらに、多発性硬化症の実験モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルを用いて、アジュバンドである結核菌に対する骨髄球系細胞の反応性が亢進し、Allergin-1 遺伝子欠損マウスでは症状が悪化するか検討する。これらの実験系により、Allergin-1 と自己免疫応答との関連を解析していく予定である。

移植片対宿主病に対する抗 DNAM-1 モノクローナル抗体を用いた予防法の確立

竹中 江里 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渋谷 彰 (人間総合科学研究科)

背景

移植片対宿主病 (GVHD) は、骨髄移植の後に起こる重篤な合併症の一つであり、皮膚の紅斑、黄疸、下痢などの症状を特徴とする。これらの症状は、移入したドナー細胞中の T 細胞がレシピエントの細胞を非自己と認識して組織傷害を起こすことに起因する。GVHD の予防や治療には免疫抑制剤が広く用いられているが、GVHD に特化した有効な予防法や治療法は未だ確立されていない。

T 細胞上に発現している活性化受容体分子の一つに、DNAM-1 がある。DNAM-1 は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する分子であり、T 細胞や NK 細胞などの免疫細胞に発現している。これまでに当研究室では、DNAM-1 が細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞の細胞傷害活性を促進することを示した。

GVHD の主な標的臓器である肝臓や腸管には DNAM-1 のリガンドである CD112 や CD155 が発現している。当研究室では、DNAM-1 を欠損したドナー細胞を移入した GVHD モデルマウスでは標的臓器の傷害が軽減されて生存率が向上することを示した。このことから、ドナー細胞上の DNAM-1 が GVHD の発症や増悪に重要な役割を担っていることが明らかになった。

しかし、DNAM-1 を標的分子とした臨床応用の可能性については未だ詳細に検討されていない。

目的

本研究では、GVHD モデルマウスへの抗 DNAM-1 中和抗体の投与を行い、これによる GVHD の予防効果を観察することによって、DNAM-1 を標的分子とした、GVHD の新たな予防法や治療法への開発の可能性を検討する。

方法

GVHD のマウスモデルとして、C57BL/6N マウス (以下 B6; ドナー) の脾細胞を、半致死量の放射線を照射した B6 × C3H/HeN の F1 マウス (以下 B6C3F1; レシピエント) へ移入する実験系を用いた。B6C3F1 マウスの細胞上に発現する MHC クラス I 分子 (H-2b/k) は B6 マウスの MHC クラス I 分子 (H-2b) とは異なるため、ドナー T 細胞はレシピエントの細胞を傷害する。

この GVHD モデルにおいて、脾細胞移入の前日に、DNAM-1 とそのリガンドとの結合を阻害する抗 DNAM-1 モノクローナル中和抗体 1 mg を腹腔内に投与し、GVHD 病態を検討した。抗 DNAM-1 抗体投与の対照群として、コントロール抗体を投与する群を設定した。また、GVHD 発症の対照群として、放射線照射のみを行い脾細胞を移入しない群を設定した。

GVHD の病態である肝障害の評価として、肝逸脱酵素である ALT・AST の血清中濃度を測定した。また、GVHD 発症時の免疫細胞の評価として、ドナー T 細胞上の DNAM-1 並びにエフェクター細胞の分化マーカーである CD44 と CD62L の発現をフローサイトメトリー法により観察した。

結果

1. 細胞移入後 14 日目の ALT・AST の血清中濃度は、コントロール抗体投与群に比べ抗 DNAM-1 抗体投与群

で有意に低かった。

2. 細胞移入後 7 日目のドナー T 細胞上の DNAM-1 の発現量を観察した結果、コントロール抗体投与群に比べ抗 DNAM-1 抗体投与群では DNAM-1 の検出量の顕著な低下を認めた。また、この低下は細胞移入後 21 日目では認められなかった。
3. 細胞移入後 7 日目のドナー由来の CD8 陽性 T 細胞および CD4 陽性 T 細胞は、組織傷害を起こしうるエフェクター細胞 (CD44 陽性 CD62L 陰性) に分化していることが確認された。しかし、抗 DNAM-1 抗体投与群とコントロール抗体投与群との間で、エフェクター細胞へ分化した T 細胞の割合に差は見られなかった。
4. 細胞移入後 7 日目と 21 日目のドナー CD8 陽性 T 細胞の絶対数は、コントロール抗体投与群に比べ抗 DNAM-1 抗体投与群で少ない傾向が観察された。一方、CD4 陽性 T 細胞の絶対数は、抗 DNAM-1 抗体投与群とコントロール抗体投与群との間で差は見られなかった。

考察

抗 DNAM-1 中和抗体の投与によって、GVHD による肝障害の軽減が観察された。また、抗 DNAM-1 抗体投与群のドナー T 細胞上では DNAM-1 の検出量の顕著な低下を認めたことから、投与した抗 DNAM-1 抗体によってドナー T 細胞上の DNAM-1 が占有されていることが示された。

以上から、レシピエントへの抗 DNAM-1 中和抗体投与によってドナー T 細胞上の DNAM-1 が占有され、リガンドとの結合による T 細胞への活性化シグナルが阻害されたことにより細胞傷害活性の抑制が起こり、GVHD による組織傷害が軽減されたと考えられる。

しかし、投与した抗 DNAM-1 抗体による T 細胞上の DNAM-1 の占有は 21 日目で観察されなくなったことから、この時点で抗体の効果は認められないと考えられる。抗 DNAM-1 抗体の持続的な投与によって、GVHD の緩和により大きな効果を持つことが期待される。

抗 DNAM-1 中和抗体による DNAM-1 の占有がドナー T 細胞に及ぼした影響については以下のことが考えられた。細胞移入後 7 日目のドナー T 細胞のエフェクター細胞への分化には差は見られなかったことから、エフェクター T 細胞分化への抗 DNAM-1 抗体の関与は小さいと考えられる。一方、細胞移入後 7 日目と 21 日目で、抗 DNAM-1 抗体投与群のドナー CD8 陽性 T 細胞の絶対数はコントロール抗体投与群と比較して少ない傾向が見られたことから、抗 DNAM-1 抗体はドナー CD8 陽性 T 細胞の細胞傷害活性の抑制だけでなく、増殖の抑制にも寄与する可能性が示唆された。

結論

抗 DNAM-1 モノクローナル中和抗体の予防的投与によって、GVHD による肝障害の軽減を認めた。このことより、GVHD の予防や治療において、DNAM-1 が有効な標的分子となる可能性が示された。

線虫 *C. elegans* に対する鮭白子抽出物の生理作用と作用メカニズムの解析

新谷 浩章 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 坂本 和一 (生命環境科学研究科)

特許申請中のため掲載は控えさせていただきます。

ヒト肝癌細胞 HepG2 における NAD の脂肪蓄積促進作用の解析

藤田 圭子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 坂本 和一 (生命環境科学研究科)

背景・目的

NAD (nicotinamid adenine dinucleotide) は、多くの酸化還元反応において、脱水素酵素の補酵素として働く物質で、牛肉、豚肉、魚、ひまわりの種、ピーナッツなどに含まれる NA (nicotin amid) を主要基質として生体内で合成されている。

一方、サーチュインは、細胞修復、エネルギー生産、アポトーシスなどを調整している脱アセチル化酵素群であり、様々な生体機能の調整役として機能している。また、活性化したサーチュインは線虫の個体寿命の延長に関わることから、「長寿関連遺伝子」とも呼ばれている。

近年、NAD が補酵素としてサーチュインの脱アセチル化酵素活性の亢進に関わることが発見され、NAD とサーチュインの密接な関連性が裏付けられた。しかしながら、哺乳類における NAD のサーチュイン制御機構については未だほとんど知られていない。

これらの事実を背景に、かねてより本研究室では、マウス前駆脂肪細胞 (3T3-L1) の分化および増殖に対する NAD の生理作用と作用機序の解析を行ってきた。その結果、3T3-L1 細胞においては、NAD は脂肪細胞の分化と脂肪蓄積に抑制的に作用することが明らかにされている。

そこで、本研究では、NAD のもつ脂肪蓄積量減少作用が 3T3-L1 特異的かどうかを調べるために、脂肪蓄積能のあるヒト肝癌細胞 (HepG2) を用いて、脂肪蓄積に対する NAD の生理作用と作用機序の解析を行った。

方法

1. Oil-red-O 染色

NAD 添加による脂肪蓄積量の変化を調べるために、Oil-red-O 染色を行った。HepG2 をコンフルエントの状態まで培養してから NAD (0、250、500、1000 μ M) を添加し、添加 2 日後に脂肪滴を Oil-red-O で染色して撮影・定量した。

2. MTT assay

NAD が細胞生存率に影響を与えるかどうかを調べるために、ミトコンドリア内脱水素酵素の働きにより MTT から生じるホルマゼンを検出する MTT assay を行った。Oil-red-O 染色時と同様に HepG2 を培養して NAD (0、250、500、1000、2000 μ M) を添加し、さらに 2 日間培養した後、MTT を添加して解析した。

3. RT-PCR

RT-PCR により、Fatty Acid Synthase (FAS)、Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) などの脂肪酸合成関連遺伝子の mRNA の発現量の変化を調べた。これまでの実験と同様に HepG2 を培養し、NAD (0、250、500、1000 μ M) を添加して、2 日後に mRNA を抽出した。cDNA を合成した後、RT-PCR を行った。

4. トリグリセリド (TG) アッセイ

MTT assay と同様に HepG2 の培養と NAD の添加を行い、添加から 2 日後に細胞内 TG の量を定量化した。

5. NAD/NADH assay

MTT assay と同様に HepG2 の培養と NAD の添加を行い、細胞内の NAD/NADH 比の変化を調べた。

6. RT-PCR

NAD による Sirt1 の mRNA 発現量の変化を、上記した RT-PCR と同様の方法で行った。

7. Sirt1 の酵素活性測定

Sirt1 により脱アセチル化され蛍光強度を増す蛍光基質を用いて、Sirt1 の酵素活性に対する NAD の作用を調べた。HepG2 の培養方法はこれまでの実験と同様である。

結果

1. NAD を添加した HepG2 は、コントロールに比べて脂肪蓄積量を増加する傾向が見られた。
2. MTT assay から、NAD は細胞生存率に影響を与えないことがわかった。
3. 脂肪酸合成関連遺伝子である FAS 及び SCD1 の mRNA の発現量も NAD の添加により増加した。

4 - 7 の実験は現在進行中である。

考察

先行研究において、NAD は 3T3-L1 脂肪細胞の分化と脂肪蓄積を抑制する働きを示した。しかし、本研究におけるこれまでの結果から、HepG2 においては、NAD は脂肪酸の合成と蓄積を促進する可能性が示唆された。これにより、NAD が脂肪蓄積に与える影響は、3T3-L1 と HepG2 で異なると考えられる。

機能性ポリフェノール・カルダモニンが代償性筋肥大に及ぼす影響 — mTOR シグナル経路の解析 —

谷口 由佳 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 武政 徹 (人間総合科学研究科)

背景・目的

現在、ポリフェノールの持つ様々な効果に注目が集まっている。ポリフェノールとは、分子内に複数のフェノール性ヒドロキシ基をもつ、植物成分の一種である。ほとんどの植物に含まれ、主に光合成によって合成される色素である。その数は 5000 種類以上に及ぶ。作用としては、植物細胞の生成、活性化、またヒトに対する効果として、抗酸化作用や、ホルモン促進作用などがあげられる¹⁾。

今回私が注目した、機能性ポリフェノールであるカルダモニンは分子式 $C_{16}H_{14}O_4$ で、2',4'-Dihydroxy-6'-methoxychalcone と明記される、カルコンの一種であり、ゲットウ、ソウズク、オオバンガジュツなどに含まれる。

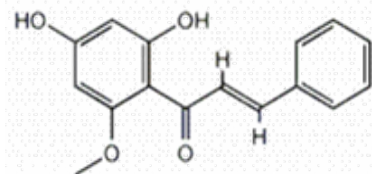


図1 カルダモニン構造図

このカルダモニンには美白効果があるとして研究されてきた。(引用文献) 美白とは肌を白く保つことだが、これにはメラニン生成量が大きくかかわっている。このメラニン生成は、mammalian target of rapamycin(mTOR) と呼ばれる細胞内タンパク質によって制御されている。この mTOR がリン酸化され、活性化することによってメラニン合成が減少するのである。カルダモニンは、この mTOR 上流のホスホリパーゼ D1(PLD1) という酵素に働きかけ、PLD1 がホスファチジルコリン酸 (PA) を産生する。この PA も mTOR の上流に存在し、メラノ - マ細胞で mTOR をリン酸化し活性化することで、 $p70^{S6k}$ をリン酸化し、メラニン生成を抑制する。

一方、mTOR - $p70^{S6k}$ のシグナル経路は、骨格筋においても重要なシグナル経路の一つである。筋繊維では、mTOR - $p70^{S6k}$ 経路の活性化によって筋タンパクの合成が促進され、筋肥大が起こる。このことから、カルダモニンには、筋肥大を促進する働きもあるのではないかと考え、実験を行った。先行研究として、培養細胞においては、カルダモニンによる mTOR 活性が確認されている²⁾。私は生体においてカルダモニンの筋肥大促進効果の有無を、共働筋切除手術という、実験的にマウスに筋肥大を引き起こす実験と組み合わせることで検証しようと考えた。

方法

1) カルダモニン溶液

カルダモニンは粉末の物質であり、脂溶性であったため、他の機能性分子を含まない綿実油に溶かして使用した。カルダモニン溶液濃度は、予備実験の結果から溶解できる上限である 0.3 mg/ml とした。

2) マウス

マウスは 8 週齢の雄性 ICR マウスを用いた。

3) 投与方法と実験群

投与方法は腹腔内投与で行い、投与量は一匹当たり 3 mg/kg ずつとした。実験期間は 14 日間とし、3 日間投与

し、1 日休むという周期で行った。よって実質 11 日投与した。実験群は以下のように分けた。

1. Control(綿実油のみ投与): Con 群
 2. カルダモニン溶液投与: Car 群
 3. 代償性過負荷(綿実油のみ投与): CO 群
 4. 代償性過負荷+カルダモニン溶液投与: CO+Car 群
- CO: Compensatory overload

4) 解析方法

投与の際に毎回体重を測定し、14 日間の投与後、マウスの後肢からヒラメ筋(遅筋)、足底筋(速筋)を摘出し、筋湿重量を測定した。摘出した筋は、ウェスタンブロッティングで mTOR、Akt、 $p70^{S6k}$ について解析した。

結果・考察

1) 筋湿重量

筋湿重量においては、足底筋において、共働筋切除による代償性過負荷の効果について有意な結果が得られた。しかし、ヒラメ筋、足底筋どちらもカルダモニンによる肥大効果はみられなかった。(図 1)

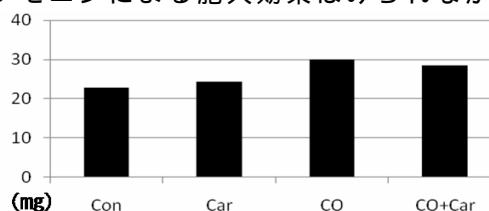


図2 足底筋の筋湿重量

2) ウェスタンブロット解析

mTOR についてはカルダモニンを投与することによって、リン酸化 mTOR の割合に増加傾向がみられた(図 2)。しかし、現段階では有意な結果が得られていない。

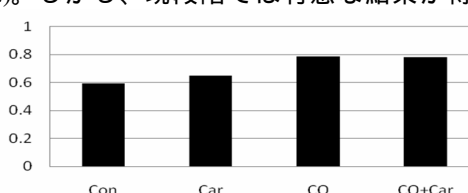


図3 ウェスタンブロッティングによる p-mTOR/mTOR 相対値

また、Akt、 $p70^{S6k}$ についても現在解析中である。現時点で、mTOR の解析結果から考察すると、control 群に比べ mTOR 活性化が増加傾向にあるが、過負荷を与えた群では差が見られない。よって、カルダモニンは日常生活における筋肥大には効果を示すが、運動による相乗効果を果たすことはできないのではないかと考えられる。このような効果が証明されれば、高齢者や、怪我などにより日常の中にスポーツを取り入れにくい人において、普段の生活の中で筋肥大を促したり、筋の委縮を防いだりすることができるのではないかと考えている。

参考文献

- 1) JIRCAS ホームページ
- 2) 木曾雄介 平成 20 年度体育専門学群 卒業論文

炎症で引き起こされた骨格筋の萎縮は免疫賦活剤物質で抑制できるか？

福田 麦穂 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 武政 徹 (人間総合科学研究科)

背景・目的

近年、高齢化が進み高齢者の QOL の向上が求められている。高齢者の QOL が低下する原因のひとつとして考えられるのは、加齢による身体活動量、エネルギー代謝量の低下である。その要因のひとつとして挙げられるのは骨格筋の顕著な萎縮 (サルコペニア) である。体の動きを司る骨格筋中のタンパク質は常に合成と分解を繰り返し、その恒常性を保っている。このような筋中のタンパク質合成と分解の分子メカニズムとして明らかになっているのが mTOR (mammalian target of rapamycin) 経路、および Atrogin1/MAFbx 経路である。加齢により mTOR 経路は抑制され、Atrogin1/MAFbx の発現が上昇し、筋萎縮が起こる。これらの反応を引き起こすの要因のひとつとして全身性の炎症が挙げられる。Bingwen Jin らは実験的にエンドトキシン的一种である LPS (リポポリサッカライド) を用いて全身性の炎症を擬似的に引き起こし、骨格筋が萎縮することを証明した (参考文献)。私は炎症を抑制すると考えられる免疫賦活剤 (物質 X: 材料提供者との秘密保持契約に従い物質名を明かすことができないため本論文ではこのように表記する) によって筋萎縮が妨げられるかをマウスを用いて検討した。

材料・方法

マウスは ICR 系 8 週齢雄性マウスを用いた。

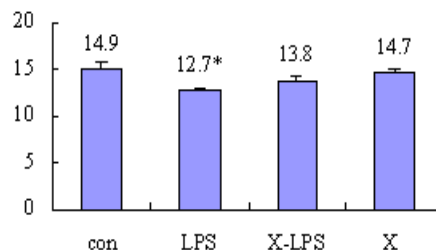
1. モデルマウスの作成マウスに生理食塩水もしくは LPS (5, 10 mg/kg B.W.) を腹腔内投与し、24 時間後に下肢の筋 (soleus, plantaris, gastrocnemius muscles) をサンプリングし soleus muscles について Western blotting を行った (Akt, phosph-Akt, S6K1, phospho-S6K1)。
2. 物質 X の抑制効果の検討マウスをランダムに 5 群に分け、それぞれに 4 日間、物質 X または D.W. をゾンデで 1 日 1 回のペースで投与した。詳細なプロトコル、測定項目は以下の通り (下表参照)。4 日目に LPS (10 mg/kg) を投与し、24 時間後に下肢の筋のサンプリングを行った。各筋の湿重量の測定、soleus muscles の Western blotting を行った。

day	1～4	4	5
control	DW	DW	サンプリング sol, pla, gas muscles
LPS	DW	LPS	
X-LPS	X	LPS	
X	DW	X	
測定項目	体重、エサの変化量、水の変化量		

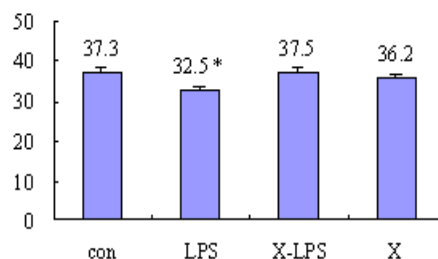
結果・考察

1. LPS を 10 mg/kg を投与した群で p-Akt が有意に減少し、p-S6K1 は減少傾向を示した。よって、実験 2 の LPS 投与濃度は 10 mg/kg とした。また、このことから LPS による筋萎縮は mTOR シグナルを解していると考えられた。
2. 物質 X 投与によって筋湿重量が回復傾向にあることがそれぞれの筋で示された (図 1)。筋内のタンパクについて現在解析中である。

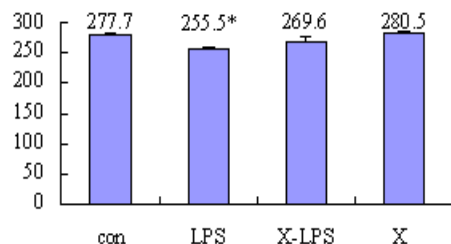
A



B



C



* p<0.05 vs. con

図 1. LPS 投与による筋萎縮を物質 X が抑制する

- A. Soleus muscles wet weight (mg)
B. Plantaris muscles wet weight (mg)
C. Gastrocnemius muscles wet weight (mg)

今後の展望

物質 X を用いたマウスの筋タンパクについて解析を進め、Atrogin1/MAFbx 経路の変化についても解析する。

参考文献

Bingwin Jin et al. Journal of Cellular Biochemistry 100:960-969 (2007)

テトラヒメナのアクチン重合システムの機能解析

柳澤 佐保子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 沼田 治 (生命環境科学研究科)

背景

アクチンは真核生物に存在し、単量体である G-アクチンが重合しフィラメント状の F-アクチンとして機能する。F-アクチンは細胞内において、ほかのタンパク質と相互作用して細胞骨格を形成し、小胞の移動、細胞移動、細胞分裂などに働く。細胞質内には、重合可能なアクチンが高濃度で存在しており、それらを厳密に制御し細胞シグナルに応じて素早くフィラメントを重合する仕組みが備わっている。

アクチン重合促進因子 Arp2/3 complex は、アクチン関連タンパク質である Arp2 と Arp3 及び Arc 1 - 5 の五つのサブユニットを含むヘテロ 7 量体を形成している。Arp2/3 complex は既存のアクチンフィラメントに結合し、約 70° の角度で新規のフィラメントを形成させることで、網目状構造をとらせる。この Arp2/3 complex は WASP などの重合核促進因子に結合することで活性化される。ヒトの Arp2/3 complex においては Arc3 の欠損により、アクチンを重合できなくなるという報告がある。

そこで今回の研究では、織毛虫テトラヒメナの Arp2 及び Arc 3 の遺伝子のノックアウトを行い、細胞における機能解析を目指した。また、その活性因子と推測される WASP の局在解析にも挑戦した。

方法

1. ARP2 または ARC3 のノックアウト株の作成

テトラヒメナは大核、小核の二つの核を持つため、遺伝子をノックアウトするためには二つの核から、目的の遺伝子を取り除く必要がある。まず、ARP2, ARC3 の両方の 3' 端および 5' 端側の非翻訳領域をテトラヒメナのゲノムより別々に約 1500 塩基ずつクローニングした。3' 端側非翻訳領域、5' 端側非翻訳領域の間に、カドミウム存在下でパラモマイシンに耐性を持たせる遺伝子 *PNeo4* カセットが入るように、ベクターに組込んだ。作成したベクターの 3' 端、5' 端の両端を制限酵素で切断後精製し、Model PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System を用いてテトラヒメナの小核に撃ち込む。するとテトラヒメナが本来持つ配列と同じ配列である非翻訳領域で相同組換えが起こり、ARP2, ARC3 の翻訳領域が *PNeo4* カセットと置き換わる。ベクターを撃ち込むテトラヒメナは、野生型 B2086 と小核に 6 - メチルプリン耐性遺伝子を持つ Cu427 を接合させた状態のものを用いた。ショット後、96 ウェルプレートに分注し、パラモマイシン耐性で 6 - メチルプリン耐性のウェルのテトラヒメナを選び、一週間培養した。植え継いだ変異体を single cell isolation し、hetero zygote hetero kalyon (小核に半分だけ変異が入り大核が野生型の遺伝子を持つ変異体) を得た。変異体は Cu427 と接合させシクロヘキシミド耐性及びパラモマイシン感受性になることを確認した。この変異体を小核の存在しない A* 株と接合させ、homo zygote hetero kalyon (小核に変異が入り、大核が野生型の変異体) を得る。この変異体同士を接合させ、大核、小核がともに完全に変異しているノックアウト株を得る計画である。

2. WASP - EGFP または WASP-mCherry 発現株の作成

テトラヒメナのゲノムより、WASP の翻訳領域をクローニングした。それを *MTT1* プロモーターの下流につなぎ、WASP の終止コドンを取り除くように蛍光色素タンパク質 EGFP または mCherry の配列を組み込んだ。これらの発現ベクターは、model PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System を用いて飢餓状態のテトラヒメナに撃ち込んだ。ベクターの持つ 3' 及び 5' *BTU1* 領域を利用した相同組換えが起こると、Cu522 の持つ taxol 感受性が失われることを指標に形質転換株を得ることができる。ショット後、一週間 taxol を添加した培地で植継ぎ、taxol 耐性を示す変異体をセクションしているところである。

結果

1. Arp2 に対するノックアウト処理を行ったものでは、96 ウェルプレート 10 枚分の細胞から、パラモマイシン耐性を持つ 8 ウェルを取得した。これらは、Cu427 と接合させようとしたが、うまく接合できなかった。一方、Arc3 に対するノックアウト処理を行ったものは 96 ウェルプレート 5 枚分の細胞のうち、パラモマイシン耐性を持つものは、1 ウェルだけであった。現在、これを植え継いで実験を進めている。
2. WASP に EGFP または mCherry をつないだ遺伝子を作成した。これらのベクターを Cu522 株に導入し、それぞれ 96 ウェルプレート 5 枚分の細胞をスクリーニングした。ところがすべてのウェルの細胞が Taxol 耐性を持ってしまった。

考察

今回利用した model PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System による遺伝子導入法は簡便であるが、形質転換体を得られる確率が低いように思われる。細胞のコンディショニングをあげたり、接合率を上昇させたり、打ち込むベクターの純度や濃度を上げるなどの工夫が必要である。

また、Cu522 は taxol の濃度をさらに上げるなど、形質転換体をスクリーニングするための手段を講じる必要があると考える。

ミオスタチンノックダウンマウスからの導入遺伝子検出の試み — ロンドン五輪に向けた遺伝子ドーピング検出への挑戦 —

菊地デイル万次郎 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 沼田 治 (生命環境科学研究科)

背景・目的

遺伝子操作によって実験動物の運動パフォーマンスを高めるという研究は複数の研究機関から報告されており¹⁾、これらの技術を転用することでヒトにおいてもアスリートの競技パフォーマンスを高められる可能性がある。このことを遺伝子ドーピングという。2001年にはIOC (International Olympic Committee)、2002年及び2003年にはWADA (World Anti-Doping Agency) が遺伝子治療技術の乱用の可能性を協議し、「治療目的以外での競技のパフォーマンスを強化する可能性がある遺伝子操作に関わる細胞、遺伝子、遺伝因子の使用を禁止する」と断言した²⁾。しかしながら遺伝子ドーピングの検出方法は確立されていないのが現状である³⁾。

遺伝子操作の中でも筋肥大のネガティブレギュレーターとして働くミオスタチン (GDF-8) を阻害するものは、効果的に筋肥大させ、筋力アップを望めるためドーピング転用への筆頭に挙げられている。

本研究ではアンチドーピングの立場から遺伝子ドーピングの検出を目指し、その研究の第一歩としてミオスタチンノックダウンマウスからの導入遺伝子の検出を目的とした。

方法

遺伝子ドーピングのモデル実験系はICR マウス 7 週齢 ♀ を実験動物とした。ミオスタチン mRNA を分解する shRNA (siRNA) を発現するインサートを組み込んだプラスミドベクター (K3) をエレクトロポレーション法により右の前脛骨筋 (TA) に導入することでミオスタチンをノックダウンした。ミオスタチンのノックダウン効果はミオスタチン mRNA、タンパク質の発現量および筋湿重量、筋横断面積の比較により確認されている。

遺伝子ドーピングの検出方法として遺伝子導入した筋およびその周辺の筋組織や血液から DNA を抽出し、導入されたプラスミド DNA の断片を Real-TimePCR により増幅することで、直接的検出を試みた。

実験 1) ミオスタチンノックダウンによる遺伝子ドーピング後、1 週間おきに 6 週間、血液と TA をサンプリングした (各週 $n = 3$)。血液および遺伝子導入した TA からの検出の可能性を経時的変化を追いかめた。

実験 2) K3 プラスミドと LacZ プラスミド (レポーター遺伝子 LacZ を発現) を導入し、3 日後に TA、長趾伸筋 (EDL)、腓腹筋 (GAS)、足底筋 (PLA)、ヒラメ筋 (SOL) をサンプリングした ($n = 10$)。遺伝子導入した TA とその周辺の筋組織からの検出の可能性を確かめた。

結果・考察

遺伝子導入した TA の筋湿重量は 1,2 週目に増加傾向 ($p < 0.1$)、3 週目に優位な増加 ($p < 0.05$) が確認された (図 1)。今回の実験系では TA そのものからは、導入後 4 週目まで検出に成功したが (図 2)、血液からの検出はどの時点でも不可能であった。また TA に隣接する EDL からの検出にも成功し (図 3)、検出不可能とされてきたターゲット組織以外からの遺伝子ドーピング検出の可能性を示すことができた。

今後は遺伝ドーピング特異的に起こる生体内での反応を見つけ出し、血液や尿からその痕跡をたどる実用的検出方法も検討したい。本研究には将来的に行われる可能性のある (もう既に行われている可能性もある) 遺伝子ドーピングに対して、安全で平等な競技のために、その抑止力として検出方法を確立することが期待されている。

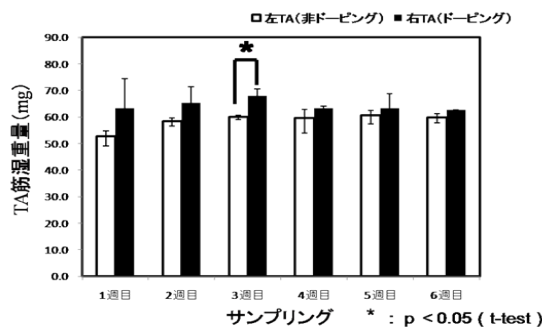


図1 実験1)
実験的遺伝子ドーピングにより筋は肥大した

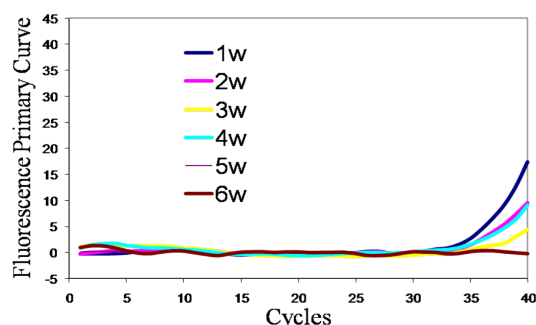


図2 実験1)
遺伝子導入したTAからは4週目まで検出可能

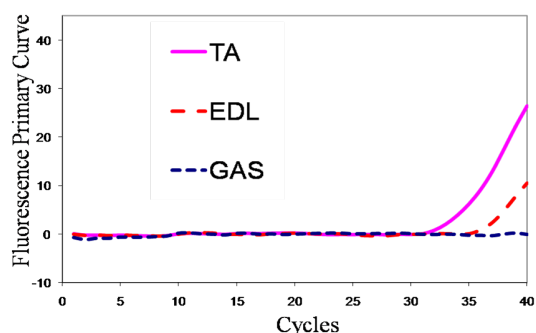


図3 実験2)
導入したTA以外の筋組織からも検出可能

参考

- 1) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *PNAS* **98**: 9306–9311, 2001.
- 2) <http://www.wada-ama.org/en/> (WADA の HP).
- 3) Developing strategies for detection of gene doping. *J Gene Med* **10**: 3–20, 2008.

A 型肝炎ウイルスに対する免疫応答並びに免疫記憶解析技術に関する研究

望月 康子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中野 賢太郎 (生命環境科学研究科)

背景・目的

カドヘリン (Cadherin, Cdh) は細胞表面に発現している Ca^{2+} 依存的細胞接着因子である。マウス BILL-Cdh(Cdh17) は B 細胞と小腸上皮に発現し、細胞の発生・分化に関与している。特に B 細胞では免疫記憶に関与することが示唆されているが、ヒトにおいても同様に、B 細胞免疫記憶で BILL-Cdh が機能しているかは不明である。

本研究の目的は、ヒト BILL-Cdh の免疫記憶に関する機能解析を行うことである。そのために、強い免疫記憶を誘導することで知られるヒト A 型肝炎ウイルス (HAV) に対する抗体産生 B 細胞での、ヒト BILL-Cdh の機能解析に必要な基礎技術を確立した。

方法

1. モノクローナル抗体の作製

1-1. 抗ヒト BILL-Cdh モノクローナル抗体の作製

ヒト BILL-Cdh をマウスに免疫し、抗ヒト BILL-Cdh 抗体産生 B 細胞を含むマウス脾細胞 (SPC) を得た。SPC とミエローマ細胞である SP2/O を細胞融合し、HAT 培地選択を行い、フローサイトメトリー (FCM) によりモノクローナル抗体 (mAb) のスクリーニングを行った。ハイブリドーマは限界希釈法によりクローニングした。

1-2. 抗 HAV mAb の作製 (既存の抗 HAV mAb とはエпитープが異なる mAb の作製)

1-1 と同様の方法で抗 HAV 抗体産生ハイブリドーマを得た。既存の mAb との ELISA 競合法試験により、新規エпитープを認識する mAb を選択した。

エпитープ: 抗原決定基。抗体によって認識される抗原上の構造。

2. フローサイトメトリーによる抗 HAV 抗体産生 B 細胞の動態解析法の確立

HAV 免疫マウスの B 細胞に HAV を反応させ、その後、抗 HAV mAb である A21-biotin を用いて、HAV 特異的な抗体産生 B 細胞の検出を行った。

3. ELISA 系の確立

3-1. 抗 HAV 抗体の測定

以下の方法を用いて標準参照液及びヒト血清中の抗体濃度測定を行い、検量線を作成した。(括弧内はコーティング、検出に使用した抗体)

- IgG/IgM 直接法 (検出: 抗ヒト IgG/IgM-HRP)
- IgG/IgM 捕捉法 (コーティング: 抗ヒト IgG/IgM, 検出: 抗 HAV mAb; A21-biotin/F1-biotin)
- 競合法 (検出: A21-biotin)

3-2. HAV 抗原の検出

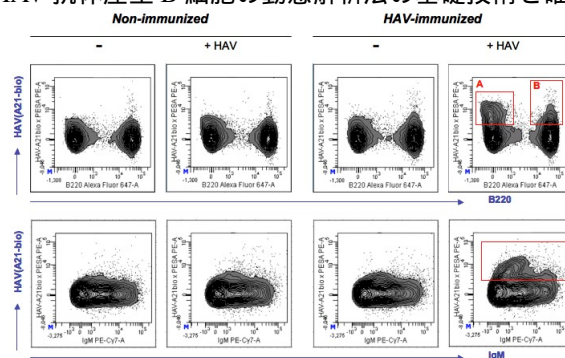
既存の抗 HAV mAb (F1, A21-biotin) を用いて、HAV 抗原の検出を行った。具体的には F1 でコーティングし、血清を加え、A21-biotin と HRP-SA で検出した。

結果・考察

1-1. 特異性・感度の高い抗ヒト BILL-Cdh mAb を 1 クローン (A2F6) 得た。

1-2. 既存の抗 HAV mAb と競合しない mAb を多数 (約 10 クローン) 確立した。

2. FCM により HAV 特異的な抗体産生 B 細胞が検出でき、抗 HAV 抗体産生 B 細胞の動態解析法の基礎技術を確立した。



た。

図 1. 抗 HAV 抗体産生 B 細胞の解析 (FCM): HAV で免疫したマウスの脾細胞にのみ HAV 反応性 B 細胞集団を検出した (枠内: 抗 HAV 抗体産生 B 細胞)。

3-1. IgG/IgM 直接法、IgM 捕捉法、競合法では、十分な直線性を持った検量線を作成でき、高感度の ELISA 系を確立できた。しかし、IgG 捕捉法では抗ヒト IgG と抗 HAV mAb である A21-biotin との間で交差反応が起きたため、IgG 捕捉法は確立できておらず、今後の課題である。

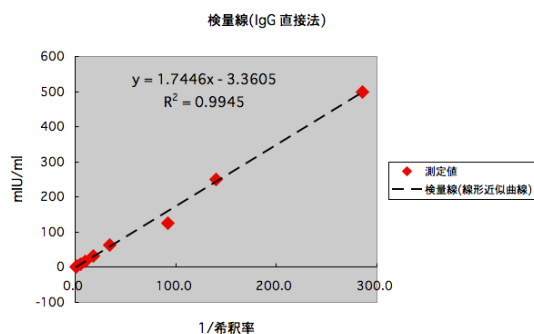


図 2. IgG 直接法の検量線: 標準参照液 (1mIU/mL 抗 HAV 抗体) を用い、直線性に優れた検量線が作成できた。

3-2. 急性 A 型肝炎患者血清から、HAV 抗原自体を検出できることを予備的実験で確認した。

今後の展望

作製した抗ヒト BILL-Cdh mAb や抗 HAV mAb を用いて、抗 HAV 抗体産生 B 細胞の解析、特に免疫記憶に関する解析を行い、ヒト BILL-Cdh との機能相関を検討する予定である。

ヒトがん細胞の悪性化における mtDNA の関与

服部 桂祐 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 林 純一 (生命環境科学研究科)

背景・目的

ミトコンドリアは酸化的リン酸化によって、生体内で必要なエネルギー (ATP) の大部分を生産する細胞小器官である。その構造は内膜と外膜からなる二重膜構造で、内膜上には呼吸酵素複合体 I~V が存在する。また、動物細胞においてミトコンドリアは核外ゲノムを有する唯一の細胞小器官であり、一細胞あたり数百~数千コピーのミトコンドリア DNA (mtDNA) を有している。これらの mtDNA は核 DNA と共に呼吸酵素複合体を構成するサブユニットをコードしているため、呼吸酵素複合体は核 DNA と mtDNA の二重支配を受けている。

mtDNA は以下の理由から核 DNA より突然変異が蓄積しやすいとされている。

- 電子伝達系における酸化的リン酸化に伴って発生する活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) に常にさらされている。
- 核 DNA に比べ修復機構が不十分である。
- 核 DNA に比べ化学発がん物質の影響を受けやすい。

また近年、さまざまなヒトがん細胞において mtDNA 突然変異が報告されていることから、mtDNA 突然変異が細胞のがん化に関与しているのではないかと、「がんミトコンドリア原因説」が提唱されている。しかし、mtDNA 突然変異が細胞のがん化の原因と決定付けるような証拠は得られておらず、仮説に留まっている。

「がんミトコンドリア原因説」の立証が進んでいない理由として、まず mtDNA を人為的に改変する技術が確立できていないことが挙げられる。またその他に、ミトコンドリアが核 DNA と mtDNA 両方の二重支配を受けているため、仮にミトコンドリアの機能低下が原因でがん化が生じる場合、そのがん化が核 DNA と mtDNA どちらの影響に起因するものか明確に出来ないことも挙げられる。しかし、これらの問題点を所属研究室は独自の手法を用いることで解決した。その手法は細胞質移植法という技術で、mtDNA 欠損細胞 (ρ^0 細胞) に mtDNA を含む細胞質体を融合することで細胞質雑種 (サイブリッド) を作製し、核を統一して純粋に mtDNA だけの影響を評価することができる。

所属研究室では、正常細胞とがん細胞の間で mtDNA を完全に置換したサイブリッド細胞を用いた先行研究から、正常細胞のがん化における mtDNA 突然変異の関与を否定した。更にマウス肺がん細胞を用いた先行研究により mtDNA 突然変異ががん細胞の転移能を誘導することを示した。この転移能獲得メカニズムの詳細な過程は、mtDNA 突然変異による呼吸酵素複合体 I の呼吸活性低下が ROS の産生量を増加させ、ROS が核 DNA にコードされている転移関連遺伝子の発現量を変化させ、転移能を獲得するというものである。この先行研究によって、がん細胞の悪性化における mtDNA 突然変異の関与をマウスにおいて世界で初めて証明した。

ただし、先行研究はマウスがん細胞を用いた研究である。よって私は、ヒトがん細胞を用いて上記の研究を立証することを目的として卒業研究を行った。ヒトがん細胞を用いて研究することで、mtDNA 突然変異によるがん細胞の転移能獲得メカニズムが、生物種を超えて一般化できるか検

証できる。またヒトがん細胞において検証することは、臨床面での潜在的ながんの悪性化を診断することや、新たな治療法の開発へとつながる。

方法・結果

細胞質移植法を駆使し、転移能を有さないヒト胎児 (Fetal) 細胞由来の mtDNA をヒト乳がん由来の高転移性細胞株 (MDA-MB-231) に導入した細胞株 (MDAmtFt) を作製した。またテクニカルコントロールとして、MDA-MB-231 に MDA-MB-231 の mtDNA を再導入した細胞株 (MDAmtMDA) も作製した。

これら二つの細胞株を実験材料として、まず *in vivo* における転移能の評価を行った。ヌードマウスの尾静脈に各サイブリッドを打ち込み、一定期間の後に肺を摘出し転移結節数をカウントした結果、MDAmtFt は MDAmtMDA に比べて転移能が抑制されていることが確認できた。つまり、核のバックグラウンドが一般的なサイブリッド間において、転移能が mtDNA によって制御されているということヒトがん細胞で初めて立証できた。更に、転移制御機構を明確にすべく *in vitro* において両サイブリッドの解析を行った。MDA-MB-231 の mtDNA は呼吸酵素複合体 I のサブユニットをコードする遺伝子領域にアミノ酸置換を伴う病原性突然変異を有している。よって呼吸酵素複合体 I の活性を測定したところ、MDAmtFt は MDAmtMDA に比べて有意に回復していた。先行研究では、呼吸酵素複合体 I の活性低下で生じる電子漏出によって産出される ROS が、転移関連遺伝子の発現を変化させていたため、今回の実験でもさまざまな種類の ROS の産生量を測定した結果、両サイブリッド間で予想に反して差異は認められなかった。

以上の結果から、mtDNA 突然変異ががん細胞の転移能を制御していることをヒトがん細胞で初めて立証した。また先行研究と同様な ROS に起因するようなカスケードではなく、ヒトがん細胞では他の因子が転移能獲得に関与している、という新しい可能性を示すこともできた。つまり mtDNA 突然変異ががん細胞の転移能獲得を誘導するカスケードは、生物種やがんの種類によって異なるという可能性を示唆している。今後は、これらの結果を元に、新しい転移制御因子の解析をすることでカスケードを明確にし、また他のヒトがん細胞を用いて同様に解析を行うことで、mtDNA 突然変異と悪性化の関係を一般化していきたいと考えている。

新たなミトコンドリア遺伝子疾患モデルマウスの作製

木場 隆介 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 林 純一 (生命環境科学研究科)

背景・目的

ミトコンドリアは、ほぼすべての真核生物にみられる細胞内小器官で、酸化的リン酸化によって生体エネルギーとして利用できるATPを合成する。その内部には、ミトコンドリア独自のゲノムであるmtDNA (mitochondrial DNA: ミトコンドリアDNA) が一細胞当たり数千コピー存在し、ATP合成に働く呼吸酵素複合体のサブユニット、及びその翻訳に必要なtRNAとrRNAをコードしている。mtDNAに特定の欠失突然変異や点突然変異などが起こり、この変異型mtDNAが細胞内に一定以上の割合で蓄積すると、ミトコンドリアの呼吸機能が低下し、脳筋症や高乳酸血症などの症状を呈するミトコンドリア病を発症することが知られている。しかし、このミトコンドリア病の発症機構や治療法に関しては、未だ不明な点が多い。そのため、mtDNAの突然変異が原因で病態を示す疾患モデルマウスを作製し、解析することが必要である。

所属研究室では、すでに、mtDNAに大規模欠失突然変異を有するmito-mice Δ や、mtDNAの構造遺伝子領域に点突然変異を有するmito-mice COIなど、いくつかの疾患モデルマウスが作製されている。しかし、ミトコンドリア病は、mtDNAの変異部位によって、呼吸機能低下という共通の過程を経ながらも異なる病状を呈するため、様々な変異に起因する疾患モデルマウスが必要となる。

所属研究室の先行研究によって、マウス肺がん細胞のmtDNAの塩基配列解析から、病原性を有する可能性のある新たな点突然変異がみつかった。それは、ミトコンドリア脳筋症の病原性突然変異として、ヒトでの報告例がある変異に相当するものだった。さらに、この変異部位はヒト、マウスといった哺乳類や、両生類、魚類など、多くの種で保存されていることがわかった。

そこで、この点突然変異を有する新たなミトコンドリア遺伝子疾患モデルマウスを作製し、解析することを本研究の目的とした。

方法・結果

・目的の点突然変異型 mtDNA の細胞内濃縮

目的の点突然変異型 mtDNA を有するマウスを作製するためには、まず、この変異型 mtDNA を高い割合で有するマウス培養細胞を得る必要がある。なぜなら、mtDNA は一細胞当たり数千コピー存在しているため、変異型 mtDNA が低率の場合、野生型 mtDNA の遺伝子産物によって、変異型 mtDNA によるミトコンドリアの呼吸機能低下が補われるからである。したがって、目的の点突然変異型 mtDNA を高い割合で蓄積させることで、この変異を高率に有するマウス培養細胞を得ることにした。

そこで、この点突然変異がみつかったマウス肺がん細胞のクローニングを繰り返し行なうことにより、細胞分裂の際の mtDNA の無作為分配 (random segregation) を通して、変異型 mtDNA が高い割合で分配されたクローンを得た。結果として、クローニングを6回行なって196クローンが得られ、その中から目的の点突然変異型 mtDNA をそれぞれ52%、67%、92%の割合で有する3つの細胞株を選択した。

・目的の点突然変異型 mtDNA を高率に有する細胞の病原性解析

マウス肺がん細胞のクローニングによって得られた3つの細胞株 (変異率52%、67%、92%) を用いて、目的の点突然変異の病原性解析を行なった。

まず、ミトコンドリアの呼吸機能を調べるために、電子伝達系内で機能するCOX (cytochrome c oxidase: 呼吸酵素複合体IV) の活性の細胞化学的解析、及び生化学的解析を行なった。その結果、変異率52%、及び67%の細胞は、それぞれ親株のマウス肺がん細胞と同程度の正常なCOXの活性を示したが、変異率92%の細胞では低下しており、ミトコンドリアの呼吸機能が低下していることが示唆された。

次に、目的の点突然変異が細胞の増殖能に及ぼす影響を解析した。ここでは、定期的に細胞数を計測することにより、その増殖能を調べた。その結果、変異率52%、及び67%の細胞に比べ、変異率92%の細胞では増殖能が低下していた。

さらに、好気呼吸の副産物であるROS (Reactive Oxygen Species: 活性酸素種) の産生量を測定した。ROSはタンパク質や脂質、核酸などと反応し、酸化障害を引き起こす有害物質として知られている。この解析結果から、変異率92%の細胞のみで、親株のマウス肺がん細胞に比べてROSの産生量の増大がみられた。

考察・展望

目的の点突然変異型 mtDNA を92%の割合で有する細胞では、ミトコンドリア呼吸機能、及び増殖能の低下、ROS産生量の増大がみられたことから、着目した変異が高率に蓄積した場合、病原性を有する可能性が示唆された。したがって、この点突然変異を高率に蓄積したマウスが作製できれば、そのマウスは病態を示す可能性が高いと考えられる。そこで、今後は、着目した変異が高率に蓄積した細胞の細胞質をマウスES細胞に移植して、目的の点突然変異を有するES細胞を樹立し、このES細胞由来の疾患モデルマウスを作製する予定である。

そして、作製した新たなミトコンドリア遺伝子疾患モデルマウスの解析から、mtDNAの変異部位と病状との関係性、及び、ミトコンドリア病の発症機構や有効な治療法の考察をしていきたいと考えている。

癌細胞上の細胞膜分子の発現解析

浅井 庸子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中田 和人 (生命環境科学研究科)

背景

CD155 は、ポリオウイルスレセプターとして同定された分子量 80-90kDa の単鎖膜貫通型糖タンパクである。細胞外領域に 3 つの免疫グロブリン様ドメインを有し、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。CD155 は骨髄細胞、内皮細胞、上皮細胞、神経細胞などに発現している。CD155 の生理機能は長い間不明であったが、最近、CD155 が、リンパ球に発現する CD226 のリガンドであることが明らかになった。さらに、CD155 が白血病、大腸癌、脳腫瘍、子宮癌、乳癌などの癌細胞に高発現することも報告された。

以上より、CD155 が癌免疫応答に重要な役割を担っていることが示唆されるが、実際の癌組織における CD155 の発現量と癌の病態や予後との関連については、いまだ詳細な解析がなされていない。

目的

CD155 の発現量と病態や予後との関連を明らかにするためには、組織標本を用いて、過去に遡って多数の症例の癌細胞上の CD155 の発現と病態を解析する必要がある。

一般に患者の手術摘出標本はホルマリン固定されて保存されており、ホルマリン固定組織標本上の CD155 を特異的な抗体で免疫染色することが有用である。しかし、ホルマリン固定により抗原性に変化を生じるため、ホルマリン固定標本の CD155 を免疫染色することができる既存の抗 CD155 抗体は現時点で存在しない。

本研究では、CD155 の発現量と病態や予後との関連を明らかにすることを目的に、ホルマリン固定細胞上 CD155 を認識する抗体の作製を試みた。

方法

1. 抗 CD155 抗体産生ハイブリドーマの作製

10% 中性緩衝ホルマリンで 2 時間固定した CD155 発現細胞株 (CD155/BW) を CFA と共にマウスの両 footpad に免疫した。その一週間後に CD155 の Fab 領域とヒト IgG1Fc 領域とを融合させたキメラタンパク (CD155 Fc) を CFA と共に追加免疫した。追加免疫から 3 日後にこのマウスの膝窩リンパ節からリンパ球を採取し、ミエローマ細胞 (SP2/0) と融合させ、HAT 選択培地にて培養した。2 週間後より肉眼で観察されるコロニーを採取した。

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 法とフローサイトメトリー法 (FACS) を用いてスクリーニングを行い、抗 CD155 抗体産生ハイブリドーマを同定した。抗 CD155 抗体のアイソタイプの決定には FACS を用いた。

2. 抗体の精製

抗 CD155 抗体産生ハイブリドーマをヌードマウスに腹腔内注入し、1 週間後腹水を回収した。カプリル酸を用いた塩析による抗体精製を行った。

3. ホルマリン固定標本の染色

CD155 発現細胞株 (CD155/BW) と、CD155 非発現細胞株 (BW) を Rag1 遺伝子欠損マウスの背部に皮下

注射して形成した腫瘍をホルマリン固定し、標本作製した。一次抗体として上記で精製した抗体を用い、二次抗体に抗マウス IgG Alexa488 を用いて蛍光免疫染色を行った。

結果

1. 抗 CD155 抗体産生ハイブリドーマの作製

HAT 選択培地上で B 細胞とミエローマ細胞が融合してできた 32 個のハイブリドーマクローンを得た。さらに 32 クローン中から、CD155 を認識するハイブリドーマ 1 クローンを得て、これを TX89 と命名した。TX89 のアイソタイプは IgG2b であった。

2. 抗体の精製

TX89 を接種したヌードマウス 1 匹から 2.4 ml の腹水を回収し、515 μ g の精製抗体を得た。

3. ホルマリン固定標本の染色

TX89 は、ホルマリン固定標本の CD155 を検出できなかった。

考察

マウス 1 匹から得られたコロニーは 32 クローンと少なかった。これは細胞融合時に用いたミエローマ細胞の培養に習熟しておらず、細胞の増殖率が悪かったことが一因であると考えられた。

ホルマリン固定組織上の CD155 を検出する抗体を得ることができなかった原因として、追加免疫で用いた CD155Fc タンパクがホルマリン未固定であったことが考えられる。追加免疫では、ホルマリン固定でマスクされる部位をエピトープとする B 細胞を増幅した可能性がある。この点を改善して、次の実験では、初回免疫のみならず、追加免疫にもホルマリン固定を施した CD155 を抗原として用いる予定である。

今後、ホルマリン固定標本上の CD155 を染色できる抗 CD155 抗体を得ることができれば、癌組織の CD155 の発現量と癌の病態や予後との関連を解析するための有用なツールとなることが期待される。

Orexin activates orexin neurons via the OX2R

田淵 紗和子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中田 和人 (生命環境科学研究科)

Introduction

Orexin is a neuropeptide which is produced in the few number of neurons located in the lateral hypothalamic area (orexin neurons). Orexin is a natural ligand for two types of G-protein coupled receptors termed orexin receptor 1 (OX1R) and orexin receptor 2 (OX2R). Orexin or OX2R null animals showed a fragmentation of sleep/wakefulness and cataplexy-like behavioral arrest. These are similar to symptoms observed in “narcolepsy”, a human sleep disorder. Specific loss of orexin neurons in narcoleptic human brain is reported. These studies suggest that orexin and OX2R have an important role in the maintenance of arousal. However, it is still unknown that in which neurons expressing OX2R are involved. In this study, I found that orexin activates orexin neurons by slice patch clamp using transgenic mice express enhanced green fluorescent protein (OX/EGFP mice) in the orexin neurons.

Materials and Methods

Animals and slice preparation

Male and female OX/EGFP mice express EGFP in the orexin neurons, 2-3 weeks, were used for slice patch clamp. To identify the receptor subtype, OX/EGFP; OX1R^{-/-} mice and OX/EGFP; OX2R^{-/-} mice were subjected to slice patch clamp. The mice were anesthetized and decapitated. The brains were rapidly isolated and sliced in 350 μ M in chilled sucrose base cutting solution using vibratome. Slices were incubated in bath solution at room temperature for 1 hour.

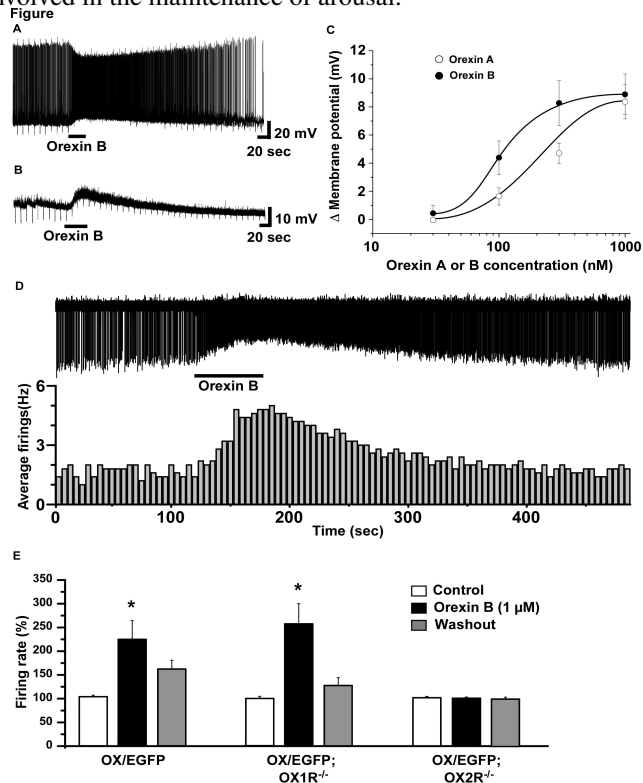
Slice patch clamp

In each experiment, same composition of bath solution was used. Orexin A or B was applied near the recording neuron through the local application glass tube. Membrane potential was recorded by whole cell current clamp with K-gluconate base pipette solution. EPSC was recorded by whole cell voltage clamp (holding at -60 mV) in the presence of PTX (400 μ M) in the bath solution. QX314 was added in the pipette solution. Firing frequency was recorded by loose cell attached mode (seal with 1G Ω).

Results and Discussion

Local application of orexin A or B induced depolarization and increase in firing in the orexin neurons (Figure A). This response was observed in the presence of TTX (1 μ M) suggested that orexin neurons were directly activated by orexin (Figure B). In addition, orexin A and B induced equal level of depolarization suggested that this response is mediated via the OX2R (Figure C). To identify the receptor subtype, orexin receptor null mice were used. Although OX/EGFP; OX1R^{-/-} mice showed equal level of depolarization to OX/EGFP mice, OX/EGFP; OX2R^{-/-} mice did not show any significant depolarization by orexin application. These results suggest that OX2R is expressing in the orexin neurons and orexin activates orexin neurons via the OX2R. Next, indirect effects via glutamatergic neurons were studied. EPSC frequency was increased by orexin in OX/EGFP mice and OX/EGFP; OX1R^{-/-}

mice but not in OX/EGFP; OX2R^{-/-} mice. Loose cell attached recordings from orexin neurons revealed that spontaneous firing was increased by orexin in OX/EGFP mice (Figure E) and OX/EGFP; OX1R^{-/-} mice, but not in OX/EGFP; OX2R^{-/-} mice (Figure D). Immuno-electron microscopy revealed direct connection between the orexin neurons. In conclusion, orexin activates orexin neurons directly and indirectly via the OX2R. This positive circuitry between the orexin neurons might be involved in the maintenance of arousal.



ミトコンドリア呼吸機能が骨格筋繊維の機能分化に与える影響の解析

三藤 崇行 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中田 和人 (生命環境科学研究科)

背景・目的

多細胞生物を構成する細胞は多様に分化しており、それぞれの細胞の機能によって最適なエネルギーの供給方法は異なる。例えば、持続的にエネルギーを消費し続ける細胞では、持続的で効率の良いエネルギーの供給が必要である。一方で、一時的に素早いエネルギーの供給を受ける必要のある細胞もある。このような細胞の機能発揮に最適化されたエネルギー供給は主にミトコンドリアの呼吸機能を調節することで実現されており、その典型例を骨格筋繊維の機能分化にみることができる。

骨格筋は多数の骨格筋繊維から成り、骨格筋繊維はその機能の違いによってタイプ I 繊維とタイプ II 繊維の二種類に大別される。骨格筋によってそれぞれのタイプの繊維が占める割合は異なり、これが各骨格筋の機能的特徴を決定する。タイプ I 繊維は遅筋繊維とも呼ばれるもので、収縮速度は遅いが持久性が高いという機能的特徴をもつ。一方、タイプ II 繊維は速筋繊維とも呼ばれ、収縮速度は速いが持久性が低いという特徴をもつ。これらの機能の違いに合わせて、それぞれのエネルギー供給方法は最適化されている。持続的なエネルギー供給を必要とするタイプ I 繊維では、酸化リン酸化によって効率良く持続的なエネルギー供給が可能なミトコンドリアへの依存が高い。一方、素早いエネルギー供給を必要とするタイプ II 繊維では、効率は悪いが素早くエネルギーを供給出来る解糖系への依存が高い。

このようなエネルギー供給方法の最適化は、主にカルシウムイオンを起点とした非常に巧妙な分子機構によって実現される。骨格筋繊維タイプは環境に応じて相互に変換し得る(変換途中のものをタイプ I/II 繊維と呼ぶ)が、例えば持続的運動に適応したタイプ II 繊維からタイプ I 繊維への変換の際には、細胞内カルシウムイオン濃度が高い状態で維持されることにより、タイプ I 繊維特異的タンパク質の発現とミトコンドリアの増殖が同時に活性化される。

このように、細胞がそれぞれの機能に合わせて常にミトコンドリアの呼吸機能を調節することで、エネルギー供給方法の最適化を行っていることは良く知られている。しかし一方で、ミトコンドリア呼吸機能が細胞の機能分化に与える影響についてはあまり知られていない。そこで本研究では、ミトコンドリア呼吸機能が骨格筋繊維の機能分化に与える影響を明らかにすることを目的とした。

材料

ミトコンドリア呼吸機能が骨格筋繊維の機能分化に与える影響を解析するために、ミトコンドリア呼吸機能低下を呈するマウスである Mito-mouse Δ を用いた。このマウスのミトコンドリアは、野生型 (WT) mtDNA と大規模欠失突然変異型 mtDNA (Δ mtDNA) をヘテロプラズミーの状態で作る。 Δ mtDNA は WT mtDNA に比べ分子量が小さく複製が速いために、時間を経るに従ってその割合は徐々に高くなっていく。 Δ mtDNA の割合が 80% 以下であればミトコンドリアは正常な呼吸機能を維持出来るが、80% を超えると呼吸機能が低下する。そのため、このマウスのミトコンドリア呼吸機能は出生後しばらくのあいだ正常であるが、その後徐々に低下する。本研究ではこの Mito-mouse Δ と WT マウスのヒラメ筋の凍結切片を作製し、その染色像を比較することでミトコンドリア呼吸機能の低下が骨格筋繊維の

機能分化に与える影響を解析した。

方法・結果

まず Mito-mouse Δ のヒラメ筋でミトコンドリア呼吸機能が低下していることを確認するために、ミトコンドリア呼吸機能の指標である COX (cytochrome c oxidase) 染色を行った。Mito-mouse Δ では WT に比べて全体に染色性が低下しており、ミトコンドリア呼吸機能が低下していることが確認出来た。

次に骨格筋繊維の機能分化への影響を解析するために、骨格筋繊維タイプの判定を行なった。各骨格筋繊維タイプの機能の違いは主に、発現しているミオシン重鎖 (MyHC) のアイソフォームの違いによって決定され、タイプ I 繊維、タイプ II 繊維ではそれぞれ MyHC I、MyHC II が特異的に発現している。それぞれのアイソフォームに特異的な抗体を用いた免疫染色の結果、Mito-mouse Δ ではタイプ II 繊維の割合が有意に減少し、骨格筋繊維タイプの変換の途中にあるタイプ I/II 繊維の割合が有意に増加していた。また骨格筋繊維タイプ判定の古典的方法である mATPase 染色によっても同様の結果が得られた。

考察

以上の結果から、ミトコンドリア呼吸機能が低下するとタイプ II 繊維がタイプ I/II 繊維に変化することが示された。また、個体によってはタイプ I 繊維の割合が増加していたことから、このタイプ I/II 繊維はタイプ II 繊維からタイプ I 繊維への変換の途中にあるものと考えられる。

ミトコンドリア呼吸機能が低下すると、それを補うように解糖系が亢進することが知られている。Mito-mouse Δ のヒラメ筋においてもミトコンドリア呼吸機能が低下し、解糖系への依存が高まっていると考えられる。すなわちエネルギーの供給方法はタイプ I 繊維には適さず、タイプ II 繊維に適したものになっていると言える。それにも関わらず、本研究で示唆されたようにタイプ II 繊維がタイプ I 繊維に変換することは、骨格筋繊維の機能とエネルギー供給方法のミスマッチを生む非適応的な変化である。ミトコンドリア呼吸機能低下に起因する疾患であるミトコンドリア病の患者さんの一部でもタイプ I 繊維の割合が増加するという報告があり、ミトコンドリア病の症状の一つである易疲労性は、今回見られたような骨格筋繊維の機能とエネルギー供給方法のミスマッチが一因となっている可能性がある。

展望

今回ミトコンドリア呼吸機能の低下が骨格筋繊維の機能分化に与える影響を明らかにすることが出来たが、その分子機構は未だ明らかでない。そこで今後は、ミトコンドリア呼吸機能が骨格筋繊維の機能分化に影響を与える分子機構を明らかにしていきたいと考えている。

Botryococcus braunii BOT 88-2 株の成長とオイル生産へのグルコースの影響

中西 洋介 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中山 剛 (生命環境科学研究科)

背景・目的

近年、石油をはじめとした化石燃料の枯渇が危ぶまれている。そこで、再生可能なエネルギー資源として、バイオマス燃料が注目されている。*Botryococcus braunii* はオイルを多く生産・蓄積する微細藻類であり、このオイルをバイオマス燃料として利用する事が可能である。しかし増殖が遅く、現在石油と張り合えるほど経済的ではない。よって、生産効率を上昇させるために増殖・オイル生産に最適な培養条件を検討する必要がある。先行研究によると、CO₂、グルコース、酢酸塩等の炭素源の添加によって増殖速度が上がる事がわかっている。特に、国内の湖沼から得られた *B. braunii* の培養株 BOT 88-2 は 45% 前後と高い含有率でオイルを生産・蓄積するが、グルコースの無い培地では増殖が遅い。そこで、本研究では *B. braunii* BOT 88-2 株の培養に最適なグルコース濃度を検討し、グルコースが成長とオイル生産量及びオイル成分に及ぼす影響を調べる事を目的として実験を行った。

材料・方法

B. braunii の BOT 88-2 株を用いた。AF-6 培地にそれぞれ 0, 1, 5, 10, 15, 20 mM となるようグルコースを加え、0 mM をコントロールとした。温度 25 度, 120 μ E/m²·sec, 12h 明:12h 暗の条件下で通気培養を行った。培養 47 日目で藻体を回収して乾燥し、クロロホルム:メタノール (2:1) で総脂質を抽出した。抽出物をシリカゲルクロマトグラフィーによって分画して、各フラクションをそれぞれ GC (ガスクロマトグラフィー)、GC/MS (質量分析計) を用いて分析した。

結果

グルコースを加えた全ての培地で、コントロールより増殖量が増えた。培養開始後 35 日目に於いては、最も増殖が良かったのが 20 mM のグルコースを加えた培地で、次いで 15 mM、10 mM とグルコースの濃度が高いほど良く増えた。ただし、10 mM、15 mM では 35 日目を以降にバクテリアがコンタミした。他ではバクテリアのコンタミは無く、47 日目に於いてもグルコース濃度の高い方が良好な増殖を示した。炭化水素の含有率はグルコースを添加しても高くなかったが、総脂質・トリグリセリドの含有率は共にグルコースの濃度に比例して高くなった。GC 及び GC/MS による分析の結果、リテンションタイムとの比較から、各濃度間で炭化水素と脂肪酸それぞれの組成には大きな違いは見られなかった。

考察

今回用いた全ての濃度のグルコースで増殖が促進される事が示唆された。炭化水素含有率はグルコースの添加によって高くなかったことから、グルコースは炭化水素生産を促進させない事が示唆された。しかし、バイオマスが大きくなった事で、培地単位体積あたりの炭化水素生産量は 5mM 以上のグルコース濃度で大きくなった。*B. braunii* は産生する炭化水素の特性により、脂肪酸から直鎖型炭化水素を産生する Race A、トリテルペノイドを産生する Race B、炭素数が 40 のリコパディエンを産生する Race L にわけられ

ている。今回対象とした培養株 BOT 88-2 は Race A に属している。今回の結果から、Race A ではオレイン酸から鎖延長、脱炭酸を経て直鎖型炭化水素が合成される系の他に、脂肪酸をグリセリンとのトリエステル、トリグリセリドとして蓄積する系がある事が示唆された。グルコースの添加によりトリグリセリドの含有率が増えた事で、単糖類を利用して脂質を合成する場合にはトリグリセリド合成系が卓越していくものと推測される。また、GC、GC/MS の分析結果からグルコースの存在は炭化水素と脂肪酸の成分に影響を及ぼさない事が示唆された。

Botryococcus B レースにおける炭化水素合成経路の探求

石松 純 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渡邊 信 (生命環境科学研究科)

背景・目的

近年、人間活動における化石燃料の大量使用が、CO₂ 排出による地球温暖化とエネルギー資源の枯渇という二重の問題を引き起こしている。光合成生物のバイオ燃料としての使用は、これらの問題に対する有効な解決方の一つである。微細藻類のバイオ燃料としての利用は、その栄養体のすべてが光合成を行うため、陸上植物に比べて高い効率で物質生産が可能である点で有望である。

淡水産緑藻の *Botryococcus braunii* は優れた炭化水素合成・貯留能力から、実用化が期待できる藻類の1つであり、合成する炭化水素の種類によって、A/B/L の3つのレースに分類される。B レースはトリテルペノイドを合成するが、合成経路については未知の部分が残し、人為的な合成の促進のためにも、その全貌を明らかにすることが求められている。

本実験では、B レースのトリテルペノイド合成の前半部、IPP (イソペンテニル 2 燐酸) の合成系に着目した。IPP 合成経路は古典的な MVA 経路、光合成生物に存在する非 MVA 経路の2経路が既知である。B レースのトリテルペノイドの生産にどちらの経路が使われているかを調べた。

方法

1. 培養方法

[1-¹³C] Glucose を炭素源としてフィードし、脱 CO₂ Air 通気攪拌 光条件による培養下で *B. braunii* B レースの炭化水素へ移行させた。培養期間は 30 日とした。

2. 炭化水素の抽出と精製

クロロホルム・メタノール (2:1) を溶媒として用い、超音波破碎によって炭化水素を抽出。シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い極性炭化水素と無極性炭化水素、次いで色素とトリテルペノイドを抽出した。

3. NMR によるラベルの測定

¹H および ¹³C について NMR 分光法を用いて炭化水素の構造を決定、各シグナルを帰属、またその強度の違いによりラベルされた炭素の位置を決定した。

結果・考察

NMR 分光法のデータを帰属した結果。トリテルペノイド内の6つのIPPユニットは、すべて1及び4位の炭素原子が、他の位置の5~10倍のシグナル強度を示し、¹³C によってラベルされていることを示した。これは非 MVA 経路を通じて IPP が合成された場合に予測されるラベルパターンと一致し、MVA 経路によって合成された場合のラベルパターン (2, 4, 5 位) と大きく異なっている。

このことから、*B. braunii* B レースのトリテルペノイドの生産において、その中間体 IPP は全て非 MVA 経路によって合成されており、MVA 経路は一切関与しないことが示された。このことは、先行研究の実験データと一致している。

また、メチル基が付加されてできると考えられている分枝炭素にも、同様に ¹³C によるラベルが観察された。これは 30 日と培養時間が長かったため、1-¹³C Glucose が代謝されて C1 プールに移行し、メチル基転移に参加したためと考えられるが、確認のために改めて実験を検討している。

今後の展望

¹³C ラベルされたさまざまな物質を用いることで、*B. braunii* B レースにおける炭化水素合成後半部及び多糖合成経路について知見を得る。

奥日光湯ノ湖に優占する沈水植物の分布

澤田 洋平 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渡邊 信 (生命環境科学研究科)

背景

奥日光の湯ノ湖は、40年ほど前までは、多様な沈水植物が茂る、多様性の豊かな湖だった。特に、現在絶滅危惧種とされている二種のシャジクモ類 (カタシャジクモ *Chara globularis* var. *globularis* とヒメフラスコモ *Nitella flexilis* var. *flexilis*) は、湖の広い範囲で見ることができた。しかし、外来種のコカナダモ (*Elodea nuttallii*) が持ち込まれ、一時は湖中がコカナダモばかりという状況になった。現在は、コカナダモの量を抑えるため、定期的にコカナダモの刈り取りが行われている。昨年度の調査の結果、カタシャジクモとヒメフラスコモは、湯ノ湖の多くの場所で復活し、コカナダモと共に、湯ノ湖で最も多く見られる種になっていたことが分かった。さらに、この三種は深度により分布域が大まかに分かれており、浅い場所にはカタシャジクモ、比較的深い場所にはコカナダモとヒメフラスコモが生えることが分かった。今回、刈り取りが継続されていることにより、優占種3種の分布が維持されているのかどうか、また、3種それぞれの光合成速度を測り、光合成の特性が3種の垂直分布に影響しているのかどうかを調べた。

方法

4月から10月まで、一カ月ごとに湯ノ湖で沈水植物を採集し、光量子密度を測定した。7月と9月には、潜水調査で、目視による分布の観察をした。深度による光環境の違いが生育に与える影響を調べるため、採集したカタシャジクモ、ヒメフラスコモ、コカナダモを用い、それぞれの光合成速度を計測した。

結果および考察

潜水による観察の結果、St.4の根の先端でヒメフラスコモが消滅してコカナダモとフサモに置き換わったこと、St.7の広い範囲でヒメフラスコモが見られたこと等、昨年と沈水植物の分布が異なる場所があり、分布が年ごとに变化する可能性が示された。また、9月にSt.5の水深1–2mでヒメフラスコモの大きな群落が出現するなど、同じ年の7月と9月でも分布が異なる場所があった。

水生植物の垂直分布の観察結果では、コカナダモとヒメフラスコモが広い範囲の水深で見られたのに対し、カタシャジクモの出現は4m以浅に限られていた。

光合成速度から光合成曲線を求めて、最大光合成速度、呼吸速度、光合成曲線の傾き、光阻害定数をもとめた結果、比較的浅い場所に分布するカタシャジクモは陽性、深場まで分布するヒメフラスコモは陰性植物の傾向がみられたが、統計的に有意な差はみられなかった。したがって、今回の実験からは、光環境の違いが分布要因だという、はっきりした証拠は見つからなかった。

本研究から、沈水植物の分布が動的だということが明らかとなり、継続した調査の重要性が示唆された。調査方法などもまだ改良の余地があるので、工夫を重ねつつ、調査を続けていきたい。

湯の湖におけるヒメフラスコモの分布と埋土卵胞子の動態

塚田 早紀 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渡邊 信 (生命環境科学研究科)

背景・目的

元来、日本の湖沼には様々な動植物が住み着き、その生物多様性により生態系は健全な状態に保たれていた。特に湖沼の生態系を透明度が高く、生物多様性を高い状態(多種多様な生物が生育・生息)に保つために重要であるのが淡水域(主に湖沼や水田)に生息する藻類・シャジクモ類である。しかし、近年人間による環境破壊が進み、シャジクモ類の多くが絶滅の危機に瀕している。

そこで我々は、昨年度から栃木県日光市にある湯ノ湖をモデルエリアとし、シャジクモ類の保全を目的とした研究を開始した。湯ノ湖にはヒメフラスコモ (*Nitella flexilis* var. *flexilis*) とカタシャジクモ (*Chara globularis* var. *globularis*) という2種のシャジクモ類が生息していることから、今回は、湖底の深度3 m以深の比較的深いところに分布するヒメフラスコモに焦点を当て研究を行った。ヒメフラスコモ群落の動態について、年度や地点間によってヒメフラスコモ群落に違いはあるのか、ヒメフラスコモの現場での生活史はどのようになっているのか、という点を明らかにすることが本研究の目的である。

結果・考察

1. フィールドでのヒメフラスコモの観察

ボートから採集器(いかり)を投げ、藻体を採集し、観察を行った。その結果、先行研究(島田, 2009)と比較し、ヒメフラスコモの季節的变化は年度による差は特にないことが分かった。4月末に前年からの栄養体に多くの無性芽が出芽し、5~6月に伸長して、6月末から生殖器官が形成された。2008年度と同様に無性芽形成より2ヶ月で生殖器官ができることが確認された。4月~10月すべてでヒメフラスコモが確認できたこと、湯ノ湖の結氷が12月末~4月中旬までおこっていること、4月のヒメフラスコモの葉体が黒ずんでいたことから、ヒメフラスコモは湖内で越冬していると考えられる。また、2008年度とちがって、9月と10月に湖内の浅い場所でヒメフラスコモが観察されたため、分布は年度によって違うということが示唆された。湖内のヒメフラスコモの出現時期、成長、生殖器官形成についての地点間の差は見られなかった。

2. 埋土卵胞子の計測

湖底から採集してきた泥および砂を顕微鏡下で観察し、卵胞子数を数え、泥および砂の乾燥重量あたりの卵胞子数を算出した。その結果、湖内の浅い場所(砂)でも深い場所(泥)でもヒメフラスコモの卵胞子は一年を通して見つかった。どの時期も採集されたヒメフラスコモは前年からの越冬個体、無性芽より成長した個体がほとんどであり、卵胞子より発芽したと判断される短い個体は9、10月の浅い場所の群落にのみ多く確認された。以上の結果より、湯ノ湖における深い場所に生育しているヒメフラスコモ群落形成に卵胞子はあまり関与していないことが示唆された。

湯ノ湖におけるカタシャジクモの生態に関する研究

小暮 はるか (筑波大学 生物学類)

指導教員: 石田 健一郎 (生命環境科学研究科)

背景・目的

現在シャジクモ類の多くが絶滅の危機に瀕している。この原因としては、富栄養化、護岸工事、水質汚濁、移入種などが挙げられる。シャジクモ帯は、懸濁物質の底泥堆積を促進し再懸濁を抑制する、水生動物の棲家となる、植物プランクトンの増殖を抑制する、という働きから、湖沼の透明度を高め、生物多様性を高めるために重要だと言われている。

栃木県日光市の湯ノ湖には、カタシャジクモ (*Chara globularis* var. *globularis*) とヒメフラスコモ (*Nitella flexilis* var. *flexilis*) の2種が生息していた (Kasaki, 1964) が、1973年頃から要注意外来生物のコカナダモ (*Elodea nuttallii*) が人の手によって持ち込まれ、湖全体に繁茂した。これにより湯ノ湖の環境資源としての価値が低下しただけでなく、シャジクモ類などの在来沈水植物の分布域が減少した。2001年から県や市によるコカナダモ刈り取りが行われている。このように、湯ノ湖においてシャジクモ類の保全は、生物多様性の観点だけでなく、環境価値の回復の観点からも早急に取り組むべき課題である。本研究では、シャジクモ類の保全へ向けて、湯ノ湖におけるシャジクモ類の実態を把握するために、『湯ノ湖におけるカタシャジクモの生殖器官形成の要因と、個体群形成・維持の方法を解明すること』を目的とした。個体群形成・維持の方法については、主に胞子の発芽に基づくものか、もしくは栄養体の存続、繁殖によるものかを、地点・深度毎に調べ、考察した。

方法

4月から10月の計7回、湯ノ湖で採集を行った。特徴的な動態が見られた St.1 と St.5 の2地点の、それぞれ浅い場所 (0.5 m 以浅で夏以降藻体が形成された場所) と深い場所 (1m 以深で4月から藻体が見られた場所) に分けて調査した。採集した藻体は毎月、栄養繁殖の季節変化を追うために無性芽数を計測、有性生殖の季節変化を追うために造精器と未受精生卵器・受精済み生卵器の数を計測した。また底質を採集し、そこに含まれる卵胞子数を計測した。見た目は壊れていなくても中身が空になっている胞子を発芽したものと仮定し、殻が見られた時期には既に発芽が起こっていたと考えた。得られた季節変化のデータから各地点における生態と、環境状態との関連を考察した。

結果・考察

浅い場所

St.1 では、昨年秋までは藻体が見られたにも拘らず4、5月には藻体が見られなかったことから、冬期に消滅したと考えられる。6月頃から藻体が生え始め、徐々に繁茂していた。発芽 (底質中の卵胞子からの推測による) は5月には始まり、2か月後の7月に生殖器官形成が始まった。St.5 においても、昨年秋までは見られた藻体が夏まで見られなかったもので、冬期に消滅したと考えられる。7月頃から藻体が見られ、徐々に繁茂していった。発芽 (底質中の卵胞子からの推測による) は7月に始まり、生殖器官形成は9月に始まった。造精器や生卵器の数は St.1 と比べて著しく少なかった。以上から推測される浅い場所でのカタシャジクモのラ

イフサイクルは、『春以降卵胞子が発芽し、約2か月の成長期間を経て生殖器官形成をする。受精し、卵胞子が底質に落ち、休眠に入る。藻体は冬期に消滅し、春以降に卵胞子から発芽し個体群を形成する』という単年サイクルの繰り返しであると考えられる。このため浅い場所では卵胞子が個体群形成に重要な役割を果たしていると示唆された。本来多年生であるカタシャジクモが単年で生息を余儀なくされる原因として、水温低下、氷が張るため成長できないことなどが考えられる。

深い場所

St.1、St.5 とともに調査をした4月から10月まで群落が形成されていた。St.1 では6月、7月に無性芽の出芽が見られ、9月に発芽 (底質中の卵胞子からの推測による) と生殖器官形成が見られた。St.5 では5月から7月にかけて無性芽の出芽が見られ、7月に生殖器官形成が見られた。6月、7月以降発芽 (底質中の卵胞子からの推測による) が見られた。以上から推測される深い場所でのカタシャジクモのライフサイクルは、春から夏にかけては無性芽による栄養繁殖サイクルで、『無性芽の出芽から約2ヶ月の生長期間を経て、再び無性芽の出芽』を繰り返し、夏以降は有性生殖サイクルも加わり『無性芽の出芽から1-3か月の生長期間を経て生殖器官を形成し、受精して卵胞子は離脱し底質に落ちる。その後休眠もしくは発芽する』と推測される。

生育と環境状態

生殖器官形成は強い紫外線照射で抑制されると、報告されている (N. V. J. de Bakker et al. 2001)。St.5 は日当たりがよいが、生殖器官数は St.1 と比べて著しく少ない。このことから、湯ノ湖におけるカタシャジクモの生殖器官形成の仮説の一つとして、『強い紫外線照射が遮られることが重要である』と考えられる。一方で、今回推測したライフサイクルを見ると、発芽または無性芽の出芽から約2か月後に生殖器官形成のピークが見られた。このことからもう一つの仮説として、『生殖器官形成が起こる時期は生体リズムによる』ということが言える。湯の湖のカタシャジクモの生殖器官形成にこれの仮説のどちらか、または両方が関るのかは今後の課題である。

保全へ向けて

湯ノ湖におけるカタシャジクモの保全には、卵胞子の蓄積を妨げない環境、及び藻体を維持する環境が重要である。今後も調査を続け、実態把握を目指すとともに、湖内での動態の差を考慮しつつ保全活動を進めていく必要があると考えられる。

クロララクニオン藻 P314 株における巨大多核細胞の分裂過程の解明

工藤 敦子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 石田 健一郎 (生命環境科学研究科)

背景・目的

クロララクニオン藻とは、従属栄養性のケルコゾア生物が、緑藻を細胞内に取り込む二次共生によって葉緑体を得た単細胞藻の一群である。現在までに 7 属 12 種が記載され、多様な生活環を持つことが報告されている。栄養細胞がアメーバ状の種、球状の種、および遊泳性の種があり、生活環を構成する細胞の種類や組合せのパターンなどにも種ごとに大きな多様性が見られる。このような生活環の多様性は、近縁の従属栄養性の原生生物群に例を見ないものである。二次共生により光合成能を獲得したことが、新たな環境への進出を可能とする進化につながり、クロララクニオン藻の生活環における多様性を生み出す原動力となったと考えられる。このため、葉緑体獲得後の適応放散を考察するという観点から、その多様な生活環が注目されており、個々の種においてこれを詳しく観察し、特徴を正確に把握することがたいへん重要となる。また、生活環に見られる特徴は、クロララクニオン藻の重要な分類形質の一つでもある。本藻に関して分類学的知見を深めるためにも、生活環に関する詳細な研究が必要といえる。

P314 株は *Gymnochlorella* 属新種のクロララクニオン藻 (記載準備中) で、移動性及び不動性の 2 種類のアメーバ状細胞を栄養細胞として持ち、生活環の一部で巨大多核細胞を形成することがわかっている (大田私信)。クロララクニオン藻において多核細胞が知られているのは、本種のほかには同属の *G. stellata* (金田私信) のみである。巨大多核細胞を含む生活環は、生活環の多様性の一端としても、また属レベルでの分類形質としても、興味深いものと言える。

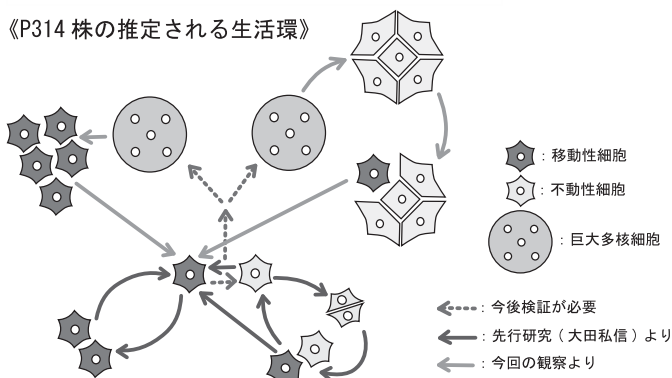
本研究では、クロララクニオン藻における生活環の多様性への理解を深め、その進化を考察すること、また分類形質として整理することを大きな目標として掲げ、P314 株の巨大多核細胞の特徴および生活環中における次ステージへの移行過程を、形態レベルで解明することを目的とした。

材料・方法

P314 株は、大田 (現山口大学) によってパラオ共和国にて 2003 年に採取され、株化されたものである。ESM 培地にて 20°C L:D = 14:10 で培養した。培養齢が進むと現れることがわかっている巨大多核細胞を効率よく得るため、植え継ぎ後 1 ヶ月以上経過したものを実験に用いた。また、培地を新しいものに交換すると分裂を始める傾向があることがわかっており、分裂過程の観察ではこの性質を利用した。

分裂過程を把握するため、巨大多核細胞を培養株中から

《P314 株の推定される生活環》



マイクロピペット法により一細胞ずつ新しい ESM 培地の入ったシャーレに単離し、倒立顕微鏡下でタイムラプスビデオ撮影を行い、各細胞の挙動を解析した。また、分裂中の各過程における核の動向を知るため、スライドガラス上に数細胞ずつ単離した巨大多核細胞を、目的のステージにおいて固定し、DAPI もしくは SYBER Green I により核 DNA の蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡あるいは共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。さらに、巨大多核細胞の微細構造を詳しく知るため、透過型電子顕微鏡観察も行った。

結果

倒立顕微鏡による観察から、古い培地中に見られる巨大多核細胞は、直径 15 – 40 μm の球形で、放射状に伸ばした複数の細い仮足でシャーレ底面に付着していることがわかった。蛍光観察の結果、核は細胞中央部に存在していた。また、核の数は今回 17 個まで確認され、必ずしも 2 の累乗とならないことがわかった。このときそれぞれの核の間に細胞膜が存在しないことが電子顕微鏡による観察からわかり、本細胞が複数細胞からなる群体ではなく、確かに多数の核を持つ単一の細胞であることが確認された。

タイムラプス撮影により、2 タイプの分裂様式が観察された。いずれにおいても、細胞中央部に集中していた多数の核が、巨大細胞全体へと均一に分散した後、細胞質分裂が起きた。一方の様式では、活発なアメーバ運動ののちに細胞質分裂が進行し、すべての娘細胞は移動性アメーバとなり数十分のうちに分散した。もう一方では、巨大多核細胞の形状はほぼ変化しないままで、サッカーボールの縫い目の様な亀裂が入り、その後、数日かけて娘細胞は一細胞ずつ巨大細胞から離れ分散した。亀裂が生じた時点で完全に細胞質分裂が完了しているのか、また、この亀裂によって核が一つずつ区切られているのか、についてはわからなかった。

考察・今後の課題

P314 株の単核細胞は、移動性アメーバと不動性アメーバの 2 つの形態をとることが知られている。2 分裂により、前者は 2 つの移動性アメーバを生じる。後者は 2 つの不動性アメーバを生じるが、やがて一方が移動性アメーバへと変化することがわかっている。今回巨大多核細胞で観察された 2 つの分裂様式および娘細胞の挙動は、単核細胞にみられる 2 つの分裂様式間の相違と同様のものである可能性がある。つまり、光学顕微鏡観察下では同一に見える多核細胞も、単核細胞と同様に、2 つのタイプ (移動性と不動性) が存在するという仮説が考えられる。この仮説が正しければ、本種は単核細胞、多核細胞それぞれに移動性・不動性の細胞分裂が存在する生活環を持つと考えることができる (図参照)。多核細胞形成過程ですでにこの 2 つの違いが決定されているのか、あるいは形成後に移行が起こっているのか、今後検証していく必要がある。

また、核の数が必ずしも 2 の累乗でないことから、多核細胞形成過程における核分裂が非同調的であることが示唆された。多核細胞の形成過程についても今後観察する必要がある。さらに、本種と *G. stellata* における巨大多核細胞を詳細に比較し、属内での多様性及び普遍性を検証することも今後の課題である。

クロララクニオン藻 *Lotharella amoebiformis* のヌクレオモルフゲノムに関する比較解析

白戸 秀 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 石田 健一郎 (生命環境科学研究科)

背景・目的

光合成真核生物には、シアノバクテリアを細胞内共生させることで葉緑体を獲得した一次植物と、一次植物を細胞内共生させ葉緑体とした二次植物がある。このような葉緑体獲得のプロセスはそれぞれ、一次共生、二次共生と呼ばれ、生物進化の過程で、一次共生は一度だけ、二次共生は複数回起こったと考えられている。クロララクニオン藻は、二次植物の一群であるが、他の多くの二次植物とは異なり、細胞内小器官として、取り込まれた一次植物の縮小した核(ヌクレオモルフ)と、一部のゲノム情報をとどめている。ヌクレオモルフは、クロララクニオン藻とクリプト藻にのみ見られ、他の二次植物では既に失われている。つまり、ヌクレオモルフは、共生の進行に伴って消失しつつある細胞核であると考えられ、二次共生の過程を明らかにするための重要な手掛かりを与えてくれる細胞小器官であると言える。

先行研究により、クロララクニオン藻の一種である *Bigelowiella natans* で、ヌクレオモルフゲノムの全配列 (373 kbp) が決定されている。このゲノムは、3本の縮小した染色体からなり、約 331 個の蛋白質、18 個の rRNA、及び 20 個の tRNA をコードしている。また、18・19・20・21 nt (ヌクレオチド) からなる、微小なイントロンが高頻度で存在することも明らかになっている。

本研究では、二次共生による葉緑体獲得において、共生藻の核ゲノム(ヌクレオモルフゲノム)がどのように進化したのかの一端を明らかにすることを目的とし、*B. natans* と系統的に離れたクロララクニオン藻の一種である *Lotharella amoebiformis* のヌクレオモルフゲノム配列を新たに取得し、*B. natans* のヌクレオモルフゲノムとの比較解析を行った。なお、*L. amoebiformis* のヌクレオモルフゲノムのサイズは約 330kbp であると推定されている。

方法

Lotharella amoebiformis Ishida et Y. Hara の培養株 (CCMP2058) を、20°C、80 – 100 $\mu\text{mol photon/m}^2\cdot\text{s}$ 、12 : 12-h L : D サイクルで培養した。細胞を2日間、暗所においた後、 8.0×10^7 cells/ml の細胞密度で試料プラグを作成し、パルスフィールド電気泳動によりヌクレオモルフ DNA を分離、エレクトロエリユージョン法により抽出、精製した。この DNA からショットガン法により 13,675 リードの配列を得た (文部科学省特定領域研究 (比較ゲノム) の支援班に委託)。配列は Sequencher (GeneCodes 社) および BLAST 検索 (NCBI <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) によりアセンブリングとアノテーションを行なった。次に、ヌクレオモルフゲノムの遺伝地図をゲノムブラウジングソフト Artemis (Wellcome trust Sanger institute) により、遺伝子の位置、サイズ、コードされている方向、*B. natans* ヌクレオモルフゲノムにおける染色体との対応に留意しつつ作成した。また、相同性検索により確認された遺伝子のうち 39 遺伝子について、遺伝子の開始点、終結点を推定し、それぞれの区間ごとに 18 ~ 21 nt の長さをとるイントロンを、イントロン・エキソン境界共通配列 (GT ~ AG) を参照しながら探索した。

結果・考察

染色体地図について

Sequencher によるアセンブリングの結果、ヌクレオモルフ DNA として 6 本の大きなコンティグ (5 ~ 100kbp) と複数の小さな DNA 断片を得た。これは *L. amoebiformis* の推定ヌクレオモルフゲノムサイズの約 80% (約 260kbp) を、カバーしており、*B. natans* で報告されたのと同様に、高い A+T 含量 (72.08%) を持つ配列であった。

B. natans のヌクレオモルフゲノムとの相同性検索の結果、*L. amoebiformis* には、112 個のオルソログ遺伝子が検出されたが、*B. natans* との相同性が見られない、機能未知の遺伝子が約 180 個あると推測された。オルソログ遺伝子 112 個のうち約 30 個が翻訳、約 30 個が RNA 代謝に関わるものであり、*B. natans* の機能未知遺伝子と相同なものは 8 個見つかった。また、これらのオルソログ遺伝子のうち 75 遺伝子は 2 ~ 7 遺伝子からなる 19 か所のシンテニー領域 (異なる生物種の染色体間で類似した遺伝子の順序をもつ領域) として保存されていた。このことから、両種の間では、種分化ののちに、大規模なゲノム再編成が起きたと考えられる。

微小イントロンについて

次に、イントロン・エキソン境界共通配列に基づくイントロン探索を 39 の遺伝子について行い、103 か所のイントロン領域を確認した。探索を行った範囲においては、イントロン長は *B. natans* では 19 nt の割合が最も大きかったのに対して、*L. amoebiformis* では 18 nt の割合が最も大きいなど、その長さの構成割合には差異が見られた。

イントロンの位置や長さは種間の相同遺伝子において保存されている場合があり、例えば、*B. natans* の cdc28 には 3 つのイントロンが存在するが、それら全てが *L. amoebiformis* における相同遺伝子の同じ位置に存在した。ただし、そのうちの 2 つは、長さが異なっていた。一方で、*B. natans* の prp22 にある 6 つのイントロン全てが、*L. amoebiformis* の相同遺伝子には存在せず、別の位置に 1 つのイントロンが挿入されていた。イントロンの獲得や維持に関して考察をするには、更に相同遺伝子の比較を進めることが必要であるが、イントロンの位置や長さは固定したものではなく、ヌクレオモルフゲノムでも変化していることが確認できた。

また、クロララクニオン藻ヌクレオモルフゲノムに見られる微小イントロンは、既知の真核生物のイントロンとしては最小のものであり、そのスプライシング機構は興味深い。しかし、*L. amoebiformis* を用いた本研究では、ゲノム配列情報のみを用いてイントロンを検索しているため、それらが実際にスプライシングを受けるのかどうかについては更なる検証が必要である。

これから

今後は、残りの配列を取得し、*B. natans* と *L. amoebiformis* のヌクレオモルフゲノム全体の比較を行うとともに、*L. amoebiformis* のヌクレオモルフに特有な遺伝子を探索する予定である。

有殻アメーバ *Paulinella chromatophora* における新規殻の構築様式

野村 真未 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 石田 健一郎 (生命環境科学研究科)

背景・目的

Paulinella chromatophora は、リザリア下界ケルコゾア門ユーグリファ目に属する原生生物であり、淡水や汽水の池などに生息している。底生性で糸状仮足をもち、珪酸質の鱗片からなる壺状の被殻をもつ有殻アメーバである。本種は、独自の一次共生によるシアノバクテリア由来の光合成オルガネラをもつことが最近明らかとなり、これは葉緑体がたった一度の一次共生によって獲得されたという定説を覆す大きな発見となった。しかし、その細胞構造や生活環などに関する基本的知見は乏しく、生物としての理解は進んでいない。*P. chromatophora* を含むユーグリファ目の有殻アメーバのほとんどは珪酸質の鱗片が規則正しく配置された殻を持っており、ユーグリファ目生物の重要な分類形質となっている。鱗片の形は丸型や楕円型、棘のあるものまである。*P. chromatophora* の殻は、図 B に示したように壺状で、1 個体につきおおそ 40~50 枚のほぼ長方形でやや湾曲した鱗片で構成されており、約 10 枚の鱗片が長辺同士で接着して帯状になった鱗片列が、5 列壺状に接着した構造になっている。各鱗片はサイズも表面の構造も異なっており、開口部のものは特に他の鱗片とは形状が大きく異なっている。この殻は、細胞分裂の直前に親細胞によって新規に細胞外に構築されると報告されている。このような殻形成は非常に特異であり、本種が細胞分裂に先立って珪酸質の殻をどのように構築するのかは非常に興味深い。ユーグリファ目において殻構築に関する報告のある *Assulina muscorum* (O. Roger Anderson et al, 1994) では、母細胞内の小胞中に珪酸が分泌されて沈殿することによって鱗片が形成され、殻の開口部の方へ運ばれるとともに成熟すること、鱗片は一枚一枚殻の開口部から外へ押し出されること、分泌小胞から供給されると思われるセメント物質によって鱗片同士がくっつけられていることが示唆されている。しかし、押し出された鱗片がどのように配置され、組み立てられていくかは明らかにされていない。本研究では、*P. chromatophora* を用いて今まで未知であった詳細な殻の構築様式を明らかにすることを目的とした。

材料・方法

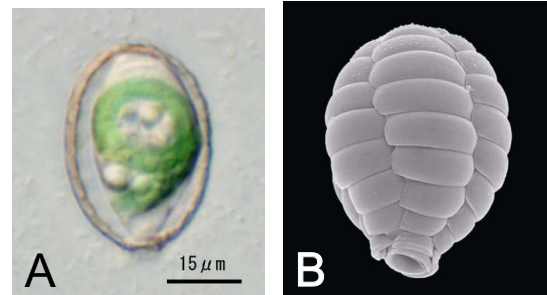
難培養性である *P. chromatophora* の培養株は、現在ドイツ産の M0880 株と日本産の FK01 株しか確立されていない。そこでまず、国立環境研究所内の池の採集から得られた *P. chromatophora* をマイクロピペット法により単離し、クローン株の確立を目指した。殻の構築過程を詳細に解析するために光学顕微鏡によるタイムラプスビデオ撮影を行った。さらに各ステージでの鱗片の配置を把握するために走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察を行った。SEM 観察に用いた試料は、1% 四酸化オスミウムと 5% グルタルアルデヒドによる同時固定または 100% エタノールによる固定をした後、凍結乾燥または自然乾燥させた。また、鱗片の形成時期と母細胞内での配置の仕方を観察するために、生体内で合成された珪酸質の鱗片のみに取り込まれる蛍光試薬 LysoSensor Yellow/Blue DND-160 (PDMPO) を用いて蛍光顕微鏡観察をした。

結果

P. chromatophora の複数の細胞について殻形成をタイムラプスビデオ解析した結果、細胞は分裂に先立って鱗片を全て細胞外へ出し、その後仮足を使って鱗片を一枚ずつ殻の形に組み立てることがわかった。普段は典型的な糸状仮足しか観察されないが、殻を組み立てる段階では、母細胞の開口部から太い仮足が伸び、それが殻の組み立てを行なう様子が観察された。さらに、SEM 観察の結果、押し出された直後の鱗片は仮足またはセメント物質によって保持されていることが示唆され、開口部を囲むように配置されることが分かった。さらに、タイムラプスビデオ解析で細胞質の移動の際に核が最初に新規殻へ移動していることが示唆された。これを確かめるために DAPI を用いて蛍光顕微鏡で観察した結果、示唆された通り核が他のオルガネラに先立って新規殻へ移動していることが示された。また、PDMPO を用いた蛍光顕微鏡観察の結果、開口部側の鱗片から順に形成されることが明らかとなった。殻構築の観察に加えて、*P. chromatophora* の新規培養株の確立も試みた。国立環境研究所の池から採集された *P. chromatophora* について、複数個体を一つの培養器に単離することにより培養株ができた。現在、この培養株から再単離をして単一個体によるクローン株の確立を目指している。

考察

以上の結果と先行研究を考慮すると、細胞質分裂に先立って鱗片が形成され、成熟しながら開口部から細胞外へ分泌され開口部の周囲に配置される。その後鱗片は太い仮足から分泌されるセメント物質で一つ一つくっつけ合わされ、壺状に広がってゆく。こうしてできた新規殻に 1 つの娘細胞の核、光合成オルガネラが順番に移り、細胞質分裂が完了することが示唆された。*P. chromatophora* の壺状の殻は 1 枚 1 枚特徴がある鱗片から構成されており、どの個体も規則性のある鱗片の配置をしている殻を持っているが、開口部から 1 枚 1 枚押し出され開口部を囲むように配置された鱗片に規則性は伺えず、単細胞生物である *P. chromatophora* が形も大きさも異なる鱗片をどのようにして順序正しく積み上げているのか、その機構は分らなかった。今後は透過型電子顕微鏡を用いて細胞内構造との関連を含めて観察する予定だ。また、ユーグリファ目全体においてこのような殻構築様式が一般的に見られるものかどうか、多様性の調査をし、ユーグリファ目生物の中で殻構築様式がどのように進化したのかを明らかにしてゆきたい。



(A) *P. chromatophora* の光学顕微鏡写真
(B) *P. chromatophora* の走査型電子顕微鏡写真

Analysis of the relationship between crystalization and coccolith polysaccharide production in the marine calcifying coccolithophorid *Emiliania huxleyi*

FAJARDO CASTRO ROSSY JOHANA (筑波大学 生物学類)

指導教員: 白岩 善博 (生命環境科学研究科)

Introduction

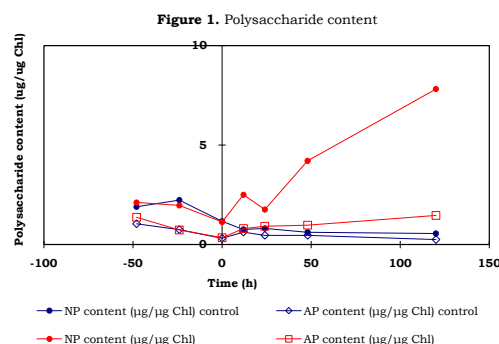
Coccolithophores are unicellular algae of the phylum Haptophyta characterized by the presence of complex calcified scales, called coccoliths, covering the cell. The shape of the coccoliths has unique characteristics in different taxa and it can be very intricate. In the case of the model coccolithophore *Emiliania huxleyi*, calcification occurs on an organic plate inside an intracellular compartment and the complete scales are later transported to their final location. Although research about the mechanism behind the formation of the calcium crystals has been very active in the recent years, there are many aspects yet unknown, particularly about the way in which the cells regulate the process. It is now known, for example, that acidic polysaccharides (AP) (or coccolith polysaccharides in *E. huxleyi*) play an important role in the process of nucleation and shaping of calcite inside the vesicle by inhibiting the growth of the crystals selectively. However, the exact relationship between calcification and the production of these polysaccharides is not well understood. In this research, the effect of a known calcification inhibitor HEBP (1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate) on the quantity of neutral and acidic polysaccharides produced by *E. huxleyi* was tested in order to explore the possibility of a feedback mechanism between the signal for initiation of calcification and the completion of the coccolith. Bisphosphonates are compounds that have a P-C-P bond and that are able to bind to the surface of calcium carbonate crystals preventing nucleation and thus inhibiting calcification.

Materials and methods

For the *in vitro* experiments equal volumes of solutions of 20 mM of calcium chloride (CaCl_2) and sodium bicarbonate (NaHCO_3) were added in the presence of different concentrations of HEBP. Increase of the turbidity of the solution as CaCO_3 crystals were formed was measured as the absorbance at 750 nm using a spectrophotometer every minute for the first 20 minutes and then every 5 minutes until the end of the reaction. *In vivo* analyses were performed using the marine calcifying haptophyte *Emiliania huxleyi* (Lohman) Hay and Mohler, collected and isolated by University of Tsukuba professor Dr. Isao Inoue from the Pacific Ocean in 1990. The algae were grown in bottles containing artificial seawater enriched with Ed Scheiber's medium and 10 nM Na_2SeO_3 instead of soil extracts. To obtain actively calcifying cells, they were pre-cultured for 3 days or until phosphate depletion of the medium could be confirmed. Phosphate depletion induces calcification in *E. huxleyi* according to previous reports (Kayano *et al.* 2009). HEBP was added to a final concentration of 1 or 0.5 mM (time 0). After this, sampling was performed regularly and the following parameters were measured: Chlorophyll content: Extraction with acetone. Phosphate concentration in the medium: Removal of the cells by centrifugation and quantification by the Molybdenum blue method. Neutral or acid polysaccharide content: Using Phenol-Sulfuric acid and Carbazole-Sulfuric acid assays respectively.

Results and analysis

The results of the *in vitro* experiments coincide with the ones obtained previously by Asahina and Okazaki (2004). HEBP inhibits calcification significantly in concentrations as low as 0.05 mM as opposed to the known chelator EDTA. When adding 0.05 mM HEBP 5 minutes after the start of the reaction, no further crystals were formed which confirmed that HEBP prevents the nucleation of calcium carbonate. In the *in vivo* experiments, inhibition of calcification was confirmed through optical and polarized light microscope. Cells grown in the presence of 1 mM of bisphosphonate were seen without coccoliths. However, the cell growth was impaired greatly compared to that of the control group. This elevated cell death rate suggests that HEBP has effects not only in the chemical process of calcification, but also in the physiological pathways of the cell. This has also been suggested for other bisphosphonates used in animal cells (Fleisch, 1998). This observation is supported also by the fact that the same tendency of decreased growth was observed in a lower proportion when adding HEBP to a final concentration of 0.5 mM. The measures of polysaccharide contents showed that production of neutral polysaccharide per chlorophyll unit increased significantly in the presence of 1 mM HEBP, and in a lesser extent when the concentration was halved. On the other hand, coccolith polysaccharide (acid polysaccharide) contents increased slightly when calcification was inhibited for all of the *in vivo* experiments. However the difference was not significant enough as to draw a conclusion. Further experimentation is required to confirm these observations. To our knowledge, the increase of the amount of neutral polysaccharide when calcification is inhibited has not been reported previously. It would seem that the inhibition of calcification triggers accumulation of sugars in the cell. This work may be helpful to better understand the physiological role of calcification in coccolithophores.



イネの生殖過程におけるペクチン・ハウ素架橋関連遺伝子の変異体表現型と発現解析

四谷 紗和子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 岩井 宏暁 (生命環境科学研究科)

背景・目的

植物の生長には、細胞接着と発達を要する過程が数多く存在する。茎頂や根端などのメリステムでは、細胞同士の接着性を調節することで緊密な情報交換を行い、器官の形成をする。また、生殖過程では柱頭と花粉、花粉管と伝達組織といったように受精にいたるまでに多くの特徴的な細胞同士の接着とコミュニケーションが必要とされる。近年、これらの過程には、細胞壁におけるペクチン-ハウ素架橋が重要であることがわかった。ペクチン-ハウ素架橋は、ペクチン中のラムノガラクトツロナ II (RG-II) 領域同士がハウ素と結合し、二量体 RG-II-ハウ素複合体 (dRG-II-B) を形成することで機能し、その形成にはペクチングルクロン酸転移酵素 = NpGUT1 が必須であることが報告されている。この報告により、双子葉植物であるタバコにおいて NpGUT1 の発現とペクチン-ハウ素架橋が、細胞同士の接着と植物の栄養・生殖生長にとって非常に重要であることが示された。またシロイヌナズナにおいてはキシラン合成への関与も報告されている。

一方、単子葉植物においてはペクチン-ハウ素架橋も含め、ペクチンの機能と重要性についての情報は極めて乏しい。興味深いことに、単子葉植物の細胞壁マトリックスは構造・成分ともに双子葉植物と大きく異なっており、ペクチンにいたってはわずか 5-10% 程度しか含まれていない。しかし、イネを用いた先行研究において、NpGUT1 遺伝子と相同性が高く GT47 family である GUT1-like 遺伝子 *OsGUT-L1* と *OsGUT-L2* の遺伝子解析が行われた結果、他の RG-II 合成遺伝子と共調して発現していたため、これらは相同遺伝子候補としてペクチン合成と発生に重要な働きを持つと考えられた。

そこで本研究では、細胞接着の制御が重要になる生殖過程に注目して、単子葉植物におけるペクチンネットワークのメカニズムと機能を明らかにするために、*OsGUT-L1* 及び *OsGUT-L2* の発現解析と欠損変異体の表現型解析を行った。

方法

1. 発現解析

イネの受粉前後の生殖器官 (穎、葯、柱頭、子房) 及び、成熟葉をサンプリングし、RT-PCR による発現解析を行った。

2. 変異体の表現型解析

OsGUT-L1、*OsGUT-L2* 各遺伝子における T-DNA 挿入変異体 (T_2) の種子を播種し、その T_3 世代について、ゲノミック PCR を用いてホモ-ヘテロ判定を行った。これら T-DNA 挿入変異体について、組換え温室において生育調査を行った。

結果・考察

(1) *OsGUT-L1*

データベースおよび RT-PCR による器官別発現解析の結果、*OsGUT-L1* は柱頭や花粉、分裂組織での発現していることが確認された。また、T-DNA 挿入変異体のホモ-ヘテロ判定により、ホモ個体の特定を行った。正常株 (Wt) は播種後 5 ヶ月目で、草丈が平均 90 cm

で稔実率がほぼ 100% であった。一方、*OsGUT-L1* 変異体では草丈が約 65 cm と低く、成長の遅延が観察された。また、稔実率が約 45% と低かったことから、生殖成長過程に重大な異常が起きている可能性が考えられた。稔実していないものでは、子房が発達しない種子が観察された。以上より、この遺伝子が生殖成長過程において、重要な機能をもつ可能性が考えられた。

(2) *OsGUT-L2*

データベースおよび RT-PCR による器官別発現解析の結果、*OsGUT-L2* は生殖、栄養成長全体を通して発現していることが確認された。明確なホモ-ヘテロ判定は完了していないが、*GUT-L1* の観察結果から、植物体の背丈・稔実率に注目して生育調査を行った。その結果 *OsGUT-L1* 変異体と同様に草丈が低く稔実率が低い個体が観察された。

これらの結果から、*OsGUT-L* が受粉・受精を含む生殖過程において重要な働きを有する可能性が示唆された。生殖過程には、細胞接着が重要になる受粉や花粉ガイダンスが含まれ、*OsGUT-L* がこういった細胞接着性に寄与することを期待している。

今後、変異体の相補性試験及び再現をとりデータの確証性を高めるとともに、プロモーター GUS や *in situ* ハイブリダイゼーションなど組織レベルでの詳しい解析を計画している。

単子葉植物イネの生殖過程におけるペクチンの動態と機能解析

市川 愛 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 岩井 宏暁 (生命環境科学研究科)

背景・目的

高等植物の細胞壁は多糖類で構成されており、その構造変化が発生・発達にも大きく影響することが知られている。細胞壁成分のひとつであるペクチンではメチル化度の変化が、細胞壁構造に対して大きく影響する。ペクチンはメチル化された状態で合成されるが、細胞壁内で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、細胞接着性を高めるなどの細胞壁の特性を変化させることが知られている。しかし近年、PME 阻害タンパク質を過剰発現させた植物では原基から生殖細胞への正常な発生ができないといった報告をはじめとして、ペクチンの脱メチル化による細胞壁構造変化は発生・分化にも影響があることが報告されてきている。しかし、発生過程における詳細な分布や機能はほとんどの植物で解明されていない。本研究では、受粉・受精過程などの細胞接着や分化が行われる組織において、ペクチンが適正なメチル化度を維持することが重要ではないかという仮説に基づき、生殖過程におけるペクチンの動態とその機能の一端を明らかにすることを目的とした。生殖器官においてはペクチンが豊富に含まれることが知られている。そこで、ペクチンリッチな細胞壁を全身に持つ双子葉植物ではなく、細胞壁中のペクチン含量が少ない単子葉植物のイネを材料として用いることで、生殖組織においてペクチンの真の機能を明らかに出来るのではないかと考えた。また、イネはモデル植物として豊富なリソースをもつことでも知られており、自殖性が高く受粉のシステムと生殖器官の構造が非常にシンプルであることから生殖器官に注目した観察をしやすさでも優れた研究材料である。本研究ではイネの花を用いて受粉前後のペクチンのメチル化度を比較することにより、生殖器官におけるペクチンの動態を調査した。また、PME 過剰発現体 (PME- Full-length cDNA Overexpressor: PME-FOX) イネの表現型を解析することで、ペクチンのメチル化が生殖組織の発達に与える影響について考察を行った。

材料・方法

材料にはイネ (*Oryza sativa*、品種: 日本晴) を用い、正常株 (WT) 及び過剰発現株 (PME-FOX) は温室で生育を行った。ペクチンの組織染色

WT の受粉前後の成熟した雌しべと PME-FOX の生殖器官をサンプリングし、パラフォルムアルデヒドで固定、テクノビット 7100 に包埋、ウルトラミクロトームで $3\mu\text{m}$ の切片を作成した。ルテニウムレッドで脱メチル化ペクチンを、NaOH で処理後にルテニウムレッドで染色することにより全ペクチンを染色した。受粉前後のメチル化度の異なるペクチンの局在様式を光学顕微鏡により観察した。

PME 過剰発現株の表現型解析

イネのゲノム、糖モチーフ、発現データベース検索 (KOME, CAZy, Oryza Express) を行うことによりイネ PME 系統樹を作成し、各遺伝子の発現様式の調査を行った。また、イネ FOX データベースから、これらの PME を過剰発現させたものを 4 ライン検索し、 T_1 種子を農業生物資源研究所より入手した。 T_1 および T_2 世代を組換え温室において育成を行い、育成調査を行った。

結果

生殖組織におけるペクチンの動態

受粉前および受粉後の雌しべについて、脱メチル化ペクチンの染色を行った結果、胚珠以外の領域では受粉前と比較して受粉後の方が高いレベルの染色性を示した。一方、全ペクチンの染色を行った場合では、受粉前後で染色レベルに差は観察されなかった。しかし、胚珠においては全ペクチン染色では強く染色されたのに対し、脱メチル化ペクチンの染色性が極めて低かった。受粉前後の雌しべではペクチンの全量はほぼ同じであったことから、受粉直後に活発なペクチン合成は起こっていないことが考えられる。一方、胚珠以外の領域では脱メチル化ペクチンの染色性が高まっていたことから、ペクチンのメチル化度が低下し、ペクチン-カルシウム架橋の形成が促進されたのではないかと考えられる。しかし、胚珠においては、他の部分と同様に受粉前後に関わらずペクチン量に変化は見られなかったが、脱メチル化ペクチンは少なく、存在しているペクチンのほとんどがメチル化されていることが示唆された。

イネのペクチンメチルエステラーゼ (PME)

シロイヌナズナなどの PME 遺伝子と相同性が高く、CAZy データベースより Carbohydrate Esterase family 8 に属する PME 保存領域をもつ遺伝子を、イネのゲノムデータベースより 37 遺伝子を選択し系統樹を作成した。Oryza Express 発現データベースより、生殖組織特異的なものと全身で発現するものの 2 つに大別されることがわかった。

ペクチンメチルエステラーゼ過剰発現株 (FOX-PME) 表現型解析

FOX データベースより入手できた 4 つの PME-FOX 株のうち、PME3 遺伝子の FOX 株でのみ 80% という高い頻度で不稔性が見られた。少量ながら得られた種子 (T_2) を組換え温室において生育させたところ、 T_2 は 29% の葯で形態不全が見られ、花粉も正常に形成されなかった。また、異常が見られた株は不稔となった。

考察

花粉管は伸長時にポリガラクトツロナーゼを分泌し、雌しべの伝達組織の壁を分解しながら進むと考えられる。本研究において受粉後の雌しべで多くの脱メチル化ペクチンが観察されたことは、伝達組織においては脱メチル化ペクチンが花粉管伸長のガイダンス役の一端を担っている可能性を示唆していると思われる。また、胚珠においてのみペクチンの脱メチル化が観察されなかったが、これは珠孔で PME 阻害タンパク質が働いているという報告とも一致する。このことから胚珠では、ペクチンのメチル化程度が、ある一定レベルに維持されていることが考えられる。一方、花粉の発生過程には、花粉四分子の細胞壁合成など多くの細胞壁の変化が起こる。PME 過剰発現によって花粉の正常な形成が観察できなかったことは、ペクチンのメチル化が必要なステージで維持されず、異常なタイミングで脱メチル化されてしまったことにより異常を引き起こしたのではないかと考えられる。以上の結果から、生殖組織における正常な発生・分化を行うためには、正常なタイミングでのペクチンのメチル化度の調節が重要ではないかと考えられる。

単子葉植物イネの器官発達に重要な細胞壁タンパク質・グリシンリッチプロテインの解析

武部 尚美 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 岩井 宏暁 (生命環境科学研究科)

背景・目的

植物の特徴である細胞壁は、植物の物理的構造の維持といった単なる“壁”としての働きだけでなく、成長・発達や生殖といった個体発生においても重要な働きを持つことが明らかになってきている。細胞壁は、セルロースなどの多糖類を中心に複雑で多様な構造をもつことが知られているが、そのほかに細胞壁タンパク質と呼ばれる構造タンパク質もまた細胞壁成分のひとつとされている。細胞壁タンパク質はエクステンシンなどのハイドロキシプロリンリッチタンパク質、プロリンリッチタンパク質、そして、グリシンリッチタンパク質 (GRP) で構成されている。GRP は、双子葉植物、単子葉植物を問わず多様な植物種に存在していることから、高等植物の成長発達に必須なのではないかと考えられている。その生理学的機能については不明であるが、ツル性植物の維管束組織や導管液、そして花粉管などに存在し、伸長成長に関わる組織の細胞壁に局在することが報告されている。そのため、細胞壁の柔軟性や外傷の修復に影響を与えるのではないかとということが考察されている。

モデル植物であるイネを含む単子葉植物の細胞壁はセルロース以外で質・量ともに双子葉植物とは全く異なるマトリックス糖鎖からなる細胞壁ネットワークを有しており、細胞壁タンパク質においても未知な点が極めて多く、まだほとんど調査されてきていない。また GRP について、遺伝子の存在は確認されているものの、機能はおろかイネ植物体の中での詳細な分布、発現パターンなど基礎的情報を含む報告がほとんどされていない。そこで、本研究では単子葉植物の GRPs が個体発生の中でどのような生理学的機能を有するのかについて明らかにすることを目的に、データベース検索により選抜した *OsGRP2* について、器官別発現解析および T-DNA 挿入変異体の表現型調査を行った。

方法

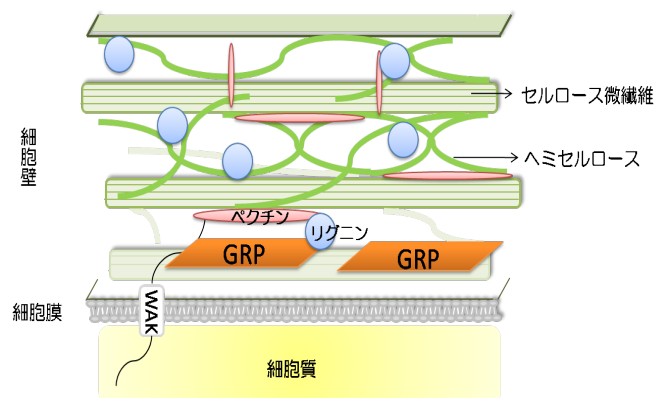
単子葉植物のモデル植物であるイネ (*Oryza sativa* 品種: Hwayoung) および T-DNA 挿入変異体を組換え温室にて育成させ、実験に用いた。

イネゲノムおよび発現データベース (iPSORT, *Oryza Express*) を用いて、細胞壁構造タンパク質特有の配列を持ち、発現量の高い遺伝子について選抜を行い、*OsGRP2* を選抜した。この *OsGRP2* の T-DNA 挿入変異体を POSTECH から入手し、ホモ個体選抜を行い、生育調査を組換え温室において行った。そして正常株 (Wt) および変異体の発現量調査を RT-PCR を用いて行った。また、正常さまざまな成長ステージにおける器官別発現解析を RT-PCR により Wt を用いて調査した。

結果・考察

細胞壁構造タンパク質である GRP を選抜するため、細胞外輸送に重要であるシグナル配列を有する遺伝子についてイネゲノムデータベースを用いて調査した。選抜した GRP 遺伝子について、発現データベースを用いて発現量を調べた結果、ほとんどの GRP 遺伝子の発現量は低いことが明らかとなった。発現量を有していたものの中で、最も発現量

の高い *OsGRP2* 遺伝子について注目して研究を行うこととした。まず、*OsGRP2* の花における器官別発現パターンを RT-PCR により確認した結果、穎、葯、子房で発現が確認された。また、それらの発現は開花前と開花後で発現量が変動していた。次に *OsGRP2* の機能を調べるために、T-DNA 挿入変異体について調査を行った。POSTECH より入手した T₁ の T-DNA 挿入変異体から得られた T₂ 種子より、ゲノミック PCR を用いてホモ個体 5 株を同定した。それらについて各成長過程における生育調査を行った。その結果、栄養成長期において、やや dwarf 形質が確認され、生殖成長期においては受粉・受精および種子形成過程に異常が観察された。現在、相補試験については準備中であり、今後、特異的なペプチド抗体を用いて *OsGRP2* タンパク質の局在様式について調査を行う予定である。



グリシンリッチプロテイン (Glycine-Rich Protein)

- ・グリシンの含有量が非常に多く、また細胞壁中に不溶化して存在している。
- ・その構造はβシート構造であると推定されている。
- ・細胞膜と細胞壁の境界面に板状に存在すると考えられている。

単子葉植物イネにおけるアラビノース糖鎖合成関連遺伝子の発現解析

稲村 拓也 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 古川 純 (生命環境科学研究科)

背景・目的

植物の細胞壁は主にセルロース、マトリックス糖鎖、構造タンパク質で構成されている。マトリックス糖鎖の一群であるペクチン性多糖の主成分である、アラビノース糖鎖は、高等植物が特徴的に有する糖鎖であり発生過程に大きな関わりを持っている。アラビノース糖鎖関連遺伝子は高等植物間で 85% 以上相同性を持つ保存性の高い遺伝子であり、その機能も広く保存されていることが期待できる。

アラビノース糖鎖合成は複雑な複合体を形成して行われることが示唆されているが、合成メカニズムに関してはほとんどわかっていない。現在までにペクチンを豊富に含む細胞壁を有する双子葉植物を用いての研究が行われてきたが、その細胞壁特性ゆえにペクチン性アラビナンに集中した研究となっている。

一方、単子葉植物であるイネでは双子葉植物と異なり、ペクチン性多糖類に加え、セルロース繊維との架橋を行うグルクロノアラビノキシランにおいてもアラビノースが含まれ、その存在が重要とされている。そのため、ペクチンを主とした生殖過程だけでなく全発生過程を通してアラビノース糖鎖の動態を調査することが可能であると考えられる。それにもかかわらずイネにおいてはほとんど報告がないのが現状である。本研究では、現在知られている全てのアラビノース糖鎖合成関連遺伝子のイネにおける相同遺伝子を用いて、栄養成長および生殖成長過程における細胞壁架橋ネットワークにおけるアラビノース糖鎖の機能を明らかにすることを目的としている。

シロイヌナズナおよびタバコを用いた研究により、アラビノース合成複合体として、アラビノース転移酵素 ARAD1 (ARabinan Deficient 1)、アラビノース輸送体と考えられる LARA1 (Long ARabinan related protein 1)、重合転移可能なフラノースへと転換する UAM (UDP-Arabinopyranose Mutase) が知られている。この 3 種のアラビノース合成関連遺伝子の栄養成長および生殖成長過程における組織別発現パターンの解析を行った。また、これらのアラビノース合成関連遺伝子と共発現している遺伝子の中から、アラビノースを含む高分子化合物の合成に関わっているであろう遺伝子を遺伝子発現ネットワークを使って同定し、それらの組織別発現パターンと比較することで、各器官でアラビノース糖鎖がどのような化合物の構成成分として用いられているかを調査した。

方法

単子葉植物のモデル生物であるイネ (*Oryza sativa* 品種: Dongjin) を温室で育成し実験に用いた。

イネゲノムおよび発現データベース (*Oryza_Express*) を用いて、イネにおけるアラビノース合成関連遺伝子の候補遺伝子を選別し、(1) *OsLARA1*、(2) *OsARAD1*~8、(3) *OsUAM1,2,3* を決定した。イネの受粉前後の生殖器官 (穎、葯、柱頭、子房)、14 日目実生の葉、茎、根、生殖成長開始後の葉、葉鞘、茎、根をサンプリングし、RT-PCR による発現解析を行った。

結果・考察

(1) *OsLARA1*

in silico 解析により相同性が極めて高い候補遺伝子が 1 コピーで存在することが明らかとなった。この候補遺伝子 *OsLARA1* について RT-PCR で発現パターンを解析した。この結果から、*OsLARA1* は受粉後の穎、受粉前の葯、14 日目実生の葉で高い発現が見られた。このことから、*OsLARA1* は開花や受粉などの生殖成長や葉の展開などの栄養成長におけるアラビノース糖鎖合成に関わっていると考えられる。また、公開マイクロアレイデータを基に、*OsLARA1* と共発現している遺伝子を検索したところ、グルクロノアラビノキシランの合成への関与が考えられる遺伝子の存在が確認できた。

(2) *OsARAD1*~8

in silico 解析では相同性の高い候補遺伝子が 8 遺伝子確認された。この中でシロイヌナズナの *ARAD1* と最も相同性の高い遺伝子を *OsARAD* とし、この遺伝子の発現パターンを解析した。解析の結果、受粉前の葯で特に高い発現が見られた。また受粉後の穎と子房でも発現が高かった。このことから *OsARADs* は開花や受粉などの生殖成長過程でのアラビノース糖鎖の合成に関わっていると考えられる。

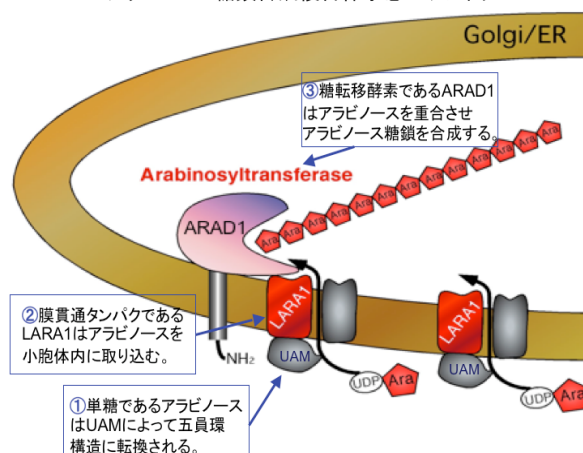
(3) *OsUAM1,2,3*

解析の結果、*OsUAM1* は栄養成長、生殖成長過程全体で非常に高い発現を示した。*OsUAM2,3* は受粉前後の穎、受粉前の葯、受粉後の子房などで特に高い発現を示していた。また、14 日目実生の茎でも高い発現が見られた。この結果から *OsUAM1,2,3* は開花や受粉、花粉管ガイダンスなどの生殖成長や支持組織である茎の発達におけるアラビノース糖鎖の合成に関与していると考えられる。

これらの結果から、*OsLARA1*、*OsARAD1*~8、*OsUAM1,2,3* は特に開花に関わる穎や、花粉の合成に関わる受粉前の葯で、共通して高い発現パターンを示していることがわかった。これらの発現パターンより共発現していることが予想されたことから、今回解析した 3 種の遺伝子産物がアラビノース糖鎖合成複合体を形成していることが推測される。

今後は発現抑制変異体を作成し、表現型等への影響を調べると共に、アラビノースで構成される高分子多糖、糖タンパク質の細胞レベルでの局在や細胞壁組成の変化を解析し、各組織でのアラビノース糖鎖合成関連遺伝子の役割の一端を明らかとしていきたい。

アラビノース糖鎖合成複合体予想モデル図



カロテノイド合成酵素遺伝子導入による黄花アサガオ作出に関する研究

恩田 和幸 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 鎌田 博 (生命環境科学研究科)

背景・目的

アサガオ (*Ipomoea nil*) は日本独自の園芸植物であると同時に、遺伝学的、生理学的知見の蓄積が豊富な実験植物でもあり、文部科学省のナショナルバイオリソースプロジェクトにも指定されている。アサガオの花弁は青色、紅色、紫色といった非常に多様な色彩を呈する。文献によれば黄色も江戸時代には存在していたとされるが、現在では明瞭な黄色の系統はない。これまで多くの育種家が交配による黄花のアサガオの作出を試みてきたが、現在、最も黄色に近いと言われる系統でもフラボノイドによる非常に淡い黄色である。従って、黄花アサガオの作出は、園芸的にも価値が高く、江戸時代に失われた品種を現代に再現するという意義もある。

カロテノイドは黄色から赤色を示す色素で、多くの植物では花弁にカロテノイドが蓄積することにより黄色を発現している。先行研究により、アサガオの花弁は *isopentenyl pyrophosphate isomerase (IPI)* 以降のカロテノイド合成酵素遺伝子群の発現が非常に低いということが明らかになっている。そこで本研究では、黄花アサガオの作出を目的とし、アサガオにカロテノイド合成酵素遺伝子群を導入することにより、花弁へのカロテノイドの蓄積を試みた。

材料・方法

実験材料にはアサガオの栽培品種である Violet (形質転換系が確立している) と Q0261 (白花であるためカロテノイドによる黄色が視認できる) を用いた。

1) カロテノイド合成酵素遺伝子を導入した形質転換体の作製及び評価

カロテノイド合成経路において *IPI* のすぐ下流に位置する *geranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPS)* と *phytoene synthase (PSY)* の 2 遺伝子を含むコンストラクトを Violet と Q0261 に導入した。

2) 花弁特異的発現プロモーターの評価

花弁特異的発現を示すことが他種の植物で報告がある、キク由来の *flavanone 3-hydroxylase (F3H)* のプロモーター及び、シロイヌナズナ由来の *non-yellow coloring 1 (NYC1)* のプロモーターに、それぞれ β -glucuronidase (*GUS*) を連結させたコンストラクトを Violet に導入した。他種における花弁特異的発現が、アサガオの花弁で保存されているかどうかを確認及び評価する目的である。

遺伝子の導入は、コンストラクトを導入したアグロバクテリウムを不定胚に感染させることで行った。再分化した個体は抗生物質カナマイシンの薬剤耐性により選抜し、馴化させることで形質転換体を作製した。

結果・考察

1) カロテノイド合成酵素遺伝子を導入した形質転換体の作製及び評価

無色のフィトエンまでを合成する酵素遺伝子である *GGPS* と *PSY* を連結したコンストラクトを Violet に導入したも

のが 7 系統、Q0261 に導入したものが 1 系統得られた。得られた形質転換体の花弁における導入遺伝子の転写レベルの発現について、リアルタイム RT-PCR 法により解析したところ、Violet の 1 系統と Q0261 の 1 系統において *GGPS* と *PSY* の発現の増加がみられた。しかし、HPLC で成分分析を行ったところ、フィトエンは検出されなかった。これらの結果より、*GGPS* と *PSY* のタンパク質が酵素として機能していない、または、生じた代謝産物がカロテノイド合成系とは別の経路に代謝される可能性が示された。本実験で用いた *GGPS* と *PSY* の cDNA は、ペチュニアなどの他種の植物では機能することから、導入遺伝子の酵素としての機能の問題よりも、生じたカロテノイドが内生の酵素により代謝される可能性の方が高いと思われる。今後は *PSY* よりも生合成経路の下流に位置する酵素遺伝子を導入し、花弁にカロテノイドが蓄積するかどうかを検討する必要がある。

2) 花弁特異的発現プロモーターの評価

F3H::GUS が 2 系統、*NYC1::GUS* が 2 系統得られた。これらの花弁と葉について *GUS* 染色を行い、プロモーターの器官特異性の詳細な検討を進めている。

アサガオの形質転換体は遺伝子を導入してから花が咲くまでに約 1 年かかる。そこで、有用なプロモーターの探索、コンストラクトの選定を効率的に行うためには、一過的発現系が有効であると考えた。アサガオは一日花であるが、二日咲きになる系統が存在する。この二日咲き系統を用いて、一過的に遺伝子を導入する「アグロインフィルトレーション法」により、アサガオの一過的発現系の構築を目指す。

謝辞

本研究をご指導くださいました花き研究所の大宮あけみ先生、山溝千尋研究員を始め、試料の提供をしていただいた九州大学の仁田坂英二先生、基礎生物学研究所の星野敦先生、名古屋大学の白武勝裕先生にここで感謝申し上げます。また、植物発生生理研究室の鎌田博教授、小野道之准教授、小野公代博士をはじめ、研究室の方々に御礼を申し上げます。

遺伝・遺伝子について分子レベルで理解するための教材の開発

紙谷 幸子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 鎌田 博 (生命環境科学研究科)

背景と目的

近年、科学技術の発達により新しい技術に基づく様々な製品が実用化され日常生活に関わるようになってきた。生物学分野においては、遺伝子組換え作物や遺伝子診断など、遺伝や遺伝子に関する技術の発達が目覚ましい。消費者はそのような製品をよく理解した上で選択しなければならないが、正しく理解するために必要な科学的知識が十分であるとは言えない。したがって、遺伝や遺伝子についての科学的知識を身に付けるための重要な機会である高等学校の理科の授業を充実させる必要がある。遺伝や遺伝子は講義形式の授業だけでは理解が難しく、実験を通して実物を扱うという学習方法が効果的である。そこで本研究では高等学校の理科の授業に取り入れることが可能な実験教材を開発することにした。授業に取り入れる実験は、まず野生型と変異型の個体の表現型の違いを観察し、次に DNA の変異部分を増幅して遺伝子型の違いを可視化し、遺伝子型と表現型の関係を学ぶというものが効果的であると考えた。そこで本研究ではこの実験を高等学校の授業に取り入れられるものにするために、専門的な機器を使わず簡単な手順で結果を得るための実験方法や条件を検討する。

材料

材料はエンドウ (*Pisum sativum* L.) を用いた。エンドウはメンデルが遺伝の法則を研究する際に用いた材料であり、高等学校の生物の教科書に登場するため授業に取り入れやすいという利点がある。本研究ではメンデルが研究に用いた変異体のうち、種子の形の変異体と矮性の変異体を用いた。種子の形の変異体はデンプン分枝酵素遺伝子中に約 800 bp のトランスポゾンが挿入されたことによるものである。矮性の変異体はジベレリン合成酵素遺伝子中の一塩基置換によるものである。

方法

1. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法

LAMP 法は等温条件下、約 1 時間で DNA を増幅することができる方法であり、専門的な機器を必要としない点において本研究で検討する実験に適している。そこで LAMP 法を用いて遺伝子型の違いを可視化する実験の方法を検討することにした。LAMP 法で増幅できる範囲は 200 bp 程度までであることを利用し、種子の形の変異体においてトランスポゾンの挿入部位を挟む位置にプライマーを設計し、野生型特異的に増幅が見られるようにした。プライマーは設計ソフト PrimerExplorer Ver.4 (<http://primerexplorer.jp/>) を用いて設計したプライマーのうち、繰り返し配列を含まないものを選別して作成した。増幅反応は栄研化学 (株) の loopamp DNA 増幅キットを用いて行った。キット付属の reaction mix にエンドウの葉から Edwards ら (1991) の方法で抽出した DNA、プライマー、DNA ポリメラーゼを加えて 60°C で 90 分反応させた。

2. Tetra-primer Amplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR 法

tetra-primer ARMS-PCR 法はアレル特異的なプライマーを用いることにより、PCR だけで SNP を判定できる方法である。矮性の変異体は点変異によるものなので、今

まで考案された実験では PCR 産物を制限酵素処理することで遺伝子型の違いを可視化していたが、tetra-primer ARMS-PCR 法を用いることにより実験の手順を減らすことができる。プライマーは設計ソフト Batchprimer3 (<http://wheat.pw.usda.gov/demos/BatchPrimer3/>) を用いて作成し、増幅反応はエンドウの葉から Edwards ら (1991) の方法で抽出した DNA をテンプレートとして、通常の PCR と同様に行った。

結果と考察

種子の形の変異体において作成した野生型の遺伝子を検出するためのプライマーを用いて、ゲノム DNA を鋳型として反応させた結果、野生型でも変異型でも増幅は見られなかった。増幅しやすくするために予め DNA を 95°C で熱変性してから反応させてもやはり増幅は見られなかった。増幅されない原因は、プライマーだけではなくテンプレートに問題がある可能性も考えられる。そこでまずプライマーの特異性を調べるためにターゲット配列周辺をクローニングした DNA を鋳型にして反応させた。すると野生型でも変異型でも増幅が見られたが、ネガティブコントロールとして別の遺伝子をクローニングした DNA を鋳型にした場合は増幅が見られなかった。したがって増幅された DNA 断片はプライマー同士の相互作用によるものではなく、プライマーがターゲット配列に働いたために増幅されたものだと考えられる。ターゲット配列周辺には繰り返し配列が含まれていることから、本来結合するはずではない部分にプライマーが結合することがあり、そのため野生型で安定して増幅が見られず、また変異型で増幅が見られることがあると考えられる。LAMP 法のためのプライマーは Tm 値が細かく指定されており、繰り返し配列を避けるとプライマーを設計できる場所が限られているため、プライマーの位置を変更する余地は少ない。したがって LAMP 法を用いて種子の形の変異体について遺伝子型を可視化する実験を行うことは困難であると考えている。

矮性の変異体において作成したプライマーは、遺伝子型非特異的、野生型特異的、変異型特異的に 1 種類ずつそれぞれ長さの異なる DNA 断片が得られるように設計した。このプライマーを用いて反応させたところ、ほぼ予想通りの結果が得られた。しかし、しばしば遺伝子型と増幅された DNA 断片が一致しないことがあった。これはプライマーの特異性が十分に高くないために、どちらのアレルでも同じように増幅反応が起きたのだと考えられる。tetra-primer ARMS-PCR 法では、プライマーの 3' 端に人為的にミスマッチを入れて非特異的な増幅を抑制しているため、今後はこのミスマッチをより強く反応を阻害するものに変える、あるいはミスマッチを増やすなどの改良を行い、プライマーの特異性を高める必要がある。

シロイヌナズナ近縁種を用いたヒストン脱アセチル化による胚的形質抑制機構の共通性の検証

島田 尚久 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 鎌田 博 (生命環境科学研究科)

背景

高等植物はその種子発芽過程において、胚発生時に特徴的な形質 (胚的形質) が抑制される。モデル植物であるシロイヌナズナの研究から、胚発生特異的に発現が見られる遺伝子群の発現が発芽時に抑制されることで、胚発生から栄養成長への転換が促されることが明らかにされている。一方、胚発生特異的な遺伝子群の発現が抑制されない変異体では栄養成長相へ正常に移行できず、胚的形質を維持し続け、胚様組織が形成される。この結果より、種子発芽時の胚的形質の抑制は、高等植物の正常な栄養成長相への移行に重要であることが示唆されている。

近年、動植物に共通して分化発達に関与することが示されている因子の一つとして、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を介した遺伝子発現抑制機構の重要性が報告されている。HDAC はヒストンに結合したアセチル基をはずすことで DNA とヒストンの結合を強め、RNA ポリメラーゼが DNA に結合できなくすることによって遺伝子の発現を抑制する。シロイヌナズナの研究では、この HDAC が胚的形質の抑制に重要であることが示されている。私の所属する研究室の先行研究では、シロイヌナズナの種子に HDAC 活性阻害剤である Trichostatin A (TSA) を処理することで、胚発生特異的に発現する遺伝子群の発現が抑制されず、胚的形質が維持され続ける事を報告した (Tanaka *et al.*, 2008)。

以上の知見から、HDAC を介した胚的形質の抑制機構が幅広い植物種で保存されていることが予測されているが、詳細は明らかではない。そこで私は、シロイヌナズナの近縁種を用い、TSA を処理したときに見られる胚的形質を解析することで、HDAC を介した胚的形質の抑制機構の共通性の検証を試みた。

材料と方法

実験材料には、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) と、その近縁種である *Arabidopsis griffithiana*、*Capsella bursa-pastris*、*Olimarabidopsis pumila* の 4 種を用いた。各種濃度の TSA を含む B5 液体培地 (5、25、50 μ M) に各植物種の種子 (100 粒) を懸濁し、暗所 10°C で 4 日間低温処理した後、16 時間明期 8 時間暗期 23°C の条件下で 2 週間振とう培養した。その後、TSA 処理した種子を TSA 非含有 B5 固形培地上に移植し、3 週間後に解析を行った。

結果と考察

50 μ M TSA で処理した時、シロイヌナズナでは胚的形質が維持され、不定胚様組織の形成が見られることが報告されている (Tanaka *et al.*, 2008)。同じ濃度で処理した時、*C. bursa-pastris* ではシロイヌナズナと同様、胚的形質が維持され、不定胚様組織の形成が見られた。TSA 処理によって誘導されたシロイヌナズナと *C. bursa-pastris* の不定胚様組織を切り出し、固形 B5 培地上で培養した結果、根や葉が形成され正常個体へと発生した。また、この個体からは種子も得られ、その種子は正常に発芽、成長した。一方、*A. griffithiana* および *O. pumila* では、50 μ M TSA 処理で致死した。また、5 あるいは 25 μ M TSA で処理した時、不定胚様組織の形成といった顕著な胚的形質は見られなかった。

次に、TSA 処理前と処理後の各近縁種の種子貯蔵蛋白質遺伝子である *CRUCIFERIN B* (*CRB*)、*EMBRYOGENIC CELL PROTEINS 63* (*ECP63*) の発現を比較した結果、全ての植物種において TSA 処理後に発現上昇が見られた。

以上の結果から、シロイヌナズナと *C. bursa-pastris* では TSA 処理によって胚的形質の抑制が阻害されることが明らかになった。形成された不定胚様組織は植物個体への再性能を持ち、不定胚と同様の組織であることも示唆された。また、*A. griffithiana* および *O. pumila* においては、TSA 処理により胚的形質および不定胚様組織の形成は見られないものの、種子貯蔵蛋白質遺伝子の発現が上昇しており、シロイヌナズナと同様に、胚的形質の抑制が阻害されている可能性が示された。以上の知見から、HDAC による胚的形質抑制機構の一部は、シロイヌナズナを含む近縁種間で保存されている可能性が示唆された。

今後の展望

今回の研究により、用いた全ての近縁種において、TSA 処理によって種子貯蔵蛋白質遺伝子の発現が上昇していたことから、胚的形質の抑制機構の共通性が示唆された。しかし、TSA 感受性および不定胚誘導の有無には違いが見られた。これは、胚発生特異的な遺伝子の種による違いと予測される。そこで今後は、HDAC による胚的形質抑制機構の共通性をより詳細に解析することを目的として、シロイヌナズナで明らかにされている *CRB* や *ECP63* の上流遺伝子 (転写制御因子) をそれぞれの近縁種において単離し、TSA 処理区と無処理区における発現解析を行うことで、不定胚誘導の起こる種と起こらない種での相違点を検証する予定である。

CRES-T 法を用いた極性遺伝子導入によるアサガオの花形改変に関する研究

川崎 真澄 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小野 道之 (生命環境科学研究科)

背景・目的

これまでの従来育種では、品種改良に長期に渡る時間や手間がかかることや他種生物間で交雑できないことなどの問題があった。RNAi 法やアンチセンス法などの遺伝子組換え技術の発達と様々な生物種におけるゲノム解読の進歩により、これらの問題は改善されてきた。しかし、植物には、機能が重複した転写活性化因子が存在していることが知られていて、特定の遺伝子の発現を抑制しても、表現型に反映されないことがあった。この問題を改善するために、CRES-T 法 (Chimeric REpressor genes-Silencing Technology) が開発された。CRES-T 法では、シロイヌナズナの転写抑制因子から同定された抑制ドメイン (SRDX) を任意の転写活性化因子に融合することで、転写活性化因子を転写抑制因子 (キメラリプレッサー) に変換する。同時に、機能が重複している転写活性化因子の活性を阻害することで、標的遺伝子の発現を抑制する。本研究室では、CRES-T 法の実証的研究を目的とした形質転換体作出を試みた。材料にはアサガオを用いた。アサガオは文科省のナショナルバイオリソースの一つに選定され、花形の変異の遺伝解析が進んでいる花きのモデル植物であることや古くから日本で園芸作物として栽培され、図譜や論文が存在していたことで、古典遺伝学・生理学における知見が多く集積している点で優れた材料である。江戸時代には、花の形態が特殊で観賞価値の高いアサガオ品種が、特に好まれ、今日ではそれらのアサガオは「変化朝顔」と呼ばれ、大学や愛好家の努力により維持されている。しかし、すべての変化朝顔が保存されているわけではなく、すでに図譜でしか確認することのできない品種も存在する。アサガオの内生遺伝子 *FEATHRED (FE)* の欠損変異体では、「獅子」と呼ばれる花形の変化を示すことが知られていて、先行研究では、*FE* の相同遺伝子として知られていたシロイヌナズナの極性遺伝子である *KANADI (KAN)* ファミリーとその下流遺伝子である *YABBY (YAB)* ファミリーの遺伝子に着目し、CRES-T 法を用いて、キメラリプレッサーを作製した。それをアグロバクテリウム法でアサガオに導入し、形質転換体を作出した。特に、*YAB1SRDX* 形質転換体では、花卉で曜を残した切れ込みが入り、さらに、葉の縮小、ちぢれなどの特殊な形態変化が観察された。そこで、*YABBY* ファミリーのその他の遺伝子の形質転換体においても特殊な形態変化を示すのではないかと考えられた。

そこで、本研究では、*YAB1* 以外の *YABBY* ファミリーに属する遺伝子である、*YAB2*、*YAB3*、*YAB4*、*YAB5*、*CRABS CLAW (CRC)* と *YABBY* ファミリーの発現制御に関わる *AINTEGUMENTA (ANT)* のキメラリプレッサーをアサガオに導入し、形質転換体作出を目指した。さらに、形態的特徴の観察、図譜との比較などを通して、現存しない変化朝顔復活の手掛かりを得る。同時に、先行研究で作出された不稔化系統を含めた個体の増殖と網室における環境影響評価実施に向けての準備を行う。

材料・方法

アサガオの栽培品種であるムラサキ (*Pharbitis nil* cv. Violet) を用いた。転写抑制ドメイン (SRDX) 含むコンストラクトを作成し、アグロバクテリウムに導入、アサガオの不定胚に感染させた。その後、カナマイシン耐性の選抜を行い、

再分化を誘導した。再分化後は、発根誘導培地に移した。発根したシュートの本葉から DNA を抽出、PCR と電気泳動を行い、目的遺伝子の導入が確認できた個体を馴化した。生育中の個体における形態観察とマイクロスライサーを用いた花、葉の組織切片の観察を行い、非形質転換体 (NT) と比較した。環境影響評価実施のための準備として、アグロバクテリウムの残存試験を行った。生育中の形質転換体の本葉を磨り潰した抽出液を、カナマイシン耐性選抜培地に塗布して培養し、残存アグロバクテリウムのコロニーの有無を調べた。

結果・考察

目的遺伝子を含むコンストラクトを導入したアグロバクテリウムをアサガオの不定胚に感染させ、*YAB3SRDX*、*YAB4SRDX*、*YAB5SRDX*、*ANTSRDX* を導入している不定胚から再分化してきたシュートを採取し、発根誘導培地に移した。そのうち、*YAB3SRDX* の 1 ラインと、*YAB4SRDX* の 1 ラインでは、DNA 抽出、PCR と電気泳動の結果、目的遺伝子の導入が確認できたので、馴化した。馴化完了後、形態観察を行った。その結果、*YAB3SRDX* と *YAB4SRDX* の花や葉の形態は非形質転換体 (NT) と比較して、大きな違いは観察されなかった。さらに、組織切片の観察による比較においても、断面構造に大きな違いは観察されなかった。今回は、形質転換体を 1 ラインずつしか観察していないため、*YAB3SRDX*、*YAB4SRDX* の機能が反映されていない個体を観察している可能性が考えられた。今後は、*YAB3SRDX*、*YAB4SRDX* を含め、その他のコンストラクトで、形質転換植物のライン数を増やし、導入遺伝子ごとの花、葉などの器官の観察を行い、形態的特徴をまとめていきたい。さらに、アサガオの内生の局在遺伝子の発現を形質転換体と非形質転換体 (NT) で比較することで、発現量と形態変化の関係性と CRES-T 法の転写抑制の効果を検討していきたい。一方、先行研究で作出された *KAN1SRDX* と *YAB1SRDX* の形質転換植物においてアグロバクテリウムの残存試験を行い、すべてのラインでアグロバクテリウムが残存していないことが確認された。今後は、学内の遺伝子組換え実験安全委員会の承認後、屋外の網室で環境影響評価を行っていきたい。

アサガオの光周性花成誘導における *PnCOP1* の解析

北野 紀子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小野 道之 (生命環境科学研究科)

背景と目的

高等植物は内外の様々な環境要因によって、栄養成長から生殖成長へと成長相を移行させる。これを花成と呼び、特に日長変化によって引き起こされるものを光周性花成誘導という。近年、光周性花成誘導の分子機構に関する研究は主に、長日植物ではシロイヌナズナ、短日植物ではイネを用いて進められてきたが、植物種毎に様々な違いが見られることが明らかになりつつある。

シロイヌナズナは、主に4つの花成経路(光周期経路・春化経路・自律的経路・ジベレリン経路)を持つ条件的長日植物である。一方で、アサガオは絶対的短日植物であり、1回の短日処理で花成が誘導され、また光中断により花成が抑制される。1回の光周期処理で花成が誘導される性質は、シロイヌナズナやイネには存在しない。本研究室ではこの性質に着目し、アサガオを研究材料として、光周性花成誘導に関する光受容体、概日時計、花成ホルモンの本体及び、茎頂での花芽分化関連遺伝子の解析が進められてきた。

シロイヌナズナの光周期経路では、概日時計の出力系として、*GIGANTEA* (*GI*) → *CONSTANS* (*CO*) → *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) のカスケードが存在し、*CO* が花成ホルモンの本体である *FT* をポジティブに制御することが明らかになってきた。一方、アサガオにおいては各々の相同遺伝子が存在するが、*CO* の相同遺伝子である *PnCO* が *FT* の相同遺伝子 *Pharbitis nil FT LEAF-TYPE* (*PnFTL*) の発現に対して抑制的に働くことが示唆されている。このことから、アサガオの光周性花成誘導機構はシロイヌナズナとは異なっていることが予想される。

そこで、本研究では、葉における光周性花成誘導の初期過程に着目し、シロイヌナズナの *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1* (*COP1*) の相同遺伝子である、*PnCOP1* の機能解析を目的とした。シロイヌナズナでは、*COP1* は花成促進因子である *CO* タンパク質の分解を通して花成抑制的に働くことが明らかになっている。アサガオでは *PnCO* が花成抑制的に働くことから、*PnCOP1* はシロイヌナズナの *COP1* とは逆に、花成に促進的に働く可能性がある。*PnCOP1* の花成における機能を明らかにすることは、アサガオの光周性花成誘導機構及び、短日植物と長日植物における光周性花成制御機構の違いの解明に繋がることが期待される。

材料と方法

アサガオ品種ムラサキ (*Pharbitis nil* cv. Violet) を用いた。ムラサキは10時間以上の暗期を1回与えるだけで花成を誘導することが明らかとなっている。

1. 花成調査

PnCOP1-RNAi (発現抑制体) を用い、恒明条件下で栽培した播種後6日目の幼植物体に12–16時間の連続した暗期を1回与る。その後再び恒明条件下で栽培し、暗期処理3週間後の花芽の数と頂端花芽形成の有無を測定する。

2. タンパク質の機能解析

Bi-molecular Fluorescent Complementation (BiFC) 法を用いて *PnCOP1* と *PnCO* のタンパクレベルでの結合

を調べる。*PnCOP1* と *PnCO* タンパク質に、YFP のN末側半分、またはC末側半部分を融合させたベクターを作成し、これを使用する。遺伝子導入にはアグロインフィルトレーション法を用い、*Nicotiana benthamiana* の本葉に導入して蛍光観察を行う。

結果及び考察

1. 花成調査

PnCOP1-RNAi の花成は、NT (非形質転換体) と比較して抑制されるという結果が得られた。*PnCOP1* は花成促進的に働き、シロイヌナズナの *COP1* とは逆の役割を持つことが明らかとなった。

シロイヌナズナの *COP1* はユビキチンリガーゼとして働き、*CO* を分解することが報告されている。従って、アサガオにおいては、花成抑制的に働く *PnCO* を *PnCOP1* が分解し、花成が促進されるのではないかと推測される。

2. タンパク質の機能解析

BiFC 法用のベクターコンストラクトを作成した。

今後、アグロインフィルトレーション法によるトランジェントアッセイを行い、*PnCOP1* と *PnCO* タンパク質の結合を、YFP の蛍光観察によって確認する。

今後の展望

PnCOP1 と *PnCO* の結合の有無が明らかになれば、アサガオの光周性花成誘導機構における、タンパクレベルでの制御の一部が解明されると期待される。また、シロイヌナズナにおいては、*COP1* と他の花成関連因子との結合も報告されており、アサガオにおいても同様に解析を進めることで、*PnCOP1* の花成誘導機構における役割が明らかになると考えられる。

アグロバクテリウム法によるサツマイモの効率的な形質転換方法の確認と塩ストレス耐性を持つ組換え体の作成

小林 万純 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 菊池 彰 (生命環境科学研究科)

背景

地球温暖化による気候変動、焼き畑農業などによる森林破壊や家畜の過放牧による土壌の乾燥によって引き起こされる塩害は世界各地で起こっており、塩害によって農作物の生育が妨げられている。そのため、塩害地でも栽培することができ、農業生産の維持や環境保全に貢献できる塩ストレス耐性を持つ作物の作出が望まれている。

塩ストレス耐性を付与する作物のターゲットとして、世界での年間生産量が第7位と世界中で広く栽培されており、現在地球規模で起こっている諸問題(エネルギー問題や食糧不足など)を解決するのに十分な可能性を秘めているサツマイモに着目した。サツマイモは6倍体、自家不和合、雄性不稔であるため従来の交配による品種改良での生産性や品質の改良は困難であった。そこで注目されたのが遺伝子組換え技術であり、エレクトロポレーション法やパーティクルガン法などの手法が開発された。そのなかでも近年、より簡単かつ効率的なアグロバクテリウム法が注目されている。これまでサツマイモにおいて様々なアグロバクテリウム法による形質転換が試みられてきたが、遺伝子導入が成功した品種、再分化個体を得られた品種は限られており、さらにその方法は品種によって異なる。そのため品種を問わない効率的な形質転換方法の確立が望まれている。

目標

サツマイモにおける品種を問わない効率的なアグロバクテリウム法の確立を念頭に、既存のアグロバクテリウム法を実施、改良することによって、効率的で再現性の高い手法の開発を目指す。また、塩ストレス耐性を持つ遺伝子組換えサツマイモの作成を目標とする。

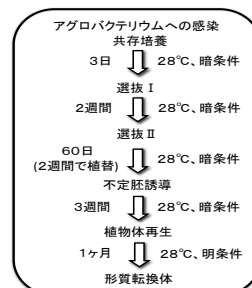
材料と方法

1) 材料

サツマイモの栽培品種である九州125号、九州126号、高系14号、ベニアズマの4品種を用いた。それぞれLS培地(3% ショ糖、0.32% ジェランガン)で維持されており、1-2ヶ月培養したものの葉と葉柄を用いた。アグロバクテリウムは *Agrobacterium tumefaciens* の系統 LBA4404 株、ベクターはマングローブから単離された塩耐性タンパク質であるマングリンをコードする遺伝子 *mangrin*、マーカー遺伝子としてカナマイシン抵抗性遺伝子 (*npt II*) を含んだ pAB7113-*mangrin* を用いた。

2) アグロバクテリウム法 (Figure 1、2)

植物体をアグロバクテリウムに感染させた後、4FA (合成オーキシン) を含む共存培養培地に移して共存培養を行った。その後カナマイシン濃度が 25 mg/l の選抜培地 I、続いてカナマイシン濃度が 50 mg/l の選抜培地 II に移し、2段階で選抜を行った。選抜中に形成されたカルスを、アブシシン酸、ジベレリンを含む不定胚誘導培地に移して不定胚誘導を行い、形成された不定胚をアブシシン酸、ゼアチンリポドを含む植物体再生培地に移して植物体の再生を行った。共存培養以降、アグロバクテリウムの除菌のため、抗生物質であるカルベニシリンかオーグメンチンを培地に加えて培養を行った。



	共存培養	選抜 I	選抜 II	不定胚誘導	再生
4FA	1	1	1	—	—
アセトシリシロン	10	—	—	—	—
カナマイシン	—	25	50	50	50
抗生物質(除菌)	—	0	0	0	0
アブシシン酸	—	—	—	4	0.05
ジベレリン	—	—	—	1	—
ゼアチンリポド	—	—	—	—	0.2

(mg/l) 0: カルベニシリン200mg/l か オーグメンチン375mg/l

Figure 2: 培地組成

Figure 1: アグロバクテリウム法

結果及び考察

九州125号を除く3品種においてカナマイシン抵抗性カルスを得ることができた。

3品種とも葉では選抜 II の1-4週目、葉柄では4-6週目になるとカルスが枯死していった (Figure 3)。その理由として、カナマイシンの濃度が高すぎる、または選抜 II の期間が長過ぎるということが考えられる。そのため、選抜 II におけるカナマイシン濃度を 25 mg/l に下げる (Gama *et al.* 1996) か、または選抜 II の期間を葉では1-2週間、葉柄では4週間にするとよいと考えられる。選抜 II の期間を短縮することによって、これまで確立されている方法に比べ、より迅速な形質転換法の確立が期待出来る。

これまでの先行研究ではアグロバクテリウムの除菌にカルベニシリンが用いられてきたが、カルス誘導を阻害することがあることが知られている。そのため本研究ではオーグメンチンの使用も試みた。その結果、葉、葉柄の両方でカルベニシリンよりもオーグメンチンを用いた場合、カルス形成が良いことがわかった。

今回、選抜を行ったカルスを不定胚誘導培地に移したが不定胚を得ることができなかった。そのためアブシシン酸、ジベレリンの濃度をさまざまに変え、最適濃度を検討する必要がある。

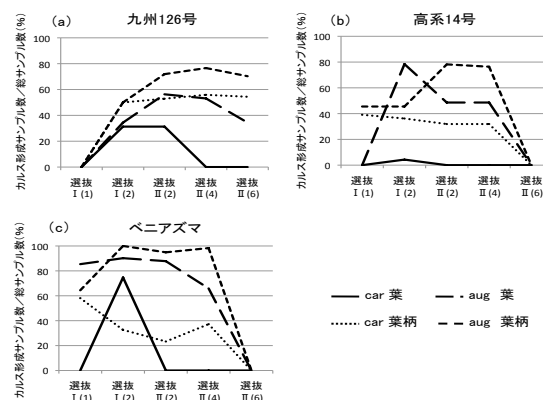


Figure 3: 選抜 II・6週間後までに得られた「カルス形成サンプル数/総サンプル数 (%)」の変化

遺伝子組換え植物が土壤機能に及ぼす影響の分子レベルでの評価方法の開発

榎村 友子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渡邊 和男 (生命環境科学研究科)

背景と目的

近年遺伝子組換え植物の実用化に向けた研究が行われているが、遺伝子組換え植物を屋外で栽培する際には事前に周辺の生態系に与える影響を調べる必要があり、周辺植生と周辺土壌微生物に対する評価が必要である。このうち土壌微生物に対しては平板培養や Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) などによる影響評価が行われているが、これらの手法を駆使しても全ての土壌微生物に対する評価は出来ない。そこで、主要栄養素である炭素・窒素・硫黄・リンなどの循環を担う土壌の機能面に着目し、土壌全体の生態系を評価する手法の利用が実施されはじめている。こうした土壌の機能は、土壌酵素の活性測定を行うことにより評価が可能で、遺伝子組換え植物の植栽によって土壌機能が損なわれないかの検討がなされている。しかしながら、現在行われている土壌酵素活性測定には、多大な時間と労力、そして費用がかかる。さらに、人体に有害な物質も使用されるため、土壌酵素活性測定に代わるより簡便な方法が求められている。

そこで本研究では、遺伝子組換え植物及びその他の植物栽培が土壌機能に及ぼす影響を、より迅速・簡便・安全に評価するマクロアレイ法を開発を目指し、硫黄循環に関わる酵素である Arylsulfatase について土壌酵素活性の指標となるプローブの探索を行った。

材料と方法

1. 材料

ユーカリ、ポプラ、ジャガイモ、ショウガなどが栽培された圃場の土壌を用いた。

2. 土壌 DNA 抽出

土壌 DNA は FastDNA SPIN Kit for soil (Qbiogene, Carlsbad, CA) を用い、付属のプロトコールに従って抽出した。ただし、収量を上げるため粉碎のステップの前にスキムミルク (40 mg/g 土壌重量) を添加した (Hoshino and Matsumoto, 2004)。

3. PCR

抽出した DNA をテンプレートとし、PCR (denature 94°C, 30 sec. + annealing 50, 55 or 60°C, 1 min. + extension 72°C, 45 sec. or 1 min. × 40 cycles) による遺伝子配列の増幅を行った。プライマーには数種類のバクテリアの Arylsulfatase をコードする遺伝子配列をもとに 500 bp 前後の遺伝子断片を増幅するよう設計・作成したものをを用いた。目的サイズの遺伝子断片の増幅に成功した PCR 産物は、クローニング・シーケンス確認後、指標プローブ候補として用いる。

4. 土壌酵素活性測定

土壌サンプルを基質とともにインキュベートし、酵素-基質反応産物の濃度を測定する方法 (Tabatabai and Bremner, 1970) を用い Arylsulfatase 活性を測定した。

結果と考察

現在まで、作成した 14 種類のプライマーセットのうち 7 種類で目的サイズ (500 bp 前後) の遺伝子断片の増幅に成功した (Figure.1)。これらの遺伝子断片は Arylsulfatase をコードする遺伝子配列の一部だと考えられる。シーケンスによりこれらの遺伝子断片の配列を取得し、データベースと照

らし合わせて Arylsulfatase をコードする遺伝子配列の一部であることの確認をしたのち、これらを指標プローブ候補とする。

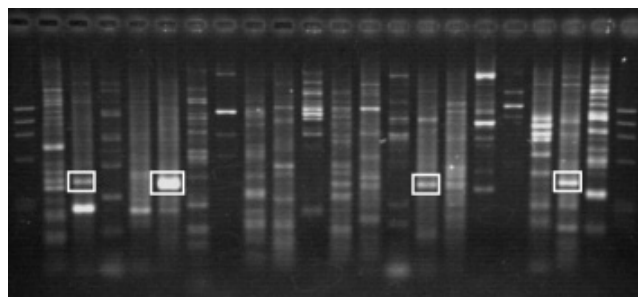


Figure 1: 設計したプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動像の一部。上段・下段の両端のレーンには ϕ X 174 マーカーを、その他のレーンにはそれぞれ異なる組み合わせのテンプレートとプライマーを用いた PCR 産物を泳動した。四角で囲ったものが目的サイズのコピーである。

ポプラ栽培土壌の 6 サンプルを用いて土壌における Arylsulfatase 活性酵素活性を測定したところ、サンプルごとに様々な活性を示した (Figure.2)。これらのサンプルから RNA を抽出し、ドットプロット解析に用いる。

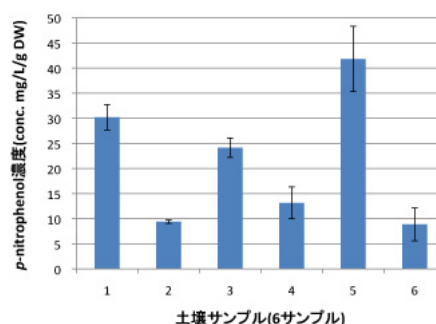


Figure 2: Arylsulfatase 活性酵素活性。グラフの横軸には土壌サンプル (6 サンプル) を、縦軸には Arylsulfatase 活性の指標である p-nitrophenol 濃度を示す。p-nitrophenol は Arylsulfatase と、基質である p-nitrophenyl sulfate との反応産物で、p-nitrophenol 濃度が高いほど酵素活性が高いと推定できる。

ドットプロット解析から、各指標プローブ候補の発現量と土壌酵素活性結果 (Figure. 2) との比較を行う。相関の高いプローブの絞り込みを行い、マクロアレイに載せるプローブを決定する。

参考文献

Takada-Hoshino Y. and Matsumoto N. (2004). An Improved DNA Extraction Method Using Skim Milk from Soils That Strongly Adsorb DNA. *Microbes Environ.* 19:13-19.

Tabatabai M. A. and Bremner J. M. (1970). Arylsulfatase activity of soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 34:225-229.

除草剤により発生する活性酸素分子種および抗酸化物質ラジカル種の ESR による解析

細井 智美 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 松本 宏 (生命環境科学研究科)

背景・目的

生体内で発生する活性酸素分子種 (ROS) は、生体成分と反応することで酸化障害を引き起こして細胞を損傷させ、動物細胞においては老化や発癌等の原因としても知られている。こうした ROS は、生体分子との反応性が非常に高く寿命が短いため、直接検出するのが困難である。ROS をより直接的に検出する方法としてフリーラジカル特異性の高い、ESR (電子スピン共鳴) 法がある。ESR では、スピントラッピング法を用いることで、ラジカル種の同定も可能である。この方法では DMPO のようなスピントラップ剤が $O_2 \cdot^-$ や $OH \cdot$ などに優れた反応性を有し、安定したラジカル付加体を形成するため、そのスペクトルを解析することが可能である。また本研究室における先行研究で、包膜が破壊された葉緑体と包膜を維持した完全葉緑体を材料に、ROS 発生剤として除草剤 MV および DCMU を用いた ESR 測定が行われており、MV のみで $O_2 \cdot^-$ のシグナルが確認された。さらに、DCMU と MV では $O_2 \cdot^-$ 発生部位が異なることおよび $O_2 \cdot^-$ は葉緑体の包膜を通過できないという可能性が示唆されている。以上の先行研究を踏まえ本研究では、除草剤による葉緑体での ROS 発生の確認と ESR 測定手法の改良および抗酸化物質であるビタミン C (L - アスコルビン酸)、ビタミン E (α -トコフェロール) ラジカルの測定を行い、抗酸化剤の反応機構およびラジカル消去に対する有効性についての知見を得ることを目的とする。

材料

供試植物:

ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.) 市販のものを使用

供試薬剤:

- ・除草剤 (ROS 発生剤)
 - Methylviologen (MV; paraquat)、
 - DCMU [3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea]
- ・トラップ剤
 - DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide)
- ・抗酸化剤
 - L - アスコルビン酸 (AsA ; ビタミン C)、
 - α -トコフェロール (α ; ビタミン E)

実験方法

実験 1. 包膜が破壊された葉緑体を用いた ROS 発生の ESR による確認

葉柄を取り除いたホウレンソウ 20 g に葉緑体調整液を 50 ml 加え、乳鉢で磨砕した。磨砕液を濾過後、遠心分離し得られた沈殿に葉緑体調整液を加え、チラコイド膜試料とした。アセトン 2 ml、蒸留水 0.45 ml、チラコイド膜試料 50 μ l を混合・攪拌し、652 nm における吸光度を測定し、クロロフィル量を 0.30 mg/ml に調整した。チラコイド膜試料に、DMPO 溶液、MV (10^{-4} M) または DCMU (10^{-4} M) を順に加え攪拌し、ESR 用扁平セルで吸い上げ、セルに光を照射した (120sec, 100 μ mol $\cdot$ m $^{-2}$ $\cdot$ sec $^{-1}$ 以上)。光照射後、速やかに ESR 装置 (JEOL-JES-FR30EXT) によりシグナルを測定し、シグナル強度を、Mn マーカーに対する相対強度で比較した (測定条件: Microwave power /4.0 mW、Magnetic field

/336.5 mT、Amplitude/2.5 $\times$ 100、Modulation width /0.2 $\times$ 0.1 mT、Time constant/0.1 s、Sweep time/2 min)。

実験 2. ビタミン C、E ラジカル測定

実験 1 の操作のうち、DMPO (30 μ l) および MV 添加後、アスコルビン酸 (10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} M) または α -トコフェロール (10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} M) を添加した。また、ESR 測定条件において Modulation width を 0.63 $\times$ 0.1 mT または 0.25 $\times$ 0.1 mT に設定した。他は全て実験 1 の操作と同様とした。

結果・考察

実験 1.

MV を用いた場合、相対強度のより高いピークを得るため、DMPO 添加量について再検討を行い、30 μ l を添加量と決定した。また、DCMU では MV の 1/3 以下のピークしか得られず、DMPO 無添加ではシグナルは測定できなかった。これは先行研究と同様の結果であった。一方、MV を添加せずに、DMPO のみを添加した条件下でもラジカルを捕捉できた。これは、光照射下で通常発生する ROS を捕らえた結果であると考えられる。

実験 2.

【ビタミン C ラジカル】 DMPO の有無に関わらずアスコルビン酸ラジカルの生成を確認できた。これより、ROS が DMPO より速くアスコルビン酸と反応することおよびアスコルビン酸の強いラジカル消去能が示された。また $\pm$ DMPO 下で、アスコルビン酸ラジカルが濃度依存的に増加した。 10^{-5} M の低濃度アスコルビン酸を添加した場合は、アスコルビン酸ラジカルとヒドロキシルラジカルが共存し、 $\pm$ DMPO 間でアスコルビン酸ラジカル強度に大差はなかった。これより低濃度アスコルビン酸下では、DMPO と AsA が競合していたと考えられる。

【ビタミン E ラジカル】 -DMPO では、 α -Toc ラジカルは検出できなかった。また+DMPO では、ヒドロキシルラジカルの α -トコフェロール濃度依存的な減少が見られた。このように、ヒドロキシルラジカル強度を指標とし、 α -トコフェロールラジカル消去を間接的に測定できた。

まとめ

今回得られた結果から、アスコルビン酸の高い抗酸化性が改めて明らかとなった。一方、 α -トコフェロールにおいては、直接トコフェロールラジカルは検出できなかったが、ヒドロキシルラジカルを指標とした間接的な測定を行うことができ、新たな測定手法を提案できた。また、今回の ESR 測定でシグナルを得られなかった DCMU や α -トコフェロールを添加した場合については、これらの各除草剤および抗酸化剤と活性酸素の詳細な反応機構についてさらに検討する必要がある。

微生物による植物由来生理活性物質の代謝

酒井 典之 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小林 達彦 (生命環境科学研究科)

背景・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。そのような物質には、植物に対して果実の熟化や老化促進、そして休眠打破などの作用を誘導し、傷害などの環境ストレスに応答して生合成され、それに対応する手助けをするものが存在する。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経路およびそれに関わる酵素・遺伝子を解明することを目的とした。

方法・結果

本生理活性物質を単一炭素源とした培地に各所の土壌を加え、集積培養を行った。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、本物質を代謝できる微生物のスクリーニングを行った。培養した菌体から調製した細胞懸濁液を基質と混合し休止菌体反応を行い、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で解析した結果、基質の減少を確認した。

今後の予定

スクリーニングを継続して行い、得られた菌株の中から特に代謝能力の高い菌を選択した後、様々な培養条件 (培地組成、培養時間、誘導剤) を検討し、生理活性物質の分解活性を低下させることなく、本菌体を大量に取得出来る培養条件を決定する。さらに、確立した条件で菌を大量に培養し、各種カラムクロマトグラフィー操作により、本生理活性物質代謝に関わる酵素の精製を行い、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 上で単一標品になるまで純化し、詳細な酵素学的諸性質を調べる計画である。その後、本酵素の遺伝子クローニングを行いたい。

微生物酵素に探索研究

前田 邦博 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小林 達彦 (生命環境科学研究科)

背景・目的

微生物は様々な酵素を作るが、我々人間は生活に役立つ多くの有用な酵素を探索し、これまで利用してきた歴史がある。例えば、*Bacillus licheniformis* の生産するアルカリプロテアーゼはタンパク質・脂質の汚れや黄ばみを取り除くために洗濯用洗剤に配合されている。また *Actinoplanes missouriensis* の生産するグルコースイソメラーゼはグルコースを基質としてフルクトースに変換することができるため、食品加工に使われる安価な甘味料代替物生産に利用されている。

本研究では利用価値の高い酵素を生産する微生物を研究室保有菌を中心にスクリーニングし、それらの菌が持つ酵素の機能を解析することを目的とした。

方法・結果

研究室保有菌のバクテリア・放線菌・酵母を、菌に応じたそれぞれの培地で前培養した。誘導剤添加の有無・28°C、37°C の培養温度など様々な培養条件で本培養を行った。培養終了後、遠心分離により培養上清と菌体に分離した。菌体はさらに破碎処理を行い、遠心分離により上清を回収することで無細胞抽出液を調製した。この培養上清と無細胞抽出液をサンプルとして、様々な基質と反応させた。本反応液中には、酵素反応により基質から生じた産物とカップリングし発色する試薬を混合しておき、反応が進むことを発色で判断できる活性測定系を構築し、反応後の吸光度を測定することで酵素活性の有無を調べた。

今後の予定

まだスクリーニングが終了していない研究室保有のカビ・担子菌・乳酸菌を対象とし、同様の活性測定系を用いて引き続きスクリーニングを行う。また、これまでにスクリーニングを行った菌の中で、吸光度上昇が見られ、目的とする酵素活性が存在すると考えられる候補株に関しては、目的とする酵素の活性の強弱を比較できる活性測定系を検討し、さらなる絞り込みが可能となる二次スクリーニングを行う予定である。

微生物による含窒素化合物分解に関する研究

中倉 啓介 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小林 達彦 (生命環境科学研究科)

背景・目的

窒素を含んだ官能基には様々な特徴を示すものが多く存在する。その中で、アジド化合物は3原子の窒素が互いに二重結合で繋がった官能基を持つ化合物の総称である。アジド化合物の特徴として、その多くが強い毒性や爆発性を有しており、様々な分野で利用されている。例えば、アジド化合物はその毒性を利用して実験用のカラムや検査試薬等の防腐剤として使われており、また爆発性を利用して銃弾や地雷の信管、身近なところでは自動車エアバックの起爆剤として使用されてきた。しかし、その高い毒性や爆発性、さらに安全かつ簡便な分解処理方法が確立されていないといった問題点から、現在はアジド化合物の使用が敬遠される傾向にある。

アジド化合物の代謝は分かっておらず、本代謝に関わる酵素の報告はなかった。当研究により、様々な培地条件下でアジド分解微生物をスクリーニングした結果、高いアジド分解活性を持つ菌株の取得に成功した。

そこで本研究では、得られたアジド化合物分解酵素の諸性質やその反応機構を解明することを目的とし、得られる知見が、アジド化合物の分解処理への応用やアジド化合物を介した有用物質生産への利用に還元され得ることを期待した。

方法・結果

本研究では既にスクリーニングに成功しているグラム陰性の桿菌で、高いアジド化合物分解活性をもつ菌株を対象とした。

アジド化合物分解活性を示す菌の培養条件を種々検討し、最もアジド分解活性が高くなる最適発現条件を決定した。本条件で大量に培養して得られた菌体を破碎し、無細胞抽出液を調製した。本無細胞抽出液から、現在、各種クロマトグラフィーを用いてアジド化合物分解に関わる酵素の精製を行っている。

今後の予定

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、単一バンドになるまでアジド化合物分解酵素の精製を行い、その諸性質を解明することで応用的な分野の研究を行う予定である。

放線菌の誘導発現機構に関する研究

井口 悠也 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 橋本 義輝 (生命環境科学研究科)

背景・目的

微生物の一種である放線菌は土壤中に生育しており、生育環境によって発現するタンパク質は変化する。それにより、放線菌は様々な生理活性物質や二次代謝産物を生産することが知られており、今日の応用微生物学上、最も重要な菌群である。

当研究室において、放線菌を特定の条件で培養すると、あるタンパク質 X が誘導発現することが先行研究により確認されている。また、このタンパク質 X をコードする遺伝子の単離にも既に成功し、この遺伝子上流にはプロモーターと予想される配列が存在していることも判明している。しかし、本タンパク質の誘導発現機構は未解明であり、また誘導発現するタンパク質の機能自体についても調べられていない。そこで本研究では、この誘導の機能を解明することを目的とした。

方法・結果

末端に制限酵素サイトを付加したプライマーを用い、放線菌の染色体 DNA を鋳型として PCR によりタンパク質 X の構造遺伝子を増幅した。その後、この遺伝子をプラスミドに連結し、大腸菌を形質転換してプラスミドを抽出した。このプラスミドのシーケンスを行い、目的の遺伝子がプラスミドに組み込まれ、PCR 増幅過程で変異が入っていないことを確認した。さらに、プライマーに付加した制限酵素で切断し、本遺伝子をタンパク質発現用ベクターに連結して発現プラスミドを構築した後、本発現プラスミドを用いて大腸菌で形質転換を行った。この形質転換体を培養し、SDS-PAGE に供したところ、予想される分子量の位置に大量に発現したタンパク質のバンドが確認できた。しかし、そのタンパク質の大部分は不溶性タンパク質として発現したため、次に、各種培養条件を検討したが、可溶性タンパク質として発現する量は増加しなかった。そこで、シャペロンベクターとの共発現を検討したところ、目的のタンパク質が可溶性画分に多く発現するようになった。この形質転換体を用いてタンパク質 X を大量に発現させるため、大量培養の条件検討を行い最適な条件を決定した。現在、この条件で大量培養を行い、得られた菌体を破碎し調製した無細胞抽出液からタンパク質 X の精製を行っているところである。

今後の予定

目的とするタンパク質 Y を精製し、その諸性質を検討する予定である。

ホスファチジルイノシトール類定量法の検討

大道 智広 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 臼井 健郎 (生命環境科学研究科)

背景・目的

イノシトールリン脂質類 (Phosphatidyl inositol phosphates; PIPs) は、真核生物の細胞膜や細胞内小器官に存在する微量脂質成分であり、イノシトール・グリセロール・脂肪酸が結合した PI (Phosphatidyl inositol、図)、及び PI のイノシトール環 3、4、5 位の水酸基がおおのリン酸化を受けることで生じるリン酸化類縁体、PI3P (Phosphatidyl inositol 3-phosphate、以下同じ)、PI4P、PI5P、PI(3,4)P₂、PI(3,5)P₂、PI(4,5)P₂、PI(3,4,5)P₃ の 8 種が知られている。これらは増殖シグナルのセカンドメッセンジャー (PI(3,4,5)P₃) やアクチン細胞骨格制御 (PI(4,5)P₂) など、おおの分子種がそれぞれ異なった細胞機能の調節に関わっている。したがって、それぞれの分子種が細胞内にどれだけ存在しているのか、また細胞内のどこに存在するのかを明らかにすることは、PIPs が関わる細胞調節機構を明らかにする上で重要である。

しかしながら PIPs の一リン酸同士 (PI3P、PI4P、PI5P) や二リン酸同士 (PI(3,4)P₂、PI(3,5)P₂、PI(4,5)P₂) は、互いにリン酸化されている部位が異なるだけで物理的性質が類似しているため一般的に分離が難しい。また PIPs は紫外領域にほとんど吸収を持たないため、UV 吸収等を利用した定量分析も困難である。これらの制約のため、現在のところ PIPs の定量には [³H] イノシトールなどの放射性同位体 (RI) を用いた方法が主流となっている。しかし RI 使用に関わる様々な制約から、より扱いが容易で安全な non-RI を用いた手法が望まれている。そこで本研究では LC-MS (Liquid chromatography-Mass spectrometry) を用いた non-RI による PIPs の分離・定量法の確立を目的として研究を行った。

材料・方法

(1) LC-MS による PIPs の分離・定量

Pettitt らの方法 (参考文献) に準拠し、標品の大豆由来 PI、及び合成 PI3P、PI(3,4)P₂、PI(3,5)P₂、PI(4,5)P₂ を用いて分離条件の検討を行なった。各 PIP を終濃度 10 ng/ml になるようにクロロホルム・メタノール・水溶液に溶解後、シリカゲルを用いた順相カラムを用いて LC-MS 解析した。

(2) 動物細胞からの PIPs 抽出・精製

ヒト T 細胞由来白血病細胞 Jurkat から酸性条件下クロロホルム・メタノール抽出した脂質画分を用いて、シリカゲルでの粗精製条件検討を行なった。分離した脂質は乾燥後、クロロホルムに溶解し、TLC プレート (Silica 60) を用いて展開した。展開後の TLC プレートに 0.05% primulin を含むアセトン溶液を吹き付け、UV (302 nm) 下で観察した。

結果・今後の展望

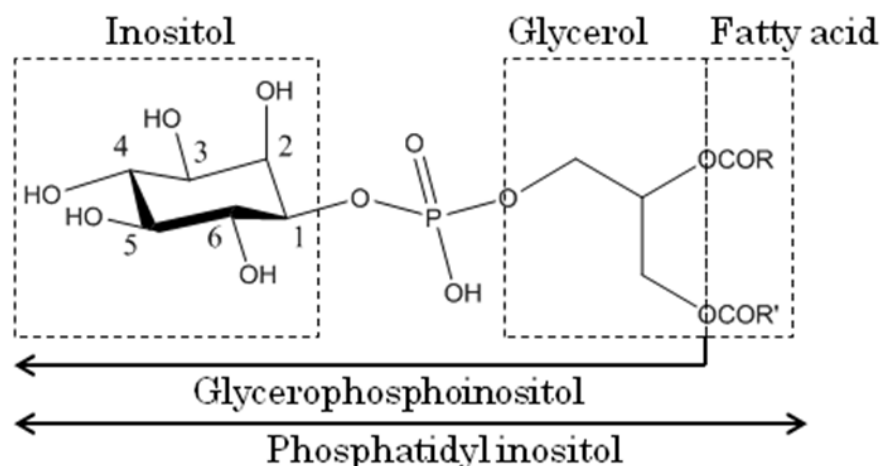
これまでに行われている研究と同様に、LC-MS 解析において PIPs の UV 吸収は観察することはできなかったが、MS により PI、PI3P、及び各 PIP₂ が分離できることが明らかになった。しかしながら PI(3,4)P₂、PI(3,5)P₂、PI(4,5)P₂ といった二リン酸同士のピークは近接しており、定量解析に用いるに十分な分離は得られていない。

また、TLC 解析により細胞抽出物には PIPs 以外の物質が多く含まれており、直接 LC-MS 解析に用いることが難しいことが明らかになった。

今後、より PIP₂ 類が分離する LC 条件、並びに LC-MS 解析に耐え得る PIPs 純度を得るための粗精製条件検討の確立を進める予定である。

参考文献

Pettitt TR, Dove SK, Lubben A, Calaminus SDJ, and Wakeham MJO. " Analysis of intact phosphoinositides in biological samples. " *J. Lipid. Res.* **47** , 1588 - 1596 (2006)



KSP 阻害剤の作用機構解析

樽井 弓佳 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 臼井 健郎 (生命環境科学研究科)

背景・目的

紡錘体チェックポイントとは、細胞分裂期における紡錘体異常を感知し、その異常が修復されるまで細胞周期進行を停止させる機構である。しかし多くの腫瘍細胞では、この紡錘体チェックポイントが活性化するにも関わらず細胞分裂が進行し、結果としてアポトーシスによる腫瘍細胞特異的な細胞死が引き起こされる。このことから紡錘体チェックポイントの活性化は抗がん剤の良い標的の一つであると考えられている。実際にかん化学療法でよく用いられる抗腫瘍剤には、微小管の重合・安定化を誘導する taxane 類や、重合阻害を引き起こす vinca alkaloid 類があり、これらは直接微小管に結合して微小管重合の安定化や不安定化を引き起こすことで紡錘体チェックポイントを活性化することが知られている。しかしながらこれらの既存微小管作用薬は、細胞分裂期以外の微小管機能も阻害してしまうため、末梢神経痛をはじめとするさまざまな副作用を引き起こすと考えられている。このような副作用をより少なくするためには、細胞分裂期でのみ作用する紡錘体チェックポイント活性化剤の開発が必要だと考えられる。

KSP (別名 Eg5、または kinesin-5) は微小管上を + 端方向に移動するキネシンモーター蛋白質の一つであり、二つの中心体から伸びる微小管上を移動することで、紡錘体形成に関わっている。これまでの研究から、KSP を阻害すると紡錘体の単極化と紡錘体チェックポイントの活性化が起こることが報告されている。KSP は間期では不活性な状態にあり、細胞分裂期において特異的リン酸化を受けて活性化することから、KSP 阻害剤はより副作用の少ない抗腫瘍剤となると考えられている。このような背景のもと、多くの製薬企業により KSP 阻害剤の開発が行われており、その内の幾つかは臨床試験が進んでいる。

KSP 阻害剤として、monastrol や terpendole E (TerE)、S-trityl-L-cysteine (STLC)、phenothiazine 骨格を有する chlorpromazine などがよく知られている。この中で monastrol に関しては既に結合部位や阻害機構について詳細な解析がなされているが、その他の化合物については不明な点が多い。そこでこれらの化合物の阻害機構を明らかにし、阻害剤間で阻害機構にどのような違いがあるか検討することにした。

材料・方法

KSP モータードメインの発現・精製

ヒト KSP モータードメイン (HsEg5(1-368)) を eXact タグ融合蛋白質として大腸菌発現させ、eXact カラムを用いてタグの無い形で精製した。

微小管 - HsEg5(1-368) 共沈実験

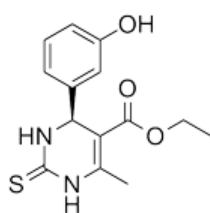
HsEg5(1-368) と濃度を振った各薬剤とを混和後、重合させた微小管と ATP を加え、室温で静置した。次に超遠心により、重合した微小管を含む沈殿と上清とに分けて SDS - PAGE を行い、薬剤が HsEg5(1-368) と微小管との結合に変化を及ぼすか検討した。

細胞内 KSP 局在検討

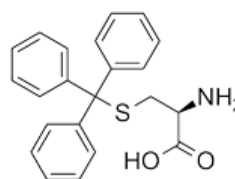
HeLa 細胞に各種薬剤を添加し、単極紡錘体形成能と KSP の局在を検討した。

結果

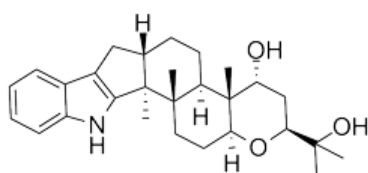
薬剤により HsEg5(1-368) と微小管との相互作用に対する効果が異なることが明らかになった。詳細は発表会にて紹介する。



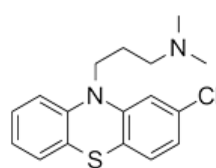
(S)-monastrol



S-trityl-L-cysteine (STLC)



Terpendole E



Chlorpromazine

酵母マーカーレス遺伝子破壊法の開発と多重遺伝子破壊株の作成

知念 拓実 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 臼井 健郎 (生命環境科学研究科)

背景・目的

化学生物学は生理活性物質や蛍光プローブ等の小分子化合物を用いて生命現象を解明する研究分野であり、その研究手法の一つである化学遺伝学は小分子化合物の生体内標的分子の同定・作用機構解析を通じて生命機能を明らかにする学問領域である。

生体内標的分子を明らかにする方法はいくつか存在するが、一つの手法として遺伝学的解析が容易な生物種を用いたアプローチがある。特に出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、真核生物のモデルでもあることから頻繁に用いられる。しかしその反面、動物細胞と比較して一般に薬剤耐性が高いことが解析を妨げる要因となっている。したがって、より薬剤感受性の高い「薬剤高感受性株」を確立することが出芽酵母を用いる上で非常に重要である。

細胞の薬剤耐性は

1. 薬剤透過性
2. 薬剤排出能
3. 薬剤不活性化酵素活性
4. 薬剤耐性変異

の主に4つのファクターにより決定されている。この中で3、4は薬剤一つ一つに特異的な耐性機構であるが、1、2は複数の薬剤に対し同時に耐性を付与することから、化学遺伝学のアプローチに有用な「多剤感受性株」作製に向け改善可能な点である。1の薬剤透過性の障壁として、細胞壁や細胞膜の脂質であるエルゴステロールが挙げられる。このうちエルゴステロールはエルゴステロール合成系の遺伝子を破壊することで取り除くことが可能であり、実際、いくつもの論文で ERG3p や ERG6p の破壊株 ($\Delta erg3$ 株や $\Delta erg6$ 株) が用いられている。一方、2の薬剤排出能には、細胞膜や液胞膜状の薬剤排出ポンプや、薬剤排出ポンプの発現を亢進する転写因子が関わっている。中でも転写因子の PDR1p と PDR3p は薬剤耐性の中心的役割を果たしていると考えられており、 $\Delta pdr1\Delta pdr3$ 二重破壊株もまたよく用いられている。その他にも *S. cerevisiae* には薬剤耐性を付与する薬剤排出ポンプ遺伝子として12種、構造的に薬剤排出ポンプと考えられる遺伝子を合わせると25種以上が報告されており、これらの遺伝子を同時に破壊することにより、さらに薬剤感受性が増した「多剤超感受性株」を作製することも可能であると考えられる。

一方、遺伝子破壊の手法として広く用いられているのは標的遺伝子をマーカー遺伝子で置き換えるというものだが、この方法によく使われる栄養要求マーカーは7つ、薬剤耐性マーカーは5つ程度しかなく、それ以上の遺伝子破壊や、その後の解析に用いる為のマーカーを保存しておくことを考えると、自ずと限界がある。

以上に述べた背景を元に、本研究ではマーカーを使わない酵母の遺伝子破壊法を確立することを主たる目的とし、それを応用して薬剤耐性に関わる複数の遺伝子を破壊した多剤超感受性株を作製することを目指した。

材料・方法

材料：

野生株 BY4741 (*MATa his3 $\Delta 0$ leu2 $\Delta 0$ met15 $\Delta 0$ ura3 $\Delta 0$*)

方法1：遺伝子破壊

遺伝子破壊用プラスミドを template に PCR を行い、目的の遺伝子の破壊 DNA 断片を作製した。作成した断片をリチウムアセテート法で親株に導入し、Uracil を含まない選択培地上で生えてきたコロニーを二度 single colony isolation して単一変異株として選択した後、Colony PCR によって目的遺伝子の破壊を確認した。

方法2：マーカーの抜き出し

標的遺伝子座の両端 150 bp ずつが直接結合した断片 (約 300 bp) を作製し、マーカー抜き出し用の DNA とした。作製した断片を上記遺伝子破壊と同様の方法で遺伝子破壊株に導入し、5-FOA を含む培地上で株を選択した。その後も同様にして Colony PCR によってマーカーの抜き出しの確認を行った。

結果

上記の手法によってマーカーレス遺伝子破壊が可能であることが明らかとなった。一遺伝子の破壊からマーカーの抜き出しまでには平均3週間程度しかかからず、「遺伝子破壊・マーカー抜き出し」を繰り返すことにより、細胞膜上の薬剤排出ポンプの10遺伝子、及び薬剤耐性に関わる転写因子の4遺伝子、計14遺伝子全てを破壊した株の作成に成功した。14遺伝子破壊株は、野生株と比較して増殖速度が若干低下するものの、さまざまな薬剤に対して高感受性を示した。

今後、作成した多剤超感受性酵母を用いて、薬剤標的の解析を行う予定である。

アクチン - アクチン結合蛋白質間相互作用を阻害する薬剤の解析

竹内 美穂 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 臼井 健郎 (生命環境科学研究科)

背景・目的

アクチンや微小管、中間径フィラメントは細胞骨格系を構築する蛋白質であり、いずれも最小単位となる蛋白質が常に重合・脱重合を繰り返す極めて動的な構造体である。アクチンはその中でも細胞の分裂や運動に極めて重要な細胞骨格であるとともに、他の細胞骨格とも協調してシグナル伝達などの様々な生命現象に関与していることが知られている。アクチンの重合・脱重合に影響を及ぼす薬剤 (以後、アクチン作用薬) も数多く知られており、その代表がアクチン重合阻害剤である latrunculin A とアクチン重合促進剤 jasplakinolide である。これらの化合物はいずれもアクチン蛋白質に直接結合し、それぞれアクチンの重合と脱重合を阻害する。一方、細胞内での生理的なアクチンの重合・脱重合は、100 種類を超えとも言われる様々なアクチン結合蛋白質によって制御されている。それらは formin などのアクチン重合促進蛋白質や cofilin などのアクチン脱重合蛋白質、gelsolin などのアクチン切断蛋白質などに分類され、細胞内で時空間的に活性制御されることにより、アクチンの構造を協調的に調節していると考えられている。したがって、特定のアクチン結合蛋白質とアクチンとの作用を阻害する化合物があれば、その結合蛋白質の機能のみを阻害する極めて特異性の高いアクチン作用薬になると期待される。

我々は以前より、amphidinolide H などのアクチン作用薬の解析を行い、その過程でアクチン作用薬は培養細胞に対してアクチンストレスファイバーの凝集体形成を引き起こすことを見出した。そこでこのような活性を示す薬剤を探索したところ、アクチンと特定のアクチン結合蛋白質との相互作用を阻害する活性を持つ化合物を見出したので報告する。

材料・方法

アクチンはウサギ背筋より、定法にしたがって単離・精製した。アクチン重合測定にはピレンアクチンを用い、重合の確認は走査電顕にて行った。また各種アクチン結合蛋白質は、そのアクチン結合ドメインを HeLa 細胞より RT-PCR によりクローニングし、大腸菌発現により得た後、アクチンとの結合アッセイに用いた。

結果・今後の展望

詳細は発表会にて紹介する。

Thermosiphon globiformans と *Methanocaldococcus jannaschii* との水素共役栄養共生

五十嵐 健輔 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 桑原 朋彦 (生命環境科学研究科)

背景・目的

水素共役栄養共生とは、代謝により水素を発生させる微生物と、水素をエネルギー源として利用する微生物との間で成立する共生関係である。発酵細菌とメタン菌との共生はその1例であり、この共生関係は水田や牛のルーメン内など自然界に広範に見られる。超好熱性細菌間では *Thermotoga maritima* (発酵バクテリア) と *Methanocaldococcus jannaschii* (メタン生成アーキア) との例が報告されている (1)。また、水素共役栄養共生は真核生物誕生のメカニズムとして提唱されている (2)。ゲノム解析から真核生物はバクテリアとアーキアのゲノム融合により誕生したことは明らかであるが、そのゲノム融合が具体的にどのようなメカニズムで起こったかは未だに不明である。水素共役栄養共生はバクテリアとアーキア間の密接な相互作用を引き起こす強力な駆動力となり得ることから、遺伝子水平転移やその究極の形であるゲノム融合による真核生物の誕生につながるというわれている。実際、*T. maritima* のゲノムの 24% はアーキアからの遺伝子水平転移によるものである (3)。その他の Thermotogales 目バクテリアのゲノム解析の結果も、程度の差はあるが同様であることから、Thermotogales 目のバクテリアには遺伝子水平転移を受け入れやすい特別な構造/メカニズムが存在すると推察される。

先行研究により Thermotogales 目に属する *Thermosiphon globiformans* は増殖の早い時期に外膜が膨らんで球体を形成すること、この外膜は細胞が近接していない部分ではペプチドグリカン (PG) に裏打ちされないことが分かっている。防御構造である PG を欠くということは、球体が遺伝子水平転移を受け入れやすい構造であると推察される。さらに *T. globiformans* は *M. jannaschii* と水素共役栄養共生しコンソーシアムを形成することが分かっている。コンソーシアム中のように両菌が持続的に接触できる環境では相互作用により菌の表層構造が変化する可能性がある。しかし、コンソーシアムを透過型電子顕微鏡観察した研究は未だに存在しない。そこで、本研究の目的は *T. globiformans* と *M. jannaschii* との水素共役栄養共生における両菌の表層構造の変化を、透過型電子顕微鏡観察によって見出すことである。

実験方法

1. 共培養のキャラクタリゼーション

T. globiformans 用の Tc 培地から S⁰ (元素状イオウ) を除去した Tc-S⁰ 培地を培養に用いた。*T. globiformans*, *M. jannaschii* を同じ菌密度 (1 × 10⁵ cells/ml) になるよう植菌後、気相を N₂ に置換した。これらの条件の下、培養温度、NaCl 濃度、pH をそれぞれ変化させた培養を行い、16 時間培養後の両菌の菌密度をバクテリア計算盤を用いて計測した。メタン濃度は Porapak Q カラムを用いたガスクロマトグラフィー (GC-14 ; Shimadzu) により測定した。

2. 透過型電子顕微鏡による観察

固定は 2-7.5% グルタルアルデヒド 90-720 min (4-20°C)、0.2-4% 四酸化オスミウム 30-60 min (20°C) で行い、エタノール濃度上昇系列による脱水、樹脂 (LV resin) 包埋、超薄切片作成後、1% 酢酸ウラン 20 min、クエン酸鉛 10 min で染色を行った (4)。

結果・考察

1. 共培養のキャラクタリゼーション

両菌の菌密度が最大になる条件は培養温度: 65-68°C, NaCl 濃度: 2.5%, pH: 6.5 であった。最適条件下では、16 時間で *T. globiformans* は 3.7 × 10⁸ cells/ml まで、*M. jannaschii* は 3.1 × 10⁷ cells/ml まで増殖した。また、気相のメタン濃度は 39,000 ppm にまで上昇した。

2. 透過型電子顕微鏡による観察

両菌の形態を、対数増殖期初期、同中期、および定常期において、共培養時とそれぞれの単独培養時と比較したところ、違いはみとめられなかった。しかし、共培養において、*T. globiformans* は対数増殖期には PG をもたない球体を生じたが、定常期には外膜全体が PG で裏打ちされた球体を生じた (PG あり/全球体=14/17)。これに対し、Tc-S⁰ 培地を用いた単独培養においては、対数増殖期のみならず、定常期にもこのような球体は出現しなかった (PG あり/全球体 = 0/12)。以上から、*T. globiformans* の PG 合成に関わる遺伝子の発現/酵素の活性が単独培養時と、*M. jannaschii* との共培養時で異なることが示唆された。今後は、増殖過程において *T. globiformans* の球体の PG 合成がどのような仕組みで変化していくのかを、細胞分裂及び PG 合成に関わる主要なタンパク質を指標にして明らかにする予定である。

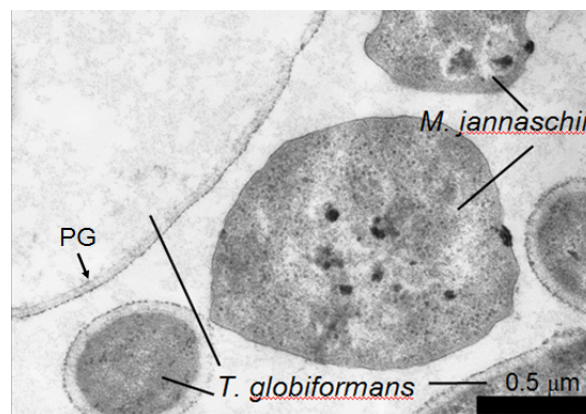


Figure 1: 共培養・定常期における *T. globiformans* と *M. jannaschii* の透過型電子顕微鏡写真。球体の膜は PG で裏打ちされている。

参考文献

- 1 Muralidharan et al. (1997) Biotechnol Bioeng 56, 268
- 2 Martin (2005) Curr Opin Microbiol 8, 630
- 3 Nelson et al. (1999) Nature 399, 323
- 4 [社] 日本顕微鏡学会編 (2004), 「電顕入門ガイドブック」, 学会出版センター

枯草菌におけるタンパク質分泌機構の解析

杉原 怜納 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中村 幸治 (生命環境科学研究科)

背景・目的

細菌にとって、タンパク質の菌体外分泌能はとても重要な機能の一つである。細胞間コミュニケーション、環境変化に対する防御、競合相手の除去など多くの場面で機能する。

グラム陽性の中温性土壌桿菌である枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は、細胞膜外膜を持たないため、菌体外に各種タンパク質を分泌する能力が高いことが知られている。また、毒素生産がなく安全性が高いことから、酵素生産菌として工業的に利用することができるため、遺伝学的、分子生物学的研究が進められてきた。

細菌においてタンパク質が菌体外に分泌されるには、分泌タンパク質前駆体のアミノ末端にあるシグナルペプチドを認識し、細胞質膜上へ輸送し、細胞膜を通過させる装置が必要となる。枯草菌 Ffh は、前駆体タンパク質の認識と輸送を担うシグナル認識粒子 (Signal Recognition Particle = SRP) の構成成分の一つである。Ffh は GTP 結合モチーフを含む G ドメインとメチオニンを多く含む M ドメインの 2 つのドメインで構成されている。これまでに、M ドメインには前駆体タンパク質のシグナル配列の認識および SRP の骨格である scRNA との結合に必須な領域が存在することが報告されている。そこで、本研究では *fth* の M ドメインコード領域内に変異を導入することで枯草菌分泌機構における Ffh の機能を解析することを目的とした。

方法

fth M ドメインコード領域内に PCR を用いたランダム変異を導入し、分泌タンパク質の分泌生産能が低下した変異株を取得、解析することにより分泌機構における Ffh の機能を解析しようと考えた。

まず、*fth* M ドメインコード領域 (450bp) 内に、エラーブローン PCR 法を用いて、ランダムに変異を導入した。このとき、選択用マーカーとしてクロラムフェニコール耐性遺伝子を付加した。そして、得られた DNA 断片を、セルラーゼ発現プラスミドを保持する野生株に形質転換により導入し、クロラムフェニコール耐性株を選択取得した。得られた変異導入株についてセルロースを添加したプレートに打ち換え、ハロアッセイを行った。菌体から分泌されたセルラーゼによりハロが形成されるため、ハロの直径を計測することでセルラーゼ分泌能の低下を判定した。

結果・考察

得られた変異導入株 3000 株についてハロアッセイを行い、野生型 *fth* 導入株比 85% 以下の株を低生産株として 314 株選択し、取得した。

変異導入株取得時の形質転換効率について、*fth* M ドメインコード領域に変異導入した DNA 断片を形質転換した場合と変異導入していない野生型 *fth* の DNA 断片を用いた場合を比較すると、形質転換効率が 5 分の 1 - 10 分の 1 低下していた。これは、*fth* が必須遺伝子であり、致死になる変異が導入された場合には生育できずに変異導入株として取得できないため、その結果として形質転換効率が低下したと考えられた。

今後の予定

今回得られた低生産株について、液体培地を用いた培養時のセルラーゼ活性測定による二次選抜を行う。二次選抜後の選抜された変異導入株について、変異導入領域である *fth* M ドメインコード領域の遺伝子配列を決定し、変異箇所の同定を行う。そして、各変異導入箇所について、これまでに報告されている Ffh の機能から、変異による分泌能低下の原因について考察する。

in vivo における枯草菌 Hfq と相互作用する sRNA の同定

野木 友加里 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中村 幸治 (生命環境科学研究科)

背景

アミノ酸をコードせず、自身が遺伝子発現制御などの機能をもつ small RNA (sRNA) の解析が様々な生物で進められている。sRNA は標的 mRNA に相補的な配列を持ち、二本鎖を形成して標的 mRNA の二次構造を変化させることで遺伝子の転写後制御を行うことが知られている。グラム陰性菌である大腸菌の sRNA は 100 個程度が同定され、機能解析が進められており、遺伝子の転写後制御にかなりの影響を及ぼしていることが考えられる。一方、グラム陽性菌の枯草菌では sRNA が十数個程度しか同定されていない。グラム陽性菌は病原菌や食品の発酵に用いられる菌なども多く、sRNA による遺伝子発現制御系の解明が有用な知見となると考えられる。sRNA は塩濃度や細胞の栄養状態、pH などの変化に対し迅速に反応して遺伝子発現制御を行うため、一般に分解されやすく、生体内で不安定に存在する。一方、sRNA を安定化し、標的 mRNA との結合を促進する Hfq という RNA 結合タンパク質が存在する。よって Hfq と結合する sRNA の検索が sRNA やその標的遺伝子の機能解析の手がかりとなる。また本研究室では、生体内タンパク質と特異的に結合する核酸を特定できる SELEX 法を用いて枯草菌 Hfq のアプタマーを検索し、AG リピート (AGAGAGA) 配列と親和性が高いことを明らかにした。本研究では、その結合配列を利用して *in vivo* において Hfq と相互作用する sRNA を同定し、その機能解析に知見を加えることを目的とした。

方法・結果

まず複数の枯草菌 sRNA に対し AG リピートを検索したところ、BsrI sRNA にのみモチーフ配列が存在することが分かった。BsrI とモチーフ配列を持たないいくつかの sRNA に対してノーザンブロットを行い発現を確認することで、Hfq の影響を調べた。実験には既存の枯草菌野生株にキシロース発現誘導性のベクター pWH1520 を導入した株、hfq 欠損株に pWH1520 を導入した株、hfq 欠損株に hfq 発現ベクターの pWH1520-hfq を導入した株の 3 種類を使用した。それらの株を前培養した後 150 ml LB 培地 (15 μ g/ml テトラサイクリン含有) に植菌し、37°C で振とう培養した。O.D.₆₀₀ = 0.2 で終濃度 0.5% となるようキシロースを添加した後、対数増殖期中期と定常期に集菌し、total RNA を採取した。さらに hfq およびそれぞれの sRNA に相補的な配列をもつ DNA プローブを作製し、ノーザンブロットを行い DIG 抗体で検出した結果、キシロースによって発現に影響を受けた sRNA が複数確認された。キシロースによる影響の見られなかった sRNA のうち、Hfq の存在下で BsrI は正に、BsrG は負に発現制御を受けていた。

次に生体内で Hfq と相互作用している sRNA を検出するため、細胞内タンパク質を変性させずに細胞を破碎するフレンチプレス法を用いて細胞抽出物を得た。発現ベクター由来の Hfq の C 末端にはヒスチジンタグ (-His $\times$ 6) が付加しているので、生体内で相互作用している RNA をアフィニティーゲルを用いることで精製することができる。現在その解析を行っている。

考察・今後の予定

in vivo で相互作用していることが確認できた RNA について欠損株を作製し、二次元電気泳動法などを用いて標的遺伝子を検索する。いくつかの sRNA はキシロースによって発現に影響が確認されたため、他の誘導因子による発現誘導ができるベクターを導入し、再度 Hfq による影響を調べる必要がある。またグルコース添加による影響があったことから、糖新生や解糖に関する遺伝子を制御する sRNA の存在が示唆され、これについても機能解析を進めたい。

文字列の冷たい罨 — OTU に特異的な配列組成の変化が分子系統解析に与える影響 —

石川 奏太 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 橋本 哲男 (生命環境科学研究科)

背景と目的

我々が生物の系統関係を明らかにしようとする場合、取られる手段の一つとして複数種の生物から得られた同一遺伝子の配列を用いた分子系統解析がある。しかしながら、分子系統解析では「真の系統樹とは全く異なるアーティファクトが選択される」という問題がしばしば発生する。そういった問題の一つとして、OTU 間で極端に塩基あるいはアミノ酸組成が異なる場合、系統解析に使用する置換モデルと実配列の経験した置換パターンとの間に不整合が起こりアーティファクトが誘導される可能性が示唆されていた。だが、この問題を検証する場合、既存の生物種由来の配列を用いた解析では真の系統樹が未知であるため、推定結果がアーティファクトであると断定することが出来ない。また、組成の偏り以外の要因がアーティファクト誘導に影響している可能性も完全に排除することができない。このような弊害により、配列間での組成の偏りが本当にアーティファクトを誘導するのか、それがどの程度深刻な問題であるかについては詳細な検討がなされていないというのが現状である。しかし、この問題は分子系統解析という分野における根本的な問題点の一つであると考えられる。そこで、今回上記の点を解決した上で配列組成の不均一性が分子系統解析においてアーティファクトを誘導するか否かについて厳密な検証を行った。

方法

本研究では、OTU 間の組成に偏りのある配列をモンテカルロシミュレーションを利用したソフトウェアを使用して生成し解析した。この方法ではユーザー定義の系統樹の情報を反映した配列を作り出すことができるため、分子系統解析の結果得られるべき真の系統樹を予め知ることが出来る。また、配列組成以外のあらゆる条件を OTU 間で一定にすることが出来るため、推定結果が組成の偏りに起因するアーティファクトであるか否かを厳密に検証することが可能である。

今回、我々は 4OTU 有根系統樹について、その各枝長の大きさの違いによる様々な系統樹 (図 1) を想定した網羅的シミュレーションを行った。実験では各系統樹 100 サンプルの配列について、まず塩基頻度を配列間で均一 (homogeneous) にした場合、系統樹の各枝長の大小関係によってアーティファクトがどの程度誘導されるかということ調べた。次に、塩基頻度を配列間で不均一 (heterogeneous) にした場合について同様の解析を行い、アーティファクトの誘導数に変化が生じるかについて検証した。ここで、この実験において各枝長の大きさとは各配列における置換速度の大きさであると考えられる。なお、配列組成を偏らせる場合、その組成値は実存する生物である Apicomplexa 類のもつ細胞内小器官 Apicoplast 由来配列の配列組成を参考にした。

結果と考察

一連の解析結果より、配列間に組成の偏りがある場合、組成の偏りが無い場合に比べて明らかにアーティファクトが強く誘導された (図 2)。これは配列間の組成の不均一性がアーティファクトを誘導する要因であるということを知

実に物語っている。さらに、この傾向は組成の偏った配列の置換速度が組成の偏っていない配列の置換速度よりも極端に大きい場合に顕著になった (図 2B)。このことから、組成に偏りが生じた配列における置換速度の上昇は、配列間での組成の不均一性に起因するアーティファクトの誘導を助長することも判明した。以上の結果は、実存する生物由来の配列を用いた系統解析でも配列組成の不均一性がアーティファクトを強力に誘導する可能性があることを示唆している。よって、配列間で組成に偏りのあるようなデータを使って分子系統解析を行う際には、我々はその解析結果を慎重に吟味しなければならないだろう。例えば、今回の実験において参考にした Apicoplast 遺伝子配列では、他の生物の相同配列に比べ特定のアミノ酸の組成が極端に偏っている。また、小サブユニットリボソーム RNA の塩基配列では生物間で GC 含量に大きなばらつきがあることも分かっている。よって、これらの配列を用いた系統解析結果については、配列組成が偏っていることによってアーティファクトが誘導される可能性を十分に考慮した上で解釈を行うべきであろう。

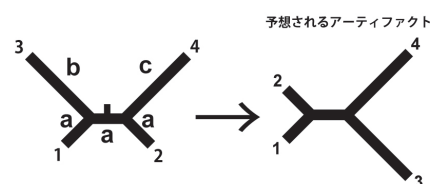


図 1. 配列生成に使用した 4OTU 系統樹

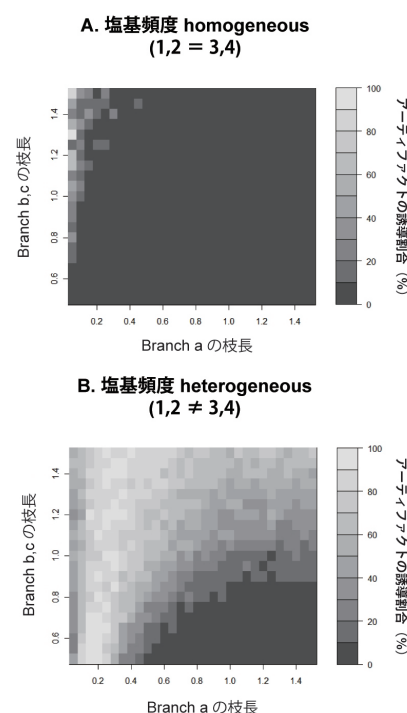


図 2. 実験結果

タチヤナギに寄生する同種寄生性 *Melampsora* sp. の分類

阿久津 翠 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 山岡 裕一 (生命環境科学研究科)

背景・目的

Melampsora 属菌は担子菌類のサビキン目メランブソラ科に属し、ヤナギ類植物に寄生する種は全て本属に属する。1982 年、Hiratsuka and Kaneko はヤナギ類に寄生する日本産 *Melampsora* 属菌のモノグラフを作成し、その中で 14 種を報告している。そのうち 7 種の生活環が明らかとなっており、全て異種寄生性である。しかし 1993 年、近藤らはタチヤナギ (*Salix subfragilis*) に同種寄生する *Melampsora* 属菌 (以下 *Melampsora* sp.) の存在を報告した。それ以前にはタチヤナギに寄生する種として *M. microsora* と *M. salicis-warburgii* が報告されていたが、2 種ともに生活環は不明であった。近藤らは *Melampsora* sp. の形態的特徴が既知種の記載と異なることを確認し、新種である可能性を示唆した。しかし、その後の調査では、タチヤナギ上で *M. microsora*、*M. salicis-warburgii* と同定できる標本が採集されなかった。そのため *Melampsora* sp. を、Hiratsuka and Kaneko (1982) がモノグラフ作成に使用したタチヤナギ上の *Melampsora* 属菌の標本と比較する必要が生じた。

本研究では、これらの 2 種の *Melampsora* 属菌の標本を用いて、形態学的及び分子系統学的に比較を行い、同種寄生性 *Melampsora* sp. の分類学的所属を決定することを目的とした。

材料・方法

2009 年 3 月から 4 月にかけて、茨城県内の 4 か所でタチヤナギ上の冬孢子堆を採集し、それらを接種源としてタチヤナギに接種して、同種寄生性を確認した菌株を確立した。これらの菌株と、野外で採集したタチヤナギ上の夏孢子堆標本を実験に供試した。Hiratsuka and Kaneko (1982) が使用したタチヤナギ上の *M. microsora* の標本 (Isotype を含む)、*M. salicis-warburgii* と同定された標本を用いた。*M. salicis-warburgii* はタチヤナギ上の標本だけでなくジャヤナギ (*Salix pierotii*)、*Salix* sp. 上の標本も用いた。これらに加えて、台湾で採集されたタイワンヤナギ (*Salix warburgii*) 上の *M. salicis-warburgii* の標本及び、英国で採集された同種寄生性 *M. amygdalinae* の標本も使用した。

光学顕微鏡を用いて夏孢子、冬孢子の長径、短径、壁の厚さを測定した。走査型電子顕微鏡で夏孢子表面構造を観察し、棘状突起の密度を計測した。また供試菌から DNA を抽出し、PCR 法で ITS4/ITS5、NL1/NL4 の 2 組のプライマーを用いて ITS 領域と D1/D2 領域を増幅し、シーケンス解析によって塩基配列を決定した。得られた塩基配列データに NCBI GenBank から *Melampsora* 属菌数種の塩基配列データを引用し、近隣結合法を用いて系統樹を構築した。

結果・考察

Melampsora sp. の夏孢子的な大きさは、*M. microsora* の夏孢子的な大きさと明瞭な差異が見られた。また *Melampsora* sp.、*M. microsora* はともに夏孢子表面が棘状突起に覆われていたが、*Melampsora* sp. の夏孢子頭頂部には平滑面が観察された。*M. salicis-warburgii* の夏孢子的な大きさは *Melampsora* sp. と明瞭な差が見られず、*Melampsora* sp. と同様に夏孢子頭頂部に平滑面が観察された。しかし棘状突起密度を計測した結果、*Melampsora* sp. との間に差異が見られた。

Melampsora sp. の冬孢子は *M. microsora*、*M. amygdalinae* と形態的に明瞭な差が認められた。

D1/D2 領域解析結果では 3 つのクレードが形成され、*M. microsora*、*M. amygdalinae* はそれぞれ Bootstrap 値 92%、96% で支持されるクレードを形成した。しかし *Melampsora* sp. と *M. salicis-warburgii* は同一クレードに属した (図 1a)。それに対して ITS 領域解析結果では、*M. amygdalinae* はクレードを形成したが *M. microsora* と *M. salicis-warburgii*、*Melampsora* sp. は同一クレードに属した (図 1b)。

以上の結果より、*Melampsora* sp. は、*M. microsora*、*M. amygdalinae* と形態的特徴及び D1/D2 領域解析結果に基づき、明確に識別できた。一方 *M. salicis-warburgii* とは、夏孢子的な形態および分子系統学的比較では明確に識別できなかった。しかし夏孢子表面の棘上突起密度に差異が見られたこと、冬孢子世代の形態の比較が行えなかったことから、*Melampsora* sp. と *M. salicis-warburgii* が同一種であるかは決定できなかった。*M. salicis-warburgii* は台湾でタイワンヤナギに寄生する菌として新種記載された種である。今後は *M. salicis-warburgii* の冬孢子世代の形態観察、宿主範囲の解明、他遺伝子領域の系統解析による比較を行い、*Melampsora* sp. の分類学的所属を決定する必要がある。

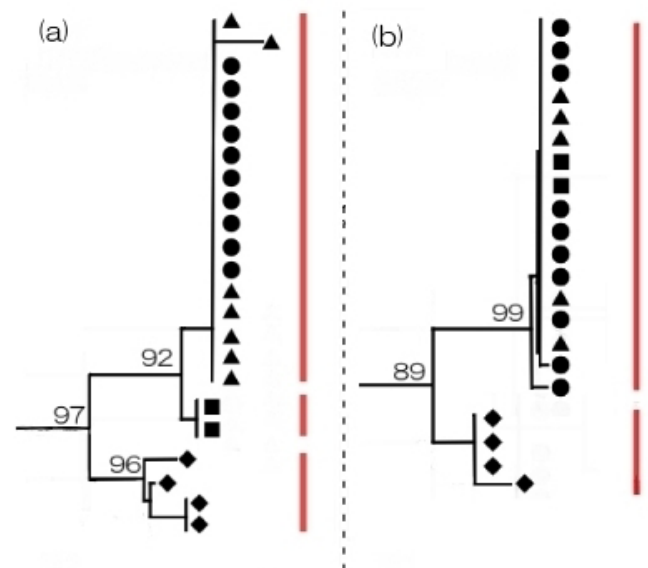


図 1 *Melampsora* 属菌の D1/D2 領域系統樹 (a) と ITS 領域系統樹 (b) の一部抜粋模式図

● : *Melampsora* sp., ▲ : *M. salicis-warburgii*, ■ : *M. microsora*, ◆ : *M. amygdalinae*

赤の傍線で各系統樹のクレードを示す

Fusarium solani のトベラ苗に対する病原性

青山 哲也 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 山岡 裕一 (生命環境科学研究科)

背景・目的

2001 年、愛知県知多市の植樹帯において、トベラの立枯れが報告された。その後、関東以西のトベラの立枯れに関して同様の報告がなされ、すべての枯死木が樹皮下穿孔虫、ピロウジマコキクイムシ (*Scolytogenes birsimensis*) の穿孔を受けており、ピロウジマコキクイムシの体表、孔道、トベラの内樹皮や材から高頻度で *Fusarium solani* が分離された。

F. solani の病原性を評価するために、茨城県日立市で採集したトベラ衰弱木より分離した *F. solani* を、樹齢 3–5 年のトベラ苗に接種した。結果、ともに接種部から外樹皮、内樹皮に上下に伸長した紡錘形の壊死病斑が形成された (黒木, 2006)。さらに、2006 年、松下は、黒木と同様の *F. solani* をトベラ苗にいくつかの条件を与え接種し観察し、*F. solani* がトベラを枯死させる病原力を有することが明らかにした。また、接種強度による差異は見られなかったが、光の条件が病徴の進展に影響することが明らかになった (松谷, 2007)。本研究では、*F. solani* がトベラを枯死させる病原力を、他地域のトベラから分離された *F. solani* も同様に有しているのか否かを明らかにし、光条件が病徴の進展にどのように関わっているのかを明らかにすることを目的とした。

材料・方法

供試菌として、実験 1 では、2005 年黒木が茨城県日立市十王町においてトベラに穿孔していたピロウジマコキクイムシから分離した *F. solani* 菌株 (To501) にくわえ、最初のトベラの立枯れ被害地であった、愛知県の名古屋市のトベラと福岡県福岡市のトベラから分離した *F. solani* 菌株を用いた。実験 2 では、茨城県日立市において分離され、すでにトベラを枯死させる病原力を有することが明らかになっている *F. solani* (7801DK) 菌株を用いた。

両実験とも 9 cm のプラスチックシャーレ内の 2% 麦芽エキス・エピオス寒天培地 (MEBA) 培地上で約 15°C、16 日間培養させたものを接種源とした。被接種植物には、樹高 65–100 cm、幹の太さ 10–15 mm のトベラ苗 (樹齢約 8 年) を用いた。

実験 1: トベラの樹皮を、火炎滅菌した直径 4 m のコルクボーラーを用いて、地際から充分離れた高さ約 15 cm のところの樹皮に上下 2 点ずつ、計 4 点くり抜き、接種源を菌糸が伸張している面を露出した組織に植え付けた。傷口は樹皮片で塞ぎ、他の菌の浸入を防ぐために上からパラフィルムで覆い生育させた。コントロールとして、菌を培養していない MEBA 培地を植え付けた。各区で 5 本の苗に接種をおこない、屋内グロース・チャンパー (23°C、14 時間明期 (照度約 4,000 lux、光量子約 80 μmol)、10 時間暗期) 内で生育させた。接種後 35 日間外部病徴を観察し、その後接種部の樹皮を剥がし、内樹皮に形成された病斑の観察と、接種部周辺のに縦横断面の観察をおこなった。また、一部の苗を地際部で剪定ばさみを用いて切断し 0.5% フクシン溶液に浸し、通水部分を染色させた。

実験 2: 接種方法は実験 1 と同じであるが、苗の光条件を変えた二つの区を設定し、接種実験を行った。23°C、14 時間明期、10 時間暗期に調整した自然光型人工気象室内を日当区 (晴天時正午: 照度約 45,000 lux、光量子約 1,000 μmol) と日陰区 (晴天時正午: 照度約 5,000 lux、光量子約 60

100 μmol) の 2 区に分け、それぞれ 10 本の苗 (内コントロール 5 本) を用いた。接種後 40 日間、外部病徴を観察した後、実験 1 と同様に内樹皮に形成された病斑を観察した。また、一部の苗は 0.5% フクシン溶液に浸し、通水部分を染色させた。

結果・考察

実験 1 では愛知県名古屋市で分離された一部の菌株を除き、すべての *F. solani* 接種区で半分以上の苗が枯死に至った。枯死した苗の内部病徴として、4 点の接種部からそれぞれ病斑が広がり、病斑どうしが癒合していた。また、0.5% フクシン溶液を用いて、接種部における横断面を観察すると、枯死に至った苗では完全に通水が阻害されているのに対し、枯死に至らなかった苗では幹の中心部周辺が赤く染色されているのが確認できた。実験 2 では、日当区で 40 日目までに枯死した苗が 5 本中 2 本のみであったのに対し、日陰区では 31 日目までに 5 本中 4 本の苗が枯死した。枯死した苗は両区間とも材内部に接種部中央から 7.6–10.2 cm 程の病斑がみられ、癒合していた。

以上の結果より、各地域のトベラ被害木から分離された *F. solani* のほとんどが、トベラを枯死させる能力を有することが明らかになった。また、*F. solani* のトベラに対する病原力は光条件、特にその強度によって左右されることが明らかになった。苗が病徴を発現してから枯死に至るまで間、内部では導管の閉塞現象が起こっていたと考えられる。トベラが *F. solani* によって枯死に至るメカニズムについて今後さらなる調査・研究が必要だろう。

菌株番号	トベラ採集地域
N87A1	愛知県名古屋市
N62-1	愛知県名古屋市
TB2-2	福岡県福岡市
TB38-1	茨城県日立市
7801DK	茨城県日立市 (衰弱木)
T0501	茨城県日立市 (衰弱木)

里山林のギャップ内を主たる生活の場とするノシメトンボの採餌活性と餌獲得量

加藤 賢太 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渡辺 守 (生命環境科学研究科)

序論

アカネ属の一種であるノシメトンボ, *Sympetrum infuscatum*, は、幼虫期を水田で過ごし、羽化直後の処女飛翔によって近隣の林内へと移動してゆく。成虫は、性的に未熟な「前繁殖期」と、生殖器官や筋肉の発達した「繁殖期」を通じて、生涯を林内で過ごしている。林内では、倒木などで生じたギャップの中で、灌木の枝先や草の葉先などに静止しているのがふつうで、典型的な「Percher」の生活様式といえる。採餌様式は待ち伏せ型で、静止場所の前方斜め上方を一航過しようとする小昆虫を発見すると、飛び掛かり、8の字を描いてもとの静止場所に戻って捕食していることが多い。産卵時のみ短時間だけ水田に飛来するものの、そこでは採餌行動を示さない。したがって、卵生産や体の維持のための採餌行動は林内ギャップでのみ行なわれているといえる。これまでに、野外個体の排出した糞量と飼育個体の餌量と排出する糞量の関係から、雌は雄よりも摂食量の多いことがわかっている。すなわち、林内のギャップにおいて、雌は、卵生産のために雄よりも活発に採餌行動を行なっている可能性が高い。本研究では、林内ギャップにおけるノシメトンボの雌雄の採餌活性を調べ、雌雄それぞれの採餌戦略を考察した。

方法

調査は、長野県白馬村の里山林 (スギ人工林と雑木林) において、8月後半から9月初めの晴天で微風時に行なった。ノシメトンボが採餌行動を開始する6時から、林内ギャップで発見した静止中の個体の採餌行動を連続して記録した。観察は、静止している個体に影響を与えないように、静止場所から3mほど離れた場所から、2人1組で行なっている。すなわち、一人が個体の行動の観察を、一人が記録を行なった。観察の際、静止場所から一直線に飛び立ち、元の静止場所に戻ってくる行動を採餌飛翔と定義した。この時、静止した個体の正面を双眼鏡を用いて観察し、餌を咀嚼していた場合を捕獲成功としている。静止場所から、飛翔して反転した場所までの距離を、目測で25cm単位で測った。静止場所の高さを目測で25cm単位で測定すると共に、静止場所の移動時刻を記録した。なお、同種他個体の通過や同種他個体との静止場所をめぐる争い、ヒョウモンチョウなどの他種の接近・通過に対しての追飛は、稀だったので激しい飛翔はしなかった。

結果

解析には、15分以上連続観察した個体のデータを用いたので、平均観察時間は雌で約30分 (最長120分)、雄で約23分 (最長93分) となった。ノシメトンボの採餌行動が始まる6時からの2時間には雌雄とも15分当たり0.5–2回の採餌飛翔を示した。採餌飛翔頻度は、朝や夕方に低く、ピークは、正午過ぎの2時間で、雌の場合、15分当たり9–10回、雄は5–6回で、雌の方が雄よりも飛翔頻度は有意に多かった (図1)。また、正午過ぎにおける雌雄の採餌飛翔頻度の差は、他の時間帯の雌雄での差よりも大きかった。その結果、雌は1日に約259回、雄は約159回採餌していると計算され、雌は雄よりも採餌に努力していることがわかった。図2のように、採餌試行回数と成功回数の関

係には、雌雄で有意な差は見られなかった。回帰直線の傾きから、採餌成功率は、雌で34%、雄で33%といえた。したがって、日当たりの捕獲成功数は、雌で101回、雄で64回と推定された。

考察

林内ギャップにおいて、ノシメトンボの静止場所付近を飛びまわっている餌となりうる小昆虫1個体の平均乾燥重量が0.17mgだったので (岩崎ら, 2009)、日当たり摂食量は、雌で約17mg、雄で約11mgと計算された。これらの値は、野外で採集した個体の排出した糞量と、飼育した個体の餌量と排出した糞量の関係から推定した日当たり摂食量 (雌17.7mg, 雄10.1mg) とほぼ一致していた。すなわち、雌は、雄よりも採餌飛翔の頻度を増やすことによって多くの餌を獲得していたといえよう。繁殖期の雌は、体の維持に必要なエネルギーだけでなく、卵の生産に必要なエネルギーを得なければならない。そのため、行動の活性が最も高まる正午過ぎの時間帯に、雄よりも活発に採餌飛翔を行なっているのかもしれない。

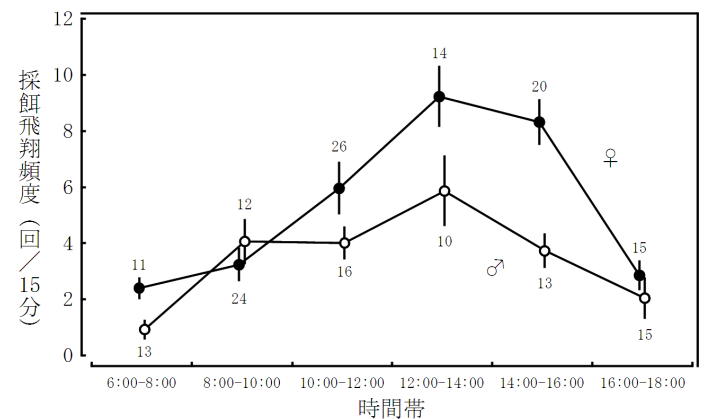


図1. 2時間当たりの採餌飛翔頻度の日周変化 (±SE). 図中の数字は観察個体数を表わす。

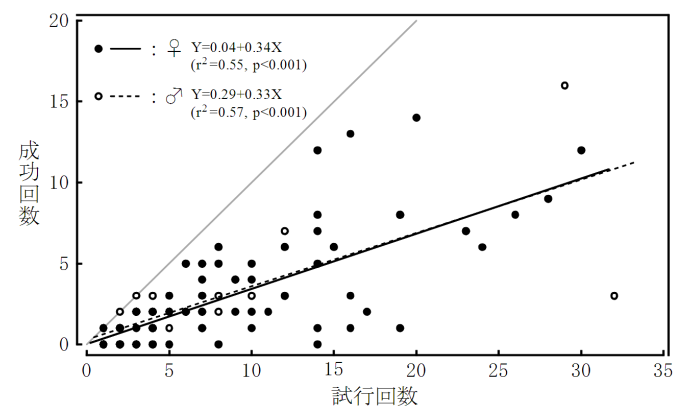


図2. 採餌試行回数と採餌成功回数の関係。灰色の直線は1対1を表わす。

冷温帯のスギ林における地表徘徊性昆虫の種組成

高橋 弘明 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渡辺 守 (生命環境科学研究科)

序論

冷温帯のスギ人工林の林床には地表徘徊性昆虫からなる群集が形成されている。群集を代表するオサムシ科昆虫には、オサムシ類とゴミムシ類が含まれ、いずれも、ミミズなどを共通の餌資源として利用している。本実験では冷温帯のスギ人工林の林床に生息する地表徘徊性昆虫群集の種組成や分布を明らかにすることで、競争関係にある種間の相互作用を考察することを目的とした。

方法

2009 年 7 月下旬と 8 月下旬の各 10 日間、長野県白馬村神城地区にある 4 ヶ所のスギ人工林の林床でピットフォール・トラップ調査を行なった。鶏のひき肉を入れたトラップ (口径 7.1 cm, 深さ 9.0 cm) を 2 m 間隔で縦横 12 個ずつ合計 144 個しかけ、設置から 24 時間後にトラップを巡回し、捕獲した昆虫を同定するとともに雌雄を判別した後に、標識を施して放逐した。調査区内の巡回が次回の捕獲に与える影響を最小限に抑えるため、放逐と次回のトラップ設置まで 1–2 日の間隔を空け、各月でそれぞれ 3–4 回の再捕獲を行なった。

結果と考察

7 月はのべ 11 種 1018 個体、8 月はそのうちの 9 種 1532 個体が出現した。そのうちオサムシ亜科の種はマルバネオサムシとクロナガオサムシ、マイマイカブリ、アキタクロナガオサムシの 4 種で、ゴミムシ類は *Pterostichus* 属、*Synuchus* 属に含まれる種であった。再捕獲はオオキンナガゴミムシを除いた全ての種でみられた。日当たり再捕獲率は、オサムシ類で約 0%–10%、ゴミムシ類で約 0%–15% だった。クロツヤヒラタゴミムシとオオクロツヤヒラタゴミムシ、マルバネオサムシはスギ林の下層植生の現存量と再捕獲率に負の相関があり、ニセクロナガゴミムシとクロナガオサムシは正の相関があった。クロツヤヒラタゴミムシとオオクロツヤヒラタゴミムシは、調査地間で密度の差が小さく、ニセクロナガゴミムシとクロナガオサムシ、マルバネオサムシは密度に大きかった。各調査地において、クロツヤヒラタゴミムシとニセクロナガゴミムシの間と、マルバネオサムシとクロナガオサムシの間に負の相関がみられ、排他的に分布していると考えられた。これらの結果をもとに、種間相互作用の観点から、冷温帯スギ林に生息する地表徘徊性昆虫の群集構造や分布様式について考察する。

イヌガラシにやって来た昆虫類の種組成

堀 翔 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渡辺 守 (生命環境科学研究科)

序論

イヌガラシは春から秋まで成長を続ける多年生の人里植物である。本種は路傍や田畑の畦に多く発生するため、しばしば人為的に刈り取られるが、その後、直ちに芽吹いて抽だいし、開花することができる。その結果、ロゼット状の株から抽だいや開花、結実している株まで、多様な成長段階の地上部をもった株が生育期間中、常に存在しているため、それに対応して様々な植食性の昆虫や、これらの昆虫を餌とする肉食性の昆虫が来訪していると考えられる。本研究では、イヌガラシの株の形態を花序や葉の成長段階によって分類し、各形態ごとのイヌガラシにおける昆虫類の群集構造を明らかにした。

材料と方法

調査は冷温帯に属する長野県白馬村において、8月末から9月初めにかけて行なった。水田の畦や路傍に発生していたイヌガラシの自然高と長径、短径を測定し、株の成長段階をⅠ-Ⅵの6段階に分類した (Fig. 1)。調査では花序が形成されているⅢ-Ⅵの株を対象とした。Ⅲの形態の株は調査対象の株の中で最も若く、花序が蕾のみで構成されている株である。成長段階が進むと、花序は開花した状態の花や、花弁が脱落して子房が発達した莢が多くなっていった。その一方で、葉は下部にあるものから次第に老化して硬化、萎縮し、最も成熟したⅥの株では最も地面に近い位置にある葉が枯れていることもあった。葉は、その展開位置と、基部にある腋芽の状態によってA-Eの5種類に分類した (Fig. 2)。葉や花序で発見した昆虫類は、見つかった葉や花序ごと採集して袋に入れ、種や個体数を記録した。昆虫類を採集した後のイヌガラシも、株ごと採集して持ち帰り、株ごとにそれぞれの形態の葉の枚数や花序数と、花序を構成する蕾や花、莢の数を計測した。

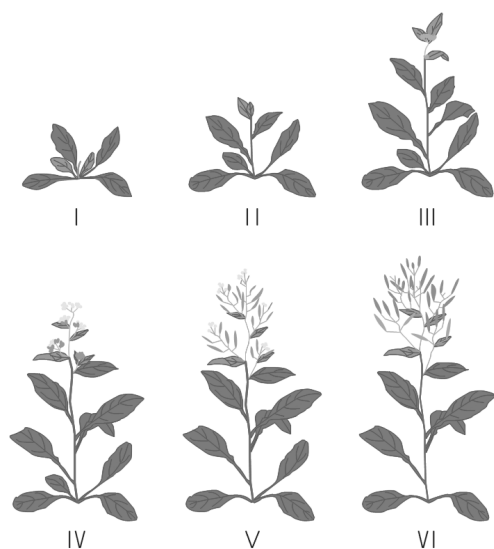


Figure 1: 株の各成長段階の模式図

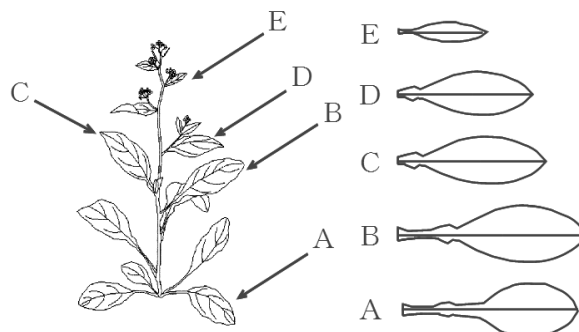


Figure 2: 葉の各形態および展開位置の模式図

結果

採集された昆虫類は、植物の汁液を吸収する吸汁性の種が5科、植物の組織を摂食する組織食性の種が6科、肉食性の種が5科、その他が1科 (アリ科) であった。成長の進行した株ほど、葉上で採集された植食性昆虫の個体数や種数は少なかった。一方、花序で採集された植食性昆虫の種数や個体数は、花序の成熟が進んだⅤやⅥの段階の株で多かった。葉の形態別に見ると、最も早く展開するロゼット葉のAには、アブラムシ類が最も多く発見された。Aより上方に位置し、面積の大きいBとCの葉では、他の葉よりも組織食性昆虫が多く見られた。面積が小さいDとEの葉では、発見された昆虫類の個体数は少なかった。花序においては、どの形態の株でもアザミウマが多く発見され、蕾や花の隙間に潜り込んでいた。花序にいた組織食性昆虫は蕾や花、莢を食べる様子が観察され、また花序には組織食性昆虫のものと思われる食痕が発見された。アリ類は開花数の多い株の花序に集中して見られ、アブラムシ類にアリ類が随伴することは稀であった。採集された肉食性昆虫の個体数は、すべての形態の株や葉、花序において、少数しか発見されなかった。

考察

肉食性の昆虫については、個体数が少なかったために、イヌガラシの形態ごとの個体数や種数に何らかの傾向を見出すことはできなかった。一方、植食性の昆虫については、イヌガラシの株や葉の形態によって個体数や種数に違いが見られた。葉においては、吸汁性の種と組織食性の種の個体数や種数が、成長の進行した株において少なかったことから、これらは葉の老化に対応したものと考えられる。花序で発見された植食性昆虫が、花序の成熟した株において個体数や種数が多かったのは、それらの株に多数存在する花や莢を利用していただけと考えられる。アリ類は開花数の多い株に集中し、頭部を花に埋めている姿が観察されたことから、イヌガラシを訪問する目的は花から分泌される蜜を得るためであると思われる。イヌガラシにおいては、株や葉の形態によって主に植食性昆虫類の群集構造が異なっており、その生育期間中に昆虫類群集の構造の変化が起こっていることが示唆された。

花色変化は何のシグナル?: ハコネウツギ (変化型) とタニウツギ (不変型) における繁殖形質の比較

鈴木 美季 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 大橋 一晴 (生命環境科学研究科)

背景と目的

植物が咲かせる美しい花の色は、ポリネーター (花粉媒介動物) に存在をアピールしたり、報酬 (蜜や花粉) の目印として覚えさせ、送受粉の機会を増やす重要な役割を担っている。よって花は、咲いているかぎり色を一定に保つのが一般的である。しかし動物媒花のなかには、咲き終えるまでの間に、花被片、あるいは雄しべや雌しべの色を大きく変化させるものが存在する。この「花色変化」という現象は、現在までに 79 科 267 属 484 種の被子植物で報告されており、全体から見れば少数派ではあるものの、その数は決して少なくない。色変化後の花にはしばしば花粉や蜜が含まれていないことから、これらの植物は古い花の色を変えて維持することにより、送受粉における何らかの利益を得ていると考えられてきた (例 Oberrath & Boehning-Gaese 1999)。

花色変化が送受粉に利益をもたらす形質であるという先行研究の主張は興味深い。しかし、そのような形質はどの植物でも有利となるはずであり、この主張だけでは、現存する多くの動物媒花で花色変化が観察されない事実を十分に説明できない。とりわけ不思議なのは、生育環境や生理的特徴が似ているはずの同じ分類群 (科・属) 内にも、しばしば花色変化する種 (変化型) としない種 (不変型) が混在することである (Delph & Lively 1989, Weiss 1995)。不変型の植物は、変化型の植物がもたない他の形質の効果によって送受粉を成功させるのかもしれない。あるいは、変化型は特定の条件が満たされた場合のみ有利になるのかもしれない。こうした可能性を検討するためには、同一の分類群に含まれる変化型と不変型の繁殖過程を詳細に調べ、両者を比較できるデータを得ることが不可欠である。

そこで本研究では、スイカズラ科タニウツギ属のハコネウツギ (変化型: 花弁が白から赤紫に変化) とタニウツギ (不変型: 花弁は薄桃色のまま) を対象として、花の形質と送受粉の定量的な比較を試みた。今回の調査では、とくに次の 2 つの疑問に答えることを目的とした。

- (1) 花の形質 (個花の寿命・色・蜜生産) にはどのようなちがいが見られるか?
- (2) 花の形質のちがいは送受粉にどのようなちがいをもたらすか?

材料と方法

筑波実験植物園と筑波大学構内で、ハコネウツギ (以下、ハコネ) とタニウツギ (以下、タニ) の植栽株を対象とし、2009 年 5-6 月の開花期に以下の調査をおこなった。

- (1) 花の形質: 個花の寿命 (花が開いてから散るまでの日数)・花色の経日変化 (花弁の反射スペクトルから算出した色変化距離)・蜜生産の経日変化 (1 日あたりの蜜生産量)
- (2) 送受粉: 残存花粉数の経日変化 (葯内に残っていた花粉粒の数)・柱頭受粉数の経日変化 (柱頭に付着していた花粉粒の数)

結果と考察

両種とも個花の寿命は約 5 日でほぼ等しく、この間にハコネは花色が日ごとに変化した一方、タニはほぼ同じ色の

ままであった。このような見かけのちがいは対称的に、蜜生産はどちらの花も 5 日間で変化していた。ただし、ハコネは 5 日間をつうじタニより蜜生産が多かった。つまり、ハコネの花は蜜をたくさん生産し、かつポリネーターが蜜量の変化を色によって識別できる状態であったのにたいし、タニの花は蜜をあまり生産せず、かつポリネーターが蜜量の変化を色によって識別できない状態であった。こうした形質のちがいは、両種の送受粉に差をもたらしているように見えた。つまり、ハコネの送受粉は前半の 3 日間でほぼ終了したのにたいし、タニの送受粉は 5 日間かけて進行した。今後は、観察された送受粉の差の普遍性を確かめるとともに、このような差をもたらすポリネーターの行動、そして繁殖成功への影響を明らかにしたい。

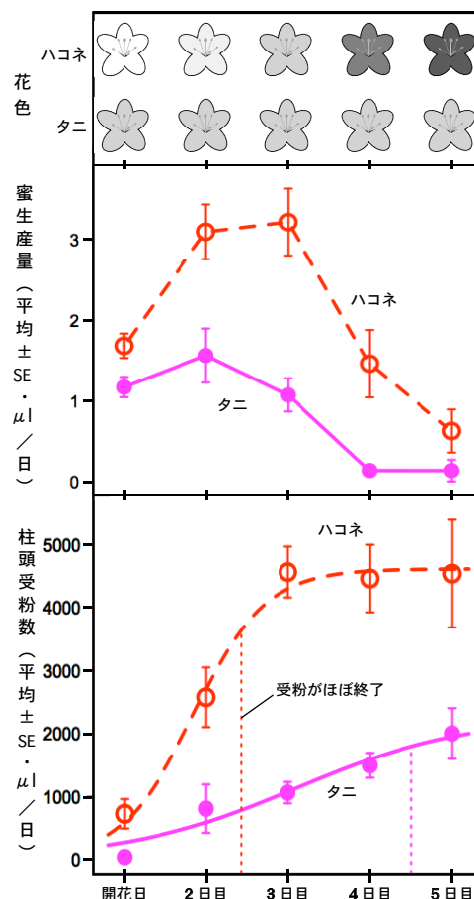


図: 花色 (上段)、蜜生産量 (中段)、柱頭受粉数 (下段) の経日変化

スゲ属 2 種の種子形質がアリ種ごとの種子の持ち去り行動におよぼす影響

田中 弘毅 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 大橋 一晴 (生命環境科学研究科)

背景と目的

アリによる種子の持ち去りは、散布や食害などの作用を通じ、種子の運命、ひいては植物の適応度に影響を及ぼすことが知られている (Giladi 2006)。例えば、ケシ科キケマン属の一年草では、アリの巣の付近から発芽した個体の種子生産量が、巣から離れた場所で発芽した個体の 2 倍近くになることが報告されている (Hanzawa *et al.* 1988)。また、持ち去られた種子の散布距離や食害の有無などは、アリの習性や体サイズなどの種間変異を反映して異なることがしばしば報告されている (Hughes and Westoby 1992)。例えば、Hughes and Westoby (1992) は、持ち去られた種子の食害率や散布距離、発芽した実生間の距離がアリの種間で異なることを報告している。このように、種子の運命はどのアリ種に持ち去られるかによって大きく左右されるので、植物は単にアリによる種子の持ち去りを促すだけでなく、さまざまなアリの中から特定の種による持ち去りだけを促進するような種子の形質を進化させてきた可能性がある。数少ない先行研究では、種子の付属物が種子を食害する程度が低いアリ種による持ち去りだけを促進することが報告されている (Hughes and Westoby 1992; Gammans 2006)。

そこで本研究では、スゲ属植物二種 (アオスゲとマスキサ) を用いた野外実験により、1) これらの植物の果実を包む膜状の組織 (= 果胞) が異なるアリ種による種子の持ち去りにどんな影響を及ぼすか、2) アリ種ごとの訪問頻度と訪問当たり持ち去り率のそれぞれに対して果胞がどんな影響を及ぼすかについて調べた。アオスゲの果胞には、脂肪組織に似た白く柔らかい部位が見られ (図 1A)、この部位がアリ類による持ち去りを促進する効果をもつことが先行研究によって示唆されている (中西 1988)。対して、マスキサの果胞には白色の部位が見られない (図 1B)。本研究では、この果胞という種子形質について操作実験を行い、アリ種ごとの反応を比較した。

材料と方法

筑波大学構内に自生するアオスゲとマスキサから種子を採取し、実験開始までの 1–2 日間冷蔵庫 (約 4°C) に保存した。これらの種子を用い、2009 年 6 月 3–12 日に、構内の 9 ヶ所で以下の実験を行った。両種について無処理種子、果胞を除去した種子を用意し (計 4 種類)、それぞれ 5 個ずつ 4 つの種子皿 (ペットボトルの蓋) に分けて入れ、これらを 1 セットとして方形区内の無作為にえらんだ位置に置いた。種子皿は 8 mm ビデオカメラで午前中 (7–12 時まで) に 4 時間撮影した。動画と調査地のアリ標本 (別途に準備) をもとに、各皿についてアリ種ごとの種子持ち去り数を記録した。

結果と考察

訪れたアリの動画記録から、アミメアリ、クロヤマアリ、クロオオアリ、ケアリ属 sp. を同定した。他のアリについても、サイズや形態から 4 つのグループに分けた (不明 1–4 と略)。種子の持ち去り数を見ると、クロオオアリのよう

特定のアリ種による持ち去りだけを促進するという先行研究の結果と一致する。また、クロヤマアリはスミレ類の種子を持ち去ることが報告されているが (Masuda and Yahara 1992)、本研究では 1 個の例外を除きどの皿の種子も持ち去らなかった。以上の結果は、一部のアリ種はアオスゲの果胞に含まれる何らかの形質に反応して種子を持ち去ることを示唆する。今後はこのような反応のメカニズムを明らかにすると共に、果胞に反応して種子を持ち去るアリ種は反応しないアリ種と比べ植物の生存率や繁殖成功にどのような影響を及ぼすかについても明らかにしてゆきたい。

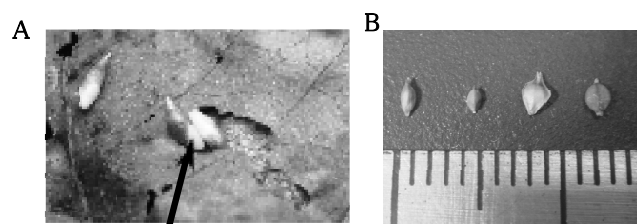


図1 アオスゲとマスキサの種子
A: 採取直後のアオスゲ種子。果胞の一部に矢印で示す白色の部位がある。アオスゲの種子は古くなると白色の部位がしぼむ。本研究では採取直後の種子を用いた。B: 採取から3ヶ月以上冷蔵庫に保存した種子。左からアオスゲの無処理種子、果胞を除去したアオスゲ種子、マスキサの無処理種子、果胞を除去したマスキサの種子。マスキサの種子は採取直後でも白色の部分がみられない。

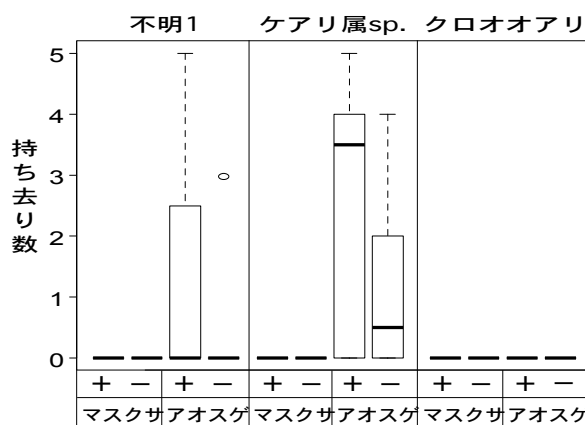


図2 アリ種ごとの種子の持ち去り数
行動の違いが顕著な3つのアリ種 (不明1、ケアリ属 sp.、クロオオアリ) について図示した。+ は無処理種子、- は果胞を除去した種子を示す。

海洋酸性化が沿岸微生物群集と物質循環に及ぼす影響に関する実験的解析

安達 大輝 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 濱 健夫 (生命環境科学研究科)

背景・目的

大気中の二酸化炭素 (CO_2) 濃度の増加は、海洋のさらなる CO_2 吸収をもたらし、「the other CO_2 problem」とも称される海洋酸性化を引き起こす。イギリスの The Royal Society (2005) はその現象を「現在弱アルカリ性である海洋表層水の pH が低下していく過程」と定義している。

現在、この海洋酸性化が進行している。現在の海洋表層水の平均 pH は $8.2 (\pm 0.2)$ であり、これは産業革命後すでに pH が 0.1 低下したことを示している。そして、IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) の IS92a scenario に基づくモデルでは、大気中 CO_2 濃度の増加に伴い、2100 年までに pH がさらに 0.3–0.4 減少するとされている。

この pH 0.3–0.4 の低下が、海洋生物に及ぼす影響を評価することは急務である。しかしながら、2009 年の時点でこの現象に対する個々の海洋生物の応答に一貫した傾向は見られていない。また、同種の生物を用いた研究でもその応答は多様であることが報告されている。

これまで行われてきた研究は、そのほとんどが単離株を用いた培養実験である。しかしながら、自然界においては多種の生物が群集を形成しており、群集での物質の動態を捉えることが生物地球化学的な物質循環を考える上で重要である。もしも、群集内で何らか (e.g. 群集組成、個々の生物活性など) の変化が生じれば、それは物質循環にも影響をもたらす可能性がある。

海洋酸性化は大気中 CO_2 濃度に対し、正のフィードバックをもたらすのか、それとも負のフィードバックをもたらすのか。この問いを考える上で、これまでの報告のように個々の生物の応答に一貫した傾向がないのであれば、群集内での応答性を把握することがより重要となってくる。ゆえに、信頼性の高い将来予測モデルを作成するためにも、あらゆる生物群集組成での応答性を評価することは必要不可欠である。

そこで本研究では、海洋酸性化を人為的に再現したタンク内で沿岸微生物群集を培養し、トレーサーとして安定同位体 (^{13}C , ^{15}N) を用いることで、炭素、および窒素の動態を明らかにすることを試みた。

培養方法

大型培養実験を筑波大学下田臨海実験センターにおいて行った (2009.5.22–6.5, 2009.11.16–30 の計 2 回)。円柱形の 400 L タンクに $100\ \mu\text{m}$ 孔径のメッシュで動物プランクトンを含む大型粒子を排除した沿岸水を満たし、レッドフィールド比 (N:P:Si = 16:1:16) に基づき培養初日に栄養塩を添加した。培養水中の炭酸系はタンク底部から高濃度 CO_2 ガスをバブリングすることで整えた。培養条件は CO_2 分圧によって分類し、400 ppm (control)、800 ppm (2100 年における大気中 CO_2 濃度)、1200 ppm の 3 種類を 1 セットとした。タンク中の CO_2 分圧は毎日バブリング (6 h) を行うことによって調整を試みた。

また、トレーサーとして安定同位体 ^{13}C で標識された $^{13}\text{CO}_2$ を CO_2 ガスに、そして ^{15}N で標識された KNO_3 を栄養塩に混合することで、培養期間内での炭素、および窒素の動態を追った。

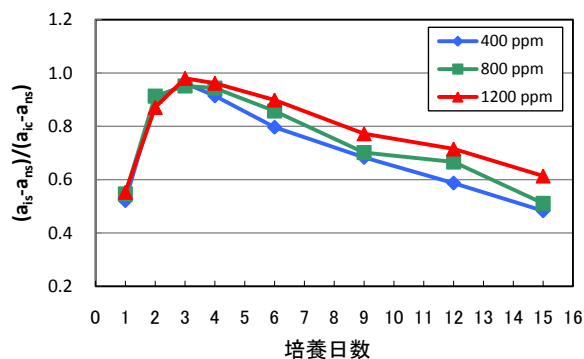


Figure 1: 縦軸の a_{is} , a_{ns} , a_{ic} はそれぞれ a_{is} : 培養試料中 POC の ^{13}C atom%, a_{ns} : 自然試料中 POC の ^{13}C atom%, a_{ic} : DIC の ^{13}C atom% を表している。

試料採取・分析方法

直径 5 cm、長さ 1 m の筒を用いて採水を行った。採水日は栄養塩添加日を Day 1 とし、5–6 月実験では Day 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 15 の計 8 回、11 月実験では Day 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 の計 9 回とした。無濾過水で培養水中の炭酸系パラメータ、溶存態無機炭素 (DIC) 中の ^{13}C 安定同位体比 (atom%) を測定した。また、培養水は孔径 $0.7\ \mu\text{m}$ のフィルター (GF/F)、さらに孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ のフィルター (Anodisc, Cyclopore membrane) で濾過し、濾液で水柱の栄養塩濃度、溶存態有機物 (DOM) 濃度、DOM 中の ^{13}C , ^{15}N atom% を測定した。また、GF/F フィルターおよび Anodisc フィルター上に残った懸濁体有機物 (POM) 濃度と POM 中の ^{13}C , ^{15}N atom% を測定した。POM・DOM 濃度、そしてそれぞれに含まれる安定同位体比によって Hama *et al.* (1983) を基に培養期間中での生産量を算出した。

結果・考察 (5-6 月実験)

Day 3–4 にかけて珪藻を主体としたブルームが全タンク内で確認された。Figure 1 は培養水中の全懸濁体有機炭素 (POC) の中で、培養開始後新たに生産された POC が占める割合を表しており、植物プランクトンの CO_2 吸収活性の指標でもある。全タンクで Day 3 において 1.0 に近い値を示していることは、それまでに生じた新たな POC が培養水中のほとんどを占めていることを示す。また、Day 1–3 までにタンク間での差が見られないことは、培養初期に顕著な珪藻の増殖が酸性化 (低 pH、高 CO_2 濃度条件) によって影響を受けないことを示唆する。このことは低 CO_2 濃度条件下で光合成速度が飽和するとされる珪藻の生理学的特性と一致する。

一方、Day 4 以降、値は全タンクで減少しているが、1200 ppm で最も高く、400 ppm で最も低いという一貫した傾向が見られた。このことは高 CO_2 濃度下において、新たに生産された POC が残存しやすい (分解されにくい)、もしくは培養後期において優占してきた他の植物プランクトングループの活性が増加する、という 2 つの可能性を示唆している。

砂底表在性端脚類 *Siphonoecetes* sp. の造巣特性

阿久津 崇 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 青木 優和 (生命環境科学研究科)

背景と目的

ヨコエビ類は沿岸魚類の主要な餌生物であり、恒常的な捕食圧の下に生活している。これを回避するため、石の下や海藻など既存の構造体の表面または内部に隠棲する種と巣の構築を行う種とがある。造巣性種の多くは固定巣を形成するが、表在性種の一部には移動性の巣を形成するものがある。*Siphonoecetes* sp. (= スナクダヤドムシ *Siphonoecetes tanabensis*) は砂底表在性で移動型の巣を構築するヨコエビの1種で、砂粒や貝殻などを接着して管状の巣をつくる。移動時には巣から体の前半分を出して第2触角で基底面を打ち、後方へと跳ねる。夏季に個体密度が増して多数の個体が海底で動き回る様子は、さながら「動く砂」である。本種は巣を背負いながら移動するという点ではヤドカリ類と似ている。しかし、自身で巣を作ることができる点および成長に応じてある程度巣を拡張できる点は、ヤドカリと異なっている。

本種の巣についての興味深い特徴として、1つの大型巣に複数の個体が同居する場合があることがあげられる (Figure 1)。同居巣内の複数個体には、幼体と成体のいずれも含まれている。この巣の形成に関する仮説としては、以下の3つが考えられる: (1) 巣の大型化による捕食リスクの低減、(2) 交尾前ガードによる雌雄の共存、(3) 子守り行動のための雌親と子の共存。いずれの仮説を検証するにしても、まず1個体を使用する巣の構築過程を明らかにする必要がある。そこで本研究では、巣材料や巣の構造に着目して個体との関係を探り、巣の構築過程を推定した。

方法

採集は2009年9月から2010年1月にかけて1ヶ月に2回実施した。調査地は静岡県下田市大浦湾内の水深約10mの砂質底である。口径約75mmの円筒型容器をサンブーとして用いて定面積内に存在する個体を砂ごと採集し、海中でポリエチレン製の袋に入れた。実験室に持ち帰ったヨコエビは巣ごとにヘキサミン中和5%海水ホルマリンで固定した。ホルマリンでの固定時には、個体は巣から出てくるので、個体と巣のいずれも傷つけることなく両者を分離することができる。

固定後は巣の形態を観察した後に、体長・巣の長径と短径・巣を構成する巣材の種類と粒数を計測した。また、巣材として巻貝の殻を使用している個体が顕著に多かったため、その殻径も測定した。

結果

巣材の種類から「巻貝の殻を利用した巣 (= 巻貝巣)」、「ゴカイの棲管を利用した巣 (= ゴカイ巣)」、「砂粒のみで構成された巣 (= 砂粒巣)」の3タイプに分けることができた。このうち、巻貝巣が80%以上を占めていた。巻貝巣とゴカイ巣では、巣の後端に巻貝またはゴカイの棲管を配置し、その殻口部に砂を接着し管状構造が形成されていた。巣のサイズは体長とともに大きくなる傾向が見られた。また、巻貝巣では、体長の増加とともに、使用する巻貝の殻サイズが増大した。

考察

巣材として巻貝殻の使用率が最も高かったが、これは巻貝の内部に既に管状構造があり、砂粒のみで巣を構築するより効率が良かったためだと考えられる。これは同様に管状構造を持つゴカイの棲管にも当てはまる。また、機械刺激を与えると貝殻の中に逃げ込む様子が観察されたことから、貝殻は一時的な避難用シェルターとして機能している可能性もある。また、体長とともに巣材として利用する巻貝殻サイズが大きくなったことから、本種は同じ巻貝殻を一生使い続けるのではなく、成長に応じて新たに巻貝殻を獲得していると考えられる。

これらの調査結果から「巻貝殻 + 砂粒」が1つの巣ユニット (Figure 2) であるとみられ、複数個体が同居する大型巣は、比較的体長の大きな個体が既存の巣ユニットを結合させて形成したものであると推定できる。しかし、大型巣には幼体も含まれることがあり、この幼体の起源については不明である。今後、同居個体間の雌雄関係や親子関係を探っていく必要がある。

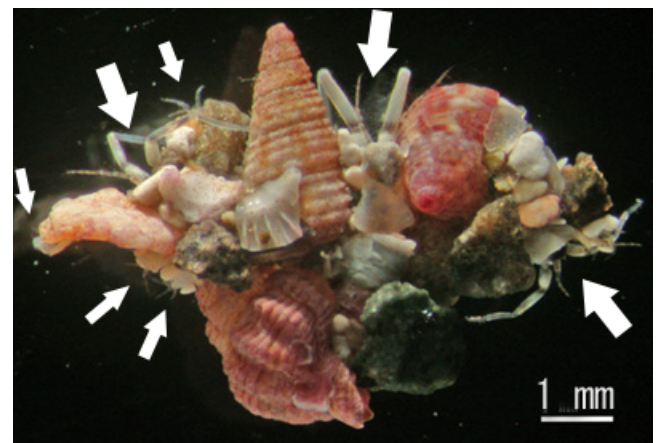


Figure 1: 複数の個体が同居する巣 (太い矢印が成体、細い矢印が幼体の位置をそれぞれ示している)

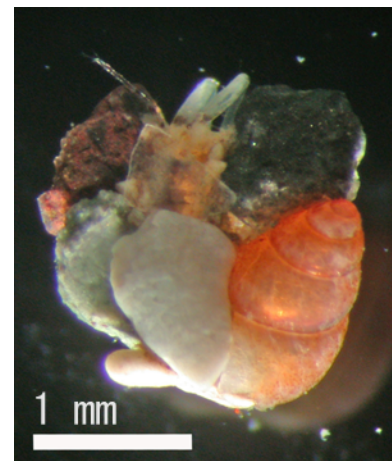


Figure 2: 単独個体が巣に入っている様子

藻食性巻貝バテイラが褐藻類カジメに与える影響の解析

吉見 仁志 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 青木 優和 (生命環境科学研究科)

背景と目的

沿岸域に形成される大型海藻の群落である藻場は多くの生物のすみかであり、また水産資源を支える上でも重要である。カジメ *Ecklonia cava* はコンブ目に属する多年生大型褐藻であり、海中林を形成する主要な海藻の1種である。カジメを摂食するものには藻食性魚類・ウニ・藻食性巻貝がいる。一般に藻食性魚類やウニの摂食圧は高く、前者は海藻本体を噛みちぎるように、後者は海藻の幼体を摂食してしまうことで、しばしば海藻に大きなダメージを与えることが知られている。一方で藻食性巻貝類は海藻への摂食行動が多く見られているものの、海藻に与える影響については実証的研究が少ない。カジメ葉上に頻出する腹足類ニシキウズガイ科のバテイラ *Omphalius pfeifferi pfeifferi* は水産資源としてもかなり重要な藻食性巻貝である。そこで本研究では、密度制御したバテイラのカジメ摂食量を定量することによって、バテイラがカジメの生長に与える影響を調べる。

実験方法

1. 生簀垂下実験

飼育容器として上面と底面に目合 5 mm の網を張った透明プラスチック容器 (直径 130 mm 高さ 65 mm) を 30 個用意した。そのうち 25 個はバテイラ 1 個体とカジメ片 (実験区) を入れ、残りの 5 つはカジメ片のみ (対照区) を入れた。バテイラのサイズは殻径が 19.5 mm – 38.7 mm である。1 つの生簀かごには実験区 5 つと対照区 1 つを入れ、これを 5 セット用意し静岡県下田市大浦湾中央部水深約 3 m に垂下した。2009 年 10 月から翌年 1 月まで 2 週間ごとにバテイラの成長とカジメの湿重量の変化を記録した。1 日あたりのバテイラのカジメ摂食量は次式で求めた。

$$\text{摂食量} = (\text{投餌量} - \text{残餌量} - \text{対照区増減量}) \div \text{日数}$$

2. 海中囲い込み実験

上面が 100 cm × 100 cm、高さ 50 cm のコンクリートブロック 6 基の天面を高さ 15 cm、厚さ 5 cm のコンクリート枠で囲い、枠の表面に銅塗料 (大日本塗料シーブルーキング) を塗布した。先行研究からバテイラは銅塗料を乗り越えられないことが示されており、これによりバテイラの密度を一定に保つことができる。このブロック 6 基を静岡県下田市大浦湾中央部水深約 10 m に設置した。各ブロックには茎長 108 mm – 235 mm のカジメを 4 本ずつ水中ボンド (コニシ株式会社 E380) で固定し、側葉の新生速度を測るためにカジメの最も下にある 10 cm 以上の両側葉にコルクボーラーで直径 5 mm の穴をあけた。ブロックには殻径約 33 mm バテイラをそれぞれ 0、30、60 個体投入した。同処理区は 2 つずつ、合計 6 区画とした。2009 年 12 月 3 日から 24 日まで各区画について 1 週間毎にバテイラの個体数、カジメの茎長と茎径、穴の位置を記録した。



Figure 1: 海中囲い込み実験で用いたコンクリートブロック

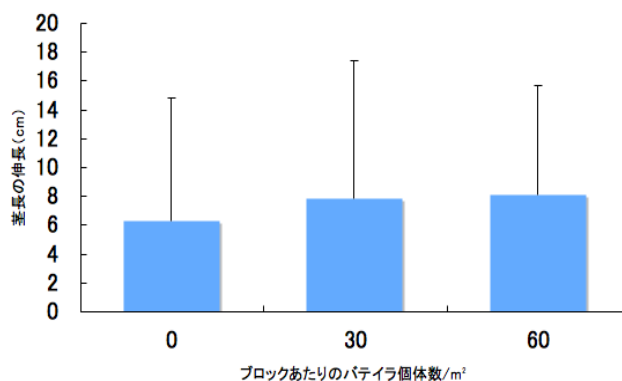


Figure 2: 囲い込み実験区におけるカジメの生長

結果

殻径の増加に伴ってバテイラのカジメ摂食量は増える傾向が見られ、またバテイラ 1 個体あたりの 1 日あたりの摂食量は最大 108 mg であった。また投入バテイラの密度とカジメの茎長、茎径、側葉の移動距離に有意な差は見られなかった (茎長: $n = 23$, $F = 0.10$, $p = 0.90$ 、茎径: $n = 23$, $F = 0.91$, $p = 0.42$ 、穴の移動: $n = 23$, $F = 1.11$, $p = 0.35$)。

考察

実験の結果から、バテイラの摂食圧がカジメの生長に与える影響は小さいことが示唆された。バテイラはカジメ葉上部表面を薄く削るように摂食しており、高密度区でも実験期間中にカジメの生長点部分を侵すことがなかったためと考えられる。その点で藻食性魚類やウニとは異なり保存的にカジメを摂食していると言える。

今後はさらに実験期間を増やし長期的なカジメへの影響を調べることで、またカジメ周囲の付着藻類が大きく減っていることが観察されたので付着藻類に対する摂食量を調べることでさらに詳細なバテイラの摂食圧が解析できるであろう。

ショウジョウバエの曲翅突然変異をかくす遺伝子

新井 健太 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 澤村 京一 (生命環境科学研究科)

背景

形態が進化したときに、どのような遺伝的变化が起こったのだろうか。遺伝学的操作ができるショウジョウバエの翅の形態に注目した。キイロショウジョウバエには、曲翅突然変異 (遺伝子名: *Curly*、遺伝子記号: *Cy*) が知られている。これはヘテロ接合で翅がそりあがり [優性形質]、ホモ接合では致死となる [劣性形質]。

ところが、曲翅突然変異をもった系統のなかに、曲翅形質を失った系統がいくつか発見されている。つまり、遺伝子型は曲翅突然変異であるにもかかわらず、表現型は野生型のまっすぐな翅となる。これらを non-Curly 系統とよぶことにする。曲翅突然変異を抑制する遺伝子についての報告は少なく、第二染色体に 1 個 [優性]、第三染色体に 1 個 [劣性] が知られている。当研究室では、多数の non-Curly 系統が新たに進化 (出現) している。non-Curly 系統に進化する遺伝的原因としては、

- すべての系統で共通の原因
- それぞれの系統で独自の原因

が考えられる。これらを判別するため、non-Curly 系統を用いて、曲翅突然変異を抑制する遺伝子のマッピングを行った。遺伝的变化と形態変化の具体的関係が示せれば、形態の進化を理解する糸口となりえる。

材料と方法

キイロショウジョウバエは 4 対の染色体をもっており、曲翅突然変異は第二染色体上に存在する。本研究では、曲翅突然変異を抑制する遺伝子が乗っている染色体を、交配実験により特定した (図 1)。材料には、当研究室で独立に生じた 3 つの non-Curly 系統をもちいた。交配実験中に曲翅突然変異を追跡するために、曲翅突然変異に連鎖している遺伝的なマーカー (瘡眼) を用いた。

結果

F₁ に翅の曲がった個体は生じなかった (表 1)。つまり曲翅突然変異を抑制する遺伝子は優性である。正逆交配でも同様の結果が得られ、伴性遺伝・細胞質遺伝は否定された。F₂ に翅の曲がった個体は生じなかった。よって原因遺伝子は、曲翅突然変異とマーカーが乗っている第二染色体上に存在している。3 つの non-Curly 系統で、同様の結果となった。

考察

今回は 3 つの non-Curly 系統において、曲翅突然変異とその抑制遺伝子が同一の第二染色体上に乗っていた。そのため、次にあげる二つの可能性が考えられる。

- 曲翅突然変異の復帰突然変異
- 曲翅突然変異抑制遺伝子が独立に 3 回進化

また、non-Curly 系統は、他にも多数が進化 (出現) している。それらの中から第二染色体以外に存在し、曲翅突然変異を抑制する、多様な遺伝子の発見が期待される。

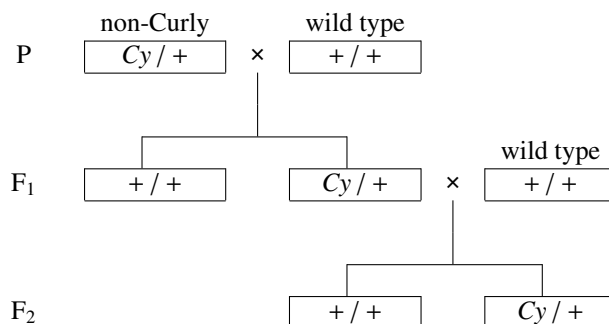


図 1 交配図 図中の記号は遺伝子型をあらわす。

表 1 表現型の分離 (一例)

	野生翅		曲翅	
	野生眼	瘡眼	野生眼	瘡眼
F ₁	77	86	0	0
F ₂	127	107	0	0

ショウジョウバエ雑種雌不妊遺伝子 *Nup160* の変異体作製

前原 一慶 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 澤村 京一 (生命環境科学研究科)

背景と目的

キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエは、交配すると雑種が生まれる。キイロショウジョウバエの第2染色体左腕の一部をオナジショウジョウバエの遺伝子で置換したイントログレッション系統がこれまでに作製されている。このイントログレッションはヘミ接合またはホモ接合の時に雌不妊を引き起こす。この雌不妊は *nuclear pore protein 160* (*Nup160*) 遺伝子が関与していることが、本研究室の先行研究で明らかになっている。*Nup160* の変異には、 $P\{EP\}Nup160^{EP372}$ 、 $P\{lacW\}I(2)SH2055^{SH2055}$ 、 $PBac\{RB\}RfC38^{e00704}$ の3つが知られている。イントログレッションとのヘテロ接合体雌では、 $P\{lacW\}I(2)SH2055^{SH2055}$ や $PBac\{RB\}RfC38^{e00704}$ はほぼ不妊であるが、 $P\{EP\}Nup160^{EP372}$ は正常な妊性を示す。これらの影響の違いは、それぞれの変異におけるトランスポゾン挿入位置の差異を反映していると思われる。今回の実験では、 $P\{EP\}Nup160^{EP372}$ からトランスポゾンを切除し、*Nup160* 遺伝子機能欠損系統を作製する。

結果

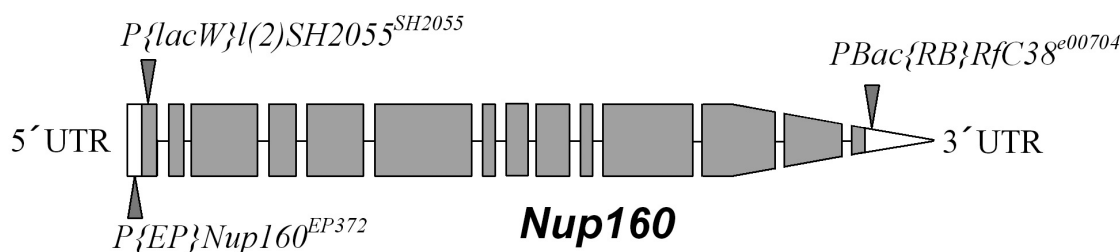
新規変異体を219系統作製した。これらの内、ホモ接合体で致死となったのは24系統(11%)であった。この劣性致死変異系統とイントログレッションのヘテロ接合体雌の妊性は、24系統中15系統(62%)で完全な不妊であり、残りの9系統は妊性があった。また、ホモ接合体で致死とならない変異系統では、検査した全ての系統で正常な妊性を示した。

考察

今回の実験で作製した15系統で完全な雌不妊を示しており、これは *Nup160* 遺伝子の機能が欠損したものと考えられる。また9系統では妊性が正常であったので、妊性に関する機能が失われていないと思われる。今後は *Nup160* の中のどの位置が欠失ならば不妊となるのかを調査する予定である。

方法と材料

$P\{EP\}Nup160^{EP372}$ 系統とトランスポゼース供給系統を交配し、両方の遺伝子を持った雄を作った。挿入トランスポゾンが切り出される時、その配列の周辺部も欠失することがある。本実験ではこのような挿入トランスポゾンを失った雄を多数作り、それぞれの新規変異を系統化した。これらの変異とイントログレッションとのヘテロ接合体雌の妊性の有無を確かめ、雑種雌不妊への影響を調べた。

*Nup160*への挿入の位置

ショウジョウバエ雑種致死遺伝子の 32C1-D1 領域におけるマッピング

村田 孝順 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 澤村 京一 (生命環境科学研究科)

目的

キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエを交配すると、雑種は致死または不妊になる。当研究室では、キイロショウジョウバエの第二染色体の一部がオナジショウジョウバエの遺伝子に置き換わっているイントログレッション系統を用いた研究を行ってきた。先行研究において、イントログレッションと欠失染色体とのヘテロ接合を作成することにより 32C1-D1 の領域に雑種致死遺伝子があることが示唆された。この領域には、7 つの遺伝子 (*Nup154*, *Art8*, *dUTPase*, *Samuel*, *Acp32CD*, *CG14913*, *CG18666*) が存在する。これらの遺伝子のうちいずれが雑種致死に関わっているかを特定するため、候補となる遺伝子へのトランスポゾン挿入変異を用いて交配実験を行った。

材料と方法

Nup154 への挿入変異 4 系統、*Samuel* への挿入変異 7 系統の雄をイントログレッション系統の雌と交配した。この交配により生まれる F₁ を数え、オナジショウジョウバエ対立遺伝子のヘミ接合体の生存率を調査した。

結果

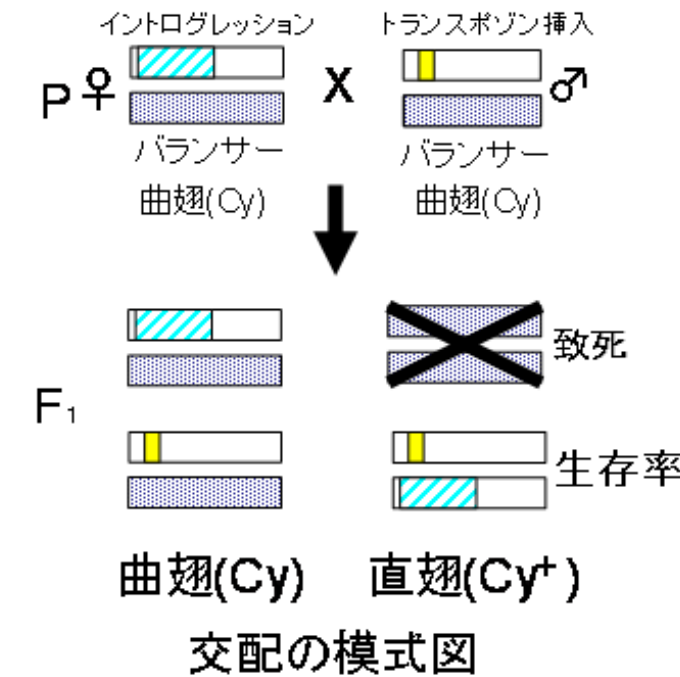
いずれの挿入変異体を用いても、オナジショウジョウバエ対立遺伝子のヘミ接合体は生存した。

考察

今回行なった実験では、この領域に存在する雑種致死の原因遺伝子を特定することはできなかった。今後の展望としては、未確認の残り 5 つの遺伝子について実験するとともに、確実に遺伝子の機能を失っている変異体を用いた交配を行なう必要がある。

イントログレッション系統♀と挿入変異体♂の交配によるF₁の数

挿入変異体	♀		♂	
	Cy+	Cy	Cy+	Cy
<i>Nup154</i> ⁴⁰⁵⁸⁶¹ / <i>CyO</i>	50	70	37	75
<i>Nup154</i> ⁴⁰¹⁸⁰¹ / <i>CyO</i>	52	67	43	99
<i>Nup154</i> ⁴⁵¹¹³³⁸⁰ / <i>CyO</i>	26	49	43	68
<i>Nup154</i> ⁴⁵¹¹²⁰⁶⁹ / <i>CyO</i>	87	121	63	114
<i>Samuel</i> ⁴⁰¹¹⁴¹¹ / <i>CyO</i>	44	104	45	80
<i>Samuel</i> ⁴⁰⁰⁶⁶³² / <i>CyO</i>	100	104	104	104
<i>Samuel</i> ⁴⁰⁰⁸⁶¹ / <i>CyO</i>	52	113	70	116
<i>Samuel</i> ⁴⁰²⁹⁴⁹ / <i>CyO</i>	32	59	46	72
<i>Samuel</i> ⁴⁵¹¹⁵⁸¹⁵ / <i>CyO</i>	97	254	109	218
<i>Samuel</i> ⁴⁵¹¹⁶⁵²⁵ / <i>CyO</i>	187	331	157	286
<i>I(2)SH0090</i> ⁴⁵¹³⁰⁰⁹⁰ / <i>CyO</i>	108	196	108	176



ショウジョウバエの翅振り行動の種間比較

北村 満彦 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 澤村 京一 (生命環境科学研究科)

背景と目的

Drosophila (ショウジョウバエ) のオスはメスに求愛する時、翅を使ったディスプレイを行う (翅ディスプレイ)。翅ディスプレイは種ごとに特徴があり、この違いが性的隔離の原因のひとつであると考えられている。この実験では *melanogaster* (*mel.* キイロショウジョウバエ)、*simulans* (*sim.* オナジショウジョウバエ) とこれらの雑種における翅ディスプレイの違いについて調査した。

材料と方法

mel. Z30, OR, CS, HR

sim. S2, C167.4, 大月, *Lhr*

雑種 *mel.* メスと *sim.* *Lhr* オスを交配させて得た F1

melanogaster と *simulans* を交配させると、F1 の雌雄いずれかが致死となる (雑種致死)。そこで雑種致死を救済する *Lhr* 遺伝子を持つ *sim.* の系統と *mel.* を交配させて雌雄の雑種を得た。

同系統のオスとメスを各 1 匹ずつ直径 38 mm、高さ 10 mm の円筒形の容器に入れ、求愛行動を観察した。翅ディスプレイを開始した時を求愛の開始とみなし、オスがメスを追わなくなった時を求愛の中断とみなすことにした。開始から中断までの時間を累積したものを求愛時間とした。交尾が成立するか、もしくは容器に入れてから 20 分が経過すると観察を終了した。各翅ディスプレイは翅を広げ始めてから閉じるまでを 1 回とみなし、回数を求愛時間で割ったものを「単位時間当たりの回数」とした。翅ディスプレイは以下の 3 種類に分類して観察した。

Wing vibration 翅を広げ震わせる。

Wing scissoring 翅の開閉をすばやく繰り返す。

Wing rowing 翅を広げるが震わせない。

結果

melanogaster は主に vibration を行い、他の翅ディスプレイはあまり行わないのに対し、*simulans* は主に scissoring を行った。種間雑種はどの翅ディスプレイも両種の間の中間の値を示した。

雑種が示した形質が *melanogaster*、*simulans* いずれの種の形質に近いのかを評価するため、*t* 検定を用いて種内系統間および種間の有意差を調べた。*melanogaster* では系統間に有意差はほとんどなかったが、*simulans* では互いに系統間で有意差が認められた。*melanogaster* と *simulans* の間にはいずれの翅ディスプレイでも有意差があった。

種間雑種の vibration はどちらの種とも有意差があった。種間雑種の scissoring は *melanogaster* との有意差はなかった。種間雑種の rowing は *simulans* との有意差はなかった。

考察と展望

以上の結果から、vibration に関する対立遺伝子は *melanogaster* と *simulans* との間では不完全優性、scissoring は *melanogaster* が優性、rowing は *simulans* が優性と考えられる。このことから、翅ディスプレイは単一の遺伝子ではなく、複数の遺伝子によって制御されているものと考えられる。しかし、性染色体上に原因遺伝子が存在する場合、必ずしも以上のことが言えるとは限らない。このことを検証するため、現在、親の雌雄を入れ替えて交配したものをを使って実験を進めている。

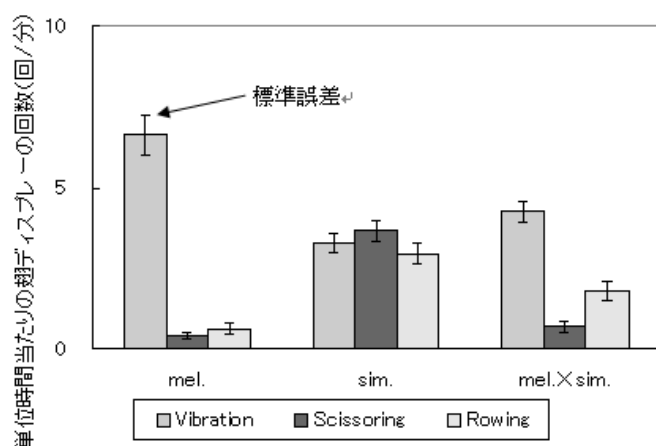


Figure 1: 単位時間当たりの翅ディスプレイの回数

ステロイド生合成に関わるコレステロール代謝酵素 Neverland の後口動物における解析

塩谷 天 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 古久保-徳永 克男 (生命環境科学研究科)

背景・目的

コレステロールは我々ヒトを含む多くの生物にとって、恒常性の維持、代謝調節、発生や分化といった様々な局面で重要な役割を担う。特に多細胞生物においてコレステロールは、脂質やステロイドの産生、および一部のシグナルタンパク質の活性調節に必須である。コレステロール代謝異常はヒトの生活習慣病にも密接に関連し、その調節機構を理解することは基礎生物学のみならず医学の面からも重要である。

所属研究室の吉山・丹羽らによって同定された *neverland* (*nvd*) は、新規コレステロール代謝酵素をコードしている。昆虫において、*nvd* は発生過程の進行を司るステロイドホルモンであるエクジソンの生合成過程に必須の役割を担う (Yoshiyama *et al.* *Development* 133: 2565–2574, 2006)。同様に、線虫 *C. elegans* の *nvd* 相同遺伝子もステロイドホルモン産生と個体発生に必須である (Rottiers *et al.* *Dev. Cell* 10: 473–482, 2006)。さらに、昆虫の *Nvd* タンパク質はステロイドホルモン生合成過程におけるコレステロールの 7, 8 位の脱水素化を担い、7-デヒドロコレステロール (7-dC) の生成に必須の役割を果たすことが示されている (Figure 1、吉山ら投稿準備中)。

ゲノム情報を用いた解析から、*nvd* 相同遺伝子は昆虫や線虫のみならず、脊椎動物を含む後口動物にも広く保存されていることが確認されている (Yoshiyama *et al.* *Development* 133: 2565–2574, 2006)。このことから、*nvd* は後口動物においてもコレステロール代謝の一端を担っていると考えられるが、その生体内機能は未解明のままである。そこで本研究では後口動物における *nvd* 相同遺伝子の機能を明らかにし、生物種を越えて保存された *nvd* によるコレステロール代謝機能の意義の解明を目指す。

材料・方法

我々はゲノム情報から *nvd* 相同遺伝子を持つことがわかっているバフンウニ *Hemicentrotus pulcherrimus*、カタユレイボヤ *Ciona intestinalis*、ゼブラフィッシュ *Danio rerio*、アフリカツメガエル *Xenopus laevis* を用いて、以下の実験により *nvd* 相同遺伝子の発現および機能解析を行った。

● 酵素活性測定

後口動物の *Nvd* タンパク質が昆虫と同様の酵素活性を有しているかを検証した。ゲノム情報から *nvd* 相同遺伝子の全長を増幅する PCR プライマーを設計し、遺伝子を単離した。単離した遺伝子をショウジョウバエの S2 培養細胞で発現させた。その後、基質となるコレステロールを培地に加え、25°C で 24 時間培養した後に培地ごと溶出し、生成物の 7-dC が産生されているかを HPLC にて確認した。

● 発現解析

バフンウニ、カタユレイボヤ、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエルの初期胚を用いて逆転写定量 PCR および *in situ* hybridization 法により *nvd* 相同遺伝子の発現時期および発現部位を検証した。

● 遺伝子発現阻害

ゼブラフィッシュの *nvd* 相同遺伝子のスプライシングを特異的に阻害するようなアンチセンスモルフォリノオリゴを作製し、それを発生初期のゼブラフィッシュ胚に顕微注入した際の表現型を観察した。

結果

酵素活性の測定において、今回用いたすべての生物種の *nvd* 相同遺伝子がコレステロールから 7-dC への変換活性を有していた。 *in situ* hybridization による発現解析の結果、*nvd* 相同遺伝子はバフンウニでは幼生の消化器官、ホヤでは幼生の一部の神経細胞と中胚葉組織、ゼブラフィッシュでは胚全体、アフリカツメガエルでは上皮組織で発現していた。すなわち、*nvd* 相同遺伝子の発現パターンは生物種によって大きくことなっていた。

nvd 相同遺伝子の機能を阻害したゼブラフィッシュの初期胚では、初期胚における細胞の覆い被せ運動の異常、および頭部と尾部の形態形成異常が観察された。

考察

今回用いた生物種すべての *Nvd* タンパク質が昆虫分子と同様のコレステロール変換活性を保持していた。このことから、*Nvd* のコレステロール代謝機能は進化的に高度に保存されていると言える。しかし一方、*nvd* の発現パターンは生物種によって異なることから、*nvd* の発生過程における役割は後口動物の種ごとに多様化していると考えられる。

ゼブラフィッシュの *nvd* 相同遺伝子の機能を阻害した際の表現型は、ステロイドホルモン低下を引き起こしたゼブラフィッシュ個体の表現型に酷似していた (Hwei-Jan *et al.* *Nature* 439: 480–483, 2006)。このことから、ゼブラフィッシュの *nvd* 相同遺伝子は生体内でステロイドホルモン産生に関与している可能性が期待される。今後、ゼブラフィッシュにおいて *nvd* が何らかのステロイドホルモン産生に関与しているかを検証するため、機能低下個体のホルモン量測定やホルモンに応答する遺伝子の発現量変化を解析していく予定である。

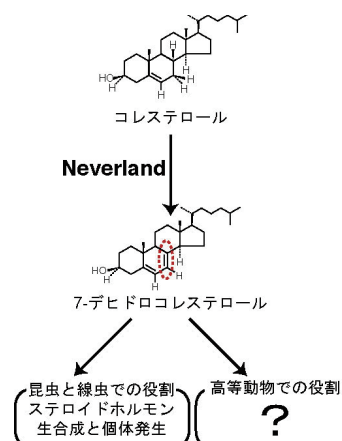


Figure 1: Neverland の機能の模式図

ショウジョウバエを使用した統合失調症の遺伝学的解析

高山 幸次郎 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 古久保-徳永 克男 (生命環境科学研究科)

背景と目的

統合失調症は妄想や幻覚などの症状を引き起こす精神疾患であり、双極性障害と共に二大精神疾患に数えられる。その生涯発症率は約1%にのぼり、遺伝要因と環境要因の両方が関係していると考えられている。発症頻度が高い上に治療困難な疾患であり、疾患発症メカニズムの解明が社会的に求められている。近年、その統合失調症発症メカニズムの解明において、遺伝的に操作した動物モデルが強力なツールとなると考えられている。

DISC1 (*Disrupted In Schizophrenia 1*) は、統合失調症を頻発するスコットランドの家系を対象とした研究によって発見された統合失調症原因候補遺伝子の一つであり、他の多くのタンパク質と相互作用することで脳の発生と機能の両面において重要な働きをしていると考えられている。当研究室では、ヒト DISC1 を導入したショウジョウバエの表現型を解析することで、DISC1 の生体内における機能を明らかにすることを試みている。ショウジョウバエに DISC1 のホモログは存在しないが、DISC1 と相互作用する多くのタンパク質が保存されている。故にヒト DISC1 をショウジョウバエにおいて発現させると、ショウジョウバエが元々もっている endogenous なタンパク質と相互作用し、何らかの表現型が現れることが期待される。これまでのところ、当研究室の先行研究によって DISC1 をキノコ体特異的に発現させたショウジョウバエにおいて嗅覚連合学習の阻害及び睡眠時間の延長が起こることが示されている。

本研究では、DISC1 を発現させたショウジョウバエにおける形態的な表現型を発見し、その表現型を用いて DISC1 の生体内における機能を解析することを目的としている。

方法

1. MARCM 法を用いたキノコ体単一神経細胞の形態観察

MARCM 法は、特定の細胞で目的の遺伝子を発現させることの出来る方法である。今回はその MARCM 法を用いて、キノコ体を構成する単一神経細胞 (γ ニューロン) で DISC1 及び mCD8::GFP を同時に発現させた。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、キノコ体単一神経細胞の DISC1 を発現させたことによる形態的变化を観察した。なお、軸索側鎖の長さを測定することでキノコ体単一神経細胞の形態的变化を評価した。

2. Neuromuscular junction (NMJ) の形態観察

GAL4-UAS システムを用いて完全長 DISC1 (DISC1 FL) を発現させたショウジョウバエ及びコントロール群のショウジョウバエの NMJ (神経と筋の接合部位) を Synaptotagmin 抗体及び HRP 抗体で二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて NMJ の形態的变化を観察した。なお、Synaptotagmin 抗体で染まる領域を Synaptic bouton area とし、その領域の面積を測定することで NMJ の形態的变化を評価した。

3. NMJ における表現型を用いた DISC1 の機能解析

以下の DISC1 コンストラクトを発現させ、2 の実験と同様に NMJ の形態的变化を評価することで、DISC1 が Synaptic bouton 形成に影響を及ぼしたメカニズムを解析した。

・ DISC1 TR (598 番目アミノ酸残基から C 末である 854 番目アミノ酸残基を欠く)

・ DISC1 46-C (N 末から 45 番目アミノ酸残基を欠く)

結果と考察

1. DISC1 FL 及び DISC1 TR をそれぞれ発現させたキノコ体単一神経細胞において、コントロール群に対して有意な軸索側鎖長の減少が見られた。このことから、DISC1 が軸索伸長経路中のタンパク質と相互作用し、その経路に何らかの影響を及ぼしたものと考えられる。
2. DISC1 FL を発現させたショウジョウバエの NMJ において、コントロール群に対し有意な Synaptic bouton area 面積の減少が見られた。このことから、軸索伸長と同様に DISC1 が Synaptic bouton 形成経路中のタンパク質と相互作用し、bouton 形成経路に何らかの影響を及ぼしたことが示唆される。
3. DISC1 TR 及び DISC1 46-C をそれぞれ発現させたショウジョウバエにおいて、共に DISC1 FL を発現させたショウジョウバエと同程度の Synaptic bouton area 面積の減少が観察された。TR は 598 番目から C 末まで欠くため、この欠失領域は Synaptic bouton 形成経路中タンパク質との相互作用に無関係であると考えられる。一方 DISC1 46-C は、神経細胞において核に局在する DISC1 FL と異なり、細胞質に局在する。故に上記の結果から、DISC1 は細胞質において bouton 形成経路に影響を及ぼしたことが示唆される。

今後の展望

依然 DISC1 を発現させたことによって表現型が生じたメカニズムは不明な点が多い。今後そのメカニズムを解明すべく、様々な領域を欠く DISC1 コンストラクトを発現させ表現型の変化を見ることで、今回発見された表現型に効いている DISC1 の領域の同定を目指す。また、神経の発生・機能に関与する遺伝子のミュータントバックグラウンドで DISC1 FL を発現させ表現型の変化を見ることで、DISC1 が影響を及ぼした経路と同一経路で働くタンパク質を探索する。

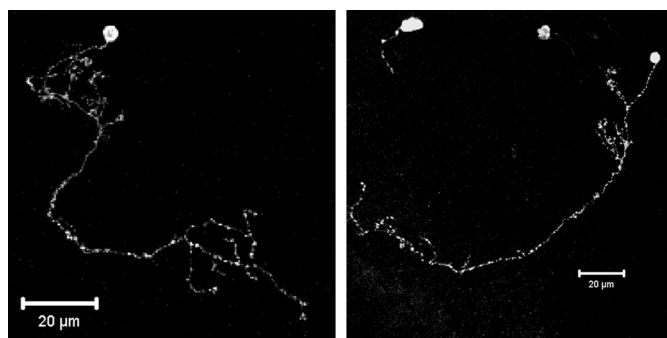


Figure 1: mCD8::GFP で標識したキノコ体単一神経細胞
左: コントロール 右: DISC1 FL を強制発現

寄生蜂 *Chelonus inanitus* の産卵行動における化学的・物理的刺激の役割

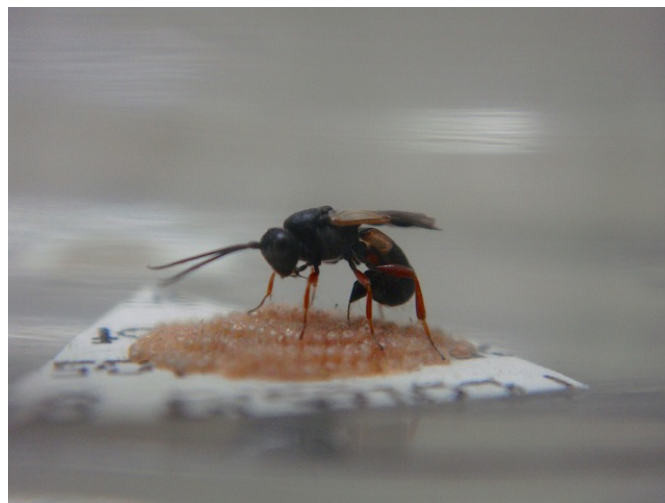
新行内 隆明 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 戒能 洋一 (生命環境科学研究科)

背景・目的

ハチ目コマユバチ科に属する寄生蜂 *Chelonus inanitus* (以下ケロナス、図 1) は、多くのチョウ目昆虫の卵に寄生する寄生蜂の一種である。ケロナスはヨトウ類などの農作物の主要な害虫に寄生することが知られており、生物的防除資材として用いるのに有用な天敵昆虫となる可能性がある。しかし、ケロナスの行動に関する論文はほぼ皆無で、産卵行動すら研究されていない。

これまでのケロナスの観察から、雌蜂は寄主となる卵塊に到達して触角で卵塊表面に触れてから産卵管を卵に挿入して産卵する行動が観察された。また、ケロナスが飼育ケース内の凸凹部分にも産卵行動を行うことも観察された。そこで本研究では「ケロナスは寄主卵塊の表面にある化学物質と、卵塊周辺の物理的刺激により寄主を認識し産卵行動に至る」との仮説をたて、化学的・物理的の両刺激に焦点を絞り実験を行った。

図 1: *Chelonus inanitus* の産卵行動

材料・方法

ケロナスの寄主として、チョウ目ヤガ科に属するハスモンヨトウを用いた。ハスモンヨトウの幼虫は、人工飼料を用いて飼育した。

寄主卵塊のエタノール抽出液 (0.2 卵塊当量、20 μ l) を 2 $\times$ 2 cm のろ紙に処理し、乾燥後直径 9 cm ガラスシャーレ内のケロナス雌 1 匹に与えた。コントロールでは、同量の溶媒のみを処理した。また、同抽出液の 20 μ l をシャーレ底面の同じ面積に塗布し風乾したものも同様に生物検定に用いた。ケロナスの産卵行動を処理部外縁および中央部での触角探索と産卵管挿入試行に分け、それらの反応率と継続時間を記録した。なお、飼育および実験は全て 25 $\pm$ 1°C、明暗周期 16L - 8D の条件下で行った。

結果・考察

ケロナスは、卵塊抽出液で処理したろ紙では外縁部と中心部のいずれでも全ての個体が反応したが、コントロールのろ紙では外縁部のみに対し 60% が反応した。一方、抽出液を直接塗布したシャーレ面には全く反応しなかった。これらの結果から、ケロナスの産卵行動は化学的刺激だけでは発現せず、物理的刺激も必要であることがわかった。

また、コントロールのろ紙外縁部に対する総滞在時間は、抽出物処理したろ紙全面でのそれより約 4 倍長い。ろ紙の平面部には反応しなかった。これは、ケロナスが産卵行動を開始して平面での反応を継続するには化学的刺激が必要な事を示唆している。

以上の結果より、*C. inanitus* は産卵行動においては化学的・物理的刺激の両方が必要であると考えられる。今後の研究として、産卵行動に関与する物質の化学的性質、物理的刺激因子の解析などを進めていきたい。

ハマキコウラコマユバチの人工培地中での発育

赤坂 泰基 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 戒能 洋一 (生命環境科学研究科)

背景・目的

内部寄生蜂にとって、寄主体内は栄養源であると同時に、生活環境の場でもある。そのため、人工培地を用いて内部寄生蜂を培養するためには、成長に必須の栄養素を充足させ、かつ生育環境として調整することが必要であり、長期の培養は困難である場合が多い。過去の研究においても合成培地を用い、内部寄生蜂の羽化までを成功させた例は非常に少ない。

ハマキコウラコマユバチ (*Ascogaster reticulata*) (ハチ目: コマユバチ科) は、チャノコカクモンハマキ等数種のハマキガ科を寄主とする内部寄生蜂の一種である。本研究ではこの寄生蜂を使用し、人工培地を用いた培養実験を行った。ハマキコウラコマユバチは先の実験で人工的な装置への産卵に成功している。この装置を人工寄主として用い、人工培地への産卵を促しその後の発育を観察した。

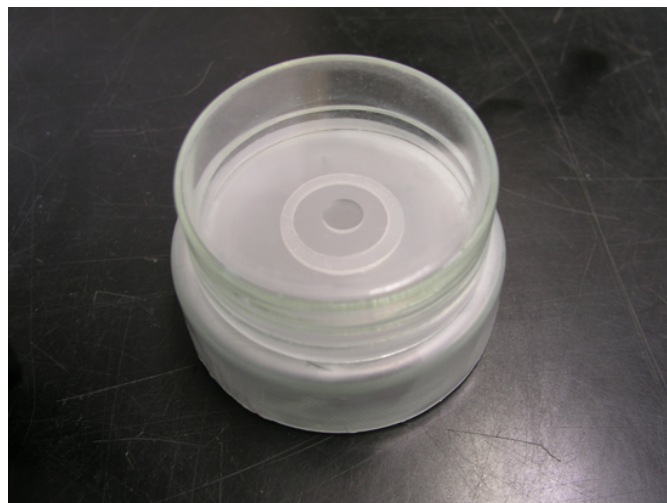


図 1. 人工寄主

材料・方法

ハマキコウラコマユバチは、羽化後 3–5 日齢の未交尾雌を使用した。また人工寄主(図 1)は、直径 5.2 cm のガラスシャーレを土台として用い、2 枚のパラフィルムで培地 (30 μ l) を挟み、その上部に寄主卵塊抽出物 (5 μ l) を塗布し作製した。供試昆虫の飼育および培養は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ で行った。

培地は、SF 900、TC-100、ExCell 420、Express Five、IPL-41、Grace の 6 種類全てに 10% FBS を混合したものを使用し、コマユバチの産卵実験を行った。各々の培地を充填した人工寄主にコマユバチを 1 頭ずつ 1 時間放ち、培地への反応、産卵の有無を調べた。また卵が確認された培地を 2 日間培養し、卵の発育状態を観察、培養に最適な培地を推定した。

次に、この結果により推定された培地を用いて産卵後 5 日目まで発育経過の観察を行い、また先の実験で明らかになっている寄主体内でのコマユバチの成長過程と比較を行った。



図 2. IPL-41 (10% FBS) 培地内のハマキコウラコマユバチ 1 齢幼虫 (産下 5 日目)

結果・考察

全ての培地においてコマユバチ雌は塗布された卵塊抽出物に反応し、培地上部周辺を探索した。長時間留まり、産卵行動が見られた培地は IPL-41 (10% FBS) 培地と TC-100 (10% FBS) 培地で、この 2 種で卵が認められた。また、2 日後に装置を分解し、卵の状態を観察した結果、TC-100 (10% FBS) 培地では胚子発生が進んでいなかったが、IPL-41 (10% FBS) 培地では潜幼虫期まで発生が進行していた。よって、IPL-41 (10% FBS) 培地が本種の培養に最も適していることがわかった。

IPL-41 (10% FBS) 培地を用いて 5 日間培養を行った結果、約 24 時間後に胞胚期から胚帯期、2 日目に体節形成の末期、3 日目に潜幼虫期、そして 4 日から 5 日で孵化し 1 齢幼虫(図 2)となった。これは寄主体内での成長速度より約 1 日遅い結果である。

また、培養期間を延長した場合でも、体サイズに変化は無く、2 齢幼虫へ脱皮しなかった。よって、IPL-41 (10% FBS) 培地のみでは幼虫の生育に必要な栄養素が足りていないことが示唆される。以上の結果をふまえ、今後は数種の栄養・ホルモン等の添加により、幼虫の伸長が行われる培地への改良を目指す予定である。

クワゴヤドリバエの寄主探索行動における植物揮発性成分の役割

田中 彩 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 戒能 洋一 (生命環境科学研究科)

背景・目的

クワゴヤドリバエ *Exorista sorbillans* (ハエ目: ヤドリバエ科) は、カイコガ幼虫など多くの鱗翅目幼虫の寄生バエである。一般に寄生性昆虫が寄主探索する際、手がかりとして寄主が食害した植物が出す揮発性物質を用いることが多い。このような寄主 - 植物 - 寄生性昆虫の関係を3者系と呼ぶ。寄生蜂での3者系研究は多いが、寄生バエでの研究はそれほど多くない。本研究ではカイコとヤマグワ (以下クワ) を用いて、クワゴヤドリバエが寄主探索において植食者誘導性植物揮発性物質 (HIPV) を利用しているかどうかを調べた。

材料・方法

寄主のカイコは人工飼料を用いて飼育した。交尾・寄主への産卵を経験した羽化後4-7日の雌バエを実験に用いた。カイコ、ハエともに温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明暗周期 16L-8D の条件下で飼育した。クワは春-秋は屋外、冬は温室内で栽培したものを用いた。風洞装置の風上に水に差したクワの枝を置き、90 cm 風下でハエをエサ (角砂糖) の上にとまらせ、25-30 cm/s の風を流して、ハエが反応するか調べた。カイコに10時間以上食害されたクワ、ハサミで人工的に傷つけたクワ、未加害のクワそれぞれに対して実験を行った。また、未加害クワ、食害クワの揮発性物質をヘッドスペース法で捕集・抽出し、この抽出物で処理した紙を未加害クワの葉のそばに置いたときハエがどう反応するか調べた。

結果・考察

カイコに食害されたクワに反応して、60% 近くのクワゴヤドリバエが餌から離れて飛び立ち、約 20% がクワに到達した。しかし、人工的に傷つけたクワや未加害クワでは20-30% のハエしか反応せず、クワまで到達したのは5% 以下だった。ヘッドスペースによる抽出物を用いた実験でも、食害クワの抽出物では55% が飛び立ったが、未加害クワの抽出物では20% 前後しか飛ばなかった。このことより、クワゴヤドリバエは食害されたクワが出す揮発性物質に反応すると推察された。しかし、実験結果からは、食害クワと未加害クワで、飛び立つ率には大きく差があるものの、クワへの到達率にはあまり差がみられなかった。これより、クワの揮発性物質はクワゴヤドリバエを寄主生息場所へ誘引するが、寄主を発見し産卵にいたるまでには揮発性物質とは別の要因が関係している可能性がある。



図 1: 角砂糖にとまるクワゴヤドリバエ

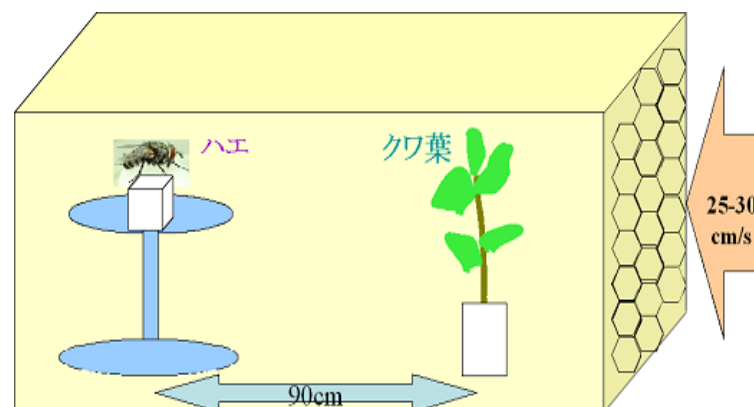


図 2: 実験に用いた風洞の模式図

Evolutionary Innovation 軟体動物巻貝における蓋の獲得

橋本 直樹 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 和田 洋 (生命環境科学研究科)

背景・目的

軟体動物門は約 20 万種が属する極めて多様な分類群であり、その中でも巻貝や笠貝などが含まれる腹足類は軟体動物最大のグループである。この腹足類のボディプランにおける進化的革新として「蓋」の獲得があげられる。蓋は、腹足類の足の後方に形成される皮質またはカルシウム質の構造で、貝殻の開口部をふさぐことで、防御の役割を果たしている (Figure1 矢印)。腹足類の中にはウミウシやアワビなどのように成体では蓋を持たない種が存在するが、直達発生をする一部の種を除くすべての腹足類が幼生期には蓋を形成することから、蓋は腹足類を特徴づける重要な形質のひとつであるといえる。しかし幼生の蓋形成に関する知見は極めて乏しく、その形成メカニズムは謎に包まれている。蓋は、多くの軟体動物が有する貝殻と、その構造や構成基質など多くの類似点をもつことから、軟体動物の貝殻を形成するための遺伝子ネットワークなどの発生プロセスが腹足類の蓋形成にも使用されている可能性がある。もしそうであれば腹足類における「蓋の獲得」が、背側で貝殻を形成していた発生メカニズムの足へのヘテロトピー (異所性) によってもたらされたものであるという可能性が示唆される。

そこで本研究では、腹足類に「蓋」という新奇形質をもたらしした発生学的基盤を明らかにするために、笠貝初期胚を用いて、蓋分泌腺形成の組織学的研究および、貝殻形成に関与すると考えられている *engrailed*・*Hox* などの遺伝子発現解析を行い、蓋形成機構の解明を試みた。

方法

・サンプル

笠貝の一種クサイロアオガイ *Notoacmea fuscoviridi* (Figure 2) の成熟個体から、人工授精により胚を採取し、以下の実験に使用した。

・組織学的研究

腹足類の幼生の蓋分泌細胞を組織学的に特定するために、固定胚を用いてパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン-エオシン二重染色法によって染色し観察した。

・遺伝子発現解析

貝殻形成に関与していることが示唆されている転写因子が蓋形成にも関与しているかどうかを検証するために、*engrailed* などのいくつかの遺伝子について in situ hybridization 法を用いて発現解析を行った。また、貝殻分泌腺や蓋分泌腺のマーカージェンを探索するために、貝殻や蓋の構造タンパク質に関与すると考えられる *chitin synthase* などの遺伝子について同様に遺伝子発現解析を行った。

結果・考察

・組織学的観察

蓋を分泌すると考えられる足後方の領域で、ほかの足上皮細胞とは形が異なる腺細胞が観察された。この細胞は初め、足の後方の付け根部分に見られたが、足の成長に伴い足の先端に向かって領域を拡大していった。観察された腺細胞領域の縁は、蓋の縁とほぼ一致していることから、この腺細胞が蓋分泌腺細胞であることが示唆された。

・遺伝子発現解析

engrailed、*dpp*、*chitin synthase*、*Hox1* などがトロコフォラ幼生の貝殻を分泌する貝殻腺やその周辺で発現していた。一方で蓋を形成する足では *engrailed* の発現が観察された。しかし、*engrailed* は神経系の形成にも関与することが知られていたため、神経マーカーによる抗体染色を行った結果、足での *engrailed* の発現部位が、将来、足神経節が形成される領域とほぼ一致した。このことから、*engrailed* は足神経節の誘導に関与するが、蓋の形成には関与していないと考えられる。また、今回解析した他の遺伝子は蓋腺では発現していなかった。今回遺伝子をクローニングした結果、7 種類の *chitin synthase* を得ることができた。キチンは貝殻および蓋の主成分のひとつであるので、貝殻腺・蓋腺の両方で発現していることが予想された。しかし、蓋腺では今回解析したすべての *chitin synthase* が発現しておらず、貝殻腺でも 7 種類中 1 つのみが発現していた。つまり蓋形成には別の *chitin synthase* が関与している可能性がある。これらのことから、蓋と貝殻は別のタンパク質合成酵素によって形成され、その上流の遺伝子ネットワークも異なっていることが考えられる。

今後の展望

今後は切片 in situ hybridization 法などを用いて、さらに詳細な遺伝子発現解析を行い、蓋に関与する遺伝子を特定していく予定である。また、今回発現を解析し、貝殻形成に関与していることが示唆された遺伝子の阻害実験などによって機能解析を進めていく予定である。さらに腹足類の姉妹群である二枚貝では、足の後方に足糸を分泌する分泌腺が存在する。この足糸は構成基質や分泌腺の位置といった点で蓋と類似しており、腹足類の蓋腺と二枚貝の足糸腺は相同な器官である可能性がある。これらの分泌腺の形成に関与する遺伝子を比較解析することで、軟体動物における新奇形質獲得のメカニズムに迫っていきたい。

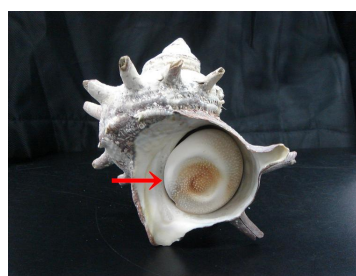


Figure 1: 腹足類の蓋

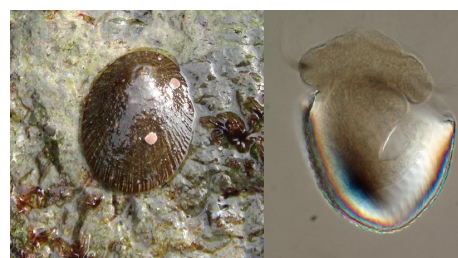


Figure 2: クサイロアオガイの成熟個体 (左) とベリジャー幼生 (右)

Evolutionary Innovation ヤツメウナギの硬節と脊椎骨獲得

原田 敏士 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 和田 洋 (生命環境科学研究科)

背景・目的

脊椎動物の最も特徴的な形質はその名の通り脊椎骨である。この椎骨を獲得することで脊椎動物は複雑な体制を獲得し、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持つことができた。しかし、この椎骨進化の詳しいメカニズムはまだ分かっていない。

椎骨の発生メカニズムについては、現生の脊椎動物の大半を占める顎口類で詳しく調べられている。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をコードする *Col2a1* 遺伝子の発現により形成される。一方、脊椎動物に近縁な無脊椎動物のナメクジウオでは *Col2a1* オルソログである *ColA* の体節での発現は体節表皮側で見られるなど、高等な脊椎動物である顎口類のものとは著しく異なっている。そのため、これら2つの動物間で、比較発生的アプローチから脊椎骨の初期進化を探るのは困難であると考えられる。そこで、より原始的な形質を持つ脊椎動物での詳細な体節分化を観察することにより、脊椎骨の初期進化を知ることが可能となる。

その原始的な脊椎動物として、無顎類ヤツメウナギが存在する。無顎類は現生脊椎動物の一つであり、約4億年前に顎口類の系統から分岐した動物群である。その特徴として、顎を持たないが、一生脊索を持つという脊椎動物祖先型の形質を持つ。これらの特徴からヤツメウナギは脊椎動物の体制進化を考えるために適した生物であると考えられる。

先行研究で、ヤツメウナギの幼生であるアンモシート幼生では *Col2a1* が体節を覆うように表皮側で発現することがわかった。このことはアンモシート幼生での体節分化における *Col2a1* の発現パターンが顎口類型ではなくナメクジウオ型であることを示唆した。しかし、面白いことに、ヤツメウナギは脊椎動物でありながらアンモシート幼生で椎骨を持たず、成体へ変態するときに椎骨が発生する。このことは、ヤツメウナギはナメクジウオのような原始的体制からより高等な脊椎動物型へと進化する中間段階であることを示唆する。そのため、ヤツメウナギの変態期における椎骨形成に関わる遺伝子発現を調べることは、初期脊椎動物の椎骨発生メカニズムに関して新たな知見を得ることができる。ところが、これまで変態期での体節における遺伝子発現はおろか、どのように椎骨が発生するかといった組織学的研究もなされていない。

以上のことから、初期脊椎動物の椎骨獲得メカニズムを理解するためには、ヤツメウナギの体節はどのような種類の細胞を生み出すのか、変態期にそれらの細胞がどのように再編成されて脊椎骨を形成するか、そして、その遺伝子発現はどのように変化するかを知る必要がある。よって、本研究では、アンモシート幼生において *Col2a1* などの硬節関連遺伝子の詳細な挙動と、変態期において組織学的、分子学的手法を用いて椎骨がどのように発生するかを観察した。

材料・方法

- サンプル: アンモシート幼生は北海道で採集したカワヤツメ (*Lethenteron japonica*) を人工授精させて得た。変態期のサンプルは富山県で変態期のスナヤツメ (*L.*

reissneri) を採集して得た。

- in situ hybridization: カワヤツメ cDNA から digoxigenin 標識の RNA プロブを合成し、in situ hybridization を行なった。アンモシート幼生は Whole-mount in situ hybridization、変態期のヤツメウナギでは切片 in situ hybridization を行った。
- 組織染色: 変態期での椎骨発生を観察するため、変態期サンプルをパラフィンで包埋し、ヘマトキシリン・エオシンの二重染色を行った。

結果と考察

(1) アンモシート幼生での *Col2a1* 発現細胞の挙動

Col2a1 発現細胞は、発現初期は体節表皮側で発現が観察された (Fig.1)。しかし発生ステージが進むにつれ *Col2a1* 発現細胞は脊索側へ移動し、最終的には体節を囲むように脊索側での発現が観察できた (Fig.2)。このことは、アンモシート幼生での *Col2a1* 発現はナメクジウオ型であることを示唆した。

(2) 変態期での椎骨形成

組織学的手法を用いて変態後の成体での椎骨を観察したところ、神経管を囲むように明確な椎骨を確認できた。それに対して変態期での椎骨は椎骨の背側境界があいまいな様相を示した。このことは変態期における椎骨発生は腹側から発生することを示唆している。

分子学的手法を用いて変態期における遺伝子発現を調べたところ、*Col2a1* 遺伝子発現は観察されなかった。このことはヤツメウナギ椎骨は *Col2a1* にコードされておらずヤツメウナギの椎骨は顎口類の椎骨と異なる成分である可能性がある。

今後の展望

本研究は軟骨基質をコードする *Col2a1* を中心に観察を行ってきた。しかし、ヤツメウナギの軟骨は異なる軟骨基質を持つことが示されている。また顎口類において *Pax1,9, scleraxis* といった転写因子が硬節に特異的に発現することも示されている。このことから、今後はこれらの遺伝子の詳しい挙動を調べることで、より詳細なヤツメウナギの硬節と椎骨形成に関する知見を得ることが期待される。

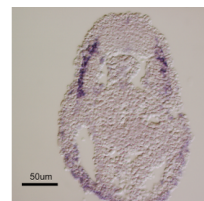


Figure.1



Figure.2

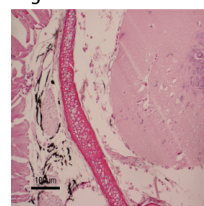


Figure.3

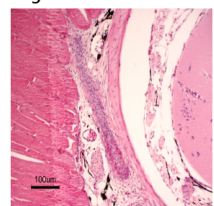


Figure.4

Evolutionary Innovation 棘皮動物プルテウス幼生の進化と中胚葉分化

藤谷 晴香 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 和田 洋 (生命環境科学研究科)

背景・目的

ウニ、ヒトデ、クモヒトデ、ナマコ、ウミユリを含む棘皮動物の幼生形態は、大きく分けてプルテウス型とオーリクラリア型の2種類に分けられる。このうち、ウニとクモヒトデに見られるプルテウス型では腕を支える幼生骨片が形成されるが、ヒトデやナマコ、ウミユリに見られるオーリクラリア型では幼生骨片が形成されない(図1)。このことから、幼生骨片が棘皮動物の大きく異なる2つの幼生形態を生み出した鍵であると考えられている。

近年、ウニの幼生において *Ets1*、*Dri*、*Alx1* などの転写因子が中胚葉の間充細胞で発現し、骨片形成に不可欠な役割をもつことが示されている。また、ウニと同様に幼生骨片をもつクモヒトデにおいても *ets1* と *alx1* が間充細胞で発現することが示されている。一方、幼生骨片をもたないヒトデにおいては *ets1* と *dri* のウニと類似した発現が報告されている。しかし、ヒトデの幼生には骨片が形成されないため、これらの遺伝子が骨片形成とは別の機能を示唆されている。

そこで本研究では、棘皮動物の発生における *ets1*、*dri*、*alx1* の機能の進化的推移を明らかにするために、棘皮動物のウミユリ、ナマコ、クモヒトデと、棘皮動物と最も近縁で類似した幼生形態をもつ半索動物のギボシムシにおいて、*ets1*、*dri*、*alx1*、*alx* を同定し、発現を調べた。

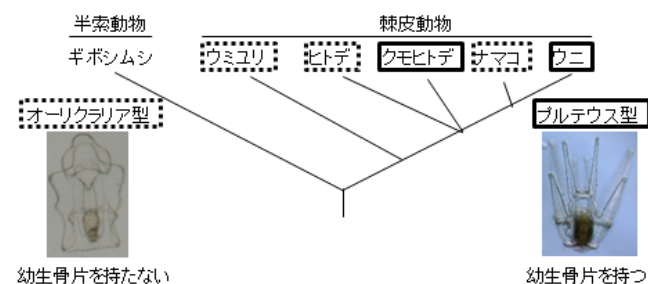


図1. 系統関係

結果・考察

(1) 遺伝子のクローニング

実験には棘皮動物からナマコ綱のニセクロナマコ *Holothuria leucospilota*、ウミユリ綱のトリノアシ *Metacrinus rotundus*、クモヒトデ綱のスナクモヒトデ *Amphipholis kochii* と、半索動物のシモダギボシムシ *Balanoglossus simodensis* を用いた。そして、各動物のcDNAからEtsドメインをもちウニの *ets1/2* とオーソログな *Hlets1*、*Mrets1*、*Bsets1* と、ARID/BRIGHT DNA 結合ドメインをもちウニの *dri* とオーソログな *Hldri*、*Mrdri*、*Akdri*、*Bsdri* を同定した。さらに、ホメオドメインとOARドメインをもちウニの *alx1* とオーソログな *Hlalx1* と *Mralx1* を同定した。一方、シモダギボシムシからは *alx1* と相同性の高いホメオドメインを持つ *Bsalx* を同定した。

(2) 遺伝子の発現パターン

同定した配列をもとにプローブを合成し、Whole-mount in situ hybridization 法により *Hlets1*、*Hldri*、*Hlalx1*、*Bsets1*、

Bsdri、*Bsalx* の発現パターンを確認した(図2)。

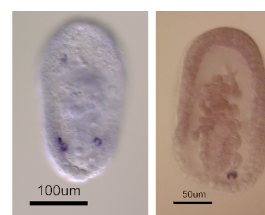
ニセクロナマコの *Hlets1* は初期原腸胚において原腸の先端で発現した。その後、原口付近の間充細胞を含むいくつかの間充細胞においてシグナルが見られるようになった。ニセクロナマコにおいて成体骨片は受精後3日目に体の後端に1つ形成される。このことから、*Hlets1* が発現する原口付近の間充細胞が成体骨片の形成に関与すると考えられた。また、本研究における *Hlets1* の間充細胞での発現は、先行研究におけるウニやヒトデ、クモヒトデの *ets1* の発現部位と類似性が見られた。このことから、*ets1* は棘皮動物の幼生においてもともと間充細胞の分化に機能していたと考えられる。実際、脊索動物においても *ets1/2* は間充細胞などの遊走性細胞で発現することが報告されている。一方、本研究においてシモダギボシムシの *Bsets1* は後期原腸胚の予定繊維帯領域で発現が見られた。このことから、*Bsets1* は繊維帯の分化に関わる新たな機能を獲得したと考えられる。

ニセクロナマコの *Hldri* は、原腸胚において原口付近の一部の間充細胞で特異的に発現した。その後、原腸の先端の将来口を形成する細胞においてシグナルが見られるようになり、口側外胚葉へと発現がシフトした。シモダギボシムシの *Bsdri* の発現部位はまだ検出できていない。ウニにおいて *dri* は一次間充細胞で発現し、その後口側外胚葉で発現することから、ウニの *dri* は骨片形成と外胚葉の分化という2つの機能に関与していると考えられている。そして、本研究における *Hldri* の発現パターンは、ウニにおける *dri* の発現パターンと類似することが分かった。

ニセクロナマコの *Hlalx1* は、原腸胚において *Hldri* と同様に原口付近の一部の間充細胞において特異的に発現が見られた。*alx1* の発現パターンはウニ、クモヒトデ、ナマコにおいて類似していることから、棘皮動物全体において *alx1* が骨片形成に関与している可能性がある。

最近、少なくとも棘皮動物において *alx* の重複があることが示唆されており、ウニとヒトデにおいて *alx1* のパラログ遺伝子が体腔で発現することが報告されている。本研究において、シモダギボシムシの *Bsalx* は後期原腸胚の前体腔で発現が見られた。つまり、*Bsalx* の発現は棘皮動物における重複前の *alx* の発現パターンを反映する可能性が考えられる。しかし、*Bsalx* のアミノ酸配列は、他の *Alx* ファミリーのタンパク質の配列とは少し違っており、今後は *Bsalx* のさらなる解析が必要である。

本研究において、*Hlets1*、*Hldri*、*Hlalx1* が間充細胞で発現することは分かったが、今後はこれらの3つの遺伝子が発現する間充細胞が成体骨片の形成に関与するかどうかを調べていく必要がある。そして、本研究により幼生形態の進化的なメカニズムの解明における重要な知見が得られることを期待する。

図2. 原腸胚における *Hldri* (左) と *Hlalx1* (右) の発現

多足類の卵巣構造 — 本当に卵細胞は卵巣外に位置するのか —

宮地 結 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 八畑 謙介 (生命環境科学研究科)

背景・目的

一般に多足類の卵巣は、一層の卵巣上皮から成る 1 本または 1 対の細長い袋状の構造であり、胴部のほぼ全長を占めている。卵巣上皮は一層の上皮層から成り、上皮層は固有の基底膜に裏打ちされている。

多足類の卵巣構造の詳細には未だ不明な点が多いが、Kubrakiewicz (1991) はヒメヤスデの一種の卵巣に関する電子顕微鏡観察に基づき、「多足類では卵巣外の血体腔中で卵形成が進行する」と結論している。しかし、Kubrakiewicz (1991) の説には以下の 2 点の理由により再検討の余地がある。1) 多足類の卵は、卵巣と構造的に連続した輸卵管を経て産卵される。もし卵母細胞が卵巣外で成長するならば、大きく成長した卵母細胞が卵巣上皮と基底膜を突き破って卵巣内あるいは輸卵管内に移動しなければならない。2) 多足類以外の節足動物諸群においては、卵形成は卵巣内、少なくとも卵巣上皮を裏打ちする基底膜より卵巣腔側で進行することが知られており、Kubrakiewicz (1991) の説は他の節足動物諸群の卵巣構造と比較すると、甚だ奇異である。

実際のところ、Kubrakiewicz (1991) の研究の焦点は濾胞細胞の分泌活性にあり、卵巣構造の解明に主眼が置かれておらず、卵巣全体の構造の把握には不十分な点が残っている可能性がある。本研究では、多足類の卵形成が卵巣外で行われているとする現在の知見を再検討する必要があると考え、多足類の一群であるアカムカデ類を材料として卵巣構造の詳細な観察を行なった。卵巣構造を把握することに主眼を置き、特に、卵巣上皮と基底膜に対する卵原細胞と卵母細胞の位置関係に注目して観察を行なった。

材料・方法

本研究では、2009 年 4 月から 10 月にかけて日本各地で採集されたアカムカデ属の 2 種 *Scolopocryptops* spp. (写真) を材料として使用した。採集されたアカムカデ類の成体雌を酢酸エチルで麻酔し、カルシウムキレート剤 (EDTA-2Na) を含む生理食塩水中で解剖、卵巣を摘出した。摘出した卵巣はブアン氏液にて固定し、エタノール・ブタノールシリーズによる脱水・透徹を行なった後、パラフィンに包埋した。厚さ 5 μm の連続パラフィン切片を作成し、Haematoxylin and Eosin 染色、Alcian Blue, PAS (Periodic Acid-SCHIFF) reaction and Haematoxylin 染色、Azocarmine G and Aniline Blue-Orange G 染色を施し、光学顕微鏡にて観察を行なった。

結果・考察

アカムカデ類の卵巣は胴部のほぼ全長にわたる 1 本の細長い袋状の構造で、消化管の背側に位置し、後端で短い輸卵管に直接続いていた。卵巣上皮は一層の細胞層から成る上皮組織で、その基底側すなわち血体腔側に基底膜をとまっていた。卵巣の内部には大きく成長した卵母細胞が含まれていた。卵原細胞は卵巣上皮の中に埋まるように存在しており、ごく若い卵母細胞も同様の位置に観察された。一方、成長中の卵母細胞は、卵巣上皮が卵巣側に陥入してできた小さな袋状の構造の中に位置していた。すなわち、成長中の卵母細胞は少なくとも卵巣上皮よりも血体腔側に位置していることになる。しかし、これらの卵母細胞が卵巣上皮の基底膜に対して卵巣腔側に位置しているのか、あ

るいは、血体腔側に位置しているのかは、本研究では十分に判別することはできなかった。これは、パラフィン切片法による観察では基底膜の形態を詳細に解明するだけの分解能を得られなかったため、今後、樹脂切片法や電子顕微鏡観察を行なうことで解決を図りたい。

アカムカデ類の卵母細胞は一見すると卵巣の外で成長するように見えるが、もしこれが卵巣上皮の基底膜より卵巣腔側に位置しているならば、他の節足動物の卵巣構造と同じ特徴を持つことになり、また産卵に際して、成長した卵母細胞は卵巣上皮の基底膜を破壊することなく卵巣腔中に排卵される。本研究では結論を得るに至らなかったが、この考えを多足類の卵母細胞が卵巣外で成長するとした Kubrakiewicz (1991) の説に対する対案として提案したい。



写真. 材料に用いたアカムカデ類の一種。
セスジアカムカデ *Scolopocryptops rubiginosus*。

絶翅目 (ジュズヒゲムシ目) の発生学的研究に向けて (昆虫綱)

真下 雄太 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 町田 龍一郎 (生命環境科学研究科)

背景・目的

絶翅目は1科2属41種(うち現生種1属35種)のみからなる、昆虫綱の中でも最小の目の一つである。日本からは未発見であり、東南アジア・中南米・中央アフリカといった熱帯・亜熱帯域を中心に分布している。絶翅目の系統学的位置に関してはこれまでに分子進化、比較形態の観点から10以上の系統仮説が提出されており、絶翅目は、昆虫類内で1, 2を争うほど謎に包まれている系統群である。昆虫類の99.9%を占める有翅昆虫類は原始的な旧翅類(トンボ目、カゲロウ目)と新翅類(昆虫の90%を占める)に大別され、この新翅類はさらに多新翅類(ゴキブリ、バッタなどの10目)、準新翅類(シラミ、カメムシなどの4目)、貧新翅類(ハエ、チョウなどの9目)の3つに分類される。絶翅目の系統学的位置付けに関しては、この多新翅類・準新翅類のどちらに属するかさえ定かではない。つまり、絶翅目は多新翅類あるいは準新翅類、さらには新翅類全体の系統学的議論において最もホットなグループである。

このような系統学的議論において、比較発生学のアプローチは、1) 形態形成の過程の詳細を観察し、他の分類群との相同性を厳密に検討することができる、2) 基本的な体制が形成される胚期特有の特徴を観察ができる、という2点で非常に力を発揮する。しかし、Silvestri (1913) による目の設立以来、約100年が経過しているものの、絶翅目の生物学的情報は極めて乏しく、発生学的研究においてはまったく知見がない。このような背景から、1) 絶翅目のカルチャーの確立、2) 胚運動全体の把握、3) 絶翅目のグラウンドプランの構築、4) 新翅類全体の系統関係の再検討を目指し、絶翅目の発生学的研究に着手した。

材料・方法

2009年2月22–28日のマレーシア Cameron Highland および Genting Highland でのサーヴェーにより、*Zorotypus caudelli* および *Zorotypus* sp. の2種、計約250個体の採集に成功した。飼育は、湿度保持のために土を敷き詰めたスチロールケース(10×10×3 cm)で室温下にて行い、乾燥酵母、さなぎ粉などを細かく砕いたものを餌として与えた。土に産み付けられた卵は個別の容器に移し、22–25°Cでインキュベートした。

得られた卵は1) Carnoy 固定液を用いて5–10分間固定し、室温下にて70%エタノール中で保存、または2) Karnovsky 固定液を用いて1分間固定した後、穿孔してから一昼夜固定し、低温下(4°C)にてカコジル酸ナトリウム緩衝液(SCB)中で保存した。固定卵および摘出胚は、DAPIで染色した場合には蛍光実体顕微鏡下で、フェノールチオンまたはヘマトキシリンで染色した場合には光学顕微鏡下で観察した。

結果・考察

卵は長径650 μmの回転楕円体で、白色、表面全体に六角形の彫刻がみられる。腹側には明瞭な突起縁をもち、その内側2か所に卵門がみられる。

卵割によって数を増した核は、卵の表層に移動して胚盤を形成する。胚盤は小さな胚域すなわち胚帯と、広大な胚外域すなわち漿膜に分化する。胚帯は後極を越えて短

胚型の胚帯伸長をしつつ腹側に移動するため、胚の前後軸は逆転する。その後、ローテーションが起こり、胚帯は卵表面を背側に移動する。胚帯はやがて腹方から卵黄内に沈み込む。同時期に頭部の分節が進み、付属肢原基が現れる。胚はやがて完全に卵黄内に沈み込む。卵黄内では分節・付属肢の伸長が進行する。再度のローテーションにより胚が再び卵腹側を向いた後、胚反転が起こる。胚反転の結果、胚の前後軸は再び卵の前後軸と一致する。体壁の伸長が始まり、背閉鎖が完了する。幼虫の形態を獲得した胚は卵内で活発に動き、再び卵腹面を向く。やがて、頭部に形成されている長大な卵歯により卵殻は切り裂かれ、一齢幼虫が孵化する。卵歯は孵化直後に脱ぎ捨てられる胚クチクラ上の構造であるため、卵より離れた一齢幼虫に卵歯はみられない。

絶翅目は、多新翅類で基本的である、1) 短胚型の胚帯形成、2) 卵表面からの平行移動による胚の沈み込みで特徴づけられ、(半) 長胚型の胚帯形成および卵内への直接的な胚の沈み込みを特徴とする準新翅類とは大きく異なる。この点で、絶翅目は多新翅類である可能性が示唆される。今後、グラウンドプランの構築、系統学的考察の発展を目指し、絶翅目のさらなる比較発生学的な検討を行っていきたい。



研究材料である *Zorotypus caudelli* およびその卵

参考文献

- Silvestri, F. (1913) Descrizione di un nuovo ordine di insetti. Bollettino del Laboratorio di Zoologia Generale e Agraria., Portici 7, 193–209.
- Karny, H.H. (1922) Zorapteren aus Sud-Sumatra. Treubia., 3, 14–29.

スunks (*Suncus murinus*) は近親交配を回避するか?

奥山 晴香 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 松崎 治 (生命環境科学研究科)

背景

スunks (*Suncus murinus*) は食虫目に属する小型哺乳動物であり、熱帯・亜熱帯を生息地とする(「スunks」近藤恭司監修, 1985)。また、発情・排卵周期が見られず(Dryden, 1969)、周年繁殖可能な交尾刺激排卵動物である(Rissmanら, 1988)。スunksの交尾は儀式化された配偶行動パターンのなかで行われ(Matsuzaki, 2002)、生殖目的だけでなく個体同士の安定した関係の確立のために交尾が用いられていることが明らかにされている(Matsuzaki, 2004)。

ところで、一般に近親交配では劣性ホモの出現率が上昇し、適応的に不利であることから、様々な種が近親交配を回避するメカニズムを発達させている。その大部分は成熟個体の出生地からの放散と、見慣れぬ異性の選好に分類される。近親の認識は視聴覚的、化学的な手がかりによる学習を基礎としていることが多いが(Tang-Martinez, 2001)、中でも匂による判別は多くの種で観察されている。

本研究は、交尾をコミュニケーションの手段として用いるスunksで、近親交配回避メカニズムの一端として、異性の選択に匂がどう関わるかを動物行動学的に調べた。

材料と方法

実験には、実験動物中央研究所が開発した Jic:Sun Line を基に継代飼育した筑波大学コロニーのスunksを用いた。雄雌を観察水槽(60W×30D×45H cm)に入れて交尾の有無を60分間観察した。観察を行った組み合わせは、非血縁同士か、同父母を持つ兄弟姉妹同士とした。兄弟姉妹については、一腹で生まれたか否かで両者の間に有意差が見られなかったため、全て兄弟姉妹として一括した。

さらに、水槽の両端に、異性の非血縁個体と兄弟姉妹個体の飼育ケージから採取した汚れた床敷を置いて、それぞれの滞在時間を測定した。

なお、比較にはU検定($p < 0.05$)あるいはFisher's exact test($p < 0.05$)を用いた。

結果

2008年からの交配記録も含めて集計すると、非血縁同士の交尾は45例中31例、兄弟姉妹同士の交尾は12例中4例であり、兄弟姉妹同士の交尾は非近親同士よりも有意に少なかった。しかし、メス1頭とオス2頭(非近親1頭と兄弟1頭)を遭遇させると、7例中3例が交尾を行い、うち2例は兄弟オスとの交尾直後に非近親オスとの交尾が行われ、1例は非近親オスとの交尾のあと兄弟オスとの交尾が行われた。残り4例はメスの威嚇が激しく、60分間では交尾に至らなかった。

また、異性の床敷の匂を嗅がせるテストを4例のメスで行ったところ、非近親オスの床敷の匂を嗅いだ時間は平均242.8秒、兄弟オスの床敷では平均231.8秒で、両者に有意差はなかった。一方、オスがメスの床敷の匂を嗅ぐ時間は、非近親メスのもので平均294.4秒、姉妹のものでは平均168.8秒で、非近親メスの床敷の匂を嗅ぐ時間の方が有意に長かった。

考察と結論

スunksの兄弟姉妹間での交尾率は非近親間の交尾率より低く、オスでのみ、メスの床敷の匂で非近親異性を選好することが観察された。このことから、スunksではオスによるメスの選択が近親交配回避のメカニズムのひとつとして働いている可能性が考えられる。因みに、マウスにおいても、オスによる非近親メスの選好傾向が報告されている(Barnard and Fitzsimons, 1988)。

しかし、床敷の匂では非近親メスの方を好んだオスも、実際のメスと遭遇すると、12例中4例が近親(姉妹)メスと交尾を行った。また、メス1頭とオス2頭の組み合わせでは、オス同士のマウンティングが多数観察され、2頭のオスが激しく入れ替わってメスにマウンティンする様子も観察された。このことから、交尾相手よりも配偶行動自体の意義が考えられる。すなわち、スunksの配偶行動は、最終的に身を寄せ合って眠ることから、単に生殖だけが目的ではなく、個体同士の関係の安定化にも利用されるだろう。本研究の結果からは、スunksの配偶行動では、この生殖以外の目的の比重が比較的重いため、近親交配回避のメカニズムが曖昧になっている可能性が考えられる。また、スunksが交尾刺激排卵動物で出会い頭に配偶行動をとること、年中食糧が豊富な熱帯・亜熱帯に生息するので繁殖時期を選ばないこと、授乳中でも交尾や妊娠が可能という生理学的な特徴によって妊娠の機会の多いこと、さらに仔の体重の倍加時間が哺乳類中最短の3日と成長が早いことなどから、1回あたりの出産のコストが相対的に低くなっているとも考えられる。さらに、一度交尾したメスのスunksは、しばらくの間受容的なままとなり、しばしば複数のオスと連続的に交尾する(Rissman, 1987)。受精は交尾後20時間から30時間の間に行われる(「スunks」近藤恭司監修, 1985)ことから、複数のオスとの連続した交尾によって、一腹で複数の父親の仔を身籠る可能性が考えられる。こうなった場合、出産1回あたりの近親交配のリスクはさらに分散されるだろう。オスが非近親との接触を好むことによっても、メスが近親(兄弟)オスと遭遇する確率を下げていると推察される。以上のことから、近親交配回避のシステムが曖昧でも種の保存には影響しないとも考えられる。

スunksにおける近親交配の回避が、匂以外の刺激や他のメカニズムに基づく可能性も考えられるだろう。また、本研究では実際に近親交配で生まれた仔の成熟後を観察することが出来なかった。依然として曖昧なスunksにおける近親交配の回避の仕組みを明らかにするため、今後のより詳細な観察と分析が期待される。

スunks (*Suncus murinus*) における個体識別と知覚の関係

佐藤 杏奈 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 松崎 治 (生命環境科学研究科)

導入

スunksは食虫目に属し原始的な特徴を持つ祖先型哺乳類で、熱帯・亜熱帯に生息している。形態学的特徴としては、雄が雌よりも大型であることやジャコウ腺を持つこと、尖った吻、まばらに毛の生えた尾などがあげられる。また、交尾刺激排卵動物であり (Dryden, 1969)、文字通り交尾によって排卵が誘発されるため、明確な発情・排卵周期が見られない (Rissman ら、1988)。従って、一度成熟期を迎えると、雌は通年繁殖に従事することが可能となる。

スunksの交尾は儀式化された一連の配偶行動パターンの中にあり、成熟した個体同士が会うことによって始まる。まずは相互確認の後、雄が雌の後方について歩く追従形成が起こり、その追従を継続するうちに雌の受容性が高まってくると交尾に至る。交尾に至るまでの時間は通常 30 ~ 120 分を要し、交尾経験のない未経験個体は経験個体に比べて長い時間を要する (「スunks」近藤恭司監修, 1985)。しかし、2 回目以降ではどの個体も交尾に至るまでの時間が短縮されることがわかっている (Rissman, 1987)。これは儀式化された行動パターン (Matsuzaki, 2002) のうち雌の威嚇が軽減し、尾振りが早くに開始されるからである。また、交尾に至らずとも両個体は最終的には身を寄せ合って眠るようになる。興味深いことに、スunksでは儀式化された配偶行動が雌雄だけでなく雄同士や雌同士にも存在し、物理的要因から一部のパターンが抜けてはいても個体同士が親密化するという点を最終目標として配偶行動を行っている (Matsuzaki, 2004)。

単独生活を行っているにもかかわらず個体の親和を重んじるような行動パターンを持つこと、2 回目以降の交尾はスムーズに行くということから、本実験ではスunksがどれだけの個体を識別しているのか、そして、個体識別において重要となっている知覚刺激因子は何であるかを調査することを目的とした。

材料と方法

実験動物は、筑波大学コロニーのスunksと実験動物中央研究所より購入した雌 23 頭、雄 15 頭の全 38 頭を使用した。立方体型の専用ケース A (図 1-3) もしくは、円柱型の専用ケース B (図 1-4) に入った雌を観察水槽 (60W×30D×45H cm) の中央にセットし、そこに雄を入れてどのように専用ケースにアプローチするかを 10 分間観察した (図 1-1, 1-2)。

本実験では、同様のペアで上記の実験を 4 日間同じ時間帯に行い、5 日目に専用ケースの内の雌のみを初めて対面する雌にすり替え、6 日目に 1-4 日に対面していた雌に戻すという操作を行った。今回用いたペアは全 24 組で、雌雄のペアの他に親子や兄弟・姉妹、また以前面識があるかどうかを基準に分類して実験に臨んだ。また、すべての実験はスunksが活発に活動する 17 時-0 時の間に行い、実験室は 1 年を通して気温 20-27 度、湿度 20-70% に保った。

結果と考察

ほとんどの雌雄のペアにおいて 1 試行目は緊張状態となり、試行の半分以上の時間が専用ケースの探索へと費やされた。2 試行目以降は観察水槽内の探索に時間が費やされ、

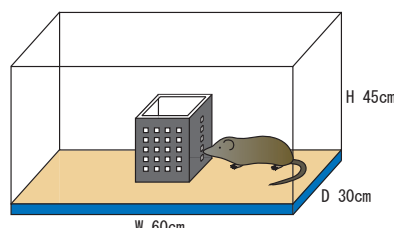


図 1-1: 実験の模式図 (側方)



図 1-2: 実験の模式図 (上方)

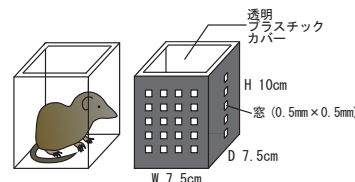


図 1-3: 専用ケース A

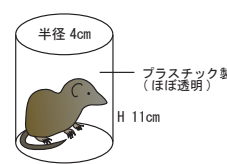


図 1-4: 専用ケース B (密閉型)

興味は専用ケース A から他へとそれていった。また、試行を重ねるごとにペア両方の個体も落ち着いた様子が見られるようになり、中には 10 分間という短い時間の中で眠ってしまう個体もいた。ところが、5 試行目に専用ケース内の個体を変えてみると、1 試行目のような緊張状態が再び引き起こされた。一部の雄では、専用ケースの A 上部に登り入念にケース内を調査しようとする行動が見られたが、そのような行動が観察されたのも 6 日間にわたる実験の中で、相手個体と初対面である 1 日目とケース内の個体が入れ変わった 5 日目を中心だった。このような結果は、専用ケース A の窓から垣間見える姿や漂う匂いによってスunksがケース内の個体を識別していることを示唆している。

また、興味深いことに専用ケース B に雌を入れ同様の観察を行うと、雄は雌の入ったケースにほとんど興味を占めなかった。観察水槽内におけるケース外の個体の動きを見ると、専用ケース B の実験では一試行 10 分間のほとんどを観察水槽の探索に従事していた。ちなみに、5 日目にケース内の雌を入れ替えても結果は同様で専用ケース B に興味を示すことは稀だった。これは、スunksがほとんど個体識別に視覚を頼りにしていないということを意味し、同時に、雄が雌に接近する上で匂が重要な役割を担うことを示唆している。

ケース内の個体の性別によってもケース外個体の動きの変化は顕著であった。専用ケース A 内が雌であった場合は、上述の通り「ケースの探索→観察水槽内の探索」という順序で、ケースの探索に多くの時間を費やされた。しかし、専用ケース A の内部が雄であった場合、ケースの探索よりも観察水槽内の探索が優先された。この場合、日を追うごとに雄がケースに接近するようになったため、警戒心からケースに接近することがためらわれたのかも知れない。

このように、今回の調査を通して、スunksが雌雄そして個体を識別し、その指標として匂が重要な役割を持つのではないかという可能性が示された。本実験ではスunksの数に制限があったため異なる条件で同じ個体を実験に使わざるを得ないことが多々あった。今後、更に詳しい行動分析に加えて例数を増加させることが期待される。

同胞の存在がスunks (Suncus murinus) の社会行動に及ぼす影響

林 奈々子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 松崎 治 (生命環境科学研究科)

背景・目的

スunks (Suncus murinus) は食虫目トガリネズミ科に属する祖先型哺乳類であり、発情・排卵周期が見られない交尾刺激排卵動物としても知られている。スunksの配偶行動は一連の定型行動であり、性別を超えて個体同士の親密化を図る上で社会行動としての重要な役割を果たす。雄が雌の後ろをついて歩く追随形成は、一貫してスunksの配偶行動の中心軸となり、“触れて離れるものについていく”“腰に触れると前進する”という2つの基本的性質によって引き起こされる。この点は、生後5–22日齢で見られる(名大文学部研究論集 81 巻, 1981) 母仔間のキャラバン形成と同様で、性成熟したスunksの配偶行動を貫く追随形成は、幼仔期のキャラバン形成が儀式化されることで別の意味を持ったものであると考えられている。つまり、スunksの社会行動の基盤は、離乳して母元を離れるまでの間に、母親や兄弟姉妹との接触によって発現すると考えられる。

母獣や同腹の兄弟姉妹と共に過ごす幼仔期の母仔集団の構成が、後のコミュニケーションの円滑さにかかわり、社会行動の基盤を作る役割を果たすならば、母仔集団構成員が少なかった仔は、通常の仔に比べて、成長後他個体と接触する際の社会行動が消極的になると考えられる。

スunksの一腹の産仔数は通常3–5頭である。本研究では、一腹で生まれた仔から1頭のみを残して母獣に抱かせて“一人っ仔”として育てさせ、他の仔は里子に出した。そして、離乳(生後15–30日目)あるいは性成熟(生後1ヶ月)するまでに接触する他個体を母獣のみに限ることで、性成熟後の配偶行動に現れる変化を観察した。

材料・方法

実験動物には、実験動物中央研究所が開発した Jic:Sun Line のスunksを基に継代飼育した筑波大学コロニーのスunks、および同研究所から購入した Jic:Sun Ler を用いた。今回は配偶行動が未経験の一人っ仔3頭(うち雄2頭、雌1頭)と、同じく未経験で兄弟姉妹を持つ雄1頭とを比較した。いずれも性成熟する生後1ヶ月齢の時点で実験を行なった。配偶相手には、生後1年未満で経験のある個体を無作為に振り当てた(ただし近親交配は避けてある)。一人っ仔3頭については、数時間をおいて2試行ずつ、試行ごとに相手を別個体に入れ替えて実験観察を繰り返した。

実験はガラス製の水槽(60W×30D×45H cm)で観察された。水槽の中央にプラスチック製の黒い仕切り板を置き、その両側に雌雄各1頭をそれぞれ配置し、スunksがその水槽内の環境に馴れた後に仕切りを上げて対面させた。全ての観察は、一台の固定ビデオカメラで撮影した。

結果・考察

合計4頭の配偶行動を観察した結果、兄弟姉妹と一緒に育った雄1頭のみが観察開始後31分で交尾に至り、その後の八つ当たり行動まで観察された。一人っ仔個体3頭については、3頭6試行のうちいずれも交尾にまで至らなかった。

特に一人っ仔雌については、1回目の試行で追随形成まで至ったものの、本個体の威嚇が激しく、接近接触してくる経験雄に対して全身を使っている抵抗もしばしば見られた。

この状況は2回目に別個体に出会わせた時も変わらず、むしろこちらは威嚇の激しさゆえに途中で実験を中断せざるを得なかった。雌の威嚇があまりに激しいと、雄が委縮して、その後の行動が変わるからである。

残る一人っ仔雄2頭のうち1頭は、1回目の試行では相手の経験雌の威嚇に気押されて、近寄ることが出来なかった。2回目の試行では追随形成まで至るものの、隅で共にうずくまることが多かった。また雌が移動した時もその歩行速度が協調的にならず速すぎて、追随形成にとどまり、マウントまで至る様子は見られなかった。

最後の、もう1頭の一人っ仔雄については、雌からの威嚇はなく、出会った直後に互いの匂いを嗅ぎ合ったが、1回目の試行では相手の経験雌についていこうとする様子なかった。2回目の試行でも、雌の後を追いかけることはあったが持続的な追随形成までには至らなかった。

なお兄弟姉妹と一緒に育った雄個体1頭は、出会いの後互いに嗅ぎ合って相互確認をするとすぐに追随形成をしており、相手の経験雌からの威嚇もなかった。

以上の通り、今回の実験観察では、一人っ仔個体と兄弟姉妹と一緒に育った個体との差が顕著に表れることとなった。

スunksの雌は、雄との出会いの後、通常、威嚇さえ儀式化された一連の行動連鎖の中で受容性が高まって交尾に至る(Matsuzaki, 2002)が、一人っ仔個体はいずれも一連の行動連鎖を展開することが出来なかった。一人っ仔雌の威嚇は特に激しく、また一人っ仔雄についても、雌からの威嚇の有無にかかわらず積極的に雌には接近しなかった様子を鑑みて、一人っ仔は初めて出会った他個体との接触に比較的消極的な様子が窺える。これは、2回目の試行において雄が追随形成まで至っていることから、他個体と出会うことで母親以外の他者の存在に馴れていったのではないかと考えられる。

しかしそこで、追随形成まで至るも隅で共にうずくまり交尾にまでは至らなかった一人っ仔雄がいたことは、他個体との出会いにより幼仔期に覚えた身を寄せ合う心地よさを満たす欲求が優先されたのではないかと考えることもできる。スunksの配偶行動のような親密化を図る一連の行動の根本には、有性生殖を行なう動物が求めあう両性の補完されるべき部分があり、同種他個体と触れ合うことでそこが満たされ、交尾に至る。通常スunksは生後1ヶ月で性成熟するが、一人っ仔の母獣は母乳量や濃度が下がることから、成長が不十分となり今回の結果に至ったと考えられる。これはつまり、行動の面で一人っ仔は性成熟が遅いとも言え換えられる。

なお実験中威嚇の激しかった雌個体2頭の母方の系統を調べたところ、激しい威嚇をする雌に行き着くことが分かった。個体のそのような特徴が親から伝わるものかどうかはわからない。ただ、今回の実験で使用した一人っ仔雌には、同じ母方の子孫でも、威嚇の激しい雌と、威嚇しなかった雌がいた。だが威嚇の激しさが親から仔に伝わる可能性について考慮に入れると、激しく威嚇して雄を寄せ付けない一人っ仔雌の行動が一人っ仔という環境因子に影響されるものなのかどうかという問題は、環境からの適宜適切な刺激によって遺伝的プログラムが発現するという遺伝的プログラム論に帰着する。性格がどのように発現するかについては今後の興味深い課題である。

ゾウリムシの温度変化に対する遊泳行動反応と培養温度の効果

中島 駿一 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 大網 一則 (生命環境科学研究科)

導入

ゾウリムシは体表に多数の繊毛を持ち、その運動によって遊泳行動を行う単細胞生物である。この生き物は、外界の様々な刺激(機械刺激・化学刺激・光刺激など)に対して遊泳行動を変化させ、特定の刺激に対し集合したり、離散したりする。ゾウリムシは温度刺激に対しても反応性を持つことが知られており、温度勾配を与えた実験槽中では、特定の温度付近に集合する。また、ゾウリムシが集合する温度は培養温度付近であり、培養温度を変えると、集合する温度も変わる事が報告されている。しかし、温度刺激に対する行動反応を再現性良く得る実験系が見いだされていない等の理由から、ゾウリムシがどのようにして培養温度付近に集まるかについての詳しいメカニズムは明らかでない部分が多い。私はゾウリムシの温度刺激に対する行動反応と培養温度の係に興味を持った。この研究は、ゾウリムシが培養温度を変えた時に、実際に培養温度付近に集合するか、また、その時にどのような行動反応が生じているのかを明らかにし、ゾウリムシが培養温度付近に集まるメカニズムを解明する事を目的としている。

材料・方法

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は麦藁の抽出液を用いて 20°C で培養した。培養温度を変える実験では、ゾウリムシを設定した温度で 1 週間以上培養した。ゾウリムシは標準溶液 (4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM Tris-HCl, pH7.4) で 3 回洗い、その後、特定の温度下 (順応温度) で 30 分以上順応させてから実験に用いた。ゾウリムシに温度刺激を与える実験系は温度をコントロールした水を循環させた容器の中に、温度刺激を与える溶液槽 (刺激槽) 全体が入る構造とした。刺激槽はアクリル板を深さ 5 mm, 直径 13 mm の円柱形にくり抜き、カバーガラスを被せ、作成した。その側面には直径 2 mm のガラス管を接続して、内部の溶液槽が外部と繋がるようにした。ゾウリムシはこの穴から、先端の細いピペットで送り込み、生じる行動反応を記録、解析した。

結果

(1) 20°C で培養したゾウリムシの生存可能温度の特定

はじめに、20°C で培養したゾウリムシがどの温度範囲で生存可能なのかを調べた。20°C から 5°C 間隔で温度を変えた溶液にゾウリムシを移し、時間とともに生存率を計測した。その結果、5–35°C の温度範囲では 6 時間を経過しても、ゾウリムシはほぼ 100% 生存していた。これよりも大きい温度変化を与えた溶液中 (0°C, 40°C) では、ゾウリムシの生存率は時間とともに低下した。50°C 以上の温度に移すと、ゾウリムシは短時間で死亡した。これらの結果より、本実験に用いる温度刺激の範囲は 5–40°C とし、ゾウリムシの培養温度は 20°C を基準として、10°C と 30°C に設定することとした。

(2) 20°C で培養したゾウリムシが示す温度刺激に対する行動反応

ゾウリムシを 20°C で培養し、その後、5°C 間隔で温度を変えた刺激液に移し、行動反応を観察・記録した。ゾウリムシを 20°C から 25°C の溶液に移すと、ゾウリムシは短い

方向転換をくり返し行った。この反応は刺激後数秒すると消失した。与える温度刺激を 30°C にすると、およそ半数のゾウリムシが後退遊泳を伴った顕著な方向転換を示し、40°C ではほぼすべての個体が後退遊泳を示した。逆に温度を低下させる刺激を与えても、ゾウリムシは方向転換を示した。この行動反応は刺激温度が低い程顕著であった。また、温度低下で生じる後退遊泳の速度は温度上昇のときと比べて顕著に遅かった。

(3) 培養温度の異なるゾウリムシの温度刺激に対する行動反応; (A) 培養温度からの温度変化

30°C と 10°C で培養したゾウリムシを用いて、培養温度から 5°C 間隔の温度上昇、温度下降の刺激を与えた。いずれの場合も、ゾウリムシは温度上昇に対しても、下降に対しても回避反応を示し、温度幅が大きいほど反応は顕著であった。

(4) 培養温度の異なるゾウリムシの温度刺激に対する行動反応; (B) 同一温度条件での比較

次に、同一条件で温度刺激を与えた場合に、培養温度によってゾウリムシの行動反応が変わるかどうかを検討した。30°C で培養したゾウリムシは 20°C から 30°C への温度刺激を与えると、ほとんど方向転換を示さなかった。逆に、20°C から 10°C への温度刺激を与えると、ゾウリムシは後退遊泳を示し、その程度は 20°C で培養したものより顕著だった。一方、10°C で培養したゾウリムシは、20°C から 30°C への刺激を与えると、顕著な方向転換を示した。逆に 20°C から 10°C への刺激を与えると、わずかな方向転換が見られたが、その程度は 20°C で培養したゾウリムシが同じ温度刺激で示すものより弱かった。

考察

20°C で培養したゾウリムシは培養温度である 20°C から温度を上げても下げても方向転換を示した。これは、ゾウリムシが 20°C の環境から離れる場合に、方向転換して 20°C の溶液に留まろうとする行動に対応する。これは先行研究の結果を支持する。一方、30°C で培養したゾウリムシも、培養温度からの温度変化 (上昇、下降いずれも) に対し、方向転換を示した。これはゾウリムシが培養温度である 30°C の溶液に留まろうとする行動に対応する。同様に、10°C で培養したゾウリムシは培養温度である 10°C の溶液に留まる行動が見られた。以上の結果より、ゾウリムシは培養温度に集合する行動をとる事が示された。実験 (4) で示した様に、ゾウリムシの温度刺激に対する行動反応は培養温度で顕著に変化しており、要約すると、ゾウリムシが培養温度に向かう際には、方向転換があまり生じなかった。これは、ゾウリムシが培養温度と異なる温度から培養温度に向かう際には、温度変化 (刺激) があるにもかかわらず、回避せずに培養温度に進入する行動に対応する。この事実は、ゾウリムシが培養温度を記憶しており、その温度に対応して、温度刺激に対する行動反応を変化させることにより、記憶した培養温度に集まる事を示している。ゾウリムシの温度変化 (刺激) に対する順応性や、温度受容「自体」の解明は今後の課題である。また、培養温度の条件として、今回は 1 週間以上培養したものをを用いたが、培養温度による行動反応の違いがどのくらいの時間で生じるものなのかも検討する必要があると考えられる。

フナムシ心臓促進神経の神経伝達物質に関する研究

仲川 枝里 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 山岸 宏 (生命環境科学研究科)

背景・目的

動物の心臓はその拍動源がどの組織に由来するかによって、生理学的に神経原性心臓と筋原性心臓に大別される。多くの動物が心筋をペースメーカーとする筋原性である中で、節足動物の甲殻類では多くの種が、心臓内にある心臓神経節のニューロンをペースメーカーとする神経原性であることが知られている。甲殻類の神経原性心臓は一般に中枢神経系から2種の促進性と1種の抑制性の神経調節を受けている。十脚類や口脚類の心臓において、促進性心臓調節神経の伝達物質としてはドーパミンが有力であることが報告されている。一方、等脚類のオオグソクムシにおいてはアセチルコリンが有力であることが示唆されているが、その根拠は必ずしも強固ではない。同じ等脚類のフナムシにおいて、2種の促進性心臓調節ニューロンが同定され、それらの心臓支配様式も明らかにされており、さらに促進効果も異なることが報告されている。そこでフナムシにおける心臓促進神経の伝達物質を明らかにすることを目的として、心臓拍動に対するアセチルコリンの効果を調べた。

材料・方法

実験材料として、甲殻類の等脚類に属するフナムシ (*Ligia exotica*) の成体 (体長約 20 mm – 35 mm) を用いた。フナムシは千葉県で採集して実験室内で飼育し、雌雄の別なく使用した。実験には、フナムシの腹甲と心臓以外の内臓及び頭部を除去して、背甲に付着した状態の半摘出心臓標本を用いた。半摘出心臓標本は、腹側を上にしてチェーンパーに固定し、常に生理塩類溶液で灌流した。心拍の測定は、標本の心臓末端を吸引電極で吸引することによって細胞外電位 (心電図) を計測できるようにし、そのシグナルを増幅器を介してオシロスコープで観察してペンレコーダーで波形・頻度を記録するとともに心拍カウンターに接続して心臓の拍動数を計測した。試薬投与は、灌流している生理的塩類溶液を、適宜、薬物を含んだ生理的塩類溶液と1分間置換することによって灌流投与を行った。 10^{-8} M – 10^{-3} M のアセチルコリン溶液を低濃度から高濃度へ順に投与し、その効果を調べた。また、フグ毒テトロドトキシン投与によって拍動のペースメーカーを心臓神経節から心筋に転移させることで、心臓拍動を神経原性から筋原性に転換させた。その状態で十分に効果の得られた濃度と同じ濃度のアセチルコリン溶液を投与し、筋原性心臓に対する効果を調べた。

結果・考察

アセチルコリンはフナムシ成体の心臓に対して濃度依存的にその拍動頻度を上昇させる正の変時性効果を生じさせた。このことはアセチルコリンが心臓のペースメーカーに作用して、その自発活動頻度を上昇させることを示している。フナムシの成体の心臓は神経原性であり、その拍動頻度は心臓内にある心臓神経節のニューロンの活動頻度によって決定されることから、アセチルコリンは心臓神経節内のニューロンに作用してその自発活動頻度に促進的な作用を及ぼすといえる。またテトロドトキシン投与によって心筋をペースメーカーとする筋原性心臓へと転換させた状態でも、アセチルコリンは心臓拍動頻度を上昇させた。このことは、

アセチルコリンがフナムシの心臓神経節内のニューロンだけでなく、心筋にも作用してその自発活動頻度に促進的な作用を及ぼすといえる。これらのことからアセチルコリンが促進性心臓調節神経の神経伝達物質の候補となりうることを示していると考えられる。さらに、フナムシにおいてアセチルコリンの阻害剤としてアトロピンが有効であることが実験で明らかとなったので、その阻害剤を用いて、促進神経刺激の効果とアセチルコリンの効果が、同じ阻害剤で阻害されるかどうかなどについて調べた。

再生メカニズム解明に向けたラボ・イモリの生産と遺伝子改変イモリ系統の作製技術の開発 (Part1)

山田 祥太 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 親文 (生命環境科学研究科)

背景と目的

イモリ (有尾両生類) は、ヒトを含む他の脊椎動物と異なり、成体でも様々なボディ・パーツ、すなわち四肢や尾 (脊髄)、顎、脳組織や眼組織 (水晶体と網膜)、心臓組織までもが完全に再生するため、古くから再生のモデルとして研究されてきた。

しかし、そのメカニズムは未だ闇の中である。イモリのボディ・パーツ再生の特徴は、再生開始時に体細胞の初期化 (発生時計の巻き戻し) 現象を伴うことと考えられている。体細胞の初期化/リプログラミングを制御する技術は、iPS細胞に代表されるように、今や再生医療の根幹をなす技術である。近年の研究から、イモリがみせる体細胞初期化現象は、iPS細胞のように発生時計を受精卵の時期にまで巻き戻すのではなく、発生の履歴を残したまま少しだけ巻き戻す現象と考えられている。また、その主幹分子メカニズムは体各部に共通であると考えられるため、このメカニズムの解明は再生医療に更なる展開をもたらす可能性がある。

所属する研究室では、イモリが再生時に実践するこうした‘ナチュラル’な体細胞初期化現象に興味を持ち、成体アカハライモリの網膜再生系をモデルとして、体細胞の初期化を誘導するシグナル経路の同定とエピジェネティックな遺伝子発現制御に関して研究を進めている。しかし、現状では、体細胞初期化に関連する分子候補を得たとしてもその機能評価は困難である。その理由は、現在利用可能な評価系 (例えば、培養系や眼球内物質注入系など) では、必ず組織に外傷を与えることになるため、体細胞初期化誘導 (再生開始の引き金) メカニズムについて解析することが原理的に不可能であるからである。そのため、動物に外傷を与えることなく、再生関連分子の機能を解析する新たな技術が必要である。

トランスジェネシスを含む個体レベルの遺伝子改変技術はこの問題の解決のために有効である。そのため、本研究では、成体イモリでターゲット分子の機能を自在に操作するシステムの開発を目的とし、マイクロインジェクションを用いて、トランスジェニックイモリの作成技術の開発に取り組んだ。しかし、遺伝子改変個体を再生研究に利用するためには、遺伝的背景のコントロールと実験動物の個体数を確保することが重要であり、その上で動物を成体まで飼育する必要がある。しかし、一般にイモリは成体 (性成熟) に達するまで3-5年を要すると考えられており、まずF1世代を作り、そこから実験用個体を得ることは、研究を進める上で非現実的である。

そこで、本研究では、核移植によるクローン個体の作製技術の開発にも取り組んだ。この手法が確立できれば、F1世代をスキップして、遺伝的背景の均一な個体を同時に、大量に得ることができる。またイモリの系統を個体として保存できるだけでなく、細胞として保存できる可能性が生まれ、実験を行う上で非常に有効で、広く応用可能な手法となると考えられる。

方法と結果

発表会にて報告します。是非ご来場ください。

再生メカニズム解明に向けたラボ・イモリの生産と遺伝子改変イモリ系統の作製技術の開発 (Part2)

倉持 麻衣子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 親文 (生命環境科学研究科)

背景と目的

イモリ (有尾両生類) は、ヒトを含む他の脊椎動物と異なり、成体でも様々なボディ・パーツ、すなわち四肢や尾 (脊髄)、顎、脳組織や眼組織 (水晶体と網膜)、心臓組織までもが完全再生するため、古くから再生のモデルとして研究されてきた。しかし、そのメカニズムは未だ闇の中である。イモリのボディ・パーツ再生の特徴は、再生開始時に体細胞の初期化 (発生時計の巻き戻し) 現象を伴うことと考えられている。

体細胞の初期化/リプログラミングを制御する技術は、iPS細胞に代表されるように、今や再生医療の根幹をなす技術である。近年の研究から、イモリがみせる体細胞初期化現象は、iPS細胞のように発生時計を受精卵の時期にまで巻き戻すのではなく、発生の履歴を残したまま少しだけ巻き戻す現象と考えられている。また、その主幹分子メカニズムは体各部に共通であると考えられるため、このメカニズムの解明は再生医療に更なる展開をもたらす可能性がある。

所属する研究室では、イモリが再生時に実践するこうした‘ナチュラル’な体細胞初期化現象に興味を持ち、成体アカハライモリの網膜再生系をモデルとして、体細胞初期化を誘導するシグナル経路の同定とエビジェネティックな遺伝子発現制御に関して研究を進めている。しかし、現状では、体細胞初期化に関連する分子候補を得たとしてもその機能評価は困難である。その理由は、現在利用可能な評価系 (例えば、培養系や眼球内物質注入系など) では、必ず組織に外傷を与えることになるため、体細胞初期化誘導 (再生開始の引き金) メカニズムについて解析することが原理的に不可能であるからである。そのため、動物に外傷を与えることなく、再生関連分子の機能を解析する新たな技術が必要である。

トランスジェネシスを含む個体レベルの遺伝子改変技術はこの問題の解決のために有効である。そのため、研究室ではすでに、成体イモリでターゲット分子の機能を自在に操作するシステムの開発に着手した [再生メカニズム解明に向けたラボ・イモリを生産と遺伝子改変イモリ系統の作製技術の開発 (Part1)]。しかし、遺伝子改変個体を再生研究に利用するためには、動物を成体まで飼育する必要がある。一般に、イモリは成体 (性成熟) に達するまで3-5年を要すると考えられており、しかも、変態後に食性や行動が変化するため、その時点での死亡率が高く、実験室内での養殖が困難とされている。そこで、本研究では、この問題を解決することを目的に、実験室内で効率よくイモリを養殖する新技術の開発に取り組んだ。

方法と結果については、発表会にて報告します。是非ご来場ください。