



生物学類

# つくば生物ジャーナル

## Tsukuba Journal of Biology



Vol.11 No.1 January 2012  
[www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb](http://www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb)



# つくば生物ジャーナル

---

Tsukuba Journal of Biology

Vol.11 No.1 January 2012

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

平成 23 年度

## 生物学類卒業研究発表会要旨集

平成 24 年 3 月 8 日

筑波大学  
生物学類

# 第一会場 2C410

8:55 - 9:10	秋山 茉莉花	クロララクニオン藻 <i>Bigelowiella natans</i> の細胞分裂に関する微細構造観察	2
9:10 - 9:25	梅澤 歩	緑藻 <i>Gonium pectorale</i> と <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> の配偶子における細胞融合部位と交配型の関係についての研究	3
9:25 - 9:40	川口 明音	海産ユーグレナ藻ユートレプチア目の分類学的研究	4
9:40 - 9:55	瀬戸 健介	菅平高原から分離された <i>Chytriomycetes</i> 属 (ツボカビ目) の分類学的研究	5
10:10 - 10:25	阿部 貴晃	哺乳類の空中進化を可能にした複合適応形態の進化～コウモリの翼形成に迫る～	6
10:25 - 10:40	土井口 誠	軟体動物門二枚貝綱における閉殻筋形成メカニズムの解明	7
10:40 - 10:55	吉村 美穂	ヤツメウナギにおける口部発生の解析と顎進化の手がかり	8
10:55 - 11:10	須黒 達巳	南日本における <i>Evarcha</i> 属ハエトリグモの分類学的研究	9
11:10 - 11:25	米原 善成	アカトンボ類における翅形態の比較研究	10
12:15 - 12:30	新井 健	淡水域バクテリアによる蛍光性溶存態有機物の生成	11
12:30 - 12:45	幣原 奈央子	西部北太平洋域における蛍光性溶存態有機物の分布と動態	12
12:45 - 13:00	井上 幸樹	海洋酸性化が植物プランクトン群集組成及びハプト藻 <i>Chrysochromulina</i> sp. に与える影響	13
13:00 - 13:15	倉持 優希	東シナ海の流れ藻から得られたナガレモヘラムシの個体群構造	14
13:15 - 13:30	村岡 祐輔	下田市大浦湾におけるヒジキ穿孔性動物群集の生活型と空間分布パターン	15
13:45 - 14:00	寺本 卓央	農耕地土壌から発生する温室効果ガスに関する研究	16
14:00 - 14:15	廣瀬 明香	高山植物は環境変化にどう応答するか～チベット高原における低標高への移植実験～	17
14:15 - 14:30	渡邊 希香	異なる遷移段階における林床植生と光環境の比較	18
14:30 - 14:45	沼尻 侑子	Variation of Cytoplasmic Incompatibility in <i>Wolbachia</i> -infected systems	19
15:15 - 15:30	川又 理沙	ハマキコウラコマユバチの寄主発見における色学習	20
15:30 - 15:45	喜古 涼太	ハマキコウラコマユバチのエサに対する学習効果の雌雄差	21
15:45 - 16:00	松井 秋倫	カイコ NO 合成酵素遺伝子 ( <i>BmNOS1</i> ) の発現解析	22
	村上 佳隆	<i>Entamoeba histolytica</i> が有するオルガネラ、ミトソームに局在するタンパク質の局在メカニズムの解明	23

## 第二会場 2C404

8:55 - 9:10	小林 幸嗣	パセリの微生物分布に関する研究	24
9:10 - 9:25	牧田 貴史	植物由来生理活性物質の微生物による代謝	25
9:25 - 9:40	荘 葉	枯草菌由来 NRPS の機能解析に関する研究	26
9:40 - 9:55	大方 知	核酸修飾酵素に関する研究	27
10:10 - 10:25	堀 博	枯草菌ストレスシグマ因子 SigB 制御下にある低分子RNAの同定と機能解析	28
10:25 - 10:40	福島 悠介	ミモシンのアレロケミカルとしての作用への活性酸素の関与	29
10:40 - 10:55	松原 陽佑	薬用植物数種における植物生育抑制活性を有する揮発性物質の同定	30
10:55 - 11:10	三輪 恭子	除草剤キンクロラックと合成オーキシシン剤との作用性比較	31
12:15 - 12:30	雨宮 萌恵	ミトコンドリア DNA 突然変異による呼吸欠損が腫瘍の表現型に与える影響	32
12:30 - 12:45	大西 彩紀子	老化したヒト繊維細胞の呼吸活性低下の原因となる核遺伝子の解明	33
12:45 - 13:00	瀧 岳	マウスのミトコンドリア DNA 多型が造腫瘍性に与える影響	34
13:00 - 13:15	山梨 晴香	高転移性を誘発する突然変異型ミトコンドリア DNA 導入マウスの病態解析	35
13:15 - 13:30	五味 峻史	<i>Tetrahymena thermophila</i> の持つ2つの低分子量 G タンパク TtRac の機能解析	36
13:45 - 14:00	三ツ間 俊人	除神経時の mTOR 活性化が除神経依存性筋萎縮に与える影響	37
14:00 - 14:15	名嘉 夏織	機能性ポリフェノール・カルダモニンが運動を負荷した骨格筋の炎症に及ぼす影響	38
14:15 - 14:30	遠藤 垂穂	パーキンソン病原因遺伝子産物 Parkin の解析 ～生存シグナルの制御～	39
14:30 - 14:45	中村 慎吾	炎症応答経路に関わる新奇ユビキチン関連タンパク質の機能解析	40
14:45 - 15:00	金 材炫	脱ユビキチン化酵素 USP15 による神経の局所翻訳制御	41
15:15 - 15:30	岩崎 弘樹	Liposome の物性に及ぼす液胞化誘導剤の影響	42
15:30 - 15:45	仙波 由行	変異アクチン発現多剤超感受性酵母に対するアクチン阻害剤の作用	43
15:45 - 16:00	林 康平	多剤超感受性酵母を用いたミトコンドリア分裂阻害剤探索系の構築	44

## 第三会場 2B411

8:55 - 9:10	伊藤 史紘	光合成生物に共通の機能未知タンパク質 Sll1252 はラン藻の光合成電子伝達系を制御する	45
9:10 - 9:25	北村 英理	円石藻 <i>Emiliana huxleyi</i> における K37:3 合成経路に関する研究	46
9:25 - 9:40	山崎 将俊	ハプト藻 <i>Emiliana huxleyi</i> のアルケノンおよび貯蔵多糖合成に関わる光合成炭素フラックスの解析	47
9:40 - 9:55	吉永 和真	<i>Botryococcus braunii</i> コロニーから単細胞を分離する方法の確立と生理活性の維持	48
10:10 - 10:25	岩島 日向子	<i>Aurantiochytrium</i> sp. 18W-13a と 4W-1b 株の培養における炭素源の検討	49
10:25 - 10:40	加藤 一輝	<i>Aurantiochytrium</i> sp. 18W-13a におけるアミノ酸要求性について	50
10:40 - 10:55	宮田 将史	ミシマサイコ <i>Bupleurum falcatum</i> SSR マーカーの開発と多様性評価	51
10:55 - 11:10	駒田 亜弥	塩害地で生育可能な遺伝子組換えユーカリの選抜及び環境リスク評価	52
11:10 - 11:25	増田 恵	国際条約に対応した生物遺伝資源の材料譲渡契約の提案	53
12:15 - 12:30	瀧沢 彩水	トマト果実成熟過程における組織別の細胞壁マトリックス多糖類の変化	54
12:30 - 12:45	長谷川 和也	単子葉植物イネにおけるペクチンのメチル化度調節関連遺伝子の解析	55
12:45 - 13:00	宮下 彩	単子葉植物イネにおけるプロリンリッチタンパク質変異体の表現型解析	56
13:00 - 13:15	犬塚 聡	イネ葉身におけるマンガン過剰が誘導する PAL 活性の解析	57
13:15 - 13:30	小原 崇司	イネのいもち病抵抗性反応における細胞壁機能の解明	58
13:45 - 14:00	大場 ゆい	多品種に応用可能なサツマイモ形質転換系の開発と塩耐性サツマイモの作出	59
14:00 - 14:15	近藤 卓也	ニンジンストレス不定胚誘導系における胚性遺伝子 <i>LEC1</i> の発現と DNA メチル化に関する研究	60
14:15 - 14:30	大島 翔平	葉緑体形質転換を用いた経口ワクチンの生産に関する研究	61
14:30 - 14:45	望月 嗣文	アサガオ「品種ムラサキ」の one-shot terminal flowering の原因遺伝子の探索	62

## 第四会場 2B412

8:55 - 9:10	清田 侑	細胞性粘菌における細胞分化過程の種間比較による解析	63
9:10 - 9:25	白田 美香	ショウジョウバエ雑種致死救済効果を抑制する遺伝子の発見と解析	64
9:25 - 9:40	天野 晴康	線虫 <i>C. elegans</i> の <i>let-7</i> マイクロ RNA 経路に関与するクロマチン構造制御因子の機能解析	65
9:40 - 9:55	鈴木 美慧	ショウジョウバエを使用した統合失調症リスク因子の遺伝学的解析	66
10:10 - 10:25	朝倉 明果	統合失調症のエクソーム解析	67
10:25 - 10:40	栗山 友理子	統合失調症に対するクロモグラニン遺伝子変異の影響	68
10:40 - 10:55	櫛瀬 佑果	発達期における興奮性ニューロンの軸索誤投射がマウス脊髄の歩行中枢出力に及ぼす影響	69
10:55 - 11:10	秋澤 文香	サル背側縫線核におけるマイクロダイアリス法を用いたセロトニンの定量	70
11:10 - 11:25	本多 健太郎	視床網様核神経活動の光学計測	71
12:15 - 12:30	北林 佳奈	<i>Staphylococcus aureus</i> のストレス応答性カルジオリピン動態のメカニズム	72
12:30 - 12:45	長崎 はるか	マウス生体内における肝細胞由来インスリン産生細胞の誘導と機能解析	73
12:45 - 13:00	浅部 幸紹	メチル化シトシン酸化酵素 TET 2 に結合する蛋白の同定と解析	74
13:00 - 13:15	長友 亘	外気温と異なる温度刺激が心理的ストレス応答に与える効果	75
13:15 - 13:30	牛木 亜季	受精後刷り込みメチル化に関わる DNA メチル化酵素の探索	76
13:45 - 14:00	佐々木 陽香	ホヤの変態における神経分化メカニズムの解析	77
14:00 - 14:15	後藤 明日香	ウニ初期胚における動物極特異的遺伝子の発現解析	78
14:15 - 14:30	櫻井 晴佳	ホヤ精子形成過程の形態的・機能的解析	79
14:30 - 14:45	田中 響	トランスジェネシスと個体間組織移植を組み合わせたイモリ再生芽細胞の Lineage Tracing 技術の開発	80
14:45 - 15:00	竹下 真以加	障害物を事前に察知するゾウリムシ	81

平成 23 年度卒業研究発表会準備委員会

生物学類

山崎 将俊

飯田 颯久

加藤 哲男

金崎 健太

徳嶋 賀彰

永井 卓眞

中山 朋美

新妻 耕太

平澤 輝仁

本多 隆利

山野 安規徳

表紙画

川口 明音

表紙画の解説：

「もしも生物学類生なら馴染みのあるいきもの達（その他含む）が DNA 複製とかしてたら」という妄想を絵にしてみました。皆さんが、どの生き物が何をしてるか、を探しながら色々懐かしんでいただけで嬉しく思います。でも実はもう一つ別のテーマが入ってますので、それも是非見てみて下さい。

## 平成 24 年度卒業研究発表会要旨集の巻頭にあたって

山崎 将俊 (筑波大学 生物学類 4 年)

卒業研究発表会とは、生物学類 4 年生が 1 年間の研究の集大成としてその成果を発表する場です。主に生物学類の先生方、同じ 4 年生の仲間、そして生物学類の後輩たちを前に自分たちの研究成果を発表します。

1 年前、私はこの卒業研究発表会の運営委員として当時の 4 年生の先輩方の研究発表を間近で聞くことができました。研究発表会前日のリハーサルの日から先輩方の緊張感が伝わり、研究発表に対する熱意が感じられたことが印象的でした。実際に発表を見た際にも、どの発表もとても工夫が凝らしてあり、12 分間という短い時間に先輩方の 1 年間が集約されているように感じました。

いざ自分が 4 年生になり卒業研究を行う立場になってみると、毎日が苦勞の連続でした。卒業研究は 2 年生 3 年生のときに履修した学生実習とは違い、4 年生自らが興味を持った研究テーマに取り組みます。指導教員や先輩方と一緒に仮説を立て、その検証のため適切な実験をデザインしました。初めは手取り足取り実験方法を教えてもらいましたが、途中からは自分らも考え実践していきました。マニュアルはあっても、自分たちの条件に合った工夫が必要でした。仮説が正しいとわかったときの感動はいうま

でもありません。一方、度重なる失敗で落ち込んだり期待通りのデータが出なかったこともあり、1 年という短い時間の中で数多くの貴重な経験をすることができました。この卒業研究は、私たち 4 年生にとって筑波大学生物学類で過ごした 4 年間の学習活動の集大成でもあります。卒業後に大学院で研究を継続する人は、この卒業研究を糧に新たな研究を始めます。就職活動を乗り切り社会人として新たな一歩を踏み出す人にとってもこの 4 年間は卒業後の人生の助けになると思います。

最後になりましたが、私たち卒研生が 1 年間卒業研究に邁進できたのも各指導教員の先生方のおかげです。この場を借りて深く感謝いたします。さらに私たちが気持ちよくこの卒業研究発表会を行えるのは、準備・運営を行って下さった世話役の廣田先生をはじめ 2、3 年生の運営委員のみなさまのおかげです。本当にありがとうございました。

この発表会には生物学類の 1、2 年生も毎年多く参加してくれます。1 年後、2 年後自分たちがどの研究室へ入りどのような研究を行うか考える良い機会になると思いますので、興味を持って聞いていただけたら幸いです。

Communicated by Mitsuru Hirota, Received February 14, 2012.

クローラクニオン藻 *Bigelowiella natans* の細胞分裂に関する微細構造観察

秋山 茉莉花 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 石田 健一郎 (生命環境系)

## 背景と目的

光合成真核生物は、光合成原核生物であるシアノバクテリアが従属栄養性真核生物に細胞内共生することで誕生した。このイベントを一次共生と呼び、これによって誕生した生物を一次植物と呼ぶ。一次植物が従属栄養性真核生物に細胞内共生することを二次共生と呼び、これによって誕生した生物を二次植物と呼ぶ。クローラクニオン藻は、緑色植物がリザリア下界ケルコゾア門に属する従属栄養性真核生物に細胞内共生した、単細胞性の二次植物である。多くの二次植物では共生藻核は既に失われているが、クローラクニオン藻では、4枚の葉緑体包膜の2枚目と3枚目の膜間領域に、共生藻の縮小した核であるヌクレオモルフをもつ。

二次共生における、共生藻のオルガネラ化の過程では、共生藻核から宿主核への遺伝子の転移、共生藻へのタンパク質輸送機構の確立、共生藻の分裂と宿主細胞周期の協調などが起こったと考えられている。クローラクニオン藻 *Bigelowiella natans* では、核・葉緑体・ヌクレオモルフのゲノムが解読されており、葉緑体へのタンパク質輸送機構の解明も進められている。しかし、共生藻と宿主の細胞周期の協調の仕組みを解明するためにまず必要だと考えられる、細胞分裂の微細構造観察は、オルガネラや核分裂の一部が確認された Moestrup et al. (2001) のみである。本研究では、クローラクニオン藻における細胞分裂の詳細な過程を微細構造レベルで把握し、分子レベルでの分裂機構解明の基礎的知見とするため、*B. natans* の細胞分裂の微細構造観察を目的とした。

## 材料と方法

## 1. 細胞周期の同調

分裂過程を効率よく観察するため、Hirakawa et al. (2011) を参考に、*B. natans* の細胞周期を同調させた。ESM 培地を用いて 20 で 2~4 週間培養し、増殖の定常期を迎えた *B. natans* を  $2.0\text{-}3.0 \times 10^5$  cells / ml の濃度で新しい培地に植え継ぎ、36 時間暗期処理の後、明期: 暗期 = 12h:12h で培養した。明期の光強度は  $40\text{-}60 \mu\text{mol photons} / \text{m}^2\text{s}$  にした。細胞周期の同調を確認するために、一定時間ごとに 0.2% グルタルアルデヒドを用いて細胞を固定し、血球計測版を用いて細胞数の計測を行い、増殖率を算出した。

## 2. 蛍光顕微鏡を用いた核・葉緑体分裂過程の観察

*B. natans* が葉緑体分裂・核分裂をしているかどうかを確認するため、0.2% グルタルアルデヒドで細胞を固定し、DAPI を用いて核 DNA を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

## 3. 透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた微細構造の観察

細胞を 2000 rpm で 5 分間遠心して回収し、2.5% グルタルアルデヒドと 0.4% 四酸化オスミウムで二重固定を行った。エタノールによる脱水の後、Spurr 樹脂に包埋し、試料ブロックを作製した。ミクロトーム (REICHERT ULTRACUT S) を用いて作製した超薄切片を、ホルムバル膜を張った単孔グリッドに回収し、酢酸ウランとクエン酸鉛で染色し、TEM 観察用試料を作製した。透過型電子顕微鏡 (HITACHI-H-7650) を用いて観察を行った。

## 結果と考察

36 時間暗期処理の後、12 時間毎・60 時間に及ぶ細胞数の計測では、明暗周期再開後 2 回目の暗期に増殖率 1.68 となり、先行研究 (Hirakawa et al. 2011) と同程度の増殖率を確認した。明暗周期再開後 2 回目の明期の始まりから暗期の終わりにかけて、2 時間毎・24 時間の計測では、暗期開始後 2~6 時間で増殖率のピークを確認した。細胞分裂の観察には、この時間帯が適していると考えられた。

36 時間暗期処理の後、2 回目の暗期に入ってから 2 時間後の細胞を DAPI で染色し、蛍光顕微鏡で観察すると、葉緑体分裂から細胞質分裂までの各ステージにある細胞を観察することができた。核と葉緑体の数や位置から、葉緑体が分裂した後、核が分裂し、核が細胞の両極に移動してから葉緑体も分配され、細胞にくびれができて細胞質も分裂すると考えられた。

細胞分裂過程のさらに詳細な知見を得るため、TEM を用いて観察を行ったところ、長い基底小体を 2 個有する細胞を観察した。*B. natans* は長短 2 種類の基底小体を 1 個づつ有するので、これは基底小体倍化後を捉えたものである。また、基底小体が核へ陥入する様子も観察した。クローラクニオン藻の *Partenskyella* 属では核分裂前期と終期で、基底小体が核の窪みに入り込んでいる様子が観察されている (遠藤 2010)。今回、*B. natans* で観察された様子は、核分裂前期か終期であると予測されたが、分裂ステージを決定するにはさらなる観察を要する。核分裂中期の様子も確認することができた。中期では核膜の大部分が崩壊しており、凝集したクロマチンが赤道面上に並び、中心小体からクロマチンへ微小管が伸びていた。これは先行研究 Moesurup et al. (2001) に見られるのと同様の結果である。

## 今後の展望

*B. natans* の細胞分裂過程における、核と葉緑体、ヌクレオモルフの挙動について詳細な微細構造の観察を行い、クローラクニオン藻において、細胞分裂過程にある各オルガネラがどのような順序でどのように分裂するのか、その過程の全貌を明らかにする予定である。

## 参考文献

- Moestrup et al. (2001) Ultrastructural studies on *Bigelowiella natans*, gen. et sp. nov., a chlorarachniophyte flagellate, *J. Phycol.* 37: 624-646
- Hirakawa et al. (2011) Nucleus- and nucleomorph-targeted histone proteins in a chlorarachniophyte alga, *Molecular Microbiology*: 80(6), 1439-1449(2011)
- 遠藤 (2010) クローラクニオン藻 *Partenskyella glossopodia* の細胞分裂に関する微細構造学的研究, 修士論文

# 緑藻 *Gonium pectorale* と *Chlamydomonas reinhardtii* の配偶子における細胞融合部位と交配型の関係についての研究

梅澤 歩 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 宮村 新一 (生命環境系)

## 目的と背景

多くの真核生物においてオス、メスという二つの性は同型配偶子の交配型 +、- から進化したと考えられている。しかし、同型配偶子の交配型 +、- それぞれがオス、メスのどちらに対応する性であるのかは不明なことが多い。もし交配型 +、- とオス、メスとを結びつける共通の性質があるとすれば、同型配偶からオス、メスが生じた性の進化を明らかに出来ると考えられる。その性質の一つとして、緑藻植物の中で受精する二つの配偶子間の細胞融合部位の違いが研究されている。緑藻綱の *Chlamydomonas reinhardtii* では二本の等長鞭毛をもつ交配型 + の同型配偶子は眼点と反対側で融合し、交配型 - の同型配偶子は眼点と同じ側で融合する。その結果、生じた接合子は二つの配偶子の鞭毛が平行に並び、二つの眼点と同じ側にそろうという性質が確認されている。このように眼点の位置を基準にすると、細胞融合部位の違いには一定のパターンがみられる。この細胞融合部位に見られる一定のパターンは主にアオサ藻綱で同型配偶から異型配偶を行う種まで確認されており、緑藻植物における二つの性を区別する性質であることが示唆されている。

しかし、細胞融合部位の違いにみられる一定のパターンは緑藻綱では *C.reinhardtii* でしか確認されていなかった。そこで、緑藻綱におけるこのパターンの普遍性を確かめるために *C.reinhardtii* に近縁な *Gonium pectorale* を研究対象とした。*G.pectorale* はボルボックス目に属する群体性の緑藻であり同型配偶子を持つことが知られている。ボルボックス目では二つの性を区別する性質の一つとして性決定遺伝子 *MID* (minus-dominance gene) の研究が進められており、*C.reinhardtii* と *G.pectorale* はともに片方の交配型の配偶子に *MID* が特異的に存在することが分かっている。

*G.pectorale* は 8,16 細胞からなる平らな群体を形成するという特徴をもち、その受精については Nozaki(1984) によって光学顕微鏡を用いて観察されている。その観察により、*G.pectorale* は *C.reinhardtii* と同様な二本の等長鞭毛と一つの眼点をもつ同型配偶子により受精を行うことがわかっている。また、その配偶子は両交配型ともに細胞融合部位に管状の受精管を生じ、その細胞融合は受精管同士から始まる事が確認されている。先行研究では *G.pectorale* の接合装置と眼点の位置関係は *C.reinhardtii* と同じように + 株と - 株とで異なることが分かったが、観察例が少ないことが問題であった。また、性決定遺伝子の不明な株を用いていたため、細胞融合部位と *MID* の有無との対応関係は不明であった。

そこで本研究では *G.pectorale* の同型配偶子における細胞融合部位の空間配置を明らかにし、その構造および空間配置について *C.reinhardtii* との比較を行っていくことを目的とした。そのために実験に用いた *G.pectorale* の培養株の性決定遺伝子の有無を明らかにし、二種の配偶子の細胞融合部位を電子顕微鏡で観察した。

## 材料と方法

材料として *G.pectorale* は国立環境研究所に保存されている NIES-1712 株 (交配型 +) と NIES-1713 株 (交配型 -) の 2 株を用いた。培養は AF-6 培地で 20℃、明期 14 時間・暗

期 10 時間で行った。受精の誘導は Hamaji et al.(2008) の方法を元に検討を行った。*C.reinhardtii* はクラミドモナスセンターに保存されている cc-124 株 (交配型 -) と cc-125 株 (交配型 +) の 2 株を用いた。

*G.pectorale* の 2 株において *MID* 遺伝子の有無を確認するために *MID* 特異的なプライマーを使った PCR を行った。また、配偶子の細胞融合部位と眼点との位置関係を明らかにするために透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察を行った。交配型 + と - のそれぞれの株で配偶子を誘導したものを 2% グルタルアルデヒドによる固定、1% オスミウムによる後固定、脱水、樹脂包埋後に切片を作成して観察した。また走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた観察も行い、1~2% グルタルアルデヒドによる固定、タンニン・オスミウム法による導電染色、脱水後に臨界点乾燥させ観察した。

## 結果と考察

PCR の結果、N1712 (+ 株) が *MID* 遺伝子を持ち、N1713 (- 株) が *MID* 遺伝子を持たないことが明らかとなった。TEM 観察の結果とあわせると、*MID* 遺伝子を持つ N1712 株が眼点と同じ側に接合装置を持ち、*MID* 遺伝子を持たない N1713 株が眼点と反対側に接合装置を持つ可能性が示唆された。*C.reinhardtii* は - 株が *MID* 遺伝子を持つことが分かっているので、細胞融合部位と *MID* 遺伝子の有無の関係は *G.pectorale* と *C.reinhardtii* で同じであった。

また、*G.pectorale* と *C.reinhardtii* の接合装置の構造や配置、数などについて SEM を用いて観察した結果、*G.pectorale* も *C.reinhardtii* も s 鞭毛根と d 鞭毛根の間に一つの接合装置を持つものが最も多く、次いで s 鞭毛根に偏って存在する場合が観察された (Figure 1 参照)。この結果は d 鞭毛根側に接合装置をもつことが知られているアオサ藻綱とは異なるものであった。

## 今後の予定

今までの結果から *MID* 遺伝子と細胞融合部位は密接な関係があることが示唆されたが、*MID* 遺伝子によって接合装置の配置がコントロールされていることを検証するために *C.reinhardtii* の *MID* 変異株を用いて、接合装置の配置を調べ、*MID* 遺伝子の有無によって細胞融合部位に変化が及ぶのかどうかということを検証していく予定である。

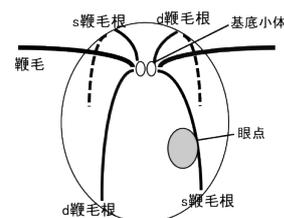


Figure 1: 配偶子の細胞における鞭毛根と眼点の配置

## 海産ユーグレナ藻ユートレプチア目の分類学的研究

川口 明音 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中山 剛 (生命環境系)

### 背景と目的

ユーグレナ藻は、捕食性、吸収栄養性、光合成性等、栄養様式が多様な単細胞真核生物のグループである。先行研究から、最も原始的な細菌捕食性ユーグレナ藻の祖先から真核生物捕食性ユーグレナ藻が誕生し、更にこの祖先から緑藻を二次共生させて光合成能を獲得した光合成性ユーグレナ藻が誕生したと考えられている。光合成性ユーグレナ藻は、主に淡水産で一本鞭毛性のユーグレナ目と、海産で二本鞭毛性のユートレプチア目に分けられており、後者の二本の鞭毛は光合成性ユーグレナ藻に近縁な真核生物捕食性のグループと共通する特徴である。また、ユーグレナ目では限られた種しかユーグレナ運動を行わないが、真核生物捕食性ユーグレナ藻とユートレプチア目では殆どの種が活発なユーグレナ運動を行う。これらのことからユートレプチア目は二次共生後初期に分岐したグループであると考えられ、このことは分子系統学的にも支持されている。以上のことから、ユートレプチア目は二次共生やその前後の適応進化を知るための祖先形質をより多く持っていると考えられる。一方で、ユートレプチア目には *Eutreptia* 属と *Eutreptiella* 属の二属が存在するが、二本の鞭毛が等長か不等長かという形質のみで分類され、未だに詳細な分子系統解析等による分類学的検討はなされていない。

以上のことから、ユートレプチア目の祖先形質の探索と、*Eutreptia* 属と *Eutreptiella* 属の分類の再検討を目的として本研究を行った。

### 方法

東京湾及び東シナ海で採集された海水から、ユートレプチア目藻類をマイクロピペット法により単離して新規培養株を作成した。また、新規培養株と株保存施設から取り寄せた既存の株に対して光学顕微鏡による観察を行った。更に、新規培養株と、配列が公表されていない株保存施設の株 (NIES2305、NIES2325、CCMP390、SCCAP K-0334) から 18S rDNA 配列を取得し、公表されている既存の株の配列と合わせて、RAxML による最尤系統樹の作成とブートストラップ解析を行った。

### 結果と考察

東京湾からは DB06、DB14、DB30 の 3 株を、東シナ海からは EC07 の 1 株を新規培養株として確立した。

光学顕微鏡観察の結果、いずれの新規培養株も、*Eutreptiella* 属の特徴である不等長な 2 本の鞭毛が確認されたので、Walne *et al.* (1986) の作成した *Eutreptiella* 属の各種の形質比較表を参照して各形質を観察した。その結果、DB06 と EC07 は *Eutreptiella gymnastica*、DB14 と DB30 は *Eutreptiella eupharyngea* と殆どの形質が一致した。また、分子系統解析の結果においても、Figure 1 に示すように、それぞれが強い支持のもとで候補種と単系統群を形成した。したがって、これらを上記の種であるとして同定した。また、既存の株においても、*E. eupharyngea* のクレードに含まれた NIES2305 (*Eutreptiella* sp.) と CCMP390 (*Eutreptiella marina*) は形態的にも共に *E. eupharyngea* の特徴を持っていた。CCMP389 (*Eutreptiella* sp.) も *E. eupharyngea* に似た形態的特徴を持っていたが、形態的に未

記載種である可能性が高かった CCMP1594 (*E. gymnastica* cf.) や NIES2325 (*Eutreptiella* sp.) とともに他の *Eutreptiella* と異なる単系統群を形成した。この 3 種は未記載種である可能性が高い。

Figure 1 に示した分子系統解析の結果から、ユートレプチア目はそれぞれ強い支持 (ブートストラップ値 100) のもと 4 つのクレードに分かれ、*Eutreptia* クレード + *Eutreptiella* クレード I、*Eutreptiella* クレード II + *Eutreptiella* クレード III の 2 つの系統に分かれた。この結果から、配列が知られている *Eutreptia* 属に限っては、強い支持で単系統群を形成することが分かった。一方 *Eutreptiella* 属が *Eutreptia* 属に対して側系統群となったことは、*Eutreptiella* 属の特徴 (二本の鞭毛が不等長) が祖先形質であったことを示唆している。

*Eutreptiella* クレード II は、*E. eupharyngea* 等を含むが、この全てにおいて、リボン状の葉緑体が核の前後二箇所に放射状に配置しており、*Eutreptiella* クレード I 内でも同様の葉緑体の配置が確認された。また、*Eutreptia* クレードではリボン状の葉緑体が核の前一箇所に存在する事が知られている。この様にユートレプチア目内の多くの系統群でリボン状の葉緑体が放射状に配置する形質が観察された。リボン状の放射状葉緑体という形質は一部のユーグレナ目藻類にも存在し、二次共生後の共通祖先に存在した原始形質であり、その後各系統において葉緑体の形態に変化が起こった可能性が示唆された。

また、*E. eupharyngea* では、株の培養年齢が進むと *Eutreptiella* 属のタイプ種である *E. marina* の原記載に似た葉緑体の配置が見られることから、*E. eupharyngea* が *E. marina* のシノニムである可能性が示唆された。

今後の展望として、*E. marina* と *E. eupharyngea* の更なる観察を行い、*Eutreptiella* クレード II が真の *Eutreptiella* 属である可能性を検証する。更に *Eutreptiella* クレード I の 3 株の分類学的情報や、それぞれのクレードの共通派生形質を集めて、これらを新属として提唱し、新種記載することを目指す。また更なる野外の新規株の確立と共にこのクレードについてより詳細に観察する必要がある。

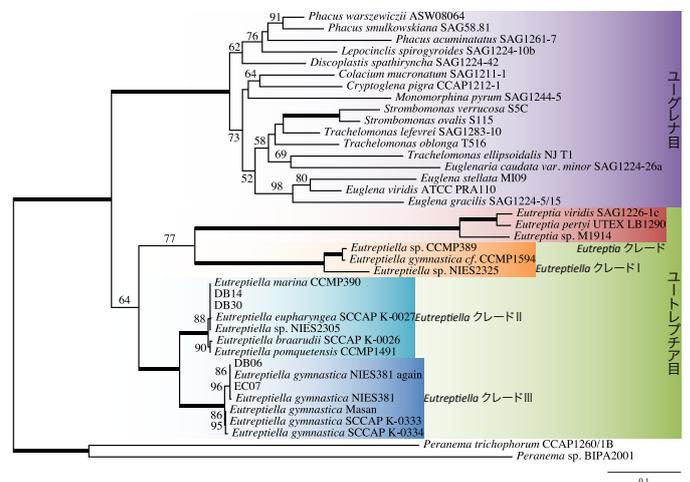


Figure 1: 18S rDNA 配列に基づく最尤系統樹 (枝周辺の数字はブートストラップ値 (50%以上のみ) を、太い枝はブートストラップ値が 100%であることを示す)

## 菅平高原から分離された *Chytriomyces* 属 (ツボカビ目) の分類学的研究

瀬戸 健介 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 出川 洋介 (生命環境系)

### 背景・目的

ツボカビ類は後方一本鞭毛を持つ遊走子を生じる真菌類である。現在、真菌類の中で最もベーサルな系統的位置を占めることが認められており、菌類の誕生、陸上への進出など、その進化を考える上で非常に重要な分類群である。

従来、ツボカビ類の種の記載や分類体系の構築は、粗培養下での形態に基づいて進められてきた。しかし、粗培養下では形態変異の把握が困難であるため、菌株を確立し変異幅を把握した上で種を再検討する必要がある。ところが、研究者が少なく分離培養が困難等の理由から培養菌株を用いた研究は一部の種に限られ、種の実態は依然として不明瞭なままであり、ツボカビ類研究の大きな障壁となっている。

本研究ではまず分離技術を習熟し、菌株を確立して正確な種の実態を解明することを目的とし、菅平におけるツボカビ類のフロア調査に着手した。その過程で最も多く分離された *Chytriomyces* 属の菌株について、培養条件の検討と光学顕微鏡による形態観察を行い、種の同定を試みた。

### 菅平高原におけるツボカビ類のフロア調査

材料・方法：菅平高原実験センター内において、湿度条件、遷移系列の異なる 7 地点 (河川として大明神沢；池沼としてトンボ池、水芭蕉池、拋水林；草原・森林としてススキ草原、アカマツ林、ミズナラ林) を設定し、水または土壌を採集した。ツボカビ類には腐生性と寄生性のものが存在するが、本研究では前者を対象とし、釣菌法による検出、分離培養を行なった。釣菌法とは、サンプルに適当な基質 (有機物) を加えて培養し、基質上に生育するツボカビ類を検出する方法で、異なる基質により多様な種を検出できる。

カップにサンプルを入れ (土壌は水没させ)、水面に基質を浮かべ、15 で培養し、7、14 日後に基質に生じたツボカビ類を観察した。基質として 4 種の天然物、マツ花粉 (P：花粉)、セミ抜け殻 (Ch：キチン)、ヘビ抜け殻 (K：ケラチン)、エノコログサ種子 (Ce：セルロース) を用いた。検出されたツボカビ類について、花粉の場合は基質ごと培地に散布し、他の基質の場合は遊走子をピペット法により単離し、培養菌株を確立した。培地には PpTG agar (ポリペプトン 1 g、トリプトン 1 g、グルコース 5 g、寒天 10 g、蒸留水 1 L) を用いた。

結果：粗培養下で認められたツボカビ類は基質上での形態に基づき 1 目 5 科 11 属に分類された。このうち 29 菌株の確立に成功し、培養下での形態観察が可能となった。そこでこれらの菌株について再検討したところ 1 目 4 科 7 属に分類された。このうち 8 菌株と最も多く分離された *Chytriomyces* 属の菌株について詳細な種の同定を行なった。

### *Chytriomyces* 属の菌株についての検討

*Chytriomyces* 属は 1945 年に Karling により設立された属で、epibiotic または interbiotic の菌体、有弁の遊走子嚢、基質外在性の休眠孢子により定義され、32 種が記載されている。種の識別は基質への付着様式、遊走子嚢の形態、仮根の形態、アポフィシス (遊走子嚢下のふくらみ) の有無、休眠孢子的形態による。本属は世界各地より高頻度に検出され、大きなバイオマスを占める生態的にも重要な分類群

である。しかし、本属のほとんどの種は粗培養下で記載されており、種レベルの分類学的再検討が求められてきた。

材料・方法：各菌株を 4 種の基質上で培養し、基質特異性の確認および各基質上での形態変異の観察を行なった。培地上で生育した菌体をガラスシャーレ内の滅菌蒸留水に移し、基質を浮かべ、15 で培養し、7、14 日後に観察した。

結果：*Chytriomyces* 属菌は、7 地点中、河川および池沼の 3 地点 (大明神沢、トンボ池、水芭蕉池) のサンプルから分離された。菌株の分離源、分離基質は Table1 を参照。

Table 1: *Chytriomyces* 属の菌株の分離源、分離基質、形態

	No	分離源	分離基質	遊走子嚢	休眠孢子
1群	KS7	水芭蕉池	Ce	主に球形(>94%) まれに垂球形	4種の基質 全ての上 で形成
	KS8	水芭蕉池	Ch		
	KS9	水芭蕉池	K		
	KS10	水芭蕉池	K		
2群	KS3	トンボ池	P	主に卵形(>54%) ときに垂球形、楕 円形、俵形、球形 まれにじん臓形、 棍棒形、扁平な球 形、突起のある形	セミ抜け殻 上でのみ 形成
	KS6	水芭蕉池	P		
	KS11	水芭蕉池	K		
	KS12	大明神沢	P		

粗培養下での観察では生育基質は限られていたが、純粋培養下ではどの菌株も 4 種の基質全ての上で生育した。

形態観察の結果、8 菌株は菌体の形態により 2 群に分けられた。2 つの群は、1) 菌体は epibiotic または interbiotic、2) アポフィシスは欠如、3) 仮根は、一本の主軸が伸び端または基部で分枝、4) 休眠孢子は、外在性、球形、褐色の厚い細胞壁を持ち、1 個の大きい油滴と周辺に複数の小さい油滴を含む、の 4 点で共通しており、*Chytriomyces* 属の定義をよく満たす。しかし、これら 2 群は、遊走子嚢の形状、休眠孢子的形成条件において明瞭に異なっていた (Table1)。1 群は、形態的特徴が原記載とよく一致することから *C. hyalinus* と同定された。2 群は卵形を含む多様な形態の遊走子嚢を生じる点では *C. appendiculatus*、*C. rotoruaensis* と類似する。しかし、休眠孢子的形態がいずれの種とも安定して明瞭に異なることから、未記載種と考えられる。

### 考察

現在、ツボカビ類の高次分類体系は、電子顕微鏡による遊走子の微細構造の観察、分子系統解析により大幅に再編成されつつある。しかし、培養下での形態観察に基づき正確に同定された既存菌株が少なく、このことが高次分類体系の改訂の障害になっている。引き続き *Chytriomyces* 属の他種についても菌株を確立して培養下での種の再検討を進めることが求められるが、一方で、種レベルの分類にも新しい技術を導入し、従来の分類形質を検証していく必要がある。今後は、まず本研究で確立された *Chytriomyces* 属 2 種の菌株に関する分子系統解析、電子顕微鏡観察を行なっていく。

## 哺乳類の空中進化を可能にした複合適応形態の進化 ~ コウモリの翼形成に迫る ~

阿部 貴晃 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 和田 洋 (生命環境系)

## 背景と目的

コウモリ類(翼手目)は地球上のさまざまな環境に進出し繁栄を遂げた哺乳類でも種数の点で二番目に大きなグループである。コウモリ類の繁栄は、飛翔能力の獲得による空中というニッチへの進出によってもたらされたと考えられるが、他の哺乳類がもたない独自の飛翔装置、すなわち翼が個体発生をとおしてどのように形作られるのかについては十分な知見が得られていない。コウモリの翼の発生に関する研究の多くは翼を構成する骨や飛膜を個別に解析しており、飛翔装置としての翼を統合的に解析したものは知られていない。

コウモリ類の翼は複数の構成要素からなる複合適応形態である。著しく伸長した指骨と橈骨、発達した飛膜、羽ばたきを支える強靱な胸筋、これらがそろってはじめてコウモリ類の翼は飛翔装置として機能し得る。コウモリ類の前肢の骨がどのようにして伸長するのか、どのような機構で指と指の間に飛膜が形成されるのか、といった問題は確かに重要である。しかし、先行研究では翼を構築する複数の組織間の相互関係については調べられておらず、コウモリ類の繁栄の礎となった翼という飛翔装置が全体としてどのようなメカニズムによって形成されるに至ったのかについては依然として不明なままである。そこで、本研究では飛膜とその内部の筋を中心に解析を進めることで、複合適応形態であるコウモリの翼の形成メカニズムの解明に取り組んだ。

## 材料及び方法

材料:日本産のコビナガコウモリ *Miniopterus fuliginosus* とアブラコウモリ *Pipistrellus abramus* の2種を用い、比較にはマウス *Mus musculus* を用いた。発生ステージの同定および種間の胚発生の比較法は、先行研究に従った。

*in situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫染色:標準プロトコルに従い、タンパク質および mRNA の局在・発現部位を調べた。

翼関連組織の形態比較解析:胚の連続組織切片を作製し、ついで、抗アセチル化チューブリン抗体を用いて切片中の神経組織を染色し、最後にヘマトキシリンによる核染色を行うことで筋、骨を染め分けた。組織が染色された切片の写真を撮影し、三次元立体(3D)モデル構築ソフトウェア Amira5 に写真を取り込み、それらを連結することで解析対象部位の3Dモデルを作成した。

## 結果

コウモリ類の翼の内部には前膜内を後頭部から第一指まで伸長する occipito-pollicalis、腋窩から体側膜内部に進入し外縁方向へ伸長する coraco-cutaneus と plagiopatagiales と呼ばれる筋が存在する(図参照)。前膜と体側膜が顕著に発達するコウモリ胚のステージ 15~17 において抗ミオシン抗体を用いて筋組織を染色し、これら飛膜内部に進入する筋の形成パターンを調べた。前膜の occipito-pollicalis はステージ 15 の時点で、後頭部に小さな筋の凝集として確認された。続くステージ 16 において、前膜の萌芽が確認できると occipito-pollicalis はそれと同調するように前膜の方向に向かって伸張していた。ステージ 17 でこの筋は前膜内部

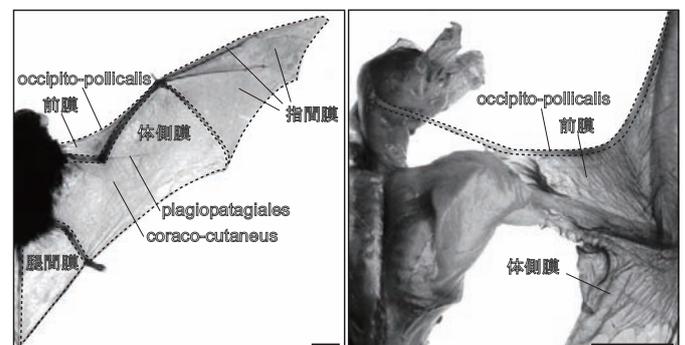
へと進入した。一方、coraco-cutaneus と plagiopatagiales はステージ 15 で初めて確認できたが、この時すでに体側膜の内部に位置していた。以降のステージでは外縁方向へ向かって飛膜の内部でさらに拡大していく様子が確認できた。

次に、これら飛膜の筋の発生学的由来を調べるため、組織切片の三次元再構築により筋の神経支配パターンを調べた。前膜の occipito-pollicalis は顔面神経によって支配されており、その神経支配パターンはマウスの広頸筋と類似していた。また、体側膜の coraco-cutaneus と plagiopatagiales は腕神経叢を形成する神経枝の一部によって支配されており、この神経枝は腕神経叢の遠位で体幹皮筋を支配する神経枝の近傍から分岐していることがわかった。

体側膜の筋が腕神経叢を構成する神経枝に支配されるといふ観察結果は、これらの筋が四肢骨格筋に代表される遊離筋に由来することを示唆する。そこで、遊離筋マーカーである *Lbx1* の発現解析を行い、体側膜の筋形成パターンを詳細に調べたところ、これらの筋はステージ 14 後期までは体幹皮筋と同じ筋芽細胞の凝集として確認できた。続くステージ 15 で体側膜が後方に拡張すると、これは体側膜内部に向かって伸張する筋芽細胞の凝集と正中背側方向に伸張する凝集の二つに分かれた。マウスの相当胚期では体幹皮筋の原基が内外二つの細胞塊に分れることはない。また、マウスでは広頸筋を形成する筋芽細胞の凝集は胸部へと伸長するが、occipito-pollicalis の原基は肩峰方向、つまり前膜の原基に向かって伸長していき、最終的に前膜内部に達した。

## 考察

本研究では飛膜とその内部に進入する筋の発生を調べた。その結果、前膜の occipito-pollicalis は他の哺乳類における広頸筋と、体側膜の coraco-cutaneus および plagiopatagiales は体幹皮筋と同じ発生学的起源を持つことがわかった。飛膜内部への筋の進入は、飛膜原基の外側方向への拡張と同調していたことから、飛膜は周辺組織を飛膜内部へと誘導する機能を有することが推察される。今後、飛膜の形成要因をさらに探求していくことで、翼という複合適応形態の進化を引き起こした複数の組織間のグローバルな形態形成の仕組みを理解することができると思われる。



コウモリ解剖図

コウモリの飛膜は部位によってそれぞれ異なる名称が与えられている。本研究は前肢前部に張られる前膜と、前肢と後肢によって支えられる体側膜、ならびにその内部に進入する筋に注目した。(Scale bars = 1 cm)

## 軟体動物門二枚貝綱における閉殻筋形成メカニズムの解明

土井口 誠 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 和田 洋 (生命環境系)

### 背景・目的

ホタテやアサリといった二枚貝は軟体動物門に属する動物であり、1枚の貝殻をもつ祖先種から進化したと考えられている。二枚貝は2枚の貝殻を獲得したことで、軟体部を完全に覆う事が可能となり、外敵による危険や不適環境から軟体部を保護するなどの防御面の向上という利点を得ることに成功した。しかし、2枚の貝殻だけではその機能を発揮することはできない。なぜなら2枚の貝殻を閉じることで初めて軟体部の保護が可能となるからである。これを達成するためには2枚の貝殻を閉じる筋肉である貝柱、すなわち閉殻筋が必要であり、閉殻筋を獲得したことにより二枚貝は機能的な防御機構を獲得する事が出来たのである。ホタテなどのように閉殻筋を成体期には一つしか持たない種も存在するが、幼生期においてはこれらの種も前方閉殻筋、後方閉殻筋の二つを形成することが知られている。

閉殻筋の発生は前方閉殻筋と後方閉殻筋で異なる。以下は二枚貝の一種、ムラサキインコガイにおける閉殻筋の発生を述べたものである。前方閉殻筋の発生過程は次のとおりである。まず受精後15時間(15hpf)において、後方へ伸びている一对の幼生牽引筋(lr)の一部が背側で結合する。そして、18hpfにおいてその結合した部分が背側に幼生牽引筋から分離され始め、21hpfにおいて完全に分離する。一方、後方閉殻筋の発生過程は前方閉殻筋とは異なる。まず、後方へ伸びていた左右の幼生牽引筋が18hpf以降、正中方向へ伸長し、21hpfにおいて左右の幼生牽引筋の後端領域が結合する。そして、24hpfにおいて左右の幼生牽引筋が正中方向に伸長し始める部分で幼生牽引筋から分離する。このように閉殻筋の発生過程は知られているが、閉殻筋の発生がどのような分子メカニズムによって制御されているかは明らかとなっていない。

閉殻筋形成に関与する可能性のある遺伝子として *hedgehog(hh)* が挙げられる。二枚貝の一種であるケガキにおいて *hh* は前方閉殻筋及び、後方閉殻筋が形成される領域の近傍で発現することが報告されている。

本研究は二枚貝の新奇形質である閉殻筋の発生メカニズムの解明を目的とし、*hh* の機能阻害をおこなうことで、閉殻筋の発生にどのような影響が生じるのかを調べた。

### 材料・方法

実験にはムラサキインコガイ *Septifer virgatus* を用いた。*hh* の機能阻害方法として RNAi 法を用い、マイクロインジェクションによって *hh* の二本鎖 RNA を受精卵に導入した。コントロールとして腹足類の *Hox1* の二本鎖 RNA を用いた。マイクロインジェクションした胚を 18hpf、21hpf、24hpf まで飼育し固定した。この固定胚において *Muscle actin(MA)* をマーカーとして Whole-mount in situ hybridization 法により筋形成の観察をおこなった。また *hh* の二本鎖 RNA をインジェクションした事によって *hh* の発現が抑制されているかを確認するためにコントロール胚、阻害胚両方において *hh* の発現解析をおこなった。

### 結果・考察

ムラサキインコガイにおいても *hh* の発現パターンはケガキと同様の発現パターンであった。*hh* の二本鎖 RNA を

導入した胚において、*hh* の発現が抑制されているかを検証した結果、RNAi により *hh* の発現が抑制されている事を確認した。次に *hh* 阻害胚において閉殻筋の形成を観察したところ、前方閉殻筋は幼生牽引筋から分離し形成されるというコントロール胚の閉殻筋形成と同様の結果が観察された (Fig.1,3,a)。一方、後方閉殻筋に関しては、18hpf において正中方向へ左右の幼生牽引筋が伸長する時点まではコントロール胚の筋形成と同様であったが、21hpf において阻害胚では左右の幼生牽引筋後端領域の結合が見られず (Fig.2,b)、24hpf においても後端領域の結合は見られなかった (Fig.4,b)。今回の実験から、後方閉殻筋の発生では左右の幼生牽引筋後端領域の結合に *hh* が関与している事が示された。今回 *hh* を阻害した結果、前方閉殻筋の発生に影響は見られなかったが、後方閉殻筋の発生には影響が見られた事から、二枚貝における閉殻筋の発生を制御する分子メカニズムは、前方閉殻筋と後方閉殻筋で異なることが示唆される。

### 今後の展望

*hh* が前方閉殻筋形成領域の近傍で発現しているにも関わらず、*hh* 阻害胚の前方閉殻筋形成に影響が出なかった原因として、前方閉殻筋形成領域の近傍で *hh* シグナルの受容体である *Patched* の発現が失われた可能性が挙げられる。今後は上記の検証として前方閉殻筋形成領域の近傍における *Patched* が発現するかどうかを調べる予定である。

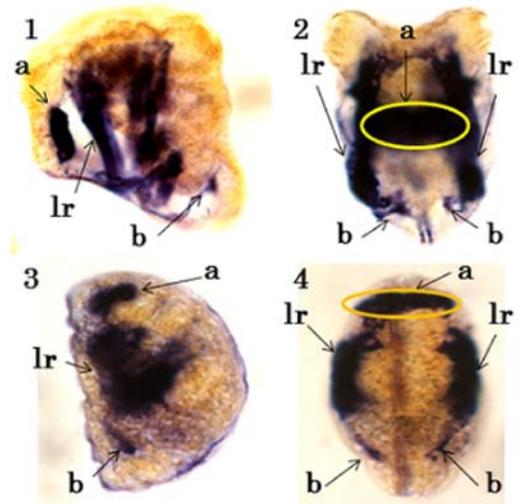


Fig : *hh* 阻害胚における MA の発現

(左: 右側面図 右: 背側正面図 1,2 : 21hpf . 3,4 : 24hpf)  
(a : 前方閉殻筋, b : 予定後方閉殻筋, lr : 幼生牽引筋)

## ヤツメウナギにおける口部発生の解析と顎進化の手がかり

吉村 美穂 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 和田 洋 (生命環境系)

### 背景・目的

脊椎動物における顎の獲得は、受動的な濾過摂餌から能動的な捕食への変化を可能にした革新的な進化だった。しかし顎獲得プロセスの詳細は明らかになっていない。顎の進化の手がかりを得るには、顎をもたず原始的な形質を多く残すヤツメウナギの口部領域発生を理解することが重要である。

現生の大部分の脊椎動物が属する顎口類における口部領域の骨性要素は、背側から梁軟骨、第1咽頭弓を構成する上顎骨および下顎骨からなり、いずれも神経堤細胞由来である。一方、無顎類に属するヤツメウナギにおける口部領域の骨性要素は、第1咽頭弓領域に背側から梁軟骨、縁膜軟骨および下唇軟骨を有しており、後者2つの骨性要素は神経堤細胞由来である。しかし、梁軟骨の細胞由来(神経堤細胞か中胚葉細胞か)については明らかになっていないため、顎口類とヤツメウナギの梁軟骨が相同であるのか議論が続いている。これは、ヤツメウナギの口部領域の発生の知見が乏しいためである。そのため、口部領域を占める細胞タイプの分布を詳細に知る必要がある。

また、口部領域骨性要素のパターニング遺伝子として、顎口類では口部領域の上皮で *Fgf8*、*Bmp4* が発現し、遊走してきた神経堤細胞の *Dlx1* および *Msx1* の発現をそれぞれ制御しパターニングに関与していると報告されている。ヤツメウナギにおいても、ホモログな *Fgf8/17*、*Bmp2/4a*、*DlxA*、*MsxA* の顎口類に類似した発現パターンが報告されているが、口部領域骨性要素のパターニングとの関連については明らかにされていない。

本研究は、ヤツメウナギにおける口部領域を占める細胞タイプの検証、および、*Fgf8/17*、*Bmp2/4a*、*DlxA*、*MsxA* の発現パターンと機能の解析を通して、顎の獲得に必要であった分子メカニズムを解明することを目的としている。

### 材料・方法

サンプル: カワヤツメ *Lethenteron japonicum*、スナヤツメ *L. reissneri* の人工受精により胚を得た。

*in situ* hybridization: 遺伝子の発現パターンを whole-mount で観察し、その後凍結切片で詳細な観察を行った。

阻害剤処理: 胚を SU5402 (FGF シグナル阻害剤) で処理し、第1咽頭弓骨性要素形成に及ぼす影響について観察した。

### 結果

#### 口部領域を占める細胞タイプの検証

神経堤細胞の遺伝子マーカーとして、第1咽頭弓の軟骨になる細胞で発現する *SoxE3*、口部領域の神経堤細胞で広く発現が観察される *DlxA* を用いた。また、筋マーカーとして *MA2* を用いた。口部領域の細胞を *in situ* hybridization によって染め分けると、上唇は神経堤細胞と中胚葉細胞で占められていた。梁軟骨になる領域は、先行研究同様 *SoxE3* の強い発現が観察された。その他の領域については、一部の細胞のタイプについて識別できた。

#### パターニング関連遺伝子の発現

*Fgf8/17* は st23 から口部領域の上皮で発現が見られ、st25 には上唇から下唇にかけて発現領域が拡大した。そして発生が進行してもその発現は維持された。*Fgf8/17* が第1咽頭弓骨性要素のパターニングと関連があるかを調べるために FGF シグナル阻害剤処理を行い、*SoxE3* の発現により第1咽頭弓骨性要素の形態を観察したが、今回設定した濃度 (30 μM) では第1咽頭弓の形態に変化が見られなかった。*DlxA* は st24 から口部領域を取り囲むように発現が見られ、st26 には上唇から下唇にかけての間葉細胞および縁膜の間葉細胞で発現が見られた。凍結切片により詳細な観察を行うと、第1咽頭弓骨性要素になる細胞で発現する *SoxE3* の発現とは重なっていないことが示された。*Bmp2/4a* は st24 から上唇と下唇の正中領域で発現が観察された。*MsxA* については、st24 から上唇と下唇の正中領域の間葉細胞で発現が見られ、発生が進行すると上唇から下唇にかけて発現領域が拡大した。

#### 考察

パターニング関連遺伝子の発現について、*DlxA* の発現は *SoxE3* の発現と重なっていないことが示された。そのため、*DlxA* の上流遺伝子である *Fgf8/17* のシグナル阻害剤で処理しても第1咽頭弓骨性要素の形態に変化が見られなかったのだと考えられる。顎口類において、*Fgf8* および *Dlx1* が第1咽頭弓骨性要素のパターニングに関与していると既に報告されている。しかしヤツメウナギにおいては顎口類とは異なり、*Fgf8/17* および *DlxA* が第1咽頭弓骨性要素のパターニングに関与していないことが示唆された。つまり、「顎」という新奇形質の獲得にはパターニング関連遺伝子である *Fgf8/17* の下流にある *DlxA* の発現領域の変更が必要であったと本研究から推測される。

#### 展望

口部領域の細胞タイプを識別するために他の遺伝子候補を検討する予定である。また、*Bmp2/4a* が第1咽頭弓骨性要素のパターニングへ関与するかを明らかにするために、BMP シグナル阻害剤処理を行い、*MsxA* の発現パターンとあわせて考察する予定である。

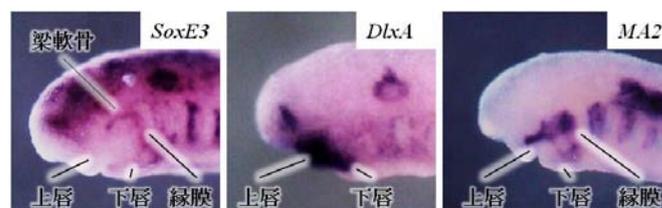


Figure 1: 口部領域の遺伝子発現

## 南日本における *Evarcha* 属ハエトリグモの分類学的研究

須黒 達巳 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 八畑 謙介 (生命環境系)

### 背景と目的

ハエトリグモ科 (クモ目) は、クモ類の中では比較的大きなグループで、現在日本に 42 属 93 種が知られている。色模様や形が特徴的であり、徘徊性でもあることから人目につきやすいが、分類学的研究はあまり進んでおらず、特に南西諸島には多くの未記載種が存在する。本研究では、南西諸島に分布する *Evarcha* 属のハエトリグモ類の分類学的な検討を行った。

南西諸島には未記載種の可能性のある *Evarcha* 属のクモが生息していることが、千国 (1989, 2000) によって報告されている。このクモは雄の頭胸部に 1 対の白いまがたま模様を持つ (以下まがたま型) (図 1 中)。演者はこれとは別に、左右の模様の先端が伸びて頭部前縁でつながるタイプ (以下カチューシャ型) (図 1 左) を予備調査により発見している。これら 2 タイプが別種なのか、それとも種内変異なのか、また未記載種なのかを明らかにするためには、既記載種との比較検討が必要である。これら 2 タイプに最も近縁と考えられる既記載種としては、西日本に分布するマミクロハエトリ *Evarcha fasciata* Seo, 1992 (図 1 右) が挙げられる。マミクロハエトリの雄は、頭胸部に白い模様のない点で他の 2 タイプとは区別される。なお、雌は 3 タイプともきわめてよく似ており、模様で区別することができない。本研究では、まがたま型、カチューシャ型、マミクロハエトリの 3 タイプについて、分布調査および詳細な形態比較を行った。なお、研究の一部は文部科学省の理数学生応援プロジェクト「先導的研究者体験プログラム」の助成を受け行った。



カチューシャ型 まがたま型 マミクロハエトリ

図 1. 3 タイプのオスの成体 (矢印は頭胸部の模様)。

### 材料と方法

検証には、静岡以西の本州、九州、ならびに南西諸島全域にわたる 18 地点から、採集および譲渡により入手した成体 224 個体 (うち雄 114 個体、雌 110 個体) の標本 (すべてアルコール液浸標本) を用いた。得られた標本は、模様をもとにタイプ分けした。

形態比較をするために、双眼実体顕微鏡を用いて雌雄の生殖器の詳細な観察を行った。あわせて、頭胸部および歩脚の 31 部位の長さを計測し、雌雄ごとに統計解析を行った。解析には、統計ソフトウェア R (2.13.0) を用いた。

### 結果

カチューシャ型は宮古島、石垣島、西表島の 3 島、まがたま型は種子島から宮古島までの島々および与那国島、マミクロハエトリは本州および九州でそれぞれ分布が確認さ

れた (図 2)。宮古島ではまがたま型とカチューシャ型が同所的に生息していたが、中間的な模様の個体は確認されなかった。

雄の生殖器 (触肢) を比較したところ、カチューシャ型は雌の生殖器との結合部が著しく長く、他の 2 タイプと容易に区別することができた。雌の生殖器 (受精囊) でも、カチューシャ型は奥行きが深い点で他の 2 タイプから区別することができた。雌雄ともに、生殖器の形態にはまがたま型とマミクロハエトリの間に明瞭な差異を見いだすことができなかった。

頭胸部および歩脚の 31 部位の比較では、脚長や眼間隔など雌雄各 4 部位において、マミクロハエトリと他の 2 タイプの間に有意な差が見られた (共分散分析:  $p < 0.01$ )。また、まがたま型と他の 2 タイプの間では雄の 1 部位において有意差が見られた (共分散分析:  $p < 0.01$ )。まがたま型とマミクロハエトリの間では、雄で 5 部位、雌で 4 部位の形態的差異が認められた。

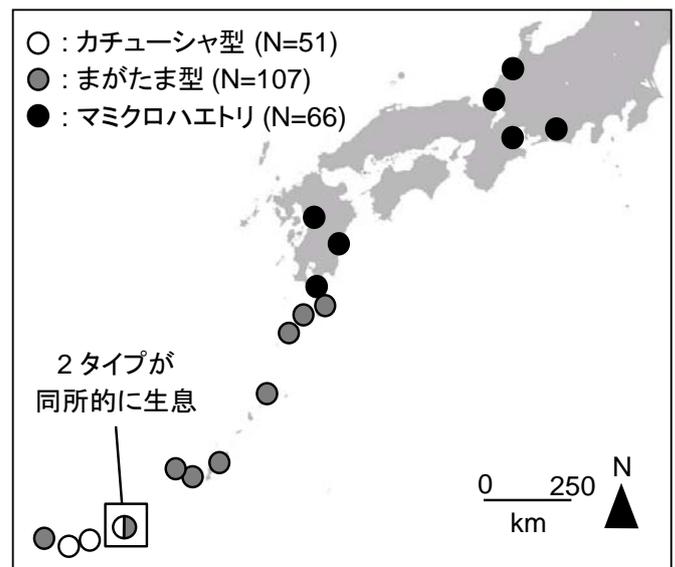


図 2. 3 タイプの分布。

### 考察

カチューシャ型は雌雄とも他の 2 タイプとは生殖器および他の形態で明瞭に区別することができた。また、まがたま型との同所的な分布が確認されたが、中間型は見られず、明瞭に 2 タイプに分かれていた。これらの証拠から、カチューシャ型は他の 2 タイプとは別種と結論した。国外産の種を含め他の既記載種とも形態的に区別できるので、カチューシャ型は未記載種と結論される。

一方、まがたま型とマミクロハエトリの間では複数の部位に形態的な差異が認められたものの、生殖器のみで区別することは困難であり、かつ同所的な分布も確認されていない。以上のことから、現時点ではこの 2 タイプは別種と扱うべきか種内変異とするべきか判断できない。今後、引き続き分布調査を進め、また形態的な差異が連続的かどうかを調べるとともに、分子マーカーを用いてタイプ間の関係を明らかにしたい。

## アカトンボ類における翅形態の比較研究

米原 善成 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 八畑 謙介 (生命環境系)

## 背景および目的

翼や翅を持つ動物では、翅の形の多様性は飛翔行動のパターンやディスプレイの有無などさまざまな要因を反映している。活発に飛翔するトンボ目昆虫においても、種間で飛翔行動に多様性が見られる。トンボ目アカネ属に属するアカトンボ類では、多くの種が自身の羽化した水辺または近隣の林内で成熟期を過ごす(定住型)。一方、アカトンボ類の1種アキアカネ *Sympetrum frequens* は、6月頃に平地で羽化した後、山の頂上付近にまで移動して夏を過ごし、9月頃からの繁殖期には再び平地の水辺へ戻る。すなわち本種は、定住型のアカトンボ類と比べて極めて長距離の飛翔を行う。このように、異なる飛翔行動を行うアカトンボ類の間には、翅の形態に差はないのだろうか。本研究では、翅形態と飛翔行動の関係に焦点をあて、アカネ属トンボ数種間で、幾何学的形態測定学の手法を用いて翅形態の比較研究を行った。

## 材料および方法

トンボ目アカネ属の、アキアカネ *Sympetrum frequens* (雄26、雌25)、ナツアカネ *S. darwinianum* (雄26、雌33)、ノシメトンボ *S. infuscatum* (雄15、雌19)、マイコアカネ *S. kunckeli* (雄15、雌4)の4種を2011年9月から10月にかけて主につくば市内で採集し、デジタルカメラによって翅を撮影した。翅の形態を定量化して比較するために、翅の写真上で相同な翅脈の交点(前翅28点、後翅27点)をランドマークとして選んだ(図)。さらに、後翅では翅の基部や後縁の形態を計測するために、等角度線と翅の輪郭の交点を7点選び、ランドマークとした(図)。これらのランドマークの座標データをもとに、前翅、後翅それぞれについてサイズ要素との回帰分析、主成分解析、標準変量解析を行った。座標データの抽出にはTPSdig (Rohlf, 2009)、統計解析にはMorphoJ v1.03a (Klingenberg, 2011)を用いた。

## 結果

予備解析の結果、前翅、後翅ともに雌雄差が見られたが、雌雄どちらにおいても種間差の傾向に大きな差が認められなかったため、種間差の結果は雌雄を分けずに述べる。

前翅についての回帰分析の結果、翅形態の種間差は翅サイズの違いと大きな相関があり、翅サイズが大きい種ほど翅は細長く、翅サイズが小さい種ほど翅の先端部が幅広いことがわかった。翅のサイズの違いが翅形態の比較に及ぼす影響を除くために、以後の解析は回帰分析の残差を用いて行った。主成分解析では、第1主成分(36.5%)、第2主成分(14.7%)ともに翅先端部の拡大縮小の差を表していた。標準変量解析でも同様に、種間差は翅先端部の形態差を示しており、翅先端部が細長い[アキアカネ+ナツアカネ]グループと、翅先端部が膨らんで幅広い[ノシメトンボ+マイコアカネ]グループの2群に大きく分かれることが明らかになった。

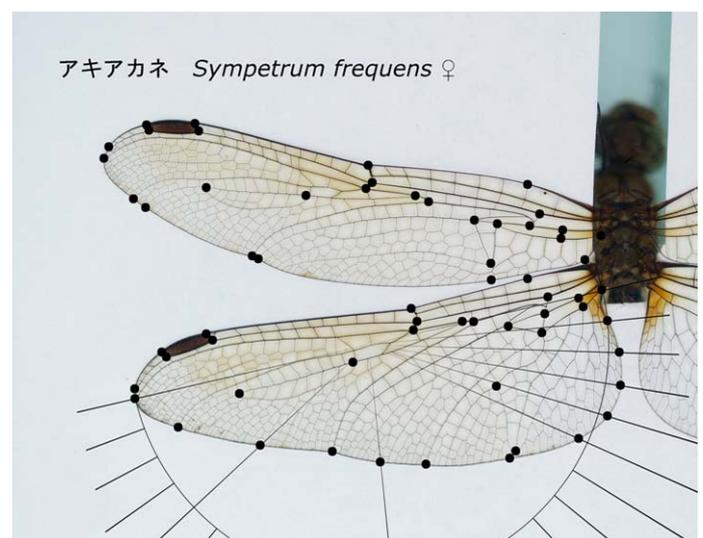
後翅形態の種間差は、前翅同様、翅サイズの差と大きな相関があり、翅サイズが大きい種ほど、翅は細長くなることがわかった。そこで、後翅においても翅サイズと形態の回帰分析の残差を用いて解析を行った。主成分解析では、第1

主成分(36.1%)は翅全体の幅の差を、第2主成分(14.4%)は翅基部の膨らみの違いを表していた。第1、第2主成分の座標上でナツアカネ、ノシメトンボ、マイコアカネが似た傾向を示す一方、アキアカネはより幅が広く、基部の膨らんだ翅を持つことがわかった。標準変量解析でも、主成分解析と同様の結果が得られ、アキアカネと他の3種との間には明瞭な形態差があることが明らかになった。

## 考察

本研究では、異なる飛翔行動を行うアカトンボ類の種間において、翅形態の比較を行った。その結果、定住型の種と比べて、長距離飛翔を行うアキアカネは、前翅が細長く、後翅は幅が広くて基部に膨らみのある特異的な形態を持つことがわかった。アカトンボ類の種間に見られる形態の差が、飛翔行動に適応して生じたものだと仮定すると次のような解釈ができる。

トンボ類は、前後の翅を独立に動かすことのできる特徴的な飛翔筋構造を持ち、前後の翅で異なる機能を果たすことが可能である。そのため、飛翔行動の違いに対して、前後の翅で機能的に異なる適応をとげている可能性がある。定住型の種に比べて細長いアキアカネの前翅は、グライダー翼としての役割を果たすことによる長距離飛翔への適応かも知れない。事実、鳥類では細長い翼が力学的に長距離飛翔に適しており、短い翼は小回りを要する飛翔に適することが知られている。一方、幅が広くて、基部の膨らんだアキアカネの後翅は上昇気流を受けて揚力を得るのに有効かも知れない。このように、アキアカネで見られた翅形態は、その飛翔行動に関連したものであると解釈できる。



図：アキアカネの翅とランドマーク

## 淡水域バクテリアによる蛍光性溶存態有機物の生成

新井 健 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 濱 健夫 (生命環境系)

### 背景

水圏環境中に存在する有機物の起源を明らかにすることは、水域の環境マネジメントを考える上で重要である。生物学的に分解されにくい特性を持つ腐植様物質と呼ばれる物質群は、水中の有機物の起源を推定するためのマーカーとして利用される。3次元励起蛍光分析(3Dimension-Excitation Emission Matrices:3D-EEMs)は溶存態有機物のうち蛍光を発する成分(蛍光性溶存態有機物:Fluorescent-Dissolved Organic Matter:F-DOM)の蛍光特性の違いを用いた簡便な分析法で、蛍光性の腐植様物質はこの方法で検出することができる。

淡水環境の腐植様物質についてはその大きな寄与から、陸上起源のものが注目されてきたが、近年では水中のバクテリアが腐植様物質を放出することが明らかになった。しかし、バクテリアがその生命活動のどの過程で腐植様物質を放出するのかは未解明な点が多い。バクテリアがどのような経路で腐植様物質を放出するのかを明らかにすることができれば、溶存態有機物生成へのバクテリアの寄与を評価することができる可能性がある。

本研究では腐植様物質生産の過程を解明するため、自然のバクテリア群集を用いた短期培養実験を行い、培養液中のF-DOMの変化をモニターした。

### 方法

2011年9月14日、霞ヶ浦の表層水を採集し植物プランクトンを除去するために孔径0.7 μmのフィルターでろ過した。そのろ液を8Lの人工湖水を満した9Lポリカーボネートボトル容器へ2%となるよう添加した。人工湖水はD-MS培地を一部改変したものをを用い、さらにグルコースを最終濃度10mgC L<sup>-1</sup>となるよう加えた。同様の系を2基用意し、20、暗条件で100日間培養した。試料は0,1,3,6,9,12,16,20,25,30,45,100日目に採取し、原液と0.2 μm Anodisc フィルターでろ過したものをを用意した。フィルター上に保持された懸濁態有機物については元素分析計で炭素量を測定し、懸濁態有機炭素濃度を算出した。ろ液は3D-EEMs、溶存態有機炭素濃度測定、栄養塩濃度測定に供した。原液は直ちにチアゾールオレンジとPIで染色処理し、フローサイトメーターでバクテリア細胞数を計測した。

### 結果・考察

実験期間中、バクテリアは3日目から6日目にかけて急激に増加し、16日目までに最大値付近を達し、20日目までに急激に減少した(Fig.1)。3D-EEMsでは2つの腐植様F-DOMのピークの出現が認められた。(Fig.2)

腐植様成分Aの蛍光強度は3日目から16日目にかけて増加し、20日目以降最大値付近の値を保持した。一方、Bは3日目から6日目にかけて増加し、さらに16日目から20日目にかけてわずかに増加した後、最大値付近の値を45日目まで維持した。この2つのF-DOMは、培養期間後半、蓄積されたものが消費されず最大値付近の値を保持していることから、生物による分解に対し比較的安定な性質を有すると考えられる。当初、バクテリアから腐植様物質が放出される場合、2つの経路を想定していた。即ち、(1)生き

ているバクテリアが代謝活動の副産物として生成している場合、または(2)死んだバクテリアの細胞が崩壊するときに細胞内構造物質の成分として放出される場合である。今回の実験においては16日目から20日目にかけて大部分のバクテリアが死滅したと考えられる。腐植様成分A,Bのそれぞれについて16日目から20日目の間の生産速度を見ると、Bの蛍光強度はわずかに増加を示し、バクテリアの死滅との関連を示唆している。一方、腐植様成分Aの生成はバクテリア細胞数が最大値付近を推移している期間に生じている。このことから、Aは(1)、Bの成分の一部は(2)の経路から放出されるという可能性を示せた。

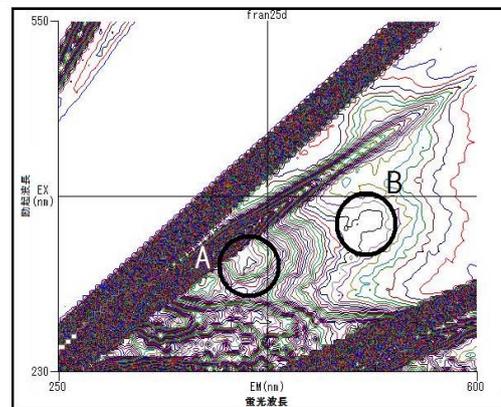
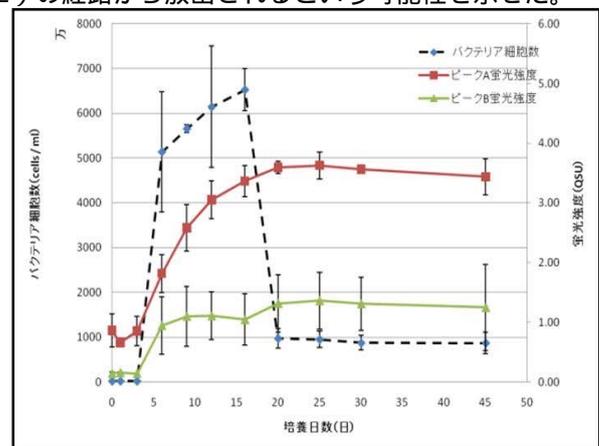


Figure1 (上) バクテリア細胞数と腐植様成分 A、B の蛍光強度の変化

Figure2 (下) ボトル 2 の 25 日目の EEM。図中の A、B が腐植様成分のものと思われるピーク。

### 今後の展望

バクテリアから放出される腐植様物質の定量的解明にはさらなる研究が必要である。今回の実験ではF-DOMは蛍光強度によって評価しており、バクテリアによって生産された腐植様物質の炭素量としての評価が行われていないためである。

また、今回放出が確認された腐植様成分A,Bを環境中で指標として用いようとする場合、これらの成分の続成変化のモデルが必要になるがそれを構築するためには分析化学的手法による多方面からの解析と、太陽光の影響など自然界の分解要因を考慮した実験が求められるであろう。

## 西部北太平洋域における蛍光性溶存態有機物の分布と動態

幣原 奈央子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 濱 健夫 (生命環境系)

## 背景・目的

海洋の溶存態有機物 (DOM) は、大気中の二酸化炭素量や陸上植生と並ぶ地球表層上の最大級の有機炭素リザーバーである。DOM プールの存在は、海洋における微生物ループの駆動や海洋の炭素隔離機能に大きく関与していると考えられており、その変動を解明することは地球表層の炭素循環を理解する上で非常に重要である。さらには、温暖化や異常気象など現在直面している地球環境問題を把握するための情報源にもなり得る。

DOM のおよそ 9 割を占めていると言われているのが、微生物分解に耐性をもつ難分解性 DOM (RDOM) である。数千～数万年スパンで海洋内に滞留するこの RDOM は、長期炭素貯蔵庫として重要性が高いにも関わらず、その生成過程や生物ポンプにおいての役割は未解明なところが多い。DOM プールの動態を理解するには、溶存態有機物を量的、そして化学的性質の両面から解析する必要がある。

FDOM (fluorescent DOM) の主要成分として腐植様物質があり、その蛍光特性を用いた様々な利用が生物地球化学分野においてなされている。FDOM は RDOM プールの大きな割合を占めていると言われており、その生成・変動過程を観測することは同時に RDOM プールの動態を推測することにつながる。また、培養実験によりバクテリアが FDOM の生成に大きく寄与している可能性が高いとの報告がされており、海洋 DOM の時間的・空間的な性質変化においても注目が上がっている。しかし、実際の海域における FDOM の分布については報告が少なく、海洋炭素貯蔵庫としての役割を示唆する研究が必要である。そこで、本研究では西部北太平洋における FDOM の分布を用いて、DOM が貯蔵・運搬される過程において起こり得る変化について検討してみた。

## 方法

海水試料の採水は気象庁気象研究所に依頼した。採水は気象観測船 (凌風丸、啓風丸) の定期観測の際に行われ、2009 年 10 月 (東経 137 度、北緯 10-30 度)、2010 年 5 月 (東経 137 度、北緯 24-26 度)、2010 年 6 月 (東経 165 度、北緯 10-35 度) の 3 セクション (Fig.1) から採水した。深度については、0～300 m では毎 25 m、300～1000 m では毎 100 m、1000～2000 m では毎 200 m、それぞれのセクションにおいて採水した。海水は CTD 採水機により採水した後、燃焼済み (450 で 5 時間) 100 mL ガラス管にそれぞれ移し、測定まで -20 で冷凍保存した。

全有機炭素濃度 (TOC) は、680 燃焼触媒酸化方式 TOC 計 (Shimadzu TOC-V) で測定した。無機炭素の除去には、3N HCl の添加と純空気 (無 CO<sub>2</sub>) の通気 1.5 分を行った。Milli-Q 水の TOC 濃度を用いて補正を行った。

蛍光特性は、分光蛍光光度計 (Hitachi F4500) で excitation-emission matrix spectroscopy (EEMs) を測定した。Ex = 230-450 nm (5 nm 間隔)、Em = 300-550 nm (2 nm 間隔)。試料は暗環境のもと自然解凍した後、1 × 1 cm 石英セルにてそれぞれ 2 回ずつ測定した。補正には Milli-Q 水の EEMs を使用した。蛍光強度の単位には QSU (quinine sulfate units) を用いた。

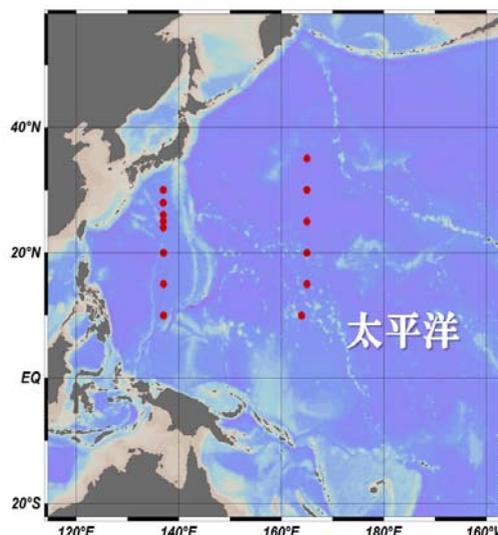


Figure 1: 採水地点 (東経 137、165 度線)

## 結果・考察

海水温度は冬季の方が、また緯度が高くなるほど混合層が厚くなっていった。これは、表面の海水が冷却され重くなると鉛直混合がしやすくなるためである。水の重さによって海水の湧昇のしやすさも左右されるため、海水温と栄養塩の分布は相関がある。

2009 年 10 月 137E 25N 700 m ( 34.13)、2010 年 5 月 137E 24N 650 m ( 34.16)、2010 年 6 月 165E 30N 650 m ( 34.02) において塩分極小層が認められた。137E の塩分小層においては両航海で FDOM 蛍光強度 (Ex/Em = 320/420 nm) が周囲より強くなっており、それぞれ 1.29 QSU、1.34 QSU であった。165E での蛍光強度は、塩分極小層では目立って強くはなかったが、代わりに 165E 20N 800 m 付近で強かった。いずれの蛍光強度が強い水域でも特に AOU が高くなっているところはなかった。つまり、蛍光強度が強くなった分の FDOM は水塊などによって運搬もしくは蓄積された可能性がある。それぞれの塩分極小層付近 FDOM を parallel factor analysis によって解析した結果、航海によって蛍光成分の分布パターンに違いがあることがわかった。

## 今後の課題

FDOM の水塊の移動による蓄積とそれに伴う化学的変化を追うには、さらに広域で、かつ海水の循環に沿った観測が必要である。また、parallel factor analysis により照射が蛍光成分の光分解を生ずるという報告があるが、DOM の動態を理解するには蛍光成分の変化が海洋内部のどのようなプロセスに起因しているのか関連付ける必要がある。

# 海洋酸性化が植物プランクトン群集組成及びハプト藻 *Chrysochromulina* sp. に与える影響

井上 幸樹 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 濱 健夫 (生命環境系)

## 背景・目的

海洋は大気中に放出される二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) の約 1/3 を吸収している。近年、人類の化石燃料消費などに起因する大気 CO<sub>2</sub> 濃度の上昇に伴って海洋に溶け込む CO<sub>2</sub> も増加し、その結果、海洋の pH の低下を生じている。これが地球温暖化に対して「もう一つの CO<sub>2</sub> 問題」とも呼ばれる海洋酸性化である。実際に産業革命～現在までに海洋表層の pH は約 0.1 低下しており、今世紀末までにはさらに 0.3～0.4 低下すると予測されている。これにより海洋の生態系や物質循環には様々な影響が及ぶと予想され、研究が進められている。植物プランクトンは海洋の一次生産の大半を占め、海洋生態系を支える主要な生産者であるため、彼らへの酸性化の影響は海洋全体に大きな影響を及ぼす可能性がある。しかし、植物プランクトンへの酸性化の影響についてはまだ得られている知見が少ない。そこで本研究では、海洋酸性化による植物プランクトン群集、及び特定の種への影響を調査すること目的とし、植物プランクトン自然群集を用いた大型水槽による野外群集培養実験と、先行の群集培養実験で酸性化による負の影響が示唆されたハプト藻 *Chrysochromulina* sp. を用いた単培養実験の二つを行った。

## 方法

### 1. 野外群集培養実験

#### 1.1 培養実験

2011 年 11 月 9 日～12 月 9 日にかけて筑波大学下田臨海実験センターにおいて、野外に 400L タンクを 6 基設置し、100 μメッシュによって大型動物プランクトンを除去した沿岸海水を導入した。CO<sub>2</sub> 濃度を調整した空気を用いてパブリングすることにより水槽内の pH と CO<sub>2</sub> 濃度を調整した。CO<sub>2</sub> 濃度は約 400ppm(現在)、800ppm(2100 年)、1200ppm の 3 条件に設定しとし、各条件 2 タンクずつで実験を行った。設置後 2 日間パブリングを継続し安定させた後 (Day-1 Day0)、栄養塩を添加し (Day1)、その後は 1 日 6 時間ずつパブリングして pH と CO<sub>2</sub> 濃度を維持した。サンプリングは全 12 回、円筒状の容器を用いて鉛直方向に均一になるように行った。

#### 1.2 分析

フローサイトメーターを用いて非固定試料を分析し、植物プランクトンの細胞数、種組成等を調べた。また、採水した海水をガラス繊維ろ紙 (GF/F) でろ過し、ろ紙上の植物プランクトンの指標色素を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって分析することにより群集を構成する植物プランクトンのグループ組成を調べた。

### 2. 単培養実験

培養室内において *Chrysochromulina* sp. の単培養株 (中山講師提供) を、緩衝剤と塩酸・水酸化ナトリウムを用いて pH7.6、8.1、8.4 に調整した培地と、コントロールの通常培地の 4 条件で培養した。約 1 週間培養し、毎日フローサイトメーターによって細胞数を計測した。

## 結果・考察

培養開始から徐々に植物プランクトン量は増加し、Day3 付近において、珪藻主体のブルームが確認された。その後植物プランクトン量は減少し、実験後期では比較的安定した。実験前期では条件による群集組成の違いはほとんど見られなかった。これは珪藻などのその時期に優占したグループには酸性化の影響がほとんどないことを示唆している。一方で、実験後期では一部で条件による群集組成の違いがみられた。特に最終日の Day29 では、先行研究と同様に、酸性化によってハプト藻 *Chrysochromulina* sp. を含むと考えられる植物プランクトン集団の割合が減少し、新たに大きさ 1～2 μm ほどのピコ植物プランクトンの 1 集団が増加する傾向がみられた (Figure)。

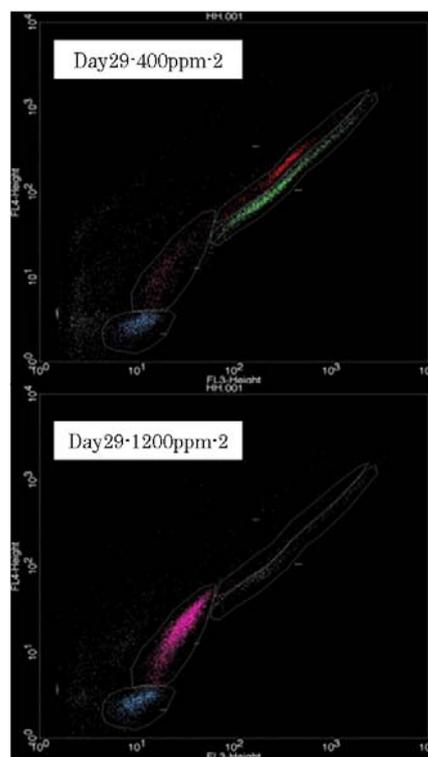


Figure  
植物プランクトン群集のフローサイトプロット  
*Chrysochromulina* sp. を含むと考えられる赤や緑のプロットが酸性化条件(下)では減少し、ピコ植物プランクトンの1グループ(ピンク)が増加した。

これらの結果は、海洋酸性化によって一部の植物プランクトン群集の組成が変化する可能性を示唆するとともに、ピコ植物プランクトンの割合が増加し、それにより植物プランクトン群集の平均サイズが減少する可能性を示唆している。また、他の種による競争等の影響を排した単培養実験においても低 pH 条件において *Chrysochromulina* sp. の増殖が弱まることが確認され、酸性化による直接的な影響を受けている可能性が示唆された。

## 今後の課題

今回の実験系では大型動物プランクトンを排除しているため、今後より現実的な影響を調べていくためには、動物プランクトンも含めた実験系についても考えていく必要がある。また、単培養では、影響を受けているメカニズムなどのより詳細な原因を調べていくことが必要である。

## 東シナ海の流れ藻から得られたナガレモヘラムシの個体群構造

倉持 優希 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 濱 健夫 (生命環境系)

### 背景と目的

フクロエビ上目・等脚目・ヘラムシ科に属するナガレモヘラムシ (*Idotea metallica*) は、海洋漂流物上のみ生息するというユニークな生活様式をもつ小型甲殻類であり、流れ藻上にはナガレモヘラムシが多数出現する(田中, 2005)。内部にガスを貯める気胞をもつホンダワラ類の褐藻は、沿岸の藻場から波などで引き剥がされると気胞の浮力により海面を漂うため、流れ藻の主要な構成種となっている(吉田, 1963)。流れ藻は漂流しながら徐々に気胞を失い最後には沈降する(三上, 2006)が、ナガレモヘラムシは遊泳力が弱く生息基質の存在なしで遊泳生活を営んでいるとは考えられない(Gutow, 2003)ため、流れ藻の沈降により生息基質を失うことになる。このように時間的・空間的に制限のあるハビタットを利用しながらナガレモヘラムシがどのように個体群を維持しているのかについては解明されていない。東シナ海沖合の流れ藻は主にアカモク (*Sargassum horneri* Agardh) のみで構成されており、流れ藻を構成する海藻の種による違いはなく、流れ藻の大きさ、漂流期間、採集場所による違いに基づいたナガレモヘラムシ個体群の比較が可能である。

そこで本研究では、東シナ海のナガレモヘラムシの個体群構造を解明することを目的とし、流れ藻の分布との関連においてナガレモヘラムシの分布特性を推察した。

### 方法

学術研究船淡青丸のKT10-1研究航海(2010年2月22日~26日, 3月1日~6日)およびKT11-1研究航海(2011年2月18日~24日)において東シナ海の流れ藻の採集調査を行った。調査定線を、黒潮、フロント域、大陸棚上の沿岸水域を通るように黒潮に垂直に設定した(Fig. 1)。また、調査定線に沿って流れ藻をブリッジから探索し、無作為的に採集を行った。ブリッジから目視で流れ藻の直径を推定するとともに、ORI ネット(口径1.6m, 目合1mm)を舷側より曳網し採集した。得られた流れ藻を真水で洗って葉上動物を落とし、それらを目合い500 μmの篩で回収するとともに流れ藻の湿重量を計測した。流れ藻から分離した葉上動物は、2010年は10%中性ホルマリンで、2011年は99%エタノールで固定した後、ナガレモヘラムシを選別した。ナガレモヘラムシ標本は、胸肢の本数、陰茎の有無、覆卵葉の有無および発達度合によって、マンカ幼生、幼体、雄、未成熟雌、成熟雌の5つに類別し、全長を測定した。

### 結果

調査の結果、東シナ海から得られた流れ藻は、2010年は湿重量  $2.2 \pm 4.6\text{kg}$  (平均  $\pm$  S.D.), 最大11.5kg, 最小0.1kg, 2011年は湿重量  $3.0 \pm 3.2\text{kg}$ , 最大13.2kg, 最小0.14kgであった。また、採集された流れ藻の総重量は2011年より2010年の標本で大きく、同様に調査年ごとのナガレモヘラムシ平均密度は2010年に  $1457.2 \pm 1959.3$  inds./kg w.w., 2011年は  $5.7 \pm 7.1$  inds./kg w.w. であり2010年に多かった。しかし、採集した流れ藻ごとに比較した場合、ナガレモヘラムシ個体数と流れ藻の湿重量や目視直径の間に相関はみられなかった。採集地点間で比較すると、中国大陸側の調査点では密度が低く、発育段階が進んでいる個体の割合

は少なかった。一方、黒潮に近い調査点では他の調査点に比べて著しく高密度で、発育段階についてもマンカ幼生を含んだ全ステージが観察された。

### 考察

田中(2006)によると、2004年3月の学術研究船白鳳丸の研究航海における調査では、流れ藻は湿重量  $1.8 \pm 1.4\text{kg}$ , ナガレモヘラムシの平均密度は  $343.0 \pm 387.2$  inds/kg w.w. であった。この報告と今回の調査の結果を合わせて考えると、流れ藻分布量の年変動とナガレモヘラムシ密度の年変動パターンは必ずしも一致しない。流れ藻毎のナガレモヘラムシ個体数と流れ藻サイズに相関が見られなかったことから、ナガレモヘラムシ個体数の変動は基質現存量に単純に依存しているわけではないと考えられる。葉上動物量と海藻量の間に関連がみられないことは、沿岸のホンダワラ類における葉上動物の出現パターンと同様であり、ナガレモヘラムシが集中分布することを示唆している。黒潮流域縁辺部に偏ったナガレモヘラムシの分布パターンは水温と関係している可能性がある。

また、中国沿岸では春の水温がナガレモヘラムシが繁殖可能となる13℃未満となるのに対して、ナガレモヘラムシが採集された調査点の水温は約16.8 - 22.7℃であった。ナガレモヘラムシの分布パターンは繁殖限界水温により分布が制限されていることに起因していると推察した。

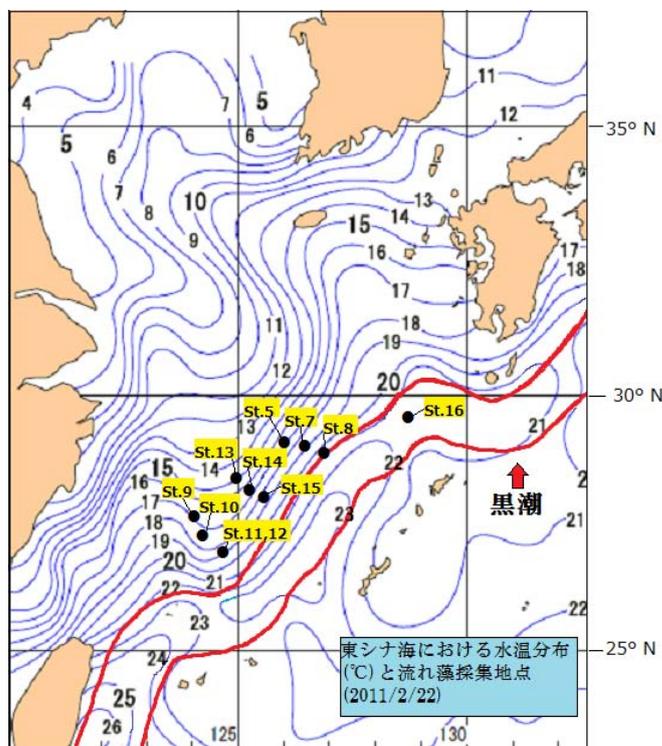


Figure.1 : 2011年2月の淡青丸KT11-1研究航海におけるナガレモヘラムシ採集地点と東シナ海の水温分布. 水温度分布は、海上保安庁の海洋速報を用いた。赤い線で囲まれる部分は、黒潮の流軸を示す。

## 下田市大浦湾におけるヒジキ穿孔性動物群集の生活型と空間分布パターン

村岡 祐輔 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 濱 健夫 (生命環境系)

### 背景

動物の生活様式を大きく分ける1つの基準に自由生活性、寄生生活がある。一般的に寄生というと、カイチュウやハリガネムシなどのように動物-動物間の寄生をイメージしやすいが、ゾウムシやタマバチなど植物-動物間の寄生もある。しかし、多くの植物-動物間の寄生の研究対象となっているのは陸上植物-昆虫であり、海藻-甲殻類での研究は限られている。本研究では褐藻の一種であるヒジキ *Sargassum fusiforme* を宿主とする穿孔性動物群集について分布パターンおよび生活型に関する基礎的な知見を得ることを目的とした。

### 方法

静岡県下田市大浦湾潮間帯において2012年1月13日に波当たりの弱い湾奥部、16日に波当たり強い湾口部(相互の距離は約200m)において採集を行った。潮間帯のヒジキ生息域に15cm×50cmの調査区をそれぞれ設置し、これを5cm×5cmの30区画に分割した。調査区内のヒジキはすべて実験室に持ち帰り、区画ごとに長さを測定した。ヒジキに穿孔している動物は、ヒジキを切開後に取り出し、5%の海水中和ホルマリン溶液で固定した。得られた動物は、できる限り低次の分類群まで同定した。巣については、仮根から巣穴までの長さ、巣穴の直径と長さ、開口数を計測した。動物を取り出した後、ヒジキは80℃で48時間乾燥した後、乾燥重量を測定した。これらのデータをもとに各動物種について、ヒジキ群落内での水平分布パターンとヒジキ藻体内での鉛直方向への分布を解析した。

### 結果

主にヒジキに穿孔していたのは、カイアシ下綱タレストリス属(89%)、ネクイムシ科1種コンブノネクイムシ(9%)、ウズムシ目1種(1%)の計3種であり、タレストリスは98%が湾奥部、ネクイムシは95%が湾口部、ウズムシは100%が湾奥部でそれぞれ採集された。それぞれの種はヒジキ中部側枝および下部主枝、下部主枝、主枝付近に特徴的に営巣していた。タレストリスの下部営巣個体は抱卵雌が80%とその大部分を占めていた。動物の体長と巣の規模を見ると、タレストリスでは巣の長さ、コンブノネクイムシでは巣の長さ並びに巣の直径に正の相関が見られた。タレストリスはヒジキ乾燥重量に対して1次関数的な個体数の増加が見られるのに対し、ネクイムシは指数関数的に増加した。

### 考察

今回得られた3種ではそれぞれ基質に嗜好性があることが示唆された。タレストリスに関してはヒジキ下部で孵化した後、分散すると考えられるが、抱卵雌のいた区画で個体数の増加が見られなかったため、ノープリウス幼生はプランクトン的な浮遊生活を経て、ヒジキに穿孔すると思われる。生殖をヒジキ下部で行うことにより、夏期のヒジキ流出がタレストリスの繁殖に与える影響は小さくなると考えられる。ネクイムシで集中的な分布が見られたのは、端脚類が浮遊幼生の現れない直達発生を行うことで、幼生が分散せずに親と同じ仮根に留まることに関連する可能性

がある。今後はヒジキ生長に伴う群集の形成過程を検証することで、種ごとの分布パターンが生じる機構をより詳細に明らかにすることが必要である。

## 農耕地土壌から発生する温室効果ガスに関する研究

寺本 卓央 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 廣田 充 (生命環境系)

### 背景・目的

現在、人間活動の活発化により大気中の温室効果ガス ( $\text{CO}_2$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{CH}_4$ ) 濃度は急激に増加している。その中でも農業分野から発生する温室効果ガス排出量は  $\text{CO}_2$  換算量で 51~61 億トンと見積もられており、人為起源の 13.5% を占める。この問題に対して世界各国で温室効果ガスの排出を削減する緩和策をとり、地球温暖化の進行を遅延させるために動きつつある。その 1 つが農耕地土壌への炭素の蓄積を増加させることである。光合成によって植物に固定された  $\text{CO}_2$  を残渣や堆きゅう肥などといった有機物で投入する。投入された有機物は土壌中の微生物によって大半は分解されるが、一部は安定な土壌有機炭素として蓄積される。すなわち、土壌への炭素投入量が分解される炭素量より多ければ土壌中に炭素が蓄積され温暖化緩和策とみなせる。

一方で、他の温室効果ガスの発生量が増加するという懸念がある。例えば、畑地では有機物に含まれる N が原因で硝化の副生産物もしくは脱窒の中間生成物として  $\text{N}_2\text{O}$  の発生量が増加する可能性が指摘されている。そのため、堆肥投入による土壌炭素蓄積効果と  $\text{N}_2\text{O}$  ガス発生との関係を統合的に評価する必要がある。 $\text{CO}_2$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{CH}_4$  など温室効果ガスの発生は土壌水分や地温などの環境要因に影響されるほか、肥培管理など圃場の管理形態にも影響される。農耕地の育成作物や利用土壌のタイプ、管理体制は多種多様である。そこで、本研究は、日本農耕地の土壌の代表的な土壌タイプである黒ボク土の堆肥連用圃場における  $\text{CO}_2$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{CH}_4$  の発生量の時間的変動や土壌水分と地温など環境要因との関係を定量的に評価することを目的とした。また、圃場管理による影響を調べるため、堆肥施用区と無堆肥区を設置し、温室効果ガスの発生量にどのように違うのかを検討した。

### 方法

#### 1. 温室効果ガス flux 測定

農業環境技術研究所内 (茨城県つくば市) の 15 年堆肥連用黒ボク土圃場に 2011 年 7 月 24 日に調査区 (28.5 m × 24.5 m) を設置した。調査区内に無堆肥区 (140 cm × 50 cm) を 4 か所に設置し、それ以外の場所に有機物として 7/28 に稲わら堆肥を投入し堆肥区とした。また、緑肥としてソルガム (*Sorghum bicolor* × *S. sudanense*) を両方の区に 8 月 11 日播種し、10 月 13 日に鋤きこんだ。そのため、調査期間は 7 月 29 日~10 月 13 日とした。温室効果ガス ( $\text{CO}_2$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{CH}_4$ ) 発生速度 (flux) の測定に密閉法を用いた。これは、チャンパー内の空気を一定時間ごとに採取後真空バイアル瓶 (15 ml) に注入し、赤外線ガス分析計やガスクロマトグラフィを用いて分析し、濃度の時間変化から flux を求める方法である。flux の時間的変動を調べるため、堆肥区の 2 か所、無堆肥区の 1 か所に設置した内径 20 cm の円筒型自動チャンパーを用いて 1 日 1 回午前 9 時ごろに自動ガスサンプリング装置によってガス採取を行った。小型データロガーによる地温と土壌水分連続測定も同時に行った。

それと同時に、面的バラツキを調べるため、堆肥区の 6 か所、無堆肥区の 3 か所にチャンパーを設置し、2 週間に 1 回手動でガスサンプリングを行った。サンプリング時の地温 (1 cm と 5 cm) と土壌水分 (0~10 cm) も測定した。サ

ンプリングしたガスは  $\text{CO}_2$  を二酸化炭素赤外分析計 LI 7000 (Li-Cor, Inc)、 $\text{N}_2\text{O}$  と  $\text{CH}_4$  はガスクロマトグラフィ GC14B FID、GC8A-ECD (SHIMADZU) で濃度 (ppm) を測定後、単位時間単位面積あたりの発生量に換算した。

#### 2. 無機態窒素測定

土壌無機態窒素 ( $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NH}_4^+$ ) の変動を知るために、堆肥区と無堆肥区の土壌深度 0~5 cm と 5~15 cm の土壌を 4 か所からサンプリングして混合した。その土 (乾土 5g 相当の生土) に 10% KCl (50ml、土壌:抽出液 = 1:10) を入れて 120 rpm  $\text{hr}^{-1}$  で 30 分振とうし抽出した。抽出液は AACS-II (BRAN LUBBE) を用いて無機態窒素の濃度を定量分析した。

### 結果・考察

$\text{CO}_2$  flux は 8 月 1 日に期間中の最大値 354.48  $\text{mg C m}^{-2} \text{hr}^{-1}$  が観測された。8 月中の  $\text{CO}_2$  flux は土壌水分との相関が高かったが、9 月以降の flux の減少傾向は地温との相関が高かった。 $\text{N}_2\text{O}$  flux は 8 月 20 日に最大値 426.76  $\mu\text{g N m}^{-2} \text{hr}^{-1}$  となった。 $\text{N}_2\text{O}$  flux の増減と土壌水分と地温との相関も  $\text{CO}_2$  と同様になった。8 月 30 日以降の  $\text{N}_2\text{O}$  flux は 31.69  $\mu\text{g N m}^{-2} \text{hr}^{-1}$  以下となり、調査期間中最も土壌水分が多かった 9 月 26 日も  $\text{N}_2\text{O}$  flux が急激に増加するのは観測されなかったことからこの時点での土壌水分との関係は小さいと言える。無機態窒素に関しては 8 月 30 日の時点では  $\text{NH}_4\text{-N}$  ( $\text{mg N kg soil}^{-1}$ ) より  $\text{NO}_3\text{-N}$  ( $\text{mg N kg soil}^{-1}$ ) の量が多かった。9 月 28 日の時点ではその関係が逆になっていた。 $\text{N}_2\text{O}$  flux は  $\text{NO}_3\text{-N}$  が多いと大きくなり、 $\text{NH}_4\text{-N}$  が多いと小さくなる関係にあった。 $\text{CH}_4$  flux は調査期間中、放出より吸収が主だった。

堆肥区と無堆肥区の flux の有意差を比較したところ、 $P > 0.05$  となり有意差はなかったので有機物投入による差は示せなかった。これは調査前に透き込まれた残渣や投入された稲わら堆肥が圃場内ではばらついてしまっているためだと考えられる。本研究は長年やっていた管理方法を変えた 1 年目のものなので、来年以降変化も経年的に変化していく可能性がある。そのため、今後も継続的に flux を測定していく予定である。

# 高山植物は環境変化にどう応答するか ~ チベット高原における低標高への移植実験 ~

廣瀬 明香 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 廣田 充 (生命環境系)

## 背景および目的

高山生態系は温暖化に脆弱な生態系とされ、世界各地の高山で温暖化による環境変化を想定した実験が行われている。それらの結果から生態系への温暖化影響は、植物の種や生育型、地域によって異なることが分かっている。地球の第3極と呼ばれる青海チベット高原には広大な高山草原生態系が存在し、環境変動がその生態系に及ぼす影響が懸念されている。また、この地域では放牧が盛んに行われ、植生はその影響を強く受けている。これまで青海チベット高原では、比較的標高の低い地域を対象として温暖化などの環境変化が与える影響に関する研究が行われてきたが、高標高域を対象とした研究例はない。高標高域は高山生態系の中でも特に環境変動の影響を受けやすい可能性があり、高標高域における環境変動の影響を解明することは極めて重要である。

そこで、本研究では将来の気温上昇が、この地域の高山植物群落に与える影響を理解するために、高標高域(3400,3600,3800 m)から低標高地(3200 m)へ植生と表層土壌(以下ミニ生態系とする)の移植実験を行い、植生の変化を調査した。また、各標高で植生変化に埋土種子がどのように寄与するかを理解するために、標高と放牧の有無に着目した土壌のまき出し実験を行った。

## 方法

**移植実験** 移植は2007年5月上旬に完了し、移植後1年と4年の夏季にポイントフレーム法を用いて出現種とその頻度を調べた。

**まき出し実験** 4標高(3600, 3800, 4000, 4200m)の禁牧区と放牧区で採集した土壌コアを、冷湿処理後、異なる4つの温度条件(5, 10, 15, 20 )下に3ヵ月間置き、発芽した実生の数を調べた。

## 結果と考察

**種の豊富さ** 各標高から移植した全てのミニ生態系で出現種数は増加し、3800 mで1.8倍と最も増加の幅が大きかった(Figure1)。これは、同地域で行われたオープントップチャンバー(OTC)を用いた先行研究の、気温上昇により出現種数が減少するという結果に反するものであった。OTCを用いた温暖化実験では気温上昇の他に、リターの蓄積や種子散布の抑制などの要因が働き、種の豊富さが減少する傾向がある。本研究ではそういった実験法による影響が少なかったため、気温の上昇が種の豊富さを上昇させる結果となった可能性がある。

**出現頻度** 全ての標高で減少した種がいた一方で、多くの種で出現頻度は増加した。その結果、出現頻度の変化量の積算値(純植生変化量)は全標高で正の値を示し、高標高ほどその値が大きかった(Figure2)。つまり、上昇した気温の幅が大きいほど、純植生変化量が増加していた。さらに、出現頻度が増加した種のみでみると積算値は高標高ほど大きくなり、減少した種のみでは高標高ほど小さくなった。これは高標高ほど減少した種が減り、より多くの種が

新たに出現したためである。また、その新規出現種の多くが3200 mでは観察されていない種、すなわち埋土種子から出現した可能性のある種であった。まき出し実験でも発芽数は高標高ほど多く、放牧区より禁牧区の方が多い結果となったことから、移植による温度上昇と放牧停止が埋土種子の発芽量を増加させた可能性が示唆された。

**種の構成比** 丈の高い種(イネ科、カヤツリグサ科)の全個体数に占める割合は、3400 mでは増加していたが、3600 mと3800 mでは減少していた。一方、丈の低い種(匍匐性植物)が占める割合は3400 mで減少し、3600 mと3800 mで増加する結果となった。しかし、全標高で丈の高い種の出現頻度は約65%とほぼ一定だった。まき出し実験では高標高ほど発芽数が多く、全発芽数のうち丈の高い種の占める割合は1割に満たなかった。以上のことから、高標高域では丈の低い種が温度上昇による埋土種子の発芽によって数を急激に増やしたと考えられる。

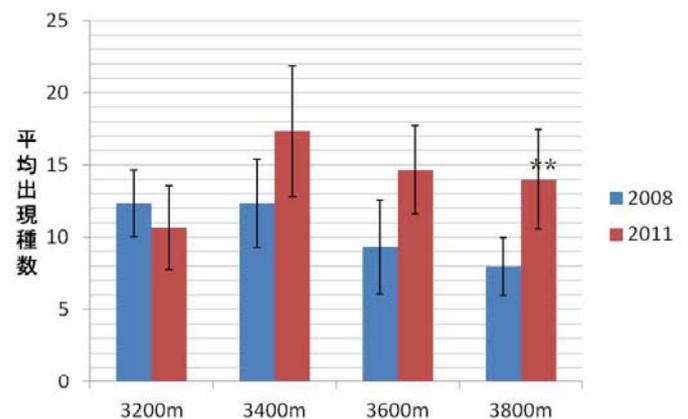


Figure 1: 種の豊富さの変化 (\*\* :  $p < 0.05$ )

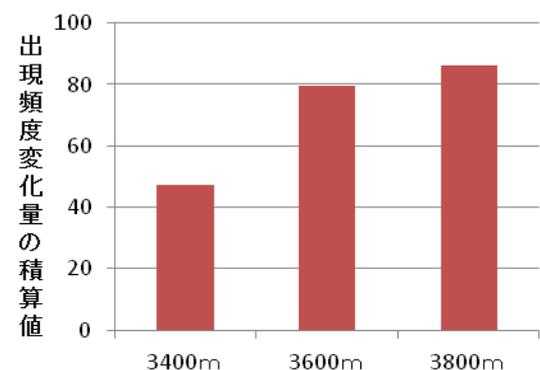


Figure 2: 純植生変化量

## 異なる遷移段階における林床植生と光環境の比較

渡邊 希香 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 廣田 充 (生命環境系)

### 背景および目的

林床では、林冠木が形成する森林構造の影響を強く受けてさまざまな微環境が形成されており、林床植物にとって重要な光環境の不均一性も高い。したがって、林床植生の分布や各林床植物の適応を理解するには、森林構造と林床光環境の関係を把握する必要がある。林床植物がどのように光環境に適応しているのか明らかにするため、これまでも種あるいは属レベルで多くの研究が行われてきたが、林床光環境の不均一性と林床植物の分布の関係を網羅的に調べた知見は少ない。そこで、本研究では優占種の異なる常緑針葉樹林と針広混交林を対象として光環境の不均一性と林床植物分布の関係を明らかにすることを目的とした。

### 方法

調査は、筑波大学菅平高原実験センターの固定調査区で行った。固定調査区には、アカマツが優占する林（アカマツ林）とアカマツに加えてミズナラやシラカバが優占する林（針広混交林）があり、両林内に本研究の調査区（50 m × 50 m）を設置した。各調査区において、2011年7月と9月に5（あるいは10）m毎に50 cm × 50 cmの方形枠を置き枠内の出現種（3 cm以上170 cm以下）とその個体数、自然高を記録し、同時に各方形枠の中心で光環境と土壤水分量を測定した。光環境は林床植物の直上（ササがある場合はササ上部）で撮影した全天写真を用いて、開空度を求めた。また、森林構造の解析には毎木調査データ（2010年）を使用した。

### 結果と考察

#### 1. 各林分の光環境

アカマツ林と針広混交林の平均開空度はそれぞれ6.2%、9.4%となり、アカマツ林の方が暗かった。両林では開空度の分布も異なっており、アカマツ林では開空度が4.6%と7.8%付近にピークがある二山型の分布を示し、混交林では10%付近にピークがある一山型の分布を示すことがわかった。（Figure 1）

#### 2. 木本の大きさと光環境の関係

中低木（胸高断面積100 cm<sup>2</sup>）の本数と開空度の関係は図2のようになり、アカマツ林では中低木が増えると暗くなった。このように、アカマツ林では林冠木ではなく中低木が林床光環境に直接的に関わっていることが示唆された。（Figure 2）

#### 3. 林床植物と光環境の関係

アカマツ林では4.6%、7.8%の両ピーク付近にミヤマウスラ、ジンヨウイチヤクソウなどが現れた一方、クモキリソウやベニバナイチヤクソウは前者のみ、ミツバツチグリやオカトラノオは後者のみに現れた。また、混交林では10%のピーク付近にチゴユリやオオバギボウシが現れ、マイズルソウやタチツボスミレはそれぞれ6.13%、7.16%と他種より広い範囲の光環境に現れた。このように、林床植物はわずかな光環境（ニッチ）の違いを利用して生育している可

能性が明らかになった。さらに、林床植物を形態ごとにまとめると、ロゼット型は暗い所、匍匐型は明るい所というように分布と光条件が特徴的な対応を示すことが分かった。このことから、林床植物はある光環境に適応した形態をしており、それが不均一な光環境での棲み分けを可能にしていると考えられた。

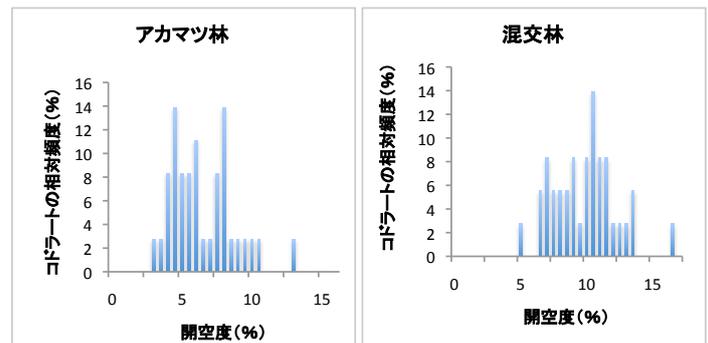


Figure 1: 各林分の光環境の頻度分布

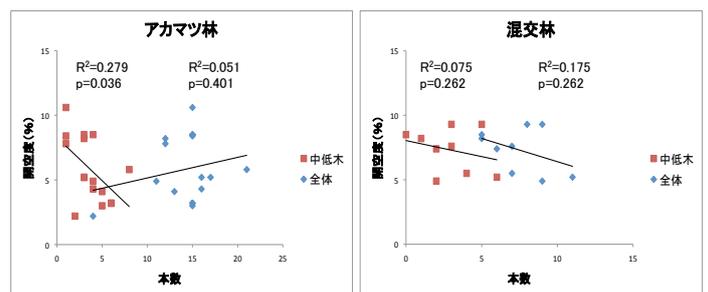


Figure 2: 中低木（胸高断面積100 cm<sup>2</sup>以下）の本数と開空度の関係

Variation of Cytoplasmic Incompatibility in *Wolbachia*-infected systems

沼尻 侑子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 徳永 幸彦 (生命環境系)

拡がり続ける *Wolbachia*

同種内の掛け合わせであるにも関わらず子孫が残せない場合がある。*Wolbachia* という共生細菌による細胞質不和合 (CI) が原因でしばしば子の致死が起こり、それは *Wolbachia* にとって都合の良い感染システムとなっている。図 1 では縦軸にメス親、横軸にオス親をとりそれらを掛け合わせた面積が次世代における子の割合となっている。CI は *Wolbachia* が感染を拡大するのに役立っているため、CI が強いほど *Wolbachia* は速く宿主集団中に感染拡大することができる。

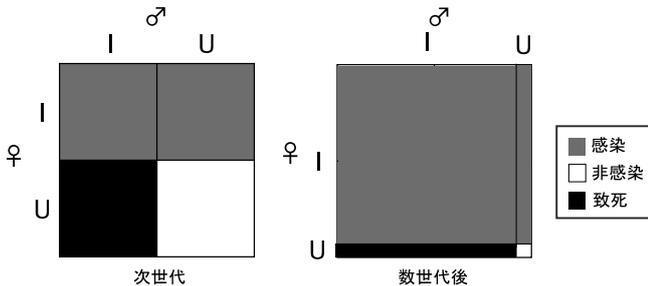


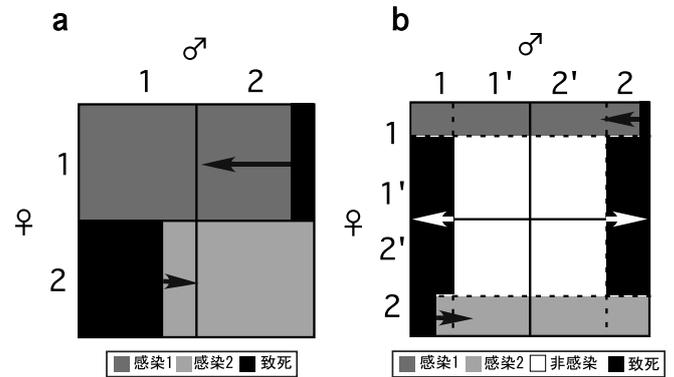
図 1: *Wolbachia* の感染システム (I: 感染 U: 非感染)

CI による致死はなぜ完全ではないのか

*Wolbachia* には複数の系統が知られている。そのため、異なる系統の *Wolbachia* に感染した宿主同士が交配することが考えられる。その場合、強い CI を示す *Wolbachia* ほど相手メス親の子の割合をより減らすことができ、宿主集団中で優位となる (図 2a 矢印)。より強い CI を示す *Wolbachia* が選択されて相手メス親の子の致死を完全にするものだけが残ると、異なる *Wolbachia* に感染した宿主間の掛け合わせでは完全な生殖隔離が起こることになり、*Wolbachia* が宿主の種分化のきっかけをつくりうる。しかし強い CI を示す *Wolbachia* が残るとは限らないことがある。不完全な伝搬が存在するときは *Wolbachia* が伝わり損なった分、感染子孫の割合は減ってしまうことになる (図 2b)。伝搬が不完全なときは、非感染個体に対する CI は強くなる必要がないとする先行研究もある (Turelli 1994)。つまり、不完全な伝播のもとでは CI は完全でないことがある (図 2b 白矢印)。実際に *Drosophila simulans* では、*Wolbachia* の伝搬が不完全であるために完全でない CI がみられている (Carrington et al. 2011)。

アカイロマメゾウムシでは CI が完全ではない

アカイロマメゾウムシ (*Callosobruchus analis*) を材料として致死率を調べたところ、本種でも完全でない CI がみられた。*C. analis* の 9 つの地域系統のうち、8 系統が *Wolbachia* に感染しており 1 系統は非感染であった。図 3 は孵化率 (CI レベルの指標) を *C. analis* の雌雄ペアごとに示したものである。非感染系統のメスと感染系統のオスとを掛け合わせて CI の強さを調べたところ、系統間だけでなく系統内でも CI の強さにはばらつきがみられた (図 3a)。この結果は CI



1, 2: 異なる *Wolbachia* 1, 2 にそれぞれ感染 1', 2': 不完全な伝搬による非感染  
図 2: 複数 *Wolbachia* の感染システム

が完全ではないことを示すので、Carrington et al. (2011) に基づけば *C. analis* では *Wolbachia* の伝搬が不完全であることが予測される。

不完全な CI は *Wolbachia* の伝搬では説明できない

*Wolbachia* の伝搬が不完全である場合、非感染個体が系統内に含まれるので系統内で掛け合わせをしたときに CI がみられるはずである。しかし *C. analis* では系統内で CI がみられなかった (図 3b)。これは *Wolbachia* の伝搬は完全であることを示し、不完全な伝搬がみられるという予測に反している。このため、*Wolbachia* の伝搬は CI が完全でないことの要因ではないといえる。他の要因として、例えば宿主が分集団として存在している場合は *Wolbachia* 間の接触がないために CI のばらつきが維持されていることが考えられる。

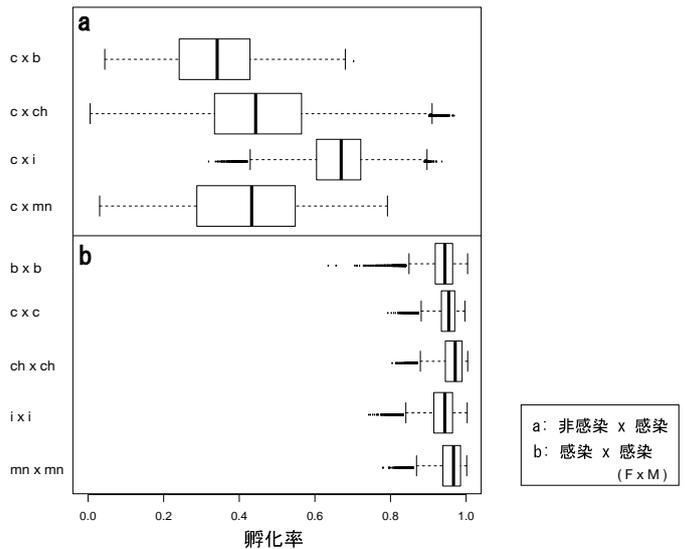


図 3: *C. analis* 系統間掛け合わせによる孵化率

## ハマキコウラコマユバチの寄主発見における色学習

川又 理沙 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 戒能 洋一 (生命環境系)

### 背景・目的

捕食寄生者は、寄主探索行動の寄主の発見において様々な情報を手がかりとして使用している。寄生蜂の *V. canescens* は色と寄主を結び付ける連合学習能力があり、*V. canescens* が自然界での寄主探索に視覚の手がかりを使っているかもしれないことが報告されている (Desouhant et al. 2010)。しかしながら、寄生蜂の寄主探索行動に関する研究は視覚の手がかりよりも寄主が食害した植物から出るにおいの手がかりに関するものが多い。

ハマキコウラコマユバチ (*Ascogaster reticulata*) (ハチ目: コマユバチ科) は茶の重要害虫であるチャノココクモンハマキ (*Adoxophyes honmai*) (チョウ目: ハマキガ科) の卵 - 幼虫寄生蜂である。この寄生蜂は、寄主の発見手段として鱗粉を使っている可能性が高いことを明らかにされているが、寄主発見の際に色を使うかどうかは未だ知られていない。

寄主探索行動を明らかにすることは生物的防除への天敵利用のための基礎データとして重要である。そこで本研究では、寄生蜂ハマキコウラコマユバチが寄主と色を結び付ける連合学習をするかどうかを調べることで、この寄生蜂が色を識別できるか、および色を寄主発見の手がかりとして使用している可能性を確かめることを目的として行った。

### 材料・方法

実験にはハマキコウラコマユバチの3・4日齢の未交尾雌を用いた。まずトレーニングでは9cmのガラスシャーレの中央に学習させたい色の色紙(緑、黒、青)を1枚置き、さらにその上にチャノココクモンハマキの卵塊をのせ、シャーレ内に寄生蜂1個体を放し、2分間産卵させ、色と卵の存在を結び付けさせた。

このトレーニングを10分間の間隔を開けて3回繰り返した後、10分間の間隔を開けて、生物検定を行った。検定はシャーレ上に学習させた紙とさせてない紙の計二枚(緑と黒、緑と青)をのせて行った。このとき色紙の上には卵塊は置かず、報酬がなくとも学習した色に来るかどうかを観察した。なおトレーニングにおいては、卵塊のみ毎回交換し、色紙は検定時に新しいものに取り換えた。

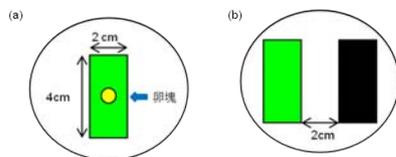


Figure 1: (a) トレーニング方法、(b) 検定方法

### 結果・考察

緑色と黒色での生物検定の結果、緑で学習させた個体は、黒よりも緑への訪問回数と訪問時間が有意に上回った。一方、黒で学習させた個体は、緑と黒の間で訪問回数と訪問時間において有意差は見られなかった。以上から一方の色ではあるが、緑に対して学習効果を示したのでハマキコウラコマユバチは緑と黒を見分けることができるということが推測される。

緑色と青色の組み合わせでは、緑で学習させた個体は緑と青の間で訪問回数や訪問時間における有意差はなかった。一方、青で学習させた個体は検定でも、緑よりも青への訪問回数と訪問時間において有意に値が高かった。緑で学習効果があまり見られなかったのは、ハマキコウラコマユバチは緑よりも青への選好性を持つ傾向があるといえる。また、青学習の結果から、ハマキコウラコマユバチは緑と青を認識することができ、青に対する学習能力を持つと考えられる。今後は他の色の組み合わせについても実験を行い、この寄生蜂における色学習の研究を進めて、ハマキコウラコマユバチの寄主発見行動の詳細を明らかにしていきたい。

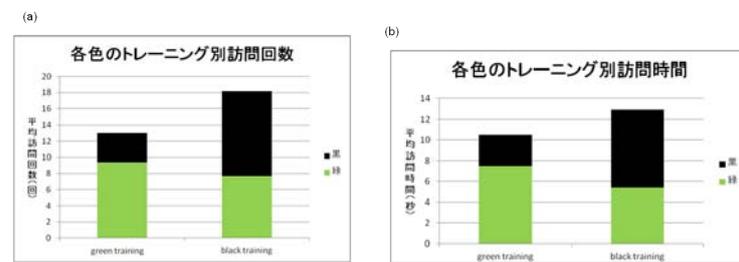


Figure 2: 緑と黒での生物検定の結果 (左: green training, 右: black training) (上段: 黒、下段: 緑)

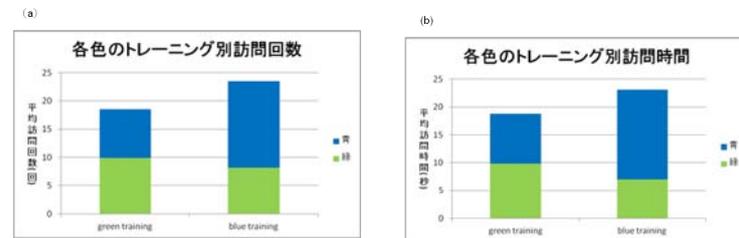


Figure 3: 緑と青での生物検定の結果 (左: green training, 右: blue training) (上段: 青、下段: 緑)

## ハマキコウラコマユバチのエサに対する学習効果の雌雄差

喜古 涼太 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 戒能 洋一 (生命環境系)

### 背景

ハマキコウラコマユバチ (*Ascogaster reticulata* Watanabe, 以下ハチ) は、チャを食害する害虫であるチャノコカクモンハマキ (*Adoxophyes honmai*) の卵-幼虫寄生蜂である。このハチは、エサや寄主卵塊などの報酬と、植物成分を連合学習できる事が知られている。そして自然界ではこの学習能力を利用し、効率よく探索行動を行っていると考えられている。またハチの生理状態の変化によって学習能力が変化する事も知られている。

本研究では、まずハチのオスとメスが連合学習を行う報酬として最適なエサ条件を調べるため、砂糖水の濃度を変えて条件付けを行った。さらにオスとメスの学習能力について調べるため、絶食させる時間を変化させて連合学習の実験を行い、オスとメスの比較をした。

### 方法

ハチは25の室内条件下で人工飼育を行った。雌雄ともに、羽化してからは直径15 cm、高さ12 cmの筒状のプラスチック容器に、蜂蜜と水をいれ飼育をした。そして、実験には3日齢または4日齢の成虫を供試した。

連合学習の条件付けを行う時は、直径9 cm、高さ2 cmのガラスシャーレにチャ葉抽出成分(1g/10ml エタノール)を5 μl 中心に線状につけ、中央に砂糖水を置き、ハチをシャーレの中に放ち吸わせた。この条件付けはハチが砂糖水を吸うまで行い、吸いはじめたら10秒以内に回収した。この条件付けを3回、10-20分の間隔をあけて行った。検定は3回目の条件付けの30分後に行い、線状につけた植物成分上を何cm歩行するか計測し学習の効果を調べた。

最適な砂糖水濃度の調査: ハチが連合学習を行う報酬として最適な砂糖水濃度を調べるため、ハチを3-4時間水とエサを与えない状態(絶食状態)にし条件付けを行ったオスとメスのハチを用いて検定を行った。検定は、濃度が10%、30%、50%の砂糖水を報酬として用いたものと、報酬を置かず植物成分を線状に処理しただけのガラスシャーレで条件付けを行うコントロールの4種類を行った。



Figure 1: 9cm のガラスシャーレを用いた検定

絶食時間での変化とオス、メスの比較: 絶食状態の時間によって学習効果が変化するかを調べ、そこからオスとメスの行動を比較するため、絶食させる時間を変化させ条件付けし、検定を行った。この時、先の実験から砂糖水の濃度によって得られる学習効果が異なったため、効果の高い砂糖水濃度で条件付けを行った。絶食させる時間は0.5時間、3時間、6時間、9時間の条件で実験を行った。そしてこれらの実験の結果からオスとメスの歩行距離を比較した。

### 結果・考察

オスでもメスでも砂糖水の濃度が低いほど、植物成分上の歩行距離は長くなった。この結果から水とエサを与えていない絶食状態において、水分の多いエサが報酬として効果的であると考えられる。

またオス、メス共に、絶食時間が長いほど、植物成分上の歩行距離は長くなった。この事から絶食時間が長いほど、学習の効果が高くなると考えられる。

そして絶食時間を変えた実験において、全ての条件でオスのほうがメスよりも長く植物成分上を歩行する傾向が見られた。そして9時間絶食では、有意にオスのほうがメスよりも歩行距離が長かった。このことからエサを報酬とした連合学習において、オスのほうがメスよりも学習した植物成分への反応が高いと思われる。この結果の原因は二つの理由が考えられる。一つはオスがメスよりもエサに対する欲求が強いという可能性である。これは、オスはメスの探索などをするために、活発に行動するのでエサによるエネルギーの補給がメスより重要であるためと予想される。もう一つは、メスはエサへの連合学習よりも卵塊への連合学習を重視するという事である。メスは記憶できる少ない情報の中に、エサに関する記憶よりも卵塊に関する記憶を重視するため、オスよりもエサに関する連合学習が弱かったのではないかと考えられる。

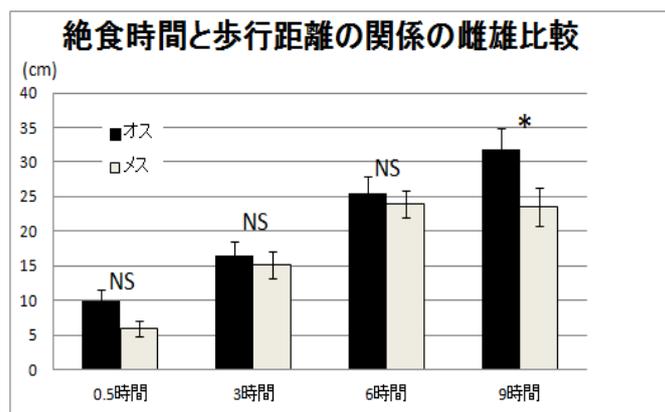


Figure 2: 絶食時間と歩行距離の関係と雌雄差 (\*は t 検定において 5%水準で有意差がある事を示し、NS は有意差がなかった事を示す。縦棒は ± SE を示す。)

カイコ NO 合成酵素遺伝子 (*BmNOS1*) の発現解析

松井 秋倫 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 戒能 洋一 (生命環境系)

## 背景・目的

昆虫免疫は細胞性免疫と体液性免疫から構成されている。体液性免疫は抗菌ペプチドの合成やフェノールオキシダーゼ系の活性化などに加え、近年気体である一酸化窒素(NO)の関与が示唆されてきた。NOは殺菌効果をもつ他、様々な経路へシグナルを伝達する因子として考えられていることから、昆虫免疫系においても大きな役割を担っていると示唆される。NOはNO合成酵素(NOS)によって合成され、カイコからクローニングされたNOS遺伝子(*BmNOS1*)は細菌感染に伴って発現量が上昇することが明らかになっている。*BmNOS1*からは既に異なる2種類のプロモーター領域がクローニングされ、1つずつ保存されたNF- $\kappa$ B結合様配列も異なっていた。そしてレポーターアッセイにより、それぞれの転写活性が異なることが示されている。本研究では*BmNOS1*プロモーターの遺伝子型の違いがカイコの脂肪体や血球での*BmNOS1*発現量に与える影響を調べることを目的とし、東海×朝日系統で*BmNOS1*プロモーターの遺伝子型を調べるとともに、リアルタイムRT-PCRによって*BmNOS1*発現量の比較を行った。

## 材料・方法

## 1. カイコサンプルの回収

東海×朝日系統のカイコ5齢幼虫に生理食塩水、大腸菌(グラム陰性)、もしくは黄色ブドウ球菌(グラム陽性)由来のペプチドグリカン(PGN)を100 ngずつ注射した。大腸菌をPGN(EC)、黄色ブドウ球菌をPGN(SA)とする。1h、4h、8h、12h後に解剖を行い脂肪体、血球を採集した。

## 2. プロモーター遺伝子型決定、シーケンス

下流にORFが繋がっていることを確認した2種類の*BmNOS1*プロモーターの遺伝子型(L型、S型とする)を判定できるプライマーを作成し、脂肪体からのDNAを鋳型としてPCRを行った。それぞれの遺伝子型のPCR産物はサブクローニングして配列を確認した。

## 3. リアルタイム RT-PCR

脂肪体、血球からRNAを抽出し、cDNA合成を行った。*BmNOS1*のORFでNADP-Hをコードする領域にプライマーを設計し、リアルタイムRT-PCRを行い、定常的に発現している*rp49*で補正をすることによって、*BmNOS1*の相対発現量を定量した。

## 結果

ゲノムPCRによってプロモーター遺伝子型調べたところL型のみを持つカイコ、L型とS型を持つLS型カイコが見つかり、その比は約6:4だったがS型カイコは見つからなかった。L型、LS型に由来するPCR産物配列は報告されているデータベース上の配列と等しかった。*BmNOS1*発現量を調べるためにリアルタイムRT-PCRを行った結果、PGN(EC)を注射したとき発現量がL型、LS型ともに4h、8hで顕著に増加した。しかしPGN(SA)では発現量の

増加は見られず、L型、LS型で発現量の明確な差は見られなかった。

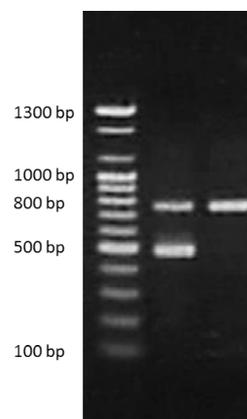


Figure 1: 電気泳動：左から分子量マーカー、LS型、L型

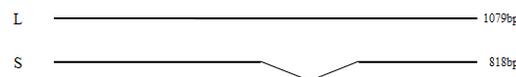


Figure 2: L型、S型プロモーター領域模式図

## 考察

先行研究のレポーターアッセイはToll経路由来の*BmRel*を用いた結果であり、今回グラム陽性菌由来のPGN(SA)を注射によってL型、LS型での*BmNOS1*発現量の比較が行えることを期待したが、両型ともに顕著な発現量の変化は見られなかった。これに関してはPGN(SA)濃度や、菌の種類の検討が必要である。一方、グラム陰性細菌由来のPGN(EC)を注射すると生理食塩水と比較し、発現量が増加した。つまり、*BmNOS1*はグラム陰性菌感染によって発現誘導されると示唆できる。グラム陰性菌に対する反応はImd経路が関わっていると示唆されているので、今後はImd経路に含まれる*BmRelish*を用いたプロモーター型による転写活性の違いの測定が必要と思われる。

# Entamoeba histolytica が有するオルガネラ、ミトソームに局在するタンパク質の局在メカニズムの解明

村上 佳隆 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 橋本 哲男 (生命環境系)

## 背景と目的

*Entamoeba histolytica* は嫌気性寄生原虫であり、Amoebozoa に属する。この *E. histolytica* の特徴の一つとして「ミトソーム」と呼ばれるオルガネラを持つことが挙げられる。ミトソームは Cpn60 や Hsp70 など通常の真核生物ではミトコンドリアに局在するタンパク質を持ち二重膜構造であるが、ゲノムをもたないためミトコンドリアが退縮的進化を遂げたものと考えられている。ミトコンドリアは、酸素依存的な酸化リン酸化による ATP 合成が行われる場であるが、嫌気性条件下で生活する *E. histolytica* のミトソームにこの機能はないため、ミトソームの生理的意義は不明であった。近年 Mi-ichi ら (2009) は *E. histolytica* のミトソームの網羅的プロテオーム解析を行い、ミトソームが硫酸活性経路の場であることを発見した。硫酸活性経路とは硫酸イオンから硫酸脂質の前駆体である 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) を合成する経路であり、*E. histolytica* のミトソームにはこの経路に参与する ATP sulfurylase(AS)、APS kinase(APSK)、Inorganic pyrophosphatase(IPP) という三種類の酵素が局在することが示された。さらにこれらの遺伝子の発現抑制株による解析で *E. histolytica* の増殖速度が低下したため硫酸脂質は *E. histolytica* の増殖に重要な物質であることが示唆された。

ミトコンドリア局在タンパク質の多くは N 末端に局在シグナルを持つとされるが、ミトソームでは局在シグナルの予測配列は存在するものの、詳細な局在メカニズムは不明である。そこで私は *E. histolytica* が持つ AS、IPP という酵素のミトソーム局在メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。この研究は以下の点で有意義である。1) AS や IPP などの硫酸活性経路に関わる酵素は *E. histolytica* の増殖に影響するため、医学的な面でこれらの酵素のミトソームへの局在メカニズムの知見が標的薬剤の探索につながる可能性がある。2) *E. histolytica* の AS は  $\delta$  プロテオバクテリア由来であり、ミトコンドリアの祖先である  $\alpha$  プロテオバクテリア由来ではないことが系統解析から示唆されている。このことから、AS の局在メカニズムの解明は、水平転移で獲得したタンパク質がいかにしてオルガネラへの輸送機構を確立するか、というより普遍的な生物学的命題の解明にも貢献し得る。

*E. histolytica* が持つ AS と IPP の局在シグナルの候補を探るために、*E. histolytica* の AS、IPP と他の真核生物の細胞質に局在する AS、IPP でアミノ酸配列をアライメントして比較すると、*E. histolytica* の AS と IPP では N 末端に伸長配列が見られた。そこで私は、これらがミトソームへの局在シグナルをもつかどうかを明らかにするために、*E. histolytica* の AS、IPP の N 末端伸長配列を削除し、C 末端に HA タグを付与したタンパク質 (AS $\Delta$ N-HA、IPP $\Delta$ N-HA) を発現するプラスミドを *E. histolytica* に導入して、N 末端伸長配列を削除した AS や IPP の局在パターンを解析した。さらに、今後 N 末端以外の部分に着目して実験を行う際に N 末端への HA タグ付与による影響が懸念されるため、C 末端に HA タグを付与したタンパク質 (HA-AS、HA-IPP) を発現するプラスミドも作製し、局在を確認した。

## 材料および方法

材料 *E. histolytica* の Cl6 株

ミュータントの作製 *E. histolytica* Cl6 株由来の cDNA を鋳型として PCR で AS、IPP それぞれをコードする遺伝子の必要な領域を増幅した。さらにそれらを pEhEx プラスミドに挿入し、*E. histolytica* の Cl6 株に取り込ませた。

タンパク質発現の確認 タンパク質発現の有無を確認するためウエスタンブロッティング (WB) を行った。このとき使用した抗体は HA 抗体と AS、IPP それぞれに対する抗体である。

局在の確認 蛍光顕微鏡を用いた IFA (Immunofluorescence assay) によりタンパク質の局在を確認した。ミトソームマーカーとして APSK 抗体を用い HA のシグナルと比較した。

## 結果と考察

AS $\Delta$ N-HA、HA-AS、HA-IPP はミトソームに局在した。一方 IPP $\Delta$ N-HA に関しては WB によりタンパク質の発現が確認されず、IFA でも蛍光が見られなかった。

AS は N 末端の削除ならびに HA タグの付与で局在が変わらなかったため、N 末端の伸長は局在シグナルではないと考えられる。また、タンパク質の発現が確認されなかった IPP $\Delta$ N-HA に関しては N 末端の削除部位がシグナル配列であったかどうか不明であるが、IPP $\Delta$ N-HA 株の mRNA を逆転写し PCR を行ったところ、電気泳動でバンドが確認されたため mRNA が翻訳されていないか、もしくはタンパク質が合成された直後に分解されている可能性が示唆される。N 末端への HA タグ付与は局在に影響が無いと思われる。

本実験では AS、IPP の N 末端に着目したが、*E. histolytica* の AS、IPP では *E. histolytica* 特異的と思われるモチーフがさらに確認されている。またミトソーム局在タンパク質は AS、IPP の他にも多く見つかっており、シグナル配列予測ソフトを用いた解析ではいくつかのタンパク質の N 末端がシグナル配列として予測されている。よって新たなモチーフや他のミトソーム局在タンパク質についても同様の手法で解析を進めていきたい。

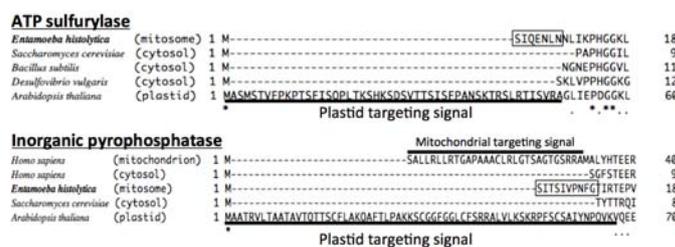


Figure 1: 様々な生物の AS、IPP で配列を比較すると、*E. histolytica* では AS、IPP 共に cytosol のタンパク質の配列に比べて伸長が見られる。なお、本実験で削除した配列はボックスで示した部分である。

---

## パセリの微生物分布に関する研究

小林 幸嗣 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小林 達彦 (生命環境系)

---

### 背景・目的

パセリは地中海原産のセリ科の植物で特有の芳香をもち、その葉から茎、そして根にかけて乾燥させても食べられるが、生食されることも多い。その芳香成分にはアピオール等の精油成分や、殺菌活性等の様々な生理活性をもつ二次代謝産物などが含まれる。そのため、パセリ表面は微生物が付着して生育するために快適とは考えにくい環境である。しかし、パセリの葉に何らかの微生物が付着していた場合には、それらの微生物はパセリ表面上で生育し得るために、特殊な性質をもつ可能性が考えられる。本研究では、パセリの葉にはどのような微生物分布が見られるかを明らかにすることを目的にした。

### 方法・結果

パセリの茎葉を分離源として、 $10^{-1}$ – $10^{-2}$  の段階希釈倍率で滅菌水に懸濁したものを培地に撒布して培養を行ったところ、コロニー形成が見られた。コロニーを単離し、その染色体 DNA を抽出した。PCR で 16S rRNA 遺伝子を増幅し、シーケンスによって解析したところ、多様な微生物の存在が確認された。

### 今後の予定

各微生物の性質をさらに詳しく調査していく予定である。

---

## 植物由来生理活性物質の微生物による代謝

牧田 貴史 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小林 達彦 (生命環境系)

---

### 背景・目的

植物には多種多様な構造を有する生理活性物質が存在する。そのような物質には抗菌作用、抗酸化作用、抗ガン作用など疾病予防・治療への効果が認められ、機能性食品や医薬品等に利用されているものがある。しかし、これらの物質の明確な作用機序はもとより、それらの代謝・分解機構は未だに明らかにされていない。

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

### 方法・結果

植物由来の生理活性物質を単一栄養源とした培地に各所の土壌等を加え、培養を行った。得られた菌体培養液を液体培地と同組成の寒天培地上に塗布し、生育したコロニーを新しい寒天培地に植え継ぐことで、菌株を単離し、植物由来の生理活性物質を代謝できる微生物のスクリーニングを行った。培養した菌体から調製した細胞懸濁液と基質とを混合し休止菌体反応を行った結果、HPLCにより基質の減少を確認した。また、研究室保存菌株の培養も行い、同様に休止菌体反応を行った。基質の減少量の多い菌を植物由来の生理活性物質の代謝能力の高い菌として選抜した。

### 今後の予定

植物由来の生理活性物質の代謝能力の高い菌を選抜し、その菌株を用いて培養条件を検討し、植物由来の生理活性物質の代謝に関わる酵素の精製を行う。

## 枯草菌由来 NRPS の機能解析に関する研究

庄 葉 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小林 達彦 (生命環境系)

### 背景および目的

枯草菌などの一部のグラム陽性菌は、ペプチドグリカンとともに細胞壁を構成するテイコ酸に D-アラニンを結合させる一連の反応に関わる *dlt* オペロンを持っている。*dlt* オペロンは *dltABCD* の 4 つの遺伝子で構成される。DltA はキャリアタンパク質である DltC のホスホバンテテイン補欠分子族に D-アラニンを結合する。DltD は DltC および DltA とコンプレックスを形成し、DltC への D-アラニンの結合反応を補助するシャペロンとして機能する。また、チャネルの機能をもつ膜タンパク質である DltB により、D-アラニンと結合した DltC は細胞外へ輸送され、最終的に細胞壁構成成分であるテイコ酸-D-アラニンができる。

DltA の反応は、ATP 依存的に D-アラニンを活性化して D-アラニル-AMP 中間体に変換した後、キャリアタンパク質に D-アラニン (アミノ酸) を付与する反応であり、non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) の特徴と類似している。本研究ではその詳しい機能解析を行うことを目的としている。

### 方法および結果

枯草菌由来 DltA の発現用プラスミドを大腸菌に導入し、得られた形質転換体の大量培養を行った。得られた菌体を超音波破碎処理して無細胞抽出液を調製し、カラムクロマトグラフィーにより DltA を精製した。なお、酵素活性測定は反応産物を定量することにより行った。

### 今後の予定

SDS-PAGE 上で単一になるまで精製した大量の DltA を用いて、酵素学的諸性質の検討を行う。

## 核酸修飾酵素に関する研究

大方 知 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 橋本 義輝 (生命環境系)

### 背景および目的

生物の細胞内で機能する核酸関連酵素には様々な種類のもので存在する。主要な働きをする酵素には、それぞれの生物に共通に存在するものも数多くあるが、生物種に特有な酵素や機能の異なるものなども多数存在する。ユーカリアに特異的であると報告されてきた核酸修飾酵素がバクテリアにも存在することが明らかになるなど、新たな事実が発見されてきている。しかしながら、生物界の第三のドメインであるアーキアにおける核酸修飾酵素の研究はあまり多くはなされていない。

アーキア特有の修飾核酸の生合成に関与する酵素をコードする遺伝子の下流に存在する遺伝子の機能はこれまで不明であったが、最近、その遺伝子産物もアーキアに特有な核酸の修飾酵素であることが最近判明した。しかし、反応機構解析などの詳細は依然として未解明のままである。本研究では、本酵素の詳しい機能解析を行うことを目的としている。

### 方法および結果

ゲノム情報を基に設計したプライマーを用い、目的遺伝子を PCR により増幅後、発現用ベクターを構築した。発現用大腸菌を宿主として本発現ベクターを導入し、得られた形質転換体に対し IPTG を添加し培養した結果、目的タンパク質は可溶性画分に発現したものの、大部分は不溶性画分に発現した。そのため、可溶性画分への発現量を増大させるためにいくつかの条件検討を行った。その結果、目的タンパク質の可溶性画分への発現量を増加させる最適培養条件を確立することに成功した。本条件で大量に培養を行い、得られた菌体を超音波破碎して無細胞抽出液を調製した。現在、各種クロマトグラフィーを利用した精製方法を検討中である。

### 今後の予定

SDS-PAGE 上で単一になるまで精製し、大量に調製した精製標品を用いて、本酵素の酵素学的諸性質の検討を行う。

# 枯草菌ストレスシグマ因子 SigB 制御下にある低分子 RNA の同定と機能解析

堀 博 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中村 幸治 (生命環境系)

## 背景・目的

真正細菌において、50~500 nt 程度の non-coding RNA (sRNA) は相補的な配列をもつ mRNA に結合して翻訳を阻害するなどの作用機構をもつ。グラム陰性細菌である大腸菌では 100 以上の sRNA が同定され、さらに機能解析が行われたことにより、sRNA がストレス応答に関与していることが明らかになった。sRNA は翻訳の過程を経ずに機能するため、迅速なストレス応答が可能であると考えられている。

グラム陽性細菌である枯草菌は環境中で様々なストレスにさらされているため、sRNA が枯草菌のストレス応答において重要な役割を担っている可能性がある。SigB 転写因子は、グラム陽性細菌においてのみ存在し、ストレス応答に必要な遺伝子の発現を促進する。

本研究では枯草菌の SigB 制御下にある sRNA の同定を目的とし、枯草菌での deep sequencing (Irnov I, et al. 2010) の結果から明らかになった新規 sRNA 候補の内、上流に SigB 転写因子の認識配列のコンセンサ配列をもつものについて発現様式を解析した。

## 方法・結果

sRNA には標的 mRNA が sRNA のコード領域から離れて存在するもの (trans-encoded sRNA) または逆鎖の遺伝子の mRNA を標的とするもの (cis-encoded sRNA) がある。本研究で対象とする sRNA の候補の内、trans-encoded sRNA と考えたのは、*ncr2360* (*rpsD-tyrS* の遺伝子間に位置する) で、cis-encoded sRNA と考えたのは、*ncr1296* (*opuBD* 逆鎖に位置する)、*ncr1265* (*yutK* の逆鎖に位置する)、*ncr1006* (*yoeA* の逆鎖に位置する) であり、どれも上流に SigB 転写因子の認識配列のコンセンサ配列をもつ。

上記 sRNA 候補がストレス下で発現することを確かめるために、ノーザンブロット解析を行った。プローブは、それぞれの sRNA のコード領域内を PCR で増幅して得られた DNA 断片を鋳型に用いた。また RNA サンプルは、(I) LB 培地にエタノールを終濃度 4%、または、(II) SMM 培地に NaCl を終濃度 0.4 M (浸透圧ストレス) を加えてから、それぞれ 0、10、及び 30 分後に集菌し、抽出した RNA を用いた。

*ncr2360* のコード領域を標的とする DNA プローブを用いたとき、(I) 及び (II) の両条件下でストレスを与えた後 10 分で約 210 nt のバンドの発現量が著しく上昇していた。また *rpsD* のコード領域を標的とする DNA プローブでは、図の (1) が主要なバンドとして検出され、(2) のバンドはほとんど検出されなかった。*tyrS* を標的とするプローブでは (3) のバンドは確認できたが、(4) のバンドは確認できなかった。

*ncr1296* を標的とするプローブを用いたとき、(II) の条件下でストレスを与えた後 10 分では、800~4000 nt の範囲の複数のバンドの発現量が上昇していた。その一方で、*ncr1296* の逆鎖に位置する *opuB* オペロンのサイズ (約 3550 nt) に近い約 3600 nt のバンド (5) は発現が抑制されていた。

*ncr1265* のコード領域を標的とするプローブを用いたとき、約 200 nt のバンドが (I) の条件下でのみ、(6) のサイズに近い約 750 nt のバンドが (I) 及び (II) の両条件下

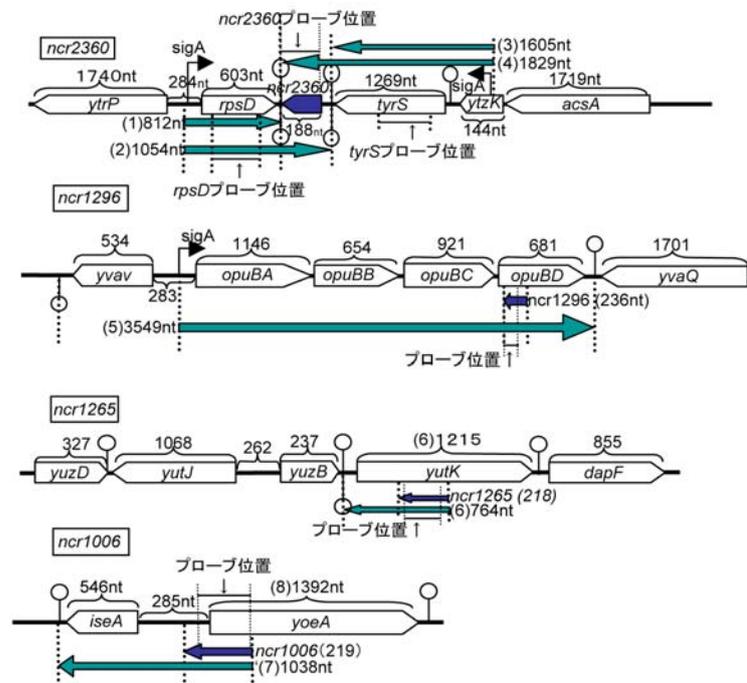
でストレスを与えた後 10 分で発現量が上昇しているのが確認できた。

*ncr1006* のコード領域を標的とするプローブを用いたとき、(I)、(II) の条件下では (7) のサイズに近い約 1050 nt のバンドをストレス添加後 10 分に検出した。

## 考察

*ncr2360* は検出したサイズ (約 210 nt) から主に下流のターミネーターで止まることが予測され、周囲の遺伝子のリードスルーの量が低いことなども併せると単独で発現する trans-encoded sRNA であると考えられる。一方、*ncr1296* については浸透圧ストレスを与えた直後で逆鎖の *opuB* オペロンの発現の抑制をしている可能性が示唆された。*ncr1265* 及び *ncr1006* についてはそれぞれ (6) と (7) が逆鎖の遺伝子の 5' 末端に向かって転写され、翻訳の制御に関与している可能性がある。*yutK* は Na<sup>+</sup>/ヌクレオチドの共輸送体で、*yoeA* は排出系トランスポーターであることがそれぞれ配列から予測された。

本研究では枯草菌において trans-encoded sRNA と考えられる *ncr2360* と、cis-encoded sRNA と考えられる *ncr1296*、*ncr1265* 及び *ncr1006* がストレス下で発現することを確認し、それらが SigB 制御下にあることを示唆した。今後、遺伝子破壊及び高発現性株などを作成し、機能解析を行う。



## ミモシンのアレロケミカルとしての作用への活性酸素の関与

福島 悠介 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 松本 宏 (生命環境系)

### 背景および目的

ミモシンはチロシンアナログの非タンパク構成アミノ酸で、オジギソウ属やギンネム属の葉や種子に多く含まれている。ミモシンは、その含有植物を食した家畜に病的症状を発現させることが知られ、動物では、DNA複製阻害、活性酸素発生の誘導、アポトーシスの誘導、金属イオンのキレート化などの報告がされている。故にミモシンの医薬品への利用が期待されている。

一方で、植物では、ミモシンはアレロケミカルとしての働きも推定されている。アレロケミカルとは、植物の二次代謝の過程において生成され、土壌や大気中に放出することで他の植物の生育等に対して影響を及ぼす化合物のことをいう。これまで、ミモシンはレタスの生育抑制作用があることが報告されたが、作用の詳細は明らかになっていない。

そこで、本研究では、ミモシンのアレロケミカルとしての作用メカニズムが活性酸素の発生と関連するかについて解析することを目的とした。

### 材料

#### 供試植物

- レタス (*Lactuca sativa* L. cv. Great Lakes 366)
- メヒシバ (*Digitaria adscendens* Henr)
- オヒシバ (*Eleusine indica* L. Gaerth)
- シコクビエ (*Eleusine coracana* L. Gaertn)
- キュウリ (*Cucumis sativus* L. cv. Shimoshi-razujibai)
- イヌビエ (*Echinochloa crus-galli* var. caudata)
- コムギ (*Triticum aestivum* L. cv. Norin61)

#### 供試薬剤

- ミモシン (3-Amino-3-hydroxy-4-oxo-1-pyridinepropanoic acid)

### 実験方法

#### ・生物試験

発芽種子を、培養管に作成した5濃度のミモシンを含んだ0.5%寒天培地に移植し、グロースチャンパー(12h/12h, 25℃/20℃)において生育させ、ミモシン処理後3日後(シコクビエのみ5日間)の茎葉と根部の伸長を測定し、GR<sub>50</sub>値(植物の生育が50%阻害される薬剤濃度)を求めた。

#### ・Evans blue 解析

1、2、3、4日間ミモシン処理を行ったレタスとコムギの根部を洗浄した後、先端から長さ0.5cmもしくは1cmのところを切り取った。その根部切片を0.25% (w/v)のEvans blue溶液に1時間室温条件下で浸漬した。その後、根を蒸留水で洗浄し、N,N-ジメチルホルムアミド溶液中に、30分暗室にて24時間浸漬で根部のEvans-blueを抽出した。その後、600nmの吸光度を測定した。

### 結果および考察

#### ・生物試験

供述したすべての植物種において、ミモシン処理によって根部の伸長が抑制されたが、レタスでは最も抑制が見られ、コムギでは抑制が少なく、GR<sub>50</sub>値は各々16 μM、109 μMであった。茎葉部においては、コムギとキュウリにおいてのみ、ミモシン処理による生育抑制がみられたが、ほかの植物種においては、ミモシン処理の影響をほとんど受けなかった。これらの結果より、コムギをミモシン耐性種、レタスをミモシン感受性種として以降の作用メカニズム解析を行うこととした。

#### ・Evans blue 解析

感受性であるレタスにおいては、2日後からミモシン処理によってEvans blue吸収量が増加し、死細胞数の増大が確認された。一方で、耐性種であるコムギにおいては、ミモシン処理によるEvans blue吸収量の増加は見られず、死細胞数が増加しなかった。

### 今後の予定

ミモシンを処理したレタス、コムギにおいて活性酸素発生の検討をするため、過酸化脂質量やスーパーオキシド発生の蛍光顕微鏡観察を行うことで、ミモシンの毒性作用メカニズムをさらに詳しく調べる予定である。また、ミモシン処理にアポトーシスが誘発される可能性についても調べる予定である。

## 薬用植物数種における植物生育抑制活性を有する揮発性物質の同定

松原 陽佑 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 松本 宏 (生命環境系)

## 背景と目的

植物が環境中に放出する化学物質が、植物体周辺環境に存在する他の植物種へ何らかの生理・生化学的な作用を及ぼすことがある。アレロパシーと呼ばれるこの作用は、放出される化学物質(アレロケミカル)の生理活性によって引き起こされ、これまでに数多くのアレロケミカルが同定されている。これらアレロケミカルの主な放出経路は、根からの滲出、雨や霧滴による植物体残渣等からの溶脱、葉等からの揮散に分けられる。これらの内、滲出物と溶脱物については古くから研究がなされてきたが、揮散する物質(揮発性物質)については、揮散後大気中で拡散して濃度が下がるため、アレロパシー作用を及ぼすほどの影響は殆ど無いと考えられてきた。近年になって、植物体から放出される揮発性物質が周辺に生育する植物の生育抑制を引き起こしていることを示唆する報告がなされたものの、滲出物・溶脱物に比べると研究報告例は非常に少ない。また、アレロケミカルは除草剤や成長調節剤の開発に利用出来る可能性がある。特に揮発性物質に関しては、アレロパシー作用に関する研究報告例が比較的少ないことから、新規の生理活性を有する物質を見出せる可能性があり、リード化合物として除草剤開発に応用できる可能性もある。

そこで本研究では、生理活性を有する二次代謝産物を豊富に含む薬用植物を対象として、植物生育抑制作用を有する揮発性物質の探索とその同定、また、除草剤開発に有望な生理活性を持つ揮発性物質の作用性を検討することを目的とした。

## 材料

## 検定植物:

レタス [*Lactuca sativa* L. cv. Great Lakes366]

## 薬用植物:

シククシャ [*Amomum xanthioides*]ウイキョウ [*Foeniculum vulgare*]ダイウイキョウ [*Illicium verum*]カノコソウ [*Valeriana fauriei*] を含む 25 種

## 揮発性物質(標品)

1,8-cineole, -pinene, -terpineol, -pinene, anethole, borneol, bornyl acetate, camphene, camphor, fenchone, limonene, myrcene

## 実験項目

## 1. バイオアッセイ(ディッシュパック法)

薬用植物を磨砕し、6穴マルチディッシュの一つの穴に添加した。その他の穴には湿らせた紙を敷き、その上にレタスの発芽種子を5粒ずつ入れ、蓋をして密閉した。25・暗条件で3日間生育させ、胚軸長と幼根長を測定した。また、比較対象として磨砕物を添加しないコントロールも同時に作製し、胚軸長と幼根長の成長率を算出した。

## 2. Head Space GC-MS 分析

植物生育抑制作用が見出された薬用植物を磨砕し、バイアル瓶に入れて密封した。これを25・暗条件で24時間

静置し、バイアル瓶のヘッドスペースに十分に揮発性物質を充満させ、ガスタイトシリンジで採取した。ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)によって分析し、薬用植物から放出される揮発性物質を同定した。

## 3. 同定された揮発性物質による植物生育抑制作用の検討

バイアル瓶にレタスの発芽種子を5粒ずつ入れ、コントロール(0 ppm)を含む6濃度に調製した揮発性物質溶液をろ紙に染みこませて封入した。この時、溶液を染みこませたる紙がレタス発芽種子に直接触れないようにした。25・暗条件で3日間生育させ、溶液濃度別に胚軸長・幼根長を測定した。各濃度別にコントロールと比較して成長率を算出し、GR50値を求めた。

## 結果

## 1. バイオアッセイ(ディッシュパック法)

25種の薬用植物の内、シククシャ種子、ウイキョウ果実、ダイウイキョウ果実、カノコソウ根の磨砕物を用いたところ、レタス発芽種子への強い生育抑制作用が確認された。シククシャ種子の磨砕物は胚軸及び幼根に対して非常に強い生育抑制作用を与え、ウイキョウ果実・ダイウイキョウ果実の磨砕物は胚軸に対して、カノコソウ根は胚軸及び幼根に対して強い生育抑制作用を与えた。また、これら生育抑制作用の強弱は磨砕物を添加した穴からの距離依存的に変動した。

## 2. Head Space GC-MS 分析

上記4種の薬用植物から放出される揮発性物質をGC-MSによって分析したところ、シククシャ種子からは borneol, camphor を始めとする7種の揮発性物質が同定された。ウイキョウとダイウイキョウからは anethole と fenchone, カノコソウからは -terpineol, -pinene が新たに同定され、計12種の揮発性物質が同定された。

## 3. 同定された揮発性物質による植物生育抑制作用の検討

同定された揮発性物質を対象としてレタス発芽種子に対する生育抑制活性を調べたところ、シククシャに含まれる borneol や camphor, ウイキョウに含まれる anethole, fenchone 等が強い植物生育抑制作用を示すことが分かった。

## 今後の展望

これまでに確認された植物生育抑制活性が高い揮発性物質の内、植物の生育に対する影響の知見が少ない anethole 等を対象として、その植物生育抑制作用と活性酸素発生による酸化傷害の関与について検討していく予定である。

## 除草剤キンクロラックと合成オーキシシン剤との作用性比較

三輪 恭子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 松本 宏 (生命環境系)

## 背景・目的

キンクロラックは、オーキシシン型除草剤に分類されている水稲・芝地用の薬剤である。広葉植物にオーキシシン剤を処理すると、葉部のカーリングなど、特徴的な症状が観察される。キンクロラックでも同じ症状が観察されることから、オーキシシン剤に分類されている。しかし本研究の先行研究により、イネ科植物におけるキンクロラックの作用機構は、エチレン生合成系を促進することで蓄積するシアンにより生育抑制を引き起こすとされる他のオーキシシン型除草剤と同一ではなく、活性酸素 (ROS) による酸化障害や細胞死が主経路である可能性が示唆された。さらに、キンクロラックによる ROS 発生にはミトコンドリア機能障害が関与している可能性も示唆されたが、詳細は明らかになっていない。

また、現在、除草剤の開発段階において作用機構の解析にマイクロアレイが利用されている。マイクロアレイは薬剤処理により変動する植物体の遺伝子発現を網羅的に検出することができる。

本研究では、キンクロラックによる ROS 発生経路を明らかにするため、イネ科であるトウモロコシを用いて、ミトコンドリア電子伝達系における呼吸阻害の有無をオーキシシン型除草剤 2,4-D との比較により検討した。さらに、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、キンクロラック処理による遺伝子発現変動をマイクロアレイで網羅的に解析し、発現パターンを他の合成オーキシシン剤と比較することでキンクロラックの作用機構に迫ることを目的とした。

## 材料

## 供試植物:

トウモロコシ (*Zea mays* L. cv. Honey Bantam)シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh)

## 供試薬剤 (合成オーキシシン剤):

キンクロラック (3,7-Dichloro-8-quinolinecarboxylic acid)

2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)

NAA(Naphthalene acetic acid)

ピクロラム (4-Amino-3,5,6-trichloropicolinic Acid)

## 方法

## 1. 根部における呼吸阻害の検討

暗所で播種後 4 日間育成したトウモロコシ根部を、0、10、50、100  $\mu\text{M}$  キンクロラック溶液および 2,4-D 溶液 (いずれも、含 0.2%DMSO、0.8%アセトン) に 12 h 浸漬する処理を暗所で行った。処理後、根端部 0.08 g(FW) を HEPES buffer 3 ml に加え、酸素電極を用いて根部の呼吸速度を測定した。

## 2. ミトコンドリア電子伝達系における呼吸阻害の検討

暗所で 4 日間育成したトウモロコシの根部 50 g(FW) を磨砕液 100 ml とともに磨砕、濾過した。濾過液を 1000  $\times$  g で 10 分間遠心分離、更に上清液を 12000  $\times$  g で 15 分間遠心分離し、沈殿物の粗ミトコンドリア画分を得た。沈殿物は洗浄液 30 ml に懸濁後 250  $\times$  g で 5 分間遠心分離し、更に上清液を 6000  $\times$  g で 15 分間遠心分離することで得ら

れた沈殿物を、反応液 1 ml に懸濁しミトコンドリアサンプルとした。

反応液 3 ml にサンプル、呼吸基質であるコハク酸、NADH および ADP、さらに阻害剤であるアジ化ナトリウムを順次加えながら、酸素電極により呼吸速度を測定し、抽出後ミトコンドリアの正常な呼吸機能を確認した。

オーキシシン剤のミトコンドリア呼吸能に対する作用を検討するため、反応液にサンプル、NADH、ADP、オーキシシン剤、アジ化ナトリウムを順次添加し、呼吸速度を測定した。オーキシシン剤として 0、10、100、1000  $\mu\text{M}$  キンクロラック溶液および 2,4-D 溶液 (いずれも、含 20%DMSO、80%アセトン) を用いた。

## 3. マイクロアレイによる遺伝子発現変動の網羅的解析

播種後約 1 カ月のシロイヌナズナ茎葉部を、0~200  $\mu\text{M}$  濃度域のキンクロラック、2,4-D、NAA、ピクロラム各溶液 (いずれも、含 0.2%DMSO、0.8%アセトン) に 2 h 浸漬する処理を行い、処理後 6 日目の新鮮重から GR40 値を算出した。シロイヌナズナ茎葉部に GR40 濃度の各オーキシシン剤を 20、40 分浸漬処理後、葉部から totalRNA を抽出し、マイクロアレイ解析に供した。totalRNA 抽出には QIAGEN RNeasy Plant Mini kit を用いた。

## 結果および考察

## 1. 根部における呼吸阻害の検討

根部においてキンクロラックは処理濃度依存的に呼吸速度を低下させる傾向が確認できた。一方、2,4-D ではこのような傾向は見られなかったことから、トウモロコシの根部呼吸系において 2,4-D は抑制作用を持たないのに対し、キンクロラックは酸素消費を抑制する作用を持つことが分かった。

## 2. ミトコンドリア電子伝達系における呼吸阻害の検討

根部の結果同様、ミトコンドリアにおいてもキンクロラックは処理濃度依存的に呼吸速度を低下させる傾向が確認できた。一方、2,4-D ではこのような傾向は見られなかったことから、キンクロラックはミトコンドリアに直接作用し、呼吸機能の低下を引き起こしている可能性が示唆された。

先行研究で示唆されたキンクロラック特有のイネ科植物における ROS 発生について、本研究により、ミトコンドリア電子伝達系にキンクロラックが直接作用し呼吸機能障害を引き起こすことで ROS を発生させている可能性が示唆された。しかしながら、キンクロラックによるミトコンドリア呼吸阻害は濃度依存的であるものの、根部において確認された呼吸阻害よりも弱いため、ROS 発生経路は他に存在する可能性もあり、さらなる検討が必要である。

## 今後の予定

現在、各オーキシシン剤処理後のシロイヌナズナから totalRNA 抽出を行っている。今後は抽出した totalRNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、各オーキシシン剤による遺伝子発現パターンから、作用機構の比較・検討を行う予定である。

## ミトコンドリア DNA 突然変異による呼吸欠損が腫瘍の表現型に与える影響

雨宮 萌恵 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 林 純一 (生命環境系)

## 背景・目的

ミトコンドリアは好気呼吸の場として ATP の大部分を産生する細胞小器官である。その内膜には呼吸酵素複合体 I~V が存在し、酸化リン酸化反応を行っている。またミトコンドリアは核ゲノムとは異なる独自のゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) を有しており、核 DNA と共に呼吸酵素複合体サブユニットをコードしている。すなわち、呼吸酵素複合体は mtDNA と核 DNA の二重支配を受けているといえる。

mtDNA は (1) 酸化リン酸化によって伴う活性酸素種 (ROS) に常にさらされていること、(2) 化学発がん剤と結合しやすいこと、(3) 核 DNA に比べて修復機構が不完全であることから、核 DNA に比べて突然変異が蓄積しやすいとされている。また近年では、様々なヒトがん細胞から mtDNA 突然変異が報告されていることを受けて、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。しかしこの説を裏付けるものはあくまで状況証拠だけであり、直接決定づけるような証拠はまだ報告されていない。

この説の立証を困難にする要因として、呼吸酵素複合体は核 DNA と mtDNA の二重支配を受けていることが挙げられる。そのため mtDNA 突然変異とがんの関係性を純粋に追求するためには、核 DNA の影響を排除し mtDNA の影響のみを考慮する必要がある。そこで、所属研究室では細胞質移植法を用いて細胞質雑種 (サイブリッド) を作製することでこの問題を解決した。この方法によって核のバックグラウンドを統一し、純粋に mtDNA の影響のみを評価することが可能となる。

高転移性ヒト乳がん細胞を用いた所属研究室の先行研究では、呼吸酵素複合体 I の活性低下をもたらす mtDNA 突然変異ががん細胞の高転移能獲得に関与していることをヒトがん細胞で初めて立証した。またこの細胞では、ATP 産生において細胞の解糖系依存を示す指標である乳酸産生量が増加しており、解糖系が亢進していることから the Warburg effect が起きている可能性が示唆される。この the Warburg effect はほとんどのがん細胞で観察される現象であり、好気条件下にも関わらず解糖系が著しく亢進し、ATP 産生を補うとともに生体内などの嫌気環境における生存を可能にするとされている。

前述した所属研究室の先行研究では、mtDNA 突然変異に起因する呼吸活性低下が解糖系亢進を促し、結果的に高転移能を誘発している可能性があるかと結論づけた。しかし、本当に呼吸活性低下が原因となって the Warburg effect が誘導されるのかということに関してはまだ解明されていない。そこで私はこの先行研究を踏まえ、様々な変異型 mtDNA を有する細胞群に焦点を当て、変異型 mtDNA によって生じる呼吸活性の低下が、the Warburg effect に基づく生体内での細胞生存や腫瘍の表現型に及ぼす影響を検証することを目的とした。

## 結果・考察

先行研究を受けて本研究は、(1) mtDNA に病原性突然変異が生じる；(2) 変異による呼吸活性の低下；(3) 解糖系が亢進する；(4) 生体内での細胞の生存が有利になる；という一連のカスケードが成立するのかどうかを検証した。また

実験材料として、HeLa 核に病原性突然変異型 mtDNA を導入したサイブリッドおよび呼吸活性がほぼ完全に失われた呼吸欠損モデルとして mtDNA を有さない <sup>0</sup>HeLa 細胞を用いた。これらのサイブリッドは所属研究室の先行研究によって既に樹立されており、カスケード (1) になっている。またコントロールにはヒト胎児由来 mtDNA を有するサイブリッドを用いた。

まず (1) から (2)、すなわち突然変異型 mtDNA により呼吸活性が低下するのかどうかを検証したところ、突然変異型 mtDNA を有するサイブリッドではコントロールと比較して呼吸活性の著しい低下が見られた。そこで、<sup>0</sup>細胞を含むこの呼吸欠損群では、呼吸活性の低下により電子伝達系を介した ATP 産生が損なわれ、解糖系に依存しているのではないかと予想し、解糖系が亢進しているのどうかを検証した。解糖系亢進の指標として呼吸欠損群における乳酸産生量を測定したところ、コントロールと比較して増加が見られ、また一方で両者の細胞内 ATP 量には差が見られなかったことから、呼吸欠損群では解糖系が亢進することで細胞の ATP 産生を補っていると考えられる。

以上の結果を踏まえ、the Warburg effect が成立するならば解糖系亢進に伴い、生体内での細胞の生存が有利になるはずである。そこで、(4) が成立するのかどうかを検証するために造腫瘍性の評価を行った。ヌードマウスの背部皮下に細胞を打ち込み一定期間観察したところ、呼吸欠損群ではコントロールと比較して腫瘍形成が見られなかった。この結果は、呼吸欠損が解糖系を促進するにも関わらず、生体内での細胞生存に不利にはたらいっている、すなわち the Warburg effect に基づくカスケードを否定していると考えられる。

そこで、生体内において腫瘍は嫌气的かつ低栄養環境下に存在することから、この環境に対する耐性が細胞の生存を左右したのではないかと予想し検証した。低酸素および低栄養条件下における細胞生存率を測定したところ、呼吸欠損群はコントロールと比較して低下傾向が見られたことから、前述した環境に対する耐性が損なわれた結果造腫瘍性に影響を及ぼした可能性が考えられる。この結果はこれらのサイブリッドで (2) から (3) が成立することを示唆している。

したがって、この呼吸欠損群は呼吸活性の低下を受けて解糖系が亢進するにも関わらず、コントロールと比較して生存や造腫瘍能が損なわれるという点で the Warburg effect を否定する結果が得られた。この要因として、呼吸欠損群では呼吸活性が著しく損なわれていることが挙げられる。すなわち、重篤な呼吸活性の低下によって生体内の環境に対する耐性が損なわれ、the Warburg effect によって獲得された生存アドバンテージが打ち消された可能性が考えられる。

## 展望

以上を踏まえ、今後はこの問題を解決するために突然変異型 mtDNA の保有率が異なるヘテロプラズミーを用いて、呼吸活性と the Warburg effect の関係性を追究していきたいと考えている。様々な保有率に応じて生じる呼吸活性の低下率が、the Warburg effect に基づく腫瘍の表現型に及ぼす影響を検証することが今後の展望である。

## 老化したヒト繊維細胞の呼吸活性低下の原因となる核遺伝子の解明

大西 彩紀子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 林 純一 (生命環境系)

### 背景・目的

「老化」という現象は全ての生物に共通して生じるが、原因やメカニズムは未だに解明されていない。老化症状の中でもミトコンドリアの呼吸機能が低下するという現象に注目した。ミトコンドリアとは細胞小器官の1つで、生命活動に必要なエネルギーである ATP を産生している。またミトコンドリアは独自のゲノムであるミトコンドリアゲノム (mtDNA) を1細胞あたり数百から数千コピー持っており、ミトコンドリア内で転写・翻訳を行う独自の遺伝子発現系が存在している。しかし mtDNA はミトコンドリア内での好気呼吸による ATP 産生時に発生する活性酸素種によるダメージを受けやすく、核 DNA よりも突然変異が蓄積しやすいと言われている。その点から老化のメカニズムを説明する一説として、「老化ミトコンドリア原因説」が提唱されている。これは加齢に伴い突然変異型 mtDNA が蓄積することによりミトコンドリアの呼吸機能低下が生じ、ATP 産生能力が低下することで、老化で見られる諸症状に繋がるという説である。しかし直接的な因果関係を証明した報告は無く、2つの問題点が存在している。まず、ミトコンドリア間には相互の機能を補償しあう作用が存在しており、単一の病原性突然変異が少なくとも80%以上蓄積しない限り呼吸機能の低下には至らない。さらに老化に伴って生じる mtDNA 突然変異はランダムな体細胞突然変異であり、その蓄積割合も非常に低いという点である。もう1点は、ミトコンドリアの呼吸鎖酵素複合体を構成するタンパク質やミトコンドリア内の転写・翻訳に必要な因子は mtDNA のみならず核 DNA にもコードされており、mtDNA ではなく核 DNA コードのミトコンドリア関連遺伝子に原因がある可能性が考えられることである。

そこで所属研究室の先行研究において、ミトコンドリア内転写活性は繊維芽細胞のドナーの年齢に関わらず一定である一方、ミトコンドリア内翻訳活性は老人由来細胞で顕著に低下していることが示されている。また、胎児及び老人由来の皮膚繊維芽細胞からそれぞれミトコンドリアを分離し、mtDNA を保持しない <sup>0</sup>HeLa 細胞に移植し、呼吸鎖酵素複合体 IV (cytochrome c oxidase: COX) 活性及びミトコンドリア内翻訳活性を測定した。結果、老人細胞由来の mtDNA を導入した細胞質雑種細胞 (サイブリッド) の活性が胎児細胞由来の mtDNA を有するサイブリッドと同等のレベルに回復することが報告された。これらのことから、老化に伴うミトコンドリア呼吸機能の低下は mtDNA 突然変異に起因するものではなく、ミトコンドリア内翻訳に関与する核 DNA コードの遺伝子によるものであることが示唆される。そこで本研究では、核 DNA コードのミトコンドリア内翻訳に関与する遺伝子の解明とその制御機構の解明を目標とした。

### 結果・展望

本研究ではヒト皮膚繊維芽細胞を用いて、胎児・若年由来と老人由来の細胞とを比較することにより加齢に伴う呼吸機能低下の原因を検証した。まず、実際に加齢に伴いミトコンドリアの呼吸機能が低下しているのかを COX 活性の染色により判定した。結果、老化した細胞において活性低下が引き起こされていることが確認できた。そこで原因

遺伝子の探索を行い、選出した候補遺伝子が単なる個人差ではなく加齢に伴い生じた結果であることを検証するため、RT-PCR を用いて複数の老化した細胞での発現量を測定することで、老化に伴うミトコンドリア呼吸活性低下の原因となる核側遺伝子の決定を試みている。

## マウスのミトコンドリア DNA 多型が造腫瘍性に与える影響

瀧淵 岳 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 林 純一 (生命環境系)

### 背景・目的

ミトコンドリアは酸化的リン酸化によって生体エネルギーである ATP の産生を行う細胞小器官である。その構造は外膜、内膜の二重脂質膜からなり、マトリックスには独自の環状二本鎖 DNA(ミトコンドリア DNA, mtDNA) を数百~数千コピー有している。mtDNA には内膜上の呼吸酵素複合体を構成するサブユニットの一部である 13 種のタンパク、その合成に必要な 2 種の rRNA、22 種の tRNA がコードされており、これらの遺伝子に病原性突然変異が生じると様々な疾患が発症することが報告されている。しかし、その一方で病原性と関連のない多型突然変異が生命現象に与える影響はいまだ研究が進んでいない。

呼吸酵素複合体を形成するタンパクは核 DNA と mtDNA の両方に由来しており、さらに mtDNA に人為的に特定の変異を導入する技術は確立されていない。上記 2 つの理由から、表現型変化の原因が mtDNA の特定部位の変異であると証明するのは一般的に困難である。しかし、所属研究室では、mtDNA 欠損細胞 (0 細胞) と、脱核処理をした細胞質体を融合させた細胞質雑種 (サイブリッド) を作成することによって核のバックグラウンドを統一し、mtDNA 突然変異の影響だけを純粋に検証することに成功している。

先行研究において、多型突然変異をもつ同種異系統のマウス由来の mtDNA を導入したサイブリッドを作製し、様々な条件下で性状解析をした結果、造腫瘍性において異なる動態が確認された。核が同一であるにも関わらず、多型突然変異をもつ同種異系統の mtDNA を組み込んだサイブリッドでは、明らかな腫瘍形成の遅延が見られた。

私は、マウスの mtDNA の多型突然変異が造腫瘍性に与える影響について、その具体的な機構の解明を目的として実験を行った。

### 方法・結果

#### 1) 細胞の性質評価

本研究で使用したサイブリッドの性状解析を様々な環境下で行った。結果として ATP 産生能、Lactate 産生能、遊走能、浸潤能、呼吸活性には有意な差は見出せなかったが、ROS(Reactive Oxygen Species: 活性酸素種) の産生量、及び酸素消費量において有意な差が見られた。

#### 2) 造腫瘍遅延に関与する変異部位の特定

本研究で使用した 2 種の細胞の全 mtDNA 配列解析の結果を比較したところ、3ヶ所の変異部位を特定した。このうち、一カ所はアミノ酸置換を伴わないため、おそらく残り二カ所のどちらか一方、あるいは両方が造腫瘍遅延に関与していると考えられる。

#### 3) 遅延メカニズムの解明

造腫瘍遅延が遅れる要因を特定する為、様々な環境下で培養した細胞をマウスの背部皮下に打ち込み、再現性の確認とともに検証を行った。

### 考察・展望

本研究において、今まであまり注目されていなかった mtDNA の多型突然変異が造腫瘍性に与える影響の解析を行い、腫瘍形成遅延のメカニズムの解明まで行き着くことは出来なかったが、原因の可能性の幅をある程度狭めることには成功した。

腫瘍形成を抑制する mtDNA 変異は前例がなく、非常に興味深いものであるため、今後さらに検証を繰り返し、原因を突き止めたいと考えている。

## 高転移性を誘発する突然変異型ミトコンドリア DNA 導入マウスの病態解析

山梨 晴香 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中田 和人 (生命環境系)

### 背景および目的

ミトコンドリアは酸化的リン酸化によって生命活動に必要なエネルギーである ATP を産生しており、独自の DNA であるミトコンドリア DNA (mtDNA) を有している。この mtDNA に突然変異が蓄積することによりミトコンドリアの正常な働きが損なわれ、生体内に様々な影響をもたらすことが知られている。中でも mtDNA 突然変異とがんの関係については長く議論の対象となっており、mtDNA 突然変異ががんを引き起こすという仮説が存在する。さらに、腫瘍の mtDNA に突然変異が蓄積していることや、mtDNA 突然変異が腫瘍増殖に寄与しているというこの仮説を支持する報告がなされている。一方で mtDNA は母性遺伝するにもかかわらずがん発症が母性遺伝するという報告はないことから、mtDNA 突然変異ががんを引き起こすという仮説を否定的にとらえることもできる。しかし、mtDNA 突然変異ががん悪性化に関わる可能性は否定できないため、所属研究室ではがん悪性化と mtDNA 突然変異の関係について検証する先行研究が行われた。マウス肺がん細胞に由来する高転移性と低転移性の 2 つの細胞株の間で mtDNA を置換したところ、転移能は置換された mtDNA に対応して変化したため、mtDNA が高転移性を誘発していることが明らかになった。また高転移性細胞株由来の mtDNA にはミトコンドリア呼吸酵素複合体 I のサブユニットである ND6 に病原性突然変異を有していた。そして、この突然変異型 mtDNA を有する高転移性を示す細胞において活性酸素種 (ROS) の産生量が増加しており、さらに核 DNA にコードされた抗アポトーシスと血管新生に関わる 3 つの遺伝子の発現上昇が見られた。よって、突然変異型 mtDNA により呼吸酵素複合体 I が欠損し、ROS の過剰産生により核遺伝子の発現が変化することによって高転移性が誘発されるというメカニズムが導き出された。しかし、生体内においてこの突然変異型 mtDNA がどのような表現型を示すのかは不明であり、これを解析するためにこの突然変異型 mtDNA を 100% で有するモデルマウスが作製された。

### 結果および考察

このモデルマウスの多くは、脾臓、肝臓、肺、リンパ節などの様々な組織で異常を呈しており、ヘマトキシリン・エオシン染色 (HE 染色) で組織切片を染色すると、小型の細胞が増殖し正常組織を追いやるような異常な浸潤が観察され、血球系のがんを発症していることがわかった。

組織で増殖している腫瘍細胞がどの細胞に由来しているのかを検証するため免疫染色を行い、それぞれリンパ球全般、B 細胞、T 細胞に特異的に発現している抗原を染め分ける抗体を用いて行うことにより、組織で増殖している腫瘍細胞は B 細胞由来であることがわかった。

より詳細な解析を行うため、生存個体から定期的に末梢血を採取し白血球を染色し観察すると、白血病の特徴である末梢血の白血球の増加は見られず、またリンパ球系白血病の特徴である末梢血中の白血球のうちリンパ球の割合の増加はどの個体においても観察されなかった。よってこの病態が白血病である可能性が否定され、一方で、腫瘍化したリンパ球が末梢血に漏れ出さず組織内で増殖するという悪性リンパ腫の特徴に一致する。

以上のことから、このモデルマウスが発症する病態は B 細胞性悪性リンパ腫であることが明らかになった。

# *Tetrahymena thermophila* の持つ 2 つの低分子量 G タンパク TtRac の機能解析

五味 峻史 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 沼田 治 (生命環境系)

## 背景及び目的

低分子量 G タンパク質は多くの生物種に保存された GTP 結合タンパク質で、GDP/GTP 交換因子 (GEF) や、GTPase 活性タンパク質 (GAP) による調節を受けて GTP または GDP と結合し、細胞内シグナルの分子スイッチとしての役割を担っている。中でも Rho ファミリーに属する Rho、Rac、Cdc42 は、様々な成長因子、サイトカイン、接着分子、ホルモン、インテグリンなどにより活性化され、アクチン細胞骨格再構成、細胞移動など、主に細胞運動においてシグナル分子として重要な役割を果たしている。例えば遊走性細胞では、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質が細胞内のアクチン重合をコントロールして極性を作り、進行方向に仮足を形成することで細胞運動を行う。また、細胞分裂制御や、細胞外環境の感受、細胞運命決定などに関わる様々な機能にも関係していることが近年明らかになってきた。

今回、繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* には 2 つの低分子量 G タンパク質の Rho ファミリータンパク質がある。。これらのタンパク質の機能はまだ明らかになっていないので、私は TtRac1、TtRac2 と名づけ、その機能を調べている。*T. thermophila* のような原始的な生物を調べることで、ヒトを含む多くの種で保存された低分子量 G タンパク質の起源を探ることができると考えている。

## 方法

### 1. 分子系統樹の作成

ヒトや酵母などを含むモデル生物の Rho ファミリー低分子量 G タンパクの配列を NCBI のデータベースで調べ、CLUSTALW により近隣結合法で系統樹を作成した。

### 2. 蛍光蛋白質付き pTEP ベクターへの TtRac 遺伝子の導入

*T. thermophila* の形質転換ではエレクトロポレーション法が有用である。そこでエレクトロポレーション形質転換法に使われる pTEP ベクターに、以前沼田研で単離された *T. thermophila* の 2 つの Rac-like 遺伝子、TtRac1、TtRac2 を挿入した。形質転換効率をあげる工夫として、pTEP ベクターには複製開始点が 2 つ入っている。また、セクションを行うための paromomycin 耐性遺伝子が入っている。

### 3. エレクトロポレーション

*T. thermophila* のエレクトロポレーションにおいて、接合後期の大核形成段階にパルスを与え、遺伝子を導入するのが効率が良くとされている。*T. thermophila* の paromomycin 感受性株 (B2086、CU427、CU428) のうち、性別の異なる 2 株を、30、SPP 培地中で別々に培養した。その後、遠心により培地を洗い、スタベーションバッファー (10 mM Tris-HCl, pH 7.5) で 30 分以内において 18~24 時間スタベーションを行った。スタベーション中に 2 株の細胞濃度を  $3.0 \times 10^5$  cells/ml に合わせた。2L 三角フラスコに二株をスタベーションバッファーごと移して混ぜ、30 分以内に静置した。4 時間経過したら細胞の様子を観察して、接

合率を測った。効率の良い形質転換を行うため、接合率が 80DAPI 染色によって核の様子を観察し、細胞の大部分が大核形成段階に入ったのを確認したら、細胞を遠心してスタベーションバッファーを洗い、エレクトロポレーションバッファー (10 mM HEPES-NaCl, pH 7.5) に  $3.0 \times 10^7$  cells/ml になるように細胞を懸濁した。また、DNA をエレクトロポレーションバッファーに 20~30 ng 溶かし、125  $\mu$ l とした。細胞懸濁液 125  $\mu$ l と DNA 溶液 125  $\mu$ l を混ぜ、Gene Pulser 鶴 (BioRad) を利用してパルスを流し、1 分静置した後、SPP 培地に懸濁した。エレクトロポレーションを行ってから 6 時間経過後、paromomycin を最終濃度 120  $\mu$ g/ml になるように加えた。

## 結果

まず系統樹作成により分子進化内の位置を調べたところ、2 種とも Rho に分化する枝と Rac・Cdc42 に分化する枝の間に属していることがわかった。原始的な低分子量 G タンパク質から各 Rho ファミリーサブクラスへと分化する途中の分子だと考えられる (Fig.1)。またエレクトロポレーションの準備として、pTEP に TtRac 遺伝子を挿入することに成功した。エレクトロポレーションの前段階である接合において、B2086  $\times$  CU428 は振盪培養で増やした細胞でも接合率は 80% を上回るのに対し、CU427  $\times$  CU428 の接合においては、培養時に振盪を行わないときのみ接合率が 80% を上回ることがわかった。また B2086  $\times$  CU428 の組み合わせでの接合を観察すると、途中で接合率が落ちるとい現象が確認されたが、CU427  $\times$  CU428 の組み合わせによる接合は、接合率が途中で落ちたりすることはなく、安定していた。以上のことから、今後は CU427  $\times$  CU428 の組み合わせで実験を続けていこうと思っている。この条件でエレクトロポレーションを行ったが、セクションの結果、形質転換した細胞が現れなかった。条件を変えて再度実験中である。

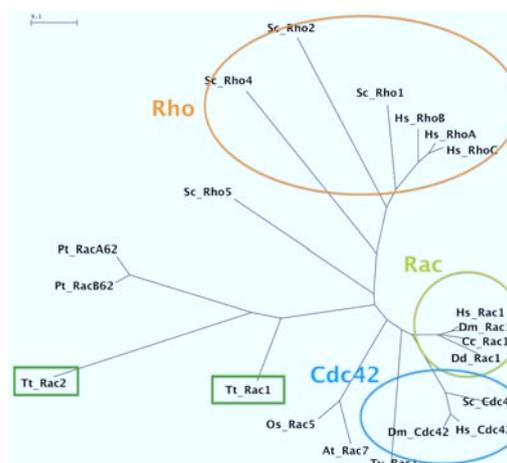


Figure 1: 様々な生物種の Rho スーパーファミリー分子系統樹内の TtRac の位置

## 除神経時の mTOR 活性化が除神経依存性筋萎縮に与える影響

三ツ間 俊人 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 沼田 治 (生命環境系)

### 背景および目的

筋量の維持には骨格筋の神経インパルスが大きな役割を果たしており、除神経による神経支配の解除は筋萎縮を誘発することが知られている。後肢懸垂を用いた筋萎縮モデルでは、筋肥大シグナルである p70S6K や Akt などの mTOR 系シグナルが抑制されることが報告されているが、不思議なことに、除神経による萎縮が進行している筋において、mTOR が活性化していることが先行研究において報告されている。この除神経を用いた筋萎縮モデルで見られる mTOR 系活性化の要因として、後肢懸垂において筋は機械的刺激を受けないが、除神経筋は接地することでストレッチなどの機械的刺激を受容することにより p70S6K のリン酸化が増加したのではないかと解釈がなされている。

私は除神経筋における mTOR の活性化は、除神経による筋萎縮に対するネガティブフィードバックとして抑制的に働いているのではないかと考えた。そこで本研究では、mTOR の阻害剤であるラパマイシンを用い、「除神経マウスへのラパマイシン投与によって筋萎縮がより促進される」という仮説を立て、その検証を行った。

### 方法

#### 1) 実験動物

実験動物は 10 週齢の C57BL/6 雄マウスを用いた。

#### 2) 実験群

(a) Control (Con) 群: n=6

(b) Denervation (Den) 群: n=6 × 4 (2, 4, 8, 14 日後にサンプリング)

(c) Denervation+Rapamycine (Den+Rap) 群: n=6 × 4 (2, 4, 8, 14 日後にサンプリング)

Den 群では、左右の後肢の坐骨神経を切除した。

Den + Rap 群では、Den 群と同様に坐骨神経を切除し、除神経当日から 14 日間、ラパマイシンを 1.5 mg/kg 体重の濃度で一日一回腹腔内投与した。

#### 3) 解析項目

Con 群は実験開始直後に、Den 群と Den + Rap 群はそれぞれ除神経 2, 4, 8, 14 日後に体重を測定し、下腿のヒラメ筋 (Soleus: Sol)、足底筋 (Plantaris: Pla)、腓腹筋 (Gastrocnemius: Gas) をサンプリングし、筋湿重量の測定を行った。最も変化の大きかった除神経 14 日後の筋湿重量のグラフを Fig.1 に示した。

また、サンプリングしたそれぞれの筋において筋繊維径の測定を行い、mTOR の活性を調べるために、mTOR の下流に存在する p70S6K のリン酸化をウエスタンブロット法により測定した。

### 結果

#### 1) 14 日後の筋湿重量

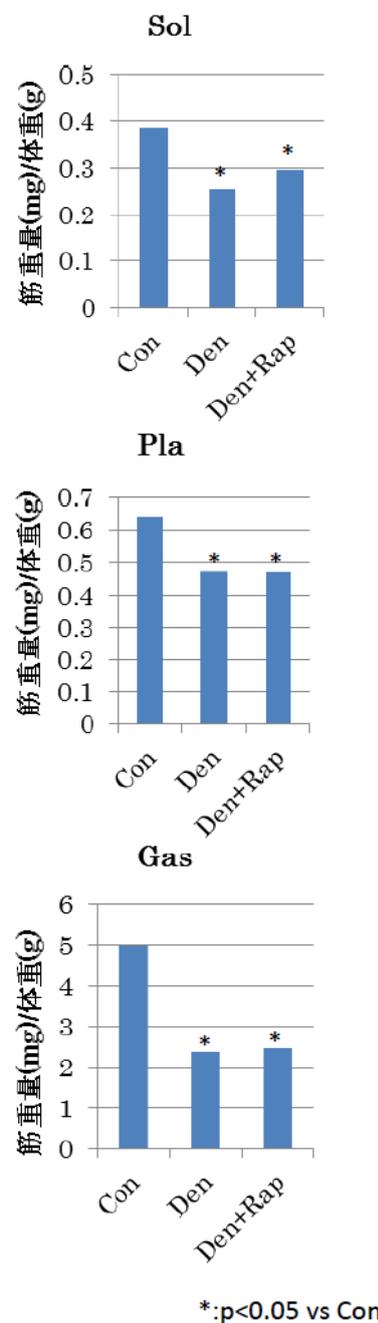


Fig.1

14 日後には、Sol、Pla、Gas のすべての筋で、Con 群に比べ、Den 群と Den+Rap 群で筋湿重量が有意に減少した。しかし、どの筋においても、Den 群と Den+Rap 群の間に有意な差は認められなかった。

#### 2) 筋繊維径の解析

現在解析中である。

#### 3) ウエスタンブロット解析

現在解析中である。

## 機能性ポリフェノール・カルダモニンが運動を負荷した骨格筋の炎症に及ぼす影響

名嘉 夏織 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 沼田 治 (生命環境系)

## 背景・目的

激しい運動に伴い、骨格筋の損傷や炎症が引き起こされる。炎症に関わる一つの因子として、転写因子である Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) が知られている。NF- $\kappa$ B は通常、阻害タンパク質である I $\kappa$ B の結合により核への移行が阻害されており、非活性の状態では細胞質に存在する。しかし、種々の刺激により I $\kappa$ B がリン酸化されると、I $\kappa$ B はプロテアソームにより分解され、遊離した NF- $\kappa$ B は、細胞質から核内へと移行して様々な遺伝子の発現を制御する。

NF- $\kappa$ B は、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  の発現を亢進する。TNF- $\alpha$  は NF- $\kappa$ B をさらに活性化し、炎症に関わるタンパク質の発現を促す。例えば、IL-1 や IL-6 など他の炎症性サイトカインの発現増加により、炎症反応が亢進する。さらに Cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現増加により、PGE2 が産生され、筋痛を引き起こす。これらの NF- $\kappa$ B が関与する反応により、骨格筋の更なる損傷や炎症が引き起こされてパフォーマンスが低下すると考えられている。

一方、カルダモニン (2',4'-Dihydroxy-6'-methoxychalcone: Fig 1) はゲットウやソウズクなどショウガ科の植物に含まれている機能性ポリフェノールである。これまでの研究で、カルダモニンは炎症細胞モデルにおいて NF- $\kappa$ B の活性化を抑制し、それにより炎症に関係するタンパク質の発現を抑制することが明らかになっている。

そこで本研究では、骨格筋培養細胞をエンドトキシンである Lipopolysaccharide (LPS) で処理することで擬似的に炎症を引き起こし、NF- $\kappa$ B を活性化させた上でカルダモニンがその活性化を抑制できるか検証することを目的とした。

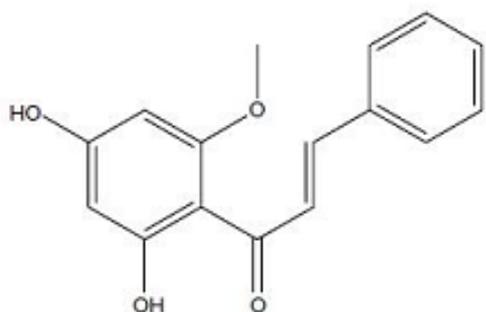


Figure 1: Structure of Cardamomin  
(molecular mass 270.28)

## 方法

## 1. 細胞

マウス由来骨格筋培養細胞 C2C12 を用いた。

## 2. カルダモニンおよび LPS 処理

カルダモニンを DMSO に溶解し、10  $\mu$ M および 50  $\mu$ M カルダモニン入り培地を調製して細胞に 30 分間処理した。その後、1.0  $\mu$ g/ml LPS 入り培地を細胞に 10、30、60 および 120 分間処理した。

## 3. 核および細胞質タンパク質抽出

カルダモニンおよび LPS を処理した細胞に核抽出液 (0.25 M Sucrose, 20 mM tricine (pH 7.8), 1 mM EDTA, 1 % Protease inhibitor) を加えて回収後、ホモジナイザーを用いて破碎し、遠心により核タンパク質と細胞質タンパク質に分離した。

## 4. 解析

得られた抽出タンパク質に含まれる NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B および p-I $\kappa$ B タンパク質をウエスタンブロッティングにより解析した。核内 NF- $\kappa$ B の増加、I $\kappa$ B の減少、および p-I $\kappa$ B の増加を NF- $\kappa$ B 活性化の指標とした。(1) コントロール (2) LPS (3) カルダモニン (4) LPS + カルダモニンの 4 つの実験群を設け、各タンパク質の発現量を比較し、カルダモニンが炎症をおこした骨格筋培養細胞の NF- $\kappa$ B の核への移行をどの程度抑制したか評価した。

## 結果・考察

各タンパク質の発現量について、現在解析中である。炎症細胞モデルでの先行研究と同様に、骨格筋培養細胞にてカルダモニンによる NF- $\kappa$ B の核移行の抑制を確認できれば、引きつづきマウス生体を用いて高強度の運動により骨格筋の炎症を誘発し、本研究で得られた知見を検証する予定である。

NF- $\kappa$ B の活性化の抑制に加え、炎症に関係する遺伝子の発現抑制など抗炎症作用のメカニズムが明らかとなれば、運動時の筋損傷や炎症によるパフォーマンスの低下に対するサプリメントとしてのカルダモニンの服用の有効性を提案できると考えられる。

## パーキンソン病原因遺伝子産物 Parkin の解析 ~ 生存シグナルの制御 ~

遠藤 垂穂 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 智樹 (生命環境系)

### 背景・目的

常染色体劣性遺伝型若年性パーキンソニズム (AR-JP) は 40 歳以下で発症する神経変性疾患であり、弧発性 (非遺伝性) パーキンソン病と同様に中脳黒質のドーパミン作動性ニューロンが選択的に脱落し、手足の震え、筋肉の固縮、動作の緩慢化などの運動障害を示すことが知られている。

Parkin は AR-JP の原因遺伝子であり、ユビキチンリガーゼとしての機能を持つ。ユビキチンリガーゼはタンパク質分解経路においてプロテアソームの分解シグナルとなるユビキチンを標的タンパク質に付加する酵素である。このため、Parkin が欠損すると標的タンパク質が分解されずに蓄積し、細胞に異常を起こしてしまうと考えられている。生体内における Parkin の機能を解析するため、我々を含む複数のグループが Parkin KO (knock-out) マウスを作成したがこれらのマウスは中脳黒質の異常をはじめとする AR-JP の病徴を示さないことが明らかになった。

しかし当研究室の先行研究により Parkin KO マウスの精原細胞が脱落し、精巣が早期に萎縮する表現型を見出した。このことから精原細胞の維持に Parkin が寄与している可能性が示唆された。この精原細胞の維持には GFR 1 から Akt に至るシグナル伝達経路が必要であると報告されている。GFR 1 は GDNF (グリア細胞系列神経栄養因子) の受容体であり、精原細胞だけでなくドーパミン作動性ニューロンの維持に寄与している可能性が示唆されている。また Akt は成長因子受容体により活性化されるリン酸化酵素であり、細胞の成長に重要な役割を果たすことが知られている。本研究では精原細胞の維持に関与すると考えられている Akt シグナル伝達経路に着目し、Parkin がこれらのシグナリングに関与しているのか明らかにすることを目的とした。

### 方法

- Parkin 過剰発現細胞における Akt シグナル伝達関連タンパク質の解析

HeLa 細胞に pcDNA、HA-parkin をトランスフェクションし、24 時間培養した後、lysis buffer (200 mM Tris-HCl (pH7.5), 125 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP40, 1 mM DTT) を加え、懸濁液を遠心した。その後、可溶性区画を回収し、western blotting 法により Akt シグナル伝達関連タンパク質を検出した。

- Parkin KO マウスにおける Akt シグナル伝達関連タンパク質の解析

野生型と Parkin KO マウス個体に麻酔を施し、精巣を摘出した。摘出した精巣に組織重量の 4 倍量相当の lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.5), 5 mM EDTA (pH8.0), 1% Triton X-100, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) を加え、ホモジナイザーによりホモジナイズした。これにより得られた懸濁液を遠心分離し、上清を可溶性区画として回収した後、western blotting 法により Akt シグナル伝達関連タンパク質を検出した。

### 結果・考察

まず Parkin が GFR 1 下流のシグナル伝達経路に関与するか、GDNF 刺激で活性化するタンパク質群に着目し、解析を行った。その結果、Parkin を過剰発現させた細胞では、Akt のタンパク質量がわずかながら増加していた。次にこの量の変化が下流のシグナリングに影響を及ぼすか、Akt の下流でリン酸化される RPS6 (リボソームタンパク質 S6) について解析したところ、コントロールと比べてリン酸化 RPS6 が有意に増加していた。このことから Parkin には Akt シグナル伝達経路を活性化する機能があり、細胞の生存促進に関与していることが示唆された。次に萎縮前の Parkin KO マウスの精巣を用いて同様の解析を行った結果、Parkin が欠損した組織抽出液ではコントロールのものに比べて Akt の量に優位な差は見られなかった。このことは Parkin KO マウスの精巣が萎縮していないことと一致する。

今後はさらに成熟したマウスの精巣や精原細胞の培養系を用いて研究を進め、Akt シグナル伝達経路における Parkin の機能を解明していきたいと考えている。また精巣と中枢神経系においては幹細胞の未分化性維持に関わる共通の因子が複数存在する。神経細胞においても Parkin が Akt シグナルの伝達に関与しているのかを解析し、パーキンソン病の病理と精巣萎縮の関係性についても調べていきたいと考えている。

## 炎症応答経路に関わる新奇ユビキチン関連タンパク質の機能解析

中村 慎吾 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 智樹 (生命環境系)

## 背景

ユビキチンは真核生物において高度に保存された小さなタンパク質であり、他のタンパク質に結合して修飾を行う。この時ユビキチンは標的タンパク質のリジン残基を介して結合するが、ユビキチン自身もリジン残基を保持しており、ユビキチン同士で結合し、ポリユビキチン鎖が形成される。ポリユビキチン鎖による修飾は、26S プロテアソーム系によるタンパク質分解の標識となるなど、様々な生体内反応を引き起こす。

また、ユビキチンに構造がよく似たタンパク質も多数報告されており、そのうちよく研究されているものの1つに NEDD8 がある。NEDD8 はユビキチンと似たような経路で他のタンパク質に結合する低分子タンパク質である。NEDD8 の修飾標的タンパク質としてよく知られているものに Cullin が存在する。Cullin はユビキチン化経路において標的タンパク質にユビキチンを付加するユビキチンリガーゼの骨格となるタンパク質ファミリーの1つである。Cullin が NEDD8 によって修飾されるとユビキチンリガーゼとしての活性が上昇するため、NEDD8 はユビキチン化経路を制御する因子であると考えられている。

当研究室の先行研究において、Yeast Two Hybrid 法によって NEDD8 と特異的に結合するタンパク質として PNBP1 が同定された。また、PNBP1 は NEDD8 以外にも Cullin 型ユビキチンリガーゼの骨格となる Cul1 とも相互作用した。このことから PNBP1 は Cul1 型ユビキチンリガーゼの活性制御因子である可能性が示唆されていたが、生理的な機能については詳細な解析が行われていなかった。当研究では炎症応答の1つで、Cul1 型ユビキチンリガーゼが関わる NF- $\kappa$ B シグナリング経路に焦点をあてて、PNBP1 がこの経路にどのような影響を与えるか実験を行った。NF- $\kappa$ B 経路は TNF 刺激を行うことによって活性化されるシグナリング経路であり、I- $\kappa$ B がユビキチンプロテアソーム系依存的に分解されることで、NF- $\kappa$ B が核内に移行して転写を活性化する。この一連の過程における、PNBP1 の役割について解析を行った。

## 実験方法

1. NF- $\kappa$ B 構成因子である p65 の核移行  
PNBP1 の発現ベクターを導入した HeLa 細胞に、5 ng/ml の TNF を 0 60 分間処理し、その後 NF- $\kappa$ B の構成因子 p65 の局在を細胞染色法によって観察した。
2. TNF 刺激による I- $\kappa$ B の分解  
PNBP1 の発現ベクターを導入した HEK293T 細胞に、10 ng/ml の TNF を 0 60 分間処理し、経時的に細胞を回収した。得られたサンプル中の I- $\kappa$ B の分解効率を Western Blotting によって解析した。
3. TNF 刺激による PNBP1-Cul1 相互作用への影響  
PNBP1 の発現ベクターを導入した HEK293T 細胞に、10 ng/ml の TNF を 0 60 分間処理し、経時的に細胞を回収した。その後、PNBP1 を免疫沈降し、Western Blotting を用いて Cul1 との相互作用を解析した。

## 結果

PNBP1 が NF- $\kappa$ B の核移行に影響を与えるか実験を行った結果、PNBP1 の過剰発現系において、TNF 刺激による NF- $\kappa$ B の核移行が抑制されていることが示された。このことから PNBP1 が NF- $\kappa$ B 経路を負に制御する因子であることが示唆された。次に、I- $\kappa$ B の分解を解析したところ、PNBP1 過剰発現系においては分解が抑制されることが明らかとなった。また、PNBP1 と Cul1 の相互作用も TNF 刺激によって強化されることが明らかとなった。これらのことから PNBP1 は Cul1 と相互作用することでユビキチンリガーゼ活性を低下させ、I- $\kappa$ B の分解を抑制し、NF- $\kappa$ B の核移行を負に制御することが考えられた。

## 展望

PNBP1 の発現をロックダウンする実験系を用いて、NF- $\kappa$ B シグナリング経路に対する役割を解析することを検討している。

## 脱ユビキチン化酵素 USP15 による神経の局所翻訳制御

金 材瓶 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 智樹 (生命環境系)

### 背景および目的

ユビキチンプロテアソームによる分解システム (UPS) は特定のタンパク質の選択的な分解を通じて細胞内タンパクの恒常性維持や品質管理、また細胞周期や転写制御、免疫系の維持など様々な細胞制御に関与している。さらに神経系においてもシナプス可塑性などに重要な役割を担っている。

神経細胞はそれぞれのシナプスに独立性を持たせるため、刺激依存的に個々のシナプスで特定のタンパク質を発現させる特徴的な局所翻訳制御機構を持っている。Neuronal granule (NG) もその一つである。NG は non translating mRNA とリボソームや翻訳開始因子などが密に集まった巨大RNP (Ribonucleoprotein) 複合体であり、特定の mRNA を個々のシナプスまで運搬することが知られている。通常、NG は mRNA を複合体内に取り込むことで翻訳を抑制するが、神経活動の刺激を受けると抑制状態が解除され、翻訳が開始される。近年、UPS が神経系における NG の制御に関与することを示唆する報告がいくつかなされ、注目されている。

脱ユビキチン化酵素である USP15 は U5/U6-sn RNP に含まれ、mRNA のプロセッシングに関与するのではないかと推測されている。当研究室の先行研究で USP15 を培養細胞に発現させたところ、NG と類似の構造を持つ Stress granule と共同在することが確認された。このことから USP15 が、神経細胞において、NG に局在し、UPS を調節することで、シナプス制御などに寄与しているのではないかと考えた。

そこで本研究では NG での USP15 の働きおよびユビキチンプロテアソームシステムの機能を明らかにすることを目的とした。さらに、本研究の中心となる NG 局所翻訳と UPS の関連性を究明するため、リアルタイムで UPS によるタンパク質分解が確認できるプローブの製作を試みた。

### 方法

#### ● USP15 の発現確認

2ヶ月齢の B6 マウスから各種臓器を採取して、重量 1 g 当たり 9 mL の RIPA buffer を加え、デジタルホモジナイザー (As One) でホモジナイズを行った。次に 100 g で 5 分間遠心分離した後、可溶性画分を回収し界面活性剤 (1%の NP-40, 0.25%Na-deoxycholate) を加え再度 14000 rpm で 5 分間遠心分離した。その後、上清を回収し、immunoblot により発現組織を解析した。

#### ● USP15 の細胞内局在

生後 6 日の B6 マウスから小脳顆粒細胞を単離し、6 日間培養した (6DIV)。その後、Myc-USP15 と NG のマーカーである EGFP-G3BP の発現ベクターを導入し、両者の局在を免疫染色により解析した。

#### ● NG 内でのユビキチン鎖形成のリアルタイムイメージング

蛍光タンパク質 Venus を分割した split-venus にユビキチン遺伝子を融合し、ユビキチン鎖を形成しているときに蛍光を発するプローブを作製した。このプローブを HEK 293T 細胞に導入し、蛍光を観察した。さら

に、ユビキチン C 末端の Gly 残基を Ala 残基に変え、基質結合とポリユビキチン鎖形成が出来ないユビキチンミュータントを split-venus と融合し、ネガティブコントロールとした。

### 結果および考察

USP15 がどの組織で発現しているのか確認するため、2ヶ月齢のマウスから各種組織を採取して western blot により発現を確認した。その結果、USP15 は脳を含む各種組織にすべて発現することが確認できた。次に USP15 の神経細胞内局在を確認するため、Myc-USP15 と EGFP-G3BP の発現ベクターを同時にマウス小脳顆粒細胞に導入した結果、USP15 が G3BP と共同在することが確認された。この結果から、USP15 と NG との関連性が強く示唆された。

NG 内でのユビキチン鎖形成をリアルタイムイメージングで確認するために作成した split-venus とユビキチン融合体を HEK 293T 培養細胞に導入した結果、蛍光が観察された。split-venus とミュータントユビキチン融合体を HEK 293T 培養細胞に導入し、split-venus とユビキチン融合体と蛍光の様子を比較した結果、蛍光強度が著しく低下することが確認された。従って split-venus とユビキチン融合体を導入した細胞で観察された蛍光は、split-venus とユビキチン融合体のポリユビキチン鎖形成によるものであると考えられる。

### 今後の展開

本研究で USP15 が NG に局在することが確認されたため、USP15 ノックアウトマウスを用いて NG における USP15 の働きを解析し、NG とユビキチンプロテアソームシステムの関連性を検討する予定である。

## Liposome の物性に及ぼす液胞化誘導剤の影響

岩崎 弘樹 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 白井 健郎 (生命環境系)

## 背景・目的

細胞内には物質を貯蔵するはたらきを持つ液胞や、内部に加水分解酵素を含み、物質の分解をおこなうリソソームなど、脂質二重膜に包まれた袋状の構造が多数存在している。中でも細胞膜を透過できない細胞外のタンパク質などを細胞内に取り込むエンドサイトーシス経路に参与している小胞はエンドソームと呼ばれ、成熟度が低い方からクラスリンが小胞の外側を覆っている被覆小胞、クラスリンが脱離した初期エンドソーム、多数の小胞を膜内に取り込んだ後期エンドソームなどに分類される。これらはそれぞれ特有のタンパク質を含み、膜組成・構造が異なることが知られているが、その成熟過程には不明な点が多い。これまでにピロリ菌が産生する VacA や覚醒剤であるメタンフェタミンなどが、初期または後期エンドソームの構造を肥大化させる、液胞化と呼ばれる現象を誘導することが知られている。これらの分子はエンドソーム成熟過程を阻害している可能性が考えられ、その液胞化誘導機構を明らかにすることによりエンドソーム成熟過程の解明が進むことが期待されるが、標的分子さえ分かっていないのが現状である。

エンドソームや細胞膜などの基本構造である脂質二重膜は、人工的に作製することが可能であり、リポソームと呼ばれている。リポソームは混合する脂質を変えることで様々な組成の脂質二重膜を作製することができる。そこで本研究では、初期エンドソームの脂質組成を基にしたリポソームを作製し、液胞化誘導剤がリポソーム膜の物性にどのような影響を及ぼすか調べることを目的として実験を行った。

## 材料・方法

## (1) リポソームの作製

初期エンドソーム膜の脂質組成は細胞膜と類似していると考えられている<sup>1)</sup>。そこで細胞膜の主要な構成成分である Phosphatidylcholine (PC) と Phosphatidylethanolamine (PE) を、モル比で 7:3 に混合したものをリポソームの基本組成とした。さらに同じく細胞膜の主要な構成成分であるコレステロール (Ch) を、モル比で PC+PE:Ch = 9:1 に混合したリポソームも作製した。これらの脂質と液胞化誘導剤を試験管内でクロロホルムに溶解し、エバポレーターでクロロホルムを留去した。次に真空乾燥によって脂質の薄膜を作製した後、薄膜を PBS で水和し、凍結融解を 10 回繰り返すことでリポソームを作製した。作製したリポソームの粒径は、リポソーム水和液をポリカーボネートフィルターに通すエクストルージョン法により 100 nm に調製し、実験に用いた。

## (2) リポソームの膜流動性の評価

膜流動性を、脂質親和性を持つ蛍光物質の偏光解消度と異方性を測定することで評価した。作製したリポソーム水和液に、脂質二重膜の中央付近に局在する蛍光プローブである 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)、あるいは脂質二重膜の表面付近に局在する蛍光プローブである 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-

6-phenyl-1,3,5-hexatriene *p*-toluenesulfonate (TMA-DPH) を遮光条件で添加した。これらを 37 °C で 1 時間取り込ませた後、蛍光分光光度計を用いてそれぞれの蛍光物質の偏光解消度と異方性を測定した。

## 結果・今後の展望

PC と PE のみから成る基本組成のリポソームでは、DPH、TMA-DPH ともに液胞化誘導剤を添加しても偏光解消度や異方性に有意な差は見られなかった。一方、コレステロールを加えたリポソームでは、DPH 添加による偏光解消度や異方性の測定では有意な差が見られなかったものの、TMA-DPH 添加による測定では、液胞化誘導剤添加により偏光解消度と異方性の値の低下が見られた。このことから、液胞化誘導剤はコレステロールを含む膜において、TMA-DPH が局在する脂質二重膜の表面付近に作用し、膜流動性を増加させている可能性が示唆された。

今後、リポソームに対する薬剤の分配率やコレステロールへの作用の解明、またコレステロール以外の初期エンドソーム膜構成成分への作用の有無を検討する予定である。

## 参考文献

- 1) Gerrit van Meer, Dennis R. Voelker, and Gerald W. Feigenson. "Membrane lipids: where they are and how they behave." *Nat. Rev. Molec. Cell Biol.*, **9**, 112-124 (2008)

## 変異アクチン発現多剤超感受性酵母に対するアクチン阻害剤の作用

仙波 由行 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 臼井 健郎 (生命環境系)

### 背景および目的

アクチンは細胞内で重合・脱重合を繰り返す細胞骨格タンパク質の1つであり、エキソサイトーシスや細胞遊走、細胞分裂など様々な生命現象に関わっている。一方、アクチンの重合・脱重合に影響を及ぼす薬剤もまた数多く知られており、細胞内アクチン機能の解析に用いられている。Latrunculin A (LatA) は単量体アクチンと1:1の複合体を形成することにより、アクチン重合を阻害するアクチン重合阻害剤である。その結合部位はATP結合部位近傍であり、SD(サブドメイン)2とSD4を架橋することでATPの解離を妨げ、アクチン重合を阻害すると考えられている<sup>1)</sup>。

近年、F-アクチンの構造が報告され、アクチンタンパク質が重合・脱重合により柔軟に構造を変えることが明らかとなってきた。このことは薬剤結合部位以外の変異によっても薬剤耐性が付与できるアロステリック部位が存在する可能性を示している。しかしながら、これまで報告されているLatA耐性変異のほとんどはATP結合部位周辺である<sup>2)</sup>。そこで本研究では、既知のLatAの結合部位以外の場所に変異を入れた酵母株を作成し、LatAの作用に関わるアミノ酸残基を見出すことを目的に研究を行った。

### 材料および方法

#### 1. 変異アクチン発現多剤超感受性酵母の作成

BY4741 (*MATa his3 0 leu2 0 met15 0 ura3 0*) 由来薬剤耐性関連12遺伝子破壊株 dTC061(*pdr1 0 pdr3 0 pdr8 0 yrr1 0 aus1 0 pdr5 0 pdr10 0 pdr11 0 pdr12 0 pdr15 0 snq2 0 yrs1 0*) に、*URA3* と野生型 *ACT1* (アクチン遺伝子) をもつプラスミド pRS316-wt*ACT1* を導入した。次に *ACT1* 破壊断片により、染色体上の *ACT1* を破壊し、プラスミド上の *ACT1* に依存して生育するシャッフル株を作成した。作成したシャッフル株に *LEU2* と変異 *ACT1* をもつプラスミド pRS315-mut*ACT1* を導入し、続いて *URA3* をもつ株に致死性をもたらす5-FOAプレート上で生育可能な株、すなわち、野生型 *ACT1* (pRS316-wt*ACT1*) を失い、変異アクチンのみを発現する、変異アクチン発現多剤超感受性株を作成した (下図)。

#### 2. 細胞増殖試験

野生型アクチンまたは変異アクチン型発現酵母をそれぞれ YPD 液体培地で対数増殖期まで培養し、1時間毎に OD<sub>600</sub> を測定した。

#### 3. 酵母アクチンの形態観察

野生型または変異型アクチン発現酵母 (OD<sub>600</sub> = 0.4) を、ホルマリン (終濃度 5%、30 min) で固定したあと、F-アクチンを Alexa568-phalloidin で染色し、蛍光顕微鏡を用いて形態観察を行った。

#### 4. 薬剤感受性の検討

0.004% SDS を含む 0.5% 寒天溶液に野生型アクチンまたは変異型アクチン発現酵母 (OD<sub>600</sub> = 0.05) を混ぜ、YPD プレートに重層した。寒天が固まった後、薬剤を直接滴下し、30 °C、2日間培養した。培養後、薬剤滴下点を中心として生育が阻止された円の大きさを比較することで、薬剤感受性を検討した。

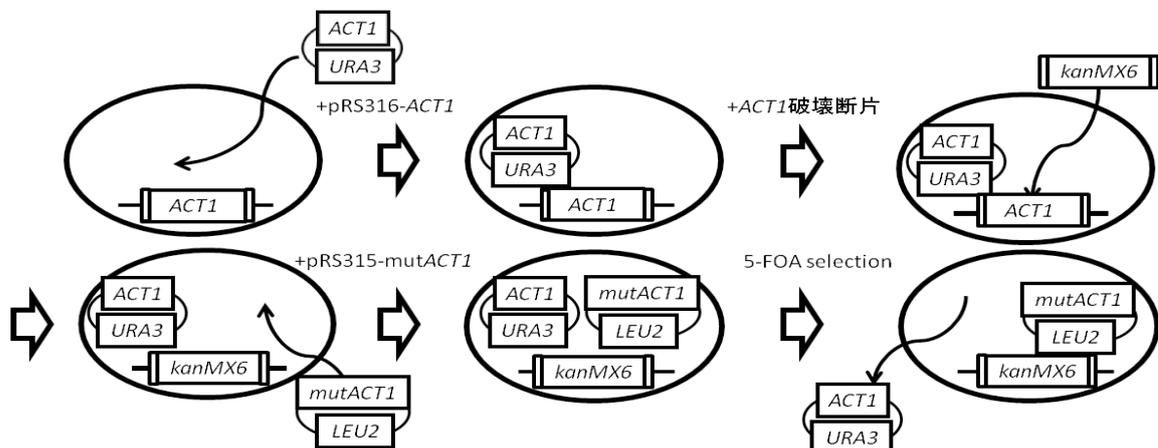
### 結果と考察

変異アクチン発現多剤超感受性酵母を10株作成したところ、1株で増殖速度の低下が見られたが、他の変異株は元株とほぼ同じ速度であった。また、増殖速度の低下が見られた株とその他1つの変異株が、他の株と比べてより球状に近い形態を示したものの、アクチン形態には顕著な差は見られなかった。LatA 感受性を検討したところ、興味深いことに球状の形態を示した2つの株で、生育阻止円の形成が見られないもの (耐性株) と、生育阻止円がより小さくなったもの (感受性株) に別れた。

以上の結果は結合部位とは異なるアミノ酸残基変化により、アロステリックに薬剤耐性・感受性を付与できることを示している。

### 参考文献

- 1) Morton WM. et al., *Nat. Cell Biol.*, **2**, 376-378 (2000)
- 2) Belmont LD. et al., *J. Cell Sci.*, **112**, 1325-1336 (1999)



## 多剤超感受性酵母を用いたミトコンドリア分裂阻害剤探索系の構築

林 康平 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 臼井 健郎 (生命環境系)

### 背景および目的

ミトコンドリアは、常に融合・分裂を繰り返すオルガネラである。融合は、好気呼吸に伴って発生する活性酸素によって傷害を受けたミトコンドリアゲノム (mtDNA) の組換え修復の鋳型となる正常な mtDNA の供給に必要であり、修復された mtDNA は分裂により分配されていく (下図)。ミトコンドリア融合・分裂の平衡が一方に偏ると、mtDNA の修復効率が悪くなり、エネルギー生産能の低下をもたらす。実際、神経変性疾患であるシャルコー・マリー・トゥース病や遺伝性視神経萎縮症などでは、ミトコンドリア動態の異常が起きていることが知られており、病態とエネルギー代謝とが密接に関わっていると考えられている。しかしながら、ミトコンドリア動態の制御機構については未だ不明な点が多い [1]。ミトコンドリア動態の制御機構を解明する方法として、融合または分裂を阻害する低分子化合物の利用がある。このような化合物の探索はミトコンドリア動態の機能解析だけでなく、ミトコンドリアが関わる細胞内現象の解明につながり、更には疾患の治療にもつながる可能性があると考えられる。そこで本研究では、当研究室が保有する多剤超感受性酵母 [2] を用いてミトコンドリア分裂阻害剤の高効率スクリーニング系の構築と化合物の探索を行うことを目的とした。

### 材料

BY4741 (*MATa his3 0 leu2 0 met15 0 ura3 0*) 由来薬剤耐性関連 12 遺伝子破壊株  
 dTC061 (*pdr1 0 pdr3 0 pdr8 0 yrr1 0 aus1 0 pdr5 0 pdr10 0 pdr11 0 pdr12 0 pdr15 0 snq2 0 yrs1 0*)

### 方法

酵母のミトコンドリアの融合を促進する代表的な因子として FZO1p が、分裂を促進する代表的な因子として FIS1p が知られている。*fzo1* 欠損株ではミトコンドリア分裂が融

合より優位になるため、ミトコンドリアが断片化して好気呼吸ができなくなる。そのため *fzo1* 欠損株はグルコースを炭素源とする醗酵性培地 (YPD 培地) では解糖系からの ATP 産生により生育が可能であるが、グリセロールを炭素源とする非醗酵性培地 (YPG 培地) では生育ができなくなる。一方、*fzo1/fis1* 二重欠損株ではミトコンドリア融合と分裂が平衡になり、YPG 培地上で生育回復することが報告されている。そこで、YPG 培地での *fzo1* 機能欠損株を用いて生育を回復させる化合物をスクリーニングすることで、Fis1p 等のミトコンドリア分裂因子を阻害する化合物を得ることができると考えられる。

- *fzo1* の破壊

遺伝子破壊用プラスミドを鋳型に cassette PCR を行い、*fzo1* 破壊用の DNA 断片を作製した。作製した断片を dTC061 株に導入し、多剤超感受性の *fzo1* 破壊株を作成した。

- Halo assay

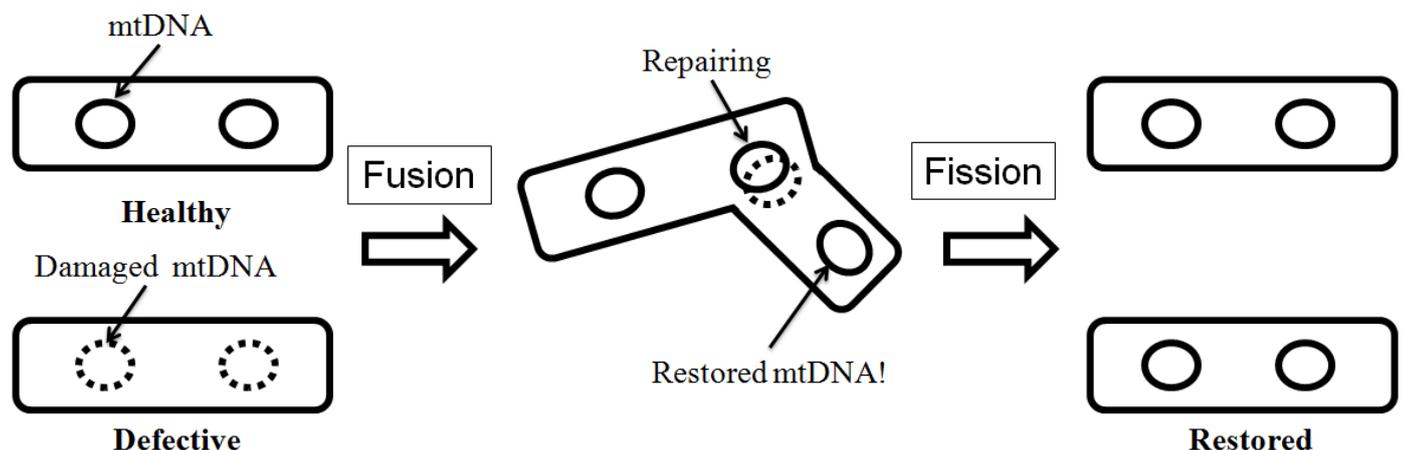
0.004% SDS を含む寒天中に、対数増殖期の *fzo1* 機能欠損株を OD<sub>600</sub> = 0.05 になるように巻き込んだ YPEG 固体培地を作成し、その上に様々な薬剤をスポットしてスクリーニングした。分裂に関わる因子が阻害された場合には、スポットした薬剤周辺に *fzo1* 破壊株の増殖が見られると考える。

### 結果および今後の展望

詳細は発表会にて紹介する。

### 参考文献

- [1] Detmer SA, and Chan DC. "Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics" *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**, 870-879 (2007)
- [2] Chinen T, Ota Y, Nagumo Y, Masumoto H, and Usui T. "Construction of multidrug-sensitive yeast with high sporulation efficiency" *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **75**, 1588-1593 (2011)



# 光合成生物に共通の機能未知タンパク質 Sll1252 はラン藻の光合成電子伝達系を制御する

伊藤 史紘 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 鈴木 石根 (生命環境系)

## 背景と目的

光合成は太陽の光エネルギーを吸収し、物質の一次生産を行う重要な反応である。その光合成反応の中でも光合成電子伝達系は、物理エネルギーである光エネルギーを化学エネルギー (ATP, NADPH) に変換するという重要な部分を担っていて、光合成反応の本質とも言える反応である。しかしながら、その制御メカニズムについては未解明な部分が多く残されている。ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の光化学系 II 複合体 (PSII) には、複数の機能未知タンパク質が相互作用することが示されている。(Kashino Y. et al. 2002) そのうちの一つ Sll1252 は、N 末側の伸長領域と C 末側の S4 様ドメインを持ち、全ての光合成生物に保存されたタンパク質であることから光合成電子伝達系において重要な機能を持っていることが予想された。

## 本実験で作成した変異株

そこで、Sll1252 の機能解明を目的として以下のような実験を行なった。ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 グルコース耐性株を用いて実験を行なった。それぞれの変異株の作製は相同性組換えによって変異を染色体上に導入し、PCR 法によって遺伝子構造を確認した。

(C)、Sll1252 の C 末端側、N 末端側をそれぞれ欠損させた *sll1252-N<sup>trn</sup>* (D)、 *sll1252-C<sup>trn</sup>* (E) を作製した。

## 結果と考察

*sll1252* の ORF を完全に薬剤耐性カセットに置換した *sll1252<sup>del</sup>* は、通常培養条件の 70  $\mu\text{mole photons/m}^2/\text{s}$  において顕著な表現型は観察されなかった。しかし、*sll1252* 遺伝子のほぼ中央にカナマイシンに耐性を与える遺伝子カセットを挿入した Sll1252 挿入破壊株 (*sll1252<sup>ins</sup>*) は、10  $\mu\text{mole photons/m}^2/\text{s}$  以下の弱光下では生育できるが、強光条件 (70  $\mu\text{mole photons/m}^2/\text{s}$  以上) に対する耐性が著しく低下していた。また、*sll1252<sup>ins</sup>* はグルコース感受性を示した。PSII の活性 ( $\text{H}_2\text{O}$   $p$ -benzoquinone) と呼吸活性は野生株と同程度であったが、全体の電子伝達活性 ( $\text{H}_2\text{O}$  methylviologen (MV)) は低下していた。DNA マイクロアレイ解析の結果、*sll1252<sup>ins</sup>* 株は、プラストキノン (PQ)-pool から *Cyt<sub>b6/f</sub>* の電子伝達を阻害する阻害剤である 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropylbenzoquinone (DBMIB) を野生株に処理した場合と類似した遺伝子発現プロファイルを示し、*sll1252<sup>ins</sup>* 株の PQ-pool の還元レベルが野生株と比較して高かったことから、*sll1252<sup>ins</sup>* 株は PQ を介した PSII から *Cyt<sub>b6/f</sub>* への電子伝達の異常が示された。

*sll1252<sup>ins</sup>* からグルコース存在下でも生育する *sll1252<sup>ins</sup>* 復帰変異株 (F) を取得したところ、その増殖速度及び全体の電子伝達活性 ( $\text{H}_2\text{O}$  MV) は野生株と同じレベルに回復していた。*sll1252<sup>ins</sup>* 復帰変異株ではカナマイシン耐性遺伝子の直後に内在性の転移因子が挿入されていた (図 1)。これらのことから挿入による *sll1252* 遺伝子の破壊により、Sll1252 の N 末端側ないし C 末端側断片一方の発現が PSII から *Cyt<sub>b6/f</sub>* への電子伝達に異常を引き起こすことが示唆された。そこで、C 末端側、N 末端側をそれぞれ欠損させた *sll1252-N<sup>trn</sup>* (D)、 *sll1252-C<sup>trn</sup>* (E) 株を作製し、増殖速度及び全体の電子伝達活性 ( $\text{H}_2\text{O}$  MV) の解析を行なった。その結果、*sll1252-C<sup>trn</sup>* 株は野生株とほぼ同様であったが、*sll1252-N<sup>trn</sup>* 株は *sll1252<sup>ins</sup>* 株と類似した表現型を示した。以上の結果から、Sll1252 の S4 ドメインを含む C 末端側の発現が PQ から *Cyt<sub>b6/f</sub>* の電子伝達を阻害することが示唆された。

また、PSII 複合体の最外部に位置する膜貫通型の小サブユニットの PsbK や PsbZ の欠損によっても、強光感受性やグルコース感受性を示すため (Kobayashi et al.2005、Bishop et al.2007)、Sll1252 はこれらのサブユニットと直接相互作用して機能する可能性が考えられる。今後それらの可能性について検証を進めたい。

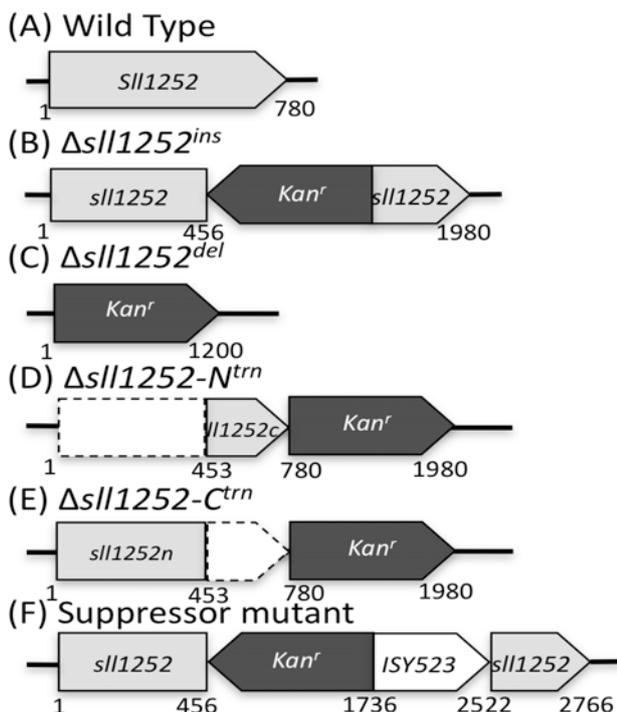


Figure 1: 野生株と変異株の遺伝子構造 矢印は遺伝子の転写方向、*Kan<sup>r</sup>* はカナマイシン耐性遺伝子、破線部分は欠損させた領域、数字は *sll1252* の翻訳開始点を起点としての塩基対の長さを示す

変異株は *sll1252* 遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子によって挿入破壊した *sll1252<sup>ins</sup>* (Fig. 1. B、以下同様)、*sll1252* の ORF を完全に薬剤耐性カセットに置換した *sll1252<sup>del</sup>*

## 参考文献

1. Kashino et al. (2002) Biochemistry 41: 8004-8012
2. Kobayashi et al. (2005) Plant Cell Physiol. 46:1561-1567
3. Bishop et al. (2007) Photosynth. Res. 93:139-147

円石藻 *Emiliania huxleyi* における K37:3 合成経路に関する研究

北村 英理 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 白岩 善博 (生命環境系)

## 背景および目的

円石藻 *Emiliania huxleyi* は、海洋中で大規模なブルームを起こすことから炭素を海底に輸送する生物ポンプの担い手として、地球規模での炭素循環に大きな影響を与えることが知られている。また、*E. huxleyi* は細胞内にアルケノンと呼ばれる長鎖多価不飽和脂質を多量に蓄積させることがわかっている。アルケノンは C<sub>37</sub> から C<sub>39</sub> という非常に長い炭素鎖をもち、不飽和結合はすべて *trans* 型である等、*cis* 型不飽和結合を持つ一般的な生体脂質とは異なるユニークな特徴を持つ。しかしながら、アルケノンの生合成経路や生理的役割などの知見は乏しく、これまでに知られている脂質合成経路に当てはまらない独自の経路があるのではないかと予想されている。

本研究では、炭素数 37 で不飽和度 3 のアルケノン (K37:3) に着目し、その合成経路の解明を目的に研究を行った。先行研究から、*E. huxleyi* を 25 で培養すると炭素数 37 で不飽和度 2 のアルケノン (K37:2) を最も多く蓄積するが、この細胞を 15 の低温培養条件に移すと K37:3 の割合が増えることが知られている [1]。このことから、K37:3 の合成経路について、以下の 2 つの仮説が考えられた。1 つは K37:2 にさらに *trans* 型の不飽和化が施されることで、K37:3 が作られるという仮説。もう一方は、K37:2 と K37:3 の合成経路は独立であり、低温によって K37:3 の合成経路が促進されるという仮説である。

脂肪酸合成経路の阻害剤であるセルレニンによってアルケノン合成は抑制される [2]。このことを利用して、アルケノン合成を促進する低温条件へ *E. huxleyi* 細胞を移し、セルレニン添加によりアルケノン合成を阻害した時の K37:2 および K37:3 の量の変化を調べた。K37:3 合成が阻害された場合、K37:2 と K37:3 は独立した経路をへて合成されることを意味し、K37:2 量の減少と K37:3 量の増大がみられる場合、不飽和化によるものと期待される。

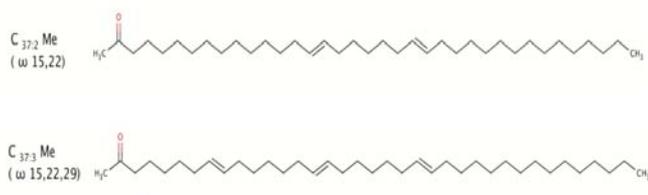


Figure 1: K37:2 と K37:3 の構造式

## 材料および方法

本研究では国立環境研究所微細藻類カルチャーコレクションの *Emiliania huxleyi* (NIES 837) 株 (グレートバリアリーフでの単離株) を使用した。培養液には人工海水 Marine Art SF1 に ESM 栄養塩および 10 nM の Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> を添加した培地を用いた。

## 1. セルレニン濃度の検討

*E. huxleyi* を 25、光強度約 70 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> の条件で通常空気を通気培養し、細胞濁度が OD<sub>750</sub> = 0.2 となるまで培養した。セルレニンを終濃度 0, 2.5,

5, 10, 20 μM となるように添加し、細胞を 25 および 15 でそれぞれ 2 日間培養した。その後、細胞を回収し、細胞数とガスクロマトグラフィー水素炎イオン化検出器 (GC-FID) を用いてアルケノン量を測定した。

## 2. K37:2・K37:3 の定量

10 μM セルレニン阻害下でのアルケノン K37:2 と K37:3 の合成量を経時的に観察した。同様に OD<sub>750</sub> = 0.2 になるまで *E. huxleyi* を培養し、その後 25 と 15 の培養条件に細胞培養液を二分した。各温度条件において、セルレニンを 0 日目もしくは 2 日目に添加した。24 時間ごとに細胞を回収し、細胞数計測による増殖のモニタリングと GC-FID を用いてアルケノンの定量を行った。

## 結果および考察

25 および 15 の条件において、セルレニンは 10 μM および 20 μM でアルケノン合成を阻害した。そのため、10 μM が適正濃度であると判断した。

25 で培養した細胞では、セルレニンは K37:2 と K37:3 の存在比に影響を与えなかった。しかし、15 では、セルレニン存在下で時間経過に伴い K37:2 が減少するとともに K37:3 が増加した。

以上の結果から、K37:3 は、K37:2 の合成経路とは独立に存在し 3 不飽和型の低分子の炭素鎖の伸長により合成されているのではなく、合成された K37:2 が不飽和化反応を受けることにより合成されることが示唆された。

## 今後の課題

この実験で得た結果を確認するために、安定同位体 <sup>13</sup>C を用いた標識実験を行う予定である。まず、<sup>13</sup>C-重炭酸または <sup>13</sup>C-酢酸を基質として加え、*E. huxleyi* を 25 で培養することで、細胞に <sup>13</sup>C ラベルの K37:2 を蓄積させる。その後細胞を 15 に移し、<sup>13</sup>C-K37:2 および <sup>13</sup>C-K37:3 の挙動を観察したいと考えている。その結果を踏まえて、K37:3 の合成経路を結論づけたい。

加えて、セルレニンとは異なる阻害剤を用いた阻害実験を計画中である。例えば、チオラクトマイシンは、脂肪酸合成酵素であるアセチルトランスフェラーゼや 3 - オキソアシル - ACP シンターゼの阻害剤である。また、トリクロサンは脂肪酸合成酵素のエノイル ACP レダクターゼを阻害する。これらの脂肪酸合成阻害剤を加えた時のアルケノン量やアルケノン組成の変化を観察することで、これまでほとんど明らかとなっていなかったアルケノンの合成経路を絞り込むことができるのではないかと考えている。

## 参考文献

- [1] Prahl, F.G. and Wakeham, S.G. 1987 *Nature* 330:367-369
- [2] Shiraiwa, Y., Kubota, M., Sorrosa, J.M. and von Wettstein-Knowles, P. 2005 *Recent Advances in Marine Science and Technology, 2004*. Edited by Saxena N, pp. 27-36.

# ハプト藻 *Emiliana huxleyi* のアルケノンおよび貯蔵多糖合成に関わる光合成炭素フラックスの解析

山崎 将俊 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 白岩 善博 (生命環境系)

## 背景及び目的

海洋性単細胞植物プランクトンである円石藻 *Emiliana huxleyi* は、アルケノンと呼ばれる炭素数 37 から 39 の長鎖不飽和ケトン合成することが知られている。アルケノンは熱分解により種々の炭化水素に変換されるため、代替バイオ燃料として利用できる可能性が示されている<sup>[1]</sup>。アルケノンは、貯蔵物質として機能すると考えられているが、*E. huxleyi* はアルケノンの他に可溶性の  $\beta$ -グルカンや酸性多糖を蓄積することも報告されている<sup>[2]</sup>。しかし、*E. huxleyi* において、光合成時に固定された炭素が、アルケノンと多糖にどのような比率で分配されているかは明らかにされておらず、またその分配比率が環境要因によってどのように制御されているかも不明である。今後、遺伝子改変や環境要因の制御によるアルケノン増産を目指すためには、アルケノンと多糖への炭素の振り分けがどのように制御されているかを知ることが必要である。そこで、本研究では、*E. huxleyi* の細胞において、アルケノンと  $\beta$ -グルカンおよび酸性多糖が各増殖相 (対数増殖期、直線期、定常期) で新規にどれだけ合成されるのか、その代謝速度を解析することを目指した。

## 方法と結果

代謝フラックス解析を行うにあたり、 $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  を基質としたトレーサー実験を行い、アルケノン、 $\beta$ -グルカン、酸性多糖の各画分に取り込まれた  $^{14}\text{C}$  量を測定することにした。この実験を行うためには、細胞をアルケノン、 $\beta$ -グルカン、酸性多糖の各画分に分離する必要がある。しかし、現在のところ単一サンプルからアルケノン、 $\beta$ -グルカン、酸性多糖を分離する手法は確立されていない。

そこで本研究では、二層分配とスピンカラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーを組み合わせることで、*E. huxleyi* 細胞からアルケノン、 $\beta$ -グルカン、酸性多糖を分離する手法を開発することにした (Figure 1)。本方法では、最初に細胞をバッファーに懸濁して破碎し、つづいてクロロホルムによる二層分配を行った。二層分配のクロロホルム層には、アルケノンを含む脂質が分配される。先行研究により脂質中のアルケノンは、薄層クロマトグラフィー (TLC) により分離できることが報告されている<sup>[3]</sup>。そこで、クロロホルム層に分配されたアルケノンは、TLC により分離する予定である。一方、二層分配の水層には、低分子、核酸、タンパク質、多糖が分配される。この水層から核酸とタンパク質を除去するために、ヌクレアーゼ処理およびプロテアーゼ処理を行なって核酸とタンパク質を分解し、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。このゲル濾過により、核酸とタンパク質は共におよそ 80% 以上が除去され、 $\beta$ -グルカンと酸性多糖は 80% 以上が回収された。さらにゲル濾過の溶出画分に含まれる  $\beta$ -グルカンと酸性多糖を分離するために、スピンカラムを使ったイオン交換クロマトグラフィーを行った。イオン交換クロマトグラフィーにより、酸性多糖は 90% が除去されたが、 $\beta$ -グルカンはほぼ 100% 回収することができた。

なお、ゲル濾過における核酸 (DNA、RNA) の除去率の算出には、サケ精子 DNA および *E. huxleyi* から抽出した

全 RNA を用いた。核酸の定量には分光光度計を用い、260 nm の吸光度を測定した。ゲル濾過によるタンパク質の除去率の算出には、 $^{35}\text{S}$ -Met/Cys でラベルした *E. huxleyi* のタンパク質を用いた。タンパク質量の指標となる  $^{35}\text{S}$  量を液体シンチレーションカウンターにより測定し、タンパク質の除去率を算出した。ゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィーにおける多糖の回収率および除去率の測定には、*E. huxleyi* から抽出した  $\beta$ -グルカンと酸性多糖を用いた。多糖定量には全糖定量法として知られるフェノール硫酸法を用いた。

## 考察

本実験結果より、単一のサンプルから簡便に  $\beta$ -グルカン、酸性多糖を分離する手法を確立することができた。今後はまず文献<sup>[3]</sup>をもとにアルケノンを TLC により分離する。そして、*E. huxleyi* 細胞の各増殖相における、アルケノン・ $\beta$ -グルカンおよび酸性多糖の新規代謝速度を  $^{14}\text{C}$  を用いたトレーサー実験により解析するつもりである。

## 参考文献

- [1] Qingyu Wu et al. (1999) *Journal of Applied Phycology* 11, 137-142
- [2] Kjell M et al. (1986) *Carbohydrate Research* 152, 243-248
- [3] Michael V et al. (1996) *Phytochemistry* 2, 465-471

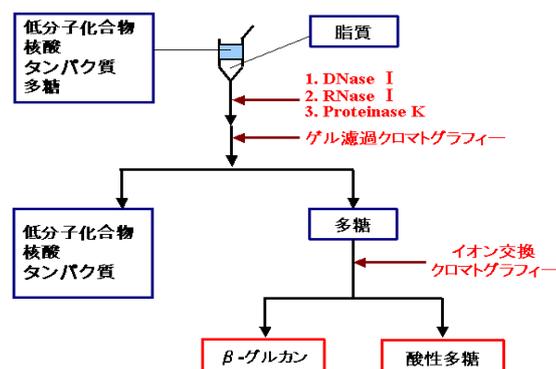


Figure 1: 確立した実験方法の概略

*Botryococcus braunii* コロニーから単細胞を分離する方法の確立と生理活性の維持

吉永 和真 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 白岩 善博 (生命環境系)

## 背景・目的

*Botryococcus braunii* は緑藻類に属する群体性微細藻類であり、光合成によって大量の炭化水素を合成し、オイルとして細胞外に分泌・蓄積する特性を持つ。このことから次世代の再生可能なバイオマスエネルギー源として大きな注目を集めている。*B. braunii* の炭化水素オイル生産性向上のための培養環境の最適化は限界近くまで進んでおり、それ以上の炭化水素オイル生産性向上のためには、遺伝子導入などによる、より効率的なオイル生産新規株の作出が必要であると考えられている。例えばカルピン回路に関わる遺伝子の組み換えなどにより増殖速度の高い株が作出可能となれば、閉鎖型培養系におけるオイル生産効率の向上が見込まれる。また新規株の作出のみならず、既存の遺伝子工学手法を用いた *B. braunii* の炭化水素オイル生合成機構などの代謝機構の解明も可能となるため、学術的な観点からも *B. braunii* への遺伝子導入法の確立は非常に有益である。しかしながら、*B. braunii* は細胞が強固に結びついたコロニーを形成する事と、細胞自体が細胞壁の外側にある非常に硬い殻のような構造に包まれているという2つの形態的特徴を持ち、そのため細胞内への遺伝子の導入は物理的に非常に困難である。この問題の解決のためには、*B. braunii* コロニーから細胞を分離させ、単細胞かつ生理活性を維持したまま培養する方法が必要であると考えられる。そこで本研究では *Botryococcus braunii* BOT22 株を用い、効率良く単細胞化する方法の確立と、単細胞処理後の細胞における生理活性の維持を目的として実験を行った。

## 材料・方法

材料には *B. braunii* BOT22(B レース株) を使用した。培地には Modified-Chu 培地を使用し、光強度 40  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、25 の環境下で通気培養した細胞を実験に使用した。中性脂質及び細胞壁は Nile Red (0.25 mg/mL in acetone)、Calcofluor White (Sigma) 蛍光試薬をそれぞれ用いて染色した。

## I. 単細胞化方法の検討

細胞の単細胞化処理については物理的処理と化学的処理の二つの面からアプローチした。物理的な処理としては注射器、MiniBeadbeater、Yeda Press の処理によるコロニーの破碎を試行した。化学的な処理としてはグリセロール(終濃度 1% ~ 20%)、エチレングリコール(終濃度 10% ~ 20%)、ヨウ素液(終濃度 0.01% ~ 20%)などを試行した。

## II. 回復培養および生理活性の測定

実験 I. において化学的処理を行った細胞は、wash した後に回収し、Modified-Chu 培地に再懸濁したものを試験管(10ml)で通気培養した。回復培養の間細胞のクロロフィル蛍光を定期的に FluorCam により計測し、回復度の指標とした。これにより単細胞化処理を行った細胞の生存率を測定しその処理法の実用性を判定した。

## 結果

## I. 単細胞化方法の検討

上記の実験の結果、物理的処理においては MiniBeadbeater 処理 (5000 rpm, 1 min) が良好な結果を示し、化学的処理においてはグリセロール添加(終濃度 20%, 30 min)

が最も良好な効果を示し、これら二つを比較した場合グリセロール添加処理がより顕著な効果を発揮した。また BOT22 に対するグリセロール添加処理はコロニーからの単細胞の脱落のみならず、BOT22 細胞を包む外殻構造の脱落を引き起こした。これらの細胞は外殻構造を持たず細胞壁がむき出しになっており、Calcofluor white (細胞壁染色液) によって容易に染色できた。単細胞化処理の後回収した単細胞では外殻構造の外れた細胞 (Shell-less cells) の割合が回収した単細胞の量に対して最大 80% (グリセロール終濃度 15%, 15 min) に達した。またこの割合は処理するグリセロールの濃度や処理時間と比例する事が示された。

## II. 回復培養および生理活性の測定

実験 I. の単細胞化方法の検討において特に結果が良好であったグリセロール添加処理を含む化学的処理では、単細胞化された細胞に一定の割合で、Shell-less cell が見つかった。これらの細胞を蛍光顕微鏡で観察した結果、処理時間および試薬濃度が増加するにつれ細胞のクロロフィル蛍光が弱まり、生存率が低下した。同様に、グリセロール終濃度 15% で 5 分間処理時は 60%、終濃度 10% で 5 分間処理時は 30%、終濃度 5% で 5 分間処理時は 5% のクロロフィル蛍光の低下が FluorCam で確認できた。その一方で、24 時間の回復培養後の計測ではグリセロール終濃度 15% 処理細胞で約 20%、10% 処理細胞で約 10% のクロロフィル蛍光の回復が見られた。

## 考察

BOT22 コロニーの単細胞化に最も顕著な結果を示したのはグリセロールによる処理であったが、長時間・高濃度のグリセロール処理は細胞に損傷を与え、処理後の生存率低下が確認された。またグリセロールによる処理はコロニーからの単細胞化だけでなく、単細胞化した細胞の何割かを Shell-less cell 化する事も発見した。一方グリセロール処理した BOT22 コロニーを Nile Red 染色すると、単細胞化した細胞の細胞外殻直下が染色されたにもかかわらず Shell-less cell 化した細胞は染色されない。この事はグリセロールによって細胞外殻直下のオイルが溶かされたため、BOT22 単細胞の Shell-less cell 化が起こったと推察できる。また化学的処理を行った細胞のクロロフィル蛍光が低下する事も蛍光顕微鏡で確認できたが、これは処理後の細胞の生存率低下を示すものであり実際に処理後の細胞のクロロフィル蛍光の低下が FluorCam でも確認できた。以上の結果より、この生存率と単細胞化した BOT22 細胞の回収量を考慮するとグリセロール終濃度 10% で 5 分間処理が最適であると結論づけられた。今後はこの研究における最終的な目標である *B. braunii* への遺伝子導入へむけ、今回の方法で単細胞化した BOT22 細胞への遺伝子導入を試みその導入成功率の計測を行う予定である。また、単細胞化した BOT22 コロニーのマトリックスへ炭化水素オイルを貯蔵できず、培地中にオイルが分泌され炭化水素オイルの抽出が格段に容易になると考えられる。そこで放射性同位体  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$  を用い、BOT22 コロニーと単細胞化した BOT22 細胞における代謝産物解析を行い炭化水素合成能の変化を確かめる予定である。

*Aurantiochytrium* sp. 18W-13a と 4W-1b 株の培養における炭素源の検討

岩島 日向子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渡邊 信 (生命環境系)

## 背景

近年、化石燃料の枯渇に対する危機感を背景として、オイル産生藻類を用いたバイオマスエネルギーが注目を集めている。また化石燃料による二酸化炭素の増加は地球温暖化の要因の1つとされており、その解決策としても、風力や太陽光、バイオマスなどのクリーンエネルギーの開発が求められている。

現行のバイオマスエネルギーの多くは陸上植物を利用している。これに対してオイル産生藻類は増殖速度が速く、バイオマスエネルギーの単位面積あたりの生産量が多いなどの利点がある。

従属栄養性の藻類である *Aurantiochytrium* は、増殖速度が速く、また DHA を始めとする不飽和脂肪酸の生産量が多いことから注目を集めてきた生物である。本研究では多くの *Aurantiochytrium* の株が確立されてきたが、中でも 4W-1b 株は増殖速度やオイル含有量が高いことが分かっており、バイオマスエネルギーの原料としての有用性が示唆されている。また 18W-13a 株は、4W-1b 株と比べるとバイオマス量は劣るものの、脂質中の約 70% がスクアレンという特徴を持つ。スクアレンはトリテルペン的一种であり、生体内ではステロールの前駆体として合成される。現在、商業的にスクアレンは、深海ザメの肝油から抽出されているが、その個体数が急激に減少していることから、供給が不安定で比較的高価であり、用途も限られている。18W-13a 株によるスクアレンの商業生産が可能になれば、医薬部外品や化粧品、健康補助食品などさまざまな市場への展開が期待される。

*Aurantiochytrium* は葉緑体を持たない従属栄養性であるため、光を必要としないが、炭素源を培地に添加する必要がある。炭素源や窒素源、温度などの培養条件はバイオマスや脂肪酸組成に影響を与えることが知られている。条件の違いに対する影響は、株ごとに違う可能性も示唆されている。従って商業化へ向けては、これらの条件を最適化してバイオマスやオイル含有量を向上させることが重要である。

そこで本研究では、炭素源に焦点をあてて研究を行った。高スクアレン産生株である *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a 株において、炭素源の違いによって増殖やオイル産生にどのような影響が生じるのかを調査した。また 4W-1b 株も同様の培養を行って増殖特性を評価するとともに、18W-13a 株との比較を行った。

## 方法

## 1. 培養株

2009年に沖縄県西表島、石垣島で採取された *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a 株、4W-1b 株を用いた。

## 2. 培養条件

濃度 50% の人工海水に、炭素源 2%、トリプトン 1%、yeast extract 0.5% を入れ、121℃、20 分間オートクレーブで滅菌を行ったものを培地として用いた (GTY 培地)。

前培養は 500 mL 三角フラスコに炭素源としてグルコースを用いた GTY 培地 200 mL を入れ、温度 25℃、100 rpm で振盪を行った。

本培養で用いた炭素源は、ガラクトース、ラクトース、マンノース、フルクトース、トレハロース、スクロース、スターチ、カルボキシメチルセルロース (CMC)、グリセリ

ンであり、コントロールとしてグルコースを使用した。ただし CMC は非常に溶けにくく、2% 入れると溶け残りが多くなってしまったため、0.5% で行った。CMC に対するコントロールとして、グルコース 0.5% 培地での培養も行った。500 mL 三角フラスコ内に培地を 200 mL 入れ、前培養したものを 500  $\mu$ L 植え継いだ。温度 25℃、100 rpm で定常期に達するまで (65 時間前後) 培養を行い、定期的に OD<sub>660</sub> 及び OD<sub>600</sub> を測定した。

## 3. 乾重量の測定

定常期に達した細胞は遠心分離 (3900 rpm、15 分 × 4 セット) で回収し、凍結乾燥を行った後、乾重量を測定した。乾重量と OD<sub>660</sub> または OD<sub>600</sub> との関係式を求め、これを用いて growth-curve を作成した。

## 4. 脂質の抽出

凍結乾燥した細胞 100 mg にクロロホルム・メタノール (2:1, v/v) 15 mL を加え、脂質を抽出した。抽出した脂質量を測定した。

## 5. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

抽出した脂質をヘキサンに溶かし、ヘキサン・クロロホルム (9:1, v/v) で TLC 板に展開した。TLC 板を乾燥後、20% 硫酸を吹きかけ、スクアレンの存在を確認した。

## 結果

全ての炭素源で細胞の増殖がみられた。しかしスターチと CMC 2% では粘性が高くなってしまい、測定値にかなり誤差が出たこと、また遠心分離による細胞の回収がうまくいかなかったことにより、growth-curve の作成はできなかった。

いずれの株でも、単糖を用いた場合、5 g/L 以上の乾重量が得られた。また、グリセリンを用いた場合も、グルコースに匹敵する乾重量が得られた。一方、二糖・多糖では 1 g/L 以上の乾重量は得られるものの、2.5 g/L 以上の乾重量に到達した処理区はなかった。

## 考察

今回の結果では、株による炭素源の利用の違いは見られなかった。18W-13a 株と 4W-1b 株は共にどの炭素源も利用することは可能であるが、単糖で増殖がよく、二糖・多糖では増殖がよくないという傾向がみられた。これは *Aurantiochytrium* が直接利用できる炭素源が単糖であり、二糖や多糖は分解して単糖にして利用することが考えられる。*Aurantiochytrium* は様々な酵素を備えていることも示唆された。

本研究では、グリセリンがグルコースの代わりに炭素源として利用しても、グルコースを用いた際と同等の乾重量が得られることを示した。2012年1月現在、グリセリンは工業過程で大量に排出され、市場価格は低下している。これを使用することができれば、商業用に培養する際のコスト削減に貢献する可能性がある。またグリセリンには振盪培養における消泡効果もあるため、培養効率が向上する可能性も考えられる。ただし、実際に安価な粗精製グリセリンを使って培養した場合、不純物によってさまざまな弊害がでてくる可能性も考慮しなければならない。これを明らかにして実用化を目指すためには、更なる実験が必要である。

*Aurantiochytrium* sp. 18W-13a におけるアミノ酸要求性について

加藤 一輝 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渡邊 信 (生命環境系)

## 背景・目的

地球温暖化とエネルギー資源の枯渇という重大な問題を解決しつつ、経済を発展させるためには、再生可能なバイオマスによる代替エネルギー資源の実用化が必要とされている。植物から得られるバイオマスは次世代の代替燃料として期待されている反面、食料との競合が大きな問題となっている。したがって、食糧と競合せず、オイル生産性の高い藻類が注目されている。

従属栄養性の藻類である *Aurantiochytrium* はラビリンチュラ類に属し、優れた脂質合成能力をもつ。中でも筑波大のグループによって単離された 18W-13a 株は増殖速度が速く、乾燥重量あたり高い割合で炭化水素スクアレン  $C_{30}H_{50}$  を産生する。スクアレンは軽油に近い物性を備えるため、燃料油としての市場開拓も期待される。現在、化粧品や健康食品として利用されているスクアレンは、主に深海サメの肝油から生産されているが、深海サメ 1 個体からとれる肝油量は少量であるために、スクアレンの生産コストは高く、さらに深海サメの一部は危急種であることから、持続的で安定したスクアレンの供給は難しい状況となっている。したがって、*Aurantiochytrium* 18W-13a 株から大量のスクアレンを生産する技術を開発することができれば、スクアレンの用途は、化粧品、健康食品のみならず、運輸燃料へと広がっていくことが期待される。本研究では、18W-13a 株がその増殖のために有機窒素源としてアミノ酸を要求することに着目した。18W-13a 株の大量培養にかかるコストを下げるには、アミノ酸の投与量と種類を最小限に抑える必要があることから、18W-13a 株の各種アミノ酸の資化性について調査した。

## 材料・方法

実験には 2009 年に沖縄県西表島で採取された *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a 株を用いた。前培養は GTY 培地 (グルコース 2%、トリプトン 1%、および酵母抽出物 0.5% を含む、50% の人工海水) 200 ml で 16 時間行った。前培養の条件は 25℃、100 rpm の振盪培養とした。

96 穴マイクロプレート培養 多数のサンプルを扱える小スケールな培養方法を確立することを目的として、96 穴マイクロプレートを用いた実験を行った。前培養した細胞  $2 \mu\text{l}$  を、マイクロプレートのそれぞれのウェルに入った GTY 培地  $200 \mu\text{l}$  に接種し、本培養を開始した。本培養の条件は 27℃、100 rpm の振盪培養とし、マイクロプレートリーダーを用いて一日に数回の頻度で  $\text{OD}_{660}$  値を測定した。

L 字型試験管 前培養した細胞  $50 \mu\text{l}$  を、L 字型試験管に入った後述の培地 10 ml に接種し、本培養を開始した。本培養では、まず Control 培地 (グルコース 2% (w/v)、Vitamin mix およびアミノ酸 20 種類をすべて含むアミノ酸溶液、50% の人工海水) を作成し、細胞が増殖できることを確かめた。次に Control 培地の 20 種類のアミノ酸のうち 1 種類を欠く、20 パターンの培地をそれぞれ作製した。培地中のアミノ酸の濃度は、Difco & BBL マニュアルを参考に算出した GTY 培地中のアミノ酸の濃度に基づき決定した。アミノ酸は、溶解度の低い一部を除いて 20 倍の濃縮液を作成し、同量ずつ分注した。メイラード反応を避けるため、アミノ酸混溶液と、グルコース・人工海水・Vitamin

mix を混ぜ合わせた溶液は別途 Autoclave 滅菌し、それぞれ 80℃ 程度まで冷却してから混合した。本培養の条件は 25℃、100 rpm の振盪培養とし、1 日に数回  $\text{OD}_{660}$  値を測定した。Autoclave 後の培地の pH は本培養前に測定した。培養開始から 96~120 時間経過後に遠心分離を行って細胞を回収した。回収した細胞は凍結乾燥後、乾燥バイオマス重量を測定した。乾燥バイオマスは Chloroform-Methanol (2:1, v/v) を溶媒として超音波破碎によって脂質を抽出し、オイル重量を計測した。また、 $\text{OD}_{660}$  値および乾燥バイオマス重量に基づいて細胞の増殖速度を、乾燥バイオマス重量とオイル重量に基づいて細胞のオイル含量を算出し、与えたアミノ酸との関係を調べた。

## 結果

96 穴マイクロプレートを用いた実験では、マイクロプレートリーダーで  $\text{OD}_{660}$  値を測定する際、水滴の影響のために正しい測定ができなかった。またウェルが小さいために攪拌が不十分であり、細胞増殖のばらつき、測定誤差ともに大きかった。L 字型試験管を用いた実験では、Control 培地では GTY 培地よりも増殖が遅く、最終的な乾燥バイオマス重量および脂質含量も低かった。アミノ酸を 1 種類ずつ除いた培養では、リシン欠乏培地において細胞の増殖が確認できなかった。その他の培地では細胞の生育が確認された。ただしリシン欠乏培地における pH は 4.33 であり、この値は GTY 培地、Control 培地、その他のアミノ酸を除いた培地の pH と比較して低く、pH による影響も否定できない。

## 考察

リシンは塩基性アミノ酸であり GTY 培地にも比較的多量に存在するため、pH を大きく変化させる要因となっており、pH 安定性の点で、GTY 培地でのリシンは重要なアミノ酸と考えられる。今回の実験で、リシン欠乏培地で細胞の増殖が確認できなかったことは、リシンが必須アミノ酸である可能性がある。しかし、pH を調整したリシン欠乏培地における 18W-13a 株の生育を確認することが必要である。

マイクロプレートを用いた培養は、同時に多数のサンプルを無菌の状態を保持したまま OD を測定できるという点において優れていた。しかし測定誤差が大きい点と、攪拌が難しい点において *Aurantiochytrium* の培養にはマイクロプレートは不向きであった。L 字型試験管を用いた培養では、Erlenmeyer フラスコを用いた培養とほぼ同様の増殖曲線が得られた。また OD 計測が容易であるという点で、*Aurantiochytrium* の培養条件の検討における有効な培養方法であることが示唆された。また、小スケールで培養が可能であるため、培地使用量の節約にも貢献した。

本実験の Control 培地は、GTY 培地よりも 18W-13a 株の生育は劣るものの、*Aurantiochytrium* の生育が確認できた。完全合成培地である Control 培地にさまざまな栄養分を添加することで、GTY 培地中のどのような物質が *Aurantiochytrium* の生育を促進するのか確かめることができる。今後はアミノ酸以外の様々な因子の重要性を確認する予定である。

ミシマサイコ *Bupleurum falcatum* SSR マーカーの開発と多様性評価

宮田 将史 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渡邊 和男 (生命環境系)

## 背景と目的

ミシマサイコ (学名: *Bupleurum falcatum* L) はセリ科ミシマサイコ属の多年生野生植物である。根の部分に薬効成分であるサイコサポニンを含むため、生薬の原料となり、商業的に利用価値が高い。また、サイコは世界中に多くの亜種・近縁種が存在し、そのなかには薬効成分を含まない種や有毒な成分を含む種も報告されている。しかし、それらの種を形態学的特徴のみで判別をすることは困難であり、従来の方法では正確に分類する事ができない。さらに、ミシマサイコは他殖性で種内変異も高く、商業利用されている系統でも、遺伝学的に固定されておらず、遺伝的多様性や遺伝子型の判定法の確立が望まれている。

DNA マーカーは DNA の多型をモニターするツールとして遺伝的多様性解析に利用される。このうち、2~4 塩基の 4 回以上の繰り返し配列からなる SSR 領域を観察するツールである。Simple Sequence Repeat (SSR) マーカーは一般に、他の DNA マーカーに比べて多型性が高いことから、種内の多様性を観察する目的でよく利用されている。

本研究は、商業的に利用価値の高いミシマサイコ属植物の遺伝資源の評価 (あるいは育種) を目指し、ミシマサイコでの 1) SSR 配列の所在とパターンの調査、2) マーカーの開発とマーカーの性能の評価、3) SSR マーカーを用いたミシマサイコの遺伝的多様性の解析、を目的とした。

## 方法

## 1. 植物材料

SSR 配列の所在とパターンの調査およびマーカー開発には、ミシマサイコ栽培品種 A を用いた。作製したマーカーの評価は品種 A に加えて、2 種の栽培品種 (品種 B および C) を用いた。また、ミシマサイコ種内の多様性評価には共同研究より提供されたこれらの 3 品種を含む、18 個体から抽出された DNA 試料を用いた。

## 2. DNA 抽出

乾燥葉から先行研究に従い、臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) 法を改変した方法で、ゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA は吸光度によって収量および品質を評価した。

## 3. SSR 領域の探索・フォワードプライマーの設計

抽出 DNA を制限酵素 (Dra I, EcoR V, Pvu II, Stu I) で消化した後、不等長アダプターをライゲーションし、これをライブラリとした。ライブラリを鋳型としてアダプターに特異的なプライマーと SSR 領域 { (AC)<sub>10</sub>, (AG)<sub>10</sub> } に特異的なプライマーを用いて PCR (94 30 sec, 62 30 sec, 72 1 min を 5 サイクル後、94 30 sec, 60 30 sec, 72 1 min を 38 サイクル) を行い、アガロースゲル電気泳動にて観察した。PCR 産物は、p-GEM T-Easy vector (プロメガ) にクローニングし、配列を決定した。フォワードプライマーは決定した配列中の GC 含量の低い位置に設計した。

## 4. リバースプライマーの設計

フォワードプライマーの設計に使用した同じライブラリを鋳型とし、アダプターに特異的なプライマーと設計したフォワードプライマーを用いて PCR (上記と同条件) を行った。PCR 産物を pGEM-T Easy vector (プロメガ) にクローニングし、配列を決定した。リバースプライマーはフォワードプライマーとの増幅長が 200 ~ 250 bp になるように設計した。

## 5. SSR マーカーを用いた遺伝型解析および多様性解析

Mighty Amp Polymerase (タカラバイオ) を用いて PCR (94 30 sec, 70 1 min を 15 サイクル後、94 30 sec, それぞれのマーカーのアニーリングに適した温度 1 min を 25 サイクル) を行った。得られたバンドの数とサイズを 2 進法の表記に変換し、NTSYSpc を用いて UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) で計算し、系統樹を作製した。また、WIN BOOT 2.0 プログラムを使用し、ブーツストラップ解析を行った。

## 結果と考察

## 1. SSR 配列の所在とパターン

本研究で予測した AG(/TC) の反復パターンは認められない場合があった。この結果と、先行研究の結果から、ミシマサイコの DNA 中には AC(/TG) の反復配列がより多く含まれていることが予測される。ただし、想定した配列を (AG)<sub>10</sub> と設定したため増幅が行われなかった可能性があるため、以降は (AG)<sub>8</sub> や (AG)<sub>10</sub> など、条件を緩く設定して開発を続けていく予定である。

## 2. マーカーの開発と性能評価

ミシマサイコ品種 A、B および C に対して、評価が未了である 2 マーカーの性能評価を行っている。詳細は発表会にて報告する。

## 3. 遺伝的多様性の評価

ミシマサイコの異なる 18 系統に対して、先行研究で作成されたマーカーに新規の 2 マーカーを加えた、計 8 マーカーを用いて遺伝型の解析を行い、多様性の評価を行っている。詳細は発表会にて報告する。

# 塩害地で生育可能な遺伝子組換えユーカリの選抜及び環境リスク評価

駒田 亜弥 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渡邊 和男 (生命環境系)

## 背景と目的

近年乾燥地では、地球温暖化がもたらす気候変動や、人為的な過放牧や過伐採、不適切な灌漑などにより、干ばつや塩害の被害が引き起こされている。これらは砂漠化を益々進行して耕作可能地を減少させ、食糧不足問題にも大きな影響を与えている。現在これらの問題を解決する一つの方法として、乾燥や塩害等の環境ストレスに耐性を持つ遺伝子組換え植物が期待されている。本研究室では、以前から植生限界地での環境植林を目標とし、遺伝子組換え技術を用いた環境ストレス耐性樹木の開発・評価に関する研究を行っている。これまで行われてきた耐塩性試験では、高濃度の塩水処理 (500 - 600 mM) における生存率から塩耐性評価を行ってきた。しかし、実際に想定される植林地においては、一過性の高塩に対する耐性より、ある程度の塩濃度下でも成長し続けられる特性が重要だと考えられている。そこで今回は、塩害地を想定した新たな塩水処理条件で、耐塩性の評価を試みることにした。また、耐塩性と遺伝子導入との関連を考察する為、導入遺伝子の発現量についても調査する。さらに、将来予想される第一種使用申請の際に必要な環境影響評価書の作成に向けて生育特性、及び環境リスク評価も併せて行う。

## 材料と方法

### 1. 材料

遺伝子組換えユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis*) 9 系統及び、非組換え体 2 系統 (CML2, cam6) を用いた。遺伝子組換え体は塩生植物であるアイスプラント由来の RBP 遺伝子導入系統 3 系統 (RBP R1, R2, R10)、マングローブ *Bruguiera sexangula* 由来の mangrin 遺伝子導入系統 3 系統 (man 15, 40, 56) 及び、塩生微生物 *Arthrobacter globiformis* 由来の codA 遺伝子導入系統 3 系統 (codA A2, A10, B25) を用いた。これらは共同研究先である日本製紙 (株) により作成され、無菌苗として受領した。培養苗の馴化は、まず閉鎖系栽培室で発根幼苗を四角錐ポット移植し 29 日間、その後半開放系栽培施設である特定網室に移して 14 日間後、黒丸ポット (直径 10.5 cm) に移植して 40 日間行った。馴化後、高さを基準に植物を通常灌水と塩水処理の 2 つのグループに分け、塩ストレス評価試験を開始した。

### 2. 塩ストレス耐性評価試験

植物に 16 週間 100 mM NaCl 水溶液を与え、およそ一週間間隔で植物の高さ、土壌の電気伝導度 (EC 値) を測定した。また、それぞれの系統について水道水を灌水した実験区を用意しこれを対照区とした。灌水は、塩水処理区、対照区共に 2 日に一回行い、成長量や生存率から塩ストレス耐性を評価した。

### 3. 遺伝子発現解析

定量 RT-PCR 法により行った。栽培中の個体から新しい葉を採取し、液体窒素を用いて凍結粉碎し、RNA queous kit (Ambion) を用いて全 RNA を抽出した。全 RNA からの cDNA 合成は PrimeScript 上<sup>®</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を用いた。

## 4. 環境リスク評価試験

### 土壌微生物相への影響評価

特定網室で 16 週間栽培した植物の栽培土を採取し、平板培養法にて糸状菌、放線菌、及び細菌のコロニー数を計測、乾燥土 1 g 当たりの菌数を算出し、遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体の間で比較した。

### アレロパシー活性の評価

アレロパシー活性の評価はサンドイッチ法によるバイオアッセイによって行った。植物の葉を採取し、乾重量 50 mg、10 mg をそれぞれ寒天培地で挟む。寒天培地上にレタスの種子を蒔き、3 日後、発芽率及び、胚軸と根の長さを測定し、アレロパシーの影響を評価及び、遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体の間で比較した。

## 結果と考察

遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体を低濃度の塩水処理下で栽培したところ、16 週間にわたり塩処理条件でも成長を続ける個体が観察された。このことから、本処理条件は塩処理条件での成長量を指標として耐塩性を評価することが可能である。しかし、処理期間中に枯死してしまう個体も多く、また、11 週目以降 EC 値の急激な増加が見られたことなど、改善の必要がある。系統毎の耐塩性の比較からは、特に codA A2 系統で塩処理条件での優れた成長が観察された。codA A2 系統は、導入遺伝子の発現量も他 2 系統 codA 遺伝子導入系統よりも約 4 倍高いことから、導入した codA 遺伝子の高発現により耐塩性形質を獲得したことが示唆される。環境リスク評価試験の結果から、土壌微生物相への影響、アレロパシー活性のいずれにおいても、全ての遺伝子組換え体において非遺伝子組換え体との間に有意な差は見られず、本研究に用いた遺伝子組換えユーカリによる環境への影響は非組換え体と同程度であると考えられる。

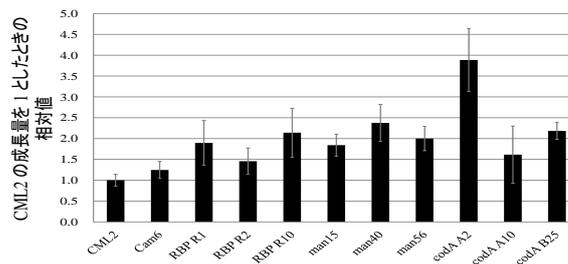


図1: 塩処理期間における成長量

## 参考文献

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

Etsuko Matsunaga et al. (2011) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eucalyptus globulus* using explants with shoot apex with introduction of bacterial choline oxidase gene to enhance salt tolerance. Plant cell Rep DOI 10.1007/s00299-011-1159-y

## 国際条約に対応した生物遺伝資源の材料譲渡契約の提案

増田 恵 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 渡邊 和男 (生命環境系)

### 背景・目的

従来、生物学研究において、研究者同士の研究材料の提供や交換は比較的自由に行われてきた。材料譲渡の自由が学問や産業の発展に貢献してきたともいえる。従来、生物学研究において、研究者同士の研究材料の提供や交換は比較的自由に行われてきた。材料譲渡の自由が学問や産業の発展に貢献してきたともいえる。今日では所有権と成果の担保のために、このような研究材料譲渡は契約書に基づいて行わなければならない。2010年に生物多様性条約の第10回締約国会議で採択された名古屋議定書でも、遺伝資源のアクセスと利益配分に関わる制度の構築を必要としている。研究材料譲渡の際に、提供者と受領者の間の合意事項として、権利の所在や使用条件・利益配分等について明文化したものがMTA (Material Transfer Agreement: 材料譲渡契約) である。研究者はMTAの条件に従い研究・研究発表・研究成果の利用を行う。MTAの目的は提供者・受領者双方の権利保護と生物遺伝資源の譲渡・使用によって将来起こり得る問題を未然に防ぐことである。MTAの問題点としては、契約条件を巡る交渉の長期化により、材料譲渡の遅れ・研究の遅れが生じることである。交渉の長期化を解決する方法の1つとして、MTAフォームの統一がある。米国のNIH (National Institute of Health) とAUTM (Association of University Technology Manager) は生物遺伝資源の材料譲渡に使用する統一のMTAとしてUBMTA (Uniform Biological Material Transfer Agreement) を作成した。今日UBMTAは、米国をはじめ、多くの海外大学・研究機関で、学術目的の材料譲渡におけるスタンダードになりつつある。一方このUBMTAが生物多様性条約 (CBD: Convention of Biological Diversity) に対応しているとはいえ、MTAの国際条約対応は今後の課題である。日本でも、グローバルイゼーションと諸国際法に対応する必要性があり、そのような部分に対応した統一のMTAフォームを使用することにより、材料譲渡における問題を解決できると考えられる。

本研究では、日本のMTAにおける問題点を解決し、材料譲渡の面から研究発展・研究者の権利保護・国際化への対応につなげることを目的としている。

### 調査

#### 1) MTAの比較

- a. 国内の大学、研究所等が使用しているMTAのひな型を集め、MTAごとに条項の有無を調査した。
- b. UBMTAを基準とし、日本のResearch University - 11 (RU-11) が使用しているMTAひな型の点数評価を行った。

#### 2) 国際条約に対応した生物遺伝資源の材料譲渡契約の提案と検証

日本の研究機関で使用することができる、国際条約に対応した生物遺伝資源の材料譲渡契約の新たな universal form を提案し、研究者・実務者の方々に意見を伺った。

### 結果・考察

#### 1) 日本の研究機関で使用されているMTAの現状

a. 日本の研究機関がひな型として使用しているMTAを比較した結果、条項に統一性がみられなかった。上記のRU-11のMTAを比較した場合、全てのMTAに記載してある条項は1個、逆に1つのMTAにしか記載されていない条項が35個であった。

各研究機関の使用しているMTAの内容が異なることが、MTAの契約において、条項の確認作業等に時間が取られ、材料移転の遅れが生じる原因の1つであると考えられる。また、使用条件が限定されていること、商業利用や特許に関する条項を含むものが少ないことから、研究成果の利用について柔軟性がなく、産業利用への発展につながりにくいと考えられる。

b. UBMTAを基準として、RU-11のMTAの点数評価を行った結果、両者に記載されている条項に違いが見られた。UBMTAとRU-11のMTAはともに、教育・研究目的の材料譲渡を目的としたMTAである。しかし、UBMTAを基準として比較すると、RU-11のMTAひな型には

- 不足する点や全体としてバランスの悪さが見受けられた。
- 一方で、UBMTAにはない条項や、UBMTAよりも詳細に条件が決められている条項が見受けられた。
- 商業利用や特許出願等、将来問題が起きる可能性のある部分に対応した条項が欠けていた。
- 生物遺伝資源の譲渡に関わる用語の定義や、生物ごとに遵守すべき条約・法律の記載が必要である。

今回はUBMTA基準の評価であるため、偏った見方ではある。しかし、日本の大学で使用されているMTAは、多くの海外大学でスタンダードとして使用されているUBMTAと内容に差があることが確認できた。日本の材料譲渡契約は未熟であり、多様な材料譲渡や国際競争に対応できていないことが示唆される。一方で論文調査などから、UBMTAは、生物多様性条約を批准していない米国の機関が作成したものであるため国際条約に対応していない、受領者に与えられる権利が提供者の意にそぐわないなど否定的な意見もある。そのため、UBMTAをそのまま日本で使用するのには難しいと考えられる。以上の結果を踏まえ、国際条約に対応した生物遺伝資源譲渡のための新たなMTAを提案し、理研BRCやNBRP実務者の方々に意見を伺った。

2) 提案した新MTAについて実務者の方々から意見を伺い、実用可能なものであるか検証した。現在調査中。2月初旬に結果回収予定。

### 参考文献

- 名古屋議定書関連サイト <http://www.cbd.int/abs/>
- UBMTA 関連サイト <http://www.autm.net/>
- 大学におけるマテリアルトランスファーの現状と問題点 調査研究報告書 2007  
国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学 他

# トマト果実成熟過程における組織別の細胞壁マトリックス多糖類の変化

瀧沢 彩水 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 岩井 宏暁 (生命環境系)

## 背景および目的

植物の果実は、種子の保護や散布のために重要な生殖器官であると同時に、私たち人間にとって豊富な栄養を含む重要な食物でもある。食用とされる果実の中には成熟が進むにつれて軟らかくなっていくものがあるが、中でもトマトは、果実の軟化が起こる代表的な果実であり、これまで果実軟化の研究に多く用いられてきた。今までのトマト果実を用いた多くの研究から、細胞壁の分解が果実軟化に関係しているということがわかっているが未だに不明な点が多い。この理由の一つとして、これまで行われてきた研究の多くが果皮のみあるいは果実全体を対象にしており、トマト果実の複雑な構造を考慮していないことが問題であると考えられる。トマト果実内の組織は、それぞれ発生過程や役割が異なっていることから、軟化の進行過程も組織ごとに異なると予想できる。私達の研究室で成熟に伴うペクチン架橋を組織別に調べた研究では、ペクチンとカルシウムの架橋の制御が組織ごとに異なるという結果が示されている。しかし、細胞壁の架橋はペクチン同士の架橋であるペクチン-カルシウム架橋のみではなく、他のヘミセルロースやセルロースといった各細胞壁構成成分どうしが互いに架橋し合っただけでなく、細胞壁の特性と強度を決定している。そこで本研究では、組織別の解析が行われたペクチンと、他の細胞壁構成成分であるヘミセルロースやセルロースとの架橋の変化が、どのように果実軟化に関わっているかを明らかにすることを目的として研究を行った。

ペクチンとヘミセルロース、ペクチンとセルロースの架橋を行っている糖としてキシロースやアラビノースがある。ヘミセルロースの成分の一つであるキシランは、キシロースを主成分として主鎖を形成し、アラビノースを側鎖を持つ細胞壁多糖である。双子葉植物において、ヘミセルロース成分の一つであるキシランは、一次細胞壁では少なく、導管組織等の二次細胞壁に含まれることが知られており、果実における存在については注目されず知見が乏しい。そこで、ヘミセルロースの中でもキシランに注目し組織別にその合成と分解について調査を行い、既に報告のあるキシログルカンやペクチンの知見とあわせて、果実軟化に伴うこれらの細胞壁構成成分の変化のメカニズムについて考察を行う。

## 試料および方法

### ● 試料

トマト (*Solanum lycopersicum*, 品種: Micro Tom) を、25 のインキュベーター内で栽培した。果実を6つの成熟段階 (Immature green (IG), Mature green (MG), Breaker (B), Turning (T), Red ripe (RR), Over ripe (OR)) にわけてサンプリングを行い、各果実を4つの組織 (外果皮、中・内果皮、隔壁、子室組織) にわけて、計24サンプルで実験を行った。

### ● キシラン分解酵素: $\beta$ -キシロシダーゼ、 $\alpha$ -アラビノフラノシダーゼの酵素活性測定

各サンプルより酢酸ナトリウムバッファーを加えて酵素液を抽出し、蛍光基質を加えて37 で2時間反応させた後、遊離してきた蛍光物質の量を吸光度計で測定することで活性を算出した。

### ● キシラン合成酵素の遺伝子発現解析

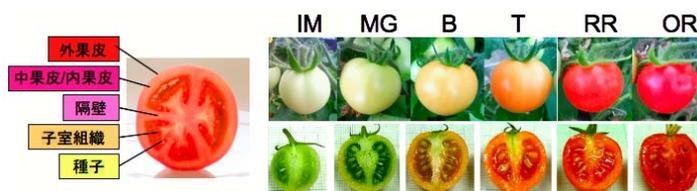
キシラン合成酵素遺伝子は、モデル植物であるシロイヌナズナにおいて *IRX9* が重要な遺伝子として知られている。この遺伝子が属する GT43 ファミリーの中において、トマトゲノム中で存在が確認されたものは *SIIRX9-L1*, *SIIRX9-L2* の2つのみであった。各サンプルから全RNAの抽出を行い、cDNAを合成した後、作製した各プライマーでRT-PCRにより発現を解析した。

### ● 糖の細胞壁局在分布

果実の樹脂切片を作成し、キシラン、アラビナンに特異的なモノクローナル抗体を用いて、免疫組織化学染色によって組織別の局在様式を調べた。

## 結果と考察

キシラン分解酵素である  $\beta$ -キシロシダーゼと  $\alpha$ -アラビノフラノシダーゼの活性は外果皮で最も高く、他の組織間では大きな差は見られなかった。両方の活性ともほぼ同じパターンを示し、果実サイズの小さいIMで最も活性が高く、果実サイズが確定したMGから軟化が進むステージにかけて急激に活性が低下した。キシログルカン転移酵素/加水分解酵素での報告とあわせて考察すると、キシランおよびキシログルカンの分解は、果実サイズの拡張には重要であるが、果実軟化には大きく関与していない可能性が考えられる。しかし一方で、トマト果実の免疫組織化学染色及び細胞壁糖組成分析の結果から、各組織とも成熟に伴ってキシロース量は増加する傾向にあった。キシロースは外果皮で最も多く、次に中・内果皮や隔壁、子室組織の順で多かった。そこで、キシラン合成酵素の発現パターンを調査した結果、外果皮で発現が最も高く、そして成熟に伴って上昇していた。以上のことから、果実サイズが肥大する成長過程ではヘミセルロースの分解は促進され、その後、細胞壁が分解されることが知られる軟化過程であっても、過度のヘミセルロースの分解は抑制されていたことが示唆された。さらに、外果皮などの一部の組織においてはキシランを含めた細胞壁構造を合成・再構築している可能性が考えられる。果実成熟・軟化の変化における細胞壁構築機構は一様ではなく、組織により様々な差があるがわかる。今後は、他の細胞壁成分についても調査する予定である。



## 単子葉植物イネにおけるペクチンのメチル化度調節関連遺伝子の解析

長谷川 和也 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 岩井 宏暁 (生命環境系)

## 背景と目的

高等植物において細胞壁は、物理的構造の維持といった「壁」としての役割のみでなく、分裂組織の維持や花器官形成といった発生に重要な役割も担っていることが知られている。一次細胞壁はセルロース、ヘミセルロース、ペクチンなどから構成されているが、なかでもペクチンは栄養成長や生殖成長の細胞接着にも関与していることが示唆されている。特に生殖過程においては、細胞接着性が多く求められることから、ペクチンが多くの働きを有している可能性がある。ペクチンはペクチンメチルトランスフェラーゼ (PMT) の働きによって、メチル化された状態でゴルジ体において合成される。細胞壁内においては、ペクチンメチルエステラーゼ (PME) によって脱メチル化された時に、ペクチンはカルシウムと架橋を形成することでゲル化する。双子葉植物では、メチル化度の調節によってゲル化を制御することが細胞壁の強度や接着性に大きく影響することが知られている。シロイヌナズナの変異体を用いた研究では、PME が花粉の発達において重要な働きをすることや、PMT の細胞接着への関与が示唆されているが、同時に栄養組織においても強い影響が見られることが報告されている。このように全身に多量のペクチンを有する双子葉植物では、ペクチンの機能欠損が与える影響が、生殖組織のみならず栄養組織に対しても大きい。そこで、茎や根といった栄養組織においてペクチンをほとんど含まず、生殖組織において豊富にペクチンを有している単子葉植物のイネを用いて、生殖過程におけるペクチンの機能に注目して研究を行った。本研究では、ペクチンのメチル化を行う第一段階である PMT の欠損変異体を調査することにより、ペクチンのメチル化度調節が生殖過程において果たす役割を明らかにすることを目的に実験を行った。

## 材料と方法

イネゲノムおよび発現データベース (SALAD, Rap DB, RiceXpro) を用いて PMT 特有の配列をもち、発現量の多い 2 つの遺伝子 (*OsPMT10* および *16*) を選抜し、その発現パターンについて調査した。選抜した遺伝子の T-DNA 挿入変異体をポステック大学から入手した。イネ (*Oryza sativa* 品種: Hwayoung, Donjin, Nipponbare) の正常株 (Wt) および *pmt* 変異体を筑波大学遺伝子実験センターの特定網室において育成させた。ホモヘテロ検定を行い欠損変異体の選抜をし、様々なステージにおける生育調査を行った。

## 結果

1、*ospmt10* 変異体

*in silico* 発現解析によると *OsPMT10* は栄養成長、生殖成長全体を通して高発現していた。ホモ・ヘテロ判定試験によりホモ個体を特定し生育調査を行った。その結果、栄養成長期にはほとんど影響が見られなかったが、生殖成長期において Wt の稔実率がほぼ 100% なのに対し、ホモ個体の稔実率はおよそ 40% であった。実体顕微鏡による観察の結果、ホモ個体の花では葯が萎れるという形質が見られた。雌しべは、Wt と大きな差は見られなかった。

2、*ospmt16* 変異体

*in silico* 発現解析によると *OsPMT16* は生殖成長において葯と雌しべのみで高く発現しており、他の栄養成長組織ではほとんど発現していなかった。ホモ・ヘテロ判定試験によりホモ個体を特定しホモ個体を特定し生育調査を行った。その結果、栄養成長期において、播種後 112 日後の草丈が Wt は平均 101.7 cm だったのに対して、ホモ個体は 79.0 cm と低かった。生殖成長期においては、Wt の稔実率がほぼ 100% なのに対してホモ個体は完全に不稔となった。実体顕微鏡による観察の結果、ホモ個体の花は柱頭の形成が不完全で、子房が萎れていた形質が見られ、また葯は Wt に比べ短かった。

## 考察

これらの結果から、PMT が生殖過程の特に稔性および葯や柱頭の発達において重要な働きを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管ガイダグスが含まれている。PMT によるペクチンメチル化度の制御は、ペクチンとカルシウム架橋形成を通じた細胞壁の特性や細胞接着性に影響を与えた可能性がある。今後は変異体の相補試験および今回得た表現型解析の再現をとることと、より詳細な解析を行う予定である。

## 単子葉植物イネにおけるプロリンリッチタンパク質変異体の表現型解析

宮下 彩 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 岩井 宏暁 (生命環境系)

### 背景

陸上植物の細胞壁は、分化、成長、生殖など、植物の生命活動のほぼ全域に亘り、枢軸となる役割を担う装置である。細胞壁はセルロースなどの多糖類を中心に構成されているが、その他に細胞壁タンパク質と呼ばれる不溶性の構造タンパク質もまた重要な構成成分の一つである。細胞壁タンパク質は、エクステンシンやプロリンリッチタンパク質 (PRP) を含むヒドロキシプロリンリッチタンパク質、グリシンリッチタンパク質で構成される。双子葉植物での研究により、エクステンシンが構造タンパク質として大きな役割を果たしていることが示唆されてきているが、単子葉植物のイネでは、そのゲノム中に構造タンパク質の主役たる不溶性のエクステンシンは見いだされていない。しかし PRP は、単子葉植物においてもデータベース検索からゲノム中に多く存在しており、種類も多岐にわたっている。また PRP では、イソジチロシン架橋、ジスルフィド結合により、エクステンシンと同様に細胞壁内で不溶化することが知られている。このことから本研究では、単子葉植物イネにおいて、PRP が構造タンパク質として植物の発生過程に大きな働きを有している可能性があると考え注目することとした。

双子葉植物での研究により PRP は、栄養成長組織では主に、木部、繊維組織、皮層において存在することが知られている。イネでも、OsPRP3 が花に特異的に発現していることがわかっている。また OsPRP3 は細胞壁に存在し、その過剰発現体の耐寒性を示すなど環境応答にも重要であると考えられている。しかし、イネで PRP に関する報告は OsPRP3 のみであり、その他の OsPRP については報告がないのが現状である。本研究では、単子葉植物イネ PRPs の T-DNA 変異体を解析して行くことを通じて、PRP がどのような生理学的機能を有しているのかについて明らかにすることを目的としている。

### 方法

シロイヌナズナで報告のある AtPRP3 と相同性の高い遺伝子を単子葉植物のモデル植物であるイネで検索した。さらにその中から、細胞壁への局在や二次構造についてデータベース予測を行うことで、細胞壁構造タンパク質特有の配列を持ち、プロリンに富むタンパク質について選抜し系統樹を作成した。次にイネゲノムおよび発現データベースを用いて発現パターンと発現量について調査した。選抜した PRP 遺伝子で T-DNA 挿入変異体が存在するもの全てについて、ポステック大学より入手した。そして野生型のイネ (*Oryza sativa*, 品種:Dongjin) および選抜した遺伝子の T-DNA 挿入変異体を特定網室にて育て、様々なステージでの生育調査を行った。

### 結果・考察

データベースによる解析から、発現量の高い PRP はイネゲノム中に数多く存在することがわかった。イネにおける OsPRP の系統樹を作成し、すべての遺伝子の発現パターンをデータベース上で調査したところ、シロイヌナズナでは根、花で発現するものがそれぞれ系統樹上でクラスターを形成していたが、イネの PRP 系統樹では、そのような

クラスターは存在していなかった。さらにこれらの発現パターンをみてみると、特定の器官のみで高い発現が見られる遺伝子が多くあった。以上のことから、OsPRP は、配列の近い遺伝子同士で働きを補完しあうことなく、それら一つ一つに特定の役割が分担されている可能性が考えられる。生殖器官特異的で高い発現が見られた OsPRP4 遺伝子の T-DNA 挿入イネの T<sub>1</sub> 株について観察したところ、野生型イネと比較して、葯や雌しべが著しく小さくなっている異常が観察された。今後は、後代の表現型観察を含めた遺伝的解析など、より詳細な解析について行っていく予定である。

## イネ葉身におけるマンガン過剰が誘導する PAL 活性の解析

犬塚 聡 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 古川 純 (生命環境系)

## 背景

マンガン (Mn) は光合成等植物の生理に必須である。しかし酸性土壌中の過剰な Mn は植物に有毒となり、初期症状として葉の褐色斑を示す。この褐色斑はアポプラストペルオキシダーゼ (PODs) に酸化されたフェノール類と Mn である。PODs の活性化により生じるフェノキシラジカルや過酸化水素は酸化ストレスの原因である事から、PODs 活性と Mn 毒性には相関関係が成り立つと考えられている。

ケイ素 (Si) は地殻に二番目に多く含まれる元素である。イネ科植物は土壌のモノケイ酸を能動輸送体により吸収し、主に葉の表皮細胞壁に沈着させる。Si は幅広い植物種を Mn 毒性を含む様々な生物的・非生物的ストレスから保護するが、その分子機構は未知である。近年は Si が細胞壁の Mn 吸着力を高めるだけでなく、アポプラストにおいて PODs 活性を上昇あるいは抑制するフェノール類の量を変化させる機能がササゲやキュウリで注目され、Mn 毒性に重要な要素であると予想されている。

多くのフェノール化合物はフェニルプロパノイド経路から合成されるので Mn 毒性と Si の効果には経路の律速酵素の関与が示唆される。Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) は経路の第一段階で L-Phenylalanine (L-Phe) を桂皮酸に変換する律速酵素である。様々な障害に対して Si も PAL もストレス緩和に機能する事を踏まえると、過剰 Mn 存在下で Si は PAL 等の活性上昇を介して Mn 毒性を抑制する様に各種フェノール類の比率を改変する構図が考えられる。

これまで Mn 毒性と Si の効果について PAL 活性の重要性は注目されなかった。そこで本研究は Mn 過障害と Si 処理による PAL 活性の解析、及びイネで既知の 3 種の PAL 遺伝子と 6 種の PAL 様蛋白質 (PLP) をコードする遺伝子から活性変化と遺伝子発現が相関する遺伝子を同定し、PODs 活性を制御するフェノール類への影響を明らかにする事で Mn 毒性を緩和する Si の効果における PAL の関与について明らかにする事を目的とした。

## 方法

## 材料と生育条件

発芽 7 日後のイネ (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) 3 個体を 1/2 Kimura 水耕液に移して 14 日培養した。Mn は  $MnCl_2$ 、Si はイオン交換樹脂を通した  $K_2SiO_3$  を添加した。第二葉を症状の観察、第三葉を PAL の活性・発現解析に用いる為に液体窒素で凍結して -80℃ に保存した。

## PAL 活性解析

凍結した葉身を破碎し、1.5 ml 破碎液 (100 mM K-borate 緩衝液 (pH 8.8), 2 mM 2-mercaptoethanol) に懸濁、遠心 (16,000 g, 10 min, 2℃) 後の上清を酵素抽出液とした。反応液は 4 mM L-Phe 0.5 ml, 100 mM K-borate 緩衝液 (pH 8.8) 0.3 ml, 酵素抽出液 0.2 ml から成り 37℃ で反応させ、5 N HCl 0.1 ml で停止した。反応液を酢酸エチルで 3 回抽出し風乾した。25% MeOH 50  $\mu$  l に溶解し 30℃ 暗所に保存した。HPLC で測定した 1 h あたりの桂皮酸生成量を PAL 活性と定義した。蛋白質定量は Bradford 法に従った。

## 金属濃度分析

72℃ で 48 h 滅菌乾燥した第三葉を 60% 硝酸:30% 過酸化水素=2:1(v/v) に一日浸し、140℃ で溶解した。純水で希

釈、残渣の濾過後に誘導結合プラズマ分光分析装置 (ICP-AES/Optima7300-DV) で各金属濃度を定量した。

## PAL 発現解析

Rice Annotation Project Data Base の PAL と相同で活性部位を保存する遺伝子に特異的な Primer を Primer3 により設計した。今後は葉身から抽出した RNA から合成した cDNA を用いて発現解析を行う。

## 結果

## 毒性 Mn 濃度の検討

Mn 毒性は遺伝型・環境条件に依存する。本研究の系では Si 欠乏条件でかつ 10-50  $\mu$  M Mn のイネは葉身に褐色斑を生じたが、他方で Si 処理のイネは 50  $\mu$  M Mn でも毒性を示さなかった。従って過剰 Mn を 50  $\mu$  M、最も生育の良好な 0.5  $\mu$  M を Control とした。

## PAL 活性解析

過剰 Mn は PAL 活性を Control の 10 倍に増加した。Si は過剰 Mn に誘導された PAL 活性を Control と有意差のない程度まで緩和した。この緩和効果は以下の葉身内 Mn 濃度の測定結果と併せると Si により葉身内の Mn 濃度が減少して活性の上昇が二次的に抑制された為と解釈される。

## 葉身内金属濃度

0-50  $\mu$  M の Mn 処理で Si 処理によらず葉身内 Mn 濃度は一貫して増加したが、Si 処理区では常に葉身内 Mn 濃度が Si 欠乏イネよりも有意に減少していた。しかし Si 処理区のイネを 50-200  $\mu$  M Mn で処理すると 100-150  $\mu$  M Mn のイネは毒性を認めないにも関わらず、Si 欠乏区で毒性を示した 10  $\mu$  M Mn のイネと Mn 濃度に有意差は無かった。この事は Si が葉身の Mn 減少に限らず、葉身自体における耐性も同時に強化する可能性を示唆した。

## 考察

Si による Mn 耐性の機構は細胞壁の Mn 吸着力強化・抗酸化系の活性化等が提出されている。イネの場合、Si は根の酸化力強化により葉身内 Mn 濃度を減少すると言われ、本研究も Si は葉身の Mn 濃度を有意に低下させる事を確認した。しかし Si 処理したイネを 100-150  $\mu$  M Mn に処理すると Si 非処理区にとって有毒な Mn 濃度を蓄積しながら毒性を示さないの、葉身の Mn 濃度減少のみが Si による Mn 耐性とは考えにくい。

本研究では Si 欠乏のイネは過剰 Mn で PAL 活性を著しく上昇したが、他方で 50  $\mu$  M Mn と同時に Si を処理した植物の PAL 活性は Control と同程度であった。PAL は一般にストレスに誘導されるが、PAL の活性が上昇しなかった事で PODs の基質や活性促進能を持つ p-クマル酸等のフェノール類がアポプラスト中で増加せず、Mn による PODs 活性の誘導も抑制される事により毒性が緩和される可能性がある。今後 Si 添加による葉身内での Mn 量減少によらない耐性機構が予測される条件において PAL 活性並びにフェノール類の定量を行う事で更なる検証を行う予定である。また、イモチ病に感染したイネでは Si による PAL 活性の亢進が報告されている。今後イモチ病感染イネにおいても PAL を解析する事により、両者の違いの要因を見出す必要がある。

## イネのいもち病抵抗性反応における細胞壁機能の解明

小原 崇司 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 古川 純 (生命環境系)

### 背景・目的

高等植物の細胞壁は、細胞の形や大きさを決定している細胞構造である。また最外層を覆っていることから、外部からの様々なストレスに対応していると考えられている。外部ストレスには温度ストレス、微量元素による化学ストレスや動物・昆虫及び病原菌による物理的ストレスがある。細胞壁は一番外側に存在しているため、病原菌が植物に感染する時には、細胞壁に最初に接することになる。しかし、病原菌による植物への感染と対応する細胞壁成分の研究は、現在までにほとんどわかっていない。以前の報告で、カロースが病害虫による傷害発生時に蓄積し、病害応答に関わると考えられていた。しかしカロース欠損変異体では逆に病原菌への抵抗性が増していたことから、詳細な解析が行われた結果、これはカロース欠損が病害応答に有効な植物ホルモンであるサリチル酸を誘導したことによるものであると報告がされた。現在、病原菌と細胞壁の直接的な関係についてあまり知見がなく、細胞壁成分が変化した植物での病原菌抵抗性の変化は見られたことがない。

そこで、本研究室において同定された種々の細胞壁改変イネを用いて、イネの主要な病原菌であるいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) に対する抵抗性を調査することで、病害応答性における細胞壁構造の重要性を明らかにすることを目的に研究を行った。

### 方法

単子葉植物のモデル植物であるイネ (*Oryza sativa* 品種: 日本晴) について、正常株 Wt と細胞壁改変イネを材料に実験を行った。

種子を1週間吸水し、1週間生育させた合計2週間後のイネの第4葉に対して、 $1.0 \times 10^5$ /ml の濃度に調製したいもち病菌の胞子を噴霧した。噴霧から約5日後病斑の様子を観察し、計数した。それぞれの病斑を軽度のものから stage1 ~ stage5 と5段階に分類した。それぞれの段階に係数をかけることで Disease index とし株間での比較を行った。

### 結果・考察

細胞壁改変イネでは正常型のイネに比べて、いもち病菌の病斑の出現様式が変化していた。Disease index による統計データより、細胞壁が変化することでいもち病に対する抵抗性が変化することがわかった。今後は、いもち病菌に対して病害抵抗性に変化がおきたメカニズムについて詳細に解析を行う。また、今回検討した細胞壁成分以外のものが変化した株を用いて知見を増やし、病原菌抵抗性における細胞壁の重要性を明らかにしていきたい。

## 多品種に応用可能なサツマイモ形質転換系の開発と塩耐性サツマイモの作出

大場 ゆい (筑波大学 生物学類)

指導教員: 菊池 彰 (生命環境系)

## 1. 背景

近年、地球温暖化による気候変動、森林開発、過放牧による土地の乾燥、地下水の過剰利用などが原因となり、塩害が世界各地で深刻化している。塩害により農作物は生育を阻害され、生産量が大幅に減少、場合によっては耕作自体が不可能となる。このような背景から、塩ストレス耐性を持ち、塩害地でも生育可能な作物の作出が望まれている。

そこで、塩ストレス耐性付与のターゲットとして、サツマイモ (*Ipomoea batatas*) に注目した。サツマイモは世界各地で栽培されており、世界第7位の生産量の作物である。デンプン生産力が高く、バイオマスエネルギー源としても期待される。さらに栄養の乏しい土壌や乾燥地帯でも生育が良好で栄養価も高い。食料、工業、エネルギー目的のいずれについても利用価値が高いため、高品質性やストレス耐性付与は今後の農業にとって有益となる。

だが、サツマイモは同質6倍体であり、自家不和合性、雄性不稔が認められ、従来の交配育種による品種の改良は困難であった。そのため、より効率的な育種方法として、遺伝子組換えによる育種が注目されている。これまでに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てきたが、近年は簡易かつ効率的なアグロバクテリウム法が注目されている。しかし前述の様に、サツマイモは同質6倍体のため、栽培品種間の遺伝的な差が大きい。遺伝子導入が成功した品種は限られており、また、その手法も異なる。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。

## 2. 目的

サツマイモにおいて既存のアグロバクテリウム法を改良、多品種に適応可能な遺伝子組換え体作出法の確立を目的とし、塩耐性サツマイモの作出を目指す。

## 3. 材料と方法

## 3-1. 材料

九州126号(品種名:コナホマレ)を植物材料とした。LS培地(3%スクロース、0.32%ジェランガン)上で25、16 h/lightで培養、期間は1ヶ月以内とし、葉と葉柄を感染に用いた。

遺伝子導入には *Rhizobium radiobacter* (通称: *Agrobacterium tumefaciens*) EHA105株を用いた。ベクターは、pAB7113-mangrin-full と pAB7113-mangrin-core の2種を用いた。いずれもマングローブより単離された塩耐性タンパク質マングリンをコードする遺伝子を含み、前者はその全配列、後者はコア部分のみの配列である。これらを用いた。いずれもマングローブより単離された塩耐性タンパク質マングリンをコードする遺伝子を含み、前者はその全配列、後者はコア部分のみの配列である。これらを用いた。いずれもマングローブより単離された塩耐性タンパク質マングリンをコードする遺伝子を含み、前者はその全配列、後者はコア部分のみの配列である。これらを用いた。いずれもマングローブより単離された塩耐性タンパク質マングリンをコードする遺伝子を含み、前者はその全配列、後者はコア部分のみの配列である。これらを用いた。

## 3-2. アグロバクテリウム法

植物体をアグロバクテリウムに感染させた後、4FA(人工オーキシン)、アセトシリゴン(アグロバクテリウムのT-DNA領域の転写を誘導する)を含む共存培地に移し、25、暗下で3日間培養した。なお、共存培養以降はアグロ

バクテリウム除菌のため、培地に常にカルベニシリン(抗生物質)を添加した。その後、4FAを含む培地でカルスを誘導、カルスが形成され次第、アブシシン酸、ジベレリンを含む不定胚誘導培地に移した。25、暗下で3~6週間培養した後に、アブシシン酸、ジベレリン、トランスゼアチンリボシド(サイトカイニン)を含む植物体再生培地に移し、25、16 h/lightで培養、植物体の再生を促した。

これらの培地のホルモン濃度を変えて培養を行い、状態の良いカルス誘導に適した条件を検討した。

各培地の組成

	共存	除菌	不定胚誘導	植物体再生
アセトシリゴン	10	-	-	-
4FA	1 or 2	1 or 2	-	-
アブシシン酸	-	-	2or4or8	0.05
ジベレリン	-	-	1 or 2	-
ゼアチンリボシド	-	-	-	0.2 or 0.4

(mg/L)

## 4. 結果と考察

本研究は小林(2008)の研究結果を基に、カルスの生存率を優先するために除菌(カルス選抜)期間を短縮、培地のホルモン組成を調整した。除菌培地に植物片を移して以降、高い確立でカルスが形成された。

4FAの濃度を変えて培養を行った際、葉柄のカルス形成率、カルス緑化の様子に差が見られたが、変更後のカルスが褐色~黒色に変化したため、従来の濃度で引き続き培養を行うことにした。まれに葉由来カルスで不定根が発生した。不定根の発生はサイトカイニンが十分に作用していないことが原因と考えられたので、植物体再生培地のサイトカイニン濃度調整、次いで内在性サイトカイニン(不定根形成促進)抑制効果を持つアブシシン酸の濃度調整を試みた。サイトカイニン濃度を上げた際も不定根は形成され、従来のカルスと大きな差は見られなかった。アブシシン酸濃度を上げた場合、白く透明なカルスが形成されたが、逆に不定根の形成率が上がった。

先行研究においては、白色で脆いカルスが良質とされている。不定胚誘導開始時には同様のカルスを得ることが出来たのだが、不定胚誘導期間が長くなるにつれ、カルスが褐変、固くなっていく傾向が見られた。現在までに、不定胚は観察出来ず、再分化個体を得ることは出来ていない。状態の良いカルスを維持しつつ、不定胚誘導に最も適したホルモン濃度、培養期間を引き続き検討して行く必要がある。

## 5. 今後の予定

引き続きホルモン濃度調整に加え、添加時期を変え、培養を行う。また、今後様々な栽培品種に対して遺伝子導入を試みる。サツマイモは栄養繁殖性作物であるためウイルス感染が起こるとその影響を排除する事が出来ない。ウイルス感染は収量や品質の低下を引き起こすため、遺伝子導入予定の栽培品種に対してウイルスフリー化を進め、質の良い植物材料の準備を行う。

## 参考文献

Nadia Anwar, Kazuo N. Watanabe, Junko A. Watanabe (2010) Transgenic sweet potato expressing mammalian cytochrome P450. *Plant cell Tiss Organ Cult* 105:219-231

# ニンジンストレス不定胚誘導系における胚性遺伝子 *LEC1* の発現と DNA メチル化に関する研究

近藤 卓也 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 菊池 彰 (生命環境系)

## 背景および目的

高等植物は、一度発生・運命が決定した体細胞が脱分化を経て、完全な個体に再生する能力である、分化全能性を容易に発揮する事ができる。特に不定胚形成現象はその典型であり、古くからニンジンをはじめとする幾つかの植物種においてその研究が行われてきた。しかし、その分子学的なメカニズムや制御機構は未だ明らかにされておらず、全ての植物種において不定胚形成を誘導する手法が確立されている訳ではない。

人工的に体細胞不定胚形成を誘導する方法としては、古くから 2,4-D のような人工オーキシンを与える実験系が知られていた。しかし、人工オーキシンによる不定胚形成には問題点がいくつかあった。例えば、人工オーキシンは不定胚形成だけでなく同時に植物ホルモンとして多様な生理反応を誘導してしまう点や、人工オーキシンが不定胚を誘導する濃度が植物の内生オーキシンの濃度と大きくかけ離れている点などである。

一方で、ストレスによって不定胚を誘導する実験系が知られている。ストレスの例としては、スクロースや食塩といった浸透圧ストレスが不定胚の誘導率が高いものの、熱ストレスや乾燥ストレス、重金属ストレスによっても不定胚が誘導される。また、ニンジンを用いたスクロースによるストレス不定胚誘導系において、胚性遺伝子である *ABI3* や *ECP* の発現量や不定胚形成率が、ストレス処理期間の長さに応じて上昇することが先行研究によって明らかにされている。しかし、胚発生に関わる重要な転写因子の一つである *LEC1* 遺伝子の発現については明らかにされていなかった。

これまでの研究報告から胚発生を制御する転写因子と考えられている *LEC1* 遺伝子について、オーキシンによる不定胚誘導系では胚性カルスや胚発生の初期に発現上昇する事が知られており、その発現制御には DNA のメチル化の低下が関与していることが示唆されている。そこで、本研究では *LEC1* 遺伝子に着目し、ストレスによる不定胚形成においても同様の変化が起こるか否かを検証する。これによって、不定胚形成の初期段階に DNA メチル化の低下と *LEC1* の発現上昇が普遍的に起こる事を見出し、体細胞不定胚形成のメカニズムの一端を明らかにしたい。

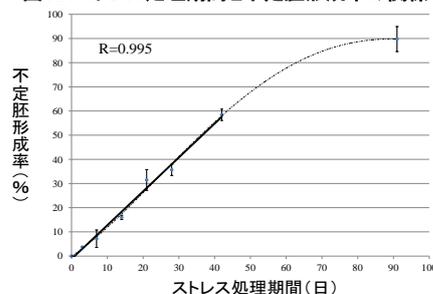
## 方法

播種から 9 日目のニンジンの茎頂を切除し、スクロースによる浸透圧ストレス処理として 24 % のスクロースを含む MS 培地で培養する。ストレス処理終了後、ストレスフリーの MS 培地で 4 週間培養し、不定胚形成率を測定する。同時にストレス処理終了時に一部の試料を冷凍保存し、DNA と RNA の抽出を行った。先行研究において、ストレス処理期間の長さや不定胚形成率の高さには正の相関が認められているため、ストレス処理期間の長さの異なる試料を複数作成した。*LEC1* 遺伝子の発現変動は、各試料の RNA から cDNA を作成し、*LEC1* のプライマーを用いて PCR を行うことで発現の有無を調べた。DNA のメチル化変動は、各試料の DNA にパイサルファイト処理を行い、シーケンス解析により、メチル化シトシンの割合を評価した。

## 結果および今後の展望

### (1) ストレス処理期間と不定胚形成率の相関性の調査

図 A : ストレス処理期間と不定胚形成率の関係



ストレス処理期間と不定胚形成率において、図 A のようにストレス処理 42 日までは強い正の相関が認められた。また、先行研究において 42 日間が最長だったストレス処理期間を 91 日間で実験したところ、ストレスフリーの培地へ移植する前の段階、即ちストレス処理のみの培養条件で、およそストレス処理 80 日目以降に、一部の切片に不定胚形成が観察された。

### (2) *LEC1* の発現解析

ストレス処理期間 3, 14, 42 日間の処理区において、*LEC1* の発現が観察され、0 日間処理区とストレスフリーの培地で 3 日間培養した処理区においては発現が観察されなかった。また、42 日間の処理区について、シーケンス解析を行い、増幅断片が *LEC1* である事を既知配列との相同性から確認した。今後は発現解析を他の処理区においても行い、ストレス処理期間との関連性を検証する予定である。

### (3) メチル化度の変化

オーキシンによる不定胚誘導系を用いた先行研究において、*LEC1* の 5' 上流域において、DNA のメチル化によって遺伝子発現に影響を及ぼす可能性のある CG 領域が多い部分が判明している。今回作成したストレス処理試料から DNA 抽出を行い、パイサルファイトシーケンス法によりストレス処理期間と DNA メチル化の変化について、解析を行なっている。

## 考察

ストレス不定胚誘導系において、胚性遺伝子の発現がストレス処理中に起こっていることが先行研究における *ABI3* や *ECP*、本研究での *LEC1* の発現解析によって分かった。ところで、通常ストレス処理後にストレスフリーの培地へ移植してから不定胚形成が観察されるが、今回実施した 91 日処理区では、ストレス処理中に不定胚の形態形成が観察された。これまでも、ストレス処理中にわずかではあるが本葉の生長が認められるケースがあり、非常に遅くではあるが細胞の成長が進行している事が知られている。この結果は、ストレスによって不定胚形態能を持つ細胞が出現し、その後、ゆっくり成長を進め、不定胚として観察されたものと考えられる。また、先行研究よりストレス処理期間の増大による不定胚形成率の上昇と *LEC1* の発現の増減には相関関係があり、メチル化度とは逆相関があると予想されるため、調査を進めていきたい。

## 葉緑体形質転換を用いた経口ワクチンの生産に関する研究

大島 翔平 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小野 道之 (生命環境系)

### 背景・目的

近年、葉緑体形質転換による生物製剤の生産はいくつかの利点により注目されている。その一つとして、発現量の高さがある。核に外来遺伝子を導入した場合より多くのタンパク質を得られることが知られている。そこで、一つの細胞内に数千から数万のコピーを持ち、植物体の中でも多量なタンパク質生産を担う葉緑体に形質転換を行い、目的のタンパク質を生産することで、より効率的な生産が可能になる。また、葉緑体は母性遺伝するため、花粉による遺伝子の拡散が起こらないので、リスクを抑えることもできる。

生産や貯蔵に大きなコストのかかる医薬、特にワクチンの応用を提案する。現在、注射型ワクチンは、その生産、貯蔵、冷蔵輸送に多くのコストがかかり、特に発展途上国では、高額で得ることが難しい。しかし、葉緑体形質転換により、ワクチン成分を生産、蓄積した「食べるワクチン」を食すことで、ワクチンの効果を得ることができれば、コストダウンにつながる。

そこで、葉緑体形質転換のモデル植物として知見の豊富なタバコを用いて研究を行った。形質転換の方法は、種によって異なり、転換効率を上昇させるには、時間がかかる場合が多い。その点、タバコはモデル植物として多くの研究がなされている。

注射型ワクチンが、全身系免疫のみ誘導するのにに対し、経口摂取による食べるワクチンは、全身系免疫と粘膜系免疫の両方を誘導することができる。発感染部位である粘膜系の免疫を誘導でき、二段階の免疫系により、強固な免疫を誘導することができる。しかしながら、経口摂取に伴い、ワクチン成分が消化酵素耐性を持ち、腸管上皮(免疫系の中心となる部位)まで輸送される必要がある。この問題を克服するため、消化酵素に分解されにくく、かつ腸管上皮に吸収されやすい、ウイルス由来の中空状コートタンパク質 VLP (Virus-Like Particle) で包んだ抗原を利用する。VLP は、もとのウイルスの核酸を欠くため、それ自体に病原性、毒性がなく、腸管上皮までの理想的なキャリアタンパクとなる。

本研究では、タバコを用いて食べるワクチンの生産を行い、将来的に実際に食すことができる農作物への応用を目指すための知見を得ることを目的とした。

### 材料・方法

タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi, 及び cv. Petite Havana SR-1) を用いた。本研究室では形質転換体の作製、VLP の発現解析を行い、サル、マウスを用いた免疫学的研究は、それぞれ (独) 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター、筑波大学人間総合科学研究科にて行う予定である。

VLP [E 型肝炎ウイルス (HEV) のコートタンパク質、HSV-tag、インフルエンザウイルスの M2 抗原を融合したもの] を形質転換により導入し、ホモプラズミー化 (形質転換した葉緑体だけを持つ状態) を目指す。M2 抗原はインフルエンザのウイルス型間で変化しないため、従来のワクチンの弱点であった型間での変化に対応できない問題を克服するユニバーサルワクチンとして注目されている。

パーティクルガン法を用いて葉切片に対して葉緑体形質転換を行った。形質転換効率を上げるため、DNA 量、発射強度を変更した (奥崎らの方法による)。

抗生物質 (スペクチノマイシン) 含有培地で選抜を行い、成長の良いシュートから DNA を抽出し、PCR を用いてジェノタイプチェックした。2 週間ごとに、シュートを切り刻んで、新しい培地に移してシュート形成させる選抜を繰り返した。同時に GFP の蛍光による選抜も行った。DNA の存在が認められたら、ウエスタンブロッティングによりタンパク質レベルでの発現を確認する。

### 結果・考察

Pal Maliga 博士より頂いた pKMS24 をもとに、新ベクター (pKMS24-HEV-HSVtag-M2) を作製した。このベクターは、AAD (スペクチノマイシン耐性) と GFP が融合された選択マーカーを持ち、蛍光観察による選抜も可能である。AAD と GFP の融合タンパク質のプロモーターには葉緑体で発現の強い *Prm*、ターミネーターには *TpsbA* が使用されている。pKMS24-HEV-HSVtag-M2 の作製にあたり、シークエンスを行い全配列を確認した。パーティクルガン法により遺伝子を打ち込み、葉緑体形質転換を試みた。現在、抗生物質による選抜と GFP の蛍光を用いて、培地での選抜を短いサイクルで繰り返すことで、ホモプラズミー化を目指している。

### 謝辞

本研究に際し、VLP 遺伝子は (独) 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター長保富康宏博士に提供していただき、形質転換ベクター pRV112A ' は京都府立大学椎名隆博士、中平洋一博士に提供していただきました。コンストラクトは筑波大学人間総合科学研究科竹内薫博士に、頂きました。厚く御礼申し上げます。葉緑体形質転換をご指導くださいました (独) 農業生物資源研究所田部井豊博士、奥崎文子博士の両氏に心から感謝いたします。形質転換ベクター pKMS24 を快く提供して下さった米国ラトガース大学ワクスマン研究所の Pal Maliga 博士に心から感謝いたします。ご指導いただいた鎌田博教授、小野公代博士、植物生理学グループの皆様にも心から感謝いたします。

## アサガオ「品種ムラサキ」の one-shot terminal flowering の原因遺伝子の探索

望月 嗣文 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 小野 道之 (生命環境系)

## 背景と目的

アサガオ (*Pharbitis nil*) の品種ムラサキは一度の暗期を与えることで花成を誘導することができ、この特性から光周性花成誘導の研究の材料として用いられている。このムラサキにおいては特に 16 時間以上の暗期を一度与えることによって茎頂まで花芽をつけることが知られている (one-shot terminal flowering)。この際に茎頂の先端部分につく花のことをターミナルフラワーと呼ぶ。ムラサキが 16 時間の暗期を一度かけることでターミナルフラワーを形成する一方で、アサガオの他の品種であるキダチやメキシコ、アフリカにおいては同じ 16 時間の条件で複数回の暗期を与えた場合においてもターミナルフラワーを形成しないことがわかっている。この事実からムラサキにおいてはアサガオの他の品種とは異なりターミナルフラワー形成の抑制に働く因子の機能の抑制または欠損が予想された。このターミナルフラワー形成を抑制する遺伝子として *TERMINAL FLOWER1* (*TFL1*) がシロイヌナズナを用いた分子遺伝学的研究によって同定されており、*TFL1* は茎頂において働き、花芽形成制御因子である *APETALA1* (*AP1*) と *LEAFY* (*LFY*) を抑制する機能を持つということが明らかにされている。先行研究においてはアサガオにおけるこの *TFL1* 相同遺伝子である *PnTFL1* についてムラサキとキダチを比較したところ、タンパク質として翻訳される部分の配列には変化は見つからなかった。しかし上流にあたる 5' 非翻訳領域において CT の繰り返し配列が存在し、この CT の繰り返し配列がムラサキにおいてはキダチと比べて 40 塩基分長くなっていた。

本実験は、この CT の繰り返し配列の長さの違いがムラサキのターミナルフラワー形成形質の原因となっているかを調べる事を目的として行った。

## 材料と方法

アサガオ (*Pharbitis nil*) 品種ムラサキとキダチを用いる。キダチは園芸品種の 1 つでジベレリン欠損の系統であり、成長しても背丈が大きくなりドワーフの形質を示す。キダチにおけるジベレリンの欠損はターミナルフラワー形成において関与していないことは明らかにされている。ムラサキとキダチは 16 時間の暗期を与えた場合にどちらも花芽をつけるが、ターミナルフラワーをつけるのはムラサキのみであり、キダチは複数回の暗期処理を行った場合においてもターミナルフラワーを形成しない。

キダチ × ムラサキを交配させて種を取り、その F1 を自家受粉させた F2 世代において実験を行った。播種後 7 日目の芽生えを暗室へ移動させ、そこで 16 時間の暗期処理を一度だけかける作業を行った。暗期処理を行った芽生えは恒明 (LL) 条件において生育させ、約一月後に花芽の数とターミナルフラワーの形成の有無を調べた。同時にアサガオから DNA を抽出し、*PnTFL1* 上流に存在する CT の繰り返し配列を挟む形でプライマーを作成して PCR を行い、その産物の長さを比較し、個体が持っている配列の長さとしてターミナルフラワーの形成との関係を調べた。

## 結果と考察

60 個体の F2 世代に暗期処理を行い LL 条件で約一月育てた結果全ての個体で花芽の形成が起こり、またそのうちの

15 個体においてターミナルフラワーの形成が確認された。

全ての F2 個体から DNA の抽出を行い、その PCR 産物を電気泳動によって長さを確認したところ 3 種類のパターンが確認された。ムラサキにおいては大きな分子量のバンド、キダチにおいては小さい分子量のバンドが観察され、CT の繰り返し分ムラサキの PCR 産物では分子量が多くなっていることを確認することができた。F2 世代では上の 2 種類の他に大きい分子量のバンドと小さい分子量のバンド両方が確認される個体も現れ、その分離比は「大バンド : 2 本バンド : 小バンド」でおおよそ「1 : 2 : 1」となった。

ターミナルフラワーを形成した 15 個体のうち、ムラサキ型の大きい分子量のバンドを持つものが 10 個体、キダチ型の小さい分子量のバンドを持つものが 2 個体、大小 2 種類のバンドを持つものが 3 個体という結果になった。この結果から CT の繰り返し配列の長さによってある程度ターミナルフラワー形成形質に違いがあり、CT の繰り返し配列が長いものを持つ個体において形成率が高い傾向があることがわかる。しかし、ヘテロ型やキダチ型の配列を持つ個体においても一部の個体で形成されたものがあるため、ターミナルフラワー形成においては *PnTFL1* 以外の遺伝子も同時に働いていることが示唆された。

## 今後の計画

今後はキダチ × ムラサキの後代について 5 回の戻し交配を行い、目的とした CT の繰り返し領域の変異部分のみをキダチ型にしたムラサキの系統を作る。これによって他の遺伝子による影響を考慮せずに野生型のムラサキとの比較を行うことができるので、戻し交配を重ねてそれが済んだ系統において表現型を観察することを目標とする。また、アサガオにおいて *PnTFL1* の花成誘導にかかわる他の因子との関連を含めた制御機構について明らかにするために発現解析などを行っていきたいと考えている。

## 細胞性粘菌における細胞分化過程の種間比較による解析

清田 侑 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 漆原 秀子 (生命環境系)

### 背景と目的

細胞性粘菌はその生活環において、細菌等の餌がある環境下では単細胞アメーバとして捕食・分裂増殖を繰り返し、飢餓状態に陥ると集合により多細胞体からなる子実体を形成する。

細胞性粘菌の研究で多く用いられる *Dictyostelium discoideum* (以下 Dd) の子実体形成では、次世代となる孢子の細胞とその塊を支える柄の細胞からなる子実体を形成する。この両種の細胞の運命は子実体形成の初期には決定されており、それぞれ予定孢子細胞、予定柄細胞と呼ばれている。一方、今回実験に用いた *Acytostelium subglobosum* (以下 As) は子実体形成時に非細胞性の柄を形成して、全ての細胞が孢子になる。また系統解析の結果から、As は Dd よりも進化的に古いと考えられている。

つまり進化の過程において、Dd 等の細胞性粘菌類が柄細胞の分化能を獲得したと考えられる。

そこで、細胞性粘菌類が柄細胞分化能を獲得した仕組みを、As と Dd との間でのゲノム比較・形態形成過程の比較により調べることが今回の研究の目的である。

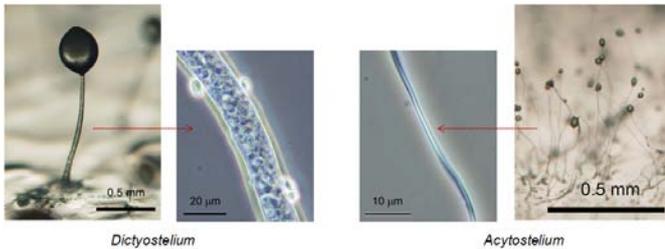


Figure 1: Dd, As の子実体と柄の構造

### 方法

#### 1. Dd の遺伝子破壊株 (以下 KO 株) の作製

先行研究におけるゲノム比較により、非細胞性の柄を形成する As には存在せず、細胞性の柄を形成する粘菌 (*Dd*, *Polysphondylium pallidum*, *Dictyostelium fasciculatum*) には存在する遺伝子が選抜されていた。これらの中にはこれまでに機能の知られていない、柄細胞分化に関連する遺伝子が含まれている可能性があると考え、Dd での機能を解析することにした。

まず、以下の項目に該当する遺伝子を取り除いて解析対象遺伝子を選抜した。

- 発現量が極端に低い遺伝子
- 増殖期での発現が高く、発生期に低下する遺伝子
- ハウスキーピング遺伝子のファミリーに含まれるもの

選抜した遺伝子について順次 Dd における KO 株の作製を行い、表現型を観察した。

#### 2. As と Dd における形態形成の違い

予定孢子細胞のマーカースとして使用される孢子外皮タンパク質を特異的に染色する抗孢子抗体を用い、As の子実体形成の様々なステージに対して免疫染色を行った。

### 結果と考察

#### 1. Dd のノックアウト株の作製

選抜した遺伝子の中から二つの遺伝子 (*mybQ*, *pkiA*) について KO 株の作製に成功し、発生過程における表現型の確認を行った。しかし、親株との違いは観察出来なかった。これらが発生以外のことに関与している遺伝子であるか、他の遺伝子が機能の欠損を補っているなどの可能性が考えられる。

#### 2. As と Dd における形態形成の違い

Dd においては形態形成期に入ると、予定柄細胞と予定孢子細胞に分化するため、後ろ 3 分の 2 にある予定孢子細胞の領域に染色がみられる。

しかし、As では全ての細胞が一樣に染まり、予定孢子細胞のみであることが分かった。

このことより、As においては全ての細胞が予定孢子細胞であり、子実体形成に従って、柄を形成しつつ孢子になるという様な変化を遂げると思われる。

また、As では共焦点レーザー顕微鏡の観察より、細胞内において孢子外皮タンパク質が局在しており、細胞に極性のあることが分かった。

Dd においては 2 種類の細胞に分化することで柄を作る働きと孢子を作る働きを分担していたが、As においてはこの極性が 1 つの細胞内で柄の形成と孢子の形成をする 2 つの働きを担うことに関係していると思われる。

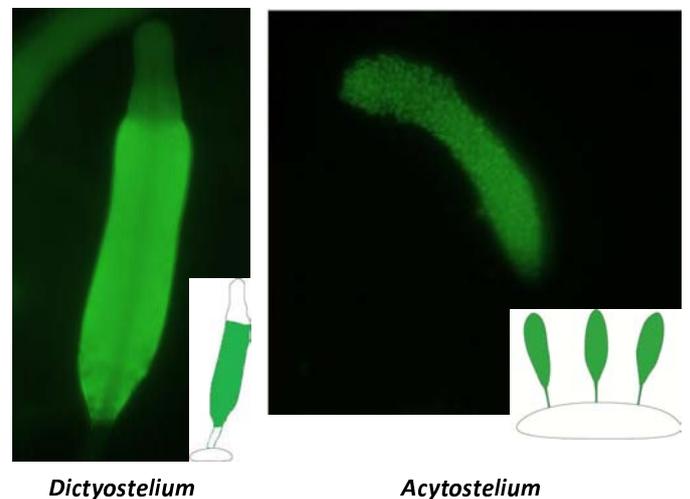


Figure 2: 発生期における抗孢子抗体での染色写真

### 今後の課題

- 他の選抜遺伝子について KO 株を作製する。
- As における細胞極性を、オルガネラや他の遺伝子産物などについて、より詳細に解析する。
- 進化の過程で予定柄細胞へと分化する機能を獲得したと考え、Dd における予定柄細胞の分化誘導因子が As でどのような働きをしているのかを調べる。

# ショウジョウバエ雑種致死救済効果を抑制する遺伝子の発見と解析

白田 美香 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 澤村 京一 (生命環境系)

## 背景・目的

キロショウジョウバエとオナジショウジョウバエには、雑種ができることがある。しかし、キロショウジョウバエが雌親、オナジショウジョウバエが雄親の場合、雑種は雌が不妊、雄が致死となる (Startevant, 1920)。この交配で雄親のオナジショウジョウバエに *Lethal hybrid rescue* (*Lhr*) 変異体を用いると、雑種で雄も救済することができる (Watanabe, 1979)。本研究では、様々な系統のキロショウジョウバエに *Lhr* 変異体のオナジショウジョウバエを交配し、雑種雄の救済効果を調べた。その結果、*Lhr* によって雑種の雄が救済されないキロショウジョウバエの系統が発見された。そこで、雑種致死救済を抑制する遺伝子がどの染色体に位置しているのか解析を行った。

## 材料・方法

キロショウジョウバエのそれぞれの系統の雌に、オナジショウジョウバエの *Lhr* 変異体系統を交配した。得られた雑種の性比を比較することにより、雑種雄の救済効果を調査した。*Lhr* を交配に使ったにも関わらず雑種雄が生まれなかったキロショウジョウバエの系統 (救済抑制系統) をスクリーニングし、救済抑制系統での雑種雄致死の時期を調査した。

## 結果

*Lhr* による雑種雄救済効果を抑制する系統を発見した (Table 1)。また、救済抑制系統との交配で致死となった蛹を解剖してみたところ、性別が判断できた 255 匹のうち 249 匹が雄であった。

## 考察・展望

キロショウジョウバエとオナジショウジョウバエの雑種雄致死は、*Lhr* によって救済されるが、今回の実験でその救済効果が抑制される系統が発見された。*Lhr*<sup>+</sup> を交配に用いたとき、雑種雄が致死となる時期は幼虫期である。しかし今回発見された救済抑制系統に *Lhr* を交配すると、雑種雄致死の時期は蛹の後期であった。これは、一度 *Lhr* によって救済された雑種雄が、救済効果の抑制によって再び致死となることを示している。現在、この救済抑制遺伝子のマッピングが進行中である。 balancer を用いて、この遺伝子がどの染色体上に存在するか調べている。一例として、X 染色体上にこの遺伝子が存在するか調べる方法を示す (Figure 1)。

## 引用文献

Startevant (1920) Genetic studies on *Drosophila simulans*. I. Introduction. Hybrids with *Drosophila melanogaster*. Genetics 6: 179-207.  
 Watanabe (1979) A gene that rescues the lethal hybrids between *Drosophila melanogaster* and *D.simulans*. Japanese Journal of Genetics 54: 325-331.

Table 1: 雑種雄救済効果の調査

交配			
系統 1	× <i>Lhr</i> <sup>+</sup>	2874	0
系統 1	× <i>Lhr</i>	725	670
系統 2	× <i>Lhr</i> <sup>+</sup>	3443	0
系統 2	× <i>Lhr</i>	639	16

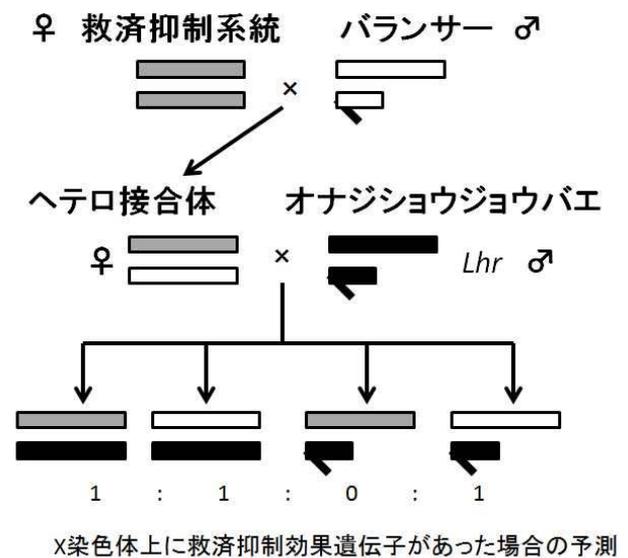


Figure 1: 雑種致死抑制遺伝子のマッピングの一例

# 線虫 *C. elegans* の *let-7* マイクロ RNA 経路に関するクロマチン構造制御因子の機能解析

天野 晴康 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 古久保-徳永 克男 (生命環境系)

## 背景・目的

多細胞生物の正常な発生には、3次元空間における発生過程の制御のみならず、適切な発生のタイミングでの分化を遂げることも重要である。しかしながら、空間軸における発生制御機構と比べ、時間軸における発生制御機構に関しては未だに多くが解明されていない。本研究では、線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて、時間軸における発生制御機構の解明を目的とした。現在までに、線虫では、ある特定の発生段階の反復や欠失により正常な発生ができない「ヘテロクロニック変異体」が幾つか同定されている。ヘテロクロニック変異体の1つ *let-7* は、線虫の発生において幼虫から成虫への移行が起らず、成長が進んでも幼虫形質を留める表現型を示す。現在までに、*let-7* の原因遺伝子は microRNA(miRNA) であることが分かっている。miRNA とは、20~25 塩基からなる小さな非翻訳 RNA であり、下流のターゲット遺伝子の機能を翻訳レベルで抑制する機能を持つ。興味深いことに、*let-7* miRNA およびターゲット遺伝子は進化的に高度に保存されており、線虫の発生タイミングを制御しているだけでなく、ヒトを含む多くの生物においても時間軸における発生制御機構に重要な役割を持つことが示唆されている。さらに近年、*let-7* が原ガン遺伝子 *lin-60/RAS* を制御し、ヒトの肺ガンと関連することも報告されており、*let-7* miRNA 経路の解明は将来的にガン治療への応用につながることも期待されている。

所属研究室の波田と丹羽らは、成虫移行に関わる分化マーカーである *apl-1* を用いたスクリーニングにより、新たな *let-7* miRNA 経路関連遺伝子の有力な候補として *trr-1* と *epc-1* を発見した。この両遺伝子は脊椎動物にまで高度に保存されており、それぞれ Transformation/transcription domain-associated protein ファミリーおよび Enhancer of Polycomb ファミリーに属する。*trr-1* と *epc-1* のコードするタンパク質は、共にヒストンアセチル基転移酵素の複合体を構成しており、クロマチン構造を制御する因子として機能する。本研究では、*trr-1* と *epc-1* が *let-7* miRNA 経路でどのような働きを持つのかを詳細に解析するために、*trr-1* と *epc-1* の機能を低下させた個体での発生タイミングに関する表現型、*trr-1* と *epc-1* と既知 *let-7* ターゲット遺伝子との遺伝学的相互作用、そして *let-7* miRNA の転写制御におけるこれらの遺伝子の役割について検討した。

## 材料・方法

実験材料として用いた線虫 *C. elegans* は、通常飼育培地 (NGM 寒天プレート) の上で 20°C で飼育した。野生型として、Bristol N2 系統を利用した。*let-7* ターゲット遺伝子の突然変異株として、*hbl-1<sup>ve18</sup>*、*lin-41<sup>ma104</sup>*、そして *lin-42<sup>m1089</sup>* を用いた。遺伝子発現をモニターするトランスジェニック系統として、*let-7::gfp*、*mir-84::gfp*、そして *col-19::gfp* を利用した。*trr-1* の点突然変異株 MT12352 はミネソタ大学の *Caenorhabditis Genetics Center* より入手した。

### ・線虫の feeding RNAi

二重鎖 RNA 干渉法 (RNAi 法) は、特定の遺伝子に対応する配列をもつ dsRNA(double-strand RNA) を用いて、その遺伝子の mRNA を分解し、機能低下を引き起こす技術

である。本研究では、dsRNA を合成する大腸菌を線虫に摂食させることで RNAi を誘導させる feeding RNAi 法を利用した。また、RNAi に使用する大腸菌は、RNAi を行う遺伝子の cDNA を feeding RNAi 用プラスミドベクター L4440 にクローニングし、このプラスミドで大腸菌宿主 HT115 を形質転換することにより作製した。

### ・ *alae* 観察

線虫成虫化の指標として、成虫特異的な体壁側方の表皮構造 (*alae*) がよく用いられている。これまでの研究から、*let-7* ターゲット遺伝子の変異体では、通常よりも早い段階 (4 齢幼虫; L4) で *alae* が形成されることが報告されている。ここでは、*let-7* ターゲット遺伝子の変異体に *trr-1* と *epc-1* の RNAi を行い、*alae* 形成時期の変化を観察した。

### ・ *col-19::gfp* の発現観察

*col-19* は成虫に移行する際に発現上昇する遺伝子である。本実験では *col-19* の発現変化を検証するために、*col-19* のプロモーターを融合した GFP を導入した系統 (*col-19::gfp*) を用いた。この系統の *let-7* ターゲット遺伝子の変異体では早い時期 (L4) に *col-19::gfp* の発現レベルが上昇する。ここでは、*let-7* ターゲット遺伝子の変異体に *trr-1* と *epc-1* の RNAi を行い、*col-19::gfp* の発現時期の変化を観察した。

### ・ *let-7::gfp, mir-84::gfp* の発現観察

*let-7* の発現変化を検証するため、*let-7* ファミリー遺伝子 (*let-7* と *mir-84*) のプロモーターと 3' 側の配列を融合した GFP を導入した系統 (*let-7::gfp, mir-84::gfp*) に *trr-1* と *epc-1* の RNAi を行い、*let-7::gfp* と *mir-84::gfp* の発現時期および発現強度の変化を観察した。

## 結果・考察

*trr-1* あるいは *epc-1* の機能を欠損させた個体を観察したところ、いずれの場合においても幼虫期から成虫期への切り替えが適切に起らず、成虫期になっても幼虫期の特徴を残した表現型を示した。次に私は、*trr-1* および *epc-1* と *let-7* 経路との遺伝学的相互作用を追求した。既知の *let-7* ターゲット遺伝子 (*hbl-1*、*lin-41*、*lin-42*) の機能低下個体においては、本来の幼虫期において成虫期の形質が早熟して現れる。私は、これらの既知 *let-7* ターゲット遺伝子と *trr-1* あるいは *epc-1* との二重機能低下個体の表現型を検討した。その結果、これらの二重機能低下個体では、早熟型の表現型が観察された。この結果は、*trr-1* と *epc-1* が遺伝学的に *let-7* ターゲット遺伝子よりも機能的に上流に位置することを示唆している。そこで私は、*trr-1* と *epc-1* が *let-7* の発現調節そのものに関わる可能性を検討した。*trr-1* と *epc-1* RNAi 個体における *let-7::gfp* と *mir-84::gfp* の発現レベルを調べたところ、野生型に比較していずれの GFP シグナルも有意に昂進していた。この結果は、*trr-1* と *epc-1* の両遺伝子が *let-7* ファミリー miRNA の発現を抑制する役割を持つことを強く示唆する。

今回の研究結果は、*let-7* miRNA の発現制御に、ヒトを含む多細胞生物にまで進化的に高度に保存されたクロマチン構造制御因子が関与することを示す初めての成果である。

# ショウジョウバエを使用した統合失調症リスク因子の遺伝学的解析

鈴木 美慧 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 古久保-徳永 克男 (生命環境系)

## 背景および目的

統合失調症は人口の約1%に発症し、日本での入院患者数は20万人いるといわれている。その主な症状は幻覚や妄想などの陽性症状と意欲低下や思考力の低下などの陰性症状との2つに分けられる。統合失調症の発症には遺伝的要因と環境的要因の両方が関わると考えられており、これまでの臨床的・病理学的研究から、脳における神経伝達物質の産生やそれらのレセプターの機能が重要であることが分かっているが、その病態形成メカニズムについては依然として多くが明らかになっていない。統合失調症の遺伝学的研究方法は大きく二通りある。(Fig.1) 一つは、GWASなどを利用して網羅的に遺伝子を解析し、患者群が共通してもつ一塩基多型 Single Nucleotide polymorphism(SNPs)をピックアップし、SNPsが含まれるゲノム上の領域から疾患関連遺伝子を解明する方法で、もう一つは疾患関連候補遺伝子をモデル動物で発現させ、作用機構や機能回復を研究していく方法である。これらの独立した研究結果を統合していくことで、より効果的な治療方法の開発が期待できる。

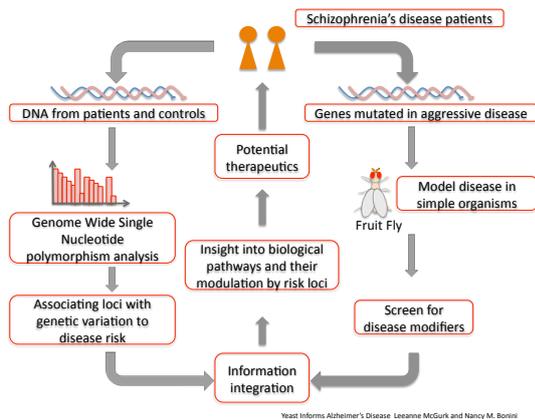


Figure 1: 統合失調症研究に置く統合的アプローチ

近年の遺伝学的研究の蓄積により統合失調症の脆弱性遺伝子が数多く発見されている。中でも *Disrupted-In-Schizophrenia-1(DISC1)* はスコットランドの統合失調症多発家系の遺伝学的解析により同定された遺伝子で、統合失調症発症に強い影響力を持ち、神経発生や学習・記憶に重要な機能を持つことが分かっている。当研究室では過去にショウジョウバエの記憶・学習中枢であるキノコ体においてヒト *DISC1* を強制発現させ、行動・形態レベルでの分子機能解析を行っている。

しかしながら、統合失調症を始めとした精神疾患は複数の遺伝的要因が関与すると考えられており、単一の遺伝子機能だけではなく、複数の脆弱性遺伝子間の遺伝的相互作用を理解する必要がある。そこで私は統合失調症の脆弱性候補遺伝子の一つである *Dysbindin* に注目した。*Dysbindin* はハエからヒトまで保存された遺伝子で、統合失調症患者死後脳の解析からは前頭前野皮質や海馬において発現レベルが低下していることが分かっている。また *Dysbindin* 欠損マウスでは、大脳皮質、海馬、視床下部におけるドーパミ

ン含量が関連しているという結果が得られている。本研究では *Dysbindin* 変異を持つショウジョウバエ幼虫の神経筋接合部 (Neuronmuscular Junction, NMJ) での構造を観察し、*Dysbindin* 変異の NMJ 形成における影響を解析した。

## 方法・材料

### 1. NMJ での神経細胞画像解析

ショウジョウバエ幼虫の NMJ は、シナプスの構造と機能の研究には最適な部位である。採卵から 120 時間後の幼虫を腹側から解剖し、免疫染色で神経を特異的に染色した。その後共焦点レーザー顕微鏡でその神経を撮影し、画像解析ソフトを用いて神経の形態的变化を観察した。解析は軸索の総面積と側鎖の長さ、軸索の分岐点の数を測った。

### 使用したショウジョウバエの系統

- 3rd Larvae  $w ; +/+ ; dysbe^{1028} / Pr Dr$
- 3rd Larvae  $w ; +/+ ; dysbe^{1028} / dysbe^{1028}$

### 2. ダブルバランスの作製と遺伝的相互作用の解析用系統作製

ハエの第2染色体にヒト *DISC1* と第3染色体に *Dysbindin* の変異が導入されている個体を作製するため、第2染色体と第3染色体にそれぞれバランス染色体を持つ系統 (ダブルバランス系統) を作成した。

### 使用したショウジョウバエの系統

- male  $w ; Sp / CyO Act-GFP ; +/+$
- female  $w ; +/+ ; Pr Dr / TM6b Ubi-GFP(CS5)$

⇒  $w ; Sp / CyO Act-GFP ; Pr Dr / TM6b Ubi-GFP(CS5)$

作製したダブルバランス系統と *Dysbindin* 変異を持つ個体とを掛け合わせ、*DISC1* との遺伝的相互作用を解析するための系統を作製した。

### 使用したショウジョウバエの系統

- male  $w ; +/+ ; dysbe^{1028} / TM6B Tb$
- female  $w ; Sp / CyO Act-GFP ; Pr Dr / TM6b Ubi-GFP(CS5)$

⇒  $w ; + / CyO Act-GFP ; dysbe^{1028} / TM6b Ubi-GFP(CS5)$

## 今後の予定

本研究において統合失調症の候補遺伝子である *Dysbindin* 変異体の NMJ の構造を観察した。今後は、*DISC1* と *Dysbindin* の遺伝的相互作用を NMJ の形態的变化を指標にして解析していく予定である。現在実験に使用する系統の遺伝的バックグラウンドをそろえるための交配を行っている。また Genome Wide Association Studies (GWAS) などの結果から、*Dysbindin* 以外で統合失調症候補遺伝子として名前が挙がっているヒト遺伝子と相同的なハエ遺伝子をリストアップし、*DISC1* との遺伝的相互作用を解析する予定である。

## 統合失調症のエクソーム解析

朝倉 明果 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 有波 忠雄 (医学医療系)

### 背景および目的

統合失調症はかつて精神分裂病と呼ばれていた精神疾患である。思春期に意欲低下、感情鈍麻、思考貧困などの陰性症状により潜行性に発症することが多く、幻覚、妄想などの活発な陽性症状の増悪と寛解を繰り返す疾患である。ドーパミン伝達シグナルの過剰状態が病態に関与するとするドーパミン仮説や興奮性アミノ酸であるグルタミン酸伝達系の脳の一部での機能不全を想定するグルタミン酸仮説などの病態仮説が知られているが、病因は殆どの場合特定できない。

一卵性双生児、あるいは両親ともに統合失調症である場合は50%前後という高い確率で発症することから、ゲノム変異が強く関係していると考えられ、精力的に研究がなされてきた。その結果、統合失調症の発症に大きな影響を持つ遺伝子変異は存在するが、その頻度は比較的稀であり、かつ、病因として働く遺伝子変異の種類は患者によってさまざまであることが明らかとなった。これまでのゲノムの一部を解析する方法では、統合失調症の病因として比較的大きな影響力を持つ遺伝子変異を発見することは殆ど出来なかった。が、次世代シーケンサーが利用できるようになり、患者一人ひとりの稀な変異も同定できるようになったことから、これまで発見されなかった統合失調症に関する遺伝子変異も同定できる可能性が飛躍的に高まった。

次世代シーケンサーを使って解析した場合の問題は非常に多くのゲノム変異が検出され、その中のどれが病因と関係しているかを絞ることが難しい点である。とくに、統合失調症のような多因子遺伝の遺伝様式をとる疾患では元々多くの遺伝子変異が関与していると予想されるので、見出された遺伝子変異が統合失調症の発症に関与していないと結論づけることは不可能であり、絞り込みは非常に難しくなる。その解決の一つの方法に、家系サンプルを用いて連鎖解析の情報を元に、ゲノム領域を絞るという手段がある。

本研究では日本人の統合失調症で連鎖が認められた連鎖領域である染色体1p21.2-1p13.2、14q11.2と14q11.2-q13.2および20p12.1-p11.2を中心に、全部のエクソームをリシーケンシングする方法で統合失調症の次世代シーケンサーを用いた解析に挑戦した。また、統合失調症の病態に関与する分子をコードしている遺伝子も候補遺伝子として解析の対象とした。

### 方法

解析に用いたサンプルは、兄弟や姉妹で統合失調症に罹患した患者からの末梢血白血球由来のDNAで、ABIのTargetSeq Exome Enrichment Kitを用いた作製法とアジレント社のSureSelectを用いた作製法の2つの方法で全エクソーム解析のライブラリ作製した。

#### ライブラリ作製

##### TargetSeq Exome Enrichment Kit の場合

TargetSeq Exome Enrichment Kit ではまず Covaris を用いて DNA を断片化した。この断片化された DNA を AMPure XP beads (BECKMAN COULTER) と DynaMag-2 magnetic rack (ABI) を利用することでセレクションした (AMPure 精製)。マルチプレックス解析ができるようにそれぞれのサンプルにバーコードとアダプターを付加し、再び AMPure 精製をし、PCR にかけて増幅させた。ライブラリにきちんとバーコードとアダプターが付加されたか、

バイオアナライザー 2100 (アジレント社) を使って DNA の長さを測定することで確認を行った。次に、エクソーム領域を取り出した。DNA に 95 度の熱を加えることで変性させ 1 本鎖にし、Exome 領域に相補的なビオチン化プローブをハイブリタイズさせ、これにビオチン化プローブと結合する Dynabeads M-270 Streptavidin (ABI) を加え、プローブとビーズを結合させたうえで DynaMag2-magnetic rack を用いてプローブと結合しているビーズを回収した。キャプチャーした領域を PCR によって増幅させ、AMPure 精製をしてライブラリを作製した。

##### SureSelect の場合

Covaris を用いて DNA を断片化し、AMPure 精製によるセレクションを行った後、アダプターの付加のみを行い、アダプターを付加させたライブラリを PCR によって増幅させた。後に、TargetSeq Exome Enrichment Kit と同様の原理を利用したハイブリタイズとビーズの回収を行った後、バーコードを付加させて、バーコード付加ライブラリを PCR を使って増幅させライブラリ作製を行った。

##### エマルジョン PCR

作製したライブラリを Emulsifier (ABI) を用いてオイルとビーズに混ぜ合わせた。ビーズと結合したライブラリを Amplifier (ABI) にかけて PCR することで、オイル内にあるビーズ上でライブラリを増幅させた。ライブラリが増幅されたビーズのみを、Enricher (ABI) を用いて回収、濃縮した。

##### 次世代シーケンサーと解析

エマルジョン PCR によって回収されたビーズを次世代シーケンサーにかけた。シーケンサーには ABI の SOLiD5500 を使用した。解析には次世代シーケンサー解析用ソフト、LifeScope を用いてゲノムをアラインした後、SNP や変異などを調べた。

### 結果

全エクソームのリシーケンシングの結果、グルタミン酸シグナル伝達に重要な影響を与える遺伝子変異を含むいくつかの興味深い変異が同定された。詳細については当日会場において発表する。

### 今後の展望

今後ゲノムサンプル数を増やし解析をすすめることで確実性を高めるとともに、新たな原因変異の同定をめざしたい。

## 統合失調症に対するクロモグラニン遺伝子変異の影響

栗山 友理子 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 有波 忠雄 (医学医療系)

## 背景・目的

統合失調症は主として思春期・青年期に発症する精神疾患で、症状は大きく陽性症状(幻覚や妄想など)と陰性症状(感情の平板化や意欲の低下など)に分けられ、他に認知機能障害を伴う。一般集団における生涯発症危険率は1%と高く、親や同胞が罹患者の場合危険率は約10倍となる。二卵性双生児の片方が罹患している場合の同胞の危険率は約17%であるのに対して、一卵性双生児では約50%であり、病因として遺伝要因が強く関与することが示唆されるが、一方で一卵性双生児の一致率が100%でないことから、発症要因には環境要因、社会心理学的要因も関与する、複雑疾患であると考えられる。統合失調症の発症機序および病態生理についてはいまだ不明であり、その病態から予測される機能的遺伝子変異の推定には限界があることから、疾患感受性遺伝子の同定には家系を用いた連鎖解析、および最近では全ゲノム関連解析による報告数が増加している。

統合失調症の発症脆弱性に関連する遺伝子座位を同定する目的で行われた先行研究の1つに、DNAマーカーを用いた症例・対照群の比較によるゲノムスキャンがあり、位置的候補遺伝子としてクロモグラニンB遺伝子(CHGB)が同定された。さらに、エクソン4内に存在するアミノ酸置換を伴う変異が、統合失調症や覚せい剤依存症と有意に関連すると報告された。クロモグラニンファミリー(A,B,C)は中枢神経系に広く分布し、神経伝達物質とともに分泌され、trans-Golgi networkにおける分泌タンパクの凝集と分泌顆粒の新生に関与している。さらにホルモンやニューロペプチドの分泌(放出)の調整を行っており、中枢神経系においては、ドーパミンの神経終末からの放出がクロモグラニンによって抑制されている。

本研究は、先行研究により統合失調症との関連が示されたCHGBについて、CHGB遺伝子全体からTag-SNPを選出し、大規模関連解析による追試を行った。クロモグラニンタンパクが疾患にどのように影響するかを解明する目的で、関連の見られた遺伝子変異とクロモグラニンタンパクの濃度との関連、クロモグラニンタンパクとストレス感受性との関係についての検討を行った。

## 材料・方法

## 1. CHGBと統合失調症の大規模関連解析

JIRAS (Japanese Genetics Initiative for Replicating Association of Schizophrenia) によって収集された、統合失調症患者 1920人・健常者 1919人を対象に、CHGB遺伝子領域とその上流・下流それぞれ2kbについて、HaploViewプログラムを用い8つのTag-SNP(rs236135, rs236139, rs236140, rs236141, rs6133278, rs6139873, rs742710, rs2821)を選出し、タイピングした。遺伝子型の同定は、Taq-Man genotyping assay法を用いた。両群の遺伝子型出現頻度について2検定を行い、Haploviewプログラムによるハプロタイプ解析を行った。SNPによる発現量変化の推定については、SNP ExpressやSNAPデータベースを用いた。

## 2. クロモグラニンタンパクの測定

血漿中のクロモグラニン量はELISA(Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay Kit)法にて測定した。各個

人のストレス感受性の評価には、自己質問紙法によるHSCL(Hopkins Symptom Checklist)、およびWCCL(The Ways of Coping Checklist)を用いた。統計解析にはIBM SPSS statistics ver.20を用いた。

## 結果・考察

## 1. CHGBと統合失調症の関連解析

8つのTag-SNP解析ではrs236141遺伝子頻度において統合失調症患者と健常者の間で有意な傾向が見られ( $P=0.061$ )、対象を男性に限ると有意差が見られた( $P=0.027$ )。rs236141とrs236140は35bpの近さに位置し、rs236141とrs236140とのハプロタイプがCHGBの発現量に関連するとの先行研究がある。この二つのSNPによるハプロタイプ解析においても男性統合失調症患者と男性健常者との間で有意差が見られ( $P=0.0287$ )、これら発現調節領域に位置するSNPが特に男性統合失調症患者に有意に関連することが示唆された。

## 2. クロモグラニンタンパクの関連解析

血漿クロモグラニン量は年齢、性別、疾患の有無とそれぞれ有意に関連したが、ロジスティック回帰分析により、統合失調症患者群において、タンパク濃度が有意に高いことは年齢、性とは独立に関連している事象であることが示唆された。rs236141遺伝子型とクロモグラニンタンパク濃度の間には有意な関連は見られなかった。さらに、ストレス感受性と、遺伝子型、タンパク濃度との関連について解析を進めている。

## 発達期における興奮性ニューロンの軸索誤投射が マウス脊髄の歩行中枢出力に及ぼす影響

梶瀬 佑果 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 西丸 広史 (医学医療系)

### 背景と目的

哺乳類が歩く際には、各関節の屈筋伸筋間および左右肢間でリズム的な交代性のパターンを持つ活動によって推進力を生み出している。この活動パターンは上位中枢からの刺激により、脊髄に局在する歩行のための中枢パターン発生回路 (CPG: central pattern generator) が活性化されることによって生み出され、各筋を支配するそれぞれの運動ニューロンから出力される。脊髄における CPG を構成するリズム発生回路は左右に対称性に存在し、相互に結合することによって左右肢の協調を生み出していることが知られているが、哺乳類の複雑な中枢神経系に効率的にアプローチすることが困難であるため、CPG を構成するニューロンの性質や結合については依然として不明な点が多く、その作動メカニズムは解明されていない。

近年、この問題にアプローチするためにラットやマウスの新生仔脊髄摘出標本モデルが用いられている。このモデルは、摘出した脊髄を酸素で飽和した人工脳脊髄液で灌流し、NMDA 型グルタミン酸受容体やセロトニン (5-HT: 5-hydroxytryptamine) 受容体を薬理的に活性化させることによって、左右肢の屈筋・伸筋群、あるいはそれらの筋に投射する運動ニューロン群軸索 (腰髄前根) からガラス吸引電極により歩行運動様活動リズムを記録することができる。このような手法を用いて歩行 CPG の神経系を正常に保ったまま体外に取り出すことで、その詳細な生理学的・薬理学的研究が可能となった。また、この手法によって歩行異常を示す遺伝子改変マウスの歩行 CPG を解析し原因を追究することで、CPG そのものの仕組みの解明が進められている。

これまでの研究により発達期マウスの脊髄における神経回路内の結合形成において、脊髄正中線上に発現するタンパク質である B3 型 Ephrin (Ephrin B3) と、その受容体であり軸索の成長円錐に発現する A4 型 Eph (EphA4) のシグナリングが重要な役割を担っていることが明らかになっている。このシグナリングは、脊髄の正中において神経軸索の伸長を抑制し、左右の軸索が混線しないように制御している。Rac 特異的 GAP ase 活性化タンパク質 (Rac GAP) である  $\alpha$ -Chn は EphA4 の下流にあり、EphA4 が Ephrin B3 と結合すると活性化され、成長円錐を前進させるタンパク質である Rac を抑制する。よって、 $\alpha$ -Chn が欠損したノックアウトマウス ( $\alpha$ -Chn<sup>-/-</sup> マウス) では、正常動物では同側に投射する軸索が正中線を越えて反対側へ投射し、ウサギの様に跳躍するという異常な歩行パターンが観察される。しかし、どのような性質をもったニューロンの軸索の異常投射がこの異常歩行を生み出しているかは明らかでない。これを明らかにすることで歩行リズムを形成する重要な脊髄ニューロンを同定できると考えられる。

本研究では脊髄の興奮性ニューロンの多くを占める小胞型グルタミン酸輸送体 2 型 (Vglut2: vesicular glutamate transporter 2) 陽性ニューロンに焦点を合わせた。このニューロン特異的に  $\alpha$ -Chn を欠損させることによって、その軸索の左右混線が歩行パターンに与える影響を調べた。これにより、このニューロンの CPG における役割を明らかにすることを目的とした。

### 材料と方法

**実験動物** Vglut2 遺伝子のプロモーター下流に Cre recombinase 遺伝子を発現させた Vglut2Cre:: $\alpha$ -Chn<sup>-/-</sup> マウスと、Cre recombinase の標的配列である loxP で挟んだ  $\alpha$ -Chn<sup>lox/flox</sup> マウスを交配し、Vglut2 陽性ニューロン特異的に  $\alpha$ -Chn が欠損した Vglut2Cre:: $\alpha$ -Chn<sup>lox/-</sup> マウスを作製した。この Vglut2Cre:: $\alpha$ -Chn<sup>lox/-</sup> マウスとその対照として  $\alpha$ -Chn<sup>lox/-</sup> マウスを用いて以下の実験を行った。

**成熟動物の歩行観察** 成熟マウスを透明なアクリル板の下からビデオカメラで歩行する様子を撮影し、左右前後肢の活動パターンの解析を行った。

**歩行運動様リズム活動の解析** 生後 0-2 日の新生仔を深麻酔下で断頭した後、冰冷人工脳脊髄液中で脊髄を摘出し、記録槽に置いた。95%酸素と 5%二酸化炭素で飽和した人工脳脊髄液で灌流しながら、ガラス吸引電極により主に屈筋の活動を反映する脊髄の第二腰髄 (L2) 前根と伸筋の活動を反映する第五腰髄 (L5) から運動ニューロン群の活動を記録した。NMDA (5.0-7.5 $\mu$ M) と 5-HT (5.0 $\mu$ M) を人工脳脊髄液に加え、歩行運動様リズム活動を誘発した。このとき左右の L2 及び L5 前根からの電気信号は生体信号増幅器を用いて 10,000 倍に増幅し、アナログデジタル (A/D) 変換装置を用いてパーソナルコンピューターに記録した。それぞれの記録は電気生理学データ解析ソフトウェア (Spike2) によって計測し、誘発されたリズム活動の空間パターンを解析した。

### 結果

**成熟動物の歩行観察**  $\alpha$ -Chn<sup>lox/-</sup> マウスでは野生型マウスと同様の正常な交代性の歩行パターンのみが観察されたのに対し、Vglut2Cre:: $\alpha$ -Chn<sup>lox/-</sup> マウスの歩行は正常な歩行パターン、同期したウサギ様跳躍歩行パターンの両方が観察された。

**歩行運動様リズム活動の解析** 新生仔脊髄摘出標本を用いて誘発したリズム活動は、 $\alpha$ -Chn<sup>lox/-</sup> マウス、Vglut2Cre:: $\alpha$ -Chn<sup>lox/-</sup> マウス共に L2-L5 間のリズムは交代性を保った。いずれの標本においても屈筋と伸筋の位相関係は安定して交代性を示した。左右の位相関係は、 $\alpha$ -Chn<sup>lox/-</sup> マウス脊髄摘出標本では安定して交代性の歩行パターンが継続したのに対し、Vglut2Cre:: $\alpha$ -Chn<sup>lox/-</sup> マウス脊髄摘出標本では交代・同期の両方のパターンが記録された。

### 考察

Vglut2Cre:: $\alpha$ -Chn<sup>lox/-</sup> マウスにおいて、新生仔脊髄摘出標本においても成熟動物同様に特徴的であった交代・同期両方の歩行様リズムを生じることから、Vglut2 陽性ニューロン軸索の左右の混線による異常な歩行様パターンの原因は脊髄内 CPG 内におけるものであることが示唆された。また、これらの興奮性ニューロンは CPG の重要な構成要素の 1 つであることが考えられる。

# サル背側縫線核におけるマイクロダイアリス法を用いたセロトニンの定量

秋澤 文香 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 設楽 宗孝 (医学医療系)

## 背景および目的

思考や認知の神経活動基盤の解明は、神経科学のみならず、精神神経疾患の病態理解や心理学、社会科学などにも役立つ。現状では、電気生理学的手法や、脳機能イメージングによる手法などを用いて、覚醒下の動物の脳活動が計測されている。一方、微小透析プローブの半透膜を介して脳内局所の物質を回収し、濃度を直接計測できるマイクロダイアリス法(微小透析法)は、主に齧歯類の脳におけるモノアミン濃度を定量する際に使用されている。

モノアミンは神経伝達物質の一種であり、ドパミンやセロトニンが含まれる。このうちセロトニンは、睡眠覚醒サイクルや食欲、リズム性運動、情動、社会的行動、ストレス回避行動、学習、記憶など、多くの機能と関連することが知られている。近年では、セロトニン神経の起始核である縫線核ニューロンの活動は、報酬獲得行動と関係しているとも言われており、注目を集めつつある。

従って、ヒトと近縁の霊長類である、サルの脳の縫線核におけるセロトニン濃度を覚醒下で調べることは、極めて重要であるものの、その技術的な困難さから、いまだに報告はない。齧歯類より大きな脳を持つサルでは、マイクロダイアリス法のプローブ刺入による脳の侵襲が大きく、モノアミン回収効率も悪い、脳に対する縫線核の比率が齧歯類と比べて小さく、定位困難であるなどの理由のためである。

そこで私は、いまだ報告の無い、覚醒アカゲザルの背側縫線核における、マイクロダイアリス法を用いたセロトニン濃度の定量法を確立することを試みた。

## 方法

実験はアカゲサル (*Macaca mulatta*) の成体オス1頭(体重 7 kg)を用いた。MRI 冠状断の画像を撮影し背側縫線核の位置を推定した。外科手術によって、頭蓋を穿孔し、頭部に記録用のチェンバー (Crist co. inc., MD, USA) を取り付け付けた。手術後に、縫線核にアプローチ可能であるかどうか、タングステン電極を刺入した状態で再度 MRI 撮影を行い、位置を確認した (Fig.1)。

頭蓋に装着したこれら一連のインプラントは、本来ニューロン活動記録用のシステムであるので、このシステムに適合したマイクロダイアリス用のプローブを開発した。プローブは柔軟な素材であるので、定位記録が可能になるよう、ニューロン活動記録用のステンレス製ガイドチューブを記録部位近くまで刺入する必要がある。プローブは、この内腔(径約 0.45 mm)を通過可能であり、かつガイドチューブ先端に半透膜が 1-2mm 程度露出した構造でなければならない。縫線核近傍からの記録を可能にするためには、これらの長さを適切に設定する必要があり、MRI 画像からプローブの仕様を正確に算出し、Eicom 社に作成を依頼した。

マイクロダイアリスは高速液体クロマトグラフ - 電気化学検出器 (Eicom HT-500) を用いた。サルにプローブを刺入し、シリンジポンプにてプローブにリンゲル液を還流した (50  $\mu$ l/min) (Fig 2)。6分間毎に還流液を回収した。セロトニンは血中や間質液中に豊富に存在するため、ガイドチューブやプローブを刺入したことに伴う侵襲によって、神経組織自体よりもはるかに高濃度のセロトニンが記録部位周辺に漏出することが多い。そこで、還流液中のセロト

ニン濃度が安定するまで、1-2 時間程度還流を続け、濃度が安定したことを確認後に、記録を開始した。

## 結果および考察

記録は三日間に分けて行った。いずれも安定したセロトニンピークを検出することができた (Fig 3)。

今回サルの背側縫線核でセロトニン濃度を定量できるようになるまでには、かなりの試行錯誤を要した。マイクロダイアリス法はきわめて高感度であり、リンゲル液や移動相等の溶液の作成に用いる器具の取り扱いといった、ごく基本的なレベルからも多くの検討と改善を要した。今後もこの記録法をより堅牢なものにしてゆくことが求められる。

今後、セロトニン神経の活動が報酬獲得行動と関係しているという仮説の検証を行いたい。そのためにサルに行わせる課題を準備し、標的部位周辺を網羅的に記録する予定である。



Figure 1: 冠状断 MRI 画像 (AP=0)

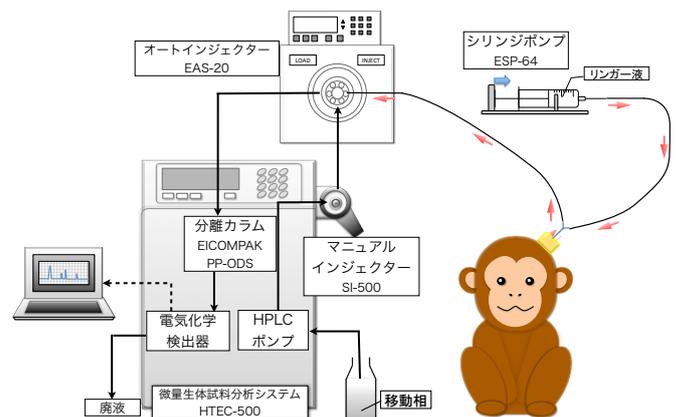


Figure 2: マイクロダイアリス HPLC オンライン自動分析システム

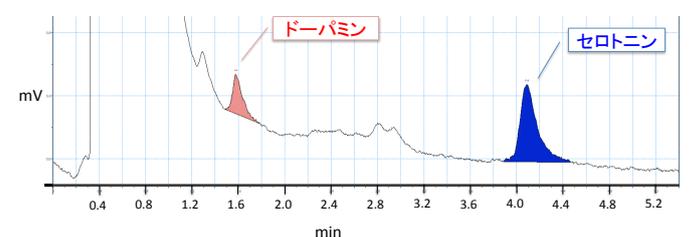


Figure 3: セロトニンピークの検出

## 視床網様核神経活動の光学計測

本多 健太郎 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 柳沢 正史 (筑波大学)

## 背景と目的

睡眠は、動き回って活動する覚醒状態とは裏腹に、外敵の危険も顧みず外界からの情報を遮断しその場にじっとしている過程である。一見するとこれは進化的にも不利な性質であるように思えるが、その量こそ違えど、脊椎動物や節足動物のように発達した神経系を持つ動物種で普遍的に見られる生理現象である。その意義については、断眠実験などから免疫機能や代謝など恒常性の維持や記憶の固定化などに寄与することが示唆されている一方で、その詳細なメカニズムは未だ謎に包まれたままである。また我々の生活においては、「四合五落」という言葉が存在するように睡眠は軽視されがちであるが、現代社会はコンピュータやテレビなどのディスプレイのほか、深夜まで営業するコンビニエンスストアなどから夜間に強い人工光を浴びる機会が増えたことも災いして、慢性的な睡眠不足に陥ったり、睡眠時無呼吸症候群などの睡眠関連を罹患している人も増加していると言われている。

この睡眠・覚醒の中枢調節機構を担う役者の一つに視床網様核 (thalamic reticular nucleus: TRN) が挙げられる。TRN は、間脳に位置する視床の周辺部を包み込むように存在する細胞核で、その全てが GABA 作動性の神経細胞で構成されており、視床からの一次体性感覚入力、視覚、聴覚入力、運動入力と、皮質からの高次体性感覚入力、視覚、聴覚入力、運動入力を受容し、視床から皮質への上向性情報伝達や皮質から視床への下向性情報伝達を修飾する働きを担っており、受容野の形成や種々のモダリティの統合に関与すると考えられている。睡眠・覚醒に関連する機能としては、ヒトではノンレム睡眠の一部に該当する睡眠段階 2 で、動物では徐波睡眠で観察される、数百ミリ秒から数秒間持続する 12-14 Hz の紡錘波 (sleep spindle) を形成するペースメーカーとして機能していることが知られている。TRN からの入力を受ける視床は、通常高頻度で発火しているが、TRN からの入力を受けると、GABA<sub>A</sub> 受容体を介した Rebound Burst Firing が引き起こされ、これが皮質に伝達されることで EEG 中の紡錘波に反映されると考えられている。この一連の流れを起始するためには、TRN 内部での発火同調と発振が起こる必要があると考えられるが、金属ないしガラス電極を用いた多細胞同時記録法を用いた先行研究では近傍細胞間で活動が同期していない可能性も示唆されている。

昨今の研究により、TRN の他にも睡眠・覚醒の中枢調節機構に関わる様々な因子が知られているが、その多くが脳の深部領域に存在しており、活動の実態を詳細に解明するためには乗り越えるべき技術的課題がいくつも存在している。また、大部分の神経核はサブピキュレーションを持つため、細胞核間のやりとりを超えた、サブタイプによる機能偏在を考慮したモデルを構築する必要がある。この知見を得るためには、セルタイプ特異的に経時的な活動計測を行うことも極めて重要である。

これを実現する方法として従来、多光子励起顕微鏡を用いたライブイメージング法や脳切片を用いたスライスパッチクランプ法などの手法が用いられてきた。しかしながら、これらの手法にもそれぞれ長所短所があり、前者は低侵襲的に鮮明な蛍光画像が得られる反面、脳表面から数百から千数百  $\mu\text{m}$  程度の深度が限界となるため、皮質や海馬といった浅部領域を対象にした研究では非常に強力であるが、皮

質表面から数千  $\mu\text{m}$  以上の深度に位置している睡眠・覚醒に関わる神経核群の細胞体は、この手法を用いて直接観察することは困難である。また後者は、蛍光プローブを用いて間接的な活動情報を得るイメージングを遥かに凌駕する高時間分解能で細胞の活動を記録できる一方で、一個体の実験動物で実施できる実験が一度限りとなるうえ、軸索や樹上突起など広範囲に分布する構造体を破壊することになるため、得られた知見が個体レベルでの機能実態に即しているか否かについてさらなる検証が求められる。このような問題から、睡眠・覚醒の中枢調節機構に関する研究をはじめとして、生命活動の根幹を担う因子の機能解析を行ううえで、これまでとは全く異なるアプローチが重要になると考えられる。

## 方法

セルタイプ特異的な活動記録をおこなうために、Cre/LoxP システムを利用した。今回の実験では GABA 作動性ニューロンを対象としているため、GABA 合成に関与する Gad1 コード領域に Cre recombinase を挿入した Gad1 Cre Knockin マウス (C57BL6/N) を用いた。また、蛍光プローブの発現系として、アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV) ベクター AAV-EF1 $\alpha$ -DIO-GCaMP を作成し、6 週齢に達したマウスに対して  $\approx 10^9$  particles となるよう micro injection をおこなった。2 週間後、頭部固定下のマウスに対して光ファイバー束から成るファイバー共焦点顕微鏡を標的領域に挿入するとともに、ネジ電極を硬膜上に置いて同時に脳波を記録した。実験完了後は還流固定を行い、免疫染色法によりプローブの発現領域とファイバーの挿入痕を確認した。

## 結果

作成した AAV-EF1 $\alpha$ -DIO-GCaMP を HEK293a に感染させる *in vivo* 発現系では、Cre recombinase 存在下でのみ特異的に GCaMP の発現が確認された。またこの細胞に ATP を添加して刺激することで、蛍光強度の上昇が確認された。この AAV ベクターを micro injection したのち、2 週間置いたマウスの脳スライスを用いた *ex vivo* でのスライスパッチクランプ法による計測では、蛍光強度と神経細胞の発火頻度との間に正の相関が確認された。また、*in vivo* 発現系を用いた記録後の組織学的見地から、TRN のほぼ全域で anti-GFP 抗体を使うことなく GCaMP の発現が確認でき、Cre recombinase との発現分布とも一致した。

## 考察

*in vivo*、*ex vivo* 発現系を用いた蛍光強度と活動の相関性から、この蛍光プローブは Cre recombinase 存在下で特異的に発現し、その蛍光強度は神経活動の大小を反映すると考えられる。*in vivo* 発現系に関しては、2 週間の発現期間を設けることで十分な発現量、蛍光量を得られることがわかった。今後はファイバー共焦点顕微鏡の記録面に入る細胞数をさらに増加させるために技術的改良を加え、現在おこなっている麻酔下、頭部固定下の実験から、覚醒下 (自然睡眠下) ないし、この系の強みを活かした freely-moving での光学計測を開始する。

# Staphylococcus aureus のストレス応答性カルジオリピン動態のメカニズム

北林 佳奈 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 森川 一也 (医学医療系)

## 背景および目的

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は我々の鼻腔や皮膚など表層に常在するが、多様な感染症を引き起こす日和見感染細菌でもある。表層環境では浸透圧の変化に常に曝されるが、本菌は広範な塩濃度環境で生存する能力を持つ。

細菌の細胞膜は、増殖相、pH、温度といった環境の変化に応答してその組成を変化させる。例えば細菌の主要リン脂質の一つであるカルジオリピン (CL) は、浸透圧ストレスに応答して蓄積量が増加することが黄色ブドウ球菌をはじめ大腸菌や枯草菌においても報告されている。

本研究室では黄色ブドウ球菌の高塩濃度下での生存に CL が必要なこと、本菌が二種類の CL 合成酵素 (Cls1、Cls2) をもつこと、Cls2 はハウスキーピングタイプで通常時の主要な CL 合成酵素であることを報告した (1)。しかしながら、Cls1 の役割は不明であり、本研究ではこれを明らかにすることを目的とした。

## 材料および方法

細菌株 *S. aureus* N315 (野生株)、*cls1* 欠損株 ( $\Delta cls1$ )、*cls2* 欠損株 ( $\Delta cls2$ )、*cls1/cls2* 欠損株 ( $\Delta cls1/2$ )

### 培養条件とストレス処理

細菌株を Luria Bertani (LB) 培地にて 37 °C、180rpm で一晚 (12~16 時間) 振とう培養した。また、これを新たな LB 培地に希釈、振とう培養して対数増殖期 (OD<sub>600</sub>=0.3) の細胞を得た。細胞を回収して PBS で洗浄したのち、高浸透圧溶液 (4M NaCl、4M KCl、20% ラフィノース) およびクエン酸 - リン酸緩衝液 (pH2.6、pH4.6) に溶解し、37 °C、180rpm で 15 分間振とうした。

### 薄層クロマトグラフィー (TLC)

回収した細胞を PBS で洗浄し、Bligh & Dyer 法 (クロロホルム:メタノールの溶液を用いた抽出法) により脂質を抽出した。抽出後、脂質を乾燥させクロロホルム:メタノールの溶媒に再び溶解した。この溶液をシリカゲル TLC プレートにアプライし、クロロホルム:メタノール:酢酸 (65:25:10 v/v/v) で展開した。展開後、硫酸銅 (100mg/ml)・8% リン酸をスプレーし、180 °C で加熱してリン脂質を検出した。

### CFU (colony forming unit) 測定

ストレス処理した細胞を LB 培地で順次希釈し、LB 寒天培地に塗布した。37 °C で一晚 (12~16 時間) 培養し、コロニー数を計測した。

### 転写・翻訳停止時の脂質合成解析

抗生物質リファンピシン、クロラムフェニコール (終濃度 100μg/ml) を培養液に加えて 37 °C、180rpm で 60 分間保温した。細胞を回収後、ストレス処理、リン脂質成分解析を行った。

## 結果

### ストレス処理による CL 蓄積量の変化

各種ストレス処理による CL 蓄積量の変化を調べた (図 1A)。ストレス未処理の場合、野生株、 $\Delta cls1$  株で CL が検出されるが、 $\Delta cls2$  株ではほとんど検出されない (1)。 $\Delta cls2$  株では高浸透圧および酸ストレス下で CL が多く蓄積することを見出した。一方、 $\Delta cls1$  株の CL 蓄積量は、高浸透圧ストレスで増加したが、酸ストレスではほとんど変化し

なかった。このことから、酸ストレスが誘導する CL 合成は主に Cls1 が担っていることが示唆された。

### ストレス下における CFU

次に、酸ストレス処理の前後で CFU を比較した。 $\Delta cls1$  株、 $\Delta cls1/2$  株の CFU が野生株に比べて 10 倍以上低下した一方、 $\Delta cls2$  株の CFU は野生株と同程度であった (図 1B)。すなわち、Cls1 による CL 合成が短時間の酸ストレス耐性に貢献していることが示された。

### CL 合成のメカニズム

Cls1 による酸ストレスに応答した CL 合成は 15 分以内という短時間で行われた。この応答が Cls1 の新規合成を必要とするかを調べるため、リファンピシン、クロラムフェニコールで転写・翻訳を停止させ、CL 量の酸応答性の有無を調べた。薬剤処理後にストレスを与えると、薬剤未処理の場合と同様に 15 分間で CL が十分量蓄積した (図 1A)。なお、これらの薬剤処理だけでは CL 蓄積量が変化しないことは確認した。以上より Cls1 による酸応答性 CL 合成は新規 Cls1 合成を介さず起こることが示唆された。

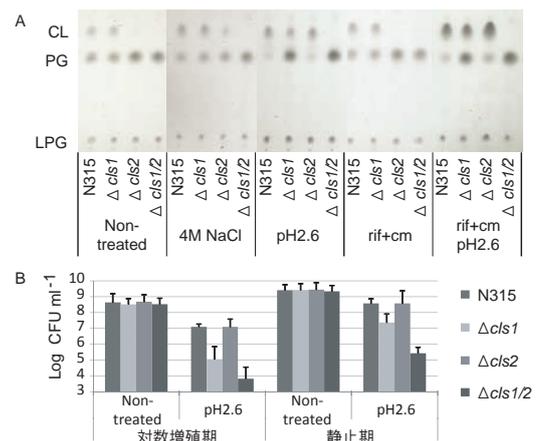


図 1: A 各種条件下のリン脂質成分 (TLC) CL: カルジオリピン、PG: ホスファチジルグリセロール、LPG: リシルホスファチジルグリセロール、rif: リファンピシン、cm: クロラムフェニコール B 酸ストレス下の CFU

## 考察

本研究にて、Cls1 による CL 合成がストレス応答性であり、酸ストレスに対する菌の生存に必要なことが明らかになった。分子系統学的解析によれば、Cls1 はブドウ球菌属にのみ存在する。Cls1 の獲得がブドウ球菌属の高い環境適応能力をもたらす要因の一つである可能性が考えられる。今後は Cls1 による酸応答性 CL 合成メカニズムを明らかにしたい。

## 参考文献

- (1) Tsai M, Ohniwa RL, Kato Y, Takeshita SL, Ohta T, Saito S, Hayashi H and Morikawa K. " *Staphylococcus aureus* requires cardiolipin for survival under conditions of high salinity. " *BMC Microbiology* 2011.11:13

## マウス生体内における肝細胞由来インスリン産生細胞の誘導と機能解析

長崎 はるか (筑波大学 生物学類)

指導教員: 高橋 智 (医学医療系)

## 背景・目的

現在、糖尿病は日本での患者数がこの10年で1.6倍に増加して890万人に達し、今や日本の国民病とも言える疾患となっている。糖尿病は主に、自己免疫機序により細胞が破壊される1型糖尿病と、全身のインスリン抵抗性亢進にともなうインスリンの相対的不全が原因となる2型糖尿病に分類される。1型及び重度の2型の糖尿病ではインスリン注射が必要となるが、日々の煩雑な血糖管理を必要とし、時に重篤な低血糖発作を引き起こす。根治療法として、膵臓またはランゲルハンス島の移植という方法があるが、ドナー不足により症例数は限られ、また、拒絶反応によって再度インスリン補充療法が必要となるケースが多くを占める。そのため、自身の非 $\beta$ 細胞からインスリン産生細胞を作製し、高血糖の改善をはかるという新たな細胞療法が現在模索されている。現在までに、実験動物において、膵外分泌細胞、膵管細胞や肝細胞から遺伝子導入によってインスリン産生細胞が作製されているが、インスリンの発現量は不十分で、しかもその新たなインスリン産生に伴う分子メカニズムは明らかになっていない。

これまでに、細胞の分化または機能維持に関わる遺伝子である *Pdx1*、内・外分泌細胞の発生に必須な *Neurod*、さらに細胞の成熟に関わる *Mafa* の3つの遺伝子を、肝細胞へと導入することでインスリン産生細胞が誘導可能という報告がされている。我々はこの報告に基づき、この *Pdx1/Neurod/Mafa*(PDA) の3遺伝子の組み合わせを、組換えアデノウイルスを用いて肝細胞へ遺伝子導入した。その一方で、*Mafa* と共に大 *Maf* 群転写因子に属する *Mafb* は、それぞれのノックアウトマウスの解析から、胎生期における細胞の分化には *Mafa* ではなく、*Mafb* が重要な役割を持つことが明らかになった。従って、*Mafa* 以上に *Mafb* のほうがより強力にインスリン誘導を可能にすると考えられた。そこで、PDA と *Pdx1/Neurod/Mafb*(PDB) の2通りの組み合わせのパターンを、*in vivo* で、それぞれマウス肝臓に遺伝子導入し、肝における、抗インスリン抗体による免疫染色、インスリン含有量測定、さらに細胞特異的遺伝子の発現について解析・比較を行った。

## 方法

## ● 組換え体アデノウイルスの調製

*Pdx1*、*Neurod*、*Mafa*、*Mafb*、GFP 発現組換えアデノウイルスは、ViraPower™ Adenoviral Expression System (Invitrogen) を使用して調製した。それぞれのウイルスの感染力価は Adeno-X Titer Kit (Clontech) を用いて測定し、 $5 \times 10^9$  infectious unit (IFU) / mouse で ICR マウスに尾静脈投与した。

## ● インスリン含有量測定

遺伝子導入3日目の野生型マウスの肝臓組織を、酸エタノール処理後、ELISA 法によりインスリン量 (ng) を測定し、これをタンパク量 (mg) で補正した。

## ● 免疫染色

遺伝子導入3日目の野生型マウスの肝臓を摘出し、ホルマリン固定、パラフィン包埋後の切片を、常法に従い抗インスリン抗体を用いて免疫染色した。

## ● 遺伝子発現解析

遺伝子導入3日目および9日目の野生型マウスの肝臓由来の cDNA を、SYBR Premix EX Taq™ (Takara) を蛍光色素として Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara) を用い、*Insulin1*、*Insulin2* を含む  $\beta$  細胞特異的遺伝子の発現量を比較した。標準化には *Hprt* を使用した。

## ● 統計学的解析

データは、平均  $\pm$  標準誤差によりあらわした。各群間におけるインスリン含有量とそれぞれの遺伝子発現量の比較検定には、多重検定を用いた。  $P < 0.05$  を有意差ありとした。

## 結果・考察

遺伝子導入後3日目において、肝臓におけるインスリン含有量は PDA 群 (N = 4) よりも PDB 群 (N = 5) のほうが、有意に増加していた ( $P = 0.007$ ) (Fig.1)。また、この PDB でのインスリン含有量を肝臓全体の重量で補正したところ、正常な膵臓の約60%程度の含有量であった。免疫染色より、PDA および PDB 投与マウスの肝臓においてインスリン陽性細胞が存在しており、タンパクレベルでインスリンが発現していることが確認できた。さらに、肝臓における遺伝子発現解析より、遺伝子導入後3日目において、PDA、PDB 両投与群で、*Insulin1*、 $\beta$  細胞特異的遺伝子の発現がみられた。PDA 群では9日目まで発現が維持されるものの、PDB 群では9日目には消失した。以上から、肝臓に *Pdx1/Neurod/Mafb* を遺伝子導入することにより、3日目の時点で膵臓の6割程度のインスリン産生、および  $\beta$  細胞特異的遺伝子が発現することがわかった。

これまでは PDA の組み合わせを遺伝子導入することでインスリン産生細胞が誘導されることが報告されていたが、今回の実験結果より、*Mafa* に代わり *Mafb* を導入することでもインスリン産生細胞を誘導できることがわかった。さらに、アデノウイルス感染後3日目においては、*Mafa* よりも *Mafb* を含む組み合わせの方がより高効率にインスリン産生を誘導できた。ただ、感染後9日目の遺伝子発現解析の結果では、PDB 投与の場合、インスリン遺伝子発現はほぼ認められないものの、PDA 投与ではその発現が維持されていた。以上の結果より、一時的なインスリンの誘導は PDB 投与のほうが効率的であるが、持続的な誘導には PDA 投与のほうが効率的であると考えられる。

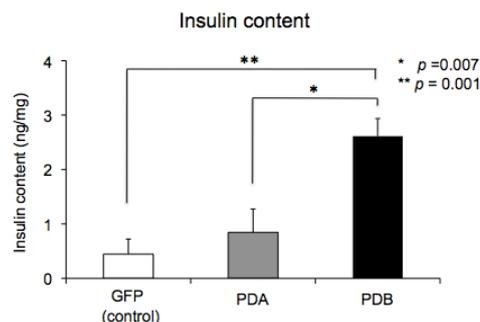


Figure 1: 遺伝子導入3日目における野生型マウス肝臓のインスリン含有量

## メチル化シトシン酸化酵素 TET2 に結合する蛋白の同定と解析

浅部 幸紹 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 滋 (医学医療系)

## 背景・目的

近年、骨髄系造血器腫瘍において TET2 遺伝子の変異または欠失が多数検出された<sup>1)</sup>。

TET2 とは染色体 4q24 に位置する遺伝子であり、3 つある TET ファミリータンパク質の 1 つである。TET2 は、Fe<sup>2+</sup> と 2-oxoglutarate 依存的に 5-methylcytosine (5mC) のメチル基を 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) に変換する活性を持つ<sup>2)</sup>。5mC は DNA methyltransferase (DNMT) 1、3a、3b によってシトシン 5 位の炭素がメチル化されたもので、最もよく解析されているエピジェネティック修飾の 1 つである。TET2 遺伝子異常はメチル化・脱メチル化の異常によるエピゲノム異常が生じることにより腫瘍化を引き起こしていると推測されている。

当研究室では TET2 に結合するタンパク質をスクリーニングしたところ、糖鎖転移酵素である O-linked GlcNAc (N-acetylglucosamine) transferase (OGT) が検出された。OGT は細胞内タンパク質のセリンまたはスレオニン残基に GlcNAc を付加することで、転写活性化やタンパク質分解などの多様な機能を果たしていると考えられている<sup>3)</sup>。本研究では、HEK293T 細胞や白血病細胞株などを用いて TET2 と OGT の関係を調べた。

## 方法

## 1. TET2 における OGT 結合領域の探索

TET2 は全長 2002 アミノ酸のタンパク質である。TET2 の変異体を作製し、OGT との結合領域を調べた。1~1104 アミノ酸から成る C 側欠損変異体および、1104~2002 アミノ酸から成る N 側欠損変異体を作製し、OGT と co-transfection させ、免疫沈降法によって結合の有無を調べた。C 側欠損変異体は当研究室で製作済みであり、N 側欠損変異体を作製した。

## ・サブクローニング

TET2 C 側領域は TET2 cDNA をテンプレートとし、Prime STAR MAX (TAKARA) を用いて増幅後、pGEM Teasy ベクター (PROMEGA) へ TA クローニングした。pBluescript KS-を制限酵素処理 (XhoI, KpnI) し、突出末端を平滑末端に改変した。次に EcoRI ~ XhoI ~ KpnI ~ SalI のオリゴを挿入し、その後 KpnI ~ SalI に標識タグである 3 × Flag, XhoI ~ KpnI に pGEM Teasy から切り出した 1104~2002 アミノ酸 C 側領域を挿入した。SalI ~ SalI で切り出して pGCDN-IRES-GFP に挿入した。

## ・リン酸カルシウム法による全長 TET2、C 側欠損変異体 TET2、N 側欠損変異体 TET2 および OGT の co-transfection

pGCDN-IRES-GFP に挿入した Flag-全長 TET2 または C 側・N 側欠損変異体 TET2 (10 μg) と pGCDN-IRES-KO に挿入した Myc-OGT (5 μg) を DW 450 μl, CaCl<sub>2</sub> 50 μl, HeBS (pH7.0) 500 μl に加えてボルテックス後、室温 30min でインキュベートした。その後 HEK293T 細胞に滴下し、7~12 時間後に phosphate buffered saline (PBS, Nissui) で wash し、48 時間後に蛍光顕微鏡で確認した。

## ・免疫沈降 (immunoprecipitation : 以下 IP)

氷冷した PBS で 2 回 wash した細胞に Lysis Buffer (50mM HEPES (SIGMA) 0.35M NaCl (Wako) 0.1%NP-40 (SIGMA) protease inhibitor cocktail (Roche) 100mM PUGNAc (TOCRIS)) 2ml 加え on ice 30min。その後スクレーパーで回収し、21500xg・20min・4 遠心した。M<sub>2</sub> 抗体 (anti-Flag, Agilent) 4 μg/sample、9E10 上清 (anti-Myc) -1ml/sample を加えて 4 over night でローテートした。Lysis Buffer であらかじめ wash した Protein-G (GE Healthcare) 50 μl を加えて 4 で 30 分間ローテートした。280xg・2min 遠心後上清を捨て、ペレットを Lysis Buffer (aprotinin (SIGMA) 200mM PMSF (SIGMA) 100mM PUGNAc) で 3 回 wash 後、M<sub>2</sub>IP 群は 3 × Flag ペプチド溶解液 (500 μg/ml 3 × Flag ペプチド (SIGMA) 50mM HEPES、0.15M NaCl) で溶出し 5 × Sample Buffer (5 × Laemmli Buffer, 0.05M DTT (Wako)) を加えて 95 °C・5min ボイルした。また 9E10-IP 群はペレットに 2 × Sample Buffer を加えて 95 °C・5min ボイルした。

## ・Western blotting 法

7.5%SDS-PAGE で電気泳動 (Mini-PROTEAN Tetra Cell (BIO RAD)) 後、25V・0.2A・60min でブロッティング (Trans-Blot Turbo<sup>TM</sup> Blotting System (BIO RAD)) し、3%ウシ血清アルブミン (BSA, SIGMA) で 60min ブロッキングした。1 × TNT で wash 後、一次抗体 M<sub>2</sub> (1 : 2000) とあるいは 9E10 上清 (1 : 10) 60min 振盪後、二次抗体 anti-マウス HRP 抗体 (1 : 10000 (Dako)) で 60min 振盪、LAS4000 (GE Healthcare) で撮影した。

## 2. TET2 における糖鎖結合部位の同定

全長 TET2、C 側・N 側欠損変異体 TET2 をそれぞれ OGT と co-transfection させた後 M<sub>2</sub> で IP した。得られたサンプルを 3%BSA で 1 時間振盪後、一次抗体 anti-O-GlcNAc 110.6 (1:1000 (SIGMA))、二次抗体 anti-マウス HRP 抗体 (1 : 10000) で染め LAS4000 で撮影した。

3. 白血病細胞株を用いた内在性 TET2 及び内在性 OGT の発現量の比較  
慢性骨髄性白血病細胞株 K562 細胞と急性単球性白血病細胞株 THP1 細胞における内在性の TET2 と OGT の発現を確認した。その際、当研究室で樹立された、shRNA により TET2 をノックダウンした K562 細胞および THP1 細胞、ウサギ抗 TET2 抗体を用いた。

TET2 ノックダウン群の K562 sh と THP1 sh とコントロール群を細胞 2 × 10<sup>6</sup> 個あたり Lysis Buffer (50mM Tris (SIGMA) 150mM NaCl、1%Triton-100 (SIGMA) 1mM EDTA (DOJINDO) 200mM PMSF, aprotinin) 100 μl を加えて針を 10 回通した後、4 °C・30min ローテートした。次に遠心して得られた lysate を、一次抗体ウサギ anti-TET2 抗体 (1:2000) と二次抗体 anti-ウサギ HRP 抗体 (1:10000 (Dako)) および一次抗体 anti-OGT 抗体 (1:200 (SANTA CRUZ)) と二次抗体 anti-マウス HRP 抗体 (1 : 10000) を用いてそれぞれ Western blotting を行った。

## 結果

1. TET2 と OGT の結合部位を調べたところ、OGT は C 側欠損変異体とは共沈されず、N 側欠損変異体 TET2 と共沈された。これにより TET2 の OGT 結合部位は C 側に存在すると考えられる。

2. 抗 O-GlcNAc 110.6 抗体で染めたところ、全長 TET2、C 側欠損変異体 TET2 及び N 側欠損変異体 TET2 のいずれでもバンドが見られた。これにより TET2 は N 側と C 側の両方で O-GlcNAc 付加が起こっていると考えられる。

3. 抗 TET2 抗体で染めたところ、コントロール導入細胞では 230kDa にバンドが見られ、shRNA ノックダウン細胞ではバンドが減弱していたことから白血病細胞株において内在性の TET2 が発現していると考えられる。抗 OGT 抗体で染色したところ、TET2 ノックダウン群とコントロール群において OGT の発現量に差は無かった。

## 考察

タンパク質の O-GlcNAc 修飾はタンパク質の機能に重要な役割を果たしている。今回 TET2 と OGT は結合し、さらに TET2 が O-GlcNAc 化修飾されていることが確認できた。今後は TET2 の OGT 結合部位や O-GlcNAc 修飾部位を同定していくと同時に、TET2 と OGT の関係がどのように腫瘍化に関連しているのかを明らかにしていきたい。

## 参考文献

- 1) F. Delhommeau and Others: Mutation in TET2 in Myeloid Cancers, N Engl J Med 360,2289-2301(2009)
- 2) Shinsuke Ito, Ana C. D' Alessio, Olena V. Taranova, Kwonho Hong, Lawrence C. Sowers, Yi Zhang: Role of Tet proteins in 5mC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. Nature;466,1129-1133 (2010)
- 3) Mark D. Roos and John A. Hanover: Structure of O-Linked GlcNAc Transferase: Mediator of Glycan-Dependent Signaling, Biochemical and Biophysical Research Communications 271,275-280(2000)

## 外気温と異なる温度刺激が心理的ストレス応答に与える効果

長友 亘 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 久野 節二 (医学医療系)

### 研究の背景

生体は、皮膚感覚を通して体外環境の温度変化を受容し、その影響を受ける。この変化が生体にとって厳しい場合には、冷たい水や暖かい水の摂取など、異なる温度刺激を直接受容する方法で体内環境の恒常性が保たれる。ここで注目すべきことは、状況に対応して、最適な温度刺激の受容が、生体に心地よさや快適性を与えるということである。例えば、ホットパックなどを用いた温熱療法では、身体機能の改善に加え、リラックス効果があると言われる。しかし、この効果を生み出す生物学的メカニズムは明らかではない。本研究では、心地よい、あるいは快適な状況では、ストレス応答が変化するかも知れないと考え、外気温と異なる温度覚の受容の生物学的効果、特にストレス応答の制御機構の活動に与える影響について、拘束ストレスを負荷されたラットの視床下部室傍核 (PVN) における初期発現タンパク質 (c-Fos と JunB) を指標に検証した。

PVN はストレス応答経路の 1 つである視床下部-下垂体-副腎皮質経軸 (HPA) の最上位に位置する神経内分泌核である。生体がストレスを受けると、小細胞性 PVN 垂核内側部に局在するニューロンが副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) を放出し、下垂体前葉から副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の分泌を促し、最終的に副腎皮質から糖質コルチコイド (ラットではコルチコステロン) を分泌させる。

ストレス負荷で、CRH ニューロンが一過性に c-Fos を発現するため、このタンパク質はストレス誘導性神経興奮マーカーとして汎用されている。また、Jun ファミリータンパク質と共役して AP-1 を形成し、転写調節因子として機能する。しかし、ストレスで PVN に発現誘導された c-Fos と共役する Jun ファミリーはまだ特定されていないが、その候補として JunB が考えられる。

### 方法

Sprague-Dawley 系成熟雄ラット (7 週齢、日本クレア) を購入し、1 週間飼育環境 (室温  $23.5 \pm 0.5$ 、明暗条件 12:12 h、点灯 08:00、自由摂餌・飲水) に順化させた後、使用した。実験時での体重は 290-310 g であった。

#### 1. 拘束ストレス負荷実験と組織固定

動物を 3 群 (各  $n=5$ ) に分け、蛍光灯の直接照明下 (約 2500 lx)、室温  $25.0 \pm 1.0$  の環境で、拘束ストレスを 30 分間与えると同時に、15、25、または 35 の温度に保たれたアルミブロックを動物の前肢肉球に直接接触させることで、各群にそれぞれ異なる温度刺激を提示した。動物をケージに戻し、拘束ストレス開始 120 分後に経心性灌流固定を行い、脳を採取した。HPA 活動の概日周期を考慮し、実験は 8:00 - 10:00 の間に行った。

#### 2. 免疫組織化学染色

固定脳から切り出した視床下部をパラフィンに包埋し、PVN を含む  $5 \mu\text{m}$  厚の前頭断連続切片を作成した。切片を用いてアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法による c-Fos および JunB の免疫染色を行った。光学顕微鏡下で室傍核の明視野組織画像を撮り、Photoshop を用いてバックグラウンドを標準化した後、Image J により PVN 内

の陽性細胞数を計測した。1 個体当たり 2 枚の隣接切片を計測に用い、各動物群の平均値について一元配置分散解析 ( $\alpha = 0.05$ ) を行った。

### 結果

3 つの動物群のいずれにおいても、PVN に c-Fos および JunB の発現を示す免疫陽性反応が認められた。25 提示群と比較し、c-Fos と JunB 免疫染色の両方で、15・35 各提示群において若干の減少傾向が見られたものの、各群間で統計的に有意な差は認められなかった (Fig. 1)。

3 群に共通して、陽性反応は小細胞性垂核に集中し、大細胞性垂核にはほとんど観察されなかった (Fig. 2)。このことは JunB 免疫染色について特に顕著で、c-Fos 免疫染色についても、個体差は JunB に比べ大きかったものの、ほぼ同様であった。

### 考察

約 25 の室温での、身体への接触による異なる温度提示はストレス反応関連の PVN ニューロン活動にほとんど影響しないことが判った。15 提示群では、25 提示群に対しわずかに減少傾向が見られたが、これは拘束ストレスで誘発された体温上昇による「暑い」という感覚による心理ストレスが、冷温提示で緩和されたのではないかと考えられる。本実験では、誤差が大きかったことから、今後は個体数を増やして観察する必要がある。また、室温を 15 や 35 に設定した場合には、異なる結果が得られる可能性も考えられる。

免疫染色の観察は PVN における c-Fos と JunB 免疫陽性反応の分布が、3 群で類似することを示した。この結果は、JunB が PVN ニューロン活動の有用なマーカーであること、また、c-Fos が転写因子 AP-1 を形成する際の共役タンパク質として働いていることを示唆する。

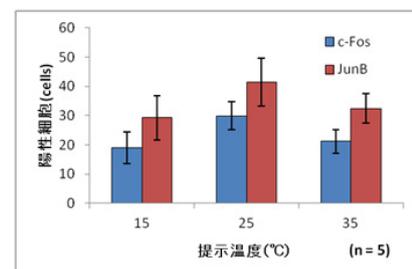


Figure 1: 各提示温度における c-Fos・JunB 陽性細胞数。誤差範囲は標準誤差平均を示す ( $n = 5$ )。

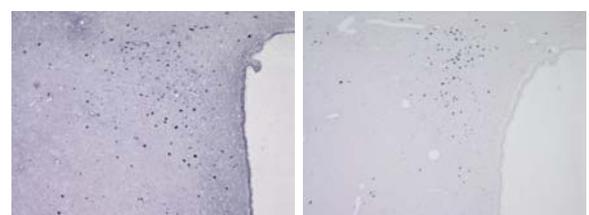


Figure 2: PVN における c-Fos(左) と JunB(右) 免疫染色

## 受精後刷り込みメチル化に関わる DNA メチル化酵素の探索

牛木 亜季 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 谷本 啓司 (生命環境系)

### 背景

哺乳類は精子と卵子が受精してできる 2 倍体の生物であり、大部分の遺伝子は父親由来と母親由来の両方の対立遺伝子座 (アリル) から同等に発現する。一方、一部の遺伝子はあらかじめ決まった片方の親由来のアリルでのみ発現し、この現象を「ゲノム刷り込み」という。また、これにより制御される遺伝子を「刷り込み遺伝子」と呼ぶ。ゲノム刷り込みの破綻は、個体発生の異常や疾患の原因となるため、その正しい制御は発生や生体機能の維持に重要である。

刷り込みを受ける遺伝子座のひとつに、*Igf2/H19* 遺伝子座がある (Figure 1)。この遺伝子座には、父親由来のときのみ発現する *Igf2* 遺伝子と母親由来のときのみ発現する *H19* 遺伝子が存在する。両遺伝子の発現制御には、*H19* 遺伝子上流に存在し、親の由来により異なる DNA メチル化状態となる Imprinting Control Region (ICR) が必須である。ICR にみられるこのような特徴的なメチル化パターン (刷り込みメチル化) は、生殖細胞の形成過程において個体の性別に応じて確立し、受精後、体細胞系列において細胞分裂を超えて維持される (Figure 2)。この結果、由来する親の性に応じた遺伝子発現制御が行われる。一方、受精後に始原生殖細胞に分化した細胞においては、親のメチル化パターンは消去され、生殖細胞の形成過程において、その個体の性別に応じて、再び新たな刷り込みメチル化が確立される。ICR は他の多くの刷り込み遺伝子座にも存在すること、また、刷り込み遺伝子の片親性発現に必須であることから、その刷り込みメチル化が親の由来を示す「印」であると考えられている。

生殖細胞における刷り込みメチル化の確立には、DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) という新規型 DNA メチル化酵素と、DNA methyltransferase 3-Like (Dnmt3L) という DNA メチル化酵素関連因子が必要であることが知られている。また一方で、生殖細胞で確立した刷り込みメチル化パターンは、受精後、Dnmt1 という維持型 DNA メチル化酵素により、DNA 複製を超えて維持される。

*Igf2/H19* 遺伝子座の ICR (*H19*-ICR) は精子形成過程、つまり父方アリルでのみ、メチル化される。一方で、他の多くの刷り込み遺伝子座の ICR は卵形成過程、つまり母方アリルでのみメチル化される。このことは、Dnmt3a や Dnmt3L が精子、あるいは卵でのみ存在していることにより刷り込みメチル化が確立するわけではないことを示している。つまり、個体の性別に応じて、メチル化すべき ICR とすべきでない ICR とを判断する、刷り込みメチル化確立のメカニズムが存在することになる。しかしながら、このメカニズムに関与する *cis* DNA 配列は未だ明らかとなっていない。

### 目的と方法

当研究室の先行研究において、*H19*-ICR 配列内に刷り込みメチル化を確立するための十分な情報が含まれているのかについて検証するために、通常、刷り込みメチル化を受けないヒト グロビン遺伝子座を保持する酵母人工染色体 (Yeast Artificial Chromosome; YAC) に、*H19*-ICR 断片を挿入した後、YAC トランスジェニックマウス (TgM) を作製した。この TgM の解析の結果、体細胞において導入 *H19*-ICR は父方アリルでのみメチル化されており、

用いた *H19*-ICR 断片内に刷り込みメチル化の確立に十分な情報が含まれていることが明らかとなった。しかしながら、興味深いことに、内在性 *H19*-ICR とは異なり、導入 *H19*-ICR は精子においてメチル化されていないことが明らかとなった。この結果はすなわち、導入 *H19*-ICR においては、受精後に刷り込みメチル化が確立したことを示している。また、詳細な解析の結果、受精後刷り込みメチル化は受精後 3.5 日の胚盤胞期で既に確立していることがわかった。

先行研究で明らかとなった、受精後刷り込みメチル化現象は、これまでに報告がなく、また、関与する *cis* DNA 配列や酵素も不明である。そこで、本研究ではこの受精後刷り込みメチル化に関わる酵素を明らかにすべく、解析を試みている。

### 結果

卒業研究発表会では、その結果の一部を報告する。

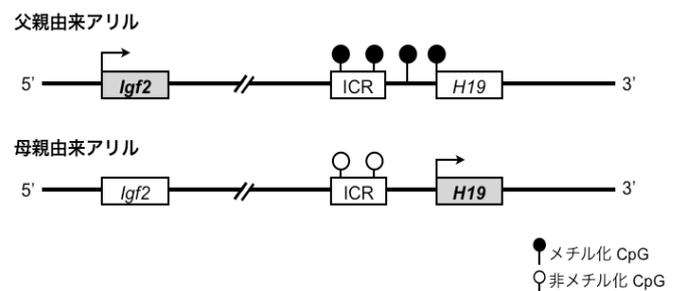


Figure 1: *Igf2/H19* 遺伝子座におけるゲノム刷り込み

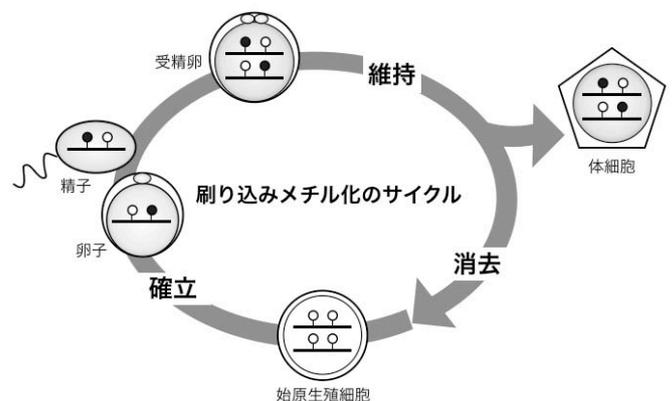


Figure 2: 刷り込みメチル化のサイクル

## ホヤの変態における神経分化メカニズムの解析

佐々木 陽香 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 笹倉 靖徳 (生命環境系)

## 背景・目的

Paired mesoderm homeobox 2(Phox2) は、paired like class に属するホメオドメインタンパク質で、脊索動物に広く保存されている転写因子である。Phox2 遺伝子は神経細胞で発現し、様々なニューロンの分化に関わることが知られている。特に哺乳類では転写のアクチベーターとして働き、コリン作動性神経の分化誘導と、ノルアドレナリン作動性神経の分化誘導をすることが知られている。脊索動物ホヤの一種である カタクウレイボヤ *Ciona intestinalis* のオタマジャクシ型幼生の中樞神経系においては、*CiPhox2* が neck と呼ばれる領域に発現していることが知られている [1]。neck にはグリア細胞の一種、上衣細胞のみが存在するとされており、また neck にある *CiPhox2* 発現細胞からは変態後に成体のコリン作動性神経が分化することが示唆されている [2]。これらのことから *CiPhox2* は neck において上衣細胞からコリン作動性神経への分化転換に関わっている可能性がある。そこで本研究では、*CiPhox2* のホヤの神経分化における機能解明を試みた。

## 方法・結果

1. *CiPhox2* を発現する細胞タイプの特定

neck 領域の *CiPhox2* 発現細胞が上衣細胞であるかを確認するため、*CiPhox2* プロモーターで蛍光タンパク質 GFP を発現させるプラスミド DNA を作製、エレクトロポレーション法によってホヤ胚に導入し *CiPhox2* 発現細胞を可視化した。続いて上衣細胞のマーカー *CiCRALBP* と GFP で免疫染色を行い *CiPhox2* 発現細胞と上衣細胞を観察した。*CiPhox2* 発現細胞と上衣細胞マーカーの発現は一部で重なっていたが、多くは一致していなかった。また成体のコリン作動性神経で GFP を発現するエンハンサートラップシステムを用いて *CiCRALBP* と GFP で免疫染色を行い観察した。成体のコリン作動性神経は neck 領域に由来していたが、成体コリン作動性神経と上衣細胞のマーカーの発現は一致しておらず上記の結果を裏付ける結果となった。

2. *CiPhox2* の強制発現

*CiPhox2* のカタクウレイボヤ神経系での機能を特定する目的で、神経細胞全般で発現する遺伝子 *Ciβ2tubulin* のプロモーターで *CiPhox2* を発現させるプラスミド DNA を作製、ホヤ胚に導入し *CiPhox2* の強制発現を行った。強制発現個体でのコリン作動性神経分化をコリン作動性神経で蛍光タンパク質 Kaede 蛍光を発する系統ホヤを利用して観察し、Kaede 蛍光発色の低下が確認された。強制発現個体でコリン作動性神経のマーカー遺伝子 *CiVACHT*、*CiChAT* の mRNA 量を定量 PCR 法を用いて測定した結果、発現量の低下が確認された。一方、GABA 作動性神経で Kaede 蛍光を発する系統を用いて *CiPhox2* 強制発現を行ったところコントロール個体と蛍光発色に差は無く、GABA 作動性神経の分化は *CiPhox2* 強制発現による影響を受けないことが示された。

## 考察

上衣細胞マーカーを発現していた *CiPhox2* 発現細胞は一部であったことから、*CiPhox2* 発現細胞には従来の報告とは異なり、上衣細胞と上衣細胞ではないセルタイプ二種類

のある可能性と、発生の初期段階では全て上衣細胞であるが分化転換の進行に伴い多くの *CiPhox2* 発現細胞で上衣細胞マーカーの発現が消失している可能性がある。これらの可能性は neck 領域から形成される成体のコリン作動性神経で上衣細胞のマーカーの発現が無かった結果からも支持される。*CiPhox2* 発現細胞は発生の初期から上衣細胞とは異なる細胞なのか、分化転換に伴い上衣細胞から異なるセルタイプへと移行しそれがコリン作動性神経への転換に必要なのかを詳細に検討する必要がある。どちらの場合でも *CiPhox2* 発現細胞には二種類あることが示唆され、どの *CiPhox2* 発現細胞がコリン作動性神経に分化するのかについて細胞レベルでの検討が必要である。

*CiPhox2* は *CiVACHT* と *CiChAT* 二つの遺伝子の発現を抑制することが示された。*CiVACHT* と *CiChAT* はシス制御領域を共有しており、*CiPhox2* 強制発現による影響にはこの領域に関わることが強く示唆される。つまりホヤにおいて *CiPhox2* は、コリン作動性神経の分化を誘導するのではなく、コリン作動性神経の運命を持つ細胞の分化を抑制することで未分化な状態に留め、変態期にこの抑制が外れることで成体のコリン作動性神経が分化すると考えられる。また GABA 作動性神経には影響を与えなかったことから *CiPhox2* の機能はコリン作動性神経の運命のみに関わると考えられる。

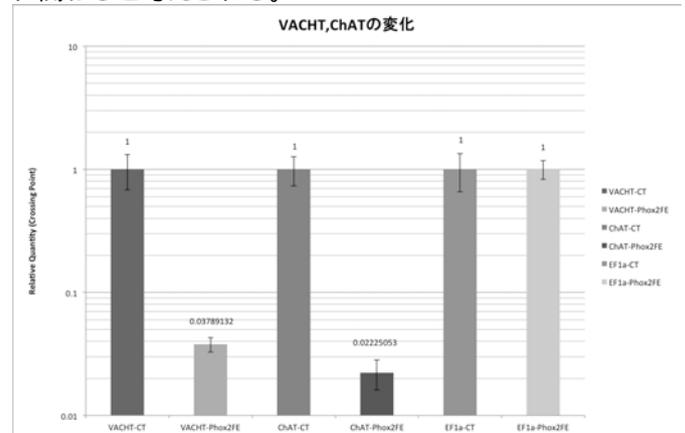


Figure1: *CiPhox2* 強制発現による *CiVACHT* と *CiChAT* の mRNA 量の変化

## 今後の実験計画

*CiPhox2* 発現細胞のセルタイプ同定の再検討と運命、分化転換のタイミング、*CiPhox2* 遺伝子の阻害や強制発現による影響をより詳しく検討したい。また *CiPhox2* は転写のリプレッサーとして直接 *CiVACHT* と *CiChAT* の発現を抑制しているのか、又は転写のアクチベーターとして他のリプレッサーとなる転写因子の発現促進を介して間接的にこれらの発現を抑制しているのかを検討する。また *CiPhox2* タンパク質の機能阻害や変異体作製を行い、*CiPhox2* による神経細胞の分化転換の詳細な分子メカニズムの解明を試みたい。

## 引用文献

- [1] Horie T. et al. (2011) Nature 469(7331):525-8.  
 [2] Dufour, H.D. et al. (2006) PNAS. USA 103, 8727-8732

## ウニ初期胚における動物極特異的遺伝子の発現解析

後藤 明日香 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 稲葉 一男 (生命環境系)

## 背景・目的

ウニ初期胚では発生の進行に伴い、前後 (anterior-posterior [AP]) および背腹 (dorsal-ventral [DV]) 軸に沿って、それぞれ異なる細胞運命が決定される。本研究では、神経外胚葉が胚前端部に分化するための分子メカニズムを解明する過程において、前端部神経外胚葉特異的に発現する転写因子 FoxQ2 の発現制御解析と、その下流因子の発現パターンの解析を目的とした。

現在、ウニ初期胚において、内胚葉および後方組織分化に重要な因子として  $\beta$ -catenin が報告されている (Logan et al. *Development*, 1999)。 $\beta$ -catenin は、細胞自立的に、また、Wnt の刺激により胚後方側の細胞核内に移行することで、その細胞の内胚葉・中胚葉への分化を促す。また、胚前方領域においては、 $\beta$ -catenin がユビキチン/プロテアソーム系による分解を受けることで、細胞の内中胚葉への分化が抑制されていることが報告されている (Weitzel et al. *Development*, 2004)。このように、胚後方領域の分化機構に関しては数多く報告されているが、胚前方領域の分化機構についての知見は少ない。近年、前端部神経外胚葉特異的に発現する転写因子 FoxQ2 が報告された (Tu et al. *Dev. Biol.*, 2006)。*foxq2* は、第 5 卵割期において予定外胚葉全体で発現を開始し、その後、胚前端部でのみ発現するよう限局されていく。この限局には、胚後方部のみで生じる  $\beta$ -catenin の核移行が必要であることから、*foxq2* は  $\beta$ -catenin シグナルの下流に位置する未知の因子によってその発現が抑制されていると考えられている。また一方、胚前端部では *foxq2* の発現が持続することから、その場所では強力な誘導シグナルかまたは抑制シグナルを排除するメカニズムが備わっていると考えられる。そこで本研究では、FoxQ2 を通して前端部神経外胚葉分化の詳細な分子メカニズムを解明することを目的として、まず、*foxq2* の発現調節エレメントの解析を行った。また、*foxq2* が神経外胚葉形成に必要であることから、その下流因子の機能解析を行う前段階として *in situ* hybridization 法を用いた神経外胚葉遺伝子発現マップの作成を試みた。

## 材料・手法

## 材料

パフンウニ *Hemicentrotus pulcherrimus*

## 手法

## 1. FoxQ2 cis-調節エレメントの解析

*foxq2* 遺伝子の 5' 領域 (2.4 kb) を 4 つの領域 (最も上流から 1, 2, 3, 4 とする) に分け、1-2-3-4、2-3-4、3-4、4 の各末端に Endo16 基本プロモーター配列と Green Fluorescent Protein (GFP) を付加したコンストラクトを作成し、受精卵にインジェクション後、後期原腸胚 (41 h) まで発生を進行させ GFP 蛍光パターンを解析した。次に、Endo16 基本プロモーター配列を除去したコンストラクト、さらに 3' 領域 (1.4 kb) を付加したコンストラクトを作成した。新たに作成したそれらのコンストラクトについても同様にインジェクションを行い、胚を発生させ GFP 蛍光パターンを解析した。

## 2. 前端部神経外胚葉遺伝子発現マッピング

FoxQ2 の下流因子である複数の前端部神経外胚葉特異的遺伝子 (*ankAT*, 26603) について、ふ化前胞胚 (12 h)、ふ化後胞胚 (14 h)、間充細胞胚 (18 h)、中期原腸胚 (27 h) において *in situ* hybridization 法を用いた *foxq2* との二重染色を行い、その発現パターンを解析した。

## 結果・考察

## 1. FoxQ2 cis-調節エレメントの解析

最初に作成したコンストラクト (1-2-3-4, 2-3-4, 3-4, 4) では GFP 蛍光パターンが外胚葉のみで発現する割合に差はなかった。よって発現調節エレメントは 4 の領域に存在すると考えられた。しかし、4 の領域の直後に End16 基本プロモーターを挿入していることから、単に End16 基本プロモーターが非特異的に発現を促しているだけである可能性が考えられた。そこで、この基本プロモーターを除去したコンストラクトを作成し、同様の実験を行った。その結果、1-2-3-4 で見られた外胚葉のみでの GFP の発現の割合はコンストラクトを短くするに従って減少し、3-4, 4 では外胚葉以外での発現が増加した。また、3' 領域を付加したコンストラクトを用いても同様の結果が得られた。以上より、外胚葉以外で *foxq2* の発現を抑制する調節エレメントは 1, 2 いずれかの領域に存在し、また 3' 領域は発現調節に関与しないことが考えられた。

## 2. 前端部神経外胚葉遺伝子発現マッピング

26603 と *foxq2* の二重染色結果からは、26603 の発色が弱かったためはっきりと発現領域の特定をすることができなかった。しかし、14h ~ 27h においては *foxq2* に比べ 26603 の発現領域の方が広いことを示す染色像が得られた。今後、さらに条件を検討することにより、より鮮明な染色パターンを得て解析する必要がある。また、*ankAT* と *foxq2* の二重染色では、27h において両者の発現領域が完全には一致せず、*ankAT* の発現領域の方が *foxq2* よりも一方向においてのみ細胞約 1 個分狭いことを確認した。ただし、この結果だけでは、*foxq2* の発現と *ankAT* の発現が重ならない領域が体の軸に対してどの方向に位置しているのかを決定することはできない。今後、原腸胚期以降、神経外胚葉から腹側まで発現が広がる *nk2.1* や、発生の早い段階から腹側外胚葉に発現する *lefty* を指標にして、*ankAT* と *foxq2* それぞれに対して二重染色を行い、位置関係を調べる必要がある。

## ホヤ精子形成過程の形態的・機能的解析

櫻井 晴佳 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 稲葉 一男 (生命環境系)

### 背景と目的

精子形成とは始原生殖細胞が体細胞分裂・減数分裂を経て精子へと分化する過程のことであるが、特に精細胞から精子への分化 (spermiogenesis 精子完成) は精子形成過程の中で最もダイナミックな形態変化を伴う。精子完成のメカニズムを知るために、本研究では研究対象として海産無脊椎動物であるカタコウレイボヤ *Ciona intestinalis* を用いた。カタコウレイボヤは全ゲノムが解明されていることに加え、精子構造が単純であり精子機能について遺伝子およびタンパク質レベルでの研究が進んでいるため、精子鞭毛形成メカニズムの研究に適していると考えられる。しかし、これまでホヤ精子形成に関する研究はほとんど行われていないため、本研究ではホヤにおける精子形成 (特に鞭毛伸長メカニズム) の研究を行うための足掛かりとして、ホヤの精子形成細胞を形態学的特徴、さらに免疫組織化学的手法を用いて分類することを試みた。

精子形成の細かい過程は生物によって異なり、大きく二つのタイプに分けられる。一つは精巣内のシストを単位として精子形成が生じるシスト型、もう一つは精原細胞から生じた異なるステージの精子形成細胞が同時に存在する非シスト型である。前口動物・魚類・両生類はシスト型精子形成を行い、爬虫類、鳥類、ヒトを含む哺乳類は非シスト型精子形成を行っている。ところが尾索動物であるホヤでは非シスト型精子形成が行われている。従って、ホヤ精子形成を明らかにすることにより非シスト型精子形成とシスト型精子形成の進化的関係についても解明できる可能性がある。

### 方法

#### (1) 形態観察

ホヤ精巣から単離した精子形成細胞を微分干渉顕微鏡で形態観察を行った。核形態は DAPI 染色後、蛍光顕微鏡で観察し、形態学的特徴から分類を行った。

#### (2) 免疫組織化学

ホヤ精巣凍結切片もしくは単離した精子形成細胞を用いて、精子形成に関わると考えられるタンパク質に対する抗体により免疫蛍光染色を行い、各精子形成時期に特異的なマーカータンパク質の探求を行った。

### 結果と考察

(1) 細胞形態から、精子形成細胞を鞭毛伸長開始前の Rounded stage と鞭毛伸長開始後の Elongated stage に分け、Rounded stage では細胞・核のサイズ、核の形態からさらに I 期、II 期、III 期、IV 期に分類した。Elongated stage では主に鞭毛の長さを指標として分類した。

(2) 以下の 4 種類の抗体を用いて精子形成時期特異的な染色が得られた (表 1)。これらの抗体はホヤ精子形成のステージを決定するマーカーとして有用であると考えられる。

CiVH: 抗カタコウレイボヤ Vasa モノクローナル抗体 (福山大学・高村教授より寄贈)。Vasa タンパク質は始原生殖細胞および精原細胞で発現する。

TD02,09: 抗カタコウレイボヤ精巣特異的高発現タンパク質抗体 (当研究室で作製)。TD02 はヒストン H1 様タンパク質、TD09 はシナプトネマコンプレックスタンパク質

(SYCP3) と相同性がある。ホヤにおいてヒストン H1 様タンパク質は脊椎動物におけるプロタミンと同様に働くと考えられる。SYCP3 は減数分裂に特異的に見られるシナプトネマ構造を構成するタンパク質であり、精母細胞のマーカーとなる。

Ac-Tu( ) : 抗アセチル化チューブリン抗体 (SIGMA、T6793)。精子鞭毛軸系を構成する チューブリンはアセチル化されている。

表 1: ホヤ精子形成ステージと各抗体の免疫蛍光染色結果

精子形成ステージ	精子形成細胞							精子
	Rounded Stage				Elongated Stage			
	I	II	III	IV	I	II	III	
細胞の大きさ (μm)	8.1~7.5	6.9~5.1	4.6~3.5	3.4~2.1	-	-	-	58.7
核の直径 (μm)	3.4~2.9	3.2~2.3(短径) 3.5~2.9(長径)	3.3~2.0	2.7~1.4	-	-	-	0.6(短径) 3.4(長径)
核形態	球型	楕円型	球型 楕円型	球型 楕円型	球型 楕円型	楕円型 桿型	楕円型 桿型	桿型
鞭毛の長さ (μm)	-	-	-	-	0~6.0	6.0~15.0	15.0~55.0	55.0
免疫蛍光染色結果	CiVH ○	×	×	×	×	×	×	×
	TD09 ×	○	○	○	○	×	×	×
	TD02 ×	×	×	×	×	×	○	○
	Ac-Tu(α) ×	×	×	○	○	○	○	○
該当する精子形成細胞	精原細胞		精母細胞		精細胞			精子

(1)、(2) の結果から、ホヤ精子形成ステージを RI、RII、RIII、RIV、EI、EII、EIII の 7 段階に分類した (表 1)。形態学的特徴および Vasa の細胞質での発現から RI は精原細胞期と同定した。RII~RIV、EI で TD09 のシグナルが見られたが、各ステージの形態学的特徴および RIV における細胞質内チューブリンのアセチル化、クロマチンの強い凝集から RII、RIII が精母細胞期、RIV~EIII が精細胞期と同定した。TD09 の精母細胞マーカーとしての有用性に関してはさらなる検討が必要である。EI~EIII では鞭毛伸長・核凝縮・細胞質の脱落が起きていると考えられる。EIII では核における体細胞ヒストンからヒストン H 1 様タンパク質への置換が起こっていると考えられる。本研究により、ホヤにおいて時期特異的なマーカータンパク質による精子形成細胞のステージ分けが可能になった。今後、セルソータなどを用いて精子形成細胞を単離し、精子形成における鞭毛構成タンパク質の発現時期が解析できると期待される。

さらに、鞭毛伸長前精細胞 (RIV) の細胞質にアセチル化チューブリンが存在することが本研究で明らかになった。その生理学的意義については不明である。このアセチル化チューブリンが、軸系を構成する要素としてそのまま鞭毛形成の際に輸送されるのか、あるいはマウスなどの精子形成において核周囲に存在するアセチル化チューブリン (マンシェット) と同様に、核の伸長に参与する構造なのかは今後の研究によって明らかにしていきたい。

# トランスジェネシスと個体間組織移植を組み合わせたイモリ再生芽細胞の Lineage Tracing 技術の開発

田中 響 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉 親文 (生命環境系)

## 背景

両生類は地球上に出現した最初の陸上四足動物である。この動物は、ヒトを含む哺乳類とは対照的に、高い body-parts 再生能をもつ。しかし、その能力や様式は、不思議なことに、多様である。中でも有尾両生類に属するイモリは、他の陸上四足動物の中でも最高の再生能力をもつとされ、‘Master of Regeneration’ と称されている (Casco-Robles *et al.*, *Nat. Protoc.*, 2011)。成体イモリのみせる再生現象の中でも、四肢の再生は魅力的で、研究者にとって究極の到達目標である。しかし、残念なことに、この現象の解明は技術的な困難さゆえに進んでおらず、100年に渡り多くが謎のまま残されている。最近、Elly M. Tanaka のグループ (Max Planck, Germany) はアホロートルの再生芽細胞の分化能に関してこれまでの定説を覆す結果を報告した。すなわち、それまでホモな細胞集団と考えられていた再生芽細胞が実はヘテロであり、組織幹細胞のように分化能も限られ、胚葉のバリアを越えることはないことを証明したのである (Kragl *et al.*, *Nature*, 2009)。しかし、残念ながら、アホロートルはネオテニーであるため、肢の構造が成体型とは異なる。そのため、これが成体イモリの肢再生を説明するかどうかは誰も答えることができない。これまでイモリでは有効な遺伝子改変技術がなかったためアホロートルでなされたような実験は不可能であった。しかし、私の所属する研究室では、すでにイモリの高効率なトランスジェニック法 (*Nat. Protoc.*, 2011) と人工変態制御による簡易な飼育法を確立している (Chiba *et al.*, *Zool. Sci.*, 2012 in press)。このことから、この問題にイモリでチャレンジしない理由はもはやない。そこで本研究では、再生芽細胞集団の系譜および分化能 (イモリの再生芽細胞は胚葉のバリアを破れるか) を明らかにする目的で、トランスジェニックイモリを作製し、その胚組織および成体肢組織の個体間移植をおこなった。

## 方法

先行研究 (Casco-Robles *et al.*, 2010) に従い、EGFP や mCherry を全身に発現するトランスジェニックイモリを作製し、6ヶ月間 22 で飼育して変態させた。変態後のイモリを麻酔し、前肢の上腕部を切断した。上腕部を生理的塩類溶液に移し、ピンセットを用いて皮膚、筋肉、骨、神経束に分離した。その後すぐに、各組織を別々の野生型イモリ (トランスジェニックイモリと同齢) の上腕部に移植した。この動物を 14 のインキュベーター内で一週間保持した後、移植した組織が生着するまでさらに 3ヶ月間 22 で飼育した。その後、生着した組織が切断面に残るように肢を切断し再生を誘導した。

成体個体間の移植では、皮膚の場合、表皮 (外胚葉由来) と真皮 (中胚葉由来) が分離できない。また、神経束の場合、移植自体が技術的に難しい。そこで、これらを解決するため、胚操作により外胚葉組織の移植を行なった。

## 結果と考察

発表会にて報告します。

## 障害物を事前に察知するゾウリムシ

竹下 真以加 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 大網 一則 (生命環境系)

### 導入

単細胞生物ゾウリムシは、体表に多数の繊毛を持ち、その運動により遊泳する。この生き物は単純な体制だが、我々高等動物と同じように様々な刺激に対して反応することができる。前進遊泳するゾウリムシは、障害物にぶつかり、細胞の前端が機械的に刺激されると、短い後退遊泳の後、細胞の前端部を回転させながら一カ所に留まり、その後、再びゆっくりと前進遊泳に戻ってゆく。この一連の行動の結果、ゾウリムシは障害物を回避することができる(回避反応)。このように、ゾウリムシは機械刺激受容機構を持ち、実際に障害物に衝突することにより、それを回避している。私は、ゾウリムシの行動を観察した際に、ゾウリムシが障害物に実際に衝突せず、直前で回避反応を示すことがあることに気づいた。もしこれが事実であれば、ゾウリムシが機械刺激を介さないで障害物を事前に察知する能力を持つことを意味しており、大変興味深い。この研究では、ゾウリムシが実際に衝突する以前に障害物を察知しているかどうかを検証し、そのメカニズムを考察することを目的とした。

### 材料・方法

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は麦藁の抽出液を用いて培養した。実験の前にはゾウリムシの細胞を標準溶液 (1mM KCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM Tris-HCl, pH7.4) で3回洗い、その後30分順応させた。実験容器はガラス製シャーレ (直径60mm、深さ20mm) を用いた。シャーレ中の溶液の量は常に14ccとし、この中にゾウリムシが約3000匹入るように密度を調整した。障害物はカバーガラス (高さ9mm 幅18mm) を使用し、シャーレの側面に接する位置に、液面とシャーレの側面に垂直になるように設置した。ゾウリムシの行動は、暗視野照明下でビデオテープに記録し、解析した。

### 結果

はじめに障害物を設置していないシャーレ内でのゾウリムシの遊泳行動を観察した。ゾウリムシはシャーレの中心部よりも縁にそって多く遊泳していた。縁を遊泳するゾウリムシは直線的に前進し、自発的な方向転換はほとんど観察されなかった。この後の実験では、ゾウリムシの行動の記録はシャーレの縁近傍で行うこととした。

次に障害物に対するゾウリムシの行動反応を調べた。障害物を入れた直後には、ほぼすべてのゾウリムシが障害物に実際にぶつかり、方向転換をした。ところが、障害物を入れて数分すると、障害物に実際には衝突せず、数mm手前で回避行動をする個体が現れた。以後、この様に障害物に衝突せずに生じる回避行動を回避行動(無衝突)とよぶことにする。回避行動(無衝突)を示す個体の割合は時間とともに増え、障害物を設置してからおよそ30分で最大(約30%)となり、その後、若干減少した。

ゾウリムシを洗ってから障害物を設置するまでの時間を変えて、同様の実験を行うと、いずれの場合も、障害物を設置してからの時間に依存して、回避行動(無衝突)を示す個体が現われた。

ゾウリムシが回避行動(無衝突)を示した位置の時間変化について調べた。回避行動(無衝突)が生じるようになっ

てしばらくの間、回避行動(無衝突)は、主に、障害物のごく近傍に限って見られた。回避行動(無衝突)が見られる範囲は時間とともに広がり、30分以降では4mm以上離れた位置でも観察できた。

障害物に向かう時のゾウリムシの遊泳速度を、障害物からの距離に対して調べた。障害物を設置して5分までは、どの距離でもゾウリムシの速度はほとんど変化がなかった。設置後10分以上経過すると、障害物から2mm以内でゾウリムシの遊泳速度が減少した。

障害物の手前で回避行動を行うゾウリムシの割合と、シャーレ内に入れたゾウリムシの個体数の関係を調べた。ゾウリムシの個体数を通常の3000匹から50匹に下げると、障害物を入れてから時間が経過しても回避行動(無衝突)を示す個体は現れなかった。個体数を増やすと回避行動(無衝突)を示す個体が増え、500匹以上ではほぼ一定の割合を示した。

障害物を設置して60分間ゾウリムシの行動を記録した後、障害物を一度取り除き、シャーレ内の溶液を攪拌し、再度障害物を設置した。この場合も、再設置直後はほぼすべての個体が実際に障害物に衝突した。再設置の後、時間が経つと、回避行動(無衝突)を示す個体が現われ、1回目の実験と同様に時間とともに増加した。

### 考察

今回の実験から、ゾウリムシは障害物に実際に衝突せず、手前で回避行動、即ち回避行動(無衝突)を行うことが明らかとなった。これは、ゾウリムシが衝突する障害物を事前に察知したことを示す。従って、そのゾウリムシは障害物にぶつかる機械的刺激によらずに障害物を回避していると考えられる。ゾウリムシは機械刺激の他に各種化学物質や温度、光、重力などに対して行動反応を示すことが知られている。時間とともに回避行動(無衝突)を示す個体が増加する事実は、回避反応を誘起する刺激が時間とともに障害物の周囲で増加し、その刺激を受容した個体が回避行動を起こしていることを示す。このように蓄積する性質を持つ刺激としては熱と化学物質が考えられるが、実験槽の温度は一定であると考えられるので、今回観察された、ゾウリムシの回避行動(無衝突)は、化学物質によるものであると考えられる。

今回の実験では、障害物へ向かう個体の中で、回避行動(無衝突)を示す個体の割合は半分以下であった。しかしながら、遊泳速度の平均値を調べてみると、障害物の近傍で有為な減少が認められた。これは、回避行動(無衝突)を生じていないゾウリムシも、障害物に衝突する以前に障害物の存在を察知して遊泳速度を低下させたことを示している。今回の実験で得られた、遊泳速度の低下と回避反応は、ともにゾウリムシの膜の脱分極に起因していると考えられる。また、ゾウリムシの密度が低い時にはこれらの行動反応は生じないことから、想定される化学物質は、ゾウリムシにより放出されるものであることが予想される。

今回得られた結果より、ゾウリムシは単純な体制作ら、試行錯誤的な衝突のみによらず、化学物質を仲介した細胞間の情報連絡を行うことにより機械的な衝突を避け、それにより細胞の損傷を減らし、生存の確率を上げていると考えられる。