

# 「形とはたらき」研究領域活動・事後評価報告書

- 平成13年度終了研究課題 -

領域総括 丸山 工作

## 1. 研究領域の概要

生物、無生物などに見られる多様な形とその意義、できかた、相互作用、系の形成、環境への適応などの「はたらき」を研究する。例えば、「形」を利用した分子認識、分子集合体の構築、それら集合体による高次構造の形成、できあがった高次構造の機能、高次構造の究極な「形」である生命、動植物でみられる寄生、共生、擬態などによる系の形成、環境への適応に関する研究などを含む。

## 2. 研究課題、研究者名

[別紙一覧表参照](#)

## 3. 選考方針

選考は「形とはたらき」領域に設けた選考会議でおこなう。会議は領域総括および選考アドバイザー（領域アドバイザー、7名）により構成し、領域総括が統括する。

基本方針は以下の通りとする。

選考方法は、書類選考、面接選考および総合選考とする。

(1) 独創的な発想に恵まれ、活力に富み、自ら研究を実施するものを優先する。より具体的には、実績がなくてもアイデアが素晴らしい人、チャレンジする人に優先して機会を与える。

(2) 基礎的な研究（理論的研究を含む）を対象とする。

## 4. 選考の経過

1応募課題につき担当選考アドバイザー2名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選定した。続いて面接選考および総合選考により、採用候補者を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採用者数
対象数	291人	32人	20人

## 5. 研究実施期間

平成10年10月～平成13年9月

## 6. 領域の活動状況

領域会議9回、さきがけ研究報告会2回（東京）を開催し、研究進捗状況の報告と討論、研究交流を図った。また領域総括は研究者を訪問し、研究実施場所の調査と研究進捗状況の把握を行った。

## 7. 評価の手続き

領域総括が個人研究者からの報告を基に、必要に応じて領域アドバイザーの協力を得て行った。また、一般公開の研究報告会において、産官学の参加研究者から研究成果に対する意見、評価を受け、それらを参考にした。

( 評価の流れ )

平成 13 年 9 月	研究終了
平成 13 年 1 1 月	研究報告会開催
平成 14 年 1 月まで	研究報告書及び自己評価提出
平成 14 年 2 月	領域総括による評価

## 8. 評価項目

- (1) 外部発表 (論文、口頭発表等)、特許、研究を通じて、新たな知見の取得等の研究成果の状況
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献

## 9. 研究結果

第 2 期生は第 1 期生 10 人の 2 倍、20 人なので、はじめからいささか玉石混合の感がないとは言いきれなかった。3 年経ってみると、20 人中 5、6 人は国際的に立派に通用する成果をあげ、12、3 人は近い将来国際レベルの研究を仕上げるものと思われ、数人はやや期待はずれであった。

よくぞ 3 年間でここまでできたと特筆に値するいくつかの研究をあげてみよう。「ゴルジ体再構築機構」(近藤 久雄)は、細胞内膜構造が細胞分裂中に解体されたあと、娘細胞で再び形成される仕組みの大筋を明らかにした野心的な試みである。再構成に必須な新蛋白質因子 p135 を単離同定し、その作用を明らかにした。さらに今まで不明であった経路を明確にして、細胞生物学上の未解決な問題に大きく貢献しつつある。「動的な高分子らせんの創出」(八島 栄次)は、ランダムな構造のポリアセチレン誘導体に光学活性体を非共有結合させて、左巻き、右巻きらせんをつくらせることに成功した。さらに光学活性体を工夫して、条件変化から左右の巻きかたを変化させ、それにともなって赤から黄(またはその逆)の色変化が生じた。これは世界的に最初の発見で、新材料開発に役立つものと期待される。「トロポニン複合体の三次元構造」(武田 壮一)は、筋収縮のカルシウム制御にあずかるトロポニン複合体の立体構造を解明しようという計画である。これまでトロポニン C の構造は知られているが、他の T と I は結晶化せず諦められていた。それをそれぞれの機能部域を細菌につくらせ、それらを結晶化するのに成功、SPring-8 で結晶解析をおこなった。その結果、トロポニン 3 成分とトロポミオシンの部分複合体の立体構造が判明した。まだ時間がかかるが、部域数を増加して全体像にせまろうとしている。できれば、画期的な業績となる(トロポニンは日本で発見された)。また、「蛋白質集合体形成能」(三原 久和)は、リシンとグルタミン酸を含む人工ペプチドを合成し、その中でらせんシート変換するものを選び出し、さらにシートが集合してアミロイドをつくるペプチドを得た。これはアルツハイマー病の原因となる現象であり、また狂牛病の原因とも関連し、これからの発展は注目に値する。

さらに、将来が楽しみな研究成果若干にふれる。

「磁性フォトニック・クリスタルの構造と機能」(井上 光輝)は磁性ガーネットの~100nm の人工結晶を光エレクトロニクス・デバイスに役立てようとしている。「低分子化合物と蛋白質」(袖岡 幹子)はがん化を起こすプロテインキナーゼの新しい阻害剤ベンゾラクトン誘導体を合成し、応用が期待される。「低分子アンサ型化合物の機能」(鹿又 宣弘)は、シクロファン面不斉制御に成功し、不斉認識・不斉誘導から新しい応用が可能となった。「クロロフィル分子集合体の構造と機能」(民秋 均)は合成クロロフィル自己会合体を用いて人工光合成系をつくる道を拓いている。「花の分化」(長谷部 光泰)、「葉の分化」(塚谷 裕一)の遺伝子研究は、植物の形態分化の仕組みに大きく貢献しつつある。また「ホヤの脊索分化」(高橋 弘樹)、「サカナの脳形成」(弓場 俊輔)は動物の発生分化解明に一石を投じる研究である。「昆虫の微小脳」(水波 誠)は原始的脳モデル提出にいたっている。

残り 7 つの研究は、予期に反したか、あるいは困難なテーマのため予備的に終わったが、いずれも将来の発展への手がかりは得られている。

20 人、3 年間のさきがけ研究は、総括すると大きな成果をあげ、わが国の科学研究の将来に大きなインパクトをもたらすものと期待される。

10. 評価者

領域総括 丸山 工作 大学入試センター 理事長

領域アドバイザー氏名

岩槻 邦男	放送大学 教授
佐藤 矩行	京都大学大学院理学研究科 教授
鈴木 正昭	岐阜大学工学部 教授
瀬高 信雄	独立行政法人 物質・材料研究機構 非常勤顧問
星 元紀	慶應義塾大学理工学部 教授
柳田 敏雄	大阪大学大学院医学系研究科 教授
吉里 勝利	広島大学大学院理学研究科 教授

(参考)

(1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	7	76	83
口頭	185	89	274
その他	29	3	32
合計	221	168	389

(2) 特許出願件数

国内	外国	計
15	1	16

(3) 受賞等

Wiley 高分子科学賞 2000 年化学賞  
 日本植物生理学会 奨励賞 (2001)  
 有機合成化学奨励賞 (2001)  
 R. B. Woodward Visiting Scholar (2001. Harvard University, U. S. A.)

(4) 招待講演

国際 39 件  
 国内 87 件

(5) 研究者の流動状況

応募時から所属機関を移った研究者 (20 名中) : 9 名

## 「形とはたらき」領域 研究課題名及び研究者名

研究者名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (応募時所属)	研究費* (百万円)
井上 光輝 (兼任)	<a href="#">磁性フォトニッククリスタルの構造と機能に関する基礎的研究</a> (豊橋技術科学大学電気・電子工学系)	豊橋技術科学大学電気・電子系 教授 (東北大学電気通信研究所 助教授)	49
鹿又 宣弘 (兼任)	<a href="#">低分子アンサ型化合物の化学的情報伝達機能</a> (明治大学理工学部)	明治大学理工学部 助教授 (理化学研究所 協力研究員)	43
小出 剛 (兼任)	<a href="#">野生マウスの体内回路網形態と行動</a> (国立遺伝学研究所)	国立遺伝学研究所 助手 (同上)	44
古賀 誠人 (兼任)	<a href="#">線虫の化学走性行動の分子遺伝学：神経回路の形とはたらき</a> (九州大学大学院理学研究科)	九州大学大学院理学研究科 助手 (同上)	40
近藤 久雄 (専任)	<a href="#">細胞内小器官ゴルジ体はなぜ特徴的な層板構造をとるのか</a> (Imperial Cancer Research Fund Cell Biology Lab.)	Principal Investigator, Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge (Imperial Cancer Research Fund Cell Biology Lab., Scientific staff)	50
斎藤 恭一 (兼任)	<a href="#">タンパク質多層集積構造によってバイオ技術を飛躍させる研究</a> (千葉大学工学部)	千葉大学工学部 助教授 (同上)	43
阪本 英二 (兼任)	<a href="#">心臓が大きく強くなるしくみの研究</a> (国立循環器病センター研究所)	国立循環器病センター研究所 室長 (同上)	46
袖岡 幹子 (兼任)	<a href="#">低分子化合物による蛋白質の形とはたらきの制御</a> (東北大学多元物質科学研究所)	東北大学多元物質科学研究所 教授 ( (財)相模中央化学研究所 主任研究員)	46
高橋 弘樹 (兼任)	<a href="#">2つの T-box 遺伝子産物 As-T と As-T2 の形とはたらき</a> (岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所)	岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 助手 (京都大学大学院理学研究科 助手)	44
武田 壮一 (兼任)	<a href="#">横紋筋収縮調節タンパク質複合体の構造解析</a> (理化学研究所播磨研究所)	理化学研究所 研究員 (松下電器産業(株)中央研究所 リサーチアソシエート)	44

(次ページへ続く)

(前ページより続く)

研究者名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (応募時所属)	研究費* (百万円)
民秋 均 (兼任)	<a href="#">クロロフィル分子集合体の超分子構造形成と機能発現</a> (立命館大学理工学部)	立命館大学理工学部 教授 (同上 助教授)	50
塚谷 裕一 (兼任)	<a href="#">葉とシュートの分化に関する分子生物学的解析</a> (岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所)	岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 助教授 (東京大学分子細胞生物学研究所 助手)	35
長谷部 光泰 (兼任)	<a href="#">花の形を作る遺伝子系の起源と進化</a> (岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所)	岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 教授 (同上 助教授)	39
藤崎 久雄 (出向)	<a href="#">脳細胞の活動と形態変化の高速高分解能計測</a> (大阪大学大学院医学系研究科)	(株)ニコン技術開発本部第二技術開発部 主任研究員 (株)ニコン筑波研究所 主任研究員)	35
藤原 徹 (兼任)	<a href="#">篩管を通じた mRNA や蛋白質の長距離移行</a> (東京大学大学院農学生命科学研究科)	東京大学大学院農学生命科学研究科 助手 (同上)	39
船津 高志 (兼任)	<a href="#">細胞内情報伝達機構の1分子イメージング</a> (早稲田大学理工学部)	早稲田大学理工学部 助教授 (同上)	53
水波 誠 (兼任)	<a href="#">微小脳の高次中枢のモジュール構造と情報表現</a> (北海道大学電子科学研究所)	東北大学大学院生命科学研究所 助教授 (北海道大学電子科学研究所 助教授)	46
三原 久和 (兼任)	<a href="#">生体高分子の自己組織化と分子進化</a> (東京工業大学大学院生命理工学研究科)	東京工業大学大学院生命理工学研究科 助教授 (同上)	42
八島 栄次 (兼任)	<a href="#">動的らせん分子の創製と応用</a> (名古屋大学大学院工学研究科)	名古屋大学大学院工学研究科 教授 (同上)	60
弓場 俊輔 (兼任)	<a href="#">脊椎動物の脳の細胞系譜の解析</a> (大阪大学細胞生体工学センター)	大阪大学細胞生体工学センター 助手 (大阪大学大学院医学系研究科 助手)	43

\* : 研究費には研究者の人的費は含まず。

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名： 磁性フォトニック・クリスタルの構造と機能に関する基礎的研究

2. 研究者名： 井上 光輝

3. 研究のねらい：

1989年にYabnolovitchが提案したフォトニック結晶(光波長オーダーの1次元、2次元あるいは3次元周期構造をもつ誘電体構造媒体：以下PCと略記する)は、フォトン<sup>1</sup>の存在を許さないフォトニック・バンド・ギャップ(以下PBGと略記する)を示すことから、輻射場の制御が可能な新しい光媒体として注目された。最近では、フォトニック結晶の概念は、マイクロアンテナなどの電磁場領域や空間音場の制御を目的とした音響場領域にまで拡大しており、光エレクトロニクスのみならず広範な工学分野で重要な概念となっている。

さきがけ研究開始以前に、これら一連のフォトニック結晶に関する研究とは独立に、透光性磁性体をナノスケールで配置した1次元構造体(1次元磁性フォトニック・クリスタル)の光学・磁気光学特性について厳密な理論解析を行ったところ、著しい磁気光学効果の増大現象が発現することを見出したが、その起源や高次元体の性質について混沌とした状態にとどまっていた。本研究はこの時点で開始し、著しい磁気光学効果増大現象の解明、実際の媒体形成による実験的検証と新しい光デバイスへの応用、さらに高次元構造を有する媒体の形成と特性解明を主なテーマとして展開した。

4. 研究結果及び自己評価：

(1) フォトニック結晶構造における巨大磁気光学効果の発現機構

フォトニック結晶構造で、なぜ巨大な磁気光学効果の増大現象が発現するかについて厳密な理論解析を行い、その発現機構を解明した。これらの成果は論文(3)、(4)、(5)、(8)で報告した。

この成果は、後述の研究に重要な知見を与えたものと評価できる。

(2) 1次元磁性フォトニック結晶の形成と特性解明

上記解析結果の実験的検証として、実際に磁性ガーネット薄膜、磁性グラニューラー薄膜、金属Co薄膜などを用いた1次元磁性フォトニック結晶を形成し、解析により定量的に一致する優れた磁気光学特性を有することを世界で初めて実証した。これらの成果は論文(6)、(7)、(9)、(10)、(11)、(12)で報告した。さらに磁場印加により電子的に特性制御可能な1次元磁性フォトニック結晶構成材料として、室温で強磁性と強誘電性が共存する新しい酸化物材料を開発した。この成果は論文(13)で報告した。

これらの成果は、世界的に見ても初めての実験検証結果を示したものであり、高く評価できる。

(3) 1次元磁性フォトニック結晶の非線形特性解明

上記線形特性に加え、1次元磁性フォトニック結晶における著しい電界閉じ込め効果による非線形磁気光学効果の発現を世界で初めて実験的に見出した(2002年国際会議報告決定)。

この研究は開始したばかりであるが、今後飛躍的な展開が期待できるものといえる。

(4) 1次元磁性フォトニック結晶を用いた新しい光デバイス

1次元磁性フォトニック結晶の特長を生かした新しい光デバイスとして、空間光変調デバイスや薄膜光アイソレータなどの応用を示した。前者については論文(14)、(15)で一部報告し、後者については現在論文投稿中である。これら新規の光デバイスの有用性は高く、テラバイト光ディスク記録装置などの工学的応用を開拓した。またこれら新規デバイスをコアにして、H13年度よりJST戦略的基礎研究推進事業(ペタバイト情報ストレージ)での研究を開始した。

これら一連の研究は、工学的に新しい分野を開拓するものとして高く評価できる。

(5) 2次元磁性フォトニック結晶形成

2次元磁性フォトニック結晶形成法として、自己組織化アルミナテンプレートとウエットプロセス（ゾル-ゲル法）による磁性ガーネット形成を組み合わせた手法を考案し、この方法で数十ナノメートルの直径をもつ磁性ガーネットナノ構造体を世界で初めて形成した。この成果は現在論文執筆中である。

2次元磁性フォトニック結晶を得るには未だ構造の周期性範囲が狭く、今後より広範囲な周期性をもつ媒体形成が不可欠といえる。

#### (6) 3次元磁性フォトニック結晶形成

3次元磁性フォトニック結晶を得る方策として、ミスト熱分解法で得られる磁性酸化物微粒子を用いた自己組織化形成法を試みた。ミスト熱分解法については論文(1)、(2)で報告した。この手法で得られる磁性微粒子形状のばらつきが大きく、3次元磁性フォトニック結晶への応用には至っていない。この難点を克服する方策として、酸化シリコン微粒子体などをコアにした尿素熱分解法を開発し、現在この手法による3次元構造体形成を試みている。

当該研究課題において最も技術的に難しいこともあり、十分な成果が得られていない。今後より詳細かつ定量的な研究を必要とする。

#### (7) 高次元磁性フォトニック結晶特性の理論解析

上記2次元、3次元体の特性を理論的に解析する方法として、周波数ドメイン及び時間ドメインによる離散的計算法を開発し、磁性ガーネット超微粒子が3次元周期構造を形成しているモデルについてそのフォトニックバンド構造を解明した。

(5)、(6)の実験結果との検証が不可欠であると同時に、明確なバンドギャップをもつ構造決定が行われていないため、今後重点的に実施すべき検討課題であると考えている。

### 5. 領域統括の見解

フォトニック結晶で磁気光学効果の増大現象が現れる機構を理論解析によって解明した。この理論に基づいて、室温で強磁性と強誘電性とが共存する酸化物材料を発見した。さらに二次元、三次元磁性フォトニック結晶への発展をしつつある。物性研究とその応用において積極的な進展を目指し、これからの飛躍的発展が大いに期待される。本さきがけ研究後、母校の教授に就任。まさに理想的なキャリアといえよう。

### 6. 主な論文等（代表的論文は(9)）

- (1) Y. Ikeda, C. Hara, T. Fujii, M. Sato, and M. Inoue, "Direct synthesis of lead-hexaferrite particles by mist pyrolysis," J. Magn. Soc. Jpn., vol.22, No.S1, pp.249-251, (1998).
- (2) T. Fujii, S. Nanpei, M. Inoue, and K. I. Arai, "Preparation of high bismuth and gallium substituted yttrium iron garnet films by coating gel on glass substrate", J. Magn. Soc. Jpn., vol.22, pp.200-202, (1998).
- (3) M. Inoue, T. Fujii, K. I. Arai, and M. Abe, "Huge enhancement of magneto-optical Faraday effect in YIG films with disordered multilayer structures", J. Magn. Soc. Jpn., vol.22, pp.141-143, (1998).
- (4) 井上光輝, 荒井賢一, 藤井壽崇, 阿部正紀, "遺伝的アルゴリズムによる積層構造の乱れた磁気光学多層膜の設計," 日本応用磁気学会誌, vol.22, pp.321-324, (1998).
- (5) M. Inoue, K. I. Arai, T. Fujii, and M. Abe, "Magneto-optical properties of one-dimensional photonic crystals composed of magnetic and dielectric layers," J. Appl. Phys., vol.83, pp.6768-6770, (1998).
- (6) M. Inoue, K. I. Arai, T. Fujii and M. Abe, "One-dimensional magnetophotonic crystals," J. Appl. Phys., vol.85, No.8, pp.5768-5770, (1999).
- (7) M. Inoue, K. Matsumoto, K. I. Arai, T. Fujii and M. Abe, "Preparation and properties of magneto-optical micro-cavities composed of Co thin film and dielectric multilayers," J. Magn.

- Magn. Mat., vol.196-197, pp.611-613, (1999).
- (8) 井上光輝, 荒井賢一, 阿部正紀, 藤井壽崇, S. Fan, J. D. Joannopoulos, “1次元磁性フォトニック結晶の局在モードの磁気光学性能指数,” 日本応用磁気学会誌, vol.23, No.7, pp.1861-1866, (1999).
  - (9) 高山知子, 仲村健志, 弥生宗男, 井上光輝, 藤井壽崇, 阿部正紀, 荒井賢一, “Bi置換YIG膜を用いた1次元磁性フォトニック結晶の作製と特性,” 日本応用磁気学会誌, vol.24, pp.391-394, (2000).
  - (10) M. Abe, E. Takeda, Y. Kitamoto, F. Shirasaki, N. Todoroki, G. Gorodetzky, S. Ohnuma, T. Masumoto, M. Inoue and K. I. Arai, “Enhancement of Magneto-optical Kerr effect in annealed granular films of Co- Au and Co-AlOx,” Korean J. of Ceramics, vol.6, pp.100-102, (2000).
  - (11) E. Takeda, N. Todoroki, Y. Kitamoto, M. Abe, M. Inoue, T. Fujii, and K. I. Arai, “Faraday effect enhancement in Co-ferrite layer incorporated into one-dimensional photonic crystal working as a Fabry-Perot resonator,” J. Appl. Phys., vol.87, No.9, pp.6782-6784, (2000).
  - (12) M. Inoue, K. I. Arai, T. Fujii and M. Abe, “Huge enhancement of magneto-optical Kerr effect of one-dimensional magnetophotonic crystals with a ferromagnetic defect layer,” Korean J. Chem., vol.6, pp.408-41 (2000).
  - (13) 加島篤, 中村優哉, 井上光輝, 藤井壽崇, “鉄基強磁性酸化物スパッタ薄膜における磁界による誘電率変化,” 日本応用磁気学会, vol.25, pp.875-878 (2001).
  - (14) J. H. Park, M. Inoue, D. H. Lee and J. K. Cho, “Effects of groove depth and patterned permalloy film on magnetization switching of LPE-gaent pixels for use in magneto-optic spatial light modulators,” J. Appl. Phys., in press (2002).
  - (15) H. Kato and M. Inoue, “Reflection-mode operation of one-dimensional magnetophotonic crystals for use in film-based magneto-optical isolators,” , J. Appl. Phys., in press, (2002).

その他の原著論文 4 編、国際会議招待講演 5 件、国内会議招待講演 5 件

当該研究に係る出版書籍：藤井壽崇、井上光輝「フォトニック結晶」、コロナ社 (2000).

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名： 低分子アンサ型化合物の化学的情報伝達機能

2. 研究者名： 鹿又宣弘

3. 研究のねらい：

アンサ化合物とは、芳香族環に炭素鎖のロープ（アンサ鎖）が巻き付いた構造を持つ分子群のことであり、これらはシクロファンとも呼ばれている。その中には面不斉と呼ばれるキラリティーを持つ分子が存在し、芳香族平面に対するロープの架かり方の違いによって鏡像異性体として区別される。ところが、アンサ化合物の構造特性を不斉源とした研究例は非常に少なく、アンサ化合物の面不斉制御と新たな機能性発現に関する“形とはたらき”の研究は挑戦的なテーマであると考えた。そこで本研究では、以下の二点を研究のねらいに定めた。第一は、分子量の小さなアンサ化合物が持つ特異な面不斉構造に着目し、その三次元構造に由来するキラリティーの立体制御を行うことである。これらの研究が進展すれば、これまで立体制御が困難であったアンサ化合物をキラル素子として利用する道を開くことが出来るからである。第二のねらいは、面不斉分子に期待される不斉認識能や不斉誘導機能を化学的情報伝達機能ととらえ、面不斉アンサ化合物をモデル分子とする補酵素の不斉転写モデル系を確立し、そのキラル分子としての有用性を実証することである。これら二点を主な研究目的とし、アンサ化合物の効率合成法の検討も含めて研究を行った。

4. 研究結果及び自己評価：

(1) アンサ化合物の面不斉立体制御法の開発

固液平衡を利用した立体制御： 面不斉アンサ化合物は新しい不斉素子として期待されるものの、無秩序なアンサ架橋鎖の“なわとび運動”が起こるため、その立体選択的合成は極めて困難であった。本研究ではこのランダムななわとび運動を巧みに利用することにより、アンサ化合物の立体制御を行った。ここでは、アンサ化合物の一種である架橋ニコチン酸誘導体に着目してその物性を検討したところ、アミノ酸由来のキラル側鎖を持つ誘導体が結晶性と油状のジアステレオマーペアとなる傾向を見いだした。この探索結果を基に、固液平衡系での動的異性化晶出を試みたところ、油状の誘導体から結晶性誘導体への選択的な異性化が進行し、単一の面不斉を蓄積させる効率的な立体制御法の開発に初めて成功した。特に、同じ不斉源から誘導される架橋エステルと架橋アミドを使い分けることにより、右手系と左手系の面不斉を自在にかつ選択的に蓄積する手法を開拓し、面不斉分子の実用的供給法を確立した。

無機多孔質材料を用いた立体制御： 固液平衡を利用した立体制御では結晶性分子の持つ面不斉が蓄積されるが、これに対してエネルギー的に不利な油状性分子への選択的異性化は大変困難であると予想される。そこで、無機多孔質材料とアンサ化合物との吸着平衡に着目した新たな面不斉変換について検討を行ったところ、アンサ化合物の固液平衡系を油状の面不斉分子へと移動させるユニークな現象を見いだした。特にシリカゲルおよびアルミナを吸着剤として利用した場合、エネルギー的に不利な油状性の架橋ニコチンアミド誘導体が約2：1のジアステレオ選択比で優先的に得られることが分かり、前述の単純な固液平衡系とは異なる立体制御が可能であることを明らかにした。今後、吸着平衡におけるアンサ化合物と多孔質材料との相互作用のメカニズムの解明と、選択性の向上が課題である。

(2) 面不斉アンサ型 NADH モデル分子の合成と生体モデル反応

本研究ではアンサ化合物の架橋型遮蔽構造を用いて酵素壁面を模倣するというモデル設計に従い、前述したアンサ化合物の面不斉制御法を基軸とする新規な架橋型 NADH モデル分子の合成と補酵素不斉転写モデル反応について研究を行った。ここでは炭酸エステル存在下にアルコキシドを作用させる簡便な方法により、面不斉立体制御に必須のキラルアミド側鎖を効率的に切断する方法を開発し、面不斉キラル素子として有用な架橋ニコチン酸の実質的不斉合成法を確立した。一方、この面不斉架橋ニコチン酸から誘導されるアンサ型 NADH モデルを用いた解糖型モデル反応では、ピルビン酸誘導体に対する生体不斉還元モデル反応が極めて高立体選択的かつ立体特異的に進行することを明らかにした。特に、NADH の活性中心に酷似した一級アミド型モデルが高い立体選択性を示した成果は前例がなく、天然補酵素に匹敵する面不斉アンサ化合物の高度な不斉誘導機能を実証した。

(3) 新しいアンサ化合物合成法の開発

アンサ化合物の合成法のうち芳香環上の置換基を直接環化する「アンサ架橋鎖合成法」は、多様なシクロファン合成への応用が期待できる反面、歪みエネルギーの蓄積を伴うエンタルピー的に不利な反応であるが故に、これまであまり利用されてこなかった。本研究では高い不斉認識機能を持ちうるアンサ化合物の汎用的かつ効率的な合成法として、サマリウムを用いる炭素-炭素結合形成反応を応用し、アンサ化合物の新しい架橋鎖合成法を開発した。本合成法は従来の架橋ニコチン酸合成に用いた芳香環骨格合成法に比べて収率が良く、また様々な芳香族のハロゲン誘導体に適応できることから、今後アンサ化合物の標準合成法として発展が期待できる。

5. 領域総括の見解：

有機化学上はじめて低分子アンサ型化合物の立体制御法を開発し、生体助酵素分子 (NADH) モデル分子を合成した。その上で新しいアンサ型化合物を合成する方法を確立しつつある。2001年度有機合成化学奨励賞で表彰されたように、その生産性の高い研究はこれからの発展が大いに期待される。

6. 主な論文等：（本研究を代表する研究成果は (1) , (2) , (4) , および(5)である。）

論文：

- (1) Nobuhiro Kanomata and Yoshiharu Ochiai, "Stereocontrol of Molecular Jump-rope: Crystallization-induced Asymmetric Transformation of Planar-chiral Cyclophanes," *Tetrahedron Lett.* 2001, 42, 1045-1048.
- (2) Nobuhiro Kanomata and Tadashi Nakata, "A Compact Chemical Miniature of a Holoenzyme, Coenzyme NADH Linked Dehydrogenase. Design and Synthesis of Bridged NADH Models and Their Highly Enantioselective Reduction," *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 4563-4568.
- (3) 鹿又宣弘, 「補酵素 NAD モデル分子を用いた生体酸化・不斉還元モデル反応」, *有機合成化学協会誌*, 1999, 57, 512-522.

特許：

- (4) 鹿又宣弘, 中田 忠, 「面性キラリティーを有する分子群の高選択的不斉変換法」, 出願日：平成 11 年 3 月 11 日, 特願平 11-64506 .
- (5) 鹿又宣弘, 「キラル補助基を効率的に除去する光学活性化合物の製造方法」, 出願日：平成

13年2月23日，特願 2001-047607 .

受賞：2001年度有機合成化学奨励賞

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名： 野生マウスの体内回路網形態と行動

2. 研究者名： 小出 剛

3. 研究のねらい：

遺伝的に異なった動物が示す多様な行動パターンを制御する遺伝的プログラミングは、いったいどのようなものであろうか。全ての個体が同じ数の遺伝子を有し、遺伝子構造の違いもそれほどないとすると、行動の違いをもたらす遺伝的多型は非常に微妙なものであると考えられる。このような行動の違いをもたらす遺伝子多型を明らかにすることによって、遺伝子の機能を多様性に結びつくものとして理解していくことをねらいとする。

4. 研究結果及び自己評価：

### 研究結果

1) マイクロサテライトマーカー多型の解析

一連の野生由来マウス系統を遺伝的解析に利用するために、マイクロサテライトマーカーの多型解析を行った。約300遺伝子座について、11系統のマウス間での多型を調べたところ、実験用系統間では予想されたように多型頻度は低い、野生由来系統を比較すると、系統間での多型頻度は顕著に高く、多くのマーカーが遺伝的解析に使用できることがわかった(論文1)。

2) 各系統の行動特性の解析

一連の野生由来マウス系統に関して、7種類の行動テストを用いて系統ごとの行動パターンを解析した。いずれの行動テストにおいても、今後の遺伝的解析に有効に利用できるような大きな行動パターンの差が検出された(論文1、2)。

3) 自発運動性の遺伝学的解析

自発運動性の高い系統としてKJR、低活動性系統としてBLG2を選抜後、交配し、自発運動性に関する遺伝子の連鎖解析を行った。376個体の解析の結果、第3番染色体遠位部位に自発運動性に関わる遺伝子の一つが存在することが明らかとなった(論文準備中)。

4) 受動的回避行動の遺伝的マッピング

受動的回避行動テストで高い回避能力を示す系統としてC57BL/6、低い回避能力を示す系統としてBLG2を選抜後、交配し、受動的回避行動に関する遺伝子の連鎖解析を行った。282個体の解析の結果、第18番染色体上に受動的回避行動の差に関わる遺伝子の一つが存在することが示唆された。

以上のように、本研究により野生由来マウス系統が有する遺伝的多様性が明らかとなり、様々な分野での研究に有用な遺伝資源であることが示された。更に、自然界でみられる多様な行動に関わる遺伝子を、野生由来マウス系統を用いた遺伝的解析により遺伝子座の特定まで行うことに成功した。

### 自己評価

1)と2)の研究を通して世界的にもユニークな野生由来マウス系統を様々な分野での研究に利用するための基盤情報を整備することができた。更に、3)と4)に示したように、行動に関わる遺伝子を

探索するという意味において、遺伝子座の特定まで行うことに成功した。行動遺伝学は特に国内では全く研究がなされていない状況であったが、本研究により世界的にも独自性の高いユニークな研究を展開することができたと考えている。更に国内での行動遺伝学の先駆的な研究になったと自負している。

3) に示したように、マウス自発運動性に関わる遺伝子座を狭い領域に絞り込むことに成功し、現在候補遺伝子の探索、解析を進めているところである。特に、Rabggtb という小胞のエンドサイトーシスに関わる遺伝子が候補遺伝子として見いだされ、その遺伝子内に系統間での多型も見いだされている。結果的には、当初の狙いであった行動に関わる遺伝子を解明しその遺伝子のネットワークを明らかにしていくまでには一歩及ばなかった。連鎖解析のためのマウス交配と解析に研究期間の大半を費やした事が大きな原因であるが、もう少し連鎖解析を高速化するなどの新技術開発ができなかったことが悔やまれる。全体的にみると、やはり遺伝子の解明に到達できなかったことで、成果が不十分だと判断されると思うが、今後数年の間に成果が更にあがる研究を展開したいと考えている。

## 5. 領域総括の見解

マウスの行動パターンを規定する遺伝子の特定という野心的なプロジェクトであったが、やはり現実にはきびしく当初の目的は達せられなかった。しかし、2つのマウス系統についてマイクロサテライトマーカーの多型解析から、ある範囲の染色体部位に自発運動性に関与する遺伝子が存在することが示唆された。その遺伝子同定から新しい切り口が開けることが期待される。わずか3年でできると思われなかったが、本プロジェクトのようにたとえ失敗してもチャレンジしてみるというひとつの例であろう。

## 6. 主な論文等

1) Koide, T., Moriwaki, K., Ikeda, K., Niki, H. and Shiroishi, T.: Multi-phenotype behavioral characterization of inbred strains derived from wild stocks of *Mus musculus*. *Mammalian Genome* 11, 664-670, 2000 (主要論文)

2) Furuse, T., Blizard, D. A., Moriwaki, K., Miura, Y., Yagasaki, K., Shiroishi, T., Koide, T.: Genetic diversity underlying capsaicin intake in the Mishima battery of mouse strains. *Brain Research Bulletin* (special issue) in press.

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名： 線虫の化学走性行動の分子遺伝学：神経回路の形とはたらき

2. 研究者名： 古賀 誠人

3. 研究のねらい：

NaCl やアミノ酸、cAMP 等の水溶性物質に対する化学走性行動は線虫にとって餌を探し当てるといふ生死に関わる最重要な行動だと考えられる。この化学走性行動に異常を示す突然変異体を徹底的に分離し、その原因遺伝子をクローニング、その発現場所、機能について主に分子遺伝学的方法で解析する。これにより、化学走性行動を産み出す機構を神経回路の形と働きの両面から明らかにすることがねらいである。

4. 研究結果及び自己評価：

研究結果

1) Na<sup>+</sup>イオンに対する化学走性変異体の分離

エチルメタンスルホン酸で変異誘発した約15万ゲノム相当の集団をスクリーニングし、Na<sup>+</sup>イオンに対する化学走性に異常のある (chemotaxis defective, Che 表現形) ミュータントを126株分離した。その内、蛍光色素の感覚神経への取り込みに異常を示す (dye filling defective, Dyf 表現形) ことから感覚器の構造異常を伴うと考えられるものが47株あった。他の79株は non-Dyf であることから神経機能の異常であることが期待される。SNP (single nucleotide polymorphism) を利用した遺伝的マッピングを行った結果、Dyf なもの、non-Dyf なものともに、それぞれ10個程度の新しい遺伝子の変異が取れたと考えられる。ただし、目標の「飽和するまで」には至らなかった。今後、この数倍のスクリーニングをする必要があると考えている。

2) 新規化学走性遺伝子、ceh-36 遺伝子のクローニング

上記の non-Dyf なものの1つである 684 番変異は哺乳類の視細胞の分化、維持等に関わるホメオドメイン蛋白質 CRX とよく似たタンパク質をコードする ceh-36 遺伝子の変異であることがわかった。ceh-36 遺伝子にはまだ突然変異体が知られておらず、今回私達の分離した 684 番変異体が初めてのものである。ceh-36 遺伝子は2つの化学感覚神経 ASE と AWC で発現し、684 番変異体では ASE と AWC の位置、形態ともに正常であるが、化学受容に関わると考えられる cGMP 依存性チャネルや膜貫通型グアニレートサイクレーズの発現が低下していた。また、ヒートショックプロモーターで ceh-36cDNA を成虫になった後の変異体に発現させると化学走性が回復することがわかった。以上のことから、CEH-36 は ASE と AWC の「発生」ではなく「活性(感覚受容の感度など)」を信号伝達分子の転写制御を通して制御する興味深い転写因子である可能性が高いと考えられる。今後そうした観点から実験を進めて行きたいと考えている。

3) 餌(大腸菌)に対する行動異常変異体の分離と解析

大腸菌の所から離れてしまう突然変異体をスクリーニングし、計14株の変異体を分離した。1つは che-2 遺伝子(感覚繊毛の形成に必要な新規 WD40 タンパク質)、2つは eat-4 遺伝子(Na<sup>+</sup>依存性 inorganic phosphate cotransporter)、1つは egl-19 遺伝子(電位依存性 Ca<sup>2+</sup> channel)の変異であった。また、1つは新規な遺伝子で、YAC クローン Y74E4 によってレスキューする所まで行っている。egl-19 と eat-4 はこれまで主に咽頭筋の活動について研究され、化学走性の観点からは研究されていない。egl-19 と eat-4 変異体の化学走性異常の原因はどの神経細胞に求められるかを明らかにすることによって神経回路のはたらきに迫っていけるのではないかと考えている。

4) che-1 のクローニングと解析

1970年代に分離され、その後は手つかずであった che-1 という化学走性変異体の原因遺伝子のク

ローニングに成功した。che-1はZincフィンガーを持つ転写因子をコードし、水溶性物質に対する化学走性行動に重要なASE化学感覚神経で発現していた。che-1変異体においてはASEの形態は正常であるが、ASEでの2つの7回膜貫通型レセプター及び3つの膜貫通型guanylyl cyclaseの発現が消失していた。以上の結果から、CHE-1タンパク質はASE感覚神経での化学受容の信号伝達の実働部隊をコードする遺伝子の発現に直接あるいは間接的に必要な転写因子であると考えられる。

#### 5) 餌の信号を仲介するグアニレートサイクレーズ DAF-11

餌が豊富だと高く、少ないと低く制御されるdaf-7/TGF-遺伝子の発現が構成的に低下する突然変異体を3株分離した。その内の1つはDAF-11膜貫通型グアニレートサイクレーズの変異であり、DAF-11はASI化学感覚神経で細胞自立的にdaf-7遺伝子発現に必要であることを明らかにした。このことは餌の感知からdaf-7遺伝子発現に至る信号伝達を、cGMPをセカンドメッセンジャーとする信号伝達系が行っていることを示している。

#### 自己評価

遺伝子の同定に至ったものが6つ、その内新規だったものが2つ(ceh-36、che-1)、他の4つ(che-2、eat-4、egl-19、daf-11)は異なった観点からではあるが、既存のものであった。ceh-36、che-1、daf-11は機能解析ができたが、いずれも感覚神経で働くものであり、目標とした「神経回路のはたらき」には遠く及ばなかった。今後、まだ少なくとも10個程度はある未同定の新規遺伝子の中に回路に迫れるものが出てくることを信じてそのクローニングを目指したい。また、もう少し焦点を絞った変異体のスクリーニングをいくつか工夫すればよかったのかもしれない。

#### 5. 領域総括の見解

ゲノムが全部明らかになっている線虫(C.elegans)を用い、化学走性行動にあずかる神経系遺伝子を見出す試みで新発見が期待された。ところが、同定された6つの遺伝子のうち、新しいものが2つにすぎなかった。その2つの遺伝子の作用は感覚神経系レベルで、目指す神経回路におけるものではなかった。その意味ではやや期待はずれであった。やむをえないところであるが、それでもひとつの新しいアプローチを示すものである。

#### 6. 論文1件

Mayumi Murakami, Makoto Koga and Yasumi Ohshima. DAF-7/TGF- expression required for larval development in C. elegans is controlled by presumed guanylyl cyclase DAF-11. Mechanisms of Development, 109, 27-35, 2001.

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名： 細胞内小器官ゴルジ体はなぜ特徴的な層板構造をとるのか

2. 研究者名： 近藤 久雄

3. 研究のねらい：

細胞を構成する細胞内小器官はそれぞれ特有な形をしているが、その形態はどうやって形成され、そしてその機能とどのような関係にあるのであろうか。細胞内小器官を形成するためには、細胞内膜融合が必要であるが、その内の主要な経路の一つ、p97/p47 経路の新規必須因子を同定することにより、細胞内小器官の形成過程を明らかにする。

4. 研究結果及び自己評価：

### 研究結果

1) 膜融合因子 p97/p47 複合体の解析

まず様々な p47 の deletion mutant の解析から p47 には二つの p97 結合領域が有ることを明らかにした。また同時に、共同研究で行った p97 と p47 の結晶解析の結果から、p97 の N 末端には二つのサブドメインがあることが分かり、p47 の一つの結合領域は p97 の一つのサブドメインに結合し、p47 のもう一つの結合領域は p97 の二つのサブドメインを繋ぎ止めるように結合していた。即ち、p97/p47 複合体が二つの異なった相互作用によって維持されていることが明らかとなった。

2) 新規因子 VRF135 の同定・単離ならびにクローニング

この p97/p47 複合体を解離するような因子があるとの仮説に基づいて、解離因子の同定・単離を試みた。その結果、分子量 135kDa の蛋白が得られた。その部分アミノ酸シーケンスから全長 cDNA を単離したところ、アミノ酸 1221 個からなる新規蛋白であり、VRF135[p97(V CP)-R recycling F factor p135]と命名した。

3) VRF135 の生化学的・機能的な役割の解明

p135 は、細胞質上清に加えて、ゴルジ体・小胞体にも存在することが、免疫電子顕微鏡と蛍光顕微鏡を用いた観察から明らかとなった。そこで、ゴルジ体と小胞体上の VRF135 の受容体を検討した結果、それぞれ syntaxin5 と syntaxin18 (以下 SNAREs と略)とを結合していることを明らかにした。p135 は p97/p47/SNARE 複合体を ATP 加水分解依存的に解離し、膜融合機構因子 p97 と p47 をリサイクルすることが分かった。

また、試験管内ゴルジ体再構成系を用いてゴルジ体における p135 の機能を検討し、p97/p47 経路によるゴルジ体膜の融合には p135 が必須であることが明らかにした。さらに、抗 VRF135 抗体を生細胞に微量注入したところ、ゴルジ体の層板構造が阻害され、加えて小胞体の網状構造形成・核膜形成も阻害された。以上から、p135 はゴルジ体・小胞体・核膜の形成に必須の因子であり、p97/p47/SNARE 複合体をリサイクルする因子と考えられる。

4) ゴルジ体・小胞体・核膜形成に必要な膜融合機構 p97/p47/VRF135 の細胞周期調節

細胞周期分裂期においてゴルジ体・小胞体・核膜がその特徴的な形態を失って小胞化するが、その機構は膜融合の阻害によると考えられてきたが、その実体は全く不明であった。今回、p97 経路の因子 p47 が分裂期にリン酸化される事を発見し、それが分裂期の膜融合機構の阻害機構であることを明らかにした。

### 自己評価

事業団との契約やラボの立ち上げに最初の 1 年が取られ、実質的にスタート出来たのが 2 年目に入ってからであることを考えると、その後は順調に出来たと考えられる。最初はゴルジ体形成に必須

な膜融合因子を探索していたのであるが、いざ単離したところ、小胞体や核膜の形成にも必須の因子であることが分かったのは意外であり、研究の楽しさを感じた。

#### 5 . 領域総括の見解

細胞内小器官ゴルジ体は、細胞分裂中に小胞に分かれ、分裂後ゴルジ体が再生される。その仕組みに関与する因子として p97 と p47 が知られていたが、本研究によって分子量 135kDa (1221個のアミノ酸からなる) の VRF135 の関与が発見された。この新因子は 小胞が融合してゴルジ体をつくる際に必須である。VRF135 は p97/p47 の ATP を分解して解離させる。解離した p47 がリン酸化されると小胞の融合は起こらない(細胞分裂時)。本研究は、謎とされたゴルジ体の消失・再形成の仕組みに新しい知見をもたらしたものであり、細胞生物学上画期的な成果といえよう。本さきがけ研究で期待し得る最大のアウトプットのひとつである。

#### 6 . 主な論文等 :

【原著論文】最も主要な成果は論文 1 ) に発表

- 1) Uchiyama, K., Jokitalo, E., Kano, F., Murata, M., Zhang, X., Rabouille, C., Newman, R., Canas, B., Pappin, D., Freemont, P., and Kondo, H. VRF135, a novel essential factor for p97-mediated membrane fusion, functions for Golgi and ER assembly in vivo. submitted to Cell ( 2回目の revise 中 )
- 2) Yuan, X., Shaw, A., Zhang, X., Kondo, H., Lally, J., Freemont, P. S., and Matthews, S. (2001). Solution structure and interaction surface of the G-terminal domain from p47: a major p97-cofactor involved in SNARE disassembly. J. Mol. Biol, 311, 255-263
- 3) Zhang, X. D., Shaw, A., Bates, P. A., Newman, R. H., Gowen, B., Orlova, E., Gorman, M. A., Kondo, H., Dokurmo, P., Lally, J., Leonard, G., Meyer, H. E., van Heel, M. & Freemont, P. S. (2000). Structure of the AAA ATPase p97. Mol. Cell, 6, 1473-1484.

【招待講演】

- ・近藤久雄 「細胞内膜融合機構 p97/p47 経路の細胞周期調節」、第 54 回日本細胞生物学会シンポジウム「リン酸化による細胞分裂制御」
- ・近藤久雄 「膜融合機構 p97/p47 経路の新規因子 VRF135 について」、第 24 回日本分子生物学会シンポジウム「細胞内メンブレントラフィック」

## 研究課題別研究評価

1 研究課題名： タンパク質多層集積構造によってバイオテクノロジーを飛躍させる研究

2 研究者名： 齋藤 恭一

3 研究のねらい：

多孔性中空糸膜（内径 2mm，外径 3mm，孔の直径 0.4  $\mu\text{m}$ ，孔の体積割合 70%）に，長さ 0.1  $\mu\text{m}$  程度の高分子鎖を，高密度にしかも膜全体に均一にグラフト（接ぎ木）する．以後，この高分子鎖をグラフト高分子鎖と呼ぶ．このグラフト高分子鎖へ荷電基を導入すると，高分子鎖がその電荷によって互いに反発し，孔の表面から孔に向かって高分子鎖がブラシのように伸びる．荷電基密度を変えることにより，この高分子鎖の伸び具合を制御できる．伸びた高分子鎖間に，タンパク質を多層にぎっしりと集積させた形を作り出すことを見出した．この多孔性中空糸膜という“マクロな形”の孔表面上に形成させた「タンパク質多層集積構造」という“マイクロな形”を利用して，(1)タンパク質の高速・高濃縮精製，(2)光学異性体の高速・完全分離，および(3)高活性な酵素反応という 3 つの高性能なはたらきを実現することを研究のねらいとした．

4 研究結果及び自己評価：

1) タンパク質の高速・高濃縮精製

タンパク質の精製は，現状ではおもに，ビーズ充填カラムクロマト法によっておこなわれている．しかしながら，時間と手間がかかるという欠点がある．そこで，イオン交換基をもつグラフト高分子鎖を固定した多孔性膜にタンパク質を多層集積させておいて，そこへ NaCl 水溶液を透過させることによって，高速・高濃縮率でタンパク質を溶出させるという手法を提案する．

ジエチルアミノ基をもつグラフト高分子鎖を固定した多孔性中空糸膜に，ウレアーゼ溶液を膜内面から外面へ向かって孔内を透過させた．ウレアーゼは膜を透過する間に，孔表面から伸びたグラフト高分子鎖中のジエチルアミノ基に吸着する．ウレアーゼの吸着量は，膜 1 グラムあたり 2 グラムに達した．この値は従来の吸着材に比べると 2 桁多い．多層集積のおかげであった．吸着操作を終えた後，溶出操作をおこなった．NaCl もタンパク質も透過流に乗って輸送されるので，タンパク質が瞬時に全量，高濃縮率で溶出された．

2) 光学異性体の高速・完全分離

光学異性体は，生体に対する薬効や毒性が異性体間で全く異なる．そこで，特に医薬や食品分野では，これらの異性体を完全に分離する必要性が高まっている．そこで，グラフト高分子鎖を固定した多孔性膜に光学異性体を識別するタンパク質の一つであるウシ血清アルブミン(BSA)を多層集積させておき，そこへ光学異性体を透過させることにより，光学異性体を高速，且つ完全に分離するという手法を提案する．

ジエチルアミノ基をもつグラフト高分子鎖を固定した多孔性中空糸膜に，アルブミン溶液を膜内面から外面へ向かって孔内を透過させた．膜を作成するときの転化率を変えてグラフト高分子鎖中のイオン交換基密度を振ることによって，アルブミンの多層集積度を 1 から 6 まで変化させた．膜の孔に移動相を透過させておいてそこへ光学異性体として DL-トリプトファンを一定量注入した．得られるクロマトグラフから保持時間を調べ，分離係数を算出した．多層集積度が高いほど分離係数も大きくなり，完全分離を達成した．多層集積を利用した甲斐があった．

3) 高活性な酵素反応

タンパク質として酵素を使うと多層集積構造は高活性な反応場となることを実証する．アミノアシラーゼ溶液をジエチルアミノ基をもつグラフト高分子鎖を固定した多孔性中空糸膜にこれまでと同様に透過させ，15 層分を多層集積させた．さらに，酵素の脱落を防ぐためにグルタルアルデヒドを使って

酵素間を架橋した。こうして作成した固定化酵素膜に、アセチル-DL-メチオニン溶液を透過させた。膜外面からの流出液中の不斉加水分解されて生成した L-メチオニン濃度を測定し、活性を算出した。これまで報告されている活性の値に比べて、10 倍高流量にしても 9 倍活性が高くなった。

この酵素反応の他にも、アスコルビン酸オキシダーゼを多層集積した膜を使ったアスコルビン酸による脱酸素、そして環状イソマルトオリゴ糖合成酵素を多層集積した膜を使ったデキストランからの環状イソマルトオリゴ糖の製造でも多層集積構造が活性の向上に有効であった。

#### 5 研究総括の見解：

多孔性中空糸膜全体に、高分子を高密度でつけて、タンパク質の濃縮精製、光学異性体の分離、能率の良い酵素反応などを行わせるという新技術開発である。ウレアーゼ吸着は膜1グラムあたり2グラムに達し、尿素除去に卓効を示した。パイロット実験は成功しているが、工業スケールにするには様々な工夫が必要と思われる。

#### 6 主な論文：さきがけ研究の成果から掲載および受理された論文 14 のうち 4 つ選択

- (1) I. Koguma, K. Sugita, K. Saito, and T. Sugo, Multilayer binding of proteins to polymer chains grafted onto porous hollow-fiber membranes containing different anion-exchange groups, *Biotechnol. Prog.*, 16, 456-461(2000).
- (2) M. Nakamura, S. Kiyohara, K. Saito, K. Sugita, and T. Sugo, High resolution of DL-tryptophan at high flow rates using a bovine serum albumin-multilayered porous hollow-fiber membrane, *Anal. Chem.*, 71, 1323-1325(1999).
- (3) T. Kawai, K. Sugita, K. Saito, and T. Sugo, Extension and shrinkage of polymer brush grafted onto porous membrane induced by protein binding, *Macromolecules*, 33, 1306-1309(2000).
- (4) T. Kawai, M. Nakamura, K. Sugita, K. Saito, and T. Sugo, High conversion in asymmetric hydrolysis during permeation through enzyme-multilayered porous hollow-fiber membranes, *Biotechnol. Prog.*, 17, 872-875(2001).

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名：心臓が大きく強くなるしくみの研究

2. 研究者氏名：阪本英二

3. 研究のねらい

心臓は、個体が生まれてから死ぬまで動き続ける驚異的な臓器である。重症な心臓病(拡張型心筋症)あるいは高血圧を自然発症するモデル動物の解析を通じ、この心臓に固有な恒常的収縮を支えるメカニズムの解明を目指した。また、用いたモデル動物に合併する興味深い遺伝子異常についての解析も試みた。

4. 研究結果及び自己評価：

1) 拡張型心筋症ハムスターに存在する第二原因遺伝子の同定とT管の支持構造の発見

心筋症ハムスターのプロトタイプである BIO14.6(B) は残存心筋の肥大を伴うが、そこから重症な拡張型を呈する TO-2(T) が分離された。本研究者は、心筋症の共通原因遺伝子として -sarcoglycan (dystrophin 結合タンパク質の一つ) を同定し、T には心筋症の重症化遺伝子が存在するとの仮説を立てた(招待講演1)。

Tでは予想に反し、心筋肥大に関連する遺伝子の発現はBより亢進していた。透過型電子顕微鏡の観察で、Tでは心筋の筋原線維内にあるZ線が脆弱であること、筋形質膜がZ線に陥入した構造であるT管の数が減っていること、を見出した。因みに、骨格筋のT管はZ線ではなく、サルコメアのより中央に陥入する。Z線タンパク質の解析から、Tでは加齢と共に desmin タンパク質が徐々に脱落し、そのcDNAには191番目の alanineを threonineに変える missense mutation (G571A) が存在することを証明した(特許3)。

次に、TではT管の数が少ないことから、T管は desmin を基盤としてZ線に支持されているのではないかと予想し、T管の支持分子としての desmin 結合タンパク質を yeast two-hybrid system を用いて探索した。候補として上がった分子量約160kDaの desmuslin 分子は、in vitro の結合実験でも、desmin と結合することを確認した。Desmuslin は、ごく最近 -dystrobrevin(dystrophin 結合タンパク質の一つで、sarcoglycans と直接結合する) に結合するタンパク質として単離されたものである。ところで私は、dystrophin とその結合タンパク質は正常では筋形質膜のみでなくT管にも存在すること、またTでは加齢と共にT管の -dystrobrevin が優先的に脱落することを免疫蛍光染色で見出していた。以上を総合すると、心筋のT管とZ線は、sarcoglycans -dystrobrevin desmuslin- desmin というタンパク質複合体で架橋されていると考えられる。拡張型心筋症ハムスターTO-2では、Z線上の desmin 遺伝子とT管上の -sarcoglycan 遺伝子に double mutation が起きた結果、両者で架橋されるT管とZ線との分子構造が世界で初めて明らかになった。哺乳類の遺伝子は約3万個であるから、この double mutation が起きる確率は約10の9乗分の1。まさに奇跡である。苦しみながらの3年間だったが、初志貫徹して本当に良かった。あと少し追加実験をし、一本の論文にまとめたい(招待講演2)。

2) 心筋肥大誘発分子のスクリーニング系の開発

ヒトの心臓由来の細胞株を用いた 心筋肥大誘発分子のハイスループットなスクリーニング系を開発した(特許2)。今後、このシステムで実際に新規生理活性物質を発見し、ポストゲノム時代に一花咲かせたい。

3) 高血圧ハムスターの導入と初期解析

高血圧は心臓肥大の最大の原因であると同時に、脳卒中、動脈硬化、腎不全など万病のもとであり、血圧調節のメカニズムの解明は医学的に極めて重要である。そこで私は、20年以上前に発見された高血圧ハムスターに注目し、薬理的予備実験を行った(契約1)。その結果、恐らく single mutation である高血圧ハムスターは、少なくとも2つ以上の降圧系 (renin-angiotensin 系、endothelin 系など) が発症に関与していることが明らかになり、その遺伝的異常は血圧感知・調節機構に存在すると予想した。連鎖解析を基本とした戦略で高血圧の原因遺伝子を同定するため、高血圧ハムスターと遺伝的に最も遠い ACN ハムスターとの大規模な交配を今月から開始する。また、endothelin による心筋調節機構の解明も行った(論文2)。

#### 4) 心筋症ハムスターに合併する遺伝子異常の解明

「心筋症」ハムスターには様々な遺伝子異常が合併する。すなわち、加齢と共に眼が黒くなるアルビノ(特許1)、拡張型心筋症(特許3)、イントロンにおける4塩基の deletion のために途中のエクソンを飛ばしてスプライスが起きる遺伝子の発見 (unpublished)、などである。は、肥大型(B)と拡張型心筋症ハムスター(T)に共通、はTのみ、はBのみである。

このことから、心筋症ハムスターにおける共通のゲノム欠失領域(論文1)には、心筋症遺伝子に加え、"mutation suppressor gene" が存在することを予想し、当該領域(30,167塩基)の全塩基配列を決定した。今後、"mutation suppressor gene" を発見したい。

#### 5. 領域総括の見解

遺伝的な心臓病のひとつである拡張型心筋症の原因遺伝子を求めて3年間トライアル・エラーを繰り返しているうちに、ハムスターから、筋原繊維のZ線構造が弱化していることに気づき、その構造に関与する2つの遺伝子変異が突き止められた。これは、遺伝的心臓病の一つの病因を明らかにするのみならず、正常心筋の微細構造の機能解明に大きく貢献するものである。努力に努力を重ねて、新知見をもたらした本人の意気を高く評価したい。

#### 6. 主な論文等( : さきがけ研究を代表するもの)

論文1. A.Sakamoto, M. Abe, T. Masaki. "Delineation of genomic deletion in cardiomyopathic hamster." FEBS Lett. 447, 124-128, 1999.

論文2. K. Ono, H. Masumiya, A. Sakamoto, G. Christe, T. Shijuku, H. Tanaka, K. Shigenobu and Y. Ozaki. "Electrophysiological analysis of the negative chronotropic effect of endothelin -1 in rabbit SA node cells." J. Physiol. 537: 467-488, 2001.

招待講演1. 阪本英二、阿部誠、眞崎知性 「心筋症の分子生物学」第25回日本医学会総会(99年4月)

招待講演2. 阪本英二「心筋症ハムスターの原因遺伝子と病態」第78回日本生理学会(02年3月)

特許1. 「眼皮膚白子症1Bの原因遺伝子とその応用」公開特許公報 特開2001-112483

特許2. 阪本英二 「マーカー遺伝子を用いた生体機能分子の評価並びに同定方法」特願2001-327576

特許3. 阪本英二 「拡張型心筋症の原因となる新規突然変異を有するデスミン遺伝子」特願2001-345491

契約1. 高血圧ハムスターのコロニーをカナダの breeder へ譲渡。

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名： 低分子化合物による蛋白質の形とはたらきの制御

2. 研究者名： 袖岡 幹子

3. 研究のねらい

癌などに関わる細胞情報伝達を担う酵素の低分子リガンドによる活性調節のしくみに着目し、そのしくみを生かして酵素活性を制御する新しいタイプの低分子化合物の創製をめざした。具体的研究対象としてプロテインキナーゼC (PKC) を選び、そのコンホメーション (形) を活性型または不活性型に偏らせることにより酵素活性 (はたらき) を制御しうる分子を開発し、さらに分子レベルでの酵素の活性化のしくみも明らかにすることをめざした。

4. 研究結果及び自己評価：

研究結果

1) 新しいPKC 結合ユニットの設計: 本研究で導入した分子設計支援システムを用い、PKC の結晶構造と既知の PKC リガンドの構造活性相関などの知見をもとに、新しい PKC 結合ユニットとしてベンゾラクトンを設計した。

2) ベンゾラクトンユニットの合成法の確立: 設計したベンゾラクトンユニットの効率の良い合成法を開発した。光学異性体の分離法も確立し光学的に純粋なベンゾラクトン誘導体を合成した。

3) 単量体の PKC 結合能ならびに活性化能の評価: まず、脂質膜と相互作用し PKC 活性化剤として働く予想される長鎖疎水性側鎖をもつベンゾラクトン単量体の PKC 結合能ならびに活性化能を評価した。その結果、モデリングにより設計した光学異性体は期待通り PKC に対して生理的リガンドに近い結合能を示したのに対し、その光学異性体はより低い結合しか示さなかった。この疎水性側鎖を有する単量体は、結合能は劣るものの高濃度における最大酵素活性で比較すると、既存の最強の活性化リガンドとして知られる TPA の 1.4 倍の活性を示した。

4) ベンゾラクトン二量体の合成と評価: ふたつのリガンド結合部位を持つ PKC の特性に着目し、ベンゾラクトンを活性コンホマー、不活性コンホマーそれぞれにぴったりと合う適当なリンカーでつないだ二量体化合物が強力な活性化剤または阻害剤となりうると考え、その合成を行った。ふたつの結合部位の距離は不明である為、まず最初にフレキシブルな様々な長さのメチレンリンカーでつないだ多数の二量体群を合成し、その PKC 結合能を調べることにより距離情報を得ることを試みた。尾部結合型二量体においては、C<sub>8</sub> C<sub>12</sub>程度で単量体を上回る最も強い結合が観察され、これらの二量体ではふたつのベンゾラクトンユニットがそれぞれ結合部位と相互作用している事が示唆された。しかしその相互作用の効率は未だ十分でなく、強力な活性化剤または阻害剤を得る為にはさらなるリンカー部分の検討が必要と思われる。

5) 固相を利用したライブラリー合成法の開発: 上記研究のように、分子設計を行う為の十分な情報が得られない場合に、最適な化合物を得る為のひとつのアプローチとしてコンビナトリアルケミストリー、即ち多種類の化合物を合成してその中から良いものを選び出すというアプローチをとらざるを得ない。その場合、律速段階となるのは合成、特に化合物の精製段階であることから、精製操作が簡便な固相担持活性エステルを用いたアミドやカーボネートの合成法を開発した。

自己評価

本研究は、これまでの自分の研究の延長ではなく新しい着想で新しい手法を取り入れたり開拓したりして自分自身の今後の研究のひとつの柱を作ることをめざして一歩ずつ研究を進めて来た。残念ながら時間が足りずに最終目標である PKC の強力な阻害剤開発や PKC 活性化の分子メカニズムの

解明には至らなかったが、その為の基礎的な知見は得られえたと考えている。また、さきがけの支援を得て、分子設計や固相合成など新しい試みを行うことができている程度の成果が得られたことは、今後の研究の展開に大きく寄与すると思われる。

## 5．領域総括の見解

酵素の作用を高めたり低めたりする化学物質は、治療薬の開発で大いに期待されている。本研究では、発がんに関与している蛋白質リン酸化酵素の活性化剤を酵素活性部域の構造から推定して化学合成し、みごとに成功した。これから阻害剤の合成にかかるところで、実用化が待たれる。さきがけ研究に採用されたとき民間研究所の研究者であった本人はそのめざましい研究成果が認められ、東北大学教授に就任。新研究室を立ち上げている。さきがけ研究が引き金となったことを喜んでいる。

## 6．主な論文等

### 論文

- ・ M. Kato and M. Sodeoka. "Polymer-Bound N-hydroxysuccinimide Esters: A Column-Free Fluorescent-Labeling Method." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9, 881 (1999).
  - ・ 袖岡幹子, "有機合成化学から生命科学へのアプローチ" *有機合成化学協会誌*, 59, 480 (2001).
- ### 口頭発表
- ・ 川崎秀和, 馬場良泰, 生越洋介, 袖岡幹子, 真弓聡, 橋本祐一, "PKC アンタゴニストの創製研究 1" 日本薬学会第 122 年会 (千葉) 2002.3.26.-28.
  - ・ 真弓聡, 長澤和夫, 橋本祐一, 馬場良泰, 生越洋介, 袖岡幹子, "PKC アンタゴニストの創製研究 2" 日本薬学会第 122 年会 (千葉) 2002.3.26.-28.
  - ・ 馬場良泰, 柳澤武史, 袖岡幹子, 真弓聡, 橋本祐一, "蛋白質の高次構造を認識する機能性分子の開発研究 P K C 結合分子の設計と評価" 日本薬学会第 21 年会 (札幌) 2001.3.28.-30.
  - ・ M. Kato, Y. Baba, T. Shimizu, M. Sodeoka, "A Column-Free Synthesis of Various Amides, Carbamates, and Ureas Using Polymer-Bound N-Hydroxysuccinimide" 第 18 回国際複素環会議 (横浜) 2001.7.29.-8.3.
  - ・ 袖岡幹子, "蛋白質の高次構造を制御する分子の開発" 平成 12 年度 KAST 科学技術セミナー (川崎) 2001.3.1.

招待講演 (1999 2001) : 国際学会 3 件、その他の国外招待セミナー等 5 件、国内学会 17 件、その他の国内招待セミナー等 8 件

受賞等 : R. B. Woodward Visiting Scholar (2001.5. Harvard University, U.S.A.)

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名：2つの T-box 遺伝子産物 As-T と As-T2 の形とはたらき

2. 研究者名：高橋 弘樹

3. 研究のねらい：

T 遺伝子は、T-boxと呼ばれる DNA 結合部位を含む新規の転写因子をコードし、脊椎動物では脊索の分化と尾を含む体幹後部の形成に重要な働きをもつ。As-T および As-T2 をそれぞれ過剰発現させると、As-Tは脊索の分化を、As-T2は筋肉の分化を異所的に誘導する。すなわち、非常によく似た T-boxを持つ転写因子の一方が脊索細胞の分化を、もう一方が筋肉細胞の分化を制御する。それではどのようにして As-T は脊索を作り As-T2 は筋肉を作るのか。本研究においては、この 2 つの T-box 遺伝子産物 As-T および As-T2 のダイナミックな機能を追跡した。

4. 研究結果及び自己評価:

(1) As-T および As-T2 の発現調節機構の解析

As-T が脊索細胞の分化に As-T2 が筋肉細胞の分化に正しく機能するためには、それぞれの発現が脊索細胞と筋肉細胞に正確に制御されていなければならない。そこで、As-T と As-T2 の発現を調節する制御領域の解析を行った。その結果 As-T の発現制御には、As-T 自身のオートレギュレーションが関与していることが示唆された。すなわち、As-T の脊索での発現が開始されると、発現が誘導された As-T 自身が上流領域に結合してさらに脊索特異的発現を誘導する。一方、As-T2 の筋肉細胞での発現制御にも、As-T と同様なオートレギュレーションによる転写活性化が関与していることが明らかになった。

(2) As-T および As-T2 の機能ドメインの解析

T-box 遺伝子の機能の特異性を担うドメインを明らかにするために、As-T と As-T2 の T-box DNA 結合ドメイン(BD)と転写活性化ドメイン(AD)を入れ替えたキメラ遺伝子を作成し、それぞれの mRNA をマボヤ卵に顕微注入して異所的に発現させ、脊索細胞に分化するのか、あるいは筋肉細胞に分化するのかを調べた。その結果、As-T の T-box DNA 結合ドメイン(BD)に、As-T2 の C 末側転写活性化ドメイン(AD)をつないだ T(BD):T2(AD)キメラを発現させた場合には、As-T の全長を発現させた場合と同じように異所的に脊索細胞が分化した。一方、筋肉細胞分化を調べてみると、T2(BD):T(AD)キメラを発現させた胚で As-T2 の全長を発現させた場合と同様に、異所的に筋肉細胞が分化した。これらの結果から、T-box 遺伝子の機能は、それぞれが持つ T-box DNA 結合ドメインの特異性によって決定されることが示唆された。

(3) As-T と As-T2 の発現制御領域と機能進化

それでは、As-T と As-T2 自身の発現を制御する 5' 上流領域に存在する T-box 結合配列の特異性はあるのか、As-T と As-T2 それぞれの 5' 上流領域(T-box 結合配列を含む)の lacZ コンストラクトとキメラ分子をマボヤ受精卵に共注入して調べた。その結果 As-T の発現を制御する領域に存在する T-box 結合配列は、As-T の T-box DNA 結合ドメインに特異性があり、As-T2 の発現を制御する領域に存在する T-box 結合配列は、As-T2 の T-box DNA 結合ドメインに特異性があることが示された。つまり、マボヤの 2 つの T-box 遺伝子 As-T と As-T2 は in vivo においてそれぞれの 5' 上流領域の T-box 結合配列と、その発現制御領域によって転写される T-box 遺伝子が認識する結合配列の特異性がリンクしていることになる。このことは、T-box 遺伝子の DNA 結合ドメインの変化と T-box 遺伝子自身の発現制御領域が協調して変化していることを示唆する結果であり、祖先型の T-box 遺伝子からいかにして機能と発現の特異性を確立してきたかという、進化に伴う遺伝子ネットワークの変化を考える手掛かりになる。

#### (4) ターゲット遺伝子の解析

個々の T-box 遺伝子もつ生理機能の特異性を明らかにするには、それぞれの下流で働くターゲット遺伝子を解析することが重要になってくる。ユウレイボヤの fork head 遺伝子(Ci-fkh)の発現制御領域に T 遺伝子(Ci-Bra)の cDNA をつないだコンストラクトをつくり、これをエレクトロポレーションによって導入すると、Ci-Bra が内胚葉に発現し、内胚葉索を脊索に変えるように働くために、T 遺伝子の下流遺伝子が動き出す。こうして、脊索が過剰にできた胚と正常胚 cDNA とのサブトラクションによって得られた cDNA ライブラリーを作成したところ、Ci-Bra によって発現が誘導される下流遺伝子であることが確認された、501 個の独立した cDNA クローンが得られた。次にこれらすべてのクローンについて、in situ ハイブリダイゼーションにより発現パターンを調べてみると、38 個の脊索特異的に発現する遺伝子が明らかになった。

#### 5. 領域総括の見解

発生の際にそれぞれの組織が分化する仕組みは、発生生物学の主要な対象である。本研究は、ホヤを用いて脊索と筋肉を分化させる遺伝子の解析を行い、それぞれの遺伝子を見出し、さらにその調節の詳細を明らかにしつつある。3年間で、きちっとした成果を得た点で典型的な成功例である。ただし、これから先の仕組みとなるとたいへん複雑で、なかなか進めないところである。どう切り込んでいくかを見守りたい。

#### 6. 主な論文等：

- 1) Mitani, Y., Takahashi, H. & Satoh, N. Regulation of muscle-specific expression and function of an ascidian T-box gene, As-T2. *Development*. 128, 3717-3728 (2001).
- 2) Hotta, K., Takahashi, H., Asakura, T., Saitoh, B., Takatori, N., Satou, Y. & Satoh, N. Characterization of Brachyury-downstream notochord genes in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Biol.* 223, 68-80 (2000).
- 3) Takahashi, H., Hotta, K., Erves, A., Gregorio, A. D., Zeller, R.W., Levine, M. & Satoh, N. Brachyury-downstream notochord differentiation in the ascidian embryo. *Genes & Dev.* 13, 1519-1523 (1999).
- 4) Takahashi, H., Mitani, Y., Satoh, G. & Satoh, N. Evolutionary alterations of the minimal promoter for notochord-specific Brachyury expression in ascidian embryos. *Development*. 126, 3725-3734 (1999).

特にさきがけ研究を代表する論文

1),2),4)

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名：横紋筋収縮調節タンパク質複合体の構造解析

2. 研究者名：武田壮一

3. 研究のねらい：

筋肉の収縮はカルシウムイオンにより調節され、トロポニン、トロポミオシンがその機能の鍵を担う。これらのタンパク質複合体がどのように働くか、分子構造から理解しようというのが本研究のねらいである。X線結晶解析法を主な研究手法とし、アミノ酸側鎖が認識できる3分解能以上の構造解析を目指した。研究のポイントは構造解析に適した結晶を得るための試料調製に置いた。機能ドメインの抽出、大腸菌による発現・精製系の確立、効率的な結晶化スクリーニング、放射光(SPring-8)を利用した回折実験、構造解析を進めた。

4. 研究結果及び自己評価：

- (1) 調節ドメイン (TnT2/TnC/TnI) の結晶化と構造解析：トロポニンの活性中心となる部分である。ヒト心筋調節ドメインの結晶を得て 2.6 分解能での構造解析に成功した。トロポニン三量体としては世界で最初の結晶構造であり、サブユニット間相互作用の詳細を明らかにした。
- (2) トロポミオシン結合ドメインの結晶化と構造解析 (TnT1)：上記(1)の調節ドメインをトロポミオシンに結びつける役割を担うドメインである。3 - 4 分解能の主鎖のトレースが期待できるデータを得ることに成功した。今後、重原子置換体を得て構造解析を進め、(1)の構造と合わせトロポニンの全体構造を明らかにしたい。
- (3) トロポミオシン C 末端フラグメント (Tm162) の結晶化と構造解析：トロポニンが結合すると考えられている部分を抽出した断片で、1.7 分解能のデータを得ることに成功した。現在位相の改良を進めており、今後モデル構築に進む予定。
- (4) Tn/Tm 複合体 (TnT/TnC/TnI/Tm162) の結晶化と構造解析：上記(1) - (3)の全てを含む機能を理解する上で最も重要な複合体である。+および - カルシウムの 2 状態の結晶を得ることに成功した。  
- カルシウムの結晶について 4.2 分解能までの回折データを得ることに成功し、現在分子置換法による解析と重原子置換体の調製を進めている。

本研究では X 線結晶構造解析法を主な手法としたため、研究期間の大半は結晶を得るための準備に費やした。したがって研究課題のほとんどは中途であるが、それぞれ今後の展開が期待できる程度には進めることが出来たと考えている。(1)は従来の生化学的な解析等による相互作用部位のマッピングに比べ飛躍的に多くの情報を提供し、今後トロポニンを研究する上での一つの基準となる構造モデルが提案できると考えている。また、構造的なドメインと考えられていた中にフレキシブルな領域が存在し、そのサブドメインが収縮制御過程において構造変化する可能性が示唆された。この結果は単離された状態では必ずしも生理的な構造を保持しているとは限らず、筋繊維中での構造および機能を知るための研究の重要性を再認識させるものである。(2)についてはこれまで構造的な知見がほとんど得られていなかったこと、(3)は既知の 7 分解能の結晶構造から飛躍的に分解能を改善できる可能性があることから、今後新しい知見が得られることが十分期待される。(4)は本研究の到達目標への足がかりといえる成果である。トロポニン、トロポミオシンはヘリックス含量が非常に高く、4-5 程度の分解能データから主鎖のモデル構築が出来る可能性が十分高い。また、同時に進めている上記(1)(3)の結果はこの複合体のモデル構築を容易にするのみならず、相互評価を行う上でも重要であろう。その意味で、複数の試料の構造解析を同時並行的に進めた本研究の戦略の有効性が示されると思う。今後は+および - カルシウムの状態に対応した構造変化を主鎖構造レベルで明らかにし、電子顕微鏡あるいは X 線繊維回折のデータと合わせ、細い繊維のモデル構築へと展開し、収縮制御機構

の理解を目指したい。

#### 5. 領域総括の見解

蛋白質の機能を理解するには、立体構造が出発点となる。ところがそのためには、結晶にしなければならぬ。それがむずかしい。筋肉蛋白質は結晶化し難いものが多い。本研究ではその点が難点であったが、トロポニン・サブユニットのいろいろな部分を遺伝子操作技術によって取得し、見事、結晶化に成功した。その結果、カルシウム制御にあずかる三つのサブユニットの活性部位の解明ができ、その機能が理解されつつある。これは世界的に見て最初である。3年間の集中的なトライアル・エラーが成功に導いたわけで、さきがけ研究の存在理由を示すことになった。

#### 6. 主な論文等

(論文)

S. Takeda, A. Yamashita, K. Maeda & Y. Maeda “Crystal structure of the regulatory domain of human cardiac troponin complex” (投稿準備中、さきがけ研究を代表する成果となる予定)

(国際会議招待講演)

S. Takeda, A. Yamashita, K. Maeda & Y. Maeda “Crystal structure of troponin ternary complex” International Workshop “Actin Filament; From structure to mechanism” 16-18 Nov. 2001 at SPring-8  
他、国内学会 6 件

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名：クロロフィル分子集合体の超分子構造形成と機能発現

2. 研究者名：民秋 均

3. 研究のねらい：

光合成における膜内集光アンテナは色素蛋白複合体によって構成されているが、緑色嫌気性光合成細菌の膜外アンテナ部（以下クロロゾームと呼ぶ）では色素のみが自己集合している。このような膜外アンテナはクロロフィル色素がらせん状に自己集合体を形成して、円筒状構造を取っているものと推定されている。そこで、アンテナ色素分子の合成モデル化合物を用いて、色素自己集合体を調製し、その超分子構造の解明と機能発現を目指した。あわせて、本モデル系と生体系とを比較することにより、生体系での膜外アンテナの超分子構造並びにエネルギー移動過程の解明も試みた。さらに、本研究によって判明した分子集合体の構築原理をもとにして、新規な高次構造体を構築し、その機能化も目指した。

4. 研究結果及び自己評価：

1) 自己集積のためにはクロロフィルにどんな分子構造が必要か？

様々な誘導体を合成することによって、 $Q_y$ 軸(N21-N23軸)上に水酸基とカルボニル基を有している亜鉛(マグネシウム/カドミウム)クロリン錯体が、天然クロロゾームと同様の自己集積することが判った。 $Q_y$ 軸上に沿って分子が自己集積することが、クロロゾーム型の色素会合体にとって必要不可欠であることが判明した。

2) クロロゾーム内にクロロフィル同族体が存在している意味は？

同族体(8や12位に様々なアルキル基が存在する)が混合することによって、近赤外領域(650~800 nm:  $Q_y$ 帯)での吸収/蛍光発光波長が長波長シフトし、クロロゾーム内でのエネルギー受容体(吸収極大=795 nm)にエネルギー移動しやすくなることが判明した。

3) 自己集積のために必要な環境は？

これまで知られていた低極性有機溶媒中や固体薄膜以外に、界面活性剤を含む水溶液中やフッ素化溶媒中においてもモデル化合物が自己会合体を形成することが新たに判った。

4) 機能モデルの構築は？

水中のトリトンX-100によるミセル中で、合成クロロフィル自己会合体とエネルギー受容体を共存させることで、クロロゾームの機能モデルを構築できた。また、ポルフィリン亜鉛錯体(クロリン錯体の17-18位の結合が二重結合になっている)の自己会合体(発光極大=660 nm)を利用することで、より低波長(高エネルギー)側の光を利用できるモデル系の構築が可能となった。

5) 単一のクロロゾームではどうなっているの？

原子間力顕微鏡/全反射型近接場型光学顕微鏡によって、サブマイクロサイズの単一クロロゾームの可視化と蛍光発光スペクトル測定ができた。この単一クロロゾームの発光スペクトルを比較することで、種によっては同一の菌体でもスペクトルに有為な差が生じる(=多様なクロロゾームによって菌体が構成されている)ことが判った。

5. 領域総括の見解：

葉緑体膜に存在するクロロフィル集合体は効率よく光エネルギーを捕らえる。その集積構造を人工的に再構成する試みにチャレンジし、人工脂質膜中にクロロフィル集合体をつくらせることに成功した。その際に、さまざまな分子集合条件が明らかにされた。さらに発展して人工光エネルギー利用系の構築が期待される。その成果は、権威ある化学誌にいくつも論文発表されている。本研究が私立大

学の研究室でなされたことを記しておきたい。

6. 主な論文等：

- S. Yagai, T. Miyatake, Y. Shimono & H. Tamiaki, "Supramolecular Structure of Self-Assembled Synthetic Zinc-13<sup>1</sup>-Oxo-Chlorins Possessing a Primary, Secondary or Tertiary Alcoholic 3<sup>1</sup>-Hydroxyl Group: Visible Spectroscopic and Molecular Modeling Studies," *Photochem. Photobiol.*, 73, 153-163 (2001).
- Y. Saga, K. Matsuura & H. Tamiaki, "Spectroscopic Studies on Self-aggregation of Bacteriochlorophyll-e in Non-polar Organic Solvents: Effects of Stereoisomeric Configuration at the 3<sup>1</sup>-position and Alkyl Substituents at the 8<sup>1</sup>-position," *Photochem. Photobiol.*, 74, 72-80 (2001).
- S. Yagai & H. Tamiaki, "Synthesis and Self-aggregation of Zinc Chlorophylls Possessing an  $\omega$ -Hydroxyalkyl Group: Effect of Distance Between Interactive Hydroxy Group and Chlorin Moiety on Aggregation," *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, 3135-3144 (2001).
- S. Yagai, T. Miyatake & H. Tamiaki, "Regio- and Stereoisomeric Control of the Aggregation of Zinc-Chlorins Possessing Inverted Interactive Hydroxyl and Carbonyl Groups," *J. Org. Chem.*, 67, in press (2002). ( さきがけ研究を代表するもの )
- Y. Saga, T. Wazawa, T. Nakada, Y. Ishii, T. Yanagida & H. Tamiaki, "Fluorescence Emission Spectroscopy of Single Light-Harvesting Complex from Green Filamentous Photosynthetic Bacteria," *J. Phys. Chem. B*, 106, in press (2002).

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名：葉とシュートの分化に関する分子生物学的解析

2. 研究者名：塚谷 裕一

3. 研究のねらい:

通常の被子植物において、シュートの先端にあるシュート頂分裂組織は、葉と茎という 2 種の器官を形成する。逆に言えば、茎も葉も、共通のシュート頂分裂組織から形成される。もともと、テローム説によれば、二又分枝するのを繰り返すだけだった茎（言い換えれば一種のシュート）から葉が進化したとされている。したがって茎的要素から葉への進化は、植物の形と機能の進化にとって、根元的であったと考えられる。そこで、葉とシュートとの区分を成り立たせているしくみを明らかにすることができれば、葉の進化の背景を、ひいてはシュートという形態の背景を明らかにできると期待できる。

その葉とシュートの分化を考える上で興味深いことに、現生の種子植物の中には、葉と茎的要素・シュートとの間の分化が曖昧で、無限成長できる葉、「無限葉」を持つ種が知られている。本研究ではそのような「葉」の特質を活かし、それまで扱ってきたモデル植物における葉形態形成のしくみの知識を背景に (Dengler and Tsukaya 2001)、葉とシュートの分化、あるいは葉の進化に関わる遺伝子ネットワークを解明しようと試みてきた。

4. 研究結果及び自己評価:

本研究のこれまでの成果を以下にまとめる。

(1) 無限葉の形成過程について発生のしくみから整理し、2 型に分類した (Tsukaya 2000)。

(2) 無限葉形成の知られている Chisocheton, Guarea 2 属を含むセンダン科の類について、分子系統的な解析を行なった結果、センダン科の中での無限葉形成は、おそらく 1 回のみ進化したと推定された (Fukuda et al. in press)。またその結果、現在の本属の種分類と属内分類体系は、抜本的に見直す必要があることが強く示唆された (Fukuda et al. in press)。これは本研究の副産物である。

(3) マメ科植物において単葉と複葉との分化に関わっているとされている遺伝子、LEAFY のホモログの部分的 cDNA クローンを用いて無限葉型の複葉を作る Guarea より単離し、組織別の発現を解析した結果、葉の頂端分裂組織で特に強く発現していることが判明した。これはマメ科以外でも LEAFY のホモログが複葉形態を司っている可能性を示す最初の例である (Tsukaya in prep.)。

(4) 現地観察および組織培養の結果から、モノフィレアの phyllomorph はシュートの一変形とみてよいことが示唆された。すなわち、葉とシュートとの区別は、分裂組織制御系が有限であるか無限であるかと同時に、二次元平面上での形態形成にとどまるか、立体的形態形成をするかの差であると考えられる。phyllomorph は、分裂組織制御系が無限でありながら二次元平面上での形態形成にとどまる、という特異な形態形成系の産物であると解釈される (Tsukaya, in prep.)。

(5) モデル植物であるシロイヌナズナで、シュート頂・葉形制御遺伝子、ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2) の機能について解析をおこなった結果、AS2 遺伝子は、シュート頂から葉原基が分化する際の鍵とされている KNOX 遺伝子群の、葉原基における発現を抑制していることが判明した (Semiarti et al. 2001)。

(6) さらに、as2 の表現型を劇的に強める新たな変異体、blp 変異体では、葉身基部及び葉柄部において分裂組織が持続的な形態形成をするばかりか、ある確率でシュート頂分裂組織の消失が起きること、またホルモン非存在下で葉より不定葉やシュートを形成するなど、極めて phyllomorph に類似した表現型を示すことが判明した。またシュート頂及び葉原基における遺伝子発現レベルの解析から、この BLP 遺伝子は、シュート頂分裂組織と葉原基との区分に関係するとされてきた、既知の遺伝子群の上流で働く可能性が強く示唆された (Ha et al. in prep.)。さらに、blp 変異と KNOX 遺伝子の構成

的発現系とを組み合わせると、葉が無限成長型に切り替わり、"super-compound leaf"になることが判明した。すなわち BLP は、この研究で求めてきた答えの 1 つである可能性が高い。

5. 領域総括の見解：

植物の葉や茎が分化する仕組みを遺伝子レベルで追究し、3 種類の遺伝子が分化の調節にあずかっていることを明らかにした。最近植物の形態形成がさかんに研究されているが、本研究は注目されること間違いない。この研究の基礎には、さまざまな植物の葉分化を丹念に調査して適切な材料を選定したことがある。

6. 主な論文等：

受賞：2001 年度 日本植物生理学会 奨励賞受賞

論文：計 8 編

1) Fukuda, T., Yokoyama, J. and Tsukaya, H. 2002. The evolutionary origin of indeterminate leaves in Meliaceae: phylogenetic relationships among species in the genera *Chisocheton* and *Guarea*, as inferred from sequences of chloroplast DNA. *Int.J. Plant Sci.* (in press)

2) Semiarti, E., Ueno, Y., Tsukaya, H., Iwakawa H., Machida C. and Machida, Y. (2001) The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* 128: 1771-1783. ほか

総・解説：計 10 編

1) Dengler, N. and Tsukaya, H. 2001. Leaf morphogenesis in dicotyledons: current issues. *Int. J. Plant Sci.* 162: 459-464. (当該号に特集を編集)

2) Tsukaya, H. 2000. The role of meristematic activities in the formation of leaf blades. *J. Plant Res.* 113: 119-126. ほか

総説書、教科書：8 編

口頭発表：10 件、特許：なし

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名： 花の形を作る遺伝子系の起源と進化

2. 研究者名： 長谷部光泰

3. 研究のねらい：

生物は多様な発生様式を持ち、その結果できる形態は多様である。発生過程は多くの転写因子によって制御されているので、発生過程の進化、とりわけボディープランの進化は、転写因子の多様化によって説明できるのではないかと考えられている。では、実際に転写因子がどのように多様化し、その結果どのような進化が起こったのであろうか。MADS-box 遺伝子族は、花形成のホメオティックセクター遺伝子である。花形成を担っている MADS-box 遺伝子が原始的な生殖器官を持つ植物でどのような機能を持っているかを解析することにより、花形成のホメオティックセクター遺伝子がどのような機能を持った遺伝子から、どのように進化してきたかを明らかにできるはずである。本研究では MADS-box 遺伝子族の進化が陸上植物の生殖器官の進化とどのように関わってきたのかを明らかにするために、裸子植物、コケ植物、緑藻類から MADS-box 遺伝子、および、被子植物で花器官形成 MADS-box 遺伝子を誘導する FLORICAULA/LEAFY (FLO/LFY) 遺伝子の機能解析を行った。

4. 研究結果及び自己評価：

- 1) 裸子植物の MADS-box 遺伝子：イチヨウとコバノグネツムから、それぞれ 11 個、4 個の MADS-box 遺伝子を単離した。遺伝子系統樹から、現生裸子植物は進化の過程で A 機能遺伝子を欠失した可能性が高いことがわかった。このことは、現生裸子植物がガク片、花弁を持たないことをうまく説明している (Hasebe 1999)。コバノグネツムと針葉樹の相同遺伝子の発現様式比較から、両者の生殖器官の相同性について新仮説を提唱した (Shindo et al. 1999)。
- 2) シダ植物と裸子植物の FLO/LFY 遺伝子：生殖器官特異的 MADS-box 遺伝子が進化した理由を調べるため、花で MADS-box 遺伝子を誘導する FLO/LFY 遺伝子をシダ植物、裸子植物から単離、機能解析した。その結果、シダ類の段階では、FLO/LFY 遺伝子 - MADS-box 遺伝子の遺伝子系は確立していなかったが、裸子植物の段階ではこの遺伝子系が確立していた可能性が高いことがわかった。このことから、シダ類の段階で栄養器官と生殖器官の両方で発現していた MADS-box 遺伝子が種子植物で生殖器官特異的に発現するようになったのは、FLO/LFY 遺伝子-MADS-box 遺伝子系が確立したからであることがわかった。
- 3) コケ植物の MADS-box 遺伝子：ヒメツリガネゴケから MADS-box 遺伝子を単離し、卵と精子の成熟時と孢子体で発現していることを明らかにした。このことから、コケ植物の段階で、シダ類にみられたような栄養器官と生殖器官の両方に発現するような MADS-box 遺伝子が存在していたことがわかった。
- 4) ヒメツリガネゴケの生殖器官形成に関わる遺伝子単離系の確立：被子植物の生殖器官とコケ植物の生殖器官は大きく異なっている。ヒメツリガネゴケから生殖器官形成に関わる新規遺伝子を単離する目的で遺伝子トラップラインを約 1 万 2 千確立し、生殖器官特異的に発現する約 100 ラインを得た。
- 5) 緑藻類における MADS-box 遺伝子の機能：陸上植物に近縁な 3 種の緑藻類 (シャジクモ、コレオケータ、ミカツキモ) からそれぞれ 1 つの MADS-box 遺伝子を単離した。これらはヒメツリガネゴケと同じように卵、精子成熟時に発現していた。また、2 倍体世代では全く発現が見られなかった。このことから、MADS-box 遺伝子は元来、1 倍体で卵精子成熟に関わっており、緑藻から陸上植物への進化の過程で 2 倍体の栄養・生殖器官での発現をも獲得したことがわかった。

## 自己評価

以上の研究結果から、MADS-box 遺伝子と陸上植物の生殖器官進化についてアウトラインを明らかにすることができた。これは陸上植物全体において、形態形成遺伝子と形態の進化を調べた初めての研究であり、発生進化学における大きな貢献ができたと考える。花器官形成遺伝子の起源は卵精子形成遺伝子にあるらしいというのは驚きであり、より詳細な機能解析をすすめたい。下等植物には分子生物学的実験ができ、遺伝子機能を解析できるようなモデルが無かった。本研究過程で、ヒメツリガネゴケを用いて遺伝子ターゲティングなどの実験系を確立することができたので、今後、MADS-box 遺伝子が卵精子形成のどのようなプロセスに関わっているかとともに、生殖器官以外の器官がどのように進化してきたのかも調べていきたい。

## 5 . 領域総括の見解

動物の体制決定ホメオティック遺伝子群に当たる植物の花形成決定マズボックス遺伝子群について、モ、コケ、シダ、種子植物と広く研究を展開したプロジェクトである。植物の形態形成の遺伝子研究では、世界で冠たる研究グループを3年間につくりあげた馬力は大いに評価したい。さきがけ研究をきっかけとして、このような活気ある研究が展開されるようになったのは特筆に値する。

## 6 . 主な論文など：（代表する論文に\*）

- \*Shindo, S., Sakakibara, K., Sano, R., Ueda, K. and Hasebe, M. 2001. Characterization of a FLORICAULA/LEAFY homologue of *Gnetum parvifolium*, and its implications for the evolution of reproductive organs in seed plants. *Int. J. Plant Sci.* 162: 1199-1209.
- Himi, S., Sano, R., Nishiyama, T., Tanahashi, T., Kato, M., Ueda, K., and Hasebe, M. 2001. Evolution of MADS-box gene induced by FLO/LFY genes. *J. Mol. Evol.* 53: 387-393.
- Hiwatashi, Y., Nishiyama, T., Fujita, T. and Hasebe, M. 2001. Establishment of gene-trap and enhancer-trap systems in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.* 28: 1-14.
- Sakakibara, K., Nishiyama, T., Kato, M., and Hasebe, M. 2001. Isolation of Homeodomain-Leucine Zipper Genes from the Moss *Physcomitrella patens* and the Evolution of Homeodomain-Leucine Zipper Genes in Land Plants. *Mol. Biol. Evol.* 18: 491-502.
- Nishiyama, T., Hiwatashi, Y., Sakakibara, K., Kato, M. and Hasebe, M. 2000. Tagged mutagenesis and gene-trap in the moss, *Physcomitrella patens* by shuttle mutagenesis. *DNA Res.* 7: 1-9.
- Shindo, S., Ito, M., Ueda, K., Kato, M. and Hasebe, M. 1999. Characterization of MADS genes in the gymnosperm *Gnetum parvifolium* and its implication on the evolution of reproductive organs in seed plants. *Evolution and Development* 1: 180-190.
- Aso, K., Kato, M., Banks, J.A. and Hasebe, M. 1999. Characterization of homeodomain-leucine zipper genes in the fern, *Ceratopteris richardii* and the evolution of the homeodomain-leucine zipper gene family in vascular plants. *Molec. Biol. Evol.* 16: 544-552
- Hasebe, M. 1999. Evolution of reproductive organs in land plants. *J. Plant Res.* 112: 463-474.
- Hasebe, M. and Ito, M. 1999. Evolution of reproductive organs in vascular plants. In M. Kato ed, *The Biology of Biodiversity*, Springer-Verlag, Tokyo. pp.243-255.

招待講演：国際学会 7 件、国内学会 7 件

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名： 脳細胞の活動と形態変化の高速高分解能計測

2. 研究者名： 藤崎久雄

3. 研究のねらい：

脳に関する観察・計測は様々なレベルで行われている。医療の現場での X 線 CT, MRI, PET 等の画像診断装置による生きている脳の内部観察，基礎研究における電子顕微鏡や共焦点レーザー走査顕微鏡による切片試料の高分解能観察，神経細胞の活動の電気生理学的な計測などの結果を統合して脳の仕組みと働きに関する理解が進んでいる。本研究では，三次元的に複雑な構造の生物試料の深部での生理学的事象を高速観察できるビデオレート 2 光子顕微鏡を構築し，生きている脳内の神経細胞および近傍の血流を高分解能で動態観察し，かつ活動の計測を同時に行う方法を確立し，これによって脳内の細胞の形態と活動との関係を明らかにすることを目的とする。これらの研究を通して得られる知識が脳の研究を推進させ，ひいては社会の高年齢化にともなって問題になっている脳の病気の解明が期待される。

4. 研究結果及び自己評価：

1) 従来の方法によるラット脳の神経活動と血流の観察

麻酔下のラットの後脛骨神経を電気刺激し，クラニアル・ウインドウを設けた体性感覚領野において，膜電位変化を蛍光色素法で，局所血流変化をレーザー Doppler 血流計で，血管の拡張・収縮，微小血管内ヘモグロビンの総量および酸素化状態の変化を顕微分光分析システムで計測し，燐光寿命計測から毛細血管床内酸素分圧分布の変化を求めた。局所血流の調節が支配領域の上流で起こっていることを示唆する結果を得た。（投稿準備中）

2) 正立型ビデオレート 2 光子顕微鏡の構築

ビデオレート共焦点顕微鏡 Nikon RCM8000 に正立の蛍光顕微鏡 Nikon E600FL を組み込み，フェムト秒パルス赤外レーザー Spectraphysics Tsunami を光源とすることによって正立型ビデオレート 2 光子顕微鏡を構築した。2 光子顕微鏡は共焦点光学系を介さずに光学切片が得られるため，ビデオレート共焦点顕微鏡のスキャナーと画像取得の機能だけを使用した。随所で用いられるミラーは，光強度損失とミラー損傷を避けるために，近赤外での反射率の高いものを用いた。2 光子顕微鏡の一つの特長は，近赤外光を励起光とするために，試料深部まで観察できることにある。とくに，脳組織のように光散乱が強い試料の観察では威力を発揮する。今回構築した 2 光子顕微鏡では 300  $\mu\text{m}$  の深さにある毛細血管および神経細胞が観察できた。

3) 正立型ビデオレート 2 光子顕微鏡によるラット脳の神経活動と血流の観察

ラット脳内神経活動を観察するためにカルシウムイオン感受性蛍光色素 fluo3 AM で神経細胞を染色し，脳内の血流を観察するために蛍光色素 FITC で赤血球を染色して，1) と同様の後脛骨神経電気刺激を加えた。刺激に应答したカルシウムイオン濃度変化が観察された。毛細血管中の血流は必要に応じて流れたり流れなかったりするという従来の説に反して，無刺激下でも毛細血管の一部分を観察し続けると，流速の変化，時には停滞，が見られた。刺激下では血流が上昇したが，1) での観察と比べて，上昇率が高く，持続時間が短く，应答時間が刺激毎に異なった。これらの結果は，血流制御が上流でなされ，毛細血管中では網目構造のゆえに部分部分で異なる应答をするが，局所（ $\sim 1 \text{ mm}^3$ ）の平均/総和として一定の应答時間，一定の流量上昇を示すと解釈される。（主論文：投稿準備中）

5. 領域総括の見解：

2光子顕微鏡を開発して、細胞表層だけでなく0.3 μm以上内部を可視化できるようにするプロジェクトで、企業から離れて自由に発展させたいという目的であった。結果としては、確かに脳組織で0.3 μm内層の毛細血管流が観察できたが、当初の目標から見て十分であったとは言い難い。この点は、企業の技術者が大学の研究室で自らのプロジェクトを効率的に進めるやり方をあらかじめ考えておくべきだったと反省する。

6. 主な論文等：

藤崎久雄：「2光子励起蛍光顕微鏡」シリーズ・光が拓く生命科学 第7巻『生命科学を拓く新しい光技術』pp.122-134（共立出版, 1999）.

藤崎久雄, 佐甲靖志：「多光子励起顕微鏡と全反射顕微鏡によるバイオロジー」分光研究 48, 260-267 (1999)

藤崎久雄：「実験技術：2光子顕微鏡」生物物理 40, 195-198 (2000)

藤崎久雄：「二光子励起法」実験医学別冊ザ・プロトコールシリーズ『GFとバイオイメージング 原理・応用・検出のすべて』pp.191-196 (羊土社, 2000).

Hisao Fujisaki, Akitoshi Seiyama, Ichiro Sase, Yasuo Ooi, Junji Seki, Toshio Yanagida: "Loose coupling in neurovascular regulation during brain activation: An active regulation by bypass route in afferent vessel" (投稿準備中)

Hisao Fujisaki, Yasuo Ooi, Akitoshi Seiyama, Toshio Yanagida: "Inhomogeneous blood flow over the capillary network at the rat brain sensory area observed with a video-rate 2-photon microscope" (主論文：投稿準備中)

藤崎久雄, Gary Y. Fan, Rung-Kay Tsay, 宮脇敦史, R. Y. Tsien, M. H. Ellisman: 「ビデオレート2光子顕微鏡の開発と応用」第22回レーザー顕微鏡研究会講演会（浜松；静岡大学 1998.11）

藤崎久雄：「多光子励起レーザー顕微鏡の特徴と生体計測法」岡崎国立共同研究機構 機構長招聘三技術課合同セミナー（岡崎；岡崎コンファレンスセンター 1998.12）

藤崎久雄：「リアルタイム2光子顕微鏡の開発と応用，FRETの原理と応用など」第7回コンフォーカル488サマーシンポジウム（前橋；国立赤城青年の家 1999.7）

藤崎久雄：「GFP FRETと2光子顕微鏡」電子顕微鏡学会シンポジウム（東京 北区；北トピア 2000.5）

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名： 篩管を通じた mRNA や蛋白質の長距離移行

2. 研究者名： 藤原 徹

3. 研究のねらい

植物の陸上への進化に伴って発達した通道組織のひとつ、篩管は篩部要素とよばれる脱核した細胞によって構成されており、原形質連絡を通じて隣接細胞と結ばれている。吸汁昆虫を用いて採取した篩管液には蛋白質や核酸が存在する。これらの遺伝子産物は隣接する細胞で合成され、細胞壁を越えて移行し機能しているものと考えられる。本研究では、このような高等植物に特有に見られる、蛋白質や mRNA の細胞間や器官間移行のしくみと、その植物の生育や分化、病原微生物との関わりにおける役割について検討した。

4. 研究結果及び自己評価：

1) 篩管 RNA のクローニング

篩管液には 100 から 200 塩基程度の長さの RNA が多く含まれている。篩管液を採取し RT-PCR 法を用いて増幅、cDNA ライブラリーを作成した。約 300 クローンの配列を決定したところ、重複はほとんどなく、rRNA, tRNA, 各種 cDNA などの断片が含まれていた。このことから篩管液中の RNA は特定の分子種が多いのではなく、多様な比較的小さな分子の集合であることが推測された。篩管液の RNA についてはじめての網羅的な記述ができたと考えている。

2) 篩管内への物質注入系の構築

イネ篩管への物質注入系を構築した。トビイロウンカの口針をレーザーで切断し、切断後、篩管液が出てきたことを確認したら葉鞘表面の篩管液滴に、蛍光色素液を添加することで、蛍光物質を導入することができた。分子量の異なる蛍光物質を注入することによって、イネ葉鞘の篩部要素 - 伴細胞間の原形質連絡の透過性を推定した。篩管液に存在する物質の解析に必須な手法を開発できたと考えている。

3) GFP mRNA の導入実験

開発した MUSI 法を用いて RNA の注入実験を行った。GFP mRNA の導入を行なったところ低頻度ではあるが、抗 GFP 抗体で western analysis を行なったところ、GFP に相当する位置にバンドが得られた。篩管液中の mRNA は翻訳されている可能性が示された。篩管液の mRNA が翻訳される可能性については、接ぎ木実験で示唆されていたが、接ぎ木実験では蛋白質の輸送と mRNA の輸送を区別することが難しいのに対して本研究では mRNA を導入しており、より強く mRNA が翻訳され得ることを示せたと考えている。

4) 篩部要素内のオルガネラへのタンパク質輸送の可能性

篩部要素内にはミトコンドリアやプラスチド等のオルガネラが存在する。これらのオルガネラは DNA を持っているが、多くの核コードの遺伝子産物が輸送されてくることも知られている。篩部要素には核が無いので、篩部要素のオルガネラには、細胞の境を越えて輸送されてきた蛋白質が局在している可能性が考えられる。GFP を用いた実験によって、細胞間移行後に蛋白質がオルガネラに局在することを示唆することができた。この結果は、植物においてはオルガネラはその属する細胞の核によってのみ支配されているのではなく、隣接する細胞核によっても支配されていることを意味しており、植物においては、見掛け上「細胞」であっても機能的には隣接細胞と遺伝情報を交換して機能していることを示すものと考えている。

5) 篩部伴細胞でのタンパク質の発現による篩管液タンパク質組成の調節

伴細胞でタンパク質の発現量を変化させることによって、篩管液のタンパク質組成を変化させるこ

とに成功した。

#### 6) TRXh を発現する形質転換タバコの解析

イネ TRXh 形質転換タバコで発現させ、原形質連絡の透過性を高めたタバコを作製した。このタバコ植物では、移行蛋白質に変異を持つタバコモザイクウイルスの細胞間移行の頻度が高まっていることを明らかにした。本実験は、植物由来の蛋白質が、植物ウイルスの細胞間移行を補佐することを in planta で示した世界で初めての実験例である。

#### 5 領域総括の見解

イネの篩管ヘウソカの口針を通じて標識 mRNA を注入して隣接細胞への輸送を実証するという独自のアプローチによって、植物での物質輸送について新知見をもたらした。このことは大変興味深いですが、さらなる発展性はなかなか困難といえる。

#### 6. 主な論文等

Ishiwatari Y, Nemoto K, Fujiwara T, Chino M and Hayashi H. "In situ hybridization study of the rice phloem thioredoxin h mRNA accumulation - possible involvement in the differentiation of vascular tissues. *Physiol. Plant.* 109, 90-96 (2000)

Fujimaki S, Fujiwara T and Hayashi H "A new method of microinjection into a single sieve tube of intact rice plants." *Plant Cell Physiol.* 41, 124-128 (2000)

Fukuda A, Ishiwatari Y, Abe K, Chino M, Fujiwara, T and Hayashi H "Control of protein content in the rice phloem sap. in *Plant Nutrition: Molecular Biology and Genetics*, Gissel-Nielsen and Jensen eds, Kluwer academic publishers b.v. pp39-45 (2000)

Sivaguru M, Fujiwara T, Samaj J, Yang ZM, Baluska F, Osawa H, Maeda T, Mori T, Volkmann D, Matsumoto H (2000) Aluminum-Induced 1,3-β-D-Glucan Inhibits Cell-to-Cell Trafficking of Molecules through Plasmodesmata. A New Mechanism of Aluminum Toxicity in Plants. *Plant Physiol.* 124, 991

Kuzuhara Y, Isobe A, Awazuhara M, Fujiwara T, and Hayashi H (2000) Glutathione levels in phloem sap of rice plants under sulfur deficient conditions *Soil Science and Plant Nutrition* 46, 265-270

Mori T, Kawakami S, Hayashi H, Yoneyama T, Watanabe Y, and Fujiwara T "Dilation of Plasmodesmata and Cell-To-Cell Movement of Viruses in Transgenic Tobacco Plants Expressing Rice Thioredoxin h" *Plasmodesma2001*, Cape Town, 2001

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名： 細胞内情報伝達機構の1分子イメージング

2. 研究者名： 船津 高志

3. 研究のねらい：

生命現象は、多数の生体分子の相互作用によって引き起こされている。これらの分子間相互作用が、細胞内の"どこ"で、どのような"タイミング"で起こっているかを明らかにするためには、従来の細胞をすりつぶして解析する生化学的な手法や、固定した細胞を用いた生体分子の観察法では、多数の分子の平均を解析するため限界がある。本研究では、生細胞の内部で蛍光標識した1分子の生体分子をビデオレートで可視化する技術を開発し、この技術を用いて mRNA の核内運動を解析した。

4. 研究結果及び自己評価：

1) 生きた細胞内で1個の生体分子を可視化する顕微鏡の開発

1分子の蛍光色素を可視化する蛍光顕微鏡法として、全反射型エバネッセント蛍光顕微鏡が多用されている。この方式では、スライドガラスから150nmまでの領域を局所的に照射するため細胞膜付近の生体分子の観察に威力を発揮するが、細胞内部を観察することはできない。また、落射蛍光顕微鏡では、観察している面の上下の蛍光が背景光となるので、細胞のように厚みをもった試料の1分子観察には適していない。これらの問題を解決するために、生細胞の内部で1分子の蛍光色素を観察できる共焦点顕微鏡を開発した。ニポードディスク型共焦点ユニット(横河電機 CSU-10)を改造し、高感度カメラを用いてビデオレートよりも早く1秒間に500枚の画像を得ることを可能にした。同様の性能を有する蛍光顕微鏡は無く、本研究で開発した装置により、今まで不可能であった生体分子間相互作用がイメージングできるようになると期待される。2光子励起法などを用い、多重染色した複数の生体分子のイメージングが今後の課題である。

2) mRNA の核内運動の1分子蛍光イメージング

mRNA のプロセッシングと核外輸送機構は、真核生物の遺伝子発現にとって非常に重要であるが、いまだに不明な点が多い。生きた細胞内の mRNA を研究するための第一歩として、蛍光標識した1分子の mRNA の核内運動を共焦点顕微鏡で観察した。モデル mRNA として、ヒト グロビン遺伝子の部分配列からなる mRNA を in vitro で合成し、グアニン残基に蛍光色素 Cy3 を平均 5~10 個、共有結合させた。この mRNA を細胞の核にマイクロインジェクションして観察したところ、動いている mRNA と止まっている mRNA が、ほぼ同数見られた。止まっていた mRNA が動き出すまでの時間をヒストグラムにして解析した結果、平均 30 秒の指数関数分布になった。次に、運動している mRNA を解析したところ、これらはブラウン運動していた。拡散定数は  $0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$  であり、純水中の約 1/100 であった。以上の結果は、mRNA が核内構造物とダイナミックな結合・解離を繰り返しながらブラウン運動で核膜孔へ到達することを示している。生細胞の核内で mRNA の運動をイメージングした例は、本研究が初めてである。今後の課題は、mRNA の核膜孔通過のメカニズムと、細胞質内輸送のメカニズムの解明である。そのための要素技術を本研究で作り上げることができた。

5. 領域総括の見解：

蛍光色素をラベルした生体高分子1分子の挙動を蛍光顕微鏡下で識別する1分子生理学を核内で行われる伝令RNAに適用して、はじめて グロビン mRNA を観察した。これから、mRNA が核膜を通過して細胞質へ移動する様子が追究されることであろう。このように新しい技術を未知の現象解明に適用するプロジェクトもさきがけ研究のひとつのテーマとなることを本研究は示している。

6 . 主な論文等 :

- (1) Yamaguchi J., Nemoto, N., Sasaki, T., Tokumasu, A., Mimori-Kiyosue, Y., Yagi, T., and Funatsu, T. 2001. Rapid functional analysis of protein-protein interactions by fluorescent C-terminal labeling and single-molecule imaging. FEBS Lett. 502: 79-83.
- (2) Taguchi,H., Ueno,T., Tadakuma,H., Yoshida,M., and Funatsu, T. 2001. Single-Molecule Observation of Protein-Protein Interactions in the Chaperonin System. Nature Biotech. 19: 861-865.
- (3) Tadakuma H., Yamaguchi, J., Ishihama, Y., and Funatsu,T. 2001. Imaging of Single Fluorescent Molecules Using Video-rate Confocal Microscopy. Biochem. Biophys. Res. Commun. 287: 323-327.
- (4) 多田隈尚史、船津高志 2001. 「生きた細胞の核内 mRNA の1分子蛍光イメージング」細胞工学 20: 672-677.

特許出願

名称 : 「局所的遺伝子発現調節法」  
出願番号 : 特願平 11-322481  
発明者 : 弓場俊輔、船津高志

招待講演

国際学会 5 件、 国内学会 8 件

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名： 微小脳の高次中枢のモジュール構造と情報表現

2. 研究者名： 水波 誠

3. 研究のねらい：

私は、わずか百万個のニューロンから構成され小さな体での生活や行動に適合した昆虫の脳を「微小脳」という概念で捉えることを提唱し、その基本設計の解明を目指している。本研究では当初、昆虫の脳の最高次中枢であるキノコ体のモジュール構造（単位構造）の機能的な意味を明らかにすることを通して、微小脳の機能設計に迫ることに狙いを定めたが、研究が進展するにつれ、そのような研究だけでは微小脳の機能設計に迫るのには限界があることが明らかになった。そこで研究の焦点を微小脳全体のシステム設計に向け直し、微小脳全体での情報の流れに目を向けた研究を進めた。

4. 研究結果及び自己評価：

1) 昆虫の嗅覚学習能力

昆虫の学習能力の解析は、脳のシステムとしての特性を明らかにするための基盤となる。ゴキブリとコオロギで、1つの匂いを水または砂糖水（報酬）と連させ、もう1つの匂いを食塩水（罰）と連させる弁別学習訓練法を開発した。この訓練法の1つを用いてコオロギの嗅覚学習能力について調べたところ、幼虫期に成立した記憶は生涯保持されること、同時に7種類の異なる匂いを報酬と連合記憶できること、明期と暗期それぞれ異なる匂いを報酬と連合させる状況依存的学習の能力があること、などが明らかになった。これらは昆虫の嗅覚学習能力について新知見をもたらす成果である。

2) キノコ体の最外層モジュールの NO シグナル伝達系の嗅覚記憶への関与

NO(一酸化窒素)含有細胞の組織化学的染色および NO 誘導性 cGMP の抗体染色により、コオロギのキノコ体の最外層モジュールを構成する細胞群に NO-cGMP シグナル伝達系が存在することが明らかになった。さらに NO 合成阻害剤(L-NAME)などを用いた行動薬理的な研究により、条件付けから3時間以後の記憶(初期の長期記憶)の成立には、NO-cGMP シグナル伝達系の正常な働きが不可欠であるとの結論が得られた。これは、キノコ体の NO-cGMP シグナル伝達系が記憶形成に関与することを初めて示唆する成果である。

3) 嗅覚学習に伴うキノコ体出力ニューロンの活動変化

匂いの連合学習訓練を行ったゴキブリを用いて、匂い学習に伴うキノコ体出力ニューロンの活動変化について調べたところ、一部のモジュールの出力ニューロンには学習した匂いに対して特異的と思われる応答を示すものがあった。その詳細については現在解析中である。

4) 前大脳側葉の感覚地図の発見

昆虫の触角には湿度や温度の受容細胞があり、その軸索は触覚葉で糸球体と呼ばれる球状の神経叢を形成して終末する。本研究の過程で、ゴキブリの冷、乾または湿糸球体に樹状突起を持ち、その軸索に投射する触角葉出力ニューロンが初めて同定された。これらのニューロンは温度や湿度の情報をキノコ体の特定のモジュールにのみ伝えていると考えられた。更に興味深いことに、これらのニューロンの側葉での終末領域は、性フェロモンの匂いの情報を受ける糸球体の出力ニューロンや一般の匂いの情報を受ける糸球体の出力ニューロンの終末領域とそれぞれ隣接していた。この結果は、側葉には触角で受容した種々の感覚情報を整然と並べた「感覚地図」があることを初めて示唆するものであった。側葉の「感覚地図」の各領域からの出力信号は、飲水行動、温度調節行動、摂食行動、性行動などの本能行動の統御に使われると考え、哺乳類の視床下部と機能的な類似性が

指摘できる。今後、この仮説についての実験的な検討を進めたい。

#### 5) 昆虫の脳の基本配線様式

ゴキブリの頸部縦連合からの逆行性染色により脳の下降性ニューロンを網羅的に同定した。それらの樹状突起の脳内分布の詳細が明らかになった結果、昆虫の脳内の信号の流れの全体像の推定が初めて可能となった。すなわち、昆虫の脳の間脳感覚中枢と胸部神経節の運動中枢は多数の並列な経路により結ばれ、またこの並列経路は感覚中枢からキノコ体や中心体などの連合中枢を通る階層的な経路により修飾を受ける、という昆虫の脳の基本構築に関する仮説を初めて提案することができた。このような昆虫の脳の並列的かつ階層的な回路構築は、哺乳類を含む脊椎動物の脳の基本構築と極めてよく似ており、異なる系統の動物の間に類似の基本構築をもつ脳がなぜ進化してきたのか、今後更に考察を深めたい。

#### 自己評価

上記のように、昆虫の脳の基本設計の解明に大きく貢献する成果が得られ、当初の狙いは充分達成できたと思う。当初の計画の一部(上記の3)では期待したほどの成果は本研究期間内には得られなかったが、全く予期していなかった発見もあった(4)。今後、これらの成果を基盤に、さらに微小脳のシステム設計の核心に迫る研究を大胆に展開し、昆虫の微小脳と哺乳類の巨大脳との共通性や微小脳に特有な性質を明らかにすることを通して「脳の多様性と進化」の解明に挑みたい。なお主要な成果の大部分は現在投稿準備中であり、執筆を急ぎたい。

#### 5. 領域総括の見解:

嗅覚、湿気や温度感覚に焦点をあてながらゴキブリやコオロギの脳の機能構造を明らかにし、「微小脳」とよんでいる。比較生理学ではあるが、次々と新知見を見出しつつある。このような努力をつづけていくうちに、ヒトの脳機能構造理解に役に立つ基礎を構築することであろう。このような研究の進めかたも、アイデンティティ確立の1つである。

#### 6. 主な論文等: (\*は代表的な論文)

- Y. Matsumoto and M. Mizunami (2002) Lifetime olfactory memory in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Comp. Physiol.* (in press \*)
- Y. Matsumoto and M. Mizunami (2002) Temporal determinants of long-term retention of olfactory memory in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Exp. Biol.* (in press \*)
- M. Sakura and M. Mizunami (2001) Olfactory learning and memory in the cockroach *Periplaneta americana*. *Zool. Sci.* 18: 21-28.
- Y. Matsumoto and M. Mizunami (2000) Olfactory learning in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Exp. Biol.* 203: 2581-2588. \*
- M. Mizunami, F. Yokohari and M. Takahata (1999) Exploration into the adaptive design of the arthropod "Microbrain". *Zool. Sci.* 16: 703-709.

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名： 生体高分子の自己組織化と分子進化

2. 研究者名： 三原 久和

3. 研究のねらい：

生体高分子の「分子進化」は、生物誕生や生物進化と関連し、我々の究極の研究目標の一つとなっている。シンプルな構造で「自己組織化能」や「自己複製能」を有する分子は、生命の起源において重要なはたらきをしていたと考えられる。生体高分子の分子進化の秘密を探ることにより、新たな分子の性質を見つけだし、新たな「分子設計」技術へと発展させることを目指した。本研究においては、とくに「プレ生命ポリマー」の候補の一つとして、ポリペプチドに焦点を絞り、ペプチド組織化集合体の形と分子進化との関連性の追求から、新規の「自己組織化能」や「自己複製能」を有する分子システムの構築を目的とした。

4. 研究結果及び自己評価：

(1) ペプチドアミロイドの自己組織化と自己複製（論文 5,6,7、総説 2 編）

狂牛病やヤコブ病として有名なプリオン病や老人性痴呆症のアルツハイマー病などの原因となるアミロイドタンパク質の自己組織化能に着目し、アミロイドタンパク質をモデル化した繊維状集合体を構築した。ペプチドアミロイド繊維は、シートが3次的に組織化した集合体である。数多くのタンパク質が試験管中においてアミロイド繊維集合体を形成することが知られており、アミロイド繊維化現象は、ポリペプチド共通の原始的性質と捉えることができる。本研究では、種々の設計タンパク質を化学合成し、アミロイド繊維の自己組織化における、相補的分子認識機構を明らかにした。またこの自己組織化能を利用し、自己複製能を有するポリペプチドの設計に発展させた。さらに配列相補的な組織化機構に基づきアミロイド繊維形成を阻害する系の構築にも成功した。本成果は、アミロイド病の阻害剤や診断法開発に応用可能である。

(2) 核酸塩基と複合化したペプチドの自己組織化と自己複製（論文 3 および 1 報投稿中）

DNA の核酸塩基と複合化したヘリックスペプチドを設計・合成し、それらの自己認識能に基づいた自己複製系の構築に成功した。DNA や RNA の 1 次元相補的認識と異なり、タンパク質における認識は立体構造も含めて複数のアミノ酸が関わった複雑なものであり、立体構造と認識の特異性・相補性を同時に設計することは難しい。そこで、本研究においては、核酸塩基を側鎖にもつアミノ酸を合成し、核酸の相補的認識機能を複合化したペプチド群の設計を行った。核酸塩基を側鎖に有するポリペプチドは、プレ生命ポリマー候補の一つである。核酸塩基をポリペプチド立体構造中に適切に配置することで、立体構造と相補的認識を組み合わせた新たな機能分子デザインが可能となった。設計したコイルドコイルペプチド上での核酸塩基間認識を用いて、ヘリックス構造の相補的自己組織化系を確立した。またこの相補的認識機構を利用した自己複製触媒系の構築にも成功した。本システムは、Peptide Chain Reaction (PCR)と呼ぶことができ、新規触媒設計に有用である。

5. 領域総括の見解：

蛋白質の集合体形成能は、生体構造構築に必須であるばかりでなく、狂牛病にみられるプリオンによる異常繊維形成にも関与する。本研究で、この異常繊維構造形成の規則（アミノ酸配列）を見出し、阻害系を明らかにした。プリオン病で、本研究で発見された阻害系の効果がテストされるのを期待したい。本研究では、10 篇もの論文が国際誌に発表され、たいへん生産的でこれからの発展が楽しみである。

## 6 . 主な論文等 :

外部発表 71 件 (論文 22 件, 総説 2 件, 特許 2 件, 口頭発表 : 国際会議 14 件, 国内会議 28 件, 取材 3 件) とくにさきがけ研究を代表する論文

### (1) 原著論文

- 1 T. Takahashi, K. Hamasaki, I. Kumagai, A. Ueno, H. Mihara, " Design of a Nucleobase- Conjugated Peptide that Recognizes HIV-1 RRE IIB RNA with High Affinity and Specificity" , Chem.Commun., 349-350 (2000)
- 2 I. Kumagai, T. Takahashi, K. Hamasaki, A. Ueno, H. Mihara, " Construction of HIV Rev Peptides Containing Peptide Nucleic Acid that Bind HIV RRE IIB RNA" , Bioorg. Med. Chem. Lett., 10, 377-379 (2000)
- 3 S. Matsumura, A. Ueno, H. Mihara, " Peptides with Nucleobase Moieties as a Stabilizing Factor for a Two-Stranded  $\alpha$ -Helix " , Chem.Commun., 1615-1616 (2000)
- 4 M. Takahashi, A. Ueno, H. Mihara, "Peptide Design Based on an Antibody Complementarity-Determining Region (CDR): Construction of Porphyrin-Binding Peptides and Their Affinity Maturation by a Combinatorial Method, " Chem. Eur. J., 6, 3196-3203 (2000)
- 5 Y. Takahashi, T. Yamashita, A. Ueno, H. Mihara, "Construction of Peptides that Undergo Structural Transition from  $\alpha$ -Helix to  $\beta$ -Sheet and Amyloid Fibril Formation by the Introduction of N-Terminal Hydrophobic Amino Acids " , Tetrahedron, 56, 7011-7018 (2000)
- 6 Y. Takahashi, A. Ueno, H. Mihara, " Mutational Analysis of Designed Peptides that Undergo Structural Transition from  $\alpha$ -Helix to  $\beta$ -Sheet and Amyloid Fibril Formation" , Structure, 8, 915-925 (2000)
- 7 Y. Takahashi, A. Ueno, H. Mihara, " Heterogeneous Assembly of Complementary Peptide Pairs into Amyloid Fibrils with Structural Transition from  $\alpha$ -Helix to  $\beta$ -Sheet " , ChemBioChem, 2001, 75-79 (2001)
- 8 T. Takahashi, K. Hamasaki, A. Ueno, H. Mhara, " Construction of Peptides with Nucleobase Amino Acids: Design and Synthesis of the Nucleobase-Conjugated Peptides Derived from HIV-1 Rev and their Binding Properties to HIV-1 RRE RNA " , Bioorg. Med. Chem., 9, 991-1000 (2001)
- 9 I. Kumagai, T. Takahashi, K. Hamasaki, A. Ueno, H. Mihara, " HIV Rev Peptides Conjugated with Peptide Nucleic Acids and Their Efficient Binding to RRE RNA " , Bioorg. Med. Chem. Lett., 11, 1169-1172 (2001)
- 10 M. Sakamoto, A. Ueno, H. Mihara, " Multi -Peptide-Metalloporphyrin Assembly on a Dendrimer Template and Photoinduced Electron Transfer Based on the Dendrimer Structure " , Chem. Eur. J., 7, 2449-2458 (2001)

### (2) 総説

- 1 H. Mihara, Y. Takahashi, " Self-Assembly of Polypeptides into Amyloid Fibrils with Structural Transitions " , Trans. Material Res. Soc. Jpn., 26, 473-478 (2001)
- 2 三原久和, " ポリペプチドの立体構造転移とアミロイド繊維への自己組織化" , 機能材料, 21(10), 11-17 (2001)

### (3) 特許

- 1 三原久和, 熊谷一郎, " レトロウイルスの発現調節蛋白質の修飾体及びその改質法" , 特願 2000-260644 号, 平成 12 年
- 2 三原久和, 小幡谷育夫, " ヘムを結合したペプチド, それを用いた酸化触媒" , 特願 2000-267093 号, 平成 12 年

(4) 国際学会招待講演 3 件、 国内学会 招待・依頼講演 6 件、取材等 2 件

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名： 動的らせん分子の創製と応用

2. 研究者名： 八島 栄次

3. 研究のねらい：

核酸や蛋白質などの生体高分子はいずれも左右どちらか一方に片寄ったらせん構造を形成し、その高度の機能の発現と深く関わっている。らせん構造はキラルであって左右どちらか一方に片寄ったらせんは光学活性となる。本研究は、高分子の高次構造の最も基本的ならせん構造に着目し、その形の制御とはたらしきの発現を、純粋に化学的手法にのっとり、行おうとするものである。目指すらせんは動的ならせんであり、しかも外部の刺激、特にキラルな刺激に対して応答し、左右どちらか一方方向巻きからなるらせん構造を形づくる分子の創製である。

4. 研究結果及び自己評価：

1) らせん高分子を自由自在につくるための新しい概念の創出

らせん高分子の構築に「動的」という概念をはじめて導入することにより、光学不活性なポリフェニルアセチレンのような高分子に、光学活性体との非共有結合的な相互作用を介して、望みの向きのらせんを自由自在に誘起できることを見出した。その際、高分子主鎖にらせん構造特有の円二色性(CD)吸収が発現し、これをプローブとすることにより、低分子化合物のキラリティー識別が可能であることを明らかにした。「光学不活性な高分子へのらせん誘起」の概念は、ポリアセチレン誘導体だけに見られる特異な現象ではなく、ポリホスファゼン(論文2)やポリイソシアニドなど他の高分子についても同様に起こる、一般性の高い概念であることも確かめている。

2) らせん構造の修復と記憶の発見

光学活性体存在下誘起された高分子の一方巻きらせん構造が、光学活性体を完全に取り除き、光学不活性な様々な化合物で置換後も、そのらせんの形を「記憶」として長時間保持できるという、極めて特異な現象を発見した(論文1)。さらに、保持されたらせん構造は光学活性体で、置換直後は完全ではないが、時間とともにもとの形に「修復」されることも明らかにした。

3) 色の変化をともなうらせん反転現象の発見

らせん誘起の考え方をさらに発展させ、高分子のらせんの向きを外部の刺激に応じて自由自在に変えることに成功した(論文5)。特に、側鎖にシクロデキストリン部位を有するポリアセチレン誘導体は、温度や溶媒といった刺激だけでなく、シクロデキストリンの空孔内に包接される分子の形やキラリティーの違いを認識してらせんのピッチが変わるとともに、その向きが反転し、溶液の色が赤から黄色(あるいはその逆)へと変化する現象を見出した。このような色調変化を示す高分子の例はなく、新しい原理にもとづくセンサーの開発につながる可能性がある。

4) 完全水中でのらせん高分子の創製の実現

らせん誘起の概念をさらに水中へと展開し、これまで実現が困難とされてきた、有機溶媒を全く使用しない完全水中での官能基を有するポリアセチレンの直接合成と生成高分子への水中でのらせん誘起を達成した(論文3, 4)。生体高分子が水中で示す高度の分子認識システムを模倣したこの成果は、水中で機能する人工らせん高分子の初めての例を提供しただけでなく、アミノ酸をはじめとする多種多様な生体関連物質や医薬品の水中でのキラリティー識別を可能にした。

5. 領域総括の見解：

ポリアセチレンなど高分子の端に光学活性体を結合させて、左右望む向きにらせん構造をつくらせることに成功した。しかも、末端物質を除いてもらせんの形を保つことができた。この発見はNature誌

(1999)に掲載され、注目を浴びた。この研究を進めて、高分子の向きを外からの刺激で自由に変えることができた。このような動的らせん構造高分子の創出はまったく新しい試みであり、今後の発展が高く期待される。本研究は、さきがけプロジェクトが独創的研究の育成をもたらすことを明白に示すよい例である。

## 6 . 主な論文等 :

### ( 1 ) 論文

- 1) Memory of Macromolecular Helicity Assisted by Interaction with Achiral Small Molecules  
E. Yashima, Y. Maeda, and Y. Okamoto, *Nature*, 399, 449-451 (1999).
- 2) Helicity Induction and Conformational Dynamics of Poly(bis(4-carboxyphenoxy)-phosphazene) with Optically Active Amines  
E. Yashima, K. Maeda, and T. Yamanaka, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 7813-7814 (2000).
- 3) Stereospecific Polymerization of Propiolic Acid with Rhodium Complexes in the Presence of Bases and Helix Induction on the Polymer in Water  
K. Maeda, H. Goto, and E. Yashima, *Macromolecules*, 34, 1160-1164 (2001).
- 4) A Helical Polyelectrolyte Induced by Specific Interactions with Biomolecules in Water  
H. Onouchi, K. Maeda, and E. Yashima, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 7441-7442 (2001).
- 5) Switching of a Macromolecular Helicity for Visual Distinction of Molecular Recognition Events  
E. Yashima, K. Maeda, and O. Sato, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 8159-8160 (2001).

### ( 2 ) 招待講演

The Gordon Research Conference on Polymers (East), June 10-15, 2000, Connecticut College (USA)等、国際会議招待講演 10件、国内会議招待講演 29件。

### ( 3 ) 特許

ポリ(ホスホノアリアルアセチレン)及びそれを用いたキラルセンサー、八島栄次、前田勝浩、特願 2000-111548, PCT/JP01/03155 等 2件。

### ( 4 ) 受賞

Wiley 高分子科学賞 2000年化学賞。

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名： 脊椎動物の脳の細胞系譜の解析

2. 研究者名： 弓場 俊輔

3. 研究のねらい：

非脊椎動物である線虫では細胞系譜が詳細に解析されているが、脊椎動物ではその細胞数の多さが解析を困難なものにし、技術的な理由でその解析が見送られてきた。そこで、私はその解析技術の開発に重きを置いて課題を提案した。この技術では個体内の単一細胞において特定遺伝子の発現を時間空間的な制約を受けずに誘導できるものである。

発現すべき遺伝子は、細胞系譜なら細胞標識用のレポーター遺伝子であるが、実験によっては機能分子の遺伝子も含まれる。本研究課題では細胞系譜という発生学はこの新技術の導入を試みるが、生理学など他の生物医学分野でも利用可能であること、また、実験対象を他の生物個体とすることも視野に入れて技術開発を行なった。

4. 研究結果及び自己評価：

1) トランスジェニック個体の作成

マーキングベクターの構築

細胞特異的プロモーターを用いてレポーター遺伝子を発現させ、標的細胞を可視化した。神経特異的プロモーターとして成長円錐特異的蛋白のラット GAP-43 遺伝子のプロモーター下流に、赤色蛍光蛋白の DsRed 遺伝子をつないだベクターをゼブラフィッシュ受精卵に導入し、一過性に発現させた。これで突起まで含んだニューロン全体が可視化できた。

メダカにおいては、ニューロン、グリア細胞の前駆細胞としての神経幹細胞のマーカーである Nestin を用いて標的細胞を可視化しようとしている。ラット Nestin エンハンサーにマウス Hsp68 最小プロモーターを繋いだもので緑色蛍光蛋白の EGFP 遺伝子をメダカで一過性に発現させると、神経上皮と思われる細胞群が可視化できた。

トレーシングベクターの構築

構成的プロモーターであるアフリカツメガエル EF1 プロモーターと EGFP 遺伝子の間に、2箇所の loxP 配列ではさまれた Cre 発現ユニットを挿入した新規組換えベクターの開発に成功した。Cre 発現ユニットは、熱ショックプロモーターであるマウス Hsp68 プロモーター下流に部位特異的組換え酵素の Cre 遺伝子を繋いだカセットと遺伝子発現阻止のための STOP カセットの2つのカセットから構成されている。

このプラスミドが導入された細胞では、熱ショックにより Cre が発現し、自律的に Cre 発現ユニットが標的配列である loxP 部位で切り出される。この結果、EF1 プロモーターに EGFP 遺伝子が直結し、以後、EGFP 遺伝子の発現が持続することになる。Cre と loxP が同一プラスミドに含まれるこの新規組換えベクターの構造については特許公開となった。

これらマーキングベクターおよびトレーシングベクターを色素の欠損したメダカ、See-through 系統に導入し、トランスジェニック個体の作成に入った。

2) 赤外レーザー顕微鏡システムの構築

標的細胞の正確な3次元位置の把握のために共焦点倒立顕微鏡を用いた。また、赤外レーザーは通信用レーザー(シングルモード ラマンレーザー、波長 1480 nm)を使用した。このレーザーを倒立顕微鏡外部から導入し、システムを完成した。このシステムについても特許公開となった。

同時に技術の普及も目指した。この実験機をもとに製品化に向けての開発も光学機器メーカーと行ない、試作1号機の評価も終えて、製品化の目処もたった(独創的研究成果育成事業)。

### 3) 赤外レーザー顕微鏡システムによる熱ショック

熱ショックプロモーターによって EGFP 遺伝子が誘導できるトランスジェニックゼブラフィッシュを用いて、骨格筋細胞および脳内細胞を標的に数秒間、赤外レーザーを照射したところ、数時間で標的細胞における EGFP 遺伝子の発現誘導に成功した。レーザー照射後の標的細胞の形態も正常で、光学毒性のない点は予想通りであったが、誘導に要するレーザー照射時間は予想を越えて短時間であり、実用化にふさわしい結果であった。

以上、細胞系譜解析のための新技術開発に成功し、メダカ脳の細胞系譜の解析を始めることが可能となった。個体差の少ない近交系が存在すること、発生のスピードが遅く、細胞系譜解析が容易であることに注目して、実験動物を当初のゼブラフィッシュからメダカに研究途中に転向したことで計画に大幅な遅れをきたし、技術開発に終わった点は大変残念であったが、課題終了後も長期にわたって系譜を解析し続けることを考えると転向はやむを得ない決断であった。今後はこの世界に例を見ない技術を駆使して生物学に新たな知見を加えるような研究に取り組みたい。

### 5. 領域総括の見解：

ゼブラフィッシュやメダカを用いて、脳細胞の系譜をつくりあげようという野心的な計画である。そのためには、1つの細胞の子孫を確実に追跡する方法を確立しなければならない。そこで、蛍光蛋白質遺伝子を胚神経幹細胞に導入して経時的に追跡する方法を開発した。赤外レーザーを使用する顕微鏡システムは特許につながった。しかし、3年間は方法の開発にあてられ、当初の研究そのものは緒についたばかりである。したがって、論文(成果)はまだである。このような、いわば将来の準備にさきがけ研究があてられるのもひとつの行き方であろう。その成果が現れるのにはなお数年を要するが、注目に値する。

### 6. 主な論文等：

#### 特許

名称：「局所的遺伝子発現調節法」

出願番号：特願平 11-322481、出願日：平成 11 年 11 月 12 日

事業団整理番号：K008P03、発明者：弓場 俊輔・船津 高志

出願人：科学技術振興事業団

#### その他

科学技術振興事業団 平成 12 年度 独創的研究成果育成事業採択課題

「個体内単一細胞の遺伝子発現を調節する赤外線レーザー顕微鏡システム」

(シグマ光機株式会社)