



本部より

第72回大会（福岡）において下さい

社団法人日本動物学会の第72回大会が10月6日(土)、7日(日)、8日(月、体育の日)の3日間、福岡市東区の九州産業大学で開催されます。福岡市は空港から近くJR博多駅まで地下鉄で6分、博多駅から九州産業大学前までJRで15分程度です。乗り換えと待ち時間を含めても、1時間以内で空港から会場においでいただけます。新幹線ご利用の場合は、博多駅から在来の鹿児島本線で九州産業大学前までお戻りいただくこととなります。このように、会場は交通至便の地にあります。多くの学会員のご参加をお待ちしています。

本大会の参加登録、演題申込は昨年度の駒場大会と同様、インターネットと従来の郵送を併用しました。郵送分については昨年度はそのままオフセット印刷をされましたが、本年度はフロッピーディスクを同封していただき、準備委員会で代理入力をいたしました。従来は原稿用紙の枠内に収まれば、制限文字数を超過しても問題はありませんでした。今回は規定通りの字数制限を組み込んだプログラムのため、字数超過の原稿は修正をお願いしました。インターネットによる登録の比率は90%を上回り、準備委員会の作業も軽減されました。ご協力ありがとうございました。

大会では、一般口演とポスター発表に加え、以下のように7題のシンポジウムを企画しました。1日目午後「卵成熟と受精 - 古典的課題の今日 -」、2日目午前「有明海を考える - その干潟と生物多様性をめぐる諸問題」、昆虫の脳と行動、生殖細胞の生物学、動物の性と行動の進化、3日目午後「発生物学者の考える神経系の多様性と進化」、日本動物学会主催 国際シンポジウム New Perspectives for Zoology」2日目の「有明海を考える」は開催地である九州に密接に関わる問題を動物学の視点から考えてみよう企画された公開シンポジウムです。奮って御参加ください。さらに、1日目午前に「オーガナイザー研究の過去・現在・未来」という

題で本年度学士院賞を受賞されました浅島誠先生（東大総合文化研究科）の特別講演を行います。1日目は関連集会、3日目は高校生のポスター発表を行います。プログラムの詳細は予稿集送付前にも動物学会のホームページでご覧いただけます。3日間の会期を通して皆様の活発な討議をお願いいたします。

(日本動物学会第72回大会準備委員会委員長 藤 義博)

平成13年度（社）日本動物学会 第2回総会開催について

(社)日本動物学会会員 各位

(社)日本動物学会
会長 星 元紀

平成13年度（社）日本動物学会第2回総会を下記の日程で開催いたします。

会員の皆様には多数のご参加を頂き、活発な議論をお願いしたいと存じます。

日時 平成13年10月7日(日) 14:30より

場所 九州産業大学1号館 S201教室

第1号議案 平成13年度収支決算中間報告についての件
第2号議案 平成14年度事業計画案についての件(後掲)
平成14年事業計画(案)

1. 学術集会の開催
第73回学会大会 金沢大学
2. 全国7支部による支部大会及びシンポジウムの開催
3. 動物学の普及活動
4. 学会誌、図書の刊行
Zoological Science 第19巻の発行
生物科学ニュースの発行
5. 動物学研究業績の表彰と研究の奨励
日本動物学会賞・奨励賞
ZOOLOGICAL SCIENCE AWARD
日本動物学会 OM 賞
若手研究者の国際会議出席補助金(安増基金・江上基金)
6. 生物科学学会連合の事業推進
7. 研究及び調査
1) 動物学資料保存に関する調査

(Z - 54)

- 2) 将来の動物学の在り方に関する調査
- 3) ガイアリスト21計画の推進
- 4) 生物教育用語の検討
- 5) 実験動物取り扱いに関する指針の検討
- 6) 国際動物分類命名規約の翻訳・出版への協力
- 7) 研究用動物提供

第3号議案 平成14年度予算案についての件

第4号議案 日本動物学会 OM 賞規定の承認

第5号議案 その他

平成13年度 日本動物学会賞

筒井和義会員（広島大学総合科学部）

「脳におけるニューロステロイドの合成と作用に関する研究」



略歴

- 1976年3月 早稲田大学教育学部理学科卒業（理学士）
- 1978年3月 早稲田大学大学院理工学研究科博士課程前期修了（理学修士）
- 1981年3月 早稲田大学大学院理工学研究科博士課程後期修了（理学博士）
- 1983年3月 広島大学理学部動物学科助手
- 1988年5月 南カリフォルニア大学神経生物学教室研究員（併任）
- ~1989年4月 ワシントン大学動物学教室客員研究員（併任）（1988年8月~10月）
- 1991年7月 神戸大学医学部講師
- 1993年2月 広島大学総合科学部助教授
- 1993年4月 広島大学大学院生物圏科学研究科担当
- 1996年10月 広島大学総合科学部教授
広島大学大学院生物圏科学研究科担当
- 2000年4月 財団法人サントリー生物有機化学研究所アドバイザー

池上 晋（広島大学生産学部）

「ヒトデの生殖・胚発生に関する細胞生理化学的研究」



略歴

- 1963年3月 東京大学農学部農芸化学科卒業
- 1965年3月 東京大学大学院化学系研究科修士課程修了
- 1968年3月 東京大学大学院農学系研究科博士課程修了，農学博士
- 1968年4月 東京大学農学部助手
- 1968年6月 国立がんセンター研究所生化学部厚生技官
- 1970年1月 東京大学農学部助手
- 1980年3月 広島大学生物生産学部助教授
- 1989年8月 広島大学生物生産学部教授

トピックス

日本動物学会賞 研究の内容

脳におけるニューロステロイドの合成と作用に関する研究 総合脳研究の展開

広島大学総合科学部
筒井和義

高次情報中枢である脳は末梢内分泌腺が合成するステロイドの標的器官として捉えられてきた。ところが、脳も独自にコレステロールをもとにステロイドを合成していることが明らかになった。脳は末梢ステロイドの標的器官であると同時に、ステロイド合成器官でもあるという事実は、これまでの常識を覆すものである。脳のステロイド合成は、哺乳類を用いた Baulieu らの研究と我々の鳥類・両生類・魚類の研究により見いだされた。この新しい概念の脳分子は、末梢内分泌腺がつくる従来の「古典的ステロイド」と区別して、「ニューロステロイド (neurosteroids)」と名付けられた。

過去10年間の研究により、広く脊椎動物の脳では、コレステロールをもとにプレグネノロン、プレグネノロン硫酸エステル、プロゲステロン、プロゲステロン代謝ステロイドなどの多くのニューロステロイドが合成されることを明らかにした。これらのニューロステロイドの作用を解析するには、脳のニューロステロイド合成細胞を明らかにする必要がある。我々は、可塑性シナプスを有する記憶ニューロンとして知られる小脳のプルキンエ細胞が活発にニューロステロイドを合成することを見だし、ニューロンによるニューロステロイド合成を初めて証明した。プルキンエ細胞が脳の代表的ニューロステロイド合成細胞であることは脊椎動物に一般化される重要な発見である。

プルキンエ細胞ではさまざまなニューロステロイドが合成されており、ニューロステロイドの作用を解析する優れた細胞モデルとなった。小脳皮質が形成される新生期にはプルキンエ細胞のプロゲステロン合成が高まる。プロゲステロンはニューロンの核内にある受容体を介してニューロンの発達とシナプス形成を導くことがわかった。この作用により新生期の小脳では運動学習を担う神経回路が構築される。一方、新生期以降プルキンエ細胞が恒常的に合成するプレグネノロン硫酸エステルは神経回路のシナプスでなされる情報伝達を調節することが明

らかになった。小脳には動物の運動を正確で円滑にする働きがあり、小脳でなされる運動学習は、神経回路のシナプスにおける情報の流れが変化することが大きな要素と考えられている。優れた研究モデルを用いた我々の研究により、脳におけるニューロステロイドの合成と作用に関する研究が著しく進展した。さらに、ニューロステロイドが運動学習に関わる脳分子であることが示された。

脳がステロイドを合成する：
ニューロステロイドの発見

末梢内分泌腺にあるステロイド合成細胞では、コレステロールをもとにチトクローム P450_{scc}(P450分子種の一つ、コレステロール側鎖切断酵素)の作用によりプレグネノロンがつくられる。このプレグネノロン合成が生体内に存在する全てのステロイドの生合成の第一段階である。プレグネノロンは 3 β -HSD (3 β -水酸基脱水素/5 α -異性化酵素)の働きにより性ステロイドとして知られるプロゲステロンに変換される。一方、チトクローム P450_{17 α -c}(P450分子種の一つ、P450c17ともよばれる)の作用でプレグネノロンからデヒドロエピアンドロステロンが合成される。また、チトクローム P450_{17 α -c}はプロゲステロンからアンドロステンジオンを合成する。従って、脳のステロイド合成を証明するには、ステロイド合成の第一段階となるプレグネノロンの合成をまず明らかにする必要がある。Baulieu ら (INSERM; フランス国立医学研究所)は哺乳類⁽¹⁾、我々は鳥類と両生類を用い⁽²⁻⁴⁾、脳のプレグネノロン合成を証明した。

Baulieu のグループは、ラットの脳にプレグネノロン硫酸エステルが高濃度に存在する現象に着目した。プレグネノロン硫酸エステルは親水性が高く、通常は血液-脳関門を通過することができない。従って、脳に存在するプレグネノロン硫酸エステルは末梢内分泌腺でつくられたものが蓄積したとは考え難い。彼らは脳が独自にコレステロールをもとにプレグネノロンやその硫酸エステルを合成しているのではないかと考え、哺乳類齧歯動物を対象にして研究を進めた⁽⁵⁻⁷⁾。その結果、脳におけるプレグネノロンとその硫酸エステルの合成が見いだされた⁽¹⁾。

我々は、鳥類と両生類を用いた研究により、脳がプレグネノロンを合成することを明らかにした⁽²⁻⁴⁾。まず、プレグネノロンの基質であるコレステロールをウズラ脳組織と反応させ、脳がプレグネノロンを合成することを生化学的に証明した⁽⁸⁾。次に、ウズラの脳にはチトクローム P450_{scc}が存在することをウエスタンブロット法

により示した⁽⁸⁻¹⁰⁾。同様の手法により、両生類のカエルの脳がコレステロールからプレグネノロンを合成することを証明し⁽¹¹⁾、広く脊椎動物の脳がプレグネノロンを合成していることが明らかになった⁽¹⁻⁴⁾。

さらに研究を進めた結果⁽¹²⁻¹⁸⁾、脊椎動物の脳では共通してチトクローム P450_{scc}、ステロイド硫酸基転移酵素（ステロイドを硫酸エステルに変える酵素）、3 β -HSD、チトクローム P450_{17 α -セ}、5 α -（ ）還元酵素などの多くのステロイド合成酵素が発現していることが証明され、脳はコレステロールをもとにプレグネノロンとプレグネノロン硫酸エステルを初めとするさまざまなステロイドを合成していることが明らかになった^(1-4, 19)。脳などの神経系が合成するこの新しい概念の脳分子はニューロステロイド（neurosteroids）と命名された。

脳におけるコレステロールから始まるニューロステロイドの生合成経路を明らかにするには、以上のステロイド合成酵素が脳のどの部位にいつ発現するのかを知る必要がある。ラット、ウズラ、カエル、ゼブラフィッシュなどを用いた我々の生化学的・分子生物学的解析により、P450_{scc} は大脳、間脳、中脳、小脳にかけて広く発現していることが明らかになった⁽¹¹⁻¹³⁾。一方、3 β -HSD の発現は小脳と大脳において高いことがわかった^(12-15, 17, 18)。また、P450_{17 α -セ}は中脳において発現することがわかった^(12, 16)。興味深いことに、3 β -HSD が新生期の時期に特異的に発現するのに対し、P450_{scc} と P450_{17 α -セ}は新生期、思春期、成熟期にかけて恒常的に発現することがわかった^(12, 13, 15-17)。

ニューロステロイド合成細胞の同定：

ニューロンによるニューロステロイド合成の発見

脳におけるニューロステロイドの作用を解析するには、ニューロステロイドを合成する細胞を明らかにする必要がある。哺乳類の研究から、まずオリゴデンドロサイトやアストロサイトなどのグリア細胞によるニューロステロイドの合成が証明された⁽¹⁾。

一方、我々は、可塑性シナプスを有する記憶ニューロンとして知られる小脳のプルキンエ細胞が活発にニューロステロイドを合成することを見だし、ニューロンによるニューロステロイド合成を初めて明らかにした^(3, 4, 20, 21)。プルキンエ細胞が脳の代表的なニューロステロイド合成細胞であることは脊椎動物に一般化される重要な発見である。

1. グリア細胞とニューロンによるニューロステロイド合成

Le Goascogne ら⁽²²⁾は P450_{scc} 抗体を用いた免疫組織化学的解析から、ラットの大脳の白質が免疫陽性を示すことを報告した。白質においてニューロン軸索のミエリン鞘を形成するのが代表的グリア細胞であるオリゴデンドロサイトである。生化学的解析により、このオリゴデンドロサイトがコレステロールをもとにプレグネノロンを合成することが明らかになった⁽⁶⁾。その後、オリゴデンドロサイトの他にアストロサイトもプレグネノロンを合成することが見いだされ、これらのグリア細胞によるニューロステロイド合成が明らかになった⁽¹⁾。

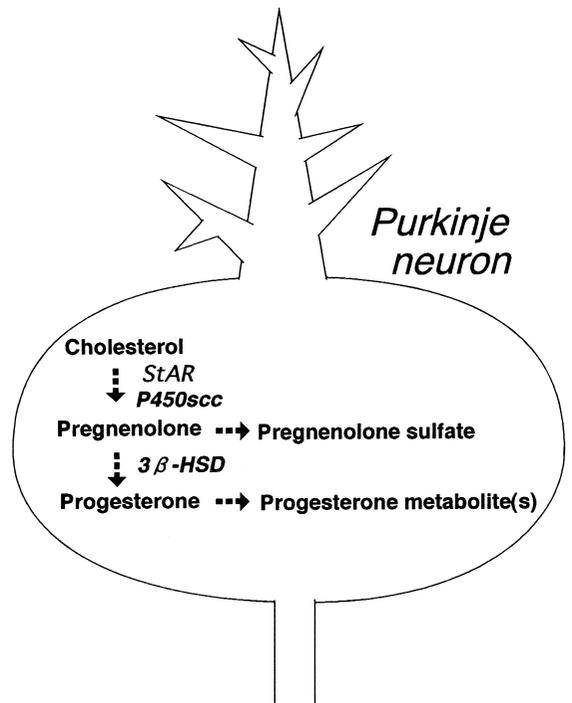


図1 プルキンエ細胞が合成するニューロステロイド

プルキンエ細胞では P450_{scc} が生後から成熟期にかけて恒常的に発現しており、コレステロールからプレグネノロンとその硫酸エステルが合成される。一方、新生期のプルキンエ細胞では3 β -HSD の発現が高まり、この細胞ではさらにプレグネノロンからプロゲステロンとその代謝ステロイドが合成される。プルキンエ細胞にはコレステロールを輸送する StAR タンパク質も発現している。

チトクローム P450_{scc} : P450分子種の一つ、コレステロール側鎖切断酵素

3 β -HSD : 3 β -水酸基脱水素/ 5 α -4 α -異性化酵素

StAR タンパク質 : ステロイド合成短期調節タンパク質

一方、ニューロンによるニューロステロイド合成は永く不明であった。我々の一連の研究により、脳の代表的ニューロンである小脳皮質のプルキンエ細胞が活発にニューロステロイドを合成することが発見された(図1)^{3,4,20,21}。

2. プルキンエ細胞は脳の代表的ニューロステロイド合成細胞である

ウズラ用いた免疫組織化学的解析により、P450scc 抗体と免疫反応を示す細胞は、大脳の高線状体・原線状体、間脳の視索前野・視床下部、小脳皮質に分布していることが見いだされた。免疫陽性細胞を同定したところ、P450scc 抗体と強く反応した細胞は小脳の皮質ニューロンであるプルキンエ細胞であった^(9,10,23)。プルキンエ細胞は記憶能力を有するニューロンとして知られ、脳の重要な細胞である。また、間脳の視索前野・視床下部は本能行動の中核であり、この脳領域のグリア細胞と一部のニューロンにも P450scc が存在することがわかった。ラット⁽¹³⁾、カエル⁽¹¹⁾、ゼブラフィッシュ⁽¹⁸⁾でもほぼ同様の結果を得た。従って、プルキンエ細胞が脳の代表的ニューロステロイド合成細胞であることは脊椎動物に一般化される重要な発見といえる(図1)。

In situ hybridization 法により遺伝子レベルからもステロイド合成細胞の同定を行ったところ、さらに新しい事実が見いだされた。プルキンエ細胞では P450scc に加え 3β -HSD が発現していることが明らかになった(図1)^{15,18}。興味深いことに、この細胞では、P450scc の発現が生後から成熟期にかけて恒常的に認められるのに対し、 3β -HSD の発現は新生期のみ検出された(図1)^{13,15}。

生化学的解析により、プルキンエ細胞はプレグネロンとその硫酸エステルを合成すること、新生期のプルキンエ細胞ではプレグネロンからプロゲステロンが合成されることが明らかになった(図1)^{13,15}。さらに、プルキンエ細胞にはコレステロールを P450scc が存在するミトコンドリア内膜に輸送する StAR タンパク質(ステロイド合成短期調節タンパク質)が発現していることも見いだされた⁽²⁴⁾。以上の研究により、プルキンエ細胞はコレステロールからプレグネロンとその硫酸エステルを生後から成熟期にかけて恒常的に合成することや、この細胞は新生期にはさらにプレグネロンからプロゲステロンとその代謝ステロイドを合成することなどが明らかとなった(図1)^{3,4,20,21}。

最近、小脳プルキンエ細胞と同様に、P450scc, P450_{17 α -H}, StAR タンパク質が海馬ニューロンである錐体細胞にも発現していることが報告された⁽²⁵⁾。このニューロンでもさまざまなニューロステロイドが合成される⁽²⁵⁾。一方、脳以外では、脊髄の背根神経節感覚ニューロンや運動ニューロンなどがニューロステロイドを合成することが報告されている。

ニューロステロイドの作用:

ニューロステロイドによるシナプス可塑性調節の発見

脳の代表的なニューロステロイド合成細胞として同定されたプルキンエ細胞を用いた実験系は、ニューロステロイドの作用を解析する良いモデルである。我々は小脳プルキンエ細胞がつくるニューロステロイドの作用を電気生理学的手法と超微形態学的手法により解析した。その結果、ニューロステロイドには、シナプス情報伝達を変化させるノンゲノミック作用とニューロンの発達・シナプス形成・神経回路構築を促すゲノミック作用があることがわかった^(3,4,20,21)。

1. シナプス情報伝達を調節するノンゲノミック作用

我々はプルキンエ細胞が合成するニューロステロイドであるプレグネロンとプレグネロン硫酸エステルの作用をラットの小脳を用い電気生理学的に解析した^(3,10,20)。小脳スライスのプルキンエ細胞からパッチクランプ法によりシナプス電流の発生頻度を調べた結果、プレグネロン硫酸エステルには抑制性のシナプス電流の発生頻度を増加させる作用があることがわかった。この効果は急性的であり、プレグネロン硫酸エステルの灌流を開始してわずか数分後から検出された。一方、プレグネロンにはプレグネロン硫酸エステルのような急性効果は確認されなかった。

詳しい解析の結果、シナプス電流の発生頻度を急性的に増加させるプレグネロン硫酸エステルの作用機序は次のように要約される(図2)^{3,4,20,21}。(a)プルキンエ細胞で合成されたプレグネロンはステロイド硫酸基転移酵素によりプレグネロン硫酸エステルとなる。(b)プレグネロン硫酸エステルはプルキンエ細胞から傍分泌されてプルキンエ細胞に投射する GABA ニューロン(抑制性伝達物質の γ -アミノ酪酸を放出するニューロン)に作用する。(c)GABA ニューロンの活動が高まり、シナプスにおける GABA の放出頻度が増加する。(d)その結果、プルキンエ細胞の活動が調節される。つまり、

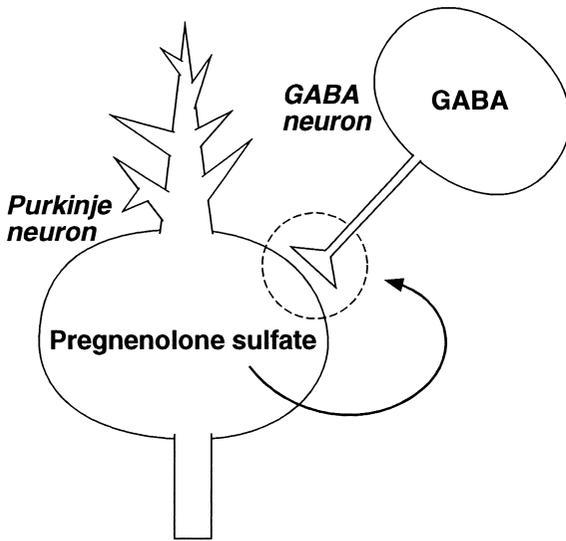


図2 プルキンエ細胞が合成するニューロステロイドのノンゲノミック作用

プルキンエ細胞で合成されたプレグネノロンは、1) 硫酸エステルとなり、2) 傍分泌されてプルキンエ細胞に投射する GABA ニューロンに作用する。3) その結果、このシナプスにおける GABA の情報伝達が変化する。

GABA：抑制性伝達物質のγ-アミノ酪酸

プレグネノロン硫酸エステルには、シナプスにおける情報伝達を変化させるという情報伝達調節因子としての作用があり、細胞膜にあるイオントロピックレセプターを介したノンゲノミック作用である、と結論された。従来、生体内のステロイドは細胞内受容体を介したゲノミック作用により脳機能を調節すると考えられていたが、ある種のニューロステロイドは新しい作用機序により情報伝達を調節することがわかった。

2. ニューロン発達・シナプス形成・神経回路構築を促進するゲノミック作用

小脳の皮質は生後まもない新生期に形成される。この時期の小脳ではニューロンの発達やシナプス形成が活発になされ、運動学習を担うハードウェアである神経回路が構築される。新生期のプルキンエ細胞が活発に合成するニューロステロイドであるプロゲステロンの作用をニューロンの発達とシナプス形成に着目して超微形態学的に解析した。その結果、プロゲステロンはプルキンエ細胞の樹状突起の伸張を促すことがわかった(図3)²⁶⁾。興味深いことに、プロゲステロンは樹状突起のシナプス

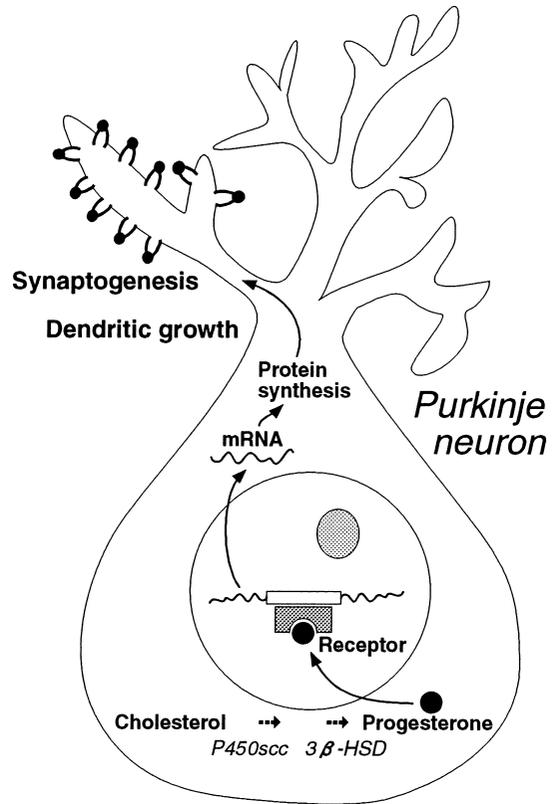


図3 プルキンエ細胞が合成するニューロステロイドのゲノミック作用

新生期のプルキンエ細胞は活発にプロゲステロンを合成する。プルキンエ細胞の核内にはプロゲステロン受容体が発現しており、プロゲステロンはこの受容体を介したゲノミック作用により、樹状突起の伸張とシナプス形成を誘導する。

形成も促進することが見いだされた(図3)²⁶⁾。さらに、プルキンエ細胞の核内にはプロゲステロン受容体が発現しており、プロゲステロンはこの受容体を介したゲノミック作用により、樹状突起の伸張とシナプス形成を促進することを発見した(図3)²⁶⁾。

このように、新生期のプルキンエ細胞が合成するプロゲステロンにはニューロンの発達とシナプス形成を導くことで、運動学習を担うハードウェアである小脳神経回路を構築する重要な働きがある^(3,4,20,21)。

まとめ

脊椎動物の脳はコレステロールをもとにさまざまなニューロステロイドを合成することが明らかになった。脳

では、小脳皮質ニューロンであるプルキンエ細胞が代表的なニューロステロイド合成細胞であり、この細胞を実験系とした我々の研究により、脳におけるニューロステロイドの合成と作用に関する理解が得られた。ニューロステロイドにはニューロン樹状突起の伸張・シナプス形成・神経回路構築などを促進するゲノミック作用と構築された回路のシナプスにおける情報伝達を調節するノンゲノミック作用があることが発見された。我々の一連の研究により、運動学習を担う記憶ニューロンであるプルキンエ細胞におけるニューロステロイドの合成と作用が明らかになった。小脳でなされる運動の学習・記憶は神経回路のシナプスでの情報の流れが変化することが大きな要素であり、ニューロステロイドが運動学習に関わる脳分子であることが示された。ニューロステロイド合成酵素とニューロステロイド受容体の遺伝子欠損動物による行動解析を進めている。

紙面の都合で、詳しい内容と多くの文献を省略した。本文の詳細は、参考文献中の総説論文に述べている。これらを参照して頂きたい。本研究は文部省科学研究費補助金（特定領域研究 A2 11170237；特定領域研究 C2 13210101；基盤研究 A1 11354010；基盤研究 B2 08454265；12440233；萌芽的研究 10874129；基盤研究企画調査 12894021）等の援助と広島大学総合脳科学研究プロジェクト、日英国際共同研究、ヒューマンフロンティアサイエンス国際共同研究により得られたものであり、浮穴和義、坂本浩隆、臼井真理子、本田陽子、稲井雄人、松永昌宏、朝田憲治、古川康雄、河内千恵、高瀬稔、山崎 岳、小南思郎、長井清香、大石 正、Robert W. Lea, J. A. Clark, G. C. Georgiou 諸氏との共同で行われた。また、研究の実施では国内外の多くの諸先生方（長濱嘉孝、川島誠一郎、安部真一、石居 進、宗岡洋二郎、小林 惇、他）から貴重なご助言を賜った。「心から感謝の意を表します。」

参考文献

- 1) Baulieu EE (1997) Review: Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Rec Progr Hormone Res* 52: 1-32
- 2) Tsutsui K, Ukena K, Takase M, Kohchi C, Lea RW (1999) Review: Neurosteroid biosynthesis in vertebrate brains. *Comp Biochem Physiol C* 124: 121-129
- 3) Tsutsui K, Ukena K (1999) Review: Neurosteroids in the cerebellar Purkinje neuron and their actions. *Int J Mol Med* 4: 49-56
- 4) Tsutsui K, Ukena K, Usui M, Sakamoto H, Takase M (2000) Review: Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. *Neurosci Res* 36: 261-278
- 5) Compagnone NA, Bulfone A, Rubenstein JLR, Mellon SH (1995) Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology* 136: 2689-2696
- 6) Jung-Testas I, Hu ZY, Baulieu EE, Robel P (1989) Neurosteroids: biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology* 125: 2083-2091
- 7) Koenig HL, Schumacher M, Ferzaz B, Do Thi AN, Ressouches A, Guennoun R, Jung-Testas I, Robel P, Akwa Y, Baulieu EE (1995) Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* 268: 1500-1503
- 8) Tsutsui K, Yamazaki T (1995) Avian neurosteroids. I. Pregnenolone biosynthesis in the quail brain. *Brain Res* 678: 1-9
- 9) Tsutsui K, Yamazaki T, Usui M, Furukawa Y, Ukena K, Kohchi C, Kominami S (1997) P450scc activity in the brain. In: Harvey S and Etches RJ (Eds), *Perspectives in Avian Endocrinology*. Journal of Endocrinol Ltd, Bristol, pp 427-436
- 10) Tsutsui K, Usui M, Yamazaki T, Ukena K, Kominami S (1997) Neurosteroids in the avian brain. In: Maitra SK (Ed), *Frontiers in Environmental and Metabolic Endocrinology*. Burdwan Press, Burdwan, pp 151-159
- 11) Takase M, Ukena K, Yamazaki T, Kominami S, Tsutsui K (1999) Pregnenolone, pregnenolone sulfate and cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the amphibian brain and their seasonal changes. *Endocrinology* 140: 1936-1944
- 12) Kohchi C, Ukena K, Tsutsui K (1998) Age- and region-specific expressions of the messenger RNAs encoding for steroidogenic enzymes P450scc, P450c17 and 3 β -HSD in the postnatal rat brain.

- Brain Res 801: 233-238
- 13) Ukena K, Usui M, Kohchi C, Tsutsui K (1998) Cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the cerebellar Purkinje neuron and its neonatal change in rats. *Endocrinology* 139: 137-147
 - 14) Ukena K, Honda Y, Inai Y, Kohchi C, Lea RW, Tsutsui K (1999) Expression and activity of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/^{5 α} -⁴-isomerase in different regions of the avian brain. *Brain Res* 818: 536-542
 - 15) Ukena K, Kohchi C, Tsutsui K (1999) Expression and activity of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/^{5 α} -⁴-isomerase in the rat Purkinje neuron during neonatal life. *Endocrinology* 140: 805-813
 - 16) Matsunaga M, Ukena K, Tsutsui K (2001) Expression and localization of cytochrome P450 17 α -hydroxylase-c17, 20-lyase in the avian brain. *Brain Res* 899: 112-122
 - 17) Ukena K, Honda Y, Lea RW, Tsutsui K (2001) Developmental changes in progesterone biosynthesis and metabolism in the quail brain. *Brain Res* 898: 190-194
 - 18) Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K (2001) Activity and localization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/^{5 α} -⁴-isomerase in the zebrafish central nervous system. *J Comp Neurol*, in press
 - 19) Tsutsui K, Schlinger BA (2001) Review: Steroidogenesis in the avian brain. In: Dawson A and Chaturvedi CM (Eds), *Avian Endocrinology*. Journal of Endocrinol Ltd, Bristol, pp 59-77
 - 20) Tsutsui K, Ukena K, Sakamoto H (2001) Review: Novel cerebellar function: Neurosteroids in the Purkinje neurons and their genomic and nongenomic actions. In: Handa R J and Hayashi S (Eds), *Neuroplasticity, Development, and Steroid Hormone Action*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp 101-116
 - 21) Tsutsui K (2001) Review: Biosynthesis and biological actions of neurosteroids in brain neurons. *Zool Sci*, in press
 - 22) Le Goascogne C, Robel P, Gouézou M, Sananès N, Baulieu EE, Waterman M (1987) Neurosteroids: cytochrome P-450scc in rat brain. *Science* 237: 1212-1215
 - 23) Usui M, Yamazaki T, Kominami S, Tsutsui K (1995) Avian neurosteroids. II. Localization of a cytochrome P450scc-like substance in the quail brain. *Brain Res* 678: 10-20
 - 24) Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T, Ichikawa Y (1998) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: Colocalization of StAR, cytochrome P-450scc (CYP XIA1), and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem* 71: 2231-2238
 - 25) Kawato S, Kimoto T, Ohta Y, Tsurugizawa T, Makino J, Hojo Y, Takahashi T (1999) Localization and activities of neurosteroidogenic systems in the hippocampal neurons. In: Okamoto M, Ishimura Y and Nawata H (Eds), *Molecular Steroidogenesis*. Universal Academy Press, Tokyo, Japan, pp 385-388
 - 26) Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K (2001) Effects of progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis. *J Neurosci*, in press

ヒトデの生殖・胚発生に関する細胞生理化学的研究

広島大学生物生産学部

池上 晋

はじめに

後生動物では、どの動物種でも成体のかたちは多彩だが、初期胚の時期には種に固有の形態の特徴が見られない。発生後期になると胚のかたちはめざましく変化し、種に特有の体のパターンが現れ、次第にそれを展開させてゆく。成体のなかで無限増殖できる細胞は生殖細胞の他にはない。それ以外の細胞はすべてその個体一代限りの細胞である。これらの体細胞が増殖する分裂回数には有限である。卵と精子が受精し、細胞数を増やしてゆく初期発生の間に、胚のどこか定められた場所で細胞の分化の方向が決定され、無限増殖型から有限増殖型へと変化する。個体のなかで卵と精子だけが40億年近い生命の歴史を宿す、超時空的存在であり続けることができる。受精卵が卵割をくり返し、分化した形質を賦与された体細胞になるまでは未分化である。未分化な胚細胞が体細胞

へと分化する過程を辿ることは、体細胞形成過程そのものを理解することである。生物種の特徴が希薄で始原生命の色濃い胚細胞が、種に特有の分子を含有する体細胞へと変換する過程において、細胞核、とくにクロマチンの変化が重要であると思われる。私はヒトデの配偶子形成と胚発生過程で、主に核タンパク質の変化に焦点をあてた研究を進めてきた。以下にその概要を述べる。

1. 精子 - ヒストンの二量化 -

精子は一倍体ゲノムを、胚発生の母体となる卵の中に導入する役割をもつ。したがって、精子は卵に辿りつけるように遊泳能力をもち、サイズが小さいのが普通である。イトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*) の精子には1本の鞭毛があり、染色体はコンパクトに凝縮している。

精子が染色体を高度に凝縮するしくみは動物種によってさまざまである。一般に体細胞の染色体では、4種類のヒストン、H2A、H2B、H3、H4 がそれぞれ2分子ずつ集まって生じたヒストン8量体コアに、145塩基対のDNAが2回巻きついてヌクレオソームを形作る。ヌクレオソームと隣のヌクレオソームの間に位置するリンカー DNA に1分子のヒストン H1 が会合している。このクロマチン構造は精子ではしばしば変造される。硬骨魚類サケ、マスではヒストンの代りに低分子の塩基性タンパク質プロタミンを含む。プロタミンは Arg 残基に富み、Arg のプラス電荷がDNAのリン酸基で中和され、非常に高度な α -ヘリックス構造をとり、染色体を凝縮

する。哺乳類ではシステイン含量の多いプロタミンが含まれ、ジスルフィド架橋によって細胞核の高度な凝縮をもたらされると考えられる。

イトマキヒトデの精子にはプロタミンはなく、ヒストン H1、H2A、H2B、H3、H4 が含まれ、ヌクレオソーム構造を形成している。われわれはイトマキヒトデのコア・ヒストン画分に通常のヒストンの2倍程度の大きさの分子量をもつタンパク質群を見いだした¹⁾。その一つ、p28をリジルエンドプロテイナーゼで分解すると K8 (図1A) と K10 (図1B) の二つのイソペプチドが得られた。p28の構造は最終的にヒストン H2B と H4 が1分子ずつ ϵ -(γ -Glutamyl) lysyl 架橋で共有結合したヒストン二量体 (図1C) であることが明らかになった¹²⁾。この他にヒストン H3 と H4 の二量体も存在する。

このような ϵ -(γ -Glutamyl) lysyl 架橋はトランスグルタミナーゼ (EC2.3.2.13)³⁾ が触媒するトランスアミド化反応によるものと考えられる。トランスグルタミナーゼの酵素活性にはカルシウム・イオンが必要であるが、正常細胞では遊離カルシウム・イオン濃度がきわめて低く、生細胞内でトランスグルタミナーゼによって架橋が生ずることは考えられない。実際にタンパク質の架橋が明らかにされている事例はいずれも細胞外に分泌されたトランスグルタミナーゼ (XIII 因子など) による細胞外成分の架橋であり、細胞内架橋の実例は無かった。ヒトデ精子のヒストン二量体はトランスグルタミナーゼによる架橋反応が生細胞内で生じ得ることを示した初めて

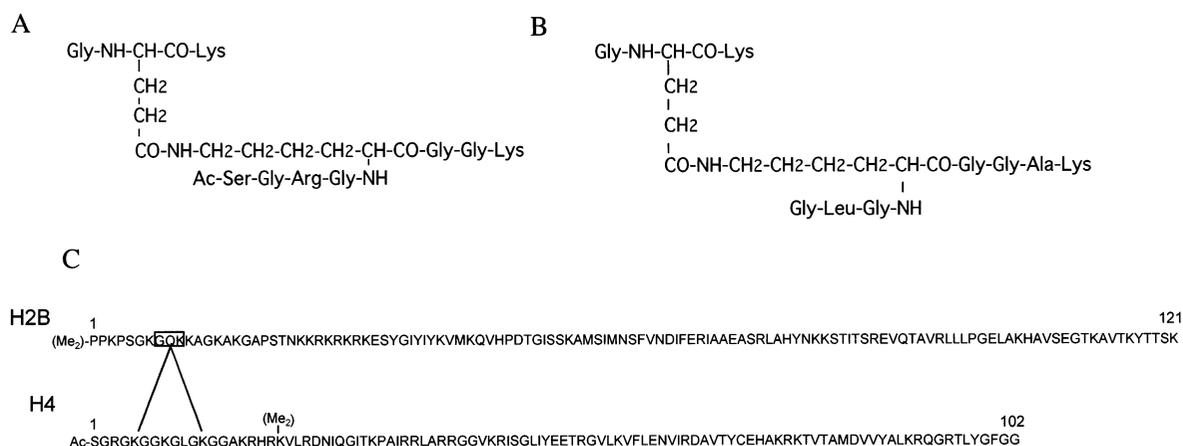


図1 イトマキヒトデ精子 p28の構造。

A. フラグメント K8 の構造。 B. フラグメント K10 の構造。 C. p28 の全構造 (アミノ酸は一文字表記)。p28 は図中の直線で示したイソペプチドのどちらかを含有する二つの異なるヒストン二量体分子である。Me はメチル基を示す。

の事例である。

上に述べた研究結果から、それぞれの種の精子がさまざまな方法で細胞核を高度に凝縮させているが、イトマキヒトデの精子では、ヒストン二量化によってクロマチンをコンパクトにまとめあげていると推定される。

2. 卵形成—核小体タンパク質 NAAP の生成—

卵は受精によって発生を開始し、成体まで達することができる。卵は全能性で、成体を構成するすべての細胞種を生み出すことができるが、それ自体は高度に特殊化した細胞であり、特殊な性質をもつ。十分に発達した卵巣は一次卵母細胞で充たされており、これは卵核胞 (Germinal vesicle) と呼ばれる大きな核が存在する (図 2 A)。核の状態は、第一減数分裂前期への過程を最後のステージで停止し、ディアキネシス期にある。一次卵母細胞では、受精後の胚発生のために大量のリボソームを合成する。リボソームは核小体で合成される。一般に核小体はタンパク質合成のさかんな細胞で著明であり、タンパク質合成を行わない精子には存在しない。イトマキヒトデの場合には卵核胞の中に 1 個の大きな核小体が存在する (図 2 A)。

私たちは卵形成過程で合成される核小体タンパク質を単離し、これを ANO39 と名付けた⁴⁾。ANO39 の DNA をクローニングし、その配列を決定した。ANO39 は RNA や DNA と非選択的に結合することから、Nucleic acid-associated protein (NAAP) 1 および 2 と名付けた 2 種のタンパク質のうち NAAP 1 に相当する (図 2)^{4,5)}。NAAP 2 は NAAP 1 の 51 位の Asn 残基が 1 塩基変異によって Thr 残基に変わったものであり、卵母細胞中に NAAP 1 とほぼ同量存在する。イトマキヒトデの一生で NAAP mRNA が存在するのは一次卵母細胞期だけである。また、この細胞が未熟な時期に多く、十分に発達した一次卵母細胞では NAAP mRNA 含量はきわめて低い⁴⁾。NAAP は典型的な母性タンパク質であって、その存在量は胚発生中変化しない。

NAAP mRNA は卵母細胞の卵核胞で合成され、これが細胞質に移行し、NAAP タンパク質の合成を指令する。細胞質で合成された NAAP が核小体に移行する過程は NAAP cDNA 上流に蛍光タンパク質 Green fluorescent protein cDNA を繋げ、その上流にショウジョウバエ熱ショックタンパク質プロモーターを配置したベクタープラスミド pHEN を卵核胞内にマイクインジェクションすることによって再現することができる。

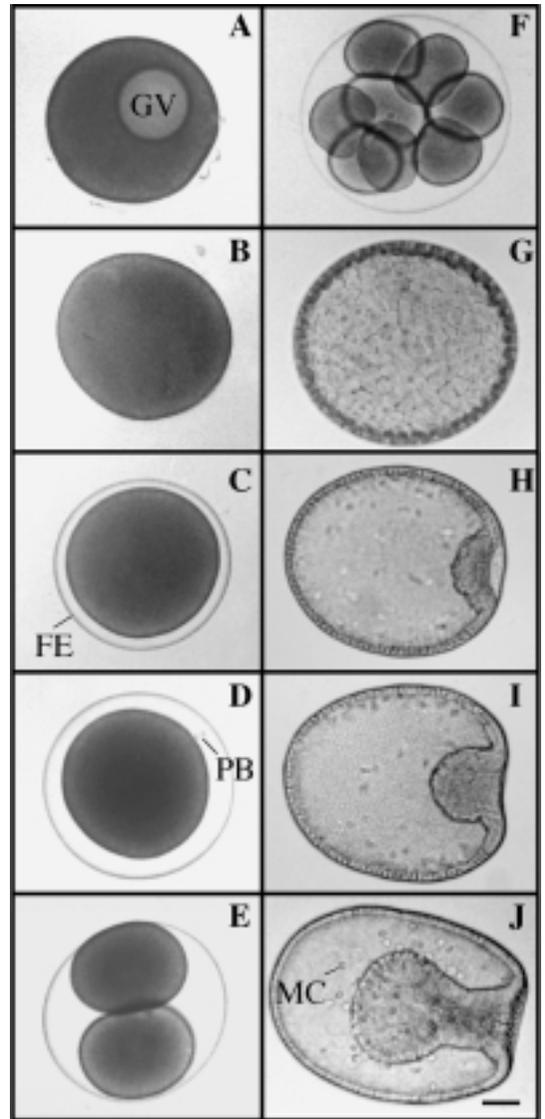


図 2 イトマキヒトデの卵成熟と胚発生。

A. 一次卵母細胞 (GV は卵核胞). B. 成熟卵. C. 受精後 10 分後の卵 (FE は受精膜). D. 減数分裂を完了した受精卵 (PB は極体). E. 2 細胞期胚. F. 8 細胞期胚. G. 中期胚 (8 時間胚). H. 初期囊胚 (15 時間胚). I. 初期囊胚 (16 時間胚). J. 中期囊胚 (24 時間胚). MC は中胚葉性の間充細胞). バーの長さは 50 μ m.

NAAP の核移行には 2 つの酸性クラスターにはさまれた双節型核移行シグナルが機能し、NAAP の核小体移行には C 末端領域が必要であることがあきらかになった。

3. 卵成熟 - NAAP のリン酸化 -

一次卵母細胞は胚発生の準備をほぼ完了しているが、この段階で精子を与えても発生を開始することなく、卵は受精に対して未成熟である。受精可能な卵の状態に達することを卵成熟と呼ぶ。卵成熟では第一減数分裂の再開とともに卵核胞崩壊 (Germinal vesicle breakdown, GVBD) が生ずる (図 2B)。引き続き、2回の減数分裂を経て2個の極体が放出される (図 2D)。卵母細胞はホルモン刺激によって成熟しつつ卵巣から輸卵管へ移行する。さらに海中へと放出され、そこで精子と出会う。ヒトの神経組織に含まれるペプチド性の生殖腺刺激物質は一次卵母細胞を取り囲む濾胞細胞に働いて二次ホルモンともいべき卵成熟誘起物質 1-Methyladenine を産生・分泌する⁶⁾。1-Methyladenine が卵表に作用すると、卵母細胞の細胞質にふくまれる卵成熟促進因子 (Maturation promoting factor, MPF) の前駆体を活性化する。活性化された MPF は Ser/Thr キナーゼとして直接、卵成熟開始の引き金を引く^{7,8)}。

卵成熟にともなう GVBD は核膜の内側を支持する核ラミナの成分が MPF でリン酸化され、可溶化し、最終的に核膜の断片化がもたらされると考えられている。核小体も GVBD に伴って崩壊するが、核小体構成タンパク質がリン酸化され、rRNA-タンパク質相互作用やタン

```

1 Ac-S K E F F W G D S L T G T K K E V K W 19
20 N P S L D D E D D F D N L D S D G I Q H 39
40 F L F L K Q A V L G A N/T A K E G E R N V 59
60 V E I E T E N F D G D N V K Q P L F S L 79
80 K L G L N E S S P L D I G I Q P P V T F 99
100 I L T A G S G P V F L S G Q H M I E I S 119
120 A D D E E E L E E D D E E E E E D E V 139
140 E V N A S P D L P V A K S K K R P L S T 159
160 S D G T A K K T K M A K L D K D A D K K 179
180 E D D D E E E D D E E E D E V M A M M D 199
200 D D E D D E D D E D F E G G E D D E E E 219
220 D E E E S D E D D D E D D N E E E E E 239
240 E D E D E E S P E K P L K T T A K G K K 259
260 G Q M N G T T T A K G D N K P K A K A K 279
280 T D T K L V K G K A K K V L A L D E I 299
300 K G K L Q E S S N V P K K E E K F K N T 319
320 V R S A F H I S E A K K L Q D L W G W F 339
340 R A S L Q K

```

図 3 イトマキヒトデ卵母細胞核小体タンパク質 NAAP 1 (ANO39) と NAAP 2 のアミノ酸配列 (一文字表記)。

p34^{cdc2}/cyclin B でリン酸化されるアミノ酸を口で囲んである。酸性クラスターは実線下線で、双節型核移行シグナルは点線下線で示す。51位のアミノ酸残基は NAAP 1 では Asn, NAAP 2 では Thr である。

パク質 - タンパク質相互作用が消失することによって可溶化され则认为られる。核小体タンパク質 NAAP の Ser¹⁴⁴ 残基 (図 3) は MPF によってリン酸化されるコンセンサス配列 Ser-Pro-X-Z (X はどんなアミノ酸残基でも良く、Z は塩基性アミノ酸) の中にあり、卵成熟が開始すると著しくリン酸化が進行する。Ser¹⁴⁴ のリン酸化エステルは卵成熟、受精、胚発生の全過程を通じて維持される⁵⁾。卵成熟過程では Ser¹⁴⁴ に加えて別の Ser/Thr 残基が一過的にリン酸化される。このようなリン酸化が、多数の核小体タンパク質との会合を離脱させることになる。NAAP の機能は、胚発生の初期に必要な核タンパク質を卵母細胞の段階で核小体に繫留させているが、NAAP の特定部位のリン酸化によってこれらのタンパク質を解き放ち、胚発生過程でそれらの機能を発揮させるものと考えられる。

4. 胚発生 - 発生アンカプラーによる分子過程の解析 -

1) 卵割期から胞胚形成へ - 細胞核の役割 -

成熟卵に精子が貫入すると卵が賦活し、卵の周囲に受精膜が形成される (図 2C)。受精卵はさかんに卵割をくり返す桑実胚となる⁹⁾。イトマキヒトデの卵割は2つの割球のサイズが同じ等割で細胞数が増えてゆく (図 2E)。20 で胚を飼育すると、30分ごとに DNA 複製を伴う有糸分裂をくり返し (図 2F)、8 回目の卵割を終え、細胞数が256となった時点で個々の割球の上皮化がはじまり、胚は一層の細胞層に囲まれた中空のボールになる。これが胞胚であり (図 2G)、この割球の間にセプテート・デスモソームが形成される¹⁰⁾。細胞膜に生じたセプテート・デスモソームが隣接する割球と連結し、球をつくること、これが真の多細胞性統合体としての胚の誕生であり、個体発生の原点である。

私たちは桑実胚と胞胚期の細胞特性の相違をあきらかにするために、発生アンカプラーを胚に与えて影響を調べた。アンカプラーとは生体エネルギー学で、呼吸系の電子の流れと ATP 合成の共役をはずす化合物を指すことばであるが、私は発生進行を細胞周期の進行と脱共役させる化合物を発生アンカプラーと名付けた。その一つが DNA 合成阻害剤アフィディコリン¹¹⁾である。卵成熟での細胞分裂は DNA 合成を伴わない細胞分裂 (減数分裂) なので、卵の成熟過程は予想通り、アフィディコリンによってなんの影響も受けない。しかし、受精卵の卵割は DNA 複製をともなう体細胞分裂であり、卵割はアフィディコリンによって影響を受ける。アフィディコリ

ンの存在下で、受精卵は、約2倍の時間を費やしなが
ら卵割が繰返した¹²⁾。受精卵は8回ないし9回の卵割で対
照胚は胞胚となるが、アフィディコリン処理胚はこの時
点で胞胚に達することなく死に至った。染色体 DNA の
複製は DNA ポリメラーゼ α , δ , ϵ によって触媒される
が、これらのポリメラーゼを選択的に阻害するアフィデ
イコリン中では染色体が複製されず、その結果、卵割に
よって生ずる割球にクロマチンが配分されない。しかし、
割球には染色体を欠く紡錘体が現れ、“無染色体分裂”
が行われる¹²⁾。こうした無染色体分裂をくり返して生じ
た割球は孤立しており、上皮化せず、決して胞胚を形成
しない。桑実胚の細胞周期には G_1 期が欠けており、M
期-S 期- G_2 期で一つのサイクルをなす。桑実胚ではア
フィディコリンによる S 期での DNA 複製の欠落があつて
も、体細胞で見られる G_2 -M 移行時期で見られる DNA
複製チェックポイント、M 期中期から後期への移行時
期で見られる紡錘体会合チェックポイントのような調節
経路は機能せず、正常胚細胞と同じように MPF の活性
化がおこり、細胞分裂が完了できることになる。

イトマキヒトデで見出されたアフィディコリンによる
無染色体分裂は、胞胚期まで多核単一細胞胚のまま発生
進行するショウジョウバエでも追証され、無核の生殖細
胞(極細胞)が生ずることが認められた¹³⁾。無染色体分
裂が多くの後生動物初期胚で可能であり、このことが初
期胚を特徴づける細胞特性であると認識されている。

イトマキヒトデ胚での“無染色体分裂”が桑実胚期の
割球に許され、胞胚形成期に許されないのは胞胚形成に
必要なタンパク質をコードする mRNA の合成不全によ
る可能性が考えられよう。桑実胚期の細胞機能に不可欠
なタンパク質はあらかじめ卵の細胞質に母性 mRNA と
してストックされた mRNA を動員することによって合
成されている。RNA ポリメラーゼ の阻害剤 α -アミニ
チンを受精卵にマイクロインジェクションして飼育する
と、正常に胞胚を形成し、その直後で発生を停止した。
このことから、核を失った割球が上皮化できないのは核
と細胞質に mRNA の受給以外の相互作用が生じ、これ
に割球の生存そのものが依存するためであろうと考えら
れる。

私たちは、枯草菌が生産する細胞膜硬化物質イツリン
A-2 をイトマキヒトデ受精卵に与えると卵割が阻害され
るが核分裂は正常に進行し、多核単一細胞胚を生ずるこ
とを見出した¹⁴⁾。対照胚が胞胚形成する直前、すなわち
単一細胞中の核数が256になるとき、突然、核が崩壊し、

クロマチン同士が融合し、死に至った。胞胚形成前では、
イトマキヒトデの胚もショウジョウバエのようなシンシ
チウムを形成し得るが、胞胚形成後は多細胞性であるこ
とが必要となっている。

上に述べたことを総合すると、胞胚形成では核、細胞
質、細胞膜がそれぞれ勝手にふるまうことが許されなく
なり、それらは相互に依存し合い、一個の細胞としての
全体性、統一性が生ずると考えられる。また、これと歩
調を合わせて、胚細胞が他から分離されて独立に分裂す
る能力を失い、個体としての統一性が生じ、個体として
の最初の形態形成を始めることになる。

2) 原腸形成と胚葉分化 - ヒストン修飾の関与 -

胞胚期に入ると少数の細胞の細胞周期に G_1 期が出現
し、細胞周期が進行する時間が遅れ、それまでの卵割の
同調性が崩れてゆく。次第に G_1 期にある細胞数が多く
なり、転写速度は漸増する。受精後10時間ぐらいにな
ると胚は胞胚期中期に達する。それまでの核は大きく、核
小体が存在しないが、この時期を少し過ぎると核はコン
パクトになり、核小体が出現する。NAAP は胞胚期初
期までは細胞質に存在するが、核小体の形成とともにこ
れに局在するようになる。

胞胚期後期に至り、それぞれの割球の外側に繊毛が生
じ、受精膜内で胚が回転を始め、続いて胚は孵化し、遊
泳する。孵化して1~2時間すると植物極側の上皮細胞
層が肥厚し、胞胚腔内へと陥入し、原口が生ずる(図
2H)。原腸は胞胚腔内を伸び(図2I)、受精後22時間ご
ろになると、先端部が薄くなり、中胚葉性の間充細胞
が生じ、これが遊離し、胞胚腔内を移動するようになる
(図2J)。その後、原腸の先端部がさらに伸長し、将来
生ずる幼生の腹面側に傾き、その位置にあたる外胚葉性
の体壁に口陥が形成される。受精後40時間のピピンナリ
ア期幼生となって口陥は原腸の先端と連絡して口を形成
し、原口は幼生の肛門になる。Dan-Sohkawa ら¹⁵⁾ は、
囊胚を解離して集合させると初めの細胞塊は不定形の胞
胚様の中空の袋を生ずるが、これがピピンナリア幼生と
なることを見出した。三胚葉細胞はすでに分化しており、
胚の解離と再構築によっても、いったん決定された細胞
分化の方向は変更できないことがあきらかにされている。

私たちは、この囊胚形成過程の分子基盤を探るために、
受精卵に作用させると、初期の卵割期、胞胚期の過程は
正常に進行するが、原腸陥入した後で発生進行を停止さ
せる発生化学物質を探索した。その結果、放線菌

Streptomyces sioyaensis が生産する抗カビ性物質として知られていたトリコスタチン A¹⁶⁾を見出した。これをイトマキヒトデ受精卵に与えて飼育すると、卵割、胞胚形成、原腸陥入には影響を与えないが、間充織細胞の形成が阻害され、この時点で発生が停止がもたらされた。トリコスタチン A が作用する時期は胞胚期中一後期の4時間に限られており、受精時からこれより前まで処理して洗い去っても発生が中断が生じない。また、この時期より後から処理を始めても発生が停止は起こらない。トリコスタチン A は 1 ng/ml で発生を囊胚前期で停止させるが、これより一万倍高い濃度で処理しても発生停止の時期は変わらない¹⁷⁾。したがって、作用はきわめて特異的であり、その一次標的は特定のマスター分子であることが予想された。Yoshida ら¹⁸⁾はトリコスタチン A がヒストンデアセチラーゼの選択的阻害剤であることを明らかにした。ヒストン 8 量体コアから飛出したヒストン H4 の N 末端領域に位置する Lys 残基の ε-アミノ基がアセチルトランスフェラーゼによってアセチル化され、ヒストン・デアセチラーゼでアセチル基が脱離する(図 4)。哺乳類の体細胞では、ヒストン・デアセチラーゼ活性が阻害されることによって細胞内に高アセチル化ヒストンが蓄積すると、細胞周期は G₁ または G₂ 期で停止する¹⁸⁾。トリコスタチン A がイトマキヒトデ胚に高アセチル化をもたらすのは中期胞胚期に限らない。しかし、中後期胞胚期でのヒストン高アセチル化が、中胚葉分化(間充織細胞形成)阻害をもたらし、これによって囊胚前期で発生が停止することは、この時期にヒストンの N 末端に位置する Lys 残基の ε-アミノ基のアセチル化

が重要な影響を与える生体反応が存在することが示唆される。私たちは、精子の項で述べた p28 の合成がこの時期で行われること、トリコスタチン A 処理を施した胚では p28 の合成が阻害されることを見出した²⁾。p28 はヒストン H2B と H4 を基質としたトランスグルタミナーゼの架橋反応生成物である。ヒストン H4 のアミノ末端領域の Lys 残基の ε-アミノ基がアセチル化されると(図 4)、この基がトランスグルタミナーゼのアミノ基供与体として機能できず、p28 の合成が阻害されることになる。これによって発生停止がもたらされる可能性が考えられる。

p28 は精子に最も多く存在するが、卵、初期胞胚期には存在せず、中期胞胚期以降の胚、幼生、成体に出現する。これは NAAP が精子、幼生や成体に存在せず、卵と初期胚だけに存在するのと好対照である。NAAP が生の実現にとって不可欠なタンパク質合成の機構づくりに係わる分子であるのに対し、ヒストン二量体は、その構造から推測すると、染色体複製を妨げ、細胞分裂の停止をもたらす、畢竟、死を具現する分子である対比できよう。

私を本研究に導いて下さり、ご指導を頂いた恩師、東京大学田村三郎名誉教授、元国立基礎生物学研究所所長故金谷晴夫博士に深く感謝する。また、アフィディコリン研究は元東京大学医学部長野 弘博士、元東北大学理学部故平井説郎博士、元田村研究室岡野桂樹博士(現、秋田県立大学生物資源学部)、ヒストン二量体研究は大阪大学下西康嗣名誉教授、大阪大学蛋白質研究所高尾敏文博士、東京大学別府輝彦名誉教授(現、日本大学生物資源科学部)、東京大学大学院農学生命科学研究科吉田稔博士、NAAP 研究は東京工業大学大学院生命工学研究科浜口幸久教授、超微細形態については名古屋市立大学自然科学研究教育センター加藤宏一教授、分子構造研究については広島大学機器分析センター太田伸二博士のご協力を賜った。これらの方々と、広島大学で私の研究室に在籍し、ともに研究を進めてきた教官、院生、学生諸氏に厚く御礼申し上げる。

参考文献

- 1) Shimizu, T., Hozumi, K., Horiike, S., Nunomura, K., Ikegami, S., Takao, T., & Shimonishi, Y. (1996) Nature 380, 32.
- 2) Shimizu, T., Takao, T., Hozumi, K., Nunomura, K.,

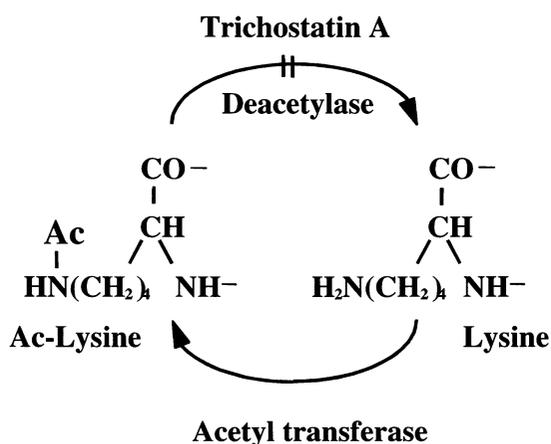


図 4 トリコスタチン A によるヒストン高アセチル化。

- Ohta, S., Shimonishi, Y., & Ikegami, S. (1997) *Biochemistry* 40, 12071-12079.
- 3) Folk, J. F. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49, 517-531.
 - 4) Nakajima, H., Matoba, K., Matsumoto, Y., Hongo, T., Kiritaka, K., Sugino, H., Nagamatsu, Y., Hamaguchi, Y., & Ikegami, S. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267, 295-304.
 - 5) Matoba, H., Matsumoto, Y., Hongo, T., Nagamatsu, Y., Sugino, H., Shimizu, T., Takao, T., Shimonishi, Y., & Ikegami, S. (2000) *Biochemistry* 39, 6390-6400.
 - 6) Kanatani, H. (1973) *Intern. Rev. Cytol.* 35, 253-298.
 - 7) Doree, M. (1990) *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 269-273.
 - 8) Kishimoto, T. (1999) *Dev. Biol.* 124, 1-8.
 - 9) Tsuchimori, N., Miyashiro, S., Shibai, H., & Ikegami, S. (1988) *Development* 103, 345-351.
 - 10) Dan-Sohkawa, M., & Fujisawa, H. (1980) *Dev. Biol.* 77, 328-339.
 - 11) Ikegami, S., Taguchi, T., Ohashi, M., Oguro, M., Nagano, H., & Mano, Y. (1978) *Nature* 275, 458-459.
 - 12) Nagano, H., Hirai, S., Okano, K., & Ikegami, S. (1981) *Dev. Biol.* 85, 409-415.
 - 13) Raff, J. W., & Glover, D. M. (1989) *Cell* 57, 611-619.
 - 14) Tsuchimori, N., Miyashiro, S., Tsuji, T., Kida, T., Shibai, H., & Ikegami, S. (1986) *Dev. Growth Differ.* 28, 619-627.
 - 15) Dan-Sohkawa, M., Yamanaka, H., & Watanabe, K. (1986) *J. Embryol. Exp. Morph.* 94, 47-60.
 - 16) Tsuji, N., Kobayashi, M., Nagasawa, K., Wakisaka, Y., & Koizumi, K. A. (1976) *J. Antibiot.* 29, 1-6.
 - 17) Ikegami, S., Ooe, Y., Shimizu, T., Kasahara, T., Tsuruta, T., Kijima, M., Yoshida, M., & Beppu, T. (1993) *Roux's Arch. Dev. Biol.* 202, 144-151.
 - 18) Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., & Beppu, T. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 17174-17179.

日本動物学会奨励賞 研究の内容

脊椎動物の進化の背景にある遺伝子レベルの進化に関する研究 - 後口動物の **Ontogeny and Phylogeny**

京都大学大学院理学研究科附属瀬戸臨海実験所
和田 洋

1, はじめに

生物学の魅力の一つはそのダイナミックな姿にあると思う。一つの卵が顕微鏡の下で卵割を繰り返し、幼生の形を作り上げていく様子は、生物のダイナミックな姿を最もよく表現しているときかもしれない。その精緻に統制されて進んでいく様子には、少しの変更も許されないようにすら思える。ところが、生物はその統制された発生過程を巧みに操り、改変を加えて、多様な形を作り上げていった。私はこのようなダイナミズムを操りつつ多様性を作り上げていった過程を理解したいと思い、後口動物の進化について研究してきた。形態の進化を理解するには、発生過程を比較し、その中から共通点と相違点をあぶり出し、最終的な形態の違いと照らし合わせることで研究が進んでいく。ただ、発生過程は現生の動物以外で知ることは困難であり、必然的に現生種間での比較に頼ることになる。その比較から進化過程を推測していくためのよりどころとして、それらの系統関係をできる限り正確に把握することが、とても大切である。そのような経緯で、私の研究は比較発生学 (Ontogeny) と分子系統学 (Phylogeny) の二本立てで進んできた。

2, 分子系統学

当時高次分類群の系統解析に広く用いられていた18S rDNA を指標として、後口動物の系統関係について解析した。ここでは、後口動物が単系統群であること、頭索動物と脊椎動物が近縁であること、尾索動物は単系統群であることなどを報告した⁽¹⁾。これらの結果は、その頃の分子系統学が従来の分類体系を覆したりするなどの華々しい(?) 成果を上げていたことを考えるとそれほどインパクトの大きなものではなかった。ただ、比較発生学の土台として考える上では、分子系統と従来の分類体系が一致したという結果を心強く受け止められた。また、ホヤなどの尾索類の中で、オタマボヤ類が最も早く分岐したことを示し、脊索動物の祖先は、固着性ではなく、自由遊泳性であったことを類推した点は、脊椎動物の進

化に関して一つの論点を提供できたのではないかと思っている^(1,2)。その後、18S rDNA から得られた系統の信頼性を確かめるために、ミトコンドリアの遺伝子配置や遺伝子のエクソン-イントロン構造をもとにして検証する研究を行った。このテーマは、分子生物学を行うための実験設備のほとんど整っていない白浜の瀬戸臨海実験所に赴任した直後に、何を始めることができるだろう？と考え、PCR だけで結果を出せるテーマとしてはじめたものだ。アミノ酸配列のデータはほぼ出そろっていたので、イントロンの位置は PCR だけでほぼ把握できると考えられた。しかし、予想以上にイントロンの挿入欠失は頻繁に起こっており、系統解析の指標には使いづらいことがわかった⁽³⁾。ちょっと残念。

これらの研究とあわせて、ホヤや棘皮動物では比較的低次の分類群の分子系統解析も行い、ホヤの無性生殖が独立に複数回進化したこと⁽⁴⁾、現生の棘皮動物 5 綱の中ではウニとナマコが近縁であること⁽⁵⁾、ヒトデの中ではスナヒトデ科が原始的であり、ブラキオラリア幼生を経ない発生型が原始的である可能性などを報告した⁽⁶⁾。ヒトデの系統関係については、現在富山大の小松先生との共同研究として大学院生の松原さんが引きついで解析をしてくれている。

比較発生をやりたくてしょうがなかった僕としては、来る日も来る日もシーケンスをやり、生き物の姿を眺めることのできなかつた日々はそれほど楽ではなかつた。しかし、今振り返ると、遺伝子の分子進化についてしっかり考える時間をもてたことは、比較発生学の中で遺伝子の進化と形態の進化を結びつける研究をする上でも大変貴重だったと感じている。

3, 比較発生学

< Pax3/7 >

比較発生学では、特に脊索動物における神経管の進化に焦点をあてて行ってきた。というよりは、そちらに引き込まれていったと言う方が正しいかもしれない。そもそも始まりは、ホヤやナメクジウオに見られるオタマジャクシ型の体制は、棘皮動物などのディブルールラ型の幼生が反口側にせり上がったとする Garstang の仮説を検証したいということだった。この仮説によると、ウニの繊毛帯は神経管の背側に相当する。そうであれば、脊椎動物の神経管の背側で発現する *Pax3/7* が繊毛帯で発現しているかもしれないと考えて、ウニの *Pax3/7* を調べようとした⁽⁷⁾。ところが、ウニの *Pax3/7* は一向に

単離できず、並行して行っていたホヤからは単離できたので、そちらの解析をしていった。このホヤの *Pax3/7* は予想通り、神経管の背側に分化する細胞で発現していた⁽⁸⁾。この遺伝子を受精卵への mRNA の顕微注入により神経管の腹側で強制発現させてやると、本来は神経管の背側の細胞から分化する予定色素細胞でしか発現しない *tyrosinase* が腹側でも発現するようになることを示し、*Pax3/7* 遺伝子がホヤでも神経管を背側化させる機能をもつことを示した⁽⁹⁾。このようにして、オタマジャクシ型の体制がホヤと脊椎動物の共通祖先で進化し、神経管もそこで進化したが、その段階で既に背腹軸に沿った分化に *Pax3/7* が関与していたと推測できた。

一方の棘皮動物の *Pax3/7* に関しても、未だあきらめきれず、現在大学院生の梶君が再度チャレンジしてくれている。もしかすると神経管の背腹軸に沿った分化の機構は、ディブルールラ幼生の口側反口側の分化と、それに付随する繊毛帯の形成機構に、その原型が探れるかもしれないと期待している。

< Pax2/5/8 >

Pax3/7 遺伝子を解析していく過程でもう一つの *Pax* 遺伝子: *Pax2/5/8* を手に入れることができた。この遺伝子は僕を神経管のもう一つの軸、前後軸に沿った分化に引き込んでいった。*Pax2/5/8* 遺伝子は、脊椎動物の神経管の前後軸に沿った分化で、オーガナイザーとしての機能を持つ中脳後脳境界の発生に関わる。ホヤにおける相同遺伝子 (*HrPax258*) は、神経管において *Otx* の発現する細胞と *Hox1* の発現する細胞にはさまれた細胞で発現しており、ホヤの神経管が *Otx* を発現する領域、*Pax2/5/8* を発現する領域、*Hox* 遺伝子群を発現する領域の 3 つの領域に分けることができることがわかった⁽¹⁰⁾。この 3 つの領域は脊椎動物の神経管の [前脳 + 中脳] [中脳後脳境界] [後脳 + 脊髄] に相当し、この 3 領域への分化が脊索動物の祖先まで遡れることがわかった。

このようにホヤと脊椎動物の共通点ばかりを見てしまうと、ホヤが脊椎動物に見えてきてしまう。進化は違いを生み出すものであり、その違いを生み出す過程を研究したかつたつもりが、結果的には同じところにばかり目が行ってしまっていた。そこで、もう少し違いにこだわった研究をしたくなつた。

< Hox >

当時ポスドクをしていたイギリスで「遺伝子が新しい

発現を獲得する」という現象が遺伝子進化と形態の進化を結びつける鍵ではないかと考えた。ボスである Peter Holland と話し、ラボのメインテーマであったナメクジウオの *Hox* を使ってこのテーマに取り組むことにした。ナメクジウオの *Hox* 遺伝子のエンハンサーをマウスに導入し、逆にマウスの *Hox* 遺伝子のエンハンサーをナメクジウオに導入するプロジェクトをはじめた。Peter のラボでは自前でマウスを使った実験はできなかったため、当時 Mill Hill にいた Miguel Manzanarez と Robb Krumlauf と共同で進めることにした。このプロジェクトはかなり博打的な色合いも強く、たとえナメクジウオとマウスが転写制御に関して相関システムを用いていたとしても、マウスのトランスの因子がナメクジウオのシスエレメントと相互作用できるかどうかはわからない。何せ7億年近く独自の道を歩いてきたものたちである。そこで、博打的な研究の保険の意味を加えつつ、ナメクジウオ自身での *Hox* の発現をしっかりと調べておくことにし、ナメクジウオでは *Hox* コードは神経管でだけ機能していることを確かめた。すなわち *Hox* 遺伝子は、脊椎動物の祖先で、神経冠での新しい発現を獲得したことがわかった⁽¹¹⁾。一方でマウスにナメクジウオのエンハンサーを導入する実験は予想以上にうまくいった。ナメクジウオのエンハンサーの中から脊椎動物の神経冠で発現を活性化するのが見つかった。さらに、そのエンハンサーはレチノイン酸によって制御されていることもわかったので、レチノイン酸シグナルを *Hox* 遺伝子の発現に伝達するシステムが神経冠での新しい機能を獲得したことが鍵となったことがわかった⁽¹²⁾。現在レチノイン酸シグナルを伝達するシステムがどのように神経冠での機能を獲得したかについて研究を行っている。神経冠の前後軸に沿った位置価は、脊椎動物の顔面の形成に必須であり、その情報は *Hox* の発現としてコードされている。したがって、*Hox* 遺伝子が神経冠で新しい発現を獲得するのに必要なエンハンサーの進化を分子進化として理解できれば、顔面という形態の進化と分子進化を結びつけることができる。少しずつ、違いを理解するための研究になってきた。

< 神経冠 >

この *Hox* の研究から神経冠の進化を考えるようになると、以前行ったホヤの *Pax3/7* の研究が気になってきた。*HrPax-37* は先述のように神経管の背側に分化する細胞で発現しているが、将来背側正中線上の表皮になる

細胞でも発現していた。この発現は、脊椎動物の *Pax3/7* 遺伝子が神経冠細胞で発現していることと比較できると考えられた⁽⁹⁾。同じ頃ナメクジウオの *Dll* 遺伝子の発現からも同様の議論が行われ⁽¹³⁾、神経冠がホヤやナメクジウオの背側正中線上の表皮に起源を持つという仮説が真実みを帯びてきた^(14, 15)。そうであるとなると、脊椎動物の神経冠は新しい細胞タイプが誕生したと考えるよりも、起源となった細胞が移動能や多分化能さらには前後軸に沿った位置価を獲得した結果進化してきたものであると考えられる。そして、まさにそれらの新しい性質こそが脊椎動物を特徴付ける複雑な顔面の形成に鍵となるものであったと言える。先述の研究はこの前後軸に沿った位置価の進化と関わるが、現在神経冠細胞の脱上皮化の進化についても取り組んでいる。

< 脊椎骨 >

脊椎動物で新しく進化してきたもう一つの形質である脊椎骨についても、その進化に背景にあった遺伝子レベルでの進化について考えている。ここでも *Pax* 遺伝子であるが、*Pax1/9* のホヤ相同遺伝子が鰓裂でのみ発現していることがわかっており⁽¹⁶⁾、脊椎動物 *Pax1/9* も硬節に加えて鰓裂でも発現していることから、ホヤと脊椎動物の祖先で *Pax1/9* は鰓裂でのみ機能していたが、脊椎動物で新たに硬節での発現・機能を獲得したと考えられる。さらに、硬節での *Pax1/9* の下流に脊椎骨細胞の分化に関わる *scleraxis*, *Sox9* や *CBFA1* などの遺伝子が脊椎骨分化の一つの転写制御システムに取り込まれ、その下流にコラーゲンなどの構造遺伝子が制御されるようになり、脊椎骨という新たな組織が進化したと考えられる。そこで、まず *Pax1/9* の硬節での発現の進化をエンハンサーのゲノム上での分子進化と結びつけることを試みている。これにより、脊椎骨進化の背景にあるゲノム DNA 上の分子進化を明らかにしたい。さらに *scleraxis*, *Sox9* や *CBFA1* など脊椎骨の分化形成に関わることの知られている遺伝子をホヤから単離し、その遺伝子の発現・機能と、脊椎骨形成の分化カスケードに取り込まれていった分子進化的な過程を明らかにしていきたいと考えている。

4, これから

これまでの比較発生学の成果は、多細胞動物の形態形成が、非常によく似た遺伝子によって行われていることを明らかにしてきた。現在我々に投げられている問は、

このよく似たシステムを使いながら、どのようにして形態の多様性を生み出しているかと言うことである。その答えの一つが、遺伝子が新しい発現を獲得し、新しい機能を持つようになったことではないかと考えている。また、新しい発現は新しいエンハンサーと結びつけることもでき、ゲノム DNA の分子進化とも結びつけることができる。つまり、遺伝子の新しい発現を獲得する機構を明らかにすることで分子進化と形態進化を結びつけることも可能になる。これからもしばらくは形態進化を遺伝子進化に結びつける研究の一つの方向性として、「遺伝子が新しい発現を獲得する」現象に取り組んでいきたい。実は、この遺伝子の新しい発現はこういうエンハンサーの進化によるという研究結果はほとんど報告されていない。したがってしばらくは、記載的な研究になるかもしれないが、その積み重ねから、遺伝子が新しい発現を獲得するメカニズムに何らかのロジックを見つければよいと思っている。先述の *Hox* 遺伝子の神経冠での新しい発現や、*Pax1/9* の硬節での新しい発現に関わるエンハンサーの進化は、できるだけ早く結論を出したい。しかし、そのエンハンサーの進化からは数億年が経過しており、分子進化の過程が推測できるかどうかはわからない。そこで、現在はより近縁な種間比較の中で、新しいエンハンサーを探る試みもしている。棘皮動物の幼生には、ウニやクモヒトデのブルテウスのようなしっかりした骨格を持つものと、ヒトデのピピンナリアのような骨格を持たないものがある。ウニで骨格の進化に関わる遺伝子をヒトデから単離し、骨格の有無を遺伝子の発現の有無と結びつけ、新しいエンハンサーにまで遡れないかと、大学院生の松原さんと取り組んでいる。また、もっと近縁な種間での比較として、ナガウニの同属別種間でも見られるような骨格形態の変異について、発生過程を比較したいと考えている。ナガウニ幼生骨格の多様性を詳細に調べてきた大学院生の金城さんが我々のグループに加わってくれたおかげで、考えることのできたテーマである。道のりは長いかもしれないが、遺伝子発現にまで還元できればエンハンサーの進化に関して非常にきれいな結果が出せるのではないかと期待している。

最後に、ここに述べた研究は、院生時代の恩師である佐藤矩行教授、イギリスでのポストドク時代のボス Peter Holland 教授の指導、激励のおかげで進めてくることができた。心から感謝の意を表したい。また、絶えず激励をしていただいたホヤの先輩研究者の方々にもお礼の意を表したい。旧動物学教室の狭い部屋での佐藤研時代を

ともにした同僚諸氏、Reading で一緒にビールを飲んだ colleagues、立ち上がったばかりの研究室で一緒に苦労してくれている大学院生にも感謝したい。

文献

- (1) H. Wada and N. Satoh (1994) Details of the evolutionary history from invertebrates to vertebrates, as deduced from the sequences of 18S rDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1801-1804.
- (2) H. Wada (1998) Evolutionary history of free swimming and sessile lifestyles in urochordates as deduced from 18S rDNA molecular phylogeny. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1189-1194.
- (3) H. Wada, M. Kobayashi, R. Sato, N. Satoh, H. Miyasaka and Y. Shirayama (2001) Dynamic insertion-deletion of introns in deuterostome EF-1 α genes. *J. Mol. Evol.* in press.
- (4) H. Wada, K. Makabe, M. Nakauchi and N. Satoh (1992) Phylogenetic relationships between solitary and colonial ascidians, as inferred from the sequence of the central regions of their respective 18S rDNAs. *Biol. Bull.* 183, 448-455.
- (5) H. Wada and N. Satoh (1994) Phylogenetic relationships among extant classes of echinoderms, as inferred from sequences of 18S rDNA, coincide with relationships deduced from the fossil record. *J. Mol. Evol.* 38, 41-49.
- (6) H. Wada, M. Komatsu and N. Satoh (1996) Mitochondrial rDNA phylogeny of the Asterozoa suggests the primitiveness of Paxillosida. *Mol. Phylogenet. Evol.* 6, 97-106.
- (7) W. Garstang (1928) The morphology of the tunicata, and its bearings on the phylogeny of the chordata. *Q. J. Microsc. Sci.* 72, 51-187.
- (8) H. Wada, P. W. H. Holland and N. Satoh (1996) Origin of patterning in neural tubes. *Nature*, 384, 123.
- (9) H. Wada, P. W. H. Holland, S. Sato, H. Yamamoto and N. Satoh (1997) Neural tube is partially dorsalized by overexpression of *HrPax-3/7*: the ascidian homologue of *Pax-3* and *Pax-7*. *Dev. Biol.*, 187, 240-252.
- (10) H. Wada, H. Saiga, N. Satoh and P. W. H. Holland

- (1998) Tripartite organization of the ancestral chordate brain and the antiquity of placodes: insights from ascidian *Pax2/5/8*, *Hox* and *Otx* genes. *Development*, 125, 1113-1122.
- (11) H. Wada, J. Garcia-Fernandez and P. W. H. Holland (1999) Colinear and segmental expression of amphioxus *Hox* genes. *Dev. Biol.*, 213, 131-141.
- (12) M. Manzanares, H. Wada, N. Itasaki, P. A. Trainor, R. Krumlauf and P. W. H. Holland (2000) Conservation and elaboration of *Hox* gene regulation during evolution of the vertebrate head. *Nature* 408, 854-857.
- (13) N. D. Holland, G. Panganiban, E. L. Henyey, L. Z. Holland (1996) Sequence and developmental expression of *AmphiDll*, an amphioxus *Distal-less* gene transcribed in the ectoderm, epidermis and nervous system: insights into evolution of craniate forebrain and neural crest. *Development*, 122, 2911-2920.
- (14) H. Wada (2001) The origin and evolution of the neural crest: a hypothetical reconstruction of its evolution. *Dev. Growth Differ.* in press.
- (15) H. Wada (2001) The origin of the neural crest and insights into evolution of the vertebrate face. in "Proceedings of the first international symposium on the biology of ascidians (ed. H. Sawada) Springer-Verlag, Tokyo, p.235-240.
- (16) M. Ogasawara, H. Wada, H. Peters and N. Satoh (1999) Developmental expression of *Pax1/9* genes in urochordate and hemichordate gills: insight into function and evolution of the pharyngeal epithelium. *Development*, 126, 2539-2550.

ゾウリムシ収縮胞をモデルとした細胞膜ダイナミクスの研究

(財) 東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所
谷 知己

1. はじめに

生きたゾウリムシを光学顕微鏡でみたことのあるひとは、この単細胞生物の細胞内に存在する2つの小胞が、正確なリズムをもって拍動していることに気付くだろう。収縮胞系 (contractile vacuole complex) である。この細胞内小器官は、ゾウリムシのみならず、湿った土壌中に住む粘菌アメーバや、淡水に棲むアメーバ、鞭毛虫、繊毛虫、さらには淡水海綿の細胞にも見られる。その役割は、細胞内浸透圧調節にある。淡水の浸透圧は細胞内液のそれよりも低い。これらの細胞は、浸透圧差によって細胞外から細胞内に浸透する水を、収縮胞系を用いて細胞外に排出することにより、細胞内の浸透圧を調節している。

ゾウリムシの収縮胞系は、その形態的な特徴によって、いくつかの部分に分けられている。光学顕微鏡で観察すると、ほぼ球形の膜小胞と、これを中心にして放射状に並んだ数本の細長い膜小胞が、周期的に膨張と弛緩を繰り返しているのを見ることが出来る。中心の膜小胞は収縮胞 (contractile vacuole) と呼ばれ、これを取り囲む膜小胞は放射腕 (radial arm) と呼ばれている。電子顕微鏡観察によって、この放射腕からは、スポンジ状の滑面膜 (smooth spongiome) を介して、液胞型プロトンポンプがぎっしりと並んだ、盲管のチューブ状膜 (decorated spongiome) が多数発生していることが明らかとなっている⁽¹⁾。この液胞型プロトンポンプは、細胞内から収縮胞内への水輸送に関わっていることが、阻害剤などを用いた実験から示されている⁽²⁾。

これまでに、このゾウリムシ収縮胞系を実験材料とした研究は大きく2種類に分けられる。ひとつは、細胞内から収縮胞膜を介して収縮胞内に水が輸送されるメカニズムの研究である。もうひとつは、収縮胞内に蓄積された水が細胞外に排出される際に見られる、膜の融合や離脱、張力変化などの、膜ダイナミクスの研究である。本研究はこのうちの後者をテーマとして取り上げている。ゾウリムシの収縮胞は、直径10 - 20ミクロンである。膜小胞の融合離脱、開口放出、張力変化などの膜ダイナミクスを、電気生理学や顕微鏡操作の技術を用いて調べる上

で、この細胞内小器官は十分な大きさを持っている。このような理由から、ゾウリムシの収縮胞を実験材料とした膜ダイナミクスの生理学的研究がはじまった。場所はハワイ州オアフ島にあるハワイ大学パシフィックバイオメディカルリサーチセンター。ここに、長年ゾウリムシの食胞や収縮胞を材料として、細胞膜ダイナミクスの研究を続けている細胞生物学者リチャード・アレンと、私のかつての指導教官で、筑波大学退官後に椰子の実のごとくオアフ島の岸辺に流れ着いた生理学者内藤豊が、電子顕微鏡観察手法と電気生理学的手法を組み合わせたゾウリムシ収縮胞の研究プロジェクトを立ち上げていた。1998年4月、ポストドクとして私はこの場所に赴いた。

2. インヴィトロ収縮胞

さて、ゾウリムシ細胞内における収縮胞系の水排出サイクルは、膜融合によって収縮胞と放射腕が連結することに始まる。細胞内から放射腕に取り込まれた水が収縮胞に送り込まれることによって、収縮胞は徐々に膨らんでゆく。ある程度水を蓄積した段階で収縮胞は突然真球状になり、放射腕との連絡を切断する。引き続いて、ポアと呼ばれる、直径1ミクロン、長さ1ミクロンほどの円筒形の開口装置内部で、細胞外液と接する細胞膜と収縮胞膜との融合が起こり、収縮胞内に蓄積されていた水が細胞の外に排出される。放射腕膜との乖離、ポアにおける細胞膜との融合は、かならず収縮胞の球形化に引き続いて起こる。すなわち、収縮胞の球形化は、収縮胞の水排出過程における膜の融合離脱を制御している。

収縮胞の球形化は、一定体積の水を包み込む収縮胞膜の表層張力増大によって引き起こされると考えられる。収縮胞の周期的な表層張力変動のメカニズムを調べるためには、収縮胞を、その活性を維持したまま細胞の外に取り出すことが出来ると都合がよい。収縮胞が細胞外に取り出された後も、その表層張力を変動させることを見つけたのは、私の前にポストドクとしてハワイにいた富永貴志である⁽³⁾。この発見を受けて、私は細胞外に取り出された収縮胞が長時間、その表層張力を変動させることのできる実験系の開発をおこなった⁽⁴⁾。ミネラルオイル中に封入されたゾウリムシをとりまく細胞外液を可能な限り取り除いた後に、収縮胞近傍の細胞膜を切開し、少量の細胞内液と共に収縮胞を取り出す。収縮胞は薄い細胞内液層に包まれて、ミネラルオイルとカバーガラスの間に挟み込まれているので、弛緩時にはミネラルオイルと細胞内液層の間に発生した界面張力によって押しつ

ぶされ、偏平な形をしている。しかしながら、表層張力増大時には、この界面を押し上げて球形化する。このインヴィトロ収縮胞は、摘出から30分程度、30秒から1分の周期で、表層張力の増大（球形化）と減少（偏平化）を繰り返す。ここで強調したい点は、このインヴィトロ収縮胞の表層張力変動には、収縮胞内外への水の出入りは関係ないことである。細胞外にとりだした収縮胞は、細胞膜上に残された開口装置ともはや相互作用することが出来ないで、蓄積した水を外に排出することはできない。また、放射腕を伴わないインヴィトロ収縮胞内に、水が新たに供給される事はない。

3. 表層張力変動の周期とタイミングを決めるもの

この周期とタイミングを決めているものは何であろうか。取り出した収縮胞を、微細なガラス針を用いて切断してみる。すると、切断によって生まれた2つの膜小胞は、直径1ミクロン程度のガラス針によって隔てられているだけであるにも関わらず、各々独立な周期とタイミングで表層張力の増大と減少を繰り返す。このことは、2つの膜小胞を取り囲む細胞内溶液中の液性因子によって、表層張力変動の周期とタイミングが一義的に決められているわけではないことを示唆している。

2つの膜小胞を分け隔てていたガラス針を取り除いてみる。2つの小胞がいずれも弛緩状態にある場合のみ、膜の融合が見られる。融合してひとつになった膜小胞は再び表層張力を周期的に変動させる。ここで興味深い現象に気がついた。融合させる前の2つの膜小胞にみられる表層張力変動の周期と、融合させたあとの1つの膜小胞にみられる周期を比較すると、融合後の周期は、融合前の2つの膜小胞にみられる周期のうち、短い方のそれに一致する傾向が見られたのである。融合した膜小胞の中で、融合前に短い周期を持っていた膜小胞に由来する部分が、なんらかの仕組みで、長い周期を持っていた膜小胞に由来する部分の表層張力増大をトリガーしているらしい。どのような仕組みであろうか？もっとも単純には、収縮胞膜の局所的な表層張力増大が、近傍の膜における表層張力の増大をトリガーするというメカニズムが考えられる。

そこで、開口端径が1ミクロン程度の吸引ピペットを用いて、膜の一部をピペット内に引き込み、局所的な膜表層張力を増大させるような刺激を与えてみた。すると、この刺激に伴って収縮胞全体の表層張力が増大したのである。つまり、収縮胞膜は、引っ張られることによ

ってその表層張力を再生的 (regenerative) に増大させる性質をもっているらしい。この吸引刺激に応じた表層張力の増大は、刺激を自発的な表層張力増大サイクルのどの時期に与えても引き起こすことが出来た。また、不応期は認められなかった。さらに興味深い事は、吸引刺激によって引き起こされた“期外張力増大”によって、その後の自発的な表層張力増大のタイミングがリセットされることである。このことは、収縮胞の自発的表層張力増大のタイミングは、哺乳類の心臓がもつ様なマスターペースメーカーによって制御されているのではないことを示唆している。

4. 収縮胞表層張力の計測

この収縮胞が球形化する際に、膜表層ではどれほどの張力が発生しているのだろうか。そこで、1976年に Hiramoto がウニ卵表層張力の計測に用いた方法⁵⁾を、直径10 - 20ミクロンの収縮胞に応用することにした。計測に用いるカンティレバーは、直径8ミクロン、長さ2ミリのカーボンファイバーの先端に、直径2ミクロン、長さ20ミクロンのガラスロッドを、カーボンファイバーの軸と直行する向きに接着したものである。ガラスロッドの先端を、細胞外に取り出した収縮胞膜の表面に押し込むことによって、膜の表面はくぼみ、カンティレバーはたわむ。くぼんだ膜の直径と収縮胞の直径、カンティレバーのたわみ量を計測することによって、表層張力を見積もることが出来る。

計測の結果、弛緩時における収縮胞の表層張力はおおよそ 1.3×10^{-4} N/m であった⁶⁾。この値は、計測方法や材料にもよるが、生理的な条件における細胞膜がもつ張力として一般的な値である。これに対して、球形時における収縮胞の表層張力はおおよそ 4.7×10^{-3} N/m と見積もられた。弛緩時の表層張力に比べて約35倍大きなこの値は、これまでに知られている、生理条件下のいかなる細胞膜の張力よりも大きい。ただし、実験的に引き伸ばされた生物膜が破断する直前に発生する張力よりも小さな値であった。つまり、この張力は膜そのものが発生し得る範囲の値であった。

5. 収縮胞表層張力増大のメカニズム

このような膜表層の張力変動を担う構造とは、どのようなものだろうか。そこで、凍結固定・凍結置換法を用いて、ゾウリムシ収縮胞の電子顕微鏡観察をおこなった。しかしながら、その周囲に収縮を担う様な構造を発見す

ることは出来なかった。

収縮胞の脂質膜自体が、その張力を変化させることは可能なのだろうか。富永らは、細胞内の収縮胞が球形化する時点で細胞に化学固定液を噴射する方法で、球形化した収縮胞膜近傍の微細構造を電子顕微鏡観察した⁷⁾。この観察によれば、表層張力増大に伴って球形化した収縮胞の膜からは、直径40ナノメートルの膜チューブが多数発生しているという。彼らはこの結果から、膜のチューブ化によって一定体積の水を包み込む脂質膜の量が減少するために、膜が引き伸ばされて張力が増大するのではないかと考えた。

あるいは、膜が質的に変化する可能性も考えられる。脂質膜は、それを構成する脂質の構造によって決まる自然曲率をもっている。このような膜の自然曲率が增大することによって、結果的に収縮胞膜の張力が増大する可能性がある。近年 Schmidt らによって同定されたエンドフィリン A1 は、シナプス小胞の再形成に必須の酵素である。この酵素は、リン脂質リゾホスファチジン酸にアシル基を付加することによって、これをホスファチジン酸に変換する⁸⁾。リゾホスファチジン酸は逆コーン型脂質 (極性頭部に対して疎水基部分が小さい) であり、ホスファチジン酸は、付加されるアシル CoA の種類にもよるが、それが不飽和脂肪酸を含む場合は、コーン型脂質 (極性頭部に対して疎水基部分が大きい) となる。Schmidt らは、エンドフィリン A1 によるリゾホスファチジン酸からホスファチジン酸への変換によって、シナプス小胞のくびれ部分における膜の自然曲率が局所的に変化する結果、膜の切断が起こるといった仮説を提唱している。今回の計測で見積もられた、球形時における収縮胞の表層張力は、生物膜を破断するには十分な値ではなかった。しかしながら実際には、収縮胞の球形化にともなって、収縮胞膜と放射腕膜との連結が切断される。この膜の切断は、膜の張力増大によるものではなく、エンドフィリン A1 様の酵素活性によって膜の自然曲率が変化する結果なのかもしれない。

6. おわりに

ゾウリムシはひとつの細胞で生きている。そのために特化した細胞内小器官が、多細胞生物の培養細胞などでははっきりと見る事の出来ない、しかしながら真核細胞に普遍的な細胞内小器官の機能を、極端に顕在化した形で我々の目前に提示している。その様な細胞内小器官の機能を調べる上で、ゾウリムシ細胞をミネラルオイル

中で切開して作る，細胞内小器官のインヴィトロ実験系は極めて有効である．細胞内とほとんど変わらない状態で（つまり，すりつぶしたり振り回したりしないで）細胞内小器官を細胞外に取り出すこの実験系に，電気生理学的手法や顕微操作技術，さらにはレーザートラップやエバネッセント場を用いた蛍光イメージングなどの技法を適用することによって，ユニークな実験系を確立したいと考えている．細胞内小器官の様々な機能を生理学的に調べようとする研究者にとって，ゾウリムシは宝の小箱である．

7. 文献

- (1) Hausmann, K. and Allen, R. D. 1977. Membranes and microtubules of the excretory apparatus of *Paramecium caudatum*. *Eur. J. Cell Biol.* 15, 303-320.
- (2) Fok, A. K., Aihara, M. S., Ishida, M., Nolte, K. V., Steck, T. L. and Allen, R. D. 1995. The pegs on the decorated tubules of the contractile vacuole complex of *Paramecium* are proton pumps. *J. Cell Sci.* 108, 3163-3170.
- (3) Tominaga, T., Allen, R. D. and Naitoh, Y. 1998. Cyclic changes in the tension of the contractile vacuole complex membrane control its exocytotic cycle. *J. Exp. Biol.* 201, 2647-2658.
- (4) Tani, T., Allen, R. D. and Naitoh, Y. 2000. Periodic tension development in the membrane of the *in vitro* contractile vacuole of *Paramecium multimicronucleatum*: modification by bisection, fusion and suction. *J. Exp. Biol.* 203, 239-251.
- (5) Hiramoto, Y. 1976. Mechanical properties of sea urchin eggs III: Visco-elasticity of the cell surface. *Dev. Growth Differ.* 18, 377-386.
- (6) Tani, T., Allen, R. D. and Naitoh, Y. Cellular membranes that undergo cyclic changes in tension: Direct measurement of force generation by an *in vitro* contractile vacuole of *Paramecium multimicronucleatum*. *J. Cell Sci.* 114, 785-795.
- (7) Tominaga, T., Naitoh, Y. and Allen, R. D. 1999. A key function of non-planar membranes and their associated microtubular ribbons in contractile vacuole membrane dynamics is revealed by electrophysiologically controlled fixation of

Paramecium. *J. Cell Sci.* 112, 3733-3775.

- (8) Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A. V., Witke, W., Huttner, W. B. and Soling, H. D. 1999. Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* 401, 123-124.

四肢形態形成の分子機構と進化

東北大学大学院生命科学研究所

田村 宏治

1. はじめに

もうずいぶん前のことになるが，動物学会東北支部の支部ニュースに短い駄文を書かせていただいたことがある．学生のころだった．その中で，“サイエンスの業界は芸能界に似ているような気がする．学会発表はオンステージ，論文はCDを出すようなもの．一発あたれば5年は持つが次が出なければドサ周り……”というようなくだりを書いた．大学院生のくせにずいぶんなことを書く自分ながら思う(当時もいろいろな反響をいただいた記憶がある)が，今になって考えると意外と的を射た表現だったかもしれない．しかしあれから10年近く経った今，当時とは違う心境で発生学を思うようになっている．

2. レチノイン酸との出会い

わたしの最初の研究は，ニワトリ胚の肢芽において形原 (Morphogen, 濃度勾配を形成することによって位置の指定をする分子) と称されていたレチノイン酸に関する研究であった．まさに濃度勾配という“概念”との戦いで，レチノイン酸という分子の難しさに苦しまされ続けたものだった．

研究室に入った学部4年生の6月に，井出宏之先生に紹介してもらった Nature 誌の論文¹⁾をみて目からうろこを落とし，こんなすごい研究のごく一部でいいから携わってみたいと単純に思い込んだ．その論文は，“We have a morphogen!” と賞されたほどの有名な論文で，以前からその濃度勾配が指の形態の違いを指定するのではないかといわれていたレチノイン酸が，正常発生中の肢芽において実際に濃度勾配を持って存在していることを証明した内容であった．しかし当時の自分には HPLC

のデータの意味が全くわからず、ただ結語だけを読んで感動していた。と同時に、濃度勾配を可視化できないこと（というよりデータが理解できないこと）に歯がゆさを感じた。そこで、濃度勾配を目で見たいという単純な動機と、無知な自分の頭で唯一知っていた“モノを見る方法”が抗体染色だけだったという発想から、レチノイン酸に対する抗体を作成して染色しレチノイン酸の分布を可視化するという実験を考えた。1987年の夏のことである。ただそのとき、たった4年後に“ We may not have a morphogen!”と賞される、レチノイン酸濃度勾配説を全面的に否定する論文²⁾に自分が参画することになるなどとは、考える由もなかった。

詳細は過去の総説^{3),4)}を読んでいただくことにして、強調しておきたいことは、当時の自分がいかに“実験の人為性”というものに敏感であったかである。濃度が5倍になるだけで違う指を作るレチノイン酸の分布を切片上で確認する際バッファー中に流出してしまう分はどうやって考えるんだ、外から加えたレチノイン酸の濃度と実際に *in vivo* で働いているレチノイン酸の濃度はどれくらい相関があるのか、そもそも外から加えたレチノイン酸の作用が内在性のレチノイン酸の機能を反映している証拠がどこにあるんだ、と毎日のように議論を繰り返した。その一つの理由はレチノイン酸が催奇形性物質としてよく知られていたからであるが、たとえ奇形を誘発するような物質でなくとも例えば遺伝子を導入するときでも、基本的には実験の人為性という点は変わらないだろう。ここ10年くらいの間にも研究環境や技術は目覚しく進歩し、さまざまな分子生物学の特殊技術が汎用できるようになってきた。例えば、ある分子(遺伝子)の機能解析をする方法のひとつに“遺伝子の強制発現系”があるが、実験の精度を押し上げ論文の載り得る Journal のランクをも押し上げるこの強力な解析方法にも弱点がある。最終的に発現させるタンパク質“濃度”の操作、である。遺伝子を強制発現させるときに、その発現量を問題にしている論文は思いのほか少ない。技術的な限界がそこにあるわけだが、限界として認識しておかなければいけない事実である。もちろん強制発現系を用いて得られる知見というのは非常に大切であり意味がある(自分もよく使う)。遺伝子を使って胚に触ることが非常に鋭い切り口になることは正しいが、人為的に施された操作が内在する分子の機能そのものを常に鏡のように写しているとは限らないことを肝に銘じておくこと、これがわたしが学生時代に経験してきたサイエンスから叩き込ま

れた、大きな教訓である。

3. 現象を見るということ

古き時代を良しとしようなどとは思わない。温故知新を語るほど歳を重ねてもいい。ただ現在進行中のわたしの考える発生学研究そのものが、胚に対して哲学を持って触れ、その応答を観察し、そこから何らかの仮説を導き出し、その真偽を確かめるべくまた胚に触れる、この繰り返しである。すなわち、現象を見ること、にほかならない。いまさらなにを当たり前のことを、と叱咤してくださる先達たちが多いことは思うが、わたしは許される場面が与えられる限り、この当たり前のことを叫びつづけたと思っている。それは、少なくとも10年前には本当に当たり前だったことがしだいに忘れられつつあるように思えてならないのと同時に、自責の念からでもあるのだが。

わたしの今までの短い研究経験の中でも、これだから研究はやめられないと思ったことが何度かある。ここでは数行の中にそれぞれの面白みのエッセンスだけをまとめてみるので、詳しくはそれぞれの論文をご参照いただきたい。

肢芽内におけるレチノイドの分布に濃度勾配が見られなかったこと⁵⁾。言い表せない驚きと同時に自分の実験に自信が持てなくなった瞬間だった。その後、自信を持てるようになるためにかけた労力はわたしにいろいろなものを与えてくれた。

指先を作るようにレチノイン酸を作用させてから若い胚に移植し直したら、肩から全部を作ってしまった⁶⁾。当時、その意味を(英語で)伝えるのに大変苦労し、論文としてまとめるのに5年近くかかったが、最近、ある遺伝子(*Meis*)を使った解析がその論文を引用してくれていて、ようやくこの実験の意義が伝わったような気がしてうれしかった。

若い胚の将来肢芽の背側を作る場所を腹の方に移植すると、それだけでもうひとつ肢が生える⁷⁾。背と腹の境界に肢が生えることを端的に示した、すごい実験だと思っている。これは、田中幹子氏の実験。MRC-5というヒト胎児胚由来の繊維芽細胞をニワトリの肢芽に移植すると重複肢を作る⁸⁾。このとき非常に奇妙だったのが、後ろ足にしか重複肢を作らないことだった。MRC-5の重複肢誘導を説明するために米井小百合氏が行っていった実験⁹⁾はうまくこの現象を説明しただけでなく、多くの副産物を産

んだ。

将来、後ろ足ができてくる部分を背中に植えてもお腹に植えても、後ろ足が生えてくる。しかし、肩のレベルの背中に移植したときだけ、前足に変わってしまうことがある。これは前足と後ろ足を定める何かがそれぞれのレベルの体幹部にあるに違いないという予想の元に行われた鹿野孝子氏の実験だが、その分子メカニズムは斎藤大介氏に受け継がれ、思わぬ展開を見せている。論文投稿中。

FGF10がカエルの肢を再生させた。横山仁氏によって、ほとんど低下してしまったカエルの肢の再生能力を FGF10が著しく向上させることが最近わかった¹⁰⁾。彼の示していた間接的な証拠は FGF10の重要性を示唆していた¹¹⁾が、こうもあっさり肢が生えるとは思わなかった。横山氏がカエルの足の指を50本作った¹²⁾ときもかなり驚いたが、この FGF10の結果はそれ以上だとわたしは思っている。

FGF 7が背中に AER を作った¹³⁾。米井小百合氏の MRC-5に始まる実験はそもそも四肢がどの位置に生えてくるかを定める機構を考えるために組まれていたが、それを調べる過程で得られた大きな副産物のひとつ。その背中の AER の意味を四肢の進化に結びつけた本人は“化け物を作って喜んでいるだけでは、発生学にならない”と冷静だが、わたしはいまだにこの現象に興味する。

初めて生きたエイ胚を見たとき¹⁴⁾。この感動はたぶん一生忘れまい。久しぶりに、まだ発生学はやめられないと思った瞬間だった。

ほとんどの場合に実験系を組むことから始めるわけで、これらの現象を導くのに当人たちが手がけた実験の数は底知れないものがある。もちろんだからこそ、発生学は面白いのである。この中で、や や などは本人がこうに違いないと思ったことを実験したらそのとおりだったというよい例で、傍らにいても感動するくらいだから本人の痛快さは言いようがないだろう。逆に、
、
のように、一見ただけでは説明がつかない現象も面白い。そこからなにを想像しそしてなにを創造するか、それが発生学の楽しみのひとつでもある。例えばに現れた現象から、今われわれは、四肢発生メカニズムの起源と進化そしてその多様性を考えるべく、を使った研究を膨らませている。

実際には解析を中心とした地味な実験も多い。井出先生の発見した細胞選別の現象を分子レベルで説明するた

めに矢嶋浩氏が行った6年がかりの解析¹⁵⁾はとても地味だったが、わたしの好きな研究のひとつである。あるいは、遠藤哲也氏がアフリカツメガエルの四肢を再生の分子メカニズム解析のための実験系として作り上げる^{16), 17)}ために行った努力には、今でも頭が下がる(四肢の再生研究についての地味で長い道のりはここでは記さないが、2年前の生物科学ニュース¹⁸⁾に書かせていただいているのでご覧いただきたい)。いずれにせよ、自分たちが行った研究に興味深く記述することができるのは、実際に研究を行った本人が本当にその研究を面白いと思いついてきた証拠だとわたしは思っている。そして、冒頭のような生意気なことを言っていた学生が10年経って30代半ばになり、学生諸君とともに研究をするようになったが、わたしの実験人生はまだまだこれからだ。あの、身震いするような感動を、もっともっと体験したい。スーパーマンを越えるためには、彼らにできなかったことをやればよい。われわれにはスーパーマンが絶対に使うことのできなかった遺伝子という鋭い武器がある。そして世の中に発想というものがなくなるはずもない。まだまだばくらにやれることはたくさんあるはずだ。

本文の内容でもお察しのとおり、わたしの研究紹介は井出研究室で行われてきた井出門下生による研究そのもの(の一部)でしかない。その意味で本奨励賞は、井出宏之教授の元で研究を行ってきたすべての同志の代表としていただいたと思っている。そしてそのような研究室を作ってくれている井出先生に、心から感謝している。

- 1) Thaller, C., and Eichele, G. (1987). Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. *Nature* 327, 625-628.
- 2) Noji, S., Nohno, T., Koyama, E., Muto, K., Ohya, K., Aoki, Y., Tamura, K., Ohsugi, K., Ide, H., Taniguchi, S. and Saito, T. (1991). Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud. *Nature* 350, 83-86.
- 3) 田村宏治 (1991). レチノイン酸はモルフォゲンか 分子レベルから現れた疑問 . 細胞工学10, 223-227.
- 4) 田村宏治, 井出宏之 (1991). 肢芽形態形成とレチノイン酸. 化学と生物 29, 690-691.

- 5) Tamura, K., Ohsugi, K., and Ide, H. (1990). Distribution of retinoids in the chick limb bud: analysis with monoclonal antibody. *Developmental Biology* 40, 20-26.
- 6) Tamura, K., Yokouchi, Y., Kuroiwa, A., and Ide, H. (1997). Retinoic acid changes the proximo-distal developmental competence and affinity of distal cells in the developing chick limb bud. *Developmental Biology* 188, 224-234.
- 7) Tanaka, M., Tamura, K., Noji, S., Nohno, T., and Ide, H. (1997). Induction of additional limb at the dorsal-ventral boundary of a chick embryo. *Developmental Biology* 182, 191-203.
- 8) onei, S., Tamura, K., Koyama, E., Nohno, T., Noji, S., and Ide, H. (1993). MRC-5, human embryonic lung fibroblasts, induce the duplication of the developing chick limb bud. *Developmental Biology* 160, 246-253.
- 9) Yonei, S., Tamura, K., Ohsugi, K., and Ide, H. (1995). MRC-5 cells induce the AER prior to the duplicated pattern formation in chick limb bud. *Developmental Biology* 170, 542-552.
- 10) Yokoyama, H., Ide, H., and Tamura, K. (2001). FGF-10 stimulates limb regeneration ability in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology* 233, 72-79.
- 11) Yokoyama, H., Yonei-Tamura, S., Endo, T., Izpisua Belmonte, J. C., Tamura, K., and Ide, H. (2000). Mesenchyme with *fgf-10* expression is responsible for regenerative capacity in *Xenopus* limb buds. *Developmental Biology* 219, 18-29.
- 12) Yokoyama, H., Endo, T., Tamura, K., Yajima, H., and Ide, H. (1998). Multiple digit formation in *Xenopus* limb bud recombinants. *Developmental Biology* 196, 1-10.
- 13) Yonei-Tamura, S., Endo, T., Yajima, H., Ohuchi, H., Ide, H., and Tamura, K. (1999). FGF7 and FGF10 directly induce the apical ectodermal ridge in chick embryos. *Developmental Biology* 211, 133-143.
- 14) Tamura, K., Kuraishi, R., Saito, D., Masaki, H., Ide, H., and Yonei-Tamura, S. (2001). Evolutionary aspects of positioning and identification of vertebrate limbs. *Journal of Anatomy*, in press.
- 15) Yajima, H., Yonei-Tamura, S., Watanabe, N., Tamura, K., and Ide, H. (1999). Role of N-cadherin in the sorting-out of mesenchymal cells and in the positional identity along the proximo-distal axis of the chick limb bud. *Developmental Dynamics* 216, 274-284.
- 16) Endo, T., Yokoyama, H., Tamura, K., and Ide, H. (1997). Shh expression in developing and regenerating limb buds of *Xenopus laevis*. *Developmental Dynamics* 209, 227-232.
- 17) Endo, T., Tamura, K., and Ide, H. (2000). Analysis of gene expressions during *Xenopus* forelimb regeneration. *Developmental Biology* 220, 296-306.
- 18) 田村宏治 (1999). 脊椎動物の四肢の再生. 生物科学ニュース11月号. 20-25.

会員異動

所属支部番号

1. 北海道, 2. 東北, 3. 関東, 4. 中部, 5. 近畿, 6. 中国・四国
7. 九州, 8. 海外

新入会 (7 / 10日現在)

高橋英之 (3; 169-8050 新宿区西早稲田1-6-1 早大・教育・生物・並木秀男研究室) / 眞 昌寛 (3; 192-0397 八王子市南大沢1-1 東京都立大学大学院理学研究科生物科学専攻発生プログラム研究室) / 三瀬武史 (7; 903-0213 沖縄県西原町千原1番地 琉球大学大学院理工学研究科海洋自然科学専攻熱帯生命機能学講座日高研究室) / 伊藤由美子 (3; 新宿区西早稲田1-6-1 早稲田大学教育学部生物学教室並木秀男研究室) / 鼠尾まい子 (3; 112-8610 東京都文京区大塚2-1-1 お茶の水女子大学理学部生物学科千葉研究室) / 高井礼人 (3; 169-8050 新宿区西早稲田1-6-1 早稲田大学教育学部生物学教室菊山研究室) / 北村徳一 (3; 192-0397 東京都八王子市南大沢1-1 東京都立大学大学院理学研究科生物科学進化遺伝学研究室) / 峯岸大輔 (3; 192-0397 東京都八王子市南大沢1-1 東京都立大学大学院理学研究科生物科学専攻進化遺伝学研究室) / 若山典央 (2; 039-3501 青森県浅虫坂本9 東北大学大学院理学研究科海洋生物学講座加藤研究室) / 加藤秀信 (2; 169-8050 東京都新宿区西早稲田1-6-1 早稲田大学教育学部生物学教室並木秀男研究室) / 川野園子 (6; 729-0292 広島県福山市学園町1番地三蔵 福山大学工学部生物工学科動物細胞工学研究室) / 石井健士 (7; 福岡市東区馬出3-1-1 九州大学大学院医学系学府分子生命科学系専攻細胞工学教室) / 高橋克明 (3; 192-0397 八王子市南大沢1-1 東京都立大学理学研究科生物科学専攻発生プログラム研究室) / 水田貴信 (3; 164-8639 東京都中野区南台1-15-1 東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻) / 松沢寛紀 (3; 192-0397 八王子市南大沢1丁目1番地 東京都立大学理学研究科生物科学専攻発生プログラム研究室) / 岡村俊也 (2; 990-8560 山形県山形市小白川町1丁目4-12 山形大学理工学研究科生物学専攻生殖生物学研究

室)/小林大樹(4;927-0553 石川県珠洲郡内浦町小木ム4-1 金沢大学自然科学研究科生命・地球学専攻臨海実験所)/上野元子(3;192-0397 八王子市南大沢1丁目1番地 東京都立大学大学院理学研究科発生プログラム研究室)/田中康裕(5;563-0043 大阪府豊中市待兼山町1-16 大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻物性生物学研究室)/橋爪篤史(5;560-0043 大阪府豊中市待兼山町1-16 自然科学棟 大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻)/新倉里絵子(3;305-8572 つくば市天王台1-1-1 筑波大学・生物科学研究科・生物物理化学専攻・中谷研究室)/吉崎史子(3;113-0033 文京区本郷7-3-1 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻野中研究室)/杉田純一(3;169-8050 東京都新宿区西早稲田1-6-1 早稲田大学教育学部生物学教室中村研究室)/小島純一(3;310-8512 水戸市文京2-1-1 茨城大学理学部自然史研究室)/日吉渉(2;990-8560 山形県山形市小白川1丁目4-12 山形大学理工学研究科生物科学専攻生体機構大講座生殖生物学研究室)/林 良樹(4;444-8585 岡崎市明大寺西郷中38番地 岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター小林研究室)/藤村美樹(3;153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系奥野研究室)/藤澤賢一(1;060-0810 札幌市北区北10条西8丁目 北海道大学・大学院理学研究科・生物科学専攻・行動知能学講座1)/綿貫公美子(3;192-0397 東京都八王子市南大沢1-1 東京都立大学大学院理学研究科生物科学専攻発生プログラム研究室)/金児 雄(4;920-1192 石川県金沢市角間町 金沢大学大学院自然科学研究科発生生物学講座桜井研究室)/岡本圭司(6;700-8530 岡山市津島中3-1-1 岡山大学理学部生物学科再生発生研)/石原吾吾(6;700-8530 岡山市津島中3-1-1 岡山大学理学部生物学科再生発生研究室)/国吉久人(6;739-8528 広島県東広島市鏡山1-4-4 広島大学生物生産学部細胞生理化学研究室)/野島俊秋(3;263-8522 千葉県稲毛区弥生町1-33 千葉大学大学院自然科学研究科生命・地球科学専攻分子細胞生物学講座細胞質分裂研究室)/谷 征大(3;263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1-33 千葉大学大学院自然科学研究科生命・地球科学専攻分子細胞生物学講座筋発生生物学研究室)/高橋 徹(7;熊本市月出3-1-100 熊本県立大学環境共生学部環境共生支援センター)/GUSEV, OLEG(6;700-8530 岡山市津島中3-1-1 岡山大学理学部生物)/山下新吾(1;060-0812 札幌市北区北12条西6丁目 北海道大学大学院工学研究科システム情報専攻生体情報工学講座神経情報工学分野)/吉田夏恵(3;192-0397 八王子市南大沢1-1 東京都立大学大学院理学研究科生物科学専攻発生プログラム研究室)/大庭春奈(4;930-8555 富山市五福3190 富山大学理学部生物学科生体制御学講座)/中川雄介(3;228-8555 神奈川相模原市北里1-15-1 北里大学理学部基礎生命研究科生物科学専攻)/日時仁恵(5;606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町 京都大学大学院理学研究科生物科学専攻動物学教室分子進化発生生物学教室)/原田香織(3;112-8610 文京区大塚2-1-1 お茶の水女子大学大学院人間文化研究科ライフサイエンス専攻千葉研究室)/谷奈緒子(5;560-0043 豊中市待兼山町1番16号 大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻中西研究室)/門口哲也(5;657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 神戸大学大学院自然科学研究科生物学専攻洲崎研究室)/大村 現(5;657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 神戸大学自然科学研究科生物学専攻洲崎研究室)/佐々木あかね(5;606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町 京都大学大学院理学研究科生物科学専攻動物学教室分子進化発生生物学教室)/木戸澄奈(5;658-8501 神戸市東灘区岡本8-9-1 甲南大

学大学院自然科学研究科生物学専攻)/大矢太郎(3;238-0225 神奈川三浦市三崎町小網代1024 東京大学大学院理学系研究科附属臨海実験所)/岡 亜希恵(1;060-0810 北海道札幌市北区北10条西8丁目 北海道大学理学研究科生物科学専攻生体情報分子学講座)/阿部哲也(4;467-8501 名古屋瑞穂区瑞穂町山の畑1番地 名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科生体情報専攻生体構造情報系)/坂 晋(1;札幌市北区北12条西6丁目 北海道大学大学院薬学研究科生化学部門)/甲斐光弘(3;236-0027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸22-2 横浜市立大学大学院総合理学研究科システム機能科学専攻分子発生学研究室)/神田敦宏(3;618-8503 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1 (財)サントリー生物有機科学研究所)/李 遠友(3;164-8639 東京都中野区南台1-15-1 東京大学海洋研究所海洋生命科学部門生理学分野)/松原重朗(6;739-8528 広島県東広島市鏡山1-4-4 広島大学大学院生物圏科学研究科生物機能科学専攻細胞生理化学研究室)/鹿毛枝里子(3;文京区本郷7-3-1 東京大学大学院理学系生物科学専攻 細胞生理化学研究室)/吉井大志(6;753-8512 山口県山口市吉田1667-1 山口大学理学部自然情報科専攻富岡研究室)/斎藤大介(2;980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻青葉東北大学理学部生物学教室井出研究室)東北大学大学院生命科学研究所井出研究室)/相川優子(3;214-0033 神奈川川崎市多摩区東三田1-1-1 明治大学農学研究科農学専攻遺伝情報制御学研究室)/久保悠子(2;980-8578 仙台市青葉区荒巻青葉 東北大学大学院生命科学研究所生命機能科学専攻山本博章研究室)/中川知美(3;305-8572 茨城県つくば市天王台1-1-1 筑波大学生物科学系沼田研究室)/小柳光正(5;606-8502 京都市左京区北白川追分町 京都大学大学院理学研究科生物物理学教室)/宮脇 亮(5;558-8585 大阪府大阪市住吉区杉本3-3-138 大阪市立大学理学部理学研究科動物生理学研究室)/佐藤由紀子(3;192-0397 東京都八王子市南大沢1-1 東京都立大学大学院理学研究科神経生理学研究室)/小川直樹(3;192-0397 東京都八王子市南大沢1-1 京都都立大学理学部生物学教室生化学研究室)/柴小菊(3;112-8610 東京都文京区大塚2-1-1 お茶の水女子大学人間文化研究科ライフサイエンス専攻馬場研究室)/廣瀬聖美(3;112-8610 東京都文京区大塚2-1-1 お茶の水女子大学人間文化研究科ライフサイエンス専攻馬場研究室)/佐々木一雄(5;606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町 京都工芸繊維大学繊維学部応用生物学科細胞機能学)/竹内勇一(3;236-0027 横浜市金沢区瀬戸22-2 横浜市立大学理学部機能科学科蠟川研究室)/堀江健生(6;678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3-2-1 姫路工業大学理学部生命科学科生体情報学・講座)/本山由美子(3;112-8610 東京都文京区大塚2-1-1 お茶の水女子大学理学部生物学科千葉研究室)/中嶋貴子(3;112-8610 東京都文京区大塚2-1-1 お茶の水女子大学理学部生物学科千葉研究室)/池田 俊(7;812-8581 福岡市東区箱崎6丁目10番1号 九州大学大学院理学研究科生物科学専攻動物生理学研究室)/大月孝志(6;700-8530 岡山市津島中三丁目1-1 岡山大学理学部内分泌教室)/櫻谷和真(5;658-8501 兵庫県神戸市東灘区岡本8-9-1 甲南大学理工学部生物学科西方研究室)/戸田一弘(3;236-0027 横浜市金沢区瀬戸22-2 横浜市立大学理学部機能科学科蠟川研究室)/堀口弘子(6;431-3192 静岡県浜松市半田山1丁目20-1 浜松医科大学大学生物学)/野村俊一郎(6;722-0073 広島県御調郡向島町2445 広島大学大学院理学研究科生物科学専攻多様性生物学講座/理学研究科付属臨海実験所)/竹村伸也(3;236-0027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸22-2 横浜市立大学大学院総合理学研究科神経行動学(蠟川)研究室)/吉永雅史(3;

社団法人 日本動物学会 平成14年度 予算書

平成14年1月1日から平成14年12月31日まで

		(単位:円)		
科 目 細 目	予算額	13年度予算	12年度決算	
I 収入の部				
1 基本財産運用収入	(100,000)	(150,000)	(141,331)	
2 入会金収入	(30,000)	(30,000)	(46,000)	
3 会費収入	(24,900,000)	(22,500,000)	(21,177,495)	
通常会員会費収入	23,000,000	21,000,000	19,665,995	
団体会員会費収入	1,800,000	1,400,000	1,511,500	
賛助会員会費収入	100,000	100,000	0	
4 事業収入	(16,610,000)	(16,400,000)	(24,677,506)	
学術誌発行事業収入	8,100,000	7,900,000	13,330,305	
学術誌予約購読料収入	2,100,000	1,900,000	1,547,730	
学術誌掲載料収入	300,000	300,000	520,000	
広告料等収入	5,700,000	5,700,000	11,262,575	
受託調査収入	10,000			
学術学会参加費等収入	8,500,000	8,500,000	11,347,201	
5 補助金等収入	(8,000,000)	(10,000,000)	(14,540,000)	
文部省学術誌刊行補助金	8,000,000	10,000,000	13,800,000	
文部省科学研究費公開促進費B	0	0	740,000	
6 雑収入	(200,000)	(210,000)	(480,500)	
利子収入	0	10,000	636	
雑収入	200,000	200,000	479,864	
7 寄付金収入	(0)	(0)	(4,314,220)	
8 安増基金取り崩し収入	(500,000)	(500,000)	(0)	
当期収入合計 (A)	50,340,000	49,790,000	65,377,052	
前期繰越収支差額	0	0	-10,264,074	
収入合計 (B)	50,340,000	49,790,000	55,112,978	

科 目 細 目	予算額	13年度予算	12年度決算
II 支出の部			
1 事業費	(39,665,000)	(39,785,000)	(48,444,372)
学術学会の開催			
大会の開催	9,000,000	9,000,000	11,415,572
学会誌等の刊行			
英文学術誌の刊行			
印刷出版費	20,000,000	20,000,000	24,370,846
通信運搬費	1,500,000	3,200,000	5,093,763
編集費	5,100,000	3,300,000	3,017,300
邦文情報誌の刊行			
印刷出版費	1,500,000	1,500,000	2,428,801
通信運搬費	550,000	1,000,000	527,324
謝金	300,000	300,000	289,980
名簿の発行	0	0	0
研究の奨励及び研究業績の表彰			
動物学会賞	200,000	200,000	200,000
江上学術奨励	200,000	200,000	210,000
安増基金奨励金	500,000	500,000	
その他の事業費			
関係学術団体との連絡・協力	15,000	15,000	48,000
支部活動補助費	100,000	300,000	0
委員会活動費			
動物提供プロジェクト委員会	30,000	30,000	0
動物学推進将来計画委員会	200,000	200,000	102,755
ガイアリスト21委員会	150,000	10,000	0
動物学資料保存委員会	150,000	10,000	0
広報委員会	150,000	10,000	0
公開シンポジウム開催費	10,000	10,000	740,031
受託調査費	10,000		
2 管理費	(10,375,000)	(9,715,000)	(10,137,735)
給料手当	3,300,000	3,160,000	3,243,000
法定福利費	500,000	500,000	522,382
会議費	50,000	50,000	88,740
旅費交通費	1,500,000	895,000	1,489,387
通信運搬費	1,415,000	1,500,000	1,388,483
消耗品費	500,000	500,000	395,102
製本費	300,000	300,000	1,940
光熱水料費	90,000	90,000	97,713
謝金	800,000	800,000	972,673
賃借料	1,520,000	1,520,000	1,158,258
雑費	400,000	400,000	780,057
3 備品購入費	(0)	(0)	(0)
4 安増基金資産	(0)	(0)	3,000,000
5 退職給与引当預金	(300,000)	(290,000)	(302,169)
6 予備費	(0)	(0)	(0)
当期支出合計 (C)	50,340,000	49,790,000	61,884,276
当期収支差額 (A)-(C)	0	0	3,492,776
次期繰越収支差額 (B)-(C)	0	0	-6,771,298

「生物科学ニュース」の購読・ご利用のおすすめ

近年の生命科学の進歩はめざましく、新しい分野が次々と開かれ、その結果として新しい学会や雑誌が次々と設立・刊行されると共に、日々各種の会合がめまぐるしく催されております。もはや個々の学会や個人がこれらの情報を処理していける時期ではなくなってきております。

この時代に対処してゆくために「生物科学ニュース」は日本動物学会および日本植物学会の和文情報誌として、会員への情報伝達、広報はもちろん、生物学に関連した学会・国際会議・シンポジウム・講演会・研修会などの開催予定とプログラム、人事・研究助成金などの公募記事、書評、関連分野の動向などを中心に、幅広く生物科学関連ニュースをもりこみ編集・刊行されています。

「生物科学ニュース」は両学会の約5,000名の会員に配布されていますが、会員以外の個人の方あるいは機関でもご購読いただけます。この機会にぜひご購読くださいますようお願い申し上げます。ご送付先、お電話番号など明記のうえ下記あてハガキ、またはファックスなど書面でお申し込みくだされば折り返し請求書・振込用紙などお送り申し上げます。

記

「生物科学ニュース」 月刊（毎月20日発行）/ B5判 / 毎号平均22頁

編集・発行 生物科学ニュース編集委員会（日本動物学会・日本植物学会）

年間購読料 3,100円（税込・送料無料）

購読料は原則として年間前払いでお願いしております。

ご希望の月号からご購読いただけますが、1月号から12月号までの12冊を一期間としますため、途中月からのご購読の場合は初年度のみ月割の購読料となります（下の例示のとおり）。以降は購読中止のご連絡をいただかない限り翌年に自動継続し1月号から12月号のサイクルで更新させていただきます。

機関購読の場合はご送付先にご担当の個人名をお入れください。

お支払いに際し特定の書類が必要な場合は作成いたしますのでご連絡ください。

見本誌ご希望の場合はお送りいたします。

すでに購読ご登録の場合はご容赦下さい。

本年度購読料 $3,100円 \times 9 / 12 = 2,325円$

次年度購読料 3,100円（年間購読料が改定された場合は別途ご案内します）

〒113-0021 東京都文京区本駒込5-16-9

財団法人 日本学会事務センター 事業部

「生物科学ニュース」係

TEL . 03-5814-5811 FAX . 03-5814-5822

関連記事掲載を御希望の方は、最新の「生物科学ニュース」を参照の上、横書き原稿用紙（1行25字が望ましい）に記事を簡潔にまとめ、下記の編集委員会宛にお送り下さい。編集委員会が関連記事と認めた場合には無料で掲載させていただきますが、様式の統一のため記事の手直しを行なうことがあります。なお、編集委員会では記事の要約表現の改訂を独自に行なうことがあります。また学会や研究会が独自の記事を出したい時には、その都度必要なスペース（“ひろば”欄）を買い切ることができます。“ひろば”の校正は買い切られた方をお願い致します。

料金：1ページ（2,000字） 40,000円

1/2ページ（1,000字） 20,000円

1/4ページ（500字） 10,000円

記事送付先：〒113 東京都文京区本郷2-27-2 東真ビル 生物科学ニュース編集委員会

原稿をお送り下さる場合、以下の点にご留意下さい。

1) 生物科学ニュースに原稿をお送り下さる場合は、フロッピーディスク（3.5インチ、テキストファイル）とプリントアウトしたものをお送り下さい。書式等は生物科学ニュース最近号をご参照下さい。

2) 現在のところ、書評欄への投稿は受けつけておりません。

3) 掲載原稿の締切日（必着）は以下の通りです。

No.359 2001年11月号 2001年9月17日（月）

No.360 2001年12月号 2001年10月15日（月）

No.361 2002年1月号 2001年11月12日（月）

No.362 2002年2月号 2001年12月3日（月）

運営委員会

社団法人 日本動物学会 岡 良隆・宍倉文夫・吉国通庸 (<http://www.soc.nacsis.ac.jp/zsj/>)

社団法人 日本植物学会 関本弘之・佐藤 忍・河野重行 (<http://bsj.or.jp/>)

編集委員会

社団法人 日本植物学会 梶田 忠・加藤美砂子・中里(岡本)侖根・東山哲也・佐藤 忍(幹事)

社団法人 日本動物学会 千葉和義・成瀬 清・松本 緑・安増茂樹・宍倉文夫(幹事)

発行 (社)日本動物学会・(社)日本植物学会 生物科学ニュース編集委員会 〒113-0033 東京都文京区本郷2-27-2
東真ビル / FAX 03-3814-5352

印刷 昭和情報プロセス株式会社 〒108-0073 東京都港区三田5-14-3 TEL 03-3452-8451

購読申込:(財)日本学会事務センター事業部 / 〒113-0021 東京都文京区本駒込5-16-9 学会センターC21
TEL 03-5814-5811 FAX 03-5814-5822
