

## 黒田カイロモルフォロジープロジェクト中間評価報告書

総括責任者： 黒田玲子（東京大学大学院総合文化研究科 教授）

研究体制： 分子カイロモルフォロジーグループ 研究員 中村朝夫 他 5 名  
生物カイロモルフォロジーグループ 研究員 清水美穂 他 3 名

評価委員： 浅島 誠 東京大学大学院総合文化研究科 教授  
原田宣之 東北大学多元物質科学研究所 教授  
星 元紀 慶應義塾大学理工学部 教授

### 1. 研究の進捗状況と今後の見込み

#### 1.1. 研究構想

われわれの世界は三次元空間で出来ており、このため分子、結晶、生物個体等のレベルでキラリティー（左右非対称性、掌性、鏡像異性）が必然的に発生する。非生物的化学合成では互いに反対のキラリティーをもつ鏡像異性体が 1:1 の比で得られるのに対して、この地球上の生命世界ではキラリティーは一方に片寄っている。すなわち、全ての生物において、蛋白質を構成するアミノ酸はすべて L-体であり、核酸を構成する糖はすべて D-体である。これを生物界におけるホモキラリティーと呼ぶが、その起源については詳らかではなく、ましてや分子レベルのキラリティーと生物個体のキラリティーの接点は全くの未解明である。本プロジェクトは、分子のキラリティーと生物のキラリティーの接点、および遺伝情報と個体の形態にみられるキラリティーの接点、換言すればキラリティーから見たミクロとマクロの接点を解明しようとするもので、非常に挑戦的で魅力ある研究構想であり、ERATO プロジェクトにこそ相応しいものといえる。

以上の構想のため本プロジェクトでは、分子カイロモルフォロジーおよび生物カイロモルフォロジーの 2 グループに分けて研究を推進している。なお、「カイロモルフォロジー」なる語は、本プロジェクトを企画するにあたって新たに造語されたものである。

#### 1.2. 研究構想の具体化状況および未踏の課題への挑戦状況

##### 1.2.1. 分子カイロモルフォロジー

本グループは、気体や液体状態よりも、固体状態ではるかに大きい分子間の相互作用、分子認識、キラル識別エネルギー等により顕在化するキラリティー効果や、固体状態ではじめて現れるキラリティー現象の解明をめざしている。従来、実験上の困難さから、それらの解明は殆ど進んでいなかったが、種々の手法を有機的に組み合わせ取り組むだけでな

く、固体状態におけるキラリティー研究を画期的に推し進めることが期待される固体試料のすべての偏光現象を測定可能な分光計 ( Universal Chiroptical Spectrometer: UCS ) の開発にも世界ではじめて挑戦している。

a)固体状態に特異的なコンフォーメーションの固定

キラルなホスト分子を用いた包接結晶化によるゲスト分子の特異的なコンフォーメーションの固定、結晶化における軸不斉化合物のコンフォーメーションの固定、アキラルなピレン二量体化合物のキラル結晶化と円偏光蛍光など、溶液中では全く存在しないコンフォーマーや物性の検出に成功しており、興味ある成果である。

b)固体特異的キラリティーの分子キラリティーへの転写

固体状態に特異的なコンフォーメーションを反映した位置・立体選択的な光反応固体状態における光反応を利用して、固体状態に特異的なコンフォーメーションのキラリティーを分子のキラリティーに転写することに種々の系で成功している。この固体光反応を低温 ( -100 )で行うことにより、60%ee の鏡像体過剰で生成物の単離を達成している。また、ホスト分子を用いた包接結晶では、1個の単結晶のX線回折の時間変化から出発系と生成物系の構造解析に成功しており、結晶中における分子の移動と反応経路を解明している。

c)固体混合によって生成する電荷移動錯体結晶

ピナフトール誘導体とベンゾキノンとを乳鉢中で固体混合すると、赤色を示す電荷移動錯体の結晶が生成することを発見している。これは2種類の結晶を固体混合する事によって、結晶中での分子の配列の組み替えが起こり、新しい結晶が生成した事を示している。この結晶は溶融結晶化したものとは全く別のものであり、固体混合の際に界面で発熱溶融が起こり、分子配列の組み替えが起こったものではないことを明瞭に示している。このように「固体状態における分子の移動」という不可思議な挙動を明らかにしている。

d)結晶化過程における分子認識

キラルな添加物の結晶が鋳型となり、アキラルな化合物がキラル結晶化することを見だし、chirality scaffolding crystallization と名づけている。生成する結晶のキラリティーは、添加物分子のキラリティーに依存しており、これを利用してキラリティーの制御が出来る可能性がある。この結果は、添加物分子のキラリティーが結晶表面の鋳型に転写され、この鋳型を基に新たなキラル結晶が成長する事を示しており、非常に興味深い。結晶表面のミクロ構造とキラリティーの関連の解明が待たれる。

さらに、固体混合によって電荷移動錯体結晶へのゲスト分子の取り込みについて非常に興味ある結果を見いだしている。ゲスト分子のキラリティーによって固体混合物の色が変化し、分子のキラリティー検出のセンサーとして機能する事を示した。また結晶構造をも

とに量子化学計算を行い、着色変化の機構を明らかにしている。

#### e) 固体における不斉反応の触媒となる金属錯体の開発

固体状態では溶液状態と異なった構造を取りうることから、固体状態に特異な不斉反応の触媒をめざして、金属錯体の構造と円二色性 (CD) スペクトルの研究を行っている。

#### f) Universal Chiroptical Spectrometer (UCS) の開発

固体状態のキラリティー研究には、固体試料の CD スペクトルの測定が欠かせない。しかし、固体試料に特有の巨視的異方性に基づく偽のシグナルがつねにつきまとい、真の CD を得ることは非常に困難であった。本プロジェクトでは巨視的異方性を含む全ての偏光現象が測定可能な分光計 Universal Chiroptical Spectrometer (UCS) を開発し、固体試料の真の CD スペクトルを求める方法を確立した。この方法では Mueller matrix 法に基づき、CD (円二色性)、CB (円複屈折)、LD (直線二色性)、LB (直線複屈折) を求めるための解析法の確立とそのための分光光度計を設計し成功している。

この方法は全ての固体試料の CD 測定に有力であり、例えば蛋白質のキャストフィルムの CD スペクトル測定に応用し、以前の他の研究者による CD 測定によって推定されていた蛋白質の構造変化が、実は偽のシグナルに起因していることを明らかにしている。このように本装置と解析法は、巨視的異方性試料のキラリティー研究に非常に強力である。

### 1.2.2. 生物カイロモルフォロジー

このグループは、生物個体のキラリティー決定因子を明らかにするために、左右軸を完全に逆転させる遺伝システムと個体レベルでの形態形成との関連を解析するのに最適と考えられる巻貝を材料として取り上げている。巻貝は遺伝的に右巻きと左巻きとが決まっており、その決定因子は細胞質因子であろうと古くから言われているが、今なおその本体は明らかにされていない。

この難問に挑戦するために、「細胞生物学的な解析」、「卵での発現蛋白質および母貝に発現する遺伝子の左右両系統での比較」、「卵に対するバイオアッセイ系の確立」という3つの大きな柱を立てて研究を進めているが、目標とする分子がどのようなものであるか全く情報が無いことを考えれば、妥当な戦略であろう。

#### a) 実験材料の確保

言うまでもないが、このような解析においては、実験材料の良し悪しが決定的な意味をもつが、ヨーロッパ産モノアラガイの一種 *Lymnaea stagnalis* の左右両系統を入手したうえで、まず効率的かつ大量に貝を増やし系統を維持するための飼育法の確立、実験に供するための大量の卵の回収などから一步一步進めており、すでに恒常的に多くの卵を得ること

ができ、生化学的、分子生物学的なアプローチが可能になっている。2年半の歳月をもって、ここで蓄積されたノウハウは、天然に左右両巻が存在するユニークな実験生物である *L. stagnalis* の価値を飛躍的に高めたものとして大いに評価できる。

#### b) バイオアッセイ系の確立

細胞質因子の同定に欠くことのできないバイオアッセイは、卵内への顕微注入法に依存しているが、巻貝の卵への顕微注入はきわめて困難であることが知られている。この貝においても、稠密なゼリー層と硬い卵膜、ならびに粘性の高い細胞質とが災いして、予想以上の技術的困難に直面している。工夫を重ねてこの隘路を一応は突破してはいるが、先行き増えるであろう検体数を考えると、未だ十分な対応とはいえない。この問題の解決は、目的とする物質が蛋白質なのか核酸であるかという、本来一番先に明らかにされるべきことに答えを出すためにも避けては通れず、一層の努力を傾ける必要がある。この問題が解決できれば、面白い系でありながら同様な技術的問題ゆえに解析が断念されている多くの問題に解決の道を拓くことにもなるので、挑戦する価値は充分にある。

しかし、左巻貝が正常に生育する率がもともと低いことを勘案すると、このアプローチが行き詰る可能性もあるので、顕微注入の技術的解決に努力する一方で、解決がつかない場合の対応策を考えておく必要がある。そのひとつとして、遺伝学的手法を導入し、左右貝のかけ合わせにより得られる子孫のうち右巻優性対立遺伝子が分離する F<sub>2</sub> 世代を利用した評価システムを既に構築しており、大きな工夫がみられる。この巻貝については、これまで遺伝子クローニングもほとんど皆無である状況である。巻型決定機構に関わる遺伝子メカニズムの解明というサブテーマをおきながら、各種スクリーニングから左右で発現差がある因子については、構築した F<sub>2</sub> パネルを利用して右巻決定因子であるかどうかの判定ができるであろう。さらに遺伝学が使えるというこの生物の特徴を生かして、ポジショナルクローニングにもとり組んでいるが、これは着実な方法である一方で、膨大な時間と資金が必要であるので、再考の余地があるかもしれない。

#### c) 左右両系統の卵割様式の比較

発生生物学の教科書には、左右らせん卵割が鏡像対象に進行すると書かれているが、今回、このグループは同種の巻貝の左右胚の割球接着様式や分裂スピンドルを間接蛍光抗体染色法により視覚化することにより、左巻胚には無く、右巻胚にのみ特徴的な形態変化があることを初めて発見した。これは、巻型決定因子の本体を推測するうえで重要な鍵となる発見であるとともに、教科書に書かれている概念をくつがえすものであり、発生・細胞生物学の分野に与えるインパクトも大きいものである。

#### d) 左右両系統で発現の異なる遺伝子および蛋白質の解析

右巻卵にのみ存在し、左旋性卵割パターンを右旋性卵割パターンにかえる物質を最も直接

的に探索する方法として、1細胞期胚の細胞質中にある蛋白質の左右胚での発現差を、蛋白質二次元電気泳動スポットパターンにより比較し、いくつかの右巻特異的な発現スポットを見出すことに成功していることは評価できる。ごく微量の蛋白質しか含まない小さな卵を地道に回収し、ゲル上で非常に美しい分離パターンを得るためのサンプル調製法を確立したことも素晴らしい。ただし、蛋白質量をもう少し増やして解析した方が良いであろう。得られたスポットの解析は現在進行中で、共同研究が計画されている。我が国が世界に誇る多段階マスマスペクトル-de novo シークエンス法により、これらの蛋白質の正体が明らかにされるのが楽しみである。

母貝における発現遺伝子の左右巻貝での比較から、右巻特異的なものを数種類同定しているが、胚への顕微注入によってその活性をアッセイする必要がある。

### 1.3. 研究者の参集状況および施設・設備の整備状況

分子グループと生物グループの研究室がそれぞれ別のキャンパスにあり、日頃の交流と協力に多少の難点はあるが、隣接キャンパスでもあり重大な問題となる心配は無いと思う。しかし、どちらのグループにしても、施設が余りに狭隘であり、研究に支障が出るのではと強く危惧する。これは、日本全体の問題点であり、容易に解決できるとは思わないが、このような挑戦的なプロジェクトを成功させるには、充分配慮すべき問題である。特に、整った飼育設備を早急に立ち上げる必要がある。このような設備は、日本では軽視されがちであるが、生物材料を扱う上での根幹をなすものであり、成果の質と量に大きく影響することを忘れてはならない。

#### 1.3.1. 分子カイロモルフォロジー

研究総括責任者の黒田玲子教授およびグループリーダーの中村朝夫博士を中心に、優れた研究者が参加している。また研究設備については今後の導入予定の機器を含めて十分なものが整備されている。

#### 1.3.2. 生物カイロモルフォロジー

全く未開拓な領域への挑戦であるので、全く異なる複数のアプローチを併用せざるを得ない。当然ながらこの研究テーマに関しての経験者が存在しない。様々な分野の経験と知識や技能を持ち、柔軟性のある人材を結集する必要があり、総括責任者だけでなく、グループリーダーの清水美穂博士の指導力も大いに期待される。同博士は分子・細胞生物学を背景としているので、無脊椎動物の発生、細胞骨格系を専門とする研究員、二次元電気泳動パターンに熟練した技術員、地道な卵の回収に尽力または貝の飼育を情熱的におこなってくれる技術員を擁するチーム構成は妥当なものである。しかしながら、1.2.2. で触れた顕微注入法の技術的解決を図るためには、そのような経験を持ちバイオアッセイ系を主体的に担えるスタッフを確保することは非常に重要であろう。また、研究員各人が自分

の始めたテーマを中心にそのまま研究を進めており、グループとしての横の連携や協力関係がやや希薄という感じもあるので、今後はもっと焦点を絞った研究方向にもっていくことが望ましい。

## 2. 研究成果の現状と今後の見込み

### 2.1. 分子カイロモルフォロジー

上記の研究進捗状況について述べたように、種々の研究課題で興味ある研究成果をあげている。固体混合で新しい結晶が形成されるという知見は興味深い。また、他のキラル結晶の表面に成長するアキラル分子の結晶がキラルとなり、そのキラリティーが添加物のキラリティーに依存するという *chirality scaffolding crystallization* も興味深い。さらにゲスト分子のキラリティーによって固体混合物の色が変化し、分子のキラリティー検出のセンサーとして機能する事も新しい研究成果である。

Universal Chiroptical Spectrometer (UCS) の開発は特に高く評価すべきものであり、今後の発展と他分野への応用が期待される。特に近年、生体系高分子膜、機能性キラル結晶、機能性キラル LB 膜、キラル液晶、キラル包接結晶など巨視的異方性をもつ試料の正確な CD スペクトル測定がますます重要になってきており、これらの測定に偉力を発揮するものと考えられる。

### 2.2. 生物カイロモルフォロジー

細胞分裂と紡錘体の関係、初期の卵割と右巻きと左巻きの決定、受精卵におけるいくつかの蛋白質や母性に発現する RNA の左右の貝による違いなど、すでにいくつかの成果はあげているとみることができる。また、らせん卵割において、右巻き胚にのみに見られる特徴的な形態変化という、当初の研究目標にはないが研究の新しい展開を期待させる興味深い発見もなされている。

### 2.3. 今後の研究への助言

本プロジェクトは、分子からマクロな形態までを統一的に左右性の問題として問う極めてユニークかつ重要なものであり、その意義は非常に高い。分子カイロモルフォロジーの方は総括責任者が長年にわたって基礎を固めてきた分野であるため成果も多く出ている。将来的に生物カイロモルフォロジーとの関連づけをおこない、新しい科学の領域を開拓していく方向にすすむことを期待する。一方、生物カイロモルフォロジーは未踏の領域にこのプロジェクトの開始とともに始めて飛び込んだ訳で苦労も多いと思われるが、未だ、技術や方法などが見えない部分もあるので、再点検し、焦点を絞ってやることを進言したい。個別な問題については以下に述べる。

#### 2.3.1. 分子カイロモルフォロジー

上記のように種々の興味ある研究成果をあげている。今後、これらの成果を方法論として発展させて、実際的な応用法として確立できればさらに素晴らしい。例えば、固体状態に特異的なコンフォーメーションのキラリティーを、固体光反応を利用して分子のキラリティーとして固定することに種々の系で成功しているが、この手法は、固体光反応に特異的な生成物の不斉合成法として有用なのでその将来性が期待される。しかし固体光反応を低温（-100℃）で行っても鏡像体過剰は 60%ee にとどまっており、実際的な難点となっている。例えば、生成物を再結晶することによって鏡像体過剰 100%ee にすることができれば、実用的な方法となりうる。あるいは間接的ではあるが、さらにキラル包接結晶として処理して光学分割し、100%ee にする方法も試みる価値があるのではないかと思う。

固体混合による着色変化を用いた分子キラリティー検出のセンサーも興味深い。しかしセンサーとして応用するためには、微量の試料に対して鋭敏で簡便に検出できる方法でなければならない。このように実際の応用に沿った方法論の開発と確立が望まれる。

このような視点に立てば、Universal Chiroptical Spectrometer (UCS) の開発は素晴らしい。今後、キラル物質に関する種々の研究分野での応用が期待される。

### 2.3.2. 生物カイロモルフォロジー

焦点を絞って解析できるようになれば、面白い研究だけに今後の発展が期待できる。「顕微注入の技術」、「卵の数の確保」、「蛋白質や RNA の解析技術」など、かなり高度の技術が必要と思われる部分が多いので、それぞれの技術を強化し、また、先端技術を持つグループと共同研究をするなどすれば、目標は射程内にあると考えられる。グループ内での連携をより強くし、このプロジェクトの成功に向かってさらに努力することを期待する。

## 3. 結語

分子カイロモルフォロジーグループは、種々の優れた成果をあげており、評価できる。今後さらに実際的な応用に向けた方法論の確立と、生物カイロモルフォロジー研究の分子レベルでの基礎となる研究のさらなる推進が望まれる。

生物カイロモルフォロジーグループは、巻貝の巻型決定因子の単離と構造決定に向けて、非常に困難なプロジェクトに良く挑戦している。いろいろと面白いアプローチや成果も出始めているが、今後、顕微注入法を含めてバイオアッセイ系が大きな意味を持つであろう。この左右性を決めている母性因子の解明に向けて、しっかりとした技術と深い考察をもって足場をかためてゆけば、大きな発展が期待でき、このプロジェクトが今後の生命科学にもたらす影響はきわめて大きいものとなるであろう。

残された期間の活動を通して、「分子から個体まで」の左右性を決める統一理論がもたらされることを、大いに期待している。

以上