

生態系における炭素・窒素循環を規定する土壌分解プロセスの 気候変動に伴う変化予測

横浜国立大学環境情報研究院・産官学連携研究員
藤井 佐織

(研究目的)

気候変動に関する政府間パネル（IPCC）が第5次報告書で報じたように、全球的な温暖化に伴って、人間活動の基盤となる生態系サービスを提供している自然生態系が変化しつつある。このような背景のもと、生物圏のさまざまなシステムを対象に、気候変動の影響評価が試みられているが、目に見えない土壌中で起こっている変化については、不明瞭な点が多い。

陸域生態系において、植物の光合成を介した一次生産は生態系の根源的な機能である。生産された有機物の大半は、最終的に枯死物として土壌生態系に加入し、土壌生物により分解される。この過程で有機物から放出された栄養塩類は、植物に吸収されることで再度植物の光合成を支える。このように植物と土壌は炭素・窒素といった物質の流れを介して相互に作用しており、切り離せないものである。

本研究では、温暖化に伴う土壌分解プロセスの変化を明らかにすることで、植物－土壌の相互作用によって存立する生態系全体がどのような影響を受けるのかについての示唆を提示する野外実験を行う。

従来、土壌生態系に供給される枯死物として、落葉を中心とする地上部の植物遺体を取り上げられてきた。このような従来のアプローチは、炭素・窒素などの物質循環プロセスを単純化している。本研究では、地上部に加えて地下部根系の分解プロセスを考慮することで、現実に即した検証を実施する。

(研究方法)

分解プロセスは、土壌に供給される枯死物の質と土壌生物活性の影響を強く受ける。気候変動に伴う気温上昇は、土壌生物活性を増大させるだけでなく、植生の変化（植物の種の入れ替わり）を引き起こすことで枯死物の質を変化させる。したがって、温暖化と土壌分解プロセスの関係を明らかにするためには、この二つの要因を考慮する必要がある。

本研究では、温暖化を模するために野外自然生態系における標高傾度を利用した。温暖化が進行すると、多くの植物種はその分布域を高標高域にある土地に移動させる。そのため、異なる標高間にある植生において、「①植物群集が土壌に供給する枯死物の質」と、「②その枯死物を分解する土壌生物の活性（寄与率）」、「③それらの結果として定まる分解速度や栄養塩類の放出速度」を比較すれば、温暖化に伴う植物－土壌相互作用の挙動の変化を推定することが可能である。以下に調査地、研究方法について具体的に述べる。

北海道・知床国立公園の羅臼岳を調査地として用いた。本対象地には50m、400m、600m、1000mに既に調査区が設置されており、木本、草本を含む植物群集や土壌動物群集の多様性調査が完了している（Mori et al. 2013, Glob Ecol Biogeogr; Ikeda et al. 2014 Popul Ecol）。これらの調査データをもとに、各4標高域において優占樹種8種を選び、これらの葉と根のり

ター（枯死物）を実験に使用した。使用した樹種は表1の通りである。

分解プロセスを追跡するために、上記のリターを用いてリターバッグ実験を行った。リターバッグ実験とは化学繊維でできたメッシュバッグの中に葉や細根のリターを詰め、森林林床に設置し、一定期間の培養を行うことにより、対象とする有機物リターの分解速度を定量する方法である。10×10cmのリターバッグに1gの葉を、10×5cmのリターバッグに0.5gの根を封入した。「上記①のリターの質」を定量化するために、分解実験設置前の各種・各部位のリターについて、炭素・窒素・リグニン濃度を測定した。「上記②、③の土壤生物の寄与率と分解速度」の定量のため、リターバッグのメッシュサイズを2種類（土壤動物侵入不可能な42 μ m・土壤動物侵入可能な1mm）用意し、分解後の重量を比較した。

（結果・考察）

各標高におけるリターのリグニン濃度、C/N比を図1に、リター重量残存率を図2に示す。リターの質の標高間における平均値の差に明瞭な傾向はなく（図1）、リター重量残存率においても標高間における各樹種の平均値の差は明瞭ではなかった。標高間の差よりも同標高内における種間の差の方が大きかった（図2）。このことから、温暖化等の気候変動に伴って植物種がその分布域を変化させても、その場所の分解速度が樹種の変化の影響を受けることは少ないと考えられる。またリターの質、分解速度共に、器官間（葉・細根）の差は大きく、物質循環モデルを構築するうえで地下部のリターを考慮する必要性が強調された。

土壤動物の寄与率に関して図3に示す。土壤動物の寄与率は、リター重量残存率の値を用いて $\text{LN} (L-42/L-1) = -\text{LN} (L-1/L-42)$ により計算を行い、この値は0より大きいときに土壤動物が侵入可能なりターの方が侵入不可能なりターよりも分解速度が大きくなることを示している。葉の分解において、土壤動物の寄与率は易分解性リターほど高くなる傾向が全標高においてみられた。根の分解においては、1000mの標高においてのみそのような傾向がみられた。また、葉と根の両方において、1000mの標高において、土壤動物の寄与率が他の標高よりも大きくなった。一般的に土壤温度が高いほど土壤微生物活性が高いといわれる。土壤動物は微生物を摂食することにより微生物の新陳代謝を高め、分解速度を促進することが知られている。1000m標高は他の標高よりも土壤温度が低く、土壤微生物活性が低かったため、土壤動物の有無が土壤微生物活性に与える影響が大きくなったのかもしれない。また、分解速度に対する土壤動物の有無の効果と樹種の違いの効果はしばしば交互作用をもつことが知られているが、易分解性の樹種ほど土壤動物の効果が大きくなる場合と難分解性の樹種ほど土壤動物の効果が大きくなる場合の両方が報告されている。本研究においては、易分解性の樹種ほど土壤動物の効果が大きくなることが示され、かつ、標高間でその傾向が変わらないことと高標高ほどその傾向が強くなることが示された。これは土壤動物とリター分解プロセスの関係における重要な知見となると考えられる。

これらの結果より、温暖化が進行した場合、植物の分布域の変化が樹種の効果を通じて分解速度に与える影響は小さいと考えられるが、土壤動物が樹種の効果との交互作用を通じてリター分解速度に及ぼす影響は変化すると考えられる。今回、対象にした土壤動物は体幅1mm以下の微生物食の土壤小型節足動物であるが、今後、大型土壤動物の効果も考慮して研究を進める必要がある。

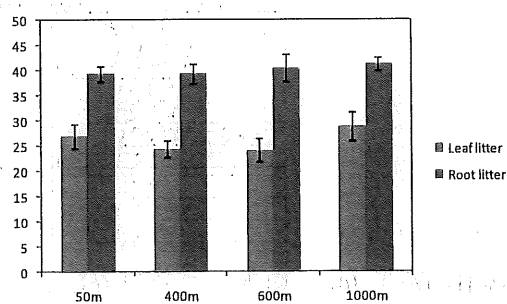
(表・図)

表1. リターバッグ実験に使用した各標高の樹種

50m	AJ	ハウチワカエデ
	AM	エゾイタヤ
	AS	トドマツ
	MO	ホオノキ
	PJ	エゾマツ
	PS	シウリザクラ
	QC	ミズナラ
	TC	イチイ
400m	AJ	ハウチワカエデ
	AM	エゾイタヤ
	AS	トドマツ
	DM	ユズリハ
	MO	ホオノキ
	QC	ミズナラ
	SC	ナナカマド
	TM	オオバボダイジュ
600m	AJ	ハウチワカエデ
	AM	エゾイタヤ
	AS	トドマツ
	BE	ダケカンバ
	PA	キハダ
	QC	ミズナラ
	SC	ナナカマド
	UL	オヒョウ
1000m	Ami	ミヤマハンノキ
	AT	ミネカエデ
	AU	オガラバナ
	BE	ダケカンバ
	PN	タカネザクラ
	SC	ナナカマド
	SM	ウラジロナナカマド
	VS	オオバスノキ

図1. 標高ごとの (a) リグニン濃度、(b) C/Nの比較
8樹種の平均値、エラーバーは標準誤差を示す。

(a) Lignin



(b) C/N

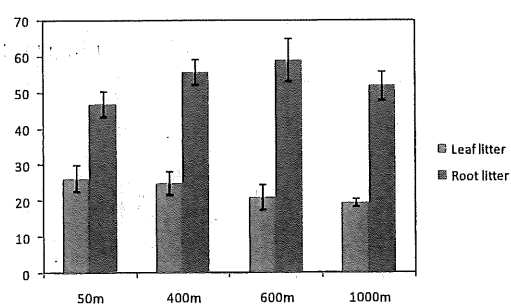


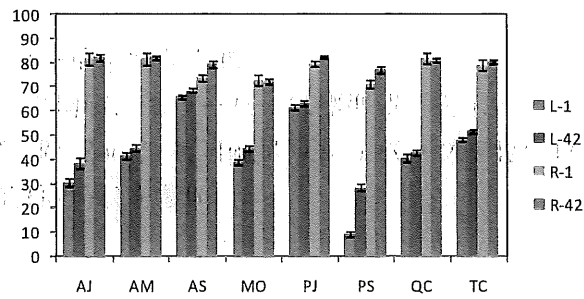
図2. リター重量残存率 (%)

10反復の平均値、エラーバーは標準誤差を示す。

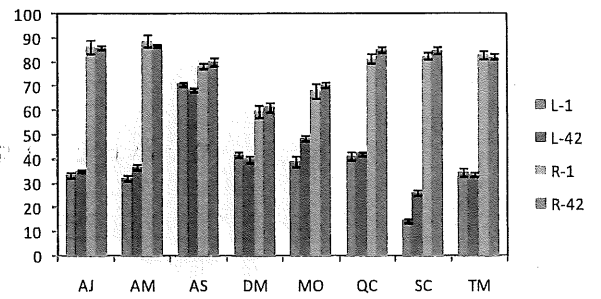
L: Leaf, R: Root, 1: 1mmメッシュバッグ, 42: 42 μ mメッシュバッグ

樹種の略称は表1を参照。

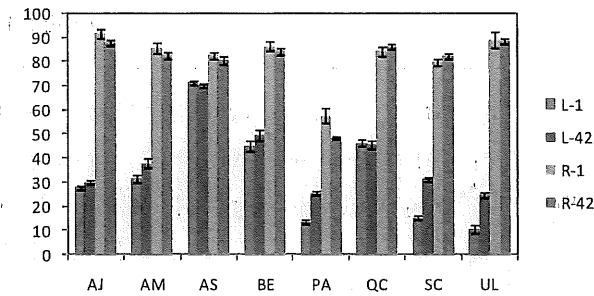
(a) 50m



(b) 400m



(c) 600m



(d) 1000m

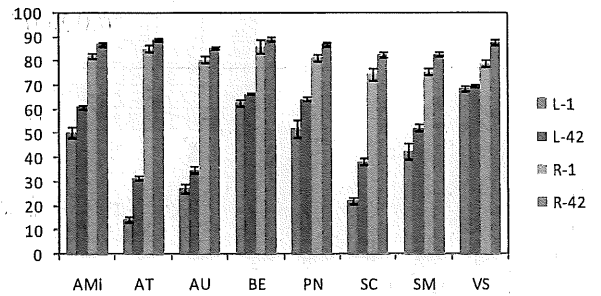


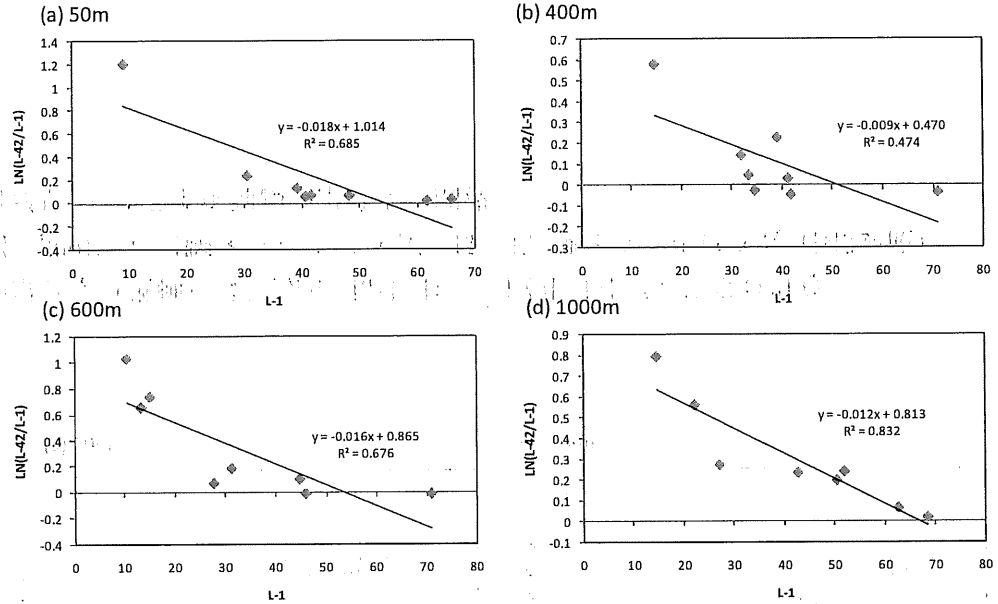
図3.

リター重量残存率 (%) と土壌動物の寄与率の関係

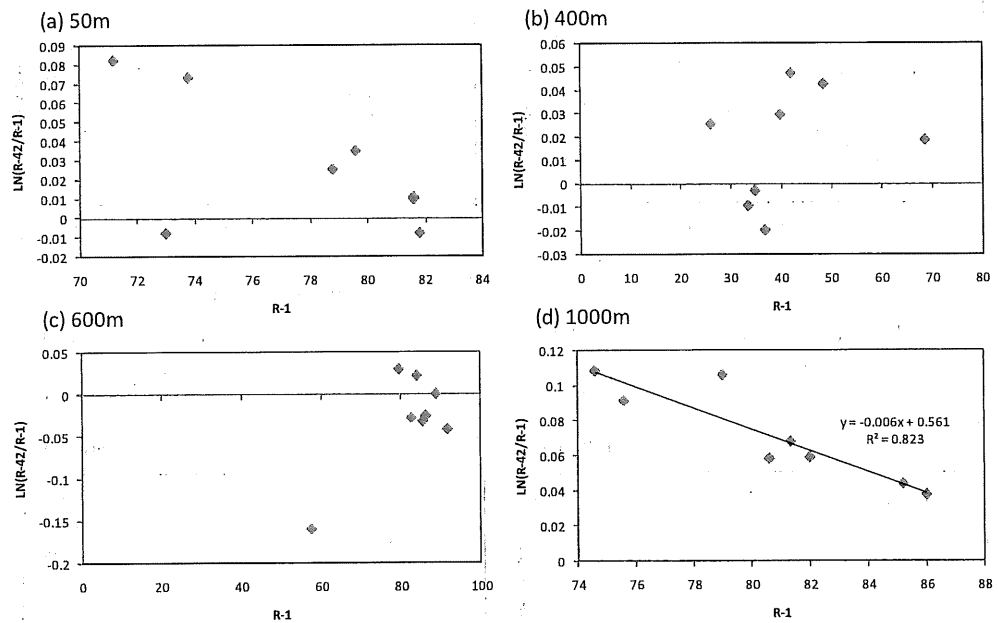
L: Leaf, R: Root, 1: 1mmメッシュバッグ, 42: 42 μ mメッシュバッグ (図2参照)

土壌動物の寄与率 (縦軸) は、 $\text{LN}(L-42/L-1) = -\text{LN}(L-1/L-42)$ により計算

A. 葉



B. 細根



・(成果・今後の発表予定等)

2015年3月の日本生態学会にて一部発表

藤井佐織・森章「森林生態系における生産者多様性と土壌機能性」シンポジウムS09-5

2016年8月の国際土壌動物会議 (XVII International Colloquium on Soil Zoology) にて発表予定

2015年度中に論文投稿予定

藤井佐織・森章「森林生態系における生産者多様性と土壌機能性」

2015年3月の日本生態学会にて一部発表

藤井佐織・森章「森林生態系における生産者多様性と土壌機能性」シンポジウムS09-5

2016年8月の国際土壌動物会議 (XVII International Colloquium on Soil Zoology) にて発表予定

2015年度中に論文投稿予定

藤井佐織・森章「森林生態系における生産者多様性と土壌機能性」

2015年3月の日本生態学会にて一部発表

藤井佐織・森章「森林生態系における生産者多様性と土壌機能性」シンポジウムS09-5

2016年8月の国際土壌動物会議 (XVII International Colloquium on Soil Zoology) にて発表予定

2015年度中に論文投稿予定

キラル型カーボンナノチューブの光学分割を指向した 分子ピンセットの創製

横浜国立大学大学院 工学研究院 助教
伊藤 傑

【研究目的】

単層カーボンナノチューブ (SWNT : Single-Walled Carbon Nanotube) は、優れた電気化学的特性、機械特性を有することから、燃料電池や半導体などの電子材料、軽量・高強度な構造材料としての応用研究が活発に行われている。通常、SWNTは多数の異性体混合物として合成されるが、高純度のSWNTを用いることで電気化学的特性が大きく向上するため、SWNTの分離精製に関する研究は精力的に行われてきた。しかし、「らせん不斉」を有するキラル型SWNTの「右らせん」と「左らせん」の分離 (光学分割) は困難であり、その報告は国内外含め数例にとどまっている。いずれも優れた研究成果であるものの、分離能が中程度 (60% ee) ^[1,2]、高価な試薬や特殊な装置が必要となる^[3]など、より簡便で高効率な手法の開発が望まれている。本研究では、キラルなピンセット型分子により片巻きらせんのSWNTを選択的に可溶化することでSWNTの光学分割を実現することを目指して、新規のキラル分子ピンセットの創製とそのキラル認識能、分子包接能の評価を行った (図1, 2)。

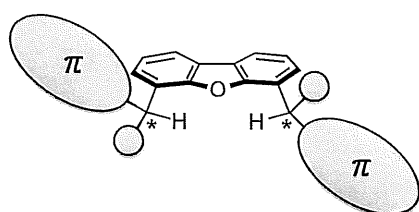


図1. 新規キラル分子ピンセット

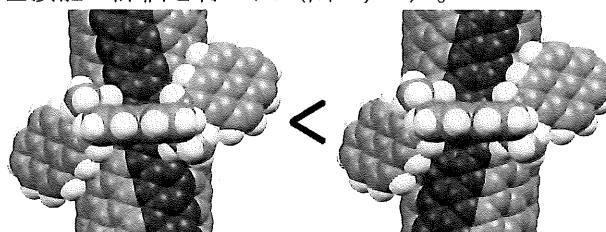


図2. キラル型SWNTと分子ピンセットとの相互作用

【研究方法】

これまでの研究で、市販のジベンゾフランより二段階で光学的にほぼ純粋なキラルジオール(*S,S*)-**1**を不斉合成することに成功している。本研究ではまず、(*S,S*)-**1**に対する立体反転を伴うアジド化およびアジドの還元により、鍵中間体であるキラルジアミン(*R,R*)-**2**を合成した。さらに、得られたジアミン(*R,R*)-**2**と種々の芳香族アルデヒドとの還元的アミノ化により(*R,R*)-**3**を合成し、キラル認識能を評価した。また、1-ブロモピレンとのBuchwald-Hartwigカップリングにより(*R,R*)-**4**を合成し、分子包接能および炭素材料の可溶化能を調査した (図3)。

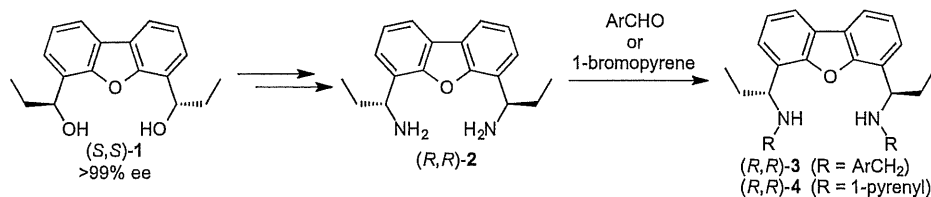


図3. 分子ピンセット(*R,R*)-**3**、(*R,R*)-**4**の合成方法

【結果と考察】

(1) キラルジアミン(*R,R*)-**2**の合成

まず、テトラメチルエチレンジアミン (TMEDA) 存在下、ヘキサン中でジベンゾフランとブチリチウムを40分間加熱還流した後、0 °Cでジメチルホルムアミド (DMF) を加えて室温で一晩攪拌することで、4,6-ジベンゾフランジアルデヒドを収率45%で得た。得られたジアルデヒドに対し、触媒量 (20 mol%) のキラルなアминаール型1,4-アミノアルコール存在下、ジエチル亜鉛をトルエン/ジクロロメタン(1:1)混合溶媒中、室温で17時間反応させることで、光学的にほぼ純粋な(*S,S*)-**1**を収率72%で得た (図4)。

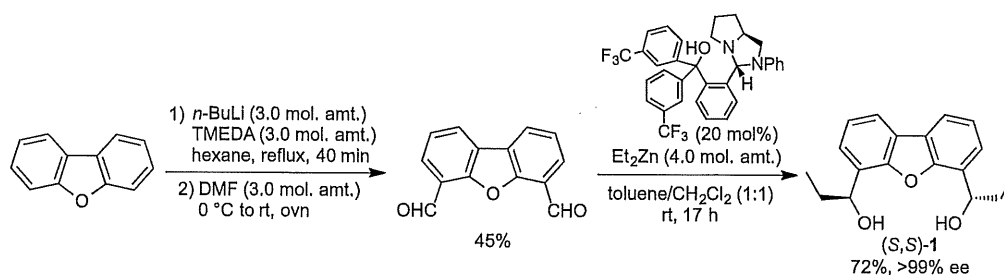


図4. キラルジオール(*S,S*)-**1**の不斉合成

次に、キラルジオール(*S,S*)-**1**とトリフェニルホスフィンのテトラヒドロフラン (THF) 溶液に、-20 °Cでアゾジカルボン酸ジエチル (DEAD)、ジフェニルリン酸アジド (dppa) を順次加え、24時間攪拌することで、ジアジド(*R,R*)-**5**を収率85%で得た。得られたジアジド(*R,R*)-**5**を、水素雰囲気下、5%パラジウム炭素とメタノール中室温で20時間攪拌することで、鍵中間体であるキラルジアミン(*R,R*)-**2**を収率98%で得た (図5)。

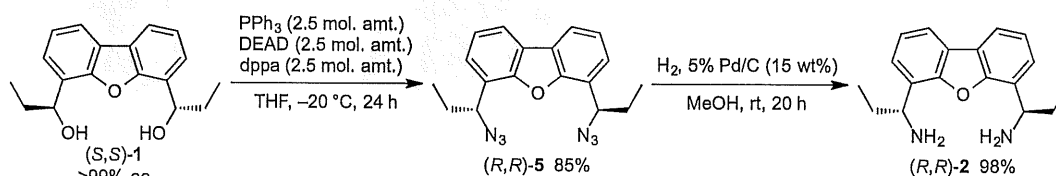


図5. キラルジアミン(*R,R*)-**2**の合成

(2) 分子ピンセット(*R,R*)-**3**の合成とそのキラル認識能

キラルジアミン(*R,R*)-**2**とベンズアルデヒド、1-ナフトアルデヒド、または1-ピレンカルバルデヒドをエタノール中、3時間加熱還流した後、水素化ホウ素ナトリウムを加えて室温で17時間攪拌することで、分子ピンセット(*R,R*)-**3a** (Ar = Ph)、(*R,R*)-**3b** (Ar = 1-ナフチル)、(*R,R*)-**3c** (Ar = 1-ピレニル)をそれぞれ収率73%、36%、23%で得た (図6)。

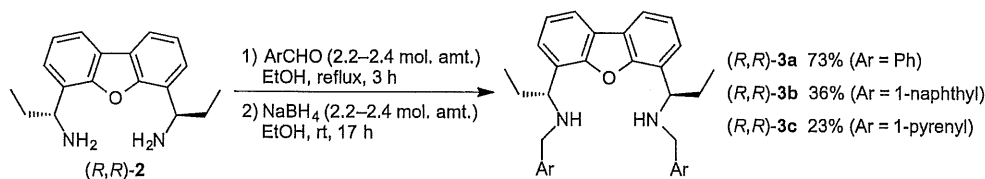
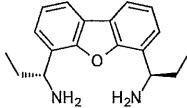
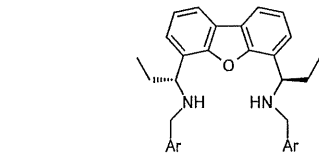
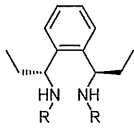


図6. 分子ピンセット(*R,R*)-**3**の合成

合成したキラルジアミン(*R,R*)-**2**および分子ピンセット(*R,R*)-**3a**–**3c**のキラル認識能を評価するため、各種ジアミンとDL-マンデル酸を重水素化クロロホルム中で混合し、¹H NMRスペクトルを測定した(表1)。まず、キラルジアミン(*R,R*)-**2**に対し、DL-マンデル酸を1:1、1:2、1:4のモル比で混合したところ、マンデル酸α位プロトンの両エナンチオマー間での化学シフト値の差(ΔΔδ)は、それぞれ0.074、0.090、0.019 ppmとなった。混合比1:1の場合にはシグナルのブロード化が起きたが、混合比1:2では両エナンチオマーのシグナルがベースラインで分離し、(*R,R*)-**2**が高いキラル認識能を有することが明らかとなった。次に、(*R,R*)-**3a**–**3c**についても同様の実験を行ったところ、混合比1:2のときにマンデル酸の両エナンチオマーのシグナルはブロード化したが大きく分離した。一方、比較のために別途合成した*o*-キシリレン型ジアミン(*R,R*)-**6a**および(*R,R*)-**6b**を用いた場合には、ΔΔδ値は最大0.043 ppmであり、ジベンゾフラン骨格を有するジアミン**2**、**3**が高いキラル認識能を有することが示された。

表1. 500 MHz ¹H NMR、CDCl₃中におけるマンデル酸のカルボン酸α位シグナルのΔΔδ値(ppm)

ジアミン						
	(<i>R,R</i>)- 2	(<i>R,R</i>)- 3a Ar=Ph	(<i>R,R</i>)- 3b Ar=1-naphthyl	(<i>R,R</i>)- 3c Ar=1-pyrenyl	(<i>R,R</i>)- 6a R=H	(<i>R,R</i>)- 6b R=PhCH ₂
混合比 ^a 1:1	0.074 ^b	0	0.053	0	0.024	0.004
混合比 ^a 1:2	0.090	0.129 ^b	0.093 ^b	0.074 ^b	0.043	0.008
混合比 ^a 1:4	0.019	0.024	0.022	0.061	0	0.015

^aジアミン/DL-マンデル酸の混合モル比。^bブロードなシグナルが観測された。

上記ジアミンのうち、(*R,R*)-**3c**は取り扱い容易な固体であり、4分の1倍モル量の**3c**を加えるのみでマンデル酸のシグナルが十分に分離(ΔΔδ=0.061 ppm)したことから、(*R,R*)-**3c**をキラルシフト試薬として用いる鏡像体過剰率の決定について検討を行った(図7)。重量比に基づき調製した鏡像体過剰率の異なるマンデル酸を、

(*R,R*)-**3c**/マンデル酸=1:4で混合して¹H NMRを測定したところ、積分比より求めた鏡像体過剰率が、重量比に基づいて調製した鏡像体過剰率と一致した。また、ベンゼン環上に置換基を有するマンデル酸誘導体や*O*-メチルマンデル酸を(*R,R*)-**3c**と混合した場合も、両エナンチオマーのシグナルが分離した(表2)。

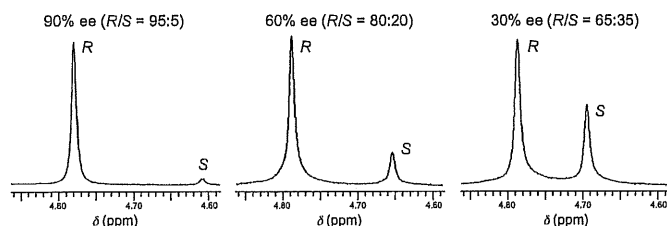
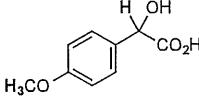
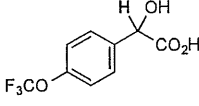
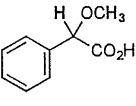


図7. キラルジアミン(*R,R*)-**3c**による鏡像体過剰率の決定

表2. マンデル酸誘導体のΔΔδ値

マンデル酸誘導体	ΔΔδ(ppm)
	C ₆ H 0.056
	OCH ₃ 0.053
	C ₆ H 0.053
	C ₆ H 0.050
	OCH ₃ 0.078

(3) 分子ピンセット(*R,R*)-4の合成とその分子包接能

キラルジアミン(*R,R*)-2と1-プロモピレンを酢酸パラジウム、2,2'-ビス(ジフェニルホスフィノ)-1,1'-ビナフチル(BINAP)、ナトリウム*tert*-ブトキシド存在下、トルエン中、12時間加熱還流することで、分子ピンセット(*R,R*)-4を収率43%で得た(図8)。

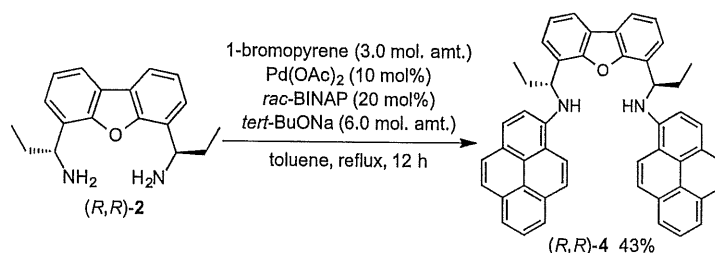


図8. 分子ピンセット(*R,R*)-4の合成

まず、アントラキノンとナフタレン-1,4,5,8-テトラカルボン酸二無水物をゲスト分子として用い、¹H NMRにより(*R,R*)-4の芳香族化合物に対する包接能を評価した。その結果、(*R,R*)-4とアントラキノンとの相互作用は観測されなかったが、ナフタレン-1,4,5,8-テトラカルボン酸二無水物とは包接複合体を形成し、その会合定数は11 M⁻¹であった。次に、SWNTのモデルとなるフラーレン(C₆₀)を用い、分子ピンセット(*R,R*)-4によるC₆₀の有機溶媒への可溶化を試みたが、(*R,R*)-4ではC₆₀の可溶化能が低いことが分かった。

以上のように、本研究では、ジベンゾフラン骨格を有する新規のキラル分子ピンセット(*R,R*)-3が高いキラル認識能を有することを明らかにした。一方、本研究で合成した分子ピンセットでは、炭素材料の可溶化能が不十分であった。本研究で得た知見に基づき、溶解性の高い置換基を持つ分子ピンセットを合成することで、SWNTを光学分割できると期待される。

【成果】

本研究で得られた成果について、1件の特許出願と2件の国内学会発表を行った。

1. 伊藤傑、浅見真年、生田健悟、「光学活性ジアミン誘導体、光学活性ジアミン、光学活性アジド、光学活性ジオール、光学活性ジアミン誘導体の製造方法及び光学活性化合物の光学純度決定法」、特願2015-98481、(出願日2015年5月13日)
2. 伊藤傑、生田健悟、浅見真年、「ジベンゾフラン骨格を有するキラルなC₂対称ジアミン誘導体の合成とその分子認識能」、『日本化学会第95春季年会』、3PB-090、千葉、2015年3月
3. 伊藤傑、生田健悟、浅見真年、「キラルなC₂対称ジアミン誘導体の合成とそのキラルシフト試薬としての利用」、『第69回有機合成化学協会関東支部シンポジウム』、B01、神奈川、2015年5月

【参考文献】

1. Peng, X.; Komatsu, N.; Bhattacharya, S.; Shimawaki, T.; Aonuma, S.; Kimura, T.; Osuka, A. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 361.
2. Akazaki, K.; Toshimitsu, F.; Ozawa, H.; Fujigaya, T.; Nakashima, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12700.
3. Green, A. A.; Duch, M. C.; Hersam, M. C. *Nano Res.* **2009**, *2*, 69.

無性・有性生殖プラナリアにおける寿命制御の種間比較

鹿児島大学学術研究院理工学域理学系・助教

野殿 英恵

(研究目的)

生殖とは次世代を創ることを指し、その様式はゲノムの混合(広義の性)の有無により無性生殖と有性生殖に大別できる。各生殖様式には生殖コストや遺伝的多様性の創出といった相異なる利点・欠点があり、自然界では多くの生物が環境条件等に応じて両生殖様式を転換し、利点を享受している。一般に有性生殖を行う生物では個体の死が不可避であり、体細胞は寿命を持ち、生殖細胞を次世代へ繋ぐ。一方、無性生殖生物に個体の死は無い。このように性と寿命は深く関わっている。進化の過程で生物は子孫に多様性を生むため有性生殖を獲得したが、ゲノムの巨大化に伴い染色体は環状から棒状に変化し、テロメア複製問題が生まれた。すなわち体細胞では細胞分裂時にテロメアの短縮が起こるため、細胞分裂回数の上限＝寿命ができた。有性生殖と引き換えに生物は寿命をもったと考えられているが、いまだ定説は無い。果たして有性生殖に老化は不可避だったのか？生殖様式と寿命は必ず相関するのか？この問題に対し、無限の再生能力をもち不死であるため体細胞にも寿命が無いと考えられる無性生殖個体と、有限の寿命を持つ有性生殖個体、さらには一個体において無性生殖と有性生殖を転換可能な種も存在するという、種によって多様な生殖様式と寿命をもつプラナリアを用いて挑んだ。

(研究方法)

淡水棲プラナリアでは、無性生殖のみで殖える無性系統、有性生殖のみの先天的有性系統、そして生殖様式を季節転換する系統が存在する(図1)。先行研究において、種内に無性系統と有性系統のみを有する *Schmidtea mediterranea* で両者の間にテロメア長維持能の差異が見出され、その分子機構が明らかになった(Tan et al. 2012)。無性系統では自切・再生(無性生殖)を経ると、短くなっていったテロメアが元の長さに戻るのに対し、有性系統では年齢とともにテロメアは短くなり、また切断・再生を経てもテロメア長はリセットされず、有性生殖でのみリセットされた。この差異はテロメア伸長酵素テロメラゼの構成サブユニット *telomerase reverse transcriptase; tert* の活性型アイソフォームの発現量と相関し、無性系統の再生時にのみ活性型 *tert* の発現比が高まることが見出された。この種の生殖様式は染色体転座の有無により先天的に決定している。それに対し、本研究で用いた *Dugesia ryukyuensis* では生殖様式決定に関わる染色体転座は存在しない上に、人為的に無性生殖から有性生殖に生殖様式を転換できることから、生殖様式とテロメア維持

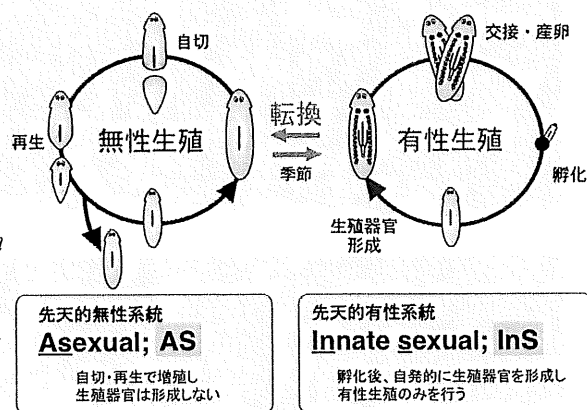


図1 プラナリアの生殖様式

能および機構の関係について新たな知見が期待できた。そこで*D. ryukyuensis*や、年周期の有性生殖後に寿命を迎える、雌性単為生殖を行うなど多様な生殖様式をとる近縁・遠縁の種（図2）に対象を拡大してテロメアバイオロジーを解析した。まず、各種のプラナリアの染色体標本を作成し、テロメア繰り返し配列をプローブとした蛍光 *in situ* hybridizationを行った。さらにテロメア長の測定、*tert*遺伝子配列の取得、スプライシングアイソフォームの同定、発現比測定を行った。

<i>D. ryukyuensis</i> (有性・無性・人為的有性化・季節転換)	DugesIIDae 科
<i>D. japonica</i> (有性・無性・季節転換)	
<i>D. lugubris</i> (有性・Pseudogamyでの雌性単為生殖)	
<i>S. mediterranea</i> (染色体転座で有性・無性)	
<i>Girardia tigrina</i> (季節性有性・無性)	Dendrocoelidae 科
<i>Dendrocoelum lacteum</i> (季節性有性・無性)	

図2 本研究で対象としたプラナリア

(結果)

図2に挙げた各種について染色体標本を作製し、各生殖様式について核型解析した結果、生殖様式と相関する染色体変異は見出されなかった。さらにテロメア配列に対する蛍光 *in situ* hybridization法を行い、染色体上でのテロメア配列の局在を調べた結果、全種・生殖様式において染色体末端にテロメア配列が存在することを確認できた（図3）。このテロメア配列に結合したプローブの標識蛍光の強度定量によるテロメア長測定を試みたが、試料間での強度の相対化が難しく実現には至らなかった。

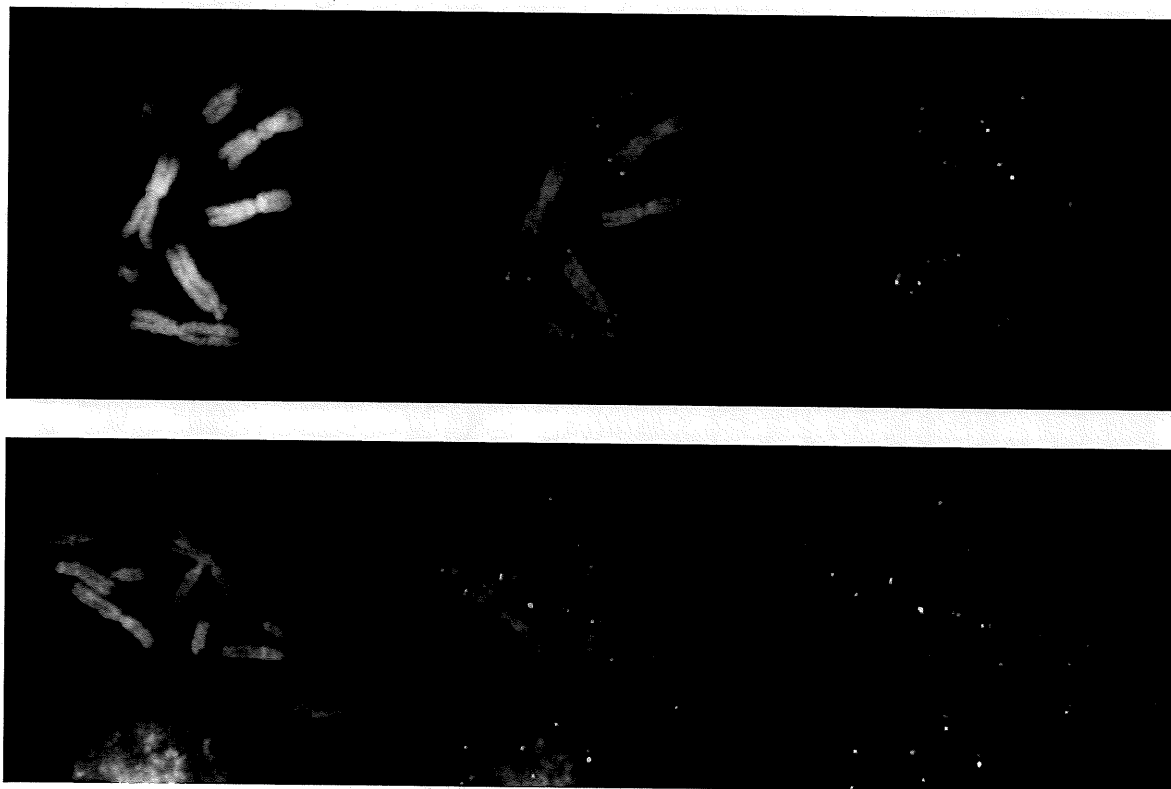


図3 テロメア FISH の結果例
 (左から DAPI による染色体像、重ね合わせ像、テロメアリピートの蛍光染色像)
 (上段: *S. mediterranea* の無性系統、下段: *D. lugubris* の有性系統)

調べた全ての種においてテロメア配列が存在していたことから、次に各種のインタクト（非再生）状態と切断・再生後のテロメア長を調べた（図4）。

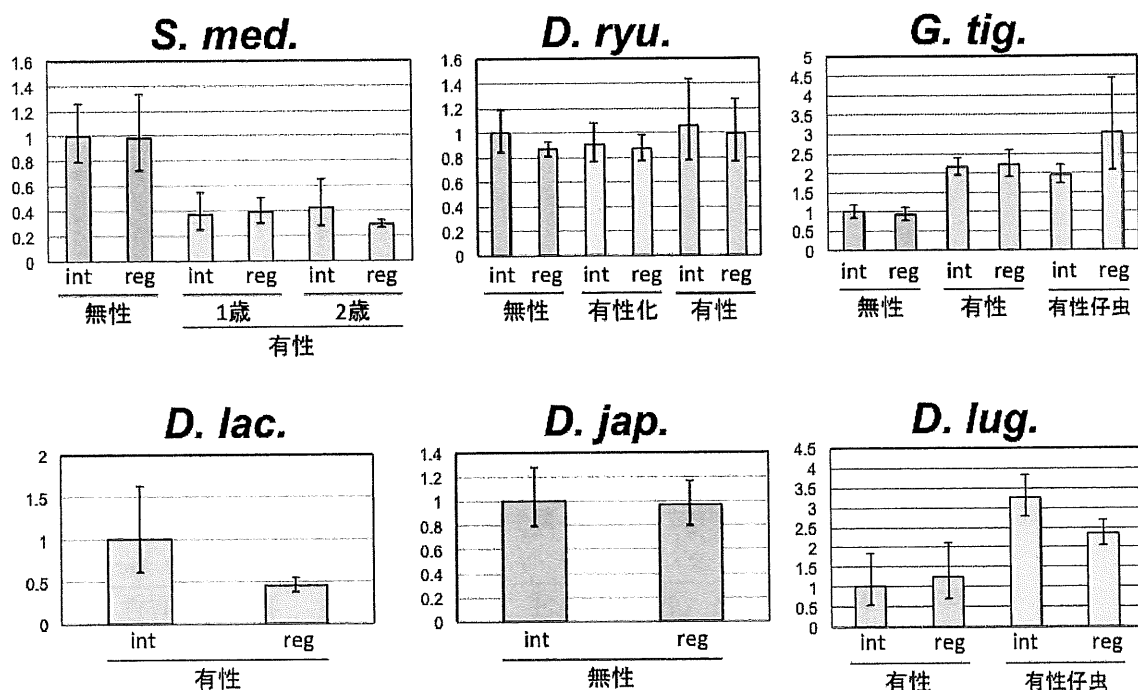


図4 種・生殖様式毎のテロメア相対長 (int:インタクト (非再生時)、reg:切断・再生後)

その結果、成体においては*D. lacteum*で切断・再生によるテロメアの顕著な短縮が見られたが、その他の種の非再生時と再生時の間では大きな変化は見られなかった。また生殖様式とテロメア長の関係は種によって様々で、*S. mediterranea*とは逆に無性個体より有性個体のテロメアが長い*G. tigrina*や、生殖様式に関わらず一定の長さを有する*D. ryukyensis*など、種間に共通する傾向は見出されなかった。有性個体の交雑により仔虫が得られた*G. tigrina*と*D. lugubris*については仔虫の再生前後でも比較したが、*G. tigrina*では切断後にテロメア長の伸長が見られたのに対し、*D. lugubris*では逆に短縮化が見られるなど仔虫の再生時のテロメア長挙動にも種間に共通した傾向はなかった。

続いて*tert*の配列決定を行った。*D. ryukyensis*については、トランスクリプトームデータベース中に存在していた部分配列を元に全長を決定した。その他の種については、配列既知の近縁種でのアライメントを元に、保存性の高い配列領域を用いてPCRを行い配列を決定した。この配列情報を元にアイソフォームの識別可能なプライマーセット (図5のエキソン模式図に矢印で示したように、スプライシング領域を挟むセット) を設計し、2か所のスプライシング領域I・II (Alt I・II) を含む転写産物 (+) と抜け落ちた産物 (-) の発現比を、まずは*S. mediterranea*と*D. ryukyensis*の非再生時と再生後に調べた (図5)。その結果、再生前後、生殖様式ごとに発現比が変化する*S. mediterranea*とは異なり、*D. ryukyensis*の場合は再生の有無や生殖様式によらず、同じ発現比で同程度の発現をしていた。またAlt IIは*S. mediterranea*の無性系統の再生時と同様の発現比であったが、Alt IについてはAlt I-型の発現は見られず、常にAlt I+型のみが発現していた。

その他の種についても非再生時にAlt IとIIのアイソフォーム発現の有無を調べた結果、表1の通りとなり、*D. lugubris*のAlt II、*G. tigrina*の無性系統のAlt I以外はいずれも非再生時に+型の発現のみが見られ、活性型のTERTを発現していると分かった。

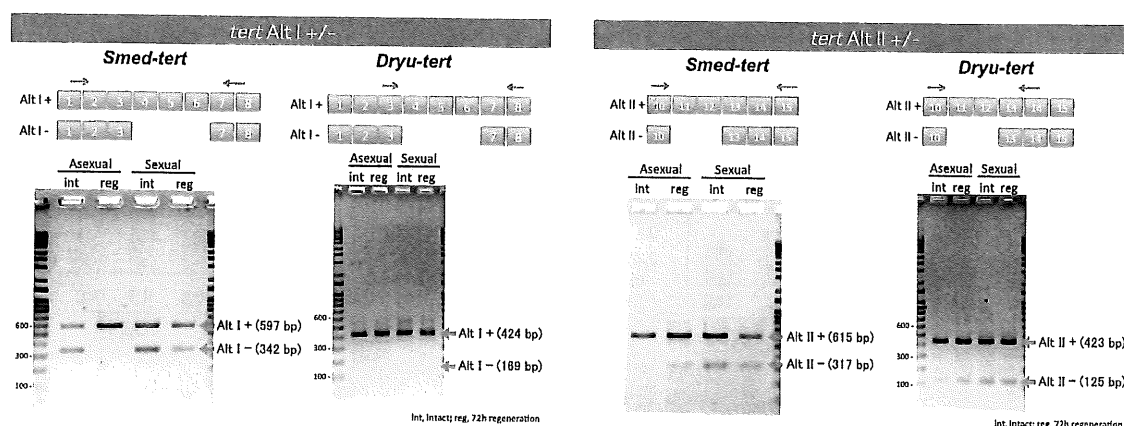


図5 *S. mediterranea*と*D. ryukyuensis*の *tert* の非再生時 (int) と再生時 (reg) の *tert* アイソフォームの発現 (左: Alt I +/- の発現比、右: Alt II +/- の発現比)

表1 プラナリアの種と生殖様式ごとの非再生時に発現が見られた *tert* アイソフォーム

	<i>D. ryu</i>			<i>S. med</i>		<i>D. lug</i>	<i>G. tig</i>		<i>D. lac</i>	<i>D. jap</i>
	無性	有性	有性化	無性	有性	有性	無性	有性	有性	無性
Alt I	+	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+	+	+
Alt II	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+

本研究において *tert* 遺伝子配列を決定した種においては *S. mediterranea* のように2か所のスプライシング部位がある種は見られなかった (表1)。しかしスプライシングが見られた種の欠損配列部位は一致していたため、*S. mediterranea* のようにストップコドンの挿入や活性部位の欠落が起こり、-型の翻訳産物は活性を持たないことが示唆された。

(成果・考察)

S. mediterranea においては生殖様式によってテロメア維持能が異なり、その分子機構として、切断・再生時に無性系統でのみ Alt I+ の *tert* の発現が上昇しテロメア伸長が起こると示されていた。本研究において各種のプラナリアのテロメア長の再生前後での変化、*tert* のスプライシングアイソフォームの発現比を調べた結果、種ごとに様々であり、種間を通じた、生殖様式ごとの一定の法則は見出されなかった。先天的無性、先天的有性と人為的有性化個体を有する *D. ryukyuensis* では生殖様式によらずテロメア長の短縮は見られず、*tert* アイソフォームの発現比も生殖様式間で差が無いなど、*S. mediterranea* とは異なる結果が得られた。テロメア長が生殖様式に依らない *D. ryukyuensis* では活性型 *tert* が生殖様式によらず発現していること、無性系統より有性系統のテロメアが長かった *G. tigrina* では無性系統でのみ Alt- 型の *tert* の発現が見られ、有性系統では活性型のみが発現していることなど、種ごとのテロメア長と *tert* の発現調節は良く相関していた。以上より本研究で「有性生殖」と「テロメア短縮」は定説に反して必ずしも相関しないと示唆された。

先行研究で見出された知見を元に生殖様式転換可能な種に研究対象を拡大し、予想を覆した新たな知見が得られた。再生時と非再生時の間でテロメア長の変化があまり見られなかったが、これは非再生時の試料個体の最後の生殖からサンプリングまでに十分な時間を経ていなかったことが原因かもしれない。そのため再生時での *tert* 発現解析をこれらの種では行わなかったが、本研究により *tert* アイソフォームの発現比やテロメア長の測定法を確立したことで更なる解析ができる基盤は整った。

小脳プルキンエ細胞の軸索起始部形成における MTCL1 タンパク質の役割

横浜市立大学大学院生命医科学研究科 客員研究員
佐竹 智子

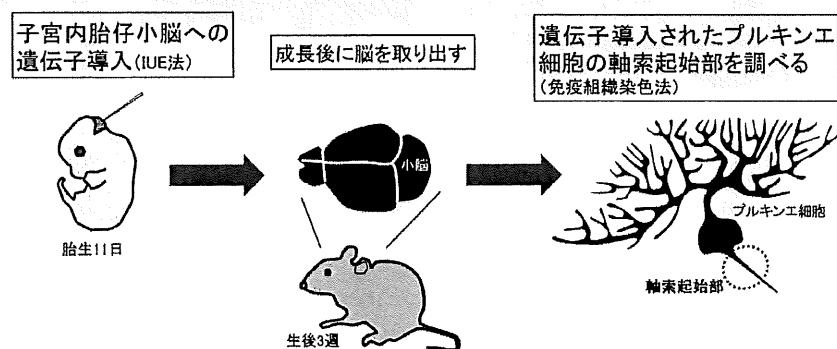
(研究目的)

神経細胞の活動電位は、細胞体と軸索の境界にある軸索起始部という領域で発生する(発火)。種々の電位依存性イオンチャネルの軸索起始部への集中的局在が発火に必須であるなど、発火の分子機構の解明が進む一方、軸索起始部の形成および機能制御の機構の理解は取り残されている。40年以上前の電子顕微鏡による観察から、軸索起始部の構造は神経細胞の種類によらず共通であり、微小管の束構造が存在するという構造的特徴が明らかにされた。微小管の束構造は極めて特殊で、神経細胞内では軸索起始部とそれに隣接する軸索丘にしか観察されない。しかし、軸索起始部の微小管の束構造の形成機構やその存在意義は、全くと言えるほど明らかになっていない。微小管架橋/束化因子であるMTCL1タンパク質は、小脳の神経細胞であるプルキンエ細胞に高発現し、プルキンエ細胞の軸索起始部付近に局在する。MTCL1ジーントラップマウスのプルキンエ細胞では、軸索起始部の形状および発火特性に異常を認め、ジーントラップのホモ接合体マウスは歩行失調を示すことから、MTCL1タンパク質がプルキンエ細胞の軸索起始部の微小管束の形成に寄与し、これが軸索起始部の形成および機能発現に重要である可能性がある。本研究では、プルキンエ細胞の軸索起始部の形成におけるMTCL1タンパク質の役割を明らかにし、軸索起始部の微小管の束構造の存在意義に迫ることを目的とした。

(研究方法)

【概要】子宮内胎仔への電気穿孔による遺伝子導入法(In utero electroporation 法, IUE法)により、野生型マウス胎仔(胎生11日目)の小脳プルキンエ細胞に、MTCL1タンパク質の発現を抑制するshRNA発現ベクター(KDベクター)やV5タグ融合MTCL1変異体の発現ベクターなどを遺伝子導入した。得られた産仔マウスが生後3週齢に達したら、小脳組織切片を作製し、免疫組織染色を行って、遺伝子導入されたプルキンエ細胞の軸索起始部の形状を観察

図 1 本研究で行った実験の概要



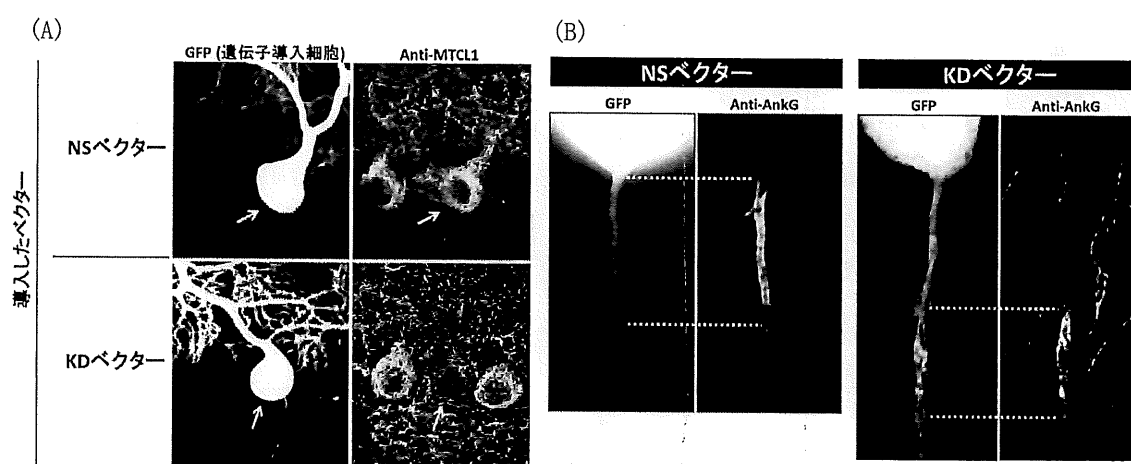
した（図1）。KDベクター導入の対照実験には、Non silencingベクター（NSベクター）を遺伝子導入した個体のプルキンエ細胞を用いた。KDベクターとNSベクターはGFP発現カセットを含むため、遺伝子導入された細胞はGFPのシグナルにより判別した。

（結 果）

1. MTCL1タンパク質の発現抑制は、軸索起始部の形成を傷害する

マウス個体内において、MTCL1が小脳プルキンエ細胞の軸索起始部の形成に寄与するかを調べるため、IUE法によりKDベクターをマウス小脳プルキンエ細胞に導入し、内在性MTCL1タンパク質の発現を抑制した。マウスのプルキンエ細胞は生後3週でほぼ発達を終えるため、遺伝子導入された個体が生後3週齢に達したところで小脳組織切片を作製し、免疫蛍光染色を行った。まず、KDベクターが導入されたプルキンエ細胞で、MTCL1タンパク質の発現が抑制されていることを確認した（図2(A)）。次に、軸索起始部に該当する領域の形状を観察したところ（図2(B), GFP）、NSベクター導入細胞では、表面が滑らかで軸索に向かって幅が細くなる形態が観察されたのに対し、MTCL1-KDベクター導入細胞では、表面が粗く随所で突起のような構造が存在し、幅が不規則な形態が観察された。そして、軸索起始部のマーカーであるAnkyrin G (AnkG) の免疫染色像を見ると（図2(B), Anti-AnkG）、NSベクター導入細胞では、AnkGの染色領域は軸索に向かって先細の形態で、かつ均一な染色強度であるのに対し、KDベクター導入細胞では、形態が不規則で、部分的にAnkGの染色が消失していた。更に、NSベクター導入細胞では、AnkGの染色起点が細胞体に接しているのに対し、KDベクター導入細胞では、染色起点が細胞体から軸索方向に解離していた。加えて、KDベクター導入細胞では、AnkGの染色像が完全に消失しているものが多数観察されたことから、「マウス個体内において、MTCL1は小脳プルキンエ細胞の軸索起始部領域の形態および構造の形成に必須」であることが示唆された。

図 2 MTCL1 タンパク質の発現抑制は、軸索起始部の形成を傷害する



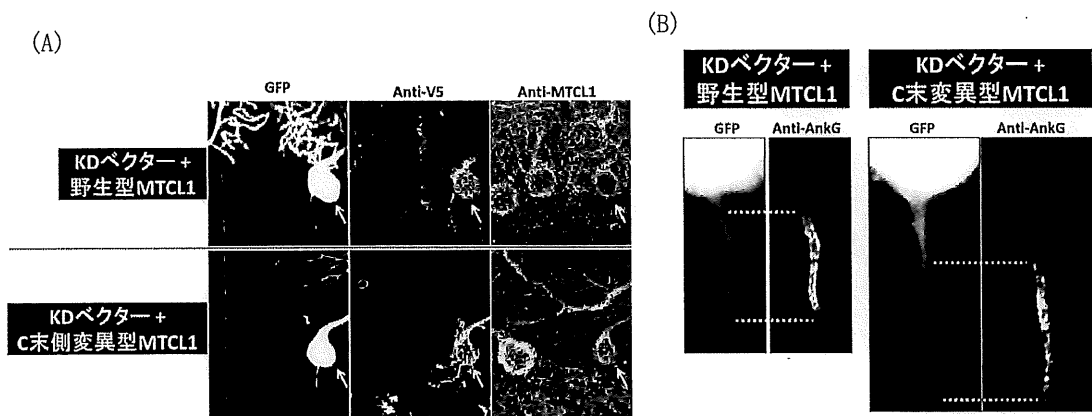
(A) KD ベクターの導入により、プルキンエ細胞の MTCL1 タンパク質の発現が抑制された。矢印は遺伝子導入されたプルキンエ細胞。KD ベクター導入細胞では、Anti-MTCL1 の免疫染色のシグナルが NS ベクター導入細胞に比べて低下した。

(B) KD ベクターの導入により、軸索起始部の形態が異常になった。図の下側が軸索側。点線囲部は AnkG 陽性の軸索起始部。KD ベクター導入細胞では、軸索起始部の表面が粗く突起が観察された。更に、Anti-AnkG の染色起点の軸索方向への解離、部分的な Anti-AnkG の染色の消失が観察された。

2. MTCL1タンパク質のC末端側の微小管結合領域は、軸索起始部の位置決定に関与する

次に、MTCL1が軸索起始部の形成に関与するメカニズムを明らかにするため、MTCL1分子のどの領域が軸索起始部の形成に寄与するのかの解明に着手した。軸索起始部には安定な微小管が束構造を形成していること、そして、MTCL1のC末側を介した微小管との結合は、微小管を安定化することから、MTCL1はC末側の微小管結合領域を介して、軸索起始部の形成に関与している可能性がある。そこで、KDベクターと共にC末側の微小管結合活性を欠損させたMTCL1変異体（C末側変異体MTCL1）を同時導入し、軸索起始部の形成異常のレスキュー効果を野生型MTCL1を同時導入した場合と比較した。まず、V5タグを融合した野生型あるいはC末側変異体MTCL1が導入されたプルキンエ細胞で、MTCL1タンパク質の発現が回復していることを確認した（図3(A)）。野生型MTCL1が導入された細胞の軸索起始部に該当する領域の形状は、表面が滑らかで軸索に向かって幅が細くなる形態が観察された（図3(B), GFP）。C末側変異体MTCL1が導入された細胞でも、軸索起始部に該当する領域の形状は野生型MTCL1が導入された場合と同様の形状となった。しかし、AnkGの染色像を観察すると、野生型MTCL1が導入された細胞では、AnkGの染色領域の起点が細胞体に近接していたのに対し、C末側変異体MTCL1が導入された細胞では、細胞体から軸索方向に解離していた（図3(B), Anti-AnkG）。AnkGの染色領域の形態は、野生型MTCL1とC末側変異体MTCL1の導入細胞で違いはなかった。これらの結果から、MTCL1は、C末側の微小管結合活性を通じて、プルキンエ細胞の軸索起始部の位置の決定に寄与することが示唆された。

図 3 C 末側変異型 MTCL1 の導入により、軸索起始部が遠位に形成された。



(A) KD ベクターと V5 タグ MTCL1 タンパク質 (野生型・C 末側変異型) の同時導入により、MTCL1 タンパク質の発現が回復する。矢印は遺伝子導入された細胞。Anti-V5 と Anti-MTCL1 の両方で染色陽性になった。

(B) 野生型と C 末側変異体 MTCL1 のいずれでも、Anti-AnkG で染色される軸索起始部の形態はレスキューされたが、C 末側変異型の導入では、軸索起始部が、野生型 MTCL1 導入に比べて遠位に形成された。

(成果・考察) 等

マウス個体内の小脳プルキンエ細胞において、微小管架橋/束化因子であるMTCL1タンパク質が、軸索起始部領域の形態および構造の形成に必須であることが示された。更に、MTCL1はC末側の微小管結合活性が、プルキンエ細胞の軸索起始部の位置の決定に関与することが

示唆された。これは、MTCL1が軸索起始部の微小管束構造の形成を通じて、軸索起始部の形成に寄与する可能性を示唆する結果である。残された課題として、MTCL1にはN末側にも微小管結合活性があるため、今後、軸索起始部形成への寄与を本研究と同様の方法で明らかにしていく。

近年、神経細胞の活動電位発生の閾値が、軸索起始部の位置によって制御されることが示され、更に、軸索起始部の位置は、神経細胞への発火刺激によって変化することが報告されている。軸索起始部の位置の制御機構も全くの未解明であり、今後これについても、MTCL1の解析を通じ、解明を目指したい。

(学会発表)

Tomoko Satake, Sandy Chen, Eriko Miura, Yukari Hayashi-Takeo, Michisuke Yuzaki, and Atsushi Suzuki

“MTCL1, a novel microtubule cross-linking protein, is essential to define the slender morphology of the axon initial segment of cerebellar purkinje cells.”

2014年11月25日 第37回 日本分子生物学会 口頭発表 パシフィコ横浜

コムギの種子数を増加させる転写因子の機能解析

横浜市立大学 木原生物学研究所 助教
佐久間 俊

(研究目的)

世界的な気候変動に伴い、コムギの価格は年々上昇している。一方で生産量の増加は緩やかでこの問題の解決には新しい多収コムギ品種開発が求められている。コムギの穂は小穂と呼ばれるイネ科特有の花器官が互生し、一つの小穂の中に3-5個の小花を形成し、2-3個の小花が種子をつける。稔実する小花数が増えれば収量の増加が期待できるが、これまでに小花数を増加させる遺伝子は明らかでなかった。我々は麦類のモデル作物であるオオムギで種子数を3倍増加させる転写因子を発見し、機能を解明した (Sakuma et al. 2013)。この転写因子はコムギにも存在することが判明したが詳細な機能はわかっていない。そこで、本研究ではコムギ転写因子の分子生物学的な機能を明らかにすることを目的に発現解析、突然変異体の解析を行ない、新しい多収コムギ品種の開発に貢献することを目指す。

(研究方法)

発現解析

1. 穂の発達段階を詳細に区別してサンプリングを行い、RNA抽出、cDNA合成し、リアルタイムPCR法により転写因子の発現量を調査する。コムギのゲノム構造は複雑で同祖遺伝子と呼ばれる配列が似た遺伝子が少なくとも3コピー存在する。そこで、同祖遺伝子を区別するプライマーを作成し、特異的なPCRが行なえるようにする必要がある。ゲノム特異的プライマーはDNAマーカーとしてその後に実験に活用できる。
2. In situ mRNA hybridizationを行い、発現部位を特定する。

コムギ突然変異体の機能解析

ガンマ線照射によって作出されてコムギ変異体集団の中から上記転写因子の変異体6系統をTILLING法により選抜した。圃場でこれらのコムギ変異体を栽培し収量関連形質を評価する。また、形質が変化した系統について発現解析を行なう。具体的にはそれぞれ120個体ずつ圃場で慣行栽培を行い、穂長、小穂数、種子数、千粒重、草丈、分げつ数を測定する。

コムギ形質転換体の作製

目的の転写因子のみをノックアウトした形質転換コムギを作製し、表現型を解析する。具体的には人工ヌクレアーゼCRISPR/Casシステムを用いたゲノム改変を行なう。

(結果)

コムギの穂は、一つの小穂の中に3-5個の小花を形成し、2-3個の小花が種子をつける。稔実する小花数が増えれば収量増加が期待できるが、これまでに小花数を増加させる遺伝子は明らかでなかった。我々は麦類のモデル作物であるオオムギで種子数を3倍増加させる転写因子*Vrs1*を発見し、機能を解明した。この転写因子はコムギにも存在することが判明したが詳細な機能はわかっていない。そこで、本研究ではコムギ転写因子の機能を明らかにすることを目的にした。

コムギ*Vrs1*遺伝子はAゲノム、Bゲノム、Dゲノムにそれぞれ1コピーずつ第2同祖染色体に存在することがわかった(図1)。qRT-PCRによる発現解析を行なったところ、Aゲノムが優先的に発現し、DゲノムはAゲノムの半分程度の発現量を示した。Bゲノムは発現していなかった(図2)。in situ hybridizationの結果、これら遺伝子は幼穂で特異的に発現し、

特に通常不稔となる上位小花で強く発現することを明らかにした。このことから、コムギでも小花の発達を抑制する機能を持つことが強く示唆された。また、RNAi形質転換体を作製し、表現型と発現レベルの相関を調べた。複数の導入遺伝子ポジティブ個体では、小花数の増加が見られた。これらの結果はコムギのシンク容量を増やし、収量を向上させるために*Vrs1*遺伝子の利用が可能であることを強く示す。

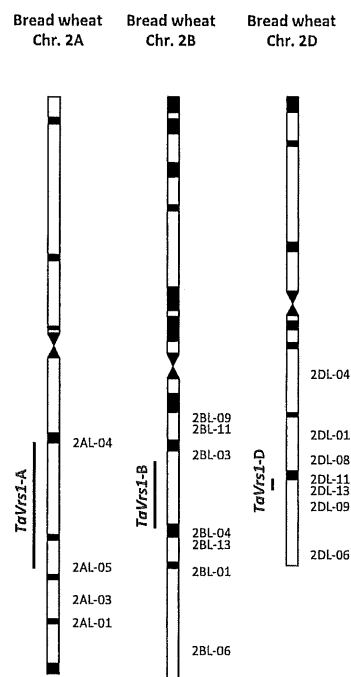


図1 コムギ *Vrs1* 遺伝子の座乗染色体

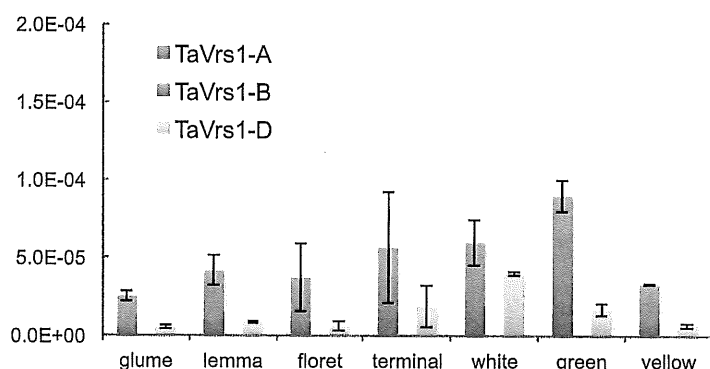


図2 コムギ*Vrs1*の発現パターン.

Glume: 護衛分化期
Lemma: 外穎分化期
Floret: 小花分化期
Terminal: 頂端小穂分化期
White: 白葎期
Green: 緑葎期
Yellow: 黄葎期

(考察)

日本人一人あたりの年間麦類消費量は小麦 49 kg と大麦 18 kg であり、その合計は米の消費量 72 kg にほぼ匹敵する。日本国民は思ったより大量の麦類を消費している。しかし我が国の麦類生産量は消費量の一割程度とあまりに少なく、そのため「食料・農業・農村基本計画」では麦類の栽培面積の拡大と同時に品種開発研究による問題解決が求められている。

穀類の多収性品種は一様にシンク能が優れており、麦類においても穂はシンクとして最も重要な収量構成要因である。麦類の増収を達成するためには穂型の改良が重要であるが、これまでに穂型を論理的に改変し増収を達成する方法は存在しなかった。現状を上回る多収品種を開発するためには既存の穂型を改良し、シンク能を増大させる必要がある。そのため、コムギの小穂数、小花数などを制御する遺伝子の単離、機能解析が必要である。

本研究で解析した遺伝子は学術的なコムギ研究に貢献するばかりでなく、多収化を実現させるDNAマーカーとして育種に利用できる。コムギの増産は世界的な課題であり、本研究で得られた成果は日本のコムギ品種改良に貢献し、さらに世界のコムギ品種に利用されるポテンシャルを持っている。

温度補償性を持つ ATPase 蛋白質 KaiC における 類似した二つのドメインの機能分担の解明

横浜市立大学・生命医科学研究科・助教

高井 直樹

(研究の背景と目的)

ほとんど全ての生物には概日時計が存在し、様々な生理活性を制御している。単細胞性の原核生物であるシアノバクテリアの遺伝子発現が概日リズムを刻むためには *kaiA*, *kaiB*, *kaiC* という3つの遺伝子が必須である。2005年これらの遺伝子の翻訳産物である3つのKai蛋白質とATPを試験管内で混合するだけで、温度に影響されないKaiCのリン酸化・脱リン酸化振動、即ち概日時計が試験管内で再構成された。この振動の周期は細胞内や動物等の個体で見られる概日振動と同様の性質を持つことが明らかにされたことから、概日時計を試験管内で直接解析することが可能となった。Kai蛋白質の中でもKaiCは相同性の高い二つのヌクレオチド結合モチーフCIとCIIから成り立つATPaseであり、ATP依存的に六量体を形成する。KaiCのATPase活性は周期の逆数（振動数）と正比例し、概日時計の最大の特徴である温度補償性を兼ね備えていたことから、概日リズムの周期を規定していることがわかった。さらに、CII欠損変異体のATPase活性はKaiC全長の90%以上の活性を有することから、時計蛋白質としての特性はCIが担うのではないかと考えられてきた。しかし、野生型KaiCのATP結合割合 (ATP/ATP+ADP)は20-30%以下なのに対し、CII欠損変異体ではほぼ100%ATPが結合しており、ATPase活性の温度補償性を著しく損なっていた。このことは、KaiCが温度補償性を維持するためにはCIIが必須であり、CIIがCIのヌクレオチド結合状態をATPからADPにスイッチさせることによりATPase活性を温度補償している可能性を示している。

そこで、本研究では様々なCIとCIIのKaiC変異体を用いることにより、周期の温度補償性を司るATPase活性がいかんして維持されているのか、その分子メカニズムを明らかにする。

(研究方法)

KaiCが司る概日時計の振動体はいかにして温度に影響されない一定の活性を保っているのだろうか？ KaiCの様々な概日周期変異体においても、リン酸化リズムの振幅の大きさは温度によって変化するのにも関わらず周期の長さはほとんど変わらなかったことから、KaiC蛋白質が司る振動体は振り子時計の等時性と似た調和振動（単振動）的な性質を持っているのではないかと申請者らは考えた。

そこで、リン酸化リズムの周期を規定していると考えられるKaiCのATPase活性に温度刺激を与え、振幅に刺激を与えた時のATPase活性の変動を測定することにした。KaiCのATPase活性は大腸菌由来のRecAをはじめとした一般的なATPaseと比べ、非常に微弱であり、一日あたり10-15分子程度しかATPを加水分解しない。よって、様々な変異型組み換えKaiC蛋白質を大腸菌BL21により精製し、微弱なATPase活性の変化を測定するために薄層クロマトグラフィー（TLC）と高速液体クロマトグラフィー（HPLC）の二つの方法を用いて測定した（名古屋大学との共同研究）。

(結果と考察)

① KaiC蛋白質に見られるATPase活性の自己抑制制御

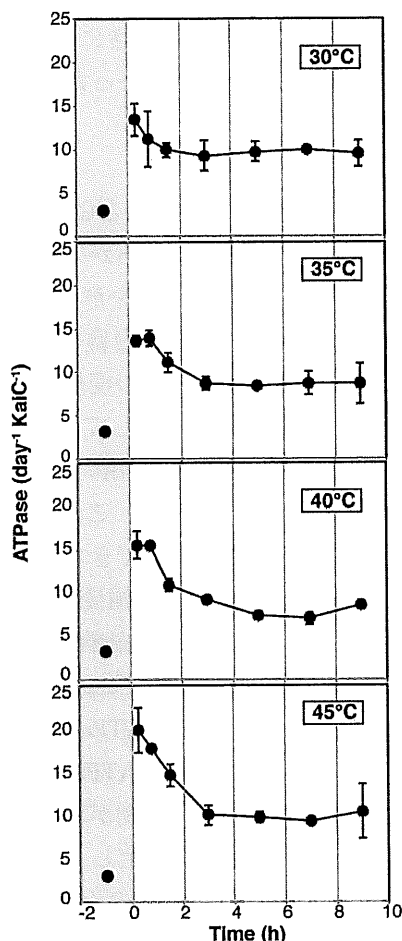


図1. 温度ジャンプ時の KaiC の ATPase 活性の変化. 氷温 (灰四角) からそれぞれの反応温度に移した時の変化を表している.

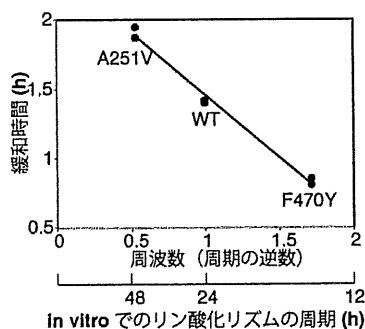


図2. 周期変異型 KaiC 蛋白質の温度ジャンプ時の定常状態までの ATPase 活性の緩和時間.

KaiC蛋白質のATPase活性は少なくとも25-45°Cの温度範囲で温度補償されており, KaiAとKaiBを加えた時のリン酸化サイクルの周期も同様に温度補償されている (Yoshida et al., PNAS, 2009). KaiCのATPase活性が調和振動としての性質を持つのであれば, その活性が温度補償されているとしても, 一時的に上昇した活性は内在する復元力の働きにより, 一定の活性に戻されるはずである. そこで, 低温から高温への温度ジャンプ直後のATPase活性の変動をTLCにより測定した. すると, 図1に示したとおり, 温度ジャンプ直後のATPase活性は温度に依存して活性が上昇するのにもかかわらず, すぐに定常状態の活性にまで戻ることがわかった. さらに, 驚くべきことに温度に応じてATPase活性の上昇値は変動するのにも関わらず, 定常状態の活性にまで戻るのには2時間程度で一定であったことから, 振幅の大きさに周期の長さは依存しないという調和振動と言われる振り子の等時性も見られたことから, KaiCの中には確かに調和振動の性質が存在することが確認できた.

② 周期変異型KaiC蛋白質におけるATPase活性の自己抑制制御

①においてKaiCのATPase活性に調和振動の性質が見られた. では, KaiCにそのような性質があるとすれば, 周期の長さの異なる変異体ではつりあいの位置, つまり定常状態の活性に戻るまでの力, 復元力に違いが見られるはずである. 具体的には短周期型の変異体では強い復元力が働いて, 野生型よりも早く, 長周期型の変異体では弱い復元力が働いて野生型よりも遅く定常状態の活性まで戻るはずである. そこで, 二つの周期変異型KaiC蛋白質F470Y (17時間周期), A251V (48時間周期)を精製し, それらを低温から高温への温度ジャンプ実験に供した. すると, 予想したとおりF470Yでは野生型よりも早く, A251Vでは野生型よりも遅く, 定常状態の活性まで戻ることがわかった. さらに, 時間分解能を高めて定常状態の活性に戻るまでの緩和速度をHPLCにより測定した. その結果, TLCによって測定した結果と非常によく似た結果が得られ, 定常状態に戻るまでの緩和時間を計算することが可能となった.

図2に示したとおり、これら3つの周期の異なるKaiC蛋白質の緩和速度を、横軸にそれぞれの蛋白質の周期の逆数(振動数)をとってプロットすると、振動数と緩和時間が逆比例することがわかった。つまり、振動数が大きい短周期型蛋白質は緩和時間が短く(緩和速度が速い)、小さい長周期型蛋白質は緩和時間が長いことがわかり、周期の長さに応じて復元力が変わるという調和振動の性質を確かにKaiCが保有することが明らかとなった。

③CIおよびCIIのATP加水分解反応の触媒部位変異体における自己抑制制御

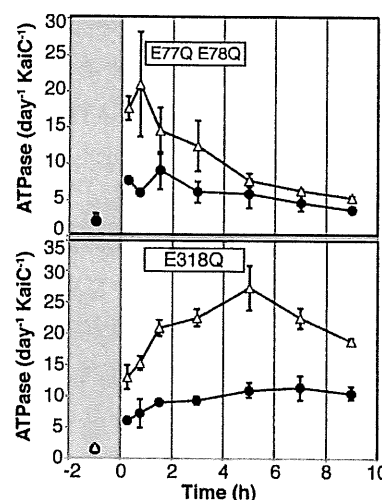


図3. ATPase 活性の触媒部位変異体の温度ジャンプ時のATPase 活性の変化。黒丸は30°C、白三角は45°C。

ことがわかった。さらに、それぞれの変異体の一日あたりのATPase活性を測定し、温度補償性を調べたところ、野生型の温度係数 Q_{10} がほぼ1.0なのにもかかわらず、CIのみの温度係数は1.7程度というように著しく温度補償性が損なわれていた。ただし、CIIのみの温度係数も完全に温度補償性を保っているわけではなく、1.3程度になっていたことから、KaiCが完全なる温度補償性($Q_{10}=1$)を保つにはCIとCIIどちらのATPase活性も必要だと考えられる。

(考察)

申請者のこれまでの研究により、KaiC蛋白質は調和振動(単振動)としての性質を維持することにより、時計の振動体としての最大の特性である周期の温度補償性を保っているのか明らかにすることができた。また、個々のドメインの寄与としてはCIだけでも全長のATPase活性の90%程度の活性を保つことができるが、温度補償性は著しく損なわれていた。このことから、少なくともKaiCが温度補償性を維持する上ではCII由来のATPase活性によるCI側のATPase活性の制御が必要になってくることがわかってきた。背景にも記したが、その分子メカニズムについてはCI側のヌクレオチド結合状態のスイッチングの解析が重要になってくると思われる。現に定常状態でのKaiCのATP結合状態は20-30%程度であるにもかかわらず、CI単独の変異体ではほぼ100%ATPが結合している(Ohkawa et al., PNAS, 2014)。CIとCIIには1つずつヌクレオチドが結合することから、もし完全長のKaiCにおいてもCIにATPが結合し続けているのならば、少なくとも定常状態でのATP結合の割合は50%程度に維

持されるはずである．にもかかわらず50%を下回っていることから，完全長のKaiCの定常状態ではCIIがCIのATPase活性をヌクレオチドのスイッチにより抑制しているのではないかと我々は考えている．そこで，今後はこれら個々のドメインがどのような相互作用により，ヌクレオチド結合状態を変換しているのかを明らかにしていく．

(謝辞)

本研究は前任地から引き続き行っている研究である．我々の乏しい研究費において，横浜学術教育振興財団から頂いた本研究費により，研究遂行に必要な酵素類，ピペットやシェイカー等の基礎的な研究機材を買い揃えることができました．大変感謝しております．

グリオブラストーマに対する、抗がん活性を併せ持つ 磁性体有機化合物を用いた化学・温熱同時単剤療法

横浜市立大学医学部医学科助教
梅村 将就

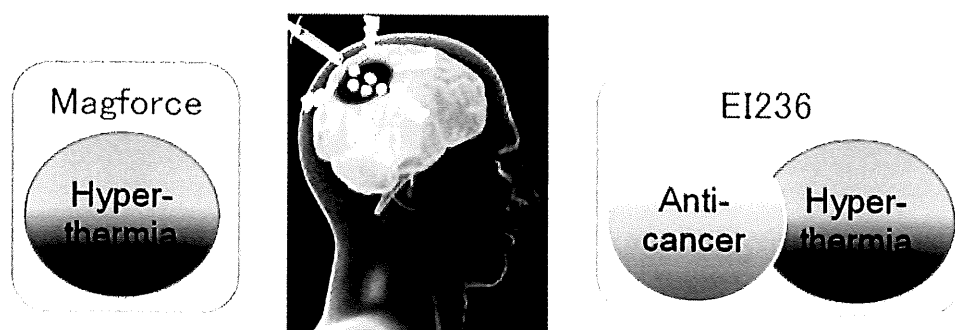
(研究目的)

本申請では、磁性有機化合物 (EI236) を用いて、難治性がんとなるグリオブラストーマに対する単剤での化学・温熱同時療法を開発することを目的とする。

(研究方法)

【研究実施計画の概要】我々が(株) IHIとの医工連携の過程で同定した抗がん活性と磁性をあわせもつ有機化合物EI236を脳内に局所投与し、交流磁場をかけることで発熱させ、グリオブラストーマに対する単剤での化学療法効果と温熱療法効果の同時療法を開発する(左下図)。実施計画としては、ヒトグリオブラストーマの培養細胞を用いて、EI236による抗腫瘍効果及び交流磁場下での自家温熱作用がもたらす温熱治療による相乗効果の評価を進めていく。その後、培養細胞実験で得られた条件を基盤として、脳内グリオブラストーマ動物モデルを用いて、EI236を脳内に局所投与し、交流磁場を体外から印可することで、EI236を発熱させ、化学・温熱療法効果を評価する。発熱の程度、体内動態、従来のグリオブラストーマ治療薬との比較などを中心に検討する。以上の結果を基盤として、EI236の臨床応用化を目指す。

【イメージ図】



現在、EI236を用いた新しいGlioblastoma(GB)治療に関する研究を行っている。EI236は磁性を持っているため、交流磁場をかけることで熱を発する特徴を持つ。そのため、EI236による治療は1剤で「抗がん作用+温熱作用」の2つ効果を同時に期待することができる。EU(特にドイツ)で施行されているMagforceは、酸化鉄である磁性体粒子を腫瘍内に注入し交流磁場をかけることで温熱作用を加える、GBの新しい治療法が行われている。Stuppらの報告と比較しprimary OS 14.6m → 23.2m, recurrent OS 9.2m → 16.4m (Phase II study,

2011) と有意な延長を認めている。本研究で使用するEI236は有機化合物でありながらMagforceで使用した酸化鉄(磁性体粒子)のように磁性を持ち、なお且つ、酸化鉄にはない抗がん作用も併せ持つため、1剤で温熱療法と療法が同時に行えるため、より高い効果と更なる予後延長効果が期待される。

GB細胞株を用いてEI236による抗腫瘍効果、温熱効果について検討した結果を報告する。

1. EI236のGB細胞に対する抗腫瘍効果の評価

EI236による抗腫瘍効果をXTT proliferation assay kit (XTT assay, ATCC)による細胞数の計測により評価した。

2. Flow Cytometry

BD FACSCanto™ IIフローサイトメーターシステム (FACS)を用いてアポトーシスによる抗腫瘍効果の評価を行った。

3. マウス臀部におけるGB皮下モデルの検討

脳内モデルでのEI236の評価の前に、条件検討を行う目的で皮下モデルを用いてEI236の抗腫瘍効果及び温熱療法効果を評価した。6週齢マウスにtribromoethanolとisofluraneを用いて全身麻酔をかけた。37℃、5%CO₂条件下で培養したU251を 1.0×10^6 個/100 μ lになるようにマトリゲル(CORNING LIFE SCIENCE)を用いて調整し、1ccシリンジと27G針を用いてマウスの左臀部皮下に緩徐に100 μ l注入し、GB細胞を移植した。注入1週間後に腫瘍径、腫瘍体積を測定した。

4. 脳内グリオブラストーマモデル動物を用いたEI236脳内投与実験

37℃、5%CO₂条件下で培養したU251を 1.0×10^6 個/10 μ lになるようにマトリゲル(CORNING LIFE SCIENCE)を用いて調製して使用した。6週齢マウスにtribromoethanolとisofluraneを用いて全身麻酔をかけ、頭部固定器(SR-5M, NARISHIGE)を用いてマウスの頭部を固定し、調整したGB細胞を脳内に移植した。

上記のヒト由来グリオブラストーマモデル動物(右下図)を用いてEI236の効果を検討する。腫瘍が直径5mmになった時点で4群に分けて治療効果の評価を行う。

①未治療群 ②EI236単純脳内投与群 ③交流磁場単独印可群 ④EI236脳内投与後、交流磁場印可を加えた群において治療効果を比較検討していく。

腫瘍効果の評価 ①～④に関して、毎日、腫瘍の写真撮影にて記録し、マウスの行動性

の観察により、活動低下や食欲低下などの諸条件も検討する。3週間後、最終腫瘍体積の比較及び、腫瘍をHE染色及び免疫染色（Ki67など）を用いて病理学的に抗腫瘍効果を判定する。ルシフェラーゼ発現グリオブラストーマ細胞を用いるため、当大学で使用可能なIn vivo imaging (IVIS)で腫瘍の評価を行う。また、放射線医学総合研究所の協力のもとMRIを用いて腫瘍の退縮評価やEI236薬剤分布なども評価する。

5. EI236のMRI撮影実験

放医学研究所に依頼し、マウスの脳内にEI236を局所注入し、MRI撮影を行った。

(結 果)

1. EI236のGB細胞に対する抗腫瘍効果の評価

YKG, U251, U87の全ての細胞株において、EI236は濃度依存的に抗腫瘍効果を強く認めた。

2. Flow Cytometry

EI236投与3.8 μ M、7.5 μ M、15 μ M、30 μ Mにてアポトーシス誘導効果を認めた。またその割合は、濃度依存的であった。

3. マウス臀部におけるGB皮下モデルの検討

マウスの臀部にGBを作成し、約1ヶ月間腫瘍の大きさをフォローした。腫瘍は刺激直後は一時的に大きくなる傾向を示した。刺激なし群は基準時の130%近くまで腫瘍の増大を認めたが、交流磁場のみの印可群は、刺激なしと比較して腫瘍が縮小する結果であった。EI236を局所注射した群は腫瘍縮小を認めた。EI236に交流磁場印可を加えた群では、EI236単独投与群と比較して更なる腫瘍縮小を認めた。

4. 脳内グリオブラストーマモデル動物を用いたEI236脳内投与実験

始めに、マウス脳内に脳腫瘍を作成し、薬剤脳内局所投与による腫瘍縮小をIn vivo imagingによる光量換算で比較検討した。脳内への腫瘍生着については、IVISでの確認と同時に脳組織切片を作成しIVIS所見との相関を検討した。HE染色では脳実質内に異型性が強く細胞分裂の認める腫瘍像が確認され、GBに特徴的とされるpseudopalisadingも認められた。

薬剤投与なし群では皮下モデル同様、徐々に腫瘍が増大する傾向であったが、EI236の局所投与群では、有意に腫瘍が縮小した。

現在、交流磁場印可を行い、さらなる腫瘍の縮小効果が得られるかを検討中である。マウスの皮下注射モデルで交流磁場印可の効果が確認できた時点で、グリオブラストーマ

脳内局所投与の検討に移る予定である。

5. EI236のMRI撮影実験

放医学研究所に依頼し、マウスの脳内にEI236を局所注入し、MRI撮影を行ったところT2強調画像にて黒く造影することがわかった。今後は撮影条件を変えて撮影することにより局所注射したEI236の局在や、濃度を推定できるように検討をすすめる。

(成果・考察) 等

EI236が複数のグリオブラストーマに対して、強い抗腫瘍効果を示すことが確認できた。現在臨床の場で実際に使用されているテモダールやギリアデルといった抗がん剤と比較しても劣らない抗腫瘍効果を示すことが検討により判明した。このことによりEI236がこの化学・温熱同時療法を行う上で適切な化合物であると考えられる。

交流磁場下でのEI236の温度上昇に関しては、皮下に注射し、交流磁場を印可した際には、十分温度が上がるのが、温度計の測定により観察できた。しかし、現時点では脳内投与での温度上昇に関しては検討が必要だと思われる。理由としては、脳内は投与スペースが非常に限られていることが挙げられる。そのため、EI236の温度上昇は、濃度依存、用量依存によることが大きく、まだ、十分温熱効果を与えるほどの温度上昇が得られていないのが現状である。そのため、現在、交流磁場の機械の開発を行なっている。具体的には、EI236に対する適切な周波数、出力などのパラメーターをいろいろ変えることにより、もっと発熱量が大きくなるような条件を検討している。それができれば、脳内でも十分EI236を発熱させ、グリオブラストーマに対する効果的な温熱効果をもたらすことができると考えられる。

MRI撮影実験では、実際にEI236が*in vivo*でも造影効果を認めることがわかったので今後は撮影条件を検討しよりいい条件を見つけることが必要と思われる。また、脳内注射後、継時的にどのように局在が変化するかなども検討が必要と思われる。

これまでの実験より、EI236はグリオブラストーマに対して、抗がん剤としても十分な効果を示し、動物モデルでも、交流磁場印可によって発熱することが分かった。そのため、今後は交流磁場印可の条件やEI236の投与条件を検討することで、十分、グリオブラストーマにおける新しい化学・温熱同時単剤療法の開発ができると考えられる。また、この治療法が確立できれば、局所投与だけでなくこの磁性有機化合物であるEI236を静脈投与し、磁石で集め、温熱を加えることによりドラッグデリバリーを用いた治療法にも応用できると考えられる。

多発性硬化症に対する新規治療法基盤の確立

横浜市立大学大学院生命医科学研究科教授

竹居 光太郎

(研究目的)

損傷などで傷ついた中枢神経系の再生は困難である。その主要因は、髄鞘膜に存在するNogoなどの再生阻害因子と神経細胞上のNogo受容体の結合による神経突起伸長阻害である。我々は、神経回路形成因子LOTUSを発見し、その結合相手としてNogo受容体を同定した。LOTUSはNogo受容体と結合し、Nogoなどの再生阻害因子とNogo受容体の結合を完全に抑制する内在性Nogo受容体拮抗物質である。近年、国の指定難病で、自己免疫性脱髄が特徴である多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) の病因の一つとして、Nogo受容体を介する神経突起伸長阻害による神経変性が注目されている。脱髄によって髄鞘膜上のNogoなどの再生阻害因子が神経細胞上に発現するNogo受容体と結合して神経突起伸長阻害作用を引き起こす。

一方、Nogoが血液中に分泌されてTリンパ球上に発現するNogo受容体と結合することで免疫反応を増悪させることが報告されている。LOTUSは神経細胞上のNogo受容体の機能を抑制することからMSの治療薬候補として有望視できるが、リンパ球上に発現するNogo受容体と血液に分泌されたNogoとの結合を抑制できるかどうかは全く知られていない。

そこで、本研究では、リンパ球上のNogo受容体とNogoの結合に対するLOTUSの拮抗作用についてLOTUSリコンビナントタンパク質を用いて検討し、LOTUSのMS治療薬としての可能性を検討することを目的とする。

(研究方法)

アルカリフォスファターゼ (AP) を融合させたAP-NogoやAP-LOTUSを作製する。APタグ付きNogo またはLOTUS (AP-NogoまたはAP-LOTUS) とNogo受容体との結合は、AP酵素の呈色反応で可視化する。一方、AP以外のタグを融合させた精製LOTUSリコンビナントタンパク質を作製する。

1. 精製LOTUSによるNogoとNogo受容体の結合阻害

マウス脾臓からリンパ球を抽出して培養し、PMAおよびイオノマイシンによってリンパ球刺激を行う。この刺激によるリンパ球におけるNogo受容体の発現上昇が知られているので、AP-LOTUSを添加してリンパ球上のLOTUS結合を確認する。次に、リンパ球刺激後、精製LOTUSリコンビナントタンパク質をリンパ球培養液に添加して37℃30分間インキュベートした後、AP-Nogoを添加して37℃30分間反応させてリンパ球上に発現するNogo受容体と添加したAP-Nogoの結合についてAP発色で定量的に解析し、精製LOTUSによる

AP-NogoとNogo受容体との結合阻害を解析する。また、ヒト（健常者）血液からパーコール法によってリンパ球（末梢血単核球）を抽出して培養し、同様にPMAおよびイオノマイシンによってリンパ球刺激を行い、ヒト精製LOTUSを用いて上記のマウスと同様の実験を行う（横浜市立大学病院倫理委員会承認済：承認番号B140501005）。これらの実験によって、マウスおよびヒトにおけるリンパ球上のNogo受容体に対するLOTUSの拮抗作用を検討する。

2. EAEマウスのリンパ球におけるサイトカインの定量解析

MS患者のリンパ球にはNgR1が高発現し、血中に存在するNogoと結合すると自己免疫性が増加し、MSの発症や病態進行に寄与することが報告されている。そこで、C57BL/6マウスを背景にもつ野生型マウスを用いて実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデル動物を作製する。このEAEマウスよりリンパ球を抽出して培養し、LOTUSリコンビナント蛋白質をリンパ球培養液に添加することでNogoとNogo受容体のリガンド・受容体結合を阻害し、ELISAキットを用いて培養上清中のインターフェロン γ （IF γ ），インターロイキン-2（IL-2），インターロイキン-17（IL-17）などのサイトカインを定量解析して、免疫応答の変化を解析する。

（結 果）

1. 精製LOTUSによるNogoとNogo受容体の結合阻害

リンパ球刺激後にAP-LOTUSを添加してリンパ球上におけるLOTUSの結合を検討したところ、AP-LOTUSはリンパ球に結合した（図1）。LOTUSはNogo受容体と相互作用を示すことから、リンパ球上に発現するNogo受容体との相互作用でLOTUS結合が見られたことを検証するため、Nogo受容体遺伝子欠損マウスから単離したリンパ球で同様に検討したところ、驚くべきことに、AP-LOTUSは結合した。このことは、刺激後のリンパ球上には、Nogo受容体以外のLOTUS結合分子が存在することを示す。

次に、リンパ球刺激後に精製LOTUS（SBP-Fc-LOTUS）を添加した後、AP-Nogo（AP-Nogo66）を添加してリンパ球上に発現するNogo受容体（NgR1）と添加したAP-Nogo66の結合について定量的に解析したところ、AP-Nogo66とNogo受容体の結合が部分的に（約32%）阻害された（図

2）。これは、リンパ球上に発現するNogo受容体とLOTUSが結合し、LOTUSのNogo受

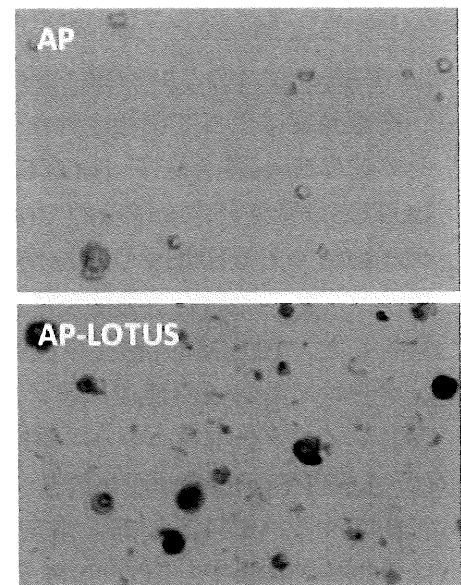


図1 リンパ球上のLOTUSの結合
上段:APの結合, 下段:AP-LOTUSの結合

容体に対する拮抗作用によると考えられた。更に、NgR1遺伝子欠損マウスから調製したリンパ球において同様の検討を行ったところ、ほぼ同様に、LOTUS添加によってAP-Nogo66とNogo受容体の結合が部分的に（約33%）阻害された（図2）。これは、Nogo受

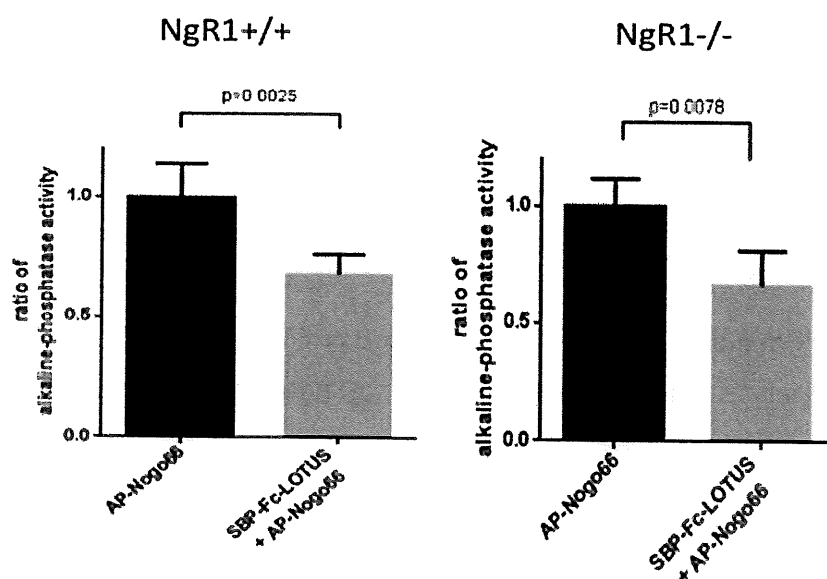


図2 LOTUSによるNogoのNogo受容体(NgR1)に対する結合阻害

左パネル: 野生型マウス (NgR1+/+) 由来のリンパ球におけるAP-Nogo66のNgR1に対する結合は、LOTUSによって約32%減弱した ($p<0.01$)。
 右パネル: NgR1遺伝子欠損マウス (NgR1-/-) 由来のリンパ球におけるAP-Nogo66のNgR1に対する結合は、LOTUSによって約33%減弱した ($p<0.01$)。

容体以外のNogo結合分子とNogoとの結合をLOTUSによって阻害したことを示す。

3. EAEマウスのリンパ球におけるサイトカインの定量解析

病態発症によって刺激されたリンパ球上のNogoとNogo受容体の結合、もしくはNogoとその他のNogo結合分子（LOTUS結合分子）によって免疫反応が増悪するのであれば、LOTUSは免疫反応を部分的ではあるが抑制する可能性がある。そこで、多発性硬化症のモデル動物であるEAEマウスを作製し、EAEマウスから採取したリンパ球を用いてLOTUSのリンパ球への結合が免疫反応に関わるサイトカインの分泌変動を生じさせるかについて解析した。100nMの精製LOTUSをEAEマウス由来の培養リンパ球に添加したところ、インターロイキン-2 (IL-2) とインターロイキン-17 (IL-17) が増加した（図3）。それに反し、インターフェロン- γ (IFN- γ) は若干減少した（図3）。ここで注目すべき現象は、LOTUSがEAEマウスのリンパ球と結合することでIL-17が増加したことで、LOTUSがEAEマウスのリンパ球と相互作用すると免疫反応が増悪する可能性が示唆された。これは予想外の結果で、LOTUSのリンパ球への結合は、上記の結果からNogoの結合を部分的に阻害してNogoによる免疫反応の増悪を抑制するものの、一方でIL-17の分泌を惹起して免疫反応の増悪を誘起する可能性があると考えられた。従って、LOTUSは創薬ターゲットとして考慮すべき側面があることが判明した。

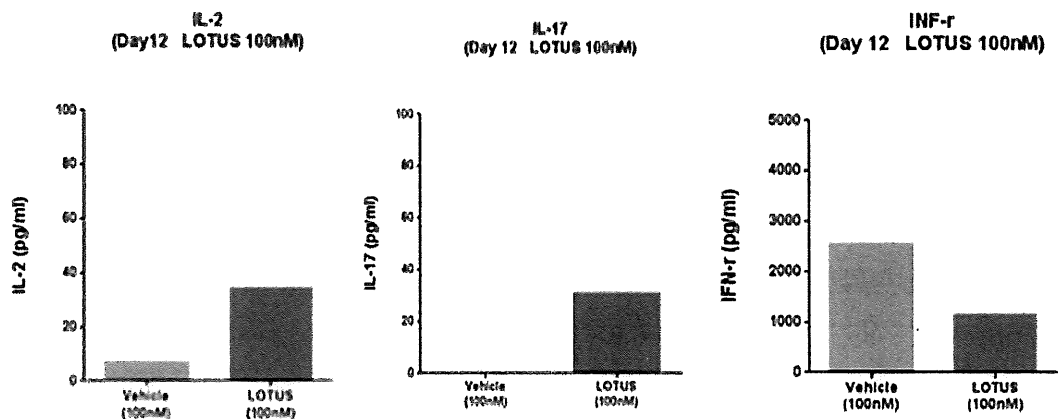


図3 EAEマウス由来リンパ球におけるLOTUS結合によるサイトカインの分泌
LOTUS(100nM)添加によるリンパ球の培養上清中のIL-2, IL-17, IFN γ の濃度

(成果・考察) 等

本研究により、1) LOTUSはリンパ球に結合すること、2) リンパ球におけるNogoとNogo受容体、およびNogoと未知のNogo結合分子との相互作用を精製LOTUSリコンビナントタンパク質が約30%抑制すること、3) MS病態モデル動物由来のリンパ球においてLOTUSはIL-2やIL-17の分泌を促進し、逆にIFN γ の分泌を抑制することが判明した。

これらの結果は、LOTUSは、Nogoによる免疫反応の増強（増悪）を部分的に抑制する反面、病態発症後のリンパ球を介した免疫反応を増強（増悪）することを示し、MSの病態発症や病態進行において2面性を有することが分かった。今後は、MS病態モデルにおいてLOTUS遺伝子欠損（LOTUS-KO）マウスとLOTUS過剰発現（LOTUS-TG）マウスを用いてMS病態モデル動物を作製し、その病態進行の改善・増悪について解析する予定である。もし、LOTUS-KOマウスで発症時期が早まったり病態が増悪したりし、逆にLOTUS-TGマウスで発症時期が遅滞したり病態が改善したりしたら、LOTUSはMSの急性増悪期における創薬ターゲットとして考えるべきである。これは意外な実験結果であるが、MSの病態生理について新たな知見を得たことになり、その理解が深まる。

MSは炎症性疾患であるため、再発抑制を目的にインターフェロン β を皮下注射したり、急性増悪期にはステロイドを点滴静注したりすることが主治療法である。また、最近ではカナビスの活性成分が病態進行の抑制に奏効すると報告され、欧米で臨床治験が進んでいる。しかし、慢性進行期の病因としてNogo受容体を介する神経系の変性作用が注目されているが、Nogo受容体を制御する方法論は全く見当たらないのが現状である。LOTUSは、Nogoなどの髄鞘由来のリガンド分子の受容体結合（Nogo受容体との結合）を阻害する内在性拮抗物質であることから、MSの病因を抑制することが期待されるが、本研究で明らかになったリンパ球に対する作用はMSの病態進行を促進するため、急性増悪期と慢性進行期とでLOTUSによる作用を分けて考える必要がある。

同種造血細胞移植における鉄および炎症性関連マーカーの病態解明と治療法の開発

横浜市立大学医学部助教
免疫・血液・呼吸器内科学 立花崇孝

(研究目的)

同種造血細胞移植における予後予測因子として、移植前血清フェリチンが確立されつつある。同種移植患者を対象として、移植前および移植後の一定時期に血清フェリチンをはじめ、種々の鉄関連マーカーおよび炎症関連マーカーを測定する。これらの相関関係を解析するとともに、各種マーカーの移植後成績に及ぼす予後的意義を横浜市大血液グループによる多施設共同前向き臨床観察研究として、検証することを目的とする。

(研究方法)

多施設共同前向き臨床観察研究として、同種移植患者を対象として、血清フェリチンを中心とした各種鉄関連マーカー、炎症性マーカーを移植前および移植後の一定時期に測定する。これらの相関関係を解析するとともに、各種マーカーの移植後成績に及ぼす予後的意義を評価する。

選択規準を満たした症例を前向きに全例登録する。目標症例数は140例で登録期間は2014年4月から2017年3月、研究期間は2014年4月から2019年3月。主要評価項目には各マーカー別2年全生存率。副次的評価項目は、(1) マーカー別2年無病生存率、マーカー別2年累積非再発死亡率、マーカー別2年累積再発率 (2) 血清フェリチンと各種測定マーカーの相関関係 (3) 各種測定マーカーと移植片対宿主病および100日以内移植関連合併症との関係が含まれる。

評価対象となるマーカー候補は、鉄関連マーカー (ferritin, 不飽和鉄結合能, 血清鉄, トランスフェリン, 非トランスフェリン結合鉄 [Non-transferrin binding iron, NTBI], ヘプシジン, 可溶性トランスフェリン受容体) および炎症関連マーカー (CRP, 可溶性sIL2受容体, IL-6, IL-10, IL-12, TNF α , Hemoxygenase-1 [HO-1], sCD163, HMGB-1, ICAM-1, ELAM-1, TNFR1, Elafin, REG3 α , ST2) が含まれる。マーカー測定時期は、移植前、移植0日、移植後14日目、21日目、28日目、100日目、6ヵ月、1年のポイントに設定した。HO-1値はELIZAキットにて、NTBI値は旭川医大へ検体搬送して測定した。HO-1値とNTBI値の相関係数はSpearmanの順位相関係数により算出した。

試験実施予定施設は、横浜市立大学附属病院、神奈川県立がんセンター、横浜市立大学附属市民総合医療センター。

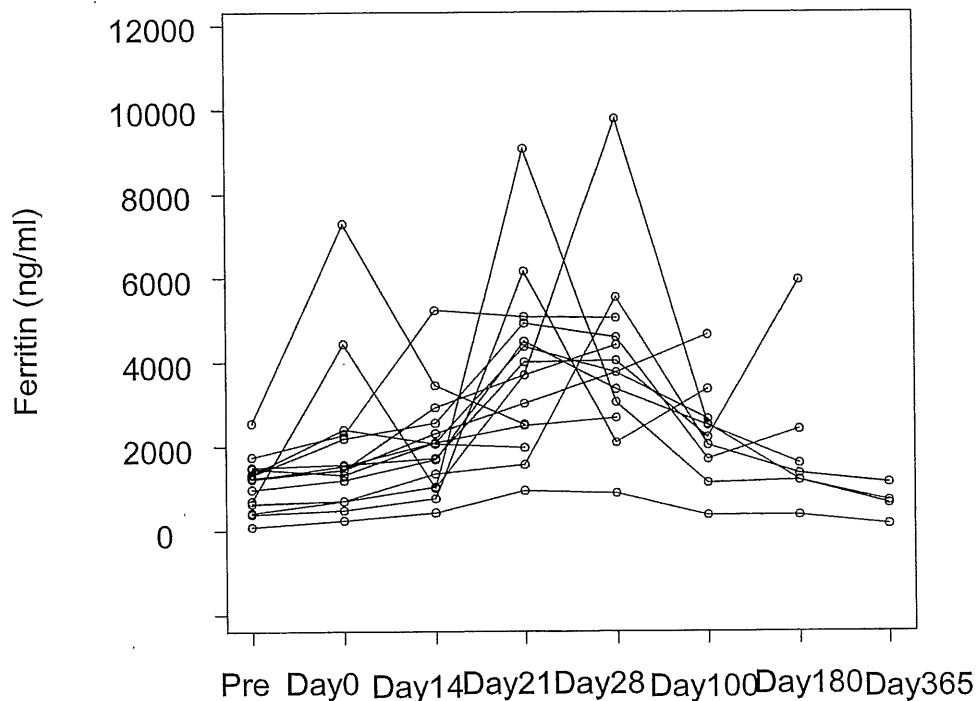
(結 果)

2014年4月1日横浜市立大学附属病院 (YCU) 研究倫理審査委員会にて研究承認を受けた。続いて、横浜市立大学附属市民総合医療センター (YMC) でも研究承認を受けた。以降、2015年3月31日時点では、登録症例数は26例であった。そのうち、HO-1測定は22例 (YCU12例、YMC10例)、NTBIは17例 (YCU10例、YMC7例) でHO-1あるいはNTBIの測定を実施した。22例の年齢中央値は52歳 (24-65)、男性16例、女性6例。診断は急性骨髄性白血病13例、悪性リンパ腫4例、成人T細胞白血病1例、骨髄異形成症候群1例、多発性骨髄腫1例、その他2例。移植前死亡1

例を含め、死亡症例は8例であった。

フェリチンについては、94件(移植前15件、移植0日15件、移植後14日15件、移植後21日15件、移植後28日13件、移植後100日10件、移植後6ヵ月7件、移植後1年4件)測定した。全体の中央値は2,403ng/ml (100-9,795)であった。それぞれ移植前1,236 ng/ml (100-2,569)、移植0日1,453 ng/ml (257-7,287)、移植後14日2,057 ng/ml (432-5,231)、移植後21日3,700 ng/ml (971-9,086)、移植後28日3,766 ng/ml (896-9,795)、移植後100日2,353 ng/ml (360-4,644)、移植後6ヵ月1,358 ng/ml (372-5,938)、移植後1年692 ng/ml (149-1,141)であった。図1にフェリチン分布の経時変化を示す。

図1 フェリチンの分布と経時変化



H0-1について、111件(移植前22件、移植0日18件、移植後14日18件、移植後21日17件、移植後28日16件、移植後 α 日6件、移植後100日7件、移植後6ヵ月6件、移植後1年1件)測定した。全体の中央値は6.67ng/ml (0.93-26.2)であった。

測定ポイント毎のH0-1中央値は、それぞれ移植前5.63 ng/ml (1.32-10.89)、移植0日6.27 ng/ml (1.46-26.2)、移植後14日7.23 ng/ml (1.32-19.2)、移植後21日8.22 ng/ml (1.92-23.1)、移植後28日8.71 ng/ml (1.87-26.2)、移植後100日6.31 ng/ml (1.24-9.31)、移植後6ヵ月5.41 ng/ml (0.93-8.37)であった。図2にH0-1分布の経時変化を示す。

NTBIについて、81件(移植前17件、移植0日14件、移植後14日13件、移植後21日11件、移植後28日11件、移植後 α 日2件、移植後100日7件、移植後6ヵ月6件、移植後1年0件)それぞれ測定した。全体の中央値は0.53 μ mol/l (range: 0.06-1.16)であった。

測定ポイント毎のNTBI中央値は、それぞれ移植前0.46 μ mol/l (0.18-1.16)、移植0日0.65 μ mol/l (0.30-1.12)、移植後14日0.61 μ mol/l (0.30-0.97)、移植後21日0.77 μ mol/l (0.26-1.08)、移植後28日0.46 μ mol/l (0.08-1.08)、移植後100日0.57 μ mol/l (0.38-0.65)、移植後6ヵ月0.48 μ mol/l (0.34-0.53)であった。図3にNTBI分布の経時変化を示す。

図2 H0-1値の分布と経時変化

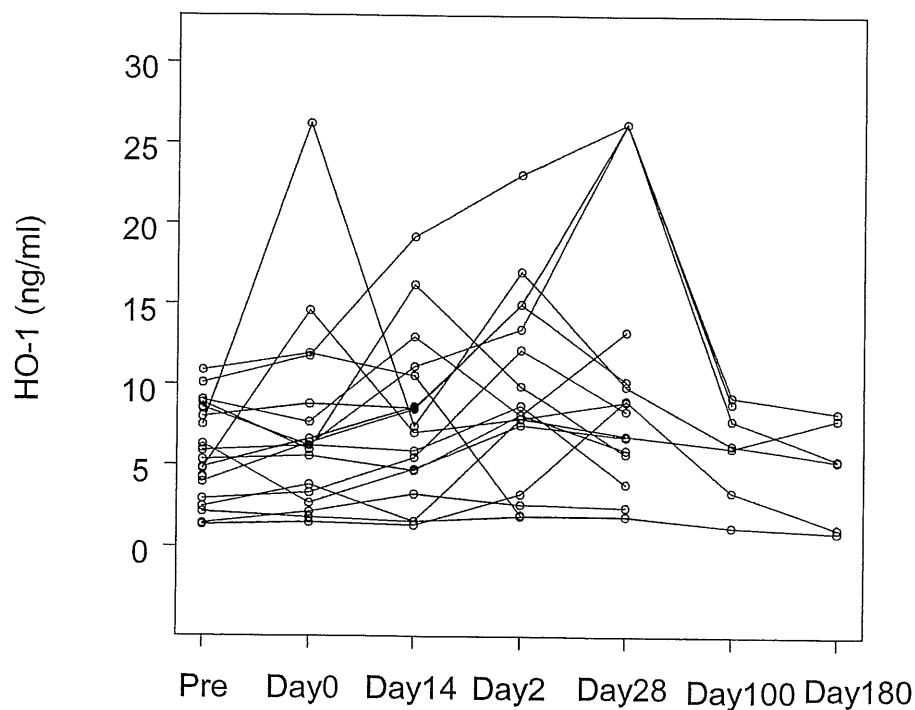
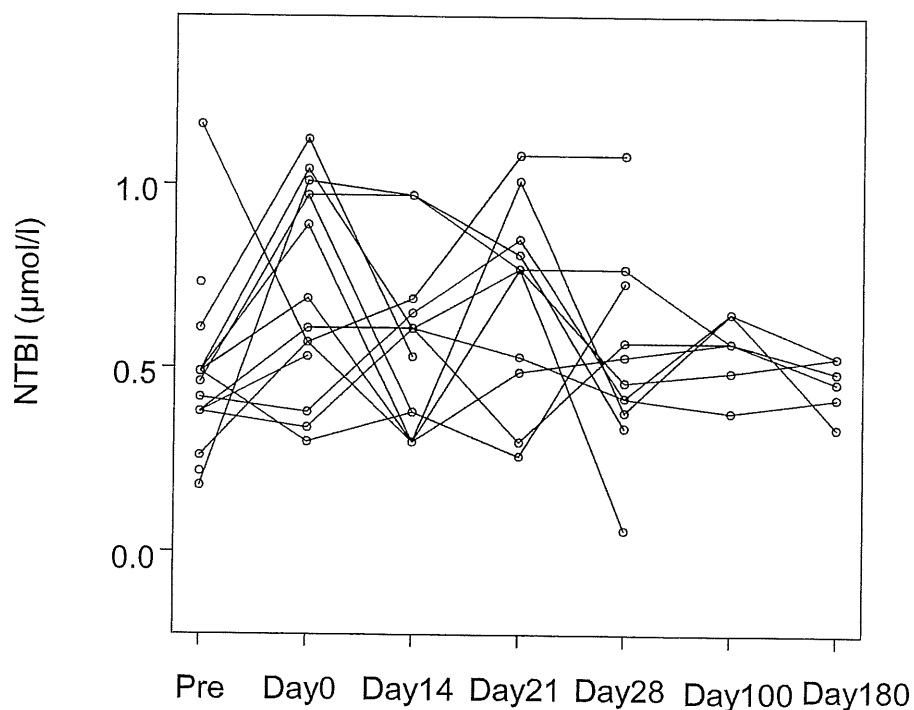


図3 NTBI値の分布と経時変化



測定ポイント毎のフェリチン (SF) 値、H0-1値、NTBI値の相関係数を表1に示す。SF/H0-1については、28日 ($r=0.56$) で適度な相関が見られた。SFとNTBIについては、有意な相関は見られなかった。H0-1とNTBIについては、移植前 ($r=0.514$) および21日 ($r=-0.51$) では、適度な相関関係が示された。

表1 各測定ポイントにおけるフェリチン (SF) 値、H0-1値、NTBI値の相関係数 (r)

	Pre	Day0	Day14	Day21	Day28	Day100	Day180
SF/HO-1(r)	0.36	-0.01	0.05	-0.07	0.56	0.21	NA
SF/NTBI(r)	-0.34	0.30	-0.24	-0.14	0.10	0.13	NA
HO-1/NTBI(r)	0.51	0.12	0.38	0.51	-0.34	-0.17	-0.21

注釈:NA, not applicable

(成果・考察)

同種移植症例における、血清フェリチン値、H0-1値、NTBI値の経時的変化が示された。

血清フェリチン値については、移植前中央値1,263 ng/mlであり、従来の1,000 ng/mlよりやや高い値が示された。移植後は0日、14日、21日、28日と経時的に上昇することが示された。生着日の中央値が20日であることから、生着直後にはフェリチン値は低下しないことが示された。以降、100日、180日、365日と経時的にフェリチン値は低下した。移植後100日以降でもフェリチン値>1,000 ng/mlの高値症例は散見されており、その臨床的意義は不明である。35日や56日のデータがないことと併せて、今後の検討課題である。

H0-1値についても、移植後0日、14日、21日、28日と経時的に上昇することが示された。フェリチン同様に、生着直後でもH0-1値が上昇することが示唆された。以降、100日、180日と経時的にH0-1値は低下した。血球貪食症候群をはじめとするマクロファージの活性化では、H0-1>14 ng/mlでは有意に高値と報告されているが、本研究におけるH0-1上昇の臨床的意義は不明である。しかし、急性GVHDや生着症候群、ヒトヘルペス6型血症といった合併症では、H0-1値は上昇しており、今後のさらなる解析が必要である。また、100日以降のH0-1値についても、症例の蓄積が必要である。

NTBI値については、基準値は0.4-0.5 $\mu\text{mol/l}$ とされている。移植後0日、14日、21日とNTBI値は上昇するが、28日では正常化した。100日および180日でもほぼ正常範囲と思われる。NTBI値は移植後早期に正常化することが示唆された。こういった変化は、フェリチン値やH0-1値と異なった。すなわち、NTBI値は移植前処置に影響を受け、急性GVHDや生着症候群に対する影響が小さい可能性が示唆された。また、輸血後鉄過剰症のマーカーとしても注目されているが、その評価は今後の課題である。症例数の蓄積とともに肝MRIによる鉄沈着との関連性の検討が必要である。

相関性の評価については、28日におけるSF/HO-1 ($r=0.56$)、移植前および21日におけるHO-1/NTBI ($r=0.51$, $r=-0.51$)のみで適度な相関が見られた。SFはHO-1およびNTBIとある程度の相関が見られることが予想されたが、実際の結果は反映されていない。症例の蓄積とともに、ST2やCD163、可溶性IL2-R、ヘプシジン、CRPといった様々なマーカーとの関連性を評価する必要がある。

同種移植前後において血清フェリチン値、H0-1値、NTBI値を同時に評価する研究報告はなく、本研究は大変有意義となる可能性が示唆された。ただし、症例数や測定マーカーおよび臨床情報収集に問題があり、今後の検討課題である。現在、神奈川県立がんセンターからも施設登録され症例登録が開始された。症例の蓄積とともに種々のマーカーを測定し、鉄および炎症関連マーカーの解析を継続する方針である。

大都市圏在住統合失調症患者における孤独感の実態と 関連要因の検討

(横浜市立大学大学院医学研究科看護学専攻地域看護学分野)

塩田 藍

I. 諸言

わが国の精神科医療は入院加療から地域生活へと移行が促進されており¹、地域在住統合失調症患者は増加することが予測される。地域生活においては患者個人および周囲の環境から生じる地域生活上の困難により、多くの地域在住統合失調症患者が孤独感を抱いていることが報告されている。地域在住統合失調症患者の孤独感²は Quality of life (QOL) の低下³および自殺の原因⁴であることから、孤独感は個人のみならず地域社会全体の安寧に関わる問題である。しかし地域在住統合失調症患者の孤独感における先行研究には以下3点の限界がある。1点目は対象の代表性であり、先行研究は海外にて実施され、特定の住居形態居住者や若年患者に限定されている。2点目は孤独感の測定方法であり、研究者毎に孤独感の定義が異なり、わが国では信頼性および妥当性を有する孤独感尺度の利用がみられていない。3点目は研究デザインであり、孤独感に相互に関連すると考えられる個人および環境の観点から包括的に要因をとらえた研究はみあたらない。以上より本研究では地域在住統合失調症患者の孤独感の実態とその関連要因を明らかにし、孤独感の低減および予防による QOL の向上並びに自殺の一次予防に資する地域看護実践の示唆を得ることを目的とした。

II. 用語の操作的定義

本研究における孤独感とは「個人の社会的関係のネットワークに量的であれ、質的であれ重大な欠損が生じた時に生起する不快な経験⁴」という主観的な概念である。

III. 研究方法

1. 対象

地域在住統合失調症患者であり、1) ICD-10 における統合失調症の診断を受けている者、2) 退院後1年半を経過し状態が安定している者、3) 18-64歳の成人、4) 本人の自由意思により調査に協力をする者、以上4条件を満たす者である。

2. 方法

横断研究であり、無記名自記式質問紙調査(郵送法)を地域活動支援センターおよび就労継続支援事業所に留め置き、平成26年8月中旬から10月下旬に実施した。

3. 調査項目

調査項目は地域在住統合失調症患者の孤独感(日本語版孤独感尺度第3版; UCLA LS⁵)、基本属性(性別、年齢、初診時年齢等)、個人要因として地域生活に対する自己効力感(地域生活に対する自己効力感尺度; SECL⁶)、自尊感情(Rosenberg 自尊感情尺度; RSE⁷)であり、環境要因として社会的孤立(日本語版 LSNS-6; LSNS-6⁸)、コミュニティインテグレーション(日本語版コミュニティインテグレーション尺度; CIM⁹)、障害者総合支援法に基づくサービスおよび制度利用である。

4. 分析方法

全変数の記述統計を実施し、地域在住統合失調症患者の孤独感と各要因の相関分析をした上で、地域在住統合失調症患者の孤独感を従属変数とした重回帰分析（強制投入法）を実施した。解析は SPSS 22.0 for Windows を使用し、有意水準は 5%未満とした。

5. 倫理的配慮

自由意思による参加同意を得た者を対象に調査を行い、個人情報の保護に留意した。本研究は横浜市立大学医学研究倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号: A140724017）。

IV. 結果

調査対象者 560 名のうち回答者数は 402 名（回収率 71.8%）であり、そのうち基本属性と各尺度の半数以上の欠損がない 264 名（有効回答率 65.7%）を分析対象とした。

1. 記述統計

1) 基本属性

対象者の平均年齢 46.1 ± 9.6 歳、男性 69.3%であった。世帯構成は親族との同居者 61.8%と最も多く、次いで単身者 25.8%、婚姻をしている者 5.3%であった。最終学歴は高等学校が 44.3%と最も多かった。就労者（アルバイト含む）29.9%であり、経済状態はやや苦しいと答えた者が 37.9%と最も多かった。

2) 個人要因

SECL の総得点は 127.3 ± 27.9 点、下位尺度である日常生活は 33.8 ± 9.4 点、治療に関する行動は 30.7 ± 6.4 点、症状対処行動は 28.2 ± 7.2 点、社会生活は 22.6 ± 5.9 点、対人関係は 12.0 ± 5.1 点であった。RSE の得点は 30.6 ± 7.8 点であった。

3) 環境要因

LSNS-6 の総得点は 10.2 ± 5.8 点、下位尺度である家族のネットワークは 5.0 ± 3.2 点、友人のネットワークは 5.2 ± 3.8 点、カットオフポイント（12 点未満）による社会的孤立にある者は 152 名（57.6%）であった。CIM の総得点は 35.6 ± 7.7 点であった。サービスおよび制度利用総数は 3.8 ± 1.1 個であり、自立支援医療（精神）および精神保健福祉手帳利用者が約 9 割であった。

4) 地域在住統合失調症患者の孤独感

UCLA LS の得点は 45.6 ± 11.2 点であった。

2. 地域在住統合失調症患者の孤独感と各要因の相関分析

相関分析において、地域在住統合失調症患者の孤独感と各要因間の相関は、基本属性では就労有無と負の相関がみられ、経済状態、併存精神疾患うつ病と正の相関がみられた。個人要因では SECL 総得点ならびに下位尺度である日常生活、治療に関する行動、疾患対処行動、社会生活、対人関係、RSE と負の相関がみられた。環境要因では LSNS-6 総得点ならびに下位尺度である家族ネットワーク、友人ネットワーク、カットオフポイントによる社会的孤立の有無、CIM、精神障害者保健福祉手帳利用有無と負の相関がみられた。

3. 地域在住統合失調症患者の孤独感と各要因の重回帰分析

地域在住統合失調症患者の孤独感を従属変数とし、単相関にて有意な関連が見られた変数を投入し、強制投入法による分析を行った。変数間の多重共線性を考慮し、重回帰分析に投入した独立変数は、調整変数として年齢、性別、就労有無、経済状態、併存精神疾患うつ病であり、個人要因より SECL 総得点、RSE、環境要因より社会的孤立、CIM、精神障害者保健福祉手帳利用有無である。その結果、地域在住統合失調症患者の孤独感と有意に関連したのは、SECL ($\beta = -0.180, P < 0.01$)、RSE ($\beta = -0.378, P < 0.001$)、社会的孤立 ($\beta = -0.255, P < 0.001$)、CIM ($\beta = -0.227, P < 0.001$) であり、これらの要因により孤独感尺度分散の 55.3% が説明された。すなわち孤独感の高い者は地域生活に対する自己効力感が低く、自尊感情が低く、社会的孤立にあり、コミュニティインテグレーションが低いことが示された。

V. 考察

本研究は、わが国で初めて地域在住統合失調症患者の孤独感とその関連要因を検討したものである。地域在住統合失調症患者の孤独感の実態について、本研究対象者の UCLA LS 得点は、海外における地域在住統合失調症患者を対象とした得点と近似しており、海外および国内の一般地域住民を対象とした得点よりも高いことから、海外同様わが国においても地域在住統合失調症患者は孤独感の高い集団であることが明らかとなった。

重回帰分析の結果、孤独感の高い地域在住統合失調症患者は地域生活に対する自己効力感が低く、自尊感情が低く、社会的孤立にあり、コミュニティインテグレーションが低いことが示された。

個人要因において地域生活に対する自己効力感は、日常生活行動に対する自信であり、地域生活上の活動実行状況に影響し、ひいては孤独感の高さに関連することが考えられる。地域生活に対する自己効力感の向上においては、患者自身が生活経験を積む機会の提供をすること、また効果が実証されている臨床プログラム Illness Management Recovery (疾病自己管理のためのプログラム) 実施の場を、患者の日中活動場所となる地域活動支援センター等へ拡大することが有効であると考ええる。自尊感情は自己の能力や価値についての評価である。患者自身で地域生活を営む際に困難が生じること、できると考えていたことの遂行が困難となることが、自分の強みや能力に対する評価に影響し、孤独感の高さに関連すると考えられる。自身の強みや能力に対する認識を向上するため患者グループを組織化の上、支援し患者同士で希望や強みを持ちあうプログラムを実施することが有効であると考ええる。

環境要因において社会的孤立にある者は家族および友人ネットワークが小さい。ソーシャルネットワークはソーシャルサポートの供給源であり、ネットワークサイズが小さいことはサポートの供給源が乏しい環境にいることを意味し、サポートの量が孤独感の高さに関連すると考えられる。支援者は患者のソーシャルネットワークのサイズおよび家族や友人を含む身近な人々との関係性をアセスメントし、ネットワーク拡大のため身近な人々が患者の日中活動に参加できるプログラムを実施することが有効であると考ええる。コミュニティインテグレーションが高い者がおかれている環境では、帰属感がもたらされ、地域住民によるサポー

ト提供され、一方でスティグマにより疎外をされる。よって地域の環境の充足状況が地域生活の住みやすさに影響し、孤独感の高さに関連すると考えられる。スティグマ除去のためには疾患知識の教育とともに、地域でのイベント等を活用し患者と地域住民の直接交流の機会を創出することが有効であり、さらに地域住民によるサポート向上のためには地域住民が特別なボランティア活動等に参加せずとも日常生活で営まれる行為において患者と普通に接することの重要性を普及啓発することが重要である。

以上より、地域在住統合失調症患者の孤独感を低減および予防する支援においては、地域在住統合失調症患者の地域生活に対する自己効力感と自尊感情を高めるための個別支援とともに、共生社会の実現に向けたネットワーク構築を含む地域づくり等の環境の整備が重要であることが示唆された。

VI. 謝辞

本研究の実施にあたり、ご支援いただきました横浜学術教育振興財団に心より御礼申し上げます。また、ご協力をいただきました対象者の皆様ならびに地域活動支援センターおよび就労継続支援事業所スタッフの皆様にも心より御礼申し上げます。さらに研究計画から論文作成の全ての過程において、詳細かつ徹底したご指導およびご高配を賜りました指導教員の田高悦子教授に深謝申し上げます。ご指導下さいました地域看護学教室の皆様にも深謝申し上げます。

VII. 引用文献

1. 厚生労働省: 精神保健医療福祉の更なる改革に向けて (今後の精神保健医療福祉のあり方等に関する検討会報告書, 2009).
2. Borge L, Martinsen EW, Ruud T, et al: Quality of life, loneliness, and social contact among long-term psychiatric patients, *Psychiatric services*. 50(1): 81-84, 1999.
3. Skodlar B, Parnas J: Self-disorder and subjective dimensions of suicidality in schizophrenia, *Compr Psychiatry*. 51(4): 363-6, 2010.
4. L. A. ペプロー, D. パールマン, 編. 孤独感の心理学 [Loneliness: A sourcebook of current theory, research and therapy] (加藤義明, 監訳). 東京: 誠信書房, 1988; 4-8.
5. 舩田ゆづり, 田高悦子, 臺有桂: 高齢者における日本語版 UCLA 孤独感尺度 (第3版) の開発とその信頼性・妥当性の検討, *日本地域看護学会誌*. 15(1): 25-32, 2012.
6. 大川希, 大島巖, 長直子: 精神分裂病者の地域生活に対する自己効力感尺度 (SECL) の開発, *精神医学*. 43(7): 727-735, 2001.
7. 山本真理子, 松井豊, 山成由紀子: 認知された自己の諸側面の構造, *教育心理学研究*. 30: 64-68, 1982.
8. 栗本鮎美, 栗田主一, 大久保孝義, 他: 日本語版 Lubben Social Network Scale 短縮版 (LSNS-6) の作成と信頼性および妥当性の検討, *日本老年医学会雑誌*. 48(2): 149-157, 2010.
9. McColl MA, Davies D, Carlson P, et al: The community integration measure: development and preliminary validation, *Arch Phys Med Rehabil*. 82(4): 429-34, 2001.

