

ISSN 0919-0023

# 鹿児島科学研究所研究報告

Bulletin of the Kagoshima Science Scholarship Foundation

No. 19

2009

財団法人 鹿児島科学研究所

The Kagoshima Science Scholarship Foundation

## ま え が き

当財団法人では、鹿児島県内の産業振興に寄与するための科学的な研究で、とくに化学またはバイオに関する研究に対して、毎年助成を行っております。

この「鹿児島科学研究所研究報告」第19号は、当財団法人が平成20年度に助成を行った研究の成果を収録したものであります。

平成21年7月

財団法人 鹿児島科学研究所

理事長 福 谷 明

## 目 次

1. 海洋生物の含有する新規化学物質の抽出・精製・同定  
～軟体サンゴ、*Sarcophyton glaucum* 由来の細胞毒性新規ビスセンプランに関する研究～  
・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1  
鹿児島大学理学部生命化学科  
岩川 哲夫
  
2. マダニの自然免疫を担う生物活性分子(TBM)に関する研究  
・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11  
鹿児島大学農学部獣医学科  
田仲 哲也
  
3. 樹木と共生する窒素固定細菌フランキアへの遺伝子導入法の開発  
・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19  
鹿児島大学大学院理工学研究科  
九町 健一
  
4. イトマキヒトデにおけるストロンチウムを用いた単為発生  
～ その分裂装置の動向 ～  
・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25  
鹿児島大学大学院理工学研究科生命化学専攻  
塔筋 弘章

# 海洋生物の含有する新規化学物質の抽出・精製・同定

～軟体サンゴ、*Sarcophyton glaucum*由来の細胞毒性新規ビスセンプランに関する研究～

岩川 哲夫

鹿児島大学理学部生命化学科  
〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-35  
TEL 099-285-8115

軟体サンゴ *Sarcophyton glaucum* から 7 種の新 4 環性ビスセンプラン (1-7) が単離された。そのうち 4 種 (1-4) は、生合成的には methyl sarcoate の  $\Delta^{4(5)}$  および  $\Delta^{8(9)}$  異性体と  $\Delta^{21(34)}$ ,<sup>35(36)</sup> ジエンの Diels-Alder によって形成されたと推定された。化合物 3 と 4 は C-27 と C-30 間にテトラヒドロフラン環をもつ化合物である。化合物 (5-7) もまた、 $\Delta^{1(14)}$ ,  $4^{(5)}$ ,  $8^{(9)}$  をもつ methyl sarcoate の異性体とセンプランジエンが Diels-Alder 反応によって生成したものと思われる。それらの構造は分光光学手法によって決定された。化合物の 6 種 (1-5, 7) は、ヒト急性骨髄性白血病細胞 (HL-60) の増殖に弱い細胞毒性を示した。

## 1. 緒言

軟体サンゴ、*Sarcophyton* 属は、広範な生物活性を示すセンプラン 2 量体の豊富な源としてよく知られている。<sup>1</sup> これまで 19 種の新奇なビスセンプランが *S. glaucum*, *S. tortuosum* および *S. larum* から単離されている。<sup>2-10</sup> 私たちはこれまで鹿児島産 *S. glaucum* の生物活性センプランの研究において、<sup>11-12</sup> ジクロロメタン可溶部から C-4 と C-8 での二重結合の異なった 4 種の新規な異性体、bisglaucumlides A-D を単離した。<sup>8</sup> Bisglaucumlides C と D は HL-60 の成長に対し、弱い細胞毒性を示した。そのジクロロメタン可溶部を更に精査することによって、新たに 7 種の新ビスセンプラン、bisglaucumlides E-K (1-7) を単離した。私たちはこれらの新化合物の単離、構造、および生物活性について報告する。

## 2. 実験

一般的な実験手法、動物試料、抽出、および単離法については、既に報告した。<sup>8, 13</sup>

溶媒 MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:19) を用いたシリカゲルクロマトグラフィーにより得られた試料 (6.8 g) のシリカゲルクロマトグラフィーを行った。MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:49) で溶離したフラクション部 (184 mg) を HPLC (ODS) クロマトグラフィーを用い精製した。CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (1:1-3:2) から、化合物 (2) (2.7 mg), (6) (1.2 mg), および (7) (1.3 mg) が溶出された。一方、MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を用いて溶出したフラクション部 (694 mg) のシリカゲルクロマトグラフィーを繰り返し、最終的には HPLC を行い精製した。溶離液 CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (9:11-3:2) を用いること

により、化合物 (1) (2.8 mg), (3) (3.2 mg), (4) (1.2 mg), および (5) (1.3 mg) が得られた。

**Bisglaucumlide E (1):** amorphous powder;  $[\alpha]_D +66.7$  ( $c$  0.12, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 230 nm (4.25); CD:  $\Delta\epsilon_{231} +3.2$ ,  $\Delta\epsilon_{252} -4.9$ ; IR (film);  $\nu_{\max}$  3503, 1732, 1709, 1661, 1615  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Table 1; HRFABMS  $m/z$  697.4314  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{41}\text{H}_{61}\text{O}_9$ , 697.4316).

**Bisglaucumlide F (2):** amorphous powder;  $[\alpha]_D +139$  ( $c$  0.30, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 238 nm (4.17); CD:  $\Delta\epsilon_{238} -10.3$ ; IR (film);  $\nu_{\max}$  3459, 1734, 1713, 1678, 1613  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Table 1; HRFABMS  $m/z$  739.4423  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{43}\text{H}_{63}\text{O}_{10}$ , 739.4421).

**Bisglaucumlide G (3):** viscous oil;  $[\alpha]_D +125$  ( $c$  0.16, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 232 nm (4.25); CD:  $\Delta\epsilon_{226} -3.4$ ,  $\Delta\epsilon_{247} +4.4$ ; IR (film)  $\nu_{\max}$  3482, 1732, 1715, 1669, 1607  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Table 1; HRFABMS  $m/z$  697.4318  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{41}\text{H}_{61}\text{O}_9$ , 697.4316).

**Bisglaucumlide H (4):** viscous oil;  $[\alpha]_D +133$  ( $c$  0.15, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 237 nm (4.09); CD:  $\Delta\epsilon_{254} -6.7$ ; IR (film);  $\nu_{\max}$  3470, 1732, 1711, 1694, 1603  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Table 1; HRFABMS  $m/z$  697.4316  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{41}\text{H}_{61}\text{O}_9$ , 697.4316).

**Bisglaucumlide I (5):** viscous oil;  $[\alpha]_D +84$  ( $c$  0.05, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 227 nm (4.30); CD:  $\Delta\epsilon_{225} +12.8$ ,  $\Delta\epsilon_{252} -8.4$ ; IR (film)  $\nu_{\max}$  3457, 1732, 1703, 1659, 1622  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Table 2; HRFABMS  $m/z$  697.4306  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{41}\text{H}_{61}\text{O}_9$ , 697.4316).

**Bisglaucumlide J (6):** amorphous powder;  $[\alpha]_D +33$  ( $c$  0.19, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 231 nm (4.20); CD:  $\Delta\epsilon_{226} +9.6$ ,  $\Delta\epsilon_{250} -13.8$ ; IR (film)  $\nu_{\max}$  3485, 1732, 1713, 1691, 1620  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Table 2; HREIMS  $m/z$  738.4340  $[\text{M}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{43}\text{H}_{62}\text{O}_{10}$ , 738.4343).

**Bisglaucumlide K (7):** amorphous powder;  $[\alpha]_D +95$  ( $c$  0.27, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 231 nm (4.20); CD:  $\Delta\epsilon_{230} -5.2$ ,  $\Delta\epsilon_{249} +10.9$ ; IR (film)  $\nu_{\max}$  3468, 1709, 1680, 1620  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Table 2; HREIMS  $m/z$  739.4426  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{43}\text{H}_{63}\text{O}_{10}$ , 738.4421).

### 3. 結果および考察

Bisglaucumlide E (1) は無定型粉末として単離され、FABMS により分子式  $\text{C}_{41}\text{H}_{61}\text{O}_9$  を示し ( $m/z$  697.431,  $[\text{M} + \text{H}]^+$ )、bisglaucumlide A の異性体と考えられる。Bisglaucumlide E の NMR は、bisglaucumlide C の NMR と酷似していたが、化合物 1 はアセチル基が欠如していた。このことは H-32 ( $\delta$  3.55, 1H, overlapped) の化学シフトが bisglaucumlide C の化学シフトと比べて、1.46 ppm だけ高磁場シフトしていることによって支持された。化合物 1 の相対的な立体化学は、NOESY スペクトルが bisglaucumlide C の NOESY スペクトルとの類似性によって明らかにされた: H-4 ( $\delta$  6.22, 1H, s)/H-2 ( $\delta$  3.94, 1H, d,  $J = 8.7$  Hz), Me-19 ( $\delta$  1.92, 3H, br s), H-36b ( $\delta$  1.98, 1H, d,  $J = 18.4$  Hz); H-7a ( $\delta$  2.57, 1H, dd,  $J = 14.2$ , 8.7 Hz)/Me-18 ( $\delta$  1.80, 3H, br s); H-7b ( $\delta$  2.13, 1H, overlapped)/Me-19; H-8 ( $\delta$  6.34, 1H, br t,  $J = 7.3$  Hz)/H-6a ( $\delta$  3.86, 1H, m), H-11a ( $\delta$  3.06, 1H, dd,  $J = 14.2$ , 8.7 Hz), H-12 ( $\delta$  2.76, 1H, m), Me-19; COOMe ( $\delta$  3.54, 3H, s)/Me-16 ( $\delta$  0.89, 3H, d,  $J = 6.7$

Hz), Me-17 ( $\delta$  0.92, 3H, d,  $J = 6.7$  Hz), H-22 ( $\delta$  4.73, 1H, d,  $J = 11.2$  Hz)。従って、化合物 **1** は、図示された構造であり、bisglaucumlide C の 32-desacetyl 誘導体である。

Bisglaucumlide F (**2**) は、分子式  $C_{43}H_{62}O_{10}$  をもつ無定型粉末であり、bisglaucumlides B-D の異性体であった。 $^1H$  NMR スペクトルにおいて、B, C, D 環に起因する共鳴は bisglaucumlides B-D のそれに似ているが、A 環に起因する共鳴のみ異なっていた。C-4 の二重結合が *E* 配置であり、C-8 の二重結合が *Z* 配置であることは、 $^{13}C$  NMR においてそれぞれ C-19 ( $\delta_c$  20.7) と C-18 ( $\delta_c$  21.5) の化学シフトから明らかであった。C-18 の化学シフトは、8*E* をもつ bisglaucumlide C の化学シフトと比べて 9.7 ppm 低磁場シフトしている。このことはまた、NOESY スペクトルにおいて、Me-19 ( $\delta$  2.09, 3H, br s) が H-6a ( $\delta$  2.15, 1H, m) に、Me-18 ( $\delta$  2.01, 3H, br s) が H-8 ( $\delta$  5.62, 1H, t,  $J = 8.0$  Hz) に相関があることより支持された。A 環の主な配座は NOE 相関によって確証された。すなわち、Me-41 ( $\delta$  3.52, 3H, s) は、H-2 ( $\delta$  3.69, 1H, d,  $J = 8.5$  Hz), Me-16 ( $\delta$  0.79, 3H, d,  $J = 6.9$  Hz), および Me-17 ( $\delta$  0.99, 3H, d,  $J = 6.8$  Hz) に相関しているため、H-2, the isopropyl group, および Me-41 were  $\beta$ -配置である。H-4 ( $\delta$  5.66, 1H, s) が H-6a と H-7b ( $\delta$  2.40, 1H, m) に、H-8 が H-6b ( $\delta$  2.08, 1H, overlapped) と H-6a に、Me-18 が H-11b ( $\delta$  2.08, 1H, overlapped) に、そして H-11a ( $\delta$  3.05, 1H, dd,  $J = 14.8, 10.9$  Hz) が Me-16 に相関していることが観察された。B-D 環の配置に関しては、 $^1H$  NMR スペクトルのシグナルパターンおよびカップリング定数、ならびに NOESY スペクトルが bisglaucumlides B-D のスペクトルとの類似によって証明された。この報告は 4*E* および 8*Z* 配置をもつビスセンプランの最初の例である。

Bisglaucumlide G (**3**) は分子式  $C_{41}H_{60}O_9$  をもつ粘着性のオイルであり、bisglaucumlides A および E の異性体である。NMR スペクトルにおいて、A 環と B 環に起因する共鳴は bisglaucumlide A の共鳴と似ているが、C 環と D 環に由来する  $^{13}C$  の化学シフトが劇的にシフトしていた。すなわち、C-26, C-27, および C-30 の化学シフトは、bisglaucumlide A では、それぞれ、 $\delta_c$  85.1, 69.9, and 69.3 の化学シフトであったが、化合物 **3** のシフトは、 $\delta_c$  74.6, 84.8, 87.6 であった。このことは C-27 および C-30 間にエーテル結合が形成されていることを意味している。A 環と B 環の相対配置は、H-2 ( $\delta$  4.02, 1H, d,  $J = 8.0$  Hz) とカルボメトキシメチルプロトン ( $\delta$  3.57, 3H, s, Me-41) 間に NOE 相関が観察されなかったが、NOESY データによって、bisglaucumlide A の A 環と B 環の相対配置と同じであると明らかにされた。すなわち、Me-41 は、Me-16 ( $\delta$  0.80, 3H, d,  $J = 6.8$  Hz) と Me-17 ( $\delta$  0.96, 3H, d,  $J = 6.8$  Hz) 間に NOE 相関を示したので、カルボメトキシ基とイソプロピル基は同じ  $\beta$ -面に位置していることを示唆した。H-4 ( $\delta$  6.05, 1H, br s) が H-2, H-6b ( $\delta$  2.30, 1H, m), H-7b ( $\delta$  2.41, 1H, overlapped), および H-8 ( $\delta$  6.24, 1H, m) と相関していることが観測された。さらに、H-7a ( $\delta$  2.53, 1H, overlapped) と Me-18 ( $\delta$  1.73, 3H, br s) 間、H-8 と H-11 ( $\delta$  3.45, 1H, dd,  $J = 13.7, 5.7$  Hz) 間、H-12 ( $\delta$  2.54, 1H, overlapped) と H-14a ( $\delta$  3.30, 1H, d,  $J = 19.1$  Hz) 間、および H-14b ( $\delta$  2.01, 1H, d,  $J = 19.1$  Hz) と H-21 ( $\delta$  3.63, 1H, br d,  $J = 11.0$  Hz) 間にも NOE 相関が見られた。それ故、これらのデータは H-2 が  $\beta$ -配置であり、H-21 は  $\alpha$ -配置をしていることを示唆された。C 環と D 環の相対的位置は、NOE 相

関により図2に描かれたように解明された。すなわち、H-21 と H-32 ( $\delta$  3.49, 1H, m)間の相関は、H-32 が  $\cdot$  配置を取っていることを示唆した。Me-38 ( $\delta$  1.74, 3H, br s)は、H-21, H-24b ( $\delta$  2.13, 1H, overlapped), および H-26 ( $\delta$  3.38, 1H, br d,  $J = 6.8$  Hz)に NOE 相関を示した。H-26 は、さらに Me-40 ( $\delta$  1.17, 3H, br s)に相関している。これらのデータは、H-26 と H-40 は  $\cdot$  配置をしていることを示した。Me-39 ( $\delta$  1.15, 3H, br s)が H-30 ( $\delta$  4.06, 1H, t,  $J = 7.4$  Hz) と H-28b ( $\delta$  1.65, 1H, overlapped)に相関し、H-30 が H-28b が相関していることは、H-39 と H-30 は  $\cdot$  配置していることを示唆している。H-22 ( $\delta$  5.26, 1H, d,  $J = 11.0$  Hz) は、H-24a ( $\delta$  2.46), H-25a ( $\delta$  1.89), および Me-41 にも NOE 相関が観測された。それ故、bisglaucumlide G は、C-27 と C-30 間に テトラヒドロフラン環を含んだ構造であると推定された。この化合物は、C-27 と C-30 間に テトラヒドロフラン環を含んだビスセンブランとしては3番目の例である。

Bisglaucumlide H (**4**)は、分子式 $C_{41}H_{60}O_9$ をもつ粘着性のオイルとして単離された。 $^1H$  NMR スペクトルは、A 環に起因する共鳴が少し異なっていること以外は、化合物**3**の NMR に似ていた。 $^{13}C$  NMR スペクトルにおいて、Me-18 と Me-19 のそれぞれ  $\delta_c$  20.5 と  $\delta_c$  27.5 での共鳴は、bisglaucumlide C の場合と同じく 4*Z*, 8*Z* 配置を示唆している。このことはさらに、Me-18 ( $\delta$  1.88, 3H, br s) と H-8 ( $\delta$  5.51, 1H, t,  $J = 8.2$  Hz)間、および Me-19 ( $\delta$  1.87, 3H, br s) と H-4 ( $\delta$  6.27, 1H, br s)間の NOE 相関によって支持された。 $^1H$  NMR スペクトルにおいて、環 B、C、D によるシグナルパターンやカップリング定数は、化合物**3**のそれらとほとんど同じであった。それ故、bisglaucumlide H の構造は、**4**と決定された。

Bisglaucumlide I (**5**)は、分子式 $C_{41}H_{60}O_9$ をもつ粘着性のオイルとして単離された。 $^1H$  NMR は化合物**1**の NMR と酷似していたが、H-2 と H-14 に起因するシグナルパターンと化学シフトが大きく変化していた (Table 1)。HMBC スペクトルにおいて (Figure 3)、メチレンプロトン ( $\delta$  2.35,  $\delta$  3.15, AB,  $J = 19.0$  Hz) と H-4 ( $\delta$  6.07, 1H, s)は、C-3 ( $\delta_c$  199.6)に相関が見られた。H-12 ( $\delta$  3.08, 1H, m) と  $\delta$  3.89 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz)のプロトンは、C-13 ( $\delta_c$  214.0) HMBC 相関を示した。また、後者のプロトンは、C-35 ( $\delta_c$  128.6)および C-36 ( $\delta_c$  32.1)に相関した。従って、メチレンプロトンと  $\delta$  3.89 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz)のプロトンは、それぞれ H-2 と H-14 に帰属された。A-B 環結合の立体配置は、NOESY スペクトルによってシスであると決定された。すなわち、H-12 と H-14 間の NOE によって、両水素は  $\cdot$  である。カルボメトキシメチルプロトン ( $\delta$  3.55, 3H, s)は、H-22 ( $\delta$  4.70, 1H, br d,  $J = 11.6$  Hz)に相関があるので、 $\cdot$  配向であると示唆される。 $\delta$  4.5<sup>(5)</sup> *Z* および  $\delta$  8.9<sup>(9)</sup> *E* 配置は、それぞれ C-19 ( $\delta$  24.9) と C-18 ( $\delta$  11.3)の化学シフトにより決定された。環 B-D のキラル中心の配置は、NMR データを化合物**1**のデータと比べることによって、**1**の配置と同じであると確認された。Bisglaucumlide I は Figure 4 に描かれたように、methyl srcophytoate の異性体**8**とジエン**9**の Diels-Alder 反応によって生合成されたと推定された。

Bisglaucumlide J (**6**)は、分子式 $C_{43}H_{62}O_{10}$ をもつ粘着性のオイルとして単離され、 $^1H$  NMR スペクトルは1個のアセチル基によるシグナルが見られることを除けば、化合物**5**の  $^1H$  NMR スペクトルによく似ていた。そのアセチル基の位置は C-32 位に存在することは、H-32 (d

5.06, 1H, d,  $J = 11.4$  Hz)の化学シフトが、化合物**5**のシフトと比較すると 1.15 ppm だけ低磁場シフトしていることによって決定された。従って、bisglaucumlide Jの構造は、構造式**6**で示された。

Bisglaucumlide K (**7**)は、分子式  $C_{43}H_{62}O_{10}$  をもつ粘着性のオイルとして単離され、化合物**6**の異性体であった。 $^1H$  NMR スペクトルにおいて、環 B-D による化学シフトやカップリング定数は、化合物**5**および**6**のそれに似ていた。A 環による共鳴は、化合物**3**のそれとよく一致を示した。すなわち、C-4 と C-8 位の E 配置の存在が、C-19 ( $\delta$  18.2) と C-18 ( $\delta$  11.2) の化学シフトによって決定された。キラル中心の配置は、化合物**6**との  $^1H$ 、 $^{13}C$ 、および NOESY スペクトルデータの比較により、化合物**6**のそれと同じであると決定された。それ故、bisglaucumlide K の構造は構造式**7**で示された。 $^1H$  と  $^{13}C$  スペクトルにおけるいつかの化学シフトおよび HMQC や HMBC スペクトルにおける相関がみられないが、それは化合物**7**の緩慢な配座相互変換によるものであろう。



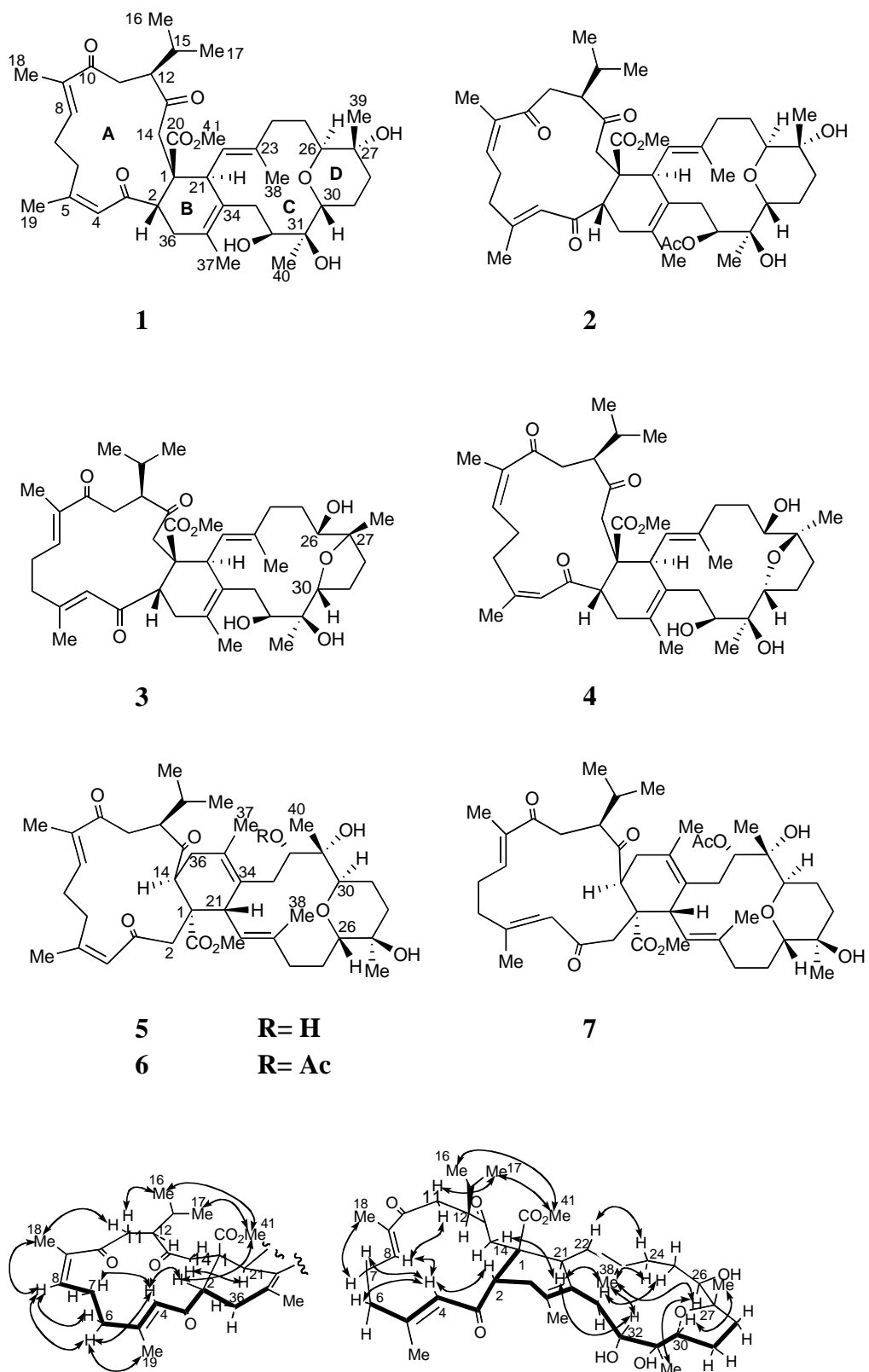


Figure 1. Selected NOE correlations of 2.

Figure 2. Selected NOE correlations of 3.

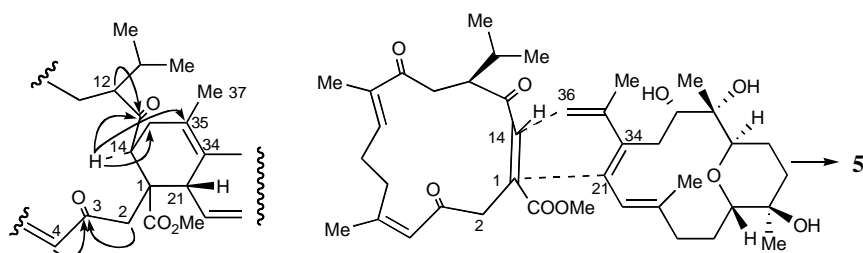


Figure 3. Selected HMBC correlations of **5**. Figure 4. Probable biogenetic pathway for **5**

新化合物の絶対構造は、化合物 **1**、**4**、**5**、および **6** CD スペクトルが bisglaucumlides C の CD スペクトルに、そして化合物 **3** と **7** の CD スペクトルが bisglaucumlide A の CD スペクトルに似ているので、構造式 **1** および **3-7** で示された。化合物 **2** もまた、生合成を考慮するとその他のビスセンプランと同様同じ絶対構造をもっていると仮定された。

Bisglaucumlides I-K は、 $\Delta^{1(14), 4(5), 8(9)}$  および  $\Delta^{21(34), 35(36)}$  センプランジエンをもった methyl sarcoate から由来した二番目のビスセンプランの単離である。これまでエタノール、アセトン、ジクロロメタン、および酢酸エチル抽出から単離されたビスセンプランに carbomethoxy 基が存在することによって、新ビスセンプラン **1-7** 中の carbomethoxy 基は、抽出中に生成したものでないと推定される。さらに、二重結合の幾何は、単離中に変化しなかった。従って、化合物 **1-7** は恐らくは真性の天然物である。

Bisglaucumlide E-K は、ヒト急性骨髄性白血病細胞 (HL60) の増殖に対する細胞毒性活性試験が行われ、次のような  $IC_{50}$  値をもつ弱い活性が示された：E ( $41.0 \mu\text{M}$ ), F ( $13.3 \mu\text{M}$ ), G ( $58.0 \mu\text{M}$ ), H ( $47.8 \mu\text{M}$ ), I ( $44.1 \mu\text{M}$ ), K ( $29.8 \mu\text{M}$ )。

**Table 1. NMR Spectral Data (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) for 1-7**

position	1		2		3		4		5		6		7	
	$\delta_c$	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ (J in Hz)
1	48.0		47.2		48.1		50.1		47.6		48.1		50.2	
2	47.1	3.94 d (8.7)	46.2	3.69 e (8.5)	46.9	4.02 d (8.0)	45.4	3.63, br t (7.7)	49.3	2.35 d (19.0)	49.3	2.69 d 19.2	50.2	2.92 br d (15.2)
3	201.7		202.6		205.0		202.2		199.6	6.07 s	198.9	6.07 s	196.9	5.55 br s
4	126.7	6.22 s	124.6	5.66 s	127.0	6.05 br s	125.4	6.27 br s	125.9		125.5		124.5	
5	157.2	2.07 <sup>a</sup>	158.8	2.08 <sup>a</sup>	159.3	2.41 <sup>b</sup>	161.0	1.97 <sup>a</sup>	156.1	2.03 m	156.6	2.01 <sup>b</sup>	155.2	2.38 m
6a	30.2	3.86 m	39.2	2.15 m	39.6	2.41 <sup>b</sup>	35.0	2.79 dt (10.2, 2.9)	30.4	3.79 dt (12.5, 2.6)	30.7	3.80 dt (2.5, 12.8)	40.0	2.09 m
b		2.13 <sup>a</sup>		2.40 m		2.30 m		1.97 <sup>a</sup>		2.51 m		2.55 m		2.48 m
7a	26.1	2.57 dd (14.2, 8.7)	26.7	2.40 m	25.1	2.53 <sup>b</sup>	27.6	2.10 m	26.2	2.25 m	25.9	2.21 m	25.3	*
b		2.13 <sup>a</sup>		2.79 m		2.41 <sup>b</sup>		2.37 m		6.40 t (7.5)		6.43 t (7.5)		6.61 br s
8	141.4	6.34 br t (7.3)	140.3	5.62 (8.0)	141.4	6.24 m	132.4	5.51 (8.2)	141.6		141.6		142.0	
9	138.3		134.9		137.9		138.6		137.2		136.9		138.1	
10	202.4		204.4		203.6		206.5		200.8		201.3		203.9	
11a	35.6	3.06 dd (14.2, 8.7)	37.0	2.08 <sup>a</sup>	33.2	3.45 dd (13.7, 5.7)	40.0	3.12 dd (18.7, 9.2)	34.6	2.76 dd (15.7, 6.3)	34.6	2.80 dd (16.2, 5.1)	*	3.41 br s
b		2.09 dd (14.2, 3.1)		3.05 dd (14.8, 10.9)		2.01 dd (13.7, 5.1)		2.22 d (18.7)		2.61 dd (15.7, 5.7)		2.38 dd (16.2, 5.7)		1.86 <sup>b</sup>
12	55.7	2.76 m	53.9	2.80 dt (10.9, 3.3)	56.1	2.54 <sup>b</sup>	50.7	3.25 m	55.5	3.08 m	54.8	3.03 q (5.9)	59.0	*
13	212.2		211.0		210.7		211.0		214.0		212.6		212.5	
14a	48.8	2.38 d (19.30)	48.0	3.30 d (19.4)	47.4	3.30 d (19.1)	48.0	2.86 d (18.5)	45.7	3.89 d (7.9)	45.6	3.62 <sup>b</sup>	45.5	3.16 m
b		3.04 d (19.3)		2.36 d (19.4)		2.01 d (19.1)		3.06 d (18.5)						
15	29.5	2.01 b	29.9	2.07 <sup>a</sup>	30.4	2.13 <sup>a</sup>	29.5	1.91 m	28.0	2.22 m	28.1	2.15 <sup>b</sup>	28.3	2.16 m
16	19.1	0.89 d (6.7)	18.0	0.79 d (6.9)	17.3	0.86 d (6.8)	18.8	0.79 d (6.8)	18.2	0.87 d (6.8)	18.4	0.87 d (6.7)	16.6	0.69 d (6.5)
17	20.8	0.92 d (6.7)	20.6	0.99 t (6.8)	20.5	0.96 d (6.8)	20.6	0.94 d (6.7)	21.1	0.89 d (6.7)	21.4	0.87 d (6.7)	21.8	1.06 br s
18	11.4	1.80 br s	11.5	2.01 br s	11.6	1.73 br s	11.6	1.88 br s	11.3	1.69 br s	11.2	1.73 br s	11.2	1.75 br s
19	24.5	1.92 br s	20.7	2.09 br s	18.7	2.09 br s	27.5	1.87 br s	24.9	1.92 br s	24.9	1.90 br s	18.2	2.26 br s
20	173.3		173.2		173.2		174.4		173.4		174.0		174.1	
21	41.1	3.64 <sup>b</sup>	40.2	3.42 br d (11.6)	40.6	3.63 br d (11.0)	46.9	3.30 br d (10.6)	40.3	3.58 br d (11.6)	40.9	3.63 <sup>b</sup>	*	3.29 m
22	124.7	4.73 d (11.2)	125.0	4.74 t (11.6)	125.7	5.26 d (11.0)	127.7	5.16 d (10.6)	125.0	4.70 d (11.6)	125.0	4.75 d (11.5)	123.9	4.90 d (10.8)
23	140.4		134.9		138.1		138.4		140.1		140.4		142.0	
24a	38.9	1.86 <sup>b</sup>	38.4	1.85 dt (3.4, 13.7)	32.7	2.13 <sup>a</sup>	32.6	2.02 m	39.0	2.43 <sup>b</sup>	38.5	2.43 m	39.0	2.42 <sup>b</sup>
b		2.41 <sup>b</sup>		2.44 m		2.46 <sup>b</sup>		2.42 m		1.85 m		1.84 dt (3.0, 12.8)		1.84 <sup>b</sup>
25a	27.0	1.56 <sup>b</sup>	26.5	1.55 dt (3.4, 13.7)	32.2	1.65 <sup>b</sup>	33.6	1.57 <sup>a</sup>	26.9	1.87 <sup>b</sup>	26.5	1.93 m	27.3	1.81 <sup>b</sup>
b		1.87 <sup>a</sup>		1.95 <sup>a</sup>		1.89 <sup>b</sup>		1.98 <sup>b</sup>		1.57 m		1.55 <sup>b</sup>		1.58 m at 27 <sup>a</sup>
26	85.1	3.64 <sup>b</sup>	85.2	3.69 d (10.9)	84.8	3.38 br d (6.8)	73.2	3.39 br d (9.6)	85.0	3.65 d (8.9)	85.1	3.68 d (9.9)	85.1	3.67 br d (8.3)
27	69.9		69.8		64.8		84.7		69.9		69.8		69.8	
28a	31.9	1.69 <sup>b</sup>	31.6	1.68 <sup>b</sup>	36.4	2.09 <sup>b</sup>	36.2	2.23 <sup>b</sup>	31.8	1.48 dd (13.7, 4.5)	31.5	1.49 dt (5.0, 13.9)	31.9	1.47 dt (14.1, 4.7)
b		1.48 dt (4.3, 13.4)		1.49 dt (13.8, 4.5)		1.65 <sup>b</sup>		1.62 m		1.69 <sup>b</sup>		1.68 <sup>b</sup>		1.69 <sup>b</sup>
29a	20.1	1.57 <sup>a</sup>	20.0	1.59 m	27.4	1.89 <sup>b</sup>	26.7	2.23 <sup>b</sup>	20.0	1.73 m	20.0	1.70 <sup>b</sup>	20.2	1.73 <sup>b</sup>
b		1.72 <sup>a</sup>		1.71 <sup>b</sup>		1.89 <sup>b</sup>		1.77 <sup>a</sup>		1.57 <sup>b</sup>		1.57 <sup>b</sup>		1.61 m
30	69.3	3.65 m	69.2	3.64 br d (9.5)	87.6	4.06 t (7.4)	88.0	3.99 (10.1, 5.7)	69.4	3.64 d (12.7)	69.2	3.63b	69.7	3.61 br d (10.1)
31	75.5		75.9		74.7		75.1		75.5		76.0		75.9	
32	71.0	3.55 <sup>b</sup>	*	5.07 br s	76.0	3.49 m	73.2	3.88 m	70.8	3.55 <sup>b</sup>	74.7	5.06 d (11.4)	74.7	5.02 br d (10.8)
33a	31.5	2.29 <sup>b</sup>	28.4	2.14 m	32.3	2.36 <sup>b</sup>	37.4	3.03b, m	31.4	2.44 <sup>b</sup>	28.6	2.71 <sup>b</sup>	29.2	2.76 br t (13.9)
b		2.43 <sup>b</sup>		2.77 m		2.48 <sup>b</sup>		1.91, m		2.27 br d (13.7)		2.16 <sup>b</sup>		2.20 br d (13.9)
34	126.0		124.0		126.5		127.7		125.6		125.0		126.3	
35	127.6		127.5		129.3		128.1		128.6		126.9		128.5	
36a	32.3	1.98 d (18.4)	32.6	1.74 br d (18.4)	32.9	1.93 br d (18.3)	33.1	2.18 m	32.1	3.12 m	31.9	2.97 dd (18.7, 9.3)	34.3	*
b		2.96 dd (18.4, 8.7)		2.86 br dd (18.4)		2.79 dd (18.3, 8.0)		2.32 dd (18.7, 7.7)		1.93 <sup>a</sup>		1.94 <sup>b</sup>		*
37	20.0	1.69 br s	19.8	1.65 br s	19.6	1.68 br s	19.2	1.71 br s	19.8	1.69 br s	19.6	1.64 br s	19.7	1.66 br s
38	19.9	1.81 br s	19.9	1.94 br s	19.7	1.74 br s	20.8	1.86 br s	19.7	1.82 br s	19.9	1.98 br s	19.9	1.91 br s
39	25.6	1.12 s	25.4	1.11 s	19.3	1.15 s	19.5	1.15 br s	25.5	1.11 s	25.4	1.11 s	25.7	1.11 br s
40	18.9	1.33 s	18.7	1.15 s	21.4	1.17 br s	18.1	1.17 br s	18.8	1.31	18.7	1.13 s	18.8	1.14 s
41	51.2	3.54 s	51.0	3.52 s	51.5	3.57 s	51.1	3.56 s	51.3	3.55 s	51.1	3.53 s	51.4	3.54 s
Ac			20.9, 170.8			C-31, C-32 OH					20.6, 170.6		20.9, 170.5	

<sup>a</sup>Chemical shift values of <sup>1</sup>H NMR data and <sup>13</sup>C NMR data are in ppm from TMS and CDC<sub>3</sub> ( $\delta$  77.0), respectively. <sup>b</sup>Overlapping signals \* not found

#### 4. 謝辞

本研究は鹿児島科学研究所の援助のもとで行うことができましたことを心から深謝申し上げます。本実験に携わった鹿児島大学理学部生命化学科有機生化学講座の学生（三浦綾子学士、福田万里子学士、橋本寛大修士）、研究に関して示唆を頂いた当講座の岡村浩明准教授、中谷宗弘名誉教授、大阪市立大学院理学研究科の土江松美博士、森本善樹教授、サンケイ化学(株)の松永禎史氏、畑中正博氏、竹村薫氏、および活性試験を行って頂いた、本学農学部生物資源化学科の侯徳興助教授および藤井信教授に深謝申し上げます。

#### 5. 引用文献

- (1) Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W.-P.; Munro, M. H.; Peter, G.; Northcote, T.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.*, **2008**, 25, 35 – 94.
- (2) Sue, J.; Long, K.; Pang, T.; He, C.-H.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 177-178.
- (3) Su, J.; Long, K.; Peng, T.; Zeng, L.; Zheng, Q.; Lin, X. *Scientia Sinic (series B)*, **1988**, 29, 1172-1184.
- (4) Ishituka, M. O.; Kusumi, T.; Kakisawa, H. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 6595-6596.
- (5) Leone, P. L.; Bowden, B. F.; Carroll, A. R.; Coll, J. C.; Meehan, G. V. *J. Nat. Prod.* **1993**, 56, 521-526.
- (6) Feller, M.; Rudi, A.; Berer, N.; Goldberg, I.; Stein, Z.; Benayahu, Y.; Schleyer, M.; Kashman, Y. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 1303-1308.
- (7) Zeng, L.-M.; Lan, W.-J.; Su, J.-Y.; Zhang, G.-W.; Feng, X.-L.; Liang, Y.-J.; Yang, X.-P. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 1915-1918.
- (8) Iwagawa, T.; Hashimoto, K.; Okamura, H.; Kurawaki, J.; Nakatani, M.; Hou, D.-X.; Fujii, M.; Doe, M.; Morimoto, Y.; Takemura, K. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 1130-1133.
- (9) Yan, X.-H.; Gvagnin, M.; Cimino, G.; Guo, Y.-W. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 5313-5316.
- (10) Jia, R.; Guo, Y.-W.; Chen, P.; Yang, Y.-M.; Mollo, E.; Gavagnin, M.; Cimino, G. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 1158-1166.
- (11) Iwagawa, T.; Nakamura, S.; Masuda, T.; Okamura, H.; Nakatani, M.; Siro, M. *Tetrahedron* **1995**, 51, 5291-5298.
- (12) Iwagawa, T.; Nakamura, S.; Okamura, H.; Nakatani, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, 69, 3543-3549.
- (13) 岩川哲夫 鹿児島科学研究所研究報告、**2006**, No. 16, 45-51.

## Studies on cytotoxic bisembranes from the soft coral *Sarcophyton glaucum*

Tetsuo Iwagawa

Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Science, Kagoshima University

1-2-35 Korimoto Kagoshima 890-0065, Japan

### Abstract

Seven new tetracyclic bisembranes (**1-7**) have been isolated from the soft coral *Sarcophyton glaucum*. Four (**1-4**) may be formed biogenetically by a Diels-Alder reaction of  $\Delta^{4(5)}$  and  $\Delta^{8(9)}$  geometrical isomers of methyl sarcoate and  $\Delta^{21(34), 35(36)}$  dienes, including two with a tetrahydrofuran ring between C-27 and C-30 (**3, 4**) and three bisembranes (**5-7**) are probably derived from methyl sarcoate isomers with  $\Delta^{1(14), 4(5), 8(9)}$  and a cembrane diene. Their structures were established on the basis of spectroscopic methods. Six of them (**1-5, 7**) exhibited weak cytotoxic activity against proliferation of human promyelocytic leukemia cell (HL-60).

# マダニの自然免疫を担う生物活性分子(TBM)に関する研究

田仲 哲也

鹿児島大学農学部獣医学科  
〒890-0065 鹿児島市郡元1丁目21-24  
TEL: 099-285-3570

## 要旨

節足動物とその媒介疾病に対するワクチンや薬剤の開発を成功させる鍵は、節足動物自身に我々が何を必要とするかを語らせることである(EMBL 所長・Dr. Kafatos, 2004)。従って、マダニにとって必須の生存基盤が宿主動物からの吸血・消化にあり、また疾病媒介の成否基盤が侵入病原体に対するマダニ自然免疫にあることに焦点を集中する。すなわち、マダニの自然免疫の分子機構と細胞機能の全容を、各種の生物活性分子(tick-bioactive molecule: TBM)であるリゾチームとロンギシンの特性・機能を解明し、これらのTBMと媒介病原体のクロストークを解明することによって明らかにすることを第1の研究目的とした。得られた研究成果を、マダニとマダニ媒介疾病の制圧技術の開発に活用することが第2の主要研究目的である。加えて、TBMの新規・多彩な機能を、医療・農業分野における革新的創薬に役立てる方途を拓くことも、重要な研究目的としている。

## 1. 緒言

### 1.1. マダニは人・動物の健康と畜産業にとって重要な害虫

地球上に棲息する500属15,000種を越える吸血性節足動物の中で、マダニはわずか17属900種(6%)の弱小グループでありながら、ヒト以外の動物では第1位、またヒトでは蚊に次いで第2位に重要な疾病媒介節足動物とみなされている<sup>1)</sup>。この第1の理由としては、マダニが魚類以外のすべての脊椎動物に寄生可能な宿主域の広さと、長期にわたる大量吸血が可能な特有の吸血・消化機構を有し、ウイルス、リケッチア、細菌、原虫、寄生虫などほぼすべての種類の病原体の伝播に関与している。また、第2の理由として、世界の畜産がマダニとマダニ媒介性疾病病によって蒙っている経済的被害額が、過去30年間毎年70億米ドル以上の巨額にのぼっていることがあげられる<sup>2)</sup>。

### 1.2. マダニとマダニ媒介疾病対策は世界的急務

従って、マダニとマダニ媒介疾病対策は人・動物の健康と畜産業にとって不可欠であり、そのための技術開発は、近年の地球温暖化や国際交易の増大によるマダニ媒介性感染症の流行域の拡大、殺ダニ剤抵抗性マダニの頻出、残留薬剤による環境・食物連鎖の汚染などの問題の深刻化と相まって、今や世界的急務となっている。

### 1.3. 研究目的

マダニ自然免疫関連分子について網羅的に遺伝子・タンパク質レベルで解析をすすめ、その成果はTBM分子をベースとしてマダニおよびマダニ媒介疾病の原因となっているバベシア治療薬の開発に応用するもので、独創性に富んだ研究戦略である。すでに、我々は治療薬候補分子の遺伝子やタンパク質レベルの性状の解析を開始しており、本提案サポートのもとでさらにマダニTBMの網羅的解

析が実施されたことにより、より優れたワクチン、薬剤分子のデリバリーが可能となる。同時に節足動物の進化・発達の過程に媒介微生物がどのように関わってきたのか、媒介者・非媒介者を分子レベルで説明できるようになる。以上のように本研究は、応用面ばかりではなく学術的にも革新性と先導性に満ちており、得られた成果は十分世界に発信できる。

## 2. 実験

### 2.1. フタトゲチマダニにおけるリゾチームの性状解析

マダニは様々な病原体に曝され、それらに対して抵抗性を示すために、初期免疫感染防御機構を発達させていることが予想される。リゾチームは動植物において広く存在していることが知られており、初期免疫応答においてリゾチームが重要な役割を担っていることが考えられる。近年各種ダニにおいて、リゾチームの報告がいくつかなされており、リゾチームが病原体に対する感染防御機構に関連していることが示唆されている。しかしながら、フタトゲチマダニにおけるリゾチームの役割については十分な知見は得られていない。そこで我々はマダニ cDNA ライブラリーを用いて、リゾチーム遺伝子のクローニングを行い、その特性について調べることを目的とした。

### 2.2. ロンギシン P4 のトキソプラズマ原虫に及ぼす影響

我々はアジア・オセアニア地域で最も重要な疾病媒介であるフタトゲチマダニの臓器別の EST データベースの作成に着手し、これまでに唾液腺、中腸、ヘモリンフ、脂肪体、卵巣、発育胚について、合計 20000 クラスターを超える完全長 cDNA ライブラリーからなる世界最大・最高水準のマダニの遺伝子ライブラリーの構築に成功した。これらの EST データベースを用いて、吸血・消化や自然免疫などのマダニの様々な生理機能を担っている TBM が分離・特性解明され、一部の TBM については、マダニ体内におけるバベシア原虫の発育、増殖、移動などとの関連から注目されている。すなわち、マダニの免疫系を担う機能分子として、ディフェンシン群の抗菌性ペプチドやリゾチームなどが知られている。すでに、昆虫全体では 150 以上の抗菌性ペプチドが報告され、細菌攻撃されたガンビアハマダラカでも 10 以上の免疫遺伝子が上方調節されていることから、マダニでは、かなりの種類の免疫系を担う機能分子が未発見と考えられる。自然免疫に依存する昆虫の生体防御では、抗菌性ペプチドが周囲の病原微生物に対するエフェクター分子として殺菌作用を示す。すでに我々はディフェンシンとホモロジーが高いロンギシンを発見し、このタンパク質が菌、酵母、バベシア原虫に殺滅作用があることを報告した<sup>3)</sup>。そこで、特に抗微生物活性が強力と予想されるロンギシンに含まれるペプチド領域、P1 と P4 を合成し、それらのトキソプラズマ原虫に対する影響を調べ、新規の抗原虫剤などの開発の基盤を確立することを目的とした。

## 3. 結果

### 3.1.

フタトゲチマダニの唾液腺の cDNA ライブラリーから完全長リゾチーム cDNA を得、塩基配列解析を行ったところ、663 bp で、ORF は 423 bp であり、その推定産物は 140 アミノ酸であった（推定分子量 15.7 kDa）。これらは 19 アミノ酸のシグナルペプチドを含んでおり、4 箇所のジスルフィド結合部位と 2 箇所の糖鎖結合部位がある C 型リゾチームに属する塩基性タンパク質であることが推測された (Fig. 1)。さらに我々は大腸菌を用いて組換え体の作出を行い、不溶性画分で得られた組換えリゾチームを 6 M 尿素存在下で可溶化後、Ni Sepharose カラム上に吸着させ、カラム上で再生

を行い、最終的に可溶化させることに成功した(Fig. 2)。この組換えリゾチームの酵素活性は 70°C から低下(Fig. 3)し、至適 pH は酸性側(Fig. 4)であった。また、マダニの吸血におけるリゾチーム遺伝子の発現の変化を調べたところ、幼ダニ、若ダニ、成ダニでは飽血前後で変化しなかった。しかしながら、成ダニのリゾチーム遺伝子の発現レベルを臓器別で比較したところ、唾液腺、ヘモリンフ、脂肪体において、吸血によってリゾチーム遺伝子の発現レベルの上昇が確認された(Fig. 5)。

```

1  GTTCCCGGGGCTTCTTTTAAACGGAGCCCGCGGGATAAGAGAAGCTGTTCTTCGACCG
61  GTCGCCTTGTATATCGGAGCGCATTGCCCTGTCCATAGTCGCCGTAACACGATGAAGCGT
                                     M K R   3
121 CGTCTTGCCGIGGTGATCCTGTTTGCTCTGCTGAGCGCGTCCAGCGCCAAGAAGTTCGGC
    R L A V V I L F A L L S A S S A K K F G  23
181 CGATGTGAGCTTGGCTCCATACTCACACGCAACGGCATTCCCAAGAACAAGATCGCAGAC
    R C E L A S I L T R N G I P K N K I A D  43
241 TGGATCTGCTTGGCTACAGCTGAGAGTAGCCTAAACTCCAGAGCTATCAACAGGAACAAG
    W I C L A T A E S S L N S R A I N R N K  63
301 AACGGAAGCAAGGACTACGGAATTTTTTCAGATAAACAATGGTTATTGGTGCAGCCCTGGT
    N G S K D Y G I F Q I N N G Y W C S P G  83
361 CGTCACAACATCTGTAGAGTTGCCCTGTTTCAGCTCTTCAGTCGGATAACATCGCTCCATCC
    R H N I C R V A C S A L Q S D N I A P S 103
421 ATCAAGTGTGCAAAGAAAATCTACCAGAGACACGGATTCGATGCATGGTACGGCTGGAAG
    I K C A K K I Y Q R H G F D A W Y G W K 123
481 AACAAGTGCCGAGGAAAGAACCTTTCTTCTACGTGAAGGGATGCAGATACTGATTTTCC
    N K C R G K N L S S Y V K G C R Y *   140
541 TGCCTGATGTCTGTGACTCGATGAAACCAAGCGGCTTGTCTTGATAAAGCAACCTTTCAA
601 AAAAGGAAATTGATTTTTTTTTGAACGCTAAGTGCAATAAAGAAGAAAGTGTAACAAAAA
661 AAA

```

Fig. 1 Nucleotide and predicted amino acid sequence of the lysozyme cDNA of *Haemaphysalis longicornis*. The nucleotide sequence is numbered on the left and deduced amino acid sequence is numbered on the right. The stop codon is indicated by an asterisk. Red and blue lettering indicate the signal peptide (1-19) and N-glycosylation sites, respectively. Green lettering indicates conserved catalytic residues (E and D) of c-type lysozymes, and under line indicates the polyadenylation signal.



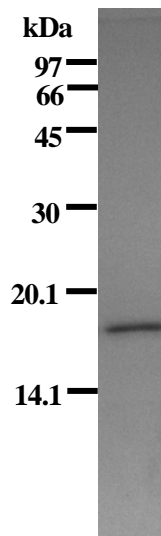


Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the recombinant lysozyme expressed in *E. coli*. Protein extracts from induced *E. coli* carrying pRSET B-lysozyme are shown. 17 kDa His-lysozyme purified using Ni Sepharose.

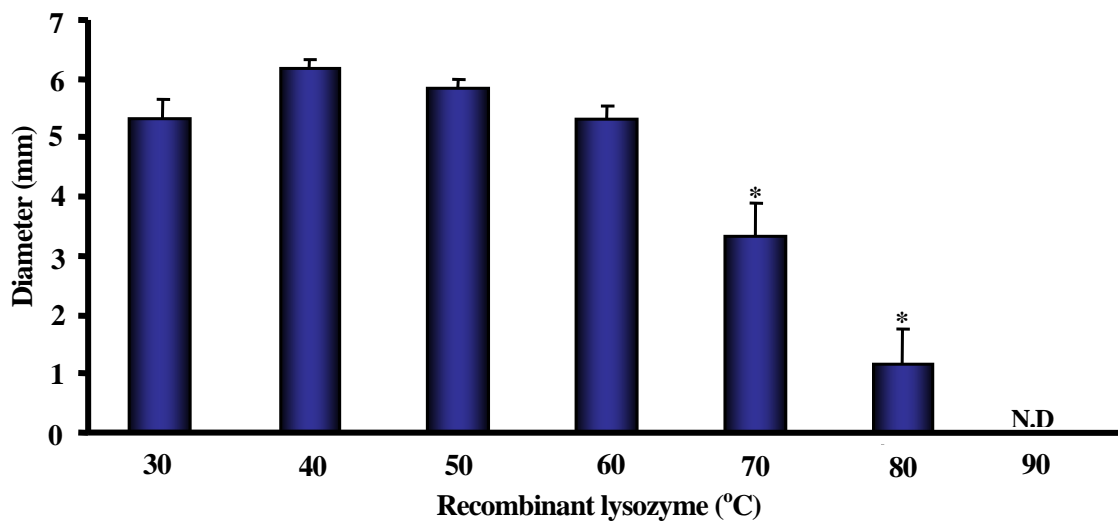


Fig. 3 Lysozyme activity at different temperatures. 2ul of lysozymes (400 µg/ml) treated at the indicated temperature for 30 minutes were assayed in agarose plates containing lyophilized *Micrococcus lysodeikticus* powder. After 24 hours, the clear zone diameter was measured in millimeter. "N.D" indicates the absence of detectable activity. Values are means  $\pm$  SD of triplicate samples. \* $p < 0.01$ , 50 °C vs. 70 °C, 80 °C

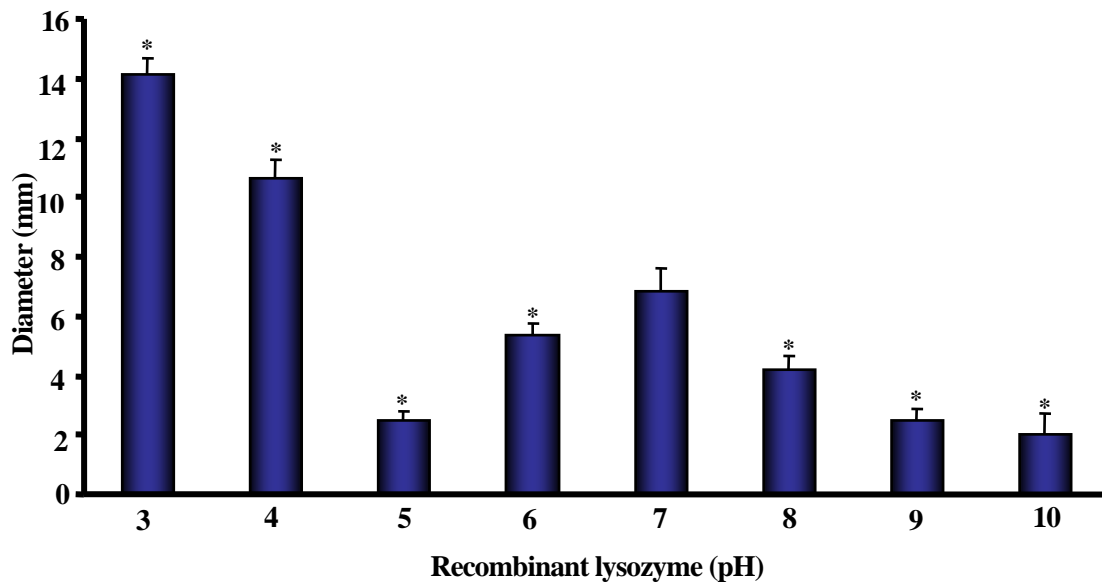


Fig. 4 Lysozyme activity as a function of pH. Phosphate buffer (0.25 M) was prepared, and the pH was adjusted with 10 N NaOH to reach the specified values. After 24 hours, clear zone diameter was measured. Values are means  $\pm$  SD of triplicate samples. \*  $p < 0.01$ , pH 7.0 vs. pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10

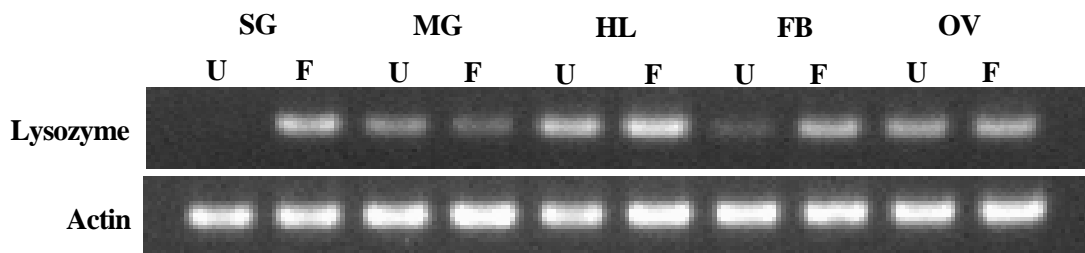


Fig. 5 Expression pattern of Lysozyme mRNA in each organ of unfed (U) and 4-day fed (F) adults. Total RNA was extracted from dissected salivary glands (SG), midgut (MG), hemolymph (HL), fat body (with trachea) (FB), and ovary (OV) of unfed and 4-day fed adults. RT-PCR was performed using lysozyme-specific primers. A 513-bp fragment was amplified by PCR. As the control, a 540-bp fragment of the constitutively expressed *H. longicornis* actin was amplified.

### 3.2.

ロンギシン合成ペプチド P1 は未処理群と同様に *T. gondii* の生存率、またはマウス 3T3 細胞への侵入に影響がなかった。それに対して、ロンギシン合成ペプチド P4 は *T. gondii* を凝集・傷害し、マウス 3T3 細胞への侵入を阻害した(Fig. 6)。

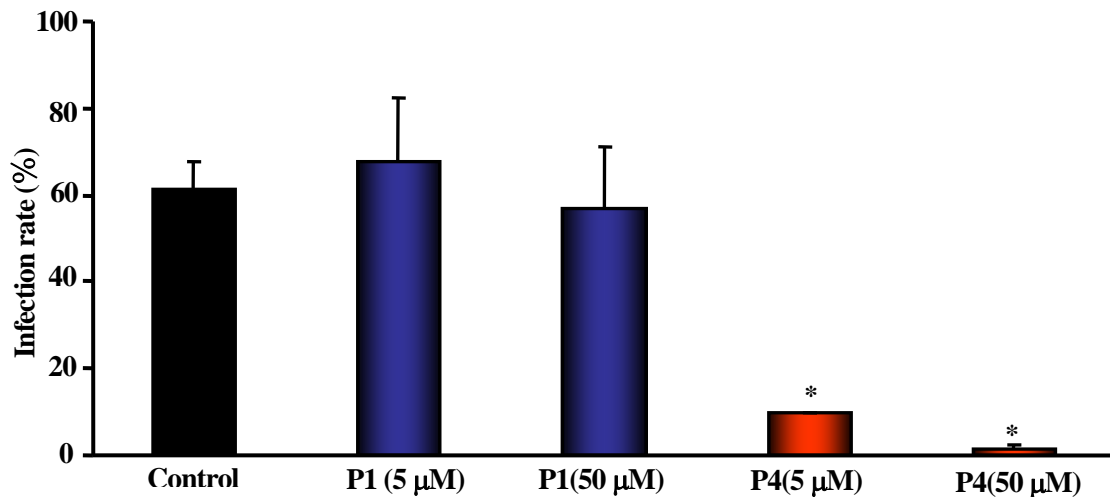


Fig. 6 Effect of longicin P4 peptide on *Toxoplasma gondii* infectivity towards NIH/3T3 cells. Parasites ( $5.0 \times 10^6$ ) exposed for 60 min at 37°C to saline alone (Control), 5 μM longicin P1, 50 μM longicin P1, 5 μM longicin P4, or 50 μM longicin P4 in 1 ml reaction volumes. Parasites were washed with DMEM and applied to NIH/3T3 monolayers on coverslips for 24 h. Infection rates are shown as ratios (%) of infected cells. Values are means  $\pm$ SD of triplicate samples. \* $p < 0.01$ , Control vs. longicin P1 or longicin P4

#### 4. 考察

我々は、マダニの cDNA ライブラリーからリゾチーム遺伝子のクローニングを行い、大腸菌を用いた組換え体の作製に成功し、その組換え体はグラム陽性菌であるマイクロコッカスリゾティクテイクス菌体粉末に対して溶菌活性を示した。現在は、マダニのグラム陰性菌、グラム陽性菌、バベシア原虫感染に対するリゾチーム感染防御メカニズムの解析を進めている。今後は得られた研究成果を用いて、TBM の新規・多彩な機能を、医療・農業分野における革新的創薬に役立てるつもりである。

我々は今回の実験と同様にロンギシン由来合成ペプチド P4 を用いて、抗菌メカニズムの検索も行ったところ、バイオインフォマティクスツールの結果により、このペプチド疎水性領域が菌体膜にもぐり込んだ後、 $\alpha$ -ヘリックス領域を形成して菌体膜へ穴をあけることを予想した。また、このペプチドと菌体の DNA の相互作用を調べるために、ペプチドと DNA を混合後、アガロースゲル上で電気泳動を行ったところ、濃度依存的に DNA の移動が阻止された泳動像が観察された。すなわち、このペプチドが菌体内に入り込んだ後、DNA と結合し複合体を形成することによって DNA の複製を阻止する可能性も示唆された(論文投稿中)。従って、このような抗菌メカニズムがトキソプラズマ原虫でも同様に機能していることが予想されるが、この抗原虫メカニズムの解明については今後の課題である。

現在、世界中の多くの研究者がマダニとその媒介疾病の防圧を目的として、有用なマダニ分子探索のための研究を精力的に進めている。我々はシスタチン<sup>4)</sup>、ロンギシンなど国内外で TBM の特許申請済みである。特許申請準備中のものを含め、酵素や抗菌ペプチドなど 20 以上の新規 TBM を発見しており、マダニの生存と疾病媒介を担う TBM の探索と特性解明の分野では世界をリードしていると自負している。

本研究で想定される成果は節足動物学・感染症学の域にとどまらず他の応用・基礎医学への波及効果は大きい。例えば、次の事例が挙げられる。

- ① マダニが新規薬理分子の宝庫であることが認知されることにより、世界的に新薬の「種」として供給できる。
- ② マダニ自然免疫関連 TBM をベースとしてマダニと媒介感染症制圧技術を確立した例はまだない。我々は宿主動物(家畜)を使ってそれらの有効性を評価できる体制にあり、成功した場合、人の節足動物感染症(マラリアなど)のワクチン・治療薬開発への波及効果は計りしれない。
- ③ 既存の殺ダニ剤と全く作用機序が異なり、宿主(人・動物)に対して毒性の低い殺ダニ剤の開発が可能となる。重要度は認識されていたにもかかわらず、病原体と媒介者のクロストークの解明はほとんど無視されてきただけに、本研究の成果は新たなベクター免疫学の創出につながる。
- ④ 吸血によって積極的に異物(宿主血液、病原体)を取り込み、また長命であるため病原体侵入を受ける機会が多いマダニでは、他の節足動物と異なる独自に進化した自然免疫系が存在しており、生物の自然免疫に新たな分子論的展開が開拓され、免疫学の教科書に新たな 1 ページを加えることを期待できる。

## 5. 謝辞

本研究課題を遂行するにあたり、研究費助成をして頂いた財団法人鹿児島科学研究所に厚くお礼を申し上げます。

## 6. 引用文献

1. Barker, S. C. and Murrell, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology* 129, Suppl: S15-36. (2004)
2. Jongejans, F. and Uilenberg, G. The global importance of ticks. *Parasitology* 129, Suppl: S3-14. (2004)
3. Tsuji, N., Battsetseg, B., Boldbaatar, D., Miyoshi, T., Xuan, X., Oliver, J-H Jr. and Fujisaki K. Babesial vector tick defensin against *Babesia* parasites. *Infect. Immun.* 75, 3633-3640. (2007)
4. Zhou, J., Ueda, M., Umemiya, R., Battsetseg, B., Boldbaatar, D., Xuan X. and Fujisaki K. A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 527-535. (2006)

## Analysis of characterization on the tick-bioactive molecule (TBM)

Tetsuya Tanaka

Department of Frontier Veterinary Science, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, 1-21-24  
Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

Sequence of tick salivary glands lysozyme from hard tick *Haemaphysalis longicornis* was determined by cloning and sequencing from EST data base. It is the first lysozyme sequence representing open reading frame codes for putative signal peptide of 19 amino acids and a mature protein composed of 140 amino-acids. Calculated molecular weights of the protein are 15700 Da and theoretical isoelectric point is 10.05. Lysozyme share 36-75% amino acid sequence identity with the lysozyme of other organisms. The full length cDNA sequence of lysozyme was obtained by PCR. Lysozyme activity of the recombinant protein expressed in *E. coli* was confirmed by a lytic zone assay using lyophilized *Micrococcus lysodeikticus* cells in agarose plates. Lysozyme activity decreased at 70 °C, and was demonstrated acidic side in a pH range. A quantitative RT-PCR was developed and used to evaluate expression during feeding of larvae, nymphs, and female adult ticks. Elevated expression on salivary glands, fat body, and hemolymphs of adult tick was observed during feeding suggesting a combined function of the *H. longicornis* lysozyme in innate immunity against microorganisms.

Longicin P4 peptide is an active part peptide produced by longicin which displays bactericidal activity against both of Gram-negative and Gram-positive bacteria and other microorganisms. In this present study, the effect of longicin P4 peptide on the infectivity of *Toxoplasma gondii* parasites was examined *in vitro*. Parasites incubated with longicin P4 had lost trypanblue dye exclusion activity after inducing aggregation, and the ability to invade mouse embryonal cell line (NIH/3T3). Our observations suggest that the longicin P4 could help prevent the development of *Toxoplasmosis* in humans after ingesting raw, infected meat.

# 樹木と共生する窒素固定細菌フランキアへの遺伝子導入法の開発

九町 健一

鹿児島大学大学院理工学研究科  
〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-35  
TEL : 099-285-8165

## 要旨

フランキアは窒素固定能を持つ土壌放線菌であり、アクチノリザル植物と共生する。フランキアの形質転換系は確立されておらず、アクチノリザル共生の遺伝子レベルの研究は立ち遅れている。これまで我々は、フランキアの翻訳開始因子 3 遺伝子 (*infC*) のプロモーターとフランキアとコドン使用頻度が比較的近いテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tet<sup>R</sup>*) を用いて、フランキアの形質転換に成功した。しかし形質転換体は不安定であった。本研究では、さらに強力なプロモーターと、コドン使用頻度をフランキアに最適化した人工合成マーカージ遺伝子を用いて、フランキアの形質転換系の改善に取り組んだ。コドン使用頻度を最適化したゲンタマイシン耐性遺伝子は、野生型より高い抗生物質耐性をフランキアに付与したことから、コドン使用頻度の改変によりマーカージ遺伝子の翻訳効率が向上したと考えられた。マイクロアレイのデータをもとに、*infC* より高い発現量を示し、転写単位の先頭に位置すると予想される遺伝子を3つ選抜した。これらのプロモーター領域を *tet<sup>R</sup>* に連結した融合遺伝子を作製し、フランキアの形質転換を試みた。

## 1 緒言

フランキアは窒素固定能を持つ土壌放線菌であり、8 科 200 種にわたる植物と共生する。フランキアの共生の宿主はアクチノリザル植物と呼ばれる。共生は根に形成される根粒という器官で行われ、フランキアはそこで大気中の窒素分子をアンモニアへ還元し、宿主植物に供給する。アクチノリザル植物のほとんどは樹木であるため、この共生は森林の窒素サイクルに重要な役割を担っている。

このような重要性にも関わらず、フランキア-アクチノリザル植物共生の分子メカニズムはよく分かっていない。近年、異なる宿主域を持つ3つのフランキア株 (*Frankia* strain CcI3, ACN14a, EAN1pec) のゲノム配列が決定され<sup>6)</sup>、いくつかの共生関連遺伝子の候補が見つかった。またプロテオーム解析により、根<sup>3)</sup>や種子<sup>1)</sup>の滲出液により誘導される遺伝子が同定された(このような遺伝子は根粒菌では共生に重要な役割を持つ)。しかしながら、これらの遺伝子が実際に共生窒素固定に関与するという遺伝学的な証明はなされていない。

フランキアの遺伝学を妨げている大きな理由は、形質転換ができないことである。Cournoyer と Normand は、エレクトロポレーション法によりフランキアのプラスミド DNA をフランキア細胞に導入することに成功した<sup>2)</sup>。しかし、その細胞が抗生物質を含む選択培地上で生育することはなかった。フランキアのゲノムは極端に GC 含量が高い(70%以上)。ゆえに我々は、一般的にバクテリアの形質

転換に用いられる選択マーカー遺伝子は、プロモーター配列やコドン使用頻度の違いからうまく発現しないのではないかと考えた。そこで我々は、フランキアの翻訳開始因子3遺伝子(*infC*)のプロモーター( $P_{infC-1}$ )と、コドン使用頻度がフランキアに比較的近いテトラサイクリン耐性遺伝子(*tet<sup>R</sup>*)を連結した融合遺伝子をマーカーとして用いることにより、フランキアの形質転換に成功した<sup>5)</sup>。しかし、形質転換体は不安定であった。恐らく培養液中に自然の突然変異で抗生物質耐性を獲得した細胞が含まれ、それらが真の形質転換体よりも高い耐性を示すことにより、集団から形質転換体が淘汰されたと考えられた。

そこで本研究では、自然耐性株を除くために、より高い活性のマーカー遺伝子を作製して形質転換体の抗生物質耐性レベルを上げることを試みた。

## 2 実験

### 2.1 コドン最適化マーカー遺伝子を用いた形質転換

メチオニンとトリプトファン以外のアミノ酸は複数のコドンによりコードされており(同義コドン)、それぞれの同義コドンの使用頻度は生物によって異なる。特定の生物に外来遺伝子を導入して発現させる場合、コドン使用頻度がその生物と大きく異なる遺伝子は効率よく翻訳されない<sup>4)</sup>。フランキアはATを多く含む同義コドンを極めて低頻度でしか使用しておらず<sup>7)</sup>、そのような同義コドンが多い遺伝子はフランキア細胞内でうまく翻訳されない可能性が考えられた。マーカー遺伝子の翻訳効率を上げるために、コドン使用頻度をフランキアに最適化したゲンタマイシン耐性遺伝子(*fgm<sup>R</sup>*)を人工合成した。合成はCodon Devices社に委託した。*fgm<sup>R</sup>*をプロモーター $P_{infC-1}$ に連結した融合遺伝子を作製し、これを相同組換え用のベクターpTSF1<sup>5)</sup>に組み込み、形質転換コンストラクトpKKF9を構築した。これをフランキアの細胞にエレクトロポレーション法により導入し、ゲンタマイシンを含む液体培地で形質転換体を選抜した。対照実験として、最適化を行っていない野生型のゲンタマイシン耐性遺伝子(*gm<sup>R</sup>*)を含むコンストラクトpKKF6<sup>5)</sup>を用いて同様の実験を行った。形質転換にはモクマオウなどと共生するCcI3株を用いた。

### 2.2 高転写活性プロモーターの探索

従来の融合マーカー遺伝子には*infC*遺伝子のプロモーターが用いられていたが、より高い転写活性を持つプロモーターを用いれば、マーカー遺伝子の活性を上げることができる。一般に発現量の高い遺伝子のプロモーター活性は高い。そこで、マイクロアレイ解析により得られた各遺伝子のシグナル値を発現量の指標として発現量が高い遺伝子を予測し、そのプロモーター領域を*tet<sup>R</sup>*に連結した形質転換コンストラクトを作製した。

## 3 結果および考察

### 3.1 コドン最適化マーカー遺伝子を用いた形質転換

*fgm<sup>R</sup>*および*gm<sup>R</sup>*の塩基配列の比較をFig. 1に示す。*fgm<sup>R</sup>*では多くのコドンがGCを多く含む同義コドンに変換された。この結果、コドン使用頻度の類似度を示す指標値であるcodon adaptation index (CAI)<sup>8)</sup>が、0.325から0.825に向上した。*fgm<sup>R</sup>*および*gm<sup>R</sup>*をプロモーター $P_{infC-1}$ に連結した融合遺伝子を含むコンストラクト、pKKF9およびpKKF6を用いて形質転換を行い、

```

gmR 1 ATGTTACCGCAGCAGCAACGATGTTACCGCAGCAGGGCAGTCCGCCCTAAAACAAGTTAGTTGGCTCAAGTAA 70
fgmR 1 ATGCTGCGGTCTCGAACGACGTCACCCAGCAGGGGTCCCGCCCCAAGACGAAGCTCGGGGGCTCCTCGA 70
M L R S S N D V T Q Q G S R P K T K L G G S S M

gmR 71 TGGGCATCATTCGCAACATGTAGGCTCGGCCCTGACCAAGTCAAATCCATGCGGGCTGCTCTTGATCTTTT 140
fgmR 71 TGGGCATCATTCGCGACGTCGCCCTGGGCCCGGATCAGGTCAAGAGCATGCGCGCCGCTGGATCTGTT 140
G I I R T C R L G P D Q V K S M R A A L D L F

gmR 141 CGGTCCCTGAGTTCCGAGACGTAGCCACCTACTCCCAACATCAGCCCGGACTCCGATTACCTCGGGAACCTTG 210
fgmR 141 CGGCCGCGAGTTCGGGGACGTCCGCACGTTACTCCCAAGCAACAGCCCGGACTCCGACTACCTCGGGAACCTTC 210
G R E F G D V A T Y S Q H Q P D S D Y L G N L

gmR 211 CTCCTAGTAAAGACATTTCATCGCCCTTIGCTGCCCTTCGACCAAGAAGCGGTTGTGGCGCTCTCGCGGCTT 280
fgmR 211 CTGCGGACCAAGACCTTCATCGCCCTCGCCGCTTCGACCAAGGAGGCGGTCGTGGGGGCGCTCGCCGCGCT 280
L R S K T F I A L A A F D Q E A V V G A L A A Y

gmR 281 ACGTTCCTGCCCAAGTTTGAGCAGCCCGGTACTGAGATCTATATCTATGATCTCGCAGTCTCCGGCGAGCA 350
fgmR 281 ACGTTCCTGCCCAAGTTTCGAGCAGCCCGGAGCGAGATCTACATCTACGACCTCGCCGCTTCGGCGGAGCA 350
V L P K F E Q P R S E I Y I Y D L A V S G E H

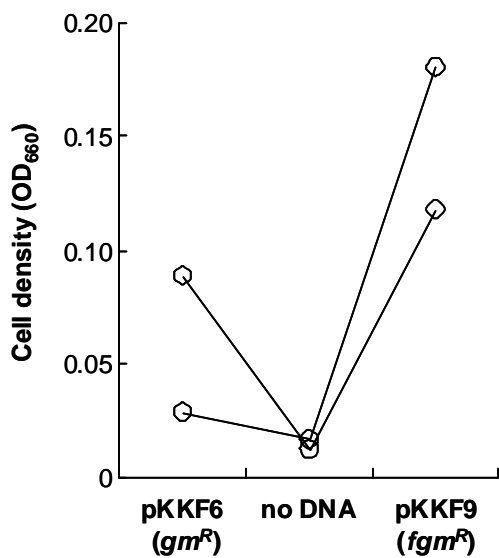
gmR 351 CCGGAGCCAGGGCATTCGCACCGCGCTCATCAATCTCCTCAAGCATGAGGCCAACCGCGCTTGGTGCCTTAT 420
fgmR 351 CCGGCCGCGAGGGCATTCGCGACCGCCCTCATCAACCTCCTCAAGCAGAGGCCAACCGCCCTCGGGGCTAC 420
R R Q G I A T A L I N L L K H E A N A L G A Y

gmR 421 GTGATCTACGTCCAGCAGCAATACCGGTGACCATCCCGCAGTGGCTCTCTATACAAAGTTGGCCATACGG 490
fgmR 421 GTGATCTACGTCCAGGCCACTACCGCGACGACCCCGCGTGGCCCTCTACACCAAGCTCGCGATCCGG 490
V I Y V Q A D Y G D D P A V A L Y T K L G I R E

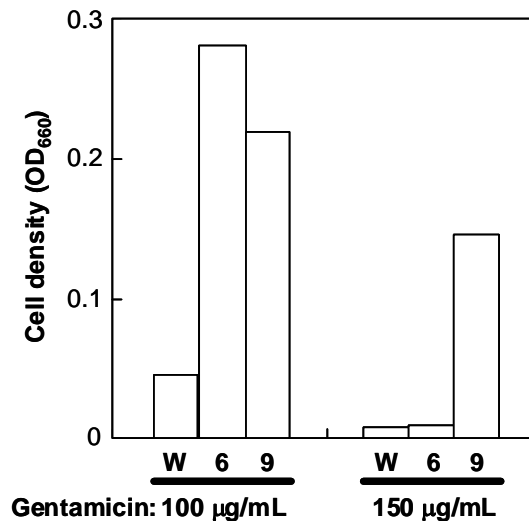
gmR 491 AAGAAAGTGATGCACTTTGATATCGACCCAGTACCGCCACCTAA 534
fgmR 491 AAGAGGTTCATGCACTTCGACATCGACCCAGCACCGCCACCTAA 534
E V M H F D I D P S T A T *

```

**Fig. 1** Sequences of *gm<sup>R</sup>* and *fgm<sup>R</sup>*. Identical nucleotides in both genes are highlighted. Amino acid sequence encoded by those genes is shown below the nucleotide sequences in upper case.



**Fig. 2** Selection of transformants in liquid media containing 75  $\mu\text{g/mL}$  gentamicin. Cell growth was evaluated by optical density ( $\text{OD}_{660}$ ). Replicate experiments examined reproducibility. Data from the same experiment are connected by lines.



**Fig. 3** Gentamicin resistance of transformants. W represents wild type strain Cc13. 6 and 9 represent transformants derived from pKKF6 and pKKF9 that contain *gm<sup>R</sup>* or *fgm<sup>R</sup>*.

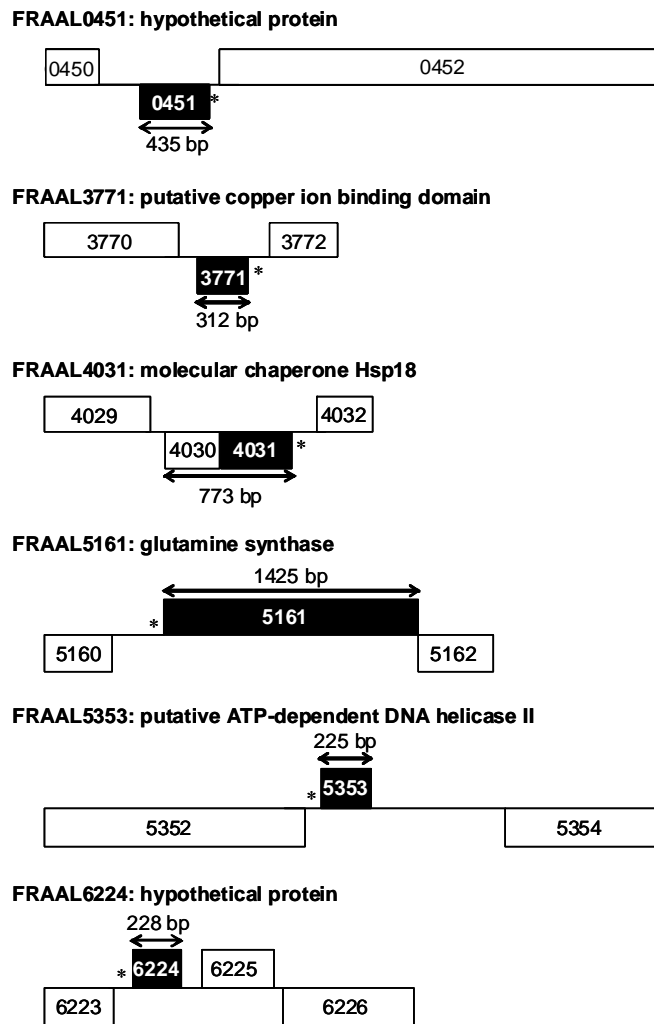


75  $\mu\text{g/mL}$  のゲンタマイシンを含む選択培地で培養した。その結果、*fgm<sup>R</sup>* のほうが選択培地中で高い増殖を示した (Fig. 2)。これらの形質転換体を 100 および 150  $\mu\text{g/mL}$  のゲンタマイシンを含む培地で培養したところ、*fgm<sup>R</sup>* を持つ形質転換体のみが 150  $\mu\text{g/mL}$  のゲンタマイシンに耐性を示した (Fig. 3)。これらの結果はコドン使用頻度の最適化により翻訳活性が上昇し、ゲンタマイシン耐性が高まったことを示す。

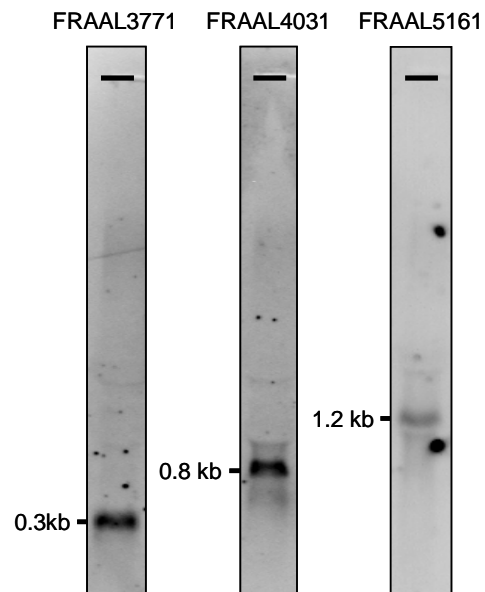
### 3.2 高転写活性プロモーターの探索

我々は、ヤシヤブシやヤマモモと共生するフランキア ACN14a 株のマイクロアレイ解析により得られた、全遺伝子の発現データを有している

(unpublished data)。それによると、*infC* 遺伝子は全 6607 遺伝子中 61 番目に高いシグナル値を示した。*infC* より高いシグナル値を示す遺伝子周辺の遺伝子地図を、ゲノム情報に基づいて作成したところ、FRAAL6224、FRAAL5353、FRAAL5161、FRAAL4031、FRAAL3771、FRAAL0451 の 6 つは単独遺伝子もしくはオペロンの先頭に位置することが予想された (Fig. 4)。つまり、これらの遺伝子の上流にはプロモーターが存在すると考えられた。ノーザンブロット解析の結果、FRAAL3771、FRAAL4031、FRAAL5161 で明瞭なシグナルが検出された (Fig. 5)。転写産物の



**Fig. 4** Gene map of highly expressed genes. Boxes above and below a horizontal line represent open reading frames (ORFs) transcribed forward and reverse direction, respectively. FRAAL ORF ID number assigned by *Frankia* genome project is shown in the box. Closed boxes are candidates for highly expressed gene predicted with microarray data. Predicted transcription units are indicated by double arrow with nucleotide length. Predicted promoter regions are indicated by asterisk.



**Fig. 5** Northern blot analysis of highly expressed genes.

サイズから、これらは予想通り転写単位の先頭に位置することが分かった。ACN14a 株のゲノム DNA を鋳型としてこれら 3 遺伝子のプロモーター領域を PCR により増幅し、*tet<sup>R</sup>* に連結した。この融合マーカー遺伝子を用いて、フランキア CcI3 株の形質転換を行った。現在、選択培地での培養を行っている。

#### 4 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をいただいた財団法人鹿児島科学研究所に感謝申し上げます。フランキア CcI3 株は、ニューハンプシャー大学の Louis Tisa 博士に譲渡していただきました。フランキアのマイクロアレイ解析は、リヨン第一大学の Philippe Normand 博士との共同研究として行いました。厚くお礼申し上げます。

#### 5 引用文献

1. Bagnarol E, Popovici J, Alloisio N, Marechal J, Pujic P, Normand P, Fernandez MP: Differential *Frankia* protein patterns induced by phenolic extracts from Myricaceae seeds. **Physiol Plant** 2007, 130:380-390.
2. Cournoyer B, Normand P: Electroporation of *Frankia* intact cells to plasmid DNA. **Acta Oecologica** 1992, 13:369-378.
3. Hammad Y, Marechal J, Cournoyer B, Normand P, Domenach AM: Modification of the protein expression pattern induced in the nitrogen-fixing actinomycete *Frankia* sp. strain ACN14a-tsr by root exudates of its symbiotic host *Alnus glutinosa* and cloning of the *sodF* gene. **Can J Microbiol** 2001, 47:541-547.
4. Kane JF: Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Curr Opin Biotechnol** 1995, 6:494-500.
5. Kucho K, Kakoi K, Yamaura M, Higashi S, Uchiumi T, Abe M: Transient transformation of *Frankia* by fusion marker genes in liquid culture. **Microbes Environ** 2009, in press.
6. Normand P, Lapierre P, Tisa LS, Gogarten JP, Alloisio N, Bagnarol E, Bassi CA, Berry AM, Bickhart DM, Choisine N *et al*: Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. **Genome Res** 2007, 17:7-15.
7. Sen A, Sur S, Bothra AK, Benson DR, Normand P, Tisa LS: The implication of life style on codon usage patterns and predicted highly expressed genes for three *Frankia* genomes. **Antonie Van Leeuwenhoek** 2008, 93:335-346.
8. Sharp PM, Li WH: The codon adaptation index - a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. **Nucleic Acids Res** 1987, 15:1281-1295.

# **Improvement of transformation method in *Frankia* that makes nitrogen-fixing symbiosis with trees**

Ken-ichi Kucho

Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University

Korimoto 1-21-35, Kagoshima 890-0065, Japan.

*Frankia* is a nitrogen-fixing actinobacterium that establishes root nodule symbiosis with actinorhizal plants. Molecular basis of the symbiosis is largely unknown because genetic manipulation of *Frankia* has not been feasible. Previously, we succeeded to transform *Frankia* using a native promoter of translation initiation factor 3 gene (*infC*) and tetracycline resistance gene (*tet<sup>R</sup>*) with a high codon usage similarity to *Frankia*'s. However, the transformants were unstable. In the present study, we tried to improve the transformation method using stronger promoters and a synthetic marker gene whose codon usage pattern was optimized to *Frankia*. Transformants derived from codon usage-optimized gentamicin resistance gene showed higher antibiotic resistance than those from the wild-type resistance gene, suggesting that modification of codon usage pattern increased translation efficiency. Using microarray data, we picked up three genes that are likely to be expressed at higher levels than *infC* and located at the head of a transcription unit. We generated fusion marker gene consisting of the promoter region of those genes and *tet<sup>R</sup>*, and transformed them to *Frankia*.

# イトマキヒトデにおけるストロンチウムを用いた単為発生

## ～ その分裂装置の動向 ～

塔筋 弘章

鹿児島大学大学院理工学研究科生命化学専攻

〒890-0065

鹿児島市郡元 1-21-35

### 要旨

卵が単独で受精せずに発生が進む現象は単為発生と呼ばれ、クローン技術確立や細胞遺伝学的研究としての利用などを目的として、哺乳類の卵などでさかんに行われている。

ストロンチウムイオンは哺乳類の卵において、受精時と同様に卵内遊離カルシウム濃度を上昇させ、賦活させる事が知られている。しかしながら、その後の発生が進行する事は稀である。なぜなら減数分裂時、卵内の分裂能力を持った中心体は全て極体へ放出され、卵には分裂能力の無い中心体のみが残される。そのため通常は精子由来の中心体を使って、細胞分裂を行う。すなわち単為発生には極体放出を抑制することが必須である。

今回の実験では、塩化ストロンチウム溶液をヒトデ成熟卵に注射すると、イノシトール三リン酸系カルシウム遊離機構による卵内カルシウム放出が起こり、受精膜が上昇した。また極体の放出を抑制しない、2つの極体が放出された卵でもその後の発生が進行した。この卵には、2つの星状体と2つの中心体の存在を確認することができた。これらの事から、イトマキヒトデ成熟卵では、複製能力を持たない中心体がストロンチウムイオンによって、再分裂能を獲得したと考えられる。

## 1. 緒言

生殖細胞である卵が単独で、受精する事無く発生が進む現象は、単為発生と呼ばれる。1887年 Hertwig が、ウニ卵の単為生殖を最初に報告して以来、人工的単為発生の研究は卵自身の持つ発生能力を明らかにしようと様々な動物の卵を材料に行われてきた。現在では、クローン技術の確立や母系染色体の細胞遺伝学的研究などを目的として、ラット・マウス・ウシといった哺乳類卵で研究がさかんに行われている。

本研究で用いたヒトデ卵においても、カフェインやテオフィリンといったメチルキサンチン処理や<sup>1)</sup>、カルシウムイオノフォアによる卵の賦活とサイトカラシン処理による極体放出の抑制を組み合わせた場合、単為発生が進行する事が報告されている<sup>2)</sup>。いずれの処理の場合でも、減数分裂過程において極体を放出させない事が必要不可欠である。これは一对の中心小体から成る細胞内オルガネラである、中心体の複製能の有無に起因するとされる<sup>3)</sup>。

中心体は、細胞分裂時に染色体分離を司る紡錘体の、両極として働く重要な器官であり、DNA複製と同様、細胞周期においてG<sub>1</sub>/S期に一回だけ複製されて、細胞質分裂により娘細胞へ1つずつ受け継がれる<sup>4,6)</sup>。しかしながらこういった一般的な中心体遺伝メカニズムと違い、減数分裂前の卵母細胞に存在する中心体は、非等価な2つの中心小体からなり、あらかじめどの細胞に分配されるか運命付けられているとされる<sup>7)</sup>。減数分裂過程において、第一分裂前のS期では中心小体が倍化され、一对の中心小体を持った中心体が第一極体と卵に分配される。続いて起こる第二減数分裂前のS期では、中心小体の倍化が起こらず、単一の中心小体を持った中心体が第二極体と卵に分配される。こうして卵が受け継いだ単一の中心小体を持つ中心体は複製能を持たず、上記の手法による単為賦活では第一・第二両方の極体を放出した卵は発生しないとされている。さらに、前核を形成する頃の成熟卵では、この一对の中心小体を持つ中心体も消失して、受精により持ち込まれた精子由来の中心体のみが、その後の発生で使用されると考えられている<sup>7)</sup>。

ストロンチウムイオンは、哺乳類の卵に対し細胞外から数時間処理すると、受精時にのような、卵内遊離カルシウムイオン濃度の定期的な上昇が起こる事が知られている<sup>8-12)</sup>。さらに、ストロンチウムにより賦活されたマウスの卵は単為発生し、その中には胚盤胞まで成長したものもあったという報告もある<sup>13)</sup>。受精時に、卵内カルシウムイオン濃度の上昇が起こる事は普遍的な現象であり、カルシウムイオンは受精に続く卵の発生開始に必要な細胞内シグナル因子である<sup>14)</sup>。カルシウムイオンやカルシウムイオノフォア、エタノール、イノシトール三リン酸などにより、人為的に卵内のカルシウム濃度を上昇させる事で卵を単為的に賦活させる事が出来る<sup>15,16)</sup>が、このときに卵割及びその後の発生に進行する事はまれである<sup>17)</sup>。

このストロンチウムにより賦活され発生が進行したマウスの卵は、1つの前核を持ち、半数体として発生する<sup>13)</sup>。一方、ストロンチウムに加え、サイトカラシン処理により減数分裂完了時の第二極体放出を抑制すると、2つの前核を持って、二倍体として発生する。ストロンチウムとサイトカラシン処理による単為発生卵は、正常受精卵と同様の発生のタイムスケジュール、発生率を示す。一方、ストロンチウム処理のみのものは、2細胞までは正常受精卵と大差ないが、その後の卵割率が受精卵や二倍体の単為発生卵より低くなり発生時間も遅れている。

本研究では、ヒトデ成熟卵を用い、ストロンチウムによる単為賦活を誘起した。この時の卵内カルシウムイオン変化、賦活後の単為発生時間、単為発生胚の核相や、中心体、星状体などの分裂装置について検討し、報告する。

## 2. 実験

実験にはイトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*) 卵を用いた。また、卵内カルシウムイオン濃度変化についてはモミジガイ (*Astropecten scoparius*) の卵を用いた。

卵成熟誘起ホルモンである 1-メチルアデニンで成熟再開させた卵を、第二極体放出後、卵固定用チャンバーに入れマイクロマニピュレーターにセット、インジェクションバッファー (450mM KCl, 10mM HEPES, pH7.4) に溶かした 1.25~2.0M  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (和光純薬) を卵内濃度が 2.0~3.3 $\mu\text{M}$  になるよう顕微注射した。チャンバー内には、硫酸欠如海水 (25 mM KCl, 399 mM NaCl, 50 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5mM Tris-HCl で pH 7.7 に調節) を用いた。実験は 20 $\times$ で行った。

細胞内カルシウムイオンの変化は、カルシウム指示薬としてオレゴングリーンを用いて測定した。インジェクションバッファーに溶かした 5mg/ml オレゴングリーン (Molecular Probes) をあらかじめ注射しておいた成熟卵に、塩化ストロンチウム溶液を注射した。注射後、計時的に撮影し、蛍光を取り込んだ。得られた画像データは、MetaMorph (Universal Imaging Corporation) で数値化した。

核相を測定するため、固定した卵は二重鎖 DNA に定量的に結合する事が知られる 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  で染色、撮影した。画像データは、画像処理ソフトウェア ImageJ (NIH) を用いて蛍光強度を数値化した。

間接蛍光抗体法で分裂装置を観察するため、卵細胞質の抽出、固定を Uetake et al. (2002) の方法で行った。一次抗体としては、星状体を可視化するため、モノクローナル マウス 抗  $\beta$ -チューブリン抗体 (Amersham) を、中心体を可視化するためには、ウサギ 抗  $\gamma$ -チューブリン抗体 (Sigma) を使用した。二次抗体としては、各々の一次抗体に対して、Alexa Fluor 555 結合 ヤギ 抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes) と Alexa Fluor 488 結合 ヤギ 抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes) を使用した。

## 3. 結果

### 3-1. ストロンチウムによる卵の賦活

塩化ストロンチウムを、イトマキヒトデ成熟卵に顕微注射すると、全ての卵で受精膜が上昇した。しかしながら未成熟卵に対しては、卵核胞崩壊や受精膜上昇など、何の変化もあらわれなかった。形態的に、正常受精卵の発生と大差ない事が分かった。ストロンチウム賦活胚の発生所要時間を Table 1 に示した。正常受精卵では、媒精後約 90 分で第一卵割が起こる。それに比べると、ストロンチウム賦活卵は注射後 167 $\pm$ 4 分 (平均値 $\pm$ SE) と、かなり遅れた。しかし、その後の卵割は約 30 分毎であり、正常受精卵と変わらなかった。

Table 1. Time course of the  $\text{Sr}^{2+}$ -activated embryo (n=120).

Stage	Time (average $\pm$ SE)
2 cell	167 $\pm$ 4 min
4 cell	198 $\pm$ 6 min
8 cell	242 $\pm$ 8 min
16 cell	270 $\pm$ 8 min
Hatch	15 h $\sim$
Bipinnaria	5 d $\sim$

モミジガイの成熟卵を用いて、ストロンチウム注射時の卵内遊離カルシウムイオン濃度変化を測定した (Fig. 1)。濃度上昇のピークの値は、ストロンチウム注射する前の蛍光値を 1 として、ピーク時にはおよそ 1.8 $\sim$ 1.9 になっていた。これは、正常受精時とほぼ同じであった。ストロンチウム注射による賦活は、カルシウム欠如海水中でも起こり受精膜上昇が確認できた。また、卵小胞体のイノシトール三リン酸活性化カルシウムイオン放出チャンネル阻害剤であるヘパリンで前処理した卵では、卵内カルシウムイオンの上昇は見られず、また、受精膜は上昇しなかった。

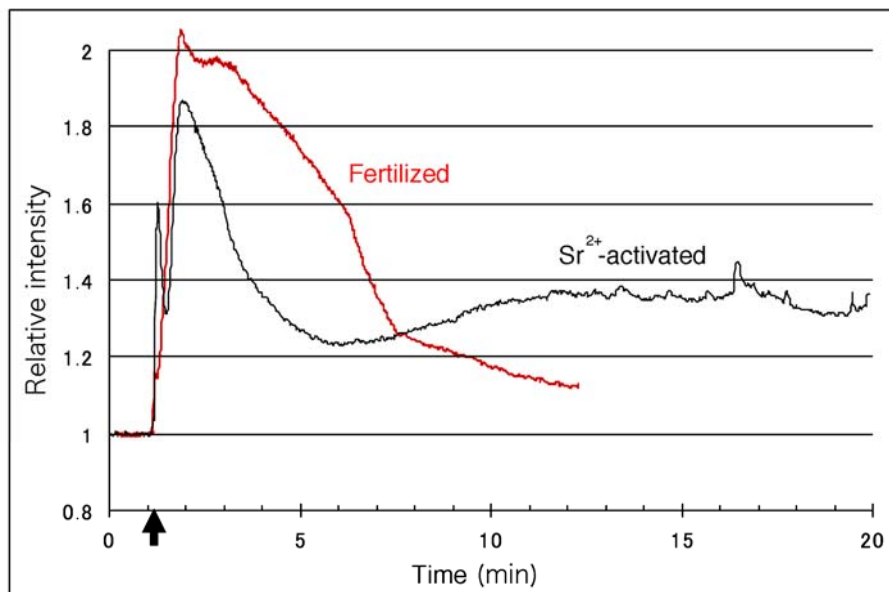


Fig. 1.  $\text{Ca}^{2+}$  transient in the  $\text{Sr}^{2+}$ -activated and fertilized eggs.

### 3-2. ストロンチウム処理卵の核相変化

二重鎖 DNA に定量的に結合する DAPI の蛍光強度を測定、解析し、コントロールの核相  $n \cdot 2n \cdot 4n$  の相対的な蛍光強度値と比較した。ストロンチウム賦活後に卵割した卵の DNA 量は  $40573 \pm 19334$  (平均値  $\pm$  SE) であり、コントロールの  $n$  の値 ( $31386 \pm 7598$ ) に近かった。また、ストロンチウム注射後、120・150・180 分の、いずれも第二極体を放出してまだ卵割を開始していない卵の値は、120 分では  $61541.93 \pm 30426$ 、150 分では 89212、180 分では 132584 であり、コントロールの核相  $n$  と  $2n$  ( $120381 \pm 20799$ ) の値の範囲にあった。このことから、ストロンチウム賦活卵の核相は  $n$  であると考えられる。

### 3-3. ストロンチウム処理卵の分裂装置

微小管の成分のうち、主に星状体、紡錘体の構成成分である  $\beta$ -チューブリン、そして中心小体の成分とされる  $\gamma$ -チューブリンを間接蛍光染色法で染色した。その結果、2つの星状体と2つの中心体があることが判明した (Fig. 2)。

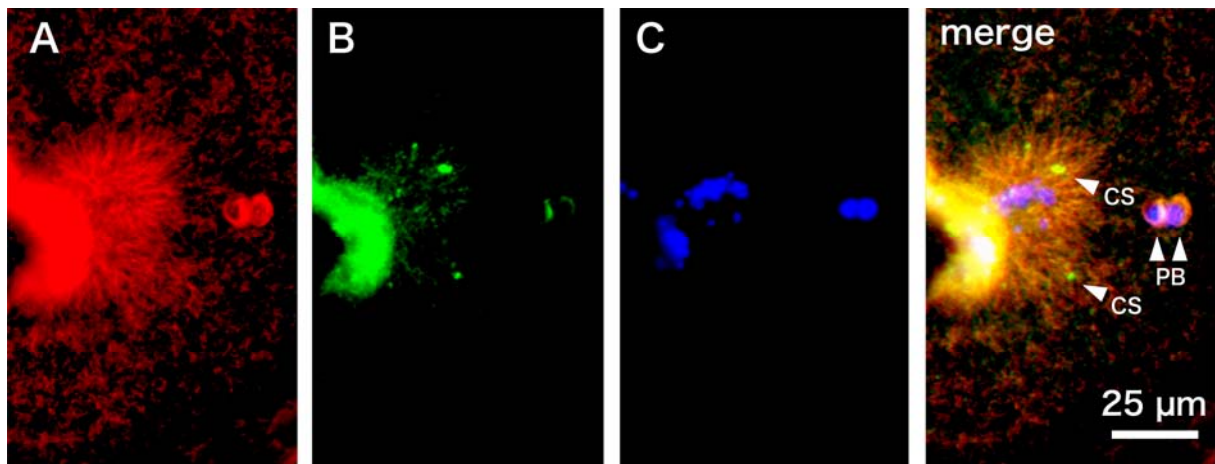


Fig. 2. Mitotic apparatus in the  $Sr^{2+}$ -activated egg.

A:  $\beta$ -tubulin, B:  $\gamma$ -tubulin, C: DNA. PB; polar bodies, CS: centrosomes.

## 4. 考察

ストロンチウムイオンはマウスの卵で単為発生を起こす事が報告されている<sup>13)</sup>。このストロンチウムイオンは、ヒトデの卵に対しても、卵内カルシウムイオン濃度上昇を伴う賦活を起こし、受精膜を上昇させた。受精時に卵内カルシウムイオン濃度上昇が起こる事は普遍的な現象であり、人為的に濃度上昇を起こすと卵を単為的に賦活させる事が出来る<sup>15,16)</sup>。しかしながらこの時に、卵割及びその後の発生に進行する事はまれである為<sup>17)</sup>、ストロンチウムイオンが単為的に発生を引き起こすメカニズムは興味深い。これまで報告されているストロンチウムによる哺乳類卵に対する賦活は、細胞外から数時間作用させていた。しかしながら今回のヒトデ卵では、塩化ストロンチウムを人工海水中に溶かして細胞外から処理しても、受精膜上昇など何の変化も見られず、直接細胞内に顕微注射しなければ効果がなかった。哺乳類の卵に対して、数時間作用させたストロンチウムイオンは、単一のカルシウムトランジェ



ントではなく、受精時に見られるものと同様の連続的なカルシウムイオン濃度の上昇（オシレーション）を起こす。これは、単一のトランジエントしか起こさない、エタノールやカルシウムイオノファであるイオノマイシンと違う点として挙げられている<sup>12)</sup>。

今回、ヒトデ卵においてもストロンチウム刺激により、卵内カルシウム濃度の上昇を起こす事が分かった。このカルシウムイオン濃度上昇のピーク値は正常受精時と同様の値であった。細胞内カルシウム貯蔵装置である小胞体膜上には、イノシトール三リン酸系レセプターとリアノジン系レセプターの2つがある。これらを活性化し、カルシウムイオン遊離を引き起こす候補として、前者に対してはイノシトール三リン酸、後者に対してはカルシウムイオンやリアノジン、サイクリック ADP リボースなどがある。ヒトデの卵では、受精時の卵内カルシウムイオン濃度上昇を起こす因子として、主にイノシトール三リン酸レセプターの関与が提示されている<sup>18,19)</sup>。小胞体のイノシトール三リン酸活性化カルシウムイオン放出チャネル阻害剤であり、正常受精も抑制するヘパリン<sup>20)</sup>で前処理した成熟卵に対しては、ストロンチウムを注射してもカルシウムイオン濃度の上昇、受精膜上昇は見られなかった。また、ストロンチウムによる賦活はカルシウム欠如海中でも起こった。これらの結果から、ストロンチウムイオンによる卵賦活時の卵内カルシウムイオン濃度上昇は、卵内イノシトール三リン酸系のカルシウム遊離機構が関与している事が考えられる。ストロンチウムイオンは、他の単為発生を誘引する因子に比べて、受精時に近い卵内カルシウム濃度の変化を示すのかもしれない。

これまで報告されているヒトデ卵の単為発生では、減数分裂過程での極体放出を抑制する事が必要不可欠であるとされている<sup>2)</sup>。これは、中心体遺伝制御のメカニズムに起因する<sup>3,7)</sup>。中心体は、細胞骨格である微小管の核である $\gamma$ -チューブリン環を含む周辺物質に囲まれた2本の中心小体対から成る細胞内オルガネラである<sup>21-23)</sup>。細胞周期においてG<sub>1</sub>/S期に一回だけ中心小体が複製されて、一对の中心小体を持った中心体が2つできる<sup>4,6)</sup>。これと違い、ヒトデ卵での減数分裂過程においては、第一減数分裂前のS期では中心小体複製が起こり第一極体と卵に正常な中心体が受け継がれるが、第二減数分裂前のS期では中心小体の複製が起こらず、分裂で生じる第二極体と卵には一本の中心小体しか持たない中心体が受け継がれる。さらに、卵に残った一本の中心小体は複製能を持たず、前核を形成する頃には消失してしまう<sup>7)</sup>。

今回の結果は、2つの極体が放出された卵には複製能を持った中心体が存在しない為に単為的に賦活しても発生はしないという、以前の報告とは異なる。またストロンチウム賦活卵では、正常受精卵では約90分で起こる第一卵割が、賦活後164±4分と正常卵よりも遅れて始まったが、その後の卵割の間隔は約30分毎と正常卵と同様であった。よって、賦活卵の発生が進行する際、ストロンチウムは減数分裂過程における中心小体の複製などに対して、何らかの作用をしていると考えられる。事実、賦活卵の卵割時には、正常卵割と同様に、複製された2個の中心体と、2個の星状体が観察された。また、ストロンチウム賦活胚は、nと2nの核相を繰り返して発生している事が示唆された。極体を放出した後の成熟卵は、一倍体のゲノムだけを持ち、これがその後の発生に使われていると予測できる。

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵抽出物において、カルシウム結合タンパク質であ

るカルモジュリンにより活性化されるカルモジュリンキナーゼ $\square$ が、中心体複製開始に必要であるという報告がある<sup>24)</sup>。この報告によると、アフリカツメガエルの胚やその *Cycling extract* (*in vitro* で細胞周期の進行に伴う現象を再現できるカエル卵の抽出物) では、細胞周期に同調した、周期的なイノシトール三リン酸系依存的なカルシウムオシレーションが起こっているとされる。また、中心体が分離する  $G_2/M$  期と中心体複製が起こる  $G_1/S$  期にオシレーションのピークとなり、中心体に局在しているカルモジュリンキナーゼ $\square$ を活性化することで中心体複製開始を制御している。ストロンチウムイオンの起こす卵内カルシウムイオン濃度変化が、ヒトデ卵の減数分裂過程でも中心体複製に何らかの影響を与えている事が考えられる。

このように、イトマキヒトデ成熟卵では、複製能力を持たない中心体がストロンチウムイオンによって、賦活されることで、再分裂能を得るなどの影響を受けて、再び発生が進行する能力を獲得した。卵割、すなわち細胞分裂の仕組み、特に中心体の動きを解明することは、単為発生の原理を明らかにする上で極めて有意義であると考えられ、さまざまな生き物の発生の仕組みを普遍的に理解することにつながる。今回は、複製能を持たない中心小体がストロンチウムイオン処理により、どのような過程を経て複製能を持つようになるのか、また、中心体1つあたりの中心小体は1つか2つかは、明らかにできなかったが、これらの現象を明らかにすることを通じて、不妊治療、畜産における繁殖、形質の保存や育種、あるいは漁業における種苗生産などの分野に応用可能な新しい技術の、基礎的な知見を得ることができると確信している。

## 5. 謝辞

本研究は財団法人鹿児島科学研究所の助成により行うことができました。深くお礼申し上げます。また、本研究に携わった、谷川由佳修士、古川智晴氏に感謝します。卵内遊離カルシウムイオン濃度変化の測定は、東北大学大学院生命科学研究科経塚啓一郎准教授にご協力いただきました。重ねて感謝の意を表します。

## 6. 参考文献

- 1) Obata, C. and Nemoto, S. (1984) Artificial parthenogenesis in starfish eggs: production of parthenogenetic development through suppression of polar body formation by methylxanthines. *Biol. Bull.* 166, 525-536.
- 2) Washitani-Nemoto, S., Saitoh, C. and Nemoto, S. (1994) Artificial parthenogenesis in starfish eggs: behavior of nuclei and chromosomes resulting in tetraploidy of parthenogenotes produced by the suppression of polar body extrusion. *Dev. Biol.* 163, 293-301.
- 3) Uetake, Y., Kato, K. H., Washitani-Nemoto, S. and Nemoto, S. (2002) Nonequivalence of maternal centrosomes/centrioles in starfish oocytes : selective casting-off of reproductive centrioles into polar bodies. *Dev. Biol.* 247, 149-164.
- 4) Kuriyama, K. and Borisy, G. (1981) Centriole cycle in Chinese hamster ovary cells as determined by whole-mount electron microscopy. *J. Cell Biol.* 91, 814-821.
- 5) Rattner, J. B. and Phillips, S. G. (1973) Independence of centriole formation and DNA synthesis. *J.*

- Cell Biol. 57, 359-372.
- 6) Robbins, E., Jentsch, G. and MiCali, A. (1968) The centriole cycle in synchronized hela cells. J. Cell Biol. 36, 329-339.
  - 7) Shirato, Y., Tamura, M., Yoneda, M. and Nemoto, S. (2006) Centrosome destined to decay in starfish oocytes. Development 133, 343-350.
  - 8) Loren, J. and Lacham-Kaplan, O. (2006) The employment of strontium to activate mouse oocytes: effects on spermatid-injection outcome. Reproduction 131, 259-267.
  - 9) Ma, S. F., Liu, X. Y., Miao, D. Q., Han, Z. B., Zhang, X., Miao, Y. L., Yanagimachi, R. and Tan, J. H. (2005) Parthenogenetic activation of mouse oocytes by strontium chloride: a search for the best conditions. Theriogenology 64,1142-1157.
  - 10) Méo, S. C., Leal, C. L. and Garcia, J. M. (2004) Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. Anim. Reprod. Sci. 81, 35-46.
  - 11) Roh, S., Malakooti, N., Morrison, J. R., Trounson, A. O. and Du, Z. T. (2003) Parthenogenetic activation of rat oocytes and their development (*in vitro*). Reprod. Fertil. Dev. 15, 135-140.
  - 12) Tomashov-Matar, R., Tchetchik, D., Eldar, A., Kaplan-Kraicer, R., Oron, Y. and Shalgi, R. (2005) Strontium-induced rat egg activation. Reproduction 130 467-474.
  - 13) Liu, L., Trimarchi, J. R. and Keefe, D. L. (2002) Haploidy but not parthenogenetic activation leads to increased incidence of apoptosis in mouse embryos. Biol. Reprod. 66, 204-210.
  - 14) Jaffe, L. F. (1983) Sources of calcium in egg activation: A review and hypothesis. Dev. Biol. 99, 265-276.
  - 15) Kline, D. and Kline, J.T. (1992) Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. Dev. Biol. 149, 80-89.
  - 16) Steinhardt, R. A. and Epel, D. (1974) Activation of sea-urchin eggs by a calcium ionophore. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71, 1915-1919.
  - 17) Ozil, J. and Huneau, D. (2001) Activation of rabbit oocytes: the impact of the Ca<sup>2+</sup> signal regime on development. Development 128, 917-928.
  - 18) Iwasaki, H., Chiba, K., Uchiyama, T., Yoshikawa, F., Suzuki, F., Ikeda, M., Furuichi, T. and Mikoshiba, K. (2002) Molecular characterization of the starfish inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and its role during oocyte maturation and fertilization. J. Biol. Chem. 277, 2763-2772.
  - 19) Moccia, F., Nusco, G. A., Lim, D., Kyozyuka, K. and Santella, L. (2006) NAADP and InsP<sub>3</sub> play distinct roles at fertilization in starfish oocytes. Dev. Biol. 294, 24-38.
  - 20) Santella, L., De Riso, L., Gragnaniello, G. and Kyozyuka, K. (1999) Cortical granule translocation during maturation of starfish oocytes requires cytoskeletal rearrangement triggered by InsP<sub>3</sub>-mediated Ca<sup>2+</sup> release. Exp. Cell Res. 248, 567-574.
  - 21) Moritz, M. and Agard, D. A. (2001) Gamma-tubulin complexes and microtubule nucleation. Curr. Opin. Struct. Biol. 11, 174-181.
  - 22) Vorobjev, I. A. and Nadezhdina, E. S. (1987) The centrosome and its role in the organization of microtubules. Int. Rev. Cytol. 106, 227-293.

- 23) Zimmerman, W., Sparks, C. A. and Doxsey, S. J. (1999) Amorphous no longer: The centrosome comes into focus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 122-128.
- 24) Matsumoto, Y. and Maller, J. M. (2002) Calcium, calmodulin, and CaMKII requirement for initiation of centrosome duplication in *Xenopus* egg extracts. *Science* 295, 499-502.

# Parthenogenetic activation of egg by strontium in starfish, *Asterina pectinifera*

— a study focused on mitotic apparatus —

Hiroaki Tosuji

Department of Chemistry and Bioscience, Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima

University, Korimoto, Kagoshima, 890-0065 Japan

## **Abstract**

Strontium is known to induce intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase in mammalian oocytes. It has been used to induce parthenogenesis. The effect of strontium on egg activation in starfish was examined. The egg activation with the fertilization membrane elevation was induced when it was microinjected into the matured egg after the protrusion of the second polar body. Immediately after injection of strontium into the egg, an increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  was observed. It is conceivable that the source of  $\text{Ca}^{2+}$  is intracellular as the extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  was unnecessary. The activated egg had two asters and two centrosomes. The nuclear phase was haploid. The egg activation with  $\text{Ca}^{2+}$  increase and the following duplicating cycle of mitotic apparatus are discussed.

平成21年7月30日 発行

鹿児島市南栄二丁目9番地  
(サンケイ化学株式会社内)

電話 099-268-7588

財団法人 鹿児島科学研究所