

行動制御研究部門

三 村 圭 一

(長崎大学教授)

I. 部門の設立と沿革 (昭和54年～昭和61年)

基礎生物学研究所が創立され、各部門が新設されつつある草創期の昭和54年に、客員部門である行動制御研究部門が設置され、客員教授として三村圭一が長崎大学教養部から就任した。当時の研究所は建物も3分の2が出来上がっているのみで、しかも生理研と同居であったため、研究室は手狭であり、あらゆる面で未完成であった。しかし研究所内は何かを創りつつある時期に特有な高揚した気分が漲っていたように思う。斯界の最高レベルの研究者に伍して仕事をするという重みや緊張感もあって、どんな研究室にするかで頭が一杯で、不便さや不満などを感じるまでには至らなかった。しかしながら、たった一人の孤独な設営はゼロからの出発であって、とにかく大変であった。大型の装置は勿論のこと、紙一枚、鉛筆一本、雑布一枚に至るまで、一人で発注して行かねばならなかったからである。それ以上に、研究に必要な装置や設備を、配分された少額とは言えない研究費で、しかも限られた期間内に使って揃えねばならないという仕事は、毎日々業者に会い、内容を検討し、発注するということの繰り返しで、贅沢な話ながら一体自分は何しにここへ来ているのか、まるで事務官兼技官兼用務員ではないかと思えてくることも一度や二度ではなかった。しかし研究室を整備するばかりが任務である訳ではないから、一人であっても、出来るだけ早く仕事を始めなくてはならないと考えて、やれるところから開始した。

客員部門なので、研究室にいる時間や限られるとか、手軽に早急に購入できた装置を使用するとか、一人でやれるテーマであることとかの条件を考慮して、当時手がけていたハエのパターン視の行動実験を細々と開始した。後になる程、大学におけると同様に、会議に時間を取られることがふえて来たが、当時は幸い会議は少なく、この点は非常に有難かった。早朝から深夜まで、時としては泊り込んで、誰とも話すこともなく、全く孤独にハエを追いまわしているといったことが続いた。

そのうち客員助教授として、北海道大学理学部の下澤楯夫が決まり、複数のメンバーとなった。下澤の努力で電気生理やそれに関連ある設備は一段と完備されて行った。

時を経て、常駐できる専任の助手が一名とれることとなったが、客員部門であるという欠陥を補うに足る的確な人材を探すのに心を砕いた。幸い適任者として、少々分野は異なるが——これが後にかえって研究室の発展に非常にプラスとなった——谷村禎一が東北大学農学部から採用された。

当初谷村は研究室の整備のため、三村や下澤が初めに味ったと同じ、あるいはそれ以上の苦勞をした。技官も居らず一人では物も移動できず、雑用に追い回されて、実験が本格的にできるようになるまで、半年以上を要した。しかし彼はその有能さを発揮し、苦勞の甲斐あって、電気生理・生化学・

形態学の多面的な解析手段が常時利用できるようになって行った。

その後、受託大学院生として、東北大学理学部の鶴川義弘（1年間）と佐藤（現・塚田）三香子（4年間）が加わり、研究室もやや賑やかになった。コンピューターに詳しい鶴川は実験計画と結果処理の面からも貢献し、自らもゾウリムシの温度に対する走性の研究で成果を挙げた。佐藤はゾウリムシの遊泳行動に異常をもつ突然変異体 CNR の繊毛膜タンパク質の2次元電気泳動による分析を行い、昼夜を分かつたぬ努力を傾注した。さらに北海道大学理学部から木村賢一（4年間）が加わり、ショウジョウバエの突然変異体の解析を行った（内容については後述）。3名とも当部門研究室の整備充実や運営の面で多大の貢献もした。なお、以上3名は基生研での成果で博士号を取得している。

このほか、北海道大学・東北大学・岡山大学・都立大学等から共同研究の人達が頻繁に来所し、それぞれ成果を挙げるとともに、われわれの今後の研究にも異なる研究手段をもつ研究者間のネットワークが出来て、大いにプラスとなった。

研究室が充実し、人数もふえ、研究活動が活発になるに反し、三村の方は、教授会議の設置や研究所長の2度の交代に伴う会合や人事小委員会等で次第に会議がふえ、そのためそれらに多くの時間がとられるようになった。このため研究所で実際に研究に携わる時間が少なくなり、本務大学の夏季休業期間などのまとまった時間以外は殆ど会議のために来所するだけになってしまった。このほか、当部門の専任の構成員が遂に助手1名のみのままであったことや、技官もいなかった状況では、折角多額の研究費をかけて購入した設備も十分には生かせず、研究成果に反映できなかった。

II. 研究のあらまし（昭和54年～昭和61年）

行動制御研究部門は動物の発現機構の解明を目的としている。部門開設から約6年間は、特に材料として無脊椎動物、なかでも飼育が容易で豊富に得られるショウジョウバエ、ニクバエ及びコオロギを主に使用した。以下述べるように、本部門の研究の進め方の特徴は、電気生理学や形態学からのアプローチがその殆どの研究手段であった動物生理学に、遺伝子や分子レベルからのアプローチを導入して行ったことであろう。しかし、このような分野の適用はまだこれからの学問領域であるため、すぐに成果が続出するというわけにはいかなかったが、その緒口が開かれ、今後さらに成果が挙がると期待できる。以下にその概要を述べる。

1. ショウジョウバエ味覚受容機構の遺伝的解析

1-1 味覚受容突然変異体による解析

味覚受容体の分子の実体を DNA レベルから解明することを最終的な目的とし、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の味覚受容突然変異体 *Tre* について以下の実験を行った。二糖類トレハロースの味覚感度はX染色体上の *Tre* 遺伝子により支配されている。対立遺伝子の関係にある *Tre* 突然変異遺伝子を多数分離し、各遺伝子間の遺伝的相互作用と味覚感度に対する温度依存性を明らかにした。トレハロース低感度系統のあるものは、ショ糖をコントロールとした時のトレハロース感度は温度に

より変化しないが、高感度系統では、温度の上昇に伴ってトレハロース感度が上昇した。このことは、行動実験と唇弁感覚毛からの神経応答の記録によって確かめられた。

以上の結果は、*Tre* 遺伝子座に関する遺伝子量効果の実験から得られた『*Tre* 遺伝子がトレハロースに対する構造遺伝子である』という仮説を支持した。

1-2 キイロショウジョウバエの自然集団における味覚感度の遺伝的変異

味覚感度には高、低感度の遺伝的 2 型が存在し、X 染色体上の *Tre* 遺伝子によって支配されていることが知られている (Tanimura, T. *et al.* 1982)。日本各地を中心として採集された isofemale line について、トレハロース感度を食用色素を利用した二者選択実験を用いて測定した。その結果、自然集団の殆どが低感度であり、高感度系統は数系統しか存在しないことが明らかとなった。

2. ハエ視細胞の視物質の解析

2-1 近紫外光吸収視物質の視細胞内局在

ハエの視細胞は、個眼毎に 8 個ずつ存在しており、そのうち R1 から R6 と番号のついた周辺視細胞の分光感度曲線は 350nm と 450~500nm の二つの極大をもつ。近紫外部の感度極大の実体については種々議論があるが、その性質を調べる目的で実験を行った。まず、基生研の大型スペクトログラフを利用して光照射したハエの複眼視細胞を 2 次元電気泳動で調べたが、若干の点を除き、明確に特定できる結果は得られなかった。次に、電気生理学的手法によって調べたところ、近紫外光の吸収が視細胞の近位側に偏在していることが示された。この結果を踏まえ、薄切した複眼標本を用いて、基生研・生理研共同の分析室で顕微分光光度測定を行い、差スペクトルを求めたところ、電気生理学の結果を支持する結果が得られた。

2-2 ショウジョウバエ視物質発色団の同定

数多くの共同研究のなかでも、特記できる成果はショウジョウバエ視物質発色団の同定とその動態に関する研究であり、大型スペクトログラフ室の共同利用実験も含めた、東北大学応用情報学研究センターとの共同研究による成果である。

ショウジョウバエの複眼は 800 個の個眼からなる。各個眼には 6 個の周辺視細胞 (R1-6) と、2 個の中心視細胞 (R7-8) の計 8 個の視細胞がある。R1-6 と R7-8 はそれぞれ光に対する感度特性が異なっている。昆虫の視物質発色団も他の生物と同様に、ビタミン A アルデヒドであると永く考えられていた。しかし、T. Suzuki (1983) らのオキシム法を用いてショウジョウバエの視物質発色団を HPLC で分析したところ、Vogt (1983, 1984) により示唆されていたように、発色団は従来考えられていた retinal ではなく、3-hydroxyretinal であることが以下の証拠から明らかになった。3-hydroxyretinal の同定は合成品を用いて行った。1) rhabdom 分画を digitonin で可溶化したタンパク質分画に 3-hydroxyretinal が存在する。2) 視細胞を欠く突然変異体 *sine oculis* (so) には存在せず、又、周

辺視細胞を欠く *outer rhabdomere absent (ora)* では正常の10%に量が減少している。3) カロテノイドを含まない培地で育成させたハエは、電気生理・顕微分光による実験から、視物質の量が0.1%程度に減少していることが明らかとなっているが、3-hydroxyretinal も同程度に減少している。4) 電気生理的に得られた R1-6 の分光感度と、rhabdom の digitonin 抽出液に様々な波長の単色光を照射した後の all-trans, 11-cis 型の 3-hydroxyretinal 量の定量との両者の波長依存性が一致した。

2-3 ショウジョウバエのロドプシンに対するモノクローン抗体の分離

この仕事は主として谷村とオーストラリア国立大学との共同研究の成果である。

HPLC による分析により、すべての視細胞の視物質は 3-hydroxyretinal を発色団としていることが明らかにされている。従って、視細胞間の異なる分光感度はオプシタンパク質の差異によると考えられる。現在少なくとも 3 種類のロドプシンが存在すると考えられ、このことは最近 G. Rubin らによる DNA レベルからの研究により明らかになっている。オプシタンパク質の動態を研究するために、ロドプシンに対するモノクローン抗体の分離を試みた。Percoll 密度勾配遠心によりショウジョウバエ頭部から rhabdom 分画を調製した。digitonin で可溶化した rhabdom タンパク質を cyanoborohydride で還元した後、ポリアクリルアミド SDS 電気泳動で分離した。retinylpsin の蛍光バンドを切り取り、マウスに免疫を施し、オプシタンパク質に対するモノクローン抗体産生ハイブリドーマ細胞を dot assay および凍結切片を用いてスクリーニングした。その結果、4 個のクローンが得られた。野生型と R1-6 を欠く *ora* 突然変異体の凍結切片の FITC 2 次抗体を用いた蛍光染色により、4 種の抗体はすべて R1-6 周辺視細胞に特異的に結合することが明らかになった。しかし、ザリガニ・*Lucilia* の視細胞は染色せず、これらの抗体はショウジョウバエのオプシンに特異的なアミノ酸配列を認識していると考えられた。immunogold を用いた電子顕微鏡観察により、抗体は周辺視細胞 R1-6 の microvilli にのみ結合することが明らかとなった。*ora* 突然変異体を用いた SDS 電気泳動のイムノブロットでも、R1-6 特異的であることが確認された。2 次元電気泳動ゲル上でのオプシタンパク質の同定を試みた結果、最近 R. Nichols と W. L. Pak (1985) によって発表されたスポットはオプシンではないことが明らかとなった。また、カロチノイド類を欠く培地で飼育したハエでは、オプシンがまったく合成されていないことが確認された。このハエに all-trans-retinal を投与すると、光を照射することにより、オプシン合成を開始させることができる。このようなハエについて、モノクローン抗体を用いた免疫電顕により、オプシンの合成やターンオーバーの細胞内の経路を明らかにする研究を行った。その結果、合成開始時には、小胞体と multivesicular body に抗原を検出することができ、今後さらに改良を加えることによって、より詳細な細胞内経路が明らかになると期待できる。

3. 神経系突然変異体

摂食行動や吻伸展反射を指標にして、大規模なショウジョウバエ神経系突然変異体のスクリーニングを行い、多数の新しい突然変異体を分離した。

3-1 乾燥に弱い突然変異体

乾燥に弱く、常に水を飲んでいないと生存できない突然変異体 *parched* があることを見出した。モザイク解析などにより、クチクラにおける水分蒸散機構に異常があると考えられた。

3-2 吻伸展反射に異常をもつ突然変異体

エチルメタンスルホン酸で変異を誘発した35,000匹のショウジョウバエからX線染色体上の3遺伝子座に属する5系統の突然変異を得た。そのうちの一つの吻伸出筋に変性が起こる *aperC* に着目し、詳しく解析した。*aperC* (遺伝子座: 1F5-2A) 突然変異体は、羽化後1-2日の間は、附節の糖刺激に対して正常に吻伸展を行うことができるが、羽化後5-6日では殆どの個体が吻を伸展できなくなる。ところが、羽化後10日では、約半数の個体が吻伸展能を回復する。この異常の原因を究明するため、頭部内の吻伸展に関与する筋肉を同定し、組織学的に調べた結果、吻伸出筋 (protractor of fulcrum) に、吻伸展能がなくなるのに伴って変性退縮が起こっていることが観察された。しかし、吻内部の筋肉や飛翔筋などには変化は見られなかった。吻伸展能の回復はこの筋肉の再生によることが明らかとなった。*aperC* 遺伝子の発現は温度感受性があり、温度シフトの実験から温度感受性期は羽化後2-4日あることがわかった。*aperC* 遺伝子は特定の筋肉群の羽化後の機能維持に関与している遺伝子であると考えられる。

4. 機械受容とその分析機構

コオロギの中樞で気流に反応する神経を探し、その性質を調べた。気流の感覚は逃避行動を引き起こし、特に視覚が役立たない状況では有効な捕食者の検出手段である。

流速が正弦波状に変わる刺激気流を用い、閾値流速の周波数依存性を調べた。中樞の介在神経には、気流の速度を感じるものと、加速度を感じるものの2通りがあった。

感覚神経繊維にも速度型と加速度型とがあった。速度型の繊維は感覚毛のうち長いものの、加速度型の繊維は短いもののそれぞれ感覚細胞の軸索であった。又、速度型の感覚神経繊維は速度型の介在神経へ、加速度型の感覚神経繊維は加速度型の介在神経へ、それぞれ選択的に入力していた。

感覚毛の機械的性質を測定したところ、感覚繊維の速度型・加速度型の応答は、主に空気の流体力学的性質を利用していることがわかった。

肢の動きを支配する運動神経は、気流感覚介在神経から信号を受けていた。加速度型介在神経は運動神経を興奮させ、速度型は抑制した。

上記実験に際し、蛍光色素ルシファーイエローによる細胞標識法の改良を行った。

5. ハエのパターン視

電気生理学的手法により、ハエの視細胞や2次ニューロンの受容域のかたちを詳しくマッピングしてみると、いくつかの規則的なかたちをもつ特異な受容域が見出されていた。それらの受容域のかたちがフィルターの役を果たして、受容域と同じかたちのパターンの弁別に関与するのではないかとの

仮定を、ニクバエと視細胞の突然変異体を含むショウジョウバエを使った行動実験によって、確かめることができた。

以上が昭和61年までの本部門の研究のあらましであるが、これらの研究には動物飼育室・分析室・大型スペクトログラフ室・RI室の協力に負うところが大であった。又、研究補助員の方々も縁の下の力となって支えてくれた。記して感謝の意を表する次第である。