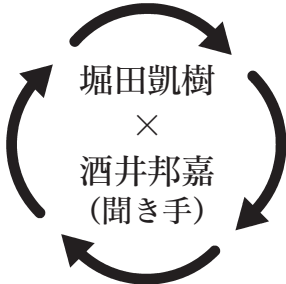
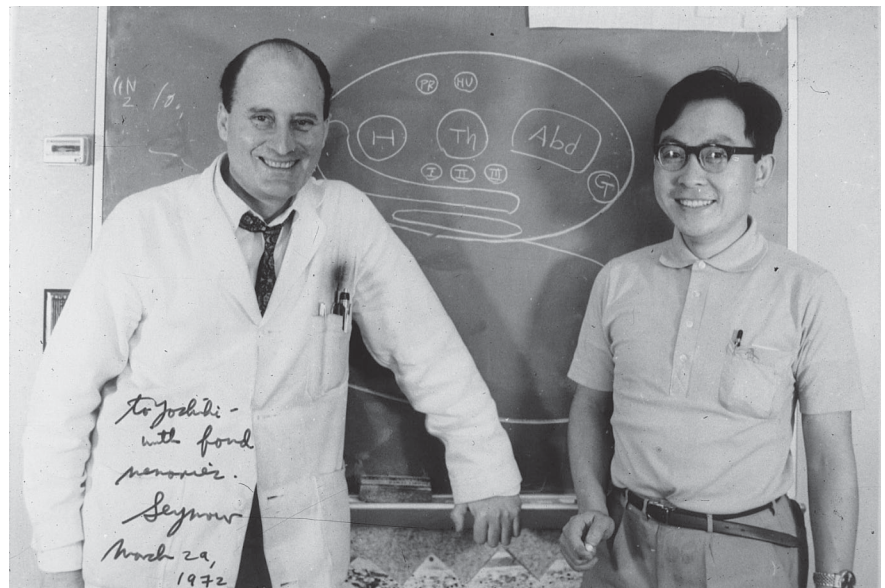


第5回

現代神経科学の源流



シーモア・ベンザー【中編】



ベンザー、堀田両氏
堀田氏の帰国直前、1972年3月29日に撮影された写真。後ろの黒板には運命予定図が書かれているのがみえる。ベンザー氏の胸ポケットはボールペンのインクでいつも黒く汚れていた。

(前号からの続き)

カウンター・カレント法

酒井 前回までのお話で、ベンザーはファージ研究での大仕事を経て、スペリー (Roger Wolcott Sperry; 1913-1994) の研究室に入り、46歳にしてようやくショウジョウバエ研究にたどり着きました。

堀田 長かったね。ようやく私も留学します (笑)。1968年から1972年のことです。

酒井 最初はショウジョウバエの「走光性」の実験ですね。「飛んで火に入る夏の虫」というぐらいですから、昆虫は光が来る方向をガイドにして飛ぶという本能、つまり走光性がある。生物の本能は遺伝的に決定されるはずだから、走光性という行動を決める遺伝子が見つかるかもしれない。

堀田 それを証明するために点突然変異を利用しました。ただ、確率的に1個1個の遺伝子に突然変異を起こして、それに伴う行動異常を探すわけだから、かなり大変な作業です。当時は遺伝子がいくつあるかはわかりませんでした。1万か10万のオーダーだと考えられていました。

ベンザーは、非常に精度よく、いったん目的の遺伝子をヒットしたときは、その個体を必ず捕まえられるくらいの精度の実験をデザインする必要があると考えた。そこでベンザーと私が工夫したのが、カウンター・カレント (counter-current) という装置 (Fig.) です。

酒井 この装置を使って、走光性の行動が正常な個体と異常な変異体とを選別されたのですね。

堀田 装置の構造を説明しましょう。試験

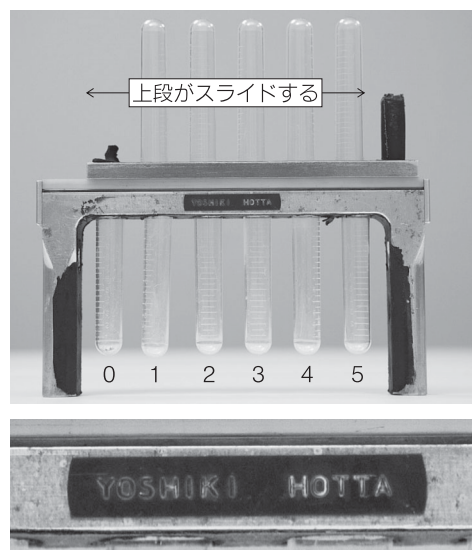


Fig. 堀田氏のカウンター・カレント
ネームプレート付き（下図）。

管が上段に5本、下段に6本（0番～5番）並んでいて、上段の試験管はすべて逆さ向きに固定されています。上段の試験管はスライドして隣の列に動かせるようになっています。

まず試験管0番にハエを入れて、上段の左端の試験管を下段の0番に合わせ、装置全体を寝かせます。そして上段の試験管の側から光を当てるわけです。30秒経ったら上段を右隣へカタンとずらし、下段の試験管を机にドンドンと打ちつけて、中のハエを下段の試験管に落としてやると、光のほうへ移動したハエは試験管1番に、移動しなかったハエは試験管0番にとどまります。

その状態から上段の試験管を左隣へ元の位置に戻します。また同じように上段の試験管の側から光を当てると、今度は試験管0番と1番の2列でハエが走り出す。そしてまた上の段を右隣へずらして、ハエを落とす。そうすると試験管0～2番の3本にハエが分布して、それぞれ光に0回反応したグループ、1回反応したグループ、2回反応したグループに分けられます。

この作業を繰り返してやると、5回の操作でハエの集団は6つの試験管に分かれるわけです。これが「カウンター・カレント法」と呼ばれる方法の原理です。ベンザーはこの方法を使って、走光性の行動を定量

化しようと考えた。これは物理化学的な分析法ですね。

しかも、この試験管は抜いて洗える。これは非常に大事なことです。

酒井 試験管に餌などが付着していたり、他の個体の臭いが残っていたら、ハエの行動に影響が出るかもしれませんからね。

堀田 今お話ししたのは光の方向に向かう“to light”という反応をみるための実験ですが、光と反対方向に向かう“from light”でも実験を行いました。つまり、下段の試験管側から光を当てて同じ操作を繰り返します。移動した個体の中には、ドンドンと衝撃を与えたことで驚いて飛び出しただけの個体もいるかもしれませんが、それならば“to light”と“from light”の条件に違いがみられず、試験管5番に多く分布するはずですよ。

酒井 走光性を示す正常な個体は、“to light”の条件では試験管5番に多く分布し、“from light”の条件では試験管0番に多く分布することになるでしょう。一方、視覚に異常のあるハエは、光の方向と無関係に移動するため、両方の条件で真ん中の試験管2番と3番あたりに多くて、ほぼ二項分布となりますね。

堀田 そういうことです。また、移動しようとしないう「ノロマ型」のハエは、“to light”と“from light”の両方の条件で試験管0番にとどまることになります。

酒井 そうした個体は、運動能力に問題がありそうです。

堀田 逆に、ハイパーアクティブ（活動過多）なハエも、少数ながら出てきました。

酒井 そうした個体はあらゆる方向に飛び回るので、“to light”と“from light”の両方の条件で試験管の後半側（3～5番）に多く分布するわけですね。

堀田 そうです。そのハイパーアクティブな中から、ハイパーキネティック（Hk）などの遺伝子が見つかり、カリウムチャネルの発見につながったのです。以上のように、複数の可能性を分離できるように実験をデザインするのがポイントです。元々は、走光性の行動突然変異体を集めるため

の装置でしたが、さらに活動全般の異常というハエもみつかった、その後の大きな仕事につながりました。

こうした行動の定量的な測定というのは初めてのことで。それまでの行動遺伝学というのは、ただ行動を観察して何か異常があるというまでの話でした。何か異常があるといわれても、何がおかしいのか、どの程度おかしいのかという定量性がないということが難点だったのです。ベンザーのアイデアで、行動異常を定量的に測ることができるようになった。しかも集団で解析するから、統計処理ができる。さすが物理学者だと思いましたね。

酒井 実験手法としては、遺伝子異常を多数の個体からスクリーニングするという発想ですね。

堀田 遺伝子に突然変異を起こさせるには、餌に混ぜたエチルメタルスルホン酸(EMS)を使います。ただし、劣性突然変異が多く起こるとい問題は当初から予想されていて、ホモ接合にしなければ症状が出ないという難しさがありました。ショウジョウバエには**バランスー染色体**という技術があって、2世代から3世代のかけ合わせで異常の起こった染色体をホモ接合に持つハエを簡単につくれます。それでも、実際に行動異常を起こす個体が見つかる確率が1,000匹に1匹以下ですから、精度と能率の両方がよいスクリーニング法が必要なのです。この実験を私は朝から晩まで2年ぐらいやりました。

モザイク法の着想

堀田 カウンター・カレント法で実験を続けていると、走光性に異常のある突然変異個体が見つかったわけですが、その個体はそもそも眼がみえているのかという疑問が出てきました。そこで私は、光刺激に反応する網膜の電位変化(ERG: electroretinogram)を測定して、光の受容細胞に異常があるのか、それとも視神経に異常があって網膜からの信号が脳に行かないのかを判別していきました。

酒井 網膜の電位変化に異常があるタイプをみつけた成果が、堀田先生の留学中の最初の論文¹⁾になりましたね。

堀田 でも、その判別をやり続けていくと、また疑問が出てきます。網膜の電位に異常があるからといって、それが眼の機能に関わる遺伝子に異常があるとは必ずしも限らないと気がついたのです。例えば、腸管での吸収に異常があれば、ビタミンAが欠乏して夜盲症になるかもしれません。ビタミンA不足は色素蛋白であるロドプシンに異常を起こします。

酒井 いわゆる「鳥目」ですね。

堀田 そこで、表現型として現れた網膜の異常の原因が、確かに眼の遺伝子変異にあるということを証明できないかと考えました。それができないと、実験結果を正しく解釈できませんから。その答えが「モザイク法」でした。

酒井 モザイク法が使えるというアイデアはどうやって着想されたのですか。

堀田 ユタ州あたりで開かれたファージのセミナーに参加したところ、ファージの話ばかりが続く中で1人だけ、エド・ルイス(Edward B. Lewis; 1918-2004)のところにいたメリアム(John Merriam)が、ショウジョウバエの**モザイク個体**の話をしたのです。彼は、体表の構造のモザイクの話しかしなかったけれど、それならば神経系などの体内の構造もモザイク状になっているはずだと私は直感しました。

そして、神経系の突然変異体でモザイクをつくれれば、体の中にもモザイク模様ができるので、どこが異常だと突然変異の症状が出るのかがわかるはずだと思いついたのです。これは移植実験と同じ論理で、しかもメスを使わずにできるのです。われながら興奮しました。セミナーが終わるや否や、夜通し車を走らせてカルテク(カリフォルニア工科大学)まで帰ったのです。翌朝、そのアイデアをベンザーに説明したら、「そうだ」と彼もすぐにわかってくれました。

酒井 ベンザーは理解が早いですね。

堀田 当時、このアイデアはベンザー以外誰も理解してくれなかったのです。私は自

バランスー染色体

優性マーカと劣性致死遺伝子を持ち、全域に逆位を持たせて正常な染色体と乗換えが起らないように人工的につくられた染色体。実験に使用する変異染色体は、このバランスー染色体と合わせて継代することで、変化させずに維持できる。バランスー染色体同士がホモ接合となる個体は致死なので、生きていれば必ず変異染色体を持つのである。

モザイク個体

異なる遺伝子構成を持つ組織が、1匹の個体に共存している状態。



堀田凱樹 氏

東京大学名誉教授

東京大学理学部教授、国立遺伝学研究所所長、総合研究大学院大学遺伝学専攻長、大学共同利用機関法人情報・システム研究機構長を歴任。1968～1972年の約4年間、カリフォルニア工科大学のベンザーの下に留学。2013年紫綬褒章受章。

分1人で思いついたつもりですが、モザイクのことはベンザーも当然エド・ルイスのところで目に知っているわけです。モザイク法は有用だと考えていたのでしょう。だから、私の話をすぐに理解してくれた。ただ、モザイク法を神経系の突然変異体に使うという実験は、私が言い出さなければ実現しなかったと思います。

酒井 その着想の次は何に取り組まれたのですか。

堀田 ベンザーと2人で議論をした結果、体の中のモザイク模様は、遺伝子型によって細胞に印をつける「セルマーカー法」を工夫すればみえるかもしれない、と考えて実験を始めました。

X染色体を利用して雌雄モザイク(gynandromorph)をつくる時には、X染色体上に載っている遺伝子由来の酵素かその産物で細胞を染め分ければ、成虫の体の中にモザイク模様が見えるはずだと考えました。そこでX染色体上の遺伝子を全部列挙して酵素を選び出し、その酵素で染められるものはないかと調べたところ2つ3つありました。しかし実際に実験してみると、その酵素は組織切片上では拡散性で細胞から出てしまうため、細胞を個別に特定できないことがわかりました。そのときは、セルマーカー法がうまくいかなかった。

そこで、成虫の体表の特徴(赤目・白目、体色、体毛の違いなど)を決めるような劣性マーカー遺伝子を利用して、体表の雌部分(XX型で劣性突然変異が発現せず正常)と雄部分(一方のX染色体が消失したXO型で劣性突然変異が発現する)の境界を決めることにしました。

酒井 それは先生が留学されてから、どのくらい時間が経っていたのですか。

堀田 2年半くらいですね。4年いた間の前半は突然変異を取っていて、後半がモザイク法の研究です。

酒井 ちょうど1970年くらいですね。

堀田 このモザイク法で得られた突然変異体の中には、翅が上に跳ね上がっている突然変異体(wings-up mutants)がありました。そういうハエも、走光性を示しません。

酒井 うまく飛べないからですか？

堀田 それは飛べないためではありません。羽の形に異常があると、不思議なことにハエの活動は不活発になるのです。片方の翅だけを上げているモザイクのハエをみせたところ、周りの仲間がやっと理解してくれました。それは筋肉の変異であって、神経系の変異ではないと後でわかりました。

運命予定図の実現

酒井 体の異常部位がマッピングができるようになるまでには、もう少し時間が必要だったのですね。

堀田 実は、スターテバント(Alfred Henry Sturtevant; 1891-1970)が論文にそのヒントを書いていました。それはスターテバントの1929年の論文²⁾ですが、雄・雌に分かれるときの頻度から、身体の2つの構造間の「距離」が推定できると述べています。1次元の染色体地図作成法を2次元に応用して、ハエの胞胚(発生初期に卵の表面側に細胞が1層並んだ状態)の上に、成虫の体の各組織に対応した「運命予定図」が描けるに違いないと予想したのです。

酒井 それはスターテバントの卓見だったのですね。

堀田 そう、彼はアイデアだけを述べて、自分ではやらなかった。そして、先ほどお話ししたジョン・メリアムが、エド・ルイスのラボでスターテバントのデータを使って、腹部体節の運命予定図が正しい順番で並ぶような地図をつくったのです。

表面の体節でそれができるなら、それとの位置関係で、神経などの内部組織も全部マップができるに違いないと私は考えました。そして、胞胚上の距離の単位を、スターテバントにちなんで「スターツ(sturts)」と呼ぶことにしたのです。

酒井 スターテバントは、自分のアイデアが実現して喜んだことでしょうか。

堀田 元々のアイデアが1929年で、その40年後に成就したわけだから、スターテバントは、すごく喜んでいましたね。それは亡くなる直前のことですが、彼はその頃

もラボのあたりをうろうろしてるのですよ(笑)。カルテクの裏庭に彼の家がありましたから。昔、カルテクの教授をしていたときの借家を、名誉教授になったときに自分で買いとって住んでいました。

染色体上に1次元のマップをつくったのがスターテバントで、われわれはそれを2次元のマップに拡張したのです。スターテバントにしてみれば、それは当然の拡張だったのですが、2次元のほうはほとんど誰も手をつける人がいませんでした。

酒井 実現には、技術的に難しい点があったのでしょうか。

堀田 これはあまり知られてないことですが、運命予定図をつくるときに、距離を完全に実験データに比例させて書いてはいないのです。実は染色体の距離もまた、組み替えの頻度と正確に比例するわけではありません。論文にいちいち書いていなくても、**ホールデンの式**という補正法を使うのです。距離の近いところは線形だと仮定しても、それほど間違いではありませんが。

酒井 2次元では補正法が確立していないのですね。

堀田 正中線の位置は、実は左右の対応点から一番遠いところにありますから、正中線を描くには何らかの補正が必要です。そこは近似をするしかありません。

酒井 実際に何か行動異常の突然変異がみつかった場合、どうやってマップに載せるのでしょうか。

堀田 約1,000匹のいろいろなパターンのモザイク個体をつくって、その1匹1匹の行動を調べ、行動異常と成虫の体表のモザイクのパターンとの相関をみるわけです。ある行動異常を引き起こす体部位のスポットがあるならば、そこがモザイクの雄部分に含まれるときにのみ行動異常が起こるはずですよ。

酒井 それを決定するのは、気の遠くなるような作業ですね。

堀田 そうですね。ハエの体を模式的に描いた絵のコピーをたくさん用意して、体の片側で約50カ所の構造を定め、雌部分を絵で赤く塗りながら境界線を引いていきました。

酒井 2つの構造を選んだときに、全モザ

イク個体の何例で雌部と雄部に分かれたかという割合が、「距離」に対応するわけですね。構造間の距離が近いほど、雌雄パターンに分かれる割合が小さくなりますから。

堀田 そういことです。原理的には、三角測量の要領で地図を描きます。当時の計算機はまだ「手回し計算機」でしたし、電卓もない時代です。

酒井 それだけ大量のデータを処理するのは、大変な作業だったことと思います。計算結果を2次元的な距離関係で表すことで、「運命予定図」が完成したのですね。その成果は『Nature』誌³⁾に掲載されました。

堀田 その原理を整理して考えると、とても面白いシステムになっているのです。突然変異は、「どの場所で、どのような性質の変化をしているか」という2つの点を明らかにすべきですが、この手法はその2つを分離して、変異を起こす場所だけを特定できるのです。それがどんな変異なのかまではわかりませんが、場所が特定されたのなら、その細胞の性質を詳細に調べればよいのです。

酒井 例えば、先ほどの走光性の異常が、眼の異常なのか腸管の異常なのかをはっきりさせられる。よくわかりました。

堀田 この考え方の意義は、今でも失われていないと思います。

酒井 その前提として、点突然変異を調べないと駄目なのですね。

堀田 点突然変異であって、原因が1つでないと、解析が複雑になってしまいますから。

酒井 そうしてすべてがうまく結びついたので、ベンザーもショウジョウバエ研究に手応えを感じたことでしょう。

堀田 留学する前は不安でしたがね。ベンザーもそう思ってたはずですよ。「なぜ、堀田が私にターゲットを絞って、自信を持って留学してきたのか、わからない。一度聞いてみたい」って、そんなことをいっていたらしい(笑)。当然こっちも不安だったのにね(笑)。

時計遺伝子の発見

酒井 続いて、「時計遺伝子 (clock gene)」



酒井邦嘉 氏

東京大学大学院総合文化研究科教授/本誌編集委員

ホールデンの式

遺伝子座の組換え頻度から遺伝子間の染色体上の距離を求める式で、ホールデン (J. B. S. Haldane; 1892-1964) が提案した。乗換えの頻度はポアソン分布に従うと仮定し、多重乗換えを推定に含めている。

夜明け頃に羽化

昆虫の羽化は夜明け前に行われるのが一般的である。それには、外敵に見つかるのを避ける利点と、日光によって羽化後の体の乾燥を促進する利点がある。

の話をお聞きしたいのですが。

堀田 概日リズム (circadian rhythm) の遺伝子 (ペリオド遺伝子: *per*) 変異体を、ベンザーの研究室にいたコノプカ (Ronald J. Konopka) という大学院生がみつけました。これが時計遺伝子と呼ばれる変異体の最初の発見で、1971年のことです。コノプカは概日リズムのことを遺伝学的に研究したくてベンザーの所に来たわけではないようです。

酒井 ベンザーのほうが時計遺伝子を狙っていたのですね。

堀田 彼は、ベンザーの論文⁹⁾を読んで興味を持ったようでした。ただ、コノプカ自身はどうしたらいいかわからないというので、カウンター・カレント法などの原理に基づく実験器械は、私がつくってあげました。

酒井 どんな方法で変異体を見つけたのですか。

堀田 これも物量作戦です。ショウジョウバエは夜明け頃に羽化しますので、突然変異を起こさせた何百という系統のショウジョウバエの羽化を系統ごとに観察し続けたわけです。明け方に羽化しなければ時間感覚に変異を持っているということですね。それで彼は、明け方かどうかに関係なくあらゆる時間帯に羽化する系統と、明け方よりも早く羽化する系統と、逆に遅く羽化する系統の3つの変異を見つけた。

酒井 それは大変根気のいる実験ですね。

堀田 それから彼は、この3つの系統遺伝子の地図を作成したのですが、驚くことにこれらは、X染色体上の同じ遺伝子座にある3つの対立遺伝子だったのです。それが私には、あまりにも不思議で信じられなかった。だから共著者になるのは断ったのです。私の名前は謝辞に書いてありますが、もし共著者になっておけば、時計遺伝子の発見者の1人になったはずでした(笑)。

酒井 その発見をデルブリュックに知らせたときには、デルブリュックもまったく信じなかったそうですね。

堀田 彼も、概日リズムのように複雑な現象には、もう少し神秘的なメカニズムがあ

るはずだと思っていたのでしょう。まあ、最初は誰もが同じように否定していましたが。学問の歴史でみると、時計遺伝子の発見というのは大きいですね。複雑な高次機能だと思っていた現象が、単純な1個の遺伝子で変化するというのですから、人々をアッとイワせる力があつた。

酒井 現代的に言えば、時計遺伝子の役割というのは何なののでしょうか。

堀田 複数のフィードバック回路のネットワークなのでしょう。概日リズムのフィードバックのパラメータが強くなったり弱くなったりするという事です。

酒井 それで周期が伸びたり縮んだりするのですね。

堀田 概日リズムが24時間周期なのは、たまたま現在の日周運動に従ってそうなっているからであって、それが19時間でも、28時間でも1つの遺伝子変異で自由に調節できるということがわかりました。

地球上の生命の長い歴史で考えれば、常に24時間周期とは限りません。「生命というのは、いとも簡単に体内時計をずらして外界に適応できます」ということを証明したわけですから、大したものですね。

残念ながらコノプカは、その後、あまり大きな仕事をせずに消えてしまいました。もうひと仕事したら、立派に教授でやっていったのになあ。それもまた不思議なものです。

(次号へ続く)

文 献

- 1) Hotta Y, Benzer S: Abnormal electroretinograms in visual mutants of *Drosophila*. *Nature* **222**: 354-356, 1969
- 2) Sturtevant AH: The claret mutant type of *Drosophila simulans*: A study of chromosome elimination and of cell-lineage. *Z. wiss. Zool.* **135**: 323-356, 1929
- 3) Hotta Y, Benzer S: Mapping of behaviour in *Drosophila* mosaics. *Nature* **240**: 527-535, 1972
- 4) Benzer S: Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution. *PNAS* **58**: 1112-1119, 1967