

ショウジョウバエの巨大ミトコンドリアが促進する精子形態形成

Elongation of Sperm Promoted by Giant Mitochondria in *Drosophila*

野 口 立 彦

Tatsuhiko Noguchi

防衛医科大学校 生物学教室

要 旨 複数の雄由来の精子が、限られた数の卵を競い合う精子競争においては、相手を打ち負かす様々な精子形態が進化する。ショウジョウバエのある種では、より長い精子を雌が選択してきた結果、体長2 mm程度の雄の精子が6 cmにも達する。*D. melanogaster*種の精子前駆細胞を初代培養し、ライブ観察する系を利用して、長大な精子の伸長メカニズムについて解析した。この精子伸長は特殊であり、精子運動に必須の鞭毛軸糸ではなく、巨大ミトコンドリアと細胞質微小管が内骨格として細胞伸長を促進することが判明した。巨大ミトコンドリア自身が微小管重合中心として働き、ミトコンドリア周囲の細胞質微小管がモータータンパク質と滑り運動を起し、伸長力を発生する。つまりショウジョウバエの長大な精子形成において、ミトコンドリアは本来の細胞呼吸の場として働くだけでなく、細胞の外形態を決める新たな役割を進化・獲得したと考えられる。

キーワード：精子形成，ミトコンドリア，微小管，生物多様性

1. はじめに

精子は卵とともに、受精という最も重要な生殖プロセスを担う細胞である。雄の体外に放出された精子は、僅かな誘因物質を頼りに鞭毛打を制御し、卵に向かって外界を遊泳する。卵付近に到達すると先体反応を起し、放出された酵素により卵周囲の構造を解かしながら卵表に接近する。卵表に到達した時点で、同種か否かを識別し、種によっては更に自己非自己の識別まで行った上で卵と細胞融合する。このような複雑な仕事を単独の細胞として完遂する為に、精子は洗練された機能的デザインを持っている。精子の頭部には主に先体胞と核があり、核後部に結合するbasal bodyを鋳型として伸びる鞭毛軸糸が鞭毛運動を駆動する。そして鞭毛の基部にはエネルギー供給装置であるミトコンドリアが局在する。更に、精子内部の複雑なコンパートメントには運動活性化と代謝調節に関連する因子が配分され、それ以外の不必要な細胞質は殆ど排除されている。つまり、所謂オタマジャクシ型の精子は、大量生産されるために小型化、スリム化した究極の遊泳受精装置として完成されており、精子の基本構造として広く種を越えて保存されている。しかし動物界全体を見渡すと、この基本形の変形版（修飾型・特殊型精子）が実に多い（中には精子かどうかさえ一見しては判別できないものもある）。精子の形態と生理機能が驚くほどの多様性を示すことは、過去の膨大な比較精子学の研究において実に見事に記述されている¹⁾。

自然界では、一匹の雌に対し複数の雄が交尾するという生殖パターンは幅広い種で見られる。雌の体内では複数の雄由来の精子が少数の卵を受精させるために競い合い（精子競争）、受精環境により適した形態・機能を持つ精子が選抜され、結果として、その形質が次世代に受け継がれることになる。中でも昆虫をはじめとする節足動物の精子は大型で、鞭毛の本数、長さ、そして二型性などを含めたその形態は、驚くほど多様であることが報告されている¹⁾。つまり精子競争においては、遊泳能力に限らず、物理的に障害するなど、競争相手を打ち負かすいかなる特性もその子孫の生殖の成功に直接貢献するのである。減数分裂以降に起こる精細胞から精子への変形過程では、鞭毛軸糸を筆頭に細胞小器官（オルガネラ）が精子特有の機能・形態へ分化し、パッケージングされていく。このオルガネラの形態形成の多様性こそが精子形態の進化と密接に結びついていることは間違いない。精子学の偉大な先達が記載した様々な形態の精子の電子顕微鏡写真は、精子内部で多彩な形態に加工されたオルガネラの博覧会のようでもある。

2. ショウジョウバエの長大な精子と生殖隔離

ショウジョウバエ属は異常なまでに長い精子を進化させた。精子の長さは短い種で300 μm程度、長い種では6 cmに達するが、長い精子は遊泳能力に長けているわけではない²⁾。雌は、受精の主導権を握り、好みの雄（すぐれた遺伝子の持ち主）の精子を選ぶため、精子の選別に適した受精嚢と呼ばれる管状の器官を進化させた。こちらでも400 μmから8 cmと長さに種依存的な差がある³⁾。この管の中で複数の雄

〒359-8513 埼玉県所沢市並木3-2
2012年11月1日受付

由来の精子が混ざり合い、排卵された卵に届くために先を争っていると考えられている。仮説では、精子の長い鞭毛は、卵に近い受精囊の出口に、頭部をより近づけるのに役立つと想像されている(図1)⁴⁾。実際、同じ種内では、より長い精子を持つ個体の方が生殖に有利であることが実験的に示されている⁵⁾。

ここで興味深いのは、精子と受精囊の長さの不一致は、種分化の非常に早い段階の生殖隔離の促進に重要な役割を果たしているという仮説である⁶⁾。例えば地域集団ごとに雌雄の器官の長さが共進化していけば、当然地域差が現れ、集団間の交配の成功率が集団内の個体と競った場合に格段に下がることが予想される。よって集団間の遺伝子交流が妨げられて、種分化を促進する結果となる。しかし、このように精子と受精囊の長さが急速に共進化し得る仕組みとは何であろうか。そして本当にショウジョウバエ属の種分化を促進しているのだろうか。

ショウジョウバエ属は、精子形態と雌の生殖器官の共進化、そして生殖隔離・種分化との関連性を研究する上で、ユニーク、且つ最も有効な生物である。最も重要なことは、顕著な生殖器官の種間差が存在し、これが長さという一次元的な発

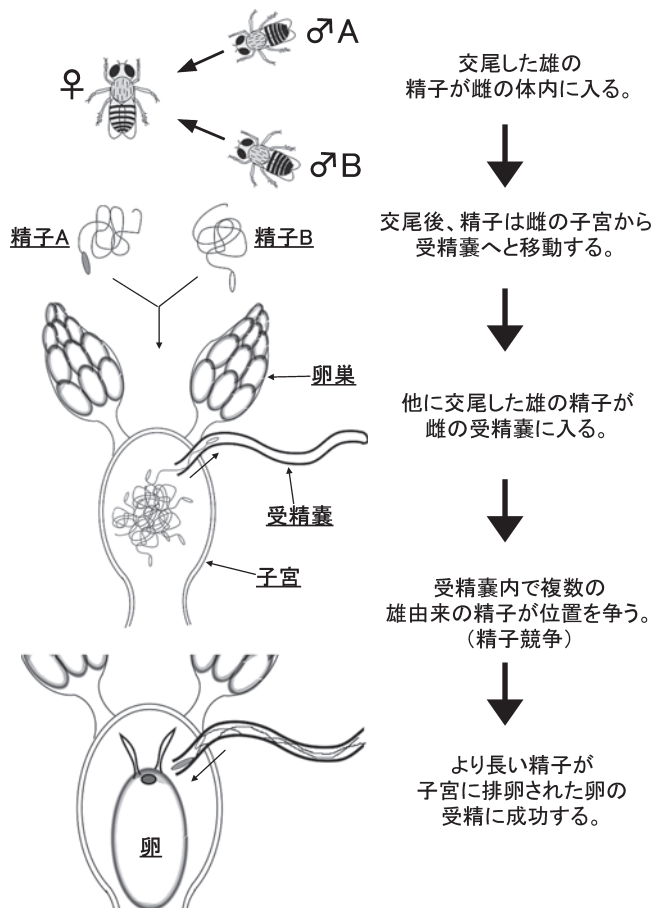


図1 ショウジョウバエの雌体内で起きる長大な精子の精子競争。複数の雄が一匹の雌と連続的に交尾する。雌の非常に長い受精囊に精子が入り、精子競争が起こる。長い精子程、排卵された卵の卵門付近に頭部を配置出来るので有利であると考えられている。

生物学上の形態形成の問題と関連づけることができることである。二番目としては、ドブジャンスキーらの同胞種研究にはじまり、歴史的に生殖隔離と種分化の研究が多くなされ、同胞種や、半種といった種形成過程を研究する上で貴重な知見が多く蓄積されていることである。また世代交代の速さを利用した進化実験が可能であるといった点が挙げられる。三番目として、集団の遺伝的变化と比較発生的解析用のツールとしての利便性が挙げられよう。(1) *D. melanogaster* 種において雄不妊変異体の蓄積、RNAi 系統ライブラリーなど、遺伝子の機能解析の分子遺伝学的手法が大変充実していること。(2) モデル生物である *D. melanogaster* 種以外の多くの種でも飼育方法が確立・リソース化され、遺伝子組み換え実験ができること。今後もゲノムプロジェクトの進行によりゲノム情報が利用できる種数が増加していくこと。(3) ショウジョウバエの精子は初代培養が可能であり精子形成を観察するために取り扱いやすい材料であること(詳細は下記参照)。これらの特性を活かしても最終的に種分化の問題に行き着くのは長い道のりであるが、その第一歩として、精子の伸長がどのようなメカニズムで起こるか、モデル生物である *D. melanogaster* 種を利用して詳細な解析を行うことにした⁷⁾。

3. *D. melanogaster* の精子形成

精巣は細長く、遠位先端には生殖幹細胞が位置している(図2)⁸⁾。生殖幹細胞より分裂した精原細胞は直ちにシスト細胞に取り囲まれてシストを形成し、以後の精子形成は全てシスト単位で進行する。精原細胞は4回分裂して16個の第一精母細胞となった後、体積にして30倍に成長する(この時点で後の細胞伸長に必要な体積まで増加する)。その後、

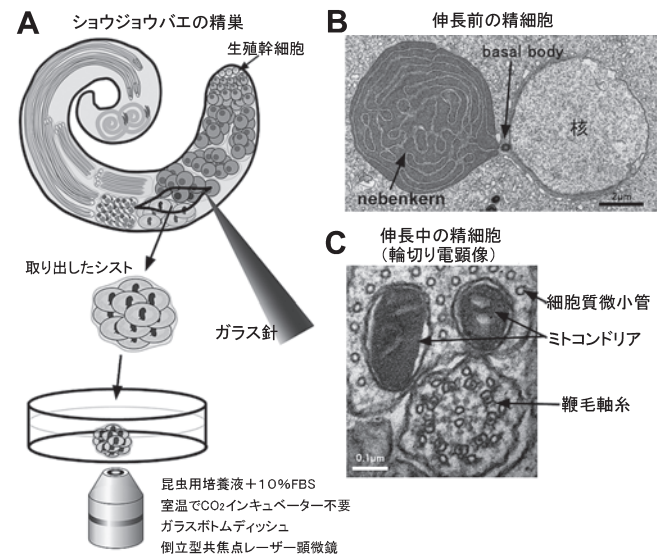


図2 ショウジョウバエの精子形成と初代培養

- A. ショウジョウバエの精巣と初代培養の模式図。
B. 精細胞中の nebenkern の電子顕微鏡像。スケールバー、2 μm。
C. 伸長する精細胞の電子顕微鏡像(輪切り断面)。スケールバー、0.1 μm。

減数分裂を経て64個の精細胞がシスト中にできる。減数分裂後の精細胞において、Fuzzy onions (精巢特異的 Mitofusin) の働きにより細胞質内に多数存在する全てのミトコンドリアが一斉に融合し、nebenkernと呼ばれる核よりも大きなミトコンドリア塊が形成される(二葉のミトコンドリアが同心円上に幾重にも重ねられてバックされた構造で、電顕切断面ではタマネギを輪切りにしたような像が観察される)(図2)⁹。また中心体から変化したbasal bodyが、核と巨大ミトコンドリアを連結した形になる。精細胞の伸長が始まると、basal bodyから鞭毛軸糸が形成され、同時に巨大ミトコンドリアが鞭毛軸糸と平行に伸長する(図2)。減数分裂直後に直径10 μmであった精細胞は、伸長完了時には1850 μmに達する。精細胞は伸長過程を経て、長さは185倍に、表面積は11倍に著増するが、体積は全く変化しない。つまり、この細胞伸長においては、細胞膜を押し伸ばす内骨格の構築が、急激な細胞膜合成を伴って進行することを示唆している。精細胞は伸長後に細胞質を捨てながら分裂(individualization)し、64個の精子が完成する。

分化途中の精細胞の初代培養は、昆虫用の培養液中で室温におき、CO₂インキュベーターなしに行うことができる(図2)。精巢の筋層をガラス針で切開して、傷つけないように取り出せばシスト単位で分化が進む。また上述の通り、細長い精巢の遠位端から近位側に徐々に押し出されながら精子の分化が進むという特徴がある。これを利用し、適当な位置で精巢を切開すれば、分化段階別にシストを取り出すことが出来る。加えて精細胞のサイズがとても大きく、細胞内の変化や発現させたGFP-マーカーのイメージングには好適である。

4. 精細胞伸長のメカニズム

精子伸長での細胞膜合成のことは今後の課題として、本稿では細胞内のオルガネラである巨大ミトコンドリアが、この長大な精子伸長の内骨格としてはたらくメカニズムについて述べる⁷。

ショウジョウバエの精子の鞭毛全長に渡って伸びている細胞内構造は、鞭毛軸糸、巨大ミトコンドリア、アクチン束、そして細胞質微小管である(図3)。そこで、それぞれの構造の内骨格としての役割を検証した。ショウジョウバエにおいても鞭毛の運動性を失った変異体の精子は受精できないので、鞭毛軸糸は精子にとって必須の構造と良い。一般に鞭毛・繊毛の伸長では、Intraflagellar transport (IFT) と呼ばれる鞭毛に沿った輸送系により、軸糸の構成成分が鞭毛先端部に輸送され軸糸構造が構築される。しかし、ショウジョウバエにおいてはIFTの機能欠損変異体でも正常な精子が完成することが示されている¹⁰。さらに中心体の構成成分を欠失することから鞭毛軸糸が全く形成されない*Dsas-4*変異体においても、精子は機能的には完成しないが、鞭毛はほぼ正常に近い伸長を見せる¹¹。あまりに長い鞭毛を発達させる必要性から、通常の鞭毛形成とは異なるメカニズムが進化した事は想像に難くない。

次に、ミトコンドリアのサイズが小さくなり、伸展したミトコンドリアの最終的な長さが短くなると予想される *fuzzy onions (fzo)* 変異体、或いは *no mitochondrial derivative (nmd)* 変異体の精子伸長について検証した。変異体の精細胞は、正常に近い速度で伸長を始めるが、途中で停止してしまうことが判明した。また *fzo* 変異体の鞭毛先端部にある一部ミトコンドリアの入り込んでいない細胞領域では、鞭毛軸糸は極度に折れ曲がっており、鞭毛軸糸だけでは細胞を真っ直ぐ伸長させるための強度を満たさないことを示唆している。この結果は、ミトコンドリアが精子鞭毛伸長に必須の構造的役割を担っていることを示唆している。

初代培養したシストの細胞伸長は、ラトランキュリンAなどのアクチン脱重合剤では阻害されないが、微小管毒であるノコダゾール処理で停止することから、細胞骨格成分のうち細胞質微小管に依存することが示された。細胞質微小管は伸長するミトコンドリアの長軸と平行に、その外膜を取り囲んで走っており(図2)、細胞質微小管を破壊した場合、巨大ミトコンドリアは張力を失い速やかに退縮する。 α -チューブリン-GFP、あるいはEB1-GFPを精巢内で発現させてタイムラプス観察をすると、細胞質微小管は非常に動的であり、ミトコンドリア長軸にそって前後に滑り運動をみせる。この動きは鞭毛先端付近で特に活発であった。更に α -チューブ

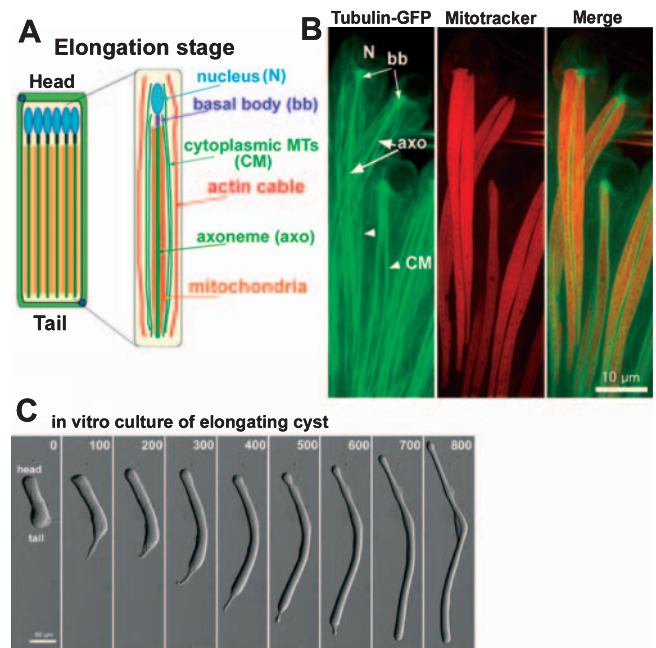


図3 ショウジョウバエの伸長する精細胞

- A. 伸長中の精細胞内を縦に走る主な構造の模式図。
 B. 精細胞の微小管とミトコンドリアの蛍光染色像。左図：チューブリン-GFP (緑)、中央：ミトコンドリア (赤)、右図：重ね合わせ像。
 N:核, bb:basal body, axo:鞭毛軸糸, CM:細胞質微小管。スケールバー、10 μm。
 C. 伸長する精細胞(シスト)のライブ観察。スケールバー、60 μm。
 A-Cは引用文献7)、Curr. Biol. (2011)より転載。

リン-GFPの局所的なFRAP実験より、鞭毛の先端付近の細胞質微小管のターンオーバーが特に高くなっていることが示された。一方、反対の核側領域の細胞質微小管は極端に安定化されていた。そこで伸長する精細胞に局所的なノコダゾール処理をするため、培養液が一定方向に流れるフローチャンバーを作成した。チャンバーは通常のガラスボトムディッシュに上方から装着する形になっている。その上面が一部開口していて、細胞を観察しながら薬剤を放出するためのガラス管の先端を、マイクロマニピュレーターを使って、狙った精細胞部分に近づけることができるようにデザインされている。さらに薬剤の入ったガラス管を、電圧調節によって排出量をコントロールできるPicoPipet (Altair社製)に接続することで、長時間安定して薬剤を放出することが可能になった。余分な薬剤は培養液の流れが洗い去るので長時間にわたる局所的な薬剤処理ができる。このシステムを用い、鞭毛先端付近の微小管のみを破壊すると、鞭毛全体の伸長が阻害された(頭部側を処理しても阻害しない)。これらの結果より、鞭毛先端付近の動的細胞質微小管が細胞伸長には重要であり、「growth zone」と名付けられた。一方、既に伸長した領域では細胞質微小管が安定化し、構造的な支えとして固定されることが示唆された。

一般に細胞内のミトコンドリアは微小管によって運搬される。ミトコンドリアと微小管の結合を仲介する分子は既に複数報告されている。その中で、Miltonは神経細胞においてミトコンドリアとモータータンパク質であるKinesinの結合を仲介する分子として発見され¹²⁾、先行研究で精子巨大ミトコンドリアの形態形成に関わることが示唆されている分子である¹³⁾。Kinesin/Miltonの働きを詳しく検討し、ミトコンドリア伸長を通し、精子伸長を促進する因子であることを明らかにした。(1) *milton* 変異体と *kinesin* 変異体の精巣でのモザイク解析を行うと、精子伸長は著しく阻害されていることが判明した。(2) GFP-Miltonは鞭毛先端付近のgrowth zoneに特に濃縮していた。(3) EB1-GFPを発現させたMiltonのRNAi変異体では、growth zone特有の微小管の滑り運動が減少し、電子顕微鏡観察でもミトコンドリア周囲の細胞質微小管数が伸長端付近で特に減少して、ミトコンドリアの形態異常も顕著になっていることが観察された。同様の表現型はMiltonの制御因子であるdMiroのRNAi変異体でも確認された。これらの結果は、神経細胞でミトコンドリアの輸送に関わっているKinesin/Milton/dMiro複合体が、ショウジョウバエの精子形成においては、はるかに大型のミトコンドリアの伸長反応にコンバートされている事を強く示唆する。

α -チューブリン-GFPの局所的なFRAP実験から、微小管重合中心(MTOC)であるbasal bodyから極めて離れたgrowth zoneで微小管の重合・脱重合が盛んに起こることが明らかになった(上記)。basal bodyを欠く*Dsas-4*変異体においてもミトコンドリアを取り巻く細胞質微小管は正常であった。ノコダゾールで細胞質微小管を完全に脱重合した後、培養液を交換してノコダゾールを除去すると、細胞質微小管

はミトコンドリア表面に近接して再び形成される。ミトコンドリアを蛍光生体染色し、重合する微小管先端をラベルするEB1-GFPと同時に三次元像を経時記録し、再重合する微小管断片とミトコンドリア表面との位置関係を、三次元再構築により検証した。その結果、精細胞のミトコンドリア表面は微小管重合を促すMTOCとして働き、自らの周りに微小管を生成する能力を有する事が示された。ミトコンドリア自身が持つMTOC活性は、ミトコンドリアがどれほど長く伸長したとしても、更なる伸長に必要な微小管が周囲に形成されることを保証するだろう。

5. 巨大ミトコンドリア伸長のモデル

巨大ミトコンドリアを伸長前後で比較すると、長さとは表面積は大幅に増加しているが体積は変化しない。(ミトコンドリア膜の合成が形態形成時にどのように制御されているかは重要な問題であるがここでは触れない。)巨大ミトコンドリアのgrowth zoneは常に細胞質微小管により引き延ばされ、後方の引き延ばされた部位は安定化された細胞質微小管により支持・固定された状態になる。growth zoneでは、微小管重合と、Kinesin/Milton/dMiro複合体を介した微小管の滑り運動が、ミトコンドリア膜を伸展する力を生み出す。これが、新たな微小管形成を促すミトコンドリア膜領域を更に露出させるというサイクルが働き、巨大ミトコンドリアの独立的な伸展が継続するのではないだろうか。加えてgrowth zoneを活性化するシグナルの存在が鞭毛先端部に想定されるが、その実体は今後の研究テーマである。

ショウジョウバエの精子形成においては、呼吸の場としての本来の役割に加えて、ミトコンドリアが細胞の外形態を決める内骨格となり得ることが示された。ミトコンドリアのもつ二重膜構造の物理的剛性に加え、MTOC活性と微小管調節因子が共同するシステムが進化したことが鍵であると考えられる。昆虫類では、巨大ミトコンドリアが大型精子の鞭毛全長に渡り縦走する形態が一般的であり、この系統では、このような精子形態形成のメカニズムが共通することが推察される。もう一つの2重膜を持つオルガネラである核も、種によって実に多様な形態をとる。恐らくこちらもその形態を修飾する機構が進化したことで、精子の外形を決定する構造として働くのであろう。

6. 組織特異的ミトコンドリアの分化

ミトコンドリアはあらゆる細胞の細胞呼吸の場であり、通常は長さ数 μm で太さ $1\mu\text{m}$ のソーセージ型をしており、その活性維持に必要な融合・分裂が常に繰り返されている。しかし網膜の光受容細胞や筋細胞など、分化し特殊化した細胞では特徴的な大きさ、形態や数を示す例が多く見られる。これは各組織で必要とされる機能と深い連関があるものと考えられている。ミトコンドリアの分化機構は、ミトコンドリア病や神経疾患、そして老化現象にも関わり、今後の研究の発展が期待される分野である^{14,15)}。

一般に精子においては、鞭毛基部のミトコンドリアは大型であり、他の細胞で見られるような活性維持のための融合・分裂サイクルは停止し、その形態や数は種によって厳密に決まっている。精子が雄の体外に放出され、あるいは交尾により雌の体内に入り、条件がそろるとミトコンドリアは呼吸によって盛んにATPを生産し、精子の鞭毛運動を支援すると考えられている（ほ乳類においては解糖系が主なATP供給の経路であることが示され、精子の代謝経路の複雑さと多様性を示している）。更に、種によっては月単位、年単位で雌の貯精嚢で精子の生存を支えることから多重の活性調節メカニズムがあるに違いない。

ショウジョウバエの精子研究を通し、(1) ミトコンドリアの形態・量・数が決定される分子機構（精子のミトコンドリアで見られるKinesin/Milton/dMiro複合体やMTOC活性は他の細胞種でもミトコンドリアの形態形成に関わる一般的なメカニズムであるかどうか今後検討が必要である。）、(2) 呼吸活性の調節の分子機構、(3) 融合・分裂サイクルから脱するための制御機構など、ミトコンドリア分化の重要な問題について研究することが可能であろう。

7. 昆虫の生殖隔離・種分化

昆虫は、小さな身体に単純な神経系を持ち、強い繁殖力を示す地上で最も繁栄している系統の動物グループといえる。昆虫の体長、形態、行動や食性は、実に多様性に富み、あらゆる環境にも適応して生存している種が存在する。昆虫の種数は1000万種とも言われ、生殖隔離を促進することによって、より速やかに新しいニッチに適応する小さな遺伝集団（将来の種）を形成しやすい仕組みが他の生物よりも発達しているに違いない。先述の通り、精子が大型で、鞭毛の全長に渡る巨大ミトコンドリアを持つことは、この系統に共通する特徴である。またショウジョウバエ以外の種でも、大型の精子と雌の受精嚢の長さ、近縁種間で相関が確認されている¹⁶⁾。よって、本研究で明らかになった精子伸長のメカニズムは、昆虫一般に共通するメカニズムである可能性があり、それによって精子競争に起因する精子の大きさの多様性が生じ易くなっているかもしれない。精子形態と雌の受精嚢の長さが共進化しやすくなれば、例えば食性の変化などで、種内に小集団が分かれば始めたとき、生殖器官の長さの不一致による生殖成功率の低下が集団間の遺伝子の交流を抑制し、種分化を促進するのかもしれない。今後、精子の長さの決定にかかわる遺伝子群の検索、雌の受精嚢の伸長メカニズムとその変化に関わる遺伝子群の検索、どのような環境要因が雌雄の生殖器官の長さに影響を及ぼすのか、そして、同種内で

雌雄の生殖器官の長さの不一致度が性的隔離指数とどのように相関するかなど課題は山ほど残されており、研究はまだスタートしたばかりである。

謝 辞

本稿の大部分は、著者が神戸理化学研究所、発生再生総合科学研究センター、形態形成シグナル研究グループに在籍中に、林茂生グループリーダーのご指導のもと、小泉美智子博士と協力して行った研究について述べたものである。お二人にはこの場を借りて心より感謝申し上げます。また、厚意により図3は引用文献7)より転載させて頂いた。

文 献

- 1) Pitnick, S., Hosken, D.J. and Birkhead, T.R.: in Birkhead, T.R., Hosken, D.J. and Pitnick, S. (Eds.), *Sperm Biology, An Evolutionary perspective*, Academic Press, Oxford, 69–149 (2009)
- 2) Pitnick, S., Markow, T.A. and Spicer, G.S.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 10614–10618 (1995)
- 3) Pitnick, S., Markow, T. and Spicer, G.S.: *Evolution*, **56**, 1804–1822 (1999)
- 4) Mollie, K., Manier, J., Belote, M., Kirstin Berben, S., Novikov, D., Stuart, W.T. and Pitnick, S.: *Science*, **328**, 354–357 (2010)
- 5) Miller, G.T. and Pitnick, S.: *Science*, **298**, 1230–1233 (2002)
- 6) Markow, T.A., Reed, L.K. and Kelleher, E.S.: *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, **65**, 155–173 (2007)
- 7) Noguchi, T., Koizumi, M. and Hayashi, S.: *Current Biology*, **21**, 805–814 (2011)
- 8) Fuller, M.T.: in Bate, M. and Martinez Arias, A. (Eds.), *The Development of Drosophila melanogaster*, Volume 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 71–147 (1993)
- 9) Hales, K.G. and Fuller, M.T.: *Cell*, **90**, 121–129 (1997)
- 10) Han, Y.G., Kwok, B.H. and Kernan, M.J.: *Current Biology*, **13**, 1679–1686 (2003)
- 11) Basto, R., Lau, J., Vinogradova, T., Gardiol, A., Woods, C.G., Khodjakov, A. and Raff, J.W.: *Cell*, **125**, 1375–1386 (2006)
- 12) Stowers, R.S., Megeath, L.J., Gorska-Andrzejak, J., Meinertzhagen, I.A. and Schwarz, T.L.: *Neuron*, **36**, 1063–1077 (2002)
- 13) Aldridge, A.C., Benson, L.P., Siegenthaler, M.M., Whigham, B.T., Stowers, R.S. and Hales, K.G.: *Fly*, **1**, 38–46 (2007)
- 14) Scheffler, I.E.: in *Mitochondria*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, 345–416 (2008)
- 15) Clark, I.E., Dodson, M.W., Jiang, C., Cao, J.H., Huh, J.R., Seol, J.H., Yoo, S.J., Hay, B.A. and Guo, M.: *Nature*, **441**, 1162–1166 (2006)
- 16) Morrow, E.H. and Gage, M.J.: *Proceedings of the Royal Society of London—Series B: Biological Sciences*, **267**, 307–313 (2000)