

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

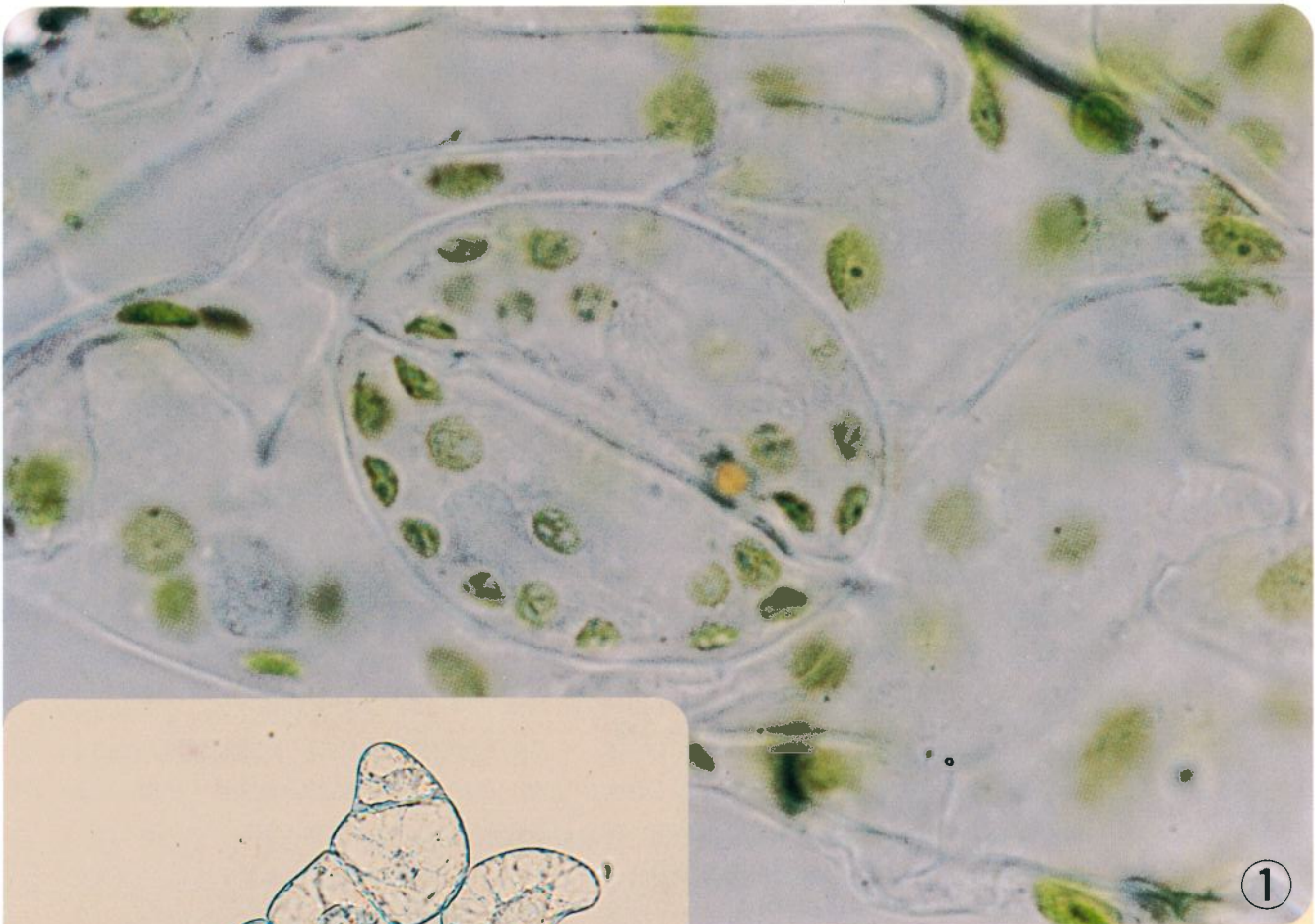
TECHNO NEWS

〈生研機構〉

ブレインテクノニュース

第79号

MAY 15, 2000



色素体遺伝子工学

- ① タバコの葉の孔辺細胞における葉緑体
- ② 原色素体を含む分裂直後のタバコ培養細胞
(名古屋大学：湯川 泰氏原図)

目 次

総 説

- 植物の形態を制御するジンクフィンガー転写因子 1
高辻博志 (農林水産省農業生物資源研究所)

国内情報

- 遺伝子操作による葉・花形態の制御 6
塚谷裕一 (岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所)
- マダイ イリドウイルス病ワクチンの開発 10
中島員洋 (水産庁養殖研究所)
- 氷核活性細菌による害虫防除—昆虫腸内定着細菌利用の一例として— 14
渡部賢司 (農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所)
- 分子擬態 18
中村義一 (東京大学医科学研究所)
- 色素体遺伝子の転写を支配する核ゲノム 22
杉田 護 (名古屋大学大学院人間情報学研究所)

文献情報

- 受精とCD9との関わり 25
K. Kaji et al (Nature genetics, 24: 279-282, 2000)
抄訳: 横尾正樹 (東北大学)
- Lactococcus lactis*オリゴペプチド輸送システム結合蛋白質への
変異導入と特異性の変化 26
A. Picon et al (Journal of Bacteriology, 182: 1600-1608, 2000)
抄訳: 上野敬太 (カルピス株)
- 甦る植物—永遠の葉の秘密 27
P. Scott (Annals of Botany, 85: 159-166, 2000)
抄訳: 岩井純夫 (鹿児島大農)
- 切り刻んだグリコサミノグリカン, 侮り難し?!
—低分子量ヒアルロン酸が動脈硬化治療薬となる可能性がある— 28
S.P.Evanko et al (Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular
Biology, 19: 1004-1013, 1999)
抄訳: 八塚信明 (マルハ株)

海外便り

- 食品の物性はヒトの咀嚼挙動に影響するか
—フランス国立食肉研究所に滞在した11か月— 29
神山かおる (農林水産省食品総合研究所)

表紙写真説明

色素体遺伝子工学 ① タバコの葉の孔辺細胞における葉緑体: 緑色の大きな葉緑体が光合成を行っている。 ② 原色素体を含む分裂直後のタバコ培養細胞: 培養細胞BY-2株の分裂直後の細胞で、中に50個程度の原色素体が存在するが、小さいのでこの写真では見えない。なお、色素体遺伝子工学に関連した色素体遺伝子の転写メカニズムについては国内情報22頁を参照して下さい。

◀総説▶

植物の形態を制御するジンクフィンガー転写因子

農林水産省 農業生物資源研究所

高辻 博志

高等植物において枝分かれおよび茎の伸長は、植物体全体の形を決める重要な要素であり、園芸植物の鑑賞的価値や作物の生産性に大きく影響する。我々は、ペチュニアのジンクフィンガー (ZF) 型転写因子群の機能解析によって、枝分かれおよび茎の伸長の制御にそれぞれ関わる機能を見出し、遺伝子組換え技術による植物の改良に利用できる可能性を示した。また、ZF転写因子の機能は形態制御にとどまらず、花粉の発達制御など多岐にわたっていることが明らかになった。

1. はじめに

高等植物において枝分かれおよび茎の伸長は、植物体全体の形 (草姿) を決める重要な要素であり、園芸植物の鑑賞的価値に大きく影響する。また、茎の伸長抑制の結果である矮性形質は倒伏耐性を高めることから、栽培の効率上も重要な形質であり、これらの形質を支配する遺伝子は、園芸植物にとどまらず、様々な作物や果樹の生産性向上にも役立てることができると考えられる。

近年、シロイヌナズナをはじめとするモデル植物から形態制御に関与する遺伝子が多数単離され、その多くが他の植物種にも共通して存在することが確認されている。明らかになった形態制御遺伝子に共通して言えることは、そのほとんどが転写因子をコードしているということである。転写因子とは、遺伝子の近傍に存在する転写制御領域DNAに作用し、mRNAへの遺伝情報の転写を制御する調節タンパク質である。生物の様々な形質の発現が、遺伝子の転写の段階において最もダイナミックに制御されており、しかも通常、複数の遺伝子の発現が一つの転写因子によって同時に制御されていることを考えると、転写因子の遺伝子に突然変異が生じたり、転写因子の遺伝子を導入した場合に、生物の形態に大きな変化をもたらすことは容易にうなず

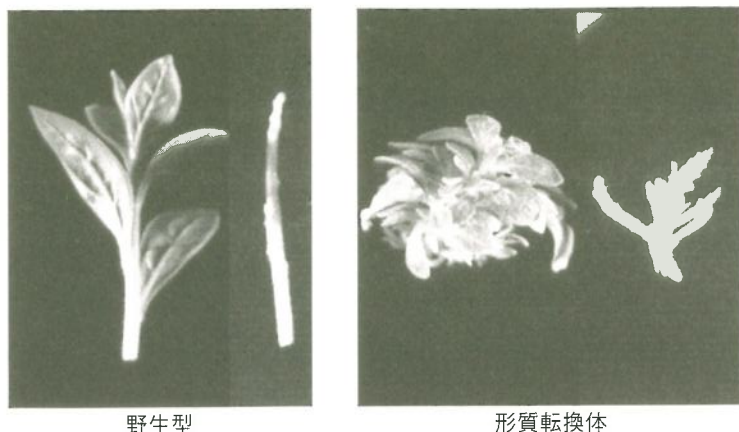
TAKATSUJI Hiroshi

〒305-8602 つくば市観音台2-1-2

ける。我々の研究グループでは転写因子のこのようなはたらきに着目し、モデル植物であると同時に園芸植物としても人気のあるペチュニアを材料として、代表的な転写因子のタイプの一つであるジンクフィンガー (ZF) 型転写因子群の機能解析を進めてきた。ZF転写因子中に含まれるZFモチーフは、標的遺伝子の転写制御領域DNA (プロモーター) に塩基配列特異的に結合するためのDNA結合ドメインとして機能すると考えられる。我々がペチュニアから単離した多数のZF遺伝子にコードされているタンパク質は、ZFモチーフの数が1個~4個まで様々であることを含め構造的に多様であり、個々のZF転写因子が植物における様々な現象に関わる転写調節に関与していると考えられる¹⁾。本稿では、それぞれ枝分かれおよび茎の伸長の制御に関わるLIFおよびPetSPL2の話を中心に、我々の研究グループで機能を見出した他のいくつかのZF転写因子の話もまじえて紹介する。

2. 枝分かれの制御に関与するLIF

多くの高等植物では、腋芽の多くが休止状態にあり、休止している腋芽の割合によって植物体全体の形が大きく左右される。枝分かれは外的条件によっても影響を受け、草食動物による摂食や人間による刈り取りなどによって生育中の頂芽が失われると、休止してい



野生型

形質転換体

図1 LIF高発現による枝分かれの促進

野生型(左)およびLIF高発現形質転換体(右)のペチュニアの枝。それぞれの隣には葉を取り除いた枝を示す。

腋芽が伸長を開始し、失われた頂芽の代償として枝に発達する。腋芽の伸長は頂芽からのオーキシンによって抑制されており、茎頂を切除すると腋芽の伸長が始まるのは、茎頂からのオーキシンの供給が停止する結果と考えられている。この時、根に由来するサイトカイニンは腋芽の伸長開始を促進する方向に作用すると考えられている。また枝分かれの制御にはジベレリンの関与も示唆されており²⁾、枝分かれの制御の分子機構を理解するためにはこれらの植物ホルモンの作用を考慮に入れることが欠かせない。

ペチュニアから同定したZF転写因子LIF (Lateral-shoot Inducing Factor, PetSPL3から改名) は、ZFモチーフを1個のみ含むタンパク質である。LIFのcDNAをカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35Sプロモーターの制御下にペチュニアに再導入して高発現させると、高度に枝分かれが促進されることが見出された。通常の条件下で生育する正常なペチュニアには数本の一次枝を生じるのみで二次枝はほとんど出現しないのに対し、LIF cDNAを高発現する形質転換体では、一次枝の数が著しく増加しているのみならず、多くの二次枝を生じている(図1)。この形質は、本来休止しているべき腋芽のほとんどが活性化された結果と見る事ができる。形質転換体に表れた表現型として、枝分かれの促進以外に、栄養生長部の茎の節間の短縮、

花卉の外縁の内側への巻き込みおよび紫色の着色(もとは白色)が観察された。LIF遺伝子の発現特異性をGUSレポーター遺伝子およびRT-PCRによって調べると、本遺伝子は休止中の腋芽の基部の狭い領域において発現していることが見出された。茎頂切除によって腋芽の伸長を誘導した時のLIF遺伝子の発現を調べると、予想に反して遺伝子発現の上昇は見られず、むしろ腋芽の伸長に伴って低下していった。LIF遺伝子が休止中の腋芽の基部に発現しているという事実は、LIFが腋芽の伸長開始の制御に関与していることを示唆している。その制御のメカニズムは、腋芽の伸長を開始させるシグナル(おそらく植物ホルモン)が腋芽基部のLIFが常時発現している細胞に受容された時、タンパク質レベルでのLIFの活性化が起こり、腋芽の伸長開始に至る遺伝子発現制御が起動する、というようなものであろうと想像される。つまり限定された細胞において植物ホルモンに対する応答を媒介するのがLIFの本来の役割であろうと我々は推測している。節間の短縮や花卉の形態および着色の変化も植物ホルモンの作用を想起させるものであり、今後どの植物ホルモンが関与しているかを含め、様々な角度からこの転写因子の機能を解析するつもりである。

3. 植物体を矮化させる作用を示す PetSPL2

PetSPL2はLIFと同じくZFモチーフを1個含み、タンパク質構造上、シロイヌナズナのSUPERMAN³⁾に類似している。PetSPL2のcDNAをCaMV 35Sプロモーターの制御下にペチュニアに再導入・高発現させると、LIFの場合とは異なって枝分かれには影響を及ぼさず、節間が著しく短縮して植物体が矮化することがわかった。LIFの場合の節間の短縮効果は栄養成長期のみを表れ、花序の節間長にはほとんど影響がなかったのに対し、PetSPL2の高発現による節間長への影響は、栄養生長部よりも生殖生長部(花序)におい

て顕著に表れた。この形質転換体の花序における節間の長さは通常の10—20%になっているため、草姿が大きく変化している(図2)。正常なペチュニアでは、茎の細胞は縦に細長い形をしているのに対し、PetSPL2を高発現する形質転換体の茎の細胞は、縦方向の細胞伸長が著しく抑制されており、横方向に肥大した形状を示していることが走査電子顕微鏡による観察によってわかった。このことから、茎の短縮は細胞伸長の異常によるものであることがわかった。その他、花のサイズが若干小さくなる、葉の外縁が上方に巻き上がるなどの表現型の変化が観察された。GUSレポーター遺伝子による解析およびRT-PCRの結果、PetSPL2遺伝子の発現は、SUPERMAN遺伝子と同じく胚珠に認められたが、それ以外に花序の節でも検出された。花序の節はPetSPL2高発現による細胞伸長への効果が最も顕著に表れる部分と隣接していることから、PetSPL2が花序において本来果たしている役割について興味をもたれる。

4. 形態を制御する転写因子機能の利用について

LIFの枝分かれ促進作用やPetSPL2の矮化作用を園芸植物や作物の改良に利用できるだろうか? LIFの場合、その機能を利用して枝分かれを促進し、花の数を増やして花卉の新品種を作製したり、果樹や果菜の結実数を増やすなどの応用が考えられる。我々が最初に得たLIFを高発現する形質転換体(T₀)では、栄養生長部の枝分かれが促進されているのみで、花序の数は変わらず、花の数が増加することもなかった。しかしながら、その自殖後代(T₁)には花序の数および花の数が共に増えている個体が含まれていることがわかった。これは、複数コピー導入された遺伝子が後代に分配される際、一部の個体ではコピー数が減少し、それに伴って導入遺伝子の発現レベルが低下したのが原因と推測される。この点が確認されれば、導入遺伝子を発現させるために用いるプロモーターを適切に選択す



野生型 形質転換体

図2 PetSPL2の高発現による矮化

野生型(左)およびPetSPL2高発現形質転換体(右)のペチュニア。

ることによって、本遺伝子を用いて枝分かれを促進すると同時に花の数を増やすことが可能となると考えられる。なお、上記の実験とは逆に、LIF遺伝子の働きを抑制することによって枝分かれを抑制的に制御できるかもしれない。もしそれが可能であれば、トマト、メロン、カーネーション、バラなどの栽培時の摘芽作業を省けるような技術に発展する可能性もあるので今後検討する予定である。

PetSPL2の節間短縮作用は、矮化によって花卉や作物に倒伏耐性を付与する目的に利用できると思われる。また、果樹に応用する場合、花序の節間が短くなることによって収穫作業が容易になることが期待される。

ペチュニアの遺伝子の機能が他の植物種に応用できるかにどうかについても興味もたれる。こころみに、ペチュニアとは分類学上かなりかけ離れている単子葉植物のイネに導入してみたが、今回の実験条件では何の変化も起こらなかった。しかしながら、この結果はLIFやPetSPL2に相当する遺伝子がイネには存在しないということを必ずしも意味するものではない。一つの可能性としては、導入

遺伝子の発現量が十分でなかったというケースが考えられる。また、種間における転写制御系の和合性の問題、つまりペチュニアの転写因子とイネの標的DNAが適合しなかったためかもしれない。もしそうなら、イネからLIFやPetSPL2に相当する遺伝子を単離し、これらを用いることによって、ペチュニアで得られたと同様の形質をイネに導入できることが十分予想される。イネよりもペチュニアに近縁の植物種におけるLIFおよびPetSPL2導入の効果については、現在、他の研究機関と共同で実験を進めている。

5. 他のZF転写因子の機能とその利用

ZFモチーフを1個のみ含むPetSPL1はタンパク質構造上も機能的にも上記のSUPERMAN³¹に対応する転写因子であると考えられる。PetSPL1 cDNAの再導入により、コサプレッションによって内在性PetSPL1の発現抑制が誘起された形質転換体では、本来の5本の雄しべの内側に2~3本の余分の雄しべが生じるという、SUPERMAN変異体と類似の表現型を示した。この時、本来雌しべが生じる領域に侵入して雄しべが形成されるた

め、正常な雌しべが形成されず雌性不稔になる。花卉における花の萎凋は、受粉の結果発生するエチレンによって促進されることが知られている。実際、ペチュニアでは、受粉しないと開花後8日間くらいしおれないが、受粉すると花が2日しかもたないことが知られている。したがって、PetSPL1導入による雌性不稔化は、花の寿命を延ばす効果をもたらすと言える。

ペチュニアには、薬に特異的に発現しているZF遺伝子(2~4フィンガー)が少なくとも7個存在し、花粉の発達の異なるステージでそれぞれ一過的に発現している³⁴。これらのZF遺伝子はZFモチーフを2~4個含む。花粉細胞に発現するものと花粉の発達を助ける役割を担うタペト層に発現するものに分かれるが、コサプレッションを利用して機能解析したところ、いずれの場合も、内在性遺伝子の発現抑制の結果として、花粉細胞の発達が阻害され、成熟した花粉粒に発達する前に細胞が死滅することが見出された。系統によっては100%近くの花粉が死滅するため、これらのZF遺伝子の機能は雄性不稔形質の導入に利用できると考えられる。

最後に、これまでに明らかになったペチュ

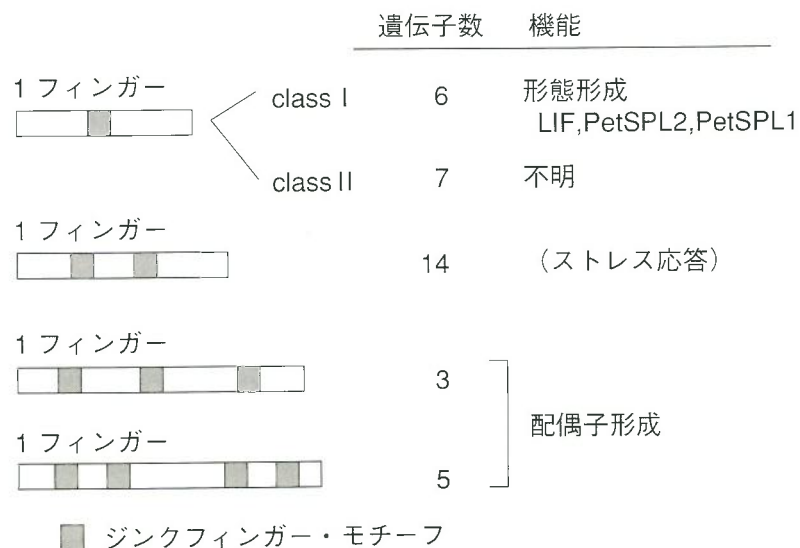


図3 ペチュニアのジンクフィンガー転写因子の構造と機能
ジンクフィンガー・モチーフの数と機能の相関を示した。この関係は完全なものではなく、2フィンガーでも配偶子形成に関与するものがある。

ニアのZF転写因子の機能をタンパク質構造と関係づけて図3にまとめた。上記以外では、ZFモチーフを2または3個含む遺伝子の中に雌しべの通道組織 (transmitting tissue) などに特異的に発現するものが含まれる⁵⁾。ZFモチーフを2個含む遺伝子のほとんどは傷害、乾燥、低温などに発現応答することから、ストレス応答の過程に関与していると推測される⁶⁾。ZFモチーフを1個のみ含む遺伝子はZFモチーフのアミノ酸配列からさらに二つのサブクラスに分けることができる。この中で、上記のLIF, PetSPL2, PetSPL1はいずれもクラスIに分類され、クラスII遺伝子については今のところほとんど知見が無い。これらのZF遺伝子の今後の解析によって新たな機能が見出されることが期待される。

謝辞

本研究の一部は、科学技術庁COE育成プロジェクトおよび生研機構「基礎研究推進事業」からの研究費によって行った。

文献

- 1) Takatsuji, H. (1999) *Plant Mol. Biol.*, 39, 1073-1078
- 2) Schumacher, K., Schmitt, T., Rossberg, M., Schmitz, G. and Theres, K. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 290-295
- 3) Sakai, H., Medrano, L. J. and Meyerowitz, E. M. (1995) *Nature*, 378, 199-203
- 4) Kobayashi, A., Sakamoto, A., Kubo, K., Rybka, Z., Kanno, Y. and Takatsuji, H. (1998) *Plant J.*, 13, 571-576
- 5) Kubo, K., Kanno, Y., Nishino, T. and Takatsuji, H. (2000) *Plant Cell Physiol.*, 41, 377-382
- 6) van der Krol, A. R., van Poecke, R. M., Vorst, O. F., Voogt, C., van Leeuwen, W., Borst-Vrensen, T. W., Takatsuji, H. and van der Plas, L. H. (1999) *Plant Physiol.*, 121, 1153-1162

◀国内情報▶

遺伝子操作による葉・花形態の制御

岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所・生命環境科学研究
センター／科技団「さきがけ研究21（形とはたらき）」

塚 谷 裕 一

葉の発生の制御機構を解明することは、植物の形づくりの仕組みの理解に必須である。これまでに私たちは、葉の発生の研究に発生遺伝学的手法を導入することで、世界に先駆けて、いくつかの鍵となる遺伝制御過程の同定に成功した。またそれら遺伝子の操作により、実際に葉及び葉の変型した器官、花器官の形状を制御することに成功している。ここではその成果について御紹介し、さらに基礎科学および科学技術分野における応用について考察した。

1. はじめに

現在地球上には、種子植物に限っても25万ないし30万種もあるだけに、植物は非常に多様な姿かたちをしている。しかしその基本構成は実に単純である。少なくとも現生の種子植物の場合、植物の体制は根とシュートに大きく2別され、うちシュートは葉と茎とのみから成り立っている。花も、このシュートが変形したものである。つまり花とは、葉が萼片、花弁、雄しべ、雌しべ（正確には心皮）に変型し、さらに節間の茎の部分が伸長せず短縮したものと考えることができる。したがって種子植物の体は、根と茎と葉、たった3つのパーツだけでできていると言ってよい。このことは、詩人であり科学者でもあったゲーテが『変形論』（1790年）で集大成して以来、植物学上の常識となっていたが、その形態形成の仕組みに関しては、久しく理解が不十分なままであった。近年、モデル植物を用いた発生遺伝学と分子遺伝学の進展に伴い、これらパーツの形態形成を司る遺伝的仕組みは徐々に明らかになってきている。ここでは特に、植物の体の構成要素の中でも、最も形態的な多様性に富む器官、葉をとりあげ、その形を制御する遺伝子の正体、さらにその作用について、私たちの研究の道のりを紹介したい。

TSUKAYA Hirokazu

〒444-8585 岡崎市明大寺町字西郷中38

2. 葉の形を制御する遺伝子を見つけるまで

葉という器官の形状はたいへん単純で、二次元平面状の、シート状の構造にすぎない。しかしその形態形成の過程は意外に複雑で、特に双子葉植物では、葉の発生の際、細胞分裂と細胞伸長とが同時かつ同所的に起こる。そのため解剖学的な解析だけでは、時間軸と空間軸としか分解軸として座標を持ちえないために、素過程に分けての理解すら困難であった。実際、細胞分裂のパターン1つをとっても、たいへん複雑である。最近、cyclin::GUS融合遺伝子を細胞分裂のマーカーとして用い、Toronto大・Dengler研究室との共同研究として、葉の発生過程における細胞分裂頻度・分布の変化を、継時的に解析する試みを行なった。その結果、シロイヌナズナの葉の発生過程において、いわゆる周縁分裂組織の役割は、従来考えられていたほど大きくないことが判明したほか、葉の組織層ごとに、分裂パターンは異なることなどが明らかとなった¹⁾。このような系では、解剖学だけではその発生の仕組みを明らかにすることができない。

そこで私は、葉の発生の研究に発生遺伝学的手法を導入することで、解析の手がかりを得ようと考え、モデル植物・シロイヌナズナ [アラビドプシス, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.] を材料に、1993年より葉の形態異

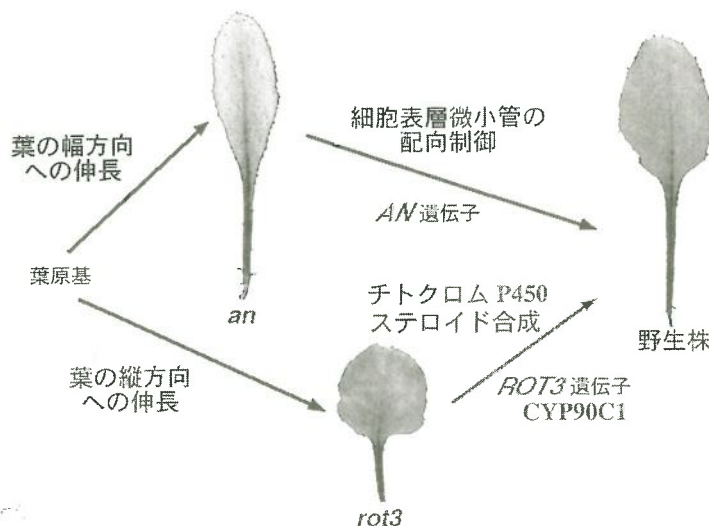


図1 葉の縦と横

葉の縦横のサイズは、シロイヌナズナにおいて、*AN*、*ROT3*というそれぞれ独立に働く2つの遺伝子によって制御されている。塚谷(2000)『多様性の生物学第3巻』(東京大学出版会)より。

常を示す突然変異体の解析を進めてきた。

その予備的な調査をする過程で注目したのが、*angustifolia* (*an*) 変異体である。これは、古くから染色体マッピングの座標として用いられてきた細葉の変異体であるが、詳しい解析はなされていなかった。これをよく見てみると、面白いことに気がついた。日本語の癖として、細い葉を見ると私たちは「細長い葉」と言ってしまうがちであるが、この変異体の葉は「細長」くはなく、「細い」だけ、つまり、葉の細さは顕著なものにも関わらず、葉の長さは正常だったのである。ということは、野生型の *AN* 遺伝子は、葉の幅の長さには関与しているが、葉の縦の長さには関与していないということであろう。さらにそれならば、*AN* 遺伝子とは別に、葉の縦の長さだけを制御する遺伝子があるはずである。

こう仮定して変異体を新たにスクリーニングした結果、予想通り葉の横幅は正常で、縦の長さのみ短い *rotundifolia3* (*rot3*) という変異体を新しく見出すことができた²⁾。この2つの変異体、*rot3* 変異体と *an* 変異体との間で二重変異体を作成すると、両親の変異形質が和の形であられる。つまりシロイヌナズナの葉の全形は、縦方向と横方向との二方向独立に制御を受けているのである(図1)²⁾。この制御は、細胞レベルでの極性伸長を通じ

たものであることも判明した²⁾。

このうち *rot3* 変異体については、アリルを探索した結果、T-DNA挿入ラインより *rot3-3* 変異体を、またEMS処理株の中から *rot3-2* 変異体を得ることができた。*rot3-1* と *rot3-3* はその表現型が酷似していたが、*rot3-2* は若干異なる表現型を示した。つまり、*rot3-2* 変異体は、葉柄が短いこと、また横幅に比べての長さが短い点で、葉全体のプロポーシオンが *rot3-1* と類似しているが、野生株に比べ葉身の面積そのものは大型化する点で異なる。また、変異形質が葉のみならず莖にも発現する点も *rot3-1* と異なる³⁾。

以上の形態的な特徴を踏まえた上で、私たちは次に、T-DNA挿入変異を利用して、*ROT3* 遺伝子の単離を行なった³⁾。*ROT3* 遺伝子は巨大な遺伝子ファミリーであるチトクロムP450遺伝子族の一員で、ステロイド合成系に共通のモチーフを持ち、植物に特異的なサブファミリーに入るものであった。類似遺伝子には、ブラシノステロイド合成系の遺伝子群がある。この *ROT3* 遺伝子は、調べた限りの植物器官の全てにおいて、ほぼ同じようなレベルで発現していたが、null変異と確認された *rot3-1* 変異体でも、その変異形質は葉と葉の変形した器官に限られていた。さらに *rot3* 変異体のアリルの1つで、表現型が他と

異なった *rot3-2* 変異体の場合は、基質認識部位と想定される領域に、アミノ酸置換が検出された。おそらく、本来と異なる基質を代謝する結果、null変異とは異なる表現型を示すものと考えられる。

またAN遺伝子はマップ上の位置を手がかりに同定を進めた結果、これも植物界からは初の、特異な遺伝子をコードしていることが判明した。現在、詳細な解析を進行中である。

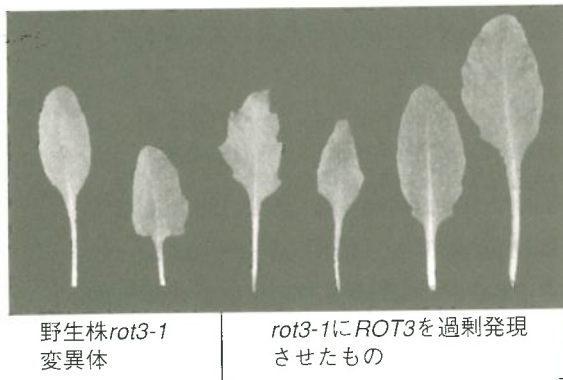


図2 *ROT3*遺伝子による葉の縦の長さの制御

シロイヌナズナでは、*ROT3*遺伝子に機能欠損が生じると (*rot3-1*変異体)、葉の縦の長さだけが短くなる。そこへ野生型 *ROT3*遺伝子を過剰発現させると、葉の幅は変化しないまま、葉の長さが増大する。文献4) から改変。

3. 遺伝子組み換えによる葉および花の形態制御

以上のようにして、葉の縦方向と横方向を制御する遺伝子の存在が明かとなったので、次に私たちは、実際にこの遺伝子を使って葉の形の制御、大きく言えばバイオデザインを試みた。*ROT3*遺伝子が本当に葉の縦の長さだけを制御する遺伝子であるならば、*ROT3*遺伝子を過剰に発現させても、葉の形は長くなるだけで、横幅の大きさは変わらないはずである。また花器官が葉の変型したものだとなれば、葉の形が縦に長くなると共に、花器官の長さも増大するであろう。

そこでトランスジェニックの系を用い、null変異と確認された *rot3-1* 変異体に *ROT3* 遺伝子を強制発現させる実験を行なった。得られたトランスジェニック植物は、予想通りに葉身も葉柄もともに長くなったが、葉の幅はほとんど変化しなかった (図2)。またアミノ酸置換の起きた変異遺伝子を導入した株では、葉柄は変化せずに、葉身が大型化するという、もともとの変異株で認められた形質を

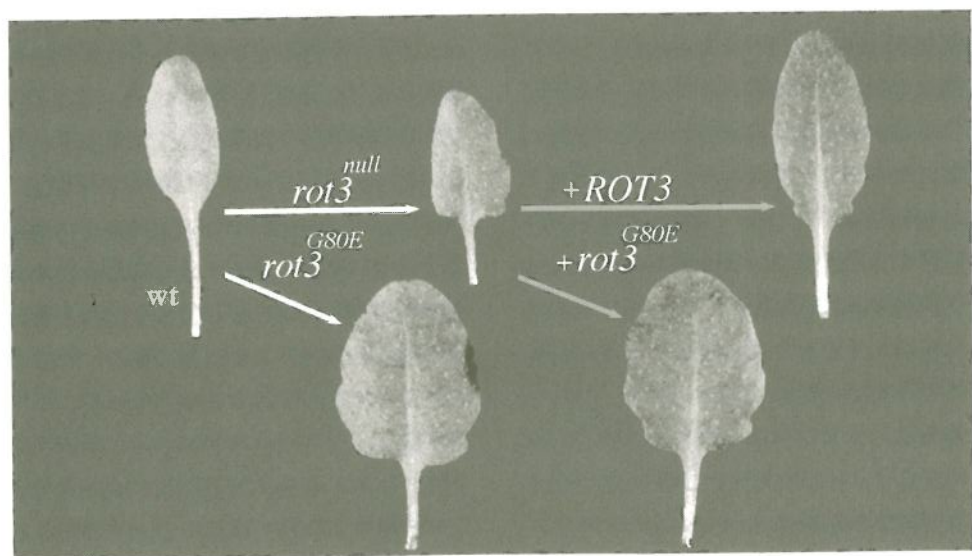


図3 *ROT3*遺伝子による葉の形の制御

rot3-1 変異体に野生型 *ROT3* 遺伝子を過剰発現させると、葉の幅は変化しないまま、葉の長さが増大する (上段)。 *ROT3* 遺伝子に特定のアミノ酸置換が生じると、葉の葉柄が短くなり、葉身の大きさは増大する (下段左)。同じ変異型遺伝子 (*ROT3^{G80E}*) を *rot3-1* 変異体に導入して発現させると、やはり葉の葉柄は短いまま、葉身の大きさが増大する (下段右)。文献4) より改変。

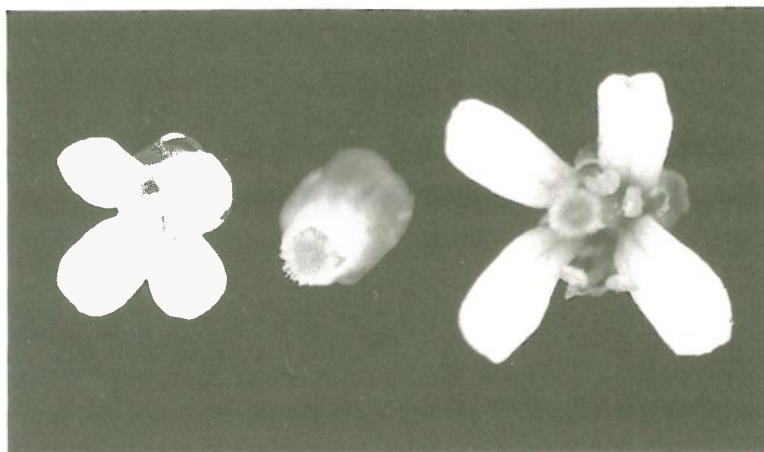


図4 ROT3遺伝子による花の形の制御

左:野生型ROT3遺伝子の機能欠失(中央)や過剰発現(右)により、花の形状も大きく変化する。文献4)より改変。

再現した(図4)⁴⁾。また同様の形態変化は、葉が変型した器官とされる花器官においても長さの増大など、葉で見られたのと同じ形態変化が認められた(図3)⁴⁾。以上の結果から、ROT3遺伝子は発生遺伝学的に推察されたとおり、葉の長さ方向への極性伸長を制御する因子であることが、再確認された。

いっぽうAN遺伝子については、機能欠失型のan変異体に野生型のAN遺伝子を導入する実験により、葉の横幅の長さの回復が認められている。この場合も、遺伝子発現量の調節をすることで、葉の横幅だけを特異的に制御するといった応用が可能と期待される。

4. おわりに

今回明らかになった現象は、今のところ実験的モデル植物であるシロイヌナズナで確かめられた段階にすぎないが、遺伝子ファミリーの普遍性から考えて、他の植物でも同じ作用をすることが期待される。葉は光合成器官としてあるいは可食部として農学的にも重要な部位であるため、縦横のサイズを人工的にデザインできれば、その応用的価値は高いであろう。またROT3遺伝子の操作により、花器官も葉と同様に形態の変化を示したことから、花卉園芸の分野でも応用が考えられる。現在、その証明実験を予定しているところである。

また基礎科学の面においても、今回明らかになった系の詳細な解明は、葉の基本的形態の制御系を明らかにする上で重要な礎となるばかりでなく、自然界における葉の形の多様化のメカニズムを解明する上でも、きわめて有効と考えられる。現在、他種植物における形態的多様性の進化過程について、当該遺伝子の果たした役割を解明する計画も、あわせてすすめている。植物の基本的パーツとして最も重要な器官、葉の理解は、今後、植物全体の理解の上で大きな手がかりを与えてくれることだろう。

文献

- 1) Donnelly, P.M., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R. and Dengler, N.G. (1999) *Dev. Biol.* 215: 407-419
- 2) Tsuge, T., Tsukaya, H., and Uchimiya, H. (1996) *Development* 122: 1589-1600
- 3) Kim, G.-T., Tsukaya, H. and Uchimiya, H. (1998) *Genes & Dev.* 12: 2381-2391
- 4) Kim, G.-T., Tsukaya, H., Saito, Y. and Uchimiya, H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 9433-9437

◀国内情報▶

マダイイリドウイルス病ワクチンの開発

水産庁 養殖研究所

中島 員 洋

マダイイリドウイルス病は、平成2年以來、養殖業界に甚大な被害を及ぼし続けている海産魚の代表的なウイルス病です。しかしながら、今まで病害防除に対する抜本的な対策はなく、本病に対する効果的なワクチンの開発が業界から切望されていました。養殖研究所では、(財)阪大微生物病研究会と共同でワクチンの実用化研究に着手し、「マダイイリドウイルスのホルマリン不活化ワクチン」を作製し本病に対する防御能を検討してきました。その結果、ワクチンの有効性が確認され、農林水産大臣の承認を受け、海産魚のウイルス病に有効なワクチンとして世界で最初に実用化され、使用されるに至っています。

1. はじめに

近年、わが国において、水産増養殖における魚種の多様化と生産量の増大に伴い、魚病による被害が増加しています。なかでも、海産養殖魚のウイルス病が産業的に大きな問題となっています。これらの内、西日本のマダイ養殖場で発生したマダイイリドウイルス病は、養殖研究所を中心とした病理学的、ウイルス学的検討により、これまでに知られていないイリドウイルス科に属するウイルスの感染によることが明らかになりました¹⁾。養殖研究所では、本ウイルスに対するモノクローナル抗体を作製し、これを利用した迅速診断法を確立しました^{2,3)}。この方法は、県水産試験場等において広範に使用されています。一方、本病の予防策に関しては、薬剤等による化学療法が期待できないことから、ワクチンをはじめとする魚類の生体防御能を利用した病害防除技術の確立が、関係方面から強く期待されています。

この10年間におけるワクチンに関する研究の発展には目覚ましいものがあります。アジュバントの開発、感染防御抗原の探索、バイオテクノロジーを駆使したワクチン投与方法の開

NAKAJIMA Kazuhiro

〒516-0193 三重県度会郡南勢町中津浜浦

422-1

発、免疫増強剤の開発など急速な勢いで進んでいます。しかしながら、実用化されている水産用のワクチンは国内外において11種類(ビブリオ病、レッドマウス病、せつそう病等)しかありません⁴⁾。また、日本国内においても、今回紹介するワクチンの他、アユやサケ科魚類のビブリオ病ワクチン及びブリの腸球菌症ワクチンが市販されているにすぎません。このように、深刻な被害を及ぼしている魚病については未だ開発段階のものが多く状況です。そこで、今回、マダイイリドウイルス病並びに開発に成功した本病ワクチンについて紹介したいと思います。

2. マダイイリドウイルス病及び原因ウイルス

平成2年夏に四国で最初に養殖マダイに発生が確認されたマダイイリドウイルス病は、翌平成3年には西日本の各地のマダイ養殖場を中心に大規模な発生が見られました。その後、本病はチダイ、イシダイ、イシガキダイ、スズキ、ブリ、ヒラマサ、カンパチ、シマアジ、トラフグ、キジハタ等多数の海産養殖魚で発生が見られ、現在では28魚種に達しています⁵⁾。

本病は、5月下旬から11月にかけて、水温が20℃より高い時期に発生し、特に25℃以上の

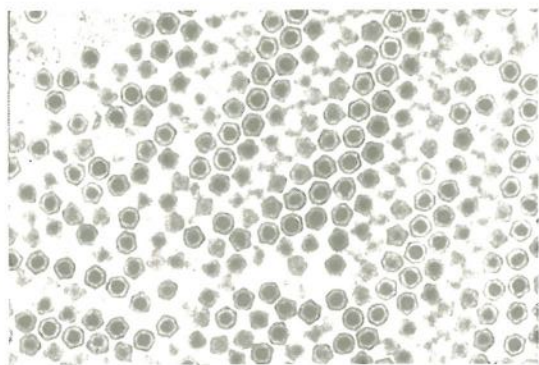


図1 マダイイリドウイルス粒子

高水温期には、被害が増大します。病魚は、体色が黒化または退色し、動作は緩慢で力無く遊泳します。体表に出血性のスレ、眼球の突出、出血等が観察されます。内臓は全体的に貧血症状を呈し、脾臓が肥大するとともに、多数の肥大球形化した細胞が出現します。

原因ウイルスであるマダイイリドウイルスは、直径が200~240nmで、感染細胞質内には、平面的には六角形を呈するウイルス粒子が多数、細胞によっては結晶状に並んで観察されます(図1)。ウイルスの物理化学的性状、ウイルス粒子などの形態学的特徴及び増殖部位等から、本ウイルスはDNAウイルスの一種のイリドウイルス科に属すると考えられています。当初、本ウイルスの魚類由来株化細胞による分離培養は難しかったのですが、その後の研究でイサキ類のヒレ由来の株化細胞(以下GF細胞)が継代培養可能な細胞と分かり、以後のウイルスの分離培養、ウイルスの性状解析及びワクチンの作製に使用しています。

3. マダイイリドウイルス不活化ワクチンの開発

マダイ病魚の脾臓から分離したマダイイリドウイルスをGF細胞に接種し、25℃で培養後、ウイルスを高濃度を含む培養上清に0.1%ホルマリンを添加し、ウイルス不活化ワクチンを作製しました。室内試験にて効果を確認後、本ワクチンの自然環境下における有効性を調べるため野外試験を行いました。ワクチンをマダイ稚魚の腹腔内に一尾あたり

0.1ml注射して(写真1)、1週間陸上水槽で飼育した後、海上の生簀に移動しました。対照としてワクチン未投与群を設け、隣接した生簀で同様に飼育しました。ワクチン投与から12週間にわたり死亡率、魚体重等を観察しました。

野外試験成績

対照群では投与5週間後から摂餌行動の不活発な魚や、死亡魚が観察されました。死亡魚の数は7週間目にピークに達しました。ワクチン投与群では対照群の死亡魚のピークより約10日後、海水温度が著しく上昇した時期に、わずかながら死亡魚が観察されました。累積死亡率は、対照群で68.5%、投与群では19.2%であり、統計学的にも有意差($p < 0.01$)が認められました(図2)。死亡魚の解剖所見や脾臓組織でのマダイイリドウイルス抗原の調査によって、対照群と投与群の死亡魚はマダイイリドウイルスの感染により死亡したことが分かりましたが、生残魚からはマダイイリドウイルス抗原は検出されませんでした。



写真1 マダイ稚魚へのワクチン接種風景

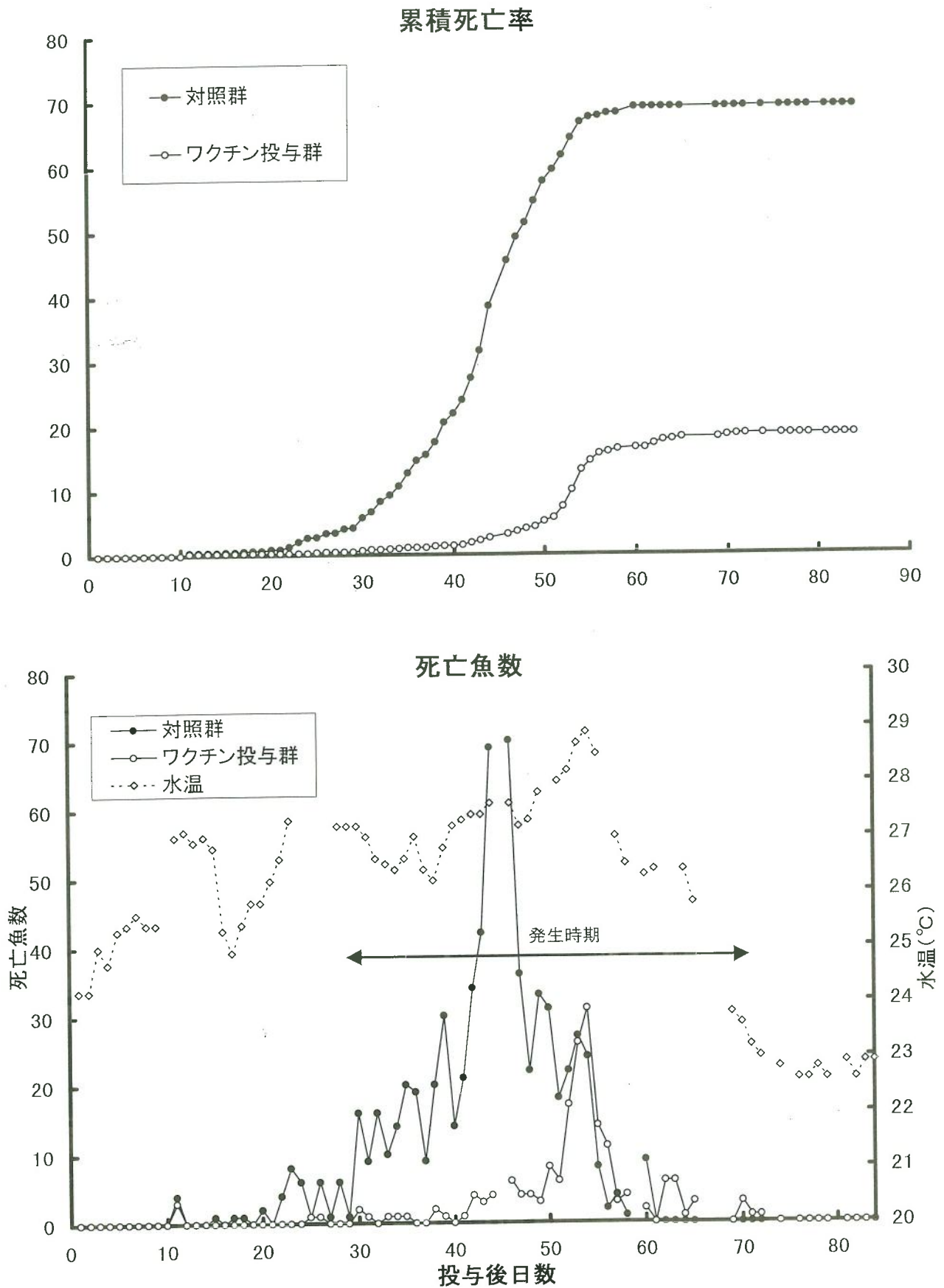


図2 野外試験の結果

これらの結果は、本ワクチンがマダイイリドウイルス病に対する防御能を誘導するのに極めて有効であることを示しています。また、投与後6週目の平均魚体重は対照群が30.8gに対して、投与群が35.6gで、ワクチン投与群の成長が優れていました。

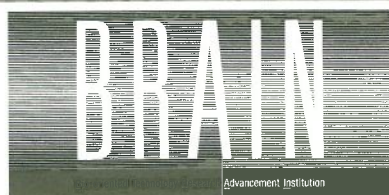
4. おわりに

このようにマダイイリドウイルス病に対して、極めて予防効果の高いワクチンの開発に成功し、実用化に至りました。本ワクチンは、海産養殖魚のウイルス病に有効なワクチンとしては世界で最初の例です。現在、マダイイリドウイルスの感染により被害を受けている他の海産養殖魚種、例えば、ブリ、カンパチなどでワクチンの有効性を検討しています。さらに、投与方法の改良、ワクチン中の有効

成分の同定及びイリドウイルスのウイルス学的解析などの研究を進めています。本ワクチンの普及により、イリドウイルス病の効果的な予防が期待されます。一方、イリドウイルス病の防除のためには、健康な種苗の確保、適正飼育（過密飼育は避ける）、死亡魚の早期除去等が重要であることは言うまでもありません。

文献

- 1) 井上潔他(1992)魚病研究 27: 19-27
- 2) Nakajima K. et al. (1995) *Fish Pathol.* 30: 47-52
- 3) Nakajima K. et al. (1995) *Fish Pathol.* 30: 115-119
- 4) 中西照幸(1999)アクアネット2(5): 18-25
- 5) 松岡学他(1996)魚病研究 31: 233-234



ブレイン テクノニュースの バックナンバーご案内 第 78 号

2000 (平成12) 年 3 月15日発行

総説

DNAワクチンテクノロジーへの
サイトカイン遺伝子の応用研究は
21世紀の感染症克服に貢献できる……………横溝祐一

国内情報

昆虫ウイルスを用いた
家畜サイトカインの生産……………犬丸茂樹
サイトカインの
動物臨床への応用……………板倉敦子・松田浩珍
抗アレルギー評価のための
ヒト免疫担当細胞株の樹立……………山本万里・川原浩治
トランスポゾンによる植物遺伝子タギング法の確立
……………町田千代子・田中博和・岩川秀和・町田泰則

地域の先端研究

薬剤を必要としない新規選抜マーカー遺伝子の
開発-チャにおける利用……………丹羽康夫
文献情報

卵細胞質内精子注入 (ICSI) 法による哺乳動物の遺
伝子導入……………(抄訳: 木村直子)

ミトコンドリアDNAは酵母染色体の
二重鎖の破損を修復する……………(抄訳: 家藤治幸)
根粒の発達をコントロールする

植物のレギュレーター……………(抄訳: 内海俊樹)
重篤なインスリン低抗性, 糖尿病

および高血圧に関与するヒトPPAR γ の
遺伝子突然変異……………(抄訳: 室田一貴)

海外便り

カイコにおけるレトロウイルスベクターの利用
—フランス分子細胞遺伝学センターでの1年間
……………河本夏雄

特別情報

BRAIN国際テクノフォーラム
—トウモロコシ育種の最前線—……………(編集部)

生研機構からのご案内

- (1) 基礎的研究開発促進事業 (若手研究者支援型)
ならびに研究開発事業成果の紹介
- (2) 平成12年度募集について

◀国内情報▶

氷核活性細菌による害虫防除 —昆虫腸内定着細菌利用の一例として—

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所

渡 部 賢 司

我々は植物葉面細菌の一種である*Erwinia herbicola*群細菌、及び*Enterobacter cloacae*が昆虫腸内で増殖することを明らかにした。これら昆虫定着細菌の利用として、氷核活性を有する*Er. ananas*の昆虫腸内定着による害虫防除について検討したところ、本細菌が昆虫の耐寒性を低下させることを明らかになった。さらに、その能力を増強させると同時に凍霜害など植物への悪影響を最小限にするために、植物体上で増殖しにくい*Ent. cloacae*に氷核活性遺伝子を導入し、氷核活性を有するトランスジェニック細菌を作出した。これらの細菌が付着した葉を食べた昆虫は、氷点下5℃程度におくと凍結・死亡することから、昆虫定着細菌に遺伝子導入することにより、害虫防除等に利用可能であることが分かった。

はじめに

ヒトなど哺乳類の腸内には、大腸菌や乳酸菌など寄生動物に病原性をほとんど示さない細菌等が腸内フローラを形成しており、病原細菌の増殖を抑える役割を果たすと考えられている。昆虫においても、これまでに腸内から多種、多様の腸内フローラを形成する細菌が分離されているが、その動態についてはあまり研究が行われておらず、また、その利用に関してもほとんど手付かずである。

そこで、我々は昆虫腸内に定着、増殖する細菌を分離、同定するとともに、その利用の1つとして、氷核活性を有する昆虫定着細菌による害虫防除について検討を行った。

1. 昆虫腸内に定着する細菌

我々はカイコ、クワノメイガ、ウンカ・ヨコバイ類等から、グラム陰性菌の*Serratia*属、*Enterobacter*属、*Erwinia*属、*Pseudomonas*属、グラム陽性菌の*Enterococcus*属、*Staphylococcus*属等の細菌を分離している。これらの中には*Er. herbicola*群細菌や

WATANABE Kenji

〒305-8634 つくば市大わし1-2

物に共通に分離される細菌もあり、寄主植物から昆虫腸内へ移行しているものと考えられる。そこで、これら分離細菌の昆虫腸内定着能を調べた。クワ葉面及びカイコ腸管から分離された*Er. herbicola*群細菌、*Ent. cloacae*、*Staphylococcus* sp. 及び*Pseudomonas syringae*を人工飼料に混ぜて5齢起蚕に12時間だけ与え、その後、処理後1、3、6日目に腸から細菌を分離し、細菌数の継時的な変化を調べた^{1,2)}。その結果 *Er. herbicola*、*Ent. cloacae* (図1) 及び*Staphylococcus* sp.は処理後1日目よりも3、6日目の方が分離細菌数が多く、カイコ腸内で定着、増殖することが示唆された。一方、*P. syringae*はいずれのサンプルからも分離されず、腸内に定着せずに速やかに排出されることが示唆された。これらの結果から、カイコ腸内には、親和性の高い定着細菌として*Er. herbicola*、*Ent. cloacae*及び*Staphylococcus* sp.の存在することが明らかになった。

2. 氷核活性細菌の害虫防除への利用

昆虫定着細菌による害虫防除について述べる前に、有用形質として利用した氷核活性能とそれを有する氷核活性細菌について触れておく。氷核活性能とは水が凍結する時の核（氷

核)となる能力のことで、強力なものほど高い温度で水を凍結させる。現在知られている最も強力な氷核物質が氷核活性細菌であり、水を-2℃~-4℃で凍結させることができる。この細菌は氷核活性タンパク質を作り、細胞膜に蓄積することで、氷核活性性能を獲得する。

近年、氷核活性細菌の利用法として越冬害虫の防除への利用が行われている。すなわち、氷核活性細菌を噴霧または餌に添食させることにより、昆虫を氷点下数℃で凍結し、越冬出来なくさせる方法である。代表的な氷核活性細菌である*P. syringae*の粉末または生菌で処理する方法が欧米において検討されており、テントウムシの一種では氷核活性細菌処理により10℃以上も高い温度で凍結することや、ある種の貯穀害虫では-5℃で約80%が死亡することが報告されている^{3,4)}。これらの研究により、氷核活性細菌による害虫防除が一躍、注目を浴びたが、氷核活性処理してから約1週間程度でその効果がなくなることが指摘されており、長期間、氷核活性細菌処理の効果を持続させる方法の開発が望まれている。

3. 氷核活性*Erwinia ananas*による昆虫の耐寒性の低下

欧米における研究では、昆虫腸内で増殖しない*P. syringae*を主に用いており、前述のように速やかに昆虫体外に排出されるために効果が持続しないものと考えられる。そこで、我々は氷核活性性能を有する昆虫定着細菌を用いることを考えた。幸い、前述の昆虫定着細菌のなかで、*Erwinia ananas* (*Er. herbicola* 群細菌の一種)は氷核活性性能を有する系統が知られており、我々もクワヤクワノメイガから分離している⁵⁾。そこで、氷核活性*Er. ananas*が昆虫の耐寒性を低下させるかどうか調べた⁶⁾。耐寒性は過冷却点と-6℃における凍結死で評価した。越冬前の2~4令クワノメイガ幼虫に氷核活性*Er. ananas*を塗布した桑葉を与えたところ、幼虫の過冷却点の平

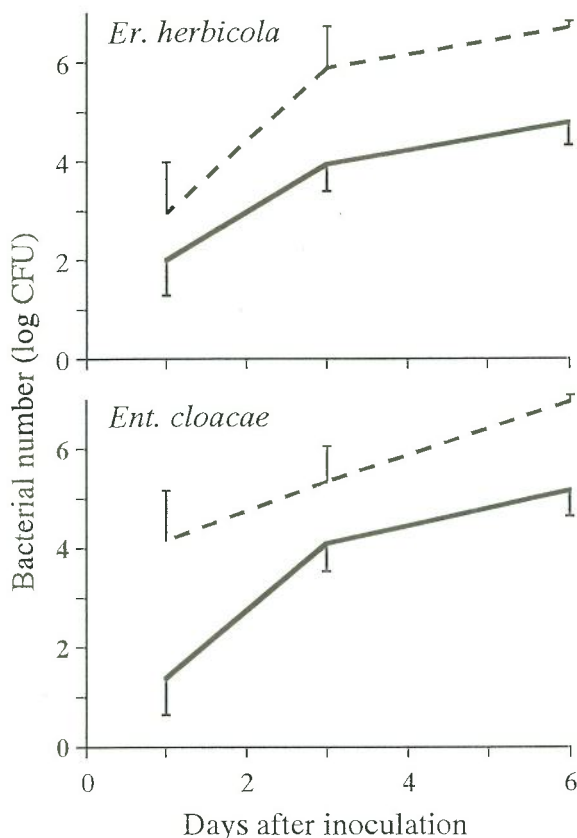


図1 カイコ腸内における*Erwinia herbicola*群細菌及び*Enterobacter cloacae*の増殖
実線は腸管、破線は糞から分離された細菌数を示す。

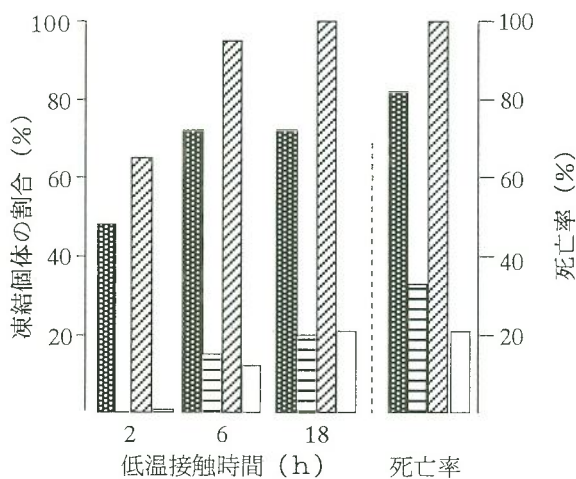


図2 氷核活性細菌処理をしたクワノメイガ幼虫の凍結、死亡個体数の割合

- :*Erwinia ananas*
- ▨ :*Pseudomonas syringae*
- ▧ :*Enterobacter cloacae*
- :滅菌蒸留水 (未処理)

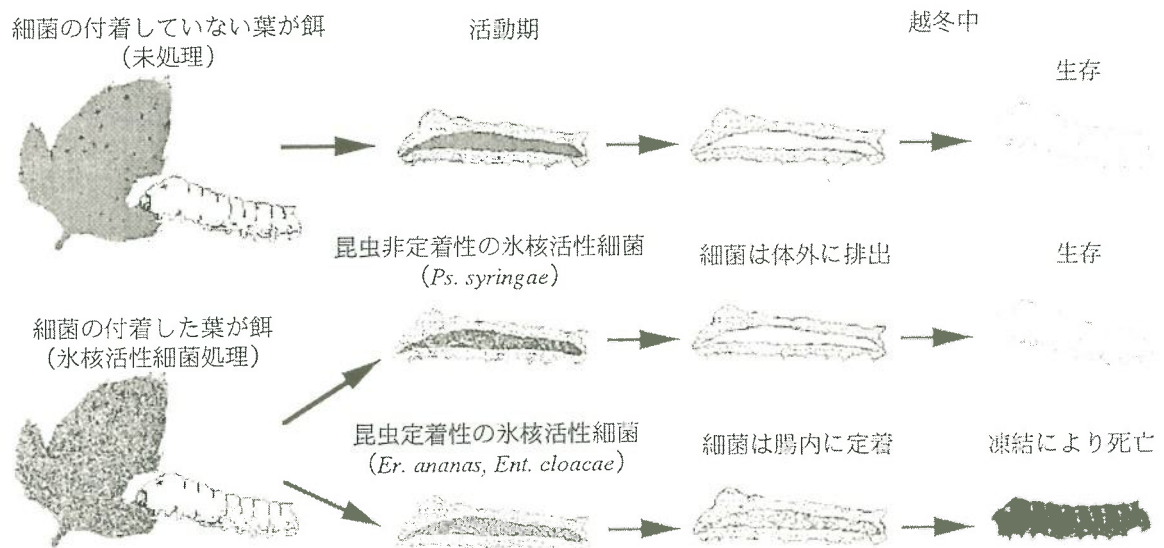


図3 氷核活性細菌処理による越冬害虫防除のメカニズム

均は処理後3日目において、未処理の幼虫と比較して6.6℃高く、-4.7℃であった。また、この過冷却点の上昇は少なくとも9日後まで安定して維持された。一方、氷核活性を与えた幼虫の過冷却点はあまり上昇せず、処理後5日目には未処理の幼虫と同程度まで低下した。

次に、-6℃の低温においた時の凍結死の割合を調べた。氷核活性*Er. ananas*を与えた区では2時間後で約50%の個体が凍結し、18時間後には、約80%の個体が凍結、死亡した(図2)。一方、未処理では、死亡個体数は約20%であった。氷核活性を与えた区でも、死亡個体数は36%であり、未処理区と比較して顕著な差は認められなかった。これらの結果により、氷核活性*Er. ananas*は従来の方法よりもクワノメイガ幼虫の耐寒性を効果的に低下させることが分かり、昆虫に氷核活性細菌を定着させる方法(gut-colonization法)による害虫防除の可能性が示唆された(図3)。

4. 遺伝子導入した昆虫定着細菌の利用

昆虫定着細菌をより幅広く利用するためには、外来遺伝子を導入、発現させる系を確立

することが必要である。昆虫定着細菌の一つ、*Ent. cloacae*は分類学的に大腸菌に近縁であり、大腸菌で通常用いられるプラスミドベクターがそのまま利用出来る。そこで、昆虫定着細菌に導入した外来遺伝子の昆虫腸内における発現を確認するために、*Ent. cloacae*に氷核活性遺伝子を導入した細菌を作出し、前述した方法で昆虫の耐寒性についての実験を行った⁷⁾。

氷核活性遺伝子導入*Ent. cloacae*を与えた幼虫の過冷却点を測定したところ、処理後3日目の幼虫の過冷却点は-3.3℃であり、滅菌蒸留水を与えた幼虫よりも約8℃、氷核活性*Er. ananas*を与えた幼虫よりも1.5℃上昇した。また、2ヵ月以上の間、この過冷却点の上昇が同じレベルで継続した。さらに-5℃の低温においた時の凍結個体数及び死亡個体数を調べたところ、*Ent. cloacae*を与えた幼虫は2時間後に約64%が凍結し、18時間後にはすべての個体が凍結、死亡した(図2)。これに対し、未処理の与えた幼虫では凍結せず、すべての幼虫が生存した。これらの結果から、氷核活性遺伝子導入*Ent. cloacae*が強力にクワノメイガ幼虫の耐寒性を低下させることが明らかになり、昆虫定着細菌に導入された遺伝子の発現が確認された。

氷核活性 *Er. ananas* はもともと植物の葉に生存する細菌であるので、野外散布等では植物に凍霜害を引き起こす可能性がある。一方、*Ent. cloacae* は植物体上であまり増殖しないことが分かっているので⁷⁾、氷核活性遺伝子導入 *Ent. cloacae* を利用した方が植物への悪影響がより少なく、かつ、より効果的に害虫防除が可能であると考えられる。

おわりに

今回明らかにした細菌以外にも、昆虫の腸内には多種の細菌が定住しており、その中には共生細菌のように宿主特異性が非常に高いものも多数存在する。しかしながら、これらの腸内定着細菌と宿主との相互作用に関わる要因についてはほとんど明らかにされていない。今後は昆虫腸内における細菌の定着に関する分子機構を明らかにするとともに、氷核活性遺伝子を含む害虫防除関連遺伝子や有用

物質生産遺伝子の導入による昆虫定着細菌の利用について研究を進めたい。

文献

- 1) K.Watanabe & M.Sato (1998) *Curr. Microbiol.* 37,352-355
- 2) K.Watanabe et al. (1998) *J.Invertebr. Pathol.* 72,104-111
- 3) J.M.Strong-Gunderson et al. (1990) *J. Insect Physiol.* 36,153-157
- 4) P.G.Fields (1993) *Environ. Entomol.* 22, 470-476
- 5) K.Takahashi et al. (1995) *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61,439-443
- 6) K.Watanabe & M. Sato (1999) *Cryobiology* 38,281-289
- 7) K.Watanabe et al. (2000) *J.Appl. Microbiol.* 88,90-97



ブレイン テクノニュースの バックナンバーご案内 第 77 号

2000 (平成12) 年 1 月 15 日発行

巻頭言

21世紀への橋渡し 堤 英隆

総説

生物農薬—研究開発の現状と課題 鈴木孝仁

国内情報

生物農薬の製剤化技術の研究開発

—ガットUR対策研究開発成果から 田中宏樹

耐乾燥性、耐塩性、耐冷性を備えた

遺伝子組換え植物の開発 篠崎和子

作溝型簡易草地更新機の開発と実用化 山名伸樹

地域の先端研究

ニシキゴイのバイオテクノロジー 佐藤 将

文献情報

凍結乾燥法を利用した精子の保存

..... (抄訳: 横尾正樹)

Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis*

ペプチダーゼ遺伝子群の *Lactococcus lactis*

への導入と発現調製 (抄訳: 上野敬太)

単子葉植物と双子葉植物における葉の発生

様式の比較に関する 2 報告 (抄訳: 木苗貴秀)

リパーゼを触媒とした構造トリグリセリド

合成における最適反応の検討 (抄訳: 丸山一輝)

イネいもち病菌の病原性機構に働く

ATP-binding cassette (ABC) transporter

..... (抄訳: 及川志保)

海外便り

DNAの引き算による病原性関連遺伝子

単離の試み—カルフォルニア大学

デービス校における一年間 竹原利明

特別情報

ブレインテクノフォーラム

質的形質に関するゲノム解析の最前線 (編集部)

◀国内情報▶

分子擬態

東京大学 医科学研究所

中村 義一

1. はじめに

オニカサゴは海底の岩肌にとけこみ、メダマガエルは背中にギョロ目の文様を描き、シロチドリの親鳥はひなの身代わりに傷ついた様を装う現象は、身を守り、餌をとり、あるいは威嚇するために、動物が進化の中でみだした「擬態」という離れ技である。植物の世界にも擬態するものが知られている。ところが、擬態という離れ技は、動物や植物というマクロの世界に限らず、ミクロの世界にも存在するらしいことが最近の研究からわかってきた。この発見は、今では多くの人が古典的と感じるタンパク質合成の研究から生まれた。

2. 伸長因子によるtRNA分子の擬態

タンパク質の合成（翻訳）はリボソームという数十種類のタンパク質とリボ核酸（RNA）からできた生産装置の上で行われ、その工程は多数のタンパク質（翻訳因子）によって制御される。その中の一群の翻訳因子が、伝令リボ核酸（tRNA）の形とそっくりという事実が発見されて「分子擬態」と命名され、にわかに注目を浴びるようになった。

tRNAは遺伝暗号を解読してアミノ酸に変換する働きをもつ分子で、その形は逆L字型をしている（図1b）。tRNAはアミノ酸を結合してEF-Tuという翻訳因子によってリボソームの決まった場所（Aサイト）に運ばれるが、その複合体の形が約20年を費やして、1995年暮にニーボルグ（デンマーク）らによ

NAKAMURA Yoshikazu

〒108-8639 港区白金台4-6-1

って解明された¹⁾。驚いたことに、全体の形がその前年にリルジャス（スウェーデン）やスタイツ（米国）らによって報告されたEF-Gという翻訳因子の形と瓜二つであった^{2,3)}。つまりEF-Gタンパク質の下側の部分はtRNAの形にそっくり、ということになる（図1c d）。

なぜ、形をまねるのであろうか？

おそらく、これらの因子はリボソーム上のtRNAの指定席に入り込んで作業をする必要があるために、必然的に「鍵と鍵穴」の関係を強要され、形も似てきたものであろう（図2）⁴⁾。しかしながら、タンパク質とリボ核酸という全く異なる素材の生体高分子の間でかくも精巧に形を擬態できることは大変な驚きで、フィギアスケートでオリンピックに出場しても「分子擬態」の技の芸術点は9.9を下らないであろう。

3. 解離因子によるtRNA分子の擬態

分子擬態には形を似せるだけでなく、働きまでも似せてしまう高度な技もある。実は遺伝暗号の発見から40年余、3文字の塩基の組み合わせで作られる64通りの暗号（コドン）のうち、アミノ酸を指定する61通りはtRNAにより解読されるが、停止信号（終止コドン）となる3通り（UAG/UGA/UAA）が「何に」「どうやって」解読されるのか謎であった。1996年に我々の研究室の伊藤は、終結反応に働くペプチド鎖解離因子（UAG/UAAに作用するRF1とUGA/UAAに作用するRF2）という2種類の翻訳因子は7つの保存された領域に区分することができ、その一部がtRNAのように停止信号を解読するのではないかと

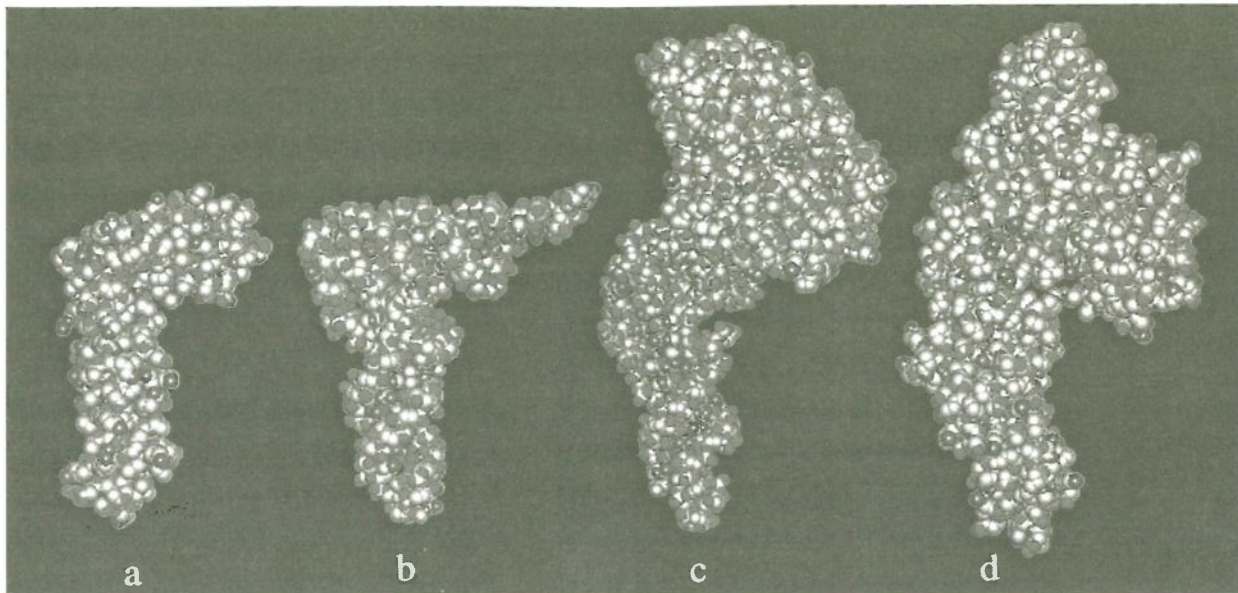


図1 tRNAの形を擬態するタンパク質の構造

X線回折法により翻訳因子の結晶の構造が明らかになった。a. *Thermus thermophilus*のRRFタンパク質 (PDB登録コード1EH1)。b. 酵母フェニルアラニンtRNA。c. *Thermus aquaticus* EF-Tu/GTP/フェニルアラニンtRNAの複合体 (PDB登録コード1TTT)。d. *Thermus thermophilus* EF-G/GDP複合体 (PDB登録コード1DAR)。

考えて、EF-Gによる分子擬態の発見と相前後し、独立に解離因子の分子擬態 (仮説) を提唱した⁵⁾。その後5年を費やし、tRNAが

コドンを識別するためにアンチコドンをもつごとく、解離因子にもペプチド製アンチコドンがあることを突き止めて、機能面から仮説

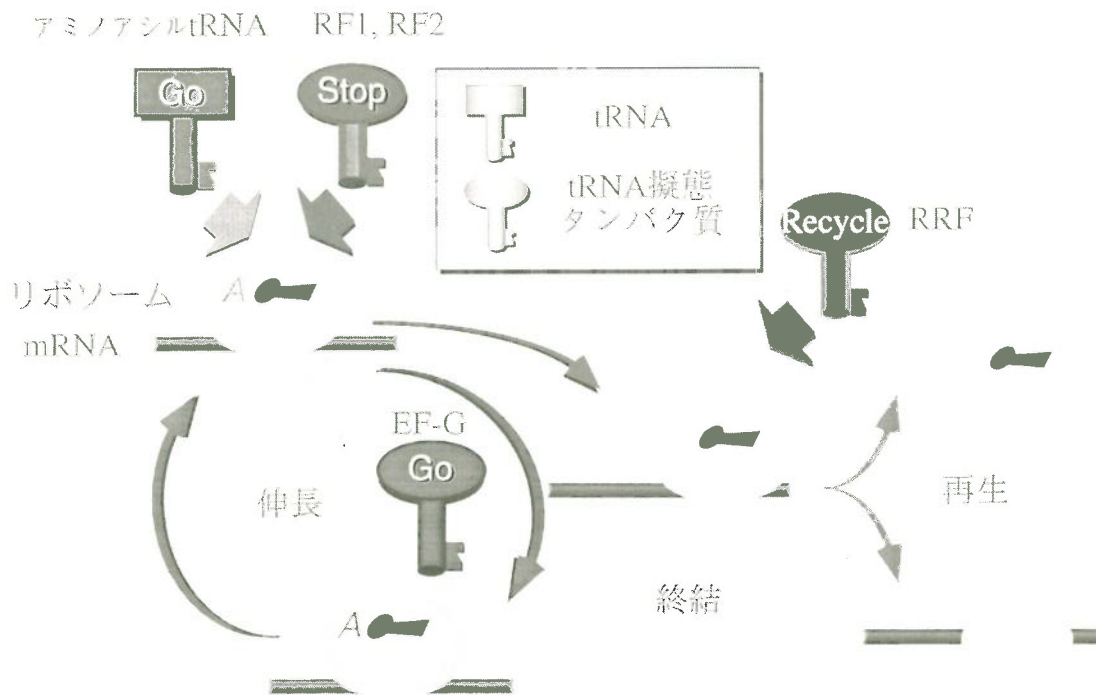


図2 tRNAの形はリボソームを動かすためのマスター鍵

タンパク質合成の伸長、終結、再生の過程でtRNAを擬態する翻訳因子はtRNAの指定席 (Aサイト) へ入って作業をする。

の正しさを証明し、本年2月10日付のネイチャーに発表した⁶⁾。

わかってみれば、シンプルな仕組みである。RF1とRF2のトリペプチド(Pro-Ala-Thr, Ser-Pro-Phe)の最初と最後のアミノ酸が各々終止コドンの2文字目と3文字目のピュリン塩基の読み分けに働く(図3)。比較的小さく親水性のアミノ酸であるセリンやスレオンはグアニン(A)とアデニン(G)の両方を認識し、大きめな疎水性のアミノ酸であるプロリンやフェニルアラニンはアデニンしか認識しない。原理がわかったので、特性の変化したペプチド・アンチコドンを作り出すこともできた。Ser-Pro-Thrは3種類の終止コドンに加えてUGG(トリプトファン)コドンでも翻訳を終結し、Pro-Pro-Pheは逆にUAAでしか翻訳を終結しないようになる。つまり、タンパク質によるRNA認識の特性を人為的に変換する術がわかってきた。

ペプチド・アンチコドンの発見により、遺伝暗号の解読メカニズムが1/3世紀を経てようやく完全に解明された。解離因子による終止コドンの読み分けは大変に正確で、百万回に1回程度の間違いしか起こさない。

tRNAアンチコドンのように相補的なRNAとRNAの対合を使わずに、どんな仕掛で高い正確さが保証されているのであろうか?その仕組みはこれからの研究に委ねることになるが、タンパク質がtRNAと同様に正確な解読能力を持ちうるということが証明された今、「分子擬態」は技術点においても10点満点を獲得するであろう。

4. リボソーム再生因子によるtRNA分子の擬態

解離因子をふくめて翻訳因子によるtRNA分子の擬態は現実味をおびてきた。もしも手許で構造解析が可能になれば、形の擬態を実証し、さらに遺伝学と構造学を密に連携させて効果的な研究を進めることができるので、私のような分子遺伝学者には夢のようなものであった。その夢が正夢になった。生研基礎プロジェクトに採択いただいたおかげで、X線結晶構造解析のための装置と構造物理学者を手にすることができた。導入してからちょうど2年たち、我々の素人研究室が、リボソーム再生因子を相手に、自前で最初のタンパ

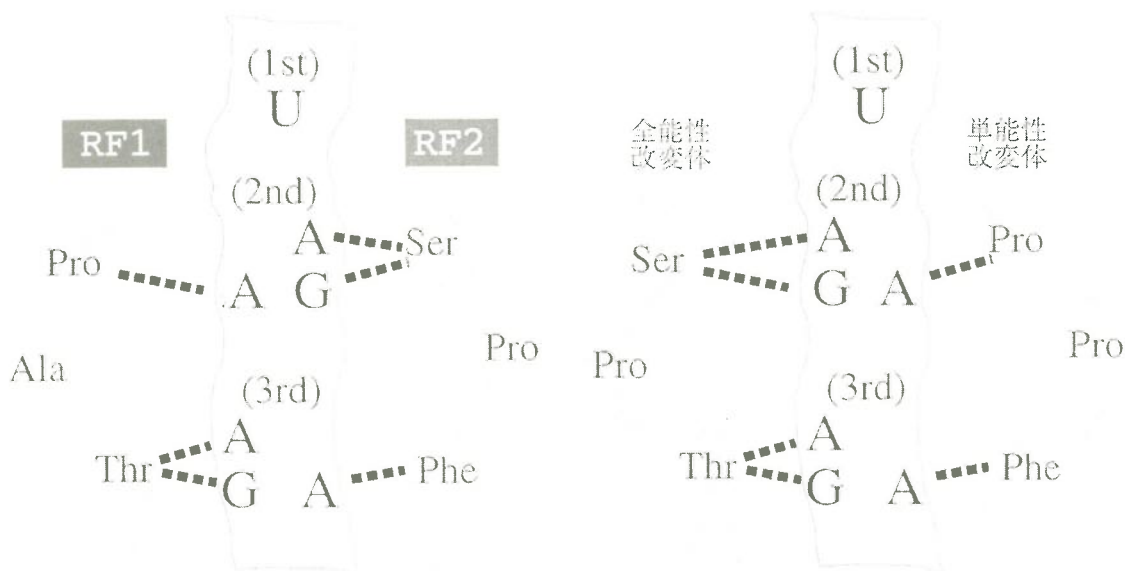


図3 バクテリアの解離因子に発見されたペプチド・アンチコドン
UAAコドンはRF1とRF2どちらにも停止信号となるが、UAGコドンはRF1、UGAコドンはRF2の停止信号である。RF1とRF2のトリペプチドが正確に読み分けをしている。アミノ酸を交換することで読み方を変換できる。

ク質の結晶構造を解くことができた。その形はtRNA分子と瓜二つであった(図1)⁷⁾。リボソーム再生因子は、ペプチド鎖が解離されたあとのリボソーム複合体を解体して次の開始反応へむかわせるための役目をもっている。その作用の仕組みは不明であったが、tRNAとの擬態性がヒントになりメカニズムの解明が進むものと思われる。

5. おわりに

タンパク質とRNAの分子擬態は、生物学にとって新しい概念である。しかし、生命がRNAワールドからタンパク質ワールドへと進化してきたことを考えれば、生命の基本原理のひとつかもしれない。進化の過程で、なぜ、どのようにして、RNAの働きがタンパク質で置き換えられたのか、あるいは置き換えられなかったのか、という生命の進化のプロセスをたどる貴重な糸であり、タンパク質やRNAの工学においても新たな分子デザインの扉を開くものと期待される⁸⁾。

文献

- 1) Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Polekhina, G., Reshetnikova, L., Clark, B.F.C. & Nyborg, J. (1995) Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNA^{Phe}, EF-Tu, and a GTP analog. *Science* 270, 1464-1472.
- 2) Evarsson, A., Brazhnikov, E., Garber, M., Zheltonosova, J., Chirgadze, Yu., Al-Karadaghi, S., Svensson, L.A. & Liljas, A. (1994) Three-dimensional structure of the ribosomal translocase: elongation factor G from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.* 13, 3669-3677.
- 3) Czworkowski, J., Wang, J., Steitz, T.A. & Moore, P.B. (1994) The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution. *EMBO J.* 13, 3661-3668.
- 4) Nakamura, Y., Ito, K., & Isaksson, L.A. (1996) Emerging understanding of translation termination. *Cell* 87, 147-150
- 5) Ito, K., Ebihara, K., Uno, M., & Nakamura, Y. (1996) Conserved motifs of prokaryotic and eukaryotic polypeptide release factors: tRNA-protein mimicry hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5443-5448.
- 6) Ito, K., Uno, M., & Nakamura, Y. (2000) A tripeptide 'anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA. *Nature* 403, 680-684.
- 7) Toyoda, T., Tin, O.F., Ito, K., Fujiwara, T., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Garber, M.B., & Nakamura, Y. (2000) Crystal structure combined with genetic analysis of the *Thermus thermophilus* ribosome recycling factor shows that a flexible hinge may act as a functional switch. *EMBO J.* Submitted for publication.
- 8) Nakamura, Y., Ito, K., & Ehrenberg, M. (2000) Mimicry grasps reality in translation termination. *Cell* In Press.

◀国内情報▶

色素体遺伝子の転写を支配する核ゲノム

名古屋大学大学院 人間情報学研究科

杉田 護

色素体は、植物の物質生産を担う重要なオルガネラで独自のゲノムをもつ。色素体遺伝子の転写には色素体ゲノムと核ゲノムのそれぞれにコードされた色素体RNAポリメラーゼが共同で働いている。これは真核細胞の中で共生進化してきた色素体が核ゲノムの支配を受けながら作り上げたユニークな遺伝情報発現システムと考えられる。本稿ではこのような色素体遺伝子の転写に関する最近の話題をとりあげる。

1. 色素体遺伝子の転写

陸上植物の色素体は、葉の細胞の中では葉緑体に、根ではアミロプラストに、果実や花では有色体にそれぞれ分化する。色素体遺伝子の研究はもっぱら葉緑体を用いて主に光合成研究をターゲットとして活発に行われてきた。炭酸固定を触媒する鍵酵素であるリブロースジリン酸カルボキシラーゼの大サブユニットをコードする *rbcL* 遺伝子や、光化学系 2 反応中心のチラコイド膜タンパク質 D1 をコードする *psbA* 遺伝子などの光合成関連遺伝子の場合、その転写開始点の上流に -10 配列 (TATAAT) と -35 配列 (TTGACA) と呼ばれる保存配列が存在する。これらの配列は大腸菌のシグマ因子 σ^{70} によって認識されるプロモーターの配列とよく似ていることから、コンセンサスタイプ (CT) プロモーターと呼んでいる。色素体ゲノムには大腸菌のコアRNAポリメラーゼのサブユニットと相同なタンパク質をコードする 4 つの配列 (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2*) が存在し、これらの配列に対応するポリペプチド鎖の存在も確認されているので、これらが色素体 RNA ポリメラーゼ (plastid encoded plastid RNA polymerase, PEP) をコードしていることは疑いない (図 1)。一方、PEP とホロ酵素を形成するシグマ因子をコードする遺伝

SUGITA Mamoru

〒464-8601 名古屋市千種区不老町

子は色素体ゲノムには存在せず核ゲノムに複数存在する。このように、色素体遺伝子の転写装置は基本的に原核生物タイプであるとこれまで考えられてきた¹⁾。しかしながら、色素体に独自の遺伝子発現制御の分子機構が存在することが明らかになり²⁾、これと同様のことが転写制御においても当てはまるのがこの数年の間にわかってきた。

2. 色素体は 2 種類以上の RNA ポリメラーゼをもつ

我々はタバコ色素体遺伝子の転写開始点を正確にマップして、色素体ゲノムの全転写単位を決定する過程でいくつかの予想しない結果を見出した。光合成遺伝子とは異なりリボソーム蛋白質やRNAポリメラーゼなどハウスキーピングな働きをする蛋白質の遺伝子はCTプロモーターをもたないものが多いことや、遺伝子 (*16SrDNA*, *atpB*, *atpI* など) によっては転写開始点を複数もつことを明らかにした (図 2)。転写開始点の上流にCTプロモーター配列が見い出されないものについては、これを非コンセンサスタイプという意味で「NC II プロモーター」と仮に名付けた^{3, 4)}。NC II プロモーターによる転写の特徴は次のとおりである。(1) 転写開始点の上流に σ^{70} タイプのコンセンサス配列が存在しない、(2) NC II プロモーターからの転写レベルは葉緑体においては著しく低い (そのた

めNC II プロモーターからの転写が見過ごされやすい)が、非光合成色素体においては転写の主演として働いている、(3) CTプロモーターからの転写が光で促進されるのに対して、NC II プロモーターからの転写は光制御を受けない、(4) NC II プロモーターからの転写は大腸菌と葉緑体のRNAポリメラーゼ活性を阻害するTagetitoxinでは阻害されない、(5) タバコの芽生えや培養細胞BY-2株をシクロヘキシミド(細胞質のタンパク質合成阻害剤)で処理するとNC II プロモーターからの転写は低下するが、スペクチノマイシンとストレプトマイシン(大腸菌と色素体のタンパク質合成阻害剤)処理では低下しない。これらのことから、NC II プロモーターからの転写には核コードの色素体RNAポリメラーゼ(nuclear encoded plastid RNA polymerase, NEP)が働いていると推論した。NC II プロモーターのことを「NEPプロモーター」、PEPによる転写プロモーターを「PEPプロモーター」とも呼ぶ。

NEPの存在はオオムギの核遺伝子突然変異*albostrians*の解析で初めて示唆された。*albostrians*の色素体にはリボソームがない(したがってPEPができない!)にもかかわらず、色素体遺伝子から転写されたmRNAが蓄積していた。このことはPEP以外のRNAポリメラーゼが色素体に存在しそれが転写を行っていることを意味している。NEPの存在を示すより直接的な証拠は、タバコの*rpoB*遺伝子をノックアウトしてできたアルビノ(白色)タバコから得られた。アルビノにおいては光合成遺伝子は転写されないが、非光合成遺伝子(*rpoB/C1/C2*, *rps15*など)は活発に転写されていた。オオムギとタバコのどちらも場合も、PEPがなくても色素体遺伝子が転写すること、すなわち核由来の色素体RNAポリメラーゼNEPによる転写が色素体で起こっていることを示している。

3. NEPの正体

研究室のKapoorとSugiuraはタバコ培養細胞

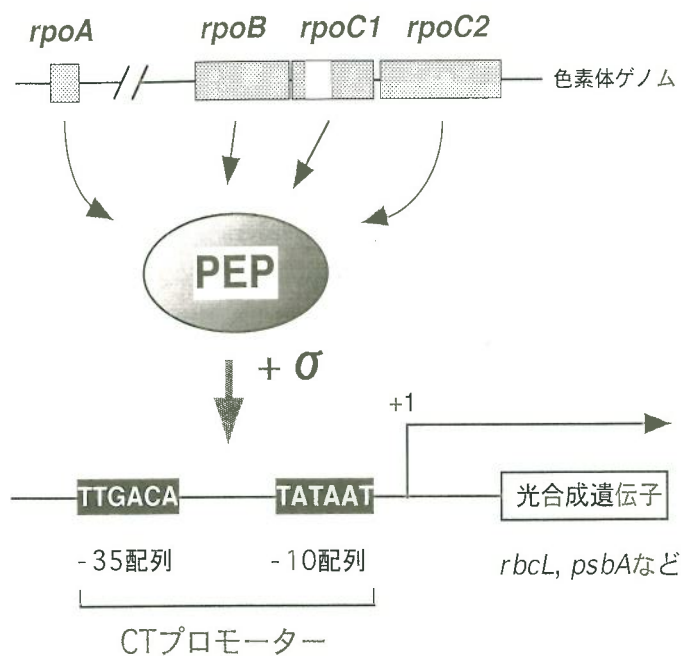


図1 色素体ゲノムのRNAポリメラーゼ遺伝子からつくられたPEPが光合成遺伝子のCTプロモーターに働き転写を行う。+1は転写開始位置を示す。

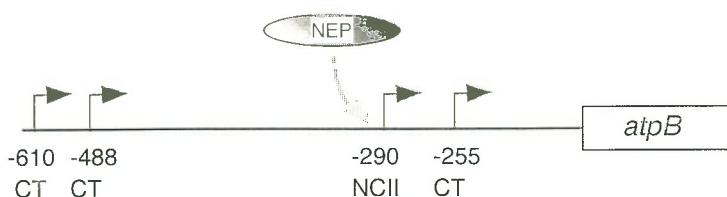


図2 色素体遺伝子*atpB*の転写開始点は4つ存在する。このうち蛋白質コード領域の上流290塩基対の位置からの転写だけがNEPによって行われる。

胞BY-2株から原色素体を純化し、NEP活性をもつ*in vitro*転写系を開発し、これを用いて転写開始点を含む40塩基対領域内のBox IとBox IIがNC II プロモーターからの転写に必須なシス配列であることを明らかにした(図3)³⁾。Box I内のYRTAコア配列は植物ミトコンドリア遺伝子のプロモーターにも存在することから、ミトコンドリアのRNAポリメラーゼと色素体NEPがお互いによく似た性質をもつことが予想される。

PEPとは異なる色素体RNAポリメラーゼとして、バクテリオファージT3やT7のRNAポリメラーゼに似た特性をもつ110 kDaのシングルポリペプチド鎖がホウレンソウで最初に報告され、さらに、出芽酵母やアカパンカ

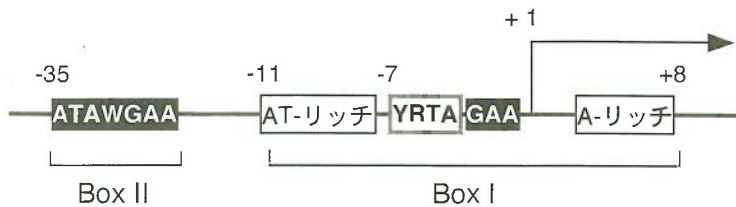


図3 NC II プロモーターの構造

びのミトコンドリアとバクテリオファージのRNAポリメラーゼと相同な蛋白質をコードするシロイヌナズナの核遺伝子が2種類単離された⁶⁾。2つの核遺伝子はオルガネラへのターゲットと輸送に働くトランジット配列をその5'領域にもっていた。著者らもタバコ属の一種 *Nicotiana sylvestris* から3種の相同配列をクローン化しそれぞれを *RpoT-A*, *RpoT-B*, *RpoT-C* と名付けた。タバコ属の *RpoT* は菌類のミトコンドリアのものと36%, バクテリオファージのものとは24%のアミノ酸が同一であった。また *RpoT-A* と *RpoT-B* の間で77%, *RpoT-C* と *RpoT-A/B* との間では65%であった⁷⁾。3つの *RpoT* のうち、*RpoT-B* だけが色素体に輸送することが確認されたので、これがNEPの有効な候補と考えられる。*RpoT-B* が実際にRNAポリメラーゼ活性を有するかどうか、NC II プロモーターを認識するかどうかについては不明である。今後、タバコ原色素体 *in vitro* 転写系を使ってこれらのことを明らかにしたい。

4. おわりに

色素体と同一起源と考えられているラン藻のゲノムには *RpoT* ホモログが存在しないことから、宿主細胞に取り込まれた原始ラン藻のRNAポリメラーゼ遺伝子を色素体ゲノムにそのまま残す一方、宿主核のRNAポリメラーゼ (NEP) 遺伝子も利用するように細胞内で共生進化してきたと思われる。NEPの存在は今のところ陸上植物の色素体に特有

の現象で、単細胞性の藻類 (クラミドモナスなど) にはその存在は確認されていない。おそらく、陸上植物の器官形成や形態形成にともない色素体も機能分化し、色素体遺伝子の転写レベルを巧みにコントロールするためNEP遺伝子を利用するようになったのであろう。

近い将来、有用遺伝子を色素体の中で発現させる「色素体遺伝子工学」の実現が予想される。このための基礎として、色素体遺伝子プロモーターの改変や、NEPによる導入有用遺伝子の転写をコントロールする発現系の組立てが望まれる。そうすれば、葉 (葉緑体) だけでなく大根 (アミロプラスト) や果実 (有色体) に有用な蛋白質を色素体を利用して大量にため込むことが可能となる。

本稿で紹介したタバコ色素体の研究は名古屋大学遺伝子実験施設杉浦研究室で行われたものである。また、本研究の遂行にあたり、農林水産省バイオテクノロジー先端技術シーズ培養研究の助成を受けた。

文献

- 1) 杉田 護 (1997) 生物と化学35,623-627.
- 2) 杉田 護他 (2000) 蛋白質核酸酵素45, 132-138.
- 3) Kapoor,S.et al. (1997) *Plant J.* 11, 327-337.
- 4) Miyagi,T.et al. (1998) *Mol.Gen.Genet.* 257, 299-307.
- 5) Kapoor,S. and Sugiura, M (1999) *Plant Cell* 11, 1799-1810.
- 6) Hess,W.R.and Börner,T. (1999) *Int. Rev. Cytol.* 190, 1-59.
- 7) 小林勇気他 (2000) 日本植物生理学会 2000年度年会要旨集p.258.

◀文献情報▶

受精とCD9との関わり

The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice

Keisuke Kaji, Shoji Oda, Tomohide Shikano, Tatsuya Ohnuki, Yoshikatsu Uematsu, Junko Sakagami, Norihiro Tada, Shunichi Miyazaki and Akira Kudo.

Nature genetics, 24: 279-282 (2000)

受精とは、配偶子（精子と卵子）の融合に始まり、雌雄前核の合体までの一連の現象である。配偶子融合は精子赤道部周辺の細胞膜と卵子微絨毛の細胞膜によって行われるが、融合するためには細胞膜同士の接着が必須である。これまで、この配偶子接着/融合に関わる分子がいくつか報告され、現在は卵子の細胞膜に発現しているインテグリンとそのリガンドとなる精子細胞膜で発現しているFertilinなどのディスインテグリンとの関係についての解析が進んでいる。一方、CD9はインテグリンや他の膜タンパク質と関係するトランスメンブラン4スーパーファミリーの一つで、様々な細胞で発現が確認されており、細胞膜上のCD9の発現の上昇によって、細胞間の膜融合を促進する事が明らかになっている。これまでの報告で、抗CD9モノクローナル抗体を感作させた卵子は精子との接触が抑制されてしまう事から、CD9が受精において何らかの役割を果たしているとされてきた。本論文では、これまでに明らかにされてきた接着/融合関連分子に加え、卵子細胞膜で発現しているCD9が配偶子の融合において重要な役割を果たしている事を報告している。

筆者らは、相同組換え技術によりCD9の exon2を欠損させたノックアウトマウス (CD9^{-/-}) を作出して実験に供した。CD9^{-/-} は雌雄ともに正常に発育した。しかし、CD9^{-/-} のオスはCD9^{+/+} およびCD9^{-/-} のメスとの交配においては繁殖性が認められたものの、CD9^{-/-} のメスはCD9^{+/+}、CD9^{-/-} いずれのオスとの交配においても不妊であった。次に、これらの卵子を用いてIVFを試みたところ、

精子の接着に関しては野生型卵子と変異型卵子とでは差は認められなかったものの、精子との融合率を比べると変異型卵子では極端に減少した。また、配偶子融合のシグナルでもある卵子のカルシウムオシレーションを調べたところ、若干の変異型卵子では確認されたが、ほとんどの変異型卵子で観察されなかった。したがって、これらのことからCD9^{-/-}メスマウスの不妊は、排卵あるいは卵成熟の欠陥によるものではなく、精子と卵母細胞とが融合できないことが原因である事が明らかとなり、卵子細胞膜で発現しているCD9が受精過程における精子-卵子融合に機能している事が示唆された。

このCD9に対する精子側のリガンドについては明らかにされていない。しかし、最近、MiyadoらやLe Naourらによっても本論文と同様の研究成果が報告されており、CD9のリガンドに関する調査およびCD9のシグナル伝達の研究は、配偶子融合過程メカニズムの分子レベルでの解明につながると思われる。また、これらの解明によって女性の不妊症治療を中心とした臨床応用や避妊ワクチンとしての応用にも期待される。

(抄訳：横尾正樹 東北大)

◀文献情報▶

*Lactococcus lactis*オリゴペプチド輸送システム結合蛋白質への変異導入と特異性の変化

Specificity Mutants of the Binding Protein of the Oligopeptide Transport System of *Lactococcus lactis*

Antonia Picon, Edmund R.S. Kunji, Frank C. Lanfermeijer, Wil N. Konings, and Bert Poolman

Journal of Bacteriology, 182: 1600-1608
Mar. 2000

乳酸菌は多くのアミノ酸を生合成により得る事が出来ない為、窒素源としての蛋白質を効率的に利用する為の蛋白質分解系を備えている。オリゴペプチド輸送体蛋白質 (OppA) はその一つとして知られ、様々な長さのペプチドの菌体内への取り込みに関与している。今回紹介する論文は*Lactococcus lactis* (*L. lactis*) ペプチド結合蛋白質について野生型と変異株の動力学諸性質を検討している。

*in vivo*での変異蛋白質の性質を観察する目的で、オリゴペプチド輸送体遺伝子(*oppA*)を*L. lactis*染色体から欠損させ、オリゴペプチド輸送機能を完全に取り去った。そして、その変異株に*oppA*を持つプラスミドを導入し発現を増幅させたところ、野生株に比べその蛋白量は8~12倍に増えた。その結果、発現の増幅によりRPPGFSPFR(ブラジキニン)結合活性は増加したが、輸送体を經由したこのペプチド全体の輸送には殆ど影響を及ぼさなかった。続いて、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium蛋白質の高次構造解析結果を参考にし、serovar Typhimuriumと*L. lactis*のOppA一次構造の比較に基づき、幾つかの部位特異的変異株を作製し、推定のペプチド結合部位に変異を導入した。全ての変異OppAは高親和性ペプチド、ブラジキニンの結合が弱い事が分かった。また、OppA変異株(D471R)を除いて、その他の変異株はブラジキニンの取り込みが大きく減少していたが、低親和性基質のKYGKの輸送は殆ど

影響を受けなかった。D471Rを発現する変異株は野生株と比べ、ペプチド輸送の*K_m*値は良く似ていたが、*V_{max}*値は2倍以上に増加していた。以上の結果から、ペプチドの菌体内への輸送は以下の4つのステップにより起こる事が考察された。1) 結合蛋白質へのペプチド結合、2) ペプチドが結合した蛋白質の膜複合体へのドッキング、3) ペプチドの膜複合体への供与、4) ペプチドの菌体内への移行。これらデータを一つの速度論モデルから議論すると、輸送の速度は、3)のステップにより決められることが示唆された。

近年、乳酸菌発酵乳中に種々の生理活性ペプチドの存在が報告されているが、それらの生成メカニズムを考察する上でオリゴペプチド輸送体の解析は重要であると考えられる。しかしながら、今回の報告では輸送体へのペプチドの結合については十分な解析がなされていたが、菌体内への移行については今後の検討を期待する。(抄訳：上野敬太 カルピス株)

◀文献情報▶

甦る植物——永遠の葉の秘密

Resurrection Plants and the Secrets of
Eternal Leaf

Peter Scott

Annals of Botany 85: 159-166 (2000)

30年以上も前にならうか。ウォルトディズニーによる「砂漠は生きている」というテレビ番組(?)があり、砂漠に生きる植物の巧妙で不思議な生の営みが描きだされていた。この時の感動が植物学への道を択ばせたと語る研究者は、決して少なくない。今回は、その不思議な植物を紹介することにする。

乾燥地域に育つ植物のあるものは、蒸散を防ぐために葉の表面積を最小にし、あるものは、体内に水を蓄える(サボテン、ユホルビア)。また、あるものは、日中気孔を閉じ、夜に炭酸ガスを取り入れる(ベンケイソウ)。だが、これらの機構は乾燥ストレスを軽減するものであっても、乾燥に耐えるものではない。ここに紹介する一連の植物群は、葉の水分の95%がなくなっても生き続け、水に会えば24時間以内に光合成を再開するResurrection plant(表題では“甦る植物”と訳したが、原題はイエスの復活と永遠性に引っかけであるようだ?)といわれる。例えば、水生植物の*Chamaeigigas intrepidus*は11ヶ月間水無でも死なない。*Craterostigma*は全くの水無でも2年は生き延び、灌水開始から、わずか2週間後には花をつける。

著者はResurrection plantの一つ*Craterostigma*を取り上げている。この植物では、灌水を中止すると17日目からクロロフィルと水分含量が急速に低下し、18日目には水分含量は僅か5—10%まで減少する。それと同時に、葉は収縮を開始し表面積は15%までに減少し、休眠にはいる。水分の減少に伴ってスクロース含量は急激に増加し、2mmole/g.dwt.と実に30倍までになる。同時に8単糖の2-オクトロースが減少することから、この化合物はスクロース合成のリザーバーとして働いていると考えられる。このスクロース

の役割としては、高分子内あるいは間の水素結合を維持することによって、細胞膜とタンパクを安定化させることにあるのではないかと考えられる。また、水分減少が始まるとアブシジン酸が増加し、種子形成の際多量に合成されるLEA(late embryogenesis abundant)タンパクも合成されることから、著者は次の経路を想定している。

乾燥→ABA合成→オクトロース分解
LEA合成
→スクロース集積→スクロース、
LEAによる細胞の保護

多くの植物はカラカラの乾燥を休眠種子あるいは孢子としてやり過ごす。が、これらの植物の葉は種子と同じ生理状態に変化することにより、“種皮のない種子”として生き延びるのかしれない。

Resurrection plantは環境適応を考える上で最適な植物であるにも拘わらず、研究はほとんどなされていず、ひょっとしたら宝の山かもしれない。アラビドプシスもいいけれど、これもおもしろい実験材料ではないだろうか。高温多湿の日本でうまく育つか、保障の限りではないが。

(抄訳：岩井純夫 鹿児島大学農学部)

◀文献情報▶

切り刻んだグリコサミノグリカン、侮り難し?!—低分子量ヒアルロン酸が動脈硬化治療薬となる可能性がある—

Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells

Evanko, S.P., Angello, J.C., Wight, T.N.

Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 19: 1004-1013 (1999)

血管平滑筋細胞 (SMC) の増殖は動脈硬化の発症や進展, さらに経皮経管的冠血管形成術 (PTCA) 後に起こる再狭窄に重要な役割を演じている。

そのため, SMCの増殖を抑制することによって動脈硬化の治療やPTCA後の再狭窄の予防を行うことができると考えられており, それをターゲットにした薬剤開発が世界中で進められている。

高分子量のヒアルロン酸 (HA) は, 溶液が高い粘弾性を示し, 生体適合性に優れていることから, 「関節炎の治療薬」や「眼科手術時に使用する薬剤」として利用されている。また, 溶液の保湿性の高さを利用して化粧品にも使われている。

今回は, SMCに対する低分子量ヒアルロン酸 (HALMW) の作用 (*in vitro*) を報告しているEvankoらの文献を紹介する。

Evankoらは, ①HAとバーシカン (コンドロイチン/デルマトン硫酸プロテオグリカンの一種) に富む細胞周辺マトリックス (HA-バーシカン・リッチ・マトリックス) をSMCが形成している ②HALMW ($\leq 3k$) 添加でHAの細胞表面への接着とマトリックス形成が阻害され, 血小板由来成長因子 (PDGF) 刺激によるSMCの増殖と移動を阻害する ③少しサイズの大きなHA (3~50k) やサイズの大きなHA (分子量不明) には作用がない ④HALMWはSMCの形態にも影響を与える (平たく広げる) という4つ

の実験結果を得た。

以上の結果から, ①HA-バーシカン・リッチ・マトリックスは, かさ高くて粘性が高いゲル様構造をつくることで細胞表面の接着性を消失させて細胞形態を変え (丸くする), SMCの増殖と移動を促進する ②HALMWは, HA-バーシカン・ゲルの構造を破壊してSMCの増殖・移動を抑制する, とEvankoらは主張している。

この文献によれば, 低分子量のHAは動脈硬化治療薬やPTCA後再狭窄の予防薬となる。

以前, 「切り刻んだヘパリン」がアルツハイマー病治療薬になるとする文献を紹介した (第73号)。HAとヘパリンは同じグリコサミノグリカン (GAG)。「切り刻んだGAG, 侮り難し」(?)。

(抄訳: 八塚信明 マルハ株)

◀海外便り▶

食品の物性はヒトの咀嚼挙動に影響するか —フランス国立食肉研究所に滞在した11か月—

農林水産省 食品総合研究所

神山 かおる

はじめに

平成9年9月から翌年7月まで、「食品物性が心理的及び生理的反応に及ぼす影響の解明」のため、科学技術庁長期在外研究員としてフランス国立食肉研究所（Station de recherches sur la viande, Institut national de la recherche agronomique: 略称SRV-INRA）に滞在した。INRAはフランスの農林省に当たる機関であり、畜産関連の研究所はフランス中央山地（Massif central）部に多い。ちょうど筑波農林団地の様に、いくつかの研究機関が一ヶ所にまとまっているが、牛や羊の放牧地の真ん中で、田舎さは筑波の比ではなかった。SRVへの通勤はINRAの通勤用バスが頼りで、残業は絶対にできない仕組みであった。

在外研究の状況

著者は食品総合研究所の食品物性研究室において、主に物理学的手法により食品の性質を研究している。米飯など多くの食品ではテクスチャーと呼ばれる、食べている時にヒトが皮膚で感じる物性がおいしさに及ぼす影響が大きい。食品物性は品質評価の面で重要なのは言うまでもなく、テクスチャーなどの感覚は、ヒトの心理や生理にも関係している。皮膚感覚を物理表現する試みは、サイコロロジーと呼ばれる分野で研究されているが、さらに生理学で用いられる手法を加えるべく、留学先を選んだ。

たまたま当時日本で高齢者のプロジェクト

KOHYAMA Kaoru

〒305-8642 つくば市観音台2-1-2



65 CLERMONT FERRAND

溶岩で作られたアンボワーズの泉（16世紀）：クレルモンフェラン市内、ミネラルウォーターで有名なボルヴィックも近い。

を持っていたので、研究テーマは高齢者の咀嚼（そしゃく）が若年者とどう異なるか、どのような食品物性が最も咀嚼挙動を変化させるか、その挙動は歯の健康状態とどう関係しているか、生理学的にどのような意義があるか、を明らかにすることを目標とした。これは、私の専門が食品物性であり、受け入れ先の研究者が生理学者であり、クレルモン・フェラン大学所属の歯科医師が参加したため、可能になったと思う。フランスで日常的に食されている食品について、高齢者と健康な若者を対象とし、食生活に関するアンケートを行うと共に、咀嚼筋筋電位及び下顎運動を同時計測した。

被験者実験は、共同研究ユニットを組んでいる大学歯学部口腔生理学研究室で行っ

た。歯学部はクレルモン・フェラン市の中心部にあるが、食品関連の文献や計算機などはINRAの方が便利に使えるため、平均してINRAと歯学部に半々ずつ通った形になる。特に大学では、毎日研究している人よりも、週に2日か3日程度研究室で仕事し、他の日は診療しているような歯科医師も多く、私も週半分勤務でも特に変わった存在ではなかった。

計測実験と基本的データの数値化をフランス滞在中に行い、統計解析はフランスの統計専門のエンジニアが助けてくれた。帰国後、電子メールをフル活用し、著者の帰国と同時に渡米した共同研究者（現在ではフランスに帰っている）と、日米仏と地球を回る電子メールでの討論を重ね、ようやく学術論文にまとまりそうになってきた。

フランス人の仕事ぶり

INRAのしくみは農水省とほぼ同じで、SRVは畜肉の流通・加工・品質を研究している。8研究部のうち、私が属したのは品質・感覚特性部であるが、レオロジー部にも物性測定等でお世話になった。部長がセンター長や所長を兼ねるため、実質研究をするのは研究員以下の職員である。部に研究者は3～5人位で、正職員のエンジニアやテクニシャンがほぼ同数いて、さらにドクターコースの学生が付いている上に、会議や書類などに一般の研究者が関わる時間は日本よりはるかに少ないため、研究効率はかなり良いと思えた。

一般にフランス人は家庭を大事にするので、給料は安くてもいつも一緒にいられるのを好む。さすがに近ごろでは昼食は職場で食べるが、夕食を家で食べないのは非常識である。一方、若くて管理職になる人などは、夜遅くまで働いているという。自分のポリシーにはこだわるが、他人の多様性を認めるという点では、彼らの考え方は大いに参考になった。

同僚のこと

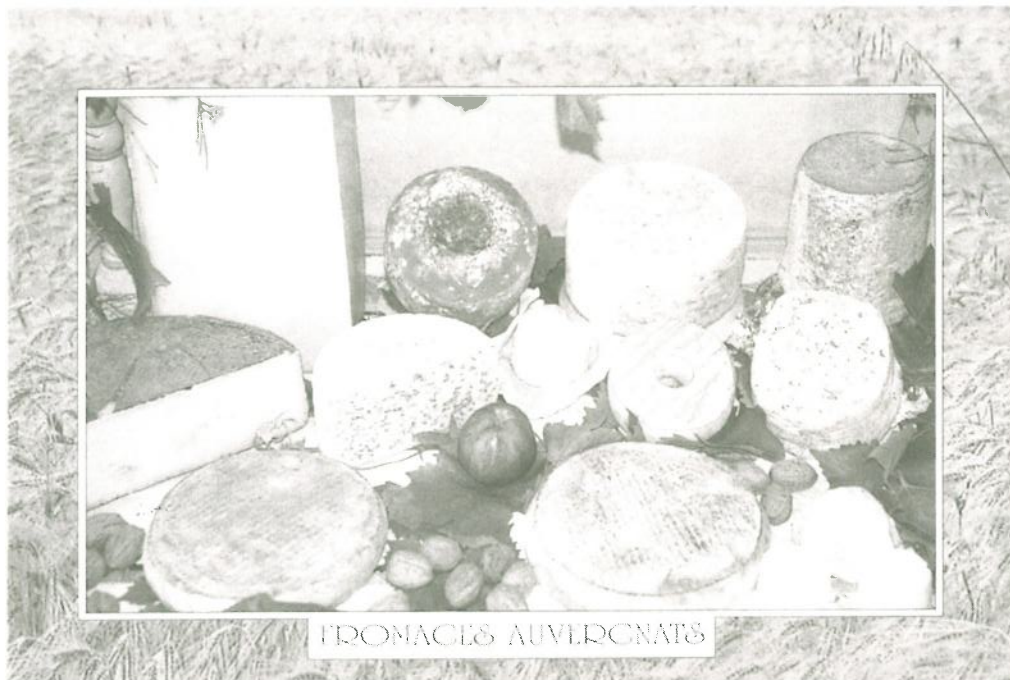
受け入れてくれたL.Mioche博士は40歳の女性で、4人の子供がいる。大学院までは神経生理学を学び、就職してから食品テクスチャー認知の研究を始めた。以後、英国との共同プロジェクトを組むなど、パイオニアとしての立場を貫いている。私の滞在中に、INRA内で博士取得後10年前後で行われる研究者としての審査があり、内外部の審査委員の前で公開の口頭試問をかなり緊張しながらこなしていた。

失業者対策もあって、フランスの公務員は勤務時間を選べる。例えば、小中学校が休みの水曜日には働かないという選択が可能で、給料は安くなり、管理職にはなれないが、子供を育てながらの研究が続けやすい。女性研究者が海外など長期出張する際に夫を含む家族を伴うことも珍しくなく、著者の滞在中でもMiocheの他にもう1組あった。

SRVではイギリス人が正職員でいた。彼は元英国公務員だったが、行政法人化にともない失職し、同分野の研究者を欲しがっていたフランスに救われたのである。フランスでは国立機関職員のうち、研究者のみは外国籍でもよいそうである。研究者の専門は狭いので、他人事とは思えない。

フランスでの生活

困ったことは言葉に尽きるが、強いて他の点を挙げるならば、フランス人の自己中心的考え方である。休暇や休憩時間は権利だから、書類がそこで1ヶ月止まってしまうのが、お客が行列していようが、休みを優先する。公営放送局がストで1ヶ月近くテレビ放送が止まったのには驚いた。私事では外国人登録証が出たのが半年後、手違いで性別男と記された身分証明書は、帰国時にもとうとう直らなかった。田舎だったこともあろうが、役場や銀行の手続き等が仏語を話さない外国人には不親切に思えたが、帰国後1年以上たった今では、そんな苦勞はほとんど忘れている。治



オーベルニュ地方特産のチーズ；手前円盤状のものがサン・ネクテール，中央半分に切ったものがブルードオーベルニュ，左奥の背の高いものがカンタル，中央右端がフォルム・ダンベール，この4つがオーベルニュの4大チーズと言われている。

安も良く、物価も安く、フランス語さえ話せば親切な人は多いし、水やチーズを代表として食べ物もおいしかったので、田舎ならではの良さも満喫できた。

おわりに

この留学先は自分で論文などを調べ、手紙を出して受け入れ先を探した。Mioche博士の年齢は会うまで知らなかったが、若そうだったので、ちゃんとしたことが学べるのかどうか、不安がないわけでもなかったが、結果的には良かった。持ちつ持たれつの関係ができたし、今後もあと20年はつきあってゆける。予算的に余裕があれば、日仏で嗜好性が異なる

食品を咀嚼させて、つまり心理的な影響によって、生理的反応の違いがあるかどうか比較研究もやってみたいと考えている。純粋な心理的方法（官能評価など）では、主観的・相対的なので同時に存在するものしか比較できないが、この留学中に取得した生体計測による方法は客観的なので、遠く離れた地域で別個に計測した数値も比べられるはずである。

長期在外研究中、研究や人生についてじっくりと考える時間がもてたお陰で、今後の自分の研究について目標となるべき物が見つかった。こころよく送り出してくれた関係各位に感謝している。



ブレイン テクノニュースの
バックナンバーご案内

第 76 号

1999 (平成11) 年11月15日発行

総 説

- 実用的な遺伝子組換えイネ品種の開発 …黒田 秋
国内情報
酵素阻害タンパク質の特徴と
その利用の可能性 ……大坪研一
イネのファイトアレキシン合成を誘導する
セレブロシド型エリシターの発見 ……岩田道顕
アブラナ属花粉アレレルゲン
一農学と医学の接点 ……鳥山欽哉・岡田 崇
穀物遠赤外線乾燥機の開発
……………久保田興太郎・日高靖之・市川友彦
地域の先端研究
植物ディフェンシン遺伝子の利用による
イネ耐病性育種 ……荘司和明
文献情報
卵巣におけるgrowth differentiation factor-9
(GDF-9)のパラクリンの利用 ……(抄訳：木村直子)

- 倍数性(Ploidy)の違いによる遺伝子発現制御
……………(抄訳：家藤治幸)
植物ゲノムの機能解析の道具：キメラRNA/DNA
オリゴヌクレオチドが*in vivo*で遺伝子特異的
変異を引き起こす ……(抄訳：小杉祐介)
エチレンは胚珠の発達を制御している
……………(抄訳：岩井純夫)
アルコール (エタノール) はインターロイキン-8
(IL-8)と腫瘍壊死因子(TNF)の産生を阻害する—
p.38経路の役割 ……(抄訳：中島 浩)
海外便り
植物分子遺伝学のモデルケース：エチレンの
生合成とシグナル伝達系 ……吉田 均
特別情報
いわゆる「ターミネーター種子」について
……………田中宏樹



ブレイン テクノニュースの
バックナンバーご案内

第 75 号

1999 (平成11) 年 9 月15日発行

総 説

- 大豆の健康機能 ……河村幸雄
国内情報
植物タンパク質由来ペプチドの生理作用 吉川正明
新規微生物発光からみた大豆の活性酵素
消去能とその応用 ……吉城由美子・大久保一良
ウナギ・レプトケファルス幼生の
人工生産 ……田中秀樹
テンサイの雄性不稔性を引き起こす
ミトコンドリア遺伝子の発現機構 ……三上哲夫
地域の先端研究
りんごの培養シュートへの放射線照射による
斑点落葉病抵抗性品種の選抜 ……齊藤 彰
文献情報

- オス体細胞クローンマウスの作出(抄訳：横尾正樹)
Lactobacillus helveticus ストレス誘導
遺伝子の解析 ……(抄訳：上野敬太)
形質転換植物による
環境汚染物質の分解 ……(抄訳：清水圭一)
外生菌根形成に関与する菌側の
遺伝子の単離 ……(抄訳：大木健広)
植物の環境ストレス (塩分, 干ばつ, 寒さ, 熱さ)
耐性を高める遺伝子 ……(抄訳：渋谷健市)
天高くサカナも肥える秋!? ヨーロッパスズキの
自発摂餌活性の年内リズム ……(抄訳：木原 稔)
海外便り
スケトウダラ仔稚魚をとりまく
食物網に関する研究 ……杉崎宏哉

編集後記

○薫風とともにブレインテクノニュース第79号をお届けします。本号の表紙には、若葉の季節に相応しく、タバコの葉の孔辺細胞の葉緑体と分裂直後の培養細胞を、名古屋大学の湯川 泰氏提供の貴重な写真で示しました。同氏のご好意に厚く御礼申し上げます。

○第79号の総説では、植物の「かたち」を制御する遺伝子を中心に、高辻博志氏（農水省農業生物資源研）に話題提供をしていただきました。また、これに関連した遺伝子操作について、塚谷裕一氏（岡崎国立共同研究機構）に執筆していただきました。

○国内情報としては、海産魚で被害甚大なウイルス病であるマダイイリドウイルス病の予防ワクチン開発について中島員洋氏（水産庁養殖研）に、昆虫腸内常在菌を利用したユニークな害虫防除法について渡部賢司氏（農水省蚕糸・昆虫農技研）に、さらに、動物や植

物の世界では周知の擬態現象が分子生物学の分野でも見出されることを中村義一氏（東大医科学研）に、植物の物質生産を担う色素体とその遺伝子工学について杉田 護氏（名古屋大）にそれぞれ紹介していただきました。

○文献情報は、横尾正樹氏（東北大）、上野敬太氏（カルピス・株）、岩井純夫氏（鹿児島大）、八塚信明氏（マルハ・株）の各位にお願いしました。

○海外便りは、神山かおる氏（農水省食品総研）に、フランス国立食肉研究所における食品の物性とヒトの咀嚼挙動の在外研究について記していただきました。

○それぞれ執筆をお願いした各研究者の方々には、お忙しい中をご協力いただき心から感謝申し上げます。

なお、本号より本誌のISSN番号を表紙に印刷することになりました。（畠山記）

本誌著作物の複写利用等について

本誌掲載の論文・記事の複写・転載等を希望される方は、執筆者ならびに生物系特定産業技術研究推進機構（生研機構）の許諾を得て行って下さい。

ブレインテクノニュース（第79号）

平成12年5月15日発行

編集兼発行者 堤 英 隆

発 行 所 生物系特定産業技術研究推進機構（生研機構）

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3丁目18番19号 虎ノ門マリビル10F

TEL. 03-3459-6565 FAX. 03-3459-6566

e-mail kikaku@tokyo.brain.go.jp

URL <http://www.tokyo.brain.go.jp/>

©Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 2000