

# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成17年9月15日発行（隔月1回15日発行）  
ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

**No.111**

15 SEPTEMBER, 2005

ブレインテクノニュース



カシノナガキクイムシ成虫



カシノナガキクイムシが排出した木屑

## カシノナガキクイムシ集合フェロモンの化学構造決定 —ナラ類集団枯死の回避を目指して—

独立行政法人 森林総合研究所

中 島 忠 一



独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構

生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）

## 目 次

## 特 集「匂いとフェロモンの科学」

- 1 匂いとフェロモン受容の分子メカニズムとその研究の現状 ..... 1  
佐藤 幸治・東原 和成 (東京大学 大学院新領域創成科学研究科)
- 2 嗅覚系における神経細胞の個性獲得と多様性識別 ..... 6  
坂野 仁 (東京大学 大学院理学系研究科)
- 3 哺乳類におけるフェロモン研究の現状と展望 ..... 10  
森 裕司 (東京大学 大学院農学生命科学研究科)
- 4 昆虫の脳におけるフェロモンと匂いの情報処理と行動発現機構 ..... 17  
加沢 知毅・岡田 公太郎・神崎 亮平 (東京大学 大学院情報理工学系研究科)

## 国内情報

- レドックス制御を包括的に解析できるジスルフィドプロテオーム  
—ポストゲノム研究の有効なツール：原理と応用— ..... 23  
矢野 裕之・黒田 秧 ((独)農業・生物系特定産業技術研究機構 作物研究所)
- 砂糖及びセルロースを原料とした酵素合成アミロースの製造と利用 ..... 27  
鷹羽 武史<sup>1</sup>・和田 守<sup>2</sup>・北村 進<sup>3</sup> (<sup>1</sup>江崎グリコ株式会社, <sup>2</sup>三和澱粉工業株式会社,  
<sup>3</sup>大阪府立大学 生命環境科学研究科)
- カシノナガキクイムシ集合フェロモンの化学構造決定  
—ナラ類集団枯死の回避を目指して— ..... 32  
中島 忠一 ((独)森林総合研究所)
- 携帯式作物生育情報測定装置の開発 ..... 36  
堀尾 光広・紺屋 秀之・西村 洋・林 和信 ((独)農業・生物系特定産業技術研究機構  
生物系特定産業技術研究支援センター)

## 地域の先端研究

- バラのアントシアニン生合成における新規糖転移酵素の発見 ..... 40  
緒方 潤・菅野 善明・鈴木 正彦 (青森県農林総合研究センター グリーンバイオ  
センター)

## 文献情報

- 搾乳牛の第1卵胞波における卵胞への血液供給量の変化 ..... 45  
T. J. Acosta et al. (*Journal of Reproduction and Development*, 51, 273-280, 2005)  
抄訳：下司 雅也
- ブルーティラピア (*Oreochromis aureus*) の性別を支配する二つの非連鎖遺伝子座 ..... 46  
B-Y. Lee et al. (*Heredity*, 92, 543-9, 2004) 抄訳：Chen Weimin
- DC-SIGNを介した樹状細胞の機能調節によりIL-10を産生する調節性T細胞を誘導する乳酸菌 ... 47  
Smits HH. et al. (*J. Allergy Clin. Immunol.*, Jun ; 115(6): 1260-7, 2005) 抄訳：野中 敦子
- 花成ホルモン発見か? ..... 48  
M. Abe et al. (*Science*, Vol 309, Issue 5737, 1052-6, 12 August, 2005) 抄訳：岩井 純夫

- 生研センターからのご案内 (アグリビジネス創出フェア開催のお知らせ) ..... 49

## 表紙の説明

カシノナガキクイムシは、植物病原菌を媒介して生きたミズナラ等を集中的に加害し、ナラ類の集団枯死を引き起こしている。筆者は、集中加害発生に重要な役割を果たしているカシノナガキクイムシ集合フェロモンの化学生態学的研究を行い、その化学構造と野外での誘因活性を明らかにした。今後は、防除技術への利用が期待される。詳細については、32頁をご覧ください。

◀特集▶「匂いとフェロモンの科学」1

## 匂いとフェロモン受容の分子メカニズムとその研究の現状

東京大学 大学院新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 分子認識化学分野

佐藤幸治・東原和成

昆虫や脊椎動物の匂いおよびフェロモン受容体の機能解析を行った結果、嗅覚器における受容体レベルでの分子認識メカニズムが明らかになった。それらは、動物が外界に存在する数十万もの化学物質を認識するために進化させてきた、究極の化学センサーの分子基盤をなすものである。

## 1. はじめに

動物が生存し繁殖により世代交代を続けていく上で、外界に存在する様々な化学物質を認識するメカニズムは、餌や配偶者の確保に直接つながる必要不可欠な外界の認知能力である。水棲動物や昆虫を含め、ほとんどの動物では嗅覚という優れた化学センサーを持ち、多種多様な外界の化学物質を識別している。この嗅覚器が識別する化学物質が「匂い」と呼ばれ、主に分子量300くらいまでの揮発性分子で構成される。また、嗅覚器は匂い以外にフェロモンも識別できる。フェロモンは同種他個体から放出され、受け手に生理学的または行動学的な反応を引き起こす物質である。匂いと比べてフェロモンはまだその大部分がベールに包まれているが、最近の昆虫フェロモン受容体<sup>10)</sup>とマウス性特異的ペプチドの発見<sup>6)</sup>は、動物が進化させてきた嗅覚を介した巧みなケミカルコミュニケーションの世界を照らすスポットライトである。

## 2. 脊椎動物における匂いやフェロモンの受容体

多くの脊椎動物では嗅覚器は2つの感覚系、

SATO Koji, TOUHARA Kazushige

〒277-8562 千葉県柏市柏の葉5-1-5

東京大学新領域生命棟201

すなわち主嗅覚系と鋤鼻神経系で構成されており、主に前者が匂いの受容に、後者がフェロモンの受容に関わっている(図1左)。主嗅覚系は嗅上皮と主嗅球で構成され、匂い受容は嗅上皮に存在する嗅細胞が担い、一次中枢である主嗅球へと匂いシグナルを伝達する。鋤鼻神経系は鼻腔の下部に存在する鋤鼻器官と副嗅球で構成され、鋤鼻器官の感覚上皮に存在する鋤鼻神経細胞がフェロモンシグナルを副嗅球へ伝達する。鋤鼻器官は動物が陸生へと進化する過程で出現したと考えられているが、鳥類やヒトでは退化している。

匂いやフェロモン分子がこれらの器官で識別される最初のステップは、各器官の感覚上皮で発現している特定の匂い受容体またはフェロモン受容体との結合である<sup>7)</sup>。外界認識を嗅覚にあまり依存しないヒトでは匂い受容に関わる嗅覚受容体はおよそ350個であるのに対し、他の哺乳類には約1000個存在し、遺伝子の中で最も大きなファミリーを形成している。これらの匂い受容体の一部は鼻以外に脳、舌、精巣などにも分布しその役割は不明な点が多いが、筆者等のグループにより精巣で発現する匂い受容体は卵と精子との受精時のケミカルコミュニケーションに関与する可能性が示された<sup>2), 13)</sup>。一方、鋤鼻器にはフェロモン受容体が存在し、主嗅覚器とは異なる分子メカニズムによってフェロモンシグナルを高次へ伝えると考えられている。

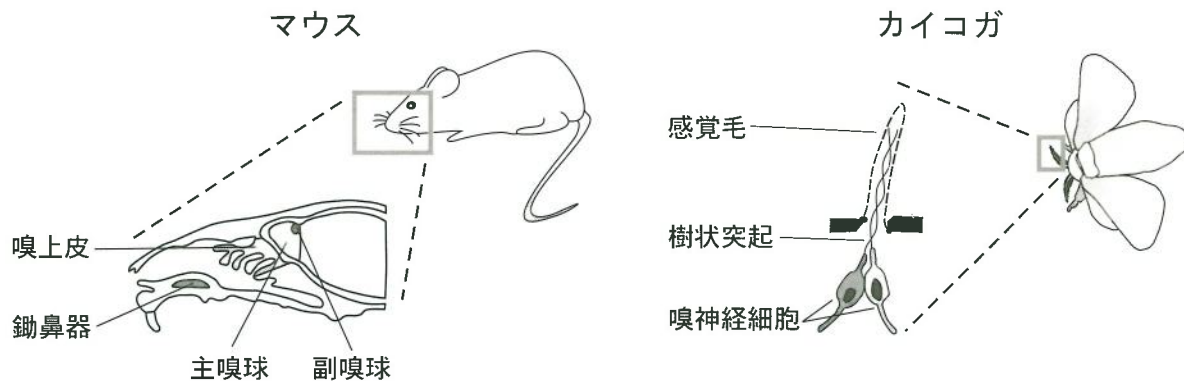


図1 脊椎動物（マウス）および昆虫（カイコガ）の嗅覚器

マウスの場合、フェロモン受容体はおよそ200個あると考えられており匂い受容体より遥かに少ない。フェロモン受容体のリガンド、つまりフェロモンのほとんどはまだ同定されていないが、哺乳類では非揮発性のペプチド分子がその候補物質として有力視されている<sup>6), 14)</sup>。これらの匂いおよびフェロモンの受容体群はそのアミノ酸配列の違いから主嗅覚器に分布する匂い受容体はOR型、犁鼻器に分布するフェロモン受容体はV1RおよびV2R型と呼ばれている。興味深いことに個々の嗅細胞、または犁鼻神経細胞にはそれぞれこれらの受容体のうちただ一つしか発現しておらず、この1細胞1受容体の発現様式が匂いやフェロモン識別の分子基盤をなしている<sup>12)</sup>。

このように匂い受容体は多数存在し、また匂い物質も無数に存在するので受容体と匂い分子の対応関係、およびその結合メカニズムはほとんどわかっていなかった。この問題に対して、我々のグループではクローブ臭の主成分であるオイゲノールを受容するmOR-EG受容体を同定し<sup>4)</sup>、生化学的手法、計算科学的手法、そして遺伝子改変技術を駆使してmOR-EGと匂い物質との結合解析を進めている。現在までに、匂い分子は受容部位のアミノ酸残基との疎水的相互作用で認識されていることが明らかとなった<sup>5)</sup>。この知見に基づき、匂い分子と結合するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換することで、mOR-EGのリガンド親和性を予測通り変

化させることにも成功した<sup>5)</sup>。このような受容体の改変技術は、創薬分野などで要求される特定のリガンドを認識する分子のデザインへの応用につながると期待され、今後、多様な分子と結合できる匂い受容体は分子認識メカニズムの解明のためのよいモデルとなるだろう。

受容体に匂いやフェロモンが結合するとGタンパク質を介して嗅上皮ではアデニル酸シクラーゼが、犁鼻器ではホスホリパーゼCが活性化され、それぞれcAMP、イノシトール3リン酸やジアシルグリセロールが合成される。これらの物質は嗅細胞や犁鼻神経細胞に存在する特定のイオンチャネルを開口させナトリウムイオンやカルシウムイオンの細胞内流入を引き起こし、細胞膜を介した電位変化が生じる。この変化はさらに膜電位を感知するイオンチャネルによって活動電位に変換され、匂いやフェロモンのシグナルを中枢へ伝える<sup>7)</sup>。このプロセスは嗅覚トランスダクションと呼ばれ、様々な生化学的生理学的な反応と変化を伴う複雑な分子メカニズムで構成されている（図2）。従って、受容体の詳細な機能解析には、匂い刺激によって起きる各酵素反応やイオンレベル、電気信号などの正確な定量が要求される。フェロモン研究ではフェロモンが個体に及ぼす作用との関連が重要であるので、今後ゲノムデータベースなどの遺伝子情報と個体レベルの知見を結びつける学際的なアプローチが発展の鍵となるだろう。

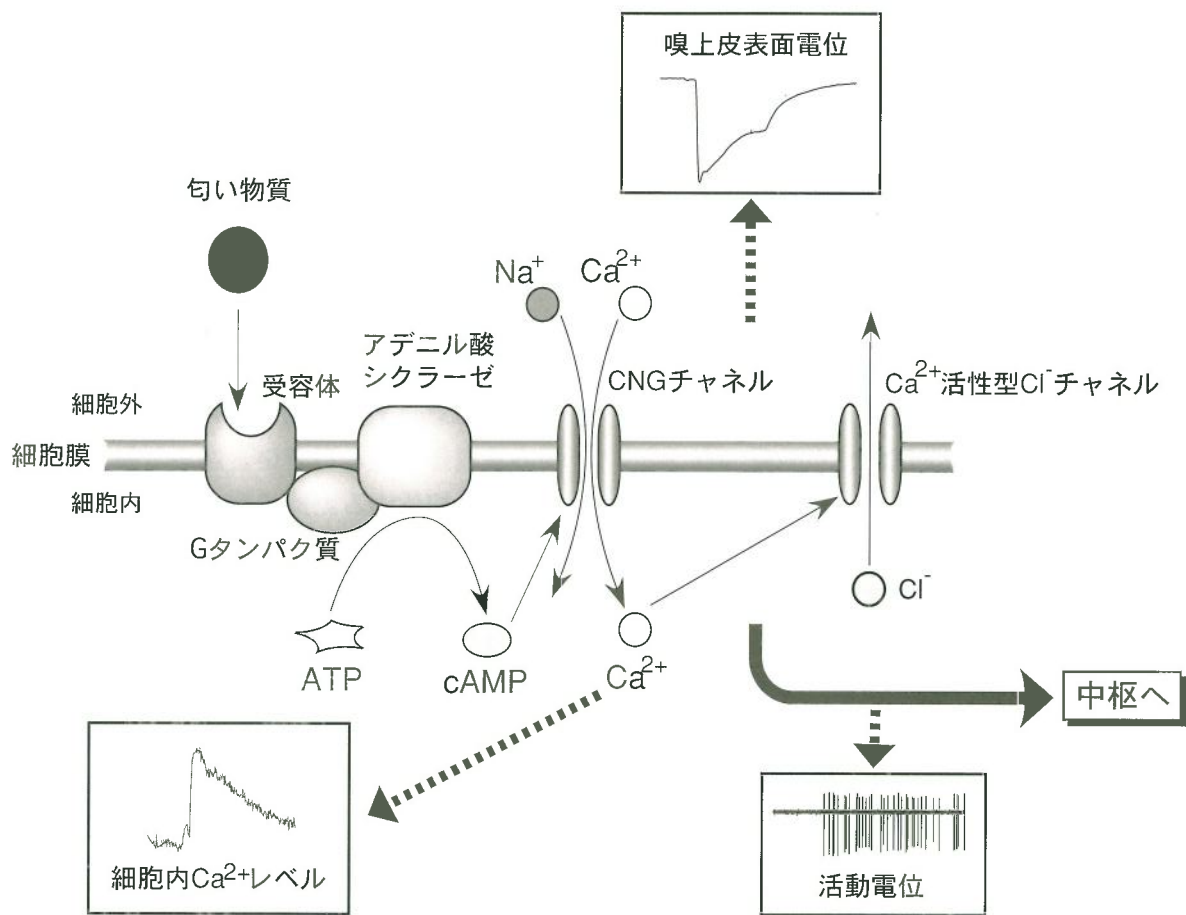


図2 匂いの信号が中枢へ伝わるメカニズムと匂い応答

### 3. 昆虫における匂いやフェロモンの受容体

脊椎動物と異なって昆虫では触角に生える数万の感覚毛が嗅覚器の役割を果たしている(図1右)。個々の感覚毛は一般的な匂い物質かフェロモンのどちらかを受容し、従って、昆虫でも哺乳類同様匂い物質とフェロモンは異なる細胞で認識されている。しかし匂い受容体の数は脊椎動物より遥かに少なく、ショウジョウバエで高々60個程度でしかない。これらの受容体は、各感覚毛の根幹部に存在する2つの嗅細胞それぞれで一種類ずつ発現している。嗅覚受容体ファミリーのOr83bは広範囲の嗅細胞に発現しており、排他的に発現しているもうひとつの受容体と複合体を形成することで初めて匂い応答が

生じることから、嗅細胞が受容する匂い物質はOr83b以外のもう一つの受容体のリガンド特異性によって決定される。つまり昆虫でも脊椎動物同様、1細胞1受容体のルールに従って匂い識別が行われると考えられている<sup>1)</sup>。ショウジョウバエは遺伝子操作がしやすいことから、既に各匂い受容体を受容する匂い物質の網羅的解析が行われその結果、個々の嗅細胞が受容できる匂いとその匂いに対する個体の反応(摂食や忌避など)は発現している受容体によって決定されることが確かめられた。つまり受容体が単に匂い物質の受け手としてだけでなく、発現している細胞の機能を決定づける機能も持っていることが示された<sup>2)</sup>。

哺乳類では鋤鼻器官で発現している遺伝子の解析によりフェロモン受容体が発見されたが、

昆虫ではフェロモン受容感覚毛だけを分離して分子生物学的に受容体を同定する術がなかった。ところが昆虫のフェロモン受容体は最近、フェロモンの発見から実に50年を経て筆者等と共同研究のグループにより発見された<sup>10)</sup>。この受容体BmOR1はオスカイコガ触角特異的に発現し、メスから放出されオスのフェロモン行動を誘発する性フェロモンであるボンビコールを高感度かつ高い選択性で受容する。さらにボンビコールの酸化物で抑制的な作用を持つボンピカルに対する受容体BmOR3も発見され、これらの受容体が一つの感覚毛の一对の嗅細胞にそれぞれ排他的に発現していることが明らかになった<sup>8)</sup>。また、受容体がフェロモンに対して感度よく応答するためにはOr83bファミリーに属するBmOR2が必要であることから<sup>8)</sup>、昆虫の匂いやフェロモンに対する応答メカニズムは脊椎動物と異なって受容体複合体形成が重要であると考えられており、現在世界中の研究グループがその機能の詳細解明に向けてしのぎを削っている。

#### 4. 受容体レベルにおける匂いとフェロモン認識メカニズムの違い

このように昆虫から脊椎動物まで、一般的な匂いとフェロモンの認識にはそれぞれ異なる分

子メカニズムが働いているが、受容体レベルでの匂いとフェロモンの識別メカニズムには各受容体がどのぐらいの数のリガンドと結合できるか、ということが大きく関与している(図3)。匂い識別の場合、昆虫<sup>3)</sup>でも脊椎動物でも<sup>4)</sup>一つの匂い受容体は複数の匂い物質と結合でき、また一つの匂い物質は複数の受容体を活性化する。その結果、個々の匂い分子は複雑な受容体活性化パターンを生み出し、高々1000個程度の受容体群で数十万種とも言われる多様な匂い物質の識別を可能としている。また匂い物質は受容体を活性化するだけでなく、受容体の働きを阻害するアンタゴニストとしての作用も持つ<sup>9)</sup>。自然界ではほとんどの場合匂いは単一の匂い分子ではなく、数百もの分子の混合臭として受容されるので、匂い物質により活性化される受容体コードとアンタゴニストによるそのコードの修飾作用が、無数と言ってよいほど存在する匂いの識別を可能とする多様性メカニズムの分子基盤とあってよい(図3左)。

これに対してフェロモン受容体とそのリガンドの対応関係は全く異なっている。哺乳類では、個々の鋤鼻神経細胞は一つのフェロモンを特異的に受容し、また特定のフェロモン識別には特定の受容体が関与している<sup>6)</sup>。哺乳類のみならず、魚類でも個々のフェロモン受容細胞は一つのフェロモンに対して特異的に応答する<sup>11)</sup>。ま

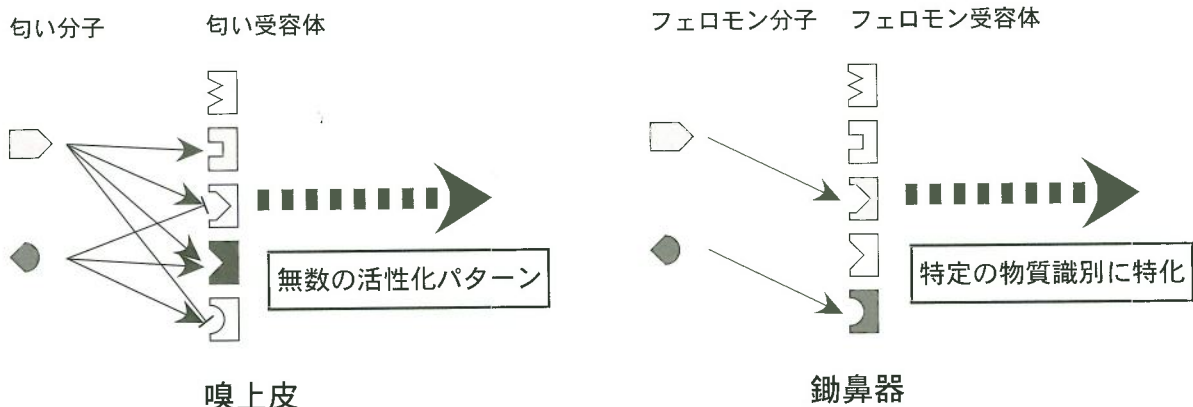


図3 受容体レベルでの匂いとフェロモン認識の模式図

匂い受容体と匂い分子は多対多の複雑な対応関係にあるが、特定のフェロモンは特定のフェロモン受容体で認識される。

た、先述のように昆虫のフェロモンは高感度で特異的な受容体を持つフェロモン受容に特化した嗅細胞が担う。そしてこれらのフェロモン受容細胞、または受容体は、嗅細胞と比べて非常に低いリガンド濃度で活性化される。このように匂い識別における多対多という多様性を生み出す受容体とリガンドとの対応関係はフェロモン識別では存在せず、フェロモン識別の分子基盤はきわめて高感度な一対一対応の受容体とリガンドの線形性である（図3右）。匂いと異なってフェロモンは微量で作用しその組成も単純であり、また個体の世代交代と直接関与することから、このような高選択性・高感受性を兼ね備えたフェロモン受容体は進化の過程で獲得した優れた形質のひとつであろう。

## 5. おわりに

近年のゲノムプロジェクトの進行により、多くの匂いやフェロモンの受容体遺伝子が明らかにされてきているが、大部分の受容体そのものはリガンド未知のオーファン受容体である。特にフェロモン受容体の場合、リガンドそのものがほとんど同定されていない。我々は生化学、分子生物学、生理学など様々なアプローチを用いてこれらの受容体の機能解析を行い、嗅覚器の持つ分子認識メカニズムを明らかにしつつある。人間にとって嗅覚は忘れ去られた感覚とされ、その重要性はあまり理解されていないが、嗅覚研究を通してこの巧妙な分子メカニズムに支えられた匂い環境の重要性を訴えていきたいと考えている。

一般的にセンサーには幅広いダイナミックレンジと優れた感度が必要だが、その両立は伝達する信号量の指数関数的な増加を招く。嗅覚器はその相反する要求に対応すべく外界の多様性

の認識に匂い受容機構を、正確で高感度な検出器としてフェロモン受容機構を持ち、それぞれ受容体のリガンドレパートリーに基づいた異なる認識メカニズムを用いている。このような二つの機能的側面をもつ嗅覚器は、動物が獲得した究極の化学センサーと言えるだろう。

## 文献

- 1) Dahanukar, A. et al. (2005), *Curr. Opin. Neurobiol.*, 15, 423-430.
- 2) Fukuda, N. et al. (2004), *J. Cell. Sci.*, 117, 5835-5845.
- 3) Hallem E. A. et al. (2004), *Cell*, 117, 965-979.
- 4) Kajiya, K. et al. (2001), *J. Neurosci.*, 21, 6018-6025.
- 5) Katada, S. et al. (2004), *J. Neurosci.*, 25, 1806-1815.
- 6) Kimoto, H. et al. (2005), *Nature*, in press.
- 7) Mombaerts, P. (2004), *Nat. Rev. Neurosci.*, 5, 263-278.
- 8) Nakagawa, et al. (2005), *Science*, 307, 1638-1642.
- 9) Oka, Y. et al. (2004), *EMBO J.*, 23, 120-126.
- 10) Sakurai, T. et al. (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 16653-16658.
- 11) Sato, K. et al. (2003), *Fish Physiol. Biochem.*, 28, 277-278.
- 12) 芹沢尚ら (2004), 蛋白質 核酸 酵素, 49, 1403-1412.
- 13) Spehr, M. et al. (2003), *Science*, 299, 2054-2058.
- 14) Stowers, L. et al. (2005), *Neuron*, 46, 699-702.

◀特集▶「匂いとフェロモンの科学」2

## 嗅覚系における神経細胞の個性獲得と多様性識別

東京大学 大学院理学系研究科 生物化学専攻  
坂野 仁

嗅覚、味覚、フェロモン受容などいわゆるケモセンシングは、様々なリガンドの構造を多様な受容体によって識別するという点で、免疫系の抗原識別に類似している。また、個々の嗅神経細胞が一種類の受容体遺伝子を相互排他的に発現するという点でも、リンパ球における抗原受容体遺伝子の対立形質排除 (allelic exclusion) に酷似している。本稿では、嗅覚受容体遺伝子の単一発現とそれに基づく軸索投射について最近の進歩を紹介する。

### 1. はじめに

匂いや味、フェロモンなど化学情報の受容は、餌となる物質への誘引、危害を及ぼす物質からの忌避、異性や個体の識別など、動物の生存にとってきわめて重要な役割を担う<sup>1)</sup>。これを反映してケモセンサリーレセプターの遺伝子は、マウスの場合全ゲノムの数%を占め、免疫系の抗原受容体遺伝子をはるかにしのぐ最大の多重遺伝子ファミリーを形成している<sup>2)</sup>。一方基質についてもその種類は多様で、特に嗅覚系の場合、匂い分子の構造決定基は数万種類以上あるとされ、個々の匂いが複数の匂い分子の組み合わせ及び量比によって規定されていることを勘案すると匂いの種類はほぼ無限とってよい。従って、せいぜい1,000種類前後の嗅覚受容体 (odorant receptor: OR) を用いていかにして多様な匂いを識別出来るのかが、嗅覚研究における大きな謎であった。

ヒトやマウスの嗅覚系では、鼻腔の嗅上皮に約1,000万個ある嗅神経細胞 (嗅細胞) のそれぞれが、一種類のOR遺伝子を相互排他的に発現しており、抗原受容体遺伝子に見られる様な対立形質排除も認められる<sup>3)</sup>。また、同じ種類の受容体を発現している嗅細胞の軸索は、互いに収斂しながら嗅球へと向かい、OR分子の種類に対応した特定の糸球へと投射する。従って、

嗅球表面にはちょうど1,000個の糸球を素子とする電光掲示板のように濃淡を含む発火のパターンが形成され、この二次元画像によって脳は匂いの種類を識別していると考えられている<sup>4)</sup>。この匂い情報の二次元展開という重要なプロセスの基礎をなすのが次の2つのルール、即ち、各嗅細胞あたり一種類のOR分子が発現されるという1神経細胞・1受容体ルールと、ORの種類に対応して投射先が決まるという1糸球・1受容体ルールである。

### 2. 嗅覚受容体遺伝子の単一発現

哺乳類の嗅覚系では、個々の嗅細胞が発現するOR遺伝子は厳密に一種類で、たとえ同種のOR遺伝子が複数存在する場合にも、単一発現が厳密に守られている<sup>5)</sup>。このようなユニークな多重遺伝子の発現制御は、これまで抗原受容体遺伝子以外には報告されておらず、遺伝子再構成の可能性もからんで、人々の注目を集めてきた<sup>6)</sup>。またこのOR遺伝子の単一発現は、嗅細胞の嗅球への投射がORの種類に依存して生じることから、匂い情報の二次元変換の基礎となっている。OR遺伝子の再編はOR遺伝子の単一発現制御や多様性識別の観点から、OR遺伝子の発見以来議論されてきたが、これについては近年、筆者らによるFISH解析<sup>7)</sup>や、その後2つのグループから報告されたクローンマウスの実験<sup>8, 9)</sup>によってその可能性が否定された。

SAKANO Hitoshi

〒113-0032 東京都文京区弥生2-11-16



それでは一体何がORの単一発現を保障しているのでしょうか。筆者らは、第14番染色体に位置するOR遺伝子MOR28を含むクラスターにローカス制御領域（LCR）を見出し、ヒトの視覚系とのアナロジーから、LCRが各クラスターにおけるOR遺伝子の相互排他的発現を保障しているとの考えを提出した<sup>10)</sup>（図1）。即ちLCRに形成される転写活性化複合体が1つのプロモーターと物理的に相互作用することにより、各クラスターにおける単一OR遺伝子の活性化が保障されると考えるのである。このLCRによるクラスターを介したORプロモーターの活性化は、OR遺伝子の同時活性化のリスクを大幅に下げるという意味で、ORの単一発現制御に大きく寄与している可能性がある。このプロセスはLCRが1つのOR遺伝子をランダムに、しかし相互排他的に選択するものであり、最初に相互作用したプロモーターがLCRをトラップすることになる。但し、複数のLCRもしくは遺伝子クラスターの間には活性化の段階で排他性がないと

すれば、早晚、別のクラスターのLCRが活性化され、その支配下にあるOR遺伝子が新たに発現するようになる。従って、ORの偽遺伝子が選択された場合には遺伝子活性化の試みは継続される必要があるが、ひとたび機能的OR分子が発現された場合には、他のORクラスターの活性化の試みは直ちに中止されなければならない。我々はOR分子そのものに、他のOR遺伝子の新たな活性化を阻止するフィードバック機能があるのではないかと考えた<sup>10)</sup>。事実、コーディング領域を欠失させたOR遺伝子や、フレームシフト型の偽遺伝子を選択した嗅細胞では、別のOR遺伝子が共発現しており、フィードバック制御の考え方が支持された。ではこの負の制御の実態はどのようなものなのであろうか。抗体遺伝子の対立形質排除の場合、プレB細胞で重鎖が発現すると、それにSykファミリーのチロシンキナーゼがリクルートされ、それによってリン酸化を受けるタンパク因子が重鎖遺伝子座のクロマチン構造を閉じる方向に働くと考

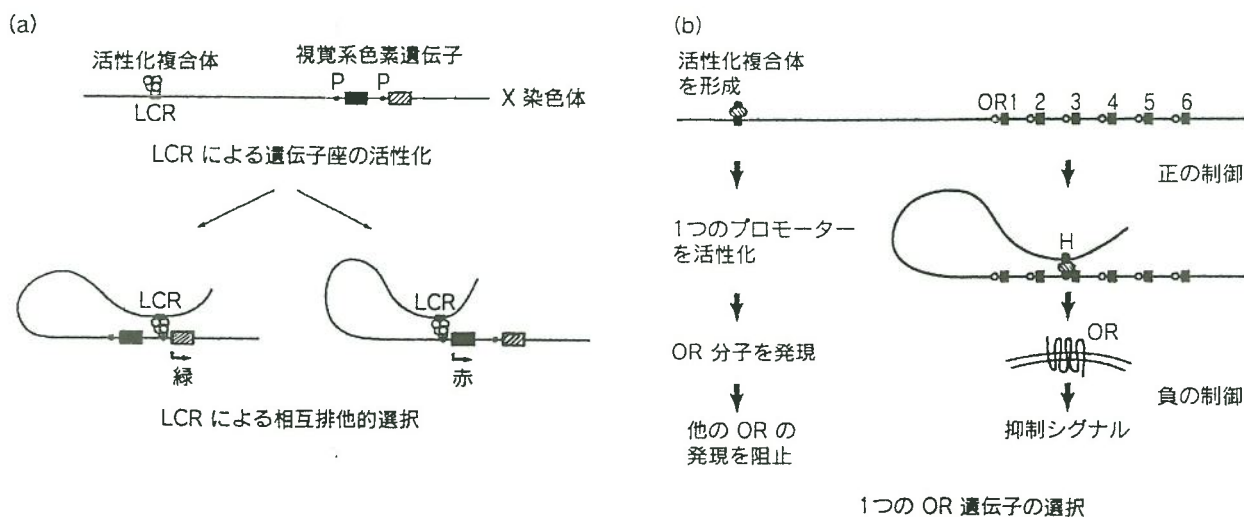


図1 LCRによる多重遺伝子の相互排他的発現制御

(a) ヒト視覚系色素遺伝子の単一発現。ヒトの錐体細胞では、遺伝子重複によって生じたと思われる赤と緑の色素遺伝子のいずれか一方が相互排他的に発現する。この制御には上流に位置するLCRが関わり、LCRに形成される遺伝子活性化複合体が、赤か緑のどちらの色素遺伝子のプロモーター（P）と結合するかでその排他的選択が行われる。(b) 嗅覚受容体遺伝子の単一発現。LCRであるH領域には転写活性化複合体が形成されると予想され、これがその制御下にある複数のプロモーター（○）の1つと会合して、1つのOR遺伝子を活性化する（正の制御）。但し、OR遺伝子のクラスターは複数あるので、ひとたびOR遺伝子が機能的に発現した場合、直ちに他のクラスターの活性化を阻止する必要がある。筆者らはOR分子が何らかの形でフィードバックインヒビターとして働くと考えている（負の制御）。

えられている。嗅覚系においても、機能的ORの発現がLCRの活性化に関わる因子を不活化する、もしくは未成熟嗅細胞の分化を進めて新たなLCRの活性化を起こらなくする等の可能性が考えられる。ORを介したフィードバックシグナルの実態やターゲット分子の解明は、今後明らかにされるべき課題として残されている。

### 3. 嗅覚受容体の種類に依存した軸索投射

次に、もう1つの基本ルールであるORによって指令的に生じる軸索の投射、即ち投射におけるOR分子の役割について考えてみよう。嗅細胞軸索の嗅球への投射について、dorsal/ventral (D/V) 軸に関しては、嗅上皮における嗅細胞の位置情報が主要なパラメーターとなっていることが知られている。しかしながら、anterior/posterior (A/P) 軸に関しては、OR分子がどのような形で投射に関与しているのかについて殆ど理解されていない。

#### (1) D/V軸に沿った投射位置の決定

筆者らのグループでは最近、様々なOR遺伝子のプローブを用いて嗅上皮切片の*in situ*ハイブリダイゼーションを行った<sup>11)</sup>。これまで、嗅上皮はORの発現パターンによって4つのゾーンに分けられ、各OR遺伝子はこれら4つの内どれか1つのゾーンで均一に発現すると言われてきた<sup>12, 13)</sup>。今回行った筆者らの解析では、魚類のORに相似性の高いOR遺伝子(クラスI)はゾーンIに局限して発現するものの、揮発性リガンドに対して進化したOR遺伝子(クラスII)についてはかなり事情が異なっていることが判明した。即ち、クラスII OR遺伝子の発現領域は、これまでの4つのゾーンに必ずしも適合しないのである。言い換えれば、個々のORは嗅上皮のdorsomedial/ventrolateral (DM/VL) 軸に沿ってそれぞれに固有な発現領域を持ち、それらは互いに連続的かつ重複して分布している。次に、これらORの嗅上皮に

おける発現領域と、そこに分布する嗅細胞の嗅球における軸索投射先を調べるため、DiIを用いて嗅細胞軸索の逆行染色を行った<sup>14)</sup>。具体的には、嗅球上の様々な場所で糸球の切断面をつくり、そこに色素を置いて軸索を介して逆行させ、嗅上皮にある細胞体を染め出すのである。その結果、嗅球上での糸球の配置とそこに投射してくる嗅細胞の嗅上皮における位置との間には、嗅球のD/V軸に沿った強い相関のあることが判明した。即ち、嗅細胞の嗅上皮での位置がその軸索投射におけるD/V軸のパラメーターになっているように思われる。現在、嗅細胞の嗅上皮における位置情報がOR遺伝子の選択にどう働いているのか、また嗅球における軸索の投射位置の決定にどう反映されているのかについては不明な点が多い。今回得られた知見は、個々のOR遺伝子にそれぞれ固有な発現ゾーンのあることを示すのみならず、嗅細胞におけるOR遺伝子の選択が、これまで考えられていたほどランダムに起こるものではなく、嗅細胞の嗅上皮での位置にかなり強く拘束されうること示唆している。

#### (2) A/P軸に沿った投射位置の決定

次にA/P軸に沿った軸索投射のパラメーターであるが、筆者らはGタンパク質を介して入力されるシグナルの強さがこのプロセスに関わる可能性について検討した。これまでいくつかのグループにより、Golf, ACIII, CNG-A2のノックアウトが行われ、これらマウスにおいて嗅細胞の軸索投射が正常に起こることから、匂いの刺激が嗅細胞の投射位置の決定に関与する可能性は低いとされてきた<sup>14)</sup>。筆者らのグループでは、OR分子においてGタンパク質との共役に必要な部位(DRYモチーフ)を変異させると二次ニューロンとのシナプス形成が行われなくなり、伸長してきた軸索が嗅球の糸球層手前で停止すること、またこの表現型は幼若嗅細胞に発現する、Golfとは異なるGタンパク質の恒常活性型変異体によってレスキューされることを見出した(今井ら、投稿中)。更にこのGタン

パク質の活性を変動させると嗅細胞の軸索投射位置がA/P軸に沿って変化する。これらの結果はGタンパク質を介して入力されるシグナルの強度が嗅細胞の投射位置の決定に関与する可能性を示唆している。

### (3) OR分子の種類に依存した軸索の選別・収斂

次に、投射過程にある軸索は、どのようにして発現するORの種類を基準に、自己・非自己を識別しているのでしょうか。我々は以前、OR分子における一アミノ酸残基の違いが軸索の収斂・選別に影響を与え糸球構造を分けうることを報告した<sup>7)</sup>。ではこの一アミノ酸残基の差という嗅細胞のidentityの違いが軸索収斂にどう影響しているのでしょうか。この問題にアプローチするには特定のORを発現する均一な細胞集団を必要とするが、嗅細胞のモノクローン株は今のところ存在しない。筆者らのグループでは特定のORのミニジーンに前述のLCRを接続し、その発現頻度を百倍以上高めたトランスジェニックマウスを作成した<sup>5)</sup>。このマウスの嗅上皮からmRNAを調製し、発現遺伝子のプロフィールを野生型マウスと比較したところ、各ORに固有な転写量を示す複数種類の細胞接着及び軸索ガイダンス分子のあることが見出された(芹沢ら、投稿中)。筆者らは、これら遺伝子の発現プロフィールが、OR分子の種類によって規定される嗅細胞のidentityとして軸索末端に表現されていると考えている。

## 4. おわりに

OR遺伝子の発見以来、ORで規定される嗅細胞の個性がどのように獲得され、それが軸索の収斂・投射にどう反映されるのかは長い間の課題であった。嗅細胞の軸索の選別に関しては、OR分子の種類に連動した細胞接着分子や軸索ガイダンス分子の発現量が、嗅細胞の個性として軸索末端に表現される可能性が出てきた。嗅球のD/V軸に沿った投射位置の決定には、嗅

細胞の嗅上皮におけるDM/VL軸に沿った位置がパラメーターとして働き、これを介して間接的に、OR分子の種類とD/V軸に沿った投射位置が関連付けられていることが示された。また嗅球のA/P軸に沿った軸索投射については、ORやGタンパク質を介して入力されるシグナルの強さが投射位置の決定に関与する可能性が出てきた。

以上述べたように、嗅細胞の軸索投射におけるneuronal identityの実態が、投射のD/V軸、A/P軸、軸索の選別・収斂などそれぞれの観点から明らかにされつつある。

## 文 献

- 1) Axel, R. (1995), *Sci. Am.*, 273, 154-159
- 2) Buck, R. and Axel, R. (1991), *Cell*, 65, 175-187
- 3) 芹沢尚ら (2004), *蛋白質 核酸 酵素*, 49, 1403-1412
- 4) Mori, K. et al. (1999), *Science*, 286, 711-715
- 5) Serizawa, S. et al. (2000), *Nature Neurosci.*, 3, 687-693
- 6) Serizawa, S. et al. (2004), *Trends in Genetics*, 20, 648-653
- 7) Ishii, T. et al. (2000), *Genes to Cells*, 6, 71-78
- 8) Li, J. et al. (2004), *Nature*, 428, 393-399
- 9) Hochedlinger, K. et al. (2002), *Nature*, 415, 1035-1038
- 10) Serizawa, S. et al. (2003), *Science*, 302, 2088-2094
- 11) Miyamichi, K. et al. (2005), *J. Neurosci.*, 25, 3586-3592
- 12) Ressler, K. et al. (1994), *Cell*, 79, 1245-1255
- 13) Vassar, E. et al. (1994), *Cell*, 79, 981-991
- 14) Reed, R. R. (2003), *Curr. Opinion Neurobiol.*, 13, 482-486

◀特集▶「匂いとフェロモンの科学」3

## 哺乳類におけるフェロモン研究の現状と展望

東京大学 大学院農学生命科学研究科  
森 裕 司

イヌやネコ、ブタやウシなど私たちに身近な存在である家畜を調べてみると、動物達がいかに豊かな嗅覚世界に暮らしているかがよく分かる。ヒトの嗅覚システムはどの動物と比べてもはるかに貧弱であるが、最近の研究から、その私たちがさえフェロモンの影響を受けているということが示された。フェロモンは理性では制御できない生理的反応と行動を引き起こす。哺乳類におけるフェロモン受容と中枢作用のメカニズムはどこまで明らかになったのだろうか。

### 1. はじめに

視覚や聴覚にくらべ嗅覚の世界は長く闇に包まれ研究は遙かに遅れていた。この闇に初めて光を当てたのは、2004年度のノーベル医学・生理学賞に輝いたリチャード・アクセル博士とリンダ・バック博士である。彼らが1991年に匂い受容体の発見を報告して以来、この十年余りの間に嗅覚研究は著しい発展を遂げ、また脳科学分野における基礎研究の好個のモデルとしてさらに多くの神経科学者や分子生物学者たちを魅了し続けている。

かつてフェロモンは昆虫の世界だけの話と思われていた。しかし哺乳類にもフェロモンが存在し、多くの動物において（おそらくヒトも含め）さまざまな生得的行動の発現に重要な役割を果たしていることを近年の研究は明らかにしてきた。そして畜産学や獣医学の分野においては、こうした基礎研究に加えて、臨床的・応用的観点に立った研究にも関心が寄せられている。すなわち、中枢神経機能に強力な影響を及ぼすフェロモン分子群を同定し、さまざまな動物における情動や行動の制御、あるいはストレス緩和といった実践的な目的に役立てようとする試みである。私たちの研究チーム（学術創成研究“フェロモン系を介する視床下部・辺縁系

MORI Yuji

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

機能の制御”研究班)もそうした課題に取り組むグループの一つである。

### 2. 哺乳類の嗅覚システム

哺乳類には主嗅覚系と鋤鼻系という二つの独立した嗅覚神経系が存在している。つまり多くの動物種はデュアルシステムで外界の嗅覚情報を感知しているのである。両システムはそれぞれどのような生物学的意義を持つ情報を受け取り、脳のどこに情報を伝えて、どのような行動を引き起こすのだろうか。本来フェロモンは、同種の個体に働きかけて、本能的（生得的）行動や生理的反応を引き起こす物質と定義されている。動物達にとって生き延びるために必要な食物や環境の匂いを「感じる匂い」とすれば、フェロモンは知覚していることすら意識に上らない、より本能的な匂いであり、「動かす匂い」ということができるかもしれない。図1は、げっ歯類の嗅覚システムで、ここには嗅覚器と鋤鼻器が示されている。

嗅覚器は通常の匂い、すなわち「感じる匂い」を、鋤鼻器はフェロモン、すなわち「動かす匂い」を感知する。「感じる匂い」分子は、鼻腔上部の嗅上皮にある嗅神経細胞の線毛上に発現している匂い受容体でキャッチされ、その情報は脳の先端に位置する主嗅球を経由して、梨状葉皮質などに伝えられる。その情報は脳皮質

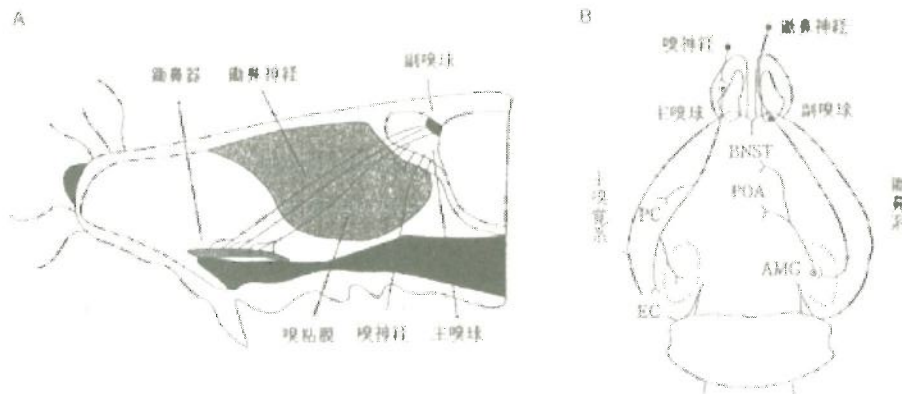


図1 嗅覚器と鋤鼻器（げっ歯類の例）

鼻腔の奥にある嗅上皮では通常の匂い、すなわち食物や環境に由来する「感じる匂い」の分子を受容し、その情報を嗅覚の一次処理中枢である主嗅球を経由して脳に伝える。一方、鼻先に近い部位に存在する袋状の鋤鼻器にはフェロモン受容体が発現しており、ここで感知されたフェロモン情報は副嗅球を経由して脳のなかの自律機能や情動を司る場所（視床下部や辺縁系）に伝えられる。A：口吻部の傍正中矢状断、B：脳の水平断面、PC：梨状皮質、EC：内嗅野、BNST：分界状床核、POA：視索前野、AMG：扁桃体

に到達し知覚され、次の行動を起こすための判断材料となる。ちなみにヒトの嗅上皮は切手ほどの大きさだが、イヌの嗅上皮は大型犬ではヒトの数十倍の大きさがある。一方、「動かす匂い」であるフェロモンは、鼻腔のより鼻先に近い部位にある袋状のかたちをした鋤鼻器に取り込まれ、その内腔の感覚上皮にある鋤鼻神経細胞の微絨毛上に発現しているフェロモン受容体でキャッチされ、その情報は主嗅球の背側にある副嗅球を経由して、視床下部などに伝えられる。この情報は「感じる匂い」とは違って意識にのぼることなく、そのかわりホルモンが分泌されるなど内分泌あるいは自律機能への大きな影響を介して、動物の生理状態や行動のより長期的な変容をもたらすのである。「動かす」匂いとよばれるゆえんである。

ウマやヤギの雄は、雌に由来する（例えば尿の）匂いを嗅ぐと、頭を上げて上唇をめくりあげる独特の表情（フレーメン）を示し、鋤鼻器にフェロモンを送り込む。げっ歯類はフレーメンをしないが、鋤鼻ポンプとよばれるしくみを使ってフェロモンを鋤鼻器内にとりこんでいる。このように鋤鼻器がフェロモン感知の中心的役割を果たしていることは多くの動物で確かめられているが、最近の研究からは次項で言及

するように主嗅覚系でもフェロモンを感知している可能性が示唆されている。

### 3. 匂い受容体とフェロモン受容体

匂い受容体の遺伝子がクローニングされるまで、嗅覚情報の受容認知システムは謎に包まれていた。なぜ何万種類もある匂いを嗅ぎ分けることができるのだろうか、光の三原色に相当するような匂いの基本要素がいくつか存在するのだろうか、といった基礎的なことすら皆目分かっていなかった。前述のアクセル博士のもとでポストドク研究員をしていたバック博士は、匂い受容体を同定しようと苦労を重ねていたがうまくいかない。ある日、彼女は天啓ともいえるひらめきを得て、のちに彼らを世紀の大発見へと導くことになる三つの仮説を立てた。さまざまな状況証拠から、（1）おそらく受容体は七回膜貫通型の構造をしており、（2）遺伝子ファミリーを形成しており、そして（3）嗅覚器に限定して遺伝子発現がみられるだろう、という三つの仮説をもとに思い切って研究の方向を絞り込んだ結果、ノーベル賞選考の過程で高く評価された1991年Cell誌上での論文発表にこぎつけたのである。

匂い受容体をコードする遺伝子の種類はマウスでは1000をこえ、ヒトでも約350と全遺伝子の1%にも相当する膨大な遺伝子群が嗅覚情報を受け取るために割り振られている。これほど大きな遺伝子ファミリーであることは誰も予測しておらず、哺乳類にとって匂いの世界がいかに重要であるかが改めて認識された。匂い受容体の発見から4年ほど遅れて、フェロモン受容体も見出された。図2に示したように、フェロモン受容体は構造的な特徴から大きく二つのファミリーに分類されている。その一つ(V1R)は匂い受容体に近い二次元構造をしているが、もう一つ(V2R)の方は細胞外ドメインがとても長い。脊椎動物の系統発生にそって魚類から哺乳類までを比較しながら調べてみると、どうやらV2Rファミリーの方がプロトタイプのように、水棲動物にはV2Rがあり、哺乳類でもげっ歯類はV2Rに加えてV1Rを具備しているが、ヤギやウマになると(そしておそらくヒトも)V1Rしか見つからない。現時点ではあくまで推測の域を出ないが、進化の過程でフェロモン受容体はまず水溶性のフェロモンに対する受容体

として魚の仲間にあられ、動物が水圏から陸にあがってから揮発性のフェロモンに対する受容体が使われるようになったのかもしれない。そしてげっ歯類以外の哺乳類では頭部(鼻)の位置が地上から離れたことで揮発性フェロモンの相対的な重要性が増し、その結果として匂い受容体に近いV1Rファミリーが新たに出現して、それと引き替えに水溶性フェロモンの受容システム(すなわちV2R)が退化した可能性が考えられる。そして霊長類になるとフェロモン受容器である鋤鼻器すら痕跡となり、その代わりにフェロモン受容体が嗅上皮に発現するようになったことを示唆する研究結果も報告されている。

#### 4. 反芻家畜の雄効果フェロモン

ヤギやヒツジでは、成熟した雄が発するフェロモンが非繁殖期の雌の性腺活動を刺激する“雄効果 Male Effect”という現象が知られている。哺乳動物では唯一そのターゲットとなる神経機構が明らかになっているフェロモン現象

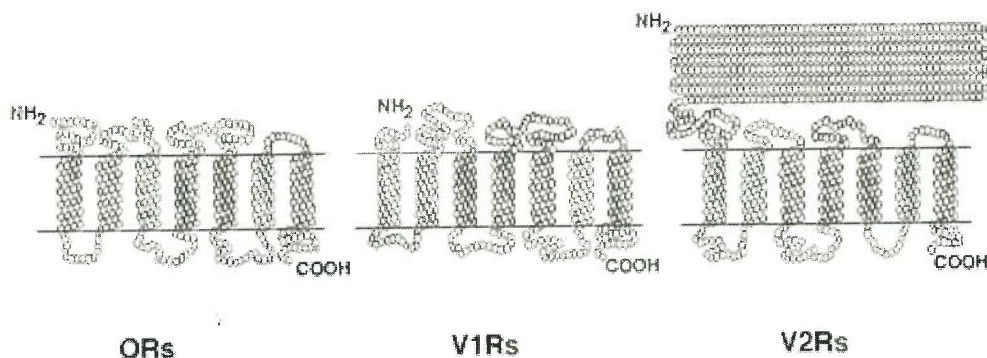


図2 匂い受容体とフェロモン受容体

匂い受容体は、細胞膜を七回貫通する構造をしており細胞膜の内側ではG蛋白質と共役している。マウスでは1000種類以上の匂い受容体があり、それぞれの嗅神経細胞では一種類の受容体遺伝子だけが発現している。そして特定の受容体をもつ嗅神経細胞は嗅上皮のさまざまな場所に散在しているが、嗅神経の軸索が主嗅球に向かう過程で次第に束ねられ、特定の糸球体へと収束して投射する。フェロモン受容体も、匂い受容体と同様に七回膜貫通型の構造であるが、塩基配列やアミノ酸配列について両者の相同性は低く、結合するG蛋白質も異なる。細胞外の構造の違いなどから二つのグループ(V1RファミリーとV2Rファミリー)に分類され、それぞれ受容するフェロモン分子の性状が違おうと予想されている。フェロモン受容体に関してははまだあまりよく分かっていないが、その種類は匂い受容体より一桁少ないと考えられている。

であり、図3に示したように、雄フェロモンは雌の視床下部に作用して性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）のパルス状分泌を刺激し、パルス頻度を増加させることによって下垂体前葉からの性腺刺激ホルモンの分泌を亢進させ、結果的に卵巣における卵胞発育とエストロゲン分泌を促すことが明らかにされている。

一方、このフェロモンが作られるメカニズムについてもヤギでは理解が進み、雄性ステロイドホルモンであるテストステロンが頭頸部の皮膚に存在する5 $\alpha$ 還元酵素によって活性型アンドロジェンであるジヒドロテストステロンに変換されてフェロモンの合成酵素を誘導し、雄効果をもたらすフェロモンが作られることが分かった。この部位ではアンドロジェンの作用によって皮脂腺の発達も惹起されるが、フェロモン産生と皮脂腺発達はそれぞれ別の機構によって

制御されるようである。興味深いことに、雄ヤギのフェロモンは雌ヤギだけでなく雌ヒツジにも効果があるが、雄ヒツジのフェロモンは雌ヒツジにしか効かない。

こうした知見の集積をもとに、ヤギをモデル動物として雄効果フェロモン分子の同定およびフェロモン産生と中枢作用メカニズムの解明に向けての研究が、神経生物学、分子生物学、有機化学などの諸手法を統合しつつ進められている。雄ヤギ被毛などの生物材料からフェロモン活性を有する分画を抽出・精製していくと、脂溶性酸性画分に含まれる揮発性物質がフェロモン候補として挙がってきた。分子構造を解明するためには今後の研究を待たなければならないが、フェロモンの産生部位で特異的に発現レベルが上昇する（100倍以上も）遺伝子がいくつか捉えられており、これらは脂肪酸の合成や修

### 雄効果をもたらすフェロモンの作用点：

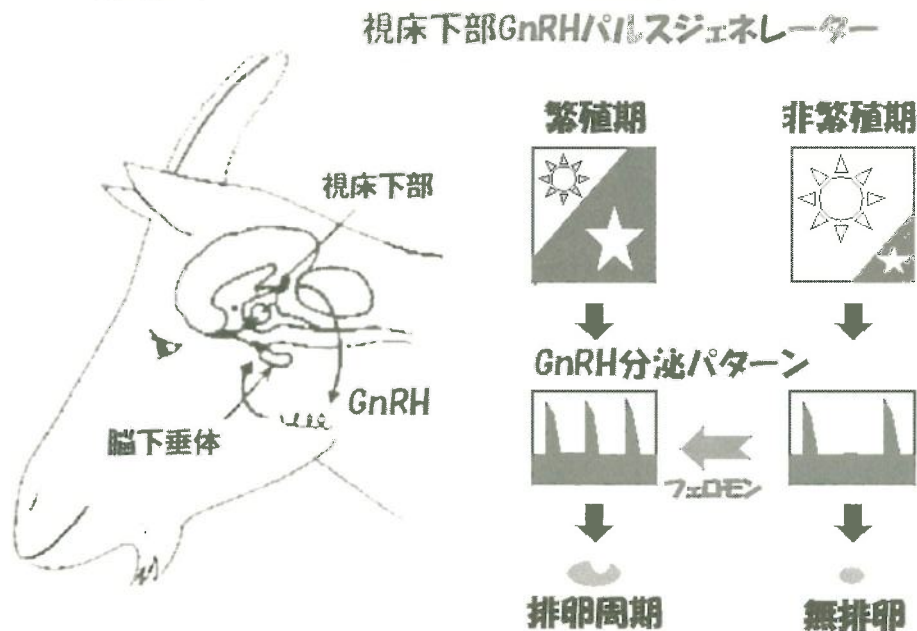


図3 反芻家畜における雄効果フェロモンの作用機構

ヒツジやヤギは季節繁殖動物であり、春から夏にかけての日長が長い時期には排卵周期は停止する。これは視床下部から神経分泌される性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）のパルス状分泌頻度が下がるためである。雄効果をもたらすフェロモンは、このGnRHパルス駆動する神経機構すなわちGnRHパルスジェネレーターに作用して、パルス頻度を再び上昇させることで雌の生殖内分泌系を刺激し、排卵へのプロセスを再開させる。電気生理学的手法（視床下部多ニューロン発射活動MUAのリアルタイム解析）を用いてGnRHパルスジェネレーターの活動をモニターすることができるため、フェロモン活性を評価するための生物学的検定法として利用されている。

飾に関わる遺伝子であることから、フェロモンの性状や物性を類推するためのヒントが得られている。また作用機序に関する研究からは、主嗅覚系と鋤鼻系という2つの独立した嗅覚システムが、大脳辺縁系の一部である扁桃体のレベルでお互いに協調してフェロモンを認識する可能性も指摘されている。

## 5. げっ歯類の水溶性フェロモン

上記の反芻家畜における性フェロモンが、匂い分子のように高揮発性の物質であるのに対して、げっ歯類は水溶性のフェロモンも利用しているらしいことが分かってきた。ストレスを受けた動物の肛門周囲から放出され仲間へ危険を伝える警報フェロモンもその一つであり、また東原グループ(東大・新領域)の研究によれば、涙の中にも重要なフェロモンが分泌されているらしい(Nature, in press)。これら水溶性フェ

ロモンは、げっ歯類で発現しているフェロモン受容体との関連を考えると、生態学的にも非常に興味深い。

雄ラットがストレスを受けると、肛門周囲と顔面よりそれぞれ異なる種類の警報フェロモンを放出し、前者はストレス性一過的体温上昇(Stress Induced Hyperthermia)など自律機能の反応を、また後者はすくみなど行動的反応を引き起こすことを見出した。また肛門周囲から放出される警報フェロモンはその合成にアンドロジェンを必要としないことが分かり、おそらく生物学的により重要な役割を果たしていると推察されたため、このフェロモンについてその受容に関する中枢神経回路やフェロモンリガンドの物性(おそらく水溶性)について検討が進められた。その結果、図4に示したように、この水溶性フェロモンは情動系に作用し、受容した個体の不安レベルを上昇させるフェロモンであることが示唆されている。この警報フェロモ

### ラットの警報フェロモン

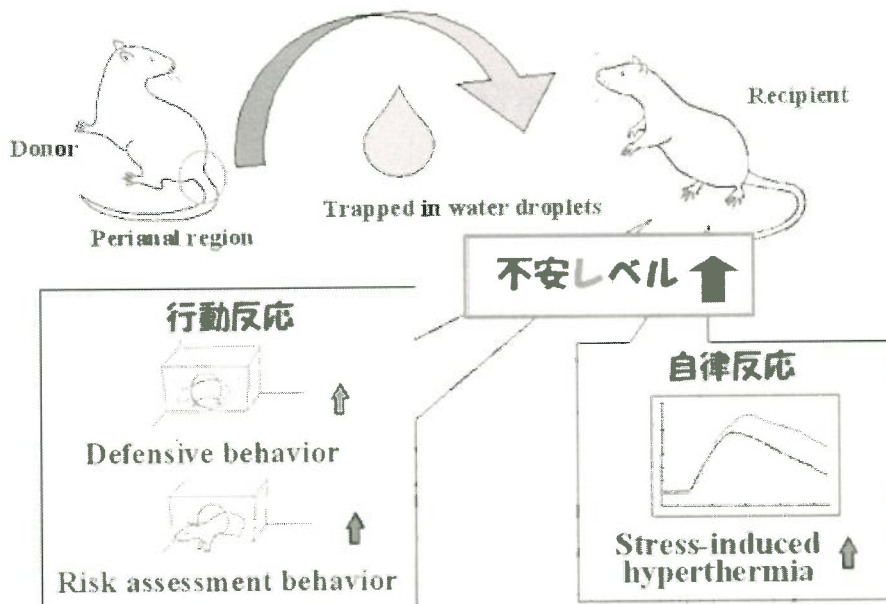


図4 ラットの警報フェロモン

ストレスを受けた雄ラットからは警報フェロモンが放出され、それを受容した個体では一過性の体温上昇など自律機能のストレス反応が起こると同時に、警戒行動や防御的行動が増えるなど行動学的反応も引き起こされる。これらは不安レベルの上昇に伴ってあらわれる典型的な反応であり、警報フェロモンは近隣の仲間へ危険を伝える意味があると推察される。肛門周囲から放出される警報フェロモンは水溶性であり、その受容にはおそらく鋤鼻器のV2R受容体に関与するものと予想される。



ンが同定されれば、自律機能に影響を与えるプライマーフェロモンとしてげっ歯類において中枢作用が確かめられたはじめてのフェロモンとなり、さらにその物性（水溶性）や関与する受容体（おそらくV2R）については、ヤギの性フェロモンとの対比という観点からも興味もたれることから、今後のフェロモン研究の新たなモデルの一つとなることが期待される。

## 6. 行動治療におけるフェロモン活用

動物行動医学の分野では不安や恐怖が原因となる問題行動が数多く知られている。従来の抗不安薬などの処方代わるあらたな取り組みとして、安寧（安心）フェロモンの臨床応用が始まった。動物がさまざまな身体的・心理的スト

レスにさらされたときに、不安のレベルが高まることは、ストレスの種類によらず普遍的にみられる反応のひとつである。図5に示したように、嗅覚系は自律機能や情動を司る視床下部・大脳辺縁系と密接な形態的・機能的リンクをもっている。過度の不安反応はさまざまな障害を二次的に引き起こすため、これを人為的に制御する必要が生じるが、もし動物たちが自ら作り出すフェロモンをうまく利用して情動反応をコントロールすることができれば、その恩恵ははかりしれないだろう。実際、フランスなどではイヌやネコなど伴侶動物における行動治療にフェロモンを応用する方法が開発されつつあり、さらにはウマやブタといった産業動物においても、繁殖効率を上げるための性フェロモンだけでなく安寧フェロモンの応用が検討され始める

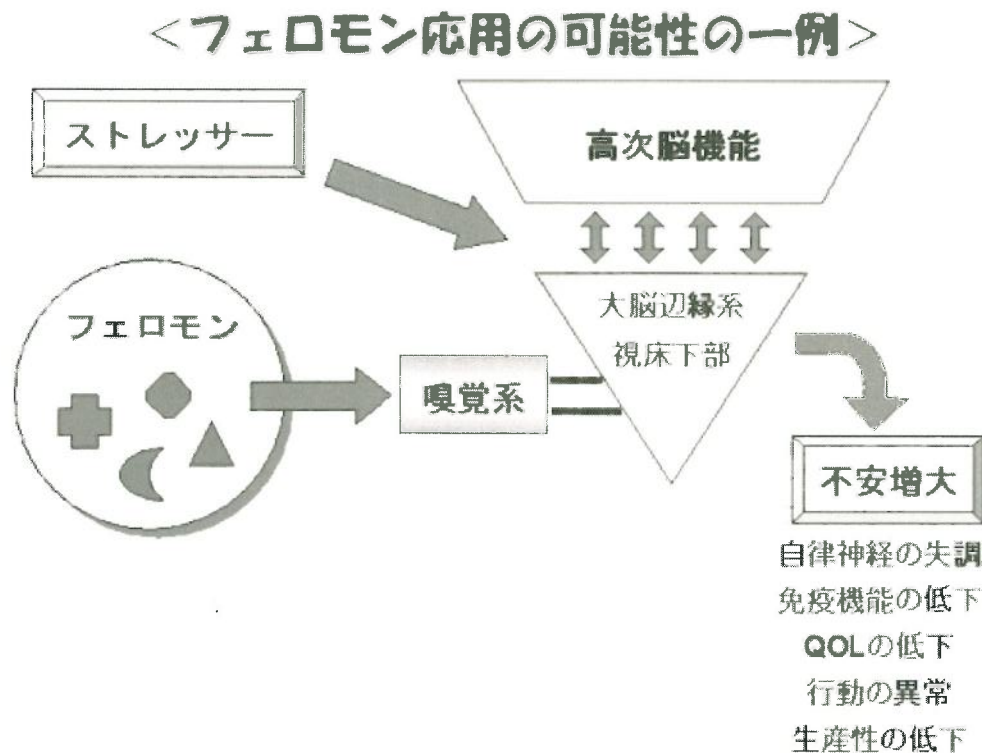


図5 フェロモンを用いた中枢機能制御

ここでは動物の中枢機能をフェロモンを用いて制御する一例として、安寧フェロモンを用いた新たなストレス緩和方法の可能性を示した。視床下部は動物が生存し繁殖するためのさまざまな欲求を満たすための行動を動機付けし、辺縁系は快・不快といった情動を生み出して行動の結果をフィードバックして将来の行動をより適応化していくためのセンターである。この視床下部・辺縁系は、嗅覚系と密接なリンクを有している。こうした知見を活用してフェロモンによる脳機能の修飾が可能となれば、さまざまな局面における応用が可能となるだろう。

など、副作用の心配がない自然な治療方法として動物福祉の観点からもこうした研究の発展に期待が高まっている。

## 7. おわりに

哺乳類フェロモンを機能的に分類すると、受容した動物の行動を変容させる“リリーサーフェロモン”と、内分泌機能など生理機能の修飾を介してより深刻で長期的な影響をもたらす“プライマーフェロモン”がある。前者については既にいくつかのリガンド分子が同定されているが、フェロモンとしてより重要な意味をもつ後者のリガンドについては、まだ単離精製・構造決定されたものはない。私たちは、反芻動物における“雄効果フェロモン”による強力な性腺刺激現象と、げっ歯類における“警報フェロモン”による情動機能の修飾現象を研究モデルとして取り上げ、これらの現象をもたらすフェロモン分子（群）の同定を当面の最重要課題に掲げた探索的研究を進めている。なぜなら、ひとたびフェロモンリガンドの化学構造が明らかになれば、それを基盤としてフェロモンの産生・分泌機構、あるいは鋤鼻・嗅覚系におけるフェロモン受容機構、そしてフェロモンが視床

下部・辺縁系の神経活動を修飾する機構などについて、一挙に解明を進めることが可能となるからである。

さまざまなバックグラウンドをもつ研究者の参入によって嗅覚研究が今後ますます進展し、哺乳類フェロモンの産生から作用にいたる化学的情報通信システム全容が解明されれば、フェロモンによる動物機能の制御法開発といった応用的研究の基盤となる新たな研究パラダイムの創成が実現するにちがいない。

## 文 献

- 1) 市川真澄ほか (2005), 日本味と匂学会誌 総説特集 “ケミカルコミュニケーションの世界”, 12 (1), 1-64
- 2) Kiyokawa Y. et al. (2005) Brain Research 1043 : 145-154
- 3) Okamura H. & Mori Y. (2005) Chemical Senses 30 (suppl 1) : i140-i141
- 4) Takigami S. et al. (2004) Chemical Senses 29 : 301-319
- 5) Hagino-Yamagishi K. et al. (2004) Journal of Comparative Neurology 472 : 246-256

◀特集▶ 「匂いとフェロモンの科学」 4

## 昆虫の脳におけるフェロモンと匂いの 情報処理と行動発現機構

東京大学 大学院情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻  
加 沢 知 毅 ・ 岡 田 公 太 郎 ・ 神 崎 亮 平

雄のガはフェロモンの匂い情報を頼りに数キロはなれた雌に定位する。また雌は宿主植物をその匂いによって探索する。このように昆虫は風などの外乱に影響されやすい「匂い」情報を実環境下で有効に利用し、さらに外界の変化に柔軟に適応している。そこには優れた情報処理機構の存在がうかがわれる。ここでは、昆虫の1 mmにも満たない微小な脳における嗅覚系の構造と機能、そして行動発現について、神経細胞、組織レベルで最新の知見とともに解説する。

### 1. はじめに

昆虫は、環境下に分布するさまざまな匂いを識別することができる。昆虫は、このような匂いをコミュニケーションの手段として広く利用している。中でも、種特異的な匂いであるフェロモンは、配偶行動や警戒行動などを発現するための鍵刺激として重要な役割を果たしている。ここではフェロモンとそれ以外の一般的な匂い（一般臭）が昆虫の脳内でどのように処理され、行動発現に至るかを、カイコガの脳内における嗅覚情報経路に即して最近の知見を概観する（図1）。

### 2. 嗅角系一次中枢・触角葉

昆虫の嗅覚受容は嗅覚に特化した感覚毛によって行われる。嗅感覚毛は口器や肢にも存在するが、特に触角に多く存在する。一般臭では一つの匂いに複数の受容体が反応して、その組み合わせによって匂い識別がなされていると考えられているのに対し、フェロモンでは、一つの受容体が一つのフェロモンに対して非常に高い

感度と特異性をもっている。嗅感覚毛内の嗅受容細胞はその軸索を嗅覚系一次中枢である触角葉に伸ばして、そこでシナプスを形成する（図1B）。触角葉はぶどうの房状に糸球体という球状の構造が集まって構成される（図2）。同一の受容体遺伝子を発現した嗅受容細胞は、同一の糸球体に収束することが報告されている<sup>19)</sup>。ただし、雄カイコガでは個体によって糸球体数に変動があることから、ひとつの受容体遺伝子と特定のひとつの糸球体が、すべての糸球体で対応しているとは限らないと我々は考えている<sup>19)</sup>。鱗翅目では触角葉内のフェロモン情報を受容する糸球体は大きく発達し、大糸球体と呼ばれる。一方、一般臭の情報は、常糸球体といわれる数十個程度の小型の糸球体に投射する（図2）。

触角葉では匂い情報は、局所介在神経を中心とした触角葉内神経ネットワークで処理される。このとき触角葉の神経群は匂い刺激に対して、同期した発火応答や特定の周波数での振動応答を示す<sup>11),14)</sup>。この振動現象には抑制性神経伝達物質であるγ-アミノ酪酸（GABA）が介在しており、近い種類の匂いを識別する際に重要な役割を果たしていることが薬理学的実験から示されている<sup>17)</sup>。昆虫の触角葉に相当する哺乳類の器官は嗅球だが、触角葉に比べ大規模では

KAZAWA Tomoki, OKADA Koutaroh,  
KANZAKI Ryohei  
〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1

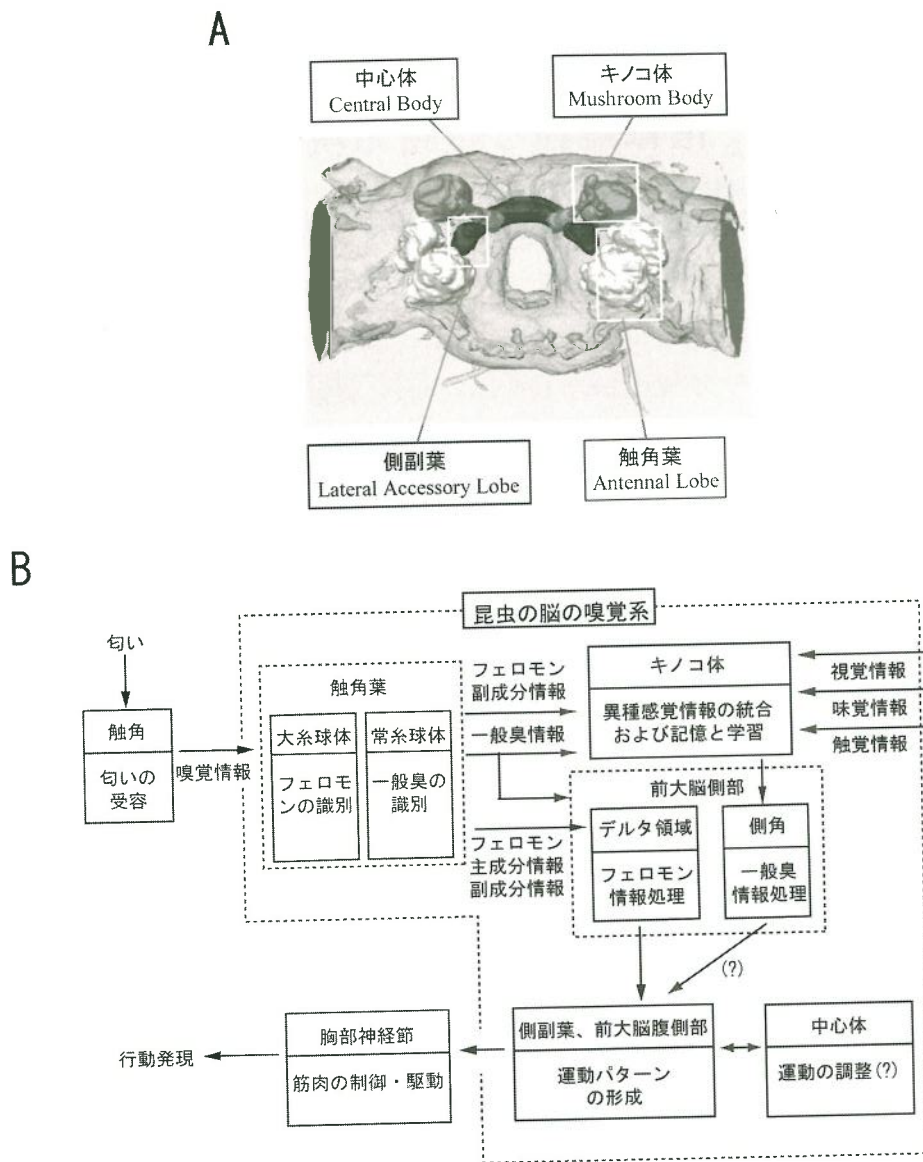


図1 雄カイコガの脳内の3次元構造 (A) と嗅覚情報の主要経路のまとめ (B)

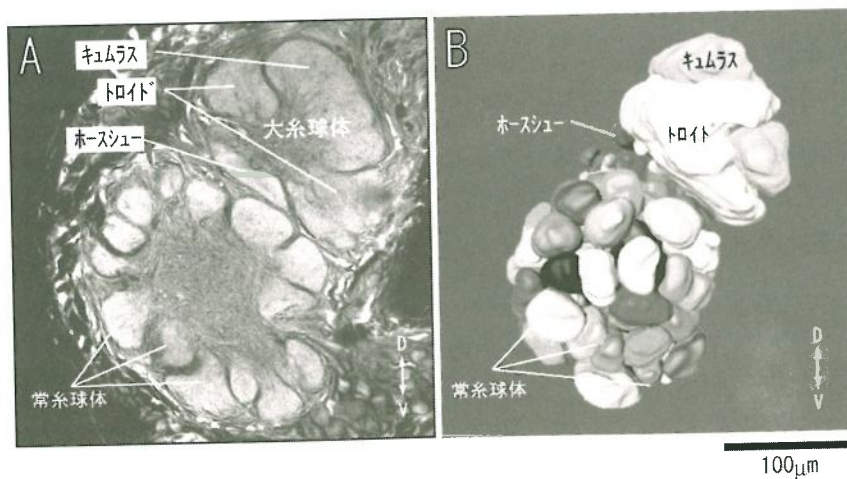


図2 雄カイコガ触角葉の共焦点顕微鏡像 (A) と糸球体の3次元再構成像 (B)  
D: 背側, V: 腹側。

あるが、触角葉と類似の糸球体構造をもち、同様な匂い信号処理が行われている<sup>3)</sup>。

カイコガのフェロモンは二つの成分からなる。1つは主成分のボンビコール、他は副成分のボンビカルである。カイコガでは主成分のみで完全な配偶行動を誘発することができる。これらのフェロモン情報は主に大糸球体で処理される。大糸球体は、キュムラス、トロイド、ホースシューといわれる3つのコンパートメントからなり、それぞれがフェロモンの構成成分の情報処理と対応している。すなわち、主成分のボンビコールはトロイド、副成分のボンビカルは、キュムラスとホースシューで情報処理される<sup>9)</sup> (図2, 3)。また、触角における嗅覚毛の空間的な位置に対応した投射パターンが

コンパートメント内においてもみられることから、匂いの空間情報も同時に大糸球体内で処理されると考えられている<sup>1)</sup>。一方、一般臭は常糸球体の時空間的な活動の組み合わせによって表現されている<sup>11)</sup>。触角葉から上位中枢への匂い情報は、個々の糸球体で分枝する出力神経によって伝達される。

### 3. 嗅覚系高次中枢・キノコ体傘部と周辺部

触角葉で処理された情報は出力神経によって嗅覚系上位中枢である前大脳に伝達される。カイコガの場合には、この伝達経路には、内側触角脳経路 (IACT)、中側触角脳経路 (MACT)、

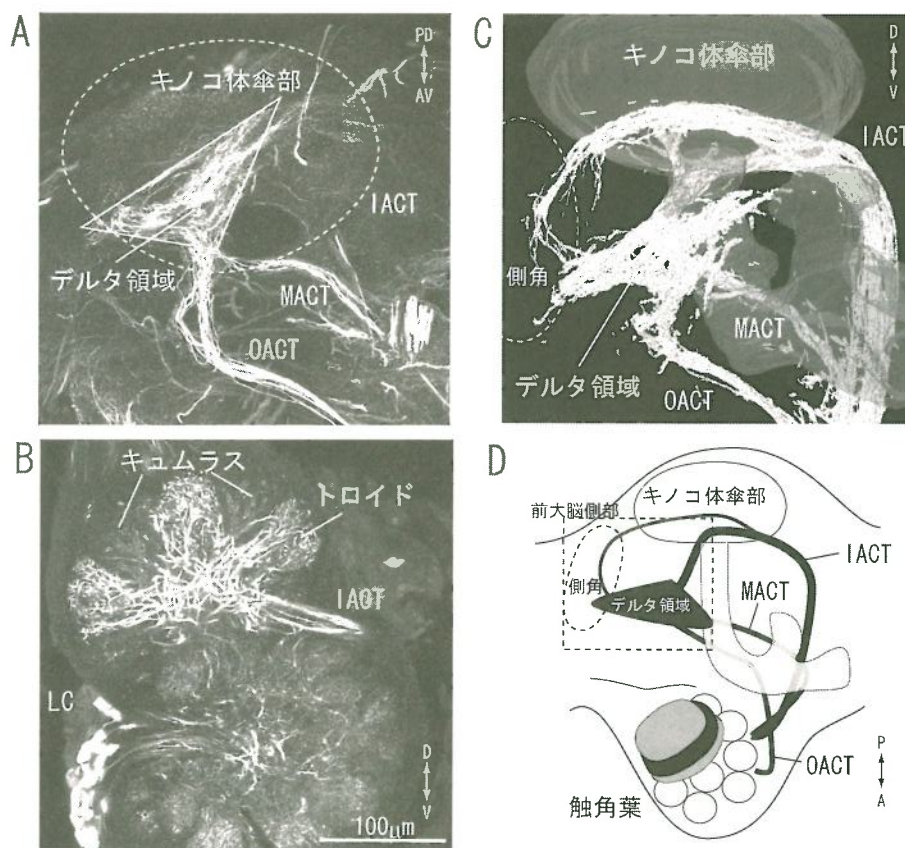


図3 触角葉から嗅覚系上位中枢である前大脳へのフェロモン情報経路

(A) NO応答性cGMPの抗体染色により、フェロモン情報経路が特異的に染色される。触角葉で処理されたフェロモン情報は、キノコ体傘部近傍の三角錐状の領域(デルタ領域)に投射する。(B) フェロモンの主成分であるボンビコールを情報処理する大糸球体内のトロイドがcGMP抗体染色により特異的に染色される。(C) cGMP抗体染色の3次元再構成像。(D) cGMP抗体染色により染色された出力神経の投射領域を示す模式図。AV: 腹側前方, D: 背側, LC: 側神経細胞群, PD: 背側後方, V: 腹側。

外側触角脳経路 (OACT) の3つがある<sup>16)</sup> (図3)。これは出力神経の持つ神経伝達物質とも対応しており, GABA作動性神経はMACTに局在している。フェロモン情報の主要な神経経路はIACTである。

出力神経の投射領域は, キノコ体と前大脳側部である<sup>9), 16)</sup> (図1B, 3D)。キノコ体は嗅覚と味覚による連合学習 (いわゆる条件反射) に関与する<sup>12)</sup>。また嗅覚情報をはじめ, 視覚情報や触覚情報など多くの異種感覚情報が収斂する領域であり, 昆虫の記憶・学習や異種感覚統合のような高度な情報処理の場である<sup>12)</sup>。

最近, 一酸化窒素 (NO) などの気体が神経間の情報伝達因子として機能することが報告されている<sup>2)</sup>。NOのターゲット細胞をcGMP抗体染色により特定する研究から, 驚くべきことに, 雄カイコガの触角葉出力神経の一部, すなわちフェロモン感受性の出力神経が選択的にマーキングされることを見出された<sup>16)</sup>。これによ

り, これまで未解決であった前大脳側部におけるフェロモン情報の投射領域 (デルタ領域) をはじめて明らかにすることとなった (図3)。さらに, フェロモンの主成分と副成分の情報を伝達する出力神経との二重染色により, デルタ領域において, 主成分と副成分の出力神経の投射領域が明瞭に区別され, また一般の匂いの出力領域 (側角といわれる) とはまったく異なることを明らかにした<sup>16)</sup> (図3C)。

また, もう一つの投射領域であるキノコ体においても, フェロモンの主成分を伝達する出力神経ではその内部にほとんど投射が見られないのに対して, 一般臭やフェロモンの副成分であるボンビコール情報を伝達する触角葉出力神経は, キノコ体傘部の広領域に投射することが示された<sup>16)</sup>。カイコガでは, 主成分のボンビコールのみで, 配偶行動が完全に解発されることから, キノコ体よりも, 前大脳側部のデルタ領域がその情報処理に重要と考えられる。

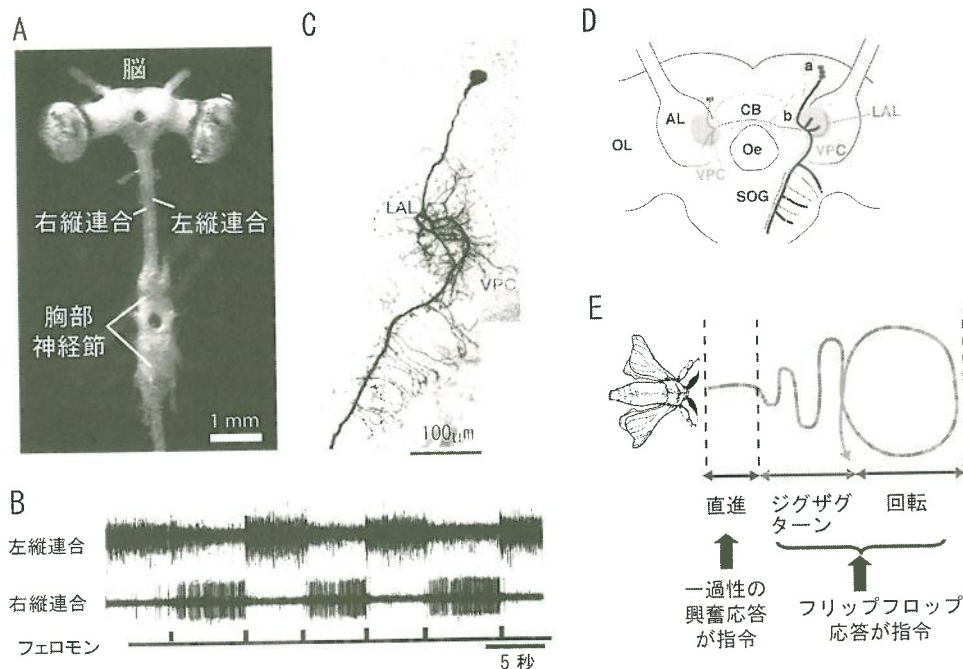


図4 側副葉のFF信号と行動

(A, B) カイコガの脳内の側副葉 (LAL) と前大脳腹側 (VPC) を介して形成されたフリップフロップ (FF) 応答は, 左右の縦連合を下降して胸部神経節に伝達される行動指令信号である。(C, D) FF応答を示す下降性介在神経の形態と脳正面模式図。AL: 触角葉, a: キノコ体 $\alpha$ 葉, b: キノコ体 $\beta$ 葉, CB: 中心体, Oe: 食道, OL: 視葉, SOG: 食道下神経節。(E) カイコガの匂い (フェロモン) 源探索は, フェロモン刺激に対して一過的な興奮応答を示す下降性介在神経 (データは示していない) と, FF応答性の下降性介在神経により指令されることで発現することが明らかになってきた。

#### 4. 嗅覚行動発現の前運動中枢・側副葉と中心体

前大脳側部のデルタ領域からの情報は、直接またはいくつかの介在神経を介して、側副葉 (LAL) と前大脳腹側部 (VPC) に伝達される<sup>6)</sup>。LALとVPCは前大脳に左右対称的に存在する (図1A, 図4D)。これらに加え前大脳の正中線上に存在する中心体を含めた領域が、運動パターンを形成する前運動中枢を形成している<sup>8), 18)</sup>。特に匂い源探索行動という匂いに関連付けられた特定の動きに関しては、LALが大きな役割を果たしている<sup>8)</sup>。LALから縦連合を介して胸部運動系に運動パターンを伝達する下降性介在神経は、フェロモン刺激により、持続的な興奮または抑制応答を示す (図4B)。その応答はフェロモン刺激ごとに興奮と抑制応答が反転するという、電子回路の記憶素子であるフリップフロップ (FF) と同様の特性を持っている<sup>8)</sup>。さらには、左右のLALから出力されるFF応答は、左右間で相互に反転しており、カイコガの運動パターンと直接関連づけられる<sup>13)</sup> (図4E)。左右のLAL-VPCの間はいくつかの種類の両側性神経でつながれており、左右のLAL-VPC間の信号処理によりFF応答が生成されると考えられる<sup>5), 8)</sup>。また、LALは、中心体と強い神経の接続をもっている<sup>15)</sup>。ショウジョウバエでは、中心体に欠陥のあることによって歩行行動に異常をきたすミュータントが多く作られており、中心体も重要な前運動中枢であることが知られている<sup>18)</sup>。これらの領域が複合体として運動パターン形成に係わると考えられる。

カイコガは、フェロモン源を探索する際に、フェロモンが触角で受容されている間は、刺激の方向に直進し、刺激後はジグザグにターンを始め、次第に回転に移行するプログラム化された歩行パターンを示す (図4E)。カイコガは、空中におけるフェロモンの分布パターンに依存して、この歩行パターンをフェロモンに遭遇するたびに繰り返すことによって、匂い源を探索することが明らかになっている<sup>7)</sup>。FF応答は、

刺激後に生じるプログラム化された行動の指令情報として胸部運動系に下降し、また、フェロモン刺激によりはじめに起こる反射的な直進歩行は、やはりLALから胸部運動系に下降する、フェロモン刺激により一過的な興奮応答を示す下降性介在神経の指令によっておこることが示されている (図4E)<sup>8)</sup>。一般臭、例えば寄主植物や餌の匂いへの定位についても同様の神経機構により発現すると考えられる。脳内で生成されたこのような匂い源探索の運動指令信号は他の多くの下降性介在神経<sup>15)</sup> とともに、胸部神経節に行動指令として伝達され、そこで定位のための個々の筋肉を駆動する運動信号に変換される (図1B)。

#### 5. 結語

以上、雄カイコガを例に昆虫の匂い受容から行動発現に到る神経過程の現在の知見を概説した。単一ニューロンの集合として匂い受容から行動発現に到るまでの情報処理経路を追跡できるのは昆虫ならではのことである。われわれは、現在、綿密に蓄積されたこれらの知見と近年の遺伝子操作技術、さらにナノテクノロジーを含んだ測定技術の開発と活用により、神経系の一部を書き換えることによる行動の改変や、行動発現時の神経活動の*in vivo*計測に取り組んでいる。また、ここでは割愛したが、このような匂いによって解発される行動は、カイコガの内部状態 (たとえば概日リズム) や、匂い (フェロモン) に遭遇する経験などによって修飾を受け、行動の発現閾値や行動パターンがダイナミックに変容することがわかってきた。これは、複雑に変化する匂い環境下で行動に柔軟性をもたせ、より適切に匂い源に定位するための昆虫が獲得した“知恵”である。昆虫のようなきわめて小規模な脳システムにより実現されるこのような環境適応システムの解明は、神経科学上の重要性はもとより、その設計原理を工学的に利用し、知的な機械システムを構築する上でもきわめて重要な課題である。

文 献

- 1) Ai, H. et al. (2004), *J. Exp. Biol.*, 207, 633-644
- 2) Alkadhi, K. A. et al. (2005), *Prog. Neurobiol.*, 75, 83-108
- 3) Friedrich, R. et al. (2001), *Curr. Opin. Neurobiol.*, 11, 468-474
- 4) Hildebrand, J.G. (1996), *J. Comp. Physiol. A*, 178, 5-19
- 5) Iwano, M. et al. (2004), *Abst. of ISOT2004*, 145
- 6) Kanzaki, R. et al. (1991), *J. Comp. Physiol. A*, 168, 281-298
- 7) Kanzaki, R. et al. (1992), *Zool. Sci.*, 9, 515-527
- 8) Kanzaki, R. et al. (1994), *J. Comp. Physiol. A*, 175, 1-14
- 9) Kanzaki, R. et al. (2003), *Chemi. Senses*, 28, 113-130
- 10) Kazawa, T. et al. (2004), *Abst. of ISOT2004*, 145
- 11) Laurent, G. (1997), *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7, 547-553
- 12) Menzel, R. et al. (1999), *J. Comp. Physiol. A*, 185, 323-340
- 13) Mishima, T. et al. (1998), *J. Comp. Physiol. A*, 183, 273-282
- 14) Okada, K. et al. (2001), *Neurosci. Lett.*, 316, 133-136
- 15) Okada, R. et al. (2003), *J. Comp. Physiol. A*, 458, 158-174
- 16) Seki, Y. et al. (2005), *J. Comp. Physiol. A*, 481, 340-351
- 17) Stopfer, M. et al. (1997), *Nature*, 390, 70-74
- 18) Strauss, R. (2002), *Curr. Opin. Neurobiol.*, 12, 633-638
- 19) Vosshall, L. B. et al. (2000), *Cell*, 102, 147-159
- 20) Yamagata, N. et al. (2004), *Abst. of ISOT2004*, 146



◀国内情報▶

## レドックス制御を包括的に解析できるジスルフィドプロテオーム —ポストゲノム研究の有効なツール：原理と応用—

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 作物研究所

矢 野 裕 之 ・ 黒 田 秧

重要な生理機構であるレドックス制御を1枚のゲル上で包括的に解析できる「ジスルフィドプロテオーム」を開発した。この手法を活用し、還元酵素チオレドキシシが関与する新しい植物レドックス機構を解明した。また、ジスルフィド結合は蛋白質のプロテアーゼ耐性やアレルギー性に関与することから、アレルギーの検出手法や低アレルギー化技術の開発にも応用している。本稿ではジスルフィドプロテオームの原理と、新しい生理機構の解明や産業への応用について実例を挙げて紹介する。

### 1. はじめに

イネ、ヒト等の数種高等生物で全遺伝子構造が解明されている。今後は得られた遺伝子情報を生命科学や産業等いかに利用し、発展に役立てるかが重要な課題である。これには静的な遺伝子とその産物である蛋白質としてどのような構造を有し動的に機能するのかを明らかにすることが鍵となる。蛋白質の多くは翻訳後に修飾を受けて機能する。これにはリン酸化、糖修飾、ジスルフィド化などがある。

蛋白質ジスルフィド結合はシステイン残基がもつSH基どうしの架橋(S-S)で、複数の蛋白質分子間で生じて複合体を形成させるものと、ひとつの蛋白質分子内で生じ構造を安定化させるものがある。植物種子では、貯蔵蛋白質が分子内・分子間ジスルフィド結合により折りたたまれ、貯蔵器官であるプロテインボディにコンパクトに収納されている。最近、ジスルフィド結合は静的なものだけでなく、酸化(S-S架橋)・還元(-SH, HS-への切断)により酵素の活性を調節し、生物の生理機構に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。「ジスルフィド」という新しい切り口からの包括的な解析により、これまで明らかにされていなかった生理機構の解明が期待される。—

YANO Hiroyuki, KURODA Shigeru

〒305-8518 茨城県つくば市観音台2-1-18

方で、アイソトープや特異的抗体を用いて研究が飛躍的に進んだリン酸化研究と比較して、包括的な解析手法のなかったレドックス研究は遅れがちであった。筆者らは最近、カリフォルニア大学(Buchanan教授)と共同でレドックス制御を1枚のゲル上で包括的に解析できる「ジスルフィドプロテオーム」を開発した<sup>1), 2)</sup>。全遺伝子構造が明らかになったイネなどを材料に、生理機構を解明するポストゲノム研究の有効なツールとして研究をすすめている。

また、ジスルフィド結合はアレルギーのプロテアーゼ耐性に関与する場合があります、これがアレルギー性を高める一因であることが明らかになりつつある。筆者らは農林水産省が推進する「アグリバイオ実用化・産業化」研究プロジェクトの一環で、ジスルフィドプロテオームを利用したアレルギーのスクリーニングや低減化の研究を実施している。これまでアレルギーの検出は患者の血清を用いて行われてきたが、ジスルフィド蛋白質の検出とプロテアーゼ耐性試験を組み合わせた新しい検出手法の開発を行っている<sup>3), 4)</sup>。

本稿ではジスルフィドプロテオームの原理と、この手法を応用した植物におけるレドックス機構の解明やアレルギー研究を通じての産業への応用について実例を挙げて紹介する。ポストゲノム研究におけるキーテクノロジーとして生命科学や産業等への貢献が期待される。

## 2. ジスルフィドプロテオームの原理

ジスルフィドプロテオームでは、粗抽出物中の蛋白質の遊離のSH基を選択的に蛍光標識した後(図1)、二次元電気泳動を行い、*in vivo*や*in vitro*でレドックス変化が起こった蛋白質を二次元電気泳動上の蛍光スポットの変化として検出することができる(図2A右、矢印で示されるスポット)。これにより、CBBなどによる通常の蛋白質染色では検出することのできないSH基の酸化還元変化(レドックス変化)を包括的に解析することができる。

## 3. 生理メカニズム解明への応用

還元酵素チオレドキシソ(Trx)は動植物や微生物でレドックス制御を支配することが明らかになりつつある。チオレドキシソの基質となる酵素や蛋白質(ターゲット)を包括的に同定することができれば、どのようなレドックス反応が起こるかが実態的に把握でき、そのメカニズムを推定することができる。我々はチオレドキシソの初めての包括的な解析手法として、ジスルフィドプロテオームを報告した<sup>1)</sup>。図2Bに示されるように、総蛋白質の検出(CBB)ではレドックス変化を識別することができない

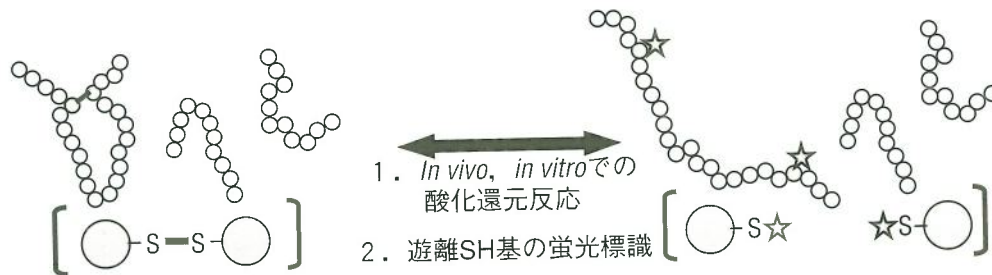


図1 蛋白質遊離SH基の選択的な蛍光標識

細胞粗抽出物中の遊離のSH基(システイン残基)を蛍光試薬モノブロモビマンにより選択的に標識する。ジスルフィド結合を形成しているSH基は標識されない。ジスルフィド結合が*in vivo*, *in vitro*反応により還元されると、その蛋白質の蛍光強度が高くなる。逆に酸化されると蛋白質の蛍光強度は低くなる。○：システイン残基、☆：蛍光色素モノブロモビマン



図2A 概念図

蛋白質の総検出(CBB)ではレドックス変化を検出することはできないが、SH基の選択的な蛍光標識(UV)により、レドックス変化を受けた蛋白質のみを検出することができる。



図2B チオレドキシソのターゲットの検出(ピーナッツ種子)

実際にピーナッツ種子のチオレドキシソのターゲットを検出したもの(文献1より許可を得て転載)。蛍光強度の高まったスポットがターゲットと同定される。

が、SH基の蛍光標識（UV）によりチオレドキシンのターゲットを検出することができる。ゲルからスポットを切り出し、内部アミノ酸配列分析によりターゲットを同定することで新しいレドックス反応を個々の蛋白質レベルで解明することができる<sup>1, 5, 6)</sup>。また、ジスルフィドプロテオームは*in vivo*反応の解析にも応用できるため、推定された反応が生体で実際に起こっているのか確かめることもできる。我々は最近、*in vivo*, *in vitro*両反応の解析により、レドックス酵素チオレドキシンのイネの種子発芽において基質特異性の異なる複数のプロテアーゼを段階的に活性化し、同時にそれぞれのプロテアーゼの基質となる蛋白質を段階的にアンフォールドして分解しやすくする詳細なメカニズムを解明した<sup>5, 6)</sup>。

#### 4. ジスルフィド蛋白質の選択的な検出法の原理

ジスルフィドプロテオームを応用し、細胞粗抽出物中のジスルフィド蛋白質のみを選択的に蛍光標識することができる（図3）。まず、ヨ

ードアセトアミドなどの非蛍光性試薬で蛋白質の遊離のSH基を修飾する。次にジチオスレイトールなどの還元剤で蛋白質のジスルフィド結合を還元する。続いて新たに露出したSH基（これはジスルフィド結合を形成していたもの）を蛍光試薬で標識する。これにより、粗抽出物中のジスルフィド蛋白質のみが選択的に蛍光標識される。この手法をアレルゲンの解析に応用した例を次に紹介する。

#### 5. アレルゲン研究への応用

##### 1) アレルゲン原因構造の解明

我々は上記の手法を応用し、コメやピーナッツのアレルゲン画分がジスルフィド蛋白質を多く含むことを明らかにした。また、穀物粗抽出物をプロテアーゼ処理し、切れ残る（プロテアーゼ耐性をもつ）複数のアレルゲンペプチド断片がいずれもジスルフィド結合を保持することを明らかにした。これは、アレルゲン蛋白質のなかでも特にジスルフィド結合を含む領域がプロテアーゼ耐性に関与する可能性を示している。また我々は、ジスルフィド蛋白質の選択的

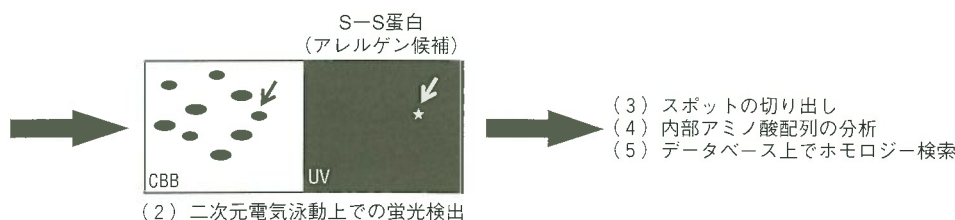
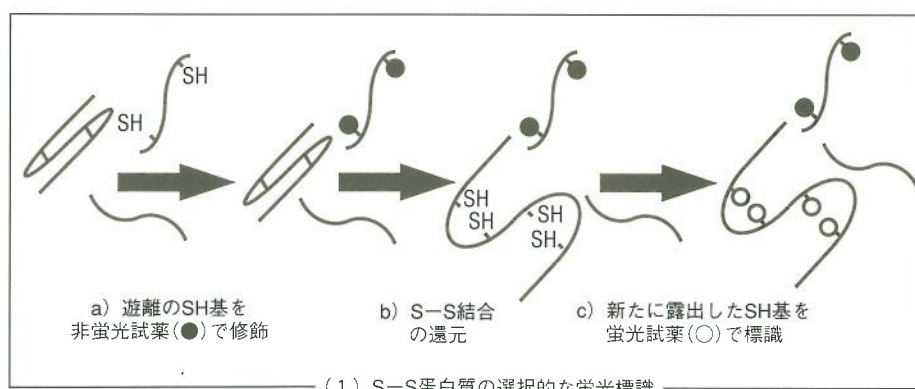


図3 ジスルフィド蛋白質の選択的な蛍光標識と内部配列分析による同定  
 ジスルフィド結合を形成していたSH基だけが選択的に蛍光標識される（図2の場合にはすべての遊離SH基が蛍光標識される。文献4より許可を得て転載）。

な蛍光標識により、穀物や花粉、ダニでアレルギー蛋白質を検出できることを明らかにした(特許出願中)。一般にアレルギーの検出は患者の血清抗体との反応性を指標として行われており、アレルギーの構造的な特徴を利用したスクリーニング手法はない。血清を用いる既存の手法は確立された良法であるが、全く原理の異なるスクリーニングを行うことでこれまで発見されていない新しいアレルギーを検出できる可能性がある。また、複数のアレルギーに共通する構造的な特徴を捉えることで、蛋白質がアレルギー性を獲得する機構を解明できる可能性がある。アレルギー性の発現機構がわかれば、非アレルギー化戦略の開発につながる。例えば、遺伝子組換え技術やポストハーベットの処理でジスルフィド結合等のアレルギーに共通する構造を破壊し、穀物や食品を低アレルギー化できる可能性がある。我々は現在、農林水産省が推進する「アグリバイオ実用化・産業化研究」に協和メデックス株式会社と共同で参画し、「包括的な低アレルギー化研究」の課題で複数の企業や医療機関と共同研究を実施し、アレルギーの検出技術の開発や低アレルギー化手法の開発を試みている。

## 2) アレルギー吸着素材の解析

大和紡績株式会社はアレルギーを吸着する素材「アレルギーキャッチャー」を開発し、これを応用して家電のエアフィルターや寝具、カーペットなどを開発している。我々は和紡績との共同研究で繊維に吸着したアレルギーの定性・定量分析手法を開発し、アレルギーキャッチャーが花粉、ハウスダスト、穀物アレルギー等、多種類のアレルギーを吸着することを見出すことで、アレルギー吸着素材としての有効性を立証した。また、ジスルフィドプロテオームを応用した研究から、アレルギーへの作用は可逆的吸着であり、ジスルフィド結合等の構造には影響を与えないことを確認した(第16回繊維連合研究

発表会で報告, 2005年8月)。これは、アレルギーキャッチャーの安全性に関する重要な知見である。

## 6. まとめ

ジスルフィドプロテオームは蛋白質をジスルフィドという新しい切り口から包括的な解析を行う初めてのプロテオーム手法である。海外の研究機関でも動植物の生理機能解明に応用されはじめ、成果が報告されている。我々は作物の生理機構解明や品質向上のための基盤的研究の有効なツールとしてさらに発展させたい。また、企業との積極的な共同研究を通じて独法での基盤研究成果を社会還元したいと考えている。

## 文 献

- 1) Yano, H. et al. (2001), A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 4794-4799.
- 2) Yano, H. et al. (2002), Disulfide proteome in the analysis of protein function and structure. *Proteomics*, 2, 1090-1096.
- 3) Yano, H. et al. (2003), Identification of disulfide proteins in the salt soluble fraction of rice (*Oryza sativa*) seed. *Cereal Chem.*, 80, 172-174.
- 4) 矢野裕之 (2003), 医学のあゆみ, 205, 522-523
- 5) Yano, H. et al. (2001), Redox changes accompanying the degradation of seed storage proteins in germinating rice. *Plant Cell Physiol.*, 42, 879-883.
- 6) Yano, H. et al. (2006), Disulfide proteome yields a detailed understanding of redox regulations: a model study of thioredoxin-linked reactions in seed germination. *Proteomics*, in press

## ◀国内情報▶

砂糖及びセルロースを原料とした  
酵素合成アミロースの製造と利用<sup>1</sup>江崎グリコ株式会社, <sup>2</sup>三和澱粉工業株式会社,<sup>3</sup>大阪府立大学 生命環境科学研究科鷹羽武史<sup>1</sup>・和田守<sup>2</sup>・北村進一<sup>3</sup>

アミロースはデンプンの成分として、また包接機能を有する機能性材料として古くから知られている。しかし、純粋なアミロースを工業的に製造することは困難であるため、アミロースの産業利用は進んでいない。私たちは、砂糖やセルロースなどの安価な原料を用いて、純粋なアミロースを合成する研究を行い、酵素合成アミロースの量産化技術を完成させた。酵素合成アミロースの製造方法、特徴、機能について紹介する。

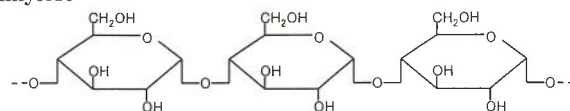
## 1. はじめに

アミロースはグルコース（ブドウ糖）が $\alpha$ -1,4結合で多数結合した直鎖状多糖である（図1）。同様にグルコースが直鎖状に多数結合した多糖には、セルロースがある。セルロースは、グルコース間の結合が、 $\beta$ -1,4結合である点がアミロースと異なる。アミロースはデンプンの構成成分であり、通常とうもろこし、馬鈴薯、米、小麦などの澱粉は、約20%のアミロースを含んでおり、残る80%はアミロペクチンと呼ばれる分岐状多糖である。アミロースは天然デンプン中に多量に存在するため、容易に入手可能な材料のように思える。しかし、実際にはデンプンからアミロースを工業的スケールで精製することは非常に困難であり、純粋なアミロースは試薬としては入手可能であるものの、産業用原料としての流通はない。アミロースを70%含有するとされる「ハイアマロースコーンスターチ」は市場で入手可能であるが、このデンプンのアミロース含量は実際には25%と報告されて

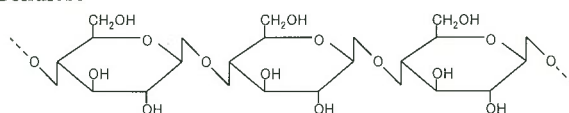
TAKAHA Takeshi<sup>1</sup>, WADA Mamoru<sup>2</sup>,KITAMURA Shinichi<sup>3</sup><sup>1</sup>〒555-8502 大阪市西淀川区歌島4-6-5<sup>2</sup>〒634-8585 奈良県橿原市雲梯町594<sup>3</sup>〒599-8531 大阪府堺市学園町1-1

おり<sup>1)</sup>、アミロペクチンの分岐構造が変化しているために見かけのアミロース含量が高く計算されているものと考えられる。つまり、「ハイアマロースコーンスターチ」は、純粋なアミロースとは、似て非なるものである。しかしながら、このハイアマロースデンプンでさえ、通常のデンプンとは大きく異なる物性、特徴を有しており、それを利用して、食品用途や、工業用途で広く利用されている。私たちは純粋なアミロースの機能や用途には大きな期待が持てると考え、アミロースの酵素合成技術の開発に取り組んだ。

Amylose



Cellulose



Sucrose

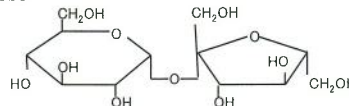


図1 アミロース、セルロース、砂糖の構造

## 2. 砂糖を原料とした酵素合成アミロースの製造

酵素合成アミロースを製造する方法として、砂糖を原料とする方法が考えられる。砂糖はグルコースとフルクトースが結合した2糖類で(図1), 熱帯地方ではサトウキビ, 寒冷地ではサトウダイコンから抽出製造される。砂糖の年間生産量は1億5千万トンに達し, 砂糖は澱粉と並んで最も安価な産業原料の一つである。砂糖に, スクロースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.7) とグルカンホスホリラーゼ (EC 2.4.1.1) を作用させることにより, アミロースが合成可能であることは, Waldmanらにより報告されていた<sup>2)</sup>。私たちはこの技術を産業利用するために, *Streptococcus mutans*由来スクロースホスホリラーゼと, 馬鈴薯由来グルカンホスホリラーゼに対し, 複数のアミノ酸置換を導入し, これら酵素の耐熱性及び安定性の改良を行った<sup>3)</sup>。さらに遺伝子工学的手法と培養工学的手法を組み合わせることにより, 酵素生産性の飛躍的上昇を実現し, 純粋なアミロース(酵素合成アミロース)の量産化体制を整えた。

スクロースホスホリラーゼとグルカンホスホリラーゼを利用した, 砂糖からの酵素合成アミロース製造の仕組みを図2 (A) に示した。スクロースホスホリラーゼによるスクロースの加リン酸分解で生じたグルコース1-リン酸は, グルカンホスホリラーゼの基質として利用され, グルコースが1単位伸長されたグルカンと無機リン酸が生成される。ここで生じた無機リン酸はスクロースホスホリラーゼの加リン酸分解の基質として利用される。このように, この反応系では, スクロースホスホリラ

ーゼとグルカンホスホリラーゼの反応が共役しており, 無機リン酸がリサイクルされることが特徴である。また, スクロースとプライマーのモル比を変えることにより, 生成するアミロースの分子量を制御することも可能である。実際にこの方法により製造した酵素合成アミロースの分析結果を図3に示す。酵素合成アミロースの分子量分布は非常に狭く, その大きさは厳密に制御できている。砂糖中のグルコースの約80%が, 酵素合成アミロースに変換されており, 量的にも質的にも良好な結果が得られている。

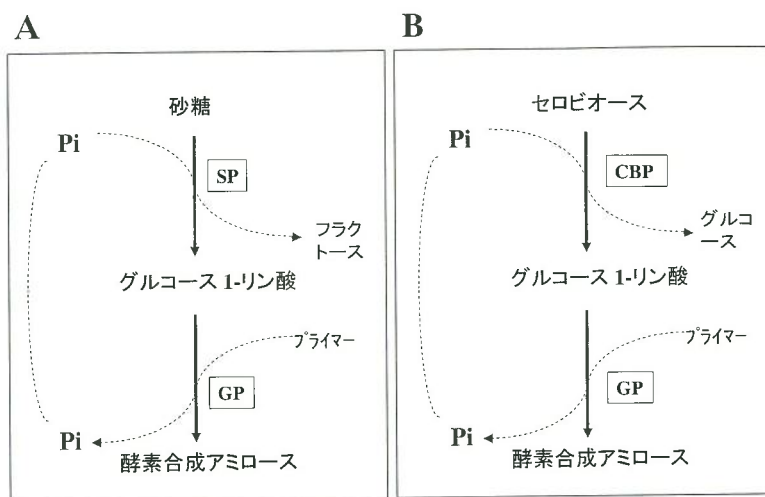


図2 砂糖 (A) 及びセロビオース (B) を原料としたアミロースの酵素合成  
SP: スクロースホスホリラーゼ, GP: グルカンホスホリラーゼ, CBP: セルビオースホスホリラーゼ

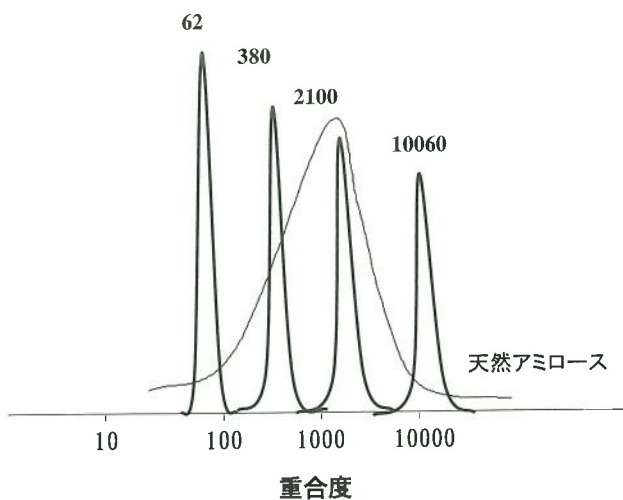


図3 砂糖を原料として製造された酵素合成アミロースの分子量分布

これまでの研究から、アミロースは重合度に応じて、物性や機能が大きく変化することがわかっている<sup>4)</sup>。様々な用途に最適となるようカスタマイズしたアミロースを製造できることは、アミロースの適用範囲を広げる上で非常に重要である。

### 3. セルロースを原料とした酵素合成アミロースの製造

セルロースは高等植物の細胞壁の主要成分であり、地球上に最も大量に存在するバイオマスである。しかし、セルロースではグルコース間の結合が $\beta$ -1,4結合であるため、人間や動物の体内では基本的に分解されず、栄養源にはならない。このため、セルロースは主として工業材料として利用されており、食品産業では食物繊維、もしくは物性改良剤として利用されるにとどまっている。セルロースの年間生産量は1000億トンと推定されており、石油資源の枯渇や食糧危機問題が心配される中、この膨大な未利用資源であるセルロースの有効活用技術の開発は人類共通の課題である。

セロビオースホスホリラーゼ (EC 2.4.1.20) は、セルロースの部分分解物であるセロビオースを加リン酸分解し、グルコース1-リン酸を生成する反応を触媒する。そこでセロビオースホスホリラーゼとグルカンホスホリラーゼの反応を組み合わせることにより、酵素合成アミロースが生産できるかどうか検討した (図 2 B)。*Clostridium thermocellum*由来のセロビオースホスホリラーゼ、および馬鈴薯由来耐熱化グルカンホスホリラーゼをセロビオースに作用させたところ、セロビオースは予想通り、酵素合成アミロース変換された。しかし、その収率は38.6%と低いものであった。私たちはこの低収率の原因が、セロビオースホスホリラーゼの反応により生ずるグルコースが、反応系内に蓄積することにあると考え、グルコース消去を目的として、ムタロターゼとグルコースオキシダーゼを反応系に添加した。この結果酵素合成アミ

ロースの収率を、64.8%まで改善することができた。現時点では砂糖を原料とする場合の収率には及ばないが、更なる収率改善に向け、研究を継続している。本技術は、未利用資源であるセルロースを高付加価値材料に変換する技術として、また栄養源とならないセルロースを、人間の栄養源となるアミロースに変換する技術として、有益なものであると考えている。

### 4. 酵素合成アミロースの機能と利用

酵素合成アミロースは、デンプン中の天然アミロースと基本的に同じ物質であり、消化管、生体組織、自然環境のいずれにおいても極めて優れた分解性を示す、安全な素材である。さらに、包接化合物形成能力、ゲル形成能力、フィルム形成能力などの特徴を有する高機能材料である。酵素合成アミロースはこれらの特徴を組み合わせて利用することにより、以下に示すような幅広い分野での利用が可能である。

#### (1) 機能性材料分野

酵素合成アミロースは図 4 に示すようなヘリックス構造 (らせん構造) をとることができ、その内部の空洞部分に、さまざまな物質を取り込み、包接化合物を形成することができる。澱粉にヨウ素液を加えると、澱粉が青色になることは有名であるが、これは、アミロースのヘリックス構造内部にヨウ素が包接されることによ

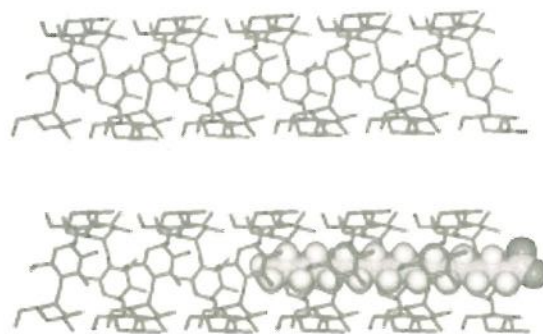


図 4 酵素合成アミロースの構造 (ステアリン酸との包接化合物)

る。酵素合成アミロースはヨウ素以外にもさまざまな物質（薬剤，機能性食品成分，界面活性剤，油，色素，フレーバー物質，環境ホルモン物質等）を取り込むことが可能であり，包接材料として，さまざまな産業分野での利用が期待される。

## （2）成型材料分野

酵素合成アミロースは優れたフィルム形成能力，ゲル形成能力を持ち，これを利用することでフィルムや繊維，中空糸，シームレスカプセル等，様々な形状に加工することが可能である（図5）。特に，酵素合成アミロースフィルムは，石油系汎用プラスチックに匹敵する強度，高い透明性，高いガスバリア性，優れた生分解性を持つとともに，包接機能を発揮させることも可能であり，酸素バリア性包装容器や光学機能フィルムなどへの応用が期待される。

## （3）医用材料分野

酵素合成アミロースの分解性や機能性，成型性を生かせる分野として，医用材料は有望な用途の一つである。生体内に埋め込んで自己組織の再生を促し，その後分解・吸収されるような再生工学用の素材の開発が精力的に行われている。このような材料は，目的の期間までは形を維持し，その後は速やかに分解されることが要求される。奈良先端大の谷原教授らは，置換度を変えたアセチル化酵素合成アミロースのフィルムをラットに埋植して分解性の評価を行った<sup>9)</sup>。その結果置換度に応じて分解性をコントロールできることが明らかになった。また，周辺組織の炎症反応などは認められなかった。酵素合成アミロースをさまざまな物質で修飾することにより，分解性の制御だけでなく温度応答性や生理活性

を付与することが考えられ，組織修復材料や再生促進材料としての利用が期待できる。

## （4）食品分野

酵素合成アミロースの包接機能は，もちろん食品分野においても利用可能であり，不安定な食品材料の安定化，フレーバーの揮発防止，臭いのマスキングなどの目的に利用が考えられる。加えて，酵素合成アミロースは，食品において，テクスチャや物性に大きな影響を与えると考えられ，物性改良，増粘，ゲル化，乳化，テクスチャー改善，安定化，粉末化などの目的で，広範な加工食品への利用も期待できる。しかしながら，現時点では，酵素合成アミロースを食品産業で利用するためには，解決すべき課題が残っている。今後は「生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業（異分野融合研究開発型）」（生物系特定産業技術研究支援センター）の支援を受け，これら課題の解決を行う計画である。

## 5. おわりに

酵素合成アミロースの原料である砂糖やセル

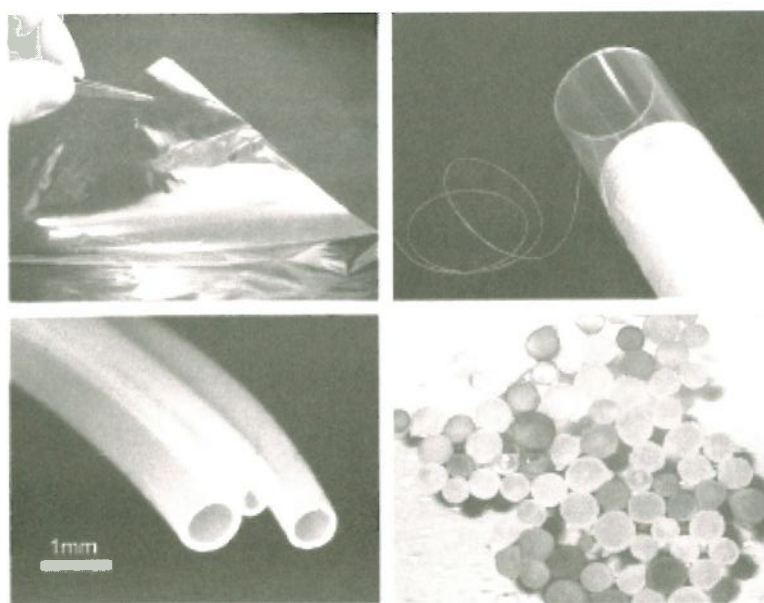


図5 酵素合成アミロースを原料とする成型物(フィルム，シームレスカプセル，繊維，中空糸)



ロースは、植物が空気中の二酸化炭素を固定して生産したものであり、毎年植物を栽培することにより再生産が可能である。酵素合成アミロースは環境中で容易に分解され、二酸化炭素と水になる。このように酵素合成アミロースは、優れた機能と、環境へのやさしさを兼ね備えた新規材料である。今後も、酵素合成アミロースの製造方法の改良と、新たな用途開発を継続し、この古くて新しい素材を育てていきたいと考えている。

本稿で紹介した研究の一部は、「知的クラスター事業」(文部科学省) および「地域新生コンソーシアム事業」(経済産業省)の支援により行われたものである。

## 文 献

- 1) Baba, T. (1987), *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 34, 213-217
- 2) Waldmann H., et al. (1986), *Carbohydrate Research*, 157, c4-c73)
- 3) Yanase M. et al. (2005), *Appl. Environ. Microbiol.*, in press
- 4) Kitamura S. (1996), in *The Materials Encyclopedia, Synthesis, Properties and Applications* (Salamone J.C., Ed) 7915-7922, CRC Press, Boca Raton, USA
- 5) 谷原正夫ら (2005) *月刊バイオインダストリー*, 22, 58-66



### ブレインテクノニュース

バックナンバーのご案内

第110号

2005年7月15日発行

#### 総 説

食品成分による肥満・生活習慣病の制御……………齊藤 昌之

#### 国内情報

エネルギー消費分子UCPの機能と食事性調節 ……齊藤 昌之  
脂肪細胞の分化・増殖と食品中の調節因子

……………河田 照雄・後藤 剛・高橋 信之  
食用植物由来の酸化ストレス制御因子による生活習慣病

の制御……………室田 佳恵子・寺尾 純二  
受精の膜融合における必須分子Izumoの発見

……………井上 直和・岡部 勝  
ポブラ葉緑体形質転換技術開発……………富澤 健一

有毒渦鞭毛藻個体群の多型分子マーカーによる遺伝的構造と  
遺伝子流動の解明……………長井 敏・練 春蘭・浜口 昌巳・

松山 幸彦・板倉 茂・宝月 岱造

耐塩性ラン藻の新規生合成経路を利用した塩害に強い植物の  
開発……………田中 義人・日比野 隆・高倍 昭洋

農作業事故情報の収集と安全啓発……………中野 丹

#### 地域の先端研究

緑色大型藻類の葉状体形成因子Thallusinの発見と今後の展開  
……………松尾 嘉英・今川 洋・西沢 麦夫・志津里 芳一

#### 文献情報

卵巣周期モニタリングのための肉牛糞便中プロジェステロン  
の酵素免疫測定法……………(抄訳：下司 雅也)

珠孔に花粉管を誘導するタンパク質の発見  
……………(抄訳：岩井 純夫)

食品の微生物学的安全性におけるゲノミクスの役割  
……………(抄訳：堂本 信彦)

カドミウムストレスに対するグルタチオントランスフェラー  
ゼの役割……………(抄訳：安達 美和)

## ◀国内情報▶

カシノナガキクイムシ集合フェロモンの化学構造決定  
－ナラ類集団枯死の回避を目指して－

独立行政法人 森林総合研究所

中 島 忠 一

養菌性クイムシの仲間であるカシノナガキクイムシは、植物病原菌を媒介して生きたミズナラ等に集中的な加害をしてナラ類の集団枯死を引き起こしている。安全で効果的な被害回避技術の開発が望まれている。集中加害発生に重要な役割を果たしているカシノナガキクイムシ集合フェロモンの化学生態学的研究を行い、その化学構造と野外での誘引活性を明らかにした。防除技術への利用が期待される。

## 1. はじめに

近年、ミズナラなどナラ類の大径木が集団で枯死する被害が、山形県から島根県に至る日本海側の地域を中心に拡大している。コナラやカシワも枯死することがあり、マツ材線虫病の広葉樹版として全国に拡大し重要な森林資源であるミズナラを枯渇させることが危惧されている。古い記録では狭い範囲での枯死が数年続いた後に終息する限定的・断続的な被害であったが、1980年代以降は枯死が周辺に拡大する広域的・連続的な被害となっている。林野庁統計によると、全国の年間被害面積は2002年に約1000haに達し、その後も増加を続けている。枯死原因は体長約4.5mmのカシノナガキクイムシ(図1, 以下カシナガと略)の集中的な穿入と引き続く辺材部での孔道延長と、それにより伝搬される植物病原菌(*Raffaelea quercivora*)の感染に伴う寄主の通水停止である<sup>2)</sup>。

枯死がもたらす直接的な経済効果がそれほど大きいとは考えられないが、人間の生活環境を向上させるためには被害を回避し健全な森林と水源涵養などの公益的機能を維持することが重要である。公立の林業関連研究機関では、燻蒸剤注入<sup>4)</sup>、ビニールシート被覆<sup>1)</sup>や食用きのこ

NAKASHIMA Tadakazu

〒305-8687 茨城県つくば市松の里1



図1 カシノナガキクイムシ成虫  
左が雌、右が雄、体長は約4.5mm。

の植菌<sup>3)</sup>等の枯死被害防止技術を開発しており、各地の防除事業で利用されている。しかし、傾斜地での作業には困難が伴うことなどから被害林の多くは放置されたままである。カシナガの生態特性を利用した安全で効果的な枯死被害防止技術の確立が求められている。

2. カシノナガキクイムシと植物病原菌  
(*R. quercivora*)

ヨーロッパや北米で用材生産等のために植林された針葉樹に大面積の枯死被害を発生させて

いる樹皮下穿孔性キクイムシは、パイオニアに誘引された多数の同種個体が生きた木に集中加害をして寄主の防御反応を回避することによって高栄養の形成層部分を餌として繁殖している。一方、カシナガを含む養菌性キクイムシは、死んだ木の貧栄養な樹幹辺材部に孔道を延ばして孔道内に繁殖させたアンブロシア菌を穿入成虫と次世代の幼虫とが摂食しており、生きた木を殺すことはないと考えられていた。しかし、カシナガはナラ類の集団枯死において木を殺す植物病原菌を媒介して集中的な加害をすることが明らかにされ、養菌性キクイムシが生立木を枯らすことが証明できた世界初の事例となった。

先導的に穿入するパイオニアの加害から枯死に至る過程は次のように考えられる。カシナガのパイオニアである雄成虫は繁殖の場となる好適な寄主に穿入し、多数の同種個体を誘引する集合フェロモンを放出することで集中加害を引き起こす<sup>3)</sup>。多数のカシナガのペアが延長する孔道は樹幹導管部において物理的傷害となる。寄主細胞を殺す力は強いが寄主細胞壁を破壊して次々と隣接細胞に感染を引き起こす力が弱い *R. quercivora* は、菌糸を細胞内に伸ばす足がかりとしてカシナガの孔道という空間を利用し分布域を広げていく。病原菌が侵入した部位では通水が停止するので、樹幹内での孔道の延長は病原菌の蔓延と通水停止域の拡大をもたらす。通水停止域が樹幹部横断面全体に広がり、樹幹部を通して葉からの蒸散に見合う水を供給できなくなると、葉が萎凋して枯死に至る。盛夏に枯死した寄主樹幹内ではカシナガの繁殖が旺盛となり、幼虫による孔道延長の際に排出される大量の顆粒状フラス（糞の混じった木屑）は翌年でも確認できるほど地際に堆積する。越冬後に蛹化・羽化した成虫は梅雨期に親の穿入孔から脱出し、新たな寄主に穿入して交尾から子育てへと続く長い樹幹内生活を始める。

### 3. 枯死回避への考え方

ナラ類を枯死に至らしめる病原菌と媒介昆虫

それぞれの特性、被穿入寄主が枯死に至る過程、さらに穿入されても枯死しない寄主木の存在等から枯死回避方策は次のように考えることができる。

カシナガの穿入を受けても萎凋・枯死に至らないミズナラが少なからず存在する。このような被穿入非枯死木の樹幹断面ではカシナガ孔道数が少なく、辺材部の変色域は水平面全体には広がっていない。すなわち、葉からの蒸散を上回る量の水を送れるだけの通水域を確保できたことで枯死を免れたと考えられる。このような非枯死木から脱出するカシナガ次世代成虫は極少数であり、加害されても枯死を回避できた寄主の増加はカシナガ個体群密度抑制に大きく寄与することが期待される。

したがってカシナガ穿入数を人為的に減少させて樹幹内総孔道長を短くすることは、病原菌の生息域すなわち通水停止域の拡大を抑制し枯死を免れる寄主個体を増加させると考えられる。行動制御物質を利用して新寄主へのカシナガ穿入数を減少させることで枯死被害を低減させる技術の開発は、作業の安全性の面からも強く求められている。そこで、強い行動制御活性を有するカシナガの集合フェロモンを対象とした化学生態学的研究を行った。

### 4. 集合フェロモン

カシナガの雄は、雌より先に寄主となる樹木の幹に穿入して数センチだけの孔道を掘り、孔道を掘るときに出る木屑を入り口から外に押し出す（図2）。このようなパイオニア穿入木には多くの雌雄成虫が集まってきて、雄は雌を迎え入れるための孔道を掘り始め、雌は雄の作った孔道に入ることで繁殖に向けた共同作業を開始する。カシナガが音響によって情報交換していることは知られているが、雌による未交尾雄穿入孔の探索における役割はよく判っていない。

野外で認められるパイオニア穿入木の雌雄成虫に対する誘引性を供試虫の行動で再現できる

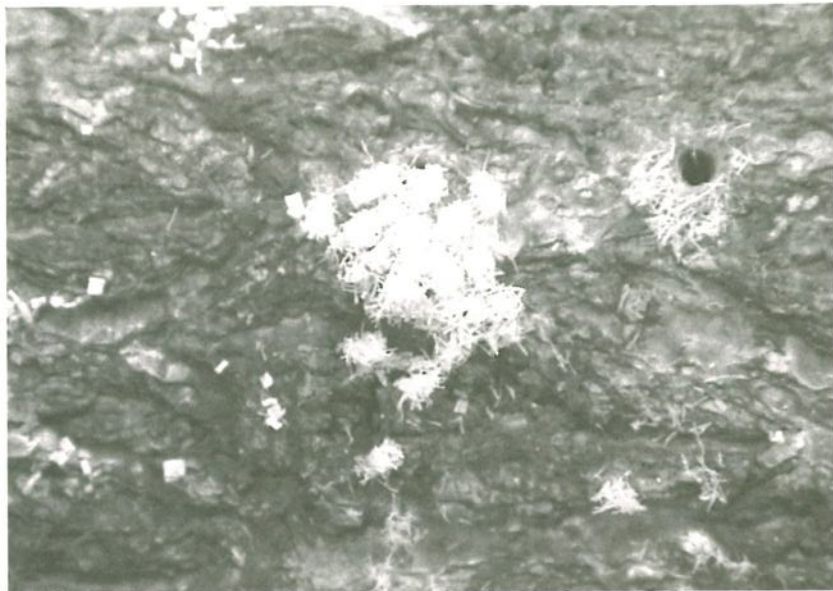


図2 カシノナガキクイムシが排出した木屑

右上に見えるのが交尾前，中央に見えるのが交尾後の穿入孔から排出された木屑で量も形態も異なる。

室内試験の構築に取り組んだが，カシナガの強い走光性に妨げられて未だ確立できていない。そこで，誘引成分の探索をガスクロマトグラフィーにより分離された化学成分が昆虫の触角に及ぼす電気生理学的反応を検出するGC-EAD法によって行った（図3）。鱗翅目や双翅目の昆虫用に開発された電極や生理食塩水に改良を加え，クイムシに特有な形状をしたカシナガの触角から電気信号を検出できる方法を開発した。

未交尾雄が孔道外へ押し出した木屑から集め

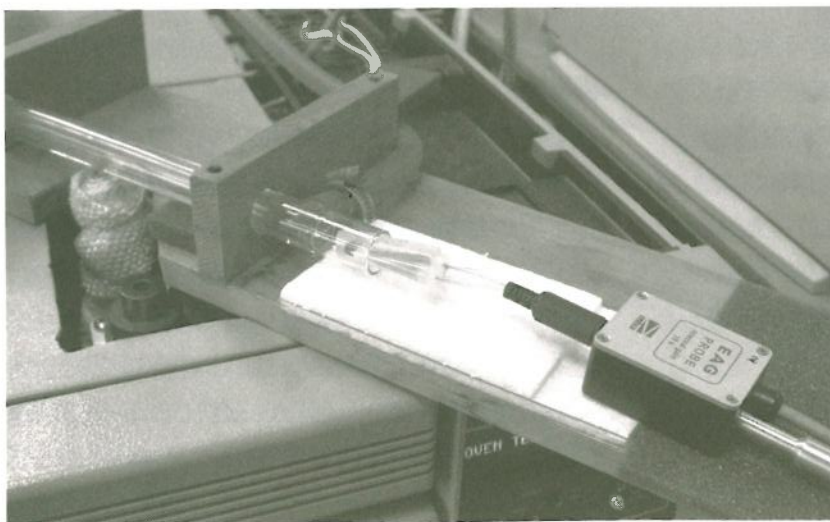


図3 GC-EAD測定装置

中央に見える触角を乗せた電極で電気生理学的反応を検出する。

た揮発成分をGC-EAD法で分析することによって，一番量の多い成分がカシナガの触角で受容される情報伝達物質であることが明らかにできた（図4）。この木屑揮発成分のGC-MS分析では複数のテルペン化合物が検出され，触角に電気生理学的反応を誘起した成分は分子量が154のモノテルペンアルコールの一種であり，化学構造は1-methyl-4-methylethyl-2-cyclohexen-1-olであることが明らかになった。置換基の相対配置は1位の水酸基と4位のmethyl-ethyl基とがシクロヘキセン

環平面の異なる側に存在するtrans体であることをマススペクトルの詳細な解析から明らかにした（図5）。情報物質の絶対立体配置が1R, 4S体なのか1S, 4R体なのかは決定できなかったが，キラルカラムを用いたGC分析で単一ピークを示すことから，カシナガは立体異性体の一方のみを利用していることが明らかになった。

この情報化学物質がカシナガ成虫にどのような行動反応を引き起こすかを明らかにするため，ラセミ体の合成化合物を誘引源とした野外捕獲試験を山形県と京都府の被害林において実施した。その結果雌雄の成虫が多数誘引されたので，雄が作っているこの化合物は，雌だけを集める性フェロモンではなく，集合フェロモンであることが明らかになった。

## 5. おわりに

カシノナガキクイムシは仔

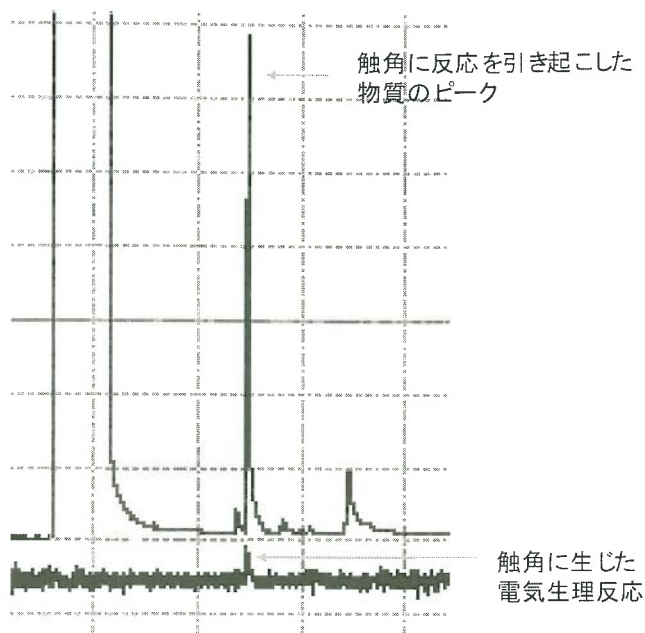


図4 木屑揮発成分のGC-EAD分析  
 上のグラフが物質の量を示し、下のグラフは触角の反応の大きさを示す。

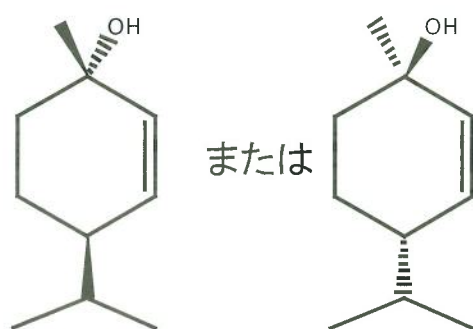


図5 集合フェロモンの化学構造

が孔道延長や育兒に関わることが明らかにされつつあり、その社会的な生活様式は生物学的に極めて面白い材料であるが、生活の大部分が樹幹内ということで研究が遅れている。また地域により異なる特性を持つ集団が存在する事が指摘されており、共生関係の確立過程等生物間相互作用や情報化学物質との関わりといった面からも興味深い生き物である。

他方、被害発生・防除といった面からの研究が求められている。ここに述べた研究ではカシ

ナガの雄が放出する一つの化合物が誘引性を示す集合フェロモンとしての生理作用を有することを明らかにした。これによりナラ類の集団枯死被害を防止する技術の開発研究において集合フェロモンの利用が可能となった。キクイムシ類の集合現象の解明研究では、集合フェロモンと抗集合フェロモンとの放出調節によって集中加害の開始と終息が制御されていることが明らかにされている。カシナガにおいても他の生理作用を示す化合物、同種または他種が生産する誘引性化合物ならびに抗集合フェロモン等忌避性化合物などについてその存否を明らかにすることが期待されている。

現在、農林水産省による先端技術を活用した農林水産研究高度化事業「ナラ類集団枯死被害防止技術と評価法の開発」のなかで集合フェロモンによる大量誘殺法開発を実施しており、他の生理活性物質をも組み込んだ防除技術へと発展させたい。

共同で研究を進めていただいた森林総合研究所の所雅彦博士、衣浦晴生博士、山形県森林研究研修センターの齊藤正一氏、ならびに京都府林業試験場の小林正秀博士に深謝します。野外生物検定に用いた合成化合物を御恵与くださった高砂香料工業株式会社に感謝いたします。

## 文献

- 1) 小林正秀ら (2003), 森林防疫, 52, 137-147
- 2) Kubono, T. et al. (2002), *Mycoscience*, 43, 255-260
- 3) 野崎愛ら (2003), 森林応用研究, 12 (2), 167-171
- 4) 齊藤正一ら (2000), 林業と薬剤, 152, 1-11
- 5) Ueda, A. et al. (2001), *J. For. Res.*, 6, 173-179

## ◀国内情報▶

## 携帯式作物生育情報測定装置の開発

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構

生物系特定産業技術研究支援センター

堀尾 光広 ・ 紺屋 秀之 ・ 西村 洋 ・ 林 和信

作物（主に水稻を対象）の生育状態を判定する携帯式の装置を開発した。作業者が本装置を携帯してほ場に入り、センサ部を作物の上にかざし手元操作ボタンを押すことで、センサ直下の作物の生育状態を瞬時に知ることができる分光反射測定式の計測装置である。計測値は水稻の茎葉窒素含有量と高い相関があり、生育ステージの違いに影響されず指数関数で回帰できる。水稻の生育診断用機器として施肥設計最適化への応用も期待できる。

## 1. はじめに

近年の水田稲作を取り巻く環境は、食生活の多様化による米消費量の減少や米価の低迷など、依然として生産者に厳しい状況が続いている。数量配分への生産調整方式の転換や、地域の特色ある水田農業の展開を図るための「産地づくり対策」といった米作りのあるべき姿が示されるなか、高付加価値・高品質米生産への取組みはますます重要となる。高品質米生産の実現には、作物の生育状況を把握しそれに適した栽培管理を行うことが求められ、従前より窒素栄養状態を知るための生育診断が行われてきた。慣行の生育診断では、茎数、草丈、葉色（葉緑素計または葉色板を使用）等を調査するが、多くの労力を要し、ほ場1筆当たりの調査株数が20株程度にとどまるため、ほ場全体の生育状況を把握することや広域を対象とすることは容易でない。こうした生育診断は主として出穂25日前～15日前の幼穂形成期から減数分裂期にかけて実施されるが、茎葉の窒素栄養状態は玄米の品質・収量とも密接な関係にあることから、今後は出穂期以降の生育状況の把握も重要度を増すと思われる。

HORIO Mitsuhiro, KONYA Hideyuki,

NISHIMURA Yoh, HAYASHI Kazunobu

〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

植生の観察等を目的に分光計測機器を用いるリモートセンシングの分野では、これまで様々な研究が行われ、そのための機器も多く作られ利用されている。いずれも、物質の種類によって光の反射が異なり、植物に限って言えば、生育の程度や活性度の違いによっても反射のしかたが違うという特性が生かされている。北海道など一部の地域で、水稻の生育診断に衛星リモートセンシングが利用され、既に実用レベルに達している技術例もあるが、この場合も補完用の地上データ取得に前述の慣行診断が併用され、そのために多くの労力を要している。衛星リモセンに限らず、分光計測機器を利用した作物の生育診断技術は今後益々その重要度を増していくと思われる。技術をより発展させ普及させるには、慣行診断にかわる簡易な手法を用いた実用技術の開発が急務である。

生研センターでは、平成14年度まで実施した「21世紀型農業機械等緊急開発事業」において、簡易な操作で水稻の窒素栄養状態の把握を可能とする「携帯式作物生育情報測定装置」（以下、携帯式装置と呼ぶ）を開発した。現在進めている「日本型水稻精密農業（PF）実証試験」では、現場適応性を評価しつつ作物、品種、地域など様々な条件での基礎的データ蓄積に努めている。以下に本装置の概要を紹介する。

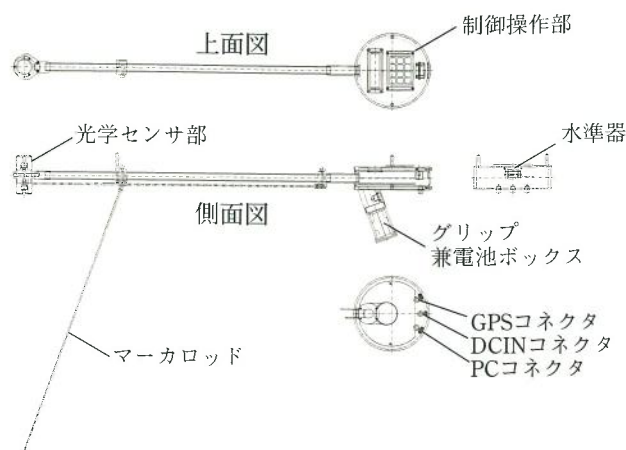


図1 携帯式装置の概要

## 2. 携帯式装置の構造概要

携帯式装置は、作物からの反射光と太陽光を測定するセンサ部、測定操作や表示、データ処理を行う制御操作部などで構成される。センサ部は3個のシリコンフォトダイオードの入射面に分光フィルタ（各々G：550nm [半値幅 $\Delta$ 50nm]，R：650nm [ $\Delta$ 80nm]，IR：880nm [ $\Delta$ 50nm])を貼布した一对のセンサブロックを鉛直方向上向きと下向きに取り付けた構成である。上向きのセンサで稲体に入射する太陽光の強度を、下向きのセンサで稲から反射される光の強度を計測することにより、3波長の分光反射率相当値を求める。上向きのセンサには、入射光角度の影響を避けるための拡散板を取り付け、センサブロック下方には、測定高さ（約60cm）を一定に保つと共に測定中心を指示するマーカロッドを取り付けている。測定は、センサ部を測定地点の真上にかざし手元ハンドルの測定ボタンを押すことで瞬時に終了する。測定値は、測定ボタン押下後直ちに表示部に表示され、装置内のメモリへ記憶される。測定終了後、RS-232C経由でパソコンへ転送したのち詳細な解析をすることもできる。またGPSを接続することにより、測定値と位置情報を同時に記憶することも可能である。装置全体の質量は約1.2kgで、湛水田等での使用を考慮し簡易防水構造となっている。

## 3. 反射率の計算と生育指標演算式

各分光波長の反射率は、上側センサ値 $I_{ux}$  ( $x$ は分光波長を示す)で下側センサ値 $I_{dx}$ を除することで求める。このとき、各センサ値からあらかじめ測定したオフセット値 ( $D_{ux}$ ,  $D_{dx}$ )を引いておく。また、除した値に白色校正係数 $W_x$ を乗することで白色板を基準とした反射率相当値 $r_x$ を計算する。ここで、各分光波長の白色校正係数 $W_x$ は、基準白色板の入射/反射強度比を測定しその逆比を求めて決定したものである。以下に反射率相当値の計算式を示す。

$$r_x = \frac{I_{dx} - D_{dx}}{I_{ux} - D_{ux}} * W_x \dots \dots (1)$$

植物特に水稲では、可視光 (RまたはG) と近赤外光 (NIR) 付近の反射の強さを調べることで、生育の状態を判断できることが判っている。また、生葉と土及び水との反射の違いを利用して、繁茂程度を判断することもできる。すなわち、生葉は可視光領域では土や水より反射率が低く、近赤外光領域では逆に反射率が高いという特性があるため、可視光領域の反射率が低くなるほど、また近赤外光領域の反射率が高くなるほど繁茂度が高くなっていると判断することができる。生育の程度を表す指標として様々な演算式が考案されているが、携帯式装置では、上記の繁茂度の違いや活性の違いを良く

表現すると考えられるNDVI（正規化植生指数）を採用し、2桁の整数で表示できるようにこれに100を乗じGI値（Growth Index）と称している。以下にGI値の演算式を示す。

$$GI = NDVI * 100 = \frac{r_{880} - r_{650}}{r_{880} + r_{650}} * 100 \dots \dots (2)$$

#### 4. 水稲生育診断への利用

慣行の水稲生育診断は、主に穂肥の判定を目的として幼穂形成期を中心に実施され、茎数、草丈、葉色を測ることで栄養状態の診断が行われる。この時期の生育診断では、それまで水稲がどれだけの窒素を吸収したかを調査し、この先稲体が必要としている窒素量を判定することがねらいである。現状では、窒素分析にはケルダール法などの理化学的手法を要するため、それに代わり茎数、草丈、葉色を測ることで、間接的ではあるが窒素含有率または窒素含有量の推定を行っている。携帯式装置は、こうした慣行法にならない、より簡易な操作で窒素含有量を推定できる手段の提供を目的としている。装置の開発にあたり実用性を調査するため、測定値と稲体の窒素含有量との関係を調べる試験を実施した。試験では、携帯式装置の測定中心4株を抜き取り、茎葉の窒素含有量を調査してGI値との関係を求めた。調査は、8府県（秋田、宮城、埼玉、新潟、滋賀、京都、兵庫、福岡）で日本の水稲作付面積上位4品種を主な対象と

し、栽植密度、基肥施用量、測定時の生育ステージ等の条件を様々に変えて実施した。図2左に穂肥期前後のGI値と茎葉窒素含有量との関係の例を示す。なお茎葉窒素の分析は、ケルダール法またはクロマト分離TDC検出方式の全窒素測定装置Sumigraph NC-220Fにより行った。

例に示すように、調査日によらず（生育ステージの違いに影響されず）全体を指数関数で回帰することができ、栽植密度や穂肥量を変えた試験区にも同様に当てはめることができる。宮城のひとめぼれでは、幼穂形成期における最適窒素含有量が5.3～5.8g/m<sup>2</sup>とされることから、GI値の最適範囲は78～80の範囲にあると判断できる。異品種間での比較では、草丈や草姿、葉色の濃淡の現れ方など、個々の品種が持つ特性の違いにより傾向が若干異なるため、実用場面では、こうした特性の違いを考慮したうえで利用方法を確立する必要がある。

水稲の収量は、穂数、一穂粒数、登熟歩合、玄米千粒重の4つの収量構成要素の積である。これら構成要素は、生育が進む過程で順次決定されるが、いずれも稲体が吸収した窒素含有量の多少に支配される。したがって生育期間中の特定の時期に窒素栄養状態を調査することにより、収量や玄米タンパク質含有率の予測も可能になると考えられる。図2右のように、携帯式装置の測定値と収量構成要素との相関を示す結果も得られている。

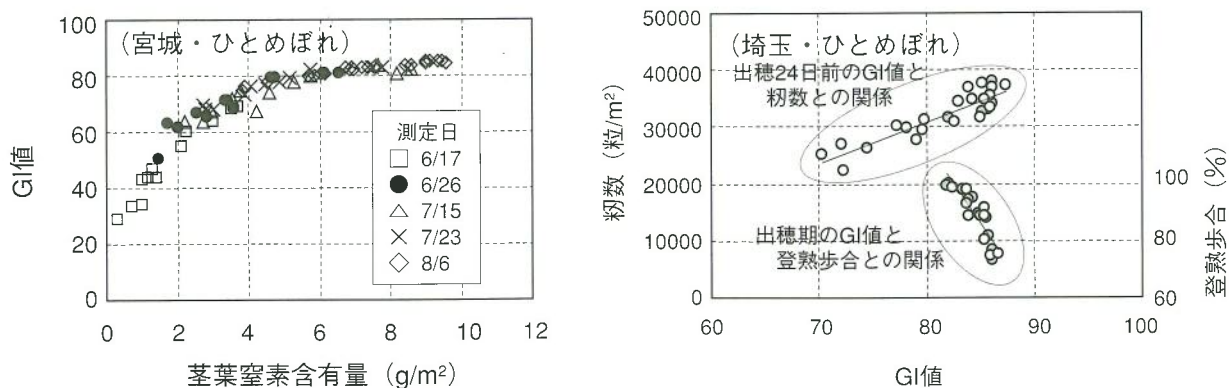


図2 GI値と茎葉窒素含有量、収量構成要素との関係



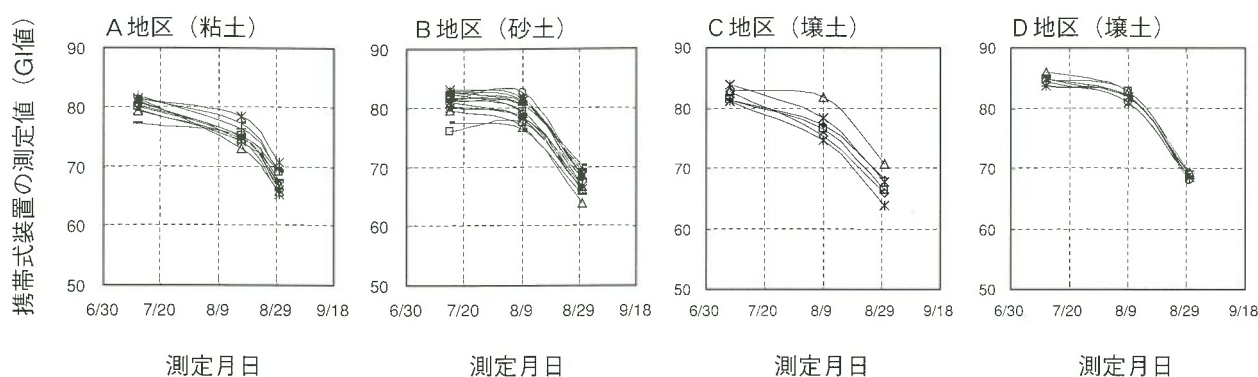


図3 携帯式測定値 (GI値) の推移 (宮城, ひとめぼれ)

## 5. ほ場の特性把握と施肥設計への応用

冒頭で紹介した「日本型水稻精密農業 (PF) 実証試験」では、新潟県長岡市越路町及び宮城県志田郡三本木町において現地試験を実施している。平成16年には、生育期間中に3回ないし4回の測定を行い、ほ場ごとにGI値の推移を見た。宮城県では、個人農家の水田約130筆を対象として、幼穂形成期、穂揃い期、登熟期の3回にわたり測定を行った。図3は、宮城で行った測定結果の一部である。地区別、土壌分類別に異なる傾向があること、同一地区内でもGI値に大小があることが認められる。同一地区内ではほぼ同様の管理 (田植時期、基肥量) が行われており、平成16年は穂肥の実施が無かったことから、ほ場の排水性の良否やそれらに起因する地力窒素発現の多少の影響が大きかったと推察される。現地試験の対象としたほ場では、一筆ごとの収量、玄米タンパク質含有量の調査も行った。同一地区でほぼ同じ管理方法でありながら、収量-タンパクの関係を見るとほ場1筆ごとに様々な異なった傾向を示した。これら収穫時の情報も合わせて考察することにより、一筆ごとのほ場の特性を把握すること、さらにはそれに基づき最適な管理を行うことも可能になると考える。

## 6. おわりに

携帯式装置は、上下センサの組合せにより補正することで外光変化の影響をキャンセルしているが、早朝や夕方など光の入射角度が小さい時や、3000ルクスを下回るような極端に低照度の時には測定を控えるのが望ましい。また、この装置は、窒素推定のための指標値を得る装置であり、窒素測定装置ではない。すなわち穂肥量判定その他に利用するには、図2に示したようなデータの裏付けが必要となる。来シーズンの本格的な実用化を目指して準備を進めているところだが、使用に際して以上の点へ周知を図りつつ普及に努める必要があると考えている。

## 文 献

- 1) Shaobing, P. et al. (1999), *Plant Prod. Sci.*, 2 (4), 227-231
- 2) 秋山侃 (1996), 日作紀, 65 (2), 379-389
- 3) 末信真二ら (1994), 福岡農総試研報, A-13, 5-8
- 4) 深山政治 (1988), 千葉農試特報, 15, 1-92

## ◀地域先端研究▶

バラのアントシアニン生合成における  
新規糖転移酵素の発見青森県農林総合研究センター グリーンバイオセンター  
緒方潤・菅野善明・鈴木正彦

花の主要な色素の1つであるアントシアニンは、その前駆体であるアントシアニジンに糖転移酵素（グリコシルトランスフェラーゼ）の働きにより糖が付加されることで生成される。この反応によりアントシアニンは安定化され水溶性となって液胞に輸送され蓄積し花卉の着色がなされる。今回、バラでのアントシアニン生合成系において、この糖転移反応が他の植物で知られている経路と異なることを酵素学的に見出し、この反応を担う糖転移酵素cDNAのクローニングを行った。その結果、バラのアントシアニン生合成は、まったく異なる新規の糖転移酵素によって行われることが明らかになった。

## 1. はじめに

花の色は花粉を運ぶ昆虫や鳥などの花粉媒介者を引き寄せる大切な役割を果たすが、その主要な橙、赤、紫や青の色素としてアントシアニンがある。これまでに500種近くのアントシアニンが様々な植物の花・果実・葉・根などから単離、同定されている<sup>1, 2)</sup>。また、そのアントシアニンの生合成は多くの植物種で詳細に研究されており、もっとも単純な構造をしたアントシアニン（アントシアニジン3-グリコシド）までの経路は高等植物では共通であると考えられてきた<sup>3, 4, 5)</sup>。1分子の4-クマロイル-CoAと3分子のマロニル-CoAが縮合しカルコンが生成され、その後、フラバノン、ジヒドロフラボノール、ロイコアントシアニジンを経てアントシアニジンができ、最後にグルコースやガラクトースなどの糖がアントシアニジンの3位に付加してアントシアニンが生成される（図1）。これらの各反応を担う酵素遺伝子は様々な方法により多数クローニングされている。アントシアニジンからアントシアニンに至る反応はアントシアニン形成における重要なステップであり、

アントシアニジンが配糖体化することによって、はじめて安定化し水溶性となり液胞に運ばれ花卉に色が生じる<sup>4, 5)</sup>。アントシアニジンの配糖体化はまずC環の3位の水酸基に糖残基が付加されるが、その後は、各植物独自の配糖体化やアシル化、メチル化などの修飾がなされ、その植物種固有のアントシアニンが合成され、結果として多様な花の色が作られている。

バラは古代から人々に‘花の女王’と賞賛され、多くの育種家が品種改良を行ってきた。バラには24,000以上の（品）種<sup>6, 7)</sup>があり、様々な花色が作出されているが、その代表的な赤い色であるアントシアニンの構造は至って簡単な構造をしたアントシアニンである。アントシアニンにはB環の水酸基の数によって、水酸基を1つ持つペラルゴニジン、2つのシアニジン、そして3つのデルフィニジンがあるが、バラはシアニジンの3位と5位にグルコース残基が付加したシアニジン3,5-O-ジグルコシド（Cy3G5G）が主要なアントシアニンである。

## 2. バラのアントシアニジン糖転移酵素の探索

バラではアントシアニン生合成に関与する酵素の精製や遺伝子の単離は意外と行われておら

OGATA Jun, KANNO Yoshiaki,

SUZUKI Masahiko

〒030-0142 青森県青森市野木山口221-10

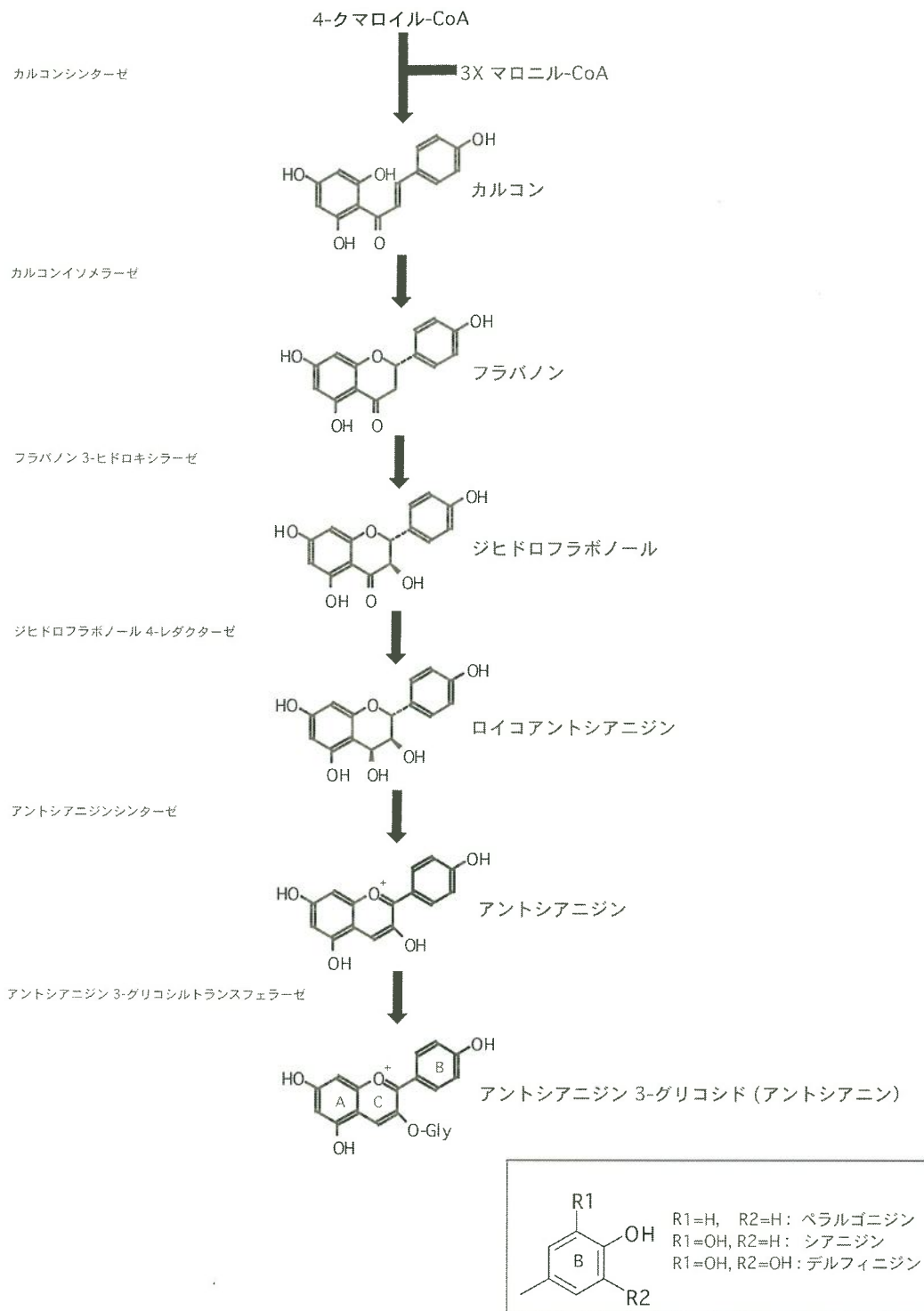


図1 アントシアニン合成経路

ず、その原因の1つとして、木本植物であり、花卉組織中に多量のフェノール類やタンニン類が含まれており、酵素や遺伝子の精製が困難なことがあげられる。花卉からフェノール類などの夾雑物質を水溶性ポリビニルピロリドンを用い除去する操作を行いながら、粗酵素液を抽出

しアントシアニンに糖を転移する酵素活性があるか検証した。これまでの他の植物での報告と照らし合わせて考えると、バラ花卉中にはCy3G5Gが蓄積していることから、まずシアニン (Cy) の3位に、そして5位にグルコースが付加する反応が行われていることになる。

Cyおよびシアニジン3-O-グルコシド (Cy3G) を糖受容体 (基質), UDP-グルコースを糖供与体として試験管内で反応を行ったが, Cyを基質とした場合はCyに糖が1つ付加した産物と2つ付加した産物が検出されたのに対し, Cy3Gを基質とした場合では反応産物は検出されなかった。また, 糖が2つ付加したと予想された反応産物はCy3G5Gであった (図2)。

Cyから生じた2つの反応産物をTLC (薄層クロマトグラフィー) により分離し詳細に解析したところ, Cyに糖が1つ付加したと思われるスポットは紫外線照射下で強い橙色の蛍光を発した。この蛍光色はCy3Gが発する青紫色とは明らかに異なるものであった。そこで, 人工的にシアニジン5-O-グルコシド (Cy5G) を作成し, その蛍光を調べたところやはり強い橙色の蛍光を示した。また, そのCy5Gを基質として酵素反応を調べるとCy3G5Gが生成された。この結果が正しいとすると, バラ花卉の粗酵素液中には, まずCyの5位に糖を付加する酵素とそのCy5Gの3位に糖を付加させる酵素の2

種類の糖転移酵素が存在していることになる。そこで, これらの反応を有する糖転移酵素の遺伝子を直接単離して調べることにした。

### 3. アントシアニン糖転移酵素遺伝子のクローニング

植物の二次代謝に関わる糖転移酵素に認められる共通のドメインを基に設計したプライマーを用い, バラ花卉から調製したRNAに対して合成したcDNAを鋳型にRT-PCRを行った。増幅産物のクローニング, 塩基配列の決定により糖転移酵素遺伝子の配列をコードすると考えられるクローンを得, さらに, その塩基配列を基にRACE法により全長cDNAの塩基配列を決定した。次にこの糖転移酵素遺伝子と考えられるタンパク質のコード領域を組換えタンパク質発現ベクターにクローニングし, 大腸菌を用い組換えタンパク質を発現させその活性解析を行った。

組換えタンパク質による酵素反応実験を行っ

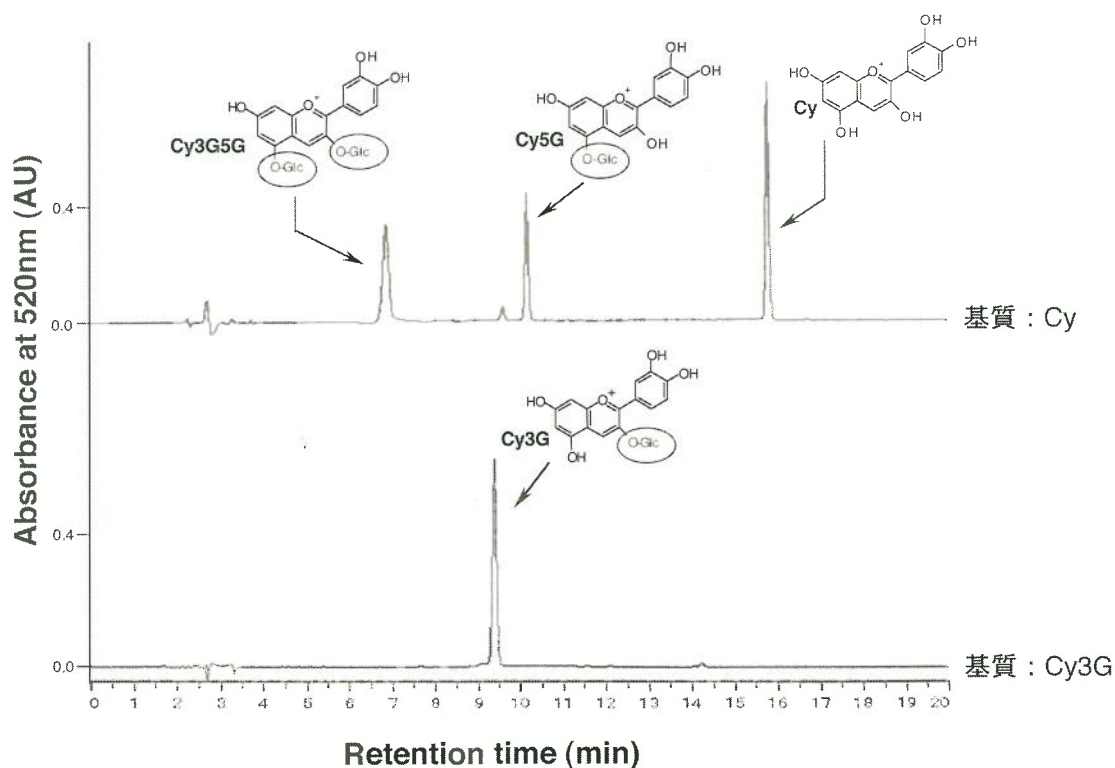


図2 HPLC (高速液体クロマトグラフィー) によるバラ花卉酵素抽出液を用いた糖転移酵素活性の解析

たところ、花卉粗酵素液を用いて得られた結果と同様の結果が得られた。即ち、この糖転移酵素cDNA由来の組換えタンパク質 (RhGT1) もCyを基質とした場合、2種類の反応産物が得られ、Cy3Gは基質とした場合は反応産物は得られなかった。またCy5Gを基質とした場合はCy3G5Gが検出されたのである。つまり、非常に興味深いことにバラのアントシアニン糖転移酵素は1つの酵素 (遺伝子) で5位から3位という順序で連続的に2つの位置に糖転移反応を行うのである<sup>8)</sup> (図3)。また、ノザンプロット法による遺伝子の発現様式を調べてみると、花卉の発育段階におけるアントシアニン蓄積の傾向と同一であった。

#### 4. 進化的な意味

糖転移酵素は様々な反応に携わっているため、その数は非常に多く、動植物において得られた糖転移酵素の系統樹は一つのスーパーファミリーを形成している。今回得られたバラの新規糖転移酵素を含めて系統樹を作成してみる

と、これまで植物で単離されたアントシアニジンの3位に糖を付加するアントシアニン3-O糖転移酵素 (3GT) とアントシアニン5-O糖転移酵素 (5GT) とのサブファミリーとは全く異なる位置にあることが分かった。つまり、これまでのアントシアニン (ジ) ンに関する糖転移酵素とはまったく異なるカテゴリーに分類されるのである (図4)。このことはバラの新規糖転移酵素は通常の植物の花に見られるアントシアニン特有の糖転移酵素とは異なった経路で進化してきたことを示唆している。なぜ、バラだけがこのような糖転移酵素を用いて色を発現させているのかは、謎であるが進化における花と花色の関係において大変興味深い。

#### 5. おわりに

アントシアニンの前駆体であるアントシアニジンはそのままでは不安定であり、糖が付加されて安定化することで色として発色できる。バラでは3位ではなく、まず5位に糖が付加するが、5位だけにグルコースが付加したアントシ

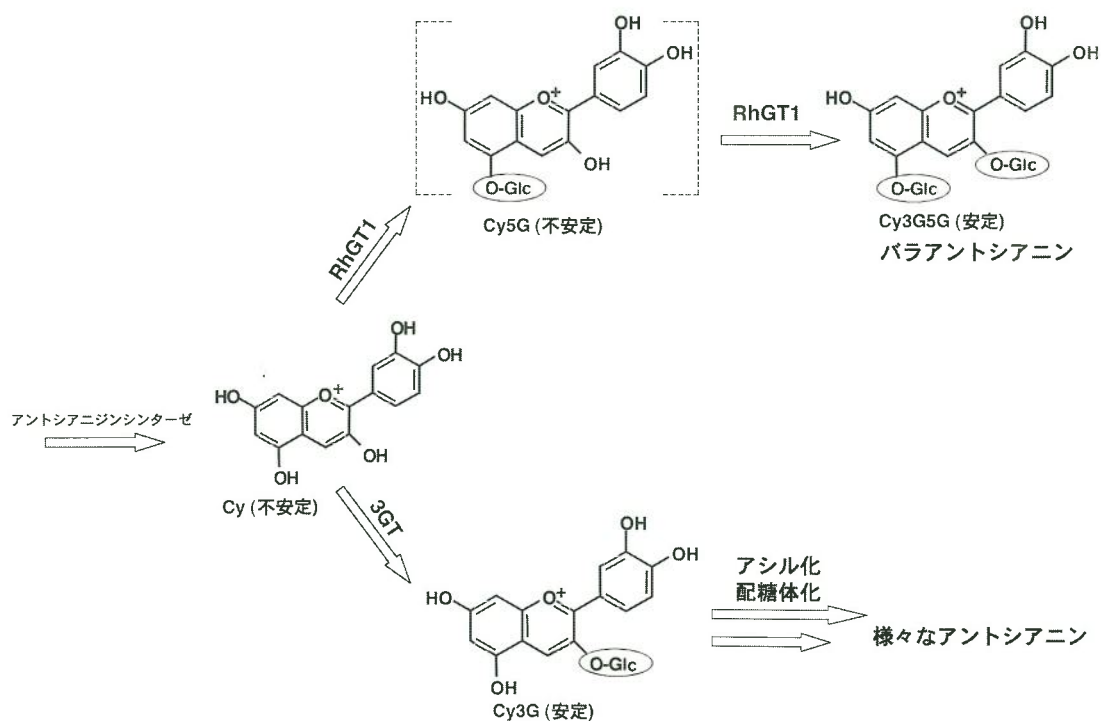


図3 バラに見られた新規アントシアニン生合成経路

アニンは検出されない。これはアントシアニン5-*O*-グルコシドはアントシアニン同様極めて不安定であり、更に3位にグルコースが付加したアントシアニン3,5-*O*-ジグルコシドとなって初めて安定化すると考えられる。アントシアニンの安定化は3位に糖が付加されて初めて成立するのであって、3位以外の位置に最初に糖を付加してもアントシアニンは安定化しないことがわかった。これは植物がアントシアニン生合成において、共通に3位の位置に最初に糖を付加するのかを説明しているのかもしれない。さらに、このことはバラにおいて多様なアントシアニンを生成するのを妨げる要因になってきたとも考えられる。多くの植物で見られるアントシアニンのアシル化はそのアントシアニン3-*O*-グリコシドを出発物質として合成されている。つまりは多くの植物が有するアシル化酵素はアントシアニン3-*O*-グリコシドを基質とするように進化し生まれてきたとも考えられる。バラのアントシアニンは他の植物の花のアントシアニンとは異なりアントシアニン3-*O*-グリコシドを中間体（基質）としてもたなかったために、そのようなアシル化酵素の進化を受け入れられずアシル化されていない単純な構造をしたアントシアニン3,5-*O*-ジグルコシドで止まってしまったのかもしれない。

## 文献

- 1) J. B. Harborne & H. Baxter (eds.) (1999), in *The Handbook of Natural Flavonoids*. Vol.2 1-114 Wiley, New York, USA.
- 2) 足立泰二ら (2004), 植物色素研究法 (植物色素研究会編)大阪公立大学共同出版会, 大阪
- 3) Tanaka, Y. et al. (2005), *Plant Cell Tiss. Organ Culture* 80, 1-24
- 4) Koes, R et al. (2005), *Trends in Plant Science* Vol.10 (5) 236- 242
- 5) Springob, K. et al. (2003), *Nat.Prod.Rep.*, 20, 288-303
- 6) Gudin, S. (2003), in *Encyclopedia of Rose Science*, (Roberts, A.V., Debener, T. & Gudin, S., Eds) 1, 25-30, Elsevier, Oxford, UK.
- 7) Cairns, T. (2000), in *Modern Roses VI: The World Eyclopedia of Roses*, Academic Press, San Diego, USA.
- 8) Ogata, J. et al. (2005), *Nature* 435, 757-758

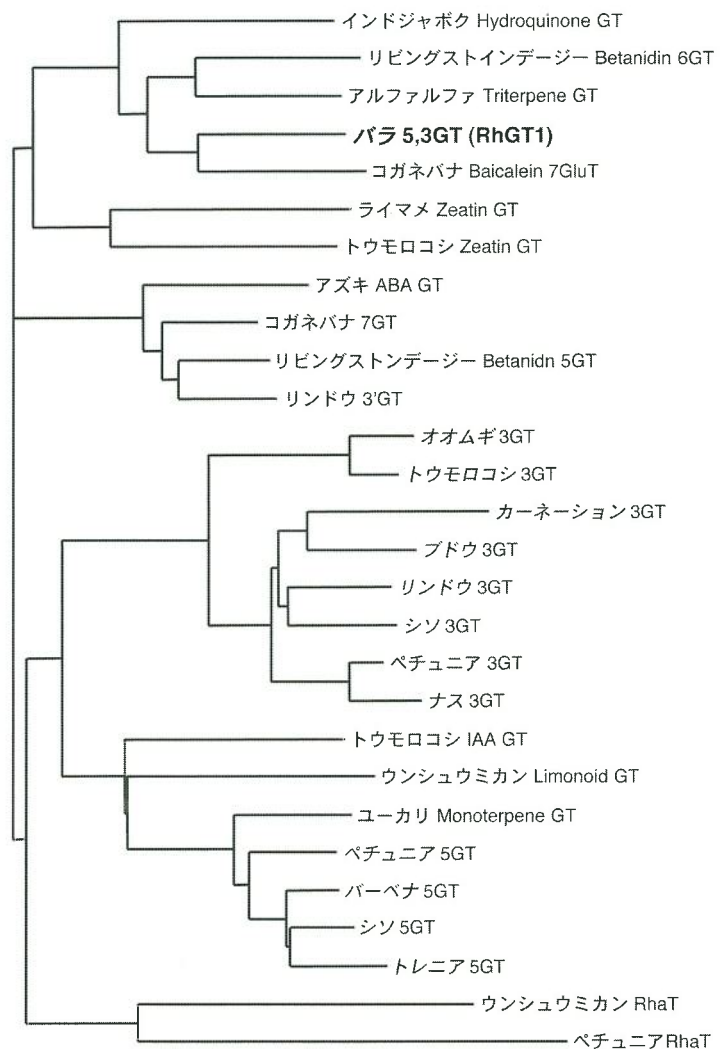


図4 バラ糖転移酵素および二次代謝関連糖転移酵素の系統樹解析

## ◀文献情報▶

搾乳牛の第1 卵胞波における  
卵胞への血液供給量の変化

Changes in Follicular Vascularity during the First Follicular Wave in Lactating Cows.

Tomas J. Acosta<sup>1) 3)</sup>, Ken-Go Hayashi<sup>1)</sup>, Motozumi Matsui<sup>2)</sup> and Akio Miyamoto<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Agricultural and Life Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,

<sup>2)</sup> Department of Clinical Veterinary Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,

<sup>3)</sup> Laboratory of Reproductive Endocrinology, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University.

*Journal of Reproduction and Development*, 51 (2005) : 273-280

牛においては、一発情周期において2回または3回の卵胞波が観察され、各卵胞波において複数の発育卵胞の中から主席卵胞が選別される。また、個々の卵胞への血液供給量の増加は卵胞の発育や主席卵胞の選別と、卵胞への血液供給の減少は卵胞閉鎖と密接に関係していると考えられている。超音波画像診断装置の利用によって非侵襲的に生体内の器官を可視化することが可能となり、種々の診断に利用されている。また、近年、カラードップラー超音波画像診断装置が開発され、血流量（流速）の変化を可視化することが可能となり、診断への利用範囲がいっそう拡大している。本論文では、発情周期中のホルスタイン種牛の第1 卵胞波における卵胞壁への血液供給量の変化をカラードップラー超音波画像診断装置を用いて経時的に観察し、血液供給量の変化と卵胞発育との関係について検討が行われた。

正常に発情周期が回帰している搾乳牛5頭を実験に用い、卵胞壁中の血管（血流の有無）の変化及び卵胞の直径を経腔型カラードップラー超音波画像診断装置を用いて観察した。黄体期

の牛に対してPGF2aを注射して黄体を退行させ、PGF2a注射48時間後にGnRHを注射することによって排卵させ、新たな卵胞波を作出した。GnRH注射後7日間、カラードップラー超音波画像診断装置を用いて毎日卵巣の観察を行い、直径2.5mm以上の卵胞について、各卵胞の最終的な直径により、1) 最大の主席卵胞、2) 2番目に大きい次席卵胞、3) 2.5mm以上のその他の小卵胞、の3グループに分類した。主席卵胞の選別が行われる時期までは、最終的に主席卵胞あるいは次席卵胞となった各グループにおいて血流が観察された卵胞の割合には差は認められなかった。一方、主席卵胞の選別が行われた後に次席卵胞となったグループにおいて血流が観察された卵胞の割合はいちじるしく減少した。さらに、主席卵胞が選別された1日後において血流が観察された小型卵胞の直径は、血流が観察されなかった小型卵胞の直径より大きかった。大型卵胞の卵胞壁の血管形成と適切な血液供給が主席卵胞となるためには不可欠であり、小型卵胞における卵胞への血液供給の存在は、卵胞の維持のために必要と考えられた。すなわち、個々の卵胞への血液供給の変化は、牛の第1 卵胞波における卵胞発育に密接に関係していることが明らかとなった。

主席卵胞の選別や黄体退行については、いまだ不明な点が多い。カラードップラー超音波画像診断装置等のあらたな機材の利用により、主席卵胞の選別や黄体退行等のメカニズムについてのさらなる研究が期待される。

(抄訳：下司雅也, GESHI Masaya, 独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 畜産草地研究所)

## ◀文献情報▶

ブルーティラピア (*Oreochromis aureus*) の性別を支配する二つの非連鎖遺伝子座Two Unlinked Loci Controlling the Sex of Blue Tilapia (*Oreochromis aureus*)B-Y. Lee<sup>1</sup>, G. Hulata<sup>2</sup> and T.D. Kocher<sup>1</sup><sup>1</sup> Hubbard Center for Genome Studies, Suite 400, Environmental Technology Building, 35 Colovos Road, University of New Hampshire, Durham, NH 03824, USA<sup>2</sup> Department of Aquaculture, Institute of Animal Science, Agricultural Research Organization, Volcani Center, PO Box 6, Bet Dagan 50250, Israel*Heredity*, 92, 543-9 (2004)

養殖魚の性別は、養殖事業に大きな影響を及ぼす。熱帯魚のティラピアは数ヶ月で性成熟し出荷サイズに達する前に養成池で繁殖するので、単位飼料当たりの生産量と収益は減ってしまう。従って、ティラピア養殖事業は単性雄魚の生産に依存している。Hickling (1960) の研究を始めとして、種間交雑、ホルモン処理やYY超雄などさまざまな方法が単性種苗生産に使われている。しかしながら、技術的な複雑さと、さらにはティラピアの性別が環境因子と複数の遺伝子に影響されるため、これらの方法は完全に信頼できるレベルには達していない。

ブルーティラピア (*Oreochromis aureus*) の性別は基本的に雌ヘテロ型 (WZ) システムにより決定される。ホルモン処理によって得られた性逆転ZZ表現型雌性と正常雄性の交雑は大抵100%雄性次世代を産むが、少数の例外も観察された。雌性発生技術も性別決定への研究に使われている。*O. aureus* 雌性はWZであれば、雌性発生の次世代の中で1雌 (WW) : 1雄 (ZZ) の比率は期待される。しかし、実際は圧倒的に多くの雌F1が出現する。Penmanら (1987) は、この現象を解釈するために第一減数分裂前期に性遺伝子の組み換えが行われると仮定した。1回交差は全部の雌 (WZ) 個体群を産出し、2回交差は均等数の雄と雌を産出する。多数の交差の雌雄発生率を解析して、セン

トロメアと性別決定遺伝子の間の距離がおよそ25cMに等しいと判明した。AvtalionとDon (1990) はこの仮説をさらに調査し、WZ雌親魚由来の雌性発生世代の中で一つの表現型雄性 (ZZ) と二つの相違表現型雌性 (WWとWZ) の次世代を産出するために比率の高い雌性に導くということを発見した。Mairら (1991) の更なる研究により、雌ヘテロ型性決定が改めて確認され、常染色体上のマイナス遺伝子の性決定への関与も示唆された。また、ブルーティラピアの雄性が同形接合体だということも明らかにされた。

ティラピアの性染色体は比較的未分化である。どの染色体対でも形態的な差異がほとんどないため、形態で性染色体を識別できない。本研究では性別決定に関与する主要な遺伝子座のDNA配列マーカーが初めて報告された。著者らは本研究の前に550マイクロサテライトマーカーを含むティラピアの遺伝子連鎖地図を構築した。本研究ではこの連鎖地図から選んだマーカーを用いて、ゲノムを迅速にスキャンして、bulked segregants法で性別関連マーカーを調べた。さらに、性別決定の部位を識別するために、ティラピア個体の遺伝子型を研究し、遺伝子座間の上位性相互作用を調査した。

著者らは表現型雌雄性別にリンクする連鎖群3 (LG3) において11個のマイクロサテライトマーカーを同定した。推定W染色体ハプロタイプは97%雄性と85%雌性個体の性別を正しく予測した。本研究の結果は、W遺伝子座がマーカーGM354, UNH168, GM271とUNH131の数センチモルガン (cM) 以内にあるということを示した。連鎖群1 (LG1) にあるマーカーは性別に密接にリンクすることを示し、この部位にある雄性決定対立遺伝子の分離を示唆した。遺伝子座の間で上位性相互作用の分析によって優性雄性抑制因子 (LG3にあるWハプロタイプ) と優性雄性決定因子 (LG1にあるYハプロタイプ) の作用を示した。これらのマーカーはさまざまな性染色体対立遺伝子の強さの研究とWハプロタイプのコピーを持つ種親の識別に役に立つ。著者らは二つの非連鎖遺伝子座を発見した。この二つの非連鎖遺伝子座は相互作用して*O. aureus*の性別を決定すると考えられている。

(抄訳：Chen Weimin, 日本水産株式会社 中央研究所 大分海洋研究センター)



◀文献情報▶

DC-SIGNを介した樹状細胞の機能  
調節によりIL-10を産生する調節  
性T細胞を誘導する乳酸菌

Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin.

Smits HH., Engering A., van der Kleij D., de Jong EC., Schipper K., van Capel TM., Zaat BA., Yazdanbakhsh M., Wierenga EA., van Kooyk Y., Kapsenberg ML.

Department of Cell Biology and Histology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Meibergdreef 15, 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands.

*J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005 Jun ; 115 (6): 1260-7.

乳酸菌はアレルギー症状や腸炎の治療として用いられることの多いプロバイオティクス微生物である。このようなプロバイオティクス微生物は制御性T細胞（Treg細胞）を介して免疫応答を負に制御していると考えられている。Treg細胞は他の免疫細胞の増殖やサイトカインの産生を阻害することにより免疫寛容を導くことから、Treg細胞が発達するとアレルギーや炎症性疾患などを抑制できることが考えられる。樹状細胞（DC）はToll様受容体（TLR）やC型レクチンといった特異的な抗原分子パターンを認識するさまざまなパターン認識受容体（PRRs）を発現することにより抗原成分を区別、認識している。DCは異なる抗原刺激に対して異なるシグナルをT細胞に伝えることにより、naïve T細胞のTh1, Th2あるいはTreg細胞への分化を誘導している。筆者らはプロバイオティクス微生物の中からランダムに選択した乳酸菌についてDC刺激を介したアレルギー症状を予防する免疫制御機能について調べている。

プロバイオティクスの中からランダムに選択

された3種類の乳酸菌、*Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*でDCを刺激した。刺激を受けたDCとnaïve T細胞を共に培養し、T細胞の分化を調べた。その結果、*L. plantarum*で刺激した場合にはTreg細胞が誘導されなかったが、*L. reuteri*や*L. casei*でDCを刺激した場合には、共培養したT細胞のIL-10の産生量が増加し、T細胞の増殖が抑制されたことからTreg細胞が誘導されることが示された。次にどのPRRが乳酸菌との相互作用に関与しているのかを調べたところ、*L. casei*でわずかなTLR4の作動がみられたが、乳酸菌3種いずれにおいてもTLRはほぼ関与しないと結論された。一方、C型レクチンであるDC-SIGN（dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin）は、Treg細胞誘導能を持つような抗原刺激を樹状細胞に与えることができる*L. reuteri*と*L. casei*との強い結合を示した。さらに、これら乳酸菌とDC-SIGNの結合を抗DC-SIGN抗体で阻害するとTreg細胞の誘導が阻害された。以上の成績から、乳酸菌がDC上のPRRであるDC-SIGNと結合することが制御性DCを導くために重要な過程であると考えられた。

プロバイオティクス微生物は胃腸炎などの炎症性疾患の治療法として期待されている。乳児期にプロバイオティクスを摂取することにより幼児期のアレルギーの発症が減少するという報告もある。ある種の微生物がDCを刺激すると制御性T細胞を誘導する事実はいへん興味深い。炎症性疾患の治療としてDC-SIGNへの結合能やTreg細胞の誘導能を指標としたプロバイオティクスのスクリーニングが構築され、ここで選択された菌株の機能解析が進められたあかつきには個々のプロバイオティクスの長を組み合わせ、複数のプロバイオティクスを用いたカクテル療法の開発が期待される。

（抄訳：野中敦子，NONAKA Atsuko，カルピス株式会社 健康・機能性食品開発研究所）

## ◀文献情報▶

## 花成ホルモン発見か？

FD, a bZIP Protein Mediating Signals from the Floral Pathway Integrator FT at the Shoot Apex.  
Mitsutomo Abe, Yasushi Kobayashi, Sumiko Yamamoto, Yasufumi Daimon, Ayako Yamaguchi, Yoko Ikeda, Harutaka Ichinoki, Michitaka Notaguchi, Koji Goto, Takashi Araki  
*Science*, Vol 309, Issue 5737, 1052-6, 12 August 2005

植物は栄養成長を終え、一定の環境条件（高低温，日長）に遭遇すると花芽を分化する。長日条件（実際は短暗期条件）に感応して花芽を形成する植物を長日植物，反対に短日（長暗期）条件に感応するものを短日植物，日長に関係なく花芽を分化するものを中性植物と言ひ，長日植物には小麦，大根，ホウレンソウなどが，短日植物には稲，大豆，朝顔などが，中性植物にはトマト，胡瓜などがある。この長短の暗期に反応して花芽誘導物質が葉で作られ維管束を通過して頂芽分裂組織に伝わるのが，大豆の接木実験で明らかにされてから（Hamner & Bonner, 1938）70年近い歳月がたち，多くの野心的な研究者が，この「花成ホルモン」の探索に乗り出しては敗退を繰り返してきた。「花成ホルモンを見つければノーベル賞」と巷間噂される所以である。今回，8月12日付けのサイエンス誌上で三つの研究グループによって相次いでその実体が発表された。そのうちの京都大学グループの論文を中心に紹介するが，興味のある方は残り二つの論文も併せてご覧ください。

ブレイクスルーをもたらしたのは，このところ生理学上の難問を次々に解決している，いわゆる逆遺伝学的アプローチで，開花遅延突然変異体とその野生型遺伝子の過剰発現体の解析によるものである。開花遺伝子T（Flowering locus T, FT）は欠損すると開花が遅延し，その遺伝子は子葉や葉の維管束で発現する20KDのタンパク質をコードしており，葉で日長に感応して概日リズムを刻むCOタンパク質によって発現を制御されていること，CO過剰発現体

では開花が早まることが知られていたが，FTより下流のシグナル伝達経路については不明であった。Abeらの報告はその点を明らかにしたものである。補助データまでいれると40頁にもなる膨大な報告であるので，概略のみ紹介させていただくことにする。

1) FT過剰発現体の開花促進作用を打ち消す変異体*fd*を単離。その野生型遺伝子FDはbZIP型転写因子をコードし，頂芽分裂組織で発現する。2) タンパク質FTとFDは相互作用（結合）能力を有しており，頂芽分裂組織の核内で結合している。3) FTは主に子葉や葉の維管束に発現し，頂芽分裂組織での発現は認められない。4) 栄養芽から花芽への転換をもたらすAP1遺伝子の発現をFD/FT結合タンパク質が促進する。著者らはこれらの結果を踏まえ，長日シグナル伝達経路を次のように推測する。「長日条件に感応してCOが増大しFT遺伝子の発現を促す。葉で合成されたFTタンパク質は茎の維管束を通過して頂芽分裂組織まで到達し，FDタンパク質と結合。その複合体が花芽形成遺伝子AP1を発現させ，栄養芽は花芽へと大転換する。すなわち，花成ホルモンはFTタンパク質である。」と。

花成ホルモンがタンパク質とは意外な結果である。葉から茎を通過して頂芽分裂組織まで容易に移動する点，タンパク質合成阻害剤で花芽誘導があまり阻害されない点から，むしろ低分子化合物を想定し，その同定が試みられていたからである。ただ，私の読み方が浅いのかも知れないが，FTが葉の維管束で発現しているが茎を通過するという直接的な証拠はないようであり，この点を明らかにする必要があるはしないか？またこのFTがシロイヌナズナ特有な物質ではなく少なくとも長日植物では普遍的なものであるかである。その点，短日植物のイネでも類似の遺伝子が存在しているとのことであり心配ないのかもしれないが，今後の研究の進展が待たれる。

（抄訳：岩井純夫，IWAI Sumio，鹿児島大学農学部）

生研センターからのご案内

Agribusiness Creation Fair 2005

# アグリビジネス創出フェア

出会えます！最新技術シーブとビジネスパートナー



2005.10.6(Thu)-7(Fri) 10:00-17:00

東京国際フォーラム  
展示ホール(地下2階)

主催：農研機構  
共催：独立行政法人 農研・生物系特定産業技術研究機構・独立行政法人 農研生物資源研究所・独立行政法人 農研環境技術研究所・独立行政法人 農研工学研究所・  
独立行政法人 農研総合研究所・独立行政法人 国際森林水産物研究所・独立行政法人 森林総合研究所・独立行政法人 水産総合研究所・  
社団法人 農林水産省技術開発部・社団法人 農研センター・独立行政法人 農業政策センター・独立行政法人 農業政策センター・独立行政法人 水産政策センター・独立行政法人 水産政策センター・独立行政法人 水産政策センター  
協賛：関係団体、マスコミ、学会など(随時)

<http://agribiz.jp/>

アグリビジネス創出フェア事務局：独立行政法人 農研水産物技術開発センター(STAFF TEL:03-3060-0611 FAX:03-3060-0277 E-mail:agribiz@staff.nri.go.jp)



ブレインテクノニュース  
バックナンバーのご案内  
第109号  
2005年5月15日発行

**総説**

怠け者の小さな植物病原微生物：ファイトプラズマ—初めて  
入れられた分子生物学的メス……柿澤 茂行・難波 成任

**国内情報**

イネ白葉枯病菌のゲノム構造—なぜ多様なレースが生まれたか  
……落合 弘和・井上 康宏・竹谷 勝・加来 久敏  
フォトクロミック蛍光タンパク質, Dronpa (ドロンパ)  
……宮脇 敦史・安藤 亮子  
植物の生長ホルモン・ブラシノステロイドと受容体BRI1の  
結合メカニズム……瀬戸 秀春・木下 俊則  
麻痺性貝毒によるトゲクリガニの毒化  
……及川 寛・藤田 恒雄・齋藤 健・里見 正隆・矢野 豊  
無花粉スギ「爽春」とスギ花粉症対策に向けた雄性不稔個体の  
今後の利用……高橋 誠・星 比呂志・岩泉 正和・

久保田 正裕・福田 陽子

MRSAに効果のある昆虫抗菌タンパク質を改変した合成ペプ  
チドを含む傷被覆フィブリンフィルムの開発  
……山川 稔・坂中(西堂)寿子・石橋 純  
超微小な溶液チャンバーを用いた1分子バイオアッセイ  
の開発……野地 博行  
田植機の苗載せ作業を軽労化する  
……小西 達也・窪田 潤・土屋 史紀

**地域の先端研究**

柿ポリフェノールの高速精製法を用いた機能性食品素材  
の開発……浜崎 貞弘

**文献情報**

泌乳初期の搾乳牛における血漿中尿素窒素濃度と卵胞液や  
子宮腔内の尿素窒素濃度あるいはアンモニア濃度との関  
連性について……(抄訳：下司 雅也)  
アグロバクテリウム以外の細菌で植物の形質転換に成功  
……(抄訳：岩井 純夫)  
イトヒキキントキダイの皮と骨由来の酸溶解性コラーゲンの  
性質……(抄訳：大庭 貴弘)

**生研センターからのご案内**



ブレインテクノニュース  
バックナンバーのご案内  
第108号  
2005年3月15日発行

**総説**

イネゲノム全塩基配列の解読完了と今後の課題……佐々木 卓治

**国内情報**

シロイヌナズナの根における幹細胞ニッチの制御機構  
……相田 光宏  
化学発光法による食品の生菌検査  
……山庄司 志朗・川崎 晋ほか  
ミヤコグサのゲノム分析に基づくプラスチド局在性の根粒・  
菌根形成初期シグナル因子の発見

……川崎 信二・今泉 温子・村上 泰弘  
家畜遺伝情報の産業利用へ向けて—牛肉の質と豚のインフル  
エンザウイルス抵抗性——三橋 忠由  
紫外線照射による穀物殺菌技術……日高 靖之

**地域の先端研究**

エリンギにおける担子胞子形成欠損突然変異株の作出  
……角田 茂幸

**文献情報**

出生後2日以内に死亡したクローンウシの臓器における遺伝  
子発現の異常……(抄訳：下司 雅也)  
タイセイヨウマダラの激減に先立って見られた成熟傾向にお  
ける急速な進化……(抄訳：岡本 崇)  
ワイン醸造における酵母*Saccharomyces cerevisiae*の酸素消  
費量、および発酵量への影響……(抄訳：安達 美和)  
カリウム欠乏のプロテオーム解析……(抄訳：岩井 純夫)

**生研センターからのご案内**

## 編集後記

第111号をお届けします。本号では特集として「匂いとフェロモンの科学」を取り上げ、佐藤幸治氏（東京大学）らに匂いとフェロモン受容のメカニズム、坂野仁氏（同）に嗅覚系における神経細胞の個性獲得と多様性識別、森裕司氏（同）に哺乳類におけるフェロモン研究、加沢知毅氏（同）らに昆虫におけるフェロモンと匂いの研究についてご紹介戴いた。

その他の研究情報として、矢野裕之氏（作物研究所）らにポストゲノム研究の有効なツールとしてのジスルフィドプロテオームに関する研究、鷹羽武史氏（江崎グリコ(株)）らに砂糖及びセルロースを原料とした酵素合成アミロースの製造と利用、中島忠一氏（(独)森林総合研究所）にカシノナガキタイムシ集合フェロモンの化学構造決定、堀尾光広氏（生研センター）らに携帯式作物生育情報測定装置の開発、鈴木正彦氏（青森県農林総合研究センター）らにバラのアントシアニン生合成における新規酵素の発見についてご紹介戴いた。また、本号の文献情報は、下司雅也氏（畜産草地研究所）、Chen Weimin 氏（日本水産(株)）、野中敦子氏（カルピス(株)）岩井純夫氏（鹿児島大学）、にそれぞれご執筆戴いた。

ご多忙な中玉稿をお寄せ頂きました執筆者各位に深甚の謝意を申し上げます。

（渡辺記）

## 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支援センター（生研センター）の許諾を得て行って下さい。

## ブレインテクノニュース 第111号

平成17年9月15日発行

発行人 津賀幸之介

編集人 吉泉 努

発行所 独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構

◎生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）

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

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

e-mail brainki1@ml.affrc.go.jp

URL <http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>

印刷・製本 日本印刷株式会社 〒101-0021 東京都千代田区外神田6-3-3 TEL 03-3833-6971