

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成19年7月15日発行（隔月1回15日発行）

ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.122

15 JULY, 2007

ブレインテクノニュース



メチル化酵素GAMT1を過剰発現させてできたミニペチュニア（左上）と正常なペチュニア（右）

ジベレリンを不活性化する新しい酵素を発見
—植物の大きさを制御

独立行政法人 理化学研究所
植物科学研究センター
山口 信次郎

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

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

総 説

- 致死性人獣共通感染症，狂犬病の研究に関する歴史・現状・今後の展開 1
 源 宣之（岐阜大学名誉教授）

国内情報

- デンプン合成酵素の変異を利用して開発された甘味種コムギ 13
 中村 俊樹¹・新畑 智也²・齊藤 美香²（¹（独）農業・食品産業技術総合研究機構
 東北農業研究センター，²日本製粉（株）中央研究所）
- ジベレリンを不活性化する新しい酵素を発見—植物の大きさを制御 19
 山口 信次郎（（独）理化学研究所 植物科学研究センター）
- シロアリセルラーゼの微生物生産 — シロアリ消化系のバイオマス変換への応用を目指す ... 23
 渡辺 裕文（（独）農業生物資源研究所）
- エゾアワビのゲノム連鎖地図の作成 29
 関野 正志¹・原 素之²（（独）水産総合研究センター¹東北区水産研究所，²養殖研究所）
- 農業機械のユニバーサルデザイン 35
 菊池 豊（（独）農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター）

文献情報

- 有糸分裂中のマウス受精卵への染色体移植後の発生のリプログラミング 40
 D. Egli et al. (*Nature*, 447, 679-685, 2007) 抄訳：下司 雅也
- 葉から茎頂へ伝達され花を誘導するシグナルの正体はFTタンパク質である 41
 L. Corbesier et al. (*Science*, Vol.316, Issue 5827, 1030-1033, 2007) 抄訳：久保山 勉
- リーシュマニアの代謝と毒性におけるメチレンテトラヒドロ葉酸リダクターゼの解析 42
 T. J. Vickers et al. (*J. Biol. Chem.* Vol.281, No.50, 38150-38158, 2006) 抄訳：金井 宗良
- CD36は，口腔感覚系における食物油の検知と自然誘発的な脂肪の好みそして消化分泌に
 関与する 43
 F. Laugerette et al. (*J. Clin. Invest.* 2005 November 1; 115(11) : 3177-3184)
 抄訳：下野 将司

表紙の説明

GAMT1とGAMT2という2つの遺伝子の翻訳産物がジベレリンをメチル化する酵素活性を有することが明らかになった。これらの遺伝子を植物体内で過剰発現させたところ，極端な矮性を示した（写真はペチュニアの例）。GAMT過剰発現株におけるジベレリン（主要な活性型ジベレリンであるGA₁）の量は，野生型と比べて極端に減少していた。これらの矮化した植物体にGA₁を投与すると，野生型植物と同等レベルに回復させることができた。以上の結果は，GAMTが植物体内でジベレリンの不活性化酵素として機能することを示している。

詳細については，19頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

致死性人獣共通感染症，狂犬病の研究に
関する歴史・現状・今後の展開岐阜大学名誉教授
源 宣 之

狂犬病は人を含めた全ての哺乳類が罹患し，発病すると100%死亡する致死性ウイルス性人獣共通感染症である。本病の病原体である狂犬病ウイルスは神経親和性が強く，他のウイルスに比べてin vitroでの研究が遅れ，なかでも致死病的病原性を制御する分子は十分に解明されていない。また，狂犬病類似ウイルスであるリッサウイルスとの関連も不明である。そこで，本稿では研究の歴史と最近の病原性に関する分子基盤の進展を中心に解説する。

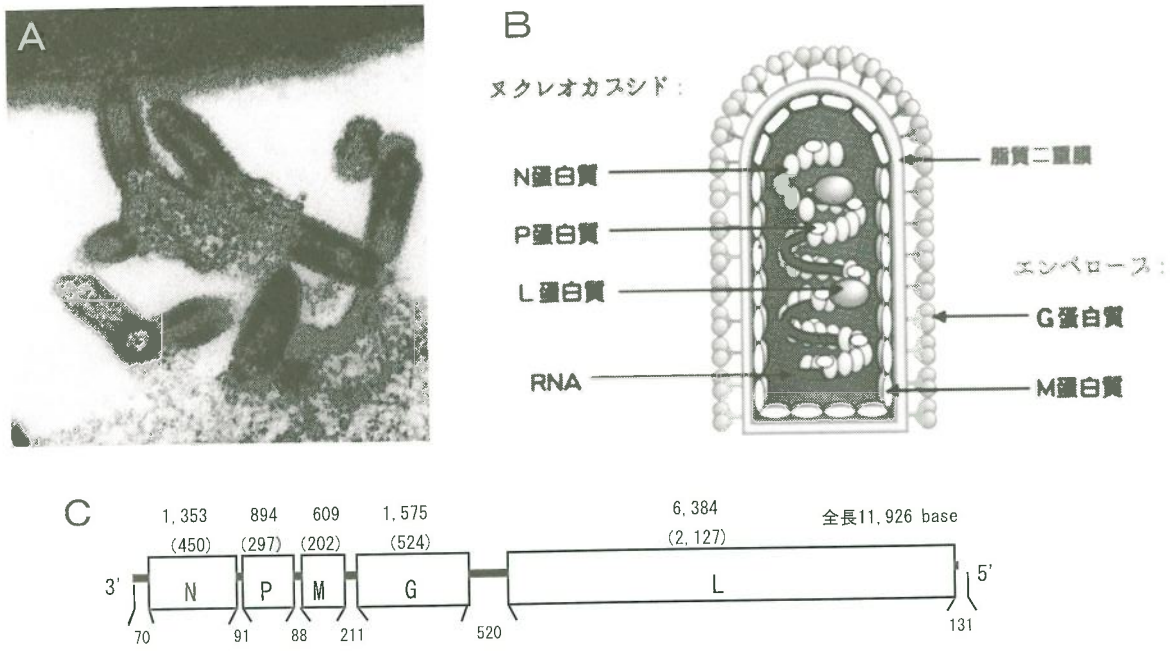
1. 病原体

狂犬病ウイルスはモノネガウイルス目，ラブドウイルス科，リッサウイルス属に分類される。図1に示すように，ウイルスはエンベロープを保有し，幅75～80nm，長さ180nmの弾丸状の特異な形態をしている。遺伝子はマイナス一本鎖のssRNAで，約12,000の塩基が3'-N-P(NS)-M-G-L-5'の順に並んでいる¹⁾。ウイルス粒子は，RNA，ヌクレオ(N)蛋白質，リン酸化(P)蛋白質およびラージ(L)蛋白質からなるヌクレオカプシドと，それらを包み込んだマトリックス(M)蛋白質と宿主由来脂質からなり膜貫通性糖(G)蛋白質を最外層に配置したエンベロープで構成されている。N蛋白質(47～62kDa)は5構造蛋白質中最も大量に存在し，複製されたRNAを保護するほかに転写酵素の働きを制御している。P蛋白質(37～40kDa)はRNAの転写や複製を制御するが，最近ウイルスの軸索内移送²⁾や感染宿主の自然免疫への対応にも関与していることが明らかにされている³⁾。L蛋白質(190kDa)はRNA依存性RNAポリメラーゼで転写および複製に関与している。M蛋白質(20～30kDa)は転写を制御し粒子形成に関与している⁴⁾。最近さらに感染細胞のアポトーシスを制御しているといわれている⁵⁾。G蛋白質(62～67kDa)はウイルスの宿

MINAMOTO Nobuyuki

〒501-3108 岐阜市大蔵台18-23

主細胞への吸着・侵入に関与し，病原性の発現に密接に関わっている。また感染防御に重要な中和抗体の産生を誘導する。狂犬病ウイルスは二大別され，自然感染動物から分離されるウイルスを街上毒(street virus)，これをウサギや他の動物の脳組織で長期間連続継代を行い，潜伏期間の短縮と一定化，末梢感染性の減少などの病原性状の変化した株を固定毒(fixed virus)という。固定毒は1880年代にPasteurらによって確立され，現在も狂犬病ワクチンの開発やウイルスの基礎的研究に重要な働きをしている⁶⁾。リッサウイルス属には狂犬病ウイルスの他に6種のウイルスが含まれ，ラゴス・バットLagos bat，モコラMokola，ドーベンハーゲDuvenhageは1950～1980年代にアフリカ各地で，European bat lyssa (EBL) virus1, EBL2は1980年代から欧州各地で，Australian bat lyssa (ABL) virusは1996年以降オーストラリアおよびパプアニューギニアで，それぞれ分離されている(表1)^{7, 8)}。さらに最近，フィリッピン，タイ，カンボジア，バングラデッシュなどでウイルスは分離されていないが，食虫・食果コウモリからABLに対する中和抗体が検出されている⁹⁾。これらのウイルスは感染した人や動物での症状や抗原・遺伝性状などの類似性から狂犬病関連(類似)あるいはリッサウイルスと呼ばれている。また，これらのウイルスはモコラを除き狂犬病ウイルスと血清学的に交差し，狂犬病ワクチンにより感染を防御するこ



(文献38より)

図1 狂犬病ウイルスの粒子とゲノム構造

- A：ウイルス粒子の透過電子顕微鏡像
- B：ウイルス粒子の模式図
- C：日本の現行動物用ワクチン製造株，(RC-HL)株のゲノム構造

表1 リッサウイルス属の分類

遺伝型	ウイルス(略称*)	分離宿主	分布地域
1	狂犬病(RABV)	全ての哺乳類	全世界
2	Lagos bat (LBV)	食果コウモリ	ナイジェリア, 中央アフリカ 南アフリカ
3	Mokola (MOKV)	トガリネズミ 人, ネコ	ナイジェリア, ジンバブエ
4	Duvenhage (DUVV)	人	南アフリカ
5	European bat lyssa1 (EBL1)	食虫コウモリ	欧州
6	European bat lyssa2 (EBL2)	食虫コウモリ	欧州
7	Australian bat lyssa (ABL)	食果コウモリ	オーストラリア
その他	Aravan (ARAV)	食虫コウモリ	キルギスタン
	Khujand (KHUV)	食虫コウモリ	タジキスタン
	Irkut (IRKV)	食虫コウモリ	ロシア
	West-Caucasian-bat (WCBV)	食虫コウモリ	ロシア

*:文献1より

ともできる。不思議なことに，これらのリッサウイルスの存在は米国などの新大陸では証明されていない。新大陸の食虫・吸血コウモリから分離されるのは全て真性の狂犬病ウイルスのみである。リッサウイルス属にはこの他に最近 Aravan, Khujand, Irkut, West-Caucasian-batの各ウイルスがユーラシア大陸各地の食虫コウモリから分離されているが，遺伝型は未分類に区分されている^{1, 10)}。

2. 研究の進展状況

Wilkinson⁶⁾によると，人類は少なくとも4300年前から，狂犬病が動物から人に伝播し，死に至らしめる致死的病気であることを知っていたと考えられている。また，紀元前4世紀にAristotelesは自著「動物の博物誌」で、『狂躁状態の犬に咬まれた全ての動物が同じ病気になる』と記述し，本病の伝播が咬傷によることを明らかにしている。さらに，西暦100年にローマ人の医師，Celsusは狂犬病を伝播する毒物は発病動物の唾液であり，発病動物に咬まれた人の処置として，出来るだけ早く焼灼薬や腐食薬あるいは加熱した鉄で咬傷部を焼くことを勧めている。焼灼療法は若干の改良がなされながらも，Pasteurによるワクチン療法が開発された1880年代まで続いている。しかし，一方では同じCelsusは，恐水症状を起こして喉の渴いた患者を不意に池に投げ込み，おぼれさすことにより水を飲ませて，症状を軽減させると述べている。このような非科学的治療法は，発病犬の肝臓の生食やルイ14世時代に流行した冷水療法としての海水浴などと共に長い間続けられたのも事実である。狂犬病が発病すると100%死亡する致死的疾患であったために，救命を求めてあらゆる試行が行われたのであろう^{11~14)}。

以上のように，非常に早い時点の資料に現代にも通じる知見の記述が散見されているが，狂犬病の科学的研究の幕開けは，Pasteurによる狂犬病ウイルスの弱毒化（固定毒の確立）にあると言えるであろう。ただ，固定毒の作出に重

要な役割を果たしたウサギにおける感染実験の基本的な手法は，Pasteur単独の業績ではなく，Galtierによって確立されたことが明らかになっている⁶⁾。しかし，Pasteurは既に炭疽，豚丹毒，家禽コレラの細菌が「ガラス容器内」での人工培養により弱毒化されることを知っており，それらの疾病の防御試験から免疫理論を確信していたことである。狂犬病ウイルス感染家兎脊髄の乾燥化もこの延長線上にあり，「ワクシネーション」という言葉を科学的用語としたことである。この点が，Pasteurの偉大さを確固たるものにしていけると言える。まずPasteurは乾燥固定毒の免疫の有効性を予め感染された犬で確かめ，次に本病の長い潜伏期間を利用して犬に咬まれた人の発病予防に試みたのである。人体の1例目は，狂犬に手足を咬まれた少年，Joseph Meisterに，ついで15歳の羊飼ひ，Jean Baptiste Jupille（図2）にそれぞれ施され，いずれも発病から逃れたのである。これら



図2 狂犬と闘うJean Baptiste Jupille
曝露後免疫2例目の少年の像で，パリのパスツール研究所の庭に立っている。

の劇的な成果が世に伝えられると，多くの患者が集まり治療され暴露後免疫が確立されていった。無論Pasteurはこの成果を得るまでに，感染動物におけるウイルスの体内分布，ウイルスの生存期間と放置温度など様々な基礎実験を行ったことは言うまでもない。

表2には，Pasteur以降現在までの代表的な研究成果を羅列した。いずれも狂犬病の予防対策にとって欠くことのできない成果であるが，なかでも1970年代のモノクローナル抗体の作出と1990年代のリバーシ・ジェネテックス（逆遺伝学）によるcDNAからの感染性ウイルス粒子の作出は，in vitroの実験が比較的難しかった狂犬病ウイルスにとって，大きな突破口になった。Schnellら¹⁵⁾によって確立されたモノネガウイルス目の逆遺伝学の手法はゲノムに任意の改変を施した感染性ウイルス粒子の作出を可能にしたことから，現在，狂犬病，インフルエンザ，麻疹などの様々なマイナス一本鎖RNAウイルスの複製機構，構造蛋白質の機能解析，革新的ワクチンの開発などの研究に幅広く応用されている^{16, 17)}。そこで，次に逆遺伝学の手法により急速に進展している狂犬病ウイルスの病原

性に関する分子基盤について既述する。

3. ウイルスの病原性に関する分子基盤

狂犬病ウイルスの病原性に関する科学的な研究の出発点は1880年代前半にPasteurにより行われた固定毒（実験室内株）の確立である。固定毒は種々の性状が街上毒と比較して弱毒化しており，現在もそれから派生したウイルス株が狂犬病ウイルスの基礎的な研究やワクチンの製造用として使われている。しかし，多くの研究者がこれまでに挑戦してきたにもかかわらず，固定毒から街上毒への復帰は確認されていない。また，街上毒から固定毒への弱毒変異機構も明らかになっていない。この病原変化はきわめて安定していることから，おそらく複数の遺伝子変異が組み合わされているものと想像される。

狂犬病ウイルスの病原性に関する分子生物学的研究は，モノクローナル抗体による抗原決定基の解析やウイルス遺伝子解析と共に急速に進展した。通常，固定毒株は成熟マウスへの脳内接種により致死的感染を起こす。その株を非神

表2 Pasteur以降の狂犬病に関する主な研究の歩み

1900s	ネグリ小体の発見(Negri, 1903), フェルミー型ワクチンの開発(Fermi, 1908)
1910s	センプル型ワクチンの開発(Semple, 1919)
1920s	日本における狂犬病ワクチンの犬への集団接種(Umeno ら, 1921)
1930s	診断および血清反応におけるマウス接種法の開発(Hoytら, 1930; Websterら, 1935)
1950s	蛍光抗体法の診断への応用(Goldwasserら, 1958), ウイルスの培養細胞での順化(Kissling, 1958)
1960s	電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察(Matsumoto, 1962), 人二倍体細胞ワクチンの開発(Wiktorら, 1965)
1970s	経口ワクチンの開発(Baerら, 1971), モノクローナル抗体による抗原解析(Wiktorら, 1978)
1980s	ウイルス遺伝子配列の決定(Anilionis, 1981), 組換えワクチンの開発(Yelverton, 1983)
1990s	リバーシ・ジェネテックス(逆遺伝学)によるcDNAからの感染性ウイルスの回収(Schnellら, 1994), 西欧におけるキツネ由来狂犬病の撲滅(Wandeler, 2000)
2000s	逆遺伝学によるウイルス構造蛋白質の機能解析(Itoら, 2001)

経組織培養細胞で長期継代すると，細胞馴化株は生後1～3日目の乳のみマウスに対して致死感染を起こすものの，成熟マウスには感染するが生残回復する。しかし，弱毒化した細胞馴化株を乳のみマウスあるいは神経芽細胞種由来の培養細胞（NA細胞）に1～2代継代することにより，その成熟マウスに対する致死感染は復帰する^{18, 19)}。この病原性の復帰にはGタンパク質の333番目の単一のアミノ酸の関与していることが，両株のアミノ酸配列の比較，モノクローナル抗体による中和耐性変異株の遺伝子解析により明らかにされた²⁰⁻²³⁾。表3に示したように，成熟マウスに致死感染を起こす強毒株は333位にアルギニンあるいはリジンを持ち，非致死感染を起こす弱毒株はイソロイシンあるいはグルタミンを持つ^{2, 24-26)}。また，強毒株はウイルスの細胞間の広がり^{27, 28)}や膜融合²⁹⁾を弱毒株より促進し，逆にアポトーシス産生能を抑制する^{30, 31)}。G蛋白質のアミノ酸変異と様々な性状変化の機構は十分に明らかになっていないが，これらの性状変化が神経細胞におけるウイルスの増殖や進展に関与し，結果として病原

性に影響を与えているものと思われる。

我が国の動物用狂犬病不活化ワクチンの製造には，長い間パスツール研究所由来のウサギ脳組織継代の西ヶ原株が使われてきた。その後1985年に，製造株は西ヶ原株を鶏胚で294代，鶏胚線維芽細胞で8代，Vero細胞およびハムスター腎臓由来HmLu細胞でそれぞれ5代，23代継代して得られた組織培養細胞馴化のRC-HL株に切り替わった。RC-HL株は成熟マウスに体重減少を示すが死亡させない弱毒株である。しかし，この株のG蛋白質の333位は強毒の西ヶ原株と同じアルギニンである³²⁾。同様なことが他の株でも明らかにされている³³⁾。このことは，病原性を制御するアミノ酸がG蛋白質の333位以外のアミノ酸あるいは領域，またはG蛋白質以外にもあることを示唆している。この点を明らかにするために，著者らは最初，333位を認識するモノクローナル抗体による中和耐性株の作出を試みたが成果を得ることが出来なかった。そこで，次に逆遺伝学を用いて弱毒型のRC-HL株ゲノムに強毒型の西ヶ原株由来の全G遺伝子あるいはその一部を組換えたキ

表3 固定毒の成熟マウスに対する致死性とG蛋白質333位のアミノ酸との関係

株名	アミノ酸配列							致死性
	333							
CVS	K	S	V	R	T	W	N	+
PV	-*	-	-	R	-	-	-	+
SAD B19	-	-	-	R	-	-	-	+
HEP-Flury	-	-	-	Q	-	-	-	-
Av 01	-	-	-	Q	-	-	-	-
.....								
西ヶ原	-	-	-	R	-	-	-	+
RC-HL	-	-	-	R	-	-	-	-

* : 同じアミノ酸

メラウイルスを作出し，病原制御領域の特定を試みた。その結果，図3に示したように，強毒型の西ヶ原株由来の全G遺伝子を保持したキメラウイルスは成熟マウスに致死感染を起こし，西ヶ原株のG蛋白質が病原発現と密接な関係にあることを直接確認した。さらに，病原発現に関連する領域がG蛋白質の333位と異なる9アミノ酸の置換の認められた164～303位領域にあり，なかでも242位のアラニン，255位のアスパラギン酸，268位のイソロイシンの3アミノ酸が重要であることを明らかにした³⁴⁻³⁶。以上の結果から，狂犬病ウイルス固定毒の成熟マウスに対する致死感染に，西ヶ原株G蛋白質の333位のアルギニン以外のアミノ酸が重要であることを初めて明らかにした。

一方，RC-HL株のどの蛋白質が弱毒化に関わっているのかを，強毒型の西ヶ原株ゲノムに弱毒型のRC-HL株の各遺伝子を組み入れた多

数のキメラウイルスを作出して調べた。その結果，弱毒化は予想に反してGあるいは他の遺伝子単独では起こらず，G遺伝子と少なくともあと1つの遺伝子がRC-HL株由来である必要が示された。このことから，西ヶ原株からRC-HL株への弱毒化はmultigenicであることが明らかとなった³⁷。

以上の結果から，狂犬病ウイルスの弱毒化と強毒化は単純な裏表の関係ではなく，共に複雑な機構を持つことが示唆された。その点をさらに確認するために，著者らは西ヶ原株と西ヶ原株から鶏胚線維芽細胞で100代継代して新たに作出した弱毒株，Ni-CE株を用いて，同様の実験を行った。Ni-CE株はマウスに対してRC-HL株と同様な弱毒型の病原性を示す。

西ヶ原株とNi-CE株との間では，全体で15アミノ酸の変異が認められた。この変異数は西ヶ原株とRC-HL株との間での48カ所に比べてき

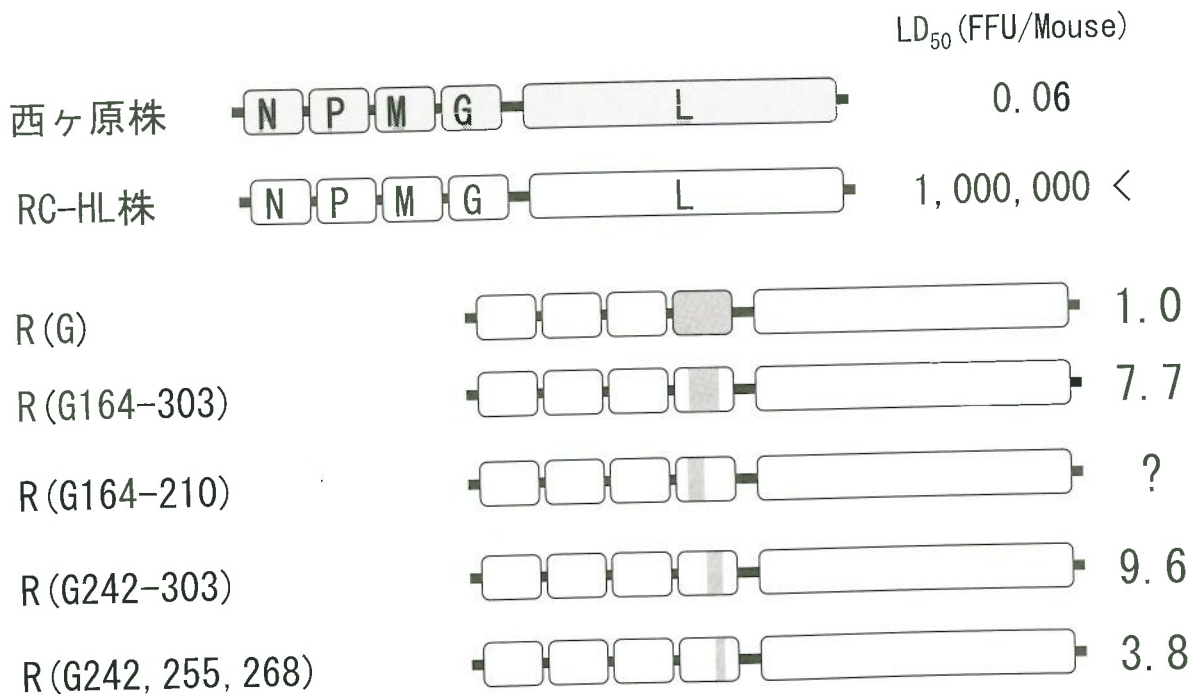


図3 狂犬病ウイルスの病原性に関与するアミノ酸の特定

強毒型の西ヶ原株は0.06LD₅₀のウイルス量で成熟マウスを死亡させるが，弱毒型のRC-HL株は1,000,000LD₅₀以上でも死亡させない。RC-HL株を背景としたキメラウイルスはR(G242-303)株を除き，致死性を回復する。この結果から，西ヶ原株G蛋白質の244位，255位，268位の3つのアミノ酸が致死感染に関与していることが明らかとなった。

わめて少ないと言える³⁸⁾。その結果，図4，5に示したように，成熟マウスに対する致死感染には西ヶ原株のGやL蛋白質ではなく，N，P，M蛋白質が関与しており，なかでもP蛋白質226位およびM蛋白質95位のアミノ酸が重要であることが示された³⁹⁾。この結果はG蛋白質が病原性の強弱を決定するとした先人達あるいは我々の先の西ヶ原-RC-HL株系の結果と異なっていた。恐らくMorimotoら³³⁾が報告しているようにウイルスの長期継代中の増殖環境（選択圧）の違いがもたらしたものと思われる。したがって，病原性に関わる重要なアミノ酸あるいは領域はウイルスの増殖環境により多様に異なる可能性もある。

このようなウイルス側の病原発現分子が宿主側の因子とどのような相互作用により病気を起こすのかは十分に解き明かされていない。最近，微生物の感染初期における宿主側の防御として，Toll-like receptors (TLR) を介した自然免疫が注目されており，特にウイルス感染時にはTLRを介して誘導されるI型インターフェロン (IFN) による抗ウイルス活性が宿主防御に重要な役割を担っていると考えられている⁴⁰⁾。またIFN情報伝達系を通して最終的に誘導されるアポトーシスも病原発現との関連性で注目されている⁴¹⁾。狂犬病ウイルスRNAの転写や複製を制御するP蛋白質は細胞由来のDynein light chain (LC8) と結合し，ウイルスの末梢から中枢神経組織への軸索内移送に係わっており，LC8と結合する領域を欠損させたウイルスでは中枢神経組織への移送が制限されることが明らかにされている²⁾。最近，P蛋白質の新たな機能として，signal transducer and activator of transcription (STAT) 1の細胞核内蓄積を阻止することによるI型IFN誘導抗ウイルス活性を抑制することが報告されている⁴²⁾。著者らも強毒型の西ヶ原株と弱毒型のNi-CE株のIFN- α の感受性を調べたところ，西ヶ原株はNi-CE株に比べて，IFN- α に強く抵抗し，その抵抗性にP蛋白質が関わっていることを両株のキメラウイルスから明らかにした⁴³⁾。P蛋白質

の226位のアスパラギンが病原発現に関与していることは既に述べたが，226位は狂犬病ウイルス感染細胞核内におけるP蛋白質の分布に係わる局在シグナル領域に隣接しており，このアミノ酸がSTATやPromyelocytic leukemia (PML) 蛋白質を介した抗ウイルス反応を阻止しているのかもしれない。

狂犬病ウイルス感染細胞におけるアポトーシスの発現は強毒型に比べて弱毒型のウイルス株で強く，G蛋白質の発現量と一致する³⁰⁾。これらの知見は，G遺伝子を二重に配置しG蛋白質が過剰に発現したウイルスでアポトーシスが增强されること⁴⁴⁾，弱毒型ウイルスに強毒型ウイルスG遺伝子を組み込んだキメラウイルスでアポトーシスの発現が抑えられ，その逆では增强されることから裏付けられ³¹⁾，少なくとも弱毒型ウイルスのG蛋白質が狂犬病ウイルスのアポトーシス発現に重要な役割を担っていることが示された。したがって，弱毒型狂犬病ウイルス感染動物では感染神経細胞にアポトーシスを発現することにより宿主の免疫機能を活性化，引き続きウイルスの増殖を抑制し，致死的感染から免れる。一方，強毒型ウイルス感染動物では，アポトーシスが起こらず，大量のウイルスが増殖して致死的感染を起こす。このような感染過程が狂犬病ウイルスの病態機構として推論されている。以上のように狂犬病ウイルスの病原発現にG蛋白質によるアポトーシスの誘導が重要な決定因子であることが報告されている一方で，感染細胞における弾丸状ウイルス粒子の形成や出芽およびウイルスRNA合成に重要な役割をしているM蛋白質^{4,45)}がCaspase-8を介してアポトーシスを誘導するとの報告もある⁴⁶⁾。私達もアポトーシスの起こりにくい強毒型の西ヶ原株と明瞭なアポトーシスを起こす弱毒型のNi-CE株とで，5つの遺伝子をそれぞれ単独で入れ替えたキメラウイルスを作出しアポトーシスの発現を確認したところ，Ni-CE株のM蛋白質を産生する感染細胞のみでアポトーシスが発現した。また，アポトーシスの発現はM蛋白質が単独で発現する細胞においても認められた。

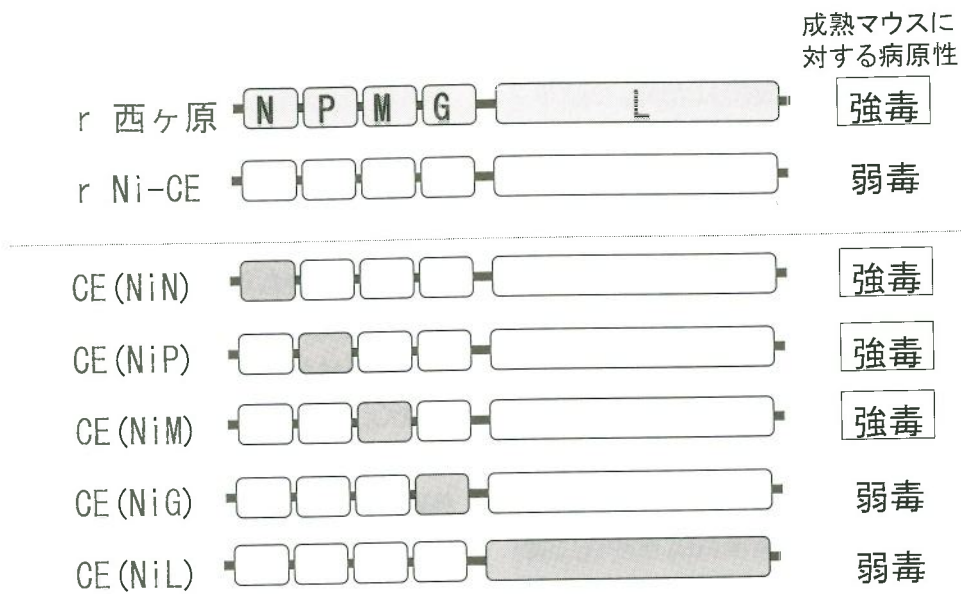
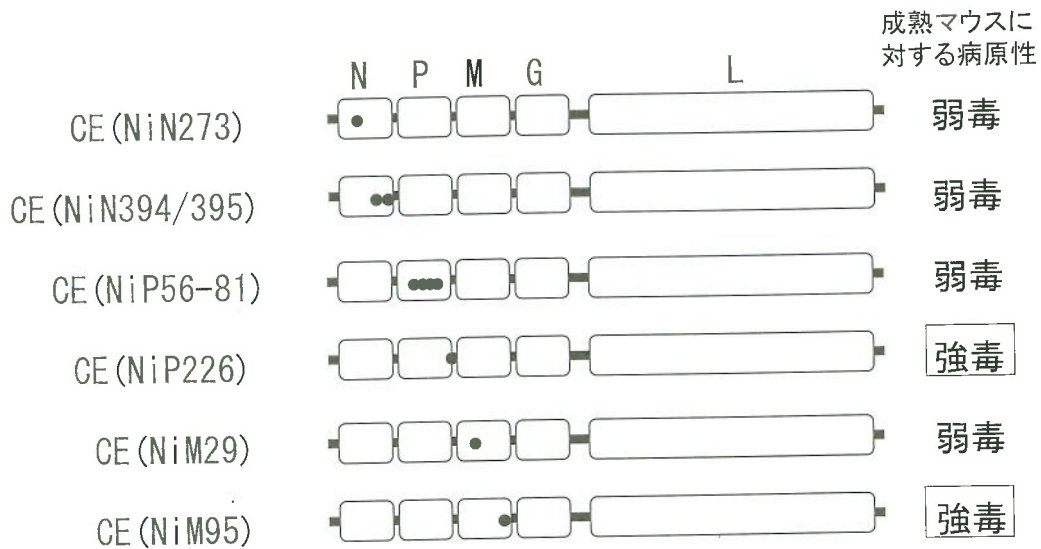


図4 Ni-CE株をベースとするキメラウイルスのマウスに対する病原性

弱毒型のNi-CE株に強毒型の西ヶ原株由来の各遺伝子をそれぞれ組換えたキメラウイルスの病原性の強弱から、西ヶ原株のN, P, M蛋白質がそれぞれ単独で致死性感染に係わっていることが明らかになった。この結果は、西ヶ原-RC-HL株でのそれと異なっていた。



●：西ヶ原株由来のアミノ酸に変換

図5 Ni-CE株をベースとした各変異ウイルスのマウスに対する病原性

弱毒型のNi-CE株に強毒型の西ヶ原株由来のアミノ酸に変換した変異ウイルスを作出し、病原性の有無を確認した。その結果、西ヶ原株のP蛋白質226位のアスパラギンとM蛋白質95位のバリンがそれぞれ単独で致死性感染に関与していることが明らかとなった。

しかし，私達の実験系ではG蛋白質によるアポトーシスの発現は起こらなかった（未発表データ）。したがって，狂犬病ウイルス感染細胞におけるアポトーシス発現にGとM蛋白質のどちらが，あるいは両方が関わっているかは今後さらに検討せねばならない。

これらの所見は病原発現機構あるいは高度に安全な生ワクチンの開発として重要な所見である。最近，PあるいはM遺伝子欠損ウイルスが作出された。これらのウイルスは，培養細胞で一次感染が起こるもののウイルス粒子は形成されず，脳内接種された哺乳マウスはまったく症状を示さず生残した。さらに欠損ウイルスで免疫されたマウスは既存のワクチンと同様な血中中和抗体を産生すると共にウイルスの攻撃に耐過し，狂犬病の生ワクチンとして有望なことを明らかにしている^{47, 48)}。

4. 今後の研究課題

全ての感染症で不明な点は多々認められるが，狂犬病ではその予防対策に極めて重要と思われる事象で不明な点が多数存在する。したがって，それらの点が今後の重要な研究課題と言える。

1) ウイルスの病原性に係わる決定分子：この課題は既述したように逆遺伝学の手法により進展しているが，多数の分子が係わっており，いまだ全容が確認されていない。特に，Pasteurにより確立された街上毒から固定毒への病原変異に関する機構解明は，ワクチン開発のみならず歴史的な研究の裏付けの点からも追求すべき課題である。

2) 発病機構：狂犬病は，主に発病動物の唾液中に排出されているウイルスが咬傷を受けた人や動物の傷口から体内に侵入することにより感染を広げる。しかし，体内に侵入したウイルスが，何故長く不定な潜伏期間（1週間から7年間で，平均でも1～2ヶ月間）を必要とするのか，またその間ウイルスは生体のどこに潜んでいるのかは，未だに不明のままである。した

がって，発病数日前から死亡するまでの確定診断はウイルス抗原や遺伝子の検出により比較的容易に出来るが，長い潜伏期間中の診断は全く出来ない。

これまでの実験感染動物から推測すると，侵入したウイルスは傷口近辺の筋肉細胞に長い間潜み，その部位でゆっくり増殖し持続感染状態になる。その後，何らかの要因が引き金となって，ウイルスは神経筋接合部に存在するニコチン性アセチルコリンレセプターに集積し，神経末端に侵入すると考えられている。末梢神経組織に侵入したウイルスは，生体内の様々な物質輸送に係わっているLC8と結合し，逆行性軸索流により中枢神経組織（CNS）に達する⁴⁹⁾。軸索中のウイルスの移動速度は50～100mm/日と推定されている。その後，ウイルスは小脳，間脳，大脳皮質の神経細胞で増殖するが，大脳の内馬領域で最も良く増殖する。したがって，感染した人や動物はウイルスが末梢神経組織に一度侵入すると7～10日間で神経症状を顕すと言われている。CNSで増殖したウイルスは，神経経路を通して末梢部の唾液腺組織，網膜，角膜，毛嚢などの周辺神経組織へ広がる。また，味蕾や嗅覚神経などの知覚神経末端器官にもウイルス抗原が認められる。これらの知見から，バイオプシーによる角膜の圧片標本やうなじの皮膚から採集された毛嚢部標本におけるウイルス抗原の検索は人の生前診断として利用されている。唾液腺組織におけるウイルス量はCNSにおけるそれより多い場合も認められる。しかし，大部分のウイルスは唾液腺組織自体よりもその周辺の末端神経組織由来で，一部が腺房細胞由来と考えられている。また，副腎髄質，消化管，肝臓，脾臓などの神経叢でもウイルスが確認されており，最近それらの臓器移植により狂犬病で発病した人が米国，ドイツで相次いで明らかにされている⁵⁰⁾。したがって，ウイルスの体内動態の解明は早期診断法の開発に重要である。

3) 発病死した人や動物における神経病変の些少性とウイルス抗原の不変性：狂犬病は人や

動物に極めて激しい神経症状を示して死に至らしめるのに比べて，神経組織の変化は微妙しか認められず，ウイルス性脳炎に伴う囲管性細胞浸潤，neuronophagiaなども乏しい。このことから，Acetylcholine, Serotonin, γ -Amino-n-Butyric Acid (GABA) などの神経伝達物質の遊離あるいは取り込み異常が激しい神経症状を誘発していると考えられている⁵¹⁾。しかしこの点も，実験動物による知見であり，自然感染例で証明されているわけでない。狂犬病ウイルスの抗原変異は他のウイルスに比べて少なく，1880年代にPasteurが作出した固定毒由来のウイルス株で作ったワクチンは現在も世界を通して予防や発病阻止に有効である。この抗原の不変性はどこから来るのであろうか？ おそらく長い潜伏期間中，体内に侵入したウイルスは抗体や他の抗ウイルス物質に影響されない部位に極端な増殖をすること無しに密やかに潜んでいるのであろうと考えられる。

4) ウイルスの自然宿主：狂犬病ウイルスの生態に関して，ウイルスが咬傷によって次々に他の動物へ伝播されることは紀元前より分かっているが，感染しても全く発病せずにウイルスを体内に保持している，いわゆる自然宿主（リザーバー）は不明である。感染動物は，動物種によって潜伏期間に長短があるものの，いずれも発病するか発病前にウイルスを排除してしまう。ナイジェリアで一見健康な犬で，時々唾液中からウイルスを排出する例が報告されているが，極めて例外的である⁵²⁾。一方，チェコで野生の小型齧歯類から多数の狂犬病ウイルスが分離され，それらの動物がリザーバーの可能性を示している⁵³⁾。野ネズミには，狂犬病ウイルスに高感受性の実験用ネズミが持たないMx遺伝子を保有している。この遺伝子を導入された細胞はラブドウイルス科の水疱性口炎ウイルス（VSV）や狂犬病ウイルスの増殖を抑制する⁵⁴⁾。この点からも，野ネズミが狂犬病ウイルスのリザーバーである可能性を示唆している。野ネズミは種類が多く，世界中至る所で生息しており，今後自然界での感染環の重要な担い手になる可

能性がある。これらが狂犬病のリザーバーだとすると，本病の撲滅に楽観視は許されない。しかし，これまで狂犬病ウイルスは全ての哺乳類に感染発病すると考えられており，人にしか感染しない天然痘と同様に本来のリザーバーはいないのかも知れない。

5) リッサウイルスの起源および狂犬病ウイルスとの関連性：狂犬病ウイルス以外のリッサウイルス属に含まれる遺伝型2～7および未分類のウイルスを本稿ではリッサウイルスとした。リッサウイルスは既述したように，狂犬病ウイルスと種々の点で類似性の有ることから狂犬病関連（類似）ウイルスと呼ばれており，アフリカ，欧州，オーストラリア，ユーラシアなどで主に食虫・食果コウモリから分離されている。さらに近年，東南アジア各国からもそれらに対する抗体が検出されていることから，これらのウイルスは旧大陸全体に浸淫していると思われる。これまでに確認されているリッサウイルスの症状や抗原・遺伝性状などの狂犬病ウイルスとの類似性以外の特徴として，人や陸棲動物にも感染・発病死させるが，それらに対しては比較的低感受性であること，ウイルスは異常を呈しているコウモリから分離され，健康なコウモリからの分離はまだ十分に確認されていないこと，などがあげられる。リッサウイルスの起源および狂犬病ウイルスとの関連性は，遺伝的に狂犬病ウイルスとABLが最も近く，ついでDUVVとEBL, LBL, MOKVの順で，最近分離されたARAVなどの未分類ウイルスはさらに離れていること⁵⁵⁾以外，ほとんど解明されていない。なかでも，日本と同様に50年間以上狂犬病の発生のないオーストラリアの土着のコウモリから多数のABLがなぜ分離されるのかは全く不明である。

5. おわりに

狂犬病ウイルスは他のウイルスと異なり，その抗原性は極めて安定しており，ワクチンは予防としても曝露後の発病阻止としても有効であ

る。にもかかわらず，本病は世界で4,000年間以上にわたり人類を悩ましている。その最大の問題は発展途上国における経済事情である。もっと安価，安全，効果の高いワクチンを開発し，狂犬病の多発している発展途上国に援助することは日本の重要な使命である。

ここでは，狂犬病に関する研究の歴史・現状・今後の課題を著者が在籍した岐阜大学応用生物科学部獣医学講座人獣共通感染症学研究分野（旧岐阜大学農学部獣医学科獣医公衆衛生学講座）での研究成果を交えて記述した。本稿を終えるにあたり，研究に携わった諸氏に感謝する。紙面の関係で発生現況，臨床症状，診断法，予防対策などを省いたが，他の総説を参照していただきたい。

文 献

- 1) Fauquet, C.M. et al. (2005), *Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, Amsterdam
- 2) Mebatsion, T. (2001), *J. Virol.*, 75, 11496-11502
- 3) Brzozka, K. et al. (2006), *J. Virol.*, 76, 3810-3818
- 4) Mebatsion, T. et al. (1999), *J. Virol.*, 73, 242-250
- 5) Kassis, R. et al. (2004), *J. Virol.*, 78, 6543-6555
- 6) Wilkinson, L. (2002), *Rabies*, (Jackson, A.C. and Wunner, W.H., eds) 1-22, Academic Press, Amsterdam
- 7) Childs, J.E. (2002), *Rabies*, (Jackson, A.C. and Wunner, W.H., eds) 113-162, Academic Press, Amsterdam
- 8) Warrell, M.J. et al. (2004), *Lancet*, 363, 959-969
- 9) Lumlertdacha, B. et al. (2005), *Emerg. Infect. Dis.*, 11, 232-236
- 10) Botvinkin, A.D. et al. (2003), *Emerg. Infect. Dis.*, 9, 1623-1626
- 11) Beran, G.W. (1981), *Handbook series in zoonoses. Section B viral zoonoses Vol. 2.* (Beran, G.W. ed.) CRC Press, Florida, 57-135,
- 12) Steele, J.H. (1975), *The natural history of rabies*, (Baer, G.M., ed.) 1-29, Academic Press, New York
- 13) Wiktor, T.J. (1985), *World's debt to Pasteur*, (Koprowski, H. et al. eds.) 141-151, Alan R. Liss Inc, New York
- 14) 岩淵秀夫 (1970), *北里メデイカルニュース*, 17 (10), 2-19
- 15) Schnell, M.J. et al. (1994), *EMBO J.*, 13, 4195-4203
- 16) Conzelmann, K.K. (1998), *Annu. Rev. Genet.*, 32, 123-162
- 17) Neumann, G. et al. (2002), *J. Gen. Virol.*, 83, 2635-2662
- 18) Clark, H.F. (1978), *Science*, 199, 1072-1075
- 19) Clark, H.F. (1980), *Infect. Immun.*, 27, 1012-1022
- 20) Coulon, P. et al. (1982) *J. Gen. Virol.*, 61, 97-100
- 21) Dietzschold, B. et al. (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80, 70-74
- 22) Prehaud, C. et al. (1988), *J. Virol.*, 62, 1-7
- 23) Seif, I. et al. (1985), *J. Virol.*, 53, 926-934
- 24) Diallo, A. (1986), *Ann. Rech. Vet.*, 17, 3-6
- 25) Morimoto, K. et al. (2001), *Vaccine*, 19, 3543-3551
- 26) Tuffereau, C. et al. (1989), *Virology*, 172, 206-212
- 27) Dietzschold, B. et al. (1985), *J. Virol.*, 56, 12-18
- 28) Yan, X. et al. (2002), *J. Neurovirol.*, 8, 345-352
- 29) Morimoto, K. et al. (1992), *Virology*, 189, 203-216
- 30) Morimoto, K. et al. (1999), *J. Virol.*, 73,

- 510-518
- 31) Prehaud, C. et al. (2003), *J. Virol.*, 77, 10537-10547
- 32) Ito, H. et al. (1994), *Microbiol. Immunol.*, 38, 479-482
- 33) Morimoto, K. et al. (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 3152-3156
- 34) Ito, N. et al. (2001), *J. Virol.*, 75, 9121-9128
- 35) Takayama-Ito, M. et al. (2004), *J. Neurovirol.*, 10, 131-135
- 36) Takayama-Ito, M. et al. (2006), *Virus Res.*, 115, 169-175
- 37) Yamada, K. et al. (2006), *Microbiol. Immunol.*, 50, 25-32
- 38) Ito, N. et al. (2001), *Microbiol. Immunol.*, 45, 51-58
- 39) Shimizu, K. et al. (2007), *Virus Res.*, 123, 154-160
- 40) 植松 智ら (2004), *ウイルス*, 54, 145-152
- 41) 藤井暢弘ら (2004), *ウイルス*, 54, 169-178
- 42) Vidy, A. et al. (2005), *J. Virol.*, 79, 14411-14420
- 43) Shimizu, K. et al. (2006), *Microbiol. Immunol.*, 50, 975-978
- 44) Faber, M. et al. (2002), *J. Virol.*, 76, 3374-3381
- 45) Finke, S. et al. (2003), *J. Virol.*, 77, 12074-12082
- 46) Kassis, R. et al. (2004), *J. Virol.*, 78, 6543-6555
- 47) Ito, N. et al. (2005), *Microbiol. Immunol.*, 49, 971-979
- 48) Shoji, Y. et al. (2004), *Virology*, 318, 295-305
- 49) Raux, H. (2000), *J. Virol.*, 74, 10212-10216
- 50) Smith, J.M. et al. (2006), *Pediatr. Transplant.*, 10, 838-843
- 51) Jackson, A.C. (2002), *Rabies*, (Jackson, A.C. and Wunner, W.H. eds.) 245-282, Academic Press, Amsterdam
- 52) Aghomo, H.O. et al. (1990), *Vet. Microbiol.*, 22, 17-22
- 53) Sodja, I. et al. (1982), *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 26, 131-140
- 54) Jin, H.K. et al. (1999), *J. Virol.*, 73, 4925-4930
- 55) Arai, Y.T. et al. (2003), *Emerg. Infect. Dis.*, 9 (3), 333-337

◀国内情報▶

デンプン合成酵素の変異を利用して開発された
甘味種コムギ¹独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター²日本製粉株式会社 中央研究所中村 俊樹¹・新畑 智也²・齊藤 美香²

デンプンは主にアミロースとアミロペクチンから構成される。今回、アミロース合成に関与する酵素を欠き、「アミロース0%のモチ変異体」とアミロペクチンの側鎖の伸張をつかさどる酵素を欠き「アミロース含量が3割程度高くなった高アミロースコムギ」を交配することにより、DNAマーカー選抜技術を使い種子に多量の糖を貯める甘味種コムギ（スイートウィート）の開発に成功した。

1. はじめに

デンプンはグルコースが連なってできている α -ポリグルカンであるが、グルコースの結合様式によって2つの成分に分けられる。グルコースが基本的に直鎖状に連なったものがアミロース（Am）、枝分かれして樹状に結合したものがアミロペクチン（Amp）である（図1）。植物種によっても異なるが、一般的には穀物の貯蔵デンプン中のAmの含量は20~30%であり、残りがAmpである。

デンプンは食品加工においては製品の加工特性や食感の改良等に幅広く用いられており、無くてはならない素材である。パンコムギにおいてもデンプンは、種子重量の60~70%を占めており、当然コムギ粉を用いた加工食品に大きな影響を与える。したがって逆にデンプン特性を改変することは、新たな加工製品開発に繋がると同時に、コムギ用途を拡大することに繋がると考えられる。

2. コムギの同祖遺伝子とその変異

パンや麺を製造するために使われるコムギは正式には「パンコムギ」あるいは「普通系コムギ」
NAKAMURA Toshiki¹, SHIMBATA Tomoya²,
SAITO Mika²

¹〒020-0198 岩手県盛岡市下厨川字赤平4²〒243-0041 神奈川県厚木市緑ヶ丘5-1-3

ギ」と呼ばれる。パンコムギは、A, B, Dの3種のゲノムで区別される2倍体植物により合成されてできた6倍体植物である。この特性は、簡単に言うとイネに代表される2倍体植物において半数体当たり1個存在する遺伝子は、パンコムギでは、A, B, Dの3ゲノム由来の3個存在することになる。これを同祖遺伝子（homoeologous genes）と呼ぶ（homologousでは無くhomoeologousである）。この同祖遺伝子がパンコムギにおける遺伝解析や変異体の発見を困難なものにしている。イネでは（半数体当たり）1個しか存在しない遺伝子に何らかの変異が生じてその機能を失うとその変異は表現型に表れる可能性が高い。例えば、モチカウルチかを決める遺伝子はイネには1つしか存在しない。従って、その遺伝子に変異が生じて機能を失えばウルチからモチになる。しかし、パンコムギは、3個の同祖遺伝子を持つため、ウルチがモチになるためには、それら3遺伝子全てに変異が生じなければならず、その確率は極めて低いものとなる。このようにコムギにおいて一般的には、放射線照射等による人為突然変異をも含めて変異体の発生する確率は、近縁の2倍体植物であるオオムギに比べて極端に低い。

3. コムギにおけるデンプン合成とその変異体

Amの合成は、顆粒結合型澱粉合成酵素I型

(GBSSI) という酵素単独の働きによってなされている (図1)。この酵素遺伝子 (GBSSI) が先に述べたウルチかモチかを決める遺伝子の正体である。この遺伝子に変異が起こり酵素が欠失あるいは機能を失うと、結果としてAmが合成されないためデンプンはAmだけからなるモチとなる。しかし、前述のようにパンコムギは、同酵素遺伝子を3個 (GBSS-A1, B1, D1とする) 持つために、通常3個の酵素 (GBSS-A1, B1, D1) によってAm合成が行われている。これが長い間パンコムギにモチ変異体が存在しなかった理由と言える。

しかし、1995年に東北農業研究センターにおいて多数のコムギ遺伝資源の中から、3個の同祖GBSSI遺伝子中1つないし2つが変異した系統を選び出し、これらを交配し変異を集積することで3個の遺伝子全てが機能しないAm0%のモチコムギを開発することに成功した¹⁾。この変異を集積するというアイデアを用いて、その後Am合成に参与する複数の酵素の1つである可溶性澱粉合成酵素II型 (SSIIa) (図1)

を欠いた変異体が日本で作出された^{2) 3)}。この変異体では、A, B, Dゲノム由来の3個のSSIIa遺伝子 (SSIIa-A1, -B1, -D1) が全て変異して機能を失っているために、アミロペクチン側鎖の鎖長が短くなる。またその側鎖の伸張阻害の影響がAm合成に現れ、Am含量が通常のそれに比べて3割ほど高くなる。そのためこのSSIIa変異体は「高アミロース」コムギと呼ばれる。

4. GBSSI及びSSIIa変異体選抜用DNAマーカー

GBSSIが全て欠失すればモチ変異体になり、モチかウルチかは、ヨウ素液でデンプンを染色すれば簡単に判別できる。ウルチは、青紫、モチは赤褐色に染色される。しかし、GBSSIが1個あるいは2個欠失したもの (部分的モチ変異体) はAm含量が数パーセント下がるだけで、ヨウ素液でも青紫色に染色されて野生型と区別ができない。しかしながら、この数パーセント

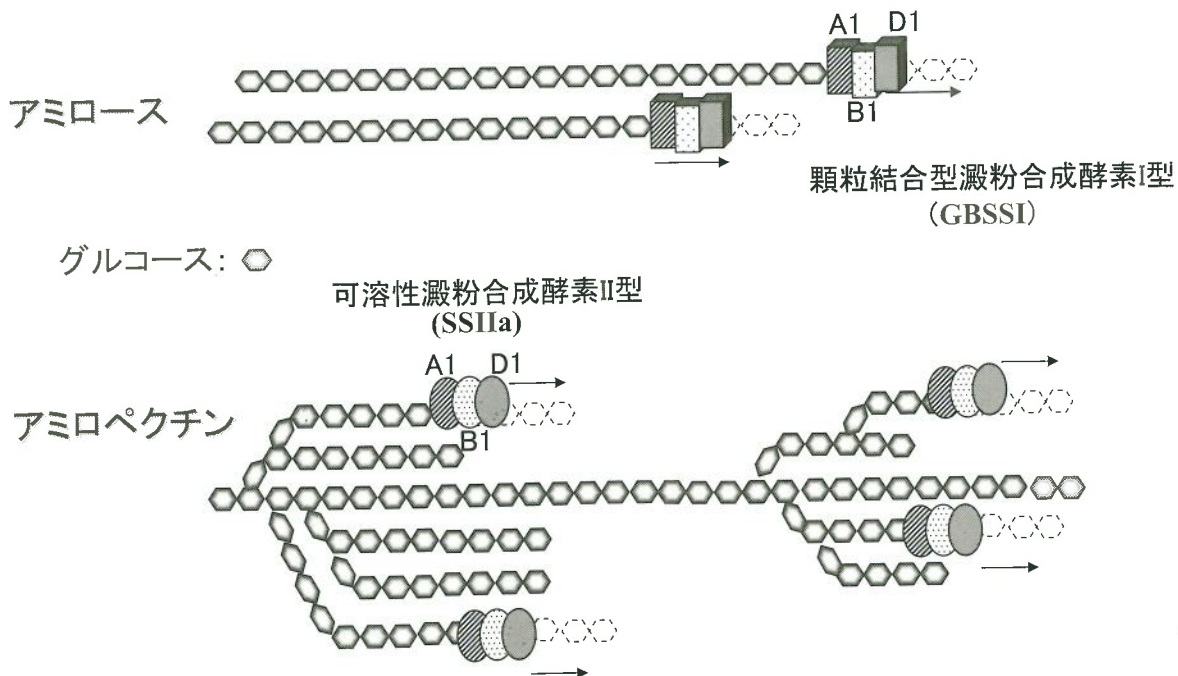


図1 アミロース、アミロペクチンとGBSSI及びSSIIa酵素の関係

アミロースはGBSSIのみによって合成されるがアミロペクチンは、複数の酵素によって合成される。SSIIaは側鎖の鎖長を伸ばす役割を担う。パンコムギにおいてはGBSSI, SSIIaともA, B, Dゲノム由来の3種 (A1, B1, D1) が存在する。

のAm低下が、実は「うどん」のこし（粘弾性）と関係しており、部分的モチ変異体（とくにB欠と言われる、*GBSSI-B1*の変異体）の選抜の重要性が判明した。これを受けて、H11～13年度に行われた農林水産省「麦緊急プロジェクト」において、PCRにより部分的変異体を選抜するためのDNAマーカーが開発され（<http://www.naro.affrc.go.jp/top/seika/2001/tohoku/tohoku01009.html>）育種事業で利用されてきている⁴⁾。このマーカーにより、野生型、モチ変異体を含めて8種類の遺伝子型の異なる個体が容易に選抜可能になった（図2上段）。

モチに比べて、*SSIIa*変異体の高アミロースコムギにおいては、その部分的変異体も含めて全てウルチのためにヨウ素液での見分けは不可能であり（図2左）、選抜においてDNAマーカー利用はさらに価値があると考えられた。そこで、私達は、まず*GBSSI*のケース⁵⁾と同様に、3種の*SSIIa*遺伝子*A1*、*B1*、*D1*に関して、それぞれ野生型と変異型の遺伝子構造を比較し、変異型に生じた欠失、挿入部分を発見し、それ

らが各ゲノム由来の*SSIIa*遺伝子が機能しない理由であることを明らかにした³⁾。さらに、それら変異部分を利用して、*SSIIa*変異を確認するためのPCRマーカーセットを「高アミロースコムギ選抜用DNAマーカー」として開発した（<http://www.tnaes.affrc.go.jp/seika/jyouhou/H17/to05007.html>）。このDNAマーカーセットは、連続戻し交配に利用できるように共優性マーカー化してあり、効率良く目的の遺伝子型の系統を育成可能という利点を持つ。

5. *GBSSI*, *SSIIa*二重変異体開発の意義

モチコムギ、高アミロースコムギともに通常とは大きく異なる特性のデンプンを蓄積しており、差別化の図りにくいコムギ粉市場に新たな可能性を提供できると期待される。そこで、我々はさらにモチコムギと高アミロースコムギを交配し、*GBSSI*と*SSIIa*の両酵素を全て欠損した二重変異体コムギを開発することにした。それら二つの澱粉合成酵素の欠失により、単純

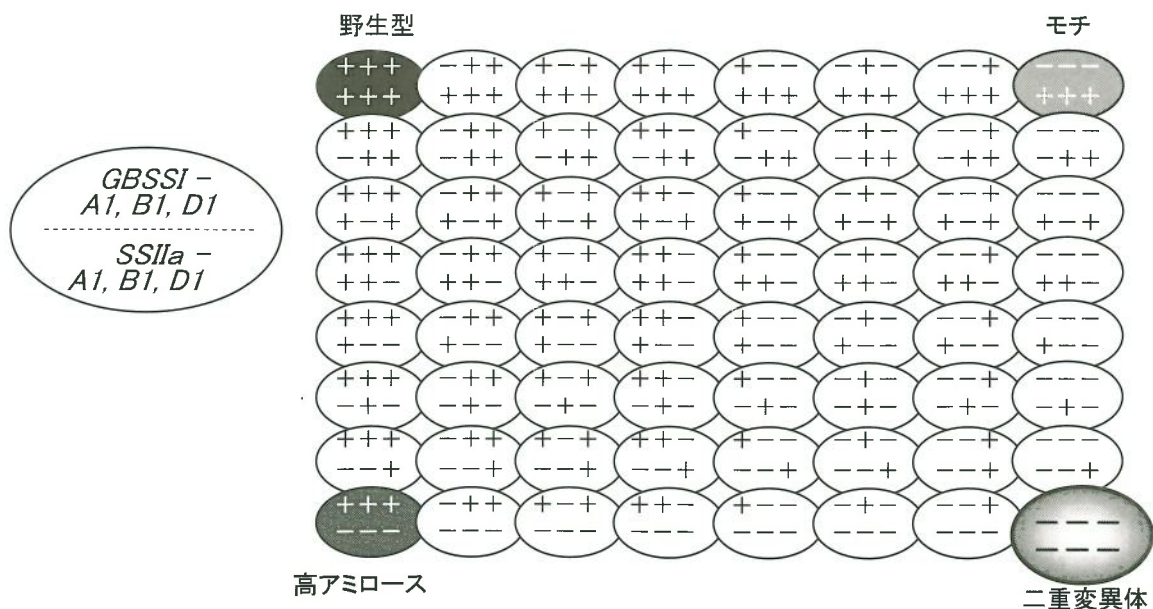


図2 モチと高アミロースコムギの交配より得られる64種のプロタイプ

モチは、顆粒結合型澱粉合成酵素遺伝子 (*GBSSI-A1*, *B1*, *D1*) が全て変異型 (-) で可溶性澱粉合成酵素 (*SSIIa-A1*, *B1*, *D1*) が正常型 (+)、高アミロースは逆に、*GBSSI* 3種全てが正常型で*SSIIa* 3種が変異型。両者を交配し、後代において、*GBSSI*, *SSIIa*の全ての遺伝子が変異型の二重変異体を2種類のDNAマーカーセットにより選抜。

には、Amを欠き多量の短い側鎖を持つAmpを持つデンプンが合成されると予想された。さらに、モチ (*SSIIa*は全て野生型) と高アミロース (*GBSSI*は全て野生型) の交配からは、野生型と二重変異体も含めて64系統が分離し (図2)、その中には先に述べた部分モチ変異体のように、完全な変異体でないが野生型とも異なり、加工特性に大きな影響を与えるものが同時に分離すると考えられた。ここにおいて *SSIIa* 変異識別用のDNAマーカーを開発した意義がある。外観形質等では識別できないと思われる64系統の選抜もこのマーカーセットと「部分モチコムギ選抜用マーカーセット」を用いれば発芽実生の葉の一部で正確かつ効率的に行えるわけである。

6. 二重変異体の選抜

東北農業研究センターで育成したモチと高アミロースの実験系統を交配し、得られたF₁種子の自殖によりさらに728個体のF₂種子を得た。メンデル遺伝によれば、モチと高アミロースコムギの交配においては、孫の代 (F₂) において4096分の1の確率で二重変異体が出現することが予想された。728個の種子を播き、発芽3葉期に前述のマーカーセットでDNA判定を行ったところ、やはり分母に当たる4096には遠く及ばないために目的の二重変異体は得られなかった。しかし、共優性DNAマーカーの強みは、次世代で二重変異体が発見される個体が含まれるかも判定できる点にある。最終的に728F₂個体の判定結果から *SSIIa-DI* のみヘテロでそれ以外は全て変異型である1個体を同定することができた。この個体の穂に付いた55個の種子を得て、それら種子からの植物体 (F₃) の遺伝子型の判定を行った結果、8個体の二重変異体を取得することができた (図3)。二重変異体のPCRによる遺伝子増幅パターンは、*GBSSI* に関してはモチコムギと同一パターン、*SSIIa* に関しては高アミロースコムギと同じパターンを示しており、*GBSSI* と *SSIIa* が全て変異型であることが

確認できた (図3)⁶⁾。

また最終的には、今回の728個体とその後代の遺伝子型判定により、 $8 \times 8 = 64$ のマトリクス (図2) を全て埋める遺伝子型を持つ系統も選抜され、改めて3重複の同祖遺伝子を基本とする6倍体コムギ育種においてDNAマーカーがいかに強力なツールであるかが再認識された。

7. 二重変異体の特徴

取得した二重変異体の特徴を検討したところ種子の外観に大きな特徴が見られた。交配に用いた親系統および通常の普通系コムギ品種の乾燥種子は通常皺粒になることは無い。しかし、二重変異体種子においては受粉後35日目までは通常となら変わらない種子形状を示していたが、その後乾燥期になると急速に収縮し、45日目には皺粒となった。そのため千粒重は親系統や対照系統に比べて明らかに減少していた⁶⁾。しかし種子形状以外の植物体外観、あるいは植物体の生育に大きな特徴の違いは見られなかった。

種子の外観上は大差が見られない25日目の種子中の糖度をBrix糖度計により測定した。種子から胚乳のみを取り出し、すりつぶした後の上清の糖度は、対照の通常の品種・系統あるいは親系統に比べて2倍程度の22度であることが判明した。スイートコーンであれば、糖度18のものはかなり甘いと言われる。22度という値は明らかに二重変異体が種子に糖を蓄積させていることを物語っていた。

そこでその高い糖度の原因を解明したところ、グルコース、スクロース、マルトースさらにグルコース三量体であるマルトトリオースの含量の増加がその原因であることが判明した。HPLCおよびキャピラリー電気泳動を用いた定量によれば、二重変異体中での含量は通常品種に比べて、グルコース、スクロースに関しては数倍、マルトトリオースは20倍、マルトースに至っては30から150倍もの増加を示していた⁶⁾。

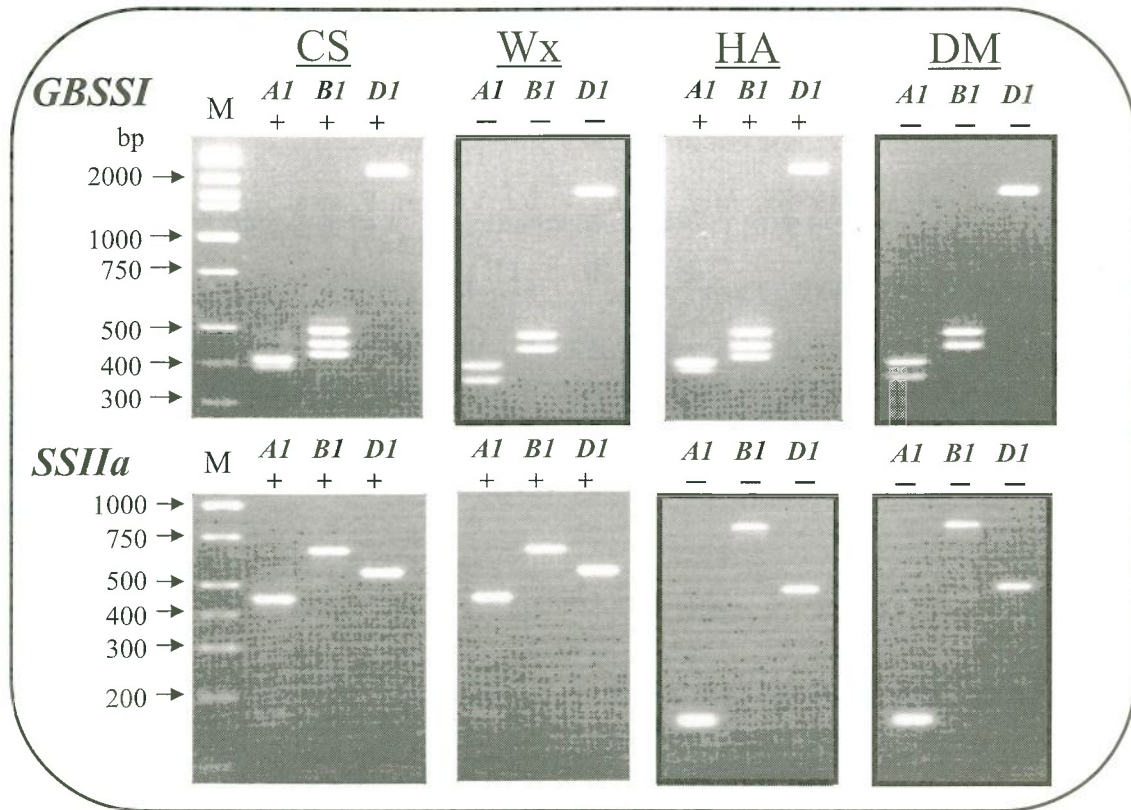


図3 DNAマーカーによる二重変異体の選抜結果

CS: Chinese Spring, Wx: モチ, HA: 高アミロース, DM: 二重変異体。+ : 正常型, - : 変異型。DMのGBSSI遺伝子のPCR増幅産物のパターンはWxのそれと、またSSIIa遺伝子の場合にはHAのそれと一致しており、合計6遺伝子全て変異型であることがわかる。

この「マイルドな甘味」を示すマルトースの高い含量は、人間の味覚にも反映しており、二重変異体未熟種子は、糖度22度を示すものの「かなり甘い」と言うよりは「甘みが感じられる」程度のものであり、また製粉した粉もほのかな甘味を呈するものであった。トウモロコシでは、複数のデンプン合成酵素遺伝子にかかわる変異体の組み合わせで甘さの異なるものが存在する。これら甘味種トウモロコシは、総称でスイートコーンと呼ばれる。そこで我々は、今回開発された二重変異体を通称で「スイートウィート」と呼ぶことにした。今後、トウモロコシ同様に他の酵素遺伝子を変異させることで別のタイプの甘味種が開発される可能性は十分に考えられるが、本研究で得られた新規のコムギはスイートウィートという新しいカテゴリに属する最初のコムギである。

8. おわりに

今回開発されたスイートウィートは実験系統であり、耐病性や適応性などの農業特性に関してはまだ不十分な状態である。そこで、今後この実験系統を交配母本として利用すると同時に、DNAマーカー選抜を用いて、全国の事業育種において地域に適応したスイートウィート品種をいかに迅速に育成するかが重要である。現在この作業をどのような枠の中で行うか検討中である。また、将来育成されるであろう品種の普及のためには、同時に受け皿としての用途開発が重要であり、スイートウィートの従来のコムギ粉製品への適応や、従来の用途にとられない、新しい用途を開発する研究も精力的に行っている。今後、品種育成と用途開発が順調に進み、最終的には世の中に役に立つ新たな

な加工素材になればと願っている。

文 献

- 1) Nakamura T. et al. (1995), *Mol. Gen. Genet.* 248, 253-259
- 2) Yamamori M. et al. (2000), *Theor. Appl. Genet.* 101, 21-29
- 3) Shimbata T. et al. (2005), *Theor. Appl. Genet.* 111, 1072-1079
- 4) Nakamura, T. et al. (2002), *Genome* 45, 1150-1156
- 5) Vrinten P. et al. (1999), *Mol. Gen. Genet.* 261,463-471
- 6) Nakamura T. et al. (2006), *Genes Genet. Syst.* 81, 361-365

◀国内情報▶

ジベレリンを不活性化する新しい酵素を発見
—植物の大きさを制御独立行政法人 理化学研究所 植物科学研究センター
山口 信次郎

ジベレリンは、植物成長ホルモン的一种であり、茎の伸長や葉の拡大を促進する作用をもつ。また、種子発芽や花芽形成のコントロールにも深く関与する。ジベレリンは植物組織中の存在量が極めて微量であり、また同族体が多数存在することから、その生合成・代謝経路の全容は未だに明らかではない。筆者らは、モデル植物のゲノム情報や逆遺伝学的手法を有効に利用することにより、メチル基転移酵素による新たなジベレリン不活性化機構の存在を明らかにした。

1. はじめに

植物ホルモンは、少量で驚くほど顕著な生理作用を示す。ジベレリンは、植物組織1グラム中にわずか10億分の1グラム（1ナノグラム）ほどしか存在しない。ところが、このわずか1ナノグラムのジベレリンが無くなると植物は正常に成長できない。ジベレリンを生合成できない突然変異株は草丈が極端に低くなり、逆にジベレリンを植物に与え続けると、草丈はどんどん高くなる。イネや小麦の生産量を飛躍的に高めた「緑の革命」に用いられた半矮性品種の原因遺伝子の一部は、ジベレリンの生合成や応答反応に関わる遺伝子であることが知られている^{1~4)}。植物ホルモンは動物のホルモンとは異なり、特定の器官で一定の作用を示すというよりは、生活環の様々な場面において複数の器官で生理機能をもつ。ジベレリンは茎や葉の成長以外にも、種子の発芽、開花時期の制御にも重要な役割を果たす。また、ブドウの種無し化もジベレリンのホルモン作用を応用して行われている。このように、ジベレリンは農業と密接に関連した植物ホルモンであり、ジベレリンを介した成長制御機構を理解することは、農業等に

YAMAGUCHI Shinjiro

〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22

において植物の能力を最大限に引き出すための技術開発に繋がる可能性がある。

2. ジベレリンの不活性化

植物ホルモンの量を生体内で効率的に調節するためには、その生合成と不活性化（分解）の双方を協調的に制御することが有効であると考えられる。例えば、ジベレリン量を生体内で効率的に増加させる場合には、生合成を誘導すると同時に不活性化を抑制すると効果的であろう。このように、ホルモンの不活性化はその量の調節に重要な役割を果たす。ジベレリンの不活性化反応として、図1に示す2位の水酸化が古くから知られており、その酵素遺伝子の発見以来ジベレリンの代表的な不活性化反応として研究が進められてきた⁵⁾。最近、筆者らの研究グループは、シトクロムP450酸化酵素による16, 17位のエポキシ化が、ジベレリンの新たな不活性化経路として機能することを見出した⁶⁾。イネの徒長型変異株である *eui* (*elongated uppermost internode*) はこのエポキシ化酵素が欠失しており、最終節間に過剰量の活性型ジベレリンが蓄積し、徒長を引き起こす。以上のように、これまでに研究されているジベレリンの不活性化酵素はジベレリンを「酸化反応」に

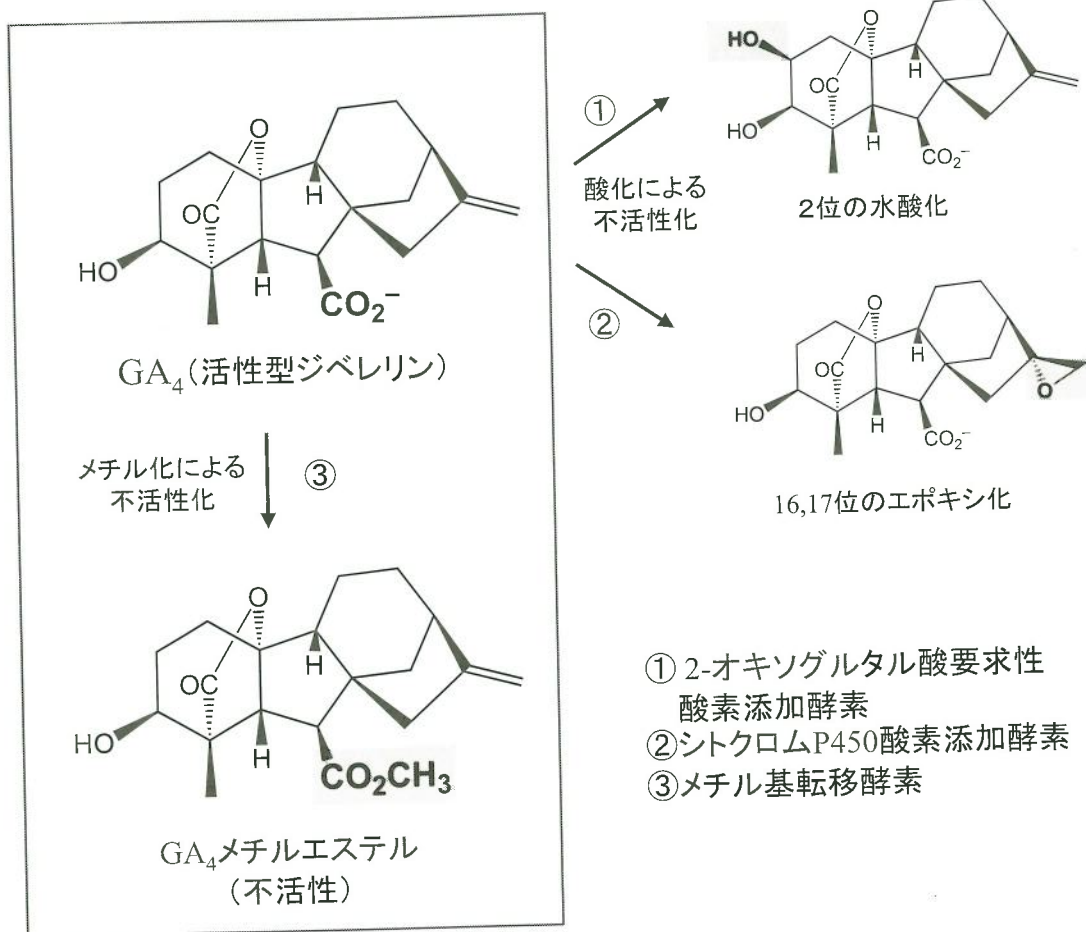


図1 ジベレリンの不活性化反応の多様性

より不活性化する酵素であった。

3. ジベレリンをメチル化する酵素の発見

ジベレリンはカルボキシル基を有する酸性物質で、細胞内ではおもにイオンとして存在すると考えられる。これまでの研究から、この酸性の性質はジベレリンが植物体内でホルモンとして働くために重要であることが分かっている。すなわち、化学合成的にこのカルボキシル基をメチルエステルに変換したジベレリンは、ほとんど生理活性を示さない。また、ジベレリン受容体への結合能は、このカルボキシル基がメチル化されると大きく低下することが報告されている⁷⁾。しかしながら、植物体内でジベレリンをメチル化する酵素が存在するかどうかは不明であった。

筆者らは、ミシガン大学のエラン・ピチャス

キー教授らと共同で、ジベレリンのカルボキシル基を特異的にメチル化するシロイヌナズナの酵素を発見した⁸⁾。植物の中には、S-アデノシルメチオニンをメチル供与体として、特定のカルボキシル基をメチル化する酵素（メチル基転移酵素）の存在が知られている。例えば、植物ホルモンであるジャスモン酸やサリチル酸は、それぞれ特定のメチル基転移酵素によりジャスモン酸メチルとサリチル酸メチルに変換される⁹⁾。全ゲノム配列情報から、シロイヌナズナには類似のメチル基転移酵素をコードする遺伝子が24個存在することが示唆されている。そこでこれらの遺伝子産物を大腸菌で生産し、放射性同位元素で標識したS-アデノシルメチオニンをを用いてジベレリンにメチル基を転移する酵素活性の有無を調べた。その結果、24の候補遺伝子のうち、GAMT1とGAMT2と名付けた二つの遺伝子の翻訳産物が試験管内でジベレリンを

メチル化する酵素活性を有することが明らかになった。

4. *GAMT*遺伝子を過剰発現する植物体—ミニ植物の作出

*GAMT1*と*GAMT2*遺伝子をシロイヌナズナ、タバコ、ペチュニア各植物体内で過剰発現させたところ、いずれも極端な矮性を示した(図2にペチュニアの例を示す)⁸⁾。これらの表現型は、*GAMT*遺伝子産物が植物体内でジベレリンをメチル化し、活性型ジベレリンの量を低下させた結果であると推定される。そこで、*GAMT*過剰発現株におけるジベレリン量を分析したところ、主要な活性型ジベレリンである GA_4 の内生量が野生型と比べて約十分の一程度に減少していることが明らかになった。また、これらの矮化した植物体に GA_4 を投与すると、野生型植物と同等レベルに成長を回復させることができた。以上の結果は、*GAMT*が植物体内でジベレリンの不活性化酵素として機能することを示している。また、これらの実験から、*GAMT*遺伝子はシロイヌナズナ以外の植物種においても機能し、ミニ植物の作出に有用であることが明らかになった。

*GAMT1*と*GAMT2*の生理的役割を明らかにするためには、これらの遺伝子機能が失われた変異株を使った解析が有効であると考えられる。*GAMT1*と*GAMT2*の遺伝子産物が植物体のどこで作られているのかを詳しく調べたところ、葉、莖、根ではほとんど検出されず、種子が形成される過程で最も多量に生産されていることが分かった⁸⁾。*GAMT1*、*GAMT2*両遺伝子が破壊された突然変異株では、鞘(未熟種子を含む果実)に野生型よりも多量のジベレリンが存在していた。シロイヌナズナの種子はジベレリンが無くなると発芽できなくなるため、ジベレリン生合成を阻害する薬剤の存在下では野生型種子の発芽が抑制される。ところが、*GAMT*両遺伝子が破壊された突然変異株の種子はジベレリンの生合成阻害剤を与えても発芽



図2 メチル化酵素*GAMT1*を構成的に発現するとミニ植物ができる
(左上) *GAMT1*を過剰発現するペチュニア；
(右) 正常なペチュニア

することができた。以上の結果から、*GAMT*遺伝子は種子におけるジベレリン量の調節に関与することが明らかになった。

5. 今後の展望・課題

今回の研究で、ジベレリンの不活性化にメチル化という新たな仕組みが存在することが明らかになった。メチル基転移酵素によるカルボキシル基のメチル化は、生体内の様々な代謝経路において発見されているが、それらの中には、メチルエステルを再びカルボキシル基に戻す加水分解反応の存在が知られている¹⁰⁾。したがって、今回明らかになったジベレリンのメチル化反応は、これまでに知られているジベレリンの「酸化」による不活性化とは異なり、可逆的であることに重要な意味があるのかもしれない。ジベレリンのメチル化が、活性型ホルモンに復活できる一時的な不活性化としての意味をもつのかどうかについては今後の研究を待たねばならない。

ジベレリンのメチル化酵素の発見により、このホルモンを不活性化するための多様な分子機構の存在がより明確になった(図1)。これらの不活性化反応は、活性型ジベレリン量を微調整するために重要な役割を果たしているものと

推定される。今後、各遺伝子の破壊株を組み合わせた多重変異株の作出などを通じて、個々の不活性化反応の生理機能を順次明らかにしていく必要がある。メチル化によるジベレリンの不活性化が、シロイヌナズナ以外の植物種においても存在するかどうかを調べることも、このメカニズムの普遍性を知る上で重要である。今後、このメチル化によるジベレリン量の調節機構をより詳細に調べることにより、種子機能の改良や植物体のサイズの調節技術の開発が期待される。

文 献

- 1) Peng, J.R., et al. (1999) *Nature* 400, 256-261.
- 2) Sasaki, A., et al. (2002) *Nature* 416, 701-702.
- 3) Spielmeyer, W., et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 9043-9048.
- 4) Monna, L., et al. (2002) *DNA Res.* 9, 11-17.
- 5) Thomas, S.G., et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4698-4703.
- 6) Zhu, Y., et al. (2006) *Plant Cell* 18, 442-456.
- 7) Ueguchi-Tanaka, M., et al. (2005) *Nature* 437, 693-698.
- 8) Varbanova, M., et al. (2007) *Plant Cell* 19, 32-45.
- 9) Chen, F., et al. (2003) *Plant J.* 36, 577-588.
- 10) Stuhlfelder, C., et al. (2004) *Eur. J. Biochem.* 271, 2976-2983.

◀国内情報▶

シロアリセルラーゼの微生物生産－
シロアリ消化系のバイオマス変換への応用を目指す

独立行政法人 農業生物資源研究所

渡 辺 裕 文

シロアリ類は分子量47kD程度、成熟時アミノ酸数432アミノ酸からなるセルラーゼをコードする遺伝子をゲノム上にもつ。4種のシロアリに由来するセルラーゼ遺伝子cDNAを使いランダムな相同組換えを行い改変cDNAライブラリーを作製、それより大腸菌での大量発現に適合したキメラセルラーゼcDNAを選抜しセルラーゼの生産に成功した。それを用いて木材の部分分解を行った。

1. はじめに

シロアリ類は、現在セルラーゼの研究が最もすすんでいるクロストリジウム菌（放線菌）やトリコデルマ菌（カビ）よりもはるか以前より過去100年間セルラーゼ分解生物としての研究対象になってきた。先日も共著論文¹⁾に関して第1著者の徳田岳を通して「シロアリ類のセルラーゼの産業利用につながる…」と吹いたところ、ロンドン大学のDavid Bignel教授には「(産業利用に関する)議論は過去30年間シロアリ研究を正当化する理由として使われてきたが、実際に商業利用された例をしらない」と皮肉られてしまった (<http://www.rsc.org/chemistryworld/News/2007/March/26030702.asp>)。技術開発を始める以前の段階からよくいわれるのは採算性の問題であるが、「シロアリセルロース消化機能」の活用が実験的なモデルにもなっていない段階で、「微生物以外で採算性がとれるはずがない」と考えるのは杞憂である。なぜなら、それを計算するモデルすら手にしていないからである。

期待されながらも産業利用がすすまない理由は本質的にふたつあると筆者は考える。ひとつは、生産者が高等動物であり、自由な増殖と目的タンパクの回収に微生物に比べはるかに時間・コストがかかることである。これまで大腸

WATANABE Hirofumi

〒305-8634 つくば市大わし1-2

菌・酵母でシロアリセルラーゼcDNAの大量発現とセルラーゼの生産を試みてきたが、プレート上で微弱な活性を検出するためのハロアッセイ²⁾を使ってタカサゴシロアリセルラーゼの微弱な発現をみる以上のことはできなかった³⁾。また、大腸菌大量発現系を使いシロアリセルラーゼの生産を試みた実験が報告されているが可溶性酵素の大量発現には成功していなかった⁴⁾。筆者らは4種類のシロアリセルラーゼcDNAのランダムな相同組換えを行い、得られたキメラcDNAライブラリーから大腸菌での大量発現に適応したクローンを選抜し、最初の問題を解決した。

2. シロアリセルラーゼの改良と大量発現

シロアリ類・ゴキブリ類は内源性（ホスト由来）セルラーゼとして糖質分解酵素ファミリー9に属するセルラーゼを生産しており、その中でもシロアリ類でこれまでに報告された全ての内源性セルラーゼは448アミノ酸（成熟時432アミノ酸）からなり、互いにアミノ酸上で70%以上の相同性を示す⁵⁾。著者らは複数種のシロアリセルラーゼcDNAを得ていたためこれらをDNase Iという酵素を用いてランダムに切断し、加熱して一本鎖DNAとしたうえ冷却して徐々に再アニールさせることによりランダムなキメラセルラーゼcDNA集団（ライブラリー）

を作製することができた（ファミリーシャフリング^{6, 7)}（図1）。このライブラリーから大腸菌による弱発現系で活性を示すものを選抜し、その中からさらに大腸菌による強発現系で可溶性分画に活性のある酵素を大量に発現するクローンを選抜した⁸⁾。選抜したクローンのひとつA18は親であるタカサゴシロアリ、ヤマトシロアリ、イエシロアリおよび豪州産の近縁種のセルラーゼのキメラであり相互に30程度のアミノ酸置換が起こっていた（図2）。また、他の選抜クローンにも同様のアミノ酸置換が起こって

いた。選抜されたクローンに起きた全てのアミノ酸置換は、触媒作用に直接かかわる活性中心に対するものではなく、活性中心を支えるタンパクの構造部分に対するものであった。

3. シロアリセルラーゼの特性

シロアリセルラーゼは活性中心を支える触媒ドメインのみからなるシングルドメイン酵素であり、結晶性セルロースに対して高い活性を示す微生物起源セルラーゼのようなセルロース吸

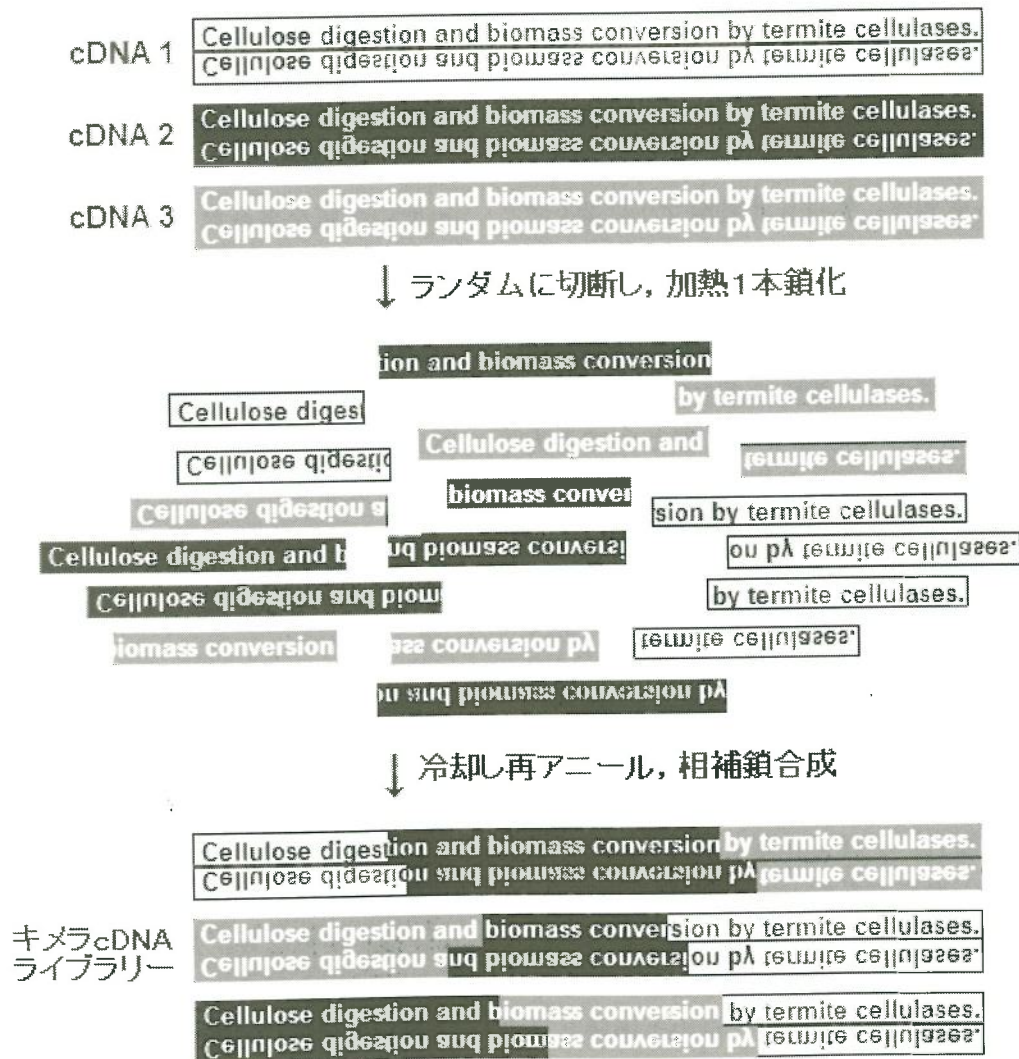


図1 ファミリーシャフリングの模式図

相同性のあるcDNAを複数準備し、それらをDNAse Iでランダムに切断したのち加熱1本鎖とし、冷却・再アニールする。ギャップ（1本鎖部分）をDNAポリメラーゼで2本鎖化するとキメラcDNAライブラリーが作製される。

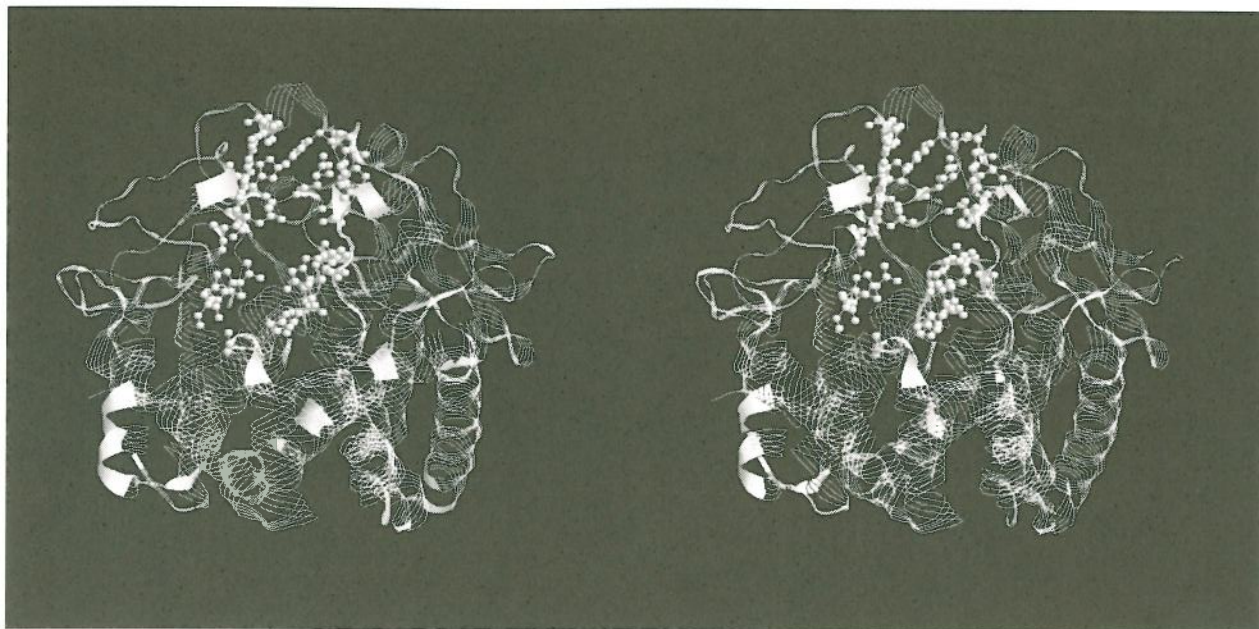


図2 A18の立体構造予想図とアミノ酸改変部位

タカサゴシロアリセルラーゼNtEG (PDB ID:1ks8A) をテンプレートとして予測したA18改変シロアリセルラーゼの立体構造。ワイヤーフレーム表示部分はヤマトシロアリセルラーゼRsEGから変化がないアミノ酸、リボン表示部分は他のシロアリセルラーゼに置換されたアミノ酸。ボール&スティック表示部分は触媒部位を構成するアミノ酸であり、この部分には変異が導入されていない。

着ドメインやセルロソームのような構造をもたない。また、シロアリの中腸で働く唯一のセルラーゼである。ヤマトシロアリから精製した内源性（唾液腺）セルラーゼは水溶性セルロースであるカルボキシメチルセルロース（CMC）に対し高い活性を示すが、結晶性セルロースに対しても数千分の一の活性を示す⁹⁾。結晶性セルロースおよび短鎖セルロースからの主産物はセロビオースであり、副産物としてその1/10程度のグルコースを生じる⁹⁾（図3）。また、ヤマトシロアリおよびタカサゴシロアリのセルラーゼはpH 4から9以上にわたる広範囲のpHで活性を示し^{9, 10)}、著者はアルカリセルラーゼとして衣料洗剤添加剤などへの応用も期待している。前述の改変クローンA18はシロアリセルラーゼのこれらの諸特性受け継ぎながら大腸菌での大量生産を可能としたクローンである⁸⁾。セルラーゼ活性は通常、低分子糖（還元糖）1マイクロモルを1分間に生ずる活性を1ユニットと定義するがA18のCMCに対するタンパク1mg当たり活性（比活性）は、500ユニット/mg

と精製RsEGや大腸菌でわずかに生産したりコンビナントRsEGの約6倍に達し、CMCに対する活性の上昇と同時に結晶性セルロースに対する活性も底上げされている。このA18を53ユニット/mgの濃度でコピー用紙および松材粉末と37℃で振とう反応させたところコピー用紙は24時間で約1%が分解し、松材粉末は14時間の反応で約0.1%が分解した。松材粉末は小動物用の床式として市販されているチップをロータリー式破砕機（一般にポリトロンと呼ばれるもの）を使って破砕しただけのものであり、脱リグニン処理をまったくしていない。著者の経験ではヤマトシロアリ1個体は約0.35ユニットの内源性セルラーゼ（RsEG）をもつが、ヤマトシロアリを直径1mm、長さ4mmの円筒に見立て、中腸がその1/10の体積を占め、唾液腺で生産されるRsEGがすべて中腸に流入すると仮定した場合の酵素濃度は1110ユニット/mlとなる。これは前述の実験条件の20倍の酵素濃度に相当し、一晚程度の時間で1%オーダーの木材が分解されると予測できる。むろん、木材の完全分

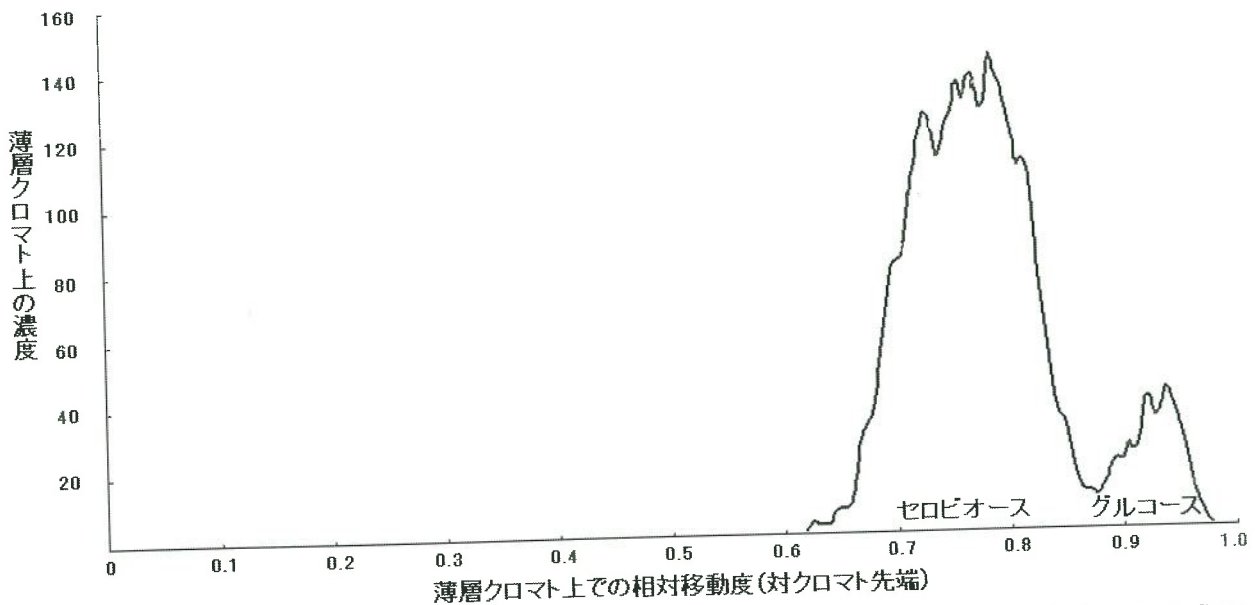


図3 結晶性セルロース (Sigmacell 20) をヤマトシロアリセルラーゼで消化したときの生成物
主産物はセロビオースでありその1/10程度のグルコースを生じる。詳しい実験条件は文献⁹⁾を参照のこと。

解にはほど遠い数値であるが、セルロースバイ
ンディングドメインもセルロソームも相乗効果
を期待できる他種のセルラーゼも無い単独の酵
素での非脱リグニン処理木材の分解効率として
は驚くべきものであろう。

4. シロアリ消化管の構造とバイオリア クターへの応用

シロアリ類の中腸は中腸前端部より分泌され
“透析チューブ”の働きをもつ囲食膜を筋肉や
その内側を覆う円柱細胞からなる中腸壁が覆う
構造となっている。囲食膜は固形の食物が柔ら
かい中腸壁を傷つけることを防止するとともに
中腸壁との間に間隙を作り分解産物や余剰な酵
素を囲食膜の外に排出させていると考えられる
(図4)。大あごでかじりとられた木材は食道を
通して第2のそしゃく器官である前胃で50マイ
クロメートル以下に分解されたのち^{11, 12)}、噴門
を通過して中腸の囲食膜内に送り込まれる。中腸
の前端と後端にはそれぞれ噴門と幽門があり、
食物の食道への逆流や未消化食物・分解産物の
後腸への流入が抑えられている。セルラーゼに

よる分解産物および消化液は囲食膜後端に達す
ると幽門にせき止められ囲食膜と中腸壁の間隙
に押し出され中腸前方に還流し、消化酵素は再
利用され生成したブドウ糖は中腸壁のレセプタ
ーにとらえられ体内に吸収されると考えられ
る。前述のようにシロアリ内源性セルラーゼは
微生物セルラーゼのようなセルロースバインデ
ィングドメインをもたないため消化木材に吸着
して後腸へ流出する酵素量が少なく抑えられて
いるのであろう。このようにシロアリの消化系
はミル(大あご, 前胃), 酵素生産装置(唾液
腺), 酵素反応タンクおよび透析装置(中腸お
よび囲食膜), 精製糖回収装置(中腸壁)から
なる極小のバイオリクターそのものであり、
この構造を産業用セルロースバイオリクター
の設計に生かすことができれば非常に効率的な
セルロース連続糖化系が構築できると著者は期
待している。

5. 今後の研究

シロアリ類の消化管はそしゃく器官である大
あごに始まり食道(前腸)・前胃・中腸と続く

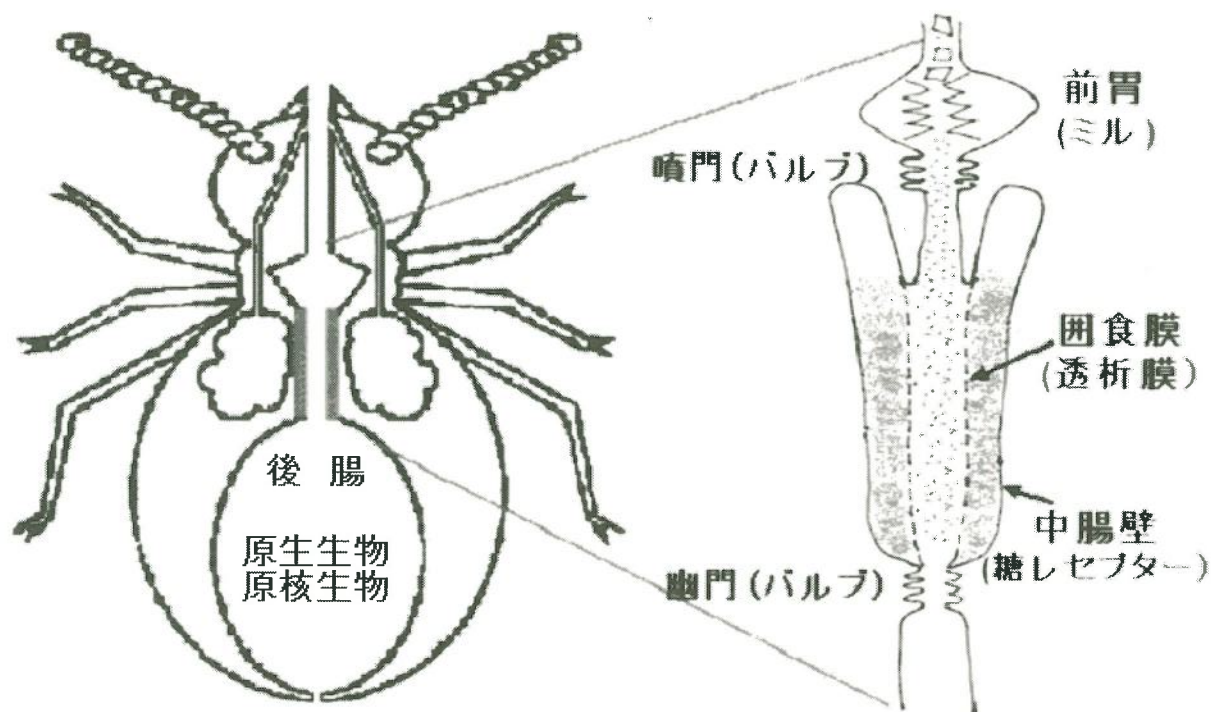


図4 シロアリ消化系の模式図

たのち巨大な後腸に達する。中部後腸は Paunch と呼ばれる原生生物や細菌・古菌の培養タンクとなっており、中腸で消化されなかった食物（木材）はここで最終的な分解を受ける。ヤマトシロアリでは唾液腺・中腸と後腸のセルラーゼ活性は CMC を基質とした場合同程度である¹³⁾。分解産物は中腸ではグルコースの形で吸収されると考えられるが、後腸では微生物相は木材の分解で得られるエネルギーを空中窒素固定と自らの維持・増殖に使い余剰エネルギーが酢酸の形で宿主シロアリに還元されると考えられている¹⁴⁾。

後腸に原生生物相をもたない高等シロアリ類（シロアリ科に属するシロアリ類）は自らの酵素のみでセルロースを分解していると考えられてきたが¹⁵⁾、高等シロアリの後腸原核生物相も通常の水系バッファで抽出されない形で（大腸菌用細胞破碎抽出液を使うと溶出される）かなりのセルラーゼ活性をもつことを最近著者らは明らかにした¹⁾。このように、シロアリをモデルとした効率の高いセルロース系バイオマス糖化系の構築を目指す上で、後腸の分解系の理解

は欠かせない。大腸菌での生産が可能になったシロアリ内源性セルラーゼとその用法をさらに改良し、シロアリ後腸微生物由来のセルラーゼをモデル分解系に加えシロアリ類同様の高い分解効率を達成してゆきたい。

最後に、シロアリセルラーゼの実用化を阻む第2の問題についてであるが、読者の皆様がもはやお気づきのようには研究者のコミットメントと研究上のプライオリティの問題である。「シロアリ」を予算獲得の理由として使い研究成果で論文を書き続ければ研究者としては生き残ることができた。しかし、地球環境問題を背景とした眼前のセルロースバイオマス活用問題に対して真摯に取り組まなければ David Bignel 教授によるコメントと同様な批判を再び仰ぐ結果となるだろう。

6. 謝辞

本研究は、農林水産省バイオテクノロジー先端技術開発研究「昆虫の機能利用と資源化に関する基礎研究」（平5～12）、農林水産省パイオ

ニア特別研究「動物セルラーゼの特性解明と利用技術の開発」(平12~14), 生研機構(現生研センター)基礎研究推進事業若手支援型「進化工学手法によるシロアリセルラーゼの改変と高効率セルロース糖化系の開発」(平11~15), 農林水産省委託プロジェクト「21世紀最大の未利用資源活用のための『昆虫テクノロジー研究』」(平15~18)の支援を受けて実施した。また, 本研究はこれらの助成に加え, 様々な共同研究者の支援で実施してきた。多大なご支援を頂いた関係各位に紙面を借りて御礼申し上げます。

文 献

- 1) G. Tokuda and H. Watanabe, *Biol Lett*, 3, 336-9 (2007).
- 2) R. M. Teather and P. J. Wood, *Appl Environ Microbiol*, 43, 777-780 (1982).
- 3) G. Tokuda, N. Lo, H. Watanabe, M. Slaytor, T. Matsumoto and H. Noda, *Biochim Biophys Acta*, 1447, 146-59 (1999).
- 4) 板倉修司, 益田貴文, 田中裕美, 榎章郎 *環動昆* 16, 113-118 (2005).
- 5) H. Watanabe and G. Tokuda, *Cell Mol Life Sci*, 58, 1167-78 (2001).
- 6) W. P. Stemmer, *Nature*, 370, 389-91 (1994).
- 7) W. P. Stemmer, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 10747-51 (1994).
- 8) J. Ni, M. Takehara and H. Watanabe, *Biosci Biotechnol Biochem*, 69, 1711-20 (2005).
- 9) H. Watanabe, M. Nakamura, G. Tokuda, I. Yamaoka, A. M. Scrivener and H. Noda, *Insect Biochem Mol Biol*, 27, 305-13 (1997).
- 10) G. Tokuda, H. Watanabe, T. Matsumoto and H. Noda, *Zoolog Sci*, 14, 83-93 (1997).
- 11) S. Itakura, K. Ueshima, H. Tanaka and A. Enoki, *Mokuzai Gakkaishi*, 41, 580-586 (1995).
- 12) T. Yoshimura, K. Tsunoda and M. Takahashi, *Mokuzai Gakkaishi*, 42, 1250-1257 (1996).
- 13) G. Tokuda, N. Lo and H. Watanabe, *Physiological Entomology*, 30, 372-380 (2005).
- 14) J. A. Breznak and A. Brune, *Annu Rev Entomol*, 39, 453-487 (1994).
- 15) M. Slaytor, *Comp Biochem Physiol*, 103B, 775-784 (1992).

◀国内情報▶

エゾアワビのゲノム連鎖地図の作成

¹独立行政法人 水産総合研究センター 東北区水産研究所,²独立行政法人 水産総合研究センター 養殖研究所関野正志¹・原素之²

マイクロサテライトマーカーに基づくエゾアワビ (*Haliotis discus hannai*) のゲノム連鎖地図を作成した。雌雄別々に作成した連鎖地図を整列させると18の連鎖グループが形成され、本種のハプロイド染色体数と一致した。本研究で得られた連鎖地図は、ほとんど明らかにされていない未知のアワビゲノム構造を解明する上で、大きな足がかりとなるとともに、今後量的形質遺伝子座(QTL)や機能的遺伝子マッピングの基盤としての利用が期待できる。

1. はじめに

日本産アワビ類のうち、寒流域沿岸に生息するエゾアワビ (学名: *Haliotis discus hannai*) は、最も重要な漁獲対象種であり、市場で1万円/kg以上の高価格で流通している。そのため漁獲量の増大と天然生産力の補強を目的として、各地でアワビ種苗 (稚貝) 生産とその放流 (栽培漁業) が行われてきた。しかし近年のエゾアワビを含むアワビ類の漁獲量は低位で推移し、現在は最盛期の3分の1程度まで落ち込んでいる (図1)。このようなアワビ資源量の減少要因は、生息環境の劣化等様々に考えられ、特定することは難しい。いずれにせよ、アワビの漁獲量は気候変動や乱獲の影響を受けやすく、漁業収入の不安定を招く。また最近のアワビ市場価格の高騰に伴い、都市部のホテルなどでは、安価な外国産アワビを提供するケースも増えてきている。このような外国産アワビ輸入量の増加に従い、この先産地偽装などの社会問題が生じる可能性も否定できない。こうした背景から、高品質な国内産アワビを安定して供給できるように、アワビ養殖の産業化が期待されている。

2. アワビ養殖の問題点

アワビ類は、草食性である、高密度飼育が可能である、また市場価値が高い、など養殖に適した特徴を持つが、現段階では小規模養殖生産が行われているにすぎない。アワビ類の養殖生産を阻む最大の問題点として、その成長の遅さが挙げられる。例えばエゾアワビの場合では、出荷サイズ (7~9 cm) まで育成するには3~5年を要する。この育成期間 (養殖期間) を短縮できれば、養殖経営に関わるランニングコスト (餌料費、養殖維持管理費、人件費、金利) などの削減に繋がり、採算の取れる養殖生産拡大への道が期待できる。すなわち育種によって成長の早いアワビ系統を養殖用品種として固定できれば、養殖期間の短縮に大きく貢献することができると期待される。これまでに、選抜育種によるエゾアワビの成長の改良が確認されているが^{1, 2, 3, 4, 5)}、親貝の養成、次代の育成、および形質評価等を行うための飼育施設や飼育管理コストの制限などがあり、養殖用優良系統の作出に至っていない。

3. ゲノム連鎖地図の必要性

成長に関与する遺伝子座と連鎖するDNAマーカーを見つけることができれば、マーカーに着目した優良個体の選抜が可能になり、効率的に育種を進めることができる (マーカー選抜育

SEKINO Masashi¹, HARA Motoyuki²¹〒985-0001 宮城県塩釜市新浜町3-27-5²〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1

種)。家畜・家禽や作物などと比較すると、ほとんどの水産生物、特に貝類では、マーカー選抜育種に必要なゲノム情報の蓄積が著しく遅れており、研究の進展が望まれている。エゾアワビの成長は、多くの遺伝子の影響を受ける、典型的な量的形質と考えられ、量的形質遺伝子 (QTL: Quantitative Trait Loci) 近傍のDNAマーカーを指標にしてマーカー選抜育種を行うためには、まずゲノム上にDNAマーカーを位置づけること、すなわちDNAマーカーによるゲノム連鎖地図を作成することが不可欠である。

そこで平成15~17年度水産庁運営費交付金プロジェクト研究「養殖用水産生物におけるゲノム情報を用いた育種基盤技術の開発」のアワビチームでは、今後のアワビ育種研究の基盤となる、DNAマーカー連鎖地図の作成を試みた。DNAマーカーには様々なタイプがあるが、連鎖地図作成を目的とすると、ゲノムを広範にカバーできること、解析が容易であること、地図距離 (マーカー間距離) 推定の基礎となる組み換え率算出に関する情報量が多いこと (共優性)、また家系間での汎用性が高いものが望ましい。これらの点でマイクロサテライトDNA (単純反復配列) は最適なマーカーの一つであり、連鎖地図作成に欠かせないツールとして幅広く利用されてきた。著者らもこれまでにアワビのマイクロサテライトマーカーを開発しており^{6, 7, 8, 9, 10)}、これらと新規に開発したものを併せて連鎖地図作成に利用した。

4. マイクロサテライトマーカーに基づくエゾアワビ連鎖地図

エゾアワビの雌雄1:1交配3家系 (60~96

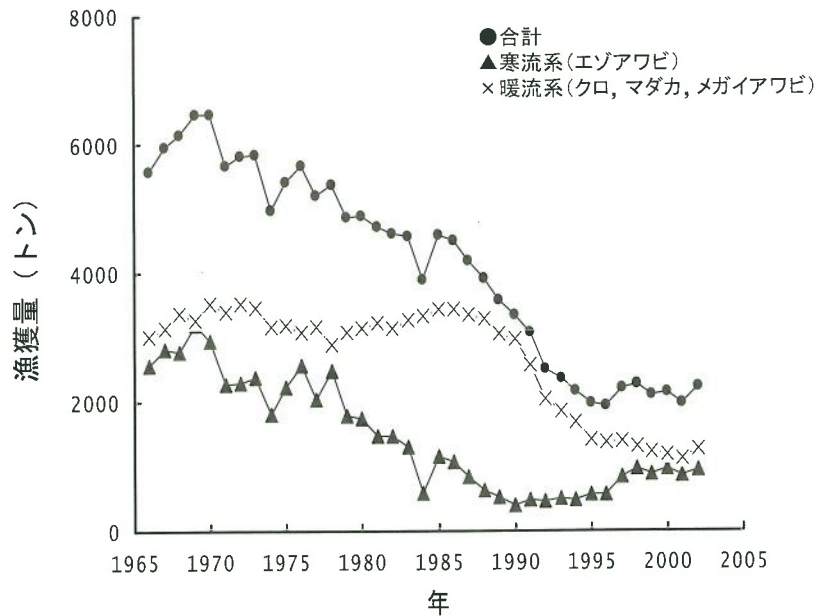


図1 日本産アワビ類漁獲量の推移

個体/家系) に対して計180個のマイクロサテライトマーカーを使って家系解析を行った。ヒトを含む多くの生物種で、雌雄間で連鎖地図長およびマーカー位置の違いがあることが報告されている。そこで連鎖地図作成にあたっては、まず家系ごとに雌雄を分けて連鎖地図を作成し (すなわち6つの連鎖地図を作成した)、各家系から得られた地図を雌雄別々に統合した (図2)。雌では19の連鎖群 (計160マーカー)、雄では18の連鎖群 (167マーカー) が形成されたが、雌雄の連鎖群を整列させれば18の連鎖群に分けられ、これはエゾアワビのハプロイド染色体数 ($n=18$)¹¹⁾ と一致した。すなわち、各連鎖群が、それぞれ1本の染色体に相当するということである。他の多くの生物と同様、性による連鎖地図の違いが認められたが、特定の連鎖グループではむしろ個体差が著しかった。紙面の都合上、ここでは詳細は省くが (文献12参照)、このような個体間差が、ゲノムの構造上の変異によるものか、あるいは致死因子などによる稚貝の生残の差が組み換え率の推定値に影響を与えたのか、不明である。連鎖地図の全長 (補正值) は、雌で約1,200cM (センチモルガン)、雄で930cMと短いこと、またLG18 (図2) の

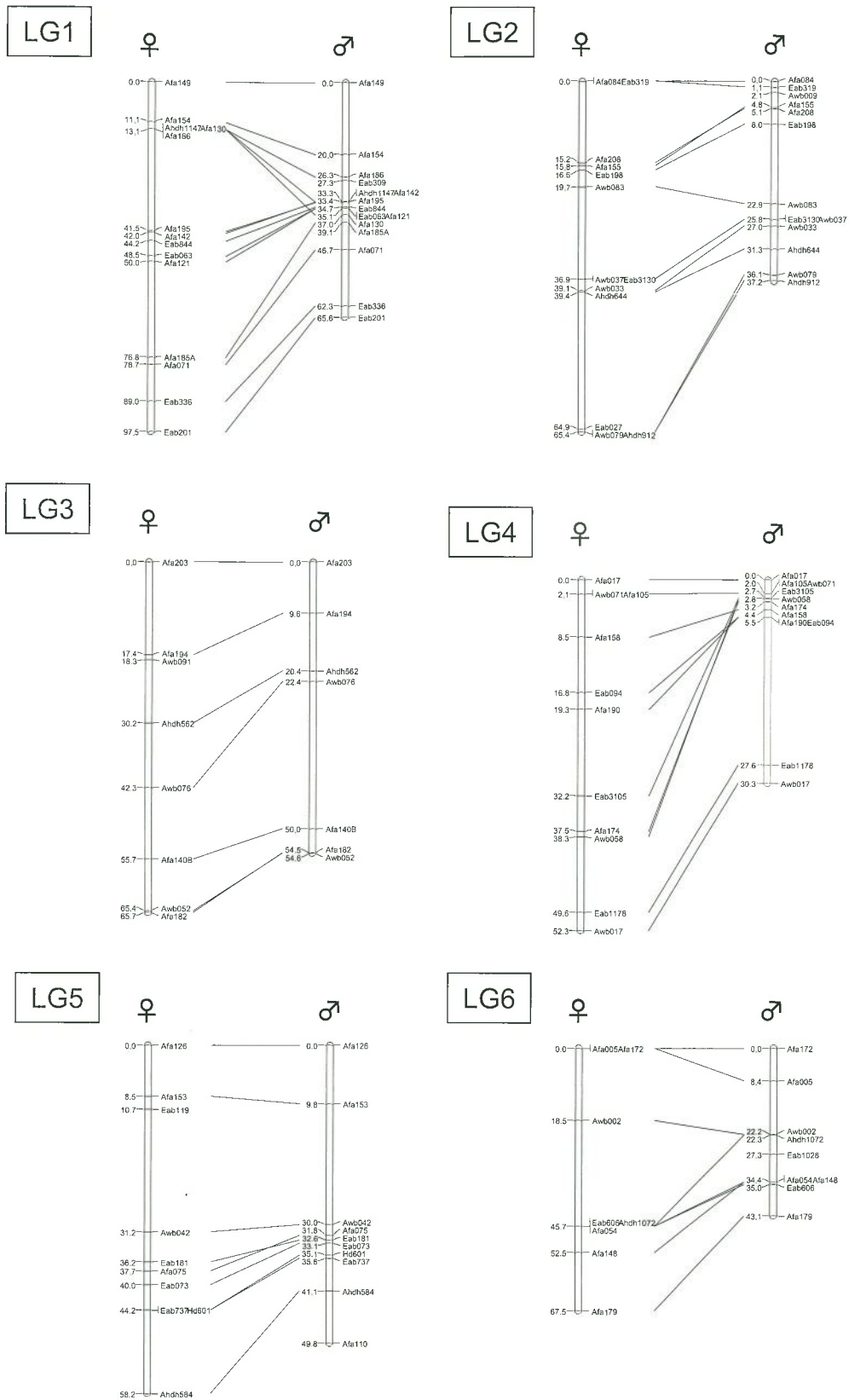
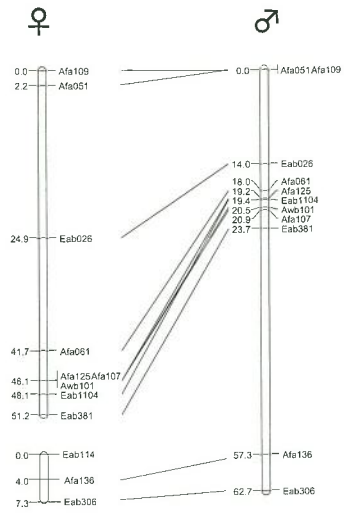
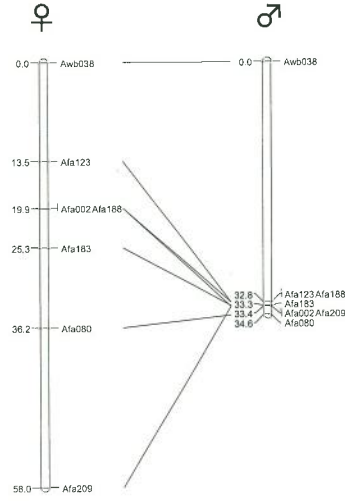


図2 マイクロサテライトマーカーに基づくエゾアワビのゲノム連鎖地図
各バーの右側にマーカー名、左側に各マーカーの原点（バーの一番上）からの相対的距離（単位はセンチモルガン：cM）が示してある。文献12より引用。

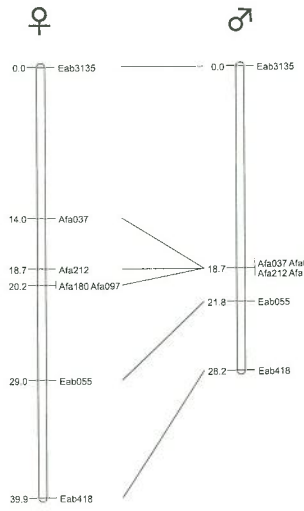
LG7



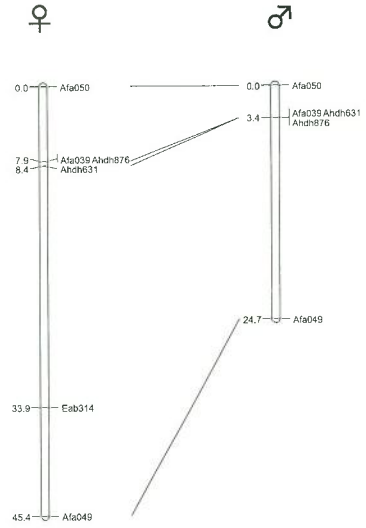
LG8



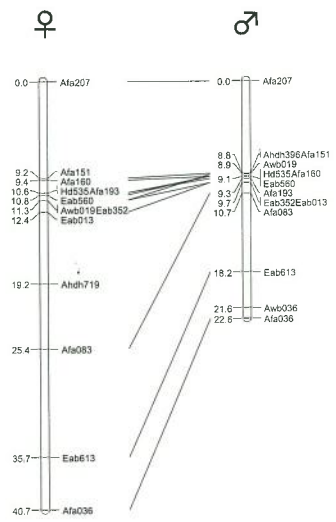
LG9



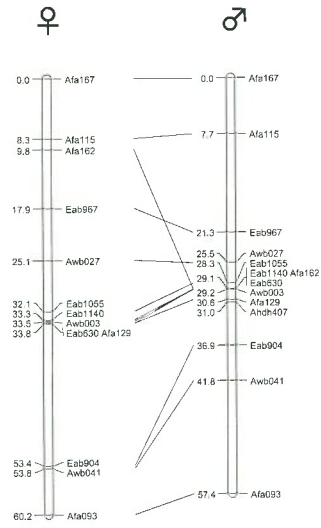
LG10



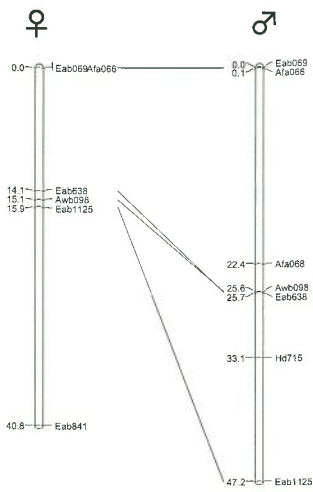
LG11



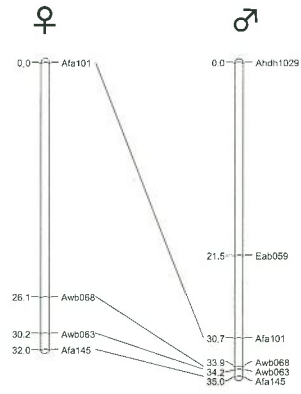
LG12



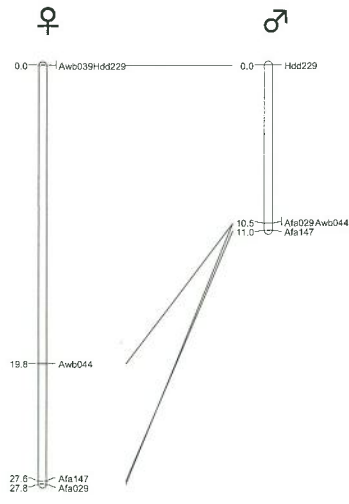
LG13



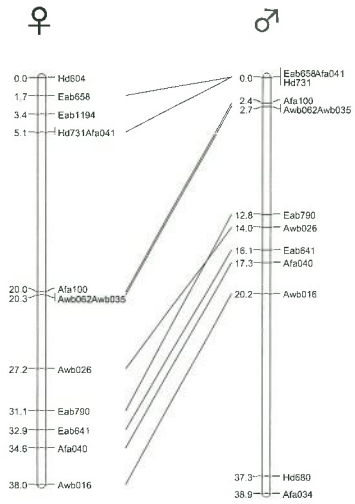
LG14



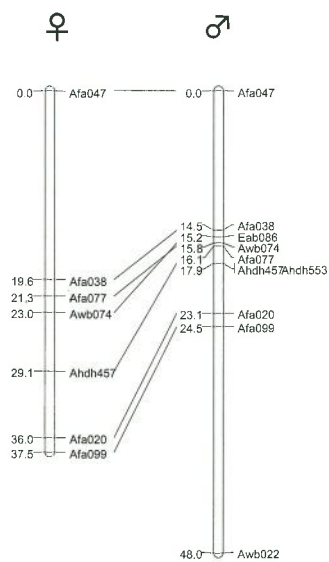
LG15



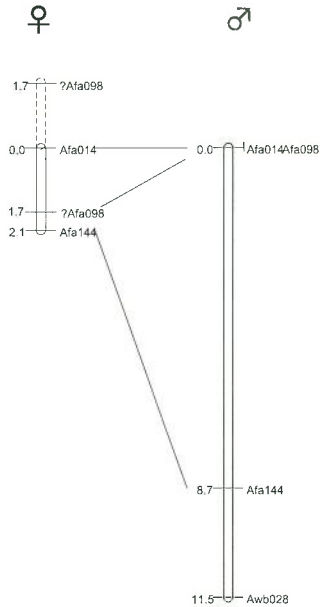
LG16



LG17



LG18



ように、わずかのマーカーしか乗っていない連鎖群もあることから、まだ相当のギャップが残されていることは明らかであり、さらにマーカー密度を上げていく必要がある。またこの連鎖地図では動原体の位置が不明である。エゾアワビの場合、人為3倍体^{13, 14)}や雌性発生2倍体¹⁵⁾を使ったGC (gene-centromere) マッピングにより、動原体位置を決定することができるだろう。

5. おわりに

本研究で得られた連鎖地図は、ほとんど明らかにされていない未知のアワビゲノム構造を解明する上で、大きな足がかりとなる。そして、今後マーカー数を増やすとともに、アワビの成長だけでなく、殻色^{16, 17)}、耐病性¹⁸⁾などの有用養殖形質に関与する遺伝子座の位置を決めていくことにより、ゲノム情報を利用したアワビ育種を進めて行きたいと考えている。また日本産アワビのうち、エゾアワビ、クロアワビ (*H. discus discus*)、マダカアワビ (*H. madaka*)、およびメガイアワビ (*H. gigantea*) は、分類学上不明瞭な点が残されている。メガイアワビは、形態的・遺伝的に他のアワビ類とは相違点が多いが、他のアワビの分類体系や進化過程に関しては良く分かっていない。エゾアワビで開発したマイクロサテライトマーカーは、クロアワビおよびマダカアワビにも利用可能であり¹⁰⁾、それぞれの種(便宜上の種)において連鎖地図を作成し、そのシンテニーを見ることにより、これらのアワビ類の種間関係について、新たな知見が得られるのではないかと期待している。

謝 辞

本研究成果は、主に、平成15～17年度水産庁運営費交付金プロジェクト研究「養殖用水産生物におけるゲノム情報を用いた育種基盤技術の

開発」の研究費により得られた。関係者の方々に感謝の意を表す。またエゾアワビ実験家系作出にあたり、岩手県水産技術開発センター小林俊将氏のご協力を頂いた。ここにお礼申し上げる。

文 献

- 1) 原 素之 (1992), 水産育種, 18, 1～12
- 2) Hara, M. and Kikuchi, S. (1992), *NOAA Tech. Rep. NMFS*, 106, 21～26
- 3) 河原ら (1997), 水産育種, 25, 81～90
- 4) 河原ら (1999), 水産育種, 28, 95～103
- 5) 小林ら (2006), 水産増殖, 54, 209～215
- 6) Sekino, M. and Hara, M. (2001), *Mol. Ecol. Notes*, 1, 8～10
- 7) Sekino, M. et al. (2005), *Aquaculture*, 243, 33～47
- 8) Hara, M. and Sekino, M. (2005), *Fish. Sci.*, 71, 754～766
- 9) Sekino, M. et al. (2006), *Mar. Biotechnol.*, 8, 453～466
- 10) Sekino, M. and Hara, M. (2007), *Conserv. Genet.*, (in press)
- 11) Arai, K. et al. (1982), *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 48, 1689～1691
- 12) Sekino, M. and Hara, M. (2007), *Genetics*, 175, 945～958
- 13) Fujino, K. et al. (1997), *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 53, 15～22
- 14) Zhang, G. et al. (1998), *J. Shellfish Res.*, 17, 783～788
- 15) Li, Q. and Kijima, A. (2005), *Mar. Biotechnol.*, 7, 669～676
- 16) Kobayashi, T. et al. (2004), *J. Shellfish Res.*, 23, 1153～1156
- 17) 小林ら (2005), 水産育種, 34, 143～147
- 18) Hara, M. et al. (2004), *J. Shellfish Res.*, 23, 1157～1161

◀国内情報▶

農業機械のユニバーサルデザイン

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
生物系特定産業技術研究支援センター
菊池 豊

ユニバーサルデザイン概念を取り入れた農業機械の改良のために、女性、高齢者等によるモニター調査で改良要望を収集した。使用者の体格差に配慮した設計を支援するためにコンピュータマネキンによるシミュレーションや運転席モデルによる基礎実験の成果をまとめ、身長別体格モデルならびに乗用型トラクタのレバー、ペダル等の配置範囲の寸法データからなる設計指針を発行した。研究と併行して農業機械メーカーと研究会を開催し、議論を進め改良された機械が徐々に販売されてきている。

1. ユニバーサルデザインとは

ユニバーサルデザインの定義は、「あらゆる年齢、背格好、能力の人が利用可能なように、製品、建物、空間やその構成要素の対応可能な範囲をできる限り拡張するデザイン」と言われ、1980年代後半にアメリカ合衆国ノースカロライナ州立大学のロナルド・メイスによって提唱された²⁾。これらの考え方を基にモノづくりが行われている。具体的な例として、「駅や病院の入り口へスロープや手すりを設置し、脚腰が衰えた人でも通行しやすくする。」「シャンプー容器側面や電話機の数字キー“5”へ突起を設置し、物が見えにくい状態でも触っただけで対象物が判別できるようにする。」等々数多く取り組まれている。

2. ユニバーサルデザインの背景

日常生活用品におけるユニバーサルデザインの普及は、①日本国民の年齢構成が急速に高齢化し、シニア向け商品市場が拡大していること、②商品が多機能化、高度化する中、性能第一から安全、快適、環境重視など消費者の要求が多様化してきていること、③核家族化によって高

KIKUCHI Yutaka

〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

齢者の生活自立が社会的に必要になってきたこと、④男女共同参画社会の推進により、これまで男社会であった分野にも女性が進出するようになったこと、⑤体格寸法の基礎データや規格、法令が整備され、設計者が利用しやすくなってきたことなどが背景と言われている¹⁾。ここで、一般的に産業機械は、運転免許または技能講習資格等を取得した知識や技能を持った者のみで使用し、機械も定期点検の義務がある。しかし、農業機械は、①使用者の性別、年齢層が幅広いこと、②公道走行以外は運転免許または技能講習資格等が不要であること、③長年使用すること、④使用する期間が作業シーズンに偏ることから、高齢者、女性を含む幅広い使用者層が農業機械を使用する可能性がある。どの程度の知識や技能、身体能力を持った者まで使用対象にするか判断が難しいところであるが、ユニバーサルデザインの原則に配慮してさらに使いやすい機械を開発することが必要である²⁾。

3. 農業機械の使用者

女性、高齢者等のモニター調査では、乗降時にステップ幅が狭い、手掛かりが不十分、エンジン始動時に鍵穴に鍵を入れにくい、キーOFF状態でホーンが鳴るものと鳴らないものがある、手順通りに操作したつもりでもエンジンが始動しない、操作具に手足が届きにくい等

の意見が寄せられた。さらに、使用者の視覚、聴覚、認知判断機能、体格、筋力の違いや配慮すべき使用環境等を明らかにした^{1), 2)} (表1)。

数多くある改良点の内、生研センターでは、使用者の体格差に配慮した設計を支援するためにコンピュータマネキンによるシミュレーションや運転席モデルによる基礎実験を行った (図1)。これらの成果をまとめ、身長別体格モデルならびに乗用型トラクタのレバー、ペダル等の配置範囲の寸法データを設計指針として2007年発行した²⁾。この指針では、設計指針は、日本人運転者 (16歳以上) の起立時、着座時の体格寸法、主要な関節間の距離、関節可動範囲並びに、16歳以上60歳未満の男女、60歳以上男女に対応した手・足の操作具配置範囲の3次元座標や活用方法、簡易評価ツール等を掲載してい

る (図2)。身長別体格モデルを用いると、設計者にとっては、想定する使用者層の身長範囲を参考にモデルを選択し設計ができ、使用者にとっては購入前にカタログ等で適応する身長を確認できるといったメリットがある。また、「女性向け」、「二世世代向け」といった新しいラインナップの製品開発も可能になる (図3)。

4. 農業機械のユニバーサルデザイン例

生研センターでの研究と併行して農業機械メーカーと研究会を開催し、改良点や研究手法について情報交換や議論を進めてきた。当初、平均的な男性を中心に設計しておりコスト面から基準を変更できないとか、ユニバーサルデザインそのものの必要性を疑う者もいたが、高齢者体

表1 想定される使用者グループ

使用者	使用者の特徴, 使用環境
特別配慮不要	想定される平均的な使用者
視覚に配慮	視力が低下した者, 暗所にいる者, 色識別が困難な者, 雨天作業中の者, サングラスを掛けている者
聴覚に配慮	聴力が低下した者, 騒音下にいる者, 耳栓, イヤマフ着用者
動作に配慮	動作制限のある者, 細かい操作が困難な者, 手袋着用者, 靴底が滑りやすくなっている者
筋力の弱い	高齢者, 女性
体格, 体重に配慮	体格の大きい者, 体格の小さい者, 肥満の者, 軽い者, ヘルメット着用者, 厚い防寒着着用者
認知判断機能に配慮	初心者, 熟練者, たまにしか使用しない者, 外来語が分からない者, 外国人, 他メーカー使用者, オートマ限定免許保有者
左利き	左手利き, 左足利き, 左目利き
共同作業等	補助作業等, 共同利用する者, 保守管理者
使用禁止者	第三者, 子供

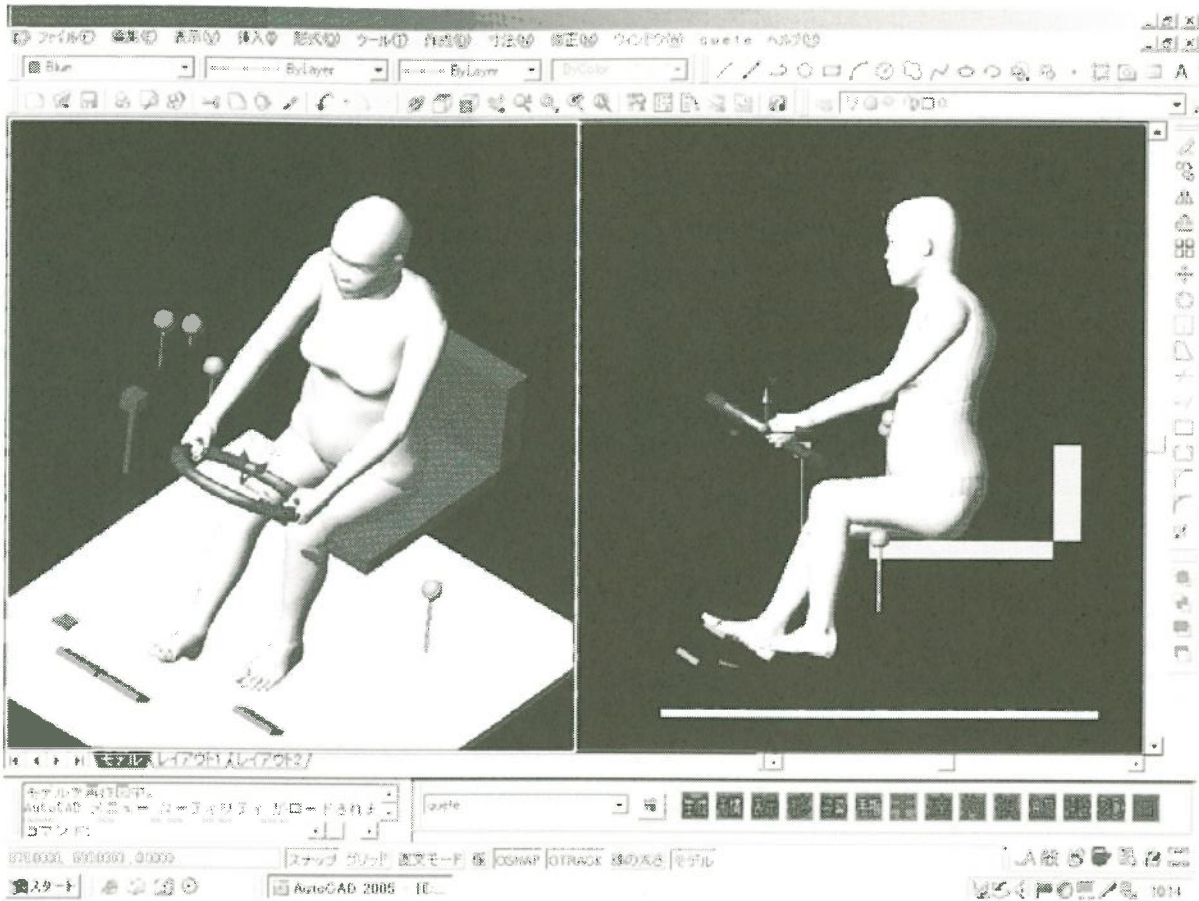


図1 コンピュータマネキンによるシミュレーション

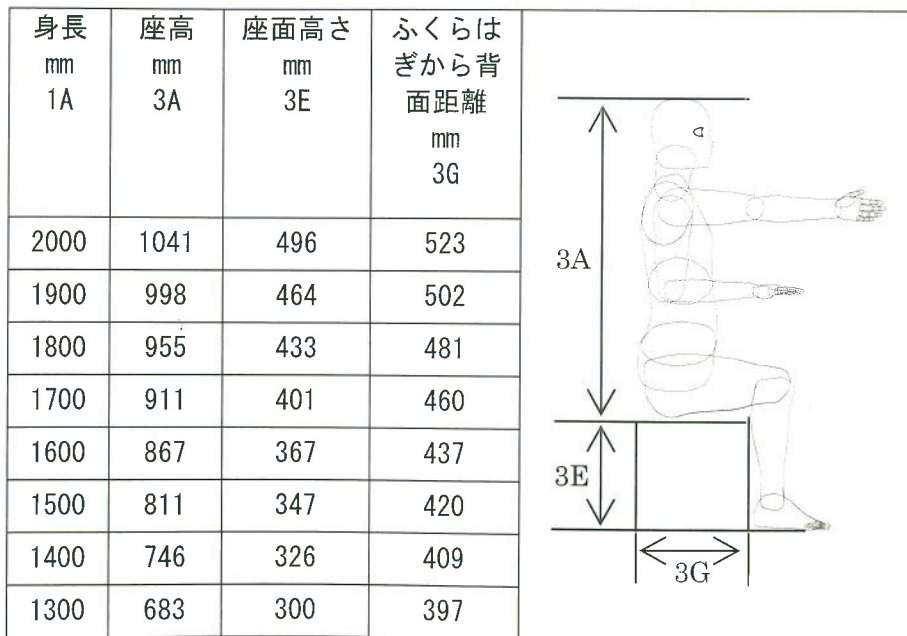


図2 身長別体格モデルと主要寸法

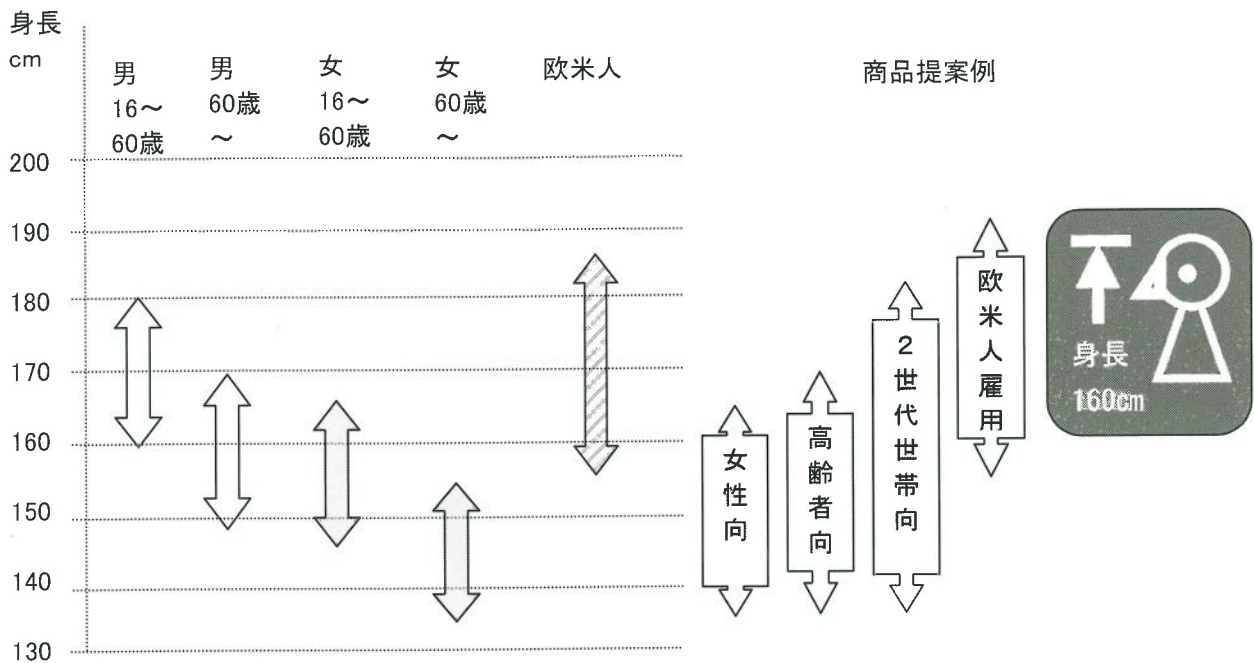


図3 使用者層毎の身長範囲と商品提案例

験を勧めたところ問題点を認識し、改良された機械が徐々に販売されるようになってきている(図4, 5)。

5. 今後の取り組み

農業機械業界でもユニバーサルデザインと表示された商品が販売され始めているものの、メーカー毎の対応がバラバラで取扱性が不十分なものが散見される。今後、高齢者等の視覚、聴覚等の心身諸機能に関する基礎研究とともに、業界での規格作りも必要である。情報機器業界では、対策例がJIS化され、これらを取り入れた商品が国内公共団体等の購入基準になっている。さらに国際規格にも提案し海外進出の戦略の一つにもなっている³⁾。農業機械業界でもこのような取り組みの推進が望まれる。

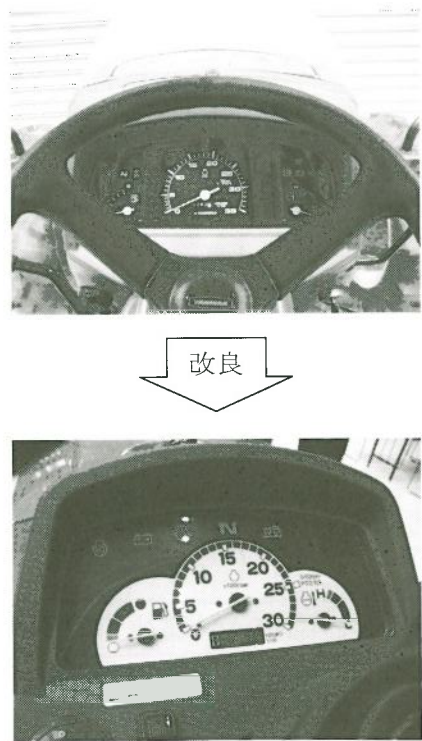


図4 改良例(その1)
(回転計の文字を大きくして見やすくした。)



図5 改良例（その2）
（キャビンドアノブを押しボタン方式から
ノブを引く方式に変更した。）

文 献

- 1) 日本人間工学会 (2003), ユニバーサルデザイン実践ガイドライン, 共立出版, 東京
- 2) 菊池 豊, 中野 丹, 岡田俊輔, 石川文武, 瀬尾明彦 (2007), 農業機械のユニバーサルデザイン指針-1, 生研センター, 埼玉
- 3) 日本規格協会 (2003), JIS Z 8071 (高齢者及び障害のある人々のニーズに対応した規格作成配慮指針), 東京

◀文献情報▶

有糸分裂中のマウス受精卵への染色体移植後の発生のリプログラミング

Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes.

Dieter Egli, Jacqueline Rosains, Garrett Birkhoff, and Kevin Eggan

The Stowers Medical Institute, Harvard Stem Cell Institute and Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138, USA.

Nature, 447, 679-685 (2007)

2つの1細胞期受精卵どうしの前核置換により産子は得られるが、より発生した胚の核を受精卵に核移植した時には胚発生は認められず、分裂間期の受精卵への体細胞核移植の試みは成功していなかった。一方、受精卵ではなく未受精卵の細胞質が核移植後のリプログラミングを支援することが明らかとなり、ヒツジ、ウサギ、ブタ、マウス胚の割球由来産子、ヒツジ胎子線維芽細胞由来産子、究極的にはDollyの誕生へとつながった。最近、マウスとウシ受精卵における核のリプログラミング能力について再検討が行われ、卵子と受精卵を用いた一連の実験から、核移植後の発生率やリプログラミング能力は、受精によって細胞質から急速に失われることが明らかとなってきた。そこで、著者らは、受精卵への核移植技術を再考し、未受精卵の細胞質には存在するが、前核期受精卵の細胞質では消失するリプログラミングや胚発生に関与する因子について再検討した。前核の除去はこれらの能力を枯渇させることから、分裂間期の受精卵からの除核は核移植後の胚発生能を失わせる。一方、減数分裂第2分裂中期や有糸分裂中の卵子からの凝集した染色体の除去はこのような能力を失わせない。これが正しいなら、リプログラミングに関与する因子を細胞質にとどめたまま染色体を除去することが可能となる。そこで、有糸分裂時の受精卵の細胞質が本当に核

のリプログラミングを支援することができるかどうか試すために、微小管重合阻害剤であるnocodazole及びプロテアソーム阻害剤であるMG-132を用いてマウス受精卵の有糸分裂を可逆的に途中でとめて染色体を取り除き、受精卵(胚)あるいは体細胞等の染色体に取り替える実験が行われた。その結果、有糸分裂中に一時停止したマウス受精卵では、分裂間期の受精卵とは異なり、体細胞核のリプログラミングや胚性幹細胞の作製、クローン産子を得ることが可能であることが明らかとなった。また、多精子受精や極体放出阻止による異数体マウス受精卵から染色体を除去して、胚性幹細胞の染色体を移植することにより、正常な染色体数を持つ胚盤胞の作出が可能となったことが明らかとなった。

今回、有糸分裂を可逆的にとめたマウス受精卵から染色体を取り除き、受精卵(胚)あるいは体細胞等の染色体に取り替えることによって、再構築卵からクローン産子と胚性幹細胞作出が可能であること、また、多精子受精などにより発生停止した異数体受精卵へ染色体を移植することにより胚盤胞の作出が可能であることが明らかとなった。未受精卵を用いる核移植とのさらなる比較検討は必要であるが、資源の効率的活用の観点からも、他の動物種においても同様にクローン動物を作出可能かどうか検討していく必要がある。また、論文にも記載されているが、本報告の結果がヒトに応用可能であれば、不妊治療の際に多精子受精などで廃棄されるヒト受精卵の利用が可能となり、患者由来の胚性幹細胞作製に用いるヒト卵子の不足を補うのに役立つ可能性も考えられる。ただし、再現性や安全性等、さらなる動物実験が不可欠である。

(抄訳：下司雅也, GESHI Masaya, 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所)

◀文献情報▶

葉から茎頂へ伝達され花を誘導するシグナルの正体はFTタンパク質である

FT Protein Movement Contributes to Long-Distance Signaling in Floral Induction of Arabidopsis

Laurent Corbesier, Coral Vincent, Seonghoe Jang, Fabio Fornara, Qingzhi Fan, Iain Searle, Antonis Giakountis, Sara Farrona, Lionel Gissot, Colin Turnbull & George Coupland,

Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Germany

Science, Vol. 316, Issue 5827, 1030-1033 (2007)

開花誘導について、日長の感知は葉で行われ、葉で感知された日長の情報が茎頂分裂組織に伝えられることが知られていた。そして、この花を誘導する情報は花成ホルモン（フロリゲン）という物質によって、葉から花へ伝達されると予想され、1930年代から候補となる物質の探索が行われてきたが、同定に成功した例はなかった。しかし、近年の発生遺伝学的な研究の進展により、花成の遺伝経路の概要が明らかになり、2005年には、*FLOWERING LOCUS T (FT)* のmRNAが葉から茎頂に移動して花成を誘導するという報告があった。しかし、この報告は根拠となるデータに誤りがあったことによって取り下げられた。今回、Max Planck 研究所のCoupland博士のグループと奈良先端科学技術大学院大学の島本教授のグループがそれぞれ、シロイヌナズナとイネにおいて、FT遺伝子から翻訳されたタンパク質（イネではHd3aタンパク質）が葉から茎頂に移動して花成を誘導するシグナルとして働いていることを報告した。これらの報告は、FTタンパク質がこれまで考えられていた花成ホルモンに、相当する物質であることを示すものである。ここでは、シロイヌナズナに関する報告を紹介する。

FTはRAFキナーゼ阻害タンパク質と相同性

がある小さなタンパク質をコードしており、長日条件で葉の維管束において発現し、開花を促進することが知られている。著者らは、FTと蛍光タンパク質GFPの融合タンパク質（FT：GFP）を師部伴細胞特異的な発現をする*SUC2* プロモーターを用いて発現し、FT：GFPがFTタンパク質と同様にFT突然変異体において開花を促進する働きを持つことを確認した。次に、このFT：GFPを発現した植物では、mRNAは師部でしか検出されないにもかかわらず、開花誘導が起きる時期になるとFT：GFPが茎頂基部で検出されるようになることを明らかにした。この結果は、FT：GFPが作られる部位から茎頂へと移動したことを示すものであった。この結果を確認するため、著者らは接ぎ木実験を行った。葉の光合成産物は師部を下って根に達し、そこから茎頂に送られることが知られている。そこで、まず、FT：GFPを生産する形質転換植物を穂木に用い、FTの突然変異体を台木に用いたところ、FT：GFPは接ぎ木の接合部を越えて台木の師部で検出された。次に、台木をFT：GFP生産植物に、接ぎ穂をFT突然変異体にしたところ、わずかではあるが、開花の促進効果が確認された。これらの接木実験によりFT：GFPが師部を長い距離移動することが裏付けられた。さらに、FT：GFPを細い葉脈の師部伴細胞で特異的に発現させたところ、FT：GFPは発現部位から移動することができず、開花の促進も生じなかった。そのため、FTが葉で発現するだけでは開花の促進が起きず、FTによって生じる二次メッセンジャーによって開花が誘導されるわけではないことが明らかになった。以上の実験により、著者らは、FTタンパク質が葉から茎頂に移動して開花を誘導するシグナル物質であることを提唱した。また、著者らは、師管液に多くのタンパク質が存在するという事は、他の情報伝達においても長距離を移動するタンパク質が関与しているのではないかと述べている。

（抄訳：久保山勉, KUBOYAMA Tsutomu, 茨城大学農学部）

◀文献情報▶

リーシュマニアの代謝と毒性におけるメチレンテトラヒドロ葉酸リダクターゼの解析

Biochemical and Genetic Analysis of Methylenetetrahydrofolate Reductase in *Leishmania* Metabolism and Virulence

Tim J. Vickers¹, Giuseppe Orsomando², Rocío Díaz de la Garza², David A. Scott¹, Song O. Kang¹, Andrew D. Hanson², and Stephen M. Beverley¹

¹ Department of Molecular Microbiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, USA

² Department of Horticultural Sciences, University of Florida, Gainesville, USA

The Journal of Biological Chemistry Vol. 281, No.50, 38150-38158 (2006)

リーシュマニア (*Leishmania major*) とは、トリパノソーマ科に属する細胞内寄生性の原生動物 (原虫) で、内臓損傷や皮膚粘膜の異常を引き起こす「リーシュマニア症」の病原因子である。この感染症はWHOの緊急に対策を要する感染症の1つとされているが、現在この病原菌に対して認可されている有効なワクチンがないため、新しい薬剤、もしくは薬剤の新規ターゲットの解析が急務である。

リーシュマニアは、メチオニン栄養要求性を示す。メチオニンは疎水性の必須アミノ酸で、タンパク質やS-adenosylmethionine (SAM) の合成に必要であるため、生体内の代謝反応において重要な役割を担っており、このメチオニン代謝経路には、SAMと同様、メチルテトラヒドロ葉酸がメチル基供与体として重要である。そこで本論文では、リーシュマニアのメチレンテトラヒドロ葉酸リダクターゼ (MTHFR) に着目し解析を行った。

真核生物と大部分の原核生物において、MTHFRは、NADHかNADPHどちらか一方の補酵素に依存した還元反応酵素である。哺乳類

や酵母のMTHFRは、N末に触媒ドメイン、Cに調節ドメインをもつが、C末のアロステリック領域にSAMが結合し、負のフィードバック阻害を受けるNADPH依存的酵素である。一方、植物や大腸菌のMTHFRは、C末領域にアロステリック領域を含まない、又はC末領域が完全に欠損しているためSAMによる阻害を受けないNADH依存的酵素である。ここで、リーシュマニアのMTHFR (*LmjMTHFR*) は、この酵素を不活性化させるC末領域 (SAM結合部位) が欠損しており、そして非常に興味深いことに、NADHのみならずNADPHの両方とも補酵素として利用することができ、SAMによる阻害を受けない酵素であることが分かった。さらに、リーシュマニアの野生株 (WT), *LmjMTHFR* のホモ接合性null変異体 (*mthfr*⁻), *LmjMTHFR* 高発現変異体 (*mthfr*⁻/+ *MTHFR*) を用い、メチオニンを除いた最少培地にホモシステインを添加し、それぞれの変異体における増殖の回復を調べた。WTでは、ホモシステイン添加により若干増殖を回復させることができるが、*mthfr*⁻では、ホモシステイン添加により増殖を回復させることができなかった。そして、*mthfr*⁻/+ *MTHFR*では、ホモシステイン添加により、メチオニン添加と同程度まで増殖が回復し、WT (ホモシステイン添加) よりも増殖を回復した。以上より、ある栄養条件下では、MTHFR活性が増殖を制御できることが示唆された。

しかし、リーシュマニアにおいてMTHFRは増殖に必須というわけではないため、目指す化学療法の有効なターゲットではないかもしれない。しかし、可能性として、メソトレキセート (葉酸代謝拮抗薬で、免疫抑制、リウマチ治療に使用) 耐性の研究分野におけるSAM代謝酵素等の働きと同様に、葉酸代謝拮抗薬との併用治療におけるターゲットとして利用することができるかも知れない。

(抄訳：金井宗良, KANAI Muneyoshi, 独立行政法人 酒類総合研究所)

◀文献情報▶

CD36は、口腔感覚系における食物油の検知と自然誘発的な脂肪の好みそして消化分泌に関与する

CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions

Fabienne Laugurette, Patricia Passilly-Degrace, Bruno Patris, Isabelle Niot, Maria Febbraio, Jean-Pierre Montmayeur, and Philippe Besnard

J. Clin. Invest. 2005 November 1; 115 (11): 3177-3184.

日常摂取カロリーの約40%は脂肪である。しかし、推奨レベルはそれよりも10%低い。高脂肪の摂取は、肥満やそれに関連する疾病（糖尿病、動脈硬化等）を誘発する。統計によると、肥満の人は痩せている人に比べて脂肪をよく好むとされる。脂肪摂取行動は、即効性の口腔感覚系の刺激（テクスチャーや匂い、味）によって複雑に制御されている。この脂肪摂取行動の現象に味覚の関与は無視できない。しかし、この味覚の関与を支持する研究結果が出始めたのは最近のことである。そこで、この脂肪摂取行動と味覚を結びつける分子として着目されたのが、脂肪酸輸送に関与する膜タンパク質であるCD36である。CD36は、長鎖脂肪酸に高親和性を持ち、ラットの舌における発現も認められている。本研究は、脂肪への嗜好が、CD36によってもたらされることを、CD36欠損マウスを用いて示した。

まず、脂肪嗜好性とCD36の関係を調べた。野生型マウスとCD36欠損マウスに、長鎖脂肪酸としてリノール酸を含む液体とこれを含まない対照液を与え、48時間の飲量を測定した。野生型マウスではリノール酸を含む液体を対照液の4倍以上摂取していたが、欠損マウスには、脂肪含有液に対する有意な嗜好性は見られなかった。ショ糖やキニーネを含む液体と含まない液体でも同様に飲量を調べたが、野生型と欠損

型マウスの間には差はなかった。摂取後に消化器系、神経系を経た刺激が脂肪に対する嗜好性に影響する可能性もあるため、0.5時間という短時間での飲量においても結果は同様であった。また固形飼料の1時間の摂取量も調べたが、野生型マウスはリノール酸を含む餌を好んで食べ、欠損マウスはそちらに対する嗜好を示さなかった。

さらに、食道を結紮したラットと野生型マウスの舌の上に、数種類の長鎖不飽和脂肪酸を滴下し、胆汁の流量と膵液中のタンパク質含有量の変化を調べた。迅速かつ持続的な上昇が見られたのは、オレイン酸（胆汁流量のみ有意）、リノール酸（いずれも有意に上昇）、リノレイン酸（いずれも有意に上昇）を用いた場合で、中鎖脂肪酸や長鎖飽和脂肪酸では、有意な上昇は起こらなかった。CD36欠損マウスの場合には、リノール酸を舌に滴下しても、胆汁の流量や膵液中のたんぱく質含有量に変化はなかった。さらに、野生型マウスの口腔内の、CD36が存在しない部分にリノール酸を滴下しても、変化は認められなかった。CD36による口腔検知は、膵液および胆汁の分泌を促し、小腸に長鎖脂肪酸が到達するのを予測させ、食物油の消化、吸収を最適化させるためなのかもしれない。最近の知見では、このCD36は、小腸においても発現しており、脂肪酸とコレステロールの取り込みに重要な役割を果たすことが示されている（*J. Biol. Chem.* 2007 May 15）。

以上の結果から、CD36が口腔内での長鎖脂肪酸の検知に関与することを示した。舌での脂肪検知システムが変化すれば、摂食行動が異常になる可能性もある。今後、長鎖脂肪酸がCD36に結合すると実際に信号伝達が行われるかどうか、さらに摂食行動に影響を与える神経経路および消化機能との関係を明らかにする必要がある。

（抄訳：下野将司，SHIMONO Masashi，日本水産株式会社 中央研究所）



ブレインテクノニュース
バックナンバーのご案内
第121号
2007年5月15日発行

総説

植物の誘導抵抗性—広範な病原体に有効な植物独自の自己
防御システム—……………高橋 英樹

総説関連情報

植物の全身獲得抵抗性……………瀬尾 茂美・光原 一朗
植物の誘導全身抵抗性……………有江 力
ジーンサイレンシングによる植物のウイルス抵抗性…増田 税

国内情報

アカネズミが有するタンニン無害化メカニズムを解明
……………島田 卓哉・齊藤 隆・大澤 朗
ブタにおいて椎骨数を増大させ体を長くした遺伝子の解明
……………美川 智

繋ぎ飼い飼養における新酪農システム実証試験

……………道宗 直昭・志藤 博克・高橋 仁康・平田 晃・
後藤 裕・川出 哲生・原田 泰弘・皆川 啓子・
山名 伸樹

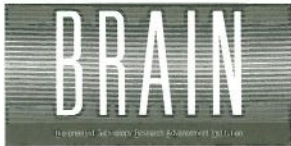
地域の先端研究

LAMP法と黄化葉巻病常発地域を活用した抵抗性トマトの
選抜技術の確立

……………福田 至朗・加藤 政司・穴井 尚子・矢部 和則

文献情報

体細胞核移植後のトリコスタチンA処置によるクローズド
コロニーマウスのクローン作出……………(抄訳：下司 雅也)
Gタンパク質連結型ABA受容体の発見……………(抄訳：久保山 勉)
乳酸菌のS-layerタンパクを被覆したリボソームの特徴づけ
……………(抄訳：芦田 延久)
シロアリに共生している原生生物は、やはりセルラーゼ産生
に関与している……………(抄訳：鈴木 賢一)



ブレインテクノニュース
バックナンバーのご案内
第120号
2007年3月15日発行

特集「DNAマーカー選抜による効率的育種」

- 1 DNAマーカー選抜による高度病害虫抵抗性ダイズの育成
……………石本 政男
- 2 ハクサイ根こぶ病高度抵抗性系統の効率的選抜技術の開発
……………松元 哲
- 3 おいしく、食べやすく、病気に強い果樹の品種開発の効率
化……………山本 俊哉

国内情報

イネキチンエリシター受容体の発見と同定
……………賀来 華江・渋谷 直人
植物の新規ペプチドホルモンの発見とその利用の可能性

……………福田 裕穂
スズメバチの繭から創る新シルク素材の開発—ホーネット
シルク研究の最前線—……………亀田 恒徳・玉田 靖
いも類の収穫前茎葉処理機の開発
……………貝沼 秀夫・青木 循・久保田 興太郎・安食 恵治

地域の先端研究

静電気を利用して農薬の付着性向上に役立つ散布機を開発
……………山根 俊

文献情報

ブタ卵子からのデモコルシン処理を併用したハンドメイド除核
……………(抄訳：下司 雅也)
葉緑体は一酸化窒素の給源……………(抄訳：岩井 純夫)
老化研究モデルとしての長寿命酵母……………(抄訳：家藤 治幸)
飼料中の脂質量及び共役リノール酸がアトランティックサー
モンでの脂質代謝酵素活性及び遺伝子発現に及ぼす影響
……………(抄訳：竹村 秀平)

生研センターからのご案内

編集後記

122号をお届けします。本号の総説では、源宣之氏（岐阜大学）に致死性人獣共通感染症、狂犬病の研究について、歴史、現状及び今後の展開にわたり、通常の国内情報の約3本分に相当する大作をご寄稿戴きました。海外では多くの国で未だに脅威となっている狂犬病について、その研究の現状等ご理解を深める一助となれば幸いです。

その他の研究情報としては、中村俊樹氏（東北農業研究センター）らにデンプン合成酵素の変異を利用して開発された甘味種コムギ、山口信次郎氏（理化学研究所）にジベレリンを不活性化し植物の大きさを制御する新しい酵素、渡辺裕文氏（農業生物資源研究所）にシロアリセルラーゼの微生物生産-バイオマス変換への応用、関野正志氏（東北区水産研究所）らにエゾアワビのゲノム連鎖地図、菊池豊氏（生研センター）に農業機械のユニバーサルデザインについて、それぞれご紹介戴きました。

また、本号の文献情報は、下司雅也氏（畜産草地研究所）、久保山勉氏（茨城大学）、金井宗良氏（酒類総合研究所）、下野将司氏（日本水産）にご執筆戴きました。

ご多忙な中玉稿をお寄せ戴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122号

平成19年7月15日発行

発行人 朝比奈 清

編集人 加藤 俊典

発行所 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

©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