

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成20年1月15日（隔月1回15日発行）
ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.125

15 JANUARY, 2008

ブレインテクノニュース

温室

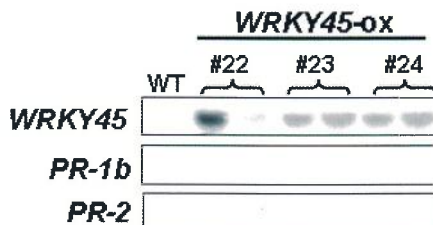


日本晴

#21

#24

WRKY45-ox



人工気象室

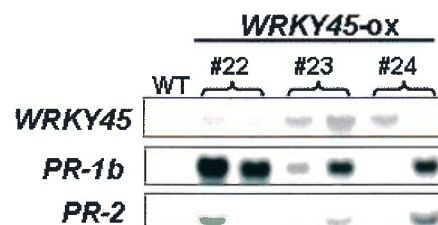


日本晴

#21

#24

WRKY45-ox



誘導抵抗性に関わる転写因子WRKY45の発見とその利用

独立行政法人 農業生物資源研究所
耐病性研究ユニット長
高 辻 博 志



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

- 誘導抵抗性に関わる転写因子WRKY45の発見とその利用…………… 1
高辻 博志 ((独)農業生物資源研究所 耐病性研究ユニット長)

国内情報

- ウイルスの増殖を防ぐ人工タンパク質を組み込んだ、ウイルス耐性植物の創出…………… 8
世良 貴史 (京都大学 工学研究科 合成・生物化学専攻)
- microRNAによるタンパク質合成の制御機構…………… 12
脇山 素明¹・横山 茂之^{1, 2} (¹(独)理化学研究所 横浜研究所 ゲノム科学総合研究センター, ²東京大学 大学院理学系研究科)
- シロアリの卵保護行動と卵認識フェロモン-擬似卵運搬で効果的な駆除技術も…………… 17
松浦 健二 (岡山大学 大学院環境学研究科 昆虫生態学研究室)
- 超低温保存の体外受精卵を借り腹の雌豚に移植し、子豚誕生に成功…………… 23
菊地 和弘¹・Tamás Somfai¹・柏崎 直巳²・永井 卓³ (¹(独)農業生物資源研究所, ²麻布大学 獣医学部, ³(独)農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所)
- 海産魚のウイルス性疾病を予防するための組換え酵母を用いた経口ワクチンの開発…………… 28
家戸 敬太郎¹・石丸 克也¹・田丸 浩²・吉水 守³・真鍋 貞夫⁴・植田 充美⁵・村田 修¹・熊井 英水¹ (¹近畿大学, ²三重大学, ³北海道大学, ⁴(財)阪大微生物病研究会, ⁵京都大学)

地域の先端研究

- ブドウ接ぎ木苗の簡易生産技術の開発-活着率向上や植え傷みの防止にも有効…………… 33
山本 孝司・中尾 知樹 (島根県農業技術センター)

文献情報

- 体細胞核の初期化能力を持つウシ卵子には23kDaのPhosphorylated Transcriptionally Controlled Tumor Protein (リン酸化TCTP) が存在する…………… 38
T. Tani et al. (*Cloning And Stem Cells*, 9(2), 267-280, 2007) 抄訳: 下司 雅也
- ブドウのゲノム塩基配列から見えてきた被子植物門で過去に生じた6倍体化…………… 39
The French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization
(*Nature* Vol.449: 463-468, 27 September, 2007) 抄訳: 久保山 勉
- 共生細菌はROS産生を介してcullin依存性のシグナル伝達を調節する…………… 40
Kumar A. et al. (*EMBO Journal*, 26, 4457-4466, 2007) 抄訳: 安田 源太郎
- スズメバチの作る絹糸タンパク質の特徴的な一次構造…………… 41
H. Sezutsu et al. (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol.71, 2725-2734, 2007) 抄訳: 漆田 洋平
- 生研センターからのご案内 (平成19年度 研究成果発表会の開催について)…………… 42

表紙の説明

筆者らは、植物活性化剤-BTHによる病害抵抗性誘導に、イネにおいては転写因子WRKY45が必須の役割を果たしていることを明らかにし、これを構成的に発現させたイネはもち病および白葉枯病に極めて強い抵抗性を示すことを見出した。生育環境の違いによるWRKY45過剰発現イネ(WRKY45-oxイネ)の初期生育を調べると、温室で育成した場合、野生型イネ(日本晴)と大差ない生育を示したが、別の環境(人工気象室)で育成した場合は明らかな遅延が見られた。また、生育遅延は抵抗性関連遺伝子(PR1b, PR2)の発現と関連していた。詳細については、1頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

誘導抵抗性に関わる転写因子WRKY45の発見とその利用

独立行政法人 農業生物資源研究所
耐病性研究ユニット長
高 辻 博 志

BTHなどの植物活性化剤は、サリチル酸を介するシグナル伝達経路に作用して植物の病害抵抗性を高める（プライミング）。イネにおいてBTHにより発現誘導される転写因子WRKY45は、BTHによる病害抵抗性誘導に必須であり、これをイネで構成的に発現させたイネはいもち病および白葉枯病に極めて強い抵抗性を示すことがわかった。WRKY45の機能発現制御の解析を通じてプライミングの分子機構を解明すると同時に、WRKY45の機能を遺伝子組換えにより実用利用するための研究を進めている。

1. plant activatorによる誘導抵抗性

病原体の局部感染を受けた植物では、幅広い種類の病原体に対する抵抗性が全身に誘導される現象が知られている。誘導抵抗性と総称されているが、病原体と宿主の組み合わせなどにより、異なるシグナル伝達経路が関与する複数のメカニズムが存在している。植物活性化剤（plant activator）は、植物生来の病害防御機構に作用して病害防除効果を示す薬剤の総称である。個々の植物活性化剤の作用機構はまだ十分解明されていないが、上記の病原菌感染によって誘導される誘導抵抗性と深く関係していると考えられる。植物活性化剤のうち、ベンゾチアジアゾール（Benzothiadiazole, BTH）¹⁾、プロベナゾール（Probenazole, PBZ）²⁾、チアジニル（Tiadinil）³⁾などは、植物の病害応答シグナル伝達のうち、サリチル酸が関与する経路（SA経路）に作用して抵抗性を誘導する。SA経路は、全身獲得性抵抗性（systemic acquired resistance, SAR）に関わるシグナル伝達経路として、主に双子葉植物で解析されてきた。SA経路に対し、BTHおよびチアジニルはSAより下流に、PBZはSAより上流に、それぞれ作用すると考えられている。これらの植物活性化剤は、適正な用量で処理された場合、抵

TAKATSUJI Hiroshi

〒305-8602 つくば市観音台2-1-2

抗性反応を恒常的に活性化するのではなく、抵抗性反応をプライミング（priming）する。プライミング状態の植物は、病原体の攻撃に対して準備した態勢（alert状態）であり、そのことにより実際の病原体感染に際して迅速に抵抗性反応を発動できる。病害抵抗性反応は通常植物に大きな負荷をかけるので、多くの突然変異体や形質転換体などに見られるように、抵抗性反応が恒常的に活性化した植物では生育や稔性への悪影響が見られることが多い。一方、プライミングされた植物では、病原体が感染するまでは抵抗性反応が活性化せず、そのため（理想的な状態では）生育等への悪影響がないと考えられる。

遺伝子組換えにより作物の病害抵抗性を改良する試みはこれまでも行われてきたが、抵抗性反応の実行に関わる遺伝子を単独で発現させても大きな効果は得られないことが多い。一方、病害応答シグナル伝達に主要な役割を果たすシグナル因子や転写因子を導入・発現させると、多数の抵抗性反応実行遺伝子を一斉に活性化するため、強い病害抵抗性が得られる一方で、抵抗性反応のために致死になったり生育や稔性が悪くなったりする人が多い。筆者らは、植物活性化剤によるプライミングにはチェックポイントとしての働きをする転写因子またはシグナル伝達因子が存在し、それを特定することができれば植物活性化剤によるプライミング状態を

再現した理想的な遺伝子組換え作物の作出が可能になるだろうと考えた（図1）。そしてイネから、その条件を満たすと考えられる転写因子WRKY45（ワーキー45と読む）を見出した⁴⁾。

2. WRKY45の発見

イネにおいて、BTHによるプライミングのキーとなる転写因子またはシグナル伝達因子を探索するため、4葉期のイネにBTH (0.5mM) を噴霧処理し、遺伝子発現の変化をマイクロアレイ (Agilent, 44K) で解析した。その結果、約1,000種の遺伝子がBTH処理後発現変化を示すことがわかった。その中には転写因子やシグナル伝達因子のアノテーションが付けられた遺伝子が多数含まれていたが、そのうちシロイヌナズナなどで病害応答への関与が多数報告されているWRKY型転写因子に特に着目した。イネには100種前後のWRKY型転写因子が存在する。その中で4種のWRKY遺伝子が顕著なBTH誘導性を示したので、それぞれのcDNAを強い構成的プロモーター活性を有するトウモ

ロコシ由来のユビキチン・プロモーターの制御下にイネにおいて発現させた。得られた形質転換体に親和性系統のいもち病菌を接種したところ、WRKY45を過剰発現するイネ (WRKY45-ox) のみが顕著な抵抗性を示した (図2 A)。次に、RNAiによってWRKY45の発現を抑制したイネ (WRKY45-kdイネ) を作製し、BTH処理によるいもち病抵抗性誘導への影響を調べた結果、WRKY45-kdイネではBTHによる抵抗性誘導が失われていた (図2 B)。これらのことから、WRKY45はBTHによるいもち病抵抗性誘導に必須の役割を果たしていることがわかった⁴⁾。

3. イネではWRKY45とOsNPR1は独立のシグナル伝達経路を構成している

BTHはサリチル酸の機能的アナログであり、両者の作用点はほぼ共通していると考えられる。筆者らのイネにおける実験でも、BTHおよびSAに発現応答する遺伝子の多くは共通していた。そこでBTHが作用するシグナル伝達

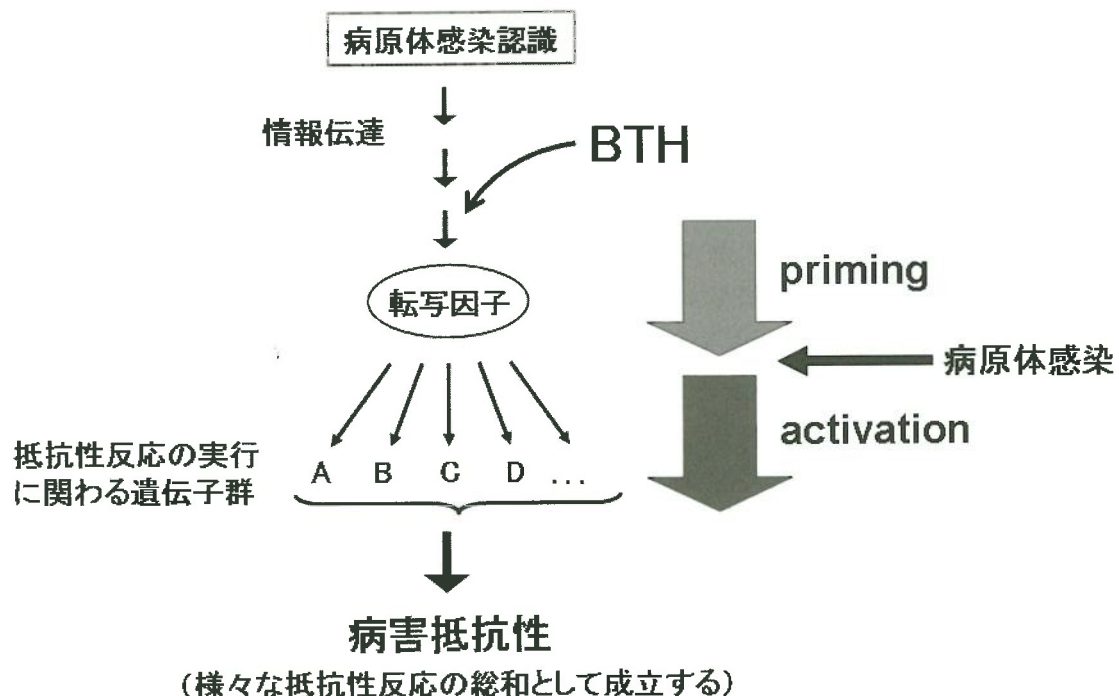


図1 BTHによるプライミングにおける転写因子の役割

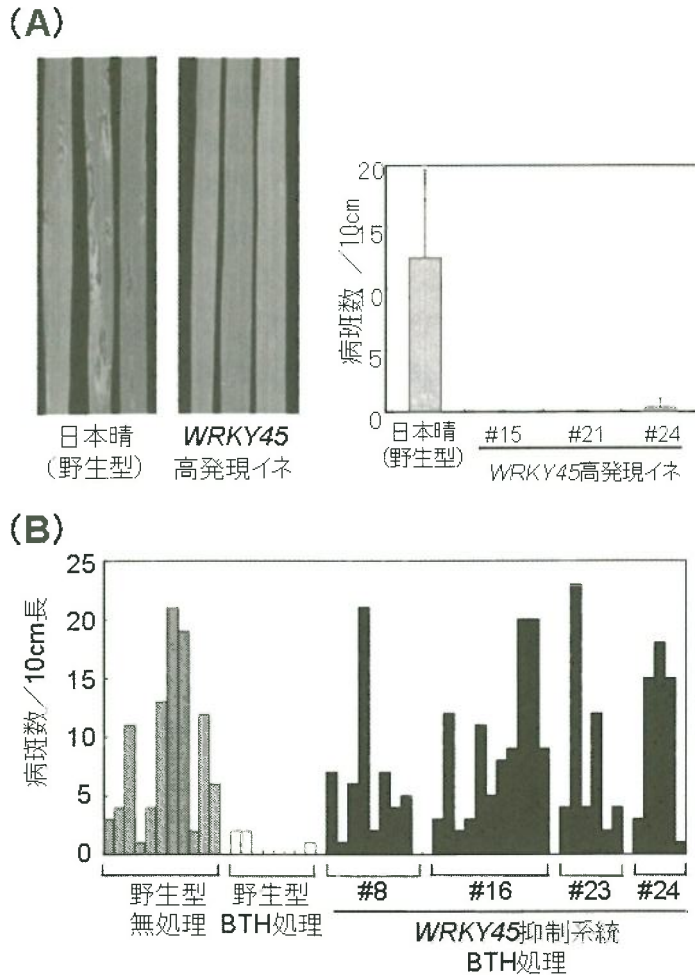


図2 WRKY45の過剰発現およびRNAi抑制の効果

- (A) WRKY45過剰発現イネは非常に強いいもち病抵抗性を示す。
 (B) WRKY45抑制イネでは、BTHによるいもち病抵抗性誘導が失われている。

経路をこれ以降SA (BTH) 経路と表記する。SA (BTH) 経路の研究が先行しているシロイヌナズナにおいては、シグナル伝達因子NPR1がこの経路において中心的な役割を果たしていることがわかっている。最近の研究によると、BTHに発現応答する遺伝子の99%以上がNPR1によって制御されている (図3)⁵⁾。NPR1の下流では数種のWRKY型転写因子が転写レベルの制御を受けている。またNPR1遺伝子の発現もWRKY型転写因子によって制御されているらしい。筆者らはNPR1に対応するイネの因子OsNPR1 (またはNH1) もBTHによるいもち病抵抗性誘導に必須であることを見出した。そこで、イネのSA (BTH) 経路においてWRKY45とOsNPR1がどのような関係にあるのか調べるため、以下のような上位性解析を行った。まず、OsNPR1-kdイネにおけるWRKY45遺伝子の

BTH誘導性を調べた結果、野生型イネと同様であった。一方、WRKY45-kdイネにおけるOsNPR1遺伝子のBTH誘導性も野生型イネと同様であった。これらの結果は、WRKY45とOsNPR1とは上流下流の関係ではなく、両者はSA (BTH) の下流で互いに独立したシグナル伝達経路を構成していることを示している (図3)。したがって、イネのSA (BTH) 経路はシロイヌナズナのそれとは大きく異なることがわかった⁴⁾。

次に、WRKY45の下流で制御されている遺伝子を特定するため、野生型およびWRKY45-kdイネをBTH処理した時の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより比較した。WRKY45に制御されている遺伝子は、野生型イネではBTHに発現応答するがWRKY45-kdイネではしないはずである。同様の実験を

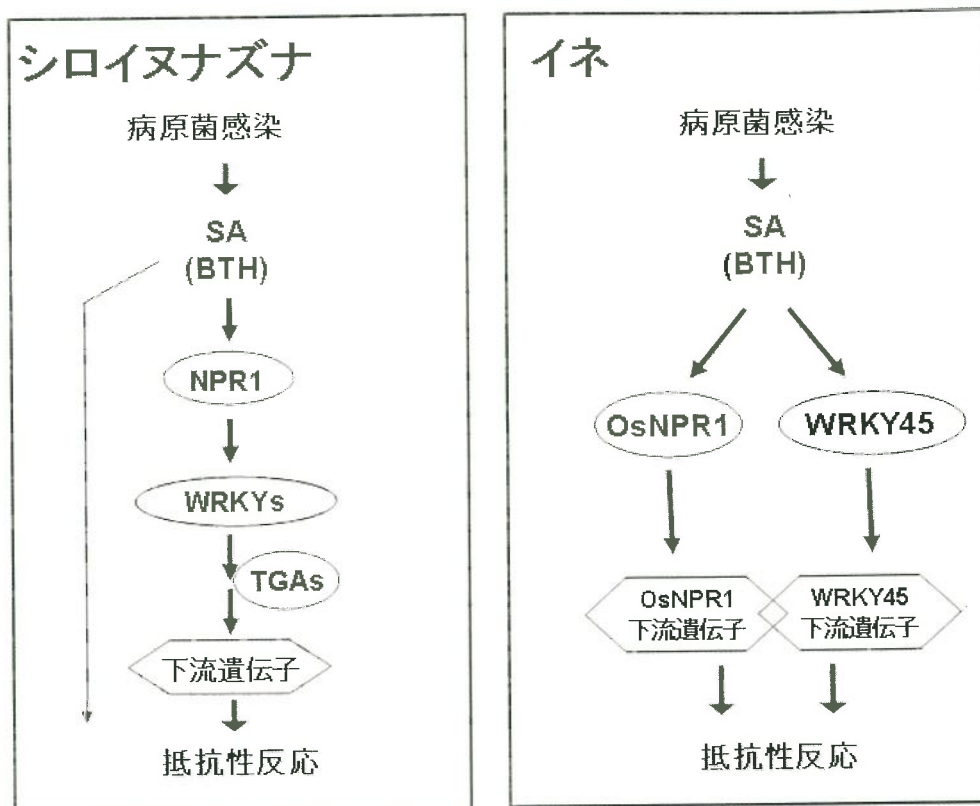


図3 シロイヌナズナとイネのサリチル酸伝達経路

シロイヌナズナでは、サリチル酸下流の遺伝子の99%以上がNPR1に依存して制御されているのに対し（左）、イネではWRKY45とOsNPR1の経路に大きく分かれ、それぞれに制御されている遺伝子の重複は少ない（右）。

OsNPR1-kdイネについても行い、OsNPR1に制御されている遺伝子を特定した。これらの実験の結果、WRKY45とOsNPR1それぞれの下流に数百個ずつの遺伝子を制御されていることがわかった（未発表）。また、WRKY45に制御されている遺伝子のわずか約5%のみがOsNPR1にも制御されているという結果になり、それぞれに制御されている遺伝子のオーバーラップは非常に少ないことが示された（図3）。これらの結果は、SA（BTH）の下流でWRKY45とOsNPR1とが独立したシグナル伝達経路を構成しているという上記の上位性解析の結果と一致している。なお、WRKY45に制御されている遺伝子としてはGSTおよびチトクロムP450、OsNPR1に制御されているものとしてはPR1aおよびPR1bが含まれていた⁴⁾。

WRKY45およびOsNPR1それぞれの下流で制

御されている遺伝子には多様なものが含まれており、それらを個別に見ていくと両制御因子に制御されている抵抗性反応について推測することができ、非常に興味深い。今後それらの遺伝子の詳細な解析により、具体的に明らかにしていきたい。

4. WRKY45過剰発現イネの生育と生育環境の影響

すでに述べたように、病害応答のシグナル伝達や転写制御に関わる因子を植物で過剰発現させた時、致死性や生育阻害、稔性の低下が見られることが多い。それに対し、ユビキチン・プロモーターを用いたWRKY45-oxイネは、温室で育成した場合、野生型イネ（日本晴）と大差ない初期生育を示し（図4）、稔実率もほぼ正

常であった。抵抗性反応発現の有無を調べるため、病害応答反応のマーカー遺伝子のPR1bおよびPR2の発現を調べたところ、両遺伝子の発現はまったく認められなかった（図4）。一方、同じWRKY45-oxイネを別の環境（人工気象室）で育成した場合、温室育成の場合より強い初期生育の遅延が見られた（図4）。この時の遺伝子発現を調べると、PR1bおよびPR2が強く発現しており、抵抗性反応が恒常的に活性化していることがわかった（図4）。両生育条件でWRKY45の発現レベルは同程度であった。抵抗性反応が活性化していないにも関わらず、温室育成したWRKY45-oxイネも人工気象室育成の場合と同様の強いいもち病抵抗性を示した。このことから、この生育条件（温室）ではWRKY45-oxイネはまさにプライミング状態にあり、病原体が感染してはじめて抵抗性反応が迅速に活性化されると推測される。また、生育

環境により、WRKY45転写の下流になんらかのシグナルが作用して抵抗性反応発現に至ると考えられる。生育環境のどの要因がWRKY45転写の下流に作用しているかについてはまだ特定できておらず、現在検討中である。ここで見られたWRKY45転写の下流でのシグナル伝達の合流は、プライミングの本質に関わる分子機構とも関係が深いことが筆者らの最近の結果から明らかになってきている。

5. WRKY45過剰発現イネのいもち病抵抗性の強さと白葉枯病抵抗性

WRKY45-oxイネのいもち病抵抗性の強度を評価するため、葉にいもち病菌胞子をスプレー接種する方法により、抵抗性強度を既存のいもち病抵抗性品種と比較した。その結果WRKY45-oxイネは、非常に強いいもち病抵抗性品種

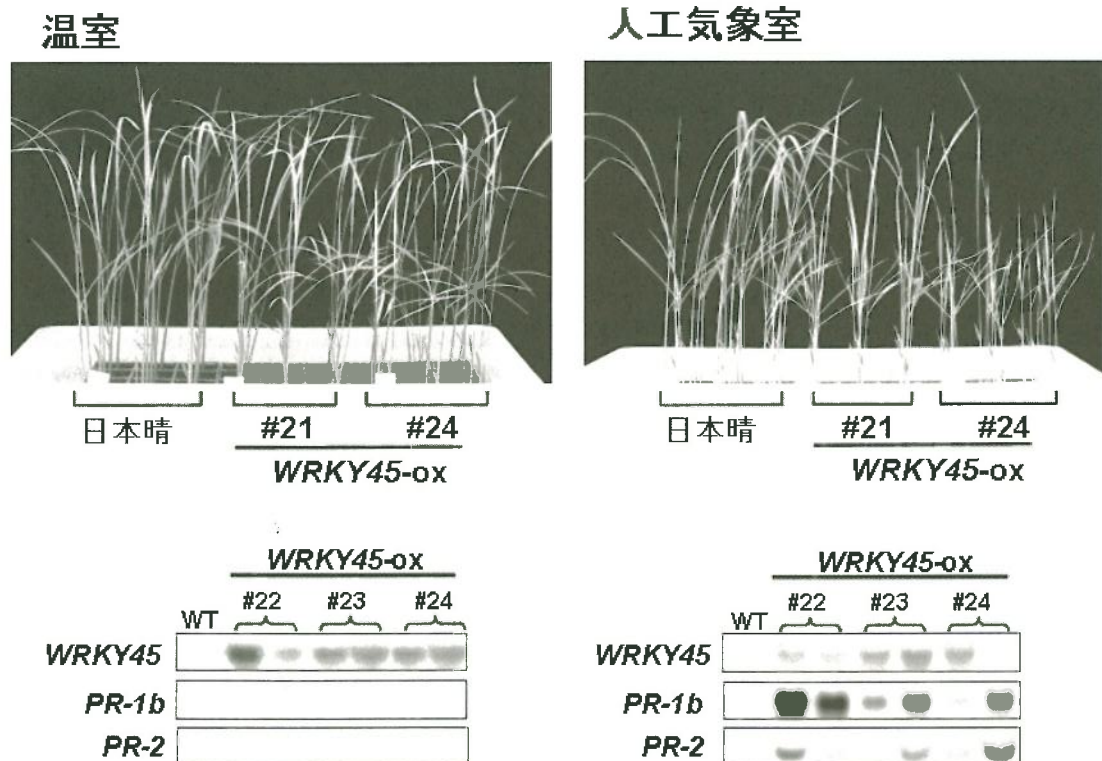


図4 WRKY45過剰発現イネの生育と遺伝子発現に及ぼす生育環境の影響
WRKY45過剰発現イネを温室で育成した時の初期生育は野生型イネ（日本晴）と大差なく、PR1bおよびPR2の発現が見られない。人工気象室で育成したWRKY45過剰発現イネは顕著な生育遅延を示し、PR1bおよびPR2が発現している。

「戦捷 (せんしょう)」よりもさらに高度ないもち病抵抗性を有することがわかった。圃場では、米の収量に直接影響する穂への感染(穂いもち)が重要である。そこで、穂首からいもち病菌胞子を接種することにより穂いもちへの効果を調べた結果、WRKY45-oxイネはこの場合にも強い抵抗性を示した。

SAシグナル伝達経路に作用するBTHなどの植物活性化剤は、糸状菌病から細菌病、ウイルス病に至る広い防除スペクトラムを示すことで知られている。WRKY45がBTH作用の中核を担うならば、WRKY45-oxイネも同様の広い耐病性スペクトラムを示すことを予想される。そこで、手始めとして細菌の*Xanthomonas oryzae*が原因で起こる白葉枯病に対する抵抗性を検定した。その結果、WRKY45-oxイネは白葉枯病に対しても非常に強い抵抗性を示すことがわかった。一般に、SAシグナル伝達経路を介する防御反応は、生体栄養性 (biotrophic) の病原体やいもち病菌のように感染過程に一時的にbiotrophicなフェーズを含む (heterotrophic) 病原体に対して有効と考えられている。このことから、SAシグナル伝達経路に作用するWRKY45は、biotrophicなフェーズを感染過程に含む多様な病害に効果を示す可能性が高いと考えられる。いもち病および白葉枯病とならんでわが国のイネの3大病害の一つで担子菌 (*Rhizoctonia solani*) が原因の紋枯病に対しては、今のところWRKY45-oxの効果を確認されない。紋枯病菌は死細胞を栄養源とするnecrotrophicな病原菌なので、SAシグナル伝達系が関与する防御機構は効果が薄いのもかもしれない。しかしながらBTHが紋枯病に有効であるという報告もあるので⁶⁾、さらに検討を要する。

6. WRKY45の実用利用について

複数の病害に対するWRKY45による抵抗性の強さは前例をみないものである。また、病原体の認識に強く依存している真性抵抗性と異なる

り、耐性菌の出現によって抵抗性が崩壊する可能性は低い。プロベナゾールやBTHなどに対する耐性菌が、長年の使用にもかかわらず出現していないという事実はこの推測を裏付けている。また、その作用機作 (プライミング) により生育に対する影響が比較的少ないことも重要なポイントのひとつである。しかしながら、この点に関しては、生育条件によって生育遅延が大きくなることから、これを回避できるように導入遺伝子を改良する必要がある (後述)。WRKY45がイネ以外の植物でも効果を示すかどうかについては、今のところデータがない。しかしながら、WRKY45遺伝子は調べたかぎり他のイネ科作物にも保存されており、広くイネ科作物に応用できる可能性が高いと考えている。

7. 今後の展望

WRKY45の機能を利用した病害抵抗性付与の技術を実用レベルまで高めるには、生育遅延の問題を解決することが必要である。その際、WRKY45の作用機構の本質と考えられる 'プライミング' を生かした利用法が望ましいと考えている。BTHなどの植物活性化剤を植物に処理する場合、過剰な用量では様々な薬害が生じるが、これはプライミングを通り越し、抵抗性反応が恒常的に活性化されるためと考えられる。つまり適度な用量がプライミング状態の確立には必要である。WRKY45の恒常的発現による抵抗性誘導の場合でも同様と考えられるので、現在用いているトウモロコシのユビキチン・プロモーターの代わりに、より低度の適切な活性を有するプロモーターでWRKY45を発現させる試みを今行っている。感染誘導性プロモーターを用いる手段も考えられるが、現在のところ適当なプロモーターがないので新規な感染誘導性プロモーターの単離を検討している。

WRKY45の実用利用の最初のターゲットとしては、飼料用イネを検討している。米国などでのバイオエタノールのブームが飼料作物の価

格高騰にもつながり社会問題化しているが、WRKY45の導入によりイネの無農薬粗放栽培が可能になれば、飼料作物生産の低コスト化に貢献し、国内生産への道が開けるかもしれない。またこれと平行して、他のイネ科作物への応用の試みとして、コムギへの導入を検討し始めた。コムギには、有効な抵抗性系統がなく残留農薬が問題となっている赤カビ病などの難病があるが、WRKY45がこれに決定的な効果を示せばその意義は大きい。さらには、バイオエタノールの資源作物と目されるトウモロコシなどのイネ科作物への応用も視野に入れている。

最近の研究により、病原菌は宿主植物に感染するために様々な戦略を進化させ、その一方で植物はそれに打ち勝つための戦略を進化させているらしいことがわかってきている。WRKY45の機能発現の制御機構を中心に見たいもち病菌-イネの相互作用においても、イネの複数のシグナル伝達経路の相互作用を舞台にした両者のせめぎ合いの構図が、筆者らの最近

の研究で見え始めており、大変興味深い。この構図を分子レベルでさらに解明することは、サイエンスとして重要であるだけでなく、さらに有効なWRKY45の利用法にもつながることが期待される。

文 献

- 1) Friedrich et al. (1996) *Plant J.* 10, 61-70.
- 2) 岩田道顕 (2001) 植物感染生理談話会論文集 (第37号) 1-13.
- 3) Yasuda et al. (2006) *J. Pesticide Sci.* 31, 329-334.
- 4) Shimono M et al. (2007) *Plant Cell* 19, 2064-2076.
- 5) Dong W et al. (2006) *PLoS Pathogens* 2, e123.
- 6) Rohilla R et al. (2002) *Pest Manag. Sci.* 58, 63-69.

◀国内情報▶

ウイルスの増殖を防ぐ人工タンパク質を 組み込んだ、ウイルス耐性植物の創出

京都大学 工学研究科 合成・生物化学専攻

世良 貴史

ウイルスは農作物の収穫に甚大な損害を与えてきたが、我々はいまだ感染を防ぐ有効な手段を持ち得ず、感染予防の手法の新たな開発が望まれている。筆者は植物自体にウイルス感染耐性を付与する新手法を開発した。すなわち、ウイルスゲノムの複製の開始に必要な、ウイルス複製タンパク質のウイルスゲノム上の複製起点への結合を阻害できる人工DNA結合タンパク質を開発し、その遺伝子を組み込んだ植物でウイルス感染耐性を示すことに成功した。

1. はじめに

植物に感染するウイルスは多くの種類が報告され、さらに新種のウイルスが見つけれ続けている。植物ウイルスは、様々な種類の農作物に感染し、その収穫量を大幅に減らし、その感染の予防および拡大を防ぐことは食糧問題の上でも非常に重要な問題である。例えば、DNAウイルスの中で大きなファミリーを形成するジェミニ・ウイルスは、アフリカではタピオカの原料となるキャッサバに対して2000億円以上の損害を与えている。アメリカ合衆国のフロリダ州のみでもウイルス感染によるトマトの被害だけで年間140億円の損失が報告されている（その他の農作物の被害例も文献1を参照）。そのため、感染の被害を食い止める多種多様な試みがなされてきたが、いまだ効果的な手法は開発されていない。たとえばブリーディングにより、ウイルス感染にある程度の抵抗性を有する農作物が作製され、市販されてはいるが、その性能はまだ満足なレベルに到達していない。ウイルスの媒体である昆虫の駆除は農業で可能であるが環境汚染の問題もあり、現在のもっとも現実的な対応は感染した植物を発見次第除去すること

SERA Takashi

〒615-8510 京都市西京区京都大学桂

とであるが、抜本的な解決策が望まれている。

2. DNAウイルスの複製メカニズム

DNAウイルスは、ゲノムとしてDNAを保持し、その中でもっとも大きなファミリーをジェミニ・ウイルスが占めている。ジェミニ・ウイルス粒子は直径約20nmの正二十面体構造が二つつながった構造から成り、2.5~3 kbpの1本鎖DNAゲノムを内包している。このウイルスは植物に侵入後、脱殻し、最終的に核に到達した後、1本鎖ゲノムDNAは宿主植物の内在性の酵素群により2本鎖DNAに変換される。この2本鎖DNAからウイルス複製タンパク質が転写・翻訳される（図1）。このウイルス複製タンパク質はDNA結合能と酵素活性を有しており、ウイルスゲノム上の複製起点に結合することにより、ウイルスゲノムDNAの複製を開始させる。最終的にウイルスが増殖することにより、ウイルスが感染した植物は発病してしまう。このことは、もし何らかの方法でこのウイルス複製タンパク質のウイルスゲノム上の複製起点への結合を阻害することができれば、たとえウイルスが植物内に侵入しても、ウイルスは複製できず増殖できないため、植物のウイルス感染を防ぐことが可能になると考えられる。

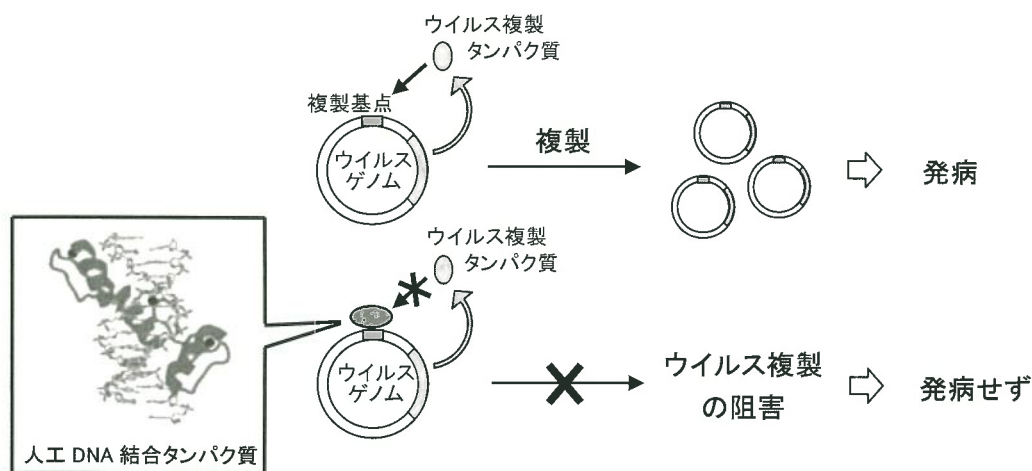


図1 DNAウイルスの複製メカニズムおよび人工DNA結合タンパク質によるDNAウイルス複製阻害

3. 人工DNA結合タンパク質

筆者の研究グループでは、ヒトを始めあらゆる真核生物の転写因子のDNA結合部位に見出される亜鉛フィンガーというDNA結合タンパク質を基にして、生体内でゲノム上の望みのDNA配列を認識できる、人工DNA結合タンパク質（図2）のデザインおよび創出法を開発した²⁾。植物を含めた様々な生物内で、ゲノム

DNA上のある特定の配列を認識できる人工のタンパク質を自由にデザインできれば、遺伝子発現をはじめ、染色体DNAが関与する多種多様な生命現象を人為的に、しかも生体とは独立にコントロールできるようになるからである。事実、筆者の研究グループでは、この人工DNA結合タンパク質に転写調節ドメインを連結させた「人工転写因子」を作製し、この人工転写遺伝子の遺伝子導入により、植物体内およびヒト培養細胞内で内在性の標的遺伝子の発現を人為的にコントロールすることに成功している（たとえば、文献3を参照）。

この人工DNA結合タンパク質は、4塩基対を認識する亜鉛フィンガー・ドメインを複数個連結したものである（図2では、例として3個の亜鉛フィンガー・ドメインを連結させた人工タンパク質を示している）。各4塩基対の認識に必要な亜鉛フィンガー・ドメインは、筆者が開発した「認識コード表」を用いてデザインする。すなわち、認識コード表からある特定の4塩基対の認識に必要な4個のアミノ酸を選ぶだけで、その認識に必要な亜鉛フィンガー・ドメインを設計できるようにした。ある特定のDNA配列を認識する人工DNA結合タンパク質をデザインする場合、まず標的のDNA配列を

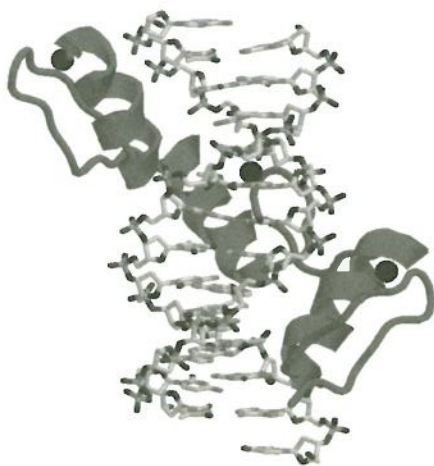


図2 人工DNA結合タンパク質

この図では、3個の亜鉛フィンガーを有する人工タンパク質を紐とリボンで示している。黒色の丸は、亜鉛を示す。

複数個の4塩基対に分割し、認識コード表を用いてデザインした、各4塩基対の認識に必要な亜鉛フィンガー・ドメインを連結するだけでよい。この手法により高い親和性および選択性を有する人工DNA結合タンパク質を創出することが可能である。

4. ウイルス耐性植物の創出

そこで、この人工DNA結合タンパク質を用いて、ウイルス複製タンパク質の、ウイルスゲノム上の複製起点への結合を阻害することによりウイルスの増殖を防ぎ、ウイルスが侵入してきても感染しない植物の創出を試みた⁴⁾。この場合、植物として、実験室でよく用いられているシロイヌナズナを選び、ジェミニ・ウイルスとして、シロイヌナズナをはじめ様々な植物に強く感染し、枯死させることが知られている



図3 人工DNA結合タンパク質によるウイルス感染耐性

天然型植物に、BSCTVを感染させると枯死した(植物2)。これに対し、人工DNA結合タンパク質を発現する植物はBSCTV感染に対して完全な耐性を示した(植物3および4)(文献2より)。植物1は、ウイルスを感染させていない、健康な天然型の植物を示す。

beet severe curly top virus (BSCTV) を用いた。このプロジェクトでは、BSCTVのウイルス複製タンパク質よりも千倍以上強い結合能を有する人工DNA結合タンパク質を開発した。この人工DNA結合タンパク質は、ウイルス複製タンパク質のBSCTV複製起点への結合をたった千分の1の量で効果的に阻害することを試験管内で確認した。

つぎに、この人工DNA結合タンパク質遺伝子を、植物に侵入できる菌であるアグロバクテリアを用いてシロイヌナズナの生殖細胞に組み込み、最終的に人工DNA結合タンパク質を発現する組み換え植物を作製した。この組み換え植物および天然型植物に、アグロバクテリアの助けを借りてBSCTVを感染させた(図3の植物2、植物3および植物4)。図3の植物2で示されているように、天然型のシロイヌナズナでは、報告どおり茎の成長が感染後停止し、感染後4週間目では枯死していた。これに対し、ウイルス複製タンパク質の複製起点への結合を効果的に阻害する人工DNA結合タンパク質遺伝子を発現するシロイヌナズナ(図3の植物3および植物4)では、感染させていない健康な天然型植物(図3の植物1)と全く同じ外観で感染症状は全く見られなかった。

これら形質転換植物では、ウイルスは侵入しているにもかかわらず、すでに植物内で発現されていた人工DNA結合タンパク質により、脱殻後2本鎖になったBSCTVの複製起点が覆われ、ウイルス複製タンパク質が結合できなくなり、複製が阻害されている。そのため、感染症状が全く見られなかった。本プロジェクトで使用したアグロバクテリアによるウイルス感染は、自然界で起こる、昆虫を介したウイルス感染よりずっと強力であり、「ウイルスの増殖を防ぐ植物」が実際の農場で十分威力を発揮することが期待される。

5. おわりに

筆者の研究グループでは、現在このアプロー

チの有用性をさらに高めるため、たとえば、1種類の人工DNA結合タンパク質でより多種多様なウイルスの感染を防ぐことを試みている。これらの研究により最終的に、たったひとつの人工DNA結合タンパク質を組み込むことにより、すべての農作物において、全種類のDNAウイルスに対する耐性を付与することが可能になるかもしれない。これら新しく作り出された、「ウイルスに侵入されても感染しない農作物」が世界中の農場で栽培され、ウイルスに感染することなく、健康に育ち、食糧問題の解決に少しでも貢献できる日を夢見ながら、日々研究に

励んでいるところである。

文 献

- 1) Varma, A. et al. (2003), *Ann. Appl. Biol.*, 142, 145-164
- 2) Sera, T. (2005), *J. Virol.*, 79, 2614-2619
- 3) Tachikawa, K. et al. (2004) *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 15225-15230
- 4) Sera, T. et al. (2002), *Biochemistry*, 41, 7074-7081

◀国内情報▶

microRNAによるタンパク質合成の制御機構

¹独立行政法人 理化学研究所 横浜研究所 ゲノム科学総合研究センター
タンパク質基盤研究グループ、²東京大学 大学院理学系研究科 生物化学専攻

脇山 素明¹・横山 茂之^{1, 2}

タンパク質合成の制御は、mRNAの転写段階のみならず翻訳段階でも行われる。近年、microRNAと呼ばれる21~22塩基長のRNAが、mRNAの標的部位に作用して翻訳を抑制することがわかってきた。この機構では、mRNAの転写量は変化せずに、タンパク質の合成量が低下する。最近私たちは、哺乳類の無細胞系で翻訳抑制の過程を再現することに成功し、その仕組みの一端を解明した。

1. はじめに

ヒトでは、ゲノム上に推定で数万種類のタンパク質の情報がコードされている。この情報は核内でmRNAに転写され、mRNAは細胞質に輸送されてタンパク質合成装置であるリボソームと会合する。そして、リボソームは、mRNAの情報に従ってアミノ酸を連結してタンパク質を合成する。この過程は、塩基配列からアミノ酸配列への変換であることから、翻訳と呼ばれる。

タンパク質合成は、その時期、合成量等が厳密にコントロールされている。一般的に、遺伝子発現量はmRNAの転写量で測られることが多いが、転写後の制御を無視する訳にはいかない。近年、microRNAと呼ばれる21から22塩基長の低分子RNAが、転写後制御で重要な役割を果たすことがわかってきた。

microRNAは、これまでに数百種類以上見いだされている。遺伝子発現阻害法に広く応用されるようになったRNA干渉 (RNAi) でも、やはり21から22塩基のRNA (siRNA) が機能するが、microRNAの作用はsiRNAとは異なっている。siRNAは、自身の配列と完全に相補的な配列をもつmRNAに作用して、その標的mRNAの切断を引き起こす。一方、microRNA

WAKIYAMA Motoaki¹, YOKOYAMA Shigeyuki^{1, 2}
〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22

は、不完全に相補的な配列を含むmRNAの翻訳を抑制し、mRNAを切断しない。このmicroRNAの翻訳抑制の機構を巡って、様々なモデルが提出され、大きな議論を巻き起こしている。

2. microRNAの生成とmiRNP複合体の形成

動物細胞では、RNAポリメラーゼIIによって転写された一次転写物 (primary-microRNA) から~70塩基長のmicroRNA前駆体 (pre-microRNA) が切り出されて細胞質に輸送される (図1)。pre-microRNAは、Dicer (ダイサー) によってプロセシングされて、21から22塩基長のmicroRNAが生成する。成熟したmicroRNAはArgonaute (アルゴノート) と呼ばれる約100kDのタンパク質に取り込まれ、さらに複数のタンパク質と複合体miRNPを形成して機能する。miRNPは、mRNAの3'非翻訳領域 (後述) にある標的配列 (microRNAと部分的に相補的) に結合して翻訳を抑制すると考えられている。個々のmicroRNAとその標的については、バイオインフォマティクスを駆使した予測と共に、標的配列を含むと推定される3'非翻訳領域を連結したレポーター遺伝子を培養細胞にトランスフェクションする等の実験によって解析されている。初期に見いだされた

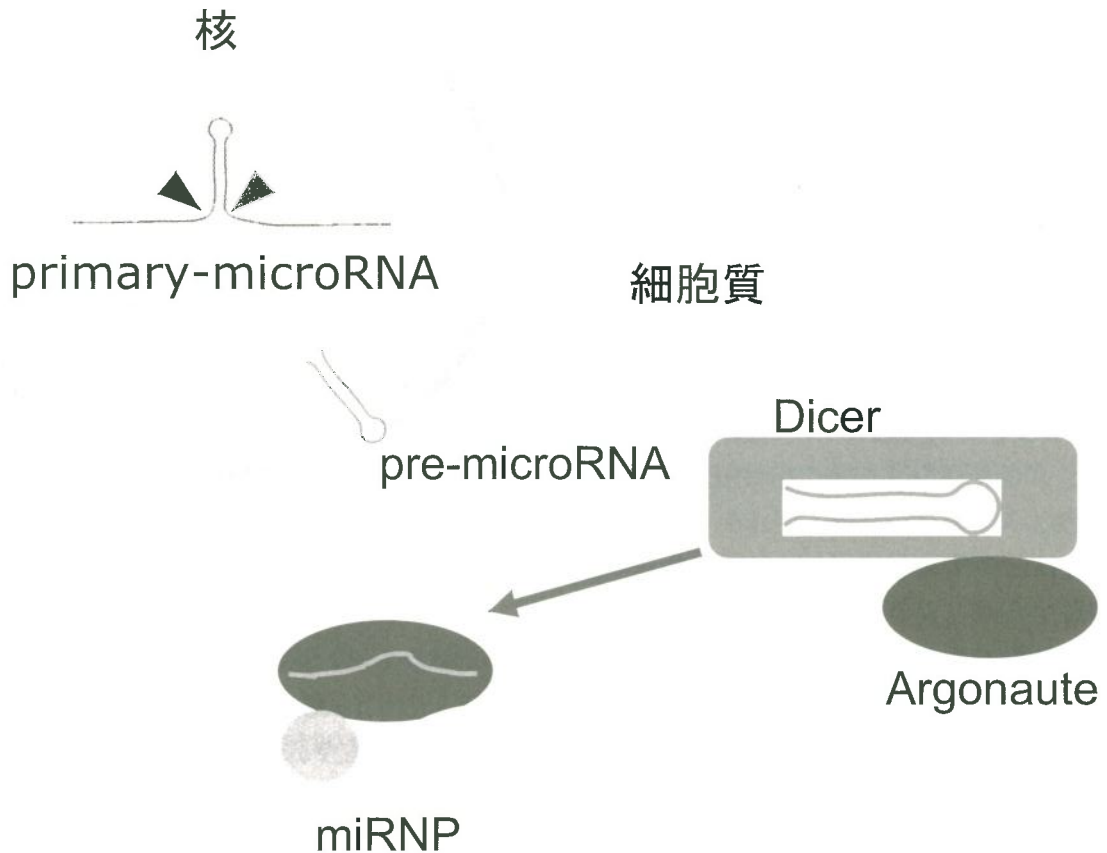


図1 microRNAのプロセッシングとmiRNPの形成

microRNAは、線虫の *lin-4* と *let-7* で、いずれも胚発生の調節をするタンパク質の発現の時期をコントロールする負の転写後調節因子であることが明らかにされた。その後、*let-7* はヒト、マウス、ニワトリ、ショウジョウバエなどでも保存されていることがわかった。*lin-4* あるいは *let-7* とその標的となる mRNA の配列の間には、中央部分にミスマッチがある (図 2 A)。microRNA の機構では、RNAi のように mRNA を切断せず、翻訳が抑制されると考えられるようになった¹⁾。

3. 翻訳抑制の機構を巡る混乱

では、翻訳抑制はどのようにして起こるのだろうか？ 線虫で、*lin-4* の標的となる mRNA が、複数のリボソームに結合してポリソームを形成しているというデータが示され、これが翻訳開

始後に何らかの機構で阻害が起こるというモデルにつながった。しかし、その後主に培養細胞を用いた実験では、翻訳の開始を阻害するという結果も報告された。

ヒトを始めとする真核生物の翻訳は、極めて多くの因子が関与する複雑な反応である。真核生物の mRNA には、通常 1 種類のタンパク質のみがコードされている。図 2 B に示すように、開始コドン AUG から終止コドンまでのコーディング領域の前後には、5' および 3' 非翻訳領域と呼ばれる、タンパク質の情報を持たない配列が存在する。この非翻訳領域には、翻訳の制御や mRNA の安定性に影響を与える配列が含まれている。microRNA の標的配列は、3' 非翻訳領域に見いだされる。真核生物の mRNA は、先頭にキャップ構造と呼ばれる修飾構造を持つ。これは、mRNA の目印であると同時に、mRNA の安定性にも寄与する。3' 非翻訳領域の

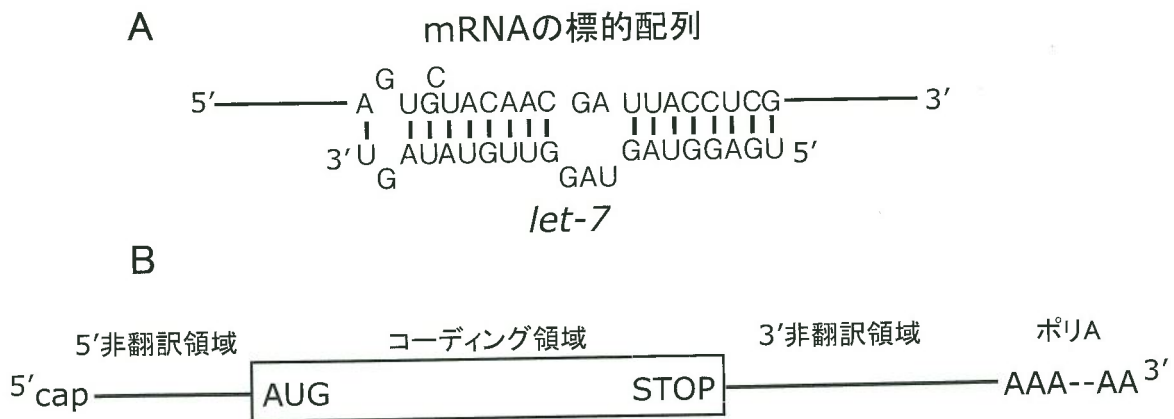


図2 A：*let-7*とその標的配列，B：mRNAの構造（模式図）

後ろには、アデノシン（A）が数十から数百程度連続するポリAテールが存在する。そして、5'末端のキャップ構造と、3'末端のポリAテールは、翻訳に重要な役割を果たすことがわかっている。

キャップ構造には、翻訳の開始因子であるeIF4Eタンパク質が結合することが知られている。キャップとeIF4Eの相互作用を介して、他の翻訳開始因子とリボソームがリクルートされて、翻訳が開始するのである²⁾。例外的に、ある種のウイルスのmRNAや一部の細胞mRNAでは、5'非翻訳領域にリボソームを含む翻訳開始複合体の結合する配列（IRES；internal ribosome entry site）が含まれている。複数の研究グループが、キャップに依存しないでIRESによって翻訳開始するmRNAは、microRNAにより翻訳抑制されないと報告した。これは、microRNAがキャップ依存の翻訳開始を阻害することを強く示唆する。しかし、別の研究グループは、哺乳類の培養細胞を用いて、microRNAの標的mRNAが多数のリボソームと結合していることを示し、翻訳開始以降の阻害や合成されたタンパク質の急速な分解といった仮説を提出している。また、ショウジョウバエの細胞を用いた実験から、microRNAの作用によるmRNAの分解の促進というモデルも提出された¹⁾。

4. 無細胞系で翻訳抑制の過程を再現する

筆者らは、翻訳抑制機構の解明には、これを*in vitro*（試験管内）で再現することが必要であると考えた。そして、ヒト由来のHEK293細胞を用いて、*let-7*による翻訳抑制を再現する無細胞系を開発した³⁾。

無細胞系とは、細胞を穏やかに破碎して調製した抽出液を用いて構築する系で、エネルギー源となるATPやアミノ酸などを加え、mRNAを導入して翻訳（タンパク質合成）させることができる系である。microRNA機構を再現する無細胞系を構築する上での戦略としては、材料となる細胞に内在するmicroRNAの効果を見るか、系の外から加えるmicroRNAによる翻訳阻害をみるという二通りが考えられる。筆者らは後者を選んだ。

筆者らは、まず、細胞抽出液内でpre-microRNAがプロセシングされるかどうかを調べることにした。このプロセシングとmiRNPの形成が共役しているという報告も出ているためである。ショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）の*let-7*前駆体を模した60ヌクレオチド長の化学合成RNAを、HEK293細胞抽出液に加えてインキュベートしたところ、プロセシングの効率が極めて低いことがわかった。そこで、microRNA経路に関わるいくつかのタンパク質をHEK293で過剰発現させてから抽出液

を調製し、これらを組み合わせて、プロセシング効率を検討した。その結果、系の外から加えたpre-microRNAを効率よくプロセシングさせるためには、過剰のArgonauteが必要であることがわかった。そこで、過剰のArgonauteを含む細胞抽出液に*let-7* microRNA前駆体を加えてプレインキュベートした後、mRNAを加えて翻訳させた。その結果、*let-7*の標的配列を含むmRNAの翻訳だけが50%以上抑制され、標的部位に変異を導入したmRNAの翻訳は抑制されないことが明らかになった。さらに、Argonauteに結合するタンパク質で、翻訳抑制で重要な役割を果たすと考えられているGW182というタンパク質を過剰発現させた細胞の抽出液を加えてみたところ、*let-7*による翻訳抑制が70%程度にまで強まることわかった。

5. mRNAの構造からみた翻訳抑制機構

翻訳抑制機構を解明するために、キャップと

IRESに依存して翻訳開始するmRNAを比較した。その結果、翻訳抑制されるのは、キャップを持ち、さらにポリAテールを有するmRNAであることが明らかになった。これは、キャップ依存の翻訳開始が阻害されることを示唆している。

キャップとポリAは、相乗的に翻訳を促進することが知られている。キャップには、前述のeIF4Eを含む翻訳開始因子複合体eIF4Fが結合し、ポリAにはPABPが結合する。PABPは、mRNAの安定化と、役割を終えたmRNAの分解経路などで機能することがわかっているが、この他にPABPはeIF4Fにも結合することが知られている。そして、PABPをほとんど除いた細胞抽出液では、ポリAが付加されたmRNAの翻訳が著しく低下する。したがって、PABPは、ポリAに結合する翻訳因子として機能すると考えられる(図3A)⁴⁾。

では、*let-7*は、どのようにして翻訳を阻害するのであろうか？ 翻訳終了後の反応液からRNAを抽出し、mRNAに変化が起きているか

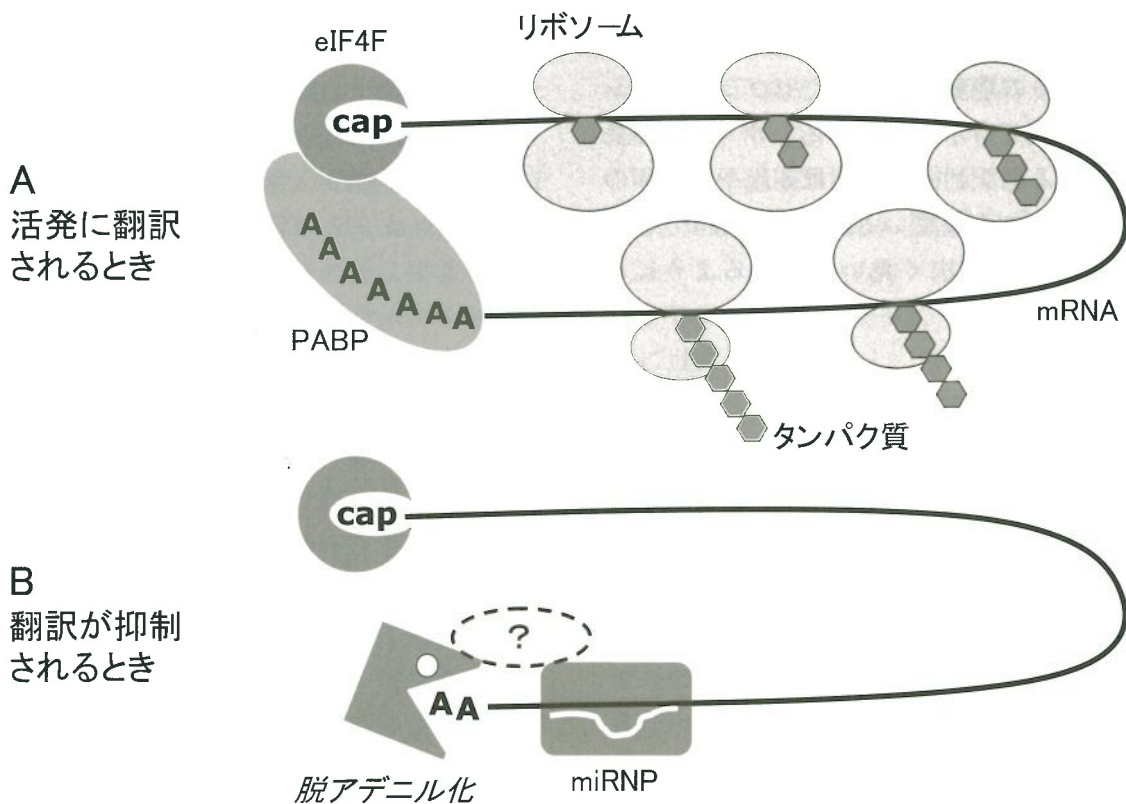


図3 microRNAによる翻訳抑制機構のモデル

どうかを調べた。その結果、mRNAの存在量に明らかな差はないが、*let-7*の標的配列をもつ mRNAは、*let-7*存在下でポリAが短くなっている（脱アデニル化されている）ことが明らかになった。この結果は、脱アデニル化により、mRNA上でのeIF4FとPABPの相互作用が壊されるために翻訳が阻害されることを強く示唆している（図3B）。

6. おわりに

現在、microRNAとその標的となるmRNAの解析が、多くの研究グループによって進められている。一方で、翻訳抑制機構の研究でも、激しい競争が繰り広げられている。我々と同様に、無細胞系で解析しようとするグループも多い。ドイツEMBLのグループは、ショウジョウバエ胚の抽出液を用いた系を、またカナダのグループが、マウス・クレブス細胞由来の系を発表した^{5, 6)}。どちらも、材料とした細胞に内在するmicroRNAによる翻訳抑制を調べている。また、ポリAの変化には着目していない。microRNAと脱アデニル化の関係については、ショウジョウバエやヒトの培養細胞、またゼブラフィッシュによる実験でも示されている。ポリAの伸長や短縮による翻訳制御は、卵母細胞や受精卵の母性mRNAで知られているが、今後microRNAの標的mRNAにも広く見いだされるようになるかもしれない。

文 献

- 1) Jackson, R.J. & Standart, N. : How do microRNAs regulate gene expression? *Science STKE*, 367 : re1, 2007
- 2) Gingras, A.C. et al. : eIF4 initiation factors : effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.*, 68 : 913-963, 1999
- 3) Wakiyama, M. et al. : *Let-7* microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes & Dev.*, 21 : 1857-1861, 2007
- 4) Kahvejian, A. et al. : Mammalian poly (A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev.*, 19 : 104-113, 2005
- 5) Thermann, R. & Hentze, M.W. : *Drosophila* miR2 induces pseudopolysomes and inhibits translation initiation. *Nature*, 447 : 875-878, 2007
- 6) Mathonnet, G. et al. : MicroRNA inhibition of translation initiation *in vitro* by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*, 317 : 1764-1767, 2007

◀国内情報▶

シロアリの卵保護行動と卵認識フェロモン
— 擬似卵運搬で効果的な駆除技術も岡山大学 大学院環境学研究科
昆虫生態学研究室
松 浦 健 二

シロアリの社会行動を強力にコントロールできるフェロモンとして特に注目されてきた卵認識フェロモンの同定に挑戦し、抗菌タンパク質のリゾチームがシロアリの卵認識フェロモンであることを特定した。シロアリはリゾチームによって卵を病原性バクテリアから保護するとともに、卵を認識するフェロモンとして利用していることが明らかになった。この発見は昆虫フェロモンの進化プロセスを解明する上でもきわめて重要な意味をもつ。また、このフェロモンは強力に卵運搬行動を誘発するため、殺虫活性物質を含有させた擬似卵をシロアリの巣の生殖中枢に運搬させることが可能であり、微量の薬剤で効果的にシロアリを駆除できる新技術への応用も可能である。

1. はじめに

シロアリ (Isoptera) とアリ・ハチ (Hymenoptera) は進化的には全く独立に高度なカースト分業に基づく真社会性を発達させた昆虫である¹⁾。これらの高度な社会性を営む昆虫では、フェロモンによる化学コミュニケーションを主な情報交換手段としている。自分たちの卵を識別して保護する行動は、最も基本的な社会行動の一つである。例えば、シロアリのワーカー (職蟻) は女王の産んだ卵を認識し、育室に運搬して世話をする習性をもつ (図 1 A)。近年、筆者らによりシロアリの卵に擬態して巣の中に生息する卵擬態菌核菌 (ターマイトボール) が発見され (図 1 B, C), シロアリの卵保護行動を誘発する卵認識フェロモンに注目が寄せられていた^{2, 3, 4)}。卵保護行動に代表される親による子の保護はシロアリにおける社会進化の出発点であり (亜社会性ルートと呼ばれる), この行動を誘発するフェロモンの同定は、社会の起源と進化を探る上でもきわめて重要な意味をもつ。また、シロアリは木材中に生息するため、殺虫剤を導入し難く、最も駆除が困難な害虫のひとつであるが、シロアリの卵認識フェロ

MATSUURA Kenji

〒700-8530 岡山県岡山市津島中1-1-1

モンを塗布した擬似卵を用いて、巣内に効率的に殺虫活性化合物を導入し、生殖中枢を破壊することが可能となる。このように基礎と応用の両面からシロアリの卵認識フェロモンの同定が待望されていた。本稿ではシロアリの卵に擬態した菌核菌ターマイトボールに関する最新の知見と、シロアリの卵認識フェロモンの同定、および、これらの知見に基づいた擬似卵運搬による新たなシロアリの駆除技術について解説する。

2. シロアリの卵に擬態する菌核菌

シロアリのワーカーは、女王の産んだ卵を育室に運んで山積みにし、世話をする習性がある (図 1 A)。ワーカーは育室の卵を毎日丁寧に舐めて (この行動をグルーミングとよぶ), 抗菌物質を含む唾液でコーティングし、糸状菌やバクテリアなどの病原性微生物や、乾燥から守っている。このようなワーカーによる卵の保護行動は最も基本的で重要な社会行動であり、ワーカーのグルーミングを受けなければ卵は生存できない。面白いことに、このようにしてできる育室の卵塊の中に、シロアリの卵とは異なる褐色の球体が見られる (図 1 B)。著者はこの未知の物体を「ターマイトボール」と名付けた²⁾。

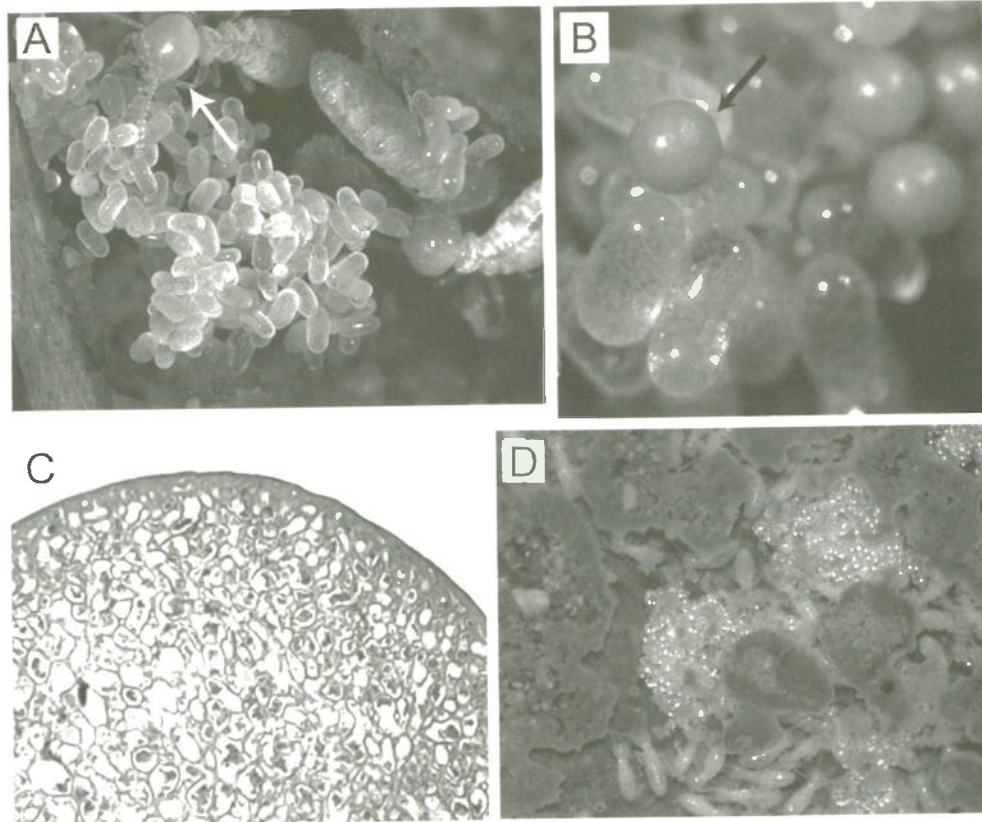


図1 シロアリの卵運搬行動と卵擬態菌核菌ターマイトボール
 (A) 巢内の育室で卵をグルーミングするヤマトシロアリのワーカー (B) 卵塊中の卵擬態菌核菌ターマイトボール(矢印)とシロアリの卵(透明な俵型) (C) ターマイトボールの組織切片 (D) 育室に搬入されたガラスビーズの擬似卵

この球体のリボソームRNA遺伝子を分析した結果、*Athelia*属の未記載種の糸状菌がつくる菌核であることが判明した。菌核とは菌糸が柔組織状に固く結合したもので、このかたちで休眠状態を保つことができる(図1C)。卵塊中に菌核が存在する現象は、ヤマトシロアリ属のシロアリに極めて普遍的にみられる。日本のヤマトシロアリ(*Reticulitermes speratus*)では、ホストの樹種によっても多少異なるが、アカマツ材に営巣した野外のコロニーはほぼ100%卵塊中に菌核を保有する。また、米国東部に広く分布する*R. flavipes*および米国東南部に生息する*R. virginicus*も同様に菌核を保有する。我々は現在までに7種のシロアリからターマイトボールを発見している^{5, 6)}。シロアリの種間で保有するターマイトボールの遺伝子(ITS領域)に有意な差は見られず、ホストレース化は生じ

ていない⁶⁾。また、一つのシロアリのコロニー内には複数のターマイトボールの遺伝子型が存在し、コロニーの創設後にワーカーが巢の周辺から卵擬態菌核菌を搬入していることが示唆されている(未発表)。したがって、ターマイトボールには、シロアリに依存した世代とは別に自由生活世代が存在すると考えられる。

では、なぜシロアリは菌核を卵塊中に運び込むのか。ガラスビーズで卵のダミーを作り、シロアリの卵認識メカニズムを調べたところ、シロアリは卵の形とサイズと、卵認識物質によって卵を認識することが分かった^{2, 4)}。シロアリの卵は俵型をしているが、ワーカーが運搬する際には常に短径の側をくわえる。卵の短径と同じサイズのガラスビーズに卵から抽出した認識物質を塗布して与えると、卵として運搬し、世話をする。そして、この菌核菌はシロアリの卵

の短径と厳密に同じサイズの菌核をつくり、さらに化学擬態もしていることが分かった⁴⁾。写真から分かるように、卵と菌核は色が異なるので、人が見ると容易に識別できる(図1B)。しかし、真っ暗な巣の中で視覚をもたないシロアリのワーカーにとって、ターマイトボールは自分たちの卵として認識される。

シロアリは抗菌活性のある糞や唾液を巣の内壁に塗って、様々な微生物の侵入から巣を守っている。このターマイトボールにとって、シロアリの巣内は言わば競争者フリーの環境となっている。卵に擬態することによって巣内に入り込んだ菌核菌は、一部が巣内で繁殖し、新たに形成された菌核はさらに卵塊中に運ばれる。卵塊中の卵よりも菌核の数の方が多いこともしばしばある。コロニーによっては卵塊中の90%以上が菌核で占められているものもあり、これらを卵と同じように毎日グルーミングすることは、シロアリにとって少なからぬコストとなっていると考えられる⁴⁾。また、ごく低頻度ではあるが、ターマイトボールが卵塊中で発芽し、周囲の卵を死亡させることも観察されている⁴⁾。一方、シロアリがターマイトボールを摂食することはなく、栄養的なプラスの効果はない(未発表)。短期的な相互作用を見る限り、両者の関係は明らかにターマイトボールの卵擬態によるシロアリへの寄生である。擬態は様々な高等動植物に普遍的に見られる現象であるが、ターマイトボールは世界で唯一の卵擬態する菌類である。

3. 昆虫フェロモンとしてのリゾチームの新機能

シロアリは卵を認識する際、その物性と化学的信号、すなわち卵認識フェロモンを手がかりとしている。前述のように卵の保護行動は社会進化の上でも最も根本的な社会行動であり、この行動を誘発するリリーサーフェロモンの同定は学術的にも、また応用的にもきわめて重要な意義を持つ。しかし、シロアリの卵保護行動の

研究に取り組んでいるのは歴史を遡ってみても筆者らの研究グループだけであり、参考となるような先行研究は皆無であった。ちなみにアリやハチは体表炭化水素で卵を認識するが⁷⁾、シロアリの卵認識には炭化水素は全く関与していない。また、化学分析に十分な量のシロアリの卵を採集するだけでも、シロアリの生態に関する知識に加えて、相当な労力と時間を要する大変な作業である。

我々は、まず、化学分析のために野外のヤマトシロアリのコロニーから合計で300万個余りの卵を採集した。当初はシロアリも膜翅目と同様に卵表面に存在する何らかのワックス成分をフェロモンとしていると予測していた。しかし、分画した油層には全く活性はなく、ターゲットは予測に反して水溶性物質であった。限外濾過によってターゲット物質のサイズは5 kDaから20 kDaと推定され、さらに、タンパク質分解酵素によって卵認識活性は完全に失われることから、比較的小さいタンパク質であることが示された(図2A)。イオン交換と疎水クロマトグラフィーの組み合わせにより、シロアリの卵抽出物から卵認識フェロモンを単離することに成功し、MALDI-TOF MSにより、ターゲット物質が分子量14.5 kDaのタンパク質であることが明らかになった(図2A)⁸⁾。

化学分析とは独立に、進化的合理性に基づいてフェロモンの候補物質を絞り込むことが可能である。多くの生物において、フェロモンはシグナルとしての機能とは別に、実用的機能を有している。先述のアリやハチでは、体表炭化水素で卵を認識するが、その体表ワックスの一次機能は乾燥から卵を守ることである。当然ながら、体表炭化水素は真社会性が進化する以前から卵表面に存在していた物質である。フェロモンが餌に含まれる成分の二次代謝産物であることも多い。シグナルの進化を考えれば必然であるが、フェロモン物質はフェロモンとして利用される以前からその場に存在していた物質である可能性が高い。では、乾燥に対する保護物質以外で、卵表面に必要な物質は何か。我々は脂

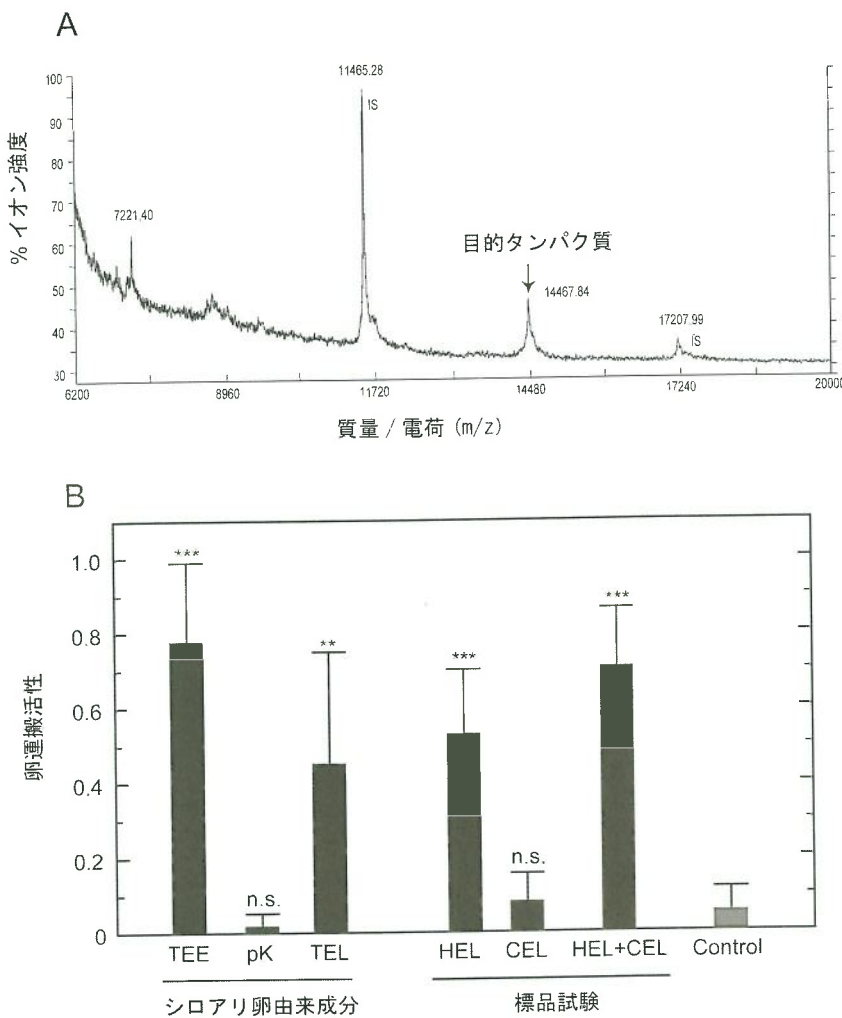


図2 シロアリ卵認識フェロモンの分析と卵運搬活性
 (A) MALDI-TOF精密質量分析によるターゲットタンパク質の分析。ただし、ISは内部標準物質 (B) 卵運搬活性試験 TEE：シロアリ卵の粗抽出物質、pK：タンパク質分解酵素の分解産物、TEL：シロアリ卵由来リゾチーム、HEL：ニワトリ卵由来リゾチーム標品、CEL：セルラーゼ標品

質でなければ、何らかの抗菌物質であろうと予測していた。そしてこの予測は的中し、シロアリの卵認識物質がグラム陽性細菌に対して溶菌活性をもつことを発見した⁸⁾。また、シロアリの唾液にも高い卵認識フェロモン活性が認められた (図3 A)。分子量および溶菌特性に基づいて、目的タンパク質は溶菌タンパク質リゾチームに絞られた。シロアリの唾液腺から分離したリゾチームに高い卵認識活性が認められ、さらにニワトリの卵白リゾチームを用いた標品試験でも高い活性が確認され、シロアリの卵認識フェロモンがリゾチームであることが立

証された⁸⁾。

RT-PCRによりシロアリリゾチーム遺伝子の発現が唾液腺と同様に卵でも確認された (図3 B)。また、ウエスタンブロットングにより、卵がまだ女王の卵巣内にある時点でリゾチームの生産が開始されることが明らかになった⁸⁾。女王の卵巣内で卵は濾胞細胞に囲まれており、未成熟卵内のリゾチームはこの濾胞細胞由来と考えられる (図4)。産卵後、育室に運搬された卵は、ワーカーによって頻りにグルーミングを受け、表面に唾液を塗布されて病原性細菌の感染から守られており、抗菌物質かつ卵認識フェロモンであるリゾチームが卵自体および唾液腺で生産されていることはきわめて合理的である。卵認識フェロモンはヤマトシロアリ属 (*Reticulitermes*) やイエシロアリ属 (*Coptotermes*) を含む下等シロアリにおいて幅広い種間交差活性が認められた⁸⁾。面白いことに、イエシロアリの卵を

ヤマトシロアリに与えても全く同じように保護行動を示す。

リゾチームは昆虫から哺乳類まで様々な動物の抗菌物質あるいは消化酵素として知られている。研究の成果は、リゾチームの昆虫フェロモンとしての全く新しい機能の発見であり、リゾチームの多面的機能の解明に大きく貢献する。シロアリ、アリ・ハチ等の高度な真社会性昆虫の社会行動に関与するフェロモンとして、これまで体表炭化水素などの脂質の分析が主であった。本研究は真社会性昆虫では初めてのタンパク質フェロモンの同定であり、今後の社会性昆

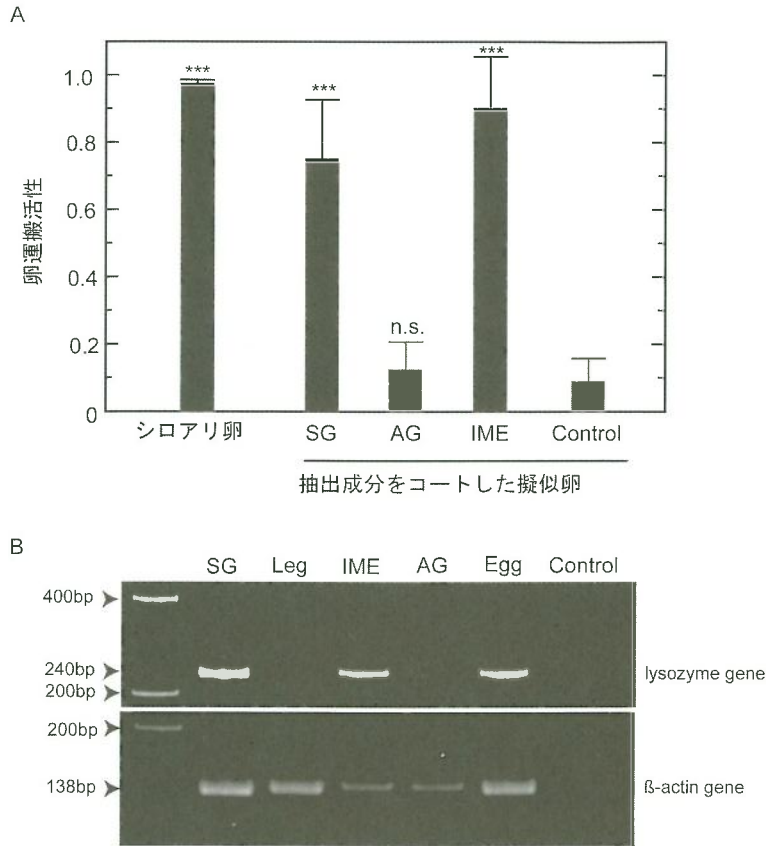


図3 卵認識フェロモンリゾチームの生産器官

(A) 各器官から抽出したタンパク質の卵運搬活性 (B) RT-PCRによるシロアリリゾチームの遺伝子発現部位の特定 SG:ワーカーの唾液腺, AG:女王の付属腺, IME:女王の卵巣内から採取した未成熟卵

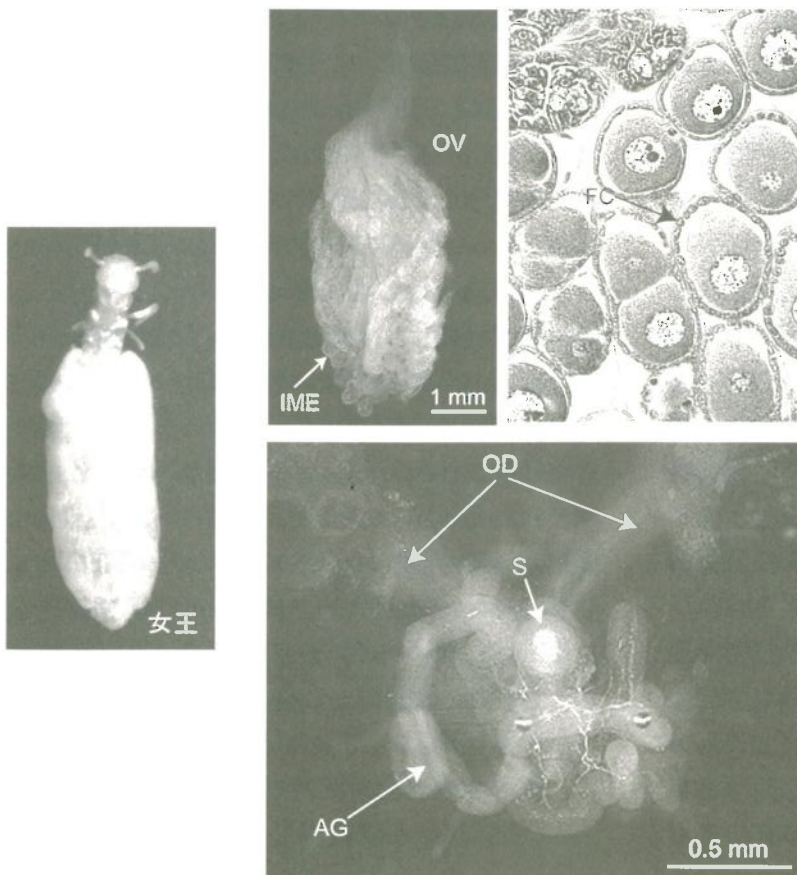


図4 女王の生殖器官

OV: 卵巣, IME: 未成熟卵, FC: 濾胞細胞, OD: 輸卵管, S: 貯精囊, AG: 付属腺

虫のフェロモン同定に新しい視点を提供した。また、シロアリにおける社会性の進化において、病原性微生物に対する防御はきわめて重要な要素であったと考えられている。本研究の成果は、シロアリが抗菌タンパク質を社会行動のフェロモンとして利用しているという発見であり、昆虫の社会進化と病原性微生物との関連について重要な示唆を与えるものである。

4. 卵運搬本能を用いたシロアリ駆除技術

シロアリは被害の甚大さと予防、駆除の困難さの点で見れば、人類にとって最も厄介な害虫の一つである。その年間被害総額は日本で少なくとも1000億円以上、米国では修理費も含めると110億ドルにも達する⁹⁾。そして、現在のシロアリ防除、駆除技術には様々な問題点がある。既存の駆除技術は基本的には加害された木材の外側から大量に薬剤を投入して殺虫するというものであり、シックハウス症候群などの健康被害や環境汚染につながる上、駆除に要するコストが大きすぎる。シロアリは営巣する木材自体を摂食するため、毒餌を用いたベイト法にも限界が指摘されている¹⁰⁾。また、巣の生殖中枢（王、女王や卵のある部位）を破壊しなければ完全に駆除できない。では、どのようにすれば効率的に生殖中枢まで殺虫活性物質を導入し、コロニー全体を破壊できるか。

高度な社会性を営み人間に害を与えている真社会性害虫を最も効率的に駆除する方法は、その社会性を逆に利用することである。上述のように、シロアリの職蟻は女王の産んだ卵を育室に運搬して世話をする習性をもつ。筆者はこの最も基本的な社会行動の一つである卵保護行動に着目し、擬似卵を用いてシロアリ自ら殺虫活性物質を巣内の生殖中枢へ運搬させる技術を開発した。ターマイトボールはまさにシロアリの連運搬を利用して巣内に運搬され、新たなニッチを獲得した生物である。人工物をシロアリ自ら巣内の生殖中枢へ運搬させる技術は、この卵

擬態メカニズムの解明によって比較的容易に実現できる。

本技術の特性は、きわめて効果的にコロニーの中枢を破壊できる点にある。擬似卵に殺虫活性物質を含ませてシロアリ自らに生殖中枢へと運搬させることにより、駆除にかかる労力を大幅に削減できる。さらに、駆除に必要な薬剤の量がきわめて微量で済む点も重要である。卵保護行動はシロアリの種に関わらず普遍的であり、さらに、我々の研究によりシロアリの卵認識物質は、広範囲の種に共通であることが明らかになっている。したがって、本技術は日本だけでなく、世界中のシロアリに適用できる画期的な駆除技術として期待できる。

文 献

- 1) Wilson, E. O. (1971), *The Insect Societies*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.
- 2) Matsuura, K. et al. (2000), *Ecological Research* 15, 405-414.
- 3) Matsuura, K. (2003), in *Insect Symbiosis* (Bourtzis, K. A., and Miller, T. A., eds.), 131-143, CRC Press Inc., Boca Raton
- 4) Matsuura, K. (2006), *Proc. Roy. Soc. B Biol. Sci.*, 273, 1203-1209.
- 5) Matsuura, K. (2005), *Applied Entomology and Zoology*, 40, 53-61.
- 6) Yashiro, T., Matsuura, K. (2007), *Annals of the Entomological Society of America*, 100, 532-538.
- 7) D'Ettorre P. et al. (2006), *Naturwissenschaften*, 93, 136-140.
- 8) Matsuura, K. et al. (2007), *PLoS ONE*, 2, e813. doi:10.1371/journal.pone.0000813
- 9) Su, N. Y. (2002), *Sociobiology*, 40, 95-101.
- 10) 吉村ら (2006), 生存圏における昆虫生態のモニタリング技術の新展開, 48-53, 京大大学生存圏研究所プロジェクト共同利用研究集会, 京都

◀国内情報▶

超低温保存の体外受精卵を借り腹の 雌豚に移植し、子豚誕生に成功

¹独立行政法人 農業生物資源研究所, ²麻布大学 獣医学部,
³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
菊地 和弘¹・Tamás Somfai¹・柏崎 直巳²・永井 卓³

ブタの体外受精卵をガラス化冷却し液体窒素中（-196℃）で保存した後、借り腹となる雌豚に移植することによって妊娠・出産に成功した。ブタの受精卵の超低温保存は、家畜の中では最も難しい技術の一つであったが、超低温保存した体外受精卵（1細胞期胚）で子豚を誕生させた最初の報告である。本手法は稀少なブタの品種などの遺伝資源のほか、クローン豚、遺伝子組換え豚等の貴重なブタ系統の長期間維持に大きく貢献する。

1. はじめに

家畜をはじめとする哺乳動物遺伝資源の保存を目的として、現在は主に精子や胚の超低温保存（=凍結保存、液体窒素中で-196℃での保存）が行われている。（独）農業生物資源研究所でも、農林水産ジーンバンク事業の一貫として、主に家畜精子を凍結保存している。保存対象として卵や胚の保存についても積極的に保存を行うことになっている。

ブタにおける卵や胚の保存に関しては、マウスやウシに比べて細胞質内に多量の脂肪滴を含み低温傷害を受けやすく、超低温保存が困難であった。したがって、ブタでは、細胞数が多く多少の細胞がダメージを受けても凍結・融解後に胚が発生できる、体内由来の初期胚（桑実胚～胚盤胞期胚：約30～200細胞）を超低温保存する方法が一般的であった。具体的には、体内由来胚（桑実胚期から胚盤胞期胚）や、体外生産胚においても4～8細胞期に脂肪滴を機械的に除去したり¹⁾、受精後に一度体内に戻して胚耐凍能を付与した胚盤胞を作製した場合 KIKUCHI Kazuhiro¹, SOMFAI Tamás¹,

KASHIWAZAKI Naomi², NAGAI Takashi³

¹〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2

²〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71

³〒305-0901 茨城県つくば市池ノ台2

（Tajima et al., 未発表）に限って出産に成功している。しかし、その成功率は極めて低く、出産率の向上が急務となっている。さらに、これまでに未受精卵および授精直後の受精卵（=1細胞期胚）での超低温保存により子豚が生まれた報告はない。遺伝資源の保全の立場からはさまざまな成熟・発生段階で超低温保存できることが望ましい。

また、ブタの体外受精では多精子受精が頻発することも問題となっている²⁾。通常に受精した単精子受精では2倍体胚へ発生し子豚になるが、多精子卵は多倍体胚へと発生しその後発生が停止し子豚には至らないと考えられている。これまで、多精子防除の関してさまざまな努力がなされているが未だ解決に至っていない。体外受精を行った際に、多精子受精卵を取り除くことが、超低温保存後の胚の発生能の改善においても効果的であると考えられる。ブタ受精卵は遠心処理後に観察すると、脂肪滴が細胞質の片隅に偏るので前核が可視化され、単精子侵入受精卵を選択出来ると言うメリットがある。

本研究では、ブタにおいて体外成熟卵を体外受精し、超低温保存する急速冷却ガラス化保存技術の開発に取り組んだ。特に、体外受精後に前核を観察することで多精子の程度を判別し発生能を有する卵を分別することで、超低温保存の効率を高めることとした。

2. ブタ胚の超低温保存

家畜の胚の超低温保存において、より融解後の高生存率を誇るガラス化冷却法が導入されるようになった。高濃度の耐凍剤（エチレングリコールやDMSOなど）を含む液（ガラス化液）中に、卵や胚を入れると急速に脱水され、細胞質の水分が耐凍剤と置換される。この状態で超急速に液体窒素中（ -196°C ）のような低温にさらすと、液や細胞質は凍ることなく（氷の結晶、すなわち氷晶が形成されることなく）、急速に固化させることができる。この状態は、氷の結晶がつくられないことがない、すなわち凍るのではないため、ガラス化されている状態と考えられている。用語としても、「凍結」ではなく「冷却」が、また「融解」ではなく「加温」が使われる。ガラス化冷却された状態では、氷晶形成による細胞への傷害が少ないため加温後に優れた生存率を示す。哺乳動物胚では1985年にマウスでいち早く成功³⁾、ブタでは1998年に報告例がある⁴⁾。ガラス化冷却法は、温度制御が比較的容易で、プログラムフリーザーによる厳密な温度制御が不要である。操作そのものも比較的容易であるため、家畜やヒトの胚を安定的に超低温保存の主流となりつつある。しかし、細胞毒性を有する高濃度の耐凍剤を使うため、処理操作には熟練が必要である。使用する器具や手法により様々な方法があり、プラスチックストローを用いる方法やマイクロドロップによる方法がある。本研究では、マイクロドロップ法の一つである、固体表面ガラス化冷却（Solid surface vitrification；SSV）法⁵⁾を行い、超急速冷却を実現させ生存性の向上を図った。

一方、従来法としての超低温保存法は、プログラムフリーザーを用いる緩慢凍結法がとられてきた。希釈液は凍る（凍結する）が細胞内は凍らないという状態を作り出す。この場合、使用する耐凍剤の種類と濃度、温度の設定や降下速度の制御が重要である。

3. 受精卵の遠心処理、ならびに多精子受精卵の発生能

ブタ受精卵への遠心処理が発生能へどのような影響を及ぼすかについて別途検討している（Somfai et al., 未発表）。体外成熟・受精後に20分間 37°C 、 $10,000\times g$ で遠心処理（処理区）をした。遠心処理を行わない卵は対照区とした。培養2日目で卵割率を、その後培養6日目で胚盤胞への発生率ならびに細胞数を調べ胚の品質を検討した。処理区と対照区の卵割率はそれぞれ76.1%ならびに75.2%、胚盤胞発生率は20.5%ならびに24.5%、細胞数はそれぞれ42.2個ならびに45.2個で、両区の間有意差はなかった。この結果より、受精卵への遠心処理そのものはその後の発生能に影響を与えないことが明らかとなった。

多精子受精卵の発生能については既に検討済みである⁶⁾。体外受精後10時間（前核期）で受精卵を遠心処理後、高倍率の実体顕微鏡下で、前核の数で受精卵を分別した。2前核形成卵（1個の雌性前核ならびに1個の雄性前核を形成する単精子受精卵）ならびに多前核形成卵（1個の雌性前核ならびに2個以上の雄性前核を形成する多精子受精卵）に分別した。分別後に固定・染色を行い信頼性をチェックしたところ、75.0%以上の合致率が得られた。この報告での単精子卵率ならびに多精子卵率はそれぞれ23.9%ならびに30.6%であり、残りは未受精卵や単為発生卵であった。2前核形成卵と多前核形成卵を別々に培養し、培養6日目で染色体標本作製し核型を分析したところ、2倍体胚（モザイク2倍体胚を含む）の出現率は、それぞれ86.3%ならびに45.8%であった。この結果を単純に計算した場合、2前核形成卵と多前核形成卵を合わせて培養した場合、全体外受精卵の34.6%が2倍体の胚盤胞として発生することが期待される。一方、2前核形成卵のみを培養した場合では、20.6%の率にとどまる。多精子受精卵で初期発生過程で倍数性の修復が起こる可能性が報告されており⁷⁾、そのメカニズム

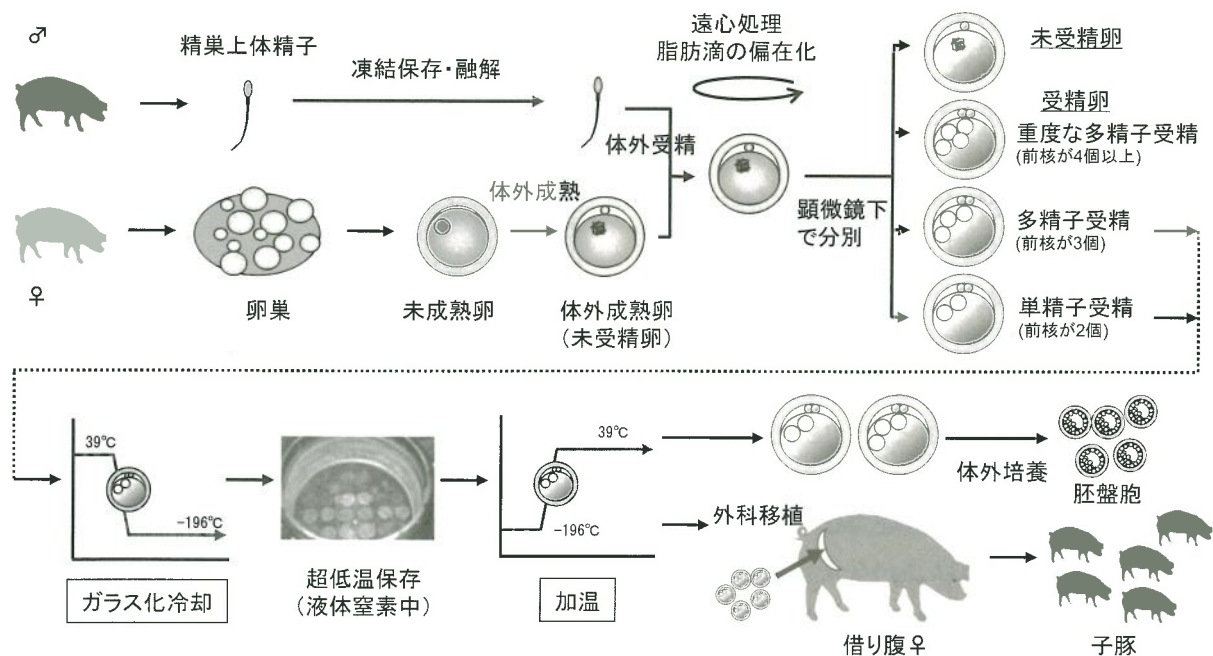


図1 体外成熟・受精卵の遠心処理・ガラス化冷却～借り腹への移植方法

屠場由来の卵巣から未成熟卵を採取し体外成熟を行い成熟卵を得た。精巢上体由来の精子を凍結保存し、融解後に体外受精を行った。遠心処理後、単精子受精卵ならびに軽度の多精子受精卵（3前核卵）をガラス化冷却し超低温保存した。加温後に、体外培養ならびに外科的移植を行い発生能を確認した。

について詳細に明らかにする必要がある。実用面から見れば、軽度の多精子受精卵の移植においても正常産子への発生が期待され、効率化に貢献すると考えられる。

4. 体外成熟・受精卵の遠心処理・ガラス化冷却～借り腹への移植

具体的手法を図1に示した。春機発動前の雌豚より卵胞卵を回収し既報⁸⁾の通り体外成熟を行い、成熟卵を選別し体外受精を行った。前述通りに遠心処理をして、前核を可視化した（図2）。2前核形成卵ならびに3前核形成卵（軽度の多精子受精卵）（以下、受精卵）を、改良したSSV法⁹⁾によりガラス化冷却を行い、液体窒素に保存した。加温後の受精卵を既報⁸⁾にて体外培養し、胚の発生能を調べた。

対照区（既報通りの体外胚作製を行ったもの）と耐凍剤対照区（耐凍剤で処理後にガラス化冷却を行わずに体外培養したもの）を比較したところ、培養2日目の卵割率（それぞれ、88.1%

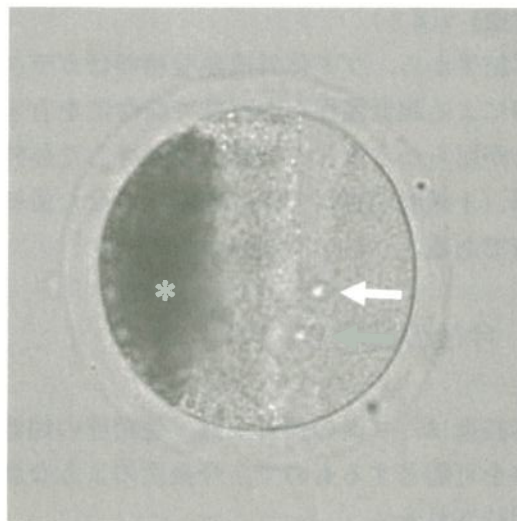


図2 遠心後の受精卵（2前核卵）

体外成熟後に体外受精し、10時間後に遠心処理を行い、脂肪滴（*）を偏在化した。脂肪滴のない部分に、核小体が明瞭に認められる雌性前核（卵由来）1個と雄性前核（侵入した精子由来）が認められる（矢印）。

ならびに86.1%)、培養6日目の胚盤胞率(それぞれ、23.2%ならびに20.8%)および胚盤胞の細胞数(それぞれ、38.0ならびに41.2個)に差がなかった。

次に、対照区の受精卵と、実験区(ガラス冷却・加温後に体外培養したもの)の加温直後の受精卵の生存率を調べたところ、両区に差はなかった(それぞれ、93.4%ならびに100%)。しかし、卵割率(それぞれ86.3%ならびに71.7%)ならびに胚盤胞率(それぞれ、24.5%ならびに15.8%)は、対照区にくらべて実験区で有意に減少した。しかし、対照区ならびに実験区での胚盤胞の平均細胞数には差がなかった(それぞれ、41.6個ならびに41.2個)。この結果から、受精卵をガラス化冷却し加温後体外で発生させると、胚盤胞率は低くなるものの得られる胚盤胞の品質はガラス化冷却を行わないものに匹敵することが明らかになった。

発情同期化した借り腹の雌豚4頭の卵管に、1頭あたり150個のガラス化冷却・加温直後の受精卵を外科的に移植したところ、2頭から計8頭の子豚が生まれた(それぞれ、5頭ならびに3頭)(図3)。

本結果から、ブタ体外成熟受精卵はガラス化冷却による超低温保存が可能で発生能を有することが明らかとなった。超低温保存した体外受精卵(1細胞期胚)で子豚を誕生させた最初の報告である。

5. 今後の展開

本技術は、ブタの体外成熟・受精卵の超低温保存を可能とするもので、今後次のような展開が期待される。

1) 稀少品種のみならず、遺伝子組換え豚やクローン豚等の貴重な個体を、受精卵として長期間超低温保存することが可能となる。さらに、育種素材としてのブタの保存も可能なので、育種にも活用できる。例えば、近交係数が上昇した場合、超低温保存していた親世代以前の豚の復元も可能となる。



図3 出産した子豚(生後3日)
雄3頭ならびに雌2頭を出産した例。

また、生体の移動が不必要となるため、液体窒素容器による受精卵の輸送も可能となり、コスト面でも優位性が高い。

- 2) 未成熟卵が使えることから、生体のみならず屠殺・病死材料を利用することが可能となるので、保存対象が拡大される。
- 3) 遺伝子組換え豚の作製法の一つに、目的遺伝子を前核に注入する方法がある。あらかじめ前核期受精卵を作製し超低温保存することで、多数の受精卵を容易に確保することができる。必要時にこれらを利用することで、遺伝子組換え豚の作出効率の向上が図ることが可能となる。
- 4) 受精卵の超低温保存技術を発展させることで、これまでの技術では困難であった未受精卵の超低温保存への応用が期待される。卵核胞期卵^{10, 11, 12)}ならびに成熟卵^{9, 12, 13)}においてガラス化冷却による超低温保存が試みられている。加温後に培養したところ胚盤胞への発生が確認されているが、これまでに産子作出の報告はない。超低温保存し

た未受精卵と凍結精子を利用することで、必要時にいつでも「交配」が可能となり、目的に合致した子豚を生産することが可能となる。

文 献

- 1) Nagashima, H. et al. (2007), *Biol. Reprod.*, 76, 900-905
- 2) Nagai, T. et al. (2006), *Front. Biosci.*, 11, 2565-2573
- 3) Rall & Fahy (1985), *Nature*, 313, 573-575.
- 4) Kobayashi, S. et al. (1998), *Cryobiology*, 36, 20-31.
- 5) Dinnyes, A. et al. (2000), *Biol. Reprod.*, 63, 513-518.
- 6) Somfai, T. et al. (in press), *Ani. Reprod. Sci.*
- 7) Han Y.M. et al. (1999), *Biol. Reprod.*, 61, 1340-1346
- 8) Kikuchi, K. et al. (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 1033-1041
- 9) Somfai, T. et al. (2007), *Cryobiology*, 55, 115-126
- 10) Isachenko, V. et al. (1998), *Cryobiology*, 36, 250-253.
- 11) Fujihira, T. et al. (2004), *Cryobiology*, 2004, 49, 286-290.
- 12) Gupta, S.K. et al. (2007), *Theriogenology*, 67, 238-248
- 13) Somfai, T. et al. (2006), *Theriogenology* 66, 415-422

◀国内情報▶

海産魚のウイルス性疾病を予防するための
組換え酵母を用いた経口ワクチンの開発

¹近畿大学 水産研究所, ²三重大学 大学院生物資源学研究所, ³北海道大学 大学院水産
科学研究院, ⁴財団法人阪大微生物病研究会 観音寺研究所, ⁵京都大学 大学院農学研究科

家戸 敬太郎¹・石丸 克也¹・田丸 浩²・吉水 守³・
真鍋 貞夫⁴・植田 充美⁵・村田 修¹・熊井 英水¹

海水魚養殖において近年重大な被害をもたらしているイリドウイルス病およびウイルス性神経壊死症を予防する
目的で、主要外被タンパク質 (MCP) および外被タンパク質 (CP) を発現する組換え酵母を作成し、マダイおよ
びイシダイにそれぞれ経口投与した。ウイルスの人為感染による攻撃試験を行った結果、いずれのウイルス病にお
いても組換え酵母の経口投与によるワクチンとしての効果が認められ、経口ワクチンによるウイルス性疾病予防の
可能性が示された。

1. はじめに

近年、魚病問題は養殖業の振興のために除外
しては考えられないほどの重要課題となっており、被害率は魚種によって異なるものの、生産
額の数%から10%内外に達しているものと推察
されている。海水養殖魚の疾病は寄生虫性、細
菌性およびウイルス性の三つに大別されるが、
近年ウイルス性疾病の発症件数が著しく増大し
ており、魚病の中でも特にウイルス性疾病対策
を検討することが今後の養殖漁業において最重
要課題のひとつであるといえる。

海水魚のウイルス性疾病の代表的なものとし
て、マダイイリドウイルス病¹⁾ およびシマアジ
のウイルス性神経壊死症²⁾ があり、これらのウ
イルス症の共通の特徴として、斃死率が高いた
めに深刻な被害が生じること、およびマダイあ

KATO Keitaro¹, ISHIMARU Katsuya¹,
TAMARU Yutaka², YOSHIMIZU Mamoru³,
MANABE Sadao⁴, UEDA Mitsuyoshi⁵,
MURATA Osamu¹, KUMAI Hidemi¹

¹〒649-2211 和歌山県西牟婁郡白浜町3153

²〒514-8507 津市栗真町屋町1577

³〒041-8611 函館市港町3-1-1

⁴〒768-0061 香川県観音寺市八幡町2-9-41

⁵〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

るいはシマアジだけではなく感染する魚種の多
い点がある。養殖魚のウイルス性疾病対策とし
ては、現在のところ有効な薬剤による治療方法
が無いことからその予防が重要となる。その最
も有効な予防法として、我が国において不活化
したイリドウイルスの注射ワクチンが開発され
、1999年より市販されており、その高い防御
効果が確認されている。しかしながら、家畜と
は異なり数万から数百万尾の単位で飼育する海
水魚養殖においてはワクチンの注射にかかる労
力も膨大なものであり、また、連続的に注射を
行うための特殊な機材と技術が要求される。ま
たウイルスに対する不活性化ワクチンのもうひ
とつの問題として、ウイルスの培養が困難であ
ることなどからコストが高くなるという点があ
る。こうした背景から、海水魚の種苗生産現場
では、配合飼料に混合させて投与することので
きる、より安価で効率的な経口ワクチンの開発
が期待されている。

そこで本研究では、ウイルスの感染防御抗原
候補タンパク質のDNA情報をもとに、そのタ
ンパク質を発現する組換え酵母を作成し、これ
を培養することで容易に安価で大量のワクチン
調製することを試みた。また、この酵母を海水
魚の発育初期に投与する配合飼料に添加し、そ
のワクチンとしての効果について検討した。

2. マダイイリドウイルス病¹⁾

マダイイリドウイルス病は、1990年頃から西日本の養殖場で広く発生するようになったウイルス病で、それまであまり深刻な病害問題のなかったマダイにおける最も深刻な病気となった^{3, 4)}。病魚は運動が不活発となり、極度の貧血症状、鰓の点状出血及び脾臓の肥大を呈する。本病は、マダイだけではなく、スズキ、ブリ、カンパチ、シマアジ、イシダイおよびイシガキダイなどの重要な養殖魚種にも発症し、2005年までにスズキ目の魚類を中心に3目31魚種で本病の発生が確認されている⁵⁾。また、魚種によって最大斃死率はほぼ100%になることもある。原因ウイルスはイリドウイルス科に属し、red sea bream iridovirus (RSIV) と命名されている⁶⁾。

RSIVはイリドウイルス科に属する直鎖状の二本鎖DNAウイルスであり、大きさ200～240nmの球形（正20面体）を呈する。中心部に直径120nmのコアが認められるが、エンベロープはみられない³⁾。RSIV全ゲノムのDNA配列が明らかにされており、主要外被タンパク質(MCP) 遺伝子を含む116のオープンリーディングフレームが推定されている⁷⁾。組換え酵母にウイルスタンパク質を発現させてワクチンとして利用する場合には、感染防御抗原となるエピトープをウイルス由来のタンパク質を発現させなければならない。RSIVに関しては最近DNAワクチンによる研究でMCPに感染防御能があることが明らかにされており⁸⁾、本実験においてもMCPを感染防御抗原候補とした。

3. シマアジのウイルス性神経壊死症²⁾

シマアジのウイルス性神経壊死症は、1990年頃にシマアジの種苗生産の初期（仔魚期）に大量斃死を引き起こし、シマアジの種苗生産が壊滅状態に陥った疾病である。病理組織学的検討、電子顕微鏡観察、感染実験などの結果から、本病はYoshikoshi and Inoue (1990)⁹⁾ がイシダイで報告したウイルス性神経壊死症（viral

nervous necrosis：VNN）と同じ病気であることが判明した。その後、シマアジにおける原因ウイルス（striped jack nervous necrosis virus：SJNNV）の伝播経路の解明、遺伝子解析、ウイルス検出のためのPCR法の開発などが行われ、それらに基づいてウイルス保有親魚の除去による垂直伝播の防止策が確立されたことから、近年ではシマアジ仔魚での本病の発症はあまりみられなくなった。しかしながら、キジハタ、クエ、マハタ、ヒラメなどの有用魚種で、シマアジよりもやや遅い時期に現在でも本病の発生が報告されており大きな問題となっている²⁾。また、東南アジア諸国、オーストラリア、ヨーロッパなどでも発生例が報告されており、イリドウイルス病とともに罹病魚種が多く（30種以上）斃死率の高い重大な被害をもたらす疾病である¹⁰⁾。病魚の脳、脊髄および網膜の神経組織に神経細胞の壊死および空胞の形成が観察され、異常遊泳が認められる¹⁰⁾。

本病の原因ウイルスは、ノダウイルス科、ベータノダウイルス属（Betanodavirus）に分類される¹⁰⁾。大きさ約25nmの正20面体構造でエンベロープを持たず、核酸はプラスセンスの2分節1本鎖RNAからなる¹¹⁾。遺伝子はRNAポリメラーゼをコードするRNA1と、外被タンパク質をコードするRNA2であり¹¹⁾、大腸菌で発現させた外被タンパク質をマハタ幼魚に注射することにより本病を予防できることが実験的に確かめられていることから、本実験においては外被タンパク質を酵母に発現させた。

4. 組換え酵母によるウイルスタンパク質の発現¹²⁾

上記のように、酵母に発現させるRSIVの抗原候補タンパク質として主要外被タンパク質(MCP) を、NNVは外被タンパク質(RNA2) をそれぞれ選んだ。RSIV不活化ワクチンより抽出したDNAおよびNNVを発症したマハタ組織より抽出したRNAから逆転写して得たDNAをテンプレートにそれぞれPCR増幅してクロー

ニングした翻訳領域の全長を含むDNA断片を得た。それらのDNA断片を酵母の細胞質にタンパク質を発現させるためのプラスミドベクターpWGP3にライゲーションし（pWGP3-RSIVMCPおよびpWGP3-SGNNVCP）、リチウムアセテート法によって酵母に形質転換した。それらの酵母を、2%カザミノ酸を含む30℃のSD-W培地で液体培養し、遠沈・回収してタンパク質を抽出後、MCPの発現をウエスタンブロット法で確認した。図1にRSIVのpWGP3-RSIVMCPおよびウエスタンブロットの結果を示した。ウエスタンブロットの結果、予想されたサイズのバンドが確認され、酵母によるRSIVのMCPの発現が確認された。

5. マダイイリドウイルス病およびイシダイのウイルス性神経壊死症に及ぼす組換え酵母の経口投与の効果

まず、孵化後80日齢のマダイ稚魚40尾ずつを用いて次の4試験区を設定した。1区：不活化ワクチン注射区、2区：MCP発現酵母経口投与区、3区：未発現酵母経口投与区、4区：未

処理対照区。酵母の投与濃度は乾燥重量で0.1%とし、投与期間は10日間とした。実験開始1ヶ月後に $10^{4.5}$ TCID₅₀/mLのイリドウイルス液を0.1mLずつ腹腔内注射する攻撃試験を行い、攻撃後の斃死率を30日間記録した。その結果、攻撃試験後30日後の累積斃死率は、不活化ワクチン区5.0%、MCP発現酵母経口投与区5.3%、未発現酵母経口投与区13.9%、未処理対照区30%であり、MCP発現酵母経口投与区の斃死率は不活化ワクチン区と同程度に低かった（図2）。また未処理対照区およびMCP発現酵母経口投与区の斃死率から算出した有効率RPS=82.5であり、組換え酵母を用いた経口ワクチンが有効である可能性が示されたが、対照区の累積斃死率が30%と低かったことなどから、今後サイズの異なる供試魚や異なる魚種を用いるなどして再現性についてさらに検討する必要があると考えられた。

次に、54日齢（平均魚体重、 1.6 ± 0.6 g）のイシダイ稚魚を40L容ポリプロピレン水槽に50尾ずつ収容し、ワクチネーションとして、1区にはCPを発現していない酵母を、2区へはCPを発現した酵母を10日間経口投与した（0.1%添

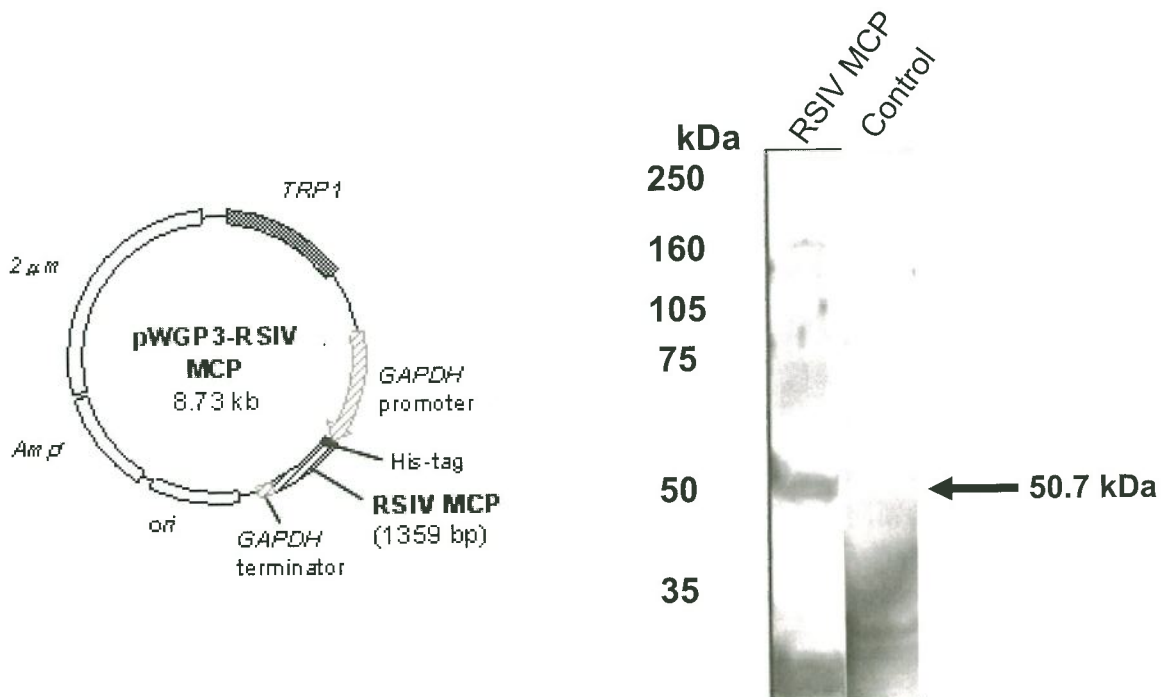


図1 酵母による細胞質へのマダイイリドウイルス主要外被タンパク質（MCP）の発現

加)。3区は無処理の対照区とした。マハタ由来のウイルス懸濁液をワクチネーション開始後30日後に全ての魚に0.1mLずつ注射して人為感染させ、さらに30日間飼育した。人為感染4日目に各試験区5尾を取り上げて眼球を採取し、リアルタイムPCR法によってCP遺伝子のコピー数を相対定量した。その結果、人為感染後の30日間の飼育ではいずれの試験区にも斃死魚はみられなかったが、人為感染4日目の相対CP遺伝子量は1区、 12.8 ± 0.3 ；2区、 2.6 ± 0.1 ；3区、 827.1 ± 20.2 となり、各区間に有意差が認められた。以上の結果から、酵母を飼料に0.1%添加するだけでもそれなりのウイルス耐性は増加するが、CPを発現した酵母を同濃度で加えることで、更に強い耐性を得ることが分かった。

6. おわりに

本研究では、海水魚の種苗生産過程において重大な被害をもたらしている2種類のウイルス病に対して、それらのウイルスタンパク質を発現した組換え酵母を経口投与することでワクチンとしての効果が認められる例を示した。組換

え酵母の経口投与によるワクチネーションが可能となれば、安価で容易にウイルス病の予防が可能となり、労力の削減や魚種・サイズの拡大など、従来の注射ワクチンからの大幅な改善が期待される。しかし、この組換え酵母の経口投与によるワクチネーションを実用化するためには、再現性、効果持続期間および安全性の確認、作用機序の解明など、今後まだまだ多くの知見を集積する必要がある。

7. 謝辞

本研究の一部は、先端技術を活用した農林水産研究高度化事業「魚病感染防御抗原を表層提示した酵母を用いた経口ワクチンの開発」（平成15～17年度）によった。また、本研究を実施するにあたり、近畿大学水産研究所のスタッフおよび学生諸氏の協力を受けた。多大なご支援をいただいた関係各位に篤く御礼申し上げます。

文献

- 1) 室賀清邦 (2004), 魚介類の感染症・寄生虫病 (若林久嗣・室賀清邦編), マダライ

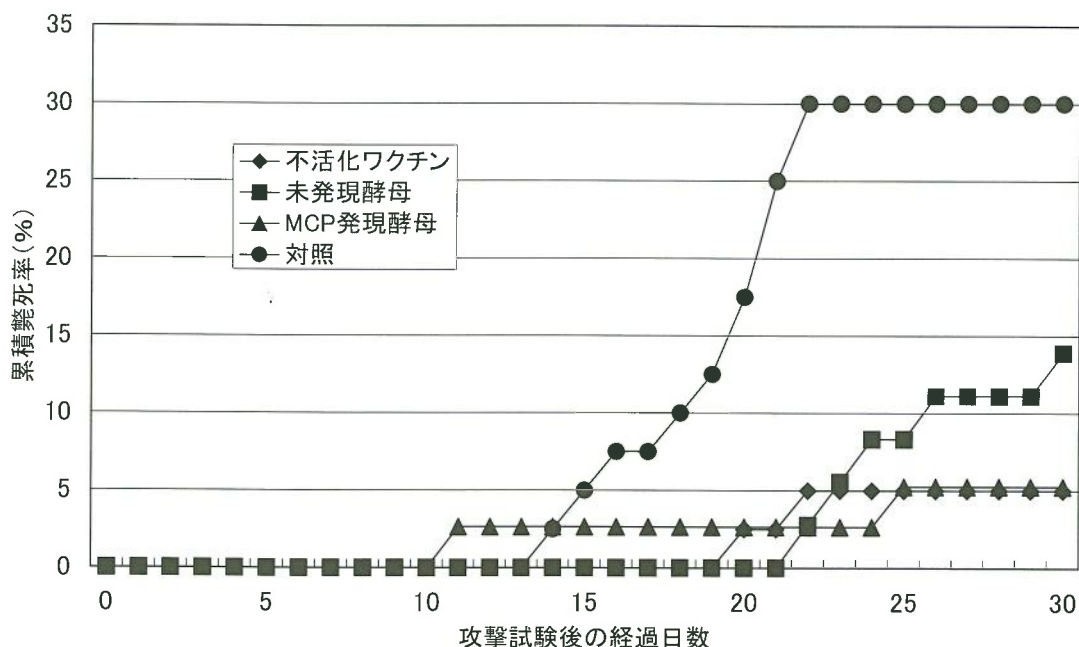


図2 RSIVのMCP発現酵母を経口投与したマダイ稚魚のイリドウイルス攻撃試験後の斃死率の推移

- リドウイルス病, 75-79, 恒星社厚生閣, 東京
- 2) 室賀清邦 (2004), 魚介類の感染症・寄生虫病 (若林久嗣・室賀清邦編), シマアジのウイルス性神経壊死症, 81-86, 恒星社厚生閣, 東京
- 3) 井上 潔ら (1992), 魚病研究, 27, 19-27
- 4) Nakajima, K. et al. (1998), *Fish Pathol.*, 33, 181-188
- 5) 中島ら (2005), ウイルス, 55 (1), 115-126
- 6) Nakajima, K. et al. (1994), *Fish Pathol.*, 29, 29-33
- 7) Kurita J. et al. (2002), *Fisheries Science* 68 suppl. II, 1113-1115
- 8) C.M.A. Caipang et al. (2006), *Fish & Shellfish Immunology*, 21, 130-138
- 9) Yoshikoshi, K. et al. (1990), *J. Fish. Dis.*, 13, 69-77
- 10) 中井敏博 (2006), 新魚病図鑑 (畑井喜司雄・小川和夫監修), シマアジウイルス性神経壊死症, 235, 緑書房, 東京
- 11) Mori, K. et al. (1992), *Virology*, 187, 368-371
- 12) Tamaru, Y. et al. (2006), *Biotechnol. Prog.*, 22, 949-953

◀地域の先端研究▶

ブドウ接ぎ木苗の簡易生産技術の開発－
活着率向上や植え傷みの防止にも有効島根県農業技術センター
山本 孝司・中尾 知樹

簡単にブドウ接ぎ木苗を育成する方法を開発した。その方法は、台木と穂木に切り込みをいれてかみ合わせ、その後、全体にパラフィルムを巻いて十分に吸水させたロックウールにさし木を行う。さし木したロックウールが乾燥しないように適宜かん水を行い、新根がロックウールから出てきたら苗木圃場に定植する。苗の植え傷みもなく、定植後の活着率は100%である。

1. はじめに

島根県のブドウ栽培は、デラウェアの加温栽培が中心であり、連続して加温を行っているため、樹勢衰弱しやすく紋羽病などによる枯損樹の発生も多い。そのため、棚面の空いた園が多く、反収も低下してきている。そこで、この対策として補植や改植・新植による早期成園化を目指した10a当たり40～60本植えの密植栽培を進めている。ところが、同じデラウェアの品種であっても、購入苗木の中には、花振るいしやすい樹、果粒肥大や着色の悪い樹が混入している場合があり、10aの園ですべて高品質生産樹に揃えるのは難しい。この課題を解決するには、自分で接ぎ木苗木を作ればよいが、休眠枝を用いた接ぎさし木育苗法は、電熱温床の準備など多くの作業がありなかなか個人で行うには難しい(図1)。そこで、パラフィルムとロックウールを用いた簡易な接ぎさし木育苗法を開発したので紹介する。



図1 苗木業者は、電熱温床を準備し、大量に苗木育成を行う。

樹から採取するため、予め印を付けて決めておく。これらの台木・穂木は、落葉直後から12月上旬頃に当年枝を採取し、一昼夜水に浸して水を含ませてから冷暗所で貯蔵するが、過湿、過乾、高温、凍結させないように注意する。採取する台木・穂木の量が少なければ、50cm程度の長さに切ってビニール袋に入れ家庭用の冷蔵庫で貯蔵しておいてもよい。

2. 接ぎさし木育苗法

1) 台木、接ぎ穂の採取と貯蔵

まず、ウイルスフリーの良質な台木を自園で育成しておく。また、接ぎ穂は、自園の高品質 YAMAMOTO Kouji, NAKAO Tomoki
〒693-0035 島根県出雲市芦渡町2440

2) 接ぎ木の時期

2月から6月まで接ぎ木時期を変えてみたが、いずれの時期とも接ぎ木活着率は80%以上であり、早い時期から接ぎ木を行えば発芽・発根も早まり、接ぎ木当年の成長もよい。特に、発芽・発根を早めるには、加温を行っているハウスに入れておくとよい。

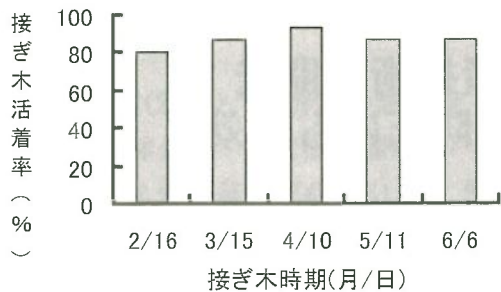


図2 接ぎ木時期が活着率に及ぼす影響(2006)

注) 台木は5BB, 穂木はデラウェア台木・穂木とも5℃の冷蔵庫で保存しておいたものを各時期に利用した。

3) 接ぎ木の方法

接ぎ木は、台木、穂木、剪定鋏、小刀、7.5cm角のロックウール、パラフィルム、さした苗を入れておくパットやコンテナを準備し、以下のような手順で行う。

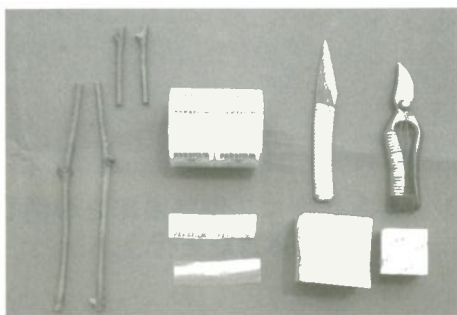


図3 接ぎさし木に準備するもの

①まず、最初に、貯蔵しておいた台木、穂木を冷暗所から取り出し調整を行う。台木は2芽以上25cm程度で切るが、この際、基部は必ず節の直下で切り、台芽は剪定鋏や小刀で取り除いておく。穂木は長さ8cm程度で1芽残して、芽の上2cm程度残して切る。このように調整を行っておくと後の作業をスムーズに進めることができる。なお、この際、台木・穂木とも乾燥しないように注意する。

②次に、図4に示すように台木・穂木とも斜めにまっすぐ切る。そして、図5、6に示すように、台木・穂木とも切面頂部の2mm程度入った位置から縦に真っ直ぐ1.5cm程度切り込みを入れる。



図4 台木、穂木とも斜めに真っ直ぐ切る。

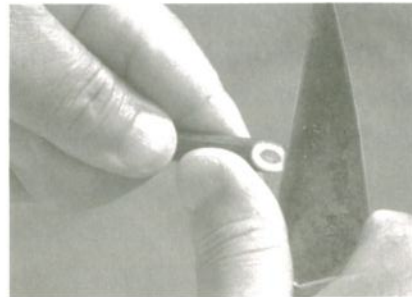


図5 台木・穂木とも切面頂部から縦に切り込みを入れる。



図6 切面頂部から1.5cm程度切り込みを入れる。

③次に、図7、8のように台木と穂木をかみ合わせるように接ぎ穂を差し込む。この際、お互いの形成層をきっちりと密着させることが大切であり、そのためには予め太さの等しいものどうしを選ぶようにする。なお、太さが違う場合には、片方の形成層を合わせるようにする。

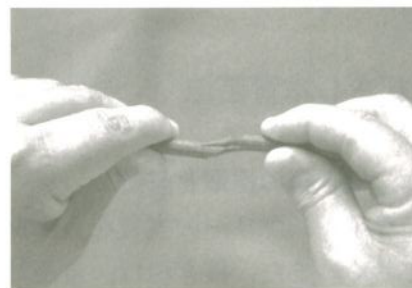


図7 台木、穂木とも互いの形成層を合わせるように差し込む。

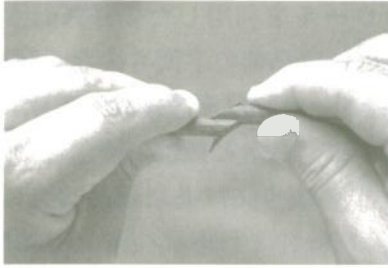


図8 隙間が出来ないように真っ直ぐに切れば、台木・穂木部分ともぴったり合う。

④次に、図9、10に示すように接ぎ木部より下10cm程度の台木部から穂木部の先端までパラフィルム（幅2.5cm、長さ10cm）を伸ばしながら芽も包み混んで隙間ができないように完全に巻き付ける。10cmのパラフィルムなら60cm程度まで伸ばすことが可能で、最後に結ばなくてもほどけることはない。パラフィルムを巻き終わったさし穂は、すべて接ぎ木が終わるまで水を入れたバケツに台木基部を浸けておく。

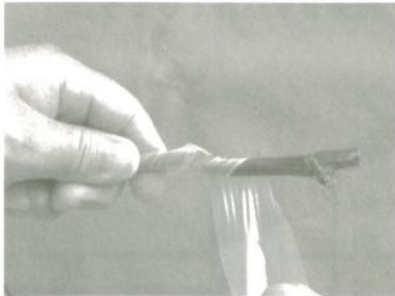


図9 接ぎ木部より下10cm程度の所からパラフィルムを伸ばしながら巻き付ける。

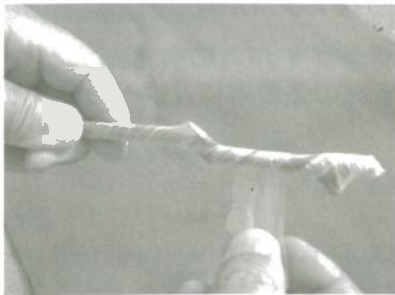


図10 芽も包み込んで隙間が出来ないようにすべて巻き付ける。

⑤次に、図11に示すように7.5cm角のロックウールにさし木を行うが、ロックウールは予め十分に水を吸わせておく。台木をさす深さは、図12のようにロックウールの底部から1cm程度

上がよいと考えられる。なお、使用するロックウールの大きさとしては、5cm角や10cm角のものでも良いが、5cm角のものは転びやすく、10cm角のものは新根がなかなか確認しにくい。

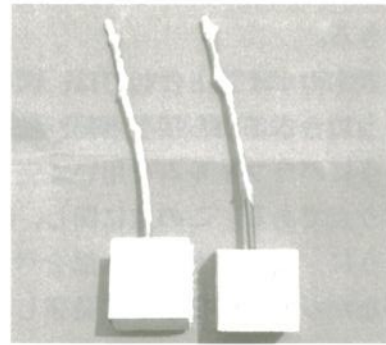


図11 接ぎさし穂は、十分に吸水させたロックウールにさし木する。

⑥すべて、ロックウールにさし木した苗は、1cm程度水をためたパットやコンテナなどを利用した水槽に入れて、その後、水がなくならないように管理を行い、新根が確認できるようになったら、育苗圃や本圃に定植する。なお、水槽の置き場所としては、上述したように早く発根させたいなら、ハウス内に入れておくのがよい。

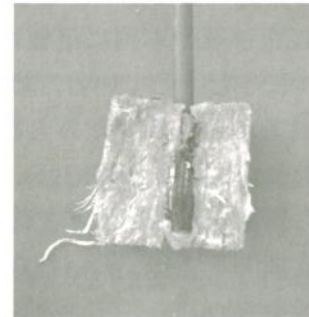


図12 さし穂は、ロックウール底部1cm程度までさす。



図13 ロックウールにさした接ぎ穂は、パットなどの水槽に入れる。

3. 簡易接ぎ木法のポイント

この接ぎさし木法は、従来から行われている電熱温床やおがくずを使用したさし木床の準備の必要もなく、上述したように簡単に取り組むことができる。

この接ぎ木のポイントとしては、図9、10に示したように台木部から接ぎ木部、穂木部が乾かないようにパラフィルムを用いて完全に被覆してしまう点である。この点に関し、図14、15に示すように、台木部から穂木部をパラフィルムで巻かなかったものはすべて発芽しないで枯れてしまった。

この原因としては、接ぎ木部から穂木部がむきだしのままであり乾燥したためと考えられた。パラフィルムは、実験用の資材でビーカーの口を覆ったりする時に用いるが、10cm幅で38m巻きが2,300円程度と安く、伸びがよく、最後に結ぶ手間もいらないため利用しやすい。

ロックウールにさした接ぎさし木苗は、外気温や水温によって異なるが1か月程度するとパラフィルムを突きぬけて発芽し、葉が4、5枚展開してくると発根してくる。そして、さし木2か月後頃に育苗圃や本圃に定植可能となる。ロックウールにさし木しているため、定植にあたって枯れることも根いたみもない。一方、従来から行われている育苗法では、接ぎ木苗を伏せた箱から苗木を取り出すときに断根しやすく育苗圃に定植する場合、根いたみを起こし活着率も低下しやすい。

ロックウールを利用した接ぎさし木育苗は、個人で行うには準備の手間も少なく簡単に行うことができる。しかし、失敗しないためには上述したように、台木と穂木の接ぎ合わせ部に隙間ができないようにすることがポイントである。



図14 台木、穂木部ともパラフィルムを巻かなかった接ぎ穂（左側）は、発芽せず枯れてしまう。

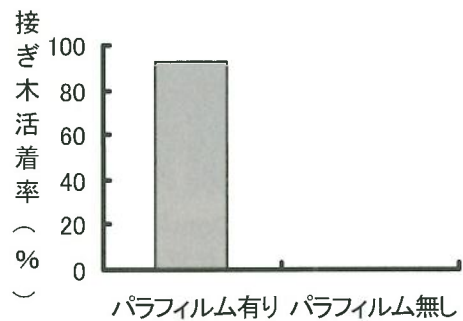


図15 パラフィルムの有無がデラウェア接ぎ穂の活着率に及ぼす影響 (2006. 4)

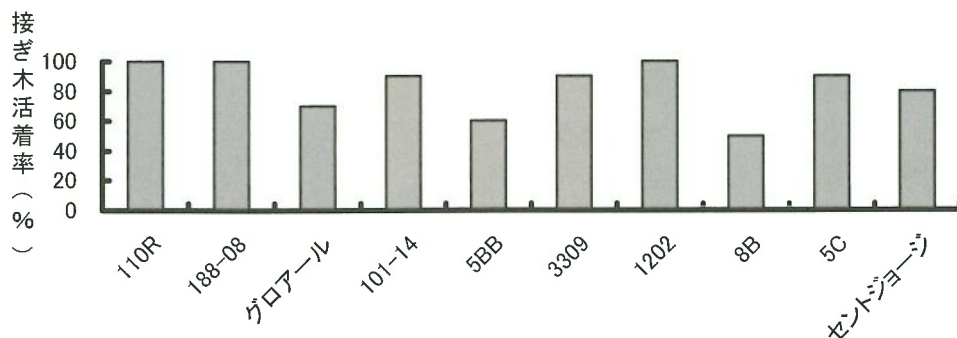


図16 台木品種がデラウェア接ぎ穂の活着率に及ぼす影響 (2007. 3)

4. 今後の課題

図16は、デラウェアを穂木として台木品種別の接ぎ木活着率を調査した結果である。接ぎ木活着率の高い品種は、110Rや188-08、1202が100%であり、低い品種は8Bが50%、5BBが60%、グロアール70%であった。この活着率の違いは、台木品種特性の違いによるものか、貯蔵養分量の差によるものか今後検討が必要であ

る。

また、もっと簡単に行うことが可能な接ぎ木法についても検討が必要である。

文 献

- 1) 大野正夫 (1977), 図解 果樹の接木挿木と高接更新, 第2版, 155-171, 博友社



ブレインテクノニュース
バックナンバーのご案内
第124号
2007年11月15日発行

総 説

ミツバチゲノムの解読完了と今後の展望
.....門脇 辰彦・木村 澄

総説関連情報

ミツバチゲノム解析と養蜂への応用—抗菌ペプチドの
理解とその応用—.....芳山 三喜雄・木村 澄

国内情報

コールドチェーンフリー経口ワクチンとしてのワクチン発現
米の開発
.....幸 義和・野地 智法・高木 英典・高岩 文雄・
増村 威宏・田中 國介・清野 宏
植物バイオマスへの¹³C代謝・分解過程の追跡—高分解能マジ
ック角回転 (hr-MAS) 法によるアプローチ

.....菊地 淳・森 哲哉・雪 真弘・西原 崇・
佐藤 一・甲野 裕之

超音波を利用した動物細胞への核酸導入技術の開発

.....根岸 洋一・遠藤 葉子・鈴木 亮・滝澤 知子
・山本 松男・丸山 一雄・新禎 幸彦

マルカメムシがダイズ上で繁殖できる能力を腸内共生細菌が規
定する.....深津 武馬・細川 貴弘

乗用型トラクタの安全キャブ・フレームの効果とシートベルト
の使用実態に関する農業者調査結果

.....富田 宗樹・水上 智道・高橋 正光・塚本 茂善

地域の先端研究

北海道産サケの品質等級判別システムの開発.....宮崎 俊之

文献情報

二母性胚由来マウスの高率生産.....(抄訳: 下司 雅也)

受容体様キナーゼFERONIAは花粉管を胚珠が受け入れる際の
雌雄相互作用を取り持つ.....(抄訳: 久保山 勉)

末端にシアル酸が付加された糖タンパク質を生産する酵母
.....(抄訳: 平野 拓也)

ニジマスの視床下部, 菱脳, ブロックマン体にはグルコセナー
ーが存在している.....(抄訳: 川中子 誠)

◀文献情報▶

体細胞核の初期化能力を持つウシ卵子には23kDaのPhosphorylated Transcriptionally Controlled Tumor Protein (リン酸化TCTP) が存在する

Bovine Oocytes with the Potential to Reprogram Somatic Cell Nuclei Have a Unique 23-kDa Protein, Phosphorylated Transcriptionally Controlled Tumor Protein (TCTP).

Tetsuya TANI¹, Hiroaki SHIMADA², Yoko KATO¹, and Yukio TSUNODA¹.

¹Laboratory of Animal Reproduction, College of Agriculture, Kinki University, Nara, Nara, Japan.

²Mie Prefecture Science and Technology Promotion Center, Livestock Division, Mie, Japan.

Cloning And Stem Cells, 9(2), 267-280, 2007

成体体細胞由来の最初のクローン家畜は、1997年にwilmurらにより羊において作出された。体細胞クローン動物は、一般的には、G0/G1期の体細胞核を除核卵子に融合させ、活性化刺激後に体外で培養し、発情を同期化した受胎動物へ胚移植することにより作出される。これまで、種々の動物種においてクローン動物が生産されているが、その作出効率は低く、妊娠中期から後期にかけての流産、生後直死、あるいは形態的な異常が、しばしば観察されている。クローン動物作出における作出効率の低さと異常発生の原因については十分には解明されていないが、卵子に導入した体細胞核の不適切な初期化が原因のひとつと考えられており、体細胞クローン胚におけるメチル化状態の異常が報告されている。しかし、卵子に導入した体細胞核の初期化に関与する卵子内の因子については明らかではなかった。本論文においては、ウシ卵子中の初期化因子の同定、初期化能力の決定、体細胞核移植胚の正常産子への発育への初期化因子の効果についての検討が行われてい

る。まず、イオノマイシンとシクロヘキシミドによる活性化刺激後3から5時間、あるいはイオノマイシンと6-DMAPで3時間処理した卵子中で認められる23kDaのタンパクが体細胞核の初期化能力を持ち、この因子は、GV期では認められないが、GVBD期の除核卵子では認められることが明らかとなった。そこで、20,000個の減数分裂第2分裂中期の卵子からタンパクを抽出し、2次元電気泳動により23kDaのスポットについてアミノ酸配列を決定したところ、ヒトのPhosphorylated Transcriptionally Controlled Tumor Protein (リン酸化TCTP)であった。卵核胞期の卵子にTCTPの二本鎖RNA(dsRNA)を注入すると核移植卵の胚盤胞期への発生能力が低下するものの、体外受精卵の胚盤胞期への発生能力は低下しなかったことから、リン酸化TCTPは、体細胞核の初期化の第1ステップを促進すると考察されている。さらに、あらかじめリン酸化TCTPペプチドを導入した卵丘細胞を用いた体細胞核移植卵由来の胚盤胞期胚の移植により、受胎牛の受胎率の向上(47%)と、流産率の低下(13%)が認められた。さらに、分娩後7頭すべてが少なくとも1ヵ月令まで生存し、形態的な異常も認められなかった。以上の結果から、ドナー細胞をリン酸化TCTPペプチドで前処理することにより、ウシ体細胞核移植における正常クローン産子への発生能を高めることが明らかとなった。

ドリーの誕生以来、数多くのクローン動物が生産されているが、その作出効率の低さが問題となっている。今回報告されたリン酸化TCTPの利用により、体細胞核移植時の核の初期化が正常化すれば、体細胞クローン動物の作出効率が飛躍的に向上する可能性がある。しかしながら、著者らも述べているように、クローン動物作出へのリン酸化TCTPの利用を普及させるためには、由来の異なる種々のドナー細胞を用いた大規模な移植試験の実施が必要である。

(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▶

ブドウのゲノム塩基配列から見えてきた被子植物門で過去に生じた6倍体化

The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla
The French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization
Nature Vol.449 : 463-468, 27 September 2007

シロイヌナズナのゲノム塩基配列解読により、これまで遺伝学的には2倍体であると考えられていたものが実は過去に染色体数の倍加を何回か経験したことが明らかになった。これらの倍数化は種の適応と分散や生物の持つ機能の変化など植物の進化に対して大きな影響を持たらしたと思われる。この論文ではブドウの精度の良いゲノム概要配列について報告している。ゲノム概要配列が解読されたのは植物では4番目、木本性の植物では2番目、果物では最初の報告となる。

ブドウの品種は遺伝子がヘテロ接合である割合が高い。そのため、著者らは品種Pinot Noirから得られたホモ接合度を高めた系統PN40024を用いて全ゲノムショットガンシーケンス法を行った。全部で620万回配列を読み、ブドウゲノムの8.4倍の塩基配列を解読した。得られた配列のうち316のスーパーコンティグとなる11.6Mbは対立遺伝子の違いを反映したもので、PN40024のうち7%がヘテロ接合であるというデータと合致していた。PN40024ゲノム全体の配列をつなぎ合わせると、19,577のコンティグ ($N_{50}=65.9\text{kb}$)、3514のスーパーコンティグ ($N_{50}=2.07\text{Mb}$) からなる487Mbの配列が得られた。これは、これまでに報告されていた475Mbpという推定値に近い値であった。409の連鎖地図上のマーカーを用いて487Mbのうちの69%の配列が19の連鎖群と対応づけられた。この配列には30,434個のタンパク質をコードする遺伝子が含まれており、同じ程度のゲノムサイズ (485Mb) を持つポプラ (45,555個) より少なく、389Mbのイネ (37,544個) よりも少なかった。ブドウゲノムは41.4%の繰り返し配列やトランスポゾンを含んでおり、繰り返し配列や

トランスポゾンが多いところでは遺伝子が少なくなるという関係が見られた。ブドウゲノムにはワインの性質に関係するタンパク質をコードする遺伝子のコピー数がこれまでに塩基配列が解読された植物に比べて高くなっているという特徴が見られた。赤ワインに含まれる健康に良い効果を持つ可能性が示されているレスベラトールの合成に必要なステルベン合成遺伝子は43の遺伝子が存在し、そのうち20は実際に発現が確認された。樹脂、芳香性の油、芳香の主要な構成成分であるテルペノイド合成に関わるテルペン合成遺伝子は、シロイヌナズナやイネで30から40個程度なのに対してブドウでは89個の遺伝子と27個の偽遺伝子が含まれていた。モノテルペン合成の基質を生産するゲラニル二リン酸合成酵素についても、ホモ二量体を作るタイプとヘテロ二量体を作るタイプの遺伝子が含まれていた。後者は大量のモノテルペンを生産するミントや *Clarkia breweri* などのような植物でしか見られないタイプである。

倍数化は植物の進化においてよく見られる現象であるため、著者らはタンパク質の相同性を用いてブドウゲノムの中で相同な領域の探索を行った。その結果、ブドウの遺伝子の大部分はそれ自身とは別に2つの相同遺伝子を持っていることが明らかになった。そのため、現在のブドウのゲノムは3つの異なる祖先に由来するゲノムを持ち、6倍性の植物を起源としておりと考えられる。著者らは、この6倍性となった時期をこれまでにゲノム塩基配列の明らかになっている植物の情報をを用いて検討した。その結果、6倍性としての特徴はブドウと同じ真正バラ類Ⅰに属するポプラや真正バラ類Ⅱに属するシロイヌナズナでは見られるが単子葉類イネでは見られない結果となった。このことから、1億3千万年前～2億4千万年前に双子葉植物が単子葉植物と分岐した後、バラ類が分岐するまでの間に6倍性化が生じたと考えられる。今後、ナス科や原始的な双子葉植物のゲノム塩基配列が明らかになれば、6倍性のより詳細な解析に役立つであろう。

(抄訳：久保山勉, KUBOYAMA Tsutomu, 茨城大学農学部)

◀文献情報▶

共生細菌はROS産生を介してcullin
依存性のシグナル伝達を調節するCommensal bacteria modulate cullin-dependent
signaling via generation of reactive oxygen
speciesKumar A, Wu H, Collier-Hyams LS, Hansen JM,
Li T, Yamoah K, Pan ZQ, Jones DP, Neish AS.
Epithelial Pathobiology Unit, Department of
Pathology and Laboratory Medicine, Emory
University, Atlanta, GA, USA.*EMBO Journal*, 26, 4457-4466 (2007)

ヒトの腸内に細菌が侵入すると、それを排除するために炎症性の免疫反応が生ずる。一方で、ヒト腸内に生息する多くの微生物により腸内フローラが形成されている。このように、腸内細菌が免疫学的寛容を獲得することは過剰な免疫反応を防ぐ観点から宿主にとっても非常に重要な現象であるが、そのメカニズムについては現在まで明らかになっていない。著者らのグループは、ヒト感染性を有するサルモネラ菌は腸上皮細胞との相互作用を通して炎症反応を惹起するが、非感染性のサルモネラ菌はI κ Bのユビキチン化を阻害することによってNF- κ Bの核移行を抑制し、炎症反応を抑えることを明らかにした。さらに、このユビキチン化阻害はE3-SCF ^{β -TrCP}ユビキチンリガーゼの一部であるcullin-1のNEDD8化抑制により生じることが示されている。しかし、微生物と上皮細胞の相互作用においてどのような経路でNEDD8化が抑制されるのか未だ明らかになっていない。近年、ショウジョウバエの上皮細胞系はホメオスタシス維持のために共生細菌により誘導される過酸化水素を必要とすること、さらに植物においてはROS (Reactive Oxygen Species) を感染細菌や共生生物との相互作用シグナルとして利用していることが明らかとなっている。哺乳類細胞においてもROSはセカンドメッセンジャーとして利用されており、NEDD8と類似性の高いSUMOの付加は過酸化水素により抑制されるとの報告があることから、NEDD8化の抑制にもROSが関与している可能性が示唆されていた。

筆者らは何種類かの腸内細菌をそれぞれヒト腸上皮細胞に作用させ、細胞内の酸化度を測定することによ

り細胞内で産生されるROSについて比較検討した。その結果、*Lactobacillus rhamnosus*を作用させた場合に最も多くのROS産生が確認され、この現象は同菌を投与したマウスの腸上皮細胞でも同様に観察された。また細胞を過酸化水素処理しても乳酸菌で処理した時と同様にNF- κ Bの核移行やI κ Bのユビキチン化、Cullin-1のNEDD8化が阻害されることが明らかとなった。さらに、このNEDD8化阻害は抗酸化剤の作用により抑制されたことから、ROSがCullin-1のNEDD8化阻害に関与していることが示唆された。

それではなぜROSによりCullin-1のNEDD8化が阻害されるのだろうか？この問いに答えるに当たって、筆者らはNEDD8化経路に着目した。NEDD8の基質に対する共有結合反応はユビキチン系に類似したE1様酵素およびE2様酵素によって触媒される。NEDD8はE2ファミリータンパク質であるUbc12のシステイン残基とチオエステル結合した後、E3の働きにより基質タンパク質と結合する。一方で、システインのスルファニル基はROSとの反応性を有し、その酸化により細胞内の還元状態を維持している。これら知見から、NEDD8とUbc12間のチオエステル結合の生成がROSにより阻害される可能性が考えられた。そこで、細胞を過酸化水素処理したところ、野生型Ubc12のNEDD8化が濃度依存的に阻害された。さらに、この阻害は変異型Ubc12 (C111A) では観察されなかったことから、ROSによるUbc12の111番目のシステイン残基の酸化を通してNEDD8とのチオエステル結合が阻害されたと考えられた。この現象は乳酸菌で細胞を処理した時、および乳酸菌を採取したマウスの腸上皮細胞においても観察された。これらの知見から、乳酸菌など腸内細菌と宿主細胞との相互作用により発生したROSがNEDD8とUbc12の結合を直接阻害することにより、cullin-1のユビキチン化が抑制されNF- κ B経路の亢進を抑えることが過剰な免疫反応の抑制に関与するものと考えられる。

この現象はプロバイオティクスの抗炎症作用にも関係している可能性があり、このような知見の収集が新たなプロバイオティクス開発に資するものと考えられる。

(抄訳：安田源太郎, YASUDA Gentaro, カルピス株式会社 健康・機能性食品開発研究所)

◀文献情報▶

スズメバチの作る絹糸タンパク質
の特徴的な一次構造Identification of Four Major Hornet Silk Genes
with a Complex of Alanine-Rich and Serine-
Rich Sequences in *Vespa simillima xanthoptera* CameronHideki SEZUTSU¹⁾, Hideyuki KAJIWARA¹⁾,
Katsura KOJIMA¹⁾, Kazuei MITA¹⁾,
Toshiki TAMURA¹⁾, Yasushi TAMADA¹⁾
and Tsunenori KAMEDA¹⁾National institute of Agrobiological Science,
Tsukuba, Ibaraki 306-8634, Japan*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol.71, 2725-
2734 (2007)

夏から秋にかけて話題に上るスズメバチは、危険な害虫としてのイメージが定着している。しかし、彼らの作る巣の中には有効なバイオ新素材の可能性が秘められている。農業生物資源研の亀田博士らの研究グループではスズメバチの作る絹糸、「ホーネットシルク」に着目し研究をはじめた。ホーネットシルクは、ハチの幼虫が成長し、蛹となる時に、巣穴の口の部分を覆う蓋の部分を指す。筆者らはこの幼虫の分泌腺の遺伝子発現とホーネットシルクの性状と観点からこの新しい新素材の検討を行っている。

ホーネットシルクはSDS-PAGEにより4つのタンパク質に分けられる (*Vespa simillima xanthoptera* Cameron Silk : Vssilk1~4)。これらタンパク質の腺細胞での遺伝子発現をEST解析により検討したところ、cDNAライブラリーの3,443配列の中で10%以上がVssilkに関するものであり、その中のVssilk1をコードする遺伝子が最も発現している知見が得られた。このような発現様式で生産されるホーネットシルクを、検討で得られた1次構造情報とタンパク質性状を合わせ、機能面の予測解析を行っている。

カイコやクモの絹糸タンパク質は、素材としての観点から多くの研究が行われている。カイコの場合、それがフィブロインとセリシンから構成され、フィブロインが繊維状構造を担うタ

ンパク質であることが知られている。クモの糸と合わせ、フィブロインは配列内に (poly) Alaモチーフを持つことが知られ、この部分が糸の強度や弾性に働いていることが示されてきた。一方、セリシンは高いSer含量に裏打ちされたタンパク質である。この両者が共同的に働くことで絹糸タンパク質の機能を全うしている。対して、一連の解析から、ホーネットシルク : Vssilk1~4の一次構造には、配列のNおよびC末端にSer-rich領域が存在し、配列中央部分にAla-rich領域が存在することが示された。このことは、ホーネットシルクがフィブロインとセリシンの特徴の両面を持つタンパク質であることを示唆している。

筆者らはさらにAla残基とSer残基に着目し、彼らの知見のホーネットシルクのC¹³ NMRでの解析結果を踏まえ、 α ヘリックス、 β シート構造のディスカッションを行っている。Ala残基は α ヘリックスの、Ser残基は β シート構造の安定化に寄与する残基であり、これらが配列の中央部と末端に存在しているホーネットシルクは、既知のカイコやクモの絹糸タンパク質と異なる様式で構造を安定化している可能性を論じている。

また、カイコやクモの絹糸と強度、弾性などの物性について比較した場合、ホーネットシルクは、強度が劣ることが示されている。前2者は、個体の生残や餌の捕捉など、生存に必須な能力であり強度を必要とする。一方、後者のホーネットシルクは巣の中で成熟を待つ間、外との隔絶環境を保つことに重きを置くため、強度が必ずしも必要でない。絹糸タンパク質の物性が、生物の生態に由来するという興味深い考察を行っていた。

このようなバイオ新素材は繊維産業への貢献のほか、生体医療材料、機能性材料の分野で注目される存在である。農林水産の分野では、このような未利用、あるいは新規素材の開拓の可能性はまだ内在しているものと考えられる。(抄訳：漆田洋平, URUSHIDA Youhei, 日本水産株式会社 中央研究所)

生研センターからのご案内

平成19年度 研究成果発表会の開催について（予告）

生物系特定産業技術研究支援センターでは、現在実施している課題のうち、平成19年度で終了する「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」の12課題と「生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業」の9課題の成果発表会を開催いたします。

入場無料で、どなたでもご参加いただけますので、多数の皆様のご来場をお待ちしております。

開催日：平成20年3月5日（水）～7（金）

場 所：東京国際フォーラム（ホールD7）

[東京都千代田区丸の内3-5-1]

入場無料

なお、プログラムや発表課題等の詳細については、平成20年2月中に生研センターのホームページに掲載するほか、パンフレットやポスターでご案内いたします。

問合せ先：基礎研究課 E-mail kisoken@ml.affrc.go.jp
TEL:03-3459-6569 FAX:03-3459-6594

技術開発課 E-mail kaihatsu@ml.affrc.go.jp
TEL:03-3459-6567 FAX:03-3459-6577

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

編集後記

2008年最初のブレインテクノニュースをお届けします。本年もよろしくお願いたします。

さて、本号の総説では、世界で初めて発見された誘導抵抗性に関するイネの転写因子WRKY45について高辻博志氏（農業生物資源研究所）に、そのメカニズムや実用利用の可能性も含め解説して戴きました。複数のイネ病害に対する抵抗性の付与やイネ科の他作物への応用等、今後の研究の展開が期待されます。

その他の研究情報としては、世良貴史氏（京都大学）に人工タンパク質を組み込んだウイルス耐性植物の創出、脇山素明氏（理化学研究所）らにmicroRNAによるタンパク質合成の制御機構、松浦健二氏（岡山大学）にシロアリの卵保護行動と卵認識フェロモン、菊地和弘氏（農業生物資源研究所）らに超低温保存した体外受精卵の借り腹の雌豚への移植と子豚誕生、家戸敬太郎氏（近畿大学）らに海産魚のウイルス性疾病を予防する経口ワクチン、山本孝司氏（島根県農業技術センター）らにブドウ接ぎ木苗の簡易生産技術について、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）、安田源太郎氏（カルピス（株））、漆田洋平氏（日本水産（株））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。

生研センター 業務のご案内

～研究開発を強力に支援いたします～

提案公募型の委託研究制度

- 民間企業の実用化段階の研究支援なら 民間実用化研究促進事業
- 基礎研究のご提案なら 新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業
- 異分野の共同研究や起業化を目指すなら 生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業

その他の支援制度

- 「共同研究先のあっせん」、「遺伝資源配布先のあっせん」などもお気軽にご相談下さい。

詳細は、生研センター企画部企画第1課までお問い合わせください。

ブレインテクノニュース 第125号

平成20年1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