

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成 21 年 9 月 15 日 (隔月 1 回 15 日 発行)

ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.135

15 SEPTEMBER, 2009

ブレインテクノニュース



異なる土壌に移植して三週間後の同齢のイネ
左：沖積土壌，右：石灰質アルカリ土壌

土壌からの鉄吸収に重要なイネの遺伝子の発見

¹東京大学大学院 農学生命科学研究科

²石川県立大学 生物資源工学研究所

板井 玲子¹・西澤 直子^{1,2}

目 次

総 説

- 土壌からの鉄吸収に重要なイネの遺伝子の発見 1
板井玲子¹・西澤直子^{1, 2} (¹東京大学大学院 農学生命科学研究科, ²石川県立大学
生物資源工学研究所)

国内情報

- チューリップ花卉からバイオプラスチック原料 6
加藤康夫 (富山県立大学工学部生物工学科)
- 液胞膜で機能するアルカロイド輸送タンパク質 11
伊藤慎悟・矢崎一史 (京都大学 生存圏研究所 森林圏遺伝子統御分野)
- 花粉管ガイダンス物質の同定と種間多様性 16
金岡雅浩・東山哲也 (名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻)
- 酸味を甘味に変える不思議なタンパク質ネオクリンの活性発現メカニズム 21
中島健一朗・古泉文子・朝倉富子・三坂巧・阿部啓子 (東京大学大学院
農学生命科学研究科 応用生命化学専攻)
- 植物病原菌の宿主感染・オルガネラ数の制御とオートファジー 25
阪井康能^{1, 3}・高野義孝² (京都大学大学院 農学研究科 ¹応用生命科学専攻・
²応用生物科学専攻, ³(独) 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業)
- 加工食品中のカビ毒オクラトキシンAとBを同時に高感度検出する技術の開発 31
川村理・佐々木絢子 (香川大学 農学部)
- 感水紙専用画像処理ソフトの開発 36
白井善彦¹・宮原佳彦¹・水上智道¹・林和信¹・中野和弘² (¹(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, ²新潟大学大学院 環境共生科学専攻)

地域の先端研究

- カキなどからのノロウイルス検出率の向上—細菌を利用した検体処理方法の改良— 40
秋場哲哉 (東京都健康安全研究センター 微生物部 ウイルス研究科)

文献情報

- ホルスタインフリージアン未経産牛あるいは経産牛の過剰排卵処置時の凍結融解性選別
X精子あるいは未選別精液の人工授精による胚生産 44
J. Peippo et al. (*Animal Reproduction Science*, 111, 80–92, 2009) 抄訳: 下司雅也
- シロイヌナズナ発達途中の胚乳におけるPolIV依存型siRNAの片親性発現 45
R. A. Mosher et al. (*Nature*, 460, 283-286, 2009) 抄訳: 高田美信
- 微生物による環境変化の適応的予測 46
A. Mitchell et al. (*Nature*, 460, 220-224, 2009) 抄訳: 若井丈人
- 魚肉すり身やかまぼこに対する筋形質タンパク質の機能性評価 48
A. Jafarpour et al. (*J Food Sci.* 74, N16-22., 2009) 抄訳: 久保田光俊

生研センターからのご案内

- 「民間実用化研究促進事業」に係る平成21年度新規課題の公募(二次募集)について 49
- アグリビジネス創出フェア開催のお知らせ 50
- 地域版アグリビジネス創出フェア開催案内 51

表紙の説明

農作物が鉄欠乏になることは、収量・品質の低下を招く農業生産上の大きな問題となっている。写真は、石灰質アルカリ土壌と沖積土壌で育てたイネである。沖積土壌のイネ(左)が緑葉で健康に生育しているのに対し、石灰質アルカリ土壌のイネ(右)は葉の多くが黄色く、生長が遅れていることがわかる。この後者のイネは最終的に枯死した。本論文では植物の鉄吸収機構を概説し、イネ科植物の鉄吸収に関わる遺伝子群の同定の過程を紹介する。詳細については1頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

土壌からの鉄吸収に重要なイネの遺伝子の発見

¹ 東京大学大学院 農学生命科学研究科² 石川県立大学 生物資源工学研究所板井 玲子¹・西澤 直子^{1, 2}

鉄は動物にも植物にも必須な元素である。ヒトが摂取する鉄の多くは、植物が土壌から吸収したものに由来する。土壌からの鉄吸収と他の必須金属(亜鉛, マンガン, 銅)や有害重金属(カドミウムなど)の吸収は完全に独立しては行われないので、植物の鉄ホメオスタシスの実体は非常に複雑である。ここでは植物の鉄吸収機構の基礎と、イネ科植物の鉄吸収に関わる遺伝子群の同定の過程を紹介する。

1. はじめに

鉄は植物の必須微量元素の中では一番多く必要で、酸化還元反応, 電子伝達反応, 酸素の運搬など多くの生物機能・生体反応に利用される。クロロフィルの生合成に鉄イオンが必要なことから、植物の鉄欠乏症状は葉色の黄白化というクロロフィル不足として現れる。鉄は地殻中の元素として4番目に存在量が多いが、好気的な条件では $\text{Fe}(\text{OH})_3$ などの難溶態となっているために、イオンとして溶け出す量は非常にわずかである。特に中性からアルカリ性の土壌中では、 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ は土壌溶液中にほとんど溶けない。このような鉄の利用性の低い石灰質アルカリ土壌は、ヨーロッパ, 中国, 北アメリカなどに広く存在する。図1に、石灰質アルカリ土壌と沖積土壌で育てたイネの写真を示した。同時期に播種したイネの幼植物をこれらの土壌に移植してしばらくすると、生長に大きな差が現れる。沖積土壌のイネが健康に生育しているのに対し、石灰質アルカリ土壌のイネは葉の多くが黄色く、

生長が遅いことがわかる。このように、農作物が鉄欠乏になることは、収量・品質の低下を招く農業生産上の大きな問題となっている。



図1 異なる土壌に移植して3週間後の同齢のイネ

左：沖積土壌, 右：石灰質アルカリ土壌

高等植物における鉄吸収機構のモデルは1986年に提唱され、還元力による機構(Strategy I)と鉄キレート物質を用いる機構(Strategy II)とに大別された。鍵になる遺伝子がほぼ単離された今日では、鉄吸収機構そのものから、吸収後の鉄の体内動態や鉄関連遺伝子の発現制御の解明などへと研究が広がっ

ITAI Reiko¹, NISHIZAWA Naoko^{1,2}

¹〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

²〒921-8836 石川県石川郡野々市町末松

1丁目308番地

ている。本稿では、高等植物の鉄吸収機構について概説し、イネ科植物において鉄吸収に関わる種々の遺伝子の発見について紹介する。

2. Strategy I

Strategy Iは双子葉植物とイネ科以外の単子葉植物が持つ鉄吸収機構で、 Fe^{2+} イオンの形態で鉄を吸収する(図2A)¹⁾。土壌中の鉄は三価鉄キレート還元酵素 FROにより Fe^{2+} イオンに還元された後、近傍に存在する二価鉄トランスポーターIRTによって吸収される。 H^+ -ATPaseにより放出された H^+ は、根圏のpHを低下させることにより可溶化鉄を増やし、またFROの働きを高める。植物はさらに、フェノール性化合物を分泌することによっても根圏に可溶化鉄を増やす。 H^+ -ATPase、FRO、IRTの活性やフェノール性化合物の生合成は、鉄欠乏ストレスにより上昇する。シロイヌナズナやトマトで単離されたFRO、IRT両遺伝子の発現は鉄欠乏により誘導される。

3. Strategy II

3-1. 鉄吸収機構

Strategy IIはイネ科植物に特有な、鉄キレート物質を利用した機構である(図2B)。Strategy II植物では、 Fe^{III} キレーターのムギネ酸(MA)類が根で合成され、分泌トランスポーターを介して根圏へと分泌される。分泌されたMA類は難溶態三価鉄を可溶化し、 Fe^{III} -MA類複合体として根細胞膜の吸収トランスポーターYS1により体内へと取り込まれる。鉄欠乏ストレス下ではMA類の合成、分泌が飛躍的に増加し、 Fe^{III} -MA類複合体の吸収活性も上昇する。

3-2. MA類の生合成経路と酵素遺伝子の単離

MA類の生合成はメチオニン(Met)を出発物質として行われる(図3)。3分子のS-アデ

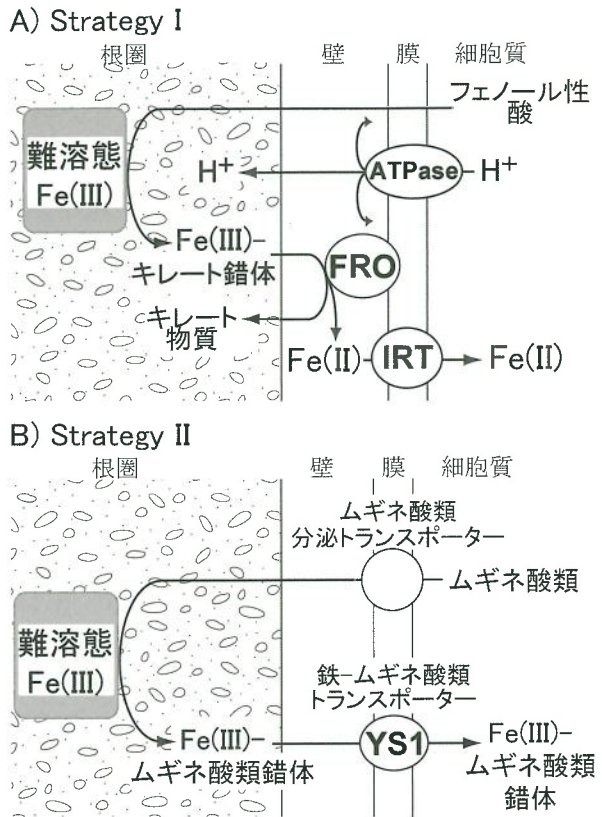


図2 高等植物の鉄吸収機構のモデル

ノシルメチオニン(SAM)のアミノブチレイト基がニコチアナミン合成酵素(NAS)により重合され、1ステップで1分子のニコチアナミン(NA)となる。NAはNAアミノ基転移酵素(NAAT)により3"-オキシ体に変換された後、2'-デオキシムギネ酸合成酵素(DMAS)により2'-デオキシムギネ酸(DMA)となる。さらにオオムギでは、DMAの2'位と3位がMA類水酸化酵素(IDS2, IDS3)により水酸化されて種々のMA類が合成される。これまでに同定されたMA類は9種あるが、図にはその一部を示した。イネ科作物の中では、オオムギは鉄欠乏耐性で、イネは特に鉄欠乏感受性である。オオムギはDMAをはじめとして複数の類縁体を多量に分泌できるのに対し、イネはDMAを主に分泌し、その分泌量も少ない。

各合成酵素遺伝子の同定は、様々な手法で行われた。NASとNAATは鉄欠乏オオムギ根からのタンパク質精製、部分アミノ酸配列の決定を経て遺伝子単離に至った^{2, 3)}。DMAS

遺伝子は、イネのマイクロアレイ解析において鉄欠乏条件下で発現上昇が著しい NAD(P)H 依存型還元酵素遺伝子として見出され、そのタンパク質の酵素活性が *in vitro* で確認された⁴⁾。ディファレンシャルスクリーニングによりオオムギから単離された *IDS2* と *IDS3* 遺伝子は互いによく似たジオキシゲナーゼをコードする。DMA を分泌するイネに、*IDS3* 遺伝子を導入することによりイネが DMA に加えて MA を分泌するようになったことから、*IDS3* の DMA 水酸化酵素活性が *in vivo* で証明された⁵⁾。*IDS2* は *IDS3* との相同性と、コムギへのオオムギ染色体添加系統の解析により、MA 類の 3 位の水酸化酵素であることが示された⁶⁾。オオムギでもイネでも、MA 類の合成酵素遺伝子群と後述のメチオニン回路に關与する酵素遺伝子群はすべて鉄欠乏誘導性であるが、これらの遺伝子がオオムギでは主に根でのみ誘導されるのに対し、イネでは全身で誘導される。

3-3. MA 類合成を支えるメチオニン回路

鉄欠乏ストレスにより MA 類合成は飛躍的に増加するが、それは原料のメチオニンが安定的に供給されることを示している。エチレン生合成経路としてリングで発見されたメチオニン回

路(または Yang cycle)からのメチオニンが MA 類合成でも利用される⁷⁾。そして、オオムギのマイクロアレイとイネのマイクロアレイ実験の詳細な解析により、メチオニン回路の全てのステップの酵素遺伝子候補は鉄欠乏ストレスにより発現誘導されることが明らかとなった^{8,9)}(図3)。さらに、アデニン・リボースリン酸基転移酵素 (APRT)、ホスホリボシルピロリン酸合成酵素 (PRPPS) やギ酸脱水素酵素 (FDH) についても、これらが鉄欠乏誘導性であることから、鉄欠乏下でメチオニン回路を支えるメンバーと考えられる。

3-4. Fe^{III}-MA 類吸収トランスポーター YS1

Fe^{III}-MA 類吸収トランスポーター YS1 は、トウモロコシの変異体 *yellow stripe 1* の解析により同定された。YS1 はオリゴペプチドを輸送する OPT ファミリーに分類され、鉄欠乏ストレスにより遺伝子発現もタンパク質量も増加する¹⁰⁾。YS1 のファミリーはそれぞれ輸送できる基質が異なる。YS1 は Fe^{III}-MA 類の他に Cu^{II}-MA 類、Zn^{II}-MA 類、Fe^{II}-NA など輸送できるのに対し、オオムギのホモログ HvYS1 は Fe^{III}-MA 類への親和性が特に高い^{10,11)}。イネのゲノムには 18 の YSL (*YS1 like*) 遺伝子が存在する¹²⁾。鉄欠乏

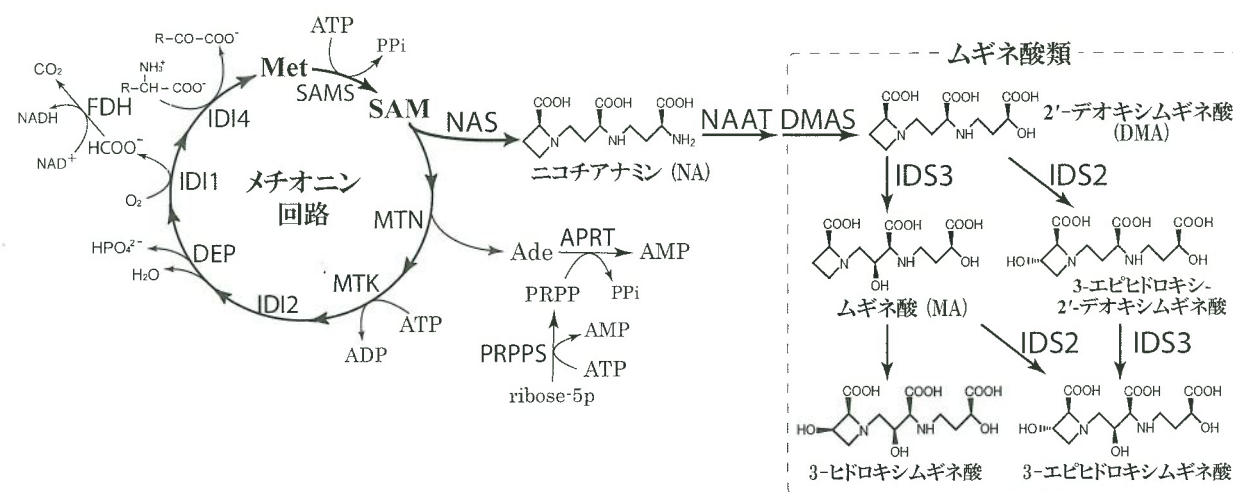


図3 ムギネ酸類の生合成経路とムギネ酸類合成を支えるメチオニン回路

の根で発現が上昇する *OsYSL15* は Fe^{III} -DMA を輸送し、根圏からの鉄吸収を担う¹³⁾。鉄欠乏の葉で特に発現が上昇する *OsYSL2* は、 Fe^{III} -DMA ではなく、 Fe^{II} -NA と Mn^{II} -NA を輸送する金属-NA のトランスポーターであることが明らかとなり、YSL は NA を介した鉄イオンの体内動態にも関わるということが証明された¹²⁾。

4. ふたつの鉄吸収機構の進化的距離

4-1. イネの鉄吸収機構

イネ科植物のうちでも、イネは Fe^{III} -DMA だけではなく Fe^{2+} イオンも直接吸収することが、ポジトロン放出核種 ^{52}Fe を用いた PETIS 法により示された¹⁴⁾。イネでは Strategy I 植物(図 2A)と同様に、鉄欠乏誘導性の二価鉄トランスポーター遺伝子 *OsIRT1*, *OsIRT2* が根で発現している¹⁴⁾。水田条件では土壌微生物の働きで還元状態が進行し、遊離 Fe^{2+} イオンが増加する。イネに Fe^{2+} イオンを吸収する能力があることは、水田のような湛水環境に適応した結果と考えられる。しかし、イネの根では Strategy I 植物のように鉄欠乏による三価鉄キレート還元酵素活性の誘導はないので、土壌の難溶態鉄を積極的に Fe^{2+} イオンに変換して IRT で吸収することはできない。

4-2. 長距離輸送のキレーターNA と YSL ファミリー

NA は MA 類の前駆体であるだけでなく、自身も鉄 (Fe^{II} , Fe^{III}) をはじめとして Zn^{II} , Cu^{II} , Mn^{II} をキレートできる¹⁵⁾。イネ科以外の植物も *NAS* 遺伝子を持つこと、また NA は様々な器官に存在することから、NA は高等植物の体内で金属の長距離輸送に働くキレーターであると考えられている。シロイヌナズナには *NAS* 遺伝子は 4 つあり、そのうちの 3 つは鉄欠乏ストレスにより根または地上部で発現上昇するので、鉄欠乏時には体内の NA 量を増加させて鉄の体内動態をスムーズにしようとしていると考えられる。さらに、 Fe^{III} -MA 類トランスポーター YS1

に相同性の高い YSL は、MA 類を合成しない Strategy I 植物であるシロイヌナズナのゲノムにも 8 つあり¹⁰⁾、前述の *OsYSL2* と同様に Fe^{II} -NA や他の金属-NA 複合体が体内移動する際のトランスポーターと考えられている。

5. 鉄関連の遺伝子の発現を制御する機構

植物で金属欠乏において働くシス配列として初めて同定されたのは、鉄欠乏応答性シスエレメント IDE1 と IDE2 である。オオムギの *IDS2* 遺伝子の上流から同定された IDE1 と IDE2 はプロモーター上で協調的に機能し、根特異的な鉄欠乏誘導性を付与する¹⁶⁾。IDE1/IDE2 の相同配列は、*NAS* や *NAAT* などの主要遺伝子の上流域に存在し、また、メチオニン回路に関与するイネの遺伝子群や *OsIRT1* などの鉄欠乏誘導性遺伝子の上流に多数発見された^{9,16)}。また、IDE1 と IDE2 はタバコを用いて決定されたことから、双子葉植物においてもこれらのシス配列が機能していると予想されている。

シス配列 IDE1 と IDE2 に作用する転写因子 IDEF1 と IDEF2 はイネから単離された。B3 型転写因子の IDEF1 は MA 類合成酵素や *OsIRT1* などの遺伝子群を制御し、NAC 型転写因子の IDEF2 は *OsYSL2* などの遺伝子群を制御する^{17,18)}。IDEF1 と IDEF2 は鉄欠乏によって発現量は変化せず、常に一定量が存在する^{17,18)}。また、マイクロアレイ解析により発見された鉄欠乏誘導性の bHLH 型転写因子遺伝子 *OsIRO2* は、IDEF1 の制御下にある^{17,19)}。*OsIRO2* は MA 類の合成酵素遺伝子や *OsYSL15* などの発現の制御に関わり、さらに別の転写因子遺伝子の鉄欠乏ストレス下での発現誘導をする²⁰⁾。これらのことから、私達は鉄欠乏ストレスにおける発現制御カスケードのモデルを立てている(図 4)。鉄欠乏シグナルが IDEF1 や IDEF2 に伝わると、鉄欠乏誘導性遺伝子の発現上昇が起こり、そして、IDEF1 から伝わった鉄欠乏のシグナルを *OsIRO2* がさらに下流の転写因子へ伝えていく

ものと考えられる。

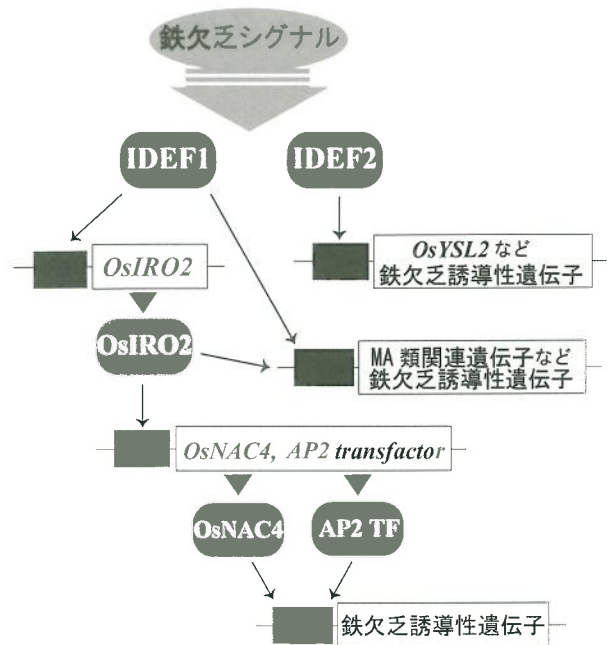


図4 鉄欠乏ストレス下での遺伝子発現制御カスケードのモデル

6. おわりに

本稿では紹介できなかったが、Strategy I でも Strategy II でも、鉄の細胞間・細胞内輸送に関わる種々のトランスポーターが報告されている。複雑な鉄ホメオスタシスを理解するためには、構成要素を列挙していくことに加え、細胞内の鉄濃度を感知する仕組みや鉄欠乏のシグナルの実体を解明することが最大の課題である。私達のグループでは、石灰質アルカリ土壌においても健全に生育できるイネを目指して、MA 類合成に関わる遺伝子群やこれらの遺伝子の発現制御を行う転写因子 *OsIRO2* 遺伝子などを強化したイネを作出してきた。これらの形質転換イネの鉄吸収能力が実際に高まっていることは、ポット試験や隔離圃場実験において明らかにしている。石灰質アルカリ土壌における農業生産性向上への貢献を目標に、今後さらに研究を進展させていきたい。

文 献

- 1) Jeong, J. and Guerinot, M.L. (2009) *Trends Plant Sci.*, 14, 280-285
- 2) Higuchi, K. et al. (1999) *Plant Physiol.*, 119, 471-479
- 3) Takahashi, M. et al. (1999) *Plant Physiol.*, 121, 947-956
- 4) Bashir, K. et al. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 32395-32402
- 5) Kobayashi, T. et al. (2001) *Planta*, 212, 864-871
- 6) Nakanishi, H. et al. (2000) *Plant Mol. Biol.*, 44, 199-207
- 7) Ma, J.F. et al. (1995) *J Biol Chem.*, 270, 16549-16554
- 8) Suzuki, M. et al. (2006) *Plant J.*, 48, 85-97
- 9) Kobayashi, T. et al. (2005) *J Exp Bot.*, 56, 1305-1316
- 10) Curie, C. et al. (2001) *Nature*, 409, 346-349
- 11) Murata, Y. et al. (2006) *Plant J.*, 46, 563-572
- 12) Koike, S. et al. (2004) *Plant J.*, 39, 415-424
- 13) Inoue, H. et al. (2009) *J Biol Chem.*, 284, 3470-3479
- 14) Ishimaru, Y. et al. (2006) *Plant J.*, 45, 335-346
- 15) von Wirén, N. et al. (1999) *Plant Physiol.*, 119, 1107-1114
- 16) Kobayashi, T. et al. (2003) *Plant J.*, 36, 780-793
- 17) Kobayashi, T. et al. (2007) *PNAS*, 104, 19150-19155
- 18) Ogo, Y. et al. (2008) *J Biol Chem.*, 283, 13407-13417
- 19) Ogo, Y. et al. (2006) *J Exp Bot.*, 57, 2867-2878
- 20) Ogo, Y. et al. (2007) *Plant J.*, 51, 366-377

◀ 国内情報 ▶

チューリップ花卉からバイオプラスチック原料

富山県立大学 工学部 生物工学科

加藤 康夫

チューリップにはチューリップポシド(Pos)と呼ばれる糖エステルが多量に存在していることが知られている。我々は、チューリップ組織中に、Posをアグリコンのラクトン化体であり強い抗菌活性を持つチューリップリン(Pa)へと変換する酵素があることを見だし、その酵素(Pos変換酵素)を精製し、性質を明らかにすることに世界で初めて成功した。さらに本酵素の応用として、植物バイオマスであるチューリップ花卉等、Posを含む組織抽出物に本酵素を作用させることで、工業原料としても有用なPa類の効率的な調製方法を確立した。

1. はじめに

チューリップポシド(Pos)およびそのアグリコンのラクトン化体であるチューリップリン(Pa)は、いくつかの植物中に高濃度存在している二次代謝産物である。これらの化合物は、約40年前にチューリップの組織中から、ドイツの研究者らによって抗菌物質として6-チューリップポシドA(Pos-A)、B(Pos-B)および対応するチューリップリンA(Pa-A)、B(Pa-B)(図1)として単離・構造決定がなされたのを始め^{1,2)}、カタクリやアルストロメリアなどのユリ科植物や、ユキヤナギなどにもPos類縁体が含まれるとの報告がなされている³⁾。

Posは抗菌活性物質として単離されてはいた

KATO Yasuo

〒939-0398 富山県射水市黒河 5180

が、中性pHにて容易にPaへと化学的に変換されるほど不安定な物質であり、抗菌活性測定における安定性が疑問視されていた。ごく最近、生方らは2種類のPos-Bのアナログを化学合成してその抗菌活性を測定したところ、Pos-Bが示す抗菌活性の活性本体はPa-Bであり、活性には糖の結合は不必要であることを示した⁴⁾。このことより、Pos類は植物体内においては単なる貯蔵物質であり、酵素・化学的にPaへと変換され、抗菌活性などの生理作用を示すものと思われる。酵素触媒による貯蔵物質→活性物質の変換例は、グルコシノレートやシアン配等体、植物ホルモンや香気成分等、植物において数多く知られていること^{5,6)}から、我々は、チューリップなどにおいてもPosとPaがその関係にあるのではと推測した。一般的には、貯蔵物質は配糖体であり、このものから活性物質への変換

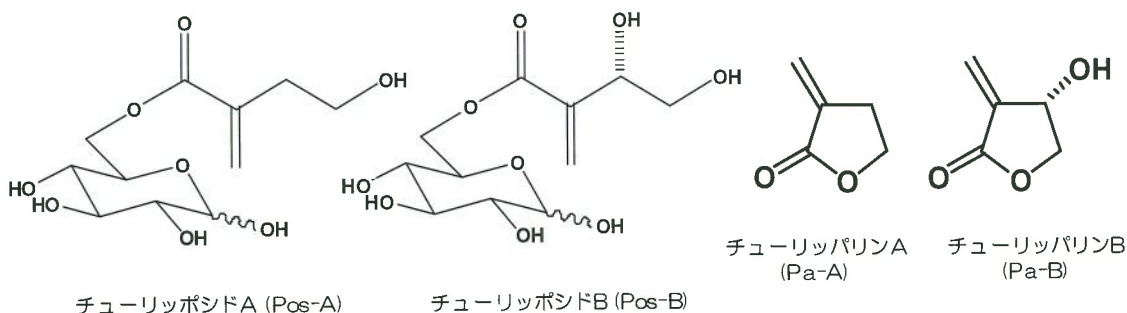


図1 チューリップ中のチューリップポシド, チューリップリン類

を行うのはグルコシダーゼのような糖加水分解酵素である。我々は、チューリップ組織中にもこのような Pos から Pa への変換を触媒する糖加水分解酵素があるのではないかと考え、検討を行うこととした。

一方、富山県はチューリップ球根出荷量日本一（年間約 3,000 万球強）であり、良質な球根を生産するため花卉が摘花され、未利用資源として大量に生成している。我々は富山県農林水産総合技術センターとの共同研究で、チューリップ花卉中の化学物質の有効利用に関して検討を行っている。先に示した Pos や Pa はチューリップ組織中に高含量（薬では乾重量の 2.3%⁷⁾）含まれることが判っているので、これらをチューリップ組織中から安定に取り出すプロセスを開発することは、本化合物類の用途開発においてきわめて重要である。我々は、先に示した変換酵素が存在すれば、この酵素をチューリップ花卉抽出液に作用させることで組織中の不安定な Pos を Pa へと変換し、容易に単離することができると考え、これについても検討を行った。

本論文では、1) チューリップ組織中からの Pos 変換酵素の単離・精製と諸性質の解明、2) Pos 変換酵素を用いたチューリップ組織からの Pa の調整法確立、について説明する。

2. チューリップ組織中からの Pos 変換酵素の単離・精製と諸性質の解明⁸⁾

我々は以前より、チューリップ組織内に著量存在する Pos 類の生合成、作用メカニズムと病害抵抗性との関係について検討を重ねてきている。チューリップの各生育ステージにおける Pos や Pa 類の組織別分布を分析する過程で、同じチューリップ組織を用いても、抽出溶媒（含水 MeOH）の組成によって、抽出物中の Pos と Pa の比が変化する現象を見出した。抽出物の Pos に対する Pa 比は、抽出溶媒中の MeOH 含量が多くなるに従って減少し、含量が 50%を超えると一定になった。このことは、チューリップ組織中には Pos を Pa へと変換する酵素が存在し、組織の破砕・抽出の過程で、組織中の Pos を Pa へと酵素的に変換していることを示唆している。有機溶媒含量が多くなる (>50%) と酵素が失活するために、その変換は妨げられるため、Pa の含量が減少するということである。オランダの研究者達も、チューリップ組織中にはこのような酵素が存在する可能性があるとして述べているが、酵素に関する検討は全く行われていなかった⁹⁾。

我々はまず、チューリップ各組織を 10mM リン酸緩衝液 (pH6.0) 中で破砕後透析し、Pos を基質として酵素反応を行い、Pa の生成を検出することで本変換酵素活性を測定した。前述したように、Pos は中性付近では不安定であり、化学的に Pa へと変換されてしまうために、酵素反応は Pos が安定である pH6.5 で行った。チューリップの全ての組織（球根、葉、根、茎、花卉、薬、雌しべ）において、本酵素活性は認められ

表1 チューリップ球根からのチューリップポシド変換酵素の精製

ステップ	総活性 (U) ^{a)}	総蛋白 (mg)	比活性 (U/mg)	収率 (%)
粗抽出液	748,000	770	971	100
DEAE-トヨパール	610,000	83.2	7,330	81.5
Butyl-トヨパール	432,000	21.7	19,900	57.8
ギガパイト	355,000	9.99	35,500	47.5
Mono-Q HR5/5	271,000	6.42	42,200	36.2

^{a)} 酵素活性の 1U は 1 分間に 1 μ mol の基質（チューリップポシド A）を生成物（チューリップパリン A）へと変換する酵素量を示す。

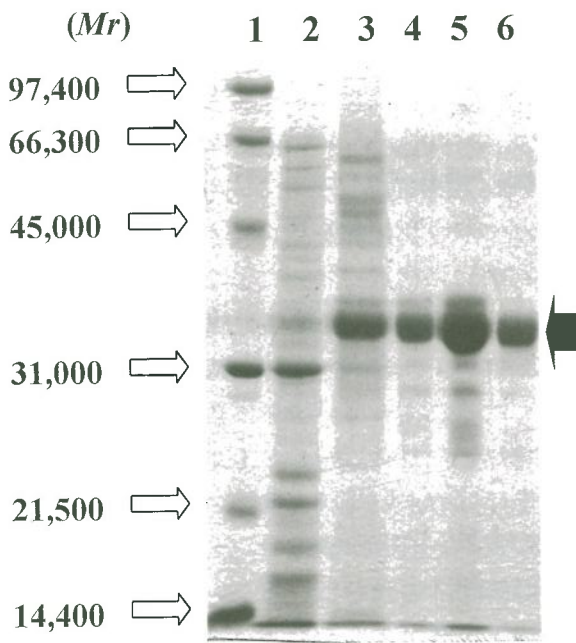


図2 各精製ステップにおける SDS-PAGE 分析
 レーン1, マーカー蛋白; レーン2, 粗抽出液;
 レーン3, DEAE-トヨパール; レーン4, Butyl-
 トヨパール; レーン5, ギガパイプ;
 レーン6, Mono-Q

たが、最も球根における酵素活性が高かった。
 「紫水晶」球根 1kg (乾燥重量) より、イオン交換、疎水、吸着、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにて本酵素を高度に精製した(表1、

図2)。本酵素は常温、中性付近に至適・安定の温度、pH をもつサブユニット分子量約 35,000 のダイマー酵素で、エステラーゼやフォスファターゼの阻害剤である重金属や NaF, PMSF により強く阻害された。各種合成基質を用いて検討したところ、本酵素は糖エステルに特異的に作用する加水分解酵素であり、Pos 類を最も良好な基質とした。これらの点から、本酵素を『チューリップシド (Pos) 変換酵素』と命名した。Pos 変換酵素活性を指標に他の組織からも本酵素を部分精製し、その性質をみたところ、組織によってその基質特異性は異なり、貯蔵する Pos の種類およびその Pa への変換効率が組織によって違うといった、組織特異的な変換メカニズムが存在することが示唆された。

3. Pos 変換酵素を用いたチューリップ組織からの Pa の調整法確立¹⁰⁾

2 で得られた Pos 変換酵素の応用として、Pos を著量含むチューリップ組織抽出液からの酵素変換による Pa の調整を検討した。チューリップ花卉の MeOH 抽出液を濃縮後、水に溶かして、このものにリン酸緩衝液 (pH7.0) および球根由来の Pos 変換酵素 (10U/mL 反応液) を加えて、室温にて酵素反応を行った。酵素非存在下でも、

表2 チューリップ花卉抽出液の酵素変換^{a)} 反応液からのチューリップリン A, B の分別抽出

溶媒	抽出効率 (%)	
	チューリップリンA	チューリップリンB
ヘキサン	7.8	<0.01
ジエチルエーテル	70	26
酢酸プロピル	86	73
キシレン	79	5.1
トルエン	84	3.1
ベンゼン	88	9.9

a) チューリップシド A, B を各々 4.0mM, 4.2mM 含むチューリップ花卉抽出液 490 μ L に、1M のリン酸緩衝液 (pH7.0) 5 μ L, チューリップシド変換酵素 (1000U/mL) 5 μ L を加え、室温にて 2 時間酵素反応を行った。反応液に NaCl を飽和量加え、各有機溶媒 (200 μ L \times 2, 100 μ L) で抽出後、有機層を合わせ、ガスクロマトグラフィーにて分析した。

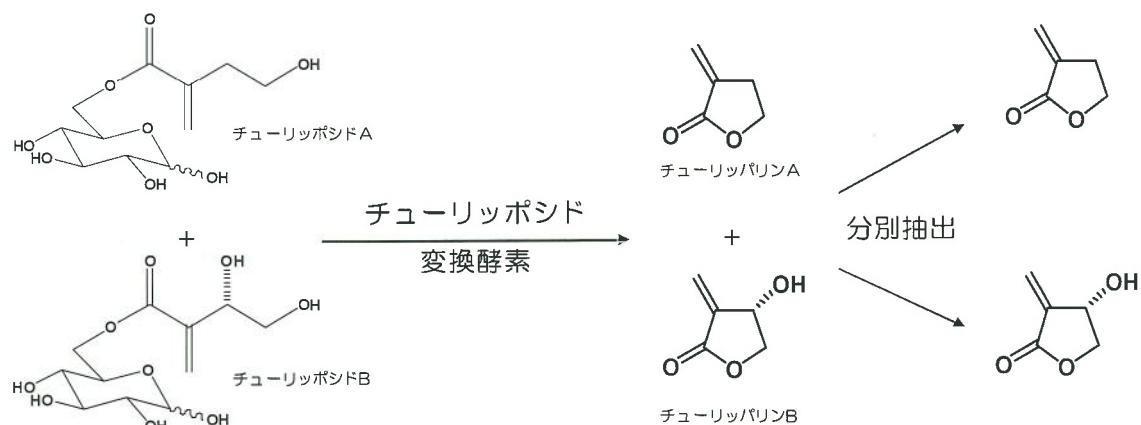


図3 酵素法によるチューリップパリン調製

化学的なPosからのPaへの変換がゆっくりと進行するが、長時間の反応は、生成したPaのさらなる分解を引き起こした。一方、酵素存在下では、2時間以内に抽出液中のPosは全てPaへと変換され、この条件下ではさらなるPaの分解も起こらなかった。ところで、チューリップ組織中にはPos-AとBの二種類が存在するため、生成するPaも酵素反応液中にPa-AとBの二種類混在することになる。このものを効率的に分離するために、有機溶媒による選択的抽出を検討した。表2に示すように、脂肪族炭化水素や酸素原子を含む有機溶媒では抽出効率の点で問題があったが、芳香族炭化水素を用いることで、酵素反応液よりPa-Aを選択的に抽出できた。選択的なPa-Aの分別抽出後、反応液中に残存しているPa-Bはブタノール等の極性溶媒を用いることで、90%以上の収率で抽出できた。用いる組織についても、花卉以外の各組織抽出物を用いて同様に酵素反応を行うことで、Pa-A、Bへと変換、分別抽出による単離が出来た。これらのことにより、図3に示すような、チューリップ組織抽出液から穏和な条件下で、Pa類を簡便に調整する方法を確立した。

本酵素反応生成物であるPa類は α -メチレン- γ -ブチロラクトンと総称され、耐熱性透明樹脂、液晶素材等の各種機能性バイオプラスチックの

原料、電気自動車に搭載されるリチウムイオン電池電極液、各種医薬品や化粧品添加物等、多くの利用価値が報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。これまでPa類は石油を原料として、多大なエネルギーを消費して化学合成により製造されていたため、富山県で生成するバイオマス資源を原料にしかつ地球環境に優しいグリーンバイオプロセスである本手法の価値は大きいと考える。

4. おわりに

本研究は、植物において知られている酵素触媒による貯蔵物質→活性物質の関係が、チューリップにおいて抗菌物質の生成に関与している可能性を示しており、Paによる耐病性向上を含めた今後のチューリップの育種研究においても新しい方向性を導くものである。今後はPos変換酵素遺伝子を取得し、その組織局在性を明らかにし、貯蔵物質→活性物質の酵素変換の関係を生化学的、分子生物学的に明らかにしてゆく予定である。

また、球根生産時に生成しその有効利用が求められている大量のチューリップ花卉をバイオマス資源としてとらえ、それを原料として石油非依存型の穏和な方法で有用物質類を生産するプロセスについても、チューリップの多面的利

用に新しい道をつけるものである。チューリップ以外の植物体中にも Pos 類縁体が含まれていることが知られており、我々は現在、幅広い植物種を原料として、本酵素反応により Pa 類を調製する試みも行っている。

謝 辞

本研究にあたり、荘司和明主幹研究員（富山県農林水産総合技術センター）、生方信教授（北海道大学）、佐藤幸生教授、中島範行教授、萩田信二郎講師（富山県立大学）を始めとする共同研究者の方々に感謝の意を表す。

文 献

- 1) Tschesche, R. et al. (1968), *Tetrahedron Lett.*, 9, 701-706
- 2) Bergman, B.H.H. et al. (1968), *Eur. J. Plant Path.*, 74, 157-162
- 3) Slob, A. et al. (1975), *Phytochemistry*, 14, 1997-2005
- 4) 生方ら(2009),日本農芸化学会平成 21 年度大会講演要旨,2P0191A
- 5) Morant A.V. et al. (2008), *Phytochemistry*, 69, 1795-1813
- 6) Zagrobelny M. et al. (2008), *Phytochemistry*, 69, 1457-1468
- 7) Shoji, K. et al. (2005), *J. Jap. S. Hort. Sci.*, 74, 469-475
- 8) Kato, Y. et al. (2009), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 1895-1897
- 9) Beijersbergen, et al. (1972), *Physiol. Plant Path.*, 2, 265-270
- 10) Kato, Y. et al. (2009), *Tetrahedron Lett.*, 50, 4751-4753
- 11) Hoffmann, H.M.R. et al. (1985), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 24, 94-110
- 12) Kuroda, M. et al. (1986), *Agric. Biol. Chem.*, 50, 243-245
- 13) Onuki, M. et al. (2008), U.S. Patent 20080311478
- 14) Mosnáček, J. et al. (2008), *Macromolecules*, 41, 5509-5511

◀ 国内情報 ▶

液胞膜で機能するアルカロイド輸送タンパク質

京都大学 生存圏研究所 森林圏遺伝子統御分野
伊藤 慎悟 ・ 矢崎 一史

ニコチンはナス科のタバコ属植物に特徴的なピリジン系アルカロイドである。タバコ植物体はニコチンを根で合成し、最終的に葉の細胞に輸送・蓄積するが、そのメカニズムについては未解明な部分が多い。特に、この「転流」の鍵をにぎるのがニコチンの膜輸送であるが、これを司るトランスポーターはこれまで報告されていなかった。本稿では、タバコ緑葉の液胞膜に局在するニコチン輸送体タンパク質について紹介する。

1. はじめに

高等植物は多様な二次代謝物質を生産しているが、その多くは病原性微生物や草食動物あるいは紫外線から自らを守るために機能していると考えられている。二次代謝産物の中でも大きなグループを形成するアルカロイド類は分子内に窒素を含むのが特徴で、強力な生理活性を有するものが多く、またその作用機作も多岐にわたり医療の分野に応用されるものもある(図1)。1806年に最初のアルカロイドとしてモルヒネがケシから単離されて以降、これまでに12,000種以上のアルカロイドが様々な植物から単離され、その構造が決定されている。現在も鎮痛剤のモルヒネをはじめ、抗マラリア薬のキニーネ、抗腫瘍薬のビンクリスチンなど、臨床現場の第一線で活用されているものが少なくない。また、食品の分野では、コーヒーや紅茶に含まれるカフェイン、さらには嗜好品の代表であるタバコのニコチンなど、アルカロイドは薬品以外にも天然の生理活性物質としてごく身近に存在する。

一方、アルカロイドは複数の不斉中心を含む複雑な化学構造を有するものが多く、その研究には常に大きな困難が伴ってきた。たとえばニコチンは、1828年に化合物として発見されたにもかかわらず、1904年に合成されるまでその正確な構造は分らなかった。また、ケシのモ

Itoh Shingo, YAZAKI Kazufumi

〒611-0011 宇治市五ヶ庄

ルヒネは1952年にその構造が明らかになったが、ドイツの薬学者Friedrich Sertürnerによって単離されてから実に146年もの年月を要した。近年では、分析技術の向上により構造解析は短時間で行えるようになったが、アルカロイドはその構造の複雑さゆえに、生化学的・分子生物学的研究が進めにくく、その生合成経路や蓄積機構に至っては現在でも不明な部分が多い。

2. 植物アルカロイドの液胞蓄積

液胞は、植物細胞内で最大のオルガネラであり、細胞の生長段階や組織によって細胞内体積の90%を占める場合も少なくない。液胞内に蓄積される化合物は、糖、有機酸、無機イオンをはじめ、アルカロイドやポリフェノール等の二次代謝物質も、主に液胞に集積する化合物として報告されてきた¹⁾。分子生物学の発展に伴い、生合成酵素の細胞内局在が容易に特定できるようになったが、それらの研究からアルカロイドの多くは、細胞質やERで生合成された後、最終的に液胞膜を通過して液胞内部に蓄積されたと考えられている。

この液胞膜におけるアルカロイドの通過メカニズムには諸説あるが、従来より有力視されていたメカニズムは、有機カチオントラップである。細胞質のpHは中性から弱塩基性(pH7.2~7.5)に維持されており、塩基性の性質を持つアルカロイドはここではチャージを持たない疎水性の形で存在するため、液胞膜を通過できる。しかし、液胞内は酸性(pH5.5前後)に保たれているため、アルカロイドは

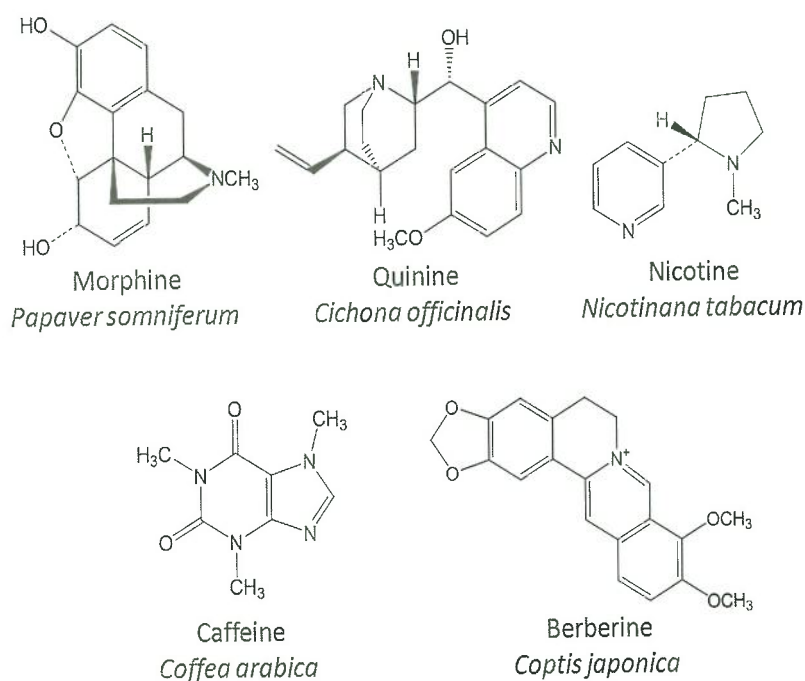


図1 代表的な植物アルカロイドと起源植物

プロトン化されて親水性のカチオンとなる。このため、脂質二重層からなる液胞膜を通過することができなくなり、液胞内にアルカロイドがトラップされるというものである。しかし一方で、単離液胞を使ったアルカロイドの取り込み実験から、この液胞膜のアルカロイド輸送が特定の立体異性体に特異的であり、イオントラップでは説明がつかないとした例も報告されている。こうした背景から、一方向のトラップメカニズム以外にもアルカロイド輸送を特異的に媒介する膜タンパク質の存在が示唆されてきた。これには、直接 ATP の加水分解エネルギーを使う一次輸送と、ATP 加水分解を伴って形成されるプロトン勾配を利用して、アルカロイドを液胞内部に対向輸送する二次輸送とがある。しかしながら、アルカロイド自体の取り扱いの困難さも加わって、これまで内在性アルカロイドの液胞内蓄積を担う植物のトランスporterは未同定であった。

3. 植物の MATE 型トランスporter

植物は外部から侵入する生体異物や、体内で生合成した有毒な代謝物質を細胞外に排出する、

もしくは液胞内に蓄積することで自身を守る能力を備えている。この毒性回避機構に重要な役割を担っている輸送タンパク質に、多剤耐性タンパク質ファミリーがある。多剤耐性タンパク質は、ABC (ATP-binding cassette) タイプ、RND (resistance nodulation cell division) タイプ、SMR (small multidrug resistance) タイプ、MFS (major facilitator superfamily) タイプ、MATE (multidrug and toxic compound extrusion) タイプなどに分類される²⁾。MATE 型トランスporterは、最初腸炎ビブリオ菌の薬剤排出

ポンプとして 1998 年に報告された比較的新しい膜タンパク質ファミリーであるが、現在急速に解析が進展している輸送体タンパク質である³⁾。

これまでの報告から、バクテリア由来の MATE 型トランスporterの多くが norfloxacin のような抗菌活性を有するフルオロキノロン系化合物を輸送基質とすることが明らかになっている⁴⁾。しかしながら、輸送基質の生理活性や化学構造に明確な類似性はほとんど無く、MATE 型トランスporterがどのようなメカニズムで基質化合物を認識するのかは現在のところ明らかになっていない。植物においては、シロイヌナズナで 58 個の MATE 遺伝子が存在することが明らかになっているが、このうち AtDTX1 を皮切りに数種の MATE 型トランスporterが報告されている⁵⁾。最近、オオムギにおいて報告された MATE 型トランスporterの HvAACT1 は、基質としてクエン酸を輸送することが示されたが、この分子は根組織からクエン酸を細胞外に排出することで、オオムギの根圏においてアルミニウム耐性に寄与している⁶⁾。注目されるのは、本トランスporterが高い基質特異性を持つことで、類似の有機酸であるリンゴ酸は輸送しない。最初に解析された細

菌の MATE 型トランスポーターが、広い基質特異性を有していたことから ‘multidrug’ の名が付けられたが、近年ではこのように MATE 型トランスポーターの中には基質特異性の高いものもあると認識されるようになってきた。しかし、MATE 型トランスポーター全般が輸送する基質の構造に一定の傾向は認められておらず、生物種により、また MATE の分子種によってその輸送基質は多種多様である。例えば、シロイヌナズナの AtTT12 及びブドウの VvAM は液胞膜局在の MATE 型トランスポーターであるが、これらはアントシアニンを輸送することが報告されている。なお、これら植物 MATE の輸送のカウンターパートについてはプロトンであると予想されているが、その詳細を解析した例は少ない(図 2)。

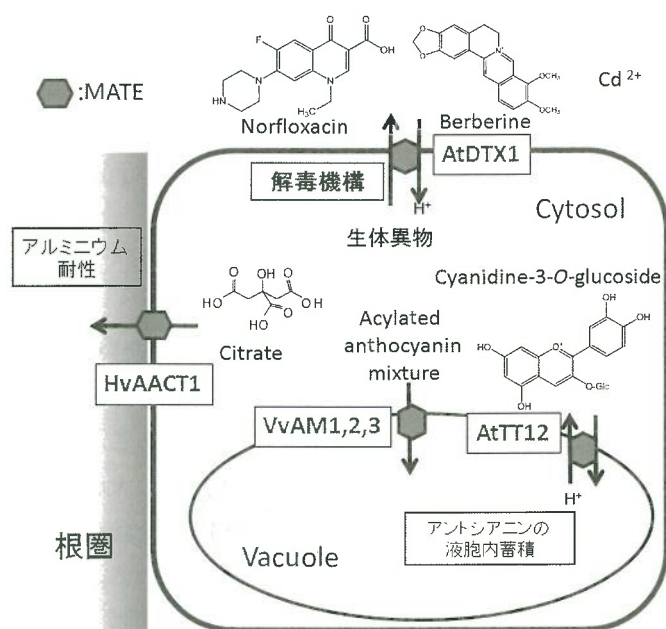


図2 植物で報告されたMATE型トランスポーターと輸送基質

4. Nt-JAT1 の同定と機能解析

代表的な植物アルカロイドのひとつであるニコチンは、タバコ属植物が産生するピリジン系のアルカロイドである。この化合物は昆虫等の食植性生物の神経系に作用することで虫害に対する防御物質として機能しているとされ、タバコが病原菌や昆虫

による攻撃を受けると、緑葉の葉緑体及びペロオキシソームで一過的にジャスモン酸の合成量が上昇し、そのジャスモン酸によるシグナルを受けて、根細胞でニコチンの生合成が促進される(図 3)。生産されたニコチンは、根組織から導管内に運ばれ、地下部から地上部に転流される。地上部へと運び込まれたニコチンは主に若い葉組織でアンローディングされ、最終的に緑葉細胞の液胞に蓄積されることで、食害に対する防御物質として機能する。また同時に、ニコチンを液胞に隔離することで、タバコ細胞は自身のアルカロイドがもつ毒性を回避していると考えられる。このニコチンの長距離輸送には、植物細胞における複数の膜系の通過が不可欠であるため、アルカロイド輸送能を持つトランスポーターの存在が以前より予想されていたが、

これまでその詳細は未解明であった。また、タバコ以外にも液胞内にアルカロイドを蓄積する植物が数多く報告される中で、液胞に内在性アルカロイドを輸送する膜タンパク質の報告例はこれまで一つもなく、長年の課題となっていた。

そこで我々は、タバコのニコチン転流に関与する輸送体の解明を目指して研究を行った。まずはじめに、タバコ培養細胞 BY-2 を材料に、傷害応答ホルモンであるジャスモン酸に応答して、ニコチン生合成酵素遺伝子と同様の発現変動を示す遺伝子を cDNA-AFLP 法で網羅的に解析した⁷⁾。その結果、ニコチンの転流

に関与することが予想される輸送体タンパク質遺伝子として、新規の MATE 型トランスポーター *Nt-JAT1* (*Nicotiana tabacum* - *J*asmonate-inducible *a*lkaloid transporter 1) を同定した⁸⁾。Nt-JAT1 はタバコ植物体の根、茎、葉それぞれの組織で発現していたが、いずれにおいてもジャスモン酸処理で遺伝子発現が一過的に上昇した。タバコ緑葉のマイクロソームを超遠心で分画し、抗 Nt-JAT1 ポリクローナル抗体を

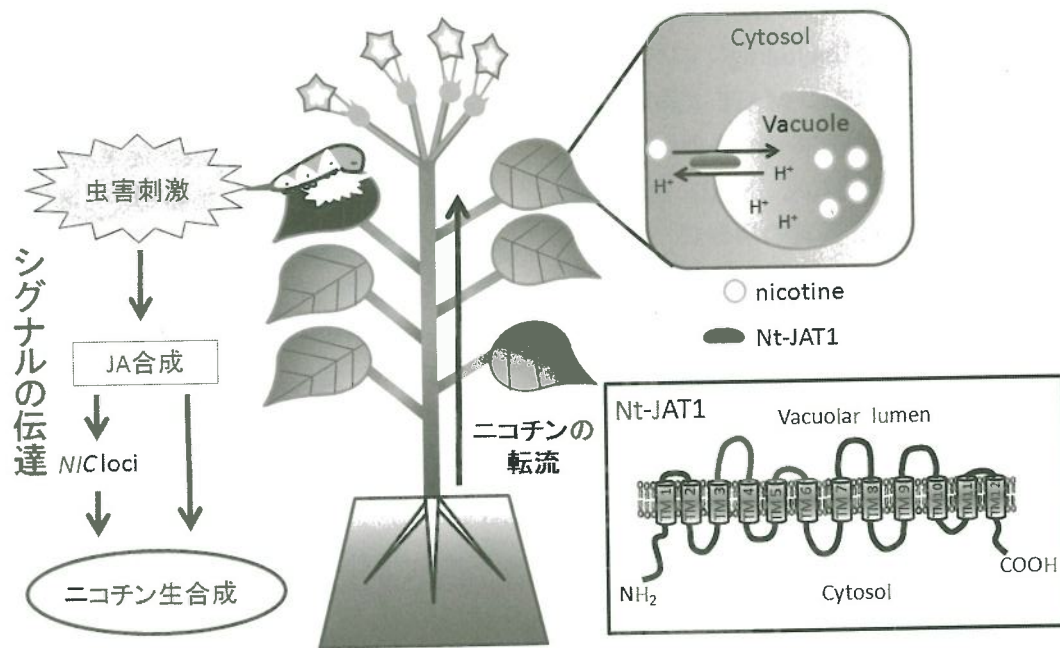


図3 ニコチンの転流とNt-JAT1の推定構造

用いた細胞内局在解析により、本タンパク質は緑葉の液胞膜上に局在することが示された。輸送実験は出芽酵母 AD1-8 株を用いて行い、解析の結果、Nt-JAT1 はニコチンを基質とするトランスポーターであることが明らかになった。さらに輸送の駆動力を解析するため、昆虫細胞 Sf9 を用いて Nt-JAT1 を発現・精製し、 H^+ -ATPase と共にプロテオリポソームの再構築を行った。その結果、ニコチン輸送はプロトンと共役していることが証明され、タバコ葉の液胞において本 MATE 分子が二次輸送機構でニコチンを運んでいることが示唆された。

本研究により、初めて内在性アルカロイドを液胞に輸送するトランスポーターの存在が実証された。他の植物種において生産されている別のアルカロイドも類似のメカニズムで液胞に運ばれているのか、今後の研究展開に興味をもたれる。なお、この Nt-JAT1 とほぼ同時に、タバコの根で特異的に発現する MATE 型トランスポーター NtMATE が奈良先端大の橋本らのグループにより報告された⁹⁾。NtMATE は、根端の皮層細胞の液胞膜上に局在し、アルカロイドの取り込みに関与するトランスポーターであった。このことから、根で生合成されたニコチンは全て地上部に転流されるのではなく、根におい

ても一部細胞内に蓄積され、おそらくは根組織を虫害等から守る働きをすることが示唆された。

5. おわりに

今回、内在性アルカロイドの液胞蓄積に、プロトン勾配を利用した二次輸送体である MATE 型トランスポーターが関与していることが初めて明らかになった。未解明な部分の大きい二次代謝産物の膜輸送研究の発展に、今回の知見が多少なりとも役立つことが期待される。応用展開を考えると、Nt-JAT1 の発現を抑制することでニコチン含量の低い葉タバコの分子育種も可能となるかもしれない。さらに、Nt-JAT1 はニコチン以外の類縁アルカロイドも輸送できることから、有用アルカロイドを産生する植物に Nt-JAT1 を発現させることで、アルカロイドを効率的に集積できる植物を作出するといった方向性も考えられる。植物二次代謝の分野では生合成酵素の研究が先行しているが、最終産物あるいは生合成中間体の細胞内・細胞間移動の実態はほとんど解明されていない。代謝と輸送はコインの表と裏の関係にも似て、両方が正常に

制御されてこそ、初めて物質の高生産が達成できることを最後に強調しておきたい。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、プロテオリポソームの再構成系によるアルカロイドの輸送解析では、岡山大学薬学部生体膜機能生化学講座の森山芳則教授のご指導を受け賜りました。ここに深謝致します。

本研究は、科学研究費補助金特定領域研究「オルガネラ分化」のサポートを得て行われました。

文 献

- 1) Shitan, N. et al. (2007), *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 8, 244-252
- 2) Omote, H. et al. (2006), *Trends Pharmacol. Sci.*, 27, 11
- 3) Morita, Y. et al. (1998), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42, 1778-1782
- 4) Kuroda, T. et al. (2009), *Biochim. Biophys. Acta.*, 1794, 763-768
- 5) Yazaki, K. et al. (2008), *Phytochem. Rev.*, 7, 513-524
- 6) Furukawa, J. et al. (2007), *Plant Cell Physiol.*, 48, 1081-1091
- 7) Goossens, A. et al. (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 8595-8600
- 8) Morita, M. et al. (2009), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106, 2447-2452
- 9) Shoji, T. et al. (2009), *Plant Physiol.*, 149, 708-299

◀ 国内情報 ▶

花粉管ガイダンス物質の同定と種間多様性

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻
金岡 雅浩 ・ 東山 哲也

被子植物の生殖過程では、雄の配偶体である精細胞が花粉管によって雌の配偶体である胚のうへと運ばれ、受精が起こる。花粉管を胚のうへ導くガイダンスシグナルが想定されていたが、その分子の実体は謎であった。我々は胚のうが突出したユニークな植物トレニアを用いて、助細胞から分泌される花粉管ガイダンス物質 LURE1, LURE2 を同定した。本稿では、LURE の分子進化が種分化に関与する可能性についても考察する。

1. はじめに

私たちが日々食物として口にする米や小麦などの穀物、果物や果菜は植物の生殖器官に由来しており、植物が受精した結果の産物である。すなわち植物の受精とは、食物生産の根幹に関わる現象であり、その全容を解明することは基礎生物学的な価値を持つのみならず、応用面においても重要な研究課題である。

高等植物における受精の概要を図1Aに示す。まず花粉がめしべの柱頭に付着すると、吸水して花粉管が発芽する。花粉管はめしべの組織内部を伸長していき、胚珠に雄の配偶体である精細胞を運ぶ。花粉管の最終目的地は胚珠の内部にある胚のう（雌性配偶体）である。胚のう内部に進入した花粉管は破裂して2つの精細胞を放出し、それぞれ卵細胞・中央細胞と受精して胚と胚乳を形成する。花粉管はめしべの中で幾度も伸長方向を変えながら、迷うことなく最終目的地である胚珠へと到達する。この、花粉管を胚珠へと導く現象を「花粉管ガイダンス」と呼ぶ。

花粉から発芽した花粉管が最終的には胚のうまで到達することは、1830年に発見された。今から140年前の1869年には花粉管が培地上で胚珠に向かうことが報告され、胚珠から花粉管を誘引する「ガイダンスシグナル」が分泌されていると考えられるようになった。その後、めし

KANAOKA Masahiro, HIGASHIYAMA Tetsuya
〒464-8602 名古屋市千種区不老町

べ内のカルシウムイオンや GABA の濃度勾配がガイダンスシグナルであるとの説が提唱されたが、決定的な証拠は得られず、一時はそもそも存在しないのではないかとさえ言われていた。研究が難航した理由は、めしべという組織の複雑さによるところが大きかった。胚のうは胚珠の奥深くに位置しており、胚珠はまためしべの子房組織に包まれている。そのため、花粉管がめしべ内部を伸長し胚珠に到達する様子を直接観察することができなかった。

この困難な問題を解決したのは、ゴマノハグサ科のトレニア (*Torenia fournieri*) という植物だった(図1B)。トレニアでは胚のうの一部が胚珠の外に飛び出しており、めしべを開いて胚珠を取り出すとすぐに卵細胞など胚のうの細胞を観察することができる。この植物を用いることで、胚珠と花粉管とを同時に培地上で培養し受精の様子をリアルタイムで観察することが可能になったのである¹⁾。

2. 花粉管ガイダンス物質は助細胞から分泌され、種特異的に機能する

それではガイダンス物質はどこに存在するのであろうか？花粉管を胚珠へ導くガイダンス物質の同定に大きなヒントを与える2つの知見が明らかになった。トレニアの胚珠を培地上に置くと花粉管が胚珠へと向かい、さらに、胚のうの先端部から中に進入しようとする様子が観察された。胚珠を花粉管から遠ざけるように動か

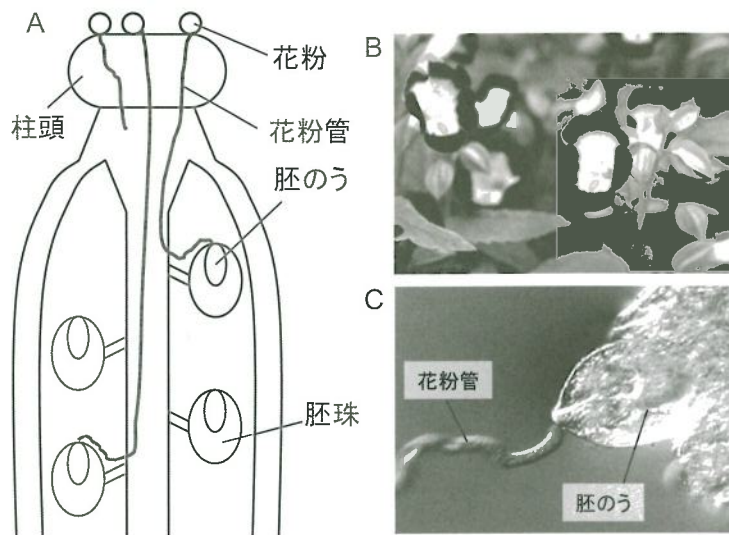


図1 胚珠による花粉管ガイダンス

- A. 柱頭で発芽した花粉管はめしべ内部を伸長し、胚珠へと到達し、胚のう内部に進入して受精する。
 B. トレニアの花。
 C. 胚のうの先端部を正確に追跡する花粉管。

しても、花粉管は正確に胚のうの先端を追跡した(図1C)。このことは、胚のうの先端から拡散性の誘引物質が分泌されていることを示唆している。続いて、胚のうを構成する細胞のうち、卵細胞、中央細胞、助細胞をレーザーで1つずつ潰すという実験が行われた。すると驚くべきことに、受精相手である卵細胞と中央細胞を両方とも潰しても花粉管の誘引率は変わらなかったのに対し、助細胞のみを潰すと誘引は完全に見られなくなってしまった²⁾。このことは助細胞から誘引物質が分泌されていることを強く示唆している。

もう1つの重要な知見は、近縁種を用いた実験から得られた。トレニア (*Torenia fournieri*) の近縁種であるアゼトウガラシ (*Lindernia micrantha*) の胚珠を培地上に置くと、アゼトウガラシの花粉管はそこに誘引される。それではトレニアとアゼトウガラシの胚珠を並べておくとどうなるだろうか?両者の胚珠を接するように培地上に置くと、トレニアの花粉管はトレニアの胚珠へ、アゼトウガラシの花粉管はアゼトウガラシの胚珠へと、迷うことなく向かったの

である³⁾。さらに、カルシウムイオンを培地中に10mMという高濃度で加えても、胚珠による誘引は阻害されなかった。よって、カルシウムイオンが単独でガイダンス物質として働いている可能性は否定され、種によって異なるシグナルが胚珠から分泌されていることが明らかになったのである。また、きわめて近縁な種でも識別されたことから、このシグナルは複雑な構造をとりうる物質であると示唆され、ペプチド性の物質である可能性が高まった。

3. TfCRP1, TfCRP3 は花粉管ガイダンス活性を示す

それでは一体ガイダンス物質の本体は何であろうか?上記の特徴を元に、助細胞で発現する遺伝子の探索をおこなった。

まず、胚珠を細胞壁分解酵素で処理し、胚のうの細胞をプロトプラスト化する手法を開発した。得られたプロトプラストの中から助細胞由来のもののみを選び出し、25個の助細胞プロトプラストからmRNAを抽出し、cDNAライブラリーを作成した。合計4128のESTクローンの塩基配列が読まれ、これらは256のコンティグにまとめることができた。この助細胞cDNAライブラリーに含まれる遺伝子には、興味深い特徴があることが明らかになった。発現量の多い遺伝子の中にはシステインに富んだ分泌型低分子ポリペプチドCRP (Cysteine-Rich Polypeptide)をコードする遺伝子が多数含まれており、上位8遺伝子中7個までがCRPだったのである。結局、256のコンティグのうち16個がCRPをコードする遺伝子であり、全ESTのリード数の29%をも占めていた。

助細胞で見つかったCRPのうち、発現量の多かった上位3つの遺伝子、*TfCRP1*, *TfCRP2*, *TfCRP3* がコードするタンパク質は、ディフェンシンスーパーファミリーに特徴的なモチーフ

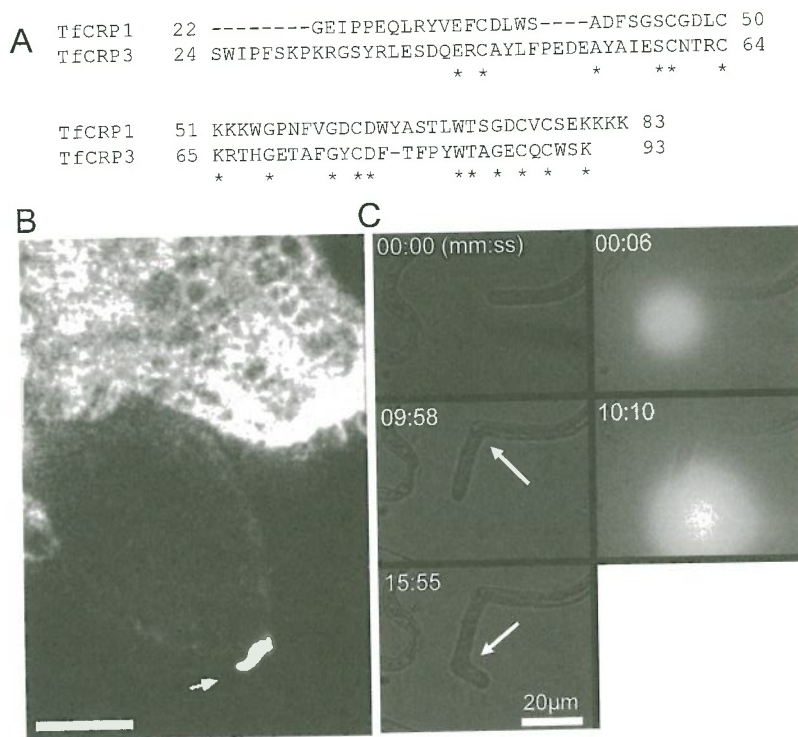


図2 TfCRP1, 3 の特徴と *in vitro* での花粉管ガイダンス
 A. TfCRP1 と TfCRP3 のアミノ酸配列の比較。両者で共通しているアミノ酸 (*) は少ないが、システイン残基はすべて保存されている。
 B. TfCRP3 の局在。胚のう先端から分泌されているのが分かる (矢印)。
 C. TfCRP3 による花粉管の伸張方向の変化。花粉管は TfCRP3 を放出した場所 (右側のパネルの白い円) に向かって伸張方向を変化させる (矢印)。

を保存していた (図 2 A)。ディフェンシンとは宿主細胞を病原菌やカビの感染から防御する機能を持つタンパク質である。また、アブラナ科植物に見られる孢子体型自家不和合反応の花粉側の因子である SP11/SCR もこのファミリーに属している。助細胞で見つかった CRP は、抗微生物活性が示されている植物ディフェンシンとは、立体構造の構築に必要なシステインの数や並びが異なっていたため、ディフェンシンとしてではなく助細胞の機能に関わる独自の働きをすることを考えられた。

TfCRP1, 2, 3 の発現を組織・細胞別 RT-PCR で確認したところ、*TfCRP2* は助細胞のみならず受精後の胚珠など複数の細胞・ステージで発現していたが、*TfCRP1*, *TfCRP3* は受精前の助細胞でのみ特異的に発現していることが分かった。抗体を作成して TfCRP1, TfCRP3 タンパク質の

局在を調べたところ、両者はともに胚のうの先端部に蓄積していることが分かった (図 2 B)。そのため、TfCRP1, TfCRP3 は助細胞で発現し、胚のうの先端部から分泌され花粉管を誘引するのではないかと考えられた。

そこで次に、*TfCRP* 遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質を発現させ、精製 TfCRP タンパク質が花粉管誘引活性を有するか検討した。精製 TfCRP3 をマイクロピペットを用いて花粉管の前に放出すると、花粉管はその方向へと曲がり、TfCRP3 に花粉管誘引活性があることが分かった (図 2 C)。花粉管の誘引を定量的に評価するため、ゼラチンビーズに様々な濃度の TfCRP3 タンパク質を封入して培地上に置くというアッセイ方法を開発した。その結果、

TfCRP3 は 4nM という低濃度でも十分な花粉管誘引活性を示すことが明らかになった。これは 1つのビーズあたりわずか 1000 分子以下のタンパク質しか含まれていない計算になる。すなわち、花粉管は TfCRP3 のほんの数程度の分子数の差を濃度差として認識して、伸長方向を決定している可能性が出てきたのである。続いて TfCRP1 も花粉管を誘引することが示されたが、TfCRP2 には活性は見られなかった。また TfCRP1, TfCRP3 はともにアゼトウガラシの胚珠の花粉管に対して誘引活性を示さなかった。このことから、これらの物質は *in vitro* で花粉管誘引物質としての性質を示すことが明らかになった。

4. 助細胞における *TfCRP1*, *TfCRP3* の機能

それでは *TfCRP1*, *TfCRP3* は助細胞でも花粉管誘引に機能しているのだろうか？次に、助細胞でこれらの遺伝子の働きが調べられた。ここでは、トレニアの胚のうが飛び出しているという特徴を利用して、モルフォリノアンチセンスオリゴマー (MO) の注入による発現阻害実験をおこなった。この MO の注入に当たっては、当研究室で開発され製品化された、レーザーサーマルマイクロインジェクションシステム (LTM) が用いられた。LTM では、レーザー照射による高い膨圧を利用するため、堅い細胞壁を持つ植物細胞にも注入が可能となる。さらに、きわめて細い針を用いるため、注入時の細胞に与えるダメージが小さくなるという利点もある。*TfCRP1* に対する MO を注入した胚珠では、無処理の胚珠やランダムな配列の MO を注入した胚珠と比べて、花粉管の誘引率が有意に低下していた。*TfCRP3* に対する MO を注入した胚珠も同様であった (図 3)。この結果より、*TfCRP1*, *TfCRP3* は助細胞による花粉管ガイダンスに確かに関わっていることが明らかになった。*In vitro* での花粉管誘引活性とあわせて、*TfCRP1*, *TfCRP3* が真の花管ガイダンス物質であることが示された。これらの結果から、*TfCRP1*, *TfCRP3* をそれぞれ英語の「誘引する」

という語にちなんで *LURE1*, *LURE2* と名付けた⁴⁾。

5. 花粉管ガイダンスの分子進化と種分化

植物は他種との交雑を防ぐために、様々な機構を備えている。筆者が複数の *Torenia* 属植物を集め、*T. fournieri* との交配をおこなったところ、花粉管は子房内部まで伸長するものの受精が正常に起こらず種子が形成されない種を見いだした。これらの種間では、花粉の発芽や花粉管伸長の制御ではなく、胚珠へのガイダンスや受精段階で種間交雑を防ぐ仕組みが働いていると考えられる。一般にディフェンシンは進化速度が非常に早く、システイン残基以外のアミノ酸配列は保存性が低いことが知られている。そこで筆者らは、*LURE* の分子進化が種分化に寄与した可能性を検討すべく、*T. fournieri* に近縁な複数の *Torenia* 属、*Lindernia* 属植物の子房 cDNA から、*LURE* のオルソログの同定を試みた。その結果、*LURE1* (*TfCRP1*) のオルソログと思われる遺伝子を単離することができた (金岡ら、未発表)。これらの遺伝子では、非同義置換が同義置換よりも多く、正の選択が働いている可能性が示唆された。つまり、*LURE1* のア

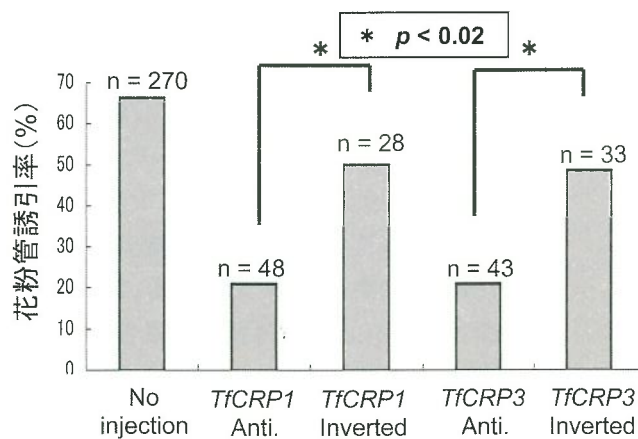


図 3 *TfCRP1*, *TfCRP3* アンチセンス MO による花粉管ガイダンスの阻害

TfCRP1, *TfCRP3* アンチセンス MO を注入した胚珠 (Anti) では、無処理の胚珠 (no injection) や無関係の MO を注入した胚珠 (Inverted) と比べて花粉管誘引率が有意に低下した。

ミノ酸配列を積極的に変化させることで他種の花管の誘引を防ぐよう進化してきたのではないかと考えられる。今後これらのペプチドのガイダンス活性の比較や、種特異性を決定するアミノ酸の同定をおこなう予定である。*LURE2* については近縁種からも相同性の高い塩基配列は見つかったが、システイン残基を保存していなかったり、ナンセンス変異が起こっていたりと、偽遺伝子化しているようだった。花粉管ガイダンスによる種間認識において、*LURE1* が中心的な役割を果たすのか、それとも *LURE1*, 2 の混合効果により種ごとに独自のガイダンスシグナルが形成されるのかについても検討していきたい。

6. おわりに

LURE1, LURE2 の属するディフェンシンファミリーは、もともと植物の自然免疫に関わる分子として同定された。ディフェンシンは、微生物やカビといった「非自己」の体内への侵入を防ぐために機能している。雌の組織である胚のうにとつては、内部に進入してくる雄の組織である花粉管は、言わば「非自己」である。植物の自己と非自己の認識・相互作用に関わる分子が、形を変えて、別種の花粉管を区別し自己と和合性のある花粉管のみを受け入れるよう働くようになったことは興味深い。今後花粉管側に存在すると思われる LURE の受容体が明らかになり、そのシグナル伝達機構が解明されれば、植物がいかにしてこの巧妙なメカニズムを進化させてきたかが明らかになるだろう。さらに、異種間で LURE 遺伝子を組み換えることにより、今まで花粉管ガイダンスの違いが障壁となり交配が不可能だった種間での交配が可能になるか

もしれない。この技術を用いることにより、新たな種を作出するといった応用が考えられ、育種において大きな役割を果たすことが期待される。

謝 辞

本研究は東山研究室の多くの人の協力により行われたものである。ここに感謝の意を表する。

文 献

- 1) Higashiyama T. et al. (1998) *Plant Cell*, 10, 2019-2032
- 2) Higashiyama, T. et al. (2001) *Science*, 293, 1480-1483
- 3) Higashiyama, T. et al. (2006) *Plant Physiol.*, 142, 481-491
- 4) Okuda, S. et al. (2009) *Nature*, 458, 357-361

◀ 国内情報 ▶

酸味を甘味に変える不思議なタンパク質 ネオクリンの活性発現メカニズム

東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻
中島 健一朗・古泉 文子・朝倉 富子・三坂 巧・阿部 啓子

西マレーシア原産の植物クルクリゴ (*Curculigo latifolia*) の果実中に見出したタンパク質ネオクリンは、そのものが弱い甘味を持つ上に、続けて酸っぱいものを味わうと一層強い甘味を感じることができる。この性質は味覚修飾活性と呼ばれ、味覚科学と食品産業の分野から注目されてきた。しかし、どのような分子メカニズムにより甘味が増強するのかは長い間不明であった。最近の研究成果により、酸っぱいものを甘く感じさせる不思議な現象の背後に潜むメカニズムを、分子レベルで解き明かすことができた。

1. 味覚修飾タンパク質ネオクリン

西マレーシア原産の熱帯植物であるクルクリゴ (*Curculigo latifolia*, 図 1) の果実を口に含んだ後にレモン等の酸味を呈するものを摂取すると、非常に甘く感じるという不思議な現象が存在する。すっぱいレモンもオレンジのように甘く感じられるのがその具体例である。この酸味を甘味へと変換する効果は味覚修飾活性と呼ばれ、クルクリゴ果実に含まれるある種のタンパク質がその活性の本体である。我々は活性タンパク質の単離・精製を行い、アミノ酸配列解析・糖鎖解析・cDNA クローニングにより全配列を決定した¹⁾。ネオクリンと命名したこのタンパク質は 2 つのサブユニット(酸性サブユニット NAS, 塩基性サブユニット NBS)から構成されており、ジスルフィド結合によりヘテロダイマーを構成していた。さらに、天然ネオクリンの中性 pH 条件下における X 線結晶構造解析²⁾から、NAS と NBS が貝殻状の構造をとってネオクリン分子を構成していることが明らかになった(図 2a)。ネオクリンはそれ自身が弱い甘味を有する甘味タンパク質であるだけでなく、同時に味覚修飾活性をも有するというユニークなタンパク質であり、非常に興味深い研究対

NAKAJIMA Ken-ichiro, KOIZUMI Ayako, ASAKURA Tomiko, MISAKA Takumi, ABE Keiko
〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

象であるといえよう。



図 1 熱帯植物クルクリゴ
植物体の根元に数センチの大きさの果実をつける
(日本新薬株式会社山科植物園で撮影)

2. ネオクリンの酸誘導性甘味についての客観的評価系の構築

まず、酸性条件下においてネオクリンが示す甘味の強度を、ヒト甘味受容体タンパク質を発現させた培養細胞に対する応答性で客観的に評価することを試みた。ヒト甘味受容体 (hT1R2 と hT1R3 のヘテロダイマー) を G タンパク質 α サブユニット (G15 と Gi3 のキメラ変異体) とともに遺伝子導入し、培養細胞 HEK293T に一過的に共発現させた。受容体発現後の細胞にネオクリンを投与した際の細

胞応答を、カルシウムイメージング法により評価した。

ネオクリンの濃度を固定して様々な pH 条件(pH 4.7~pH 8.0 の範囲)で細胞に投与し、応答を計測した。その結果、ネオクリンに対する細胞応答は pH の値が 8.0 から 4.7 に低下するにつれ、pH 依存的に増加した。すなわちネオクリンは pH の低下とともにヒト甘味受容体を活性化することが示された。この性質はネオクリンを口で味わった場合の現象と非常に良く一致したことから、培養細胞を用いた評価系はネオクリンの持つ酸誘導性の甘味活性を測定するのに妥当であると判断した。また、pH-細胞応答曲線における 50%応答を示す pH の値は 7.1 であった。pH7.1 付近でプロトン化される可能性のあるアミノ酸残基は側鎖にイミダゾール基(pKa 6.5)をもつヒスチジンであることから、ネオクリンのヒスチジン残基が酸誘導性の甘味活性に関与する可能性が考えられた。

3. ネオクリンのヒスチジン残基変異体 (HA バリエント) の性質

野生型ネオクリンについては、ヘテロダイマーを形成してかつ味覚修飾活性を有するリコンビナントタンパク質を、麴菌発現系を用いて分泌生産させることができる³⁾。そこでヒスチジン残基がネオクリンの有する酸誘導性甘味活性の発現に影響を与えるかどうかを検討するため、ネオクリンに存在する5ヶ所のヒスチジン残基をアラニンへと変異させた変異体(HA バリエント)をデザインし、同様に麴菌発現系で発現生産させた。

得られた HA バリエントについて培養細胞を用いた客観的評価系で活性測定をしたところ、野生型ネオクリンの場合と異なり、弱酸性~弱アルカリ性の領域ではほぼ一定の強い甘味を示した。つまり酸誘導性の甘味活性を失うものの、甘味タンパク質としての性質を示すことが判明した。すなわち、ネオクリンの pH に依存した甘味強度の変化にはヒスチジン残基が決定的に寄与していることが示された。

4. 中性 pH 条件下でのネオクリン・HA バリエントの機能差異

中性条件下においては、ネオクリンは甘味受容体を弱くしか活性化しないのに対し、HA バリエントは強く活性化することが示された。そこで、受容体活性化能の異なる両者を様々な比率で混合し、pH7.6 で細胞に投与した。はじめに HA バリエントの濃度を一定にし、ネオクリンの濃度を变化させたところ、細胞応答はネオクリンの濃度が増すにつれ減少した。次に、ネオクリン存在下と非存在下で HA バリエントの濃度応答曲線を解析したところ、ネオクリンが存在すると最大応答の値は変化しないが EC₅₀ の値が増した。これらの結果から、ネオクリンは中性 pH 条件では競合阻害的に HA バリエントによる甘味受容体の活性化を抑制することが示唆された。

5. HA バリエントの構造予測

なぜ HA バリエントが中性 pH でも強い甘味を示すのかを検討するため、ネオクリンの結晶構造をもとに分子動力学シミュレーションによる構造予測を

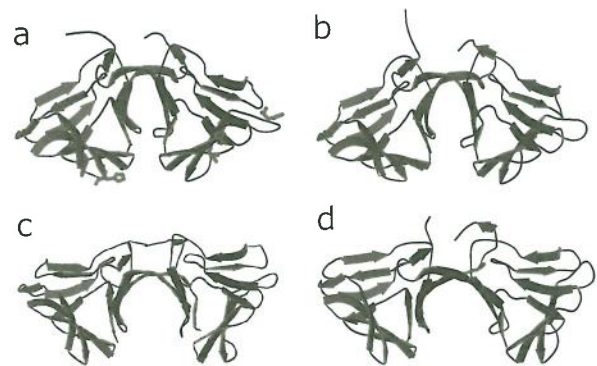


図2 ネオクリンと HA バリエントの構造予測

(a) ネオクリン(PDB ID: 2D04)の結晶構造。NAS, NBS サブユニットをリボンモデルで、ヒスチジン残基をスティックモデルで示す。

(b-d) 分子動力学シミュレーションによる構造予測。

(b) 中性 pH でのネオクリンの構造、(c) 酸性 pH でのネオクリンの構造、(d) 中性 pH での HA バリエントの構造

行った。シミュレーションの結果、ネオクリンはヒスチジンやアスパラギン酸残基が全てプロトン化していない条件(pH 7.0)では、両サブユニットが近いままの closed 構造をとるのに対し(図 2b), これらを全てプロトン化した条件(pH 3.0)では、両者が離れた open 構造をとった(図 2c)。一方、HA バリエーションの中性 pH での構造をシミュレーションしたところ、HA バリエーションはネオクリンが closed 構造をとる pH 7.0 という条件でも、ネオクリンの酸性 pH での構造に類似した open 構造をとった(図 2d)。したがって、HA バリエーションが中性 pH でも強い甘味を示すのは、pH に関わらず常に open 構造をとるためと予想される。

6. ネオクリンの活性発現メカニズム

分子シミュレーションの結果と実験結果に基づき、味覚修飾活性についてネオクリンと甘味受容体の相互作用から以下のように説明することができる。

ネオクリンは機能・構造的に closed-inactive 型と

open-active 型の平衡状態にあるが、両者はともに甘味受容体に作用できる。中性 pH では平衡は closed-inactive 型へと傾くため、open-active 型のネオクリンの存在比率はわずかで、甘味受容体は弱くしか活性化されない(図 3 左)。一方、酸性 pH では平衡は open-active 型に傾き、大半のネオクリン分子は open-active 型をとるため、甘味受容体は強く活性化される(図 3 右)。このように pH が中性から酸性に変化するにつれて、活性型のネオクリンの割合が増加し、酸性 pH で強い甘味が生じると考えられる⁴⁾。

ネオクリンが pH 依存的にヒト甘味受容体を活性化するだけでなく、ヒト甘味受容体に対して中性ではアンタゴニストとして、酸性ではアゴニストとして作用すること、さらにこの機能変化にはネオクリンの pH 依存的な立体構造変化が関与しているという新たなモデルによって、酸っぱいものを甘く感じさせる不思議な現象の背後に潜むメカニズムを分子レベルで解き明かしたといえよう。

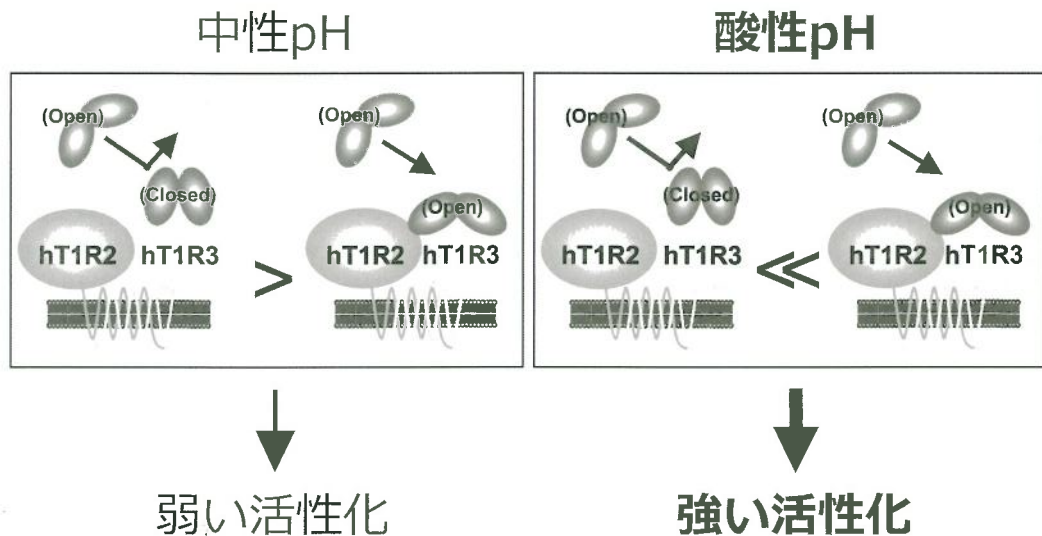


図3 ネオクリンの活性発現メカニズムに関するモデル

中性 pH においてはネオクリンがアンタゴニストとして働くため、ヒト甘味受容体 (hT1R2・hT1R3) は弱くしか活性化されず、弱い甘味しか感じられない。一方、酸性 pH においてはネオクリンがアゴニストとして機能し、甘味受容体を強く活性化する。そのため、より強い甘味を感じる。

7. 今後の研究展開

本稿にて紹介したネオクリンに関する研究については、生物系特定産業技術研究支援センターによって実施されている「生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業(異分野融合研究開発型)」として平成19年度に採択され、企業との共同研究も含め多方面から研究を展開している。(採択課題名「味覚修飾蛋白質ネオクリンとそのバリエーションの機能解析・用途開発」: 東京大学, 財団法人サントリー生物有機科学研究所, 株式会社ミツカングループ本社・中央研究所, 日清食品ホールディングス株式会社・食品総合研究所, (独)農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所の共同研究)

本研究課題は、酸味を甘味に変換するネオクリンの食品への用途開発を目指した研究であり、食品として摂取することを想定したネオクリンの安全性評価にも着手している⁵⁾。またそれとともに、食品の味の設計へ向けた基盤研究も行っている。味物質(ネオクリンおよびそのバリエーション)とヒト味覚受容体の相互作用を解析することにより、「同一物質

が、溶液の状態によって味(ここでは甘味)の強度の増強ならびに味質の変換(酸味から甘味)を生じる」原理の解明を行っていく。この過程で明らかになったエビデンスは、実際にヒトが感じる味覚の総合判断の一般論を導きだすのに貢献していくのである。将来的には味の相乗・相殺といった複雑な味の相互作用を科学的に解析し、食品の新しい味の設計へと繋げていくことを目標としている。

文 献

- 1) Shirasuka, Y. et al. (2004), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 1403-1407
- 2) Shimizu-Ibuka, A. et al. (2006), *J. Mol. Biol.*, 359, 148-158
- 3) Nakajima, K. et al. (2006), *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 3716-3723
- 4) Nakajima, K. et al. (2008), *FASEB J.*, 22, 2323-2330
- 5) Shimizu-Ibuka, A. et al. (2008), *J. Agric. Food Chem.*, 56, 5338-5344

◀ 国内情報 ▶

植物病原菌の宿主感染・オルガネラ数の制御と
オートファジー

京都大学大学院 農学研究科 ¹応用生命科学専攻・²応用生物科学専攻
³独立行政法人 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業

阪井 康能^{1,3}・高野 義孝²

ウリ類に感染する植物感染菌 *Colletotrichum orbiculare* が宿主に侵入するには、ペルオキシソームの合成のみならず、ペルオキシソームの選択的分解（ペキシソファジー）も重要な役割を果たす。ペキシソファジーに関わる分子 Atg26 の生理生化学機能から植物病原性発現について探る。

1. はじめに

自食作用，オートファジーとも呼ばれる生命現象は，酵母，カビから，動植物にいたるまで広く真核生物がもつ細胞内分解機構である。プロテアーゼなどによる他の分解機構と異なり，ミトコンドリアやペルオキシソームといったオルガネラやリボソームなど，大きな構造体を，ごっそり丸ごと，分解する。その秘密は，被分解物を，いったん，新たに脂質 2 重層からなる隔離膜が包み込み，オートファゴソームと呼ばれる，分解物を取り込んだオルガネラを形成し，これが多くの加水分解酵素を含んだ液胞・リソソームに取り囲まれたのちに，分解されるのである。従って，新生膜やオルガネラの形成，膜の融合といった”膜のダイナミズム”がオートファジー分子機構の基盤にあることになる。オートファジーは，従来，非選択的でバルクな細胞内分解機構としてとらえられてきた。窒素源などの栄養飢餓条件によって誘導されるオートファジーがそれに属する。一方，ペルオキシソーム分解は，酵母の培地変換による炭素源適応

の際にもおこり，これは，豊栄養条件下，ペルオキシソームに対して選択的に起こるため，”ペキシソファジー”とよばれている。

植物に病害をもたらすカビ（以下，植物病原菌）の多くは植物葉上で，その分生胞子が発芽した後，付着器と呼ばれる感染器官を形成する（図 1）。炭疽病菌やイネいもち病菌においては，この付着器細胞は，メラニン色素により黒色を呈しており，この付着器のメラニン化は病原性に必須である。ウリ科に病害を引き起こす植物病原菌であるウリ類炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare* において，ペルオキシソームを形成できない *pex6* 変異株は，付着器のメラニン化ができず，宿主植物への病原性を失う¹⁾。本菌の分生胞子の細胞内には，炭素・エネルギー源となる脂質を貯蔵している脂質滴や，貯蔵した脂質をβ-酸化によりアセチル CoA にまで分解するためのペルオキシソーム，その他，ミトコンドリアが多数，観察される。*pex6* 変異株は，この脂肪滴を材料とした脂肪酸β-酸化を行うことができないため，結果として，アセチル CoA を出発物質としている付着器のメラニン合成ができないことを明らかにしていた^{1,2)}。このように，植物病原菌の付着器形成プロセスは，ペルオキシソームの形成を必要としている。

SAKAI Yasuyoshi^{1,3}, TAKANO Yoshitaka²

^{1,2} 〒606-8202 京都市左京区北白川追分町

³ 〒332-0012 埼玉県川口市本町 4-1-8

川口センタービル

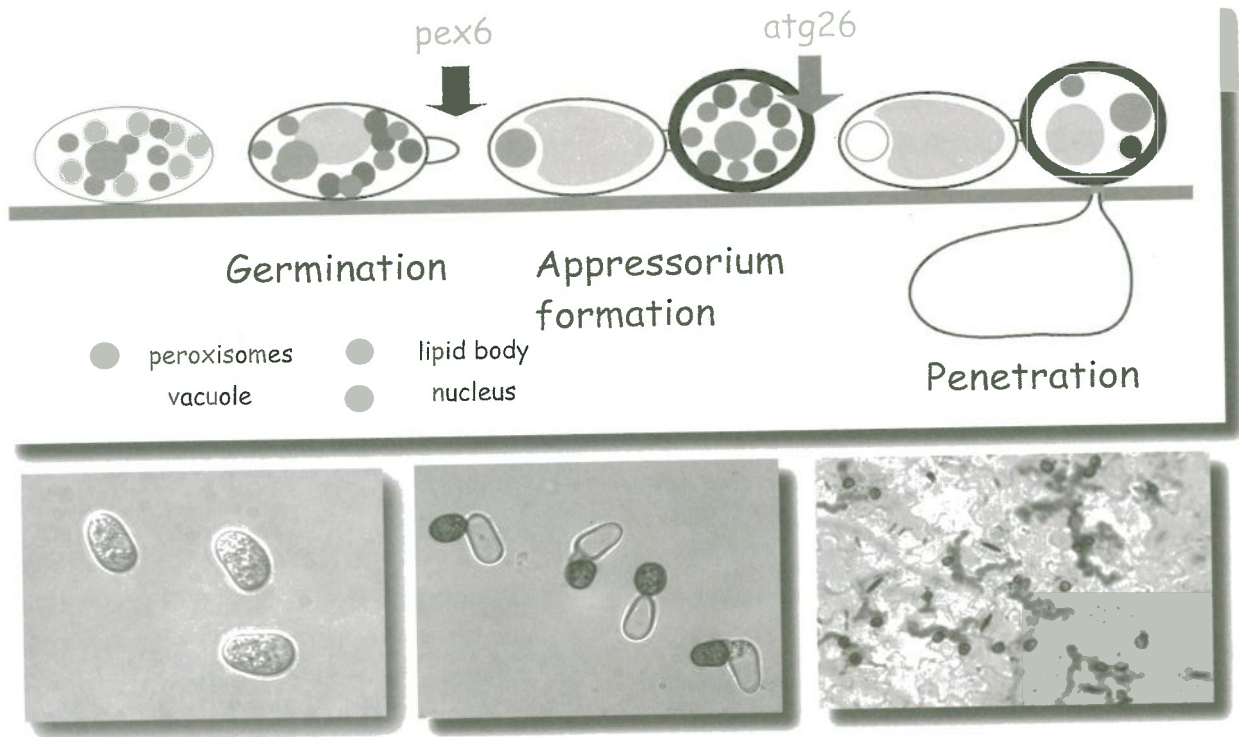


図1 植物病原菌 *Colletotrichum orbiculare* の葉上における付着器形成の分化過程と宿主への侵入

分生孢子から、メラニン色素を持つ黒い付着器が形成され、そこから宿主へ侵入する。ペルオキシソーム形成欠損 *pex6* 変異は分化過程を抑制し、ペルオキシソーム分解 *atg26* 変異は侵入過程を抑制する。

今回、我々は、この植物病原菌の感染の過程において、Atg26 が関わるペキシソファジーが起こっていること、さらに Atg26 が植物病原性の発現にきわめて重要な役割を果たしていることを明らかにした³⁾。すなわち、ペルオキシソーム形成と同時に、ペルオキシソーム分解が、植物感染過程の細胞内で巧みに制御されながら行われていることが明らかにされたのである。以下、その詳細について述べる。

2. メタノール資化性酵母 PpAtg26 の分子構造とペキシソファジーにおける機能

Atg26 は、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* においてペキシソファジーに必要な因子として、先に我々が世界に先駆けて同定していたものであった⁴⁾。Atg26 は、UDP-グルコースとステロールからステロールグルコシド(SG)を

合成する触媒活性をもち、C 末端付近に UDP-グルコースを結合する触媒ドメインを持つ(図2)。

N 末端側には PI4P に強く特異的に結合する脂質結合ドメイン、GRAM と PH-GRAM を持つ⁵⁾。ペキシソファジーを誘導すると、ペルオキシソームを取り囲む新生膜構造体ペキシソファゴソームが出現する。その形成機構は完全には解明されていないが、多くの膜形成にかかわる Atg 分子が、いったん Preautophagosomal structure (PAS) と呼ばれる未知の構造体を集積した後、オートファゴソームの1種であるペキシソファゴソームが形成されることがわかっている^{5,6)}。PpAtg26 は、PI4P 結合領域依存的に、PAS にリクルートされ、その上でステロールグルコシドが合成されないと、ペキシソファゴソームは形成されない。したがって PpAtg26 の脂質結合ドメインと SG 合成触媒領域は、どちらか一方を欠

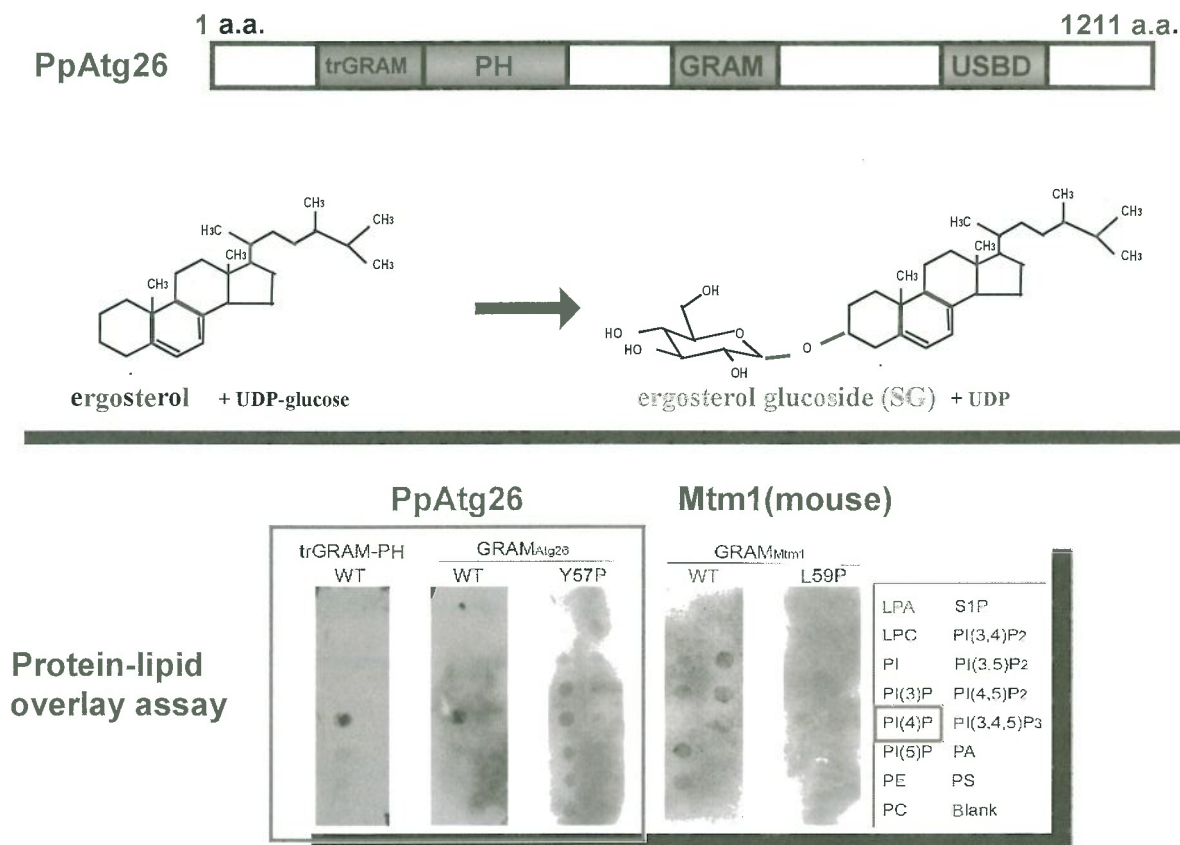


図2 Atg26 の分子構造と生化学機能

Atg26 は、UDP-sugar 結合領域 (USBD) と2つの脂質結合ドメイン (PH-GRAM と GRAM) をもつ。USBD 領域には、エルゴステロールから、ステロールグルコシドを合成する触媒活性がある。一方、2つの脂質結合ドメインは、PI4P に特異的に結合する。

失させても、ペキシファジーは進行しない⁵⁾。言い換えれば、脂質結合ドメインと触媒ドメインの両方がペキシファジーの進行には必要であった。

3. 植物病原菌におけるペキシファジー

ウリ類炭疽病菌の挿入変異株ライブラリーから、キュウリに対する植物病原性を指標に、植物病原性欠損株を分離し、挿入部位の DNA 塩基配列から変異遺伝子を同定したところ、その一つに *CoATG26* が同定された。そこでまず、野生株の感染過程でペキシファジーが起こるのかを調べることにした。その結果、胞子が付着

器へと分化する過程では、ミトコンドリア数の減少に比較して、ペルオキシソーム数が有意に減少すること、その過程において、隔離新生膜のマーカータンパク質である Atg8 が、ペルオキシソームを包み込む様子が観察され、ペルオキシソームのオートファジーによる分解が確認できた³⁾。

一方、*Coatg26* 変異株では、ペルオキシソーム数の減少は、野生株ほどには観察されず、メタノール資化性酵母の場合と同じように、ウリ類炭疽病菌においても *CoAtg26* は、ペルオキシソーム分解に関与する分子であることが明らかとなった。

4. *Coatg26* 変異株の植物感染性

ペルオキシソーム形成不全の *Copex6* 変異株と同様に、*Coatg26* 変異株は、植物感染性を失っていたわけだが、その細胞レベルでの表現型には、大きな違いが見られる（図3）。*Copex6* 変異株は、先に述べたように、付着器形成に伴う分化過程に不全が認められたが、*Coatg26* 株では、ペルオキシソーム形成・メラニン合成とともに正常で、付着器への分化に異常はみられなかった^{1,3)}。

しかし、植物宿主細胞への侵入は、野生株と比較して、*Coatg26* 変異株では、明かな不全が認められ、*Coatg26* 変異株は、宿主への侵入段階での障害が認められた。

ペキシソファジー不全と宿主侵入不全との関係を、さらに解析するために、メタノール資化性酵母の場合と同様に、*CoAtg26* の各ドメイン欠損変異体を、*Coatg26* 変異株に導入し、ペキシソファジーと植物病原性との関連性を調べた(図4)³⁾。その結果、本病原菌が、植物病原性を発現するためには、PH-GRAM・GRAM の2つの脂質結合ドメイン、さらに、SG 合成能の両者が必要であった。これは先に述べた *Atg26* のメタノール資化性酵母における分子生理機能から考えて、ペキシソファジーが、植物病原性の発現に必要であることを、きわめて強く示唆する結果であった。

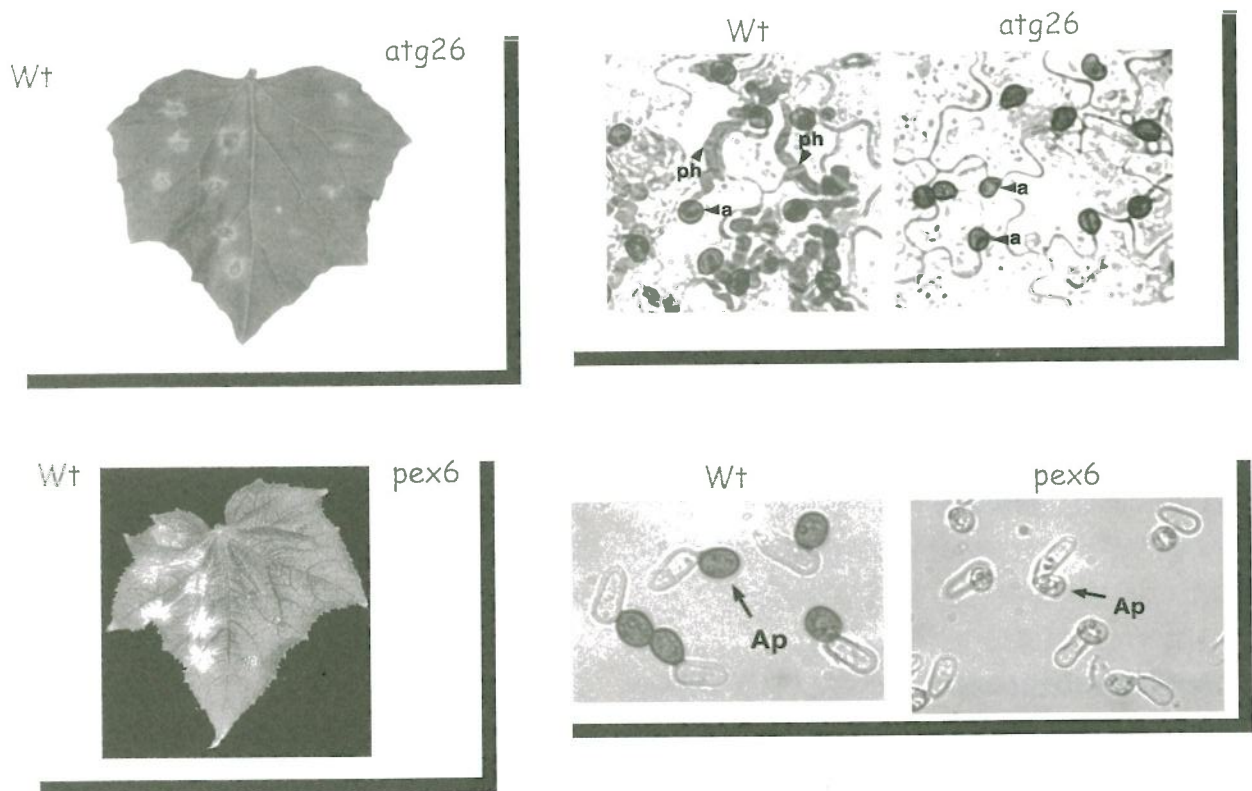


図3 ペルオキシソーム形成変異 *pex6* 株 とペルオキシソーム分解変異 *atg26* 変異株の、植物病原性における表現型

両変異株ともに、植物病原性を失っているが、*pex6* 変異株では、付着器への分化が不完全で、付着器が、メラニン色素による黒色を呈さないのに対し、*atg26* 変異株では、見かけ上、付着器の形成は正常である。しかし宿主へは侵入しない。

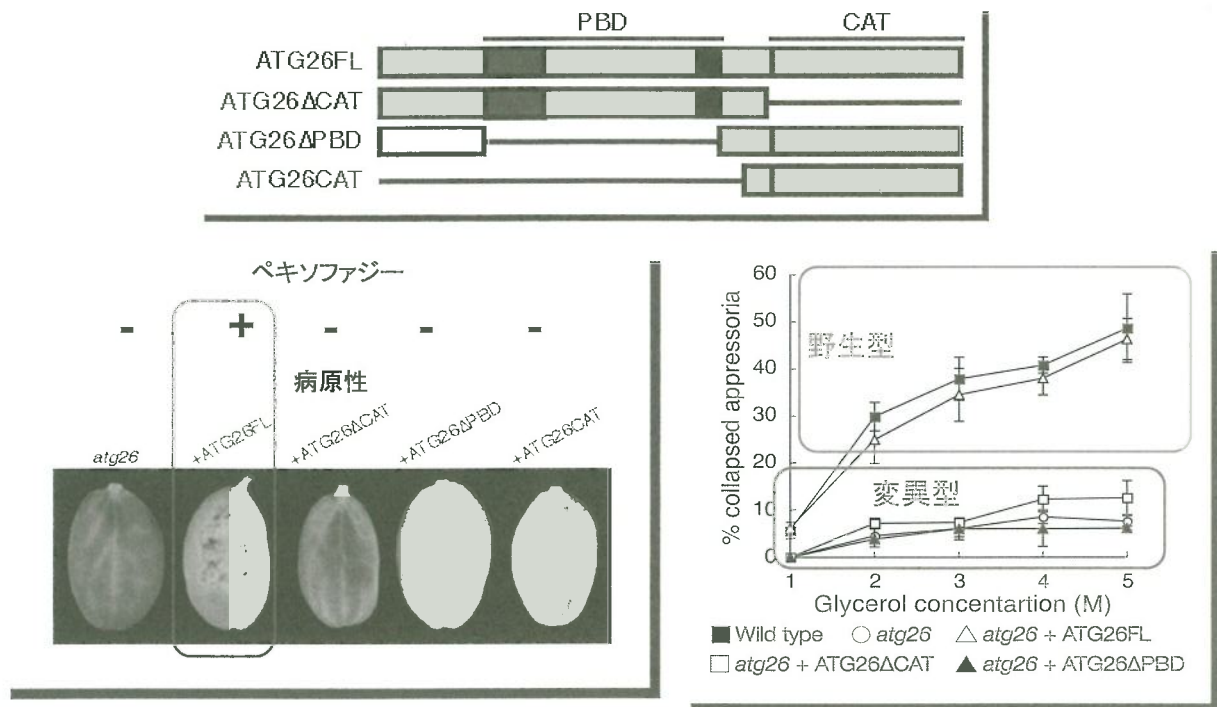


図4 CoAtg26 ドメイン欠失株を用いた表現型解析

USBD 領域を欠損し SG 合成触媒能を失った *Atg26* ΔCAT, 2つの脂質結合ドメインを欠失した *Atg26* ΔPBD, SG 合成触媒能のみをもつ *Atg26* CAT をもつプラスミド (上段) を, それぞれ, *atg26* 欠損変異株に導入し, 3つの表現型, すなわち, (下段 左) ペキシソファジー, 植物病原性, (下段 右) 低高浸透圧液内における付着器細胞の崩壊度を調べた。その結果, これらのすべての表現型の発現には SG 合成能と脂質結合能の両者が必要であり, これらが非常に強い関連性を示していることが明らかとなった。

5. ペキシソファジーとオートファジーの植物感染菌における意義

なぜ, ペキシソファジーが, 植物病原性に必要なのか? まだ謎に包まれたままである。しかし, その糸口になるかもしれない結果が得られている。ドメイン欠失株を含めペキシソファジー欠損変異体では, その付着器細胞が高浸透圧耐性を示したことである(図4)³⁾。この表現型のもつ真の生理的意義は現在のところわからない。炭疽病菌が植物細胞に侵入するためには, 付着器細胞が重要な役割を果たしており, 本細胞内の膨圧上昇が機械的侵入力を生み出している。ペキシソファジー欠損変異体が示す高浸透圧耐性は, この付着器の細胞強度の低下を示している

可能性があり, このことが付着器の侵入機能に障害を与えているのかもしれない。糸状菌には, 細胞が物理的傷害を受けた時に, 細胞膜をふさぐオルガネラとして, Woronin ボディが知られている。Woronin ボディは, ペルオキシソームの一種で, 植物感染にも必要であることから, Woronin ボディ分解と植物感染性の関連についても今後興味深い^{7,8)}。

一方, ウリ類炭疽病菌の野生株では, 分化過程の初期段階では, 細胞質に局在させた蛍光タンパク質の液胞への蓄積が観察されており, 選択的オートファジーであるペキシソファジーのみならず, 非選択的オートファジーの誘導も認められる。イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* を用いた研究から, オートファジー経路を完全に

遮断してしまうような *atg1* や *atg8* 変異体でも、植物感染に傷害があることが、報告されている^{9,10)}。また、ウリ類炭疽病菌の *Coatg8* 変異株では、*Coatg26* 変異株とは異なって、付着器への分化にも異常を示したことから、非選択的オートファジーと選択的オートファジーであるペキソファジーの両方が、侵入過程には必要であり、しかも、そこには、何らかの調節機構があるのではないかと考えている³⁾。

6. 今後の展望:Ag26 によるペキソファジーの活性化と阻害

我々は、CoAtg26 は、非選択的オートファジーに引き続いて、ペキソファジーが起こるための、鍵レギュレーターであると考えている。カビ胞子の分化過程は、きわめて複雑なもので、ペキソファジー活性がその分化の進行状況にあわせて、調節されており、CoAtg26 がそれを制御している、というものである。本分子が PI4P シグナリングの支配下にあることを考えると、その可能性は高い。

SG 合成触媒能をもつ CoAtg26 が植物感染に必要な分子であった。以前から SG 合成と植物病原性の関連が、指摘されていたものの、その理由についてはわかっていなかった。今回、SG 合成がペキソファジーに必要であることが、明らかとなった。Atg26 による SG 合成触媒活性

の阻害剤を開発すれば、病原菌の植物感染を抑制することができるようになるかもしれない。オートファジーによるオルガネラの選択的分解が、新たな農薬デザインのターゲットとなりうることを示すものであり、今後の展開を楽しみにしている。

文献

- 1) Kimura,A.et al. (2001), *Plant Cell* 13, 1945-57.
- 2) Asakura, M. et al. (2006), *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 6345-6354 .
- 3) Asakura, M. et al. (2009), *Plant Cell*, 21, 1291-1304.
- 4) Oku ,M. et al. (2003), *EMBO J*, 22, 3231-3241.
- 5) Yamashita, S. et al. (2006), *J. Cell Biol.*, 173, 709-717.
- 6) Noda ,T. et al. (2002), *Trends Cell Biol.*, 12, 231-235.
- 7) Jedd ,G. et al. (2000), *Nature Cell Biol.*, 2, 226-231.
- 8) Soundararajan, S. et al. (2004), *Plant Cell*, 16, 1564-1574.
- 9) Liu X. H. et al. (2007), *Eukaryot. Cell*, 6, 997-1005.
- 10) Veneault-Fourrey, C. et al. (2006), *Science*, 312, 580-583.

◀ 国内情報 ▶

加工食品中のカビ毒オクラトキシンAとBを
同時に高感度検出する技術の開発香川大学 農学部
川村理・佐々木絢子

腎発がん性カビ毒であるオクラトキシン (OT) A と B を同程度認識するモノクローナル抗体を作製し、これを用いたイムノアフィニティーカラムを作製した。これを従来の物理化学的クリーンアップ法の代わりに用い、簡便かつ高感度に加工食品中の OTA と B を同時に検出する方法を開発し、市販加工食品 (コーヒーと削り節) の OTA と B の汚染調査を行い、OTA と B の汚染レベルを明らかにした。

1. マイコトキシン

マイコトキシン (カビ毒)¹⁾ は、主として圃場又は保存中の穀物などに付着・増殖した有毒真菌 (カビ) が産生する 2 次代謝産物で、300 種類以上が知られている。マイコトキシンは、一般的に熱に安定であり、通常の加工・調理程度の加熱ではあまり分解されることなく、食品に残留する。また、マイコトキシンは、汚染飼料を摂取した家畜の乳汁、卵、肉などに移行し、家畜を経由し、食品汚染 (マイコトキシンの 2 次汚染) することも知られている。マイコトキシンには発がん性、免疫抑制作用、催奇形性や内分泌攪乱作用などを有しており、比較的微量摂取でその毒性を発現することから、マイコトキシンの食品汚染は食の安全を確保する上で重要な課題の一つである。

また、農林水産省が優先的にリスク管理を行うべき有害化学物質のリスト (平成 18 年 4 月 20 日) において²⁾、29 項目中 9 項目 (約 1/3) がマイコトキシンであり、一般消費者やマスコミなどにはあまり認知されていないが、専門家には、マイコトキシンを重要な健康危害因子として認識している。

KAWAMURA Osamu , SASAKI Ayako
〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393

2. オクラトキシン

オクラトキシンは、オクラトキシンA (OTA) とその脱塩素体で OTA よりは毒性が 1/3~1/20 程度ながら同様な毒性を有しているオクラトキシンB (OTB, 図 1) が知られている。国際がん研究所は、OTA をクラス 2b (動物実験で発がん性が認められ、ヒトでも発がん性リスクがある物質) と位置付けている。また、OTA は上記リストの「優先的にリスク管理を実施する必要のある危害要因」に挙げられている。オクラトキシン類は、*Aspergillus ochraceus* や *Penicillium verrucosum* など数十種類によって生産され、腎障害性、催奇形性、腎発がん性などを有している。OT の生産菌は熱帯から亜寒帯に分布していることや血清タンパク質に結合し長期間生体内に残留することから、穀類 (麦類やトウモロコシ) その加工品、ワイン、ビール、コーヒー、ココア製品、乾燥果実、肉類とその加工品など最も広範囲な食品を汚染している³⁾。国内では国産の豚⁴⁾ やヒト⁵⁾ の血中汚染が高頻度にあることが知られており、最近の国内汚染調査の結果、小麦粉、パスタ、そば、レーズン、チョコレート、インスタントコーヒー、ココア、ビールやワインなどで汚染頻度が高いことが報告されている⁶⁾。日本でのオクラトキシン

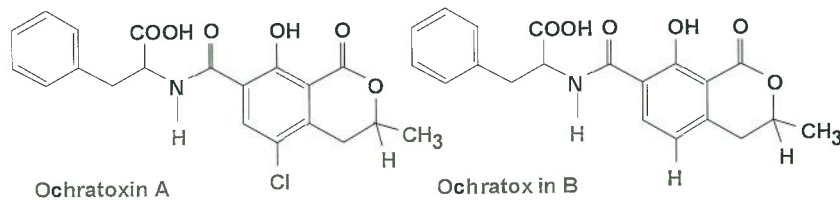


図1 オクラトキシンAとBの構造式

の基準値は設定されていないが、EUではベビーフードで0.5 ppb、ワインとブドウジュースで2 ppb、穀物加工品で3 ppb、未加工穀物や焙煎コーヒーで5 ppb、インスタントコーヒーとレーズンで10 ppbを最大基準値に設定しており、2008年Codex委員会では、5 ppb(小麦、大麦、ライ麦)を最大基準値として採択した。これらの動向から、近い将来、日本において何らかの規制が設定される可能性が高い。

現在、規制値が設定されているのはOTAのみであるが、ダイオキシン類と同様に弱いながら同じ毒性を持つOTBを加味してオクラトキシンのリスク評価を行う必要があると筆者は考えており、そのためには、加工食品中の簡便かつ高感度なOTAとBの同時分析法の確立が不可欠である。

3. イムノアフィニティーカラム

チョコレート、インスタントコーヒー、ココ

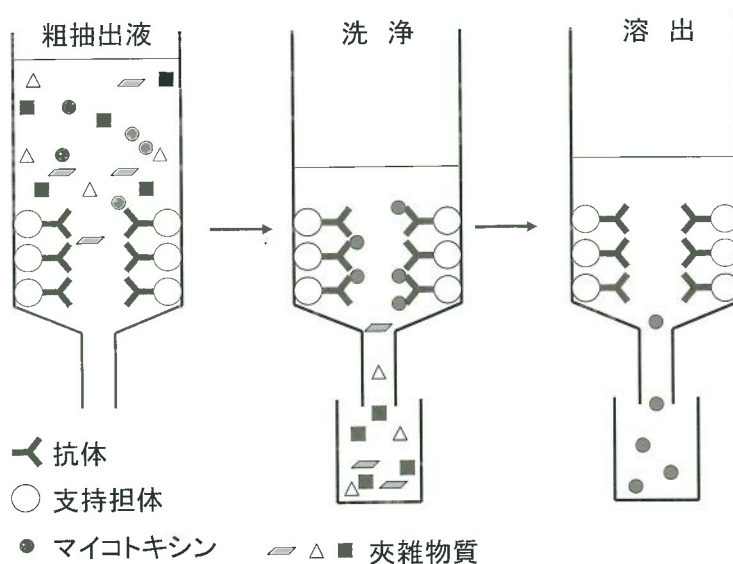


図2 イムノアフィニティーカラムの原理

ア、ビールやワインなど加工・加熱食品中には、従来の物理化学的クリーンアップ法では簡単に除去できない分析に支障をきたす夾雑物質を多く含んでおり、

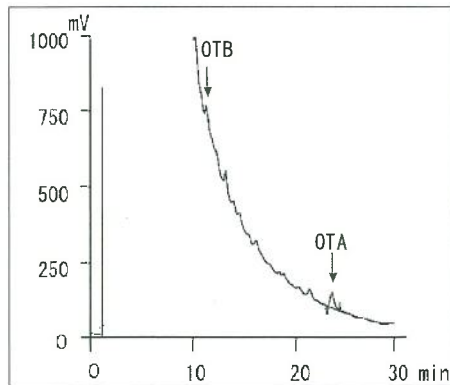
多くの行程と時間や熟練した技術などが必要で、多数の食品中の微量のマイコトキシン分析は、大規模に行われてこなかった。また、従来法では、クロロホルムなどの毒性の強い有機溶媒などを大量に使うなど、実験者の健康や環境に負荷を与えるなどの問題もあった。

マイコトキシンに対する抗体を結合させたイムノアフィニティーカラム(IAC)をクリーンアップ法として用いる方法は(図2イムノアフィニティーカラムの原理)、抗原抗体反応という特異性の高い方法を利用するため、目的物質を複雑な夾雑物質が存在しているマトリックスから容易にクリーンアップすることができる(図3焙煎コーヒー豆の分析例)。また、IACで用いることで夾雑物質をほとんど除去することが可能なので、分析前のサンプルをかなり濃縮できるのでLC/MS/MSなど高価な機器でなく、一般的なHPLCでも高感度に分析することが可能である。さらに、毒性の強い有機溶媒をほとんど使用せず、操作も用意であることから、実験者の健康や環境に負荷を与えることなく、多数検体分析に適した方法である。

4. 加工食品中のオクラトキシンAとBの同時分析

オクラトキシン-タンパク質複合体で免役したマウス脾臓細胞を用い常法により細胞融合を行った結果、OTAとOTBに同程度に反応するモノ

DEA固相抽出法(物理化学的方法)



イムノアフィニティーカラム法

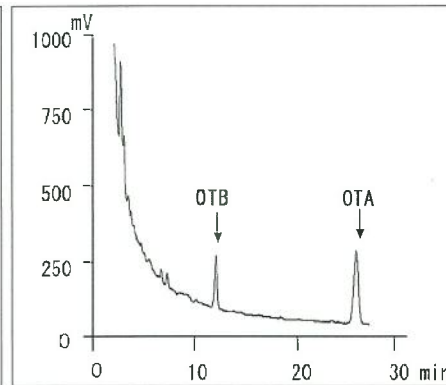


図3 焙煎コーヒー豆をDEA固相抽出法(物理化学的方法, 従来法)とイムノアフィニティーカラム法でクリーンアップ後のHPLCのクロマトグラムの比較

クローナル抗体 OTB.2 を得た。抗体産生細胞ハイブリドーマを無血清培地 Hybridoma-SFH (GIBCO) で大量培養後、抗体を精製し、Affi-Gel 10 (Bio-Rad) と結合させた。抗体結合ゲルを詰めたミニカラムを作製した。

(1) コーヒー

焙煎コーヒー豆(粉碎したものも含む)の場合、いくつかの抽出法について検討したが、市販されているコーヒーメーカーを使用して熱水抽出する方法が最も優れていた。すなわち、微粉末に粉碎した焙煎コーヒー豆 10 g を市販のペーパーフィルターに入れ、蒸留水 140 mL をセットした。電源を入れ、コーヒー熱水抽出を得た。放冷後、5%重曹で pH を 7.3 に調整し、ガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ液 10 mL を IAC でクリーンアップした。IAC は 0.01M リン酸緩衝生理食塩水 pH 7.3 (PBS) 10 mL を流し平衡化した後、サンプル溶液を負荷した。次いで、PBS 10 mL でカラムを洗浄後、3 mL のメタノールで溶出した。溶出液は遠心エバポレーターで溶媒を留去後、0.2 mL の移動相に再溶解し、0.05 mL を蛍光 HPLC で分析した。HPLC は、カラムは CAPCELL PAK C₁₈MG (4.6×250 mm, 粒子径 5μm, 資生堂), 移動相はアセトニトリル:水:酢酸 (40+58+2), 蛍光検出器は、島津製作所 RF-10AD(励起 335 nm, 蛍光 465 nm)を用い、カ

ラム温度 40℃で行った。インスタントコーヒーは、5 g を 200 mL の 1% 重曹に溶解後、ガラス繊維ろ紙でろ過した。飲用コーヒー(缶コーヒーなど)では、5%重曹で pH を 7.3 に調整し、ガラス繊維ろ紙でろ過したろ液をそれぞれ 10 mL を上記と同様に IAC でクリーンアップ後、HPLC で分析した。添加回収実験の結果を

表 1 に示した。回収率は 93.1~117.8% で RSD は焙煎コーヒーで 3.7~6.7% でやや高かったが、インスタントコーヒー及び飲用コーヒーでは 4% 以下であり、ほぼ満足できる結果であった。

本法を用いて市販の焙煎コーヒー豆(48 検体)、インスタントコーヒー(29 検体)と飲用コーヒー(53 検体)を分析した。また、検出限界以上の OTA 及び OTB が検出された場合は全てメチル化を行い確認した。その結果(表 2)、焙煎コーヒー豆では OTA が 30 検体(62.5%, 平均 0.18 ppb)、OTB が 18 検体(37.5%, 平均 0.07 ppb)で検出され、インスタントコーヒーでは OTA が 29 検体(75.9%, 平均 0.47 ppb)、OTB が 8 検体(27.6%, 平均 0.23 ppb)で検出され、飲用コーヒーでは OTA が 46 検体(86.8%, 平均 0.008 ppb)、OTB が 25 検体(47.2%, 平均 0.004 ppb)で検出された。いずれの検体も EU の基準値を上回るものはなかったが、今回分析した 130 検体のコーヒーでは、75% が OTA 陽性であり、39% が OTB 陽性で高頻度に汚染されていた。また、コーヒーが比較的高頻度で OTB 汚染があることを初めて明らかにした。さらに、インスタントコーヒーが比較的高濃度汚染していたが、実際に飲む濃度に換算して比較すると、焙煎コーヒー(陽性検体の平均値 OTA 0.013 と OTB 0.005 ppb) > 飲用コーヒー(陽性検体の平均値

表1 コーヒーおよび削り節での添加回収実験

n=3

検体	添加量	OTA			OTB		
		回収率(%)	SD(%)	RSD(%)	回収率(%)	SD(%)	RSD(%)
焙煎コーヒー豆	0.2 ppb	96.6	3.6	3.7	100.7	5.7	5.7
	1.0 ppb	93.1	5.8	6.2	98.5	5.6	5.7
	5.0 ppb	94.3	6.3	6.7	96.4	7.0	7.3
インスタントコーヒー	0.2 ppb	117.8	3.2	2.7	100.3	2.4	2.3
	1.0 ppb	100.5	3.2	3.2	96.0	1.9	1.9
	5.0 ppb	100.6	0.4	0.4	99.1	0.6	0.6
飲用コーヒー*	0.2 ppb	108.0	0.8	0.7	97.9	1.5	1.6
	1.0 ppb	108.4	0.8	0.7	104.5	0.9	0.9
	5.0 ppb	104.5	0.6	0.6	102.0	0.2	0.2
削り節	0.2 ppb	86.8	1.3	1.5	88.3	4.8	5.4
	2.0 ppb	91.7	2.0	2.2	87.9	5.1	5.8
	20.0 ppb	85.4	0.7	0.8	88.0	0.3	0.3

*: 缶コーヒー、ペットボトル詰めコーヒー等

表2 市販コーヒーと削り節の分析結果

		検体数	陽性数	陽性率	検出量(ppb)		飲用換算*	
					陽性検体の 平均値	最大汚染 濃度	陽性検体の 平均値	最大汚染 濃度
焙煎コーヒー豆 ^a	OTA	48	30	62.5%	0.18	0.60	0.013	0.043
	OTB		18	37.5%	0.07	0.18	0.005	0.013
インスタントコーヒー ^a	OTA	29	22	75.9%	0.47	2.56	0.002	0.009
	OTB		8	27.6%	0.23	0.56	0.001	0.002
飲用コーヒー ^b	OTA	53	46	86.8%			0.008	0.048
	OTB		25	47.2%			0.004	0.011
コーヒー全体	OTA	130	98	75.4%				
	OTB		51	39.2%				
削り節 ^c	OTA	48	7	14.6%	8.02	50.2	0.72 ^d	
	OTB		4	8.3%	7.59	37.1	0.32 ^d	

* 焙煎コーヒー豆では 10g/140 mL、インスタントコーヒーでは2g/140 mL に換算した値

a: 検出限; 0.015 ppb (S/N >3)、定量限界; 0.04 ppb (S/N >10)

b: 検出限; 0.0005 ppb (S/N >3)、定量限界; 0.0015 ppb (S/N >10)

c: 検出限; 0.03 ppb (S/N >3)、定量限界; 0.05 ppb (S/N >10)

d: 陽性検体の中央値

OTA 0.008 と OTB 0.004 ppb) > インスタントコーヒー (陽性検体の平均値 OTA 0.002 と OTB 0.001 ppb) の順位となった。

(2) 削り節

過去に OT の高濃度汚染があった節製品 (鰹節など) について分析法を検討し、汚染調査を行った。先行研究の結果、枯れ節などからは OT

はほとんど検出されず、鯉節製造工程で出る副産物である削り節（または削り粉）の汚染が確認されたので、削り節を中心に分析を行った。

いくつかの抽出法を検討した結果以下の方法で良好な結果を得た。すなわち、削り節を粉碎した後、15 gにCH₃CN:1%NaHCO₃ (6+4) 60mLを加え、30分振とう抽出した。抽出液を遠心(3,000rpm, 5分)後、上清をろ過した。ろ液5mLにPBS 45mLを加え希釈し、ガラス繊維ろ紙でろ過した。このろ液10mLをIACに負荷し、コーヒーと同様にクリーンナップ後、HPLC分析を行った。添加回収実験の結果OTAは回収率85~92%, CV3%以下でOTBは回収率87~89%, CV6%以下というほぼ良好な結果であった。

本法を用いて、国内市販削り節48検体を分析した。また、検出限界以上のOTA及びOTBが検出された場合は全てメチル化を行い確認した。その結果(表2)、削り節48検体中OTAが7検体(検出率14.6%)で0.108~50.2ppbの汚染濃度範囲(平均値8.02ppb, 中央値0.72ppb)、OTBが4検体(検出率8.3%)で0.093~37.1ppbの汚染濃度範囲(平均値7.59ppb, 中央値0.32ppb)で検出された。削り節のOTの汚染頻度はそれほど高くないが、1検体で50.3ppbのOTAと37.1ppbのOTBで汚染されている検体があった。また、削り節からOTBが検出されたのは本研究が初めてである。以上のことから、削り節はまれにOTに高濃度汚染されている場合があり、今後監視を続けていく必要がある。

5. おわりに

本法はOTAとBを同程度認識するOTB.2を用いた加工食品中のOTAとBを同時に高感度検出する技術であり、これにより、比較的高頻度にOTB汚染があることを明らかにした。また、上記以外に、小麦、玄米、トウモロコシなどの穀物、加工食品としては風味調味料、液体だし、味噌、醤油や紅茶および豚肉への適用が可能であることを確認し、いくつかの市販食品を分析し、OTの食品汚染に関するいくつかの新知見

を得ている。OTの国内での基準値は設定されていないが、世界的動向から、我が国でも設定の方向に向かうのは明らかであり、今後、本IACのキット化に向けて検討を進めていきたい。

謝 辞

本研究は、平成19年度JSTシーズ発掘試験研究助成を受けた成果の一部であり、助成に対して深く感謝いたします。

文 献

- 1) 宇田川俊一ら(2002), 食品安全性セミナー〈5〉マイコトキシン, 中央法規出版
- 2) 農林水産省ホームページ(2009年8月)
http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/chemical.html
- 3) Pfohl-Leszkowicz, A. et al. (2007), *Mol. Nutr. Food Res.* 51 61-99
- 4) Kawamura, O. et al. (1990), *Food Agri. Immunol.* 2, 135-143.
- 5) Ueno, Y (1998), *Food Chem. Toxicol.* 36, 445-449.
- 6) 小西良子ほか(2007), 平成16-18年度厚生労働省科学研究総合報告書: 食品中のカビ毒の毒性及び暴露評価に関する研究.

◀ 国内情報 ▶

感水紙専用画像処理ソフトの開発

¹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

²新潟大学 大学院 環境共生科学専攻

臼井善彦¹・宮原佳彦¹・水上智道¹・林和信¹・中野和弘²

農薬飛散試験などで測定地点に設置された感水紙面上の液斑被覆面積率を自動算出する画像処理ソフトを開発した。本ソフトは、測定開始から被覆面積率算出までの一連の処理をワンクリック操作で行うことができ、算出結果は保存可能である。本ソフトは、市販ソフトの操作に熟練した測定者が同じ測定を行った場合と比較して、同等の被覆面積率を算出でき、作業時間は1/4以下で済む。

1. はじめに

農薬は農作物の安定的かつ効率的な生産に不可欠な資材である。しかし、一部の農薬は人に対して毒性を持つため、生産者に対する健康被害、あるいは農作物への残留農薬がしばしば問題となってきた¹⁾。このような背景の中、2006年5月より食品の残留農薬に関するポジティブリスト制が導入され、生産者はこれまで以上に農薬の適正使用やドリフト防止に対する配慮が求められるようになった。特に日本では欧米諸国と異なり、狭い耕地に様々な作物が栽培されることも珍しくなく、農薬のドリフトに対する懸念が強い。しかし、これまでドリフトを簡易・迅速に評価する手法が確立されておらず、生産者を含めた農業関係者からは、簡便なドリフト評価法の確立を望む声が多く聞かれた。

生研センターでは、2005年度に特別研究チーム（ドリフト）が編成され、ドリフトを簡易かつ精度良く測定・評価する手法について検討し

USUI Yoshihiko¹, MIYAHARA Sumihiko¹,
MIZUKAMI Tomomichi¹, HAYASHI Kazunobu¹
NAKANO Kazuhiro²

¹〒331-8537 さいたま市北区日進町 1-40-2

²〒950-2181 新潟市西区五十嵐 2 の町 8050

てきた。ドリフトの評価法としては、実際に飛散した農薬を捕捉し、その成分量を分析する方法がある。しかし、この方法は一般的に高額な分析機器や高度な分析技術が必要である。また、ドリフトという現象が気象、作物、ほ場等の様々な要因が複合的に作用した結果起こる現象であるため、できるだけ多くの条件で試験を行うことが必要となる。これらのことを勘案し、当センターでは、より簡易なドリフト評価法として、液滴によって黄色から青色に変色する感水紙を用いた評価法を検討した。しかし、感水紙を用いた方法は、目視評価のため、測定者による個人差が出やすく正確な評価は困難であるといった問題点もある。また最近、市販の画像処理ソフトを使用して感水紙面の付着液斑画像から被覆面積率を算出する方法が採られることがあるが、この場合、画像処理ソフトの購入費用に加え、測定者が目視で二値化処理の閾値設定をする必要があるため、多大な労力と時間を要する。そこで、当センターでは感水紙の被覆面積率を簡易かつ精度良く算出できる専用画像処理ソフトを開発したので紹介する。（図1）

2. 開発したソフトの画像処理アルゴリズム



図1 薬液散布時のドリフトの様子

1) 画像データの取得

感水紙サンプル (76×52mm) を A4 サイズの台紙に 8 枚貼付した後、市販のフラットベッド型イメージスキャナにより 800dpi のカラー画像データ (24bit, ビットマップ方式) として取得し、パーソナルコンピュータに保存した。

2) 画像処理

構築した画像処理アルゴリズムでは、まず感水紙のカラー画像データを各色成分 (R, G, B) に分離し、R 成分画像を抽出する (R 画像は B, G 画像よりもコントラストが高いため)。さらに最大 8 面の測定対象エリア対にして、それぞれの測定領域毎の輝度ヒストグラムに基づき、判別分析法により閾値を算出する。算出された閾値をもとに、変色部 (感水紙の素地が液滴の付着により青色に変色した部分) と未変色部 (感水紙の素地で黄色の部分) の二値化を行い、変色部の画素数と測定対象エリアの画素数を演算処理することにより被覆面積率を算出する。また、ラベリング処理を行い、一定画素数以上の塊が検出された場合、ドリフトした微粒子以外の大きな液滴の付着や指紋等による変色部として除去する。(図 2)

3. 開発したソフトの特長

開発したソフトは、プログラミング言語

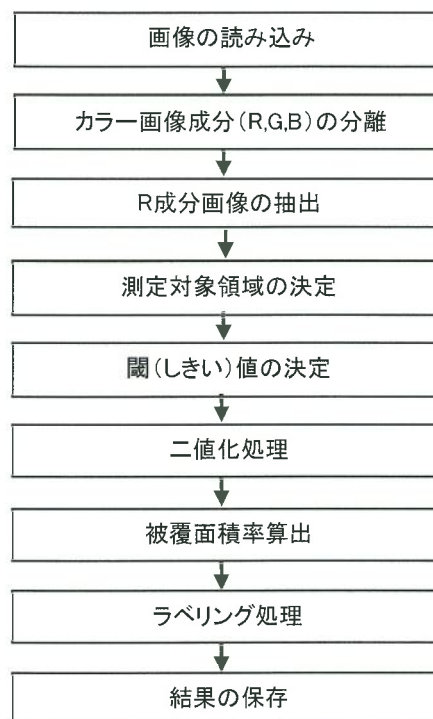


図2 画像処理のフロー

「C#」を用いて開発され、Windows パソコン (OS : Windows2000 Service Pack3 以降, モニタの必要解像度 : 800×600 程度) で動作する。読み込み可能なファイル形式は JPEG, BMP, PNG, TIFF 等一般的なファイルであれば問題ない。同ソフトは、前述の画像処理アルゴリズムに基づいて、感水紙付着液斑の被覆面積率の算出を自動的に行い、ワンクリックで感水紙 1 枚毎の被

覆面積率と閾値を出力・表示する。これらの算出結果は CSV 形式のファイルとして保存可能である。また、ユーザーが任意に測定範囲を設

定する事が可能であるため、サイズの異なる感水紙にも対応可能である。(図3)

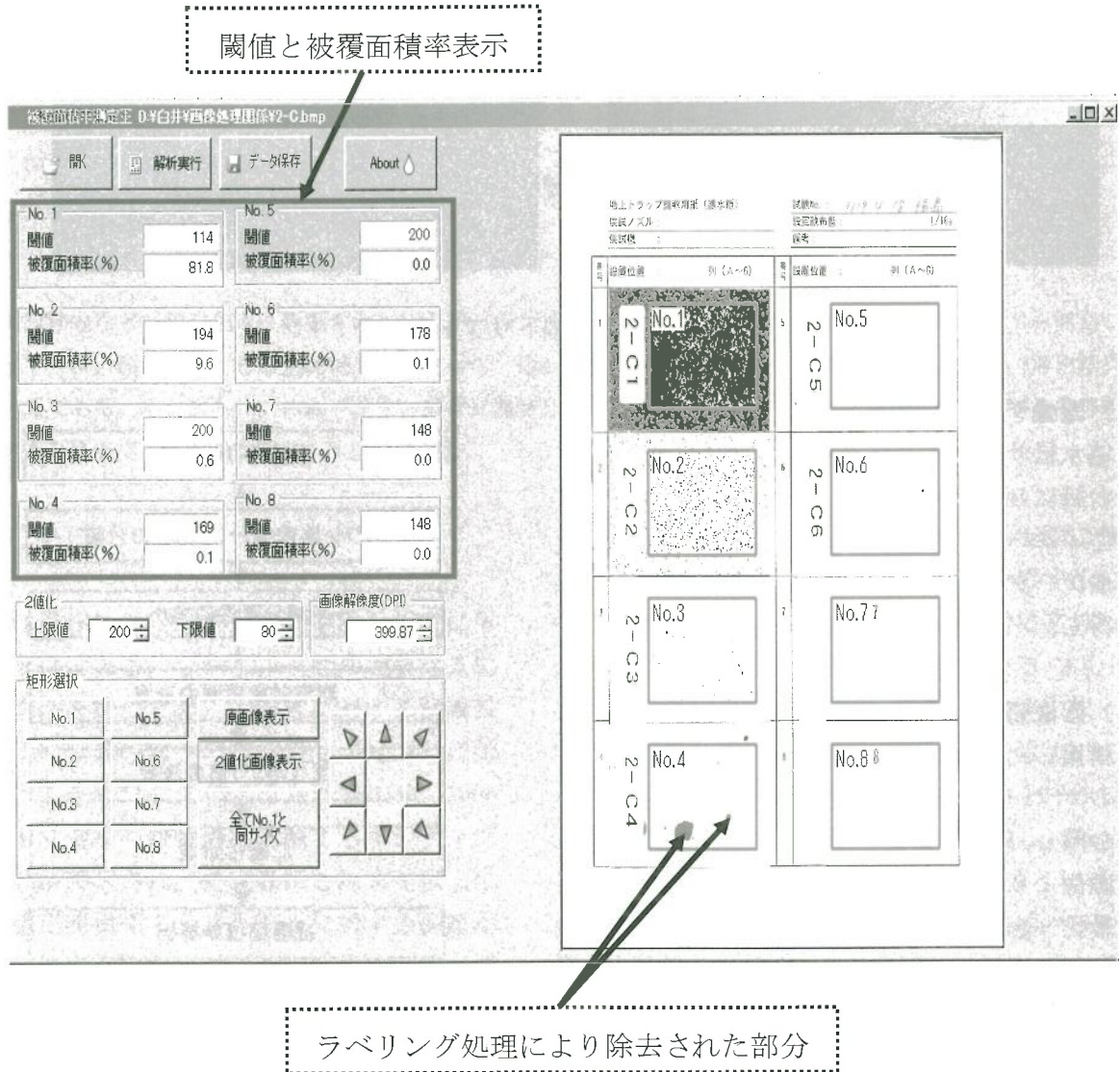


図3 開発したソフトの実行画面

1) 測定精度

同一サンプルに対して、市販の画像処理ソフトを用いて、熟練の測定者が手動設定した閾値で二値化を行い、算出した被覆面積率(以下、手動測定という)と、開発したソフトで算出した被覆面積率(以下、自動測定という)を比較したところ、両者間で高い相関(決定係数 $R^2=0.99$)が認められた。このことから、本研究で開発した自動測定は、熟練の測定者

と同等の精度で測定が可能であり、十分実用的であることが示された。(図4)

2) 作業能率

同一サンプルに対して、手動測定と自動測定でそれぞれ3反復の被覆面積率測定所要時間(A4台紙に感水紙サンプル8枚貼付したものを1画像とした場合)を計測し、1画像あたりの平均測定所要時間を求めた。その結

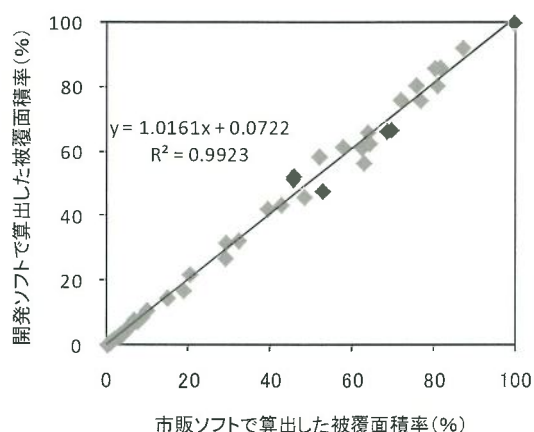


図4 開発ソフトと市販ソフトで算出した被覆面積率の関係

果、手動測定は Windows XP (CPU: Intel Pentium4 2.8GHz) の場合で4分34秒、Windows Vista (CPU: Intel Xeon 3.16GHz) の場合で3分49秒であった。一方、開発したソフトを使用した自動測定は Windows XP の場合で1分4秒、Windows Vista の場合で20秒であった。以上より、自動測定は手動測定と比較してパソコンのOSがWindows XPの場合で4倍以上、Windows Vistaの場合で11倍以上の作業能率を有していることが分かった。

3) 解像度の影響

同一サンプルに対して、異なる解像度(400dpiと800dpi)で画像化し、自動測定で被覆面積率を算出したところ、両者間で高い相

関(決定係数 $R^2=0.99$)が認められた。この結果から、800dpiと比較して解像度の低い400dpiの画像を解析に供しても測定精度への影響は小さいことが明らかとなり、スキャン時間の短縮が可能となった。

4. まとめ

2006年のポジティブリスト制施行後、関係各方面のドリフト対策への取り組みの結果、今日まで、当初懸念されたドリフトの問題が表面化する事態には至っていない。同制度は継続的に実施されていくものであり、ドリフト対策を含めた農業生産現場における農薬の適正使用に関する配慮は、今後も不断の努力と対応が求められていくことは言うまでもない²⁾。今回開発した感水紙専用画像処理ソフトは、感水紙を用いたドリフトの簡易・迅速評価に有効なツールの一つである。ドリフト低減・防止対策に取り組んでいる各方面に利用され、農家をはじめとする現場関係者の一助となれば幸いである。

文献

- 1) 藤田俊一ら(2005), 地上防除ドリフト対策マニュアル, 2-3
- 2) 宮原佳彦ら(2009), 平成20年度生研センター研究報告会資料, 13-25

◀ 地域の先端研究 ▶

カキなどからのノロウイルス検出率の向上
— 細菌を利用した検体処理方法の改良 —東京都健康安全研究センター 微生物部 ウイルス研究科
秋場 哲哉

食品からのノロウイルス検出率向上を目的として、細菌 (*Klebsiella oxytoca*) を利用した検体処理法を考案し有用性の検証を行った。カキ 18 検体、他の食品 15 検体を用いたノロウイルス添加回収実験や市販二枚貝 111 検体を用いた検査で、厚生労働省通知による処理法と比較し回収率、検出率とも向上する結果を得た。細菌を利用した検体処理法は簡易な操作で検出率向上を図れることから、食品からのノロウイルス検査に有効な手法であると考えられた。

1. はじめに

冬期に多発するノロウイルス (NV) が原因の食中毒事件は近年増加傾向にあり、その検査は平成 15 年 11 月 5 日付けの厚生労働省通知¹⁾に記載された方法に基づき実施されている。カキからの NV 検査を例とした場合、まず数個体から取り出した中腸腺を用いて 10% 乳剤を作製後、夾雑物の除去及びウイルスの濃縮を目的に遠心処理を行う。その後、ウイルス遺伝子(RNA)の抽出、逆転写反応を経てリアルタイムPCRによる検査を行いNVの有無を判定するといったものである。カキなどの食品からの NV 検出は、食中毒原因物質の特定や感染経路の究明を行い、感染の拡大や新たな発生を未然に防止する上で重要な検査である。しかし、実際に食品から NV が検出される事例は非常に少なく、東京都では 2006 年度に 1,100 件、2007 年度には 898 件の食中毒関連食品の検査を行ったが、この約二千件の検査で NV が検出されたのはわずか 1 件のみであった。また、これとは別にカキなど二枚貝の調

AKIBA Tetsuya

〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

査を 2006 年度には 169 件、2007 年度には 107 件行ったが NV はまったく検出されなかった。このような結果は、NV による食中毒事件の発生状況から見て不自然であり、食品からの NV 検出法の問題に起因する偽陰性が存在するのではないかと思われた。偽陰性が生じる理由の一つとして、食品成分由来の夾雑物の除去が不十分であるため、残存する夾雑物がその後の検査工程に妨害物質として影響し、食品中に含まれる微量な NV の検出を困難なものとしていることが考えられた。

2. 細菌を用いた検査妨害物質の除去法

我々は食品成分由来の夾雑物に着目し、より効果的な夾雑物除去方法についてカキを用いて検討を行った。まずウイルス遺伝子の抽出時に二段階の精製処理を行う手法を考案し、カキ乳剤を用いた NV 添加回収実験を繰り返した結果、回収率をある程度高めることができた。ところが、実験用カキの在庫が無くなり、保存してあった少々古いカキ乳剤を用いて実験を行った時データに変化が生じた。それは厚生労働省通知どおりに行う従来法によ

る回収率が向上し、二段階精製を行う手法との差がほとんど無くなってしまふものであった。その後異なる遺伝子型の NV を添加したり、試薬を替えて実験を行う等してみても結果は同様であった。我々はこの現象について、古いカキ乳剤を用いた実験ではもともと乳剤中に含まれていた細菌による腐敗や、カキの自己融解が保存中に進んだことによって、検査を妨害する夾雑物が減少したのではないかと考えた。そこで、あらかじめ検査用食品を腐敗させることで検査妨害物質を除去する方法を試みた。カキや魚等の食品を腐敗させた後、得られた腐敗液を NV 添加回収実験用のカキ乳剤に加え 35℃ で一晚培養した。この培養液を従来法どおりに処理して NV の回収率を見たところ、非常に高い回収率を得ることができた。その後、食品の腐敗液から数種の細菌を分離同定した後にそれぞれの菌を用いて実験を行い、最も高い回収率を示す添加用細菌、*Klebsiella oxytoca* を得るに至った。実験に精力的に協力して頂いた、当時東海大学大学院生の田中達也君の頭文字を合わせてこの方法を A3T 法と呼ぶこととした(図 1)。

3. ノロウイルス添加回収実験

生食用マガキ 18 検体、刺身やパン、サラダ等の食品 15 検体を用いた NV 添加回収実験の結果を図 2 に示した。添加回収用ウイルスとして過去に当センターで食中毒患者の糞便から検出した NV 遺伝子型 GI/8 株、GII/13 株を用いた。それぞれの食品から作製した 10% 乳剤に各ウイルスを添加後、従来法と A3T 法による検出、回収を行った。A3T 法に用いる菌液は *K. oxytoca* を 35℃、20 時間普通斜面培地で培養後、PBS (-) を用いて Mcfarland 4 (1.2×10^9 /mL) 程度に調整した。従来法、A3T 法とも遠心処理、RNA 抽出、DNase 処理、逆

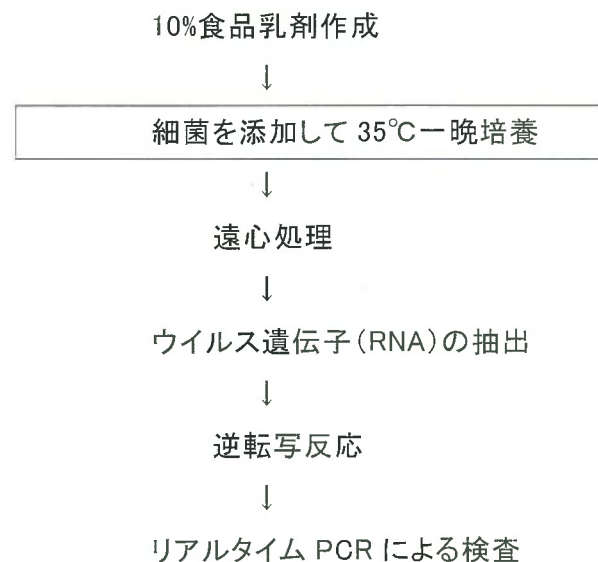


図 1 A3T 法によるノロウイルス検査
厚生労働省通知による検査法に細菌添加培養工程を追加した。

転写反応及びリアルタイム PCR による NV の検出は厚生労働省通知に従った。リアルタイム PCR 用のプライマー及びプローブは GI 検出用に COG1F/COG1R, RING1-TP (a), GII 用として COG2F/COG2R, RING2-TP を用い、50℃ 2分、95℃ 10分を 1 回、95℃ 15 秒、56℃ 1分を 45 回繰り返した。

従来法の NV 回収率の平均は、カキでは GI/8 で 0.3%、GII/13 で 0.5%、他の食品では GI/8 で 1.9%、GII/13 で 7.9%であった。これに対し A3T 法の回収率の平均は、カキでは GI/8 で 8.6%、GII/13 で 11.6%、他の食品では GI/8 で 13.9%、GII/13 で 19.6%に上昇した。食品乳剤の代わりに PBS (-) を用いた対照材料の従来法による回収率は GI/8 で 21.9%、GII/13 で 31.2%であった²⁾。

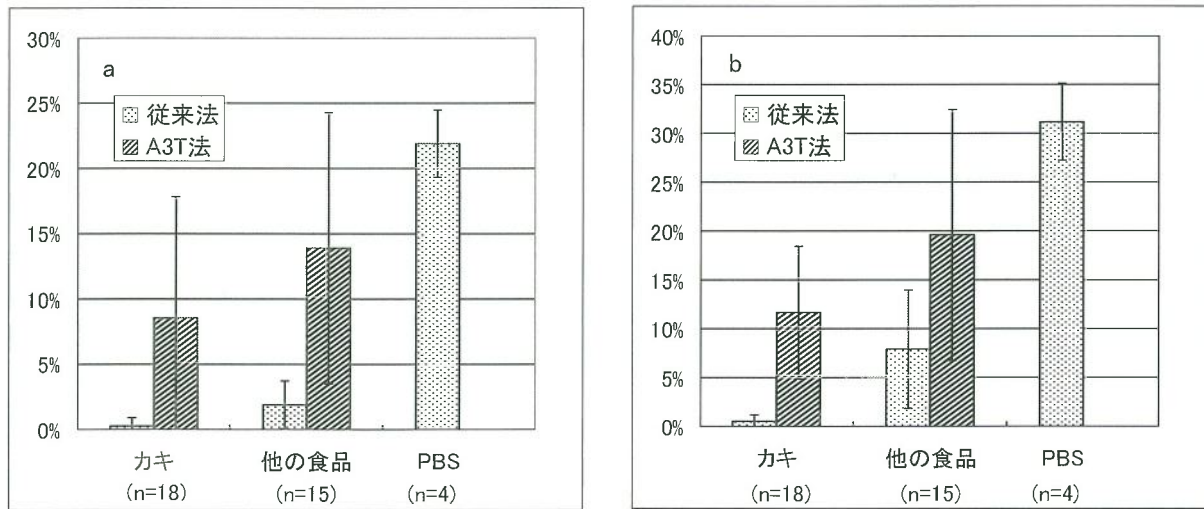


図2 10%食品乳剤に添加したノロウイルスの回収率

a: ノロウイルス GI/8

b: ノロウイルス GI/13

4. 市販二枚貝からのノロウイルス検出

添加回収実験では良好な結果が得られたが、実際の食品に付着あるいは蓄積されているNVはより微量であると予測される。そのような実際の食品検査における効果を検証するため2008年5月から翌2009年2月までの10ヶ月間に購入した市販二枚貝からA3T法を

用いてNVの検出を試みた。111検体の検査を行った結果従来法では1検体(0.9%)のみがNV陽性と判定されたがA3T法では20検体(18.0%)からNVを検出することが可能であった(表1)。特に従来法ではすべてNV陰性と判定された生食用カキ45検体のうち9検体(20.0%)からA3T法によりNVが検出されたことは特筆すべきものと考えられた。

表1 市販二枚貝のノロウイルス検査結果

	検体数	従来法		A3T法	
		陽性数	陽性率(%)	陽性数	陽性率(%)
生食用カキ	45	0	0.0	9	20.0
加熱調理用カキ	32	0	0.0	6	18.8
シジミ	14	1	7.1	2	14.3
アサリ	8	0	0.0	0	0.0
ハマグリ	7	0	0.0	0	0.0
ホンビノスガイ	5	0	0.0	3	60.0
合計	111	1	0.9	20	18.0

5. 展望と課題

食品の腐敗液から分離した *K. oxytoca* による A3T 法の再現性、普遍性を確認するため、腐敗細菌を主とした 10 種の標準菌株を用いた A3T 法による NV 添加回収実験を行った。その結果、いずれの菌株を用いても従来法による NV 回収量を上回った。中でも *Enterobacter aerogenes* NBRC 13534, *Proteus vulgaris* NBRC 3045, *Escherichia coli* NBRC 102203 の 3 株は *Klebsiella oxytoca* NBRC 102593 と同等あるいはそれ以上の回収率を示した³⁾。また、検体の濃縮からリアルタイム PCR によるノロウイルス検出までの一連の検査工程において、カキ由来の成分は主に核酸抽出工程を妨害しており、A3T 法による夾雑物の除去はこの妨害作用を軽減することで NV 回収率を向上させるものと推察された⁴⁾。A3T 法は糖類や蛋白等複数種の食品成分を一度の操作で除去でき、特殊な器具や試薬類を

必要としないことから、実際の NV 検査に応用することは容易である。しかし、検査妨害物質を完全に除去するには至っていないことや一部の食品ではあまり効果が見られないこと、さらには今回の検討結果をどのように行政や食品衛生の場に活かしていくか等が今後の課題と考えられる。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長：食安監発第 1105001 号 (2003)
- 2) 秋場哲哉 他 (2008), 食品衛生学雑誌, 49(6), 407-410
- 3) 秋場哲哉 他 (2008), 東京都健康安全研究センター研究年報, 59, 59-63
- 4) 仲真晶子 他 (2009), 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全・安心確保推進研究事業 平成 20 年度総括・分担研究報告書

◀ 文献情報 ▶

ホルスタインフリージアン未経産牛あるいは経産牛の過剰排卵処置時の凍結融解性選別 X 精子あるいは未選別精液の人工授精による胚生産

Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen.

J. Peippo^a, K. Vartia^b, K. Kananen-Anttila^c, M. Raty^a, K. Korhonen^a, T. Hurme^d, H. Myllymaki^e, A. Sairanen^f, A. Maki-Tanila^a.

^aMTT Agrifood Research Finland, Biotechnology and Food Research, Finland. ^bProAgria Cooperative Breeding Service, Finland.

^cUniversity of Kuopio, Department of Biosciences, Finland. ^dMTT Agrifood Research Finland, Services Unit, Finland. ^eEmbryocenter Ltd., Finland. ^fMTT Agrifood Research Finland, Animal Production Research, Finland.

Animal Reproduction Science, 111, 80–92 (2009)

本論文では、ホルスタインフリージアン未経産牛あるいは経産牛の過剰排卵処置時の凍結融解性選別 X 精子 (200 万精子/tube) あるいは未選別精液 (1500 万精子/tube) の人工授精による胚生産効率を検討している。実験 1 では、実験農場において、8 頭の未経産牛と 6 頭の経産牛に対して、ホルスタイン種種雄牛 1 頭の精液を用いて検討が行われ、移植可能胚についてはすべて性判別が実施された。実験 2 では、3 頭のホルスタイン種種雄牛由来の性選別 X 精子を用いて 28 戸の一般の牧場において 59 回の採卵が、また、32 頭のホルスタイン種種雄牛の未選別精液を用いて 79 牧場において 179 回の採卵が行われた。過剰排卵処置は、発情後 8-12 日から、FSH を 8 回にわけて減量投与することにより実施された。人工授精は、発情開始 12 時間後から 9-15 時間間隔で 2~4 回行われた。精子数の少ない性選別 X 精子は子宮角に、未選別精液は子宮体に注入された。実験 1 において、性選別 X 精子及び未選別精液を用いた場合、未経産牛では、回収胚に占める移植可能胚の割合は 70.3%及び

75.0%、経産牛においては 48.4%及び 100%であった。性選別 X 精子を用いた場合の移植可能雌胚の割合は、未選別精液を用いた場合に比べて約 2 倍であった (未経産牛:96.4%対 41.1%、経産牛:81.1%対 39.8%)。実験 2 における性選別 X 精子あるいは未選別精液を用いた場合の移植可能胚の割合は、未経産牛においては 53.9%及び 65.5%、経産牛においては 21.1%及び 64.5%であった。従って、未選別精液を用いた場合と比較して、経産牛に性選別 X 精子を用いた場合の移植可能胚の割合は有意に低く ($p < 0.005$)、未受精卵の割合は有意に高かった ($p < 0.001$)。変性卵やランク 1 胚の割合は、未経産牛・経産牛の違いや精子性選別の有無による差は認められなかった。また、移植可能胚、未受精卵あるいは変性卵の割合には、種雄牛間の差は認められなかった。以上の結果から、過剰排卵処置時に、標準精子数の未選別精液のかわりに精子量の少ない性選別 X 精子を用いることにより移植可能雌胚の割合を高めることは可能であるが、一般の牧場、とりわけ経産牛においては、精子数の少ない性選別 X 精子を用いた場合に受精率が低下することから、移植可能胚の採卵効率が低くなることが示された。

雌雄産み分け技術は、酪農家や肉用牛繁殖農家で目的とする性の子牛のみを生産することにより、効率的な経営を可能とする。日本においても、フローサイトメーターによる雌雄産み分け用選別精液 (Sort90 など) が販売されるようになり、90%以上の確率で未経産牛においては、希望する性の子牛が生産可能となってきている。しかしながら、本論文にもあるように、経産牛においては雌雄産み分け用選別精液による受胎率が低いため、現在のところ、この技術は未経産牛に限定され、経産牛の後代を取るためには利用が困難である。能力のわかった経産牛の後代生産への性選別精液の利用が望まれており、経産牛においても利用可能な性選別精液の作成・人工授精技術・生体内採卵技術等の開発が今後必要である。

(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 ▶

シロイヌナズナ発達途中の胚乳におけるPolIV依存型siRNAの片親性発現

Uniparental expression of PolIV-dependent siRNAs in developing endosperm of *Arabidopsis*.

R. A. Mosher¹, C. W. Melnyk¹, K. A. Kelly¹, R. M. Dunn¹, D. J. Studholme² & D. C. Baulcombe¹.

¹ Department of Plant Sciences, University of Cambridge, UK, ² The Sainsbury Laboratory, UK.

Nature, 460, 283-286 (2009)

多くの真核生物には、ジーンサイレンシングに深く関わる低分子 RNA(sRNA)が存在している。マイクロ RNA (miRNA) は、メッセンジャーRNA(mRNA)を標的としてその破壊や翻訳阻害を行っていると考えられており、最も研究が進んでいる sRNA といえる。しかしながら、シロイヌナズナの花器官では、蓄積している sRNA のわずか5%が miRNA であり、その他の大部分を占めるのが低分子干渉 RNA(siRNA)と呼ばれる sRNA である。siRNA は数千の遺伝子座から転写され、10 万を超える種類があるとされている。ほとんどの siRNA の生合成は、DNA 依存型 RNA ポリメラーゼ II の相同タンパク質である RNA ポリメラーゼ IV 依存的であり、これらを p4-siRNA と呼んでいる。これまでの先行研究の結果、いくつかの p4-siRNA はストレス応答に関与することが報告されている。また、DNA や、クロマチンの後天的(エピジェネティック)な修飾に関わるものも見つかってはいるが、他のほとんどの p4-siRNA に関しては、機能面を含めて生物学的意味はほとんどわかっていない。本論文において著者らは p4-siRNA の解析をおこなうため、様々な組織でその蓄積量を観察したところ、sRNA は生殖器官で最も多くの蓄積量が見られるとの以前の報告通り、いくつかの p4-siRNA は花器官と若い鞘にのみ存在していた(タイプ I)ものの、発達中のほとんど

の器官に存在するもの(タイプ II)も見つかった。タイプ I の p4-siRNA は、開花 4-6 日後に蓄積量が最大となり、成熟した鞘では検出できないほどまでに低下していた。さらに、この p4-siRNA の蓄積は、胚乳でのみ見られることを明らかにした。また、全器官に存在するタイプ II の p4-siRNA もまた、種皮もしくは胚乳において非常に高い蓄積量が認められた。次に、RNA ポリメラーゼ IV の最大サブユニットである NRPD1A の突然変異体 *nprpd1a* と野生型との相互交雑時の p4-siRNA 発現・蓄積量を調べた。その結果、柱頭親由来(母方)の NRPD1A が野生型であるときのみ、p4-siRNA が検出可能であり、母方の遺伝子型背景を突然変異体型にした場合には、タイプ I、タイプ II p4-siRNA いずれも検出できなかった。また、NRPD1A の遺伝子型が父方か母方かを判別可能なマーカーを用いて、異なる生態型間雑種の実生で発現している NRPD1A の遺伝子型を調査したところ、NRPD1A は母方・父方いずれの遺伝子座も転写されていた。つまり、p4-siRNA が産出される遺伝子座そのものが片親性の発現制御(ゲノムインプリンティング)を受けていることを明らかにした。さらに、異なる生態間雑種から作出した sRNA ライブラリーに対して、次世代シーケンサーを用いた解析も行い上記事実を確認するとともに、シロイヌナズナでインプリンティングを受ける sRNA を大量に見いだした。著者らは、本論文による研究成果が植物のゲノムインプリンティングと RNA サイレncing との関連を示す最初の証拠であるとしている。

今回の結果は自殖性のシロイヌナズナ用いたものであるが、他の植物においても同様に雌性配偶体(特に胚乳)特異的な p4-siRNA の存在を考えさせられる結果であった。著者らは、母方片親性の p4-siRNA 発現は、異種を含む様々な花粉との雑種形成において何らかの機能をもつことによって、進化的上で重要な役割を果たしてきたのではないかと示唆している。

(抄訳：高田美信, TAKADA Yoshinobu, 東北大学大学院 生命科学研究所)

◀ 文献情報 ▶

微生物による環境変化の適応的予測

Adaptive prediction of environmental changes by microorganisms

Amir Mitchell¹, Gal H. Romano², Bella Groisman¹, Avihu Yona¹, Erez Dekel³, Martin Kupiec², Orna Dahan^{1*} & Yitzhak Pilpel^{1,4*}

¹Department of Molecular Genetics, Weizmann Institute of Science Rehovot 76100, Israel.

²Department of Molecular Microbiology and Biotechnology, Tel Aviv University, Tel Aviv 69978, Israel. ³Department of Molecular Cell Biology, Weizmann Institute of Science Rehovot 76100, Israel. ⁴Department of Systems Biology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA.

*These authors contributed equally to this work. *Nature*, 460, 220-224, (2009)

微生物は、常に環境の刺激とストレスに直面している。もっともシンプルな応答反応は、環境をモニターし、ある刺激に対して直接的に応答する方法である。しかし、本論文では、一連の変化が反復的なパターンに従うような予測可能な環境にいる微生物が、1つの刺激をその後の環境への適切な対応に結びつけることができるということを示唆している。哺乳類の消化管を通過する大腸菌と、発酵過程を経る酵母の2つのモデル生物は、古典的なパブロフの条件付けに似た過程で、その次に経験することを予想するように進化している。また、大腸菌を一連の環境変化のうち最初のものだけに繰り返し暴露すると、条件付けされた反応を失ってしまう。

著者らは、まず *Escherichia coli* (大腸菌)を用いて実験を行っている。大腸菌は、生活環のあいだに生息地を変化させ、2つの主要な生息地を使用する。ひとつは哺乳類の腸で、もうひとつは水、土、堆積物などである。腸での環境は、予想可能な環境である。腸を通過するとき、マ

ルトースなどの他の糖に先行してラクトースにさらされる。本論文では、グリーンフルオロセプトプロテイン(GFP)をマルトースオペロンとラクトースオペロンのプロモーターにつないだ形質転換大腸菌を使用して、プロモーター活性を測定している。マルトースオペロンは、マルトースによって誘導されるが、ラクトースでも弱いレベルながら誘導された。この誘導は、大腸菌の菌株に限定されず、また、マルトースによってラクトースオペロンが誘導されることはなかった。また、ラクトースで培養後にマルトースで培養すると、すばやく適応し生育が速かった。その逆では、生育に差はなかった。このことによって、使用する糖の変換において、非対称な一方向性の適応戦略(この場合、ラクトースでマルトースオペロンの誘導があるが、逆のマルトースでラクトースオペロンの誘導がないこと)が用いられていることが確かめられている。

次に、マルトースへの暴露なしにラクトースを含む状態で500世代培養すると、マルトースによるマルトースオペロンの誘導は起こるものの、ラクトースによるマルトースオペロンの誘導は、ほとんどなくなった。また、ラクトースで培養後のマルトースでの培養時にみられた生育の速さもみられなくなった。このことによって、大腸菌にみられたラクトースによるマルトースオペロンの誘導は、ラクトースでの培養中に必要なものではなく、エネルギーの浪費であり、その後の利益がこの浪費に勝ることがなければ、このクロストークが排除されるということが暗示されている。また、ラクトースの代わりに、ガラクトースとスクロースを使用した実験では、ラクトースの時と同様な、マルトースを含む培地での生育の改善がみられず、このクロストークはラクトース特異的であった。このことは、今回観察された予想能力は、微生物の生育環境における刺激の特異的な組み合わせに反応できるように進化したことを示唆している。これらのことから、著者らは、後に起こる糖の変更を予想することは、大腸菌にとって自然な

生育環境によって選択された、順応形質であると結論づけている。

さらに著者らは、環境変化予測が調節ネットワークの中に組み込まれた、より複雑なケースとして、*Saccharomyces cerevisiae* (酵母)の醸造プロセスをとりあげている。酵母が、ワインのような醸造プロセスでうけるストレス環境変化を予測するか検討したところ、醸造工程の初期にうける低pH、熱、エタノールなどの刺激によって、その後うける酸素ストレスに対する耐性が強くなった。また、酢酸や銅などの関連のないストレスでは、後の酸素ストレスに対する応答はみられなかった。これらのことから、酵母

でも、自然環境の変化の方向性に対応した、一方向性の応答があり、酸素ストレス応答に影響するストレスに特異性があることを、酵母の生育を確認することで明らかにした。

今回大腸菌と酵母で確かめられた細胞レベルの環境の予想は、進化の過程で繰り返し選択された順応であり、種の多様性のなかに多く存在しているだろうと著者らは提案している。最後に著者らは、一方向性の非対称な予想は、微生物の洗練された環境応答の強力なツールだろうと結論づけている。

(抄訳：若井丈人，WAKAI Taketo，カルピス株式会社 健康・機能性食品開発研究所)

◀ 文献情報 ▶

魚肉すり身やかまぼこに対する筋形質タンパク質の機能性評価

Characteristics of sarcoplasmic proteins and their interaction with surimi and kamaboko gel.

A. Jafarpour and E.M. Gorczyca

Food Science, School of Applied Science, RMIT Univ., Melbourne, Victoria 3001, Australia.

J Food Sci. 74, N16-22. (2009)

魚肉を原料として製造される冷凍すり身は一般的に、水晒し工程により筋形質タンパク質を含む水溶性の成分を除去し、筋原繊維タンパク質を濃縮して生産されている。今回報告する文献では魚肉タンパク質の主成分の一つである筋形質タンパク質に着目しているが、すり身製造時に不純物として除去されている成分ということもあり、すり身のゲル化に与える影響については過去にも調査がされている。これまでの報告では、筋形質タンパク質はゲル物性を増強させるとの報告例と、脆弱化させるとの両方の報告例があり、ゲル化に与える影響については明確にはなっていない。今回、筆者らはコイの筋形質タンパク質を使用し、すり身のゲル化に与える影響について考察している。

筋形質タンパク質は、コイの筋肉から水溶性画分を抽出し、フリーズドライ処理により乾燥粉末化した上で試料として試験に使用している。その筋形質タンパク質をイトヨリ由来のすり身に添加し加熱ゲルを作製し、そのゲル物性を動的粘弾性やゲル強度測定により評価した。5%~35%まで添加量を調製しゲル物性を評価したところ、濃度依存的に筋形質タンパク質の添加によりゲル強度が向上することが認められた。

これは、すり身の主成分である筋原繊維タンパク質より加熱ゲルが形成される際に、筋形質

タンパク質が筋原繊維タンパク質の重合促進に機能しているためとし、物質の特定は本論文ではなされていないものの、タンパク質間の分子架橋を触媒する酵素であるトランスグルタミナーゼが筋形質タンパク質に含まれており、それがゲル化に寄与していることが原因であると推察している。

一方、加熱ゲルの色調については、筋形質タンパク質に血合筋由来の成分が含まれているために、白度が低下する結果となっている。

また、電子顕微鏡により筋形質タンパク質と筋原繊維タンパク質の相互作用の観察が検討されているが、ゲル強度の向上効果を説明できるような構造の変化は観察されなかった。

冷凍すり身の製造工程における水晒し処理は、トリメチルアミノオキサイド(TMAO)等の冷凍変性に関与する物質や、プロテアーゼ等のゲル形成能を低下させる物質を除去する工程であり、すり身の品質を保つ上では重要とされている。一方、今回報告されているように、筋形質タンパク質を含め、魚肉中の水溶性タンパク質にはすり身の品質を向上させうる成分も含まれている。

現状、筋形質タンパク質は品質に悪影響を及ぼす物質と共にすり身製造時に除去されているが、タンパク質資源の有効利用を推進していく上でも、筋形質タンパク質内のゲル化促進物質の同定や、その回収・精製方法の開発等の研究がさらに進むことが期待される。

(抄訳：久保田光俊，KUBOTA Mitsutoshi，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

**「民間実用化研究促進事業」に係る
平成21年度新規課題の公募（二次募集）について**

生研センターでは、農林水産省の定めた農林水産研究基本計画等に即して農林水産業、食品産業、醸造業等の向上に資する画期的な技術開発を促進することを目的として、民間における実用化段階の研究開発を対象に「民間実用化研究促進事業」を実施しております。

このたび、以下のとおり本事業の平成21年度新規課題の公募の二次募集を行うこととなりましたので、お知らせいたします。

二次募集期間：平成21年9月14日（月）～10月2日（金）

詳細につきましては、当センターのホームページ上にて公表しております。

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

<お問い合わせ先>

生研センター 新技術開発部 民間研究促進第1課

電話：03（3459）6565

FAX：03（3459）6566

E-mail：minkanken@ml.affrc.go.jp

生研センターからのご案内

アグリビジネス創出フェア 開催のお知らせ

アグリビジネス創出フェアは、農林水産省主催による技術交流展示会です。

平成21年度においては、11月25日（水）から27日（金）までの3日間、幕張メッセにおいて、盛大に開催されることとなっており、生産者、産業界、研究者、行政部局等の関係者が一堂に会する機会は、技術シーズとニーズに関わる幅広い人・情報の交流を通じて、食と農林水産の未来を拓く新たな連携の芽が育つこととなるでしょう。

是非、この機会に産学官連携による交流の輪を広げてみてはいかがでしょうか。

- 会 期 2009年11月25日（水）～27日（金） 9：30～16：30
- 会 場 幕張メッセ
- 主 催 農林水産省

詳細につきましては、下記のホームページをご覧ください。

<http://agribiz-fair.jp/>

<お問い合わせ先>

アグリビジネス創出フェア2009事務局（株式会社フジヤ）

電話：03（5560）7731 FAX：03（5548）2838

E-mail：agribiz-ex@fujiya-net.co.jp


 生研センターからのご案内

地域版アグリビジネス創出フェア 開催案内

11月25日（水）から27日（金）までの3日間、幕張メッセにおいて開催されるアグリビジネス創出フェアと連携し、地域においてそれぞれ技術交流フェアを開催しております。

今年度は、以下のとおり予定しておりますので、ご参加・ご来場をお待ちしております。

【北海道地域】

- アグリビジネス創出フェア in Hokkaido

日時：平成21年12月4日～5日

場所：札幌市内で開催予定

（主催：NPO 法人グリーンテクノバンク）

【東海地域】

- アグリビジネス創出産学官・農商工連携

「農林水産・食品産業新技術開発フェア 2009in 東海」

日時：平成21年12月1日（火）

場所：愛知県産業労働センター 6F 展示場

（主催：NPO 法人 東海地域生物系先端技術研究会、東海農政局）

【近畿地域】

- 知財ビジネスマッチングフェア 2009

日時：平成21年10月21日（水）～22日（木）

場所：インテックス大阪

（主催：特許庁、近畿経済産業局、近畿知財戦略本部）

【中国四国地域】

- 中国四国地域アグリビジネス創出フェア

日時：平成21年12月8日（火）

場所：広島市立中小企業会館

（主催：NPO 法人中四国アグリテック）

【九州地域】

- アグリビジネス創出フェア 2009 in 九州

日時：平成21年11月13日（金）

場所：福岡ファッションビル第1会議室

（主催：九州バイオリサーチネット、（独）農研機構、（社）食品需給研究センター、九州食料産業クラスター連絡協議会）

＜お問い合わせ先＞

生研センター 企画部 企画第1課

電話：03(3459)6565 FAX：03(3459)6566

E-mail:brainki1@ml.affrc.go.jp



バックナンバーのご案内
第 134 号
2009 年 7 月 15 日発行

総説

生体との適合性を高めた絹糸の作製と再生医療分野への応用
朝倉哲郎

国内情報

カイコを用い、インフルエンザウイルス吸着剤の合成に必要な酵素を生産することに成功 朴 龍洙
CRES-T 法を利用した新形質花きの開発 四方雅仁・鳴海貴子・佐々木克友・山口博康・間竜太郎・大坪憲弘
緑色光で植物の病害抵抗性を引き出す 石田 豊・工藤りか・山本敬司・末包亜矢子・小松精二
イチゴの植物工場的な生産を可能とする移動栽培装置 林 茂彦・齋藤貞文・山本聡史

地域の先端研究

ナガイモにインフルエンザウイルスの感染抑制作用タンパク質成分(デオスコリンA)があることを発見 三上稔之・畑山一郎・加藤陽治・伊藤聖子・工藤重光・市田淳治・奈良岡馨・柴田浩夫・小田桐弓芽乃

文献情報

未経産牛由来卵子へのコレセミド処理は、核移植胚の発生率、受胎率及び分娩率を向上させる (抄訳: 下司雅也)
ヒナゲシからの花粉側自家不和合性決定因子の単離 (抄訳: 高田美信)
出芽酵母において、Pho91 はリン酸・ポリリン酸代謝を制御する液胞リン酸トランスポーターである (抄訳: 金井宗良)
DHA 複合リポソームによるヒト腫瘍細胞のアポトーシス誘導 (抄訳: 山崎圭樹)

生研センターからのご案内



バックナンバーのご案内
第 133 号
2009 年 5 月 15 日発行

総説

ゲノミクスを背景とした新たな作物育種 矢野昌裕・福岡修一・江花薫子・山本敏央

国内情報

根粒菌および菌根菌との細胞内共生に共通して必要な遺伝子の機能同定 矢野幸司・林 誠
植物の耐乾燥性を向上させる方法 - 生理活性脂質の代謝調節を利用した植物の気孔開閉の制御 - 今井博之
遺伝子組換えエネによるサイトカインの生産 藤原義博
マナモコの放卵・放精行動を誘起する神経ペプチド(クビプリン)の解明 吉国通庸・大野薫・山野恵祐
キュウリホモプシス根腐病の発病機構の解明とそれに基づく防除対策 永坂厚・堀越紀夫・太田弘志・岩館康哉・山口貴之・山田修・古屋廣光・藤晋一・松崎辰夫・門田育生

ディスク式中耕培土機の開発 手島司・後藤隆志・藤井幸人・長澤教夫・大西正洋

地域の先端研究

13年間冷凍されていた精巣組織から体細胞クローンウシ作製に成功 星野洋一郎

文献情報

プロゲステロン感作下での高用量エストロジオールベンゾエート投与は、リピートブリーダー牛の子宮内膜 EGF 濃度の周期的な変化を正常化するとともに、受胎性を回復させる (抄訳: 下司雅也)
助細胞から分泌されるディフェンシン様タンパク質「ルアー」が花粉管を誘引する (抄訳: 高田美信)
細菌の宿主域を変化させるには単一の調節遺伝子で十分である (抄訳: 若井丈人)
アニサキス接触性皮膚炎における IL-4 および IL-13 の機能的役割 (抄訳: 平山健史)

生研センターからのご案内

編集後記

135号をお届けします。本号の総説では板井玲子氏（東京大学）らに土壌からの鉄吸収に重要なイネの遺伝子の発見についてご紹介戴きました。

その他の研究情報としては、加藤康夫氏（富山県立大学）にチューリップ花卉からバイオプラスチック原料の開発、伊藤慎悟氏（京都大学）らに液胞膜で機能するアルカロイド輸送タンパク質、金岡雅浩氏（名古屋大学）らに花粉管ガイダンス物質の同定と種間多様性、中島健一朗氏（東京大学）らに酸味を甘味に変える不思議なタンパク質ネオクリンの活性発現メカニズムの解明、阪井康能氏（京都大学）らに植物病原菌の宿主感染・オルガネラ数の制御とオートファジー、川村理氏（香川大学）らに加工食品中のカビ毒オクラトキシンAとBを同時に高感度検出する技術の開発、臼井善彦氏（生研センター）らに感水紙専用画像処理ソフトの開発、秋場哲哉氏（東京都健康安全研究センター）にカキなどからのノロウイルス検出率の向上について、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）、高田美信氏（東北大学）、若井丈人氏（カルピス（株））、久保田光俊氏（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。（佐々木記）

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**
- 技術シーズ開発のための基礎研究や
応用・発展研究及びベンチャー創業を目指すなら **イノベーション創出基礎的研究推進事業**

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135号

平成21年9月15日発行

発行人 曾根 則人

編集人 浅野 将人

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/>