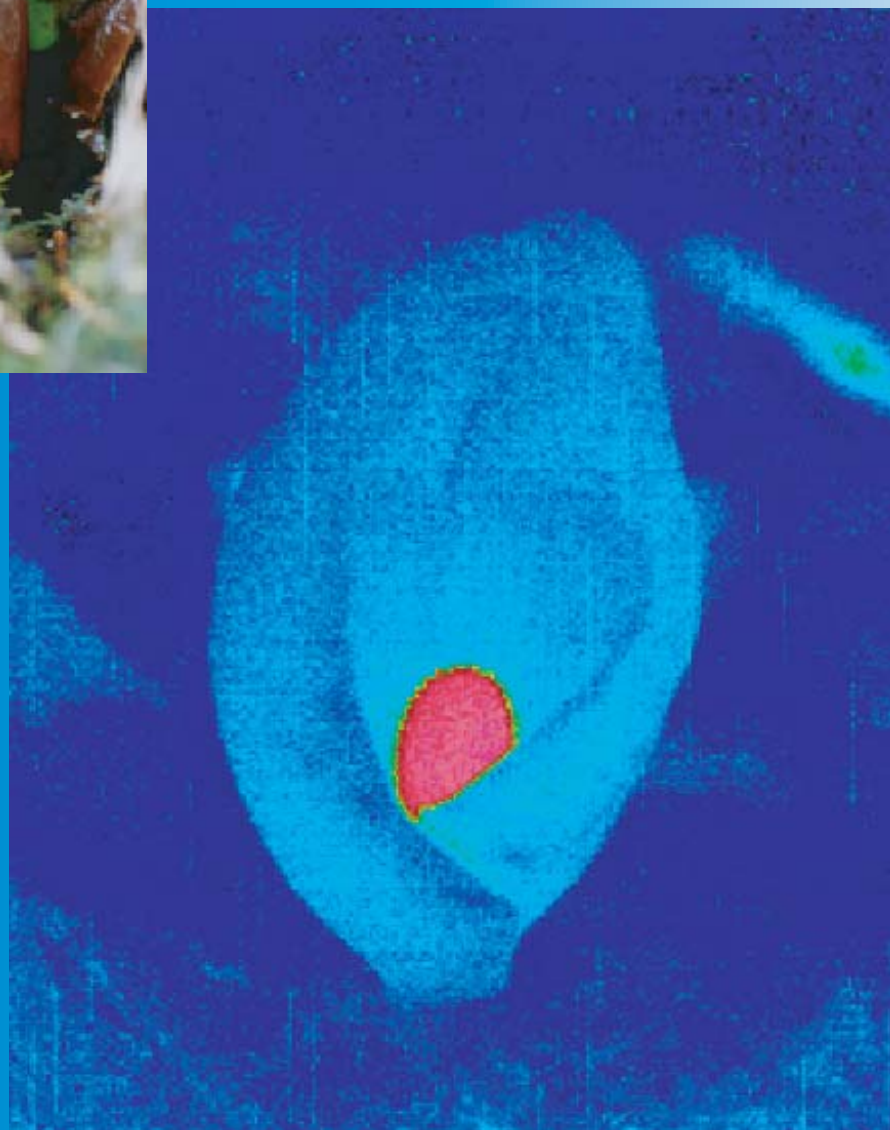


基礎研究推進事業 研究成果

(2005年度終了課題)



独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構
生物系特定産業技術研究支援センター

表紙説明

ミズバショウに似た姿形で早春に花を咲かせるザゼンソウは、北海道・本州・朝鮮の各地域と北米東部に分布している。その肉穂花序（にくすいかじょ：花弁のないたくさんの花が集まり棍棒状になったもの）と呼ばれる器官が特異的に発熱して、氷点下を含む外気温の変動にも拘わらず、その体温を20℃以上の一定温度に維持することができる。表紙は、ザゼンソウの発熱現象をとらえたサーモグラフィー画像である。

（岩手大学農学部附属寒冷バイオシステム研究センター：伊藤 菊一）

基礎研究推進事業

研究成果（2005年度終了課題）

目 次

一 般 型

家畜とヒトの炎症性腸疾患の発生機序と関連性の解明 （(独)農業・生物系特定産業技術研究機構動物衛生研究所／百溪 英一)……………	1
化学環境認識に基づく「昆虫型行動決定スイッチングシステム」の解明 （京都工芸繊維大学繊維学部／尾崎 まみこ)……………	3
昆虫の抗微生物タンパク質の特性解明と利用基盤技術の開発 （(独)農業生物資源研究所／山川 稔)……………	5
細菌「超チャネル」の構造生物学的解析と環境浄化型「スーパー細菌」の創成 （京都大学大学院農学研究科／村田 幸作)……………	7
植物ホルモンアブシジン酸の制御機構の解明とバイオテクノロジーへの応用 （(独)理化学研究所／篠崎 一雄)……………	9
人工制限酵素を用いた高等生物の遺伝子操作とニュー・バイオテクノロジーの創成 （東京大学先端科学技術研究センター／小宮山 真)……………	11
タンパク質工場としての糸状菌の高度利用に関する基盤的研究 （東京大学大学院農学生命科学研究科／北本 勝ひこ)……………	13
ナノプローブによる生物機能のナノ領域でのアクティブ計測 （東京大学大学院情報理工学系研究科／下山 勲)……………	15
若手研究者支援型	
ザゼンソウを模倣した温度制御アルゴリズムの開発とその生物系発熱制御デバイスへの応用 （岩手大学農学部附属寒冷バイオシステム研究センター／伊藤 菊一)……………	17
非メチオニン型翻訳開始機構の解析とその利用法の開発 （(独)農業生物資源研究所／中島 信彦)……………	19
肉食性昆虫の共生微生物が産生する殺虫性タンパク質に関する基礎研究 （近畿大学農学部／松田 一彦)……………	21
微生物による昆虫の生殖操作機構の解明と利用 （(独)産業技術総合研究所／深津 武馬)……………	23

■研究課題名

家畜とヒトの炎症性腸疾患の発生機序と関連性の解明 (H13～17)

■研究の目的

腸の粘膜と筋層の免疫学的機能を分子生物学的に探求することにより、牛のヨーネ病と、ヨーネ菌との関連性が示唆されているヒトの炎症性腸疾患であるクローン病の病理発生機序の比較を行い、両疾患の比較から畜産物の安全性を評価し、さらに、両疾病の解明や対策に役立つ基礎的知見や応用技術を創出することを目的とする。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①ウシヨーネ病とヒトの炎症性腸疾患における粘膜環境維持機構の解明
(◎百溪 英一／(独)農業・生物系特定産業技術研究機構動物衛生研究所)
- ②ヒトクローン病と家畜の炎症性腸疾患における消化管運動機能障害機構の解明
(尾崎 博／東京大学大学院農学生命科学研究科)



百溪 英一



尾崎 博

■研究の内容及び主要成果

- ①インターロイキン 10 (IL-10) がウシヨーネ病の感染から発症における免疫抑制現象の鍵分子であることを実証。さらに、早期診断に有効なインターフェロン γ ELISA 法を、IL-10 発現抑制により 30 倍高感度化する新技術を発明した (国際特許公開)。サイトカインなどの比較遺伝子発現解析により、ヨーネ菌の IL-10 産生誘導特性を証明し、クローン病に特徴的な IL-10 の産生低下現象と相反する特徴を指摘した。牛の神経ペプチドの一種、ウロコルチンをクローニングし、検出系を確立して、新たな診断技術を発明した (国際特許申請済み)。
- ②消化管の筋層内常在型マクロファージの生物学的性状を明らかにし、粘膜とは独立した免疫系の存在を筋層部で証明した。薬物誘発性腸炎モデルや自然発症腸炎モデルでの常在型マクロファージの活性化や増加を解明。筋層免疫反応時にマクロファージが筋層の神経やカハール細胞を傷害することや、マクロファージに由来する IL-1 β と TNF- α が平滑筋に作用して CPI-17 蛋白の発現低下を介して平滑筋の Ca 感受性低下を誘導し、消化管運動機能の低下をもたらすという、新たな消化管病態分子機構を提唱した。

■見込まれる波及効果

本研究で開発した 2 種の診断法はヨーネ病の清浄化に有効であり、畜産上の経済的ロスを低減し、食の安全性と畜産物の品質向上に資することができる。また、炎症性腸疾患における筋層炎症の全体像を明らかにしたことにより、従来の粘膜炎症制御とは異なり、運動機能の改善という新たな視点に立つ治療法開発のための基盤を確立した。

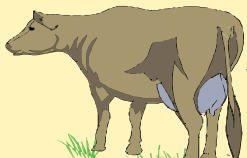
■主な発表論文

- Buza JJ., *et al.*: Neutralization of interleukin-10 significantly enhances gamma interferon expression in peripheral blood by stimulation with Johnin purified protein derivative and by infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in experimentally infected cattle with paratuberculosis. *Infect Immun.* 72(4): 2425-2428.(2004)
- Buza JJ., *et al.*: *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infection causes suppression of RANTES, monocyte chemoattractant protein 1, and tumor necrosis factor alpha expression in peripheral blood of experimentally infected cattle. *Infect Immun* 71(12): 7223-7227.(2003)
- Won KJ., *et al.*: Increased smooth muscle contractility of intestine in the genetic null of the endothelin ETB receptor : a rat model for long segment Hirschsprung's disease. *Gut* 50: 355-360 (2002).
- Ohama T., *et al.*: Chronic treatment with IL-1 β attenuates contraction by decreasing the activities of CPI-17 and MYPT-1 in intestinal smooth muscle. *J Biol Chem* 278: 48794-48804, 2003
- Suzuki T., *et al.*: Muscularis inflammation and the loss of interstitial cells of Cajal in the endothelin ETB receptor null rat. *Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol)*. 287: G638-646 (2004).
- Ozaki H., *et al.*: Isolation and characterization of resident macrophages from the smooth muscle layers of murine small intestine *Neurogastroenterol Motility* 16: 1-13 (2004).

■研究のイメージ

- ①ヨーネ病とクローン病の病理発生における関連性や相違を明らかにし、消費者に対し畜産物の安全性を証明すること。
- ②消化管の研究は特に家畜で十分でないことから、家畜、ヒト、実験動物を比較した消化管粘膜環境維持機構の解明を行うこと。

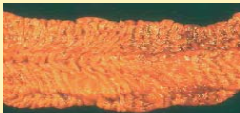
ヨーネ病 (家畜法定伝染病)
(家畜の炎症性腸疾患)





糞便への排菌
牛乳中への排菌

食品衛生上の疑問

炎症性腸疾患の比較 (問題点)



クローン病 (厚労省指定難病疾患)
(ヒトの炎症性腸疾患)

臨床的共通点
慢性下痢
痩せ・体重減少
難治性

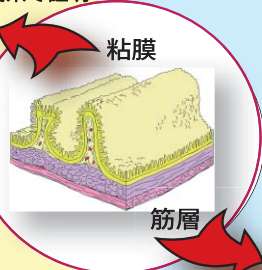
両疾患の関連性解明と疑わしい伝染病の征圧

免疫・分子病理学的研究 (腸管粘膜系主体)

- 粘膜感染時に菌はどう侵入し、そこで何が起るのかを解明
- 腸の上皮細胞とマクロファージの新たな関係を培養系で証明
- 人の腸上皮細胞のスフェロイド培養にマクロファージはアポトーシス(細胞死)を誘導。
- IL-10がヨーネ病の免疫抑制現象と診断の阻害要因であることを突き止め、早期診断法に応用！(国際特許)
- 神経ペプチドウロコルチンの免疫抑制現象への関与を明らかにし、ヨーネ病の新型の診断技術を開発！(国際特許)

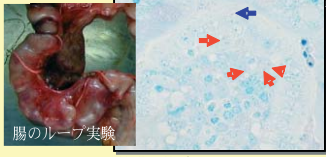
生理・病態機能的研究 (腸管運動系主体)

- 腸の筋層に分布する常在型マクロファージ、その近傍に位置するカハール介在細胞などの未解明細胞群の炎症における機能を解明。
- 実験的クローン病病変における細胞増殖
- 筋層炎症において平滑筋に収縮蛋白質レベルで変化が生じ、腸の運動機能を阻害することを解明！



粘膜
筋層

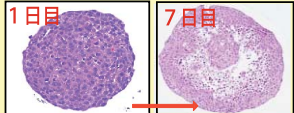
腸のルーブ実験




粘膜に菌が侵入した瞬間

ヨーネ菌が腸のM細胞に取り込まれるとマクロファージがすぐに食べ、免疫抑制サイトカインIL-10が持続的に作られることを証明。

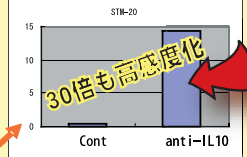
1日目 7日目




抗IL-10/IFN ELISAでのヨーネ病の診断結果



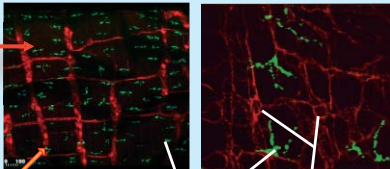
30倍も高感度化 陽性!



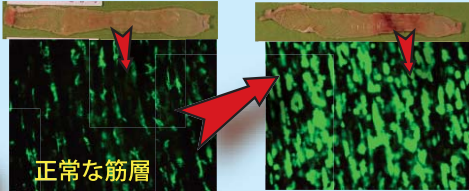
ウロコルチンとCRHの遺伝子検出



筋層間神経叢 筋層常在マクロファージ カハール介在細胞

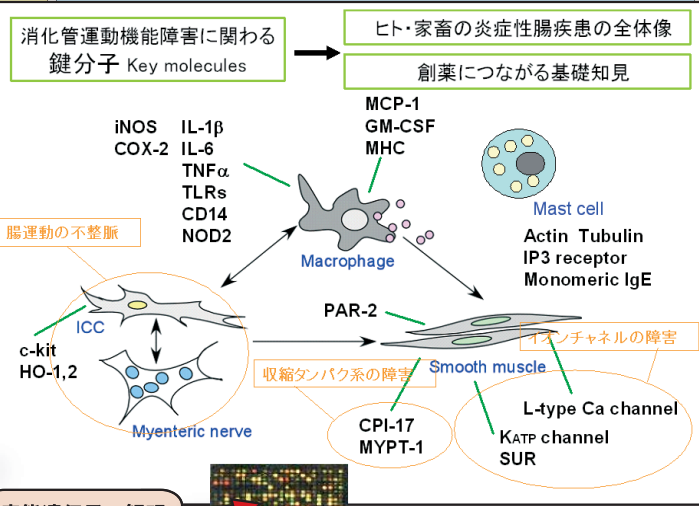


正常な筋層

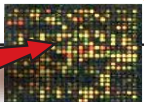


消化管運動機能障害に関わる鍵分子 Key molecules

ヒト・家畜の炎症性腸疾患の全体像 創薬につながる基礎知見



病態遺伝子の解明 DNAマイクロアレイ



新規鍵分子の抽出

ヨーネ病



●社会的出口

- ヨーネ病に対する新たな高感度診断法の発明
- ヨーネ菌感染とクローン病のIL-10産生の差異
- 畜産物の安全性評価の向上

●学問的出口

- ヨーネ病の病理発生機構解明の進展
- 消化管科学のレベルアップ
- 新たな学説の構築
- 新規重要遺伝子の発見と役割解明

■研究課題名

化学環境認識に基づく「昆虫型行動決定スイッチングシステム」の解明 (H13～17)

■研究の目的

簡潔な神経構造を以って豊かな行動を見せる昆虫をモデルに、分子、細胞、個体レベルの研究を階層縦断的に行い、主に、味覚刺激により誘導される摂食行動の切り替えがどのように行われるかに注目して、そのメカニズムを明らかにする。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①昆虫型行動決定スイッチングシステムとして作動する接触化学受容細胞の機能蛋白質とその遺伝子の特定
(◎尾崎 まみこ／京都工芸繊維大学)
- ②昆虫の接触化学受容細胞の作動機構と行動決定システムにおける役割 (中村 整／電気通信大学)
- ③昆虫の接触化学システムを通じた行動制御の基礎研究
(朝岡 潔／(独)農業生物資源研究所)



尾崎 まみこ



中村 整



朝岡 潔

■研究の内容及び主要成果

- ①分子レベルの研究：クロキンバエの摂食行動に着目し、味覚受容部位のプロテオーム解析により蛋白質を特定し、その構造と機能を決定した。特に2種類のG蛋白質GsとGqが、各々糖刺激を受けた受容分子と共役することで糖受容神経が興奮あるいは順応の双方向に進むことから、これらのG蛋白質が摂食行動を誘導する糖受容細胞の神経活動のスイッチングを司っていることが証明された。
- ②細胞レベルの研究：クロキンバエの拒食を促す受容細胞の機能的特定と、その働きに不可欠なOBPの関与について新たな発見があった。摂食を促す糖受容細胞の活動についても、その情報変換過程にNOカスケードが関わっていることを、いくつかの機能蛋白質の存在とともに世界で初めて証明することができた。
- ③個体レベルの研究：摂食行動を左右する食欲の増減の切り替えには味覚のほかに内外の環境要因が関与するが、中枢の情報統合を介した摂食行動を調節する生体アミンを、クロキンバエとカイコで探索した。
- ④クロオオアリの攻撃行動において巣特異的の化学シグナルを受容判別する感覚器を発見した。

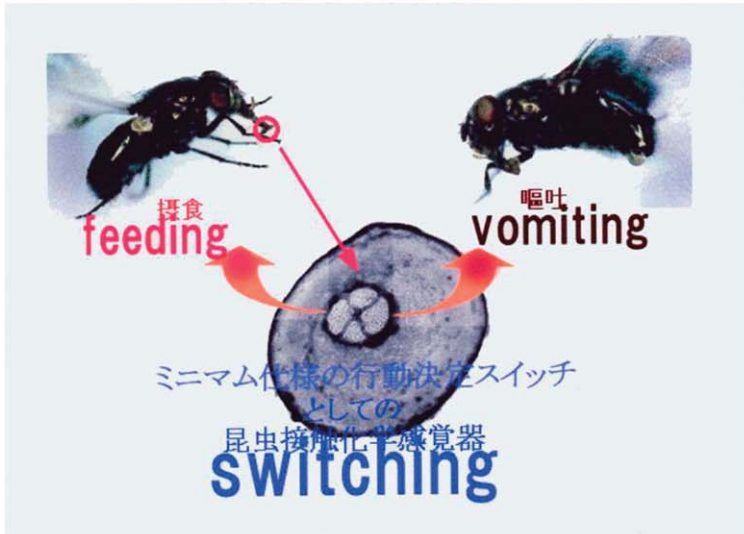
■見込まれる波及効果

昆虫の摂食行動の制御に繋がる本研究成果は、害虫防除の観点から農林業における生産性の向上を図る上で考慮すべき根幹を成す基礎的知見となる。味覚器で働くOBPは、苦味や毒性のある親油性化学物質を包み込んで安全かつ有効に親水環境へ移すキャリアとして、污水处理や飲料の苦味除去に利用価値が期待される。

■主な発表論文

- Ozaki M., *et al.*: Perception of noxious compounds by contact chemoreceptors of the blowfly, *Phormia regina*: Putative role of an odorant-binding protein. *Chemical Senses* 28: 349-359 (2003)
- Murata Y., *et al.*: Intrinsic nitric oxide regulates the taste response of the sugar receptor cell in the blowfly, *Phormia regina*. *Chemical Senses* 29: 75-81 (2004)
- Sasaki K. and Asaoka K.: Different physiological properties in a pool of mandibular closer motor neurons in a caterpillar, *Bombyx mori*. *Neurosci. Lett.* 374: 166-170 (2005)
- Nisimura T., *et al.*: Experiential effects of appetitive and nonappetitive odors on feeding behavior in the blowfly, *Phormia regina*: A putative role for tyramine in appetite regulation. *J. Neurosci.* 25: 7507-7516 (2005)
- Ozaki M., *et al.*: Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science* 309: 311-314 (2005)

■研究のイメージ



異種モダリティーが関与するスイッチ

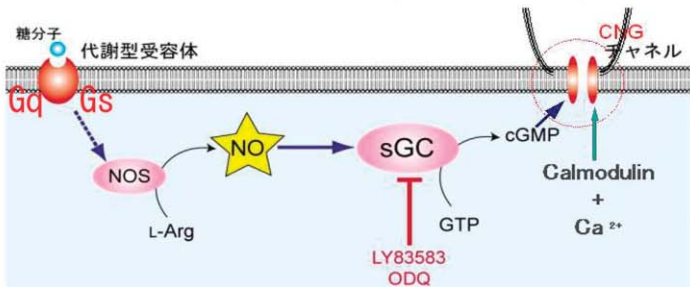
食欲決定を左右するアミンの発見 (J. Neurosci., 2005)



分子・細胞レベルのスイッチ

糖受容細胞

パッチ膜上でイオンチャンネルの観測に成功
 情報変換過程における NO カスケードの関与を証明
 G 蛋白質による細胞興奮 (Gs) と順応 (Gq) の切り替え
 (Chem. Sen., 2004)



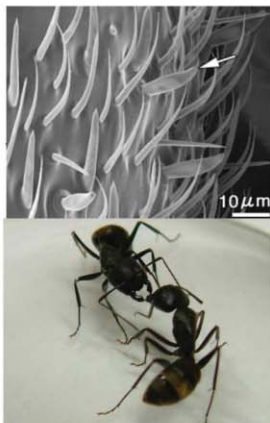
毒物・苦味受容細胞

受容周辺分子機構の解明
 刺激運搬蛋白質の作用機序の解明
 (Chem. Sen., 2003, 2005)



器官・組織レベルのスイッチ

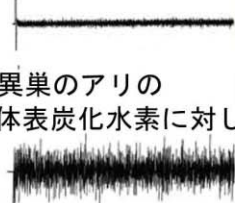
クロオオアリの攻撃行動スイッチ



敵と味方を見分けるセンサーの発見 (Science, 2005)

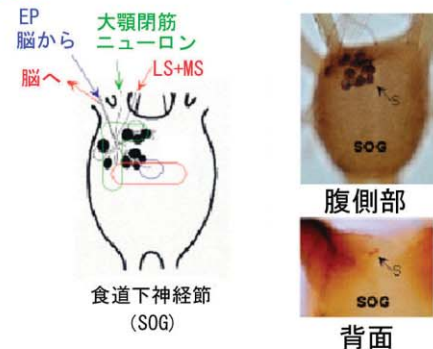
同巣のアリの体表炭化水素に対して

異巣のアリの体表炭化水素に対して



カイコの摂食運動スイッチ

咀嚼運動を支配する大顎運動神経細胞群の発見 (Neurosci. Let., 2005)



■研究課題名

昆虫の抗微生物タンパク質の特性解明と利用基盤技術の開発 (H13 ~ 17)

■研究の目的

昆虫が特異的にもつ先天的免疫に着目し、抗微生物タンパク質の特性と発現機構を明らかにするとともに、優れた抗菌活性を示すペプチドを改変しその機能を強化することにより、畜産分野における薬剤耐性病原細菌の制御等感染症対策上の新たな基盤技術の可能性を探る。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ① 昆虫の抗微生物タンパク質の特性解明と改変
(◎山川 稔／(独)農業生物資源研究所)
- ② 昆虫の抗微生物タンパク質発現抑制実験系の確立と微生物感染に与える影響の解明 (森 肇／京都工芸繊維大学繊維学部)
- ③ 昆虫の抗微生物タンパク質改変ペプチドの機能評価
(中村 菊保 (16年度まで廣田 好和)／(独)農業・生物系特定産業技術研究機構動物衛生研究所)



山川 稔

森 肇

中村 菊保

■研究の内容及び主要成果

- ① 種々の昆虫の抗微生物ペプチドの構造や性質、遺伝子発現様式を明らかにした。これを基に活性中心を改変し抗菌機能を強化した改変ペプチドを多数作成し、各種の細菌に対する作用特性を解析するとともに、これらが細菌細胞膜の膜バリアー能を物理化学的に直接破壊する抗菌メカニズムを明らかにした。
- ② 鱗翅目昆虫では世界初で、かつ、簡易、高効率の遺伝子発現抑制形質転換カイコの作出技術を開発した。この RNAi 技術を利用して細胞内シグナル伝達に関与する転写因子の一つである Rel のわずかな構造差によって抗微生物タンパク質遺伝子の選択的活性化が引き起こされるという新しい現象を明らかにした。
- ③ マウス生体を用いて各種改変ペプチドの抗菌機能を評価し、その中からメチシリン耐性黄色ブドウ球菌や病原性大腸菌による感染阻止に有望なものを得た。またエンドトキシンショックモデルマウスを用いて、改変ペプチドが TNF- α 遺伝子の発現を抑制することによって治癒効果を示すことを明らかにした。

■見込まれる波及効果

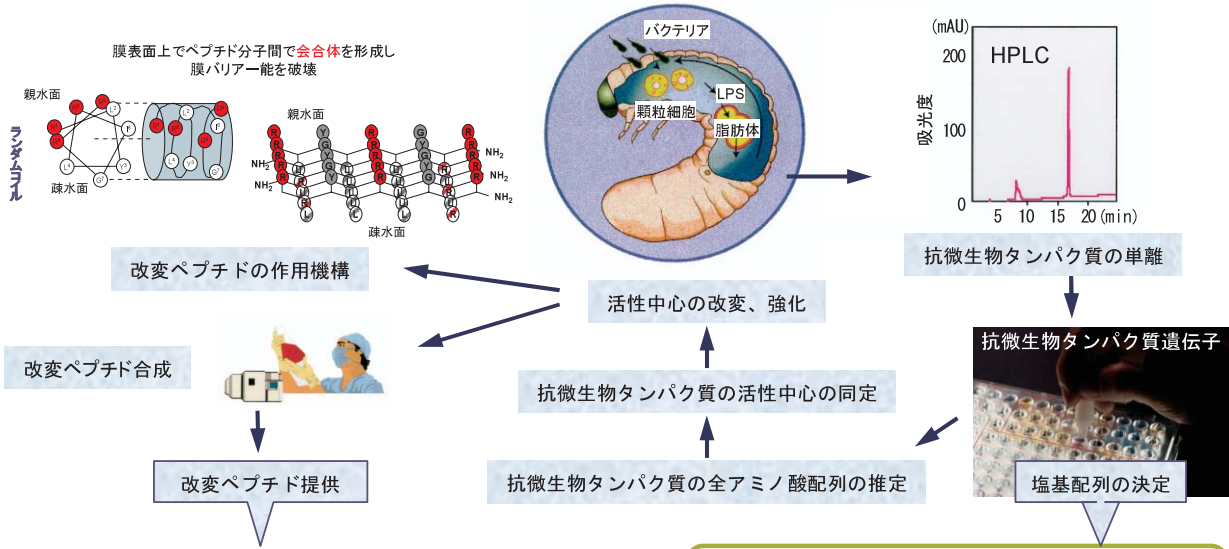
畜産分野における新しい薬剤耐性病原細菌による感染症の治療剤や外用薬としての抗細菌剤等の利用が期待される。

■主な発表論文

- Hemmi H., *et al.*: Structural basis for new pattern of conserved amino acid residues related to chitin-binding in the antifungal peptide from the coconut beetle, *Oryctes rhinoceros*. *J. Biol. Chem.* 278 : 22820-22827 (2003)
- Saido-Sakanaka H. *et al.*: In vitro and in vivo activity of antimicrobial peptides synthesized based on the insect defensin. *Peptides* 25: 19-27 (2004)
- Sakurai T., *et al.*: The sex pheromone receptor in the silk moth, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 : 16653-16658 (2004)
- Yamamoto M. *et al.*: A new and highly efficient method for the silkworm transgenesis using *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus and *piggyBac* transposable elements. *Biothechnol. Bioeng.* 88 : 849-853 (2004)
- Yamada M., *et al.*: Therapeutic effect of modified oligopeptides from the beetle, *Allomyrina dichotoma* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in mice. *J. Vet. Med. Sci.* 67 : 1005-1011 (2005)
- Koyama Y., *et al.*: Protective effects of antimicrobial peptides derived from the beetle, *Allomyrina dichotoma* defensin on endotoxin shock in mice. *International Immunopharmacol.* 6 : 234-240 (2006)

■研究のイメージ

昆虫の抗微生物タンパク質の特性解明と改変



昆虫の抗微生物タンパク質改変ペプチドの機能評価

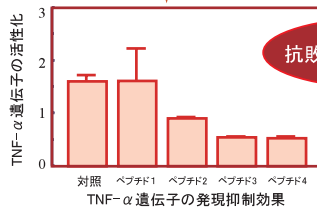
改変ペプチドの家畜の免疫機能に及ぼす影響の解明

- 細胞性免疫系・抗体産生系
- 粘膜機能と粘膜免疫系



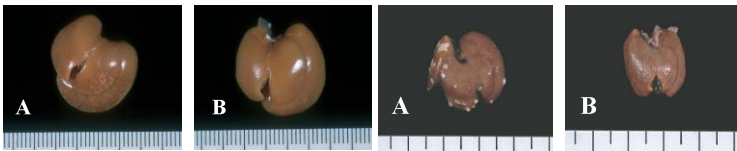
改変ペプチドの動物の感染症に及ぼす効果の解明

- 改変ペプチドの投与方法・安全性・治療効果



抗敗血症治療の可能性

薬剤耐性症対策への可能性

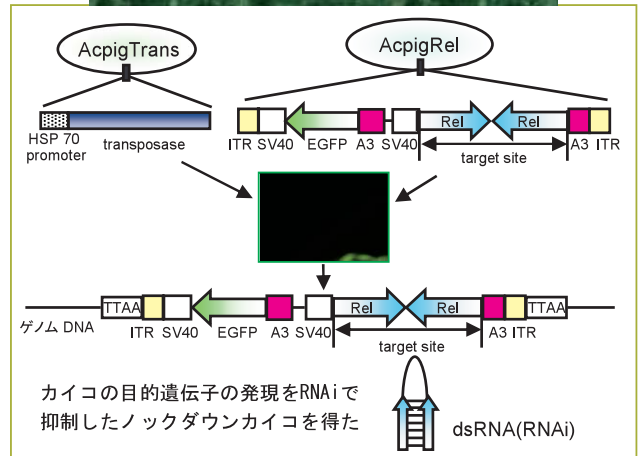


病原性大腸菌
A: コントロールマウス肝臓
B: 改変ペプチド投与肝臓

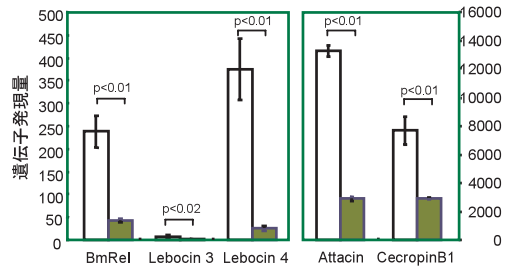
薬剤耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)
A: コントロールマウス肝臓
B: 改変ペプチド投与肝臓

昆虫の抗微生物タンパク質発現抑制実験系の確立と微生物感染に与える影響の解明

バキュロウイルスを用いたノックダウンカイコの作製



カイコの目的遺伝子の発現をRNAiで抑制したノックダウンカイコを得た



転写因子BmRel遺伝子発現を抑制した場合の抗微生物タンパク質遺伝子に与える影響の解析

■研究課題名

細菌「超チャネル」の構造生物学的解析と環境浄化型「スーパー細菌」の創成 (H13～17)

■研究の目的

スフィンゴモナス属細菌 A1 株は、細胞表層に形成した巨大な孔（体腔）から高分子物質を直接細胞内に取り込む巧妙な分子装置（超チャネル）を有する。本研究では、「超チャネル」の構造と機能を解析し、細菌細胞表層の動的構造と潜在的機能を明らかにする。また、「超チャネル」の分子移植により、スフィンゴモナス属細菌の特徴を活かした環境浄化能の高い「スーパー細菌」を創成し、環境問題への対処法、及び大規模細胞機能改変技術を確立する。

■研究項目及び実施体制（◎は研究代表者）

- ①高分子取り込み「超チャネル」の分子生物学的機能解析
（◎村田 幸作／京都大学大学院農学研究科）
- ②X線結晶構造解析による高分子取り込み「超チャネル」の構造・機能相関
（三上 文三／京都大学大学院農学研究科）
- ③「スーパー細菌」の創成と機能解析
（村田 幸作／京都大学大学院農学研究科）



村田 幸作



三上 文三

■研究の内容及び主要成果

- ①スフィンゴモナス属細菌 A1 株の全ゲノム構造を決定し、応用微生物学上重要な本属細菌の形態学的特性と機能多様性の解析基盤を構築した。
- ②スフィンゴモナス属細菌 A1 株の体腔と巨大分子輸送装置（ABC トランスポーター）の構造と機能の全容を解明し、細菌細胞表層の動的構造と器官創出機構、及び細菌の新規巨大分子資化機構の存在を示した。
- ③多糖代謝関連酵素の構造生物学的解析により、触媒反応機構とタンパク質モジュールの機能の理解、進化的・分類学的考察、他酵素への分子変換、並びに新規生理機能性糖質の分子設計を可能にした。
- ④スフィンゴモナス属細菌 A1 株の「超チャネル」を他の有用細菌に分子移植することにより、環境浄化型「スーパー細菌」を創出し、本研究の目標を達成した。

■見込まれる波及効果

- ①ダイオキシンなどの化学物質に汚染された農耕地、用水などの汚染除去のため、「スーパー細菌」を用いた実際的なバイオレメディエーションが期待できる。
- ②細菌多糖（バイオマス）の食料素材などへの有効利用と新規な生理機能性糖質の分子設計が可能になる。
- ③分子移植法による細胞の大規模機能改変と新規な細菌細胞の創出に途を拓く。
- ④多糖リアーゼを対象とする細菌感染機構の理解と細菌感染防御に有用な方法論を提供する。

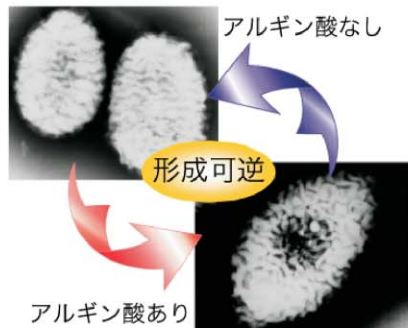
■主な発表論文

- Aso Y., *et al.*: Engineering of the dioxin-degrading Sphingomonad, *Sphingomonas wittichii* RW1, by molecular transplantation of super-channel from *Sphingomonas* sp. A1. *Nature Biotechnol.*, Published online: 15 Jan. (2006)
- Hashimoto W., *et al.*: Proteomics-based identification of outer-membrane proteins responsible for import of macromolecules in *Sphingomonas* sp. A1: Alginate-binding flagellin on cell surface. *Biochemistry*, 44(42), 13783-13794 (2005).
- Itoh T., *et al.*: Crystal structure of unsaturated glucuronyl hydrolase responsible for the degradation of glycosaminoglycan, from *Bacillus* sp. GL1, at 1.8 Å resolution. *J.Biol.Chem.*, 279(30), 31804-31812 (2004).
- Yamasaki M., *et al.*: Structure and function of a hypothetical *Pseudomonas aeruginosa* protein PA1167 classified into family PL-7. *J.Biol.Chem.*, 279(30), 31863-31872 (2004).
- Mishima Y., *et al.*: Crystal structure of AlgQ2, a macromolecule(alginate)-binding protein of *Sphingomonas* sp. A1, complexed with an alginate tetrasaccharide at 1.6 Å resolution. *J.Biol.Chem.*, 278(8), 6552-6559 (2003).
- Momma K., *et al.*: Crystal structure of AlgQ2, a macromolecule(alginate)-binding protein of *Sphingomonas* sp. A1 at 2.0 Å resolution. *J.Mol.Biol.*, 316(5), 1061-1069 (2002).

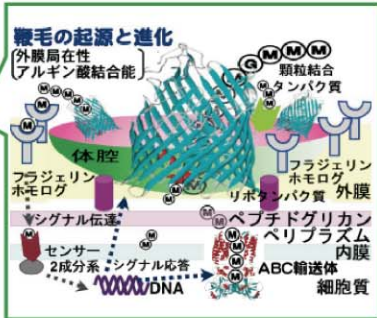
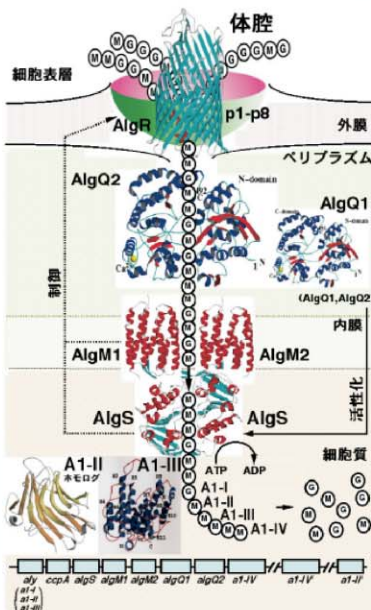
■研究のイメージ

細菌「超チャネル」の分子機構の解明

Sphingomonas sp. A1



体腔 (pit) (アルギン酸濃縮能)
超チャネル = +
ABC トランスポーター (アルギン酸輸送能)



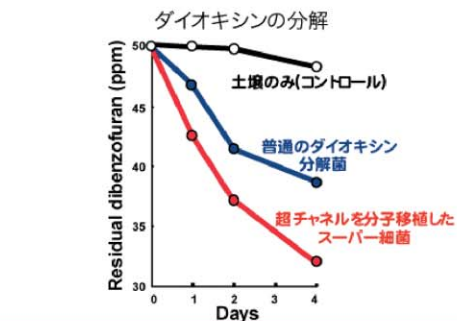
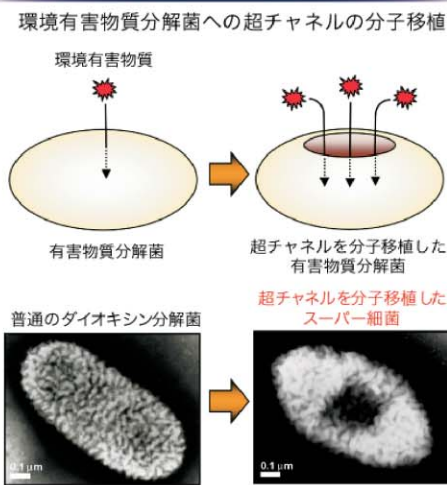
- 「超チャネル」の解析
- ・高分子物質輸送機構の解明
 - ・鞭毛の起源と進化の理解
 - ・多糖関連酵素の機能の解明
 - ・微生物物質輸送機能の改良

多糖関連酵素の構造生物学的解析

新規多糖関連酵素の構造-機能相関の解明

新規機能酵素の *de novo* デザイン

「スーパー細菌」の創成



「超チャネル」の分子移植
高度な微生物分子育種に大きく貢献する普遍的な手法

■研究課題名

植物ホルモンアブシジン酸の制御機構の解明とバイオテクノロジーへの応用 (H13 ~ 17)

■研究の目的

植物ホルモンのアブシジン酸 (ABA) は、乾燥、塩、低温ストレス応答や耐性の獲得、種子の成熟、休眠さらに発芽の制御、葉の老化などの重要な生理機能に関わっている。本研究では、ゲノム解析の進んでいるシロイヌナズナやイネを用いて、ABAの生合成・分解、受容、シグナル伝達、遺伝子発現に関わる制御因子の遺伝子の同定とその機能解析を行い、ABAの環境ストレス応答や種子成熟・休眠・発芽過程におけるABAの生理機能の制御機構を解明する。これらの制御因子を用いた遺伝子導入によりABAの生理機能を人為的に制御して、環境ストレス耐性の分子育種に利用する。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①植物ホルモンアブシジン酸の合成・分解の制御及びシグナル受容機構の解明とバイオテクノロジーへの応用
(◎篠崎 一雄／(独)理化学研究所)
- ②植物ホルモンアブシジン酸による遺伝子発現制御、シグナル伝達機構の解明とバイオテクノロジーへの応用
(篠崎 和子／(独)国際農林水産業研究センター)



篠崎 一雄



篠崎 和子

■研究の内容及び主要成果

ABAの生合成・分解、受容、シグナル伝達、遺伝子発現に関わる主要な制御因子の遺伝子を同定し、ABA応答のシグナル伝達系、遺伝子制御系の主要な経路を明らかにした。

- ① ABAの生合成の主要な酵素NCED3・分解酵素CYP707A3を同定し、遺伝子操作によりABAレベルの制御に成功した。また乾燥ストレス耐性の付与にも成功した。これをシロイヌナズナからイネに応用展開した。
- ② ABA応答の受容に関わると推定されるレセプター型プロテインキナーゼRPK1を同定した。RPK1はストレス応答、種子発芽、根の伸張、老化などABA応答の上流のシグナル伝達因子であると考えられる。
- ③ アブシジン酸を介して乾燥・塩ストレスによって誘導される遺伝子発現を制御する転写因子(AREB, MYB2, MYC2, NAC)を同定し、ABAによる遺伝子発現の分子機構における役割を明らかにした。マイクロアレイにより、これらの転写因子により多数のストレス誘導性遺伝子を同定した。
- ④ ABAによる遺伝子発現を制御する転写因子(AREB, MYC, MYB)やプロテインキナーゼ(SnRK2)などの遺伝子を用いることにより、高レベルの乾燥ストレス耐性植物の作出に成功した。

■見込まれる波及効果

本研究で機能を明らかにしたABAの生合成・分解、受容、シグナル伝達、遺伝子発現に関わる主要な制御因子の遺伝子群は、バイオテクノロジーを用いた乾燥・塩ストレス耐性作物開発に利用できる。さらに乾燥耐性植物の作出や種子の発芽などを制御する技術が確立されれば、世界の気候変化に対応した食料の安定生産に貢献できると考えられる。

■主な発表論文

- Furihata, T., *et al.*: ABA-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *in press* (2006)
- Fujita Y., *et al.*: AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA-signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* 17: 3470-3488 (2005)
- Katagiri T., *et al.*: An important role of phosphatidic acid in ABA signaling during germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 43: 107-117 (2005)
- Osakabe Y., *et al.*: An LRR receptor kinase, RPK1, is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 17: 1105-1119 (2005)
- Umezawa T., *et al.*: SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2 protein kinase that improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 17306-17331 (2004)
- Abe H., *et al.*: Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 63-78 (2003)

■研究のイメージ

乾燥ストレス時に機能するABA合成、分解のキー酵素の遺伝子を解明した。

これらを制御することで乾燥耐性植物を開発した。



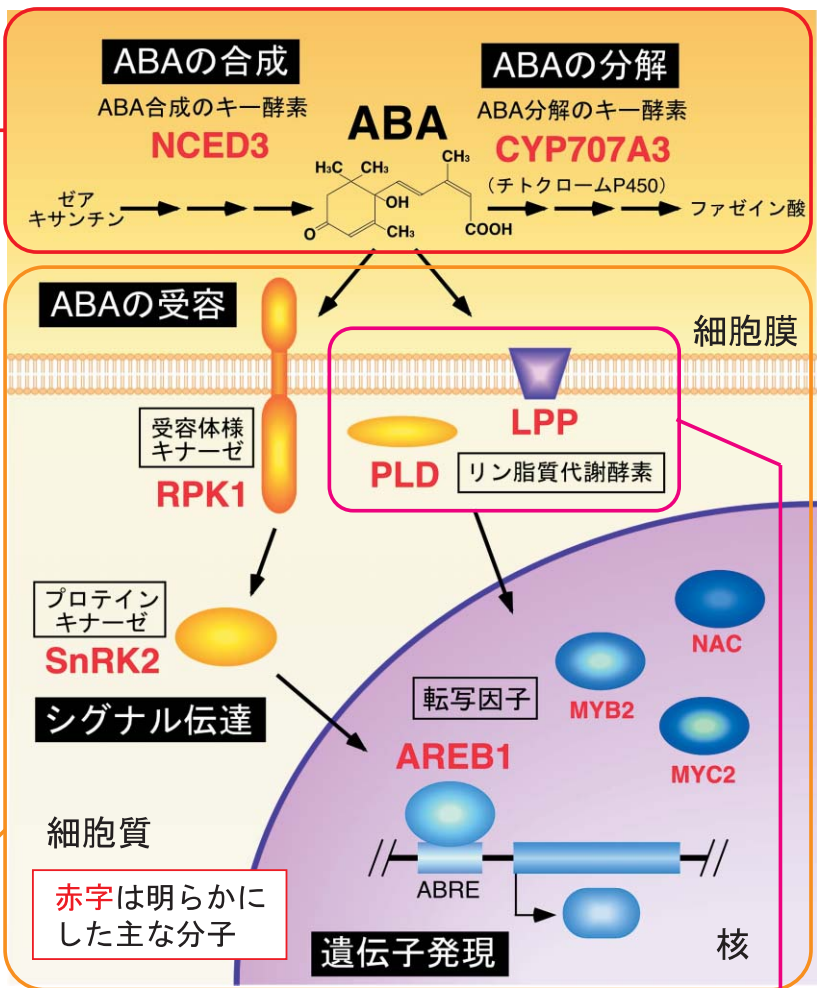
ABA合成酵素遺伝子*NCED*の過剰発現イネ(まん中と右)はコントロール(左)に比べて顕著な乾燥耐性を示した。写真は乾燥処理後。

ABAの受容、細胞内シグナル伝達、遺伝子発現に至る新規なABAシグナル伝達系を発見した。

プロテインキナーゼ*SnRK2*や転写因子*AREB1*を導入することにより乾燥耐性植物を開発した。



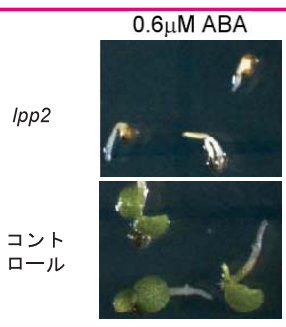
活性型*AREB1*過剰発現植物(中央と右)はコントロール(左)に比べて顕著な乾燥耐性を示した。写真は乾燥処理後。



赤字は明らかにした主な分子

リン脂質ホスファチジン酸の代謝制御により、種子発芽時のABA応答性を改変することができた。

*LPP*遺伝子破壊株*lpp2*(上)は、コントロール(下)に比べてABA存在下での発芽時のABA応答性が高いことが明らかになった。



ABAレベルやABA応答の制御により環境ストレス耐性植物の開発に成功した



ABA応答の制御により、種子発芽の制御技術基盤を開発した



5件の特許を出願し、企業・外部研究機関との共同研究を進めている

■研究課題名

人工制限酵素を用いた高等生物の遺伝子操作とニュー・バイオテクノロジーの創成 (H13～17)

■研究の目的

ヒトをはじめとする種々の生物のゲノム解析の完成に伴い、遺伝子操作の対象が下等生物から高等生物へと移行することは必定である。ところが、高等生物の染色体 DNA は非常に巨大であり、天然の制限酵素では、所定の一箇所での切断することができない。高等生物を対象とする遺伝子操作を実現するには、天然酵素よりも長い DNA 塩基配列を認識する人工制限酵素がどうしても必要である。また、高等生物の特定の RNA を精密に解析するにも、あるいは、これを選択的に分解して対応する遺伝子の発現を制御するにも同様の特異性が必要となる。

本研究では、望みの特異性で所定の位置を選択的に切断する人工制限酵素ならびに RNA カッターを開発し、これを用いてバイオテクノロジーに新機軸を切り開く。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①人工制限酵素の構築
(◎小宮山 真/東京大学先端科学技術研究センター)
- ② 高等生物の遺伝子操作
(浅沼 浩之/名古屋大学大学院工学研究科)



小宮山 真

浅沼 浩之

■研究の内容及び主要成果

- ① Ce(IV)/EDTA 錯体 (DNA 切断触媒) とペプチド核酸 PNA (DNA 塩基配列認識部位) とをハイブリッド化することにより、人工制限酵素 (ARCUT = Artificial Restriction DNA CUTter) を開発した。ARCUT に使用する PNA の配列や長さは目的に応じて自在に変えられるために、巨大 DNA でも思い通りの位置で選択的に切断できる。実際に、プラスミド DNA (数千塩基対) やファージ DNA (数万塩基対) のみならず、これらよりもはるかに巨大な大腸菌ゲノム DNA (数百万塩基対) を所定位置で選択的に切断することに成功した。さらに、ARCUT を用いて調製した組み換えタンパクが哺乳動物細胞内で正常に発現することも確認した。こうして、巨大 DNA の操作ツールとしての ARCUT の有用性を実証した。
- ②切断標的部位の正面にアクリジンを導入した修飾オリゴヌクレオチドと希土類イオン (Ⅲ) とを併用することにより、RNA の所定部位を選択的に切断できるカッターの開発に成功した。さらに、この RNA カッターを用いて mRNA から小断片を切り出し、その分子量を測定することで SNP や塩基挿入・欠損 (indel) を正確に解析した。

■見込まれる波及効果

本研究で開発した ARCUT は、巨大 DNA を望みの位置で自在に切断できる世界で唯一のツールである。しかも、天然制限酵素と同様にリン酸ジエステルの加水分解で DNA を切断するので、現状のバイオテクノロジーとのマッチングも極めて良好である。効率的な医療、動植物の品種改良、有用物質の生産をはじめとして広範な応用が期待される。

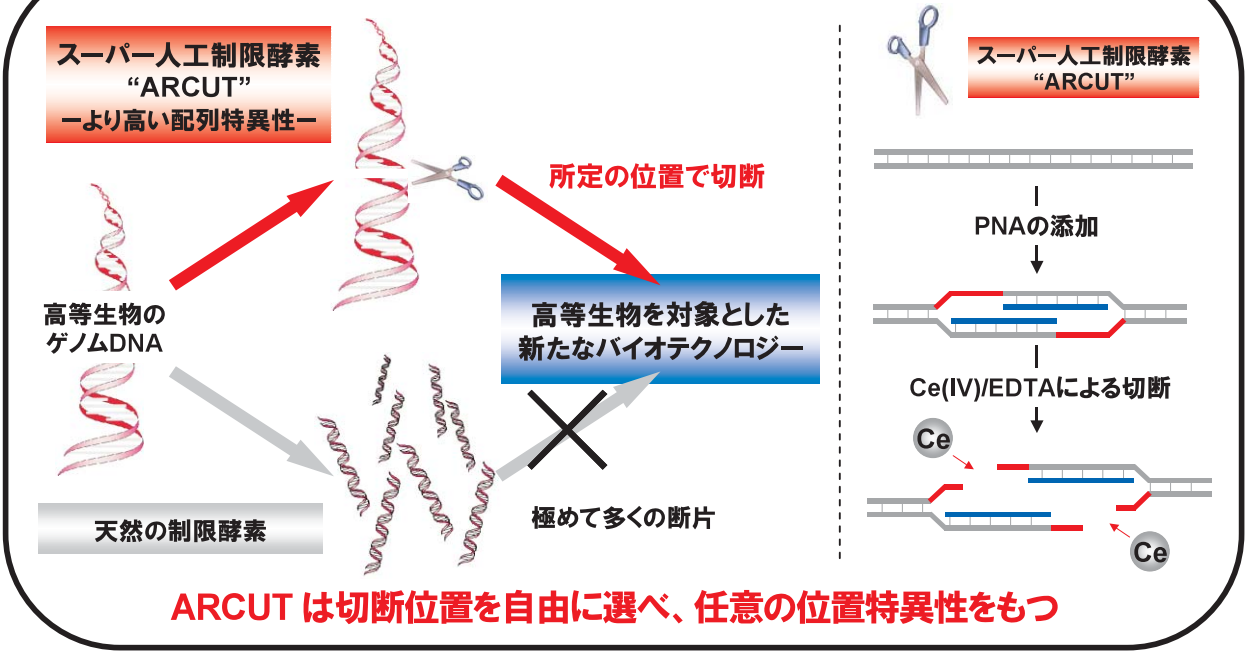
■主な発表論文

- Yamamoto Y., *et al.*: Site-selective and hydrolytic two-strand scission of double-stranded DNA using Ce(IV)/EDTA and pseudo-complementary PNA. *Nucleic Acids Res.* 32: e153 (2004).
- Chen W., *et al.*: Site-selective DNA hydrolysis by combining Ce(IV)/EDTA with monophosphate-bearing oligonucleotides and enzymatic ligation of the scission fragments. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 10285-10291 (2004).
- Kuzuya A., *et al.*: Selective activation of two sites in RNA by acridine-bearing oligonucleotides for clipping of designated RNA fragments. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 1430-1436 (2004).
- Kuzuya A., *et al.*: Metal ion-induced site-selective RNA hydrolysis by use of acridine-bearing oligonucleotide as cofactor. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 6887-6894 (2002).
- Kitamura Y. and Komiyama M.: Preferential hydrolysis of gap and bulge sites in DNA by Ce(IV)/EDTA complex. *Nucleic Acids Res.* 30: e102 (2002).

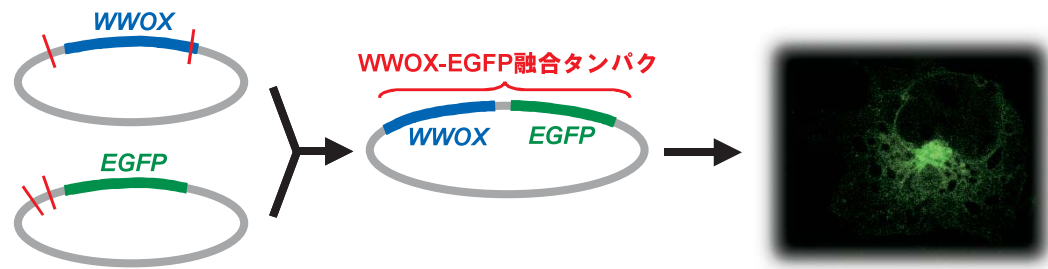
■ 研究のイメージ

DNA の位置選択的切断のための新たなバイオツールの開発に成功
 効率的な医療、動植物の品種改良、有用物質の生産などへ応用可能

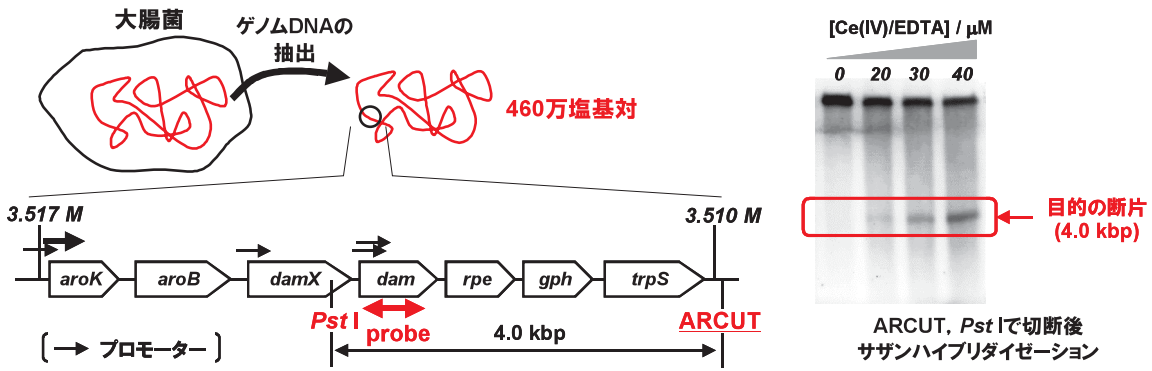
スーパー人工制限酵素“ARCUT”が拓くニュー・バイオテクノロジー



応用例① ARCUT を用いた遺伝子組み換え —融合タンパクの構築—



応用例② ARCUT を用いた巨大 DNA の切断 —大腸菌ゲノム DNA の切断—



ARCUT を用いて 460 万塩基対からなる大腸菌ゲノム DNA を位置選択的に切断することに成功
 (6 塩基対認識の天然制限酵素で切断すると 1000 を超える場所で切断されてしまう)

■研究課題名

タンパク質工場としての糸状菌の高度利用に関する基盤的研究 (H13～17)

■研究の目的

食糧・環境などの分野で様々なタンパク質を遺伝子組換えにより大量生産するタンパク質工場の必要性が高まっている。麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、細胞外にタンパク質を分泌生産する能力が最も高い真核生物のひとつである。本研究では、麹菌のもつ高い分泌生産能力を分子生物学および細胞生物学的に解析を行うことにより、高純度かつ大量のタンパク質を生産するセルファクトリーとしてのスーパー麹菌の創製を目的とした。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①糸状菌の細胞内構造及び細胞表層構造の改変による高効率タンパク質生産システムの構築
(◎北本 勝ひこ／東京大学大学院農学生命科学研究科)
- ②固体培養環境下でのタンパク質生産制御系の解析と新規生産システムの構築
(秋田 修／(独)酒類総合研究所)



北本 勝ひこ



秋田 修

■研究の内容及び主要成果

- ①麹菌のもつタンパク質高分泌能を理解するために、これまでほとんど研究がなされていなかった細胞生物学的解析を進め、ゲノム情報と GFP (緑色蛍光タンパク質) を用いたバイオイメーキング技術により、麹菌の全オルガネラの可視化に成功した。
- ②固体培養において麹菌が高いタンパク質生産能をもつことについて、cDNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行い、遺伝子発現プロファイルデータベース化した。また、麹菌におけるプロテオーム解析の手法を確立し、培養条件による分泌タンパク質の差異を明らかにした。
- ③麹菌の新規宿主ベクター系 (4重栄養要求性株の育種とベクターの整備) の構築、麹菌用の超迅速かつ簡便な発現プラスミド作成法の確立、さらに発現制御可能な新規プロモーターの開発など、遅れていた麹菌の分子生物学的基盤を整備した。
- ④異種タンパク質生産のためのスーパー麹菌として、生産タンパク質の分解に関与する主要な5種類のプロテアーゼ遺伝子破壊株を育種し、さらには、これらをもとに高分泌変異株を取得した。また、液胞タンパク質を培地中に分泌生産する変異株の取得にも成功した。

■見込まれる波及効果

麹菌の分子生物学的技術基盤が整備されたことは、麹菌のゲノム解析の完了と相まって、醸造食品製造における麹菌の働きの分子レベルでの理解に大きく貢献する。これにより、麹菌の合理的な育種が進む。また、近い将来、麹菌を用いた様々な植物や動物由来の有用なタンパク質生産が開始され、新たな発酵醸造産業が起こることが期待される。

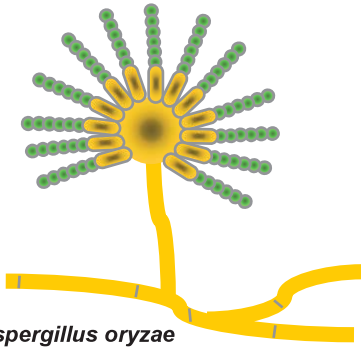
■主な発表論文

- Shoji J. *et al.* Vacuolar membrane dynamics in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*, *Eukaryot. Cell*, 5, 411-421 (2006)
- Maruyama J. *et al.* Differential distribution of endoplasmic reticulum network as visualized by the BipA-EGFP fusion protein in hyphal compartments across the septum of the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*, *Fungal Genet Biol*, *in press* (2006)
- Maruyama J. *et al.* Three-dimensional image analysis of plugging at the septal pore by Woronin body during hypotonic shock inducing hyphal tip bursting in *Aspergillus oryzae*, *Biochem Biophys Res Commun.* 331, 1081-1088 (2005)
- Ohneda M. *et al.* Isolation and characterization of *Aspergillus oryzae* vacuolar protein sorting mutants, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 4856-4861 (2005)

■ 研究のイメージ

I 麹菌の細胞生物学的解析

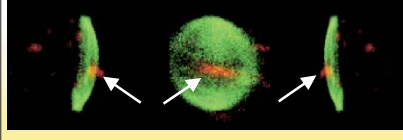
オルガネラの可視化と動態解析
(小胞体、ゴルジ体、液胞、核、ミトコンドリア、Woronin body)



麹菌 *Aspergillus oryzae*

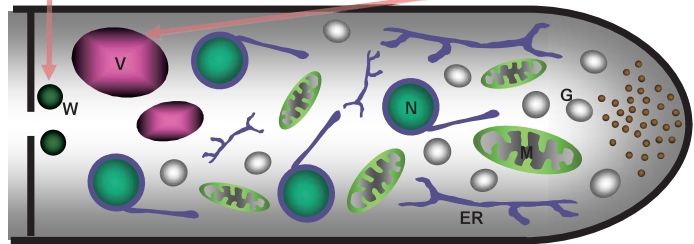
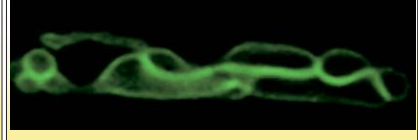
Woronin body

糸状菌特異的なオルガネラ (赤)。隣の細胞に溶菌が伝わるのを防ぐために、隔壁 (緑) の孔をふさぐ様子を蛍光タンパク質を用いて糸状菌で初めて可視化した。

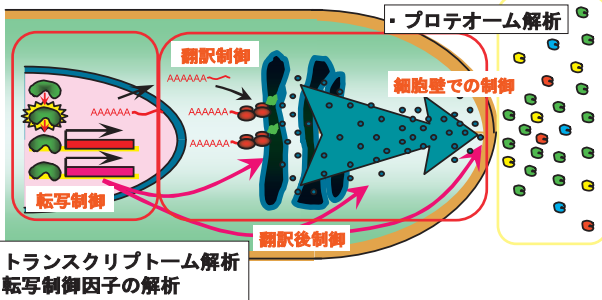


液胞

糸状菌において最も大きなオルガネラ。様々な生育段階 (発芽時、菌糸成長、分生子形成) における液胞膜 (緑) の特徴的な形態を可視化した。



II 麹菌の固体培養環境下でのタンパク質生産制御機構



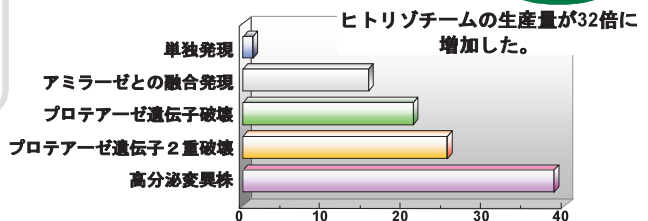
- ・トランスクリプトーム解析
- ・転写制御因子の解析

III 麹菌の分子生物学的基盤の整備

- ・麹菌の新規宿主ベクター系の構築 (4重栄養要求性株の育種とベクターの整備)
- ・麹菌用の超迅速かつ簡便な発現プラスミド作製法の確立
- ・発現制御可能な新規プロモーター (*PthiA*) の開発

IV 異種タンパク質生産のためのスーパー麹菌の育種

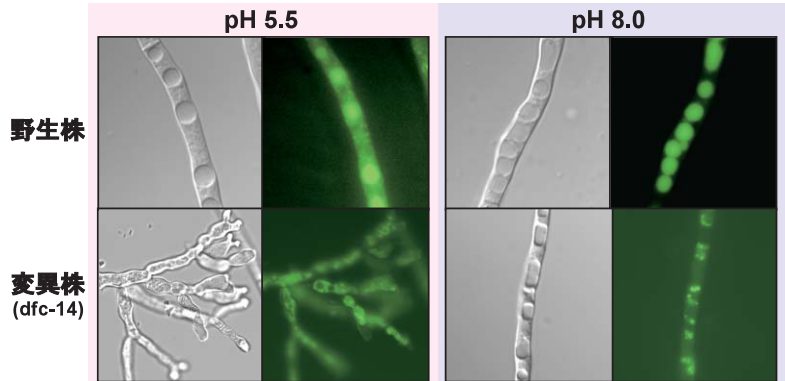
- ・5種類のプロテアーゼ遺伝子破壊株の育種および高分泌変異株の取得



- ・液胞タンパク質を培地中に分泌生産する変異株の取得

V 麹菌による異種タンパク質の生産

ヒトリゾチウム、植物甘味タンパク質、フグタンパク質 (パフレクチン、インターロイキン)



⇒EGFPと融合した液胞タンパク質が液胞に局在せずに分泌され、pH依存的に菌糸や液胞の形態異常が観察された。

■研究課題名

ナノプローブによる生物機能のナノ領域でのアクティブ計測 (H13～17)

■研究の目的

近年、バイオテクノロジーやナノテクノロジーの進展に伴い、生物学の研究・応用分野において、生体の細胞内の多様な情報をナノレベルで計測して分析できる技術が重要となってきている。

本研究では、工学と生物学の二つの分野の研究チームが連携・協力して、生体に対して低侵襲でかつアクティブな刺激機能を持ったナノプローブを用い、信号の発生源に微小プローブを近づけることによって従来手法より微小な刺激応答信号を精度よく計測することを目的とした。生体組織への電圧印加、微量の薬物注入、光励起などの刺激に対して、生体内の活動電位、イオン濃度、蛍光観察などの電気・化学・光学的な応答信号をサブミクロンの分解能と高い時間分解能で計測できる総合的な計測システム「ナノプロービングシステム」を開発することを目指した。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①ナノプロービングシステムの研究
(◎下山 勲／東京大学大学院情報理工学系研究科)
- ②ナノプローブによる生物機能計測
(神崎 亮平／東京大学大学院情報理工学系研究科)



下山 勲



神崎 亮平

■研究の内容及び主要成果

- ①ナノリード、ナノインジェクション、ナノスコープの三つの要素からなるナノプロービングシステムの研究を行なった。これら三要素を統合したものととしてガラス管統合プローブを、またワンチップ化したものととしてMEMS統合ナノプローブを開発した。
- ②ナノプロービングシステムにより、生体でのナノ領域からの高速 Ca^{2+} 濃度計測と膜電位の同時記録法、局所領域への薬物のインジェクション法を確立し、昆虫等の *in vivo* 脳で検証した。本システムは、高い空間および時間分解能をもつイメージング法を含む多機能システムであり、既存の計測法では得られないナノ領域の生体活動に関する知見を得た。

■見込まれる波及効果

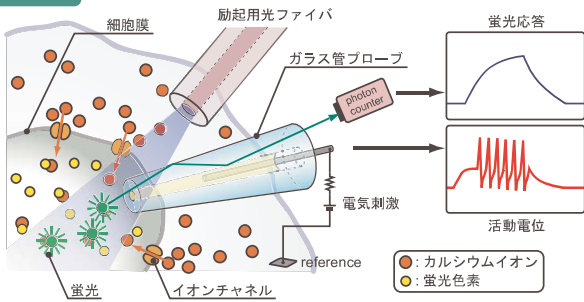
本計測システムの低侵襲で高い空間および時間分解能計測により、今後、生物機能解析などの分野でより高度な新しい展開が期待できる。さらに畜産、食品、医療などの応用分野においても、例えば病理検査と薬剤の投与、家畜の生理・健康状態の把握、細胞レベルの内視鏡としての病理検査などへの貢献が期待できる。また、本研究で開発されるナノレベルの工学的微小技術は、ナノスケールの世界の基盤技術であることから、今後、情報通信や環境など様々な分野にも幅広く活用されることが期待できる。

■主な発表論文

- Hoshino K., *et al.*: Electrowetting-based pico-liter liquid actuation in a glass-tube microinjector. *Sens. Actuators A-Phys.* 114 : 473-477 (2004)
- Nagasawa S. and Shimoyama I.: Calcium concentration measurement by local fluorescent-dye injection. *Sens. Actuators B-Chem* 102 : 7-13 (2004)
- Kanzaki R., *et al.* : Projections to higher olfactory centers from subdivisions of the antennal lobe macroglomerular complex of the male *silkworm*. *Chem. Senses.* 28 : 113-130 (2003)
- Hill ES, *et al.*: Visualization of modulatory effects of serotonin in the silkworm antennal lobe. *J. Exp. Biol.* 206 : 345-352 (2003)
- Seki Y., *et al.*: Pheromone processing center in the protocerebrum of *Bombyx mori* revealed by NO-induced anti-cGMP immunocytochemistry. *J. Comp. Neurol.* 481 : 340-351 (2004)

■研究のイメージ

概要

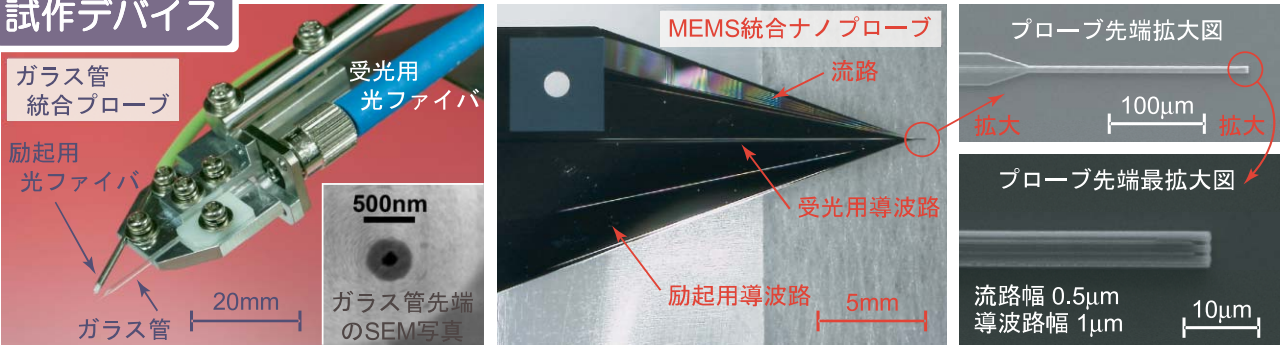


- 信号の発生源に近づけば小さな信号が計測可能
- 生体組織への電圧印加・微量の薬物注入・光励起等の刺激が可能
- 刺激に対する生体内の活動電位・イオン濃度・蛍光応答等の電気・化学・光学的な応答を複数同時計測可能

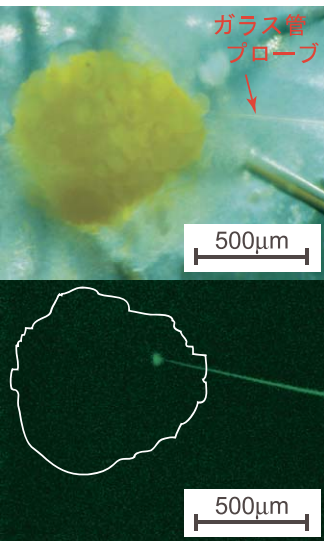


- 総合的な生体情報計測システムである「**ナノプロービングシステム**」の開発
- 「**ナノプロービングシステム**」を用いた生物機能計測

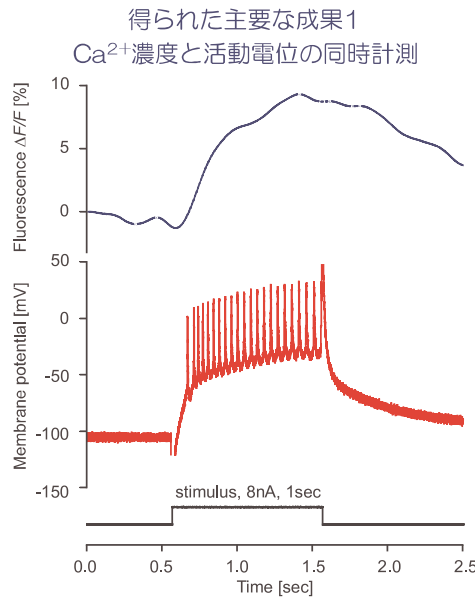
試作デバイス



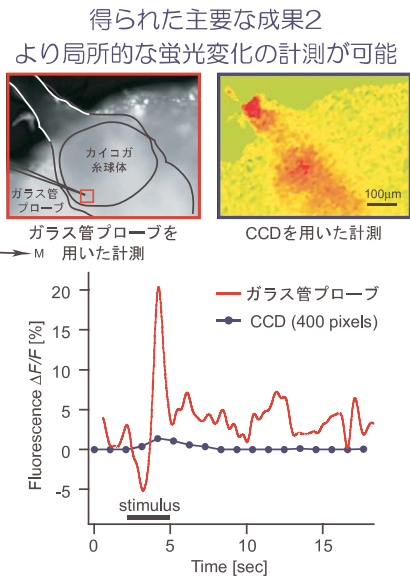
実験と結果



(上) アメフラシロ球神経節の細胞にガラス管統合プローブを刺入。(下) カルシウムインジケータ (OGB1) をインジェクションしている蛍光画像。

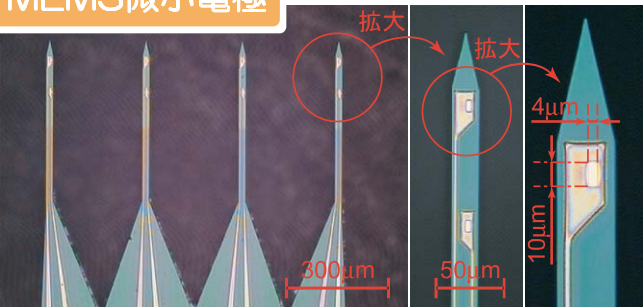


アメフラシロ球神経節の細胞を電気刺激し、そこから同時記録法により得られた(上) Ca²⁺インジケータの蛍光応答、(下) 膜電位。

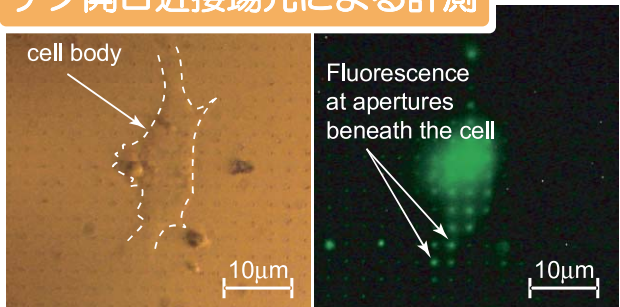


アルミコーティングナノプロービングシステムを用いた触角神経電気刺激時の応答。既存手法 (CCD) では約3%の応答 (青) であるが、本プローブでは20%の応答 (赤) が得られた。

MEMS微小電極



ナノ開口近接場光による計測



■研究課題名

ザゼンソウを模倣した温度制御アルゴリズムの開発とその生物系発熱制御デバイスへの応用 (H13～17)

■研究の目的

ザゼンソウ (*Symplocarpus foetidus*) は、氷点下を含む外気温の変動にも拘わらず、その肉穂花序の温度を 20℃ 内外に維持することができる発熱植物である。本研究においては、ザゼンソウの発熱制御システムに関わる数理アルゴリズム及び生物因子等の解析を通じ、高等植物の発熱現象をより深く理解するとともに、発熱制御デバイスへの応用の可能性を探ることを目的とした。

■研究項目及び実施体制

- ① 恒温植物の温度データ収集および発熱制御関連遺伝子資源の検索
- ② コンピューターシミュレーションによる発熱制御アルゴリズムの開発とその検証
- ③ バイオ発熱制御デバイスの開発
(伊藤 菊一／岩手大学農学部附属寒冷バイオシステム研究センター)



伊藤 菊一

■研究の内容及び主要成果

- ① ザゼンソウ発熱現象について決定論的非線形予測手法等を用いたカオス理論により解析した結果、本植物の発熱制御システムは、“Zazen attractor” と名付けた低次元の非線形ダイナミクスを基本とすることを発見するとともに、その温度制御アルゴリズムは、ある種の微分方程式によって近似できることを見出した。
- ② 環境温度変化に対するザゼンソウ肉穂花序の発熱応答の詳細な解析により、本植物の発熱器官である肉穂花序には、± 0.9℃ の温度変化を認識し、その発熱レベルを調節できる極めて鋭敏な温度センサー機能が存在することを突き止めた。
- ③ ザゼンソウの発熱因子である 5 回膜貫通型の脱共役蛋白質 (SfUCPb) は、動植物に広く分布する 6 回膜貫通型脱共役蛋白質 (UCP) と比較して、より高い脱共役活性を有する新規分子であることが示唆され、本因子の発現が寒冷環境におけるザゼンソウの熱産生能力の分子基盤になっていることが予想された。

■見込まれる波及効果

ザゼンソウを対象とした温度制御アルゴリズム解析は、高等植物におけるカオス研究の先駆けとなるものであり、農作物等の環境適応研究において、新しい学問領域を形成する可能性がある。また、ザゼンソウ型制御アルゴリズムは、産業用制御プログラムとしても有用である (国際特許出願：PCT/JP2004/018297)。

■主な発表論文

- Ito K., *et al.*: Structural requirements for the perception of ambient temperature signals in homeothermic heat production of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). *Plant Cell Environ.* 26: 783-788 (2003)
- Ito K., *et al.*: Ubiquitous expression of a gene encoding for uncoupling protein isolated from the thermogenic inflorescence of the dead horse arum *Helicodiceros muscivorus*. *J. Exp. Bot.* 54: 1113-1114 (2003)
- Ito K., *et al.*: Temperature-triggered periodical thermogenic oscillations in skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). *Plant Cell Physiol.* 45: 257-264 (2004)
- Ito K. and Seymour R. S.: Expression of uncoupling protein and alternative oxidase depends on lipid or carbohydrate substrates in thermogenic plants. *Biol. Lett.* 1: 427-430 (2005)
- Onda Y. and Ito K.: Changes in the composition of xylem sap during development of the spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 1156-1161 (2005)
- Ito T. and Ito K.: Nonlinear dynamics of homeothermic temperature control in skunk cabbage, *Symplocarpus foetidus*. *Phys. Rev. E* 72: 051909 (2005)

■研究のイメージ

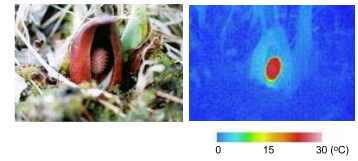
ザゼンソウとは？ **寒冷環境で発熱し体温を保つことができる唯一の恒温植物**

ザゼンソウの特徴

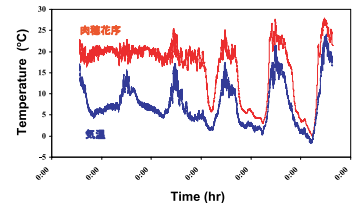
- ◎北東アジアおよび北米大陸東海岸に自生する **サトイモ科の野生植物**。
- ◎寒冷環境で**肉穂花序が特異的に発熱**。
- ◎外気温の変動にも拘わらずその**肉穂花序の温度を20℃内外に維持**。



群落地で自生しているザゼンソウ



肉穂花序特異的な発熱現象

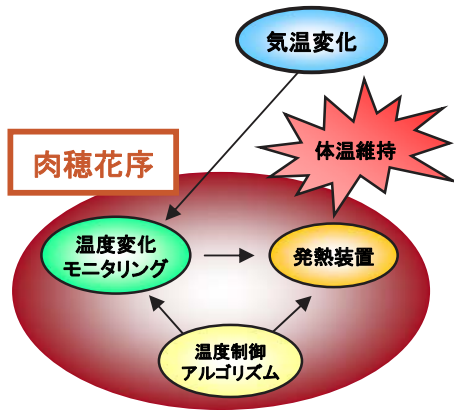


肉穂花序の恒温維持機能

研究目的

- ザゼンソウの発熱制御システムに関わる数理アルゴリズムおよび生物因子等の解明。
- ザゼンソウ型発熱制御デバイスへの応用。

ザゼンソウの発熱制御システム



温度制御アルゴリズム



The Zen of Skunk Cabbage
By Kim Krieger
Copenhagen Daily News
18 November 2005

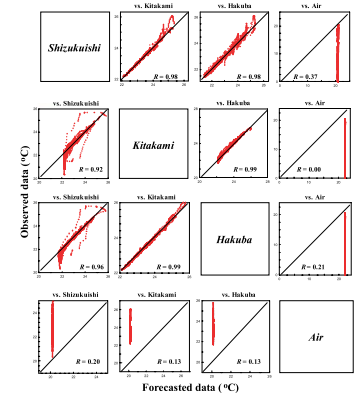
Skunk cabbage shares more than a healthy stink with its warm-blooded neighbors: the sharks, pangolin, and other animals, the plant produces body heat. Now, a clever mathematical analysis has shown that this rascal relative of the alum tree may have a beautifully simple thermostat.

Skunk cabbage (*Symphoricarpos foetidus*) is widespread in the woods of northeastern North America and Asia, in the United States and Canada. Its distant as a small, swampy reed-like plant in meadows and is called "Skunkweed" or "Zan plant." Researchers realized in the 1970s that skunk cabbage maintained a constant body temperature (the only one in the plant kingdom) in skunk cabbage's total heat. But data that looked too easy to crank up the heat.

In the November issue of *Science*, Krieger and his colleagues at the University of Toronto tracked the plant's temperature over time and found it was not just a few degrees warmer than the air, it was **constant**. That means the plant in your kitchen may also track the temperature of the kitchen.

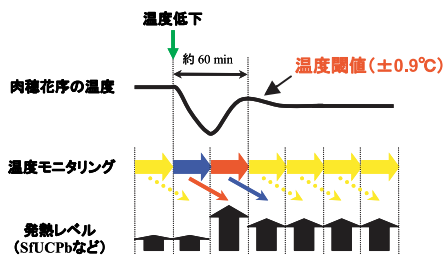
at Florida State University, where they've been tracking their heat on a job, on the molecular level.

Zazen Attractor



非線形ダイナミクスを特徴とするザゼンソウ固有の温度制御アルゴリズムの存在を発見(2005)。

温度変化モニタリング



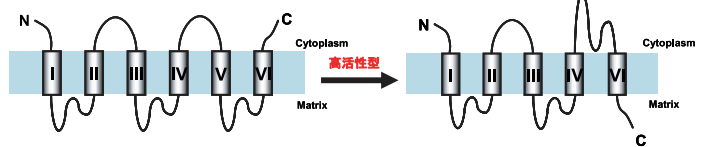
時間軸依存型体温振動モデル

発熱器官である肉穂花序に温度センサーが存在(2003)。

発熱制御に関わる温度センサーは±0.9℃の温度変化を認識可能(2004)。

発熱装置

発熱制御デバイスへの応用



動植物に広く分布する6回膜貫通型UCP分子

ザゼンソウ発熱因子SfUCPbを模倣した5回膜貫通型UCP分子

波及効果・展望

- ◎農作物を含む生命の環境適応手段としての**カオスの重要性**。
- ◎ザゼンソウの発熱制御因子を利用した**環境ストレス耐性作物の開発**。
- ◎ザゼンソウ型**制御アルゴリズムの産業応用**。

→ 実用化の推進 大学発ベンチャー企業

ザゼンソウ技術開発研究所 2005.12.16 設立

■研究課題名

非メチオニン型翻訳開始機構の解析とその利用法の開発 (H13～17)

■研究の目的

昆虫のプラス鎖 RNA ウイルスであるチャバネアオカメムシ腸管ウイルス (Plautia stali intestine virus, PSIV) の外被タンパク質コード領域の上流には、AUG コドンに依存せずにタンパク質の合成開始を行わせる RNA 配列 (Intergenic Internal ribosome entry site, IGR-IRES) がある。一般には、開始メチオニン tRNA を使用しないタンパク質の合成開始は不可能とされていたため、この昆虫ウイルス由来の RNA 配列の機能を解析し、様々なアミノ酸からのタンパク質合成開始を可能にすることを目的とした。

■研究項目及び実施体制

- ① IGR-IRES の翻訳開始機構の解析
- ② IGR-IRES の利用法の開発
(中島 信彦／(独)農業生物資源研究所)



中島 信彦

■研究の内容及び主要成果

- ①約 200 塩基の RNA から構成される PSIV の IGR-IRES の中で、一本鎖状態にある塩基が 40S リボソームに翻訳開始因子を介さずに直接認識されることを明らかにし、その一次配列が類縁ウイルスで保存されていることを示した。
- ② IGR-IRES の中で、タンパク質合成開始点決定の役割を担う領域は、その上流部分に形成されるシュードノットの形成に依存してリボソーム上に正しく配置されることを示した。
- ③ IGR-IRES 類似の安定した二次構造を形成しうる塩基配列は真核生物の塩基配列データベースには登録されておらず、開始 tRNA を介さない翻訳開始はジシストロウイルスに特異的な現象と考えられた。
- ④自然界のジシストロウイルス遺伝子では、グルタミンまたはアラニンからのタンパク質合成開始しか報告されていない。しかし、翻訳第一コドンを変異させたところ、いずれの伸長反応用 tRNA による翻訳開始も可能であった。無細胞タンパク質合成法で IGR-IRES を使用することにより、いろいろなアミノ酸を N 末端に持つタンパク質の合成が可能になった。
- ⑤ IGR-IRES を介した翻訳効率を向上させるには、異種遺伝子の配列が IGR-IRES の高次構造形成を妨げないようにする必要がある。

■見込まれる波及効果

開始メチオニン tRNA を使用しないリボソームによるタンパク質合成開始はこれまで不可能とされていたが、ジシストロウイルスの IGR-IRES を使用すれば任意のアミノ酸を N 末に保有するタンパク質の合成が可能になる。分泌タンパク質など N 末端がメチオニンではないタンパク質を無細胞系で直接合成するために利用できる。

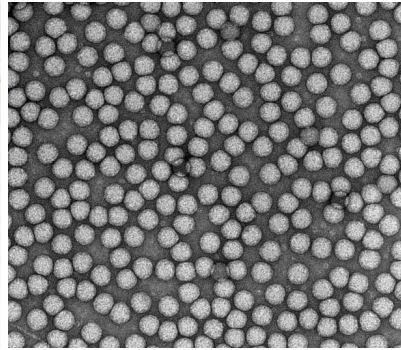
■主な発表論文

- Shibuya N., *et al.*: Cell-free synthesis of polypeptides lacking an amino-terminal methionine by using a dicistroviral intergenic ribosome entry site. *Journal of Biochemistry* 136: 601-606. (2004)
- Hatakeyama Y., *et al.*: Structural variant of the intergenic internal ribosome entry site elements in dicistroviruses and computational search for their counterparts. *RNA* 10: 779-786. (2004)
- Shibuya N., *et al.*: Conditional rather than absolute requirements of the capsid coding sequence for initiation of methionine-independent translation in *Plautia stali* intestine virus. *Journal of Virology* 77: 12002-12010. (2003)
- Nishiyama T., *et al.*: Structural elements in the internal ribosome entry site of *Plautia stali* intestine virus responsible for binding with ribosomes. *Nucleic Acids Research* 31: 2434-2442. (2003)

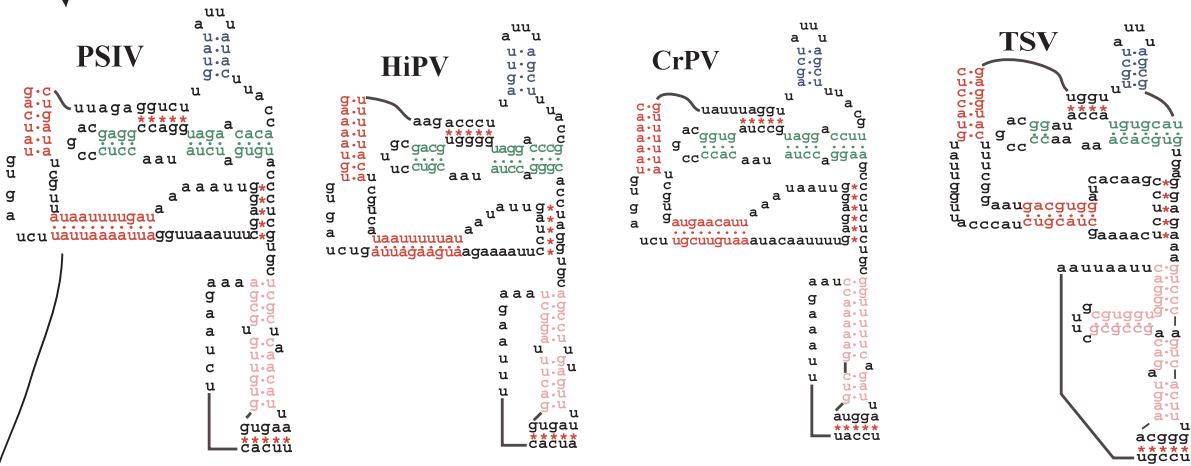
■研究のイメージ



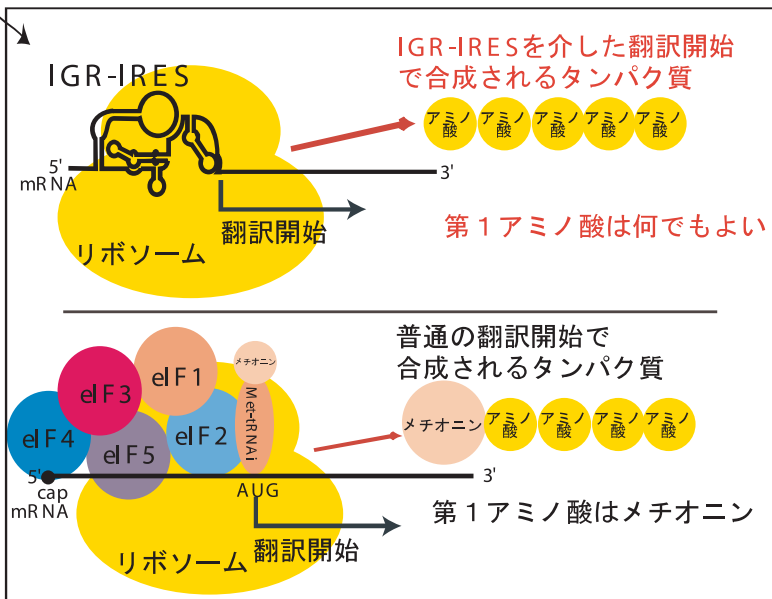
チャバネアオカメムシ (*Plautia stali*)



チャバネアオカメムシ腸管ウイルス
Plautia stali intestine virus (PSIV)



いろいろなウイルスのIGR-IRESの構造



IGR-IRES + リボソーム } だけで合成開始

コムギ胚芽抽出液における合成例
 ホタルルシフェラーゼ (分子量62万): 78 μg/ml
 ウミシイタケルシフェラーゼ (分子量36万): 88 μg/ml
 (AUG開始コドン を削除した配列を翻訳)

翻訳開始因子(eIF)1, eIF2, eIF3, eIF4, eIF5 + 開始メチオニンtRNA + リボソーム } 合成開始のために たくさんの因子類が必要

■研究課題名

肉食性昆虫の共生微生物が産生する殺虫性タンパク質に関する基礎研究（H13～17）

■研究の目的

アリジゴクの吐き戻し液は獲物に対して毒性を示し、しかも獲物は昆虫病原菌に感染したかのように黒変して致死する。本研究では、このような研究代表者自らが発見した現象に寄与する昆虫病原微生物群の実態を解明する。さらに、昆虫病原微生物に起源を有する殺虫性蛋白質の構造および作用機構を解明することによって、生物農薬として利用可能な微生物の新たな探索法や未解明の昆虫の弱点を提示することを目指す。

■研究項目及び実施体制

- ①アリジゴクに共生する微生物の昆虫病原性の評価
- ②病原微生物に起源を有する殺虫性蛋白質の構造解明
- ③殺虫性蛋白質の活性発現機構の解明とその調節分子の探索
(松田 一彦／近畿大学農学部)



松田 一彦

■研究の内容及び主要成果

- ①アリジゴクのそ嚢に含まれる細菌類の殺虫効果を評価した結果、新規細菌を含む多数の細菌類が注射あるいは経口投与で顕著な殺虫活性を示すことを見出した。また、そ嚢内容物に含まれる 16S rRNA 遺伝子を解析することによって、数種の殺虫性細菌がそ嚢内で主要な菌種として存在することを明らかにした。
- ②クロコウスバカゲロウ幼虫から得た細菌類のうち *B. cereus* および新規 *Bacillus* 属細菌が産生する殺虫性蛋白質と、クロコウスバカゲロウ幼虫の吐き戻し液に含まれる殺虫性蛋白質の構造を解明した。
- ③殺虫性蛋白質の標的となる可能性を有する神経イオンチャネルの機能を、パッチクランプ法によって長時間にわたり安定して記録する方法を確立する一方、*B. cereus* が産生する sphingomyelinase C がその触媒機能によって殺虫活性を生じていることを明らかにした。

■見込まれる波及効果

本研究によって得られた、生きているアリジゴクのそ嚢に多数の昆虫病原菌が共生しているという概念は、他の吸汁性肉食昆虫にも外挿可能であると推察される。この発見は、従来土壌や昆虫の死体を探索するのが常であった昆虫病原菌の探索法に対して再考を迫り、合成農薬の使用量の軽減や *B. thuringiensis* 耐性問題の解決に貢献する新たな生物農薬の可能性を開くと考えられる。また、殺虫性蛋白質の作用機構研究で明らかとなった昆虫の弱点は、新規な昆虫制御剤開発の基盤概念として利用し得ると期待される。

■主な発表論文

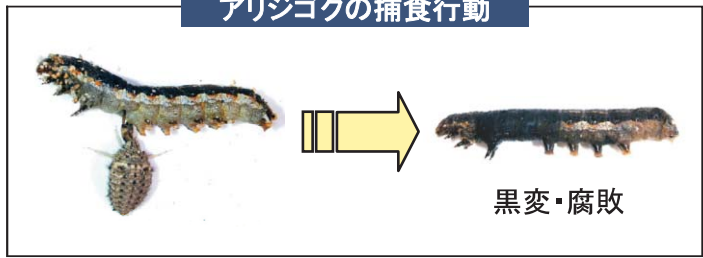
- Ihara M., *et al.* : Differential blocking actions of 4'-ethynyl-4-n-propylbicycloorthobenzoate (EBOB) and γ -hexachlorocyclohexane on γ -aminobutyric acid and glutamic acid-induced responses of American cockroach neurons. *Invert Neurosci* 5 : 157-164 (2005)
- Nishiwaki H., *et al.* : Purification and functional characterization of insecticidal sphingomyelinase C produced by *Bacillus cereus*. *Eur J Biochem* 271 : 601-606 (2004)
- Morimoto M., *et al.* : Evaluation of calcium-alginate gel as an artificial diet medium for bioassays on common cutworms. *J Agric Food Chem*, 52 : 4737-4739 (2004)

■研究のイメージ

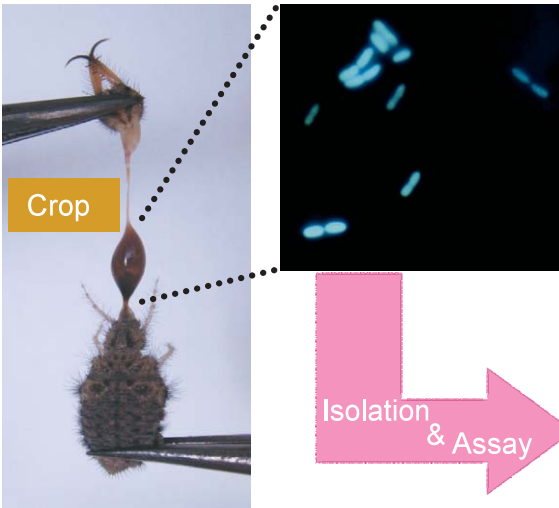
クロコウスバカゲロウ (*Myrmeleon bore*)



アリジゴクの捕食行動



黒変・腐敗



注射投与

経口投与



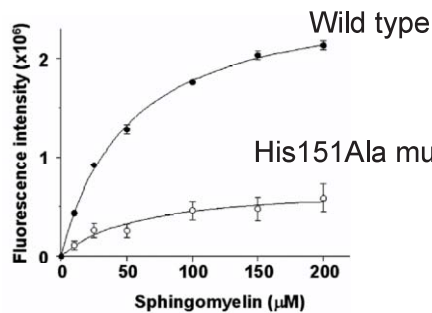
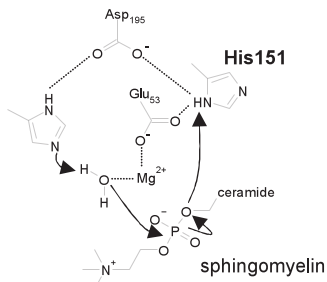
昆虫病原性細菌

- Bacillus cereus*
 - Bacillus velezensis*
 - Bacillus sp. 1*
 - Bacillus sp. 2*
 - Enterobacter aerogenes*
 - Klebsiella sp.*
 - Morganella morganii* etc.
- (赤字は新規細菌)

*B. cereus*が生産する殺虫性タンパク質

Spingomyelinase C

Spingomyelinase Cの活性中心



スフィンゴミエリン加水分解能の低下とともに殺虫活性消失

新規殺虫性タンパク質

Bacillus sp.



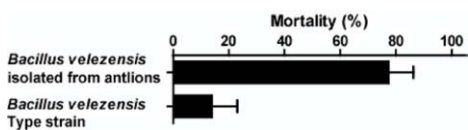
分泌

約55 kDa protein

経口投与で殺虫効果を発揮する細菌

Negative control

B. velezensis isolated from antlions



アリジゴクから単離した菌株に殺虫活性

“生きた”昆虫の体内から
昆虫病原性細菌を単離
(新規細菌含む)
殺虫性タンパク質遺伝子の取得
昆虫の弱点解明

新しい害虫防除手段の開発



■研究課題名

微生物による昆虫の生殖操作機構の解明と利用 (H13～17)

■研究の目的

高度な分子遺伝学的技術が自在に駆使できるショウジョウバエ、およびさまざまな昆虫類に雄殺しや細胞質不和合といった高度な生殖操作をおこなう内部共生細菌であるスピロプラズマとボルバキアをモデル系として、内部共生および微生物による昆虫の生殖操作に関与する分子機構を解明することを目的とする。宿主昆虫側からはショウジョウバエの分子遺伝学的技術を活用した突然変異体スクリーニングを、共生細菌側からはゲノム解析を主要なアプローチとして採用し、内部共生および生殖操作に関わるさまざまな分子過程を総合的に理解することをめざす。さらにはその成果を適用することにより、昆虫共生工学や昆虫生殖工学といった新たな応用分野への展開も志向する。

■研究項目及び実施体制

- ① EP 因子挿入突然変異系統の作成および生殖操作救済突然変異体のスクリーニング
- ② 生殖操作関連遺伝子の同定及び構造、発現、機能解析
- ③ 雄殺しおよび非雄殺しスピロプラズマのゲノム解析
(深津 武馬／(独)産業技術総合研究所)



深津 武馬

■研究の内容及び主要成果

- ① 共生細菌の感染維持に影響するような宿主昆虫の突然変異体を取得した。
- ② 共生細菌の感染密度と雄殺し表現型強度の関係から、生殖操作表現型に関する「閾値密度仮説」を提唱するとともに、共生細菌の感染維持にかかわる宿主昆虫の免疫系との相互作用および回避機構を解明した。
- ③ 雄殺し共生細菌スピロプラズマ NSRO 系統のゲノムを解析した。
- ④ 共生細菌から宿主昆虫への遺伝子水平転移現象を発見した。

■見込まれる波及効果

共生細菌における昆虫免疫系の回避機構、宿主体内における高密度感染機構、生殖操作の分子機構などの理解からは、将来的には新規微生物農薬の開発、殺虫効果の増強、天敵昆虫の性特異的な制御や生産技術の開発などへの展開が期待される。

■主な発表論文

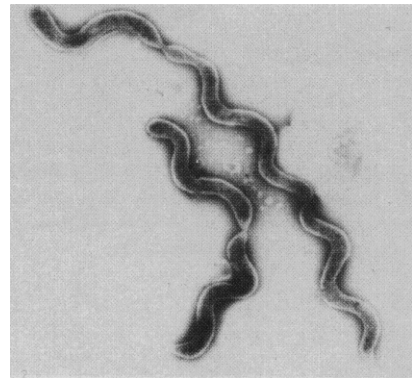
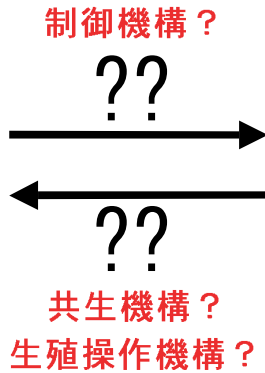
- Anbutsu H., Fukatsu T. Tissue-specific infection dynamics of male-killing and non-male-killing spiroplasmas in *Drosophila melanogaster*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55: in press (2006)
- Kondo N., et al. : Infection density of *Wolbachia* endosymbiont affected by co-infection and host genotype. *Biol. Lett.* 1: 488-491 (2005)
- Anbutsu H., Fukatsu T. : Population dynamics of male-killing and non-male-killing spiroplasmas in *Drosophila melanogaster*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1428-1434 (2003)
- Hurst G. D. D., et al. : Hidden from the host: *Spiroplasma* bacteria infecting *Drosophila* do not cause an immune response, but are suppressed by ectopic immune activation. *Insect Mol. Biol.* 12: 93-97 (2003)
- Kondo N., et al. : Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 14280-14285 (2002)

■研究のイメージ

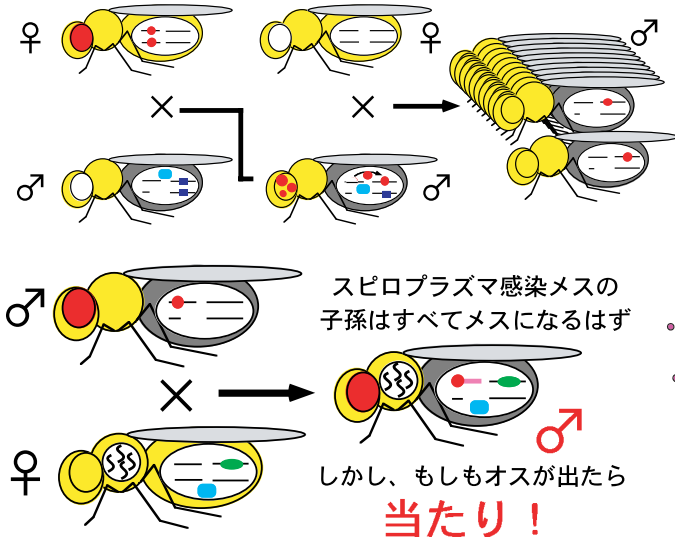
微生物による昆虫の生殖操作機構の解明と利用



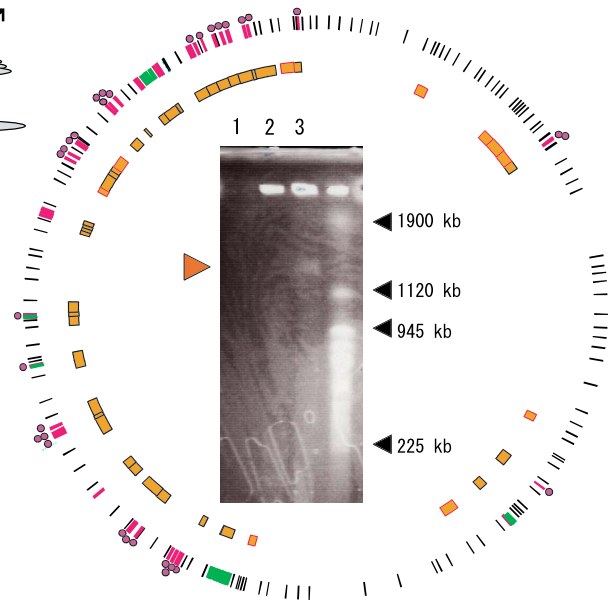
キイロショウジョウバエ：
理想的なモデル昆虫
高度な分子遺伝学的技術の利用



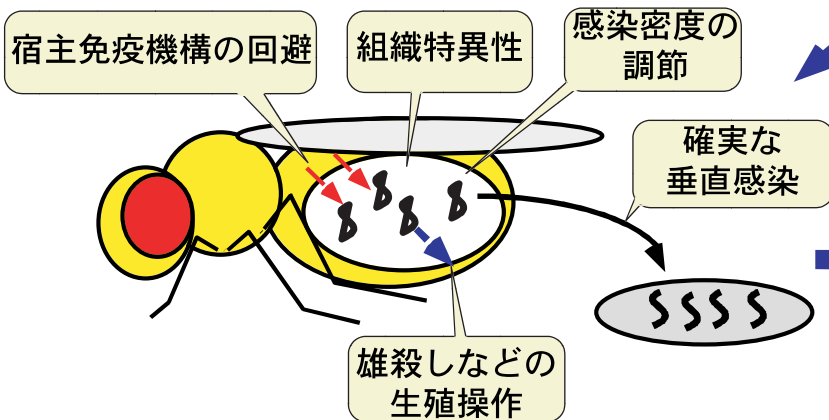
雄殺しスピロプラズマ：
ショウジョウバエに共生して
高度な生殖操作をひきおこす



宿主分子遺伝学からのアプローチ



共生細菌ゲノミクスからのアプローチ



内部共生、生殖操作の分子機構の理解

- 昆虫共生工学
- 昆虫生殖工学
- 天敵昆虫の効率的生産
- 微生物農薬の効力増強
-

「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」について

農林水産業、飲食料品産業等生物系特定産業の分野において、生物の持つ多様な機能を活用することにより、新技術・新分野を創出し、それを通じて農林水産業の発展、地球規模での人口問題、食料問題、環境問題の解決等に資するため、将来の産業技術のシーズとなる基礎的な試験研究を提案公募により実施しています。

対象研究分野／生物系特定産業に関する基礎研究であって、新技術・新分野の創出に資するもの。具体的な分野は以下のとおり。

- ①生物機能解明・生産力向上分野
- ②高機能・高品質食品分野
- ③生物系素材分野
- ④生物機能利用による環境改善分野
- ⑤工学・環境学的手法による生物機能向上分野
- ⑥共通基盤に関する研究分野（このほか、①～⑤に該当しないもの）

応募資格／大学、国公立試験研究機関、独立行政法人、民間の研究機関等、生物系の産業技術に関する基礎研究を実施する能力のある機関に所属している研究者又はそのグループ。

研究応募枠／「一般型」については、応募者の年齢制限無し。

「若手研究者支援型」については、応募者の年齢を39歳以下に制限。

研究期間と研究費の規模／（研究費には間接経費を含む）

○一般型 研究期間：3～5年間

研究費：1課題あたり2千万円～1億円程度／年

○若手研究者支援型

研究期間：3年間

研究費：

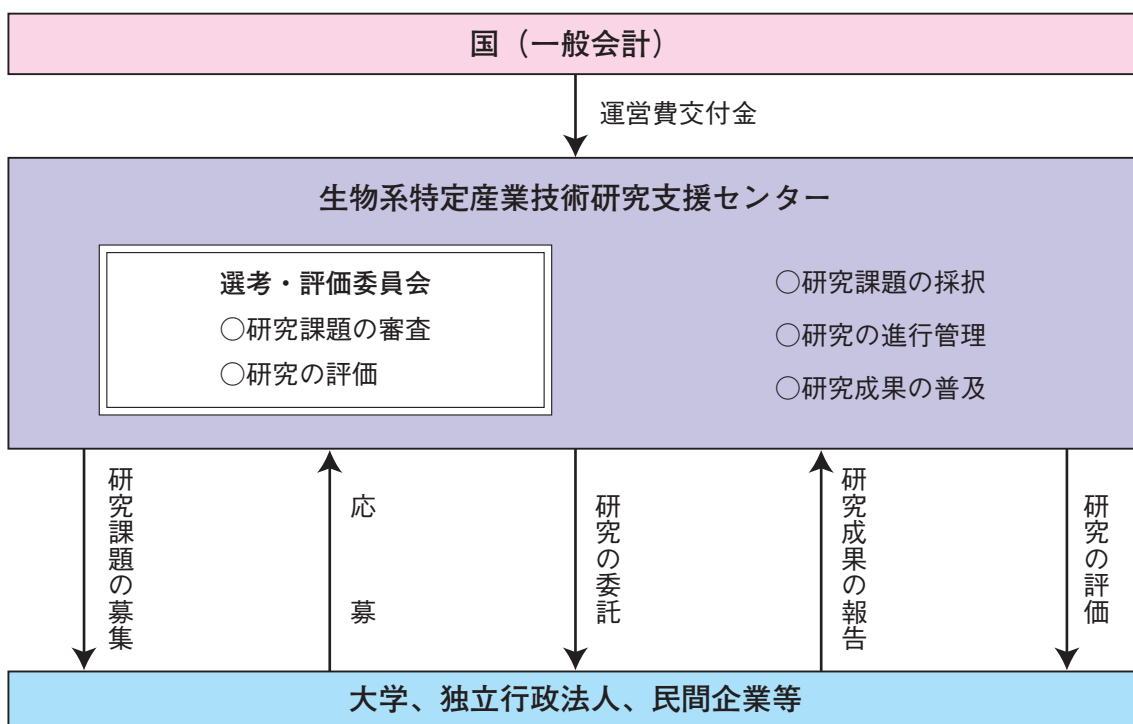
・参画機関数1～3の場合：1課題あたり2千万円～5千万円程度／年

・参画機関数4以上の場合：1課題あたり2千万円～1億円程度／年

研究実施形態／生研センターからの委託研究

研究成果の帰属／生研センターが認めた場合は受託機関に帰属。それ以外は共有。

■事業の仕組み



生物系特定産業技術研究支援センター 東京事務所



お問い合わせ先

基礎研究課

住 所 〒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

電 話 03-3459-6569

FAX 03-3459-6594

生研センターホームページ・アドレス

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

営団地下鉄日比谷線 神谷町 徒歩2分

神谷町駅 霞ヶ関寄り出口3番を出て、左へ10m

左折後50m右手。虎ノ門マリビル10階