

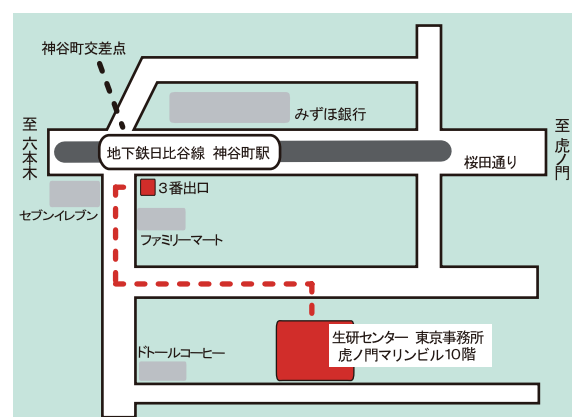
基礎研究推進事業 研究成果

(2008年度終了課題)

基礎研究推進事業 研究成果 (2008年度終了課題)



生物系特定産業技術研究支援センター 東京事務所



東京メトロ日比谷線 神谷町駅 徒歩2分
神谷町駅 霞ヶ関寄り3番出口を出て、左へ10m
左折後50m右手。虎ノ門マリビル10階

- お問い合わせ先
基礎研究課
〒105-0001
東京都港区虎ノ門3-18-19
虎ノ門マリビル10階
03-3459-6569
- 生研センターホームページ
<http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>

生物系特定産業技術研究支援センター

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

表紙説明

左上（採餌蜂）：

セイヨウミツバチ (*Apis mellifera* L.) の働き蜂は羽化後の日齢に伴い、巣の中で幼虫や女王蜂の世話をする「育児」から巣の外で花蜜や花粉を採集する「採餌」へと分業する（齢差分業）。写真は、ツルソバの花を訪れたセイヨウミツバチの働き蜂。本研究では働き蜂の齢差分業の分子・神経的基盤を探る目的で、齢差分業に伴って脳で発現が変動する遺伝子を探索し、核内（エクダステロイド）受容体 HR38 の遺伝子が、採餌蜂の脳の高次中枢であるキノコ体の一部の領野（小型ケニオン細胞）で発現増強することを見出した。キノコ体のエクダステロイド情報伝達系のモード転換が齢差分業に関わる可能性が指摘できる。

右下（ダンスコミュニケーション）：

セイヨウミツバチの働き蜂は、餌場の位置を「尻振りダンス」を用いて仲間の働き蜂に伝達する能力をもつ。写真中央がダンスを踊っている働き蜂で、周りを取り囲む働き蜂がダンスに追従し、その情報を読み解いている働き蜂である。本研究では、新しく同定した「初期応答遺伝子（神経興奮に伴い、一過的にその神経細胞で発現する）」*Kakusei*（覚醒）を用いて、採餌蜂の脳ではキノコ体の一部の部域（小型ケニオン細胞と、その周辺の領野）が選択的に活動していることを初めて示した。また、キノコ体でそれらの領野選択的に発現する遺伝子を初めて同定し、世界に先駆けてミツバチ脳の「分子的解剖」を行った。

（東京大学大学院理学系研究科：久保 健雄）

基礎研究推進事業

研究成果（2008年度終了課題）

目次

一般型

SuperSAGE法を利用したイネーいもち病菌相互作用の解析 （(財) 岩手生物工学研究センター／寺内 良平）……………	1
イネの逆遺伝学及び逆エピ遺伝学的技法開発と機能解析 （自然科学研究機構基礎生物学研究所／飯田 滋）……………	3
酵母の発酵環境ストレス適応機構の解明と新規な発酵生産系開発への基盤研究 （奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科／高木 博史）……………	5
昆虫が有する病原体認識システムの解明とその利用 （東北大学大学院薬学研究科／倉田 祥一朗）……………	7
自然な睡眠覚醒調節作用を持つ天然素材の探索に関する研究 （(財) 大阪バイオサイエンス研究所／裏出 良博）……………	9
セスバニア <i>Azorhizobium caulinodans</i> 系を用いた根粒成熟の分子メカニズムの解明 （東京大学生物生産工学研究センター／小柳津 広志）……………	11
相同組換え開始酵素Spo11による新世代ゲノム加工技術 （独立行政法人理化学研究所／柴田 武彦）……………	13
動物ゲノム情報の多面展開を目指したDNAメチル化プロフィール解析 （東京大学大学院農学生命科学研究科／塩田 邦郎）……………	15
ネムリユスリカの極限環境に対する耐性の分子機構の解明 （独立行政法人農業生物資源研究所／奥田 隆）……………	17
分子生物学の新しいモデル生物としてのミツバチの開発と利用 （東京大学大学院理学系研究科／久保 健雄）……………	19
マダニの生存戦略と原虫媒介のinterfaceに関する分子基盤の解明 （鹿児島大学農学部／藤崎 幸蔵）……………	21
核移植と染色体操作を組み合わせた新規手法による魚類体細胞クローンおよび遺伝子ターゲティング技術の開発 （名古屋大学生物機能開発利用研究センター／若松 佑子）……………	23
高次タンパク質の大量発現用バクミドの開発及び応用 （静岡大学創造科学技術大学院／朴 龍洙）……………	25

若手研究者支援型

昆虫免疫応答改変によるアンチ・インセクトベクターの開発 （帯広畜産大学原虫病研究センター／嘉糠 洋陸）……………	27
シロアリの卵運搬本能を利用した駆除技術の開発 （岡山大学大学院環境学研究科／松浦 健二）……………	29
微生物を用いたペプチドの大量生産法の開発 （北海道大学大学院先端生命科学研究院／相沢 智康）……………	31
カイコゲノム研究基盤を活用した昆虫の比較ゲノム解析 （独立行政法人農業生物資源研究所／安河内 祐二）……………	33
環境中での細菌の環境汚染物質分解能を支配するプラスミド機能の解明 （東京大学生物生産工学研究センター／野尻 秀昭）……………	35
酵素によるイノシトールリン脂質及びイノシトールリン酸の合成 （名古屋大学大学院生命農学研究科／岩崎 雄吾）……………	37
糸状菌の低酸素応答機構の解明と利用 （筑波大学大学院生命環境科学研究科／高谷 直樹）……………	39
新規DNA型RNAiライブラリーによる昆虫免疫関与因子の網羅的探索法の確立とその利用技術の開発 （独立行政法人農業生物資源研究所／田中 博光）……………	41
ヘテロシス固定による新育種法の開発に向けたアポミクシス機構の解明 （農研機構畜産草地研究所／高原 学）……………	43

■研究課題名

イネの逆遺伝学及び逆エビ遺伝学的技法開発と機能解析

■研究の目的

世界人口の半数の主食として最重要穀物であるイネは、詳細なゲノム配列解析が2004年末に終了し、各種の系統、完全長cDNAやタグライン等のリソースが整備されている。それ故、穀類のモデル植物としても、また育種上からも、イネの内在性のゲノム配列を自在に改変して、未知遺伝子の機能を解明したり、育種上重要な形質を賦与できるような技術開発が望まれている。また、従来のイネの挿入変異作出による遺伝子同定法には、高頻度の培養変異が同時に起こり得ることも知られており、培養変異を伴わない挿入変異作出法も望まれていた。本研究は、これらの問題を解決すべく逆遺伝学的新技術の創出をめざし、さらに、シロイヌナズナなど極く一部のモデル植物でしか解析されていない、エピジェネティクス関連遺伝子、特にDNAメチル化関連遺伝子変異体を新たに分離して、イネのエピジェネティックな発現制御機構を解明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 遺伝子ターゲティングとタギングによるイネゲノムの機能解析 (◎飯田 滋／自然科学研究機構基礎生物学研究所)
- ② イネのDNAトランスポゾン挿入変異系統の効率的作出と機能解析 (前川雅彦／岡山大学資源生物科学研究所)



■研究の内容及び主要成果

- ① DNAメチル化関連の10遺伝子を初め合計13遺伝子の改変に成功して、相同組換による遺伝子ターゲティング法の開発に成功し、イネのDNAメチル化関連遺伝子の機能について有用な知見を得た。
- ② レポーター遺伝子を標的遺伝子と置換えて、標的遺伝子の発現活性を解析することに成功した。
- ③ 標的遺伝子に効率よく点変異を導入できることを見出し、任意の変異導入法の基盤を確立した。
- ④ イネの内在性DNAトランスポゾン*nDart*を用いた培養変異を伴わない挿入変異作出法であるタギング法の確立に成功し、DNAトランスポゾンの特性を解析して、複数の育種上重要な変異を分離できた。

■見込まれる波及効果

本研究で開発した相同組換による遺伝子ターゲティング法は、任意の変異をゲノムの導入する変異創成法なので、望ましい変異を導入したイネの作出は、長期的には農林水産業、飲食料品産業、醸造業等々の産業や社会に影響を及ぼし、その波及効果は大きいと期待される。また、培養変異を伴わず、組換DNA技術を用いない挿入変異導入法である遺伝子タギング法による変異創成も育種等への種々の波及効果が考えられる。

■主な発表論文

Iida, S., Terada, R.: A tale of two integrations, transgene and T-DNA: gene targeting by homologous recombination in rice. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 132-138 (2004).

Tsugane, K., et al.: An active DNA transposon *nDart* causing leaf variegation and mutable dwarfism and its related elements in rice. *Plant J.* 45: 46-57 (2006).

Terada, R., et al.: Gene targeting by homologous recombination as a biotechnological tool for rice functional genomics. *Plant Physiol.* 144: 846-856 (2007).

Nishimura, H. et al.: Distribution and mapping of an active autonomous *aDart* element responsible for mobilizing nonautonomous *nDart* 1 transposons in cultivated rice varieties. *Theor. Appl. Genet.* 116: 395-405 (2008).

Johzuka-Hisatomi, Y. et al.: Efficient transfer of base changes from a vector to the rice genome by homologous recombination: involvement of heteroduplex formation and mismatch correction. *Nucleic Acids Res.* 36: 4727-4735 (2008).

■研究成果の概要

イネの逆遺伝学及び逆エビ遺伝学的技法開発と機能解析

遺伝子ターゲティング

相同組換えによる自在なゲノム配列の改変

求められる技術

- ・再現性のある変異体の作出
- ・プロモーター活性をモニターできるノックインターゲティング
- ・任意の遺伝子をデザインした通りに改変できる技術

遺伝子タギング

イネ内在性DNAトランスポゾンの挿入による遺伝子破壊

求められる技術

- ・培養変異がなく効率の良いタギング集団
- ・トランスポゾンの転移制御
- ・挿入領域の迅速かつ正確な同定

メチル化関連遺伝子のノックイン改変

プロモーター活性の解析: プロモーターの活性をGUS染色で観察。標的遺伝子のプロモーターの特性を詳細に解析。

再現性のある変異体の作出: 10個のメチル化関連遺伝子のノックアウト改変体を作成に成功。試みた全ての遺伝子の改変に成功!

遺伝子ターゲティングにより、デザインした通りのゲノム改変体の作出、さらに同一の変異体を再現性よく独立に複数分離することに成功。

メチル化関連遺伝子の機能: 作出した変異体の表現型の多くが、種子の異常、不稔など穀物としての主要器官で観察。これら遺伝子の生殖や種子形成への重要度を示唆。

従来までの変異導入法では得ることが困難と考えられる種子形成や生殖にかかわる遺伝子の変異体も、遺伝子ターゲティングにより、効率良く得ることに成功。次世代には伝達されない変異も遺伝子ターゲティングによって創成可能。

イネ内在性の活性な非自律性DNAトランスポゾン*nDart*と自律性因子の*aDart*系因子の同定

*nDart*の転移制御

*aDart*の発現解析

ゲノム配列から見いだした*nDart/Dart*系トランスポゾン

高頻度な変異系統出現率

50%

インディカイネでの遺伝子タギングシステムの確立

whitish leaf gene::GFP Overlay Chloroplast

インディカイネでタギングできた遺伝子の細胞内の局在

挿入部位の迅速な可視化 相補的な二つの方法

iPCRを改変したn1-OSPIPCR法

AFLPを改変したTD法

易変性(変わり易い)変異: 遺伝子破壊と優性獲得変異

新たな挿入変異の同定と解析

粒数増加 優性変異

野生型

イネの新たな逆遺伝学及び逆エビ遺伝学的技法の開発

イネの生体機能解明のための新技法開発と機能解析

■研究課題名

酵母の発酵環境ストレス適応機構の解明と新規な発酵生産系開発への基盤研究

■研究の目的

発酵生産環境において酵母には多様なストレスが負荷され、細胞内タンパク質の変性に伴う異常タンパク質の生成により有用機能が制限される。本研究では、研究代表者等が見出した「異常タンパク質の生成回避・検知処理機構」を中心に酵母のストレス適応機構を解明する。また、実用ストレス条件下における酵母の遺伝子発現ネットワークを解明し、ストレス適応機構の理解に役立てる。さらに、各機構の高機能化と高度利用により、優れたストレス耐性を有する産業酵母の作製と実用化に向けた開発技術を確認する。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①異常タンパク質生成を伴うストレスに対する酵母の適応機構の解明 (◎高木 博史／奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)
- ②パン酵母におけるストレス耐性の網羅的解析と新機能開発 (島 純／独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所)
- ③清酒ろみにおける酵母の遺伝子発現ネットワーク解析とその応用 (下飯 仁／独立行政法人酒類総合研究所)



■研究の内容及び主要成果

- ①酵母の新規なストレス適応機構を解析し、プロリンの細胞内含量と局在の重要性、アセチル化酵素Mpr1のプロリン代謝を介した抗酸化機構、ユビキチンリガーゼRsp5の異常タンパク質処理機構等を明らかにした。
- ②ストレス適応に重要な各酵素 (Pro1, Mpr1, Rsp5) について、遺伝子へのランダム変異導入により高機能型の変異酵素を取得し、各々の分子機構の解明と発現酵母におけるストレス耐性の向上に成功した。
- ③製パンストレス環境におけるパン酵母遺伝子の網羅的な発現機能解析を行ない、膨大な遺伝子情報を蓄積した。また、セルフクロニング法による育種技術を確認し、ストレス耐性パン酵母を作製した。
- ④もろみ中の清酒酵母の遺伝子発現プロファイルを解析し、エタノール耐性や生産能強化のための知見を得た。また、清酒酵母のエタノール適応機構を見出し、高濃度エタノール生産への効果を実証した。

■見込まれる波及効果

酵母のストレス適応機構や実用ストレス環境における産業酵母の遺伝子情報に関する膨大な知見を活用し、高度なストレス耐性産業酵母の開発が期待できる。例えば、プロリンやMpr1は冷凍生地やドライイーストの効率的生産を可能にする。また、製パンストレスと酸化ストレスとの共通性もパン酵母の育種に応用できる。さらに、エタノール高生産と耐性に関する成果は、有用な清酒酵母やバイオエタノール酵母の開発に寄与する。

■主な発表論文

Wu H., et al.: Global gene expression analysis of yeast cells during sake brewing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 7353-7358 (2006)

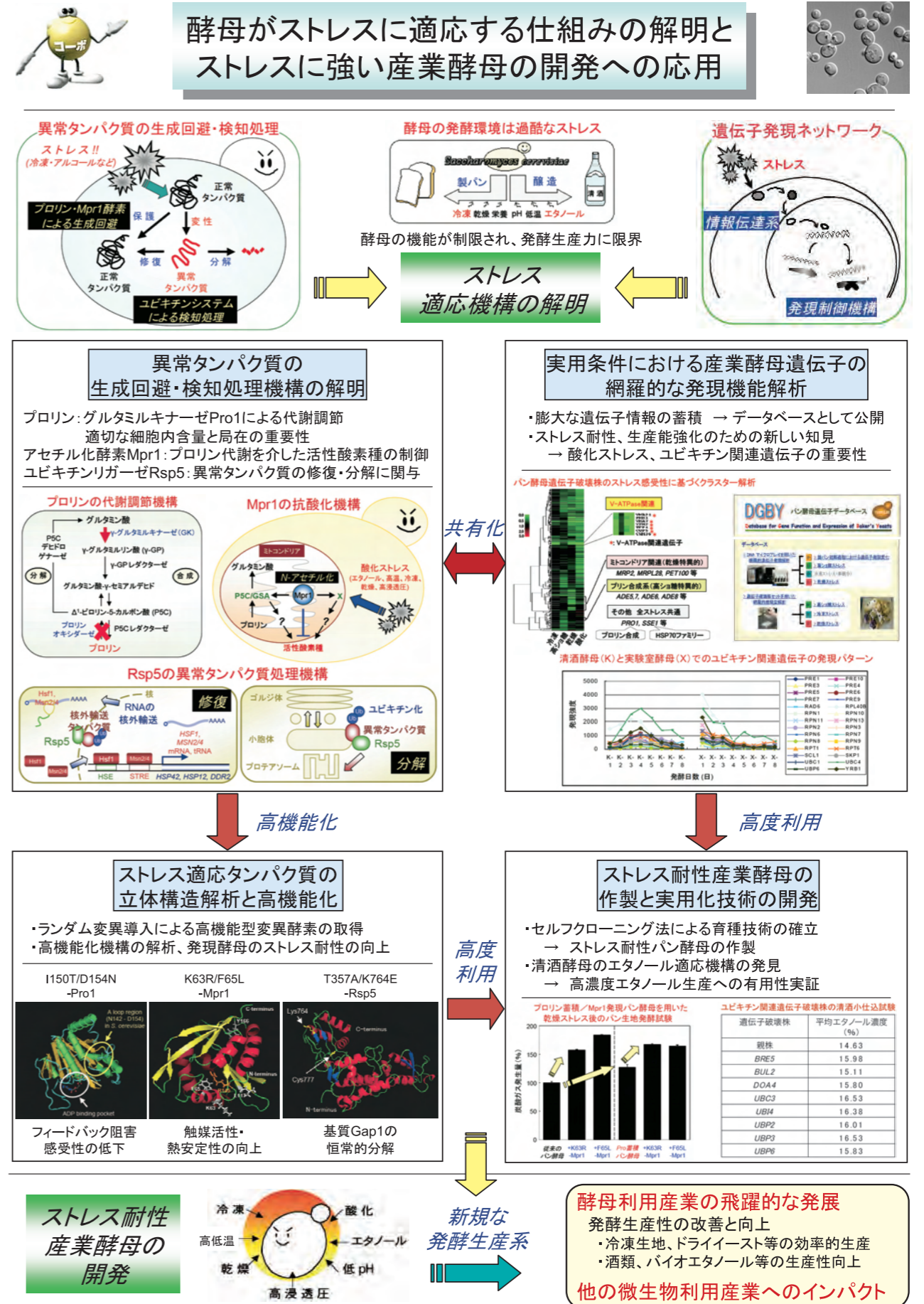
Ando A., et al.: Identification and classification of genes required for tolerance to freeze-thaw stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains. *FEMS Yeast Res.*, 7: 244-253 (2007)

Sekine T., et al.: Desensitization of feedback inhibition of the *Saccharomyces cerevisiae* γ -glutamyl kinase enhances proline accumulation and freezing tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 4011-4019 (2007)

Haitani Y. and Takagi H.: Rsp5 is required for the nuclear export of mRNA of *HSF1* and *MSN2/4* under stress conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells*, 13: 105-116 (2008)

Iinoya K., et al.: Engineering of the yeast antioxidant enzyme Mpr1 for enhanced activity and stability. *Biotechnol. Bioeng.*, 103: 341-352 (2009)

■研究成果の概要



■研究課題名

昆虫が有する病原体認識システムの解明とその利用

■研究の目的

昆虫は、遺伝の再編成に頼らずとも、多様な病原体を認識し排除できる。本研究は、昆虫の病原体認識システムを解明し、それを多様な対象に対応可能な新規なシグナル増幅技術として展開する。さらに、昆虫の感染防御反応に作用する化合物を同定し、この化合物をもとに、昆虫の耐病性的人為的制御を目指す。加えて、昆虫の感染防御機構が、哺乳動物の自然免疫系と共通性を示すことから、得られた化合物を哺乳動物の自然免疫制御に展開する。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①昆虫の病原体認識システムの解明と利用
(◎倉田祥一郎／東北大学大学院薬学研究科)
- ②昆虫の感染防御反応を制御する化合物の探索と利用
(◎倉田祥一郎／東北大学大学院薬学研究科)



倉田 祥一郎

■研究の内容及び主要成果

- ①病原体認識蛋白質PGRP-LEを中心とした細胞内外での病原体認識機構と、新規受容体グアニル酸シクラーゼが制御する新たな感染防御機構の存在が明らかとなった。加えて、病原体認識蛋白質が示す分子密度上昇に依存したシグナル増幅をもとにした、新規シグナル増幅技術の成功例が示された。
- ②昆虫の感染防御反応を抑制する化合物20種、増強する化合物3種が同定され、それらが、昆虫耐病性的人為的制御に使用可能であることが、昆虫媒介性伝染病の感染モデル、害虫モデル実験などにより示された。また、これらの化合物の中には、哺乳動物の自然免疫系の制御に展開できるものがあることが示された。

■見込まれる波及効果

受容体の分子密度上昇を利用したシグナル増幅技術は、対象とするリガンドに制約がない。したがって、様々な対象を検出できる系として、PCRやELISAといった既存する検出技術を相補する新技術としての展開が期待できる。また、昆虫耐病性を人為的に制御できる化合物が提出された。病原体が感染した時のみ、殺虫効果を示す化合物は、昆虫への選択圧が低く、薬剤耐性昆虫の出現の問題に対応できる可能性がある。このような耐病性制御による昆虫管理技術は、環境共存型の害虫防除、あるいは昆虫媒介性伝染病に感染したキャリアー昆虫を選択的に駆除できる新技術などとして、生物系特定産業や社会への貢献が期待できる。哺乳動物の自然免疫系を制御できる化合物は、医薬品のリード化合物、抗生物質に依存しない家畜の感染防御などに展開が可能である。

■主な発表論文

Takehana, A., *et al.*: Peptidoglycan Recognition Protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in *Drosophila* immunity. *EMBO J.* 23: 4690-4700 (2004)

Kaneko, T., *et al.*: PGRP-LC and PGRP-LE play essential yet distinct roles in the *drosophila* immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nature Immunol.* 7: 715-723 (2006)

Sekiya, M., *et al.*: Establishment of in vitro systems to identify compounds acting on innate immune responses and to determine their target molecules using transgenic *Drosophila*. *Life Science.* 80, 113-119 (2006)

Yano, T., *et al.*: Autophagic control of *Listeria* through intracellular innate immune recognition in *Drosophila*. *Nature Immunol.* 9 : 908-916 (2008)

Sekiya, M., *et al.*: A cyclopentanediol analogue selectively suppresses the conserved innate immunity pathways, *Drosophila* IMD and TNF- α pathways. *Biochem. Pharm.* 75: 2165-2174 (2008)

■研究成果の概要

昆虫が有する病原体認識システムの解明とその利用

- (1) 昆虫の病原体認識システムの解明と利用
- (2) 昆虫の感染防御反応を制御する化合物の探索と利用

機構解明

新規受容体の同定

病原体認識 システムの解明

細胞内自然免疫機構

分子基盤と変異体

分子プローブと新たな作用点

化合物の同定

抑制化合物 20
増強化合物 3

強力な誘導体の創製

作用点の同定

新規シグナル増幅技術への展開

分子密度上昇による感染シグナルの活性化

新規シグナル増幅技術

感染防御反応の人為的制御

昆虫媒介性伝染病感染モデル

害虫モデル

哺乳動物自然免疫系に作用する化合物

昆虫感染防御反応の人為的制御と利用への大きな前進

■研究課題名

自然な睡眠覚醒調節作用を持つ天然素材の探索に関する研究

■研究の目的

ヒトは人生の3分の1を眠って過ごす。睡眠は心身の健全な発育と健康の維持に必須であり、最も手軽で有効な疲労回復手段である。しかし、24時間社会の日本では国民の約30%が睡眠不足に悩まされている。また、睡眠不足による経済損失は3億5千億円にもほり社会問題となっている。本研究課題では、この現状の改善に向けて、脳波の周波数や波形解析により睡眠の量と質を解析できる睡眠バイオアッセイシステムを確立し、天然素材の中からヒトが本来持つ睡眠覚醒機能調節を刺激して快眠効果や眠気防止効果をもたらす素材を探索した。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①動物睡眠のオンライン型解析システムの構築
- ②自然な睡眠や覚醒を誘発する天然素材のスクリーニング
- ③睡眠覚醒調節作用を持つ成分の同定と作用機構の解明
(◎裏出良博／(財)大阪バイオサイエンス研究所)



裏出 良博

■研究の内容及び主要成果

- ①動物の脳波の周波数や波形解析により睡眠の量と質を解析できるオンライン型睡眠バイオアッセイシステムを確立した。
- ②赤外線モニター装置による行動量測定により最終的には204種類の素材のスクリーニングを行なった。その結果、鎮静効果を持つ素材や、覚醒効果を持つ素材を見出した。さらに、これらの効果が認められた素材に関して脳波測定を行った。その結果、睡眠効果が認められた素材7種類と有効成分5種類、また、覚醒効果が認められた素材3種類と有効成分1種類を見出した。
- ③睡眠効果や覚醒効果を示した物質の機能性成分の単離に成功し、作用機構を解明した。
- ④オンライン型睡眠バイオアッセイシステムを用いて新たな睡眠覚醒調節機構の存在を証明した。

■見込まれる波及効果

ヒトが本来持つ睡眠覚醒調節機能を促進する天然素材を効率的・高精度に探索し、機能性食品として開発を進めることにより、不眠に悩む人のQOLの向上や睡眠不足により生じる産業事故の減少につながる。また、新たな健康食品産業の創設が期待される。

■主な発表論文

Huang ZL, et al.: Adenosine A_{2A}, but not A₁, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat Neurosci.* 8:858-859 (2005).
 Huang ZL, et al.: Altered sleep-wake characteristics and lack of arousal response to H3 receptor antagonist in histamine H1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4687-4692 (2006).
 Qu WM, et al.: Lipocalin-type prostaglandin D synthase produces prostaglandin D2 involved in regulation of physiological sleep. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17949-17954 (2006).
 Oishi Y, et al.: Adenosine in the tuberomammillary nucleus inhibits the histaminergic system via A1 receptors and promotes non-rapid eye movement sleep. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:19992-19997 (2008).

■研究成果の概要

睡眠改善機能食品の開発

オンライン型睡眠解析システムの開発

睡眠解析システム SleepSign®
特開2007-105383
「睡眠計及び睡眠状態判定方法」

増幅器
スリッパリング
電極

覚醒 ノンレム睡眠 レム睡眠
0 25 0.75-4 6-10 Hz

スクリーニング法

行動量測定 → 成分分離 → 脳波測定

成分同定と作用機構の解明

鎮静効果：105種 睡眠効果：12種 (うち成分5種) 覚醒効果：3種

・特開2008-50352「睡眠改善剤」・特開2007-141608「睡眠改善剤」・特開2008-230843「鎮静剤およびその睡眠改善剤としての使用」

睡眠改善候補物質 クロシン (特開2008-299598)

サフラン (クロシンを含有)

クロシンの構造式
Glc-Glc-O

*P<0.05, **P<0.01 vs 生理食塩水, n=6

眠気防止物質候補 カカオエキス

**P<0.01 vs 水, n=5-7

波及効果

- ①不眠に悩む人のQOLの向上や睡眠不足により生じる産業事故の減少につながる。
- ②新たな健康食品産業の創設が期待される。

■研究課題名

セスバニア - *Azorhizobium caulinodans* 系を用いた根粒成熟の分子メカニズムの解明

■研究の目的

この研究は、非マメ科作物に生物窒素固定能を付与することを最終的な目的として、自然生態系で生物窒素固定の大部分を行っているマメ科根粒の形成メカニズムを解明する。近年マメ科モデル植物ミヤコグサを用いて、Nodファクターを初発シグナルとした根粒形成の初期過程がだいに明らかとなってきた。この研究ではミヤコグサ系で解明が進められていない後期成熟過程の分子メカニズムを申請者が独自に開発したセスバニア系を用いて解明を行う。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①根粒成熟・維持機構における根粒菌-植物間の重要因子遺伝子群の機能解明
(◎小柳津広志および青野俊裕/東京大学生物生産工学研究センター)
- ②植物側の根粒成熟を誘導するシグナル伝達経路の解明
(◎小柳津広志/東京大学生物生産工学研究センター)



小柳津 広志

■研究の内容及び主要成果

- ①根粒成熟・維持機構における根粒菌-植物間の重要因子遺伝子群の機能解明
*A. caulinodans*変異株のスクリーニングの結果、多数の新規遺伝子の根粒形成への関与が明らかになった。そこで、オートトランスポーターである巨大外膜タンパク質、リポ多糖(LPS)合成遺伝子群に焦点を絞った。その結果、オートトランスポーターである巨大外膜タンパク質の欠損は植物の病原応答を引き起こし、これが原因で窒素固定能が低下することから、このタンパク質が根粒菌とマメ科植物の親和性を決定している可能性が示唆された。また、根粒菌のLPS構造の変異は植物細胞中で根粒菌数を低下させることから、この分子も根粒菌とマメ科植物の親和性を決定する分子の一つであることを示した。
- ②植物側の根粒成熟を誘導するシグナル伝達経路の解明
ミヤコグサの変異株ライブラリーから、無効根粒を形成する株および過剰着生株を多数取得し、それらの遺伝子の特徴および性質の解明を進めた。その結果、新規過剰着生遺伝子*Rdh1*の欠損は豆果の収量を約50%増加させた。また、IGN1タンパク質は根粒内に多量に生成されるノジュリン遺伝子群の発現を制御していることを明らかとした。さらに、ノジュリン遺伝子群の発現制御には根粒菌のリポ多糖の構造が関与していることを示した。

■見込まれる波及効果

第1の成果は、根粒中に発現されるノジュリンの存在は必ずしも共生窒素固定に必要なということを示したことにある。このことは、非マメ科植物に根粒形成をさせた場合、根粒菌とマメ科植物の複雑な相互作用を考慮しなくても、窒素固定力を発揮させることができることを示している。第2の成果は、根粒菌においてはLPSが根粒菌とマメ科植物との親和性を決定する分子であることを明らかとしたことにある。第3に、この研究で取得したミヤコグサの新規な根粒過剰着生*rdh1*変異株では豆果の収量が約50%増収することが明らかとなり、これが将来マメ科作物の増収のための育種に貢献することが期待される。

■主な発表論文

Suzuki S *et al.*: Rhizobial Factors required for stem nodule maturation and maintenance in *Sesbania rostrata*-*Azorhizobium caulinodans* ORS571 symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6650-6659 (2007)

Lee KB *et al.*: The genome of the versatile nitrogen fixer *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *BMC Genomics* 9: article No. 271 (2008)

Suzuki T *et al.*: An outermembrane autotransporter, AoaA, of *Azorhizobium caulinodans* is required for sustaining highN₂-fixing activity of stem nodules. *FEMS Microbiol. Letters* 285: 16-24 (2008)

Ishikawa K *et al.*: Isolation of a novel root-determined hypernodulation mutant *rdh1* of *Lotus japonicus*. *Soil Sci. Plant Nutr.* 54: 259-263 (2008)

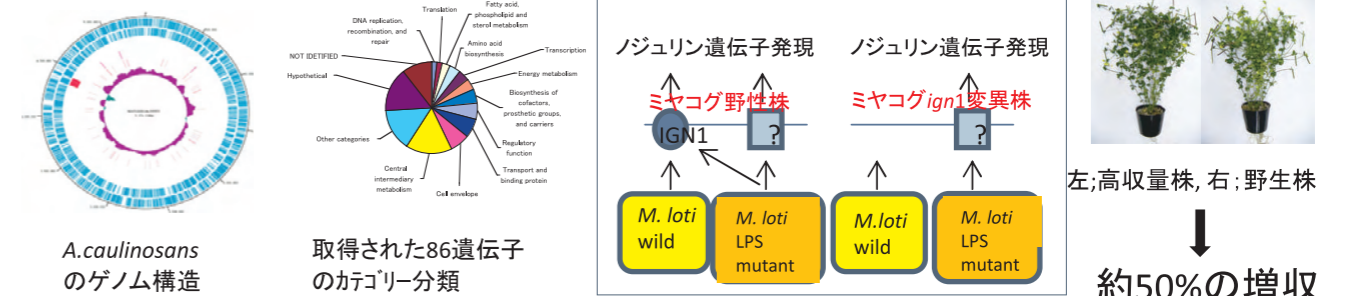
Yokota K *et al.*: Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *Plant Cell* in press (2009)

■研究成果の概要

セスバニア-*Azorhizobium caulinodans*系を用いた根粒成熟のメカニズムの解明



根粒菌 *A. caulinodans* の全ゲノム解読
 根粒成熟に関与する遺伝子のミュータントライブラリーによる網羅的スクリーニング
 根粒成熟に関与する遺伝子のミュータントライブラリーによる網羅的スクリーニング
 種子の収量を上げる遺伝子のミュータントライブラリーによる網羅的スクリーニング



共生に必要なノジュリン遺伝子の発現にマメ科植物のIGN1が、根粒菌のLPSが重要な機能を果たすことの発見

根粒菌の根粒の成熟の鍵遺伝子の解明

- ・リポ多糖(LPS)
- ・オートトランスポーター機能を有する巨大外膜タンパク質

非マメ科作物へ窒素固定能を付与するための技術的基礎を提示
 マメ科作物増収の可能性を示唆

■研究課題名

相同組換え開始酵素Spo11による新世代ゲノム加工技術

■研究目的

長年希求されているイネのゲノム全体の中から任意の標的遺伝子だけを加工する標的遺伝子組換え技術を、生物が自然に行う相同組換え機構を利用して開発し、安全・安心な次世代高速ゲノム加工技術の核とする。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①組換え開始酵素Spo11による標的相同組換え活性化法の確立 (◎柴田武彦/独立行政法人理化学研究所)
- ②組換え開始酵素Spo11によるイネの相同組換え制御 (若狭 暁/東京農業大学農学部遺伝育種学研究室)
- ③組換え標的遺伝子特異的に結合する蛋白質ドメインの開発に関する研究 (胡桃坂 仁志/早稲田大学理工学術院 胡桃坂研究室)
- ④昆虫での Spo11誘導による高効率な標的相同組換え法の確立 (草野 好司/京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科)



■研究の内容及び主要成果

- ①イネで利用できる諸迅速アッセイ系を確立し、イネ花粉での相同組換えを検出した。
- ②イネで利用できる特異DNA配列結合ドメインをデザインした。
- ③SPO11の減数分裂期二重鎖切断機能検定系を構築し、Spo11ホモログ等の個々の検定を可能にした。
- ④酵母を用いたリード研究で、Spo11のDNA切断能活性化の機構と、組換え開始とそれに先立つDNA複製との協調制御の仕組みを明らかにした。
- ⑤イネの4種、シロイヌナズナの3種のSpo11ホモログの可溶状態での単離法を世界に先駆けて確立し、SPO11の組換え開始酵素機能に必要なDNA結合の部位をその蛋白質立体構造上に決めた。
- ⑥イネの減数分裂期組換え開始二重鎖切断に働くSPO11を同定した。また、新たなイネのSpo11ホモログを同定し、その機能について重要な示唆を得た。
- ⑦イネの減数分裂期で、SPO11による二重鎖切断の直後に働く組換え酵素DMC1の分子機能を同定した。

■見込まれる波及効果

- ①高等植物のSpo11ホモログ群を活性型蛋白質として単離する方法の確立に成功し、他の生物と異なる複数のSpo11ホモログを持つ植物において、その機能を解析する道を開いた。
- ②SPO11の減数分裂期二重鎖切断機能を生体で検定できる系を実現した。①と②との成果により、イネでのSPO11活性の自在制御による標的組換え技術の実現を阻んでいた大きな壁が取り除かれた。
- ③すでに、効率よく相同組換えを検出できることも示したので、これらの成果をもとに、標的遺伝子組換え技術の実現に大きく前進する条件が整った、これにより、自然法則に沿った合理的な育種を効率よく高速で行う全く新しいイネの次世代ゲノム加工技術を提供できる。

■主な発表論文

Sakane, I., et al.: Filament formation and robust strand exchange activities of the rice DMC1A and DMC1B proteins. *Nucleic Acids Res.*, 36, 4266-4276 (2008).

Sasanuma H., et al.: Cdc 7-dependent phosphorylation of Mer 2 facilitates initiation of yeast meiotic recombination. *Genes Dev.*: 398-410 (2008).

Hirota K., et al.: Stepwise chromatin remodelling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNAs. *Nature*: 130-134 (2008).

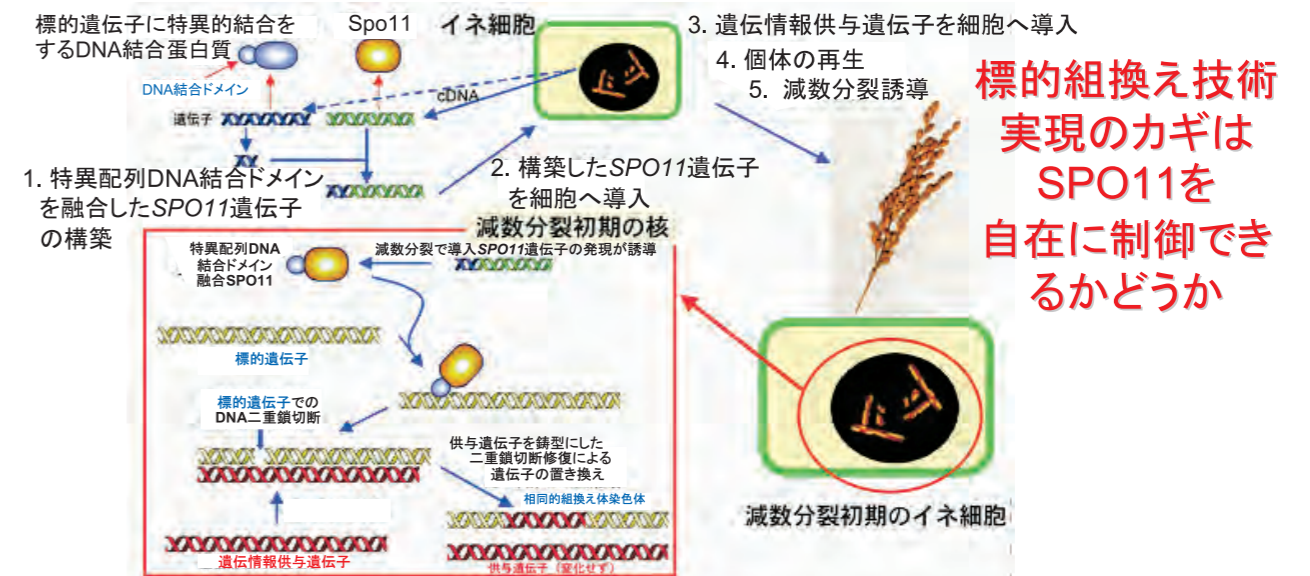
Hirota K., et al.: Distinct chromatin modulators regulate the formation of accessible and repressive chromatin at the fission yeast recombination hotspot ade 6 -M26. *Mol. Biol. Cell*: 1162-1173 (2008).

Ochiai-Fukuda T., et al.: A fluorescent antibiotic resistance marker for rapid production of transgenic rice plants. *J. Biotechnol.*: 521-527 (2006).

■研究成果の概要

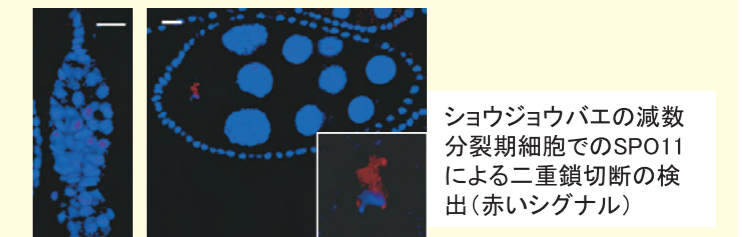
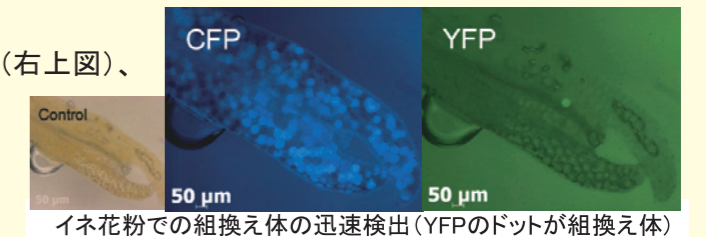
相同組換え開始酵素Spo11による新世代ゲノム加工技術

目的: SPO11を利用した標的遺伝子の相同組換えによる改変

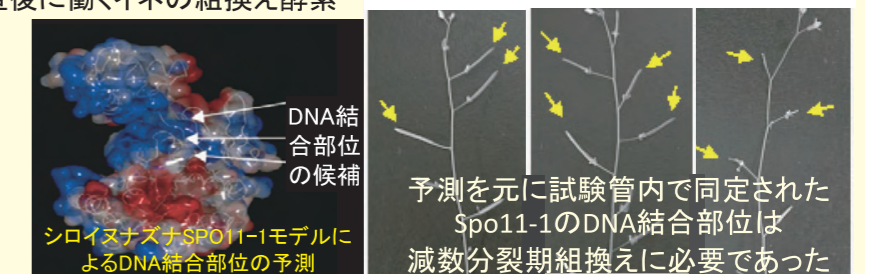


研究の内容及び主要成果

- ✓ 新迅速アッセイ系でイネ花粉の組換え同定(右上図)、デザインした特異DNA配列結合ドメインの構築
- ✓ SPO11の減数分裂期二重鎖切断機能検定系の構築(右下図)
- 酵母を用いたリード研究:
 - ✓ Spo11 のDNA切断能活性化機構の解明
 - ✓ 組換え開始と先立つDNA複製との協調制御機構の解明
- ✓ イネの4種、シロイヌナズナの3種のSpo11ホモログの可溶状態での単離に初めて成功 (特許申請中)
- ✓ イネの減数分裂期組換え開始二重鎖切断に働くSPO11を同定
- ✓ 組換え開始の機能に働くSPO11のDNA結合の部位を同定 (下図)
- ✓ 新規機能のイネのSpo11ホモログの同定
- ✓ SPO11による二重鎖切断の直後に働くイネの組換え酵素の分子機能の同定



spo11欠損個体にDNA結合部位候補



➡ SPO11制御への最大の壁を越えた

シロイヌナズナSPO11-1モデルによるDNA結合部位の予測

■研究課題名

動物ゲノム情報の多面展開を目指したDNAメチル化プロファイル解析

■研究の目的

DNAメチル化は哺乳類のゲノムに見られる唯一の化学修飾である。DNAメチル化はクロマチン構造の変化とともに、厳密な遺伝子発現制御に関係する。我々は先にゲノム上には多数の細胞・組織特異的メチル化可変領域（T-DMR）が存在することを発見している。一旦分化した細胞では、DNAがメチル化された領域は細胞世代を越えて継承されるので、DNAメチル化は遺伝子発現の記憶装置と考えられる。細胞の種類に固有のDNAメチル化パターンの集合を“DNAメチル化プロファイル”と呼ぶ。本研究では、①遺伝子の転写調節領域に存在するT-DMRについて、主要細胞、組織毎のDNAメチル化プロファイル（T-DMRアトラス）を既存または新規の解析法により明らかにし、基本データベースを作製する。また、②このデータベースをもとにクロマチン関連因子（ヒストン修飾酵素、ヒストンサブタイプ）や非コードアンチセンスRNAとの相互作用、細胞分化との関わりを明らかにし、③核移植胚や再生医療用の幹細胞のように人工的に作製された胚・細胞の正常性評価などに応用することを目的とする。それぞれの体細胞ではゲノムDNAの遺伝情報（塩基配列）が同一であっても、異なるDNAメチル化プロファイルが形成されることにより細胞の種類に特有の遺伝子発現パターンが維持されているのである。したがって、本研究で得られる成果は生物学の基礎として重要であるばかりでなく、家畜繁殖、再生医療、食品安全、環境、創薬など様々な多方面展開を意識した応用研究の基盤となる。

■研究項目及び実施体制（◎は研究代表者）

- ①ゲノムワイドDNAメチル化領域解析
（◎塩田 邦郎・田中 智／東京大学大学院農学生命科学研究科）
- ②DNAメチル化制御機構に関する生化学的解析
（田中 智・◎塩田 邦郎／東京大学大学院農学生命科学研究科）
- ③核移植胚・細胞・個体の評価系確立
（◎塩田 邦郎・田中 智・中山 裕之／東京大学大学院農学生命科学研究科）



塩田 邦郎

■研究の内容及び主要成果

- ①DNAチップを用いた新規のゲノムワイドDNAメチル化解析法であるD-REAM（T-DMR profiling with Restriction tag-mediated Amplification）法の開発に成功した。
 - ②マウス主要組織、幹細胞などの解析から合計数千の遺伝子領域のDNAメチル化データベース（T-DMRアトラス）を構築し、一般に公開できるようになった。
 - ③ヒストン修飾酵素のDNAメチル化プロファイル形成への関与や、非コードアンチセンスRNAと領域特異的DNA脱メチル化との関わりを明らかにした。
 - ④T-DMRアトラスをもとに、DNAメチル化プロファイルが核移植胚、幹細胞などの正常性評価に用いることが可能であることを証明した。
- ①-④をもとに家畜を含む哺乳類の発生・分化におけるエピジェネティクス制御の基盤を築いた。

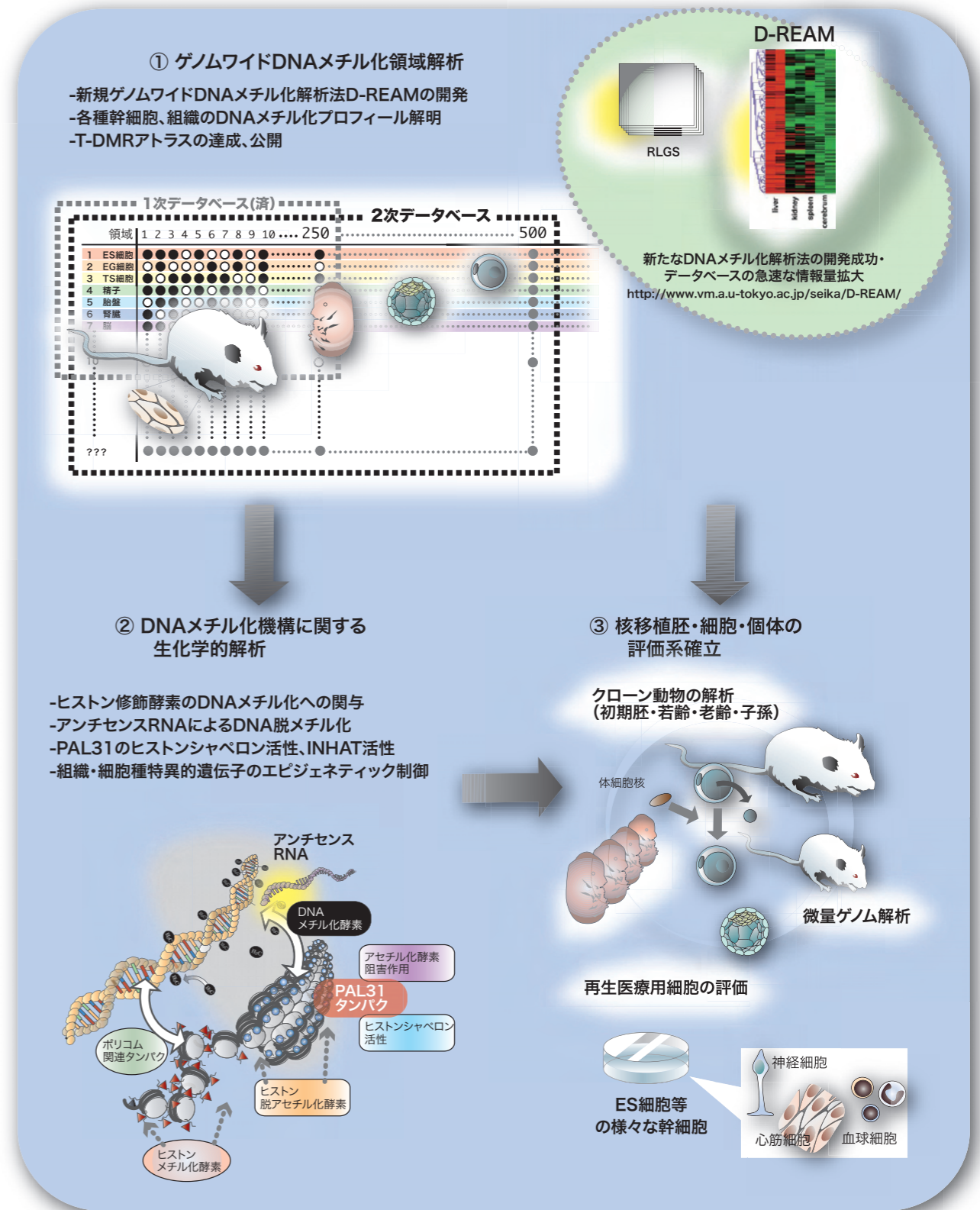
■見込まれる波及効果

本研究で達成したマウスT-DMRのDNAメチル化アトラスは、核移植胚、胚操作動物、人工的に作製された有用細胞の正常性評価や効率的な樹立に有効である。これらの情報をもとに、家畜生産における品種改良や育種、正常性維持のための食品開発、有用胚・細胞評価に応用することが可能である。また医療分野でも再生医療・幹細胞治療のために作製される細胞の正常性評価や効率の良い細胞誘導系の開発にも応用可能である。

■主な発表論文

- Hattori N., et al.: Preference of DNA methyltransferases for CpG islands in mouse embryonic stem cells. *Genome Res.* 14: 1733-1740 (2004)
- Hattori N., et al.: Preference of Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem.* 279: 17063-17069 (2004)
- Ohgane J., et al.: The Sall3 locus is an epigenetic hotspot of aberrant DNA methylation associated with placentomegaly of cloned mice. *Genes Cells* 9: 253-260 (2004)
- Hattori N., et al.: Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells. *Genes Cells* 12: 387-396 (2007)
- Ikegami K., et al.: Genome-wide and locus-specific DNA hypomethylation in G9a deficient mouse embryonic stem cells. *Genes Cells.* 12: 1-11 (2007)
- Yagi S., et al.: DNA methylation profile of tissue-dependent differentially methylated regions (T-DMRs) in mouse promoter regions demonstrating tissue-specific gene expression. *Genome Res.* 18: 1969-1978 (2008)

■研究成果の概要



■研究課題名

ネムリユスリカの極限環境に対する耐性の分子機構の解明

■研究の目的

ネムリユスリカ幼虫は、身体からほぼ完全に水分を失っても、水に戻すと蘇生する。この極限的な乾燥耐性（クリプトビオシス）の背景にはトレハロースとLEAタンパク質が生体成分の保護剤として関わっている。生体分子の保護作用を生理生化学、分子生物学、さらに物理化学的手法で解明する。

■研究項目及び実施体制（◎は研究代表者）

- ①ネムリユスリカのクリプトビオシスの分子機構の解明
（◎奥田 隆／独立行政法人 農業生物資源研究所）
- ②ネムリユスリカのクリプトビオシスの物理化学的研究
（櫻井 実／東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター）



奥田 隆

櫻井 実

■研究の内容及び主要成果

- ①ネムリユスリカのクリプトビオシスに関わるいくつかの重要な遺伝子を単離した。その一つはトレハローストランスポーター遺伝子（TRET1）であろう。トレハロースを特異的かつ大容量輸送すること、輸送能力拡散受動型輸送体なのでトレハロースの細胞内への出し入れは培養液のトレハロース濃度を調節する事で容易にできることなど、応用面で優れた特性を持つことがわかった。実際ネムリユスリカ以外のほ乳類培養細胞に導入しトレハロース輸送活性を付加することができストレス耐性を誘導することができた。
- ②クリプトビオシス生物の乾燥ストレスから生体成分を保護するメカニズムとしてトレハロースの水置換とガラス化が重要であることが提唱されており、それを実証することができた。顕微FTIRを用いて困難とされていたクリプトビオシス生物の体内でのトレハロースの局在の可視化に成功しトレハロースが身体全体に均一に分布していることがわかった。
- ③天然に存在するグルコ二糖すべてに対しガラス状態の物性を測定し、トレハロースが最も優れたガラス化剤であることを示した。これらの結果より、ネムリユスリカが息巻する温度環境を考慮すると、クリプトビオシスを誘導・維持する糖質として、少なくとも天然グルコ二糖の範囲内では、トレハロース以外のものはあり得ないことを示した。
- ④クリプトビオシスの誘導に伴い活性酸素の発生し、それが生体成分や細胞に損傷を与えるものの、蘇生時にそれを修復していた。活性酸素は乾燥耐性関連遺伝子の発現の引き金となっていた。

■見込まれる波及効果

- ①優良形質を持った家畜の未受精卵の凍結保存が困難とされているが、拡散受動型トレハロース輸送体、TRET1を一過的に発現させトレハロースを細胞内に導入する事で凍結保存あるいは乾燥保存が可能となる。さらにTRET1を植物培養細胞に導入し、乾燥や低温ストレス耐性の作物および花持ちの良い花卉植物の構築も期待される。
- ②乾燥耐性関連因子のLEAタンパク質のモチーフから創出したモデルLEAペプチドを添加することにより、ワクチンや血清などの有用タンパク質のフリーズドライ保存技術の開発が期待される。

■主な発表論文

Sakurai, M. *et al.*: Vitrification of trehalose is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. PNAS 105 : 5093-5098 (2008)

Kikawada, T. *et al.*: Dehydration-inducible changes in expression of two aquaporins in the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. Biochim. Biophys. Acta 1778 : 5514-5520 (2008)

Kikawada, T. *et al.*: Trehalose transporter 1, a facilitated and high-capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells. PNAS 104 : 11585-11590 (2007)

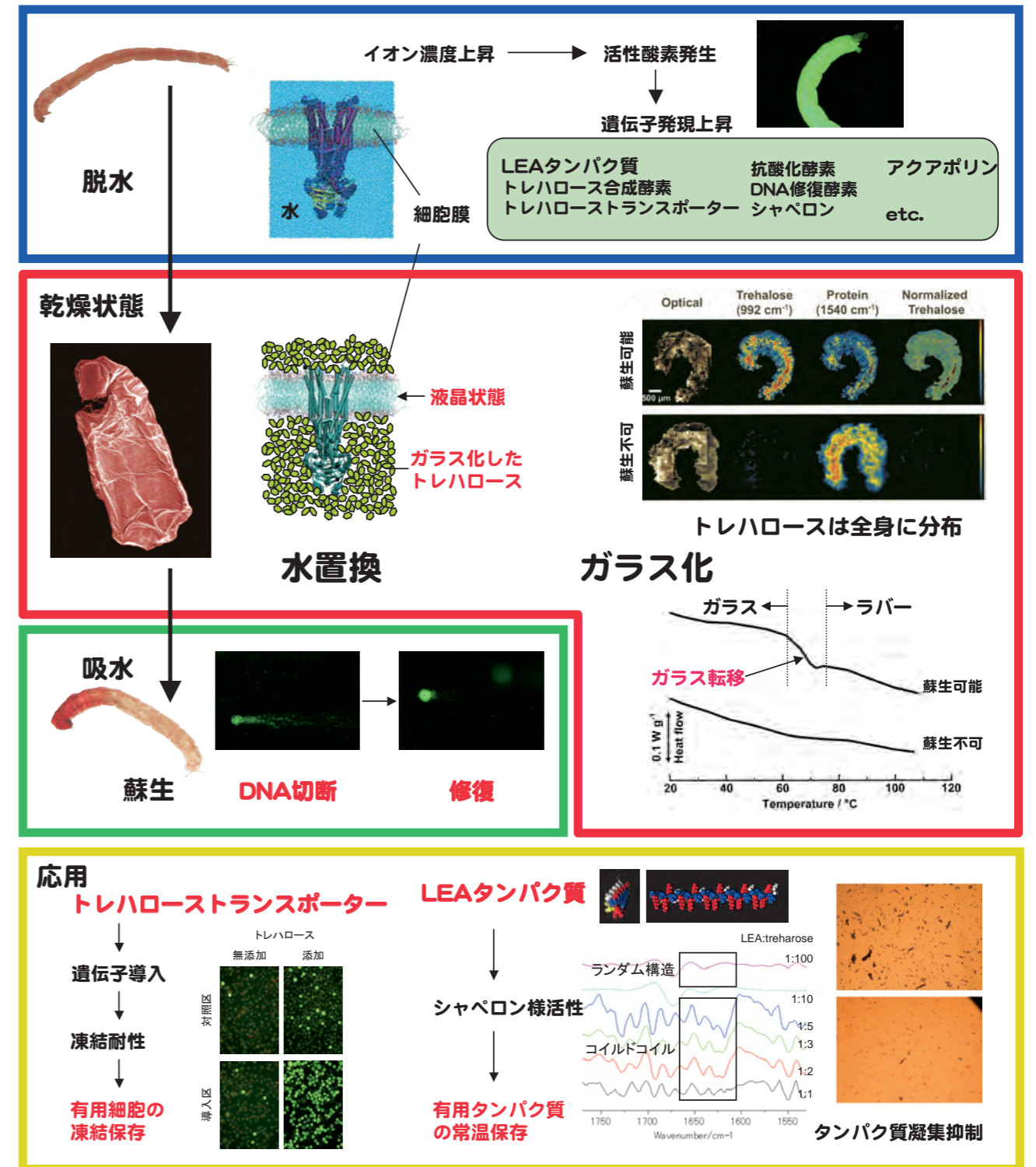
Zhu, B. *et al.*: Natural DNA mixed with trehalose persists in B-form double-stranding even in dry state. J. Phys. Chem. B 111: 5542-5544 (2007)

Kikawada, T. *et al.*: Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. Biochem. Biophys. Res. Commun. 348 : 56-61 (2006)

Oku, K. *et al.*: Combined NMR and quantum chemical study on the interaction between trehalose and diene relevant to the antioxidant function of trehalose. J. Phys. Chem. B 109 : 3032-3040 (2004)

■研究成果の概要

ネムリユスリカのクリプトビオシスのメカニズム
(極限的な乾燥耐性)



■研究課題名

分子生物学の新しいモデル生物としてのミツバチの開発と利用

■研究の目的

ミツバチの行動の分子・神経的基盤を理解し、ミツバチを動物の高次行動の研究のための新たな「モデル生物」として開発・利用するため、ミツバチのダンス、攻撃行動、社会性行動、脳機能に関わる遺伝子・タンパク質を同定・解析し、それらを発現する神経回路を同定する。またそのホモログの構造と機能がどの程度、種を越えて保存されているか調べる。またウイルスベクターを用いたミツバチへの外来遺伝子導入法の確立を試みる。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①初期応答遺伝子*Kakusei*を用いたダンスコミュニケーションの神経基盤の解析
(木矢剛智、國枝武和、◎久保健雄／東京大学大学院理学系研究科)
- ②視覚-口吻伸張反射連合学習系を用いた視覚情報処理機構の解析
(堀沙耶香、中岡貴義、木矢剛智、竹内秀明、◎久保健雄)
- ③Kakugoウイルス感染と攻撃性の相関解析と、ウイルスベクターによる外来遺伝子導入の試み
(藤幸知子、竹内秀明、◎久保健雄)
- ④ミツバチの社会性行動に応じて脳で発現が変動する遺伝子に関する研究
(森岡瑞枝、竹内秀明、中岡貴義、堀川大樹、◎久保健雄)
- ⑤キノコ体選択的な転写因子*Mblk-1*とそのホモログに関する研究
(國枝武和、竹内秀明、◎久保健雄)



久保 健雄

■研究の内容及び主要成果

- ①初期応答遺伝子*Kakusei*を用いて採餌蜂の脳で活動的な脳領域をマッピングすることにより、採餌蜂の脳では高次中枢であるキノコ体の一部の神経細胞（小型ケニヨン細胞）が選択的に興奮していることを見出した。
- ②働き蜂が距離を算出する仕組みを知るために、実験室内で固定した働き蜂を用いて、オプティック・フロー（視界を横切る物体の流れ）と砂糖水に対する口吻伸張反射を連合させる連合学習系を新たに確立した。
- ③Kakugoウイルス（KV）の疫学調査を実施し、感染コロニーや感染個体の脳でのKVの分布を調べることで、非致死性であるKVの感染が、ミツバチの生理や行動に影響する可能性を示した。
- ④ミツバチ脳で領域・行動選択的に発現する「遺伝子発現マップ」を作製し、ミツバチの行動特性を支える脳の分子・神経的特徴を見出した。特に脳機能がホルモンにより制御される可能性を示し、脳の新しい「層構造」を発見した。
- ⑤ミツバチ脳でキノコ体選択的に発現する転写因子*Mblk-1*の線虫ホモログ*MBR-1*の解析から、線虫で過剰な「神経突起剪定」が生じることを発見し、それに関わる*MBR-1*を含むシグナルカスケードを発見した。

■見込まれる波及効果

本研究は今後、動物一般の社会性行動やコミュニケーション能力に関する研究分野においても、先導的役割を果たす可能性がある。またその知見は将来的には様々な生物系特定産業技術の分野に利用できる可能性がある。例えば1) コミュニケーション障害や神経的疾患に関わるヒト遺伝子の同定と、それを利用した診断・治療、2) コミュニケーション能力や社会性行動を人為的に修飾した動物（「刺さないミツバチ」など）の作出・利用、3) 養蜂業におけるミツバチの病原微生物からの保護への応用、などである。

■主な発表論文

Kage E., *et al.*: *MBR-1*, a novel helix-turn-helix transcription factor, is required for pruning excessive neurites in *Caenorhabditis elegans* *Curr. Biol.* 15: 1554-1559 (2005)

Fujiyuki T., *et al.*: Prevalence and phylogeny of *Kakugo* virus, a novel insect picorna-like virus that infects the honeybee (*Apis mellifera* L.), under various colony conditions. *J. Virol.* 80: 11528-11538 (2006)

Hori S., *et al.*: Associative learning and discrimination of motion cues in the harnessed honeybee *Apis mellifera* L. *J. Comp. Physiol.* 193: 825-833 (2007)

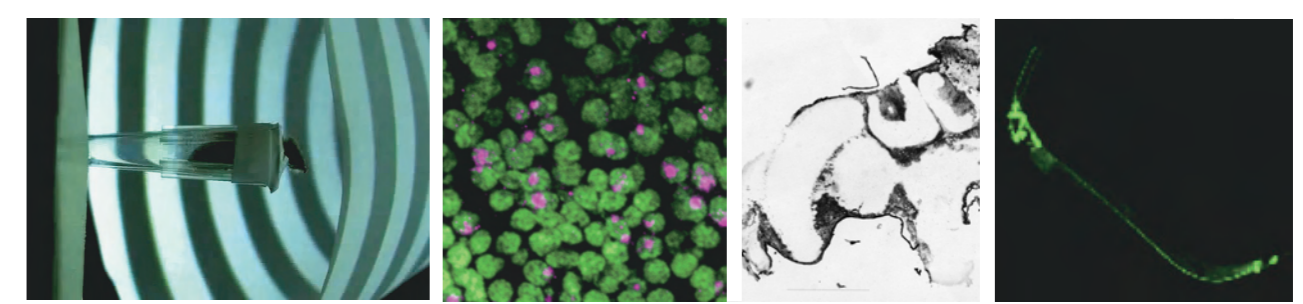
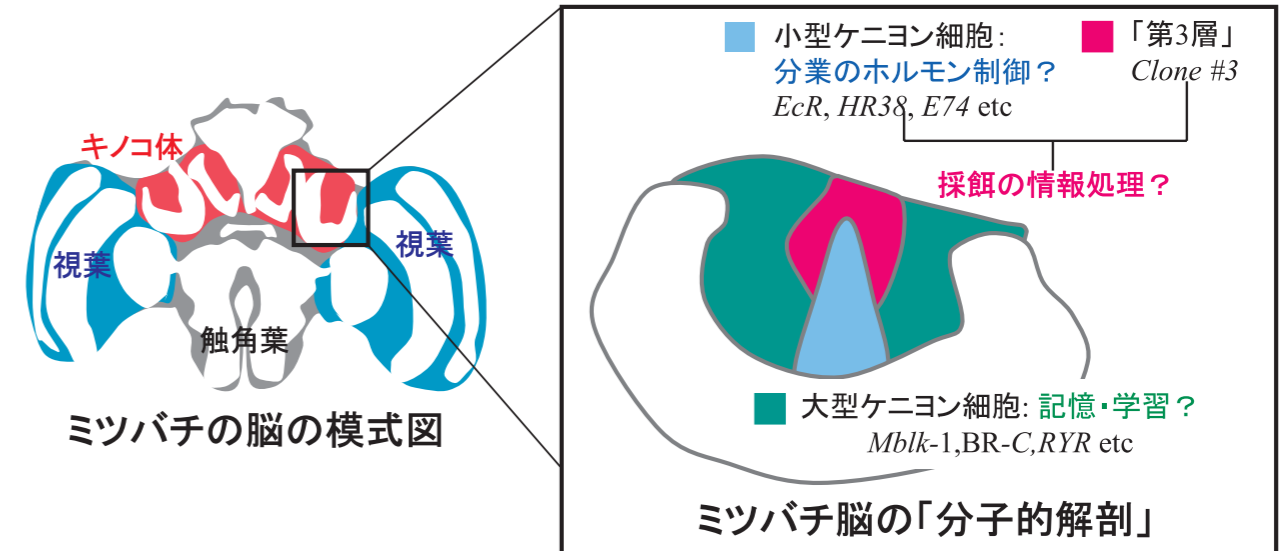
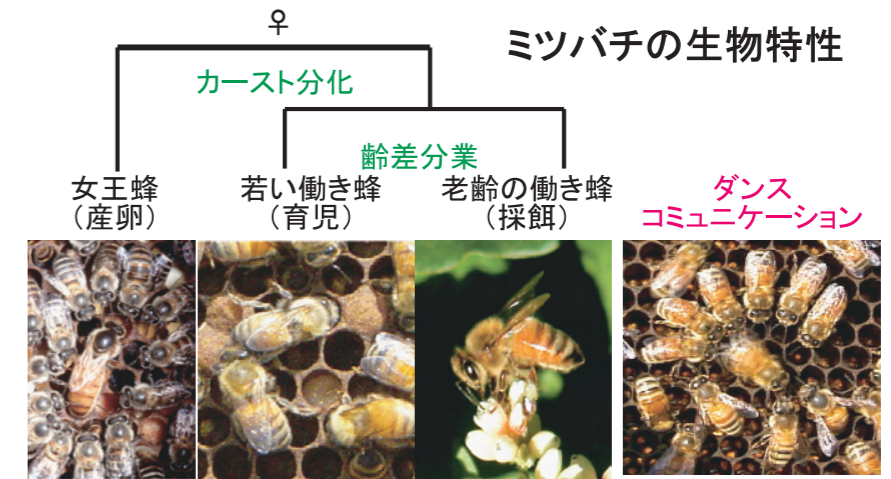
Kiya T., *et al.*: Increased neural activity of a mushroom body neuron subtype in the brains of forager honeybees. *PLoS ONE* 2 (4): e371 (2007)

Hayashi Y. *et al.*: A trophic role for Wnt-Ror kinase signaling during developmental pruning in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Neurosci.* in press (2009)

■研究成果の概要

分子生物学の新しいモデル生物としてのミツバチの開発と利用

東京大学大学院理学系研究科



新しい実験系の確立・利用
(左)オプティック・フロー-連合学習系
(右)初期応答遺伝子*Kakusei*を用いた
神経活動の検出

ミツバチウイルス学の展開
(左)*Kakugo*ウイルスの脳感染
線虫遺伝学への展開
(右)*mbr-1*発現ニューロンの可視化

研究課題名

マダニの生存戦略と原虫媒介のinterfacelに関する分子基盤の解明

研究の目的

わが国を含むアジア地域において最も重要な人獣寄生性のマダニであるフタトゲチマダニのESTデータベースを構築し、これを用いて、マダニの生存戦略にとって必須の基盤である吸血・消化と自然免疫において重要な役割を果たしている生物活性分子について、特性・機能とともに、マダニ体内のパベシア原虫の発育・伝搬増殖に及ぼす影響を明らかにする。本研究によって、マダニ特有の生存戦略と高い病原体媒介能に関する分子基盤が解明されるとともに、マダニの寄生・吸血や、疾病媒介を阻止するための新たな技術開発の方途や、医療や農林水産業分野など多方面における新規創薬の可能性が示されることが期待できる。

研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①マダニの吸血・消化と媒介原虫のクロストークの解明 (◎藤崎 幸蔵/鹿児島大学農学部)
②マダニの自然免疫と媒介原虫のクロストークの解明 (辻 尚利/(独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所)



研究の内容及び主要成果

- ①マダニのものとしては現段階では世界最高水準の約16,000クローンから成り、しかも節足動物として唯一の臓器別のESTデータベースを構築するとともに、これを利用したcDNAマイクロアレイによるマダニ遺伝子の網羅的解析を可能にした。
②マダニのRNA干渉法を確立し、生物活性分子の内在性機能とともに病原虫に対する伝搬制御物質の個体レベルでの検証を可能にした。
③マダニの血液消化に直接関わる中腸上皮細胞におけるヘモグロビン分解経路の存在を明らかにし、構成される各種プロテアーゼには極めて精妙な連携による加水分解作用があることを解明した。
④マダニの生物活性分子の中には、アミノ酸シグナル伝達経路に関わる分子のように、本来の生理機能に加えて、エフェクター分子としてマダニ体内の病原虫の存続・伝搬に対する調節機能を有するものがあることを明らかにした。

見込まれる波及効果

マダニの生存戦略と疾病媒介の分子基盤の解明を図ることを目的とする本研究によって得られた成果は、農林水産業、とりわけ畜産・家畜衛生分野における予防治療薬・ワクチン開発に多大な貢献をすることが期待される。とくに、血液消化で生じたアミノ酸に関連するシグナル伝達経路が病原虫の伝搬に大きな影響を示す可能性を明らかにしたことは、動物や人の様々な節足動物媒介感染症に対する研究に新たなパラダイムを開いたもので、今後の疾病対策の確立に寄与するところが大きい。

主な発表論文

Islam MK, et al.: The hard tick Kunitz inhibitor, Haemangin, is a novel modulator of angiogenesis and wound healing and is crucial for slower blood-feeding arthropods. PLoS Pathogen (Accepted).
Tsuji N., et al.: A cysteine protease is critical for Babesia spp. Transmission in Haemaphysalis ticks. PLoS Pathogen 4: e10000620, 1-14 (2008).
Umemiya R., et al.: Autophagy-related genes from a tick, Haemaphysalis longicornis. Autophagy 4: 79-81 (2008).
Boldbaatar B., et al.: Tick vitellogenin receptor reveals critical role in oocyte development and transovarial transmission of Babesia parasite. Biochem. Cell Biol. 86: 331-344 (2008).
Tsuji N., et al.: Babesial vector tick defensin against Babesia parasites. Infect. Immun. 75: 3633-3640 (2007).

研究成果の概要

マダニの生存を左右する生物活性分子

特性と機能の解明
動態の解析

マダニ体内の病原虫
に対する影響の解明

マダニの臓器別ESTデータベース構築 -> 特性・機能の解明
cDNAマイクロアレイ作成 -> 遺伝子の網羅的解析
遺伝子ノックダウン法の確立 -> 原虫伝搬制御の検証

Diagram showing the breakdown of hemoglobin in the midgut, the role of longipain and longicin, and the effect of longicin on parasite transmission. Includes bar graphs for parasite numbers and a graph for parasitemia.

マダニの生存戦略と病原体媒介能の分子基盤の概要を解明

マダニと媒介原虫病を阻止するための技術基盤
生物活性分子を活用した新規創薬の可能性

社会貢献

■研究課題名

核移植と染色体操作を組み合わせた新規手法による魚類体細胞クローンおよび遺伝子ターゲティング技術の開発

■研究の目的

水産の分野でもさまざまな魚種でゲノムの解明が進められている。ゲノム情報を水産魚類産業に利用するためにはクローン技術および遺伝子ターゲティング技術などが必要である。これらの技術は哺乳動物ではすでに実用化され、クローン家畜などの新産業分野が展開している。しかし、魚類では卵割の早さなど、哺乳動物とは異なった困難さがあり、安定した技術は開発されていない。そこで本研究課題では、新しい発想を持って魚類におけるクローン技術を開発し、遺伝子ターゲティング技術へ応用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体細胞核移植法の確立に関する研究 (◎若松佑子/名古屋大学生物機能開発利用研究センター)
- ②体細胞クローン技術の確立に関する研究 (◎若松佑子/名古屋大学生物機能開発利用研究センター)
- ③体細胞核のリプログラミングに関する研究 (◎若松佑子、橋本寿史/名古屋大学生物機能開発利用研究センター)
- ④遺伝子ターゲティング技術の開発に関する研究 (橋本寿史、◎若松佑子/名古屋大学生物機能開発利用研究センター)
- ⑤有用魚種(キンギョ)への応用に関する研究 (◎若松佑子/名古屋大学生物機能開発利用研究センター)



■研究の内容及び主要成果

- ①メダカを用いて、有核二倍体化卵を用いた新しい体細胞クローン技術を確認した。成体クローンの形成率は16%で、哺乳動物におけるクローン形成率の約3倍の高さである。
- ②ドナーとレシピエントの細胞周期がクローン形成機構に関わることが示唆された。その機構の解明は基礎科学的観点のみならず、クローン形成率の更なる向上やこの技術の実用化の観点からも興味深い。
- ③キンギョ水泡眼の水疱液が魚類卵の保存と魚類培養細胞の増殖促進に有効であることを発見した。
- ④遺伝子ターゲティング技術を開発するため、ターゲティングベクターのメダカ培養細胞への導入を試みた。

■見込まれる波及効果

魚類におけるクローン技術の確立により、ランチュウや錦鯉などの高級観賞魚のクローン作製が可能になる。将来的にはマグロなどの高級水産魚種のクローン作製への応用も考えられる。また、遺伝子改変などの精密な遺伝子制御に基づいた水産魚種の養殖や、それらからの医薬品や高機能食品の生産など、新産業の創成にも貢献できる。希少魚種の保存に利用することも可能である。さらに、哺乳動物におけるクローン研究と情報交換が可能になることにより、畜産分野への貢献も考えられる。

■主な発表論文

Bubenshchikova E., et al.: Generation of fertile and diploid fish, medaka (*Oryzias latipes*), from nuclear transplantation of blastula and four-somite-stage embryonic cells into nonenucleated unfertilized eggs. *Clon. Stem Cell* 7 (4): 255-264 (2005)

Kaftanovskaya E., et al.: Ploidy mosaicism in well-developed nuclear transplants produced by transfer of adult somatic cell nuclei to nonenucleated eggs of medaka (*Oryzias latipes*). *Dev. Growth Dif.* 49 (9): 691-698 (2007)

Bubenshchikova E., et al.: Diploidized eggs reprogram adult somatic cell nuclei to pluripotency in nuclear transfer in medaka fish (*Oryzias latipes*). *Dev. Growth Dif.* 49 (9): 699-709 (2007)

Bubenshchikova E., et al.: Nuclear transplants from adult somatic cells generated by a novel method using diploidized eggs as recipients in medaka fish (*Oryzias latipes*). *Clon. Stem Cell* 10 (4): 443-452 (2008)

Sawatari E., et al.: Cell growth promoting activity of fluid from eye sacs of bubble-eye goldfish (*Carassius auratus*). *Zool. Sci.*, in press.

■研究成果の概要

核移植と染色体操作を組み合わせた魚類クローン技術の開発

メダカにおける有核二倍体化卵への成体体細胞核の移植法

メダカ核移植個体のクローン性の高精度検証

異系統間(HNI-1とd-r-Tg:OIMA1-GFP)のDNA多型マーカーを利用した遺伝型解析から、核移植個体は高いクローン性を持つことがわかった。

ドナーとレシピエント

レシピエント ヒメダカ ドナー Tg(β -actin-GFP) ドナー細胞尾鰭由来

ドナー様で二倍体、妊性がある核移植個体が得られた

核移植個体

ドナーマーカー GFPはメンデル遺伝した

F1 F2

GFPDPCR解析

A B C

魚類のクローン技術が確立した

キンギョ水泡眼の水疱に蓄積する体液の効果を発見

両目の周りに水疱が生じ、そこに体液が蓄積する性質がある

水疱眼

自然に回復

注射器で水疱内液を採取

水疱内液採取後の水疱眼

1) 未受精卵の保存液に添加

2) 培養細胞に添加

水疱内液の培養細胞増殖促進効果

通常の培養液(FBS 20%) + 水疱内液 低密度

細胞数 (x10⁴)

培養日数

水疱内液は魚類未受精卵の保存、及び培養細胞の増殖促進効果をもつ

見込まれる波及効果

水産クローン新産業創成

クロマクロ ニシキゴイ

有用魚類の遺伝子制御

遺伝子機能解析
遺伝子改変
高機能物質生産
バイオリクター

希少魚種の保存

カジカ イトヨ

比較クローン分野創成

初期化における細胞周期同調、卵核の影響
哺乳動物クローニングへの貢献

■研究課題名

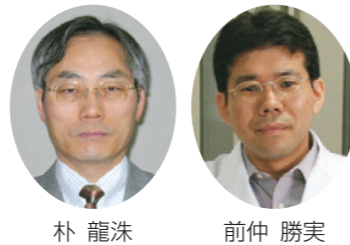
高次タンパク質の大量発現用バクミドの開発及び応用

■研究の目的

カイコは、タンパク質合成能力が極めて高く、翻訳後修飾を受ける高次タンパク質の大量発現系として知られているが、煩雑な操作や遺伝子組換えに時間を要するなど、汎用的な使用には至っていない。そこで、我々が開発した組換え作業を大腸菌で行える世界初のBmNPVバクミド系は、ハイスループット系として注目されている。しかし、プロテアーゼの働きによるカイコの液状化および組換えタンパク質の断片化、カイコ体内の蓄積による組換えタンパク質の回収率の低下、カイコ体液や脂肪体からの組換えタンパク質の精製効率の低下等、様々な問題を解決する必要がある。本研究では、プロテアーゼの欠損バクミドの開発、カイコ体液への分泌率の向上、分子シャペロンによるタンパク質の安定化、及びカイコで発現した組換えタンパク質の効率的精製法の確立を目指す。また、糖転移酵素、ヒト型抗体、膜タンパク質、ヒトやマウス由来の免疫系表面受容体、および創薬として重要度が高い7回膜貫通型のG protein coupled receptors (GPCR) の発現・精製法を確立し、本バクミドの汎用性を立証する。また、バキュロウイルス表面にヒトやマウス由来の受容体の提示、ヒトやマウス細胞への遺伝子導入や目的蛋白質を発現させる系の確立を試みることでBmNPVバクミドの汎用性を高め、実用化の基盤を築く。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①カイコをタンパク質生産工場とするバクミドの開発 (◎朴 龍洙/静岡大学創造科学技術大学院)
- ②免疫系細胞表面受容体の組換え蛋白質とウイルスの作製 (前仲 勝実/九州大学生体防御医学研究所)



朴 龍洙 前仲 勝実

■研究の内容及び主要成果

- ①ウイルス由来のシステインプロテアーゼ及びキチナーゼ両欠損バクミドを開発し、それぞれ85%及び56%の活性を抑制することができ、タンパク質の発現収率を大幅改善した。また、カイコに適したシグナル配列を連結することにより体液への分泌率を95%以上に向上させた。また、分子シャペロンを共発現することによって、糖転移酵素の発現を2.3~2.5倍も向上することに成功した。
- ②目的タンパク質に適したタグと融合することで、遺伝子発現効率が高く、精製効率を60%以上にすることができ、カイコ一匹あたりから数十~数百μgの生物機能を有するタンパク質を生産・精製することができた。N型糖鎖については昆虫細胞特有のトリマンノシルコア構造を有しており、条件によっては末端にN-アセチルグルコサミンの付加した複合型の糖鎖の修飾が明らかとなった。
- ③ヒトやマウス由来の糖鎖修飾を受ける膜表面受容体群の発現の調製法（発現と精製）の確立に成功した。
- ④膜タンパク質GPCRを生物機能を有する状態でウイルス表面にも発現させることができた。また、ワクチンターゲットであるウイルス表面タンパク質とその受容体分子の発現に成功した。

■見込まれる波及効果

カイコの体液や脂肪体から迅速にタンパク質に発現させ、生物機能を有する形でタンパク質の機能解析や構造解析を可能とするので、ライフサイエンスの基盤技術として期待できる。特に、バキュロウイルス表面にタンパク質の提示、バキュロウイルスのワクチン化、及び動物細胞への遺伝子導入のためには本バクミドは欠かせないと考えられ、カイコの有効な利用法として付加価値の高い技術となることは大いに期待できる。

■主な発表論文

Kuroki K., *et al.*: Detection of weak ligand interactions of leukocyte Ig-like receptor B1 by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Immunol. Methods* 320: 172-176 (2007).

Hashiguchi T., *et al.*: Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104: 19535-19540 (2007).

Kato T. and Park E.Y.: Specific expression of GFP_{uv}-β1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 fusion protein in fat body of *Bombyx mori* silkworm larvae using signal peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359: 543-548 (2007).

Park E.Y., *et al.*: Human IgG1 expression in silkworm larval hemolymph using BmNPV bacmids and its N-linked glycan structure. *J. Biotechnol.*, 39: 108-114 (2009).

Ogata M., *et al.*: Chemoenzymatic synthesis of sialoglycopolypeptides as glycomimetics to block infection by avian and human influenza viruses. *Bioconjugate Chem.*, in press (2009).

■研究成果の概要

高次タンパク質の大量生産用バクミドの開発及び応用

改良型BmNPVバクミドの開発

従来方法より迅速・簡便に遺伝子発現が可能な**世界初BmNPVバクミド**
 >システインプロテアーゼ・キチナーゼ欠損バクミド
 >シグナル配列の付加による体液への分泌能の向上
 >分子シャペロン共発現によるタンパク質の品質向上
 >タンパク質の精製効率の向上

改良型BmNPVバクミドの応用

一本鎖抗体やヒトIgGを蚕の体液に分泌させ、精製率80%以上で精製IgGを得た。

リガンド結合 GPCR

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) の効率的発現・精製

細胞膜受容体分子 各種受容体分子のウイルス表面提示

糖転移酵素による人工糖鎖の効率的合成

蚕の体液に分泌発現した糖転移酵素による糖鎖伸長

翻訳後修飾を受けた高次タンパク質の大量発現

最大精製率64% 数十~数百μg/蚕

シリクロードからバイオロードへの基盤構築

■研究課題名

昆虫免疫応答改変によるアンチ・インセクトベクターの開発

■研究の目的

蚊、ハエ、ノミやシラミなど節足動物を媒体とした感染症では、寄生虫やウイルスなどの病原体が節足動物の体内で成長・増殖し、宿主に伝播されることにより感染が成り立つ。このような病原体媒介節足動物はインセクトベクター（“運び屋昆虫”）と呼ばれ、農作物、家畜、野生動物、そして伴侶動物（ペット）に疾病を媒介し広く被害を及ぼしている。またこれらの中には人間と動物間に病原体が相互伝播する人獣共通感染症を媒介するものも多数存在し、対策が不可欠となっている。本研究では、昆虫自身が保有する免疫応答を調節する方法を探索し、病原体を保持することが不可能な昆虫（“アンチ・インセクトベクター”）を作出することにより、感染症の制圧を目指す基盤とするものである。

■研究項目及び実施体制（◎は研究代表者）

- ①感染をコントロールする節足動物側免疫制御因子の同定と機能解析
- ②病原体媒介蚊を用いた節足動物側免疫制御因子の機能解析
- ③病原体を媒介する能力が低下した節足動物（アンチ・インセクトベクター）の開発
（◎嘉糠 洋陸／帯広畜産大学原虫病研究センター）



嘉糠 洋陸

■研究の内容及び主要成果

- ①ショウジョウバエ感染モデルを利用した免疫制御因子のスクリーニングと機能解析により、抗マalaria原虫排除能を持つC型レクチンFurrowedの同定、p38 MAPキナーゼによって制御される抗病原体トランス機能の発見等に成功した。
- ②病原体媒介蚊の中腸において、C型レクチンFurrowedが抗マalaria原虫免疫システムに貢献していることを見出した。
- ③病原体媒介蚊・病原体・中腸内細菌との三者の相互作用を利用し、外部から口吻を通じて蚊中腸内に細菌を導入する手法により、マalaria原虫の保持能力が低下したハマダラカ（アンチ・インセクトベクター）の作出に成功した。

■見込まれる波及効果

牛や馬における小型ピロプラズマ病や豚がその保有動物となる日本脳炎など、蚊やダニなどの節足動物に媒介される感染症は、畜産業において直接的・間接的に被害をもたらしている。しかし現状の対策は節足動物の駆除剤に依存している状態である。本研究課題によって得られた知見は、節足動物側の媒介能のコントロールによる感染症や畜産物の被害を軽減するという概念を推し進め、特に“畜産における微生物農薬の開発”などの新しい分野の開拓が強く期待される。

■主な発表論文

Kanuka H., et al.: *Drosophila* Caspase Transduces Shaggy/GSK-3b Kinase Activity in Neural Precursor Development. *EMBO J* 24 : 3793-3808 (2005)

Kanuka H., et al.: Gain-of-function screen identifies a role of the Sec61alpha translocon in *Drosophila* postmitotic neurotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1726 : 225-237 (2005)

Kuranaga E., et al.: *Drosophila* IKK-related kinase controls caspase activity through IAP degradation. *Cell* 126 : 583-596 (2006)

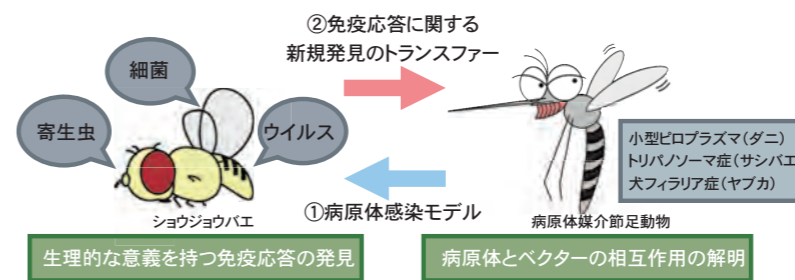
Okado K., et al.: Rapid recruitment of innate immunity regulates variation of intracellular pathogen resistance in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun* 379 : 6-10 (2008)

■研究成果の概要

「病原体を媒介しない節足動物”アンチ・インセクトベクター”の開発」



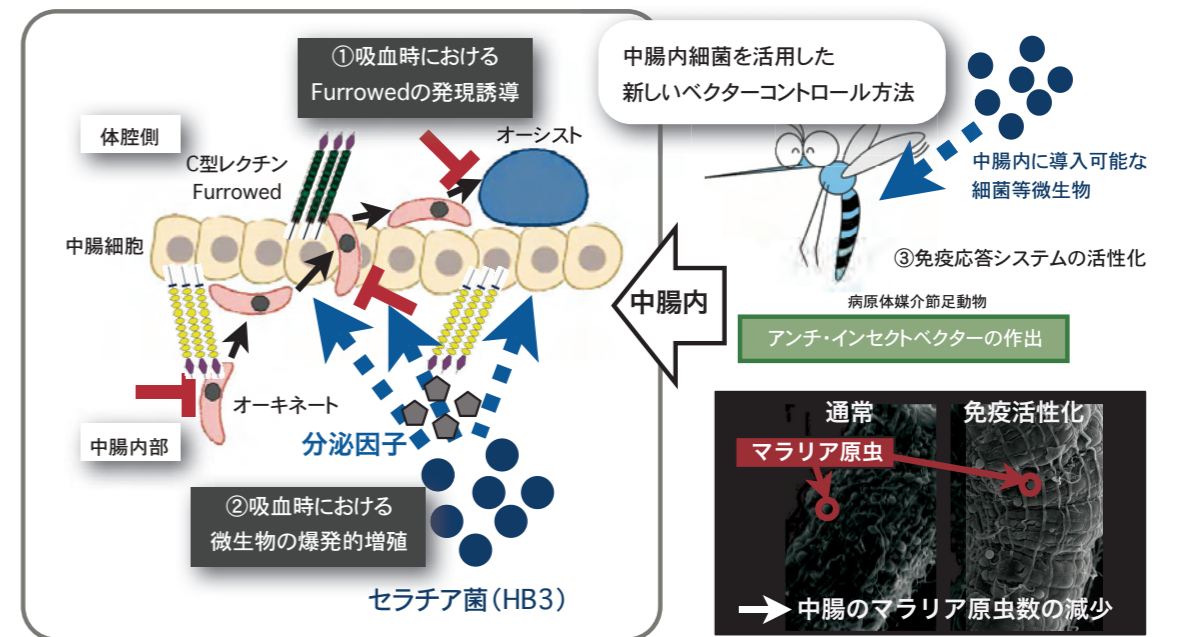
《ショウジョウバエをモデルとした戦略》



ハマダラカ内のマalaria原虫



《免疫応答システムを活用したアンチ・インセクトベクターの作成》



展望 アンチ・インセクトベクターから畜産版”微生物農薬”の開発へ

■研究課題名

シロアリの卵運搬本能を利用した駆除技術の開発

■研究の目的

シロアリはその被害規模と駆除の困難さから、人類にとって最も厄介な害虫の一つである。加害された木材の外側から大量に薬剤を投入して殺虫する既存の駆除技術は、多額の費用がかかり、シックハウス症候群などの健康被害や環境汚染につながる。シロアリの職蟻は女王の産んだ卵を育室に運搬して世話をする習性をもつ。シロアリの卵に物理的・化学的に巧みに擬態して巣内に寄生する菌類を発見した。この卵擬態メカニズムに基づいて、シロアリの卵を模した基材に卵認識物質を塗布することによって、巣の生殖中枢に効率的に殺虫活性化合物を導入することができ、一般家庭でも簡単にシロア리를駆除することが可能となる。この画期的駆除技術を実現するため、シロアリの卵認識フェロモンを特定し、シロアリの卵認識メカニズムの全貌を解明する。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①シロアリの卵認識物質の化学分析
(◎松浦 健二/岡山大学大学院環境学研究所・田村 隆/岡山大学農学部微生物遺伝子化学研究室)
- ②卵擬態菌核菌の単離培養およびrRNA遺伝子分析
(◎松浦 健二/岡山大学大学院自然科学研究科)
- ③擬似卵駆除剤のフィールド評価
(◎松浦 健二/岡山大学大学院自然科学研究科)



松浦 健二

■研究の内容及び主要成果

- ①シロアリの卵認識フェロモン成分が唾液と卵に共通して含まれる抗菌タンパク質のリゾチームと、セルロース分解酵素の一つβ-グルコシダーゼであることを世界で初めて突き止めた。
- ②卵擬態菌核菌の巧みな化学的・物理的擬態のメカニズムを解明し、また、分布と系統関係、伝播経路についても解明した。
- ③卵認識メカニズムのデータを基に作製した人工擬似卵をシロアリの巣内に導入することに成功し、殺虫活性物質をコートして卵塊中に運搬させ、グルーミングを介して殺虫成分を取り込ませることも成功した。

■見込まれる波及効果

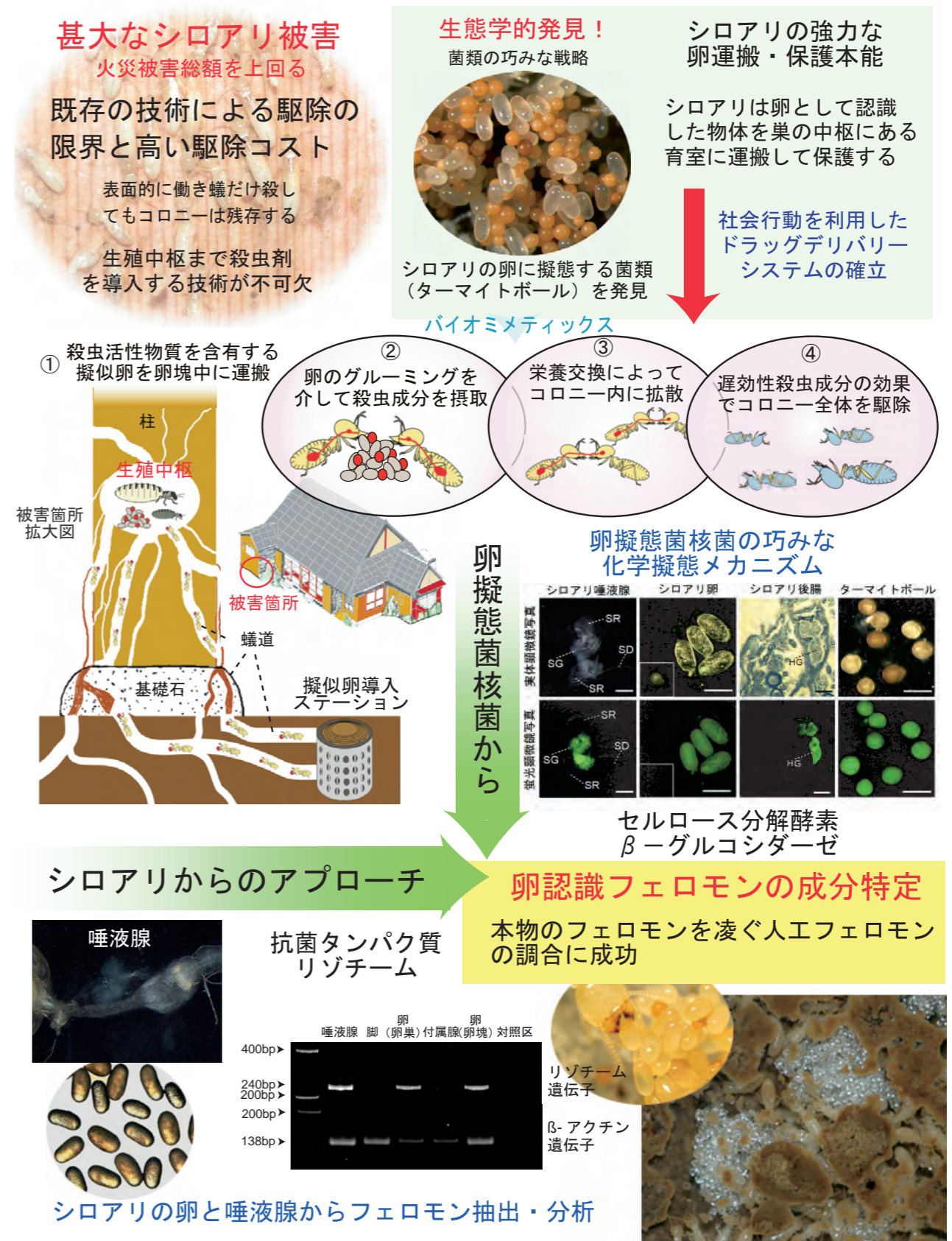
本駆除技術は、シロアリの卵運搬・保護という強力な本能行動を利用するというオリジナルの原理に基づいた全く新しい駆除技術であり、きわめて効果的にコロニーの中核を破壊できる。擬似卵に殺虫活性物質を含ませてシロアリ自らに生殖中枢へと運搬させることにより、駆除にかかる労力を大幅に削減でき、駆除に必要な薬剤の量が微量で済むため、一般消費者でも安心して使用できる製品が実現する。安全性、駆除効果、環境への配慮、駆除コストの全てにおいて既存の殺虫剤散布やベイト法などの駆除技術よりも優れており、既存の駆除技術を刷新するだけでなく、一般家庭向けの実効性のあるシロアリ駆除剤として、新たな市場を創出する。

■主な発表論文

- Matsuura, K.: Termite-egg mimicry by a sclerotium-forming fungus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273: 1203-1209 (2006)
- Matsuura, K., Kobayashi, N., Yashiro, T.: Seasonal pattern of egg production in field colonies of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Population Ecology* 49: 179-183 (2007)
- Yashiro, T., Matsuura, K.: Distribution and phylogenetic analysis of the termite-egg mimicking fungi "termite balls" in *Reticulitermes* termites. *Annals of the Entomological Society of America* 100: 532-538 (2007)
- Matsuura, K., et al.: The antibacterial protein lysozyme identified as the termite egg recognition pheromone. *PLoS ONE* 2: e813. doi:10.1371/journal.pone.0000813 (2007)
- Matsuura, K., et al.: Cuckoo fungus mimics termite eggs by producing the cellulose-digesting enzyme beta-glucosidase. *Current Biology* 19: 30-36 (2009)

■研究成果の概要

シロアリの卵運搬本能を利用して、擬似卵に含ませた殺虫剤を自分で巣の中核まで運搬させる画期的駆除技術



■研究課題名

微生物を用いたペプチドの大量生産法の開発

■研究の目的

本研究課題では、遺伝子組み換えによる有用ペプチドの生産を目的として、その発現を助ける新規分子（キャリアタンパク質）のデザイン・研究開発を進める。安定に生産を行うために、ターゲットペプチドやタンパク質を分解から保護し、また生産したペプチドやタンパク質が工場としての微生物に悪影響を及ぼさないように不活性化する、技術の開発を目標とする。特に、現在、化学的な合成法が生産法の主流となっているアミノ酸残基数の比較的小さい短鎖のペプチドを中心に、微生物を用いた効率のよい生産系を開発し、産業レベルでの実用化を目指し基礎研究を行う。

■研究項目及び実施体制（◎は研究代表者）

微生物を用いたペプチドの大量生産法の開発
（◎相沢 智康／国立大学法人北海道大学大学院先端生命科学研究院）



相沢 智康

■研究の内容及び主要成果

- ①分解や毒性の影響で従来は微生物での生産が困難であったペプチドに対して、融合タンパク質及び共発現により生産を安定させる新技術の開発に成功した。
- ②メタノール資化酵母を用いた高密度培養・発現系において、有用ペプチド・タンパク質の大量生産法について検討をおこない、ペプチドの高効率かつ安定な生産に利用可能な新規の融合タンパク質の開発に成功した。
- ③新開発の手法を応用し、農林水産業の発展に貢献する可能性をもつ重要ペプチド、蛋白質の立体構造解析、機能解析をすすめ、新規の有用な知見を得るとともに本研究で開発した新技術の有用性を証明した。

■見込まれる波及効果

本課題で開発に成功した発現系は、ポストゲノム時代のバイオ研究、産業分野の主役としてさらに需要が高まるであろう、ペプチド・タンパク質生産の重要な基盤技術として成長する可能性を秘めており、微生物を利用した新たな産業の創生に寄与すると期待できる。特に、農林水産業、食品作業等に有用と考えられるペプチドの立体構造解析や機能解析といった研究分野への利用、有用ペプチドの産業応用利用等に大きく貢献できると考えられる。

■主な発表論文

Mizuguchi M., *et al.*: Effects of the stabilization of the molten globule state on the folding mechanism of α -lactalbumin: a study of a chimera of bovine and human α -lactalbumin. *Proteins* 61: 356-365 (2005)

Saito S., *et al.*: Structural approach to a novel tandem repeat DNA-binding domain, STPR, by CD and NMR. *Biochemistry* 46: 1703-1713 (2007)

Nonaka Y., *et al.*: Spontaneous asparaginyl deamidation of canine milk lysozyme under mild conditions. *Proteins* 72: 313-322 (2008)

Kouno T., *et al.*: A novel beta-defensin structure: a potential strategy of big defensin to overcome resistance by Gram-positive bacteria. *Biochemistry* 47: 10611-10619 (2008)

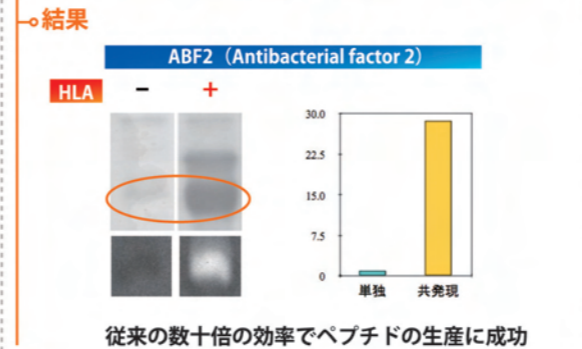
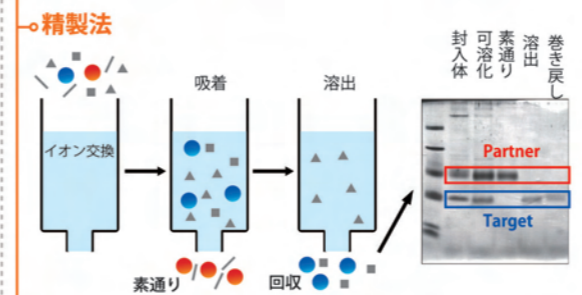
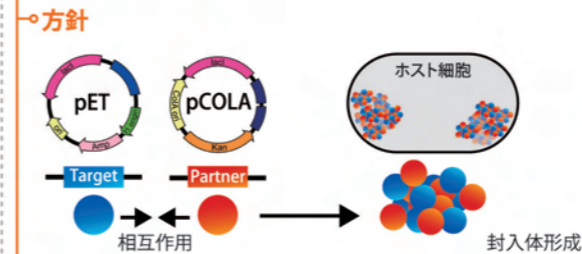
Nonaka, Y., *et al.*: X-ray crystallography and structural stability of digestive lysozyme from cow stomach. *FEBS Journal* in press

Nakatogawa, S., *et al.*: A novel peptide mediates aggregation and migration of hemocytes from an insect. *Current Biology* in press

■研究成果の概要

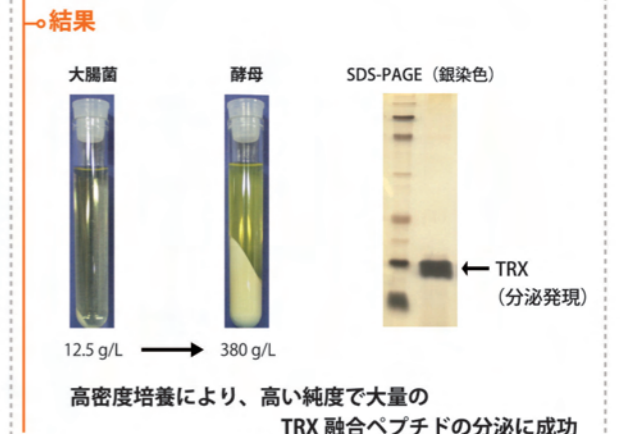
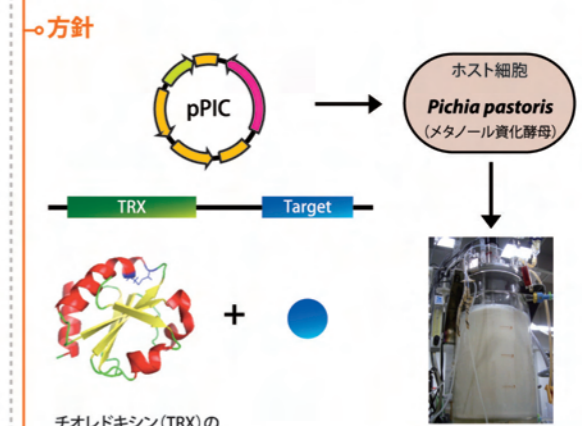
高効率でペプチドを生産する共発現系

○概要
分解を受けやすいターゲットペプチドを、共発現によって安定に生産する方法の開発に成功した。この方法によって、ターゲットペプチドの発現量の増加と精製の簡便化が期待できる。



酵母の高密度培養を利用した発現系

○概要
メタノール資化酵母は高密度培養が可能であり、ペプチドの高効率の生産への応用が期待できる。この高密度培養に利用可能な、新しいペプチド融合発現系の開発に成功した。



カイク転写制御因子 FMBP-1 ヨトウガ サイトカイン GBP カプトガニ抗菌ペプチド BDF ウシ消化酵素 胃リゾチーム

立体構造 (溶液 NMR) 立体構造 (溶液 NMR) 立体構造 (溶液 NMR) 立体構造 (X線構造)

昆虫の産業応用へ 新規農薬のシーズ 農林水産への応用 畜産業への有用な情報

■研究課題名

カイコゲノム研究基盤を活用した昆虫の比較ゲノム解析

■研究の目的

陸上動物種の8割以上を占めるとも言われる昆虫は、その著しい多様性ゆえ特定の種を集中的に解析して得られたゲノム情報をどのように他の種の研究に活用するかが大きな課題である。

本研究では多くの主要害虫を含む鱗翅目(ガやチョウの仲間)において、種間での染色体上の遺伝子配置の相同性(シンテニー)を明らかにした比較ゲノム地図を作成する。その結果、カイコゲノム情報から目的の害虫遺伝子候補を効率的に予測してクローニングすることも容易になるなど、カイコのゲノム研究成果の利活用を円滑に行うことが可能になる。また、異なる種の相同な遺伝子のゲノム塩基配列を大規模に比較可能になるため、目的遺伝子を制御するプロモーターなどの機能解析が加速化されることが期待される。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ① 遺伝・物理地図情報を用いた比較ゲノム解析
(◎安河内 祐二/独立行政法人農業生物資源研究所)
- ② FISHによる昆虫の比較ゲノム解析
(佐原 健/北海道大学大学院農学研究院)



安河内 祐二

■研究の内容及び主要成果

- ① 種間で保存されている遺伝子を含む細菌人工染色体(BAC)を5種類の蛍光色素でラベルして染色体に結合させることにより、どの遺伝子が染色体上のどこにあるのかを効率的に明らかにする技術を確立した。
- ② 比較的高等な鱗翅目昆虫では、カイコと染色体構成が非常に類似していること(染色体シンテニーの存在と高度な遺伝子配置の保存性)を明らかにして、カイコゲノム情報を効率的に活用する基盤が整備できた。
- ③ 今回開発した染色体比較法は種が異なっても近縁であれば適用できる(ZOO-FISHの開発)ことを示し、多種多様に分化した昆虫のゲノムを効率的に比較するのに適した手法であることを実証した。

■見込まれる波及効果

直接的な波及効果として、ゲノム情報が充分でない種で未知の遺伝子の単離する場合、形質に強く連鎖するマーカーを含む染色体領域と相同なカイコ染色体領域を効率的に特定することで、当該種のみでは非常に困難であった解析を可能とするとともに、従来手法よりも費用や時間を大幅に削減できる。

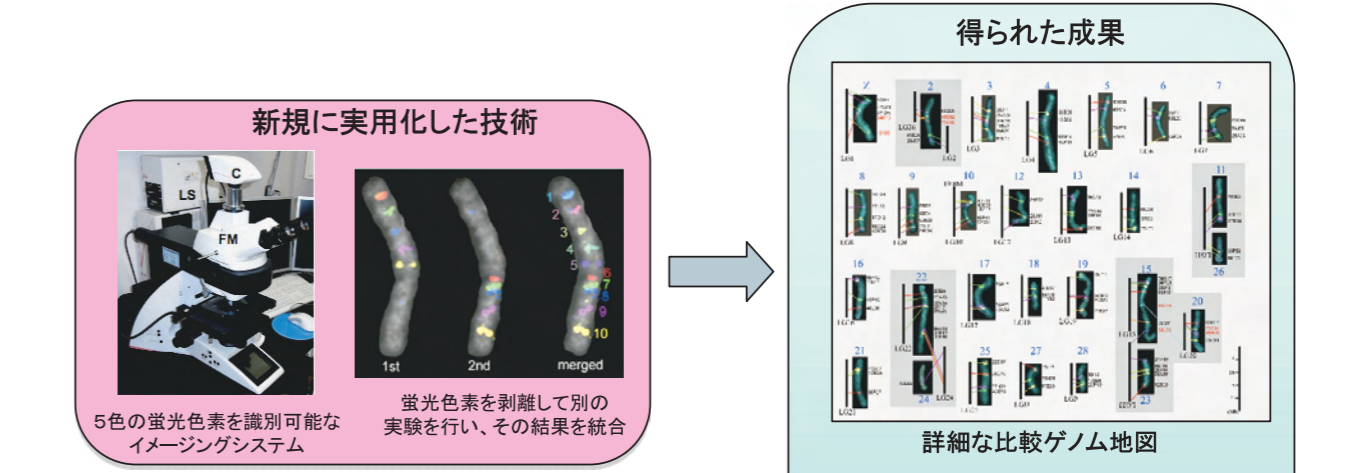
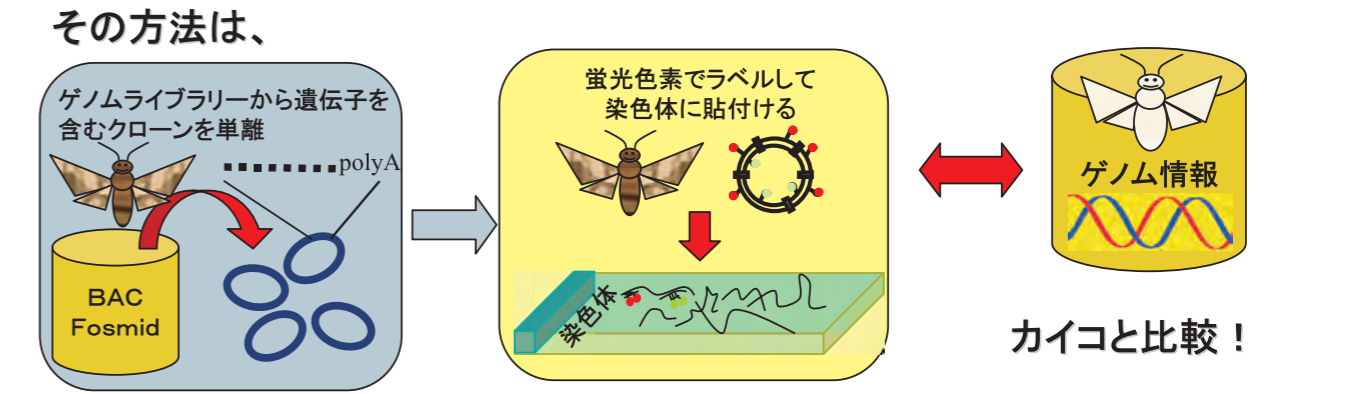
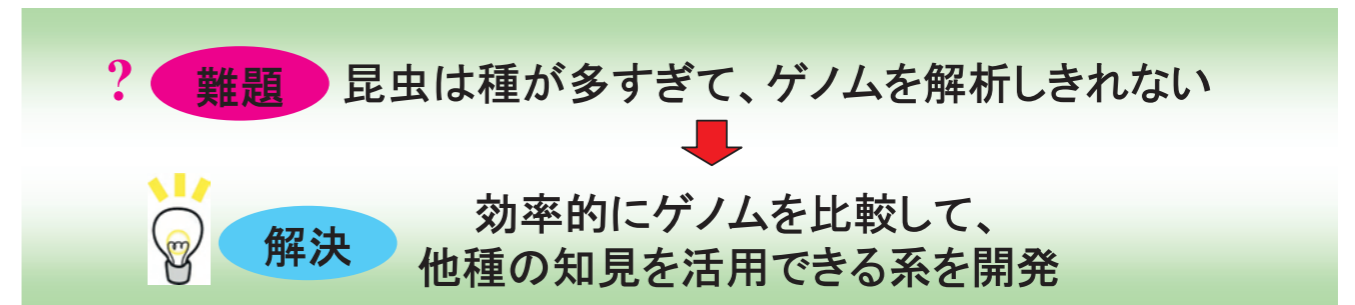
その結果として、例えば農業使用の際に生ずる抵抗性の獲得という問題に対して、いわば「テーラーメイド診療の農業版」として、対象昆虫の集団の遺伝型のモニタリングを行って使用薬剤を決めるなどして、より安全で生態系への負荷の低い昆虫管理技術が実現することが期待される。また、昆虫あるいは節足動物特異的な遺伝子の相互作用を多数明らかにして、脊椎動物への毒性の低い農薬のターゲットを選定できる可能性がある。

■主な発表論文

Sahara K *et al.*: Conserved synteny of genes between chromosome 15 of *Bombyx mori* and a chromosome of *Manduca sexta* shown by five-color BAC-FISH. *Genome*, 50(11), 1061-1065 (2007)

Shibata F *et al.*: Reprobing of multicolour FISH in preparations of lepidopteran chromosomes. *Zool Sci* in press (2009)

■研究成果の概要



期待される効果

- ・カイコのゲノム情報を活用して、カイコ以外のガの遺伝子の単離が容易になる。
- ・従来手法では説明が困難だった現象の説明が進み、より安全で環境に優しい昆虫管理技術の開発につながる。
- ・遺伝子や調節領域の相互比較が進み、カイコにおける外来遺伝子発現系を効率化できる。



■研究課題名

環境中での細菌の環境汚染物質分解能を支配するプラスミド機能の解明

■研究の目的

難分解性物質による汚染を除去するためには、強力な分解菌を汚染現場に添加するバイオオーグメンテーションが有効であるが、場当たりに添加するだけでは期待するほどの分解力が発揮されないことが多い。難分解性物質分解菌では分解酵素遺伝子が接合伝達プラスミド上に存在する例が多いが、分解効果の不確実性の解消には、分解能（分解菌、分解プラスミド）の環境中での振る舞いを分子レベルで詳細に理解し、その理解に立脚した汚染環境に最適化・オーダーメイド化されたバイオオーグメンテーション技術を確認する必要がある。本研究はそのための基盤情報を得ることを目的とし、ダイオキシン・カルバゾール分解IncP-7プラスミドを材料に、各種環境中での動態を精査するとともに、プラスミドが機能を発現するために必要な染色体-プラスミド間の相互作用を分子レベルで解明して、環境中での振る舞いの原因を理解する。この理解の上で、うまく分解プラスミドを使うにはどうすれば良いのかを、考察する。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①ダイオキシン・カルバゾール分解系IncP-7プラスミドpCAR1ホモログの分布の解明
- ②pCAR1の環境中での動態モニタリング
- ③pCAR1と多様な宿主細菌ゲノムとの特異的相互作用の解明
(◎野尻秀昭/国立大学法人東京大学生物生産工学研究センター)



野尻 秀昭

■研究の内容及び主要成果

- ①pCAR1を保持する宿主が変わると、その環境中での分解性・生残性が変化し、分解除去に有利な宿主が存在するのを見いだした。
- ②土壌中でのpCAR1の接合伝達は検出できないが、特定の宿主からは水環境中で高い頻度の接合伝達が認められた。この水環境での接合伝達の成立には、Ca²⁺やMg²⁺が必須であることを示した。
- ③pCAR1上のダイオキシン・カルバゾール分解酵素遺伝子の発現を正に制御する宿主因子を同定した。
- ④種々の宿主にpCAR1が保持された場合に、転写変動するプラスミド・染色体の遺伝子を網羅的に明らかにし、それを制御するプラスミド上の核様体形成タンパク質の機能を推定した。

■見込まれる波及効果

本研究で示された、宿主の選定の重要性や、二価陽イオンの影響、鉄制御の重要性は、IncP-7群の分解プラスミドに固有の現象ではなく、他の分解プラスミドにも共通の事象である可能性が高い。今後、カルバゾール・ダイオキシンに限らず、他の多環芳香族炭化水素や有機溶剤汚染のバイオレメディエーション技術の最適化に資する事ができる。

■主な発表論文

Miyakoshi M., et al.: Transcriptome analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 harboring the completely sequenced IncP-7 plasmid pCAR1. *J. Bacteriol.* 189: 6849-6860 (2007)

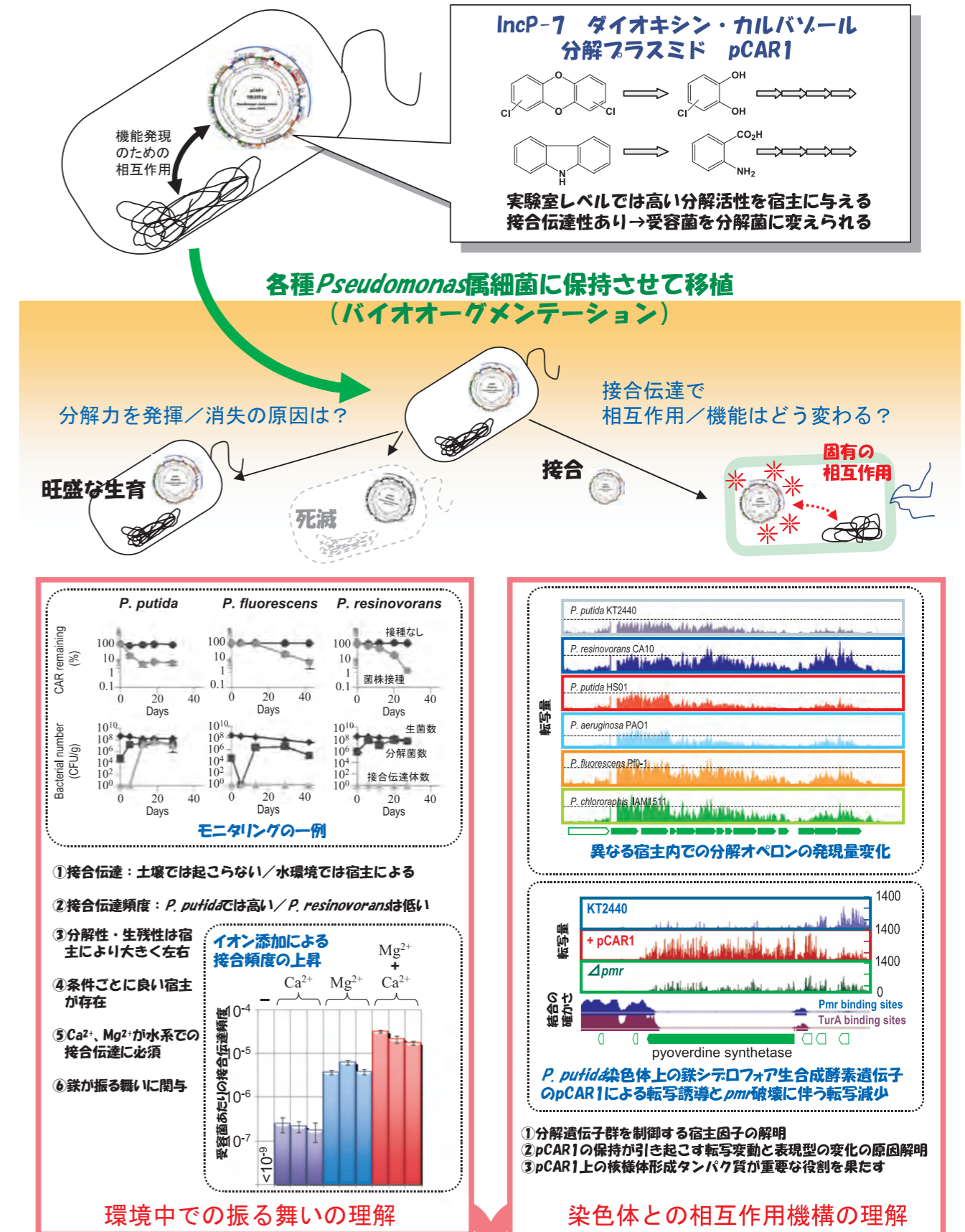
Shintani M., et al.: Conjugative transfer of the IncP-7 carbazole degradative plasmid, pCAR1, in river water samples. *Biotechnol. Lett.* 30: 117-122 (2008)

Shintani M., et al.: Behavior of the IncP-7 carbazole-degradative plasmid pCAR1 in artificial environmental samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 485-497 (2008)

Takahashi Y., et al.: The complete nucleotide sequence of pCAR2: pCAR2 and pCAR1 was structurally identical IncP-7 carbazole degradative plasmids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: in press

Miyakoshi M., et al.: High-resolution mapping of plasmid transcriptomes in different host bacteria. *BMC Genomics* 10: 12 (2009)

■研究成果の概要



振る舞いの機構解明に基づくオーグメンテーション法の最適化

■研究課題名

酵素によるイノシトールリン脂質及びイノシトールリン酸の合成

■研究の目的

天然リン脂質の一種であるホスファチジルイノシトール (PI) には抗肥満・抗高脂血症・コレステロール低減等、有用な生理機能が認められており、機能性食品としての利用が期待されている。しかし、植物レシチン等の天然成分からPIを抽出・精製するためには毒性の溶媒を多量に必要とする等の問題があり、これまでPIを食品素材として製造する有効な方法はなかった。そこで本研究では、PI合成活性を持たない既存の放線菌ホスホリパーゼD (PLD) を蛋白工学的に改変して同合成活性を有する実用的な改良型酵素を開発し、それを用いてPIおよびその誘導体であるイノシトールリン酸 (IP) を製造するための基礎研究を行う。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①リン脂質変換酵素の機能改変と大量調製法の確立
- ②改変酵素を用いたイノシトールリン脂質およびイノシトールリン酸の合成
(◎岩崎雄吾／国立大学法人名古屋大学大学院生命農学研究科)



岩崎 雄吾

■研究の内容及び主要成果

- ①PI合成活性を持たない放線菌PLDを蛋白工学的に改変し、同合成活性を付与する事に成功した。さらに改変酵素の位置特異性を詳細に解析し、特定の異性体を選択的に生成する改変PLDの開発に成功した。
- ②組換え放線菌発現系を用いて改変酵素の大量発現に成功した。
- ③改変PLDの立体構造を決定し、改変酵素のPI合成能をその構造から説明することが出来た。
- ④大豆レシチンとmyo-イノシトールから有毒な有機溶媒を用いない方法で、高効率なPI合成に成功した。
- ⑤改変PLDとPI-PLCを共役させ、イノシトールリン酸のワンポット合成に成功した。

■見込まれる波及効果

製造されたPIやIPは、機能性食品素材としての利用が期待できる。また、原料となる大豆レシチンやイノシトールは農産物の加工の際の副生物として得られるから、本研究は食品分野における副生物の有効利用に寄与するものである。さらに、この課題の中で開発したPI異性体分析法はリン脂質製剤の品質管理、脂質化学分野における生化学分析などにも応用できる。

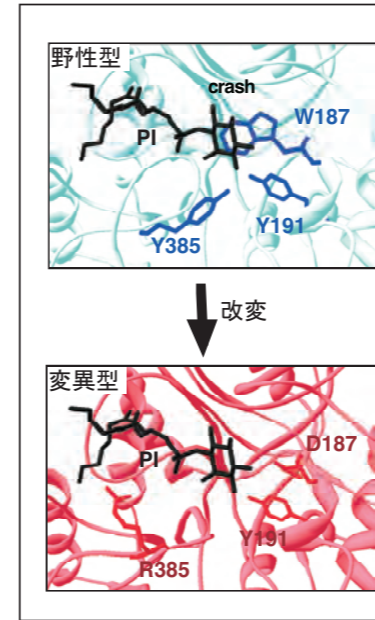
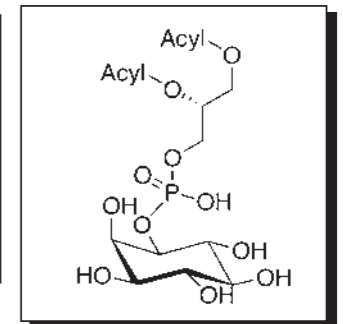
■主な発表論文

- Masayama A. *et al.* *Streptomyces* phospholipase D mutants with altered substrate specificity capable of phosphatidylinositol synthesis. *ChemBioChem*, 9, 974-981 (2008).
- Masayama A. *et al.* Isolation of phospholipase D mutants having phosphatidylinositol-synthesizing activity with positional specificity on *myo*-inositol. *ChemBioChem*, 10, 559-564 (2009).

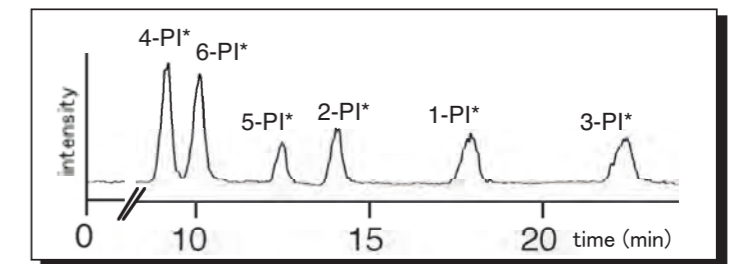
■研究成果の概要

酵素によるイノシトールリン脂質及びイノシトールリン酸の合成

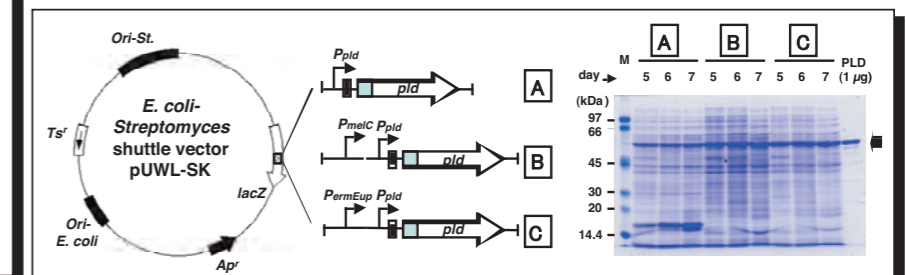
ホスファチジルイノシトール(PI)には脂質代謝改善作用が認められており、機能性食品としての利用が期待されている。従来PIは天然物から抽出されていたため、きわめて高価であった。本研究では元来PI合成活性を持たない放線菌ホスホリパーゼD(PLD)を蛋白工学的に改変する事で同活性を付与し、それを用いてPIを高効率で酵素合成する。またPLD/PLC共役反応系を構築し、イノシトールリン酸の合成も試みる。



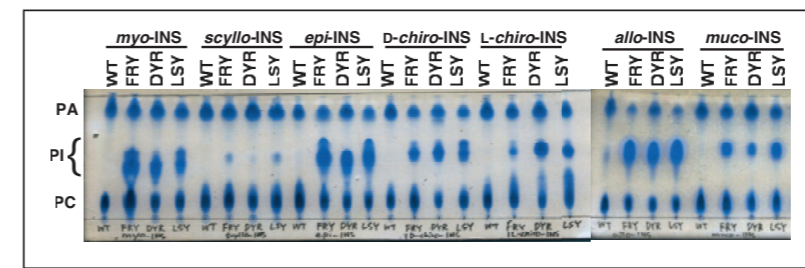
PI合成活性を付与した改変型PLDを開発



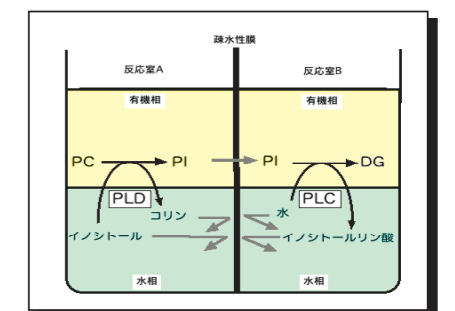
PI異性体組成の完全分析法を確立



改変型PLDの大量発現系を確立



改変型PLDを用いたPIの高効率合成



PLD/PLC共役反応によるイノシトールリン酸の合成

機能性食品素材としての利用

■研究課題名

糸状菌の低酸素応答機構の解明と利用

■研究目的

糸状菌（カビ）は古くから我が国の醸造・発酵産業にとって重要な微生物であるとともに、近年では、酵素製剤や抗生物質の供給源としても利用されている。一方、これらのプロセスには、酸素の供給（通気）が大きな影響を与えることが知られている。本研究では、通気の変化に伴うカビのエネルギー代謝の変化と調節の分子メカニズムをポストゲノム解析の手法などを用いて明らかとする。また、得られた知見をもとにした代謝工学により、産業上重要なカビの高機能化を行う。

■研究項目及び実施体制（◎は研究代表者）

- ①カビ嫌氣的エネルギー獲得機構の分子機構の解明
- ②カビエネルギー代謝ネットワークの網羅的解析と高機能化
- ③実用化に向けた基盤技術開発

（◎高谷直樹／筑波大学大学院生命環境科学研究科）



高谷 直樹

■研究の内容及び主要成果

- ①カビが低酸素状態にさらされた時に発現する特異な反応に関わる鍵酵素として、硝酸塩の還元を行うNiaDや元素状硫黄の還元を行うGlrとSR/Trrを発見した。
- ②モデルカビ*Aspergillus nidulans*のプロテオーム解析を行い、カビが低酸素状態に反応して、さまざまな代謝（ペントース、アミノ酸、核酸などの代謝、ストレス応答）を変化させることを見出した。
- ③グルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子の高発現により、野生型株の2～4倍のγ-アミノ酪酸（GABA）を含有する麹菌（*Aspergillus oryzae*）を作出することに成功した。

■見込まれる波及効果

カビには、醸造・発酵産業や物質生産に利用されるもの以外にも、作物の病害や穀類の汚染を引き起こすものが数多く知られている。また、家畜やヒトの病原菌も知られることから、カビは農林水産業に密接に関わっているといえる。本研究により得られたカビのエネルギー代謝に関する基礎的研究成果は、これらのカビの生育制御・抑制技術を構築する上で重要である。

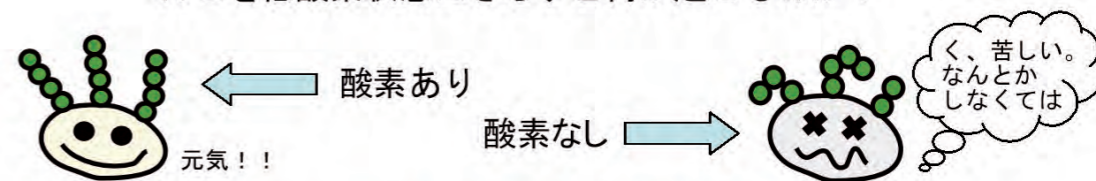
■主な発表論文

- Sato, I., *et al.*: The glutathione system of *Aspergillus nidulans* involves a fungal specific glutathione-S-transferase. *J. Biol. Chem.* (2009, in press)
- Shimizu, M., *et al.*: Proteomic analysis of *Aspergillus nidulans* cultured under hypoxic conditions. *Proteomics* 9: 7-19. (2009)
- Takaya, N.: Response to hypoxia, reduction of electron acceptors, and subsequent survival by filamentous fungi. *Biosci. Biotech. Biochem.* 73: 1-8 (2009)
- Fujii, T., and Takaya, N.: Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* involves NADH-nitrate reductase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 412-420 (2008)
- Abe, T., *et al.*: Anaerobic elemental sulfur reduction by fungus *Fusarium oxysporum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 2402-2407 (2007)

■研究成果の概要

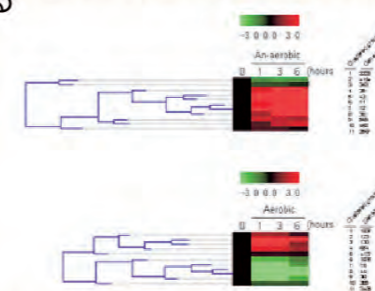
カビの低酸素応答機構の解明と新規発酵技術開発のための基盤研究

カビを低酸素状態にさらすと何が起こるのか？

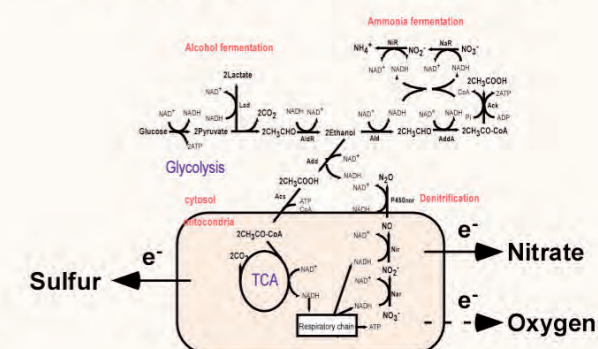


研究によりわかったこと

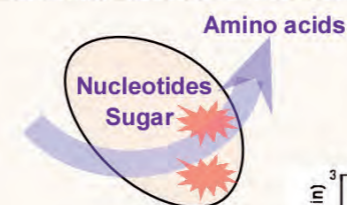
非常に多くの遺伝子の発現が変化する



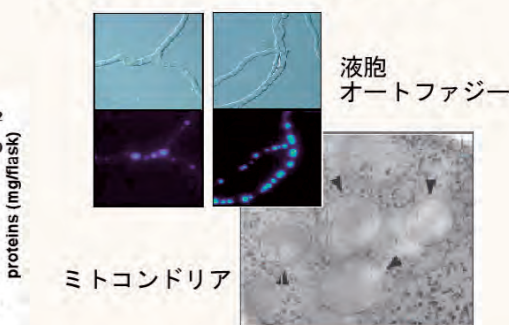
酸素の代わりに使うものを使う



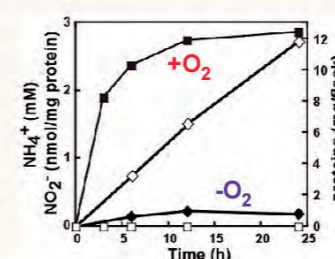
新たな代謝メカニズムを発見する



オルガネラ機能を調整する

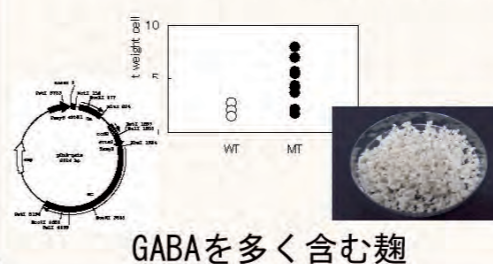


ゆっくり生長する



得られた成果の応用

高機能性のカビの分子育種



カビの生育制御技術の開発に役立つ



■研究課題名

新規DNA型RNAiライブラリーによる昆虫免疫関与因子の網羅的探索法の確立とその利用技術の開発

■研究の目的

安全性が高くかつ、効力の優れた害虫防除技術を開発し、広く実用化させるには昆虫の免疫機構をさらに深く解析する必要がある。本研究では、昆虫の免疫機構に関わる未知の因子を機能的、網羅的かつ効率的に探索するための強力な手法として、DNA型RNAiライブラリーの作製法及び、このライブラリーを用いてのスクリーニング法をカイコ培養細胞を用いて確立し、さらにスクリーニングによって取得された免疫関与因子の機能解析を行うことで、未知の昆虫免疫機構を明らかにすることを目的とする。これら研究の成果は、環境保全型農業に即した新しい害虫防除技術の開発、感染症の新規治療の開発等の基礎的知見として貢献されることが期待される。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①新規DNA型RNAiライブラリーによる昆虫免疫関与因子の網羅的探索法の確立とその利用技術の開発
(◎田中博光／独立行政法人農業生物資源研究所)



田中 博光

■研究の内容及び主要成果

- ①DNA型RNAiライブラリー構築のための新規手法を開発した。また、RNAiライブラリーによる機能的スクリーニングによって、カイコDNAウイルスの感染防御・増殖抑制に関わる新規因子を同定し、DNAウイルスに対する新規細胞内増殖抑制制御機構を明らかにした。さらに、カイコ抗微生物ペプチド遺伝子の新規転写制御因子を明らかにした。

■見込まれる波及効果

本研究の成果は、新しい環境保全型に即した害虫防除技術の開発、有益昆虫保護のための技術開発、病原微生物に対する新しい創薬・治療薬開発のための基盤的知見となることが期待される。ライブラリーを用いてのスクリーニング技術は昆虫の様々な生命現象に関わる因子の探索にも利用できることから、こうした探索を通じ昆虫の制御技術の向上に貢献できると考えられる。

■主な発表論文

Tanaka H, *et al.*: shRNA expression plasmids generated by a novel method efficiently induce gene-specific knockdown in a silkworm cell line. *Mol. Biotechnology* 41: 173-179 (2009)

Tanaka H, *et al.*: Lipopolysaccharide elicits expression of immune-related genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* 18: 71-75 (2009)

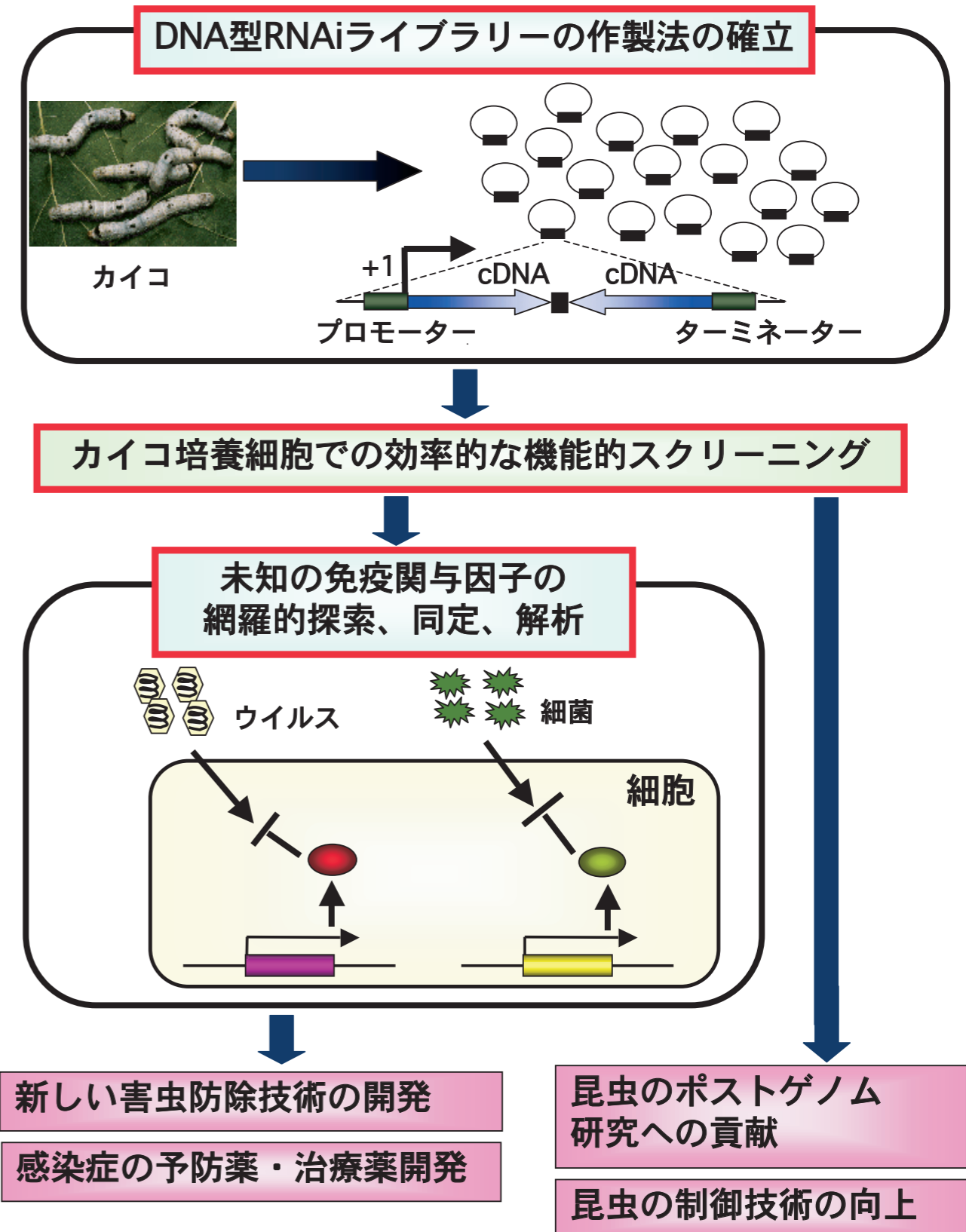
Tanaka H, *et al.*: A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 1087-1110 (2008)

Tanaka H, *et al.*: Identification and functional analysis of Relish homologs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta* 1769: 559 (2007)

Tanaka, H, *et al.*: Correlation of differential expression of silkworm antimicrobial peptide genes with different amount of Rel family proteins and their gene transcriptional activity. *Biosci Biotechnol Biochem* (in press)

■研究成果の概要

新規DNA型RNAiライブラリーによる昆虫免疫関与因子の網羅的探索法の確立とその利用技術の開発



■研究課題名

ヘテロシス固定による新育種法の開発に向けたアポミクシス機構の解明

■研究の目的

「アポミクシス」とは、無性的な胚発生によって植物の種子が形成される生殖様式をいい、母株と全く同じ遺伝子型を持った種子を大量に得ることができる。アポミクシスを農業的に利用できるようになれば、トウモロコシ・ハイブリッドライス・野菜などヘテロシスを利用する作物の育種年限が大きく短縮されるとともに、種子生産コストが低減できるなど、育種・種子生産システムの大革新が期待できる。本研究ではアポミクシス利用へ向けた基礎として、熱帯性牧草ギニアグラスを研究材料に染色体・ゲノム解析と網羅的発現解析を行い、両方の知見を総合してアポミクシスに関わる遺伝子の全体像を把握することを目指す。

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①ギニアグラスのアポミクシス遺伝子座近傍領域のゲノム構造の解明
 - ②ギニアグラスの花穂で発現するアポミクシス特異的遺伝子群の解明
- (◎高原 学／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)



高原 学

■研究の内容及び主要成果

- ①ギニアグラスのアポミクシス遺伝子領域に約150個のSTSマーカーを新規に作出した。またこれらのマーカーを用い、アポミクシス遺伝子領域のゲノム断片を含むBACクローンを約300個特定した。
- ②アポミクシスに連鎖するSTSマーカーから得られたBACによるFISH解析により、ただ1本のアポミクシス特異的染色体を視覚的に特定した。またアポミクシス遺伝子領域が12Mbp以上に及ぶ広い領域であることを視覚的に示した。
- ③ギニアグラス未熟花穂のcDNAライブラリー（計10条件）から合計14,688クローンの塩基配列を決定し、12,477個のユニークなクローンを得た。またアポミクシス品種で共通に発現するESTを978個、そのうち有性生殖系統で発現しないESTを476個特定した。
- ④ギニアグラスの未熟子房のマイクロアレイ解析と定量PCR解析により、アポミクシス未熟子房で特異的に高い発現を示す遺伝子を3個特定した。

■見込まれる波及効果

本研究を元に単離される遺伝子を農業的に利用できるようになれば、主としてトウモロコシ・ハイブリッドライス・野菜などヘテロシスを利用する作物の育種年限が大きく短縮されるとともに、種子生産コストが低減できるなど、種苗会社に大きなメリットをもたらすと期待される。

■主な発表論文

Akiyama Y., et al.: Estimation of genome size and physical mapping of ribosomal DNA in diploid and tetraploid guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Grassland Sci.* 54: 89-97 (2008)

Yamada-Akiyama H., et al.: Analysis of expressed sequence tags in apomictic guineagrass (*Panicum maximum*). *J. Plant Physiol.* 166: 750-761 (2009)

■研究成果の概要

アポミクシス：単為発生によりクローン種子を形成する生殖様式

①アポミクシス遺伝子領域のゲノム解析・染色体解析

■アポミクシス遺伝子領域の高密度STSマーカー開発

アポミクシス遺伝子領域のBACクローンの網羅的特定
↓
次世代シーケンサーによる配列読解へ

■アポミクシス特異的染色体の解析

②ギニアグラス未熟花穂での発現解析

■未熟花穂で発現する遺伝子のEST解析

→ 約15,000クローンのESTを決定

■未熟子房で発現する遺伝子の特定

アポミクシスを利用した画期的育種システムの開発

1. アポミクシス遺伝子を導入した系統を作出し、他の系統と交配する。

2. 得られた優秀なF₁個体から採種するだけで、F₁個体と同じ遺伝子型を持つ種子(クローン種子)が大量に得られる。

3. 直ちに品種として利用できる。