

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成16年7月15日発行（隔月1回15日発行）

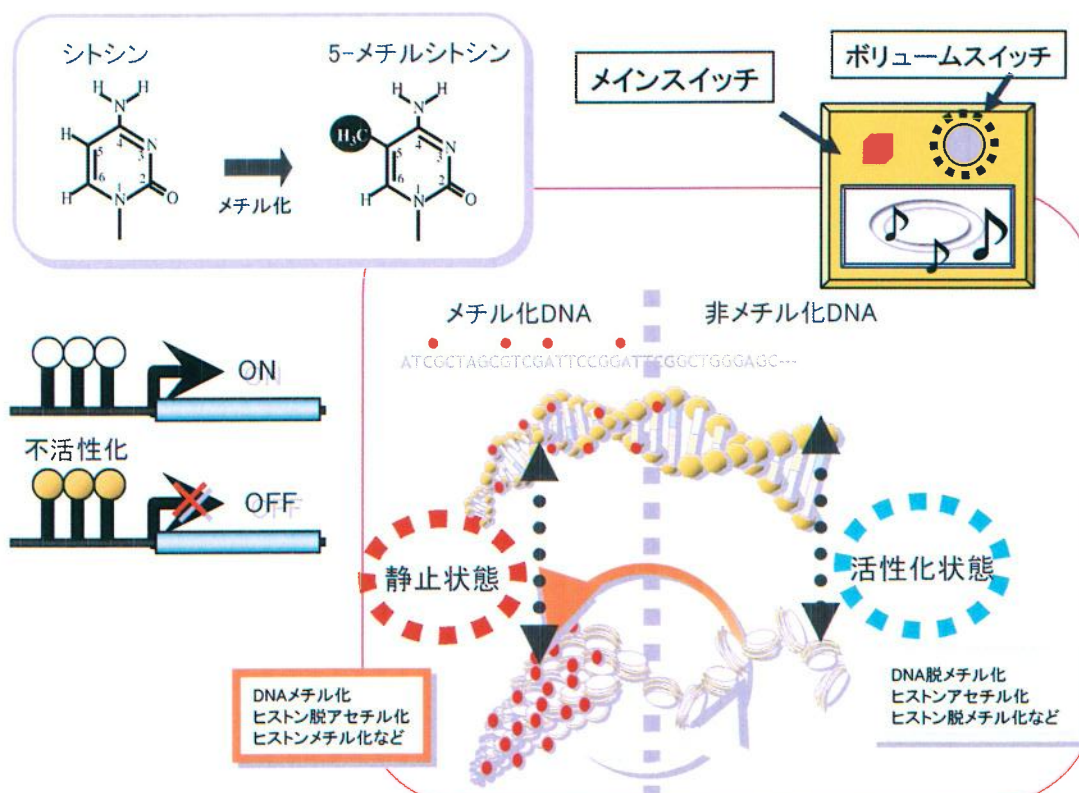
ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.104

15 JULY, 2004

ブレインテクノニュース



DNAメチル化とクロマチン修飾によるエピジェネティック制御装置

哺乳類におけるエピジェネティクス研究の 現状と展望

東京大学大学院農学生命科学研究科

塩田 邦 郎

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（生研センター）

目 次

特 集 「エピジェネティクス研究の現状と展望」

- | | | |
|---|--|----|
| 1 | 哺乳類におけるエピジェネティクス研究の現状と展望 | 1 |
| | 塩田 邦郎 (東京大学大学院 農学生命科学研究科) | |
| 2 | 植物分野におけるエピジェネティクスの現状 | 9 |
| | 星野 敦・飯田 滋 (大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 基礎生物学研究所) | |
| 3 | マウス単為発生胚の誕生 —哺乳類の生殖戦略— | 15 |
| | 河野 友宏 (東京農業大学 応用生物科学部 バイオサイエンス学科) | |

国内情報

- | | | |
|--|---|----|
| | 分画したダイズタンパク質の機能性とダイズ種子プロテオームデータベースの構築 | 20 |
| | 森山 達哉・丸山 伸之 (京都大学大学院 農学研究科) | |
| | ABA不活性化酵素CYP707遺伝子の同定と機能解析 —休眠種子の覚醒遺伝子— | 26 |
| | 南原 英司・岡本 昌憲・久城 哲夫 ([独] 理化学研究所植物科学研究センター) | |
| | 塩素系薬剤によるリゲニンの分離に伴うクロロホルムの発生とその拡散防止 | 30 |
| | 真柄 謙吾 ([独] 森林総合研究所) | |
| | 土壌サンプル粉碎篩分け装置 | 34 |
| | 後藤 隆志・手島 司・市来 秀之・清水 一史 ([独] 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) | |

地域の先端研究

- | | | |
|--|--|----|
| | 「アクアDNAブック」の作成とその活用について | 37 |
| | 長谷川 理 ¹⁾ ・岡本 信明 ²⁾ ・藤 加菜子 ²⁾ ・林崎 良英 ³⁾ ・河合 純 ³⁾ ・中村 光江 ³⁾ ・
谷川 直樹 ³⁾ ・小関 恵子 ³⁾ (神奈川県水産総合研究所 ¹⁾ 東京海洋大学 ²⁾ 理化学研究所 ³⁾) | |

文献情報

- | | | |
|--|---|----|
| | オブシク処理への腔内留置型黄体ホルモン製剤の併用は、哺乳中の黒毛和種への定時授精における受胎率を向上させる | 41 |
| | N. Kawate et al. (<i>Theriogenology</i> , 61, 399-406, 2004) 抄訳：下司 雅也 | |
| | 魚の高活性不凍タンパク質 | 42 |
| | C. B. Marshall et al. (<i>Nature</i> , 429, 153, 2004) 抄訳：千葉 智 | |
| | 酵母 <i>S. cerevisiae</i> におけるグルタチオンを介する無毒化経路 | 43 |
| | K. G. Sharma et al. (<i>Arch Microbio</i> , 180, 108-117, 2003) 抄訳：高岡 康道 | |
| | 一酸化窒素合成酵素、植物でついに発見 | 44 |
| | F. Q. Guo et al. (<i>Science</i> , 302, 100-103, 2003) 抄訳：岩井 純夫 | |

- | | | |
|--|------------------------------------|----|
| | 生研センターからのご案内 (アグリビジネス創出フェア開催のお知らせ) | 45 |
|--|------------------------------------|----|

表紙写真説明

遺伝子発現の制御について、DNAメチル化、クロマチン構造による制御系と転写因子による制御系との関係は、メインスイッチとボリュームスイッチに例えられる。転写因子による制御はDNAが低メチル化であり弛緩したクロマチン構造となっている領域において有効であり、不活性化領域では機能できない。詳細については、本誌1頁をご覧ください。

◀特集▶「エピジェネティクス研究の現状と展望」1

哺乳類におけるエピジェネティクス研究の 現状と展望

東京大学大学院 農学生命科学研究科

塩 田 邦 郎

マウスやヒトの全ゲノム塩基配列が決定され、生命科学研究はポストゲノム時代に突入した。今後の課題は、身体を構成するほぼ全ての細胞が、同じDNAを持ちながら、如何にして異なった形質を発揮し維持しているかを知ることである。DNAのメチル化は哺乳類ゲノムDNAにみられる唯一の化学修飾で、メチル化された遺伝子領域は不活性化される。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超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。“DNA塩基配列の変化を伴わず細胞分裂後も継承される遺伝子機能の変化を研究する学問領域”はエピジェネティクスと呼ばれる。本稿では、哺乳類のエピジェネティクス系について、今後の展開を含め、紹介する。

1. エピジェネティクスとは

受精から始まる哺乳類の個体発生では、連続的な細胞分裂、増殖、分化を繰り返し、最終的に様々な形態や機能を有する約200種類の細胞へと分化していく。DNAの塩基配列によってコードされた遺伝情報は、体を作る全細胞の設計図の束に例えられ、どの細胞でも同じである。一方で、個々の遺伝情報は各組織や細胞でいつ、どのように使用するかを指定されねばならず、設計図上に書き込まれた作業手順書が必要となる。受精卵から胎仔発生を経て個体が誕生するまでには、それぞれの細胞に必要な遺伝子の発現をオンにし、不必要な遺伝子の発現をオフにすることが必要である¹⁾。染色体はDNAとヒストンなどが結合したクロマチンから構成されている。エピジェネティクスはゲノム作業の手順書を解析する研究領域で、DNAメチル化とクロマチン構造変化が分子機構の中心である。

メチル化シトシンは1948年にウシ胸腺ゲノムDNAから発見された。約半世紀を経て、ゲノムDNAのメチル化は大腸菌から植物、脊椎動物まで広範にわたる生物種で見られる様々な生命現象に関係していることが明らかになり、進

化や個体発生の観点からも重要な学問領域となってきた²⁾。哺乳類ではゲノムDNAを構成するアデニン、グアニン (G)、シトシン (C)、チミンの塩基の中で、主にCG配列 (CG相補対との混同を避けるためCpGと記す) のシトシンのみがメチル化される (図1, 左上)。DNAがメチル化された遺伝子領域はクロマチン凝縮を伴い、遺伝子発現が厳しく抑制される不活性化領域となること、逆に、遺伝子発現が行われている領域では低メチル化状況にありクロマチン構造は緩んでいることが明らかになってきた。従来、細胞や組織特異的な遺伝子発現の制御は、転写因子によってのみ説明されてきた。DNAメチル化とクロマチン構造による制御系と転写因子による制御系の関係は、メインスイッチとボリュームスイッチに例えることができる (図1, 右上)。転写因子による制御はDNAが低メチル化であり弛緩したクロマチン構造となっている領域において有効で、不活性化領域では機能できない。したがって、ゲノムDNAメチル化による転写の制御は、遺伝子発現調節機構の最上位に位置することになる。

SHIOTA Kunio

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

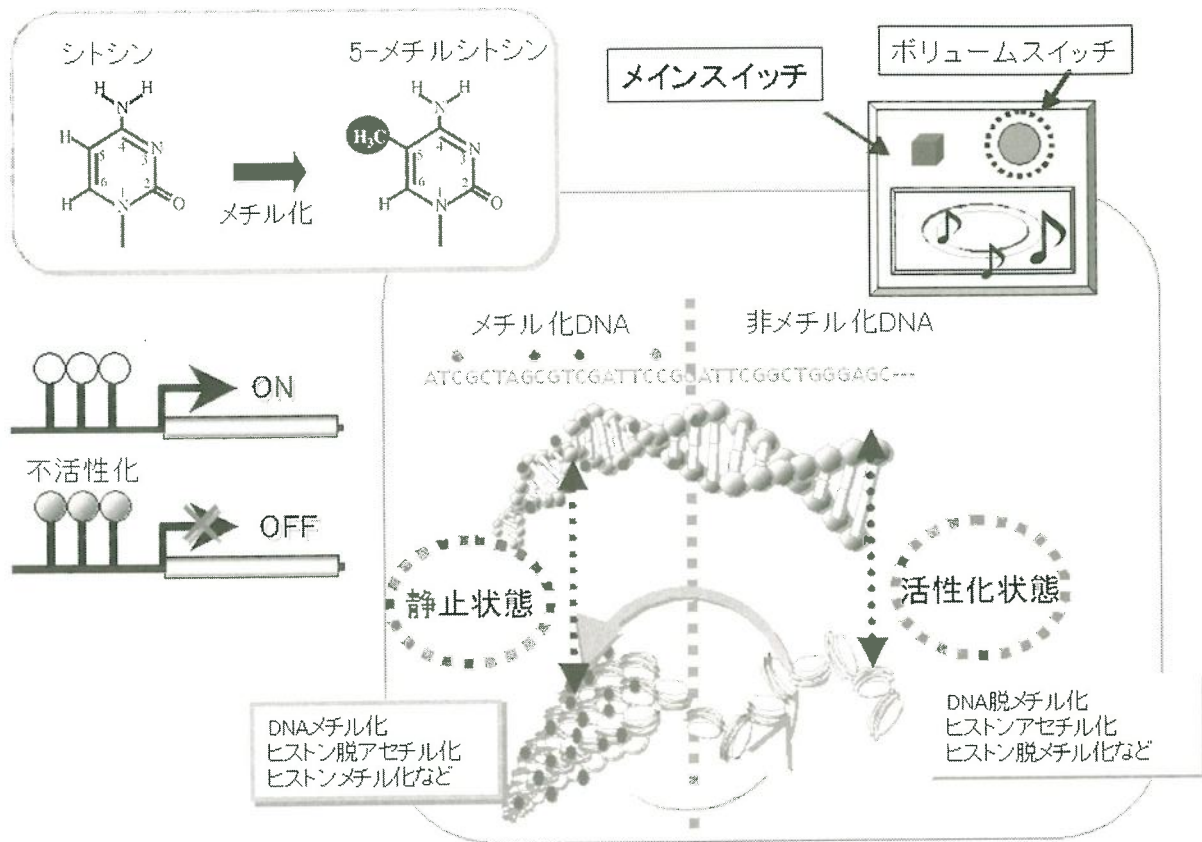


図1 DNAメチル化とクロマチン修飾によるエピジェネティック制御装置

DNAメチル化とクロマチン構造変化（ヒストン修飾）による遺伝子の不活性化。DNAがメチル化された領域ではヒストン脱アセチル化やヒストンメチル化がおり、逆にヒストン脱アセチル化やヒストンメチル化はDNAメチル化を引き起こすことが知られている。こうした遺伝子領域ではクロマチンは凝集した状態となり、遺伝子は不活性となる。通常、遺伝子発現制御は転写因子の有無で説明されてきた。転写因子によるスイッチは図右上のボリュームスイッチに相当する。それに対して、DNAメチル化・クロマチン凝縮による遺伝子スイッチは、転写因子の有無に関係なく遺伝子を不活性にできるので、メインスイッチに相当する。

2. DNAメチル化により制御されている発生・分化のマスター遺伝子

DNAメチル化は、細胞の分化や個体発生に重要なマスター遺伝子の制御に関与していることが明らかになりつつある。Oct4遺伝子は、哺乳類のPOU family転写因子のひとつであり、全能性や多分化能のある細胞で発現していることから細胞の多分化能の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。Oct4遺伝子の上流領域には、CpG配列が多数存在しており、発現している胚性幹細胞では、これらのCpGは低メチル化状態である³⁾。それに対し、発現が厳しく抑制されている栄養膜幹細胞では、高頻

度にメチル化されている（図2）。また、Oct4遺伝子のDNAメチル化とヒストンの脱アセチル化が見られ、クロマチン構造が凝縮していることが明らかになっている。

Sry遺伝子は精巣の発生を誘導するマスター遺伝子で、胎生期の生殖巣でのみ発現する。マウスSry遺伝子の上流域約4.4kbにはわずかに11個のCpG配列しか存在しておらず、CpG配列の出現頻度はかなり低い。プロモーター領域と考えられる上流約600塩基中に存在する5個のCpGは精巣の発生とSry遺伝子の発現時期に特異的に脱メチル化されることが明らかとなっている⁴⁾。

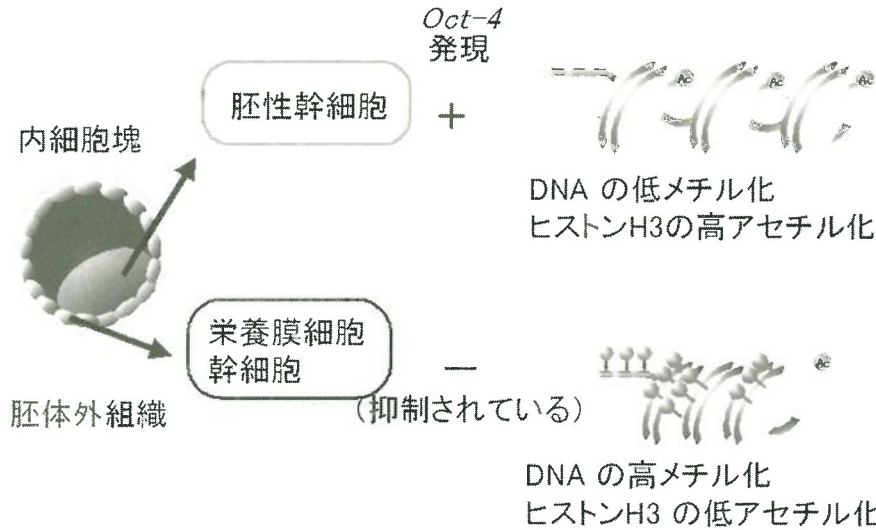


図2 DNAメチル化とクロマチン構造変化によるOct-4遺伝子の発現制御
 多くの場合、DNAメチル化はクロマチン構造変化を伴い、遺伝子領域が不活性化される。様々な遺伝子がDNAメチル化とクロマチン凝縮により不活性化される。クロマチン構造はヒストン修飾により制御されている。Oct4遺伝子は着床前胚や胚性幹細胞では発現しているが、他の細胞では発現が厳しく制限されている。図ではOct4が発現している細胞ではDNAは低メチル化で、ヒストンが高アセチル化され、クロマチン構造が緩んでいることを示している。一方、Oct4が発現していない細胞（例、栄養膜細胞幹細胞）ではDNAは高メチル化状態で、ヒストンは低アセチル化状態にある。

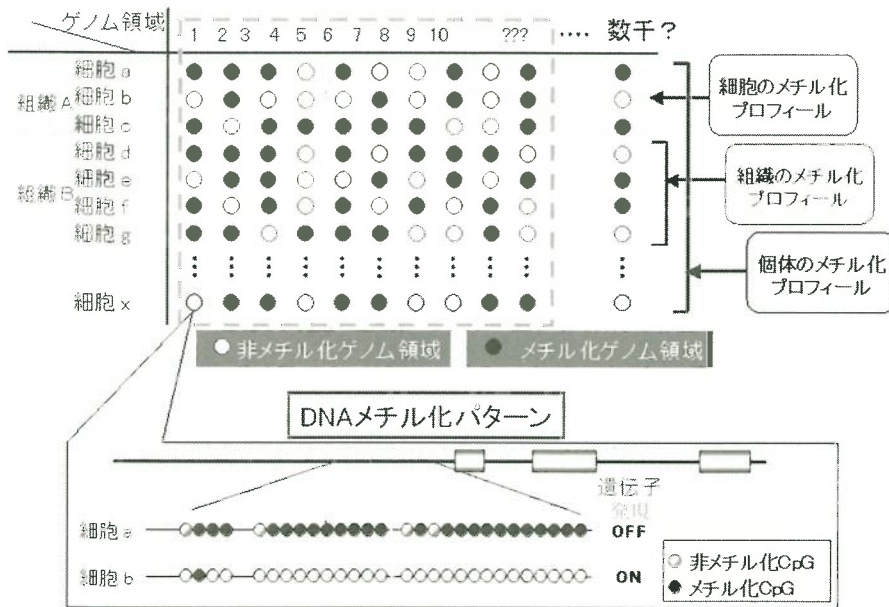


図3 DNAメチル化プロフィール

遺伝子領域のCpG配列では、細胞の種類に応じた「DNAメチル化パターン」が形成されている。ゲノム上に散らばる各遺伝子のDNAメチル化パターンの組み合わせはその細胞に特有であり、「細胞のDNAメチル化プロフィール」をなす。細胞のDNAメチル化プロフィールはその細胞で活性化・休眠化されている遺伝子セットの情報でもある。組織を構成する細胞のDNAメチル化プロフィールの集まりは「組織のDNAメチル化プロフィール」として、また個体の全細胞では「個体のDNAメチル化プロフィール」としてDNAメチル化データベースを形作る。

3. CpGアイランドとゲノム全域のDNAメチル化プロフィール

哺乳類のゲノムDNAのGC含量は約40%と低く、CpGの出現頻度は確率的に期待される数値の1/5から1/4程度しか存在しない。しかし、ゲノム上にはCpG配列が密に存在する領域がありCpGアイランドと呼ばれている。CpGアイランドの多くは遺伝子の近傍、特に5'上流の転写調節領域に存在していることが知られている。ヒトのゲノムには約29,000の、マウスゲノムには約15,500のCpGアイランドが存在する。CpGアイランドを持つ遺伝子は全遺伝子の総数の約半数を占める。したがって、CpGアイランドを持つ領域を網羅的に解析することで遺伝子領域に焦点を当てたゲノムワイドDNAメチル化解析が可能となる。

近年、マウスゲノム1500領域のCpGアイランドに焦点をあてたゲノムワイド解析データを基に、DNAメチル化プロフィールが得ら

れた(図3)。ゲノム上に散在する各遺伝子はそれぞれDNAメチル化パターンが存在するが、その組み合わせは細胞の種類に特有である。(本稿では、細胞種固有のDNAメチル化パターンの集合を「DNAメチル化プロフィール」と呼ぶ)。これまでの研究で得られたDNAメチル化プロフィールを基にすると、2種類の細胞間に10-30領域(1-2%に相当)のDNAメチル化に違いが検出される。他の新たな細胞・組織のゲノム解析で細胞・組織特異的なDNAメチル化領域数が更に約2%ずつ加算され、10種類の細胞・組織(胚性幹細胞, 生殖細胞, 脳, 腎臓など)の解析では、16%に達した。したがって、少なくとも数千のCpGアイランドが細胞・組織によりメチル化されていることが推測

される(図3)⁵⁾。哺乳類の体は約200種類の細胞から構成されていることを考慮すると、更に多くのCpGアイランドを持つ遺伝子がメチル化の標的となっていることが考えられる。

DNAメチル化プロフィールを形成するCpGアイランドを持つ組織特異的な遺伝子の例として、スフィンゴシンキナーゼ1遺伝子, E-カドヘリン, エンドセリンレセプターB, プロピオメラノコルチンなどが挙げられる。これらの遺伝子のCpG遺伝子はプロモーター領域に組織特異的にメチル化される領域を有し、メチル化により発現は抑制される。DNAメチル化プロフィールは細胞の種類に特有で、遺伝子の不活性化領域を指定したゲノムのバーコードと考えることができる。ゲノムメインスイッチのON/OFF模様が、発生・分化・内分泌系・代謝系・免疫系・神経系など、様々な生体制御系に参与する遺伝子制御の基礎になっているのである。

4. 個体発生に伴うDNAメチル化プロフィール

卵と精子はそれぞれの固有のDNAメチル化プロフィールを持つ。受精後、それぞれのDNAを受け継いだ初期胚のゲノムDNAは、発生の進行に伴い領域特異的にメチル化/脱メチル化され、細胞の種類に特異的なDNAメチル化プロフィールを形成していくと考えられる(図4)。

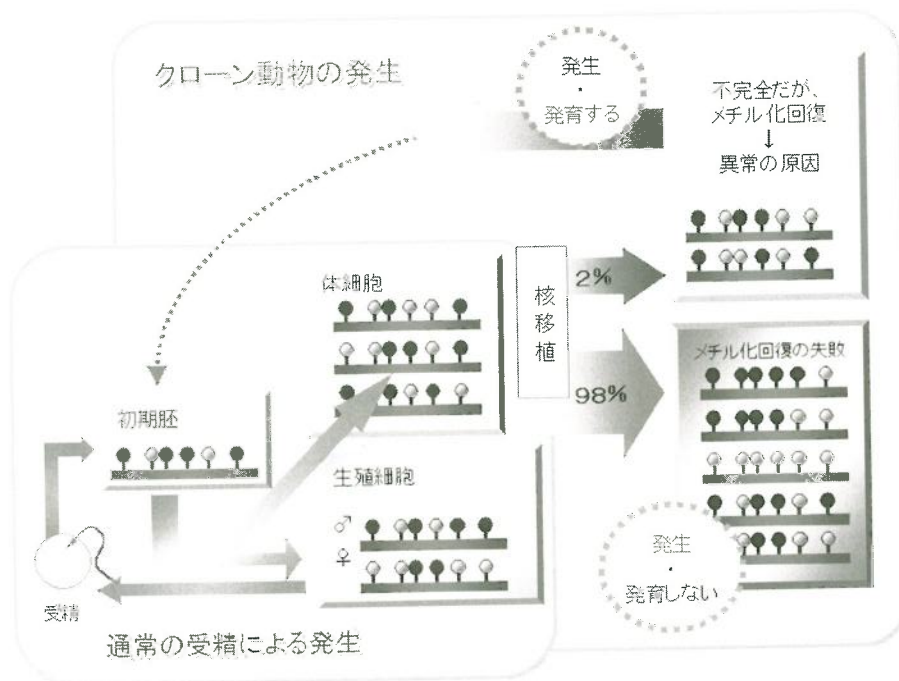


図4 DNAメチル化による発生プログラム

ゲノムDNAには細胞・組織特異的にメチル化・脱メチル化される多数の領域が存在し、特異的なDNAメチル化プロフィールを形成している(図3)。発生の進行に伴ってゲノムのDNAメチル化プロフィールは変化し、細胞の遺伝子発現セットが決定される。通常の生殖では生殖細胞のみが受精により初期胚型のDNAメチル化プロフィールを形成することができる。初期胚と体細胞ではDNAメチル化プロフィールは大きく異なるため、体細胞の核を卵に移植しても完全な初期胚型のDNAメチル化プロフィールを形成させることは困難である。そのため、体細胞核の移植によるクローン胚では多くの場合は異常なDNAメチル化を示し発生・発育に異常が生じる。(●メチル化, ○非メチル化)。

体細胞核移植クローン動物では、ドナー体細胞の核ゲノムは、そのメチル化プロファイルを初期胚型へ書き換えを行う必要がある。当然ながら、誕生にまで至ったクローンマウスの各組織では、自然交配動物とほぼ同じDNAメチル化プロファイルを有している（ゲノムの1000領域の99%以上は正常動物と一致）。（大幅にDNAメチル化プロファイルが異なる場合は発生しない¹¹⁾。しかし、誕生に至ったクローン動物でも、例外なく若干（1%以下）のDNAメチル化異常が検出されている。クローン動物は核ドナーの極めてよくできたコピーであるが、完全なコピーではないといえる。上述のように組織特異的なCpGのメチル化部位は数多く存在することを考えると、全ての領域を初期胚型に戻すのは非常に困難であると推定できる。

胚・胎仔の正常発生に不可欠の遺伝子領域でDNAメチル化異常が起きると胚の発生停止や胎仔の奇形を引き起こすことは容易に推測できる。一方、DNAメチル化異常が胚・胎仔期に必要な領域で起きた場合は誕生まで至ると考えられる。いずれにしても、細胞・組織特異的なDNAメチル化・クロマチン構造プロファイルが、発生の基礎になっており、クローン発生の障害になっているのである。

5. エピジェネティクス制御系の正常と異常

DNAメチル化とクロマチン構造変化によるエピジェネティクス系は、発現が許される

遺伝子（群）と厳しく抑制される遺伝子（群）を細胞世代を超えて記憶する機構である。分化した細胞ではメチル化プロファイルが維持され、細胞種に固有の遺伝子発現セットが維持されることになる。したがって、いかなる原因であれDNAメチル化状況が乱れると細胞のガン化を含め、様々な形質の異常に繋がる恐れが生じる（図5）。しかも、エピジェネティクス情報は細胞分裂後も継承されるので、その異常は慢性的に持続する可能性が生じる。

シトシン残基へのメチル基の転位反応はDNAメチル転移酵素によっておこなわれる（図6）。DNAメチル化酵素活性には、非メチル化シトシンが新たにメチル化される*de novo*メチル化活性と、DNA複製時に親鎖DNA上のメチル化パターンを新生DNA鎖上に写し取る維持型メチル化活性が存在する。脱メチル化は、複製時にDNAメチル化維持のための酵素が作

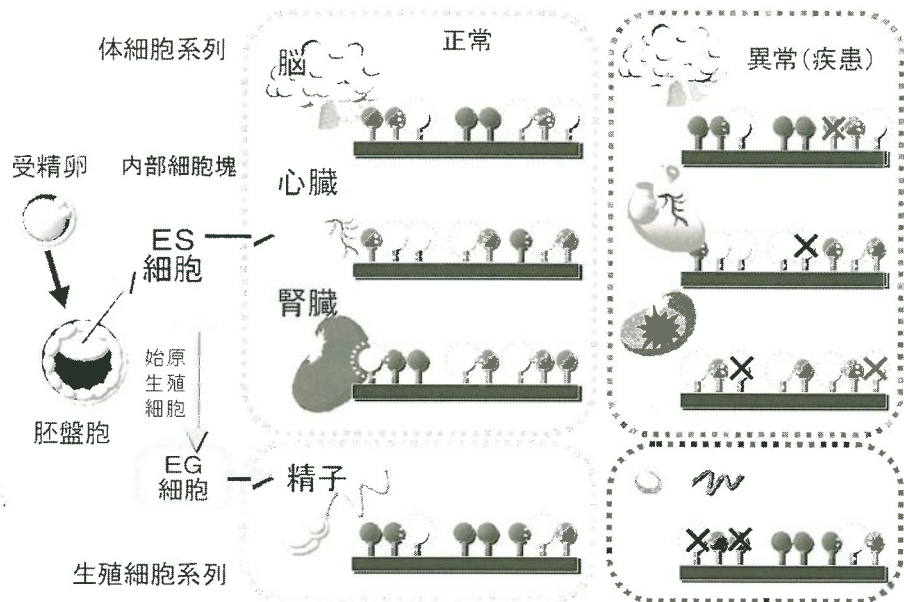


図5 エピジェネティクスの正常と異常

受精に始まる個体の発生は、受精卵のDNAメチル化プロファイルが細胞の分化に応じてダイナミックに変化し、各分化細胞・組織のDNAメチル化プロファイルを形成していく過程でもある。発生途上に外来の化学物質などによってこのDNAメチル化プロファイル形成過程が乱されると、奇形や様々な異常を誘発する。成体においてもDNAメチル化プロファイルの異常はガンや生活習慣病をはじめ多くの疾病の原因になっていると考えられる。再生医療の為の細胞の評価にもDNAメチル化プロファイルの解析は重要となる。

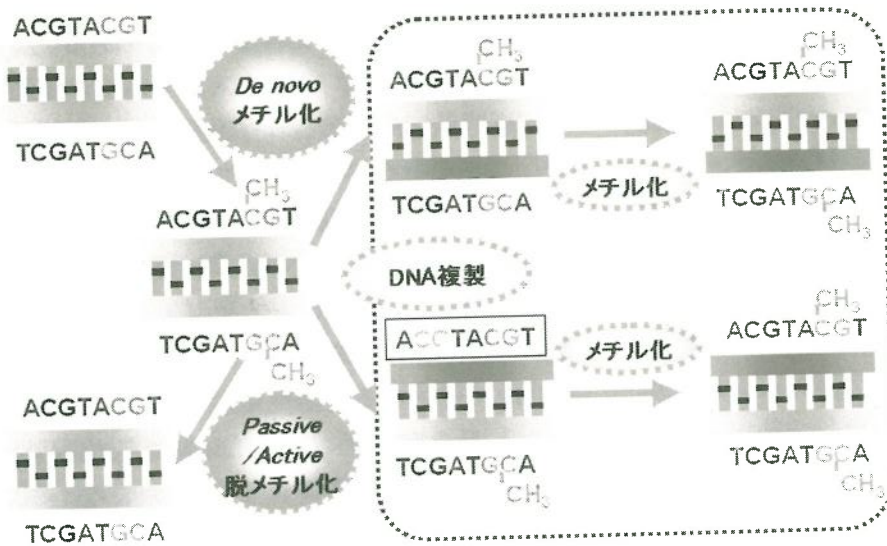


図6 DNAメチル化とメチル化パターンの維持

脊椎動物では主にCG配列を持つシトシンがメチル化される。DNAメチル転移酵素の活性には、非メチル化DNA鎖をメチル化するde novoメチル化活性と、親鎖DNAメチル化パターンを認識して新生鎖DNAをメチル化する維持活性がある。これまでに数種類のDNAメチル転移酵素が発見されている。発生や分化の過程ではDNAのメチル化と脱メチル化が起きるが、一旦分化した細胞では維持型活性により親鎖DNAのメチル化パターンが継承される。DNA複製時にDNAメチル基転移酵素が働かな居場合、新生鎖DNAは非メチル化となる。積極的に二本鎖のDNA脱メチル化が観察されているが、脱メチル化酵素は発見されていない。

用しない消極的な脱メチル化と、積極的脱メチル化の両方の経路が考えられているが、脱メチル化酵素は現在のところ発見されていない。

クロマチン構造はヒストンの化学修飾（アセチル化、メチル化、リン酸化など）により制御されている。ヒストンのアセチル化はクロマチン構造を緩ませ、脱アセチル化により凝縮する。また、ヒストンのメチル化（ヒストンH3のリジン残基など）は、クロマチンの構造を凝縮する。DNAがメチル化された領域はクロマチン構造が凝縮し、いわゆるヘテロクロマチンになり、DNA非メチル化領域はクロマチン構造が緩んだユークロマチン構造をとることになる（図1，2）。

上記のDNAメチル転移酵素やヒストン修飾酵素、あるいは、これら酵素の基質や補酵素、さらには、これらの分子の細胞内移動や分子修飾などが影響を受けた場合、細胞のゲノム機能

は不可逆的な変化を起こすことになり、ガンなど深刻な病気の原因となる⁶⁾。例えば、DNAメチル化阻害剤やヒストン脱アセチル化阻害剤などで処理することで、細胞の形質を不可逆的に変えることが可能である。また、環境汚染物質であるヒ素やコリン欠乏食はゲノム全体の低メチル化を促進し、発ガンの原因となることが示唆されている。DNAの突然変異以外に、エピジェネティクス系の異常により細胞形質の不可逆的な変化は起き得るのである（図6）。ゲノムの塩基配列変化を起こす物質を（突然）変

異原と呼ぶのに対して、エピジェネティクス変化を起こす化合物はエピ（突然）変異原（Epimutagen）と呼ばれる。環境汚染物質、食品添加物など様々な化合物の中には変異原ではないが、不可逆的な細胞形質の変化を誘導するエピ変異原が含まれているが、体系的な検査体制は整備されていない。エピジェネティクス系の異常が奇形・生活習慣病・ガンなど、様々な個体レベルの異常の原因になっていることが明らかになりつつある。

6. エピジェネティクスのポストゲノム研究における位置づけ

ポストゲノム研究として、ゲノム情報に基づくタンパク質の構造・機能解析、糖鎖の構造・機能解析、疾患と関連したSNPs解析などの研究が数年前から行われている。エピジェネティ

クスは、個体の生涯を通じて安定したジェネティクス(ゲノムDNA情報)と、瞬時に変化するRNA発現情報との中間に位置する(図7)。DNAメチル化で制御される遺伝子領域は膨大で、発生や様々な機能に関する領域を含むことは記した。したがって、DNAメチル化異常が、細胞や組織の異常(形態・機能)の原因となることは容易に予測される。このことは同時に、有用な遺伝子の探索系としてエピジェネティクス解析が有効であることも示唆している。例えば、*Sry*遺伝子のように発現量は僅かで発現時期も限定している場合、従来のRNA側からの探索法で検出することは困難であろう。これまでに明らかにされたDNAメチル化データベース(図3)には、未だに機能が解析されていない遺伝子領域が相当数含まれていることは興味深い。

8. おわりに

マウス・ヒトゲノムプロジェクト完了後、様々な生命科学分野でエピジェネティクス研究の重要性が認識され、その研究は世界的に加速している^{7), 8)}。米国ではこの数年に新たな研究分野として、様々なエピジェネティクスの研究の国家予算が相次いで創設されている⁹⁾。ゲノム上に膨大な数のDNAメチル化領域が散在していること、DNAがメチル化された遺伝子領域はクロマチン凝縮を伴い遺伝子発現が厳しく抑制される不活性化領域となること、そして細

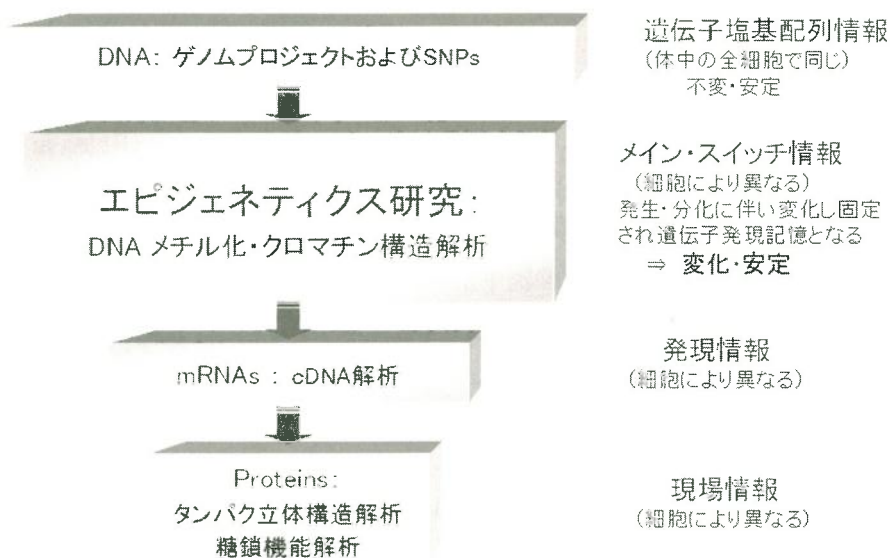


図7 エピジェネティクス研究の位置づけ

ゲノムDNAの遺伝子情報は塩基配列からなる一次情報で、そこから生物種や個体差を区別することは可能でも、細胞や組織の種類を規定することは不可能である。一方、タンパク質やmRNA発現の情報が細胞や組織ごとに解析されてきたが、それらをゲノムDNAの情報とリンクさせることはできなかった。エピジェネティクス研究は、DNAメチル化やヒストン修飾など遺伝子発現のメインスイッチであるエピジェネティック機構の解析であり、ゲノムレベルとmRNA・タンパク質レベルの情報を繋ぐことを可能とする研究領域である。

胞の種類によりゲノムの活性領域と不活性領域は異なっていることが明らかになってきた。エピジェネティクスは、ポストゲノム研究の新たなパラダイムで、品種改良、家畜繁殖、再生医療用細胞、家畜の有用遺伝子の探索系、環境汚染物質リスクアセスメント、好ましい食品開発、薬物・食品添加物安全性評価、病気の診断、創薬標的探索など、新たな基盤となることは間違いない。21世紀の生命科学領域の基盤として、ヒト、実験動物(マウス、ラット)、家畜などのゲノム全域を対象としたエピジェネティクス情報の解析とデータベース整備が重要である。

文献

- 1) Shiota, K. and Yanagimachi, R., (2002), Differentiation 69, 162-166.
- 2) 大鐘潤, 塩田邦郎 (2002) 遺伝, 別冊15号, 98-105.

- 3) Hattori, N. et al. (2004), *J. Biol. Chem.* 279, 17063-17069.
- 4) Nishino K. et al. (2004), *J. Biol. Chem.* 279, 22306-22313.
- 5) Shiota, K. et al. (2002), *Genes to Cells* 7, 961-969.
- 6) 牛島俊和ら (2003) *実験医学*21, 1538-1544.
- 7) Fazzari M. J. and Grealley J. M. (2004) *Nature Reviews* 5, 446-455.
- 8) Shiota, K. et al. (2004), *Cytogenet Genome Res* 105, 325-334.
- 9) 米国のEpigenetics関連予算 (<http://www.nci.nih.gov/>) (<http://www.nih.gov>)
 - (1) Diet, DNA methylation and other epigenetic events, and cancer prevention (Release data, September 27, 2002), (RFA, CA-03-016)
 - (2) Gene-environment effects and epigenesis in depression (Release date, April 9, 2004), (RFA-MH-05-006)
 - (3) Reproductive genetics and epigenetics (Release date, January 8, 2004), (PA-04-049)



ブレインテクノニュース

バックナンバーのご案内
第103号
2004年5月15日発行

総★説

カイコゲノム全塩基配列の解説……………三田和英・佐々木卓治

国内情報

カイコゲノムに散在するトランスポゾン……………行弘研司

昆虫ホルモンレセプター研究とカイコゲノム情報……………塩月孝博

マイクロアレイの利用によるカイコの発現遺伝子の解析

……………野田博明・三田和英・嶋田 透

SuperSAGE法による真核生物の遺伝子発現解析

……………松村英生・寺内良平

遺伝子改変マウスの環境化学物質モニターへの応用

……………高橋 智・本橋ほづみ・伊藤 健・依馬正次

搾乳ユニット自動搬送装置の開発……………平田 晃・後藤 裕
砂糖・エタノール生産のための株出多収性サトウキビ（モン
スターケーン）の開発……………杉本 明

地域の先端研究

ハナサキガニの完全養殖……………橘高二郎

非病原性フザリウム菌を用いたサツマイモつる割病の防除

……………渡邊 健

文献情報

ウシ卵管内および子宮内の局所pH ……………(抄訳：下司雅也)

脂肪酸及び脂質を多く含む魚の摂取と中年層における認識

能力の関係……………(抄訳：高見幸司)

一酸化窒素は側根発生に関係している……………(抄訳：岩井純夫)

OXIIキナーゼはシロイヌナズナの酸化的バーストを介する

シグナル伝達に必要である……………(抄訳：吉川 彰)

生研センターからのご案内

◀特集▶ 「エピジェネティクス研究の現状と展望」 2

植物分野におけるエピジェネティクスの現状

大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 基礎生物学研究所

星 野 敦 ・ 飯 田 滋

高等植物においてDNAやヒストンの化学修飾などでゲノム上に刻まれたエピジェネティックな遺伝情報は、ゲノムの安定性に寄与し、発生や環境応答を含む広範な生体機能を制御している。近年、その生成や維持に係わる分子メカニズムも急速に理解が進んでいる。ポストゲノムシーケンス時代の重要な研究課題となった、植物のエピジェネティクスの現状を概説する。

1. 書き換え可能な遺伝情報

エピジェネティクスとは、DNA塩基配列の変化を伴わずに細胞分裂を経て娘細胞や子孫に伝達される遺伝子機能の変化、さらには、この現象を探求する学問のことである^{1), 2)}。エピジェネティックな遺伝情報の担い手は、DNAのメチル化、DNAを巻き取るヒストンの化学修飾、さらにヌクレオソームに接触して複合体を形成するクロマチン因子である。哺乳類では主にCG配列内のシトシンしかメチル化されないが、植物では全てのシトシンがメチル化され得ることが知られ、全ゲノムのシトシンのうち、シロイヌナズナでは6%、トウモロコシでは25%がメチル化されている。ヒストンはアセチル化、リン酸化、メチル化、ユビキチン化などの修飾を受けるが、ヒストンH3とH4のN末端の特定のリシン残基へのメチル化とアセチル化が遺伝情報として重要だとされている。DNAのメチル化とヒストンの9番目のリシン(H3K9)のメチル化は、遺伝子発現が抑制されている凝集したクロマチン(ヘテロクロマチン)に多く見られる。ヘテロクロマチンは染色中心(クロモセーター)や、rRNA遺伝子クラスターなどに観察される。これとは逆に、非メチル化DNAとH3K4のメチル化は一般に遺伝子

HOSHINO Atsushi, IIDA Shigeru

〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町西郷中38

発現が活性なユークロマチンとの相関がある(図1)^{3), 4)}。

エピジェネティックな遺伝情報は細胞分裂時に正確にコピーされて伝達される。一般に哺乳類では世代ごとにエピジェネティックな遺伝情報がリセットされるが、植物ではリセットされずに世代を超えて伝達され得ることが知られている。この性質はエピ変異体、すなわち塩基配列は同じにも拘わらず遺伝子発現、表現型が異なる植物として観察されている。ホソバウンラン(*Linaria vulgaris*)の花形態に係わる遺伝子のエピ変異はその一例である⁵⁾。野生型の花は上下非対称であるが、エピ変異体では*cycloidea*遺伝子がDNAメチル化を伴い転写抑制されて放射状に対称な花となる。このエピ変異は250年前にリンネが観察しており、現在までメチル化と転写抑制状態が維持されてきたことになる。

このような安定性とは裏腹に、しばしば可逆的に変化して遺伝子機能に影響することがエピジェネティックな遺伝情報の特質である。この可塑性により生じる遺伝子発現の不安定性は非メンデル遺伝現象の一因ともなっており、古くから研究されている。マクリントックが発見したトランスポゾンの活性変化のほか、パラ変異(paramutation)、アントシアニン色素生合成を制御するR遺伝子のインプリンティングなど、トウモロコシでの非メンデル遺伝現象が代

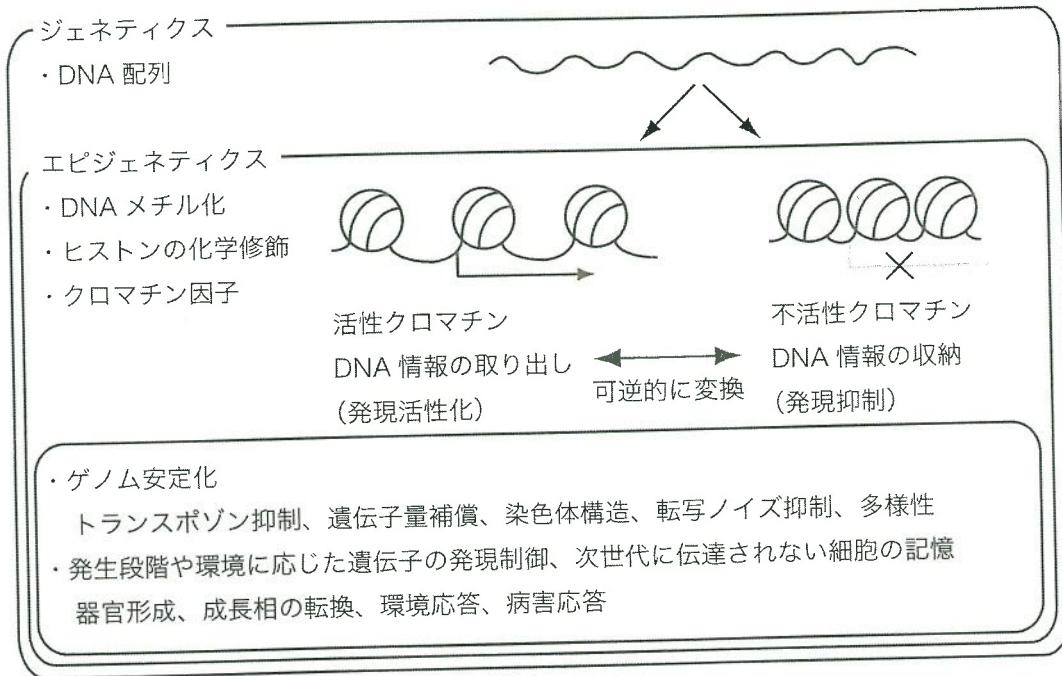


図1 植物分野におけるエピジェネティクス

エピジェネティックな遺伝情報は可逆的に変換し、DNA配列情報の取り出しと収納により様々な生体機能を制御している。

表例である^{11, 4)}。1990年代には導入遺伝子と導入遺伝子に相同な内在性遺伝子の双方が抑制されるコ-suppressionやパラ変異が形質転換植物でも観察されている。さらに植物は可塑性を利用して様々な生体機能を巧みに制御していることが、最近の研究から分かってきている(図1)。とくにシロイヌナズナにおいて種子や花の発生、成長相の転換と維持、胚乳で見られるインプリンティングの制御に関する解析が進ん

でいる^{6)~12)}。これら生体機能の制御に係わるエピジェネティックな遺伝情報の変化については世代を越えた伝達は見出されず、一代限りの細胞の記憶として働いている。

2. エピジェネティックな遺伝情報を制御する分子機構

シロイヌナズナの変異体の解析から、エピジェネティックな遺伝情報の確立とその維持、生体機能の制御機構が急速に明らかにされつつあるので、その現状を概説する。

2.1 DNAメチル化

DNAのメチル化には、DNA複製直後に新たに合成されたDNA鎖をメチル化する維持型メチル化と、メチル化されてい

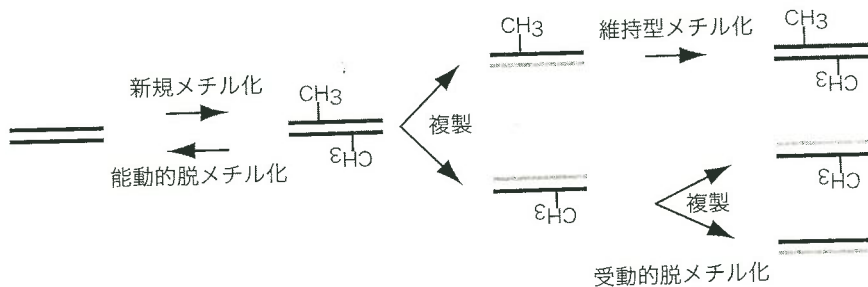


図2 真核生物ゲノムのDNAメチル化

DNAメチル化には、メチル化されていないDNAの新規メチル化と、複製後のヘミメチル化状態のDNAに対する維持型メチル化がある。脱メチル化には複製後のDNAに維持型メチル化が起こらない受動的経路と、酵素反応により積極的にメチル化DNAを取り除く能動的経路がある。

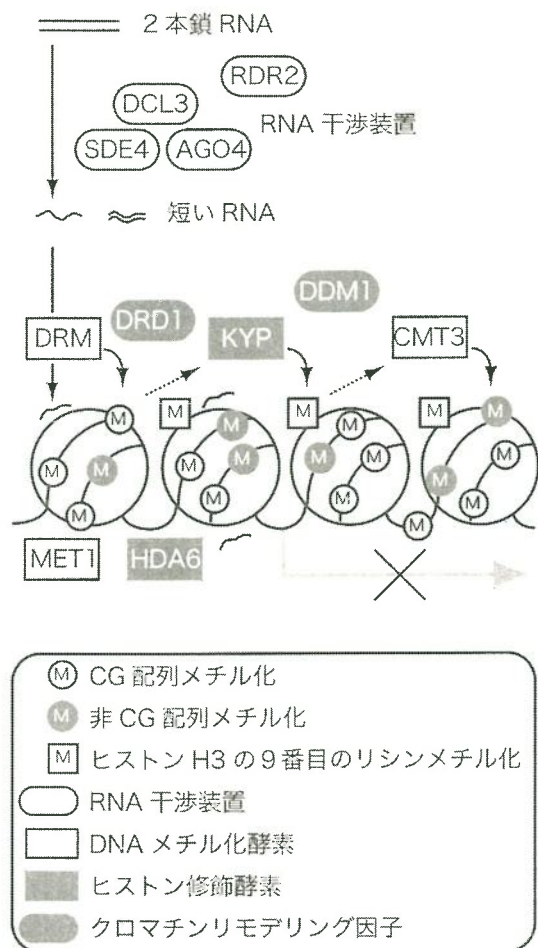


図3 RNAに依存した塩基配列特異的なDNAメチル化機構

2本鎖RNAがRNA干渉装置により短いRNAに分解され、その配列に相同なDNA配列が新規メチル化を受ける。さらに二次的にDNAとヒストンの修飾酵素などが働いてヘテロクロマチン化が進むと考えられている。

ないDNAを新たにメチル化する新規 (*de novo*) メチル化があり、それぞれに異なるDNAメチル化酵素が働いている (図2)。進化的に保存されているCG配列への維持型メチル化はMET1 (METHYLTRANSFERASE1) が主役であり、CG以外の配列のメチル化酵素としてCMT3 (CHROMOMETHYLASE3)、新規メチル化を行うDRM1, 2 (DOMAIN REARRANGED METHYLASE1, 2) も同定されている。*met1* 変異体では各種の発生異常が観察されるが、*cmt3*や*drm1*, 2二重変異体では目立った異常は報告されておらず、CG配列の維持が生体機能

の正常な発現に重要らしい^{3) 4)}。

DNAメチル化の維持には、メチル化酵素のほかにクロマチンリモデリング因子であるDDM1 (DECREASED IN DNA METHYLATION1) が重要な役割を担っている¹³⁾。*ddm1* 変異体ではCG配列、非CG配列のメチル化が低下するため、トランスポゾンの活性化、各種の遺伝子の異所的な発現などが見られる。異所的な発現をする遺伝子には、4番染色体にクラスターをなす病害抵抗性遺伝子も含まれる¹⁴⁾。DDM1やMET1の欠損によりメチル化が低下したDNAは、野生型個体と交配してDDM1やMET1を補っても速やかに回復することはない。数世代を経ても回復しないことから、いちど確立したエピ変異座はDNA配列が変化した突然変異とおなじようにメンデル遺伝する。

一方、メチル化の消去にはDNA複製時にメチル化を維持しないことで行われる受動的脱メチル化と、酵素の作用により積極的に消去する能動的脱メチル化の2つの経路が存在する (図2)。ある種のDNAの脱メチル化は、DNAグリコシラーゼドメインをもつDME (DEMETTER) やROS1 (ROSS OF SILENCING1) がDNAの修復経路を利用して働くと考えられている^{11), 15)}。

2.2 ヒストンのメチル化と脱アセチル化

ヒストンH3の9番目のリシンのメチル化 (H3K9^{Me}) は、広い生物種でヘテロクロマチン領域に見出されて遺伝子の転写抑制と相関がある。KYP (KRYPTONITE) は進化的に保存されたH3K9のメチル化酵素であり、シロイヌナズナに29種存在するヒストンメチル化酵素の中でも主要な役割を担っている¹⁶⁾。H3K9メチル化とDNAメチル化は相互に促進してクロマチンの凝集に係わることが示唆されているが (図3)、ヘテロクロマチン構造の維持にはDNAとH3K9のメチル化以外の因子も必要である¹⁷⁾。

一方、ヒストンの脱アセチル化も遺伝子抑制との相関がある。ヒストン脱アセチル化酵素で

あるHDA6の欠損変異体では、後述のRdDM (RNA-directed DNA methylation) により転写抑制された遺伝子領域でDNAメチル化の低下と転写の回復が見られる¹⁸⁾。

2.3 RNAに依存した配列特異的なDNAのメチル化

DNAメチル化などが特定のゲノム領域に限定される塩基配列特異性はどのように決まるのであろうか。植物では2本鎖のRNAを発現させるとセントラルドグマに逆行して、その配列に対応するゲノムDNAをメチル化するRdDMと呼ばれる現象が働いている¹⁹⁾。たとえば人工的にプロモーター配列に対応する2本鎖RNAを転写させると、プロモーター配列のDNAはメチル化されて下流の遺伝子は転写抑制される(図3)。

これまで述べてきたDNAやヒストンの修飾に係わる因子のほか、RNA干渉装置がRdDMには必要である^{20) 21)}。2本鎖RNAは21-26塩基のRNAに分解されたのち、ガイド役となって相同なDNA配列のメチル化を誘導すると考えられている^{3), 4)}。

これまでのところ全ての塩基配列特異的なDNAメチル化にRdDMに係わるのか、それとも他の機構が植物に存在するのかは明らかではないが、少なくとも染色中心やrRNA遺伝子領域でRdDMが作用しているという証拠は未だ得られていない。アカパンカビなどではDNAの繰り返し配列が相同なDNA配列をメチル化する機構が知られており²²⁾、DNA配列間の相互作用やDNAの高次構造などがメチル化を誘導する機構が存在するのかも知れない。

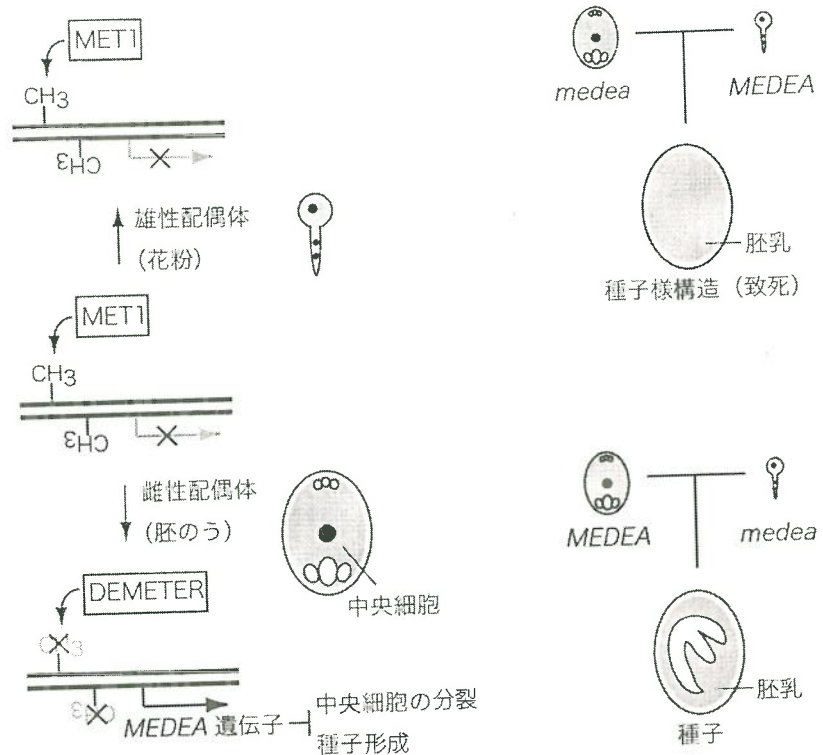


図4 MEA遺伝子のインプリンティング

MEA遺伝子の活性化は、DMEに依存して雌性配偶体でのみ特異的に起こり、中央細胞の分裂と種子形成を抑制されている(左)。MEAの欠損が母親ゲノムから由来すると抑制が起こらずに種子様の構造体が発生するが(右上)、欠損が父親ゲノムに由来しても正常な種子が形成される(右下)。

2.4 DNAメチル化と生体機能の制御

ゲノムインプリンティングは父親もしくは母親のどちらか一方に由来する遺伝子を発現させる機構であり、植物では胚乳に特異的な現象となっている(図4)。胚乳で母親由来のアレルだけが特異的に発現するFWAとMEDEA (MEA) 遺伝子はMET1に依存したDNAメチル化により抑制されることが示唆されており、これらの遺伝子の活性化には先に述べたDMEが必要である。DMEは受精後に胚乳に分化する雌性配偶体の中央細胞で発現してDNAの脱メチル化に働くらしいが、その機構は明らかではない。^{11), 12), 23)}。

2.5 クロマチン因子と生体機能の制御

シロイヌナズナの発生異常を示す変異体の解



図5 春化による体細胞記憶の書き換え

花成を抑制する *FLC* 遺伝子は長期の低温処理によりエピジェネティックな遺伝情報が書き換えられて転写抑制される。

析から、各種クロマチン因子の遺伝子が相次いでクローン化されている。興味深いことにクローン化された遺伝子の多くはポリコーム群タンパク質など転写抑制に係わる因子をコードすることが予測されている^{6), 7), 10)}。これらのクロマチン因子は発生段階や環境に応じて遺伝子の転写を抑制し、器官形成や成長相の転換に係わっている。たとえば花成の抑制遺伝子である *FLOWERING LOCUS C (FLC)* の発現は、春化によりヒストンH3のメチル化を伴って転写抑制される(図5)。ポリコーム群タンパク質である *VERNALIZATION2 (VRN2)* やヒストンの脱アセチル化因子の欠損変異体では *FLC* 遺伝子の抑制が起こらずに開花遅延が起こることから、これらのタンパク質も *FLC* 遺伝子のエピジェネティックな抑制に働くことが示唆されている^{8)~10)}。シロイヌナズナは長い冬を経験したという記憶をクロマチン構造に書き込んで、栄養成長から生殖成長への成長相転換を促進しているらしい。外的環境がエピジェネティックな遺伝情報を書き換える点で、たいへん興味深い。また、胚乳でインプリントされた *MEA* 遺伝子もポリコーム群タンパク質をコー

ドし、ほかのポリコーム群タンパク質と複合体を形成して配偶子から孢子体への成長相の転換、種子とさやの発生を制御する。これらのタンパク質の欠損が母親から遺伝すると、受精を経ずに雌性配偶体の中央細胞が分裂を開始して種子形成、さやの伸長が起こるが卵細胞は複製しないために致死となる。受精した場合にも胚乳が異常増殖した種子様の構造を形成して致死となる(図4)⁷⁾。 *MEA* などのターゲットとして *MADS* ドメインを持つ転写因子が同定されており、その遺伝子のプロモーターへの *MEDEA* を含む複合体の結合が示されている²⁴⁾。

3. おわりに

植物のエピジェネティクスは、トウモロコシなどで観察された非メンデル遺伝現象の解析に始まり、特殊な遺伝子発現制御の問題として研究が進化した¹⁾。そのためエピジェネティックな遺伝子発現制御は、トランスポゾンや導入遺伝子あるいは倍数化などで生じる細胞にとって好ましくない転写や組換えを抑制する「ゲノム安定化」との関連から論じられることが多かった(図1)。しかし、高等植物のモデル植物であるシロイヌナズナの研究から、エピジェネティックな遺伝情報の可塑性を利用して器官形成や成長相転換に係わり、環境に应答する植物の巧みな生存戦略の理解が進んでいる。最近開発されつつある全ゲノム配列を20数bpのオリゴヌクレオチドで網羅するマイクロアレイ(tiling array)を用いてゲノム全体のDNAやヒストンのメチル化などの動態を調べる手法からも^{25), 26)}、エピジェネティックな遺伝情報の機能に関して今後多くの新発見があるであろう。

イネは世界の半数以上の人々の主食で、本年末には穀類では最小(430 Mb)なゲノム配列の詳細が明らかにされる予定である。穀類のモデル植物として、ジェネティックな観点からイネ固有の遺伝子の機能を解明する機能ゲノム学的研究が世界中で推進されているが、本稿で述べたようなエピジェネティクスはほとんど行わ

れてはいない。我国はイネゲノムの半分以上の配列解析を担い、イネの機能ゲノム学的解析の技術的展開においても主要な貢献をしてきた。ゲノム配列情報の発現を制御するエピジェネティックな遺伝情報は、高等植物の種々の生体機能に対してゲノム配列情報と同様に重要な役割を果たしていると考えられ、その解析はポストゲノム時代の最重要課題の一つである。イネゲノムはシロイヌナズナの約3倍強（トウモロコシは約20倍）なので、tiling arrayなどを適用してゲノム全体を解析することも可能になる。シロイヌナズナばかりでなくイネなど有用植物のエピジェネティクスの今後の展開に興味と関心を持って頂ければ望外の喜びである。

文 献

- 1) Russo, V. E. A. et al Eds. (1996), *Epigenetic mechanisms of gene regulation*, Cold Spring Harbor Press, New York
- 2) 佐々木裕之編 (2004), *エピジェネティクス*, シュプリンガー・フェアラーク, 東京
- 3) Tariq, M. et al. (2004), *Trends Genet.*, 20, 244-251.
- 4) Bender, J. (2004), *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 41-68.
- 5) Cubas, P. et al. (1999), *Nature*, 401, 157-161.
- 6) Wagner, D. (2003), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6, 20-28.
- 7) Hsieh, T. F. et al. (2003), *Trends Plant Sci.*, 8, 439-445.
- 8) Sung, S. et al. (2004), *Nature*, 427, 159-164.
- 9) Bastow, R. et al. (2004), *Nature*, 427, 164-167.
- 10) Sung, S. et al. (2004), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7, 4-10.
- 11) Choi, Y. et al. (2002), *Cell*, 110, 33-42
- 12) Kinoshita, T. et al. (2004), *Science*, 303, 521-523.
- 13) Jeddelloh, J. A. et al. (1999), *Nature Genet.*, 22, 94-97.
- 14) Stokes, T. L. et al. (2002), *Genes Dev.*, 16, 171-182.
- 15) Gong, Z. et al. (2002), *Cell*, 111, 803-814
- 16) Jackson, J. P. et al. (2002), *Nature*, 416, 556-560.
- 17) Tariq, M et al. (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 8823-8827
- 18) Aufsatz, W. et al. (2002), *EMBO J.*, 21, 6832-6841.
- 19) Mette, M. F. et al. (1999), *EMBO J.*, 18, 241-248.
- 20) Zilberman, D. et al. (2003), *Science*, 299, 716-719.
- 21) Chan, S. W. L. et al. (2004), *Science*, 303, 1336.
- 22) Selker, E. U. (2002), *Adv. Genet.*, 46, 439-450.
- 23) Xiao, W. (2003), *Dev. Cell.*, 5, 891-901.
- 24) Kohler, C. et al. (2003), *Genes Dev.*, 17, 1540-1553.
- 25) Mantripragada, K. K. (2004), *Trends Genet.*, 20, 87-94.
- 26) Ecker, J. R. (2004), *Genome-wide studies using Arabidopsis*. 第12回国際イネゲノムフォーラム, つくば

◀特集▶「エピジェネティクス研究の現状と展望」3

マウス単為発生胚の誕生 —哺乳類の生殖戦略—

東京農業大学 応用生物科学部 バイオサイエンス学科

河野友宏

これまでに、受精系を介した繁殖技術は、体外受精をはじめとして、すでに応用化されているものが多い。また、体細胞クローンも、雌雄ゲノムを持つ体細胞核から生産される。哺乳動物では、雄あるいは雌のゲノムの存在が不可欠であるために、単為生殖による個体生産技術は、全く不可能と考えられていた。しかし、ゲノミックインプリンティングを改変することにより、母性ゲノムのみから個体を発生させることに成功した。本稿では、単為発生マウス誕生の過程を示し、その生物学的意味と可能性について考察する。

1. はじめに

すべての生物は多様な生殖戦略を模索し、よりリスクの少ない生殖方法を選択して子孫繁栄に努め現在に至っている。高等生物が営んでいる最も典型的な生殖方法は有性生殖であり、卵子と精子が受精して新しいゲノム構成を持つ新個体を生じるものである。一方、雌の生殖細胞である卵子が単独で新個体を形成する単為生殖も、やはり有性生殖に含まれる。単為生殖は、昆虫、魚類、爬虫類等において広く観察されており、全く放棄してしまったのは哺乳類のみである。鳥類ですら、単為生殖により個体が生じることは家禽繁殖学の教科書にも記されている。生殖効率の観点から見ると、両性の配偶子を必要とするコスト高の有性生殖方法に比べ、単為生殖は明らかに効率の良い生殖方法である。にもかかわらず、哺乳類はなぜこの生殖方法を完全に放棄したのであろうか。視点を雌から雄に変えて見れば、個体発生に対する雄ゲノムの寄与を不可欠なものとしている仕組みを構築したとも考えられる。

われわれ研究者は、哺乳類の放棄した生殖方法、すなわち‘クローン集団を作るための無性生殖’や‘単為生殖’を核移植技術の応用によ

KONO Tomohiro

〒156-8502 世田谷区桜丘1-1-1

ってあらゆる動物種で試み、哺乳類の生殖細胞の特性や機能の解明に取り組んでいる。本稿では、それらについて紹介させて頂きたい。

2. 哺乳類の特性とゲノミックインプリンティング

哺乳類の個体発生には、精子および卵子に由来する両ゲノムの寄与が不可欠である。大多数の遺伝子は精子および卵子に由来する遺伝子座から等しく発現しているが、哺乳類では、一部の遺伝子ではあるが、母親と父親のどちらに由来したかにより対立遺伝子の発現が著しく異なっている。このような遺伝子発現は、後成的な遺伝子修飾（エピジェネティクス）機構であるゲノミックインプリンティング（遺伝子刷り込み）により制御されていることが明らかにされた¹⁾。片親性発現を示す遺伝子はインプリント遺伝子と呼ばれ、100~200程度存在すると推定されている。したがって、雌ゲノムのみから構成される単為発生胚では、母親アレル発現をするインプリント遺伝子は過剰発現し、一方父親アレル発現するインプリント遺伝子は発現が抑制されているために、正常な個体発生を遂げることができないと説明される²⁾。

ゲノミックインプリンティングの分子生物学的制御機構の実態は、配偶子の形成過程で遺伝

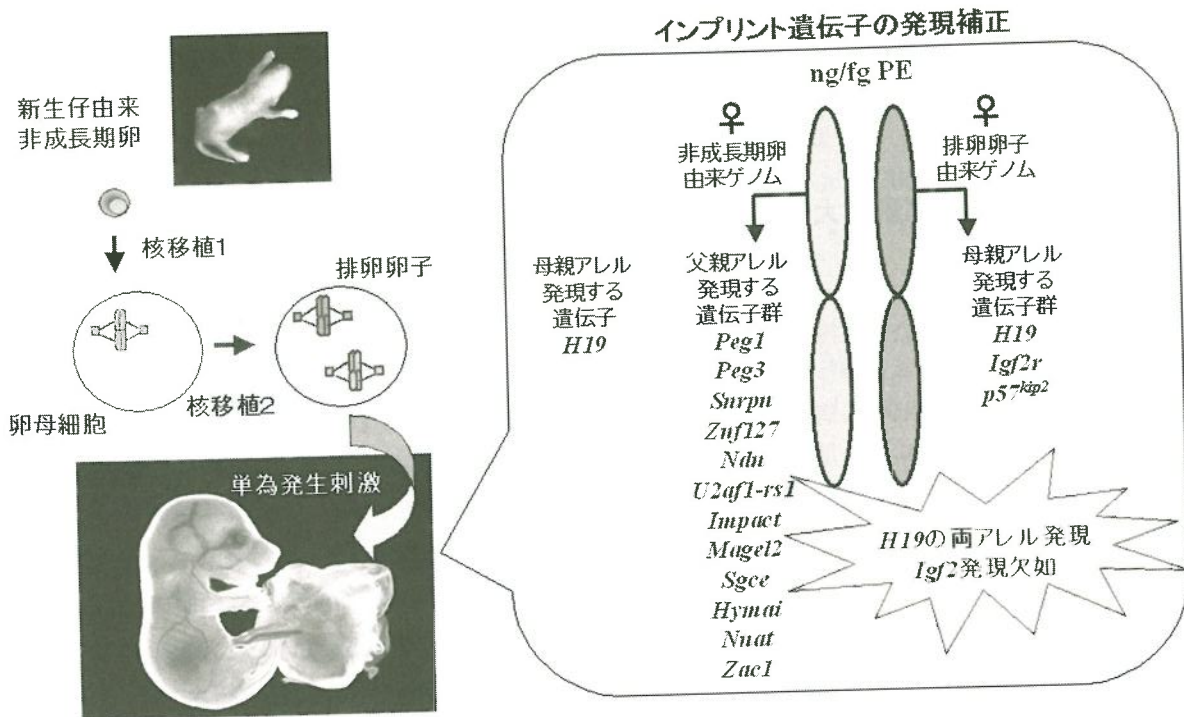


図1 ゲノム修飾的人為的改変により発生延長したマウス単為発生胚におけるインプリント遺伝子の発現

子の発現制御領域に対して行われるDNAメチル化修飾であると考えられている。雌雄生殖系列では独自に、その性に従ったDNAメチル化修飾が行われていることになる。このマークは、遺伝子配列上の情報とは異なり、世代ごとに生殖細胞形成過程でリセット(リプログラミング)される^{3), 4)}。体細胞クローンで頻発する発生異常もこのような後成的遺伝子修飾のリプログラミングの異常と捉えることもできる⁵⁾。

3. 単為発生マウス誕生の謎解き

上述したように、ゲノミックインプリンティングの情報は生殖細胞形成過程で刷り込まれる。このことは、未発育の生殖系列細胞ではゲノミックインプリンティングの情報が刷り込まれていないことを意味している。事実、誕生直後の新生仔マウス卵母細胞では、どうやら全く情報の刷り込みが行われていない⁶⁾。さらに、雌の生殖系列で発現制御されるインプリント遺伝子の数は、雄の生殖系列において制御される

インプリント遺伝子の数に比べ、圧倒的に多いことが分かってきた。そこで、卵子の操作技術を駆使して、新生仔卵母細胞に由来する半数体ゲノムと、正常卵子の半数体ゲノムを持つ2倍体単為発生胚 (ng/fg PE) を作成して、その発生が調べられた。その結果、正常な卵子ゲノムのみから作成された2倍体単為発生胚 (fg/fg PE) では、臓器形成前の妊娠初期で致死になるのに対し、ng/fg PEでは、雌側で制御されている遺伝子のおそらくすべてにおいて発現の逆転が生じ、ほぼ臓器形成が認められる妊娠中期にまで発生延長することが明らかとなった(図1)^{6), 7)}。

しかしながら、雄側すなわち精子形成過程で発現制御を受けるインプリント遺伝子の発現には、当然のことながら何ら変化が生じない。雌アレルにおけるそれらの遺伝子発現を改変するには、対象となる遺伝子を欠損させるターゲットイング操作が必要となる。幸い現在までのところ、雄側で発現制御を受けることが確認されているインプリント遺伝子は2セット4遺伝子に

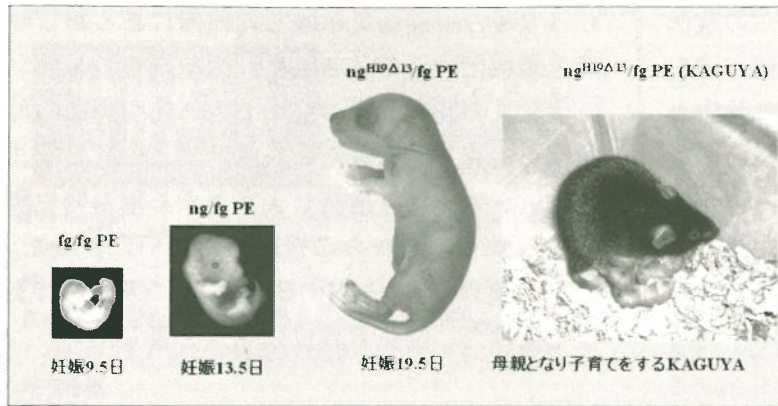


図2 マウス単為発生胚の発生延長

過ぎない^{8), 9)}。そこで、胎仔の成長を調節する重要な遺伝子であるインスリン様成長因子II型 (Insulin like Growth Factor II, *Igf2*) およびその下流に位置する *H19* 遺伝子 (タンパクをコードしていない) に焦点を絞り、遺伝子ターゲティングマウスを用いて、それらの発現を雄型に改変する試みが行われた。*Igf2* 遺伝子は雄 (精子由来) アレルから、一方 *H19* 遺伝子は雌 (卵子由来) アレルからそれぞれ発現している。都合の良いことに、両者の発現調節は *H19* 遺伝子の上流部に位置する一カ所の制御領域で行われている。そこで、*H19* 遺伝子本体とその上流の制御領域をあわせて欠損させたマウスを用いて、実験が行われた。

このようにして作成された単為発生胚 ($ng^{H19\Delta 13}/fg$ PE) は、期待通り新生仔卵母細胞由来のゲノムからは、本来発現するはずのない *Igf2* 遺伝子が発現し、逆に *H19* 遺伝子の発現は認められなくなった。つまり、精子由来のゲノムからの遺伝子発現パターンに、より近づいたことになる。そして驚くべきことに、妊娠満期までの発生を遂げることができた。さらに、そのうちのごく少数ではあるが、全く正常と思われる新生仔が誕生したのである (図2)。ハイスループットの遺伝子発現解析法である cDNA マイクロアレイ法で 11,000 遺伝子の発現を解析したところ、この単為発生胎仔では大多数の遺伝子で発現が正常化していたのである (図3)。このようにわずか2つの遺伝子の発現制御が、

広範な遺伝子の発現を正常化し、個体発生を導いたことには驚くほかはない¹⁰⁾。

“KAGUYA” と名付けられた単為発生マウスは、すくすくと成長し、成熟した雌個体となって正常な産仔を分娩した。エピジェネティクスによる遺伝子発現調節が、哺乳類の個体発生を支配している決定的な証拠となった。なお、“KAGUYA” は本来の単為発生の定義からは

み出しているが、雌だけのゲノムから発生したマウスであることに間違いはない。現時点では、正確に表現する科学用語はなく、単為発生マウスとさせていただいたことをご理解頂きたい。

4. 性と“KAGUYA”誕生の意味

“KAGUYA” の誕生は、ゲノムレベルにおける雌雄の競合を示した良い例であろう。上述を例にとってみれば、雄の生殖細胞が *H19* および *Igf2* 遺伝子の発現制御機構を獲得したことによって、ほ乳類の雌は卵子のみで単為生殖個体を誕生させることができなくなったのではないかと解釈できる。個体発生という最もダイナミックな生命現象において、あたかも雌雄ゲノムはそれぞれの意志を持ち、自らの遺伝情報を如何に効率的に次世代へ伝達するかを競っているかのようにも

A B



図3 cDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

11,000の遺伝子の発現量を妊娠12.5日胎仔各4例で比較した。A; 妊娠13.5日で致死となる ng/fg PE, B; *H19* 遺伝子の欠損を導入し、個体発生可能となった $ng^{H19\Delta 13}/fg$ PE。

見える。少なくとも哺乳類の雄は、自らの遺伝情報を例外なく確実に子孫に伝える生殖方法を獲得したのである。一方、母性側からは胎生となったために生じた妊娠による自身の生命の危険性を可能な限り軽減しようとしている姿が垣間見える。雌雄それぞれの利害関係を主張しあった結果、受精による生殖方法が選択され、単為生殖は排除されたのであろうか。

5. 応用への可能性

“KAGUYA”が誕生し、単為生殖が様々なバイオテクノロジー分野で貢献する可能性が見いだされた。現在考えられる応用の可能性を以下にまとめてみた。

- a) 哺乳類における新たな個体生産システムにより有用動物の育種、および雌雄個体の選択的生産技術（雌雄の産み分け等、雌個体のみ又は雄個体のみを選択的に作成する技術）等のバイオテクノロジー分野の発展に貢献する可能性を示している。
- b) 生殖系列細胞におけるゲノムの機能獲得機構の解明に大きく貢献し、生殖細胞の高度利用に繋がる新しい視点を提供している。
- c) 体細胞クローンなどで発症している発生異常と後成的な遺伝子修飾の変化による遺伝子発現異常との関連についての解明に貢献する。
- d) 哺乳動物の個体発生に対する雌雄ゲノムの役割を解き明かすことに繋がるものと期待される。
- e) 幹細胞テクノロジーは、再生医療の領域で重要な研究課題となっており、単為発生胚に正常に近い性質を持たせることができれば、幹細胞を作成する胚として適切な材料となり得る。

5. おわりに

この研究は決して完結したものではなく、む

しろ今後の可能性を示唆した段階にある新しい研究領域といえる。さらに、生殖細胞のエピジェネシスの制御機構の解明と人為的な調節の可能性を追究して行きたい。哺乳類における第3の生殖システムを構築しようとする単為発生研究は、多くの方からご援助いただいた。また、2002年度からBRAINの研究課題に採択され支援を受けた。関係者各位に謝意を表したい。

文 献 等

- 1) http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/imprinting/all_impmaps.html
- 2) Monk, M. (1987), *Nature*, 328, 203-204.
- 3) Tada, M., Tada, T., Lefebvre, L., Barton, S.C. and Surani, M.A. (1997), *EMBO J.* 16, 6510-6520.
- 4) Obata, Y. and Kono, T. (2002), *J Biol. Chem.*, 276, 26694-26698.
- 5) Ogawa, H., Ono, Y., Shimozawa, N., Sotomaru, Y., Katsuzawa, Y., Hiura, H., Ito, M. and Kono, T. (2003), *Reproduction*, 126, 549-557.
- 6) Kono, T., Obata, Y., Yoshimizu, T., Nakahara, T. and Carroll, J. (1996), *Nat. Genet.* 13, 91-94.
- 7) Obata, Y., Kaneko-Ishino, T., Koide, T., Takai, Y., Ueda, T., Domeki, I., Shiroishi, T., Ishino, F. and Kono, T. (1998), *Development*, 125, 1553-1560.
- 8) Leighton, P.A., Ingram, R.S., Eggenchwiler, J., Efstratiadis, A. and Tilghman, S.M. (1995), *Nature*, 375, 34-39.
- 9) Schmidt, J.V., Matteson, P.G., Jones, B.K., Guan, X.J. and Tilghman, S.M. (2000), *Genes Dev.*, 14, 1997-2002.
- 10) Kono, T., Obata, Y., Wu, Q., Niwa, K., Ono, Y., Yamamoto, Y., Park, E.S., Seo, J.S. and Ogawa, H. (2004), *Nature*, 428, 860-864.



ブレイン テクノニュース
バックナンバーのご案内
第102号
2004年3月15日発行

総説

食の安全と安心のための減農薬を目指した病虫害防除
技術の普及状況と研究開発の現状……………梅川 學

国内情報

昆虫変態の鍵をにぎる幼若ホルモン合成酵素遺伝子の発見と
その意義……………篠田徹郎
黒毛和牛のおいしさの主要因としての和牛香とその構成成分
……………沖谷明紘
組換え技術の信頼性向上を目指して—SDIシステムによる
ゲノム操作技術の開発—

……………海老沼宏安 南藤和也・渡邊恵子
新種ツノシマクジラの発見……………和田志郎

地域の先端研究

内生細菌を用いたトマト土壌病害の防除……………相野公孝
土着天敵を活用した難防除害虫ミナミキイロアザミウマ
の総合的管理……………永井一哉

文献情報

胚性幹細胞からの胚性生殖細胞および雄性配偶子の誘導
……………(抄訳：下司雅也)
養殖サケにおける有機汚染の世界評価……………(抄訳：森 徹)
小さなRNAの大きな仕事 ……………(抄訳：岩井純夫)
酵母*S. cerevisiae*のTH15遺伝子ファミリー ……(抄訳：家藤治幸)

海外便り

果樹の画期的生育制御技術の開発に向けて
—イギリス・国際園芸研究所での1年間—
……………草場新之助

生研センターからのご案内



ブレイン テクノニュース
バックナンバーのご案内
第101号
2004年1月15日発行

総説

生分解性プラスチックからバイオマス（由来）プラスチックへ
……………木村俊範

国内情報

農業・食品副産物からの生分解性素材の開発……………五十部誠一郎
木質系機能性プラスチック……………平林靖彦
木質資源からのバイオエタノール生産—超臨界水及び
亜臨界水処理による木材の高速化学変換—
……………松永正弘・松井宏昭・清水孝浩・山本誠一
植物の生長を決める巧妙な仕組み—エチレンシグナルと
糖シグナルのクロストーク—……………柳澤修一
リング由来ポリフェノールによるガン予防効果

……………庄司俊彦・三浦富智・佐藤達資・
樋廻博重・神田智正・池田満雄
傾斜地果樹用多目的モノレール（回行式）の開発 ……金光幹雄

地域の先端研究

ブタ胚の耐凍性を飛躍的に向上させる凍結保存方法の開発
……………牛島 仁・中根 崇・長嶋比呂志

文献情報

異種移植と体外培養を組み合わせる原始卵胞から得た
ブタ体外受精卵……………(抄訳：下司雅也)
ノーウォークウイルス感染に対する感受性と抵抗性
……………(抄訳：秦 淳一郎)
Ca²⁺：セカンド それとも ファースト ……(抄訳：岩井純夫)
LC/MSによるグラマーナ・バターノ・チーズ中のオリゴ
ペプチド分析……………(抄訳：松浦啓一)

海外便り

フランスでのウシ骨格筋の特徴についての研究と牛肉生産
—フランス国立農業研究所（INRA）における1年間—
……………上田靖子

生研センターからのご案内

◀国内情報▶

分画したダイズタンパク質の機能性とダイズ種子
プロテオームデータベースの構築

京都大学大学院農学研究科

森 山 達 哉 ・ 丸 山 伸 之

ダイズタンパク質を分画し、マウスを用いた動物実験に供したところ、 β -コングリシニン（7Sグロブリン）画分に脂質代謝適正化能や血糖値低下能がある事が判明し、そのメカニズムや付随する生体応答を解析した。次に、この機能性を有する β -コングリシニンの質的・量的な品種間多様性を明らかにするために約5800種のダイズ種子のプロテオームを解析し、他の情報とともにデータベース化し、ウェブ上に公開した。このダイズ品種の網羅的解析によって、ダイズタンパク質の新規な分子種の発見・構造解析に成功した。

1. はじめに

ダイズ種子の含有するタンパク質（ダイズタンパク質）は、アミノ酸スコアや加工特性に優れており、さまざまな食品素材や添加剤として多用されている。また、多彩な生理機能性を有していることも知られており、健康増進に有用な食品素材としても確立されている。生理機能性のうち、最も良く知られているのは血清コレステロール値低下作用などの脂質代謝適正化能である。ダイズ種子貯蔵タンパク質は大きく分けて2つの主要な画分、 β -コングリシニン（7Sグロブリン）とグリシニン（11Sグロブリン）からなる。前者は α 、 α' 、 β の3つのサブユニットからなり、後者はA鎖、B鎖からなる。このほかにもさまざまなタンパク質分子種が存在しており、それらの構成は品種間で多様性を示す。

このような多様な構成タンパク質の異なる成分には、それぞれに特徴的な機能性が隠れているのではないかという観点から、分画されたダイズタンパク質の機能性を解明する研究が近年行われてきた。著者らもマウスの脂質代謝やホルモンレベルの変動に及ぼす分画ダイズタンパク質の効果を解析した¹⁻³⁾。また、平行して

MORIYAMA Tatsuya, MARUYAMA Nobuyuki

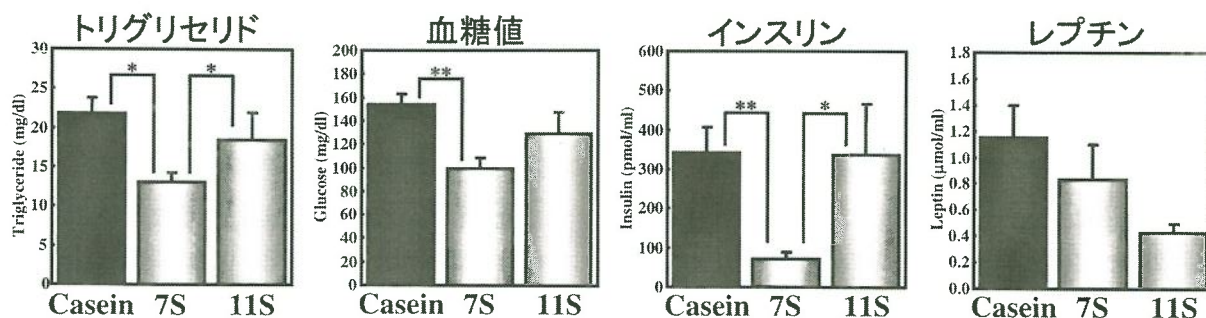
〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄

ダイズタンパク質の構成成分の量的質的多様性解明の情報基盤としてプロテオームデータベースを構築した。このようなダイズタンパク質中の特徴的な構成分子の機能性の解析やその存在量のデータベース化は、ダイズの有する特別な用途を開拓するとともにその用途に資するための有用品種の選定を効率化するための強力な情報源となると考えられる。

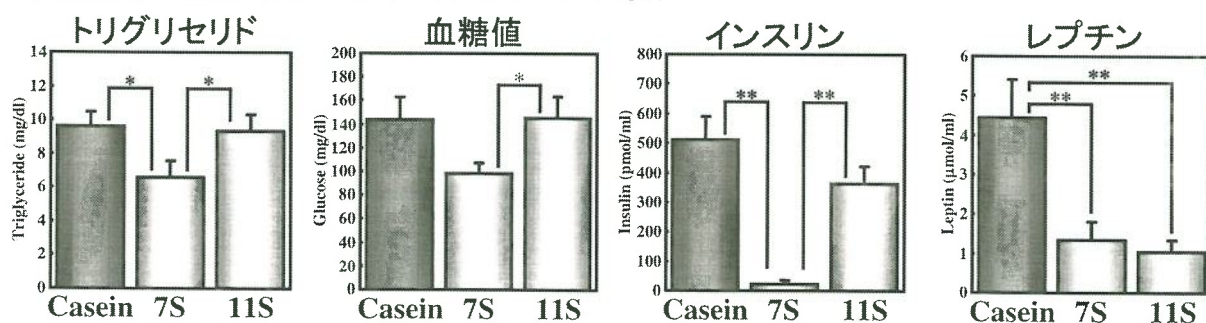
2. 分画したダイズタンパク質（ β -コングリシニン）の生理機能性^{1)~3)}

ダイズから β -コングリシニンを分画し、これを正常マウス及び肥満・糖尿病モデルマウスに制限食条件下で2週間与えた¹⁾。その結果、コントロールであるカゼイン群と比べ、 β -コングリシニン食群では血清トリグリセリド（中性脂肪）濃度や血糖値、血清インスリン濃度などが低下した（図1）。そのメカニズムを解析するために、脂質代謝の中心臓器である肝臓の脂質代謝関連酵素活性を調べた。その結果、脂肪酸 β -酸化系の酵素活性が上昇し、反対に脂肪酸合成酵素（FAS）の活性が低下していた。また、糞中のトリグリセリドレベルも β -コングリシニン食群で高い傾向が見られた。これらの複数の作用点で血清トリグリセリド濃度が低下したことが示唆された。興味深いことに、こ

(A) 正常マウス(ICR系)



(B) 肥満・糖尿病マウス(KK-Ay系)



7S: β -コングリシニン
11S: グリシニン

Each value shows mean \pm S.E. Significantly different from Casein group with dunnett's test *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (n = 9 or 10)

図1 分画したダイズタンパク質食による血清パラメータの変動

コントロール群であるカゼイン食群と比べて、ダイズ β -コングリシニン食群では多くのパラメータが変動した。

のような脂質代謝調節能はもう一方の画分であるグリシニンではほとんど見られなかった。以前から、ダイズタンパク質食によって血清のコレステロールレベルのみならずトリグリセリドレベルも低下させる効果が指摘されていたが、今回の結果から考えると、ダイズタンパク質の有する脂質代謝調節能の主たる関与画分は β -コングリシニン画分であると推察される。

このような β -コングリシニンの効果とそのアミノ酸組成によるものか、あるいはなんらかの配列情報が有する作用なのか、また、混入するイソフラボン類などの低分子化合物が寄与しているのかという点を明らかにする必要がある。そこで、分画した β -コングリシニンをエタノールにて洗浄し、イソフラボン類やサポニンなどの低分子化合物を除去した。次いで、ア

ミノ酸を添加し、カゼインとアミノ酸バランスを等しくしたエタノール洗浄 β -コングリシニンを用いて再び動物実験を行った^{2, 3)}。その結果、アミノ酸組成をカゼインと一致させても、さきの結果と同様に血清トリグリセリド濃度や血清コレステロール濃度、血糖値、血清インスリン濃度などがカゼイン群と比べて有意に低下した(データ省略)。このことから、 β -コングリシニンによる脂質代謝適正化能はイソフラボンなどの低分子化合物や、そのアミノ酸組成によるものではなく、 β -コングリシニンタンパク質(または派生するペプチド)のアミノ酸配列が有する効果であることが証明された。この場合も肝臓における脂肪酸合成酵素の活性や遺伝子発現、タンパク質量などが全て低下しており、血清トリグリセリド濃度の低下には肝臓で

の脂肪酸合成酵素の遺伝子レベル・タンパク質レベルでの抑制が深く関与していることが示唆された。

このような脂質代謝適正化能を有するダイズβ-コングリシニン新規な高機能性食品タンパク質素材として応用可能と考えられる。また、実際にヒトでの有効性についても報告されている。そこで、β-コングリシニンを高含有する品種や変異β-コングリシニンを有する品種などの検索を兼ねて、ダイズ品種のプロテオームを解析し、データベース化を行った。

3. ダイズ種子プロテオームデータベースについて

主要なダイズ種子貯蔵タンパク質であるβ-コングリシニン及びグリシニンには、血清コレステロール値低下作用、免疫賦活作用などの生理機能が今まで報告されている^{4), 5)}。さらに、β-コングリシニンには、前章で概説したように、中性脂質の代謝調節機能も持つことが明らかとなった^{1) ~ 3)}。また、両グロブリン以外にも、トリプシンインヒビターなど、様々な生理機能を持つことが報告されている成分が多く含まれている。これらの生理機能は現代社会で問題となっている生活習慣病を予防するため、今後、ダイズタンパク質の食品素材としての重要性がより増していくものと予想される。一方、古くか

らダイズタンパク質は豆腐など種々の加工食品の製造に利用されてきたが、これは、ダイズタンパク質が優れた加工特性を持つことによる。これらのことから、ダイズタンパク質の各構成成分が、どのような生理機能や加工特性を持ち、そして、それらがどれくらい種子に含まれているのかを知ることが、ダイズタンパク質を食品素材として利用する上で、重要であると考えられる。また、今まで使用されてこなかったダイ

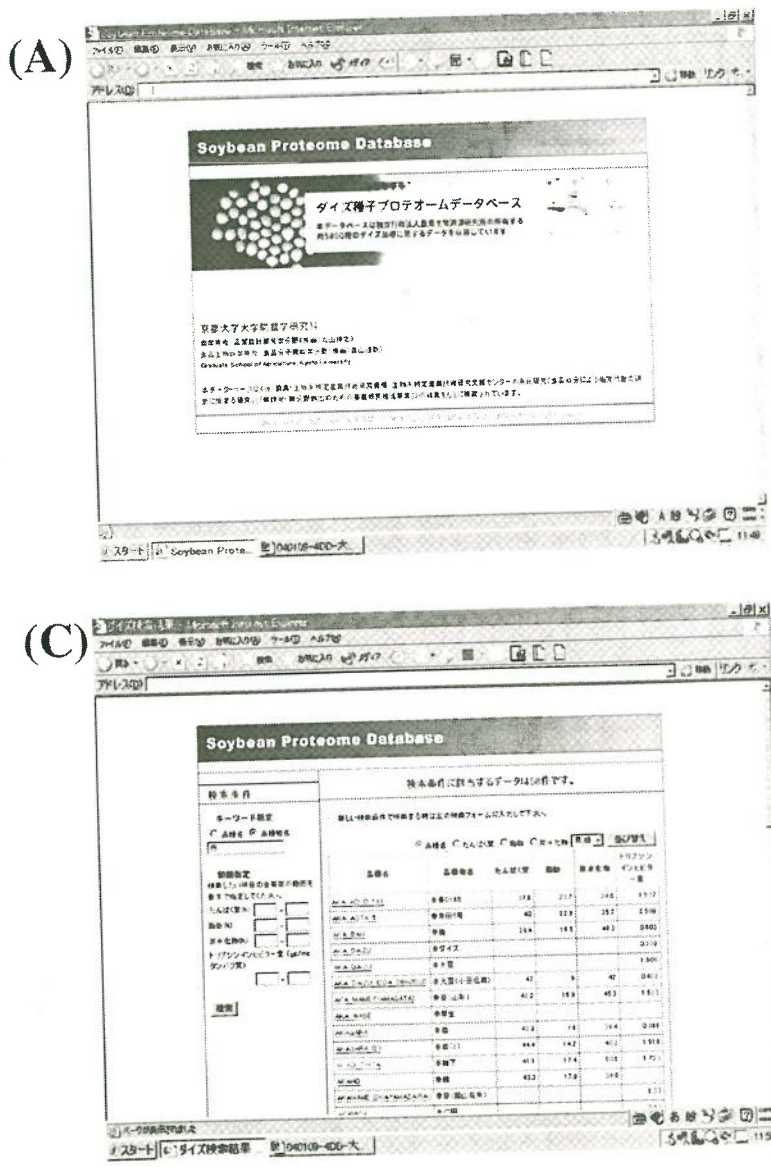
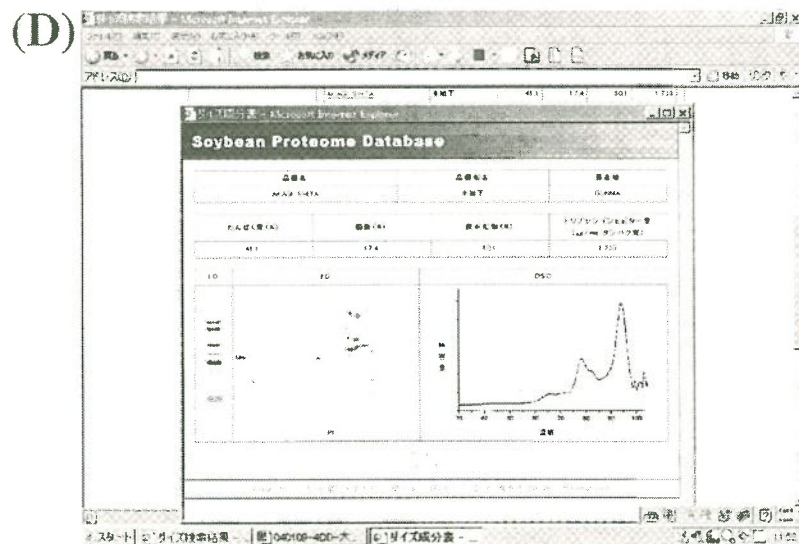
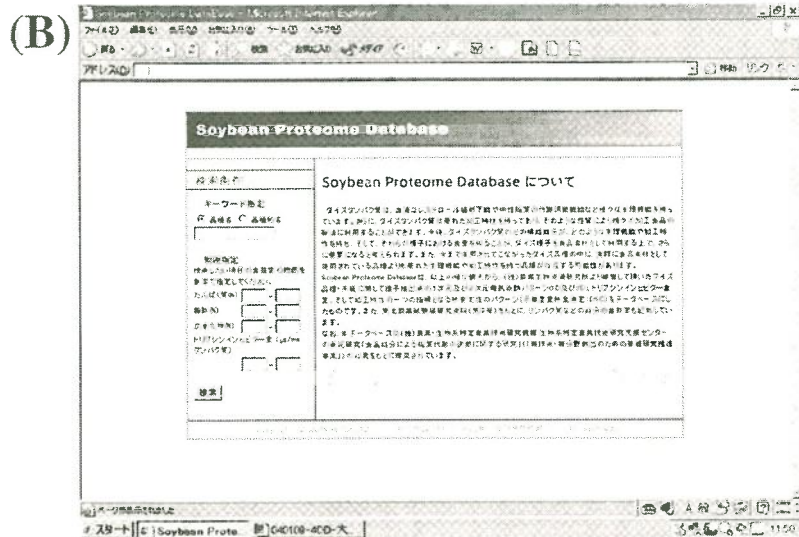


図2 ダイズ種子プロテオームデータベース
(A) ダイズ種子プロテオームデータベースの開始画面。
(C) 検索された品種がリストアップされる。品種名をクリックすることにより、詳細な情報が表示される。

ズ品種の中に、実際に食品素材として使用されている品種よりも優れた生理機能や加工特性を持つ構成成分を含む品種が存在する可能性がある。以上のような観点から、独立行政法人農業生物資源研究所より移管して頂いた約5800種のダイズ品種を用いて、ダイズ種子抽出液の構成成分（一次元及び二次元電気泳動）、トリプシンインヒビター含量、そして加工特性の一つの指標となる熱安定性（示差走査熱量測定）の解

析を行い、それらをデータベースにした。また、東北農業試験場研究資料をもとに、タンパク質などの成分の含有率もデータベース上に記載した。データベースはWeb上（<http://www.hinshitsusekkei.kais.kyoto-u.ac.jp/Soybean/>）に公開している（図2）。このデータベースには、様々な検索機能を付与しており、品種名だけではなく、タンパク質、脂肪、炭水化物の含有率や、トリプシンインヒビター含量の項目でも、簡単に検索することができる。一方、一次元及び二次元電気泳動パターンや、熱安定性のパターンは画像として、閲覧できるようになっている。

また、データベースを構築する過程で、特徴的な構成成分を同定し、その要因について解析したので、簡単に解説したい。約5800種のダイズ品種の解析から、 β -コングリシニンの β サブユニットの一般的なものよりも電気泳動上移動度の大きいものも含む品種を45品種、グリシニンのA3ポリペプチドとして一般的なものよりも電気泳動上移動度の小さいものを持つ品種を3品種見出し、両者を β ★及びA3★と名付けた。このような移動度の違いに糖鎖の付加の有無が影響している可能性があるため、糖鎖を認識するレクチン及び糖鎖を切断する酵素であるグリコシダーゼを用いて解析したところ、一般的な品種の β とA3と同様に、 β ★には糖鎖が付加されており、A3★には付加され



- (B) 品種名、タンパク質、脂肪、炭水化物の含有率及びトリプシンインヒビターの含量で検索できる。
- (D) 各品種について、タンパク質、脂肪、炭水化物の含有率とともに一次元（1D）及び二次元（2D）電気泳動、示差走査熱量測定（DSC）のパターンが表示される。

ていなかった。さらに、RT-PCRにより、それぞれのcDNAを調製し、その塩基配列を決定したところ、塩基配列から推定されるβ★の一次構造は、一般的な品種であるワセスズナリのもとの比較して2-6残基ほどの置換が見られたが、部分的な欠失や挿入は全く見られなかった(図3)。一方、A3★の一次構造は、報告されているものに対して、一残基置換されているのみであった。これらのことから、β★及びA3★と一般的なものとの電気泳動上の移動度の差には、挿入や欠失ではなく、一残基または数残基のアミノ酸の置換が原因となっていることが示された⁶⁾。また、示差走査熱量測定から、β★のみからなる分子種は、βのみからなるものよりも、熱安定性が低い分子種が多く含まれていることが明らかとなった。これらの結果は、貯蔵タンパク質の塩基配列の多型性を示しているとともに、β★及びA3★のような既知の配列とは異なる貯蔵タンパク質には新規な生理活性ペプチドが含まれている可能性がある。さらに、一般的なものよりも

熱安定性の低いβ★が多く含まれている品種を産業利用できれば、加工食品の製造コストの低減化につながると考えられる。

今後、さらにダイズタンパク質の各構成成分の生理機能や加工特性、アレルギー性などが詳細に解析され、そのような情報を追加することにより、さらに本データベースがバージョンアップされ、より有用に活用されるものと考えて

Wase	1	<u>LKVR</u> EDENN	FYFRSSNSFQ	TLFENQNGRI	RLQRFNKRS	PQLENLRDYS	IVQFQSKPNT
Gmβ/β*1	1L.	.	.	.
Gmβ/β*2	1	.	..L.
Gmβ/β*3	1	.	..L.
Gmβ/β*4	1	.	C.
Gmβ/β*5	1	.	..L.
Wase	61	IILLPHHADAD	FLLFVLSGRA	ILTLVNNDDR	DSYNLHPGDA	QRIPAGTTY	LVNPHDQNL
Gmβ/β*1	61
Gmβ/β*2	61H.	.	.
Gmβ/β*3	61
Gmβ/β*4	61
Gmβ/β*5	61
Wase	121	KIIKLAIPVN	KPGRYDDFFL	SSTQAQQSYL	QGFSHNILET	SFHSEFEEIN	RVLFGEEEQ
Gmβ/β*1	121
Gmβ/β*2	121
Gmβ/β*3	121
Gmβ/β*4	121QG..
Gmβ/β*5	121QG..
Wase	181	RQEGVIVEL	SKEQIRQLSR	RAKSSSRKTI	SSEDEPFNLR	SRNPIYSNNF	GKFFEITPEK
Gmβ/β*1	181
Gmβ/β*2	181
Gmβ/β*3	181H.	.	.
Gmβ/β*4	181
Gmβ/β*5	181
Wase	241	NPQLRDLDF	LSSVDINEGA	LLLPHFNSKA	IVILVINEGD	ANIELVGIKE	QQQKQKQEEE
Gmβ/β*1	241
Gmβ/β*2	241
Gmβ/β*3	241
Gmβ/β*4	241A.	.
Gmβ/β*5	241
Wase	301	PLEVQRYRAE	LSEDDVVFIP	AAYPFVFNAT	SNLNFLAFGI	NAENNQRNFL	AGEKDNVVRQ
Gmβ/β*1	301	..C.I..
Gmβ/β*2	301
Gmβ/β*3	301
Gmβ/β*4	301A.I..
Gmβ/β*5	301I..
Wase	361	IERRQVELAF	PGSAQDVERL	LKKQRESYFV	DAQPQQKEEG	SKGRKGPFP	ILGALY
Gmβ/β*1	361
Gmβ/β*2	361
Gmβ/β*3	361
Gmβ/β*4	361
Gmβ/β*5	361

図3 cDNAから推定されるβ★及びβのアミノ酸配列
β★/βの5種類のcDNAクローンの塩基配列を決定し、推定されるアミノ酸配列を一般的な品種であるワセスズナリ(Wase)のものと同様にアライメントしている。

いる。

6. おわりに

ダイズタンパク質を構成する各種タンパク質分子の個々の生理機能性やアレルギー性、加工特性などに関する研究は始まったばかりである。世界に誇る日本型食生活の主役のひとつである大豆の成分中に、高機能性を見出し、「メイドイン日本」産の市場競争力の高い高品質型大豆を発見・育種・実用化することが望まれる。そのためにも食品化学や栄養化学、作物学、育種学などの異分野間の連携によって、この分野の研究が益々進展することが期待される。

本研究は、生物系特定産業技術研究推進機構、平成11年度「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」採択課題の一部として行われたものであり、ご支援頂きました生物系特定産業技術研究支援センターの関係者の皆様に深謝い

たします。また、本研究にご協力いただきました京都大学大学院農学研究科の裏出令子先生、内海成先生、小川正先生、前淵元宏博士に感謝いたします。

文 献

- 1) Moriyama, T. et al. (2004), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 352-359.
- 2) 森山達哉ら（平成15年）「生活習慣病予防改善効果を有するタンパク質食品素材」特願2003-314358
- 3) Maebuchi, M. et al. (2004), *J. Nutr.*, 134, 1274S.
- 4) Kito, M. et al. (1993), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 354-355.
- 5) Tsuruki, T. et al. (2003), *FEBS Lett.*, 540, 206-210.
- 6) Maruyama, N. et al. (2003), *Phytochemistry*, 64, 701-708.

◀国内情報▶

ABA不活性化酵素CYP707遺伝子の同定と機能解析
—休眠種子の覚醒遺伝子—独立行政法人 理化学研究所 植物科学研究センター
南原英司・岡本昌憲・久城哲夫

種子が休眠を維持する上で、植物ホルモンであるアブシジン酸（ABA）の量の調節が重要な鍵を握っている。乾燥種子に高濃度に蓄積されたABAが吸水に伴って急激に減少することが発芽の引き金となる。著者らは、長く特定されていなかったABAの主要な不活性化酵素遺伝子を、モデル植物のゲノム情報を編集し、遺伝子発現プロファイルや代謝プロファイルから得られる情報を基に同定した。この遺伝子を破壊したシロイヌナズナの突然変異株の種子はABAを高濃度に蓄積し、高い種子休眠性を示した。今後、農作物の発芽調節やストレス耐性付与への応用が期待される。

1. はじめに

植物種子は周囲の環境を感知して、休眠状態で居続けるか発芽して以後の生長に向かうかを決める。種子の眠りは稀に土の中で1000年を越えることもある。種子の休眠は植物ホルモンであるアブシジン酸（ABA）によって促進される¹⁾。従って、様々な植物種で知られているABA生合成欠損変異株は、種子休眠性が低く、時には穂発芽をする。種子には高濃度のABAが蓄積しており、種子が吸水し発芽する時に一過的なABAの減少がみられる。これは主要なABA不活性化酵素であるABA 8'水酸化酵素によるところが大きい。ABA 8'水酸化酵素は20年程前の報告によってシトクロームP450モノオキシゲナーゼ（P450）型の酵素によって触媒されることが示唆されていたが、それをコードしている遺伝子の同定はなされていなかった²⁾（図1）。

P450はヘム鉄の酸化還元能を利用して、大気中の酸素分子を還元的に活性化して基質を酸化する一群の一酸素添加酵素である。P450は植物において、ホルモンの生合成や代謝、多様な二次代謝産物の生合成、ならびに除草剤など

の薬物の代謝・解毒など、代謝反応全般に関与している。P450は広く生物界に分布し、大腸菌には存在しないが、パン酵母には3個、ヒトには56個、ショウジョウバエには87個、そしてシロイヌナズナには272個のP450遺伝子が存在している。さらにイネのゲノム配列中には458個見い出されている。様々な生物種のゲノム配列が解読されたことによって、植物ゲノムには他の生物種と比べて圧倒的に多くのP450遺伝子が存在していることが明らかとなってきた。このことはいかに植物が固有の代謝経路を独自に進化させてきたかを物語っている。全ゲノム配列解読によって明らかになったこれらP450遺伝子の機能を同定していくことが今後の大きな課題である。しかしながら、配列情報だけから基質を同定することは難しく、また代謝経路のどのステップにP450が関わっているのかが定かではない場合が多い。折角得られた膨大なゲノム情報を有効に活用するためには、新たな試みによるP450の機能同定が望まれる。

筆者らはこのような観点から、未だ遺伝子が知られていなかったABAの代謝を担う、ABA 8'水酸化酵素をコードするP450遺伝子の同定を試みたので、その経緯について解説する³⁾。

NAMBARA Eiji, OKAMOTO Masanori,

KUSHIRO Tetsuo

〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22

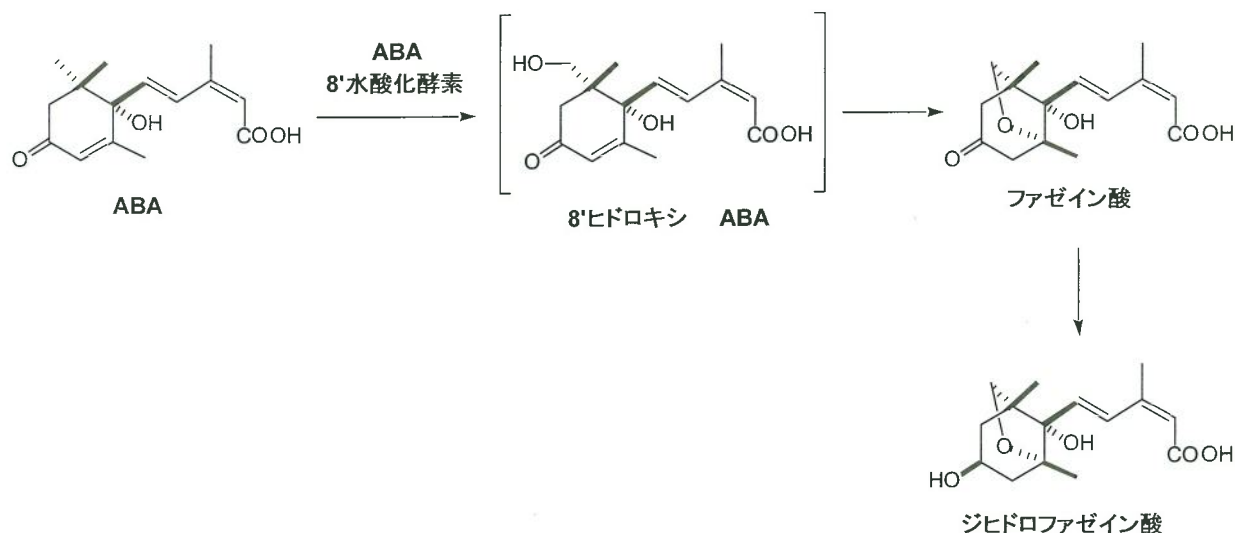


図1 ABA 8'水酸化経路

ABA 8'水酸化酵素はABAの8'位を水酸化する。8'ヒドロキシABAは非酵素的に分子内環化をしてファゼイン酸となり、その後、還元酵素によってジヒドロファゼイン酸に変換される。

2. ABA 8'水酸化酵素をコードする P450遺伝子の同定

シロイヌナズナの全ゲノム配列中に見い出された272個のP450遺伝子について系統樹解析から大きくAタイプ及びnon-Aタイプに分類されている⁴⁾。Aタイプは植物独自に進化してきたグループであり、non-Aタイプは植物以外の他の生物のP450と比較的相同性を有するグループである。さらにP450遺伝子はコードするアミノ酸配列の相同性によりCYP番号毎のファミリーに分類されている。40~55%の相同性を有する遺伝子には同じCYP番号が与えられ、55%以上の相同性を示すものにはCYP番号の後に共通のアルファベットを付与する。シロイヌナズナには全部で45のCYP番号（ファミリー）が存在し、各々のファミリーに含まれる遺伝子の数はまちまちであり、最も大きいCYP71ファミリーには54個の遺伝子が存在している。

この膨大な系統樹の中から目的のABA 8'水酸化酵素の遺伝子を同定する足がかりをつかむため、まずこれまでに明らかになった植物ホルモンの生合成及び代謝に関わるP450を挙げて

みた。その結果、12個のP450遺伝子のうち、オーキシンの生合成に関与するCYP79ファミリーとジベレリンの生合成に関わるCYP701ファミリー以外は全てnon-Aタイプに属することが分かった。さらにこれらの遺伝子は同一ファミリーに遺伝子が1~4個しか存在しない、小さいファミリーにのみ存在していることが伺えた。またABAはテルペノイド化合物であるが、テルペノイドを基質とするP450が系統樹上で比較的近い位置に存在することも明らかになった。さらに興味深いことに、ABAと構造的にも生合成的にも類似した、哺乳動物のレチノイン酸を代謝するP450（CYP26）は、この領域に存在するP450と最も高い相同性を示した。このような点から、目的のABA 8'水酸化酵素もnon-Aタイプに存在しており、小さいファミリーに属しているのではないかと推測した。

次にイネのP450遺伝子と比較したところ、片方の植物にしか存在しないファミリーがあることが分かった。ABA 8'水酸化酵素は両植物に共通に存在することが予想されたので、両方の植物種に存在するファミリーのみを候補遺伝子とした。

以上の経過により、1) non-Aタイプに属す

る、2) 小さいファミリーに属する、3) イネにも共通に存在する、4) テルペノイドを基質とするP450と近い位置に存在することが望ましい、といった基準を満たす候補遺伝子を絞り込んだ。

ここで、種子吸水時におけるDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析のデータを調べた。種子吸水時にはABAの内生量は一過的に減少し、ABA 8'水酸化酵素がこの時期に高く発現していると思われる。そこでマイクロアレイから得られた約220個のシロイヌナズナP450遺伝子の発現パターンも候補遺伝子の絞り込みに活用した。

これらの候補遺伝子を酵母の系に導入し、機能解析を行った。発現用の酵母にはシロイヌナズナのP450還元酵素が組み込んである株を用いた⁵⁾。その結果、CYP707ファミリーの遺伝子を組み込んだ酵母においてファゼイン酸合成活性が観察され、目的のABA 8'水酸化酵素遺伝子をコードしていることが明らかになった。シロイヌナズナのゲノムには4つのCYP707遺伝子があり (CYP707A1-A4)、すべて同等に活性を有していた。

3. CYP707の活性とP450阻害剤

酵母で発現させたCYP707の生化学的特徴はこれまでに報告されてきたABA 8'水酸化酵素の性質と一致した。トウモロコシの培養細胞のミクロソーム画分に見られるABA 8'水酸化酵素の活性はP450阻害剤として知られているテトシクラシスによって阻害されることが知られていた。酵母で発現させたCYP707の活性も同様にテトシクラシスによって阻害された。興味深い事に、別のP450阻害剤であるメチラポンはCYP707の活性に影響を与えなかった。このことから、様々なP450阻害剤によってCYP707の活性に選択的に作用する阻害剤を検索する可能性が考えられる。実際に、これまでに選択的なP450阻害剤は生長調節物質として利用されている。ジベレリン生合成にかかわるカウレン

酸化酵素CYP701Aを選択的に阻害するユニコナゾールは矮化剤として、また、ブラシノライド合成の鍵酵素と考えられているCYP90B/DWF4に特異的に作用するブラシナゾールは生長促進物質として基礎研究や農業・園芸で広く用いられている。

4. CYP707の機能と種子休眠性

4つのCYP707遺伝子のシロイヌナズナでの発現解析を行った。葉、根、茎、花序、未熟果実では複数のCYP707遺伝子が発現していたのに対して、乾燥種子ではCYP707A2が唯一発現しており、種子吸水初期にすみやかに発現が誘導されていた (図2)。この時、他の3つの遺伝子はほとんど発現しておらず、CYP707A2が単独で吸水時の一過的なABA内生量の減少に関

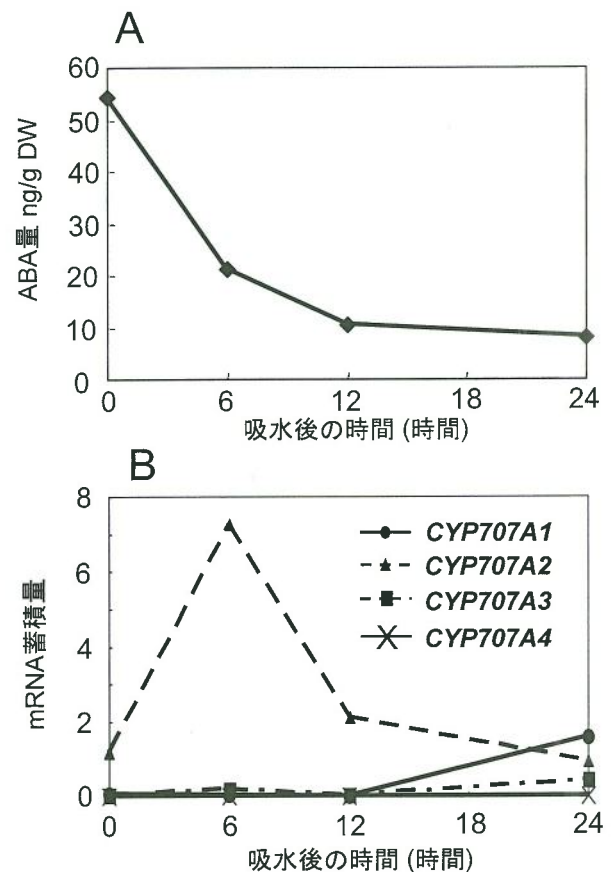


図2 種子発芽時のABAの減少と連動したCYP707A2の遺伝子発現

- (A) 種子吸水時の種子のABA量の変化
(B) CYP707A mRNA量の変化の相対値

CYP707A2 遺伝子が壊れた変異株は著しい発芽遅延を示す

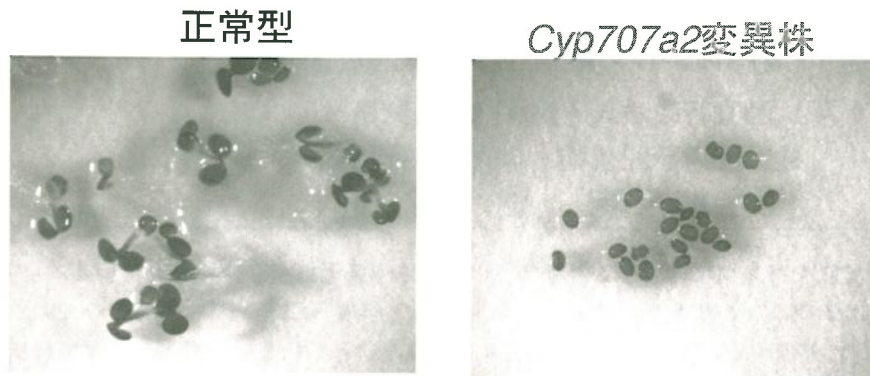


図3 野生型種子とcyp707a2種子の発芽

収穫直後の種子を播種して吸水後4日目の写真。cyp707a2変異株種子は吸水後2週間たってもほとんど発芽しない。

与していると考えられる。実際、CYP707A2欠損の突然変異株を調べたところ、著しい発芽阻害が観察された。さらに、この変異株では野生株と比べてABA内生量の大幅な蓄積が見られ、この高濃度のABAは種子吸水後も高いレベルを保ったままであった(図3)。

おわりに

コムギは収穫前の降水や低温によって穂発芽が見られ、農業的にも問題となっている。穂発芽コムギが数%でも混入したコムギから作った小麦粉では、発芽時に活性化される種子貯蔵物質分解酵素がデンプンやタンパク質を分解してしまい柔らかいパンやコシのあるうどんを作る事が出来ない。今回、同定されたCYP707遺伝子はこのようなコムギの穂発芽を抑える育種において重要なターゲットとなるであろう。また、ABAはストレスホルモンとして知られており、

植物体が乾燥や低温に曝されたときに防御システムを活性化する。ホルモン量は通常植物内で厳密に調節されているために、ABAの投与や生合成経路の人為的な活性化によっては限られたストレス耐性しか付与することができなかった。この要因は内性のABA 8'水酸化酵素の作用にあり、実際、

このような処理によって内生のABA量よりもその代謝物の増加が顕著に観察される。CYP707Aの発現が低下した品種や特異的な阻害剤を開発する事によってこれまで困難であった内生ABA量の調節が可能となるであろう。

文 献

- 1) Zeevaart, J.A.D. et al. (1988), *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 39, 439-473.
- 2) Cutler, A.J. et al. (1999), *Trends Plant Sci.*, 4, 472-478.
- 3) Kushiro, T., Okamoto, M. et al. (2004), *EMBO J.*, 23, 1647-1656.
- 4) 大村恒雄ら, P450の分子生物学(2003) 講談社
- 5) Pompon et al. (1996). *Methods Enzymol.*, 272, 51-64.

◀国内情報▶

塩素系薬剤によるリグニンの分離に伴う クロロホルムの発生とその拡散防止

独立行政法人・森林総合研究所
成分利用研究領域・木材化学研究室
真 柄 謙 吾

木材中のリグニンを分離して紙やパルプに利用する過程において、塩素系漂白剤が使用されている。そのうち、次亜塩素酸塩を用いた場合には多量のクロロホルムが発生するが、これを抑制するためにアルカリ中での水酸化物イオンによる SN_2 反応を利用してギ酸へと脱ハロゲン化することを試みた。その結果、実際のパルプ処理においてもクロロホルムの発生をほぼ完全に抑制することが可能となった。

1. はじめに

木材からリグニンを分離し、残りのセルロース・ヘミセルロースを紙パルプなどへ利用するために、長年に渡って塩素や次亜塩素酸塩といった塩素系の薬剤が使用されてきた。これら塩素系薬剤は、低コストでしかもリグニンとの反応選択性が高いことが特徴であり、その効果から紙パルプにおける脱リグニンのみならず水道水の塩素殺菌、病院等における消毒剤、家庭でのカビ取り剤などにも利用されている。また、最近では水道水の電気分解から生成した次亜塩素酸水による洗濯にまでその利用が及んでいる。これらは、酸性で塩素 (Cl_2)、中性で次亜塩素酸 ($HClO$)、アルカリ性では次亜塩素酸塩 (ClO^- 、例えば $NaClO$) として存在する。近年、これらの薬剤についてリグニンと塩素の反応からはダイオキシンが生成し、またリグニンと次亜塩素酸塩との反応からは多量のクロロホルムが生成（日本製紙連合会H11年度調査で年1118トン）することが明らかとなった。そこで、現在これら塩素系漂白剤をダイオキシンやクロロホルムを生成しない二酸化塩素や他の酸素系薬剤へ転換する動きが進行している。

しかし、回収古紙のようにリグニンとともに蛍光白色剤（例えばジアミノスチルベンジスル

MAGARA Kengo
〒305-8687 つくば市松の里1

ホン酸)をも分解する必要がある場合や、コスト的に高価な代替薬剤への転換が困難な場合、次亜塩素酸塩を継続使用せざるを得ない。そこで、こういった場合でもクロロホルムの発生を抑制しながらリグニンを分離する方法について紹介する。

2. 次亜塩素酸塩とリグニンの反応におけるクロロホルムの生成機構

塩素がリグニンと反応する場合、分子状塩素 Cl_2 は水中で分極して Cl^+ と Cl^- に分かれる。このうち Cl^+ がリグニンと反応してこれを酸化分解するが、その反応に先立ってリグニンの芳香環への塩素置換が生じ、ダイオキシンを始めとする多量の有機塩素化合物が生成する。次亜塩素酸塩の場合、リグニンとの反応活性種は ClO^- であるが、やはり酸化反応に先立って分子状塩素と同様に塩素置換が生じ、有機塩素化合物が形成される。その後、リグニンは図1に示すように側鎖や芳香環の開裂反応を受けて低分子化し、最終的に生成したトリクロロケトン構造がアルカリ中で加水分解されてクロロホルムが遊離するとされている¹⁾。この反応経路は、次亜塩素酸塩とリグニンが反応する限り抑制することは困難であると思われる。従って、クロロホルム生成抑制は生成したクロロホルムをいかに迅速に分解して大気中への拡散を抑えるかとい

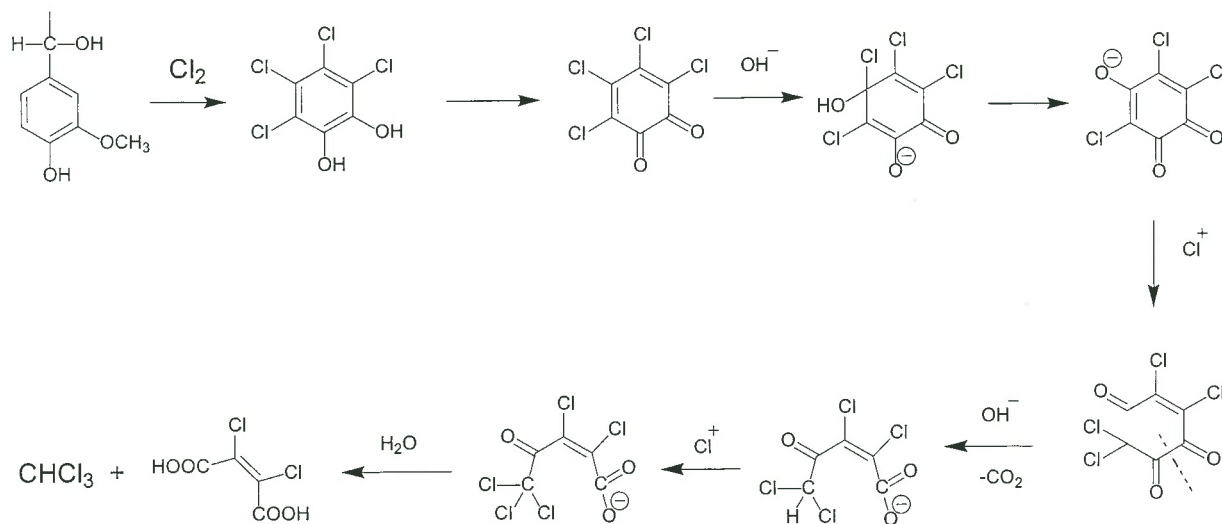


図1 リグニンの次亜塩素酸塩処理におけるクロロホルムの生成機構¹⁾

う方向に絞られる。

3. アルカリ中でのクロロホルムの分解

クロロホルムは、図2に示すようにメタンの三個の水素が塩素に置換された有機塩素化合物である。これをアルカリ中で加熱すると、水酸化物イオンが中心の炭素に近づきSN₂反応により脱塩素を伴って置換する。もう一分子の水酸化物イオンがさらに残りの塩素と置換しカルボニルへと落ち着く時に最後の塩素が脱離するので、最終的にギ酸へと変換され、無毒化されることになる。この反応を継続的に進行させるためには、十分なアルカリ（水酸化物イオン）と温度が必要となる。しかし、幸い次亜塩素酸塩によるパルプ漂白はアルカリ性下で行われるため、そのアルカリ濃度を最適化しながら加温することにより、漂白中に生じたクロロホルムを同時にギ酸へと変換すること

が可能になると考える。そこで、実際にクロロホルムをpH13のアルカリ中70℃で加熱し、生成するギ酸を定量した。結果は、図2に示すようにクロロホルムは約60分間でほぼ全量が反応し、同時にその約70%がギ酸へ変換された。

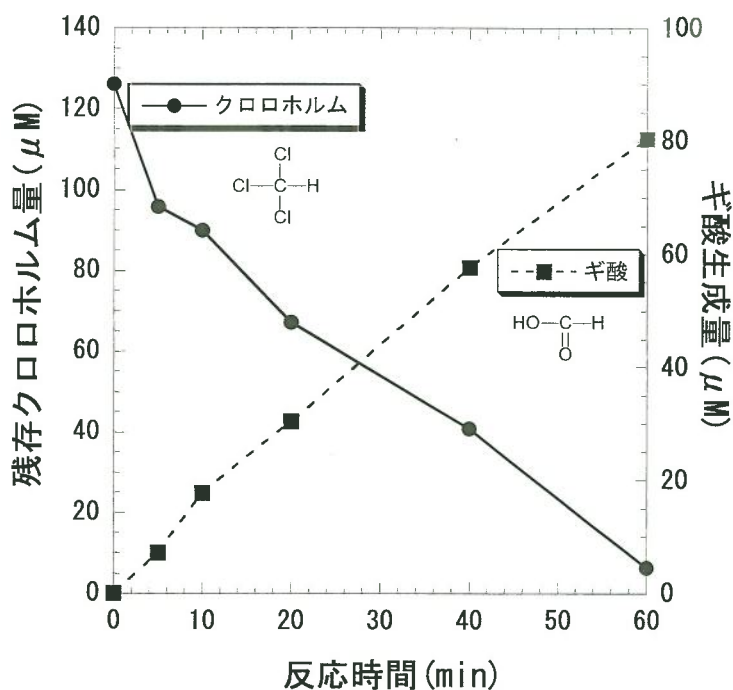


図2 クロロホルムのアルカリ分解 (pH13, 70℃)

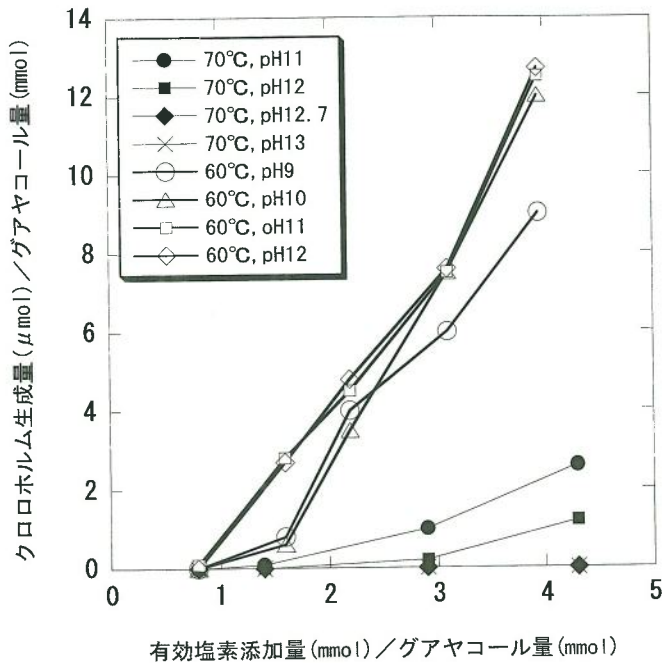


図3 グアヤコールの次亜塩素酸塩処理において生成するクロロホルム量

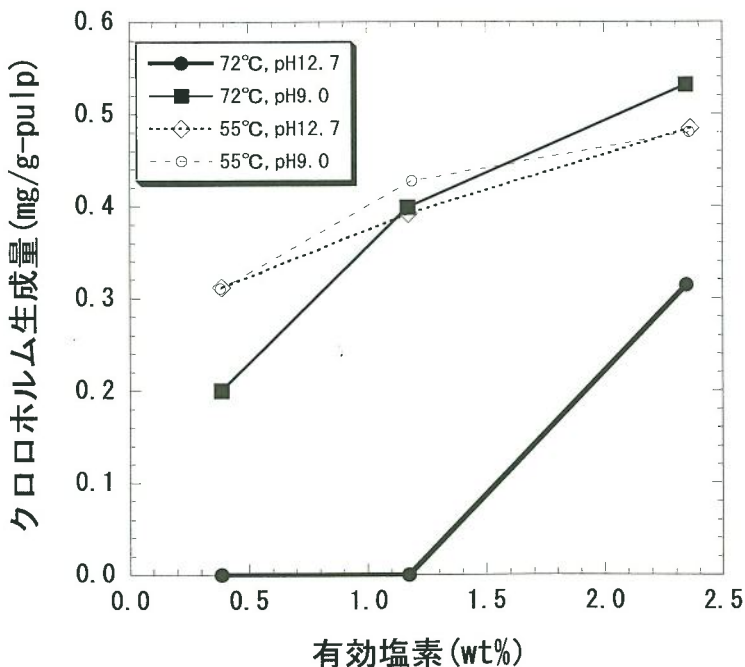


図4 各種条件下での酸素漂白済みクラフトパルプの次亜塩素酸塩漂白におけるクロロホルム生成量

4. リグニンモデル化合物の次亜塩素酸塩処理により発生するクロロホルムの分解

次に、リグニン構造のモデル化合物であるグアヤコール (2-メトキシフェノール) を各種条件下で次亜塩素酸塩と反応させ、生成するクロロホルムを定量し図3に示した。反応温度60℃と70℃では結果に大きな違いが確認されたが、これは温度によってクロロホルムの分解が促進されたことに加えて、高温中での酸化反応の促進によって相対的に塩素置換反応が減少し²⁾、トリクロロケトン構造のようなクロロホルム前駆体の生成量も減少したためと推定する。この結果から、クロロホルムの生成抑制には12.7以上のpHと70℃以上の加熱温度を必要とすることが明らかとなった。そこで、この処理条件を用いて、実際のクラフトパルプを次亜塩素酸塩処理し生成するクロロホルム量の変化を検討した。

5. クラフトパルプの次亜塩素酸塩処理におけるクロロホルムの生成抑制

クラフトパルプ化後、なお残留する少量のリグニンを分解するため、塩素や次亜塩素酸塩、二酸化塩素および過酸化水素などを用いた多段漂白が行われるが、その中で次亜塩素酸塩処理は通常40～60℃、pH9-10程度、次亜塩素酸塩添加率0.3% (対パルプあたりの有効塩素) の条件で行われている。そこで、一般的な処理条件として

55°C, pH9.0と, クロロホルム分解のための処理条件である72°C, pH12.7をそれぞれ組み合わせて次亜塩素酸塩添加量とクロロホルム生成量の関係を検討した。結果は図4に示すように, 72°C, pH12.7の処理条件においてのみ約1.2%の添加率までクロロホルムの発生を抑制することが可能であった。

これらの実験はすべて密閉系において検討したが, 実際の次亜塩素酸塩処理は開放系で行われている。その場合, クロロホルムは沸点が低いいため分解される前に大気中に拡散すると思われるが, 実際には約90%が拡散せずに液中でギ酸へと変換された。

6. おわりに

次亜塩素酸塩によるリグニン分離処理において生成するクロロホルムは, 処理条件の変更に

よりその発生を抑制することが可能である。しかし, この時生成する有機塩素化合物はクロロホルムだけではなく, 塩素化有機酸から高分子有機塩素化合物まで多岐に渡っている。これらのうちいくらかはクロロホルムのようにアルカリ中で加温することにより分解可能であるが, ほとんどは変化することなく環境中へと放出されていく。従って, これらの発生を根本的に解決するためには, 今後, 新規の無公害型リグニン処理薬剤の開発が必要になると考える。

文 献

- 1) Hrutfiord, B. F. et al. (1990), Tappi J., No.6, 219-225.
- 2) 紙パルプ製造技術シリーズ3 (2000), パルプの洗浄・精選・漂白, 初版, 124, 紙パルプ技術協会, 東京



ブレインテクノニュース
バックナンバーのご案内
第100号
2003年11月15日発行

総 説

稲における耐冷性の遺伝・育種研究の現状と今後の展望
……………清水博之

国内情報

穂ばらみ期耐冷性の異なるイネ準同質遺伝子系統を用いたマイクロアレイ解析……………佐藤 裕
スズメバチの攻撃行動を促進する警報フェロモン……………小野正人
淡水魚類集団の遺伝的構造と有効集団サイズの推定
……………山本祥一郎

地域の先端研究

青森県農林総合研究センター藤坂稲作研究部におけるイネの耐冷性育種……………坂井 真・須藤 充・神田伸一郎
宮城県古川農試におけるイネの耐冷性育種

……………永野邦明・千葉文弥
LAMP法によるトマト黄化葉巻ウイルス検出技術の開発
……………福田至朗・吉田桂子・神戸三智雄
飼料イネサイレージ用乳酸菌「畜草1号」の開発と普及
……………吉田宣夫・蔡 義民

文献情報

ケモカインの一種であるインターフェロン γ 誘導蛋白10KDa (IP-10) はIFN- τ により産生が刺激され, ヒツジ子宮内膜に免疫担当細胞を供給する……………(抄訳: 下司雅也)
酵母*S.cerevisiae*における酸性フォスファターゼPHO5の発現制御機構……………(抄訳: 家藤治幸)
イネにおける花芽運命決定の制御機構……………(抄訳: 寿崎拓哉)
冷凍ヘイクのクオリティ・インデックス・メソッドの開発
……………(抄訳: 沖田裕司)

海外便り

材料学研究のメッカ、マサチューセッツ州立大学で一娘と過ごした2年間……………秦 珠子

生研センターからのご案内

新組織の設立・発足ほか

◀国内情報▶

土壤サンプル粉碎篩分け装置

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 基礎技術研究部
 後藤 隆志・手島 司・市来 秀之・清水 一史

土壤分析用の風乾土壤を、一对の6角ローラで粉碎し、振動篩で篩分ける小型の装置を開発した。本装置の利用により、作業能率の向上（人力作業の2～4倍程度）、大量処理時の労働負担の軽減、粉塵の少ない作業環境の実現、粗大有機物混入の減少などの効果が期待できる。

1. はじめに

土壤分析は、適正施肥による作物の増収・高品質化、肥料成分の流出等による環境負荷低減をはかる上で、ますます重要になってきている。一般に土壤分析は、ほ場での採土から分析まで多くの工程を経て行われるが、前処理作業については現在も手作業で行われることが多い¹⁾。特に、乳棒と乳鉢によって行う「粉碎」作業、篩による「篩分け」作業は、塵埃が発生する中で行う腕の疲れる作業であり、大量に分析を行う場面では、その省力化が求められている。外国製の粉碎篩分け装置が一部で使用されているものの、この装置には大型で設置面積が広いこと、塵埃の発生が多く集塵装置の設置が必要なこと、高価なことなどの問題がある。

このような背景を受け、農林水産省の「21世紀型農業機械等緊急開発事業」において、富士平工業（株）、（株）日立製作所及び（株）日立ハイテクノロジーズの協力のもと、小型で比較的安価な「土壤サンプル粉碎篩分け装置」の開発を行ったので紹介する。

2. 粉碎篩分け装置の概要

(1) 装置の構造

開発した装置（図1）は、奥行48cm、全幅23cm、全高41cm、質量30kgの小型な装置であり、土壤収納部、土壤粉碎・篩分け部、吸引部等から構成されている。土壤収納部としては、粉碎する土壤を収納する「ホッパ」、篩の上から排出される土壤を収納する「篩上土壤容器」、篩を通過した土壤を収納する「篩下土壤容器」があり、ホッパには直径2cm程度以上の大きな土塊の通過を規制する「大土塊規制バー」が取り付けられている。本装置の心臓部である粉碎・篩分け部は、109又は131rpmで回転する一对の6角ローラで構成される「粉碎ローラ」、目開き2mm又は1mmの篩が24又は29Hzで振動する「振動篩」からなる。吸引部としては、

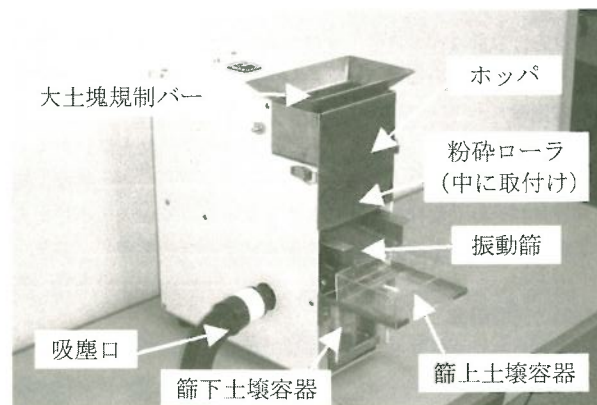


図1 土壤サンプル粉碎篩分け装置の外観

GOTOH Takashi, TESHIMA Tsukasa,
 ICHIKI Hideyuki, SHIMIZU Kazufumi
 〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

周囲や装置内への塵埃の飛散・堆積を防ぐための「吸塵口」があり，市販の家庭用掃除機を接続して吸塵を行う。

一対のローラを用いて粉碎を行う場合は，一般的に円柱形のローラの表面に溝を付け，かき込み性能を高める構造とすることが多い。しかし，分析用の土壤を粉碎する場合は，他のサンプルの混入を防ぐ必要があるため，ローラの表面に土が付着しにくい構造にしなければならない。そこで，滑らかな表面でも土のかき込み性能を維持するため，ローラの形状を六角柱とし，回転時の振動を減らすため，左右のローラの位相を 30° ずらして取付けた。また，サンプル土壤には礫が含まれていることが多いため，駆動歯車軸を中心に揺動するアームに粉碎ローラを取付け，バネで内側へ押し付ける構造とし（図2），ローラ間に礫が侵入した時にはローラが左右に開いて礫を逃がすようにした。

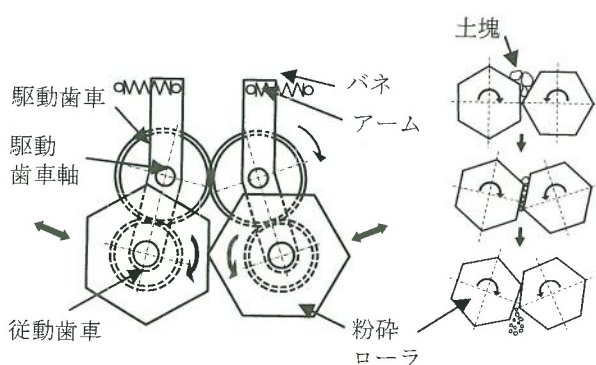


図2 六角ローラ式粉碎ローラとローラの動き

(2) 作業方法

まず，篩上土壤容器に粉碎前の風乾土壤を入れる。作業者は片手に土壤を入れた容器を，もう一方の手に空の容器をそれぞれ持ち，空の容器を振動篩の手前に保持するとともに，土壤をホッパに投入する（図3）。投入された土壤は，ホッパ下方に取付けられた粉碎ローラで粉碎され，振動篩の上へ落下する。篩上の土壤は，篩の手前に保持された篩上土壤容器に，篩下の土壤は篩の下方に置かれた篩下土壤容器にそれぞれ



図3 作業状況

れ収納される。作業者は，篩下土壤容器内の土が分析に必要な量になるまで，篩上土壤容器内の土をホッパへ再投入する。

3. 作業性能

土壤分析を行っている3箇所の土壤分析センター（JA全農岩手営農対策室，JAとぴあ浜松ADセンター，JA佐賀経済連肥料工場）に試作装置を持ち込み，以下の試験を行った。対照区として，乳鉢・乳棒と篩による人力作業を行った。

(1) 作業状態等の観察

土塊径2 cm未満の風乾した畑土壤7種類（土性：砂壤土3種類，埴壤土2種類，軽埴土，重埴土），水田土壤4種類（土性：壤土，軽埴土，シルト質埴土，重埴土）を供試し，作業状態，塵埃の発生状態，篩分けられた土壤の状態を観察した。

その結果，粘土含量が高く硬い土や石礫の混入が多い土を含め，すべての土の粉碎篩分けを円滑に行うことができた。また，人力作業に比べ，塵埃の飛散が減少し，篩分けられた土壤中への粗大有機物の混入が少なかった（人力作業

表1 作業能率試験の結果（畑土壤3種類、水田土壤3種類の平均）

篩目 開き	供試 土壤	作業時間 (min)						作業時間比 (人力/装置)
		粉碎篩分け装置での作業			人力作業(乳棒・乳鉢と篩)			
		粉碎・篩分	清掃	計	粉碎・篩分	清掃	計	
2 mm	畑	0.44	1.0	1.4	4.0	0.6	4.6	3.2
	水田	0.51	0.9	1.4	3.8	0.6	4.4	3.1
1 mm	畑	1.1	0.9	2.0	5.0	0.6	5.6	2.7
	水田	1.1	1.0	2.1	4.7	0.6	5.3	2.5

投入土壤質量：350g、篩分土壤質量：約200g

では、乳棒によりサンプル中の根やわらなどの粗大有機物が粉碎されるが、開発装置ではこれら有機物の粉碎が少ないため）。

(2) 作業能率の測定

畑土壤3種類(土性：埴壤土2種類, 重埴土), 水田土壤3種類(土性：壤土, シルト質埴土, 重埴土)の風乾土を供試して作業能率を調査した。供試土壤としては、予め目開き4, 10, 20mmの篩で篩分け、篩分けた土壤(4mm以下, 4~10mm, 10~20mm)の混合割合を一定にして袋詰めしたものを使用した。試験は、供試土壤を350g投入した後、篩上から排出される土壤を作業者が連続的にホッパ内に再投入し、篩下土壤が200g程度回収されるまでの時間と、ローラや篩等についた土をワイヤブラシで清掃する時間を測定して行った。対照人力作業の作業者は、延べ4名であり、同じ土を2名で作業した。

表1に作業能率試験の結果を示す。1サンプル当たりの平均作業時間(清掃時間を含む)は、2mmの篩を使用した場合1.1~1.7分(平均1.4分)、1mmの篩を使用した場合1.6~2.8分(平

均2.2分)であった。これに対し人力作業では、個人差や土の種類による変動が大きかったものの、2mmの篩を使用した場合2.5~7.2分(平均3.2分)、1mmの篩を使用した場合2.8~8.9分(平均5.4分)であった。試作装置の作業能率は人力作業の1.7~4.3倍(平均2.9倍)であり、粘土含量が多く粉碎しにくい土で能率向上効果が高くなる傾向があった。

4. おわりに

開発した装置は、細部を改良して2004年に、富士平工業(株)より市販される予定である。本装置が、土壤分析作業の省力化をとおり、適正施肥による農産物の増収・高品質化や環境負荷の低減に貢献することを期待する。

文 献

- 1) 名倉ら(1998), 日立評論80(3), 263-266.
- 2) 後藤隆志ら(2004), 土壤サンプル粉碎篩分装置の開発と実用化, 平成15年度生研センター研究報告会資料, 25-33.

◀地域先端研究▶

「アクアDNAブック」の作成とその活用について

¹神奈川県水産総合研究所, ²東京海洋大学, ³理化学研究所

長谷川 理¹・岡本 信明²・藤 加菜子²・林崎 良英³・

河合 純³・中村 光江³・谷川 直樹³・小関 恵子³

「DNAブック」とはDNAを頒布、保管するためにDNAそのものとその情報の両方が紙面上に印刷された書籍のことである。今回、この技術を用いて水産分野における「アクアDNAブック」を作成した。本書のなかにはQTL解析のためのヒラメのマイクロサテライトマーカーと魚病疾病診断のためのDNAマーカーが収録されており、水産研究のための新たなツールとして活用されることが期待される。

1. はじめに

近年、ウイルス病によるコイの大量斃死や一昨年に生じたトラフグの寄生虫駆除に対するホルマリン使用など水産動物の疾病問題に対して社会的関心が高まっている。これらの背景には養殖水産物の食品としての安全性に対して懸念が生じているためと考えられる。

一方、魚の疾病問題に関しては、従来から生産者の被害をどのように軽減するかという点に重きが置かれ、水産用医薬品等の開発研究が行われてきた。しかし、最近では消費者サイドに立った魚類防疫対策が強く求められるようになっている。

農業や畜産における病害防止対策としては、耐病性形質を有する優良品種の作出など育種研究が古くから行われてきたが、水産分野における優良品種の開発研究は、歴史が浅くこの分野の研究は著しく立ち遅れている。

水産分野では優良種苗を生産するために、従来から餌料や飼育方法など外的要因を改善する

HASEGAWA Osamu¹, OKAMOTO Nobuaki²,
FUJI Kanako², HAYASHIZAKI Yoshihide³,
KAWAI Jun³, NAKAMURA Mitsue³,
TANIGAWA Naoki³, KOSEKI Keiko³,

¹〒238-0237 三浦市三崎町城ヶ島養老子

²〒108-8477 港区港南4-5-7

³〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22

ための研究が数多く実施され、現在までに様々な成果が得られている。しかし、外的要因を改善するだけでは解決できない多くの問題が残されている。これらの課題を根本的に解決するためには育種研究は避けることができない研究課題である。

このような情勢のなかで神奈川県では食品として安全な水産物を生産するために、増養殖業を対象とした魚類防疫対策事業を実施するとともに、水産庁のゲノム育種プロジェクトに参加している。また、東京海洋大学、理化学研究所ともヒラメの育種研究に共同で取り組んでおり、本編ではこれら3機関における共同研究の一環として作製した「アクアDNAブック」の概要について報告する。

2. DNAブックとは

「DNAブック」とはDNAを常温で保存及び頒布するために理化学研究所ゲノム科学総合研究センターの遺伝子構造・機能グループが新しいコンセプトに基づいて開発した書籍の形態をした研究ツールのことである。理化学研究所ではこの技術を用いて、昨年マウスのcDNAクローンが収録された「マウスDNAブック」を作製した^{1), 2)}。これらについては本誌³⁾においても国内情報として取り上げられており、詳細についてはそちらを参照していただきたい。

「アクアDNAブック」とは、この技術を用いてヒラメのマイクロサテライトDNAマーカーと水産動物の疾病診断用のDNAマーカーを収録した、水産分野における「DNAブック」のことである（写真1）。

また、本ブックは人工的な合成されたオリゴDNAを収録したものであり、このような書籍形式でオリゴDNAを配布するのははじめての試みである。

3. 「アクアDNAブック」作成の経緯

ヒラメは雌魚のほうが雄魚よりも成長が早いために、種苗を全雌化することにより、効率的な養殖生産が期待できる。このため、神奈川県では1992年から染色体操作を用いて、ヒラメの全雌生産技術の開発に取り組んできた。この過程において、耐

病性や成長性などの量的形質に特徴を有する集団を継代飼育して系統として固定してきた。従来、耐病性や成長性といった量的形質を選抜育種するためには、長い年月を必要としたがDNAマーカー

を用いたQTL解析により、選抜育種のための時間が大幅に短縮される。そこで、QTL解析による優良品種の開発を東京海洋大学と共同で実施してきた。現在までに東京海洋大学において、本県で継代飼育したヒラメをもとに約200種類のマイクロサテライトマーカーを開発し、これらを24の連鎖群に配置した遺伝子地図が作成されている⁴⁾。ブタや牛などの畜産動物で作成されている高密度遺伝子地図のレベルには遠く及ばないものの、これら連鎖地図を用いて、

耐病性形質と連鎖するDNAマーカーも既に検索されてきている。

このQTL解析をさらに効率的に行うためには、多くのDNAマーカーが掲載された遺伝子連鎖地図を作製することが必要であり、現在、ヒラメの高密度連鎖地図の作製を進めている。また、近年、水産においてはマイクロサテライトDNAマーカーを天然魚の系群解析や種判別などにも使用し始めており、DNAマーカーは水産研究にとって新しいツールとして期待されている。

4. 水産動物の疾病に関する問題点

また、冒頭にも述べたように、防疫対策は各地域の水産研究機関にとって重要な業務となっている。しかし、防疫対策への取り組みは養殖

業の盛んな地域と養殖業があまり営まれていない地域では、魚病診断技術に格差が生じているのが実情である。特に海産魚類においてこの傾向は顕著であるが、養殖規模の大きさにかかわらず多くの地域において海産

魚養殖は営まれており、各地方の水産研究所は、地域の魚病診断やその防疫対策に取り組んでいる。疾病診断を迅速にまた適切に行うためには、設備や人員の確保はもちろんであるが、多くの症例に接して経験を積み重ねることが不可欠である。養殖の盛んな地域においては、日常業務の積み重ねによって技術や知見が向上するが、養殖経営体の少ない地域の魚病担当者は、病魚に接する機会が少ないために、原因の特定に時間を要するなど適切な措置に迅速性を欠くこと

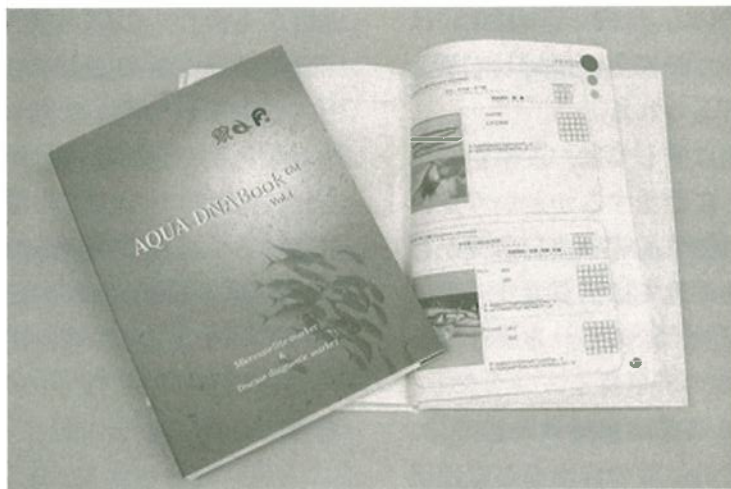


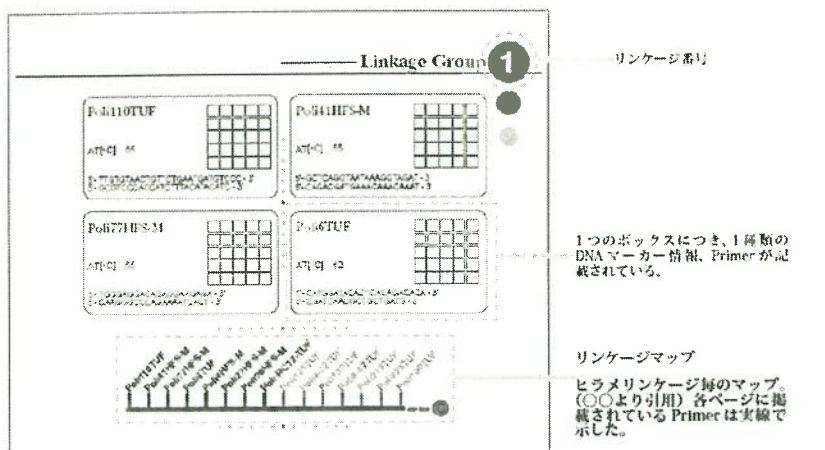
写真1 アクアDNAブック Vol.1

も生じている。また、免疫学的手法や培養細胞を用いた診断方法などは抗体の確保や継代細胞を必要とするが、これらを日頃から確保しておく事が困難な研究機関もある。

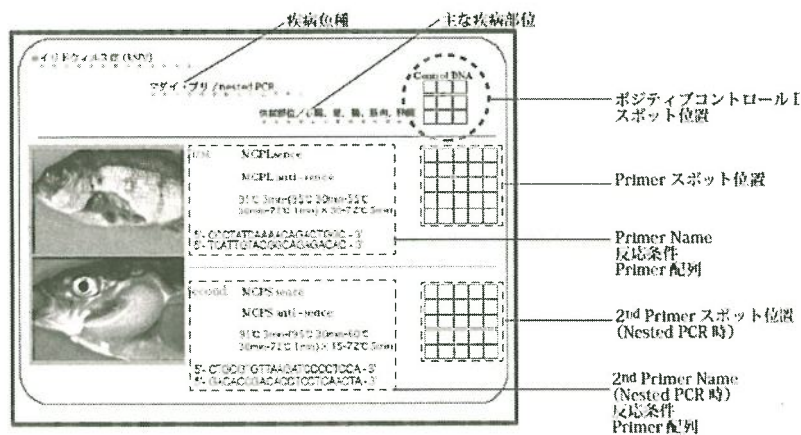
一方、近年になって、PCR法による疾病診断が様々な種類の疾病で開発されてきている。

また、PCR法は疾病診断だけではなく前記の育種や系群判別などへも利用されるために、各地の水産研究機関において実行可能な方法である。このため、本県のような養殖基盤が零細な地域の研究機関における疾病診断やコイヘルペス等いままでに経験したことの無い海外からの疾病診断にも適当な方法と考えられる。

そこで、QTL法による選抜育種とPCR法による疾病の迅速診断の普及を目的として3機関が協力して「アクアDNAブック」を作製した。



ヒラメマイクロサテライトマーカー



疾病診断用マーカー

図1 アクアDNAブックのページ見本

5. 「アクアDNAブック」の概要

「アクアDNAブック」にはヒラメのマイクロサテライトDNAマーカーと診断用マーカーがそれぞれ見本のように収録されている(図1)。各マーカーは、ForwardとReverseの両プライマーを混合したものを5 μpmolずつ水溶紙に25検体分ずつスポットしてある。プライマーには赤色の色素が混合され、スポットされている位置が容易に確認出来るようになっている。このスポットされた部位をΦ2mm以下に切取り、これらと試料及び市販のPCRキットを用いてPCR反応を行うことが出来る。

a) ヒラメのマイクロサテライトマーカー

24のリンクージに配置した217種類のマイクロサテライトDNAマーカーと各マーカーの配列情報及びその連鎖群の染色体地図を示し、各マーカーのリンクージ上の位置を併記している。

b) 疾病診断用マーカー

17種類(DNAウイルス4種類, RNAウイルス4種類, バクテリア7, 寄生虫2)の疾病について、そのPCR検査用のオリゴDNAを収録し、各プライマーの塩基配列情報を併記してある。

また、疾病診断についてはプライマーが正しく働くことを担保するためのポジティブコント

ロールDNAを疾病ごとに9検体ずつ収録してある。なお、ポジティブコントロールDNAについては、疾病の拡散防止を考慮して、病原体から直接に抽出したものではなく、各増幅産物をプラスミドベクターに導入後、これらを大腸菌に形質転換して、これらから得られたプラスミドDNAを抽出してポジティブコントロールとして収録した。

6. おわりに

今回作成した「アクアDNAブック」は、水産研究の新たなツールとして試作的に作製したものである。今後、本ブックは公立の水産研究機関を中心に無償配布することを予定している。各機関において本ブックの有効性について検討していただくとともに、それらの結果をもとに今後さらに充実したものの作製していきたいと考えている。最後に、「アクアDNAブック」を作製していただく機会を与えて下さいました

神奈川県科学アカデミー（KAST）とDNAブック作製に係わる特許技術を無償で提供していただいた（株）ダナフォーム、本ブックの作製にご尽力いただいた理化学研究所並びに東京海洋大学の皆様に感謝申し上げます。

文 献

- 1) J. Kawai and Y. Hayashizaki (2003), *Genome Research*, 13, 1488-1495.
- 2) Y. Hayashizaki and J. Kawai (2004), *Nature Review Genetics*, 5, 223-227.
- 3) 河合 純・林崎 良英 (2003), *ブレインテクノニュース*, 99, 30-35
- 4) M.R.M. Coimbra, K. Kobayashi, S. Koretsugu, O. Hasegawa, E. Ohara, A. Ozaki, T. Sakamoto, K. Narusa and N. Okamoto (2003), A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, *Aquaculture*, 220, 203-218.

◀文献情報▶

オブシンク処理への腔内留置型黄体ホルモン製剤の併用は、哺乳中の黒毛和種への定時授精における受胎率を向上させる

Improved conception in timed-artificial insemination using a progesterone-releasing intravaginal device and Ovsynch protocol in postpartum suckled Japanese Black beef cows.

N. Kawate^a, T. Itami^b, T. Choushi^b, T. Saitoh^c, T. Wada^c, K. Matsuoka^c, K. Uenaka^d, N. Tanaka^d, A. Yamanaka^a, M. Sakase^a, H. Tamada^a, T. Inaba^e and T. Sawada^a

^aLaboratory of Theriogenology, Osaka Prefecture University, ^bKinan Livestock Hygiene Service Center of Wakayama Prefecture, ^cTajima Chief Veterinary Clinical Center, Hyogo Prefectural Federation of Agricultural Mutual Aid Association, ^dTango Branch, Hokubu Veterinary Clinical Center, Kyoto Prefectural Federation of Agricultural Mutual Aid Association, ^eLaboratory of Cell Pathobiology, Osaka Prefecture University.

Theriogenology, 61, 399-406 (2004)

オブシンク／定時授精技術は、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) とプロスタグランジンF2 α (PGF2 α) を用いて、2回目のGnRH投与後24から32時間の8時間に排卵を同期化させ、発情観察をせずに定時授精による高受胎率を確保するために、搾乳牛で開発された技術である。一方、2回目のGnRH投与と同時に人工授精を行うコシンク処理への腔内留置型黄体ホルモン製剤 (CIDR) 併用の有効性については結論が出ていない。そこで、本論文では、哺乳中の黒毛和種に対するオブシンク処理時のCIDR併用によるプロジェステロン投与が、定時授精による受胎率に及ぼす影響が検討した。また、CIDR併用の有無が、血漿中プロジェステロン及びエストラジオール-17 β 濃度に及ぼす影響についても併せて検討した。対照区の38頭に対しては、標準的なオブシンク処理

(Day0 : GnRHアナログ100 μ g, Day7 : PGF2 α アナログ500 μ g, Day9 : GnRHアナログ100 μ g) を行い、2回目のGnRH投与約20時間後のDay10に人工授精を実施した。CIDR併用オブシンク処理区の40頭に対しては、Day0から7日間CIDRを腔内に挿入した。また、Day0, 1, 7, 9, 10, 17の血漿中プロジェステロン濃度及びDay7, 9, 10, 17の血漿中エストラジオール-17 β 濃度を測定した。その結果、対照区 (オブシンク区 : 47.7%) に比べて、CIDR併用オブシンク処理区の受胎率 (72.5%) は有意に高かった。また、CIDR挿入により、Day1及び7のプロジェステロン濃度のみ有意に高くなったが、エストラジオール-17 β 濃度には影響しなかった。

搾乳牛へのオブシンク処理の有効性については様々な報告がなされているが、オブシンク処理の欠点として、発情後15日以降に処理を開始すると、処置中に黄体の退行や排卵がおこるために受胎率が低下することが報告されている。今回、哺乳中の黒毛和種に対するオブシンク処理へのCIDR併用により、処置中の血漿中プロジェステロン濃度の低下がおさえられ、対照区に比べて受胎率を有意に高めることが明らかとなった。今後、発情周期をおさえた上で、CIDR併用の有用性について、さらに検討する必要がある。オブシンク／定時授精技術は、発情観察を省略可能で、発情発見の労力と時間が節約できるとともに、授精業務をプログラムできるという面で有用な手法である。しかし、ホルモン処置のコストがかかることから、コスト面を十分に考えたうえで導入を検討する必要がある。

(抄訳：下司雅也, GESHI Masaya, 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所)

◀文献情報▶

魚の高活性不凍タンパク質

Hyperactive antifreeze protein in a fish

Christopher B. Marshall¹, Garth L. Fletcher²,
Peter L. Davies¹¹Department of Biochemistry, Queen's
University, Kingston, Ontario K7L 3N6,
Canada²Ocean Sciences Centre, Memorial University
of Newfoundland, St John's, Newfoundland
A1C 5S7, Canada*Nature*, 429, 153 (2004)

極地の海に棲む魚にはその低い温度帯で生きるために血漿中に“不凍タンパク質 (Antifreeze protein: AFP)”を持っていることが知られている。これは氷結晶の表面に結合してその成長を阻止し、生体組織を凍結から守っている。北極海に棲むカレイ科の Winter flounder (*Pleuronectes americanus*) から30年前に不凍タンパク質 (Type I) が発見された。そしてそのAFPは生体内におよそ10~15mg ml⁻¹存在していることがわかっている。この Type I AFPは熱ヒステリシスはその存在量から0.7℃となり、したがって Winter flounderの血漿の凍結温度は-1.5℃となる。しかしながら海水の凍結温度は-1.9℃であり、実際はどのように生体を保護しているのかが疑問である。こうした点に著者らは注目し、研究を行った結果、さらに2℃もの熱ヒステリシス活性を持つタンパク質が発見された。このタンパク質は分子量16,683で0.1mg ml⁻¹で1.1℃の熱ヒステリシス活性を有しており、他の魚由来のAFPと比較して非常に活性が高く、特異的である。これは Winter flounderにある遺伝子の5aから推測される分子量16,276のタンパク質と似ているがN末端のシーケンスおよびアミノ酸組成の解析からわずかに違っていることがわかった。5aはこれまで偽遺伝子として解釈されていたが、今回の Winter flounderより発見されたAFPはこのように従来解釈されていなかったタンパク質との相同性を示しており、このこと

はタンパク質の調製方法などの考慮により新たな知見が得られたわけである。

AFPの研究が始まってから30年ほど経つがこうした新たな発見はこれからも続くと思われる。それは生物の多様性に起因することもあるが、我々の研究に対するアプローチ方法を少し変えてみることで従来見えなかった部分が新たな知見として得られることが十分にある。AFPはその特性を利用して食品、医療、農業など広く利用することがこれまでに提案されてきているが、まだ実際には一般的ではない。AFPは生物に広く存在していることがわかっているが、魚類起源のAFPの特性は未知の部分も多くこれからの研究に期待し、実用化が望まれる。

(抄訳：千葉 智, CHIBA Satoru, 日本水産株式会社中央研究所)

◀文献情報▶

酵母 *S. cerevisiae* におけるグルタチオンを介する無毒化経路

The glutathione-mediated detoxification pathway in yeast: an analysis using the red pigment that accumulates in certain adenine biosynthetic mutants of yeasts reveals the involvement of novel genes.

K. G. Sharma, R. Kaur, A. K. Bachhawat
Department of Physiology and Biophysics,
University of Iowa, Iowa, USA

Department of Molecular Biology and
Genetics, Johns Hopkins School of Medicine,
725 North Wolfe Street, PCTB 504,
Baltimore, MD, USA

Arch Microbiol, 180, 108-117 (2003)

全ての生物は、生体内における新陳代謝から生じる老廃物や外界からの有害物質ストレスに対抗する戦略を持っている。例えばその一つとして、酵母 *S. cerevisiae* では、細胞内でグルクロン酸やグルコース、グルタチオンなどが有害物質と結合し、細胞外へ排出する、又はこれらの結合体を液胞中へ輸送する、という無毒化機構を持っている。

S. cerevisiae の *ade1* および *ade2* 変異株は、アデニン制限培地上でアデニン中間体を蓄積する。さらに、その蓄積されたアデニン中間体はグルタチオンと結合し、液胞中へ輸送・貯蓄され、そのことで菌体は赤色を呈するようになる。液胞内輸送に関係するトランスポーターとして、液胞型ATPアーゼの他に Ycf1p, Bat1p および Bpt1p の存在が知られている。そこで筆者らは、アデニン中間体による赤色表現型を利用し、アデニン中間体の液胞輸送に関与するトランスポーターについての検討を行った。

Ycf1p および Bpt1p は、すでにアデニン中間体の液胞輸送に関与していることが明らかにされているが、Bat1p はその機能として依然不明な点が多い。

表現型を検討した結果、 $\Delta ycf1 \Delta bpt1$ 株 (YCF1, BPT1 二重破壊株) は赤色が減少する

のみであったが、 $\Delta ycf1 \Delta bpt1 \Delta bat1$ 株では、白色コロニーを形成した。このことより Bat1p もアデニン中間体の液胞輸送に関与していることが明らかとなった。また、培養時間の延長により $\Delta ycf1 \Delta bpt1 \Delta bat1$ 株が徐々に赤色を呈したことより、Ycf1p, Bpt1p および Bat1p のトランスポーター以外にもアデニン中間体の輸送に関与している因子のあることが示唆された。

そこで、液胞型ATPアーゼによるアデニン中間体の輸送を検討するために、94 kDa のサブユニットをコードしている VPH1 遺伝子について $\Delta vph1 \Delta ycf1 \Delta bpt1 \Delta bat1$ 株を作成し、その表現型を調べたところ、白色コロニーを形成し、しかも、培養時間に関わらず白色のままであった。

以上の結果から、アデニン中間体の液胞輸送に関して、すでに報告のあった Ycf1p, Bpt1p に加え、新たに Bat1p および液胞型ATPアーゼの計4つのトランスポーターがその働きを担っていることが明らかとなった。

酵母 *S. cerevisiae* に限らず、細胞内における液胞への物質輸送及び液胞機能の解明は、無毒化機構を始めとして、非常に重要な研究課題であり、発酵分野などへの応用が期待される。(抄訳：高岡康道, TAKAOKA Yasumichi, 広島大学大学院生物圏科学研究科)

◀文献情報▶

一酸化窒素合成酵素，植物でついに発見

Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling.

Fang-Qing Guo, Mamoru Okamoto, Niegel M. Crawford

Science, 302, 100-103 (2003)

一酸化窒素 (NO) は、大気にも、地中にも、金星にも、火星にも、宇宙空間にもあまねく存在する単純かつ原始的な化合物であり、70年、80年代には、大気汚染の元凶NO_xとして眼の仇にされていた。ところが、1989年にNOが内皮組織の弛緩因子であることが突き止められや、世間の関心はNOからONへと変化し、1992年には「その年最も注目された化合物」に選ばれ、1998年にはノーベル賞に輝き、間違いなく、今、一番注目されている化合物である。

哺乳動物での輝かしい成果に較べNOに関する植物科学は遅れ、数年前にその機能が確認されたに過ぎないが、NOへの植物科学者の興味はここ数年非常に高まり、様々な機能が明らかにされてはきた。ところが、NO産生酵素については長らく不明で「ミッシングリング (失われた輪)」とさえ言われていた (Mata, 2002)。動物では一酸化窒素合成酵素 (NOS) によって、アミノ酸の1種アルギニンからNOが産生される系が知られているが、植物でもNOS活性が確認され、遺伝子の確定も時間の問題だと思われていたのだが、シロイヌナズナの全塩基配列の公表が混乱を生み出した。NOSに相同な塩基配列が見つからないのである。そして、プロテオーム解析の結果もこれに輪をかけた。動物NOS抗体に反応するタンパクにはNOS活性がなかったのである。大混乱の始まりである。そして、NOSはNO主要産生系ではなく、NO₂を還元する亜硝酸還元酵素がその主要経路ではないのかという意見に大半が傾きかけていたのだが、昨年半ばグリシン脱カルボン酸酵素のPタンパクにNOS活性があることが示され

(Chandok等)、ついで、本論文により、遺伝子の存在が確認され、失われた輪はここに閉じた。

カタツムリNOS遺伝子がHuang等によって1999年単離されたが、驚くべき事にその塩基配列は哺乳動物とは似ても似つかぬものであった。本論文の著者たちは、植物NOSはひょっとしてこっちに近いのではないのかと仮説を立て、実験に取り掛かった。シロイヌナズナのT-DNAタギングラインから、カタツムリNOSと相同性を持つDNAにT-DNAが挿入された変異体、*atnos1* (論文中にはAtNOS1と書いてあるが、ここでは通例に従い、変異体は小文字のイタリック体で示すことにする) を選抜してきた。*atnos1*のNOS活性は野生型の1/4しかないが、野生型遺伝子を導入した個体は活性が上昇し、NOS阻害剤L-NAMEで活性が低下する。また、ABA添加により野生型植物根毛のNO発生は高まるが、*atnos1*ではほとんど検出できない。ここまでの結果でAtNOS1はNOSであることがほぼ示されたと言えるが、揺るぎないものにしようと、AtNOS1タンパクが実際に活性をもっているものなのか、大腸菌でタンパクを発現精製し、酵素学的性質を調べていく。NOS活性はあり、NADPH, Ca²⁺, FAD, FMN, カルモジュリンを活性発現に必要とする。アルギニンに対するKm値は12.5 μMであり、まさにNOSであることが確認された。

この酵素をキーとして植物のシグナル伝達の解析が今から詳細に始まることになるであろうが、本論文はまた別の興味をもかきたててくれる。この酵素の起源、分子進化的位置付けについてである。どこかで早速始めている人がいるのでしょね。

(抄訳：岩井純夫, IWAI Sumio, 鹿児島大学農学部)

生研センターからのご案内

アグリビジネス 創出フェア

開催のお知らせ

平成**16**年**10**月

14木 **15**金

**東京国際フォーラム
展示ホール** 東京都千代田区丸の内3-5-1

科学技術が経済・社会を牽引するエンジンと位置づけられる現在、産学官の連携活動については、一層の取り組み強化が求められています。

農林水産省では、研究成果の事業化や技術移転、市場開拓などのビジネスチャンスの創出を促進するため、産業界、研究者等の関係者が一堂に会する機会として、「アグリビジネス創出フェア」を開催致します。

多くの民間企業の方々の来場が見込まれ双方向の交流を促進!!

大学・独立行政法人など、農林水産分野の研究機関における研究開発の取組状況・成果の紹介

研究者による共同研究テーマの提案

研究開発やベンチャー創出支援に係る施策の紹介

来場者と出展者の個別相談等

バイオテクノロジー戦略大綱の実行

「食べる」、「暮らす」、「生きる」の向上に資するため、農林水産・食品分野の研究シーズの実用化、産業化を推進

国民のニーズ 企業のニーズ

バイオ関連産業の振興

よりよく「食べる」 よりよく「暮らす」 よりよく「生きる」

期待される成果・波及効果

2010年において期待される市場規模25兆円のわが国バイオ関連産業のうち、食料産業6.3兆円、環境 エネルギー産業4.2兆円、医療分野4兆円の計18.9兆円への成長

第1回 アグリビジネス創出フェア

産・学・官の積極的な参加を仰ぎ、農林水産・食品産業分野の研究成果の実用化と産業化に向けた環境づくりを行う

問合せ先 農林水産省 農林水産技術会議事務局 先端産業技術研究課 電話:03-3502-8111(内線5157)
(社)農林水産先端技術産業振興センター 電話:03-3586-8644

詳細については農林水産技術会議ホームページへ ▶ <http://www.s.affrc.go.jp/>

近日公開

※数の方々にご参加頂けますよう、お願い致します。



ブレインテクノニュース
バックナンバーのご案内
第99号
2003年9月30日発行

総説

健康機能性を付与した遺伝子組換えイネの研究開発の現状
……………高岩文雄

国内情報

スギ花粉症に効果のあるペプチド含有米の開発
……………高木英典・高岩文雄
血糖コントロール作用を持つペプチド含有米の開発
……………城森孝仁・小原由香里・田下 聡・林 裕二
ウシ卵母細胞を受精可能な卵子まで効率よく長期培養する技術
の開発……………平尾雄二
麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻 *Alexandrium* シストの休眠・発芽生理
の解明……………山口峰生・板倉 茂

ピロロキノリンキノンを補酵素として利用する哺乳類の酵素の
発見……………加藤忠史・笠原和起
スギ採種圃の遺伝子流動の実態把握と最適採種圃の提案
……………津村義彦・谷 尚樹・森口喜成・平 英彰
DNAブッカーイネの遺伝子資源（完全長cDNAクローン）
頒布の可能性……………河合 勉・林崎良英
自動直進田植機の開発……………松尾陽介

文献情報

遺伝子が同一な母ウマからの体細胞クローン仔ウマの誕生
……………(抄訳：下司雅也)
鉛の腸管吸収と組織蓄積におけるラムノガラクトソロン-II
量体の影響……………(抄訳：松浦啓一)
早すぎた死……………(抄訳：岩井純夫)
循環器疾患の予防を目的とした抗酸化ビタミンの使用
……………(抄訳：神野修次)

海外便り

ストレス応答機構の細胞周期への影響
……………パターソン癌研究所での1年間……………濱松潮香



ブレインテクノニュース
バックナンバーのご案内
第98号
2003年9月15日発行

総説

アルコール濃度の低い清酒の開発……………木曾邦明

国内情報

酸性土壌における生産性の向上をめざして—アルミニウム
耐性機構と耐性遺伝子の解析……………松本英明・佐々木孝行
果樹のDNA鑑定……………山本俊哉
デシケータ法を利用した木質建材からの放散アセトアルデヒド
の簡易測定法……………塔村真一郎・井上明生・宮本康太
マダイ養殖漁場における海水中の細菌群集の有機物分解活性
と群集組成の変動……………坂見知子
畜舎排水浄化処理装置の開発と実用化……………道宗直昭

地域の先端研究

新規酵母を用いた低アルコール濃度清酒の開発
……………橋本建哉・伊藤謙治
小麦タンパク質「グリアジン画分」による国産小麦粉を用いた
パンの大量生産技術の開発
……………新井千秋・廣瀬理恵子・柴田朋子・丹下幹子
高精度水田用除草機の開発……………宮原佳彦

文献情報

卵丘細胞を用いた核移植胚由来子牛におけるドナー細胞由来
ミトコンドリアDNAの増加……………(抄訳：下司雅也)
糸状菌 *Neurospora crassa* のゲノム配列……………(抄訳：織田 健)
都会のポプラと田舎のポプラ……………(抄訳：岩井純夫)
OsTBI はイネの分げつ成長を負に制御する (抄訳：丸尾喜宏)
粉末モデルにおけるゼイン二次構造におよぼす水分活性と脂質
の影響……………(抄訳：郡山 剛)

海外便り

ウソカの飛来を高精度に予測せよ
……………米国立大気研究センターでの1年間……………大塚 彰

生研機構からのご案内

編集後記

第104号をお届けします。本号では、「エピジェネティクス研究」を特集に組み、塩田邦郎氏（東京大学）に哺乳類における研究の現状を、星野敦・飯田滋両氏（自然科学研究機構・基礎生物学研究所）に植物分野における研究の現状を、また、河野友宏氏（東京農業大学）には実際にマウス単為発生胚の誕生に至ったエピジェネティクス研究の現状についてご紹介戴いた。

その他の研究情報として、森山達哉氏ら（京都大学）に大豆タンパク質の機能性解明、南原英司氏ら（独・理化学研究所）に休眠種子の覚醒遺伝子、真柄謙吾氏（独・森林総合研究所）に木材中のリグニン分離方法の改良、後藤隆志氏ら（生研センター）に土壌サンプル粉碎篩分け装置の開発、長谷川理氏（神奈川県水産総合研究所）他の方々にアクアDNAブックの作成とその活用についてご紹介戴いた。また、文献情報は、下司雅也氏（独・畜産草地研究所）、千葉智氏（日本水産株式会社）、高岡康道氏（広島大学）、岩井純夫氏（鹿児島大学）にそれぞれご紹介戴いた。執筆者各位に深甚の謝意を申し上げます。
(渡辺記)

本誌著作物の複写利用等について

本誌掲載の論文・記事の複写・転載等を希望される方は、執筆者ならびに生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）の許諾を得て行って下さい。

ブレインテクノニュース 第104号

平成16年7月15日発行

発行人 津賀幸之介

編集人 吉奥 努

発行所 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（生研センター）

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3丁目18番19号 虎ノ門マリビル10階

TEL 03-3459-6565 FAX 03-3459-6566

e-mail brainki1@ml.affrc.go.jp

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

印刷・製本 日本印刷株式会社 〒101-0021 東京都千代田区外神田6-3-3 TEL 03-3833-6971