

脂肪細胞の分化・増殖過程

脂肪細胞の分化・増殖と食品中の調節因子

¹ 京都大学大学院 農学研究科 食品生物科学専攻

² 自然科学研究機構 生理学研究所

河田 照雄¹・後藤 剛¹・高橋 信之²

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

総 説

- 食品成分による肥満・生活習慣病の制御 1
 齊藤 昌之 (北海道大学大学院 獣医学研究科)

国内情報

- エネルギー消費分子UCPの機能と食事性調節 5
 齊藤 昌之 (北海道大学大学院 獣医学研究科)
- 脂肪細胞の分化・増殖と食品中の調節因子 10
 河田 照雄¹・後藤 剛¹・高橋 信之² (¹京都大学大学院 農学研究科 食品生物科学専攻
²自然科学研究機構 生理学研究所)
- 食用植物由来の酸化ストレス制御因子による生活習慣病の制御 16
 室田 佳恵子・寺尾 純二 (徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部)
- 受精の膜融合における必須分子Izumoの発見 21
 井上 直和・岡部 勝 (大阪大学 微生物病研究所 遺伝情報実験センター)
- ポプラ葉緑体形質転換技術開発 25
 富澤 健一 ((財)地球環境産業技術研究機構 植物研究グループ)
- 有毒渦鞭毛藻個体群の多型分子マーカーによる遺伝的構造と遺伝子流動の解明 29
 長井 敏¹・練 春蘭²・浜口 昌巳¹・松山 幸彦¹・板倉 茂¹・宝月 岱造³
 (¹(独)水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所, ²東京大学 アジア生物資源環境研究
 センター, ³東京大学 農学生命科学研究科)
- 耐塩性ラン藻の新規生合成経路を利用した塩害に強い植物の開発 33
 田中 義人¹・日比野 隆¹・高倍 昭洋² (¹名城大学 理工学部, ²名城大学 総合研究所)
- 農作業事故情報の収集と安全啓発 38
 中野 丹 ((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

- 緑色大型藻類の葉状体形成因子Thallusinの発見と今後の展開 42
 松尾 嘉英¹・今川 洋²・西沢 麦夫²・志津里 芳一¹ (¹(株)海洋バイオテクノロジー
 研究所, ²徳島文理大学 薬学部)

文献情報

- 卵巣周期モニタリングのための肉牛糞便中プロジェステロンの酵素免疫測定法 46
 N. Isobe et al. (*Animal Reproduction Science*, 87, 1-10, 2005) 抄訳: 下司 雅也
- 珠孔に花粉管を誘導するタンパク質の発見 47
 M.L. Márton et al. (*Science*, 307, 73-76, 2005) 抄訳: 岩井 純夫
- 食品の微生物学的安全性におけるゲノミクスの役割 48
 T. Abee et al. (*TRENDS in Biotechnology*, 22, 653-660, 2004) 抄訳: 堂本 信彦
- カドミウムストレスに対するグルタチオントランスフェラーゼの役割 49
 P.D.B. Adamis et al. (*Toxicology Letters*, 154, 81-88, 2004) 抄訳: 安達 美和

表紙の説明

脂肪細胞は、軟骨細胞、平滑筋細胞などと同じ系列の幹細胞から分化すると考えられている。図は、幹細胞から脂肪細胞が形成されるまでの一連の過程を表したものであり、各過程において脂肪細胞を特徴づける遺伝子が整然と発現してくる。詳細については、10頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

食品成分による肥満・生活習慣病の制御

北海道大学大学院 獣医学研究科

齊 藤 昌 之

過食や運動不足などに起因する肥満、特に内臓脂肪の過剰蓄積が、糖尿病や高血圧症、動脈硬化症などの生活習慣病の基盤となっている。このメタボリックシンドロームの病態に、脂肪細胞由来のアディポサイトカインの異常や酸化ストレスが中心的役割を果たしていることが明らかになってきたので、これらを制御する食事因子の探索・解析が生活習慣病対策として重要となってきた。

1. はじめに

第二次世界大戦後の混乱期から高度成長期を経て成熟社会へと変貌してきた我が国において、伝染病や寄生虫病などが減少する一方で、糖尿病や高血圧、動脈硬化症、癌などのいわゆる生活習慣病が増加しつつあることは多くの統計資料が示すところであり、その対策が国家的課題となっている。これらの疾病はかつては成人病と呼ばれていたが、成人に限らず子供にも見られ、食事や運動、喫煙などの環境因子・生活スタイルが大きな要因となることが明らかになるにつれて、現在は生活習慣病との呼称が定着している。本稿では、生活習慣病と肥満との関係について、本年4月に策定された「メタボリックシンドローム」の概念を紹介しながら、その主役分子機構としてのアディポサイトカインと酸化ストレスについて解説し、生活習慣因子としての食事について、特に食品中の成分による制御に関する国内情報につなげたい。

2. 肥満と生活習慣病、メタボリックシンドローム

糖尿病や心疾患などの発症率が肥満者ほど高いことは、50年以上も前に米国での生命保険会

SAITO Masayuki
〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目

社の統計データでも示されていたが、我が国でも1980年代以降多くの疫学調査研究が行なわれ、現在では肥満がこれら生活習慣病の最大の危険因子であることが広く知られている。肥満は体脂肪が異常に蓄積した状態であるが、蓄積部位の違いによって皮下脂肪型と内臓脂肪型に大別される。前者は腰周りなどの皮下脂肪が厚くヒップが太いが、後者は腹腔内の消化管や腎臓などの周囲に脂肪がたまってウェストが太くなったタイプの肥満である。これが単なる外見上の違いだけに止まらず、生活習慣病への危険度の上で大きく異なり、同じ肥満度（BMI）であっても、皮下脂肪型よりも内臓脂肪型の方が糖尿病や動脈硬化症、高血圧の罹患率が高いことが明らかになってきた。これらの事実に基づき、2000年に日本肥満学会は、BMIが22を理想とし25以上を肥満としたうえで、肥満に伴う健康障害を合併している場合、あるいは内臓脂肪型肥満である場合（ウェストが男性で85cm以上、女性で90cm以上、あるいは腹部CT検査で内臓脂肪面積が100cm²以上）は、病的肥満すなわち「肥満症」と定義した¹⁾。

一方、心筋梗塞をはじめとする動脈硬化性疾患のリスクファクターとして、従来高コレステロール血症が重視されていたが、実際にはそれが主要因と考えられるケースは少なく、むしろ、耐糖能異常や高血圧、高脂血症（高中性脂肪、低HDLコレステロール、高コレステロール）、

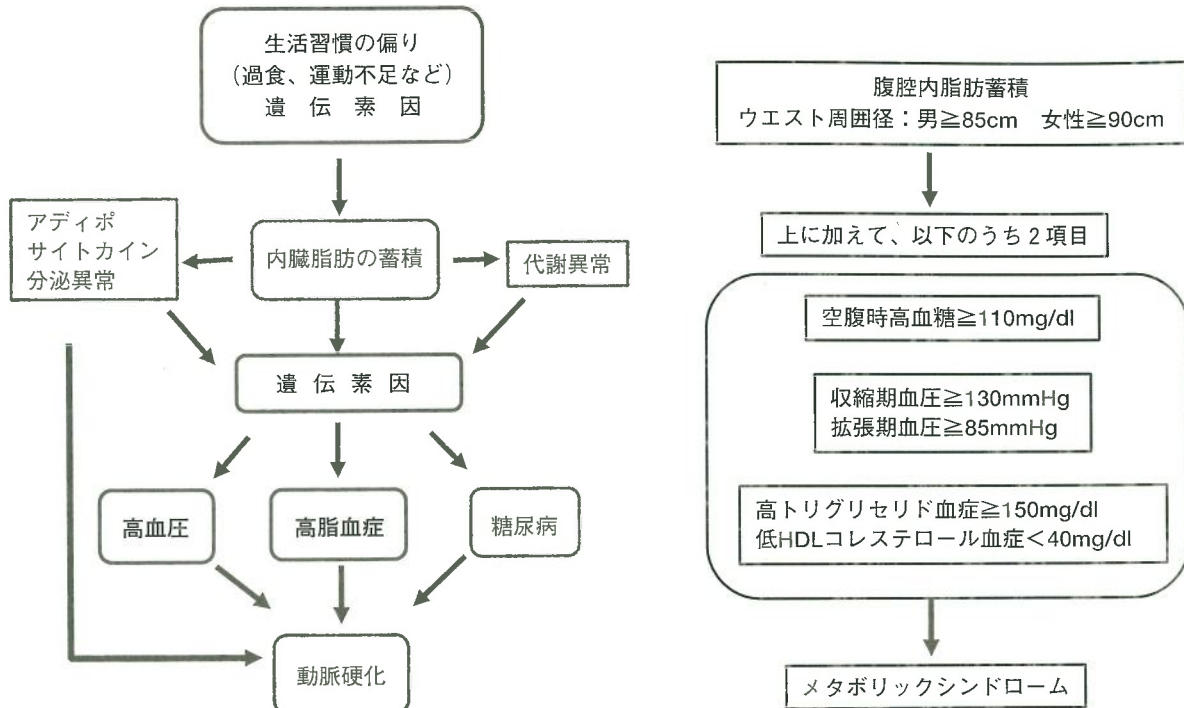


図1 メタボリックシンドロームの概念と診断基準

内臓脂肪蓄積を基盤として高血圧、高脂血症、糖尿病、さらには動脈硬化へと進展する。これらの発症は遺伝素因によって影響される。右は2005年4月に策定された日本人のメタボリックシンドロームの診断基準。

肥満（とくに内臓脂肪型肥満）などが同一個人に集積するケースが多いことが明らかになり、シンドロームX、死の四重奏などと呼ばれていた。このように多彩な要因が関わるマルチプルリスクファクター症候群と上述の肥満症の定義を統合して、現在は、内臓脂肪肥満を基盤として脂質代謝異常や高血圧、耐糖能異常等の多数の危険因子が集積して動脈硬化へと至るといふメタボリックシンドロームの概念としてまとめられており、その診断基準も本年4月に作成された（図1）²⁾。

3. 脂肪細胞とアディポサイトカイン、酸化ストレス

メタボリックシンドロームの基盤に内臓脂肪の過剰蓄積があるのなら、そのメカニズムは何であろうか？もっとも単純かつ直接的な考えは、肥満した内臓脂肪から何らかの因子が出てそれが循環器や臓腑、肝臓などに悪影響を及ぼ

すという、癌の悪液質と同じアイデアである。脂肪組織の最大の役割は、中性脂肪を貯え必要に応じて全身に分解供給するエネルギー貯蔵庫としての機能である。実際、絶食や運動時には多量の脂肪酸が脂肪細胞から血中に放出される。しかしここ10年ほどの間に、エネルギー基質のみならず多種多様な生理活性ペプチドが脂肪細胞から分泌されることが明らかになってきた。現在までに、レプチンをはじめとして腫瘍壊死因子（TNF α ）やアディポネクチン、レジスチン、PAI-1など数十種類が知られており、脂肪細胞由来のサイトカインなのでアディポサイトカイン（あるいはアディポカイン）と総称されている（図2）。アディポサイトカインは多彩な生理活性を有しており、しかも肥満をはじめとする脂肪細胞の状態によって合成・分泌が変化するので、メタボリックシンドロームの中心因子とされている³⁾。以下、いくつかの例を紹介する。

レプチンは、遺伝性肥満ob/obマウスの原因

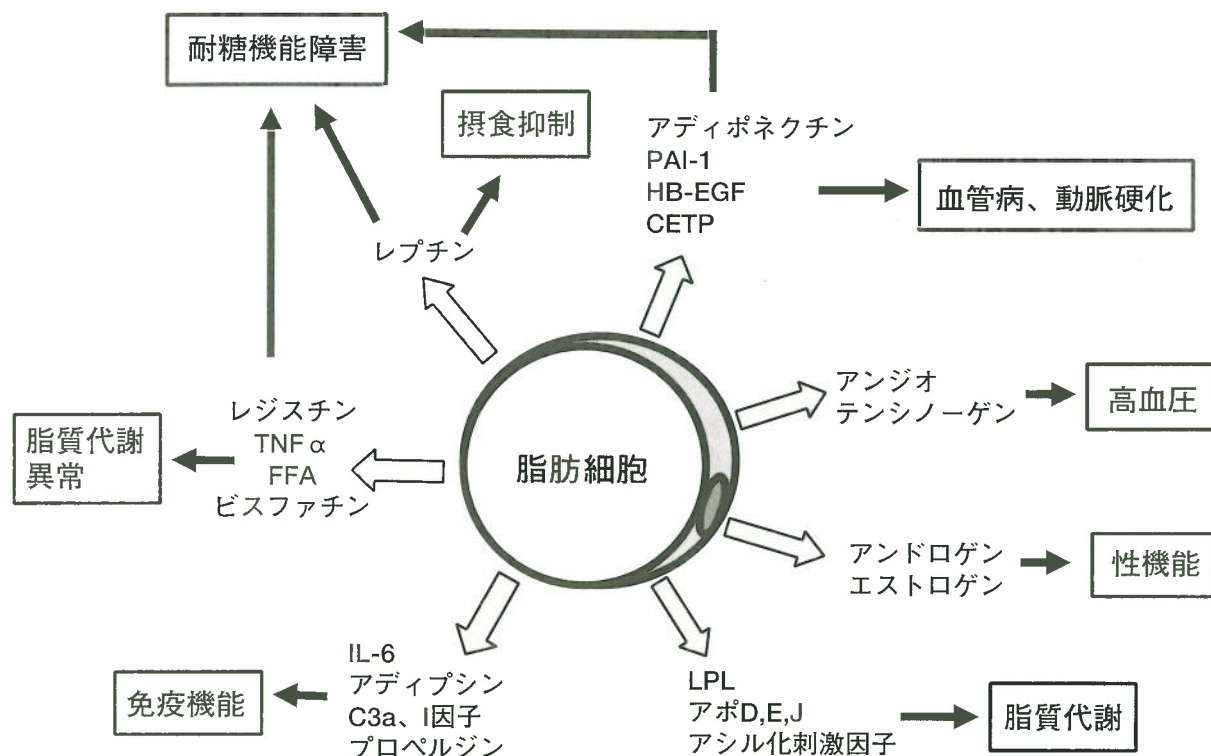


図2 脂肪細胞由来のアディポサイトカインとその作用・関連異常

遺伝子産物として1994年に分子クローニングされたアディポサイトカインで、脂肪細胞から血中に分泌され間脳視床下部のレセプターを介して、摂食抑制やエネルギー消費亢進を引き起こす作用を持つ。レプチンは末梢レベルでもリンパ球や筋肉などにも直接作用して、多彩な効果を発揮することが知られている。従って、レプチンの過不足は摂食行動のみならず糖や脂肪など多くの代謝に影響を与えることは、容易に想像できる。例えば、体脂肪を極端に少なくした fat-lessマウスは、血中レプチン濃度が低いばかりでなく耐糖能低下を呈するが、この症状はレプチン投与によって改善できる。同様のレプチン効果は脂肪萎縮性糖尿病の患者でも実証されており、レプチンが正常な糖代謝に重要であることがわかる。

レプチンの血中レベルは体脂肪量に正比例し、肥満では高レプチン血症となる。ところが、極端な痩せと同様に肥満・高レプチン血症でも耐糖能異常となり糖尿病へと進展する。これは

肥満ではレプチンの作用が弱い（レプチン抵抗性）ためであると理解されているが、レプチン以外にも肥満と耐糖能異常を結ぶ因子の存在を示唆している。松沢らのグループによって発見されたアディポネクチンはその最有力因子である。事実、アディポネクチンは肝臓での糖新生を抑制すると共に、骨格筋での糖利用を促進する作用を有し、アディポネクチン欠損マウスでは耐糖能異常が誘発される。アディポネクチンの血中レベルはレプチンとは逆に肥満で低下することを考え併せると、レプチン抵抗性に加えてアディポネクチン不足が耐糖能異常の原因であると思われる。アディポネクチンは他にも血管に直接作用して動脈硬化性の変化を抑制することも知られており、メタボリックシンドロームのキープレイヤーの一つであると思われる。

アディポサイトカインの知見とは別に、肥満や糖尿病、動脈硬化症では酸化ストレスが増大していることが知られている⁴⁾。酸化ストレスとは生体における酸化と抗酸化のバランスが破

総し酸化に傾いた状態を指すが、スーパーオキシド、過酸化水素などの活性酸素種の増加が見られる。これらの活性酸素は反応性が高く、例えば血管内皮で産生される一酸化窒素NOと反応してこれを減少させる。NOは血管に対して拡張作用があるばかりでなく、血小板凝集、平滑筋増殖、白血球の接着などを抑制し抗動脈硬化作用を持っているので、活性酸素によるNO減少はONOO⁻という細胞障害性の高い別の活性酸素の生成と併せて、動脈硬化を進展させる重要な因子となる。さらに、酸化ストレスは血管壁内に取り込まれたLDLの酸化を促進するので、これも動脈硬化巢の発育を促すことになる。

最近、肥満した脂肪細胞では活性酸素の生成酵素（NADPHオキシダーゼ）が高まり消去酵素が低下して、活性酸素種が増加することが見出され、これが原因となってアディポネクチンをはじめとするアディポサイトカインの合成・分泌が異常となることが明らかとなった⁵⁾。脂肪細胞での酸化ストレスを増やす因子の一つとして遊離脂肪酸が想定されているが、今後の研究の進展が注目される場所である。

4. 食事と食品成分に関する国内情報へ：おわりに代えて

上記のように、肥満と生活習慣病の関係については、内臓脂肪型肥満を基盤とするメタボリックシンドロームという概念でまとめることができるが、そのキープレイヤーとしてアディポサイトカインや酸化ストレスが注目されている。しかし、単なる肥満ではなく「なぜ内臓脂肪型肥満なのか」については、必ずしも明確になっているわけではない。ごく最近、内臓脂肪組織にほぼ限定して合成されるアディポサイトカインとしてビスファチンが発見された。また、内臓脂肪（大網脂肪組織）からの血液は門脈を介して肝臓に直接流入するので、肝臓での代謝

はより強く影響されるのも関係すると思われる。いずれにせよ、内臓脂肪と皮下脂肪の違いを詳細に解析することが、今後ますます重要となってくるであろう。

これまで紹介した最新知見を踏まえてメタボリックシンドロームへの対策を考える際には、上流の肥満そのものへの対策と下流のアディポサイトカインや酸化ストレスなどの連関因子への対策に大別できる。食事や食品成分を中心として考えると、食事の総エネルギー量、脂肪量、摂取回数、消化吸収率、エネルギー消費への影響などについての知見は前者に寄与するものである。以下の国内情報の項では、食事制限とは別の視点からの肥満対策について、エネルギー消費分子UCPを中心に齊藤が紹介する。一方、血中リポ蛋白質や血管に対する食品中の抗酸化成分の効果についての知見は後者に直結するであろう。これについては、フラボノイドの効果を中心に室田らが紹介する。もちろん、両者を厳密に区別することは不可能であり、むしろ一体のものとして有効な食事条件や食品因子を探るほうが現実的かつ有益であろう。肥満の中心に位置する脂肪細胞の増殖、分化、機能に関する基礎的知見の集積が重要なゆえんであり、これに関する情報を河田らが紹介する。

文 献

- 1) 日本肥満学会肥満症診断基準検討委員会 (2000), 肥満研究, 6, 18-28
- 2) 松沢佑次ら (2005), アディポサイエンス, 2, 8-71
- 3) 春日雅人ら (2004), アディポサイエンス, 1, 239-309
- 4) 安藤克之 (2004), 別冊医学のあゆみ, 糖尿病・代謝症候群, 58-61
- 5) Furukawa S. et al. (2004), *J. Clin. Invest.*, 114, 1752-1761

◀国内情報▶

エネルギー消費分子UCPの機能と食事性調節

北海道大学大学院 獣医学研究科

齊 藤 昌 之

生活習慣病の上流にある肥満の制御には、エネルギーの摂取だけでなく消費の調節も重要である。ミトコンドリアの脱共役蛋白質UCPは、自律的なエネルギー消費を担う分子の一つであり、これの異常が肥満を誘発するので、逆に活性化によって肥満の軽減が期待できる。本稿では、UCP遺伝子の発現調節や活性化の機構に関する知見を整理し、食事因子の影響について、味覚や脂肪酸の効果を中心に考察した。

1. はじめに

糖尿病や高血圧などの生活習慣病の上流には肥満、特に内臓脂肪型の肥満があることは周知の事実である。肥満の制御には、エネルギーの摂取だけでなく消費の調節も重要である。脂肪酸やグルコースなどの化学的エネルギーは、必要に応じてATPに合成され、筋肉運動や能動輸送、生合成など利用された後、最終的に熱となるが、生体は熱エネルギーを回収利用する仕組みを持たないので、体外に放散するのみである。従って、これらの過程をバイパスあるいは繰り返せば熱産生が増え、エネルギーが消費されることになる。脱共役蛋白質（uncoupling protein, UCP）は、この最初の段階で脂肪を直接熱に変換する分子の一つである。UCPは、もともと小型齧歯類や冬眠動物の熱産生部位である褐色脂肪細胞に特異的な蛋白質として知られていたが、1997年にこれと相同な新たな分子が相次いでクローニングされ、現在では、従来のUCP 1と新たなアイソフォームUCP 2～5を併せてUCPファミリーをなしている。以下、UCPによるエネルギー消費の仕組みと肥満との関連、さらには食事の質や量の影響について紹介し、これらによる制御の可能性を議論したい。

SAITO Masayuki

〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目

2. エネルギー散逸分子としてのUCP

UCPファミリーはミトコンドリア内膜に存在する約300個のアミノ酸からなるポリペプチドであり、その名のとおり酸化リン酸化を脱共役させる機能を持っている（図1）。即ち、細胞内でグルコースや脂肪酸が分解されるとNADHやFADH₂が生成し、これらが電子伝達系で酸化される過程で放出されるエネルギーは、一旦ミトコンドリア膜を介するプロトンの電気化学的勾配として保存される。このエネルギー勾配に従ってプロトンがミトコンドリア内に流入する際に、膜ATP合成酵素を駆動してADPと無機リン酸を縮合させる。このように、普通のミトコンドリアでは電子伝達とATP合成が内膜でのプロトン濃度勾配を介して密に共役しているが、UCPはこのプロトン濃度勾配を短絡的に解消する特殊なチャネルである。従って、UCPが活性化されると化学エネルギーがATPを経ずに直接熱へと変換され散逸消費されることになる。

UCPファミリーのうち、UCP 1は褐色脂肪組織に特異的に存在し、UCP 2は白色脂肪組織や骨格筋、脾臓、小腸など全身に幅広く、UCP 3は主に骨格筋に、UCP 4とUCP 5は主に脳に存在する。いずれも脱共役活性を有するが、全身のエネルギー消費や肥満との関係についてはなお未解明の点が多い。以下、知見の多

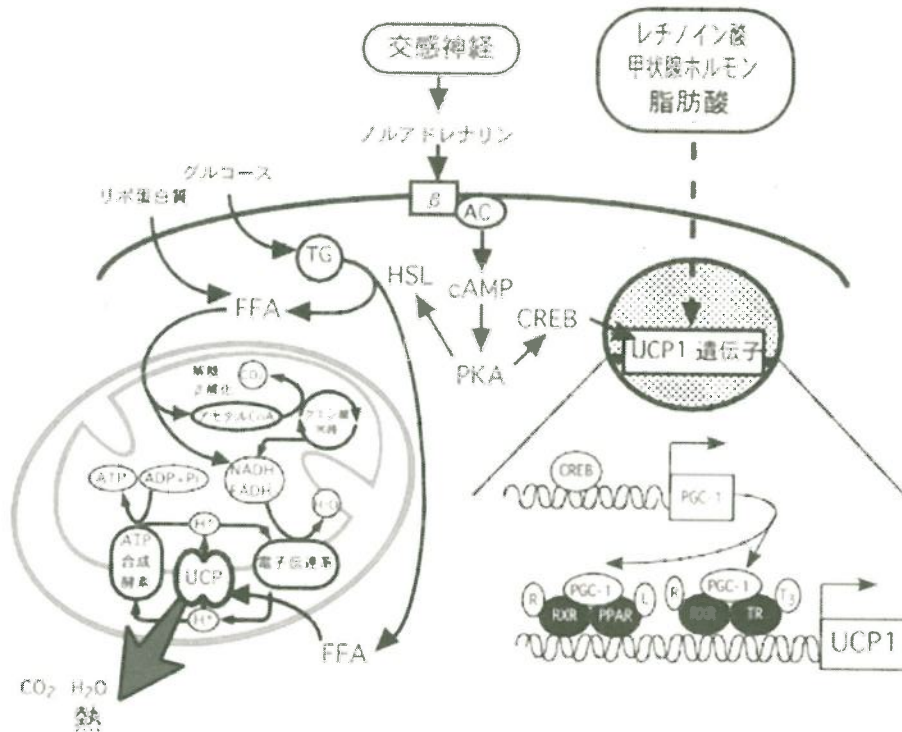


図1 UCPによるエネルギー消費と褐色脂肪UCP1遺伝子発現の調節

β：βアドレナリン受容体, Gs：G蛋白質, AC：アデニル酸シクラーゼ, PKA：プロテインキナーゼA, CREB：cAMP応答配列結合蛋白質, TG：トリグリセリド, FFA：遊離脂肪酸, HSL：ホルモン感受性リパーゼ, PPAR：ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体, PGC-1：PPARγコアクチベーター-1, RXR：レチノイドX受容体, TR：T3受容体, R：レチノイン酸, L：PPARリガンド

いUCP 1を中心に紹介し、UCP 2, 3についても附言する。なお、UCPに関する一般的な事柄は総説¹⁻³⁾に詳しい。

3. UCPと熱産生・エネルギー消費・肥満との関係

UCPの生理的役割については、エネルギー出納を変化させた時や肥満動物におけるUCP遺伝子発現の変化やUCP遺伝子トランスジェニック動物に関する知見から推定することができる(表1)。正常な動物では、カフェテリア食による自発的多食や寒冷暴露などを行うと、エネルギー摂取量が増加すると同時に、交感神経活動が亢進し熱産生・エネルギー消費も増加し、逆に絶食にすると消費も減少して、全体としてエネルギーバランスがある程度維持され

る。また、甲状腺ホルモン(T3)やβ3アドレナリン作動薬、レプチンの投与によってもエネルギー消費が増加する。これら全ての条件でUCP遺伝子発現のパターンをみると、エネルギー消費の変化と対応して変動するのはUCP 1のみである。この事実は、UCP 1がエネルギー消費の調節に一定の役割を果たしていることを示唆している。事実、UCP 1を過剰発現させたマウスは肥満が抑えられ、逆に欠失させると寒冷耐性が低下すると共に肥満になりやすいことが証明された⁴⁾。肥満モデル動物ではUCP 1の発現が低下するので、エネルギー消費も減少し多食と相まって肥満が進展すると思われる。

UCP 2とUCP 3遺伝子発現の変動は、UCP 1と同じ場合もあるが逆の場合もあり、特にエネルギー消費が減少する絶食で発現が増加す

る。また、これらの過剰発現マウスは肥満抵抗性を示すが、欠損マウスは寒冷耐性で肥満にもならない。このように、UCP 1は古くから知られているとおり実際に熱産生分子として働いており、エネルギー消費の自律的調節に大きな役割を果たしていると思われるが、UCP 2とUCP 3については、必ずしもコンセンサスが得られていないのが現状である。

4. 交感神経によるUCP 1の活性化

UCP 1を活性化してエネルギー消費を増やすことができれば、肥満の予防・治療に新たな道が拓けるので、薬物や食餌をはじめとして様々な試みが行われている。

UCP 1の活性化には、褐色脂肪細胞のβアドレナリン受容体の刺激が必須である(図1)。即ち、寒冷暴露や多食などによる交感神経の活動亢進やβ受容体作動薬投与によってβ受容体が刺激されると、アデニル酸シクラーゼ→プロテインキナーゼA→ホルモン感受性リパーゼと一連の酵素が活性化され、細胞内トリグリセリドから脂肪酸が遊離する。この脂肪酸は酸化分解されて熱源となるのみならず、UCP 1に直接作用してプロトンチャネル機能を活性化する作用を持つ。

β受容体刺激は即時的にUCP 1熱産生を活性化すると同時に、T3などと協調してUCP 1遺伝子発現のみならずミトコンドリアの増加と褐色脂肪組織の増生を引き起こし、動物個体としての熱産生能力を高めエネルギー消費を亢進させる。β受容体刺激は白色脂肪の脂肪動員も亢進させるので、全体として肥満を軽減・予防

表1 各種刺激および動物におけるエネルギー消費とUCP遺伝子発現

エネルギー消費		UCP1	UCP2	UCP3
代表的な分布部位		褐色脂肪	白色脂肪	骨格筋
正常動物				
・自発的過食 (カフェテリア食)	↑	↑	↑	→
・高脂肪食	↑ →	↑	↑	↑ →
・絶食	↓	↓	↑	↑
・寒冷暴露	↑	↑	↑	↑
<hr/>				
・T ₃	↑	↑	↑	↑
・β ₃ 作動薬	↑	↑	↑	↑ →
・レプチン投与	↑	↑	↑	↑ →
<hr/>				
肥満動物				
・ob/ob, db/db, Zucker	↓	↓	↑	→
・VMH破壊	↓	↓	↑	→
<hr/>				
遺伝子改変動物		UCP1	UCP2	UCP3
<hr/>				
・UCP過剰マウス	肥満	↓	↓	↓
	エネルギー消費	↑	↑	↑
・UCP欠損マウス	肥満	→ ↑	→	→
	エネルギー消費	↓	→	→
	寒冷耐性	↓	→	→

することが期待できる。実際、脂肪細胞に特有のβ3受容体作動薬は、摂食量にはほとんど影響することなく熱産生を増加させ体脂肪を減らす効果があることが、マウスやラット、イヌで実証されており^{5, 6)}、ヒトへの応用も試行されている。

5. 食事によるUCP1の活性化

上述のような薬物ではなく生理的に交感神経・UCP 1を活性化できる代表例が、寒冷暴露とカフェテリア食である(表1)。両者ともに多食となるが、前者では体温維持のための熱産生として必須である。一方カフェテリア食による多食は味覚などによる嗜好性に起因するとされているが、味覚刺激は交感神経・UCP 1によるエネルギー消費にも促進的に作用して、全体としてのバランスを維持する効果があることが知られている。例えば、流動食を非経口的

に与え経口摂取させた場合と比較すると、非経口摂取の方が褐色脂肪での交感神経活性や熱産生活性が低く、長期に渡ると体重や体脂肪量が多くなる。トウガラシやショウガなどには交感神経や熱産生を活性化する成分があることはよく知られているが、その一部はこのような味覚刺激を介した作用である可能性が考えられよう。

褐色脂肪でのUCP 1 遺伝子の発現は、 β 受容体のみならず核内受容体刺激によっても相乗的に増強される。これに関与するのはT3受容体やペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 (PPAR)、レチノイドX受容体 (RXR) などであるが、特にPPARについては、UCP 1 のみならずUCP 2 やUCP 3、さらには脂肪代謝や脂肪細胞の分化などにも中心的役割を果たすことが知られており、これの活性化因子は重要である。注目すべきは、各種の長鎖脂肪酸やその誘導体、ある種のイソプレノール類など、食品中にはPPARやRXRのリガンド活性を有する成分が多数存在するという事実である。特にリノール酸やリノレン酸、アラキドン酸などの不飽和脂肪酸はそれ自身としてのみならずそれから合成されるプロスタノイドとして、PPARを強く活性化する。従って、これらのうちから特異性と有効性が高い成分を探索することが今後重要となるであろう。

6. UCP 2, UCP 3 の役割と脂肪酸

先述のように、UCP 2 やUCP 3 がエネルギー消費分子として機能しているか否かについては必ずしもコンセンサスは得られていないが、活性酸素や脂肪酸分解との関係で注目されている。例えば、UCP 2 欠損マウスは原虫感染に対する抵抗性が増加しており、通常のマウ

スに比べて死亡率が大きく低下する。これはマクロファージなどでの活性酸素生成の亢進が関与するとされている。即ち、UCP 2 が無いとプロトン濃度勾配がよりきつくなり電子伝達系が還元状態になるので、過剰の電子が酸素に移され活性酸素が増えるのである。

また、骨格筋に大量に発現しているUCP 3 は、褐色脂肪UCP 1 と同じく β 受容体 (主に $\beta 2$ 受容体)、T3受容体、PPARの刺激により亢進するが⁷⁾、特に血中に遊離脂肪酸が増加すると発現が増加する。脂肪酸にはPPARリガンド活性があることやUCP 1 と同様にUCP 3 の脱共役機能の活性化作用があることなどを考え併せると、骨格筋UCPは脂肪酸の代謝と関係するのではないかと思われる。事実、エネルギーバランス調節のキー分子の一つであるレプチンが、直接的および交感神経の活性化を介して間接的に骨格筋の脂肪酸酸化を亢進させることが知られており⁸⁾、これで生じるエネルギーの最終処理や過剰の脂肪酸毒性の解消にUCP 3 が関与している可能性が高い。食品中の脂肪酸やその誘導体の効果と併せて興味を持たれるところである。

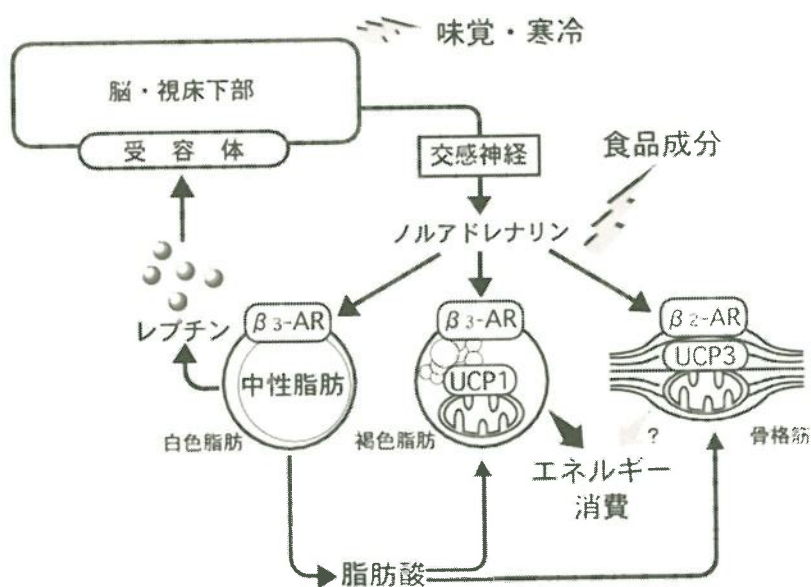


図2 UCPによる脂肪酸、エネルギー消費の調節

7. おわりに

本稿では、エネルギー消費分子としてのUCPの可能性について紹介した。図2にそれらをまとめたが、多くはマウスなどの実験動物での知見によっており、そのままヒトに当てはめることはできない。しかし最近、ヒトの褐色脂肪を非侵襲的に可視化することが可能となり⁹⁾、マウスなどと同様に機能することが確認されたので、肥満対策のターゲット分子の一つとして改めて注目されはじめている。また、UCP2やUCP3についても、ヒトの遺伝子変異・多型が多数報告されており、そのうちのいくつかは肥満やインスリン抵抗性と有意に関連しているとされている。今後、ヒトを対象としてUCPの遺伝子発現や活性とエネルギー代謝、食品因子との関係を明らかにすることが一層重要となってきた。

文 献

- 1) Ricquier, D. et al (2000), *Biochem. J.*, 345, 161-179
- 2) 齊藤昌之 (2003), *日本栄養・食糧学会誌*, 56, 33-39
- 3) 猪熊健一ら (2004), *現代医療*, 36, 1815-1820
- 4) Kontani, Y. et al (2005), *Aging Cell*, 4, 147-155
- 5) Nagase, I. et al (1996), *J. Clin. Invest.*, 97, 2898-2904
- 6) Sasaki, N. et al (1998), *J. Vet. Med. Sci.*, 60, 465-469
- 7) Nagase, I. et al (1999), *FEBS Lett.*, 461, 319-322
- 8) Minokoshi, Y. et al (2002), *Nature*, 415, 339-343
- 9) Fukuchi, K. et al (2003), *J. Nucl. Med.*, 44, 1582-1585

◀国内情報▶

脂肪細胞の分化・増殖と食品中の調節因子

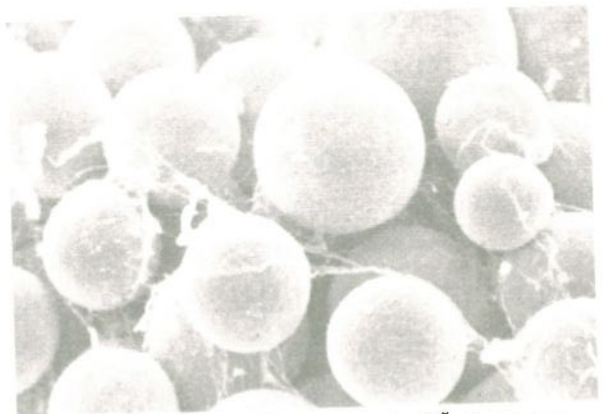
¹京都大学大学院 農学研究科 食品生物科学専攻²自然科学研究機構 生理学研究所河田照雄¹・後藤剛¹・高橋信之²

過栄養の環境が生じやすい経済的先進国では、肥満は多くの生活習慣病の発症基盤と考えられ、その対策は予防医学上重要な課題とされている。従来、肥満がなぜ生活習慣病の発症基盤となるのかについては科学的な解明が充分でなかった。近年脂肪組織を構成する脂肪細胞の分化・増殖機構、さらには生活習慣病発症と深く関わる因子類の脂肪細胞での生成・分泌などの新しい知見が多数集積してきた。本稿では、脂肪細胞の諸性質、分化・増殖機構とそれに関わる食品由来因子の新しい機能について紹介する。

1. 脂肪細胞の細胞学的特性

脂肪細胞には白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞があり、単に脂肪細胞といえば前者を意味する(図1)。両細胞は生体の特徴的な部位で発生・分化し組織を形成する。白色脂肪組織は、単なる脂肪の貯蔵庫であり、代謝的に不活発な組織と見なされていた。しかし最近では交感神経系や内分泌系の制御下で脂肪組織の営む活発な代謝制御機構が認識され、脂肪組織が脂質代謝や糖代謝の接点となって生体全体のエネルギーバランスの要となっていることが明らかとなってきた。

白色脂肪組織は一般に脂肪組織として知られているもので量的にも多く、全身に広く分布する。白色脂肪組織は、食物摂取後の余剰エネルギーを中性脂肪の形で貯め込み、必要な時に脂肪酸とグリセロールの形で全身に再供給するために特殊化した器官である。また、白色脂肪細胞は少なくともこのような脂肪の合成と分解の両能力を同時に有する細胞と定義される。白色脂肪組織は複数の細胞から構成されており、それらの細胞には、脂肪滴を貯め込んだ脂肪細胞、

KAWADA Teruo¹, GOTO Tsuyoshi¹,TAKAHASHI Nobuyuki²¹〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄京都大学宇治キャンパス²〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西剛中38

White adipose tissue

図1 白色脂肪組織の電子顕微鏡写真(普通の大きさは、直径が約30~80ミクロン)

前駆脂肪細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、神経細胞などがある。それらの細胞のうち成熟脂肪細胞の数は、以前は乳幼児期や思春期など限られた時期にしか増加せず、その時期に生涯の数(およそ300億個)が決定されると考えられていたが、近年の注意深い研究によって成人になっても過剰のエネルギー摂取や運動不足などによって脂肪細胞の数が増加し、肥満者では400~600億個にも達することが明らかとなってきた。これはヒトの体を構成する細胞のおよそ0.5~1%であるが、重量では通常約20%前後、肥満者では30~40%にまで達する。脂肪細胞の直径は、10 μ mから200 μ mものバリエーションがある。1個の成熟脂肪細胞には通常0.5~0.9 μ g、上限でおよそ1.2 μ gの脂肪が含まれて

いる。

2. 脂肪細胞・肥満と病態発症との関連

成人の軽度の肥満では、個々の脂肪細胞の脂肪含量が増加し、細胞が肥大化 (hypertrophy) する。脂肪細胞の肥大化は、病態発症と深く関連することが次第に明らかになりつつある。また脂肪細胞の大きさには限界があるため、さらに過剰の食物をとると脂肪細胞数の増加 (hyperplasty) を引き起こすことによって獲得したエネルギーを逃すことなく迅速に貯蔵する。また、白色脂肪細胞は脂肪を溜め込むだけでなく、それらの貯蔵エネルギーをβアドレナリン受容体を介した神経系・内分泌系の制御下に脂肪酸の形態で全身に再供給し、生体の恒常性を維持している。

動物は本来恒常的に「飢え」に直面しており、捕獲や逃避などの活動のためのエネルギー源を体内に貯蔵しておくことが生き残るための必須条件である。そのためか動物がエネルギーを体内に溜め込む機構は極めて巧妙である。脂肪組織は一連の脂肪細胞の増殖と分化の過程を介して極めて効率的にエネルギーを脂肪の形態で貯蔵する。動物は本来生存のためにエネルギーを脂肪として体内に保持しやすく、かつ放出しに

くいという生理的特徴がある。このような特性は、脂肪組織の形成能力の発達という形でヒトの肥満発症と深く関わっている。さらに近年、成熟し脂肪滴が充満した脂肪細胞からはTNF-αなどのサイトカイン類をはじめとして各種の化学因子が細胞外に分泌され、脂肪組織内さらには全身性に強く影響を及ぼすことが明らかとなってきた (図2)。このような白色脂肪細胞から分泌される生理活性物質は、アディポサイトカイン (adipocytokine) と命名されている¹⁾。現在、このような脂肪細胞から分泌される因子類は、病態発症に関して防ぐ作用をするもの (善玉アディポサイトカイン) と逆に悪化させる作用をするもの (悪玉アディポサイトカイン) の2種類に分けて考えられる。それらは、脂肪細胞の大きさなどの要因により生成・分泌量が制御される可能性が指摘されている。肥満とそれに伴う糖尿病、高血圧や動脈硬化症など、いわゆる生活習慣病の発症との関わりを理解することが予防医学・健康医学上極めて重要となってきた。

3. 脂肪細胞の形成とその制御

脂肪細胞は、結合組織の細胞群に属し間葉系幹細胞から分化すると考えられている。この分

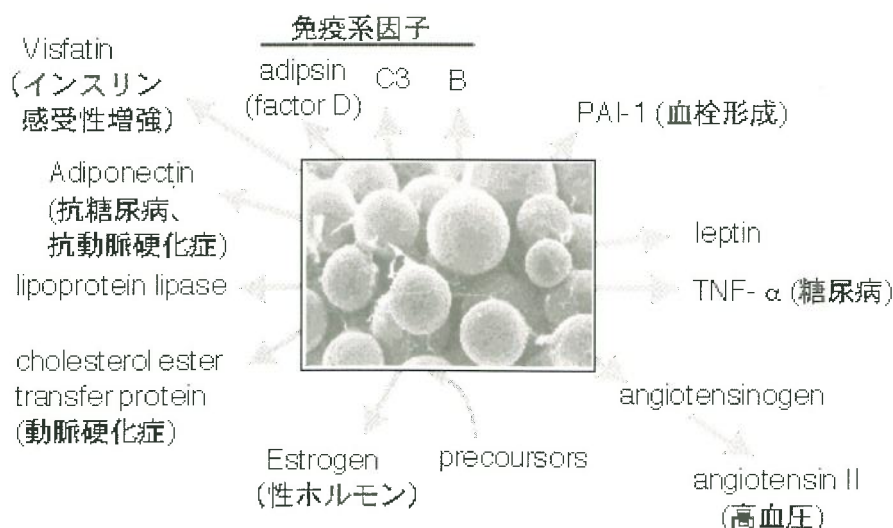


図2 分泌細胞としての白色脂肪細胞

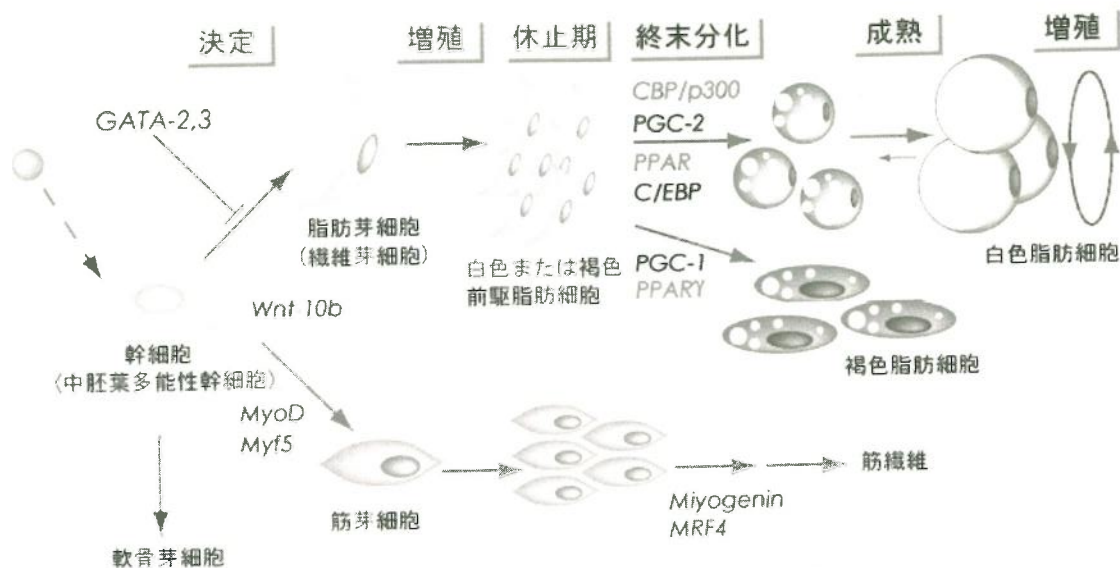


図3 脂肪細胞の分化・増殖過程

化系列には、線維芽細胞、軟骨細胞、骨細胞、平滑筋細胞など体の構造的枠組みを保つ細胞が含まれている。この系列の細胞の特徴は、その前駆細胞が結合組織に広く分布し、活発な増殖性や遊走性を示し、適応的に既存の組織を修復、代償、更新するなどの共通点を有していることである。ただ、それらの細胞群のうち脂肪細胞は、肥満状態を考えれば容易に推察できるように組織形成の明瞭な終了点を持たない特異な細胞である。脂肪細胞の形成過程は、大まかに次の5つの過程に分けて考えることができる。(1) 幹細胞が脂肪細胞としての素地を獲得した脂肪芽細胞に決定される過程、(2) 脂肪芽細胞が増殖する過程、(3) 細胞の増殖停止過程、(4) 前駆脂肪細胞が未成熟な脂肪細胞へ終末分化する過程、そして(5) 未成熟な脂肪細胞に脂肪が蓄積する成熟過程、である。各過程において脂肪細胞を特徴づける遺伝子が整然と発現してくる(図3)。

最近、脂肪細胞の分化遺伝子の発現調節機構についての解析が急速に進展してきた。その結果、転写因子のひとつであるC/EBP(CCAAT/enhancer binding protein)ファミリーとリガンド依存性の受容体型転写因子であるPPAR(peroxisome proliferator-activated receptor, ペ

ルオキシソーム増殖剤応答性受容体)ファミリーが、相互作用しネットワークを形成しながらマスターレギュレーターとして機能していることが明らかとなってきた²⁾。事実、脂肪細胞ではCBPという共役因子の介在のもとにPPAR γ とC/EBP α が互いに相手側の遺伝子の転写を活性化させ、両者の発現を維持していく機構が働いている³⁾。特に脂質科学、栄養学的に興味深いことは、脂肪酸自身がリガンドとなりPPARを活性化し遺伝子発現の転写調節を担う、即ち脂肪酸やその誘導体が脂溶性ビタミンの如くホルモン様の作用(図4)を発揮することである⁴⁾。

4. 脂肪細胞分化調節機構の主役、PPAR γ

PPARは、発見当初肝細胞のペルオキシソームを誘導する作用をもつ抗高脂血症薬(フィブラート)などの化合物によって転写活性化能を示す内因性リガンドが未同定ないわゆるオーファンレセプターであった。誘導剤がPPARのリガンドとして直接結合しなかったことから、PPARという名称には“activated; 応答性”が付加されている。種々の動物種および臓器から

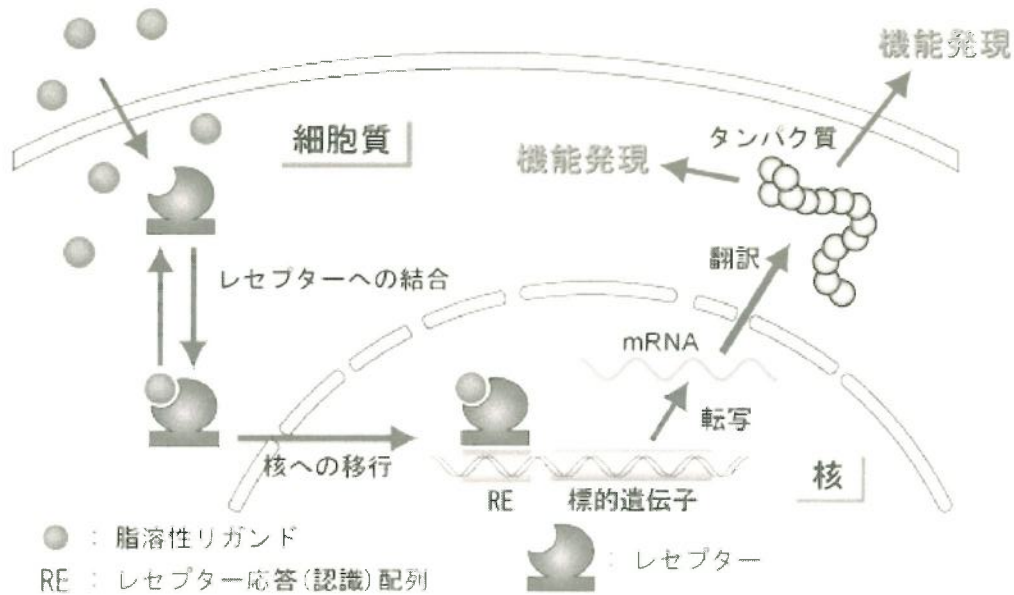


図4 脂溶性ホルモンの作用機構の模式図

ビタミンAやステロイドホルモンなどと類似の機構で脂肪酸もホルモンとして作用する。

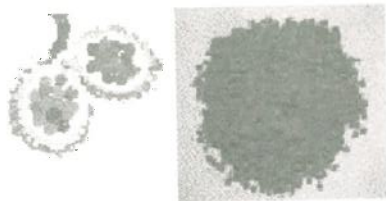
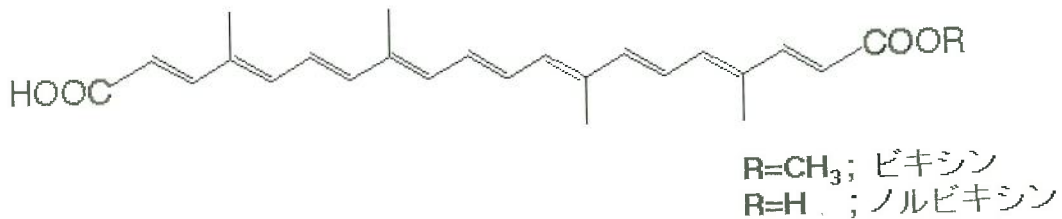
複数のPPARサブタイプ遺伝子が見いだされている。哺乳動物においては、 α 、 δ [ヒトではNUC I, マウスではFAAR (fatty acid-activated receptor), カエルではPPAR β とも呼ばれている], および γ の3種類のサブタイプ遺伝子が明らかとなっている。 α 型は主として肝臓, 心筋, 消化管に, δ 型は組織特異性がみられず普遍的に発現している。一方, γ 型はさらに γ 1型と γ 2型の2種類のアイソホームが知られており, それらはPPAR γ 遺伝子のプロモーター選択によって5'末端の異なるmRNAから生成される。 γ 2型は脂肪細胞で特異的な発現がみられ脂肪細胞の分化と深く関連している⁵⁾。 γ 1型は, 免疫系臓器や副腎, 小腸で発現している。

PPARsは, レチノイン酸レセプター (RAR), 甲状腺ホルモンレセプター (TR), ビタミンDレセプター (VDR) などの核内レセプターと同様に, 9-シスレチノイン酸をリガンドとするレチノイドXレセプター (RXR) と安定なヘテロ二量体を形成して標的遺伝子の特異的なDNA配列 (AGGTCA-X-AGGTCA; peroxisome proliferator response element (PPRE))

に結合する。PPARファミリーの特徴のひとつは, 化学構造的に多様な化合物をリガンドとすることである。また, α 、 δ 型がフィブレート類や脂肪酸類, また γ 型が新規抗糖尿病薬 (インスリン抵抗性改善剤) であるチアゾリジン誘導体などをリガンドとしているようにPPARs各サブタイプ間でリガンドの結合あるいは活性化特異性が認められる。このことは各サブタイプ間のリガンド結合ドメインの相同性が低いことから支持される。また興味深いことに, リノール酸, アラキドン酸やエイコサペンタエン酸などの食事から由来するポピュラーな脂肪酸類が直接PPAR α と δ のリガンドになることが示され, 脂肪細胞分化のレギュレーターとしてのみならず脂質代謝におけるPPARsのモレキュラーセンサーとしての機能, つまり肥満状態の継続や改善にも重要な役割を果たしていることが判明し, 注目されてきている^{6,7)}。

5. 食品中の脂肪細胞形成調節因子

これまでに述べたような肥満や脂肪細胞に関する研究成果をもとに, 肥満や生活習慣病の予



- 南米産ペニノキの種子より抽出
- 黄色食品色素として使われている
- 毒性がないことが知られている
- 生体内でビキシシンはノルビキシシンに代謝される

図5 ビキシシン, ノルビキシシンの化学構造
それらを作るペニノキの果実のスケッチと種子からの抽出物の写真

防や改善に効果を示すと考えられる機能性食品素材の開発も進められている。筆者らはこのようなPPARsの特性を利用して天然食素材中の抗糖尿病・抗肥満作用を有する新たな生理活性成分の検索を行った^{8, 9)}。その結果、いくつかの食品成分にそのような効果があることを見出している。たとえば、ビキシシンと呼ばれるカロテノイドの一種は、PPAR γ の活性化を指標にして見出された¹⁰⁾。この色素は南米に自生するペニノキの果実中に含まれ、マーガリンなどに用いられる食用色素としても利用されている(図5)。このビキシシンを含む飼料にてマウスを飼育したところ、コントロールとくらべて有意な体重抑制、脂肪重量の抑制、血中脂質の改善などが見出された。このマウスの褐色脂肪細胞を解析したところ、UCP1と呼ばれるタンパク質が増加していた(斉藤の項参照)。このタンパク質はエネルギーを熱に変換する機能があり、このタンパク質が増加することにより、体内のエネルギーが効率的に熱に変換され、抗肥満効果が発揮されたものと考えられた。その他、イソプレノイドのイソプレノール類に属するファルネソールやゲラニオール、ゲラニルゲラニオールは、PPAR γ 活性のみならず、PPAR α 活性も示し、脂肪細胞の糖質代謝改善(脂肪細胞機能改善)と肝細胞での脂肪酸代謝(β 酸化)

の促進効果の複数の作用(デュアルアゴニストと呼ばれる)を併せ持つことが判明した。また、興味深いことに葉緑体の構成成分であるクロロフィルに含まれるフィトールは、強力なPPAR α 活性を有し、肝臓での脂質代謝を促進することが明らかとなった。この作用は、間接的ながら脂肪組織への脂肪蓄積の抑制をもたらすことが期待される。

今後も、肥満や生活習慣病に対して予防・改善効果を示すような食品成分や食品素材が見出され実用化が進むと考えられる。このような高機能性食品成分は疾病予備軍とも言える人々をはじめとして多くの一般の人々の健康維持や疾病予防に役立つプライマリーケア食品として重要性が増すであろう。そして、科学的な裏付けを維持した形での研究開発が健全に進展すれば、我が国が世界に誇りうるバイオ健康産業が成長することになる。

6. おわりに

脂肪組織が過形成された状態が肥満である。脂肪細胞の基本的な分化の制御機構は上述のように次第に明らかとなり、そこに脂肪酸やその誘導体、さらには食品因子がホルモン様物質となって遺伝子の転写レベルで深く関与している

実態が解明されてきた。さらに脂肪組織の発達部位の違いが病態発症と深く関連し、腸管膜脂肪など門脈系に存在する内臓脂肪組織の発達は、糖尿病や、高血圧、動脈硬化性疾患を来しやすいことが判明してきている。従って、今後の肥満研究の大きな課題のひとつとしてこのような病態に結びつく部位特異的な分化の制御機構、さらにはそのような履歴をもつ細胞の代謝特性や病態発症との関連などに関して食品由来因子のリガンド分子的機能の解明が大いに期待されることである。

文 献

- 1) Shimomura I. et al. (1996) Nature Med. 2, 800-805.
- 2) Ailhaud G. (1999) Clin Chim Acta, 286, 181-185.
- 3) Takahashi N. et al. (2002) J.Biol. Chem. 277, 16906-16912.
- 4) Kawada T. et al. (2001) J. Nutr. Sci. Vitaminol. 47, 1-5.
- 5) Tontonoz P. et al. (1994) Genes Dev 8: 1224-1229.
- 6) Forman BM. et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4312-4317.
- 7) Kliewer SA. et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4318-4322.
- 8) Takahashi N. et al. (2002) FEBS Letters 514, 315-322.
- 9) Takahashi N. et al. (2003) FEBS Letters 550, 190-194.
- 10) 「アゴニスト剤及び医薬組成物」特願 2003-167929

◀国内情報▶

食用植物由来の酸化ストレス制御因子 による生活習慣病の制御

徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 食品機能学分野
室 田 佳 恵 子 ・ 寺 尾 純 二

生活習慣病の発症に酸化ストレスが深く関わるようになってきた。一方、植物性食品素材には多種多様な抗酸化成分が含まれることから、食事由来の抗酸化成分による生活習慣病の予防や改善効果が期待されている。本稿では近年注目されている植物性抗酸化成分「フラボノイド」による生活習慣病、特に動脈硬化症や心疾患の予防効果に関する研究の最近の知見を紹介する。

1. はじめに

現代社会において生活習慣病は克服すべき大きな課題である。生活習慣病とは名前の通り生活習慣が疾病を引き起こす一因となる疾病群であり、とくに食習慣が大きな影響を及ぼすことは異論のないところである。一方、生活習慣病の発症や進行には酸化ストレスが深く関与することが明らかになってきた。酸化ストレスとは生体内の活性酸素発生系と抗酸化防御系のバランスが破綻した状態をいうが、酸化ストレスが亢進すると活性酸素による生体成分への直接的な攻撃や酸化ストレス感受性の細胞内情報伝達系の混乱が生じ、疾病の発生につながる。そこで、抗酸化防御系に寄与する食品抗酸化成分の積極的な摂取による生活習慣病の予防に大きな期待が集まっている。本稿では、最近関心の高い食品抗酸化成分であるフラボノイドを対象として、その予防効果が最も期待されている動脈硬化症との関係について述べる。他の抗酸化食品成分や食習慣と生活習慣病予防の関連については成書を参照されたい¹⁾。

2. フラボノイドの生体利用性 (bioavailability)

植物性食品素材に広く含まれるフラボノイドはポリフェノールの一種であり、強い抗酸化性をもつ食品成分である。代表的なフラボノイドとして、主に野菜類に含まれるケルセチンなどのフラボノール類（ケルセチンやケンフェロールなど）、大豆に特徴的な成分であるイソフラボン類（ゲニステイン、ダイゼインなど）、茶に豊富に含まれるカテキン類、ベリー等の果実に含まれるアントシアニン類等が挙げられる（図1）。

植物中のフラボノイドは通常フェノール性水酸基に種々の糖が1つ以上結合した配糖体として存在している。食事から摂取したフラボノイドの吸収代謝機構については多くの総説があり^{2, 3)} その詳細はここでは触れないが、総じて配糖体は抗酸化性が弱く、また配糖体そのままでは体内へと吸収されにくい。フラボノイド配糖体は盲腸／大腸において腸内細菌の加水分解作用により糖部分が脱離し、アグリコンが生成することが以前より知られていた。さらに近年になって、一部の配糖体の糖を加水分解できるβ-グルコシダーゼ活性が腸管細胞に存在することがわかった。本酵素の作用で生じたアグリコンは細胞に容易に取り込まれた後、抱合作用を受けグルクロン酸／硫酸抱合体となり血中へ

MUROTA Kaeko, TERAO Junji
〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町3-18-15

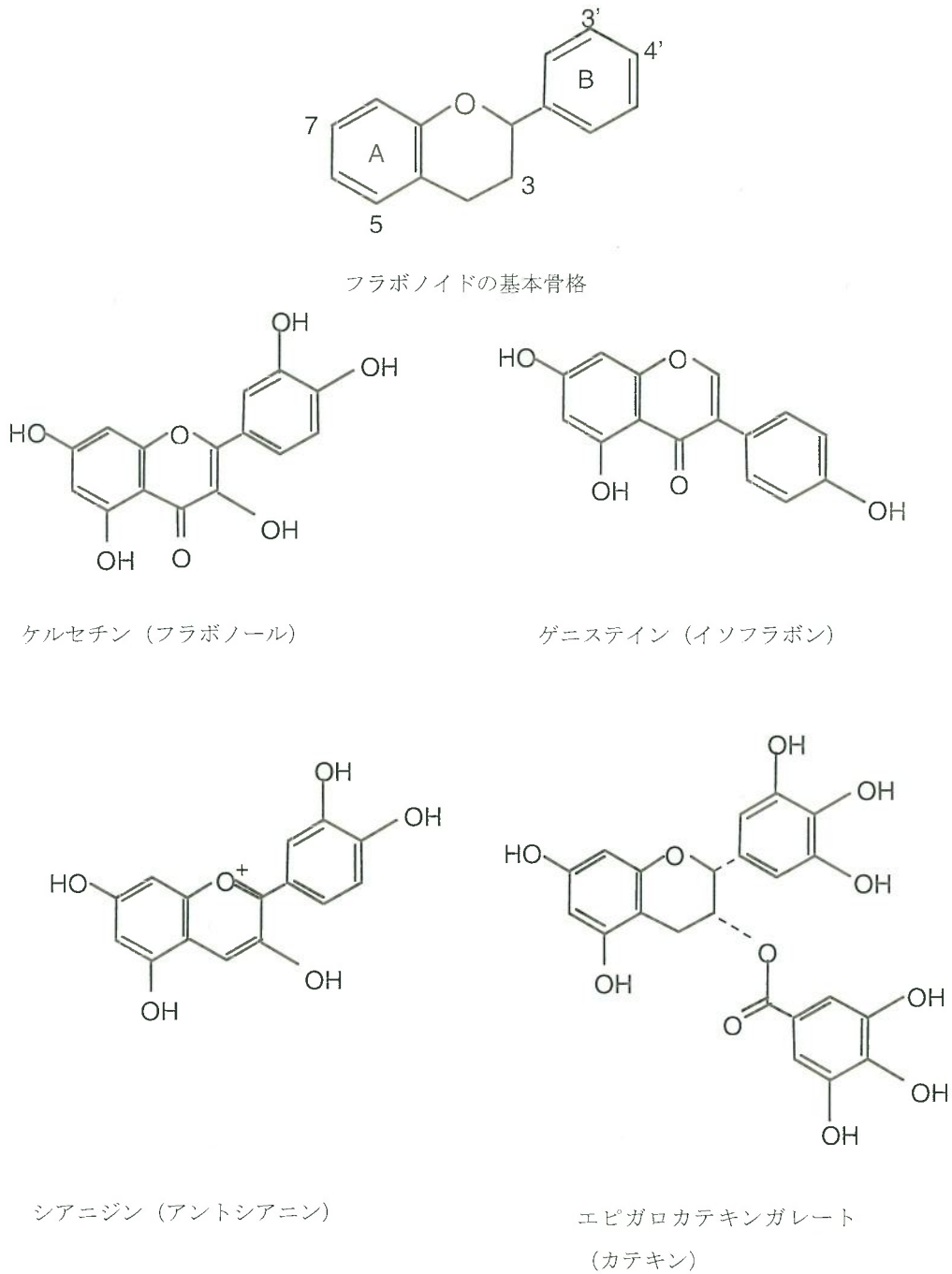


図1 食品中の主なフラボノイド (アグリコン) の構造

と運ばれる。また、一部の配糖体はグルコース輸送担体を介して細胞に取り込まれることも知られており、これらは細胞内に存在するβ-グルコシダーゼの作用でやはりアグリコンへと変換された後に抱合体化される。腸管細胞内で生じた抱合体代謝物は薬剤排出ポンプにより腸管

管腔へと戻されるものもあるが、一部は門脈へ分泌されて肝臓でさらなる代謝を受けた後に、胆汁あるいは尿へと排泄される。したがって体内を循環する血流中のフラボノイドの多くは抱合体代謝物として存在している。

3. フラボノイドの機能性

これまでフラボノイドの生理機能に関する研究はほとんどがアグリコンを対象として行われてきた。アグリコンは遊離のフェノール性水酸基をもつが、とくにその2つが隣接して存在するカテコール構造をもつと強い抗酸化性を発揮する（図1ケルセチンの構造を参照）。しかしながら、フラボノイドのヒトに及ぼす生理機能に基づいた疾病予防の可能性を追求するためには、実際に生体内に存在する代謝物を用いた研究を行う必要がある。ヒトにおけるフラボノイドのbioavailabilityに関して明らかになってい

る知見は分子種によって異なる⁴⁾。ここでは比較的研究が進んでいるケルセチンの主要なヒト血漿代謝物⁵⁾を表1に示した。

現状ではフラボノイド代謝物の標品がほとんど存在しないため、それらを用いた実験は少ない。われわれはケルセチン-3-グルクロニド(Q3GA)を用いてケルセチン代謝物の機能を評価している。3位がグルクロン酸抱合されたこの代謝物は、B環にカテコール構造を保持したまま血漿中に存在しており、アグリコンに比べれば弱いながらも代謝物としてはかなり高い抗酸化活性をもつことをみとめた⁶⁾（図2）。

表1 ヒト血漿中に存在する主なケルセチン代謝物*

Quercetin-3'-sulfate (Q3'S)
Quercetin-3-glucuronide (Q3GA)
Quercetin-4'-glucuronide (Q4'GA)
Quercetin-3'-glucuronide (Q3'GA)
3'-Methyl quercetin-3-glucuronide (Isorhamnetin-3-glucuronide)

*Dayら⁵⁾の論文を基にした。硫酸基あるいはグルクロン酸抱合およびメチル化の位置については図1の構造を参照のこと。

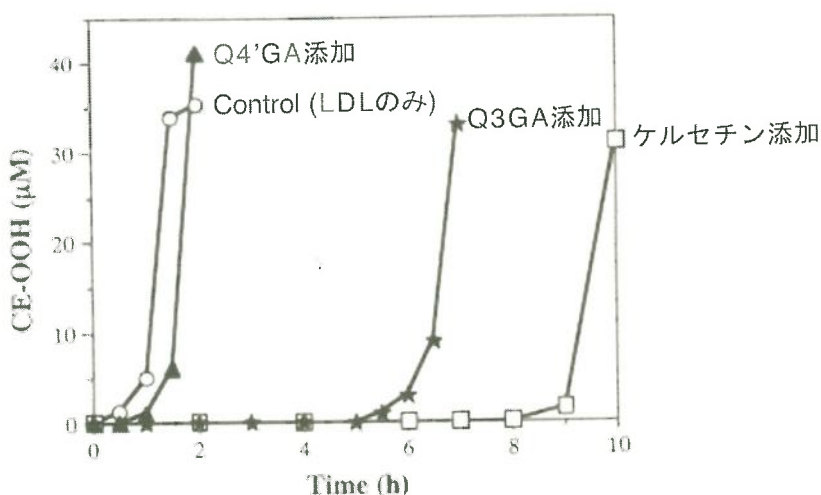


図2 ヒトLDLの銅イオン誘導酸化に対するケルセチンアグリコンと代謝物の効果⁶⁾

各フラボノイドを $5\mu\text{M}$ となるようにLDL画分に添加し 37°C でインキュベートした。脂質過酸化の指標としてコレステロールエステルヒドロペルオキシド(CE-OOH)をHPLCにて定量した。

4. 動脈硬化症に対するフラボノイドの疾病予防効果

初めに述べたように、生活習慣病の発症に酸化ストレスが関与することが明らかになりつつある。とくに動脈硬化症では、酸化LDLが泡沫細胞の形成、血管内皮細胞障害、単球の細胞接着などその発症の各プロセスに重要な役割を果たすという報告が数多くあり、酸化ストレスが密接に関連することは疑いない。フラボノイド代謝物の生体内分布は未解明であるが、通常の食生活において摂取したフラボノイドの一部はヒト血漿に低濃度($0.01\text{-}1\mu\text{M}$ 程度)ではあるが、存在しうることには明らかである。したがって、LDL酸化変性の抑制は食事由来フラボノイドの抗酸化機能発現における第一のターゲットである。

これまでに“フレンチ・パラドックス”をはじめとして、

フラボノイドの摂取が虚血性心疾患のリスクを軽減することを示唆する疫学データが数多く報告されている。また、単離したLDLを利用してフラボノイドの酸化抑制効果を調べるin vitro, ex vivo実験のデータも豊富にある。われわれの研究室では、高コレステロール食による動脈硬化モデルウサギに対してケルセチン配糖体を同時投与すると病変部位の減少と症状の軽減がもたらされることを最近報告した⁷⁾ (図3)。

元来、ヒト血中にはさまざまな内因性の抗酸化物質が存在しており、血清アルブミンもそのひとつである。アルブミンは血漿中で遊離の脂肪酸を結合するタンパク質として機能しているが、血中のフラボノイドも血漿では主にアルブミンに結合することがいくつかの研究グループより示唆されている。したがって、フラボノイド抱合体代謝物がLDLそのものに蓄積して直接的にLDLを酸化攻撃から防御することについては疑問がある。われわれは、ケルセチン配糖体を豊富に含む食品であるタマネギを500g摂取した場合でもケルセチン代謝物は多くがアルブミン画分に分布し、LDL自体への分布はほとんど無視できる量であることを確認した。一方、別のグループは種々のケルセチン代謝物がヒト血清アルブミンに結合しうることを、代謝

物の構造によってアルブミンとの複合体のin vitroにおける抗酸化力の強さが異なることを最近報告している⁸⁾。これらのことから、フラボノイド摂取が血漿の抗酸化性を高めるのは、フラボノイド代謝物がアルブミンと複合体を形成した状態でリポタンパク質の酸化を抑制するためであると推定される。

一方、LPS刺激をしたラットにフラボノイドの一種であるルテオリンを投与するとLPS刺激をしない場合に比べて血漿中でのアグリコンの量が増加することが報告されている⁹⁾。したがって、炎症など非常に強い酸化ストレスがかかるような部位では、好中球等より分泌される β -グルクロニダーゼの作用により抗酸化性の強いアグリコンが生じる可能性がある。

ケルセチン代謝物には、抗酸化物質としての機能に加え細胞内情報伝達系への機能も示唆される。例えば血管平滑筋細胞を用いた実験において、Q3GAはMAPキナーゼ系が関わる情報伝達系に作用しアンジオテンシンIIによる細胞肥大化を阻害することが報告されている¹⁰⁾。また、効果は弱いもののタバコ由来タールによる赤血球変形能の低下を抑制することも示唆された¹¹⁾。フラボノイド代謝物が実際に血管平滑筋細胞や赤血球に分布するかどうかは現在のところ不明であるが、フラボノイドの動脈硬化予防

コントロール食
高コレステロール食
高コレステロール食＋
ケルセチン配糖体



図3 動脈硬化モデルウサギの大動脈にみられる脂質沈着

コントロール食あるいは高コレステロール食を1ヶ月間摂食させたウサギの大動脈を採取し、Oil Red Oにて染色した。高コレステロール食にケルセチン配糖体 (quercetin-3-glucoside) を添加したものを摂取させた群では血管壁への脂質沈着が抑えられていることがわかる (文献7参照)。

機構を解明する上ではどちらも興味深い結果であるといえるであろう。

5. おわりに

フラボノイドをはじめとする非栄養素食品機能成分の多くは強い抗酸化性を持つため、生体における酸化ストレスを制御し得る因子として注目されている。研究が進むにつれて、単に活性酸素種を捕捉消去するのみでなく、細胞全体のレドックス制御に関わることで細胞機能の制御に一役買っていることが明らかになりつつある。さまざまな疾病予防に関わる機能の解明が進むにつれて、これまでに食品から摂取していた量を遥かに超えるサプリメントなどによる多量摂取がなされるようになると、本来の成分が潜在的に有する変異原性¹²⁾等の毒性を警戒しなければならない。今後は、生体への有用性と同時に安全性にも配慮した機能性研究をめざす必要があるだろう。

文 献

1) 大東肇 (2003), 食と生活習慣病—予防に

- 向けた最新の展開(菅原努監修), 第1版, 食による生活習慣病の予防, 昭和堂, 京都
- 2) Murota, K. and Terao, J. (2003), *Arch. Biochem. Biophys.*, 417, 12-17
- 3) Manach, C. et al. (2004) *Am. J. Clin. Nutr.*, 79, 727-747
- 4) Manach, C. et al. (2005) *Am. J. Clin. Nutr.*, 81, 230S-242S
- 5) Day, A. et al. (2001) *Free Radic. Res.* 35, 941-952
- 6) Moon, J.H. et al. (2001) *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1274-1285
- 7) Kamada, C. et al. (2005) *Free Radic. Res.*, 39, 185-194
- 8) Janisch, K.M. et al. (2004) *Free Radic. Res.*, 38, 877-884
- 9) Shimoi, K. et al. (2001) *Drug Metab. Dispos.* 12, 1521-1524
- 10) Yoshizumi, M. et al. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1458-1465
- 11) Begum, A.N. and Terao, J. (2002) *J. Nutr. Biochem.*, 13, 265-272
- 12) Hardigree, A.A. and Epler, J.L. (1978) *Mutat. Res.* 58, 231-239

◀国内情報▶

受精の膜融合における必須分子Izumoの発見

大阪大学 微生物病研究所 遺伝情報実験センター

井 上 直 和 ・ 岡 部 勝

受精の膜融合の仕組みや、融合にかかわる因子の同定は多くの研究者の興味を集めてきたにもかかわらず未知のまま残されていた。しかし最近、ノックアウトマウスの解析から卵子側の融合因子としてテトラスパニンのCD9が同定され、融合の分子メカニズムが明らかになり始めている。今回著者らは、抗精子モノクローナル抗体を用いた遺伝子クローニングにより精子側の融合必須因子Izumoを同定し、この遺伝子の機能をノックアウトマウスの作製と解析により見出した。

1. はじめに

受精は、雌性生殖器内に射出された多くの精子（ヒトの場合1～3億匹）が様々な障害を乗り越えながら最終的に1匹の精子が卵子に到達後、融合し、父親の遺伝子情報を受け渡す過程である。これらステップのなかでも特に「融合」は、卵子にたどり着いたごく僅かな精子が正確かつ確実に起こさなければならない現象であり、次世代へ種を保存するために必要不可欠なものである。そこには種を超えて共通な見事な仕組みが存在するのではないかと考えられるが、「融合」の仕組みについて分子生物学的な解析はほとんどなされていないのが現状である。今回我々は、世界で初めてほ乳類の精子膜上で融合に深く関与するタンパク質を同定することができたので、卵子側の融合に関与する因子とともに紹介したい。

2. 受精の膜融合ステップ

精子が卵子の細胞膜と融合するためには、先体と呼ばれる精子頭部の構造物がエキソサイトーシスを起こし、そこに含まれるタンパク質を放出する「先体反応」を起こすことが必要であ

INOUE Naokazu, OKABE Masaru

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-1

る。先体反応を終えた精子は速やかに卵子の細胞膜と結合し融合を開始する。ヒトを含む真獣類では電子顕微鏡下の観察から先体赤道部の細胞膜で融合し始めることが知られている（図1A）。この部分は精子が先体反応を起こす前から表面に露出しているが、先体反応前に精子が卵子と融合することはない。おそらく何らかの修飾を受けてはじめて融合可能な状態へと変化するであろう。

3. 卵子側の融合因子

これまでに、生化学的な解析から精子側の融合因子と考えられていたファーティリン（ADAMファミリーのタンパク質でADAM1bと2のヘテロダイマー）が卵子側のインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ と結合し、融合が引き起こされると考えられてきた。しかし、遺伝子ノックアウトが行われるようになり様相が一変した。すなわち、ファーティリンノックアウト精子でも融合能が保たれていること¹⁾、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ をそれぞれノックアウトした卵子でも融合能があること^{2, 3)}などを統合して、これら因子が融合に関与している可能性に大きな疑問符がつけられた。

そのような中、今まで受精に関係する分子とは全く思われていなかった、免疫系細胞の分化

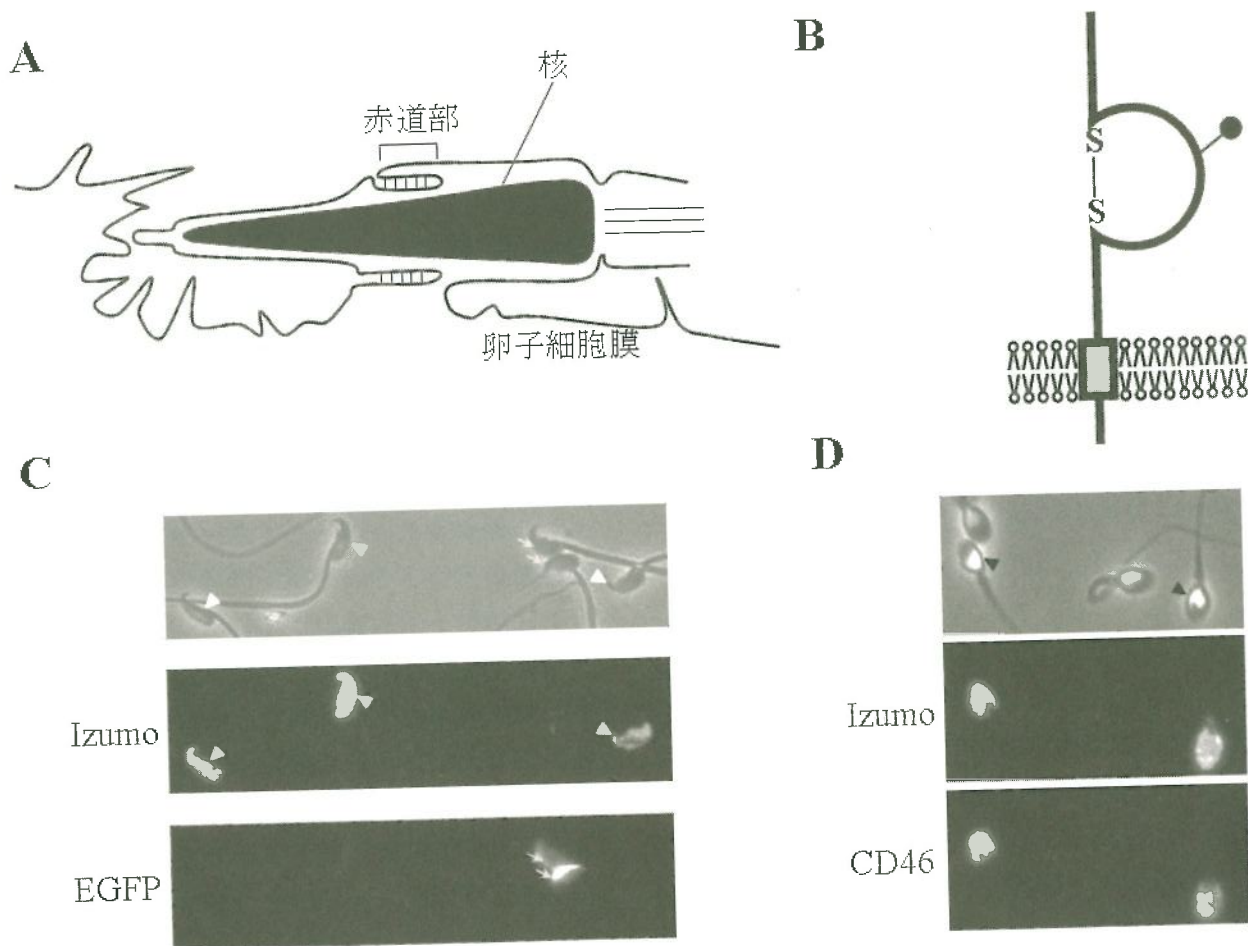


図1 精子膜タンパク質Izumoの構造と発現局在

- A：精子／卵子の膜融合は精子側の赤道部から始まる。
 B：Izumoは、細胞外にImmunoglobulin様ドメインを1つだけもつI型の膜貫通型糖タンパク質である。
 C：マウスIzumoは、先体反応後の精子でのみ膜表面にあらわれる。なお、先体部にEGFPを保持する精子を用いることで、先体反応前の精子と先体反応後の精子（蛍光が消失）を識別した。
 D：ヒトIzumoも同様に先体反応後の精子でのみ膜表面にあらわれる。また、Izumoと同じ性質をもつCD46を先体反応後のマーカーとして観察した。
 Aは、Yanagimachi R: Mammalian Fertilization (Raven, New York, 1994) より改変。B～Dは、Inoue, N. et al (2005), Nature., 434: 234-238.より改変。

にかかわる4回膜貫通型のファミリー分子であるCD9をノックアウトするとその雌から作られる卵子は、精子と融合できないことが明らかになった(図2A)。しかし顕微授精法により精子を細胞質内に直接注入することで融合のステップをバイパスすると正常に産仔が得られることから、CD9は融合のステップに特異的に関与していることが証明された⁽⁴⁻⁶⁾。

このほかに、GPIアンカー型タンパク質の生合成系にかかわるPig-aをZP3プロモーターで

Creを発現させることにより卵子のみでノックアウトすると、その卵子は、精子と結合できるものの融合能がほとんど失われると報告された⁽⁷⁾。このことから、卵子上のGPIアンカー型タンパク質が融合に関与することが考えられるが、この方法では卵子上のすべてのGPIアンカー型タンパク質が欠失することによる膜構造変化など2次的な要因に起因する可能性も否めない。このことから融合に寄与するGPIアンカー型タンパク質を同定することが今後必要とされる。

4. 精子側の融合因子

このように、融合にかかわる卵子側の因子はおぼろげながら姿を現し始めている。しかし精子側の因子は、長年探し求められていたにもかかわらず上記したファーチリン以外にこれまで報告されていない。著者らは約20年前にすでに融合のステップを特異的に阻害する抗精子モノクローナル抗体 (OBF13) を見出していた⁸⁾。しかし、この抗体のサブクラスがIgMということもあって抗原の探索が困難で、長らくお蔵入りであったが抗原の抽出法や検出法の進歩もあり、最近になってやっとウエスタンブロット解析から2次元泳動後のゲル上で抗原スポットを同定することができた。あとはLC-MS/MSからアミノ酸配列分析、遺伝子の同定まで一気に解析を進めることができた。この遺伝子は新規分子であったので、縁結びの神様のいる出雲大社に因んで「Izumo」と命名した。

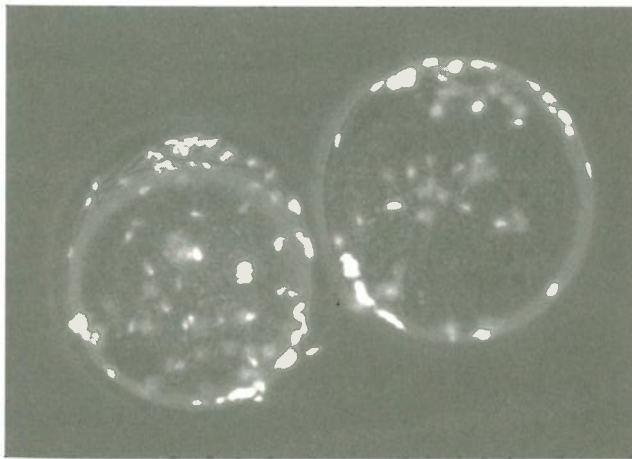
Izumoは細胞外にImmunoglobulin様ドメインを1つだけもつ、Immunoglobulin super-

familyのI型の膜貫通型糖タンパク質であった(図1B)。ヒト、マウスIzumoをそれぞれ特異的に認識するポリクローナル抗体をこの遺伝子からのリコンビナントタンパク質を抗原として作製し、タンパク質レベルでの組織分布を調べると、マウスでは精巣及び精子に特異的に存在していることが明らかになった。また、ヒトでも同様に精子に存在していることが分かった。精子の蛍光染色の結果から、この因子は新鮮精子の膜表面には存在しておらず、先体反応を起こすと同時に精子の赤道部を含む頭部全体に広がって分布することが分かった(図1C, D)。

5. Izumoノックアウトマウスの作製と解析

Izumoは精子に特異的に存在するタンパク質であったので、我々は迷うことなくストレートノックアウトマウスを定法にしたがって作製した。ノックアウトマウスは外見上健康であったが予想どおり雄マウスは不妊であり、ノックア

A



B

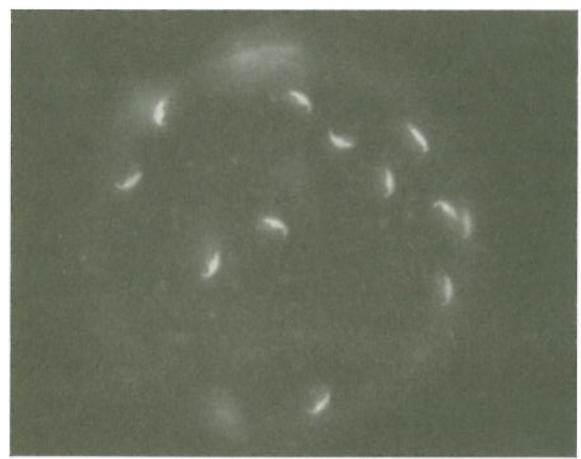


図2 融合能欠損を呈するCD9ノックアウト卵子とIzumoノックアウト精子

- A: CD9ノックアウト卵子に対して精子を加えヘキストで精子の核を染色すると、精子は正常に透明帯を通過するが、融合できないため囲卵腔に蓄積されている様子が観察される。
- B: Izumoノックアウト精子は先体反応を引き起こし、透明帯を通過することができるが、融合が全く起こらないため囲卵腔に精子が多数存在する。なお先体反応の有無は、先体反応後の精子に特異的に反応する抗体MN9 (千葉大学の年森清隆教授より御供与頂いた) を用いて染色し、評価した。

ウトマウスからの精子を用いた体外受精を行っても受精卵を得ることはできなかった。さらに詳細に調べると、この精子は正常に先体反応を引き起こし透明帯を通過していることが確認できた(図2B)。つまり、このステップまでノックアウト精子に何ら問題はないことは明らかであった。次に、精子と卵子が正常に融合すると精子側にヘキストが移ることで融合精子を識別することができるという系を用いて精子の融合能力を検討したところ、ノックアウト精子は、卵子と融合する能力を完全に欠失していることが分かった。この因子が融合の過程にのみ必要な分子であることは、ノックアウト精子が卵子細胞膜との結合能を有することや、融合のステップを顕微授精法でバイパスさせるとノックアウト精子からも産仔を得ることができることで示された。またヒトの場合もIzumoが、卵子との結合または融合に機能するタンパク質であるということを、特異的抗体を用いた体外受精阻害実験から明らかにすることができた⁹⁾。

Izumoは多くのImmunoglobulin superfamilyタンパク質と同様に、他の分子と結合することによって細胞間の接着や融合に機能しているかもしれない。あるいは精子膜上で別の分子と複合体を形成している可能性もある。今後は卵子で発見された融合因子であるCD9を含めた卵子膜タンパク質との相互作用を解析して行くことにより、受精の融合メカニズムを明らかにできるのではないかと考えている。

6. おわりに

今回の発見により、長年探し求められていた精子側の融合因子を同定することに成功した。またこの研究成果は、精子と卵子の融合メカニズムの解明に大きく貢献するだけでなく、避妊ワクチンや不妊の診断などの社会的要求が大きい臨床分野においても、応用できる可能性を秘めている。

文 献

- 1) Cho, C. et al. (1998), *Science*, 281: 1857-1859.
- 2) Miller, B. J. et al. (2000), *J Cell Biol.*, 149: 1289-1296.
- 3) He, Z. Y. et al. (2003), *Dev Biol.*, 254: 226-237.
- 4) Le Naour, F. et al. (2000), *Science*, 287: 319-321.
- 5) Miyado, K. et al. (2000), *Science*, 287: 321-324.
- 6) Kaji, K. et al. (2000), *Nat Genet.*, 24: 279-282.
- 7) Alfieri, J. A. et al. (2003), *J Cell Sci.*, 116: 2149-2155.
- 8) Okabe, M. et al. (1987), *J Reprod Immunol.*, 11: 91-100.
- 9) Inoue, N. et al. (2005), *Nature*, 434: 234-238.

◀国内情報▶

ポプラ葉緑体形質転換技術開発

財団法人 地球環境産業技術研究機構 植物研究グループ

富 澤 健 一

葉緑体形質転換系はこれまでのところ、タバコ、イネ等限られた草本類にのみ報告されている。葉緑体への遺伝子導入技術に汎用性を持たせるためにも、葉緑体形質転換可能な宿主を拡大することが期待されるが、この際対象とすべき植物は培養技術がある程度確立されているものが実践的である。ここでは、細胞核への遺伝子導入系がすでに確立しているポプラを対象に葉緑体遺伝子導入系を確立することを目的とした研究開発の現状を紹介する。

1. 二酸化炭素吸収源としての森林再生

京都議定書のロシアの批准にともない、本年2月にいよいよ発効の運びとなった。この議定書において、二酸化炭素等に関し日本は1990年比で6%の削減目標が課せられている。また、森林を吸収源とみなし、吸収量の一部を削減量として認められていることから、森林再生によせられる期待は大きい。

植物を二酸化炭素吸収源として利用する場合、その効率はその植物のもつ生産性に左右される。植物の生産性は個体レベルの二酸化炭素固定量に依存する。すなわち光合成能力のより高い植物が、二酸化炭素吸収源としては適しているといえる。一方、固定生活を営む植物にとって、その生産性は環境要因により左右される。過度の乾燥、強光等は植物にとって環境ストレスとなり、その生産性は低下する。地球規模で見た場合、より環境ストレスの少ない地域は農作物の生産に利用されており、二酸化炭素吸収源としての森林はより環境ストレスの高い、過酷な地域を対象とせざるを得ない。また、地球温暖化対策としての植林においては、植林時における投入エネルギーを最小限に抑えることが望ましい。こうした観点から、1年生である草本植物より多年にわたり生育し続ける樹木がよ

り適切である。

以上の点を考慮すれば、二酸化炭素吸収源として利用する植物は、個体レベルの光合成能力の高く、環境ストレスに強い樹木が適切であることがわかる。こうした樹木を具体的に得る一つの方法は、遺伝子組換え技術の利用である。遺伝子組換え技術を二酸化炭素吸収源としての森林再生に適用する場合、もう一つの国際的取り決めであるカルタヘナ議定書も考慮の対象としなければならない。すなわち、生物の多様性確保の観点から、従来の植物核への遺伝子導入では、花粉の飛散による導入遺伝子の自然界への伝播が問題視されている。一方、葉緑体への遺伝子導入による組換え植物体の場合、母性遺伝という現象からこうした懸念は軽減できる。また、葉緑体は、光合成の場であり、また植物を乾燥等不良環境下に置いたとき第一にダメージを受ける器官でもある。さらに、我々のこれまでの研究から葉緑体は高濃度の外来タンパク質の蓄積によっても、光合成二酸化炭素固定と生育はほとんど影響を受けないことが明らかにされている。こうした点が、有用遺伝子の葉緑体ゲノムへの直接導入による葉緑体改良、すなわち葉緑体工学こそが植物による二酸化炭素吸収源拡大を具現化するための基幹技術と位置づけている所以である。

TOMIZAWA Ken-Ichi

〒619-0292 京都府相楽郡木津町木津川台9-2

2. 葉緑体の安定形質転換のステップ

葉緑体工学を行う上で必須である葉緑体形質転換手法は、Maligaらにより確立されたが、これまでにタバコ、ジャガイモ等限られた草本植物種でしか成功していない¹⁾。我々はモデル樹木としてポプラを選定し、この葉緑体形質転換手法の開発を試みた。ここでは、この開発過程を例に葉緑体への遺伝導入手法確立のための戦略について述べてみたい。葉緑体の安定形質転換は、大きく以下の4つのステップに分けられる。すなわち、1) 導入されるDNAの構築、2) DNAの導入、3) DNAの導入された植物体の再生、4) 次世代の獲得である。1) 導入されるDNAの構築においては、導入遺伝子は相同組換えにより葉緑体ゲノムに取り込まれることをねらいとしているため、葉緑体ゲノム配列と相同性をもつ配列を付加しておく必要がある。また葉緑体における遺伝子発現のための宿主由来のプロモータやターミネータの配列情報も有用である。こうした観点から我々はポプラ葉緑体全ゲノム配列を決定した(図1)²⁾。この結果、ポプラ葉緑体ゲノムは、156,505bp

からなり、27,660bpの逆方向反復配列により85,017bpからなるlarge single copy領域と16,168bpよりなるsmall single copy領域に分断されていた。rpl32やrps16が欠失しているもののその全体の構造はタバコの葉緑体ゲノム構造と非常に良く似ていた。最近のゲノム解析の迅速化により、高々150kb程度の葉緑体ゲノムのドラフト配列決定は1週間程度で可能である。実際、我々の行ったポプラ葉緑体ゲノムの全配列決定の場合、ポプラ生葉からパーコール密度勾配遠心により葉緑体を単離し、そこからDNA抽出、配列決定、遺伝子の特定といったプロセスにかかった期間は3ヶ月程度であり、得られる情報の有用性から今後新規宿主における葉緑体形質転換法確立を行う場合、この葉緑体ゲノムの全配列決定は定法として位置付けている。2) DNAの導入に関しては、パーティクルガンによる方法、ポリエチレングリコールを用いてプロトプラストを介した導入手法、あるいはマイクロインジェクションによる細胞への導入等が報告されているが、パーティクルガンによる方法が現時点では最も実践的である。というのもマイクロインジェクションによる方

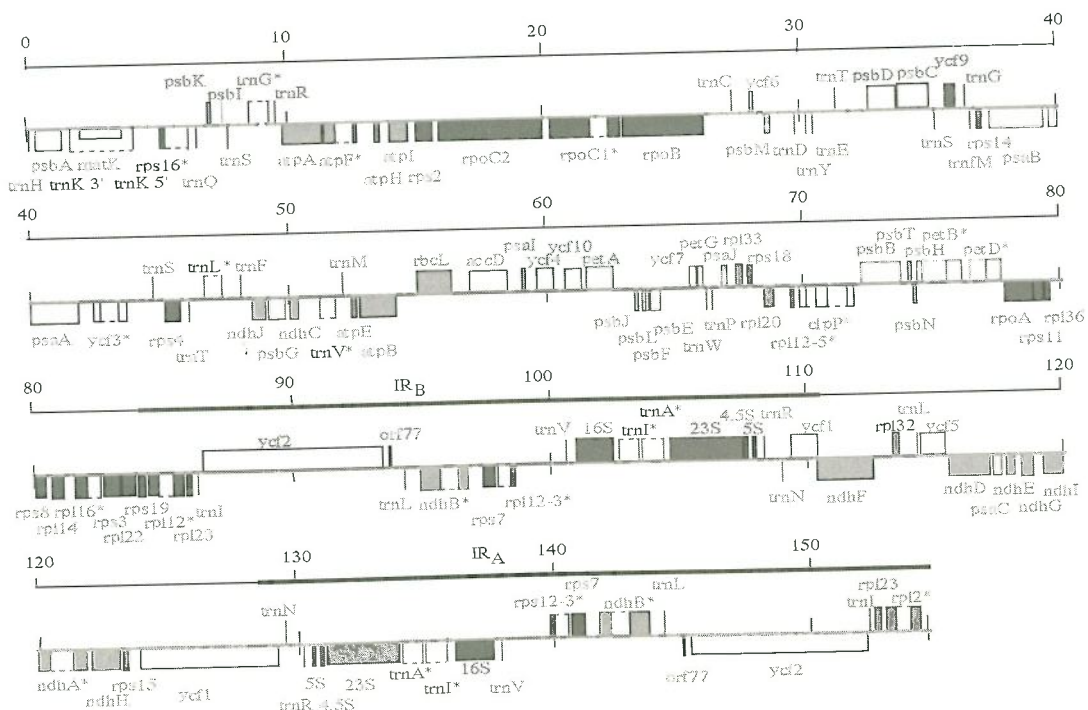


図1 ポプラ葉緑体ゲノムの遺伝子地図

法は実施例が少なく、またプロトプラストを介した手法の場合、その植物体までの再生ステップが確立されている植物種が限られているからである。ポプラの場合、パーティクルガンによる形質転換効率はタバコのそれに比べ1/10程度と劣るものの十分に実用性がある効率である。高等植物の葉緑体形質転換では、3) DNAの導入された植物体の再生がもっとも考慮すべきステップと考えられる。適当な選択圧下での植物体の再生により、遺伝子導入された葉緑体ゲノムと野生型とが混在する、いわゆるheteroplasmicな状態からhomoplasmicに移行させるステップである。この場合選択圧として利用されるのが、培地中に混在させる抗生物質であり、スペクチノマイシンと選択マーカー遺伝子としてのaadA遺伝子が実施例も多く実践的である。し

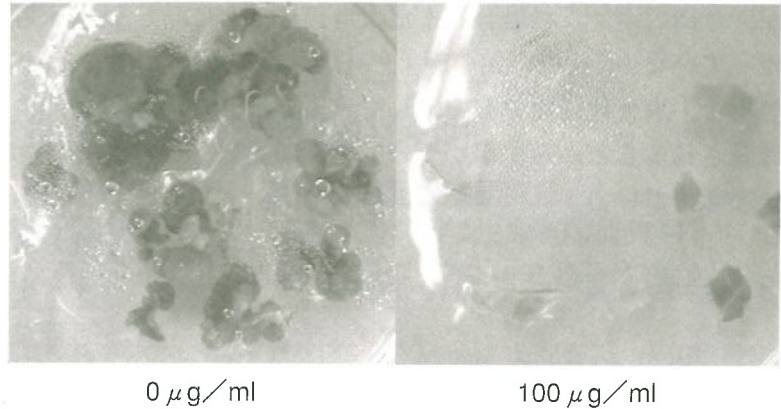


図2 ポプラ生葉切片のカルス化におけるスペクチノマイシンの影響

スペクチノマイシンが培地中に100 μ/mlの濃度で存在するともはやカルス化しない。

かしながら、植物種によっては野生型においてスペクチノマイシン耐性を示すものもあり、こうした点においてはスペクチノマイシン以外の選抜手法の開発が望まれる。幸いなことにポプラの場合、その野生型はスペクチノマイシン感受性であり、aadA遺伝子を選択マーカーとして利用できた。新規宿主における葉緑体形質転換法確立を行う場合、いずれにも先立ちこのスペクチノマイシン感受性を見るのが適切であると考えられる。ポプラの葉緑体形質転換法の開発にあたってはまずこれから始めた。タバコの場合500 μg/mlの濃度で選抜を行うことから、まず、野生型のポプラの生葉を切り刻んだものを500 μg/mlのスペクチノマイシンを含む培地中におき、感受性であることを確かめた。この後、ゲノム配列決定と平行して、選抜のための最適濃度を決定した(図2)。この結果、ポプラの場合、30 μg/mlの濃度を用いている。遺伝子の導入自体は通常PCRにより確認するが、今回のポプラの場合、GFP遺伝子の導入による蛍光も同時に観察した(図3)。4) 次世代の獲得のステップに関しては、導入遺伝子の世代間の安定性、母性遺伝等の確認のため必要だ

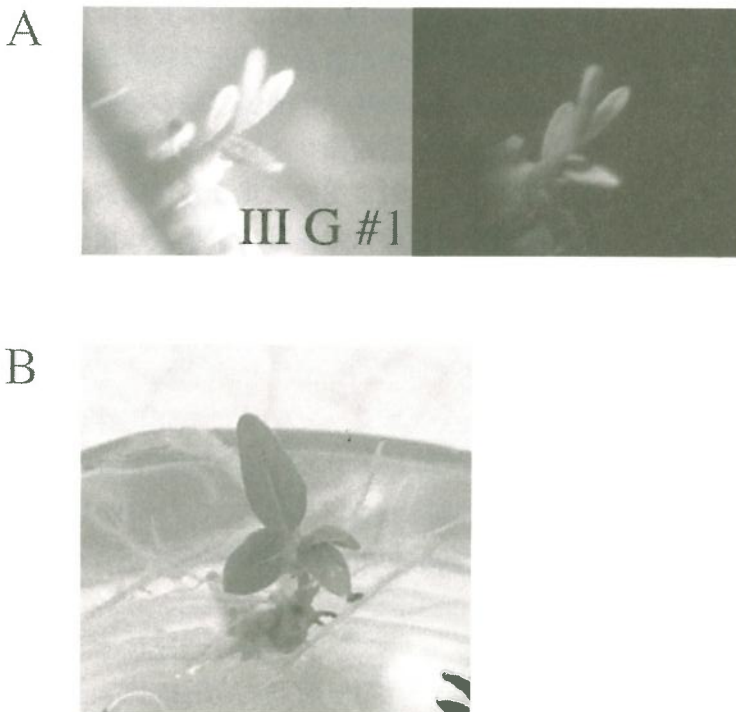


図3 GFPを導入したポプラ葉緑体形質転換体カルスから生じた幼葉(A左)とそのGFP蛍光像(A右)。発根した葉緑体形質転換体(B)。

が、今回のポプラの場合、まだ次世代を得るに至っていない。我々の他の例（タバコやレタス）の場合、次世代以降でも安定して導入遺伝子が確認されることから、ポプラの場合も問題はないと考えている。

3. 炭素循環社会における植林

大気中の二酸化炭素増加による地球温暖化問題は、エネルギー問題に置き換えることができる。化石エネルギーを使い続ける限り大気中の二酸化炭素増加は避けられず、この場合の植林は、いわゆる産業廃棄物としての二酸化炭素処理にはほかならない。一方、化石に代わりバイオマスエネルギー源とした炭素循環社会が提唱されている。しかし、藁等の農業廃棄物などを循環資源と位置付けこれをもってカーボンニュートラルという言葉を用いる人がいるが、注意が必要である。例えば、日本における米の生産過程で、収穫される米のエネルギーの50%以上がその生産に投入される農薬、肥料、人力等である。年間1000万トンの米を収穫している日本で、投入エネルギーは原油換算で220万klに相当する。つまり生産性を維持するために多量の石油を使用していることを前提に考えるべきである。バイオマス生産に石油をそれだけ使うということは、ただ単にそのままほうっておけば二酸化炭素として出てしまうから、幾らかでもエネルギーを回収しようという一種のごみ発電に類似する考えであることを理解すべきである。従って、真の意味での炭素循環社会というか、バイオマスを中心とした循環系をつくるならば、リファイナリー過程プラス再生系、すなわち植林によってバージンバイオマスをいかに

供給するか、いかにそれを使っていくかを視野に入れたような植林技術でなければならない。循環的にいかに化石燃料の利用を抑えたような形で植林を行っていくかという観点から考えれば、求められる植物は単に植物個体当たりの生産性の増強のみならず、緑化のための投入エネルギーを限り無く0に近づけられる、粗放栽培が可能な植物であろう。

炭素循環社会におけるバイオマス再生系と粗放栽培を次世代のキーワードとしたとき、ここでその緒端を示した葉緑体工学の限界が顕在化してくる。すなわち、葉緑体工学による植物の生産性向上は、潜在的生産性向上にすぎず、例えば窒素源の問題等、野外に植栽した際直ちに問題となろう。従って、ここでいう粗放栽培を具現化するためには、もはや植物それ自体の改良のみならず、土壌を含めたトータルな視点が要求され、こうした観点からの基盤研究の充実が望まれる。我々人類が今後持続的発展を求めらるなら、人類の活動と生態系との調和と共存を図っていくことが不可欠である。21世紀の大規模緑化は、単なる植林や環境保全といったキーワードで括られるべきものではなく、これまで自然まかせであったグローバルな炭素循環システムから、人類の産業・経済活動の発展をも許容する新たな炭素循環システムの再構築と捉えるべきである。21世紀の大規模緑化による新たな炭素循環システムの構築に、我々は積極的に貢献すべき時期を迎えている。

文 献

- 1) Maliga, P (2004), *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 289-313
- 2) Accession number: AP008956

◀国内情報▶

有毒渦鞭毛藻個体群の多型分子マーカーによる 遺伝的構造と遺伝子流動の解明

¹独立行政法人 水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所,
²東京大学 アジア生物資源環境研究センター, ³東京大学 農学生命科学研究科
長井 敏¹・練 春蘭²・浜口 昌巳¹・松山 幸彦¹・板倉 茂¹・宝月 岱造³

有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の高度多型を有するマイクロサテライトマーカーを開発し、日本及び韓国沿岸に分布する本種個体群の遺伝的構造を解析した。その結果、海流・潮流などの自然現象による遺伝子流動（集団の混合）は小さく、むしろ人為的な要因による遺伝子流動が生じてきたことが強く示唆された。本法は移入種の問題を科学的に評価する方法として活用されることが期待される。

1. はじめに

平成17年6月1日に「特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律」が施行され、外来種、移入種などの侵入生物の問題がマスコミ等でも大きく取りあげられている。移入種の問題は、植物プランクトンの分野でも例外ではなく、近年、日本沿岸のみならず世界各地で新奇の有害・有毒プランクトンが新たに台頭し、食用貝類の大量斃死や毒化現象を引き起こして、新たな社会問題となっている。*A. tamarense* による麻痺性貝毒の発生は、1980年代までは北海道、東北、関東地方の太平洋岸の一部の海域に限られてきた¹⁻³⁾。しかし、1990年代に入り、本種のブルームは東日本の未発生海域や西日本でも発生するようになり、特に広島湾や仙台湾では毎年のように麻痺性貝毒が発生するようになった⁴⁻⁶⁾。我国沿岸域において、有害・有毒プランクトンの分布拡大経路については、栄養細胞やシスト（耐久性のある細胞）（図1）の船舶のバラスト水や水産種苗の移植

等を介した日本国海外からの移入、さらに地球温暖化に伴う水温上昇による沿岸域の環境変化の影響などが推測されているが、現在のところ不明である。

最近、長井ほかは、世界的に広範囲に分布を拡大している有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense*（麻痺性貝毒原因種）のマイクロサテライトマーカー（以下、MS）の開発を行い、高度多型を有する13個のマーカー開発に成功した⁷⁾。本研究では、開発したMSマーカーを用いて日本及び韓国沿岸各地に分布する本種個体群の遺伝的構造と遺伝子流動の程度を明らかにし、分布の拡大が海流・潮流などの自然現象によるのか、あるいはバラスト水など人為的な要因によるものかを解明することを目的とし、マイクロサテライト多型解析を行った。



図1 *Alexandrium tamarense* の栄養細胞（左）とシスト（右）

NAGAI Satoshi¹, LIAN Chunlan²,
HAMAGUCHI Masami¹,
MATSUYAMA Yukihiko¹,

ITAKURA Shigeru¹, HOUGETSU Taizo³

¹〒739-0452 広島県佐伯郡大野町丸石2-17-5

²〒188-0002 東京都西東京市緑町1-1-8

³〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

2. 個体群内の遺伝的構造

日本沿岸9地点（北海道：オホーツク海，厚岸湾，噴火湾，本州：岩手県大船渡湾，宮城県仙台湾，愛知県三河湾，兵庫県神戸港，広島県呉湾・太田川河口域），及び韓国1地点（鎮海湾）から採集した海水及び底泥サンプルから，各地点41～63株のクローン培養株を確立し（合計520株）（図2），集藻後，株毎にDNAを抽出した。

開発した13個のMSマーカーのうち，比較的PCR増幅の良好であった9個のプライマーペアを用いて，各株のDNAからPCR増幅を試みた。

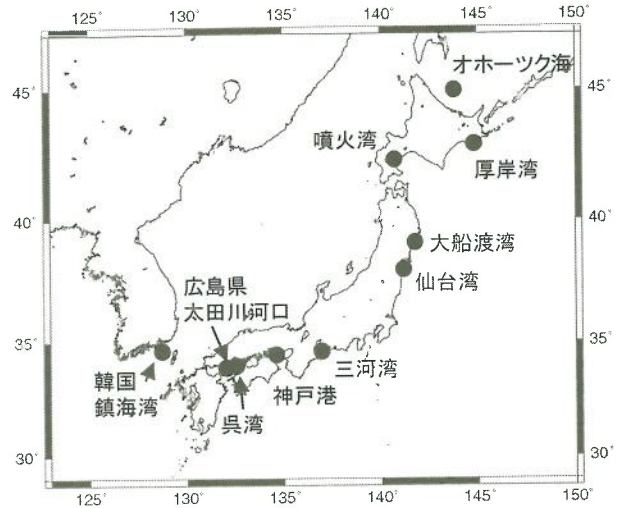


図2 サンプルング地点図

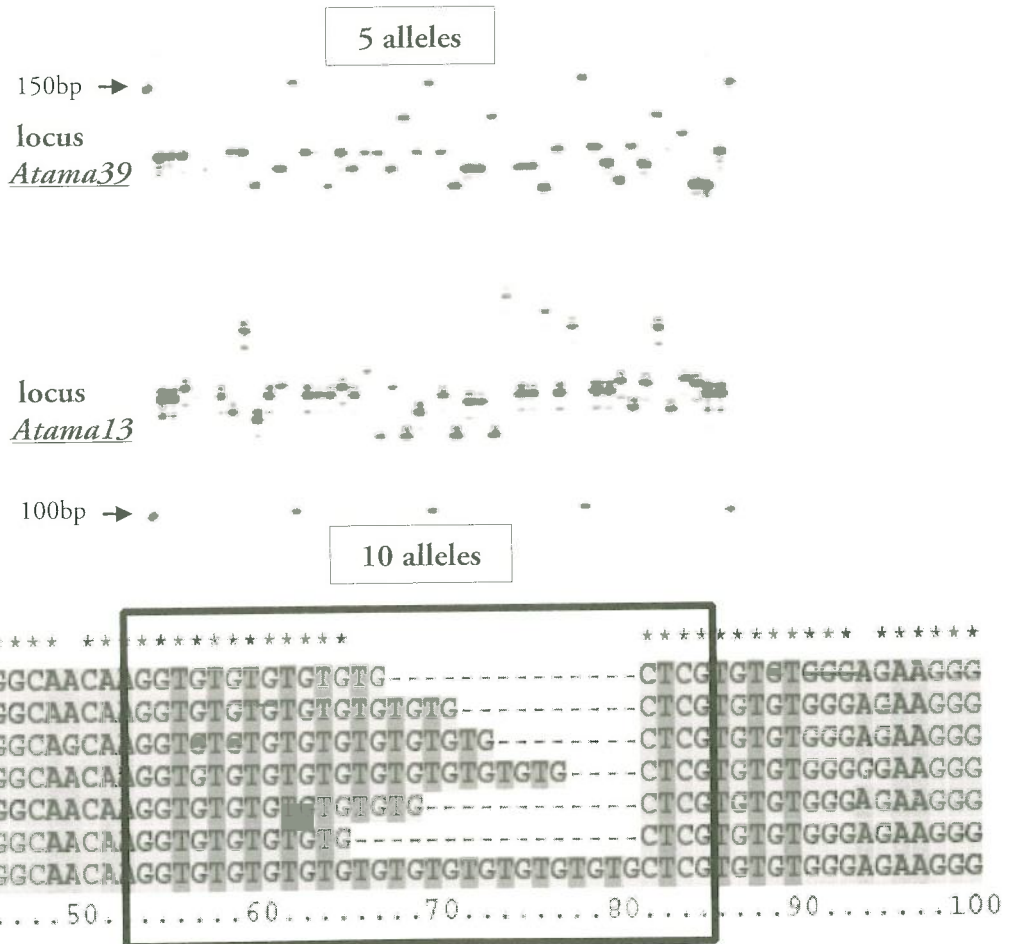


図3 マイクロサテライト多型

上図：広島湾から分離したクローン培養株（約40株）の遺伝子を用いて開発したマイクロサテライト遺伝子座（*Atama13*, *Atama39*）の増幅を試みた（SQ-5500 sequencer（日立）を用いて6% Long Ranger sequencing gel（FMC BioProducts）で電気泳動）。個体によりバンドサイズが異なる例を示した。
 下図：電気泳動で異なるバンドサイズが得られたサンプルの塩基配列を示した。GTのリピート数が異なることがわかる。

各PCR産物を、シークエンサーを用いて6%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い、解析ソフトによりバンドサイズを決定した。そして、遺伝子座ごとに対立遺伝子数、対立遺伝子頻度、遺伝子多様度を求めた。個体群間の遺伝的分化については遺伝距離や統計学的有意差を求めた。以上より、日本及び韓国沿岸域に分布する*A. tamarense*個体群の遺伝的構造及び遺伝子流動の程度について推定した。

各個体群において9個のプライマーペアを用いたPCR増幅が得られた株の割合は94.5~99.0%であり、いずれのプライマーペアも集団遺伝学的解析を行うために十分なPCR増幅が見られた。本種の栄養細胞の核相は単相であり、シークエンスゲル上のバンドは全て明瞭な1本であった(図3上)。また、全ての遺伝子座において多型が見られ(図3上)、リピートの変異が確認された(図3下)。各遺伝子座における対立遺伝子数は7-42(17.6±10.1, 平均±標準偏差)、遺伝子多様度は0.55~0.95(0.77±0.11)の範囲にあった。

遺伝子型については、噴火湾、仙台湾、三河湾、呉湾及び太田川河口域の個体群内の株は全て異なる型に類別されたが、オホーツク海、厚岸湾、神戸港及び鎮海湾の個体群の株間では、2、3の遺伝子型の重複が認められた。しかしながら、各個体群の遺伝子多様度には差が見られず、遺伝子多様度に及ぼすこの重複の影響はないものと判断された。

3. 個体群間の遺伝子流動

45のペア個体群におけるNeiの遺伝距離と地理的距離の関係について調べた結果、両者の間には有意な正の相関関係が認められた($r=0.60$, $N=45$, $P=0.0002$; Mantel test)(図4)。この相関は、地理的距離に応じて集団の遺伝的分化が生じてきたこと、すなわち海流・潮流による集団間の遺伝子流動が制限されてきたことを強く示唆するものである。

集団の分化の程度について、Fisher's com-

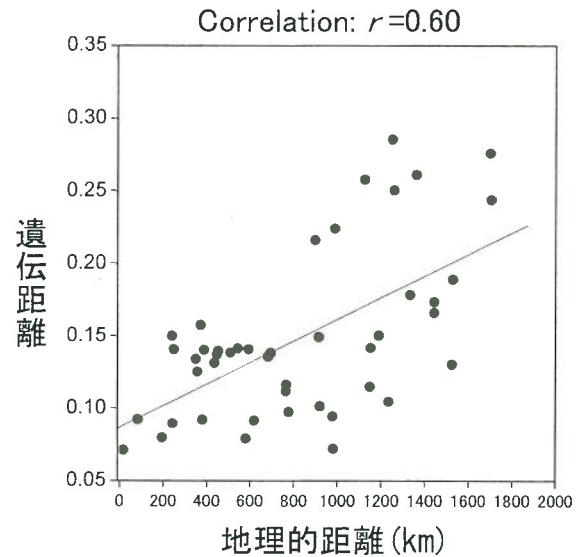


図4 2地点間の遺伝距離と地理的距離の有意な正の相関

*A. tamarense*個体群は地理的距離に応じて遺伝的分化が生じており、海流などの自然現象による集団間の遺伝子流動が小さいことを示す($r=0.60$, $n=45$, $P=0.0002$; Mantel test)。

bined testに加えBonferroni correctionによる統計学的解析を行ったところ、45ペア個体群のうち、26のペア個体群で有意な集団分化が認められた($P<0.05-0.001$)(表1)。この結果も同様に、*A. tamarense*個体群間の混合があまりなく、遺伝子流動の程度が小さいことを示している。一方、Fisher's testの結果は、幾つかのペア集団間で遺伝的に近縁であるということを示した。とりわけ大船渡湾と広島太田川河口域、仙台湾と太田川河口域の個体群間においては、地理的には1,000kmも離れているにもかかわらず、高い遺伝的類似性を示した。この類似性は、これらの個体群間で人為的な要因による遺伝子流動が生じてきたことを示唆している。大船渡・仙台と広島は日本有数のカキ養殖の産地であり、これまで仙台と広島の間ではカキ種苗を日常的に移入させてきた経緯がある。仙台及び広島におけるカキ稚貝の出荷の時期は1~3月であり、*A. tamarense*のブルームの発生期とよく一致する。稚貝とともに本種の栄養細胞やシストが持ち運びされたことにより遺伝子流動が生じた可能性は十分考えられる。今田ら⁸⁾は、

表1 *A. tamarense*の個体群間における遺伝的分化と類似性について
(Probability value for Fisher's combined test)

	オホーツク海	厚岸湾	噴火湾	大船渡湾	仙台湾	三河湾	神戸港	吳湾	広島湾 太田川河口	韓国 鎮海湾
オホーツク海										
厚岸湾	<0.00001***									
噴火湾	0.00043*	0.00800								
大船渡湾	<0.00001***	0.00014**	0.30972							
仙台湾	<0.00001***	<0.00001***	0.00165	0.08779						
三河湾	<0.00001***	<0.00001***	<0.00001***	0.08643	0.01121					
神戸港	<0.00001***	<0.00001***	0.00001***	0.01422	0.01280	0.62949				
吳湾	<0.00001***	<0.00001***	0.00006***	0.06063	0.00009***	0.00137	0.00027*			
広島湾・太田川	<0.00001***	<0.00001***	0.03294	0.51903	0.27521	0.01843	0.02882	0.47669		
韓国鎮海湾	<0.00001***	<0.00001***	<0.00001***	0.00063*	<0.00001***	0.00388	0.06189	<0.00001***	<0.00001***	

***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$, P -value with asterisks are significant after sequential Bonferroni correction for 45 multiple tests.

二枚貝を特異的に殺す渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* のカキ貝殻内海水中における生存能について調べた結果、室内条件下では4日後も *H. circularisquama* は生存することを報告しており、従って、貝の種苗の移送に伴い、日本沿岸各地に栄養細胞が運搬された結果、新たな海域で赤潮を形成するに至った可能性があることを指摘している。*A. tamarense* についてもカキ種苗の運搬により、栄養細胞やシストが別の海域に運ばれる可能性について詳しく検証してみる必要がある。

4. 今後の展開

このように、高度多型を有するMSマーカーを用いれば、有害・有毒プランクトン個体群の遺伝的構造や遺伝子流動の程度を推定することができ、遺伝子流動が自然現象によるのか、あるいは人為的な要因によるのかを推定することは可能である。だが、マイクロサテライトマーカーによる集団解析の結果だけから、生物種の遺伝子流動に及ぼす人為的な要因の関与を正確に評価するのはやや困難である。今後、ミトコンドリアDNAのハプロタイプ解析など、さらにもう一つ別の多型分子マーカーを用いて解析することにより、より客観的な評価を行いたい。将来、これらの高度多型分子マーカーを用いて、

A. tamarense 個体群の世界的規模での分布拡大に、タンカーのバラスト水、水産種苗の移植など的人為的な要因がどの程度関与しているのかについてさらに確度を上げて解析を行いたい。

文献

- 1) Kawabata, T. et al. (1962), *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 28, 344-351
- 2) 嶋田宏 (1991), 沿岸海洋研究, 38, 15-22
- 3) 石田ら (2003), 愛知県水産試験場研究報告, 10, 25-36
- 4) Asakawa, M. et al. (1993), *Toxicon* 33, 691-697
- 5) Itakura, S. et al. (2002), *Fish. Sci.*, 68, 77-86
- 6) 一見和彦ら (2000), 東北区水産研究所研究報告, 63, 119-124
- 7) Nagai, S. et al. (2004), *Mol. Ecol. Notes* 4, 83-85
- 8) Imada, N. et al. (2001), in *Harmful Algal Blooms 2000* (Hallegraeff, G. M., Blackburn, S. I., Bolch, C. J. and Lewis, R. J., Eds), 474-476, International Oceanographic Commission of UNESCO.

◀国内情報▶

耐塩性ラン藻の新規生合成経路を利用した
塩害に強い植物の開発¹名城大学 理工学部, ²名城大学 総合研究所田中義人¹・日比野隆¹・高倍昭洋²

耐塩性ラン藻 *Aphanothece halophytica* は、適合溶質であるグリシンベタインをN-メチル基転移酵素によってグリシンから合成する。*A. halophytica* から単離された2つのグリシンベタイン合成系の遺伝子を導入した形質転換アラビドプシスは、葉、茎、根すべての組織でグリシンベタインを蓄積し、従来用いられてきたコリン酸化酵素遺伝子の形質転換体よりも高い環境ストレス耐性を示した。

1. 植物の環境ストレス耐性

今日、世界の耕作地の20%近くが塩類の集積の影響を受けているといわれている。塩類の集積は植物のイオンバランスを攪乱するとともに、高浸透圧ストレスをもたらす。植物細胞内の水ポテンシャルが低下し、イオン（特にNa⁺）濃度が上昇すると酵素の変性・失活が起こり、エネルギー代謝が円滑に進まなくなると活性酸素などが生じ、細胞が傷害を受けることになる。近年、分子生物学と遺伝子工学的手法によって、植物の塩耐性の機構に対する理解が深まるとともに、植物の耐塩性を向上させるための応用が進められてきた。植物の耐塩性にとって重要と考えられている要素の主なものは、1) 有害イオンであるNa⁺の排除、2) 浸透圧調節、3) 失活した蛋白質の再生、4) 活性酸素種の消去、5) これらを協同的に作用させるシグナル伝達・転写調節機構である。これまで、遺伝子工学的手法によって植物の塩耐性を向上させるための多くの試みがなされてきた。上に挙げた要素のうち、1) のNa⁺イオンの排除については、Na⁺/H⁺アンチポーター遺伝子の過剰発現が植物の塩耐性の向上にとって有効であることが示されている^{1, 2)}。

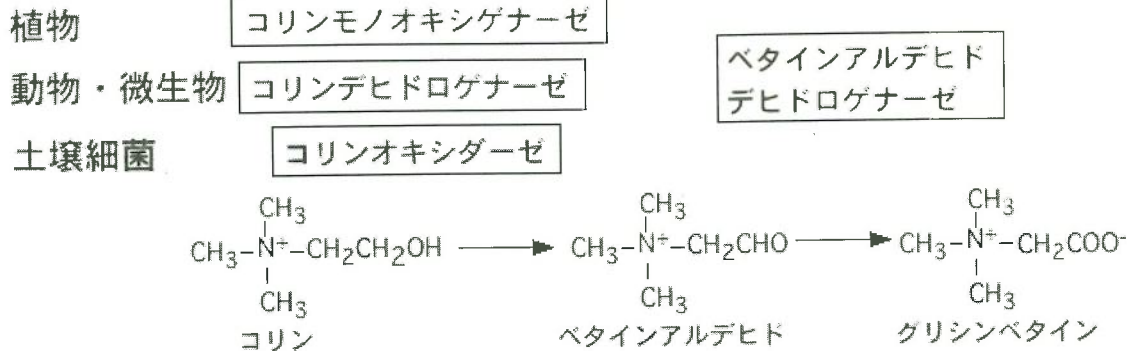
TANAKA Yoshito¹, HIBINO Takashi¹,
TAKABE Teruhiro²^{1, 2}〒468-8502 名古屋市天白区塩釜口1-501

2) の浸透圧調節についてみると、生物は細胞内の浸透圧ポテンシャルを調節するための特別な機構を持っていることが知られている。そのひとつが、糖・プロリンなどのアミノ酸・四級アミン化合物などの低分子の適合溶質を蓄積する能力である³⁾。グリシンベタインは四級アミン化合物であり、塩耐性を示す生物が蓄積する適合溶質のうち最も重要なもののひとつである。

2. 適合溶質グリシンベタインの生合成経路

グリシンベタインの生合成系を植物に導入する試みは、得られる形質転換植物のグリシンベタインの蓄積量が低いという問題にぶつかっていた⁴⁾。従来知られていたグリシンベタインの生合成経路はコリン→ベタインアルデヒド→グリシンベタインという、コリンを基質とする2段階の酸化反応であった（図1A）。第一段階の反応は、植物においては葉緑体に局在するコリンモノオキシゲナーゼ（CMO）⁵⁾、動物および微生物においてはコリンデヒドロゲナーゼ（CDH）⁶⁾、ある種の微生物ではコリンオキシダーゼ⁷⁾によって触媒される。第二段階の反応は、すべての生物においてNAD⁺依存性のベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ（BADH）によって触媒される。ただし、いくつかの微生物で

A. コリンの酸化による合成経路



B. グリシンのメチル化による合成経路

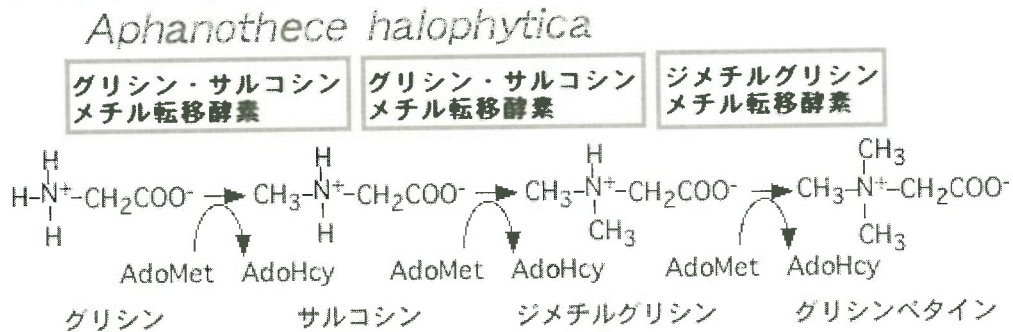


図1 基質が異なる2つのグリシンベタイン合成経路

はCDHあるいはコリンオキシダーゼが第二段階の反応も触媒する。遺伝子導入によって植物にグリシンベタインの合成能力を付与しようとする従来の試みはすべてコリン酸化酵素遺伝子を用いたものであった。得られる形質転換植物におけるグリシンベタインの蓄積量が少ないという結果から、コリンの供給量、すなわちコリンの生合成経路をさかのぼってセリン→エタノールアミン→コリンへと到る前駆体の生合成およびそれらの葉緑体への輸送がグリシンベタインの蓄積にとって制限要因となっていると考えられてきた。

最近、私たちは耐塩性ラン藻 *Aphanothece halophytica* がグリシンを基質として3段階のメチル化反応によってグリシンベタインを合成することを報告した (図1B)⁸⁾。 *A. halophytica* は、0.25~3.0M NaClの広い塩濃度の範囲で生育できる耐塩性ラン藻で、適合溶質としてグリシンベタインを蓄積することが知られている。

*A. halophytica*の熱ショック蛋白質のひとつであるDnaKは、他の生物のDnaK/Hsp70ファミリーの蛋白質よりも長いC末端アミノ酸配列を持ち、高塩濃度下できわめて高い蛋白質フォールディング活性を有すること⁹⁾や、Na⁺/H⁺アンチポーターのイオン選択性が他の生物のホモログ蛋白質で報告されているものとは異なる¹⁰⁾など、高塩環境で生育するための独特な機構を持っていることが明らかになってきている。

*A. halophytica*におけるグリシンベタイン生合成は2つのN-メチル基転移酵素によって触媒される。1つ目の酵素であるグリシンサルコシンメチルトランスフェラーゼ (ApGSMT) はグリシンからサルコシン、さらにサルコシンからジメチルグリシンへのメチル化反応を触媒し、2つ目の酵素であるジメチルグリシンメチルトランスフェラーゼ (ApDMT) はジメチルグリシンからグリシンベタインへのメチル化を触媒する。これらの酵素活性の生化学的性質を

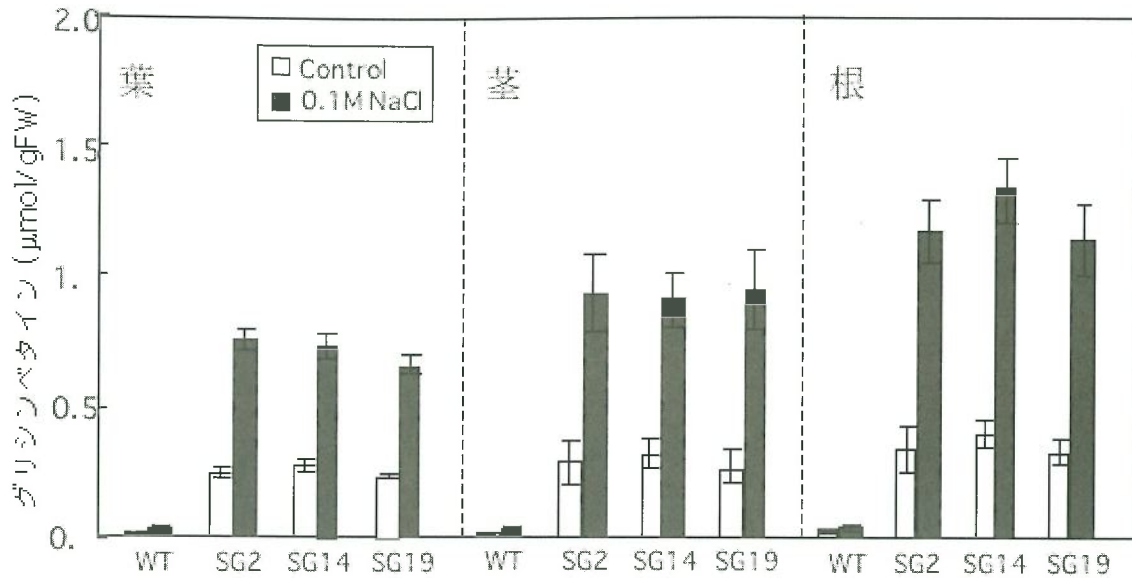


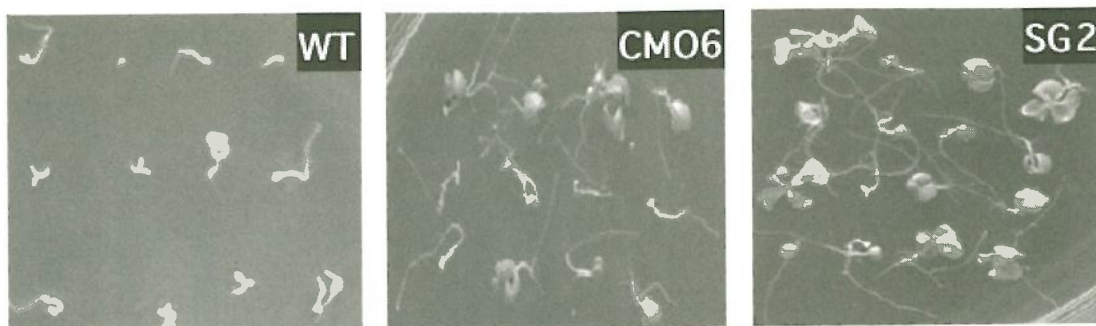
図2 ApGSMT/ApDMT形質転換アラビドプシスのグリシンベタイン蓄積量
非ストレス条件 (Control) または0.1M NaCl塩ストレス条件下で3~4週間生育させた植物体のグリシンベタイン量を測定した。
WT, 野生型; SG2, SG14, SG19, 独立に得られた形質転換体の系統

調べたところ、多くのメチル基転移酵素がメチル化反応の副生成物であるS-アデノシル-L-ホモシステインによって非常に強く阻害されるのに対して、ApGSMTとApDMTは強い阻害を受けなかった。また、最終産物であるグリシンベタインはこれら酵素のメチル基転移反応を全く阻害しないことが明らかになった⁸⁾。そこで私たちは、*A. halophytica*由来のこれらメチル基転移酵素が、これまでの試みの限界を乗り越えて植物に高いグリシンベタイン生合成能力を付与するかどうか検討することにした¹⁰⁾。その結果、ApGSMTとApDMTを共発現させたアラビドプシスでは、従来のコリン酸化酵素遺伝子を導入した植物と比べて高い濃度のグリシンベタインを蓄積することが明らかとなった。この結果は、植物の耐塩性を向上させるために、グリシンからグリシンベタインを合成する経路を導入することが有効であることを示している。

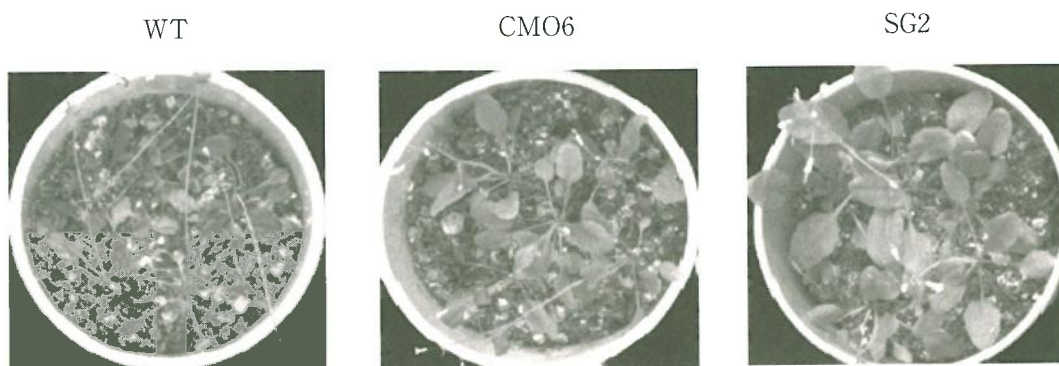
3. 形質転換アラビドプシスの環境ストレス耐性

野生型のアラビドプシスではグリシンベタインはほとんど検出できないのに対して、ApGSMT/ApDMTを発現した形質転換体ではグリシンベタインの蓄積が観察され、塩ストレス条件下では蓄積量が増加した (図2)。CMO遺伝子を導入した場合はグリシンベタインは主に根で蓄積したが¹²⁾、ApGSMT/ApDMT形質転換体では、グリシンベタインは、葉、茎、根のすべてで蓄積し、100mM NaClの塩ストレス下では1~1.5 μmol/g生重量であった。ApGSMT/ApDMT形質転換体の様々な組織でグリシンベタインの蓄積がみられたので、植物が環境ストレス耐性を獲得するために有効であると考えられた。

実際、ApGSMT/ApDMT形質転換体は、様々な環境ストレスに対して、CMO形質転換植物よりもすぐれた耐性を示した。培地中のNaCl濃度が増加すると、野生型の種子の発芽は著しく阻害されるのに対し、形質転換体では



A. 0.1M NaClを含む1/10 MS培地で14日発芽させたアラビドプシス芽生え



B. 1カ月生育させたアラビドプシスを乾燥ストレス条件に移してから14日後の植物体

図3 ApGSMT/ApDMT形質転換アラビドプシスの環境ストレス耐性
WT, 野生型; CMO6, CMO形質転換体; SG2, ApGSMT/ApDMT形質転換体

有意に高い発芽率を示した。発芽後の芽生えの生育にも違いがみられ、0.1M NaClを含む培地では、播種後14日後では野生型のすべてとCMO形質転換体の40%では子葉の黄化がみられたのに対し、ApGSMT/ApDMT形質転換体では90%程度の芽生えが緑色を保持して生育した(図3A)。また、ApGSMT/ApDMT形質転換

植物は乾燥ストレスに対しても耐性が向上した(図3B)。さらに、生殖成長期のストレス耐性についても実験を行った。最初の花芽が現れた時点から0.2M NaClを含む培地に移し、種子が成熟するまで生育させた結果、個体あたりの鞘の数、種子の総重量ともに、ApGSMT/ApDMT形質転換植物は非ストレス条件の場合の1/3程

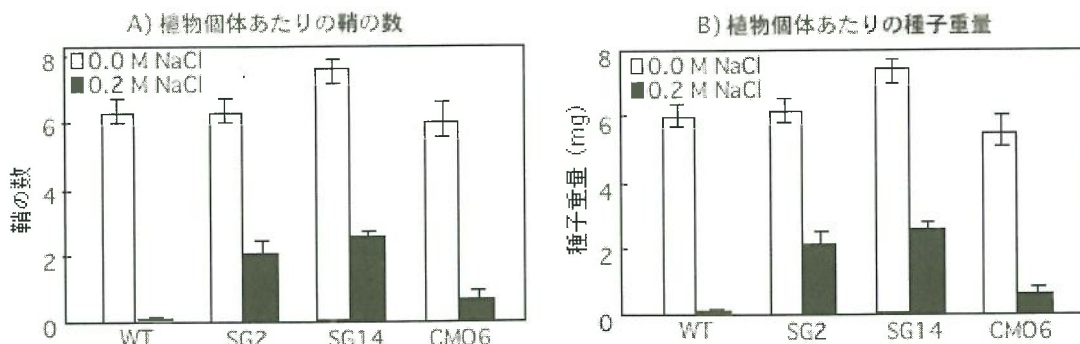


図4 ApGSMT/ApDMT形質転換体の生殖生長期における塩ストレス耐性
2-3週間生育した植物体を0.2M NaCl塩ストレス条件に移し、15日後に鞘の数を数えた(A)。その後成熟し乾燥した鞘から得られた種子量を測定した(B)。

度の値となり、これは同じ塩ストレス条件下での野生型の値と比べて約15倍高いものであった(図4)。

4. グリシンベタイン合成に対するN-メチル基転移酵素の有効性

ApGSMT/ApDMT形質転換体の様々な組織でグリシンベタインの蓄積がみられた理由としては、どの組織においても基質の供給量が多いということが考えられる。グリシンとセリンは植物におけるメチル基の供給源と考えられ、両者はセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼとグリシンカルボキシラーゼの作用によって相互に変換されることが知られている。グリシンとセリンはどちらも基本的なアミノ酸なので、すべての植物組織にとってグリシンの生合成は容易であると考えられる。高塩条件では遊離のセリンの量が増加することが報告されており¹³⁾、また、メチル化反応においてメチル基を供給するS-アデノシル-L-メチオニンの合成酵素は塩ストレスによって発現量が増加することが報告されている¹⁴⁾。したがって、塩ストレス条件下でのグリシンベタインの生合成をグリシンを基質としてApGSMT/ApDMTによって行わせることは、従来のコリンを基質とする経路と比べて効率的であると考えられる。

5. 今後の展望

植物の塩耐性を向上させる上で、Na⁺/H⁺アンチポーターの遺伝子操作が効果的であったのに比べて、グリシンベタイン生合成系の遺伝子導入によって適合溶質の蓄積量を増やそうとする試みは、形質転換体のグリシンベタイン蓄積量が低いという、一種の「壁」に直面していた。しかし、N-メチルトランスフェラーゼ遺伝子を用いて得られた私たちの結果は、植物の環境ストレス耐性を向上させる上で適合溶質である

グリシンベタインが重要であることを改めて示したものと考えている。今後は、Na⁺/H⁺アンチポーターによるNa⁺の排除能力の強化と、N-メチル基転移酵素によるグリシンベタイン合成能力の付与による適合溶質蓄積能力の強化を組み合わせることによって、植物の環境ストレス耐性のさらなる向上が実現できることを期待している。

文 献

- 1) Apse, M. P. et al. (1999), *Science*, 285, 1256-1258
- 2) Shi, H. et al. (2001), *Nat. Biotechnol.*, 21, 81-85
- 3) Rhodes, D. et al. (1993), *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 44, 357-384
- 4) Rontein, D. et al. (2002), *Metab. Eng.*, 4, 49-56
- 5) Rathinastabapathi, B. et al. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 3454-3458
- 6) Lamark, T. et al. (1991), *Mol. Microbiol.*, 5, 1049-1064
- 7) Hayashi, H. et al. (1997), *Plant J.*, 12, 133-142
- 8) Waditee, R. et al. (2003), *J. Biol. Chem.*, 278, 4932-4942
- 9) Hibino, T. et al. (1999), *Plant Mol. Biol.*, 40, 409-418
- 10) Waditee, R. et al. (2001), *J. Biol. Chem.*, 276, 36931-36938
- 11) Waditee, R. et al. (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 1318-1323
- 12) Hibino, T. et al. (2002), *J. Biol. Chem.*, 277, 41352-41360
- 13) Ho, C. L. et al. (2001), *Amino Acids*, 20, 243-259
- 14) Espartero, J. et al. (1994), *Plant Mol. Biol.*, 25, 217-227

◀国内情報▶

農作業事故情報の収集と安全啓発

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
中 野 丹

農作業の安全性を一層向上させるためには、事故の実態や原因を総合的に分析し、安全啓発に活用する必要がある。そこで、死傷事故や安全啓発情報を収集し、安全工学の手法を用いてヒューマンエラー、人—機械系のインターフェイス、作業環境の観点から分析した。さらに、農業者を始めとする関係者へ、分かりやすく加工したコンテンツをインターネットで提供することで農作業安全を支援するホームページを開発した。

1. はじめに

農作業の事故防止のため各種安全対策が行われているにもかかわらず、農業従事者の高齢化等を背景に農作業死亡事故は年間400件前後で推移している。また、負傷事故の実態についてはほとんど把握されていない状況であった。

より強力な安全対策を推進するため、全国規模での農作業死傷事故の実態の把握及び事故原因の詳細な分析が不可欠である。そこで、事故の実態や原因を総合的に収集・分析し、安全啓発に活用する農作業安全情報システム（図1）を開発したのでその概要を紹介する。

2. 農作業事故の現状

農作業事故の現状は、農林水産省の農作業事故調査結果報告書に詳述されている。これによると近年の農作業による死亡事故は年間400件前後で推移している。

平成14年度の調査結果によると、農業機械作業に係わる事故が70%をしめている。

その中では乗用型トラクタの事故が54%と最も多い。原因の中では転落・転倒が64%で最も多い。また、年齢階層では60歳以上が82%で農業就業者の高齢化に伴い、高齢者の事故の増加

NAKANO Makoto

〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

が目立っている。

したがって、現在「乗用型トラクタの転落・転倒」と「高齢者」の対策が重要な課題となっている。

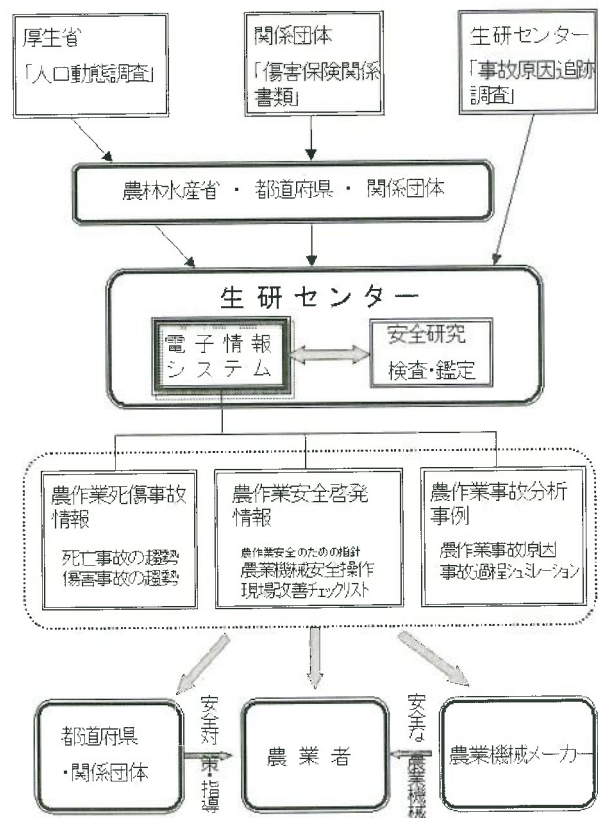


図1 農作業安全情報システムの概念図

3. 安全啓発の重要性

事故は、「人」、「機械」、「環境」の要素が複雑に関係して起きるが、中でもヒューマンエラー（人的ミス）が7割を越えるという報告もある。そのため、安全対策には「人」に関する部分が大きく、安全啓発が重要とされている。

近年、交通事故や他産業の労働災害は減少傾向を示しているが、安全対策として「機械」へ安全装置を付加するほか「人」への安全啓発を重視している。

その方法としてITを活用する例が多く、自動車分野では、国土交通省が行っている「自動車総合安全情報」や社団法人日本自動車連盟（JAF）の「交通安全、環境活動」、産業分野では中央労働災害防止協会の「安全衛生情報」のホームページが運営されている。

農業分野ではこの種のホームページの整備が遅れていたが、英国の安全衛生庁や米国の国立労働安全衛生研究所が運営する農作業安全に関するホームページを調査し、我国におけるホームページによる安全啓発手法を検討した。

4. 研究の内容

本研究では、事故調査、安全啓発情報の収集・提供、ヒューマンエラーバックアップシス

テムの開発の3項目を行った。

1) 事故調査

従来の死亡事故調査（「人口動態調査死亡小票」を保健所で閲覧するもの）に、新たに死傷事故調査（「傷害保険関係書類」から農業機械事故情報を抽出）を加え、死傷事故の機種別・原因別、年齢階層別・男女別の割合や毎年の推移などの統計的分析を行った。

また、事故事例やヒヤリ体験事例の調査として、事故現場へ出向き被災者や関係者から直接話を聞いた。

2) 安全啓発情報の収集・提供

農業機械士等全国の農家に対し、農作業現場改善チェックリストについての評価並びに農家が自ら取組んでいる改善事例等を現場で聞き取り調査した。

3) ヒューマンエラーバックアップシステム

安全講習の手法として、印刷物やビデオが使われているが、受講者側の関与が少なく、教える側からの一方的情報伝達となりやすい。そこで、対話型で農業者が自ら安全意識点検ができる教育ソフトを開発した。



図2 農作業安全情報のトップページ

表1 提供情報の内容

農作業事故情報

- ・死亡事故の動向、負傷事故の動向、事故事例、危険作業事例

安全啓発情報

- ・農作業安全指針、農作業現場改善チェックリスト、改善事例検索、安全ポイント

その他

- ・安全用品リスト、文献リスト、用語の解説、・県・関係団体・国外サイトの紹介、安全コラム
- ・英文バージョン（一部）



図3 危険作業事例の一部

表2 提供情報の内容

- ・トラクタの片ブレーキ操作による急旋回
- ・前輪分担荷重の減少及び急発進による前輪浮上
- ・歩行型トラクタの後進時のハンドルの跳ね上がり
- ・コンバインの畦越え時の機体の揺動
- ・刈払機の詰まり除去時のエンジン停止

5. 成果

1) 農作業事故情報（死傷事故の動向，事事故例），安全啓発情報（農作業安全指針，改善事例検索），その他（安全用品リスト，内外の関連リンク）等のコンテンツから構成されている農作業安全情報のホームページである（図2，表1）。

2) 農作業事故情報では，死傷事故の動向を年齢別，月別，曜日別，時刻別等の項目について主にグラフを用いて示し，事故原因追跡調査の結果は事故事例を主にイラストを用いて示す（図4）。また，危険作業事例ではサムネイル（小さな写真）を目次として使い，興味のある項目をクリックして動画と解説を出すなど，視覚的にも理解しやすく構成されている（図3，表2）。

事故原因追跡調査結果

原等の機関の協力を得て，事故を体験された方から調査した事故の事例です。

目次

- 事例1: 乗用型トラクター1 事例11: 管理機1
- 事例2: 乗用型トラクター2 事例12: 歩行型トラクター4
- 事例3: 乗用型トラクター3 事例13: 歩行型トラクター6
- 事例4: 乗用型トラクター4 事例14: 田植機1
- 事例5: 乗用型トラクター5 事例15: コンバイン(自脱型)1

事例1: 乗用型トラクター1 重心位置，登坂速度，片ブレーキ



図4 事故原因追跡調査（例：転倒事故）

検索結果

データベース名: kaizen r25

番号	タイトル	作目	作業	地域	目的
1000001	運搬機改良案	森本 幸 野 菜	運搬・播種	福岡 豊前 豊前	効率化・省力化，物損整備，集積率の向上
具体的方法					収集 磨傷 注 磨傷 ファイル 2000 調査 修正
<p>結れを分かりやすくするため上面を緑色に塗装 長さ表示，傾けて見やすく，傾斜台上で使える台 秤，単純作業負担の緩和（ラジオ放送），照明の 確保</p>					



図5 改善事例検索例

3) 安全啓発情報では、農作業安全指針のような文書資料を電子化することで、必要な情報が、場所、時間を選ばず簡単に利用できる。また、農家が工夫した安全、快適、軽労に関する改善事例を、作目（穀類、野菜等）、作業（育苗、耕うん、播種等）、目的（重量物負担軽減、作業姿勢改善等）などのキーワードをプルダウンメニューで検索し、目的とする事例を写真と解説つきで簡単に利用できる（図5）。

4) その他の項目では、農作業安全に役立つ資材、保護具等のメーカー名、住所等を一覧表で示し、必要な用品を見つけることができる。また、国内外の主要な安全関係サイトにリンクすることで、農作業安全関係の最新の情報を入手できる。

5) 教育ソフトはトラクタによる耕耘作業を事例とし「始業準備」、「格納庫内での点検」、「道路走行」、「圃場作業」、「終業準備」の各シーンと「総合評価」から構成されており、各画面の質問に応じて正解を選択すると得点が加算され総合成績が表示される。所要時間は20分～30分である（図6）。

6. おわりに

新たな事故対策として、自動車や他産業などの分野で導入されている、インターネットを利

用して安全情報を提供するシステムの開発を行った。農作業安全情報ホームページはアクセスが着実に増え、県、団体、民間などではリンク付けや啓発資料への利用があった。独自で農作業安全に関するサイトを立ち上げている県も増加しており、Google等の主な検索エンジンから「農作業安全情報」のキーワードで検索すると、同様のサイトが増えてきている。

今後、本サイトの運営をどのように継続するか問題であるが、米国の国立労働安全衛生研究所が運営するホームページ（米国内の農作業安全に関する10センターが連携して、全国ベースでの農作業安全の向上に活動している。）のように、日本でも関連機関の連携をとって農作業安全の向上を図れる仕組み作りが必要である。本システムが始めの一歩となることを願っている。

文 献

- 1) 石川文武，中野 丹，菊池 豊：農業機械の安全性に関する研究（第21報），生研機構研究成績12-2，生研機構，2001.3
- 2) 石川文武，中野 丹，菊池 豊：農業機械の安全性に関する研究（第22報），生研機構研究成績13-1，生研機構，2002.3
- 3) 石川文武，中野 丹，菊池 豊：農業機械の安全性に関する研究（第23報），生研機構研究成績14-1，生研機構，2003.3
- 4) 農林水産省生産局生産資材課：農作業安全対策の実施状況について，平成13年度農作業事故防止中央運動推進会議 別冊資料，2003.3
- 5) 石川文武，中野 丹，菊池 豊：農業機械の安全性に関する研究（第24報），生研機構研究成績15-2，生研センター，2004.3
- 6) 生研センター 農作業安全情報ホームページ <http://brain.naro.affrc.go.jp/anzenweb/index.html>，2005



図6 教育ソフトの入口画面

◀地域の先端研究▶

緑色大型藻類の葉状体形成因子Thallusinの
発見と今後の展開

¹(株) 海洋バイオテクノロジー研究所, ²徳島文理大学 薬学部
松尾嘉英¹・今川洋²・西沢麦夫²・志津里芳一¹

大型藻類は一般的に完全な光合成独立栄養生物ではなく、培養する際には様々なビタミン類を添加しなくてはならない。我々は、大型緑藻類の葉状体形成に不可欠な物質を付着性のバクテリアから世界で初めて単離構造決定し、葉状体形成物質Thallusinと命名した。Thallusinはこれまで困難であった実験室内における大型緑藻類の無菌培養や絶滅危惧種の保存培養、優良品種の種苗生産など様々な応用が期待できる。

1. はじめに

自然の海水中には何かが産生したビタミン類がほどよく配合されていると考えられ、そこに生息している海藻類の発生や成長を助けていると思われる。この現象は、対象とする海藻を採集し、成分が既知である人工海水で無菌培養することで確認出来る。その海藻の成長が異常に遅かったり、形態が再現されない場合、天然海水に比べてその人工海水には何らかの成分が不足していると見なすことができる。こうした外因性因子要求の観点で大型藻類の培養を初めて試みたのはProvasoliである¹⁾。Provasoliは緑藻アオサの遊走子を抗生物質で無菌化処理して培養したところ、葉状体の形成がみられずいびつな藻体にしかならないことを発見した。その後40年以上にわたって多くの葉状性緑藻類と同様の事例が報告され、天然の海

¹〒026-0001 岩手県釜石市平田第3地割75-1

²〒770-8514 徳島県徳島市山城町西浜傍示180



図1 マキヒトエアッセイ

単菌化したバクテリア培養液あるいはコロニーを無菌・単細胞化したマキヒトエ細胞に直接添加し、7~14日間培養した。活性の判定は極めて明敏で、何も添加しない場合は、マキヒトエは緩いコロニーのまま成長するが(左図)、バクテリアに活性がある場合は小さな葉状体を形成し、放出されて成長した無数の遊走子(黒矢印)も観察される(右図)。点線の○で囲ったのは添加した活性菌の菌体。

水中には極微量の“undefined morphogenetic factor”が存在しており藻類の成長と葉状体形成を助けていると考えられてきた²⁾。純化による異常形態も海藻の種類によって異なるが、もっとも極端なものは葉状性緑藻マキヒトエの場合といえるかもしれない³⁾。この海藻は無菌下合成培地中ではほぼ単細胞状態にまで崩れるが、生海水、さらには特定のバクテリアの培養液を添加すると元の葉状体を回復することが知られていた。我々は海藻類に対するバクテリア群の役割に着目し、この緑藻マキヒトエをモデル生物として葉状体形成因子の解明を試みた。

2. スクリーニング

まず、海洋環境中における活性菌の分布を見るために広範なスクリーニングを行った。スクリーニングは植え継ぎ直後のマキヒトエに単菌化したバクテリアのコロニーを直接接種し、7～14日間培養して葉状体形成の有無を判定する方法で行った(図1)。海洋環境中のさまざまな海藻表面や海綿動物から分離されたバクテリアを1000株以上試験したところ、約50株の活性菌を見出した。

また、それらの活性菌の分離源としては緑藻表面から得られる確率が高かった(表1)。さらに、分子系統解析を行ったところ活性菌はいくつかのクラスターを形成するが、それらはすべて*Bacteroidetes phy.*に属し、特に*Zobellia uliginosa* ATCC 14397近辺に集中した⁴⁾(図2左)。また、これらの活性は活性菌の培養上清にみられ、各培養上清の比活性を検討したところYM2-23株が他の菌に比べて10～100倍強いことが明らかとなった(図2右)。

3. 単離精製, 構造決定, 活性

そこで、本株を大量に培養し、葉状体形成を誘引する活性物質を精製することを試みた。詳細は省くが、活性物質が非常に不安定であること、および活性菌の生産量が極めて微量(通常培養液1Lから活性物質1 μ g程度、培養法および精製法を最適化しても5～25 μ g)であるため活性物質の精製に2年、さらに構造決定まで2年を要した。最終的に構造は精製した活性物質から3段階の化学変換で得られる誘導体をX線結晶解析することでようやく決定すること

表1 マキヒトエアッセイにおけるスクリーニング結果

試験株の由来	試験株数	活性株数
緑藻表面	308	31
褐藻表面	146	6
紅藻表面	206	3
海綿動物	429	4
カルチャーコレクション	54	4

緑藻表面から高いヒット率で多数の活性株が得られた。カルチャーコレクション株はすべて*Bacteroidetes phy.*に属する活性株と近緑のものを選んで試験した。

ができた。活性物質は分子内にジピコリン酸を有する新規な化合物で、葉状体の形成を誘引する物質という意味でThallusin(図3-A)と命名した⁵⁾。

Thallusinは非常に比活性が高く、マキヒトエを使ったアッセイ系では最少有効濃度は実に1 μ g/mLであるが、成長による細胞数の増加に伴い消費されるためビタミン同様培地交換などの際には再添加しなくてはならない(図3-B, -C, -D)。また、Thallusinはマキヒトエだけでなく、アナアオサやボウアオノリの無菌化した遊走子の正常な葉状体形成を誘引することが明らかになった(図3-E, F)。自然界ではこれら緑藻類の表面に生息する微生物群がThallusinを産生し、大型緑藻類の葉状体形成を助けていると考えられる。

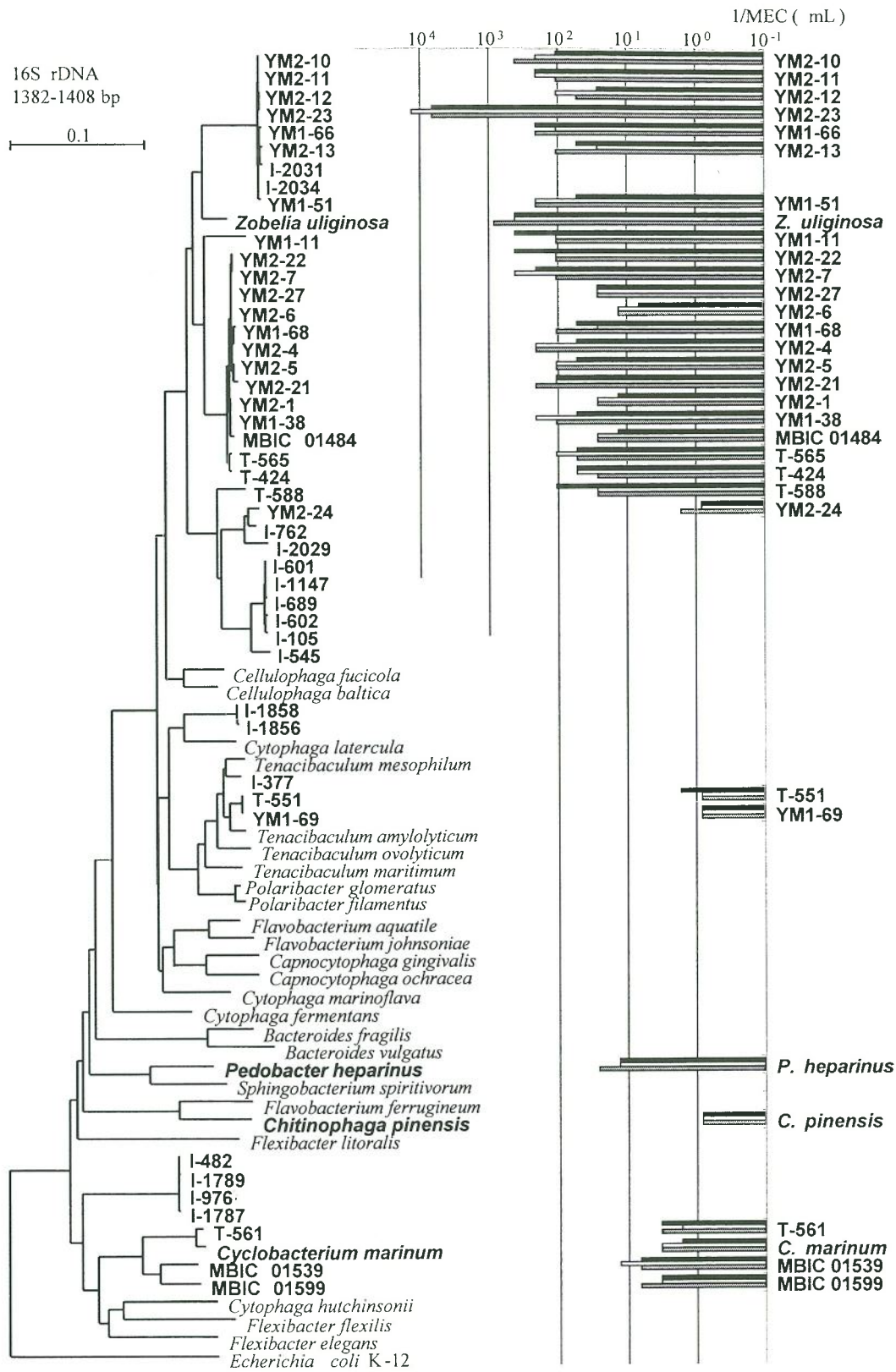


図2 (前頁) 活性株の16S rDNA配列に基づく系統樹と培養上清の比活性

系統樹中、活性株を太字で非活性株を明朝体で表している。比活性のグラフで横軸は最少有効濃度 (MEC) の逆数、つまり培養上清 1 μL で活性化できるマキヒトエの培養液量 (mL) を表す。試験は3連で行い、たとえばYM2-23株は活性菌培養上清 1 μL でマキヒトエ培養液7800mL (平均) を活性化することが可能であることを表す。

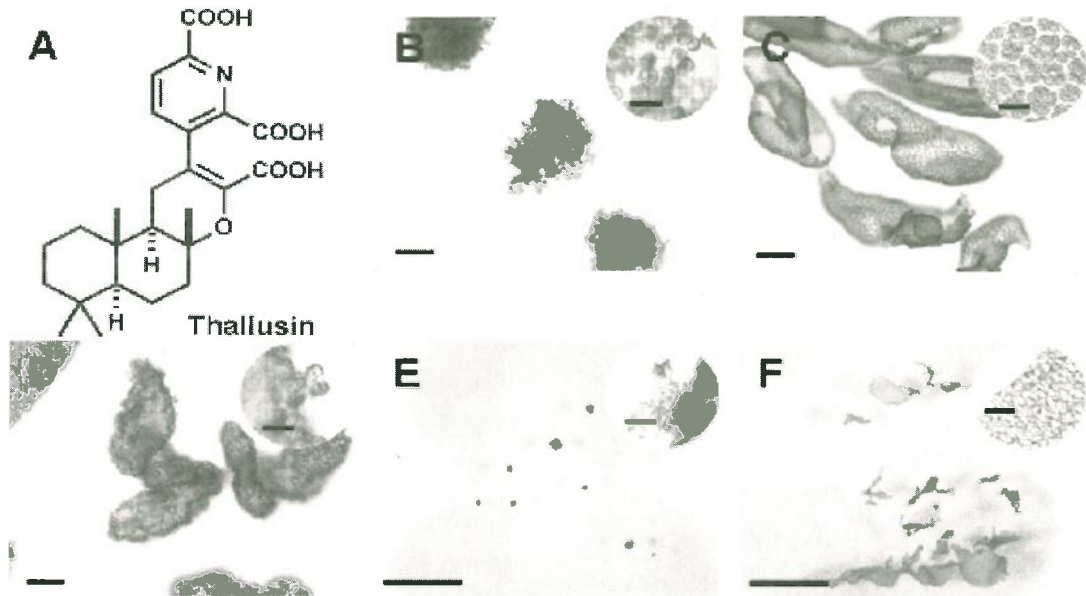


図3 マキヒトエおよびアナオサに対するThallusinの効果

A: Thallusin, B: マキヒトエは無菌下では葉状体を形成せずにゆるい単細胞の集塊となり、ピペットティ
 ングにより容易に崩れてしまう。C: 葉状体形成物質Thallusinを1 ng/mL添加して培養すると葉状体形成
 が誘導される。D: Thallusinが欠乏し葉状体が崩れ始めた。添加量1 pg/mL。E: 無菌下合成培地中でアナ
 オサ遊走子は成長が極めて遅く葉状体を形成しない。F: Thallusinを1 ng/mL添加して培養すると自然界
 で見られるのと同じような葉状体を形成する。ポウアオノリに対しても同様の効果が見られた。

B, C, D 静置培養7日目, Bar=100 μm (円内は20 μm)

E, F 静置培養2か月目(毎週培地交換), Bar=4 mm (円内は20 μm)

4. おわりに

40年以上にわたって謎であった大型緑藻の葉
 状体形成物質が今回世界で初めて明らかとなっ
 た。分離構造決定されたThallusinはジピコリ
 ン酸誘導体としても初めての天然有機化合物で
 あった。今後、他の活性菌が同じ化合物を作っ
 ているのか、葉状体形成因子は自然界に他にも
 あるのか、どのような機構で藻類は葉状体を形成
 しているのか、なぜ緑藻類はこのような重要な
 因子を他に依存しているのかなどさらなる疑問
 について取り組み、優良品種の種苗維持管理や
 希少種の保存培養など生産や環境保護などの応
 用へと展開していきたい。

文 献

- 1) Provasoli, L. (1958), *Biol. Bull.* 144, 375-384.
- 2) Bonneau, E. R. (1977), *J. Phycol.* 13, 133-140.
- 3) Tatewaki, M. et al. (1983), *J. Phycol.* 19, 409-416.
- 4) Matsuo, Y. et al. (2003), *Env. Microbiol.* 5, 25-35.
- 5) Matsuo, Y. et al. (2005), *Science*, 307, 1598.

◀文献情報▶

卵巣周期モニタリングのための肉牛糞便中プロジェステロンの酵素免疫測定法

Enzyme immunoassay of progesterone in the feces from beef cattle to monitor the ovarian cycle.

N. Isobe^a, T. Nakao^a, H. Yamashiro^b, M. Shimada^b

^aGraduate School for International Development and Cooperation, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima 739-8529, Japan,

^bGraduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

Animal Reproduction Science, 87(2005): 1-10

黄体機能を調べるための非侵襲的な方法が繁殖生理学的分野において開発されてきている。たとえば、乳汁中プロジェステロン濃度の測定は、搾乳牛の黄体機能を調べるのに有用な情報をもたらす。しかし、この方法は未経産牛や肉牛には適応できない。一方、糞便は容易に採取可能なことから、糞便中ホルモンの測定法が種々の動物で検討されている。本論文では、糞便中プロジェステロンの測定により、肉牛の卵巣周期をモニター可能かどうかの検討が行われた。

14頭の肉牛の直腸糞各0.3gを6mlの100%メタノールと混ぜ、15分間振とうした。1700×gで5分間遠心分離し、上清20 μ lと蒸留水90 μ lを混合し、3mlの石油エーテルを用いて抽出した。抽出液中のプロジェステロンは、抗プロジェステロン抗体とペルオキシダーゼ標識プロジェステロンを用いた第2抗体固相法による酵素免疫測定法により測定した。本測定法はプロジェステロンのみに特異的であり、類縁物質との交叉反応率は、5 α -pregnanedione：5.8%，20 β -hydroxy-progesterone：0.7%，deoxycorticosterone：0.62%，pregnenolone：0.2%，5

β -pregnane-3 α -ol-20-one：0.1%及び17 α -hydroxyprogesterone：0.05%であった。さらに、石油エーテルによって抽出される糞便中代謝産物には交叉反応を示さなかった。本測定法の測定感度は0.0055ng/ml (0.11ng/g)であり、測定内及び測定間変動は9.6～10.9%及び10.8～16.6%，糞便からのプロジェステロンの回収率は73～84%であった。卵巣周期中の糞便中プロジェステロン濃度の変動パターンは、血漿中プロジェステロン濃度の推移とほぼ並行し、糞便中及び血漿中プロジェステロン濃度には高い正の相関関係が認められた。卵巣周期0日（血漿中プロジェステロンが最低濃度の日）における糞便中プロジェステロン濃度は50ng/ml以下であり、卵巣周期9日にかけていちじるしい濃度の上昇が認められた（ $P < 0.01$ ）。また、卵巣周期の14～18日にかけて、糞便中プロジェステロン濃度のいちじるしい減少が認められた（ $P < 0.01$ ）。卵巣周期において、糞便中プロジェステロン濃度の最小値と最大値の差は、少なくとも48ng/g（平均74ng/g）あり、発情周期9，11，14日の糞便中プロジェステロン濃度は、卵巣周期0日に比べて20ng/g以上高い値を示した。今回開発されたウシ糞便中プロジェステロンの酵素免疫測定法は、肉牛の卵巣周期をモニター可能であることが明らかとなった。

糞便中プロジェステロンの測定により、非侵襲的に黄体機能を知ることができ、動物福祉の観点からも有効な方法となる可能性がある。しかしながら、血漿中と糞便中のプロジェステロン濃度の変動には時間的なずれが生じており、糞便中プロジェステロンの測定により黄体機能を把握するためには、この時間的なずれを補正する方法の確立が必要である。

（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▶

珠孔に花粉管を誘導するタンパク質の発見

Micropylar Pollen Tube Guidance by Egg Apparatus 1 of Maize

Mihaela L. Márton, Simone Cordts, Jean Broadhvest, Thomas Dresselhaus¹*Science* (2005) 307: 73-576

花粉はめしべの先端（柱頭）につくと花粉管を発芽し、卵細胞の待つ胚嚢を目指してわき目もふらず突き進む。どうやって花粉管はその道が分かるのだろうか？ その道筋は、柱頭から花柱を通り胚珠までと、胚珠の玄関口珠孔に入り奥座敷の卵細胞に辿りつく過程とに分けられ、前者の道標になる物質を孢子体要因と言い、後者の道標を配偶体要因というが、孢子体要因にはγ-アミノ酪酸（シロイヌナズナ）、TTS蛋白質（タバコ）、ケモシアニン（ユリ）等があることが知られている。配偶体要因は胚嚢中の助細胞がその給源であることがトレニアで明らかにされてはいたが、その物質の特定にはいたっていなかった。Mártonらは、トウモロコシの誘惑物質がタンパク質であることを示唆する結果を得たので、紹介したい。

Mártonらはトウモロコシ卵細胞cDNAライブラリーを作成し、卵細胞と助細胞で発現し受精により発現が低下する*ZmEA1*を釣り上げてきた。この遺伝子の発現するタンパク質は94個のアミノ酸からなり一回の膜貫通ドメインを有している。RNAiとアンチセンスにより*ZmEA1*発現抑制個体を父方と交配した場合には稔性があるが、母方とした場合稔性はほぼ1/2に低下する。このとき、花粉管は胚珠の前まで辿りついているのだが、珠孔へは浸入せずその手前で迂回しており、玄関口を見つけないでいる。

*ZmEA1*が花粉管の胚珠への浸入に一役買っているのは明白である。

誘導物質であるためには、助細胞から溢出し胚珠の外まで流れ出なくてはならないが（発現

抑制個体では胚珠の手前で迷子になっているのは、珠孔から流れ出る物質がないと考えられる）、本タンパク質は膜タンパク質であり、容易に流れ出るとは考え難いが、本タンパクのC末端にGFPをつないだ遺伝子導入個体では、始め助細胞に存在したGFPが次第に胚嚢の外側にまで移動しており、C末端近くで切断されているようである。ということは、実際にはこの分解産物が胚珠の外まで流れ出て誘導していると考えられる。また、*ZmEA1*はトウモロコシ、同じイネ科のイネ、小麦、大麦にはホモログが存在するが、双子葉植物のシロイヌナズナ（アブラナ科）、タバコ（ナス科）には存在せず、このタンパクが遠縁交雑を妨げる役割を担っているのではないかと推論している。

この論文は卵細胞誘引要因を明らかにした見事なものではあるが疑問は残る。このタンパク質あるいはその分解産物が花粉管を誘導するという直接的な証拠は示されていない。あくまで状況証拠である。次の報告を期待したい。本研究は植物発生生理学上のあくまで基礎的な成果ではあるが、交雑不可能種間の交雑を可能にし、雌性不稔系統の作出につながるのかもしれない。

（抄訳：岩井純夫, IWAI Sumio, 鹿児島大学農学部）

◀文献情報▶

食品の微生物学的安全性における
ゲノミクスの役割

Impact of genomics on microbial food safety

Tjakko Abee^{1, 2}, Willem van Schaik^{1, 2} and
Roland J. Siezen^{1, 3, 4}¹ Wageningen Centre for Food Sciences, P.O.
Box 557, 6700 AN Wageningen, The Nether-
lands² Laboratory of Food Microbiology, Wagenin-
gen University and Research Centre,
Bomenweg 2, 6603 HD Wageningen, The
Netherlands³ Center for Molecular and Biomolecular Infor-
matics, Radboud University, P.O. Box 9010,
6500 BL Nijmegen, The Netherlands⁴ NIZO Food research, P.O. Box 20, 6710 BA
Ede, The Netherlands*TRENDS in Biotechnology*, 22, 653-660
(2004)

食品の世界的なグローバル化によ
って食品に起因する食中毒が散発するケースが
みられるようになってきた。中でもready-to-
eat食品の普及や食品保蔵技術の変化によって
食中毒菌の中でも低温菌や中温菌が問題となっ
ている。これらの微生物によって引き起こされ
る食中毒の被害の拡大を抑えるためには感染源
である食中毒原因菌の迅速な特定と適切な対策
が要求される。そのために、各食中毒の原因と
なっている病原体の種間や菌株間の関連性を明
らかにすることが必要である。

そこで、本報では食品に起因する病原体であ
る *Listeria monocytogenes* と *Bacillus cereus* を
対象としたゲノムDNA配列の解読とその多様
性を利用した分子生物学的手法すなわち、比較
ゲノム解析、DNAマイクロアレイ技術による
トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、
分子間相互作用解析や挿入欠失変異体の網羅的
解析による疾患の病因と病態を分子レベルで解
明する機能ゲノミクス研究について論じてい

る。

具体的には、*L. monocytogenes* EGDe（血
清型1/2a）ゲノムと *L. innocua* CLIP12262（血
清型6a）ゲノムの比較ゲノム解析による病原遺
伝子群領域の特定、DNAマイクロアレイ技術
を使用した病原体の検出とtyping、*L. monocy-
togenes* 病原遺伝子群LIPI-1と細胞侵入に関与
するinl遺伝子クラスターを中心とした毒素産
生と感染防御機構の解明、*L. monocytogenes*
や *B. cereus* などが環境に適応するための代謝
経路の解明、*B. subtilis* や *B. cereus* の σ 因子に
よるストレス応答の発現制御機構の解析につい
て概説している。

ヒトゲノム解読完了によって開始されたポス
トゲノムシーケンス研究は、ヒトゲノムを中心
としたゲノム医学の分野が先行している。今
後は、食品の安全性の分野でのゲノムDNA配
列の実際的な利益がもたらされるべきであると
結んでいる。

（抄訳：堂本信彦，DOUMOTO Nobuhiko，日本
水産株式会社 中央研究所）

◀文献情報▶

カドミウムストレスに対する
グルタチオントランスフェラーゼ
の役割

The role of glutathione transferases in cadmium stress

Paula D.B. Adamis^a, Débora S. Gomes^a, Maria Lucia C.C. Pinto^b, Anita D. Panek^a, Elis C.A. Eleutherio^a

^a Departamento de Bioquímica, IQ, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Departamento de Química Analítica, IQ, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Toxicology Letters, 154 (2004) 81-88

カドミウムはプラスチック、充電池、金属加工等で広く利用されている。一方、カドミウムの生体に対する毒性は強く、イタイイタイ病の原因物質とされている。また、カドミウムは日本の土壤に自然に存在する重金属で、生体内に取り込まれるとほとんど排出されず蓄積する。そのため、米、大豆、海産物等様々な食品中にカドミウムの微量の蓄積が見られ、長期間の摂取による影響が示唆されている。特に、米から比較的高濃度のカドミウムが検出されており、関心が高まっている。そのため、最近、土壤中のカドミウムを植物や微生物を用いて回収する手法が注目されている。本報では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてカドミウムの吸収量にカドミウム無毒化機構が重要であることを示した文献を紹介する。

酵母は生体内でカドミウム (Cd) を無毒化する機構を持っており、その機構は一般的に以下のように考えられている。細胞内に入った Cd はグルタチオン (GSH) によりキレートされ、GSH-Cd 複合体を形成する。その後、Ycf1p により GSH-Cd 複合体は液胞へ輸送され、Cd は無毒化される。

一方、Cd の吸収調節には細胞質中の GSH-Cd 複合体の濃度が関与することが示唆されている。この GSH-Cd 複合体は glutathione S-trans-

ferase (GST) により形成される。この GST は *GTT1* 遺伝子と *GTT2* 遺伝子によりコードされている。また、酵母を Cd に被爆させると *GTT2* 遺伝子は 25 倍の発現量を示すため、GST はカドミウム吸収調節へ関与している可能性が示唆されている。そのため、GST のカドミウム吸収調節への関与について調べた。結果、GST 欠損株 ($\Delta gtt1$, $\Delta gtt2$ 破壊株) は野生株に比べて 2 倍量の Cd 吸収を示した。この結果は、GSH-Cd 複合体の形成は GST に依存するという仮定を大きく裏付けている。また、細胞透過性の GSH 前駆体である、グルタチオンモノエチルエステル (GME) を $\Delta gtt1$ 株へ添加すると、Cd 吸収量は野生株と同レベルまで低下した。しかし $\Delta gtt2$ 株へ GME を添加しても、Cd 回収量は変化しなかった。これらの結果から Cd の解毒機構において、Gtt1p は GSH のホメオスタシスに関与し、Gtt2p は GSH-Cd 複合体の形成に関与することが示唆された。

また、これまでの研究で GSH はカドミウムストレス下の細胞膜の保護に重要であることが示唆されている。そのため、GSH 欠損株 ($\Delta gsh1$ 破壊株) と $\Delta gtt2$ 破壊株の Cd 耐性について調べた。結果、Cd 耐性は野生株と比較して $\Delta gsh1$ 株は低く、 $\Delta gtt2$ 株は高かった。以上の結果から、GSH は細胞防御に非常に重要であるが、Cd-GSH 複合体が形成されると細胞防御機構が低下することが示唆された。

このカドミウム解毒機構の解明により、カドミウム汚染の浄化技術への応用が期待される。(抄訳：安達美和, ADACHI Miwa, 広島大学大学院 生物圏科学研究科)



ブレイン テクノニュース
バックナンバーのご案内
第109号
2005年5月15日発行

総説

怠け者の小さな植物病原微生物：ファイトプラズマ—初めて
入れられた分子生物学的メス……柿澤 茂行・難波 成任

国内情報

イネ白葉枯病菌のゲノム構造—なぜ多様なレースが生まれたか
……落合 弘和・井上 康宏・竹谷 勝・加来 久敏
フォトクロミック蛍光タンパク質, Dronpa (ドロンパ)
……宮脇 敦史・安藤 亮子
植物の生長ホルモン・ブラシノステロイドと受容体BR11の
結合メカニズム……瀬戸 秀春・木下 俊則
麻痺性貝毒によるトゲクリガニの毒化
……及川 寛・藤田 恒雄・齋藤 健・里見 正隆・矢野 豊
無花粉スギ「爽春」とスギ花粉症対策に向けた雄性不稔個体の
今後の利用……高橋 誠・星 比呂志・岩泉 正和・

久保田 正裕・福田 陽子

MRSAに効果のある昆虫抗菌タンパク質を改変した合成ペプ
チドを含む傷被覆フィブロインフィルムの開発
……山川 稔・坂中(西堂)寿子・石橋 純
超微小な溶液チャンバーを用いた1分子バイオアッセイ
の開発……野地 博行
田植機の苗載せ作業を軽労化する
……小西 達也・窪田 潤・土屋 史紀

地域の先端研究

柿ポリフェノールの高速精製法を用いた機能性食品素材
の開発……浜崎 貞弘

文献情報

泌乳初期の搾乳牛における血漿中尿素窒素濃度と卵胞液や
子宮腔内の尿素窒素濃度あるいはアンモニア濃度との関
連性について……(抄訳：下司 雅也)
アグロバクテリウム以外の細菌で植物の形質転換に成功
……(抄訳：岩井 純夫)
イトヒキキントキダイの皮と骨由来の酸溶解性コラーゲンの
性質……(抄訳：大庭 貴弘)

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108号
2005年3月15日発行

総説

イネゲノム全塩基配列の解読完了と今後の課題……佐々木 卓治

国内情報

シロイヌナズナの根における幹細胞ニッチの制御機構
……相田 光宏
化学発光法による食品の生菌検査
……山庄司 志朗・川崎 晋ほか
ミヤコグサのゲノム分析に基づくプラスチド局在性の根粒・
菌根形成初期シグナル因子の発見

……川崎 信二・今泉 温子・村上 泰弘
家畜遺伝情報の産業利用へ向けて—牛肉の質と豚のインフル
エンザウイルス抵抗性——三橋 忠由
紫外線照射による穀物殺菌技術……日高 靖之

地域の先端研究

エリンギにおける担子胞子形成欠損突然変異株の作出
……角田 茂幸

文献情報

出生後2日以内に死亡したクローンウシの臓器における遺伝
子発現の異常……(抄訳：下司 雅也)
タイセイヨウマダラの激減に先立って見られた成熟傾向にお
ける急速な進化……(抄訳：岡本 崇)
ワイン醸造における酵母*Saccharomyces cerevisiae*の酸素消
費量、および発酵量への影響……(抄訳：安達 美和)
カリウム欠乏のプロテオーム解析……(抄訳：岩井 純夫)

生研センターからのご案内

編集後記

第110号をお届けします。既にお気付きの方もおられるかと存じますが、平成17年度（前号）から、総説と関連国内情報においてテーマ性をより鮮明にするなど、新企画を打ち出しております。本号では、齊藤昌之氏（北海道大学）に「食品成分による肥満・生活習慣病の制御」と題して総説をご執筆頂くとともに、関連する国内情報として、同氏にはエネルギー消費分子UCPについて、河田照雄氏（京都大学）らに脂肪細胞の分化・増殖について、室田佳恵子氏（徳島大学）らに酸化ストレスと食事由来の抗酸化成分について、ご執筆戴きました。多くの現代人に共通の悩み、心配事となっている肥満や生活習慣病について、その食品由来成分による制御との関係を、それぞれご専門の分野で最新の知見を踏まえてご紹介戴きました。

この他にも、諸先生方から内外の貴重かつ新鮮な研究情報をお寄せ頂きました。ご多忙な中ご執筆頂きました研究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110号

平成17年 7月15日発行

発行人 津賀幸之介

編集人 吉臭 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