

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成19年1月15日発行（隔月1回15日発行）

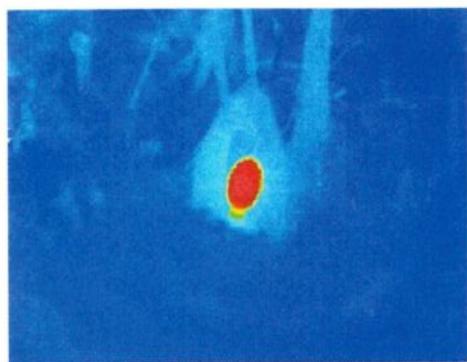
ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.119

15 JANUARY, 2007

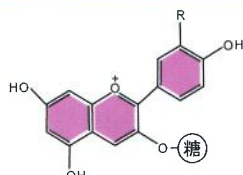
ブレインテクノニュース



0 15 30 (°C)

発熱植物ザゼンソウに見出された非線形体温制御システム

岩手大学
伊藤 孝徳・伊藤 菊一



アントシアニン3位配糖体



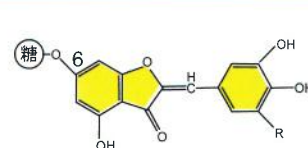
アントシアニン色素を蓄積するトレニア



アントシアニン色素を蓄積するキンギョソウ



アントシアニン色素を蓄積するコスモス



オーロン6位配糖体



オーロン生成経路の導入によりオーロン色素を蓄積する遺伝子組換えトレニア



オーロン色素を蓄積するキンギョソウ



オーロン色素を蓄積するコスモス

黄色フラボノイド，オーロンによる黄色花の分子育種

¹サントリー株式会社，²東北大学
小埜 栄一郎¹・中山 亨²



独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）

目 次

総 説

- 発熱植物ザゼンソウに見出された非線形体温制御システム 1
伊藤 孝徳・伊藤 菊一 (岩手大学 農学部附属 寒冷バイオシステム研究センター)

総説関連情報

- 極小サイズ時系列のアンサンブル再構成による生態ダイナミクス推定法—農学における決定論的非線形予測とカオス制御の可能性— 9
酒井 憲司 (東京農工大学大学院 共生科学技術研究院 生存科学COE研究拠点)

国内情報

- コムギの低温適応においてRNAの働きを助けるタンパク質 15
中南 健太郎^{1, 2}・Dale Karlson^{1, 2}・今井 亮三¹ (¹(独)農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター, ²現: West Virginia University)
- 黄色フラボノイド, オーロンによる黄色花の分子育種 19
小埜 栄一郎¹・中山 亨² (¹サントリー(株) 先進コア技術研究所, ²東北大学大学院 工学研究科 バイオ工学専攻 応用生命化学講座)
- 自然免疫における病原体認識蛋白質の多機能性 26
倉田 祥一郎 (東北大学 大学院薬学研究科)
- 昆虫のステロイドホルモン合成を抑制する神経支配の発見 30
田中 良明¹・山中 直岐²・片岡 宏志² (¹(独)農業生物資源研究所, ²東京大学 大学院 新領域創成科学研究科)

地域の先端研究

- 細胞剥離法を用いたウシ性判別産子の生産に成功 34
尾形 康弘・日高 健雅・松重 忠美 (広島県立畜産技術センター)

文献情報

- 細胞質内精子注入時に原形質膜と先体を同時除去した精子を用いることにより, 卵子の活性化率と胚発生率が向上する 38
K. Morozumi et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 17661-17666, 2006) 抄訳: 下司 雅也
一酸化窒素合成酵素はまた振り出しに 39
N. M. Crawford et al. (*Trends in Plant Science* 11: 526-527, 2006) 抄訳: 岩井 純夫
回腸部に病変が認められるクローン病患者においてパネート細胞の産生する α デフェンシンは減少している 40
Weichenthal M et al. (*Proc Natl Acad Sci USA*, 102(50): 18129-34, 2005) 抄訳: 芦田 延久
レスベラトロールは, 高カロリー餌摂取マウスの健康および寿命を改善する 41
J. A. Baur et al. (*Nature*, 444, 337-342 2006) 抄訳: 秦 淳一郎

- 生研センターからのご案内 (2007年度新規研究課題募集のお知らせほか) 42

表紙の説明

(左) サトイモ科の植物であるザゼンソウは, 肉穂花序と呼ばれる器官を発熱させ, 外気温の変動にも拘わらず, その体温を制御しておよそ20℃程度の一定温度に維持することができる。そのユニークな体温制御システムが筆者らにより初めて明らかにされた。

(右) 筆者らは, 黄色フラボノイド色素, オーロンの生合成経路を明らかにした。さらに, この生合成経路を青紫色のトレニアに導入した結果, 黄色のキンギョソウやコスモスと同様にオーロン色素を蓄積し, 花色は黄色に変換した。詳細については, それぞれ1頁, 19頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

発熱植物ザゼンソウに見出された 非線形体温制御システム

岩手大学 農学部附属 寒冷バイオシステム研究センター

伊 藤 孝 徳 ・ 伊 藤 菊 一

早春に花を咲かせるザゼンソウは、氷点下を含む外気温の変動にも関わらず、その肉穂花序と呼ばれる花器の温度を20℃程度に制御することのできるサトイモ科の発熱植物である。本植物の発熱現象の発見は1970年代まで遡ることができるが、その体温制御システムはこれまで全く不明のまま残されていた。本稿では、我々の行ったザゼンソウの発熱制御アルゴリズム解析により初めて明らかとなったユニークな非線形体温制御システムについて紹介する。

1. はじめに

一般に、植物は体温制御機構を持たず、その体温は周囲の気温変動とともに変化するものと考えられている。このような植物においては、低温馴化に伴う凍結耐性の獲得等によって、低温による傷害や凍結などの環境ストレスを回避し、寒冷環境に適応していることが知られている。しかしながら、早春、まだ雪深い湿地において花を咲かせるサトイモ科の植物であるザゼンソウは、驚くべきことに、その肉穂花序と呼ばれる特異器官を積極的に発熱させることにより低温を回避している^{1, 2)}。ザゼンソウはサトイモ科の植物に見られる雌雄異熟性により雌雄の性表現を経時的に変化させるが、興味深いことに、本植物の肉穂花序温度を連続的に測定すると、雌期においては氷点下を含む気温の急激な変動にもかかわらず、その体温を制御し、およそ20℃程度の一定温度に維持することができる“恒温性”が観察される(図1)²⁾。このように、寒冷環境において発熱により体温を制御できる植物はザゼンソウ以外には報告例がない。このような“恒温性”というユニークな特徴を有するザゼンソウの体温制御においては、発熱のレベルやタイミング等を統御する“発熱制御アルゴリズム”が内在していることが予想

ITO Takanori, ITO Kikukatsu

〒020-8550 岩手県盛岡市上田3-18-8

される。従って、本植物の発熱現象の解明を目指した研究は、植物の発熱制御メカニズムの理解という生物学的意義だけに留まらず、生物を模倣した新しい制御アルゴリズムの開発や実用化など産業の発展にも繋がる興味深い研究領域であると言える。

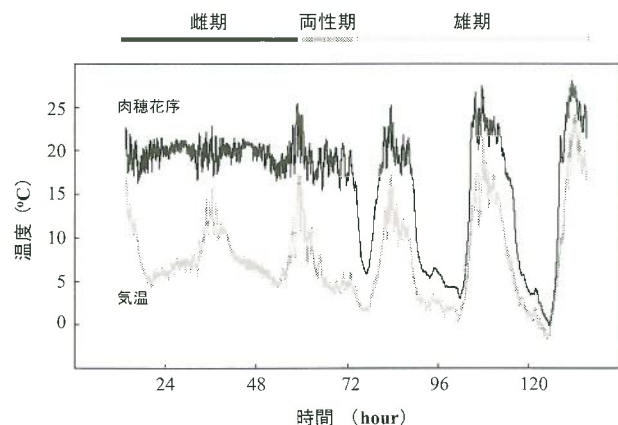


図1 ザゼンソウ肉穂花序における体温時系列データ

ザゼンソウ肉穂花序温度を気温とともに1分ごとに測定した時系列データを示す。雌雄異熟性を示すザゼンソウは、その肉穂花序の性表現(分化ステージ)を、花粉の全く見られない雌期、花粉が肉穂花序の半分くらいまで現れる両性期、肉穂花序全体が花粉に覆われる雄期と変化させるが、これら分化ステージのうち、ザゼンソウ肉穂花序は雌期において発熱し、その体温を20℃程度の一定温度に制御する。

2. ザゼンソウの体温制御機構の解析

(1) 時系列データにおける3つの分類

ザゼンソウを対象とする我々の研究は、生体機能を1つのシステム、すなわち「複数の要素が互いに関係しあい1つの機能を発揮する要素の集合体」として捉え、数理モデルの構築やコンピュータ・シミュレーションを駆使することにより、ザゼンソウの体温制御システムを解き明かそうとする点に特徴がある。

このような目的を達成するためには、まず、ザゼンソウの発熱現象に関わる定量的な測定データが必要となる。そこで我々は、日本国内のさまざまな群落地に生育するザゼンソウの肉穂花序温度の時系列データを網羅的に収集し、詳細な解析を行った。その結果、興味深いことにザゼンソウ肉穂花序の温度は60分を主な周期として複雑に振動していることが明らかとなった³⁾。時系列データに現れるこのような振動現象は、その時系列データの基となるシステムの動的な振る舞い(=ダイナミクス)によって生成されるものである。従って、ザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データの中に現れる振動現象を詳細に解析することにより、ザゼンソウにおける体温制御機構の構造や特性を理解することが可能であると考えられる。

時系列データに見られるような複雑な振動現象を解析する手法としてカオス時系列解析手法がある。このような手法を用いると、観測によって得られる時系列データを大きく3つに分類することができる—1つは周期的なダイナミクス(準周期的なダイナミクスも含める)、もう1つはランダム(確率論的)なダイナミクス、3つめは決定論的なカオスによるダイナミクスである。ランダムな事象とは、サイコロを振るような操作に相当し、どんな規則性も持たない、いわばギャンブルのようなものである。ある程度のランダム性は許されるとしても、完全なランダムではシステムとしては成立し得ない。さらに、ここでいうカオスとは混沌という意味ではなく、秩序とあいまいさの両方の特徴を兼ね

備えた興味深い現象、すなわち、一見複雑で不規則だと思われるようなデータの裏に、非常に単純な規則性が隠されているような現象を示すものである⁴⁾。生物をシステムとして理解するためには、解析の対象とする生体システムから得られる時系列データが周期あるいは決定論的カオスに従うダイナミクスによって支配されていることが前提となる。

(2) 解析手法

本研究によって得られたザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データが、上に記した3つのダイナミクスのうち、どのダイナミクスに支配されるかを調べるため、我々はカオス時系列解析手法の1つである決定論的非線形予測手法を用いることとした⁵⁾。この手法は、解析の対象となる時系列データを2つに分割し、前半部分のデータを用いて後半部分のデータの予測時系列データをつくり、実際に得られている後半部分の時系列データと予測時系列データとの間の相関係数すなわち予測精度によってダイナミクスの分類を行うものであり、データ点数が比較的少ない時系列データに対しても信頼のできる解を得ることができるという特徴を持つ。予測時系列データは、前半部分のデータにおける最後のデータのパターンと最も似ているパターンを過去のデータから探し出し(図2A)、そのデータの p ($p: 1, 2, \dots, N/2$, ここで N は得られていた時系列データに含まれる全データ点数)ステップ先を、図2Bに示す数式を用いて計算することにより生成される。解析対象の時系列データが周期的なダイナミクスに支配される場合、短期予測はもちろん長期予測であっても完全に予測可能であり、予測精度は予測ステップの長さに関係なく高い値で一定となる。また、解析対象がランダムであった場合は、決定論的なダイナミクスは存在しないため、予測ステップの長さによらず予測精度は常に0となる。そして、解析対象が決定論的カオスによって支配される場合には、決定論的カオスの特徴の1つである短期予測可能性と長期予測不可能性により、短

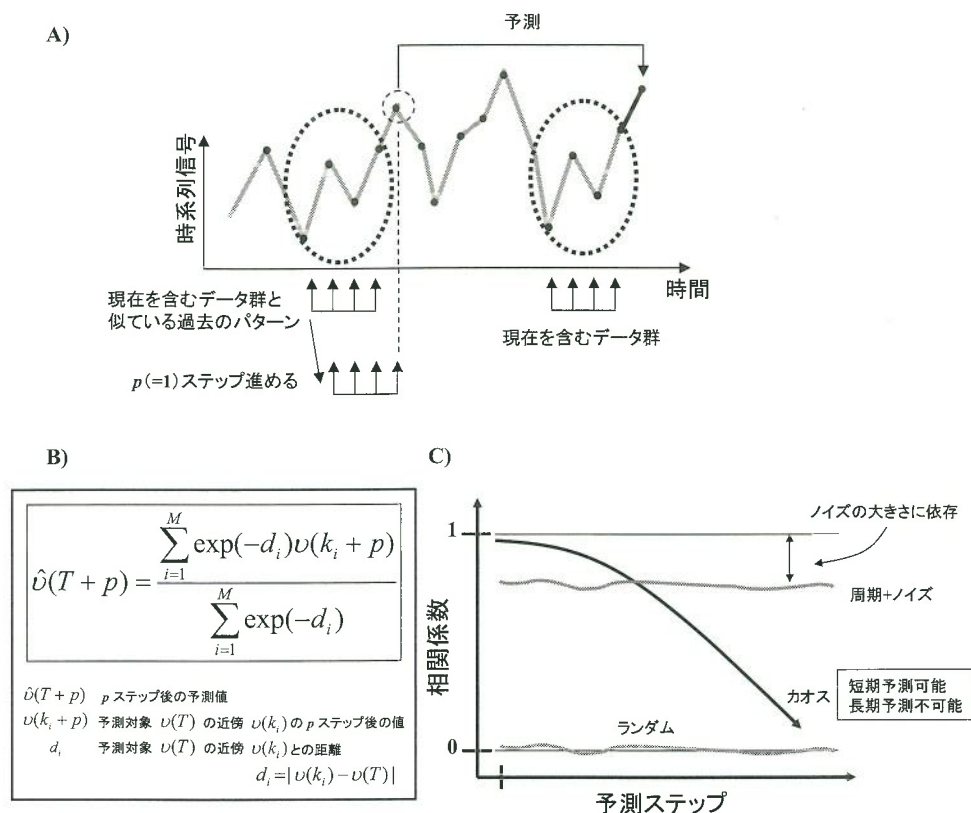


図2 決定論的非線形予測手法の原理とカオスの特徴

A) 決定論的非線形予測手法の原理。予測対象とする時系列データの最後のデータ・パターンと最も似ているパターンを、過去のデータから検索し、見つけれられた過去のデータのある時間ステップ先のデータを、予測した時系列データ点として採用する。実際にはB) に示す計算式を用いて、予測対象とする時系列データの最後のデータ・パターンに似ているパターンをいくつか検索し、最も似ているパターンから重みをつけて足し合わせ、平均したものを予測時系列データ点とする。C) 決定論的非線形予測手法による時系列データの分類。周期的なデータは常に予測精度が高く、ランダムなデータでは、予測精度は常に0である。カオスであれば右下がりのグラフを描く。これは、カオスの特徴の1つである、短期予測可能・長期予測不可能性に対応する。

いステップであれば予測可能であり予測精度は高い値を示すが、長期ステップでは予測困難となり、予測ステップを長くするに従って予測精度は低くなる (図2C)。

(3) カオスの発見

本研究では、まず、解析対象となる時系列データを得るため、温度センサー (熱電対) をザゼンソウ肉穂花序に挿入し、24時間かけて本植物の体温状態が安定になった後、およそ3000点 (約2日分) の体温データを収集した (図3A)。さらに、得られた時系列データに対し、決定論的非線形予測手法を適用した結果、ザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データの特徴は、典型的

な決定論的カオスの特徴と一致するものであった (図3B)。しかしながら、ここで用いた決定論的非線形予測手法では、非整数ブラウン運動のような有色ノイズをカオスとして判定してしまうことがある。そこで、TsonisとElsnerによって提案された方法⁶⁾—決定論的カオスにおいては、予測ステップに対する初期変位が指数関数的に拡大され、非整数ブラウン運動では予測ステップのべき乗に比例することを利用した方法—を用いて、ザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データが決定論的カオスに支配されるのか、あるいは非整数ブラウン運動に従うのかを識別した。その結果、ザゼンソウ肉穂花序の体温変動は、非整数ブラウン運動のような疑似カ

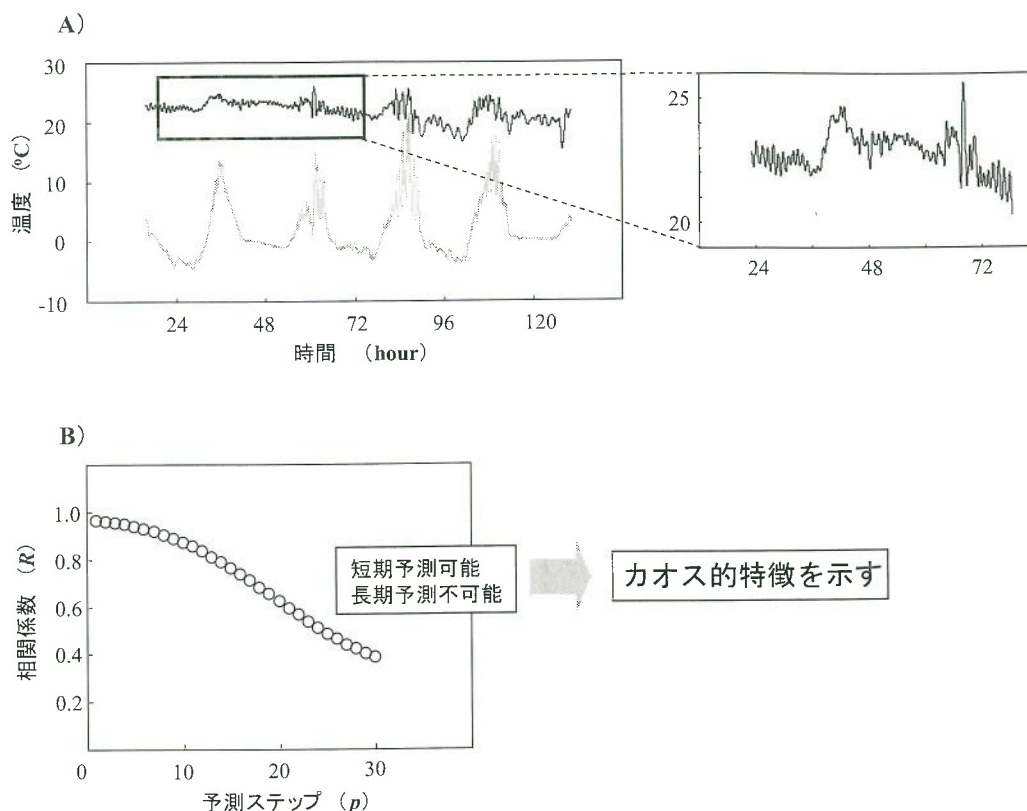


図3 ザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データに決定論的非線形予測手法を適用した結果
 A) 解析に用いたザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データ。ザゼンソウ肉穂花序に温度センサー（熱電対）を取り付けた直後は、ザゼンソウの体温制御に影響を及ぼすと考えられるため、24時間の時間間隔を置き、その後約3000点（2日分）の時系列データを用いて解析を行う。B) ザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データに決定論的非線形予測手法を適用した結果。予測ステップ（ p ）の増加とともにその相関係数（ R ）は減少する。これはカオスの特徴の1つである、短期予測可能・長期予測不可能性を示している。

オスとは異なる現象であることが判明し（図4）、本植物の体温制御システムは決定論的カオスに支配されるダイナミクスを持つことが明らかとなった。これは、恒温植物の体温振動にカオス性が存在することを初めて示唆した重要な知見であり、ザゼンソウ肉穂花序における体温制御システムには規則性が存在し、数学的に記述することが可能であることを示している。

3. ザゼンソウの体温制御機構におけるダイナミクス

次に我々は、ザゼンソウ肉穂花序における体温制御機構のダイナミクスの特性を調べた。システムのダイナミクスの特性は、事象を規定す

る自由度（次元）の解析により理解することが可能である。そこで我々は、埋め込み次元解析⁷⁾を行うことにより、ザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データのアトラクタ⁸⁾—時系列データの基となるシステムのダイナミクスを幾何学的に表現したもので、システムを表す方程式の解軌道に対応する—を再構成するための空間の次元を求めた。埋め込み次元解析の結果、本植物の体温時系列データのアトラクタに対する再構成空間の次元は3次元であると決定された（図5A）。そこで、3次元空間にザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データのアトラクタを再構成すると、円筒状の非常に複雑な軌道を描くユニークなアトラクター—ストレンジアトラクター—が得られた（図5B）。我々はこれを、ザゼンソ

ウ肉穂花序の体温時系列データより得られた特徴的なアトラクタであることから、“Zazen attractor”と名づけた⁹⁾。さらに、相関次元解析¹⁰⁾によって、3次元空間内に再構成された“Zazen attractor”そのものの次元、すなわちザゼンソウにおける体温制御機構のダイナミク

スの自由度を求めた。ダイナミクスの自由度は時系列データを生じさせる過程に含まれる変数の個数、言い換えると、時系列データを決定する方程式に現れる変数の個数に対応する。従って、ダイナミクスの自由度を求めることは、そのダイナミクスが支配するシステムを構成する

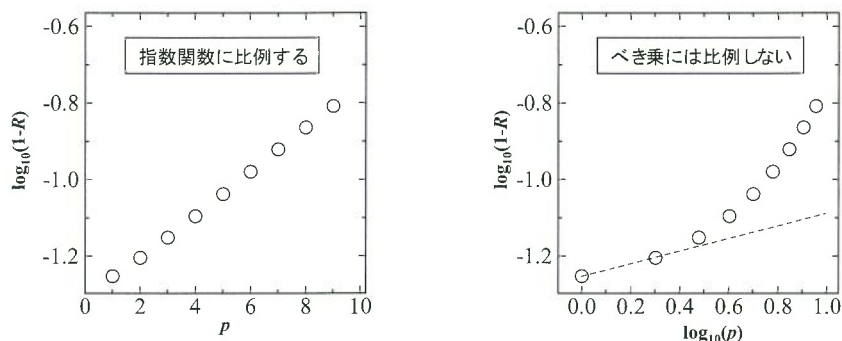


図4 カオスと擬似カオスの判定結果

TsonisとElsnerの方法⁶⁾を、ザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データに対する非線形予測（図3B）に適用した結果。左図は、図3Bにおける予測ステップ（ p ）に対する予測精度（ R ）を片対数プロットしたものである。一方、右図は図3Bにおける予測ステップ（ p ）と予測精度（ R ）を両対数プロットしたものである（ここで、図を右上がりのグラフとして見やすい形にするため、予測精度（ R ）の対数を $\log_{10}(1-R)$ と計算し、それぞれのグラフの縦軸としてとった）。これらの結果は、ザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データの予測精度は、指数関数に比例し、べき乗には比例しないことを示しており、疑似カオスの可能性が否定された。従って、ザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データは、カオスの性質を持つことが明らかである。

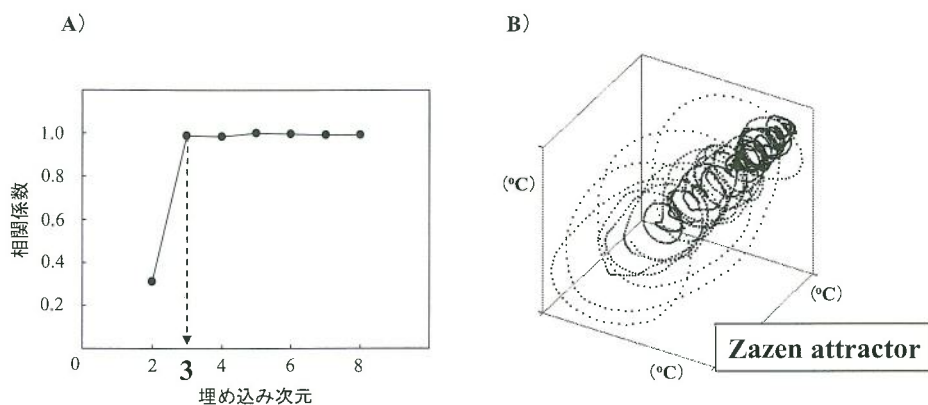


図5 ザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データに対する埋め込み次元解析の結果と“Zazen attractor”

A) ザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データに対する埋め込み次元解析の結果。ザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データでは、埋め込み次元を3以上にするとその予測精度は1で一定となる。これは、ザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データを支配するダイナミクスは、最低3次元の空間で再構成されることを表す。B) 3次元空間に再構成されたアトラクタ。螺旋状の非常に複雑且つユニークな軌道を描くことが明らかとなった。我々は、このようなアトラクタを、ザゼンソウから得られたアトラクタであることから“Zazen attractor”と命名した⁹⁾。

要素の個数を決定するための手掛かりとなると期待される。

ザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データに対して相関次元解析を行った結果、その自由度はおよそ2.6であることが明らかとなった(図6)。これは、ザゼンソウ肉穂花序における体温制御が、大きな2つの要素と、それらと従属関係にあるようなもう1つの要素との相互作用によって実現され得ることを示唆しており、これはザゼンソウの体温制御機構を解明する上で重要な知見となると考えられる。

ここまでは、あるザゼンソウ1個体を用いた解析結果であるが、我々の得た“Zazen attractor”の示すダイナミクスには個体差が存在するのであろうか、それともザゼンソウという種に固有のものであるのだろうか? “Zazen attractor”の示すダイナミクスがザゼンソウに固有のものであると仮定すると、異なる群落地に生育するザゼンソウ個体における体温制御システムのダイナミクスが、同一の“Zazen attractor”によって表現することが可能であると考えられる。このような観点から、我々は、カオス時系列解析に用いた決定論的非線形予測

手法を拡張することによって、時系列データを生成するダイナミクスの同一性を定量的に解析する手法を考案した⁹⁾。先述のとおり、決定論的非線形予測手法は、通常、1つの時系列データを2つに分割することによって行われる。2つに分割されたデータは元々1つの時系列データであったため、これらのデータを支配するダイナミクスは同じであることが保証される。しかし、もし、1つの時系列データの前半部分と後半部分で、そのデータを支配するダイナミクスが全く異なるとしたらどうだろうか。この場合、前半部分のデータを使って後半部分のデータを予測することはほぼ不可能である(ある方程式を使って、全く別の方程式の解を求めようとすることを考えるとわかりやすい)。すなわち、全く異なるダイナミクスによって支配される2つの時系列データ間では互いを予測することはできない。これは、予測精度の高さが、2つの時系列データのダイナミクスの同一性に対応していると考えられる。それゆえに、ある群落地に生育するザゼンソウの肉穂花序の体温時系列データを用いて、別の群落地に生育するザゼンソウの肉穂花序の体温時系列データを決定

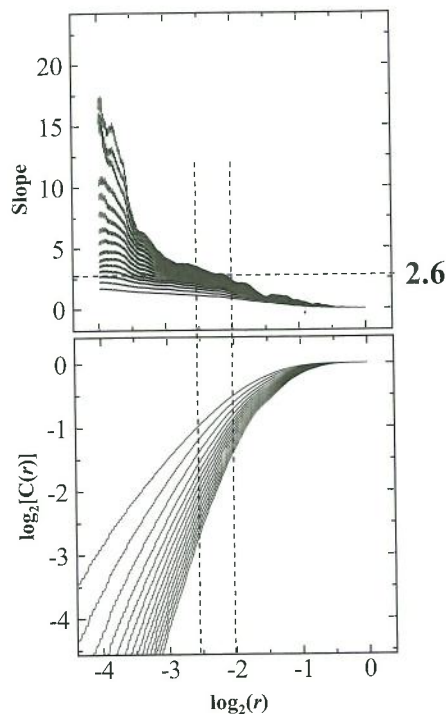


図6 ザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データを支配するダイナミクス“Zazen attractor”に対する相関次元解析の結果

ザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データに対する相関次元解析の結果。相関次元は、アトラクタを再構成した空間に半径 r の微小領域を仮定し、微小領域の半径を大きくしていったときの、微小領域に含まれるアトラクタの点の数の変化の様子によって計算される。このような解析をザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データに対して行った結果、ザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データを支配するダイナミクスの次元はおよそ2.6と得られた。これは、埋め込み次元解析の結果(図5A)と矛盾しない。

論的非線形予測手法によって予測することによって、ザゼンソウ肉穂花序の発熱制御システムにおける、環境変動に対する柔軟さ・しなやかさおよび個体差によらない同一性を定量的に示すことが可能となると考えられる。

そこで我々は、岩手県雫石町、岩手県北上市、そして長野県白馬村の群落地に生育するザゼンソウの肉穂花序の体温時系列データを収集し、それらを用いて互いを予測することによって、そのダイナミクスの同一性を検証した。また、それぞれの群落地のザゼンソウの肉穂花序の体温時系列データと気温の時系列データに対して

も同様の手法を適用することにより、気温から受ける本植物の発熱制御システムへの影響を調べた。その結果、気温の時系列データを用いてザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データを予測することはできないが、生育する群落地が異なっても、ザゼンソウ同士であれば、その肉穂花序の体温時系列データを予測することは可能であることが判明した(図7)。これは、ザゼンソウ肉穂花序の発熱制御ダイナミクスは気温からの影響を受けにくく、生育する群落地の環境や個体差によらないザゼンソウ固有のダイナミクスであることを示している。

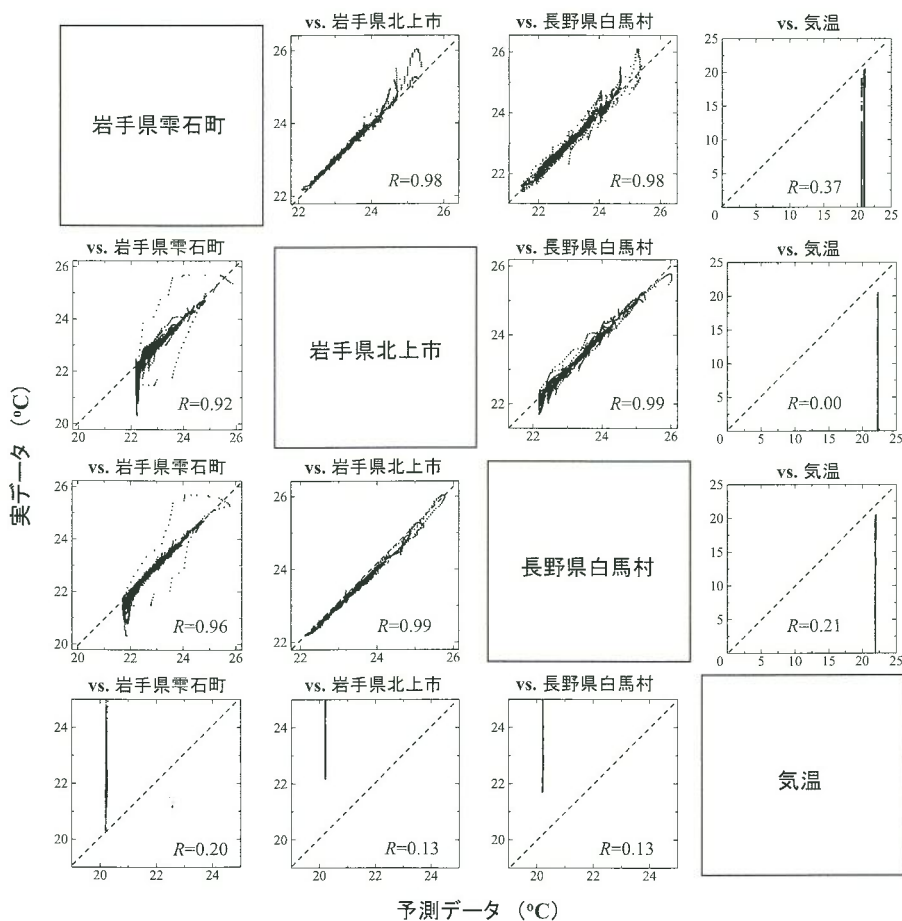


図7 ザゼンソウは、環境や個体差に依らない固有の体温制御ダイナミクスを有する
1段目、2段目、3段目はそれぞれ岩手県雫石町、岩手県北上市、長野県白馬村に自生するザゼンソウの肉穂花序の温度時系列データを用いて、他の群落地に自生するザゼンソウの肉穂花序の温度を予測した結果を示す。さらに比較のため、気温のデータを用いて、それぞれの群落地に自生するザゼンソウの肉穂花序の温度を予測した結果を4段目に示す。ここで、図中の R は実データと予測データ間の相関係数すなわち予測精度を示す。ザゼンソウ肉穂花序の体温時系列データ間では、その体温変化を非常に高い精度で予測することが可能である。したがって、本植物の体温制御のダイナミクスは、生育環境や個体差によらず、同一であると考えられる。(文献9より改変)

4. おわりに

以上述べてきたように、ザゼンソウ肉穂花序の体温制御システムはカオス的特性を積極的に利用することによって環境変動に柔軟且つしなやかに対応する非線形制御システムであるといえる。このような非線形性を導入した制御システムの特徴として、当該システムを構成する要素群やそれらの間の相互作用が同一であっても、その状態がカオス的に分岐することによって（分岐現象¹¹⁾ = 内部構造やシステムの構造を変化させることなく、あるパラメータの値を僅かに変えることのみによって、まったく別の状態へと遷移する現象。線形方程式では、別の安定状態をつくるためには方程式そのものを変更しなければならないが、分岐現象を示す非線形方程式では方程式そのものを変更することなく別の状態が得られる。ロジスティック方程式をはじめとする非線形方程式にみられる特徴の1つ)、種々の外部環境に対しより柔軟に適應することができる可能性も考えられよう。このような“ザゼンソウ型制御アルゴリズム”は、線形制御に代表される人間が考案した制御方式とはその作動原理を異にするものである。現在、筆者らはザゼンソウ肉穂花序におけるこのような優れた体温制御システムを再構築し、工学的なデバイスへの応用を目指した研究も行っている。このようなシステムを構築し、産業に応用することができれば、従来汎用されてきた制御方式とは異なる新しい制御システムとして、社会に対して大きな波及効果を及ぼすことが見込まれる。さらに、ザゼンソウの体温制御システムにおけるカオスの機能を追求することによ

り、所謂、“生命システム”における非線形ダイナミクスの意義がより明確になるであろう。近い将来、カオス的人為的制御により生物の環境適応機構をより普遍的に議論できる時代が訪れるかもしれない。

なお、本研究の一部は生研センタープロジェクトの一環として行われた。

文 献

- 1) Knutson R. M. (1974), *Science*, 186, 746-747
- 2) Ito, K. et al. (2003), *Plant Cell Environ.*, 26, 783-788
- 3) Ito, K. et al. (2004), *Plant Cell Physiol.*, 45, 257-264
- 4) Li, T.Y. and Yorke, J.A. (1975), *American Math. Monthly*, 82, 985-992
- 5) Sugihara, G. and May, R.M. (1990), *Nature*, 344, 734-741
- 6) Tsonis, A.A. and Elsner, J.B. (1992), *Nature*, 358, 217-220
- 7) 池田徹, 山田泰司, 小室元政 (2000), カオス時系列解析の基礎と応用 (合原一幸編), 産業図書
- 8) Eckmann, J.P. and Ruelle, D. (1985), *Rev. Mod. Phys.*, 57, 617-656
- 9) Ito, T. and Ito, K. (2005), *Phys. Rev. E*, 72, 051909
- 10) Grassberger, P. and Procaccia, I. (1983), *Physica D*, 35, 189-208
- 11) May, R.M. (1976), *Nature*, 261, 459-467

◀総説関連情報▶

極小サイズ時系列のアンサンブル再構成による 生態ダイナミクス推定法 —農学における決定論的非線形予測とカオス制御の可能性—

東京農工大学大学院 共生科学技術研究院 生存科学COE研究拠点

酒 井 憲 司

伊藤らのザゼンアトラクタの解析は、非線形時系列解析の植物生理現象への適用において先駆的な成功事例である。本稿ではその関連情報として、非線形時系列解析（カオス時系列解析）の農学や生態学への導入における方法論上の課題、「データサイズ問題」、「マニピュレーション問題」、「オブザベーション問題」について、これら3問題克服のための取り組みを、温州みかんの隔年結果現象やコナラドングリの時空間ダイナミクスに関する研究を通じて紹介する。

1. カオス農学の方法と課題

1) カオス農学とカオス工学

カオスや非線形力学の魅力は、複雑な変動が古典力学の枠組みの中でも扱えるかも知れない、という希望を与えてくれることである。カオス農学の目的は、カオス理論や非線形力学を農学の諸問題に適用するための枠組構築である。カオスの実応用としてカオス工学が合原らによって提唱され¹⁾、わが国において大きな発展を遂げている。しかし、線形理論の堅固な基盤上に成立した工学においてカオス（もしくは非線形工学）を語る場合と、線形理論がそこまでの役割を果たしていない農学においてカオスを語る場合には、多くの共通部分とともに重要な相違点がある。即ち、工学においては、如何に線形化操作を解除すべきかから問い、農学においては、解除に先立つ線形化操作の設定から物事が始まるのである。そのため、カオス農学においては演繹的アプローチと帰納的アプローチの併用が特に肝要となる^{2), 3)}。

2) 方法論上の3課題

「単純なメカニズムが駆動する一見ランダムな変動」、これが決定論的カオスの定義である。

SAKAI Kenshi

〒183-8509 東京都府中市幸町3-5-8

よって、カオスの存在は、一見複雑に見える時系列データからそれを生み出すメカニズム（ダイナミクス）の存在を保証する。対象とする現象がカオスであれば背後に横たわるダイナミクスを利用して、予測そして制御の可能性が予定される。農学や工学のような実学にとってのカオスの魅力は将にこの予測可能性と制御可能性といえる。当然、「複雑な現象の背後に潜むダイナミクスを如何に同定するか？」という問いは実験家にとって最も切実な問いであり、“非線形時系列解析”はそのために成立した分野である。そこでは、相関次元、Lyapunov指数、決定論的非線形予測、定常性検定の諸手法、埋め込み手法、OGY制御、サロゲートアルゴリズム等々によって、現象の自己相似性、再帰性、軌道不安定性、定常性、決定性などを多角的に検証しながら、予測・制御手法が体系的に整備されてきた。十分データサイズ（数千点以上）があれば1本の時系列データから現象を支配するダイナミクスを再構成することができ、物理系分野を中心として広範な応用がなされてきた。

しかし、農学や生態学が対象とする現象では、高々1年に1点しかデータが取得できない場合も多い。当然、数千点のデータサイズを前提として用意された非線形時系列解析の枠組みはそのまま適用できない。カオス理論隆盛の起源が

生態学にあるにもかかわらず、実用的な応用が生態学において皆無に近い現状はこのこと因る。このような極めてサイズの小さいデータからダイナミクス再構成を行う問題を我々は「データサイズ問題」と定義した。一方、対象とするダイナミクスの状態変数を直接測定できない場合も多々ある。このような場合には状態変数と1:1に対応するような観測量（オブザベーション）を通じて状態変数を推定する必要がある。この問題を「オブザベーション問題」と定義する。実学的には得られたダイナミクスに制御を適用し、生態系や耕地の管理に結び付けたい。即ち、制御に必要な操作量の算出が必要であり、これを「マニピュレーション問題」と定義する。

2. アンサンブル再構成による樹木作物豊凶変動の非線形ダイナミクスの同定・予測・制御

1) 樹木作物の豊凶変動の非線形ダイナミクス
 柑橘類やナッツなどの樹木作物では、個体レベルや群落レベルで果実生産量が大きく変動する豊凶現象が知られ、温州みかんなどの柑橘類ではこれを隔年結果もしくはマस्टィングと呼んでいる。世界では、柑橘類全体で98,731,751

トン（2001年）、オレンジ61,093,736（2001）、リンゴ60,237,466トン（2001）、コーヒー7,044,678トン（2001）、ピスタチオ321,431トン（2001）が生産されており、隔年結果防止技術、着花・果調節技術、収量予測法の開発は果樹学における中心的課題である。

現象が内生的であるか外生的であるかは生態学における重要な問いである。Isagiは植物の物質収支モデルによって、樹木果実の豊凶変動が内生的なメカニズムによって駆動されていることを主張した⁴⁾。植物個体の光合成による純正産物から呼吸消費等を差し引いたものを余剰生産物 P_s とし、 P_s は毎年個体内に蓄積する。その蓄積量 I が閾値（ L_T ）を越えると、 $I-L_T$ が開花コスト C_f として用いられ、個体は開花する。開花したのちに結実にいたるが、その結実コスト C_a は開花コスト C_f に定数係数（ R_c ）をかけたものである。植物体に蓄積されている余剰生産物 I は開花後には $I=L_T$ であり、結実後には $I=L_T-C_a=R_c C_f$ である。これを写像として記述すると一種のテントマップとなる。極めて単純な非線形ダイナミクスであるが、 R_C と制御パラメータとしてカオスを示す（図1）。

もちろん多くのモデルがそうであるように、このモデルにも多様なバリエーションが存在する。しかし、最も重要な主張は、果樹豊凶は非

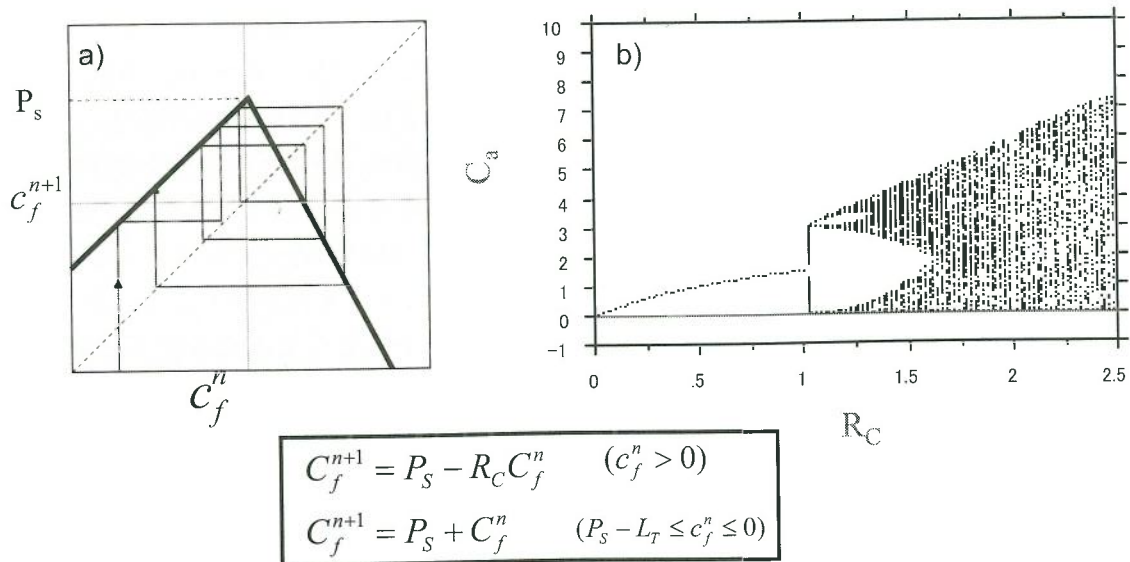


図1 隔年結果の物質収支モデル (Isagi's Model)

線形ダイナミクスに駆動された現象であるというものである。このモデルは区分線形であり、冒頭述べた、「解除に先立つ線形化操作の設定から物事が始まる」は、このことを指す。

2) データサイズ問題への取組み

農学分野の変動現象では、多くの場合年単位で現象が進行するために、データサイズが極めて小さく10点以下の場合も一般である。しかしその反面、農学データでは反復は比較的大きくすることも可能である。ここでは、図2に示すように、7年間の短い果実数のデータを48個体に関して収集した。これらをアンサンブルとして一括に扱い、このアンサンブルデータセットに対して、ヤコビ行列推定による局所線形ダイナミクス再構成を実施した。これを検証するために、1年後収量の予測を実施した。即ち、ある年以前の収量データのみから翌年の収量を予測値として計算し、翌年の実際の収量データと比較するのである (Sakai, 2006)。その結果、2002, 2003, 2004年の3回において高い精度の

1年後予測 (当該時間より過去の情報のみを用いて1年後の予測収量を計算する。) が実施できた。図2に示したように、波線で示した3点のデータが1年後予測値であり、実線で結ばれた7点は実測値である。48個体に対して3回の検証機会があり、この144回の予測のうち、矢印の8回は失敗したが、その他は成功している。表1に示すように、果実数 x および増分 Δx についていずれも高い予測精度を示した。一方、図2-bは48個体の収量の頻度分布である。1998, 2000, 2001, 2003は不作年であり、それ以外の1999, 2002は豊作年である。左の7図が実データの分布であり、右の3図は未来予測値の分布である。図2-aで示した個体レベルの予測だけではなく、集団レベルでの同調についても予測が成功していること示している。これらの結果は、アンサンブルデータセットを用いた局所ダイナミクス再構成の妥当性が実証されたことを意味する⁵⁾。

実データから実用的に妥当なダイナミクスが再構成できた場合、それを用いて非線形時系列

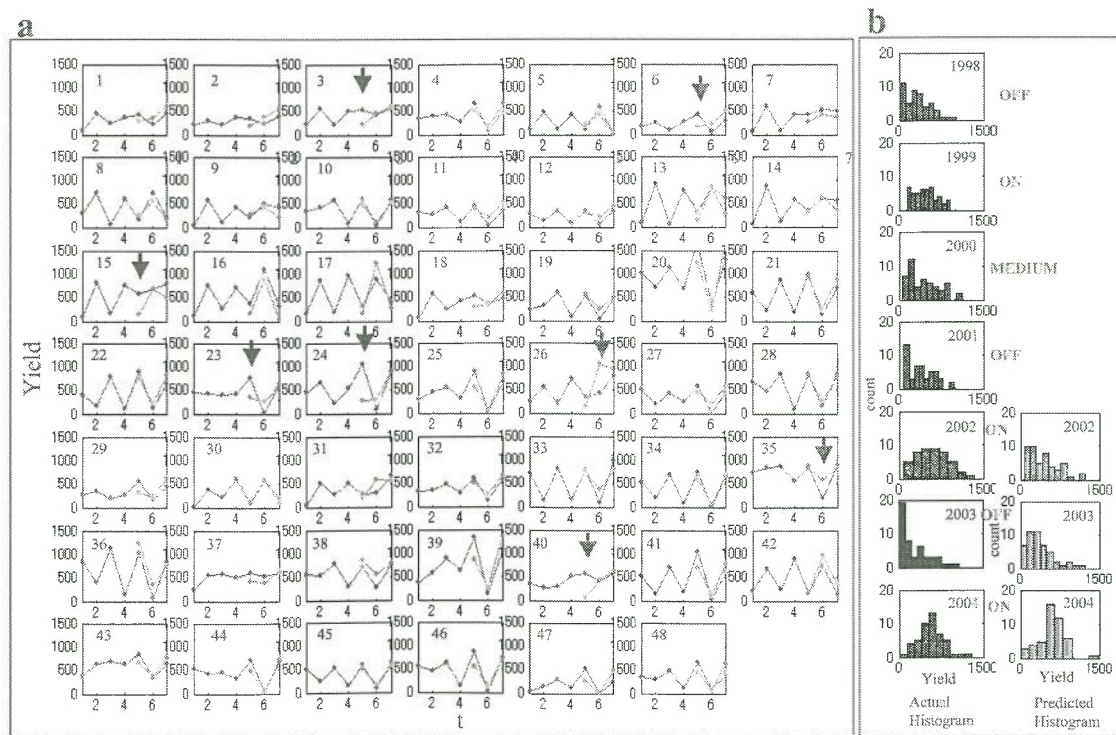


図2 温州ミカン隔年結果のアンサンブルデータと予測結果

表1 果実数xおよびx増分Δxに関する予測精度

Year	x(t)			Δx(t)		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
RRMSE	0.785	0.671	0.662	0.569	0.362	0.386
C.C.	0.82	0.833	0.844	0.912	0.951	0.955
F-test	94.2	104.3	113.5	227.0	439.8	473.9
p-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

解析の様々な解析ツールを利用することができる。局所リアプノフ指数は全て正の値を示したし、決定論的非線形予測では、短期予測可能性と長期予測不可能性が示された。相関次元も2.7-2.9として推定された。

これを局所ダイナミクスのアンサンブル再構成 (Ensemble Reconstruction of Local Dynamics) 手法として提案している。

3) マニピュレーション問題への解

非線形時系列解析によってダイナミクスの存在が保証された場合、予測とともに制御についての検討も可能である。OGY法はカオス制御と不安定平衡点の安定化に利用される代表的なアルゴリズムである⁶⁾。下記のようなダイナミクスFを有する場合、微小の操作量uを与えることによって、制御を行う。(不安定平衡点の不安定平衡点近傍に系の状態が不安定平衡点に接近したときに、制御入力uを与えて安定多様体にシフトさせる。これにより、安定多様体は栽培現場では摘果による収量安定化に相当する。

$$X(t+1) = F(X(t), u(t)) \quad (1)$$

(1) 式は下記のように線形化される。

$$X(t+1) - X_t = D_x f(X_t, 0) (x(t) - x_t) + D_u f(X_t, 0) u(t) \quad (2)$$

制御入力u(t)は次式で計算される。

$$u(t) = \begin{cases} -\lambda_u [1, -\lambda_s] (X(t) - X_t) & |X(t) - X_t| \leq \varepsilon \\ 0 & |X(t) - X_t| > \varepsilon \end{cases} \quad (3)$$

λ_s および λ_u は実験的に求められた $D_x f(X_t, 0)$ の固有値であり、それぞれ安定方向、不安定方向に対応する。系の状態 $X(t)$ が不安定平

衡点 X_t の近傍 ($< \varepsilon$) に接近した場合、制御入力をシステムに印加する。これによって、新たな系の状態 $X(t+1)$ は安定多様体上に移動し、自動的に不安定平衡点 X_t に向かって吸引される。ここでは、応答局面法によって同定した大域的非線形ダイナミクス⁷⁾ について下記のOGY制御を適用した。

$$x_1(t+1) = x_1(t) 10^{f(x_1(t), x_2(t))} + u(t) \quad (4)$$

$$x_2(t+1) = x_1(t)$$

where,

$$f(x_1(t), x_2(t)) = a_0 + a_{11}x_1(t)^{\theta_1} + a_{22}x_2(t)^{\theta_2} + a_{11}x_1(t)^{2\theta_1} + a_{22}x_2(t)^{2\theta_2} + a_{12}x_1(t)^{\theta_1}x_2(t)^{\theta_2}$$

$x_1(t)$: t年における摘果後の果実数

$x_2(t) = x_1(t-1)$: t-1年における摘果後の果実数

$u(t)$: t年における摘果数

同定された大域的非線形ダイナミクスにノイズを重乗させて、OGY制御の数値実験を試みた^{2), 8)}。図3-aは無制御時の収量変動で、図3-bは制御時の収量変動である。図3-bの白丸は制御入力(摘果量)を示している。制御時には収量は制御されているが、制御解除により豊凶変動が復活していることがわかる。図3-c, dは各々a, bにおける相平面での系状態変化を示している。

3. 時空間ダイナミクスにおけるオブザベーション計測

樹木個体ごとの収量が現象のダイナミクスを記述する状態変数である。しかし、実用上、果

樹園レベルで個体収量を経年的に確保することは実用上困難であり、ましてや、林分のドンダリ豊凶の個体データなどは現実的に不可能である。このように、対象のダイナミクスの状態変数を直接計測できない状況は常にある。間接的に状態変数を推定できれば、それを用いて等価なダイナミクスを再構成することができる。航空ハイパースペクトル画像やマルチスペクトル画像を用い、温州ミカンの収量やコナラ収量の推定を行った。温州ミカンについては、PLS, NNTなどを用いることにより高い精度で推定が可能となった⁹⁾。図4には、八王子の東京農工大附属演習林の航空マルチスペクトル画像を用いたコナラ収量推定の試みを示した。左図はセンシングイメージにおいて外挿によって得られた収量推定マップであり、右はCMLシミュレーションによる収量変動の時空間ダイナミクスの空間パターンである。それぞれ、帰納的、演

繹的なアプローチであり、両者の比較・評価手法の開発は今後特に重要な研究分野である¹⁰⁾。

4. 結 語

本稿では、個体レベル、林分レベルの実データ解析の事例を用いて、カオス農学の方法論上解決すべき3課題を紹介した。当然のことながら、図2や図4から経済データや遺伝子発現パターンなど、まったく異なる対象とスケールの現象を連想されるむきも多いと思う。「データサイズ問題」、「マニピュレーション問題」、「オブザベーション問題」は、遺伝子レベルから社会-生態系まで全ての階層の時空間変動を扱う場合には避けては通れない方法論上の課題である。これらを克服する手法は、研究の対象や空間スケールを越えて成立する普遍的な原理として開発されるべきである。

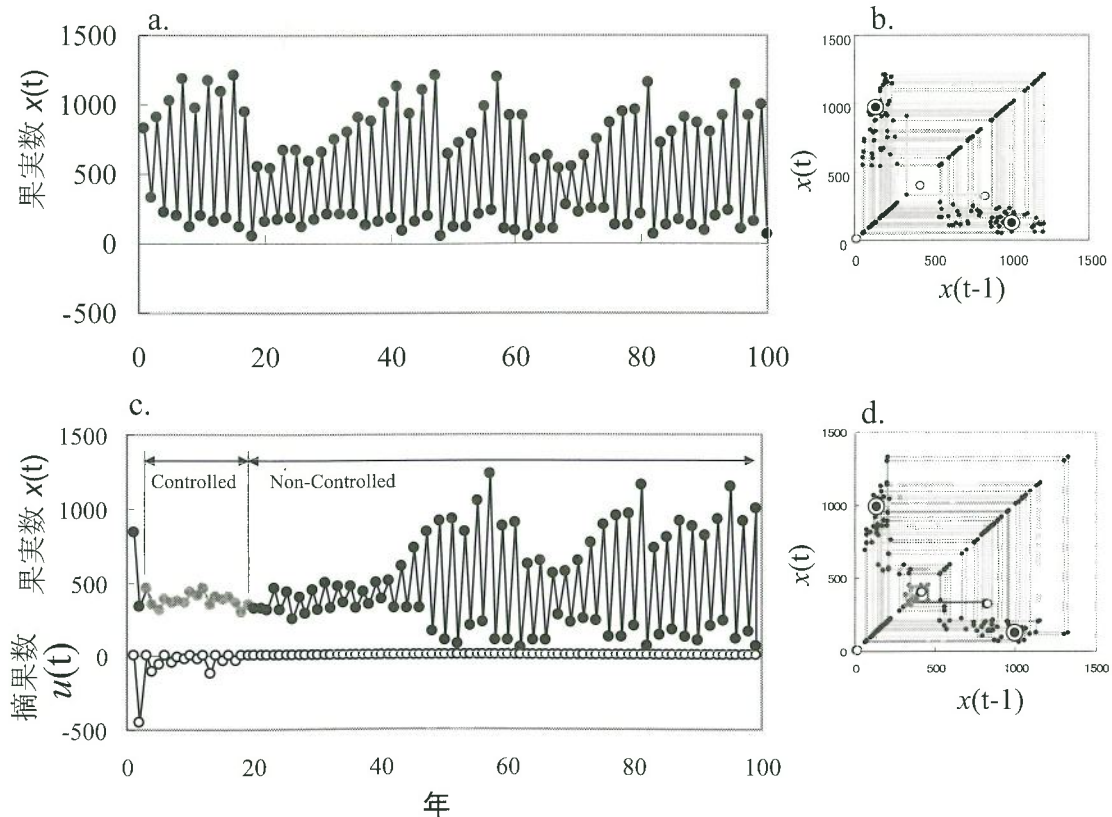


図3 OGY法による温州ミカン隔年結果のカオス制御数値実験

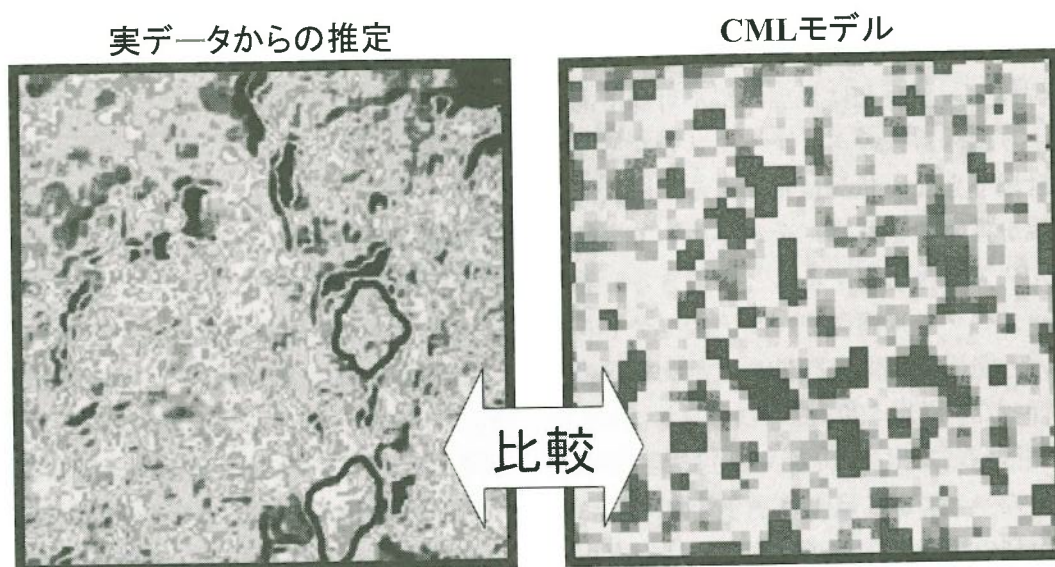


図4 マルチスペクトルイメージによるコナラドングリ収量の推定マップとCMLモデル

文 献

- 1) 合原一幸：カオス応用戦略
- 2) 酒井憲司：カオス農学入門，朝倉書店，1997
- 3) 酒井憲司：農のカオス解析，産業総合技術研究所編，複雑工学，ダイヤモンド社，2004
- 4) Isagi, Y., Sugimura, K., Sumida, A., Ito, H. How does masting happen and synchronize?, *J. Theor. Biol.* 1997; 187, 231-239
- 5) Sakai, K., Y. Noguchi, S. Asada, Detecting Chaos in a Orchard : Ensemble Reconstruction of Nonlinear Dynamics, Proc. The 2nd Workshop of Application of Chaos Theory and Nonlinear Dynamics on Agricultural and Ecological Systems, Fuchu, March, 2006
- 6) Ott, E., Grebogi, C., York, J.A., 1990. Controlling Chaos. *Phys. Rev. Lett.* 64, 1996-1999
- 7) Ellner, S., Turchin, P., 1995. Chaos in a noisy world : New method and evidence from time-series analysis. *The American Naturalist.* 145(3), 343-375.
- 8) Sakai Detecting Chaos in a Citrus Orchard : Ensemble Reconstruction of Non-linear Dynamics from Very Short Runs' Alternate Bearing Dataset, Prod. Int. Workshop on Ecological Informatics on Chaos and Complex Systems, Tokyo, Fuchu, March, 2006
- 9) Xujun Ye, Kenshi Sakai, Leroy Ortega Garciano, Shin-Ichi Asada, Akira Sasao, Hyper-Spectral Imaging to Construct Observers of Citrus Alternate Bearing Dynamics-Estimation of tree crop yields using a neural network modeling-, *J. Ecological Modeling*, 2006, 198(3-4), 15 October, 426-432
- 10) 秋田鉄也・酒井憲司ほか，航空マルチスペクトルイメージングを用いたコナラ収量推定法，農業機械学会誌，68(4)，49-55，2006

◀国内情報▶

コムギの低温適応においてRNAの働きを助けるタンパク質

¹独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

北海道農業研究センター 低温耐性研究チーム

²現：Plant and Soil Sciences West Virginia University中南 健太郎^{1, 2}・Dale Karlson^{1, 2}・今井 亮三¹

越冬性の植物は低温に対し誘導耐性を示す。しかし、その適応メカニズムの詳細は未解明なところが多い。冬コムギから見いだされた低温誘導性のWCSP1は大腸菌の低温ショックタンパク質と高い保存性を有するRNA結合タンパク質であった。本稿では、大腸菌の実験系を用いたWCSP1の機能解析を通して、植物の低温耐性に関与し、大腸菌から高等植物まで保存された転写後調節メカニズムについて紹介する。

1. はじめに

生物は様々な環境ストレスに対し多様な応答を示す。高温環境下では、熱ショック反応といわれるバクテリアから高等生物まで共通の機構が起こることが知られている。高温により増加する熱ショックタンパク質は、高温下で変性した酵素・タンパク質の構造をリフォールディングし、その活性を回復する分子シャペロンである。熱ショック反応ではこの分子シャペロンが蓄積することで、生体内の重要な酵素・タンパク質を保護し高温に応答する。一方、細胞の低温に対する応答については多くが未解明である。大腸菌では低温下で、低温ショックタンパク質の一つであるCspAが全タンパク質量の10%以上にも増加する¹⁾。低温ショックタンパク質は熱ショックタンパク質とは異なり、低温下で安定するRNAの二次構造を解除するRNAシャペロンであり、転写、翻訳段階における調節機能を有することが近年明らかになってきた²⁾。

2. WCSP1の発見

低温は植物の成長と生物生産にとって大きく影響を与える重要な環境因子の一つである。多くの熱帯、亜熱帯植物は低温に対する耐性が低いため、低温で簡単にダメージを負ってしまう。これに対して、越冬性植物は低温に対し高度な耐性を示し、それは低温馴化過程で獲得される。越冬性の植物である冬コムギは2週間ほど凍らない程度の低温にさらされることで低温に対し高い耐性を獲得する。

WCSP1 (wheat cold shock domain protein 1) は冬コムギの低温馴化クラウン組織から単離された低温誘導性遺伝子である³⁾。WCSP1タンパク質はN末端側にバクテリアと共通の構造であるRNA結合モチーフ (RNP1, 2) を有する低温ショックドメイン (CSD) と、C末端側のレトロウィルスタイプ (CCHCタイプ) ジンクフィンガーモチーフを有するグリシンリッチ領域からなる (図1A)。CSDをもつタンパク質は大腸菌等のバクテリアから下等植物、高等植物、動物にまで広く分布し、このドメインは高度に保存されている⁴⁾。バクテリアタイプの低温ショックタンパク質はCSDのみからなるが、植物はグリシンリッチ領域を持っているのが特徴である。WCSP1は低温特異的に発現し、その発現量はmRNAレベル、タンパク質レベルともに低温馴化にともない増加した (図

NAKAMINAMI Kentaro^{1, 2}, KARLSON Dale^{1, 2},IMAI Ryozo¹¹〒062-8555 札幌市豊平区羊ヶ丘1²1090 Agriculture Science Building, Morgantown, WV 26506-6108, USA

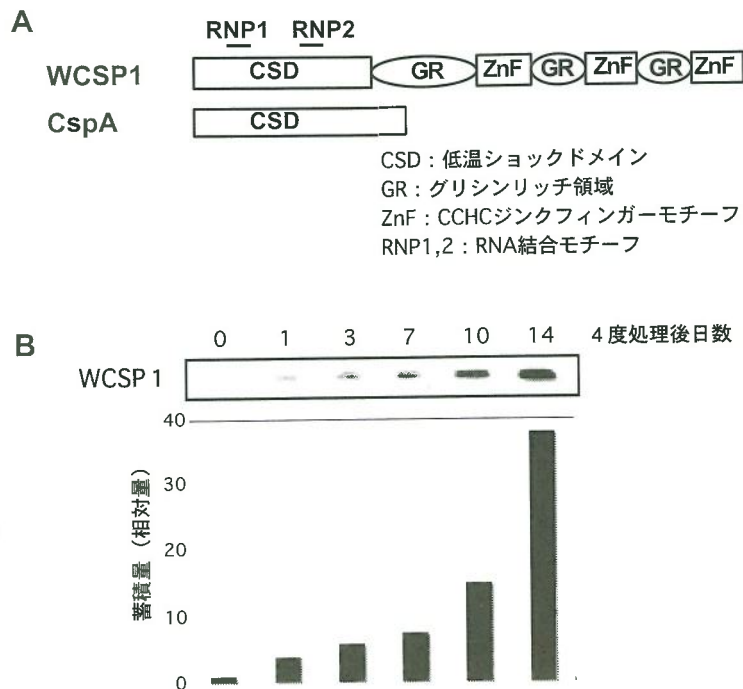


図1 WCSP1と大腸菌CspAの構造と低温馴化過程におけるWCSP1タンパク質の蓄積
 A) WCSP1と大腸菌CspAは共通のドメインを持つタンパク質である。B) 低温馴化過程においてWCSP1タンパク質が高度に蓄積する。タンパク質量はウエスタン分析により相対的な発光強度で示した。

1 B)。また、試験管内アッセイによりWCSP1は核酸結合活性を示すことが明らかとなり、大腸菌の低温ショックタンパク質と共通の機能を有する可能性が考えられた。

3. WCSP1の機能

まず著者らはWCSP1のどのドメインがWCSP1の核酸結合活性に重要であるかを調べた。組換えタンパク質を用いた試験管内実験により、C末端側のCCHCタイプのジンクフィンガーを含むグリシンリッチ領域を除いたタンパク質でも核酸結合活性を示した。前述のとおりWCSP1は大きくN末端側のCSDとC末端側のグリシンリッチドメインの2つのドメインから構成されるのだが、RNA結合モチーフを含むN末端側のCSDが核酸結合活性に重要であることが明らかとなった。つまりバクテリアと高度に保存されたCSDがこのタンパク質の機能本体を担っていると考えられる。現段階ではまだ不明であるが、著者らはC末端側のグリシンリ

ッチ領域はタンパク質-タンパク質相互作用に関わるドメインではないかと考えている。

低温ショックタンパク質の詳細な機能については、大腸菌でよく研究されている。CspAはRNAの安定高次構造を解除するRNAシャペロンとして機能する。*metY-rpsO*オペロンにおいては転写終結解除因子としても機能することが明らかとなっている⁵⁾。そこで、WCSP1がCspAと同様の機能を有するかどうか調べるため、大腸菌の低温ショックタンパク質欠損変異株を用い、WCSP1が欠損変異株の低温感受性を相補するかを調べた。変異株中でWCSP1を発現させたところ、変異株は低温下での生育を回復し、WCSP1はCspAの機能を相補することが示された。またWCSP1がRNAシャペロンとしての機能を有するかについて調べるため、*trpL*ターミネーターの下流にクロラムフェニコール耐性遺伝子を組み込んだ大腸菌株を用いてその機能解析を行った。その結果、WCSP1を発現させた菌株では*trpL*ターミネーターの構造が解除され、クロラムフェニコール耐性が

示された。これらの結果はWCSP1が大腸菌内でCspAと同様の機能，即ちRNAシャペロン活性をもつことを示している（図2 A, B）。さらに試験管内でもRNAシャペロン活性解析を行った。RNAの高次構造のモデルとして部分的に相補の二本鎖DNAを用い，WCSP1が二本鎖を一本鎖に解離できるかどうかを解析した。基質二本鎖DNAは片方の鎖の5'末端をFITC蛍光分子で標識し，もう一方の鎖の3'をクエンチャー（BHQ）で標識した。この分子ビーコンを用い，核酸解離活性をFITCの蛍光シグナルとして検出した。この実験からWCSP1は二本鎖DNAを解離する活性を示し，試験管内でもRNAシャペロン活性を有することが明らかとなった（図2 C, D）。CSD内のRNA結合配列であるRNPモチーフを変異させると，体内，試験管内ともにRNAシャペロン活性を示さず，CSDのRNA結合活性がWCSP1の機能に重要であることが示唆された。

4. 分子レベルでの低温適応メカニズムの保存

大腸菌では低温下で多量に蓄積した低温ショックタンパク質がRNAの高次構造の解除因子として機能する。このタンパク質が転写・翻訳レベルでの調節を行うことで低温に対する耐性が獲得される。著者らはWCSP1がこの大腸菌低温ショックタンパク質と同様の機能を有することを示した。さらに，コムギ内でのWCSP1の細胞内局在解析の結果，WCSP1が核，核膜及び小胞体に局在していることが示された。以上の結果はWCSP1が大腸菌の低温ショックタンパク質と同様に，転写・翻訳レベルで遺伝子・タンパク質の発現調節機能を有する可能性を強く示唆するものである。特に低温馴化過程においてWCSP1が低温下でのRNAの高次構造解除を介した翻訳調節により耐性を獲得している可能性が考えられている。これは，高温ショックでは変性したタンパク質の構造維持が重要

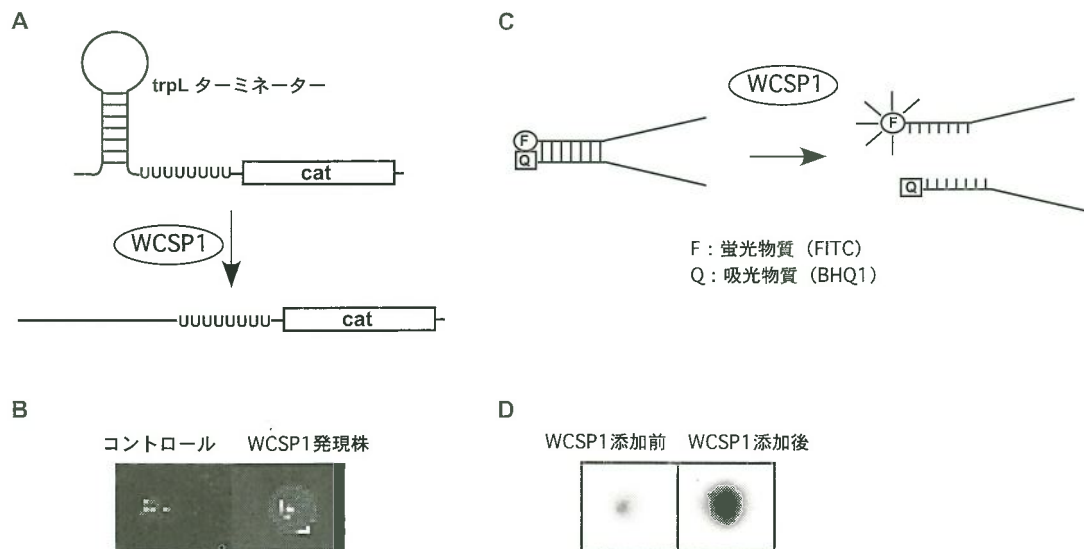


図2 *in vivo* (A, B), *in vitro* (C, D) RNAシャペロン解析

A) クロラムフェニコール耐性遺伝子上流にtrpLターミネーターを組み込んだ大腸菌RL211株が，WCSP1のヘアピンループ構造ターミネーターの解除により，クロラムフェニコール耐性を示す。B) ベクターのみのコントロール（左）と比較してWCSP1発現株（右）はクロラムフェニコール培地で生育可能である。C) 部分相補鎖DNA（分子ビーコン）がWCSP1タンパク質により一本鎖DNAに解離し蛍光シグナルを発する。D) WCSP1添加前（左）と比較してWCSP1添加後（右）で蛍光シグナルを検出し，WCSP1が試験管内でRNAシャペロン活性を有することが示された。

であるのに対し、低温下ではRNAの構造維持が重要であることを示している。また、高温ショック反応と同様に、植物の低温ショック反応ではCSDタンパク質によるバクテリアから高等生物にまで保存されたシステムにより耐性を獲得することが今回初めて明らかとなった。

5. おわりに

低温に対する植物の応答の一つは、原核生物から高等植物にまで高度に保存されたRNAの構造維持による転写後調節であった(図3)。この低温耐性機構は低温馴化時に低温ショックタンパク質の発現量の増加にともない徐々に獲得され、越冬のための準備をするものと考えられる。しかし、WCSP1がコムギ内で低温耐性機構獲得のためにどのようなRNA分子の構造を維持しているか、ターゲットとなるRNAは何であるかについては現段階では不明である。試験管内実験では、WCSP1は非特異的に核酸に結合するが³⁾、著者らは、コムギ内にターゲットRNAが存在し、それが低温耐性に関わる可能性があると考えている。また、WCSP1のRNA高次構造解除メカニズムについても興味深く、RNAシャペロン活性あるいはターゲットRNAへの結合には相互作用タンパク質の存在の可能性も考えられる。ターゲット遺伝子や相互作用タンパク質の探索を含む更なるWCSP1の機能解析は、低温耐性機構獲得の解明に重要であると期待される。また、低温ショックタンパク質を利用した新たな低温耐性付与機構の開発はイネ等の低温感受性植物への応用

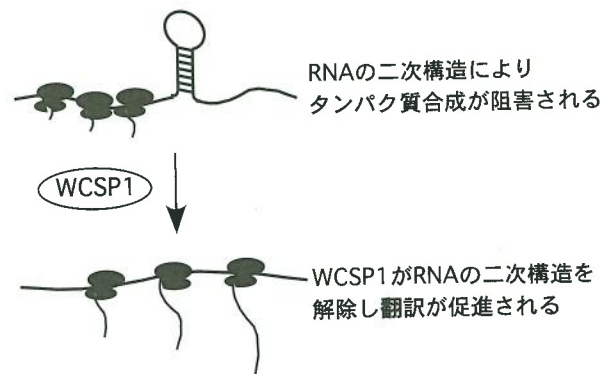


図3 生体内でのWCSP1の機能

植物内での予想されるWCSP1タンパク質機能のモデルを示す。安定二次構造をとるRNAにWCSP1タンパク質が結合し、構造を解除することで阻害されていたタンパク質合成を促進する。

が期待される。

文 献

- 1) Goldstein, J. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 87, 283-287
- 2) Jiang, W. et al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 196-202
- 3) Karlson, D. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 35248-35256
- 4) Karlson, D. and Imai, R. (2003) Plant Physiol. 131, 12-15
- 5) Bae, W. et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97, 7784-7789
- 6) Nakaminami, K. et al. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 103, 10122-10127

◀国内情報▶

黄色フラボノイド，オーロンによる黄色花の分子育種

¹サントリー株式会社 先進コア技術研究所，
²東北大学 大学院工学研究科 バイオ工学専攻 応用生命化学講座
小 笠 栄一郎¹ ・ 中 山 亨²

黄色フラボノイド色素であるオーロンの生合成は長年不明であった。オーロン生合成経路を明らかにするために、キンギョソウからオーロン合成酵素とカルコン4'位配糖体化酵素を単離した。両酵素遺伝子はオーロン生合成と協調的な発現パターンを示した。両遺伝子を共発現する遺伝子組換え植物はオーロンを生産した。さらに、アントシアニン代謝経路を抑制した三重遺伝子組換え植物はオーロン量が増加し、花色が青から黄色へ変換した。

1. はじめに

花の色は昆虫や鳥類を誘引するための主要な視覚シグナルであり、殊に受粉に媒介者を必要とする植物にとって花色発現は安定に子孫を残すための重要な形質である。一般に自家受粉をする花に比べて受粉に媒介者を必要とする植物種は多様な花色を呈する。この多様な花色発現は主としてアントシアニンと呼ばれる水溶性のフラボノイド色素によって決定される。アントシアニンは橙～赤～紫色までの幅広い色相を呈する主要なフラボノイド色素であり、これまで300種以上が同定されている¹⁾。これまでの遺伝学および生化学的研究からアントシアニン骨格の合成経路および生合成酵素遺伝子については概ね明らかとなっている²⁾。一般的にアントシアニンは3位の水酸基が配糖体化されており、色素の安定性や分子会合に寄与しているとされている(図1)。アントシアニン色素は骨格形成後に配糖体化やアシル化などの修飾受け、液胞に輸送されて蓄積する。

黄色のフラボノイド色素としてはカルコンとオーロンが知られている(図1)¹⁾。ベニバナやカーネーションに代表される黄色花はカルコンが主要色素である。カルコンは不安定な色素

であり、中性付近ではナリングニンに代表される無色のフラバノンに非酵素的に代謝される。この反応はカルコン異性化酵素(CHI)によっても触媒される。一方、オーロンは蛍光特性を有する鮮やかな黄色を呈するフラボノイドであり、オーロンの一種であるオーレウシジンの6位配糖体はゴマノハグサ科キンギョソウ(*Antirrhinum majus*)の黄色花卉の主要色素である(図1)。これ以外にもゴマノハグサ科リナリア、キク科コレオプシス、キク科ダリア、キク科コスモス、マメ科ダイズ、カタバミ科オキザリス、イソマツ科スターチスなど植物界に幅広く存在するフラボノイド色素である。またシダ植物やゼニゴケなどの苔類においてもオーロンの蓄積が報告されており、花の進化以前にその生合成機構が存在したと考えられるが、花色以外でのオーロンの生理的な役割は定かでない。オーロンやカルコンなどのフラボノイドはUV光を吸収するため、植物が陸上に進出した際にUV光によるDNA損傷を防ぐ役割を果たしていたのではないかと推測されている。これまでに知られているオーロンはその6位が配糖体化されているものがほとんどである¹⁾。花卉園芸産業において花色は重要な形質であるが主要な園芸植物であるフクロウソウ科ゼラニウム、サクラソウ科シクラメン、イワタバコ科セントポーリア、ヒルガオ科アサガオなどには黄色がないため黄色品種の開発が切望されている。

¹〒618-8503 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1
サントリー研究センター

²〒980-8579 宮城県仙台市青葉6-6-11

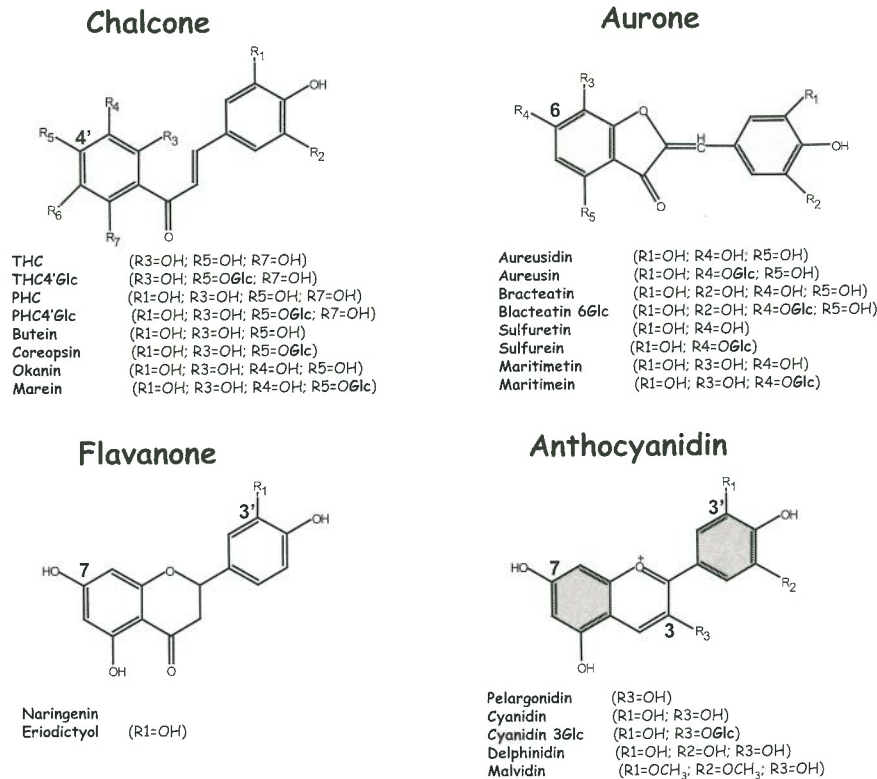


図1 フラボノイド色素の構造

カルコンの4'位はオーロンの6位およびフラバノン・アントシアニジンの7位に相当する。
無表記のR基は水素である。

2. オーロン生合成の場合

オーロン生合成経路については長年不明であったが、2000年に黄色キンギョソウ花卉から、カルコンからオーレウシジンを生成する活性を指標にオーロン合成酵素 (AmAS1) が精製された³⁾。単離されたAmAS1は銅を含む39kDaの糖タンパク質であった。アミノ酸配列を基に単離されたAmAS1遺伝子は推定64kDaのポリフェノール酸化酵素 (PPO) 様の配列を有しており、AmAS1は前駆体タンパク質として発現し、N末端領域とC末端領域がプロセシングされて39kDaの活性型の成熟タンパク質になると考えられた (図2)。またAmAS1遺伝子は花卉におけるオーロン蓄積パターンと類似した発現パターンを示したため、オーロン合成は転写レベルで調節されていることが示唆された⁴⁾。このようにして初めて花色発現というPPOの生理的役割が明らかとなった。

ゴマノハグサ科トレニア (*Torenia hybrida*) のサマーウェーブブルー品種 (SWB, サントリーフラワーズ株式会社) の花卉はマルビジン型のアントシアニン色素によって青紫色を呈する (図1)。本トレニア品種は既に形質転換系が確立されている⁵⁾。そこで、オーロン生産によって黄色い花を分子育種するために、AmAS1遺伝子を構成的に発現するトレニアを作出した。しかしながら形質転換トレニアにおいて導入遺伝子の発現は確認されたもののオーロンの蓄積は認められず、花色は変化しなかった。

一般的にPPOタンパク質は色素体に局在しており、そのN末端側に色素体への輸送シグナル配列を有しているが、AmAS1のN末端領域にはそのシグナル様配列が存在しない。また、基質であるテトラヒドロキシカルコン (THC) に対するAmAS1の作用の至適pHは5.4と低いため色素体がオーロン生成の場で考えるのは不

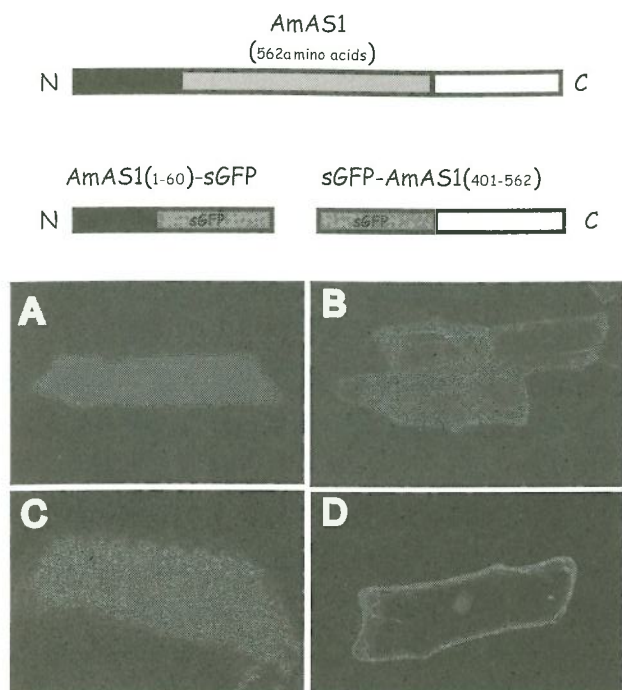


図2 オーロン合成酵素の細胞内局在性

AmAS1の前駆タンパク質 (64kDa) のN末 (黒) とC末 (白) のポリペプチドがプロセシングされ成熟したAmAS1タンパク質 (灰色, 39kDa) になる。N末端領域およびC末端領域の機能を調べるためにGFPとのキメラ遺伝子を構築し、タマネギ表皮細胞を用いて一過的発現解析を行った。(A) AmAS1前駆体のN末端配列のC末端にsGFPを融合させたAmAS1 (1-60残基)-sGFPキメラタンパク質は遺伝子導入48時間後に液胞内腔に局在した。(B) この液胞局在はドミナントネガティブ型のAtSar1との共発現により阻害され、その結果、小胞体とみられるネットワーク上のシグナルが得られた。(C) 遺伝子導入24時間後においては顆粒状のゴルジ体に局在するAmAS1 (N1-60残基)-sGFPキメラタンパク質。(D) sGFP-AmAS1 (401-562残基) キメラタンパク質はGFP同様に細胞質および核に局在した。以上の結果から、AmAS1のN末ポリペプチドは液胞輸送シグナルとして機能し、AmAS1は小胞体からゴルジ体を経て液胞へ輸送されることが示された。(注) 小埜ら (2006)⁷⁾ から改変。

自然である⁶⁾。そこでAmAS1の細胞内局在性を明らかにするためにAmAS1とGFPを融合したキメラタンパク質遺伝子を作製し、ボンバードメント法による一過的発現解析を行った⁷⁾。AmAS1のN末端ポリペプチド (1-60残基) とGFPを融合したキメラタンパク質は液胞内腔に観察された (図2)。また、この液胞輸送はドミナントネガティブ型のシロイヌナズナSar1タンパク質との共発現により阻害され、さらにゴルジ体マーカーであるシロイヌナズナAVP2-mRFPキメラタンパク質を共発現させた経時的観察によりAmAS1前駆体の輸送はゴルジ体を経由することが確認された。段階的削除コンストラクトの一過的発現解析の結果、AmAS1のN末端側から48-59残基の領域が液胞輸送に必要であることが分かった。また、シヨ糖密度勾配遠心によって分画されたキンギョソウ花卉を用いた抗AmAS1抗体を用いたウエスタンブロット解析の結果、活性型AmAS1と思われる39kDaのバンドおよびAmAS1活性は液胞マーカーであるフラボノイドと共存した⁷⁾。以上の結果より、AmAS1は小胞体からゴルジ体を経て液胞内腔へ輸送される新規タイプのPPOで

あり、液胞がオーロン生合成の場であることが強く示唆された⁷⁾。これまで一般的なフラボノイド色素は細胞質で合成された後、液胞に運ばれて貯蔵されると考えられてきたが、液胞内腔においてもフラボノイド骨格の合成が行われているという極めて新しい知見が得られた。また同時に、AmAS1遺伝子を過剰発現させたトレニアにおいてオーロンが生成されなかったことは、基質であるカルコンと酵素であるAmAS1の細胞内コンパートメントが異なることに起因すると示唆された。

3. カルコン4'位配糖体化酵素遺伝子の単離

一般にフラボノイドの配糖体化は化合物の水溶性を高め、色素の安定化に関わっていると考えられている⁸⁾。キンギョソウ花卉においてはオーロン6位配糖体の蓄積に先立って、カルコン4'位配糖体が観察される⁴⁾。またAmAS1はカルコン4'位配糖体を基質にオーロン6位配糖体を生成することができ、その活性はカルコンを基質にした場合より高い³⁾。従って、カルコ

ン4'位配糖体こそがAmAS1の真の基質であるという作業仮説を基に黄色キンギョソウからカルコン4'位配糖体化酵素遺伝子(Am4'CGT)の単離を試みた。植物の配糖体化酵素遺伝子(UDP-glycosyltransferase:UGT)は大きな遺伝子ファミリーを形成しており、シロイヌナズナにおいては100を超えるUGT様遺伝子がアノテーションされているが、機能が明らかになっているのはごく一部である。

Am4'CGT遺伝子を単離するためにキンギョソウ花弁cDNAライブラリーをUGTプロンプで網羅的にスクリーニングした結果、既知のアントシアニン3位配糖体化酵素(3GT/UGT78B2)と17種の新規配糖体化酵素様遺伝子が同定された。このうちの一つのUGT88D3遺伝子はキンギョソウの花弁成長に沿ってAmAS1遺伝子と協調的な発現パターンを示した(図3)。相同性検索の結果、UGT88D3は機能未知のシロイヌナズナUGT88A1と最も高い40%の配列同一性を示した。このUGT88D3の生化学的活性を明らかにするために組換えタンパク質を大腸菌において発現させた。UGT88D3組換えタンパク質とTHCと糖供与体であるUDP-グルコ

ースとの反応液をHPLC分析に供したところ、THC4'位配糖体が確認された(図3)。また、ペンタヒドロキシカルコン(PhC)に対しても4'位配糖体化活性が確認された。さらに植物細胞内におけるUGT88D3の機能を明らかにするために同遺伝子を構成的に発現する形質転換トレンニアを作出したところ、その花弁においてTHC4'位配糖体の蓄積が確認された。これによりUGT88D3遺伝子がキンギョソウ由来カルコン4'位配糖体化酵素をコードしていることが明らかとなった⁹⁾。

4. 黄色い花の分子育種

作業仮説に基づいてAm4'CGTとAmAS1遺伝子を共発現する二重形質転換体を作製した。形質転換体の花弁は非形質転換体同様に青色を呈したが、雄蕊、雌蕊および花冠の基部において黄色を呈色する領域が観察された。また、花弁全体から非形質転換体では認められない蛍光が認められた。色素分析の結果、形質転換花弁においてオーレウシジン6位配糖体の蓄積が確認された⁹⁾。この二重形質転換系統においては

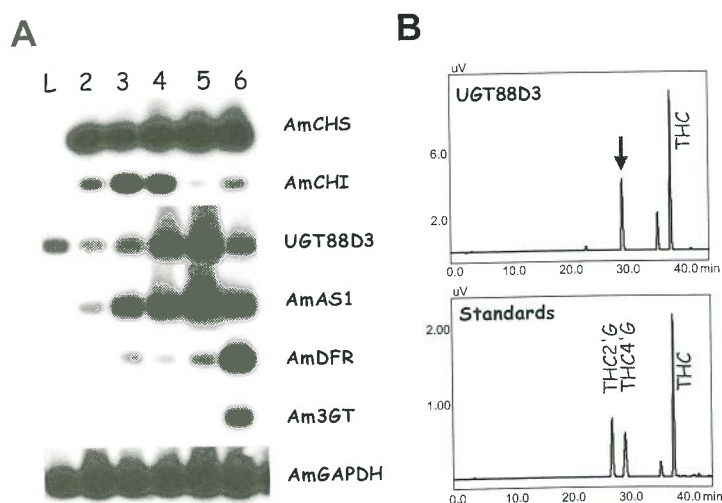


図3 キンギョソウ配糖体化酵素遺伝子UGT88D3の発現および機能解析

(A) キンギョソウ花弁におけるフラボノイド生合成酵素遺伝子発現をRT-PCR/サザンブロット法により解析した。キンギョソウ新規配糖体化酵素UGT88D3はAmAS1と協調的な遺伝子発現パターンを示した。

AmCHS: カルコン合成酵素, AmCHI: カルコン異性化酵素, AmDFR: ジヒドロフラボノール還元酵素, Am3GT: アントシアニン3位配糖体化酵素, AmGAPDH: グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(内部標準遺伝子)。L: 成熟葉, 各レーン花弁ステージに対応する⁴⁾。(B) 大腸菌において

て発現させたUGT88D3タンパク質とTHC(テトラヒドロキシカルコン)との反応液をHPLC分析に供した。(上) 反応液の360nmにおけるクロマトグラム。保持時間30分に新たに生成したカルコン配糖体のピークが得られた(矢印)。(下) カルコンおよびその配糖体の標品のクロマトグラム。THC4'位配糖体は保持時間30分に検出された。(注) 小笠ら(2006)⁹⁾から改変。

オーロンの蓄積に伴い，アントシアニンおよびフラボンが微減していた。Am4' CGTのC末端側にGFPを融合したキメラタンパク質はキンギョソウ花弁表皮細胞の細胞質に局在したため，細胞質においてカルコンは配糖体化されることが示された⁹⁾。従って，細胞質におけるカルコンの配糖体化はカルコンの液胞輸送を促進するのであろう。2000年にアルファルファのCHIの結晶構造が解かれ，170番目のスレオニン残基がカルコンの4'位に相当する水酸基と水素結合していることが明らかとなった¹⁰⁾。従って4'位の配糖体化はカルコンとCHIの物理的な相互作用に対して阻害的に働くことで，安定的なカルコンの液胞輸送に寄与しているのかもしれない。

キンギョソウの遺伝学実験から，単色の黄色発現にはオーロン蓄積に加え，アントシアニンを欠損する変異が必要であることが古くから知られていた¹¹⁾。例えばフラバノン3位水酸化酵素(F3H)である*Incolorata*やフラボノイド構造遺伝子群の発現を正に制御するMYB型転写因子である*Rosea*の機能欠損変異を伴わない場合，オーロンとアントシアニンが混在して橙～赤系の花色を呈することが知られている^{11, 12)}。そこでオーロンによる黄色花を分子育種するために，Am4' CGTとAmAS1遺伝子の共発現に加え，RNAi法でアントシアニン生合成経路の構造遺伝子であるF3Hまたはジヒドロフラボノール還元酵素(DFR)を抑制した三重形質転換体を作製した。その結果，両3重形質転換系統の花弁は単色の黄色を呈した⁹⁾。また，これらの形質転換体の花弁から強い蛍光が観察された(図4)。色素分析の結果，両系統のアントシアニン量が激減し，二重形質転換体と比べオーレウシジン6位配糖体が倍増していた⁹⁾。一方，内在性アントシアニン生合成経路を抑制しただけの形質転換体はアントシアニン量が激減し，白色の花弁を形成した。このように内在性アントシアニン生合成経路の抑制は単に，花弁からアントシアニン色素に由来する色を除くのみならず，オーロン合成酵素へ基質をより多く

供給するという効果を奏した。このことはアントシアニン，フラボンおよびオーロンの3種のフラボノイド色素は共通したカルコンの基質プールから由来していることを意味している。おそらく自然界のオーロンによる黄色花も内在性アントシアニン経路に何らかの欠損を有しており，効率的にオーロンを合成しているものと考えられる。

ほとんどのオーロンが6位配糖体として蓄積し，それに対応するカルコン4'位配糖体が存在する。キンギョソウの他では，コスモスにはスルフレイン(スルフレチン6位配糖体)と呼ばれるオーロン6位配糖体とコレオプシン(プテイン4'位配糖体)と呼ばれるカルコン4'位配糖体が存在する。また，ビデンスにはマリチメイン(マリチメチン6位配糖体)と呼ばれるオーロン6位配糖体とマレイン(オカニン4'位配糖体)と呼ばれるカルコン4'位配糖体が存在する¹⁾。従って，カルコン4'位配糖体化はアントシアニン3位配糖体化に相当する一般的なフラボノイド修飾であろう。

5. おわりに

以上のようにカルコンの4'位配糖体化と，それに引き続く酸化的な環形成反応がオーロン6位配糖体に至る分子機構であることを明らかにした(図4)⁹⁾。この基質の液胞輸送をはさむ二つの酵素反応は非常にユニークであり，フラボノイド以外の二次代謝経路を研究する上でも注目すべき点である。今回のオーロン経路の解明により，基本的な花色(赤，橙，紫，黄色)を決定するフラボノイド骨格形成が理解された。今後のフラボノイド研究は属または種特異的な骨格修飾を司る酵素研究に特化されていくと考えられる。また，多種多様なフラボノイド色素がどのようにして液胞内腔へ輸送されているかについては不明な部分が多く残されている。したがってフラボノイド輸送体に係る研究も今後の重要な課題である。

オーロン合成に関わるカルコン4'位配糖体化

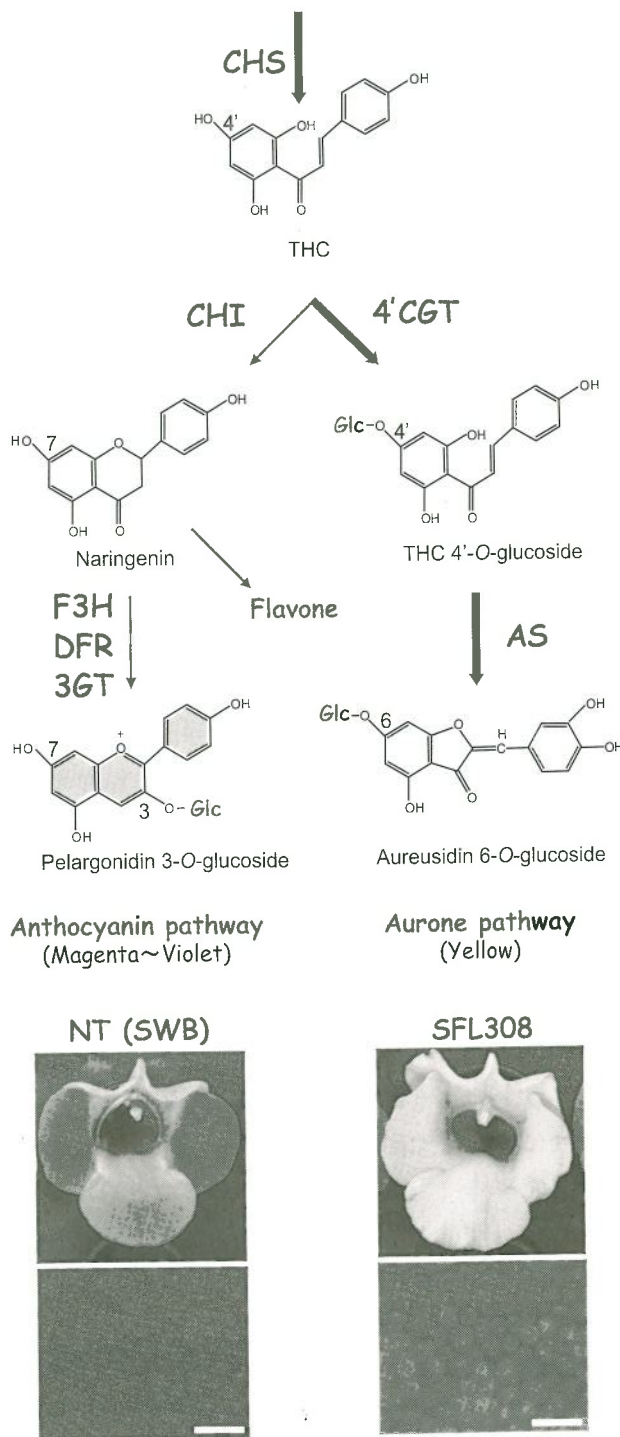


図4 オーロン経路とアントシアニン経路
オーロン生合成経路はカルコン4'位配糖体化酵素(4'CGT)とオーロン合成酵素(AS)によって触媒される。したがってカルコンはオーロン生合成経路とアントシアニン生合成経路の分岐点である。トレニア サマーウェーブ品種(SWB, サントリーフラワーズ株式会社)はマルビジン型アントシアニン色素によって青紫色を呈する(写真左)。アントシアニン生合成酵素であるF3H遺伝子をRNAiによって抑制し, さらに4'CGTとASを発現した三重形質転換体(SFL308系統)の花弁はオーレウシジン6位配糖体を主色素として蓄積し, 黄色を呈した(写真右上)。SFL308系統の花弁表皮細胞からはオーロンに由来する蛍光が観察された(写真右下)。NT: 非形質転換体。サイズバーは100 μ m。(注) 小椋ら(2006)⁹⁾から改変。

酵素とオーロン合成酵素は構造や細胞内局在性は異なるものの, 非常に同調した遺伝子発現パターンを示す。このことから, 花弁形態形成の後期に効率よくオーロン生合成を行うために, 両遺伝子の5'上流に共通の転写調節因子が存在すると考えられるが, 今のところオーロン生合成酵素遺伝子の発現制御に関する知見は乏しい。

両酵素遺伝子の5'上流にはmybやbHLH型転写因子の結合モチーフが数多くみられる。オーロン生合成経路をより深く理解するためにはこれらの上流因子の同定も欠かせないであろう。また, 遺伝学的に同定されているオーロン生合成に関与する *Sulfurea*, *Violacea* および *CFR1011* 遺伝子座の原因遺伝子の単離もオーロン生合成

だけでなくフラボノイド代謝の全体像をより明瞭なものにしてくれることであろう^{13, 14)}。

ツバキやコスモスにおいては数十年の歳月をかけて従来の交配によって待望の黄色品種が育種されたが，交配育種は目的の形質が交配可能な遺伝資源に存在する場合に限定される。カルコンはフラボノイド生合成の初期化合物であるためにほとんどの植物において合成されている。従ってここで示したオーロンによる黄色花の分子育種法は極めて汎用的な方法であり，将来的に花卉園芸産業に大きく貢献できるものと期待される。

文 献

- 1) Harborne, J. B., et al. (1999) *The Handbook of Natural Flavonoids 2*, John Wiley and Sons Inc. (UK).
- 2) Tanaka, Y., et al. (2005) *Plant Cell Tissue. Org. Cult.* 80, 1-24.
- 3) Nakayama, T., et al. (2000) *Science* 290, 1163-1166.
- 4) Sato, T., et al. (2001) *Plant Sci.* 160, 229-236.
- 5) Aida, R., et al. (2000) *Plant Sci.* 153, 33-42.
- 6) Nakayama, T. (2002) *J. Biosci. Bioengin.* 94, 487-491.
- 7) Ono, E., et al. (2006) *Plant J.* 45, 133-143.
- 8) Lim, E-K., et al. (2004) *EMBO J.* 23, 2915-2922.
- 9) Ono, E., et al. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 11075-11080.
- 10) Jez, J. M., et al. (2000) *Nature Structural Biol.* 7, 786-791.
- 11) Forkmann, G., et al. (1981) *Z. Naturforsch.* 36c, 411-416.
- 12) Schwinn, K., et al. (2006) *Plant Cell* 18, 831-851.
- 13) Davies, K. M., et al. (2006) *Physiol. Plant.* 128, 593-603.
- 14) Whibley, A. C., et al. (2006) *Science* 313, 963-966.

◀国内情報▶

自然免疫における病原体認識蛋白質の多機能性

東北大学 大学院薬学研究科
倉 田 祥 一 郎

自然免疫では、遺伝子の再編成に頼らずに多様な病原体を認識する。これを担うのが病原体認識蛋白質であり、ショウジョウバエでは、ペプチドグリカン認識蛋白質 (PGRP) ファミリーが同定されている。私たちは、PGRP-LEが、血液中で病原体を認識し自然免疫応答を誘導するだけでなく、免疫応答細胞表面、さらには細胞内においても、病原体を認識し免疫応答を誘導する多機能性を有していることを明らかにした。

1. はじめに

動物の感染防御機構には、獲得免疫と自然免疫があり、顎を持つ高等脊椎動物のみが、これらを併せ持つ。その他の多くの動物は、自然免疫のみで感染を防いでいる。獲得免疫が、遺伝子の再編成により多様な異物を認識するのに対して、自然免疫では、ゲノムにコードされた有限の因子で、多様な病原体を認識する必要がある。したがって、自然免疫研究の焦点の一つに、有限の因子で、血液中、細胞内など様々な局面において、多様な病原体をいかにして認識し、排除するかという問題が挙げられる¹⁾。

ショウジョウバエの感染防御に関わるToll受容体のホモログが、哺乳動物で同定され、Toll様受容体 (TLRs) が病原体認識蛋白質であることが明らかとなった。TLRファミリーは、細胞外病原体の認識を行う膜蛋白質で、細胞内シグナル伝達系を活性化し、自然免疫応答を誘導する²⁾。細胞内では、TLRファミリーと同様にロイシンリッチリピートを持つNOD様受容体 (NLRs) が、細胞内寄生病原体の認識に関わる³⁾。一方、ショウジョウバエでは、Toll受容体は病原体の認識は行わず、ペプチドグリカン認識蛋白質 (PGRP) ファミリーが、病原体認識蛋白質として機能する。PGRPsは、TLRsと同様にファミリーを形成しており、ショウジ

KURATA Shoichiro

〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉6-3

ョウバエでは13種、マウス・ヒトでは4種存在している。私たちを含め複数の研究グループにより、ショウジョウバエでは、PGRP-SA、-SC1a、-SD、-LC、-LEが、細胞外病原細菌の認識に関わることが示されている⁴⁻¹⁰⁾。今回、私たちは、PGRP-LEが、血液中で細胞外病原細菌の認識に関わる¹¹⁾と共に、免疫応答細胞の細胞表面、さらに細胞内においても病原細菌の認識に関わる多機能性を示すことを見いだした¹²⁾。

2. ショウジョウバエ自然免疫におけるPGRPファミリーによる病原体認識

抗菌ペプチドの産生誘導は、昆虫からヒトにまで広く見られる主要な自然免疫応答の一つである。ショウジョウバエでは、真菌が感染すると、主に真菌に作用する抗菌ペプチドDrosomycinなどの産生が誘導される。一方、グラム陰性細菌の感染では、グラム陰性細菌に強く作用する抗菌ペプチドDiptericinなどが誘導される。いずれも哺乳動物の肝臓に相当する脂肪体で作られ、血液中に分泌される。Drosomycinは、前述したToll受容体が制御するToll経路と呼ばれる細胞内シグナル伝達系の活性化により主に誘導され、Diptericinは、これとは異なる細胞内シグナル伝達系imd経路の活性化により主に誘導される。したがって、ショウジョウバエでは、真菌が感染すると主にToll経路が活性化し、抗真菌ペプチドが誘導さ

れ、グラム陰性細菌が感染すると主にimd経路が活性化し、抗菌ペプチドが誘導される。グラム陽性細菌の感染では、主にToll経路が活性化される。Toll経路、imd経路のいずれにおいても、その上流で病原細菌を認識しているのが、PGRPファミリーの分子である（図1）。

Toll経路の上流で、グラム陽性細菌の認識に関わるのが、PGRP-SA、-SC1a、-SDである。PGRP-SAの変異体では、グラム陽性細菌の感染に対して抵抗性が失われるが、野生型から回収した血液をPGRP-SAの変異体へ移入すると、この抵抗性が回復することから、PGRP-SAは、血液中でグラム陽性細菌を認識していることが分かる⁴⁾。imd経路の上流でグラム陰性細菌などの認識に関わるのが、PGRP-LCと-LEである⁷⁻¹⁰⁾。PGRP-LCは免疫応答細胞の細胞膜上に存在し、PGRP-LEは血液中に存在するが、両者は協同的な作用を示す。すなわち、それぞれ単

独の変異体では、大腸菌などのグラム陰性細菌に対する抵抗性にそれほど変化は見られないが、両者の二重変異体ではその抵抗性が著しく低下する¹¹⁾。

PGRPファミリーは、細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンの構造の違いを識別し、それぞれToll経路、imd経路を活性化する。ペプチドグリカンは、マイコプラズマ以外のすべての細菌が有し、二糖の繰り返しからなるグルカン部と、ペプチド部からなるが、そのペプチド部は、細菌種によって多様性を示す。多くのグラム陽性細菌は、リシンを含むステムペプチド同士が、さらにペプチドによって架橋されたペプチドグリカンを有している。一方、一部のグラム陽性細菌と、ほとんどのグラム陰性細菌は、リシンの代わりにアミノ酸の誘導體であるジアミノピメリン酸（DAP）を含むステムペプチドが直接架橋されたペプチドグリカンを有して

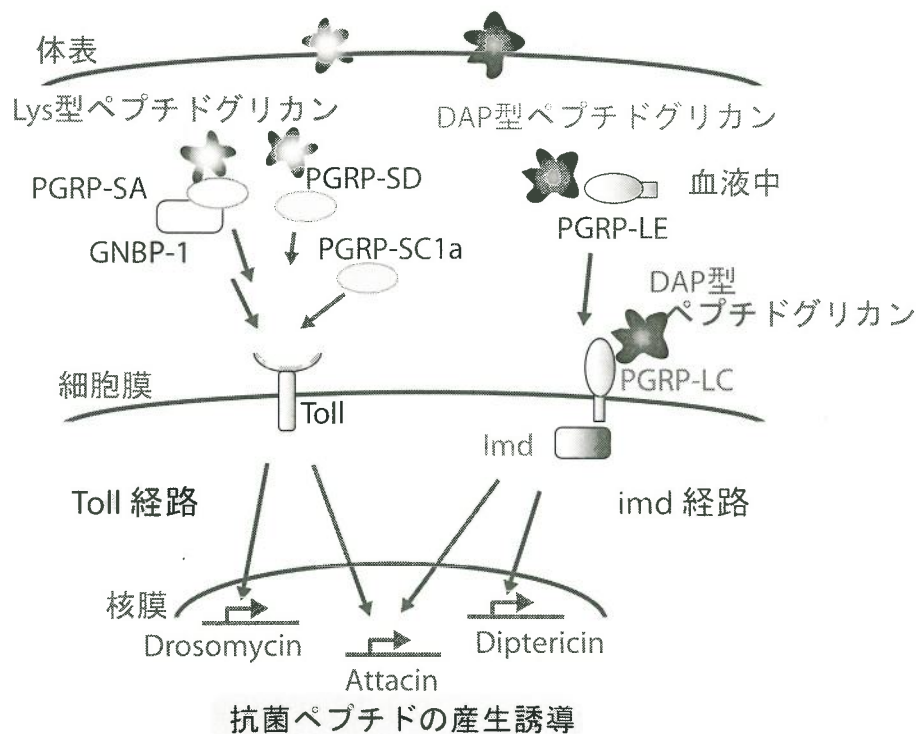


図1 ペプチドグリカン認識蛋白質（PGRP）ファミリーによるペプチドグリカン（PGN）の識別と抗菌ペプチド産生誘導

血液中のPGRP-SAは、グラム陽性細菌などのリシン型PGNの認識に関わり、GNBP-1と共にToll経路を活性化する。PGRP-SC1aと-SDは、グラム陽性細菌によるToll経路の活性化に関わる。グラム陰性細菌などのDAP型PGNを認識するPGRP-LEは血液中に存在し、imd経路を活性化する。同じく、細胞膜上に存在するPGRP-LCも、DAP型PGNの認識に関与し、imd経路を活性化する。PGRP-LEと-LCは、協同的に作用する。

いる。私たちは、imd経路を活性化するPGRP-LEが、DAP型のペプチドグリカン（PGN）を認識するが、リシン型のペプチドグリカンは認識しないことを見いだした¹⁰⁾。この結果は、DAP型ペプチドグリカンを有する細菌が主にimd経路を活性化し、リシン型ペプチドグリカンを有する細菌が主にToll経路を活性化することを説明する。その後、同じくimd経路を活性化するPGRP-LCが、PGRP-LEと同様にDAP型ペプチドグリカンの認識に関わり、Toll経路の活性化に関わるPGRP-SAが、PGRP-LEが認識しないリシン型ペプチドグリカンの認識に関わることが示された。したがって、ショウジョウバエでは、PGRPファミリーが、ペプチドグリカンの構造の違いを識別し、それぞれの細菌に対応した自然免疫応答を誘導する（図1）。哺乳動物でも、NODファミリーがペプチドグリカンの構造の違いを識別することが示され、自然免疫におけるペプチドグリカン識別の重要性は広く認められるようになった¹³⁾。

3. PGRP-LEの多機能性

PGRPファミリーは、いずれもC末端側にPGRPドメインと呼ばれる保存された領域を有し、PGRPドメインがペプチドグリカンの認識

に関わる。認識するペプチドグリカンの最小構造は、PGRP-LCと-LEでは、グルカン部の二糖とそれに結合するL-Ala- γ -D-Glu-meso-DAP-D-Alaのペプチドである。これは、百日咳（およびその他の感染症）における細菌性毒性因子として知られる気管上皮細胞毒素（TCT）である。哺乳動物でのTCT受容体は未だに同定されていない。PGRP-LEのPGRPドメインとTCTの複合体の結晶構造解析を行ったところ、PGRP-LEのPGRPドメインはTCTに結合すると多量体化することが分かった¹⁴⁾。これが手がかりとなり、血液中に存在するPGRP-LEのPGRPドメインが、TCT依存に細胞膜上に存在するPGRP-LCに結合し、共受容体として作用することが明らかとなった。すなわち、PGRP-LEは細胞表面でのTCTの認識にも関わる。PGRP-LCは、そのアイソフォームである-LCxと-LCaがTCTまたはペプチドグリカン依存に結合しシグナルを活性化する（図2）。

細胞外から働きかけるPGRP-LEの役割を確認する目的で、モザイク解析を行ったところ、確かに脂肪体では血液中からPGRP-LEが作用し、imd経路を活性化することが確認できた。ところが思いがけず、腎臓に相当するマルピーギ管では、細胞内でPGRP-LEが作用しimd経路を活性化することが明らかとなった。実際、

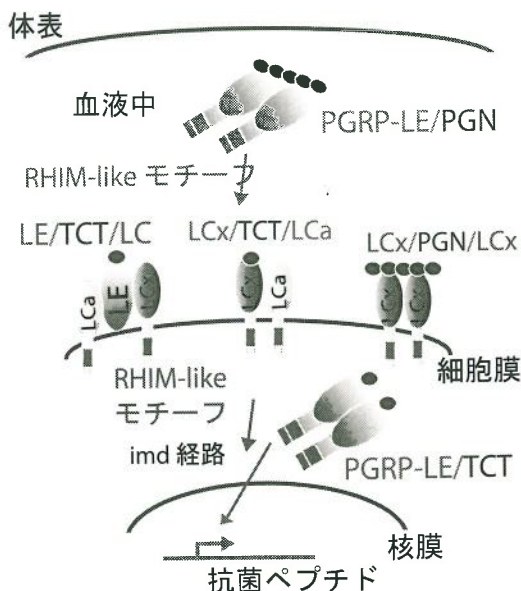


図2 PGRP-LEの示す多機能性とRHIM-likeモチーフによるシグナル活性化

血液中でDAP型ペプチドグリカン（PGN）を認識し、シグナル伝達を行うPGRP-LEは、免疫応答細胞の表面で、PGRP-LCの共受容体として、PGNのモノマーであるTCTの認識に関わると共に、細胞内においてもTCTの認識に関わる。いずれの場合も、シグナル伝達には、PGRP-LCの細胞内ドメインとPGRP-LEのN末端側に共通して存在するRHIM-likeモチーフが必要とされる。

PGRP-LEは、細胞質中にも存在し、細胞内に導入したTCTを認識してimd経路を活性化した。そして、この活性化はPGRP-LCとは無関係であることが分かった。したがって、PGRP-LEは、血液中、免疫細胞表面、さらに細胞内で、病原細菌の構成成分を認識するという多機能性を有していることが明らかとなった(図2)¹²⁾。病原体認識蛋白質が多機能性を示す初めての例である。

細胞膜上のPGRP-LCに加えて、PGRP-LEが細胞内に存在し、imd経路を活性化する事が明らかとなったが、PGRP-LCの細胞内ドメインとPGRP-LEのN末端側に共通して存在するRHIM-likeモチーフが、それぞれのimd経路の活性化に重要であることが明らかとなった。さらに、RHIM-likeモチーフは、PGRP-LEによる血液中でのシグナル活性化にも必要とされる(図2)¹²⁾。このRHIM-likeモチーフは、哺乳動物のTLR-3によるシグナル伝達経路におけるアダプター蛋白質TRIFとRIP-1の相互作用に必要であるRHIMモチーフに相同性を示すことから、種を超えて自然免疫シグナル伝達を制御するモチーフであると考えられる¹²⁾。

4. おわりに

ショウジョウバエでは、PGRPファミリーが、細菌の有するペプチドグリカンの構造を識別し、対応する自然免疫応答を活性化する。その際、PGRP-LEは、血液中で病原細菌の認識に関わるだけでなく、細胞表面に存在するPGRP-LCの共受容体としての機能も有する。加えて、PGRP-LEは、細胞内においても病原細菌の構成成分を認識する多機能性を示す。ここに、自然免疫が、数限られた因子を用いて、効率よく感染防御を行う戦略が垣間見える。それは、PGRP-LEとPGRP-LCが、血液中、細胞表面、細胞内において、自然免疫応答を活性化する際に、常に同じRHIM-likeモチーフを用いているということにも言える。

今回、ショウジョウバエにおいて、初めて細

胞内で機能する病原体認識蛋白質が同定された。リステリア菌、結核菌や赤痢菌などは、血液中での排除を逃れて細胞内に寄生し増殖する。このような細胞内寄生細菌に対する感染防御機構の解明がさらに進展することが期待できる。

謝 辞

本研究は、現在進行中の生研センターによる「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」により推進されたものであり感謝致します。

文 献

- 1) Janeway, C. A. Jr. et al. (2002), *Annu. Rev. immunol.*, 20, 197-216
- 2) Akira, S. et al. (2001), *Nature Immunol.*, 2, 675-680
- 3) Meylan, E. et al. (2006), *Nature*, 442, 39-44
- 4) Michel, T. et al. (2001), *Nature*, 414, 756-759
- 5) Garver, L. S. et al. (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103, 660-665
- 6) Bischoff, V. et al. (2004), *Nature Immunol.*, 5, 1175-1180
- 7) Gottar, M. et al. (2002), *Nature*, 416, 640-644
- 8) Choe, K. M. et al. (2002), *Science*, 296, 359-362
- 9) Rämetsch, M. et al. (2002), *Nature*, 416, 644-648
- 10) Takehana, A. et al. (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99, 13705-13710
- 11) Takehana, A. et al. (2004), *EMBO J.*, 23, 4690-4700
- 12) Kaneko, T. et al. (2006), *Nature Immunol.*, 7, 715-723
- 13) Girardin, S. E. et al. (2004), *Eur J Immunol.*, 34, 1777-1782
- 14) Lim, J. H. et al. (2006), *J. Biol. Chem.*, 281, 8286-8295

◀国内情報▶

昆虫のステロイドホルモン合成を抑制する神経支配の発見

¹独立行政法人 農業生物資源研究所

²東京大学 大学院新領域創成科学研究科

田中良明¹・山中直岐²・片岡宏誌²

昆虫の脱皮・変態はステロイドホルモンである脱皮ホルモンによって誘導されるが、その生合成は脳から体液中に分泌されるペプチドホルモンによってのみ制御されると考えられていた。しかし、我々の研究グループは、カイコ幼虫の胸部神経節から神経軸索を介した新たな昆虫脱皮ホルモンの制御機構を分子レベルで解明し、昆虫でも神経投射と液性因子の両方による内分泌器官の活性制御が存在することを初めて明らかにした。

1. はじめに

昆虫の脱皮・変態は、胸部に存在する前胸腺で合成されるステロイドホルモンである脱皮ホルモンによって誘導される。脱皮ホルモンの生合成は、脳から分泌される前胸腺刺激ホルモン (Prothoracicotropic hormone, PTTH) によって主に制御され、PTTHの脳からの分泌が脱皮・変態開始のタイミングを決定すると長い間考えられてきた。脱皮ホルモンの生合成がPTTHのみによって制御されているのであれば、脳を除去した個体はPTTHが分泌されないため発育を停止するはずである。ところが、カイコでは日122×支115号という交雑品種以外は蛹化直後に脳を摘出して発育を停止しない¹⁾。また、欧米で実験に用いられるタバコスズメガの幼虫では、脳を除去した幼虫は発育を停止することなく脱皮や変態を始めようとする個体がいる²⁾。これらのことは、PTTH以外の前胸腺を制御する機構も昆虫の発育制御に関与することを示唆する。本稿では、筆者らの研究グループによって近年解明された前胸腺の活性制御機構の新知見、特に、今まで解明されていなかった神経投射を介した前胸腺の活性制御機構を中心に紹介する。

TANAKA Yoshiaki¹, YAMANAKA Naoki²,
KATAOKA Hiroshi²

¹〒305-8634 茨城県つくば市大わし1-2

²〒277-8562 柏市柏の葉5-1-5

2. 前胸腺の活性を抑制する液性因子

昆虫と同じ節足動物であるエビ、カニなど甲殻類の脱皮も脱皮ホルモンによって誘起されるが、産生器官であるY器官における脱皮ホルモンの生合成は脱皮抑制ホルモン (Molt-inhibiting hormone, MIH) という抑制因子のみによって制御され³⁾、PTTHのような促進因子は存在しない、と考えられている。つまり、同じ節足動物であっても、昆虫は促進因子、甲殻類は抑制因子によってのみ脱皮ホルモンの生合成が制御されていると考えられてきた。一方、脊椎動物のステロイドホルモンは抑制と促進両方の因子によって制御されており、節足動物のようにどちらか一方の因子しか存在しない、というのはあまり合理的でないようにも思える。実際に報告例は少ないものの、昆虫でも前胸腺抑制因子の存在はしばしば示唆されていた^{4, 5)}。筆者らの研究グループは、1999年にカイコ幼虫脳から昆虫で初めて前胸腺の活性を抑制する神経ペプチドを単離することに成功し、前胸腺抑制ペプチド (Prothoracicostatic peptide, PTSP) と名付けた⁶⁾。このペプチドは9残基のアミノ酸からなり、MIHとはまったく相同性がないが、タバコスズメガから既に単離されていた筋収縮抑制ペプチド (Myoinhibitory peptide, MIP) と同一の構造である。また、フタホシコオロギやキイロシヨウジョウバエから単離されたアラトスタチン (幼若ホルモンの生合成を抑

制する神経ペプチド)とも類似した構造である^{7, 8)}。PTSPは前胸腺の器官培養系および幼虫への注射実験において活性化された前胸腺の脱皮ホルモン合成を抑制する^{6, 9)}。しかし、PTTHによる前胸腺の活性化を阻害するためにはPTTHと比較して高濃度のPTSPが必要であり、PTSPが生体内でPTTHの作用を阻害する前胸腺抑制因子としての機能を担うかはまだ証明されていない。

また、PTSP以外の前胸腺抑制活性を示す別の液性因子として、ミオサプレッシン(Bommo-myosuppressin, BMS)がカイコの脳から単離されている。BMSはPTSPより低濃度で前胸腺の活性を抑制し、また、その受容体が前胸腺で強く発現していることから、前胸腺抑制ホルモンとして機能することが示唆される¹⁰⁾。ミオサプレッシンはもともと無脊椎動物に広く保存されている生理活性ペプチドで、カルボキシル末端のアミノ酸配列が—FMRF-amideとなっているFMRFアミド関連ペプチド(FaRP)の1種である。FaRPは二枚貝の一種であるビノスワレガイの神経節から心拍上昇活性を示すペプチドとして単離されたペプチドであるが¹¹⁾、カルボキシル末端側にこれと類似する配列をもつ関連ペプチドは無脊椎動物に広く存在し、筋収縮や摂食行動の制御など多様な作用を示すことが知られている^{12, 13)}。しかし、FaRPが内分泌の制御に関わることはほとんど報告がなかった。一方、カルボキシル末端2残基のアミノ酸配列が—RF-amideとなっている脊椎動物のRFアミドペプチドは、生殖腺抑制ホルモンなどの視床下部ペプチドとして内分泌の制御に重要な作用を示すことが知られている¹⁴⁾。したがって、BMSが昆虫の内分泌制御に関わることは、RFアミドペプチドファミリーの機能が無脊椎動物と脊椎動物で共通であることを示したものと見える。

3. 神経支配による前胸腺の活性抑制機構

前胸腺の活性を制御するPTTHやPTSP、BMSは全て脳から体液中に分泌される液性の因子(ペプチドホルモン)である。しかし、前胸腺には近接する神経節から神経が投射していることが、約240年も前の18世紀後半に鱗翅目昆虫の一種で報告されたのをはじめ¹⁵⁾、様々な昆虫で前胸腺の神経分布が観察されている。当然、これらの神経が前胸腺の活性制御に関わることを証明しようとする試みは過去にも様々な昆虫でなされていたが、ワモンゴキブリ¹⁶⁾とヨトウガ¹⁷⁾を用いた電気生理実験から、前胸腺に投射する神経の発火と体液中の脱皮ホルモン濃度に相関があるという報告があるくらいで生化学的・分子生物学的な実験事実は乏しかった。また、前胸腺に投射する神経をすべて切断した培養条件下でも、前胸腺の脱皮ホルモン分泌活性が体内と大きく異なることはない。したがって、前胸腺に投射する神経の機能についてあまり関心が払われることはなかった。筆者らは、カイコの前胸神経節から前胸腺に投射する神経に着目し、様々な神経ペプチドに対する抗体を用いてこの神経の染色を試み、この神経を介して前胸腺に運ばれる神経ペプチドを推定した。当初はPTSPがこの神経を介して前胸腺に運ばれることを期待したのであるが、残念ながらこの神経はPTSP抗体では染色されなかった。ところが、用いた抗体のうちFMRFアミドペプチド抗体でこの神経は明瞭に染色された(図1)¹⁸⁾。つまり、FaRPが神経を介して前胸腺の活性制御に関わることを示唆されたのである。この神経はBMSのアミノ末端側を認識する抗体では染色されないことから、BMS以外のFaRPであることが示唆された。そこで、筆者らは脳および前胸神経節からBMS以外のFaRPの精製を試み、最終的にはカイコゲノム情報を用いることで遺伝子の側から4個のカイコFMRFアミドペプチド(Bommo-FMRFamide, BRFa)を構造決定した。BRFaは前胸腺抑制作用を示すが、



図1 抗FMRFアミドペプチド抗体により染色された前胸腺へ投射する神経

マイクロモラー ($10^{-4} \sim 10^{-6}$ モル/リットル) の高濃度でしか効かないため、BMSのような体液中に分泌される抑制因子ではなく、神経を介して前胸腺に直接運ばれた場合に抑制因子として機能することが示唆された。BRFaが前胸神経節から神経を介して前胸腺に運ばれていることを直接証明するため、前胸神経節から前胸腺に投射する神経の軸索の断片をマトリクス支援型レーザー脱離イオン化 (Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) 法を用いた飛行時間型質量分析 (Time-of-flight mass spectrometry, TOF-MS) で直接分析したところ、BRFa遺伝子上にコードされている4個のBRFaペプチドが検出された。このことから、前胸腺に投射する神経を介して前胸腺に運ばれるFaRPがBRFaであることが証明された。さらに、この神経の発火頻度が前胸腺の活性が低い時に高く、前胸腺が活性化されている時に低いことが電気生理実験の結果から示され、生体内でこの神経が前胸腺の抑制に関わることが強く示唆された (図2)¹⁹⁾。ここに、2世紀以上もの間不明であった神経による前胸腺の制御機

構が、分子レベルで初めて解明されたのである。

以上の結果から、前胸腺における脱皮ホルモンの生合成制御機構は図3のように考えられる。従来はPTTHが前胸腺を刺激して脱皮ホルモンを分泌すると考えられていたが、前胸腺を抑制する液性因子としてPTSPやBMSが脳から分泌され、また、前胸神経節からは神経を介してBRFaが前胸腺に運ばれ脱皮ホルモン合成を抑制することが新たに明らかになった。つまり、前胸腺は液性因子と神経の二重支配を受けていると推測される。内分泌器官への神経投射は、脊椎動物の副腎髄質などでもみられる。しかし、神経投射とホルモンなどの液性因子がどのように協調して内分泌器官の活性を制御しているかということはあまりわかっていない。カイコの場合は神経投射と液性因子の制御系がどちらも分子レベルで解明されており、しかも脊椎動物と比較して単純な経路である、というメリットがある。カイコの前胸腺は、神経投射と液性因子がどのように協調して内分泌を制御しているか

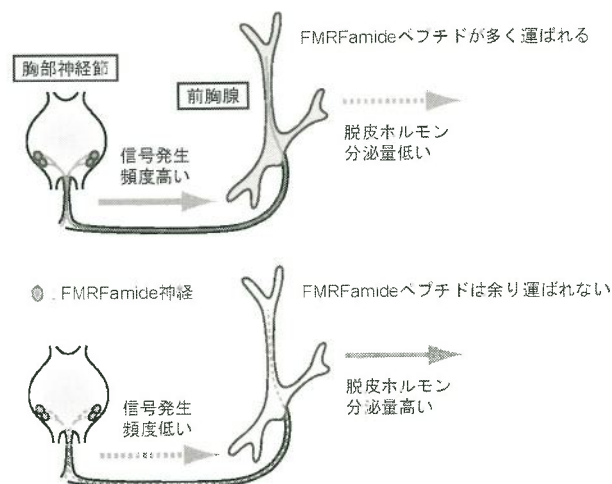


図2 神経の発火頻度と前胸腺からの脱皮ホルモン分泌の関係

神経の信号発生頻度 (発火頻度) が高い時はFMRFアミドペプチドが前胸腺に多く運ばれるために脱皮ホルモン分泌が抑制され、発生頻度が低くなるとFMRFアミドペプチドがあまり運ばれないため脱皮ホルモン分泌量が増加する。

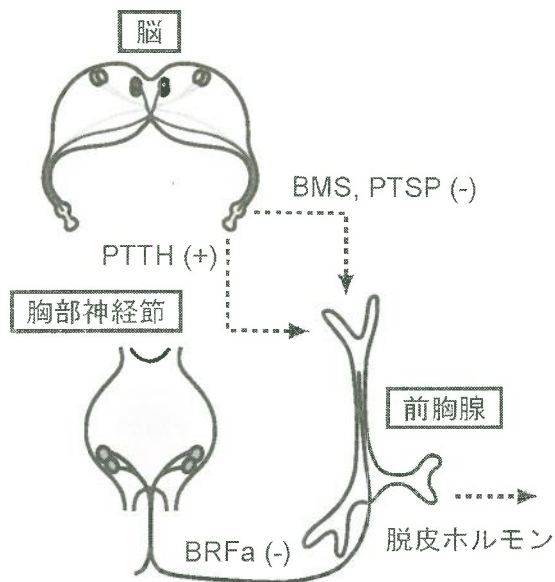


図3 カイコ前胸腺の活性制御機構の模式図
実線は神経の投射，点線は体液中への分泌を示す。
+は前胸腺に対する促進作用，-は抑制作用を示す。

を解明する優れたモデルとなるであろう。

4. おわりに

1917年にポーランド人Kopećが行ったマイマイガを用いた脳ホルモンの研究に端を発した昆虫ホルモンの研究も、1世紀近くが経過した。しかし、前胸腺の活性制御における神経支配のように、長い間未解明の問題も多く残されている。近年、カイコをはじめとした数種昆虫の全ゲノムの解読やマイクロアレイ等の遺伝子発現解析技術、および質量分析技術等の発達により、昆虫の微小な組織でも物質の単離や発現解析が飛躍的に容易になった²⁰⁾。これらの技術を用いて未解明の問題を再検討することで、昆虫の発育・行動を制御する新たな機構の発見につながることを期待される。

文献

- 1) 小林勝利 (1957), 蚕糸試験場報告, 15, 181.
- 2) Truman, J.W. (1972), *J. Exp. Biol.*, 57, 805.
- 3) Chung, J.S. et al. (1996), *Neuropept.*, 30, 95.
- 4) Carlisle, D.B. and Ellis, P. (1968), *Nature*, 220, 706.
- 5) Hua, Y.-J. and Koolman, J. (1995), *Reg. Pept.*, 57, 263.
- 6) Hua Y.-J. et al. (1999), *J. Biol. Chem.*, 274, 31169.
- 7) Lorenz, M.W. et al. (1995), *J. Biol. Chem.*, 270, 21103.
- 8) Williamson, M. et al. (2001), *Biochem Biophys Res Commun.*, 281, 544.
- 9) Liu, X. et al. (2004), *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 56, 155.
- 10) Yamanaka, N. et al. (2005), *J. Biol. Chem.*, 280, 14684.
- 11) Price, D.A. and Greenberg, M.J. (1977), *Prep. Biochem.*, 7, 261.
- 12) Nicols, R. (2003), *Annu. Rev. Entomol.*, 48, 485.
- 13) McVeigh, P. et al. (2006) *Trends Parasitol.*, 22, 385.
- 14) Fukusumi, S. et al. (2006), *Peptides*, 27, 1138.
- 15) Lyonet, P. (1762), *Traité anatomique de la chenille qui ronge le bois de Saule.*
- 16) Richter, K. and Gorsch, M. (1983), *Experientia*, 39, 1233.
- 17) Okajima, A. and Watanabe, M. (1989), *Zool. Sci.*, 6, 459.
- 18) 田中良明 (2006), 蚕糸・昆虫バイオテク, 75, 91
- 19) Yamanaka, N. et al. (2006), *Proc. Natl. Sci. USA*, 103.
- 20) 山中直岐・片岡宏誌 (2005), 化学と生物, 43, 671.

◀地域の先端研究▶

細胞剥離法を用いたウシ性判別産子の生産に成功

広島県立畜産技術センター

尾形康弘・日高健雅・松重忠美

酪農経営において、生まれてくる子ウシの性別は、経営に直結する大きな問題の一つである。近年、受精胚での性別が行われているが、性別胚の受胎性や保存性に問題があり広く普及にまで至っていない。これらの問題点を解決して、後継牛の計画的生産、子ウシ販売による副収入増加等による酪農経営基盤の安定化を図り、県民に地元産の安全・安心な牛乳の安定供給を図って行きたい。

1. はじめに

家畜において、生産される子畜の性コントロールの実現は長い間の夢となっており、多くの研究者がこれまでいろいろな方法にチャレンジしている。

精子側からのアプローチとしては、パーコール密度勾配遠心法や人工授精のタイミングを調整する方法などがあり、最近ではフローサイトメーターとセルソーターを用いた精子分離などがある。

卵子側からのアプローチとしては、H-Y抗原の利用、性染色体分析法や受精胚の発育スピードによる選別があり、1990年代になってPCR法を利用した手法が開発され、数社から性別用キットも販売されている。

このように、日進月歩の技術を活用しながら性別という目標に向かって現在も研究が行われている。

2. 研究開発の背景

広島県が乳牛の研究に取り組んでいると言え、この業界に詳しい方なら驚かれる方もいらっしゃるかもしれない。本県を含め中国地方は、古くから和牛の産地として知られており、現在

も広島牛（黒毛和種）に関する行政施策や研究が精力的に行われている。

しかしながら、広島県北部の中山間地では、農業従事者の高齢化や後継者不足等によって和牛繁殖農家は減少の一途を辿っており、このままの状態が続けば、近い将来広島牛の素牛を生産する基盤すら危うい状態にある。

平成18年度からは広島牛生産構造改革促進事業の中で、受精胚移植の技術向上を行うと共に、未経産乳用種を借り腹として、広島牛の素牛生産頭数を増やす振興策を行っている。

この施策を推進するためには、酪農経営の基盤安定が必須となるが、受精胚移植を行う乳用牛を飼養している酪農家は、乳価の据え置き、家畜排泄物法の施行、消費減退にともなう減産型計画生産によって経営的に厳しい状況に置かれている。そのため生乳以外の収入の増加が見込める新技術の導入が求められている。

そこで我々は、酪農家の希望に添った後継牛生産が確実にできる性別胚の生産技術の開発に取り組むことにした。

これが実現すれば、酪農家は計画的なメス牛の生産ができるため、後継牛生産の必要がなくなった余剰の乳用牛に黒毛和種の受精胚を移植することができる。乳用牛から生産された黒毛和種の子牛は乳用種雄子牛の5倍以上の収益が見込めるため、副収入の増加により経営の安定化が期待できる。

OGATA Yasuhiro

〒727-0023 広島県庄原市七塚町584

3. 現在の性別判別法の主流

現在行われているウシの性別判別方法は、大きく二つの方法に分けられる。

一つは精子の段階での性別判別である。

哺乳動物の精子には、X染色体を持つ精子（メス）とY染色体を持つ精子（オス）があり、これらの精子間にはDNA含量の差（3.8%）が存在する。これを、蛍光色素で染色し、フローサイトメーターにかけレーザー照射によって検知した蛍光強度の差を荷電の差に置き換え、電極でオス・メス精子を分取するというものである。

90%の正確度で精子を選別することができ、実際に一部の農家でも人工授精に利用されており、実用化の一手前まで来ている。

もう一つの方法は、受精胚の段階で性別判別を行う方法で、受精後7日目の胚盤胞期胚の一部を金属製ブレードで切断採取し、その細胞核の中に含まれるDNAのオス特異的DNA配列を検出し、電気泳動と発色反応により可視化することで性別判別を行うものである。

近年では、LAMP法を利用した牛胚性別判別試薬キット（栄研化学）¹⁾が販売されており、実用化に向けてまた一歩前進している。

4. 新しい簡易な性別判別胚生産法の開発

受精胚を用いた性別判別の問題点は、性別判別に用いるサンプル細胞の採取法と性別判別した胚の保存性にある。サンプル細胞を採取する際、正確に性別判定を行うためには、少しでも多くの細胞を採取する必要があるが、多くの細胞を採取すると受胎牛へ戻す性別判別胚の受胎性が低下してしまい、逆に採取個数が少ないと性別判別の精度が低下したり、性別判定ができない場合がある。

細胞採取個数については、LAMP法を用いた性別判別キットの開発によって、10個以下の少ない細胞でも正確な判定結果が得られるようになった。

一方で、金属製ブレードによる栄養膜細胞切

断は、採取する細胞の他に、切断部周囲の一部の細胞を破壊することが避けられず、受胎性や保存性を低下させてしまうことに問題がある。

このような問題を解決するために、受精胚からの性別判別用のサンプル細胞の採取法についても、従来法の欠点を改善するいくつかの優れた方法が開発されている。

受精胚の透明帯にスリットを造り、そこから飛び出した細胞をサンプリングするヘルニア法²⁾や、受精後5日目の桑実期胚にガラス製ピペットを挿入し、割球をサンプリングする細胞吸引法³⁾などがその代表である。

しかしながら、これらの方法は、いずれもマイクロマニピュレータによる顕微操作を必要とするため、高度な機器の整備と熟練した技術が必要とする。

そこで我々は、簡便でしかも受精胚に出来るだけダメージを与えない細胞採取法がないものかと考えた。

その中で、核移植時のドナー胚を単離割球にする方法にヒントを得て、性別判別用サンプル細胞の採取を試みても意外にも、簡単に細胞採取ができた。

しかもこの方法は、細胞を切断することがないため、細胞採取後の性別判別胚（胚盤胞期胚）の品質がすばらしく美しかったのである。

従来法で必須であったマイクロマニピュレータを必要とせず、胚の品質改善が見込めるこの方法を我々は、性別判別用サンプル細胞採取法として実用化するための研究を行うことにした。

5. 性別判別胚の作出方法

①経膈採卵による生体からの卵子採取

経膈採卵によって供卵牛から卵胞内卵子を採取する。これは、ヒトでも行われている方法と同様で、1～2週間間隔で繰り返して採卵することができる。1回の採卵でおおよそ、黒毛和種で25個、乳用種で15個前後の卵子が採取することができる。

②体外受精・培養

成熟培養を22～24時間行った後、凍結精液を用い、常法にしたがって体外受精を行う。約6時間媒精したのち、発生用培地に移し、低酸素条件下で培養を行う。3日後に培地交換を行い、Vero細胞との共培養を更に行う。

③細胞剥離

体外受精後5日目の桑実期胚を用いる。まず、0.25%アクチナーゼE溶液に胚を入れ、透明帯を溶解させる。

次に、0.125%トリプシン+EDTA・4Naの酵素液に透明帯を除去した桑実期胚を入れ、細胞間の結合をゆるめる。そしてガラス製の毛細管をガスバーナーで先端を細くしたガラス製ピペットで受精胚を数回ピペッティングすることで、胚表面の細胞が数個剥離する。剥離したら直ちに酵素液の作用を止めるため、胚を牛胎児血清入りのM2液に移す。これを長く行くと胚は割球にばらばらになってしまうので注意が必要である(図1)。

サンプル細胞を剥離した胚は、Vero細胞との共培養で更に48時間培養を続け胚盤胞期胚まで発生させる。

④受精胚移植

胚盤胞期まで发育した性判別済み胚を、受胎牛となる雌ウシの発情後7日目の黄体期子宮内に頸管経由法で受精胚移植を行う。

6. これまでに得られた結果

今回開発した、細胞剥離法による性判別胚生産は、従来の金属製ブレードによる栄養膜切断法と比較すると、性判別のために採取する細胞個数は約1/5程度の2.7個にまで減少させることができた(図2)。

性判別の操作を行った受精胚の胞胚腔形成率は、ブレード切断法84.6%(77/91)、細胞剥離法91.4%(74/81)と両者に有意差はなかったものの、細胞剥

離法が高い発生率であった。

性判別率については、ブレード切断法95.0%(19/20)、細胞剥離法92.0%(46/50)と両者とも差がなく同様に性判定できることが確認された。

採取する細胞数を少なくできたこと、切断による細胞の損傷が回避されたことなどにより、

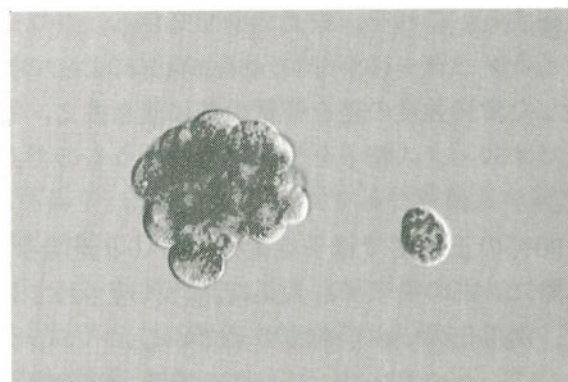


図1 桑実期胚に細胞剥離法を適用した直後

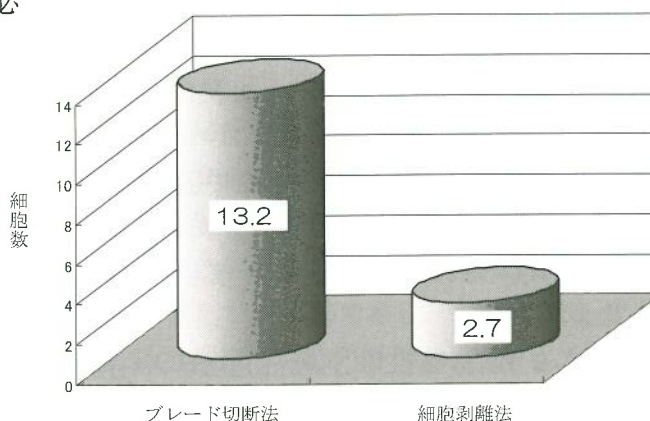


図2 性判別用サンプル細胞の採取個数

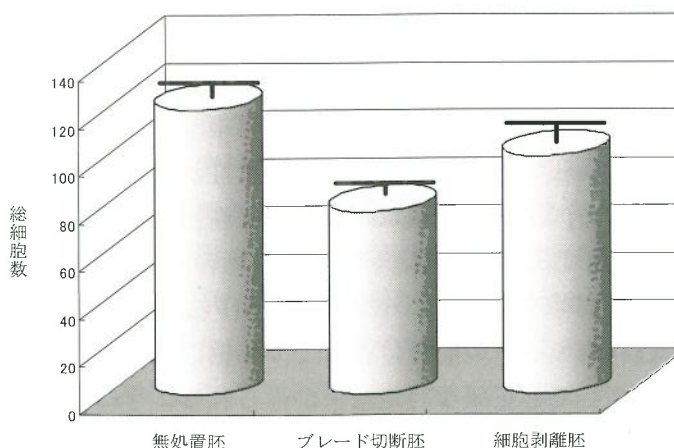


図3 性判別胚の総細胞数(体外受精後7日目)

受胎牛の子宮内に戻す受精胚の細胞数は、ブレード切断法 77.0 ± 2.7 個から細胞剥離法 100.0 ± 6.7 個へと大幅に増加でき（図3）、この方法が移植胚の品質（細胞数）を向上させることが確認された（図4）。

性判別胚の移植成績も、新鮮胚移植の成績では、無処置胚68.4%（13/19）、ブレード切断法83.3%（5/6）及び細胞剥離法68.0%（17/25）と細胞剥離による性判別胚は、無処置胚やブレード切断胚と同様の受胎性を示しており、受胎性も問題ないことが確認されている。

2006年8月には、性判別した乳牛の雌ウシも正常に生まれており、今後も6頭の出産が予定されている（図5）。

7. 今後の研究方向

細胞剥離法による性判別胚の作出研究は、始まったばかりであり、現在は受胎性の確認と産子の正常性の調査を行っている。

移植や保存に用いる受精後7日目の胚盤胞期胚の細胞数を少しでも増やすことができ、ガラス化保存した性判別胚が50%以上受胎するようになれば、実用化できると考えており、これらを目標に、剥離する酵素の種類や培養方法の検討を行い、1日も早く酪農家の経営安定に寄与できる技術開発を行いたいと考えている。

文 献

- 1) 平山博樹ら（2004）*Theriogenology*, 62, 887-896
- 2) 青柳和重ら（2005）平成15年度東北農業研究成果情報
- 3) 森安悟（2004）*農家の友* 5月号, 76-77

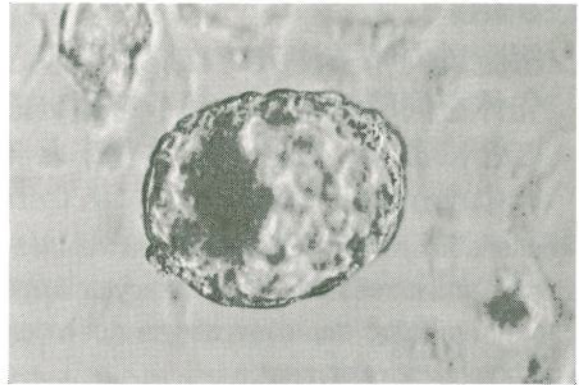


図4 細胞剥離法で生産した性判別胚

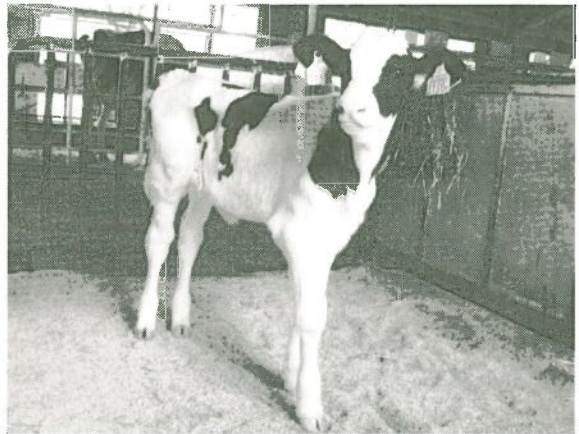


図5 判定通り生まれた乳用雌ウシ

◀文献情報▶

細胞質内精子注入時に原形質膜と先体を同時除去した精子を用いることにより、卵子の活性化率と胚発生率が向上する

Simultaneous removal of sperm plasma membrane and acrosome before intracytoplasmic sperm injection improves oocyte activation/embryonic development.

Kazuto Morozumi¹, Tomohide Shikano², Shunichi Miyazaki², and Ryuzo Yanagimachi¹

¹ Institute for Biogenesis Research, University of Hawaii School of Medicine, Honolulu, HI 96822; and

² Department of Physiology, Tokyo Women's Medical University School of Medicine, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 17661-17666 (2006)

精子1個を卵子の細胞質内に直接注入することを細胞質内精子注入法 (ICSI) と呼んでいる。ICSIにおいては、1個の卵子を受精させるために必要なのは正常な遺伝情報を持つ精子1個のみであり、精子の濃度、形態、運動性の有無にかかわらず精子核が正常な遺伝情報を持っている限り、ICSIにより健康な産子を得ることが可能である。自然な受精とICSIの大きな違いは、ICSIにおいて精子原形質膜のみならず強力な加水分解酵素群を含む先体を卵子内に導入することである。先体の内容物が卵子に有害である可能性が示されており、先体の小さな動物種においては、卵子への先体の注入によりあまり問題は起こらないが、ハムスターのように大型の先体を持つものでは、先体のついた精子を卵子に注入すると卵子は死んでしまう。さらに、自然な受精とICSIの大きな違いは、卵子の活性化の重要なシグナルである卵子内のCa²⁺濃度のパルス状の増加 (Ca²⁺ oscillation) の開始が、自然な受精に比べてICSIの方が遅れるということである。マウスにおいては、自然な受精において

は精子と卵子の膜融合の1~3分後にはCa²⁺ oscillationが開始するが、ICSIの場合には15~30分後に開始することが報告されている。ヒトの卵子においては、精子尾部末端をさわることにより不動化した原形質膜付きの精子をICSIした場合には、4~12時間後にCa²⁺ oscillationが開始するが、精子尾部の3分の1の部分にピエゾパルスを与えて不動化した精子の場合には、Ca²⁺ oscillationはより早く (14±6分) 開始する。減数分裂完了を指標とした場合に、ICSI前に精子原形質膜を除去することにより卵子の活性化は早まること、原形質膜除去ブタ精子のICSIにより受精率が高まることも報告されている。そこで、Morozumiらは、ICSI前のマウス精子からの原形質膜と先体の同時除去が卵子の活性化開始を早めるだけではなく胚発生率を向上させるかどうかを検討した。その結果、Triton X-100ではなく、膜リン脂質の加水分解産物であるlysolecithinを用いて直前に精子膜の除去を行った精子をICSIすることにより、Ca²⁺ oscillationの開始を早めるとともに胚発生率が向上し、さらには産子が効率よく得られることを明らかにした。

ICSIは精子が1個あれば受精卵1個を作製可能な技術である。また、運動性を失った精子からも受精卵を作出することが可能であり、遺伝資源の有効活用のためにも重要な技術である。今回の報告では、主としてマウス及びヒトについて検討が行われたが、他の動物種においての検討とともに、原形質膜除去によるICSIが産子に与える影響についても引き続き検討が必要である。ICSI直前の原形質膜除去法が、ICSIの有効活用のためのブレークスルーとなることを期待したい。

(抄訳：下司雅也, GESHI Masaya, 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所)

◀文献情報▶

一酸化窒素合成酵素はまた振り出しに

Response to Zemojitel et al.: Plant nitric oxide synthase: back to square one

Nigel M. Crawford, Mary Galli, Rudolf Tischner, Yair M. Heimer, Mamoru Okamoto and Alyson Mack

Trends in Plant Science (2006) 11: 526-527

NOはNO₂と共にNO_xと呼ばれる大気汚染物質であり、有害物質と思われていた。ところが、1987年に血管の平滑筋弛緩因子がNOであることが突き止められ、多くの動物でNO産生酵素の存在が明らかになると様相は一変し、実はシグナル伝達物質として多種多様な働きをする有用物質であることになった。植物でその生理的意義が明らかになったのは更に10年以上遅れ1998年のことであり、以来、発芽、細胞死、耐病性、光合成の制御に関わっていることが次々と明らかになった。このように重要な役割を果たしているにもかかわらず、植物の産生酵素の実体については諸説入り乱れる状況にある。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。植物NOSの探索が始まる。まず、名乗りをあげたのはグリシ脱炭酸酵素のPタンパク質であるが、これは否定される。次にカタツムリでNO合成に関与しているタンパク質と相同性を持つ *AtNOS1* が、Crawfordの研究室から報告される。この遺伝子を大腸菌で発現させたタンパク質はアルギニン法とグリース法でNOS活性を示し、その欠損変異体はNO産生が抑えられ、NOが関与されるとされるABA誘導性気孔閉口も起こさない。これで植物NOSも決着がついたかと

思われたのである (ブレインテクノニュース第104号 (平成16年7月発行) の本欄でも紹介した。)

しかしである。Zemojitelのグループから、*AtNOS1*はアルギニン法でもグリース法でもNOS活性がないとの疑念が提出された (同誌同号524頁)。それに対しCrawfordは誤りを認めた。*AtNOS1*はアルギニンを変化させる活性はあるものの、反応生成物はNOSのもう一つの反応生成物シトルリンをTLCで確認できず、オルニチン、アグマチンとN-OHアルギニンしか検出できなかった。また、NOの産生も確認できなかった。依然としてNO発生にかかわる因子ではあるものの、NOSではない。(ただ、N-OHアルギニンはアルギニンがNOSによりシトルリンに変換する際の反応中間体であり、標品の活性が低いためにNOもシトルリンが検出できなかったに過ぎないと言うGuoの反論 (同誌同号527頁) もあながち否定はできないが。)

これでまた植物NOSはまた振り出しに戻った。果たして植物NOSは存在するのだろうか。アルギニンに誘導されるNO産生があるにしても、アルギニンが直接的な基質となるのではないのかも知れない。いや、やはりNOSはあるのか。

NO産生系はまだ闇の中である。

(抄訳：岩井純夫, IWAI Sumio, 鹿児島大学農学部)

◀文献情報▶

回腸部に病変が認められるクローン病患者においてパネート細胞の産生する α デフェンシンは減少しているReduced Paneth cell α -defensins in ileal Crohn's disease

Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H Jr, Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL.

Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, University of California, Davis, 95616, USA.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Dec 13; 102 (50): 18129-34.

クローン病 (CD) は一種の突発性の炎症性腸疾患 (IBD) であり、その病因は不明であるが、少なくとも炎症を誘発し、また永続させるのに腸内細菌の関与が示唆されている。IBDはヒトの小腸及び大腸に病変を生じ、食生活や生活スタイルの変化に伴いその患者数は増加傾向にある。遺伝的な変異として、CD患者ではIBD感受性遺伝子として同定されたNOD2/CARD15に欠損変異があることも報告されている。NOD2は単球や上皮細胞で発見され、ムラミルジペプチドや細菌由来のペプチドグリカンを認識する分子であり、NF- κ Bによる転写を活性化する。ヒトのパネート細胞 (PC) では抗菌ペプチド (HD5及びHD6) が合成され、分泌されている。近年、NOD2欠損マウスにおいてヒトの α デフェンシンの相同体であるクリプチジンの産生量が低下することも報告されている。

著者らは回腸部に病変をもつCD患者のPCに由来する α デフェンシンについて検討した。CD患者と正常な回腸組織における α デフェンシンを組織染色と定量的リアルタイムPCRを用いて比較すると、HD5の発現が減少していることが明らかとなった。さらに複数のNOD2/CARD15変異体 (WT, SNP8, SNP12, SNP13) についての解析も行ったところ、SNP13の変異

においてHD5の発現が減少していることをつきとめた。そしてHD5のタンパク発現を検討するために正常者、NOD2-WTとNOD2-SNP13遺伝子を持つCD患者の回腸組織についてウェスタンブロット解析を行った結果、NOD2-SNP13遺伝子を持つCD患者においてHD5の発現が最も減少していることが明らかとなった。これらの結果から、NOD2のSNP13がHD5の発現の低下に関わっていることが示唆された。さらにPCが産生し、炎症反応に関わっていることが報告されている α -1-アンチトリプシン、リゾチームならびにホスホリパーゼA2についてイムノブロット法によって検討したが、NOD2-WTとNOD2-SNP13間では発現の有意差は認められなかった。

次に、粘膜における炎症の程度について組織学的な評価 (炎症なし、中等度炎症、重度炎症に区分) を行い、CD患者を3つのグループに分類し、そのサイトカイン量やデフェンシン量を測定した。まず炎症誘発性のサイトカインであるIL-8の発現は炎症の程度に比例して増加していたが、HD5とHD6の発現は炎症の程度との関連が認められなかった。また回腸囊のバイオプシーを行い、大腸菌と黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を測定した結果、CD患者は抗菌活性が低下していることが明らかとなった。

以上の結果から回腸にCD病変を発症する場合にのみPC由来の α デフェンシンは特異的に欠乏しており、回腸における粘膜面の自然免疫防御能が損なわれると考えられ、CD発病の一因であることが示唆された。またHD5及びHD6の減少が全てのCD患者に見られる現象でなく、むしろ回腸部に炎症をきたしているCD患者特有の症状であると考えられる。腸内細菌叢の構成の変化が細菌の粘膜における浸潤を促進し、回腸部に生ずるCDにおいて慢性的な炎症を引き起こすという報告もあることから、腸管粘膜における微生物構成のバランスの維持が炎症の抑制のために重要であると考えられている。今回の知見から、抗菌ペプチドと炎症に関しての知見が集積されていくと考えられる。

(抄訳：芦田延久, ASHIDA Nobuhisa, カルピス株式会社 健康・機能性食品開発研究所)

◀文献情報▶

レスベラトロールは、高カロリー餌摂取マウスの健康および寿命を改善する

Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet

Joseph A. Baur, et al.

Department of Pathology, Paul F Glenn Laboratories for the Biological Mechanisms of Aging, Harvard Medical School, 77 Avenue Louis Pasteur, Boston, Massachusetts 02115, USA.

Nature, 444, 337-342 (2006)

カロリー制限が寿命を延長するという現象は、70年以上前から既に知られていた。この現象は出芽酵母，線虫，ショウジョウバエ，魚類，哺乳類に至るまで広く認められている。遺伝子のサイレンシングを司るSir2 (Silence information regulation 2) がこの現象に深く関わることは後の酵母の研究から明らかとなった。2000年，このSir2がNAD⁺依存性脱アセチル化酵素であることが判明する。本文献に登場するレスベラトロールはポリフェノールの1種であり，このSir2の酵素活性を最も強く促進し，多くの生物種で寿命延長効果を示すことが知られている。

本文献では，カロリー制限を模倣するこのレスベラトロールが，肥満という病理状態にどのような影響をもたらすのかについて検証を行っている。結果は興味深いものであった。高カロリー餌を摂取したマウスでは体重が増加すると同時に，短命化およびQOLの指標となる運動機能の低下が現れる。しかし，レスベラトロールを同時に摂取すると，生存日数が通常餌摂取マウス並みに改善され，同時に運動機能も大幅に回復したのである。不思議なことに，この運動機能の改善は加齢とともに上昇した。また，通常餌摂取マウスにレスベラトロールを摂取させた場合，運動機能のさらなる向上が認められ

たとされている。

レスベラトロールは，肥満に伴う病的諸症状に対しても強い効果を発揮した。インシュリン感受性は肥満とともに低下し，結果として糖尿病や動脈硬化の発症原因ともなる。しかし，レスベラトロールはこのインシュリン感受性低下についても顕著な改善効果を示した。また，レスベラトロールは肝実質細胞内ミトコンドリア数を増加させ，高カロリー餌による脂肪肝発症を強く抑制した。さらに，肝臓中の153の遺伝子は高カロリー餌によってその発現量が大きく変動したが，レスベラトロールはこのうち144の遺伝子の発現を改善させた。

驚くことは，こうした肥満に対するレスベラトロールの改善効果が体重の減少を殆ど伴わないことである。つまり，太っているけど健康で長寿なマウスということになる。さらに，レスベラトロールの効果が中齢からの摂取で十分発揮されたということも特筆されることだろう。著者らは，経口摂取可能な低分子物質によって健康と寿命の増進が可能であることを示すものとして報告を締めている。ゴムボールのように弾けた中高年の方々が街を闊歩する日もそう遠くないのかもしれない。

(抄訳：秦 淳一郎，HATA Jun-ichiro，日本水産株式会社 中央研究所)

生研センターからのご案内

2007年度 新規研究課題募集のお知らせ

—新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業—

事業の趣旨

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

2007年度については、研究者の対象年齢を制限しない「一般型」及び39歳以下の若手研究者を対象とした「若手研究者支援型」の新規研究課題を下記により募集します。

なお、本年度から、一般型において、我が国の生物系特定産業の分野における諸外国と共通の課題の解決を図るものについて国際ワークショップの開催や外国機関に所属する研究者の招へいなどの国際活動を行うことが可能となりました。

■ 研究分野

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

■ 研究枠・研究期間・研究費の規模

(研究費には間接経費を含みます)

○一般型

研究代表者を含む研究チームの構成員の年齢制限なし

研究期間: 3~5年間

研究費: 1課題あたり原則2~8千万円程度/年

(国際活動の実施を希望し、かつ、妥当であると生研センターが認めた場合は、研究費の上限が1億円程度となります。)

○若手研究者支援型

研究代表者を含む研究チームの構成員全ての年齢を39歳以下に制限

研究期間: 3年間

研究費:

- ・参画機関数1~3の場合;
1課題あたり原則2~4千万円程度/年
- ・参画機関数4以上の場合;
1課題あたり原則2~8千万円程度/年

■ 応募資格

- ① 日本国内の基礎研究を実施する能力のある機関に所属する常勤の研究者であること。
- ② 若手研究者支援型に応募の場合は、研究代表者を含む研究チームの構成員全ての年齢が、2007年4月1日において39歳以下であること。
- ③ 留意事項
 - ・生研センターで実施している提案公募事業(本事業、異分野融合研究支援事業及び民間実用化研究促進事業)で、2007年

度に継続を予定している課題において、研究の実施に責任を持つ研究者(研究代表者、参画機関の研究責任者)は応募できません。

・同一の研究代表者/研究分担者が2007年度に本事業に応募いただけるのは、1研究課題に限ります。また、本事業に応募いただく場合には、生研センターで実施している「生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業」及び「民間実用化研究促進事業」には応募できません。

■ 採択予定課題数

「一般型」・「若手研究者支援型」合わせて
15課題程度

■ 応募期間: 2007年3月1日(木)~

2007年3月15日(木)締切(当日17時必着)

■ 研究課題の決定

学識経験者で構成する課題選考のための委員会が①一次審査(書類審査)、②二次審査(面接審査)の二段階審査により採択候補課題を選定。

生研センターはその結果を踏まえて採択課題を決定。

■ スケジュール

3月1日	受付開始
3月15日	受付終了(17時必着)
4月	一次審査(書類審査)
5月	二次審査(面接審査)
6月	採択課題決定
8月~	委託試験研究契約締結(研究開始)

♪詳細は応募要領をご覧ください。

♪応募要領・様式は生研センターのホームページよりダウンロードできます。

<http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/marumoto/up/h19boshu/top/>

【問合せ先】 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
生物系特定産業技術研究支援センター(生研センター) 新技術開発部 基礎研究課

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3-18-19 虎ノ門マリビル10階
TEL: 03-3459-6569 FAX: 03-3459-6594
URL <http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/> (生研センターホームページ)

生研センターからのご案内

2007年度
新規研究課題募集のお知らせ
 —生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業—

事業趣旨

生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）では、農林水産業、飲食品産業、醸造業等の生物系特定産業分野において、将来的に新事業の創出や起業化の促進につながる画期的な技術開発を推進しています。

このため、新事業の創出につながる技術開発を行う「異分野融合研究開発型」並びに起業化の促進につながる技術開発を行う「起業化促進型」について、新規研究課題を下記により募集します。

研究分野・応募資格・研究期間・研究費

○ 異分野融合研究開発型

研究分野：将来的に新事業の創出につながる技術開発

応募資格：民間企業、大学、独立行政法人等の異分野にまたがる複数の研究者が共同して研究を行う研究共同体（コンソーシアム）

研究期間：原則として3～5年間

研究費：1コンソーシアム当たり年間60百万円程度を上限

○ 起業化促進型

研究分野：独創的な発想や研究シーズを活かしたベンチャー企業設立を目指す技術開発

応募資格：ベンチャー企業設立を目指す民間企業、大学、独立行政法人等の研究者のほか起業化支援者及び起業家（単一機関または複数機関の研究チーム）

研究期間：原則として2年間（1年の延長を認める場合あり）

研究費：1研究課題当たり年間26百万円程度を上限

採択予定課題数

「異分野融合研究開発型」・「起業化促進型」合わせて10課題程度

募集期間

2007年3月1日（木）～2007年3月15日（木）17時締切（当日必着）

課題の選定方法

外部の専門的有識者等で構成される選考・評価委員会による第1次審査（書類審査）及び第2次審査（面接審査）を行い、採択課題を選定します。

スケジュール

3月 1日	受付開始
3月15日	受付終了（必着）
4月	一次審査（書類審査）
5月	二次審査（面接審査）
6月	採択課題決定
8月～	委託試験研究契約締結／研究開始予定

応募要領・様式は生研センターのホームページからダウンロードできます。

【問い合わせ先】

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
 生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）
 新技術開発部 技術開発課
 〒105-0001 東京都港区虎ノ門3-18-19 虎ノ門マリビル10階
 TEL：03-3459-6567 FAX：03-3459-6577
 URL <http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>（生研センターホームページ）

生研センターからのご案内

平成18年度 研究成果発表会の開催について（予告）

生物系特定産業技術研究支援センターでは、現在実施している課題のうち、平成18年度で終了する「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」の15課題と「生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業」の8課題の成果発表会を開催いたします。

入場無料で、どなたでもご参加いただけますので、多数の皆様のご来場をお待ちしております。

開催日：平成19年3月7日（水）～9（金）

場 所：東京国際フォーラム（ホールD7）

[東京都千代田区丸の内3-5-1]

入場無料

なお、プログラムや発表課題等の詳細については、平成19年2月中に生研センターのホームページに掲載するほか、パンフレットやポスターでご案内いたします。

問合せ先：基礎研究課 E-mail kisoken@ml.affrc.go.jp
TEL:03-3459-6569 FAX:03-3459-6594

技術開発課 E-mail kaihatsu@ml.affrc.go.jp
TEL:03-3459-6567 FAX:03-3459-6577

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

編集後記

2007年を迎えました。本年もよろしくお願いたします。さて、本誌第119号の総説では、伊藤孝徳氏（岩手大学）らに大変ユニークな植物ザゼンソウの発熱現象とその非線形体温制御システムについてご紹介戴きました。また、総説に関連して、酒井憲司氏（東京農工大学）にカオス理論による生態ダイナミクス推定について概説して戴きました。

その他の研究情報としては、今井亮三氏（北海道農業研究センター）らにコムギの低温適応においてRNAの働きを助けるタンパク質の発見、小埜栄一郎氏（サントリー(株)）らに遺伝子組換えによる黄色花の育種、倉田祥一郎氏（東北大学）に自然免疫における病原体認識蛋白質の多機能性、田中良明氏（(独)農業生物資源研究所）らに昆虫のステロイドホルモン合成を抑制する神経支配の発見、尾形康弘氏（広島県立畜産技術センター）らに細胞剥離法を用いたウシ性判別産子の生産技術の開発と、それぞれ興味深く貴重なご研究の一端をご紹介戴きました。

また、本号の文献情報は、下司雅也氏（畜産草地研究所）、岩井純夫氏（鹿児島大学）、芦田延久氏（カルピス(株)）、秦淳一郎氏（日本水産(株)）にご執筆戴きました。

ご多忙な中玉稿をお寄せ戴きました執筆者各位に深甚の謝意を申し上げます。（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119号

平成19年1月15日発行

発行人 朝比奈 清

編集人 石川 清康

発行所 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

◎生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）

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

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

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

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

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