

*BRAIN*

**生研機構**  
**基礎研究推進事業 成果発表会**  
**(平成8年度採択課題)**

生物系特定産業技術研究推進機構  
Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

表紙写真：ペプチド鎖解離因子結晶のX線解析写真.  
東京大学医科学研究所 中村義一

---

# ごあいさつ

生物系特定産業技術研究推進機構

理事長 堤 英 隆



生研機構の業務の推進につきましては、日頃より格別のご理解、ご支援をいただいております。深く感謝申し上げます。

「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」につきましては、農林水産業、食品産業等生物系特定産業の分野において、生物のも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るところであります。

本事業は平成8年度より実施しており、本年度で5年目を迎えましたが、生研機構としては、今後とも優れた研究課題の採択に努めて参るとともに、今までの成果の発表・普及を図っていくことが重要であると考えております。

このため、初年度採択課題21課題の内、本年度で予定の研究期間を終了する20課題について、今回、研究者の皆様はじめ外部に向けての成果発表会を開催することと致しました。

本事業の成果がさらに当該研究分野の深化に寄与すること、また応用・実用研究の段階を経て、我が国の生物系特定産業の更なる発展に資することができれば幸甚に存じます。

引き続き皆様方の暖かいご支援とご指導をお願い申し上げます。

平成13年2月

---

# 目次

## 2月14日(水)

- 昆虫・微生物寄生共生系の分子機構の解明と利用  
(東京大学・石川 統) ..... 1
- 昆虫の生体機能に基づくバイオマイクロマシンの研究  
(東京大学・下山 勲) ..... 3
- CO<sub>2</sub>固定細菌を利用した地球環境修復システムの構築  
(大阪大学・森川正章) ..... 5
- 宿主決定の分子機構：植物マイコプラズマの遺伝子発現・  
制御メカニズム  
(東京大学・難波成任) ..... 7
- 植物病原菌類における多剤耐性の分子機構の解明  
(東京大学・日比忠明) ..... 9

## 2月28日(水)

- 乾燥・塩ストレス耐性の分子機構の解明と分子育種への応用  
(国際農林水産業研究センター・篠崎和子) ..... 11
- 植物の遺伝子発現の光スイッチング機構の解明と応用  
(日立製作所基礎研究所・古谷雅樹) ..... 13
- 光過剰による光合成抑制機構の解明と遺伝子導入による  
回避システムの開発  
(農業生物資源研究所・徳富光恵) ..... 15
- ペプチド性植物増殖因子に関する基礎的研究  
(名古屋大学・坂神洋次) ..... 17
- 森林生態系における共生関係の解明と共生機能の  
高度利用のための基礎研究  
(東京大学・鈴木和夫) ..... 19

# 目次

## 3月1日(木)

- 哺乳動物の高度に発達した薬物代謝機能を利用した環境負荷物質の代謝・分解技術の開発  
(神戸大学・大川秀郎)…………… 21
- 近赤外分光法による乳牛生体情報のオンラインモニタリング手法の開発  
(畜産試験場・田辺 忍)…………… 23
- 臓器移植医療に応用するためのブタの品種改良・増産に関する研究  
(大阪大学・白倉良太)…………… 25
- 無脊椎動物を利用したヒト病態の解析と病態モデル動物開発の基礎研究  
(東京大学・鈴木利治)…………… 27
- 茶機能検定系の構築と茶成分新機能の解析  
(野菜・茶業試験場・袴田勝弘)…………… 29

## 3月2日(金)

- 生物資源の低投入型生産機械システムに関する基礎研究  
(京都大学・梅田幹雄)…………… 31
- カンキツ類によるがん予防に関する基礎的研究  
(果樹試験場・矢野昌充)…………… 33
- 味覚シグナリングの分子機構の解析と食品の品質設計基盤の展開  
(東京大学・阿部啓子)…………… 35
- 生理機能調節性タンパク質集積作物の開発と利用に関する総合的基盤研究  
(京都大学・内海 成)…………… 37
- ドメインシャッフリングによる高機能キメラ酵素の創出と植物における発現  
(食品総合研究所・林 清)…………… 39

**生研機構**  
**基礎研究推進事業 成果発表会**

**(平成 8 年度採択課題)**

## 1 【研究課題名】

### 昆虫・微生物寄生共生系の分子機構の解明と利用



Hajime Ishikawa

## 2 【研究項目及び実施体制】 (◎は総括研究代表者)

- ① 昆虫内共生微生物の遺伝子産物の機能とその変化に関する研究  
(◎石川 統／東京大学大学院理学系研究科)
- ② 昆虫共生系が生産する物質とその機能に関する研究  
(野田博明／農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所)
- ③ 昆虫寄生・共生菌が宿主体内で特異的に発現する遺伝子の探索，解明，利用  
(深津武馬／経済産業省産業技術総合研究所)



Hiroaki Noda

## 3 【研究の目的】

昆虫は多種多様な微生物と寄生ないし共生しつつ生活している。これらの微生物には宿主との相互作用の場でのみ特異的機能を発揮するものも多い。本研究の目的は、このような昆虫・微生物間の寄生および共生系に内在する生命原理を解明し、それらの有効利用への途を拓くことにある。



Takema Fukatsu

## 4 【研究の内容】

アブラムシの菌細胞内共生細菌Buchnera，ウンカの酵母様細胞内共生真菌，シロアリおよびその消化管内共生原虫，昆虫を中心とする無脊椎動物に広く分布する細胞内共生リケッチアWolbachia，社会性アブラムシにみられる酵母様細胞間共生真菌，および冬虫夏草をもたらす昆虫病原性真菌などをおもな材料として，遺伝子およびゲノムの構造解析，遺伝子発現の解析と遺伝子産物の同定，性状の検討，遺伝子解析による分子進化的研究を行う。

## 5 【主要な成果】

- ① Buchneraのゲノム解析を行い，これがおよそ641kbの環状二本鎖DNAであり，583個のORFを含むことを明らかにした。また，その遺伝子レパートリーは細胞寄生細菌とは著しく異なる特徴をもつことを示した。これは絶対共生細菌についての初のゲノム解析である (*Nature* 407: 81, 2000)。
- ② シロアリでは腸内に共生している原生生物や細菌がセルロースを分解していると考えられてきた。このシロアリのセルロース分解機構を解明するために，セルラーゼ遺伝子の単離・解析を行った結果，昆虫から初めてセルラーゼ遺伝子を見つけ，シロアリ自身が主要なセルラーゼを生産していることを明らかにした (*Nature* 394: 330, 1998)。
- ③ 昆虫類に内部寄生・共生する高度な能力を発達させた冬虫夏草類および酵母様共生真菌について，単離・培養・系統化，系統進化関係の解明，寄主特異性や内部共生の進化過程の解明，多数の新規group I intronsの発見，特異的発現遺伝子の解析等を推進し，多くの新知見を得た。

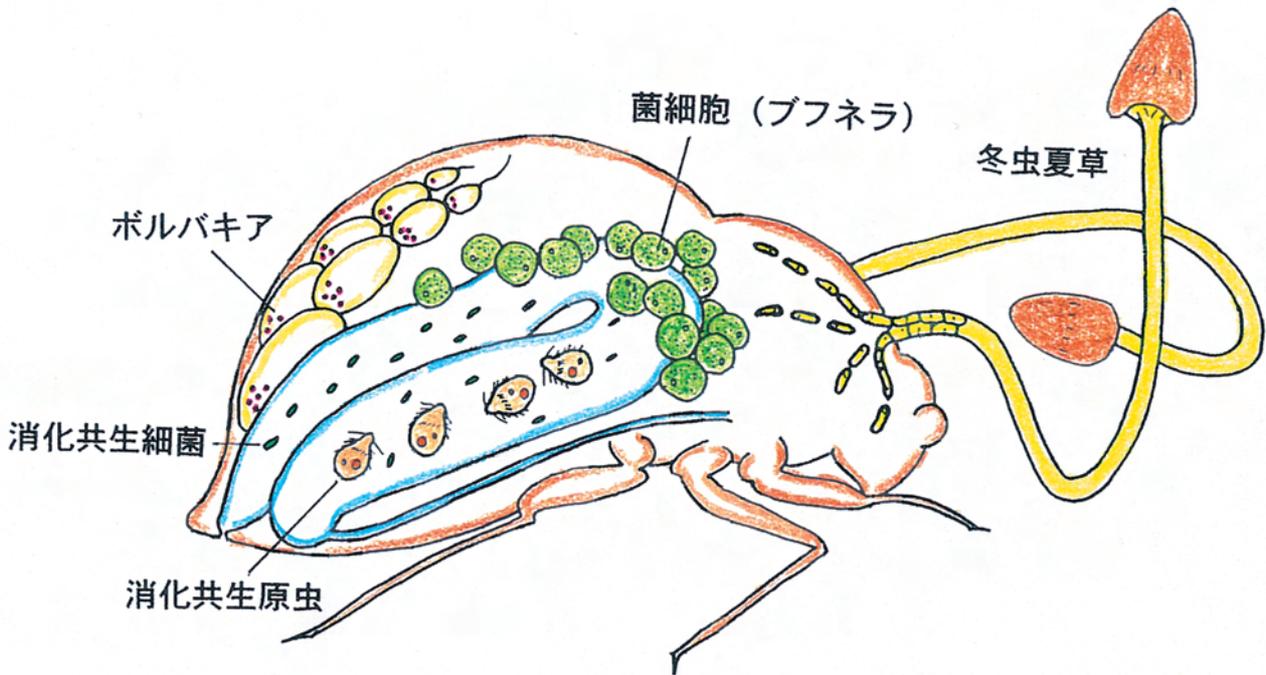


図1 本研究が対象とする昆虫関連微生物の概略模式図

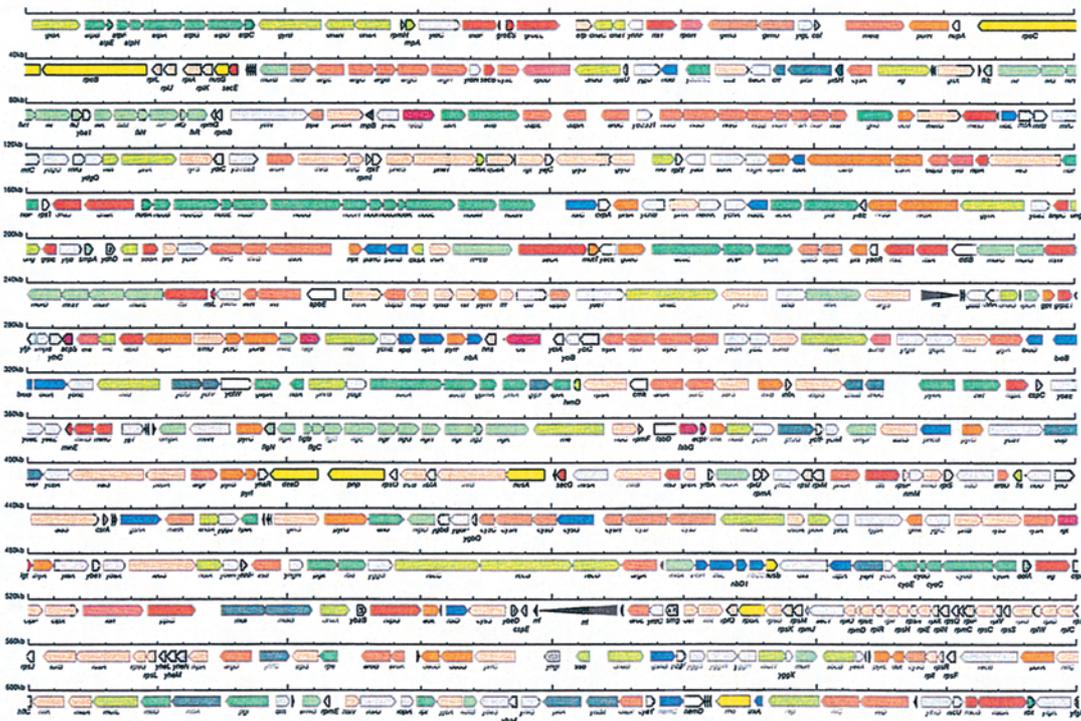


図2 ブフネラゲノムにおける各種遺伝子の配置。同類の遺伝子は同色で示してある。タンパク質をコードする遺伝子の数は全部で583個あり、そのうちブフネラに固有の遺伝子はわずか3個である。それら以外のほとんどすべての遺伝子は、大腸菌にも含まれている。

## 1 【研究課題名】

### 昆虫の生体機能に基づくバイオマイクロマシンの研究



Isao Shimoyama

## 2 【研究項目及び実施体制】（◎は総括研究代表者）

- ① バイオマイクロマシンによる昆虫機能の再構成（◎下山 勲／東京大学大学院工学系研究科）
- ② 昆虫の神経・行動機能を規範としたバイオマイクロマシンの研究  
（神崎亮平／筑波大学生物科学系）



Ryohei Kanzaki

## 3 【研究の目的】

昆虫には小さな昆虫なりの数々のすばらしい生体機能があるが、従来これらの機能は生物学的な観察や解析の対象にとどまっていた。最近になって昆虫の生体機能の利用が提案されてきている。また、10数年前から、半導体加工に代表される微細加工技術によって機械と電子回路を合わせ持つ微小機械（MEMS, Micro Electro Mechanical Systems）の研究が盛んになってきている。本研究では、筑波大学の神崎グループが行った昆虫の神経行動学的な手法による生物学的解析結果を、東大の下山グループでMEMS技術を使って統合して微小電子機械システムを作り、生物学的解析結果の正当性を構成的手法により確かめ昆虫の生体機能を理解するとともに、微小システムを構築するための原理を追究し、昆虫の機能に基づく新しいデバイスを提案する。

## 4 【研究の内容】

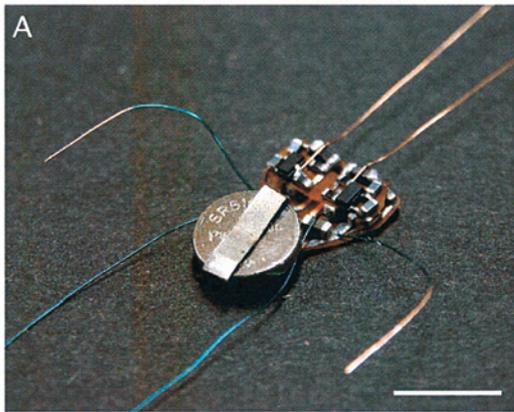
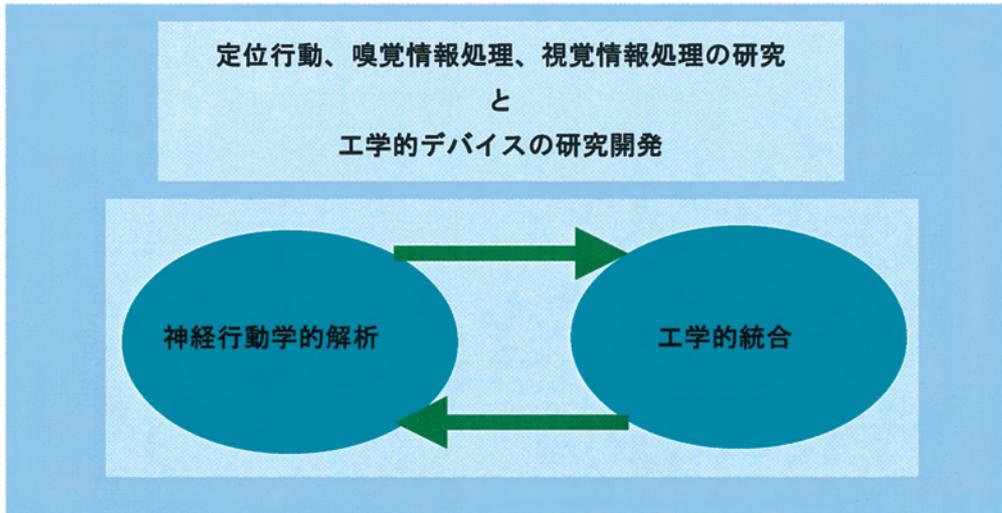
昆虫の匂い源定位行動に着目し、微小な脳システムによる匂い識別機構、匂い源探索のアルゴリズムとその神経機構を解明し、類似の環境情報処理機能を持つ人工ニューラルネットを作成した。これを搭載した小型移動ロボットによって、構成的に発現メカニズムを研究した。昆虫の運動系の活動を計測するための超小型テレメトリシステムを開発し、その計測結果から微小システムの行動（はばたき飛行）のダイナミクスを分析した。また、昆虫の生体機能のうち、触角、複眼、歩行、飛行について、機構やセンサを研究・開発した。

## 5 【主要な成果】

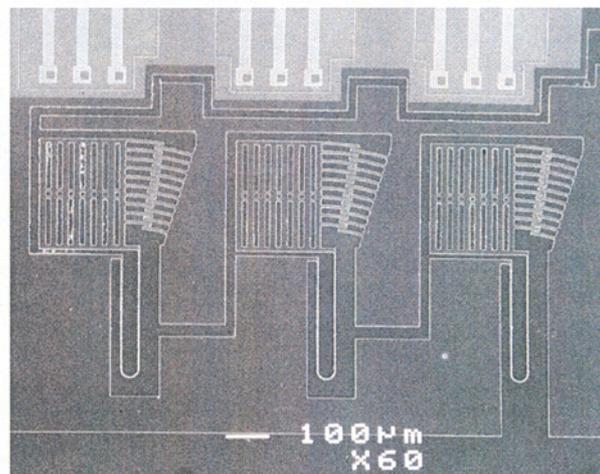
- ① 昆虫の脳神経機能のモデル化（匂い識別機構）：昆虫の嗅覚系一次中枢である触角葉の匂い識別に関する電気生理・光学計測、免疫組織化学などの手法による分析から、匂い識別機構をニューロンネットワークとしてモデル化した（特許出願中（特願2000-128793, *Neurosci Lett* 258: 135-138, 1998）。
- ② 昆虫の行動システムのモデル化（匂い源探索アルゴリズム）：昆虫の匂い源探索の行動レベルでのアルゴリズムのほぼ全容を明らかにした。また、個々の脳ニューロンの構造と機能の分析から、匂い源探索行動を指令する神経回路網のモデル化を行い、小型移動ロボットにソフトウェアとして搭載して、雄カイコガの定位行動と同様の行動がロボットで発現した（*J Comp Physiol A* 184: 143-160, 1999 *Biosensors and Bioelectronics* 14: 195-202, 1999）。
- ③ テレメトリによる生体情報計測：電子回路技術、半導体加工技術を用いて、微小テレメータ、微小電極、微小リモート電力供給回路などの生物学実験のためのツールを試作・研究した。特に、総重量0.32g（2ch）の世界最小レベルの超小型テレメトリの製作に成功した。昆虫に装着しても正常な飛行を示した。高速度撮影装置との併用により、昆虫のはばたき飛行に関するメカニズムの新しい知見を得た（特許出願中, *J MEMS* 9(1): 24-31, 2000）。
- ④ 複眼型マイクロ視覚センサ：直径1mmのレンズを組み込んだレンズアレイと、ポリイミドフィルム上に寸法0.75mmのフォトダイオードをアレイ状に配置したフォトセンサアレイをピエゾアクチュエータで振動させた受光部分から成るラージスケールモデルを試作し評価した。昆虫の視覚情報処理を手本にして人工複眼の情報処理系を試作し、ロボットに搭載して障害物回避をした。半導体技術を用いて微小化を試み、ラージモデル試作した複眼型センサと同様のマイクロ複眼型視覚センサを試作した（特許出願中（特願平11-355280, 特願2000-373706）, *J MEMS* 9(1): 32-37, 2000）。

## 6 【研究のイメージ】

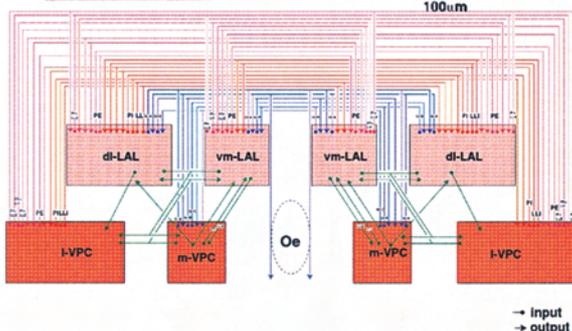
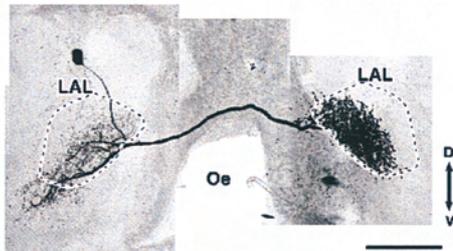
神崎の神経行動学的解析手法と下山の工学的統合（構成的手法）の相補的関係を研究の方法論として使って生物学的な知見を得た。さらにこの結果を使って工学的デバイスの研究開発を行った。



製作した超小型テレメトリシステム。



シリコン基盤の上にフォトダイオードを作り、さらにその上に静電アクチュエータを作り込んだ、複眼型視覚センサの一部。この上にマイクロレンズアレイを置く。



カイコガの脳の単一の神経細胞の3次元構造とその応答特性の分析から、フリップフロップ応答の形成には脳内特定領域（LAL）間を結ぶ両側性神経（左上図）による相互抑制が重要であり、その形成に関与する神経回路（左下図）が明らかになった。1本1本の線がそれぞれ1つの神経細胞にあたる。このネットワークを移動機械のプログラムとして使って、カイコガの定位行動を構成的に研究した。（右下図）

## 1 【研究課題名】

### CO<sub>2</sub>固定細菌を利用した地球環境修復システムの構築



Masaaki Morikawa

## 2 【研究項目及び実施体制】(◎は総括研究代表者)

- ① CO<sub>2</sub>固定細菌を利用した地球環境修復システム(◎森川正章／大阪大学大学院工学研究科)
- ② 微生物の多彩なCO<sub>2</sub>代謝機構に関する基礎研究(跡見晴幸／京都大学大学院工学研究科)



Haruyuki Atomi

## 3 【研究の目的】

単純な細胞構造をもつ微生物は一般に世代時間が短く、ヒトなどの多細胞高等生物群をはるかにしのぐ環境適応能力を発揮する。例えば、氷点下の南極海や100℃を越える熱水鉱床からも微生物は見つかっている。そこで本研究では微生物の強靱な代謝能力に注目し、CO<sub>2</sub>や有害炭化水素類の固定分解など地球環境修復技術に利用可能な特殊環境微生物を広く探索し、その可能性について探ることを目的とした。

## 4 【研究の内容】

対象とする特殊環境として多くの環境汚染物質の生成と深い関係にある油田環境を選び、国内外の油田から100種類以上の微生物を分離した。その中で先ず炭化水素類の嫌気分解能力及び地球温暖化の原因物質であるCO<sub>2</sub>から石油成分(アルカン)を生産する能力を有する新属細菌HD-1を取得し、その代謝機構について検討した。また、CO<sub>2</sub>固定に関するその他の微生物反応の特徴について解析した。一方、寒冷地帯の低温油田あるいは深部地下高温油田の微生物生態系について調査し、従来の常温微生物では不可能な環境下における石油分解など新しい地球環境修復技術開発に貢献する可能性について検討した。

## 5 【主要な成果】

- (1) HD-1のCO<sub>2</sub>固定経路について検討した結果、本微生物には分子量100kDaを越えるbiotin依存型carboxylaseが複数種類存在することが判明した。このような大きさの酵素は原核生物では初めてである。これらのうち120kDa酵素にはacetyl-CoA carboxylase活性が認められ、HD-1が3-hydroxypropionic acid経路によりCO<sub>2</sub>を固定している可能性が示唆された。
- (2) HD-1のアルカン合成反応において供給律速になるH<sub>2</sub>をポルフィリン抗体酵素／ヒドロゲナーゼシステムを使って生成できることを示した。
- (3) 地下2000mから分離した高度好熱油田細菌を使って常温菌では分解の難しい高分子量炭化水素を70℃の高温で分解できることを示した。さらにその炭化水素代謝経路が細菌型ではなく真核生物型であったことから、本細菌が石油分解酵母の起源に関与する可能性が示唆された。
- (4) 超好熱始原菌内に新型のRibulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) が存在することを発見した。本酵素は(L2)5というこれまでにはない五角形十量体構造であり、従来のRubiscoと比べてはるかに高いcarboxylase活性を有していることを見出した。

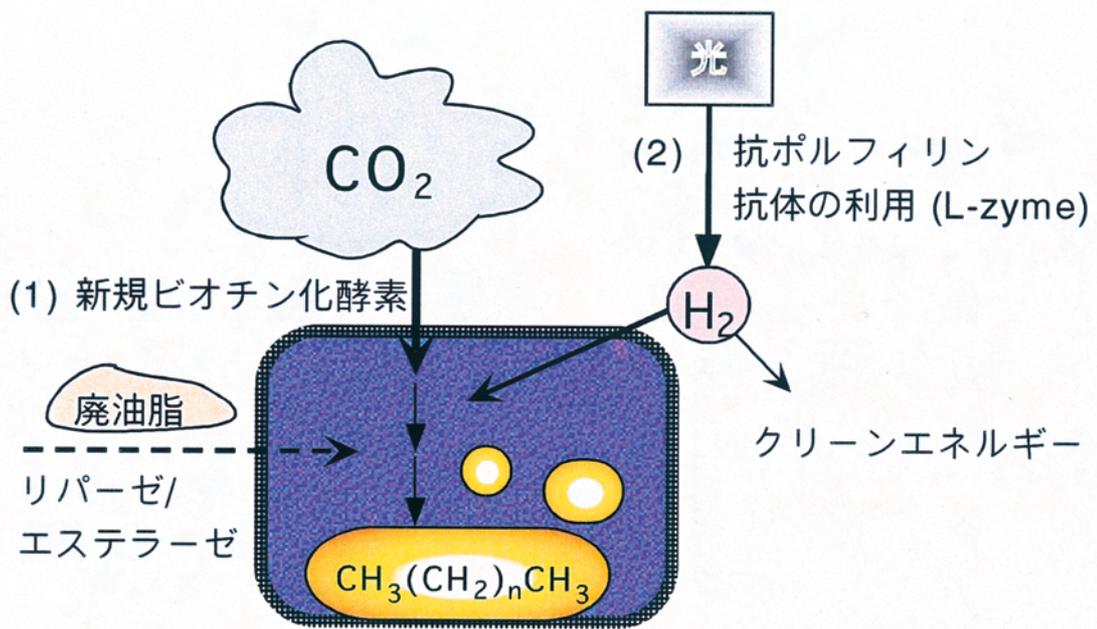


図1 アルカン合成細菌HD-1によるCO<sub>2</sub>再資源化

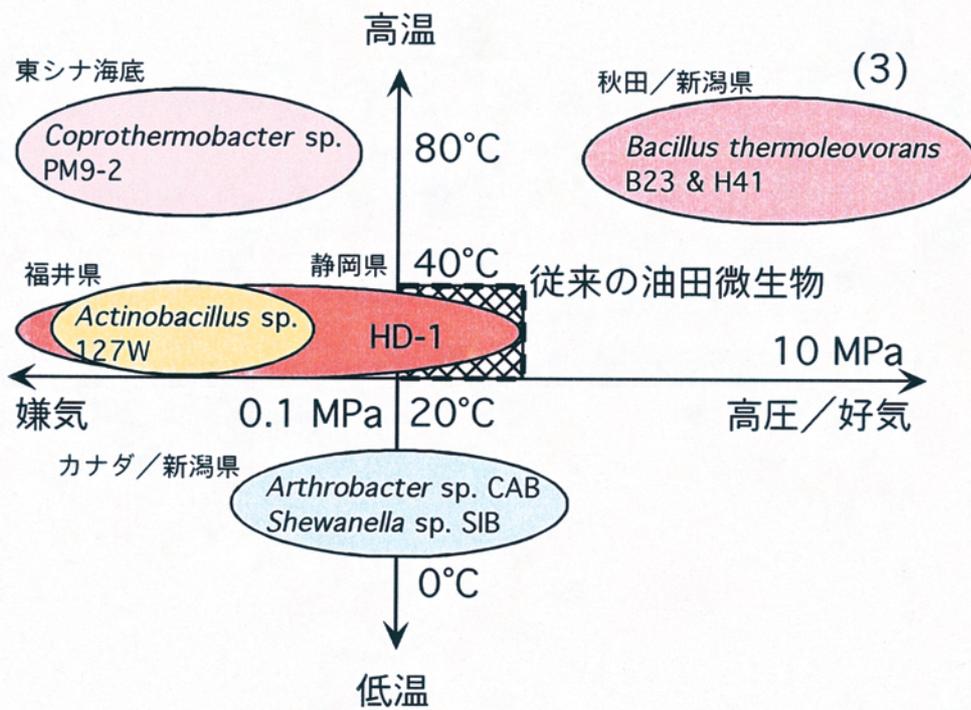


図2 多様な油田微生物

## 1 【研究課題名】

# 宿主決定の分子機構：植物マイコプラズマの遺伝子発現・制御メカニズム



Shigetou Namba

## 2 【研究項目及び実施体制】 (◎は総括研究代表者)

- ① 植物マイコプラズマの宿主決定の分子機構  
(◎難波成任／東京大学大学院新領域創成科学研究科)
- ② 植物マイコプラズマの組織化学的解析による植物及び昆虫宿主特異性決定の生物学的解明  
(土崎常男／財鯉淵学園)



Tsuneo Tsuchizaki

## 3 【研究の目的】

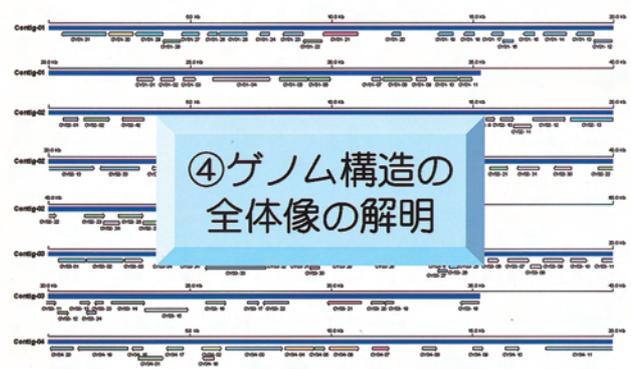
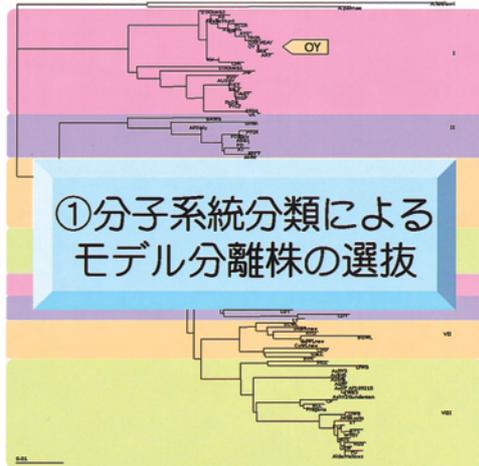
植物マイコプラズマは1967年に世界で最初に我が国で発見された植物病原微生物で、内外を問わず農業生産上きわめて甚大な被害を生じている。しかし、培養に成功していないことから研究が遅れ、遺伝子レベルでの究明は全く行われておらず、本微生物の早急な特性解明と耐性組換え戦略の構築が切望されている。本研究では、植物マイコプラズマのDNAとその遺伝子の機能を解析し、宿主決定に関わる遺伝子の発現・制御機構を調べるとともに、その進化的起源に迫る。また耐性植物の構築戦略を模索する。

## 4 【研究の内容】

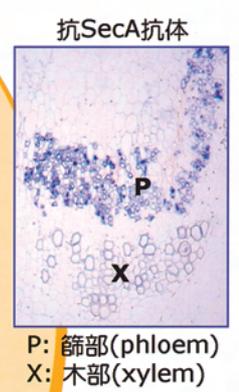
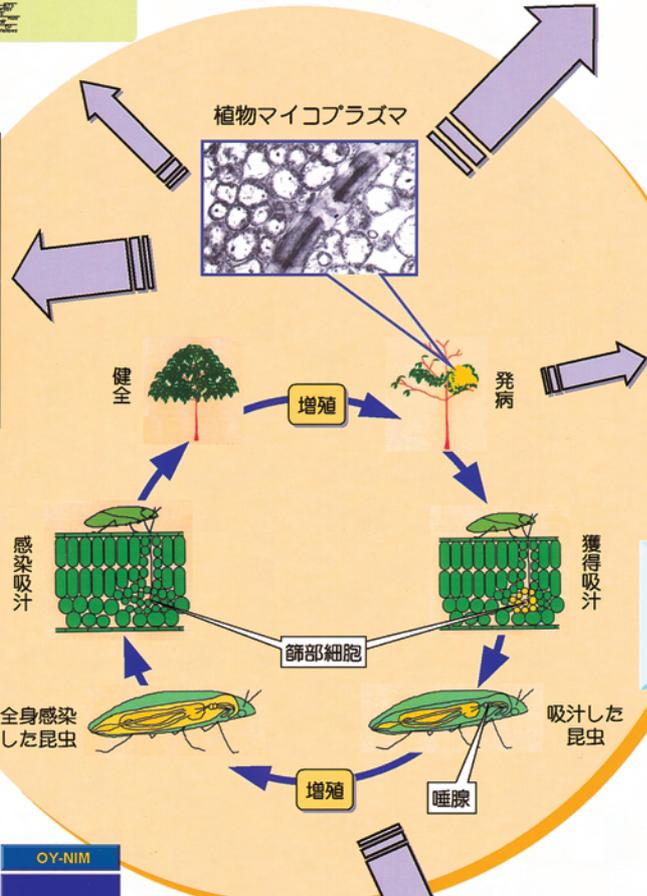
①植物マイコプラズマの分子系統分類により、モデル分離株を確立し、②植物・昆虫の宿主特異性や病原性に関わる種々の変異株を作出・分離し、その生物学的な解析を行った。③また、それらに特異的な遺伝子発現を解析した。④さらに、ゲノムや⑤染色体外DNAの構造解析を進め、⑥宿主決定に関わるメカニズムを分子レベルで解析した。以上の成果をもとに、耐性植物開発に向けた基盤的知見を得た。

## 5 【主要な成果】

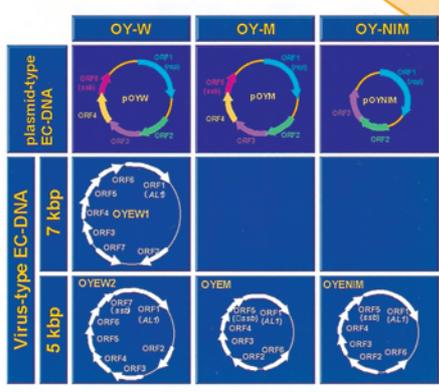
植物マイコプラズマのモデル（野生）株（*Phytoplasma asteri*）の宿主特異性・病原性に関する各種変異株を用いて研究を行った。野性株・変異株よりウイルス型複製酵素を持った染色体外DNAと、キメラ型複製酵素を持ったプラスミド（viromid）を見出し、それらの構造を比較解析した結果、宿主特異性・病原性の変異に伴う欠失・組換え等を見出した。これらのDNAは、植物細胞内において高レベルで発現する。また、約1 Mbaseのゲノム構造の解析を進めた。植物マイコプラズマは様々な基質を宿主細胞に依存しながら、最小の代謝系を維持しつつ進化を遂げ、ゲノムがコンパクト化する過程で、特徴的な遺伝子構成を築いてきたと思われる。これらの遺伝子データに基づき、植物マイコプラズマの各変異株において特異的に発現する遺伝子群の宿主細胞における発現解析を行った。また、宿主特異性の解析を進めた。昆虫宿主特異性は、植物マイコプラズマの昆虫細胞内における増殖能の可否によるのではなく、消化器官から昆虫細胞内への侵入の可否による。一方、植物宿主特異性は主に保毒昆虫の唾腺細胞から植物篩部細胞へ侵入した植物マイコプラズマの細胞内における増殖の可否による。また、全ての植物マイコプラズマに適用可能な検出診断系を確立した。以上の成果をもとに、耐性組換え戦略の基盤を構築した。



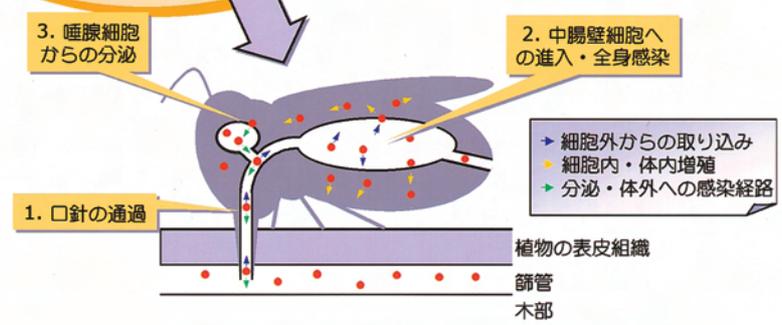
②変異株の作出



③遺伝子発現解析



⑤変異形質関連遺伝子の解析



⑥昆虫における宿主特異性の決定機構モデル

## 1 【研究課題名】

### 植物病原菌類における多剤耐性の分子機構の解明



Tadaaki Hibi

## 2 【研究項目及び実施体制】 (◎は総括研究代表者)

- ① 植物病原菌類における多剤耐性遺伝子の発現機構の解明  
(◎日比忠明／東京大学大学院農学生命科学研究科)
- ② 植物病原菌類における薬剤耐性誘発因子の作用機構の解明 (阿久津克己／茨城大学農学部)



Katsumi Akutsu

## 3 【研究の目的】

現在、農業の現場では、選択性の高い殺菌剤の普及に伴ってこれら薬剤に対する耐性菌の出現が問題となっており、これに対処する新たな戦略の構築が求められている。そのためには、まず、薬剤耐性の分子機構の解明を急ぐ必要がある。ヒトのがん細胞や酵母では、ABCトランスポーターをコードする多剤耐性遺伝子が化学構造や作用機構の異なる各種薬剤に対する多剤耐性に関与していることが知られている。そこで、カンキツ緑かび病菌のDMI剤耐性など、植物病原菌類の薬剤耐性における多剤耐性遺伝子の関与について解析することにした。一方、灰色かび病菌のジカルポキシイミド系薬剤耐性が耐性菌由来の低分子物質によって誘発されることを見いだしたことから、この薬剤耐性誘発因子の構造とその誘発機構についても解析し、耐性菌出現のメカニズムを解明することにした。

## 4 【研究の内容】

各種植物病原菌類における多剤耐性遺伝子の存在を確認した後、本遺伝子を単離して構造を解析するとともに、遺伝子破壊実験と薬剤による発現誘導実験によって薬剤耐性への関与を明らかにする。さらに、カンキツ緑かび病菌のDMI剤耐性の分子機構を解明する。一方、灰色かび病菌の薬剤耐性誘発因子を単離・精製して、その構造と耐性誘発機構を解析する。また、植物体上における本菌とその同属異種菌との間での耐性誘発を検証する。

## 5 【主要な成果】

- ① カンキツ緑かび病菌をはじめ、各種の植物病原菌にABCトランスポーター遺伝子群（多剤耐性遺伝子群）が存在することを明らかにした後、その遺伝子破壊実験の結果から、この遺伝子群が各種薬剤の菌体外への排出を分担しており、菌類の薬剤耐性に必須の基本的な遺伝子であることを証明した。植物病原菌類では最初の報告である。
- ② カンキツ緑かび病菌のDMI剤耐性の主因は、この薬剤の標的酵素であるデメチラーゼ遺伝子が、その上流に存在している重複エンハンサー配列の転写促進作用によって過剰発現していることによることを証明した。植物病原菌類ではこれまでに報告例のない新たな耐性機構である。
- ③ 灰色かび病菌の薬剤耐性誘発因子を単離・精製してその構造を解析した結果、この本体がcAMPであることを証明するとともに、cAMPによって本菌のトランスポゾンBotyが活性化され転位することによって耐性が誘発されるという可能性を示唆するデータを得た。また、自然界においても実際に耐性菌が分泌するcAMPによって耐性誘発現象が起こっている可能性が示唆された。従来、報告例のない新たな耐性誘発機構であると考えられる。

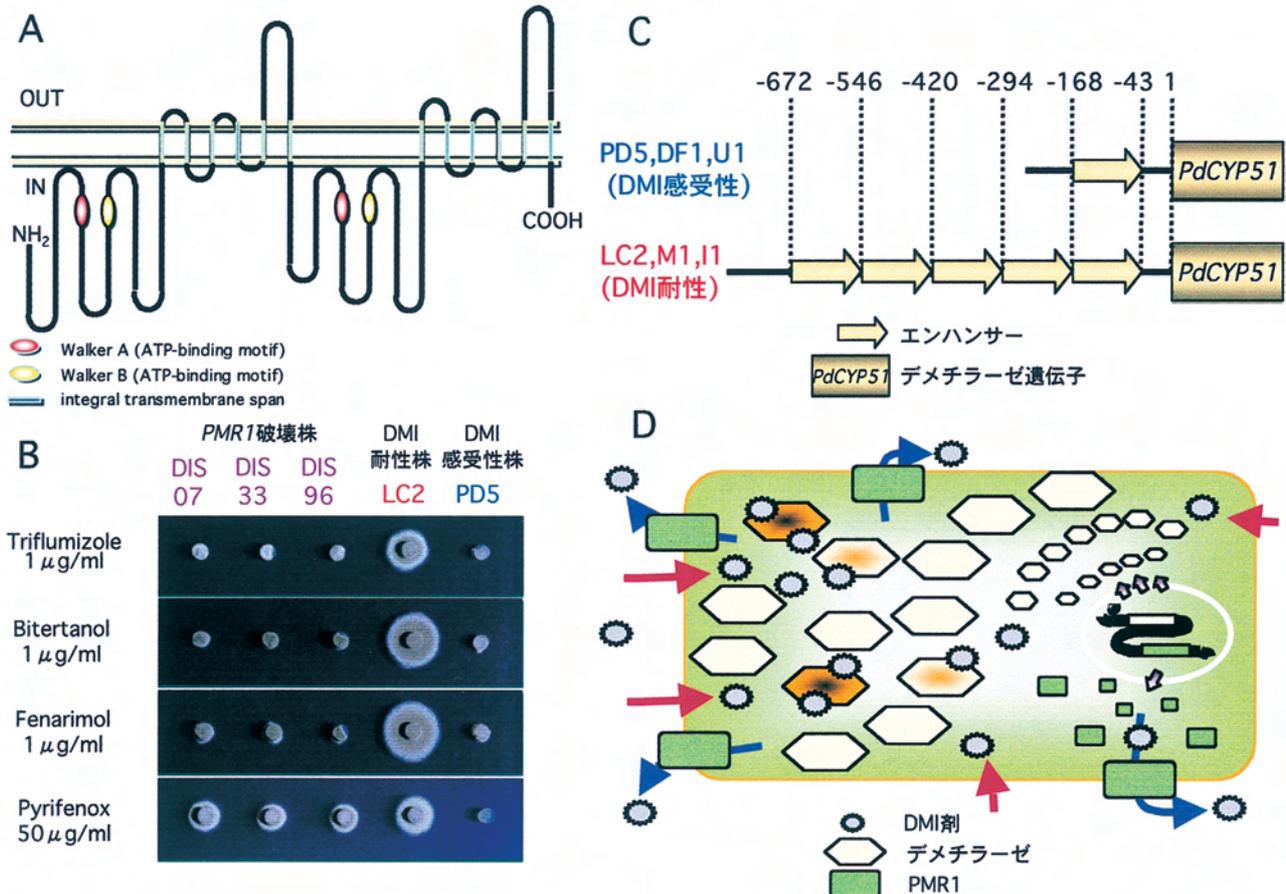


図1 カンキツ緑かび病菌のABCトランスポーター遺伝子とDMI剤耐性機構  
DMI剤の排出を担っているABCトランスポーター PMR1の推定構造(A)とその遺伝子破壊実験(B)。  
重複エンハンサー配列(C)と標的酵素遺伝子の過剰発現によるDMI剤耐性機構(D)。

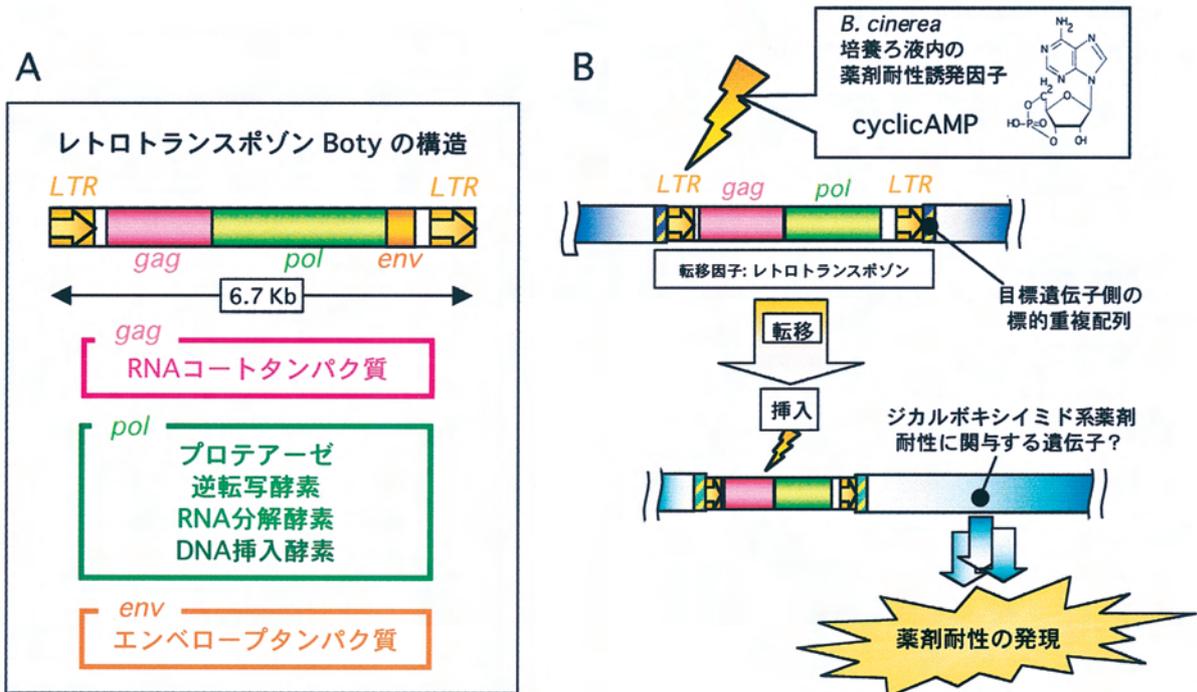


図2 灰色かび病菌培養ろ液中に存在する耐性誘発因子cAMPによる耐性誘発機構に関する仮説  
培養ろ液中に存在するcAMPが灰色かび病菌のレトロトランスポゾンBoty(A)の転移を活性化し、移転先のジカルボキシイミド系薬剤耐性に関する遺伝子を活性化する(B)。

## 1 【研究課題名】

### 乾燥・塩ストレス耐性の分子機構の解明と分子育種への応用



Kazuko Shinozaki

## 2 【研究項目及び実施体制】 (◎は総括研究代表者)

- ① 乾燥・塩ストレス耐性機構の分子生物学的解析と育種への利用  
(◎篠崎和子／農林水産省国際農林水産業研究センター)
- ② 乾燥・塩ストレス耐性機構の分子遺伝学的解析 (篠崎一雄／理化学研究所)



Kazuo Shinozaki

## 3 【研究の目的】

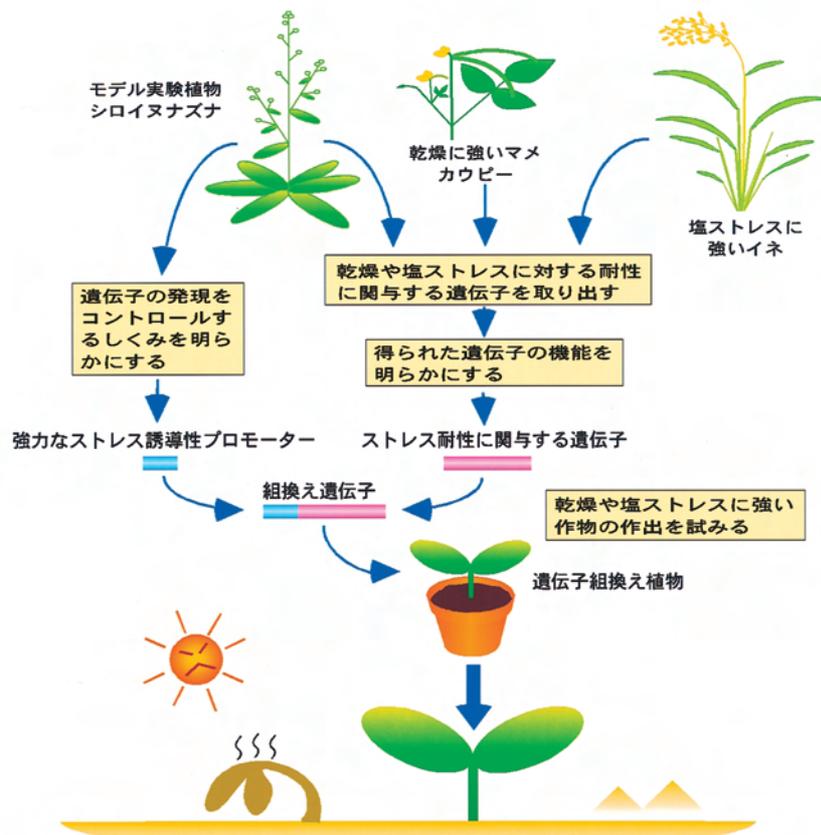
近年土壌の塩類化、砂漠化等地球規模の環境劣化が深刻化している。また、異常気象は世界各地で農業生産に大被害を及ぼしている。しかし、乾燥、塩害等の環境劣化に対する耐性作物の分子育種は、その耐性を獲得するための分子機構が複雑なため、研究開発が遅れている。そこで、植物の持つ乾燥や塩ストレスに対する耐性機構を分子レベルで明らかにして、環境劣悪地に対応できる環境耐性作物の分子育種のための基礎研究を行う。

## 4 【研究の内容】

本研究では分子生物学的、分子遺伝学的に優れた特質を持つモデル実験植物であるシロイヌナズナを中心に、乾燥や塩ストレス耐性に関与する機能遺伝子群とその調節遺伝子群を分子生物学的方法や分子遺伝学的方法を用いて可能な限り単離する。その機能を生化学的手法や分子生物学的解析法やゲノム科学的手法を用いて明らかにする。また、ストレス時に効率良く遺伝子の発現を制御するプロモーターを開発する。さらに、得られた有用遺伝子やプロモーターを組み合わせることで植物に導入し、これまで困難とされてきた地球環境劣化に対応できる植物の開発に向けた基礎研究を行う。

## 5 【主要な成果】

- ① モデル実験植物であるアラビドプシス、乾燥耐性なマメ科作物であるカウピー、塩耐性のイネを用いて、乾燥・塩耐性の獲得に機能する種々の機能遺伝子やストレスに対する応答機構で働く調節遺伝子を単離してその機能を明らかにした。(Plant Cell 10, 1391, 1998; Plant Cell 11, 1743, 1998; PNAS 97, 11633, 2000)
- ② 4種の乾燥・塩ストレス誘導性プロモーターや再吸水応答性プロモーターを単離して、そのストレス応答性や再吸水応答性を明らかにした。
- ③ 乾燥・塩・低温ストレス誘導性遺伝子の発現を制御する転写因子の遺伝子と乾燥・塩ストレス誘導性プロモーターとを組み合わせることで植物に導入することにより、高レベルの乾燥・塩・凍結耐性植物の作出に成功した。(Nature Biotechnology 17, 287, 1999; Plant Cell in press 2000)
- ④ 種々の植物で同様な乾燥や塩ストレスに対する耐性機構が機能していることを明らかにした。



遺伝子組換えで開発した乾燥や塩ストレスに強い作物の  
利用により食糧問題や地球の砂漠化問題を解決する！

図1 乾燥，塩ストレス耐性の分子機構の解明と分子育種への応用

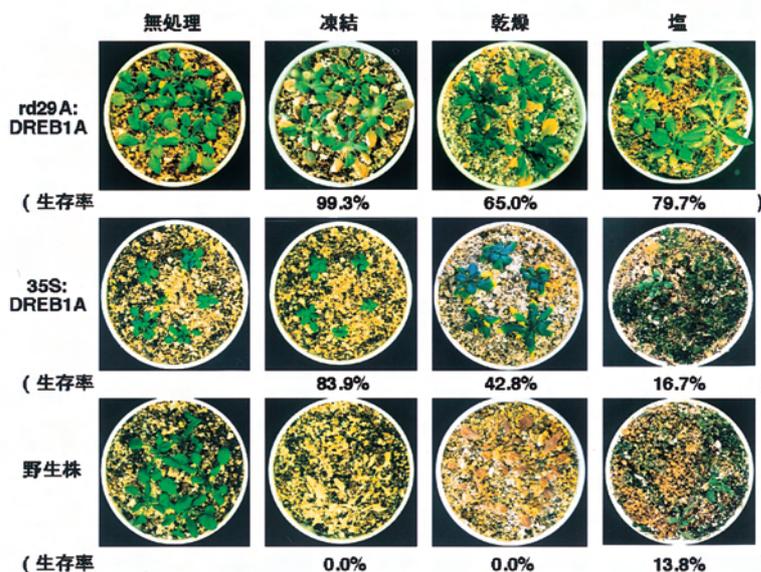


図2 DREB1A遺伝子を過剰発現させた遺伝子組換え体の乾燥・塩・凍結耐性

DREB1A cDNAをrd29Aプロモーター (rd29A : DREB1A) またはCaMV 35Sプロモーター (35S : DREB1A) と結合してシロイヌナズナに遺伝子導入した。得られた遺伝子組換え体を用いてストレス処理を行った。凍結処理：-6℃で2日間凍結させた。乾燥処理：2週間給水を止めた。塩処理：海水と同じ濃度の食塩水 (600mM NaCl) に2時間漬けた。

## 1 【研究課題名】

### 植物の遺伝子発現の光スイッチング機構の解明と応用



Masaki Furuya

## 2 【研究項目及び実施体制】（◎は総括研究代表者）

- ① フィトクロム分子種特異的な光スイッチ機構の解明と応用  
(◎古谷雅樹／(株)日立製作所基礎研究所)
- ② イネフィトクロム機能の解明と応用 (高野 誠／農林水産省農業生物資源研究所)
- ③ 光シグナルの長距離伝達系の研究 (長谷あきら／京都大学大学院理学研究科)



Makoto Takano

## 3 【研究の目的】

植物は幾つかの光リセプター群によって環境の光情報を捕獲しているが、そのなかでフィトクロムが最も主要な働きをしている。本研究は、「フィトクロム」がどのような仕組みによって光情報を捕獲し、遺伝子の発現を制御しているか、その分子機構を解明し、その成果を踏まえて植物の発育や生殖を「光シグナル」の利用によって制御することを目的としている。



Akira Nagatani

## 4 【研究の内容】

本研究では、モデル植物としてアラビドプシスとイネを選び、複数の光リセプターが手分けをして環境情報を捕獲しシグナルを伝達する分子機構(図)をフィトクロム分子種欠損変異種を使って解析し、光リセプターから下流に発信されるシグナルによって制御される「遺伝子発現制御」の仕組みを分子生物学と細胞生物学の手法を使って明らかにした。

## 5 【主要な成果】

- ① 色素蛋白フィトクロムA, B, Cが全く異なる幾つかの仕組みで光を捕らえる機構を、それぞれの分子種欠損変異種を利用して、作用スペクトルを測ることにより発見した(PNAS 1996)。フィトクロムBは赤色光と近赤外光により可逆的にON/OFF反応のスイッチを切り替えるが、フィトクロムAは近紫外・可視・近赤外域の極微弱光による引き金反応と近赤外光と青色光による高エネルギー反応を制御している(図)。
- ② 暗所で育った植物の凍結切片を免疫組織化学的に調べると、フィトクロムAもBも特定のオルガネラには含まれず細胞質に溶けて存在している。しかし、細胞が光を受けると、フィトクロムAは数分のうちに、フィトクロムBは数時間をかけて、細胞質から核へ移行する(J Cell Biol 1999, Pl Cell 2000)。
- ③ 遺伝子組み替えの手法を用いて造ったフィトクロムのアポ蛋白に、有機化学的に合成した種々のテトラピロール誘導体を結合させて、人工フィトクロムをつくり、光可逆的吸収変化を調べた結果、各ピロール環がそれぞれ異なる働きをフィトクロム分子の光学活性に果たしていることを発見した(PNAS 2001)。
- ④ 酵母two-hybrid法を使って、フィトクロムAとBの分子と直接に反応して下流へ信号を伝える蛋白PIM1とPIM2を単離・固定し、これらの蛋白を欠く変異種の解析を行って、シグナル伝達経路を調べた。
- ⑤ 蛍光ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いて、ゲノム内の遺伝子の発現を大規模に検索する方法を開発して、フィトクロムAあるいはBに依存して発現する遺伝子の大規模検索を行って、初期応答遺伝子および遅延応答遺伝子を単離・同定した。その結果、フィトクロムAとBは光捕獲の機構や核移行の過程が全く異なるにも関わらず、それぞれが引き起こす遺伝子発現調節は分子種特異的な場合はごく少なく、相補的であった。

6 【研究のイメージ】

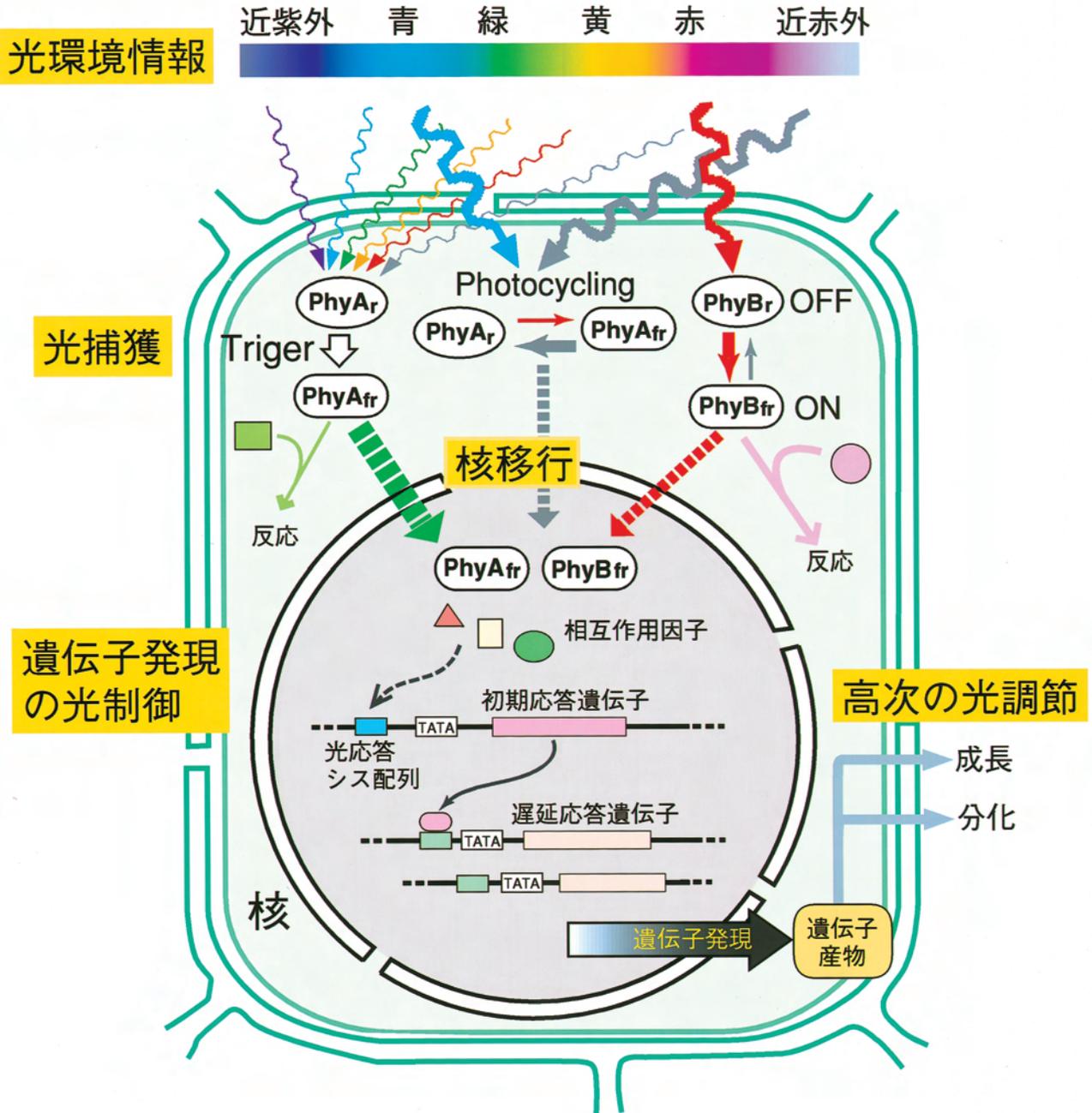


図 遺伝子発現の光スイッチング機構

## 1 【研究課題名】

### 光過剰による光合成抑制機構の解明と遺伝子導入による回避システムの開発



Mitsue Tokutomi

## 2 【研究項目及び実施体制】 (◎は総括研究代表者)

- ① 光合成効率の低下要因の解明と遺伝子導入による光合成効率の改良  
(◎徳富光恵／農林水産省農業生物資源研究所)
- ② C3植物へのC4光合成回路の付与 (松岡 信／名古屋大学生物分子応答研究センター)
- ③ 遺伝子導入による芝草の光合成機能と環境ストレス耐性の向上  
(趙 徹／株式会社ジェイツー)



Makoto Matsuoka

## 3 【研究の目的】

光合成にとって現在の地球環境は光が過剰な状態であり、植物の光合成効率は恒常的に抑制されている。本研究は、遺伝子導入技術を用いて、光過剰による光合成抑制を回避するシステムを植物に導入し、植物の光合成機能・物質生産能の改良を図ることを目的としている。



Tetsu Cho

## 4 【研究の内容】

エネルギーアイドリングシステムの導入と解析 (C3植物へのC4光合成回路の付与)：光過剰で生じる過剰なATPを消去し過エネルギー状態の解消を図るため、C3植物であるイネおよびベントグラスにC4光合成回路を付与する。

蛋白質リサイクリングシステムの導入と解析：光過剰で引き起こされる蛋白質の損傷を修復するため、葉緑体内で作用する分子シャペロンを導入する。

分解産物スカベンジングシステムの導入と解析：損傷を受けた蛋白質や色素などを除去するためのシステムを開発する。

## 5 【主要な成果】

- ① C3植物であるイネにC4植物であるトウモロコシのC4光合成酵素PEPC遺伝子を導入し、イネ内でPEPC蛋白質をトウモロコシ並に高発現させることに初めて成功した (*Nature Biotech.* 17: 76, 1999)。この知見を元に、イネおよびベントグラスにおいて、C4光合成回路の構成に必要な複数のC4光合成酵素を高発現させることが可能となった。
- ② C4光合成酵素遺伝子の進化のメカニズムの解析をおこない、C4光合成遺伝子の発現強度と発現の細胞種特異性を統一的に理解するモデルを提出した。
- ③ 光合成の場である葉緑体内で分子シャペロン蛋白質 (葉緑体局在性低分子量熱ショック蛋白質) を構成的に発現させることにより、植物の光酸化ストレス耐性が改良されることを明らかにした。

6

【研究のイメージ】

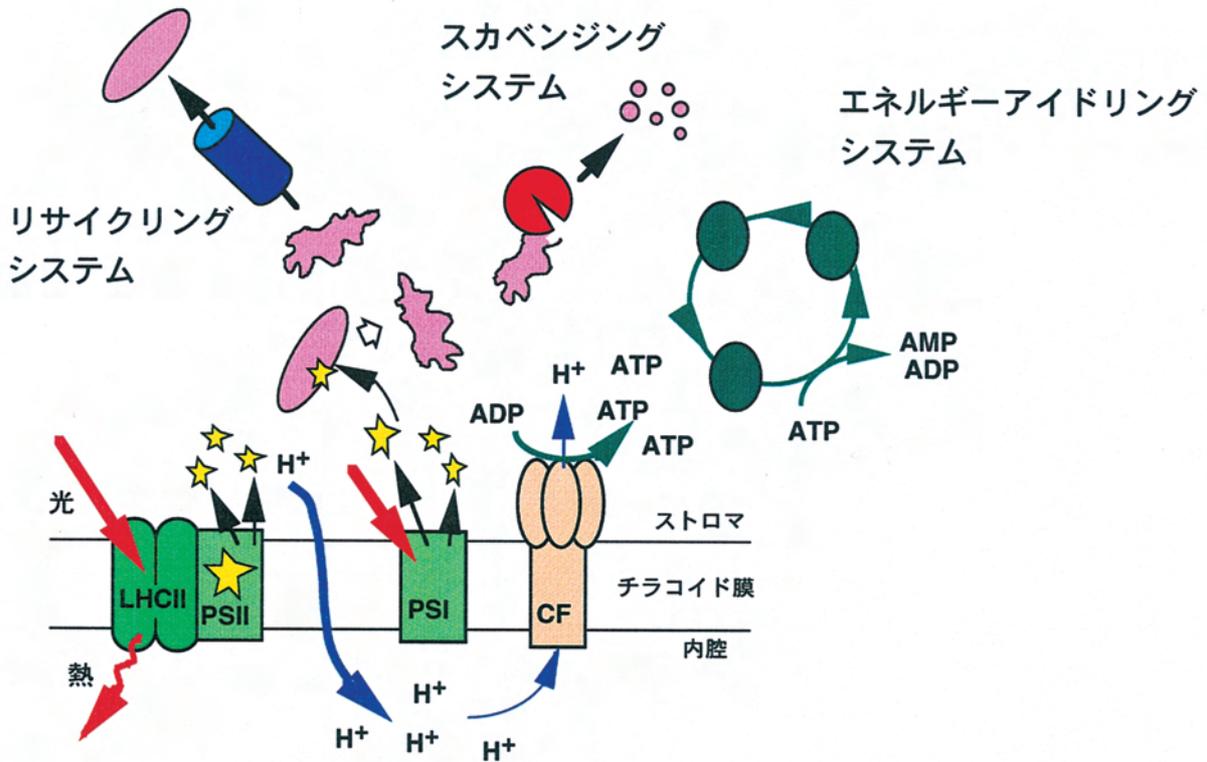


図1 光過剰条件下の葉緑体内で起こる諸現象と導入する回避システム

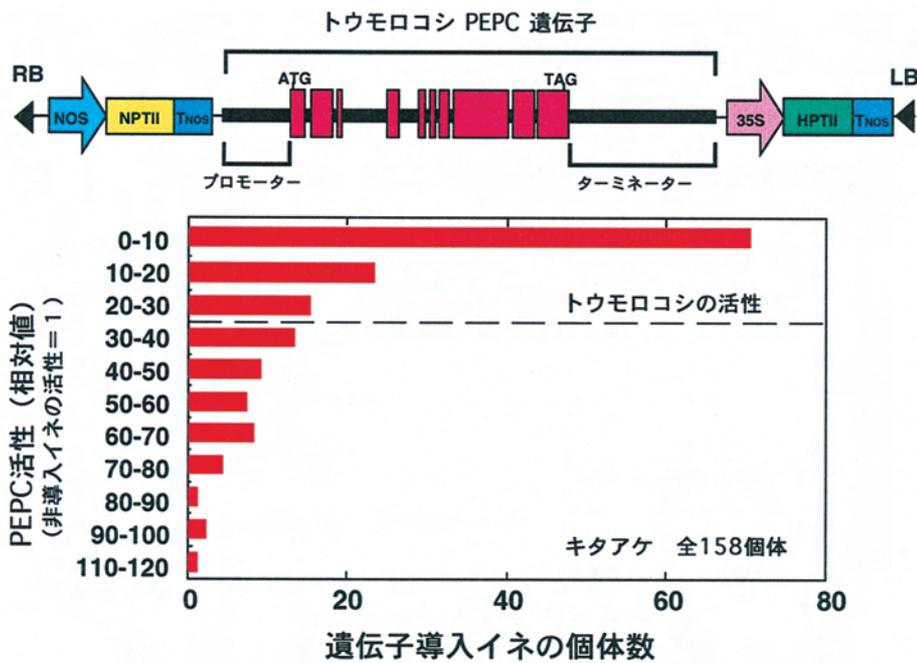


図2 トウモロコシPEPC遺伝子の導入によるPEPCの高発現  
 (上図) 導入したトウモロコシPEPC遺伝子  
 (下図) 形質転換イネ (遺伝子導入当代) 緑葉のPEPC活性

## 1 【研究課題名】

### ペプチド性植物増殖因子に関する基礎的研究



Yoji Sakagami

## 2 【研究項目及び実施体制】 (◎は総括研究代表者)

- ① ペプチド性植物増殖因子に関する生物有機化学的研究  
(◎坂神洋次／名古屋大学大学院生命農学研究科)
- ② ペプチド性植物増殖因子に関する生理学的研究 (鎌田 博／筑波大学生物科学系)



Hiroshi Kamada

## 3 【研究の目的】

ペプチド性の因子は生物界において主要な信号物質であるが、高等植物ではペプチド性の信号物質は1990年代まで知られていなかった。研究代表者らは世界に先駆けて、ペプチド性植物増殖因子ファイトスルフォカイン (PSK) を発見し、その化学構造を明らかにするとともに化学合成にも成功した。本研究はPSKの生合成、受容体、生理作用などを解明することを目的としている。

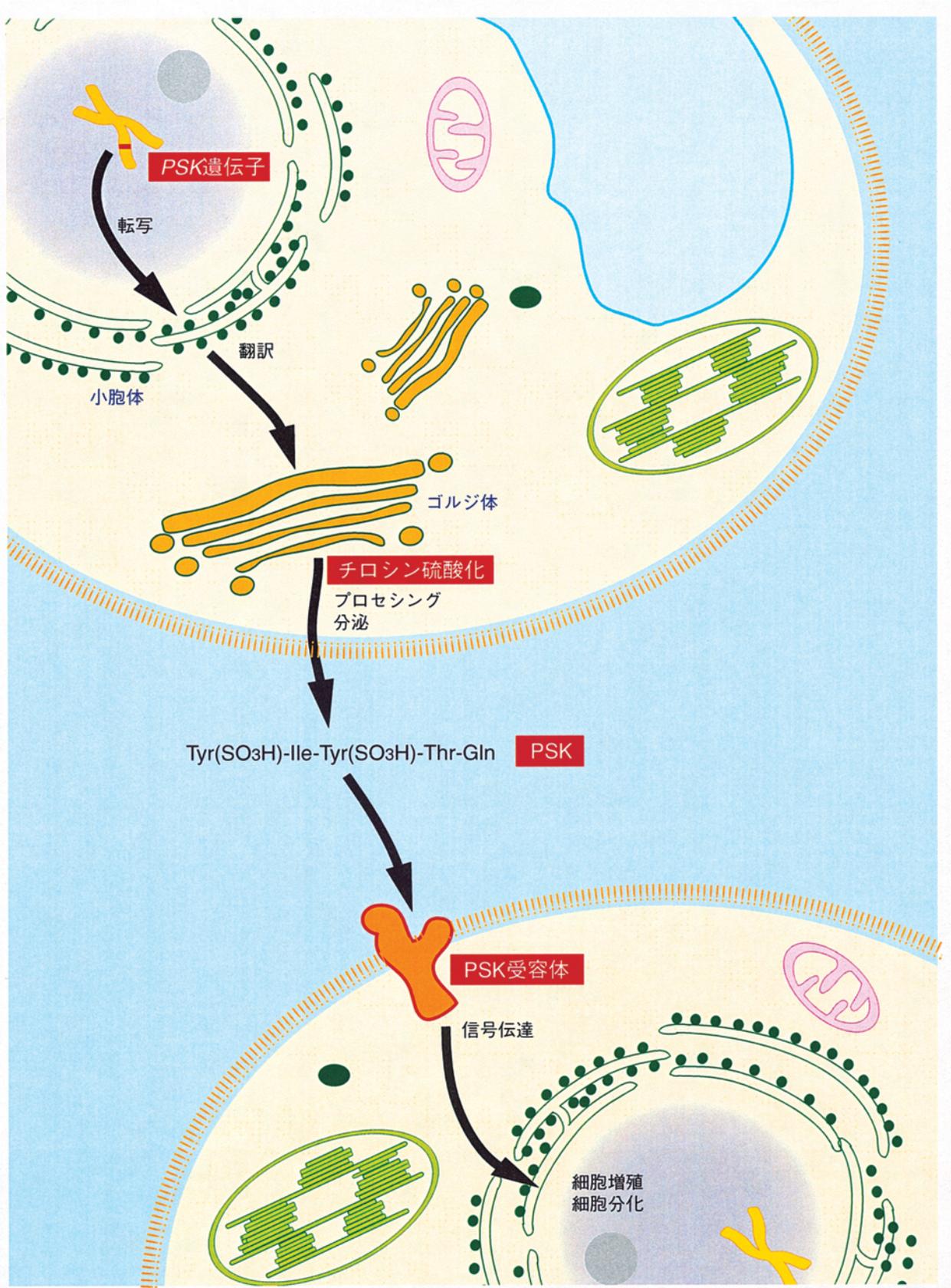
## 4 【研究の内容】

PSKは、硫酸化されたチロシン2残基を含むアミノ酸5残基からなるペプチドで、植物培養細胞の増殖を低濃度で促進する。PSKをコードする遺伝子をクローニングし、さらに植物としては初めてのチロシン硫酸化の機構の解明を目指す。PSKは哺乳動物の増殖因子と同様に細胞膜上に特異的な受容体が存在し、受容体を介しての信号伝達が想定されるので、まずPSKに特異的な結合部位を検証し、結合タンパク質を精製し、その構造と機能の解明を目指す。PSKの植物界における分布を調査し、その生理作用を検討して生物生産への応用の基礎を築く。

## 5 【主要な成果】

- ① イネ、トウモロコシなどの単子葉植物とニンジン、シロイヌナズナなどの双子葉植物の細胞培養液上清を調査した結果、ほぼ全ての植物がPSKを生産していることが判明した。培養細胞系におけるPSKの生理作用として、アスパラガス、イネ、ヒヤクニチソウの細胞分裂促進、ヒヤクニチソウ細胞の仮導管分化促進、ニンジン細胞の不定胚形成促進、植物個体を用いた系では、キュウリの芽生えにおけるクロロフィル合成促進と不定根形成促進、シロイヌナズナにおける夜間高温耐性の促進など多彩な生理作用が明らかになった。
- ② PSKを多量に生産しているイネO<sub>3</sub>細胞のcDNAライブラリーよりPSK前駆体遺伝子O<sub>3</sub>PSKをクローニングすることに成功した。O<sub>3</sub>PSKは89アミノ酸をコードしており、N末端の22アミノ酸はシグナルペプチドと考えられ、PSKはC末端付近に1個がコードされていて、その前後はチロシンの硫酸化に重要と考えられる酸性アミノ酸に富んでいる。O<sub>3</sub>PSKをセンス方向に組み込んだO<sub>3</sub>細胞は増殖が盛んになり、アンチ方向のものはほとんど増殖しなくなった。またO<sub>3</sub>PSKのゲノム解析から、1個のイントロンが存在することを明らかにし、プロモータ領域の解析も行った。さらにチロシン硫酸化酵素について、部分精製を行ないその性質について明らかにした。
- ③ PSKは動物の増殖因子のように受容体を介してその生理作用を発現すると考え、PSKに放射性同位体を導入して、細胞及び細胞膜成分に特異的結合部位が存在することを明らかにした。イネO<sub>3</sub>細胞の場合は高低二種の親和性結合部位が検出され、光アフィニティーラベルにより高親和性タンパクは2種あることが判明した。ニンジン細胞では120, 150kDの2種の高親和性結合部位が検出され、これらのタンパクを精製し、部分アミノ酸配列を明らかにしている。

## PSKの生産および受容体を介した信号伝達のメカニズム



PSK前駆体遺伝子から転写、翻訳により生産されるPSK前駆体タンパク質は、ゴルジ体に存在するチロシン硫酸化酵素によって硫酸化され、さらにプロセッシングを経て細胞外に成熟PSKとして分泌される。このPSKは、細胞膜上に存在する特異的受容体を介して細胞内にシグナルを伝達し、細胞増殖や細胞分化などを誘導する。

## 1 【研究課題名】

### 森林生態系における共生関係の解明と共生機能の高度利用のための基礎研究



Taizo Hogetsu

## 2 【研究項目及び実施体制】 (◎は総括研究代表者)

- ① 森林生態系における共生関係の解明  
(宝月岱造／東京大学アジア生物資源環境研究センター)
- ② 共生機能と環境ストレス耐性機能の解明 (丹下 健／東京大学大学院農学生命科学研究科)
- ③ 共生機能利用によるマツ林の活用技術の開発  
(◎鈴木和夫／東京大学大学院農学生命科学研究科)



Takeshi Tange

## 3 【研究の目的】

森林生態系の維持機構には植物と微生物の生物間相互の共生関係が重要な役割を果たしていると考えられているが、その詳細は明らかでない。そこで、現在世界的に衰退現象が問題とされるマツ林について、樹木-外生菌根菌共生系の生理・生態的性質を明らかにするとともに、共生関係を利用した樹木の環境ストレス耐性機能についての検討やマツタケなどの外生菌根菌栽培技術の開発に寄与することを目的とする。



Kazuo Suzuki

## 4 【研究の内容】

樹木-外生菌根菌共生系がもつ機能について、人工的な菌根形成実験系・平箱実験系を用いて、オートラジオグラフィーなどの実験手法によって、外生菌根共生系の生理学的特徴を明らかにするとともに、DNA多型解析によって菌根菌の繁殖様式について解析する。外生菌根形成による環境耐性獲得機能について、大気二酸化炭素濃度の上昇と土壌の酸性化に焦点をあてて、不可給態リン酸の吸収能とアルミニウム過剰耐性の獲得との関係を明らかにし、共生機能が環境ストレス耐性に及ぼす影響を評価する。マツタケなど外生菌根菌による共生現象の構造と機能について微細構造から、遺伝的性質をDNA多型解析から明らかにし、また、マツタケなど外生菌根菌の人工菌根合成法、マツタケ人工シロ誘導法、マツタケの定着技術の開発などを行う。

## 5 【主要な成果】

- ① 定量的経時オートラジオグラフィーの適用により、宿主から菌根菌への<sup>14</sup>C-光合成産物の移動を解析した。<sup>14</sup>C-光合成産物の移動については、菌糸を通した樹木間の移動の有無が近年問題になっているが、本研究からそれがないことを明確に示した。
- ② 菌根菌の繁殖特性を明らかにするために、マイクロサテライトDNA多型解析法及びITS多型解析法にいくつか改良を加え、菌根菌個体群のジーンフロー、地下部菌根菌集団の存在状態を遺伝的に明らかにした。
- ③ 樹木の根のアルミニウム害を緩和する有機酸の分泌は、アカマツの外生菌根で誘導されるという菌根形成によるアカマツの耐性獲得機構を明らかにした。
- ④ いままでアカマツとの共生機能が不明とされたマツタケの菌根内における微細構造と生理的機能の詳細を明らかにし、マツタケは典型的な菌根菌であることを明らかにした。
- ⑤ マツタケ菌根の迅速人工合成法 (特願平11-357439号) 及びマツタケの人工シロ誘導法 (特許出願中) を確立した。今後、半自然及び野外アカマツ林でのマツタケの人工栽培への応用が期待される。



図1 研究のイメージ

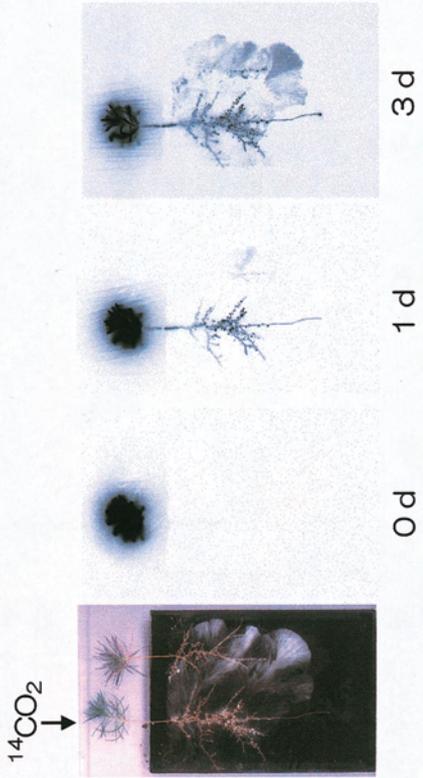


図2 アカマツ2個体間の菌根共生系 オートラジオオグラフが示す<sup>14</sup>Cの速やかな移動

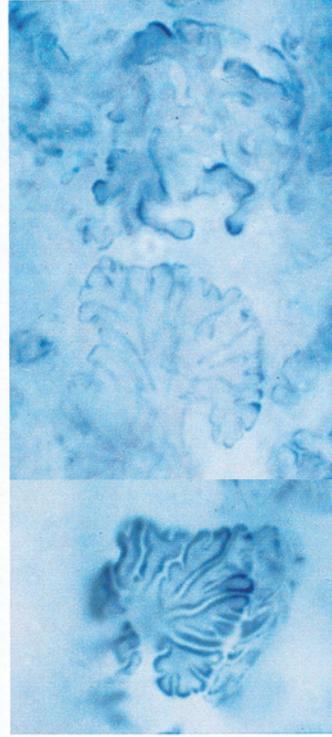


図3 典型的な外生菌根を形成するマツタケ arrowhead, flat-fan, open-fanなどの様々な形態を示す扇状のハルテイトヒネット

## 1 【研究課題名】

### 哺乳動物の高度に発達した薬物代謝機能を利用した環境負荷物質の代謝・分解技術の開発



Hideo Ohkawa

## 2 【研究項目及び実施体制】 (◎は総括研究代表者)

- ① 哺乳動物の薬物代謝酵素系を利用した環境負荷物質の代謝・分解に関する研究  
(◎大川秀郎／神戸大学農学部)
- ② 植物への薬物代謝遺伝子の導入と評価 (大川安信／農林水産省農業生物資源研究所)



Yasunobu Ohkawa

## 3 【研究の目的】

現在、「環境負荷化学物質」、即ち、環境中で安定で長期に残留して、生態系や人の健康に影響を及ぼすことが心配されている環境ホルモンや残留農薬などによる土壌、水質及び農産物などの汚染の拡大が心配されている。そこで、哺乳動物の高度に発達した薬物代謝酵素系を、その能力が未開発な植物に付与・発現して、環境負荷化学物質を代謝・分解する能力を高めた植物を作出し、それらの遺伝形質・環境安全性を評価して、農業環境浄化及び作物における農薬残留の低減に役立てる。

## 4 【研究の内容】

哺乳動物の肝臓には多くのチトクロームP450分子種 (P450またはCYP) が存在し、そのうち、ヒトの肝臓チトクロームP450の11分子種はP450依存性薬物代謝の90%以上に参与している。それらのうちから除草剤などを代謝・分解する分子種を選定して、選定した主要なP450遺伝子を発現するトランスジェニック・バレイショ、イネなどを作出し、それらが除草剤、環境ホルモンなどを代謝・分解する性能を評価する。さらに、それらの遺伝形質の安定性・環境安全性などを評価する。

一方、植物の薬物代謝酵素系についても比較検討する。

## 5 【主要な成果】

①肝臓のP450分子種のうち、除草剤の代謝・分解に係わる主要な7分子種のP450を選定し、②選定したP450分子種について、単独発現または複数同時発現した形質転換植物を作出して、③それらの除草剤代謝・耐性の性能を評価した。さらに、④環境ホルモンの代謝・分解に関しても評価した (特許出願)。また、⑤それらの次世代での安定発現、⑥環境安全性の確認試験などを実施した。

一方、⑦高等植物の異物代謝型P450遺伝子をシロイヌナズナ、タバコ、イネなどから取得した。それらのうち、⑧2, 4-D誘導型のタバコCYP71A11のプロモーターを用いて、それと緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子とを融合したレポーター遺伝子を発現するモニタリング用植物及びそれと薬物代謝型CYP2C19cDNAとを融合して発現した環境負荷物質代謝・分解用植物を作出した (特許出願)。

6

【研究のイメージ】

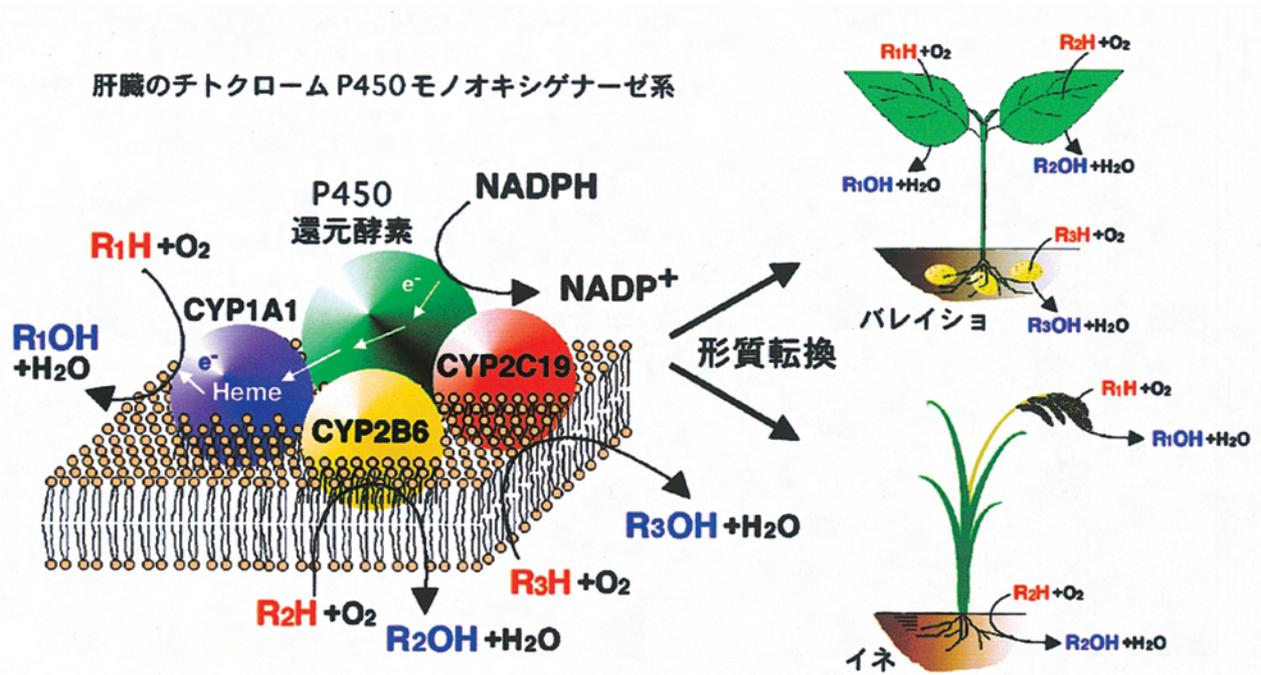


図1 哺乳動物の肝臓薬物代謝酵素を発現した環境負荷化学物質代謝・分解用トランスジェニック作物の作出・性能評価

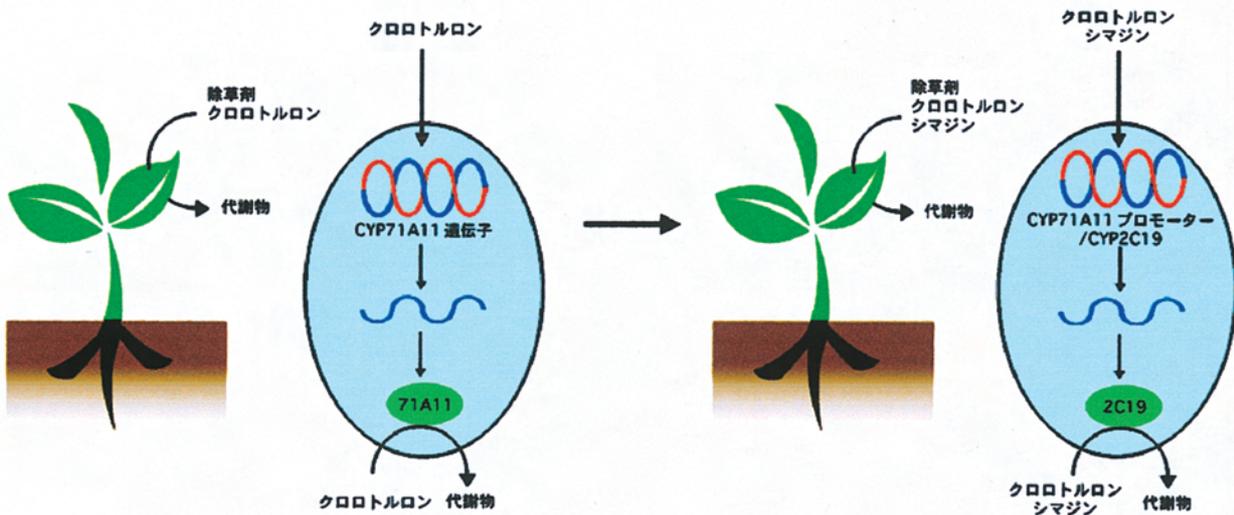


図2 植物の薬物代謝酵素遺伝子を利用した外来性異物代謝・分解用植物の作出

## 1

## 【研究課題名】

## 近赤外分光法による乳牛生体情報のオンラインモニタリング手法の開発



Shinobu Tanabe

## 2

## 【研究項目及び実施体制】（◎は総括研究代表者）

- ① 飼料・栄養管理法と生体プロセス変動の関係解明（◎田辺 忍／農林水産省畜産試験場）
- ② 近赤外分光法による生体液の連続モニタリング手法の開発  
（河野澄夫／農林水産省食品総合研究所）
- ③ 生体情報の無侵襲及び連続測定装置の開発（伊藤和彦／北海道大学大学院農学研究科）
- ④ 近赤外分光法によって得られる情報の解析・総合化手法の開発  
（尾崎幸洋／関西学院大学理学部）
- ⑤ 生体プロセス情報のフィードバックシステムの開発（Roumiana TSENKOVA／神戸大学農学部）



Sumio Kawano

## 3

## 【研究の目的】

我が国の乳牛の泌乳量の改善は著しく、現在では、年間の平均乳量が8300kgに達しており、1万kgを越える牛も多数、存在している。しかし、一方でこのような高泌乳化に伴い、疾病の多発や繁殖成績の不良などの問題が大きくなってきており、その原因として多頭数飼養環境下における高泌乳牛の適切な栄養管理の困難さが指摘されている。

乳牛の栄養状態・生理状態を的確に把握することは適切な栄養管理を行うための第1歩であり、乳牛生体における栄養素の代謝プロセスを、近赤外分光法によって非破壊・無侵襲的に連続モニタリングする手法を開発することができれば精密な乳牛飼養管理システムの実現に大きく寄与するものと思われる。



Kazuhiko Ito

## 4

## 【研究の内容】

- ① 乳牛から、牛乳、血液、胃液及び尿などの生体液を採取して、その化学成分組成を近赤外分光法により精密に分析する手法を確立する。
- ② 搾乳システムあるいは乳牛健康診断システム（プロファイルテスト）に組み込むことを目標としたオンライン及びアットライン設置型の近赤外計測装置及びポータブル型の計測装置を開発する。
- ③ 乳牛を用いて、飼料栄養管理法と生体プロセス変動の関係に関するデータの蓄積を図るとともに、近赤外分光法により計測可能な栄養管理指標を抽出する。
- ④ 開発した計測装置を用い、選定した栄養管理指標に基づくモニタリングシステムを構築する。



Yukihiro Ozaki

## 5

## 【主要な成果】

- ① 牛乳、胃液、血液及び尿などの乳牛生体液中の化学成分を長波長域の近赤外スペクトルを用いて高精度で測定できること、牛乳の衛生管理上重要な体細胞数についても定性的ではあるが測定可能であることが示された。さらに、短波長域を用いた場合も、測定部の改善と二次元相関分光法を利用して検量線を作成することにより乳牛の栄養・健康状態モニタリングに対して十分な精度で近赤外分光法が利用できることを明らかにした。
- ② 近赤外スペクトルの短波長域を利用した、ミルカーに装着可能な小型のオンライン計測装置、自動車に積載可能なサイズのアットライン計測装置及びポータブル計測装置を開発した。特に、オンライン計測装置は現在普及しつつあるロボット搾乳装置に組み込むことにより、自動搾乳システムの高度化に大きく寄与するものと思われる。
- ③ 開発された装置を活用した乳牛の栄養・健康状態モニタリングシステムを提案した。本システムはオンラインモニタリングシステムとアットライン検診システムから構成され、その診断結果に基づいて飼料設計を行う飼料給与改善プログラムが作成されている。



Roumiana TSENKOVA

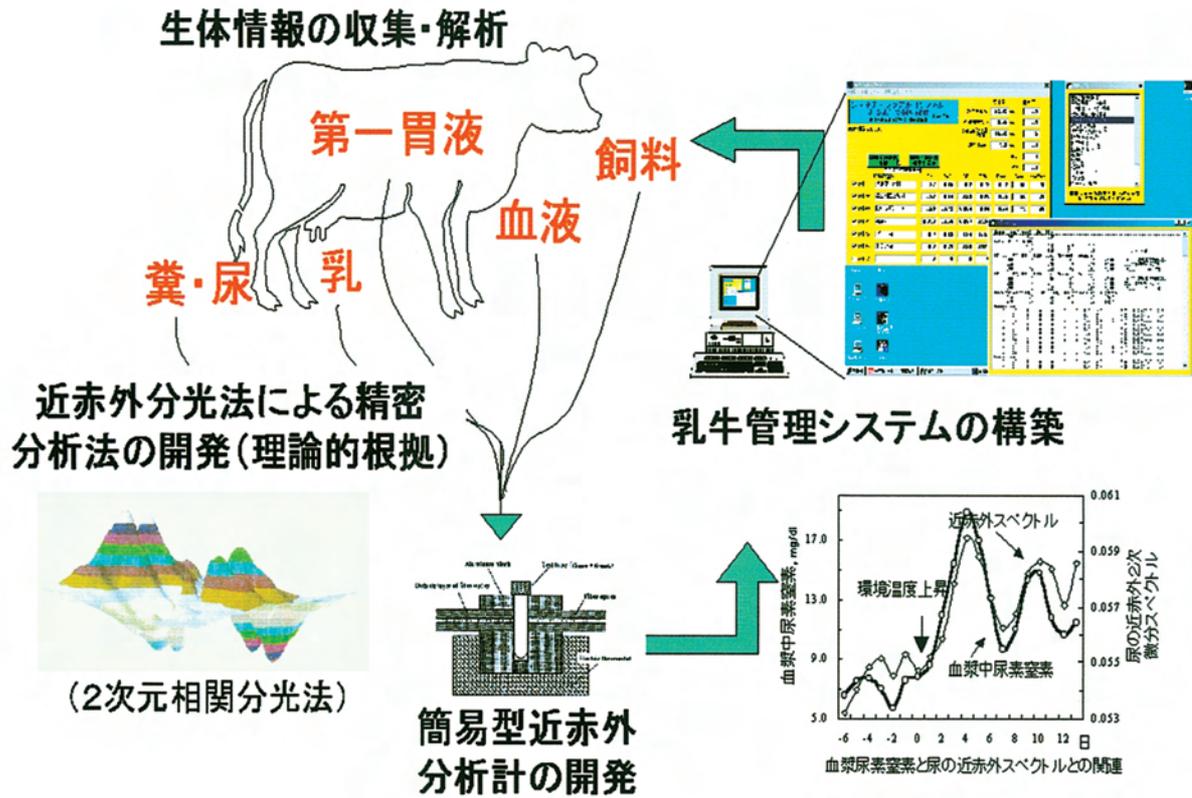


図1 プロジェクトの概要

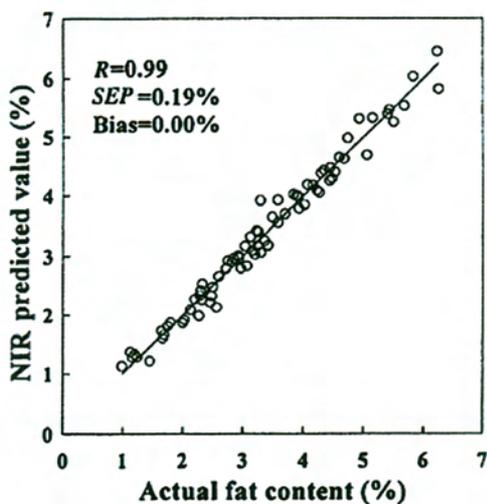


図2 近赤外分光法による牛乳中脂肪含量の測定  
700-1100nmのスペクトルを用い、PLS回帰分析により検量線を作成

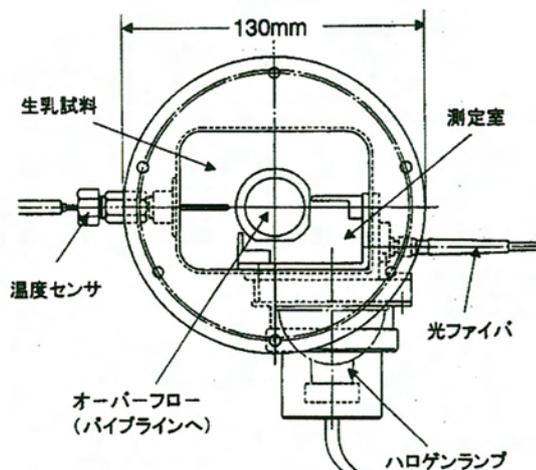


図3 オンライン装着型近赤外牛乳成分分析装置  
本装置を搾乳装置に組み込むことにより乳成分の随時、連続測定が可能となった

## 1

## 【研究課題名】

## 臓器移植医療に応用するためのブタの品種改良・増産に関する研究



Ryota Shirakura

## 2

## 【研究項目及び実施体制】（◎は総括研究代表者）

- ① 異種移植の臨床応用に関する基礎的研究（◎白倉良太／大阪大学大学院医学系研究科）
- ② ブタの遺伝子工学・発生工学に関する基礎的研究（重久 保／日本ハム中央研究所）
- ③ 人畜共通感染症とその伝達感染に関する基礎的研究  
（瀬谷 司／大阪府成人病センター研究所）
- ④ ブタにおける発生工学に関する研究（長嶋比呂志／明治大学農学部）



Tamotsu Shigehisa

## 3

## 【研究の目的】

当プロジェクトは“移植医療に応用するためのブタを生産するために必要な基礎的研究”を完成させることを目的としている。最近の研究状況によると、ヒトの補体制御蛋白を高発現したブタは超急性拒絶反応は回避できるが数日後から起こる急性血管性拒絶反応は回避できないとされ、平均3週間の生着しか望めない。われわれは補体制御蛋白を高発現させると同時に異種抗原（糖鎖抗原）をできるだけ少なくしたブタが必要であると考え、このプロジェクトを開始した。



Tsukasa Seya

## 4

## 【研究の内容】

“移植医療に応用するためのブタを生産するために必要な基礎的研究”を目的としていることから、次の4つの柱を立てた。

- (1) 超急性拒絶反応と急性血管性拒絶反応を回避するための基礎的研究：ブタの抗原を減らす方法（抗原を作り出す酵素遺伝子のノックアウトと膜構造の改変の2面からアプローチ）とブタ細胞表面でのヒト補体の制御法について、遺伝子工学的、発生工学的手法を用いて、何の遺伝子をどのように改変する必要があるのかを検討した。
- (2) 遺伝子改変ブタの新規作出と繁殖：独自に開発したヒトの糖転移酵素遺伝子、補体制御遺伝子を実際にブタに導入した。ブタに高発現させる方法と作出効率を高める技術を検討し、またその形質が子孫に継代できるかを検討した。
- (3) 安全性の確保：ヒト補体制御蛋白の多くがウイルスの感染受容体でもあることから、ブタに導入する遺伝子（cDNA）の構造を検討した。



Hiroshi Nagashima

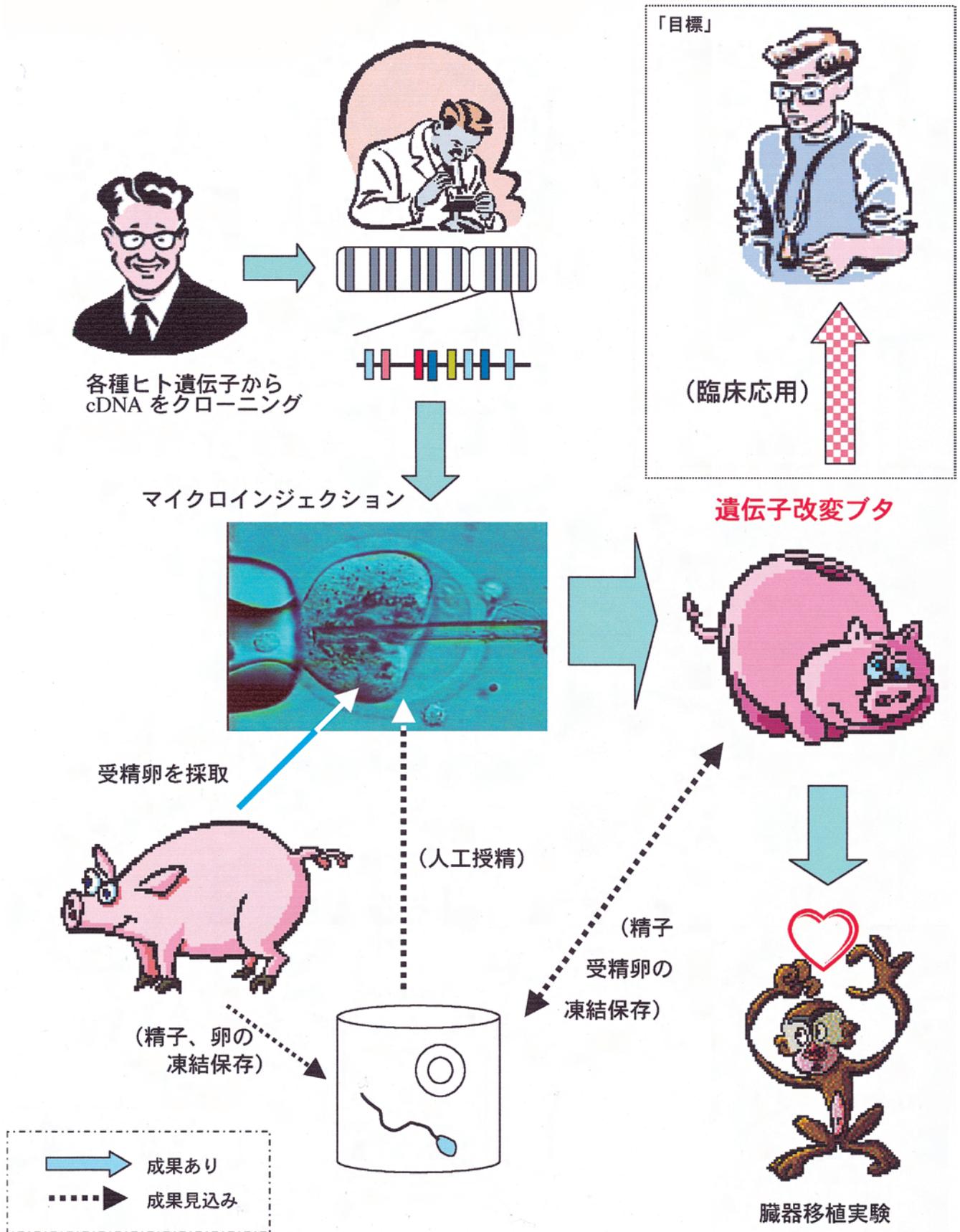
以上4つの研究は、移植用ブタの品質に集約されなければならないため、各研究は同時進行とし、情報交換を密にし、相互協力・共同研究の形で行ってきた。

## 5

## 【主要な成果】

- (1) 移植用ブタに有効な遺伝子に関する基礎的研究から、我々独自の導入候補遺伝子を12種類確立した。
- (2) 当プロジェクト独自に開発したものを含めて、3種類の遺伝子を導入したトランスジェニック＝ブタを9系統作り出し、3世代まで継代できた。サルに移植する実験は進行中（サルの入手が困難なこと、サルの組換えDNA実験は規制が厳しいことにより実験数が増えないため）だが、良好な成績が出つつある。また、系統間の交配実験により有効ヒト蛋白を超高発現するブタ（ホモ接合体）や、2種類のヒト遺伝子を持つブタが生れる予定（妊娠中）。
- (3) 以上のトランスジェニック＝ブタは、作出技術の開発・改良によって、極めて効率よく作出された。作出効率として、従来の15～20倍に（系統により異なるが、pMCP-DAF系の場合、遺伝子導入胚あたりTg産子数が0.1%から1.7%に）高めることができた。
- (4) ブタの標的遺伝子をノックアウトするための核移植技術を開発中で、効率的なクローンブタ作出（ブタ卵子、受精卵の凍結保存法の確立とそれを用いた核移植）体系の基盤が確立した。
- (5) 安定供給のためのブタ精子および卵子の凍結保存法をほぼ確立した。

「臓器移植医療に応用するためのブタの品種改良・増産に関する研究」



## 1 【研究課題名】

### 無脊椎動物を利用したヒト病態の解析と病態モデル動物開発の基礎研究



Toshiharu Suzuki

## 2 【研究項目及び実施体制】

無脊椎動物を利用したヒト病態の解析と病態モデル動物開発の基礎研究(鈴木利治/東京大学大学院薬学系研究科)

## 3 【研究の目的】

長寿社会の到来とともに社会的な問題となりつつある老人性痴呆症等の神経疾患の原因を究明したり、記憶の形成・維持の機構を解析して神経機能を明らかにする上で、研究の障害となっている問題点を無脊椎動物の生体システムを用いてブレークスルーし、神経変性疾患の解析や基本的な神経機能の解析に貢献する事を目的とする。無脊椎動物を用いて得られた成果を哺乳類動物にフィードバック・フィードフォワードする事で、病態モデル動物の開発に貢献する。

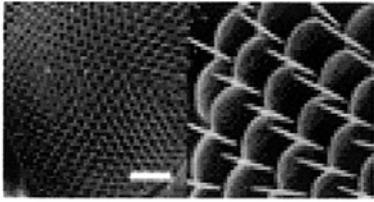
## 4 【研究の内容】

本研究では、主にショウジョウバエの遺伝子ネットワークシステムとナメクジの神経ネットワークシステムを利用する。1世代時間の短いショウジョウバエは逆遺伝学を駆使して、遺伝子機能を検定するのに適した系であり、ナメクジは比較的単純な神経系を持つが高度な神経機能を発現することから、記憶・学習の機構の解明に適した系である。これら無脊椎動物の実験系と並行して、得られた成果を利用しつつ哺乳類動物（主にマウス）を用いた病態モデル動物開発の基礎研究を行う。ヒトの病態解明を効率的に進める上で、昆虫等無脊椎動物の有効性を証明し、実験動物産業の多様化に寄与すると共に、新規病態モデルの開発を目指す。

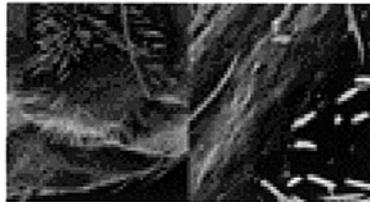
## 5 【主要な成果】

- ① 代表的な老人性痴呆症であるアルツハイマー病の原因因子の1つである、アミロイド前駆体タンパク質の代謝を制御する新規ヒト遺伝子X11Lの単離に成功し、その作用機構を明らかにした。ショウジョウバエからこのホモログ遺伝子を単離する事に成功し、ヒト及びハエの遺伝子をハエの視神経で発現させることで、この遺伝子が神経変性に関与する事を示した。この成果を受けて、マウスX11L遺伝子をノックアウトした変異マウスの作製に成功した。ノックアウトマウスの作成方法は、世界に先駆けてC57BL/6系統由来のゲノム・ES細胞を用いて成功した。この方法の実用化は、問題が指摘されていた従来法の欠点を解消し、神経機能の検定に有用なモデル動物作製に道を拓くものである。
- ② ナメクジ単離脳において、忌避性行動の指標となる運動出力神経を発見・同定し、これを用いて、哺乳類では不可能であった *in vitro* 嗅覚学習系を世界に先駆けて開発した。この成果を利用して、学習依存的な嗅覚中枢神経活動変化を明らかにし、中枢神経の同期活動が持つ新たな意義を示した。また、ナメクジの条件付けを利用して、長期記憶形成に関与すると期待される新規遺伝子LAPS18の単離に成功した。さらに、哺乳類動物の学習系としてマウスを用いた瞬目反射条件付けの実験系を確立した。この成果は、各種変異マウスを用いた病態モデル動物の基礎研究に有力な手段となるものである。

(A) Wild type



(B) UAS-dX11L/+  
GMR-Gal4/+

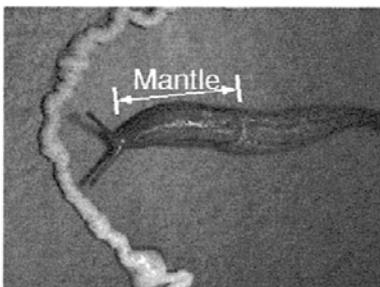


(C) UAS-hX11L/+  
GMR-Gal4/+



(図1) ショウジョウバエ視神経にショウジョウバエX11L遺伝子 (dx11L), とヒトX11L遺伝子 (hX11L) を発現させた個体における複眼の形態。複眼を走査電子顕微鏡で観察した (左: 低倍率, 右: 高倍率)。野生型では, 個眼が規則正しく並び複眼を構成しているが, X11L遺伝子を発現させた個体では, 形態形成異常が観察された。これは, 3令幼虫以降の成虫原基でアポトーシスが起きた結果であった。X11Lが神経変性に関与するタンパク質であることをショウジョウバエを用いて明らかに出来た。

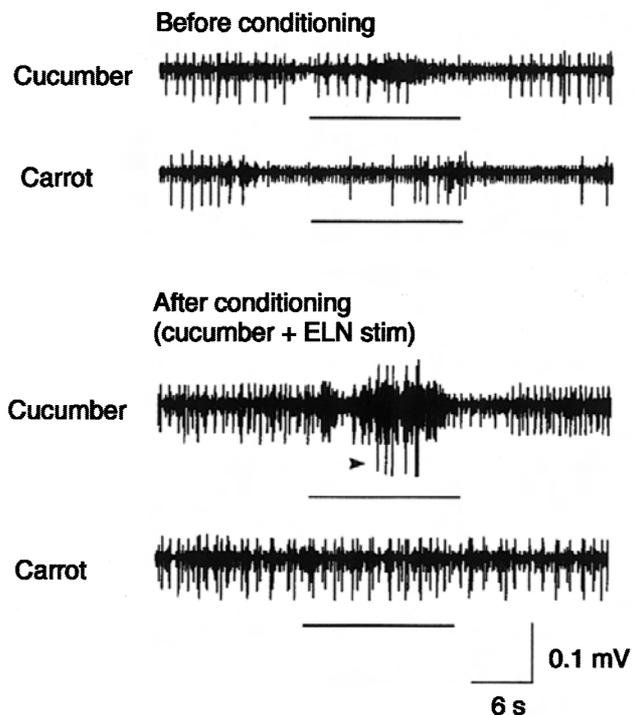
(A) Rat chow  
(appetitive odor)



(B) Conditioned carrot  
(aversive odor)



(C) In vitro conditioning



(図2) ナメクジの忌避性運動神経 (p-VN) の活動を指標としたin vitro条件付け。(A, B) 匂いに対するナメクジの行動。誘引性の匂い (ラット飼料) を提示しても忌避行動 (外套膜収縮) は起きない(A)が, 条件付けによって忌避性にした匂い (ニンジン) を提示すると外套膜収縮が起きる(B)。(C) in vitro条件付け。条件付け前は, キュウリとニンジンのいずれの匂いに対しても外套膜運動神経p-VNの発火は生じない。次にキュウリの匂いを用いて in vitro 条件付けを行うと, その後はキュウリの匂いに対してp-VNが発火するようになる (矢印)。条件付け後もニンジンの匂いに対してはp-VNは発火しないので, 条件付けられた匂いに特異的な反応である。

## 1 【研究課題名】

### 茶機能検定系の構築と茶成分新機能の解析



Katsuhiko Hakamata

## 2 【研究項目及び実施体制】 (◎は総括研究代表者)

茶機能検定系の構築と茶成分新機能の解析 (◎袴田勝弘／農林水産省野菜・茶業試験場)

- ① ヒトアレルギー関与細胞株の樹立とその細胞機能の解析  
(山本(前田)万里／農林水産省野菜・茶業試験場)
- ② 茶成分中における食品アレルギー反応抑制因子の探索  
(立花宏文／九州大学大学院農学研究院)
- ③ アレルギー関与細胞による酸化的ストレス関与成分検索システムの開発と抗アレルギー作用物質の探索 (佐野満昭／静岡県立大学薬学部)
- ④ 茶成分の肝障害抑制効果とその作用機構に関する研究 (杉山公男／静岡大学農学部)
- ⑤ 茶葉中水溶性高分子画分 (TNDs) の発がん抑制に関する研究  
(中村好志／静岡県立大学薬学部)



Mari (Maeda) Yamamoto

## 3 【研究の目的】

茶の機能性については、十数年前より研究が行われてきたが、本研究においては、茶の機能性に関わる既知及び未知の成分を対象に体系的に研究を行い、茶の健康に対する寄与効果を実証し、茶特有の優れた機能性素材としての道を切り拓き、茶産業や食品産業の発展に資することを目的としている。



Hirofumi Tachibana

## 4 【研究の内容】

効果的な抗アレルギー性検定系の構築を目的に安定したヒトアレルギー関与免疫担当細胞株を樹立し、抗アレルギー因子探索のための評価系構築して、茶葉中より新規の抗アレルギー因子を探索、単離、同定する。また、新たな機能性として、肝臓障害抑制作用及び抗がん(発がんプロモーション抑制)作用をもつ物質を茶成分から単離し、作用機作の解明を行う。新たな茶の機能性の解明により、茶の需要拡大、茶産業、食品産業への応用を目指す。



Mitsuaki Sano

## 5 【主要な成果】

- ① 効率的な抗アレルギー性検定のためのヒト融合親細胞株、ヒトマスト細胞株、ヒト好塩基球株、ヒトB細胞株を樹立して細胞機能を解析した。また、新たな茶葉中抗アレルギー物質としてエピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート、エピガロカテキン-3-O-(4-O-メチル)ガレート(いずれもマスト細胞活性化抑制物質)及びストリクチニン(IgE産生抑制物質)を単離・精製し、その作用機作、合成法、代謝経路等を解明した。
- ② 茶が肝障害(LPSによる肝炎モデル系等)を抑制する、それにはカフェイン、カテキンが関与し、特にカフェインはTNF- $\alpha$ 産生阻害によりアポトーシスを抑制することで肝炎抑制作用を示すことを明らかにした。
- ③ 茶の水溶性高分子画分は発がんプロモーション抑制作用をもち、細胞毒性が少ないこと、活性成分は、AP-1転写活性化を抑制してがん化を抑制する化合物(EGCG等)とAP-1転写活性化を抑制せず細胞の形態制御系を修飾してがん化を抑制する化合物(ミリシトリン等)が混在する複合タンニンの混合物であることを明らかにした。



Kimio Sugiyama



Yoshiyuki Nakamura

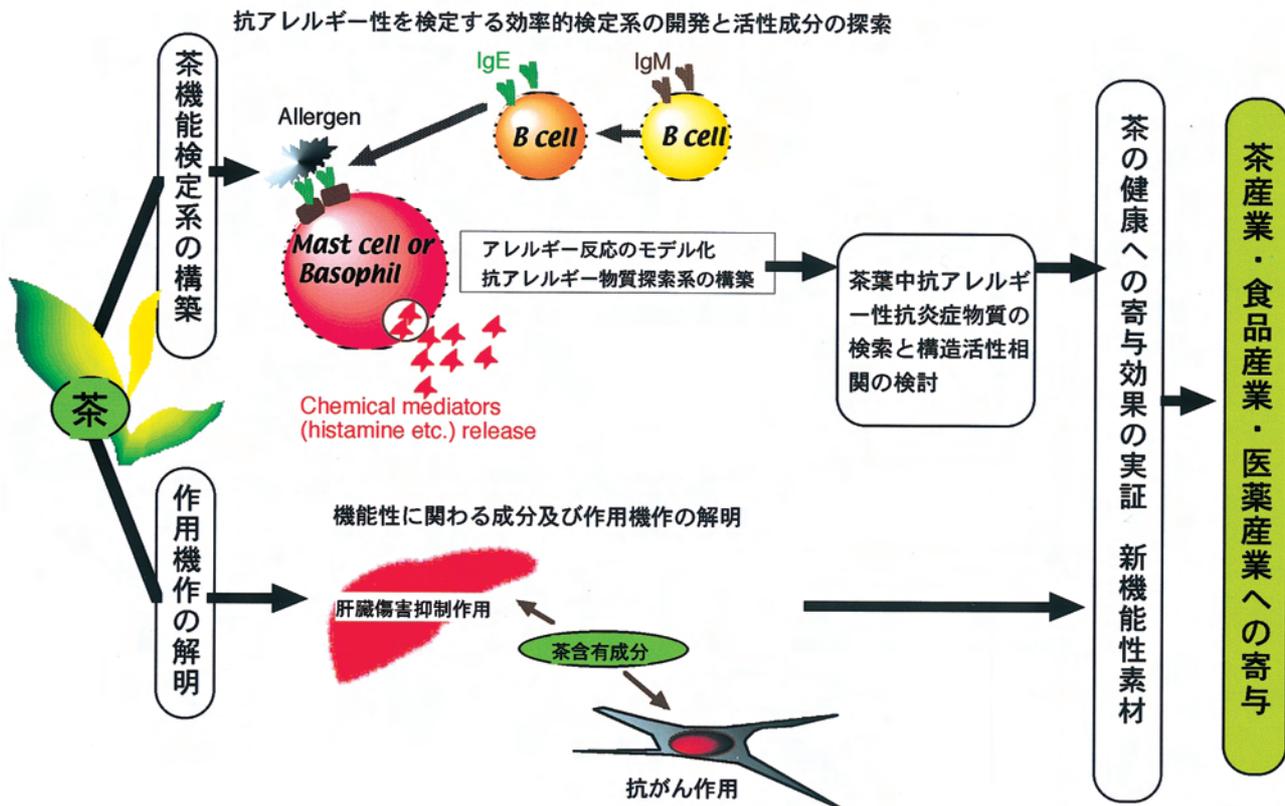


図1 本研究の全体イメージ図

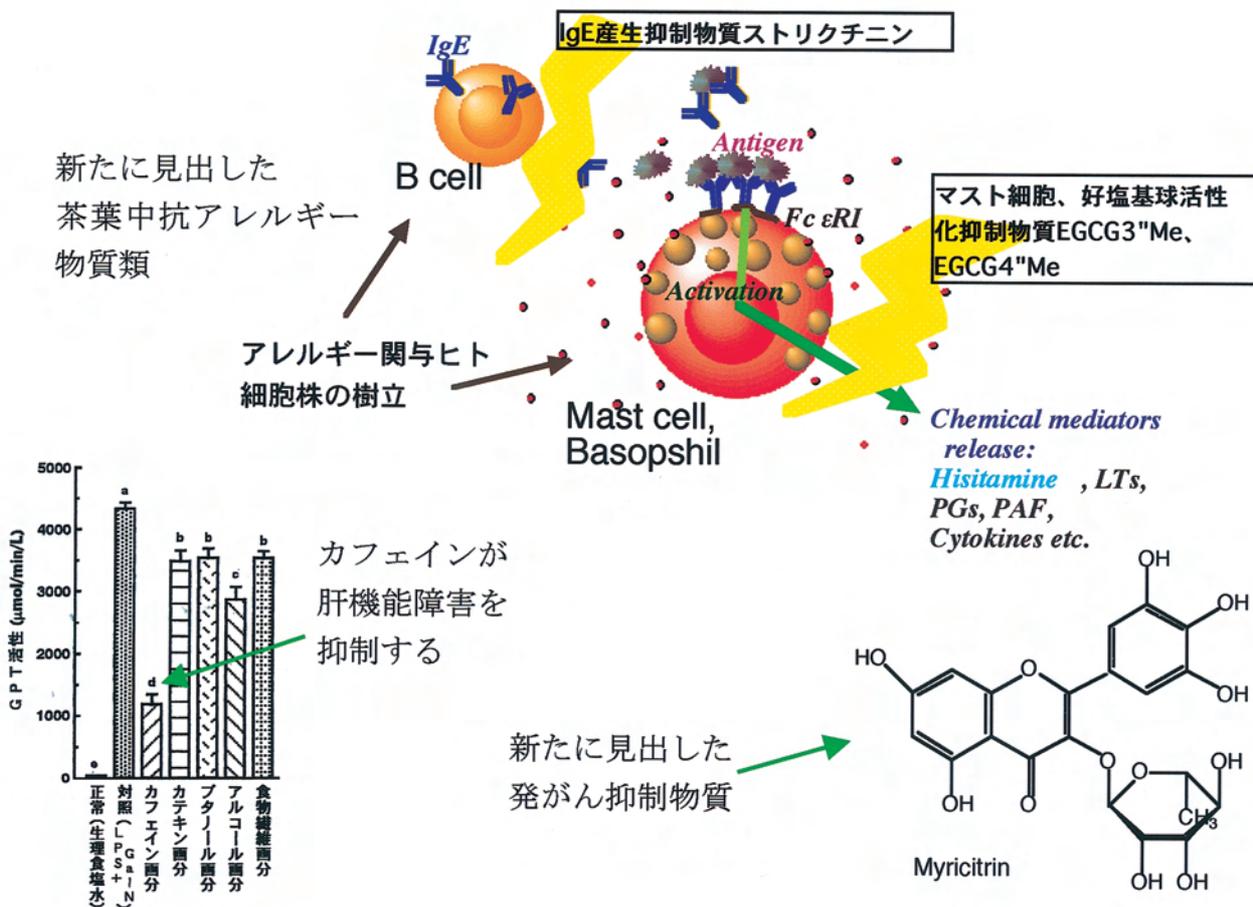


図2 本研究で得られた主要な成果

## 1 【研究課題名】

### 生物資源の低投入型生産機械システムに関する基礎研究



Mikio Umeda

## 2 【研究項目及び実施体制】

生物資源の低投入型生産機械システムに関する基礎研究

(梅田幹雄／京都大学大学院農学研究科)

## 3 【研究の目的】

社会の持続的発展のためには、作物や土壌の特性を考慮した低投入環境保全型農業の実現が必要である。本研究は、土壌条件、生育量、収量等をマップ化して条件に合わせて可変施肥を行い、施肥量削減と収量確保をはかる精密農業と、群管理システムや自律走行車両等の先進的農作業機械システムの組み合わせにより、環境保全型農業生産機械システム技術を確立することを目的とする。

## 4 【研究の内容】

- ① 群管理システムを中心とする収穫・運搬システムの研究：作業者の操縦するコンバインを、コンピュータ制御の2台の無人コンバインが追走することにより、1人の作業者が3台のコンバインを操作する群管理システムの開発と、光ファイバジャイロによる慣性航法と画像処理により農道を認識して自律走行する2種類の無人運搬車の開発を行った。
- ② 低投入生産のためのほ場マップの作成に関する研究：イネは収量を最大にする面積当たりの穎花数（もみ数）を有する。穎花数は出穂期の保有窒素量により決定する。精密農業とは、イネの最適窒素量から、穂肥施肥時に既に保有している窒素と施肥後土壌から供給される土壌由来窒素を差し引いた不足分を施用することにより、収量を維持しながら施肥量削減をはかる農法をいう。このためには、土壌由来窒素の基になる土壌の化学特性値、表面の凹凸など土壌条件をマップ化すること、及び収量をマップ化することが基礎となる。本研究で0.5haの水田で土壌と収量マップを作成した。あわせて収量センサーの開発も行った。
- ③ 生産環境情報に基づく施肥機械システムの研究：基肥と穂肥を0, 3, 6kg/10a変化させ9通りの組み合わせの区画を3種類作り、近赤外、赤及び緑の反射率を測定し植生指数（NDVI）を求めて、NDVIと保有窒素量の関係を求めた。また、GPSにより位置を認識してコンピュータの指示通り施肥を行う可変施肥機を開発した。生育量マップと土壌マップから必要な施肥量を算出し、これに基づいて可変施肥を行い、均一施肥区と可変施肥区の収量変動の比較を行った。

## 5 【主要な成果】

群管理システムを中心とする収穫・運搬システムの研究では、計画通り2台の無人コンバインが追走して稲を収穫する実験に成功した。無人運搬車では農道での直線走行と交差点での旋回と、障害物の認識に成功した。

ほ場マップについては1997年から作成し、最適区画、データ収集法、ジオスタティスティクスによる統計処理等の試行錯誤を経て、1999年には均一施肥した0.5haの完全なほ場マップの作成、イネの最適窒素保有量、NDVIによる窒素量の推定に成功した。最終年の2000年はヘリからのNDVIの測定を加えたほ場実験、及び0.5haほ場の東半分について、開発したGPS可変施肥機を用いて、総量を12.8%削減した可変施肥を行い、収量の均一化、施肥量の削減が図れることを明らかにした。収量センサーについても実用化の目途をつけた。

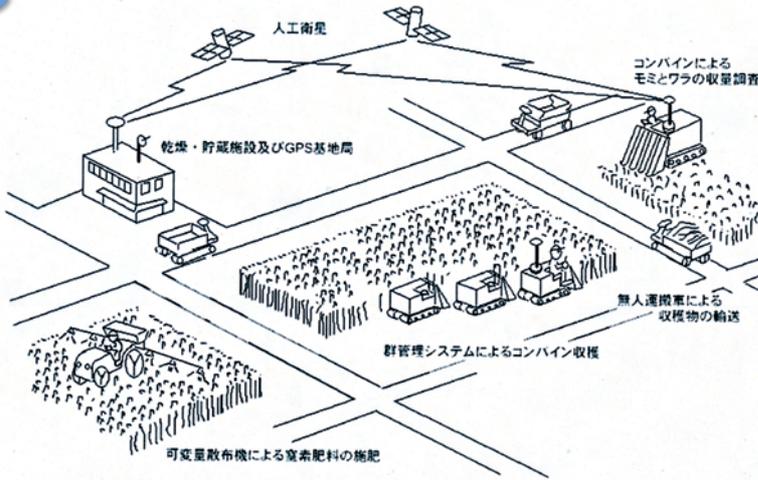


図1 本研究の概念図



図2 無人運搬車



図3 群管理システムによる稲の収穫



図4 穂肥の可変量散布

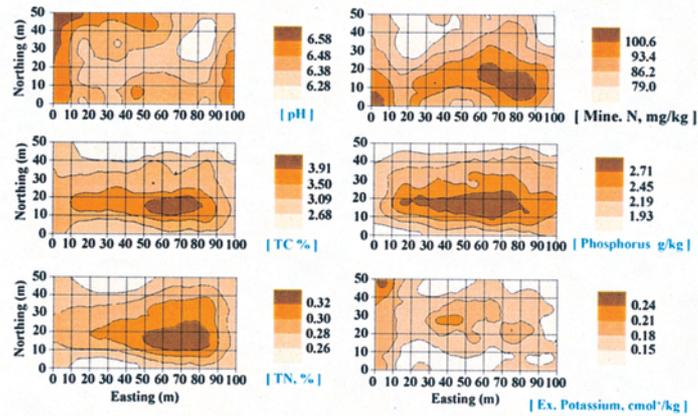


図5 土壌マップ (1999年5月)

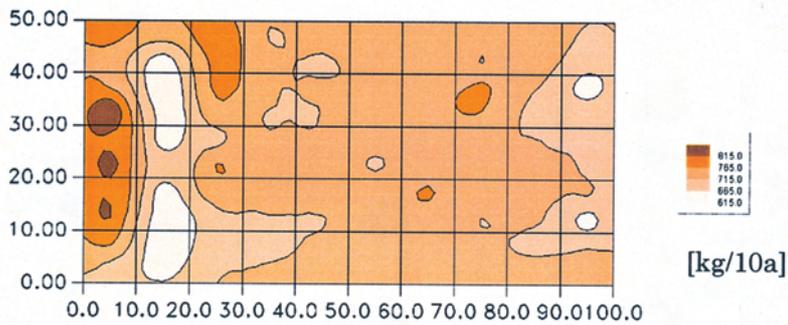


図6 モミの収量マップ (2000年10月)

## 1 【研究課題名】

### カンキツ類によるがん予防に関する基礎的研究



Masamichi Yano

## 2 【研究項目及び実施体制】 (◎は総括研究代表者)

- ① 発がん抑制成分の高含有カンキツ素材の作出 (◎矢野昌充／農林水産省果樹試験場)
- ② カンキツ由来成分の発がん抑制効力評価と抑制機序の解明  
(西野輔翼／京都府立医科大学医学部)
- ③ カンキツ由来の発がん抑制成分の生物有機化学的研究  
(大東 肇／京都大学大学院農学研究科)
- ④ 発がん抑制物質の作用機構に関する基礎的研究 (小清水弘一／近畿大学生物理工学部)



Hoyoku Nishino

## 3 【研究の目的】

多くの疫学研究において、カンキツ類はがん予防効果を示す食品の一つに挙げられている。しかし、どのカンキツ成分が役立っているかは十分解明されていない。カンキツ類から発がん抑制成分を新たに見出し、その学術的評価を確定させる。加えて新たに発見した成分が質、量ともに豊富なカンキツを作出する。この研究を通じてカンキツ類のがん予防食品としての評価を高める。



Hajime Ohigashi

## 4 【研究の内容】

- ・発がん抑制成分の探索：発がんプロモーション、活性酵素・窒素種産生、シクロオキシゲナーゼ-2の発現、がん細胞増殖等に対する抑制活性を探索の指標とした。
- ・動物での効果確認：マウス、ラットを用いる化学発がんの実験系を用いた。
- ・作用機構の解析：培養細胞によるモデル実験系、化学発がんの実験系によった。
- ・ヒトレベルでの効果推定：大腸・肺がんを対象とするケース・コントロール研究。
- ・高含有カンキツ素材の作出：果樹試保有の遺伝資源から探索と交雑種の作出を行った。



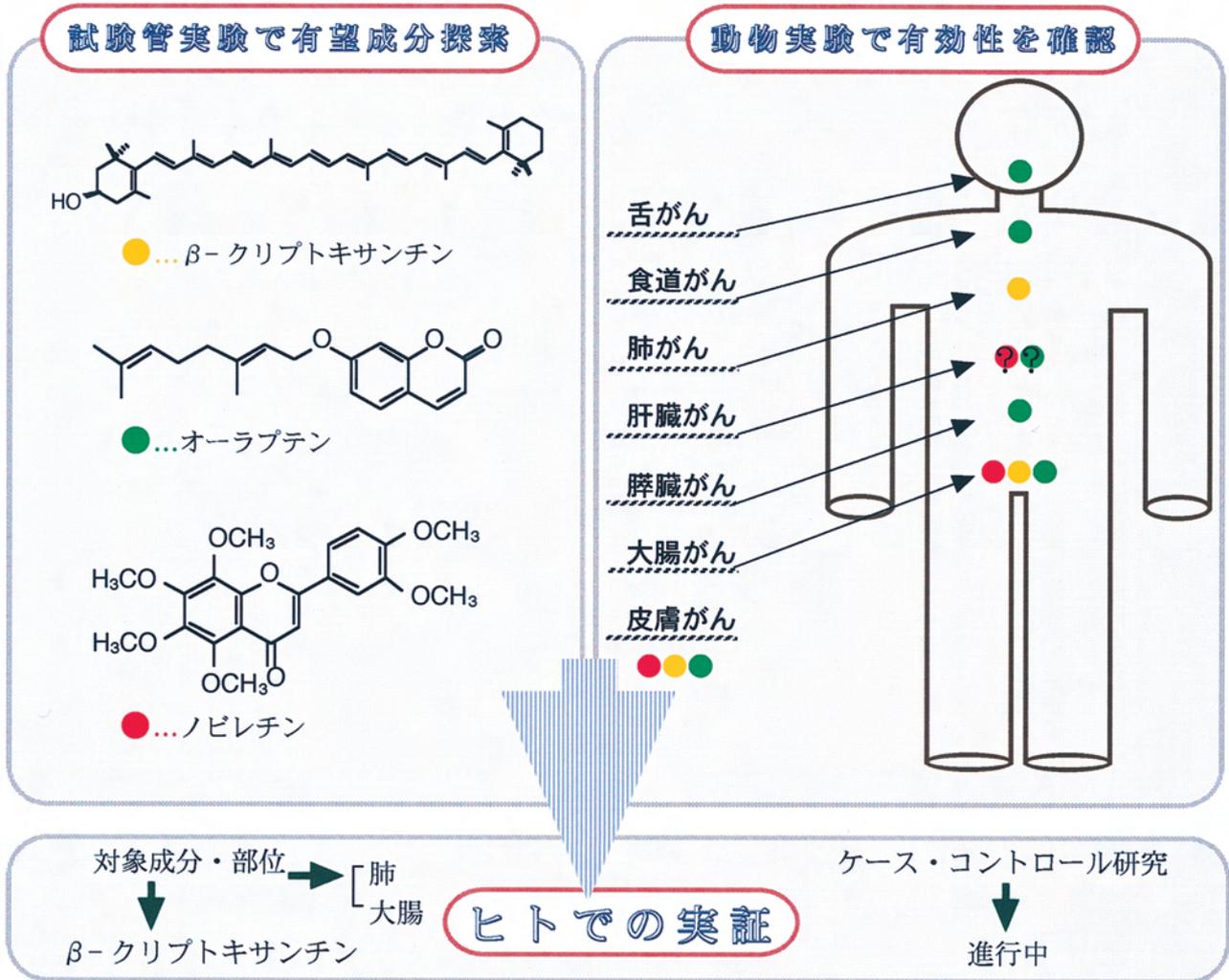
Koichi Kosimizu

## 5 【主要な成果】

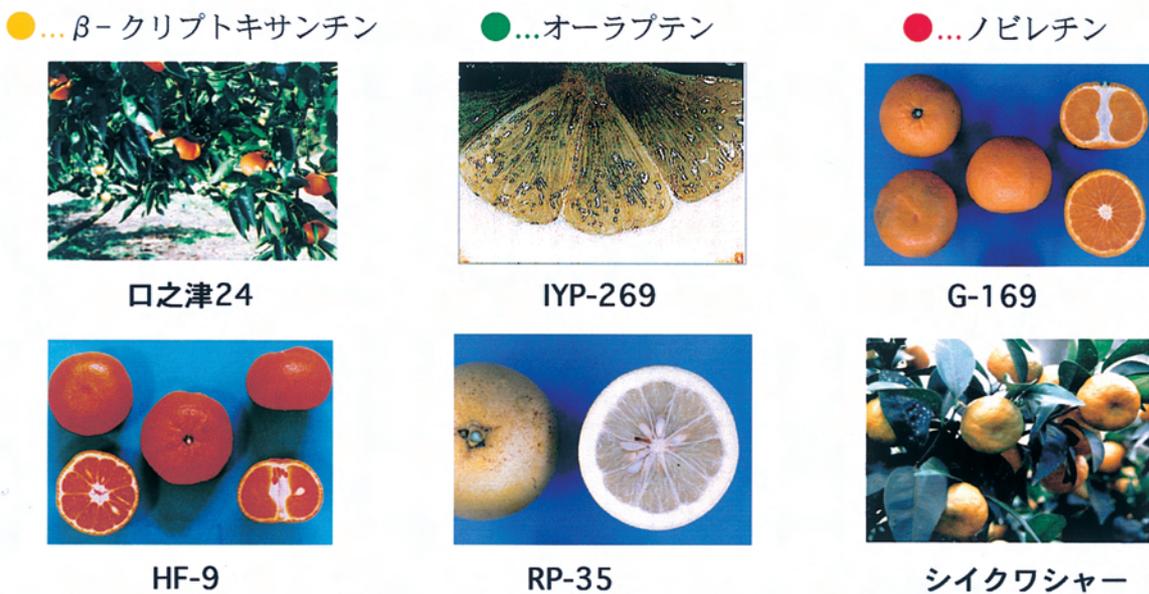
- ・カンキツ類に特徴的な成分であるβ-クリプトキサンチン (CRP)、オーラプテン (AUR)、ノビレチン (NOB) に優れた発がん抑制活性があることを世界で初めて明らかにした。
- ・CRPは含有量・消費量の多さ、ヒトにおける吸収・蓄積パターンの研究結果からウンシュウミカンがもっとも重要な供給源であると結論した。CRPの、ヒトにおける効能を実証するために大規模ケース・コントロール研究を大腸、肺を対象として開始し、現在進行中である。
- ・ユニークな化学構造を有するAURとNOBは多くの発がんモデルで優れた発がん抑制活性を示した。その作用が活性酵素・窒素種産生抑制などの新たな抑制機序で説明できる事を明らかにし、発がん研究の最先端誌 *Cancer Research*, *Carcinogenesis* などに発表した。この2成分を取り上げ、国の内外で多くの共同研究に発展させ、がん予防研究の発展に大きく貢献した。
- ・新たに発がん抑制活性を発見した3成分について、高含有遺伝資源の探索と3成分含有量の遺伝様式を解明するとともに、多くの高含有カンキツ雑種の作出に成功した。
- ・以上の成果は将来、カンキツのがん予防食品としての評価向上に役立つものである。

6 【研究のイメージ】

発がん抑制成分の発見・評価



高含有系統作出の試み



## 1

## 【研究課題名】

## 味覚シグナリングの分子機構の解析と食品の品質設計基盤の展開



Keiko Abe

## 2

## 【研究項目及び実施体制】(◎は総括研究代表者)

- ① 味覚受容と細胞内シグナリングの分子機構  
(◎阿部啓子／東京大学大学院農学生命科学研究科)
- ② 味覚シグナリングに関与する味細胞・味神経の分子生物学的解明  
(榎森康文／東京大学大学院理学系研究科)



Yasufumi Enomori

## 3

## 【研究の目的】

食品の最も食品たる所以は“おいしさ”であるとして過言ではなからう。その基本的な起因は味覚にある。生物学の面からみると、味覚は動物の食の受託・忌避行動を決定づけ、適正な生命活動を誘導するイニシエーターである。人間科学の面からみると、それは私たちの生活に豊かさを付与する要因である。本研究はこの重要な感覚の本質を分子・細胞レベルで解明し、その成果を人間社会に活用する基盤を創出する目的で行った。

## 4

## 【研究の内容】

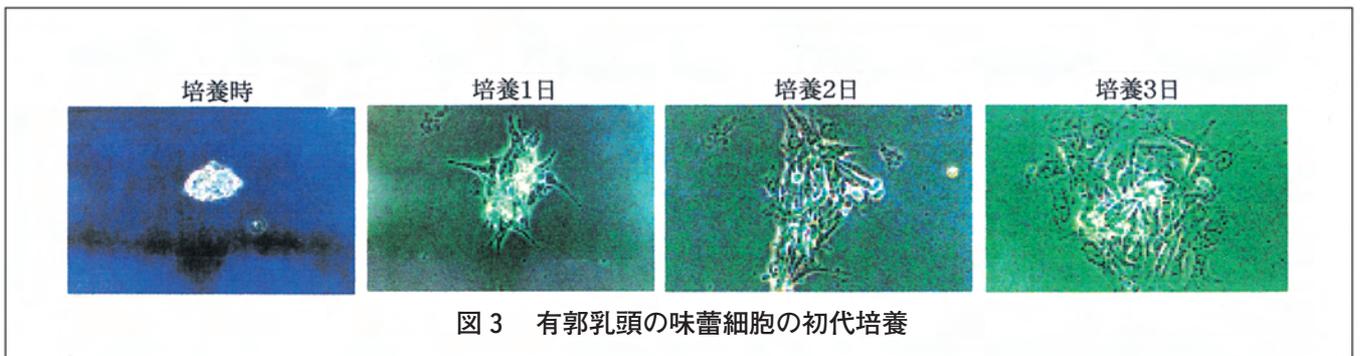
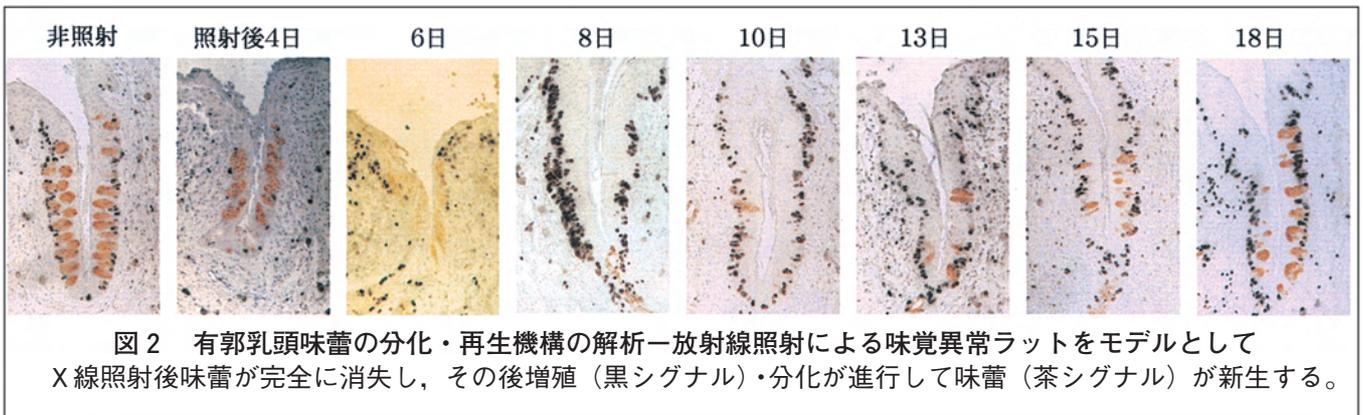
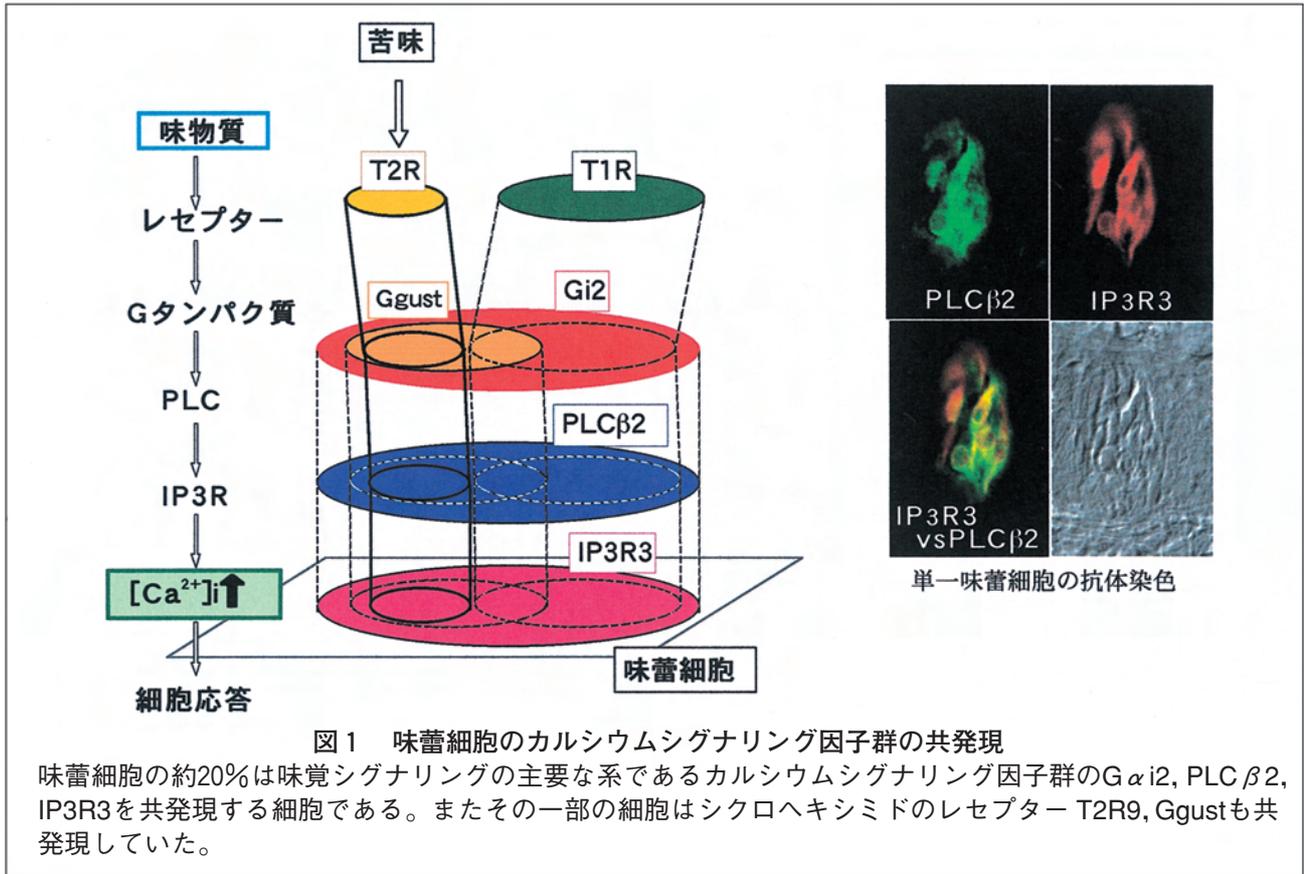
- 本研究者らによる味覚レセプターの分子クローニング (*J. Biol. Chem.*, 1993) 以来、この分野の研究は国際的に激化しているが、その中でわれわれは以下の5項目を研究し、世界の先陣の一翼を維持している。すなわち
- ① 脊椎動物の味覚の味蕾細胞内での情報伝達(シグナリング)に関与する分子群の発見とそれらの発現パターンと作動機序を分子(遺伝子)レベルで解析した。
  - ② 基本味は味細胞からのシグナルを味神経が受容・伝達するのに対し、基本味以外の味は、舌や口腔内に終末を持つ体性感覚神経による。味の神経分子論を確立するために味覚に関与する神経伝達機構の分子的特性の解析に着手した。
  - ③ 味覚シグナリングを行う味蕾細胞が特殊な形態(紡錘形)をとることから、その形態形成に関与する因子を分子レベルで究明した。
  - ④ 味蕾細胞はきわめて速やかな代謝回転を示すことから、その増殖・分化の特徴を究明した。しかも研究のツールとして放射線(X線)照射というユニークな方法を用いた。
  - ⑤ そして味蕾細胞の分子・生物学研究の上に必須とされながら、世界的に未だ成功していないその初代培養に挑戦し、味覚シグナリングの効率的な研究と、成果の“出口”の1つである味覚工学創出の基盤を固めた。

## 5

## 【主要な成果】

上記の①～⑤の順に概要を記す。

- ① 味蕾細胞は80～120個の不均一な細胞の集合体で、その約20%が味覚シグナリングの主要な系であるカルシウムシグナリング因子群(Gai2, PLC $\beta$ 2, IP3R3)を共発現する細胞であった。しかもその一部では、苦味物質→T2R9→Ggust $\beta$  $\gamma$ →IP3R3→Ca<sup>2+</sup>上昇という一連のカスケードが進行していることを解明した。またそれ以降の候補分子としてCa<sup>2+</sup>感受性イオンチャンネルを同定し、そのイオンチャンネル→細胞膜の脱分極→味神経へのトランスミッター放出→脳への電気シグナル伝達のスキームを提唱した(図1)。
- ② 口腔内に神経終末を投射する三叉、鼓索、舌咽神経細胞体(TG, GG, PG)における分子的特性解析を行った。GGとPGのtrkB陽性細胞からの神経が味細胞が伝える基本味を、一方、TGとPGのVR1, TREK-1,あるいはSP陽性細胞の神経終末が基本味以外の味を直接受容し、伝達することを示した。
- ③ 味蕾細胞の主要な一部は味孔の側から基底部へと伸長する紡錘細胞であって、そこにはアクチン結合タンパク質(CAP)が発現していて、形態形成と同時に、“足場タンパク質”との接着を介して味覚シグナリングの調節を行っていることを示唆し得た。
- ④ 放射線治療を受けた癌患者は味覚障害に陥る。これとほぼ同等量のX線をラットに照射すると味蕾はすべて消失した。しかしこれは一過的で、徐々に舌の乳頭上皮の増殖再生が起り、ついで味蕾が新生した(図2)。これを細胞レベルでみると、味蕾細胞そのものの増殖・分化が進行し、速やかに正常化した。分子レベルでみると、正常化過程の初期には一般細胞の基本骨格の形成および基本機能の発現に関与する分子が、後期には味蕾細胞を特徴づけるシグナリング分子が発現していた。
- ⑤ ラット舌の有郭乳頭の味蕾細胞を1週間以上も生細胞の状態に維持することに世界で初めて成功した(図3)。しかも、この初代培養細胞に味覚レセプターと同様にGタンパク質共役タンパク質の( $\alpha$ 1-AR)遺伝子をアデノウイルスを介して導入し、これが機能的に発現したことを確認した。この成功は、味覚シグナリングの分子・細胞学的研究と味覚工学の創出に突破口を拓くものと期待される。



## 1 【研究課題名】

### 生理機能調節性タンパク質集積作物の開発と利用に関する総合的基盤研究



Shigeru Utsumi

## 2 【研究項目及び実施体制】 (◎は総括研究代表者)

- ① 生理機能調節性タンパク質の分子設計と利用に関する基盤的研究  
(◎内海 成／京都大学食糧科学研究所)
- ② 生理機能調節性タンパク質集積作物の分子育種  
(高岩文雄／農林水産省農業生物資源研究所)
- ③ 食品アレルゲンの活性発現機構と遺伝子転換作物のアレルゲン性評価に関する基盤的研究  
(松田 幹／名古屋大学大学院生命農学研究科)



Fumio Takaiwa

## 3 【研究の目的】

21世紀は、食糧問題が人類にとっての最も主要な課題である。心疾患、高血圧、アレルギーなどの食源性疾患の増大、高齢社会の到来、および人工の増大と環境悪化による食糧不足がその原因である。食糧不足が最も深刻になるのはタンパク質であり、質の高い、機能的に優れたタンパク質の供給体制の確立が急務である。本研究は、生理機能性を持つ、あるいは強化したタンパク質を高度に蓄積した作物を開発することによってこれらの課題の解決を図ることを目的とする。



Tsukasa Matsuda

## 4 【研究の内容】

食品タンパク質に由来するペプチドに健康の維持・増進に役立つ機能を持つものがあることを見出している。そこで、そのような生理機能性を持つペプチドをさらに探索するとともに高活性化設計を行う(京都大学)。一方、血清コレステロール値低下機能を持つダイズタンパク質の遺伝子発現機構を解明する(農林水産省)。これらに基づいて、生理機能性を格段に強化し、優れた生活習慣病予防効果を持つ新型ダイズタンパク質を分子設計するとともに、それらを高度かつ安全に集積したコメを開発する(京都大学、農林水産省、名古屋大学)。

## 5 【主要な成果】

- ① 食品タンパク質に由来する血圧降下ペプチド、免疫促進ペプチド、脱毛防止ペプチドなどの探索と高活性化設計に成功した。また、ダイズタンパク質の主要成分であるグリシニンとコングリシニンの立体構造を解明した。これらに基づいて、生理機能を強化・付与したダイズタンパク質を設計し、さらに検証した(京都大学)。
- ② コメの可食部である胚乳に特異的な遺伝子のプロモーターを単離し、胚乳特異的な発現にかかわるシス制御配列およびこれらのシス配列に結合する転写因子を単離・同定した。開発した胚乳特異的なプロモーターや種子タンパク質の突然変異体を利用して、グリシニンを種子タンパク質あたり約10%程度集積させたコメの開発に成功した(農林水産省)。
- ③ 有用タンパク質を集積する作物を開発する際に、組換え体における内因性アレルゲンの変動は重要な安全性評価項目の一つである。ダイズグリシニンを高度に集積させたイネを含む数種の形質転換イネの種子アレルゲンを特異抗体を用いて詳細に解析し、遺伝子の導入・発現により主要アレルゲンが増加したものはないこと、逆に低下したものがあることを見出した(名古屋大学)。
- ④ ダイズグリシニン遺伝子転換コメの安全性を、代謝変動、消化実験、急性・亜急性、および慢性毒性試験により確認した。また、遺伝子転換作物(食糧)の安全性評価基盤を確立した(京都大学)。

6 【研究のイメージ】

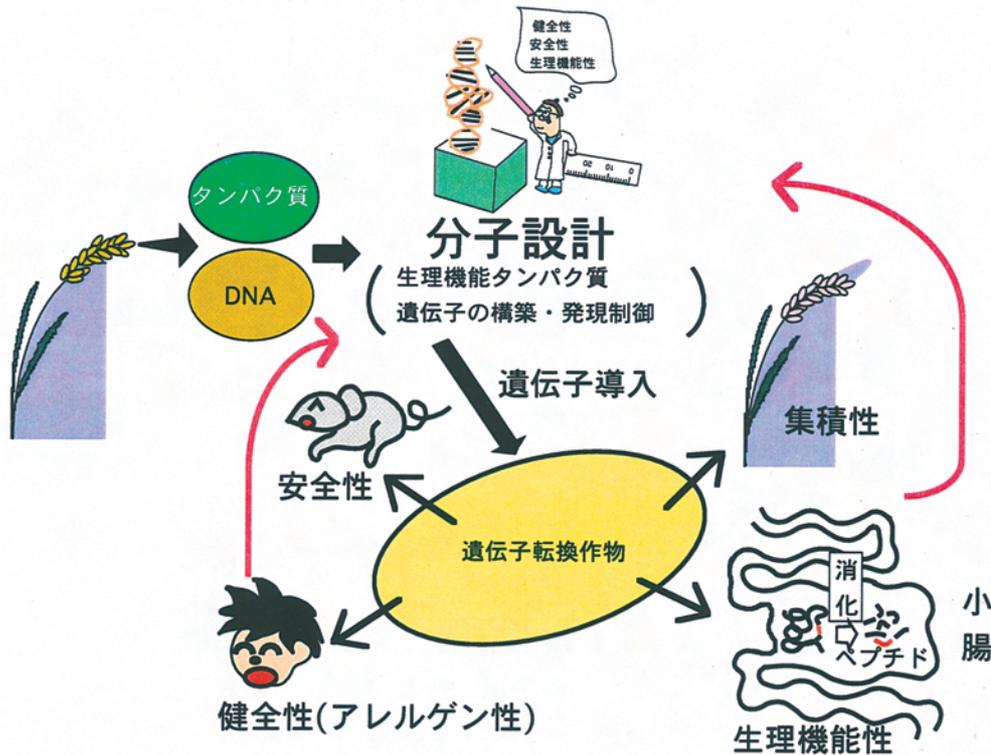


図1 研究全体のイメージ図

食品タンパク質の生理機能性と立体構造を解明し、高度な生理機能を持つタンパク質を分子設計する。そして、新型タンパク質を高度に集積し、安全かつ健全な（アレルゲン性のない）作物を開発する。

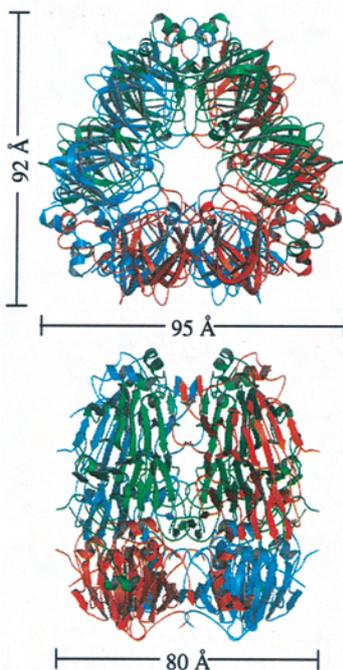


図2 ダイズグリシニンの立体構造のリボンモデルの図

上図は、対称軸に対して垂直に見た図。下図はそれを横から見た図。赤、青、緑で示したひとつのユニットはサブユニットを、数字はディメンションを示している。

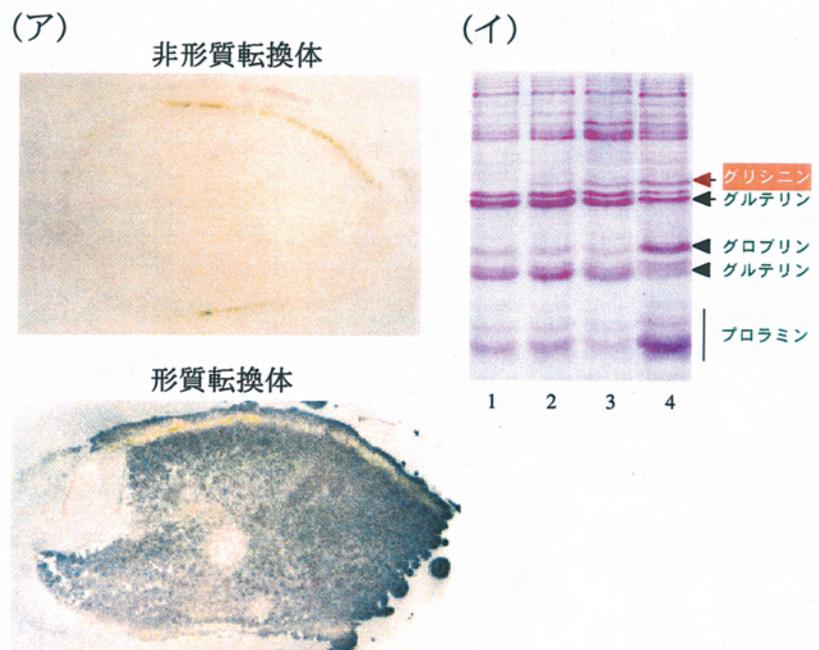


図3 ダイズグリシニンを産生するコメにおける局在性と集積レベル

(ア) グリシニンの局在性。普通のコメは染まらないが、形質転換体でグリシニンの集積部位（胚乳）が染まっている。(イ) グリシニンの集積レベル。1. 形質転換体；2. グリシニンを3%程集積しているコメ；3. 翻訳開始部位とプロモーター間を改良することにより7%まで高めたコメ；4. 突然変異と交配することにより10%まで高めたコメ。

1

## 【研究課題名】

## ドメインシャッフリングによる高機能キメラ酵素の創出と植物における発現



Kiyoshi Hayashi

2

## 【研究項目及び実施体制】 (◎は総括研究代表者)

- ① ドメインシャッフリングによる高機能キメラ酵素の創出  
(◎林 清／農林水産省食品総合研究所)
- ② 高機能キメラ酵素の植物における発現 (大宮邦雄／三重大学生物資源学部)



Kunio Ohmiya

3

## 【研究の目的】

生物は、数十億年の間に進化してきた。この生物の進化は、とりもなおさず蛋白質（酵素）の進化であり、その進化の手法は、大きく2つに大別することができる。第1の手法は、蛋白質をコードする遺伝子上の1つの塩基の変化に起因するものであり、蛋白質を構成する多くのアミノ酸のうちの1残基が変化する。第2の手法は、エキソンシャッフリング等の遺伝子の相同組換えに起因するものであり、蛋白質を構成するアミノ酸配列が大幅に変化し、蛋白質の特性に極めて大きな変化をもたらす。環境に適応した生体を維持・調節するために、この両者の手法が複合的に繰り返され、蛋白質は進化してきた。ただし、相同組換えといったアミノ酸配列の大きな変化は、生物にとって致死的である場合が多く、さほど高頻繁に生じなかったものと推察される。

そこで、ダイナミックでありながら技術的には未開発の後者の手法に着目し、本研究を進めた。すなわち、①遺伝子シャッフリングにより新たな酵素（キメラ酵素）を創出し、既存酵素の特性を改良する技術の確立と、②本技術の適用により得られたキメラ酵素を植物に発現させることによるバイオマス資源の有効利用化の2つの目標に向けて、取り組んだ。

4

## 【研究の内容】

本研究では、低アレルゲン化食品素材の苦味低減に効果のあるアミノペプチダーゼ、ならびに植物細胞壁に作用し飼料効率向上に有用なセルラーゼ、キシラナーゼを対象とした。酵素遺伝子の任意の領域を他の酵素遺伝子の領域とシャッフリングする手法を確立するとともに、キメラ酵素を活性型酵素としてフォールディングする（折れたたみ）技術を開発することにより、熱安定性や基質特異性が向上した、高機能キメラ酵素を創出した。さらに、イネに改良キシラナーゼ、セルラーゼ等の酵素を発現させ、その飼料効率向上特性を解明した。

5

## 【主要な成果】

## 1) 遺伝子のキメラ化による酵素の特性改良

複数の酵素遺伝子を対象に、遺伝子の任意の位置で組み換える手法を開発した。本手法を、 $\beta$ -グルコシダーゼ、キシラナーゼ、アミノペプチダー等の酵素に適用し、分子活性を低下させることなく基質親和性を改変したり、加熱に対する安定性を向上させることに成功し、本手法が分子交配的に利用できることを明らかにした(*Prtein Engin.*, 13, in press (2000))。

## 2) 細胞壁関連酵素のイネにおける発現と飼料効率向上

キシラナーゼやセルラーゼを導入した組換えイネを構築し、以下の成果を得た。①飼料イネの保水性、膨潤性は組換えイネでやや高く、細胞壁構造のゆるみが観察された。②ナイロンバック法を用いた消化率は、組換えイネでやや高い傾向が認められた。③競合PCR、FISH法により、組換えイネには繊維分解性ルーメン細菌の付着量が増加していることが判明した。

## 3) 酵素のリフォールディングキットの開発

人為的に遺伝子を改変すると、対象酵素が活性型として得られず、封入体として得られる場合が少なくない。そこで、界面活性剤と界面活性剤を包摂する多糖類を組合わせて使用する迅速リフォールディングシステムを開発した。本システムは、大腸菌で発現させた際、活性型として得られない他の組換え酵素にも有効であることから、現在、キット試薬として上市する作業を進めている(*FEBS Let.* in press (2000))。

6

【研究のイメージ】

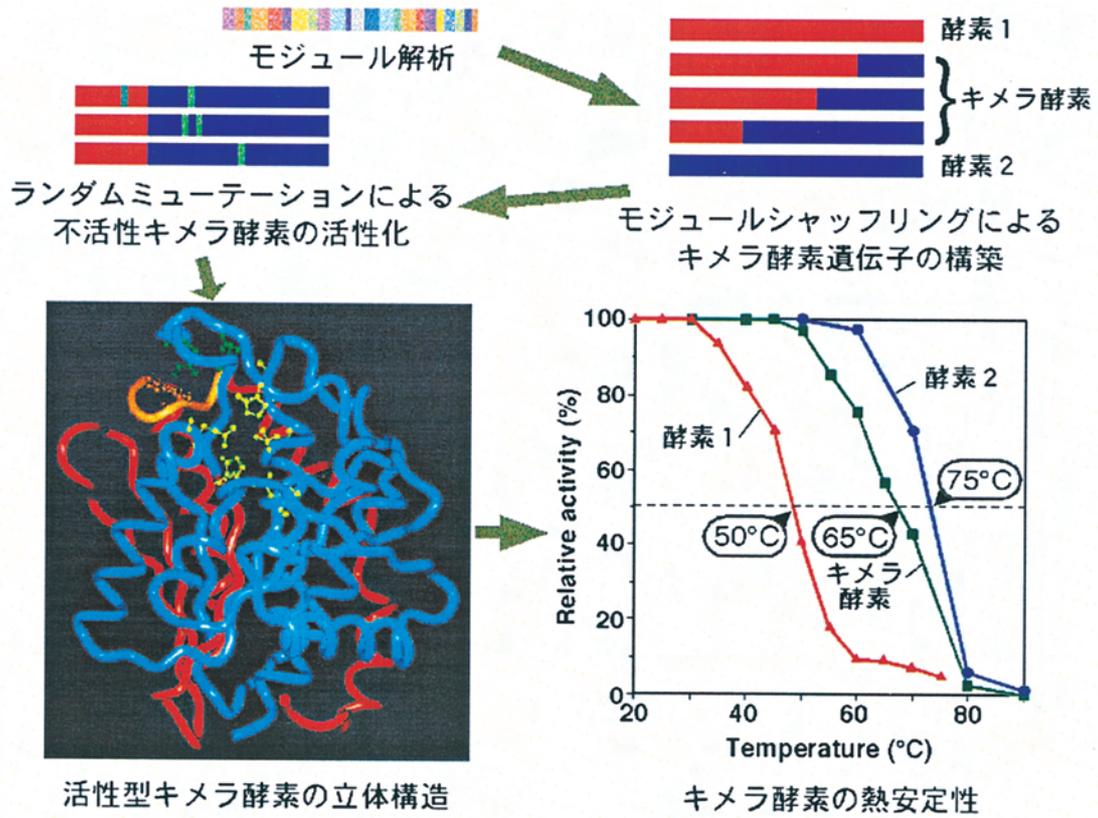


図1 キメラ化によるアミノペプチダーゼの特性改良

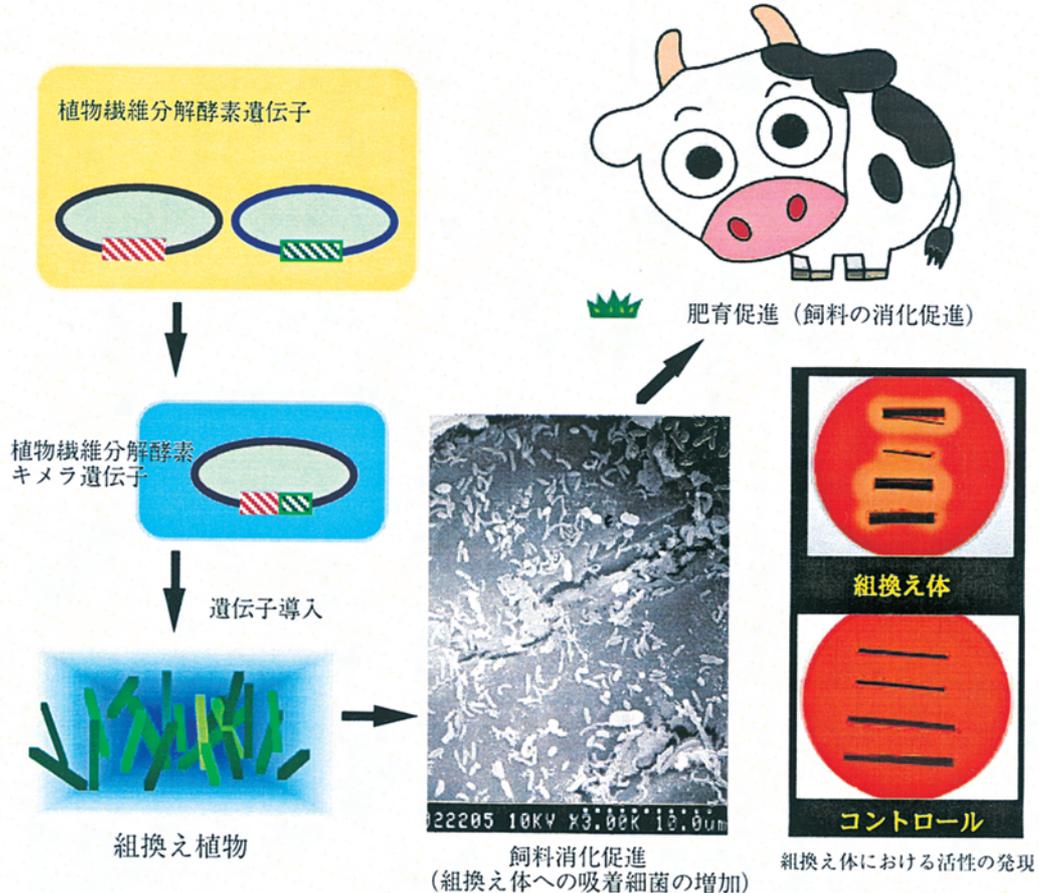


図2 組換えイネにおける飼料効率の向上



### 生物系特定産業技術研究推進機構 東京事務所



営団地下鉄日比谷線 神谷町 徒歩2分  
神谷町駅 霞ヶ関寄り出口3番を出て、左へ10m  
左折後50m右手。虎ノ門マリンビル10階

お問い合わせ先

新技術開発部 基礎研究課

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

電 話 03-3459-6569

F A X 03-3459-6594

E-mail [kisoken@tokyo.brain.go.jp](mailto:kisoken@tokyo.brain.go.jp)

また、インターネットでも  
情報提供を行っています。

生研機構ホームページ・アドレス

URL <http://www.tokyo.brain.go.jp>