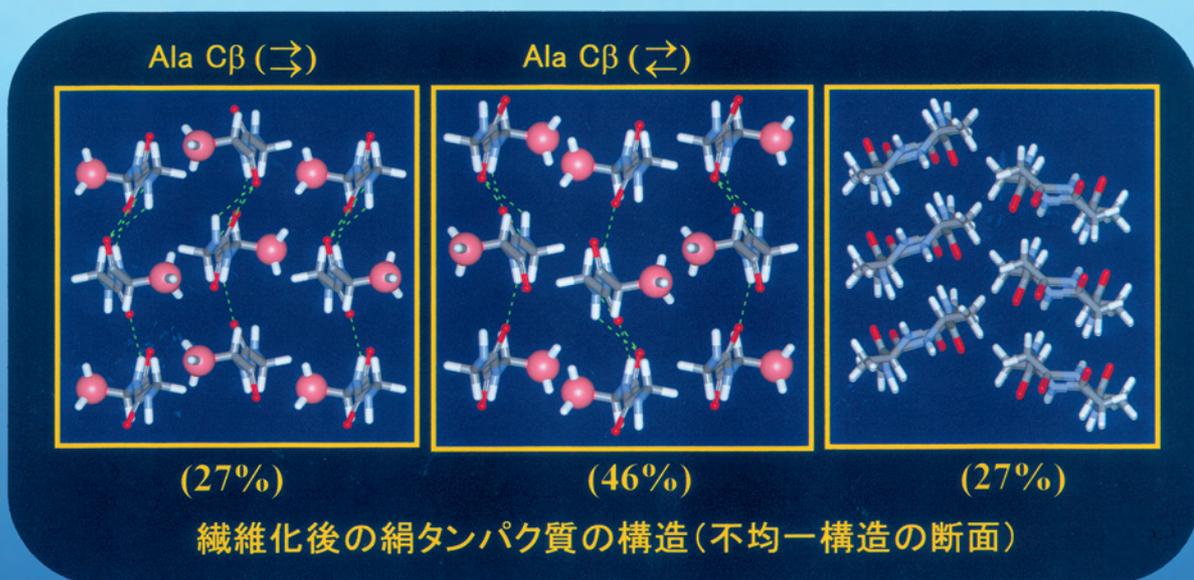
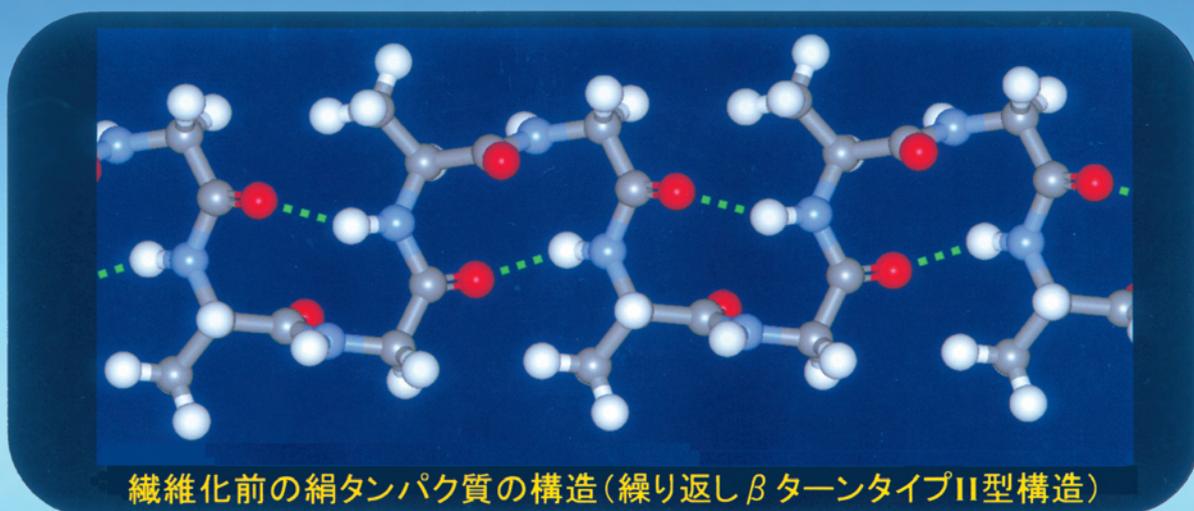


生研機構 基礎研究推進事業 成果発表会

(平成13年度終了課題)



表紙の説明

表紙に掲載の分子構造モデルは、これまで解明が困難であった、蚕が絹をつくる時の繊維化前と繊維化後の絹タンパク質の構造を原子レベルで表したもので、本研究事業の研究によって明らかにされました。

この研究では、固体NMRを駆使した新しい分析手法を開発・使用して、世界で初めてそれらの構造決定と繊維化機構の解明に成功し、その成果により高分子学会賞を受賞するとともに、成果の一部はネイチャーにも発表されました。また、これらの知見を活かして、今後における絹の新たな利用展開に必要な新しい絹の分子設計や新規の絹繊維・絹様材料の作成手法などの基盤技術が整えられました。

(この研究成果の発表課題名:「絹タンパク質の構造-物性相関の徹底解明と新しい絹繊維等の開発」(東京農工大学 朝倉 哲郎))

ご挨拶

生物系特定産業技術研究推進機構

理事長 堤 英 隆



はじめに、生研機構の業務の推進につきまして、日頃からご支援、ご理解をいただいておりますことに深く感謝申し上げます。

平成8年度から提案公募方式で実施しております「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、昨年度に引き続き、第2期の卒業生を送り出すことになりました。昨年度に終了した第1期の課題においては、我が国のライフサイエンスの発展に寄与するような優れた成果が多々生み出され、これを基礎として、新たな実用化段階の成果を目指した研究も推進されております。

平成13年度に終了する20課題につきましても、我が国のライフサイエンスの分野における諸課題に果敢にチャレンジしていただいた結果として、①酵母プリオンの基本特性の解明、②新しい絹繊維・絹様材料の設計及び製造プロセスの開発、③世界で初めての成牛体細胞クローン牛の作出をはじめとして、国際的にも高く評価される成果を世に送り出すことができました。

今回の成果発表会は、それらの成果をあらためて、関係する研究者をはじめ、世の皆様方に披露することによって、将来的な産業技術のシーズの育成ひいては我が国のライフサイエンスや関連産業の発展等に広く寄与することを狙いとしております。

引き続き、皆様方の暖かいご支援をお願い申し上げます。

平成14年3月

3月18日(月曜日)

イネのミュータントパネルを用いた遺伝子機能の系統的解析技術の開発と利用 (農業生物資源研究所 廣近洋彦)	1
イネ QTL に関する遺伝子ネットワークのゲノム生物学的解明 (農業生物資源研究所 佐々木卓治)	3
スギのゲノム解析とその高度利用に関する基礎的研究 (森林総合研究所 長坂壽俊)	5
ジベレリンの輸送・受容・シグナル伝達機構の解明とその制御技術の開発に関する研究 (東京大学 山口五十磨)	7
植物性染色体の全構造決定に基づく性制御技術の開発 (京都大学 大山莞爾)	9
植物における呼吸調節機構の解明とその機能制御 (東京大学 平井篤志)	11
エリターシグナル伝達過程の解析に基づく高度環境適応性作物の開発のための基礎研究 (農業生物資源研究所 渋谷直人)	13

3月19日(火曜日)

植物の情報シグナルによる植物-害虫-天敵三者間の免疫的相互作用(生態免疫系)に関する基礎的研究 (京都大学 高林純示)	15
微生物由来の環境保全型害虫防除蛋白質に関する基盤研究 (岡山大学 酒井 裕)	17
環境微生物の難分解性芳香族化合物分解能の多様性に関する分子生物学・分子生態学的研究 (長岡技術科学大学 福田雅夫)	19
新規脱窒菌を用いた N ₂ O 抑止型好気脱窒システムの構築と水処理への応用 (東京大学 祥雲弘文)	21
モノネガウイルス・レプリコン系の開発と応用 (東京大学 甲斐知恵子)	23
継代培養細胞を用いた家畜繁殖技術の開発に関する基礎的研究 (近畿大学 角田幸雄)	25
消化管機能の分子生物学的解析と計画的食品設計 (東京大学 加藤久典)	27

3月20日(水曜日)

特異性改変植物レクチンライブラリーの作成と細胞交通プローブとしての利用 (東京大学 入村達郎)	29
超単分散性マイクロスフィアを用いた新規な分離場および反応場の構築に関する基礎的研究 (食品総合研究所 中嶋光敏)	31
分子擬態を利用した生物系素材の基礎研究 (東京大学 中村義一)	33
食用植物由来の酸化ストレス制御因子に関する基盤的研究 (名古屋大学 大澤俊彦)	35
金属タンパク質の界面電子移動制御と生物機能の高度利用 (熊本大学 谷口 功)	37
絹タンパク質の構造－物性相関の徹底解明と新しい絹繊維等の開発 (東京農工大学 朝倉哲郎)	39

研究課題名

イネのミュータントパネルを用いた遺伝子機能の系統的解析技術の開発と利用

研究項目及び実施体制(◎は総括研究代表者)

- ①ミュータントパネルの作出と遺伝子機能の系統的解析技術の開発
(◎廣近洋彦／独立行政法人農業生物資源研究所)
- ②破壊遺伝子の効率的解析技術の開発(小野里桂／農林水産先端技術研究所)



廣近洋彦



小野里桂

研究の目的

イネゲノムの構造解析が急速な勢いで進められている。しかし、配列情報だけから遺伝子の機能を知るには限界があり、多くの遺伝子は機能未解明のため有効利用されていない。遺伝子の機能解析法には種々の方法があるが、トランスポゾンを利用した遺伝子破壊法は、一度に多数の遺伝子破壊系統を作出することができ、各破壊系統の示す表現型を解析することにより系統的に遺伝子機能を調べることができるため、ゲノム時代のニーズに合った重要な方法となっている。本研究では、トランスポゾンによる遺伝子破壊を利用して大量の遺伝子破壊イネ系統を作出し、遺伝子の機能を系統的に解析するためのシステムを開発するとともに、これらのシステムを利用して遺伝子の機能解析を進める。

研究の内容

研究代表者らによって発見されたイネのレトロトランスポゾンによる効率的遺伝子破壊を利用し、大量の遺伝子破壊系統の作出を目指すとともに、それらを利用して効率的に機能解析を進めるためのシステムを開発する。具体的には、作出された変異体の表現型のデータベースの構築、目的とする遺伝子の変異体スクリーニングシステムの開発、破壊遺伝子の網羅的解析とデータベース化を目指す。また、これらのシステム及びデータベースを利用して、遺伝子の機能解析を進める。

主要な成果

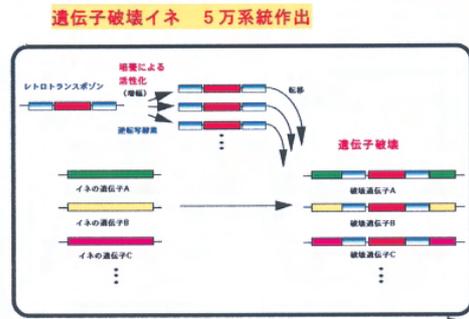
- ①イネの遺伝子機能解析研究を推進するための重要な材料であるミュータントパネル(培養によるレトロトランスポゾン *Tos17* の活性化によってイネ遺伝子を破壊した変異系統群 50,000 系統)を作出した。
- ②レトロトランスポゾンの挿入により破壊された 12,000 件の遺伝子の配列を明らかにした。類似性検索により、代謝、転写調節、翻訳調節、シグナルの受容、伝達に関与すると推定される遺伝子や、病害抵抗性、形態形成関連遺伝子等、種々のクラスの遺伝子が破壊された変異系統を同定した。
- ③PCRによる変異体スクリーニングシステムを開発した。4万種類の変異系統の中から目的とする遺伝子の変異体をスクリーニングすることが可能となった。
- ④上記のシステム及びデータベースを利用して機能解析をすすめ、30種類の遺伝子の機能を明らかにした。そのうち塩ストレス耐性や、草型、草丈を制御する遺伝子等5種類について、特許出願を行った。

主な発表論文

- Sato Y., *et al.* : Loss-of-function mutations in the rice homeobox gene *OSH15* affect the architecture of internodes resulting in dwarf plants : *EMBO J.*, 15: 992-1002 (1999)
- Agrawal G. K., *et al.* : Screening of the rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon *Tos17* insertion: Tagging of a zeaxanthin epoxidase gene and a novel *OsTATC* gene : *Plant Physiol.*, 125: 1248-1257 (2001)
- Takano M., *et al.* : Isolation and characterization of rice phytochrome A mutants : *Plant Cell*, 13: 521-534 (2001)
- Yamazaki M., *et al.* : The rice retrotransposon *Tos17* prefers low-copy number sequences as integration targets : *Mol. Genet. Genomics*, 265: 336-344 (2001)
- Hirochika H. : Contribution of the *Tos17* retrotransposon to rice functional genomics : *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4 : 118-122 (2001)

研究のイメージ

①培養によるレトロトランスポソンの活性化と大量遺伝子破壊



④ 遺伝子単離、機能解析

30種類の遺伝子の生物機能解明

単離、機能解析された遺伝子

変異体の表現型 (遺伝子機能)	破壊遺伝子
半矮性 (遺伝子発現の抑制)	新規核移行タンパク質遺伝子
半矮性 (節間伸長)	homeobox gene (<i>OSH15</i>)
半矮性 (節間、穂の伸長)	receptor-like protein kinase
極矮性 (ジベレリン合成)	P450
極矮性 (ジベレリン合成)	<i>ent</i> -kaurene synthase
細葉 (横方向伸長)	新規遺伝子
茎頂分裂組織異常 (茎頂分裂組織の形成)	NAC domain protein
穎花異常、不稔 (花器官の分化)	<i>OsMADS1</i>
鎌いらず (セルロース合成)	cellulose synthase (<i>OsCesA4, 7, 11</i>)
胚発生異常 (胚発生、器官分化)	MAP kinase (<i>OsMPK2</i>)
側根伸長阻害 (側根伸長)	ring finger protein
光形態形成異常 (光形態形成)	phytochrome A
閉穎異常 (閉穎)	GH3様遺伝子
穂発芽 (7-シジノ酸合成)	zeaxanthin epoxidase
穂発芽、黄緑葉 (葉緑体の機能)	TatC様遺伝子
疑似病斑変異 (耐病性)	新規プロテインキナーゼ
塩ストレス感受性 (塩ストレス耐性)	新規遺伝子

②破壊遺伝子の大量解析、データベース化

12,000件の破壊遺伝子の解析

破壊遺伝子の類似性検索に基づく分類

Category	Number
Cell growth/division	332
Cell structure	74
Disease/defence	778
Energy	37
Intracellular traffic	20
Metabolism	439
Protein destination and storage	85
Protein synthesis	50
Secondary Metabolism	64
Signal transduction	508
Transcription	222
Transporters	242
Transposons	473
Unclear classification	2124
Total hit	5448
Total Independent Insertions	12136
31593 sequences (3275 lines) analyzed.	

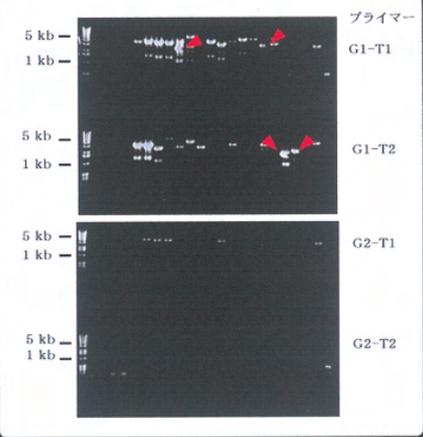
Nov 16, 2001

③変異体のスクリーニングシステムの開発

40,000系統のスクリーニングが可能

PCRスクリーニングの例

10944系統をスクリーニングした結果、4種類の変異系統の存在が示された (矢印)。



研究課題名

イネ QTL に関する遺伝子ネットワークのゲノム生物学的解明

研究項目及び実施体制(◎は総括研究代表者)

- ①実験系統群の作出および環境適応性形質の評価(吉村 淳/九州大学大学院農学研究院)
- ②環境適応性形質の遺伝解析(◎佐々木卓治/独立行政法人農業生物資源研究所)
- ③環境適応性形質関連遺伝子の単離及びその発現機構の解析(山内歌子/農林水産先端技術研究所)



吉村 淳

研究の目的

植物の品種あるいは個体間には多様な表現形質の変異が認められる。これらの変異の多くは、複数の遺伝子の制御と環境の影響を受け複雑な遺伝をすることから、従来は分子レベルでの研究対象とされなかった。本研究では、イネゲノム解析研究において作出された様々な研究資源を活用し、イネの開花期(出穂期)を複雑形質のモデルとして、関与遺伝子座(QTL)の検出ならびに遺伝子の単離・同定ならびに出穂期の遺伝的調節機構の解明を目的とした。



佐々木卓治

研究の内容

近縁野生種を含めた多様な遺伝資源を利用して、遺伝解析に利用可能な実験系統群を作出する。DNA マーカーを用いて出穂期に関する遺伝解析を行い、それぞれの形質に関与する QTL の染色体上での位置を決定する。QTL の準同質遺伝子系統(NIL)を作出し、遺伝子作用ならびに遺伝子間相互作用の解析を行う。出穂期関連 QTL について、マップベースクローニング法により遺伝子を単離・同定する。単離した遺伝子の発現解析ならびに遺伝学的相互作用の解析結果に基づき出穂期の遺伝的調節機構のモデルを構築する。



山内歌子

主要な成果

- ①作出した実験系統群を活用して、イネの出穂期に少なくとも 15 種類の QTL が関与していることを明らかにした(図2)。
- ②7 種類の QTL が感光性(日長に依存する開花)に関与することを明らかにした(図2)。感光性遺伝子座間には遺伝子間相互作用が見出され、*Hd1* は感光性の発現において極めて重要な役割を果たしていることが示唆された(図3)。
- ③マップベースクローニング法により感光性関連 QTL (*Hd1*, *Hd3a*, *Hd6*) を単離・同定した。シロイヌナズナとの比較において、*Hd1*, *Hd3a* は開花関連遺伝子 *CO* および *FT* と類似する構造をもっており、*Hd6* は生物時計に関連するプロテインカイネース *CK2 α* 遺伝子に類似する構造を有していた(図3)。さらに、*Hd5*, *Hd9* および *Hd14(Ehd)* の候補遺伝子を特定した。
- ④イネの出穂(開花)に関する遺伝的制御機構のモデルを構築した(図3)。短日条件では *Hd1* 遺伝子が *Hd3a* 遺伝子の転写レベルを上げることで出穂が促進されており、シロイヌナズナの長日条件における *CO* および *FT* 遺伝子との機能の類似性が明らかとなった。一方、長日条件では、*Hd1* 遺伝子が他の感光性遺伝子 (*Hd2*, *Hd3b*, *Hd5* および *Hd6*) と協調して出穂の抑制因子として働いていることが推定された。
- ⑤イネ開花調節の遺伝的制御機構解明は、短日植物における初めての例であり、シロイヌナズナ(長日植物)との比較生物学において重要な知見となった。自然変異を利用した遺伝子機能解析の本研究手法は、他の形質への応用が期待される。

主な発表論文

- Yamamoto T., *et al.* : Identification of heading date quantitative trait locus *Hd6* and characterization of its epistatic interactions with *Hd2* in rice using advanced backcross progeny : *Genetics*, 154: 885-891 (2000)
- Yano M., *et al.* : *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene *CONSTANS* : *Plant Cell*, 12: 2473-2483 (2000)
- Yano M. : Genetic and molecular dissection of naturally occurring variations : *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4: 130-135 (2001)
- Takahashi Y., *et al.* : *Hd6*, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the alpha subunit of protein kinase CK2 : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 7922-7927 (2001)
- Yano M., *et al.* : Genetic control of flowering time in rice, a short-day plant : *Plant Physiol.*, 127: 1425-1429 (2001)

研究課題名

スギのゲノム解析とその高度利用に関する基礎的研究

研究項目及び実施体制(◎は総括研究代表者)

スギのゲノム解析とその高度利用に関する基礎的研究

(◎長坂壽俊／独立行政法人森林総合研究所)

- ①スギゲノム上の遺伝マーカーの開発と高密度基盤連鎖地図の確立
(津村義彦／独立行政法人森林総合研究所)
- ②スギ材質関連遺伝子の QTL 解析(近藤禎二／独立行政法人林木育種センター)
- ③スギ花粉 cDNA クローンの構造及び発現解析と多型マーカーのスクリーニング
(向井 譲／静岡大学農学部)
- ④スギゲノム上の遺伝子マーカーのシーケンス情報に基づく分子進化学的解析
(舘田英典／九州大学大学院理学研究院)



長坂壽俊



津村義彦



近藤禎二



向井 譲



舘田英典

研究の目的

林木の遺伝育種には二つの重要な課題がある。一つは育種年限の大幅短縮を中心とした林木育種の高度化であり、あと一つは林木集団の遺伝解析に基づく森林の遺伝的多様性の合理的な保全である。林木のゲノム解析研究では、表裏一体のこれら二つの重要課題をブレイクスルーするための基礎研究を行う。

研究の内容

日本の固有種であり重要な植林樹種でもあるスギは、成長や材質の改良、花粉症対策など様々な問題についての解決が求められている。本研究では、簡便で情報量の多い DNA 遺伝マーカーの開発を通して、ゲノム全体をカバーする連鎖解析を行い、高密度な基盤連鎖地図を構築する。また、この連鎖地図をベースに、アレルゲン関連遺伝子のマッピングおよび育種に有用な材質関連遺伝子の QTL マッピングを行うとともに、分子進化学的手法による適応的遺伝変異の探索を行う。さらに、ゲノム解析の情報を、天然林の遺伝的多様性の解析に適用することにより、失われつつある森林資源の効果的な遺伝的管理手法の構築にも寄与する。

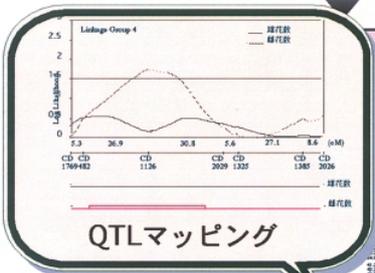
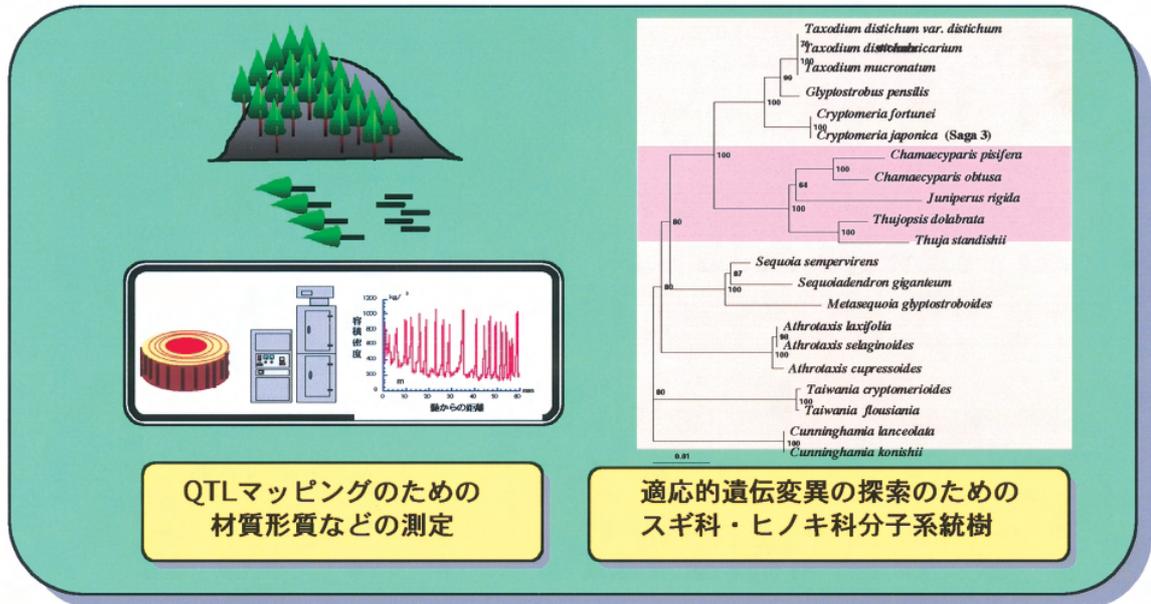
主要な成果

- ①スギの高密度連鎖地図の作製を行った。連鎖地図を効率的に構築するための共優性遺伝マーカーを多数開発した。また、これらの共優性遺伝マーカーで全国に分布するスギ天然林集団の遺伝的多様性の評価を行い、地域的な特徴を明らかにした。
- ②ヤング率等の材質関連遺伝子の QTL 解析を行い、検出のための DNA マーカーを開発した。
- ③花粉アレルゲン遺伝子の特性および連鎖群での位置を明らかにした。
- ④種内・種間の塩基配列変異パターンを自然淘汰との関係で理論的に明らかにした。スギ・ヒノキ科樹木の系統関係を葉緑体 DNA 配列から推定し、更に核遺伝子の分子進化学的解析から適応的変異候補サイトの存在を明らかにした。

主な発表論文

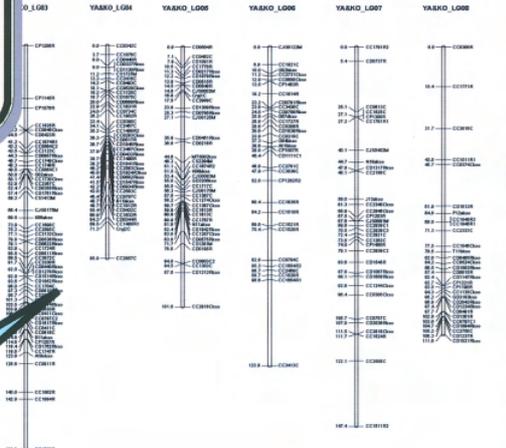
- Iwata H., *et al.* : Cleaved amplified polymorphic sequence markers in sugi, *Cryptomeria japonica* D. Don, and their locations on the linkage map : *Theor. Appl. Genet.*, 103: 881-895(2001)
- Tsumura Y. & N. Tomaru : Genetic diversity of *Cryptomeria japonica* using co-dominant DNA markers based on sequence tagged site : *Theor. Appl. Genet.*, 98: 396-404(1999)
- Kuramoto N., *et al.* : Detection of quantitative trait loci for wood strength in *Cryptomeria japonica* : *Can. J. For. Res.*, 30: 1525-1533(2000)
- Kusumi J., *et al.* : Phylogenetic relationships in Taxodiaceae and Cupressaceae based on the matK, chlL, trnL-trnF IGS region and trnL intron sequences : *Am. J. Bot.*, 87: 1480-1488(2000)
- Tachida H. : Molecular evolution in multisite nearly neutral mutation model : *J. Mol. Evol.*, 50(1): 69-81 (2000)

研究のイメージ



QTLマッピング

分子集団遺伝学的手法による
適応的遺伝子の探索



花粉アレルゲン遺伝子のマッピング

基盤連鎖地図
484遺伝子座、総地図距離1287.9 cM



連鎖地図ベースの
遺伝資源調査

・ 林木育種の高度化
・ 遺伝資源及び多様性の高度管理・利用

研究課題名

ジベレリンの輸送・受容・シグナル伝達機構の解明とその制御技術の開発に関する研究

研究項目及び実施体制(◎は総括研究代表者)

- ①ジベレリン結合タンパク質に関する研究(中嶋正敏/東京大学大学院農学生命科学研究科)
- ②ジベレリンのシグナル伝達機構の解明に関する研究
(鈴木義人/東京大学大学院農学生命科学研究科)
- ③抗体を用いたジベレリンの輸送制御に関する研究
(◎山口五十磨/東京大学大学院農学生命科学研究科)



中嶋正敏



鈴木義人



山口五十磨

研究の目的

発芽や伸長成長、性の表現など植物のさまざまな生理現象に深く関わっている植物ホルモンであるジベレリン(GA)の受容とシグナル伝達の初期過程における分子機構を明らかにするとともに、抗体を用いて通導組織を介したGAの輸送や移行を制御する手法を開発し、植物の成長調節の新たな技術の開発に貢献する。

研究の内容

ジベレリン受容体の解明を目指して、アズキ胚軸のGA結合タンパク質を特定するための精製を進めるとともに、酵母を用いたthree-hybrid系やG α 共役受容体検索系を構築し、受容体遺伝子の検索を試みた。また、GA応答性アラビノガラクトタン蛋白質(AGP)遺伝子をクローニングし、アズキ、キュウリ等の胚軸伸長に対するGAの作用におけるAGPの関与、大麦種子における α -アミラーゼ誘導におけるGAシグナル伝達系上のAGPの関与について追究した。さらに、抗GA一本鎖抗体の構築と植物への導入を利用した、成長制御技術の開発を目指した。

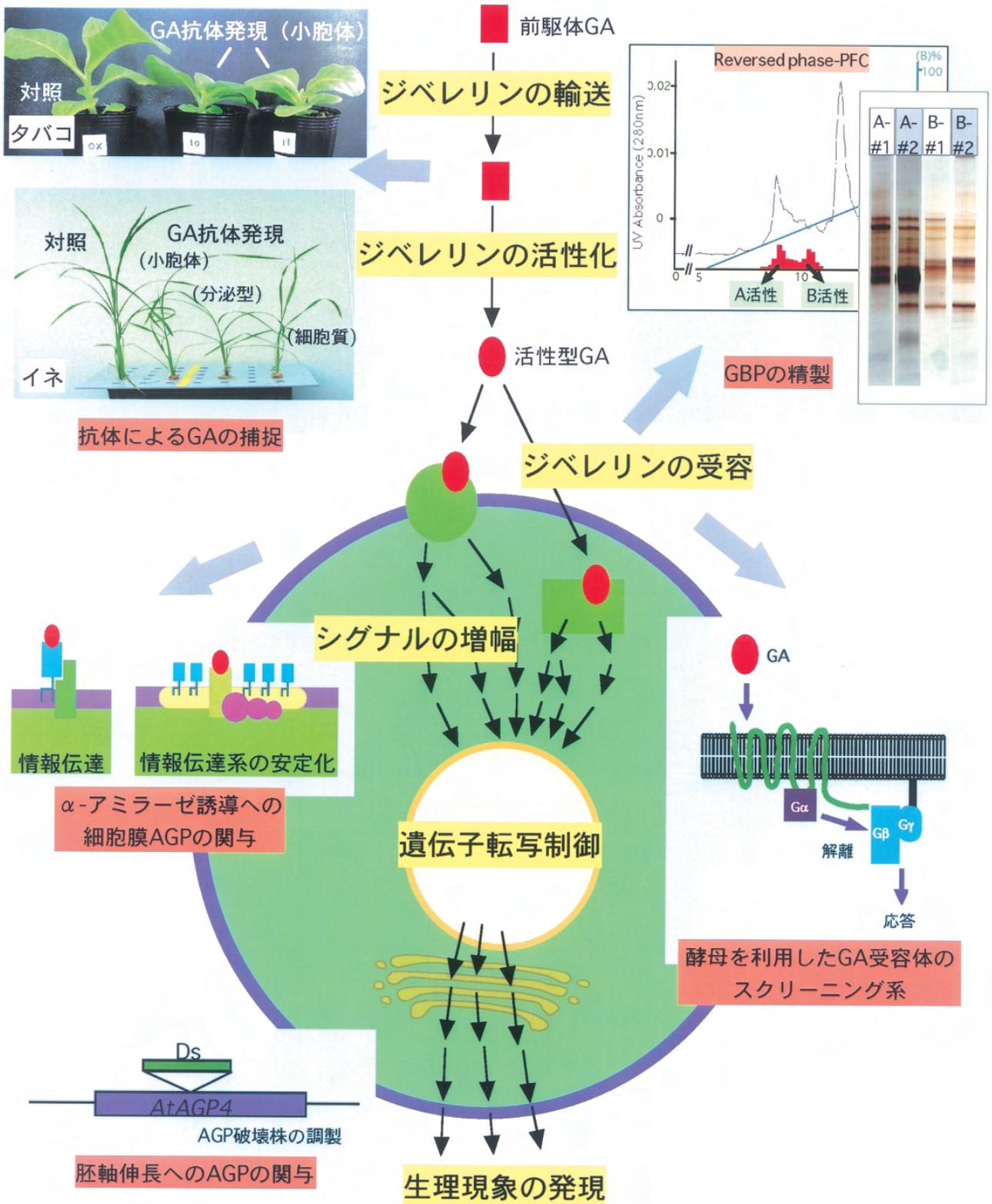
主要な成果

- ①アズキのGA結合タンパク質として2つの活性成分(A・B活性)が存在すること、両活性成分とも活性型GAに高い親和性(Kd=6 \times 10⁻¹⁰M)を示すこと、分子質量(25~30kDa)や等電点(pI=8~9)も非常に類似していること、存在量は約0.1pmol/kgFWであることを明らかにした。B活性を約50万倍まで濃縮し、候補タンパク質についての検討を行っている。
- ②植物のG α サブユニットを酵母に組み込み、G α の関与が示唆されているGA受容体をコードする遺伝子のスクリーニング系を開発した。
- ③キュウリ胚軸からのGA応答性AGP遺伝子の同定を起点に、アズキ、キュウリにおける胚軸伸長にAGPが必要であることを明らかにした。また、シロイヌナズナのAGPの一つであるAtAGP4の破壊株を調製した。
- ④さらに、大麦アリュuron細胞での α -アミラーゼ誘導におけるGA情報伝達に細胞膜AGPの関与を明らかにした。
- ⑤輸送型と考えられる活性型GAの前駆体、GA_{19/24}に対する抗体を一本鎖抗体としてタバコでは植物体全体で、イネでは伴細胞特異的に発現させ、GAの生合成や輸送を攪乱することにより、背丈の低くなる変異体を作成した。

主な発表論文

- Chono M., *et al.*: Characterization of a protein kinase gene responsive to auxin and gibberellin in cucumber hypocotyls: *Plant Cell Physiol.*, 39: 958-967 (1998)
- Suzuki Y., *et al.*: Preparation and application of anti-idiotypic antibody against anti-gibberellin A₄ antibody: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63: 648-654 (1999)
- Shimada N., *et al.*: Expression of a functional single-chain antibody against GA_{24/19} in transgenic tobacco: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63: 779-783 (1999)
- Suzuki Y., *et al.*: A novel transposon tagging element for obtaining gain-of-function mutants based on a self-stabilizing Ac derivative: *Plant Mol. Biol.*, 45: 123-131 (2001)
- Chono M., *et al.*: Expression pattern of the CsPK3 auxin-responsive protein kinase gene: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63: 605-612 (2001)

研究のイメージ



研究課題名

植物性染色体の全構造決定に基づく性制御技術の開発

研究項目及び実施体制(◎は総括研究代表者)

- ①植物性染色体の全構造解析に基づく性制御技術の開発
(◎大山莞爾／京都大学大学院生命科学研究科)
- ②性染色体単離による性染色体特異的遺伝子群の単離
(中山繁樹／独立行政法人農業生物資源研究所)



大山莞爾

研究の目的

雌雄異株植物の中には性染色体を有するものがあり、哺乳動物の場合と同様、性染色体に性決定・性分化関連遺伝子がコードされていると考えられる。植物性染色体に関する研究は、これまで主に大型の性染色体をもつヒロハノマンテマを用いて行われてきたが、性決定因子の同定には至っていない。そこで、雌雄異株植物であるゼニゴケの小型の性染色体を網羅的に解析し、植物における性の決定・分化に必要な遺伝子群とその制御機構の解明を行う。



中山繁樹

研究の内容

ゼニゴケは雌雄異株植物であるとともに、生活環のほとんどを半数体として過ごすので、性染色体について雄株はY染色体のみ、雌株はX染色体のみを有する。本研究課題では、ゼニゴケのこのY染色体・X染色体の排他性を利用して、雄および雌に特異的な遺伝情報を個別に解析する。まず、染色体上の遺伝子の位置を知るための超高効率FISH法の開発を行いながら、ゼニゴケ性染色体DNAを単離する。次いで性染色体の全塩基配列を明らかにし、性の決定・分化に必要な遺伝子群を単離・解析する。

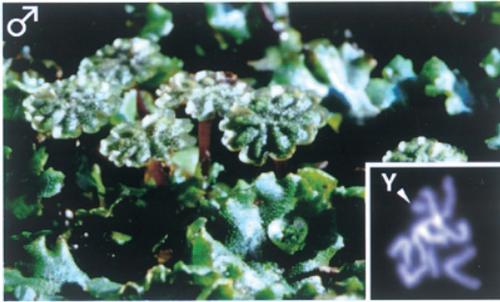
主要な成果

- ①ゼニゴケ雌株・雄株それぞれについてゲノミックライブラリーを作成し、Y染色体に由来するクローン pMM4G7を得た(*Plant J.*, 2000)。このクローンの解析から、ゼニゴケY染色体には特異的の反復配列が蓄積している領域があり、その領域のみに存在して雄生殖器官特異的に発現している遺伝子 ORF162 を見いだした(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001)。
- ②染色体DNA マーカーを単離した(*Genetics*, 2001)。それらを用いた染色体ウォーキングにより、Y染色体については合計で約5Mbのコンティグ地図を作製した。
- ③パーティクルガンによるゼニゴケの形質転換系を開発した(*Transgenic Res.*, 2000)。この系を利用して約2000のタグラインを作成し、その中から生殖器を恒常的に誘導する変異株を単離した。
- ④ゼニゴケのX染色体に存在する45SリボソームDNAクラスターにX染色体特異的な反復配列が存在することを明らかにした。X、Y染色体それぞれに特異的に存在する反復配列の解析から、塩基配列の付加と反復が、ゼニゴケ性染色体の分化に重要な役割を果たしていると考えられることを明らかにした(*Chromosome Res.*, 2001)。

主な発表論文

- Okada S., *et al.* : Construction of male and female PAC genomic libraries suitable for identification of Y-chromosome-specific clones from the liverwort, *Marchantia polymorpha* : *Plant J.*, 24: 421-428 (2000)
- Okada S., *et al.* : The Y chromosome in the liverwort *Marchantia polymorpha* has accumulated unique repeat sequences harboring a male-specific gene: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 9454-9459 (2001)
- Fujisawa M., *et al.* : Isolation of X- and Y-chromosome-specific DNA markers from a liverwort, *Marchantia polymorpha*, by representational difference analysis : *Genetics.*, 159: 981-985 (2001)
- Takenaka M., *et al.* : Direct transformation and plant regeneration of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L. : *Transgenic Res.*, 9: 179-185 (2000)
- Nakayama S., *et al.* : Additional locus of rDNA sequence specific to the X chromosome of the liverwort, *Marchantia polymorpha* : *Chromosome Res.*, 9: 469-473 (2001)

研究のイメージ

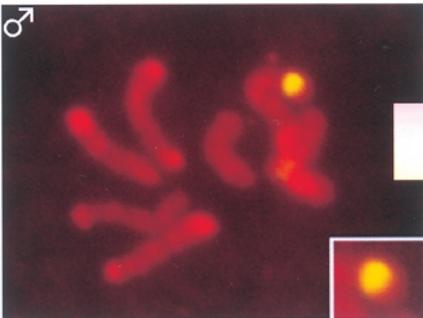


ゼニゴケ雄株の生殖器。右下は染色体像で、Y染色体を矢印で示す。

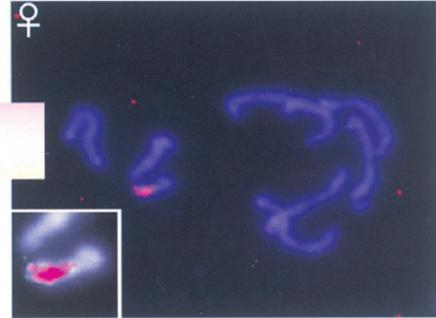


ゼニゴケ雌株の生殖器。右下は染色体像で、X染色体を矢印で示す。

雄株・雌株それぞれの
ゲノムライブラリーの作製

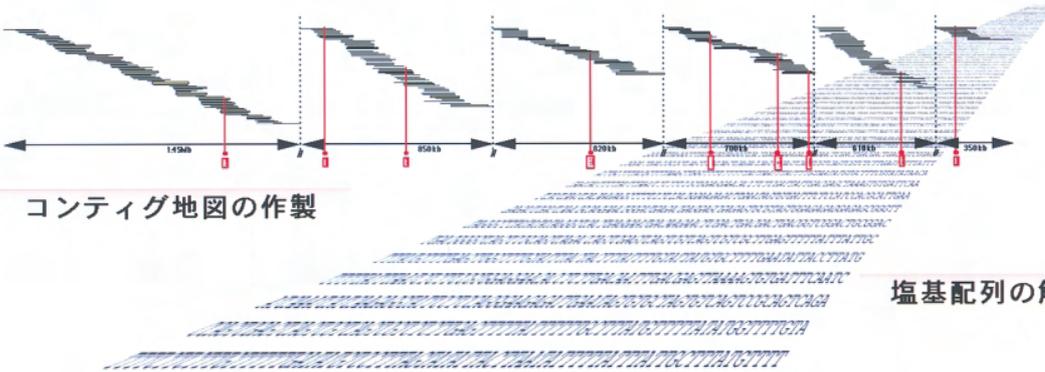


Y染色体特異的の反復配列のシグナル（黄）。右下はY染色体の拡大図。



X染色体特異的の反復配列（赤）のシグナル。左下はX染色体の拡大図。

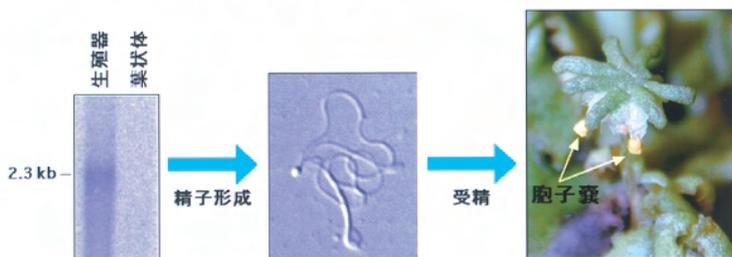
FISHによる性染色体
クローンの単離と解析



コンティグ地図の作製

塩基配列の解読

性制御に関する遺伝子



精子形成に関する遺伝子

ORF162はY染色体のみに存在する遺伝子で、生殖器官特異的に発現している。



生殖器誘導の制御遺伝子

hpt2040株は、恒常的に生殖器を形成する。

研究課題名

植物における呼吸調節機構の解明とその機能制御

研究項目及び実施体制(◎は総括研究代表者)

- ①環境応答における核・ミトコンドリアのクロストークの解析
(◎平井篤志/東京大学大学院農学生命科学研究科)
- ②雄性不稔発現の分子機構解明(三上哲夫/北海道大学大学院農学研究科)



平井篤志

研究の目的

エネルギー代謝で重要な働きをする植物ミトコンドリアにおける呼吸調節機構の解明をめざし、ミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定すると共に、一連の呼吸関連核遺伝子の構造も明らかにする。さらにこれらの遺伝子の低温、冠水などのストレスに応答する発現を調べる。以上を通して呼吸に依存する農業特性と考えられる作物の細胞質雄性不稔・障害型冷害・冠水抵抗性などの分子機構を解明し、その制御を試みる。



三上哲夫

研究の内容

イネにおいて呼吸に関連する遺伝子の構造と環境に応答するそれらの発現変動をノーザン法やウエスタン法で調べ、植物の環境応答機構を解明する。特に、イネは冠水抵抗性が高い作物なので、その機構を調べる。

テンサイの正常株と細胞質雄性不稔株のミトコンドリアゲノムに含まれる遺伝情報を全て解読し、両ゲノム間の比較解析を行って雄性不稔原因遺伝子を明らかにする。また、この原因ミトコンドリア遺伝子の作用を抑えて花粉稔性の回復をもたらす稔性回復核遺伝子を、ポジショナルクローニングにより単離する。

主要な成果

- ①イネの冠水抵抗性がミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素(ALDH2)の発現による有毒なアセトアルデヒドの無毒化によることを明らかにした(図1)。
- ②トウモロコシで稔性回復遺伝子であるALDH2はイネでもアセチルCoA合成酵素(ACS)と共に開花期の穂で発現し、脂質合成などにより稔性に関係していることを示した(図2)。
- ③テンサイの正常株および細胞質雄性不稔株のミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決め、それぞれ368,799bp、501,022bpから成ることを明らかにした。両ゲノムの全一次構造をセットで解読したのはテンサイが最初の事例である(図2)。
- ④雄性不稔原因遺伝子の有力候補としてatp6プレシーケンスを見出した(図3)。また、これまで報告例のない新規のシステイン tRNA 遺伝子を発見した。
- ⑤稔性回復核遺伝子Xに近接するマーカーを含むBACクローンを得た。このクローンの解析をもとに、X遺伝子の単離が進展中である。

主な発表論文

- Kubo T., *et al.* : Alterations in organization and transcription of the mitochondrial genomes of cytoplasmic male sterile sugar beet (*Beta vulgaris* L.) : *Mol. Gen. Genet.*, 262: 283-290 (1999)
- Arimura S., *et al.* : A novel plant nuclear gene coding for chloroplast ribosomal protein S9 has a transit peptide related to that of rice chloroplast ribosomal protein L12 : *FEBS Lett.*, 450: 231-234 (1999)
- Nakazono M., *et al.* : Expression of a gene encoding mitochondrial aldehyde dehydrogenase in rice increases under submerged conditions : *Plant Physiol.*, 124: 587-598 (2000)
- Tsuji H., *et al.* : Transcript levels of the nuclear-encoded respiratory genes in rice decrease by oxygen deprivation : evidence for involvement of calcium in expression of the alternative oxidase 1a gene : *FEBS Lett.*, 471: 201-204 (2000)
- Kubo T., *et al.* : The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNACys(GCA) : *Nucleic Acids Res.*, 28: 2571-2576 (2000)

研究のイメージ

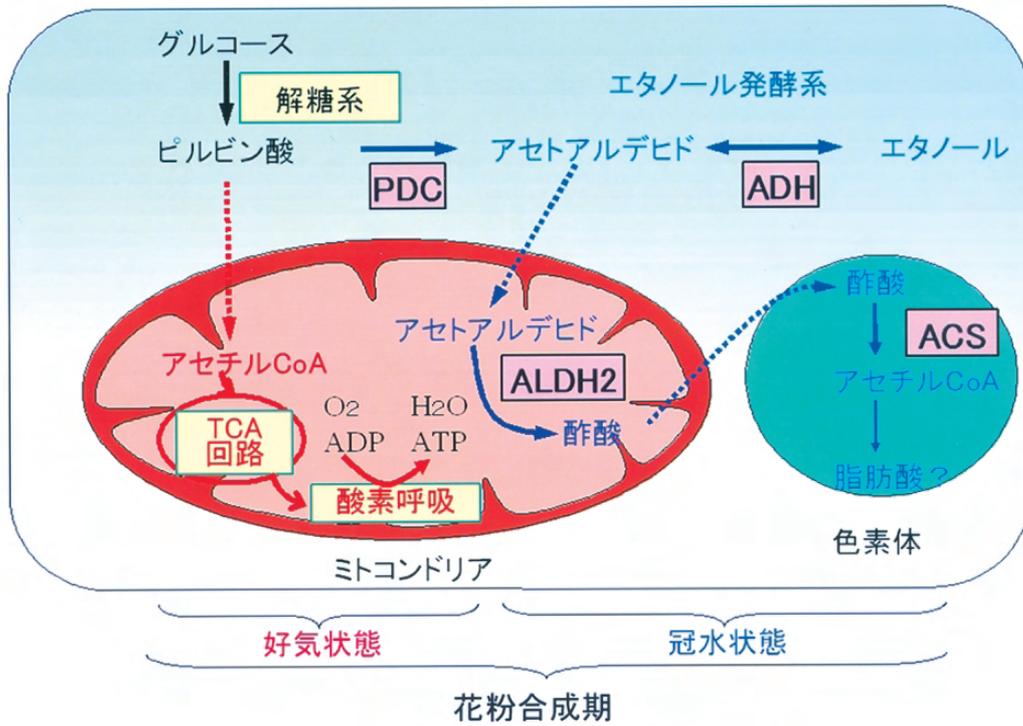


図1 イネにおける冠水時および花粉合成期の呼吸関連代謝経路

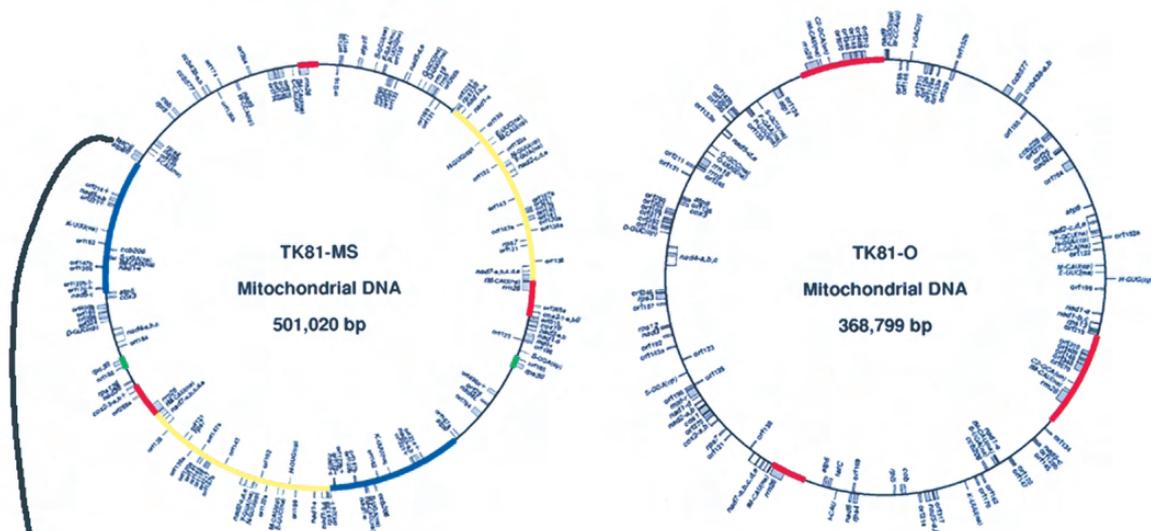


図2 テンサイ細胞質雄性不稔株（左）と正常株（右）のミトコンドリアゲノム全塩基配列決定



図3 テンサイ細胞質雄性不稔株性原因遺伝子となりうる preSATP6 ポリペプチドの発現様式

研究課題名

エリシターシグナル伝達過程の解析に基づく高度環境適応性作物の開発のための基礎研究

研究項目及び実施体制(◎は総括研究代表者)

- ①エリシターの構造・機能解析(◎渋谷直人/独立行政法人農業生物資源研究所)
- ②エリシターシグナルの受容・伝達過程の生化学的解析(賀来華江/独立行政法人農業生物資源研究所)
- ③エリシター応答性遺伝子の機能と発現調節機構の解析(南 栄一/独立行政法人農業生物資源研究所)



渋谷直人

研究の目的

植物が病原菌由来のシグナル分子(エリシター)を認識し、細胞内・細胞間シグナル伝達経路を経て生体防御関連遺伝子の発現を誘導するメカニズムを明らかにすることにより、植物の外界に対する応答や適応能力をシグナルの検出と伝達というレベルで制御する技術の開発基盤を確立することを目的とする。



南 栄一

研究の内容

イネ培養細胞に防御応答を誘導する新規なエリシターの単離・構造解析を行う。培養細胞を用いたモデル系を利用して、エリシターの受容に関わる分子とその下流のシグナル伝達系の解析を行う。エリシターによって誘導される遺伝子群の発現制御機構ならびに防御応答における役割を解析する。培養細胞で得られた結果と植物体レベルでの防御応答との関連を調べる。



賀来華江

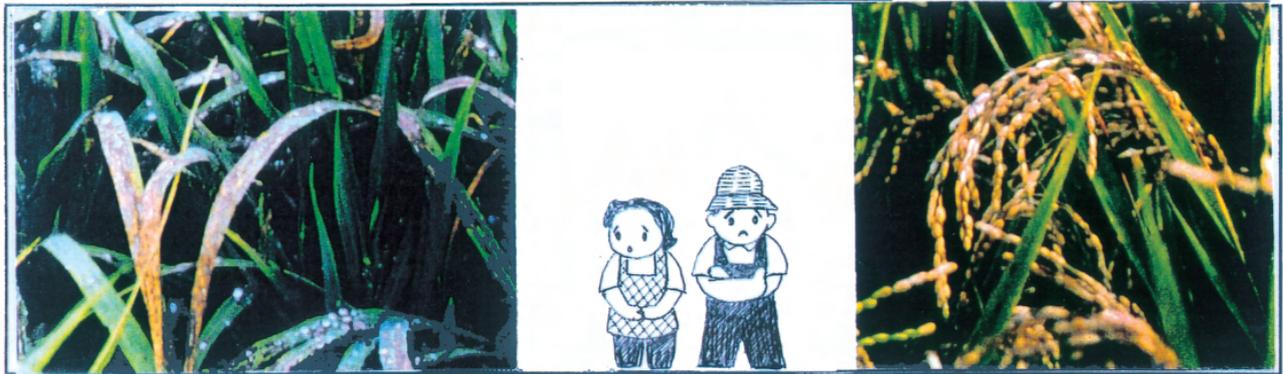
主要な成果

- ①イモチ病菌細胞壁βグルカンから強いエリシター活性を示す新規5糖を単離し、構造を解明した。イネとダイズでは全く異なるグルカン断片をエリシターとして認識することを示した。
- ②イネ培養細胞原形質膜からキチンオリゴ糖エリシター受容体と想定される膜糖タンパク質を単離精製した。この分子はエリシター刺激により膜上で2量体を形成しシグナル伝達を行うことが示唆された。類似した分子が様々な植物細胞原形質膜に存在し、エリシター応答性とも対応することから、これらが進化的に保存された防御応答関連受容体分子であることが示唆された。本受容体を介したシグナル伝達は3量体Gタンパク質を必要としないことを変異体を用いて明らかにした。
- ③エリシターにより誘導される活性酸素生成や一部遺伝子の発現は、PLC/PLDの活性化とホスファチジン酸の生成により制御されていることを示した。エリシター応答性遺伝子の発現に至るシグナル伝達経路は、細胞質酸性化、ジャスモン酸、タンパクキナーゼ・ホスファターゼ阻害剤に対する感受性、タンパク合成の要求性などで区別される複雑な分岐構造をもち、その上流にCa²⁺による制御が存在することが示唆された。
- ④エリシター初期応答遺伝子として単離したRing-H2 finger型遺伝子(EL5)がユビキチンリガーゼであること、ユビキチン結合酵素も同時に発現誘導されることを明らかにし、エリシター応答の際にユビキチン・プロテアソーム系を介したタンパク分解系が活性化されていることを示唆した。
- ⑤切除葉にキチンオリゴ糖を処理すると葉肉細胞にEL2, EL3の2種のエリシター応答性遺伝子の発現誘導が見られた。また、キチンオリゴ糖を根に処理した芽生えの葉身で、いもち病菌に対する誘導抵抗性が観察された。

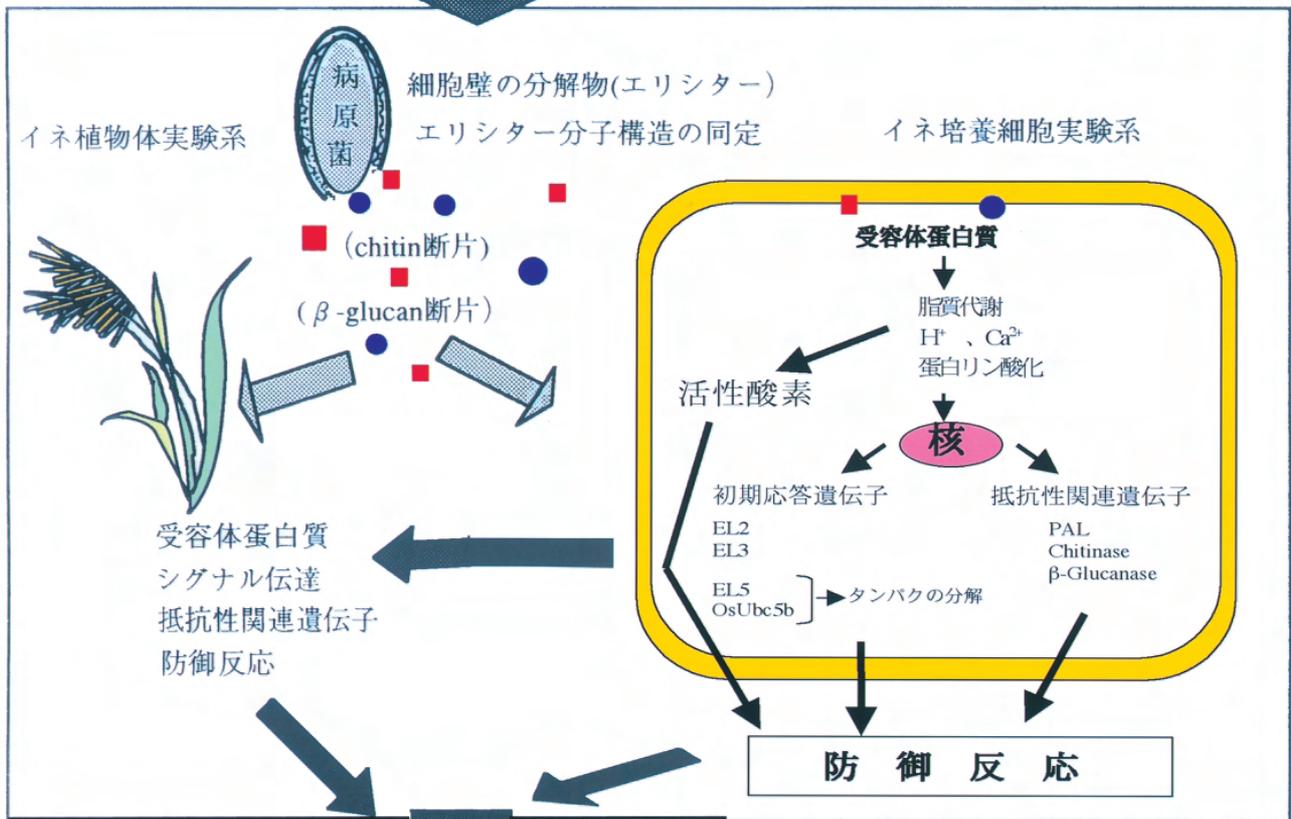
主な論文発表

- Ito Y., *et al.* : Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitoooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling : *Plant J.*, 12: 347-356 (1997)
- He D-Y., *et al.* : Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor, N-acetylchitoheptaose : *Mol. Plant Microbe Int.*, 11: 1167-1174 (1998)
- Yamaguchi T., *et al.* : Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: β-glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells : *Plant Cell*, 12: 817-826 (2000)
- Takai R., *et al.* : Isolation and analysis of expression mechanisms of a rice gene, EL5, which shows structural similarity to ATL family from *Arabidopsis*, in response to N-acetylchitoooligosaccharide elicitor : *Plant Sci.*, 160: 577-583 (2001)
- N. Shibuya & E. Minami : Oligosaccharide Signaling for Defense Responses in Plant : *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, in press.

研究のイメージ



病害抵抗性メカニズムの解明



高度な病害・環境耐性作物の開発

新規な病害制御技術の基盤の確立



研究課題名

植物の情報シグナルによる植物－害虫－天敵三者間の免疫的相互作用(生態免疫系)に関する基礎的研究

研究項目及び実施体制(◎は総括研究代表者)

- ①動物－植物間の免疫的相互作用機構の化学生態学的解析
(◎高林純示／京大大学生態学研究センター)
- ②動物－植物間の免疫的相互作用の分子生物学的解析(西岡孝明／京都大学大学院農学研究科)



高林純示



西岡孝明

研究の目的

農作物の病虫害防除のために大量使用される化学農薬による環境汚染や人の健康への悪影響が世界的な問題となっており、農薬に過度に依存せず、天敵を有効に利用した病虫害防除が望まれている。我々は、多くの植物が害虫に被害された際に特異的な匂い成分(SOSシグナル)を放出することで害虫の有力天敵を誘引し、害虫を退治してもらうという植物の間接防衛戦略に注目した。この匂いシグナルを介した植物－天敵間の相互作用を解明し、環境にやさしい新たな害虫防除法の確立を目的としている。

研究の内容

研究項目①では、植物が被害を受けたときに放出する情報(SOシグナル)による植物の天敵誘引能力の解明を野外実験、実験室内操作実験と化学分析を組み合わせて明らかにした。

研究項目②では、被害を受けた植物が誘導的に生産するSOSシグナルの生産メカニズムを分子生物学的な手法で明らかにした。

主要な成果

- ①植物－鱗翅目害虫－寄生蜂三者系および植物－ハダニ－ハダニ天敵三者系において植物からの匂いシグナルを介した生態免疫的な相互作用のネットワークを解明した。
- ②ハダニで被害されたマメ葉は、ジャスモン酸(JA)とサリチル酸(SA)エチレンの3つのシグナル伝達経路を通じ防衛機構を活性化させ、匂い成分を生産・放出することを解明した。
- ③害虫被害株で発現する遺伝子をマイクロアレイを用いて網羅的に解析し、被害で植物が示す生理的応答の全体像を明らかにした。
- ④植物が害虫の被害を受けた際に出る匂いシグナル成分を、隣接する植物も認識し、害虫の防衛を始める現象(植物間のコミュニケーション)を世界にさきがけて発見した。
- ⑤植物の香りの生合成酵素の一つであるリアーゼの遺伝子組み換え植物を作出することにより、天敵を効率よく誘引することに成功した。

主な発表論文

Horiuchi J., *et al.*: Exogenous ACC enhances volatile production mediated by jasmonic acid in lima bean leaves: *EEBS letters*, in press.

Arimura G., *et al.*: Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants: *The Plant Journal*, in press.

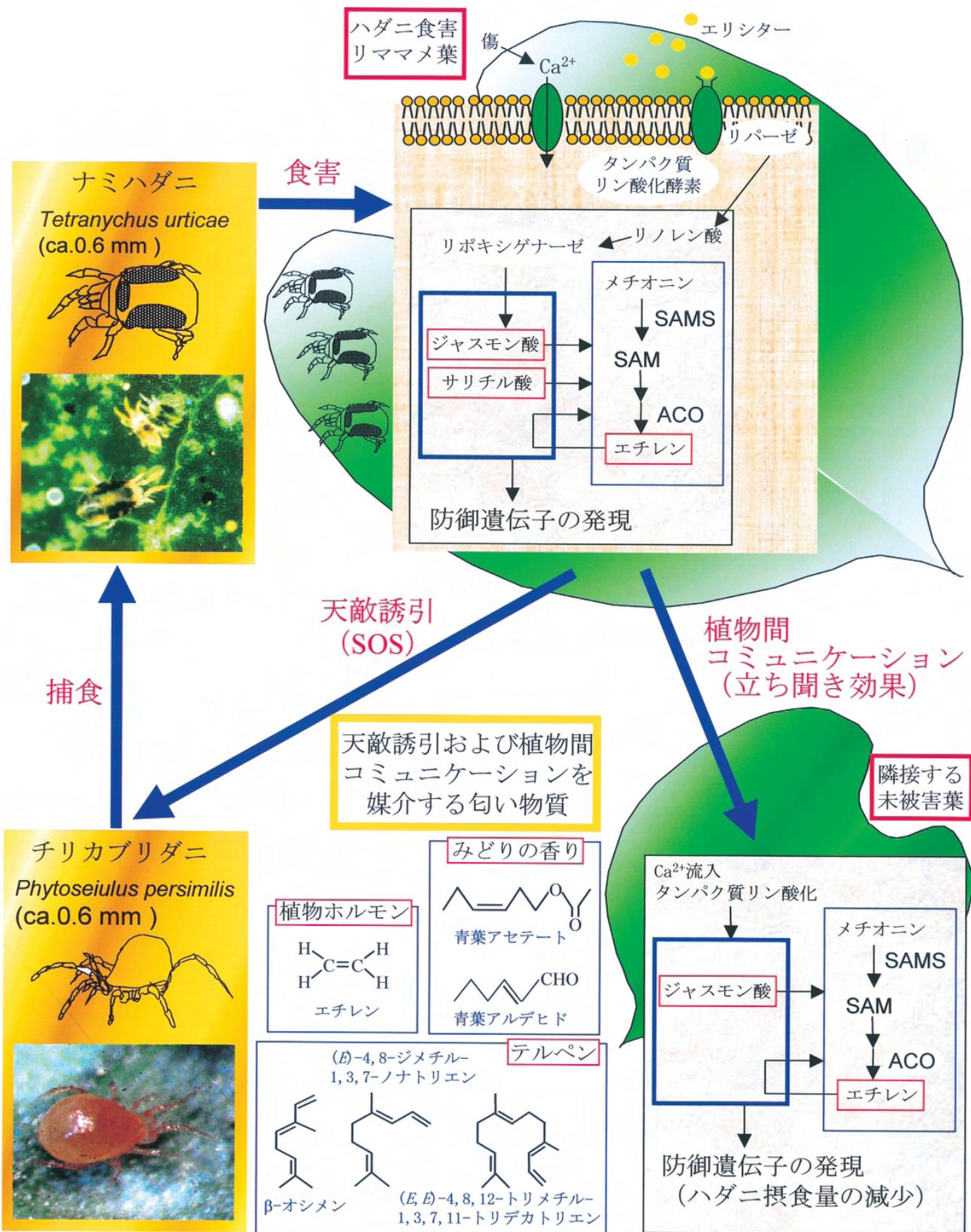
Shiojiri K., *et al.*: Oviposition preference of herbivores is affected by tritrophic interaction webs: *Ecology letters*, in press.

Arimura G., *et al.*: Comprehensive responses in lima bean leaves induced by herbivore-induced volatiles: *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 277: 305-310 (2000)

Arimura G., *et al.*: Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves: *Nature*, 6795: 512-515 (2000)

Ozawa R., *et al.*: Involvement of jasmonate- and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants: *Plant Cell Physiol.*, 41: 391-398 (2000)

研究のイメージ



研究課題名

微生物由来の環境保全型害虫防除蛋白質に関する基盤研究

研究項目及び実施体制(◎は総括研究代表者)

- ①環境保全型害虫防除剤の殺虫メカニズムに関する研究
(姫野道夫・杉本憲治/大阪府立大学大学院農学生命科学研究科)
- ②環境インパクトの小さい殺虫蛋白質の動態の解析と害虫防除システムの構築
(◎酒井 裕/岡山大学工学部)
- ③微生物由来害虫防除蛋白質の高生産技術の開発(千 菊夫/信州大学農学部)
- ④新規な有害双翅目昆虫特異的殺虫蛋白質を産生するBT菌のスクリーニングと遺伝子解析
(武部 聡/近畿大学生物理工学部)



酒井 裕



姫野道夫



杉本憲治



千 菊夫



武部 聡

研究の目的

グラム陽性菌 *Bacillus thuringiensis* (BT 菌) が産生する特異的殺虫蛋白質 (BT トキシン) は、環境にやさしい殺虫剤として利用されてきたが(図1)、その幅広い利用を阻む問題点が指摘されている。本研究ではBT トキシンの活性化、受容体、安定化、および遺伝的構成を解明し、また新規殺虫蛋白質の探索・創製により、BT トキシンの問題点の克服と即ちの有効利用を図るために必要な知的基盤を構築する。

研究の内容

鱗翅目昆虫特異的BT トキシンであるCry1Aa および双翅目昆虫特異的Cry4A の受容体の性状と機能を解明する。Cry4A などの活性化過程の解明と活性型分子の同定、及び標的細胞膜との結合過程を解明する。またBT 菌における殺虫蛋白質遺伝子構成、新規な殺虫蛋白質の選抜、及び人為的構築のための適切な手法を確立する。

主要な成果

- ①Cry4A は活性化の過程で130kDa プロトキシンがプロセッシングを受け、20kDa 及び45kDa 断片が生成すること、さらにこれら2つのポリペプチドの会合体がCry4A 活性型分子の実体であることを明らかにした(図2)。
- ②Cry1Aa に特異的に結合するカイコ中腸上皮細胞膜蛋白質BtR175のバリエーションcDNAを哺乳類培養細胞に導入し、安定発現株を作成した。この細胞株はCry1Aa 感受性を獲得しており、Cry1Aa 投与によって細胞死に至ることが示された。従って、Cry1Aa 感受性はその受容体BtR175の存在のみによって発現し得ることが明らかとなった(図3)。
- ③数種類のBT トキシンの標的細胞への結合を詳細に解析し、それらの結合特性のBT トキシンの種類による相違点を明らかにした。
- ④*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* の70MDa プラスミドの塩基配列を決定し、殺虫蛋白質遺伝子及び関連遺伝子の構成を明らかにした。
- ⑤BT 菌及び関連菌株の殺虫蛋白質遺伝子を検出、クローニングする手法を確立し、新規な遺伝子の検出・クローニング・構造解析を行った。

主な発表論文

- Yoshisue H., *et al.* : Identification of a second transcriptional start site for the insecticidal protein gene *cryIVA* of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: *Gene*, 185: 251-255(1997)
- Ihara H., *et al.* : Purification and partial amino acid sequences of the binding protein from *Bombyx mori* for Cry1Aa δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: *Comp. Biochem. Physiol.*, 120: 197-204(1998)
- Yamagiwa M., *et al.* : Activation process of dipteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3464-3469(1999)
- Ikawa S., *et al.* : cDNA cloning of the Cry1Aa receptor variants from *Bombyx mori* and their expression in mammalian cells: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 64: 2682-2685(2000)
- Yamagiwa M., *et al.* : Binding properties of *Bacillus thuringiensis* Cry4A toxin to the apical microvilli of larval midgut of *Culex pipiens*

: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 65: 2419-2427 (2001)

研究のイメージ

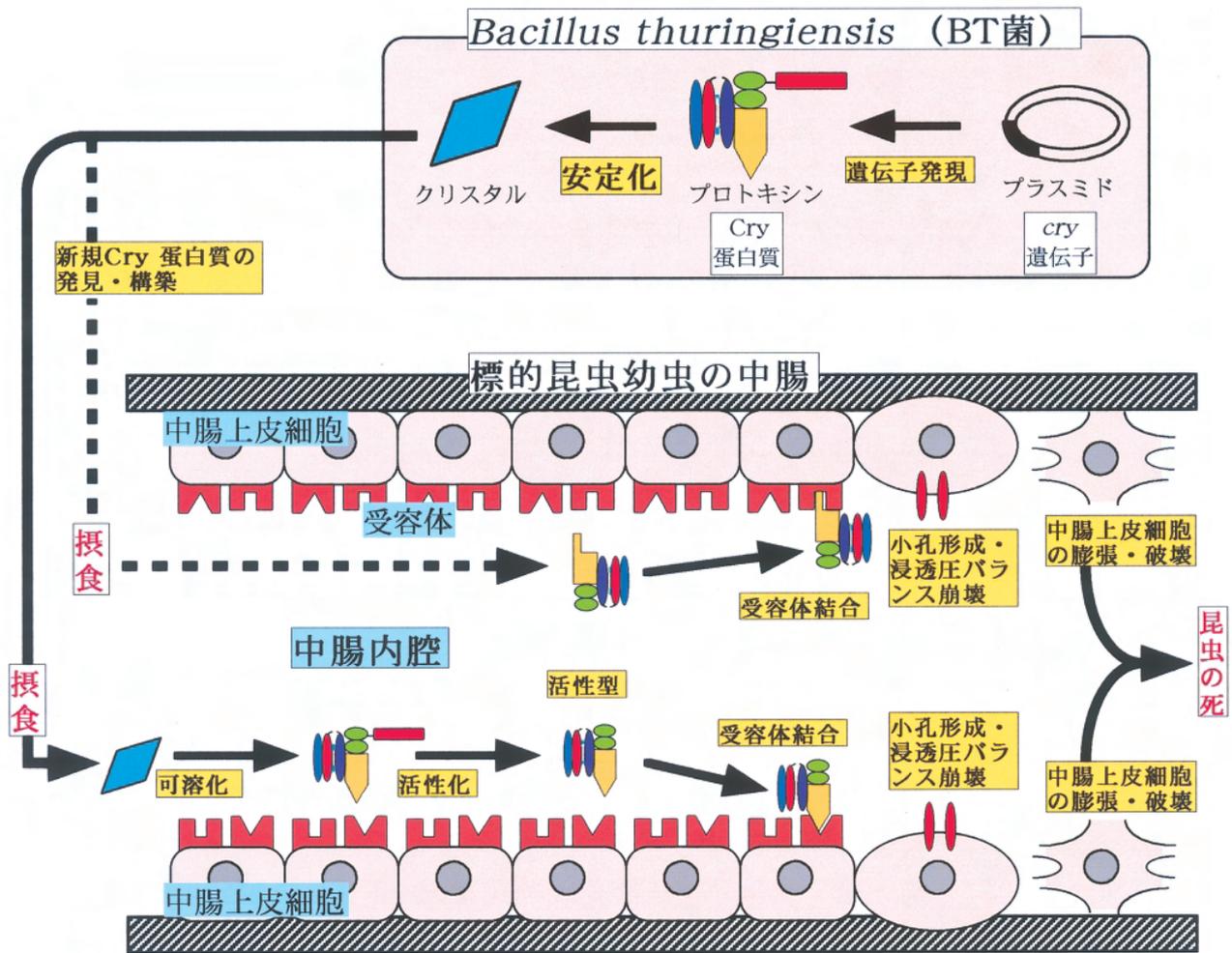


図1 殺虫蛋白質の発現と作用過程

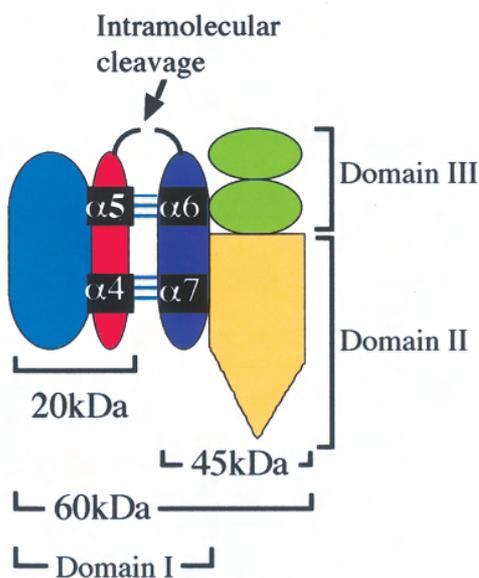


図2 双翅目特異的Cry4Aの活性型分子モデル

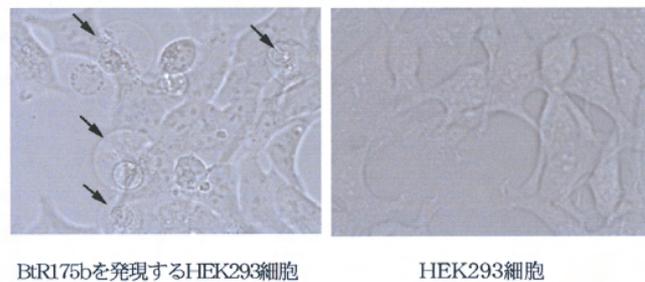


図3 Cry1Aaを投与した場合の細胞形態変化

受容体 BtR175b を発現する HEK293 細胞には顕著な膨張が見られるが (→)、HEK293 細胞にはそのような変化は認められない。

研究課題名

環境微生物の難分解性芳香族化合物分解能の多様性に関する分子生物学・分子生態学的研究

研究項目及び実施体制(◎は総括研究代表者)

- ①多環芳香族化合物分解系酵素の構造と多様性の解明と機能解析
(◎福田雅夫／長岡技術科学大学工学部)
- ②単環芳香族化合物分解系の多様性と分解機構に関する研究
(宮下清貴・小川直人／独立行政法人農業環境技術研究所)
- ③土壌生態系における農薬分解エステラーゼ生産菌およびエステラーゼ遺伝子の多様性と農薬分解機構に関する分子生態学的研究(早津雅仁／静岡大学農学部)



福田雅夫



宮下清貴



小川直人



早津雅仁

研究の目的

環境汚染のバイオ修復への活用をめざし、ポリ塩化ビフェニルや農薬など環境汚染をひきおこす芳香族化合物の分解微生物ならびに分解酵素とその遺伝子の構造、機能、発現を解析する。得られる知見を総合して分解機構や多様性を明らかにし、効率的な完全分解を実現できる最適な分解酵素系を備えた分解菌を構築することを目的とする。

研究の内容

ポリ塩化ビフェニル(PCB)や農薬を含むの芳香族化合物は、水酸基の付いたカテコール型の中間体を生じ、芳香環開裂を受けて代謝される。難分解性芳香族化合物の分解は安息香酸型やカテコール型の中間体への変換を触媒する初発(上流)分解酵素系と、これらの中間体の分解を触媒する下流分解酵素系で構成されている。

本研究は上流分解酵素系と下流分解酵素系のそれぞれの鍵酵素に関する解析を進め、得られた成果を総合して効率的な完全分解酵素システム構築をめざすものである。上流分解酵素系では環境汚染物質として知られるPCB、内分泌攪乱作用が問題となっているカーバメイト系農薬のカルバリル、有機リン系農薬のフェントロチオンを、下流分解酵素系ではクロロ安息香酸とクロロカテコールを対象として研究をおこなった。

主要な成果

- ① PCB分解菌 *Rhodococcus* sp. RHA1 が2つの発現制御系のもとで多様なPCB分解酵素系を同時に発現することを明らかにした。また分解酵素遺伝子をコードする巨大線状プラスミドの分子構造を明らかにした。
- ② PCB分解系の鍵をにぎる芳香環開裂酵素2, 3-dihydroxybiphenyl dioxygenaseの三次元立体構造解析から活性中心におけるリグニン分解系酵素との収斂進化を明らかにし、三次元立体構造にもとづく酵素の改良に成功した。
- ③ 土壌からカーバメイト系殺虫剤分解菌を分離し、カーバメイトエステラーゼの起源の多様性を明らかにした。また有機リン系殺虫剤分解に関わる上流分解酵素系の遺伝子構造を明らかにした。
- ④ *Burkholderia* sp. NK8のクロロ安息香酸(CBA)分解能がCBAジオキシゲナーゼの基質特異性に支配されること、CBAから生じるクロロカテコールのオルソ開裂酵素の多様性と基質特異性の由来を明らかにした。
- ⑤ RHA1のPCB分解遺伝子をNK8株に導入して発現させることに成功し、組換え分解菌を構築した。カルバリルの分解でも分解菌の組み合わせをおこなった。また分解菌の土壌中での挙動の把握にも成功した。

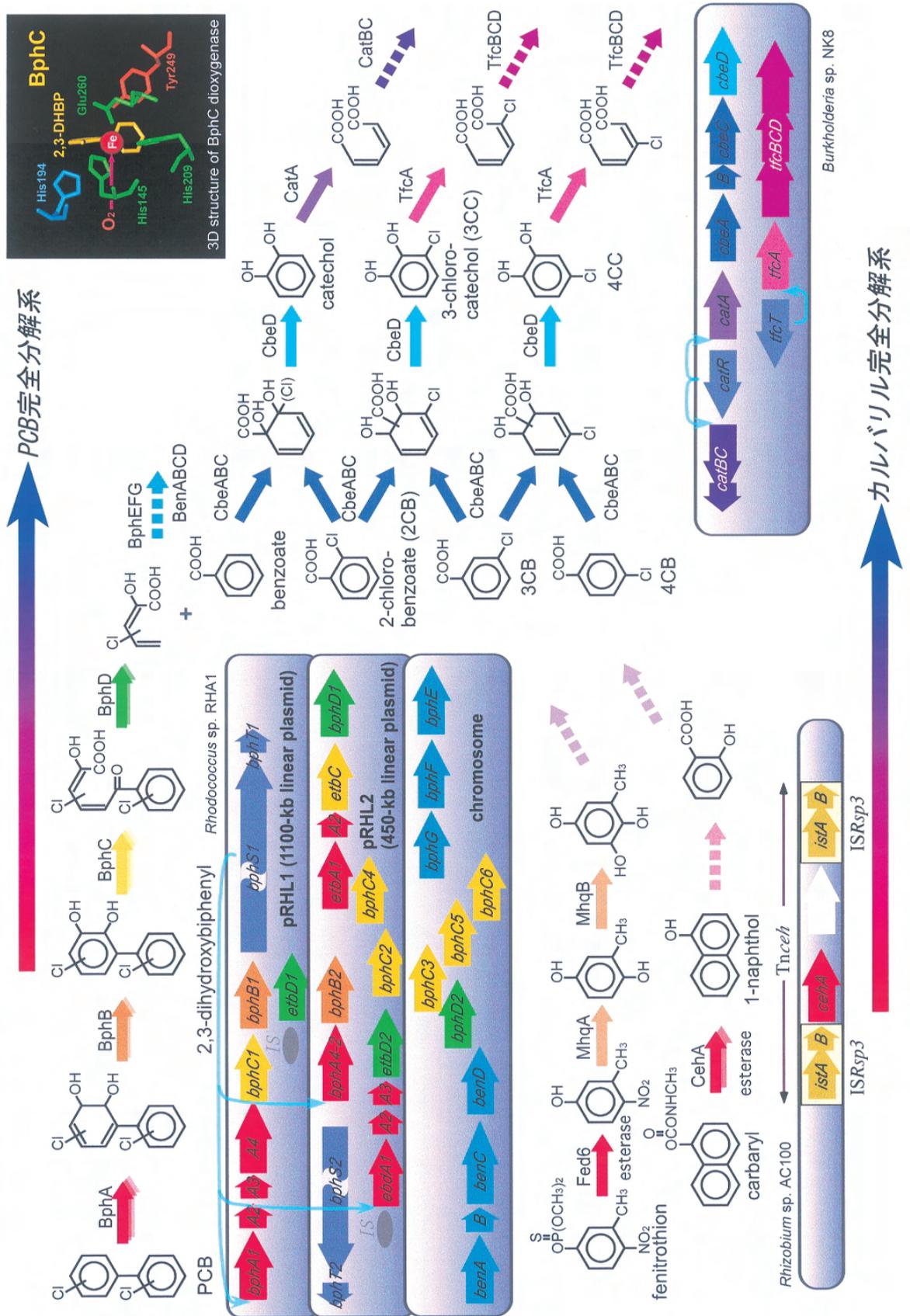
主な発表論文

- Yamada A., *et al.* : Two nearly identical aromatic compound hydrolase genes in a strong polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1 : *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2006-2012(1998)
- Shimizu S., *et al.* : Characterization of the 450-kb linear plasmid in a polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1 : *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 2021-2028(2001)
- Uragami Y., *et al.* : Crystal structures of substrate free and complex forms of reactivated BphC, an extradiol type ring-cleavage dioxygenase : *J. Inorg. Biochem.*, 83: 269-279(2001)
- Hayatsu M., *et al.* : Involvement of two plasmids in fenitrothion degradation by *Burkholderia* sp. strain NF100 : *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1737-1740(2000)
- Francisco P. Jr., *et al.* : The chlorobenzoate dioxygenase genes of *Burkholderia* sp. strain NK8 involved in the catabolism of chloroben-

zoates : *Microbiology*, 147: 121-133 (2001)

研究のイメージ

環境微生物の難分解性芳香族化合物分解能の多様性に関する分子生物学・分子生態学的研究



研究課題名

新規脱窒菌を用いた N₂O 抑止型好気脱窒システムの構築と水処理への応用

研究項目及び実施体制(◎は総括研究代表者)

- ◎放線菌 *Streptomyces antibioticus* の新規窒素代謝系に関する基礎研究
(◎祥雲弘文/東京大学大学院農学生命科学研究科)
- ◎新規好気脱窒系の機構解明と水処理のための応用技術開発(高谷直樹/筑波大学応用生物化学系)



祥雲弘文

研究の目的

強い温室効果をもつ亜酸化窒素(N₂O)の大気中濃度が急増している。その主要発生源は農耕地、海洋、排水処理場などである。N₂O 発生抑止のために排水処理場での窒素除去は極めて重要であるが、現在の技術ではその過程で大量の N₂O が発生している。本研究ではバイオテクノロジー技術を駆使し、N₂O を発生しない酸素耐性好気脱窒システムを構築、水処理へ応用することを目的とする。



高谷直樹

研究の内容

酸素耐性の好気脱窒菌の自然界からの単離、遺伝子組換えによる育種、複合培養系の構築、菌体の固定化、など、三種の異なるアプローチから目的の脱窒系構築を目指した。その結果、画期的好気脱窒菌 *Pseudomonas stutzeri* TR2 株の発見、遺伝子組換え及び固定化混合培養による好気脱窒系の構築手法を確立した。さらにこれら好気脱窒システムをリアクターに組み込み、排水処理への実用化を目指している。

主要な成果

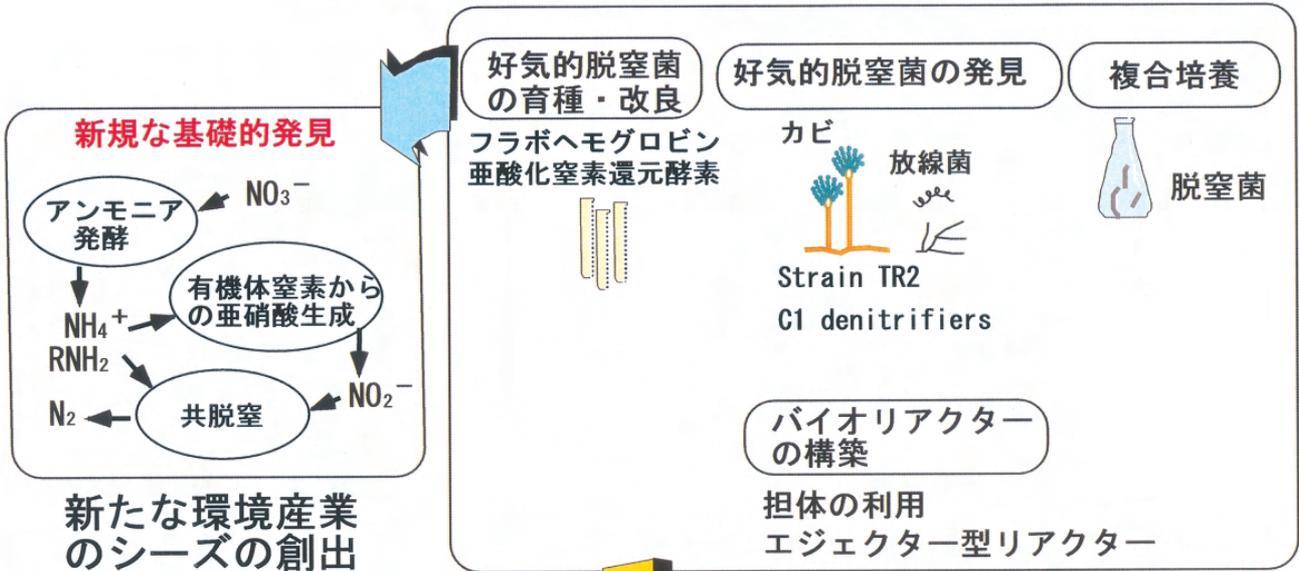
好気脱窒菌検索の結果、カビのアンモニア発酵、放線菌の脱窒、共脱窒、及び有機体窒素からの脱窒など、非常に興味深い新発見の成果を得た。*P. stutzeri* TR2 株の酸素耐性脱窒酵素遺伝子の単離、カビ脱窒系の酸素抑制に関わるプロモーター領域の機構解明等を行った。環境(処理槽)中の *P. stutzeri* TR2 株の PCR による検出法を開発した。排水処理に関わる微生物はこれまで活性汚泥などとひとまとめに呼ばれ、微生物学的解析は殆どなされていない。本プロジェクトの成果は、水処理技術における新分野、新たな方向性を開拓したものである。

主な発表論文

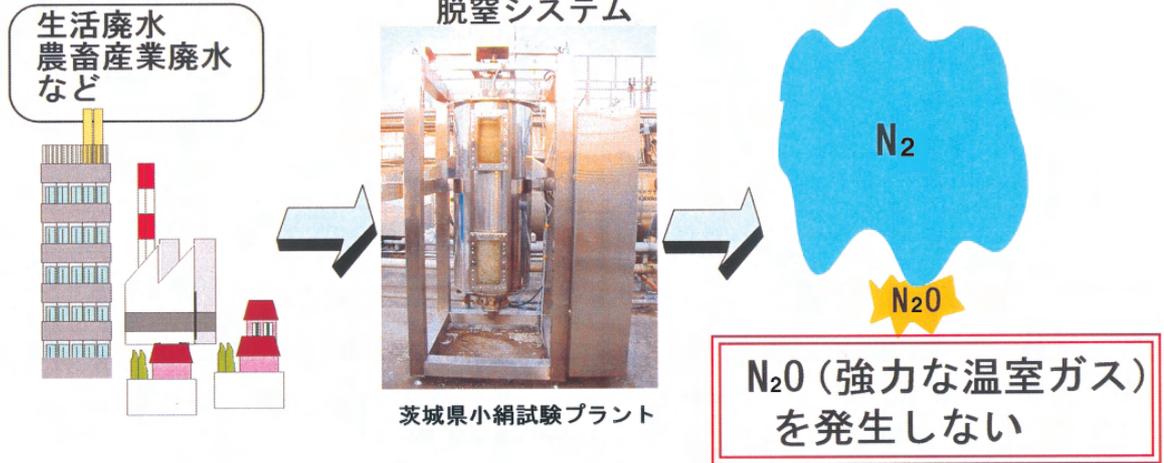
- Takaya N., *et al.* : Cytochrome P450nor, a novel class of mitochondrial cytochrome P450 involved in nitrate respiration in the fungus *Fusarium oxysporum*: *Arch. Biochem. Biophys.*, 372: 340-346(1999)
- Zhang L., *et al.* : Purification and cDNA cloning of the nitric oxide reductase P450nor from the bacidiomycetes *Trichosporon cutaneum* : *Eur. J. Biochem.*, 268: 3198-3204(2001)
- Zhou Z., *et al.* : Ammonia fermentation, a novel anoxic metabolism of nitrate by fungi : *J. Biol. Chem.*, 277: 1892-1896(2002)
- Takaya N., *et al.* : Transcriptional control of nitric oxide reductase gene (*CYP55*) in the fungal denitrifier *Fusarium oxysporum* : *Biosci. Biotech. Biochem.*: in press.
- Uchimura H., *et al.* : Nitrate reductase-formate dehydrogenase couple supports a hybrid respiration system in the fungal mitochondrion : *J. Biochem.* : in press.

研究のイメージ

【N₂O抑止型好気脱窒システムの構築】



好氣的N₂ガス生産型脱窒システム



研究課題名

モノネガウイルス・レプリコン系の開発と応用

研究項目及び実施体制(◎は総括研究代表者)

- ①モノネガウイルス・レプリコン系の開発と応用(◎甲斐知恵子/東京大学医科学研究所)
- ②センダイウイルスベクターを用いた有用物質生産系の開発(加藤 篤/国立感染症研究所)

研究の目的

モノネガウイルス(マイナス1本鎖RNAウイルス)群のウイルスは、伝播力と致死率の高い感染症を引き起こすものが多く、ヒトにも動物にも大きな被害を及ぼしている。本ウイルス群では、cDNAクローンからウイルスを作出するリバーシジェネティックス法の開発が困難であったため、本ウイルス群の病原性発現の分子機構の研究が遅れており、基礎的特性解明と効果的防御法開発が待望されていた。本研究では、このウイルス群のうちモービリウイルス属を中心として、新リバーシジェネティックス法を開発し、新手法を用いたウイルス学的基礎研究を行ない、その成果を基に新しい防御法を開発するための基盤創出を目的とした。また、本ウイルスの特性を生かし、有用蛋白発現系としての開発と改良のための基礎的研究も目的とした。



甲斐知恵子



加藤 篤

研究の内容

①イヌジステンパーウイルス(CDV)を中心としたモノネガウイルス・レプリコン系の開発に成功し、②ウイルスの増殖機構、病原性、免疫原性の基礎研究を行なった。③また、新技術を用いた新型ワクチン開発のための基礎研究も行なった。④さらに、センダイウイルスの特性を生かし有用蛋白大量発現系の開発と改良を行い、⑤サイトカインを発現させて有用性を検証した。以上の成果をもとに、モノネガウイルスの基礎的知見を得、新型ワクチンやベクター開発への戦略的基盤を構築した。

主要な成果

独自に分離したCDV野外株からフルゲノムプラスミドを作製し、リバーシジェネティックス系の樹立に成功した。CDVゲノム上にリポーター遺伝子を導入してウイルスゲノム上の転写制御配列の機能解析等を行い、ウイルスベクターとして有効利用するための基礎的知見を得た。また、本系によって作製したGFP発現CDVを用いて新たな細胞侵入因子を見出した。同時に、牛痘ウイルス(RPV)でも独自の株においてリバーシジェネティックス系の確立に成功した。特にRPVでは我々の開発した自然病態を再現する優秀なウサギ感染モデル系に、この新たな組換えウイルス作出技術を導入することにより、種特異性決定機構に関与するウイルス蛋白の解明研究に着手できた。また病原性の異なるウイルスクローンの作出にも成功していることから、病原性発現機構解明の突破口を開いたと期待される。さらに応用研究として、CDVの新リバーシジェネティックス系を用いて、ヒトとイヌの人獣共通感染症であるリーシュマニアの抗原遺伝子を発現する2価ワクチンの開発を行い、防御効果の基礎的な検証を行なった。

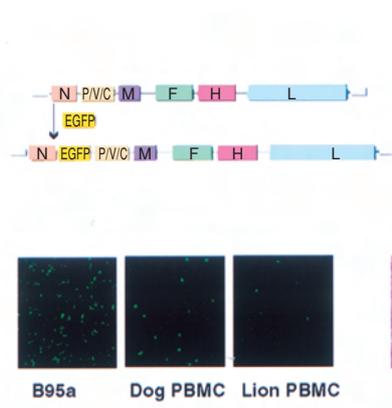
また、センダイウイルスのリバーシジェネティックス系を用いて、これまで未解明であったV,C蛋白の役割について、病原性への関与やIFN抵抗性への役割を明らかにし、ウイルスベクターの安全性を上げる改変を可能にした。さらに有用蛋白大量発現系として、サイトカインを発現させ、精製発現蛋白の生物活性および動物実験での有用性を実証した。

これら得られた成果は、モノネガウイルスのウイルス学的基礎研究に多くの新たな知見を与え、有効な新型組換えワクチンや新たなウイルスベクター開発の戦略的基盤を構築したと考えられる。

主な発表論文

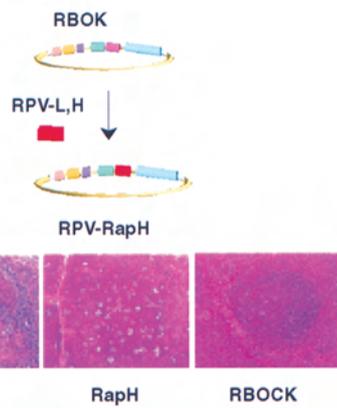
- Kobune F., *et al.* : Nonhuman Primate Models of Measles : *Lab. Anim. Sci.*, 46(3): 315-320 (1996)
- Iwatsuki K., *et al.* : Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin proteins of field isolates from dogs naturally infected with canine distemper virus : *J. Gen. Virol.*, 78: 373-380 (1997)
- Iwatsuki K., *et al.* : Establishment of a persistent mutant of canine distemper virus: *Microbe. Infect.*, 1(12): 987-991 (1999)
- Kato A., *et al.* : Sendai virus gene start signals are not equivalent in reinitiation capacity: Moderation at the fusion protein gene : *J. Virol.* 73: 9237-9246 (1999)
- Yoneda M., *et al.* : Rinderpest virus H protein: role in determining host range in rabbits: *J. Gen. Virol.* In press (2001)

研究のイメージ



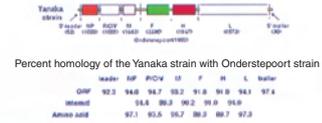
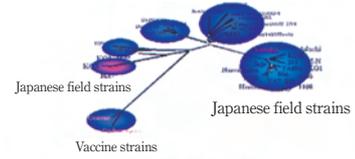
ウイルス宿主域の解析

ウイルス性状の基礎的解析



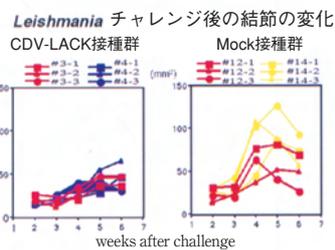
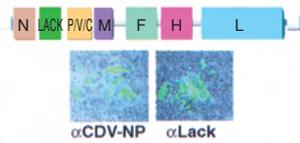
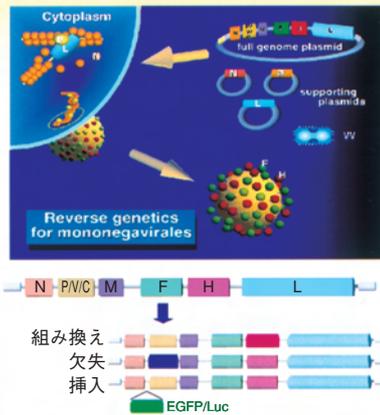
病原性発現関与部位の解析

Phylogenetic tree of canine distemper viruses isolated in Japan and other countries

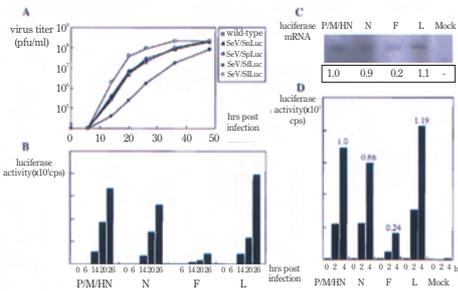


CDV野外流行株の性状解析

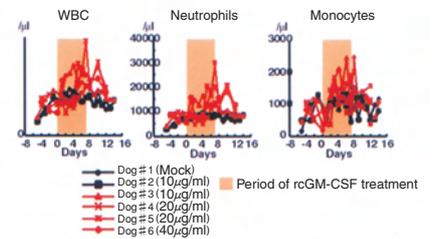
モノネガウイルスのリバースジェネティクス系確立



2価ワクチン開発に向けた基礎研究



センダイウイルスベクター開発の基礎研究



発現サイトカインの動物での有効性

研究課題名

継代培養細胞を用いた家畜繁殖技術の開発に関する研究

研究項目及び実施体制(◎は総括研究代表者)

- ①家畜初期胚ならびに体細胞由来細胞株の樹立と個体発生に関する研究
(◎角田幸雄/近畿大学農学部)
- ②胎子生殖細胞と生殖細胞株を使った発生工学技術の開発
(中辻憲夫/京都大学再生医科学研究所)



角田幸雄



中辻憲夫

研究の目的

すぐれた遺伝形質を持つ雌畜から多数の初期胚を採取して他の雌に移植する受精卵移植技術が開発されて、家畜の育種・改良が進められてきたが、採取できる初期胚が限られていることから画期的な効果は上がっていない。このため、本研究では、新しい家畜繁殖技術の開発等に資するため、初期胚、各種の体細胞ならびに胎子生殖細胞から培養細胞株を樹立し、生殖細胞の場合は遺伝子導入を行った上で、これらの細胞から個体を作成するのに必要な基礎的な技術を開発する。

研究の内容

- ①本研究で対象とする細胞は、胚性幹細胞、始原生殖細胞ならびに体細胞である。胚性幹細胞から個体を作成する技術を確認するため、高温処置胚盤胞および4倍体胚盤胞への顕微注入並びに除核未受精卵への核移植に必要な条件を明らかにし、個体作出技術の開発を行った。また、種々の体細胞から正常な染色体構成を持つ継代培養細胞株を樹立し、体細胞クローン個体作出技術の開発を行った。
- ②マウス精巣内の生殖細胞への直接的遺伝子導入を実現するため、遺伝子ベクターの構造や遺伝子導入条件に関する研究を行うことによって、新規な遺伝子導入動物作成技術の開発を行った。また、マウス始原生殖細胞の体外培養系を確立して細胞分化制御因子の解明を進めることによって、胎子生殖細胞から培養下で配偶子への分化を進行させる技術の開発を行った。

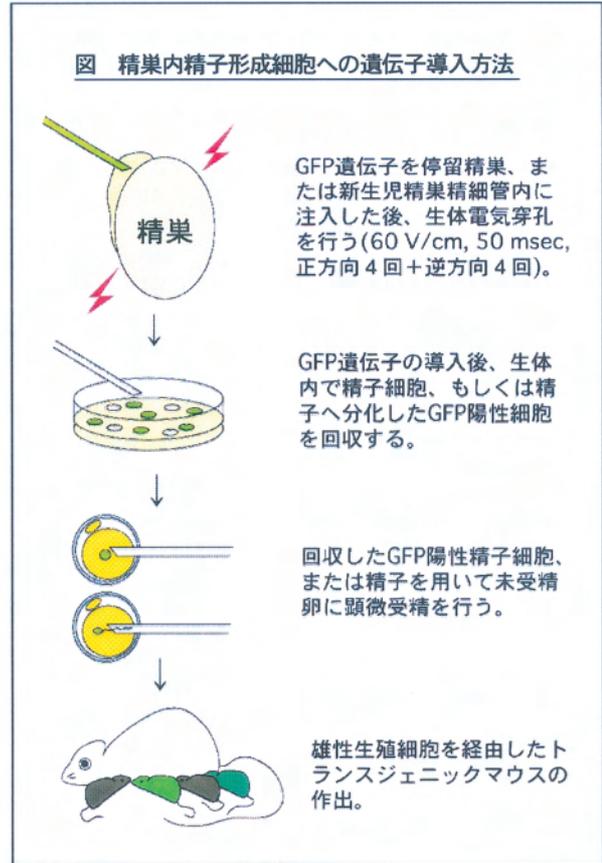
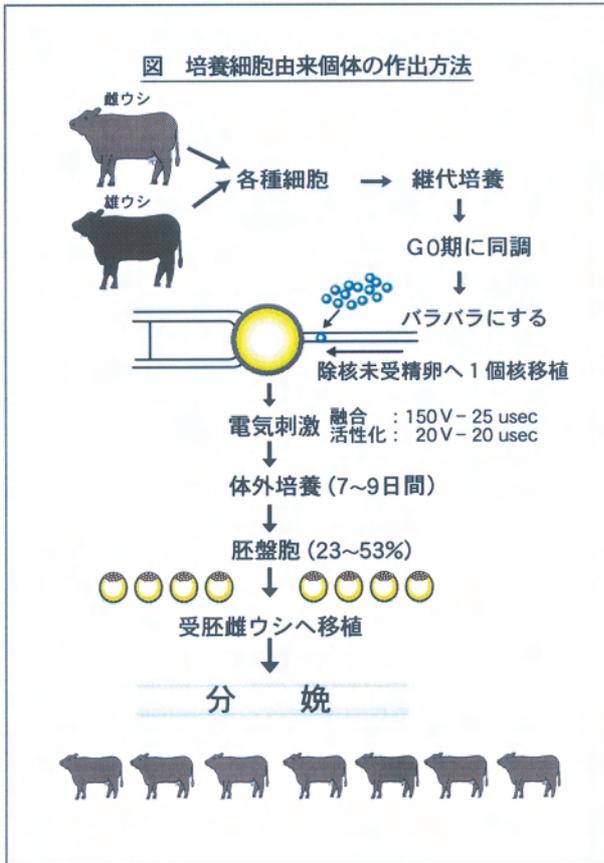
主要な成果

- ①世界で初めて成牛体細胞クローン子牛の作出に成功し、体細胞の由来と子牛への発生能の関係を明らかにした。(特許出願中)。
- ②ES細胞由来クローンマウスの作出に成功した。
- ③未受精卵細胞質中に核の初期化因子が存在することを明らかにした。
- ④始原生殖細胞を卵母細胞に分化させることに成功した。
- ⑤精巣内精子形成細胞への遺伝子導入方法の開発に成功し、顕微注入を行うことによって、高効率でトランスジェニック動物を作成することに成功した。(国内、国外特許出願中)

主な発表論文

- Kato Y., *et al.* : Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282:2095-2098 (1998)
- Tani T., *et al.* : Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol. Reprod.*, 64: 324-330 (2001)
- Amano T., *et al.* : The full term development of enucleated mouse oocytes fused with ES cells from different cell lines: *Reproduction*, 121: 729-733 (2001)
- Huang Z., *et al.* : In vivo transfection of testicular germ cells and transgenesis by using the mitochondrially localized jellyfish fluorescent protein gene: *FEBS Lett.*, 487: 248-251 (2000)
- Chuma S. & Nakatsuji N. : Autonomous transition into meiosis of mouse fetal germ cells in vitro and its inhibition by gp 130-mediated signaling. *Devel. Biol.*, 229: 468-479 (2001)

研究のイメージ



世界で最初の成牛体細胞由来クローン



ES細胞由来マウス



トランスジェニックマウス

初期胚や体細胞由来の培養細胞、遺伝子導入胎子生殖細胞から個体を作成する技術の開発

研究課題名

消化管機能の分子生物学的解析と計画的食品設計

研究項目及び実施体制(◎は総括研究代表者)

- ①消化管の諸機能の制御を意図した食品設計の基盤解析
(◎加藤久典／東京大学大学院農学生命科学研究科)
- ②消化管の神経機能の制御を意図した食品設計の基盤解析
(永尾雅哉／京都大学大学院農学生命科学研究科)
- ③消化管の代謝機能の制御を意図した食品設計の基盤解析
(渡辺道子／高崎健康福祉大学健康福祉学部)



加藤久典

永尾雅哉

渡辺道子

研究の目的

消化管は、生体と食品が最初に出会う場であり、食物の消化と吸収の他にも様々な重要な役割を果たしている。それは、巨大な免疫器官として生体防御を担い、複雑な神経系により情報の授受を行い、内分泌器官として様々な生体調節因子を分泌し、独特の代謝機能により恒常性維持に寄与し、さらに多様な微生物の力をも活用しているなど、複雑で謎の多い組織である。本研究では、この消化管の謎に対して分子生物学的手法を駆使した徹底的な解析を行い、さらに消化管機能を食品成分によって制御することを目指すとともに、計画的な食品設計(Intentional Food Designing)によって特に健康な老後を送るための食を提案することを目的とした。

研究の内容

上記各中課題代表者とその他の消化管機能の専門家(上野川修一、清水誠、伊藤喜久治、以上東京大学大学院農学生命科学研究科)が結集し、分子生物学的手法を中心に多方面から消化管機能について解析を行った。その一部を挙げると、①消化と吸収機能を制御する成分を食品中から幅広く検索する、②消化管の免疫機構について分子細胞生物学的に解析し、食品アレルギーとの関連では経口免疫寛容が起こる機構についても明らかにする、③未知の点が多い微量元素の吸収機構について検討する、④食品成分による摂食調節因子の修飾や消化管の神経系を介した食欲制御機構を解析する、⑤腸管の環境改善に寄与する微生物の同定や食品成分による制御の試み、などがある。免疫系、代謝系などを制御する食品を実際に創り出すことも対象としている。

主要な成果

- ①食品アレルギーや免疫応答に関しては、独自のモデル細胞系や有用なトランスジェニック動物系を活用して、例えば経口で投与された抗原が抗原として認識される際の細胞の機構を明らかにできた。製造法を確立した低アレルゲン化小麦粉は、特許出願と工業的生産に至り、様々な食品として多くの患者に役立っている。これは免疫寛容誘導に有効であるという証拠も得られた。
- ②必須微量元素亜鉛の吸収や利用に関わると考えられる新規亜鉛トランスポーターのクローニングと機能解析を行い、小腸上皮やインスリン産生細胞で高発現していることを見出した。消化管の吸収機能を修飾する因子を食品中から数多く見出し、それらの作用機構を明らかにしてきた。修飾される機能と食品の例としては、糖消化酵素(食酢)、タウリン(ゴマ)やグルコース(緑茶)のトランスポーター、タイトジャンクション(エノキタケ)などがある。
- ③食品成分による摂食制御機構として、消化管の特定の迷走神経枝が食品中アミノ酸バランスを速やかに感知すること、レプチンや脳腸ペプチドなどの摂食調節因子の活性や遺伝子発現が食餌組成に影響を受けることを明らかにし、高齢期の食欲維持のための情報を蓄積した。
- ④独自のノトバイオトマウスなどの系を確立して、胆汁酸の変化や腸内腐敗などに注目して重要な菌種の同定やそれを制御する食品因子の発見に成功した。

主な発表論文

H. Hamada, *et al.* : Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. : *J. Immunol.* 168 : 57-64 (2002)

H. Watanabe, *et al.* : Purification and cDNA cloning of a protein derived from *Flammulina velutipes* that increases the permeability of the intestinal Caco-2 cell monolayer. : *Eur. J. Biochem.* 262 : 850-857 (1999)

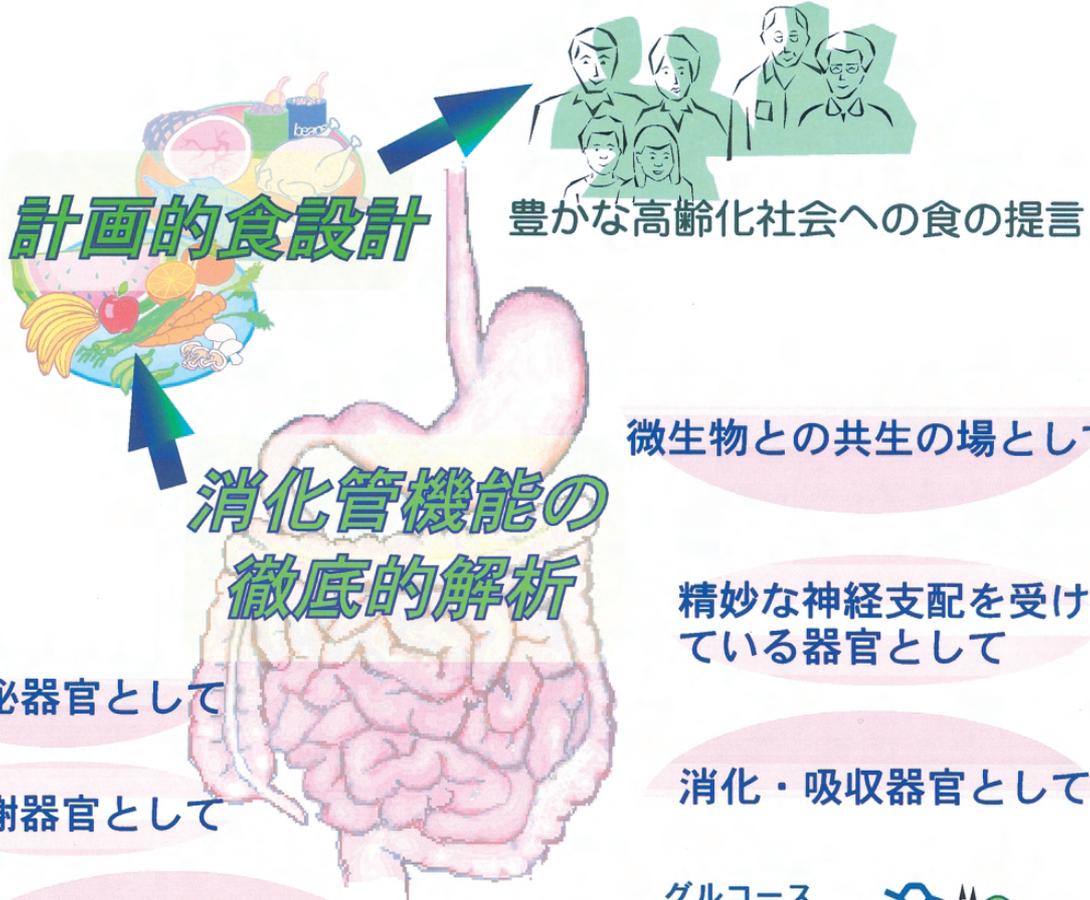
M. Nagao, *et al.* : Unidirectional transport from apical to basolateral compartment of cobalt ion in polarized Madin-Darby canine kidney cells. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257 : 289-294 (1999)

T. Hidaka, *et al.* : Screening of microbial products modifying the action of leptin (obese gene product) by a biosensor. : *J. Antibiot.* 52 : 429-432 (1999)

S. Narushima, *et al.* : Composition of cecal bile acids in ex-germfree mice inoculated with human intestinal bacteria. : *Lipids* 35 : 639-644 (2000)

M. Watanabe, *et al.* : Novel method for producing hypoallergenic wheat flour by enzymatic fragmentation of the constituent allergens and its application to food processing. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 : 2663-2667 (2000)

研究のイメージ



微生物との共生の場として

精妙な神経支配を受けている器官として

内分泌器官として

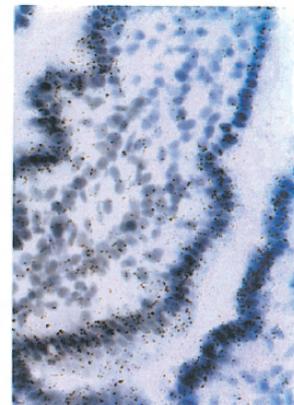
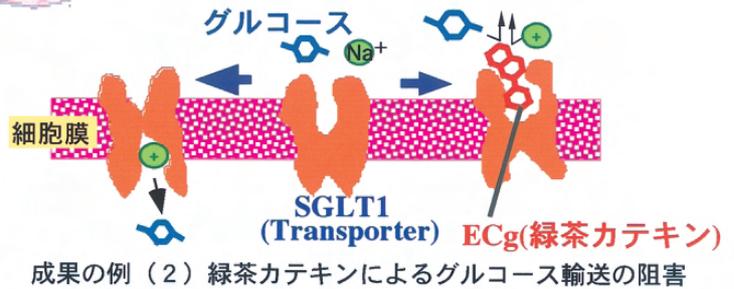
代謝器官として

消化・吸収器官として

免疫器官として



成果の例 (1) 食品成分によるアレルギー抑制
あるいは免疫機能の増強



成果の例 (4) 新しく発見した
亜鉛トランスポーターが小腸上皮
細胞層に多いことを示す (黒い点)



成果の例 (3) 低アレルギー化小麦粉で作ったクッキーとパスタ

研究課題名

特異性改変植物レクチンライブラリーの作成と細胞交通プローブとしての利用

研究項目及び実施体制

特異性改変植物レクチンライブラリーの作成と細胞交通プローブとしての利用
(入村達郎／東京大学大学院薬学系研究科)



入村達郎

研究の目的

植物には未知の能力が秘められており、これらの能力を担う分子は新しい生物学の領域を切り開くツールとして高い価値を持つ可能性がある。植物レクチンもその一つである。天然に得られる糖鎖認識分子として植物レクチンは既に利用されていたが、有用なものの数は限られていた。本研究では、多数の植物レクチンをライブラリーとして創製し、有用なものを選別する方法を確立し、これらを実際に糖鎖生物学の新しい領域に利用することを目的とした。

研究の内容

マメ科レクチンの一つイヌエンジュマメ (*Maackia amurensis*) レクチンをフレームとして、糖鎖認識部位に遺伝子工学的な改変を行ってライブラリーとした。ランダムクローニング及び細胞に対する結合によってパニングを行い多数のレクチンを得た。これらはいずれも、多様な結合特異性を持つ新規なレクチンであることを証明した。ムチン型糖鎖のペプチド上での付加部位が厳密に制御されている事、付加部位の異なる糖ペプチドを植物レクチンが見分けることを証明した。また、これらの構造が、癌転移、接触過敏症の感作時、消化管上皮の感染性微生物などの細胞交通を制御することを示した。

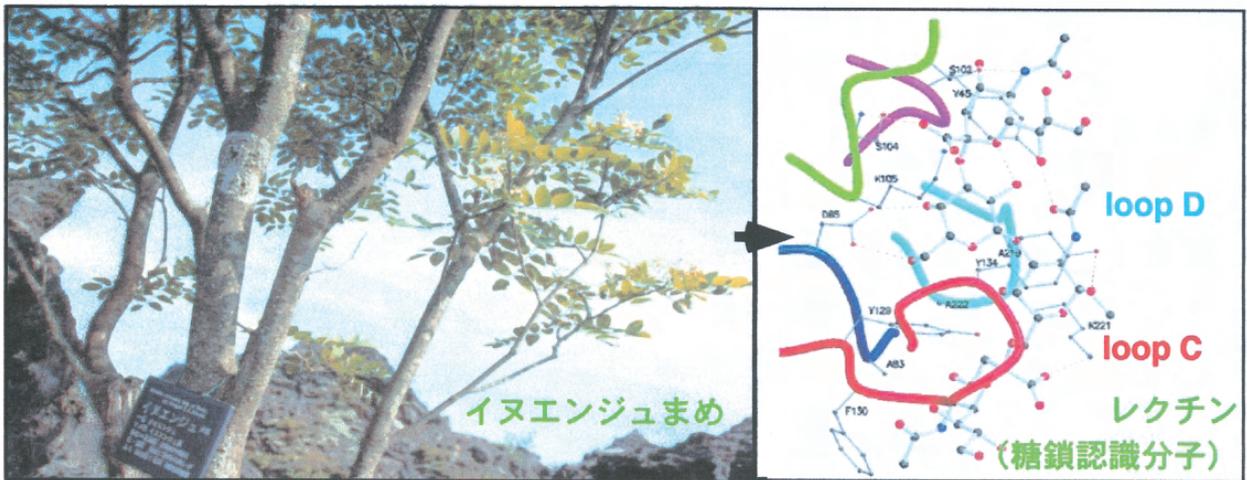
主要な成果

- ①多様な糖鎖認識特異性を持つ植物レクチンを創製する方法を確立し、約300種の改変レクチンを得た。
- ②改変レクチンを植物で生産する方法を確立した。
- ③ムチン型糖鎖のペプチド上での付加部位を決定する方法を確立し、ムチンのO-グリコシルーションにおける個々のN-アセチルガラクトサミン転移酵素の相対的な寄与を明らかにした。また、得られた糖鎖ペプチド複合体と、レクチンとの相互作用を測定し、レクチンが高次の特異性を持つことを初めて示した。
- ④癌転移、接触過敏症、上皮の感染において、レクチンとそのリガンドの相互作用が重要であることを明らかにした。
- ⑤レクチンライブラリーをバイオインフォマティクスの道具として用いるための基礎が築かれた。

主な発表論文

- Sato K., *et al.* : Contribution of dermal macrophage trafficking in the sensitization phase of contact hypersensitivity: *J. Immunol.*, 161: 6835-6844 (1998)
- Iida S., *et al.* : Interaction of human macrophage C-type lectin with o-linked N-acetylgalactosamine residues on mucin glycopeptide: *J. Biol. Chem.*, 274: 16, 10697-10705 (1999)
- Ota M., *et al.* : Involvement of cell surface glycans in adhesion of human colon carcinoma cells to liver tissue in a frozen section assay: role of endo- β -galactosidase-sensitive structures: *Cancer Res.*, 60: 5261-5268 (2000)
- Yim M., *et al.* : Mutated plant lectin library useful to identify different cells: *Proc Nat Acad Sci USA*, 98: 2222-2225 (2001)
- Kato K., *et al.* : N-acetylglactosamine incorporation into a peptide containing consecutive threonine residues by UDP-N-acetyl-D-galactosaminide: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases: *Glycobiol.*, 11: 821-829 (2001)

研究のイメージ



129 130 134
-VAVEFDTY**FGHSY**DP**WDPNYR-**
 イヌエンジュまめレクチン遺伝子

糖鎖認識ループC又はDに
 変異またはアミノ酸を挿入

-VAVEFDTY**XXHXXD**XX**DPNYR-**
-VAVEFDTY**FGHSY**DP**WDPNYR-**
 X レクチンライブラリー

クローニング又はファージ
 を用いたスクリーニング

多数の有用なレクチンのライブラリー

病気に関係する細胞交通
 におけるレクチンの重要
 性を検証した。
 アレルギー
 癌転移
 消化器感染症
 大腸癌の実験的な肝転移

有用なレクチン

改変レクチ
 ンを植物で
 生産する方
 法を確立し
 した。

改変レクチンの糖鎖複合
 体に対する特異性を解析
 した。

レクチンライブラリーを簡
 便に使用するための技術開
 発を行なった。

バイオイン
 フォーマ
 ティックス
 の道具

レクチンライブラリーを
 細胞交通に基づく診断と
 医薬品の開発に利用する
 基盤を築いた。

細胞の同定
 細胞診断
 血清診断
 感染性寄生体の同定

研究課題名

超単分散性マイクロスフィアを用いた新規な分離場および反応場の構築に関する基礎的研究

研究項目及び実施体制

超単分散性マイクロスフィアを用いた新規な分離場および反応場の構築に関する基礎的研究
(中嶋光敏/独立行政法人食品総合研究所)



中嶋光敏

研究の目的

マイクロスフィア(MS; エマルション、微粒子)は、食品や医薬品等に使用されているが、サイズの不均一さや安定性の面から利用が限定されている。そこでMSのサイズと均一性の制御を目的として、 μm オーダーの微細流路を持つシリコンマイクロチャンネル(MC)を作製し、これを利用した単分散MS作成技術を確立する。MSとしては水中油滴(O/W)、W/O、複合型エマルション、脂質や高分子微粒子を作成し、その特性を解明する。また油脂とエタノールを利用した低粘性マイクロエマルション系、様々な機能性成分を高濃度で含有するエタノールエマルション系の作出とその特性解明を行い、MSの新たな用途を開発する。

研究の内容

作製したMCをモジュールにセットして、分散相となる液体をMCを介して連続相に吐出し、液滴を形成させた。形状やサイズの異なるMCの作製、各種モジュールの製作、可視化システムの改良を行い液滴形成とその特性を調べた。乳化機構の解析、液滴形成と界面活性剤の関係、MCの疎水化と油中水滴(W/O)エマルションの作成、複合エマルションの作成、作成したエマルションの微粒子化について検討した。またエタノールと油脂を利用したマイクロエマルションおよびエマルション系を作出し、その特性を明らかにした。

主要な成果

- ①スピードカメラ観察により、新規に開発したMC乳化法は、従来の機械的攪拌による剪断と異なり、複雑なMC構造に基づく界面張力により分散相が自発的に剪断される乳化法であることを示した。
- ②テラスや仕切壁、チャンネルサイズ・長さの異なる平板型MCを作製し、MCの構造が単分散エマルションの作成に与える影響を検討した。また、回収が容易なクロスフロー型MCモジュールを開発した。
- ③微細加工技術により作製したシリコンMCを用いて、 $3\sim 100\mu\text{m}$ のサイズの単分散エマルションを作成することができた。
- ④高融点天然油脂を用いて、高温液体状態でMC乳化を行い、単分散エマルションを作成し常温にすることで、均一サイズの固体脂質微粒子の作出に成功した。
- ⑤シリコンMCのほかに、洗浄・再生が容易なステンレスMCを作製し、 $20\sim 210\mu\text{m}$ のO/Wエマルションを作成することができた。
- ⑥新たに膜乳化可視化装置の製作を行った。膜面での微視的挙動の顕微鏡による直接観察が可能となり、ガラス膜や高分子膜を用いた膜乳化の特性を明らかにした。
- ⑦平板型MCは生産性に難点があったが、新たに貫通型MCとして円状と長方形の断面を有する貫通型MCの作製に成功した。円状MCでは出口で大きく膨張し液滴作成はできなかったが、長方形の貫通型MCを用いることにより、自発的な液滴形成が起り、単分散エマルションの効率的作成(最大 10mL/h)が可能であることが明らかとなった。
- ⑧モノグリセリドを界面活性剤として用いたトリオレイン/エタノール系、あるいはトリオレインを牛脂に変えた系を作成し、低粘性バイオ燃料としての適合性を有することを明らかにした。
- ⑨エタノールを分散相、植物油を連続相、界面活性剤をデカグリセリンオレイン酸エステルとした長期間安定な分散系を見だし、その安定化機構を提案した。

主な発表論文

- Tong J., *et al.* : Surfactant Effect on Production of Monodispersed Microspheres by Microchannel Emulsification Method : *J Surfactants Detergents*, 3: 285-293 (2000)
- Sugiura S., *et al.* : Interfacial Tension Driven Monodispersed Droplet Formation from Microfabricated Channel Array: *Langmuir*, 17: 5562-5566(2001)
- Liu X.Q., *et al.* : Stability Characteristics of Dispersed Oil Droplets Prepared by the Microchannel Emulsification Method: *J Colloid Interface Sci*, 233: 23-30 (2001)
- Kobayashi I., *et al.* : Preparation of Micron-Scale Monodisperse Oil-in-Water Microspheres by Microchannel Emulsification: *J Am Oil Chem Soc*, 78: 797-802 (2001)
- Xu Q., *et al.* : Effect of the Dispersion Behavior of a Nonionic Surfactant on Surface Activity and Emulsion Stability: *J Colloid Interface*

Sci, 242: 443-449 (2001)

研究のイメージ

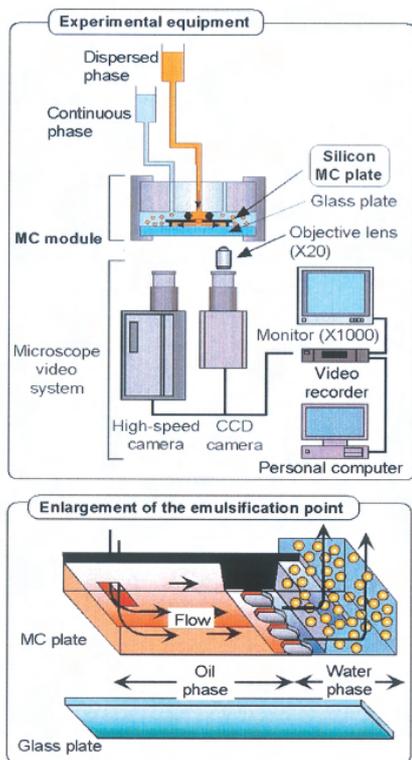


図1 実験装置とマイクロチャンネル (MC) 乳化の概略図

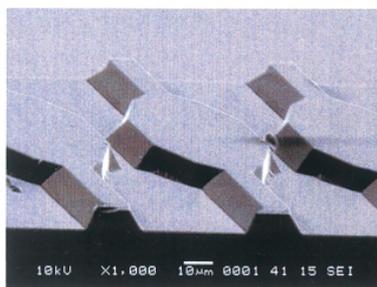


図2 仕切壁付きシリコンマイクロチャンネル

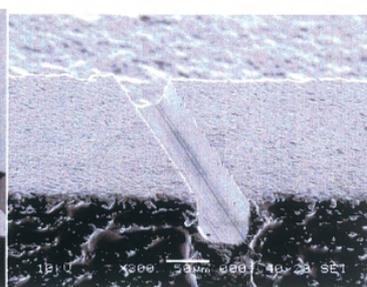


図3 ステンレスマイクロチャンネル

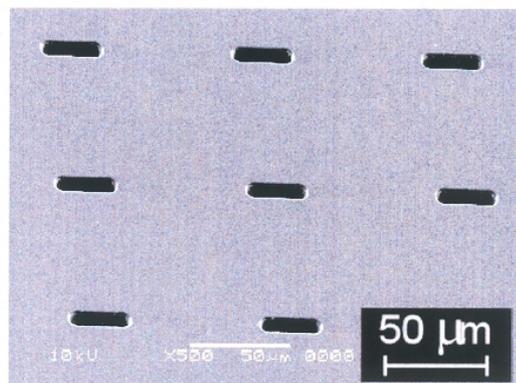


図5 長形状貫通型マイクロチャンネル

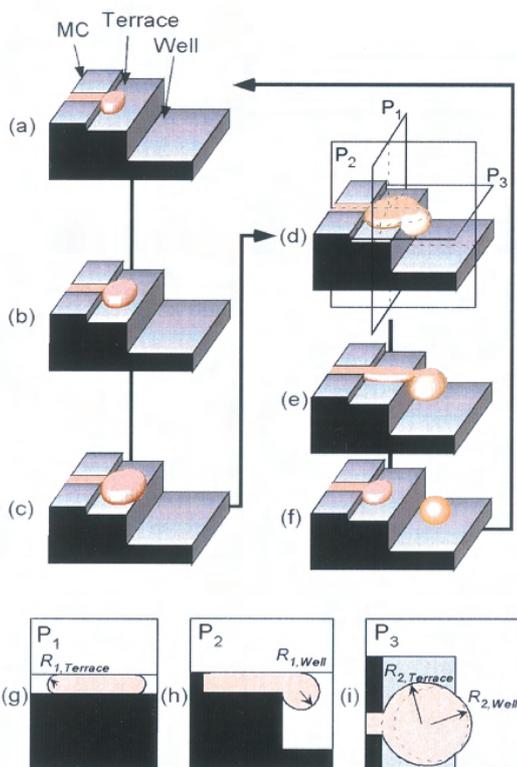


図4 界面張力による自発的な形状変化に基づく液滴生成機構

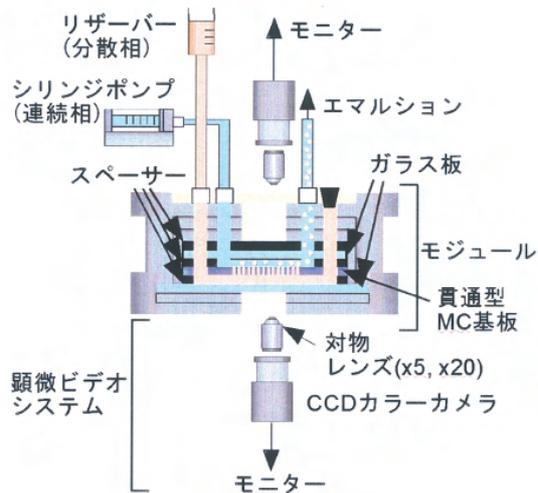


図6 貫通型マイクロチャンネル乳化装置

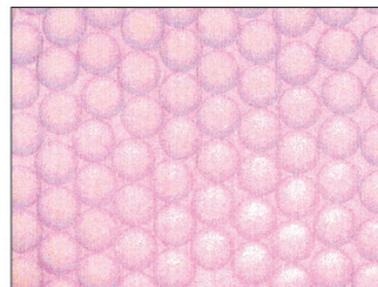


図7 得られた単分散エマルジョン (約 30 µm)

研究課題名

分子擬態を利用した生物系素材の基礎研究

研究項目及び実施体制

分子擬態を利用した生物系素材の基礎研究(中村義一／東京大学医科学研究所)



中村義一

研究の目的

擬態は、魚や昆虫などの世界だけでなく、ミクロの世界にも存在し、タンパク質合成(翻訳)を調節するタンパク質がtRNAを巧みに擬態し機能する。このようなタンパク質・RNA間の「分子擬態」の仕組みを解明し、新しいバイオテクノロジーへ挑戦する。さらに、酵母では擬態分子の働きがプリオン性因子により制御されるため、酵母プリオンの基本特性を解明して、プリオン伝搬のモデル研究として役立てる。

研究の内容

遺伝暗号が発見されてから40年余、終止コドン解読の仕組みが未解明であったため、翻訳(解離)因子による終止コドン認識機構に照準して、分子擬態の機能的な解析を推進した。さらに、翻訳因子のX線結晶回折法により、分子擬態の構造的な解析を行った。プリオン研究については、広範な酵母種から(プリオン特性をもつ)解離因子ホモログを分離し、プリオン伝搬機構を解析した。最後に、生理活性ならびに遺伝子調節因子に対して特異的な相互作用活性をもつRNA分子の人工進化(SELEX)を行い、分子擬態の応用研究を推進した。

主要な成果

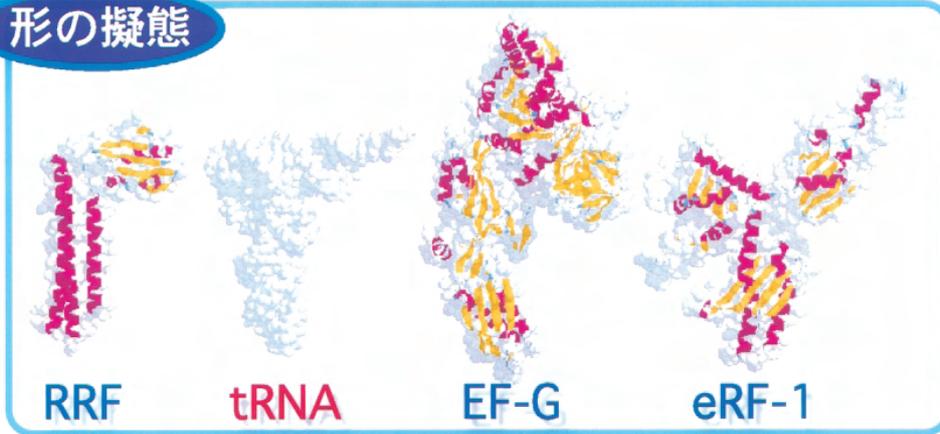
- ①終止コドンに対するペプチドアンチコドンを発見し、遺伝暗号解読の完全解をもたらした。この発見により、タンパク質がRNAの機能までも巧妙に擬態しうることを明らかにした。
- ②タンパク質合成の最終ステップで働く(高度好熱菌)リボソーム再生因子(RRF)の2.6 Å結晶構造を解明して、tRNA擬態性を証明した。これにより、分子擬態を、機能ならびに構造の両面から解析する当初目標を達成した。
- ③強い異種間伝搬性をもつ「スーパープリオン」を酵母種 *Kluyveromyces lactis* から分離し、共凝集による準プリオン(quasi-prion)モデルを提出した。

主な発表論文

- Ito K., *et al.* : A tripeptide 'anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA: *Nature*, 403: 680-684 (2000)
- Nakamura Y., *et al.* : Mimicry grasps reality in translation termination: *Cell*, 101: 349-352 (2000)
- Wilson K., *et al.* : Functional sites of interaction between release factor RF1 and the ribosome: *Nature Str. Biol.*, 7: 866-870 (2000)
- Nakayashiki T., *et al.* : Yeast [PSI+] prions that are crosstransmissible and susceptible beyond a species barrier through a quasi-prion state: *Mol. Cell*, 7: 1121-1130 (2001)
- Uno M., *et al.* : Polypeptide release at sense and non-cognate stop codons by localized charge-exchange alterations in translational release factors: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 1819-1824 (2002)

1 翻訳蛋白質因子によるtRNA分子擬態 (molecular mimicry) の発見。

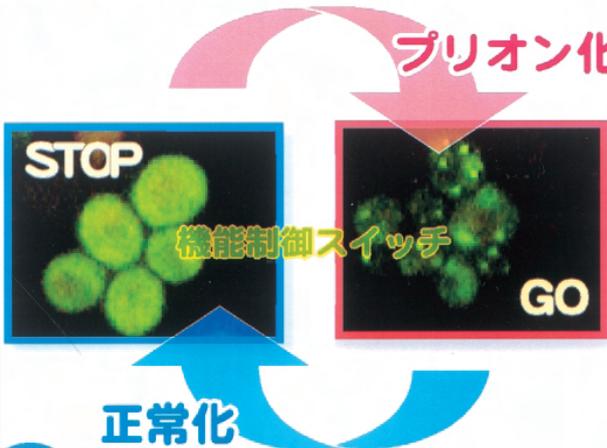
形の擬態



蛋白質とRNAの間の分子擬態
生物学の新概念
新テクノロジー

擬態の応用

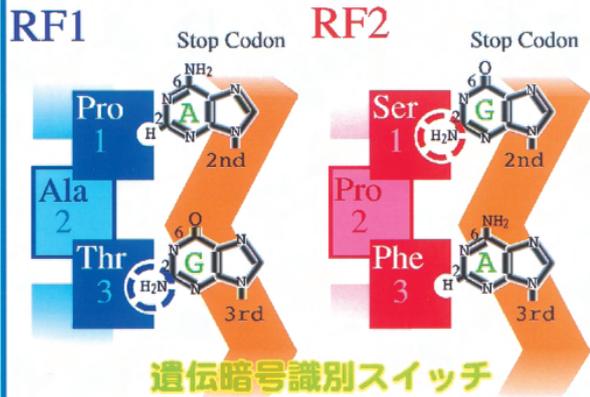
擬態分子の機能制御機構の解明



3 解離因子にはプリオン様の特性があり、酵母プリオンと言われる。緑の蛍光標識により、プリオン凝集体を簡単に視覚化できる。酵母のプリオン病は終止コドンの信号無視である。

機能の擬態

ペプチドアンチコドンの発見



2 終止コドン解読の仕組みは40年間謎であった。タンパク質である解離因子が遺伝暗号を解読する。

研究課題名

食用植物由来の酸化ストレス制御因子に関する基盤的研究

研究項目及び実施体制(◎印は総括研究代表者)

- ①酸化ストレス制御因子含有食用植物素材の探索と評価システムの構築
(◎大澤俊彦／名古屋大学大学院生命農学研究科)
- ②植物性食品中の機能性色素の生体内動態の解明
(長尾昭彦／独立行政法人食品総合研究所)
- ③植物性食品中の機能性色素の酸化ストレス制御機構の解明
(寺尾純二／徳島大学医学部)
- ④新しい酸化ストレス応答遺伝子の探索と細胞・個体レベルにおける抗酸化剤評価系の確立に関する研究(豊國伸哉／京都大学大学院医学研究科)
- ⑤酸化ストレス制御成分高含有食用植物の創出(田代亨／三重大学生物資源学部)
- ⑥香辛植物に含まれる酸化抑制因子の解明(中谷延二／大阪市立大学生活科学部)



大澤俊彦



豊國伸哉



長尾昭彦



田代 亨



寺尾純二



中谷延二

研究の目的

日常摂取している食用植物中に存在する、酸化ストレスに関連した疾病を予防する食品因子の探索を酸化ストレス傷害の制御を指標に行うと共に、酸化ストレス制御成分高含有食用植物の創出を行い、試験管レベルから個体レベル、そしてヒトを対象とした、生活習慣病予防介入試験のための基礎となりうる総合的解析システムの構築を目的とする。

研究の内容

酸化ストレスの制御を基盤として熱帯産の香辛植物を対象に酸化抑制因子の検索を行うと共に、活性物質の有機化学的解析、免疫化学的手法を利用した抗酸化活性評価法の開発や疾病予防酵素群誘導システムの開発を行い、トランスジェニック植物を含めた酸化ストレス制御成分高含有食用植物の創出を行った。また、カロテノイドやフラボノイド、アントシアニンなど抗酸化食品因子の生体内での機能性発現機構について代謝・吸収機構を中心に酸化ストレス応答遺伝子発現のメカニズムについても検討を行い、最終的にヒトへの介入試験を行うための基盤的解析を行った。

主要な成果

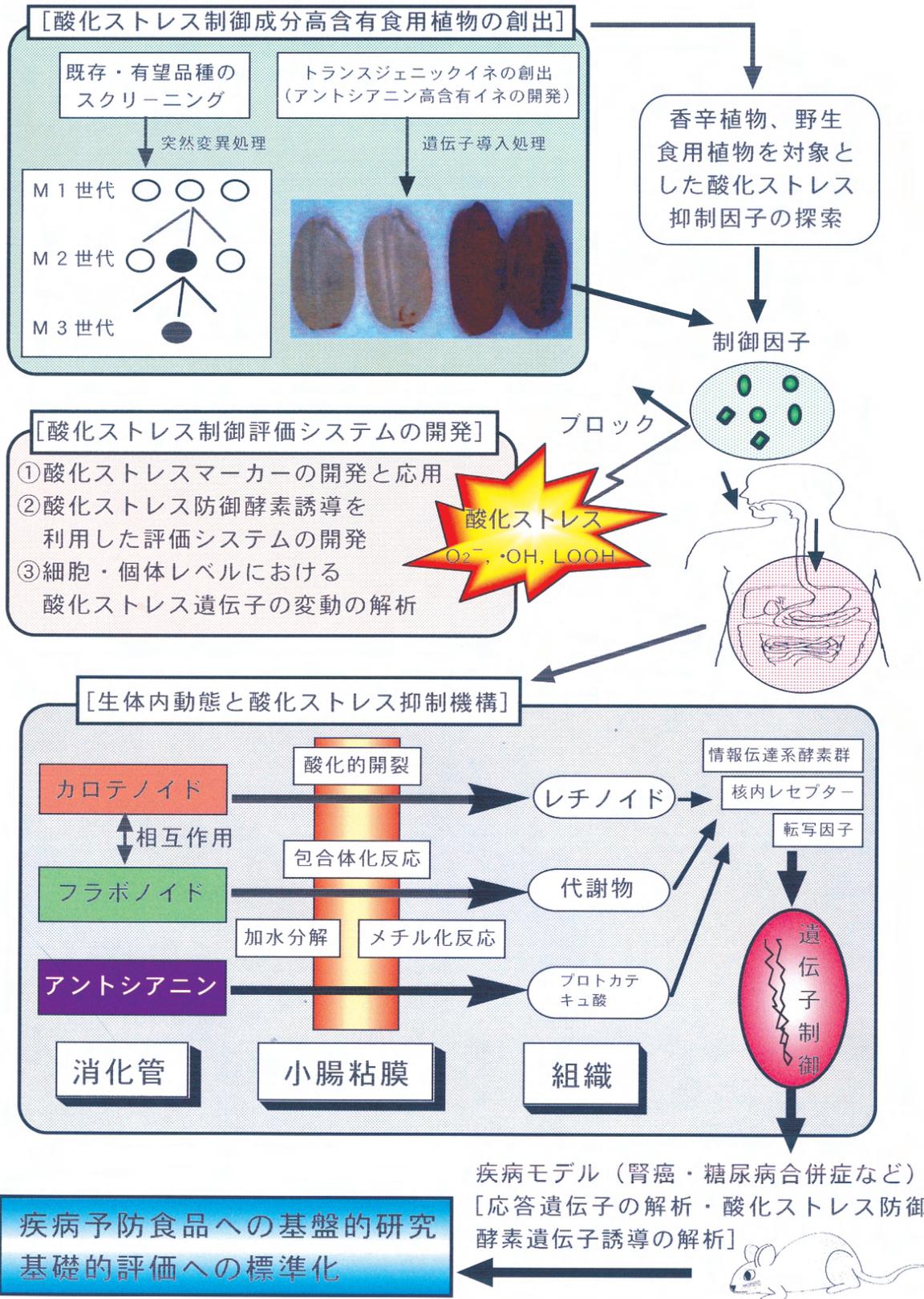
- ①紫トウモロコシの 35S::C1 遺伝子を導入した白米種子(ノトヒカリ)の胚乳部にアントシアニンが蓄積したトランスジェニック米種子を開発し、ニンニク優良系統中に存在する強力な解毒酵素誘導因子の探索に成功した。
- ②新規な酸化ストレス制御評価法の開発を目的に、細胞への人工遺伝子導入を含めた新しい第二相酵素誘導システムを確立し、酸化ストレス応答遺伝子発現のメカニズム解析に成功した。また、カロテノイド、フラボノイドを用いた生体内機能発現の機構解析において消化管での吸収・代謝の有機化学的解析を中心に酸化ストレス傷害の低減やアポトーシス誘導などに新しい知見を得ることができた。
- ③疾病モデル動物(糖尿病性白内障モデルラットや腎がん発症モデルマウス)に対してのアントシアニン、高アントシアニン含有米の投与により、最終的なヒトへの介入試験の基盤の確立に成功した。

主な発表論文

- T. tsuda, *et al.* : Absorption and Metabolism of Cyanidin 3-O- β -D-glucoside in Rats: *FEBS Lett.*, 449: 179-182 (1999)
- Y. nakamura, *et al.* : Redox Regulation of Glutathione S-transferase P1 Induction by Benzyl Isothiocyanate: Possible Correlation of Enzyme Induction with the Formation of Reactive Oxygen Intermediates: *Cancer Res.*, 60: 219-225 (2000)
- K. murota, *et al.* : Efficiency of absorption and metabolic conversion of quercetin and its glucosides in human intestinal cell line Caco-2.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 384 (2): 391-397 (2000)
- A. nagao, *et al.* : Inhibition of β -carotene-15, 15'-dioxygenase activity by dietary flavonoids: *J. Nutr. Biochem.*, 11 (6): 348-355 (2000)
- T. tanaka, *et al.* : Expression of stress-response and cell proliferation genes in renal cell carcinoma induced by oxidative stress: *Am J Pathol.*, 156: 2149-2157 (2000)

H. kikuzaki, et al.: Phenylbutanoid Dimers from the Leaves of *Alpinia flabellata*: *Phytochemistry*,56: 109-114 (2001)

研究のイメージ



研究課題名

金属タンパク質の界面電子移動制御と生物機能の高度利用

研究項目及び実施体制(◎印は総括研究代表者)

- ①生体機能電極を用いた金属タンパク質など生体分子の認識と機能解析・新規機能分子の創製に関する研究(◎谷口 功/熊本大学工学部)
- ②生物電気化学法による光合成類似反応系の構築に関する研究(西山勝彦/熊本大学工学部)
- ③食品管理・非破壊品質評価のためのセンサ電極(情報変換素子)開発とその応用に関する研究(谷口 功/熊本大学工学部)



谷口 功



西山勝彦

研究の目的

機能電極界面を用いた電気化学的手法で生体系や自然界の機能を解明することで、食品産業及び生物系産業のための基盤技術の開発が可能になってきた。そこで本研究では、電子を言葉として生体分子と対話(電気化学的に応答)できるインターフェース(機能電極界面)を開発し、生体内や自然界で金属タンパク質が電子移動を通して発揮している触媒、物質運搬・貯蔵、情報 伝達などの機能を解明するとともに、それを応用して、新しい食品科学の展開の基礎となる生物電気化学的分子変換、センサー素子の開発などを目的とした。

研究の内容

機能電極界面を用いた電気化学的手法を用いて、金属タンパク質と自在に対話(情報変換)できる機能電極の開発、人工金属タンパク質機能電極の作製、機能電極を用いた金属タンパク質の生物化学的な機能発現のメカニズムの解明、生物電気化学的手法による人工光合成類似反応系の構築、さらに、食品科学のためのセンサー素子、特に窒素酸化物のためのセンサ素子の開発について研究を進めた。

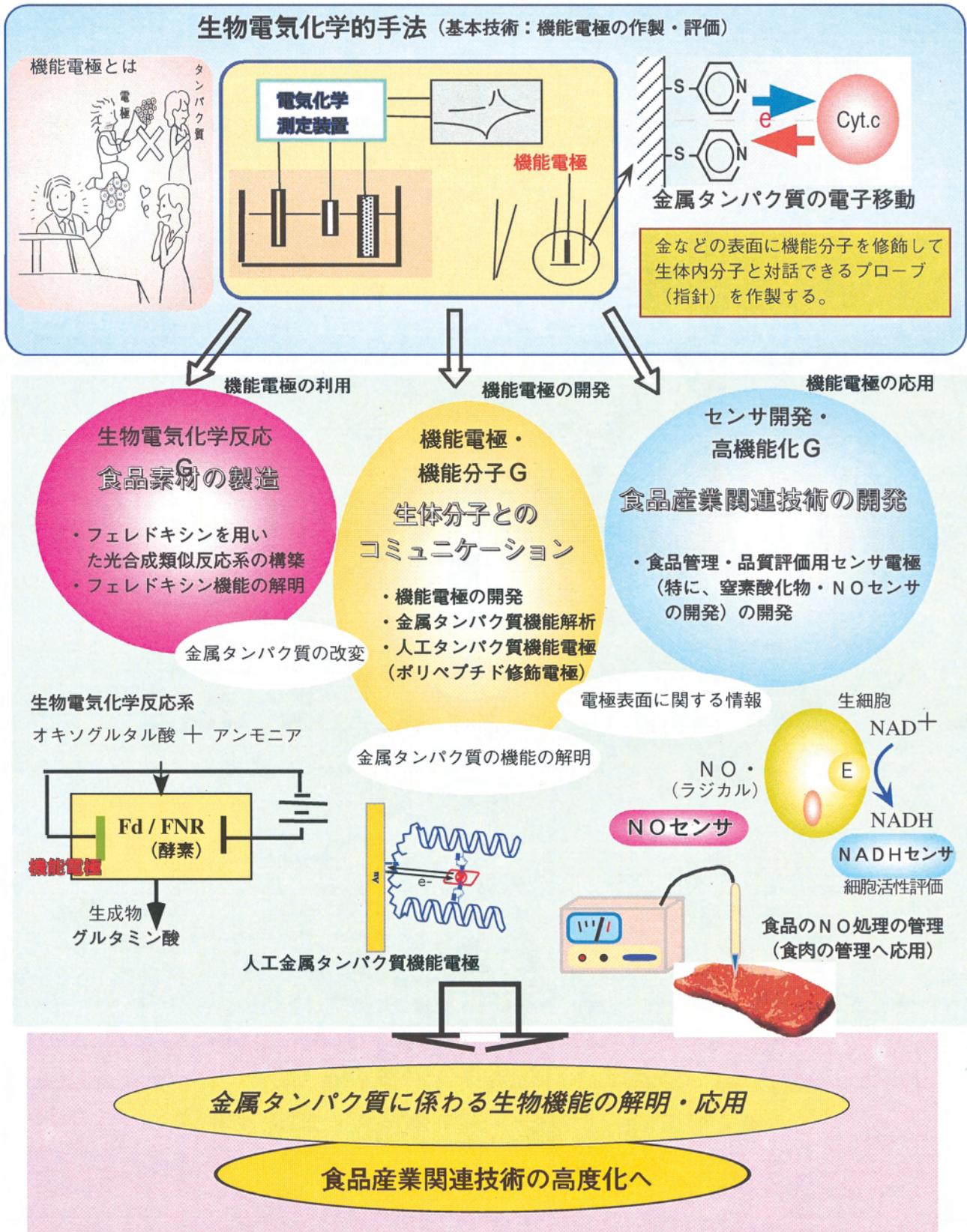
主要な成果

- ①電極表面に分子を一分子層程度を並べて(ナノテクノロジー)表面を高性能化した機能電極界面を用いて種々の金属タンパク質の電子移動制御が可能となった。この種の電極を用いて、フェレドキシンやミオグロビン等の金属タンパク質のアミノ酸残基の機能解析や新規な人工再構成改変金属タンパク質分子の機能解析が可能となった。さらに、ポリペプチド修飾電極を用いた人工タンパク質機能界面の作製の基礎を確立した。
- ②食品素材の合成の基礎として、フェレドキシンを用いた生物電気化学的人工光合成類似の立体選択的なアミノ酸合成法を確立し、新しいフェレドキシン・酵素(FNR, SiR)固定化機能電極の開発に成功した。
- ③各種センサ電極として、金属電極および金属タンパク質、ヘミン及び関連金属錯体化合物修飾電極を用いた電気化学的窒素酸化物(NO センサなど)を開発し、食品の品質評価への利用法を示した。

主な発表論文

- I. Taniguchi, *et al.* : Simple methods for preparation of a well-defined 4-pyridinethiol modified surface on Au(111) electrodes for cytochrome c electrochemistry: *Electrochim. Acta*, 45: 2843- 2854 (2000)
- T. Akashi, *et al.* : Comparison of the Electrostatic Binding Sites on the Surface of Ferredoxin for Two Ferredoxin-dependent Enzymes, Ferredoxin-NADP+ Reductase and Sulfate Reductase: *J. Biol. Chem.*, 274: 29399-29405 (1999)
- I. Taniguchi, *et al.* : Electroanalytical chemistry of myoglobin with modification of distal histidine by cyanated imidazole: *J. Electroanal. Chem.*, 468: 9-18 (1999)
- T. Sawaguchi, *et al.* : Direct Observation of 4-Mercaptopyridine and Bis(4-pyridyl) disulfide Monolayers on Au(111) in Perchloric Acid Solution Using In situ Scanning Tunneling Microscopy: *Langmuir*, 14: 3565-3569 (1998)
- I. Taniguchi: Functional Electrodes for Probing Metalloproteins and Bioelectrochemical Systems: *Interface*, 6: 34-37 (1997)

研究のイメージ



研究課題名

絹タンパク質の構造—物性相関の徹底解明とバイオセンシングシステム等への応用

研究項目及び実施体制

絹タンパク質の原子レベルでの構造—物性相関の解明と新しい絹繊維等の開発
(朝倉哲郎/東京農工大学工学部)



朝倉哲郎

研究の目的

絹は、化学合成繊維などに比べて環境や人にやさしく、しかもその構造を変えることによって、特性のより優れたものに改変、あるいは各種の機能性をもつ絹を創成できる。

このような特性をもつ絹の構造と物性について、新たに開発する解析能力の高い固体核磁気共鳴(固体NMR)構造解析手法を用いて詳細に解明し、その知見を生かして、優れた特性をもった新しい絹繊維等を開発することを目的とする。

研究の内容

- ①絹の原子レベルでの詳細な構造決定のための固体NMR構造解析手法の開発
- ②蚕における絹の繊維化前・繊維化後の構造と繊維化機構の解明
- ③絹タンパク質の構造—物性相関に関する新しい知見を生かして、優れた特性を持つ新しい絹の分子設計とそれに基づく新規絹様物質の作成
- ④再生絹繊維の製造プロセスの開発(新しい溶媒、製造手法等の開発)と優れた新たな特性を持つ絹繊維等の開発

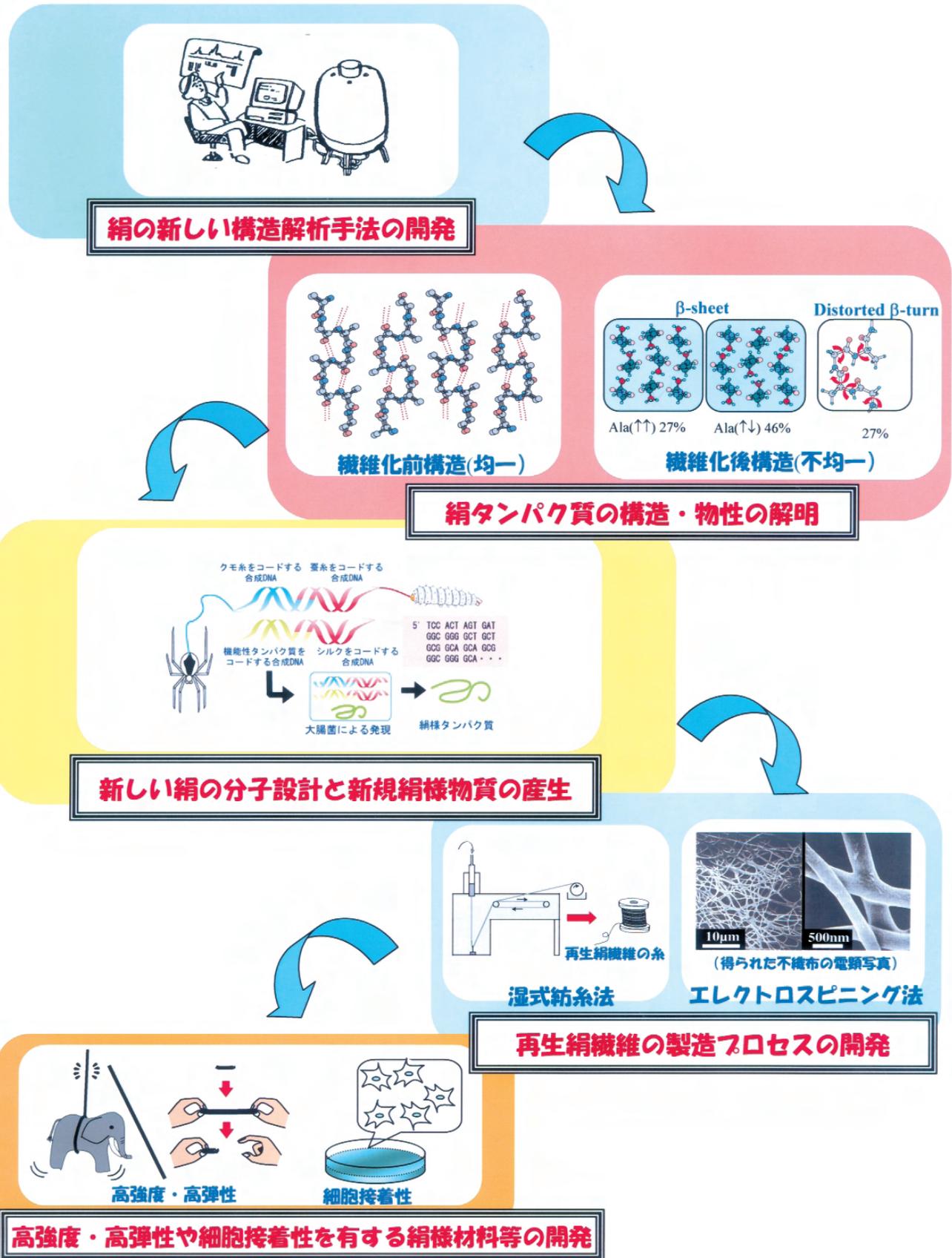
主な成果

- ①固体NMR法を用いて、これまで構造の解析が困難であった、非晶構造についても解析が可能な優れた高分子・繊維構造の解析手法を確立した。
- ②①で開発した解析手法を用いて、世界で初めて、家蚕絹の繊維化前・繊維化後の構造を決定するとともに、蚕の巧みな繊維化機構の解明に成功した。これによると、絹の繊維化前の構造は、分子内水素結合と分子間水素結合が交互に形成された繰り返し β ターン構造を示しており、これが蚕の吐糸の際のわずかな延伸力等により、瞬時にすべての分子間水素結合が形成されて繊維化後の構造に変化する。その構造は、73%が分子間構造の異なる2種類の β シート構造で、残りの27%がゆがんだ β ターン構造という著しく不均一な構造であることが明らかになった。
- ③再生絹繊維の製造に適した新しい溶媒の開発等により、従来技術では製造が困難であった高強度な再生絹繊維の製造プロセッシング技術を確立した。
- ④開発した新しい絹の分子設計や再生絹繊維製造技術などを駆使して、高強度・高弾性の特性を有した家蚕と野蚕のハイブリッド絹様材料や研究資材として新たな利用が期待できる細胞接着性を有する絹様物質などの作成手法を開発した。

主な発表論文

- Asakura T., *et al.* : A Repeated b-Turn Structure in Poly(Ala-Gly) as a Model for Silk I of *Bombyx mori* Silk Fibroin studied with Two-dimensional Spin-diffusion NMR under Off Magic Angle Spinning and Rotational Echo Double Resonance: *J. Mol. Biol.*, 306: 291-305 (2001)
- Zhao C. & Asakura T., : Structure of Silk studied with NMR: *Prog. NMR Spec.*, 39: 301-352 (2001)
- Asakura T., : Structure of *Bombyx mori* Silk Fibroin Before Spinning in Solid State studied with Wide Angle X-Ray Scattering and ^{13}C CP/MAS NMR: *Biopolymers*, 58: 521-525 (2001)
- Yao J., *et al.* : Artificial Spinning and Characterization of Silk Fiber from *Bombyx mori* Silk Fibroin in Hexafluoroacetone Hydrate: *Macromolecules*, in press (2001)
- J. D. van Beek *et al.* : Solid-state NMR determination of the secondary structure of *Samia cynthia ricini* silk: *Nature*, 405: 1077-1079 (2000)

研究のイメージ



生物系特定産業技術研究推進機構 東京事務所



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

生研機構ホームページ・アドレス

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

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