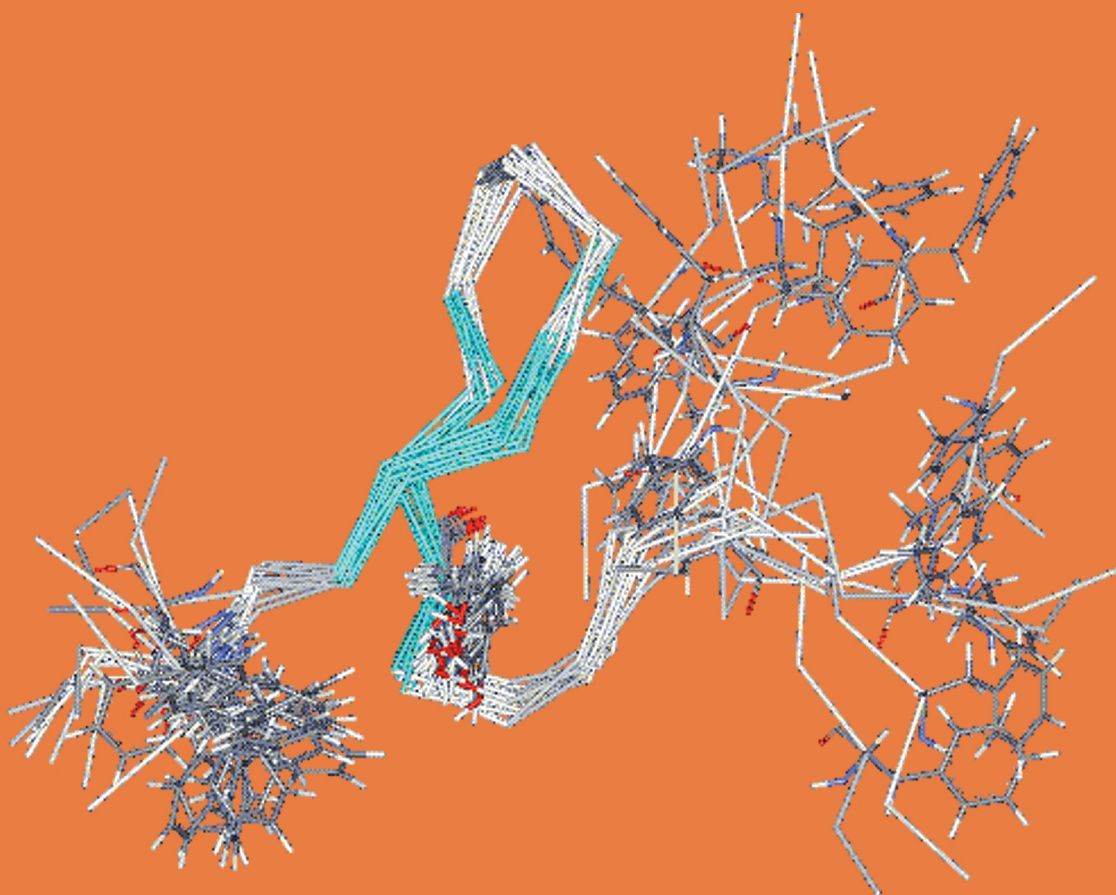


生研センター基礎研究推進事業 成果発表会

(2003年度終了課題)



独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構
生物系特定産業技術研究支援センター

表紙は、「昆虫細胞成長因子の機能解析と利用に向けた基礎研究」(p. 17) の研究成果である「NMR 構造解析に基づく昆虫細胞成長因子の立体構造図」(富山医科薬科大学 河野 敬一)

図の説明

昆虫生理活性ペプチド Growth-blocking peptide (GBP) は、アミノ酸 25 残基からなる動物界で最小の細胞成長因子である。昆虫培養細胞のみならず、特定のヒト培養細胞に対しても顕著な細胞増殖作用を示す。さらに、GBP は昆虫血球細胞の活性化や幼虫発育調節などの多機能性を有するサイトカインと言える。表紙図は、GBP の NMR 解析結果に基づく立体構造のモデル図である。中心部はしっかりしたベーターヘアピン構造をとり、両末端部は自由度の大きな領域といえる。本研究によって、中心部のベーターヘアピン構造は元より、両末端のフレキシブルな領域も生理活性発現に不可欠であることが証明された。

ごあいさつ

独立行政法人
農業・生物系特定産業技術研究機構
副理事長 小林 新一



生研機構は、昨年10月に、(独)農業技術研究機構と統合され、新たに「(独)農業・生物系特定産業技術研究機構」が発足し、これまで生研機構で行ってきた業務は、新法人内の「生物系特定産業技術研究支援センター(生研センター)」が担っていくこととなりました。

生研センターは、今後も、生物系特定産業技術の高度化等に資するため、民間、大学、独立行政法人等の研究勢力を結集し、産学官の連携の拠点として、基礎から応用・実用化までの研究開発の効率的な推進を図って参ります。

さて、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、農林水産業、食品産業等の分野において、生物の持つ多様な機能を活用することにより、バイオ技術等新しい技術を創出し、人口問題、食料問題、環境問題の解決に寄与すべく、産学官の連携による数々の基礎研究を支援して参りました。

本事業で得られた成果を関係者だけでなく、研究者、産業界等広く国民の皆様にお伝えし、さらに様々な分野で利活用いただきたいとの思いを込めまして、平成12年度から、終了課題の成果発表会を開催しておりますが、今年度で開催4回目を迎えることとなりました。

今年度に終了する18課題においても、①味覚応答の発現機序の解明、②藍色細菌をモデルとした植物の生物時計機構の解明、③動物の体を構成する各種細胞・組織に特異的なDNAメチル化情報の解析など、幅広い分野で数多くの成果があがっており、将来的に我が国のライフサイエンスの発展を支えていくものと期待しています。

また、生研センターでは、基礎研究推進事業などで得られる基礎的な成果をさらに発展させ、将来的に生物系特定産業の活性化に資するよう、応用・実用化につながる研究支援事業(新事業創出研究開発事業、異分野融合研究支援事業)をあわせて推進しています。現在、基礎研究推進事業の終了課題の幾つかが、これらの事業で次のステップの研究を進めている状況にあります。

今後とも、この基礎研究推進事業を着実に推進し、各種事業との連携のもと、生研センターとしての使命を果たしていくよう、より一層努力して参ります。

引き続き、皆様方の暖かいご支援とご指導をいただければ幸いです。

平成16年3月

3月10日(水)

味覚応答の発現機序の解明 (日野 明寛 独立行政法人食品総合研究所)	1
肥満・脂肪代謝制御の分子機構と食品中の活性化因子に関する研究 (斉藤 昌之 北海道大学大学院獣医学研究科)	3
食品成分による脂質代謝の調節に関する研究 (森山 達哉 京都大学大学院農学研究科)	5
NMRによる機能未知タンパク質の動的構造解析と機能の推定に関する基礎的研究 (山崎 俊正 独立行政法人農業生物資源研究所)	7
広範な特性の米及び変異米の食味特性の解明及び新評価技術 (大坪 研一 独立行政法人食品総合研究所)	9
共生微生物等を利用した荒廃土壌の修復技術の開発 (齋藤 雅典 独立行政法人農業環境技術研究所(前畜産草地研究所))	11

3月11日(木)

ミツバチの脳機能に働く遺伝子を利用した新品種開発等に関する基礎的研究 (久保 健雄 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻)	13
進化工学手法によるシロアリセルラーゼの改変と高効率セルロース糖化系の開発 (渡辺 裕文 独立行政法人農業生物資源研究所)	15
昆虫細胞成長因子の機能解明と利用に向けた基礎研究 (早川 洋一 北海道大学低温科学研究所)	17
植物の生物時計機構の解明と光周性の人為的制御 (石浦 正寛 名古屋大学遺伝子実験施設)	19
植物の耐寒性形質に関わる分子機能の複合的解析とその応用 (上村 松生 岩手大学農学部)	21
穀類細胞への新たな遺伝子導入法の開発 (野々村 賢一 国立遺伝学研究所実験圃場)	23

3月12日(金)

特殊レーザー加工技術を応用した新しい植物形質転換法の開発 (小林 昭雄 大阪大学大学院工学研究科応用生物工学専攻)	25
環境化学物質応答の分子機構の解明 (高橋 智 筑波大学基礎医学系・生命科学動物資源センター)	27
遺伝子導入飼料作物を用いた新しい家畜疾病予防法の開発 (松本 安喜 東京大学大学院農学生命科学研究科)	29
DNA メチル化情報の解析による動物ゲノムの高度利用 (塩田 邦郎 東京大学大学院農学生命科学研究科)	31
抗病性産業動物の作出に関する分子遺伝学的研究 (橋本 敬一郎 藤田保健衛生大学総合医科学研究所)	33
行動特性の育種改良を目指した、家畜の脳内物質関連遺伝子の解析 (村山 美穂 岐阜大学農学部)	35
「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」について	37

研究課題名

味覚応答の発現機序の解明

研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ① 食の機能性向上のための味覚情報の伝達・認知機構に関する分子生物学的研究
(◎日野 明寛／独立行政法人食品総合研究所)
- ② 遺伝的変異マウスを利用した味覚情報の伝達・認知機構の生理・生化学的及び行動学的研究
(二ノ宮 裕三／九州大学大学院歯学研究院)



日野 明寛



二ノ宮 裕三

研究の目的

味覚は生体のホメオスタシスの維持に深く関与していることが知られているが、味覚と生理機能の相互作用については分子レベルでの解明は殆どなされていない。本研究では、味覚入力における味細胞と脳神経系の情報伝達やその応答特異性を分子・細胞レベルで解析し、生理調節機能という出力としての味覚応答を行動学的及び生理学的現象としてとらえることで、味覚による生体の生理調節機序を解明することを目的としている。

研究の内容

① マウス有郭乳頭で発現する遺伝子を網羅的に含む味覚DNAチップの開発を行うとともに、味受容に変異のあるマウス等を利用して新規味覚関連遺伝子の探索を行った。② マウス味細胞の分化・維持の分子レベルの解析を進め、舌上皮から細胞株の樹立を試みた。③ 神経切断後の神経再生過程における行動応答、神経応答さらには味受容関連分子の再発現とそれらの連関を解析した。④ 飽食ホルモンであるレプチンの味覚修飾効果と食物依存性の唾液タンパク質の合成誘導システムについて解析した。

主要な成果

- ① 新規の甘味受容体 T1r3 のクローニングに成功し乳頭間で発現様式が異なることを見出すとともに、味覚情報伝達に関与すると考えられる遺伝子を複数明らかにした。また T1r3-KO マウスの味覚応答の解析から甘味受容体が複数存在することを明らかにした。
- ② 味蕾の維持には分化増殖因子である Shh-Ptc 系が関与することを明らかにし、味覚関連遺伝子を発現する舌上皮由来の細胞株 KT-1 を樹立した。
- ③ 味細胞と味神経は互いに選択的にシナプスを形成しており、味細胞のターンオーバーに際しても脳に伝える味覚情報が大きく変化することなく維持されることを明らかにした。
- ④ レプチンは味細胞に存在する受容体を介して甘味を特異的に抑制すること、またヒトにおいても血清レプチン濃度は甘味閾値と相関すること、さらに食物の摂取により特定の唾液タンパク質が誘導され、栄養効率の改善に働くことを明確にし、これら味覚情報を介した食調節系の存在を明らかにした。

見込まれる波及効果

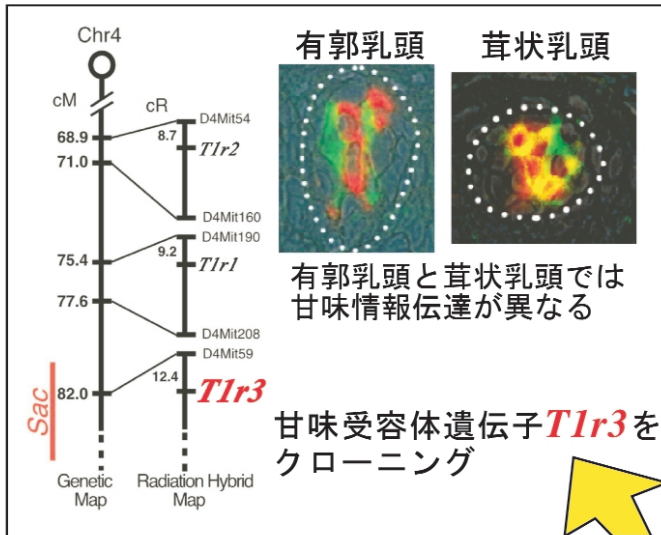
本研究で同定された味受容関連遺伝子や樹立した培養細胞株は、新規味物質などの物質の探索に利用でき、分子・細胞機能に基づく食品の味や機能の設計基盤となる。また、明らかにされた味覚と生理機能調節の関係は、生活習慣病患者が増加しつつある社会に向けて健全な食生活を提示するばかりでなく、この調節機構を利用した医食境界領域における新食品産業の創出へつながる。

主な発表論文

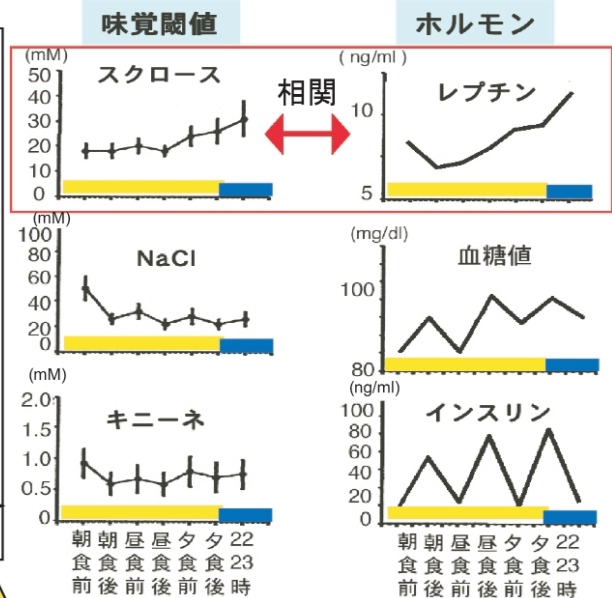
- Kitagawa M., *et al.* : Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste : *Biochem Biophys Res Commun.*, 283 : 236-242 (2001)
- Kim M., *et al.* : Regional expression patterns of taste receptors and gustducin in the mouse tongue : *Biochem Biophys Res Commun.*, 12 : 500-506 (2003)
- Kawai K., *et al.* : Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice : *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 97 : 11044-11049 (2000)
- Yasumatsu K., *et al.* : Recovery of amiloride-sensitive neural coding during regeneration of the gustatory nerve : Behavioral-neural correlation of salt taste discrimination : *J. Neurosci.*, 23 : 4362-4368 (2003)
- Damak S., *et al.* : Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3 : *Science*, 301 : 850-853 (2003)

研究のイメージ

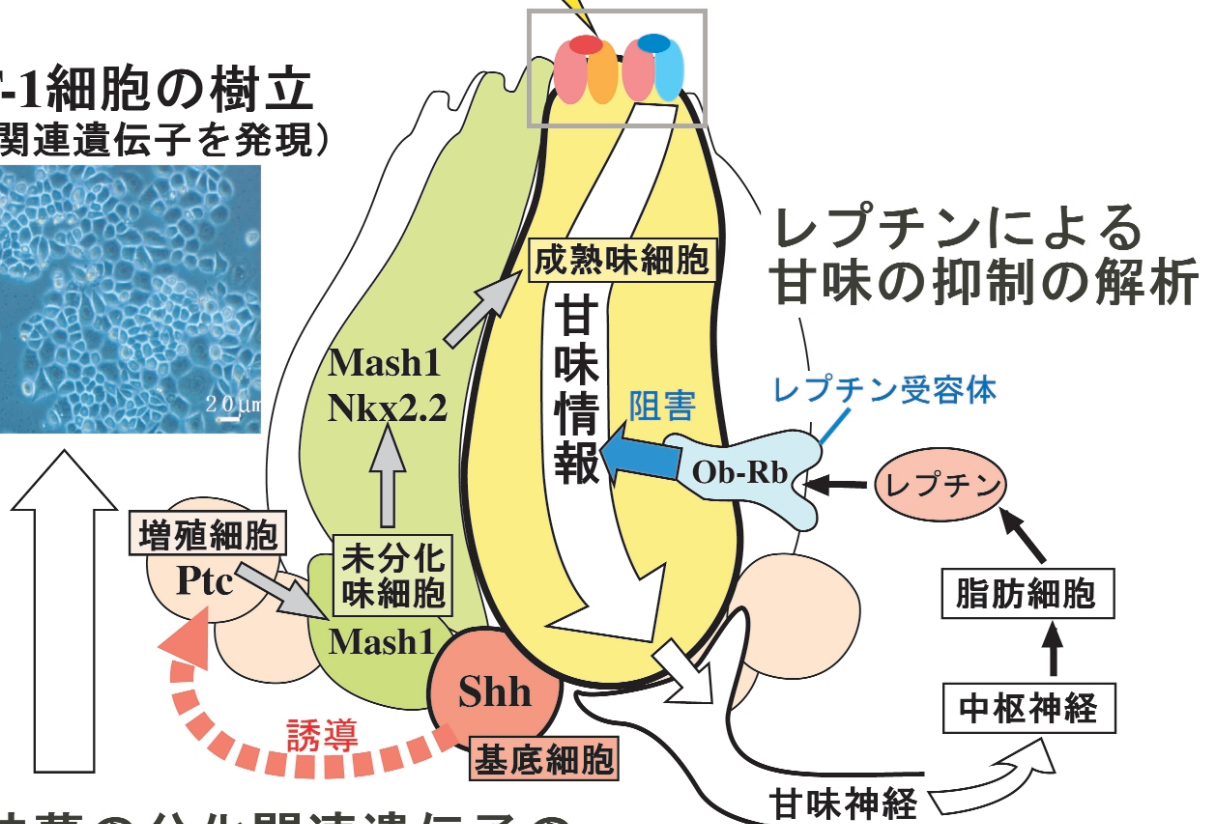
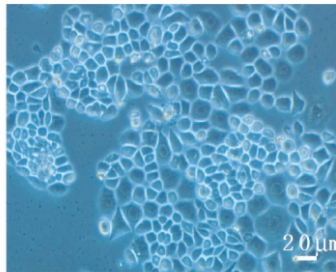
味受容体T1r3の単離と機能解析



ヒトの血中ホルモン濃度と味覚閾値の概日リズムとの相関



KT-1細胞の樹立 (味覚関連遺伝子を発現)



味蕾の分化関連遺伝子の発現解析

研究課題名

肥満・脂肪代謝制御の分子機構と食品中の活性化因子に関する研究

研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ① エネルギー消費分子脱共役蛋白質の制御機構と食品中の活性化因子に関する研究
(◎齊藤 昌之／北海道大学大学院獣医学研究科)
- ② 脂肪細胞のライフサイクルを支配する分子機構の解明とその制御法の開発
(河田 照雄／京都大学大学院農学研究科)
- ③ 食品由来脂肪酸の生体内代謝とアラキドン酸カスケード反応を介した脂肪細胞制御に関する研究
(横田 一成／島根大学生物資源科学部)
- ④ 食品素材中の脂肪酸関連有効成分の検索とその食品化学的特性に関する研究
(宮下 和夫／北海道大学大学院水産科学研究科)



齊藤 昌之



河田 照雄



横田 一成



宮下 和夫

研究の目的

肥満・生活習慣病に関わる2種類の分子(脂肪細胞を制御する核内レセプターとエネルギー消費を増やす脱共役蛋白質 UCP)に作用する食品成分を探索し、新しいプライマリーケア食品開発への手掛かりを得る。

研究の内容

脂肪細胞のライフサイクル支配機構について核内レセプター PPAR と共役因子の役割を中心に検討すると共に、UCP の機能発現について解析する。それに基づき、PPAR と UCP を指標とする in vitro 評価系を構築して、活性化あるいは抑制する食品成分を探索し、食品化学的性質や体内代謝・作用様式の検討とともに、抗肥満・抗生活習慣病効果を in vivo で検証する。

主要な成果

- ① 脂肪細胞分化における核内レセプター PPAR γ と転写共役因子(CBP, p300)の重要性を証明し、両者を組み合わせて PPAR リガンドの大規模スクリーニングレポーターアッセイ系を確立した。
- ② 脂肪細胞の分化過程でプロスタグランジン(PG)合成パターンが変化し、成熟すると PGD₂ や PGJ₂ 誘導体が PPAR の内因性リガンドになりうることを示した。
- ③ 褐色脂肪や骨格筋の細胞で、UCP1, UCP2, UCP3 遺伝子発現における α アドレナリンレセプターと核内レセプター(PPAR、RXR)の役割を明らかにし、これを利用したスクリーニング系を確立した。
- ④ 上記スクリーニング系によって、魚油の活性を確認すると共に、共役脂肪酸、高度不飽和脂肪酸、テルペノイド化合物など、多数の候補物質を検索・選択した。
- ⑤ 選択されてきた候補物質のいくつかは肥満モデル動物(マウス、イヌ)で抗肥満・抗生活習慣病効果を示したので、これらの効率的な調製法や安定化法を確立した。

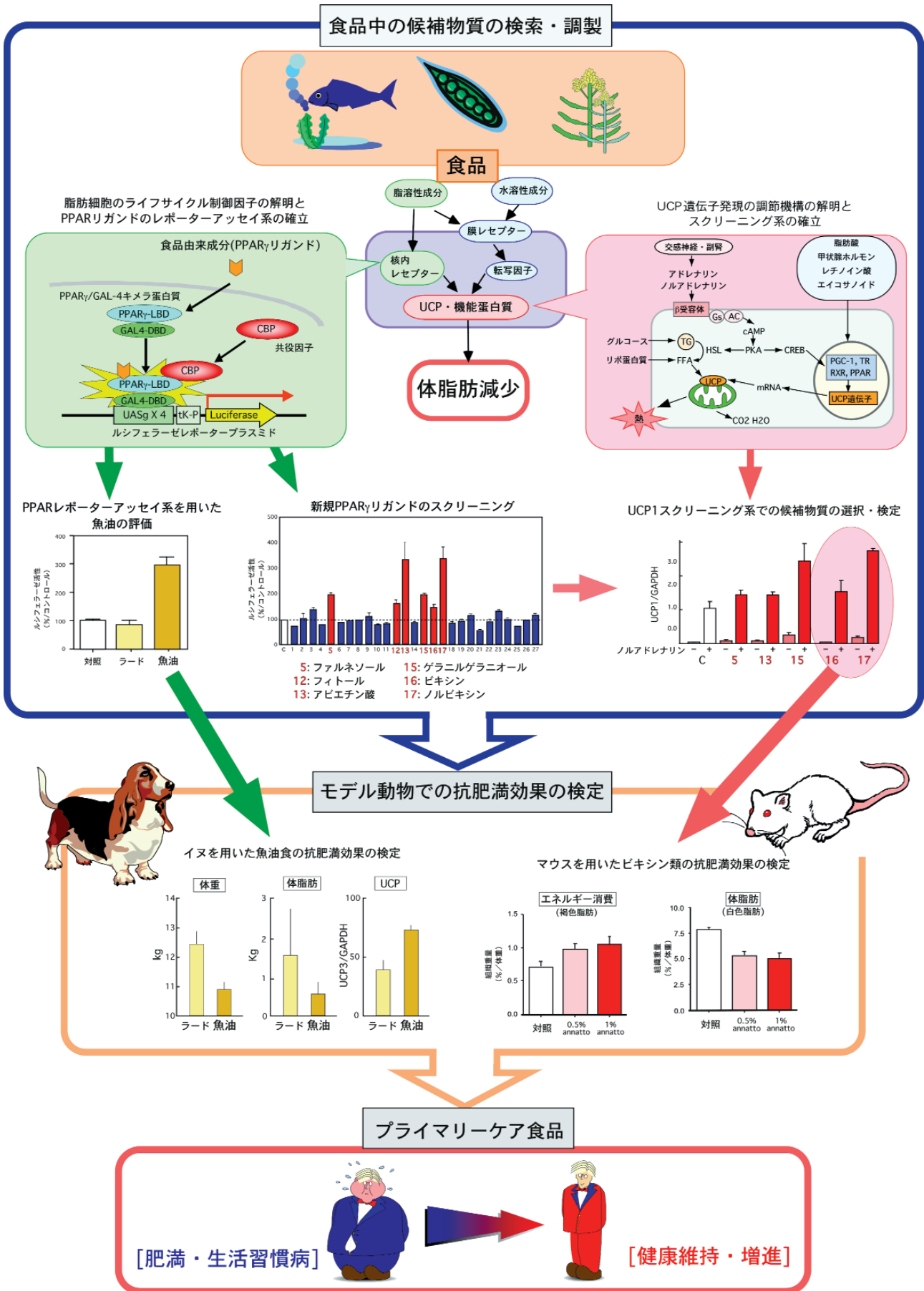
見込まれる波及効果

肥満や生活習慣病の予防・改善効果を持つ食品の開発や、その素材を提供する動植物の栽培育成を促す。

主な発表論文

- Nagase I, *et al.* : Up-regulation of uncoupling proteins by β -adrenergic stimulation in L6 myotubes : *FEBS Lett.*, 494 : 175-180 (2001)
- Noguchi R, *et al.* : Dietary effects of bitter melon oil on blood and liver lipids of rats : *Arch. Biochem. Biophys.*, 396 : 207-212 (2001)
- Takahashi N, *et al.* : Dual action of isoprenols on activation of both PPAR γ and PPAR α in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes : *FEBS Lett.*, 514 : 315-322 (2002)
- Takahashi N, *et al.* : Overexpression and ribozyme-mediated targeting of transcriptional coactivators CREB-binding protein and p300 revealed their indispensable roles in adipocyte differentiation through the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ : *J. Biol. Chem.*, 277 : 16906-16912 (2002)
- Takahashi N, *et al.* : Abietic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) in RAW264.7 macrophages and 3T3-L1 adipocytes to regulate gene expression involved in inflammation and lipid metabolism : *FEBS Lett.*, 550 : 190-194 (2003)

研究のイメージ



研究課題名

食品成分による脂質代謝の調節に関する研究

研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①脂質代謝機能に関する試験研究
(◎森山 達哉／京都大学大学院農学研究科)
- ②食用植物性タンパク質の単離・精製及び有効品種の検索に関する試験研究
(丸山 伸之／京都大学大学院農学研究科)



森山 達哉



丸山 伸之

研究の目的

ダイズタンパク質などの食用植物性素材に焦点を当て、脂質代謝を適正に調節する成分や画分を見出し、その作用機構の解明や、機能性食品素材としての実用化を目指した基礎的な検討を行う。また、有効な画分の含有率や、特徴的な分子種を探索するための基盤情報源としてダイズ品種のデータベースを構築する。

研究の内容

- ①ダイズタンパク質を大量に分画・精製し、飼料として肥満モデルマウスなどに与えた。飼育後、血清の各種パラメーター、肝臓での脂質代謝関連酵素活性やそれらの遺伝子発現レベル、等を詳細に解析した。
- ②ヒト肝臓培養細胞を用いた in vitro の系によって、脂質代謝に有効なダイズタンパク質由来ペプチドや機能性ペプチド、低分子食品成分を探索した。
- ③脂質代謝の調節を解析するための新規な方法論や解析ツール、測定系、ターゲット分子などを開発した。
- ④有効品種を検索するための基盤データとして、(独)農業生物資源研究所より移管したダイズ品種(約5,800種)の種子プロテオームを解析しデータベース化し、特徴的な構成成分の構造を解析した。

主要な成果

- ①ダイズタンパク質のうち、血清脂質や血糖値、高インスリン値などを低下させる機能を有した画分(β -コングリシニン: 7S グロブリン)を見出し、その作用機構や生体への効果・影響について解明した。
- ②ダイズ β -コングリシニンを分解して得たペプチド混合物は、脂質代謝適正化能を維持し、かつ乳化性や溶解性、安全性の点で優れており、新規機能性食品素材として実用化可能であることがわかった。
- ③加工食品やダイズ種子中に含まれるダイズ β -コングリシニンの特異的な定量法を確立した。
- ④ダイズ品種約5,800種類のタンパク質組成、成分組成、加工特性などの情報を掲載したダイズ種子プロテオームデータベースを構築した。特徴的な構成成分(β 変異体、A3変異体)の構造を明らかにした。
- ⑤培養肝細胞からのリポタンパク質分泌を抑制する β -コングリシニン由来ペプチドや食品由来低分子化合物を見出し、脂質代謝調節能を有する食品素材として利用できる可能性を示した。
- ⑥脂質代謝と密接に関わるインスリン抵抗性の責任分子として報告されたレジスチンの定量法を開発し、レジスチンの変動を解析した。その結果、当初の説を否定する結果を得、新規な生理機能性を示唆した。

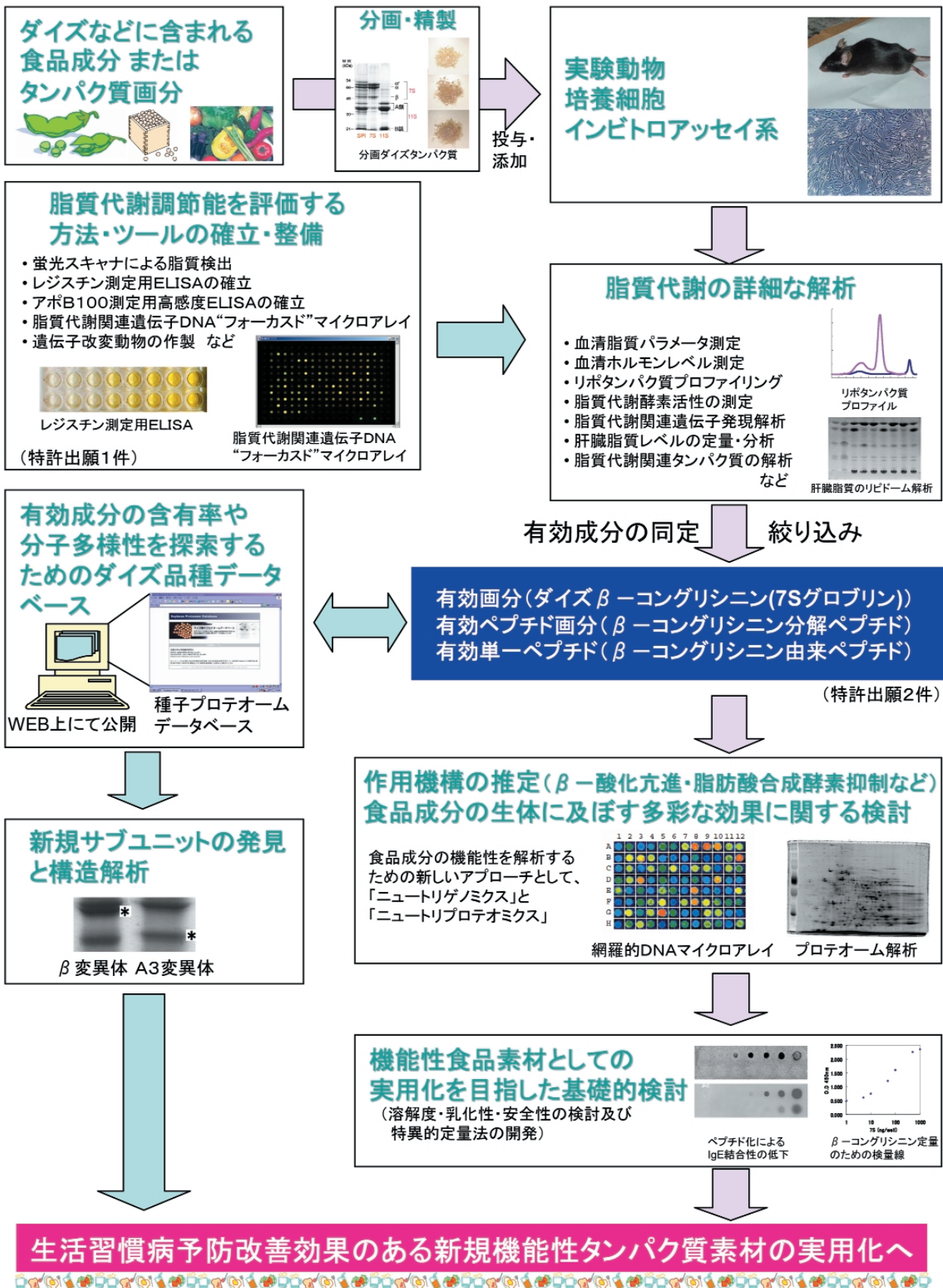
見込まれる波及効果

本研究で見出したダイズ由来機能性タンパク質・ペプチド素材は、健康増進のための高付加価値食品素材として食品産業による産業化が期待される。また、新規な脂質代謝解析ツールや定量法は、バイオ研究支援産業において産業化可能である。

主な発表論文

- Moriyama T., *et al.* : 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase is sterol-dependently cleaved by cathepsin L-type cysteine protease in the isolated endoplasmic reticulum. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 386 : 205-212 (2001)
- Kishimoto K., *et al.* : Nondestructive quantification of neutral lipids by thin-layer chromatography and laser-fluorescent scanning : Suitable methods for "lipidome" analysis. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 13 : 521-534 (2001)
- Maruyama N., *et al.* : Molecular and structural analysis of electrophoretic variants of soybean seed storage proteins. : *Phytochemistry*, 64 : 701-708 (2003)
- Maebuchi M., *et al.* : Low resistin levels in adipose tissues and serum in high-fat fed mice and genetically obese mice : development of an ELISA system for quantification of resistin. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 416 : 164-170 (2003)
- Moriyama T., *et al.* : Soybean β -conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of β -oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68 : 357-364 (2004)

研究のイメージ



研究課題名

NMRによる機能未知タンパク質の動的構造解析と機能の推定に関する基礎的研究

研究項目及び実施体制

NMRによる機能未知タンパク質の動的構造解析と機能の推定に関する基礎的研究
(山崎 俊正／独立行政法人農業生物資源研究所)



山崎 俊正

研究の目的

ゲノムプロジェクトの進展に伴い、分子機能が特定されていない有用遺伝子が多数見出されている。これら有用遺伝子の機能と機能発現機構を解明することはゲノム情報の戦略的バイオテクノロジー利用に大きな道を拓く。本研究は、機能の発現体であるタンパク質の立体構造と分子運動性を解析することにより効率的に機能未知遺伝子の機能を予測・特定する新しい研究法の確立を目指す。

研究の内容

NMR法により原子レベルの分解能で決定したタンパク質の動的構造について、原子団の3次元配置と化学的性質に基づいて分子表面のトポケミストリーを解析し機能と機能性残基を推定する。推定機能は生化学実験により検証する。推定した機能性残基は、点変異タンパク質およびタンパク質／ターゲット分子複合体のNMR解析により検証する。

主要な成果

- ①タンパク質は、立体構造上に3次元配置された機能性原子団がターゲット生体分子上に同様の規則で配置された機能性原子団を認識して生体超分子を形成して、機能を発現する。我々は、機能未知タンパク質の立体構造上に位置する原子団の3次元配置を化学的性質を考慮した上で数値解析することにより機能と機能発現機構を予測・特定するトポケミストリー解析法を提唱した。
- ②電子伝達タンパク質フェレドキシンFdのFd NADP⁺還元酵素FNR認識機構を解明し、トポケミストリー解析法の正当性を実証した。
- ③植物タンパク質レグインスリンのインスリン様活性の発現機構を解明した。
- ④大腸菌細胞分裂に関与する新規機能未知タンパク質YhhPの機能性残基を特定することに成功した。
- ⑤エリシター誘導性の機能未知イネ遺伝子EL5がユビキチンリガーゼとして機能することを予測し、これを実証することに成功した。
- ⑥高等植物のB型レスポンスレギュレータに保存される機能未知ドメインBモチーフの機能の特定に成功した。
- ⑦HTH型およびZF型転写因子のDNA認識機構について理論モデルを構築した。

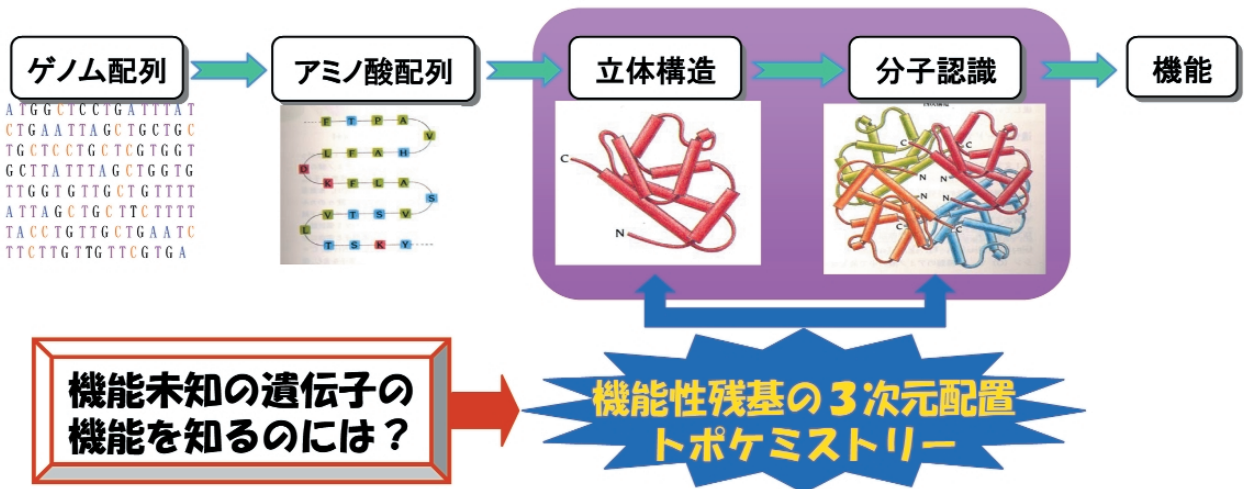
見込まれる波及効果

タンパク質機能のトポケミカルモデル化は機能素子である原子団の3次元配置を具現化することであり、創薬等の新機能生体分子の設計や生物機能の改変など生物学的利用にとどまらず、化学物質に生体機能を付与するような高機能分子システムの構築など合成化学的利用にも資する。

主な発表論文

- Katoh E., *et al.* : High precision NMR structure of YhhP, a novel Escherichia coli protein implicated in cell division : *J. Mol. Biol.*, 304 : 219-229 (2000)
- Kurusu G., *et al.* : Structure of the electron transfer complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP⁺ reductase : *Nature Struct. Biol.*, 8 : 117-121 (2001)
- Hosoda K., *et al.* : Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA-binding motifs of the Arabidopsis response regulators : *Plant Cell*, 14 : 2015-2029 (2002)
- Yamazaki T., *et al.* : A possible function and the tertiary structure of a 4-kDa peptide in legumes : *Eur. J. Biochem.*, 270 : 1269-1276 (2003)
- Katoh S., *et al.* : High precision NMR structure and function of the RING-H2 finger domain of EL5, a rice protein whose expression is increased upon exposure to pathogen derived oligosaccharides : *J. Biol. Chem.*, 278 : 15341-15348 (2003)

研究のイメージ



Fd/FNR複合体の分子認識機構

FdのArg40, Asp60, Asp65, Asp66とFNRのGlu154, Lys33, Lys91, Lys88が対称な三角形を形成している

レグインスリン(右)とインスリン(左)のNMR構造

立体構造は異なるが疎水的な機能性残基が同等のトポケミストリーを有する
↓
同一の機能を発現する

イネ機能未知EL5の機能の特定

NMR解析
トポケミストリー解析

機能推定: E2結合

イネE2の探索
・イネDBの検索
・Microarray

Candidate 2232: E2-like
"2232", induced by elicitor, shows similar expression profile as EL5

検証: EL5 = E3 & 2232 = E2

polyubiquitination
In vitro assay

E2-binding site by NMR

EL5特異的基質の探索 (相互作用の解析)
↓
新規ターゲット

機能未知Bモチーフの機能の特定

NMR解析
トポケミストリー解析

機能推定: DNA結合

DNA認識機構の解明
Bモチーフ/DNA複合体のNMR解析

検証: ターゲットDNAの特定と親和性の測定

- ・PCR-assisted DNA binding site selection
- ・Gel retardation assay
- ・ K_d determined by SPR

Target core sequence: AGATT ($K_d = 0.6 \mu M$)

研究課題名

広範な特性の米及び変異米の食味特性の解明及び新評価技術

研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①米の食味特性の解明及び新評価技術の開発
(◎大坪 研一／独立行政法人食品総合研究所)
- ②イネ種子貯蔵成分に関する遺伝子新素材の開発と特性評価
(佐藤 光／九州大学大学院農学研究院)



大坪 研一



佐藤 光

研究の目的

世界の広範な特性の米及び突然変異米を試料とし、イネ種子の貯蔵成分の生合成機構の解明及び各種新遺伝素材の開発を行う。試料米の食味に関する多面的物理化学評価結果及び上記の分子・細胞レベルの基礎的知見に基づいて、米の新食味要因の探索と解明を行い、その結果を活用して新食味評価手法を開発することを目的とした。

研究の内容

世界各国より収集した試料米及び九州大学で独自に開発した受精卵処理法を用いて作出した各種の変異体を試料とし、①MNU受精卵処理後代及び在来品種中の貯蔵成分に関する変異の探索、②貯蔵成分に関する変異体の遺伝様式の解明、③貯蔵成分に関する変異体の生理・生化学的特性の解析、④貯蔵成分に関する遺伝子の単離と同定、⑤米飯物理特性の評価、⑥呈味性成分の分析及び新評価手法の開発、⑦米粒微細構造評価技術の開発、⑧米食味関連DNAマーカーの開発とそれらに基づく食味推定技術の開発、⑨米粒半粒を試料とする良食味米選抜技術の開発を行った。これらの研究により、米の新食味要因の解明と新評価技術の開発を行った。

主要な成果

- ①新たに貯蔵デンプン及び貯蔵タンパク質に関する変異体1206系統と168系統を作出し、デンプン合成酵素、同枝作り酵素、同枝切り酵素等のデンプン合成関連酵素変異体を単離・同定した。
- ②タンパク質変異体 *esp2* は胚乳特異的PDI、*glup3* はVPEの構造遺伝子変異であることを解明した。
- ③アミロースが共通で、アミロペクチンがインド型あるいは日本型の変異系統を作出し、それらのデンプン特性を比較することによって、アミロペクチンのデンプン特性に与える影響を明らかにした。
- ④世界各国の広範な特性の米及び九州大学育成の各種突然変異米の外観特性、米飯物性、呈味性等、食味関連特性を多面的に評価し、試料米の物理化学的特性を明らかにした。
- ⑤低真空SEM画像及び実体顕微鏡画像を混合画像化することにより、米粒の微細構造やタンパク質顆粒の集積状況を観察する技術を開発した。
- ⑥デンプン枝切り酵素やグルテリン等、新たに見いだした食味要因に関係するDNAマーカーを作出し、インド型米と日本型米の識別技術とDNA食味判別技術を開発し、半粒試料による良食味系統選抜技術を提案した。

見込まれる波及効果

食味関連遺伝子の単離と機能解明、新食味評価技術とDNAマーカー作出により、育種の効率化が図られるとともに、分子育種・DNA食味選抜が可能になり、今後の良食味米、多様な食味の米の開発が期待される。

主な発表論文

- Nishi A., *et al.* : Biochemical and genetic analyses of the effects of *amylose-extender* mutation in rice endosperm. *Plant Physiol*, 127 : 1-14 (2001)
- Takemoto Y., *et al.* : The rice mutant *esp2* greatly accumulates the glutelin precursor and deletes the protein disulfide isomelase. *Plant Physiol*, 128 : 1212-1222 (2002)
- Satoh H., *et al.* : Starch Branching Enzyme I-Deficient Mutation Specifically Affects the Structure and Properties of Starch in Rice Endosperm. *Plant Physiol*, 133 : 1111-1121 (2003)
- Okadome H. *et al.* : Chemometric Formulas Based on Physical properties of Single-cooked rice Grains for Determination of Amylose and Protein Contents. *J. Food Sci.*, 67, 702-707 (2002)
- Shimizu N. *et al.* : Application of Visible / Near-infrared Spectroscopy for the Improvement of Amylose Determination Accuracy, *Food Sci. Technol. Res.*, 9, 134-136 (2003)

研究のイメージ

米の食味評価

官能検査: 基準的だが試料と時間を要す。嗜好も影響。
 理化学評価: 客観的だが間接的な推定法。
 分光食味計: 簡易・非破壊評価だが機種間差あり。

↓

広範な米、変異米による詳細な研究が必要

貯蔵成分の遺伝学的分子生物学的研究

胚乳澱粉

アミロース (直鎖状分子) アミロペクチン (分枝状分子)

ADPグルコース 可溶性澱粉合成酵素

ピロホスホリラーゼ *Aik1*, *lug2*

澱粉粒結合型澱粉合成酵素 *SSI*, *SSIa*, *SSIb*, *SSIII*

wx, *du1-5* 枝切り酵素 (ISA, PUL) *sug1*, *sug2?*

枝作り酵素 (*BEI*, *sbe1*, *BEIIa*, *ae*, *BEIIb*, *sbe2*)

澱粉合成系の遺伝的制御モデル

核: グルテリン遺伝子①, プロラミン遺伝子②

小胞体: ③ PBI

ゴルジ体: ④ pac小胞

液胞 (PBI): ⑤ 前駆体 → 成熟型

① タンパク質構造遺伝子及びその発現制御
Pro1~4, Glu4~7, Esp1
 ② 細胞骨格によるmRNAの輸送
 ③ 小胞体内でのタンパク質の分別及び集積
Esp2(PDI), Glup4, Glup6, Esp3, esp4
 ④ 集積部位である液胞への輸送
glup1, Glup2, glup5, Glup7
 ⑤ 液胞内での成熟
Glu3(VPE)

タンパク質の生成・集積の遺伝的制御モデル

多面的な理化学的食味評価

味センサー, 味度メーター, においセンサー, 電子顕微鏡, 物性試験機

味のセンサー: 味, 香り, 組織, 物性

米飯物性(表層の粘り/硬さ)

試料米	分子	変異
金剛丸	アミロース対照	BE2a欠損
EM9	アミロペクチン対照	BE1/GHSS欠
EM19	アミロペクチン対照	BE1/GHSS欠
EM10	BE2b欠損	BE2a欠損
EM72	BE2b欠損	BE2a欠損
EM6	アミロペクチン対照	BE2a欠損
EM420	アミロペクチン対照	低アミロ/BE2b減
自中45	アミロペクチン対照	BE1欠損
SBE1L	アミロペクチン対照	BE1欠損
JR36L	アミロペクチン対照	BE1欠損

米飯粒表層のA3/A1

米飯物性(全体の粘り/硬さ)

試料米	分子	変異
金剛丸	アミロペクチン対照	BE1/GHSS欠
EM9	アミロペクチン対照	BE1/GHSS欠
EM19	アミロペクチン対照	BE1/GHSS欠
EM10	BE2b欠損	BE2a欠損
EM72	BE2b欠損	BE2a欠損
EM6	アミロペクチン対照	BE2a欠損
EM420	アミロペクチン対照	低アミロ/BE2b減
自中45	アミロペクチン対照	BE1欠損
SBE1L	アミロペクチン対照	BE1欠損
JR36L	アミロペクチン対照	BE1欠損

米飯粒全体のA3/A1

世界の米の物性推定式(検査線)

(n=19, R=0.99)

理論値

米飯物性の観測値

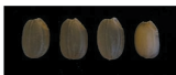
$Y = -0.025 + 0.11MO + 0.20N + 0.14P - 0.60D + 0.15G + 0.2M + 0.12J + 0.61NK$

DNAマーカーに基づく食味推定の一例

SS1, DBE, GluJ等の新食味要因を見だし、それらによるDNA食味推定技術を開発した



期待される波及効果



種の交配

有胚 ↓ 無胚

↓

播種 ← DNA判別

↓

次世代 ← DNA判別

↓

良食味系統選抜

DNA食味推定による半粒育種の開発

ハツシモ

主成分: コシカカリ

1. イネ貯蔵成分の合成酵素や輸送蓄積機構に関する知見を基に、デンプン、タンパク質の合成・蓄積機構解明が進む。
2. 新たに発見された新食味要因を基礎にした物理化学的または分子生物学的な新食味評価技術が確立される。
3. 新たに作られた各種変異米を素材として超良食味米や加工米飯好適品種等、優良品種の育成が行われる。
4. 半粒の育種素材を試料とするDNA食味選抜技術を用い、育種初期からの良食味系統の選抜が行われる。

研究課題名

共生微生物等を利用した荒廃土壌の修復技術の開発

研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①耐乾性ラン藻の耐乾機構解明とラン藻を利用した荒廃土壌修復技術の開発
(大森 正之／東京大学大学院総合文化研究科)
- ②パイオニア植物におけるエンドフィティック共生微生物の機能解明と
その利用技術開発
(南澤 究／東北大学大学院生命科学研究科)
- ③パイオニア植物における VA 菌根菌の機能解明とその利用技術開発
(◎齋藤 雅典／独立行政法人 農業環境技術研究所(前畜産草地研究所))
- ④共生微生物等の機能を活用した荒廃土壌の新修復技術の開発
(丸本 卓哉／山口大学農学部)



大森 正之



南澤 究



齋藤 雅典



丸本 卓哉

研究の目的

世界的に土壌の劣化・荒廃が進行しており、その修復は緊急に解決を要する。養分が枯渇し乾燥ストレスにさらされる荒廃土壌における緑化修復を促進するために、植物に共生しその養分獲得を助ける微生物等に注目し、これらの微生物機能を活用した新たな緑化修復技術の開発を目指す。

研究の内容

荒廃土壌のパイオニア生物の一種である土壌性ラン藻についてその耐乾性と土壌被覆効果を、また、パイオニア性の野生植物の茎葉部に共生する内生窒素固定菌と根部に共生しリン等の養分吸収を助ける VA 菌根菌の生理機能の解明を進める。さらに、荒廃土壌の植生回復過程におけるこれら微生物の役割を解明し、微生物を利用した新たな土壌修復技術を提案する。

主要な成果

- ①ラン藻の耐乾性は、cAMP を介した細胞内情報伝達機構によって調節されていることを明らかにし、cAMP 結合タンパク質(転写因子)を同定した。
- ②荒廃土壌のパイオニア性植物に、*Clostridium* 属細菌と非窒素固定細菌からなる嫌気窒素固定コンソーシアム(複合微生物共同体)が普遍的に存在していることを発見した。
- ③植物の根に共生する VA 菌根菌の菌糸はきわめて発達した管状液胞構造を有していることを初めて見出し、こうした細胞内構造が菌糸内のリン酸輸送に必要であることを明らかにした。
- ④土壌性ラン藻は土壌被覆効果によって乾燥条件下における植物の定着に寄与しており、また嫌気性窒素固定コンソーシアムは、非マメ科植物体内における窒素固定のみならず植物の塩類ストレス耐性に、寄与していることを明らかにした。
- ⑤雲仙普賢岳・ピナツポ火山の泥流地帯における現地調査を通して、火山性泥流地帯における植生回復に VA 菌根菌含有資材が有効であることを実証し、また VA 菌根菌が植生遷移を促進することによって植生回復に寄与していることを明らかにした。

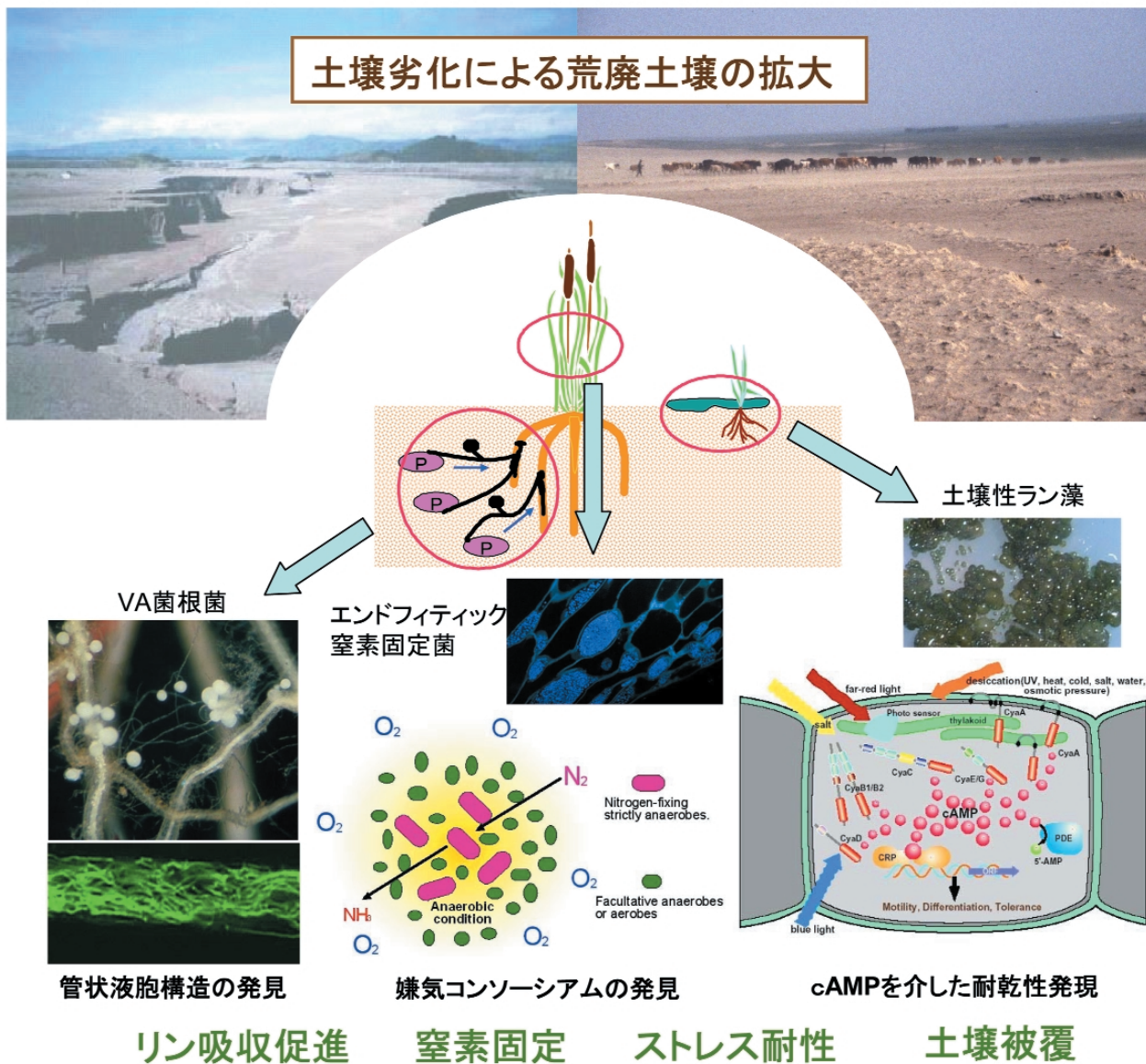
見込まれる波及効果

ラン藻及び共生微生物等を利用した新規土壌修復技術の開発。

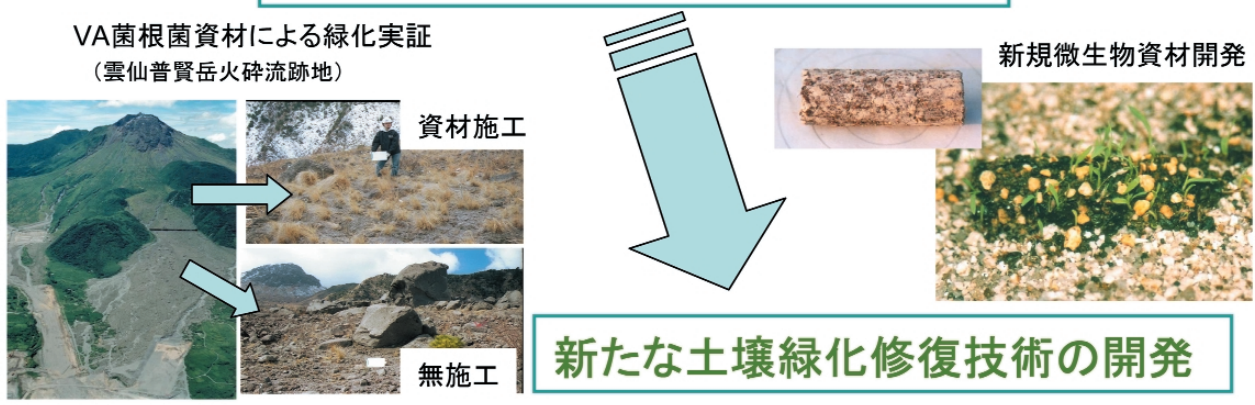
主な発表論文

- Yoshimura, H., *et al.* : Identification and characterization of a novel cAMP receptor protein in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.*, 275, 6241-6245 (2000)
- Yoshimura, H., *et al.* : Screening for the target gene of cyanobacterial cAMP receptor protein SYCRP1. *Mol. Microbiol.*, 43, 843-853 (2002).
- Elbeltagy, A., *et al.* : Endophytic colonization and *in planta*-nitrogen fixation by *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5285-93 (2001)
- Uetake, Y., *et al.* : Extensive tubular vacuole in *Gigaspora margarita*. *New Phytol.*, 154, 761-768 (2002)
- Yokoyama, K., *et al.* : A molecular marker diagnostic of a specific isolate of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 212, 171-175 (2002)

研究のイメージ



微生物機能の活用による緑化修復促進



研究課題名

ミツバチの脳機能に働く遺伝子を利用した新品種開発等に関する基礎的研究

研究項目及び実施体制

ミツバチの脳機能に働く遺伝子を利用した新品種開発等に関する基礎的研究
(久保 健雄／東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻)



久保 健雄

研究の目的

ミツバチはハチミツ生産やポリネーターとしての利用等、農業分野で活用されている。一方で、社会性昆虫としてカースト分化や働き蜂の分業等の社会行動を示すほか、ダンス言語により花の位置を教えるという高次行動を示すことから、分子生物学の研究対象としても注目されている。本研究ではこうしたミツバチの行動を規定する遺伝子を同定し、その成果を他生物種にも敷衍することで脳神経科学に寄与するとともに、これらの遺伝子の発現を人為的に調節することで、ミツバチの性質を改変するための基礎的技術の開発を目的とした。

研究の内容

ミツバチの行動を規定する遺伝子として、①ミツバチ脳の高次中枢(キノコ体)選択的に発現する遺伝子と、②行動選択的に脳で発現する遺伝子を考えた。これらの遺伝子を同定し、遺伝子産物の機能を明らかにするとともに、他動物種におけるホモログの機能解析を行う。合わせて、当該遺伝子の発現を人為的に調節する方法として、ミツバチ脳への外来遺伝子の導入と、脳機能のアッセイ系を確立する。

主要な成果

- ①キノコ体選択的に発現し、Ras / MAPK 系により制御される新規な転写因子、Mblk-1 を初めて同定した。またその線虫ホモログが、行動可塑性と神経回路の形成に働くことを発見した。さらに、ミツバチ脳から2種類の新規な非翻訳性核RNA、Ks-1 と AncR-1 を同定し、RNA の新たな分子機能を提唱した。
- ②キノコ体選択的に発現する遺伝子を cDNA microarray 法により網羅的に検索し、31 個の遺伝子を同定した。その結果、キノコ体の介在神経のサブタイプ選択的な遺伝子発現パターンを見出した。
- ③女王蜂の脳で選択的に発現する QM1 遺伝子が、新規な神経分泌ホルモンをコードすることを見出した。この分子が、女王蜂固有な行動や生理状態をもたらす可能性を指摘した。
- ④攻撃的な働き蜂の脳に特異的に検出される RNA、*Kakugo* が、新規なウイルスのゲノム RNA であることを示し、その感染性を実証した。ウイルス感染がミツバチの攻撃行動に影響する可能性を初めて指摘した。
- ⑤ミツバチの脳機能を調べるためのアッセイ系として、光刺激—口吻伸展反射連合学習系を構築した。また、エレクトロポレーション法を用いて、ミツバチ脳に GFP 遺伝子を効率的に導入／発現する方法を開発した。

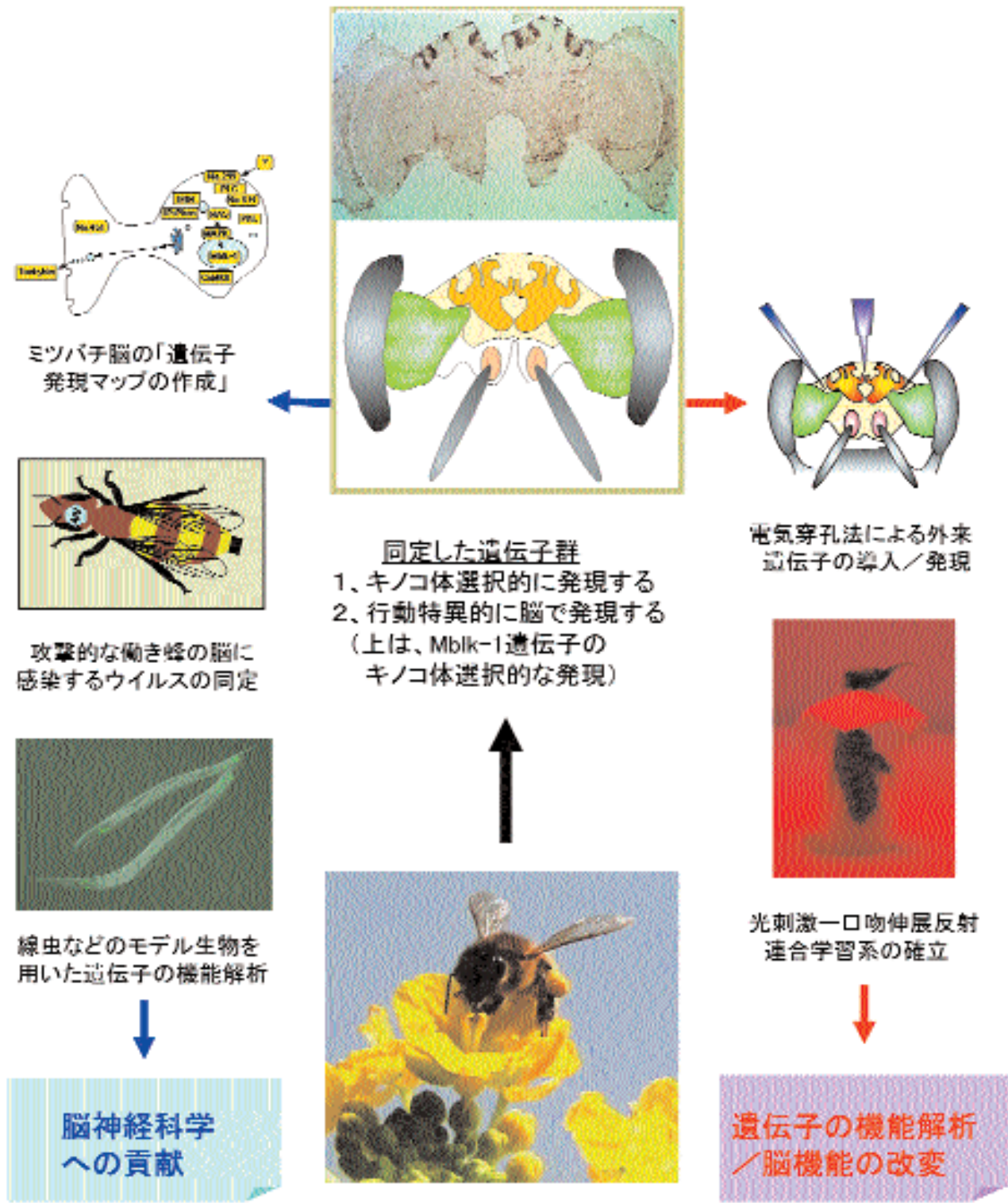
見込まれる波及効果

ミツバチの「分子社会生物学」とも言える新しい研究分野が開拓されつつあり、学術的意義は大きい。また、今回同定された遺伝子群は、将来のミツバチの新品種開発に向けて利用可能である。

主な発表論文

- Fujiyuki, T. *et al.* : Novel insect picorna-like virus identified in the brains of aggressive worker honeybees. *J. Virol.* 78(3), 1093-1100(2004)
- Park, J.-M. *et al.* : The activity of Mblk-1, a mushroom body selective transcription factor from the honeybee, is modulated by the Ras / MAPK pathway. *J. Biol. Chem.* 278 : 18689-18694 (2003)
- Kunieda, T. *et al.* : Identification and characterization of Mlk-1, 2 : two mouse homologues of Mblk-1, a transcription factor from the honeybee brain. *FEBS Lett.* 535, 61-65 (2003)
- Sawata *et al.* : Identification and punctate nuclear localization of a novel noncoding RNA, Ks-1, from the honeybee brain. *RNA*, 8 : 772-785 (2002)

研究のイメージ



同定した遺伝子群
 1、キノコ体選択的に発現する
 2、行動特異的に脳で発現する
 (上は、Mblk-1遺伝子のキノコ体選択的な発現)

ミツバチの生物学的特徴
 1、社会性昆虫：
 カースト分化、働き蜂の分業
 2、ダンス言語：
 記号的コミュニケーション

研究課題名

進化学手法によるシロアリセルラーゼの改変と高効率セルロース糖化系の開発

研究項目及び実施体制

- ①進化学手法によるシロアリセルラーゼの改変と高効率セルロース糖化系の開発
(渡辺 裕文／独立行政法人農業生物資源研究所)



渡辺 裕文

研究の目的

現在のセルラーゼ研究は、様々な酵素の組み合わせとそれらの相乗効果によってセルロースを分解する糸状菌のセルラーゼ系や様々な酵素を束ねるセルロソームと呼ばれる細菌細胞表面構造物を中心としている。しかしながら応用分野では大量生産に向くシンプルな酵素系が求められる。食材性昆虫類のセルロース消化系は、そしゃく器官と3種類以下の単純な構造の酵素を組み合わせたシンプルなもので応用利用に好適である。こうした食材性昆虫類セルラーゼとその遺伝子を収集し、それらを改変選抜することにより、高pH耐性や高温耐性や微生物を使ったりコンピナント生産適性など、洗剤添加剤・パルプ改質・バイオマス転換などの酵素素材となりうる新規セルラーゼを収集・作出することを目的とした。

研究の内容

シロアリ類・カミキリムシ類を中心とした食材性昆虫類より、昆虫自身と共生微生物が作り出す様々なセルラーゼとその遺伝子を精製・クローニングし、その性質を解明した。また、これらのセルラーゼ遺伝子にDNAシャフリング法(類似した遺伝子のランダムな相同組替え)などで改変を加え、改変遺伝子ライブラリーを微生物に形質転換し、優れたセルラーゼを取り込んだ株がセルロースを栄養源として生きのこることによりセルラーゼ遺伝子が選抜されるシステムの構築を目指した。

主要な成果

- ①シロアリ類30種類あまりの新規セルラーゼ遺伝子に加えて、シロアリ類共生原生物由来の新規セルラーゼ遺伝子およびカミキリムシを中心とした甲虫類のセルラーゼ遺伝子など高等動物および共生原生物由来の新規セルラーゼ遺伝子50種あまりを発見・クローニングした。
- ②シロアリセルラーゼ遺伝子組換え酵母と非組換え酵母の生育速度の差を検出する培養系を構築し、進化学手法(改変異種起源遺伝子を組み込んだ改変微生物の淘汰・選抜により目的の機能をもつ改変遺伝子を選抜する手法)による食材性昆虫類セルラーゼ選抜のための基礎的知見を得た。加えて大腸菌をホストとした高pH・高温活性による選抜系を構築した。

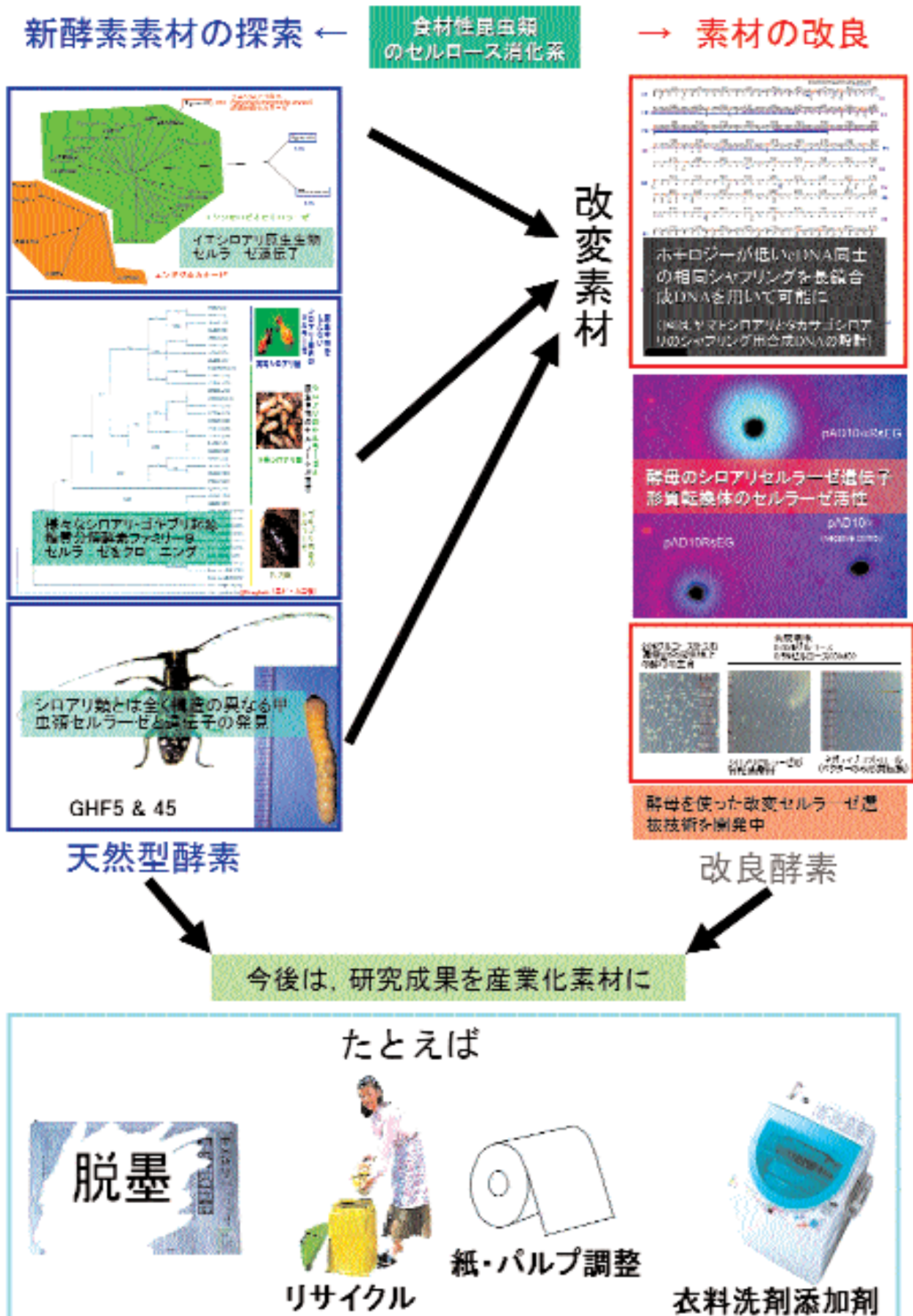
見込まれる波及効果

本研究で得られた様々な動物セルラーゼ遺伝子は、洗剤添加剤・パルプ改質・脱インキなどの分野で新たな応用素材として活用される可能性がある。また、食材性昆虫類がもつそしゃく器官(ミル)と単純な酵素の組み合わせはバイオマスコンバージョンの理想型でありバイオマス転換技術の発展に資するだろう。

主な発表論文

- Keisuke Nakashima *et al.* Dual cellulose digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* (Shiraki). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32 : 777-784 (2002)
- Hirofumi Watanabe *et al.* New endo-beta-1, 4-glucoanases and their precursor cDNAs from the symbiotic protozoa of *Coptotermes* termites. *Cellular Molecular Life Sciences* 59 : 1983-1992 (2002)
- Keisuke Nakashima *et al.* Cellulase genes from the parabasal symbiont *Pseudotrichonympha grassii* in the hindgut of the wood-feeding termite *Coptotermes formosanus*. *Cellular Molecular Life Sciences* 59 : 1554-1560 (2002)
- Gaku Tokuda, Hitoshi Saitoh, and Hirofumi Watanabe. A digestive beta-glucosidase from the salivary glands of the termite, *Neotermes koshunensis* (Shiraki) : distribution, characterization and isolation of its precursor cDNA by 5'- and 3'-RACE amplifications with degenerate primers. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32 : 1681-1689 (2002)
- Masahiro Sugimura, Hirofumi Watanabe, Nathan Lo, and Hitoshi Saito. Purification, characterization, cDNA cloning and nucleotide sequencing of a cellulase from the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris*. *European Journal of Biochemistry* 270 : 3455-3460 (2003)

研究のイメージ



研究課題名

昆虫細胞成長因子の機能解明と利用に向けた基礎研究

研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ① 昆虫成長因子の作用機構解明と新規成長因子の探索
(◎早川 洋一／北海道大学低温科学研究所)
- ② ヒト細胞に活性を示す昆虫成長因子の構造改変と新薬開発
(河野 敬一／富山医科薬科大学薬学部)
- ③ 昆虫成長因子の機能と情報伝達の解明
(神村 学／独立行政法人農業生物資源研究所)



早川 洋一



河野 敬一



神村 学

研究の目的

哺乳類ではこれまで数多くの細胞成長因子が発見され、各方面への応用研究も進んでいる。一方、昆虫においては、その報告例も少なく、これまで集中的かつ体系的に推進されたことのない未知なる研究分野と言える。本研究の目的は、昆虫細胞成長因子の概括的理解を目標に、その利用も視野に入れた基礎研究を行うことにある。

研究の内容

昆虫から同定されたペプチド性細胞成長因子第1号であるGBP(growth-blocking peptide)をモデルペプチドとしてその多角的基礎研究、さらに、新規細胞成長因子の探索を2つの主要課題に据えて研究を行った。その結果、GBPの各種多機能性を実証することができ、さらに、その多機能性の要因について考察を深めることができた。また、複数の新規細胞成長因子を同定し、その幾つかの因子については一次構造の決定に成功した。

主要な成果

- ① GBPは、細胞増殖作用の他に、幼虫発育調節、麻痺誘起作用、血球活性化作用といった多機能性を示し、特に、細胞増殖作用と血球活性化作用を示すGBP最小構造が異なることを明らかにした。
- ② GBPレセプター解析の結果、血球細胞のGBPレセプターは解離定数 K_d が1～3nMの中親和性一種類であるのに対して、昆虫培養細胞High Fiveの K_d 値は0.26nMと13.7nMの高親和性、低親和性の二種類が存在するを見出した。
- ③ GBPは胚発生の過程で、生理機能が未知とされてきた食道下体と言われる組織から分泌され、左右一對の頭原基を成長過程で中央に寄せて融合させる作用を担っていること突き止めた。
- ④ 昆虫血球細胞の一種であるエノシトイドは、GBPによって細胞崩壊し、その過程でGBPに特異的結合性を示すGBP結合タンパク質を放出することを発見した。その一次構造を決定し、新規のタンパク質であることを証明した。
- ⑤ 複数種の昆虫のGBP遺伝子構造を解析し、GBPコーディング領域の上流に2種類のORFが存在することを明らかにすると共に、これらが真核生物では非常に珍しいポリシストロニックな翻訳調節を受けている可能性を見出した。
- ⑥ これまで鱗翅目昆虫のみからしか見つかっていなかったGBPであるが、ヒツジギンバエからGBP様活性を持つペプチドを単離し一次構造決定に成功した。このペプチド構造を基に、ショウジョウバエとカのデータベースから各々複数種の類似ペプチドが同定でき、GBP様低分子ペプチド族の昆虫類における普遍的存在の可能性を示した。
- ⑦ BmPP(カイコGBP)の形質転換カイコ作成に成功し、強制発現によって幼虫発育が著しく遅れることを見出した。

見込まれる波及効果

遺伝子工学的実験手法の確立によって、貴重な微量生理活性タンパク質の生産工場と称されるカイコであるが、その人為的な発育調節技術は必ずしも十分とは言えない。今回、形質転換カイコにおいて、GBP発現量を調節することによって、その幼虫発育速度を操作することが可能であることを明らかにした。従って、今後、さらに正確にGBP発現量を調節し得る形質転換体を作成することによって、より有用な昆虫工場としてのカイコの供給が可能になるものと期待できる。

主な発表論文

- Matsumoto Y., *et al.* : Insect cytokine, Growth-blocking peptide, triggers off a termination system of cellular immunity by inducing its binding protein : *J. Biol. Chem.*, 278 : 38579-38585 (2003)
- Tada M., *et al.* : Role of aromatic residues in the structure and biological activity of the small cytokine, growth-blocking peptide (GBP) : *J. Biol. Chem.*, 278 : 10778-10783 (2003)
- Aizawa T., *et al.* : Structure and activity of the insect cytokine growth-blocking peptide : *J. Biol. Chem.*, 276 : 31813-31818 (2001)
- Ohnishi A., *et al.* : Characterization of receptors of insect cytokine, growth-blocking peptide, in human keratinocyte and insect Sf9 cells : *J. Biol. Chem.*, 276 : 37974-37979 (2001)
- Kamimura M., *et al.* : Molecular cloning of silkworm paralytic peptide and its developmental regulation : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 286 : 67-73 (2001)

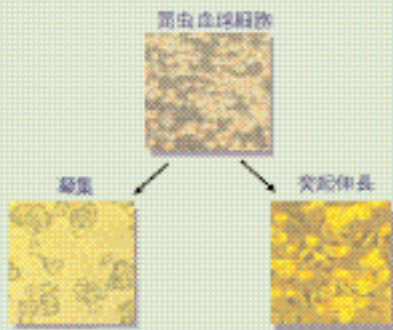
研究のイメージ

未知なる昆虫資源
 昆虫由来細胞成長因子



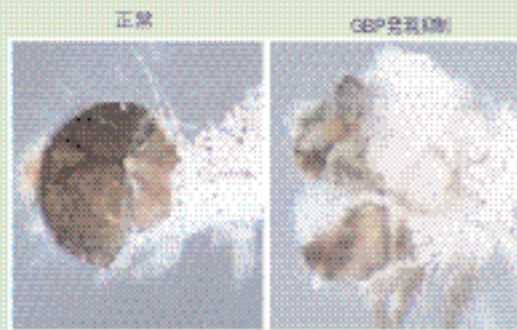
約4日間でのアヲヨトウ 幼虫の体長の変化
 約10倍もの体重増加が認められる急激な成長には
 様々な成長因子が関与しているに違いない!

昆虫血球細胞への
 GBPの作用解析



GBPは血球細胞に活性化（凝集、
 突起伸長）刺激を与える

GBP発現抑制による
 頭部初期形態の異常



GBPは初期発生における頭部形態の
 形成にも関与

基礎研究成果

GBPトランスジェニック
 カイコの発育操作



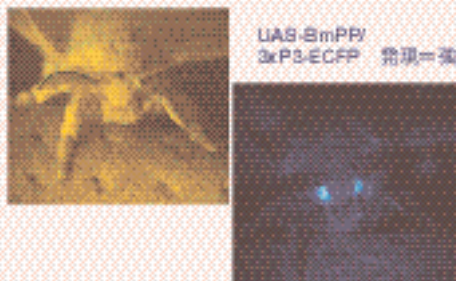
GBPトランスジェニックカイコでGBP
 強発現による幼虫発育阻害を確認

昆虫細胞成長因子の
 立体構造と機能の解析



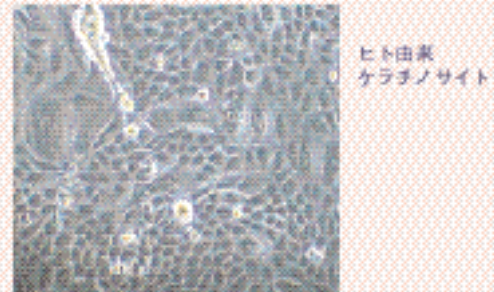
GBPは、脊椎動物由来のEGFのC末端
 ドメインと立体構造上の類似性を有し
 EGF受容体と相互作用

トランスジェニック
 カイコへの応用



GBP発現量を調整することで、
 幼虫の成長を制御—
 飼育への応用が期待される

ヒト細胞に対する活性
 再生医療への応用



GBPは、ヒト由来の細胞にだけ極めて
 細胞特異性の高い増殖活性を示す—
 再生医療へつながる成果

応用研究成果

研究課題名

植物の生物時計機構の解明と光周性の人為的制御

研究項目及び実施体制

植物の生物時計機構の解明と光周性の人為的制御
(石浦 正寛／名古屋大学遺伝子実験施設)



石浦 正寛

研究の目的

植物の生物時計と光周性の制御に関しては、本体ではない関連する遺伝子がクローニングされつつあるが、本体の分子機構は解明されていない。本研究計画の目的は、①時計本体の遺伝子がクローニングされている藍色細菌において、時計の分子機構を原子レベルで解明する。②植物の生物時計本体の遺伝子をクローニングし、時計の分子機構を解明する。③時計遺伝子を操作して、光周性を人為的に制御することである。

研究の内容

①好熱性藍色細菌の時計タンパク質のX線結晶構造を解明し、藍色細菌の生物時計の分子機構を原子レベルで解明する。②藍色細菌において、DNAアレイ解析により生物時計による遺伝子発現制御の全体像を解明する。③シロイヌナズナにおいて、リズム変異体を網羅的に分離し、真の時計遺伝子をクローニングし、時計の分子機構を解明する。④シロイヌナズナやイネにおいて、時計遺伝子を操作して光周性を人為的に制御する。

主要な成果

- ①好熱性藍色細菌 *Thermosynechococcus elongatus* の時計タンパク質 KaiA と KaiB の X線結晶構造を決定し、その分子機構を原子レベルで解明した。時計タンパク質 KaiC の6量体ポット状構造を解明した。
- ② *T. elongatus* においてオリゴDNA マイクロアレイを開発した。常温性藍色細菌 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 において、DNAアレイ解析により生物時計による遺伝子発現制御の全体像を解明した。
- ③生物発光を利用して植物の遺伝子発現をリアルタイム測定するための装置2種と制御・解析プログラムを開発した。
- ④シロイヌナズナで顕著な異常(無周期、短周期、長周期、位相や振幅の異常)を示すリズム変異体35種を分離し、「真の時計遺伝子」と思われる遺伝子1つをクローニングした。イネで相同遺伝子を見つけた。

見込まれる波及効果

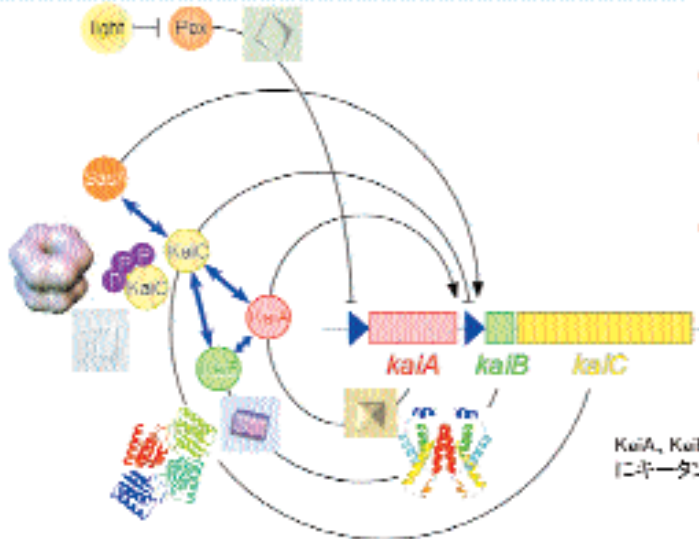
生物時計の解明は、花芽形成や生殖期を人為的に制御することにより、食料生産や品種改良などにおいて農林水産業に多大の波及効果を及ぼす。

主な発表論文

- Iwase R, *et al.* : Crystalization and preliminary crystallographic analysis of the circadian clock protein KaiB from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Acta Cryst.*, (2004), in press.
- Onai K, *et al.* : Natural transformation of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 : Simple and efficient method for gene transfer. *Mol. Genet. Genomics*, 271 : 50-59 (2004)
- Hayashi F, *et al.* : ATP-induced hexameric ring structure of the cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *Genes to Cells*, 8 : 287-296 (2003)
- Burder R, *et al.* : Identification of a new cryptochrome class : structure, function, and evolution. *Mol. Cell*, 11 : 59-67 (2003)
- Aoki S, *et al.* : A-promoter-trap vector for clock-controlled genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Microbiol Method.*, 49 : 265-274 (2002)

研究のイメージ

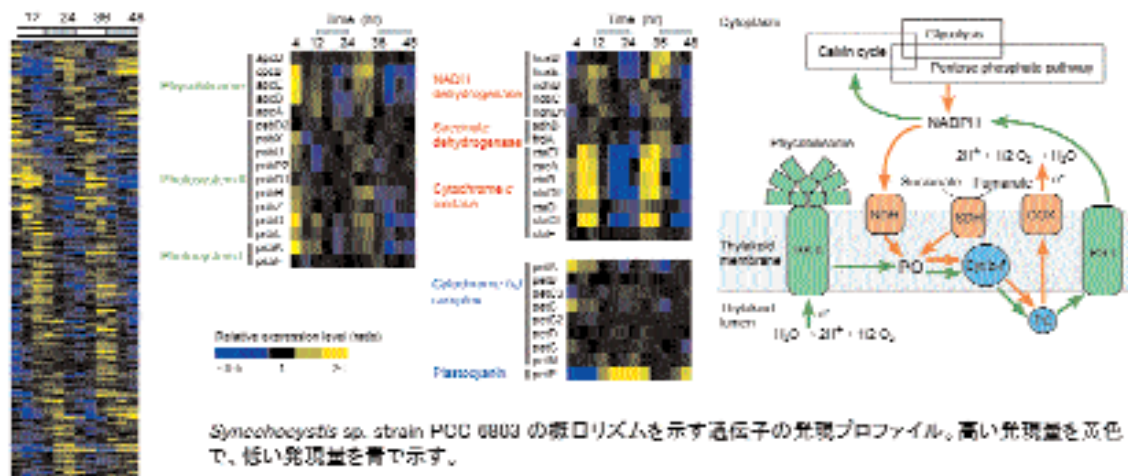
I 時計タンパク質初の三次元構造の解明



- ① KaiC (単粒子解析)
興味深い六量体ポット状構造
- ② KaiB (X線結晶構造解析)
新規フォールドなサブユニット構造
四量体機能構造もユニーク
- ③ KaiA (X線結晶構造解析)
新規フォールドなサブユニット構造
二量体機能構造もユニーク

KaiA, KaiB, KaiCを中心とした藍色細菌の生物時計モデルにキータンパク質の三次元構造をはじめ込んだ。

II DNAアレイを用いた遺伝子発現時計制御の全体像解明



Synechocystis sp. strain PCC 6803 の概口リズムを示す遺伝子の発現プロファイル。高い発現量を灰色で、低い発現量を青で示す。

III 真の高等植物時計遺伝子のクローニング

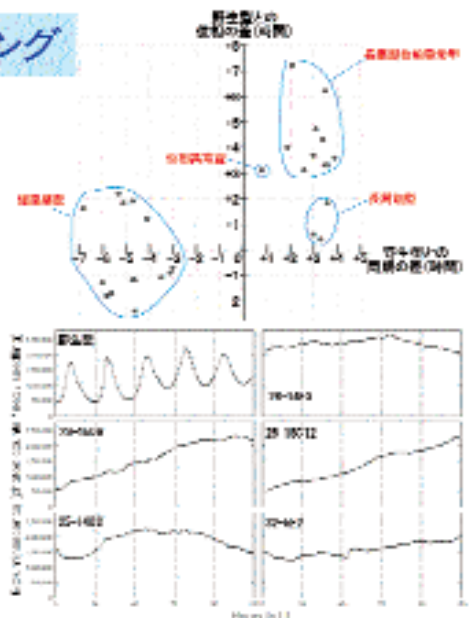
分離したシロイヌナズナ時計変異体の一覧

株	レポーター	分類	周期(時間)	位相(時間)
0-38	GL	野生型	23.1 ± 0.5	9.9 ± 0.5
23-150R	GL	AR	無周期	-
25-141G	GL	AR	長周期	-
26-14E3	GL	AR	長周期	-
26-18C12	GL	AR	無周期	-
37-5E2	GL	AR	無周期	-
F-1	FL	野生型	23.1 ± 0.5	3.4 ± 1.4
45-12A8	FL	AR	長周期	-

二種類のレポーターを用い、無周期の変異株を6株単離した。長周期型、長周期位相変異型、短周期型、位相異常型はそれぞれ3、10、14、1株単離できた。

(右上図)分離した時計変異体の分類と野生型との周期・位相の差

(右下図)代表的な無周期変異体の生物発光リズム



研究課題名

植物の耐寒性形質に関わる分子機能の複合的解析とその応用

研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ① アクティベーション・タギング法を用いた植物の耐寒性関与遺伝子群の探索
(西田 生郎／東京大学大学院理学系研究科)
- ② 植物耐寒性関与遺伝子のアクティベーション・タギング法による分離と遺伝子導入による植物耐寒性の改良
(和田 元／東京大学大学院総合文化研究科)
- ③ 耐凍性増大の分子的メカニズムに関する基礎的研究：生体膜の安定性に注目して
(◎上村 松生／岩手大学農学部)
- ④ 高耐寒性植物に存在する凍結制御機構に関わる分子機能の解析
(石川 雅也／独立行政法人農業生物資源研究所)
- ⑤ 低温誘導遺伝子の耐凍性に及ぼす機能的役割の解析
(藤川 清三／北海道大学大学院農学研究科)



西田 生郎



和田 元



上村 松生



石川 雅也



藤川 清三

研究の目的

地球温暖化が進行している現在でさえ、低温は世界の作物生産に影響を与える最大不安定要因の一つである。事実、世界各地で頻発する局地的異常低温により毎年膨大な凍霜害が発生している。本研究では、分子生物学的および生理・生化学的研究により植物の耐寒性を総合的に理解した上で、高耐寒性作物を作成する際に広範囲に利用できる分子育種論構築に必要な基礎的、および、網羅的な情報を得ることを目的とした。

研究の内容

- ① アクティベーション・タギング法などを用いて新規耐寒性関連遺伝子群及びその調節因子を探索・同定した。
- ② 耐寒性の程度や機構の異なる植物を用いて耐寒性獲得(低温馴化)分子機構の総合的解析を試みた。
- ③ 耐寒性獲得過程で起こる様々な物質変動及び細胞膜変動の機能評価を行った。
- ④ 耐寒性関連遺伝子群にコードされる最終産物の耐寒性に関する分子機能を *in planta* 及び *in vitro* で解析した。

主要な成果

- ① *Arabidopsis* 変異株 *frit1* は成熟した葉序の糖レベルが野生型より高いため、高い耐凍性を示すことを見いだした。
- ② *Arabidopsis* 胚軸カルスアクティベーション・タグライン解析から耐凍性増大に関与する 26 候補遺伝子を同定した。
- ③ *Arabidopsis* 耐凍性増大過程で変動する細胞膜タンパク質 lipoprotein-like protein の耐凍性増大への関与を見いだした。
- ④ 植物組織から氷核活性物質を活性のあるまま単離することに成功し、その特徴や組成を明らかにした。
- ⑤ 高耐凍性を示す北方樹木の冬季蓄積タンパク質の *in vitro* 凍害保護機能と *in planta* 耐凍性向上機能を明らかにした。

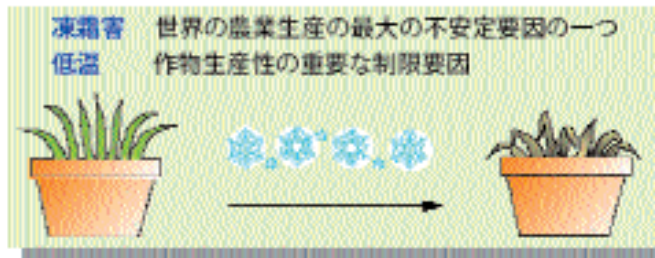
見込まれる波及効果

耐寒性関与遺伝子や耐寒性関与物質の代謝過程関連遺伝子を用いた高耐寒性作物作成のための分子育種論構築が可能になった。凍結制御物質は、細胞の超低温保存法や食品産業(冷凍保存食品の品質・食味向上など)へ応用できる。

主な発表論文

- Takagi T., *et al.* : The leaf-order-dependent enhancement of freezing tolerance in cold-acclimated *Arabidopsis* rosettes is not correlated with the transcript levels of the cold-inducible transcription factors of *CBF / DREB1* : *Plant Cell Physiol*, 44 : 922-931 (2003)
- Sakurai I., *et al.* : Requirement of phosphatidylglycerol for maintenance of photosynthetic machinery : *Plant Physiol*, 133 : 1376-1384 (2003).
- Kawamura Y. & M. Uemura : Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation : *Plant J.*, 36 : 141-154 (2003).
- Sekozawa Y., *et al.* : Seasonal changes in the ice nucleation activity of various tissues in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) in relation to their freezing behavior and frost injury : *Acta Hort.*, 587 : 543-547 (2002).
- Ukaji N., *et al.* : Cold acclimation-induced WAP27 localized in endoplasmic reticulum in cortical parenchyma cells of mulberry tree was homologous to group 3 late-embryogenesis abundant proteins : *Plant Physiol*, 126 : 1588-1597 (2001).

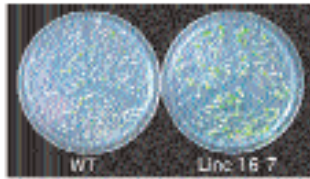
研究のイメージ



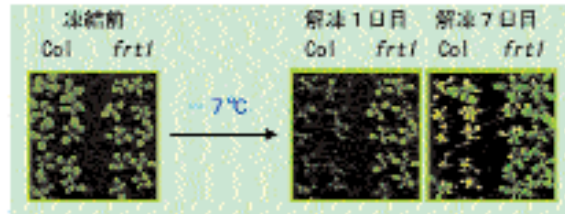
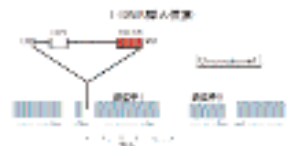
高耐寒性作物を開発するために：

1. 耐寒性関与遺伝子の探索と同定
2. 多様な耐寒性機構の解析
3. 耐寒性関与物質や耐寒性関与遺伝子の機能評価

1. シロイヌナズナ耐寒性関与遺伝子の探索と同定の例



WT Line 16-7
 (15℃凍結 → 15℃) →
 凍結後24時間インキュベーション後15℃で培養した。



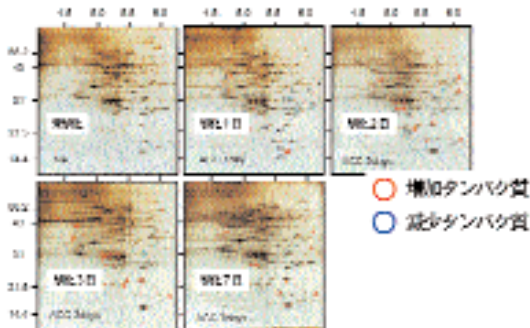
新しい凍凍性変異株 *freezing tolerant1 (frt1)* (上)
 ✓ 低温馴化2日後に脱馴化処理した植物体を-7℃で凍結すると、*frt1*は野生型(*col*)よりも高い生存率を示す

耐寒性増大に関する遺伝子候補 (左)
 ✓ 高耐寒性アクトベーション・タグライン (16-7) において、挿入されたT-DNA近傍に数個の耐寒性関与遺伝子候補が存在する

2. 多様な耐寒性機構の解析

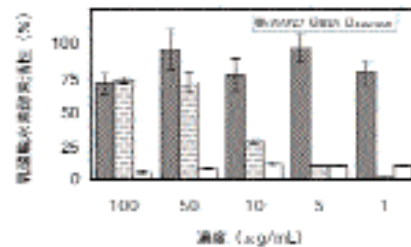
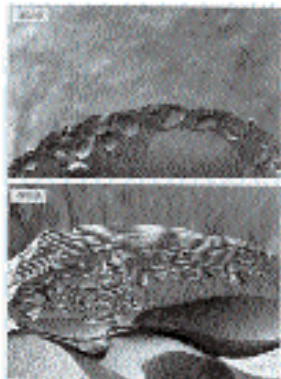


世界で初めて単離された植物の水核活性物質
 ✓ 六角形が並んだり合ったような構造をとっている (電子顕微鏡写真)



耐寒性獲得過程におけるシロイヌナズナ細胞膜のタンパク質変動
 ✓ 約30種の変動するタンパク質を同定し、そのうち lipoprotein-like protein が細胞外凍結耐凍性増大に貢献している

3. 耐寒性関与遺伝子機能の評価



高耐寒性樹木の冬期蓄積タンパク質 WAP27 の作用機構
 ✓ 凍結脱水過程における小胞体膜構造形成の促進による細胞膜安定性増大を介して耐寒性増大を引き起こす (電子顕微鏡写真)

✓ *in vitro* では、凍結による乳酸脱水素酵素の活性低下を効果的に低減する (図)



➡ 高耐寒性作物を開発する分子育種論構築に貢献

研究課題名

穀類細胞への新たな遺伝子導入法の開発

研究項目及び実施体制

穀類細胞への新たな遺伝子導入法の開発
(野々村 賢一／国立遺伝学研究所実験圃場)



野々村 賢一

研究の目的

野生植物は様々な有用遺伝子を保有することが知られている。しかしその遺伝子資源を育種に有効利用するための手法は必ずしも整備されていない。本研究はモデル作物であるイネを素材として、①遺伝子操作育種のための新規ベクターの開発に向けた試み、②遺伝子操作に頼らない、人為交配による新たな育種手法の開発に向けての遺伝学的な基盤の確立を目的とする。

研究の内容

- ①イネの人工染色体の構築：細胞分裂の際、染色体を均等に分配するのに重要な「動原体」領域のイネにおける構成と、動原体結合タンパク質を解析した。動原体DNAを単離し、試験管内での再構築後にイネ細胞へ再導入した。
- ②野生イネ有用遺伝子の栽培イネへの新たな導入法の検討：交配による遺伝子導入で問題となるのが、雑種第一代目の減数分裂で生じる生殖バリアーである事から(図参照)、突然変異体を用いて減数分裂に関わるイネ遺伝子の同定と、その機能解析を行った。

主要な成果

- ①動原体特異的な繰り返し配列RCE1を同定し、イネ第5染色体での分布の概要を明らかにした。
- ②ヒト動原体タンパク質CENP-Aと相同な配列を持つイネCHR1タンパク質(Centromeric Histone of Rice 1)を同定し、動原体特異的な繰り返し配列Cent-Oに選択的に結合することを明らかにした。
- ③減数分裂細胞で特異的に発現する新規イネ遺伝子PAIR1を同定し、減数分裂期の相同染色体対合に必須の機能を持つことを見出した。また野生イネのPAIR1遺伝子座では、栽培イネと比較して多くのDNA変異が蓄積されていたことから、PAIR1が減数分裂における生殖バリアーと関係している可能性が示唆された。
- ④染色体対合を仲介するシナプトネマ複合体の形成に必須の機能を持つ新規イネ遺伝子PAIR2を同定した。
- ⑤イネ生殖細胞の分化過程で、細胞の運命決定に重要な役割を果たす新規遺伝子MSP1を同定した。

見込まれる波及効果

上記の遺伝子や知見は、麦類やトウモロコシなど他のイネ科穀類での応用が期待できる。本研究を基盤として実用的な遺伝子導入法が確立できれば、遺伝子資源を有効に活用したイネ科穀類の育種が可能となる。

主な発表論文

- Nonomura K.I. and Kurata N. The centromere composition of multiple repetitive sequences on rice chromosome 5. *Chromosoma*, 110 : 284-291 (2001)
- Kurata, N., *et al.* Rice genome organization : the centromere and genome interactions. *Annals Bot.*, 90 : 427-435 (2002)
- Nonomura K.I., *et al.* The *MSP1* gene is necessary to restrict the number of cells entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in rice. *Plant Cell*, 15 : 1728-1739 (2003)
- Nonomura K.I., *et al.* The insertional mutation of rice *PAIR2* gene, the ortholog of Arabidopsis *ASY1*, caused a defect in homologous chromosome pairing in meiosis. *Mol. Genet. Genomics*, (2004) in press.

野生植物のもつ有用遺伝子 (耐虫性、耐病性、耐ストレス性、...)

栽培植物への導入

新ベクターの開発

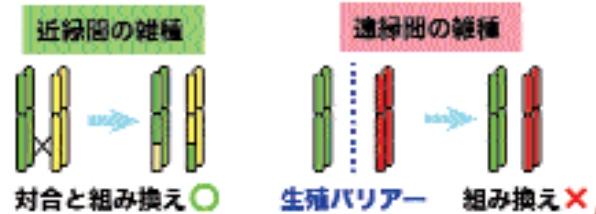
人為交配の試み

従来法の問題点

- ・ 導入DNAの大きさに制限
- ・ 導入遺伝子の発現が、挿入された染色体部位ごとに異なる

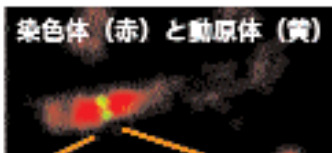
従来法の問題点

- ・ 雑種の減数分裂で染色体が対合せず、両親の染色体の間で遺伝子交換が困難



イネ人工染色体の構築の試み

- ・ イネ動原体領域の解析 (動原体は染色体分配に必須の部位)



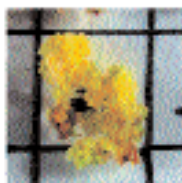
繰り返し配列の構成



試験管内再構築



細胞への導入



イネのカルス

相互作用の解析

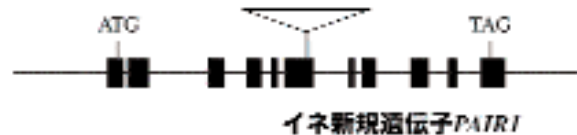
動原体タンパク質



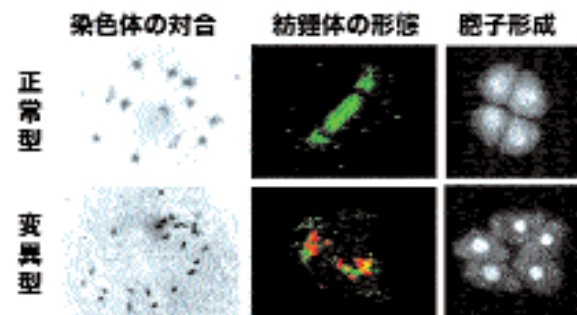
個体の再生

減数分裂に関連するイネ遺伝子の解析

- ・ 転位因子の挿入による遺伝子破壊の探索



- ・ 突然変異体の減数分裂における表現型を解析



- ・ 単離した遺伝子の、野生イネでの多様性を探索

新たな遺伝子導入法開発への分子的基盤の確立

研究課題名

特殊レーザー加工技術を応用した新しい植物形質転換法の開発

研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①植物細胞レーザー加工システムの開発
(◎小林 昭雄／大阪大学大学院工学研究科応用生物学専攻)
- ②レーザー加工技術を用いた遺伝子導入技術の開発
(福井 希一／大阪大学大学院工学研究科応用生物学専攻)
- ③レーザー加工技術を用いた遺伝子導入法における導入遺伝子の構築
(原島 俊／大阪大学大学院工学研究科応用生物学専攻)



小林 昭雄



福井 希一



原島 俊

研究の目的

近年、植物の形質転換技術は目覚ましい進歩をとげ、植物育種は分子育種の時代に突入した。一方我が国では、植物の形質転換に関わる基本特許の殆どが欧米に帰属している事が大きな障害となり、実用的な形質転換植物の開発が極めて遅れている。また、従来の形質転換法はメガベース単位の改変染色体を植物細胞へ戻す技術の確立等、現状では解決されていない多くの問題を残している。本研究では、レーザー光の優れた加工特性を利用して、植物細胞を自在に加工できる植物細胞レーザー加工システムを構築するとともに、酵母人工染色体(YAC)等のサイズの大きい遺伝物質を植物に安定的に導入できる我が国独自の植物形質転換法の開発を目的とした。

研究の内容

上記目的を達成するため、①植物細胞レーザー加工システムの開発、②レーザー加工技術を用いた遺伝子導入技術の開発、③本遺伝子導入法に用いる導入遺伝子の構築、の3つの研究項目を柱として研究を遂行した。①では対象細胞に熱損傷を与えず、サブミクロンの精度で植物細胞壁に穿孔できるエキシマレーザーを利用した植物細胞加工装置の開発を行った。②では、物理的強度の弱い巨大染色体等の遺伝物質を保護し、安定的にレーザー処理細胞へ導入する方法論の開発を行った。③では、YACの任意の部分を切り出し、①②の方法を用いて植物細胞に導入するための巨大遺伝子の調製方法について開発を行った。

主要な成果

- ①これまで困難であったインタクトな植物組織中の特定細胞の細胞壁に穿孔、削剥加工を施せるレーザー植物細胞加工装置の開発に成功するとともに、本装置を用いた植物形質転換に成功した。
- ②ミクロンサイズのアルギン酸カルシウムビーズ(バイオペーズ)にDNAをトラップすることにより、巨大DNAに物理的損傷を与えずに形質転換に利用できる方法を確立した。
- ③YACライブラリーとしてクローン化された植物染色体の任意領域を、植物細胞の直接形質転換が可能な選択符号を付与した形のYACとして自在に切り出し、調製できる巨大DNA加工技術の開発に成功した。

見込まれる波及効果

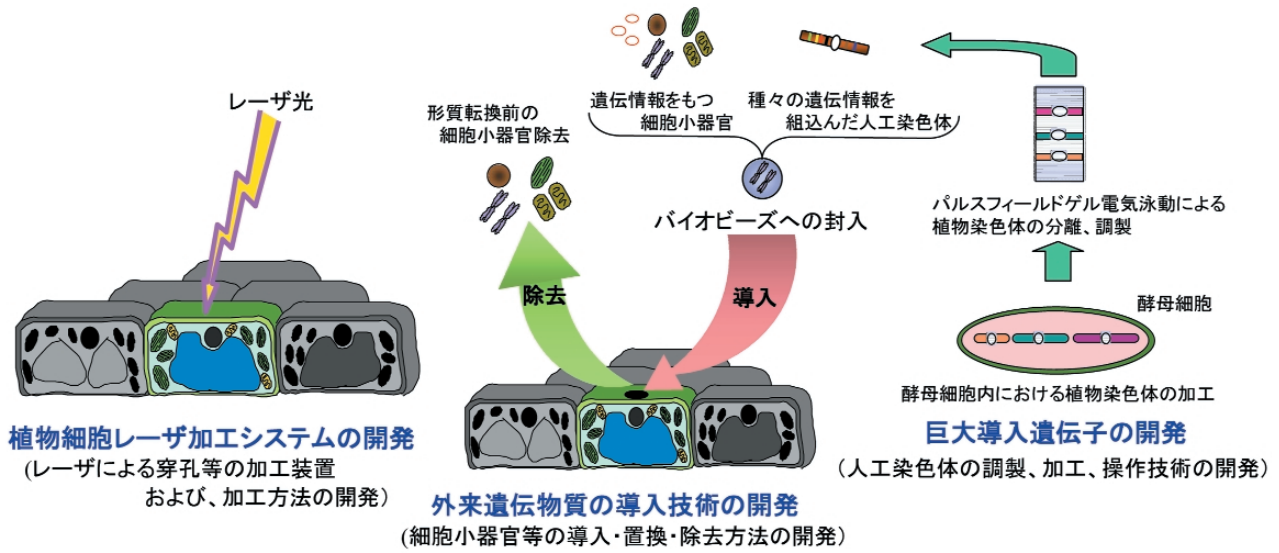
本研究で開発された技術は、既存形質転換法の特許回避を目的とした単なる代替技術ではなく、オルガネラ(遺伝子)の改変をも視野に入れた新規遺伝子改変技術であり、延いては食料品としての農作物や工業原料としての植物材料に全く新しい機能を付与する新しい方法論を提供するものである。

主な発表論文

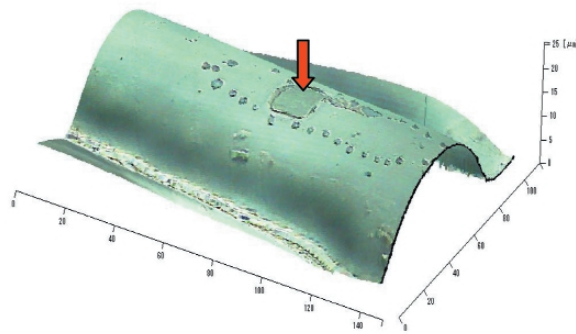
- Kobayashi A., *et al.* : Laser-based method for cell wall and membrane perforation : *Eur. Pat. Appl.* (EP 1225221) pp. 18 (2002)
- Kobayashi A., *et al.* : A method for introducing foreign materials into cells using a laser beam to perforate the cell membrane : *Eur. Pat. Appl.* (EP 1225228) pp. 21 (2002).
- Sone T., *et al.* : A novel gene delivery system in plants with calcium alginate micro-beads : *J. Biosci. Bioeng.* : 94 : 87-91 (2001)
- Sugiyama M., *et al.* : Repeated chromosome splitting targeted to delta sequences in *Saccharomyces cerevisiae* : *J. Biosci. Bioeng.* : 96 : 397-400 (2003)

研究のイメージ

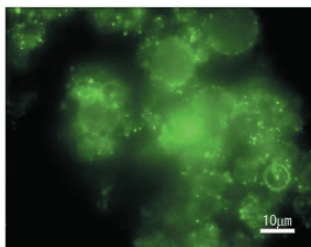
＜レーザーの優れた加工特性を利用して、従来法の欠点を克服した独自の植物形質転換法を開発する＞



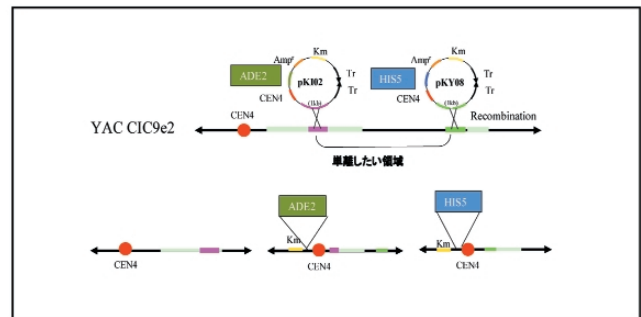
開口部を通したマイクロインジェクションや PEG 法の適用が可能



細胞壁のエキシマレーザー加工 (部分的削剥)
(3D 形状測定顕微鏡像)



YAC DNA を包摂したバイオビーズ
(YOYO-1 染色)



植物染色体任意領域の単離

研究課題名

環境化学物質応答の分子機構の解明

研究項目及び実施体制

環境化学物質応答の分子機構の解明

(高橋 智/筑波大学基礎医学系・生命科学動物資源センター)



高橋 智

研究の目的

本研究では、環境化学物質に対する応答が転写因子レベルでいかに統合され、遺伝子の誘導的発現を引き起こし、化学物質に対する生体防御機構を形成するのか、また、その破綻からどのような異常が生体に発現するのかを解析することを目的とする。

研究の内容

環境化学物質応答の分子機構を明らかにするために、その「鍵」分子の遺伝子改変マウスを作製し、その表現型を解析することにより、それらの「鍵」分子が、環境化学物質応答においてどのような機能を有しているかを明らかにする。また、作製した遺伝子改変マウスの環境化学物質モニター動物としての応用を検討する。

主要な成果

- ①環境化学物質応答の「鍵」分子である、転写因子 Nrf2、Nrf3、Bach1、AhRR および Nrf2 の制御分子である Keap1 の欠損マウス、ヒト型ダイオキシン受容体(AhR)挿入マウスを作製した。
- ②Nrf2 と転写因子である小 Maf 群タンパク質のヘテロ2量体が、解毒反応制御の中心的機能を担っていることを遺伝子改変マウスを用いて個体レベルで明らかにした。また、小 Maf 群タンパク質の DNA 結合配列認識機構を NMR 解析により明らかにした。
- ③Nrf2 欠損マウスでは、化学物質の代謝機能が低下しており、薬物等の副作用が顕著に現れることが明らかとなった。Nrf2 欠損マウスは、薬物副作用のモニター動物として利用可能であることを明らかにした。
- ④マウス本来の AhR に換えてヒト AhR のみを発現するヒト型 AhR 挿入マウスを国立環境研究所との共同研究により開発した。ヒトに対するダイオキシンの毒性評価に使用できるものと考えられる。
- ⑤転写因子 Nrf2 の制御分子である Keap1 の欠損マウスを作製し解析したところ、Keap1 が生体内で Nrf2 制御の中心的な機能を担っていることを明らかにした。Keap1 の機能を調節することにより、環境化学物質に対して抵抗性のマウスを作製することが可能となった。

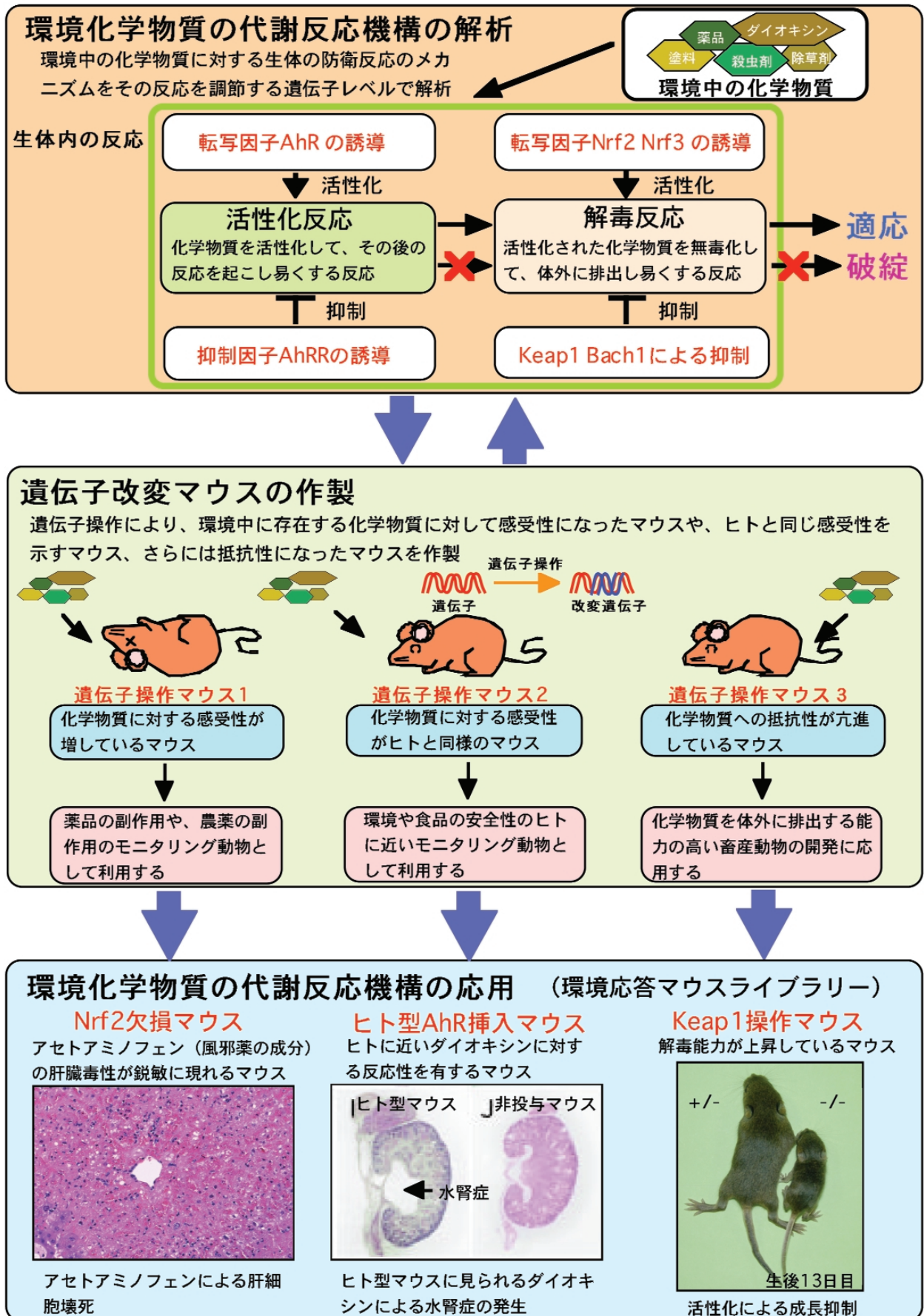
見込まれる波及効果

本研究により作製した、Nrf2、Nrf3、Bach1、Keap1、AhRR それぞれの欠損マウス、ヒト型 AhR 挿入マウスなどの環境応答マウスライブラリーは、今後、環境中に存在する化学物質や薬品の副作用のモニタリングに、大いに利用されると考えられる。

主な発表論文

- Motohashi H, *et al.* Positive or negative MARE-dependent transcriptional regulation is determined by the abundance of small Maf proteins. *Cell.* 103, 865-875, (2000)
- Kusunoki H, *et al.* Solution structure of the DNA-binding domain of MafG. *Nat Struct Biol.* 4, 252-256, (2002)
- Hirotsune S, *et al.* Unique role of an expressed pseudogene as a functional non-coding RNA to regulate mRNA stability from its homologous coding gene. *Nature.* 423, 91-96, (2003)
- Moriguchi T, *et al.* Distinct response to dioxin in an arylhydrocarbon receptor (AhR)-humanized mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 5652-5657, (2003)
- Wakabayashi N, *et al.* Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive nrf2 activation. *Nat Genet.* 35, 238-245, (2003)

研究のイメージ



研究課題名

遺伝子導入飼料作物を用いた新しい家畜疾病予防法の開発

研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ① 遺伝子導入飼料作物の作成及びサイトカイン導入効果の検討
(◎松本 安喜／東京大学大学院農学生命科学研究科)
- ② 液性免疫活性化を促すコレラ毒素 A/B 鎖遺伝子と家畜病原体感染防御遺伝子の融合遺伝子作成及びその組換え植物による翻訳産物の生化学的・免疫学的解析
(新川 武／琉球大学遺伝子実験センター分子感染防御分野)
- ③ 家畜感染症防御抗原の探索及び遺伝子導入飼料作物を用いた家畜疾病予防法の宿主動物を用いた効果検定
(辻 尚利／独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構動物衛生研究所)



松本 安喜



新川 武



辻 尚利

研究の目的

ほとんどの感染症において、病原体は粘膜から侵入する中で、全身性の免疫反応に加え、粘膜における分泌型 IgA の産生といった粘膜局所の免疫機能を高め得る経口粘膜免疫法は、新たなワクチンデリバリーシステムとして期待されている。本研究では、家畜感染症に対するコンポーネントワクチンを遺伝子導入植物により作成し、摂食による防御免疫誘導能を検討する。また、コレラ毒素等の蛋白質アジュバントの免疫増強作用及び経鼻粘膜免疫の有効性についても検討する。

研究の内容

- ① 豚回虫クチクラ蛋白のアミノ酸プロファイリングの作成及び抗原遺伝子のクローニングを行い、新規の豚回虫感染防御遺伝子の探索とその分子性状を解析する。
- ② 様々な感染症について、粘膜免疫が有効な感染症を探索し、その防御免疫抗原を特定する。
- ③ コレラ毒素を用いた複合粘膜アジュバントの有効性を検討する。
- ④ 新規・既知のワクチン候補抗原を作物の可食部位に発現させその経口投与による病原体の感染防御を試みる。

主要な成果

- ① 新規豚回虫感染防御抗原 As14 及び As16 の発見
- ② マラリア伝播阻止ワクチン、及び日本脳炎ウイルスの経鼻免疫による感染阻止
- ③ キメラ化コレラ毒素による新たな粘膜免疫アジュバントとしての利用法の提案
- ④ 新規豚回虫感染防御抗原 As14 及び As16 を種子に発現する遺伝子組換えイネの作出、及びその経口投与によるマウスにおける感染防御効果の検討

見込まれる波及効果

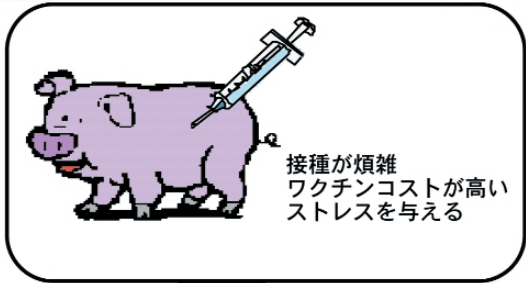
当研究成果の利用により、効果的な経口免疫法が実用化されれば、ワクチン生産のコスト削減、ワクチン接種コストの低減と省力化、接種に伴うストレスの軽減が可能となる。これにより安価で安全な食肉の産生及び野外動物への免疫法の開発に大きく貢献することが期待できる。

主な発表論文

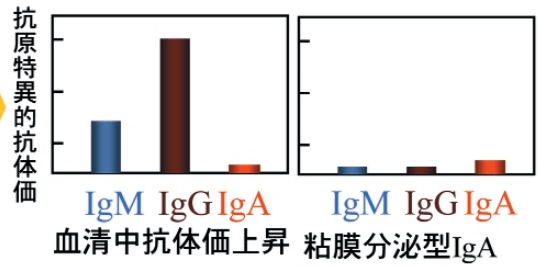
- Kasuga-Aoki H., *et al.* : Identification of larval-stage antigens of *Ascaris suum* recognized by immune sera from pigs : *J. Vet. Med. Sci.*, 63 : 683-685 (2001)
- Tsuji N., *et al.* : Intranasal immunization with recombinant *Ascaris suum* 14-kilodalton antigen coupled with cholera toxin B subunit induces protective immunity to *A. suum* infection in mice : *Infect. Immunity*, 69 : 7285-7292 (2001)
- Arakawa T., *et al.* : Serum antibodies induced by intranasal immunization of mice with *Plasmodium vivax* Pvs25 co-administered with cholera toxin completely block parasite transmission to mosquitoes : *Vaccine*, 21 : 3143-3148 (2003)
- Islam MK, *et al.* : Inorganic pyrophosphatase in the roundworm *Ascaris* and its role in the development and molting process of the larval stage parasites : *Eur. J. Biochem.*, 270 : 2814-2826 (2003)
- Tsuji N., *et al.* : Mice intranasally immunized with a recombinant 16-kilodalton antigen from roundworm *Ascaris* parasites are protected against larval migration of *Ascaris suum* : *Infect. Immunity*, 71 : 5314-5323 (2003)

研究のイメージ

現状：注射によるワクチン

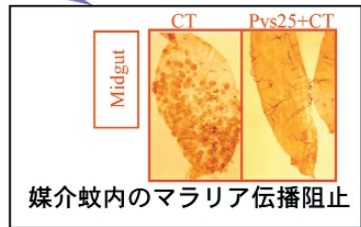
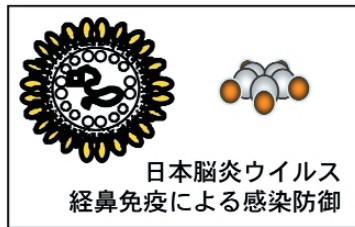
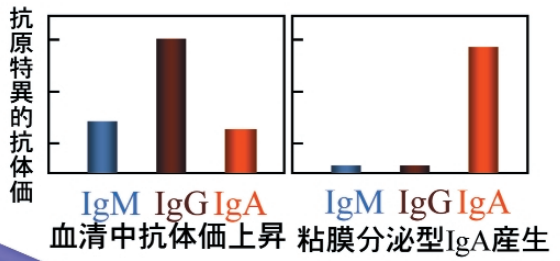
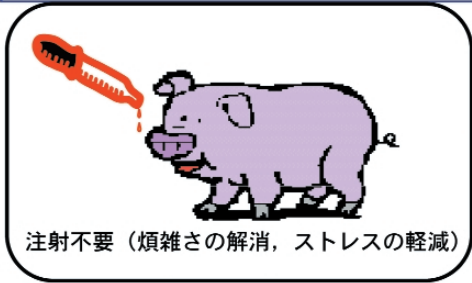


全身性免疫のみ上昇

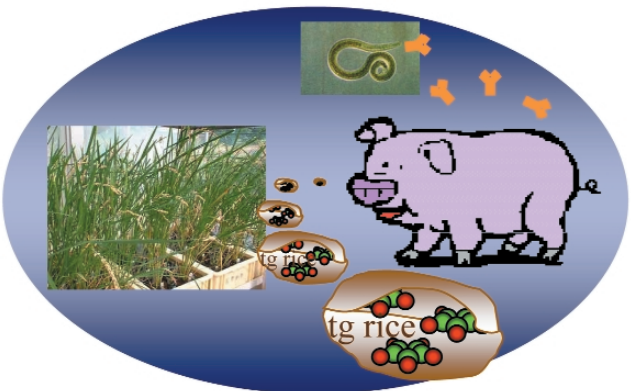
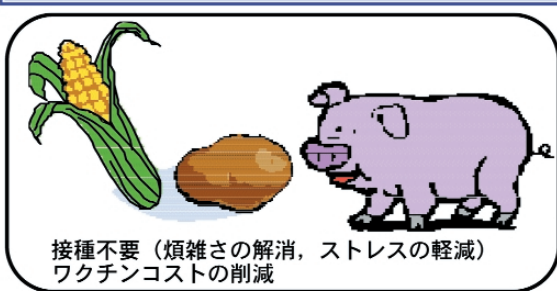


粘膜免疫では全身性に加え粘膜表面の防御免疫も誘導

将来：ワクチンの経鼻免疫



発展型：食べるワクチンによる経口免疫



自然宿主であるブタにおける経口免疫によるブタ回虫感染防御免疫の誘導（目標）

研究課題名

DNAメチル化情報の解析による動物ゲノムの高度利用

研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①ゲノムDNAのメチル化状況の解析
 - ②DNAメチル化の制御機構についての生化学的研究
 - ③ゲノムメチル化制御系解析のための各種の幹細胞株の樹立
 - ④細胞の核を初期胚型に戻すための細胞生化学的研究
- (◎塩田 邦郎・田中 智/東京大学大学院農学生命科学研究科)



塩田 邦郎

田中 智

研究の目的

哺乳類の個体発生では、受精から始まる連続的な細胞分裂・増殖・分化を繰り返し、最終的に様々な形態や機能を有する細胞が生じる。各細胞固有の形態・機能は、不可逆的な遺伝子発現パターンに支えられているが、細胞の遺伝子発現パターンの記憶機構については謎であった。本研究は、哺乳類ゲノムDNAの唯一の化学修飾であるDNAメチル化に焦点をあて、マウスゲノム解析を中心に展開したもので、個体発生のDNAメチル化によるプログラムの解読を目的にしている。

研究の内容

マウスを用いてCG配列の豊富な数千のゲノム領域(CpGアイランド)のメチル化状況を解析し、ゲノムDNAあたり少なくとも数千の領域が、組織特異的なメチル化パターンを形成していることを発見した。また、DNAメチル化パターン形成・維持の分子機構も解明が進んだ。体細胞のゲノムDNAの遺伝情報(塩基配列)は同一であっても、メチル化パターンは細胞の種類により異なっているのである。メチル化された遺伝子は不活性になるので、発生の基礎として重要で、クローン動物の発生に関する分子解析アプローチも可能となった。

主要な成果

- ①幹細胞を含む様々な細胞・組織のゲノムワイドのDNAメチル化解析を行い、細胞の種類に特有のDNAメチル化パターンが存在することを発見し、マウスゲノムのDNAメチル化データベースを作成した。DNAメチル化と脱メチル化による複雑なエピジェネティック変化が、細胞分化・発生の基盤となっている。
- ②CpGアイランドを含む遺伝子領域のDNAメチル化とその維持は、繰り返し配列を主体とする非遺伝子領域とは異なり、主にDNAメチル転移酵素(Dnmt3a/3b)により制御されていることを明らかにした。
- ③DNAメチル転移酵素(Dnmt1)はメチルシトシン結合蛋白質の一つMeCP2と結合することを明らかにした。この発見によりDNAメチル化パターン維持の分子機構に新たな概念を提供した。
- ④幹細胞(胚性・栄養膜幹細胞)分化に伴いDNAメチル化パターンが大きく変化することが明らかになった。また、発生に重要なマスター遺伝子がDNAメチル化により制御されていることも明らかにされた。
- ⑤クローンマウスではDNAメチル化に異常があることを明らかにした。DNAメチル化異常は発生異常の原因となるので、DNAメチル化解析は、病気や初期胚の診断等の新たな指標となる。

見込まれる波及効果

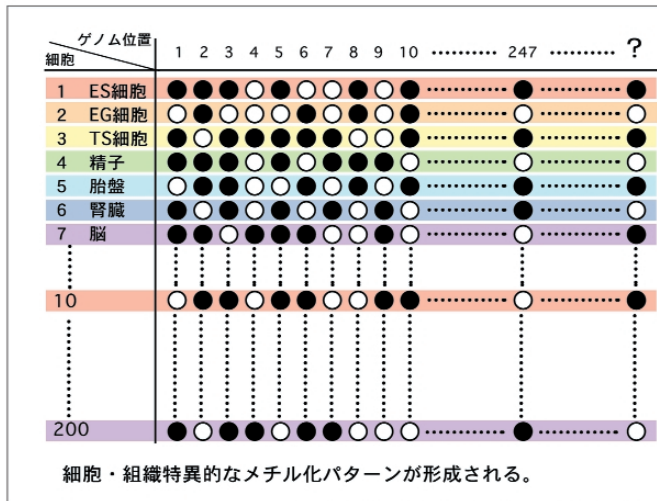
DNAメチル化情報は生命科学の新たなパラダイムで、動物生産の効率化や初期胚の診断、および環境汚染物質・食品添加物などの健康への影響など、畜産を含む農業および食品安全性評価などに大きく貢献する。また、様々な疾病の治療・診断法や創薬標的分子の探索系確立のための利用など、生命科学産業への波及効果も大きい。

主な発表論文

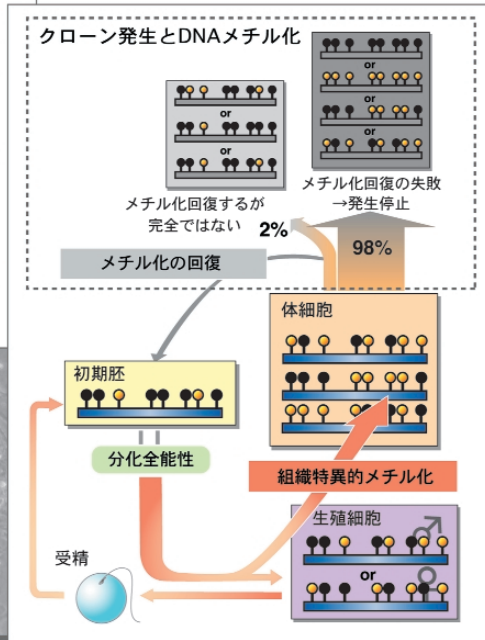
- Ohgane J., *et al.*, DNA methylation variation in cloned mice : *Genesis*, 30 : 45-50 (2001).
- Imamura T., *et al.*, CpG island of rat sphingosine kinase 1 gene : tissue-dependent DNA methylation status and multiple alternative first exons : *Genomics*, 76 : 117-125 (2001).
- Tanaka S., *et al.*, Placentomegaly in cloned mice caused by expansion of spongiotrophoblast layer. *Biol. Reprod.*, 65 : 1813-1821 (2001).
- Shiota K., and Yanagimachi R., Epigenetics by DNA methylation for development of normal and cloned animals : *Differentiation*, 69 : 162-166 (2002).
- Shiota K., *et al.*, Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in Mice, *Genes Cells*, 7 : 961-969 (2002).
- Kimura H., Shiota K., Methyl-CpG binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1 : *J. Biol. Chem.*, 278 : 4806-4812 (2003).

研究のイメージ

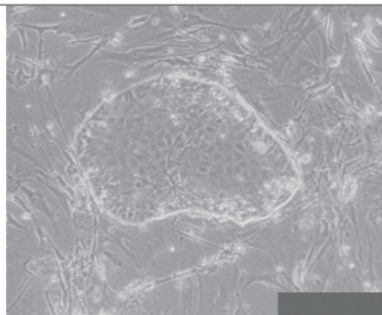
DNAメチル化パターンの解析



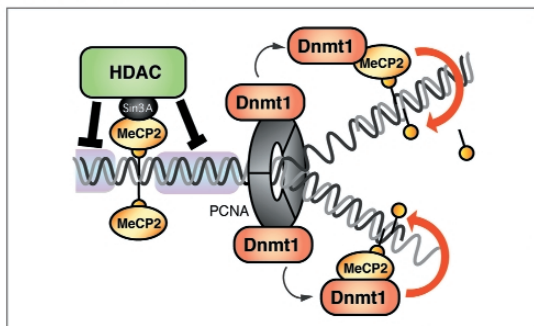
体細胞核移植胚では多くの場合（98%）は異常なDNAメチル化を示し、発生・発育に異常が生じる。成功率は低い、生まれてきたクローン動物のDNAメチル化パターンはほぼ正常である。しかし、親の完全なコピーではなくDNAメチル化の異常が検出される。



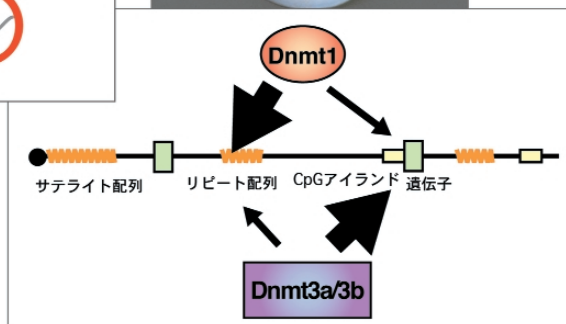
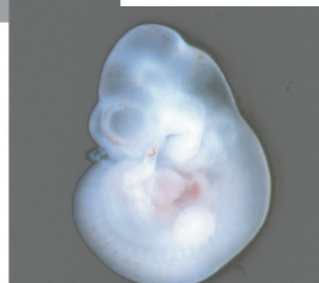
各種幹細胞の樹立



DNAメチル化制御機構の解析



メチル化シトシン結合タンパク (MeCP2) はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) と結合して遺伝子の不活性化を起こしている。DNAメチル化酵素 (Dnmt1) は核タンパク (PCNA) と結合するが、MeCP2とも結合することが明らかになった。



遺伝子領域 (CpGアイランド) のメチル化は非遺伝子領域 (リピート) とは異なった様式でメチル化されている。

DNAメチル化情報の応用

動物生産の効率化
病気の診断・治療法

初期胚診断

環境汚染物質・
食品添加物などの
健康への影響のモニタリング

研究課題名

抗病性産業動物の作出に関する分子遺伝学的研究

研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①ニジマス MHC 遺伝子の多様性及び機能の解析に関する基礎研究
(乙竹 充/水産総合研究センター養殖研究所)
- ②新規 MHC 関連遺伝子群の構造並びに機能の解明
(◎橋本 敬一郎/藤田保健衛生大学総合医科学研究所)
- ③ニワトリ MHC 遺伝子領域におけるマレック病関連遺伝子の探索とその遺伝探索マーカーの開発
(山本 義雄/広島大学大学院生物圏科学研究科)
- ④ニワトリにおける抗病性遺伝子座の解明
(三橋 忠由/独立行政法人農業生物資源研究所)



乙竹 充



橋本 敬一郎



山本 義雄



三橋 忠由

研究の目的

大量飼養される魚類及び鶏において、疾病防御は大変重要である。抗病性に関与すると予想される白血球型遺伝子(主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)遺伝子)群及びMHC 遺伝子領域の解析を行い、抗病性に関連する遺伝子群を解明し、これまで哺乳動物と比べて生体防御系の知見が乏しい魚類、鶏等の産業動物の疾病対策に資することが目的である。

研究の内容

- ①魚類の疾病抵抗性の遺伝子マーカーとして、MHC 遺伝子に着目し、ニジマスを用いてその多様性と機能を解析する。
- ②新規 MHC 関連遺伝子群について、その構造および機能の解明を進め、魚類等の MHC 遺伝子研究の基盤を形成する。
- ③ニワトリマレック病ウイルス(MDV)抵抗性に関わる原因および関連遺伝子をニワトリ MHC 遺伝子領域内で探索し、その遺伝マーカーを開発する。

主要な成果

- ①ニジマスの古典的 MHC クラス I 遺伝子について、遺伝子座の数は1つであることを明らかにし、多数の対立遺伝子群を解明し、白血球型の分類法を確立した。
- ②ニジマスの白血球型は、移植片の拒絶反応およびワクチンの有効性と関連することを明らかにした。また、MHC クラス I 類似遺伝子が存在する別の遺伝子領域は、抗病性との関連が高いことが明らかとなった。
- ③魚類において、新規 MHC 関連遺伝子の単離に成功し、その特徴的な構造を明らかにし、MHC 遺伝子群の基礎的理解に貢献する結果が得られ、さらにゲノム構造の理解を深める知見が得られた。
- ④ニワトリにおいては、MDV 抵抗性(B^{21})および感受性系統(B^{19})の BAC ライブラリーを作成し、両系統の MHC 領域の塩基配列を決定した。MDV 抵抗性系統は、MHC 領域の NKr , $RING3$, $DM\alpha$, $DM\beta_2$ 遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異が認められ、MDV 抵抗性と関連する候補遺伝子が明らかになった。

見込まれる波及効果

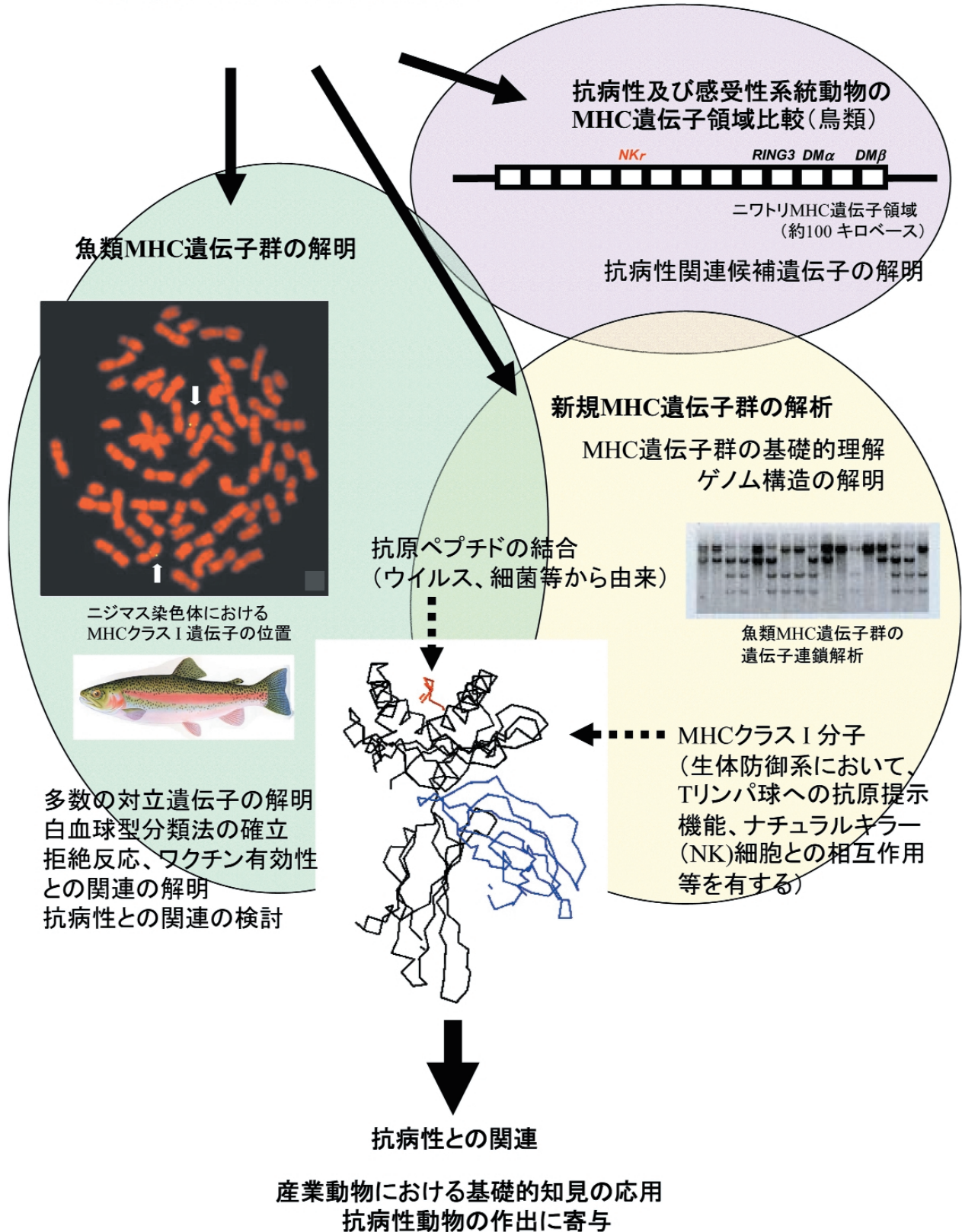
魚類において、MHC 領域を指標とした耐病性系統およびワクチンへの高反応性系統の育種に道を開いた。これらの育種は根本的な感染防除対策として、農林水産業や食品産業等に大きく寄与することが期待される。また鶏 MHC 領域の解析も、養鶏産業における疾病防御への貢献が期待される。

主な発表論文

- Aoyagi, K, *et al.* : Classical MHC class I gene composed of highly divergent sequence lineages share a single locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) : *J. Immunol.*, 168 : 260-273 (2002)
- Fujiwara, A., *et al.* : Chromosome mapping of MHC class I in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) : *Fish Shellfish Immunol.*, 14 : 171-175 (2003)
- Sarder R., *et al.* : The MHC class I linkage group is a major determinant in the in vivo rejection of allogeneic erythrocytes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) : *Immunogenetics*, 55 : 315-324 (2003)
- Ohta, Y. *et al.* : Primitive synteny of vertebrate major histocompatibility complex class I and class II genes : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 4712-4717 (2000)
- Yamaguchi, H. and Hashimoto, K. : Association of MR1 protein, an MHC class I-related molecule, with β_2 -microglobulin : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 722-729 (2002)
- Nishibori, M. *et al.* : Characterization of Major Histocompatibility Complex Genes in Junglefowls, genus *Gallus*. *J. Poult. Sci.*, 40 : 21-29 (2003)

研究のイメージ

生体防御系において重要な
主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)領域



研究課題名

行動特性の育種改良を目指した、家畜の脳内物質関連遺伝子の解析

研究項目及び実施体制

行動特性の育種改良を目指した、家畜の脳内物質関連遺伝子の解析
(村山 美穂／岐阜大学農学部)



村山 美穂

研究の目的

日本国内のイヌの飼育数は1,000万頭にもものぼり、伴侶動物としての需要がますます増加する一方、問題行動も増加している。また平成15年10月に身体障害者補助犬法が施行され、盲導犬など有用犬の役割が社会的に浸透してきたものの、その育成は困難で、供給数は不足している。本研究では、遺伝子を指標とした有用犬適性個体の育成および、家畜の生産性向上を目指して、ヒトにおいて性格との関連が報告されている脳内物質関連の遺伝子多様性を、イヌなどの家畜で探索し、品種や個体の行動特性との関連を解析した。

研究の内容

ヒトではドーパミンやセロトニンなどの神経伝達物質の受容や輸送に関与する様々なタンパク質の遺伝子の個人差と性格や精神疾患との関連が報告されている。それら遺伝子の多様性を、イヌ、ウシ、ニワトリなどの家畜や家禽、およびヒトに系統的に近い霊長類で解析した。イヌではドーパミン D4 受容体遺伝子等に多型領域を見だし、品種間や個体間の比較を行った。また有用犬の訓練個体の行動特性評価や合否と遺伝子型の関連を解析した。

主要な成果

- ①イヌでは、ドーパミン受容体 D4 遺伝子のエキソン3、エキソン1、イントロン2の3箇所、セロトニン受容体 1A 遺伝子、アンドロゲン受容体遺伝子において、品種ごとのアレル頻度分布を解析した。品種の行動特性評価との比較から、特定のアレルと「攻撃性」や「社会性」に関連を見いだした。
- ②ニワトリのドーパミン受容体 D4 遺伝子エキソン1領域にも多型を発見し、品種によるアレル頻度の差を明らかにした。
- ③霊長類では8遺伝子で多型を見だし、種間および種内のアレル頻度分布の比較を行った。培養細胞において、反復配列が、レポーター遺伝子の発現量に影響することを見いだした。飼育チンパンジーの行動特性評価と遺伝子型に関連性を見いだした。
- ④イヌ脳内でのドーパミン受容体 D4 の分布を、脳組織のウエスタンブロットリングおよび免疫組織染色によって明らかにした。
- ⑤盲導犬、麻薬探知犬の候補において、個体の行動特性と遺伝子型の関連性を見いだした。また盲導犬の発達および訓練過程での行動特性の変化から、遺伝子と環境それぞれの影響を受ける時期や強さを解析した。

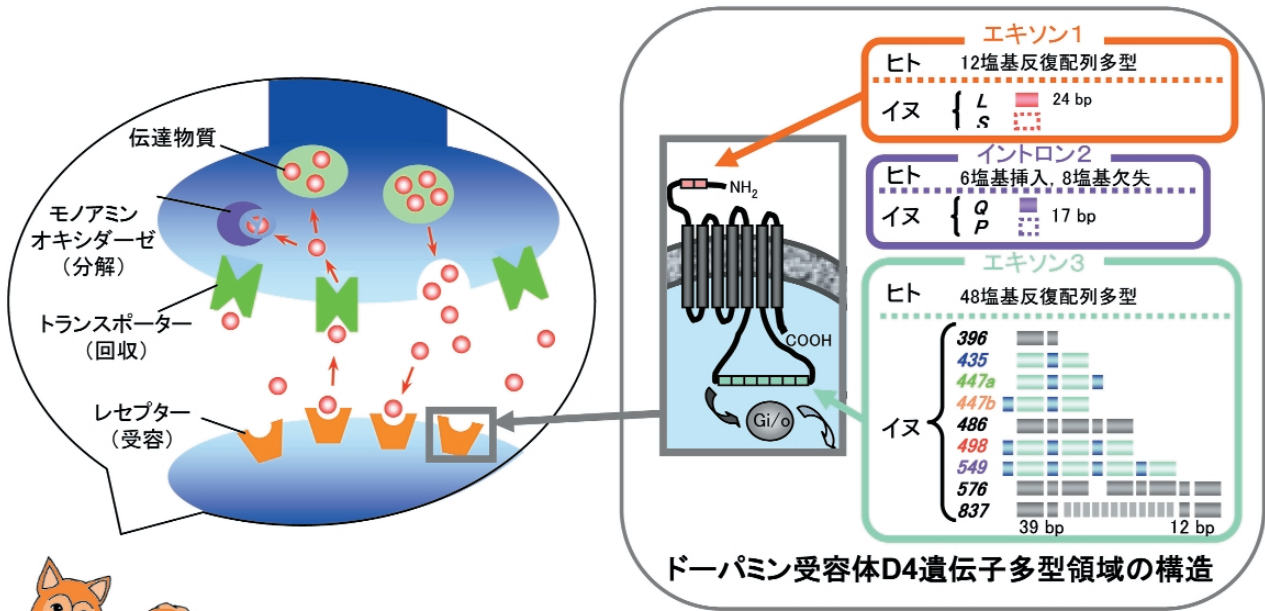
見込まれる波及効果

本研究の成果により、遺伝子型判定による有用犬の早期段階での選別や適性に合った訓練法の工夫、ストレスを感じにくく、生産性の高い家畜・家禽の育種改良への応用が期待される。

主な発表論文

- 新美陽子 他: イヌにおけるドーパミン受容体 D4 遺伝子多型領域の解析: *DNA 多型*, 9: 100-104 (2001)
- Niimi, Y., et al.: Breed differences in allele frequency of the dopamine receptor D4 gene in dogs: *J. Hered.*, 92(5): 433-436 (2001)
- 井上(村山)美穂 他: イヌにおけるドーパミン受容体 D4 遺伝子多型と行動特性との関連: *DNA 多型*, 10: 64-70 (2002)
- Inoue-Murayama, M., et al.: Sequence Comparison of the Dopamine Receptor D4 Exon III Repetitive Region in Several Species of the Order Carnivora: *J. Vet. Med. Sci.*, 64 (8): 747-749 (2002)
- Inoue-Murayama, M., et al.: Variation of variable number of tandem repeat sequences in the 3'-untranslated region of primate dopamine transporter genes that affects reporter gene expression: *Neurosci. Lett.*, 334: 206-210 (2002)

研究のイメージ

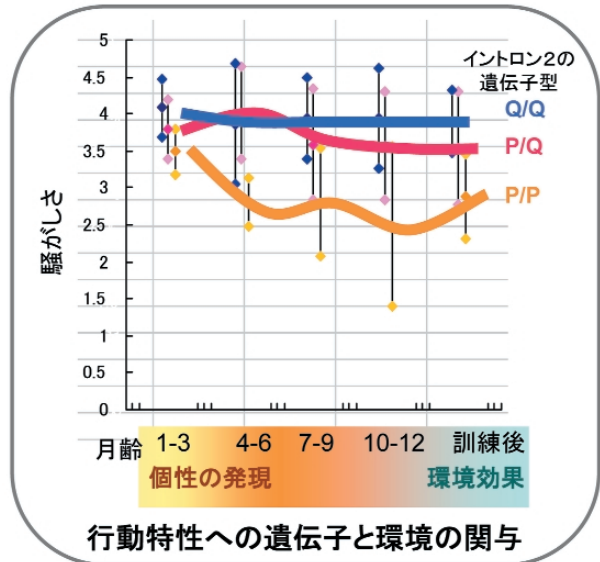
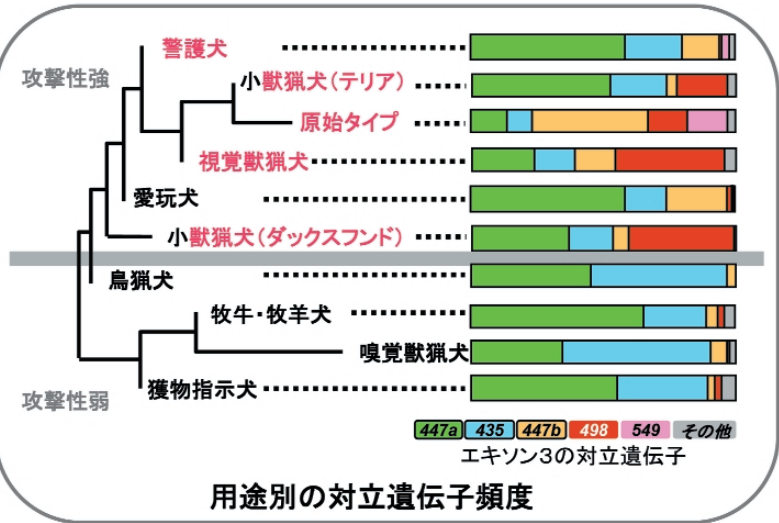


- 活動性.....5
- 服従性.....4
- 集中力.....3
- 人なつこさ.....4
- 他犬への攻撃性..2
- 不安の感じやすさ..1

遺伝子の個体差を調べ、
行動特性を評価する



有用犬供給数の増加



「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」について

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

対象研究分野

生物系特定産業に関する基礎研究であって、新技術・新分野の創出に資するもの。具体的な分野は以下のとおり。

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

研究期間

原則として3～5年間

研究費の規模

1課題当たり年間1億円程度を上限（研究内容に応じて弾力的に運用）

応募資格

大学、国公立試験研究機関、独立行政法人、民間の研究機関等、生物系の産業技術に関する基礎研究を実施する能力のある機関に所属している研究者又はそのグループ。

研究応募枠

「一般型」については、応募者の年齢制限無し。

「若手研究者支援型」については、応募者の年齢を39歳以下に制限。

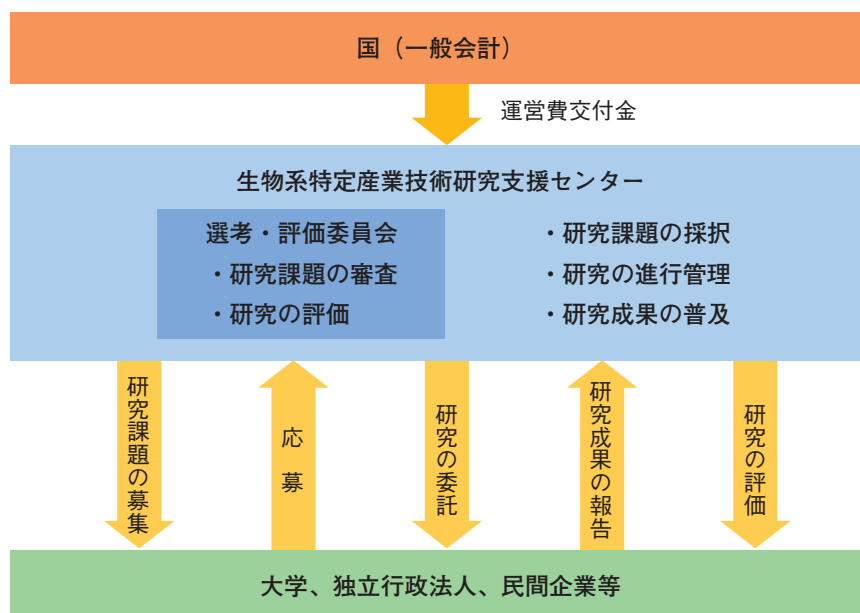
研究実施形態

生研センターからの委託研究

研究成果の帰属

生研センターが認めた場合は受託機関に帰属。それ以外は共有。

事業の仕組み



生物系特定産業技術研究支援センター 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
虎ノ門マリビル10階

電 話 03-3459-6569

FAX 03-3459-6594

生研センターホームページ・アドレス

URL <http://brain.naro.affrc.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。虎ノ門マリビル10階