

基礎研究推進事業 研究成果

(2004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「カイコの遺伝子機能解析システムの構築」の研究成果である。トランスジェニックカイコの成虫の複眼における赤色蛍光タンパク質遺伝子の発現を示した。

(独立行政法人 農業生物資源研究所 田村俊樹)

本研究ではプラスミドDNAをカイコ卵に注射し、次世代の個体をスクリーニングすることによりトランスジェニックカイコを作る方法を確立した。トランスジェニックカイコの利用は、同時に進められた発現遺伝子のデータベースやDNAチップとともに、遺伝子の機能解明には不可欠である。また、この方法による目的個体の出現頻度は0.1～0.5%であるため多数の個体を調べる必要があり、研究を効率的に行うためには容易に目的遺伝子導入個体を見分けることが大切である。本研究ではスクリーニングのため、数種類のマーカー遺伝子が確立されたが、表紙はその一つで眼での発現特性を持つ赤色蛍光タンパク質遺伝子が導入されたカイコ成虫の複眼を実体蛍光顕微鏡で撮影したものである。

基礎研究推進事業

研究成果（2004年度終了課題）

目 次

| | |
|--|----|
| カイコの遺伝子機能解析システムの構築 (独立行政法人 農業生物資源研究所／田村 俊樹)..... | 1 |
| ニワトリモノクローナル抗体の新しい作成技術・実用化技術の開発に関する研究 (広島大学大学院生物圏科学研究科／松田 治男)..... | 3 |
| ラショナル・プロテイン・デザインおよびセレクション法の確立と「スーパープロテイン」の創出 (東京大学大学院工学系研究科／多比良和誠)..... | 5 |
| インスレーターの作用機構の解明と有用生物作出技術の開発 (東京大学大学院理学系研究科／赤坂 甲治)..... | 7 |
| ダイオキシン類の微生物分解系を用いた環境修復のための基盤研究 (芝浦工業大学大学院工学系研究科／大森 俊雄)..... | 9 |
| 葉緑体の増殖制御技術の開発と応用に関する先導的研究 (立教大学理学部／黒岩 常祥)..... | 11 |
| マメ科植物等のゲノム分析による根粒形成機構の系統的解明 (独立行政法人 農業生物資源研究所／川崎 信二)..... | 13 |
| 植物ホルモン情報伝達の分子機構解明による植物機能改変 ＝形態形成の人為的コントロールを目指して＝ (独立行政法人 農業生物資源研究所／小松 節子)..... | 15 |
| 生体関連触媒を用いる植物資源からの高分子新素材の創出 (大阪大学大学院工学研究科／宇山 浩)..... | 17 |

■研究課題名**カイコの遺伝子機能解析システムの構築****■研究項目及び実施体制** (◎は研究代表者)

- ①-1: 形質転換カイコの作出効率の向上と利用技術の開発
(◎田村 俊樹/独立行政法人 農業生物資源研究所)
- ①-2: カイコ全発現遺伝子の cDNA チップの作製とその利用の技術開発
(三田 和英/独立行政法人 農業生物資源研究所)
- ②: 形質転換系、既存突然変異および DNA チップを用いたカイコ遺伝子の機能解析
(嶋田 透 (15 年度まで小林正彦) / 東京大学大学院 農学生命科学研究科)



田村 俊樹



三田 和英



嶋田 透

■研究の目的

昆虫を用いたバイオテクノロジー産業を創出するためには、遺伝子機能を解析するシステムの構築が不可欠である。本研究では、産業昆虫として我国に卓越した知見が蓄積されているカイコを対象として、形質転換体の効率的な作出法の確立と導入遺伝子の発現制御法の開発、発現遺伝子のデータベース化と DNA チップの作出を行うとともに、これらを基に開発された系を利用して昆虫特異的な遺伝子機能を解析し、そのシステムの有効性を実証する。得られた成果は新たな昆虫産業等の創出をめざした応用研究の加速化に資する。

■研究の内容

- ①カイコの形質転換体の効率的な作出法を開発するため、卵への DNA の注射方法や新しいベクターの開発を行うとともに導入遺伝子の発現制御、遺伝子機能解析に必要な系を整備する。
- ②カイコ EST の大量シーケンシングとデータベースの構築を行い、得られた塩基配列をもとに DNA チップを作出する。
- ③形質転換系やデータベース、DNA チップ等上記成果を利用して、休眠や性決定機構などの解析を行い、開発された遺伝子機能解析システムを検証する。

■主要な成果

- ①形質転換カイコの作出効率が従来の数十倍と飛躍的に改善されるとともに、キヌレニン酸化酵素遺伝子等既存特許に抵触しない新しいベクターを開発した。また、ゲノム中に挿入された遺伝子を人為的に転移させ、得られる変異から遺伝子機能を解析する系を作出した。
- ②全発現遺伝子の 80% 以上をカバーする EST データベースを構築した。これを利用して 17,000 個の独立 EST に対応する DNA チップを作出し、内外に提供できる体制を整えた。
- ③開発されたシステムを利用して、休眠や性決定、ウイルス感染などの昆虫特異的な機能を解析し、本システムの有効性を実証した。同時に、これら機能の関連遺伝子の同定と機能解析を行った。

■見込まれる波及効果

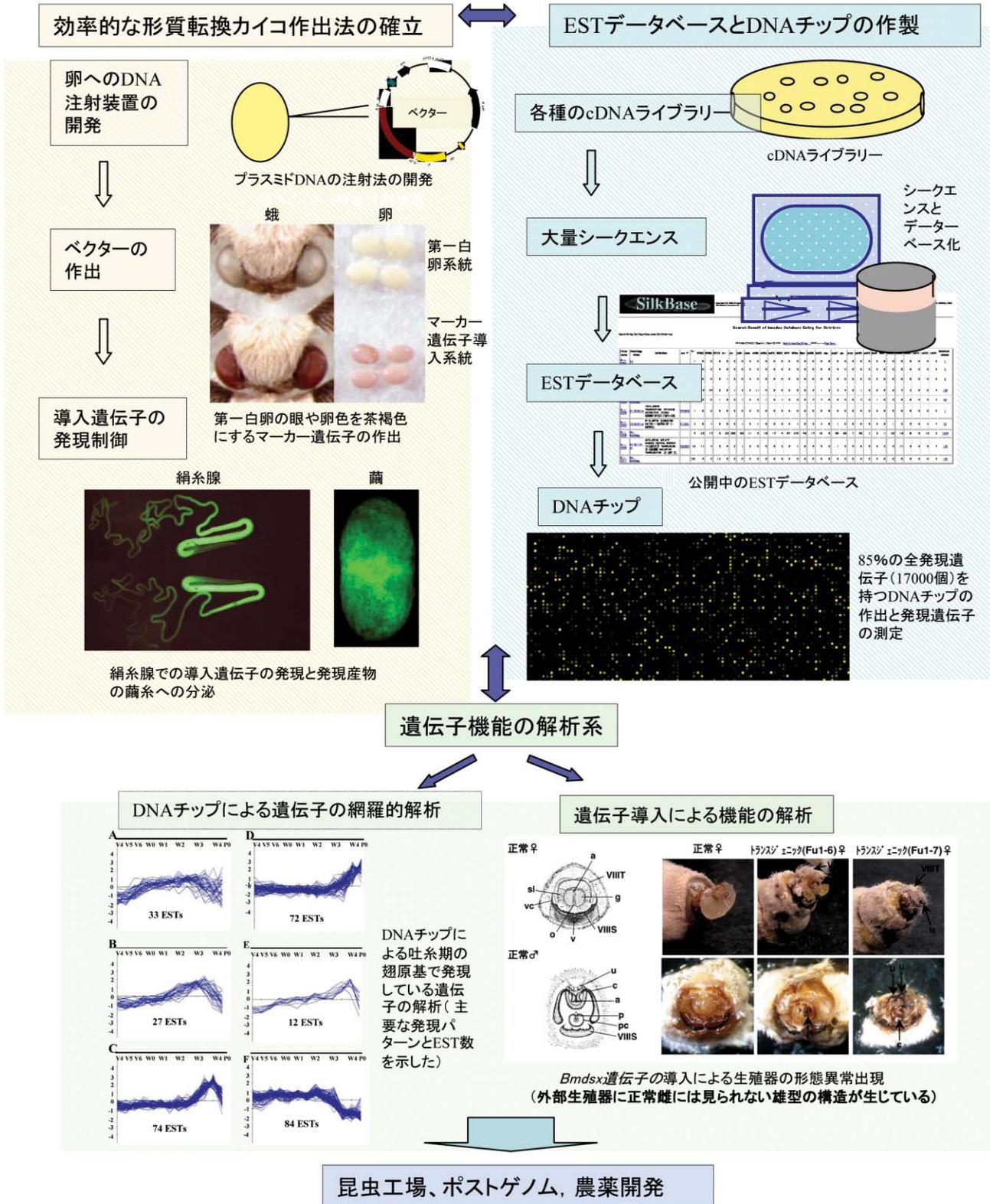
- ①カイコ遺伝子機能解析システムが整備され、遺伝子の網羅的解析やトランスポゾンによる突然変異の誘発などポストゲノム研究の飛躍的な発展が期待できる。
- ②「昆虫工場」等応用研究プロジェクトにカイコ形質転換体を利用し、機能性生糸、医薬品原料等カイコを使った新しい素材や有用物質の生産が可能になる。
- ③カイコの成果を他の昆虫に応用し、DNA チップ等を用いた遺伝子の網羅的解析や農薬の標的遺伝子の同定により、環境調和型の害虫管理技術に途を開く。

■主な発表論文

- Imamura M., *et al.* Targeted gene expression using the *Gal4/UAS* system in the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics* 165: 1329-1340 (2003)
- Mita K., *et al.* The construction of an EST database for *Bombyx mori* and its application. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA* 100: 14121-14126 (2003)
- Suzuki M., *et al.* Role of the male *BmDSX* protein in the sexual differentiation of *Bombyx mori*. *Evolution and Development* 7: 58-68 (2005)

■研究のイメージ

カイコの遺伝子機能解析システムの構築



■研究課題名

ニワトリモノクローナル抗体の新しい作成技術・実用化技術の開発に関する研究

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①細胞融合によるニワトリモノクローナル抗体の作成技術の開発
- ②組み換えニワトリモノクローナル抗体の作成技術の開発
(◎松田 治男／広島大学大学院生物圏科学研究科)
- ③ニワトリモノクローナル抗体の糖鎖構造解析による新規利用の検討
(西村 敏英／広島大学大学院生物圏科学研究科)
- ④ニワトリモノクローナル抗体の実用化技術の構築
(古澤 修一／広島大学大学院生物圏科学研究科)



松田 治男



西村 敏英



古澤 修一

■研究の目的

ニワトリ抗体の特性を生かすことで、ニワトリ抗体の多様な活用の可能性が期待できるようになってきた。細胞融合技術によるマウスモノクローナル抗体作成技術がニワトリにおいても取り入れられたが、その実用的活用には、克服しなければならない様々な技術開発と基礎研究が望まれた。本研究では、ニワトリモノクローナル抗体の優れた特性に着目し、ニワトリモノクローナル抗体の新しい作成技術と実用化技術の開発を目的とした。

■研究の内容

ニワトリモノクローナル抗体について、効率よい細胞融合法の確立、遺伝子組み換え技術による多彩な組み換え抗体の作成技術の構築、ニワトリ抗体の糖鎖構造の解析とニワトリ抗体親和性レクチンの探索、そして、ニワトリモノクローナル抗体の実用化のための技術開発等をおこなった。

■主要な成果

- ①純系ニワトリに移植可能な細胞融合用細胞株の樹立とハイブリドーマの効果的維持のための IL-6 の活用
- ②組み換えニワトリ抗体発現用ベクターの開発と CHO 細胞によるニワトリ抗体の大量生産系の確立
- ③ニワトリ抗体の糖鎖解析を通じたニワトリ抗体精製用新規海藻レクチンの発見
- ④ニワトリ×ヒトキメラ抗体の大量生産系の構築

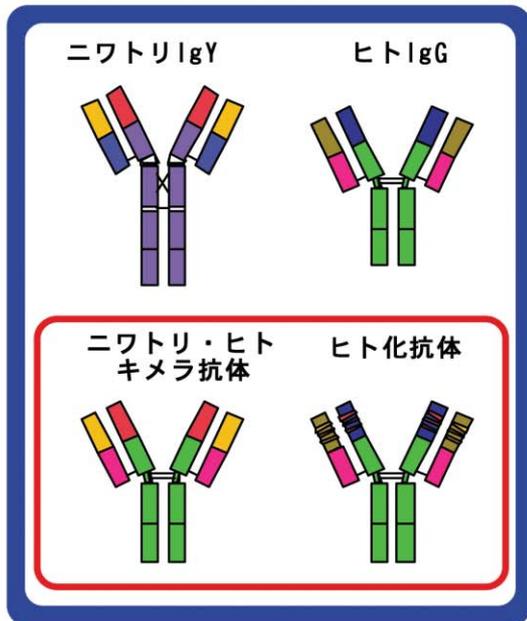
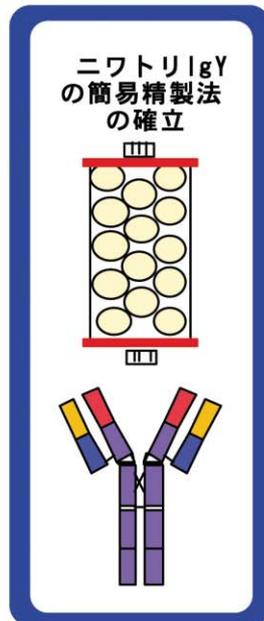
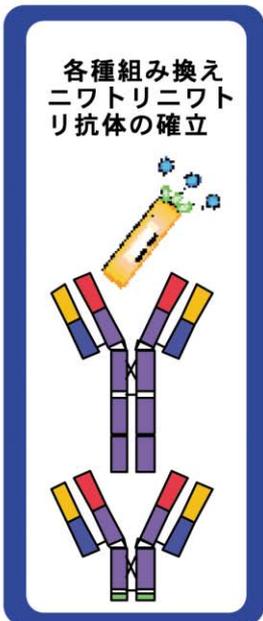
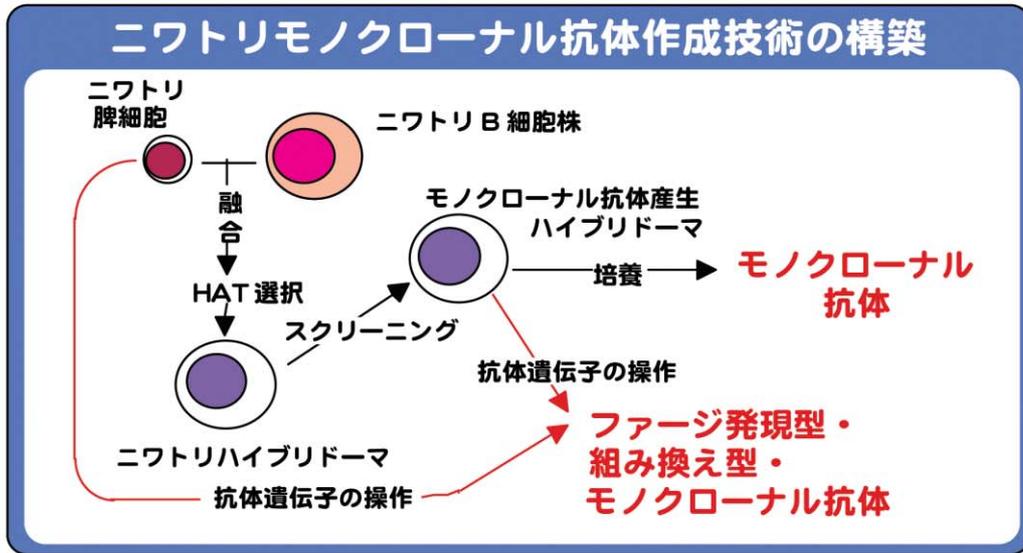
■見込まれる波及効果

- ①ニワトリモノクローナル抗体を用いた新規な抗体検査薬
- ②家畜をはじめ小動物やヒトを対象としたニワトリモノクローナル抗体の抗体医薬としての活用

■主な発表論文

- Nakamura N., *et al.* Construction of recombinant monoclonal antibodies from a chicken hybridoma line secreting specific antibody. *Cytootechnol.* 31: 191-198 (2000)
- Nakamura N., *et al.* Two expression vectors for the phage-displayed chicken monoclonal antibody. *J. Immunol. Methods* 280: 157-164 (2003)
- Horiuchi H., *et al.* Chicken leukemia inhibitory factor maintains chicken embryonic stem cells in the undifferentiated state. *J. Biol. Chem.* 279: 24514-24520 (2004)
- Nakamura N., *et al.* Establishment of a chicken monoclonal antibody panel against mammalian prion protein. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 807-814 (2004)
- Nhishibori N., *et al.* Expression vectors for chicken-human chimeric antibodies. *Biologicals* 32: 213-218 (2004)

■研究のイメージ



■研究課題名

ラショナル・プロテイン・デザインおよびセレクション法の確立による「スーパープロテイン」の創出

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ① 「スーパープロテイン」の創出にむけた機能タンパク質の無細胞系新規選抜法の開発と有用タンパク質の創生
(◎多比良 和誠/東京大学大学院工学系研究科)
- ② ラショナル・プロテイン・セレクション法による新機能糖結合タンパク質の創出
(長谷川 典巳/山形大学・理学部)
- ③ 「スーパープロテインの創出にむけたタンパク質分子のデザインと構造解析」
(小林 秀行/食品総合研究所)



多比良 和誠



長谷川 典巳



小林 秀行

■研究の目的

機能性タンパク質とその遺伝情報とを1対1で結合させる機能を有する機能性リボ核酸を分子設計し、それを用いて無細胞系で新規機能性タンパク質を選択する新規の機能性タンパク質選択システムを開発する。また、これら技術の確立と同時に、構造機能解析、計算化学を駆使した分子デザイン、および非天然型アミノ酸側鎖の導入システムとの融合を行い、最終的には天然型を凌駕するスーパープロテインを創生する。

本課題では特に糖質分解酵素に注目し、単なる酵素の高機能化、高活性化だけにとどまらず、酵素反応のスイッチングが自由自在にできる酵素(スイッチングエンザイム)の創出にも着手する。

■研究の内容

- ① 実際に応用が困難であった従来法よりも簡便に機能性タンパク質を選択できるシステムの開発を行った。
- ② これまで導入が困難であった非天然アミノ酸をタンパク質に導入するための手法の開発を行った。
- ③ ラショナル・プロテイン・セレクションおよびデザイン法を用い、糖分解酵素の高機能化、高活性化を行った。

■主要な成果

- ① 4種類以上の新規の機能性タンパク質選択システムを独自に開発した。これらの手法はターゲットの選択条件などに合わせた使い分けが可能であり、酵素などを活性で選択することが可能な手法を含む。さらに、これら手法を用いて従来法よりもより強くリガンドに結合する新規ペプチドを創出した。
- ② アジ化ナトリウムで活性を自由自在にスイッチでき、しかも反応過程で生成物(天然にない修飾糖)と未反応物を分離できるスーパーキシラナーゼを創出した。またこの酵素の特長を生かし、そのX線結晶解析からキシラナーゼの酵素反応の全行程を世界で初めて可視化した。さらに、その構造情報を基に非天然アミノ酸の導入を加味した分子デザインにより、天然アミノ酸置換では不可能であった活性向上型キシラナーゼを創出した。
- ③ 構造機能相関を調べることでキシラナーゼの基質特異性発現のメカニズムを解明した。また、ラショナル・プロテイン・デザイン法により2重の変位を導入することで酵素の基質特異性の制御を可能にした。
- ④ 4塩基コドン法による非天然アミノ酸導入により、これまでにない蛍光波長を持つGFPを創出した。

■見込まれる波及効果

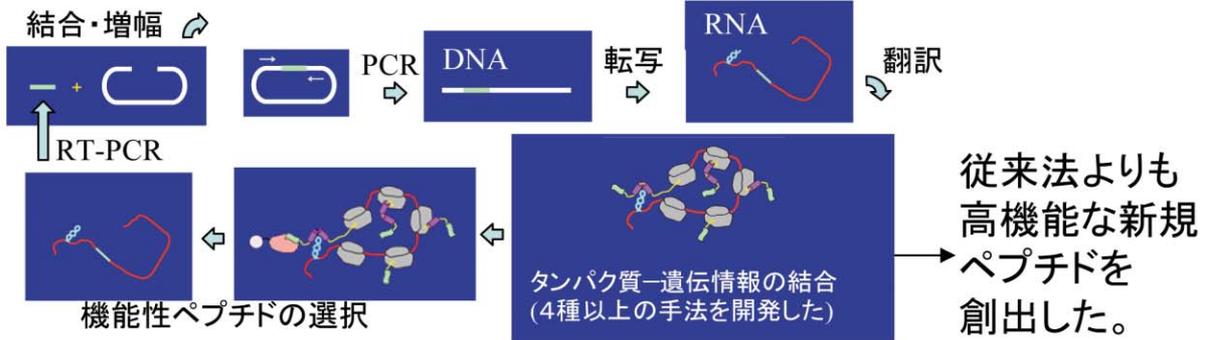
- ① 我々の開発したラショナル・プロテイン・セレクション法を用いることで、従来作成が困難であった新規の高機能ペプチドの創出が容易となった。これは産業に対する経済的な効果は大きい。
- ② スwitchingエンザイム創出法は多くの糖質加水分解酵素で普遍な手法である。本酵素の特長である酵素反応の自在性、および新規修飾糖の生産能力は、新規産業への発展を大きく期待させるものである。
- ③ スwitchingエンザイムは反応産物を一時的に保持することにより精製も容易であり、産業に対する経済的効果だけでも絶大なものと予想できる。
- ④ 糖質加水分解酵素の高機能化や、基質特異性の制御を可能にしたことは食品産業、農林水産業等に対し有用な情報である。

■主な発表論文

- Fujita S., *et al.* Novel approach for linking genotype to phenotype in vitro by exploiting an extremely strong interaction between RNA and protein. *J. Med. Chem.* 45 : 1598-606 (2002).
- Kaneko S., *et al.* Structure and function of a family 10 b-xylanase chimera of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 FXYN and *Cellulomonas fimi* Cex. *J. Biol. Chem.* 279 : 26619-26626 (2004).
- Ito S., *et al.* Rational affinity purification of native *Streptomyces* family 10 xylanase. *J. Biotechnol.* 110 : 137-142 (2004).
- Sawata S.Y., *et al.* A system based on specific protein-RNA interactions for analysis of target protein-protein interactions in vitro. successful selection of membrane-bound Bak-Bcl-xL proteins in vitro. *Protein Eng. Des. Sel.* 17 : 501-508 (2004).

■研究のイメージ

ラショナル・プロテイン・セレクション



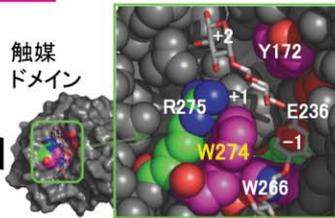
① 精製工程が無く生成物の取得ができる酵素の獲得

② 活性向上型非天然アミノ酸導入酵素の獲得



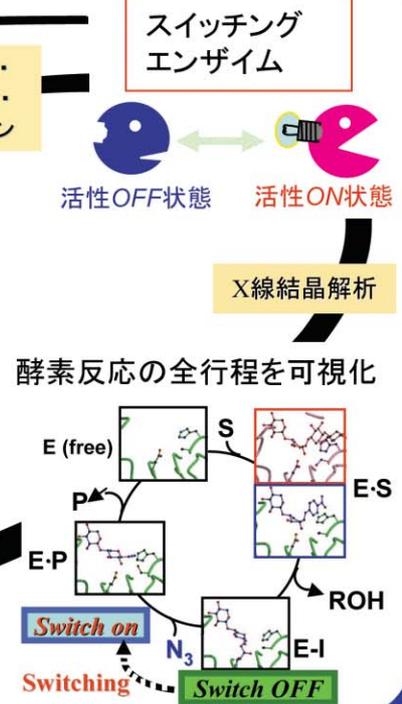
スーパープロテイン誕生

非天然アミノ酸導入酵素を綿密にデザイン

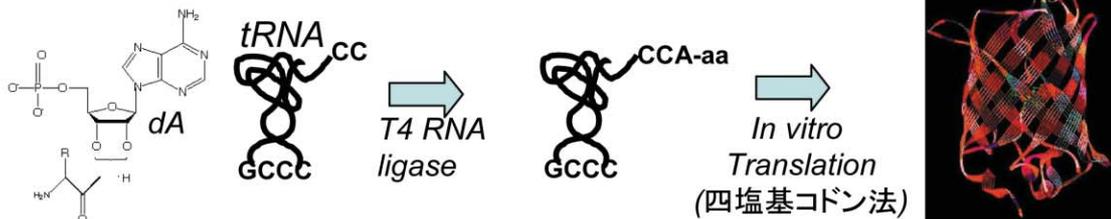


② 非天然アミノ酸導入

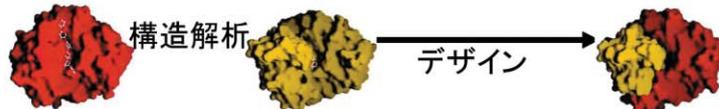
ラショナル・プロテイン・デザイン



・新規非天然アミノアシルtRNA調製法を開発



・キシラーゼの基質特異性発現メカニズムを解明・基質認識特異性を制御



ラショナル・プロテイン・デザイン

■研究課題名

インスレーターの作用機構の解明と有用生物作出技術の開発

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①インスレーターの検索とその分子機構の解明
(◎赤坂 甲治/東京大学大学院理学系研究科)
- ②インスレーターの抗メチル化効果の解析
(田嶋 正二/大阪大学 蛋白質研究所)
- ③植物におけるインスレーターの機能解析とそれを利用したワクチン安定生産植物の作製
(吉田 和哉/奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科)
- ④インスレーターを利用した導入遺伝子の持続的発現技術の開発に関する基礎研究
(松岡 雅雄/京都大学ウイルス研究所)
- ⑤インスレーターを用いた遺伝子の高発現組換えクローン家畜の作出
(安江 博/独立行政法人農業生物資源研究所)



赤坂 甲治



田嶋 正二



吉田 和哉



松岡 雅雄



安江 博

■研究の目的

有用動植物作出、遺伝子治療などさまざまな分野で遺伝子導入が行われている。しかし、導入した遺伝子は時間の経過とともに不活性化される問題があった。当該研究はインスレーター（クロマチンの境界）を利用し、導入遺伝子を安定的に発現させる技術を開発することを目的とする。

■研究の内容

- ①インスレーター ArsINS の分子機構及び、ヒトゲノム由来新規インスレーターの単離。
- ②マウス培養細胞における ArsINS の外来遺伝子発現維持効果と DNA メチル化の解析。
- ③ワクチンタンパク質トランスジェニックイチゴの作製及びマウス個体を使った免疫誘導の検出系の確立。
- ④遺伝子治療用 ArsINS レンチウイルスベクターの作成と抗サイレンシング機能の解析。
- ⑤最も効率のよい ArsINS ベクターの開発および、動物個体の継代による導入遺伝子の発現レベルの解析。

■主要な成果

- ① ArsINS 結合新規核マトリクスタンパク質 Unichrom はポジション効果にかかわることを明らかにした。
- ② ArsINS はヒストン修飾とは独立して遺伝子のメチル化を防ぐ機能をもつ可能性を示した。
- ③ ワクチンタンパク質遺伝子導入イチゴを作製し、マウス個体を用いた免疫誘導活性検出系を確立した。
- ④ ArsINS は遺伝子治療用ベクターの開発に極めて有用であることを証明した。
- ⑤ 外来遺伝子を最も効率よく安定的に発現させるための ArsINS ベクターを開発した。さらに、ArsINS ベクターを利用した高発現体細胞トランスジェニックブタが得られた。

■見込まれる波及効果

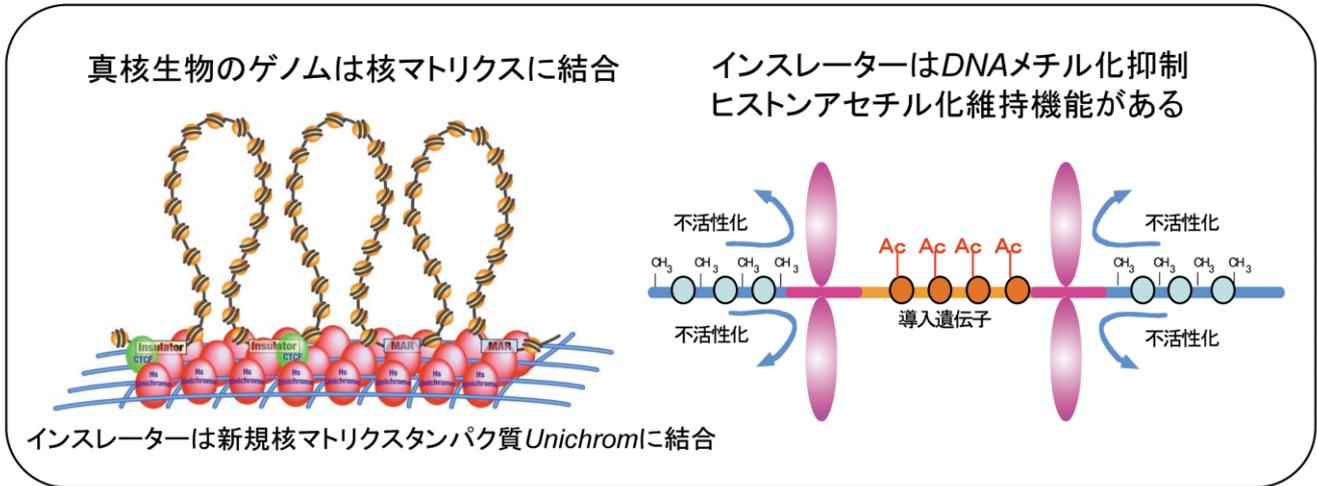
インスレーターの分子機構が明らかになったことにより、より効率的なインスレーターの応用に向けた研究計画が可能になった。また、ArsINS の導入遺伝子安定発現機能により、トランスジェニック植物の高機能化、安定的遺伝子治療、幹細胞への遺伝子導入による再生医療、有用物質産生家畜の作出が容易になると期待される。

■主な発表論文

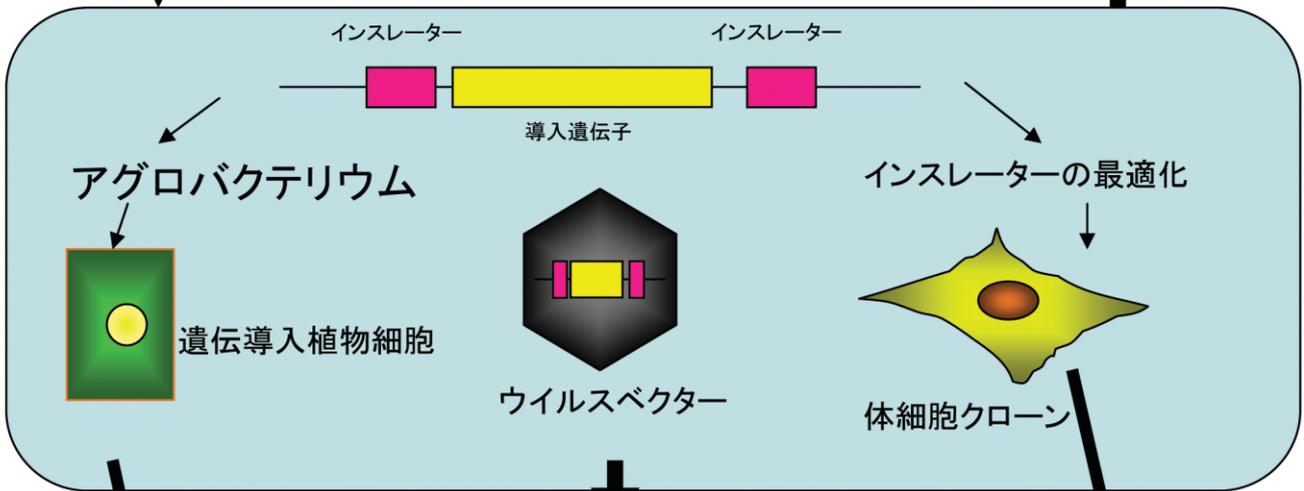
- Moritani K., *et al.* A new G-stretch-DNA-binding protein, Unichrom, displays cell cycle dependent expression in sea urchin embryos. *Dev. Growth & Differ.* 46: 335-341 (2004)
- Suetake I., *et al.* DNMT3L stimulates DNA methylation activity of *Dnmt3a* and *Dnmt3b* through a direct interaction. *J. Biol. Chem.* 279: 27816-27823 (2004)
- Nagaya S., *et al.* An insulator element from the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* suppresses variation in transgene expression in cultured tobacco cells. *Mol. Genet. Genomics* 265: 405-413 (2001)
- Hino S Fan J., *et al.* Sea urchin insulator protects lentiviral vector from silencing by maintaining active chromatin structure. *Gene Therapy* 11: 819-28 (2004)
- Fujisaki S., *et al.* Analysis of a full-length cDNA library constructed from swine olfactory bulb for elucidation of expressing genes and their transcription initiation sites. *J. Veterinary Medical Science* 66(1): 15-23 (2004)

■研究のイメージ

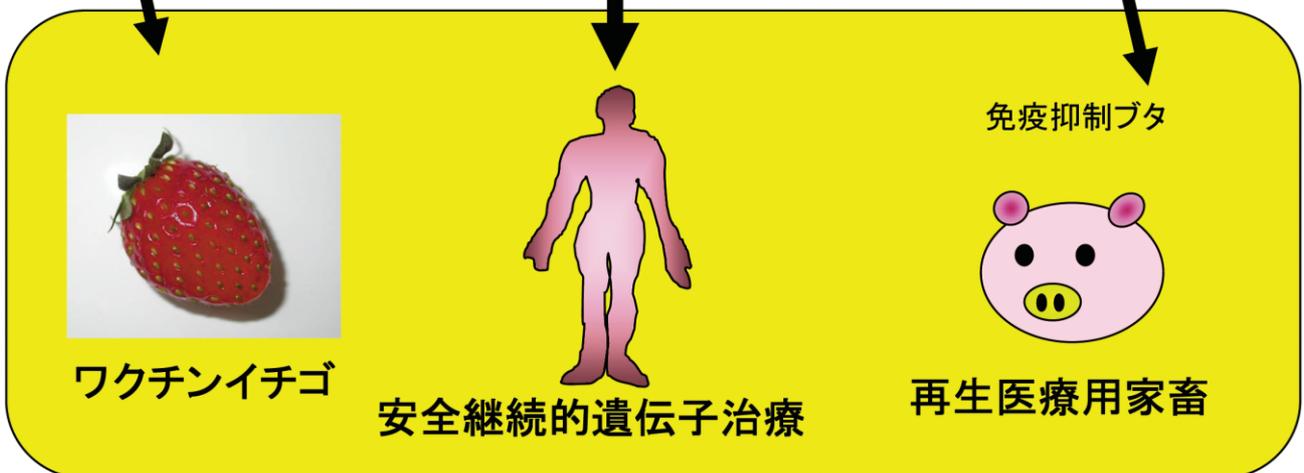
インスレーターの分子機構の解明



インスレーター・ベクターの開発



インスレーターによる導入遺伝子の安定的発現



■研究課題名

ダイオキシン類の微生物分解系を用いた環境修復のための基盤研究

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ①ダイオキシン・ジベンゾフラン分解系酵素群の機能構造解析と遺伝子伝播機構の解明
(野尻 秀昭/東京大学生物生産工学研究センター)
- ②ダイオキシン分解系酵素の改変体の作成と機能解析
(◎大森 俊雄/芝浦工業大学大学院工学研究科)
- ③コプラナーポリ塩化ビフェニル分解への応用を目指したクメン分解酵素群の機能構造解析とダイオキシン類分解系酵素の分子モデリング
(若木 高善/東京大学大学院農学生命科学研究科)



野尻 秀昭



大森 俊雄



若木 高善

■研究の目的

自然界に広く拡散してしまったダイオキシン類の処理方法として、ダイオキシン分解性細菌を利用した浄化法の確立が急務である。本研究では、細菌のダイオキシン分解酵素の機能解明と改良型酵素の創製、自然界でのダイオキシン分解系遺伝子の伝播の機構解明を行い、分解力増強への応用をはかることを目的とした。

■研究の内容

分解酵素がダイオキシン類をどの様に認識するのか・どの様に分解するのかを、X線結晶構造解析と分子モデリング手法により明らかにするとともに、変異酵素のデザインを行って高分解能酵素を創製する。また、分解酵素遺伝子群を他の細菌に伝播させる可動遺伝因子の同定と伝播機構の解明、伝播頻度の解明を行う。

■主要な成果

- ①ダイオキシン・PCB 分解の初期反応に関与する Car 酵素群 (5 種)、Cum 酵素群 (6 種) のうち、8 種の酵素の構造を明らかにし、基質特異性決定機構・反応触媒機構を解析した (右ページ参照)。
- ②ダイオキシン分子に対する初発酸化酵素の酸化酵素コンポーネント (CarAa) が酸化反応を行うには、フェレドキシン (CarAc) から電子を受け取ることが必須だが、本研究では、各単体の構造解明に成功したのに加え、共結晶構造の解明にも成功し、両タンパク質間の相互作用と電子伝達機構を明らかにした。
- ③ダイオキシン分解系 car 遺伝子群は、2つの巨大プラスミド (pCAR1, pCAR3) とトランスポゾンの働きでグラム陰性細菌間を伝播することを明らかにし、両プラスミドゲノムの全塩基配列も決定した。
- ④分解酵素と基質の複合体をモデリングし酵素機能の解析を行うと共に、適切なテンプレートがない部分の構造予測のためのフラグメントアセンブリ法に基づく *ab initio* タンパク質構造予測手法を開発した。

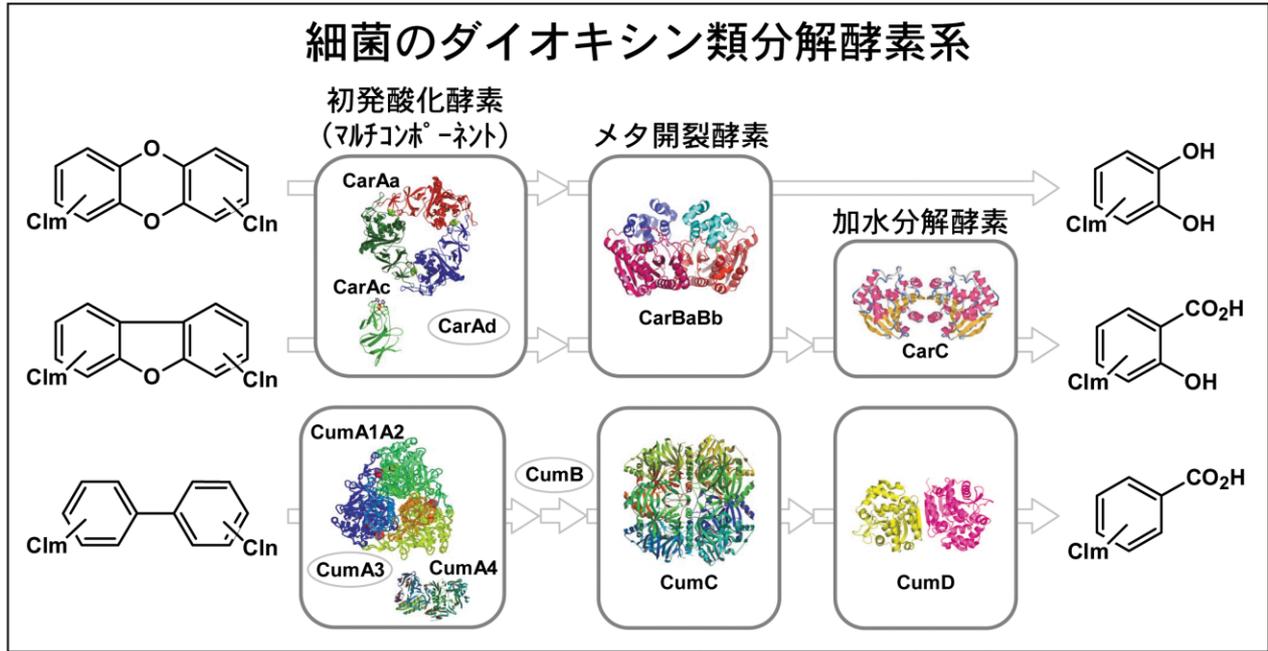
■見込まれる波及効果

さらなる改良型酵素を創製するとともに、それを用いた汚染除去手法の最適化を行うことで、耕作地を含む土壌や河川底土等で広範にみられるダイオキシン汚染を実際に浄化できるバイオ技術を確立することができる。

■主な発表論文

- Maeda K., *et al.* Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *J. Mol. Biol.* 326: 21-33 (2003)
- Habe H., *et al.* Crystal structure of a histidine-tagged serine hydrolase involved in the carbazole degradation (CarC enzyme): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303: 631-639 (2003)
- Ishida T., *et al.* Development of an *ab initio* protein structure prediction system ABLE. *Proceedings of the 14th International Conference on Genome Informatics (GIW 2003)*: 228-237 (2003)
- Nam J. -W., *et al.* Purification and characterization of carbazole 1,9a-dioxygenase, a three-component dioxygenase system of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5882-5890 (2002)
- Fushinobu S., *et al.* Crystal structure of a *meta*-cleavage product hydrolase from *Pseudomonas fluorescens* IP01 (CumD) complexed with cleavage products. *Protein Sci.* 11: 2184-2195 (2002)

■ 研究のイメージ



分解酵素のX線結晶構造解析・分子モデリングによる解析

基質結合ポケットの形状解明

電子伝達複合体の構造解析

基質結合状態のモデリング

電子伝達経路の解明

ダイオキシン類分解系の遺伝子解析・存在形態の解析

*Pseudomonas*と近縁細菌でのダイオキシン分解能伝播に関わるプラスミド pCAR1

*Sphingomonas*属細菌でのダイオキシン分解能伝播に関わるプラスミド pCAR3

高分解能酵素のデザインと機能・構造解析

改変酵素CarAaF275W (緑)の変異箇所の野生型 (紫)との比較

基質特異性が野生型ダイオキシン分解酵素と異なる改変酵素のデザイン・創製と機能解析

ダイオキシン類分解遺伝子群の自然界での挙動の解析

pCAR1の接合伝達頻度

- P. chlororaphis*
- P. putida* (A)
- P. fluorescens*
- P. resinovorans* (>10⁻²)
- P. putida* (B) (>10⁻³)
- P. stutzeri*

効率的ダイオキシン分解系の構築と汚染処理技術の確立

■研究課題名

葉緑体の増殖制御技術の開発と応用に関する先導的研究

■研究項目及び実施体制 (◎は研究代表者)

- ① 極限環境藻類を用いた葉緑体増殖機構に関する基盤研究
(◎黒岩 常祥／立教大学理学部)
- ② 海洋藻類の原核型及び真核型葉緑体分裂遺伝子の探索と遺伝子導入による葉緑体増殖技術の開発と応用
(河野 重行／東京大学大学院新領域創成科学研究科)
- ③ 陸上植物の葉緑体増殖制御技術の開発と遺伝子破壊による葉緑体分裂関連遺伝子の機能解析
(高野 博嘉／熊本大学理学部)
- ④ 原始紅藻から陸上植物への進化と遺伝子導入技術を基盤とした葉緑体増殖機構の普遍性の解明
(東山 哲也／東京大学大学院理学系研究科)



黒岩 常祥



河野 重行



高野 博嘉



東山 哲也

■研究の目的

光合成の現場である「葉緑体（色素体）」は細菌の共生により誕生し、増殖して機能を果たす。本研究の目的は、色素体の分裂機構を原始紅藻から高等植物までを視野に解明し、食糧生産向上と環境浄化に役立つ基盤成果を挙げることである。

■研究の内容

色素体の分裂増殖には、原核生物由来及び宿主真核生物由来の遺伝子の関与が想定された。そこで *ftsZ* 遺伝子などの原核型遺伝子群の解析と、色素体分裂装置の単離とゲノム解読による真核型遺伝子群の解析を行い、分裂増殖機構の全容解明を目指した。材料は、極限環境に棲息する原始紅藻 *Cyanidioschyzon* “シゾン”、海洋藻類（二次共生藻類を含む）そして陸上植物（コケ、シダ、被子植物）を用いた。方法として、比較ゲノム解析、色素体の分裂装置の大量単離、シゾンの3ゲノムの完全解読等の他、新たに開発した諸技術を利用した。

■主要な成果

- ① ゲノム解析により 85 種の海洋藻類、陸上植物などに、原核型分裂遺伝子 *ftsZ* 遺伝子が共通に存在することを明らかにした。*FtsZ* は分裂開始前に分裂予定域にリングを形成し、分裂面を決定する機能をもつことが分かった。真核型分裂遺伝子由来と推定される PD（内中外）リングの内、中 PD リングは外 PD リングの形成誘導に関与していた。外 PD リングは外側に形成される 5nm の繊維の束で、分裂の進行につれて幅と厚みを増し、分裂面を収縮する動力源であることが分かった。プロテオーム解析から外 PD リングの遺伝子は繊維性の 75kDa タンパク質をコードしている可能性が高い。
- ② シゾンの3ゲノムの完全解読に成功し、解読したゲノム情報から真核型分裂遺伝子ダイナミンを発見した。遺伝子は1個で、その産物は外 PD リングの内側にリングを形成し、娘色素体の最後の分断に関与した。以上の結果から、色素体の分裂はダイナミックトリオ：*FtsZ* リング、PD（内中外）リングそしてダイナミンリングが順次出現し、位置決定、収縮そして分断などの機能を発揮して遂行されることが明らかとなった。

■見込まれる波及効果

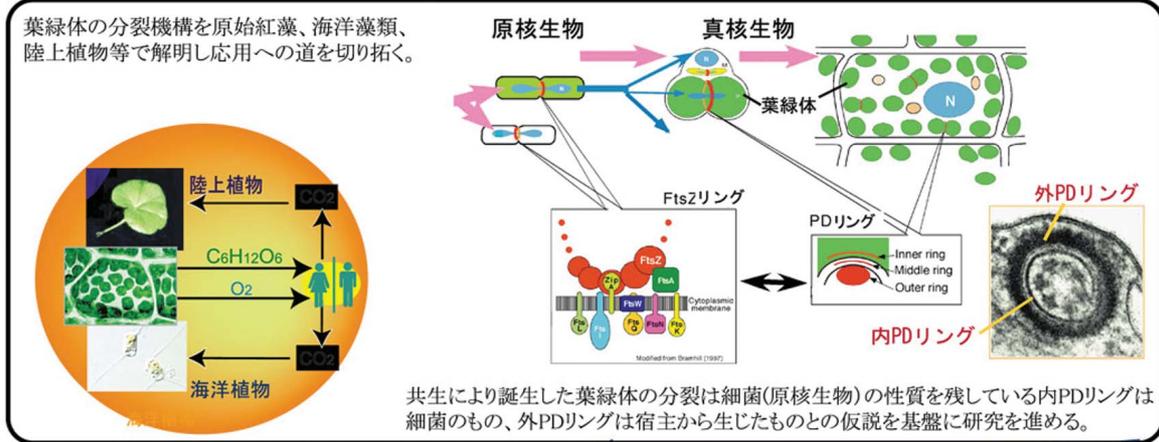
色素体の分裂制御遺伝子の操作により、色素体数の増加を誘導でき、食糧増産に結びつく可能性が高い。一方、分裂装置形成を阻害すれば、赤潮、白潮を起こす海洋藻類の撲滅や、色素体やその分裂装置の存在が明らかになったマラリア（トキソプラズマを含む）原虫類の撲滅に役立つと考えられる。

■主な発表論文

- Matsuzaki M., *et al.* Genome sequence of the ultra-small unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428 : 653-657 (2004)
- Miyagishima S., *et al.* A plant-specific dynamin-related protein forms a ring at the chloroplast division site. *Plant Cell* 15 : 655-665 (2003)
- Nishida K., *et al.* Dynamic recruitment of dynamin for final mitochondrial severance in a red alga. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 : 2146-2151 (2003)
- Nishimura Y., *et al.* mt⁺ gamete specific nuclease that targets mt⁻ chloroplasts during the sexual reproduction in *Chlamydomonas*. *Genes and Dev.* 16 : 1116-1128 (2002)
- Higashiyama T., *et al.* Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science* 293. 1480-1483 (2001)
- Miyagishima S., *et al.* Plastid division is driven by a complex mechanism that involves the bacterial and eukaryotic division rings. *Plant Cell* 13 : 2257-2268 (2001)

■ 研究のイメージ

研究目的



成果

原核型FtsZはリング構造をとり葉緑体の分裂を制御。2001

トキソプラズマで色素体分裂装置を発見。2001

細胞当りの葉緑体数を100倍増やすことに成功。2003

Science

真核植物の基”シゾン”

3ゲノムの完全解読

ミトコンドリア 1998

細胞核 2004

葉緑体 2003

プロテオーム解析 2004

3ゲノムマイクロアレイトランスクリプトーム解析 2004

構造生物学 2005以降

遺伝子破壊 2004

バイオインフォマティクス比較ゲノム科学 2004

FtsZを海洋・陸上植物34種で同定。

真核型遺伝子ダイナミンが葉緑体分裂を制御することを発見。Nature 2003 news and views in brief

原始紅藻”シゾン”の3ゲノムの完全解読に成功。2004

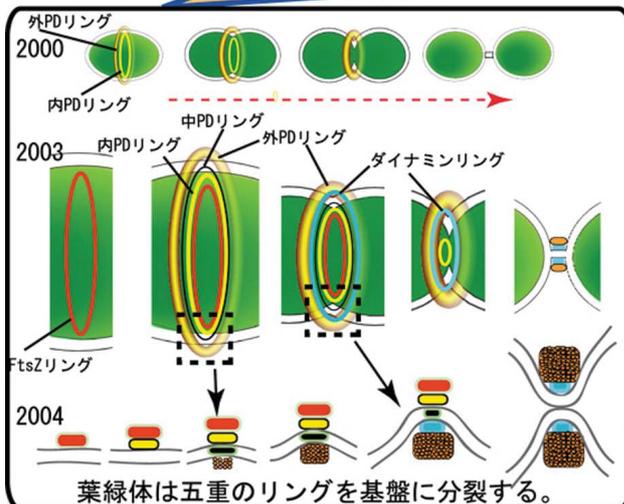
葉緑体の分裂装置(ダイナミン・外PDリング複合体)の単離。2004

nature highlights

Simply red: the first algal genome to be sequenced. p.653

* 数字は論文・成果完成年

まとめ



展開

- 促進
- 穀類の基盤遺伝子の解明
 - 食糧生産の向上
 - 温暖化・酸性化耐性植物の育成
- 制御
- マラリアの撲滅
 - 赤潮・白潮の阻止

■研究課題名

マメ科植物等のゲノム分析による根粒形成機構の系統的解明

■研究項目及び実施課題 (◎は研究代表者)

- ①ミヤコグサのゲノム解析を基にした根粒形成遺伝子群の系統的単離と機能解析
(◎川崎 信二／独立行政法人農業生物資源研究所生理機能研究グループ)
- ②ミヤコグサとダイズのシンテニーを利用した遺伝子単離システムの開発
(原田 久也／千葉大学園芸学部)
- ③根粒菌ゲノムの機能分析による共生窒素固定遺伝子群の系統的単離
(佐伯 和彦／奈良女子大学理学部)



川崎 信二



原田 久也



佐伯 和彦

■研究の目的

根粒菌との共生による窒素固定能や高タンパク含量の種子等、他の植物に見られない機能を持つマメ科植物のモデル植物・ミヤコグサや主要作物のダイズ、それらと共生する根粒菌のゲノムや変異体を分析することにより、これまで未知であった根粒形成に至る情報伝達過程を植物・根粒菌の両サイドから解明することを目的とする。

■研究の内容

ミヤコグサとダイズについて高密度分子地図とゲノムライブラリーとを作製し、これらをもとに根粒形成過程やそれに関連する機能についての変異体の原因遺伝子をポジショナルクローニングにより単離同定する。得られた遺伝子の機能を分析することにより根粒着生に至る情報伝達の過程の解明を試みる。根粒菌については、整列化ゲノムライブラリーや系統的部分ゲノム欠損株の機能分析により正常な根粒を形成するのに必要な菌側での因子群を明らかにする。

■主要な成果

ミヤコグサとダイズについてそれぞれ1700,1061 マーカーからなる高密度分子地図と高品位のゲノムライブラリーとを作製した。根粒菌については整列化コスミドライブラリーと一連の系統的な部分ゲノム欠損株の作製法を開発し、それぞれの菌株の根粒着生能力の分析から *purB*, *argF* 等根粒形成・根粒細胞内への侵入に必須な遺伝子群を同定した。

これらの成果をもとにミヤコグサの根粒形成の初期過程の変異体 *Ljsym70,71,72,86* の原因遺伝子を単離した。*Ljsym71,86* の原因遺伝子は極めて類似した、プロプラスチドに局在するイオンチャネル分子ペアをコードしていた。プラスチドの情報伝達への関与が示されたのは始めてのことである。*Ljsym72* の原因遺伝子はカルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素をコードしており、根粒形成を始動する各種遺伝子の転写を制御するとも考えられる *Ljsym70* の原因遺伝子産物をリン酸化で活性化させている可能性が高まった。これらが根粒形成のための情報伝達のコア部分を形成するものと考えられる。ダイズでは根粒の超着生変異体 *Nts1* の原因遺伝子が、ミヤコグサの原因遺伝子 *HAR1* と共に同定され、シグナル分子受容体構造ロイシンリッチリピートを細胞外に向けて細胞表層に存在するのが示された。

■見込まれる波及効果

マメ科植物と根粒菌の両側から根粒形成の過程が解明されることにより、将来は主要作物や緑化植物等に根粒形成能を付与して、窒素肥料の欠乏や過多による食物不足や環境破壊の解決、砂漠・荒地の緑化等に寄与すると期待される。

■主な発表論文

- Imaizumi-Anraku H., *et al.* Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature Online J.* (2004 Dec.22)
- Nishimura R., *et al.* HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* 420: 426-429 (2003)
- Hayashi M., *et al.* Construction of a genetic linkage map of the model legume *Lotus japonicus* using an intraspecific F2 population. *DNA Res.* 8: 301-310 (2002)
- Kawasaki S., *et al.* Construction of high-density map, genome library, and saturation mapping of nodulation genes. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 52 Brassicas and Legumes* Ed. by Nagata T. *et al.* (2003) Springer
- Hattori Y., *et al.* Ordered cosmid library of the *Mesorhizobium loti* MAF303099 genome for systematic gene disruption and complementation analysis. *Plant Cell Physiol.* 43: 1542-1557 (2000)

■研究課題名

植物ホルモン情報伝達の分子機構解明による植物機能改変 ＝形態形成の人為的コントロールを目指して＝

■研究項目及び実施体制（◎は研究代表者）

- ① イネの草型を制御する植物ホルモン情報伝達の分子機構解明と育種への応用
（◎小松 節子／独立行政法人農業生物資源研究所）
- ② イネ矮化遺伝子の単離と機能解析および草型育種への応用
（北野 英己／名古屋大学生物機能開発利用研究センター）



小松 節子



北野 英己

■研究の目的

イネの生活環の調節に大きく関与しているジベレリンやブラシノステロイド等の情報伝達機構あるいは生合成系を、分子遺伝学的・タンパク質化学的手法、およびゲノム情報を利用することにより解明する。さらにその情報伝達系・生合成系を人為的に制御することにより、理想的な草型を持つ健全次世代型多収性イネの素材開発を目指す。

■研究の内容

イネの草型に関与するジベレリン・ブラシノステロイドに関連する突然変異体群をスクリーニングし、それらの原因遺伝子を単離し機能解明した。イネの草型制御において、ジベレリン・ブラシノステロイドの情報が受容・伝達され機能発現に至る情報伝達機構を解明した。さらに解析した植物ホルモンの情報伝達系・生合成系を人為的に制御することにより理想的な草型を持つイネ育種素材を開発した。

■主要な成果

- ① 大規模な変異集団からジベレリンおよびブラシノステロイド関連変異体を選抜した。分子遺伝学的手法によりそれらの原因遺伝子 (*gid1*, *gid2*, *slr1*, *d61*, *brd1*, *d2*) の単離・解析に成功した。
- ② ジベレリンおよびブラシノステロイドの生合成や情報伝達に関わる原因遺伝子群を単離した。中でもイネの緑の革命に貢献した *sd1* 変異体の原因となった遺伝子が、GA20 酸化酵素をコードしていることを明らかにした。
- ③ ジベレリンおよびブラシノステロイド情報伝達に関わるタンパク質遺伝子群を単離し機能発現系を解析した。特にカルシウムを介するリン酸化情報伝達系がイネの茎葉伸長・根の成長に重要であることを明らかにした。
- ④ 活性型ジベレリン分解酵素 GA2ox2 およびブラシノステロイド受容体 BRI1 をコードする遺伝子を導入した形質転換イネ「こしひかり」は、半矮性・直立葉を示した。

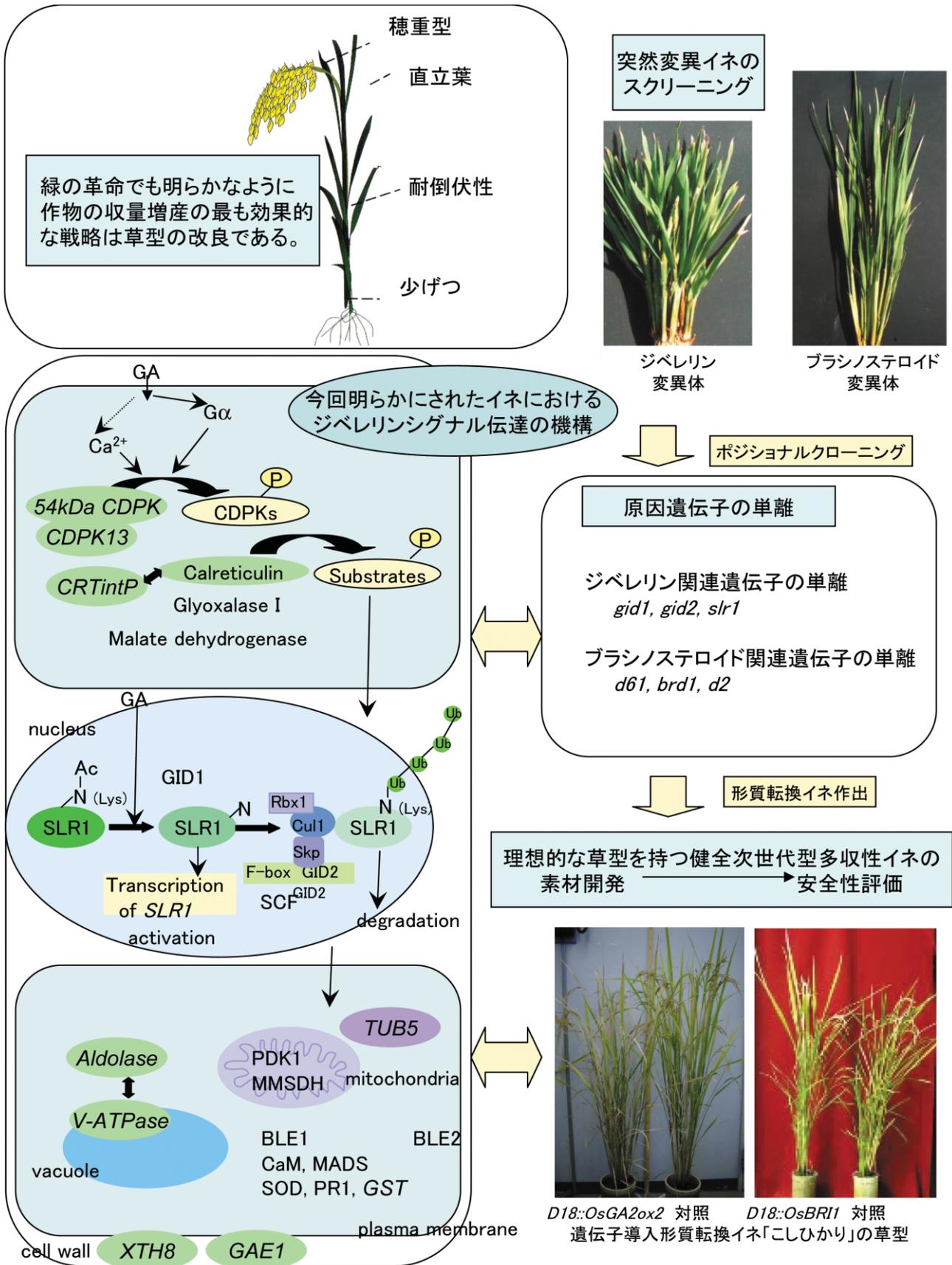
■見込まれる波及効果

従来個々の機能性タンパク質遺伝子として情報伝達機構に関与していることが報告されてきた物質の相互作用が解明されたことにより、生物学基礎研究の発展が期待される。イネの草型に関与する原因遺伝子群の単離は、今後分子育種による草型改良により、世界の食糧増産に向けて大きな波及効果を持つ。

■主な発表論文

- Ito H., *et al.* The gibberellin signaling pathway is regulated by appearance and disappearance of SLENDER RICE 1 in nuclei. *Plant Cell* 14: 1-16(2002)
- Sasaki A., *et al.* Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* 299: 1896-1898(2003)
- Sakamoto T., *et al.* Genetic manipulation of gibberellin metabolism in transgenic rice. *Nature Biotech* 21: 909-913(2003)
- Jan A., *et al.* Characterization of xyloglucan endotransglucosylase gene that is up regulated by gibberellin in rice leaf sheath. *Plant Physiol* 136: 3640-3681(2004)

■研究のイメージ



■研究課題名

生体関連触媒を用いる植物資源からの高分子新素材の創出

■研究項目及び実施体制

- ①人工木質ポリマーに関する研究
- ②ポリペプチド-ポリフェノールハイブリッドに関する研究
- ③植物油脂からの硬化性ポリマー合成に関する研究
(宇山 浩/大阪大学大学院工学研究科)



宇山 浩

■研究の目的

本研究では生物資源を出発物質に用い、生体関連触媒（酵素及び酵素モデル錯体）の特異的な触媒作用を利用した新しい高分子材料の開発を目的とする。天然資源は自然界では酵素作用により合成、変換されており、酵素触媒に対する高い反応性を有している。本研究では人工木質ポリマー、ポリペプチド-ポリフェノールハイブリッド、植物油脂からの硬化性ポリマーをターゲット材料とし、生体関連触媒作用を駆使した高分子新素材の創製、及びそれらの機能開発を検討した。

■研究の内容

生体関連触媒を用いるポリマー間酸化カップリング反応を精密制御する手法を確立し、それを異種ポリマー間の酸化カップリングに拡張することにより、バイオポリマーハイブリッドを合成する。また、ポリペプチドにフラボノイド類を酵素的にコンジュゲート化する手法を開拓し、フラボノイドの機能増幅を目指す。更に安価な植物油脂を基盤とする硬化性前駆体の酵素合成を検討し、新しい生分解性コーティング材料を開発する。

■主要な成果

- ①酵素モデル錯体を用いることにより人工グニンの酸化カップリングを制御する手法を見出し、超高分子量ポリマーを創出した。更に本手法を異種ポリマー間カップリング反応に応用し、人工木質ポリマー（右図）やポリペプチド-ポリフェノールハイブリッド合成に展開した。
- ②酸化酵素を用いてポリペプチドにフラボノイドをコンジュゲート化させる手法を開発した（右図：ポリリジン-カテキンハイブリッド）。また、コンジュゲート化によりフラボノイドの抗酸化性が増幅され、疾病関連酵素に対する阻害機能が発現した。
- ③油脂成分を側鎖にもつ硬化性ポリマーを合成し、その架橋により高性能塗膜を開発した。更に植物油脂エポキシ化物を無機化合物とナノレベルで複合化することにより、生分解性グリーンナノコンポジットを創製した。

■見込まれる波及効果

本研究で開発した高分子新材料は再生可能な天然資源を原料としているため、実用化に伴い、それらの生産に係わる農林水産業へ多大な波及効果を及ぼす。更に開発した高分子新材料には食品、化粧品、塗料、環境材料などの幅広い用途が想定される。

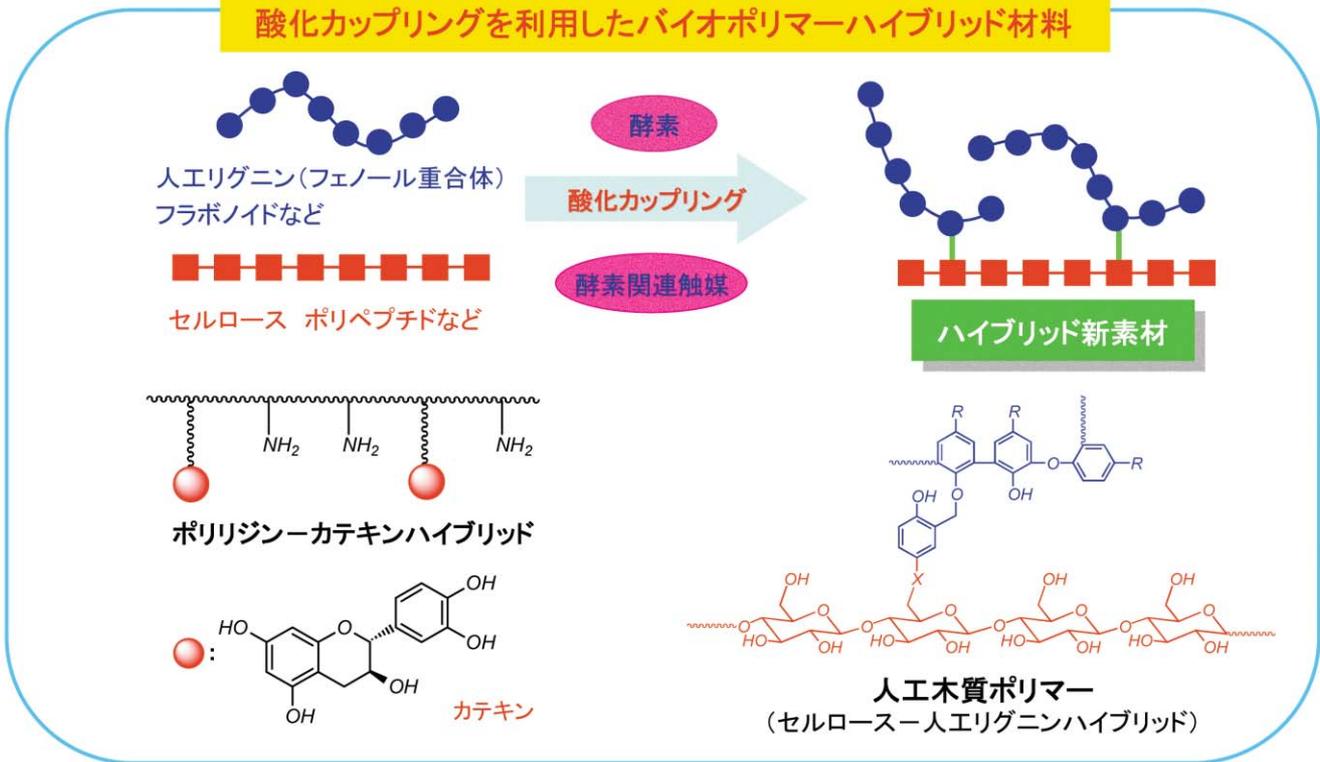
■主な発表論文

- Uyama H., *et al.* Green nanocomposites from renewable resources : plant oil-clay hybrid materials. *Chem. Mater.* 15 : 2492-2494 (2003)
- Tonami H., *et al.* Oxidative cross-coupling between phenolic polymer and phenol-containing cellulose: synthesis of a new class of artificial wood polymers. *Macromolecules* 37 : 7901-7905 (2004)
- Fukuoka T., *et al.* Synthesis of poly(amino acid)-polyphenol hybrids by oxidative cross-coupling. *Macromolecules* 37 : 8481-8484 (2004)
- Ihara N., *et al.* Amplification of inhibitory activity of catechin against disease-related enzymes by conjugation on poly(ϵ -lysine). *Biomacromol.* 5 : 1633-1636 (2004)

■ 研究のイメージ



酸化カップリングを利用したバイオポリマーハイブリッド材料



生分解性グリーンナノコンポジット



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