

日本農芸化学会中四国支部  
第3回農芸化学の未来開拓セミナー

要旨

蛋白質ループの構造と機能

日 井 隆雄 (福井県立大学生物資源学部) - 2 -

植物の受容体型キナーゼによる環境ストレス応答と生長制御

刑部 祐里子 (東京大学大学院農学生命科学研究科) - 4 -

ADME (吸収・分布・代謝・排泄) と分子モデリング

赤松 美紀 (京都大学大学院農学研究科) - 6 -

植物の活性酸素-Ca<sup>2+</sup>情報伝達ネットワークと自然免疫の制御

朽津 和幸 (東京理科大学理工学部) - 8 -

カルシウム情報伝達系解明のための分子プローブの合成

泉 実 (岡山大学大学院自然科学研究科) - 10 -

ニコチアミンの金属制御機構

高橋 美智子 (宇都宮大学農学部) - 12 -

アーキアゲノム情報を基盤とした生命科学

仲宗根 薫 (近畿大学工学部) - 14 -

アルミニウム活性化型リンゴ酸輸送体 ALMT1 の機能多様性

佐々木 孝行 (岡山大学資源植物科学研究所) - 16 -

## 蛋白質ループの構造と機能

日 井 隆 雄 (福井県立大学生物資源学部)

蛋白質の構造と機能の関係を調べると一口に言っても、蛋白質の機能が多彩であるように、その構造もまた種々様々であり、構造が決定されれば直ぐに機能解明や応用につながるというわけではない。蛋白質の二次構造は $\alpha$ ヘリックス、 $\beta$ ストランド、ループに大別されるが、なかでもループの構造は極めて複雑であり、蛋白質の構造と機能の関係について最も理解が遅れている部分でもある。筆者は、この蛋白質ループの構造と機能の関係に魅せられてこれまで研究してきた。そこで、ループに関する構造生物学的研究に関して取り組んできた事例を紹介し、実用的な蛋白質の機能改変にいかに応用するか、できれば膜蛋白質の構造解析への取り組みについても触れてみたい。

### 1) 機能性ループの構造変化が果たす役割

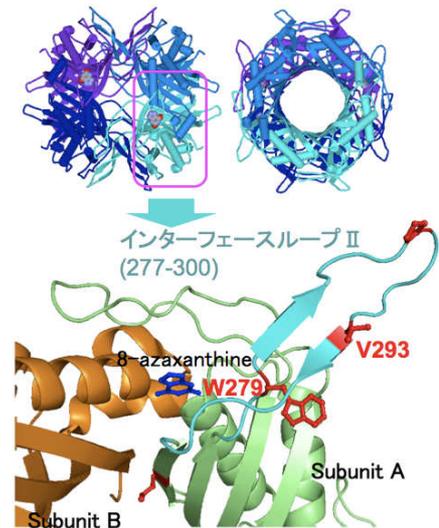
酵素ではしばしばループの構造変化が基質の認識に重要な役割をしている例が認められる。トリオースフォスフェートイソメラーゼ(TIM)は解糖系の酵素で、ジヒドロキシアセトンリン酸とD-グリセルアルデヒド3-リン酸との可逆的な変換を触媒する。本酵素の166-176残基の領域はフレキシブルループと呼ばれ、基質の結合に伴って活性中心に覆いかぶさるように閉じること(誘導適合)が示されてきた(Karplus & Petsko (1990))。この構造変化の結果、反応中間体のコンフォメーションが固定され、活性中心に侵入した水分子による加水分解を防ぐことが示唆された(Pompliano *et al.* (1990), Lolis & Petsko (1990))。同様に、グルタチオン合成酵素でもループ欠損変異体の反応速度解析やX線結晶構造解析から基質グリシンを認識するフレキシブルループ(残基226-242)が反応中間体の加水分解を防ぐことが示された(Tanaka *et al.* (1992), Hibi *et al.* (1996))。このようにループの構造変化は基質の結合と連動することで、反応中間体の保護、生成物の解離などにより酵素の反応特異性や基質特異性を高める働きをしていると考えられている。しかし、こうした機能発現にはどのようなループの構造変化が必要なのかなど、詳細は不明であり、応用に向けて解決すべき課題は多い。

### 2) 尿酸酸化酵素ウリカーゼとインターフェースループ

ウリカーゼは尿酸を酸化する酵素であり尿酸の定量分析に利用され、特に高い基質特異性をもつ*Bacillus*属細菌TB-90由来ウリカーゼ(BaUOD, EC1.7.3.3)は臨床検査薬としてこれまで用いられてきた。近年、尿酸値は生活習慣病の監視マーカーとして位置づけられつつあるため、日常生活で使えるような簡便で安価な分析手段が望まれるようになり、実際、尿酸測定用バイオセンサが最近市販された。センサ用途では熱安定性と同時に低温(25~30°C)における高い反応性も同時に求められる。BaUODの結晶構造(PDB ID: 1J2G)に基づいて、部位特異的変異による変異体について検討することとなった。

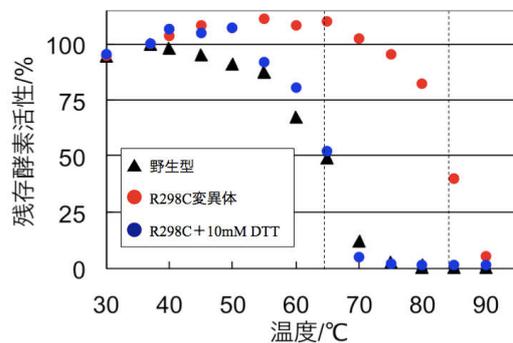
立体構造に基づいて酵素分子の触媒能や安定性を考えるとき、溶媒やリガンドとの相互作用を通じてタンパク質内部の分子運動が実際どのように変化しているかが重要となる。こう

した分子運動は、X線結晶構造解析法では温度因子として知られる原子の運動に関連したパラメータから推定することができる。BaUOD 四量体は $\beta$ バレルを構成する2つのサブユニット界面に活性中心を持ち、この活性中心 $\beta$ ストランドに連なるインターフェースループ II (残基 277-300; 右図) が4量体形成に関わっている。インターフェースループ II の領域は特に高い温度因子を示し、構造変化し易い構造であることが示唆されたことから、本ループに着目することで有用変異体酵素の作製に成功した。

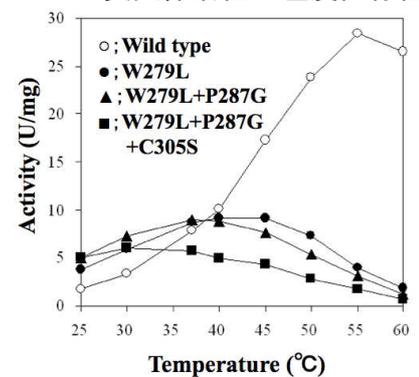


インターフェースループ II 内の Pro リッチなターン構造の中央に位置する Arg298 を Cys に置換した R298C 変異体では、加熱処理後の残存酵素活性が 50% となる温度は 85°C と野生型酵素より約 20°C 上昇し、現存するウリカーゼとしては最も高い熱安定性を示した。還元剤を添加すると熱安定性の増加は認められなくなり、Cys298 によるサブユニット間 SS 架橋の形成が熱安定性の上昇に必須であることが示唆された。一方、本ループのヒンジ部分に位置する Trp 279 の変異体やその三重変異体酵素は、熱安定性が野生型と同等以上ながら、常温における酵素活性が野生型に比べ 2 倍以上上昇し、低温反応性が高く、且つ熱安定なウリカーゼを創出し得ることが示された。

### R298C 変異体の熱安定性と SS 結合



### W279 変異体活性の温度依存性



### 3) 膜蛋白質のループ構造の重要性と構造解析へのアプローチ

貫通型膜蛋白質は極性が低いリン脂質平面二重膜内に埋め込まれるため、その二重膜内の立体構造は $\alpha$ ヘリックス構造か $\beta$ バレル構造に限定される。その結果、ループ構造は全て膜外に局在することになり、細胞内外からの刺激に伴う構造変化を伝える上で重要な役割を担っていると考えられる。しかし、結晶構造などから得られる立体構造情報の多くは、十分な高分解能が得られないものが多く、表面に局在するループ構造に関する情報が欠落しているものが多い。X線結晶構造解析を始めとして高分解能解析への取り組みは続けられているが、膜内で機能している姿を捉えるためには他のアプローチによる検証も必要となる。そこで、円二色性(CD)スペクトル測定に関する取り組みについて紹介したい。本方法は、リポソーム内に埋め込まれた膜蛋白質の二次構造情報を測定することができるが、さらに真空紫外 CD スペクトルの場合、さらに微細構造の情報を得ることが期待され、3次元構造の精密化に利用することが期待されている。

## 植物の受容体型キナーゼによる環境ストレス応答と生長制御

刑部 祐里子（東京大学大学院農学生命科学研究科）

砂漠化の進行などの地球規模の環境悪化が大きな問題になっている。さらに、爆発的な人口増加に対して、劣化した農地の増大などの状況下での食糧増産は解決すべき重要な課題となっている。地球上の生物にとって、水は組織や細胞、細胞膜やタンパク質構造の維持や代謝反応に欠かすことが出来ない生命の根源である。水が失われると生物はその極限状況に適応するか、またはストレスの強度によっては死に至る。水分の不足に対する応答性や適応反応は生物によって異なっている。植物は動くことが出来ないため、このような環境ストレスに対して生き延びるため、生命維持のためにどう対応するかというストレス耐性・適応機構が進化的に発達してきた。植物の乾燥や高塩ストレスに抵抗し生命を維持する分子機構は何だろうか。植物では、種子や花粉が常に乾燥にさらされており、これらは適切に水分が与えられれば即時に生長発達を開始する。このような種子の発芽、発生および花粉形成等に関わる機構と、成熟した植物が乾燥ストレスに適応し耐性を獲得する機構とは密接に関係していることが分かってきた。さらには、最近の研究から、乾燥と高塩条件に対する応答反応には高い類似性があることが分子レベルで明らかにされている。高塩ストレスは乾燥ストレスと共通して水ポテンシャルの低下を伴い浸透圧ストレスとして植物細胞に感知される。近年、植物に本来備わっているストレスに対する適応機構で働く遺伝子が明らかになり、これらの遺伝子を植物中で強化させたり適切に稼働させたりすることで、植物の環境ストレス耐性が向上することが示された。これらの手法を作物に応用することで、今後の地球環境の悪化に対応する環境ストレス耐性作物が開発できると期待されている。近年の植物ゲノム科学研究の進展により、乾燥や高塩ストレスによる特異的遺伝子発現（トランスクリプトーム）やタンパク質発現（プロテオーム）や代謝産物の変化（メタボローム）を植物ゲノム全体で比較することが可能になり、これらの解析から耐性獲得で働く主要な遺伝子群が明らかにされつつある。さらに、植物が水分ストレスを制御するシグナル伝達因子として、タンパク質のリン酸化および脱リン酸化が非常に重要であることが知られている。水分ストレス時に働く植物ホルモンのアブシジン酸（ABA）は、乾燥などの水分ストレスに応答し植物体内に合成される植物ホルモンの一種であり、種子休眠や気孔の閉鎖などの誘導や、水分ストレス耐性に関与する遺伝子の発現を誘導する。最近、ABA受容体が最近単離され、ABAシグナル伝達に関わる重要なプロテインキナーゼおよびフォスファターゼの機能制御を行うことが示された。

植物の受容体型キナーゼは、動物のホルモンレセプターに類似の構造をしていることから名付けられている。つまり、ロイシンに富んだ繰り返し配列構造等の細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内キナーゼドメイン構造を持ち、細胞外の情報を細胞内へ伝達していると考えられている。シロイヌナズナには600種類以上の受容体型キナーゼが存在しており、様々なシグナル伝達経路に関わっている。水分ストレスのシグナルは細胞の外環境において生じ、細胞膜はストレス感受の重要な部位である。我々は、シロイヌナズナの水分ストレスに関わる細胞膜局在型受容体型キナーゼの研究を進めており、乾燥ストレス・ABA応答に関与する因子の一つとしてRPK1遺伝子を単離している。RPK1タンパク質を高濃度に蓄積する過剰発現植物を作出し乾燥への耐性

を解析した結果、RPK1遺伝子破壊株は乾燥ストレスに対し弱い一方、RPK1過剰発現植物はストレス耐性能が向上することが明らかになった。さらに、RPK1過剰発現植物はABAへの感受性が上昇し、気孔の閉鎖が素早く起こっていることで、植物体内の水分の損失を防いでいることが分かった。このことは、植物細胞中に高濃度に存在するRPK1タンパク質が関与する情報伝達の増強が行われ、ストレスシグナルが下流因子に強く伝達されたことによるものと考えられた。RPK1過剰発現植物のマイクロアレイ解析の結果、多数のストレス耐性獲得に働く遺伝子が強く発現しており、キナーゼ不活性型RPK1タンパク質の過剰発現植物では以上のような表現型は見られなかった。マイクロアレイ解析で明らかになった遺伝子には、生物において様々なストレスなどの二次メッセンジャーとして働く活性酸素種（Reactive Oxygen Species; ROS）に応答する遺伝子が多く含まれており、さらに、RPK1過剰発現植物では、ROS除去に働くスーパーオキシドジスムターゼ活性が上昇していた。酸化ストレスは植物の生産性を強く抑制するが、RPK1過剰発現植物では酸化ストレスそのものに対しても高い耐性能を示した。RPK1はROSの生成の調節を行うことで乾燥ストレス/ABAシグナル伝達経路に働くことが明らかになった。一方で、RPK1がシロイヌナズナの胚形成に関わる受容体であることが最近示されている。植物の生長を制御する植物ホルモンの1つであるブラシノステロイドの受容体、受容体型キナーゼBRI1は別のタイプの受容体型キナーゼBAK1と受容体複合体を形成しブラシノステロイドシグナル伝達を制御することが示されているが、最近BAK1は病害応答性のシグナル伝達や、細胞死にも関わる多機能性の受容体であることが分かってきた。以上のように、細胞外環境を認識する受容体型キナーゼの中には、受容体複合体を形成するだけでなく、それ自体が様々な機能を持ち、植物の生老病死に多岐に関わっているシグナル伝達制御因子であるものが存在することが明らかになってきている。これらの因子が関わるシグナル伝達経路を効率よく制御することが出来れば、植物の生長とストレス耐性の両方が向上した作物作出の応用研究が期待できるかもしれないと考えている。

<学生の皆さんへ>一つのものをやり遂げようと決めたならば、途中で決してあきらめず手放さず、しつこいぐらいにやってほしいと思います。成功や成果を急がずに「雨垂れ石を穿つ」です。

## ADME(吸収・分布・代謝・排泄)と分子モデリング

赤松 美紀 (京都大学大学院農学研究科)

ADME ということばはあまり聞き慣れないかもしれないが、Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion(吸収・分布・代謝・排泄)の略である。すなわち、ヒト体内における化学物質の動態を表している。私たちは日常生活の中でさまざまな化学物質に曝露されており、それらの中には人体にとって有害なものが存在する。化学物質のリスク評価を行うには、化学物質の動態、すなわち、ADME を知ることが重要になる。身の回りの化学物質がどの程度体内に吸収されるか、吸収後、どの程度体内の標的部位に分布するか、どの程度体内で代謝されて無害な物質に変換するか、どの程度体外へ排泄されるかということがわかれば、私たちの体内における化学物質の曝露量を見積もることができる。「リスク」は化学物質そのものの毒性と曝露量によって決まることから、曝露量を予測することができれば化学物質のリスク評価に役立つ。

一方、創薬の分野でも ADME は重要視されている。新しい医薬や農薬を創製するとき、良く効く、すなわち、高活性の化合物を目指さなければならないのはもちろんだが、例えば医薬を例にとると、いくらその薬の効果が高くても、薬を飲んだときに体内に吸収されなければ効くはずがない。体内に吸収されても、体内で簡単に代謝分解されたり体外へ排泄されてしまっては仕方がない。以前は高活性化合物を見出した後でその化合物の動態を調べていたため、動態の問題で医薬にならなかった例が多数を占めていた。このことから、最近では医薬の候補化合物を合成する前にコンピューターを用いて、その化合物の動態を予測する研究が盛んである。

私たちの研究グループでは、「定量的構造活性相関(Quantitative Structure-Activity Relationship: QSAR)」や「分子モデリング」の手法を用いて、ADME 予測を試みている。QSAR とは一連の化学物質の化学構造とその化学物質が与える生理活性強度との間の関係を、論理的モデルを設定してそのモデルに基づいて解析する手法である。また、分子モデリングとは分子力学、分子軌道、分子動力学法などの手法を用いてコンピューター上に化合物分子の推定三次元構造を作成することである。低分子だけでなく、タンパク質など高分子の構造作成も可能で、新規医薬のドラッグデザインなどに広く利用されている。私たちは、まず、化学物質がどの程度体内へ吸収されるかを評価するために、人工脂質膜を用いたアッセイ系により、化学物質の受動的膜透過性を測定し、その透過性を予測する QSAR モデル式を導いた。そして、人工脂質膜透過性からヒトへの経口吸収性を予測する手法を確立した。現在は、ヒトの代謝酵素 Cytochrome P450(CYP)と農薬との相互作用、および異物排出ポンプである P-糖タンパク質(P-gp)と化学物質との相互作用について検討している。P-gp は抗ガン剤の多剤耐性にも関わっており、輸送基質を認識すると ATP を加水分解し、生じたエネルギーにより自らの構造を変えて基質を細胞内から細胞外へ排出する。このとき、ATP 加水分解活性(ATPase 活性)と基質の輸送性との間には相関関係が認められている。私たちは、化学物質が P-gp の基質になり得るかどうかを評価するために ATPase 活性と化学物質の立体構造との

間の関係を QSAR 手法により解析し、P-gp の基質結合部位についての情報を得た。近年、ラット P-gp の結晶構造が報告されたため、それとのホモロジー(アミノ酸配列類似性)を元にしてヒト P-gp の構造をモデリングし、基質となる化学物質がどのように結合するかについて検討を重ねている。また、ヒト CYP にはさまざまな分子種が存在するが、各分子種が認識する基質の化学構造はそれぞれ異なっている。私たちは、いくつかの CYP 分子種を用いて、実際にある農薬を代謝させて得られた代謝物構造を同定した。その実験結果を予測するため、CYP の分子モデリングおよび化学物質のドッキングを行い、それぞれの CYP の基質認識機構を解明しようとしている。これらの結果について講演する。



図 左：ヒト CYP3A4 と erythromycin との複合体(結晶構造)  
右：ホモロジーモデリングによる P-糖タンパク質の構造

<学生の方へ>

私たちのグループは、コンピューターを使ってタンパク質のモデリングや構造活性相関解析を行っていますが、コンピューター計算だけですべてがわかるはずはなく、実験結果があってこそ、計算が生きてくるのだと思っています。従って、私たちは、まず、実験を行ってデータを出し、そのデータを解析して仮説を立て、その仮説を立証するためにコンピューター計算を用いるという研究方法をとっています。確かに最近のコンピューターの進歩はめざましく、素早く計算が行われて美しい図が表示され、人目を引きませんが、それも地味な実験データに裏打ちされるからこそ役立つのだということは忘れないで下さい。すなわち、研究を行うというのは決して格好良いものではなく、地味な努力が大半を占めているということです。実験がうまくいかず、長い間思わしい結果が得られないことも多々あります。でも、それだけに何らかの結果が得られたときの喜びは大きく、次のステップへの弾みとなるのです。

私自身を振り返ってみると、ここまで続けてこられたのは、今、行っている研究が「好き」だからです。何事も「好き」でなければ続かないと思います。皆さんも研究に限らず、好きなことを見つけて進んでいって下さい。

# 植物の活性酸素-Ca<sup>2+</sup>情報伝達ネットワークと自然免疫の制御

朽津 和幸（東京理科大学理工学部）

植物は、動物のように移動して不利な環境から逃げる代わりに、悪環境や外敵から自分を守る巧妙な仕組みを進化の過程で獲得して来た。私たちは、植物培養細胞が病原菌由来の感染シグナル分子を認識し、自律的な細胞死や抗菌性物質の合成を含む防御応答を誘導するモデル実験系を構築し、植物が誘導する免疫・生体防御系の制御機構を解析して来た[1-2]。感染シグナルの認識に伴い、膜電位の脱分極や、特徴的なパターンを示す Ca<sup>2+</sup>の動員と活性酸素種(ROS)の生成が誘導され、Ca<sup>2+</sup>と ROS が生体情報の担い手として、防御応答の制御に重要な役割を果たすことが明らかとなりつつある。

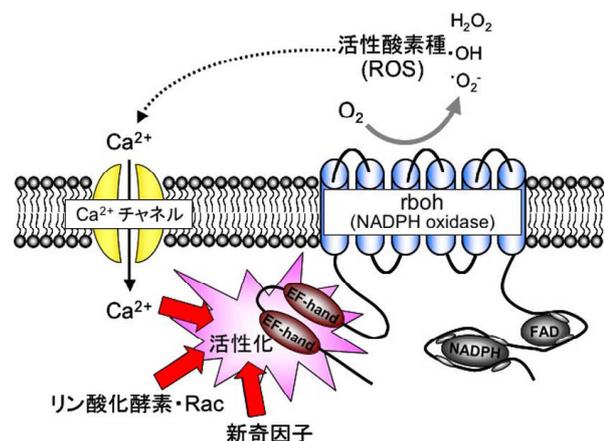
## 1. Ca<sup>2+</sup>を介した情報伝達の分子機構

細胞質の Ca<sup>2+</sup>濃度は通常低く保たれており、細胞膜や細胞内膜系の Ca<sup>2+</sup>チャネルの活性化に伴い、Ca<sup>2+</sup>濃度の時間的・空間的変動が誘導されると考えられる[3]が、その分子機構はほとんど解明されていない。膜電位センサードメインを持つイネの陽イオンチャネル候補因子 OsTPC1 の過剰発現株と機能破壊株を用いた解析から、この因子がMAPキナーゼカスケードの活性化やプログラム細胞死の誘導を含む Ca<sup>2+</sup>を介した自然免疫応答の調節因子として重要な役割を果たす可能性が示唆された[4]。

植物のゲノム中には、哺乳動物以上に多様な EF-hand 領域を持つ Ca<sup>2+</sup>センサータンパク質が存在する。calmodulin (CaM)は、ヒトに 1 種類しか存在しないが、植物にはアミノ酸配列の異なる 3 種が存在し、機能分担し、生体防御系においても重要な役割を果たす[5-7]。さらに最近私たちは、動物の calcineurin の Ca<sup>2+</sup>センサーサブユニットと相同なイネの CBL 及び、それと特異的に相互作用するプロテインキナーゼ CIPK が、抗菌性物質の合成を含む感染防御応答の制御に重要な役割を果たすことを見出した[8]。

## 2. 活性酸素種の積極的生成と情報伝達

植物は、呼吸に加えて光合成の際にも副次的に大量の ROS が生成されるため、多種の ROS 消去系を発達させている。その一方で、形態形成・生体防御応答・環境ストレス応答など多様な局面において、NADPH oxidase 等の酵素により、シグナル分子として ROS を生成する。両刃の剣とも言える ROS の積極的生成系は、時間的・空間的に厳密に制御されていると考えられる。モデル植物シロイヌナズナには 10 種もの NOX/rboh 遺伝子が存在する。私たちは、異種発現系を構築し、AtrbohC, D が ROS 生成能を持ち、Ca<sup>2+</sup>とリン酸化により相乗的に活性化されることを明らかにした[9-10]。すなわち ROS 生成酵素が、一種の Ca<sup>2+</sup>センサータンパク質として機能すると考えられる。また種々の植物細胞には、ROS によって活性化される Ca<sup>2+</sup>チャネルが存在する。生成と Ca<sup>2+</sup>動員とが相互に正の feed back 制御を受け、Ca<sup>2+</sup>-ROS シグナルネットワ



ークを形成するとモデルを提唱した[10-12]。こうした仕組みは、感染防御応答、環境ストレス応答や、根毛の先端成長[10]に代表される発生・形態形成の制御など、植物のさまざまな局面において重要な役割を果たすと考えられる。

### 3. 植物の情報処理システムの解明に向けて

生命の歴史の中で生物は多様化し、動植物は共通の祖先からそれぞれ独自の戦略を採用して高度な進化を遂げて来た。これまで動物、植物、微生物は、それぞれの専門家によって独立に研究される傾向にあった。しかし近年、ヒトのゲノムと並行してシロイヌナズナやイネ等の高等植物のゲノムが解読されるなど、ゲノム解析が急激に進展した結果、ゲノム情報を多様な生物間の架け橋として利用することにより、研究成果を統合し、遺伝子機能の研究に新しい光を当てることができる時代が到来した。すなわち、生命科学は、情報科学の技術を活用して、細分化されたさまざまな分野が新たに統合される時代を迎えつつある。

植物においても、情報の処理・伝達を担う分子やその生成・制御の素過程が急速に明らかにならつつある。植物は、脳のような中央統御型情報処理システムを進化させて来なかったが、環境変化を巧みに察知して、自らの体を移動させることなく自分の体を再構築して適応するという独自の情報処理システムを進化させて来た。素過程の知見に基づいて、植物の情報処理ネットワークの全体像を構築する研究を推進することが今後の大きな課題であり、環境・食糧問題の解決を目指して、植物の耐病性、環境ストレス耐性を高め生産力を向上させる新世代の植物バイオテクノロジーを展開する上でも重要な基礎となろう。

#### 参考文献

- [1] Kadota *et al.*, *Plant J.* 2004; [2] Kadota *et al.*, *Plant Cell Physiol.* 2004; [3] 来須 *et al.*, **植物の生長調節** 2007; [4] Kurusu *et al.*, *Plant J.* 2005; [5] Karita *et al.*, *Plant Cell Physiol.* 2004; [6] Katou *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2005; [7] Takabatake *et al.*, *Plant Cell Physiol.* 2007; [8] Kurusu *et al.*, *Plant Physiol.* 2010; [9] Ogasawara *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2008; [10] Takeda *et al.*, *Science* 2008; [11] 武田 *et al.*, **細胞工学** 2008; [12] 賀屋 *et al.*, **実験医学** 2009.

#### 元気先生がゆく

くちつ かずゆき  
朽津 和幸 先生

(理工学部 応用生物科学科 教授)

「20世紀は主に医学、薬学分野で生物学が応用されてきましたが、21世紀は環境、食糧の分野で人類は大きな問題に直面することになります。植物の“生き様”の仕組みを解明することは、その解決に絶対に必要なことです」。

理工学部応用生物科学科の朽津和幸先生が、20年にわたって研究してきた分野が“植物”だ。動物に比べて劣っているとさえ思われがちな植物だが、移動せず、大地に根をおろして生きるため周囲の環境の変化に対する適応力には並大抵ではないものが隠されている。

免疫もそのひとつだ。ウイルスやバクテリア、カビなどから攻撃を受けた時、植物には敵もろともひとつの細胞を“自殺”させて被害を封じ込める仕組みがある。その情報は他の部分にまで伝えられ、二度目の攻撃にも備えるのだ。

植物には、光を追いかける“視覚”も、ガスに反応する“嗅覚”も、触れられると反応する“触覚”もある。朽津先生が、動物の神経で情報伝達するのと似た電位の変化を植物で見つけたのは、農林水産省農業生物資源研究所（現在は独立行政法人）の研究員時代のことだった。以来、研究を深め、植物の情報伝達にカルシウムイオンと活性酸素が深く関わっていることを突き止めた。互いを制御する情報ネットワーク仮説を提唱し、さらなる解明に挑んでいる。

直接、携わるのは基礎研究だが、常に念頭にあるのはその先の応用だ。情報が集中する東京と、大規模な実験が可能なつくばの間にある、理科大野田キャンパスの立地を活用。各機関との連携を深め、環境問題や食糧問題の解決に植物の力を活用することを構想している。

学生たちの教育にも、研究への取り組みはもちろんだが、実社会でリーダーシップを発揮できるように知財、技術経営、科学コミュニケーション等を学ぶことを奨励したり、他の分野の専門家はもちろん、企業や公務員など日本の科学技術の方向を決める人たちとの公流の場も積極的に設けている。

研究と教育に加え、もうひとつ、朽津先生が重視するのが社会との関わりだ。現在、理科大として初めて文部科学省の研究振興局で学術調査官を兼務し、国の研究費の配分などについて研究者の立場からアドバイスをを行っている。サイエンス夢工房や親子科学教室に参画し、子どもたちや一般の方々に科学に興味を持ってもらうことも、社会との関係を重視する現れた。「自分の遺伝子DNAを蛍光顕微鏡で覗くと、誰もがその美しさに驚きます。遺伝子組換えにはまだまだ多くの誤解がありますが、安全性をさらに高め、役立てていくためにも研究を重ねなければなりません」。

研究、教育、そして社会貢献。3本柱を土台に、日本の科学の樹を大きく育てようとしている。 (山本 明文：ライター)



「日本の植物研究は世界でもトップクラス。基礎研究から応用まで密な連携が欠かせない」と語る朽津先生



学生たちは研究に打ち込むと同時に、将来、社会でリーダーシップを発揮できるように鍛えられる。

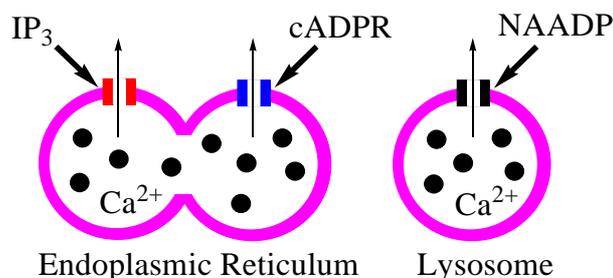
科学フォーラム(2009)より

## カルシウム情報伝達系解明のための分子プローブの合成

泉 実 (岡山大学大学院自然科学研究科)

<研究背景>カルシウム (Ca) は骨格の構成要素としてだけでなく、ホルモン分泌や神経伝達物質の放出、筋収縮、受精、発生など様々な生理機能の調整において重要な役割を担っている。カルシウムイオンは細胞内液には殆ど存在せず、細胞外からのカルシウムイオンの流入や、細胞内の小胞体に蓄えられたカルシウムイオンの放出は、様々なシグナルとしての生理的機能がある。

生体内でカルシウムイオンの放出を誘導するセカンドメッセンジャーとしてイノシトール三リン酸 (Inositol triphosphate, IP<sub>3</sub>) やサイクリック ADP リボース (cyclic Adenosine dipshosphate ribose, cADPR) が知られているが、NAADP (Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate) が IP<sub>3</sub> と同じくセカンドメッセンジャーとして働いていることが近年分かった。Lee らは、NAADP が IP<sub>3</sub> とは異なる機構でカルシウムイオン放出を誘導していることを発見した。さらに植物や動物においても NAADP がカルシウムイオン放出を誘導していることが明らかになった。また、NAADP はリソソームにおけるカルシウムイオン放出を誘導していることも明らかになった。しかしながら、そのメカニズムや機能などまだ解明されていない点が多い。



<研究内容>メカニズムや機能を解明するためには、作用する化合物をまず見つけ出す必要がある。それをリード化合物と言う。数十年前の研究では、そのリード化合物を自然界から地道な作業で探索することが主流であった。近年、分子生物学やその周辺の研究の進歩により、コンピューターを用いることによって、化合物の構造を推定・探索できるようになった。これをバーチャルスクリーニングと呼んでいる。本研究では、コンピューターによる分子設計で推定した NAADP の 3 次元構造と類似した立体構造を持つ化合物群をライブラリーから検索し、それらをスクリーニングすることで NAADP のアンタゴニストである Ned-19 を発見した。ここで、Ned-19 は分子内に 2 ヶ所の不斉中心を持つため、実際には 4 種の異性体が存在する (図 1)。市販の Ned-19 はジアステレオマー混合物であった。そこで、この 4 種を作り分け、それらの活性と作用機構の詳細を調べることにした。

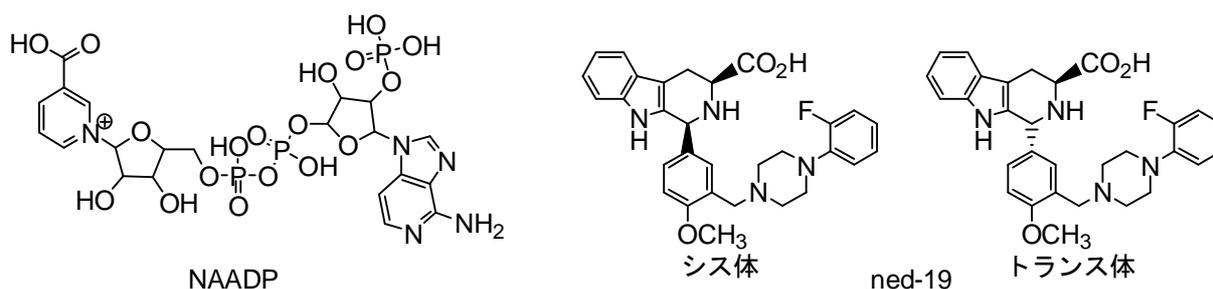


図 1 NAADP (Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate) と ned-19 の構造

すでに報告した Ned-19 の合成ルート<sup>(1)</sup> では、副生成物が多く目的物の精製が困難で、収率が低いという問題点があった。そこで、自動合成装置 Nautilus2400 を用いて種々の条件検討を行い、合成ルートを改善した。鍵反応である Pictet-Spengler 反応の反応溶媒を DMF からジクロロエタンに変更することで反応の後処理の簡便化を図った。また、予め **2** とピペラジンをを用いて **4** を合成し、**4** と **1** から **5** を合成することによって、副生成物が少なく、より効率的に **5** を得ることが出来た (図 2)。

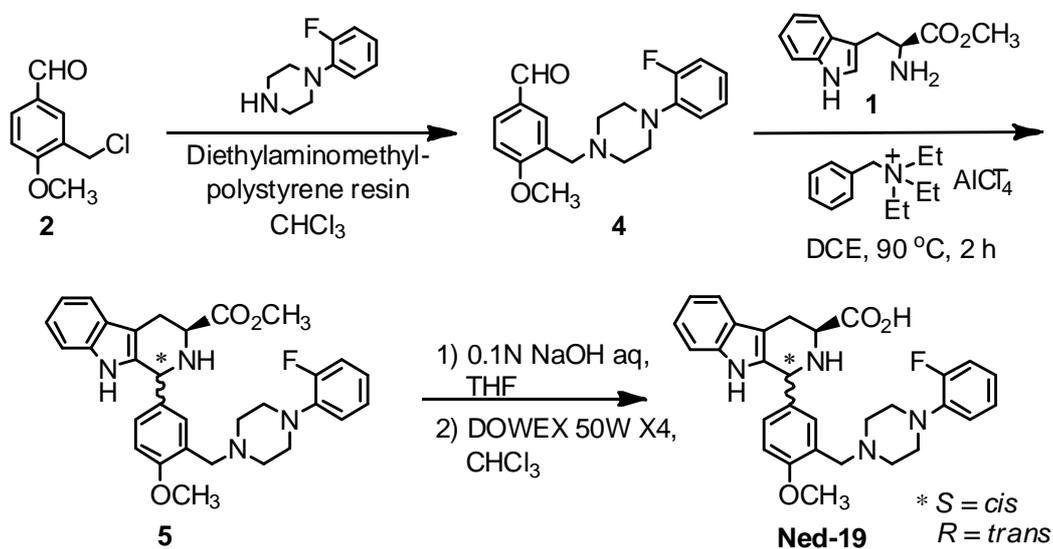


図 2 Ned-19 の合成経路

合成した Ned-19 の立体異性体を用いて、ウニ卵におけるカルシウムイオン放出誘導の検討を行なった。この結果と立体的な相同性から、その生理活性は L-トリプトファンを基質として合成したトランス体の Ned-19 が最も強い NAADP アンタゴニスト活性を有することがわかった。また、**5** や Ned-20 (Ned-19 のオルト位にあるフッ素がパラ位についた化合物) を用いたアッセイにより、NAADP 受容体には 2 つの結合部位があることが示唆された<sup>(2)</sup>。NAADP 受容体や NAADP の機能について更なる知見を得るために、Ned-19 構造の一部を改変した誘導体を合成し、その活性を現在評価中である。

- (1) Identification of a Chemical Probe for NAADP by Virtual Screening, E. Naylor, et al., *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 220-226 (2009)
- (2) Analogues of the nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) antagonist Ned-19 indicate two binding sites on the NAADP receptor, D. Rosen, et al., *J. Biol. Chem.*, **284**, 34930-34934 (2009)

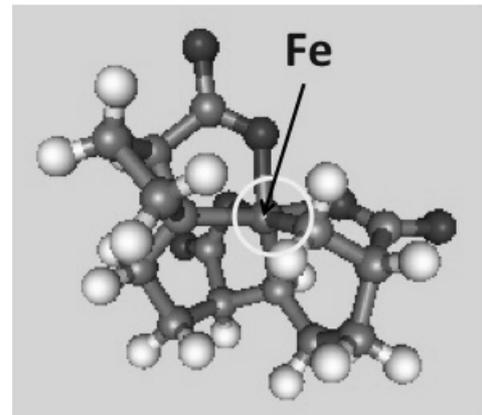
<あとがき>

研究を続けていく際に、重要だと思ふのが「コネ」だと思います。「コネ」と言うと聞こえが悪いですが、「人脈」と言い換えれば、その重要性は理解していただけたと思います。私自身も研究を進める上で、多くの共同研究者や友人の協力がなくては、良い仕事が出来ないと実感しています。当然ながら、コネとして、指導教員として、私を選んでくれた学生にも感謝しなければなりません。

## ニコチアナミンの金属制御機構

高橋 美智子 (宇都宮大学農学部)

ニコチアナミン(NA)は植物が作る化合物であり、Fe(II), Fe(III), Cu, Mn, Zn, Niなどの金属元素を結合することができる金属のキレーターである。右図はNAがFe(III)イオンを結合する分子モデルである。NAはこのような金属錯体を形成して植物体内の輸送を行うと考えられている。一方で、NAから作られるムギネ酸という金属のキレーターはイネ科植物のみで作られ、Fe(III)を結合できる。NAは植物体内における金属移行に関わり、体外には分泌されないが、ムギネ酸はイネ科植物の根から分泌され、土壤中の鉄を結合しムギネ酸鉄として再度根から取り込まれる。NAはメチオニンを出発物質とし、3分子のs-アデノシルメチオニン(SAM)からニコチアナミン合成酵素(NAS)によって作られる。また、ムギネ酸はNAを基質とするニコチアナミンアミノ基転移酵素(NAAT)とデオキシムギネ酸合成酵素(DMAS)によって作られる。

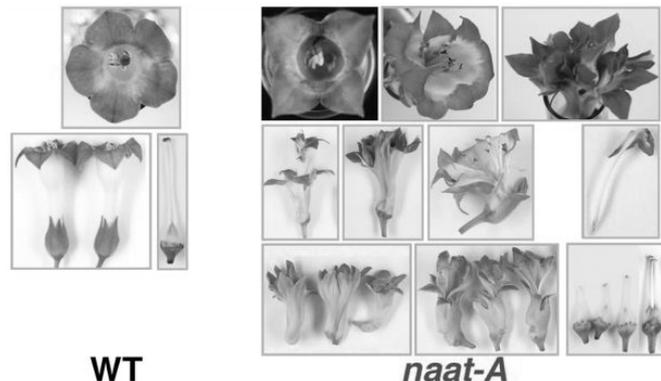


NAFe(III)の分子モデル

高等植物におけるNAの役割のうち、本セミナーでは以下のような機能を紹介する。

### 【NAと生殖生長、および種子成熟】

NAは花器官や種子の形成・成熟に必要であり、特に鉄や亜鉛を輸送に重要な役割を果たす。NAを基質とするNAATの遺伝子をタバコで過剰発現するとNA濃度が検出限界以下になり、花や新しい葉の鉄や亜鉛の濃度が低下し、正常な花器官や種子が形成されない。逆にNAをたくさん作るタバコでは種子の鉄・亜鉛濃度が上昇する。これはイネにおいても同様で、NAを過剰に作るイネは種子の鉄、亜鉛濃度が増加する。



### 【NAと金属過剰ストレス】

NAは植物の重金属過剰ストレス耐性に重要な役割を果たす。NAを過剰に合成するシロイヌナズナやタバコは特にニッケル過剰に顕著な耐性を示す。



参考文献

Masuda H., et al. Overexpression of the barley nicotianamine synthase gene HvNAS1 increases iron and zinc concentrations in rice grains. *Rice* 2: 155-166 (2009)

Takahashi M., et al., The role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant re-productive development. *Plant Cell*, 15: 1263-1280 (2003)

## アーキアゲノム情報を基盤とした生命科学

仲宗根 薫 (近畿大学工学部)

「アーキア」を研究材料にする研究上の大きな意義は何だろうか？研究成果は、周辺の生物学にどのようなインパクトを与えることができるだろうか？アーキアは、真正細菌や真核生物とは独立に進化した生物ドメインであり、他のそれぞれのドメインとの共通の特徴に加えて、アーキア特異的な代謝経路や生体構成物質の存在などから、生理、生化学的な興味が尽きない。多くのアーキアにおいては既に全ゲノム情報が解析されており、現実のアーキア研究は「Genome-based molecular biology」と呼ぶにふさわしい段階にあるといえる。比較ゲノム解析に基づく多方面の研究の進展の中で、遺伝情報伝達系という基本生命過程では、アーキアにおける関連分子は、真核生物型でありながら、装置としては非常に限定されたシンプルなシステムを構成し、真核生物基本素過程の源流をなすものとして捉えることが明確になってきた。そこで本セミナーでは、高度好塩性微生物を研究材料として取り上げ、基本的な微生物学的特徴の概観から、転写、翻訳、進化、新しいバイオテクノロジーのあり方に関する話題を提供し、アーキア生化学・分子生物学の今後の行方を議論したい。

### 話題1：高度好塩性微生物の特性

微生物は、その成育に対する食塩の濃度の影響により幾つかに分類され、2.5Mから5.2M NaCl（飽和）（13-27%）がその成育の最適塩濃度であるものは、高度好塩微生物と定義される。これら微生物は分類系統学的に見た場合、殆どがアーキアに属し、高度好塩性アーキア（extremely halophilic archaeon）と呼ばれることが多い。ここでは生育の至適塩濃度が20%の *Haloarcula*属に分類される、高度好塩アーキア *Haloarcula japonica* TR-1株を研究材料として取り上げる。

### 話題2：高度好塩性アーキア *H. japonica* の全ゲノム解析

これまで本菌株全体をシステムティックに理解するためのゲノム情報解析の基盤整備は行われてきていなかった。そこで我々は、高度好塩性アーキアのゲノム情報に基づく様々なレベルでの研究の基盤形成、またゲノム資源としての潜在性を最大限に利用する目的で、*H. japonica*の全ゲノムを解析した。*H. japonica* TR-1株の染色体DNAよりショットガンライブラリーを作成し、8x程度のcoverageでシーケンシング、Phred/Phrapによるアッセンブル、その後、様々なリピート解析によりゲノム配列のフィニッシングを行い、約4.2Mbのゲノム配列情報を得た。さらにIn silico MolecularCloning Genomic Edition (imcGE)ソフトウェアによりアノテーションを行った。全ゲノムを解析の結果、5つのレプリコン(3.0Mb, 613kb, 506kb, 95kb, 51kb),約4,057の遺伝子の存在が示唆された。既にゲノム解析の終了している *H. marismortui* と TR-1株とは同属であるばかりでなく、16SrDNA解析からはお互いに非常に近縁であることが明らかであるものの、レプリコンの数(8レプリコン)は異なり、また最大のレプリコンにお

る必須遺伝子群に関してはオペロン構造の保存性が高いことが確認されたが、それ以外のレプリコンの遺伝子組成はお互いに異なるものが多く観察された。

### 話題3：高度好塩性アーキアの遺伝子情報発現システムの特徴

好塩微生物の持つ遺伝子の中には、高濃度の塩存在下で制御されるものの存在が示唆されているが、その詳細な研究例は少ない状況にある。このような背景から、好塩微生物の遺伝子発現機構の解明とその応用を目指し、そのスタートとしてRNAポリメラーゼ及び基本転写因子であるTBP遺伝子群のクローニングを開始した。本研究では試験管内再構成も視野に入れ、これら遺伝子群の大腸菌における高発現も行った。これまで本菌株のRNAポリメラーゼは10種以上のサブユニットから構成されていることを確認しており、これらの構造解析及び高発現を行った。一方、基本転写因子であるTBPは本菌株ではゲノム上に6コピー存在し、アミノ酸配列の相同性解析から好塩性アーキアにおいて共通に見いだされるTBPを確認した。また、TBP破壊株を作成しその生育を確認したところ、野生株と比較し破壊株は生育の遅延が観察された。

リボソームは、rRNA (*rrn*オペロン) とリボソームが蛋白から成る巨大核酸-蛋白複合体であり、通常各々の微生物はその細胞中にたった1種類のrDNA塩基配列が存在する。ところが高度好塩性アーキア (extremely halophilic archaeon) の一つ、*Haloarcula*属アーキアの中には、2種類の16SrDNA塩基配列が観察される種が明らかにされてきており、このことから*Haloarcula*属アーキアは、細胞中に複数のリボソームを有することが考えられる。これは、高度好塩性アーキアの細胞内で複数のリボソームが進化的なスケールの時間を通し作り上げてきたものであり、高度好塩性アーキアリボソームの研究を通し、自然が行ったリボソームの改変作業を垣間見ることができないかと思われる。我々は*Haloarcula japonica* TR-1株を研究材料として選択し、本菌株の有するリボソームの多様性に関する分子生物学的研究を通し、蛋白合成装置の進化の考察と、蛋白合成装置改変の可能性を探る「リボソーム工学」の創成を最終目標としている。サザン解析などにより、*H. japonica*は、複数の*rrn*オペロン、*rrnA*と*rrnB*の2種の*rrn*オペロンの存在を確認し、本菌株の16S、23S、5SrRNA遺伝子を含む*rrn*オペロンの構造解析を行った。さらに、ダブルクロスオーバーで相同組換えが可能な遺伝子破壊用ベクターpDRBを構築し、*H. japonica*に導入することで*rrnB*破壊株を得た。

## アルミニウム活性化型リンゴ酸輸送体 ALMT1 の機能多様性

佐々木 孝行（岡山大学資源植物科学研究所）

【はじめに】世界の農耕可能地の 30~40%を占める酸性土壌では、アルミニウム (Al) イオンが毒性を示すために植物の生育は抑制される。特に Al イオンに直接さらされる根において顕著な阻害がみられる。このような Al 毒性に対して多くの植物が多様な耐性機構を進化させ、酸性土壌で生育している。植物が持つ Al 耐性機構の一つに、根からの有機酸放出があげられる。有機酸は Al とキレートし、Al を無毒化する。1993 年にオーストラリアの研究者らが、Al 耐性の異なるコムギ準同質遺伝子系統の ET8 (Al 耐性) と ES8 (Al 感受性) における耐性の差が根端特異的なリンゴ酸の放出であることを実験的に証明した。ここで報告された準同質遺伝子系統は、Al 耐性品種を供与親とし、感受性品種を反復親として数回の戻し交雑を行うことによって作られたもので、ALMT1 の発見につながった極めて重要な研究材料となった。彼らのグループはさらに詳細な解析を行い、リンゴ酸がアニオン輸送体を介して放出されることを予見していた。しかし、その遺伝子の実体は長い間不明であった。

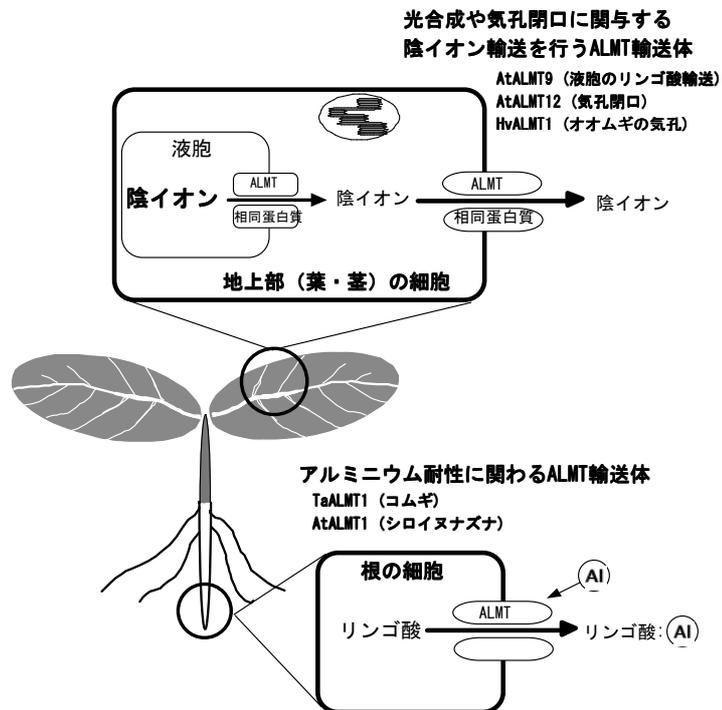
【ALMT1 遺伝子の発見】私たちは 2004 年に、この準同質遺伝子系統コムギ、ET8 と ES8 の間でサブトラクション法を行い、ET8 で特異的高発現する遺伝子の単離を報告した。この遺伝子を、形質転換植物を用いた解析およびアフリカツメガエル卵母細胞（オーサイト）の遺伝子発現系を用いた電気生理的解析を行った結果から、この遺伝子が Al により活性化されるリンゴ酸輸送体をコードすることを明らかにし、ALMT1 (aluminum-activated malate transporter 1) と命名した。また、ALMT1 を形質転換したオオムギでは Al に応答したリンゴ酸放出がみられ、その結果として Al 耐性そして酸性土壌耐性を付与できることが示された。そして、コムギでは、ALMT1 の上流配列に存在する繰返し配列が、ALMT1 遺伝子の高発現および Al 耐性に強く関与することも明らかとなった。そのため、この上流の繰返し配列の違いを応用した分子マーカーが、コムギの Al 耐性系統を選抜するために有効であることが示された。

【コムギ ALMT1 の Al 活性化機構】ALMT1 輸送体の特徴として Al により活性化されることが上げられる。毒性をもつ金属イオンの Al が、輸送体を活性化するのは非常に珍しい性質である。そこで私たちは、この Al 活性化機構について解析を行った。

コムギの ALMT1 タンパク質（全 459 アミノ酸残基）は C-末端領域に比較的長い親水性ペプチド(239 アミノ酸残基)をもち、それは細胞外に配向することが示唆されている。さらに、ALMT1 はオーサイトの発現系およびタバコ培養細胞発現系での電気生理学的解析から、ALMT1 タンパク質自身が Al 活性化を制御すると考えられた。タンパク質を構成する 20 あるアミノ酸の中で、酸性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）のカルボキシル基が Al イオンと結合しやすいことが分かっている。そこで、C 末端領域の 15 箇所の酸性アミノ酸を選抜し、site-directed mutagenesis 法により各々アスパラギンとグルタミンに変異させた ALMT1 遺伝子を作製した。これらをオーサイトに発現させ、電気生理学的に解析を行った結果、3 箇所のアミノ酸変異により、Al で活性化されるリンゴ酸放出に伴う内向き電流が完全に抑制された。さらに、C 末端領域を段階的に欠失したクローンを作製し、解析を行ったところ、

これらの欠失変異 ALMT1 では内向き電流がみられなかった。したがって、C 末端領域全体が Al 活性化に関与すると考えられる。以上の結果から、ALMT1 の C 末端の 3 つの酸性アミノ酸が、Al との結合を介して輸送体の活性化に関わる可能性が高いと考えている。

【ALMT タイプ輸送体の研究】生物には様々な輸送体が存在する。これらは多くの場合、微生物・動物・植物のタンパク質でよく似た構造をもつことが多い。しかし、ALMT の場合、類似のタンパク質は微生物と動物では見つからず、植物に特異的となっている。コムギから ALMT1 が見つかり、ALMT 相同タンパク質の解析も進んできた。2006 年には、シロイヌナズナの AtALMT1 も Al で活性化されるリンゴ酸輸送体であり、Al 耐性遺伝子であることが証明された。さらに、トウモ



ALMT 遺伝子ファミリーの発現場所と生理学的役割

ロコシの相同タンパク質である ZmALMT1 は、Al で活性化されない無機アニオンの輸送体であることが明らかとなった。また、コムギの ALMT1、AtALMT1、ZmALMT1 はいずれも細胞膜に局在するが、シロイヌナズナの AtALMT9 は液胞に局在し、液胞に蓄積されたリンゴ酸の輸送に関わることが報告された。

【気孔閉口に関与する ALMT 輸送体】私たちは、13 あるシロイヌナズナの AtALMT 遺伝子の中で、AtALMT12 が、気孔を構成する孔辺細胞で特異的に発現する無機アニオン輸送体であり、気孔閉口に関与することを明らかにした。植物の気孔は、二酸化炭素の吸収や水の蒸散が制御し、いくつかのイオンチャネルによって調節されている。AtALMT12 は既知の S-および R-タイプアニオンチャネルではないと考えられ、新しい機構により気孔閉口を調節していると考えられる。そして最近、オオムギの HvALMT1 がやはり気孔で発現するアニオン輸送体であることが報告された。

このように、植物に特異的な ALMT タンパク質ファミリーには、関与する生理的役割に多様性があることが示され、今後さらに ALMT の新たな役割が明らかになると予想される。

学生の皆さんへ一言

近年、子供たちの理科離れが言われていますが、今日ここにお集まりの皆さんは、理科・科学が好きで大学に入学された貴重な人材だと思います。是非、自分の興味のある研究や物事に対して、自由な発想をもって取り組んで頂きたいです。そして、大学生生活を楽しんで欲しいと思います。