平成10年度新規課題

(農林水産省)

- ◎農業環境技術研究所
- 1. アフィニティバインディングアッセイによる微生物の環境シグナル物質認識レセプターの単離・解析法の開発
- ◎森林総合研究所
- 2. タンパク質のリン酸化を介した樹木細胞の増殖・分化機構の解明
- ◎北海道農業試験場
- 3. 効率的DNA多型検出による作物育種法の開発
- ◎東北農業試験場
- 4. イネ葯由来の発現量補正ライブラリー作製法の開発と耐冷性関連微量発現遺伝子の単離
- ◎四国農業試験場
- 5. 糖・脂質をヨウ素転座先とする光反応クロスリンス標識法の開発

農林水産分野における放射線の利用例

1 放射線育種

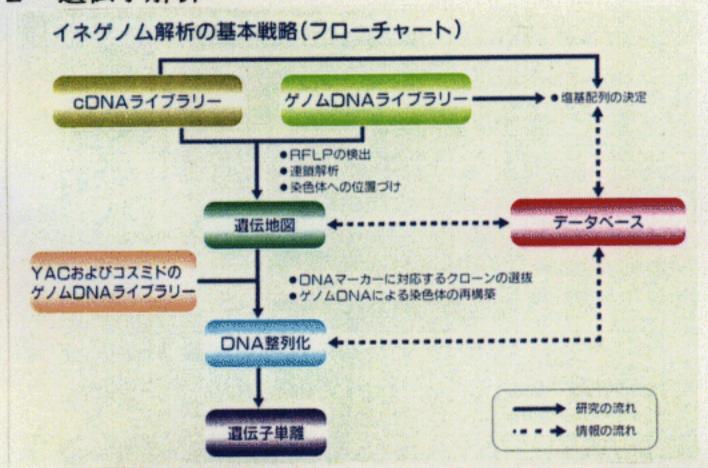


放射線育種により育成した品種

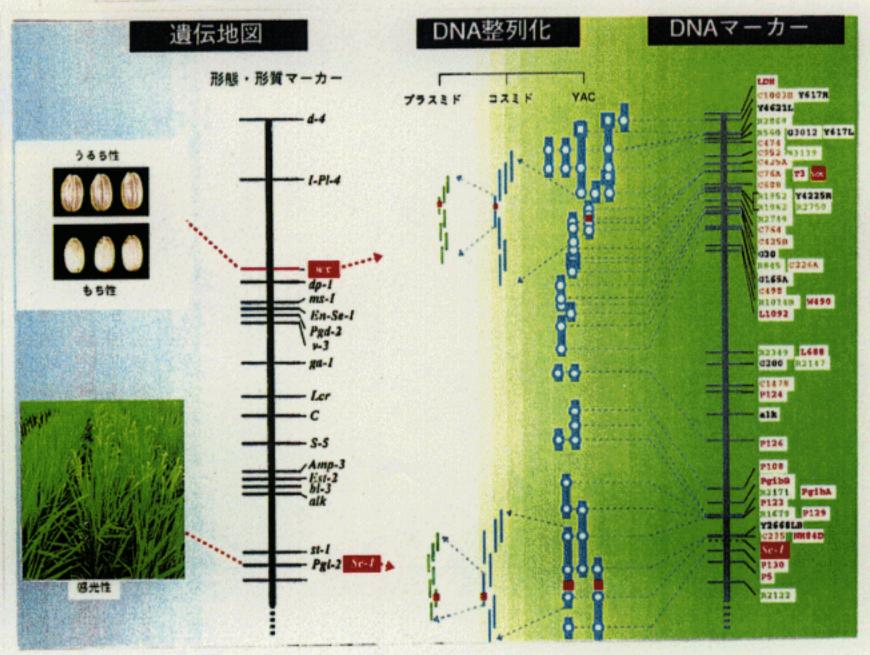
作物	育成品種・系統名
イネ	レイメイ (昭41), 放育系LGC-1 (平4) ほか8品種
コムギ	ゼンコウジコムギ (昭44)
ハトムギ	ハトムスメ (平4)
ダイズ	ライデン(昭41),コスズ(昭61) ほか3品種
アズキ	紅南部 (昭53)
イグサ	せとなみ (昭57), ふくなみ (昭59)
ナシ	ゴールド二十世紀 (平2) , 寿新水 (平8) , おさゴールド (平9)
キク	南風の初雪(平3) ほか5品種
シバ	ウィンターカーペット (平4) ほか1品種

従来の二十世紀(左上)と、農林水産省農業生物資源研究所放射線育種場で 育成したゴールド二十世紀(右下)の幼果における病徴の差異

2 遺伝子解析



(注) イネゲノム解析は、約4億3千万塩基対 (推定約3万の遺伝子) あるイネの全遺伝子 情報の解明をめざす戦略的研究のこと。



(参考)農林水産ジーンバンク における生物遺伝資源の 保有点数(平成8年度末)

植物	21万点
微生物	1.7万株
動物	722点
林木	2.4万点
水産生物	339点
DNA	2.3万点

国立機関原子力試験研究費

4. アフィニティーバインディングアッセイによる微生物の環境シグナル物質認識レセプターの単離・解析法の開発 (新規 平成10~14年度)

晨業環境技術研究所

[研究の目的]

地球規模での環境問題がますます重要になる中で、微生物を利用した環境制御技術、すなわち、バイオリメディエーション等の環境保全・浄化技術や植物病原菌の制御技術等の新たな農業技術の開発が求められている。環境微生物は環境中の汚染物質、農薬、生物間相互作用物質等の様々な環境シグナル物質を感知・認識し、細胞内情報伝達を経て遺伝子を発現させ、環境の変化に応答している。微生物の有用物質生産や難分解性汚染物質分解の誘導機構、植物病原菌の宿主-寄生菌相互関係等を解明するためには、一連の環境応答を引き起こす最初の因子である環境シグナル物質認識レセプターを明らかにし、解析することが必須である。しかし、これまで環境シグナル物質認識レセプターの精製・単離に成功した例はほとんどなく、レセプターによるシグナル認識の詳細なメカニズムはほとんどの場合不明である。

レセプターは無胞あたりのコピー数が少ないため、直接の単離は容易ではない。そこで、RIを用いたアフィニティーバインディングアッセイ法を開発し、それを利用した環境認識レセプターの効率的な単離・解析方法や、機能性生体分子間の相互作用の解析法の検討を行う。多くの環境シグナル物質の標識法としては、化学合成しかないのが現状である。本課題では、①微生物の菌体外酵素生産の誘導物質であり、植物-微生物間のシグナル物質としての働きや種々の生理活性作用を持つ少糖類(オリゴサッカライド)、②微生物の難分解性化合物分解遺伝子の誘導物質である分解中間産物、③病原菌-植物の相互作用に直接関与している病原菌特異的タンパク質を対象に、それぞれの効率的な標識方法を確立する。次いで、標識したシグナル物質とレセプター物質との安定的な結合条件を解明し、アフィニティーバインディングアッセイによりレセプター物質を単能・精製する方法を開発する。単離・精製したレセプターは生体内の局在部位を調べ、遺伝子破壊株を作成してその働きを明らかにする。

【平成10年度研究計画】

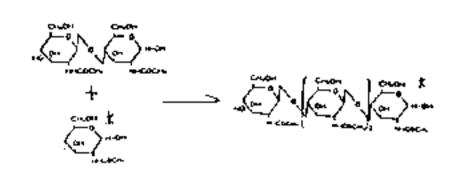
アフィーティーバインディングアッセイ法に適した。シグナル物質の標準法の検討。

- ・シグナル物質であるキトオリゴサッカライドを生成する合成酵素や加水分解酵素を検索し、遺伝子の単離と発現ベクターへの組み込みにより、大量発現(生産)の系を構築する。
- ・芳香族塩素化合物分解遺伝子の誘導物質であるクロロムコン酸を生合成する系を、必要な分解遺伝子を組み合わせることで開発する。
- ・病原性関連タンパク質を高効率で生産するin vitroの系を開発する。

[平成10年度概算要求]

概算要求総額 (内 訳)	21,947千円(0千円)
試験研究費	21, 947千円 (0 千円)
備品費	9, 889千円 (0 千円)
消耗品費	12, 026千円 (0 千円)
印刷製本費	32千円 (0 千円)

アフィニティーバインディングアッセイによる微生物の環境応答シグナル物質認識レセプターの単離・解析法の開発



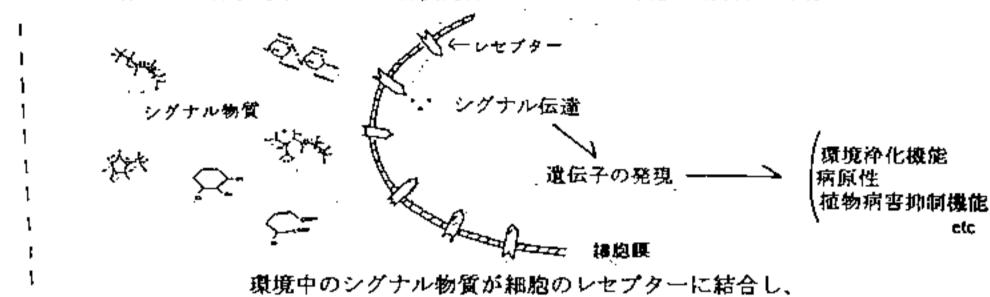
合成酵素や分解酵素の逆反応による キチンオリゴサッカライドの標識

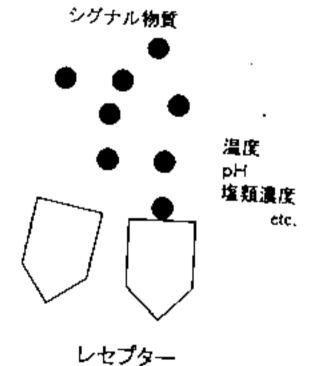
生物変換による クロロカテコールの標識

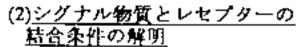


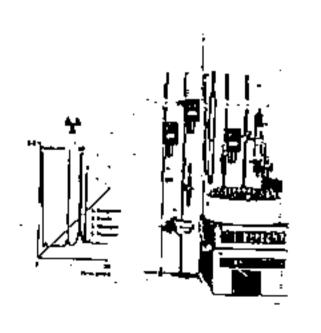
病原菌 クンパク質 病原菌特異的タンパク質の標識

(!)シグナル物質の放射能 標識技術の開発









レセプター遺伝子のクローニングと 遺伝子破壊株の作出

2

(3)シグナル物質の単離法の開発

(4)<u>レセプターの構造・</u> 機能の解析 遺伝子随線

18. タンパク質のリン酸化を介した樹木細胞の増殖・分化機構の解明(新四 平成10~14年度)

森林総合研究所

[研究の目的]

本材生産力の増強、アレルギー性花粉の抑制など、近年のニーズに応える新しい特性を備えた樹木を育種していく場合に、その育種素材の創出法として、遺伝子操作技術の利用が考えられる。樹木の遺伝子操作を行うためには、①有用遺伝子の単態、②遺伝子導入法の確立、③遺伝子を導入した樹木細胞から個体への再分化技術の確立が必要である。しかし、遺伝子導入法の開発に比して、樹木からの有用遺伝子の単離および、個体再分化技術の開発は遅れている。日本の有用樹種であるスギやヒノキも、人為的に細胞の増殖・分化を制御することができず、個体への再分化技術が確立していない。つまり、遺伝子導入はできても、細胞を分化させることができず、再生個体が得られないために、遺伝子組換え体が作れない樹種が多く存在し、それを克服するための技術開発が急がれている。

動物細胞の増殖・分化の研究では、動物細胞内のタンパク質リン酸化酵素が多数単塵され、それらの酵素遺伝子を細胞に導入したり、あるいはそれらの酵素と相互作用する生体分子を細胞に作用させることによって、細胞の増殖・分化を制御することが可能となってきた。最近の研究では、植物にも、タンパク質のリン酸化を仲介する酵素が存在することが示され、動物細胞と同様に、植物細胞の増殖・分化に関与すると推定

されている。しかし、その直接的な証明はまだ無く、それを利用した植物細胞の増殖・分化の制御技術もできていない。

本研究課題では、樹木のタンパク質リン酸化酵素の機能をラジオアイソトープ(RI)標識化合物を用いて解明し、それらの酵素が樹木細胞の増殖や分化をどのように制御しているかを明らかにする。また、RIを利用して、それらの酵素と相互作用する生体分子を単離する新しいスクリーニング法を明発し、単離した生体分子の細胞増殖や分化に与える影響を解明する。本課題で得られる研究成果は、RIを利用した新規の生体分子の単離法、樹木の組織培養技術・形質転換技術の開発に大きく寄与する。

【平成10年度研究計画】

- (1) 現在得られているタンパク質リン酸化酵素遺伝子の全領域を単離し、構造決定をする。
- (2)樹木細胞中の各種生体分子のRI標識法を開発する。

[平成10年度價算要求]

(内 訳) 積度旅費 122千円 (0千) 試験研究費 11,820千円 (0千) 備品費 6,640千円 (0千) 消耗品費 4,107千円 (0千)
印刷製本費 32千円(0千 賃金 942千円(0千 雑役務費 99千円(0千

平成10年度国立機関原子力試験研究費課題

研究課題名:タンパク質のリン酸化を介した樹木細胞の増殖・分化機構の解明



細胞の増殖・分化にはタンパク質リン酸化酵素が関与していると推定される

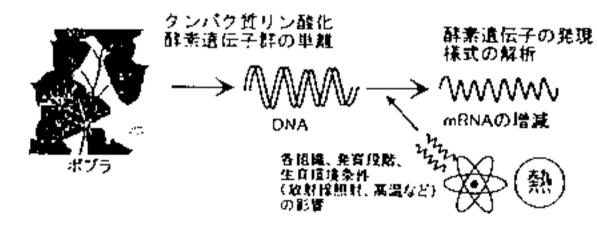
タンパク質リン酸化酵素および 相互作用する生体分子の機能解析

樹木の細胞増殖・分化機構の解明

人為的制御技術の開発

<研究概要>

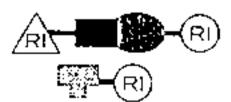
(1) タンパク質リン酸化酵素遺伝子の単離、 構造決定、発現の解析



(3) 樹木生体分子のR + 標識法の開発、R + 標識生体 分子を利用したスクリーニング法の開発

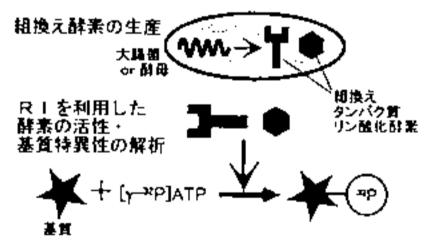
> 多重標識法 特異的な生体分子標識法。

リン酸化酵素と結合する生体分子の 新規スクリーニング法の開発





(2) 組換え酵素タンパク質および形質転換樹木を用いた タンパク質リン酸化酵素の機能解析



(4)タンバク質リン酸化酵素と相互作用 する生体分子の機能解析

スクリーニングから 得られた生体分子

細胞増殖・分化 への影響

樹木を培養している 培地に生体分子を添加する ことで、成長制御などは可能か? 形質転換樹木を利用した 酵素の細胞内機能の解析



酵素量の増加・減少による | 繊胞増殖・分化への影響

<波及効果>

- 1.RI標識を利用した 樹木の未知生体分子 単離法の開発
- 2、樹木の細胞増殖・分 化機構の解明、 および制御技術の開 発

農林水産省

10. 効率的DNA多型検出による作物育種法の開発(新規 平成10~12年度)

北海道農業試験場

[研究の目的]

本研究では、作物育種において利用できるDNAマーカーの効率的な作成法及びDNA多型検出法を開発する。

近年、生物の個体や系統間でのDNAの違いを識別できるDNAマーカーが開発されて、病原菌の検出や遺伝病の診断などの医学分野ではその利用が進んでいる。作物や家畜の育種においても、DNAマーカーは従来遺伝解析が困難であった作物や家畜の形質を支配する遺伝子を解明するための画期的な方法として大きな期待が寄せられている。しかし、作物開発のためのDNAマーカーとしては、現在までに利用されてきたRFLPマーカーやRAPDマーカーは、マーカー作成に多くの労力を要し、遺伝子型の判定には多量の試料を要したり、結果の再現性に問題があるなどの欠点がある。DNAマーカーを今後作物育種に利用したり、作物の重要な形質を支配する遺伝子を解析して単離するためには、PCR法の簡便さを取り入れた利用しやすいDNAマーカーを、効率的に作成することが重要である。

そこで、本研究では、まず、作物のDNAマーカーを効率的に作成するための新しい方法として、最近、微生物のDNAの解析等に用いられているAFLP法を作物のDNAマーカー作成に応用するための条件を解明する。次に、DNA多型の検出が困難な近縁の作物系統間で効率的

にDNAマーカーを作成するための方法として、二次元電気泳動を用いたAFLP法を新たに開発する。

また、現在のDNA多型判定は電気泳動によるDNAの分離操作が煩雑なため、多数試料の遺伝子型を迅速に判定するには多大の時間と労力が必要である。そこで、PCR反応により特定遺伝子の存在をアイソトーブの取り込み反応によって検出し、また、多重標識することにより同時に多数の遺伝子を分析するため、電気泳動によらない簡便、迅速な遺伝子型判定法を開発する。

[平成10年度研究計画]

[平成10年度概算要求]

(1) 作物におけるAFLP佐の確立

作物のDNA多型を検出できるAFLPマーカー開発法を確立する。イネ、バレイショ、テンサイ、タマネギを材料として、使用制限酵素の種類、アダプターノブライマーの塩基配列を検討する。

DNAは損傷が少なく純度の高いものが要求されるので、クロマチンを単離した後プロテナーゼでタンパクを分解し、塩化セシウム/超遠心法により精製し、透折して塩化セシウムを除去する。DNAを分解する制限酵素には8塩基電別酵素を含め、いくつかのものを比較する。アダプターの塩基配列は、似たものが作物DNAに反復配列として含まれていないことが重要であり、いくつかのものを合成してPCR反応を飲みることにより、適切なものを選ぶ。プライマーの未端の塩基配列を変えることにより、PCR反応によって増幅される断片の数を初めは数十から数百とし、条件が確立した後には数百~千になるようにして、アダプター及びプライマーを設計する。

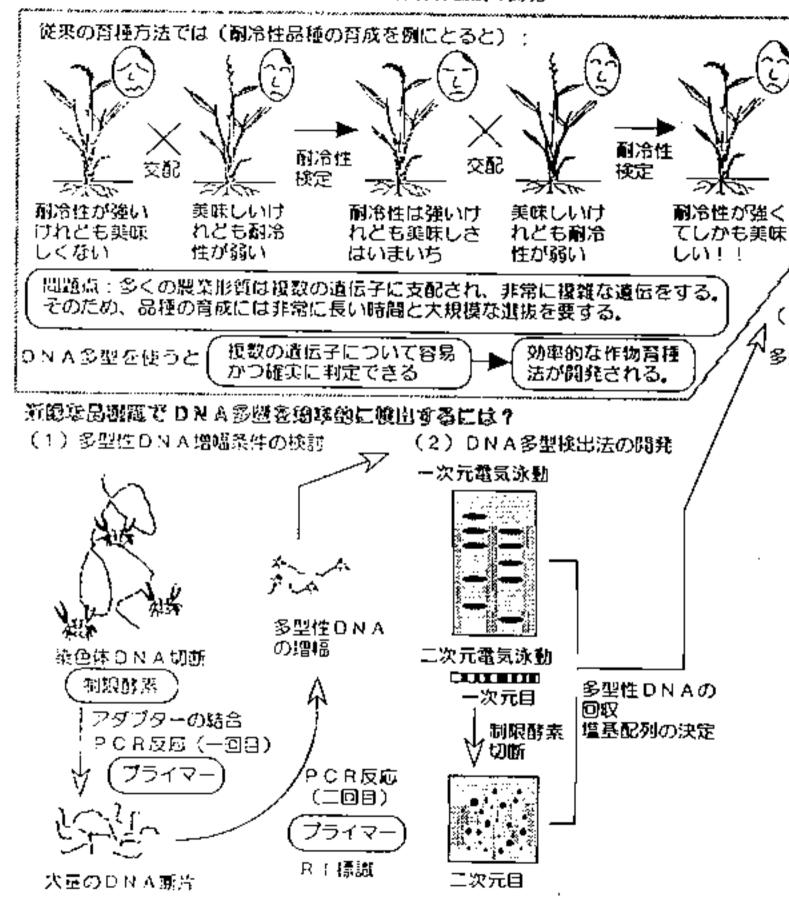
開発した方法を用いて、イネ、パレイショ、テンサイのAFLPマーカーを作成する。

(2)電気泳動によらない遺伝子型判定法の開発

特異的にDNA合成を行わせるために必要なPCR反応の条件、及び副反応がある場合における複数のプライマーを用いた多重標識によって特異的成分を検出するための条件を検討する。標識に利用できる核種として33P及び32P、35S3Hなどがあり、標識の方法にはポリヌクレオチドキナーゼを用いた末端原識、及びPCR反応の際 [α32P] dCTPなどを取り込ませる方法がある。プライマーの長さは、プライマーと標的となる塩基配列との結合の特異性を高める上で重要であり、10~20塩基程度では長いほど特異性を増すが、長すぎるとかえって非特異的な反応が起こる。PCR反応条件(但度サイクル条件、使用酵素の選択)との兼ね合いで決定すべき点であり、これらの条件について検討する。

頻算要求総額 (内一訳)	G, 081千円 (0 千円)
職員旅費	199千円(0 千円)
試験研究費	5,882千円(0 千円)

印刷級本致 3 2 千円 (0 千円) 光熱水料 3 8 1 千円 (0 千円) 賃金 7 0 7 千円 (0 千円)

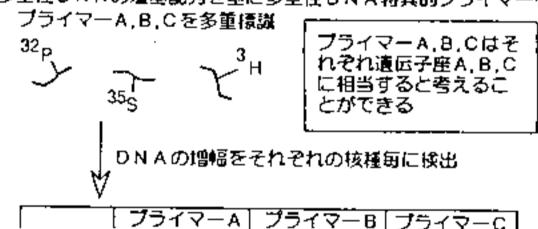


【波及効果】

- 1. R | 多重標識を利用した効率的作物育種 法の開発
- 2. 農業形質の遺伝的機構の解明

(3)多重標識によって複数のDNA多型を同時に検出する方法の開発

多型性DNAの塩基配列を基に多型性DNA特異的ブライマーを設計。



		プライマーA	プライマーB	ブライマーC
品種	4	+	<u> </u>	<u> </u>
品種			_	+
			•	
		h	1	
		,	,	

品種イ、口の遺伝子型の判定

		遺伝子座A	遺伝子館B	通伝子座C
品種	1	AA or Aa	AA or Aa	aa
品技	0	aa_	aa	AA or Aa

11、イネ葯出来の発現量補正ライブラリー作製法の開発と耐冷性関連微量発現遺伝子の単離(新規 平成10~12年度)

東北農業試験

[研究の目的]

イネは生長過程の様々な段階で冷温により様々な生理的障害を受けるが、農業生産上最も大きな被害につながるのは、生殖成長期の冷温である。実際、イネの冷害の多くは花粉の発育障害に起因することが明らかにされていることから、現在花粉の発育障害のキーステップに関与する酵素遺伝子の解明に取り組んでいる。しかし、遺伝子発現時期が花粉形成の中でも小胞子初期というごく一時期に限られ、さらにその発現量が非常に少ないという制約から、それらの遺伝子のクローニングには成功していない。従来のcDNAライブラリーの作成法に従うと、発現量の多い遺伝子ほど高い頻度でクローン化されるため、機能は重要であるが発現量が少ない遺伝子を捕捉するには不都合であった。そこで、ラジオアイントープによる高感度検出を利用し、遺伝子をその発現量に関わらず同程度で含むような発現量補正ライブラリーの作製法を開発し、耐冷性関連遺伝子を単離することを目的とした。

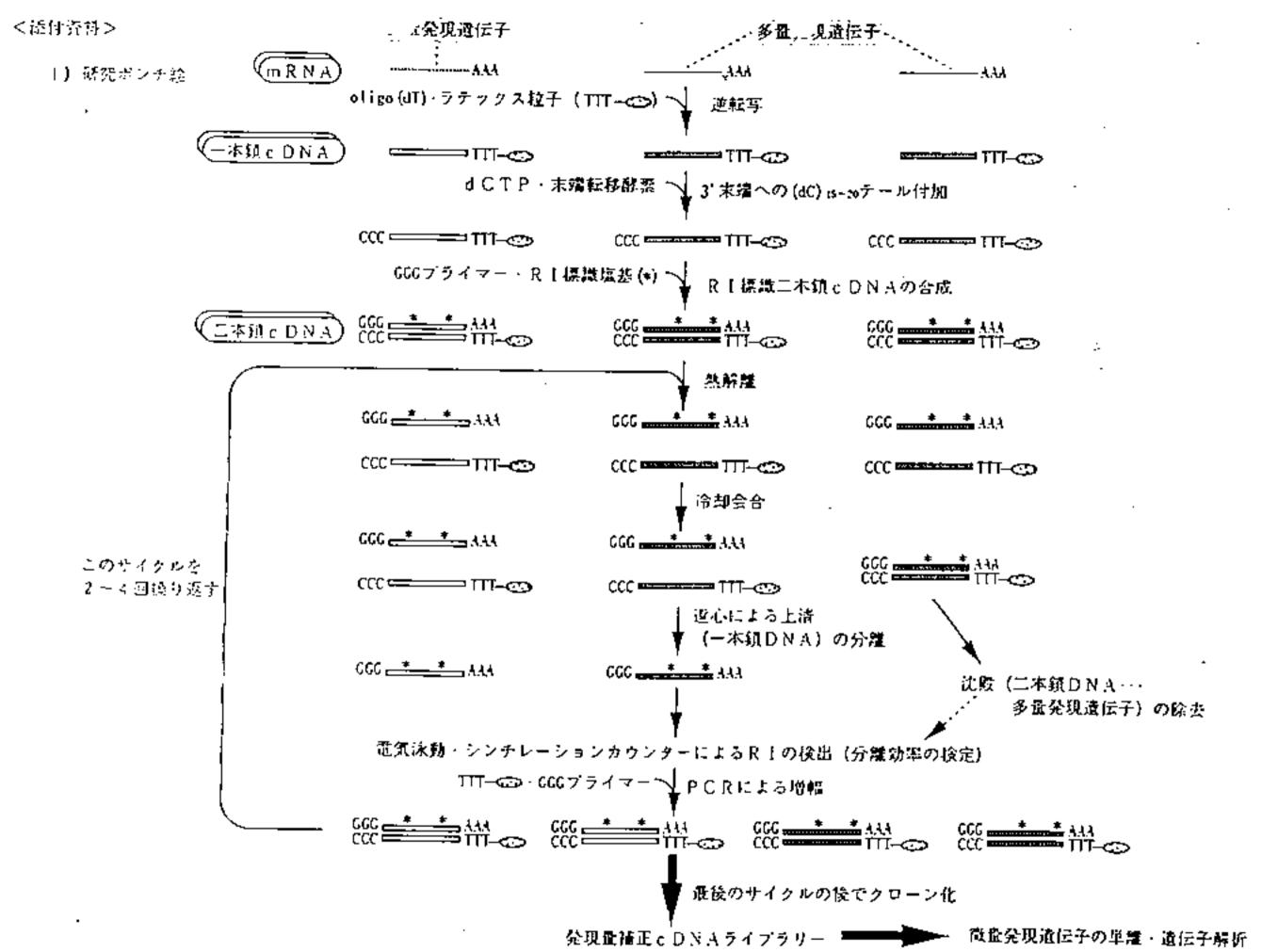
[平成10年度研究計画]

微量遺伝子の発現量補正方法の開発

ラテックス粒子のついたDNA額をプライマーとして合成した二本額cDNAの熱解離および冷却再会合条件を検討する。そして、遠心分離によりラテックス粒子のついたDNA額が沈殿することを利用して一本額DNAと二本額DNAを分離する方法を開発し、分離された一本額DNAの回収率及びサイズ分布を調べる。

[平成10年度概算要求]

概算要求総額 (内 訳)	3,740千円(0 千円)
職員旅費 試験研究費 備品費 消耗品費 印刷製本費 光熱水料 貧金	68千円(3,672千円(2,195千円(1,084千円(32千円(116千円(245千円(0千円) 0千円) 0千円) 0千円) 0千円)



国立機関原子力試験研究費

12. 糖・脂質をヨウ素転座先とする光反応クロスリンク標識法の開発 (新規 平成10~12年度)

四国農業試験場

[研究の目的]

光反応クロスリンク標識法は、あるタンパクやペプチドと特異的に結合するタンパクの検出・同定に好適な方法の一つとして1982年に開発された手法で、プローブとなるタンパク・ペプチドをあらかじめクロスリンク試薬を介して「14Iで標識後、プローブと特異的に結合するタンパクと混合して紫外線を照射すると、始めはプローブを標識していた「14Iが結合タンパクの方へ転塵することによって、結合タンパクが模量されることを原理とする。タンパク・ペプチド以外のプローブとしてはこれまでにリポ多糖が用いられた例があるが、「14Iの転塵先にタンパク以外の物質である糖や脂質が用いられた報告は未だない。その理由としては、タンパクとそれに特異的に結合する糖・脂質の分子量を比較すると、一般にタンパクの方が大きく、分子量が小さい糖・脂質から分子量の大きいタンパクへの

*** I転座は容易であるのに対し、その逆のタンパクから糖・脂質への転座では、*** Iは糖・脂質よりもタンパクへ自己転座する確率が高く、標識効率が低いことが考えられる。しかし、比較的高分子の糖・脂質を転座先に用いることにより、タンパクから糖・脂質への*** 1転座効率の向上が期待できる。

一方、細胞生理学的研究では、何らかの糖・脂質結合性を有すると推定される受容体タンパクが得られても、それらが特異的に結合する糖・脂質リガンドの同定が困難である場合が少なくない。そこで本課題では、光反応クロスリンク標識反応において、タンパクをプロープとし、「種屋生力として糖・脂質を用いることを初めて試みる。転座可能な糖・脂質の種類や分子量を明らかにするとともに、「*** [転座効率が最も高いクロスリンク試薬を選定する。さらに本法を応用して、既知の受容体タンパクに対する未知の糖・脂質リガンドの検索を行い、新規に見出されたリガンドの情報伝達強度を既知のリガンドと比較する。

[平成10年度研究計画]

- (1) 微生物をジャーファーメンターで培養して、クロスリンク反応の転座先となる多糖類を抽出・精製する。
- (2) プローブに用いる市販の結合タンパクが、実際に糖と特異的に結合するかどうかを、蛍光偏光度稠定装置を用いてあらかじめ確認する。
- (3) タンパクとクロスリンク試薬、125 Iを反応させて保護化プローブを作製し、それと轄・脂質をクロスリンク反応させて、125 I転座効率と転座先の駅の種類や分子量との関係を明らかにする。
- (4) 1211転座効率が最も高いクロスリンク試薬を選定するとともに、紫外線照射量等の転座反応条件の検討も行う。

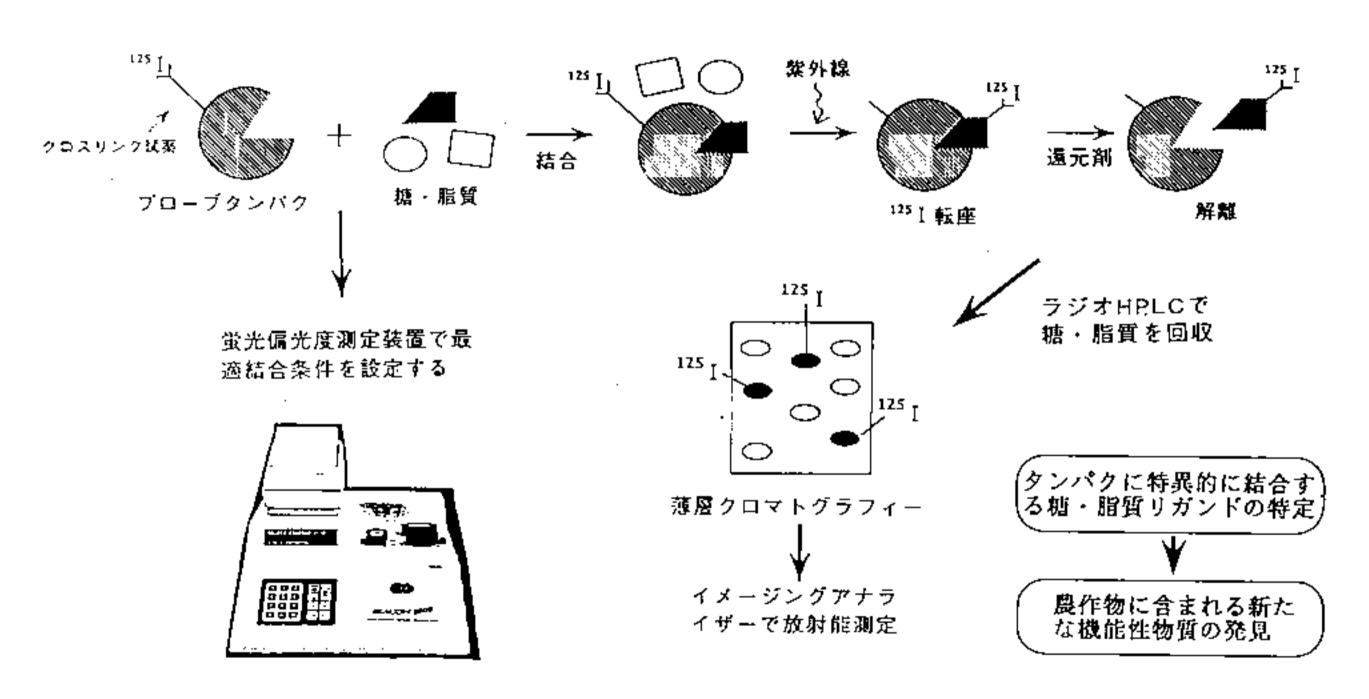
[平成10年度概算要求]

類算要求総額 (内 訳)	8,036千円 (0千円)
職員旅費 試験研究費 備品費 消耗品費 印刷製本費 光熱水料 質金 雑役務費	278千円(7,758千円(4,513千円(2,588千円(32千円(298千円(236千円(91千円(0 千円) 0 千円) 0 千円) 0 千円) 0 千円) 0 千円)
_		~ 1 1 37

<添付資料>研究ポンチ絵

朝究課題名:恵・脂質をヨウ素転癌先とする光反応クロスリンク様識法の開発(新規 平成10~12年度)

四国農業試験場



農林水産省