

研究課題

ストレス応答の統合生物学：各種ストレスに対する資源生物の防御機構

中尾実樹 *・宮本敬久・本城賢一・竹下 稔・橘 哲也

(九州大学大学院農学研究院、* 研究代表者)

目的

人為環境下で集約的に育成される資源生物は、様々なストレスに曝され、その健全な生育が脅かされやすい。生物はストレスに応答し、それを緩和させるための様々な仕組みを本来持っているはずであるが、それらの分子機構には不明な点が多い。そこで本研究では、温度、飢餓、感染など様々な生体ストレスに対する微生物、動物、および植物の防御機構を分子レベルで解析することを目的とした。

研究成果

1. 感染防御

1. 1 植物ウイルス間の競合に関する分子生物学的解析

植物はウイルスなどの病原体の侵入感染に対し、免疫機構を備えていないものの、抵抗性反応を発動させ自己を守る機構を備えていると考えられている。植物ウイルスにおいては、あらかじめあるウイルス（一次ウイルス）を植物に接種し、一定期間の後そのウイルスに近縁のウイルス（二次ウイルス）を再接種した場合、後から接種した二次ウイルスが全く感染増殖できないかあるいは増殖が種々の程度に制限される現象があることが古くから知られている。この現象はウイルスの干渉効果(cross protection)と呼ばれ、実用的には自然界からの探索あるいは人為的突然変異によって病徴の微弱なウイルス系統を獲得し、それを弱毒ウイルスとしていわゆるワクチンのように使用することにより、本現象を植物ウイルス病防除の一手段として利用する試みが広く検討されてきた。この現象が最初に報告されたのは 1929 年(McKinney)のことであるにも関わらず、その後干渉効果の機構に関する基礎的研究はほとんどなされないまま植物ウイルス研究の長い歴史が過ぎ去った。しかしながら、近年発見されたジーンサイレンシング現象によるウイルス RNA 分解作用と本現象との関連性を示唆する研究報告もなされるようになった。

このような背景のもとで、我々は干渉効果が完全あるいは不完全なキュウリモザイクウイルス(*Cucumber mosaic virus*; 以下 CMV) 系統の組合せに着目し、植物ウイルス間に生じ

る干渉効果の機構を分子レベルで解明することを試みた。まず、感染個体組織レベルでのウイルス間の競合という視点から、各宿主植物における一次ウイルス、二次ウイルスの移行増殖の推移について詳細な解析を行った。この干渉効果試験では一次、二次ウイルス RNA の検出に各々特異的な遺伝子プローブを用いた。各宿主におけるウイルス RNA 蓄積の解析結果からは、二次ウイルス接種葉ならびにその上位葉における一次ウイルスの蓄積量の多少で二次ウイルスの全身感染の成否を説明できなかつたため、むしろ一次ウイルスと二次ウイルス間の移行分布形態の違いや宿主全体におけるウイルス抵抗性反応の誘導動態が二次ウイルスによる再感染の成否を左右すると考えられた。そこで、ササゲの感染葉組織レベルにおける干渉効果発現の様相を tissue-blot ならびに隣接切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションにより詳細に観察したところ、同時混合接種試験ならびに干渉効果試験を行った2つの CMV 系統は相互に局在化した移行蓄積形態をとることが示された(Fig. 1)。

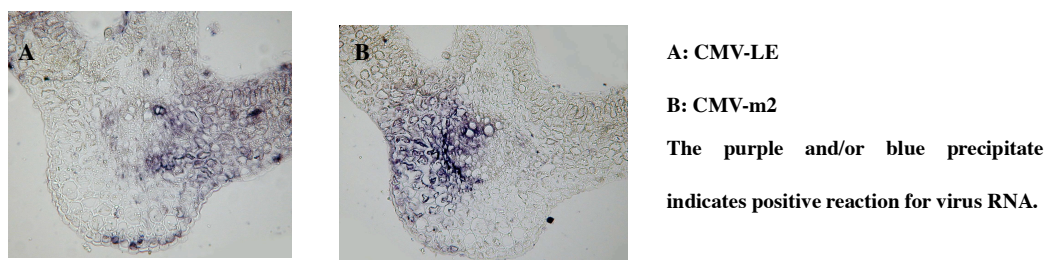


Fig. 1. Spatial analysis of virus RNA in the non-inoculated upper leaves of cowpea co-inoculated with CMV strains.

また、接種範囲を分けて接種試験を行ったところ、2つの系統は境界線を境にして拮抗した分布形態をとることも明示された。これらの結果から、一次ウイルスが先に感染増殖した部位では二次ウイルスの感染増殖が抑制されることや二次ウイルスの感染が成立した部位では一次ウイルスとの競合が生じていることが分子生物学的レベルで初めて実証された。

我々の行ったササゲにおける CMV 系統の接種試験において、CMV が移行増殖している感染葉組織ではウイルス誘導型 RNA 依存 RNA 複製酵素(RNA dependent RNA polymerase; 以下 RdRp)遺伝子 mRNA の特異的蓄積が検出され、ササゲの RdRp 遺伝子 mRNA はウイルス増殖に呼応した蓄積動態を示すことが明らかとなった。植物にコードされる RdRp 遺伝子ファミリーの中にはジーンサイレンシング現象における RNA 分解活性シグナルの維持増幅への関与が示唆されているものや、ジーンサイレンシング現象とは異なる分子機構によるウイルス RNA 蓄積抑制機能が示唆されているものがある。RdRp 遺伝子ファミリーの機能解析は植物ウイルス間における干渉効果の分子機構とジーンサイレンシング現象との関連性、ひいては植物ウイルス増殖抑制分子機構を追究する上で重要な意義を持つと考

えられる。本研究のさらなる進展により、植物が本来備えているウイルス増殖に対する抵抗性反応の一端を解明できるものと期待される。

1. 2 魚類の感染防御レクチンの同定

ほ乳類において、ある種のレクチンが、細菌やウイルスによる感染ストレスに対して第一線で防御を担当する自然免疫機構の一員として機能することが知られている。特に、マンノース結合レクチン(MBL)は、多様な微生物の糖鎖を認識するパターン認識分子として知られており、MASP と呼ばれるプロテアーゼを介して補体を強力に活性化させる。本研究は、下等な脊椎動物である硬骨魚類においても、MBL と相同な分子が自然免疫因子として存在するかどうかを明らかにすることを目的とした。

コイ血清(300 ml)から7%ポリエチレングリコールで沈殿したタンパク質を回収し、N-アセチルグルコサミン-アガロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーによってMBL、酸処理アガロースカラムによって新規ガラクトース結合レクチン(GalBL)を精製した。還元条件下でのSDS-PAGEにおいて、MBLは30 kDaの、GalBLは32 kDaの主要バンドを示した。両レクチンのN末端アミノ酸配列を決定したところ、両レクチン共に、コーゲン用の繰り返し配列(Gly-X-Y)を含んでいた(Fig. 2)。

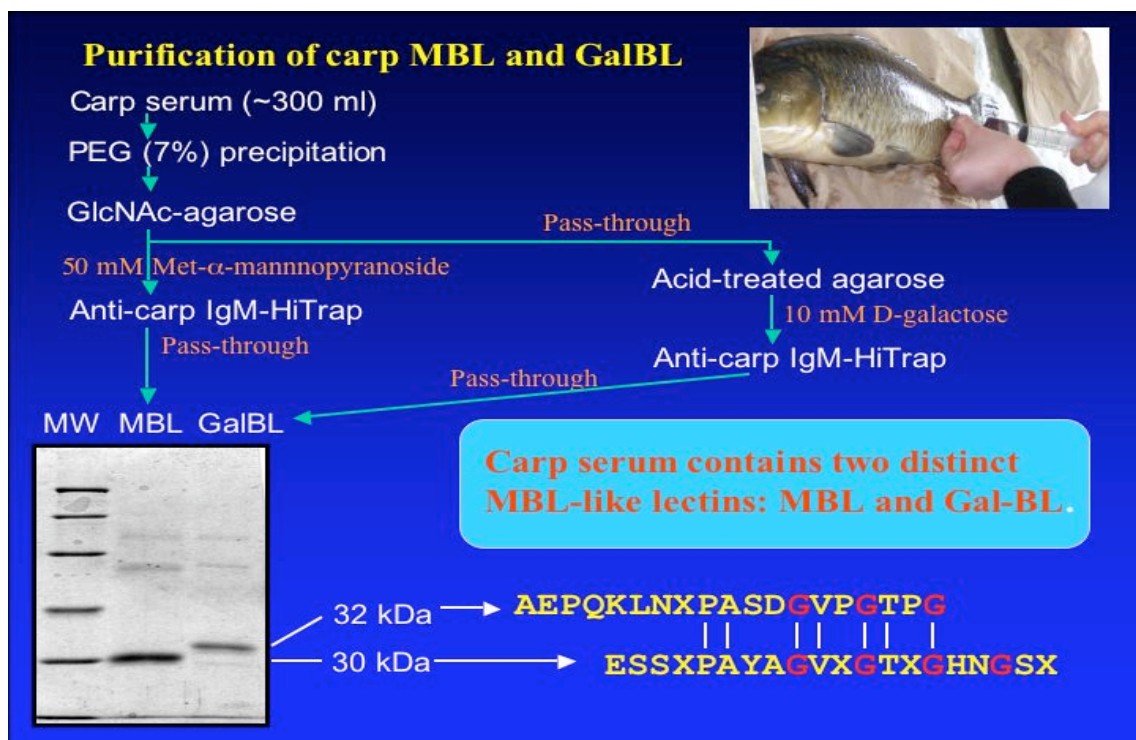


Fig. 2 Identification of MBL and GalBL in carp serum.

次に、コイ MBL および GalBL が補体系を活性化するかどうかを検討するために、ヒト

補体成分 C4 に対する分解活性を観察した。Fig. 3 に示すように、両レクチンともに C4 の α 鎖を限定加水分解した。一方、メチルアミン処理によって不活化した C4 に対しても分解活性を示さなかった。これらの結果は、C4 の分解は精製レクチンに夾雑しているかもしれない非特異的プロテアーゼによるものではなく、おそらく MBL や GalBL に C4 を特異的に加水分解する成分が会合しているためであると考えられた。

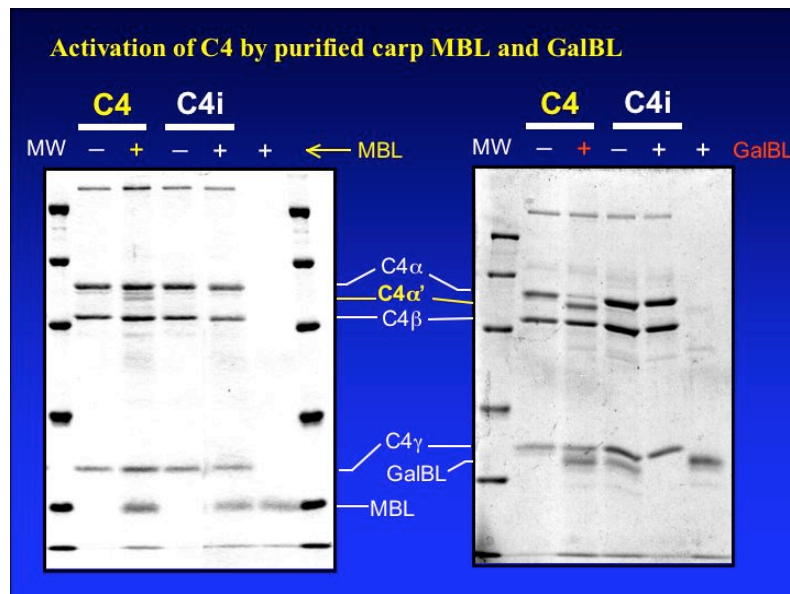


Fig. 3. Proteolytic activation of the complement component C4 by carp MBL and GalBL

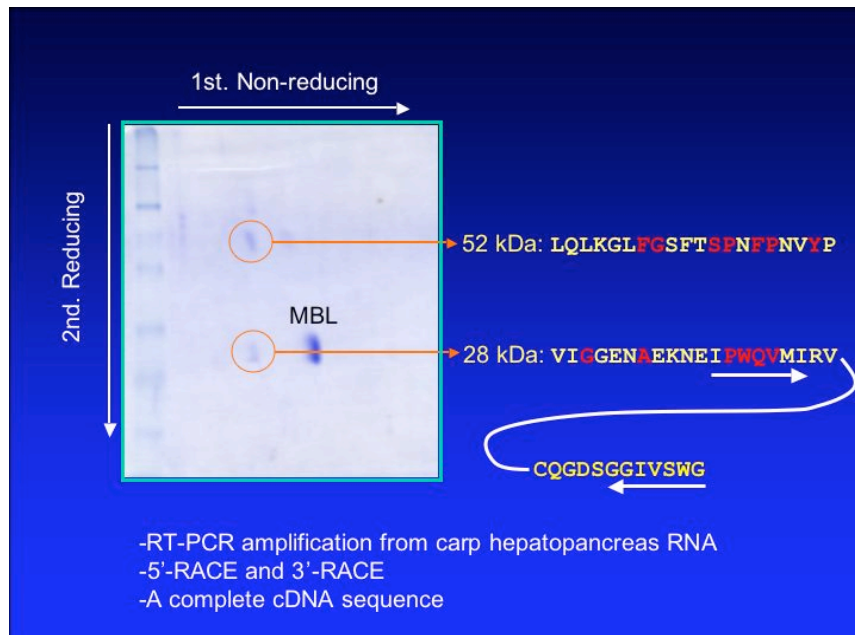


Fig. 4. Identification of a MASP2-like protein complexed with carp MBL

MBL に会合する成分を検出するために、精製コイ MBL を 2 次元 SDS-PAGE で分離した。Fig. 4 に示すように、MBL のスポットの他に、分子量 55 kDa と 28 kDa のスポットが検出され、これらペプチドの N 末端配列は、それぞれヒト MASP2 の H 鎖と L 鎖に有意な相同性を示した。

以上の結果から、コイ血清には、ヒト MBL と相同な構造を持つものの糖鎖特異性の異なる 2 種のレクチン (MBL および GalBL) が存在すること、および両レクチンともに補体を活性化することが判明した。さらに、両レクチンによる補体の活性化は、活性化は、ヒト MASP2 に相同な成分によって媒介されることが示唆された。これまで、コラーゲン様構造を含むレクチンでガラクトースに特異的なものは報告例がなく、本研究で発見された GalBL の生体防御における役割に興味を持たれる。

2. 飢餓ストレス応答

動物が飢餓状態に陥ると正常な成長はおろかその生命を維持することさえ困難となる。この状態から逃れるために、動物はエネルギーの消費を抑えるとともに摂食行動をとることにより外部エネルギーの摂取を図る。

摂食行動の制御には中枢神経系が関与していることが明らかにされており、また摂食行動を制御する脳内神経ペプチドも数多く発見されている。その一つにニューロペプチドY (NPY) がある。NPY は強力な脳内摂食刺激ペプチド¹⁾で絶食状態になるとその分泌が増加する。さらに、マウスではエネルギー消費を抑えることも明らかにされている²⁾。すなわち、NPY は絶食状態でのエネルギー消費を抑えかつ摂食行動を刺激するという、飢餓ストレス改善作用を有する可能性がある。

ただし、これらの知見は実験動物で得られたもので、資源動物における NPY の作用については不明な点が多い。本研究ではニワトリヒナの脳内 NPY がエネルギー代謝にどのような影響を与えるかを調べ、飢餓ストレスとの関連について調べた。

実験には、5~7 日齢の卵用種雄ヒナを用いた。(実験 1) NPY がヒナのエネルギー代謝にどのような影響を与えるかを調べるため、NPY を脳室投与した後の直腸温の変化について調べた。さらに、血中代謝成分(トリアシルグリセロール、遊離脂肪酸)の濃度変化について調べた。その結果、NPY の脳室投与によりヒナの直腸温が有意に低下した(データ未掲載)。また、血中代謝成分ではトリアシルグリセロール(TG)濃度が有意に低下し、一方、遊離脂肪酸(FFA)濃度が有意に増加した(Fig. 5)。

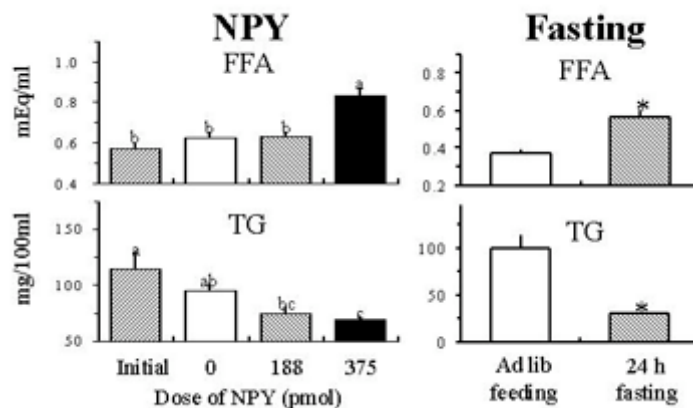


Fig. 5. Effect of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y (NPY) or fasting on plasma free fatty acid (FFA) and triacylglycerol (TG) concentrations in layer chicks. Their blood were collected by heart puncture at 30 min after the injection or 24 h after fasting. Results are expressed as means \pm S.E.M. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and then analyzed with Tukey-Kramer test as a post hoc test. Groups with different figures are significantly different ($P < 0.05$).

(実験 2) 実験 1 で観察した血中代謝成分の変化が、NPY レセプターサブタイプの一つである NPY Y1 レセプターを介しているかをそのアンタゴニスト (BIBP3226) を用いて調べたところ、NPY による血中代謝成分の濃度変化は BIBP3226 によって抑えられた (Fig. 6)。

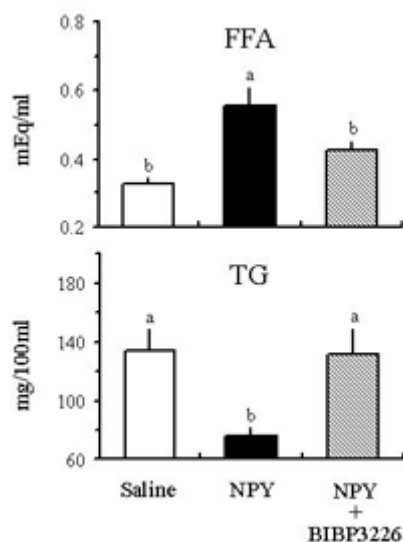


Fig. 6. Effect of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y (NPY) with BIBP3226, a NPY-1 receptor antagonist, on plasma free fatty acid (FFA) and triacylglycerol (TG) concentrations in layer chicks. The injected doses of NPY and BIBP3226 were 375 and 3750 pmol, respectively. Their blood were collected by heart puncture at 30 min after the injection. Results are expressed as means \pm S.E.M. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and then analyzed with Tukey-Kramer test as a post hoc test. Groups with different figures are significantly different ($P < 0.05$).

(実験 3) 絶食状態における血中代謝成分の変化が NPY によるものかを BIBP3226 を用いて調べた。血中代謝成分の変化のうち、FFA についてのみ BIBP3226 によって抑えられる傾向が見られた (データ未掲載)。

NPY の脳室投与によりヒナの直腸温が減少したことは、ヒナの脳内 NPY がエネルギー代謝を抑えることを示している。NPY はヒナの摂食行動を刺激することから¹⁾、ヒナ脳内 NPY は体内エネルギー消費を抑えるとともに外部エネルギーの摂取を促すことで飢餓ストレス改善に関与している可能性がある。さらに、NPY の脳室投与により血中 TG 濃度が減少し、FFA 濃度が増加した現象 (Fig. 5) には、NPY Y1 レセプターが関わってことを明らかにした (Fig. 6)。この NPY による血中代謝成分の変化は飢餓状態のそれと酷似していた (Fig. 5)。飢餓状態が進行するとグルコースを主としたエネルギー消費から TG を主としたものに移行する。TG はグリセロールと FFA に分解され、その後 FFA は β 酸化により利用される。飢餓状態では血中 TG は組織に取り込まれ FFA に分解されるので、血中 TG 濃度が減少し FFA 濃度が増加する。本研究の結果から、ヒナ脳内 NPY は血中 TG の組織へ

の取り込みと FFA 産生を促すことで絶食状態を作り出していると予測される。

その可能性を検証するため、ヒナの飢餓状態における血中代謝成分の濃度変化が BIBP3226 によって阻害できるかを調べた。BIBP3226 は血中 TG 濃度の減少には影響を与えなかったが、血中 FFA 濃度の増加を抑える傾向を示した。この結果は脳内 NPY が TG の分解、すなわち FFA の産生を抑えていること示し、脳内 NPY が絶食状態を作り出していることを示唆した。絶食状態が進行すれば脳内 NPY の合成と分泌が刺激される。したがって、脳内 NPY はその作用で自らの分泌を高め、飢餓状態からの脱出を進めている可能性がある。

3. 低温ストレス応答

ある種の植物は一定期間低温で処理されることにより耐凍性を獲得し、凍結後も生存可能となる。本研究では植物の耐凍性獲得機構の解明を目的とし、クロレラから、耐凍性獲得時に特異的に発現する遺伝子の単離同定を試みた。

低温処理（3℃，24時間）されたクロレラならびに未処理のクロレラから mRNA を単離し、PCR Select cDNA subtraction キット（Clontech 社）を用いて、低温処理時に特異的に発現する遺伝子群を PCR 増幅産物として得た。これらを pGEM-T easy vector（Promega 社）に T-A クローニングし、得られたクローンの塩基配列の決定を行った。

低温処理を受けた際に発現する遺伝子の部分断片を含むクローンは約 260 個得られた。これまでに、約 100 個の塩基配列の決定を行った。配列が決定されたクローンについて相同性検索を行った結果、いくつかのグループに分類された（Table 1）。これらのクローンにはストレス誘導性蛋白質として知られている蛋白質をコードする遺伝子（11種）の他、代謝系および細胞内調節に酵素蛋白質（5種）、リボソーム蛋白質などの翻訳系に関わる蛋白質（8種）、さらにはその他の分類として構造蛋白質として機能しているもの（7種）をコードするものが見られた。また、機能が未知の蛋白質（25種）も同時にクローニングされた。特に、これまで本研究室で耐凍性獲得への関与について報告している HIC6 および HIC12 蛋白質コード遺伝子も単離されていることから、耐凍性獲得時に重要な役割を果たす遺伝子が数多く単離されていると考えられる。これまでに他の植物からも低温誘導性として報告例のない遺伝子も単離されているので、耐凍性獲得への関与を追求する必要がある。

今後の展開としては、得られた低温処理に特異的な遺伝子の解析を進め、塩基配列を基にプライマーを作製し、低温処理時におけるそれぞれの遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法により定量する。低温処理における特異的な発現すなわち耐凍性獲得への関与が推察された遺伝子について形質転換植物体の作製などにより耐凍性獲得における役割を明確

にする。

Table 1. クロレラ由来低温誘導性遺伝子

相同性を有する蛋白質	クローン数
ストレス誘導性蛋白質	
Heat shock cognate protein 70	2
Heat shock protein 70(dnaK-type molecular shaperone)	1
Heat shock protein	1
Cell division protein ftsH	1
Clp protease	1
ATP dependent Clp protease(ClpC)	1
Chloroplast ω 6 desaturase	1
Prohibitin	2
Early light inducible protein	3
Group3 LEA protein (HIC6)	24
Group3 LEA protein (HIC12)	2
酵素群	
ATP synthase gamma chain	1
Adenosylhomosysteinase	1
Enolase	1
Glutamine synthetase	1
Tiazole biosynthetic enzyme	1
リボソーム蛋白質群	
Similar to ribosomal protein	1
Ribosomal protein S20	3
50S Ribosomal protein	2
60S ribosomal protein	12
60S ribosomal protein L11	1
40S ribosomal protein	4
40S ribosomal protein S20	1
Translation initiation factor 6	1
その他	
2-oxoglutarate/malate translocater	1
Ferritin	1
Ferredoxin	1
ADP, ATP carrier protein	1
GTP binding protein	1
Chlorophyll a/b binding protein	2
Translation initiation factor 6	2
Unknown	25

成果発表

1. Takeshita *et al.* (2004) Competition between wild-type virus and a reassortant from subgroups I and II of CMV and activation of antiviral responses in cowpea. *Arch. Virol.* (in press)
2. Takeshita et al. (2004) Spatial analysis for exclusive interactions between subgroups I

and II of Cucumber mosaic virus in cowpea. *Virology* (accepted)

3. Nakao M, *et al.* (2004) An MBL-MASP2 complex that functions in the lectin pathway of a bony fish, the common carp (*Cyprinus carpio*). *Mol. Immunol.* 41: 284.