
助成研究報告書

特定課題研究

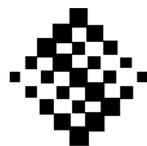
(2003－2005年度)

ソルトゲノミクス

SALT GENOMICS

The Salt Science Research Foundation
Project Research Report

平成19年3月



財団法人ソルト・サイエンス研究財団

特定課題研究報告書 目次

03S – 05S ソルトゲノミクス

1	はじめに	
	荒井 綜一 (東京農業大学)	1
2	ラン藻の塩誘導性遺伝子および塩シグナル伝達系のマイクロアレイ解析	
	鈴木 石根 (筑波大学)	3
3	シロイヌナズナの塩応答性遺伝子群の DNA アレイによる解析	
	小林 裕和 (静岡県立大学)	1 5
4	高血圧症の食塩感受性を規定する因子のゲノム解析	
	萩原 俊男 (大阪大学)	2 5
5	塩味応答の DNA アレイ解析	
	阿部 啓子 (東京大学)	3 3
6	おわりに	
	荒井 綜一 (東京農業大学)	4 5

CONTENTS

PROJECT RESEARCHES

SALT GENOMICS

1	Introduction	
	Soichi Arai (Tokyo University of Agriculture)	1
2	Microarray Analysis of the Salt-Inducible Genes and Signal Transduction Pathway of Salt Stress in Cyanobacteria	
	Iwane Suzuki (Tsukuba University)	3
3	Analysis of Genes for Salt Tolerance by DNA Array in <i>Arabidopsis</i>	
	Hirokazu Kobayashi (University of Shizuoka)	1 5
4	Genetic Analysis to Identify the Predisposing Factors to Salt Sensitive Hypertension	
	Toshio Ogihara (Osaka University)	2 5
5	DNA Array Analysis of Salty Taste Response	
	Keiko Abe (University of Tokyo)	3 3
6	Conclusion	
	Soichi Arai (Tokyo University of Agriculture)	4 5

1. はじめに

荒井 綜一 (東京農業大学)

食塩は、私たちの日常の食生活と、そして長い歴史を通じて育成されてきた食文化と、切っても切れない関係にあることは言うまでもない。生物にとっても、動物・植物・微生物を問わず、食塩の本体である塩化ナトリウム(NaCl)とりわけナトリウムイオン(Na^+)が必要不可欠の存在であるのは周知の事実である。が、時として、それが過剰になると悪影響をきたすケースも多々知られている。環境問題としての植物の塩害や健康問題としての高血圧症などがその例である。このような場合、しばしば生物はNaCl過剰傷害を取り除くいわゆる報酬機構を働かせ、自身の生体恒常性(ホメオスタシス)を保とうとする。こうした諸問題につき、長年に亘って、ライフサイエンスのさまざまな分野の多くの研究者たちは、それぞれの関心領域で奥深い研究を行い、大きな成果を挙げてきた。しかし、研究の大部分は各論(ケース・スタディー)から総論(普遍的結論)を誘導しようとする帰納法的アプローチに終始し、総論(網羅的研究)から各論(個別のケース)を推理しようとする演繹法的アプローチに欠けていた。

ところが、今世紀に入るや否や、ライフサイエンスの分野に1つの画期的な出来事が起きた。ヒト・ゲノム計画の完了がそれである。これにより、私たちの身体に存在する2万種類以上の遺伝子DNAのすべて(ゲノム)の構造が判明した。もともと、これ以前から、いくつかの代表的な動・植・微生物のゲノム解析は終了していたので、それらを合わせると、ヒトを含めた主要な生物の全遺伝子の構造が解読されたことになる。こうして世の中は、個々の遺伝子を逐一解明しようとしていた時代から、解明されたゲノムの情報を利用する時代へと変わったのである。いわゆる“ポストゲノム時代”の幕開けである。

ゲノム情報を利用する科学として先ずファルマコゲノミクス(医薬品ゲノム科学)が誕生した。次いで、トキシコゲ

ノミクス(毒性ゲノム科学)、フィットゲノミクス(植物ゲノム科学)、メタゲノミクス(微生物ゲノム科学)、ニュートリゲノミクス(栄養ゲノム科学)が相次いで旗揚げした。これらには共通点がある。いま、生体が何らかの外来物質の負荷を受けると、必ずといってよいほど、体内では全遺伝子のうちの1つあるいは複数が活性化(アップ・レギュレーション)されたり、不活性化(ダウン・レギュレーション)されたりする。そこで、DNAマイクロアレイ解析という手法を用いてこうした変動を計測すれば、外来刺激に対する生体の本質的な応答を数値的に把握することができる。しかも、計測の対象となる遺伝子は2万~3万にも及ぶので、解析は必然的に網羅的な幅広いものとなる。まず全体を網にかけ、それから個々のケースを抜き出し、詳しく研究していこうとするゲノミクスが演繹法的アプローチとされる所以である。

食塩の科学で、従来の奥深い研究にこの幅広い研究を付加し、いわばタテ糸にヨコ糸を織りなすことの必要性を強く感じていた私は、数年前、“ソルトゲノミクス”という新語を提唱し、これによって研究を補完すべきだと主張し、しかもこれを現行の各分野内“プロジェクト研究”とは別の、分野間連携型の“特定課題研究”として実現したい旨、本財団研究運営審議会の席で提案した。幸いにして提案が理事会・評議員会で承認され、平成15年度から発足したのが、微生物、高等植物、ヒト、哺乳類を対象とし、NaClとくに Na^+ の影響をそれぞれの関心領域について系統的に解析する本特定課題研究「ソルトゲノミクス」である。世界的にも類例をみないこの組織的研究では、規模の小さいオムニバス形式ではあるが、平成17年度末までの3年間に、きわめて先端的で独創的な、しかも尖鋭なアプローチが展開された。以下に詳細な研究報告を記載する。

2. ラン藻の塩誘導性遺伝子および塩シグナル伝達系のマイクロアレイ解析

鈴木 石根 (筑波大学大学院生命環境科学研究科)
兼崎 友 (基礎生物学研究所)

1. はじめに

生物は様々な環境条件に曝されると、多数の遺伝子の発現を制御してその条件に適応する⁽¹⁻³⁾。それらの遺伝子はストレス応答性遺伝子と呼ばれ、多くの生物から同定され、そのなかには適応能獲得の分子機構が明らかにされているものも少なくない。例えば、1.2 M の NaCl 存在下にも適応できるラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下 *Synechocystis* と略す) は、高塩濃度環境に曝されると、適合溶質のグルコシルグリセロール (GG) 合成系遺伝子の *ggpS* 遺伝子、および GG の取り込みに関わる輸送体をコードする遺伝子の発現が誘導される^(4, 5)。GG 合成能を欠損した株では、高塩濃度条件下で細胞壁が正常に合成されず、その結果細胞分裂の障害が起こり、細胞壁の強度が弱くなって細胞が肥大し、最終的には溶菌して致死となる⁽⁶⁾。また、塩ストレス条件下では、多数のシャペロンやタンパク質分解酵素を含む、熱ショックタンパク質の発現も誘導される⁽⁷⁾。このような既知の塩ストレス誘導性遺伝子で、*Synechocystis* の塩耐性能の獲得機構を説明できるのか、あるいは未知の高塩濃度に対する耐性能の獲得に関わる遺伝子があるのかを明らかにするため、*Synechocystis* の染色体上の遺伝子のほぼ全体をカバーする DNA マイクロアレイを用いて、塩ストレスにより発現制御を受ける新奇遺伝子群の解析を行った⁽⁸⁾。その結果、既知の耐塩性に関わる遺伝子に加えて、多数の機能未同定遺伝子の発現が塩ストレス条件で変化することが明らかになった。この結果は、未知の適応機構の存在を強く示唆するものであった。それら機能未同定遺伝子の機能の解明が、生物の塩ストレス環境への適応の機構を理解する上で重要であるが、これまでそれらの観点から機能未知遺伝子の解析が行われてはいない。本研究では、塩ストレス応答性機能未同定遺伝子のうち、酸素発生型の光合成生物 (ラン藻および植物) のゲノムにのみ保存された遺伝子に着目した。これらの遺伝子は光合成機能の塩ストレス適応に関わる可能性が考えられるので、それらの遺伝子破壊株を作製して、塩ストレス条件下での光合成活性に着目して解析を行うことにした。

また、それら塩ストレス誘導性遺伝子の発現制御に関わる分子機構の解明も、生物の塩ストレス適応機構の解

明に重要である。しかしながら、その分子機構は細胞機構の比較的単純な微生物においてすら、ほとんどと言ってよいほどわかっていない。大腸菌や枯草菌では、多くの塩誘導性遺伝子の発現がシグマ因子 RpoS および SigB によって制御され^(1, 7)、*Synechocystis* においても SigF と名付けられたシグマ因子が塩誘導性遺伝子発現の制御に関わっていることがすでに報告されている⁽⁹⁾。しかしながら、これらのシグマ因子は高塩濃度シグナルを直接検知するわけではないと考えられる。生物には塩ストレスを何らかの機構により検知し、塩ストレス誘導性遺伝子の発現を制御する塩ストレスセンサーとそのシグナル伝達因子が備わっていると予想される。そこで、我々は本特定課題研究の主要な研究目的として、*Synechocystis* から塩ストレスセンサーと塩シグナル伝達系の同定を試みることにした。まず我々は、原核生物からカビ、植物および原虫類に保存され、様々な環境因子のセンサーとして機能するヒスチジンキナーゼと、ヒスチジンキナーゼによりリン酸化され、活性が調節される転写因子であるレスポンスレギュレーターに着目した⁽¹⁰⁾。*Synechocystis* の染色体ゲノム上には 43 種のヒスチジンキナーゼと 41 種類のレスポンスレギュレーターが存在する⁽¹¹⁾。我々はこれまでに、これらヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレーターの遺伝子の遺伝子破壊株ライブラリーを作製している。これらの網羅的変異株ライブラリーから、低温センサー⁽¹²⁾、浸透圧センサー⁽¹³⁾、マンガニオンセンサー⁽¹⁴⁾、リン酸イオンセンサー⁽¹⁵⁾およびそのシグナル伝達系を同定し、この手法の有効性を実証している。本特定課題研究では、それら変異株と野生株の高塩濃度ストレス条件下でのゲノムレベルでの遺伝子発現を DNA マイクロアレイで解析することにより、塩ストレス応答に関わる、センサー分子とシグナル伝達系の解明を目指した。

2. 研究結果および考察

2.1 塩ストレス誘導性遺伝子

塩ストレスに対する *Synechocystis* の遺伝子発現のレベルでの応答を研究するために、DNA microarray を用いた。0.5 M の NaCl ストレスに 30 分間曝した *Synechocystis*

の細胞の遺伝子発現を調べると、塩ストレス条件下では 147 の遺伝子の発現が誘導され、また、228 の遺伝子が抑制されていた⁽⁸⁾。こうして得られた塩ストレス誘導性あるいは抑制性の遺伝子のうち、約半数が機能未知のタンパク質をコードすることがわかった。これらの塩ストレス条件下で発現量が変動する機能未知のタンパク質は、既知あるいは未知の塩ストレスへの適応過程に関わっていることが予想された。

Synechocystis の塩ストレス応答性の遺伝子約 350 個のうちに、遺伝子産物のアミノ酸一次構造からその機能が予測できないいわゆる機能未同定遺伝子のうち、光合成生物(ラン藻および植物)のゲノムにのみ保存された機能未同定遺伝子は 30 個存在した。これらの光合成生物にのみ高度に保存された塩ストレス応答性機能未同定遺伝子は、塩ストレス条件下での光合成機能の適応機構に必要なタンパク質をコードすると考えられた。そこで、これらの機能未同定遺伝子の破壊株を作製した。それら遺伝子破壊株の光合成活性を通常の培養条件下と、発現誘導が見られた塩ストレス条件下で野生株と比較した。その結果、特に *slr1674* 遺伝子の変異株で野生株に比べて 20%程度、光合成活性が低下していた。通常の培養条件下での光合成活性、およびそれぞれの培養条件下での呼吸活性は野生株と同様であったことから、この遺伝子の産物は塩ストレス条件下での光合成活性の維持に関わっているものと考えられた。まず、*slr1674* 遺伝子の塩ストレス条件下での発現誘導をノーザン解析により確認した。通常の培養条件下ではわずかに転写産物が検出されたが、0.5 M NaCl による塩ストレスを 20 分間与えた細胞では、mRNA 量が約 20 倍増加していた。この結果は、DNA マイクロアレイの結果とよく一致していた。*slr1674* 遺伝子破壊株では野生株で見られた様な、転写産物の蓄積は見られなかった、したがって、*slr1674* 遺伝子破壊株では正常な *slr1674* タンパク質は発現していないことが予想された。*Slr1674* タンパク質のオルソログは、*Anabaena* sp. PCC 7120 をはじめ数種のラン藻ゲノムとシロイヌナズナのゲノムに見出された。興味深いことに *Slr1674* タンパク質のパラログ *Slr1638* が、*Synechocystis* に存在し *Slr1638* のオルソログはすべてのラン藻のゲノムに保存されていた。*slr1638* 遺伝子の発現は、塩ストレス条件下で 2 倍程度までしか誘導されなかったが、そのアミノ酸配列の相同性から同一の機能を有するのではないかと考え、両者を併せて解析することとした。通常の培養条件下では、*Slr1674*、*Slr1638* いずれの変異株も野生株と同様の生育速度を示した。しかしながら、特に塩ストレスを与えた直後に著しい生育速度の低下が見られた。この

生育速度の低下はやがて回復し、その後は野生株とほぼ同様の速度で生育できることがわかった。これらの結果は、*Slr1674* と *Slr1638* は光合成機能および塩ストレス応答に必須な因子ではないが、塩ストレス条件下に素早く適応するために何らかの機能を有していると推定された。海洋性のラン藻のゲノムにおいて *slr1638* 遺伝子は、膜局在性のタンパク質の成熟化に関わるリーダーペプチダーゼ B 遺伝子 (*LepB*) と遺伝子クラスターを形成して存在していること、*Synechocystis* の DNA マイクロアレイのクラスタリング解析の結果、*slr1638* 遺伝子の発現パターンが *lepB* 遺伝子の発現パターンとよく類似していることが示されたことから、膜タンパク質のシグナル配列のプロセシングに、*Slr1674* と *Slr1638* の産物が関わっているのではないかと予想した。その仮説に基づき、*slr1674* の遺伝子産物の機能をさらに詳しく解析するため、光化学系サブユニット *PsbV* の蓄積量をウエスタンブロット法により解析した。その結果、*slr1674* 遺伝子破壊株では塩ストレスを与える前から *PsbV* の前駆体が野生株より多く蓄積していること、塩ストレス条件下では野生株、遺伝子破壊株のいずれにおいても前駆体の蓄積が見られること、変異株では 3 時間までストレスを与えると前駆体、成熟体ともに蓄積量が減少していることがわかった。これらの結果は *slr1674* が *PsbV* の成熟化に何らかの関わりも持つことを示唆する結果であると考えられた。今後は、*Slr1674* と *Slr1638* の産物の働きにより詳細な分子機構を解析していくとともに、その他の機能未知遺伝子の役割についてもさらに解析をしていく必要がある。

2. 2 塩ストレスセンサーおよび塩ストレスシグナル伝達系の解析

2. 3. 1 Hik33-Rre31

野生株とヒスチジンキナーゼおよびレスポンスレギュレーター遺伝子の網羅的破壊株ライブラリーを 0.5 M NaCl 条件に曝し、20 分後の遺伝子発現を DNA マイクロアレイを用いて、比較しセンサーおよびシグナル伝達系因子のノックアウトによる影響を調べた。その結果、5つのヒスチジンキナーゼ (Table I) と4つのレスポンスレギュレーター (Table II) の遺伝子破壊株で野生株とは異なる発現パターンを示し、それらが協調して塩ストレス条件下での遺伝子発現を制御するセンサー・シグナル伝達系を構成することが示唆された^(16,17)。

まず、*Hik33* の変異株では5つの遺伝子の塩誘導性が顕著に影響を受けていた⁽¹⁶⁾。これらの遺伝子は高等植物⁽¹⁸⁾および他のラン藻で明らかにされた強光誘導性遺伝子 (*hli*) のホモログ⁽¹⁹⁾: *ssr2595*, *ssl2542*, *ssl1632* を含んでいた。これらタンパク質は、強光下での光化学系の過剰な励起

エネルギーの消去に関わっていることが示唆されている。このことからそれらの遺伝子産物は、塩ストレス条件下で光合成の装置の保護に関わっている可能性が示唆される。Hik33 変異株では、機能未知のタンパク質をコードする *slr1544* の発現を制御していた。これら Hik33 により制御を受ける遺伝子群は、他の環境ストレスによっても誘導される。Hik33 は低温ストレスおよび浸透圧ストレスによる遺伝子発現制御に関わることが報告されている。塩ストレス条件下で Hik33 により発現制御を受ける5つの遺伝子はいずれも、低温および高浸透圧で誘導される遺伝子群であった。塩ストレスは浸透圧のストレスも同時に細胞に与えるので、塩による浸透圧の変化が Hik33 により検知され共通の遺伝子群の発現が制御されている可能性が考えられる。*slr1544* 遺伝子の塩ストレス条件下での発現を野生株とレスポンスレギュレーター変異株でスロットブロット解析により測定した、ほとんどのレスポンスレギュレーター変異株では野生株と同様の発現の誘導が観察されたが、中で1つのレスポンスレギュレーター変異株 Rre31 だけは *slr1544* の発現がほぼ完全に押さえられていた⁽¹⁷⁾。DNA microarray を用いた解析からその他の Hik33 により発現制御がみられた遺伝子も Rre31 の変異株では発現が見られなくなっていた。すなわち、Hik33 と Rre31 は塩ストレス条件下で同じ遺伝子群の発現に関わっており、Hik33 により受容された塩ストレスシグナルは Rre31 を介して遺伝子発現の制御まで伝えられていることが示唆された⁽¹⁷⁾。

しかしながら、たいへん興味深いことに Rre31 は低温条件下での遺伝子発現に関わっていないことがわかった。Hik33 は塩ストレス条件下では Rre31 とともに働き、塩シグナル伝達系を構成するが、おそらく低温条件下ではレスポンスレギュレーター以外のレスポンスレギュレーターにシグナルを伝達しているようである。この結果は、これまで知られてきたヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレーターから構成される二成分制御系の常識から異なった結果である。しかしながら、酵母のヒスチジンキナーゼが浸透圧と酸化ストレスの2種類のシグナルを検知できる可能性が、示唆されていること、大腸菌の全てのヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレーターの組み合わせで試験管内でのリン酸転位反応を調べた結果から、極めて高い頻度でこれまで知られていたペア以外の経路にリン酸基の転移が示されたことから、二成分制御系はこれまで考えられていた様な⁽¹⁰⁾リジッドなシグナル伝達系路ではなく、二成分制御系間のクロストークによって、より柔軟な応答が可能なシグナル伝達系路である可能性が示唆された。Hik33 を含む経路はその好例であると考えられ

る。

2.3.2 Hik34-Rre1

Hik34 の変異により熱ショックタンパク質遺伝子の発現レベルは通常の培養条件下においても上昇する^(20,21)。また、Hik34 の変異株は野生株や他のヒスチジンキナーゼの変異株に比べて熱ショックに対して耐性であった。Hik34 の変異株においても熱ショック条件下での遺伝子発現の誘導はほぼ野生株と同様に見られた。しかしながら、野生株では熱ショックタンパク質遺伝子の熱ショック誘導は一過性であるが、Hik34 変異株ではより長時間発現が持続していた。これらの結果は Hik34 が何らかの機構で熱ショックタンパク質遺伝子の発現に関わっていることを示唆するものである。しかしながら、Hik34 がどの様に熱ショック応答に関わるかはわかっていない。一方、Hik34 変異株では、通常塩ストレスにより発現誘導が見られる遺伝子のうち、シャペロンタンパク質 *slr0093* (*dnaJ*)、*sll1514* (*hspA*)および *sll0170* (*dnaK*)、プロテアーゼサブユニット *slr1641* (*clpB*)および Superoxide dismutase *slr1516* (*sodB*)のように、ストレス応答に関連する既知のタンパク質遺伝子が誘導を受けなくなった⁽¹⁶⁾。この点は熱ショック条件、塩ストレス条件下で類似の遺伝子の発現が制御されるにもかかわらず、その制御機構への Hik34 の関わりは異なっていることを示す、大変興味深い結果である。Hik34 の下流で機能するレスポンスレギュレーターを *hspA* 遺伝子の発現を指標にスクリーニングを行った。その結果、Rre1 の変異株が *hspA* 遺伝子の塩ストレス誘導を消失することが示された⁽¹⁷⁾。ところが、DNA マイクロアレイ解析の結果、Rre1 により塩ストレス条件下で発現の制御が見られた遺伝子群は Hik34 で制御を受ける遺伝子群よりさらに多いことがわかった。すなわち、Rre1 は Hik34 からの刺激と少なくとももう一つ別のヒスチジンキナーゼからのシグナルを受け取っている可能性が示された。Rre1 が Hik34 の外にどのヒスチジンキナーゼからシグナルを受け取るのかは大変興味深い課題である。熱ショック条件下では Hik34 の変異が遺伝子の発現にさほど影響しないが、Rre1 の変異は熱ショック誘導に大いに関わっていることが示された。Hik34 以外のヒスチジンキナーゼが熱ショック条件下で主要なセンサー分子である可能性が示唆された⁽¹⁷⁾。

酵母2ハイブリッドスクリーニング法により、*Synechocystis* の二成分制御系因子の相互作用因子の網羅的スクリーニングがなされ、その結果、Rre1 は Hik2 と相互作用が見られることが示された。Hik2 は通常の培養条件下で完全なノックアウトラインを作製することができない遺伝子で、おそらく必須遺伝子であることが推定されて

いる。Hik2 から Rre1 へのシグナルの伝達や両遺伝子の改変株の詳細な解析結果を待たなければならないが、おそらく Hik34-Rre1、Hik2-Rre1 という経路が並列に機能していると考えられる。

2. 3. 3 Hik16-Hik41-Rre17

ヒスチジンキナーゼ変異株のスクリーニングにより、Hik16 の変異株と Hik41 の変異株で同じ遺伝子群 (*sll0939*, *slr0967*, *sll0938*) の発現が影響を受けることが示されていた。アミノ酸の一次配列情報から、Hik16 は膜貫通性のヒスチジンキナーゼであり、一方 Hik41 は細胞質に存在する可溶性のタンパク質であること、また Hik41 は N 末端のシグナルインプットドメインに他のヒスチジンキナーゼからシグナルを受け取るレシーバドメインと相同な配列が存在するハイブリッド型のヒスチジンキナーゼであったことから、Hik16 が受容した塩ストレスシグナルを Hik41 が受け取りさらに下流のレスポンスレギュレーターに伝達する経路が考えられた⁽¹⁶⁾。Hik16-Hik41 で制御を受ける *slr0967* の発現を指標にレスポンスレギュレーター変異株のスクリーニングを行い、Rre17 がそれら2つのヒスチジンキナーゼ変異株と同様に *slr0967* の発現が認められなくなることがわかった。DNA マイクロアレイを用いた解析により、予想されたように *sll0939*, *slr0967*, *sll0938* の3種の遺伝子の発現が Hik16, Hik41, Rre17 のいずれの変異株においても、もはや塩ストレス誘導を示さなかった。これらの結果から、Hik16-Hik41 の下流には Rre17 が位置していることが示された。Hik16 と Rre17 は染色体上に隣接して存在する。大腸菌や枯草菌ではヒスチジンキナーゼとともに働くレスポンスレギュレーターは染色体上に隣接して存在し共転写される^(16,17)。Hik16 と Rre17 はそのアナロジーを *Synechocystis* においても示した例と言える。

Hik16-Hik41-Rre17 の発現制御系で制御を受ける遺伝子群 (*sll0939*, *slr0967*, *sll0938*) の発現制御様式を、0.5 M NaCl, 0.25 M Na₂SO₄, 0.3 M NaNO₃, 0.375 M KCl, Osmotic stress (0.5 M Sorbitol) の条件で比較した。これらの環境条件で野生株の生育速度はいずれも通常の培養条件の約半分に低下することがわかっている条件である。その結果、これらの遺伝子群は 0.5 M NaCl の条件下でのみ顕著な発現の誘導が見られることがわかった。Hik16 は Na⁺ と Cl⁻ の両方を検知しており、Na⁺ あるいは Cl⁻ だけでは発現の誘導に関わっていないことが示された⁽¹⁶⁾。

2. 3. 4 Hik10-Rre3

Hik10 はプロテアーゼをコードする *htrA* 遺伝子の高浸透圧条件下での発現誘導を制御する。Hik10 とともに働

くレスポンスレギュレーターは Rre3 であった。*htrA* 遺伝子の塩ストレス誘導性にも Hik10-Rre3 の2成分情報伝達系が関わっているかどうかを確認するため、*htrA* 遺伝子をプローブとしたスロットブロット解析および DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、Hik10-Rre3 は塩ストレス条件下においても *htrA* 遺伝子の発現を制御することが示された^(16,17)。Hik10 と Rre3 のペアは、酵母2ハイブリッドスクリーニングの過程でも同定され、遺伝子破壊による機能解析とよく一致する結果が得られた例となっている。

3. 今後の課題

本特定課題研究において、我々は DNA マイクロアレイとシグナルセンサーおよびシグナル伝達体の遺伝子の網羅的破壊株ライブラリーを用いて、少なくとも4つの二成分制御系が独立に、塩ストレス応答性遺伝子の発現を制御していることを見出した。その中には塩ストレスを初めとして複数の環境ストレス条件に応答し、少なくとも2種類のレスポンスレギュレーターにシグナルを分配して遺伝子の発現制御に関わる Hik33 や、Hik34 と Hik2 の少なくとも2つのヒスチジンキナーゼからシグナルを統合して、ストレス応答性遺伝子の発現を制御する Rre1 が含まれていた。このような二成分制御系因子間のシグナル伝達のクロストークの制御系はまだ解明されていない研究分野である。今後、シグナルの分配や統合といったクロストークがどのようなメカニズムで制御され、細胞内で適切に行われるのかについて、明らかにされる必要がある。我々は Hik33 の C 末端に特異的に結合する新奇タンパク質 Ssl3451 を見出した。試験管内でこのタンパク質と Hik33 を共存させると、Hik33 の自己リン酸化の活性が10倍以上高まること、Hik33 から Rre31 へのリン酸転位反応が阻害されることがわかってきた。今後、このような二成分制御系の活性を制御する新奇因子が、細胞内でのシグナルの伝達およびクロストークにどのような様に関わっているのかを明らかにし、その役割を詳細に明らかにしていく必要がある。

ラン藻の塩ストレス応答機構の網羅的解析により、塩ストレス応答性遺伝子の大部分は制御メカニズムが明らかにされたが、まだ制御機構が不明な遺伝子群が存在する。それらは本研究課題で対象とした二成分制御系以外の発現調節機構によって制御されているのか、複数の二成分制御系が強調して作用し、単一の経路をノックアウトしても効果が見られないのか、現時点では定かではないが、その制御メカニズムについても検証していかねばならない。また、本研究課題で明らかにしたセンサー分子が塩ストレスをどのようなメカニズムで検知し、情報を下流の

レスポンスレギュレーターへ伝達するののかの最も重要な情報は全く明らかにされていない。これは塩ストレスシグナルの受容のみならず、ほとんどのヒスチジンキナーゼに当てはまることであるが、いくつかのヒスチジンキナーゼの機能があきらかにされてきているので、今後はそのシグナル受容のメカニズムについての解析が必要となってくると考えられる。

本特定領域研究において、塩ストレス応答性の光合成生物に特異的に保存された機能未知遺伝子の機能解析を行った。これらの機能未知遺伝子は、光合成機能に必須な遺伝子ではなく、塩ストレス条件下での光合成機構の活性の維持に関わるタンパク質をコードすると予想された。その仮説の通り、それら遺伝子の破壊株は通常の培養条件下で致死とはならず、塩ストレス条件下で野生株より適応に長い時間が必要だったり、生育速度に差が見られたり、細胞内の光合成色素量が少なかったりする表現型を示した。本研究の過程で、われわれは *slr1674* 遺伝子に着目し、その機構の解析を目指したが、残念ながら確実な結論を得るには至っていない。今後、作製した機能未知遺伝子の変異株のさらなる解析を通して、機能を明らかにし未知の塩ストレス耐性の分子機構を明らかにする必要がある。

4. 結論

本特定課題研究で、塩ストレス条件で遺伝子発現の制御に関わる可能性が示唆された 5 種類のヒスチジンキナーゼと4つのレスポンスレギュレーターを同定した。分子シャペロンとプロテアーゼに代表されるストレス・レスポンスに関わるタンパク質遺伝子の発現は、*Hik34-Rre1* により制御を受け、様々なストレス条件の下での細胞膜の流動性、あるいは物性の変化によって引き起こされる遺伝子発現の誘導は、*Hik33-Rre31* により制御される。更に、*Hik16-Hik41* と *Rre17* は、特に Na と Cl のイオンに応答し、機能未知のタンパク質遺伝子の発現を制御する。*Hik10-Rre3* はプロテアーゼ *HtrA* 遺伝子の発現を制御する。しかしながら、これらは塩ストレス誘導性遺伝子の一部の遺伝子の発現を説明できるにすぎない。他の多くの塩性の誘致可能な遺伝子は、ヒスチジンキナーゼの変異により影響を受けなかった。今後はそれらセンサー分子の下流で遺伝子発現の制御に直接関わるシグナル伝達系路・発現制御機構の解析、およびセンサー分子が如何に塩シグナルを検知するののかについての解析が必要であると考えられる。今後はセンサー分子が如何に塩シグナルを検知し、シグナルをレスポンスレギュレーターに伝達するの分子機構についての解析が必要であると

考えられる。*Hik33* は少なくとも2種類のレスポンスレギュレーターへシグナルを分配し、*Rre1* は少なくとも2つのヒスチジンキナーゼからシグナルを受け取る可能性が示唆されている。二成分制御系間のシグナルのクロストーク(統合と分配)は、今後ホットな研究対象分野となることが予想され、その分子機構についてさらに解析することが必要である。

引用文献

1. Hecker, M., Schumann, W., & Volker, U. (1996) *Mol Microbiol* **19**, 417-428.
2. Los, D. A., & Murata, N. (1999) *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**, 221-230.
3. Vinnemeier, J., & Hagemann, M. (1999) *Arch Microbiol* **172**, 377-386.
4. Engelbrecht, F., Marin, K., & Hagemann, M. (1999) *Appl Environ Microbiol* **65**, 4822-4829.
5. Mikkat, S., Hagemann, M., & Schoor, A. (1996) *Microbiology* **142**, 1725-1732.
6. Ferjani, A., Mustardy, L., Sulpice, R., Marin, K., Suzuki, I., Hagemann, M., & Murata, N. (2003) *Plant Physiol* **131**, 1628-1637.
7. Volker, U., Mach, H., Schmid, R., & Hecker, M. (1992) *J Gen Microbiol* **138**, 2125-2135.
8. Kanasaki, Y., Suzuki, I., Allakhverdiev, S. I., Mikami, K. & Murata, N. (2002) *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 339-348.
9. Huckauf, J., Nomura, C., Forchhammer, K., & Hagemann, M. (2000) *Microbiology* **146**, 2877-2889.
10. Koretke, K. K., Lupas, A. N., Warren, P. V., Rosenberg, M., & Brown, J. R. (2000) *Mol Biol Evol* **17**, 1956-1970.
11. Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., & Tabata, S. (1996) *DNA Res* **3**, 109-136.
12. Suzuki, I., Los, D. A., Kanasaki, Y., Mikami, K., & Murata, N. (2000) *EMBO J* **19**, 1327-1334.
13. Mikami, K., Kanasaki, Y., Suzuki, I., & Murata, N. (2002) *Mol Microbiol* **46**, 905-915.
14. Yamaguchi, K., Suzuki, I., Yamamoto, H., Lyukevich, A., Bodrova, I., Los, D. A., Piven, I., Zinchenko, V.,

- Kanehisa, M., & Murata, N. (2002) *Plant Cell* **14**, 2901-2913.
15. Hirani, T. A., Suzuki, I., Murata, N., Hayashi, H., & Eaton-Rye, J. J. (2001) *Plant Mol Biol* **45**, 133-144.
16. Marin, K., Suzuki, I., Yamaguchi, K., Ribbeck, K., Yamamoto, H., Kanesaki, Y., Hagemann, M., & Murata, N. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9061-9066.
17. Shoumskaya, M. A., Paithoonrangsarid, K., Kanesaki, Y., Los, D. A., Zinchenko, V. V., Tanticharoen, M., Suzuki, I., & Murata, N. (2005) *J Biol Chem* **280**, 21531-21538.
18. Dolganov, N. A., Bhaya, D., & Grossman, A. R. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 636-640.
19. He, Q., Dolganov, N., Bjorkman, O., & Grossman, A. R. (2001) *J Biol Chem* **276**, 306-314.
20. Suzuki, I., Kanesaki, Y., Hayashi, H., Hall, J. J., Simon, W. J., Slabas, A. R., & Murata, N. (2005) *Plant Physiol* **138**, 1409-1421.
21. Slabas, A. R., Suzuki, I., Murata, N., Simon, W. J., & Hall, J. J. (2006) *Proteomics* **6**, 845-864.

表 1

Effects of the inactivation of *Hik33*, *Hik34*, *Hik16*, *Hik41*, and *Hik10* on the induction by salt stress of gene expression

Cells, grown under control conditions, were incubated with 0.5 M NaCl for 20 min. Each value indicates the ratio of the transcript in salt-stress cells to that in controls. The numbering of ORFs corresponds to that in the database on the Cyanobase website (ftp.kazusa.or.jp/pub/cyano/Synechocystis/6803ann_new_old3.xls). This table lists the salt stress-inducible genes with induction factors higher than 4.0 in control cells. Modified from Maria et al. (17)

ORF	Name	Product	Induction by 0.5 M NaCl							Control ^c
			WT ^a	Δ Hik33 ^b	Δ Hik34 ^b	Δ Hik16 ^b	Δ Hik41 ^b	Δ Hik10 ^b		
Genes whose induction by salt stress was reduced in Δ Rre31 cells (Group 1)										
<i>slr1544^d</i>		Putative protein	23.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1 (0) ^{ae}	7.9 ± 2.4 (37)	25.4 ± 5.4 (131)	14.2 ± 2.5 (71)	10.5 ± 2.0 (51)	19.6 ± 3.3	
<i>slr1687</i>		Putative protein	16.0 ± 0.4	4.6 ± 0.4 (35)	6.6 ± 0.7 (54)	12.6 ± 0.9 (112)	9.9 ± 0.0 (86)	10.7 ± 2.4 (94)	11.3 ± 1.5	
<i>ssr2595</i>	<i>hitB</i>	High light-inducible protein	15.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1 (-1)	7.4 ± 3.4 (65)	11.2 ± 1.3 (104)	11.7 ± 1.4 (109)	6.3 ± 2.1 (54)	10.8 ± 1.6	
<i>ssl2542</i>	<i>hliA</i>	High light-inducible protein	9.8 ± 0.0	0.9 ± 0.0 (-2)	4.7 ± 2.2 (51)	13.9 ± 4.0 (176)	5.0 ± 0.9 (55)	5.3 ± 0.5 (59)	8.3 ± 1.3	
<i>slr1722</i>		Putative protein	10.3 ± 0.2	3.4 ± 0.2 (36)	15.2 ± 6.0 (213)	5.9 ± 0.0 (73)	3.2 ± 0.3 (33)	9.7 ± 3.5 (131)	7.7 ± 1.2	
<i>slr1621^f</i>		Membrane protein	8.4 ± 0.8	5.9 ± 0.8 (81)	9.0 ± 0.1 (131)	6.9 ± 0.2 (97)	5.9 ± 0.5 (80)	6.4 ± 1.3 (88)	7.1 ± 0.5	
<i>ssr2016</i>		Putative protein	6.4 ± 0.0	0.7 ± 0.0 (-5)	2.1 ± 0.8 (18)	7.1 ± 2.2 (100)	6.4 ± 0.3 (88)	3.2 ± 0.8 (36)	7.1 ± 1.3	
<i>ssl1633</i>	<i>hliC</i>	High light-inducible protein	4.9 ± 0.1	2.4 ± 0.1 (28)	2.8 ± 0.3 (35)	7.5 ± 0.7 (131)	5.1 ± 1.8 (82)	3.8 ± 1.9 (56)	6.0 ± 0.9	
<i>slr1483</i>		Periplasmic protein	8.0 ± 0.0	0.7 ± 0.0 (-7)	2.9 ± 0.6 (41)	4.0 ± 0.2 (67)	2.6 ± 0.3 (35)	5.2 ± 0.8 (94)	5.5 ± 0.9	
<i>slr2012</i>	<i>sigD</i>	RNA polymerase σ factor	4.9 ± 0.4	1.8 ± 0.4 (23)	3.2 ± 0.6 (59)	6.5 ± 0.6 (149)	4.7 ± 0.5 (101)	4.5 ± 0.8 (95)	4.7 ± 0.4	
<i>slr1797</i>	<i>ycj21</i>	Yec21 gene product	6.2 ± 0.2	2.3 ± 0.2 (40)	2.9 ± 0.4 (57)	4.6 ± 0.1 (107)	2.9 ± 0.2 (56)	3.7 ± 0.5 (79)	4.4 ± 0.5	
Genes whose induction by salt stress was reduced in Δ Rrel cells (Group 2)										
<i>slr0528</i>		Putative protein	74.4 ± 4.0	16.2 ± 4.0 (33)	22.2 ± 5.3 (46)	47.2 ± 3.6 (100)	35.7 ± 3.6 (75)	45.9 ± 11.6 (97)	47.1 ± 7.9	
<i>slr1514</i>	<i>hspA</i>	Small heat-shock protein	49.7 ± 6.8	47.2 ± 6.8 (112)	12.1 ± 1.6 (27)	41.8 ± 0.3 (99)	53.0 ± 7.3 (126)	28.3 ± 16.0 (66)	42.1 ± 5.1	
<i>slr0959</i>		Putative protein	19.3 ± 1.1	18.2 ± 1.1 (99)	10.0 ± 0.2 (52)	13.1 ± 0.7 (70)	35.2 ± 1.9 (198)	15.5 ± 1.6 (84)	18.3 ± 2.1	
<i>slr0306</i>	<i>sigB</i>	RNA polymerase σ factor	20.3 ± 2.2	14.5 ± 2.2 (91)	12.5 ± 1.6 (77)	14.3 ± 0.6 (90)	14.4 ± 2.4 (90)	18.9 ± 4.0 (121)	15.9 ± 1.7	
<i>slr1641</i>	<i>clpB1</i>	ClpB protein	22.3 ± 1.3	9.9 ± 1.3 (62)	7.0 ± 0.6 (42)	18.4 ± 0.3 (123)	11.3 ± 1.3 (72)	22.0 ± 5.9 (148)	15.2 ± 1.8	
<i>slr1603</i>		Putative protein	22.5 ± 2.1	11.0 ± 2.1 (74)	9.8 ± 2.4 (66)	18.3 ± 0.0 (129)	8.5 ± 0.1 (56)	18.1 ± 4.0 (128)	14.4 ± 1.7	
<i>slr0093</i>	<i>dnaJ</i>	Heat-shock protein 40	9.4 ± 2.0	17.2 ± 2.0 (139)	4.5 ± 0.0 (30)	13.1 ± 0.7 (103)	17.9 ± 1.2 (145)	14.5 ± 0.6 (116)	12.7 ± 1.4	
<i>slr0846</i>		Putative protein	14.6 ± 1.1	8.5 ± 1.1 (74)	6.5 ± 0.1 (55)	12.2 ± 1.1 (111)	9.9 ± 2.1 (88)	11.8 ± 3.1 (107)	11.1 ± 1.5	
<i>ssl3044</i>		Hydrogenase component	14.5 ± 0.0	6.0 ± 0.0 (50)	6.0 ± 0.2 (50)	12.5 ± 1.5 (116)	14.4 ± 2.1 (136)	9.7 ± 1.8 (88)	10.9 ± 1.2	
<i>slr1915</i>		Putative protein	10.3 ± 0.5	10.9 ± 0.5 (110)	5.6 ± 0.1 (51)	10.7 ± 1.1 (107)	11.9 ± 0.6 (120)	10.6 ± 1.7 (106)	10.0 ± 0.9	
<i>slr1516</i>	<i>sodB</i>	Superoxide dismutase	16.1 ± 2.0	10.4 ± 2.0 (107)	6.4 ± 0.1 (61)	6.7 ± 0.5 (65)	7.7 ± 1.2 (76)	8.3 ± 1.2 (83)	9.8 ± 1.1	
<i>slr0170</i>	<i>dnaK2</i>	Heat-shock protein 70	12.0 ± 0.2	7.1 ± 0.2 (80)	3.9 ± 0.2 (37)	7.4 ± 0.4 (83)	8.4 ± 1.0 (96)	9.8 ± 1.5 (114)	8.7 ± 1.0	
<i>slr1884</i>		Putative protein	11.3 ± 0.8	7.4 ± 0.8 (88)	5.0 ± 0.8 (55)	9.9 ± 0.4 (121)	7.4 ± 0.8 (87)	10.5 ± 0.4 (129)	8.3 ± 0.8	
<i>slr1963</i>		Water-soluble carotenoid protein	14.2 ± 2.2	10.5 ± 2.2 (131)	5.1 ± 0.1 (56)	7.0 ± 0.6 (82)	8.6 ± 1.5 (104)	8.9 ± 0.8 (108)	8.3 ± 1.0	
<i>ssr3188</i>		Putative protein	9.4 ± 1.5	8.3 ± 1.5 (111)	5.8 ± 0.2 (73)	9.2 ± 1.4 (126)	6.9 ± 0.8 (90)	7.4 ± 1.0 (98)	7.5 ± 0.6	
<i>slr1686</i>		Putative protein	7.3 ± 0.7	5.1 ± 0.7 (72)	3.3 ± 0.1 (40)	8.2 ± 0.5 (126)	11.7 ± 0.7 (187)	6.4 ± 1.5 (94)	6.7 ± 0.7	
<i>slr0852</i>		Putative protein	5.9 ± 0.1	6.4 ± 0.1 (103)	4.0 ± 0.2 (58)	7.6 ± 0.6 (127)	7.2 ± 0.6 (120)	7.4 ± 1.1 (123)	6.2 ± 0.5	
<i>slr1167</i>	<i>pbp</i>	Penicillin-binding protein 4	11.1 ± 0.5	6.9 ± 0.5 (117)	0.8 ± 0.0 (-4)	5.8 ± 0.3 (95)	7.0 ± 0.9 (119)	6.2 ± 1.7 (103)	6.1 ± 0.9	
<i>slr0095</i>		O-methyltransferase	4.8 ± 0.3	7.2 ± 0.3 (131)	2.4 ± 0.3 (29)	5.3 ± 0.5 (92)	8.3 ± 0.3 (155)	5.5 ± 1.1 (95)	5.7 ± 0.7	
<i>slr1916</i>		Esterase	6.1 ± 0.1	7.9 ± 0.1 (152)	3.2 ± 0.4 (47)	4.5 ± 0.2 (77)	9.6 ± 1.1 (190)	4.6 ± 0.5 (80)	5.5 ± 0.6	
<i>ssl2971</i>		Putative protein	7.2 ± 0.6	4.4 ± 0.6 (81)	3.4 ± 0.4 (58)	5.8 ± 0.3 (113)	3.9 ± 0.1 (70)	6.7 ± 1.1 (136)	5.2 ± 0.5	
<i>slr0853</i>	<i>rimI</i>	Ribosomal-protein-alanine acetyltransferase	4.5 ± 0.5	6.1 ± 0.5 (129)	3.4 ± 0.0 (61)	6.4 ± 1.4 (138)	7.4 ± 0.9 (162)	6.0 ± 2.1 (127)	4.9 ± 0.5	

ORF	Name	Product	Induction by 0.5 M NaCl							Control ^c
			WT ^a	Δ Hik33 ^b	Δ Hik34 ^b	Δ Hik16 ^b	Δ Hik41 ^b	Δ Hik10 ^b		
<i>slr1192</i>		Zinc-containing alcohol dehydrogenase family	5.1 ± 0.2	4.2 ± 0.2 (87)	3.4 ± 0.1 (66)	4.8 ± 0.4 (104)	5.3 ± 0.1 (118)	6.2 ± 0.7 (144)	4.6 ± 0.3	
<i>slr0416</i>	<i>groEL2</i>	60-kDa chaperonin 2	5.5 ± 0.8	4.9 ± 0.8 (118)	2.8 ± 0.2 (55)	3.6 ± 0.3 (77)	4.6 ± 0.9 (109)	4.4 ± 0.4 (102)	4.4 ± 0.4	
<i>slr1107</i>		Putative protein	5.0 ± 0.3	3.6 ± 0.3 (81)	2.9 ± 0.2 (59)	6.1 ± 0.5 (158)	3.7 ± 0.1 (83)	4.5 ± 0.3 (108)	4.2 ± 0.3	
Genes whose induction by salt stress was reduced in Δ Rre17 cells (Group 3)										
<i>slr0939</i>		Putative protein	35.8 ± 3.1	40.8 ± 3.1 (184)	22.8 ± 0.8 (101)	3.1 ± 0.7 (10)	1.2 ± 0.1 (1)	27.6 ± 7.7 (123)	22.6 ± 3.8	
<i>slr1704</i>		Putative protein	11.9 ± 3.4	22.0 ± 3.4 (99)	24.7 ± 1.0 (112)	31.8 ± 0.9 (145)	15.6 ± 7.9 (69)	39.4 ± 8.3 (181)	22.2 ± 3.0	
<i>slr0967</i>		Putative protein	32.3 ± 8.9	27.4 ± 8.9 (148)	19.5 ± 1.2 (104)	3.5 ± 0.5 (14)	2.0 ± 0.0 (6)	24.9 ± 3.8 (134)	18.8 ± 2.9	
<i>ssr2194</i>		Putative protein	8.9 ± 2.1	15.7 ± 2.1 (99)	30.5 ± 9.1 (198)	30.9 ± 7.2 (201)	11.8 ± 5.1 (73)	14.1 ± 8.0 (88)	15.9 ± 2.5	
<i>slr0938</i>		<i>N</i> -Succinyl diaminopimelate aminotransferase	8.5 ± 4.1	16.5 ± 4.1 (250)	5.8 ± 0.3 (77)	1.0 ± 0.1 (0)	0.9 ± 0.1 (-1)	11.0 ± 4.5 (161)	7.2 ± 1.5	
Gene whose induction by salt stress was reduced in Δ Rre3 cells (Group 4)										
<i>slr1204</i>	<i>htrA</i>	Serine protease HtrA	9.5 ± 0.8	6.4 ± 0.8 (144)	5.0 ± 0.1 (99)	6.8 ± 0.0 (119)	5.4 ± 1.0 (90)	1.2 ± 0.1 (5)	5.9 ± 0.7	
Genes whose induction by salt stress was unaffected in Δ Rre31, Δ Rre1, Δ Rre17, and Δ Rre3 cells (Group 5)										
<i>slr1862</i>		Putative protein	152.4 ± 26.4	144.3 ± 26.4 (94)	114.5 ± 3.3 (75)	199.3 ± 10.1 (131)	108.1 ± 4.8 (71)	109.2 ± 8.7 (71)	152.7 ± 12.6	
<i>slr1863</i>		Putative protein	106.5 ± 8.3	124.9 ± 8.3 (102)	88.8 ± 4.1 (72)	126.4 ± 11.1 (103)	143.8 ± 22.8 (117)	83.8 ± 45.7 (68)	122.7 ± 8.1	
<i>slr1566</i>	<i>ggsS</i>	Glucosylglycerol-3-phosphate synthase	13.2 ± 2.3	18.8 ± 2.3 (110)	20.4 ± 1.7 (119)	11.5 ± 0.8 (65)	19.0 ± 2.8 (111)	16.9 ± 3.9 (98)	17.2 ± 1.7	
<i>slr1085</i>	<i>gpd</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	9.7 ± 0.8	12.6 ± 0.8 (111)	9.1 ± 2.6 (78)	6.5 ± 0.2 (53)	16.2 ± 2.0 (147)	10.9 ± 2.7 (95)	11.4 ± 1.0	
<i>slr0895</i>		Putative protein	7.2 ± 1.1	7.3 ± 1.1 (98)	5.3 ± 0.5 (66)	6.4 ± 1.5 (84)	12.3 ± 2.1 (176)	4.0 ± 1.0 (47)	7.4 ± 0.8	
<i>slr1652</i>		Putative protein	6.1 ± 0.7	10.0 ± 0.7 (142)	4.0 ± 0.3 (48)	7.2 ± 0.6 (98)	9.4 ± 0.7 (132)	5.5 ± 1.3 (71)	7.3 ± 0.6	
<i>slr1594</i>	<i>ndhR</i>	Transcriptional regulator of <i>ndhF3</i> operon	9.7 ± 0.4	5.1 ± 0.4 (69)	7.3 ± 1.2 (105)	5.9 ± 0.8 (82)	5.4 ± 0.1 (74)	4.5 ± 1.6 (59)	7.0 ± 0.5	
<i>ssr2153</i>		Putative protein	4.6 ± 3.5	8.0 ± 3.5 (118)	7.6 ± 0.4 (111)	9.4 ± 3.6 (141)	9.4 ± 4.4 (141)	7.4 ± 4.7 (107)	6.9 ± 1.0	
<i>slr1738</i>		Putative protein	6.5 ± 0.1	6.4 ± 0.1 (106)	5.2 ± 0.8 (81)	6.5 ± 0.5 (107)	7.0 ± 0.0 (115)	7.0 ± 1.2 (116)	6.2 ± 0.4	
<i>slr1932</i>		Putative protein	5.8 ± 0.2	6.7 ± 0.2 (121)	7.0 ± 1.0 (126)	4.5 ± 0.2 (73)	8.8 ± 0.8 (165)	3.7 ± 0.3 (56)	5.7 ± 0.4	
<i>slr1620</i>		Putative protein	6.0 ± 0.4	6.4 ± 0.4 (124)	4.8 ± 0.7 (86)	5.1 ± 0.7 (94)	7.0 ± 0.2 (138)	5.4 ± 1.1 (101)	5.4 ± 0.5	
Probable phyloquinone-biosynthetic										
<i>slr1653</i>	<i>menG</i>	methyltransferase	5.1 ± 0.1	6.0 ± 0.1 (118)	3.7 ± 0.5 (65)	5.3 ± 0.5 (101)	5.7 ± 1.0 (112)	4.5 ± 0.6 (84)	5.2 ± 0.4	
<i>slr1894</i>		Putative protein	4.9 ± 0.1	3.0 ± 0.1 (64)	3.3 ± 0.2 (220)	4.2 ± 0.0 (78)	3.9 ± 0.3 (66)	4.9 ± 0.2 (109)	4.5 ± 0.5	
<i>slr1501</i>		Putative protein	5.2 ± 0.2	3.3 ± 0.2 (58)	8.8 ± 2.9 (67)	3.7 ± 0.0 (95)	3.3 ± 0.2 (85)	4.9 ± 0.6 (114)	4.4 ± 0.3	

^a These values represent the averaged induction factors and ranges of deviation of results, which were calculated from the results of four independent experiments with wild-type cells.

^b These values represent the averaged induction factors and ranges of deviation of results, which were calculated from the results of two independent experiments with Rre mutant cells.

^c Induction factors and S.D. of controls were calculated by averaging the induction factors from 22 independent experiments (four experiments with wild-type cells and two experiments each with Δ Hik33, Δ Hik34, Δ Hik41, Δ Hik10, Δ Rre31, Δ Rre1, Δ Rre17, and Δ Rre3 mutant cells).

^d Underlining of ORFs indicates a strictly regulated gene whose RE was lower than 15 for some Rre.

^e The number in parentheses is the RE.

^f The salt stress-inducible expression of the *slr1621* gene was controlled by Rre31 but not by Hik33

表 2

Salt stress-inducible genes and effects of the inactivation of *Rre31*, *Rre1*, *Rre17*, and *Rre3* on the induction of these genes

Cells, grown under control conditions, were incubated with 0.5 M NaCl for 20 min. Each value indicates the ratio of the level of the transcript in salt-stressed cells to that in controls. The numbering of ORFs corresponds to that in the database on the Cyanobase website (ftp.kazusa.or.jp/pub/cyano/Synechocystis/6803ann_new_old3.xls). This table lists the salt stress-inducible genes with induction factors higher than 4.0 in control cells. Modified from Maria et al. (17).

ORF	Name	Product	Induction by 0.5 M NaCl					
			WT ^a	$\Delta Rre31^b$	$\Delta Rre1^b$	$\Delta Rre17^b$	$\Delta Rre3^b$	Control ^c
Genes whose induction by salt stress was reduced in $\Delta Rre31$ cells (Group 1)								
<i>slr1544^d</i>		Putative protein	23.2 ± 0.1	0.8 ± 2.4 (-1)e	22.7 ± 5.4 (117)	44.5 ± 0.9 (234)	40.3 ± 3.7 (212)	19.6 ± 3.3
<i>slr1687^f</i>		Putative protein	16.0 ± 0.4	3.5 ± 0.7 (24)	3.4 ± 0.9 (24)	21.1 ± 0.9 (195)	19.0 ± 0.5 (174)	11.3 ± 1.5
<i>ssr2595</i>	<i>hltB</i>	High light-inducible protein	15.1 ± 0.1	0.7 ± 3.4 (-3)	15.8 ± 1.3 (151)	19.5 ± 0.2 (189)	14.4 ± 0.1 (137)	10.8 ± 1.6
<i>ssl2542</i>	<i>hltA</i>	High light-inducible protein	9.8 ± 0.0	1.0 ± 2.2 (0)	11.3 ± 4.0 (140)	13.4 ± 2.3 (169)	16.7 ± 0.6 (214)	8.3 ± 1.3
<i>slr1722</i>		Putative protein	10.3 ± 0.2	3.2 ± 6.0 (33)	11.4 ± 0.0 (155)	5.3 ± 0.1 (64)	10.9 ± 2.9 (148)	7.7 ± 1.2
<i>slr1621</i>		Membrane protein	8.4 ± 0.8	3.2 ± 0.1 (36)	5.6 ± 0.2 (74)	8.8 ± 0.7 (127)	8.9 ± 1.2 (128)	7.1 ± 0.5
<i>ssr2016</i>		Putative protein	6.4 ± 0.0	0.8 ± 0.8 (-4)	16.6 ± 2.2 (255)	17.0 ± 1.3 (262)	12.0 ± 0.5 (179)	7.1 ± 1.3
<i>ssl1633</i>	<i>hltC</i>	High light-inducible protein	4.9 ± 0.1	1.3 ± 0.3 (7)	12.4 ± 0.7 (229)	11.0 ± 0.4 (201)	8.6 ± 1.4 (153)	6.0 ± 0.9
<i>slr1483</i>		Periplasmic protein	8.0 ± 0.0	0.8 ± 0.6 (-5)	5.9 ± 0.2 (110)	11.2 ± 2.9 (226)	10.7 ± 1.6 (217)	5.5 ± 0.9
<i>slr2012</i>	<i>sigD</i>	RNA polymerase σ factor	4.9 ± 0.4	1.8 ± 0.6 (21)	5.6 ± 0.6 (126)	6.8 ± 0.1 (157)	6.8 ± 0.3 (158)	4.7 ± 0.4
<i>slr1797</i>	<i>ycf21</i>	Ycf21 gene product	6.2 ± 0.2	2.0 ± 0.4 (30)	5.1 ± 0.1 (122)	6.0 ± 0.3 (148)	6.2 ± 0.9 (155)	4.4 ± 0.5
Genes whose induction by salt stress was reduced in $\Delta Rre1$ cells (Group 2)								
<i>slr0528</i>		Putative protein	74.4 ± 4.0	13.6 ± 5.3 (27)	1.5 ± 3.6 (1)	74.6 ± 8.6 (160)	106.9 ± 9.6 (230)	47.1 ± 7.9
<i>slr1514</i>	<i>hspA</i>	Small heat-shock protein	49.7 ± 6.8	43.1 ± 1.6 (102)	1.5 ± 0.3 (1)	71.0 ± 1.1 (170)	54.4 ± 6.4 (130)	42.1 ± 5.1
<i>slr0959</i>		Putative protein	19.3 ± 1.1	20.7 ± 0.2 (114)	1.7 ± 0.7 (4)	27.6 ± 3.8 (153)	20.9 ± 2.8 (115)	18.3 ± 2.1
<i>slr0306</i>	<i>sigB</i>	RNA polymerase σ factor	22.3 ± 2.2	18.5 ± 1.6 (118)	2.7 ± 0.6 (11)	16.1 ± 1.0 (101)	26.2 ± 7.9 (170)	15.9 ± 1.7
<i>slr1641</i>	<i>clpB1</i>	ClpB protein	20.3 ± 1.3	14.8 ± 0.6 (97)	0.8 ± 0.3 (-2)	20.2 ± 1.2 (135)	25.4 ± 4.7 (172)	15.2 ± 1.8
<i>slr1603</i>		Putative protein	22.5 ± 2.1	14.8 ± 2.4 (103)	1.0 ± 0.0 (0)	13.4 ± 2.2 (93)	22.1 ± 2.7 (157)	14.4 ± 1.7
<i>slr0093</i>	<i>dnaJ</i>	Heat-shock protein 40	9.4 ± 2.0	17.1 ± 0.0 (138)	0.9 ± 0.7 (-1)	21.3 ± 1.5 (174)	14.3 ± 0.8 (114)	12.7 ± 1.4
<i>slr0846</i>		Putative protein	14.6 ± 1.1	6.9 ± 0.1 (59)	0.9 ± 1.1 (-1)	14.9 ± 4.1 (138)	17.7 ± 2.9 (165)	11.1 ± 1.5
<i>ssl3044</i>		Hydrogenase component	14.5 ± 0.0	6.0 ± 0.2 (51)	2.6 ± 1.5 (16)	17.9 ± 0.2 (171)	14.1 ± 0.3 (133)	10.9 ± 1.2
<i>slr1915</i>		Putative protein	10.3 ± 0.5	14.0 ± 0.1 (143)	0.7 ± 1.1 (-3)	14.1 ± 1.3 (144)	11.9 ± 0.0 (121)	10.0 ± 0.9
<i>slr1516</i>	<i>sodB</i>	Superoxide dismutase	16.1 ± 2.0	8.9 ± 0.1 (90)	1.9 ± 0.5 (10)	11.6 ± 1.4 (120)	12.5 ± 0.3 (131)	9.8 ± 1.1
<i>slr0170</i>	<i>dnaK2</i>	Heat-shock protein 70	12.0 ± 0.2	8.4 ± 0.2 (96)	1.0 ± 0.4 (1)	12.1 ± 2.0 (143)	14.1 ± 2.6 (170)	8.7 ± 1.0
<i>slr1884</i>		Putative protein	11.3 ± 0.8	7.7 ± 0.8 (91)	1.0 ± 0.4 (0)	9.4 ± 0.1 (114)	11.6 ± 0.1 (144)	8.3 ± 0.8
<i>slr1963</i>		Water-soluble carotenoid protein	14.2 ± 2.2	4.5 ± 0.1 (48)	0.8 ± 0.6 (-3)	6.4 ± 0.1 (75)	10.4 ± 0.6 (128)	8.3 ± 1.0
<i>ssr3188</i>		Putative protein	9.4 ± 1.5	6.6 ± 0.2 (86)	1.4 ± 1.4 (7)	9.6 ± 0.8 (132)	9.3 ± 0.6 (128)	7.5 ± 0.6
<i>slr1686</i>		Putative protein	7.3 ± 0.7	6.9 ± 0.1 (103)	1.2 ± 0.5 (4)	10.1 ± 1.3 (160)	6.7 ± 0.5 (100)	6.7 ± 0.7
<i>slr0852</i>		Putative protein	5.9 ± 0.1	9.4 ± 0.2 (161)	0.9 ± 0.6 (-2)	7.4 ± 0.3 (122)	6.9 ± 1.0 (113)	6.2 ± 0.5
<i>slr1167</i>	<i>pbp</i>	Penicillin-binding protein 4	11.1 ± 0.5	6.4 ± 0.0 (107)	1.2 ± 0.3 (3)	6.5 ± 0.7 (110)	5.3 ± 1.2 (85)	6.1 ± 0.9
<i>slr0095</i>		O-methyltransferase	4.8 ± 0.3	10.9 ± 0.3 (209)	0.8 ± 0.5 (-5)	8.3 ± 0.2 (155)	5.4 ± 0.9 (92)	5.7 ± 0.7
<i>slr1916</i>		Esterase	6.1 ± 0.1	7.1 ± 0.4 (134)	0.8 ± 0.2 (-4)	6.5 ± 0.8 (121)	4.8 ± 0.1 (83)	5.5 ± 0.6
<i>ssl2971</i>		Putative protein	7.2 ± 0.6	5.4 ± 0.4 (103)	1.2 ± 0.3 (4)	6.7 ± 0.8 (134)	6.6 ± 1.1 (131)	5.2 ± 0.5
<i>slr0853</i>	<i>rimI</i>	Ribosomal-protein-alanine acetyltransferase	4.5 ± 0.5	7.5 ± 0.0 (165)	1.1 ± 1.4 (2)	5.2 ± 0.1 (106)	4.5 ± 0.9 (90)	4.9 ± 0.5

ORF	Name	Product	Induction by 0.5 M NaCl					
			WT ^a	Δ Rre31 ^b	Δ Rre1 ^b	Δ Rre17 ^b	Δ Rre3 ^b	Control ^c
<i>slr1192</i>		Zinc-containing alcohol dehydrogenase family	5.1 ± 0.2	5.0 ± 0.1 (111)	1.2 ± 0.4 (6)	4.7 ± 0.3 (101)	6.2 ± 1.3 (144)	4.6 ± 0.3
<i>slr0416</i>	<i>groEL2</i>	60-kDa chaperonin 2	5.5 ± 0.8	4.5 ± 0.2 (103)	0.6 ± 0.3 (-11)	5.0 ± 0.1 (119)	5.8 ± 0.5 (144)	4.4 ± 0.4
<i>slr1107</i>		Putative protein	5.0 ± 0.3	5.3 ± 0.2 (133)	1.0 ± 0.5 (-1)	4.4 ± 0.7 (103)	5.4 ± 0.3 (136)	4.2 ± 0.3
Genes whose induction by salt stress was reduced in Δ Rre17 cells (Group 3)								
<i>slr0939</i>		Putative protein	35.8 ± 3.1	39.2 ± 0.8 (177)	14.1 ± 0.7 (60)	1.2 ± 0.0 (1)	31.2 ± 5.6 (140)	22.6 ± 3.8
<i>slr1704</i>		Putative protein	11.9 ± 3.4	21.6 ± 1.0 (97)	22.6 ± 0.9 (102)	4.5 ± 1.2 (16)	29.6 ± 2.8 (135)	22.2 ± 3.0
<i>slr0967</i>		Putative protein	32.3 ± 8.9	17.3 ± 1.2 (91)	15.4 ± 0.5 (81)	1.9 ± 0.1 (5)	30.3 ± 1.6 (164)	18.8 ± 2.9
<i>ssr2194</i>		Putative protein	8.9 ± 2.1	14.5 ± 9.1 (91)	18.1 ± 7.2 (115)	4.8 ± 1.3 (25)	15.7 ± 0.8 (99)	15.9 ± 2.5
<i>slr0938</i>		<i>N</i> -Succinylidiaminopimelate aminotransferase	8.5 ± 4.1	19.3 ± 0.3 (295)	5.5 ± 0.1 (73)	1.1 ± 0.0 (1)	6.2 ± 0.3 (84)	7.2 ± 1.5
Gene whose induction by salt stress was reduced in Δ Rre3 cells (Group 4)								
<i>slr1204</i>	<i>htrA</i>	Serine protease HtrA	9.5 ± 0.8	8.0 ± 0.1 (144)	5.8 ± 0.0 (82)	6.0 ± 1.0 (102)	1.0 ± 0.0 (0)	5.9 ± 0.7
Genes whose induction by salt stress was unaffected in Δ Rre31, Δ Rre1, Δ Rre17, and Δ Rre3 cells (Group 5)								
<i>slr1862</i>		Putative protein	152.4 ± 26.4	121.7 ± 3.3 (80)	142.4 ± 10.1 (93)	211.4 ± 28.6 (139)	228.3 ± 2.9 (150)	152.7 ± 12.6
<i>slr1863</i>		Putative protein	106.5 ± 8.3	141.4 ± 4.1 (115)	110.8 ± 11.1 (90)	160.8 ± 2.5 (131)	133.0 ± 18.3 (108)	122.7 ± 8.1
<i>slr1566</i>	<i>gspS</i>	Glucosylglycerol-phosphate synthase	13.2 ± 2.3	9.6 ± 1.7 (53)	16.1 ± 0.8 (93)	31.0 ± 3.8 (184)	24.6 ± 5.6 (145)	17.2 ± 1.7
<i>slr1085</i>	<i>glpD</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	9.7 ± 0.8	8.3 ± 2.6 (70)	11.6 ± 0.2 (102)	18.6 ± 1.2 (169)	14.8 ± 4.3 (133)	11.4 ± 1.0
<i>slr0895</i>		Putative protein	7.2 ± 1.1	11.5 ± 0.5 (164)	5.9 ± 1.5 (76)	9.1 ± 0.3 (126)	6.0 ± 1.5 (79)	7.4 ± 0.8
<i>slr1652</i>		Putative protein	6.1 ± 0.7	13.1 ± 0.3 (191)	5.3 ± 0.6 (68)	8.6 ± 0.4 (121)	5.7 ± 0.9 (74)	7.3 ± 0.6
<i>slr1594</i>	<i>ndhR</i>	Transcriptional regulator of <i>ndhF3</i> operon	9.7 ± 0.4	7.1 ± 1.2 (101)	8.6 ± 0.8 (126)	5.6 ± 0.4 (77)	6.3 ± 0.6 (88)	7.0 ± 0.5
<i>slr1738</i>		Putative protein	6.5 ± 0.1	5.3 ± 0.8 (83)	3.7 ± 0.5 (53)	7.3 ± 1.0 (122)	7.6 ± 1.3 (128)	6.9 ± 1.0
<i>ssr2153</i>		Putative protein	4.6 ± 3.5	8.3 ± 0.4 (123)	7.4 ± 3.6 (108)	4.1 ± 0.6 (52)	4.5 ± 0.9 (59)	6.2 ± 0.4
<i>slr1932</i>		Putative protein	5.8 ± 0.2	5.3 ± 1.0 (91)	5.1 ± 0.2 (86)	5.8 ± 0.5 (101)	4.7 ± 0.2 (79)	5.7 ± 0.4
<i>slr1620</i>		Putative protein	6.0 ± 0.4	5.8 ± 0.7 (111)	3.3 ± 0.7 (53)	6.4 ± 1.6 (124)	3.8 ± 0.4 (64)	5.4 ± 0.5
Probable phyloquinone-biosynthetic								
<i>slr1653</i>	<i>menG</i>	methyltransferase	5.1 ± 0.1	7.9 ± 0.5 (163)	3.9 ± 0.5 (69)	6.4 ± 0.2 (128)	4.7 ± 0.0 (89)	5.2 ± 0.4
<i>slr1894</i>		Putative protein	4.9 ± 0.1	3.3 ± 0.2 (53)	3.9 ± 0.0 (114)	6.1 ± 0.8 (57)	6.0 ± 0.2 (84)	4.5 ± 0.5
<i>slr1501</i>		Putative protein	5.2 ± 0.2	2.9 ± 0.7 (67)	5.0 ± 0.0 (84)	3.0 ± 0.3 (150)	4.0 ± 0.4 (146)	4.4 ± 0.3

^aThese values represent the averaged induction factors and ranges of deviation of results, which were calculated from the results of four independent experiments with wild-type cells.

^bThese values represent the averaged induction factors and ranges of deviation of results, which were calculated from the results of two independent experiments with Rre mutant cells.

^cInduction factors and S.D. of controls were calculated by averaging the induction factors from 22 independent experiments (four with wild-type cells and two each with Δ Hik33, Δ Hik34, Δ Hik16, Δ Hik41, Δ Hik10, Δ Rre31, Δ Rre1, Δ Rre17, and Δ Rre3 mutant cells).

^dUnderlining of an ORF indicates a strictly regulated gene whose RE was lower than 15 for some Rre.

^eThe number in parentheses is the RE.

^fThe *slr1687* gene is categorized as a gene whose inducibility was reduced in Rre31 cells (RE 24), but not in Rre1 (RE 24) cells, because mutation of the cognate Hik33 and Hik34 yielded values of RE of 55 and 54, respectively.

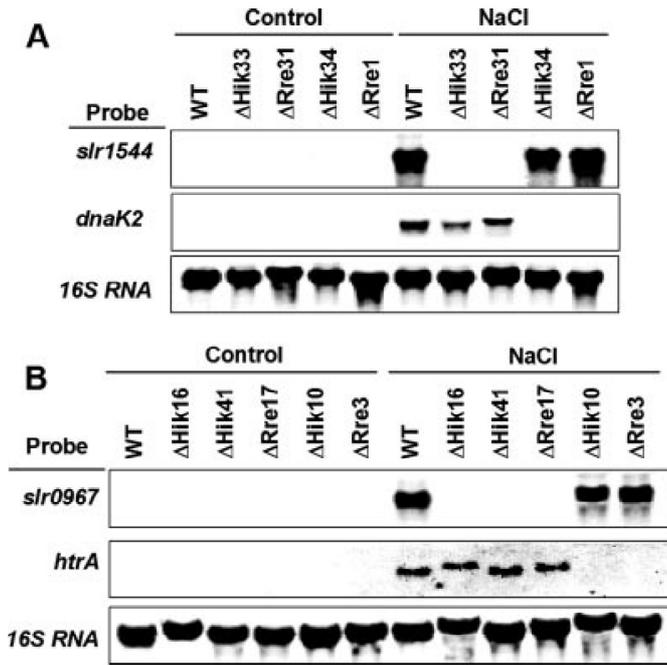


Figure 1. Northern blotting analysis of the salt-inducible expression of genes.

A, the expression of the *slr1544* and *dnaK2* genes in wild-type (WT), Δ Hik33, Δ Rre31, Δ Hik34, and Δ Rre1 mutant cells. B, the expression of *slr0967* and *htrA* genes in WT, Δ Hik16, Δ Hik41, Δ Rre17, Δ Hik10, and Δ Rre3 mutant cells. Total RNA was isolated from wild-type, Hik mutant, and Rre mutant cells before (Control) and 20 min after (NaCl) treatment with 0.5 M NaCl. The extracted RNA (15 μ g) was fractionated on a 1.2% agarose gel that contained 2.05 M formaldehyde and allowed to hybridize with labeled probes derived from *slr1544*, *dnaK2*, *slr0967*, *htrA*, and 16 S rRNA.

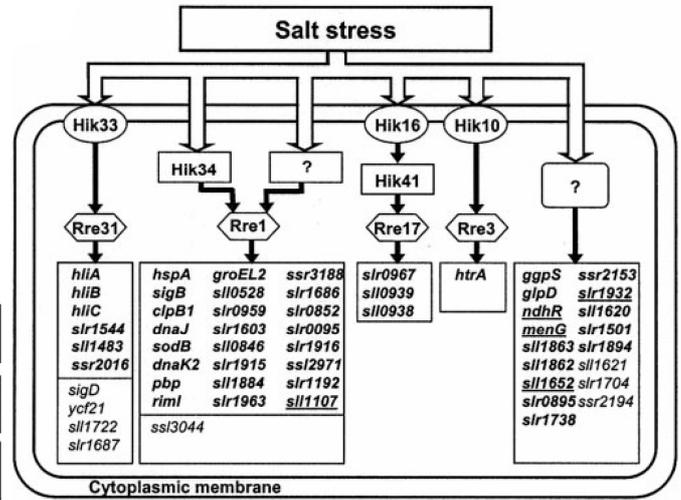


Figure 2. Hypothetical scheme for the perception and transduction of salt signals, including the genes whose salt stress-inducible expression is regulated by the indicated individual Hik-Rre systems in *Synechocystis*.

Genes included in this scheme revealed induction factors greater than 4.0 under salt stress. Genes in **bold** letters are genes whose inducibility by salt stress was strictly regulated (RE 15) by a specific Rre, whereas the expression of genes in *light* type was only reduced (RE 15–50) by the indicated Rres. Underlining indicates genes whose expression was specifically induced by salt stress.

Microarray analysis of the salt-inducible genes and signal transduction pathway of salt stress in cyanobacteria.

Iwane Suzuki

Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

Summary

Plants and microorganisms acclimate to salt stress by regulating the expression of large numbers of genes. In the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, a DNA microarray analysis revealed that salt stress due to 0.5 M NaCl induced genes for heat-shock proteins and the enzymes for the synthesis of an osmolyte, glucosylglycerolm and genes for proteins of unknown functions. We screened a library of mutants of all 43 histidine kinases by the DNA microarray, suggesting that five histidine kinases, namely, Hik33, Hik34, Hik16, Hik41 and Hik10 perceived and transduced salt signals to regulate gene expression. However, Hik33, Hik34, Hik10 and Hik16 acting with Hik41 regulated the expression of different sets of genes. We further screened a mutant library of response regulators, which are phosphorylated by certain histidine kinases and regulate gene expression, and found that each pairs of mutants of histidine kinase and response regulator, Δ Hik33- Δ Rre31, Δ Hik34- Δ Rre1, Δ Hik16- Δ Hik41- Δ Rre17, and Δ Hik10- Δ Rre3, were involved in the regulation of gene expression under the salt stress. The mechanisms of salt signal perception of the sensors should be studied in the future and the meaning of existence of the multiple salt sensors is also interesting questions to understand the acclimation process to the salt stress conditions.

Among the salt stress-inducible genes, we picked up 30 genes for unknown proteins, which were conserved in other photosynthetic organisms, such as cyanobacteria and higher plants, and inactivated each gene. These genes might encode important proteins which have roles for acclimation of photosynthetic activity under the salt stress. We examined phenotypes of the mutants with or without salt stress and found that growth rate of a mutant of *slr1674*, whose expression was induced 19-fold under the salt-stress condition, was drastically retarded under the salt stress. Precursors of a subunit of photosystem II, PsbV, in the mutant cells were more accumulated under the salt stress than those in wild-type cells, suggesting that the *slr1674* encodes a protein which stimulates maturation of the subunit for photosystem II under the salt stress conditions. The *in vivo* function of the proteins will be demonstrated in near future.

3. シロイヌナズナの塩応答性遺伝子群の DNA アレイによる解析

小林 裕和 (静岡県立大学大学院生活健康科学研究科)
小川 剛史 (静岡県立大学大学院生活健康科学研究科)
山本 崇主 (静岡県立大学大学院生活健康科学研究科)
清水 正則 (静岡県立大学大学院生活健康科学研究科)

1. 研究目的

世界人口は100年間で4倍に増大した。その結果、人類は有史以来最大規模の食糧不足および環境破壊に直面し、地球の包容力に限界があることを悟った。熱帯雨林は13万km²/年(北海道と九州を合わせた面積)ずつ減少し、不毛乾燥地帯は6万km²/年(九州と四国を合わせて面積)ずつ増大している。さらに、過度な地下水くみ上げ等により、農耕地の塩分集積化は進み、農作物が育たない塩分析出地帯の総計は、955万km²(米国土面積に匹敵)になる。一方、人類が放出する炭酸ガス(CO₂)は約180億トン/年(50億トン炭素/年)と推定され、大気中CO₂濃度は100年の間に約30%増加し、現在380ppm(0.0380%)となった。大気中CO₂は、地球からの放熱を妨げ、地球温暖化をもたらす。植物は、穀類および根菜類として食糧源になると同時に、森林としてCO₂を固定する(推定:約3.5万トンCO₂/km²/年)。食糧増産およびCO₂固定増大のためには、植物の栽培・生育面積を増やさなければならないが、地球上に残されているのは、塩集積地域を含む不毛乾燥地帯である。

耐塩植物としては、熱帯・亜熱帯の汽水地域に生育するマングローブがよく知られており、海水(約3%のNaClを含む)の1/4から1/2の塩濃度において生育が良好であり、海水の濃度でも生存できる。一方、塩に比較的強い栽培植物としては、大麦、甜菜、および綿が挙げられ、これらは0.5%NaClでも減収を伴わないことが知られている。しかしながら、これらの性質を支配する遺伝子については十分解明されていない。植物の耐塩機構としては、浸透圧調節物質の蓄積、高塩土壌からの能動的な水分吸収、体内中NaClの積極的除去、および塩耐性光合成能力の獲得などが考えられる。また、植物のストレス応答遺伝子発現に興味を持たれている。これらのうち、浸透圧調節物質の蓄積あるいは乾燥誘導性遺伝子の発現を人為的に制御することにより、植物への環境ストレス耐性の付与の成功例がある。しかしながら、環境ストレスに対する耐性および応答機構の全貌は明らかにされていない。

本助成研究者は、高等植物でいち早く核ゲノムDNA塩基配列が決定されているシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)⁽¹⁾を用い、光合成独立栄養生長が耐塩性になった突然変異系統を選抜することを通して、その未知の耐塩機構を解明したいと考えた。

発芽以降の光合成独立栄養生長において、野生系統が完全に枯死する濃度の塩含有培地(0.20~0.25MNaCl、海水の約半分あるいは生理的食塩水の2倍弱の塩濃度)で生存しうることを指標に、変異原メタンスルホン酸エチル(EMS)処理したシロイヌナズナM2世代実生から、耐塩性突然変異系統を選抜した。合計148,300個体から2系統の光合成生育耐塩性突然変異系統を選抜し、*pst1* (*photoautotrophic salt tolerance 1*)および*pst2*と命名した。これら*pst*突然変異系統の耐塩性は、実生の時期から植物体が成熟するまでの光合成生育の期間を通して維持されることを確認した。また、塩ストレスがない条件下で生育させた植物体の形態において、野生系統に対して有意な差異は見い出されなかった。これらのうち*pst1*植物体においては、葉緑体における活性酸素消去系として知られているスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)およびアルコールペルオキシダーゼの活性が顕著に増大しており、塩ストレス下において光合成光化学系を介して発生する活性酸素を速やかに解毒化することにより、耐塩性を獲得しているものと考えられた⁽²⁾。一方、*pst2*突然変異系統については、生理・生化学的解析においては、その耐塩機構の特定が困難であった。

2000年12月にシロイヌナズナの核ゲノム全DNA塩基配列が決定され⁽¹⁾、シロイヌナズナを用いたポストシーケンズ時代の解析方法論の活用がより現実的なものとなった。したがって、DNAアレイ解析を*pst2*の耐塩機構の解明に適用した。

2. 研究方法

2.1 植物材料と育成

シロイヌナズナ野生系統Columbia(Col)および*pst2*系統⁽²⁾を実験に供した。種子は滅菌後、ミネラル固形培地

あるいは Murashige-Skoog (MS) 固形培地⁽²⁾を用い、22°C、湿度 40~60%、照度 3,000~5,000 lux の連続白色光条件下で、3 週間生育させた。塩ストレスを付す場合は、0.2 M NaCl を添加した培地に移植し、同条件下で培養した。

2. 2 オリゴマイクロアレイ

RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて精製した 20 µg RNA を Agilent Fluorescent Direct Label Kit (Agilent Technologies) により蛍光標識した。Agilent Arabidopsis 1 Microarray Kit (Agilent Technologies) を用い、Agilent DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies) によりデータを取り込んだ。シグナル強度の数値化には Feature Extraction (Agilent Technologies) を用いた。その後の解析には Excel (Microsoft) を使用した。

2. 3 RNA の調製

植物個体(約 0.1 g) を液体窒素で凍らせ、乳鉢で破碎したものを新しいチューブに移した。あらかじめ 50°C にインキュベートしておいた 1 mL Isogen (Nippon Gene) を加え、ボルテックスで激しく攪拌した。50°C で 10 分間インキュベートし、その後、室温で 5 分間静置した。0.2 mL クロロホルムを加え、ボルテックスで攪拌し、室温で 2 分間静置した。15,000×g で 15 分間(4°C) 遠心し、上層(水層)を回収して新しいチューブに移した。0.2 mL クロロホルムを加え、1 分間激しく混合し、10,000×g で 5 分間(4°C) 遠心し、上層(水層)を回収した。このクロロホルム処理を中間層のタンパク質がなくなるまで繰り返した。集めた上層(水層)に 0.5 mL イソプロパノールを加え、5 分間軽く混合した。15,000×g で 15 分間(4°C) 遠心し、上清を捨て、沈殿を風乾した。沈殿を 0.1 mL RNase-free water に溶解し、10 µL 3 M 酢酸ナトリウムを加え混合した。氷上で 20 分間静置し、15,000×g で 15 分間(4°C) 遠心した。上清を

回収し、0.25 mL エタノールを加えて、-70°C で 1 時間インキュベートした。15,000×g で 10 分間(4°C) 遠心し、上清を捨て 1 mL 70% エタノールを加えて洗浄した。15,000×g で 5 分間(4°C) 遠心し、上清を捨て、沈殿を風乾した。沈殿を 20 µL RNase-free water に溶解した。RNase-free Deoxyribonuclease I (Takara) を用い、プロトコールに従って 37°C で 30 分間反応させた。クロロホルム処理を中間層のタンパク質がなくなるまで繰り返し、エタノール沈殿で全 RNA を回収した。

2. 4 RT-PCR

cDNA は、1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche) を用い、標準プロトコールに従って調製した。

2. 5 RACE (rapid amplification of cDNA ends)

SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) を用い、標準プロトコールに従って、プライマー (Table 1) の設計、cDNA の調製および RACE PCR を行った。

2. 6 DNA 塩基配列決定

回収したプラスミドを鋳型とし、DYEnamicTM Terminator Cycle Sequence Kit (Amersham Biosciences) を用い、20 µL 反応液(1 µL 鋳型、各 10 pmol プライマー、8 µL Sequencing reagent premix、超純水で 20 µL)、94°C 20 秒 → (95°C 20 秒、50°C 15 秒、60°C 60 秒) × 30 回の PCR を行った。PCR 産物を Autoseq G-50 (Amersham Biosciences) を用い精製後、ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer (ABI) により DNA 塩基配列を決定した。

2. 7 sGFP 融合タンパク質コンストラクトの作製

sGFP と融合させる領域に対して *NcoI* と *BspHI* の制限酵素部位を付加したプライマーを設計した。リアルタイム RT-PCR 用に調製した野生系統の cDNA を鋳型として

Table 1 Primers employed in the present work

①	at2g22760-f: 5'-TGTTCTCATGGCACAAGATCTCC-3'
②	at2g22760-r: 5'-AAGAATCGTTACCTTGTCGCC-3'
③	pst-p6-r: 5'-CTTGAAAGAAGACCTAAACCATTGCG-3'
④	pst-p3-r: 5'-TTCATTGCTCTTTCAGCTCTCCTTCCCG-3'
⑤	pst-p1-f: 5'-CTCATGGCACAAGATCTCCGGTTCTTGC-3'
⑥	pst-555-r: 5'-AGTCGAAATCAATGTCTACTAG-3'
⑦	pst-1776-f: 5'-CAAAGCTATTTCCGATAACGACC-3'
⑧	pst-1140-r: 5'-GTTGTTCTTGGAGTTGTTTC-3'
⑨	bhlh19-nf: 5'-ATTATTTCTAGACGATCGTTTCCCATGGATGAAGATTTTTTCTTACCCGATTTCTCACTAG-3'
⑩	bhlh19-cr: 5'-ACTAAACTCGAGAGAAGACCTAAACCATTGCGAGTCTCAGG-3'

Use of each primer is described in the text.

KOD-Plus-(東洋紡)による増幅を行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、ゲルから目的産物のみを切り出して Quantum Prep™ Freeze'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Column(Bio-Rad)を用い、標準プロトコールに従って精製した。pGEM5 ベクター(Promega)を制限酵素 *EcoRV* で切断しておき、Ligation-Convenience Kit(ニッポンジーン)を用いて、精製した産物と連結させた。ライゲーション産物を *Escherichia coli* Competent High DH5 α (東洋紡)に標準プロトコールに従って導入し、形質転換を行った。形質転換後、適量の LB 液体培地⁽³⁾を大腸菌溶液に加え、37°Cで30分間振盪培養を行い、抗生物質アンピシリン(最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を加えた MacConkey 寒天培地に塗布した。固形培地を37°Cで一晩保温し形質転換コロニー(白色)を得た。得られたコロニーに対して、pGEM5 に特異的な M13 をプライマーとして、ExTaq™ Hot Start Version(タカラバイオ)を使用して PCR を行い、アガロースゲル電気泳動により挿入断片を確認した。形質転換された大腸菌をアンピシリン(最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を含む LB 液体培地で37°C、14時間振盪培養した。培養液を2 mL チューブに移し、4°C、6,000 rpm で3分間遠心した。上清を除き、沈殿を200 μL の Solution I⁽³⁾を加え懸濁した。300 μL の Solution IIを加え2~3回穏やかに混和し、氷上で10分間静置した。300 μL の Solution IIIを加え2~3回混和し、氷上で10分間静置した。4°C 15,000 rpm で10分間遠心し上清を新しいチューブにデカンテーションで移した。Ribonuclease(DNase-free) Glycerol Solution(ニッポンジーン、最終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を加え、37°Cで30分以上保温し、残留 RNA を分解した。200 μL のクロロホルムを加え10分間ボルテックスし、室温 15,000 rpm で10分間遠心した。上層(水相)を新しいチューブに移した。等量のクロロホルムを加え、この抽出を中間層がなくなるまで繰り返した。等量のイソプロパノールを加え10分間ボルテックスし、4°C 15,000 rpm で10分間遠心した。上清を除き、沈殿を70%エタノール1 mLで濯ぎ、風乾した。乾燥させた沈殿を50 μL の TE に溶解し、プラスミド溶液とした。プラスミド溶液5~10 μL を制限酵素 *NcoI* と *BspHI* で処理し、アガロースゲル電気泳動により確認した。BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用い、PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)により、導入した DNA 断片の塩基配列を決定した。sGFP 融合タンパク質発現ベクターとして、pTH2⁽⁴⁾を使用した。上記プラスミドから目的の配列を制限酵素 *NcoI* と *BspHI* により切り出し、アガロースゲル電気泳動、ゲル回収、精製を行った。同時に pTH2 を制

限酵素 *NcoI* により処理し、両者を連結した。大腸菌への導入後、DNA 塩基配列決定により接合部の配列を確認した。

2.8 一過性発現および蛍光観察

パーティクルガンは、BioListic PDS-1000/He Particle Delivery System(Bio-Rad)を使用した。10ショット分に対して、金粒子に滅菌蒸留水 230 μL を加え、ボルテックスにより完全に懸濁させる。2.5 M CaCl_2 250 μL を加え、1分間ボルテックスする。濃度を調整したプラスミド溶液 25 μL を加え、1分間ボルテックスした。0.1 M スペルミジン 50 μL を加え、10秒おきに1分間の静置後ボルテックスというサイクルを10回行った。4°C、10,000 rpm で100%エタノールに懸濁し、軽くボルテックスした。この溶液を5.4 μL /ショットで用いた。Rupture Disk (1,300 psi), Macrocarriers, Stopping Screens を70%エタノールに10分間以上浸し、滅菌した濾紙の上で乾燥させた。MS 固形培地上に広げたタマネギ表皮細胞をチャンバー内の下から2段目に置いた。24時間後に共焦点レーザー走査顕微鏡システム LSM510 META v3.1(Carl Zeiss)を用い蛍光を観察した。励起光に Argon2 を使用した。

2.9 バイナリーベクターの構築

非ストレス型 bHLH19 および塩ストレス誘導型 bHLH19 cDNA を鋳型として、フォワード側に制限酵素 *XbaI* サイトを付加(5'-ATTAT TTCTA GACGA TCGTT TCCCA TGGAT GAAGA TTTT TCTTA CCCGA TTTCT CACTA G-3')、リバーズ側に *SacI* サイトを付加したプライマー(5'-ACTAA AACTC GAGAG AAGAC CTAAC CCATT GCGAG TCTCA GG-3')を用いて、開始コドンと終止コドンを含んだ鎖長の DNA 断片を増幅した。

これらの断片を Bluescript II SK(+)(ニッポンジーン)の *EcoRI* 部位にサブクローニングし、コロニーPCR 後、プラスミド DNA を回収し、制限酵素処理および DNA 塩基配列決定によりコンストラクトを確認した⁽³⁾。これらのプラスミド DNA およびバイナリーベクター pSMAB701 をそれぞれ制限酵素 *SacI/XbaI* で処理し、アガロースゲルで電気泳動後、目的のバンドをゲルから切り出し、Quantum Prep™ Freeze'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns(Bio-Rad)を用いて精製した。これらを Ligation Pack(ニッポンジーン)により連結し、Competent high JM109(東洋紡)を用いて形質転換し、非ストレス型および塩誘導型 bHLH19 cDNA を pSMAB701 ベクターの *uidA* と置き換えたコンストラクトを作製した(Fig. 1)。

pSMAB701 に含まれる形質転換選択マーカーであるスペクチノマイシン 100 mg/mL を含む LB 固形培地を用い、生育してきたコロニーを形質転換候補株とした。コロ

シーPCR、プラスミド DNA 回収、制限酵素処理、および DNA 塩基配列決定により、コンストラクトを確認した。

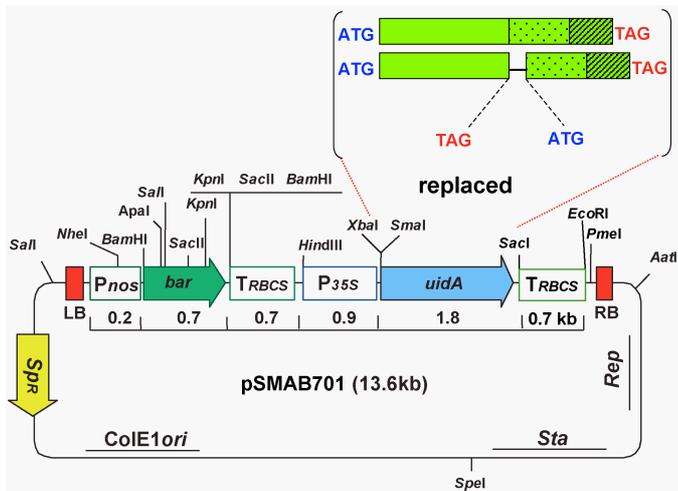


Fig. 1 Construct of a binary vector for introducing alternatively-spliced cDNA for bHLH19. *SpR*, spectinomycin/streptomycin resistance gene from Tn7; *Sta*: region involved in plasmid stability from *Pseudomonas* plasmid pVS1; *Rep*, origin of replication from pVS1 for plasmid maintenance in *Agrobacterium* spp.; *ColE1 ori*, ColE1 replication origin from pBR322; *bar*, bialaphos resistance (phosphinothricin acetyltransferase gene); *TRBCS*, polyadenylation signal from *Arabidopsis RBCS-2B* gene

2. 10 *Agrobacterium* の形質転換

Gene Pulser (Bio-Rad) を用い、エレクトロポレーション法により *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 に導入した。 *A. tumefaciens* 懸濁液 40 μ L とプラスミド溶液を 10 倍希釈したもの 1 μ L をエレクトロポレーション用キュベットに移し、2.5 kV, 25 μ F, 200 Ω にて処理後、キュベット内の菌液を LB 液体培地 1 mL に移し、30 $^{\circ}$ C, 20 分, 150 rpm で培養した。 *A. tumefaciens* Ti プラスミドおよび pSMAB701 の選択マーカーであるスペクチノマイシン 100 μ g/mL、ゲンタマイシン 25 μ g/mL、およびリファンピシン 50 μ g/mL を含む LB 固形培地を用い、28 $^{\circ}$ C, 一晚培養し、生育してきたコロニーを形質転換候補株とした。

形質転換した *A. tumefaciens* をスペクチノマイシン 100 μ g/mL、ゲンタマイシン 25 μ g/mL およびリファンピシン 50 μ g/mL を含む LB 液体培地 1.5 mL に植菌し、28 $^{\circ}$ C, 170 rpm で 20 時間培養した。その後、プラスミド DNA を回収し、制限酵素処理によりコンストラクトを確認した。

2. 11 シロイヌナズナの形質転換

バイナリーベクターを導入した *A. tumefaciens* をスペクチノマイシン 100 μ g/mL、ゲンタマイシン 25 μ g/mL およびリファンピシン 50 μ g/mL を含む LB 液体培地 1.5 mL

に植菌し、前培養として 28 $^{\circ}$ C, 170 rpm で 20 時間培養した。本培養として、前培養液を同じ組成の液体培地 200 mL に 1/1,000 倍容で移し、28 $^{\circ}$ C, 170 rpm で 22 時間培養した。遠心により集菌後、接種溶液⁽⁵⁾ 80 mL に懸濁し、適当な大きさの容器に移した後、さらに接種溶液数 mL を加えた。

MS 培地にて約 2 週間育成させたシロイヌナズナ野生系統 Col をロックウールに移し、さらに約 2 週間育成後、開花直前の蕾が出てきた植物体を用いた。懸濁接種液に 3 分間浸漬し、形質転換を行った。

3. 研究結果と考察

3. 1 オリゴマイクロアレイ

シロイヌナズナ核遺伝子 cDNA (EST) マクロアレイフィルター (12,264 クローン)⁽⁶⁾ [シロイヌナズナ DNA アレイコンソーシアム (The Japanese Consortium for *Arabidopsis thaliana* DNA Array, JCAA) の共同作業として作製] とシロイヌナズナ核遺伝子チップ (14,880 遺伝子 60 mer 合成オリゴヌクレオチド, Agilent Technologies) の性能を比較した。オリゴマイクロアレイの方が優れた結果を与え、標準偏差による検定およびノイズ除去の結果有意差の P 値 (有意確率) が 0.01 以下となったスポットをプロットし、解析した (Fig. 2)。

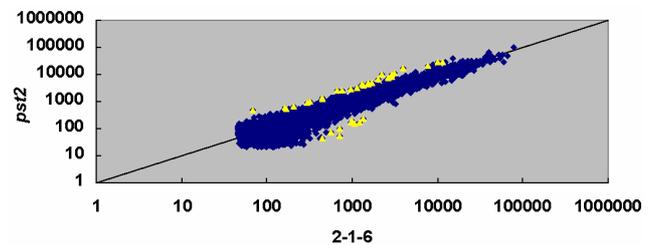


Fig. 2 Scattered plot of oligo-microarray.

pst2 変異系統および野生系統を低 K^+ 培地 (ミネラル固形培地) および高 K^+ 培地 (MS 固形培地) において 3 週間生育させ、葉から RNA を調製し、シロイヌナズナ核遺伝子チップ (14,880 遺伝子に対するそれぞれ 60-mer 合成オリゴヌクレオチド, Agilent Technologies) を用いた解析に供した。標準偏差による検定およびノイズ除去の結果、有意差の P 値 (有意確率) が 0.01 以下となることを指標とした。野外での生育条件により近い低 K^+ 培地において、putative bHLH transcription factor (bHLH19; 遺伝子番号 At2g22760; bHLH, basic helix-loop-helix, DNA-結合タンパク質モチーフ) は、*pst2* 系統特異的に高発現を示した (Table 2)。この高発現は、リアルタイム RT-PCR においても確認した。

Table 2 Genes whose expression is enhanced or diminished in *pst2* line

<i>pst2</i> / wild-type > 3		
low K ⁺ medium (mineral)	putative bHLH transcription factor	14.37
	anter-specific proline-rich-like protein (APG-like)	6.80
high K ⁺ medium (MS)	cold-regulated protein cor15a precursor	15.82
	tyrosine transaminase like protein	8.47
	hypothetical protein	4.92
	low-temperature-induced protein 78 (sp Q06738)	3.67
	leucoanthocyanidin dioxygenase-like protein	3.65
	palmitoyl-protein thioesterase precursor-like	3.55
	beta-glucosidase, putative	3.37
	putative calcium-binding EF-hand protein	3.22
	cold-regulated protein cor15b precursor	3.21
putative tyrosine aminotransferase	3.07	
<i>pst2</i> / wild-type < 0.333		
low K ⁺ medium (mineral)	putative protein kinase	0.07
high K ⁺ medium (MS)	monogalactosyldiacylglycerol synthase	0.24
	putative receptor protein kinase	0.25
	putative protein	0.26
	putative protein	0.33
	ethylene responsive element binding factor-like	0.33

Agilent Arabidopsis 1 Microarray Kit (Agilent Technologies) made of 60-mer oligonucleotides of 14, 880 genes were employed.

3. 2 *bHLH19* 遺伝子転写産物

bHLH19 転写産物をプライマー①/② (Table 1) を用い RT-PCR により解析したところ、塩ストレスにより新たな産物が生じることが明らかになった (Fig. 3)。

これら転写産物の塩基配列を決定した結果、選択的スプライシングの介在が明らかになった (Fig. 4)。生産される RNA 分子種の全鎖長情報を得るために、RACE (rapid amplification of cDNA ends) による解析を行った。

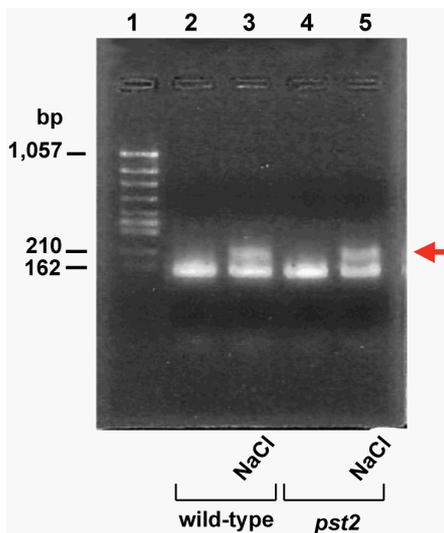


Fig. 3 RT-PCR products of *bHLH19* gene (qualitative analysis, being the intensity of each band at a plateau). The 3-week-old plants of wild-type and *pst2* were transferred to 0.2 M NaCl-containing mineral medium solidified with 0.3% Gelrite (2) through liquid medium of the same composition in which roots were briefly dipped, and incubated for 12 hr (lanes 3 and 5). The cDNA was amplified with primers ① and ② (Table 1). The red arrow indicates the product of alternative splicing.

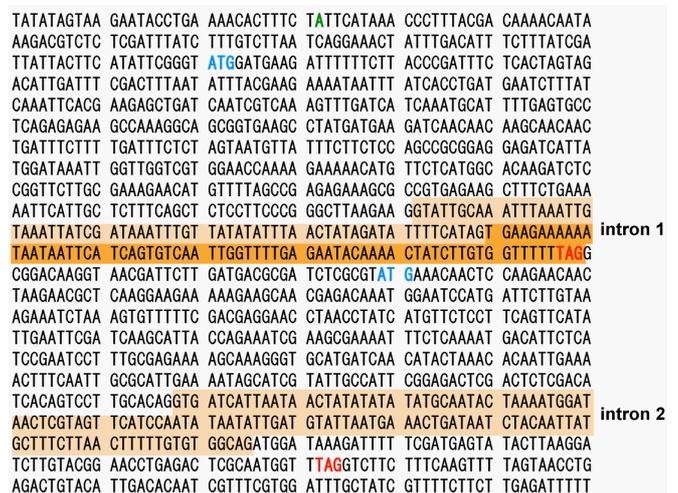


Fig. 4 Nucleotide sequence of *bHLH19* gene

5'側の RACE には、確実に末端領域を増幅させるために、選択的スプライシングの起こるイントロン 1 の上流と下流に1つずつ (プライマー③/④, Table 1)、3'側の RACE にはイントロン 1 の上流に1つ (プライマー⑤, Table 1) 設計した。塩ストレス 12 時間の処理を行った植物から全 RNA を回収し、それぞれのプライマーと、逆転写の際

に両末端に付加する配列に相補的なプライマーを用い RACE を行った。DNA 塩基配列の決定には、上記プライマーに加え、さらに3つのプライマー(プライマー⑥, ⑦, ⑧, Table 1)を使用した。塩基配列を決定した結果、塩ストレス 12 時間処理を行った植物と非ストレス条件下の植物とともに、転写開始点と予想される 5'側の末端は、開始コドンと予想される部位から約 110 bp 上流の A であることが分かった(Fig. 4)。

また、RACE 産物 57 クローンに対し DNA 塩基配列を決定しイントロンの状態を調べたところ、スプライシングのされ方には5つのパターンがあり、それぞれ、通常のスプライシングが起こっている完全スプライス型

“completely-spliced”、塩ストレスで誘導されると考えられる3つのパターン(不完全スプライス型 “incompletely-spliced 1”、“incompletely-spliced 2”、“incompletely-spliced 3”)、スプライシングされない “non-spliced” が存在していた(Fig. 5)。

“completely-spliced” は転写開始点より 551 番目塩基から689 番目塩基、“incompletely-spliced 3” は551 番目塩基から 661 番目塩基、“incompletely-spliced 2” は551 番目塩基から 644 番目塩基、“incompletely-spliced 1” は551 番目塩基から619 番目塩基がイントロンとして除かれ、“non-spliced” は551 番目塩基から 689 番目塩基までのすべてのイントロンが残っていた。

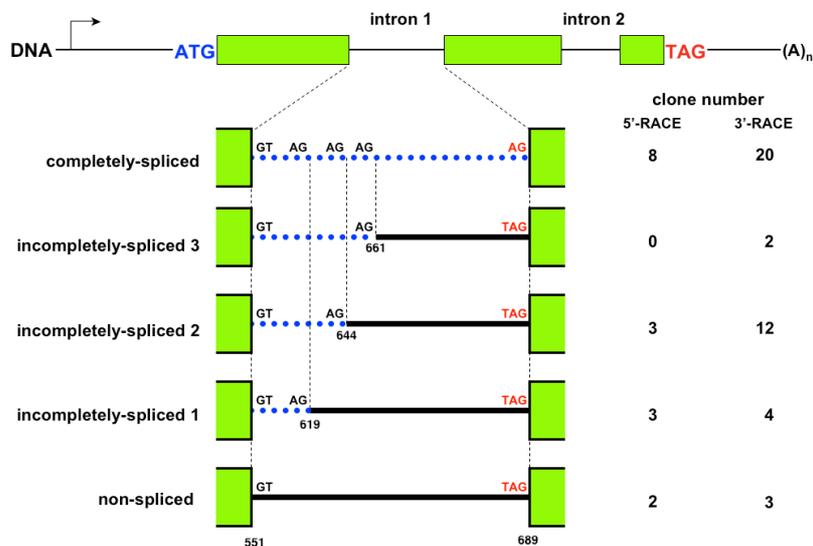


Fig. 5 Types and frequency of alternative splicing of intron 1.

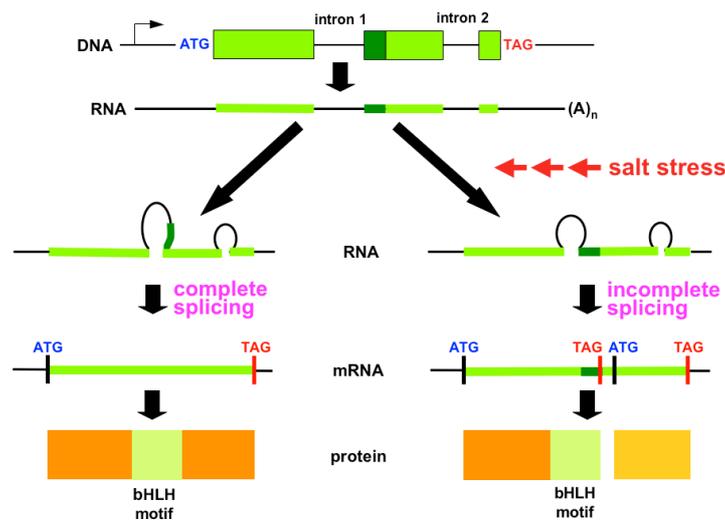


Fig. 6 Schematic representation of two species of alternatively-spliced mRNA for bHLH19.

The constitutively-present completely-spliced mRNA (left: “complete splicing”) and salt-induced incompletely-spliced one (right: “incomplete splicing”) are shown.

5'側 RACE および 3'側 RACE の産物あわせて 57 クロンの DNA 塩基配列決定の結果、“completely-spliced” が 28 クローン、“incompletely-spliced 3” が 2 クローン、“incompletely-spliced 2” が 15 クローン（以後、“incompletely-spliced” と呼ぶ）、“incompletely-spliced 1” が 7 クローン、“non-spliced” が 5 クローンであった (Fig. 5)。この選択的 RNA スプライシングと塩ストレスの関係を示すと Fig. 6 のようになる。

3.3 pHLH19 の細胞内局在

bHLH19 が転写因子として働くことを裏づけるために、sGFP との融合タンパク質を一過性発現させ、その細胞内局在を調べた (Fig. 7)。完全スプライス型 “completely-spliced” および不完全スプライス型 “incompletely-spliced” の bHLH19 タンパク質を sGFP との融合させた。その結果、bHLH19 の完全スプライス型との融合タンパク質は核に顆粒状になって局在し、焦点深度を変えて観察することにより核内部に局在することが明らかになった。不完全スプライス型との融合タンパク質は核に局在する傾向が強いが、顆粒状の局在は観察されなかった (Fig. 7)。

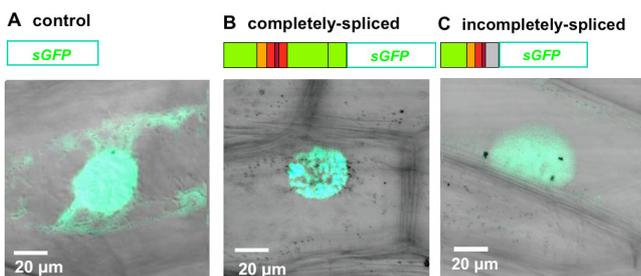


Fig. 7 Intracellular localization of sGFP fusion proteins observed by confocal microscopy.

The represented constructs were transiently expressed in epidermal cells of onion bulbs following particle bombardment. Although sGFP alone tended to accumulate in the nucleus and the interspace between vacuole and cell membrane (A), sGFP fused to “completely-spliced” (B) or “incompletely-spliced” cDNA of bHLH19 (C) was observed restrictively only in the nucleus.

3.4 形質転換系統の表現型

完全スプライス型 “completely-spliced” および不完全スプライス型 “incompletely-spliced” の bHLH19 タンパク質 cDNA を pSMAB701 の *XbaI/SacI* 部位に導入した (Fig. 1)。これらのコンストラクトを用い、シロイヌナズナ Col 系統を形質転換した。形質転換遺伝子に対してホモ接合とした後、表現型を観察した。

bHLH19 ノックアウト系統 (GABI-Kat 461E05) も併せて実験に供した。MS 培地に播種し、非ストレス条件下で 1

週間生育後、150 mM NaCl を含むミネラル培地に移した (Fig. 8)。さらに 1~2 週間後、塩ストレスにより生育が困難になった個体は白色化するので、全個体中の白色になっていない個体数を数え、その数値を生存率とし耐塩性の評価の指標とした。その結果、野生系統に対して、完全スプライス型発現系統の生存率は 2.2 倍、不完全スプライス型発現系統は 3.4 倍であった。また、ノックアウト系統の生存率は野生系統の半分程度であった。

発芽の時点からの耐塩性を調べるために、同じ系統の植物を用い、75 mM NaCl を含む無糖 MS 培地に播種し、そのまま生育させた (Fig. 9)。

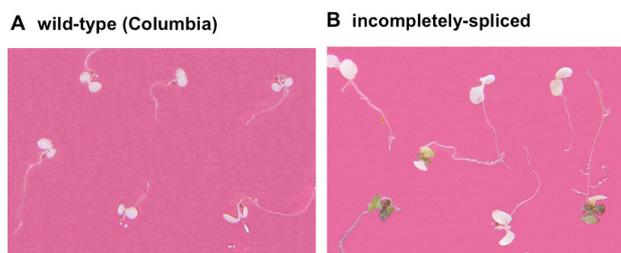


Fig. 8 The salt-tolerance of *Arabidopsis* lines of “wild-type” and transformed with bHLH19 cDNA “incompletely-spliced” during autotrophic growth after germination.

Seeds of these lines were sowed and grown on the MS medium without salt stress for 1 week, and transferred to the medium containing 0.2 M NaCl and incubated for 2 weeks in the light.

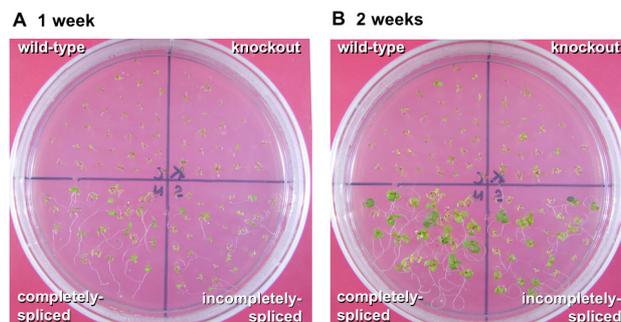


Fig. 9 The salt-tolerance of 4 lines of *Arabidopsis*, “wild-type” (Columbia), bHLH19 “knockout”, bHLH19 cDNA “completely-spliced”, and bHLH19 cDNA “incompletely-spliced”.

These lines were grown during indicated periods after sowing on the MS solid medium containing 75 mM NaCl. The difference from the experiments shown in Fig. 8, is here even germination done under salt stress.

1 週間すると根を伸長する個体としない個体がみられ、伸長する個体数を数え、その数値を生存率とし耐塩性の評価の指標とした。その結果、野生系統に対して、完全

スプライス型発現系統の生存率は 10.2 倍、不完全スプライス型発現系統の生存率は 5.6 倍であった。また、ノックアウト系統の生存率は野生系統の 3 割程度であった。

塩以外の環境ストレスに対する *bHLH19* の関与を調べるために、低温ストレス条件下で生育させた (Fig. 10)。MS 培地で 2 週間生育した個体を土に植え替え、4°C の明条件下で生育させた。その結果、完全スプライス型および不完全スプライス型発現系統は、3~4 週間後に花茎の伸長がほぼ全ての個体でみられたが、野生系統とノックアウト系統はほとんど伸長しなかった。さらに、より過酷な凍結ストレス (-20°C, 6 時間) に晒した後、非ストレス条件下で生育させた。その結果、野生系統、完全スプライス型および不完全スプライス型発現系統、ノックアウト系統の全てがその成長を止めたまま枯死した。

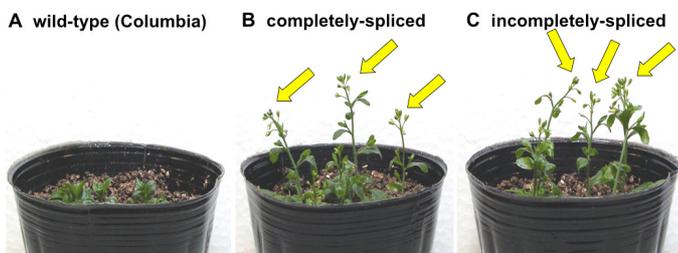


Fig. 10 The cold-tolerance of *Arabidopsis* lines, “wild-type” (A) and transgenic with *bHLH19* cDNA “completely-spliced” (B) and “incompletely-spliced” (C). The plants were grown under the usual condition for 2 weeks after germination on the MS solid medium, and transferred to soil in pots. The plants in pots were placed at 4°C for 4 weeks in the light.

3.5 *bHLH19* RNA の選択的スプライシングとその産物の機能

PST2 遺伝子は、*bHLH19* 遺伝子の転写を抑制しており、*pst2* 変異系統においては、この抑制が解除されている (Fig. 11)。*bHLH19* の完全型および不完全型 cDNA の強制発現系統の表現型から、*bHLH19* は、塩および低温に対して耐性を付与する機能を有する。*bHLH19* の完全型および不完全型発現産物が細胞核に局在することから、*bHLH19* は転写因子として機能していると推察される。*bHLH19* の RNA は、塩ストレスにより選択的スプライシングされ、生じた不完全型スプライシング産物タンパク質は、発芽時の耐塩性には特に寄与が大きい。

4. 今後の課題

耐塩性は水分枯渇耐性 (乾燥耐性) を伴っていることが多く、*bHLH19* 遺伝子の他植物への導入により、地球

上の塩分集積地域に加えて不毛乾燥地帯の緑化およびこれらの地域における農耕への寄与が期待される。果物の栽培においては、糖度を上げるため灌漑を制限するが、これに伴う収量の減少の緩和への貢献が期待される。また、シバ等に遺伝子を導入すれば、ビルの屋上緑化や道路のり面の緑化における灌漑コストの低減にも寄与できると考える。さらに、*bHLH19* は低温耐性能を有するため、低温地域での農耕や緑化への貢献が期待され、加えて、冷害に対する耐性の付与にも活用できると考えられる。

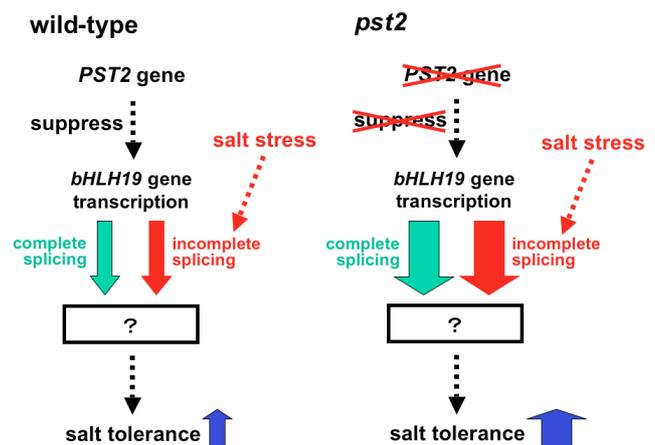


Fig. 11 A hypothetical model of function of *PST2* with and *bHLH19* gene transcription followed by alternative RNA splicing under salt stress.

文献

1. The Arabidopsis Genome Initiative: Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 796-815 (2000)
2. Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K., and Kobayashi, H.: A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell*, **11**, 1195-1206 (1999)
3. Sambrook, J., and Russell, D.W.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001)
4. Niwa, Y., Hirano, T., Yoshimoto, K., Shimizu, M., and Kobayashi, H.: Non-invasive quantitative detection and applications of nontoxic-, S65T-type green fluorescent protein in living plants. *Plant J.*, **18**, 455-463 (1999)

5. Clough, S. J., and Bent, A. F.: Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735–743 (1998)
6. Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S. and Tabata, S.: A Large scale analysis of cDNA in *Arabidopsis thaliana*: Generation of 12,028 nNon-redundant expressed sequence tags from normalized and size-selected cDNA libraries. *DNA Research*, **7**, 175-180 (2000)

特 許

1. 発明の名称: 植物に環境ストレス耐性を付与するポリヌクレオチド
発明者: 清水正則, 小川剛史, 小林裕和
出願人: 静岡県
特許出願番号: PCT/JP2006/305328 (独立行政法人科学技術振興機構原出願支援対象)
出願日: 2006年3月13日

Analysis of Genes for Salt Tolerance by DNA Array in *Arabidopsis*

Hirokazu Kobayashi, Msanori Shimaizu, and Takeshi Ogawa

Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka

Summary

Salt tolerance in plants has been attributed to many mechanisms, including accumulation of osmoregulatory solutes inside cells, enhanced ability of cells to take up water or K^+ from surrounding solutions of higher salt concentration, elimination of excess NaCl, and the ability to maintain photosynthetic activity under salt stress. To further investigate the mechanisms of salt tolerance, we have begun to screen and characterize mutants of *Arabidopsis thaliana* tolerant to high NaCl concentrations during photoautotrophic growth. Several mutants of *Arabidopsis* with altered responses to salt have been reported, including mutants tolerant of salt during germination and mutants that are salt-hypersensitive. However, there were no reports of mutants whose photoautotrophic growth was salt tolerant. We have already selected several *pst* (*photoautotrophic salt tolerance*) mutant lines.

Higher expression of gene for putative bHLH transcription factor (bHLH19; At2g22760; bHLH, basic helix-loop-helix, a DNA-binding protein motif) was first detected specifically in *pst2* mutant plants by microarray of approx 15,000 genes, and confirmed by real-time RT-PCR. The abundant species of this mRNA present in plants grown without salt stress was “completely-spliced”, whereas the major species generated under salt stress was “incompletely-spliced”. The intracellular localization of bHLH19 molecules encoded in either completely or incompletely-spliced mRNA was determined by transient expression of the proteins fused to sGFP, resulting in restrictive presence in the nucleus as we expected to function as a transcription factor. The function of bHLH19 was examined with plants transgenic with constructs to express these mRNA species. The wild-type *Arabidopsis* (Columbia) and knocked-out one were sensitive to 75 mM NaCl in the MS solid medium, although lines transgenic with completely- or incompletely-spliced species of cDNA were tolerant to the salt stress during germination and its subsequent growth. The salt-induced and alternatively-spliced species tended to be highly tolerant. The autotrophic growth of plants transformed with bHLH19 cDNA fragments after germination was also tolerant to salt. Furthermore, the transgenic plants exhibited the high tolerance to cold temperature at 4°C for 4 weeks. The bHLH19 may be the most crucial for the novel networks of signal transduction for acclimation and tolerance to salt and cold temperature.

4. 高血圧症の食塩感受性を規定する因子のゲノム解析

荻原 俊男 (大阪大学大学院医学系研究科老年・腎臓内科学)
 勝谷 友宏 (大阪大学大学院医学系研究科老年・腎臓内科学)

1. 研究目的

2004 年末に高血圧治療に関するガイドラインが改訂され、循環器死亡や重篤な循環器合併症予防のために、より厳格な降圧が求められるようになった。本態性高血圧症の発症、進展には、食塩摂取過剰をはじめとする環境因子、遺伝因子が相互作用をもちながら複雑に関与しており、食塩感受性遺伝子を同定することは、個人の遺伝的資質に応じた特異的な治療の確立に貢献するものと期待される。本研究では、本態性高血圧症における食塩感受性高血圧の遺伝子診断を目指すとともに、個人の生活環境、遺伝的資質の多様性に応じた治療法の開発を図るため、高血圧感受性遺伝子や環境因子との相互作用を中心に研究を行った。

循環器疾患最大のリスクとなる本態性高血圧の発症には遺伝因子と環境因子が深く関与しており、レニン-アンジオテンシン系遺伝子を中心に感受性遺伝子多型解析が盛んに行われている。有名なものとしては、最も強力な昇圧物質であるアンジオテンシン II 産生に関わるアンジオテンシン変換酵素 (ACE: angiotensin converting enzyme) 遺伝子の挿入 (I: insertion)・欠失 (D: deletion) 多型、本系の律速段階と考えられる基質となるアンジオテンシノーゲン (AGT: angiotensinogen) 遺伝子のエクソン2にあるメチオニンからスレオニンへのアミノ酸変異を伴う M235T 多型、アンジオテンシン II の主効果の殆どを司るアンジオテンシン II-1 型受容体 (AT1: angiotensin II receptor, type 1) 遺伝子の A1166C 多型などがある。ACE 遺伝子はラットゲノムスキャンにおいて高血圧との関連が示唆されているほか、ヒト ACE 遺伝子の DD 型は虚血性心疾患、冠動脈再狭窄、IgA 腎症などのリスクを高めるとされる。我々は、都市部一般住民検診を用いた前向き研究である吹田研究において、インフォームドコンセントの得られた 5,014 人の ACE 遺伝子 I/D 多型の意義を検討し、男性特異的に高血圧リスクを高めることを示した¹。この結果は、DD 多型頻度が倍に達する米国のフラミンガム研究の結果と完全に合致するものであり、人種を越えて普遍的に影響を及ぼしたと考えられる。また、ACE 阻害薬投与患者では II 型保有群で乾性咳嗽が多いことに着目し、高齢者肺炎感受性と本多型の関連を検討したと

ころ、ACE/DD 保有者で肺炎感受性が高いことや、降圧薬反応性が悪いことなども判明した²。一方、AGT/M235T 多型との関連では、T235 アリル保有が虚血性心疾患リスクとなることをはじめ報告した³ほか、完全連鎖不平衡にある T+31C 多型 (イントロン1に存在) を利用し、同じ吹田研究において C+31 (=T235) アリル保有が単純に高血圧罹患の有無と相関するのではなく、高血圧家族歴と関連することを示した⁴。白人集団における相関解析の結果をまとめたレビューにおいても、高血圧家族歴を有する場合にのみ有意な相関が認められることが報告されており、我々の結果と合致すると考えられた。一方、AT1/A1166C 多型は高血圧との直接の関連は認められなかったが、心肥大やラクナ梗塞リスクが高まることを明らかにした。さらに、AT1 と拮抗作用を示すアンジオテンシン II-2 型受容体 (AT2: angiotensin II receptor, type 2) 遺伝子の全長のクローニングに成功し、3'非翻訳領域に C3123A 多型を同定した⁵。

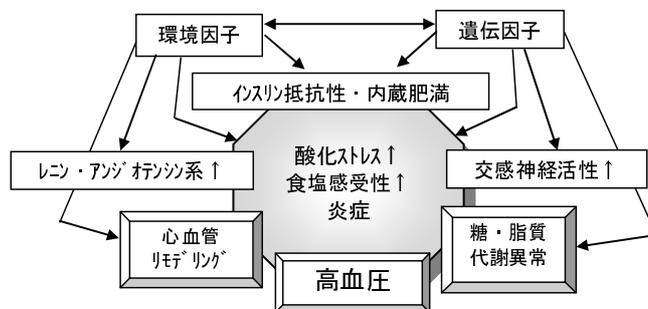


図 1 高血圧と食塩感受性に関する交絡因子

図 1に示すように、食塩感受性関連遺伝子の候補としては、レニン-アンジオテンシン系遺伝子多型だけでなく、腎・尿細管レベルで水や電解質の出納に関わる各種チャネル、トランスポーター遺伝子が考えられる他、間接的に食塩感受性と関わり深い交感神経活性亢進、糖・脂質代謝異常、酸化ストレス、インスリン抵抗性、肥満などの因子も考えられる。本研究では、阪大研究、大迫研究を中心とする遺伝疫学的研究において、サイアザイド感受性NaCl共輸送対遺伝子など食塩感受性と関連の

深い遺伝子多型の意義を検証するとどまらず、図1に示す関連する各種病態との関連を検討し、興味深いいくつかの知見を得た。利尿薬の反応性に関するトランスクリプトーム解析の結果も含めて3年間の研究成果を概説するとともに、各年度報告書に盛り込めなかった現在進行中の本プロジェクトとも関連する臨床薬理遺伝学的研究の進捗状況についても最後に触れることとする。

2. 研究方法

a. 研究対象

① 大迫研究

本研究は東北大学大学院臨床薬学との共同研究によって実施された。大迫研究は、岩手県東部の大迫町の一般住民約7,000人を対象とした1987年から始まったコホート研究で、特徴として多くの24時間自由行動下血圧と家庭血圧のデータを有する。対象は40歳以上の大迫町住民で、町外で勤務する者(n=575)や、入院中患者、長期臥床者、重症認知症患者も除外した(n=152)。随時血圧は健診時に、少なくとも2分の安静座位後、USM-700F(UEDA Electric Works Co. Ltd)を用いて測定された。24時間血圧は30分間隔にABPM-630(Nippon Colin Co. Ltd.)で測定した平均値を用い、家庭血圧は起床後、就寝前の1時間以内にHEM-401C(Omron Life Science, Co. Ltd.)で測定した21日間の平均値を用いた。日本高血圧学会の高血圧治療ガイドライン2004(JSH2004)に従い、エントリー時の随時血圧(CBP)が140/90 mmHg以上かつ24時間の平均血圧(ABP)が135/80 mmHg以上かつ21日間の家庭血圧(HBP)の平均が135/85 mmHg以上または降圧薬内服中を「高血圧群」と、CBP<140/90 mmHgかつABP<135/80 mmHgかつHBP<135/85 mmHgの降圧薬非服用者を「正常血圧群」と定義した。最終的に代表性が確認された1,808名の対象者の中で、遺伝子解析、疫学研究に対するインフォームドコンセントが取得されている1,464名を対象に解析を実施した。さらに、上記参加者の中で頭部MRI健診に参加した57~83才の352名については、基底核におけるラクナスコアおよびPVH(periventricular hyperintensity)の評価を行った。

② 阪大研究

阪大研究は、大阪大学医学部附属病院の外来・入院患者を対象としたケース・コントロール研究である(n=757, 平均年齢63.9±9.9歳)。50歳未満発症かつ家族歴を持ち、エントリー時血圧160/95 mmHg以上または降圧薬内服中の条件を満たす非糖尿病患者を高血圧群(n=386)、高血圧家族歴がなく非糖尿病患者を正常血圧群(n=371)

とした。全症例において遺伝子解析に対するインフォームドコンセントが取得されている。

③ MHコホート研究

本研究は舩尾和子先生との共同研究によって行われた。

大阪にある一企業において、5年間のフォローアップと研究参加のインフォームドコンセントの得られた1,121名の検診データを元に解析を行った。本コホート研究では、検診時に、12時間以上の絶食後のBMI、体脂肪量(BF-102, Tanitaによる測定)、ウェスト・ヒップ比(W/H)、血圧および心拍数(TM-2713, A&D)の測定と、末梢静脈血におけるノルエピネフリンの測定を実施した。研究開始時に、年齢>50才以上、肥満あり(BMI≥25 kg/m²)、糖尿病あり(空腹時血糖≥100 mg/dL)、高血圧あり(SBP/DBP≥140/90 mmHg、または降圧薬服用)、過去1年間に5%以上の著しい体重の変動を示した者は除外した。最終的に、160名の非肥満、若年者を対象として、5年間のコホート研究を実施した。尚、本研究は大阪大学のヒトゲノム研究倫理委員会の承認を得たプロトコールに基づき実施された。

b. 遺伝子多型解析と統計解析

遺伝子解析に対するインフォームドコンセントが得られた対象者より末梢血の採血を実施し、白血球分画よりQIAamp DNA Blood Kit(QIAGEN Inc.)を用いてDNAを抽出した。

遺伝子多型解析には、TaqMan PCR法を用いた。各遺伝子多型の詳細な情報については、各年度報告書に記載しているため、本報告書では省略する。増幅条件は、初期denature:95°C, 10分、95°C, 15秒と60°C, 1分を40サイクルとし、PCR増幅産物をABI PRISM 7900でプローブの蛍光強度測定により遺伝子型を決定した。

遺伝子型頻度分布はHardy-Weinberg法則に基づいて算出される期待値と実測値間の有意差検定により検証した。遺伝子型と表現型の関連解析は、SPSS 8.0を用いて行い、分割表分析では χ^2 検定、変数との関連はANOVA(one-way analysis of variance)によりp<0.05を統計学的有意差ありと判定した。

3. 研究結果

a. 既報告の代表的食塩感受性遺伝子多型の日本人における頻度

代表的な食塩感受性遺伝子として、アンジオテンシノーゲン遺伝子のT+31C多型(AGT/T+31C)、 α アデュシン遺伝子のGly460Trp多型(ADD1/Gly460Trp)、アルドステロン合成酵素遺伝子のC-344T多型

(*CYP11B2/C-344T*)、G蛋白β3サブユニット遺伝子のC825T多型(*GNB3/C825T*)の4つを検討した。*AGT/C+31*アレルが81%(白人では45%)、*ADD1/Trp460*アレルが57%(白人では15%)、*CYP11B2/T-344*アレルが69%(白人では50%)、*GNB3/T825*アレルが52%(白人では25%)と全て有意に($p<0.01$)に高値であった⁶(図2)。

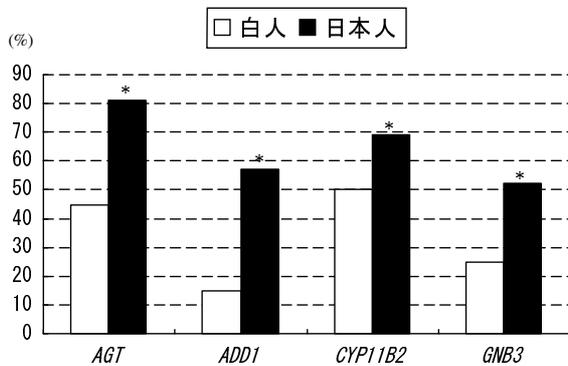


図2 食塩感受性遺伝子多型の白人・日本人間比較
食塩感受性を高めるリスクアレル(対立遺伝子)頻度。
*: $p<0.01$

さらに*AGT/T+31C*と血圧日内変動の関連を大迫研究で検討した結果、C+31アレル保有に従い、夜間降圧の程度が有意に($p<0.05$)減少した。すなわち、C+31アレル保有により、循環器疾患リスク増加や食塩感受性と関連が深いnon-dipperの頻度が高くなることが観察された⁷。

b. TSC遺伝子多型と高血圧

本研究の主候補遺伝子として検討したのは、腎臓の遠位尿細管に存在しNa-Cl共輸送体ファミリーに属し、サイアザイド利尿薬によって機能が抑制されるNa輸送体であるTSC(Thiazide sensitive NaCl cotransporter)遺伝子である。TSC遺伝子は、常染色体劣性遺伝形式をとり、Na喪失による低血圧、低レニン、高アルドステロン、低カリウム性アルカローシス、低マグネシウム血症、低カルシウム尿など、サイアザイド利尿薬を長期投与したときに起こるのと同様の病態を呈するGitelman症候群の原因遺伝子でもある⁸。本研究では、Gitelman症候群がTSC遺伝子の「機能喪失変異(loss of function)」で起きるとするならば、高血圧は「機能獲得型変異(gain of function)」によって惹起されると仮定し、欧米で最近高血圧との関連が報告された3つの多型について検討を加えた。

その結果、Gly264Ala多型は阪大研究の対象者では同定できなかったが、他の2つの多型の遺伝子型頻度はHardy-Weinberg平衡に準じた分布を示し、Arg904Gln(G/A)多型は高血圧と有意な関連を示し(高血圧群:Gアレル:92.8%、Aアレル:7.2% 正常血圧群:

Gアレル:95.6%、Aアレル:4.4%、 $p=0.02$ 、オッズ比=1.7、95%CI: 1.1- 2.6)、優性遺伝形式での解析でも(GG vs. GA+AA)でも有意な関連が確認された($p=0.017$ 、オッズ比=1.8、95%CI=1.1- 3.2)(表1)。男女別の解析を行うと、女性においてAアレル頻度は高血圧群で有意に高く($p=0.0021$,OR=2.7, 95%CI=1.4-5.1)、GG vs. GA+AAでも2群間で有意差がみられた($p=0.03$,OR=2.3, 95%CI=1.1-4.9)⁹。男性では有意な関連は認められなかった($p=0.72$)。Aアレルの高血圧感受性への影響は、50才未満発症者において特に強く認められた。尚、Thr465Thr(C1420T)多型と高血圧の間には有意な関連は認められなかった。

表1 ADRB1/Arg389Gly多型とHBP日間変動の関連

遺伝子型	Arg/Arg	Arg/Gly+Gly/Gly	p
HBP (n=772)	(n=478)	(n=294)	
朝方 血圧日間変動			
ΔSBP (mmHg)	8.01±0.12	7.54±0.15	0.011*
ΔDBP (mmHg)	6.45±0.12	5.88±0.15	0.0024*
夕方 血圧日間変動			
ΔSBP (mmHg)	8.36±0.12	7.98±0.15	0.046*
ΔDBP (mmHg)	6.77±0.11	6.49±0.14	0.095

c. アドレナリン受容体遺伝子多型と血圧や脈拍の変化の関連

本研究では、交感神経活性亢進の候補遺伝子多型とされるβ1アドレナリン受容体遺伝子(*ADRB1*)多型(Arg389GlyおよびSer49Gly)の意義について大迫研究で、高血圧、糖尿病、肥満、メタボリックシンドロームとの関連が報告されているβ2アドレナリン受容体遺伝子(*ADRB2*)多型(Arg16GlyおよびGln27Glu)およびβ3アドレナリン受容体遺伝子(*ADRB3*)多型(Trp64Arg)の意義についてMHコホート研究で検証した。

① 大迫研究におけるADRB1多型の意義

大迫研究において、*ADRB1/Arg389*アレルまたはArg389ホモ接合体保有者において、高血圧罹患に対するオッズ比が1.34 (1.02-1.75)と有意に高く($\chi^2=4.49$, $p=0.034$)、Arg389アレル保有が高血圧罹患リスクを高めることが示唆された。一方で、*ADRB1/Ser49Gly*多型と高血圧有病率の間には関連を認めなかった。降圧薬の影響を除外するために降圧薬服用者を除外し、非降圧薬服用者のみで*ADRB1*の2つの多型と血圧の間の関連を検討した結果、高血圧罹患との関連と同様、Ser49Gly多型と全ての血圧測定値間間に有意な関連は認められなかったが、*ADRB1/Arg389Gly*多型とABPMに基づく夜

間収縮期血圧平均値、家庭血圧に基づく朝および夕方の収縮期血圧平均値間には有意な相関が認められ、特にArg/Arg型保有者ではGly389アレル保有者間よりも約2 mmHg高い血圧値を示すことが示された。さらに、毎日の血圧測定がなされている家庭血圧値の変動と本遺伝子多型の関連を検証したところ、朝・夕、収縮期・拡張期を問わず、血圧の日間変動とArg/Gly遺伝子多型に有意な関連が認められ、Arg/Arg型保有では血圧変動幅が大きいことが示された(表1)。

また、血圧と共に交感神経活性の指標となる心拍数とADRB1多型の関連も検討したところ、血圧と異なり、Arg389Glyは有意な相関を認めなかったのに対し、Gly/Gly49型保有者ではArg49アレル保有者に比し5-6bpmの有意(p<0.003)な心拍数の増加が認められた。

さらに、頭部MRI所見より算出された基底核ラクナスコアおよびPVHとADRB1多型の関連解析を実施した。その結果、交絡因子補正後において、ADRB1/Arg389Gly多型と基底核ラクナスコアの間に有意な相関(p<0.05)が示された。Gly/Gly型保有者のラクナスコアは、血圧値や降圧薬服用をはじめとする交絡因子補正後も有意に高く、多変量解析の結果においても無症候性脳梗塞の独立した危険因子であることが示唆された。

② MHコホート研究におけるADRB2, ADRB3遺伝子多型の意義

5年間に10%以上の体重および血圧の増加した群を体重増加群、血圧上昇群と定義し、10%未満の体重維持群、血圧維持群におけるADRB2, ADRB3多型頻度の比較を行った。体重増加群では、BMIが22.2±1.8 kg/m²から24.6±2.0 kg/m²へと有意な増加(p<0.05)を認めたほか、SBPも127±6 mmHgから141±7 mmHgと有意な上昇(p<0.01)を認めた。一方、血圧上昇群においても、BMIは22.6±1.6 kg/m²から24.3±2.1 kg/m²へと有意な増加(p<0.05)を示したことから、血圧上昇と体重増加には密接な関連があることが示唆された。

遺伝子多型頻度比較の結果からは、ADRB2 Arg16Gly多型では、Gly16アレル保有者が体重増加群(p=0.012)、血圧上昇群(p<0.001)いずれにおいても有意に多く、ADRB2 Gln27Glu多型では血圧上昇群においてのみGlu27頻度が有意に高い結果となった。一方、ADRB3 Trp64Arg多型では、体重、血圧の変化と有意な関連を認めたが、アレル頻度は血圧上昇群においてのみ有意にTrp64アレル保有者が多く(p=0.022)、体重変化との関連は認められなかった(p=0.122)。また、体重増加群や血圧上昇群では、コホート開始時より血漿ノルエ

ピネフリン濃度が高い傾向が認められた上、5年後にはいずれも有意な増加(p<0.05)が認められた¹⁰。

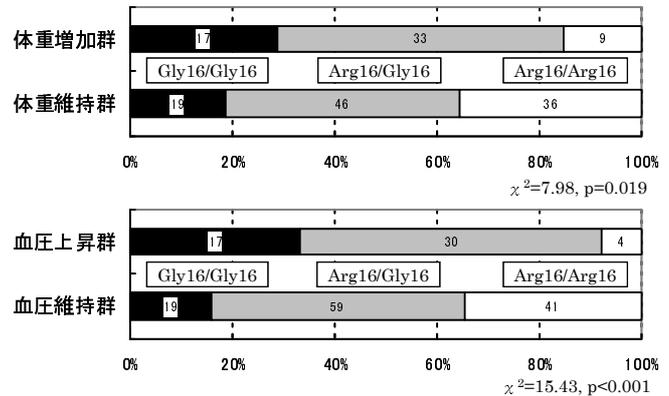


図 3 体重および血圧変化群、維持群におけるADRB2 Arg16Gly多型頻度の比較

d. 利尿薬投与試験における末梢血トランスクリプトーム解析

b.で述べたように、サイアザイド感受性 NaCl 共輸送体遺伝子(TSC) Arg904Gln(G/A)多型は女性、特に若年発症において高血圧感受性と有意な関連を認めた。これらの結果に基づき、利尿薬と本遺伝子多型との関連、利尿薬投与前後での遺伝子発現プロファイルの変化について、アレイを用いた解析をBML, Applied Biosystemsと共同で実施した。

ABI1700を用いたアレイ解析では、シグナルの中央値を規準に揃えるグローバルノーマライゼーションを実施し、QC解析の結果、アレイデータの信頼性に問題がないことが確認された。利尿薬投与前または後のサンプル間の総当たり解析をM-Aプロットを用いて実施したところ、横軸に収束しないブロードなプロットが得られ、シグナルの個人差が大きいことが示唆された。これに対し、投与前後の同一被験者での比較ではシャープなプロットが得られ、投与前後の発現変動はそれほど大きくないこと、末梢血トランスクリプトーム解析の再現性が良いことが明らかになった。QQプロットで変動の大きい遺伝子の抽出を試みるために、S/N比>2を得た遺伝子だけを用い、有意差が無いとする帰無仮説を棄却する危険率を0.01に設定したところ1,158遺伝子が抽出され、Bonferroni step-down(Holm)の多重検定実施後も166の有意な変動を示す遺伝子として抽出された。166遺伝子を階層的クラスタリングによりクラスター解析すると、サンプル間で差が大きく、投与前、投与後でクラスタリングされることが確認された。Panther ウェブサイトで biological process から166遺伝子の特徴を探った結果、pre-mRNA processing,

intracellular protein traffic, mitosis などと関連する遺伝子が多いことが示された。次に TSC 遺伝子型データ(GG vs GA)のデータを入力し、同様に $p < 0.01$ の規準で抽出を行った結果、131 遺伝子が得られた。クラスター解析の結果、GG 型保有者の投与前と GA 型保有者の投与後のプロファイルが近似しており、GA 型保有者の投与前と GG 型の投与後も近いことが示された。Panther の process 分類を試みたところ、mRNA transcription に関与する遺伝子群の発現頻度が高いことが示され、molecular function による分類でも転写因子関連が多いことが明らかになった。

4. 考察

a. 食塩感受性と高血圧

黒人では食塩感受性が強く、高血圧罹患率が高いとされる。米国合同委員会の高血圧治療ガイドライン JNC7¹¹ は、大規模臨床試験である ALLHAT の結果に基づき策定されたが、利尿薬がファーストラインとして取り入れられた理由として、黒人の食塩感受性が遺伝的に高いことが述べられている。米国では既に黒人専用の心不全薬が発売されており、人種のように遺伝的な違いの影響を大きく受ける要因を治療を実施する前に考慮する必要性が認識される時代を迎えつつある。日本人も比較的食塩感受性の強い民族とされてきたが、これが遺伝的に規定されているものか否かを示す傍証に乏しいのが現状であった。

本研究では、欧米を中心に高血圧感受性遺伝子として比較的コンセンサスの得られている4つの遺伝子多型を1,000人以上の大規模遺伝疫学的研究で比較検討した結果、食塩感受性遺伝子のリスクアレル頻度が日本人で全て高いことが示された。すなわち、日本人は欧米白人よりも黒人に近い食塩感受性の強い民族であることが再確認されたこととなり、より厳格な減塩指導と、欧米よりも少量の利尿薬投与が推奨されるものと思われる。ALLHAT の結果から利尿薬投与が我が国でも増加するものと思われるが、耐糖能を悪化させる高容量の利尿薬慢性投与が、糖尿病や肥満感受性が白人よりも高いとされる日本人において最終的なエンドポイント(死亡率)を改善するか否かについては慎重に見極める必要があり、超高齢化社会が間近な我が国では、より安全な減塩指導がまず取り組むべき課題であると言える。また、日本人のエビデンスを確立することが重要であり、日本高血圧学会が共催する利尿薬治療の長期予後を検証する DIME 研究や、同学会が後援する家庭血圧をベースとして7年間にわたる予後を検討する HOMED-BP 研究など、

日本人による日本人のための大規模臨床研究の成果を待つ必要があるものとする。尚、2006年10月に福岡で開催される第21回国際高血圧学会では、CASE-J や JATOS など世界が注目する日本人における大規模臨床研究の結果も発表されることになっている。

b. TSC 遺伝子の関連解析、トランスクリプトーム解析からの展望

前述したように TSC (Thiazide sensitive NaCl cotransporter) 遺伝子は Gitelman 症候群の原因遺伝子として知られる一方で、高血圧感受性遺伝子あるいは治療反応性を規定する因子の一つとしても注目されている。第49回日本腎臓学術集会において、高血圧・腎臓病の遺伝子解析に関するシンポジウムが企画されたが、異なる3施設からの発表において、高血圧感受性、降圧薬治療反応性、糖尿病性腎症のリスクとして本遺伝子多型が報告されたことは極めて興味深い。特に国立循環器病センターのグループは、本遺伝子の多型を網羅的に詳細に検討しており、今後は tag-SNP と呼ばれる多型については病態や治療反応性と網羅的に関連を検証する必要があるものとする。また、若年発症の女性においてのみ高血圧との関連が明らかになったが、エストロゲンが多く、悪い生活習慣の少ない若年女性においては、相対的に遺伝因子の影響を反映しやすいことが、これまでの複数の遺伝子多型解析で示されており、減塩などの生活指導の効果が期待される場所でもある。

一方、トランスクリプトーム解析では、遺伝子多型の違いにより発現プロファイルが異なること、性別の影響が大きいこと、利尿薬投与前後でプロファイルが逆転することなど、興味深い知見が得られた。利尿薬投与前後の僅か2時間という短時間での末梢血を用いたトランスクリプトーム解析であり、転写因子を中心とする変化が中心であったが、再現性は比較的よく保たれていること、個人差が大きいこと、解析コストが著しく高価であること、などアレイ解析の長所と短所が浮き彫りになった。しかしながら、末梢血中にはリンパ球や単球などサイトカイン関連で検討される血球だけでなく、高い比率を占め好中球、骨髄から誘導される各種前駆細胞なども含まれており、発現の変化する因子の単離にのみ固執することなく、プロファイルやネットワークとして発現パターンを観察することも重要と思われる。本研究開始後も、徐々にアレイ解析のコストダウンが図られているが、価格の壁を乗り越えるためには、プール解析や、サブトラクションの工夫が肝要と考えられた。

現在、Ca拮抗薬を用いた介入試験が終了しており、約1年近い投与における経時的なトランスクリプトーム解析

が行える試料収集が完了し、RNAの抽出作業の最中である。本研究における急性期の利尿薬投与試験でのノウハウを生かして、慢性投与におけるトランスクリプトーム解析の意義が検証できるものと期待される。

c. アドレナリン受容体遺伝子多型解析の結果が示すもの

図1に示したように、メタボリックシンドロームで示される各種病態と食塩感受性は多岐にわたって重なる部分が多い。アドレナリン受容体の各サブタイプの遺伝子多型は、このメタボリックシンドロームに関わる各種病態に、少しずつ異なる角度から影響を及ぼすことが知られており、本研究の結果と合わせると研究デザインや多型解析の意義を考える上で、交感神経系の微調節が高血圧や肥満の発症、進展に少なからず影響を及ぼしていることが推察された。

今回、「血圧の日間変動」との相関が初めて示された *ADRB1/Arg389Gly* 多型は、G蛋白結合部位に存在し、Arg389アレルはイソプロテレノール刺激による細胞内 adenylate cyclase 活性を高める。心臓特異的にArg389アレルを過剰発現したマウスとArg/Arg389型保有者における検討では、Arg389アレル保有は交感神経活性亢進を惹起し、心不全易罹患性を高めることや、カルベジロールによる治療効果が大きいことが示されている。この結果を受けるとArg/Arg389型保有者では高血圧に対するオッズ比が1.9(95% CI: 1.3-2.7)に達するという報告や、β遮断薬であるアテノロールによる降圧がArg/Arg389型保有者で有意に多いとする報告がなされている。また、今回の検討で連鎖不平衡にはないことも示されたSer49Gly多型は心拍数との関連のみが報告されているが、本研究でもこれを裏付ける結果となった。

一方で、*ADRB2*の2つの遺伝子多型、特にArg16Gly多型のGly16アレルが肥満を伴う血圧上昇リスクとして作用したのに対し、*ADRB3 Trp64Arg*多型のTrp64アレルは血圧上昇のみに作用することが明らかになった。*ADRB2 Arg16Gly*多型と高血圧の関連について、Gratzeらは正常血圧の白人男性においてGly16/Gly16型保有者の基礎血圧が高く、β2アドレナリン受容体選択的作動薬であるサルブタモールを静脈内投与すると、反射性の交感神経活性亢進に乏しく、血管拡張を伴って降圧しやすいことを報告している。尚、この際の24時間蓄尿によるNa排泄量には、遺伝子型間で差を認めていない。Preriaらも、1,576名のブラジル人一般集団において、*ADRB2*多型と高血圧、肥満との関連を指摘しており、Gly16/Gly16型保有者の高血圧に対するオッズ比は1.48倍に達することを報告している。一方で、*ADRB3 Trp64Arg*多型は血圧と

の関連を認めたものの、肥満に伴う血圧の変化は認められなかった。我々は、関連解析で本多型と高血圧やインスリン抵抗性の関連を認めないとする報告をしているが、今回の検討数ではArg64/Arg64型保有者の数が少なく、統計学的有意差を議論するには対象者数が少なすぎるものとする。現在、大迫研究、端野・壮瞥研究など、我が国を代表する高血圧に関する疫学研究にて、これら*ADRB*多型の検討を進めており、既に端野・壮瞥研究において*ADRB2 Arg16Gly*多型と*ADRB3 Trp64Arg*多型がメタボリックシンドロームの易感受性と有意な関連があることが観察されており、現在、論文化に向けた確認実験を行っている。

5. 今後の課題

本研究では、日本人の食塩感受性が遺伝的に高いこと、遺伝子多型の影響は環境因子や服薬内容などで大きく左右されること、従って「至適環境」というものを設定することが遺伝子解析を有用なものとする効果的な考え方であること、遺伝子発現情報は中間型表現型として利用できる可能性があること(但しこれにはまだまだ追加実験や時系列での検証が必要)、古くて新しい交感神経系の調整因子が高血圧やメタボリックシンドロームに関わっていること、などが明らかになったと言える。

2005年に提唱されたメタボリック症候群の診断基準では、内臓肥満をベースとする新しい概念であるが、古典的な食塩感受性、インスリン抵抗性との関連も深く、脂肪細胞の分化、インスリンのシグナル伝達、ミトコンドリアにおける各種酸化ストレス、脂肪酸のβ酸化などを指標に「食塩摂取」の功罪を検討する必要があるであろう。京都大学の辻本教授らが、トランスクリプトーム解析を単なる遺伝子の定量的評価でなく、ネットワークとして捉えて評価をする試みを始めており、創薬や薬力学の分野を大きく変えつつあるが、高血圧モデルラットや培養細胞系において、これらの技術を利用することにより、複雑な代謝マップのどの辺に脆弱な箇所があるかを推定出来る可能性が示唆されている。これをさらに、利尿薬をはじめとする降圧薬投与前後などで評価するシステムに応用すると、薬効や副作用発現で最も重要なネットワークが同定できる他、新たな治療ターゲット、副作用を予知する新規バイオマーカーの同定などにも直結するかもしれない。このためには、末梢血発現プロファイル解析の意義を確立させるために、RNAの安定性、実験の再現性などをまだまだ検証する必要があり、マイクロアレイの一段のコストダウンが望まれるところである。

我々は、降圧薬治療効果と遺伝子多型の関連を7年

間のコホート研究で検討する HOMED-BP-GENE 研究を 2005 年 8 月よりスタートし、これまでに 250 例を超える検体の収集に成功しているほか、54 週間の Ca 拮抗薬投与試験における遺伝子多型とトランスクリプトーム解析を現在実施している。これらの解析からは、降圧薬反応性や臓器合併症予防効果、副作用発現などを予知可能とする新たなバイオマーカーの同定が期待されるほか、創薬に結びつく新たな因子の単離にも結びつくかもしれない。

謝 辞

最後に、本研究に多大な助成を頂いたソルトサイエンス研究財団、研究に対する拡充ご助言を賜った荒井綾一先生に感謝申し上げますとともに、下記の共同研究者ならびに貴重な試料収集に御協力頂いた各研究参加の皆様にも厚く御礼申し上げます。

大阪大学大学院医学系研究科老年・腎臓内科学: 楽木宏実、大石充、杉本研、石川一彦、岩嶋義雄、山本浩一、鷹見洋一、田中千尋、呉村将文、舛尾和子、東北大学: 大久保孝義、目時弘仁、菊谷昌浩、戸恒和人、今井潤、札幌医大: 赤坂憲、齋藤重幸、浦信明、島本和明、UCSF: Theodore W. Kurtz

文 献

1. Higaki J, Baba S, Katsuya T, *et al.* Deletion allele of angiotensin-converting enzyme gene increases risk of essential hypertension in Japanese men : the Suita Study. *Circulation*, 101: 2060-2065 (2000).
2. Katsuya T, Iwashima Y, Sugimoto K, *et al.* Effects of antihypertensive drugs and gene variants in the renin-angiotensin system. *Hypertens Res*, 24: 463-467 (2001).
3. Katsuya T, Koike G, Yee TW, *et al.* Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet*, 345: 1600-1603 (1995).
4. Ishikawa K, Baba S, Katsuya T, *et al.* T+31C polymorphism of angiotensinogen gene and essential hypertension. *Hypertension*, 37: 281-285 (2001).
5. Katsuya T, Horiuchi M, Minami S, *et al.* Genomic organization and polymorphism of human angiotensin II type 2 receptor: no evidence for its gene mutation in two families of human premature ovarian failure syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 127: 221-228 (1997).
6. Katsuya T, Ishikawa K, Sugimoto K, *et al.* Salt sensitivity of Japanese from the viewpoint of gene polymorphism. *Hypertens Res*, 26: 521-525 (2003).
7. Fujiwara T, Katsuya T, Matsubara M, *et al.* T+31C polymorphism of angiotensinogen gene and nocturnal blood pressure decline: the Ohasama study. *Am J Hypertens*, 15: 628-632 (2002).
8. Simon DB, Nelson Williams C, Bia MJ, *et al.* Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet*, 12: 24-30 (1996).
9. Matsuo A, Katsuya T, Ishikawa K, *et al.* G2736A polymorphism of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter gene predisposes to hypertension in young women. *J Hypertens*, 22: 2123-2127 (2004).
10. Masuo K, Katsuya T, Fu Y, *et al.* Beta2- and beta3-adrenergic receptor polymorphisms are related to the onset of weight gain and blood pressure elevation over 5 years. *Circulation*, 111: 3429-3434 (2005).
11. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, *et al.* The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *Jama*, 289: 2560-2572 (2003).

Genetic analysis to identify the predisposing factors to salt sensitive hypertension

Toshio Ogihara and Tomohiro Katsuya

Department of Geriatric Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine

Summary

To achieve the tailored medicine as a safeguard against these disorders, it is required to clarify their pathogenesis. Even though many papers concerning molecular mechanism of cardiovascular disease have been published, there has been little success in identifying the correlation among genome, transcriptome, proteome, and environment in the pathogenesis of cardiovascular disease. We have been examined the genotype-phenotype interactions in many candidate genes using a huge number of samples to identify several unique interactions between gene polymorphism and environmental factors. For example, T235 allele of angiotensinogen gene modulates the salt sensitivity and increases a risk for lacunar infarction and non-dipper type of blood pressure variation. Interestingly, the frequency of four candidate genes of salt sensitive hypertension, angiotensinogen (*AGT*), aldosterone synthase (*CYP11B2*), alpha adducin (*ADD1*) and G protein beta 3 subunit (*GNB3*), were significantly higher in Japanese than that in Caucasians. Arg904Gln polymorphism of thiazide sensitive sodium-chloride co-transporter (*TSC*) gene contributed to increase the predisposition to hypertension via gain of *TSC* function only in Japanese. We also carried out the microarray analysis to examine gene expression level in a thiazide (HCTZ) administration test, resulted that the peripheral transcriptome was altered according to *TSC* genotype and HCTZ administration. Since recent report suggested the positive association between functional polymorphisms in the beta 2- and beta 3-adrenergic receptors and cardiovascular function, our 5-year longitudinal study clarified that the beta 2-adrenergic receptor polymorphisms related to weight gain, blood pressure (BP) elevation via alteration of sympathetic nerve activity. In addition, beta-1 adrenergic receptor polymorphism was associated with heart rate and daily home blood pressure variation and increased risk for lacunar infarction in the Ohasama Study. Put together these results, we would like to propose the importance to examine the genetic factors with precise and accurate clinical phenotypes. Lessons from large genetic epidemiological studies taught us that genetic information may be able to provide the “optimal environment” suited for individual constitution. We would like to express gratitude to all collaborators of large epidemiological studies and Salt Science Research Foundation for their continuous grant support.

5. 塩味応答の DNA アレイ解析

阿部 啓子 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

松本 一朗 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

1. 研究目的

味覚は、動物が生命を維持するために食物摂取の適否を判別する重要な感覚である。ヒトを感じる主要な味に甘・苦・塩・酸・旨の5基本味があるが、これらの味を呈する物質は、口腔内の上皮層、特に舌上の乳頭と呼ばれる構造の中に存在する味蕾で受容される¹⁾。甘味・苦味・旨味が分子によって喚起される味であるのに対し、塩味・酸味はイオンによって引き起こされる。甘・酸・苦・旨味は味蕾に存在する受容体²⁻⁶⁾が同定され、それぞれ異なる味細胞で受容される。塩味は甘味や旨味の増強など多くの味質と密接に関連している。さらに塩味は食品の嗜好意欲を高めるなどの生理作用もあるが、塩味の受容機構は不明である。

味蕾で受容される味刺激の情報は、シナプスを介して味神経に伝わり、延髄の孤束核(NST)、橋(PBN)、視床の後内側腹側核小細胞性領域(VPMpc)に伝わり、最終的に大脳皮質の味覚野(CTA)で認識される(図1)。PBNからはVPMpcへの入力他に、扁桃体中心核(CNA)、外側視床下部(LH)などへも投射する⁷⁾。このような上行性の入力と同時にCTAからPBNやNSTへの下行性の入力も存在し、味情報に関わる神経伝導路は複雑である⁸⁾。

PBNは小脳から中脳へ運動性の情報を伝える繊維束である結合腕(BC)を囲む神経細胞集団であり、橋と中

脳の結合部の被蓋背外側部に位置する。味情報は主にNST吻側部からPBNの内側部へ、一般臓性感覚情報は主にNST尾側部からPBNの外側部へと入力される⁷⁾。細胞の形態や投射組織の違いにより、PBNはいくつかの領域(部分核)に分けられるが、その境界は明確ではない。口腔内味刺激に対するPBNにおけるc-Fosの免疫応答解析⁹⁻¹¹⁾から、甘味刺激に対してはcentral lateralで、塩味刺激に対してはmedial部の内側の結合腕に接する部分とdorsal lateralの一部で応答が見られる(図2)。酸味刺激、苦味刺激は反応位置が似ておりexternal medial、external lateralで応答が見られるが、酸味刺激の方が若干内側寄りである。また、一般臓性感覚に対しては、extreme lateralに強い応答が得られる。

PBNは口腔内味刺激に対するc-Fosの免疫応答も部分核により異なるが、それぞれの部分核がどのような役割を担っているかはわかっておらず、その分子知見はほとんどない。PBNでは、好ましい味情報と嫌悪する味情報は異なる細胞で応答し、塩味は濃度により両方の細胞に分かれることが知られているが、これらの細胞の分子特性については不明である。

本研究は①味覚情報の中継核PBNの神経細胞特性の解析ならびに②PBNにおける塩味を含む基本味応答の遺伝子発現プロファイル解析の2つの項目に焦点をあて実施した。

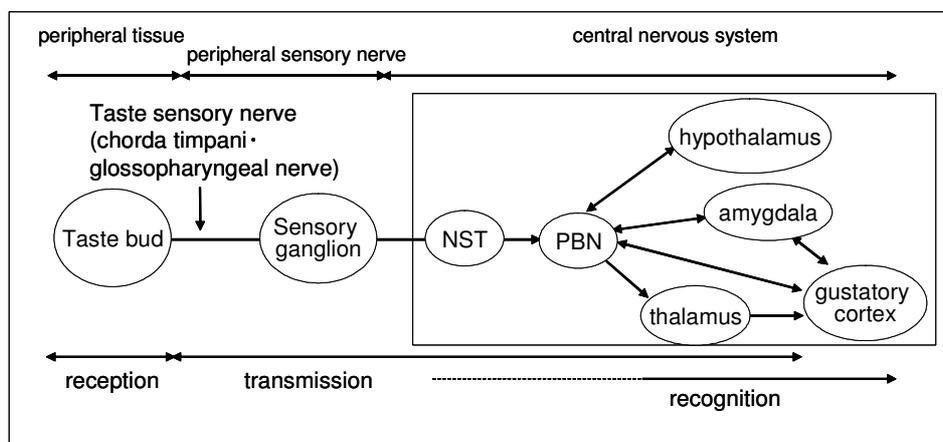


Fig. 1 Taste signaling system

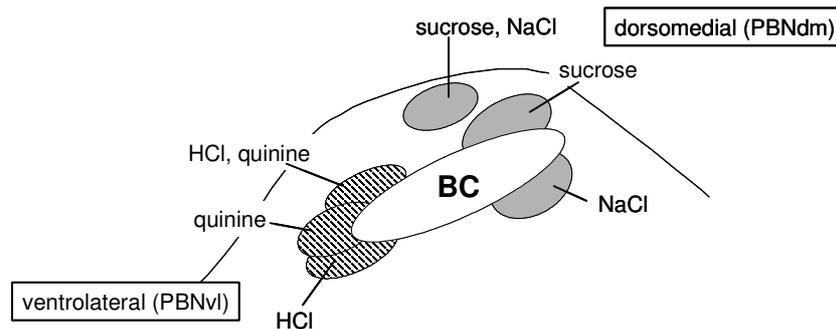


Fig. 2 c-Fos response exerted after stimulation with tastants

2. 研究方法

2.1 神経核の抽出

Wistar ラット(成体、雄、250-300 g)を断頭し、氷上で PBN、PBNdm、PBNvl、Pr5 を摘出し(図 3)、RNAlater™ (Ambion, Inc. Austin, Texas, USA) に浸漬し、-20 °C で保存した。PBNdm、PBNvl は PBN を 3 つに分けて中央部を残し、背内側約 3 分の 1 を PBNdm、腹外側約 3 分の 1 を PBNvl とした。In situ ハイブリダイゼーションに用いる組織は、ラット脳幹から結合腕傍核を含む 3 mm の coronal 切片を切り出し、O.C.T. compound に包埋して凍結ブロックを作製し、-80 °C で保存した。

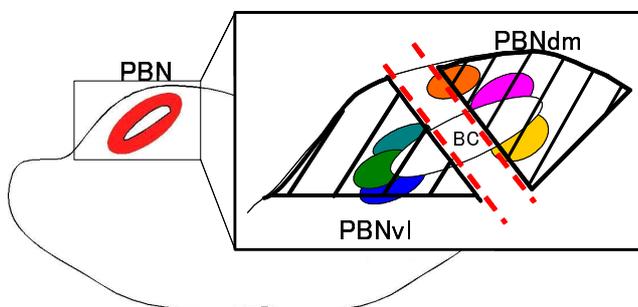


Fig. 3 PBN, Pr5, PBNdm and PBNvl tissues

2.2 DNA マイクロアレイ解析

ラット PBN から、RNeasy mini kit を使用し、DNase I 処理を行って total RNA を精製した¹²⁾。total RNA 1 µg から T7-(dT)₂₄ primer を用いて 1 本鎖 cDNA、ついで 2 本鎖 cDNA を調製した。さらに、ビオチン化基質と T7 RNA polymerase によってビオチン化 cRNA を合成した (in vitro transcription)。これを RNeasy mini kit で精製し、アルカリ処理で 35~200 bases に断片化した。断片化した cRNA 各 15 µg に内部標準物質を添加し、Gene Chip (Affymetrix 社, Rat Expression Array 230A) に注

入し、ハイブリオープンで 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。洗浄およびシグナルの蛍光標識は Fluidic Station で行った。蛍光シグナルを GeneArray Scanner で検出し、ソフトウェア Microarray Suite を用いて数値化した。

2.3 DNA マイクロアレイデータの解析

アレイ実験のデータは基本的には既報の方法^{13,14)} に準じて処理を行った。PBNdm、PBNvl それぞれについて 3 種類の刺激(個体数 3)を行い、各 9 サンプルの正規化データを得、一元配置等分散分析 (One-way ANOVA) を行った。危険率 1% で有意差のある遺伝子を抽出し、これらの遺伝子について Tukey の多重比較検定を行い、どの刺激間で有意差があるかを調べた。GeneChip Operating Software (Affimetrix) により算出された各遺伝子の発現は指標 (Flag) を参照し、有意差を示した両群で 2 サンプル以上が Absent である遺伝子を除外した。

味刺激実験のデータも基本的には上述に従って行った。塩あるいは酸味液刺激の場合は、各実験区で一定量発現していると予想される解糖系酸化酵素 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現量を、無・水刺激ラットの GAPDH の発現量に合わせることで正規化を行った。発現量の増減は Microarray Suite を用いて解析した。

2.4 in situ ハイブリダイゼーション

ラット遺伝子のプローブとなる cDNA 断片は、ラット PBN、Pr5、brain、testis から抽出した全 RNA から RT-PCR を行い取得した。In situ ハイブリダイゼーションは既報^{13,14)}に従った。

2.5 ラットの味刺激

Wistar ラット(成体、雄、250-300 g)を麻酔下、頭部皮膚から口腔内へのカニューレ挿入^{9,15)} 手術を行い、水による口腔内刺激トレーニングを行った後、味刺激溶液は頭の上から流し入れた(この方法を用いることにより、忌

避する溶液でも麻酔せずに飲ませることが可能)。各群 5 匹ずつ用いて味刺激を行った。塩あるいは酸味刺激は、塩 0.1 M NaCl、酸 0.1 M HCl を用いた。甘・酸・塩・苦味の 4 種混合味刺激は、0.1 M sucrose、0.1 M NaCl、0.1 M HCl、5 mM denatonium の混合溶液、対照溶液として H₂O を使用した。また、嗜好する味液は 0.2 M NaCl と 0.5 M sucrose (NS) の混合溶液、忌避する味液は 5 mM denatonium benzoate と 0.1 M HCl (DH) を 10 ml 投与した。味刺激から 60 分後に断頭し、PBNdm、PBNvl を摘出した。RNA 抽出および cRNA プローブは 1 の実験と同様に行った。味刺激後の PBN における *c-fos* mRNA、*c-Fos-LI* のシグナルが、1 時間後に最大となる(大阪大学 乾博士私信)ことを参考にして、いずれの場合も味刺激 1 時間後に PBN を摘出し、RNA later 中で保存し、DNA マイクロアレイ解析を行った。

3. 研究結果および考察

3.1 味覚情報の中継核 PBN の神経細胞特性の解析

3.1.1 マイクロアレイデータの全体像の把握

PBN を他の中枢神経系組織と比較し、その特性が異なるかどうかを調べた。同時に、PBN を 2 つの領域に分け、その領域によって特性が異なるのかも解析した。対照とする中枢神経系組織には、橋の三叉神経主知覚核 (principal sensory trigeminal nucleus, Pr5) を用いた。Pr5 は三叉神経節からの線維を受ける第 2 次ニューロンで、頭部の触覚や深部感覚情報を伝達する中枢の体性感覚中継核である。PBN 内の領域は、背内側部 (dorsomedial, PBNdm)、腹外側部 (ventrolateral, PBNvl) の 2 つに分けたものを比較した(図 3)。PBNdm は塩味、甘味など好まれる味で口腔内を刺激した際に *c-Fos* が応答する細胞を含む領域であるのに対し、PBNvl は苦味、酸味など嫌悪される味の *c-Fos* 応答細胞領域であることが報告されている⁹⁻¹¹⁾。

ラット PBN、PBNdm、PBNvl、Pr5 の各組織 3 個体ずつ、計 12 サンプルの DNA マイクロアレイデータは GAPDH 正規化後散布図を作成し、同一組織群内および異種組織群間の遺伝子発現の全体像を観察した。どのサンプル間の比較でも大部分の遺伝子の発現量は変化しないものの組織によって発現量の異なる遺伝子も複数存在することが示唆された。各サンプル間の Pearson 相関係数を算出したところ、最も低い値でさえ 0.948 であった。味蕾とその周辺の上皮細胞では、同様の解析から得られる Pearson 相関係数は 0.900 未満であることから、橋の神経核間の遺伝子発現様式は、比較的類似性が高いこ

とが示唆された。一方、PBNvl 以外では、群内サンプル間の Pearson 相関係数の平均は異群サンプル間の平均よりも大きいことから、神経核により遺伝子発現特性の違いがあることが示唆された。これらのことから、神経核特異的発現を示す遺伝子は、神経核細胞の機能特性と直接的に結びつくものであると推定された。

次に、サンプルの類似性/相異性をしらべるために階層的クラスタ解析を行った(図 4)。PBN と Pr5 の 6 サンプル(図 4-A)、および PBNdm と Pr5 の 6 サンプル(図 4-B)を解析した場合には、それぞれ同群のサンプルがクラスタを形成したが、PBN と PBNdm の 6 サンプル(図 4-E)を解析した場合には、同群サンプルのクラスタが形成されなかった。PBNdm は PBN の一部であり、遺伝子発現様式の全体像が非常に類似していることを表していると考えられる。また、PBN、PBNdm は Pr5 と遺伝子発現特性が異なることも示唆された。

3.1.2 組織間で発現が異なる遺伝子の抽出

神経核間で発現量が異なる遺伝子を抽出するため、統計学的に解析を行った。一元配置等分散分析 (One-way ANOVA) を行い、FDR<0.1 で有意差のある 1,950 遺伝子を抽出し、階層的クラスタ解析を行った。図 5 に示すように各組織ごとにクラスタが形成された。組織間では PBN クラスタと PBNdm クラスタが最も近く、次いでこれらと PBNvl が一つのクラスタを形成し、Pr5 が最も離れたクラスタを形成していた。この結果は、PBN と PBNdm の遺伝子発現様式の類似度が最も高く、PBNvl もこれらとの類似性を有しており、PBN に属する神経核とそれ以外の Pr5 は、遺伝子発現様式が最も異なることを示している。

一方、Tukey の多重比較検定を行ったところ、1,950 遺伝子のうち PBN-Pr5 間で有意差のあった遺伝子は 1,684、PBNdm-Pr5 間では 1,624、PBNvl-Pr5 間では 698、PBNvl-PBNdm 間では 1,220、PBN-PBNdm 間では 493、PBN-PBNvl 間では 1,291 であった。これらの多くは発現数値や神経核間の発現数値比が小さい遺伝子であった。いずれかの組織間で発現数値に 5 倍以上の差があり、かつ発現が強い方の発現数値が 500 以上の遺伝子は 28 遺伝子しかなく、発現数値比を 2 倍以上とした場合は約 400 遺伝子であった。このことは、神経核間の特性の違いに大きく寄与する遺伝子は少ないことを示唆している(図 6)。

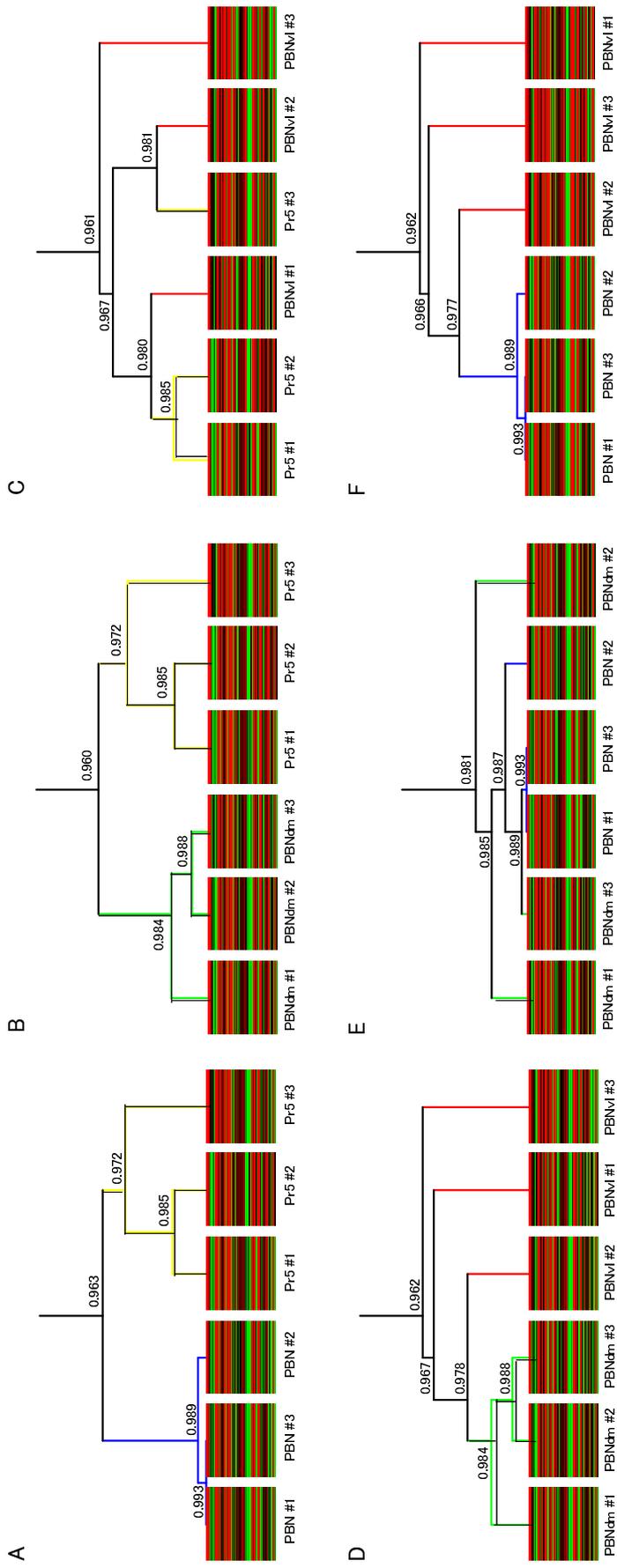


Fig. 4 Clustering analysis

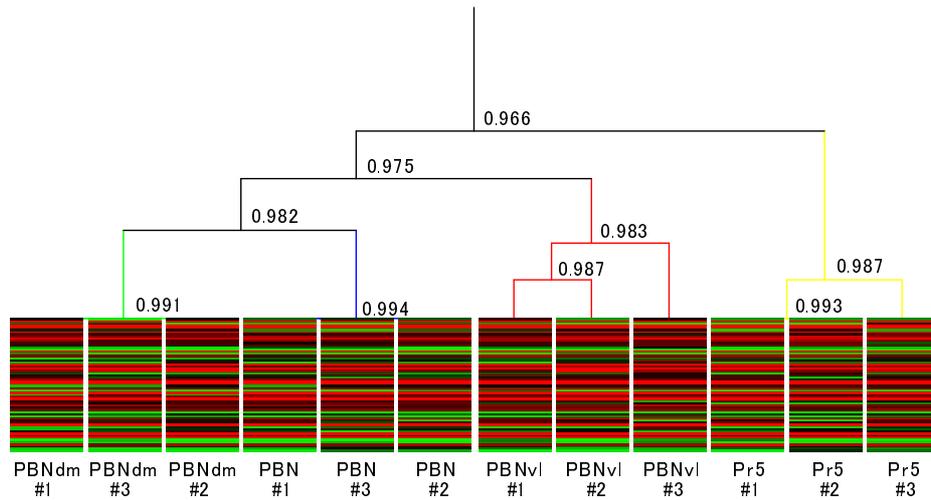


Fig. 5 Clustering analysis

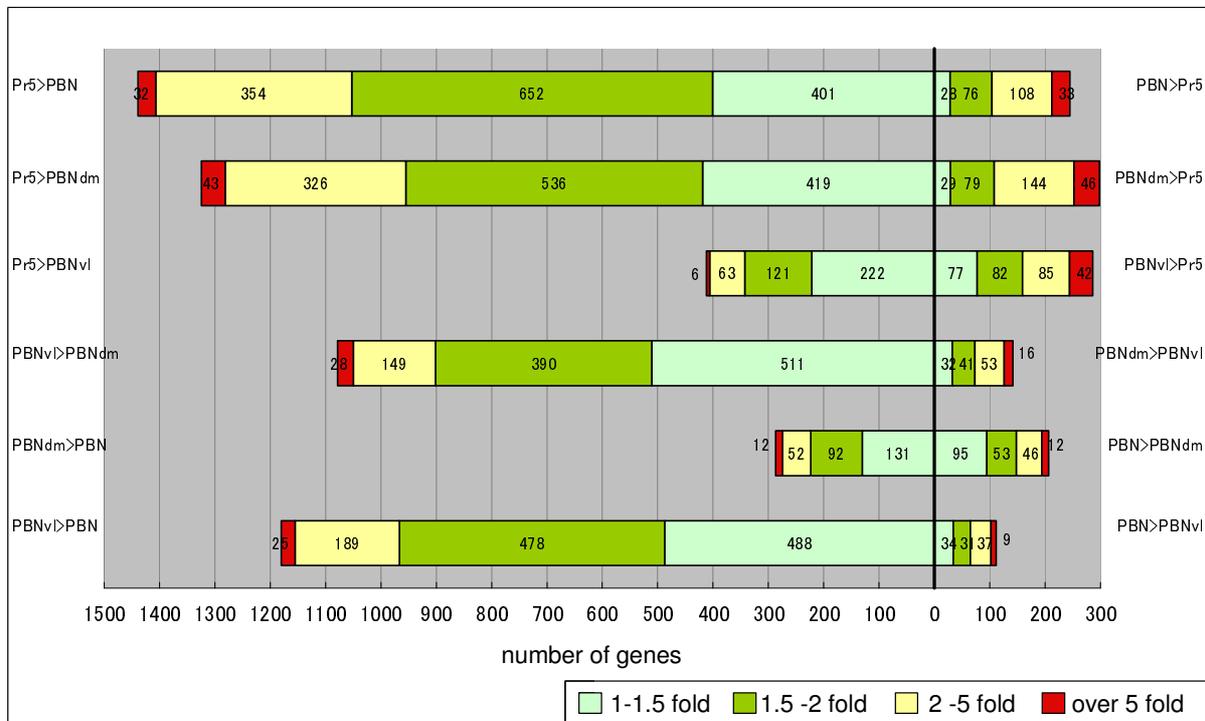


Fig. 6 Numbers of genes selected by Student's *t*-test (FDR < 0.01)

3. 1. 3 組織間で発現数値に有意差があった遺伝子の組織染色による発現様式の確認

上記の 28 遺伝子の発現を確認するために、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。また、発現数値比が 2 倍以上 5 倍未満で発現数値が 500 以上の遺伝子 340 個からも 3 遺伝子を選択し、計 31 遺伝子について PBN と Pr5 が両方含まれる橋の coronal 切片に対して *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、31 遺伝子のうち、5 遺伝子についてはシグナルは見られず、7 遺伝子は全体

的に濃いシグナルが観察されたが、残りの 19 遺伝子については組織間のシグナル強度および頻度に差が見られた。他組織に比べて PBNvl 領域で強く発現したのは 3 遺伝子、PBN 全体で強く発現したのは 5 遺伝子、Pr5 領域で強く発現したのは 5 遺伝子であった。PBNdm 領域で強く発現した遺伝子は見られなかったが、PBN と隣接する組織である三叉神経中脳路核 (mesencephalic nucleus of trigeminal nerve, Me5)、または青斑核 (locus coeruleus, LC) でシグナルが観察された遺伝子が 6 遺

伝子存在した。

本研究はPBNの遺伝子発現特性がPr5と異なること、さらにPBN内部でもPBNdm領域とPBNvl領域の遺伝子発現特性が異なることをDNAマイクロアレイ解析と*in situ*ハイブリダイゼーション解析により明らかにした。PBNとPr5は異なる感覚を中継する組織であるにも関わらず、遺伝子発現様式は非常に似ていた。中継する感覚は異なるが、橋に存在する中枢神経系の中継核という共通項は性質に大きな影響を与える要因なのであろう。一方、4組織の中で組織間の遺伝子発現特性の差が最も大きかったのは、PBNとPr5、PBNdmとPr5であった。また、組織間の遺伝子発現特性の差が最も小さかったのはPBNとPBNdmであった。PBNdmはPBNの一部であり、PBNとPr5は異なる組織であることを考えると、この結果は妥当なものであると考えられる。PBNvlもPBNの一部なので、Pr5との差が大きく、PBNとの差が小さくなると予想されたが、PBNvl内のばらつきが大きくそのような傾向は観察されなかった。

PBNにあるPBNvlとPBNdmの領域間において遺伝子発現が異なることが明らかになり、PBNvlを特徴づける遺伝子3個を見出した。一方、PBNdmの分子マーカを見出すことに成功していない。今後、発現数値が5倍未満の遺伝子について解析を進めることにより、PBNdm特異的に発現する遺伝子を見出すことができると考えられる。

3.2 PBNにおける塩味を含む基本味応答の遺伝子発現プロファイル解析

3.2.1 口腔内塩味および酸味刺激に伴う遺伝子発現プロファイリング

3.2.1.1 塩味(NaCl)刺激と酸味(HCl)刺激を比較したスキッタープロット

GAPDHで正規化した後、塩味刺激実験1および2(NaCl-1, NaCl-2)と酸味刺激実験1および2(HCl-1, HCl-2)の4通りの比較の(NaCl 1-HCl 1, NaCl 1-HCl 2, NaCl 2-HCl 1, NaCl 2-HCl 2)スキッタープロットを図7

に示した。 $y=x$ に近いスポットは塩味刺激と酸味刺激において変動の少ない遺伝子群を示す。全遺伝子群の観察からどの組み合わせにおいてもNaCl群、HCl群の各群に $y=x$ 軸から距離を示す遺伝子群が存在し、それらに偏りは見られなかった。したがって、4つのサンプルの実験データを以下に述べるように詳細に解析した。

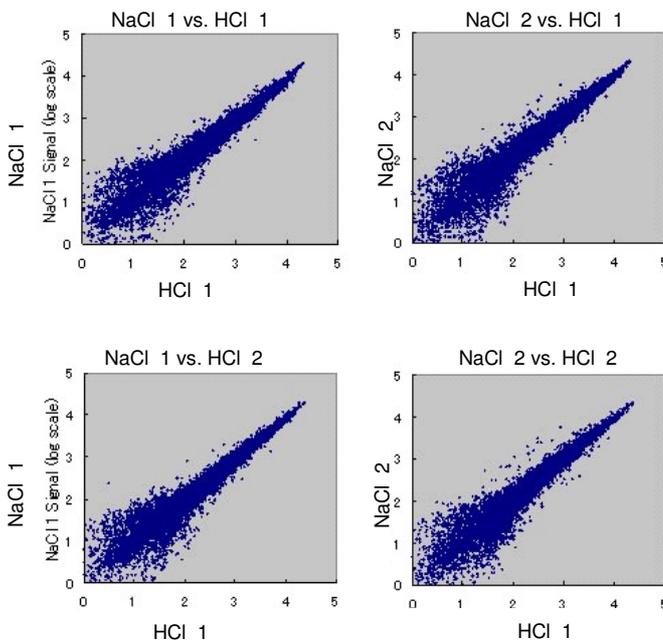


Fig. 7 Scatter plots

3.2.1.2 発現遺伝子数

使用したアレイ上には15,866遺伝子がスポットされている。このうち、各味刺激1時間後のPBNにおいて発現が認められた遺伝子P(present)は約11,000個、発現が認められなかった遺伝子A(absent)は4,500~4,700個、その境界にある遺伝子M(marginal)は約200個であった(表1)。また、Pに存在する遺伝子群の発現量の平均シグナル値は、1,100~1,200程であった。このように遺伝子発現全体では、塩味刺激群と酸味刺激群では、発現遺伝子数およびその発現量が大きく変化していなかった。

Table 1 Numbers of genes expressed by treatment with NaCl or HCl

	NaCl 1		NaCl 2		HCl 1		HCl 2	
	number of genes	signal average						
P	10924	1073	11243	1242	11246	1237	11025	1228
M	219	150	186	171	193	124	216	163
A	4723	63	4437	62	4427	50	4625	64

The symbols P, M and A stand for “present”, “marginal” and “absent” of gene expression (transcription), respectively.

3. 2. 1. 3 塩味刺激と酸味刺激の遺伝子発現変動の解析

上記の4サンプルのアレイデータをAffymetrix社の解析ソフトMicroarray Suiteを用いて比較した。4通り全てで発現が増加、または減少した遺伝子を抽出した結果、塩味刺激で発現が上向きに調節された遺伝子44個、下向きに調節された遺伝子54個が抽出された(表2)。

Table 2 Numbers of genes up- and down-regulated by treatment with NaCl compared to HCl

Gene expression level* by treatment with				number of genes	
NaCl		HCl		Up	Down
P	P	P	P	38	50
P	P	P	M	1	-
P	P	P	A	1	-
P	P	A	A	2	-
P	M	A	A	1	-
P	A	A	A	1	-
A	A	A	A	1	-
P	A	P	P	-	2
M	M	P	P	-	1
M	A	P	P	-	1

* For the symbols see Table 1.

3. 2. 1. 4 発現変動した遺伝子の発現量の変化

抽出された98遺伝子について両刺激群間の変動倍率を調べた。図8に示すように2倍以上変化した遺伝子は、増加では9遺伝子、減少では5遺伝子、1.5倍以上~2倍未満は増加が25遺伝子、減少が18遺伝子、1.5倍未満は増加が10遺伝子、減少が31遺伝子であった。このように塩味刺激後に伴う発現変動の比率はほとんどが2倍以下で、2.5倍以上変動したのは、わずか3遺伝子であった。

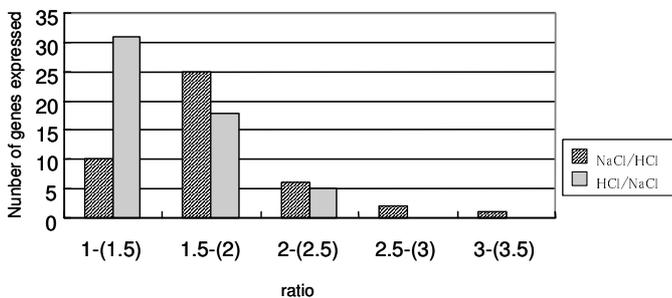


Fig. 8 Numbers of genes extracted with statistical significance

2倍以上に増加した遺伝子の遺伝子産物には、細胞接着に与関する gap junction protein、connexin 43 や転

写を抑制する分子として知られている RP58 protein、ミトコンドリアに存在する Cl-channel、増殖・分化に関与する分子、またアルツハイマー病の原因タンパク質として知られる amyloid protein precursor-like 2 などがあつた。2倍以上減少した遺伝子の遺伝子産物には、過剰な重金属を補足し生体を防御する metallothionein や、カテコールアミンの代謝に関与する酵素である catechol-O-methyltransferase などがあつた。

本研究では「口腔における塩味刺激に伴い、味覚コーディングの一部を担う PBN において遺伝子発現変動が生ずるであろう」という仮説を基に実験を行った。塩味と同じイオン系の酸味刺激と比較したところ、約100種類の遺伝子の発現が2倍以上高あるいは1/2倍以下に変化した。これは使用したチップの総遺伝子の約0.7%にあたる。変動遺伝子数が少ないのは、塩味や酸味に反応する細胞が PBN に含まれる細胞のごく僅かであることによるのかもしれない。2種類の刺激では、陰イオンが同じであるため、単純に Na⁺と H⁺の違いにより発現の変動が現れてきた遺伝子であると言える。つまり、塩味刺激で発現が増加した44遺伝子は、Na⁺によって発現が増加した、または H⁺によって発現が抑制された遺伝子である。発現が減少した54遺伝子は、Na⁺によって発現が抑制された、または H⁺によって発現が増加した遺伝子だと考えることができる。以上、本研究から塩刺激と酸刺激でいくつかの特定の遺伝子の発現が変動することは明らかになった。

3. 2. 2 4基本味(甘・酸・塩・苦)混合溶液刺激に対する PBN での遺伝子発現応答

3. 2. 2. 1 全サンプル間のスキッタープロット

PBN の遺伝子発現プロフィール解析を行い、味覚神経伝達機構の分子知見を得ることを試みるため、前述したように塩(NaCl)と酸(HCl)刺激を比較すると、PBN では味刺激の種類に依存した遺伝子発現応答が起きることが明らかとなった。そこで本項では、甘・酸・塩・苦味の混合味溶液を用い、PBN での味刺激依存的な応答遺伝子について解析した。

混合味溶液、対照溶液による口腔内刺激1時間後のラット PBN の遺伝子発現データを、DNA マイクロアレイを用いて取得した。全8サンプルの遺伝子発現データの scatter plots を作成し、各サンプル間の全体的な遺伝子発現の様子を観察した(図9)。同一刺激群内のサンプル間では、発現量比等倍を表す直線を中心とした分布を示し、相関係数も大きかった(水刺激サンプル間の相関係数平均:0.994、味刺激サンプル間の相関係数平均:0.993)。一方、異刺激サンプル間では、同じように発現

量比等倍の直線を中心とした分布を示すものの、若干の広がりが見られ、相関係数も同一刺激サンプル間のそれよりも少し小さかった(異刺激サンプル間の相関係数平均:0.986)。

3. 2. 2. 2 サンプル間のクラスター解析

GeneSpring software を用いてデータを 50th percentile

で正規化し、サンプル間の相関距離によるクラスター解析を行ったところ、味刺激群、水刺激群の各群ごとにクラスターを形成した(図 10)。これは、味刺激依存的な遺伝子発現応答を捉えられている可能性が高いことを示している。

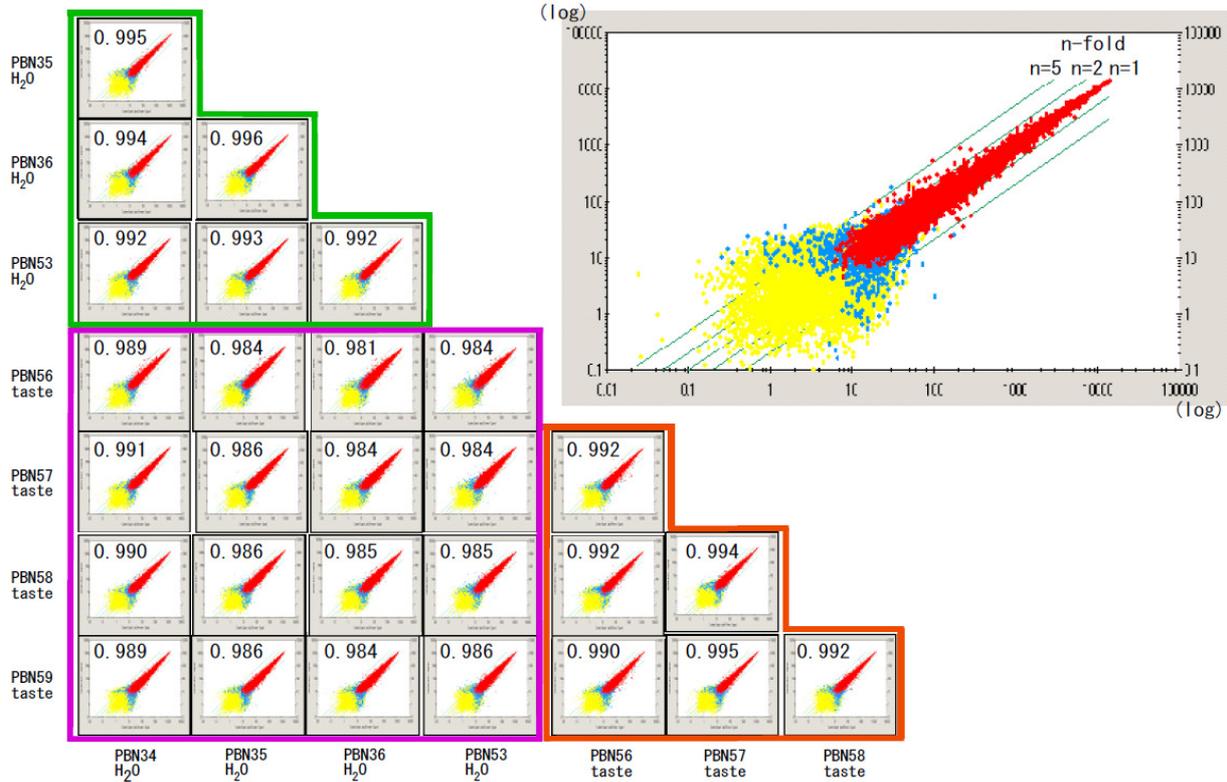


Fig. 9 Scatter plots

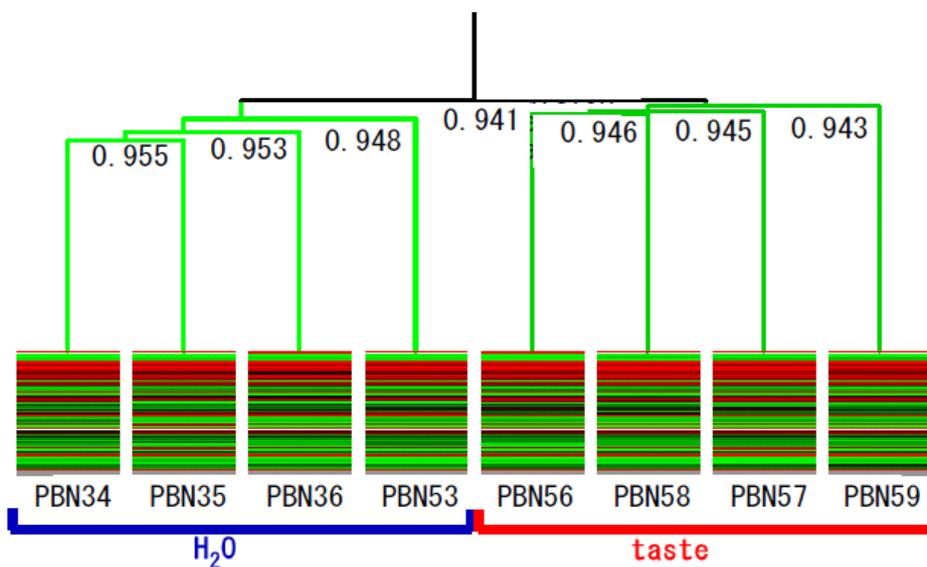


Fig. 10 Clustering analysis

3. 2. 2. 3 味刺激依存的に発現応答した遺伝子数

全 31,042 遺伝子に対して Student's *t*-test (FDR<0.1) で有意差があるとされた遺伝子を抽出した。味刺激により発現が増加したのは 913 遺伝子、減少したのは 711 遺伝子であった。また、これらの遺伝子の発現量がコントロールに対して何倍に変化したかを算出し、2 倍以上、1.5 倍以上 2 倍未満、1.5 倍未満変化したものに分類した。発現が増加したものは倍数変化の低いものが多く、減少したものは倍数変化の高いものが比較的多かった (図 11)。

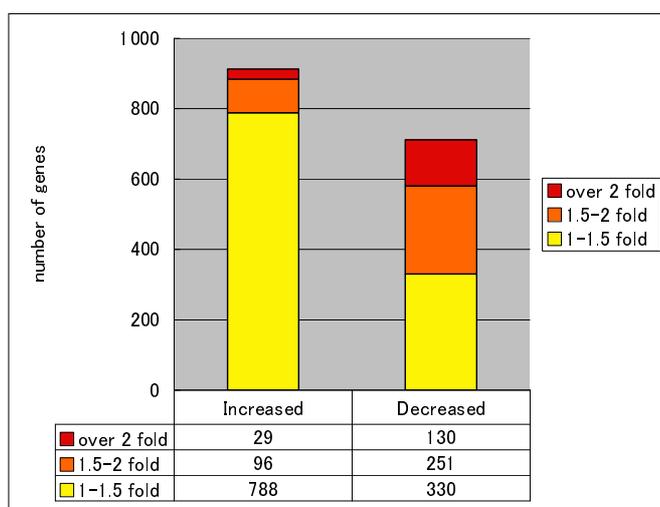


Fig. 11 Numbers of genes selected by Student's *t*-test (FDR<0.1)

口腔において甘、苦、塩、酸味の混合溶液を刺激し、PBN における遺伝子発現解析を行った。混合溶液刺激群と水刺激群の合計 8 サンプルは再現性が高いデータであった。統計的に有意な差のある遺伝子が多数得られたことから、口腔内味刺激により PBN で生ずる遺伝子発現変動をマイクロアレイによって捉えることができた。統計解析で得られた、味刺激により有意に発現が変化するとされた遺伝子は、倍数変化の小さいものが大半であった (一番大きいもので 4 倍程度)。これは、日常的に摂取する「味」刺激は PBN において遺伝子変動を生ずるものの、その変化の程度はあまり大きくないことを示唆するものである。

3. 2. 3 PBN 内の部分領域 PBNdm と PBNvl における味刺激に伴う遺伝子発現変動の解析

3. 2. 3. 1 マイクロアレイデータの全体像

前述 3.1 の結果から、PBN 内の部分領域、PBNdm と PBNvl は定常状態における遺伝子発現特性が異なるということが示された。そこで本項では、好まれる味あるい

は嫌悪される味で口腔内を刺激し、PBNdm と PBNvl 領域での遺伝子発現様式を比較した。また、両者間での応答遺伝子の違いについても検討した。

好まれる溶液として甘味と塩味を混ぜた溶液 (NS)、嫌悪される溶液として酸味と苦味を混ぜた溶液 (DH) で刺激し、PBNdm および PBNvl 領域の細胞を得て DNA マイクロアレイを行った。

3. 2. 3. 2 刺激応答遺伝子の抽出

各サンプル間の Pearson 相関係数を算出し階層的クラスタ解析を行った。両解析結果から、味刺激による差よりも各サンプルの個体差の方が大きいことが示唆された。刺激によって大きく発現が変動する遺伝子を統計学的に抽出するため、PBNdm、PBNvl それぞれについて一元配置等分散分析を行った。FDR<0.1 では有意差のある遺伝子は抽出されず、FDR<0.5 で PBNdm では 6 遺伝子、PBNvl では 1 遺伝子のみが抽出された。FDR を考慮せず、危険率 1% で有意差のある遺伝子を抽出したところ、PBNdm で 293 遺伝子、PBNvl で 258 遺伝子が抽出された。これらの遺伝子について Tukey の多重比較検定を行い、少なくとも一方の群で再現的に発現していると判断された遺伝子を抽出した。このうち、発現数値比が 1.5 倍以上のものは PBNdm、PBNvl どちらにおいても 100 遺伝子程度であり、DH 刺激 - H₂O 刺激間で最も多くの遺伝子が検出された (表 3)。

Table 3 Numbers of genes selected by Student's *t*-test (FDR<0.01)

Tastant	PBNdm	PBNvl
DH vs NS	16 (15)	27 (7)
NS vs H ₂ O	23 (16)	22 (7)
DH vs H ₂ O	47 (37)	76 (28)

NS: 0.2 M NaCl + 0.5 M sucrose

DH: 5 mM denatonium benzoate + 0.1 M HCl

PBNdm では DH 刺激、PBNvl では H₂O 刺激による c-Fos の免疫応答がないことを考慮すると、PBNdm では H₂O 刺激による遺伝子発現変動が、PBNvl では DH 刺激による遺伝子発現変動が起きたと考えられる。NS 刺激および H₂O 刺激は PBNdm の一部に c-Fos の免疫応答を誘導するが、遺伝子発現解析からは 23 遺伝子を抽出できた。同様に、c-Fos の免疫応答が誘導されない PBNvl においても、22 遺伝子に発現の違いが観察された。したがって、刺激応答の検出方法として、DNA マイクロアレイ解析は c-Fos の免疫応答よりも検出感度が高いことが示された。

刺激の種類により発現量が有意に異なる遺伝子を統計学的に抽出する過程において、FDR<0.5 を満たす遺伝子がほとんどなかった。この理由を考察してみたい。PBN の部分領域 PBNvl および PBNdm には、嫌悪する味(苦味および酸味)に応答する細胞群および好ましい味(甘味および塩味)に応答する細胞群がそれぞれに含まれている。本実験では、その領域に含まれる細胞中の刺激応答細胞の割合を増大させ、遺伝子発現応答が相加的に検出されることを期待して、混合味溶液による刺激を行った。しかし、この方法が適切ではなかった可能性がある。むしろ味刺激の種類により遺伝子発現応答特性も異なることも予想される。単独の味刺激と刺激後のサンプリング時間などの検討が必要と思われる。

PBN における味刺激に対する応答は、これまで電位変化や c-Fos の免疫応答性から解析されているのみであり、遺伝子発現変動から捉えようとした本研究は新たな試みである。このような研究は味覚研究に新たな方向性を見だし、今後の研究の発展に寄与するものであるといえる。

謝 辞

本研究に助成を賜りましたソルトサイエンス研究財団に深謝申し上げます。
また、本研究にご協力を頂きました大阪大学大学院人間文化研究科行動生態学講座 山本 隆教授ならびに乾賢助手に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Lindemann, B. (1996). Taste reception. *Physiol Rev* 76, 718-766.
- 2) Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrashekar, J., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. (2000). A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100, 693-702.
- 3) Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C. S., and Ryba, N. J. (2000). T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* 100, 703-711.
- 4) Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106, 381-390.
- 5) Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. (2002). An amino-acid taste receptor. *Nature* 416, 199-202.
- 6) Ishimaru, Y., Inada, H., Kubota, M., Zhuang, H., Tominaga, M., and Matsunami, H. (2006). Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 12569-74.
- 7) Yamamoto, T. (1984). Taste responses of cortical neurons. *Prog Neurobiol* 23, 273-315.
- 8) Nishijo, H., Uwano, T., Tamura, R., and Ono, T. (1998). Gustatory and multimodal neuronal responses in the amygdala during licking and discrimination of sensory stimuli in awake rats. *J Neurophysiol* 79, 21-36.
- 9) Yamamoto, T., Shimura, T., Sakai, N., and Ozaki, N. (1994). Representation of hedonics and quality of taste stimuli in the parabrachial nucleus of the rat. *Physiol Behav* 56, 1197-1202.
- 10) Yamamoto, T., Sako, N., Sakai, N., and Iwafune, A. (1997). Gustatory and visceral inputs to the amygdala of the rat: conditioned taste aversion and induction of c-fos-like immunoreactivity. *Neurosci Lett* 226, 127-130.
- 11) Yamamoto, T., and Sawa, K. (2000). Comparison of c-fos-like immunoreactivity in the brainstem following intraoral and intragastric infusions of chemical solutions in rats. *Brain Res* 866, 144-151.
- 12) Matsumoto, I., Emori, Y., Ninomiya, Y., and Abe, K. (2001). A comparative study of three cranial sensory ganglia projecting into the oral cavity: in situ hybridization analyses of neurotrophin receptors and thermosensitive cation channels. *Brain Res Mol Brain Res* 93, 105-112.
- 13) Matsumoto, I., Emori, Y., Nakamura, S., Shimizu, K., Arai, S., and Abe, K. (2003). DNA microarray cluster analysis reveals tissue similarity and potential neuron-specific genes expressed in cranial sensory ganglia. *J. Neurosci. Res.* 74, 818-828.
- 14) Ohmoto, M., Matsumoto, I., Misaka, T., and Abe, K. Taste receptor cells express voltage-dependent potassium channels in a cell age-specific manner. *Chem. Senses* in press.
- 15) Travers, S. P. (2002). Quinine and citric acid elicit distinctive Fos-like immunoreactivity in the rat nucleus of the solitary tract. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282, R1798-1810.

DNA Array Analysis of Salty Taste Response

Keiko Abe, Ichiro Matsumoto

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

Summary

Chemical compounds as food constituents are received at taste buds and the resulting taste signals are transduced up to the brain by way of taste nerves, nucleus of the solitary tract and parabrachial nucleus (PBN). The PBN as a relay nucleus for taste signal transduction possesses cells whose responses are differential depending on whether the taste information is acceptable or aversive. The present study aims at gene expression profile analysis on taste information-dependent cell properties in PBN and also on how the acceptable taste information is offered by taste stimuli including NaCl.

1. Gene expression properties in PBN at a baseline

We excised the four tissues from rats: 1) PBN itself, 2) the dorsomedial in PBN (PBNdm) responding to acceptable taste, 3) the ventrolateral in PBN (PBNvl) responding to aversive tastes and 4) the principal sensory trigeminal nucleus (Pr5) as a relay nucleus for somatosensory transduction. DNA microarray analysis of total RNA samples extracted from these four tissues at a baseline was carried out. We then selected 31 genes whose between-tissue differences in expression intensity were large, and analyzed their expression patterns in PBN by *in situ* hybridization. As a result, 19 among the 31 genes were found to show larger signal intensities and frequencies generally in the nuclei than in the other parts. Particularly stronger expressions were observed for 5 genes in PBN as a whole, 6 in PBNdm, 3 in PBNvl, and the rest (5 genes) in Pr5.

2. Gene expression responses in PBN at an intermediate end point after tastant application

Animal experiments were carried out using the three taste solutions, 0.1 M NaCl, 0.1 M HCl, and a mixture of 0.1 M NaCl, 0.1 M HCl, 0.1 M sucrose and 5 mM denatonium (bitter substance). Pure water were used as a control. The stimulation with 0.1 M NaCl and that with 0.1 M HCl actually gave differences in expression intensities of some particular genes; 40 genes were found to be up-regulated by the NaCl stimulation, with 45 genes down-regulated. The mixed tastant solution and the pure water (control) gave a large difference, and our analysis for significantly up- and down-regulated gene numbers revealed that 29 among 8,000 genes were expressed with more than two-fold intensities and 130 with less than half intensities. The result suggests that taste responses can be represented as gene expression profiles at the PBN.

The two samples 1) 0.2 M NaCl / 0.5 M sucrose (NS) as an acceptable tastant and 2) 5 mM denatonium benzoate / 0.1 M HCl (DH) as a aversive tastant, as well as pure water as a control, were applied to the rat oral cavity. The present study on gene expression analysis by DNA microarray method disclosed that PBN was different from Pr5 in molecular modality and also that, in particular, PBNdm and PBNvl constantly differ from each other in cell property regarding taste information. It deserves to note that PBNdm responds to an acceptable taste of NaCl applied at a low concentration, while an aversive, condensed NaCl taste is responded by PBNvl. These taste differentiation analysis at the DNA level would contribute to a basic understanding of the palatability of this important salt, NaCl.

6. おわりに

荒井 綜一 (東京農業大学)

平成 15 年度から実施されてきた特定課題研究「ソルトゲノミクス」は平成 17 年度末をもって一応終了した。この 3 年間で以下の成果を挙げた。

鈴木(筑波大学)および兼崎(自然科学研究機構基礎生物学研究所)は、光合成微生物であるラン藻(*synechocystis*)の塩ストレス(塩によって受ける傷害)軽減にかかわる多数の塩誘導性遺伝子を明らかにした。すなわち、ゲノム情報としてのみ知られていたその候補遺伝子の存否を DNA マイクロアレイ法によって網羅的に検証し、5 種類のヒスチジンキナーゼ Hik10, Hik16, Hik31, Hik33, Hik41 および 4 種類のレスポンス・レギュレーター Rre1, Rre3, Rre17, Rre31 をコードする遺伝子の実在を明らかにした。また、ストレス応答に関与するプロテアーゼや分子シャペロン(タンパク質保護分子)の発現を制御する多様な Hik-Rre の組み合わせシステムが Na⁺および Cl⁻によって誘導されることを見だし、これがラン藻の塩センサーである可能性を初めて示した。

小林ら(静岡県立大学)はモデル植物であるシロイヌナズナ(*Arabidopsis*)に突然変異を起こさせ、光合成段階で非突然変異種(野生種)よりも優れた塩耐性を表す系統を複数種選抜し、それらの葉で塩処理によって発現するタンパク質の遺伝子を、DNA マイクロアレイ解析を用い、詳細に検索した。その結果、発現タンパク質は転写因子特有の塩基性ヘリクス・ループ・ヘリクス(bHLH)ドメインをもち、その転写産物(mRNA)は塩ストレスによって選択的スプライシングを受けて2つのタンパク質を産生した。しかも両タンパク質は細胞核に局在していて、1%程度の濃度の NaCl で約 30 種類の遺伝子を発現させたことから、耐塩機構を誘導する新しい bHLH 制御遺伝子発現カスケードの存在が明らかになった。この研究は、将来、水分蒸発によって塩が高濃度に集積した土壌が高等植物に及ぼす塩害を軽減させるのに応用し得ると期待される。

荻原および勝谷(大阪大学)は、入院・来院患者の集団(コホート)の調査データを参考に、食塩感受性高血圧症にかかわる遺伝子群とその変異によって生じる多型の違い(個人差)が利尿薬感受性とどのように相関するかを解析した。とくに興味深いのは、末梢血のトランスクリプトーム(遺伝子転写産物群)の解析によってサイアザイド感

受性 NaCl 共輸送体遺伝子(TSC)の多型と利尿薬感受性の関係が明らかにされた点である。この場合、レニン・アンジオテンシン系、アドレナリン受容体(β -3)、アルドステロン合成酵素(α アジュシン)などの遺伝子多型が血圧の個人差と関係していた。また、内臓肥満が起因となるメタボリック・シンドロームの成因や進行に食塩感受性が密接に関係することから、これを調節する遺伝子因子の違いを解明することの重要性が示唆された。今後、個人の体質に応じた食塩摂取対応やテーラーメイド栄養を具体化することの意義が強調された。

阿部および松本(東京大学)は、甘・酸・塩・苦・旨の 5 基本味の感覚が末梢(口腔の味蕾)から中枢の橋・結合腕傍核(PBN)に伝達され、知覚される際、PBNdm 領域は甘味・旨味・薄塩味を“好き”と、PBNvl 領域は酸味・苦味・濃塩味を“嫌い”と判定するという最近の知見に基づき、ラットのこの2つの領域のそれぞれで食塩の負荷の有無によって遺伝子発現にどのような変動があるかを DNA マイクロアレイ法で網羅的に解析した。その結果、解析対象とした約 8,000 種類の遺伝子のうち、食塩で変動するのは PBNdm で 293 種類、PBNvl で 258 種類であり、しかも変動遺伝子の機能類型が明らかになった。これは、動物が食物の適否を判断して摂食・忌避行動を起こす基因にきわめて多様な深層機序が働いていることを示唆する。また、薄塩味で「好き」が、濃塩味で「嫌い」が呼び起こされることを遺伝子レベルで説明しようとする本研究は、ヒトの食塩嗜好の分子ロジックの解明にもつながろう。日本人が長年に亘って培ってきた“塩加減”の食文化の本質を理解し得る日も近い。

以上のヒト・動物・植物・微生物の横断的研究から明らかになった共通項は、食塩の負荷によって多様な遺伝子が発現すること、そのうちのいくつかは NaCl センサーとして働くタンパク質をコードすること、センサーがキッカケとなって多様なシグナル伝達系が作動すること、その結果、さまざまな報酬現象が現れることに集約されよう。こうして生物たちは長い長い年月を生き永らえてきたのだと想像される。本研究は、このような果てしなき夢を私たちに与えてくれるものでもあった。

きわめて先端的・独創的で、オムニバス形式ではあったがシステムティックに運営され、演繹法的アプローチに

よって従来の食塩研究に新風を吹き込んだであろう本特定課題研究を一応終了するに当たり、研究担当者には勿論、終始貴重なご助言を賜った今井 正先生、村田紀

夫先生ほか多くの研究運営審議会委員、大所高所から有益なご示唆を賜った藤巻正生研究顧問、そして財団の皆様全員に心から感謝申し上げる次第である。

プロジェクト助成研究報告書 (特定課題研究)

Project Research Report

平成19年3月

March, 2007

財団法人ソルト・サイエンス研究財団
The Salt Science Research Foundation

〒106-0032 東京都港区六本木7-15-14 塩業ビル
Engyo Bldg. 7-15-14 Roppongi, Minatoku, Tokyo 106-0032, Japan

Tel. 03-3497-5711 Fax. 03-3497-5712

URL <http://www.saltscience.or.jp>

I S B N 9 7 8 - 4 - 9 0 2 1 9 2 - 1 2 - 4