

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

TECHNO NEWS

〈生研機構〉

ブレインテクノニュース

第90号

MARCH 15, 2002

The cover features a collage of images. On the left, a cluster of pink and white tobacco flowers is shown against a blue background, labeled (b). On the right, a tobacco plant with white flowers and green buds is shown against a light background, labeled (c). At the bottom right, another cluster of pink and white tobacco flowers is shown against a blue background, labeled (a). In the bottom left, a diagram shows a heavy ion beam (represented by a yellow arrow) passing through a tobacco egg cell (labeled 'タバコ受精卵細胞'). The beam is labeled with isotopes: ^{12}C , ^{14}N , ^{20}Ne , ^{40}Ar , and ^{56}Fe , and the text 'などの重イオンビーム'. An inset image shows a laboratory setting with scientific equipment.

重イオン突然変異誘発法による植物の品種改良

理化学研究所植物機能研究室 阿部知子・吉田茂男
サントリー（株）基礎研究所 鈴木賢一・久住高章

目 次

総 説

- トランスジェニック・ニワトリの作出に向けて 1
堀内浩幸・古澤修一・松田治男 (広島大学生物生産学部免疫生物学研究室)

国内情報

- ポストゲノム時代のバキュロウイルスを用いたタンパク質生産系 5
鈴木健夫 (片倉工業株式会社 中央蚕研事業所)
- 体細胞クローン雄牛の精子テロメア長の正常性 10
宮下範和 (独立行政法人 農業生物資源研究所)
- 重イオン突然変異誘発法による植物の品種改良 14
阿部知子¹・吉田茂男¹・鈴木賢一²・久住高章² (¹ 理化学研究所植物機能研究室,
² サントリー株式会社 基礎研究所)
- 納豆の糸引き成分の合成開始物質の発見と今後の展望 18
伊藤義文・木村啓太郎 (独立行政法人 食品総合研究所)
- 高温誘導性の活性酸素消去遺伝子で低温に強いイネを作る 23
佐藤 裕・猿山晴夫* (独立行政法人 農業技術研究機構 北海道農業研究センター,
* 株式会社北海道グリーンバイオ研究所)

地域の先端研究

- 食感も滑らかで大豆臭の少ない生大豆粉の新製法開発 27
大野彰一 (社団法人 岡山県農業開発研究所)

文献情報

- 移植卵巣の生殖能—移植用器官の凍結バンクの実現化にむけて— 31
X. Wang et al. (Nature, 415, 385, 2002)
抄訳: 木村直子 (東北大学大学院 農学研究科)
- 酵母によるsiderophoreの取り込み 32
O. Protchenko et al. (J. Biol. Chem., 276 (52), 49244-49250, 2001)
抄訳: 北垣浩志 (独立行政法人 酒類総合研究所)
- シロイヌナズナの突然変異体三量体Gタンパク質βサブユニットは
葉, 花, 果実形成に影響する 33
K. A. Lease et al. (The Plant Cell, 13, 2631-2641, 2001)
抄訳: 春原英彦 (東京大学大学院 農学生命科学研究科)
- プロスタグランジンD合成酵素により誘導される腎臓尿細管細胞のアポトーシス 34
John K. Maesaka et al. (Kidney International, 60, 1692-1698, 2001)
抄訳: 土田貴正 (マルハ株式会社 中央研究所)

海外便り

- 水分ストレス下の樹木における木部形成時に発現する遺伝子の解明
—スウェーデン・スウェーデン農業科学大学における1年間— 35
安部 久 (独立行政法人 森林総合研究所)

生研機構からのご案内

- 生研機構の一般公開のお知らせ 22
平成14年度各種募集について 38

表紙写真説明

重イオンビーム照射による栽培タバコ (*Nicotiana tabacum* L.) の変異誘発効果; 左下写真に示した照射装置により, タバコの受精卵細胞に重イオンを照射し開花期まで観察したところ, 正常花 (a) に対しフリル花 (b), 白花 (c) の変異株が頻出した。この方法によりパーベナ (花卉園芸植物) の新品種が作出され, 商品化されている。この技術の詳細については, 国内情報14頁以下をご覧ください。

◀総説▶

トランスジェニック・ニワトリの作出に向けて

広島大学生物生産学部 免疫生物学研究室

堀内 浩幸・古澤 修一・松田 治男

トランスジェニック・ニワトリの作出は、タンパク質の生産工場だけではなく、ニワトリの品種改良など、その用途は多岐にわたると予想される。トランスジェニック・ニワトリの作出には、胚性幹細胞 (ES) もしくは胚性生殖細胞 (EG) の樹立が必須であり、これらの培養系に必須因子である白血病阻害因子 (LIF) のクローニングが不可欠であった。著者らは、ニワトリ LIF のクローニングに成功し、ニワトリ胚性細胞に極めて有効であることを見いだした。

1. はじめに

生物工場は、安価で安全性に優れた有用なタンパク質の生産工場として注目されている。中でも、動物工場は医薬品や生体材料など、人への応用面で開発が急がれる分野である。動物工場には、世界初の体細胞クローン動物である羊の“ドリー”の成功以降、受精卵操作が確立されている牛や羊で注目されてきたが、未だ実用化には至っていない。ニワトリは中でも後発ではあるが、実用化に最も近い動物種であり、そのキーポイントが白血病阻害因子 (LIF) の発見である。ここでは、一般的な生物工場の種類と現状、ならびにトランスジェニック・ニワトリの作出にむけた試みと今後の展開について触れてみたい。

2. 生物工場とは

タンパク質は遺伝子をもとに合成され、また、合成されたタンパク質は細胞内で複雑な修飾過程を経て機能的なタンパク質となるため、化学合成が極めて困難である。そこで、有用なタンパク質生産には、生物体にその有用タンパク質の遺伝子を導入して、生物にタンパク質を合成させる手段が一般的であり、これを生産ラインまで規模を大きくしたもの

HORIUCHI Hiroyuki, FURUSAWA Shuichi,

MATSUDA Haruo

〒739-8528 東広島市鏡山1-4-4

が生物工場と呼ばれている。生物工場は、大きく微生物工場、植物工場、昆虫工場、動物工場に大別される。この中で、最も実用化が進んでいるのは微生物工場である。インスリンやインターフェロンなど多くの医薬品が、遺伝子組換え技術をもとに大腸菌などの細菌で生産され、市場に出回っている。細菌は遺伝子組換え操作が容易で、また大量培養が比較的簡単なため、工業レベルに発展しやすいという利点がある反面、問題点も多い。目的のタンパク質は細菌内に産生されるため、細菌を破壊して目的のタンパク質を精製しなければならないが、細菌由来のタンパク質中には熱性因子などが多く含まれており、これらを完全に除かないと (目的のタンパク質を高純度に精製)、製品として使用できない。また、原核生物と真核生物では、遺伝子から翻訳後のタンパク質の修飾過程に大きな違いがあり、遺伝子の設計図通りタンパク質を産生させても、細菌由来のタンパク質では機能しない場合も多い。このような場合、遺伝子を導入する細胞には真核細胞を用いなければならない。植物工場、昆虫工場や動物工場が必要となる。

3. 動物工場とは

生物工場の中で、最も期待されているのが動物工場である。動物工場は大きく二つに分けられる。実際に実用化されている動物細胞

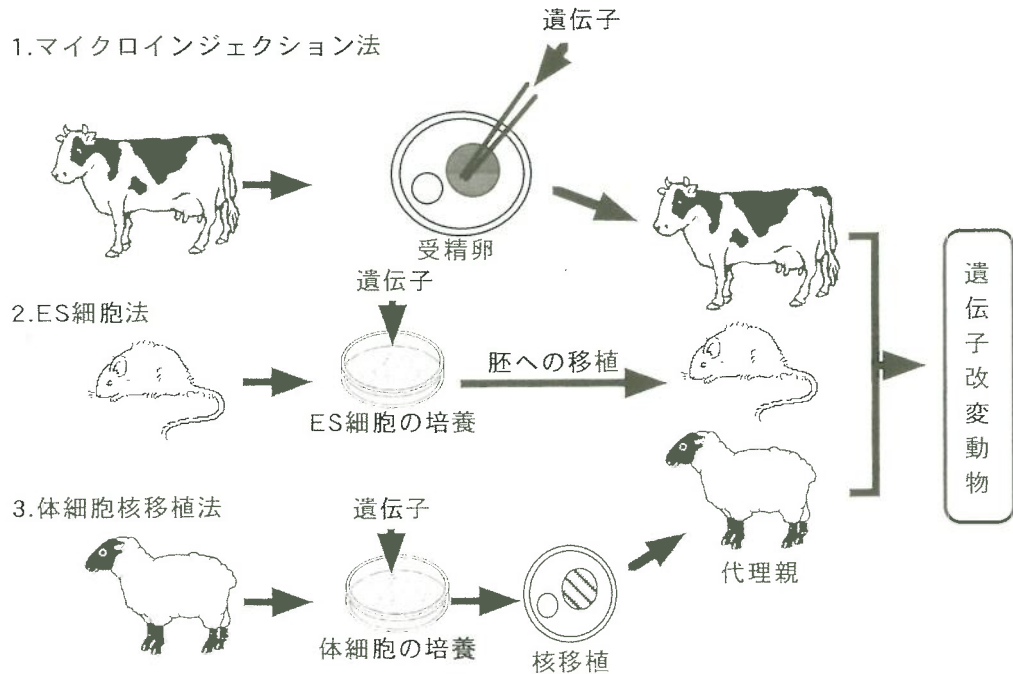


図1 代表的な遺伝子改変動物作製技術

マイクロインジェクション法では受精卵を採集後、受精卵の雄性前核に遺伝子を導入し、代理親へ受精卵を移植する。ES細胞法では、胚性幹細胞を培養し、その細胞（ES細胞）に遺伝子を導入し、胚移植を行う。体細胞核移植法では、体細胞の培養系に遺伝子を導入し、導入細胞から核を取り出して、核移植を行い、その卵細胞を代理親へ移植する。

培養系を用いる方法、そして遺伝子改変動物（トランスジェニック・アニマル）を作出してその生産物を用いる方法である。動物細胞培養系を用いる場合は、特別な培養液と培養装置が必要なため、高額な設備投資が必要になる。そこで、注目されているのがクローン技術を含めた遺伝子改変動物作出技術である。すなわち、牛や羊のミルク中に有用タンパク質が生産されるように遺伝子改変牛や羊を作製し、そのミルク中から有用タンパク質を精製する手法である。この方法を用いれば、微生物工場で問題であった不純物や不完全なタンパク質修飾の問題がすべて解決するだけではなく、大量生産が可能という夢のような技術である。問題は、そのような遺伝子改変動物をどのように作出するかという技術にかかっている。

遺伝子改変動物の作出方法は、大きく分けて3つある。受精卵の核に直接遺伝子を導入するマイクロインジェクション法、トランスジェニック・マウスで使用されているES細胞

胞を利用する方法、そして体細胞核移植法（クローン技術）である（図1）。米国のベンチャー企業では、牛や羊のミルク中に有用タンパク質を生産させることに成功しているが、大量生産するには数百頭規模の遺伝子改変動物と飼育施設を確保しなければならず、当初の見積もりより多額の経費が必要となることが懸念されている。

現在、最も注目されている技術は体細胞核移植法（クローン技術）である。体細胞核移植法の利点は、体細胞を体外で培養して遺伝子を導入できる点であり、遺伝子導入細胞だけを選抜し、その核を受精卵に移植できることから確実に遺伝子改変動物を作出することができる。さらに、クローン技術の最大の利点は、無限に同一個体を増やせるという点でも、動物工場に最適の技術といえる。しかし、体細胞クローン動物は、まだ多くの問題点、例えば生産直後の死亡率の高さ、寿命が短いことや生体異常など、今後解決しなければならない問題点も多い。

4. 動物工場としてのニワトリと現状

このような現状の中で、再注目されているのがニワトリである。ニワトリは牛や羊などの大動物と違って単位面積当たりの飼育数が多く確保でき、さらに、性成熟が早く、産卵鶏においては一日に平均して一個の卵を生み、子孫は約3週間で得られる。このように、ニワトリは極めて生産性の優れた産業動物であるために、トランスジェニック・ニワトリを切望する声は、国内外を問わず、研究者、産業界からの要請も多い。では、トランスジェニック・ニワトリを作出する上で問題点となっていることは何であろう。ニワトリは卵生のため、胚操作が極めてやりやすい動物であることから、トランスジェニック作出技術のなかでも遺伝子導入方法や鶏卵での有用タンパク質の蓄積などの分野で研究が進んでいる¹⁾。しかし、ニワトリでは発生過程が哺乳類と若干異なるため、マイクロインジェクション法や核移植法が困難なこと、また、ニワトリでは、トランスジェニックを作出する上で最も重要な遺伝子を導入する細胞（ESもしくはEG）が確立されていない点が大きな障壁となっている。これまでに、我が国を含めた諸外国において、ニワトリ胚性細胞の培養系の確立のための研究が実施され、ES細胞で一例²⁾、EG細胞でも一例³⁾が成功したと報告された。しかし、いずれの場合もキメラ体の作出にとどまり、本質的なトランスジェニック（外来遺伝子の導入と部位特異的発現）には至っていない。また、成功例を参考に多くの研究者が追試実験を行っているが、その効率の悪さから追試実験自体が難しく、実用レベルでの発展性が望めない状況にある。

5. トランスジェニック・ニワトリの作出に向けて

ESおよびEG細胞の確立のポイントは、いかに分化を抑制した状態で細胞を増殖維持できるかということである。マウスの場合、白血病阻害因子（LIF）の発見⁴⁾が契機となり、

表1 異種動物間におけるLIFアミノ酸配列の相同性

	アミノ酸の相同性 (%)				
	ヒト	マウス	ウシ	ブタ	ヒツジ
ニワトリ	42.7	39.3	44.7	43.7	44.2
ヒト		79.8	89.1	87.1	88.6
マウス			76.8	78.3	74.9
ウシ				88.1	86.6
ブタ					84.7

このポイントを見事に克服し、研究レベルではあるが、トランスジェニック・マウスの作出が可能となった。すなわち、胚性細胞の分化抑制と細胞増殖にLIFは必須因子であったわけである⁵⁾。一方ニワトリでは、LIFなどの生理活性液性因子（サイトカイン）の解析が遅れている。その原因は、哺乳類で発見された分子の相同遺伝子塩基配列が哺乳類と大きく異なっているためである。通常、相同分子のクローニングには、異種間で良く保存された塩基配列をもとに行われるが、哺乳動物・ニワトリ間では塩基配列の相同性が低く、

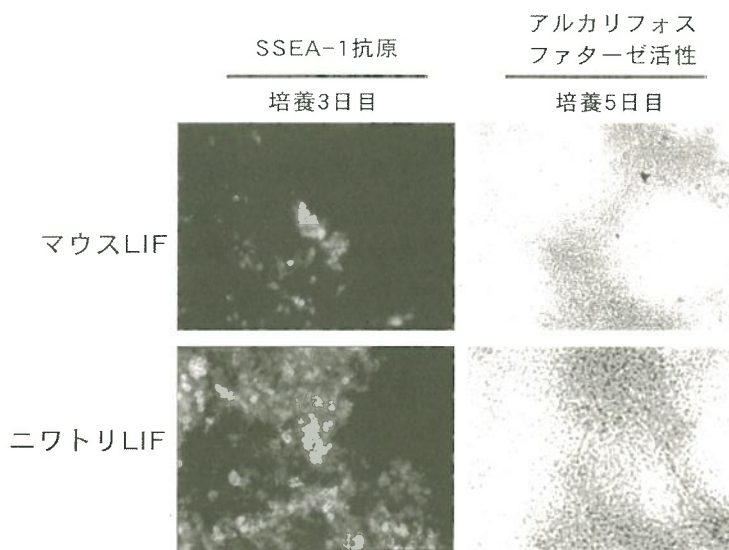


図2 リコンビナントLIFの生物活性

胚性幹細胞が未分化な状態のときに発現しているSSEA-1抗原とアルカリフォスファターゼ活性を、ニワトリ胚盤葉細胞の培養系で試験した。SSEA-1抗原は、特異抗体を用いて免疫蛍光染色しているのので、白い部分が陽性細胞である。また、アルカリフォスファターゼ活性は黒い部分が陽性である。ここでは、それぞれ典型的な例として、培養3日後と5日後を示したが、同様の結果が培養1日目から観察された。

この方法はうまく行かない場合が多い。これまでに多くの研究者がニワトリLIFのクローニングを試みてはいたが、成功しなかった要因はここにあった。しかし、胚性細胞の培養にはどうしてもLIFの添加が必要であったため、ニワトリES、EG細胞の培養成功例では、マウスLIFおよびLIFと同じファミリーであるマウス由来因子などを添加されてきた。しかし前述の通り、その再現性の低さから、一部には、ニワトリ胚性細胞にLIFは必須ではないといった考えさえ広がっていた。昨年、本研究室では、塩基配列の相同性に依存しない方法でニワトリLIFのクローニングに成功した(生研機構基礎研究事業の助成による)。その結果、予想したとおり、ニワトリLIFはマウスLIFと比較して、アミノ酸レベルの相同性が40%にも満たないことがわかった(表1)。

ニワトリにおけるES細胞には、放卵直後の受精卵に形成された胚盤葉細胞を用いる。この点も、胎生である哺乳類と比較して、格段に操作が簡単である。著者らは、ニワトリLIF遺伝子をクローニング後、直ちにそのリコンビナントを作成した。そのリコンビナントニワトリLIFを用いて、これまで利用されてきたマウスLIFと比較するかたちでニワトリLIFの有効性を試験している。先にも述べたように、ES細胞を樹立する上で最も重要な点は、細胞の分化を抑制したままいかに増殖させるかである。その指標として、細胞増殖性と未分化状態で細胞に発現しているSSEA-1抗原およびアルカリフォスファターゼ活性がある。マウスのES細胞培養用培地(サイトカイン無し)を基本培地に、2%のニワトリ血清を加えたものに、市販されているマウスES細胞培養用マウスLIF、または作製したりコンビナントニワトリLIFを胚盤葉

細胞培養系に添加し、SSEA-1抗原の発現維持とアルカリフォスファターゼ活性を測定した。その結果、リコンビナントニワトリLIF添加群は、細胞増殖性、SSEA-1抗原の発現およびアルカリフォスファターゼ活性のすべての面で、マウスLIF添加群と比較して効果が高いことがわかった(図2)。

6. おわりに

著者らの研究から、ニワトリLIFは胚盤葉細胞の培養に極めて有効であることが確認された。現在、ニワトリLIF添加培地を基本として、LIF以外の因子の添加や有用な支持細胞の構築をおこない、汎用性のあるES細胞株の樹立とその培養系の構築に向けた研究を進めている。また、ニワトリはEG細胞の候補である始原生殖細胞が、哺乳類より得やすいという特徴をもつため、EG細胞株の樹立に向けた研究にも着手した。ニワトリの場合、この2つの細胞が確立されることで、一気にトランスジェニック・ニワトリの作出が進展すると考えられる。

文献

- 1) 堀内浩幸ら(1998), 栄養と健康のライフサイエンス, 3(4), 39-44
- 2) Pain, B. et al. (1996), *Development*, 122(8), 2339-2348
- 3) Park, T. S. et al. (2000), *Mol. Reprod. Dev.*, 56(4), 475-482
- 4) Gearing, D. P. et al. (1987), *EMBO J.*, 6, 3995-4002
- 5) Smith, A. G. et al. (1988), *Nature*, 336, 688-690

◀国内情報▶

ポストゲノム時代のバキュロウイルスを用いた タンパク質生産系

片倉工業株式会社 中央蚕研事業所
鈴木 健 夫

ポストゲノム時代を迎えタンパク質の網羅的解析が進められる中、機能や構造を保持した組換えタンパク質を、スループットを上げて生産することが要望されている。バキュロウイルス発現系は、膜タンパク質を含む幅広いタンパク質を、活性型で生産できる系として知られる。我々はこの系に様々な技術改良を加え、高効率なタンパク質生産システムとして確立した。ハイスループット化への試みも併せて当システムについて紹介する。

1. はじめに

ヒトをはじめ様々な生物でゲノム情報の解析が急速に進む一方、生体機能に直接的に関与する「タンパク質」の解析に、いよいよ研究の重点が向けられるようになってきた。いわゆるポストゲノム時代では、網羅的なタンパク質の機能・構造解析が進められようとしており、相互作用解析、立体構造解析等のために、組換えタンパク質発現系の重要度が増してきている。このような網羅的な解析のために、機能や構造を保った多種類の組換えタンパク質を、高いスループットで生産できる技術が求められるようになってきた。

カイコ及び昆虫細胞を宿主として、バキュロウイルスを用いてタンパク質生産を行う系^{1,2)} (以下、バキュロ生産系と略) は、膜タンパク質を含め様々な種類のタンパク質の発現に用いられ、既に多くの実績がある。

我々は、カイコ虫体を宿主として用いるバキュロ生産系を中心として、これまで様々な独自の技術開発を行ってきており、ポストゲノムの多様な発現ニーズに応えられるような生産系開発を進めている。本稿ではその紹介を行うと共に、ポストゲノムにおける当生産系の活用についても述べることにする。

2. バキュロウイルス生産系の概要

バキュロウイルスは昆虫ウイルスの一種で、環状の2本鎖DNAをゲノムに持つ。タンパク質生産に用いられるバキュロウイルス(核多角体病ウイルス: Nucleopolyhedrovirus)の最大の特徴は、増殖したウイルス粒子がポリヘドリンと呼ばれる結晶性タンパク質に封入されることである。

ポリヘドリンは、極めて強力なプロモーター活性によりウイルス感染末期に大量に合成される(感染昆虫細胞の全タンパク質の3割を占める)。このポリヘドリン自体はウイルス増殖には必要でないため、この強力なプロモーター活性を外来タンパク質の生産に利用しようというのが、バキュロ生産系の基本原理である。

バキュロウイルスへの遺伝子導入は、ウイルスゲノムサイズが130kbと大きいため、直接の導入は難しい。そのため、ポリヘドリンプロモーター周辺領域を一部クロニングしたプラスミド(トランスファーベクター)を利用し、培養昆虫細胞内で相同組換えにより導入する手法が一般に用いられる。

バキュロ生産系が高いタンパク質生産性を有することは、一般に広く受け入れられているが、さらに宿主として虫体(カイコ)を利用した場合の生産性は、昆虫細胞を用いる場合の数十倍から数百倍に達する。真核細胞発

SUZUKI Takeo

〒350-1332 埼玉県狭山市下奥富1548

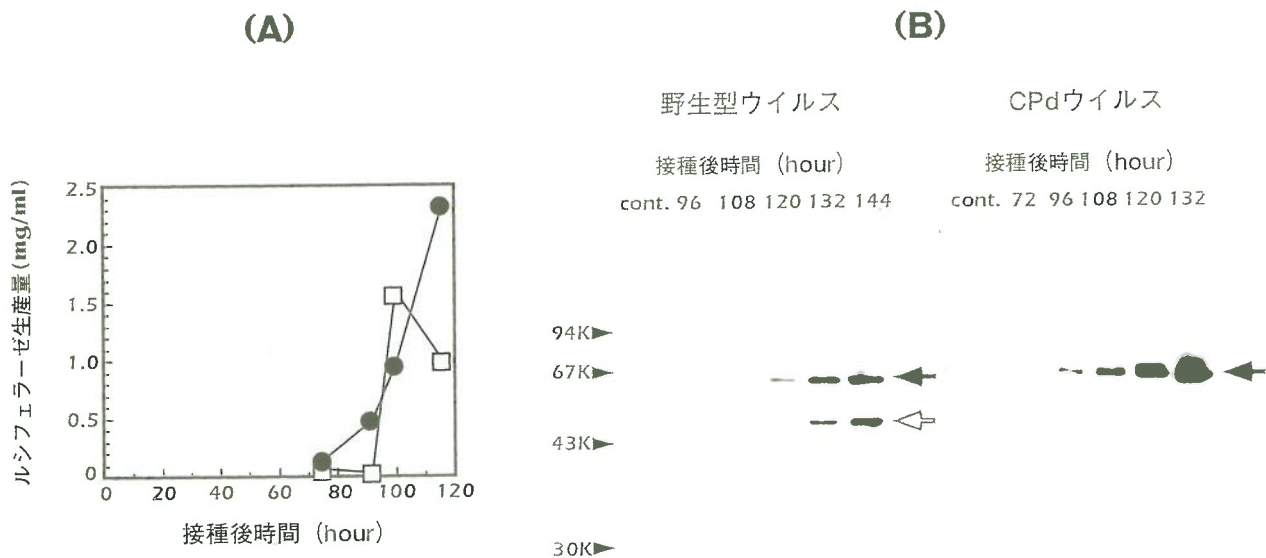


図1 CPdウイルスと野生型ウイルスでのルシフェラーゼ生産性の比較
 (A) 各ウイルス感染後のカイコ体液中ルシフェラーゼ量の経時変化。
 ●：CPdウイルス，□：野生型ウイルス
 (B) ウェスタンブロットによるルシフェラーゼタンパク質の比較。
 黒矢印：インтактなルシフェラーゼ。白矢印：部分分解物。

現系であるため、糖鎖付加やリン酸化、ミリスチル化などの翻訳後修飾も天然型に近い形でなされることが特徴である。また、バキュロウイルスは鱗翅目昆虫にしか感染せず、安全性が高い。

翻訳後修飾は、タンパク質の機能発現に重要な役割をしている場合が多い。例えば、糖鎖付加はタンパク質間の相互作用にも密接に関与する。バキュロウイルスで生産したタンパク質は、これまで一般に高マンノース型糖鎖が主体で、複合型糖鎖の付加は見られないと考えられてきた。最近、N-アセチルグルコサミニダーゼ阻害剤を培養系に添加することで、シアル酸を含む複合型糖鎖を検出したとの報告³¹⁾があり、今後バキュロ生産系において、さらに天然型に近い糖鎖修飾を受けたタンパク質の生産が期待される。

3. バキュロウイルスの改良

バキュロウイルスで生産したタンパク質は、その生産過程で分解を受けることがある。我々は、この分解がウイルス自身が産生する

システインプロテアーゼによるものであることを突き止めた。そこで、ウイルスゲノム上のシステインプロテアーゼ遺伝子を欠損したウイルス (CPd) を開発した^{1, 31)}。

実際に、このウイルスを用いてホタルルシフェラーゼを生産したところ、従来見られた部分分解物が消失し、生産性自体も3倍程度向上した³¹⁾ (図1)。このCPdウイルスの利用により、システインプロテアーゼ感受性の高いタンパク質の生産も可能になり、当系で生産できるタンパク質の種類が格段に広がった。ポストゲノムの網羅的タンパク質発現においては、特に重要な意味を持つ。

前述のように、カイコ虫体を宿主に用いた場合、タンパク質の生産性は格段に上昇するが、宿主域の関係で昆虫細胞 (ヨトウガ由来) 系で使用するウイルス (*Autographa californica* NPV) がそのまま使用できるわけではない。そこで、カイコで大量生産する場合は、カイコにのみ感染するバキュロウイルス (*Bombyx mori* NPV) に再度遺伝子を組換える必要があり、非効率的であった。

Kondo et al.³¹⁾ やMori et al.⁷⁾ は、相同組

換えの手法を用いてバキュロウイルスの宿主域を拡大する操作を行い、カイコ、昆虫細胞の双方で感染できるバキュロウイルスの作出について報告している。我々は、同様の手法を用いることで、いずれの宿主でもタンパク質発現が行えるバキュロウイルス（ABvウイルス）を作製した。このABvウイルスは、カイコでの生産性が従来ウイルスの約2倍に向上している（図2）。ABvウイルスの使用により、両宿主間の移行は自由であり、研究目的に応じて、各々の利点（大量生産性、易精製）を生かすことが可能になった。

我々は、その他にもカイコへの大規模ウイルス感染技術⁹⁾、タンパク質生産性の高いカイコの作出⁹⁾など、タンパク質生産システムとして様々な視点からの構築を進めている。

4. 生産例

我々の研究室では、カイコ-バキュロ生産系を用いて、既に200種類程度のタンパク質の発現を実施している。前述のホタルルシフェラーゼや各種動物サイトカイン等では精製技術を確立し、実用レベルでの生産を行っている。

膜タンパク質の生産実例として、ウマインフルエンザウイルスの抗原タンパク質であるヘマグルチニン（HA）の例を挙げる¹⁰⁾。HAタンパク質は、カイコを宿主とした場合、カイコ1頭当たり約400 μ g生産された。カイコのコホモジェネートを2%のTriton-X100で可溶化し、フェツインアフィニティークロマトグラフィーにより極めて高い純度で精製品を得た（図3）。収率は60%であり、カイコ50頭から約12mgの精製HAタンパク質を取得することができた。

我々は、このHAタンパク質を活用し、抗ウマインフルエンザHA抗体を測定するキットを開発した。精製HAタンパク質は抗原として高い純度と特異性を持ち、当キットの測定値は、従来法（HI試験）と高い相関性が得られることを確認している。

バキュロ生産系では、細胞毒性因子につい

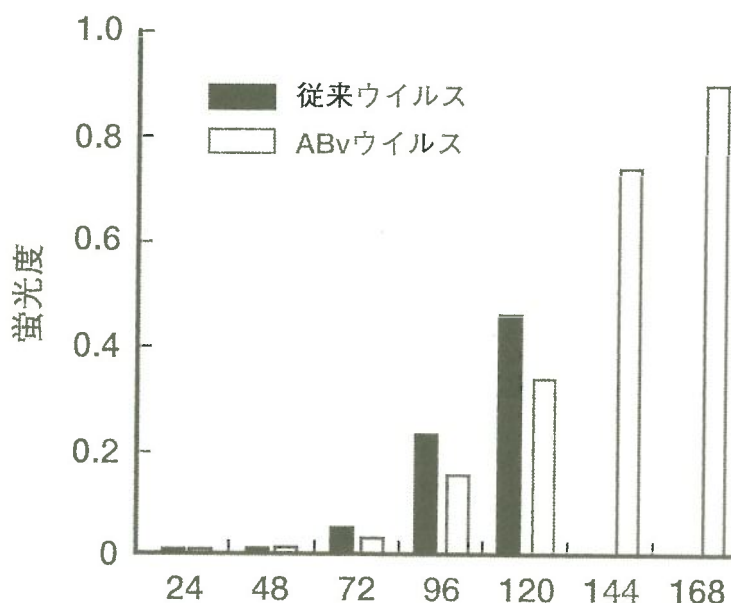


図2 ABvウイルスと従来ウイルスでの緑色蛍光タンパク質（GFP）生産性の比較

Abvウイルスは従来ウイルスよりも感染期間が長く、生産性は2倍近く向上した（従来ウイルスは、ウイルス接種後144時間でカイコは死亡）。

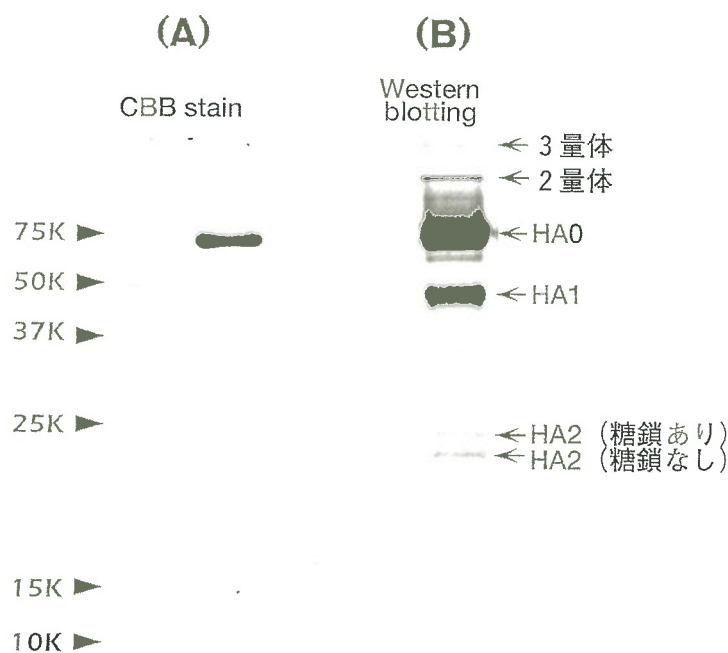


図3 カイコで生産したウマインフルエンザの組換えHAタンパク質

(A) 精製した組換えHAタンパク質のSDS-PAGEによる分析（クマシーブリリアントブルー染色）。
(B) 抗HA抗体によるウエスタンブロッティング。

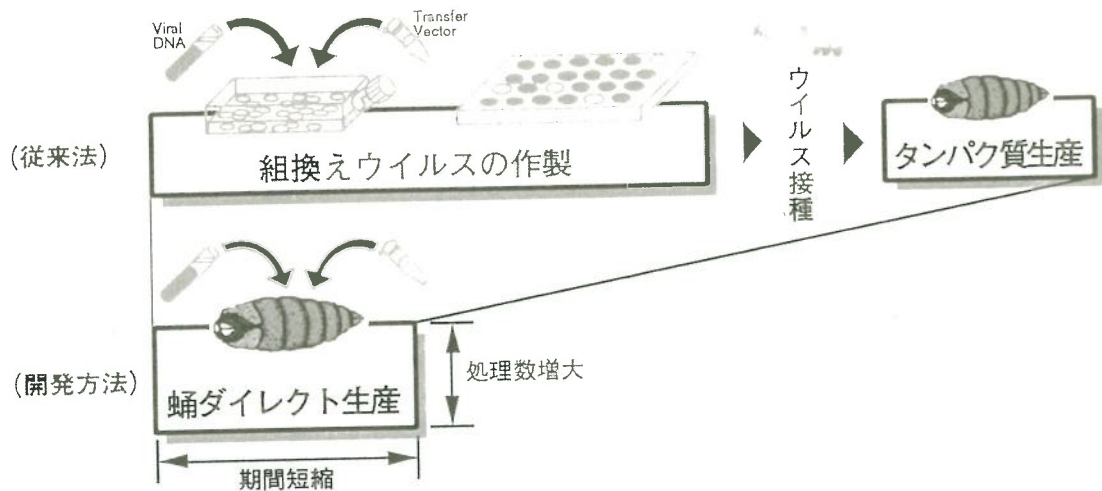


図4 蛹ダイレクト生産法によるハイスループットタンパク質生産

でも比較的効率良く生産可能である。例えば、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼ-3は、カイコ及び昆虫細胞で効率良く生産できる。バキュロウイルスは、ゲノム上にアポトーシスを抑制するタンパク質 (p35) をコードしているが、我々はこれを過剰発現させることで、さらにカスパーゼ-3の生産性が高まることを確認した。

また、バキュロ生産系は、結晶構造解析用のタンパク質の取得にもよく利用されている。カイコを用いた場合は、カイコ1頭から100 μ gから数mgの精製品が得られる場合が多く、構造解析用タンパク質の生産には特に有用である。ある細胞内タンパク質は、カイコ蛹15頭から20mgの精製品が取得され、結晶化、構造解析にも成功した。

バキュロ生産系は、膜タンパク質の発現については特に優れており、Gタンパク共役受容体やトランスポーターなどの複数回膜貫通タンパク質の発現に関する報告が多くある¹¹⁾。我々の経験では、膜タンパク質の生産にカイコ蛹を用いることで高い生産性を得ている。今後の課題とされる膜タンパク質の構造解析においても、当系が大きく貢献する可能性があると考えている。

5. ハイスループット化に向けて

バキュロ生産系は、既に幅広いタンパク質

の生産で実績を上げているが、生産工程が複雑でありタンパク質を得るまで2ヶ月程度かかることから、ポストゲノムの多品種発現需要に対し、十分なスループットを持っているとは言い難い。そこで、我々はバキュロ生産系のスループットを高めるための研究に取り組んだ。

カイコ虫体は1基の「全自動細胞培養装置」に準えることができ、個々のカイコに別々のタンパク質を生産させることが可能である。多数の培養設備を整えるのと比較し、低コストでの多品種生産が行える利点がある。中でもカイコ蛹は、タンパク質生産能力に優れ、取扱いやすく冷蔵保存が可能なことから、多品種生産の宿主として適している。

我々はカイコ蛹を使用し、蛹体内で組換えからタンパク質発現までを一貫して行わせるシステムを開発した(図4)。従来、バキュロウイルスへの遺伝子導入は、熟練した遺伝子操作が必要であり、ハイスループット化の大きな障害となっていた。蛹はウイルス感受性が高く、ごくわずか(数千個)のウイルスの侵入により、容易に感染し安定したタンパク質発現が起こる。我々はこれを利用し、直接蛹体内に外来遺伝子を含むトランスファーベクターとウイルスDNAを導入することで、蛹の体内で相同組換えが起こり、増殖したウイルスが更にタンパク質発現まで至ることを確認した。

この「蛹ダイレクト生産法」により、従来の10~20倍スループットが向上し、しかも各タンパク質は従来通りmgオーダーでの生産が可能となった。機能解析・構造解析の分野で大いに活用されることを期待している。

6. おわりに

当社では、これらのバキュロ生産系に関する開発技術を用いて、研究用のタンパク質を受託生産するサービス (Superwormサービス) を提供している。蛹ダイレクト生産法によるハイスループット発現サービスも提供を開始しており、無細胞合成系と比較しても質的、量的に高いレベルでのタンパク質提供が可能である。

以上、我々の技術開発を中心に、バキュロ生産系の有用性を紹介してきた。特にカイコを利用する生産技術は日本固有のものであり、日本のタンパク質解析研究の進展に役立つことを期待している。

バキュロ生産系を応用した、更に新しい魅力的な技術も開発されつつある。バキュロウイルスのエンベロープ上に、発現した膜タンパク質がディスプレイされることを利用し、バキュロウイルスそのものをデバイスとして活用する開発¹²⁾や、ポリヘドリンに親和性のあるペプチドとの融合タンパク質を発現し、ポリヘドリン結晶タンパク質に自動的に封入させ、結晶構造解析や蛋白チップに利用する技術の開発¹³⁾等が進められている。今後の進展に期待したい。

謝 辞

バキュロウイルスの改良研究について、京都工芸繊維大学の小田耕平教授、森肇助教授の甚大なるご支援を頂きました。ここに深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Smith, G. E. et al. (1983), *J. Virol.*, 45, 215-225
- 2) Maeda, S. et al. (1985), *Nature*, 325, 592-594
- 3) Watanabe, S. et al. (2000), *J. Biol. Chem.*, in press
- 4) Takahashi, S. et al. (1997), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1507-1511
- 5) Suzuki, T. et al. (1997), *J. Gen. Virol.*, 78, 3073-3080
- 6) Kondo, A. and Maeda, S. (1991), *J. Virol.*, 65, 3625-3632
- 7) Mori, H. et al. (1992), *J. Gen. Virol.*, 73, 1877-1880
- 8) 岡崎博之ら (1995), *日本蚕糸学雑誌*, 64, 504-508
- 9) 山崎泰正ら (1997), *日本蚕糸学雑誌*, 66, 277-281
- 10) Sugiura, T. et al. (2001), *J. Virol. Methods.*, 98, 1-8
- 11) Bouvier, M. et al. (1998), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9, 522-527
- 12) 山口美峰子ら (2001), *日本蛋白質科学会第1回年会*, 136
- 13) Ikeda, K. et al. (2001), *J. Virol.*, 75, 988-995

◀国内情報▶

体細胞クローン雄牛の精子テロメア長の正常性

独立行政法人 農業生物資源研究所

宮 下 範 和

高齢（12歳）の種雄牛の筋肉細胞から作出された体細胞クローン牛において、その寿命と生涯生産能力が注目されている。その精子と白血球について、細胞老化の指標とされているテロメア長を測定したところ、正常な長さを有していた。また、その精液を普通の雌牛に人工授精して得た次世代子牛においても、白血球のテロメア長は正常であった。クローン牛およびその次世代子牛のいずれも、体型・行動ともに正常に発育している。

1. はじめに

これまでに体細胞クローン動物は、ヒツジ、マウス、ウシ、ヤギ、ブタ、ネコにおいて作出されてきた。体細胞クローン牛は、①コピーを作りたい元の個体（細胞提供牛）の細胞を採取して培養し（これをドナー細胞と呼ぶ）、②一方、屠場などで得られた卵子を培養系で成熟させた後に核を除去し、③その除核卵子の中にドナー細胞をまるごと挿入して電気刺激で融合・発生させ（これを再構築胚と呼ぶ）、④再構築胚が胚盤胞まで発生したところで、発情周期を合せた雌牛の子宮に移植し妊娠させ、やがて子牛として出生させて得る。ドナー細胞としては、耳の皮膚由来の繊維芽細胞や、過排卵処理して卵子を得る際に副次的に得られる卵丘細胞が使われることが多いが、その他乳腺上皮細胞や卵管上皮細胞、子宮上皮細胞、筋肉組織に由来する細胞（筋繊維ではない）、白血球などにおいてもクローン牛の作出の成功例が報告されている。

そこで疑問が浮かぶ。核移植で用いられるドナー細胞は、細胞提供牛の体内で多かれ少なかれ加齢の影響を受けているはずである。そのため、生まれてくる体細胞クローン牛はその月齢どおりに若いのか、それともドナー細胞が受けた老化を引き継いでいるのか？

そして、体細胞クローン牛はどのくらい生き

MIYASHITA Norikazu

〒305-8602 茨城県稲敷郡莒崎町池の台2

られ、そして生涯の間にどの程度の生産能力（特に子供の数や、乳牛の場合乳量）を発揮できるのか？ また、例えば生理活性物質の遺伝子を導入した乳腺上皮細胞をドナー細胞として核移植を行い、得られたクローン家畜の乳中にその生理活性物質を生産させるという「動物工場」の発想の場合においても、遺伝子を導入した細胞株を樹立するまでには多くの細胞分裂を要するためドナー細胞の老化が不可避的に進んでおり、クローン牛の老化に関する検討がなされなければならない。

2. テロメアと細胞老化

この謎を解く鍵の1つとして、「テロメア長」が着目されている。テロメアとは染色体の末端にあるDNA・タンパク質複合体構造であり、細胞分裂の際に、最末端が構造上完全には複製されえないため不可避的に短縮する性質をもつ。そして細胞分裂が繰り返されることでテロメアが極限まで短縮すると、細胞周期を停止させる方向のシグナル伝達系が作動し、細胞は増殖が不可能になる。その結果、例えば免疫系で増殖能のある細胞が減少すれば病原に対する抵抗力が減少するように、生体の機能が低下して最終的に個体の寿命に影響が及ぶこともある。

ウシの細胞株において、1回の細胞分裂につきテロメア長は114bpずつ短縮するというデータが得られており、その決定係数は

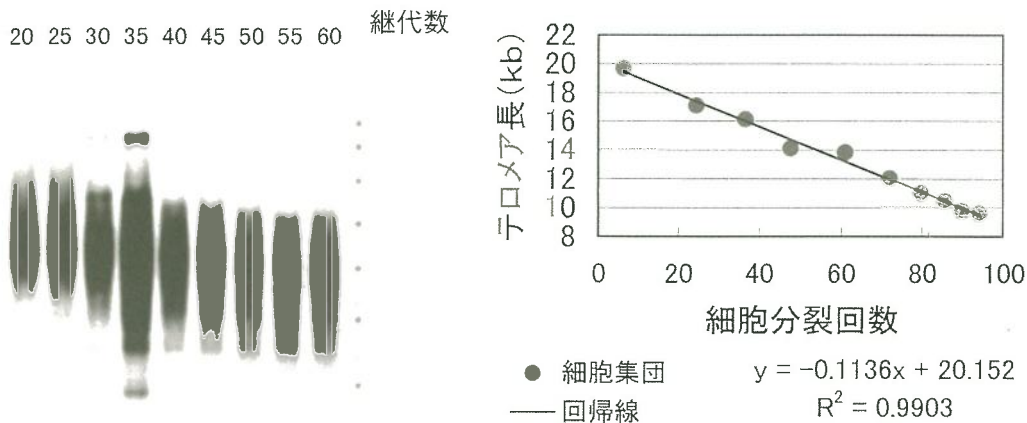


図1 細胞老化とテロメア短縮

左図では、ウシの細胞株において、継代培養を繰り返すにつれテロメアが短縮していることを示した。右図では、左図の継代数を細胞分裂回数（PDL）に変換して横軸とし、左図のスメア像から計算された平均テロメア長を縦軸にしてプロットした。

0.990であった（図1）。また、ウシの場合、テロメア短縮の初期値である精子テロメア長は20.5～23.9kbであり、それが発生に伴い短縮して出生時には白血球テロメア長は16.1～21.9kbとなり、その後も加齢にともない年平均0.22kbずつ短縮することが分かっている。ヒトの場合、老化して増殖能を喪失した培養細胞のテロメア長が約5 kb、一方100歳時の白血球テロメア長も約5 kbであり、白血球テロメア長が個体の寿命と強く相関し、個体の寿命に関する優れた指標になりうるように思われる。しかしながら、ウシにおいては同様に老化した培養細胞のテロメア長が9.7kbであるのに対し（図1）、老齢のウシの白血球テロメア長は15kb程度であり、テロメアが培養細胞の老化の一因を担うことは疑問の余地がないものの、テロメアと個体の寿命との因果関係に関しては検討の余地がある。マウスにおいても、長いテロメアをもったまま寿命を終えると報告されている。

また、細胞の種類により細胞分裂頻度や細胞内環境が異なるため、各臓器間でテロメア長は異なっている。その中でも、きわめて多数回の細胞分裂を行う生殖細胞系列において

は、テロメラーゼという酵素が発現しており、これによって細胞分裂に伴うテロメアの不可避免的な短縮が補填されている。そのため、精子のテロメア長は加齢に関わらずほぼ一定に保たれている。換言すれば、精子のテロメア長は、受精とともに始まる新たな生命にテロメア短縮の初期値を与えているため、その意義は重要なのである。

ちなみに、テロメラーゼは、ヒトやウシでは、生殖細胞系列と胎児期の細胞、成体の幹細胞の一部でしか発現していない。マウスのような短命の動物では比較的多くの臓器で発現しているが、長命の動物種では細胞の癌化を防ぐために発現する臓器が限られていると言われている。なお、多くの癌細胞ではテロメラーゼが発現しており、そのため無秩序な細胞増殖が可能になっている。

3. クローン雄牛の精子テロメア長

本研究では、12歳の種雄牛の筋肉に由来する細胞を用いて核移植を行い、2頭のクローン牛を得た。クローン牛は既に3歳になるが、体型・行動ともに異常は観察されず、また後

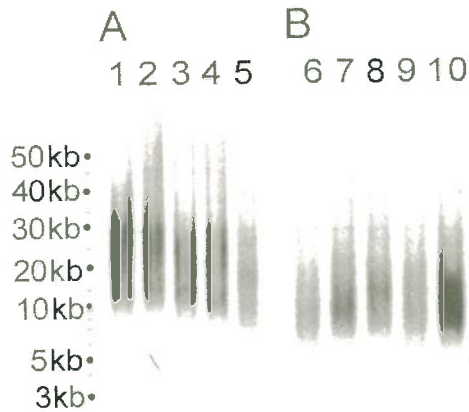


図2 テロメア解析の例

- 1：細胞提供牛の精子
- 2, 3：クローン雄牛の精子
- 4, 5：通常の雄牛の精子
- 6：細胞提供牛の白血球（14歳時）
- 7, 8：クローン雄牛の白血球（0歳時）
- 9, 10：クローン雄牛の後代産子の白血球（0歳時）

述するように繁殖能力についても問題は見つかっていない。この例におけるドナー細胞のテロメア長は20.1kbであった。そして、得られたクローン牛の精子のテロメア長はそれぞれ25.9kbと20.7kbであった（図2A）。つまり、ドナー細胞の、加齢により幾分短くなっていたテロメアが、核移植されてから精子形成が行われるまでの間に伸長したわけである。この伸長のメカニズムはよく分からないが、発生中に通常発現されるテロメラゼが再構築胚においてより活性化されるようなことは認められず、またその発現時期も通常の胚より



図3 クローン雄牛の次世代子牛

や遅れると報告されており、テロメラゼ単独では説明できないと思われる。また、2頭のクローン雄牛の間で精子テロメア長に大きな差があったが、この原因についてもテロメア伸長のメカニズム解明の過程で検討されるものと思われる。これらの精子テロメア長は、通常の牛の精子テロメア長と同じかやや長い値であった。ちなみに細胞提供牛の精子テロメア長は22.2kbであった。また、これらクローン牛の0歳時での白血球のテロメア長も、同世代のその変動範囲内であった。

4. クローン牛の繁殖能力と次世代子牛の白血球テロメア長

クローン牛の精液について、精子数や精液量・性状、凍結融解耐性、体外受精能などは正常であった。そしてそのうち1頭の精液を用いて、通常の雌牛に人工授精することで9頭の次世代子牛を得た。この際、受胎率や流産率に関しても問題はなかった。これら9頭の次世代子牛についても、体型・行動ともに異常は観察されていない（図3）。そして、それらの白血球テロメア長を調べたところ、17.4～21.9kbであり（図2B）、通常の子牛の白血球テロメア長の変動範囲内であった。

5. その他のクローン動物のテロメア長

6歳の羊の乳腺細胞から作出されたクローン羊・ドリーのテロメア長は、同年代の羊よりも短く、元の乳腺細胞のテロメア長と同程度であると報告された。つまりドリーの場合は「テロメアに関しては」老化が引き継がれていたのである。そして最近、老化の徴候かもしれない関節炎が発症したと報道され、テロメアとの因果関係が注目される。しかしながら、その後作出された海外のクローン牛（皮膚繊維芽細胞および卵丘細胞由来）のテロメア長は、いずれも通常の子牛のテロメア長の変動範囲内であるという。ドナー細胞の継代培養を繰り返してテロメアを極限近くま

で短くさせてから核移植した場合も、生まれたクローン牛は通常のテロメア長にリセットされていたという報告すらある。クローンマウスや、クローンマウスの細胞を再び核移植して得られたクローンマウスにおいても、テロメアは短くなかったと報告されている。

6. 終わりに

牛の人工授精技術や受精卵移植技術の普及率は日本が世界一であり、後代検定事業（種雄牛候補牛について試験的に子牛を作り、その子牛の生産能力から種雄牛候補牛の遺伝能力を精確に推定し優れた個体のみを選抜するシステム）の進展とも相まって、今や数万頭もの子牛を世に送り出している種雄牛さえいる。特に和牛の場合、優れた種雄牛を持つ産地は「銘柄牛」としてブランド化した牛肉を売り出すことで莫大な経済効果を得られるようになった。このように研究と産業の関係が密接であり双方高いレベルの基盤があったからこそ、日本のクローン技術は世界に冠たるレベルになりえたと思われる。今後、クローン牛が実用化されるとすればまず第一に種雄

牛のコピーとして利用されるであろうし、そうして技術が再び産業に還元されることで研究と産業の間の好循環サイクルが脈々と続くよう願ってやまない。この研究がその一助になれば幸いである。

最後に、本研究を進めるにあたりご支援いただきました大分県畜産試験場の佐々江洋太郎、志賀一穂の両氏に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Betts, D. H. et al. (2001), *PNAS*, 98, 1077-1082
- 2) Lanza, R. P. et al. (2000), *Science*, 288, 665-669
- 3) Miyashita, N. (2002), *Biol. Reprod.*, in press
- 4) Shiels, P. G. et al. (1999), *Nature*, 399, 316-317
- 5) Shiga, K. et al. (1999), *Theirogenology*, 52, 527-535
- 6) Tian, X. C. et al. (2000), *Nature Genet.*, 26, 272-273

◀国内情報▶

重イオン突然変異誘発法による植物の品種改良

¹理化学研究所植物機能研究室, ²サントリー(株)基礎研究所
阿部 知子¹・吉田 茂男¹・鈴木 賢一²・久住 高章²

理化学研究所では、リングサイクロトロンで発生させた重イオンビームを用いて、植物の突然変異誘発に関する研究を行っている。重イオンビームによる突然変異誘発法は、多種多様な花色変異株や環境耐性株などを高率で得られ、日本独自の新技术として注目されている。サントリー株式会社基礎研究所の協力のもと、花卉園芸植物のパーペナで従来品種よりも花持ちの良い品種を育成することに成功し、2002年春に市販する運びとなった。

1. はじめに

植物の突然変異誘発方法には、1) X線、ガンマー線、中性子線などのエネルギー線照射、2) アルキル化剤および核酸塩基アナログなどの化学物質処理、3) トランスポゾンやT-DNAを用いる遺伝子組換え、4) 植物組織培養過程の体細胞変異などがある。植物遺伝子組換えは、人為的に変異植物を作り出す画期的方法として応用範囲を広げ、最近では米国の農作物の中で着実に浸透している。この分野の基盤技術研究は、戦略的に先行する米国が綿密に特許化しているために、我が国独自の植物遺伝子組換え技術を開発することは非常に難しい状況にある。一方、農作物は原種植物から品種改良という継承技術(育種)によって農業上有益な遺伝形質を選抜して得られたものである。自然突然変異は生物進化の基本的要因であり、突然変異育種は、それを人為的に再現あるいは新たに誘発するものであり、この技術史の中で、高度な突然変異を上手に活用すると育種の効率が大幅に改善されることは証明されている。

日本におけるエネルギー線による植物突然変異誘発法および育種技術の開発研究は、1960年に世界に先駆け、世界最大規模のガン

¹ ABE Tomoko, YOSHIDA Shigeo

〒351-0198 和光市広沢2-1

² SUZUKI Ken-ichi, KUSUMI Takaaki

〒618-8503 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1

マー・フィールド(放射線育種場、独立行政法人農業生物資源研究所、<http://www.irb.affrc.go.jp>)の運転が開始されて以来、現在まで積極的に取り組まれている。一方、近年新たな変異原として生体に最も大きな影響を与える重イオンビームが注目され、現在もその効果の検証が続いている。高エネルギー重イオンビームによる生物学の基礎研究を行っている施設の代表的なところは世界的にも5箇所程度であるが、日本にはそのうち理化学研究所(RARF:RIKEN accelerator research facility)原子力研究所高崎研究所、放射線医学総合研究所の3研究所がある。

2. 重イオンビームは粒子

重イオンとはヘリウムより「重い元素」の原子から電子をはぎとり、プラスに帯電した粒子、すなわちイオン化した原子核をさす。RARFで発生する重イオンビームは高エネルギー(炭素で核子当り135MeV、鉄で核子当り90MeV)であるため、イオンが停止するまでの距離「飛程」が長く(水中に換算して炭素4センチ、鉄4ミリ)、空気中で容易に生体に照射することが可能であり、また、世界有数のビーム強度を誇っているため、必要な線量を短時間(数秒から数十秒)で与えることが出来る。一方、X線やガンマー線では0.2~2.8keV/mmであるLET値(線エネルギー付与:エネルギー線が軌跡に沿って物質に

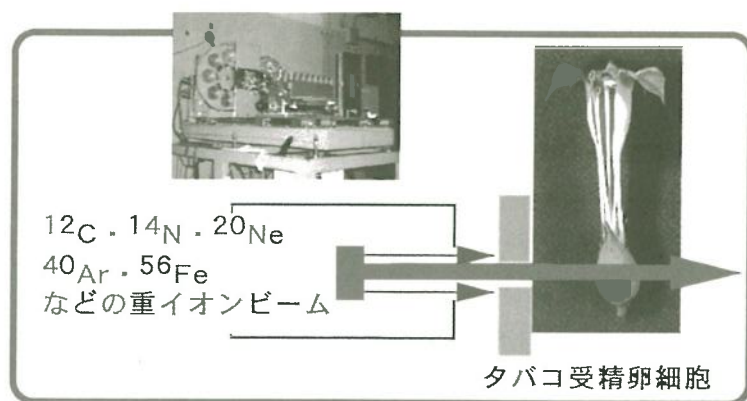


図1 重イオン植物照射方法の模式図

与えるエネルギーの大きさ)がRARFで発生する重イオンビームでは20~4000keV/mmと圧倒的に高い。X線やガンマー線の作用は、照射によって発生するラジカルなどの間接作用によるものが殆どであり、遺伝子上の広い領域が影響を受けるが、重イオンビームの影響はその軌跡周辺に限定されるという特徴がある。重イオンビームが細胞中の遺伝子近傍を通過するときDNA二本鎖の一部を引きちぎる。この損傷は直ちに遺伝子修復機構の作用を受け、損傷の程度が致命的でない場合には、その後正常に細胞分化過程が進行する。これらの結果として、ヒト胚細胞を用いた変異実験において、重イオンビーム照射はガンマー線照射より高率にDNA欠失型の突然変異が生じている¹⁾。アラビドプシスでは欠失のみではなく転座や点突然変異²⁾が、また酵母でも点突然変異が観察されており³⁾、重イオン照射による変異誘発機構は欠失のみではなく多岐にわたるものと考えられる。

3. 栽培タバコへの重イオンビーム照射による変異誘発効果

1花に約2000粒の種子を形成する栽培タバコの受精卵細胞を用いて重イオンビームの効果を検証した。タバコ (*Nicotiana tabacum* L., Xanthi品種, BY-4品種) は、いずれも受粉処理後24時間から48時間の間に2個の細胞に分裂する。そこで、栽培タバコ鉢植えをRARFに持ち込み、照射野に受粉24~108時

間後の子房を合わせて、 $^{12}\text{C} \cdot ^{14}\text{N} \cdot ^{20}\text{Ne}$ (135 MeV/u), ^{40}Ar (95 MeV/u) ビームを5~200グレイ (Gy) で照射し、1カ月後に M_1 種子を収穫した (図1)。LETは ^{12}C , ^{14}N , ^{20}Ne , ^{40}Ar , それぞれ23, 28.5, 63および240KeV/mmであった。 M_1 種子は滅菌後、1/2MS寒天培地に播種し25℃連続光に置き、2週間後に発芽率を1カ月後に形態異常率を観察した。両品種共に、高線量照射区では顕著な発芽率低下、ならびに胚細胞の発育抑制が認められ、1花当りの種子重は著しく減少した。 ^{12}C , ^{14}N や ^{20}Ne イオンは発芽率にあまり影響のない極めて僅かな線量 (10~20Gy) で高い変異効果を示すこと、 ^{40}Ar では致死率が高くなることが判明した。また、形態異常率は、BY-4では処理ステージによる明確な差異を示さなかったが、Xanthiでは ^{14}N と ^{20}Ne 両ビーム照射区とも受粉後36~48時間のステージに明瞭なピークが認められ、形態異常率も10~18%と高かった。また形態異常株を開花期まで調査したところ、矮性・斑入り・細葉・巻葉・帯化した個体や花色や花卉の数に変化したもの・不稔個体が観察され、タバコでは報告例の少ないアルビノ (白色変異) 株が頻出するなど形態異常の程度が他の変異法に比べて著しく大きいことも明示された。また、本方法で作出された変異株は、花卉・花色変異株 (図2)、周縁キメラ株⁴⁾、区分キメラ株、アルビノ株⁵⁾などの形態変異株の他に、除草剤耐性、ホルモン応答異常、重金属耐性、塩耐性獲得など生理反応に特徴のあるものも多

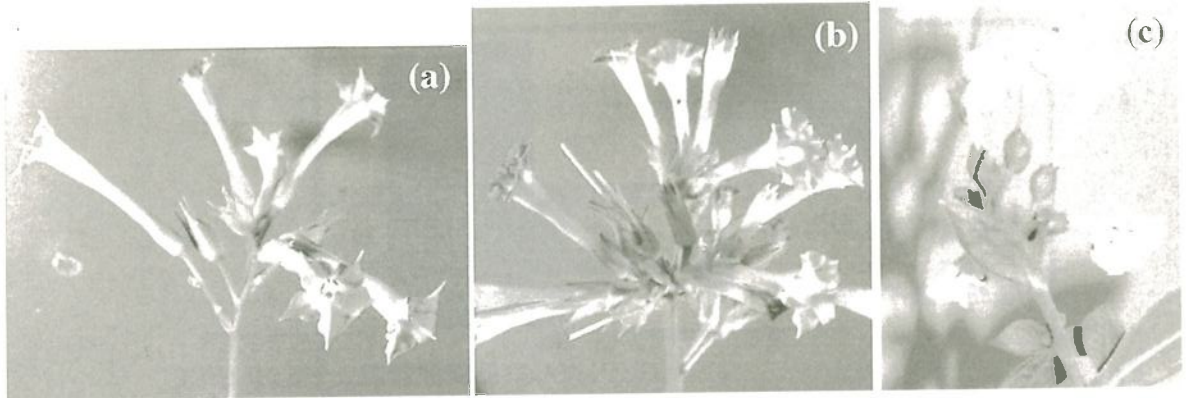


図2 栽培タバコの重イオン照射により誘発した変異株
(a) 正常花, (b) フリル花, (c) 白花

く認められた⁶⁾。

4. 花卉園芸植物バーベナ育種への応用

一度植栽した花壇苗が長い期間花を咲かせ続ける四季咲き性品種は、世界的に大きな市場ニーズがある。サントリー(株)が開発したバーベナ花手毬シリーズは、ほふく性で花房が大きく、春から秋まで開花し、うどんこ病にも強いことから、海外でも高く評価されている。しかし、花手毬コーラルピンク(*Verbena hybrida* “TEMARI CORALPINK”)は他の花手毬シリーズと比較した場合、通年開花性が若干弱く、自家種子を形成しやすかった。一般に植物の種子形成では、種子発達のために植物体からの栄養分の供給、胚乳などの貯蔵機関への蓄積が優先され植物体自身が弱体化して、花数が減少するとされる。そこで、重イオンビーム照射による突然変異法を用いて花手毬コーラルピンクの不稔系統を育成することにより、開花特性を向上することを試みた。花手毬コーラルピンクの無菌植物から調整した、2つの腋芽を含む茎1節を各区64本MS寒天培地に置床し、¹⁴N (135 MeV/u)重イオンビームを1~10Gy照射した⁷⁾。照射後の脇芽から生長してきたシュートを生存個体とすると、全ての区において生存率は80%前後であった。馴化、育苗し、温室内で開花、自然結実による選抜を行った。その結果、自

家種子を形成しない花が多数観察され、その中でも花房全体に不稔が認められた4系統を選抜した。圃場での栽培試験を行った結果、従来品種と比較し全ての不稔系統で、期待通り開花特性が向上し、さらに株の老化の抑制・花房数の増加も認められた。これら不稔系統は、温室内および屋外栽培試験を通し、花色・花形・葉・草姿・日長感受性・耐病性など不稔以外の形質は、従来品種と比較して差異は認められなかった。すなわち、この不稔系統は、従来品種が持っていた有用な形質を損なうことなく、「花持ちの良さ」「花房数の増加」などという新たな形質を獲得したといえる。なお新しく品種改良に成功したバーベナは、重イオンビーム照射による新しい育種法では初の商品化となる。

5. おわりに

園芸植物では、生活文化の発展に伴い、多様な価値観に基づく高観賞価値付与という育種が盛んに行われるようになってきたが、依然、斑入り葉は観賞価値の1つである。サントリー(株)が開発した新しいタイプのほふく性・栄養繁殖性ペチュニアのサフィニアシリーズ⁸⁾で、また(株)北海道グリーンバイオ研究所ではサンダーソニア⁹⁾で重イオンビーム照射により斑入り葉をもつ変異株取得に成功しており、現在安定性および生育特性について調査を行っている。この他にも、(財)広島市農

林業振興センターでは切り花ダリアの花色変異株を育成し¹⁰⁾、そのうちの一品種を広島市中央卸売市場で試験販売して好評を博している。神奈川県農業総合研究所ではバラの花色や花卉数変異株育成など¹¹⁾に成功している。重イオンビーム照射による変異スペクトラムはダリアやキク¹²⁾では、ガンマー線照射とは異っていた。一方、イネ¹³⁾や大麦¹⁴⁾の重イオン照射種子の後代より短桿などの変異株が得られている。これらの成果より、重イオンビーム照射による人為突然変異誘発法は新品種育成を目的とした植物育種に有効な新しい技術となると考えられる。

文 献

- 1) Suzuki, Y. et al. (1995) J. Radiat. Res. 36, 185-195
- 2) Shikazono, N. et al. (1998) Genes Genet. Syst. 73, 173-179
- 3) Yoshimatsu, M. et al. (2000) RIKEN Accel. Prog. Rep. 33, 139
- 4) Bae, C.H. et al. (2000) Plant Science 151, 93-101
- 5) Bae, C.H. et al. (2001) Ann.Bot. 88, 545-554
- 6) Abe, T. et al. (2001) Gamma Field Symposia No.39, 45-56
- 7) Suzuki, K. et al. (2002) RIKEN Accel. Prog. Rep. 35, in press
- 8) Miyazaki, K. et al. (2002) RIKEN Accel. Prog. Rep. 35, in press
- 9) Horita, M. et al. (2002) RIKEN Accel. Prog. Rep. 35, in press
- 10) 浜谷美佐子ら (2000) 助広島市農林業振興センター平成11年度試験報告, 54-70
- 11) 原靖英ら (2000) 神奈川県農業総合研究所平成11年度試験研究成績書 (花き・観賞樹), 3-6
- 12) 永富成紀ら (1997) 放射線育種場テクニカルニュースNo.60
- 13) Abe, T. et al. (1999) RIKEN Accel. Prog. Rep. 32, 145
- 14) Honda, I. et al. (2001) RIKEN Accel. Prog. Rep. 34, 171

◀国内情報▶

納豆の糸引き成分の合成開始物質の発見と
今後の展望

独立行政法人 食品総合研究所
伊藤 義文・木村 啓太郎

納豆菌の糸引き成分であるポリグルタミン酸の合成は、ComXと呼ばれるペプチドフェロモンの信号を引き金として始まる。納豆菌の仲間は、固有の構造をもつComXフェロモンをコミュニケーションの手段として仲間の数を知り、細胞の過密な状況に対応するための“社会的活動”を行っている。ComXフェロモンは、多様な酵素・ペプチドの生産にも関わっている。フェロモン情報の伝達メカニズムを活用した新たな微生物酵素・ペプチド生産技術の展開が期待される。

1. はじめに

納豆の糸を引く粘り成分の本体は、ポリグルタミン酸である。納豆菌によってつくられるポリグルタミン酸は、約5万個のグルタミン酸が γ -ペプチド結合で結ばれている¹⁾。高い粘性と保水力、そして蛋白質には存在しないD型のグルタミン酸がほぼ半分含まれることが、納豆菌のポリグルタミン酸の特徴である¹⁾。納豆菌は、このようなユニークな化学構造と物性をもつポリグルタミン酸を何の目的で、またどのような合成と制御メカニズムを使ってつくるのであろうか？

私たちは、納豆菌の細胞密度を認識する装置がポリグルタミン酸合成開始のスイッチとして働いていることを発見した²⁻⁴⁾。この発見を契機に、ポリグルタミン酸が果たす高細胞密度下での役割が明らかになりつつある。納豆菌の細胞密度認識機構とポリグルタミン酸の生理的機能を紹介し、細胞密度の情報伝達システムを利用した物質生産を展望する。

2. 枯草菌・納豆菌における細胞密度認識とシグナル伝達機構

「単細胞」である細菌もコミュニケーション手段をもち、集団として振る舞うことが知られてきた。動植物に対する病原因子や毒素、
ITOY Yoshifumi, KIMURA Keitarou
〒305-8642 つくば市観音台2-1-12

分解酵素、抗菌物質などの生産は、細菌の集団行為の代表例である。納豆菌は、枯草菌と同じ種 (*Bacillus subtilis*) に属する。枯草菌は、ComXフェロモンと呼ばれる細胞密度シグナルペプチドを合成する (図1, 2)。枯草菌168株での研究によると、ComXフェロモン遺伝子 (*comX*) は、*comQPA*の三つの遺伝子とクラスターを形成する (図2)。55個のアミノ酸からなるComXフェロモンの前駆体は、ComQ蛋白質によって切断され、C末端側の10個のアミノ酸からなる活性型フェロモンが培地に分泌される。培地中のComXフェロモンの濃度は、ComP蛋白質によって感知され、リン酸リレーによるシグナル伝達でComA蛋白質に伝えられる (図1)。ComA応答制御蛋白質は、DNAを取り込むための形質転換遺伝子、プロテアーゼ遺伝子、レバンスクララーゼ遺伝子、サーファクチン (界面活性をもつ環状ペプチド) 合成遺伝子などの発現を活性化する。

3. 納豆の糸引き成分の合成開始物質 (ComXフェロモン) の構造

トランスポゾンと呼ばれる“動くDNA”を利用して納豆菌のポリグルタミン酸の生産に必要な遺伝子を検索した結果、*comP*遺伝子が破壊された納豆菌は、ポリグルタミン酸をつくれなことがわかった^{2, 3)}。納豆菌と枯草菌168株では、*comP*遺伝子と*comQXA*

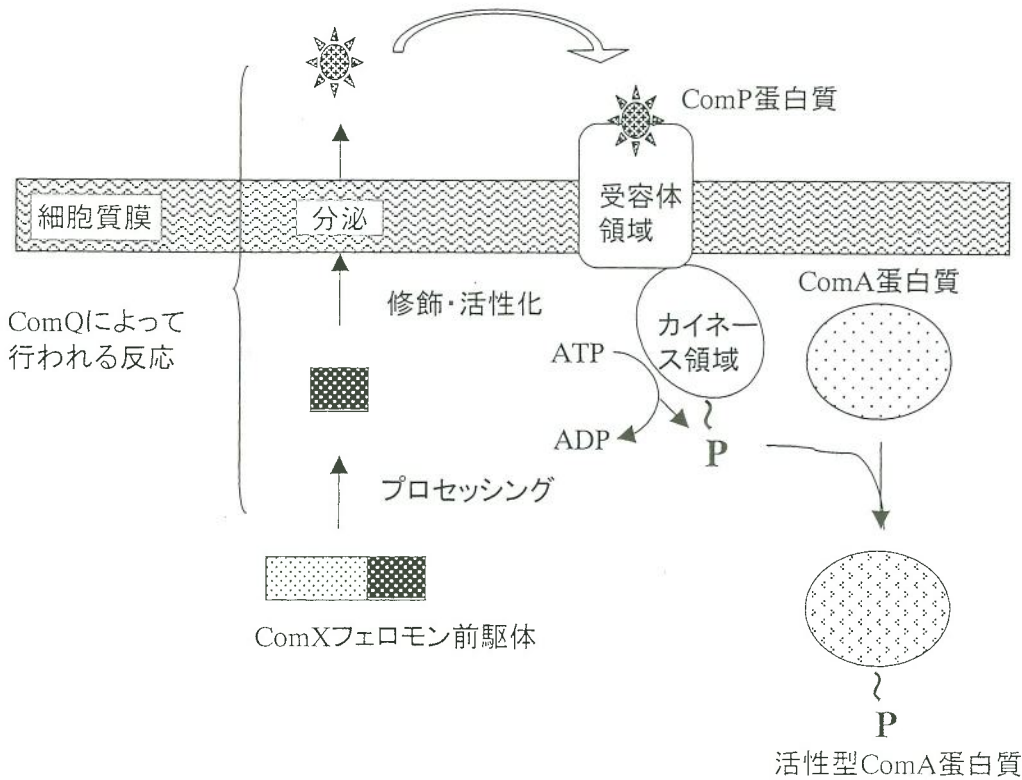


図1 納豆菌のComXフェロモンの活性化・分泌機構及びComP蛋白質を介したComA応答制御蛋白質のリン酸化による活性化機構

遺伝子に特徴的な違いがある。納豆菌と枯草菌168株のComXフェロモンは、共通するアミノ酸が少ないばかりではなく、納豆菌のComXフェロモンC末端側には16個のアミノ酸が余分にある（図2，下図）。さらに、ComQ蛋白質とComPの受容体の配列も枯草菌168株のそれらとは大きく異なっており、同一アミノ酸残基はそれぞれ44%と36%にすぎない（図2，上図）。ところが、両株のComPのカイネース領域とComA蛋白質のアミノ酸配列は極めて良く似ており、それぞれ95%及び100%のアミノ酸残基が同一である（図2，上図）。ComXフェロモンの構造に対応して、フェロモン前駆体の切断と分泌を行うComQ蛋白質やComP蛋白質のフェロモン受容体の構造は異なり、フェロモンが認識された後の過程に関わるComP蛋白質のカイネース領域とComA応答制御蛋白質の構造は共通である。

納豆菌と枯草菌168株のComXフェロモンの合成と認識の特異性は高く、168株のComQ蛋白質は納豆菌のComXフェロモン前駆体を活性型フェロモンとして分泌できない。また、

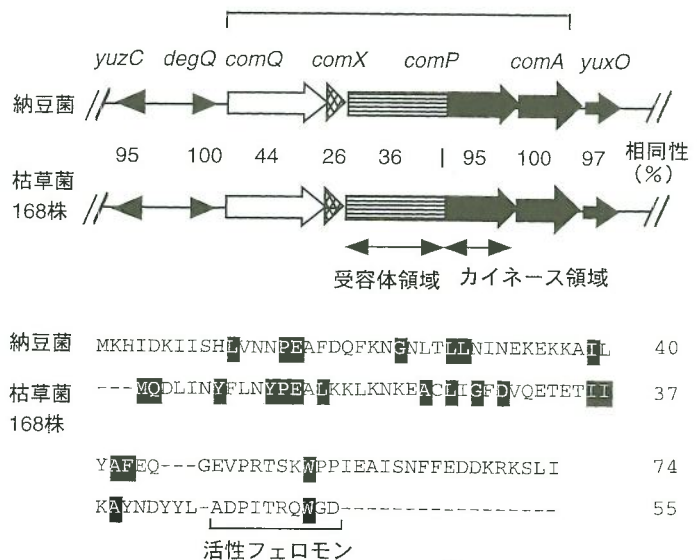


図2 納豆菌・枯草菌のcomQXP遺伝子の比較（上図）とComXフェロモンのアミノ酸配列（下図）

下図の下線部分が枯草菌168株の活性型ComXフェロモンのアミノ酸配列

4. 枯草菌・納豆菌の細胞密度認識システムの特異性

枯草菌168株のComP受容体は納豆菌のComXフェロモンを認識しない⁴⁾。逆に、納豆菌のComQ蛋白質は168株のComXフェロモンを活性型フェロモンとして分泌できず、納豆菌のComP受容体は168株のComXフェロモンを認識できない⁴⁾。この結果から、枯草菌・納豆菌には、ComXフェロモンの構造で分けられる菌株のグループ(フェロタイプ)が存在することが明らかとなった。

5. 納豆菌におけるポリグルタミン酸の役割

納豆菌にとってポリグルタミン酸をつくるメリット、言い換えればポリグルタミン酸の微生物学的な機能は何であろうか? ポリグルタミン酸のような細胞の外に合成される夾膜成分は、細胞防御機能をもつ。細菌が防御すべき敵は、彼らを餌とするアメーバや原生動物などの捕食者とバクテリオファージ(ファージ)である。細胞が密集した細菌の集落

(コロニー)は、捕食者の格好の標的であり、細胞が密集するコロニーへのファージの感染は脅威である。

バリアー機能

ポリグルタミン酸の機能の一つは、コロニーを捕食者やファージの感染から防御するためのバリアーであると考えられる。野生型の納豆菌とポリグルタミン酸をつくらない納豆菌の変異株をファージと混ぜて培養し、増殖したファージの数を数えた。野生型の納豆菌で増殖したファージの数は、変異株で増殖したファージ数の1%以下であることから、ポリグルタミン酸がファージの感染を防いでいることが明らかとなった。

貯蔵栄養

培養を続けるとポリグルタミン酸は徐々に分解され、消滅する。ところが、培地にはポリグルタミン酸から生成したグルタミン酸は全く存在しない。これは、納豆菌がグルタミ

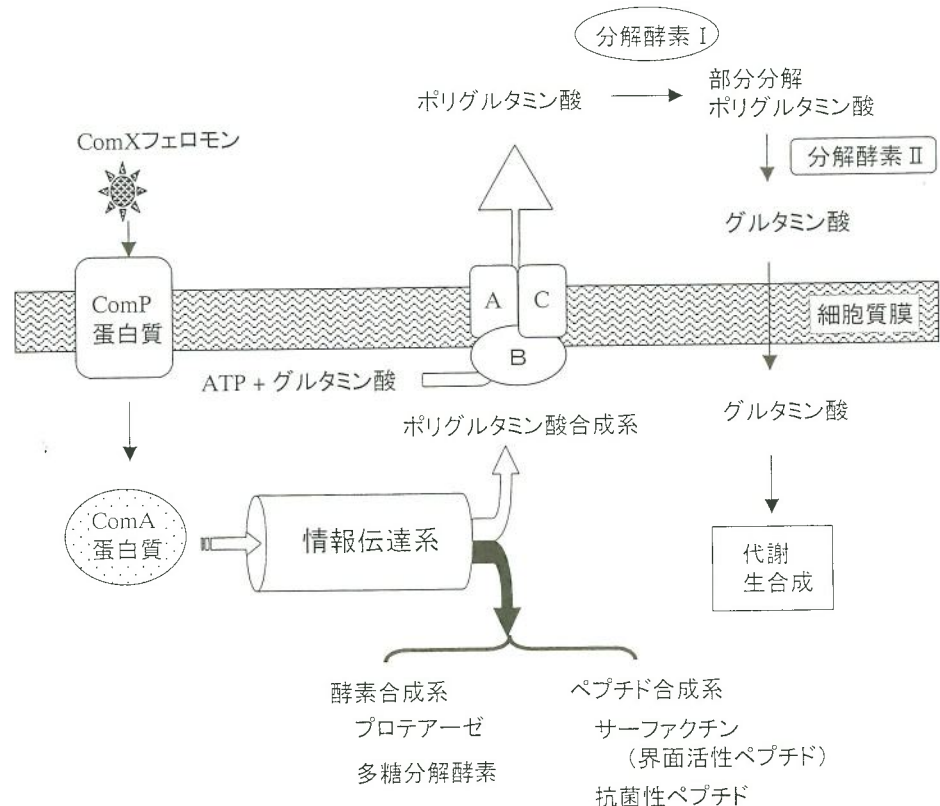


図3 納豆菌のポリグルタミン酸の合成と分解のメカニズム

ン酸を“食べている”ことを物語っている。納豆菌はポリグルタミン酸を“食べる”ために、二種類のポリグルタミン酸分解酵素をもっていることがわかった。一番目の酵素でポリグルタミン酸を分子量が10万程度の断片に大まかに切断する。二番目の酵素は、分子量10万のポリグルタミン酸の端からグルタミン酸を一つずつ外す(図3)。グルタミン酸は、炭素、窒素、そしてエネルギー源となり、納豆菌の優れた栄養源である。高細胞密度の環境は、栄養欠乏と背中合わせである。納豆菌は、ComXフェロモンで細胞の増加を感知して、栄養をポリグルタミン酸に“加工”・“貯蔵”する。栄養が枯渇すると備蓄のポリグルタミン酸を分解して食べている。

6. おわりに

納豆菌のComQXPA細胞密度認識システムが、納豆の糸引き成分であるポリグルタミン酸の合成開始を決定している(図3)。ポリグルタミン酸の合成メカニズムに隠れていた納豆菌の能力と知恵を見ることができる。納豆菌は仲間の数を知るために、仲間同士だけに通用するComXフェロモンでコミュニケーションをしている。仲間が増え納豆菌の集落が形成されると、細胞がばらばらに存在していた時とは異なる“社会的な行動”が必要となる。納豆菌は、ComXフェロモンで社会的な行動を開始するタイミングを取り合っている。納豆菌の社会的行動は、外敵(ファージや捕食者)からの集落の防備であり、食料の確保である。ポリグルタミン酸の合成は、その二つの目的に合致し、ポリグルタミン酸の合成がComXフェロモンで開始される理由もそこにある。

納豆菌は備蓄したポリグルタミン酸を分解して、グルタミン酸を利用するために必要な二つのポリグルタミン酸分解酵素遺伝子をもっている。ポリグルタミン酸分解酵素遺伝子の欠損変異株を造成してポリグルタミン酸の生産量を調べたところ、変異株は野生株の10倍量のポリグルタミン酸を蓄積することがわ

野生株



変異株



4日 7日
培養日数

図4 ポリグルタミン酸分解酵素欠損株によるポリグルタミン酸の大量生産

ポリグルタミン酸は、抗体を用いたアガロースゲルの二次元電気泳動で検出。

かった(図4)。ポリグルタミン酸は高い粘性と保水力に加えてカルシウム吸収促進作用⁵⁾がある。ポリグルタミン酸分解酵素欠損変異株は、ポリグルタミン酸の生産と用途開発に貢献することが期待される。

枯草菌・納豆菌の蛋白質や多糖類の分解酵素や生理活性ペプチドの生産もComXフェロモンの信号で開始される。ComXフェロモンの情報が酵素遺伝子の発現に至る経路は、未だに混沌としている。ComXフェロモンの情報の流れを解明し、それを操作することによって目的の遺伝子機能を最大限に引き出すことが可能と思われる。

文献

- 1) T. Nagai, et al. (1997) J. Gen. Appl. Microbiol., 43, 139-143
- 2) 伊藤義文, 永井利郎 (1994) 日本醸造協会誌, 89, 620-625
- 3) 伊藤義文 (1999) バイオサイエンスとインダストリー, 57, 247-250
- 4) L.-S. P. Tran, et al. (2000) Mol. Microbiol., 37, 1159-1171
- 5) H. Tanimoto, et al. (2001) Biosci. Biotechnol. Biochem., 65, 516-521

生研機構からのご案内

生研機構 一般公開

～農業機械を見てみよう～

平成14年3月31日（日） 午前10時～午後4時

「農業機械を見てみよう」と題し、生研機構（本部）の構内を公開します。桜の季節、皆様お誘い合わせのうえ、お気軽にお越し下さい。

○最新農業機械の実演

- ・自律走行トラクタ
- ・ベールラッパー
- ・傾斜地用モノレール

○「農業機械今・昔」の展示

昔の農機具から最新の農業機械まで、実物やビデオでご紹介します。

また、生研機構で開発した各種農業機械、研究開発内容等もご紹介します。



傾斜地用モノレール



皆様のご来場をお待ちしています。

生物系特定産業技術研究推進機構

埼玉県さいたま市日進町1-40-2

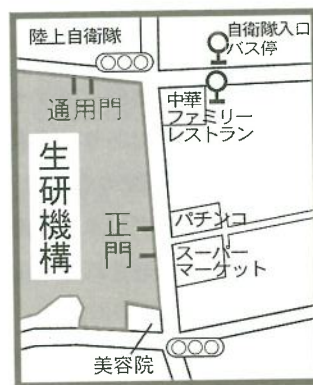
TEL: 048-654-7000 (代)

(お問い合わせ: 評価試験部 塚本)

ホームページ: <http://www.brain.go.jp/>

交通案内

JR大宮駅西口⑥番バス乗場より「三進自動車」
「シティハイツ三橋」行き乗車約10分、
「自衛隊入口」バス停下車。(運賃¥190)



▲バス停からの案内図

ご注意!

- ★飲食は自由ですが、酒類はご遠慮下さい。
- ★お車でのご来場はご遠慮下さい。

◀国内情報▶

高温誘導性の活性酸素消去遺伝子で 低温に強いイネを作る

¹独立行政法人 農業技術研究機構北海道農業研究センター

²(株)北海道グリーンバイオ研究所

佐藤 裕¹・猿山 晴夫²

北海道のイネの直播栽培を安定化するためには、生育初期の低温耐性を強化することが極めて重要である。イネは低温馴化能力を持たないが、幼苗を高温処理すると、低温枯死耐性が著しく高まる。本研究では、高温処理による低温耐性発現機構を明らかにし、関与遺伝子を単離・利用することによって、イネの低温枯死耐性強化法を開発した。

1. はじめに

熱帯・亜熱帯原産の植物の多くは、12℃以下の低温に曝されると著しい低温傷害を受ける。中には馴化により耐性が増すものもあるが、イネはこの能力を持たないため、15℃前後の温度で処理しても、低温耐性は向上しない。ところが、イネの幼苗を高温処理すると、低温枯死耐性が著しく上昇する。本研究では、高温処理による低温枯死耐性発現に関与する遺伝子を単離、利用することにより、イネの低温枯死耐性強化法を開発したので、以下これらの概要について紹介する。

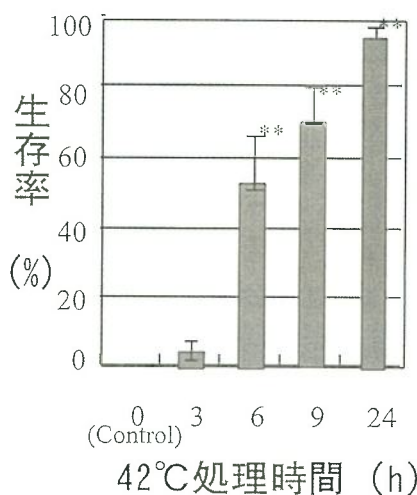


図1 高温処理による低温耐性の変化

*** 1%水準で有意。

2. 高温処理によってイネ幼苗の 低温枯死耐性が向上する

筆者らは、イネの幼苗を高温処理すると、低温枯死耐性が著しく上昇することを発見した¹⁾(図1)。低温ではなく高温によって低温耐性が獲得されたわけである。このような、あるストレスが別の種類のストレス耐性の発現を誘導する現象を交差耐性と呼ぶ。交差耐性は、非生物学的ストレスと生物学的ストレスとの境界を越えて発現することもあり、そのシグナル伝達の仕方に関心が集まっている²⁾。

¹ SATO Yutaka

〒062-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘1

² SARUYAMA Haruo

〒069-1317 北海道夕張郡長沼町東5線北15

交差耐性の仕組みを解き明かすことができれば、例えば低温馴化能を持たないイネに低温耐性を付与したり、一つか二つの遺伝子を操作するだけで種々のストレス耐性を効率よく向上させる方法が見つかるかもしれない。

高温処理によって低温耐性が著しく向上する現象は、本来低温保存が不可能な熱帯原産の果実で数多く報告されている。これらの報告の中には、熱ショックタンパク質 (HSP) が低温耐性獲得に関与していることをうかがわせるデータもあり、高温で発現誘導されたHSPが分子シャペロンとして働き、低温によるタンパク質の変性や凝集を防いでいると考えられている。

3. 低温ストレスの主な原因は酸化ストレスである

低温に弱い植物にとって、低温ストレスの

主な原因は酸化ストレスであると考えられている。低温によって細胞内に生成した過酸化水素や超酸化ラジカルなどの活性酸素種 (AOS) が、DNA・脂質・タンパク質などと

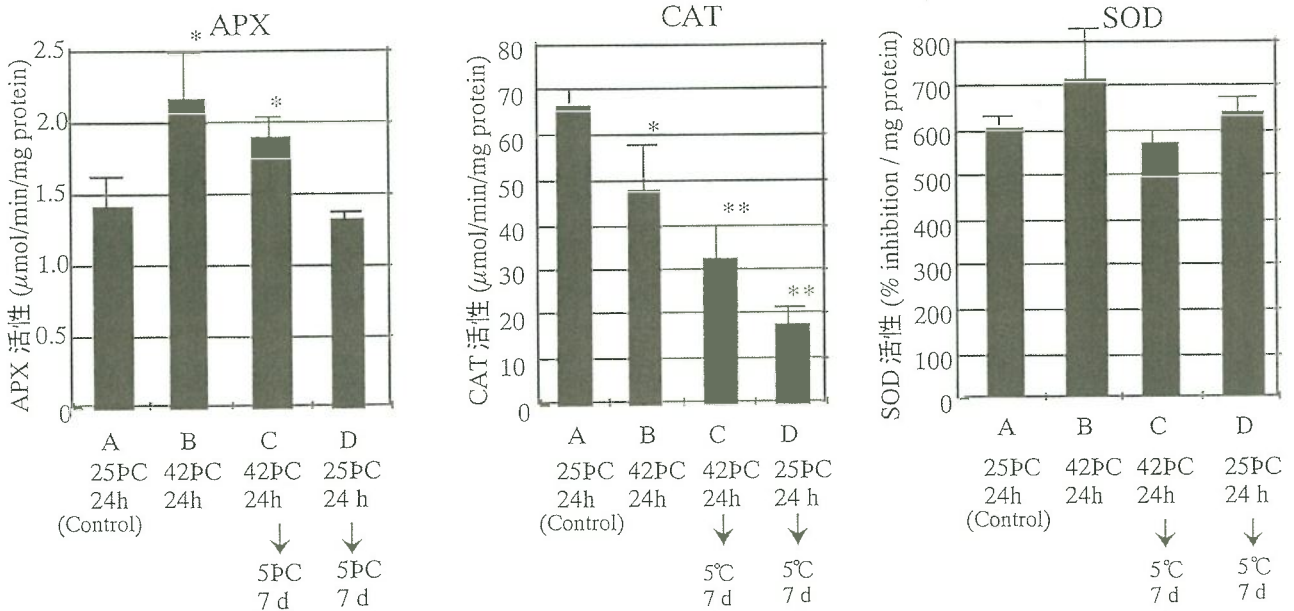


図2 高温及び低温処理が活性酸素除去系酵素の活性に及ぼす影響

*は5%水準で有意, **は1%水準で有意。

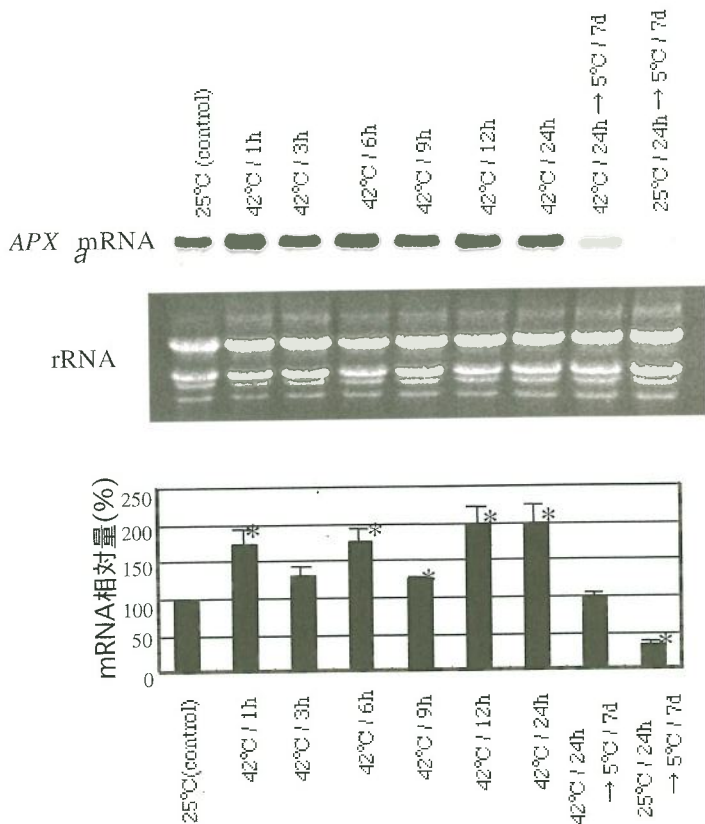


図3 APXαのノーザン解析

*は5%水準で有意。

素早く反応して、細胞にダメージを与えるのである。植物には、活性酸素除去系の酵素があり、通常はAOSをうまく処理しているが、ストレスが強すぎたり長引いたりすると、この除去系の処理能力を越えてしまい、その結果、細胞が傷害を受ける。このような酸化ストレスは明条件下で生じる低温傷害にのみ関与していると考えられてきたが、暗黒下でも低温によって同様に酸化ストレスが生じることが、トウモロコシの実生を用いた分子・生化学的実験で証明された³⁾。

以上のことから筆者らは、高温処理によってイネの低温耐性が向上するのは、高温によってAOS除去系が活性化されるためであるという仮説を立てた。また、低温に強いイネ品種は弱い品種よりも、AOS除去系酵素であるアスコルビン酸パーオキシダーゼ (APX) とカタラーゼ (CAT) の活性が高い⁴⁾ ことから、低温耐性獲得にはこれらの酵素が関与している可能性が高いと考えた。

4. APXの活性が高温で高まる

高温処理したイネ幼苗と無処理の幼苗のAPX,スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 及びCATの活性を測定し、両者を比較した。その結果、高温処理によってAPX活性が2倍近くまで上昇することが分かった (図2)。これに対し、CAT活性は高温処理によって低下し、SOD活性は対照区との間で有意な差がなかった。

5. APXa遺伝子は高温で転写が誘導される

唯一高温処理で活性が高まったAPXに着目して、その遺伝子発現が高温で高まるかどうかをノーザン解析によって調べた。用いたプローブは、細胞質型のAPXaである。その結果、APXaのmRNAのレベルは、高温処理1時間後には既に対照区よりも高く、その後24時間にわたって高いことが判明した (図3)。従って、APXaの転写は、高温で誘導される。

シロイヌナズナの*apx1*、*apx2*及びエンドウの*apx1*のプロモーター領域には、熱ショック転写因子 (HSF) が結合するシスエレメント (HSE) が存在し、これらは実際に機能していることが報告されている¹⁾。イネのAPXのプロモーターにも同様にHSEが存在すれば、高温によってAPXの転写が誘導される現象を説明することができる。そこで、イネAPXaのプロモーター領域を単離して塩基配列を決定したところ、図4に示すようにHSEに特徴的な配列がTATA boxの上流に見つかった¹⁾。従って、APXaは、このHSEを介して高温誘導されていると考えられる。

6. APXaを過剰発現させたイネは低温耐性が高い

APX活性の上昇がイネ幼苗の低温耐性向上にどれほど寄与しているのかは、これまでの研究結果からは分からないため、APXaを

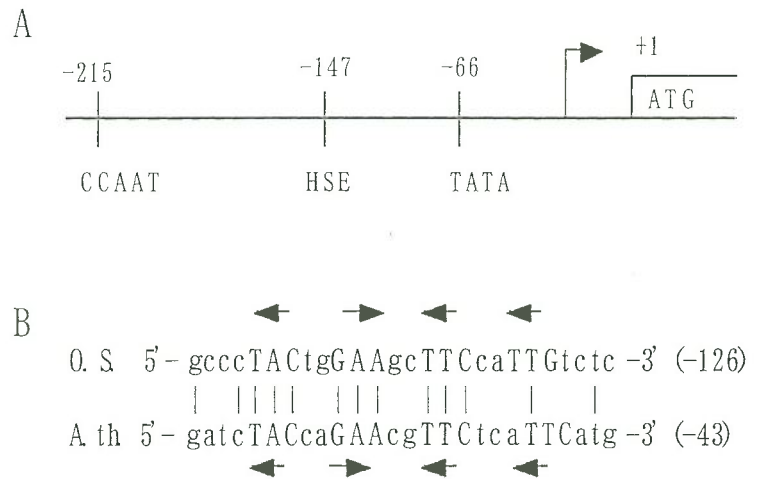
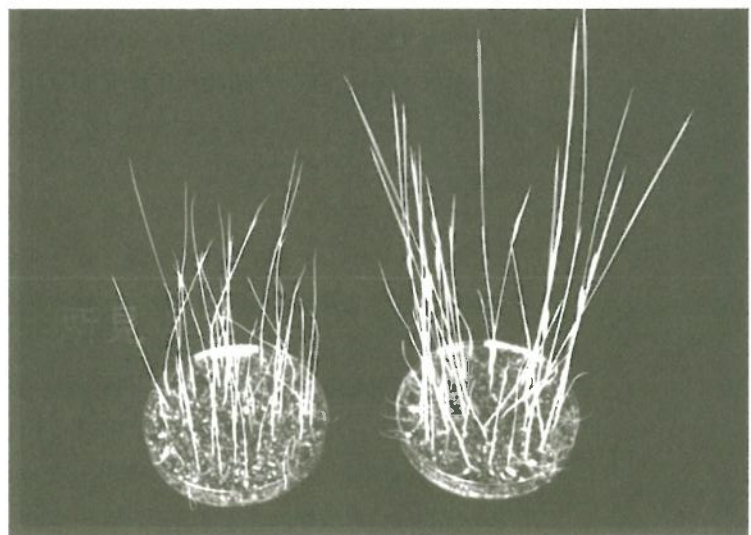


図4 APXa遺伝子のプロモーター構造

A: ATGは翻訳開始コドンを示す。APXaのcDNAの5'端を矢印と+1で示した。Cisエレメントとして推定される領域を転写開始点からの塩基数で示した。

B: Arabidopsisの*apx1*プロモーター上のHSEとイネのAPXaプロモーター上のHSEの比較。HSEのモチーフnGAAnを大文字で示した。両種とも二つのモチーフが中央で逆向きに向き合い、HSF結合のための最小限のモチーフnGAAnnTTCnと完全に一致している。その両側には、1塩基置換されたモチーフが存在している。nGAAn様モチーフの方向を矢印で示した。



ゆきひかり
生存率0%

APX991217-5-2
生存率48%

図5 APXaを過剰発現させた形質転換イネ (APX991217-5-2) 及び原品種 (ゆきひかり) の低温枯死耐性 (5°C10日間)

過剰発現させた形質転換イネを作成し、その後代系統の低温枯死耐性を調べた。その結果、原品種よりも明らかにAPX活性が高く、かつ低温枯死耐性の優れる形質転換系統を得ることができた (図5)。

7. おわりに

以上の結果から、高温処理によって低温枯死耐性が向上するのは、*APXa*の発現が高温で誘導され、*APX*活性が高まるためであることが明らかである。また、*APXa*を過剰発現させた形質転換イネは、北海道のイネの直播栽培で特に問題となる生育初期の低温耐性向上のための新しい育種材料としての利用が期待できる。

文 献

- 1) Sato, Y. et al. (2001), *J. Exp. Bot.*, 52, 145-151
- 2) Bowler, C. et al. (2000), *Trends Plant Sci.*, 5, 241
- 3) Prasad, T.K. et al. (1994), *Plant Cell*, 6, 65
- 4) Saruyama, H. et al. (1995), *Plant Sci.*, 109, 105
- 5) Storozhenko, S. et al. (1998), *Plant Physiol.*, 118, 1005

(30頁よりの続き)

- 7) 青山固著 (1948), 製粉の技術, 産業評論社
- 8) 安井泰治 (1981), 別冊化学工業, 26, 223 - 228
- 9) M.G. Scanlon et al. (1988), *Cereal Chem.*, 65 (6), 486 - 492
- 10) N. Hunt Moore (1983), *JAACS*, 60 (2), 189 - 192
- 11) K. Saio et al. (1982), *Cereal Chem.*, 59 (5), 408 - 412
- 12) 渡辺篤二ら著 (1948), 大豆食品, 229 - 235, (株)光琳

◀地域の先端研究▶

食感も滑らかで大豆臭の少ない 生大豆粉の新製法開発

(社)岡山県農業開発研究所

大 野 彰 一

丸大豆や脱脂大豆にロールリファイナーにより圧縮剪断応力を加え、大豆の微小細胞構造の破壊と造粒を同時に行うことにより、大豆タンパク質の変性、大豆臭、着色が少なく、使用時に滑らかな食感を与える全脂大豆粉および脱脂大豆粉が得られた。これにより、従来、利用が限定されていたこれら生大豆粉の利用を豆腐、豆乳、パン、麺、アイスクリーム、ソーセージ、水産練り製品、菓子類、惣菜の他、従来にない新たな食品等、広範囲の食品に拡大するとともに、おから等の副産物が発生しない、資源の有効利活用を図ることができる。

1. はじめに

近年、豆腐の製造や大豆タンパクの精製時に副生するおからやホエーが、産業廃棄物として問題視され、また、これらに含まれる食物繊維やイソフラボン化合物等の機能が注目を集めている^{1,2,3)}。そこで資源の有効利用と新しい健康食品の開発の観点から、丸大豆を丸ごと粉碎した全脂大豆粉や脱脂大豆を原料とする大豆粉を積極的に利用しようとする試みが豆腐類食品を中心に進められている。特許上に見られるこれらの試みとしては、水に浸漬した大豆を液体窒素で凍結後、粉碎し、濾過工程なく豆腐を製造する方法⁴⁾、脱皮大豆を空冷ミクロジェット粉碎機で微粉化した豆腐用生大豆粉の製法⁵⁾、全粒大豆粉末の懸濁液を湿式ジェットミルで微粉化した豆乳の製造⁶⁾等、多数の出願がある。いずれも大豆タンパク質の変性を抑えながら大豆を機械的に微粉碎し、口当たりの滑らかな豆腐、豆乳を製造するものである。一般的に、生大豆の粉碎においては、粉碎物の粒度、タンパク質の変性、油脂の酸化、大豆臭、着色等が製品の品質を決定する主要な要素となる。今回、丸大豆又は脱脂大豆をロールミルの一種であるロールリファイナーで粉碎することにより、従来の生大豆粉の品質を改善できることを見

OHNO Shoichi

〒701-2221 赤磐郡赤坂町大苅田798-3

出したので、その製法、品質上の特徴と併せ、各種食品に対する利用適性について報告する。

2. ロールリファイナーにより破碎した生大豆粉末の性状と品質

ロールミルは、古くから小麦粉の製造^{7,8,9)}や採油前大豆の圧扁調製¹⁰⁾等に広く利用されている粉碎機であるが、このロールを多段に組み合わせたロールリファイナーがチョコレートやインク、塗料の製造に用いられている。ロールリファイナーによる破碎(ロール破碎)は、速度の異なる2本のロールの間に材料を通し、ロール表面に薄膜を形成させながら次のロールに移行させ、圧縮と剪断の2種の力により材料を分散、混練、磨砕するので、後段のロール程早く回転している。チョコレート生地のリファイニングには、普通、5段ロールのものが使われている。図1にロール破碎による大豆の粉碎工程略図を示す。水分を6%に乾燥した脱皮大豆を1mmφのスクリーン付き衝撃式粉碎機、ピンミルにて一次粉碎した。この粗碎大豆粉を3段ロールリファイナー(株井上製作所製、ロール寸法φ121×280mmL、ロール回転数na:120rpm、nb:312rpm、nc:816rpm)に2回通すことにより、生大豆粉を得た。

表1にロール破碎した生大豆粉及びその豆乳の性状を衝撃式粉碎機により調製した生大

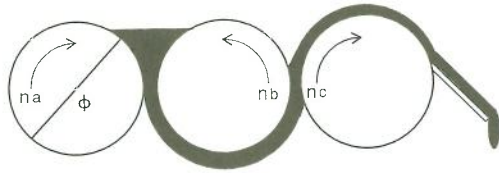


図1 ロールリファイナーによる大豆の粉碎
3段ロールによる大豆の粉碎工程略図
ロール寸法φ121×280mmL
ロール回転数na:120rpm, nb:312rpm,
nc:816rpm

豆粉と市販製パン用生大豆粉のデータとともに示す。また、図2には走査型電子顕微鏡による生大豆粉の形状、図3には光学顕微鏡による豆乳の微視的構造の観察結果を示す。

ロール破碎した生大豆粉は、360μmの大きさの粒子にもかかわらず、これを10wt%濃度に加水、90℃、20分間、加熱した豆乳は、滑らかな舌触りとなり、衝撃式粉碎機により得られた粉末の場合に認められた細胞組織塊のような構造は観察されなかった。これは、ピンミルのような衝撃式粉碎では、衝撃に強い部分を中心に大豆の細胞組織を保持した状態で大豆粒子が粉碎される傾向にあるため、相当微粉化しても粉体の粒度分布に対応して細胞組織塊が残る。これに対し、ロール破碎では、大豆粒度に関係なく、圧縮剪断力が材料全体に均一に加わるため、熱水中で容易に崩壊、分散する程度まで大豆組織の細胞レベルの破壊を均質に起こすことができることを

表1 ロール破碎により得られた生大豆粉及びその豆乳の性状

粉碎方法		生大豆粉の性状						豆乳の性状			
一次粉碎	二次粉碎	水分(%)	平均粒子(μm)	粒子の形状	大豆臭 ^{a)}	NSI ^{b)} (%)	かさ比重(g/cd)	粘度 ^{c)} (cp)	舌触り	残存細胞組織 ^{d)}	熱水可溶性蛋白質 ^{e)} (g/100g大豆粉)
衝撃式粉碎(1mmハス)		6.7	500	不定形	+	94.4	0.44	500	ざらつく	++	36
衝撃式粉碎(0.1mmハス)		6.0	70	不定形	++	82.7	0.36	900	ざらつく	+	36
衝撃式粉碎(1mmハス)	ロール破碎	6.5	360	板状	+	75.1	0.41	500	滑らか	-	39
市販生大豆粉(製パン用粉)		6.2	10~200	不定形	++	89.8	0.35	1100	ややざらつく	+	37

- a) 5名のパネラーによる官能検査により行った。青臭みが強い：十、弱い：十とした。
- b) 可溶性窒素の定量は、粉末試料5gを純水250mlに分散し、30℃で1時間振とうした後、10,000Gで10分間遠心分離し、上澄み液中の窒素濃度をケルダール法に準拠して測定した。可溶性タンパク質の割合(NSI)は、原料窒素に対する水溶性窒素の百分率で表示した。
- c) 粘度測定は、大豆粉を10wt%濃度に30分間分散した水溶液についてB型回転粘度計を用い30℃で行った。
- d) 大豆粉を10wt%濃度に分散した水溶液を90℃、20分間加熱して得た豆乳中に残存する細胞組織を顕微鏡観察により行った。細胞組織が多量に観察：十、僅かに観察：十、殆ど観察されず一とした。
- e) 熱水可溶性蛋白質の割合は、10,000Gで6分間遠心分離した上澄み液中の窒素濃度の測定より算出し、大豆粉100gに対するg数で表示した。

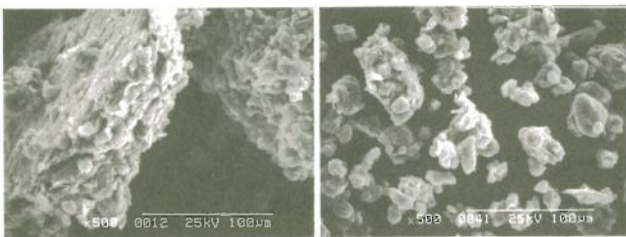


図2 生大豆粉の形状

走査型電子顕微鏡による丸大豆のロール破碎物と衝撃式粉碎物の形態、
左側：ロール破碎物、右側：衝撃式粉碎物

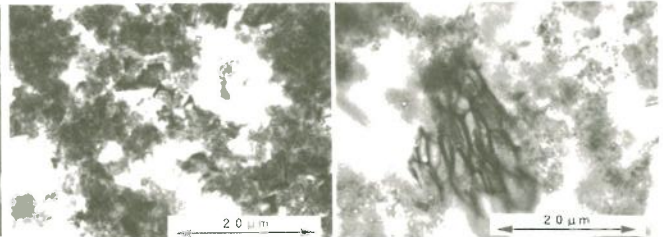


図3 豆乳の微視的構造

生大豆粉を加水、加熱した豆乳(10wt%、90℃、20分)に残存する微視的構造
左側：ロール破碎物の豆乳、右側：衝撃式粉碎物の豆乳

示唆するものである。

食品用大豆粉の場合、可溶性タンパク質の割合（NSI；原料窒素に対する水可溶性窒素の百分率）が80%以上必要とされているが、ロール破碎した生大豆粉では、75%と低い値を示したものの熱水中では逆に溶け出るタンパク質の割合は高い値となった。これは、ロール破碎では細胞組織が潰され板状の粒子となり、物理的束縛により水に対するタンパク質の溶解性が低下していたものが、熱水中では分散が高まり、破碎粒子内に保存されたタンパク質が溶出されたものと思われる。本試験における大豆のロール破碎に要した圧縮応力は、4 MPaと低圧であり、それぞれのロールの周速0.76, 1.98, 5.17m/sec.の速度差が主体となって大豆粒子が引き裂かれ、細胞組織が破碎される。従って、ロール破碎では、ジェットミル等の数千MPaを必要とする製粉法に比べ、極めて短時間に作用する剪断応力により大豆組織を均質に破壊するため、機械的圧力によるタンパク変性も低く抑えられたと考えられる。

さらに、ロール破碎した生大豆粉は、粒子径、かさ比重ともに大きく、水に分散させたときに低粘性であり、ダマになりにくく、豆乳調製等の実用に際して有利である。また、ロール破碎により得られた生大豆粉は、衝撃式粉碎等による大豆粉に比較して空気との接触が少なく、短時間に粉碎されることから、大豆中に含まれる油脂の酸化も低く、酸化酵素による青臭みに代表される大豆臭や着色も保存期間を通じ低く抑えられていたと考えられる。市販生大豆粉の1%メタロール抽出液の着色度（OD420-740）が0.07であるのに対し、ロール破碎生大豆粉では0.04であった。

大豆のロール破碎による粉末化のもう一つの特徴は、外皮を含んだままの原料や脱脂大豆でも容易に脱皮丸大豆と同様に均質な粉末が得られることである。大豆重量の約8%にも達する非常に硬い組織を有する大豆外皮は、通常、除去され、飼料等の食品以外に利用されるが、予め原料重量の5%の大豆油を添加、混合することにより、外皮を含んだままの大

豆も容易にロール破碎することが可能であり、滑らかな食感を有する食品用大豆粉が得られた。大豆油は、大豆粒子の流動性を向上させ、ロール面への接着を防止する目的で添加したが、菓子用離型剤も同様の効果があった。脱脂大豆を原料とする場合は、原料重量に対し13%の大豆油の還元が必要であった。

これらロール破碎を行った生大豆粉は、酸素透過性の低い容器に密封し、製品となるが、製品の品質は室温でも数ヶ月は安定であり、低温保存によりさらに長期に維持された。普通、大豆粉末では、細胞内顆粒の破壊による成分相互間の反応、酵素作用の促進により、タンパク質の不溶化等の経時変化が著しく起こることが知られている¹¹⁾が、ロール破碎では大豆組織の破壊の程度は、他の粉碎法に比べ低く抑えられ、保存性が向上したものと考えられる。

3. ロール粉碎大豆粉の利用適性

ロール粉碎により得られた生大豆粉は、タンパク変性、油脂の酸化、大豆臭、着色が少なく、加水状態での使用において良好な分散性、均質性、滑らかな食感を示すことから、従来からパンや麺類など一部の食品に利用が制限されていた生大豆粉の利用¹²⁾を拡大する可能性がある。そこで、ロール破碎生大豆粉の豆腐類、豆乳、パン、麺、アイスクリーム、ソーセージ、水産練り製品、菓子類、惣菜への利用適性について調査した。

その結果、小麦粉の4%をロール破碎生大豆粉で置き換えた食パンでは、市販のパン用生大豆粉に比べ、焼き上がりが白く、膨化状態も良好であった。また、小麦粉の10%を置き換えたうどんにおいても、市販品添加の場合に見られる着色は、低く抑えられ、つやともちもちとした食感が特徴的なめん線が得られることが分かった。

さらに、全粒豆腐、あげ、麻婆豆腐、豆腐ソーセージ、豆腐ハンバーグ、豆腐ドーナツ、豆腐アイス、豆乳ヨーグルト、生大豆粉入りさつま揚げ、生大豆粉入りせんべい、呉汁の

表2 各種生大豆粉末を利用した豆腐^{a)}の性状

番号	原料大豆粉		豆腐の性状		
			性状, 食味	破壊強度 ^{b)} (g/cm ²)	総合評価 ^{c)}
1	脱皮丸大豆	ロール 破碎	凝固性良好, 切り口ツルツとして いる。食感滑らかで, 市販充填 豆腐に近い味。	84	○
2	脱皮丸大豆 +大豆油5%	〃	外観, 食感ともに滑らか, 弱い油 臭あり。	45	○
3	皮付丸大豆 +大豆油5%	〃	やや脆く, 少しざらついた食感, 独特な渋みあり。	44	△
4	脱脂大豆 +乳化剤 ^{d)} 30%	〃	凝固性良好, 食感は滑らか。粉 臭と僅かな油臭を感じる。	56	△
5	(脱皮丸大豆 +脱脂大豆) +乳化剤30%	〃	食感は滑らか。クリーム色。僅か えぐ味あり。	54	○
6	脱皮丸大豆	衝撃粉 砕	きめ荒く, ざらつき感強い。脆く, えぐ味あり。	51	×
7	市販充填豆腐			99	○

a) ロール破碎した各種生大豆粉に3倍量の水を加え, ミキサーにて均質化した懸濁液を, 予め沸かした熱湯中に6wt/vol%濃度となるように流し入れ, 20分間で90℃まで液温を上昇させ, 熱水可溶性蛋白質を溶出させた。その後, 液の温度を40℃まで下げ, 少量の水に溶いた市販の充填豆腐用の凝固剤カルグルコNFを大豆粉分散液に対し0.3wt%加え, よく攪拌混合した後, 透明プラスチック袋に密封した。これを, 85℃の温湯に30分間漬けて, 凝固させた後, 流水で冷却した。

b) レオメータによる破壊応力を測定した。

c) パネラー5名による官能検査により行った。良い:○, やや課題あり:△, 悪い:×とした。

d) 乳化剤は, 製菓パン用離型用剤デコレU700, 横浜油脂工業(株)を使用した。



図4 ロール破碎物を利用した各種食品

素等, 従来は廃棄していたおからや大豆外皮等の大豆成分を含んだ新しいタイプの食品を開発することができる知見を得た。ロール破碎生大豆粉を利用した各種食品の試作例を図4に示す。

この内, ロール破碎により得た各種生大豆粉を利用した全粒豆腐の評価結果を表2に示す。豆腐は, 原料大豆粉の成分を全て含む充填豆腐とした。ロール破碎した大豆粉を使用したものは, 力学的強度は, 市販品に比べや

や落ちるものの, 滑らかな食感であり, おから分や大豆外皮に由来する独特のえぐ味や渋みは食味を大きく損なうほど強くなかった。また, 外皮やおから分を含んだロール破碎大豆粉を利用したあげでは, 全粒豆腐に見られたえぐ味や苦味は全く感じられず, 通常のあげにはない特徴的な食感を持つものになった。

4. おわりに

大豆のロール粉碎では, 大豆粒子は2本のロールの周速差によって極めて短時間に引き裂かれ, タンパク質の変性, 油脂の酸化を抑えた状態で, 微小細胞構造が均質に破壊される。そのため, 得られた生大豆粉は, 食感も滑らかで, 大豆臭が少なく, 従来の生大豆粉にない幅広い利用適性を有するものであり, ガスバリアー性の高い容器に密封することにより長期に品質が保たれることも分かった。また, ロール粉碎の処理量は, ロール長, 最終ロールの周速, 薄膜層の厚さにより決まるが, 大豆粒子は弾性を持つのでロール間隙より大きな1mm大の粗碎大豆粒子であっても圧出可能であり, 量産化も容易である。将来, 小麦粉のような様々な調理に使える家庭用生大豆粉が商品化されることも期待された。

文 献

- 1) 齋尾恭子 (2000), 食品と科学, 42 (8), 75-80
- 2) 高松清治 (2000), 食品と科学, 42 (8), 81-85
- 3) 福島男児ら (2000), 食品工業, 43 (18), 18-66
- 4) 齊藤英一 (1982), 特公昭57 - 1448, とろふの製法
- 5) 菅原茂友ら (1989), 特開平1 - 124361, 豆腐製造用生粉の製法
- 6) 矢崎達雄 (2000), 特開2000 - 102357, 全粒大豆を用いた大豆加工食品およびその製法

(以下, 26頁へ続く)

◀文献情報▶

移植卵巣の生殖能—移植用
器官の凍結バンクの実現化
にむけて—

Fertility after intact ovary transplantation—
Frozen banking of whole organs for trans-
plantation is starting to look feasible—

Xiang Wang¹, Huifang Chen¹, Hang Yin², S.
Samuel Kim³, Seang Lin Tan², Roger G.
Gosden²,

¹Laboratory of Experimental Surgery,
Centre Hospitalier de l'Université de
Montreal, Notre-Dame Hospital, Montreal,
Quebec H2L 4M1, Canada, ²Department of
Obstetrics and Gynaecology, McGill Univer-
sity, Royal Victoria Hospital, Montreal,
Quebec H3A 1A1, Canada, ³Department of
Obstetrics and Gynaecology, University of
Washington School of Medicine, Seattle,
Washington 98105, USA

Nature 415, 385 (2002)

現在、器官の外科的移植はドナーからの供
給量および提供された器官の保存性により制
限されている。凍結器官の移植が可能になれ
ば、これらの技術は飛躍的に普及すると考え
られるが、現在のところまだ成功していない。
著者らは凍結したラットの卵巣の器官移植を
行い、これらの卵巣から胎仔を得ることに成
功した。

麻酔したLewis成熟雌ラットの片側の卵
巣、卵管および子宮の上部を大動脈と静脈の
一部と共に取り出し、ヘパリン処理し卵巣周
辺を摘出した同系ラットのレシピエントに、
これらを血管および子宮を縫合し移植した。
一方で同様の方法で摘出した卵巣周辺器官を
0.1 Mフルクトースと0~1.5 M（徐々に濃度
を上げていく）ジメチルスルホキシドを含む
M2培地で30分間還流し、緩慢冷却した後、
液体窒素で凍結した。液体窒素内で一晚放置
した後、素速く融解し、再び還流により卵巣
内の耐凍剤を除去し、同様の方法でこれらを

移植した。移植4週間後に、それぞれのレシ
ピエントラットの性周期を確認し、一部のラ
ットで交配試験を行った。移植10週間後に安
楽死させ、血中のFSHおよびエストラジオ
ール-17βの濃度を測定した。さらに移植し
た卵巣の組織観察を行った。新鮮なままの卵
巣器官を移植したラットは全て性周期を再開
し、卵胞発育、子宮重量および血中FSH濃
度は対照区のラットと変わらなかった。一方、
凍結卵巣器官を移植したラットのうちの57%
(4/7匹)で発育卵胞がみられ、最近排卵した
後の黄体を確認した。このうちの1匹は交配
試験により妊娠し、2匹の正常な胎仔を得た。
凍結卵巣器官を移植したグループは、対照区
と比較し、血中FSH濃度が高く、エストラ
ジオール-17β濃度は低く、わずかな発育卵
胞がみられ、子宮重量は低かった。これらの
結果は、凍結による血管内の氷形成によるダ
メージのためと考えられた。

生殖器官の凍結バンクは絶滅危機にある品
種の動物や化学治療により生殖能を失う可
能性のある女性の子孫維持のために有効である。
今後は耐凍剤の毒性を最小限にする検討など
のさらなる凍結技術の開発が課題であろう。
(抄訳：木村直子, KIMURA Naoko, 東北大
学大学院農学研究科)

◀文献情報▶

酵母によるsiderophoreの
取り込み

Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae*
Olga Protchenko, Tracy Ferea, Jared Rashford, John Tiedeman, Patrick O. Brown, David Botstein, Caroline C. Philpott, Liver Diseases Section, NIDDK, National Institutes of Health

J. Biol. Chem., 276 (52), 49244-49250 (2001)

環境中の鉄はほとんどが不溶性のFe(Ⅲ)水酸化体として存在するため、鉄のbioavailabilityはとても低い。そこで生物は、Fe(Ⅲ)をより水溶性の高いFe(Ⅱ)に還元したり、siderophore(微生物が生産する鉄キレートペプチド)に結合させて取り込むなどの戦略をとっている。酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)は自分ではsiderophoreを作らないが、他の生物が作ったsiderophoreは取り込んで利用することがこれまで知られていた。今回、siderophoreの摂取を促進する酵母細胞壁タンパク質について報告した最近の論文をご紹介します。

生体にとって鉄は必須元素であると同時に濃度が高くなると毒にもなりうるため、鉄摂取に関わる遺伝子の発現は厳密に制御されている。酵母も例外ではなく、酵母は環境中の鉄濃度が低くなると、これらの鉄摂取に関わる遺伝子の発現を増やして対応する。そこでこの論文の著者らは鉄摂取に関わる遺伝子を同定するために、鉄欠乏時及び鉄摂取に関わる遺伝子を制御しているAFT1の活性化型の変異株で発現が増加している遺伝子をcDNAマイクロアレイにより検索した。その結果、機能未知の3つの遺伝子が同定できたので、これらをFit1-3と命名した。事実これらの遺伝子の5'側上流にはAFT1結合配列があった。これらのタンパク質のハイドロパシープロットを調べたところ、N末とC末に疎水性領域があったことから、これらのタンパク質

はGPIアンカータンパク質であると考えられた。実際、エピトープタグをFit1に付加して免疫抗体染色を行ったところ、細胞壁に局在していた。

Fit1-3が実際に鉄の取り込みに関与しているかを確認するため、Fit1-3の遺伝子破壊株を作成してsiderophoreの取り込みを調べた。その結果、これらの遺伝子の単独破壊株及び二重破壊株では酵母によるsiderophoreの取り込みが野生株に比べて少なくなっていることが確認された。また、細胞壁に保持されている鉄の量も、野生株と比べて単独破壊株及び二重・三重破壊株において減少していた。さらに、Fit1-3を破壊すると、細胞内でsiderophoreの輸送に関与していることが知られているArn1や、鉄を還元して取り込むFet3の発現が補償的に増加していた。これらの結果から、Fit1-3はsiderophoreの取り込みを促進していると考えられた。

今後、酵母によるsiderophore取り込みの全体像を明らかにするためには、Fit1-3がどのようなメカニズムでsiderophoreの取り込みを促進しているかを調べる必要があるだろう。

(抄訳：北垣浩志, KITAGAKI Hiroshi, 独立行政法人 酒類総合研究所)

◀文献情報▶

シロイヌナズナの突然変異体三量体Gタンパク質 β サブユニットは葉、花、果実形成に影響する

A mutant Arabidopsis heterotrimeric G-Protein β subunit affects leaf, flower, and fruit development.

K. A. Lease, J. Wen, J. Li, J. T. Doke, E. Liscum, J. C. Walker

Division of Biological Sciences, University of Missouri-Columbia, Columbia, Missouri 65211

The Plant Cell 13, 2631-2641 (2001)

Gタンパク質は、GTP結合タンパク質ファミリーの一つで、動物ではホルモンや神経伝達物質などが細胞膜上の受容体として結合して、細胞内にセカンドメッセンジャーを産出するときに情報の伝達・増幅因子として機能しているタンパク質である。受容体刺激の情報は、共役する三量体Gタンパク質をGTP結合型 α サブユニットと $\beta\gamma$ 複合体とに解離させ、活性化された α サブユニットまたは $\beta\gamma$ 複合体が、細胞内にセカンドメッセンジャーを生成するアデニル酸シクラーゼやホスホリパーゼなどの酵素活性あるいはイオンチャンネルの開閉を制御すると考えられている。3種のサブユニット中、最も分子量の大きい α サブユニットはグアノシン三リン酸(GTP)または二リン酸(GDP)との結合部位およびGTPの加水分解活性が存在する。また、 β サブユニットと γ サブユニットは常に会合状態にある。

以前より、植物の三量体Gタンパク質シグナルの機能は薬理的な研究から多く推論されており、三量体Gタンパク質シグナルがイオンチャンネルの制御、ジベレリンシグナル伝達、アブシジン酸シグナルなどで機能していることを示唆している。最近、イネとシロイヌナズナの三量体Gタンパク質 α サブユニットの機能欠損変異体が報告された。また、

シロイヌナズナにおいては過剰発現実験も行われており、発生上の機能についての知見が集まってきている。 α サブユニットの一方で、 β あるいは γ の機能獲得あるいは欠損変異体は報告されていない。したがって、植物におけるこれらのサブユニットの生理学的な重要性はいまだ不明である。

そこでこの論文では、レセプター様キナーゼERECTAのシグナル経路で機能する遺伝子の単離を目的とした遺伝学的スクリーニングが行われた。これらの変異体は*elk* (*erecta-like*) 変異体と名付けられ、5つにグループ分けされた。著者らは*ELK4*をポジショナルクローニングし、3量体Gタンパク質の β ユニットと推定されるAGB1をコードしていることを見いだした。そこで、*elk4*は*agb1*とした。*agb1-1*個体は*er*変異体で見られるのと同じ様な果実の表現型を示した。しかし、莖長ではWTのよりほんのわずかに短い*er*と区別ができ、小花柄ではWTよりわずかに長く、葉は*er*個体のよりも丸い形をしていた。分子学的解析から*agb1-1*はヌルな変異体であることが示唆された。AGB1のmRNAは調査したすべての器官で発現しており、長角果で最も高い発現を示した。*agb1-1*と*er*の二重変異体の解析からAGB1は、長角果の幅を制御するER発育経路で機能していることが示唆された。しかし、葉、莖の発育と同様、長角果の長さにも影響する様々な経路でも機能していることも示唆された。AGB1が器官の形の制御関与していることは、三量体Gタンパク質がシロイヌナズナの発育制御因子であることを示唆している。

(抄訳：春原英彦, SUNOHARA Hidehiko, 東京大学大学院 農学生命科学研究科)

◀文献情報▶

プロスタグランジンD合成酵素により誘導される腎臓尿細管細胞のアポトーシス

Prostaglandin D₂ synthase induces apoptosis in pig kidney LLC-PK1 cells

John K. Maesaka, Thomas Palaia, Linda Frese, Steven Fishbane, and Louis Ragolia
Department of Medicine, Division of Nephrology, Winthrop University Hospital, Mineola, and SUNY Medical School at Stony Brook, New York, USA

Kidney International, 60, 1692-1698 (2001)

リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素 (PGDS) はプロスタグランジンH₂ (PGH₂) をプロスタグランジンD₂ (PGD₂) に変換する酵素であり、β-トレースの名でも知られている。リポカリンとは、低分子の脂溶性生理活性物質を輸送する蛋白の遺伝子群の総称であるが、PGDSは、レチノイドの輸送機能を保持し、さらに酵素機能を併せ持つ多機能蛋白である。また、PGDSは腎不全患者の血中で増加することが知られていたが、最近では、尿中でも腎疾患の早期から増加することが明らかになってきており、腎疾患との関連が注目されている。

PGD₂の生理作用としては、睡眠誘発、血小板凝集抑制、血管拡張、PGE₂で惹起される痛覚過敏反応の抑制、そしてアレルギーや炎症反応に関与することが報告されている。また、PGD₂はPPAR γ のリガンドである15-デオキシ $\Delta^{12,14}$ PGJ₂(15-dPGJ₂)の前駆体でもある。

アポトーシスは、慢性あるいは急性の腎障害の過程で認められ、腎障害に何らかの形で関与していると考えられるが、著者らは、ブタ尿細管上皮細胞由来のLLC-PK1細胞を培養して、PGDSのアポトーシスに対する影響をTUNELアッセイ、annexin V染色により調べた。LLC-PK1細胞を75%コンフルエンスの状態、PGDSとともに24時間インキュベートしたところ、0~200 μ g/mlの濃度範囲

で用量依存的にアポトーシスが6倍程度まで増加した。このアポトーシスは、抗PGDS抗体や、PGDS酵素活性の阻害剤である亜セレン酸ナトリウム、あるいは、PGH₂を産生するシクロオキシゲナーゼ-2の阻害剤によりPGDS無添加とほぼ同等まで抑制され、PGDSにより誘導されていることが確認された。また、アポトーシス誘導剤として知られるcamptothecinによって誘導されるアポトーシスでは、これらの薬剤によるアポトーシスの抑制効果は認められなかった。

PGD₂と相反する生理作用を多く示すPGE₁やPGE₂をLLC-PK1細胞の培地に添加すると、PGDSに誘導されるアポトーシスを抑制した。しかし、PGD₂とPGE₂の共通の前駆体であるPGH₂はこのアポトーシスを抑制しなかった。一方、インスリン様増殖因子I、あるいは、インスリン、血小板由来増殖因子をそれぞれは無血清培地に添加したところ、これらのすべての増殖因子はPGDSに誘導されるアポトーシスを抑制した。また、PGD₂あるいは15-dPGJ₂の単独添加でもアポトーシスは3~4倍程度まで増加した。

これらの結果から著者らは、PGDSの酵素活性により産生されたPGD₂あるいはその代謝物がアポトーシスを誘導しているか、あるいは、PGH₂の減少によってアポトーシスが誘導されているものとしている。また、腎機能の低下によるPGDSの蓄積が、腎障害を悪化させる可能性があることと、この機序が、おそらく他のプロスタグランジンや増殖因子によって制御されていることを指摘している。

アポトーシスは、組織を保護するために誘導されていることも考えられるため、PGDSが著者らの述べるように腎障害を悪化させる可能性があるのか、逆に、アポトーシスを介して腎保護的に働くのか、腎障害に果たす役割に興味もたれる。いずれにしても、PGDSは糖尿病性腎症などにおいて、早期腎症の診断マーカーとしても期待されており、今後のさらなる研究発展が望まれるところである。(抄訳：土田貴正, TSUCHIDA Takamasa, マルハ株式会社 中央研究所)

◀海外便り▶

水分ストレス下の樹木における木部形成時に 発現する遺伝子の解明

—スウェーデン・スウェーデン農業科学大学における1年間—

独立行政法人・森林総合研究所

安 部 久

1. はじめに

2000年9月からの1年間、科学技術庁長期在外研究員としてスウェーデンのウメオ市にあるスウェーデン農業科学大学において研究を行う機会を得た。ウメオ市は首都ストックホルムから北へ約700km、飛行機で約1時間の北緯約64度に位置し、人口は12万人程度、町にはスウェーデン農業科学大学の他に総合大学のウメオ大学がある大学町である。ストックホルム、ヨーテボリ、マルメといったスウェーデンの大都市のほとんどが南部に位置しているため、ウメオ市は北部の中心都市といった感じである。スウェーデン農業科学大学は、スタッフ、学生含めて6500人程度の大学で本部はウプサラにある。ウメオには森林学部の大部分と水生生物学科がある。筆者は森林学部の森林遺伝・植物生理学科で在外研究を行った。

多くの人が想像するようにスウェーデンは森林国であり、森林は国土の70パーセントを占める。国土は日本の1.2倍、人口は約900万人で15分の1、森林の割合は同程度であるが、表土の浸食が進み、急峻な山地がほとんどない。そのため日本のような急峻な奥山での困難な林業とは異なり、大型で高性能な林業機械の使用が可能になり、木材の伐採、搬出等が容易である。また、豊富な森林蓄積量を背景に林業やその関連産業はスウェーデンの大きな産業の一つになっているため、研究も進み、スウェーデンは森林関連研究の先進国となっている。

ABE Hisashi

〒305-8687 茨城県稲敷郡基崎町松の里1



図1 スウェーデン農業科学大学林学部の全景

2. 在外研究について

筆者が在外研究を行った森林遺伝学・植物生理学科には約80人が所属していた。外国人のポストドクが約15人（うち日本人5人）いたことは、学科に国際的な知名度と競争力があることを意味している。筆者の受け入れ研究者のBjörn Sundberg教授らのグループは、植物ホルモンの微量定量やその移動経路と作用機構に関する研究を行っているほか、EUのプロジェクトで、交雑ヤマナラシの木部形成に関与する遺伝子のcDNAライブラリーを作製しており、近年、その中でも細胞壁関連のいくつかの酵素の遺伝子について集中的研究を行っている。

筆者は樹木の木部細胞の拡大に関して研究を行っていた。木部細胞の大きさは木材の物理的性質に影響を及ぼし、細胞形態は木材材質の遺伝的指標となりうるため、木部細胞が拡大するメカニズムを探ることは、木材の材

質改良を模索する上でも非常に重要である。植物細胞は拡大する際に水を必要とし、植物の水分状態は細胞の拡大に影響を与える一方、植物細胞壁の物理的性質も重要な要素である。筆者は本在外研究を通して、木部細胞の拡大に影響を及ぼすと考えられる酵素の遺伝子発現について顕微鏡的な解析手法を確立し、それによって発現パターンを解析した。交雑ヤマナラシから単離された酵素遺伝子の中で、筆者は主にExpansin (PtExp1) に関して解析を行った。Expansinは細胞壁作用性の酵素で、細胞壁のゆるみを生じさせることが知られており、細胞の拡大と密接な関係があると考えられている。この遺伝子が、樹木の幹の組織においてどのような役割を果たしているかは不明であり、筆者はこの遺伝子の組織的な分布について、in situ RT-PCR法を用いて解析した。

この方法は、従来用いられていた in situ ハイブリダイゼーション法と異なり、切片作製までの工程が短く、RNA分解酵素非存在状態での操作が短時間ですむため、比較的容易に結果がえられる。また、この方法では複数の遺伝子の解析が短期間で可能であり、樹木組織への応用も期待できる。これまでの in situ ハイブリダイゼーション法の木部細胞への応用例では、木化した細胞壁へのプローブの非特異的な吸着が多く報告され、木部細胞における遺伝子発現解析の障害となっているため、筆者が in situ RT-PCR法の適用を試みる場合にもプローブの非特異的な吸着が予想されたので、それを防ぐための方法も検討した。交雑ヤマナラシの樹幹を用い、細切後、固定、切片化、RT-PCRの工程を経て観察を行ったが、このうち固定液、切片化手法、RT-PCR条件について最適な条件を、rbcS, 26S rRNA, 遺伝子を用いて検定し、さらにPtExp1を用いて発現パターンを解析した。

実験で得られた最適条件下で in situ RT-PCR法を行ったところ、解像力の高い良好な結果が得られた。ネガティブコントロールや細胞壁等での非特異的なシグナルが見られず、また、RNA分解酵素処理した試料でシ

グナルが殆ど見られなかったことから、得られたシグナルはターゲットRNAに由来するものであると確認された。細胞の肥大成長に関与しているPtExp1の発現は形成層および細胞拡大帯にある細胞に限られていた。これらは既に報告されている発現パターンと一致し、in situ RT-PCR法の信憑性を裏付けるものとなった。また、この遺伝子は樹木の二次木部細胞の細胞分裂・拡大と大きな関係があることが示唆された。本在外研究で、液層状態での in situ RT-PCR法の樹幹組織へ適用する場合の最適条件が得られたことは、今後樹木の遺伝子の機能解明を進めていく上で、多くの研究に応用されることが期待できる。

3. スウェーデンにおける研究生活

筆者はスウェーデン滞在の全般において独特の言葉や文化に接する機会を多く得た。日常生活においても英語は良く通じたが、生活していく上での細部の交渉や、実験室内での名称等を把握するにはスウェーデン語を必要とし、友人に通訳を頼む必要もあった。片言ではあるがスウェーデン語を話そうとするとコミュニケーションが円滑にいく場合が多く、英語ばかりでなく在外研究先の母国語を身につけることの重要性を強く感じた。実験室ではある程度の競争的な雰囲気があったが、研究資金を獲得してくる教授、助教授は結果如何によっては給与もなくなるため、かなりシビアな立場におかれていたようである。獲得できなくても他の研究者から補助してもらって、研究の下請けをするなど、最終的な手段もあったようである。周囲の人々はとても親切で、筆者自身分子生物学的手法を用いて研究するのは初めてであったが、分からないことは何でも聞きやすい雰囲気であった。また、スウェーデン語の通訳を頼む際も、快く引き受けてくれる人が多かった。それもこれも困っている人は助けるという国民性からきているようである。

ミーティング、ゼミは多く、週に3回程度あった。ゼミにも、最新の文献を紹介するも

ニケーションの場になっていた。

4. おわりに

スウェーデンは農林業国である一方、ノーベル賞を主催する科学国でもある。物質的に決して豊かな国とは言えないが、個人を尊重しながらみんなで力を合わせて生活しているという雰囲気がある。スウェーデンは高福祉国で有名である。我々ですら滞在期間中、医療や福祉、語学習得の面でその恩恵を受けることが出来た。それに加えて、高齢化問題、難民問題等で、税金はかなり高い。それでも国民はそれを受け入れているのは、税金の使い道がはっきりしていて、国民の意見も尊重されやすいためだろうか。政治への関心も高い。我が国でも共通の問題が多く、これからの我が国が見習わなければならない国の一つでもあるような気がする。

最後に、このように大変貴重な在外研究の機会を与えていただいた科学技術庁（当時）、農林水産省及び森林総合研究所の関係者の皆様にこの場を借りてあらためてお礼を申し上げます。



図2 夏至祭のメイポール。夏至祭には、市民が広場に集まって祝う。これから夏休みがはじめる。

の、自分の研究の進行状況を紹介するものなどがあつた。発表における使用言語は英語であつたが、学科内の一般的な情報交換はスウェーデン語で行われた。毎日恒例の午前10時と午後2時にコーヒータイムがあり、コミュ

生研機構からのご案内

平成14年度各種募集について

生研機構で実施している以下の事業について、それぞれ課題等の募集を開始する予定ですのでご案内致します。なお、募集要領・様式などの詳細については、インターネットのホームページ (<http://www.tokyo.brain.go.jp/>) においてご紹介しておりますのでご覧下さい。

生研機構のホームページに関するお問い合わせは、企画第一課（電話 03-3459-6565, e-mail ; kikaku@tokyo.brain.go.jp）へお願いします。

新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業

1. 事業の趣旨

「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」については、農林水産業、食品産業等生物系特定産業の分野において、生物の持つ多様な機能を活用することにより、新技術・新分野を創出し、それを通じて農林水産業の発展、地球規模での人口問題、食料問題、環境問題の解決等に資するため、将来の産業技術のシーズとなる基礎的な試験研究を提案公募により実施しています。

平成14年度については、研究者の対象年齢を制限しない「一般型」、及び39歳以下の若手研究者を対象とした「若手研究者支援型」の新規研究課題を下記により募集します。

2. 対象とする研究分野

- ① 生物機能解明・生産力向上分野
- ② 高機能・高品質食品分野
- ③ 生物系素材分野
- ④ 生物機能利用による環境改善分野
- ⑤ 工学・環境学的手法による生物機能向上分野
- ⑥ 共通基盤に関する研究分野

3. 応募資格

大学、国公立試験研究機関、独立行政法人、民間の研究機関等、生物系の産業技術に関する基礎研究を実施する能力のある機関に所属する研究者（研究チームの代表者等）であること。

*「若手研究者支援型」については、研究代表者を含む研究チームの構成員の年齢が、平成14年4月1日において39歳以下であること。

★以下の事項に該当の場合は応募できません。

- ◎本事業において、現在採択されている研究課題の代表者（総括研究代表者及び構成する課題の研究代表者）。
- ◎他の特殊法人等が政府出資金等により実施している基礎研究推進制度において、既に採択されている研究課題の研究代表者。
- ◎本事業の本年度募集において、別の研究課題で応募する研究代表者（同一型、及び「一般型」と「若手研究者支援型」の重複応募はできません）。

4. 研究期間：原則として、3～5年間。

5. 研究費の規模：1課題当たり年間1億円程度を上限とし、研究の内容に応じて弾力的に運用します。

6. 採択予定課題数

- 「一般型」：7～8課題程度。
- 「若手研究者支援型」：数課題。

生研機構からのご案内

7. 研究課題選定の方法

学識経験者で構成する課題選考のための委員会が、①書類審査により課題を絞り、②面接審査を行い採択候補課題を選定します。

8. 契約の締結

国立試験研究機関とは共同研究契約を、大学等それ以外の研究機関とは委託研究契約を締結します。

9. 研究成果の取扱い

本研究の成果として得られた知的所有権については、原則として生研機構と研究実施機関との均等共有とします。

10. 応募期間：平成14年4月1日(月)～4月30日(火)。

☆今後のスケジュール：4月30日 応募締切

5月頃 第一次審査（書類審査）

6月頃 第二次審査（面接審査）

7月頃 採択課題決定

☆応募要領・様式：生研機構のホームページよりダウンロードできます。

《お問い合わせ先》基礎研究課（担当：渡辺，高瀬）

電話 03-3459-6569 FAX 03-3459-6594 e-mail: kisoken@tokyo.brain.go.jp

新事業創出研究開発事業「地域型」

1. 事業の趣旨

生研機構では、豊で健康な食生活と安心して暮らせる生活環境の実現を基本テーマとして、生命科学等の分野を対象に、民間企業を主体とした産学官のコンソーシアムを形成し、新事業、新雇用の創出を目指した新事業創出研究開発事業に取り組んでいます。

このような中、地域における新事業の創出及び産業発展基盤の形成のためには、我が国の各地域の多様な資源と人材を活用し、地域に根ざした研究開発を産学官の連携により抜本的に強化することが喫緊の課題となっています。

このため、特に地域特性を活かした研究分野を対象に、民間企業を主体とした地域研究共同体（地域コンソーシアム）を形成し、地域における新事業、新雇用の創出につながる研究開発を推進する新事業創出研究開発事業（地域型）を実施し、平成14年度においても新規課題を募集します。

2. 事業の対象範囲

地域特性を活かした新事業の創出が期待される研究分野であって、地域資源の有効活用やこれらを用いた高機能・高品質食品の開発等の農林水産関連分野、食品分野等を対象とします。（食品以外の生産資材等の開発分野を含みます）。

3. 応募資格

地域コンソーシアム（地域研究共同体）を形成して応募していただきます。地域コンソーシアムには

- ① 対象地域を設定し、その対象地域内に研究対象となる資源（材料等）があること。
- ② 複数の民間企業の参加を必須とし、大学、独立行政法人、公立試験研究機関等のいずれかの参加。
- ③ 地域コンソーシアムを代表する技術コーディネーターの設置。

を条件とします。また、技術コーディネーター等にも要件を設けております。

生研機構からのご案内

4. 研究期間：原則として5年間。
5. 研究費の規模：初年度は地域コンソーシアム当たり6千万円を上限に設定。
6. 応募締切：平成14年4月30日(火)〔必着〕。
7. 成果の取扱い
本研究の成果として得られた知的所有権については、原則として生研機構と研究実施機関との均等共有とします。
8. その他
国立大学及び独立行政法人におけるポストク等の雇用は、各機関の規定に基づいて各機関で行うこととします。

☆当面の予定：3月1日～11日 説明会（東京、京都、福岡、札幌、仙台）
4月30日 応募締切
5月頃 第一次審査（書類審査）
6月頃 第二次審査（面接審査）
7月頃 採択課題決定

☆応募要領・様式：生研機構のホームページよりダウンロードできます。

《お問い合わせ先》技術開発課（担当：田村，村井）

電話 03-3459-6567 FAX 03-3459-6577 e-mail: kaihatsu@tokyo.brain.go.jp

融 資 事 業

1. 事業の趣旨

企業等におけるバイオテクノロジー関係の試験研究に対する長期・低利の融資制度で、試験研究の成功度合いに応じて利率を減免する一般融資制度と、貸付元本を減免する特別融資制度があります。

2. 募集開始時期：平成14年3月～

《お問い合わせ先》 融資課

電話 03-3459-6565 FAX 03-3459-6566 e-mail: yushi@tokyo.brain.go.jp

編集後記

◆ブレインテクノニュース第90号をお届けします。本号の表紙には、阿部知子・吉田茂男（理化学研究所）、鈴木賢一・久住高章（サントリー基礎研究所）氏らの、高エネルギー重イオンビームによる植物の突然変異誘発を、栽培タバコを例に示していただき、併せてそれらの詳細を国内情報として紹介していただきました。

◆本号の総説は、タンパク質の生産工場としての生物工場（微生物工場、植物工場、昆虫工場、動物工場）の一端を担うトランスジェニック・ニワトリの作出（ES細胞の樹立）に向けた研究を、堀内浩幸・古澤修一・松田治男（広島大学）氏らにまとめていただきました。

◆そのほかの国内情報は、生物工場の具体例である「ポストゲノム時代のバキュロウイルスを用いたタンパク質生産系」を鈴木健夫氏（片倉工業株式会社中央蚕研事業所）に、また「体細胞クローン雄牛の精子テロメア長の正常性」について宮下範和氏（独立行政法人 農業生物資源研究所）、「納豆の糸引き成分の合成開始物質の発見と今後

の展望」を伊藤義文・木村啓太郎氏ら（独立行政法人 食品総合研究所）、「高温誘導性の活性酸素消去遺伝子で低温に強いイネを作る」研究を佐藤 裕氏（独立行政法人 北海道農業研究センター）猿山晴夫氏（北海道グリーンバイオ研究所）らにご紹介いただきました。地域研究として、大野彰一氏（社団法人 岡山県農業開発研究所）に「食感も滑らかで大豆臭の少ない生大豆粉の新製法開発」を、さらに海外便りとして阿部久氏（独立行政法人 森林総合研究所）に「水分ストレス下の樹木における木部形成時に発現する遺伝子の解明」を、また文献情報では木村直子氏（東北大学大学院）、北垣浩志氏（独立行政法人 酒類総合研究所）、春原英彦氏（東京大学大学院）、土田貴正氏（マルハ機中央研究所）にそれぞれご紹介いただきました。お忙しい中をご執筆下さった研究者各位に、改めて深謝申し上げます。

◆次号は、総説として搾乳牛の古くて新しい病気である「乳房炎」研究を取り上げる予定です。ご期待下さい。 （畠山記）

本誌著作物の複写利用等について

本誌掲載の論文・記事の複写・転載等を希望される方は、執筆者ならびに生物系特定産業技術研究推進機構（生研機構）の許諾を得て行って下さい。

ブレインテクノニュース（第90号）

平成14年3月15日発行

編集兼発行者 堤 英 隆

発 行 所 生物系特定産業技術研究推進機構（生研機構）

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3丁目18番19号 虎ノ門マリビル10F

TEL. 03-3459-6565 FAX. 03-3459-6566

e-mail kikaku@tokyo.brain.go.jp

URL <http://www.tokyo.brain.go.jp/>

©Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 2001



基礎研究推進事業 成果発表会

(平成13年度終了課題)

開催日：2002年3月18日(月)～20日(水)
場 所：東京国際フォーラム (ホールD)
 東京都千代田区丸の内3-5-1

入場無料

プログラム

第1日目 3月18日(月)

- | | | |
|-------|---|-------------------|
| 9:50 | イネのミュータントパネルを用いた遺伝子機能の系統的解析技術の開発と利用 | (農業生物資源研究所 廣近 洋彦) |
| 10:50 | イネQTLに関する遺伝子ネットワークのゲノム生物学的解明 | (農業生物資源研究所 佐々木卓治) |
| 11:40 | スギのゲノム解析とその高度利用に関する基礎的研究 | (森林総合研究所 長坂 壽俊) |
| 13:20 | ジベレリンの輸送・受容・シグナル伝達機構の解明とその制御技術の開発に関する研究 | (東京大学 山口五十磨) |
| 14:10 | 植物性染色体の全構造決定に基づく性制御技術の開発 | (京都大学 大山 完爾) |
| 15:10 | 植物における呼吸調節機構の解明とその機能制御 | (東京大学 平井 篤志) |
| 16:00 | エリクターシグナル伝達過程の解析に基づく高度環境適応性作物開発のための基礎研究 | (農業生物資源研究所 渋谷 直人) |

第2日目 3月19日(火)

- | | | |
|-------|---|------------------|
| 10:00 | 植物の情報シグナルによる植物-害虫-天敵三者間の免疫的相互作用(生態免疫系)に関する基礎研究 | (京都大学 高林 純示) |
| 10:50 | 微生物由来の環境保全型害虫防除タンパク質に関する基礎研究 | (岡山大学 酒井 裕) |
| 11:40 | 環境微生物の難分解性芳香族化合物分解能の多様性に関する分子生物学・分子生態学的研究 | (長岡技術科学大学 福田 雅夫) |
| 13:20 | 新規脱窒菌を用いたN ₂ O排出抑制型好気脱窒システムの構築と水処理への応用 | (東京大学 祥雲 弘文) |
| 14:10 | モノネガウイルス・レプリコン系の開発と応用 | (東京大学 甲斐知恵子) |
| 15:10 | 継代培養細胞を用いた家畜繁殖技術の開発に関する基礎的研究 | (近畿大学 角田 幸雄) |
| 16:00 | 消化管機能の分子生物学的解析と計画的食品設計 | (東京大学 加藤 久典) |

第3日目 3月20日(水)

- | | | |
|-------|--|-----------------|
| 10:00 | 特異性改変植物レクチンライブラリーの作成と細胞交通プローブとしての利用 | (東京大学 入村 達郎) |
| 10:50 | 超単分散性マイクロスフィアを用いた新規な分離場及び反応場の構築に関する基礎的研究 | (食品総合研究所 中嶋 光敏) |
| 11:40 | 分子擬態を利用した生物系素材の基礎研究 | (東京大学 中村 義一) |
| 13:20 | 食用植物由来の酸化ストレス制御因子に関する基礎的研究 | (名古屋大学 大澤 俊彦) |
| 14:10 | 金属タンパク質の界面電子移動制御と生物機能の高度利用 | (熊本大学 谷口 功) |
| 15:10 | 絹タンパク質の構造-物性相関の徹底解明と新しい絹繊維等の開発 | (東京農工大学 朝倉 哲郎) |

お問合せ先：基礎研究課 e-mail kisoken@tokyo.brain.go.jp
 TEL:03-3459-6569 FAX:03-3459-6594
 URL <http://www.tokyo.brain.go.jp>