

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

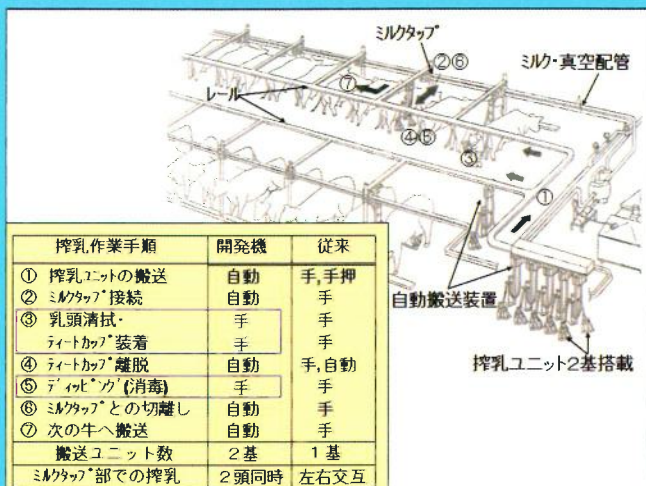
平成16年5月15日発行（隔月1回15日発行）
ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.103

15 MAY, 2004

ブレインテクノニュース



搾乳ユニット自動搬送装置の開発

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構
生物系特定産業技術研究支援センター

平田 晃・後藤 裕

目 次

総 説

- カイコゲノム全塩基配列の解読 1
三田 和英・佐々木 卓治 ([独] 農業生物資源研究所)

国内情報

- カイコゲノム中に散在するトランスポゾン 6
行弘 研司 ([独] 農業生物資源研究所)
- 昆虫ホルモンレセプター研究とカイコゲノム情報 10
塩月 孝博 ([独] 農業生物資源研究所)
- マイクロアレイの利用によるカイコの発現遺伝子の解析 13
野田 博明・三田 和秀 ([独] 農業生物資源研究所)
嶋田 透 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
- SuperSAGE法による真核生物の遺伝子発現解析 16
松村 英生・寺内 良平 ([財] 岩手生物工学研究センター)
- 遺伝子改変マウスの環境化学物質モニターへの応用 21
高橋 智・本橋 ほづみ・伊藤 健・依馬 正次 (筑波大学大学院・人間総合科学研究科)
- 搾乳ユニット自動搬送装置の開発 27
平田 晃・後藤 裕 ([独] 農業・生物系特定産業技術研究機構
生物系特定産業技術研究支援センター)
- 砂糖・エタノール生産のための株出多収性サトウキビ 32
(モンスターケーン) の開発 - 琉球弧における安定多収糖質作物生産 -
杉本 明 ([独] 農業・生物系特定産業技術研究機構 九州沖縄農業研究センター)

地域の先端研究

- ハナサキガニの完全養殖 36
橋高 二郎 (根室市水産研究所)
- 非病原性フザリウム菌を用いたサツマイモつる割病の防除 41
渡邊 健 (茨城県農業総合センター 農業研究所)

文献情報

- ウシ卵管内および子宮内の局所pH 46
S. Hugentobler et al. (*Theriogenology*, 61, 1419-1427, 2004) 抄訳: 下司 雅也
- 脂肪酸及び脂質を多く含む魚の摂取と中年層における認識能力の関係 47
S. Kalmijin et al. (*Neurology*, 62, 275-280, 2004) 抄訳: 高見 幸司
- 一酸化窒素は側根発生に関係している 48
N. Correa-Aragunde et al. (*Planta*, 218, 900-905, 2004) 抄訳: 岩井 純夫
- OXI1キナーゼはシロイヌナズナの酸化的バーストを介するシグナル伝達に必要である 49
Rentel MC et al. (*Nature*, 427, 858-61, 2004) 抄訳: 吉川 彰
草場 新之助 ([独] 農業・生物系特定産業技術研究機構 近畿中国四国農業研究センター)

- 生研センターからのご案内 (研究開発を対象にした一般・特別融資制度のご案内) 50

表紙写真説明

我が国で太宗を占める繋ぎ飼い式牛舎において、搾乳作業の省力化、大幅な作業能率の向上を比較的 low 額の投資で実現できる技術として、「搾乳ユニット自動搬送装置」が開発された。左の図は本装置の基本コンセプトをまとめたものであり、右の写真は本装置の設置の状況を示したものである。本装置の設置により、1人作業では1時間当たりの搾乳頭数は50頭前後と、設置前の2倍以上の能率を確保できることが分かった。詳細については、本誌27頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

カイコゲノム全塩基配列の解読

農業生物資源研究所ゲノム研究グループ

三 田 和 英 ・ 佐 々 木 卓 治

ホールゲノムショットガン法によりカイコのゲノム塩基配列情報が解読された。本方法の性質上、まだ多数の断片に分断されているものの、カイコゲノム5億塩基対のうち約80%に相当する配列が解読された。既知のカイコ遺伝子の配列と対応する配列は調べた限りすべて見いだされ、そのカバー率は20~100%であった。本配列情報を利用することでカイコを中心とした昆虫ゲノム研究が急速に進展するものと期待される。

1. はじめに

通称カイコは正しくは完全に家畜化された鱗翅目昆虫、家蚕 (*Bombyx mori*) を指す。その家畜としての歴史は古く、シルクロードと名付けられた、古代から現代に至るまでユーラシア大陸を横断する文化と物資の主要な流通経路に沿った地域の遺跡からの発掘品として多数の絹製品が見いだされていることから明らかである。しかし、その祖先種が何であったのか、あるいはどのような地域でいつごろ祖先種が家畜化されてきたのか、正確には分かっていない。おそらく人類が農耕に本格的に取り組み、主要な穀類や大型哺乳類が野生種から馴化されたと同時代の、今からおおよそ1万年前に繭を作るいくつかの野蚕の中から餌となる桑の栽培環境との調和からカイコの祖先種が選ばれたのであろう。この選択が賢明であったことは、その後の絹製品の布としての優秀さによる需要から、養蚕業が産業として一大発展をとげたことを見ればよく理解できる。

カイコはその絹糸生産能力を最大限に引き出すために国をあげての育種対象となり、わが国が優良品種作出に貢献した事例は多数知られている。もっともよく知られた例は一代雑種の固定であり、この結果により大型の繭が得られる

MITA Kazuei, SASAKI Takuji

〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2

ようになった。この事象は遺伝的には雑種強勢としてよく知られており、最近では大多数の野菜育種等に利用されている。このようにカイコは育種と同時に遺伝解析の対象として用いられ、メンデル遺伝の法則はわが国において1906年、カイコを用いて観察されていたことは、知る人ぞ知る有名な事実である¹⁾。この他、カイコ卵が示す休眠現象の生理生化学的研究による休眠ホルモン等の脳ホルモンの発見はカイコが実験素材として基礎科学の発展に大いに貢献した事例として忘れてはならない²⁾。

もちろん養蚕業はわが国の戦前の基幹産業であり、功罪両面に足跡を残している。しかし、人工繊維の普及とともに養蚕業は基幹産業ではなくなってしまった。これはコストや生産能力を考えれば当然といえるが、他方、絹糸が示す光沢や加工特性など、人工繊維が及ばない品質を考えると養蚕業が全く無価値になったわけではない。実際、世界規模での生産量はわが国での生産量の衰退と対照的に増加しているのである。この事実は絹の品質改良をめざすカイコの育種はまだまだ要望があることを意味する。さらには絹生産以上に現代のカイコ育種に期待される目標は新たな機能をもつカイコの産出である。従来、カイコに感染したタンパク質封入体を形成するウイルスを利用して、外来遺伝子由来の有用タンパク質を生産する系は確立されているが³⁾、カイコのゲノムそのものに外来遺伝子

を組み込む方がカイコ自体の特性が利用できる
ので望ましい方法である。カイコにおいて大量
に合成される絹タンパク質の発現系を利用する
試みがなされ、形質転換が成功している⁴⁾。また、
カイコは農業上深刻な被害を与えるヨトウ
ガを代表とする鱗翅目害虫のモデル昆虫とし
て、農薬の薬理機作あるいはホルモン作用の基
礎研究対象として用いられている。遺伝資源の
収集と保存も古くから行われている。

カイコはこのように基礎から応用まで多様な
用途をもつ生物であり、その詳細な遺伝情報の
獲得は今後カイコが一層その存在価値を發揮す
るのに欠かせない。これまでカイコのゲノム解
析はよちよち歩きではあるが、少しずつ進めら
れていた。しかし、平成15年度、一気にゲノム
塩基配列を読むプロジェクトが実行され、部分
的にではあるものの、カイコの遺伝情報がゲノ
ムワイドに入手可能となった (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/>)。この情報の詳細を述べるととも
に、これを利用して行えることと、今後さらに
付加すべき情報について解説する。

2. カイコゲノム塩基配列解読の実際

ゲノム塩基配列を解読する合理性は、遺伝情
報を正確に獲得することにある。ここでの正確
さは塩基配列自体の正確さのみではなく、その
配列がゲノムのどの箇所由来なのかという
位置情報も含んでいる。前者の情報は最新の高
速自動シーケンサー1台を稼働させれば1日で
約50万塩基対のデータの入手が可能であり、し
かも配列の精度の判定を行わせるコンピュー
ターソフトも利用できる。カイコのゲノムサイ
ズは約5億塩基対であるから、1000日間稼働す
ればカイコゲノムと当量の配列が得られる計
算になる。もちろん実際には多数の自動シー
ケンサーを用いるので数倍当量の配列データ
も短期間で得ることができる。この能力に大
きく依存するのが今回カイコでも用いられた
ホールゲノムショットガン配列解析法(WGS法)
である⁵⁾。具体的にはカイコ品種p50T(大造ともいう)

を用い、5令3日目幼虫の絹糸線細胞より
DNAを抽出し物理的剪断により断片とした後
に、2~3kbおよび7~10kbの画分を得る。
これらのDNA断片集団をプラスミドベクター
pUC18につなぎ、大腸菌DH10Bを形質転換す
る。そして形質転換体をランダムに選んで塩
基配列解析の鋳型DNAを得て、ひたすら次々
に高速自動シーケンサーによりそれらの両端
の塩基配列を読むのである。まさにショット
ガン法である。こうして、信頼できる品質と
判断された500塩基以上の長さの配列を合計
約284万個得た。この量はカイコゲノムの約
3当量に相当する。ここでは解析しているDNA
断片がカイコゲノムのどの位置由来したもの
かは皆目わからないし、WGS法の実行上知る
必要もない。それは後回しにするのである。

次に重要なことは280万個に及ぶ約500塩
基対の配列の重ね合せである。一般的にこの
操作は単にAGCTのデジタル信号を重ねるの
ではなく、シーケンサーが送り出す塩基配
列の電気泳動パターン(トレースファイル)を
重ねるのである。このことでより精度の高い
繋ぎ合わせが可能になる。さらに重要なこと
は、このように多数の配列の中からお互いに
重なり合う相手として拾い出された配列の信
頼度が高い、という点である。この信頼度を
高めるにはカイコゲノム中に存在する実
に多数の類似繰返し配列を正しく処置しな
くしてはならない。このような繰返し配列は
生物種ごとに特徴があり、この情報を重ね
合わせに用いるプログラムに組み込む必要
がある。われわれはRAMENと名付けられた、
わが国で独自に開発されたプログラムを用
いて正しい重ね合わせを試みた。その結果、
最大19kb、平均長1,790bpの重ね合わ
された塩基配列(コンティグという)が約
213,000個得られた。また、鋳型DNAの
塩基配列がすべて読まれていないために
完全には重ね合わされないものの、両端
の配列がコンティグ間をまたいでおり
繋ぎ合わせることができた塩基配列(スキ
ャフォールドという、AGCT以外に未解読
のNを含む)が約49,000個得られている。
最長のスキャ

表1 RAMENプログラムによるWGS塩基配列データの繋ぎ合わせ結果

総解読数	2,843,020
2~3kb 断片の解読数	2,166,908
7~10kb 断片の解読数	676,112
総コンティグ数	213,289
コンティグ最大長	19,243bp
コンティグ平均長	1,790bp
総スキュフォールド数	49,345
スキュフォールド最大長 (Nを含む)	224,537bp
スキュフォールド平均長 (Nを含む)	10,415bp
総スキュフォールド内塩基数 (Nを含む)	513,919,331bp
スキュフォールド最大長 (Nを除く)	215,846bp
スキュフォールド平均長 (Nを除く)	7,843bp
総スキュフォールド内塩基数 (Nを除く)	386,552,210bp

フォールドは220kb, 総計長は400Mbと見積もられ、カイコゲノムサイズ500Mbの約80%が解読(あるいは潜在的解読)状態となった(表1)。

3. 解読された遺伝情報の品質

解読された塩基配列の精度はどうであろうか。この検証は、すでに同一カイコ品種のDNAを用いて別途きちんと解読した塩基配列とWGS法で得られた塩基配列を、厳しい判定基準により比較することで行った。表2に示すように5種類のBACクローンに対する比較結果をみると、BACの総計配列658kbの82%がWGS法で得られたコンティグの塩基配列とほぼ正しく対応していることがわかった。ここで対照として選ばれたBACクローンはカイコゲノム中から繰り返し配列の割合が低い、配列解読の容易なものであることを考慮しても今回WGS法で得られた塩基配列の精度の高いことがわかる。

次に、得られた塩基配列がこれまでクローン化されたカイコ由来の種々の遺伝子をどの程度含んでいるのか検討し、本情報利用による遺伝

子発見の可能性を探った。表3にその結果の一部を示したが、データベースに登録された50個の既知遺伝子が全くWGS法で得られた配列中に見いだされなかった例はなく、最も対応する配列領域割合が低かったフィブロイン重鎖の16%からフィブロイン軽鎖、エクダイソン受容体B1,あるいはトレハレースのように100%その配列がWGS配列に対応した例まで観察された。大多数は60%以上の領域で対応配列が観察され、フィブロイン重鎖の例はその特殊な繰り返し塩基配列が、RAMENプログラム適用前に行ったWGSデータから繰り返し配列を除去する操作により除かれてしまった結果によるものと推察された。

上記2法による検定から、WGS法で得て、RAMENプログラムにより重ね合わせた塩基配列は、今後のカイコゲノム研究の第一段階で用いる資源として十分利用価値がある、と判断された。

4. おわりに

今回行ったWGS法による塩基配列解析結果

表2 既に塩基配列決定が行われたBACとWGS法による配列との比較

BAC クローン名	染色体	塩基数 (bp)	BAC の配列上に並べた WGS 法 配列の塩基数 (bp)	カバー率 (%)
4L14	Z	159,412	132,610	83.1
12L03	Z	159,882	132,292	82.7
544H24	2	204,881	160,272	78.2
559G11	11	149,562	129,540	86.6
534E24	13	124,898	103,961	83.2
Total		798,635	658,675	82.5

表3 WGS配列中に見出された既知遺伝子と対応する配列例とそれらのカバー率

遺伝子名	塩基数(bp)	対応 WGS 配列塩基数と対応率(%/bp)	WGS 配列での カバー率(%)
フィブロイン重鎖	15,792	99.5/2515	16
フィブロイン軽鎖	789	98.9/789	100
セリシン 1A	2,340	97.2/1414	60.4
トレハラーズ	1,740	99.0/1740	100
ピテロジェニン	5,349	98.7/5320	99.5
エクダイソン受容体 B1	1,632	99.4/1632	100
アディポキネティックホルモン受容体	1,893	97.6/1819	96
コラゾニンプレプロ前駆体	862	98.9/657	76.2
幼若ホルモンエポキサイドヒドロラーゼ	1,386	98.5/1369	98.8
前胸腺刺激ホルモン	675	98.5/673	99.7

は、地図情報を全く含んでいない。得られたコンティグあるいはスキュフォールドはゲノム中のどの箇所に由来するものなのか、皆目わからないのである。これでは最初にも述べたように正確な塩基配列情報とはならず、今後広くカイコの遺伝解析や育種研究にこの情報を利用する際に必ず不便さを思い知ることになる。では、WGS法で得られたデータの位置情報はどのようにして得られるのか。答えはただひとつ、塩

基配列が明らかな目印（マーカー）を遺伝解析により作成することである。しかも共優性マーカーであることが望ましい。カイコゲノムとスキュフォールドのサイズを勘案すると最低2000個は必要になる。また、スキュフォールドあるいはコンティグ間には隙間があるので、これも埋めなくてはならない。幸いにして中国の西南農業大学においてもわが国と同様にWGS法で配列解読を進めている。近々双方の配列データを持

ち寄ってまとめる計画であるので、現在の隙間の数が減ることが期待される。とはいえ、クローニングされやすい、あるいは配列解読が容易なゲノム領域は双方同じ手法を用いているので似るであろうし、逆に隙間として残る解読が困難な領域も似るであろう。この問題を解決するには隙間を確実に橋渡しすると予想される大きさのDNA断片の両端の塩基配列を解読することである。マーカー作成と橋渡し配列の獲得が今回得られたWGS法による塩基配列情報の価値をゆるぎないものにし、今後のカイコゲノム研究の発展に資するものとする唯一の戦略である。

分子生物学の勃興と発展がカイコ研究にも大きく影響し、カイコを特徴づけるカイコ特有の多くの重要な遺伝子がクローニングされてきた。それらの大多数はわが国の研究者の成果であった。今後カイコの全遺伝情報の根源である塩基配列情報が地図情報を伴った高度な情報となれば、わが国のカイコおよび昆虫研究は現在より更に発展し、カイコを用いた新たな物質生

産研究、鱗翅目昆虫の生活環の制御、あるいはこれまでにゲノム塩基配列が解読されているショウジョウバエやハマダラカとカイコのそれとを比較することで、それぞれに特有の生理生化学的信号伝達機構などが解明されることが期待される⁶⁾。

文 献

- 1) 田島弥太郎 (1967), 遺伝, 21, 11月号, 4-8
- 2) 山下興亜, 新美輝幸 (2000), 遺伝, 54, 10月号, 65-69
- 3) 前田進 (1993), 昆虫ウイルスとバイオテクノロジー, サイエンスハウス, 東京
- 4) Yamao, M. et al. (1999), Genes Dev. 13, 511-516
- 5) Mita, K. et al. (2004), DNA Research 11, 27-35
- 6) 竹田敏 (2003), 昆虫機能の秘密, 工業調査会, 東京

◀国内情報▶

カイコゲノム中に散在するトランスポゾン

独立行政法人 農業生物資源研究所
行 弘 研 司

カイコは、キイロシヨウジョウバエに比べてゲノムサイズが大きく、そのためキイロシヨウジョウバエとは量的にも質的にも異なるトランスポゾンの分布が予想される。知られている限りではカイコのトランスポゾンのコピー数はキイロシヨウジョウバエを勝るものが多く、キイロシヨウジョウバエでは知られていないタイプも存在する。カイコの全ゲノム塩基配列の分析が進むことで、遺伝子工学に有用なトランスポゾンの発見も期待される。

1. はじめに

トランスポゾンは、生物のゲノム中を転移し遺伝子に挿入した場合突然変異を誘発する。このような有害効果に関わらずトランスポゾンが程度の差はあれゲノムの主要な構成要素であることが多くの真核生物における全ゲノム塩基配列の解読によって明らかになってきた。特にゲノムサイズとの関わりは顕著でゲノムサイズが 3×10^9 bpのヒトではトランスポゾンないし反復配列が全体の半分近くを占めるのに対して、キイロシヨウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) ではゲノムの真性クロマチン (1.17×10^8 bp) においてトランスポゾンは全体の約4%を占めるにすぎない。

キイロシヨウジョウバエは、P因子を用いてトランスジェニック系が確立されたことで古典遺伝学の実験動物から分子生物学ばかりでなく発生学の有用な材料になった。これにはモーガン以来蓄積されてきた遺伝学的知見が寄与したことは言うまでもない。

カイコ (*Bombyx mori*) はキイロシヨウジョウバエについて遺伝学的情報が蓄積している昆虫である。そのゲノムサイズは 5×10^8 bpとキイロシヨウジョウバエよりも大きく、染色体数もキイロシヨウジョウバエが4本に対して28

本である。キイロシヨウジョウバエでは染色体の染色中心と呼ばれる領域に大量のトランスポゾンが存在している。これがカイコに当てはまるならば、それだけでより大量のトランスポゾンの存在が示唆される。では、カイコのゲノム中に潜むトランスポゾンはどのようなものだろうか？

2. 転移様式によるトランスポゾンの分類

トランスポゾンは転移様式からクラスIとIIに二分される。クラスIは1度トランスポゾンから全長にわたるmRNAに転写されたのち自身がコードする逆転写酵素によってDNAに逆転写されて転移する。クラスIは両末端に比較的長い同じ方向の反復配列 (Long Terminal Repeat: LTR) を持つLTRレトロトランスポゾン (図1a) と持たないノンLTRレトロトランスポゾン (図1b) に分けられる。

クラス2はそれ自身がコードするトランスポゼイスによって直接DNAがゲノム中を転移するもので、末端に比較的短い逆向き反復配列 (Terminal Inverted Repeat: TIR) があるのが通例である (図1c)。

3. カイコのクラスIトランスポゾン

YUKUHIRO Kenji

〒305-8634 茨城県つくば市大わし1-2

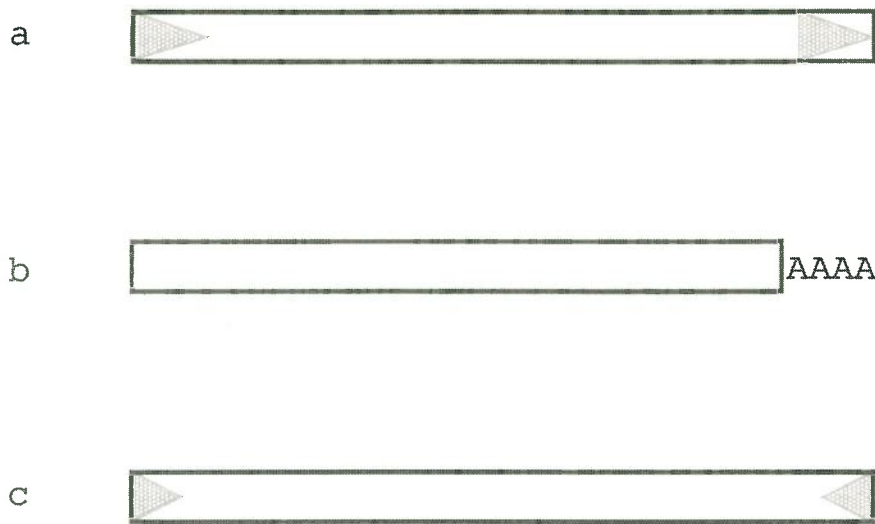


図1 典型的なトランスポゾンの構造

- a: LTR (Long Terminal Repeat) レトロトランスポゾンの構造
 両端にLTRがあり、内部に逆転写酵素をコードする。レトロウィルスのように外殻タンパク質をコードするものもある。
- b: ノンLTRレトロトランスポゾンの構造
 3'末端にアデニンのストレッチがある。逆転写反応の不完全な終了により5'側に欠損が生じ5'末端は高度に多型的である。内部に逆転写酵素をコードする
- c: クラスIIトランスポゾン
 両端に比較的短いTerminal Inverted Repeatがある。内部にトランスポゼイスをコードする。

カイコでは*LIBm* (2) ないし*BMCI* (5) と呼ばれるノンLTRレトロトランスポゾンがゲノム中に数千個散在する。ノンLTRレトロトランスポゾンの構造的特徴は一方の端 (3'端) に mRNAの3'端に付加されたポリAテイルに由来するアデニンのストレッチがあり、さらに、3'端を共有するものの長さに高度の多型が存在することである。これは逆転写過程がmRNAの5'端にとどく前に不完全に終了して様々な程度で5'側を欠失したコピーが生じた結果であると考えられている。当然、5'側を欠いたコピーは逆転写酵素を生産できない。*LIBm*もこの例にもれない。このようなノンLTRトランスポゾンをLong Interspersed Repetitive Element (LINE) と呼ぶ。

LINEに対してShort Interspersed repetitive

Element (SINE) と呼ばれる自前の逆転写酵素をコードしていないノンLTRレトロトランスポゾンがある。SINEはキイロショウジョウバエでは存在は確認されていない。カイコでは半数体ゲノム当たり約20,000コピー存在すると推定される*Bm1*がこのタイプに属する。*Bm1*は約450 bpの*Bm1.1*と*Bm1.1*の5'側を欠いた約250bpの*Bm1.2*に概ね2分される¹⁾。*Bm1.1*の5'端には典型的SINEの特徴であるtRNAとの相同性が観察される領域があり、これにより*Bm1.1*の転写にはRNAポリメラーゼIIIが関与すると考えられているが検討の余地が残され

ている。

キイロショウジョウバエは染色体の末端に形成され染色体の安定化に寄与するテロメア配列を欠き、それを補完する形で2種のLINE様レトロトランスポゾンが働いている。カイコではテロメアは存在するがテロメア配列を標的として挿入し染色体の末端部に偏在する2種のLINE様レトロトランスポゾン (*TRAS1*と*SART1*) が知られている。現在*SART1*のこの性質を利用したジーントランスファースシステムの開発が進んでいる⁴⁾。

カイコではLTRレトロトランスポゾンとして*MAG*, *Kabuki*等があり、それらはメス特異的な性染色体であるW染色体上に大量に存在していることが知られている。

4. カイコのクラス II トランスポゾン

カイコにおけるキイロショウジョウバエのP因子が属するクラス II トランスポゾンの代表的なものは mariner-like element (MLE) であろう。MLEは類縁関係が遠い生物種間で相同性の高いコピーが発見されるため、種の壁を越えて水平伝播したと考えられている⁶⁾。カイコゲノムには少なくとも3種の相互に塩基配列が多様化したMLEファミリーの存在しており、それぞれのコピー数は半数体ゲノム当たり1000以上に及ぶと推定されている。これは上記のP因子が100に届かないことと対照的である。

Miniature Inverted Repeat Transposable element (MITE) はおそらくクラス II に分類されるトランスポゾンである。カイコではMLEに比べれば遥かにコピー数の少ないが、*Organdy*というMITEが存在している³⁾ (図2)。*Organdy*はモリブデン補酵素遺伝子の第5エキソンに挿入し油蚕突然変異の一つである *og^r* を誘発していた。*og^r* の記載は1929年であるが、*og^r* ホモ接合では両性とも不捻であることを考慮すれば、この突然変異の出現は記載時期を大幅に遡るものではないと考えられる。したがって現在でも *Organdy* の転移する可能性は高い。

5. おわりに

カイコゲノムの全塩基配列の解読により上記

```
TGCCGGAACCACACTGCGCTATTTCGCTATTTCGTTATGC
gagctattcacgcgcatacggcgaagtgtggagagtat
attcgccaatattcgctttattcgtacgcataaacacat
aaggacgaatagcaaatacgcgtatccgctcgacttgtc
ggttttttgacacacttcaaaggacacgaataagccga
atatgcgcatcgactgccacacttcggtatgtcattc
gctcgcttgtgagttgtagcggcgtgtatcgacgtgt
cttatgacttghtaatcatccaccagcgtttttcttttcg
gtctttcagtaactttttacaacaagtattggtaagaa
acatttaggaaataataaattgcggcaactctcaacac
gtccatcgctccacgcaacaagacacatatttgcctt
at ttggcataattcagcgcacaagttcgaagtgtggat
ggcatgtttgttgtttgcgcgcttcacagatattttgg
cgaatacggcgtagtCACATAACGAATGGCGCATAACG
CAGTGTGGTCCCAGCA
```

図2 *Organdy*の塩基配列の特徴

両端の40塩基よりなるTIRは大文字で表した。TIRに隣接する同方向の25塩基の反復配列には太字で表した。この配列のアクセッション番号はAB091367である。

以外の新規のトランスポゾンの発見が期待される。現在でも可動するものが確認されれば、P因子のようなトランスジェニック系の開発の可能性がでてくる。また、ヒトが野生種のクワコ (*B. mandarina*) からカイコを育種する過程で突然変異を誘発するトランスポゾンがどのように貢献してきたかの解明もカイコのゲノム全塩基配列の分析が進むことで間近に迫っている。

文献

- 1) Eickbush T. H., 1995. Mobile elements of lepidopteran genomes. P77-106, in Molecular model systems in the Lepidoptera, Cambridge University Press.
- 2) Ichimura S. et al. (1997), *J. Mol. Evol.* 45: 253-64.
- 3) Komoto N. et al. (2003), *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 33: 417-27.
- 4) Matsumoto T. et al. (2004), *Mol. Cell. Biol.*

24(1): 105-22.

311-23.

5) Ogura T. et al. (1994), *Chromosoma* 103:

6) Robertson H.M. (1993), *Nature* 362: 241-5.



ブレインテクノニュース
バックナンバーのご案内
第102号
2004年3月15日発行

総説

食の安全と安心のための減農薬を目指した病害虫防除
技術の普及状況と研究開発の現状……………梅川 學

国内情報

昆虫変態の鍵をにぎる幼若ホルモン合成酵素遺伝子の発見と
その意義……………篠田徹郎

黒毛和牛のおいしさの主要因としての和牛香とその構成成分
……………沖谷明紘

組換え技術の信頼性向上を目指して—SDIシステムによる
ゲノム操作技術の開発—

……………海老沼宏安 南藤和也・渡邊恵子
新種ツノシマクジラの発見……………和田志郎

地域の先端研究

内生細菌を用いたトマト土壌病害の防除……………相野公孝
土着天敵を活用した難防除害虫ミナミキイロアザミウマ
の総合的管理……………永井一哉

文献情報

胚性幹細胞からの胚性生殖細胞および雄性配偶子の誘導
……………(抄訳：下司雅也)
養殖サケにおける有機汚染の世界評価……………(抄訳：森 徹)
小さなRNAの大きな仕事……………(抄訳：岩井純夫)
酵母*S. cerevisiae*のTH15遺伝子ファミリー ……(抄訳：家藤治幸)

海外便り

果樹の画期的生育制御技術の開発に向けて
—イギリス・国際園芸研究所での1年間—
……………草場新之助

生研センターからのご案内

◀国内情報▶

昆虫ホルモンレセプター研究とカイコゲノム情報

独立行政法人 農業生物資源研究所

塩 月 孝 博

最近のカイコのホルモンレセプター研究では、新規核内オーファンレセプターの同定と機能解明や、膜レセプターのリガンドとの対応が進んでおり、今後、ゲノム情報に基づくことによってそれらの研究が加速するであろう。また遅れている幼若ホルモンの研究では、最も鍵となるレセプター分子と作用機構の解明においてカイコゲノム解析情報が大きく寄与するものと期待される。

1. はじめに

各種生物のゲノム解析プロジェクトの進展により、生理生化学研究が加速してきた。昆虫では双翅目のキイロショウジョウバエ、ネッタシマカに続いて、鱗翅目のカイコでも全ゲノム配列が明らかになりつつあり、広く生物や動物に共通の遺伝子のほか、昆虫内では共通だが昆虫に固有のもの、不完全変態、完全変態等の多様性の鍵を握るものなどが明らかになると期待される。ここでは、その中で、脱皮・変態を司る昆虫ホルモンレセプター研究との関係について考える。

2. 核内レセプター

昆虫脱皮ホルモン、エクダイソンのレセプター (EcR) は核内レセプタースーパーファミリーに属し、リガンド結合領域と高度に保存されたDNA結合領域を持つ¹⁾。EcRはエクジステロイドと結合後、ultraspiracle (USP) とヘテロダイマーを形成することでエクダイソン応答配列に結合し、さらに転写制御因子群をリクルートし、標的遺伝子の転写を開始させる。哺乳動物のレチノイン酸レセプター (RAR) とレチノイドXレセプター (RXR) のヘテロダイマー

がEcR/USPに相当すると考えられており、その転写調節には核内レセプターに属するオーファンレセプター (リガンド未知) が関与する例も知られている。

そこで、我々はカイコを用いて未知のオーファンレセプターの探索を行った結果、リガンド結合領域が既知の核内レセプターと相同性を示さない新規のオーファンレセプターが得られ、BmHR78と命名した²⁾。幼虫5齢期の各器官におけるBmHR78 mRNAの発現量は精巣でもっとも高く、5齢期を通じて常に発現していた。既知の核内レセプターとの相互作用をYeast two hybrid法で調べたところ、BmHR78はホモダイマーを形成したが、それよりもさらに強くEcRのパートナーであるUSPとヘテロダイマーを形成することが分かった。USPと結合する分子としてEcRとDrosophilaのDHR38がいままで知られていたが、BmHR78はそれらのいずれともアミノ酸配列レベルで相同性が低く、これはBmHR78が新規レセプターであることを示唆する。さらに、USPは精巣でも発現していることを確認しており、実際に*in vivo*系においても*in vitro*系でもBmHR78はUSPと結合したことから、エクダイソンの情報伝達系を調節する可能性が推測された (図)。カイコゲノム解析においても、これまでに報告のないオーファンレセプターが発見されており、その機能解明が待たれる。

SHIOTSUKI Takahiro

〒305-8634 茨城県つくば市大わし1-2

3. 膜レセプター

一方、膜レセプターはチロシンキナーゼ型レセプター、あるいは7回膜貫通型Gタンパク質結合レセプター(GPCR)に分かれ、神経伝達に参与するアミンの他、内分泌を制御するペプチドホルモンの多くは後者のGPCRに結合する。ゲノム情報から、ヒトでは約900、キイロシヨウジョウバエでは約100のGPCRが存在することが予測されており、キ

イロシヨウジョウバエでは、その中で約30のGPCRがペプチドホルモンのレセプターと考えられている^{3), 4)}。

カイコではこれまで、幼若ホルモン(JH)の生合成・分泌を抑制するアラトスタチンのレセプターがクローニングされ、CHO細胞で発現させたレセプターにカイコのアラトスタチンを添加することによりリガンド濃度依存的に情報伝達されることが確認されている⁵⁾。タバコスズメガではクローニングされたコラゾニンレセプターをCHO細胞、あるいはアフリカツメガエルで発現させ、コラゾニンの機能を予測した⁶⁾。このようにGPCRの機能発現系が確立したので、ゲノム解析で存在が確認された新規GPCRについてそれぞれのリガンド特定と情報伝達機能の解明が進むものと考えられる。

4. 幼若ホルモン(JH)レセプター

昆虫の生理・生化学を理解する上での大きな障害は、昆虫に固有で、かつ多くの場面で働いているJHの活性発現の分子機構が詳しく分かっていないこと、特にレセプター分子が明解な

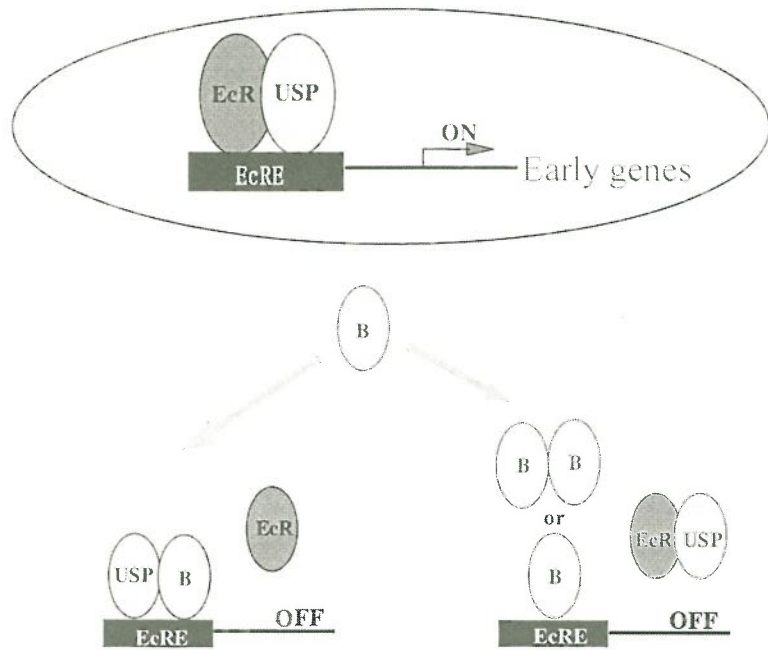


図 EcR/USPの遺伝子発現機構と予想されるBmHR78(B)の作用機構

形では単離されていないことに由来する。これまでJHが脂溶性リガンドであることから、膜を透過し核内へ移行すると考えられ、核内レセプターを想定し研究が行われてきたが、その単離には至っていない。しかし、トウヒシントメハマキのJHエステラーゼの上流に、JHで誘導され、その誘導が20-ヒドロキシエクダイソンで抑制されるJH応答配列が報告されたことから、核内レセプターの存在が予想される⁷⁾。

DNAマイクロアレイを用いることにより、転写が誘導、あるいは抑制される遺伝子の特定から、JHレセプター分子が明らかになる可能性は高い。しかしJHは、一つホルモンで多様な生理活性を有することから、レセプター分子や、それに続く情報伝達経路も複数が存在することが予想され、核内レセプターのほか、膜レセプター、細胞質レセプター、核内の転写制御因子、という可能性もある。ホルモンがレセプターに結合した後の情報伝達は、膜レセプターであればタンパク質のリン酸基による修飾等、核内レセプターであればリガンド依存的な立体構造変化・タンパク質間相互作用等といった遺伝子発現を介さない短時間での反応であ

る。遺伝子情報に基づく解析に加えて、そうした遺伝子発現制御に至るまでに機能しているタンパク質の修飾、及びタンパク質相互作用の解析を行うことでJHの分子作用機構も一気に解明されるものと期待される。

5. おわりに

ゲノムプロジェクトで構成タンパク質のアミノ酸配列と転写制御領域の遺伝子配列が明らかになりつつある。しかし、そのタンパク質の機能や性質の検討にはNativeな形で発現したタンパク質を得る必要があるため、今後は、精製や立体構築技術が求められる。一方で、DNAチップを用いたマイクロアレイによる遺伝子発現の差分解析も可能になったが、そこからは見えてこないタンパク質・ペプチドの修飾や糖鎖、脂質も重要である。全ゲノム情報が解析されつつあるカイコは大型昆虫であるため、ショウジョウバエでは困難であった器官ごとの遺伝子及びタンパク質の解析や、外科的実験が可能であ

る。その利点を活かすことによって、レセプターと昆虫ホルモンの作用機序の研究が大きく進展するであろう。

文 献

- 1) 藤原晴彦, 神村学 (1998): ホルモンの分子生物学8, 105-126, 学会出版センター, 東京
- 2) M. Hirai et al. (2002), *Mol. Cell. Endocrinol.*, 189, 201-211
- 3) R.S. Hewes and P.H. Taghert, (2001), *Genome Res.*, 11, 1126-1142
- 4) T. Meeusen et al. (2003), *Int. Rev. Cytol.*, 230, 189-261
- 5) T. Secher et al. (2001), *J. Biol. Chem.*, 276, 47052-47060
- 6) Y-J. Kim et al. (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101, 6704-6709
- 7) D.R. Kethidi et al. (2004), *J. Biol. Chem.*, 279, 19634-19642

◀国内情報▶

マイクロアレイの利用によるカイコの発現遺伝子の解析

独立行政法人 農業生物資源研究所

野 田 博 明 ・ 三 田 和 英

東京大学大学院 農学生命科学研究科

嶋 田 透

カイコゲノム研究の一環として作製されたカイコcDNAマイクロアレイにより、カイコで発現している遺伝子を網羅的に解析できるようになった。現在、このマイクロアレイを利用して、昆虫ホルモンの作用機構、昆虫微生物の宿主内での機能、殺虫剤の昆虫に及ぼす影響などが、発現遺伝子のレベルから調べられている。

1. はじめに

昆虫が示す多様な機能を分子の働きから理解するには、どのステージでどのような分子が見つかるかを知るといのは極めて有効な研究方法である。昆虫の多様な複雑な現象がより単純により深く理解できるようになる。生物では、DNAからメッセンジャーRNA (mRNA) が作られ、そこからタンパク質が作られるわけであるが、このmRNAを追跡するのがトランスクリプトーム解析 (DNAからの転写産物であるmRNAをトランスクリプトと呼ぶ) であり、タンパク質を追跡するのがプロテオーム解析 (タンパク質であるプロテインから名付けられている) である。発現遺伝子解析とは、このmRNAを調べるトランスクリプトーム解析のことである。

遺伝子発現の解析は、比較するサンプル間で発現レベルが大きく異なるものを見つけて、その遺伝子の働きを明らかにしていくことがこれまで主体であった。もちろん、今後もこのようなアプローチは重要であるが、特定の現象を多くの遺伝子の発現からみたり、組織や細胞の状態を複数の遺伝子の発現情報から理解する場合な

NODA Hiroaki, MITA Kazuei

〒305-8634 つくば市大わし1-2

SHIMADA Toru

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

ど、多数の遺伝子を同時に調査できることが必要である。このような目的に合致する研究手法に、マイクロアレイ解析がある。

2. マイクロアレイとは

マイクロアレイはDNAチップとも呼ばれ、DNAをスライドグラス上あるいはシリコンの基盤上に高密度にスポットした (貼り付けた) ものである。スライドグラス上でDNAを順次合成していく方法もある。解析手順を表1に示した。解析を行うには、それぞれの組織で発現している遺伝子 (mRNA) を抽出し、それをもとにcDNAを合成して蛍光色素でラベル (標識) する。マイクロアレイ上に貼り付けたDNAと同じ (相補的) 配列があると、ハイブリダイズ (互いにくっつく) してその部分 (DNAを貼り付けたスポット) が蛍光色素で明るく光る。これにより、多く発現している遺伝子や発現していない遺伝子などがわかる。これまでの遺伝子発現の実験では、目的の遺伝子一つ一つに標識をして、それぞれの組織での発現を調べるため、一つ一つの遺伝子の結果しか得られない。ところが、マイクロアレイでは、サンプルの発現している遺伝子全体を標識することにより、マイクロアレイ上に貼り付けたDNA全部に対して調査ができる。いわゆる網羅的解析ができる。マイクロアレイ上の蛍光強

度をアレイスキャナーと呼ばれる機械で読み取り、コンピューター上にスポットを表示して、解析を進める。そのために、データ読み取りや

表1 マイクロアレイ解析の手順

1. サンプルからのRNA抽出
2. 逆転写反応によるcDNA合成
3. 合成したcDNA精製
4. cDNAの蛍光標識化
5. 標識プローブの精製
6. アレイ上でのハイブリダイゼーション
7. 洗浄
8. アレイスキャナーでの蛍光検出
9. 有効なスポットの選別と強度補正
10. データの解析

データの解析のためのコンピューター・ソフトウェアが開発されており、それらを使ってサンプル間の遺伝子発現量比較や、発現量の時間的な推移を調査する。一般には、二つの色素(Cy3とCy5)を使って、同じマイクロアレイ上でサンプル間の比較を行う。緑の色素と赤の色素によって、どちらの発現量が多いかを判断でき、ほぼ同じならば黄色に光る。

3. カイコのcDNAマイクロアレイ

カイコでは、EST解析が行われてきており、現在約6万本のシーケンスが読まれ、すでに3万6千本が公開されている¹⁾ (<http://www.ab.a.u-tokyo.ac.jp/silkbase/>および <http://sgp.dna.affrc.go.jp/>)。これまでに

解析されたcDNAから重複していない配列を約6000個選び出し、PCRによってDNAを増幅し、スライドガラス上にそれら(ターゲットDNA)を2組ずつスポットしたマイクロアレイが作られている。現在の解析方法では、組織からRNA全体として5~10マイクログラムを抽出することが必要であるが、市販のキットにより、比較的容易にサンプル(プローブDNA)を作製できる。試しに、同じサンプルを2色の蛍光色素でラベルしてマイクロアレイスキャナーで読み取ったデータを図1に示した。比較的安定に対角線上にスポットが載っているが、若干のばらつきもあり、今後の改良の余地もある。

4. マイクロアレイを用いた研究

マイクロアレイは、一度に多数の遺伝子の発現の変化を調べることができる²⁾ので、遺伝子

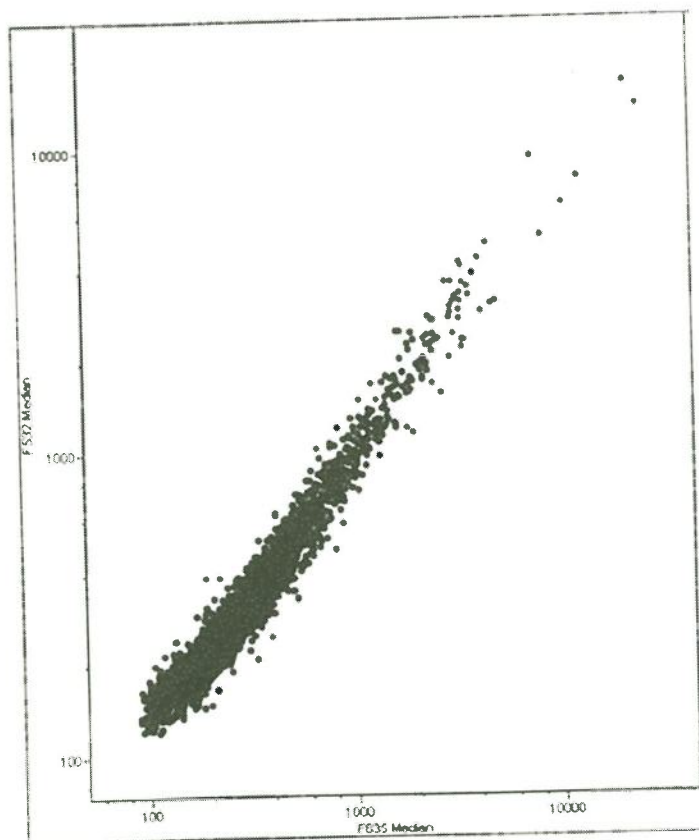


図1 カイコcDNAマイクロアレイのスクリーンショット。同じサンプルをCy3とCy5でそれぞれ標識したもの。同じサンプルでどの程度ばらつきがあるかをテストしている。

発現に影響を与える物質に関する調査に適している。昆虫ホルモンは、遺伝子の発現制御によってその機能を現すことがよく知られている。そこで、細胞や昆虫個体にホルモンを作用させた後に、どのような遺伝子が発現するかを調べることによって、ホルモン応答性の遺伝子を網羅的に拾い上げることができる。また、昆虫は多くの共生微生物と関わっており、細胞内に感染している微生物がどのように宿主昆虫に影響を与えているかを、宿主の細胞の遺伝子発現から探することもできる。実際、細胞に微生物を感染させることにより、宿主にとって重要ないくつかの遺伝子が発現してきたり、発現が抑えられたりするという結果が得られている。

また、昆虫に対する殺虫剤の影響をマイクロアレイを用いて調査中である。殺虫剤の種類によって、特定の遺伝子グループの発現に影響を受けると考えられ、薬剤の作用機構解明や薬剤抵抗性害虫のモニタリングなどにも使えたと期待されている。

5. 今後の展開

現在使用されているカイコcDNAマイクロアレイは、500bp前後の長さのDNAを貼付けたものであるが、今後数十塩基の短いオリゴDNAを貼付けたオリゴアレイを作製し、より高感度でシグナルが安定しているものに変更していくことが検討されている。これは、既にイネのマイクロアレイでは実施されている。これを用いて、カイコでの遺伝子間相互の関係を詳細に解明し、殺虫剤の新規の作用分子を探索していくことなどが考えられる。また、現在カイコ以外の昆虫でも発現している遺伝子の塩基配列解析が行われており、その遺伝子情報をもとにした害虫マイクロアレイ作製にもこれらの技術が生かされていくことになろう。

文 献

- 1) Mita, K. et al. (2003), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 14121-14126.
- 2) Ote, M. et al. (2004), Insect Biochem. Mol. Biol. 印刷中.

◀国内情報▶

SuperSAGE法による真核生物の遺伝子発現解析

財団法人 岩手生物工学研究センター

松 村 英 生 ・ 寺 内 良 平

筆者らは、Ⅲ型制限酵素EcoP15Iを用いることによって、発現遺伝子のメッセンジャーRNAから26塩基の断片を取り出して解析するSuperSAGE法を開発した。SuperSAGE法を利用することにより、相互作用している2種以上の真核生物の遺伝子発現を、同時に、定量的に解析することが初めて可能になった。さらに本法によって、DNAデータベースの完備していない生物種の定量的遺伝子発現解析も飛躍的に容易になった。

1. はじめに

DNA塩基配列決定法の飛躍的な進歩により、生物のゲノム解読が進んでいる。現在までに、多くの原核生物をはじめ、出芽酵母、分裂酵母、線虫、ショウジョウバエ、マウス、ヒト、ラット、シロイヌナズナやイネにおいて全ゲノム配列の解読がほぼ完了した。ゲノム配列が明らかになった生物において、研究の焦点は、遺伝子機能解明に移行しつつある。2002年にドラフト配列が公表されたイネを例にとると¹⁾、そのゲノムは、約4～5億塩基からなること、約3万個から5万個の遺伝子を含むことなどが明らかになった。こうした多数の遺伝子から、それぞれの研究者にとって重要な遺伝子をどのように選別して解析するかが、現在重要な課題となっている。この目的のために利用可能な技術の一つに遺伝子発現解析法がある。すなわち、各研究者が興味をもつ特定の組織・器官・条件において特異的に発現している（あるいは特異的に発現していない）遺伝子を同定することにより、研究対象とする遺伝子の数を、実験的に扱える数まで減らすことができる。遺伝子発現解析法には、最も広く利用されているマイクロアレイ法をはじめ、多くの種類がある。私たちの研究グループでは、主にイネの遺伝子発現解析の目

MATSUMURA Hideo, TERAUCHI Ryohei

〒024-0003 岩手県北上市成田22-174-4

的で、Velculescu²⁾らによって1995年に開発されたSerial Analysis of Gene Expression (SAGE)法という方法を用いてきた^{3) 4) 5)}。

2. SAGE法

SAGE法は、発現している多数の遺伝子のmRNAそれぞれの特定の位置からBsmFIというⅡs型制限酵素を用いることにより13-15塩基の断片を抽出して、その塩基配列を決定して解析する方法である(図1)。この短い断片をタグと呼ぶ。一試料あたり1万-数万個のタグの塩基配列を決定し、その中に、何種類のタグが含まれ、それぞれのタグが何回出現するかを調べる。これら各タグの出現頻度は、タグを抽出した元の各mRNAの絶対量を反映するため、これによりタグ配列に基づいた発現プロファイルを得ることができる。一方、各タグの13-15塩基の配列を用いて、調べている生物種のEST/cDNA配列データベースを対象にしたBLAST検索を実施すると、多くの場合、タグに対応する遺伝子名が明らかになる。これら2つの作業を総合することにより、目的の試料中で発現している遺伝子の名前とその発現量を知ることができる。SAGE法は、各遺伝子に対応する13-15塩基のタグを数え上げることにより遺伝子発現量を調べるという点で、他の方法よりも定量性が高い。また、本法はデジタル的な

SAGE: Serial Analysis of Gene Expression

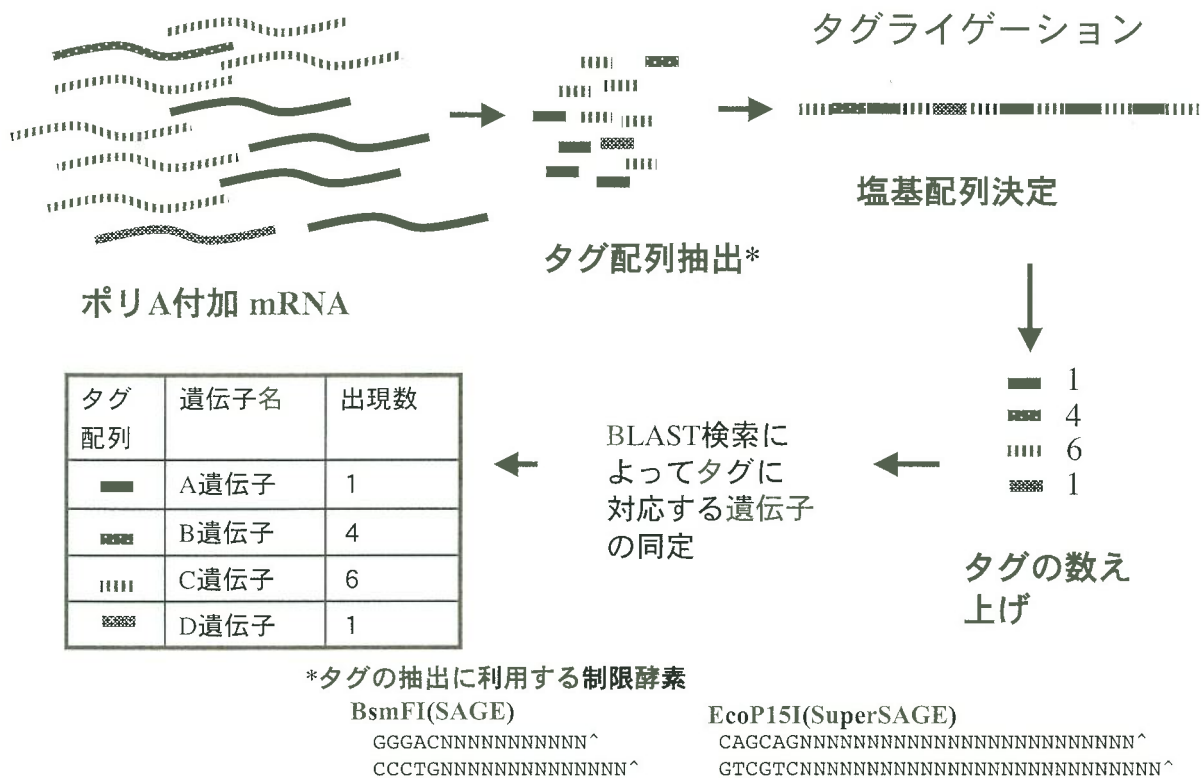


図1 SAGE法の原理

解析法であるので、バイオインフォーマティクスとの適合性が高く、ゲノム配列情報が蓄積するにつれ一層有用性を増す方法であると期待される。しかし、SAGE法には、タグの長さが13-15塩基と短いことに原因する問題があった。すなわち、SAGEタグで特定の生物種のDNAデータベースに対してBLAST検索を行った場合でも、しばしば複数の遺伝子に合致することがあり、タグから遺伝子の一意的な同定ができない場合があった。また、DNAデータベースの完備していない生物種にSAGE法を適用した場合、タグ断片を用いて、タグに対応する遺伝子のより長い断片を実験的に得る作業が必要となるが、13-15塩基の配列を利用して、RACE法やcDNAライブラリーのスクリーニングにより確実にタグから遺伝子を同定することには、実際には大きな困難が伴った。

3. SuperSAGE法の開発

こうしたSAGE法の問題点を解決するために、私たちは、ドイツのベルリン大学のDetlev Krüger教授およびフランクフルト大学のGünter Kahl教授らのグループと共同で研究を進め、Ⅲ型制限酵素EcoP15I（図1，右下）を利用することにより、各mRNAから26~28塩基のタグ断片を抽出して解析することに成功し、この方法をSuperSAGE法と名付けた⁶⁾。タグの長さが、13-15塩基（SAGE法）から26塩基（SuperSAGE法）に倍増したことにより、今まで不可能だった多くの事が可能になった。すなわち、(1) DNAデータベースを用いてタグから遺伝子を同定する作業が飛躍的に容易になった。表1に、実際にイネを材料にして得られたタグ30種類を用いてBLAST検索をした結果

表1 イネ成葉から得られたSAGEおよびSuperSAGEタグ30種類をGenbankに登録されている全塩基配列に対してBLAST検索した結果

	SuperSAGE タグ (26塩基)	SAGE タグ (15塩基)
タグ配列と完全に一致する配列を持つ種の数の平均値	1.065	4.968
タグ配列と完全に一致する配列を持つ種の最大数	2	9

を示す。各タグについて、その長さを、SuperSAGE法に対応する26塩基と、SAGEタグとして得られる最長のタグ長15塩基とに設定して、イネだけでなくあらゆる生物種のデータを含むDNAデータベースGenbankの塩基配列全体に対してBLAST検索を行った。各タグ配列と完全に合致する塩基配列を含む生物種の数を調べて、その数の30タグについての平均値と最大値を示した。30種類のSuperSAGEタグは、平均して1.1種、最大でも2種の生物の塩基配列と合致した。そして、それらのほとんどは、イネの塩基配列にのみ合致した。一方、従来のSAGEタグは平均5種、最大9種の生物の塩基配列に合致している。この結果は、SuperSAGEタグの情報量が十分大きいために、その情報量によってタグがどの生物の何の遺伝子から由来したかを一意的に同定することが可能であることを示唆している。さらに(2) DNAデータベースの完備していない生物種においては、SuperSAGEタグ配列を直接プライマーとして用いて、3'-RACE法によってタグの下流配列を迅速に増幅して単離することができる。この配列情報をもちいてBLAST検索することにより、遺伝子名の同定も速やかに行うことができる。

4. SuperSAGE法によるイネ-いもち病菌相互作用の解析⁶⁾

上述したSuperSAGE法の特長を利用すると、異なる2種以上の真核生物が相互作用している

場所で、それぞれの生物種の遺伝子発現を同時に解析することができる。その例として、私たちは、いもち病菌に感染したイネの葉における遺伝子発現解析を実施した。いもち病菌も、そのゲノム配列の大部分が公表されている。計約1万2千タグを解析したところ、ほとんどはイネのDNA配列に合致したが、74タグはイネにはあらず、いもち病菌のDNA配列に合致した。いもち病菌由来で最も多いタグはハイドロフォービン遺伝子に対応した。この遺伝子は、いもち病菌のイネ感染に必須であることが知られている。この結果は、イネといもち病菌の遺伝子発現を同時にSuperSAGE法で解析できることを示している。このような植物と病原菌が実際に接している条件下で植物側、菌側の遺伝子発現を同時にかつ定量的に解析できる方法は、他では見られない方法である。

5. DNAデータベースの完備していない生物へのSuperSAGE法の応用⁶⁾

タバコ属のベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) はDNAデータベースの完備していない生物種であるが、この植物へのSuperSAGE法の適用を試みた。ベンサミアナタバコにジャガイモ疫病菌のタンパク質エリシターINF1を処理すると過敏細胞死が誘導されることが知られている。この過敏細胞死の開始前に発現が変化する遺伝子の同定を目的として、INF1処理1時間後と水処理1時間後のべ

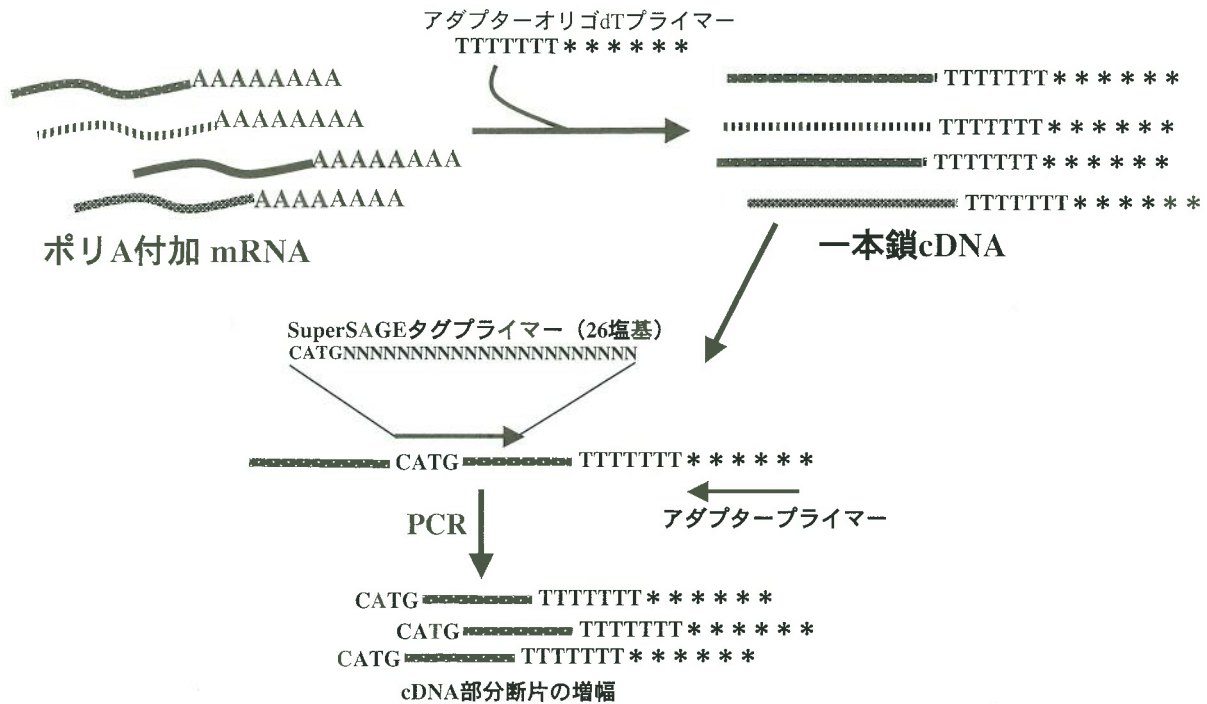


図2 3'-RACE法によるSuperSAGEタグからのcDNA断片の増幅

ンサミアナタバコ葉からmRNAを抽出し、SuperSAGE法により各5千タグの解析およびデータの比較を行った。得られたタグ配列から遺伝子の同定を行うために、タグ配列を用いて図2に示すような3'-RACEを行い、得られたより長いcDNA断片でBLAST検索を行うと、殆どの場合遺伝子名を同定することができた。この解析の結果、INF 1 処理によって多くの光合成関係もしくは葉緑体局在のタンパク質の遺伝子発現が抑制されることが明らかになった。このようにSuperSAGEによる発現解析や遺伝子の探索がDNAデータベースの完備していない生物、すなわちあらゆる真核生物で可能であることが示された。

6. おわりに

従来の大量遺伝子発現解析法のようなfunctional genomics (機能ゲノム学) の技術は実質的に限られた生物種でしか活用できなかった。しかし、SuperSAGEは、あらゆる真核生物において、しかも解析困難であった試料で、短期


間に少ない労力で、多数の遺伝子発現解析を可能にする方法であり、既知の方法をはるかに超える能力をもっている。さらに、本法は発展性においても優れている。例えば、この方法で興味あるタグが同定されれば、タグ断片に対応するオリゴヌクレオチドを合成してマイクロアレイを作成し、多くの検体を解析することも容易にできる。また、発現解析後の遺伝子機能解析においても、SuperSAGEタグは有用である。すなわち26塩基のタグ配列はそのままRNAi (RNA interference) のための断片として利用可能であると考えている。このSuperSAGE法を中心とした遺伝子機能解明技術が、今後多くの様々な研究材料で利用されることを期待している。

文献

- 1) Goff S.A. et al. (2002), Science, 296, 92-100
- 2) Velculescu V.E. et al. (1995), Science, 270, 484-487
- 3) Matsumura H. et al. (1999), Plant J., 20,

719-726
 4) Matsumura H. et al. (2003), Plant J., 33, 425-434
 5) Irie T. et al. (2003), Mol.Gen.Gen., 269,

181-189
 6) Matsumura H. et al. (2003), Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A., 100, 15718-15723



ブレインテクノニュース

バックナンバーのご案内

第101号

2004年1月15日発行

総説

生分解性プラスチックからバイオマス（由来）プラスチックへ
木村俊範

国内情報

農業・食品副産物からの生分解性素材の開発.....五十部誠一郎
 木質系機能性プラスチック.....平林靖彦
 木質資源からのバイオエタノール生産—超臨界水及び
 亜臨界水処理による木材の高速化学変換—
松永正弘・松井宏昭・清水孝浩・山本誠一
 植物の生長を決める巧妙な仕組み—エチレンシグナルと
 糖シグナルのクロストーク—.....柳澤修一
 リンゴ由来ポリフェノールによるガン予防効果

.....庄司俊彦・三浦富智・佐藤達資・
 樋廻博重・神田智正・池田満雄
 傾斜地果樹用多目的モノレール（回行式）の開発金光幹雄

地域の先端研究

ブタ胚の耐凍性を飛躍的に向上させる凍結保存方法の開発
牛島 仁・中根 崇・長嶋比呂志

文献情報

異種移植と体外培養を組み合わせて原始卵胞から得た
 ブタ体外受精卵.....(抄訳：下司雅也)
 ノーウォークウイルス感染に対する感受性と抵抗性
(抄訳：秦 淳一郎)
 Ca²⁺：セカンド それとも ファースト(抄訳：岩井純夫)
 LC/MSによるグラマーナ・パダーノ・チーズ中のオリゴ
 ペプチド分析.....(抄訳：松浦啓一)

海外便り

フランスでのウシ骨格筋の特徴についての研究と牛肉生産
 —フランス国立農業研究所（INRA）における1年間—
上田靖子

生研センターからのご案内

◀国内情報▶

遺伝子改変マウスの環境化学物質モニターへの応用

筑波大学大学院・人間総合科学研究科

高橋 智・本橋ほづみ・伊東 健・依馬正次

近年、マウスの遺伝子改変技術の進歩に伴い、様々な遺伝子改変マウスを比較的容易に作製することが可能となってきた。我々は以前より、化学物質代謝を統合的に制御していると考えられる転写因子群の遺伝子改変マウスを作製し、それらの転写因子群が生体内における化学物質代謝に必須の機能を有していること、また、作製された遺伝子改変マウスが、様々な環境化学物質に対するモニター動物として利用できることを明らかにしてきた。本総説では、遺伝子改変マウスの様々な作製方法とその応用について概説したい。

1. はじめに

現在、地球上には様々な化学物質があふれている。それらの化学物質は、天然に存在するものや人工的に合成されたものがあるが、多くのものは食物連鎖を通じて生体内に取り込まれている。体内に取り込まれた化学物質は生体内に存在する異物代謝系によって分解され排出されるが、その反応の調節がどのように行われているのかは十分に理解されていなかった。近年、遺伝子改変マウスを用いた研究により、それらの化学物質の代謝反応の調節機構が明らかにされつつある。

2. 化学物質を代謝する異物代謝系の概要

生体内に取り込まれた化学物質の代謝反応は、非常に単純化すれば第一相反応および第二相反応に分類される。第一相反応は、生体化学物質が第二相反応を受ける準備段階、すなわち、第二相反応を惹起するための生体化学物質への官能基付与過程であり、酸化、還元、加水分解、水和、脱チオアセチル化、異性化等が含まれる。

TAKAHASHI Satoru, MOTOHASHI Hozumi,

ITO Ken, EMA Masatsugu

〒305-8575 茨城県つくば市天王台1-1-1

一方、第二相の抱合反応は、真の意味での解毒反応であって、生体化学物質を不活性な排泄されやすい代謝産物に変換する反応であり、グルクロン酸、グルタチオン、メチル、アセチル、アミノ酸、硫酸、脂肪酸等の各種抱合反応が含まれる。最近ではこれら2つの反応に加え、代謝産物を排出する排出過程を異物代謝系第三相とすることが提唱されている。第三相の過程には様々な輸送担体が関与している(図1)。生体異物の代謝反応は、単純化するとこのような3つの反応過程よりなり、それぞれの過程に非常に多数の酵素群や輸送担体群が関与しているが、実際に個々の化学物質の代謝について解析してみると、非常に多様な反応経路が存在し、必ずしもこのような分類が適切でない場合があることも事実である。いずれにしても、それぞれの反応過程は化学物質の摂取によって速やかに誘導されるが、その制御メカニズムの詳細は最近まで明らかにされていなかった。最近の遺伝子改変マウスを用いた研究より、それらの反応過程を制御している転写因子が個体レベルで相次いで証明されている。実際に、第一相酵素群の遺伝子発現制御機構の研究から、異物反応配列(Xenobiotic-Responsive Element; XRE)が発見され、そこに結合して機能するダイオキシン受容体(Aryl Hydrocarbon Receptor; AhR)が同定され、AhRを欠損するマウスでは

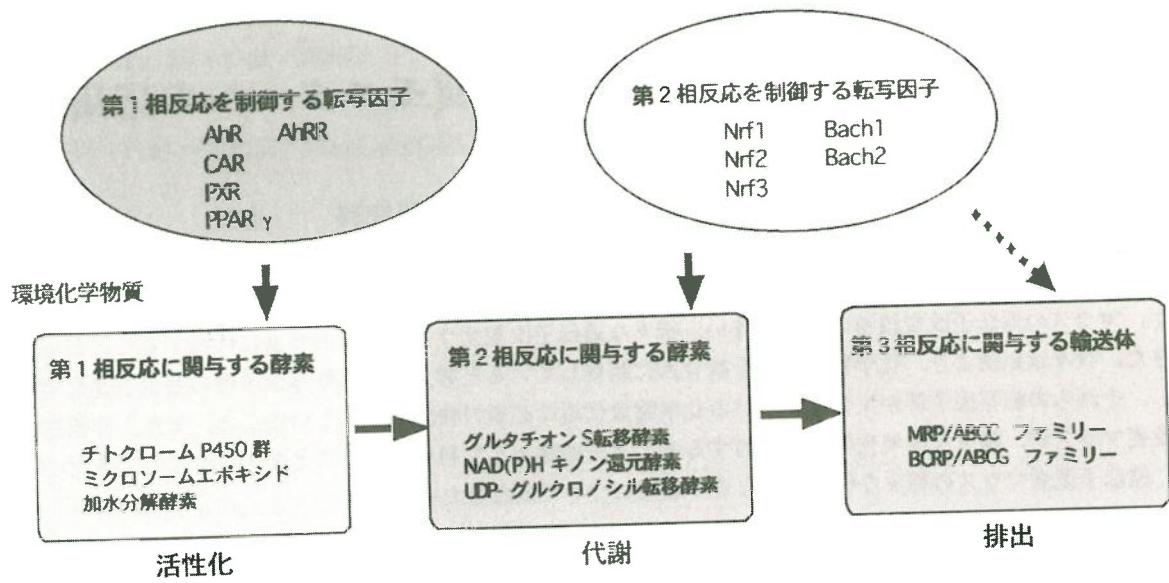
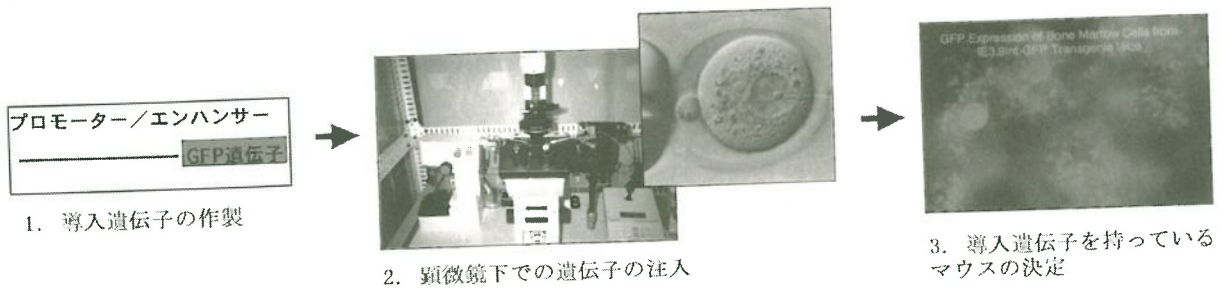


図1 現在明らかになっている異物代謝系の概要図
異物代謝系は三相の反応系からなっている。それぞれの反応を司る酵素群や輸送担体の発現誘導は転写因子により制御されている。

トランスジェニックマウスの作製方法



ターゲティングマウスの作製方法

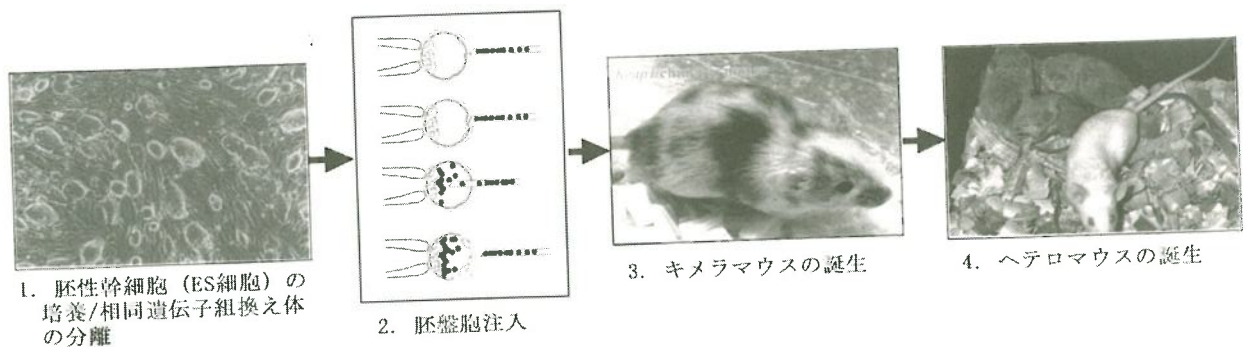


図2 遺伝子改変マウスの作製手法
トランスジェニック法とターゲティング法が確立されている。

シトクロームp450群の酵素誘導が起こらないことが明らかにされている。また、第一相の酵素群の誘導にはCAR (Constitutive Androstane Receptor), PXR (Pregnane X Receptor), PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) 等の転写因子も重要であることがそれぞれの遺伝子欠損マウスの解析から明らかにされている。一方、第二相反応に関与する酵素群の遺伝子発現制御には、抗酸化剤応答配列 (Antioxidant-Response Element; ARE) が重要であることが以前より知られていたが、我々の研究により転写因子Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2 p45-Related Factor 2) がAREに結合して統一的に制御していることが明らかにされた。また、Nrf2はKeap1 (Kelch-like ECH Associating Protein 1) というタンパク質によって細胞内局在と分解が制御されていることも明らかとなった。さらに第三相の一部の輸送担体の誘導にもNrf2が関与していることが報告されている。この様に異物代謝系全体の制御機構について、急速に情報が蓄積しつつある。

3. 遺伝子改変マウスの作製技術の進歩

遺伝子改変マウスの作製は大きく分けて、外来性の遺伝子を顕微鏡下に導入する遺伝子導入 (トランスジェニック) 法と胚性幹 (Embryonic Stem; ES) 細胞を用いて内在性の特定の遺伝子を任意に改変する標的遺伝子組換え (ジーンターゲット) 法に分類される (図2)。いずれの技術も既に確立されているものであるが、顕微鏡やマイクロインジェクターの改良によって作製効率が向上した。またES細胞を用いた標的遺伝子組換え法も、組換え体のスクリーニングにPCRを組み合わせることで、迅速に行うことが可能となった。さらにDNAの組換えを個体内で誘導することができるCre-loxPシステムの導入により、特定の時期や部位のみでの遺伝子欠損や、マウス遺伝子のヒト遺伝子との置換や塩基の点変異等の特定の変異の導入が可能となってきた。実際に、筆者等が兼

任している筑波大学生命科学動物資源センターでは、作製システムの効率化や技術導入によって大学外からの依頼に応じてトランスジェニックマウスやターゲティングマウスを受託作製するサービスを行っている。我々は、筑波大学生命科学動物資源センターの作製システムを用いて多くの遺伝子改変マウスの作製を行っており、その中で、環境化学物質のモニターとして応用が可能なマウスが複数樹立されており、その代表的なものを以下に紹介する。

4. 遺伝子改変マウスの環境化学物質モニターへの応用

4.1 Nrf2欠損マウス

前述のように、我々は異物代謝系の制御機構を明らかにする目的で、その発現制御に関わると考えられる様々な遺伝子について改変マウスの作製を行い、その表現型を解析することによって、制御機構を明らかにしてきた。その過程で、転写因子Nrf2欠損マウスが、環境化学物質のモニターマウスとして有用であることが証明された。Nrf2欠損マウスでは、異物代謝系第二相の多くの代謝酵素の誘導が起こらないため、化学物質に対して非常に感受性になっていることが明らかになった。我々は、財団法人残留農薬研究所の榎本、原田両博士等との共同研究で、Nrf2欠損マウスに対するアセトアミノフェンの投与実験を行った。アセトアミノフェンは市販の総合感冒薬に配合されている解熱鎮痛薬で、通常の使用量ではほとんど副作用の現れない安全性の高い薬品であるが、大過剰に服用すると肝臓毒性が現れることが知られており、以前埼玉県で起きた保険金殺人事件は、アセトアミノフェンのこの副作用が悪用された。Nrf2欠損マウスに、野生型マウスではほとんど毒性が現れない量のアセトアミノフェンを投与したところ、肝細胞の壊死が起こり投与したマウスのほとんどが死亡した (図3)¹⁾。このようにNrf2欠損マウスは化学物質に対して感受性が高く、農林水産物等の安全性を高感度に

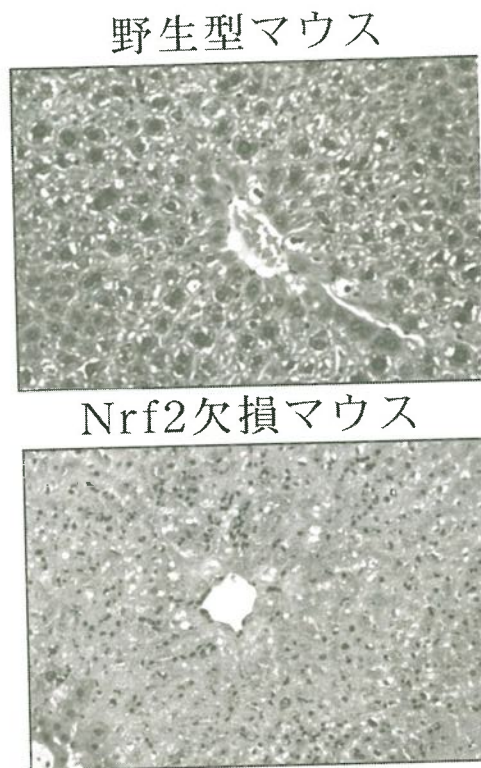
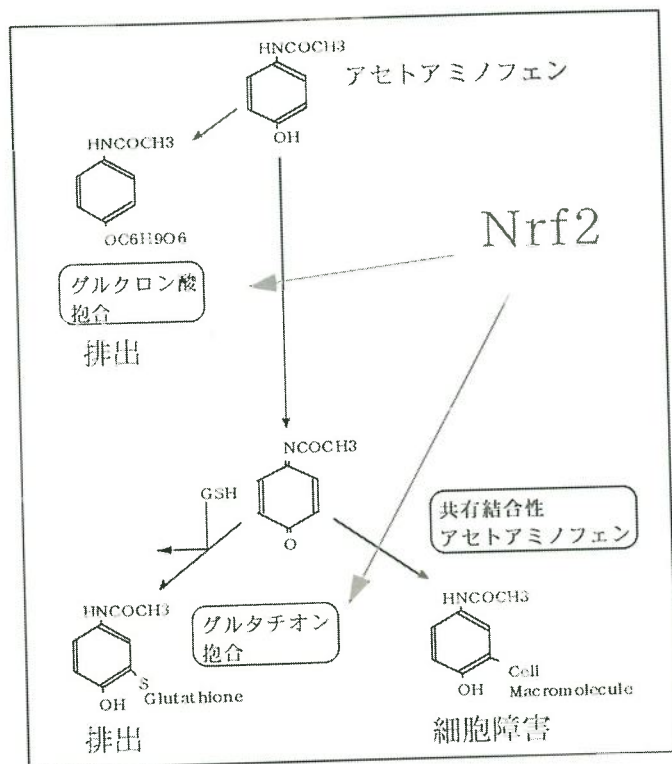


図3 Nrf2欠損マウスに見られるアセトアミノフェンの急性肝毒性
Nrf2欠損マウスでは野生型マウスでは毒性が出ないアセトアミノフェンの投与量で、肝細胞壊死がおこり出血が見られ、マウスが死亡する。

モニターすることができると考えられる。またこのマウスについて、国立環境研究所の青木博士等との共同研究により、最近社会問題化しているディーゼル排気ガスの暴露実験を行ったところ、Nrf2欠損マウスではディーゼル排気ガスによるDNAの傷害が有意に増加することが明らかになった²⁾。このようにNrf2欠損マウスは鋭敏な環境化学物質のモニターマウスとして様々に利用できることが明らかになり、現在多くの研究所で利用されている。

4.2 Keap1欠損マウス

Nrf2タンパク質の機能を調整しているタンパク質Keap1を欠損するマウスを遺伝子操作により作製した。このマウスでは、Nrf2タンパク質が恒常的に活性化しており、化学物質の分解や排出の能力が強くなっていることが証明された。一方、当初全く予想しなかったことに、このマウスではNrf2タンパク質の恒常的な活

性化によって、皮膚に過剰角化が起きるという副作用が観察された。このことからNrf2が異物代謝のみならず、皮膚の物理刺激に対する反応の制御にも関与していることが予想された³⁾。Keap1の完全欠損マウスは、過剰角化により成長障害を示すので、このままでは直ちに畜産動物への応用はできないが、keap1遺伝子を一部改変することによって、環境化学物質の代謝能力が増強された、体に化学物質が残留しないような家畜を作出することが可能になると考えられる。

4.3 ヒト型ダイオキシン受容体(hAhR)マウス

ダイオキシンは、環境中に存在する化学物質として最も毒性が強い化学物質の一つであるが、その毒性は動物種によって大きく異なることが明らかになっている。これは動物種によってAhRのアミノ酸配列が異なり、ダイオキシンに対する結合活性が大きく異なっているため

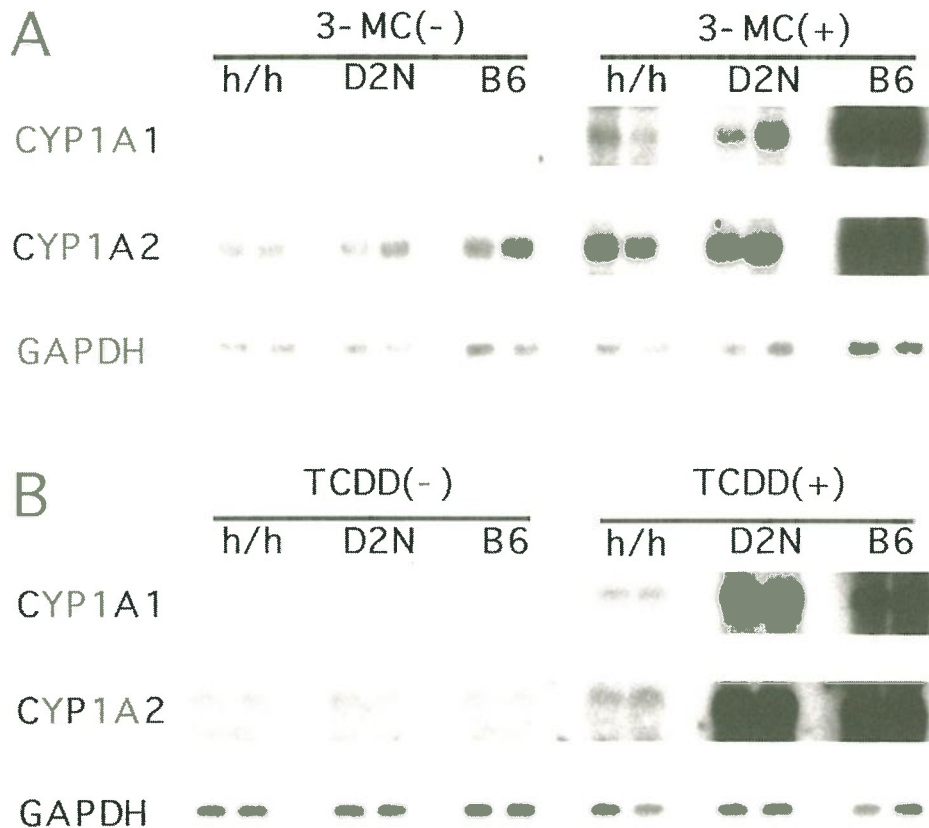


図4 hAhRマウスの3-MCとTCDDに対する反応

hAhR (h/h), DBA/2 (D2N) とC57BL/6 (B6) マウスに3-MC投与 (3-MC (+)) とTCDD投与 (TCDD (+)) を行ってシトクロームp450 CYP1A1とCYP1A2の発現誘導をmRNAの発現量で解析した。その結果hAhR (h/h) は3-MC投与に対してはDBA/2 (D2N) と同程度のシトクロームの誘導を示すが、TCDD投与については、弱い誘導しか示さないことが明らかとなった。

と説明されている。実際にマウスの種類によっても結合活性が異なり、高親和性のC57BL/6マウスでは、ダイオキシンに対する感受性が高く、低親和性のDBA/2マウスではダイオキシンに対する感受性が低く、その差は10倍程度もある。一方ヒトに対しては、事故や戦争などから得られた幾つかの研究結果があるが、実際にどの程度の量が人体に対して危険なのか、また、AhRのアミノ酸配列からヒトは低感受性であると考えられているが個体レベルではどうかは明らかになっていない。そこで、ヒトに対するダイオキシンの毒性を予想するために、マウスのAhRの構造遺伝子をヒトAhRの構造遺伝子と置換したマウス (hAhRマウス) を遺伝子操作により作製した。このマウスは、ヒト型のAhRのみを発現しており、ヒトと類似した

ダイオキシン毒性を示すと考えられる。実際にこのマウスにAhRの典型的なリガンドである3-メチルコラントレン (3-MC) を投与した場合には、低感受性のDBA/2マウスと同程度のシトクロームp450酵素の誘導が観察されたが、代表的なダイオキシンであるTCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) を投与した場合は、DBA/2マウスより弱い誘導が観察された⁴⁾。このことは、ヒトAhRはダイオキシンに対して低反応性であることを示している。実際にダイオキシンによる催奇形性はhAhRマウスではDBA/2マウスよりも弱いものであった。このようにhAhRマウスは、ヒトに対するダイオキシンの毒性評価に非常に有用であると考えられる。

5. おわりに

今回我々は異物代謝系の発現制御機構を解明する目的で、様々な遺伝子改変マウスを作製したが、それらのマウスは環境化学物質のモニターや、農林水産物の安全性の確認、さらにはヒトに対する安全基準の設定に利用可能であると考えられる。今後、より多くの遺伝子改変マウスが、環境のモニター動物として利用されるものと考えられる。

本研究は、生物系特定産業技術推進機構、平成11年度「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」採択課題として行われたものであり、ご支援をいただきました生物系特定産業技術研究支援センターの関係者の方々に深謝いた

します。また、本研究にご協力いただきました国立環境研究 遠山千春先生、筑波大学 山本雅之先生、藤井義明先生に改めて感謝いたします。

文 献

- Enomoto A, et al. (2001), *Toxicol. Sci.* 59, 169-177.
- Aoki Y, et al. (2001), *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 173, 154-160.
- Wakabayashi N, et al. (2003), *Nat Genet.* 35, 238-245.
- Moriguchi T, et al. (2003), *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 5652-5657.

◀国内情報▶

搾乳ユニット自動搬送装置の開発

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構
生物系特定産業技術研究支援センター 畜産工学研究部
平 田 晃 ・ 後 藤 裕

繋ぎ飼い式牛舎でのパイプラインミルクカーを用いた搾乳作業を大幅に省力化する搾乳ユニット自動搬送装置を開発した。牛舎内に配置したレールを走行して搾乳ユニットを2基ずつ搾乳牛の所まで自動搬送し、ミルクラインとの接続、搾乳終了検知、離脱、次の牛までの移動を自動で行う。2頭同時に順次搾乳でき、装置4台・8ユニットを用いて1人1時間で約50頭と従来の2倍の作業能率が得られることを民間牧場で実証した。

1. はじめに

我が国では、搾乳の対象となる経産牛の80%近くは「繋ぎ飼い式牛舎」で飼養され、こうした経営が、全体の約90%を占めている。繋ぎ飼いは、個体管理に有利である反面、作業動線が長く多労である。家族労働2人では経産牛50頭程度が労力的に限界といわれ、60頭を超えたらフリーストール・ミルクパラー方式や搾乳ロボットの導入が推奨されてきた。しかし、フリーストール方式への転換は、高額投資となるために返済に大幅な増頭を要し、エサの確保、糞尿処理、広い土地基盤の確保などから、誰もができる選択ではないのが実態である。生研センターが平成11年に畜産近代化リース協会の協力を得て、成牛50頭以上の繋ぎ飼い農家を対象に実施したアンケート調査(2,480戸抽出、回答数912戸)の結果では、将来の飼養管理の省力化について「繋ぎ飼い方式」を要望した経営が70.8%を占めた。搾乳ユニット自動搬送装置は、こうした要望に応え、「ゆとりある酪農経営」を低コストで実現するために、既存の牛舎で使える自動化搾乳システムとして開発したものである。

2. 繋ぎ飼い牛舎での搾乳作業と問題点

繋ぎ飼い牛舎内では、乳牛を横並びに1頭ずつ繋いで飼養する区画(ストール)列が、通路を挟んで尻合わせ、または、頭合わせで2列平行に配列されている。ストール列に沿って牛舎最奥部から牛乳処理室に向けて流れ勾配をつけた搾乳パイプラインには、2頭に対し1カ所ずつミルクタップが設けられ、搾乳ユニットは、ここに接続して拍動真空圧と搾乳真空圧を供給され、片側1頭ずつに付け替えて搾乳する。現状の搾乳作業は手作業中心で、搾乳ユニットの運搬、ミルクタップとの接続、前搾り・乳頭清拭、ティートカップ装着、機械搾乳、搾乳終了検知・ティートカップ離脱、乳頭消毒、もう片側の乳牛での同作業、次のミルクタップまで運搬という作業ルーチンで構成されている。

搾乳ユニットの人力運搬の問題は、①搾乳ユニットのミルクチューブ長は約3mで身長の高い女性が引きずらないように運ぶのは大変であること、②パイプラインのハイポイント高さは牛床から2mでありミルクタップとの接続位置が高いこと、③カップの自動離脱装置を付加すると約8kgと重いこと、④人力運搬に伴う作業や所要時間が使用ユニット数を制約していることである。また、人力運搬に加え搾乳ユニットを1頭おきに使うため、作業者が搾乳状態を観察しながらユニット落下等に適切に対処でき

HIRATA Akira, GOTOH Hiroshi

〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

る範囲（頭数）が限定されること、左右の牛のユニット付け替えに戻るため作業動線が長いこと、しゃがむ回数が多いことである。1人が使用するユニットの数は、通常2～3ユニットまでで、前述のアンケート調査農家平均では、2.7ユニットで16.5頭／人・時であった。軽労化手段として市販化されている手押し搬送のレール懸架式ミルクカーでも3～4ユニットが限界といわれ、作業能率は25頭／人・時前後である。

3. 搾乳ユニット自動搬送の基本コンセプト

この繋ぎ飼い搾乳作業を50頭／人・時に効率化する搾乳システムの開発が、大きなねらいである。

1人1時間当たりの搾乳頭数は、1ユニットで1時間に搾乳できる頭数（繋ぎ飼い・パイプラインミルクカー方式では概ね5～8頭）に、1人が扱うユニットの数を乗じて推定される。約50頭（40～64頭）／人・時の作業能率を得るには、1人で8ユニットを扱える仕組みが不可欠となる。従来の2倍の数である。そこで、搾乳ユニット自動搬送装置の基本コンセプト（図1）は、作業動線を短縮し作業性を高めるために、2頭同時搾乳を前提として、ティートカップ自動離脱装置付きの搾乳ユニット2つずつを自動搬送し、乳牛の間に進入してミルクタップとの自動接続、搾乳終了検知後に次の牛に自動的に移動するものとした。開発の前に自動搬送装置4台・8ユニットを1人で使う仮想作業でのタイムチャート分析を行い、搬送速度は0.3m／秒程度が適切で、機械搾乳時間（3～9分）、2頭分の作業時間（90～120秒）で1人1時間50頭の搾乳作業は可能という推定結果を得た。

4. 開発の技術的ポイント

開発する装置は、既存の繋ぎ飼い・パイプ

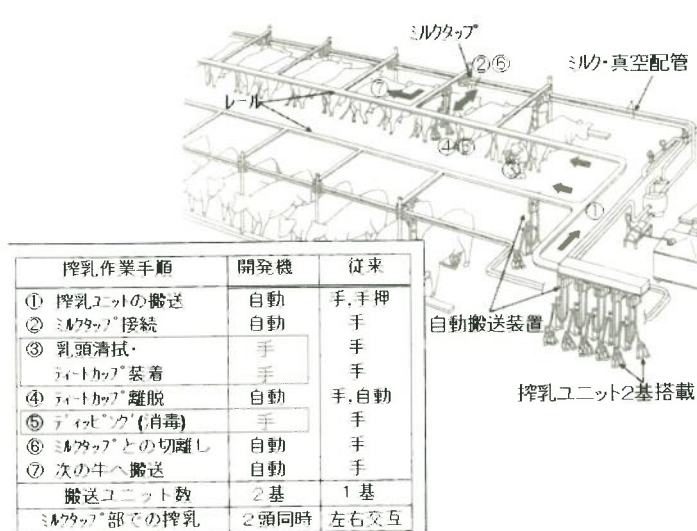


図1 搾乳ユニット自動搬送装置の基本コンセプト

インミルクカー方式の搾乳現場にマッチングし、技術が単純明快で誰にでも使いやすく、なによりも動物に受け入れられるシステムでなければならない。

1) 動物との協調：乳牛が自動搬送装置を認知し、彼ら係留牛の間への進入を許容して進入路が毎回確保されることが、この装置の実用化を進める上で不可欠の条件である。これについては、基礎試験段階で民間牧場の牛舎内にレールを仮設置し、装置を手動操作して係留牛の間に尻側から進入させて挙動を観察した。1回目は供試12頭中の内1頭がネックレール前方に飛び出そうとし、牛舎内全頭が大きく動揺した。しかし、3回目の試行で危険のないことを理解すると、その後1頭を除いて落ち着きを取り戻した。多くは尻側から進入する装置と協調して左右に避ける挙動を示すようになり、比較的簡単な馴致作業で進入が許容されることを確認した。また、馴れてくると装置両側に懸架した搾乳ユニットを突き上げるなどの挙動も想定されたので、実用機段階では乳牛（体重700kgf）との接触破損回避のため、装置本体制御部は走行部中央直下に左右±25°揺動自在に懸架し、搾乳ユニットは走行部両側にフック金具で懸架してそのディストリビュータは配管接続部にセットする構造とした。さらに進入時にチューブが

乳牛の尾根部に引っかかるなど走行モーター（DC24V 30W）に過負荷が生じた場合には、一旦後退して再進入する機能を設けた。

2) **自動搬送・配管接続システム**：搬送装置には手動操作と自動運転モードを設けている。本体制御部のSWを「搾乳」に切替えて運転ボタンを押せば、自動運転が始まる。2つの搾乳ユニットを搭載した搬送装置は、牛乳処理室横のホームポジションから走行レールを通り・分岐ポイント・分岐レールを経由して係留牛の間に進入する。この時、搬送装置は進入すべき分岐ポイントを行き過ぎた地点で可動ドグを検出後、スイッチバックして装置の配管接続部側から分岐レールに進入し、ミルクラインの2連ミルクタップと自動接続する。作業者は左右の牛に搾乳ユニットを装着し2頭同時搾乳が行われる。搾乳が終了してティートカップが自動離脱すると、搾乳ユニット側から完了信号が赤外線により搬送装置制御部に伝えられる。搬送装置は左右の牛の搾乳完了信号を受信してから次の牛へと自動的に移動する。可動ドグは、分岐ポイントへの進入履歴の有無をメカ的に示すものである。ドグが倒れていれば進入履歴有り、搬送装置は通過してドグの立っている分岐ポイントを検出して進入する。これにより、搾乳ユニットの搬送が効率的になり、作業動線は短縮される。全ての搾乳が終わりSWを「帰還」側に切り替えて運転ボタンを押せば、ホームポジションに戻り、自動充電が行われる。搬送装置が帰還する際に全ての可動ドグは、未進入の状態にリセットされる。

3) **配管接続部とミルクタップ**：走行部左右に懸架された搾乳ユニットのディストリビュータ1対は、ミルクラインに設けた2連ミルクタップ（間隔200mm）と自動接続されるが、一動作で短時間に完了することが望ましい。この2組同時の接続は、分岐レールに進入する搬送装置の水平方向の押し込み力で行い、切り離しも逆動作で行われる。このため、ミルクタップは、搾乳ユニットのディストリビュータとの接・離が、ほぼ水平方向の押し込み・引き抜き動作だ

けで可能な構造のものを選定している。また、ミルクラインは受乳装置に向かって1/100程度の勾配を持ち、温湯80℃による洗浄時の熱膨張を逃がすためにルーズに支持されている。このため、分岐レールと2連ミルクタップとの位置関係には左右方向に最大±20mm程度、進入角度の狂いを含むズレを生じる可能性がある。配管接続部のディストリビュータ支持機構は、このズレを吸収できる仕組みとなっている。このズレの問題から、100頭規模の牛舎が導入できる限界となる。

4) **衝突回避システム**：牛舎では、複数の自動搬送装置が自立的にレールを移動することになる。衝突防止のために、再帰反射型の光電センサを走行部の前後に設けている。進行右方向に一定角度を持たせて取り付け、障害物（他の搬送装置）を検出すると停止し数秒間待機する単純な方式である。

5) **トラブル対応**：停止ボタンを押せば手動操作に切り替えられ、自動運転に戻せば、そこから続行できる。搾乳ユニットは、搬送装置から外せば、従来どおり手で運びミルクタップと接続して使うことができるので、万が一の場合にも必ず搾乳できる。

5. 民間モニター牧場での評価試験

全国5カ所の牧場にモニター導入し、実作業に供試して以下について調査した。図2に搾乳ユニット自動搬送装置の走行状況と搾乳作業の様子を示した。

1) **耐久性**：5牧場で設置後8ヶ月～1年9ヶ月以上毎日の作業で使用しているが耐久性不良による故障は発生しておらず、順調に稼働を続けている。

2) **作業能率（表）**：通常時の作業能率は、使用ユニット数の増加と、ティートカップ離脱の自動化で、1時間当たりの搾乳頭数が増加した。1人作業では1時間当たりの搾乳頭数は概ね目標とした50頭前後となり、設置前と比較して2倍以上の能率で作業ができることが分かった。

表 モニター牧場での搾乳作業状況（設置前→設置後）

牧場	長野県A牧場	北海道B牧場	新潟県C牧場	福島県D牧場	栃木県E牧場
牛舎方式	対尻式	対尻式	対尻式	対尻式	対頭式
牛床数	60床	54床→72床*1	53床	36床	40床
設置年月	2002年3月	2002年10月	2002年11月	2002年12月	2003年5月
搾乳頭数	38頭→50頭	43頭→60頭	38頭→39頭	33頭→34頭	38頭→38頭
通常時作業人数	3人→3人	3人→3人	2人→2人	1人→1人	3人→2人
使用ユニット数	6U→8U	6U→8U	6U→8U	2U→4U	4U→8U*2
カップ離脱方式	自動→自動	手→手動*3	手→自動	手→自動	手→自動
通常時搾乳時間	50分→46分	82分→84分	54分→37分	84分→62分	63分→42分
1人作業時搾乳時間	90分*4→57分	—	120分*4→52分	同上	120分*4→54分
通常時作業能率搾乳頭数/時間	46頭→65頭	31頭→43頭	42頭→63頭	24頭→33頭	36頭→54頭
1人作業時搾乳頭数/時間	25頭→53頭	—	19頭→42頭	同上	19頭→40頭

*1：新築牛舎に設置； *2：1人作業時は6U； *3：自動離脱装置を手動に切り換えて使用；

*4：聞き取り調査によるデータ

3) 作業改善効果：5牧場のうち2牧場が、前搾り、1頭1布の乳頭清拭、乳頭消毒を新たに実施するようになり、それを含めて4牧場が推奨手順で搾乳作業を行うようになった。

4) 使用者の評価：「重いユニットの運搬や高い位置にあるミルク配管との接続がなくなり、搾乳作業が大変楽になった。」「搾乳作業が楽しくなった。」といった総じて良好なものであ

った。

6. おわりに

本装置は、共同研究企業であるオリオン機械株式会社のご協力を得て開発されたものである。また、評価試験に快く協力いただいた民間牧場の方々、並びに根釧農試、長野畜試、

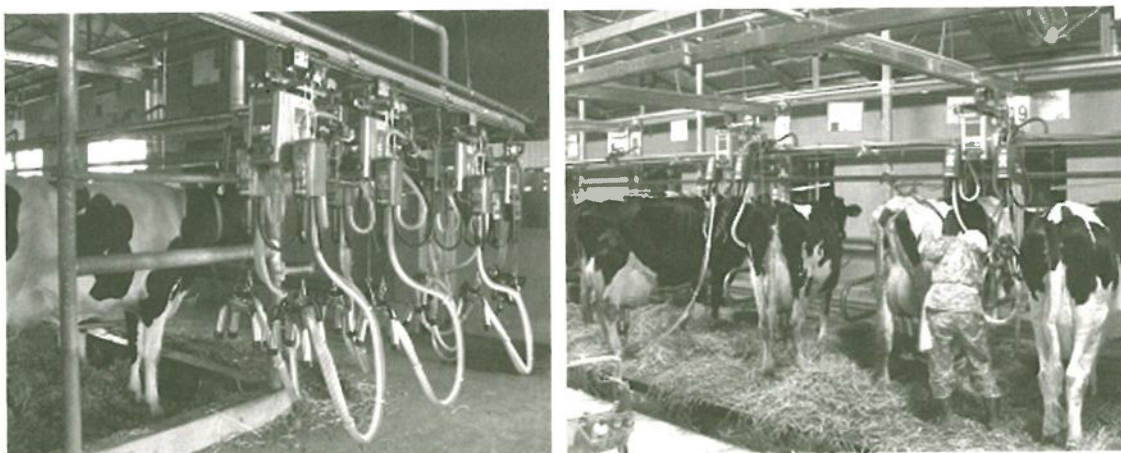


図2 搾乳ユニット自動搬送装置の走行状況と搾乳作業の様子

新潟畜研センター，栃木酪試をはじめ関係各方面のお力添えを得て，平成15年10月1日から市販化する運びとなった。ここに改めて謝意を表したい。

文 献

1) 生研機構 (1999), 牛舎内での飼養管理の

省力化に関する意向調査結果概要

- 2) 農林水産省生産局畜産部畜産企画課(2003), 平成14年度畜産経営の動向, 中央畜産会, 東京
- 3) 平田 晃 (2003), 畜産の研究, 第57巻2号, 9-14
- 4) 平田 晃ら (2004), 生研センター平成15年度研究報告会資料, 46-54



ブレイン テクノニュース
バックナンバーのご案内
第100号
2003年11月15日発行

総 説

稲における耐冷性の遺伝・育種研究の現状と今後の展望
.....清水博之

国内情報

穂ばらみ期耐冷性の異なるイネ準同質遺伝子系統を用いたマイクローレイ解析.....佐藤 裕
スズメバチの攻撃行動を促進する警報フェロモン.....小野正人
淡水魚類集団の遺伝的構造と有効集団サイズの推定
.....山本祥一郎

地域の先端研究

青森県農林総合研究センター藤坂稲作研究部におけるイネの耐冷性育種.....坂井 真・須藤 充・神田伸一郎
宮城県古川農試におけるイネの耐冷性育種

.....永野邦明・千葉文弥
LAMP法によるトマト黄化葉巻ウイルス検出技術の開発
.....福田至朗・吉田桂子・神戸三智雄
飼料イネサイレージ用乳酸菌「畜草1号」の開発と普及
.....吉田宣夫・蔡 義民

文献情報

ケモカインの一種であるインターフェロンγ誘導蛋白10KDa (IP-10) はIFN- τ により産生が刺激され、ヒツジ子宮内膜に免疫担当細胞を供給する.....(抄訳：下司雅也)
酵母*S.cerevisiae*における酸性フォスファターゼPHO5の発現制御機構.....(抄訳：家藤治幸)
イネにおける花芽運命決定の制御機構.....(抄訳：寿崎拓哉)
冷凍ヘイクのクオリティ・インデックス・メソッドの開発
.....(抄訳：沖田裕司)

海外便り

材料学研究のメッカ、マサチューセッツ州立大学で一娘と過ごした2年間.....秦 珠子

生研センターからのご案内

新組織の設立・発足ほか

◀国内情報▶

砂糖・エタノール生産のための株出多収性サトウキビ
（モンスターケーン）の開発
—琉球弧における安定多収糖質作物生産—独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 九州沖縄農業研究センター
杉 本 明

台風・干ばつ等のためにさとうきびの収量が低い琉球弧で安定多収を実現するために、製糖用実用品種とサトウキビ野生種等との間で種・属間交雑を実施し、優れた根系と収穫後の株再生力を基準に、砂糖含有率は低いが、茎数が多く収穫後の株再生力の高い多収性系統を選抜した。繊維分が高く、純糖率も低いが、原料茎重が多く砂糖収量が多いため、琉球弧における糖質・エネルギー作物としての利用が期待される。

1. 琉球弧におけるさとうきびの生産安定に向けた品種育成の方向

台風・干ばつ、植付時の圃場の悪条件や低地力等の影響で、琉球弧のさとうきびは収量が不安定で低い。収穫・萌芽期の低温等のため、低コスト化の要である株出栽培（収穫後の再生株を養成して収穫する栽培方法）は一回の収量も継続回数も少ない。夏植、春植、株出、3作型の内、夏植は台風・干ばつ被害が比較的少ないことが知られ、その安定性は、梅雨の降雨の十分な利用と、干ばつ・台風発生時の根圏・節数の確保によると推察されている。しかし、夏植には、在圃期間が長い、倒伏により収穫作業が難渋する、収穫後の萌芽が不良で株出収量が少ない、等の弱点がある。九沖農研では、夏植の弱点を克服するため、秋に植えて1年後に収穫する栽培法（夏植型1年栽培）の開発に取り組み、秋収穫栽培は冬収穫、春収穫に比べて多収であるが既存品種では糖度が低過ぎること、育成系統の中には秋収穫でも高糖性を示すものがあることを明らかにした。秋収穫と冬・春収穫とを組み合わせることで収穫期間を長期化することにより、ハーベスタを小型化し畦幅を縮小して原料茎数の増加と多収を実現すること、機械・施

SUGIMOTO Akira
作物機能開発部・さとうきび育種研究室
〒891-3102 鹿児島県西之表市安納1742-1

設の稼働率を向上すること、輪作・複合経営を促進することを提案した。収穫期間の拡張には冬収穫の株出改善が重要なため、Ni16, KF92-93, KF93T-509, KF92T-519のような、萌芽が優れる株出多収性品種・系統を育成した。これらは普及品種の収量が少ない圃場でも生育が良く、新植、株出ともに多収で可製糖量が多い。KF92-93は繊維分が高く、可製糖率はNiF8対比で94%と低いが、NiF8が少収な場合でも茎収量が多く、安定して可製糖量が多いのが特徴である。

2. 不良環境に適応性の高い株出多収性新形質サトウキビ（モンスターケーン）の開発

台風・干ばつや低肥沃度土壌への適応に必要な深く発達した根系や、台風・干ばつ多発時期までの地上部の十分な発達に必要な地上部・地下部の旺盛な初期生育を具える系統は、製糖用さとうきび相互の交配後代には見あたらない。KF92-93やKF92T-519も厳しい干ばつ・台風には耐え得るものではない。そこで、サトウキビ野生種 (*Saccharum spontaneum*) やススキ属植物 (*Miscanthus* spp.), エリアンサス属植物 (*Erianthus* spp.), スイートソルガム (*Sorghum biclor*) 等を用いた種・属間交雑による飛躍的な変異の作出を検討した。種・属間



写真1 広がりの大きいサトウキビ野生種の株（左）と強く深いエリアンサス属植物の根系（右）



a：飼料用に試験栽培中のKRSp93-19



b：収穫約8か月後の種・属間交雑系統



c：根系が深い'97S-41



d：分けつが多い'97S-133



e：種・属間交雑系統の根系
最左；NiF8、左5番目（中央）；'97S-41

写真2 種・属間交雑で作出した多回株出多収性系統

表1 種・属間交雑で作出した多収性系統の株出栽培における物質生産力

品種・ 系統名	1 茎重 (g)	茎 数 (本/a)	原料茎重 (kg/a)	繊維分 (%)	可製糖率 (%)	可製糖量 (kg/a)	糖収量 (kg/a)	全乾物重 (kg/a)
KF92T-519	480(684)	636(722)	261(497)	10.8(10.3)	6.7(9.3)	17(52)	34(53)	91(174)
KF92-93	620(769)	1682(1396)	1032(967)	12.2(12.7)	6.6(9.7)	71(97)	139(147)	406(384)
95GA-22	560(438)	3705(3002)	1943(1260)	17.9(20.0)	1.2(5.0)	22(52)	164(139)	740(544)
95GA-24	560(607)	1659(1577)	1112(1040)	12.5(14.2)	4.4(8.4)	47(91)	113(136)	321(350)
95GA-27	530(544)	2523(2174)	1159(1126)	17.8(19.4)	3.6(6.2)	41(72)	110(134)	434(471)
KRSp93-19	760(-)	2773(-)	1943(-)	14.6(-)	2.8(-)	55(-)	197(-)	722(-)
S8-5	630(-)	3818(-)	2407(-)	16.9(-)	3.0(-)	71(-)	203(-)	907(-)
JW630	130(114)	4477(3572)	950(406)	32.8(20.7)	-(-)	-(-)	49(-)	900(-)
IJ76-349	440(404)	2500(2118)	860(833)	28.7(29.0)	-(-)	-(-)	43(-)	464(474)

注) 第3回株出栽培の成績。()内は新植から第3回株出まで4回収穫の平均値。波線上段、KF92T-519, KF92-93は製糖用実用品種, 下2段, JW630およびIJ76-349は多収性のモデルとして用いた遺伝資源。

1区4.4m², {1.1m(畦幅)×2m×2畦}, 2反復。2000年2月1日採苗, ガラス室で育苗後, 3月中旬, 圃場に定植。N; P₂O₅; K₂O=1.62:1.2:1.5kg/aを基肥および, 中耕・培土時に施用。2001.1春植収穫, 2002.1.30に1株収穫, 2002.9.3, 2株収穫, 2003.9.8, 3株収穫。KRSp93-19とS8-5は1.1m×1畦で反復なし。

交雑は世界各地で行われているが, 我が国では1980年に永富が日本列島に分布するサトウキビ野生種の収集・特性評価と製糖用さとうきびとの交配を実施したことに始まる。

九州沖縄農業研究センター作物機能開発部さとうきび育種研究室では, 1996年から, 長期多回株出多収性さとうきび品種の育成を目標に, 前述の遺伝資源を用いて種・属間交雑を始めた。交配素材となる野生種やエリアンサス属植物には, 製糖用さとうきびには見られない, 幅の広い根系や深い根系を具えるものが認められた(写真1)。それらは, 長期間にわたる株出の継続に必要な分げつ生態, 乾燥への適応に必要な広い根系や深い根系を具えていた。優れた根系, 優れた萌芽・分げつ特性を基準にして選抜を進めた結果, 深い根系や優れた分げつ特性を具える多数の株出多収性系統を選抜した(写真2)。

表1に第3回株出の結果と新植から第3回株出まで4回収穫の平均値を示した。株出多収性のモデル植物に用いたリピディウム属植物JW630は, 茎収量が950kg/a, 乾物収量は900kg/aと高かったが, 糖収量は49kg/aと少なく, 砂糖の生産力は認められなかった。製糖用多収

性系統KF92-93は, 原料茎重が1032kg/aと高く, 9月収穫のため可製糖率は6.6%と低かったが可製糖量は71kg/a, 全糖収量は139kg/aであった。種・属間交雑系統の中で乾物収量が最高だったのはS8-5(Ni6×グラガクロエット)で, 907kg/a, 可製糖率は3.0%と低かったが原料茎重が2407kg/aと多かったため, 可製糖量は71kg/a, 糖収量は203kg/aと多かった。'95GA-22(Ni9×SugarDrip)は乾物収量740kg/a, 原料茎重は1943kg/aと多かったが可製糖率が1.2%と低いため可製糖量は22kg/aと少なかった。全糖収量は164kg/aと多かった。KRSp93-19(NCo310×グラガクロエット)は乾物収量が732kg/a, 原料茎重が1943kg/aと多く, 可製糖量は55kg/a, 全糖収量は197kg/aであった。繊維分は14.6~17.9%と高かった。新植および第1回株出で可製糖量, 糖収量が高かった'95GA-24(Ni9×SugarDrip)等は株出の継続に伴って生育が衰えた。'95GA-22, KRSp93-19, S8-5, S5-33(NCo310×グラガクロエット)等は株出3回目でも生育旺盛であった。

2. 実用化に向けた今後の研究方向

表2には深い根系を具える株出多収性系統'97S-41 (G38×US56-15-2), およびその突然変異処理系統(01M系統)等の生産力を示した。どの系統も収穫後の萌芽が優れるのが特徴であった。その他にも、根系や萌芽・分けつ特性が優れ不良環境適応性が期待される株出多収性系統を数多く作出した。その中には乾物生産力と糖生産力とを兼ね備えるものも認められた。優れた根系・株再生力に基づく高い乾物生産力・糖生産力, そのような特性を具える系統は, 不良環境条件下における糖質・エネルギー原料生産を地力改良型栽培で進めるための材料として

活用されることが期待される。

作出した系統の大部分は目標である株出多収性を示したが, 当初の交配組み合わせはNCo310, Ni6, IRK67-1, Ni9等の製糖用品種を母親, サトウキビ野生種グラガ・クロエットを父親に用いたものが多く, 製糖用さとうきびの重要病害である黒穂病に感受性の可能性が高い。実用化には黒穂病抵抗性の強化が必要である。品種育成を急ぐために, 本年度からは, 多数の系統を対象に黒穂病検定を実施して抵抗性系統を選定すると共に, 黒穂病抵抗性作出能力の高い交配組み合わせを探索し, 集中的に優良系統を作出する予定である。

表2 種・属間交雑で作出した根系の深い'97S-41等の株出栽培における生産力

系統名	茎数 (本/a)	1茎重 (g)	茎重 (kg/a)	蔗汁BX (%)	糖収量 (kg/a)	乾物重 (kg/a)	乾物率 (%)
NCo310	636±64	443±30	302±24	11.4±0.7	30±6	89±1	21±0.8
01M- 2	2818	468	1338	13.1	142	566	31
97S- 51	2591	750	1445	10.4	127	553	27
01M- 5	2591	706	1354	12.1	137	549	31
01M- 91	2227	584	1246	9.5	100	491	30
01M- 94	2545	520	1254	9.3	99	489	30
97S-41	1909	627	1154	10.7	102	455	29
108系統平均	1786±361	592±89	909±231	10.0±1.5	78±25	334±92	27±2.7

注) 種子島試験地の黒ボク圃場における第1回株出の成績。2002年9月～2003年9月。1区2.2m², 反復なし。NCo310(製糖用実用品種)は3反復。108系統平均は供試した108系統の平均値。

◀地域の先端研究▶

ハナサキガニの完全養殖

根室市水産研究所

橘 高 二 郎

ハナサキガニ *Paralithodes brevipes* の1 齢稚ガニ各60尾を制御水温（0 歳に対しては約15℃，1 歳以降は約12℃）及び季節変化する外海水温（-1~17℃）で飼育した。水温制御区では2 歳末に580gに達したが3 歳（771g）においても再生産は行われなかった。季節変化区では6 歳初めに雌4尾が772gに達し，同年級の雄2 尾と交尾，産卵した。抱卵雌3 尾は3℃で，産卵317日後から26日間にゾエア8,750尾を孵化，その約9%が変態した。

1. はじめに

ハナサキガニ *Paralithodes brevipes* (図1) は北海道根室半島，北方4 島周辺及びサハリン，クリール列島に生息する大型の甲殻類で，タラバガニ *P. camtschaticus* 及びアブラガニ *P. platypus* と共に北大平洋を代表する重要甲殻類資源タラバガニ属を構成している。タラバガニがオホーツク海，ベーリング海のシルト質の海底に広く分布するのに対して，アブラガニは貝殻混じりの底質を選択し，ハナサキガニは岩礁域に生息するため後2 者の分布域及び資源量は限定されている。北海道沿岸では，季節的な水温変化に伴うタラバガニ若齢群の索餌回遊が認められるが，主産卵場はより北方のロシア及び米国200海里水域内である。それに対してハナサキガニの成熟個体は根室半島沖でも漁獲され，同海域を繁殖場の一部とする日本・ロシアの共有資源と考えられる。最近の日本のタラバガニ類輸入量の増加は，ロシアの漁獲量の増大を引起し，北洋の資源量は憂慮すべきレベルに減少しているのではないかと危惧されている。ハナサキガニの完全養殖の達成は，その全生活史の人為的制御の可能性を実証したのであって，

種苗生産・放流による天然での資源培養はもちろ

ろん，人工的環境での養殖生産の展開が期待さ

れている。

2. ハナサキガニ完全養殖技術の確立

2.1 ハナサキガニの初期生活史

天然においてハナサキガニの成熟した雌は6 月頃，脱皮・交尾・産卵，翌年5 月頃まで抱卵し，ゾエア幼生を孵化する。ゾエアは動植物プランクトンを摂餌，水温8~10℃では3 週間に3 回脱皮してグロコトエに変態する。

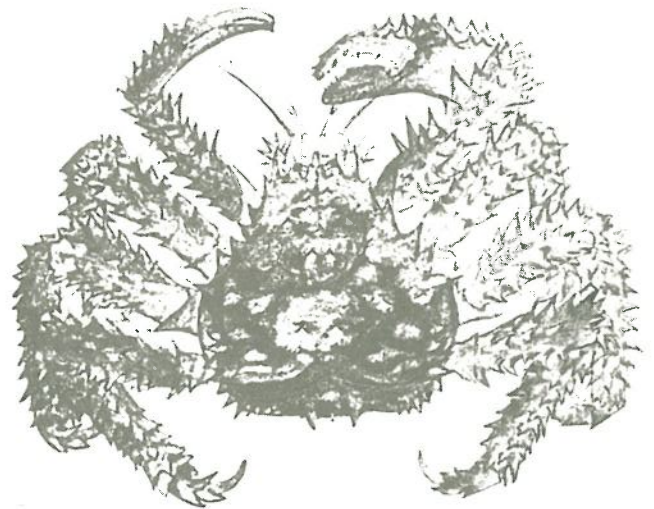


図1 ハナサキガニ（出所：文献1）

グロコトエは摂餌することなく，専ら遊泳し付けて着場所を探索する。グロコトエの期間は約3 週間で，脱皮して稚ガニになると底棲生活に

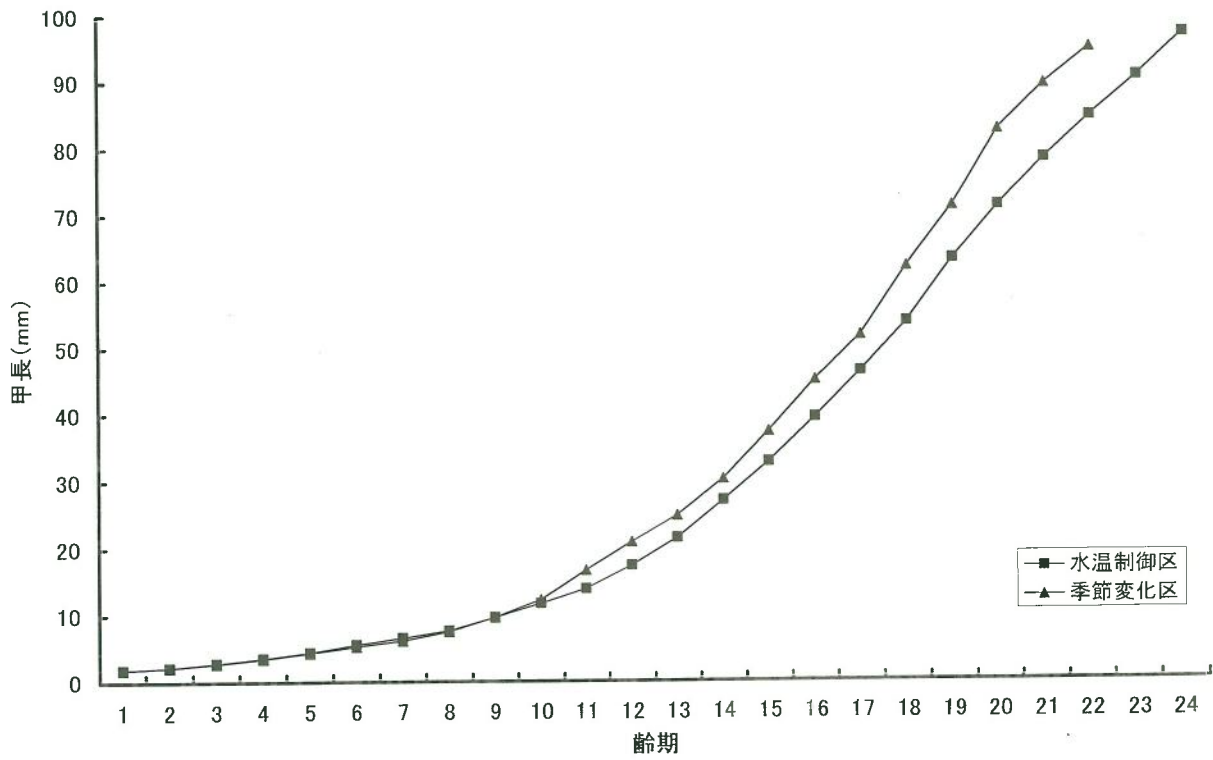


図3 ハナサキガニの齢期と甲長

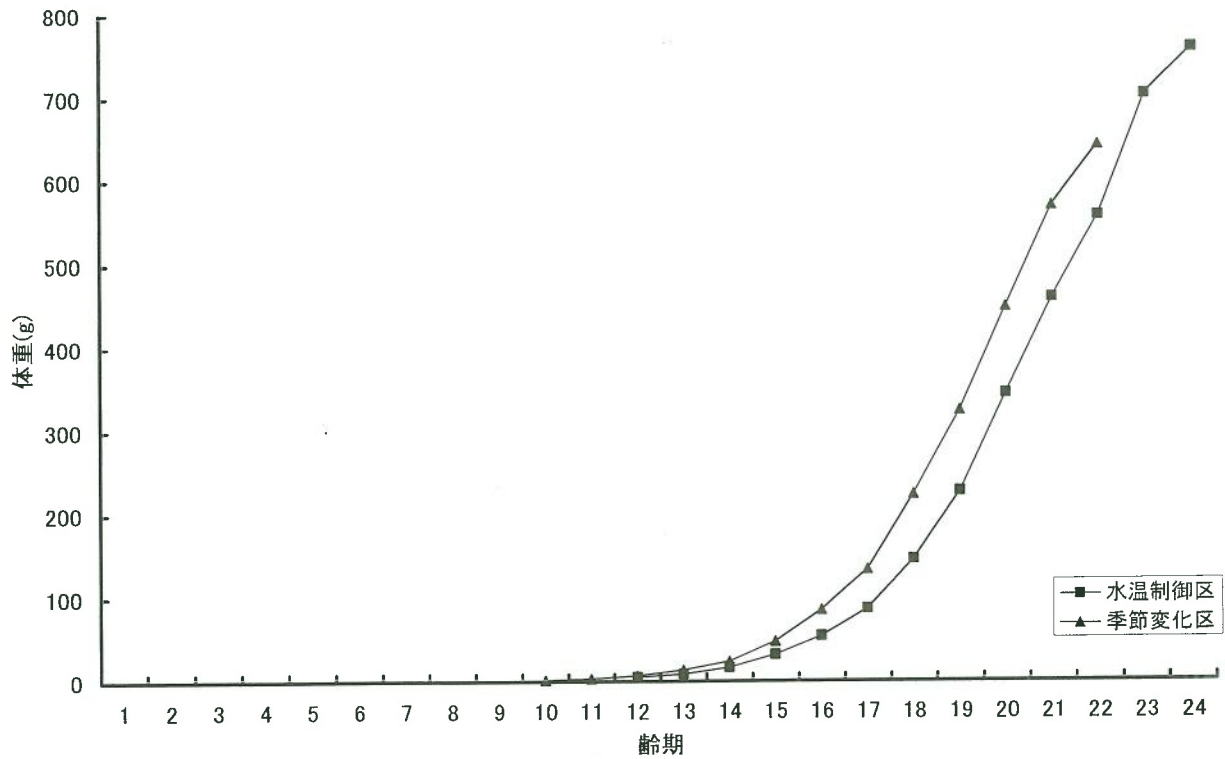


図4 ハナサキガニの齢期と体重

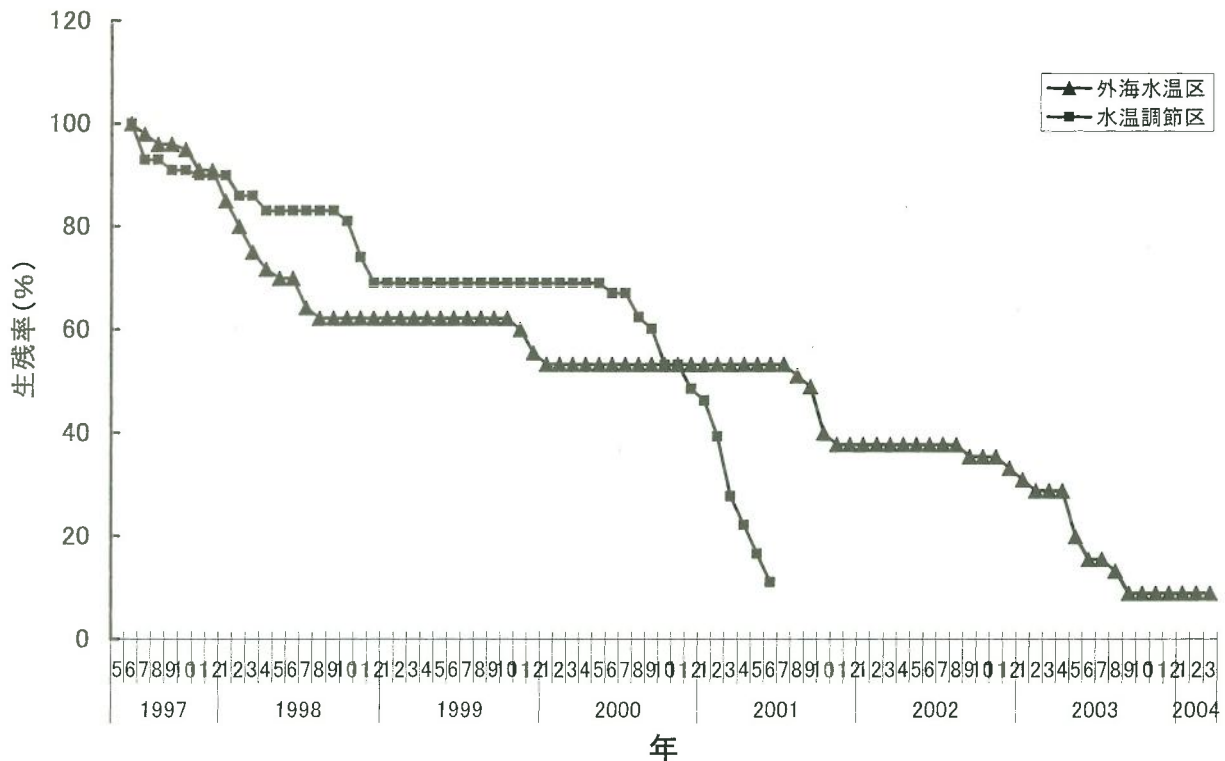


図5 ハナサキガニの生残率

の平均体重は2, 47, 130, 331, 488gであった。ハナサキガニの脚はタラバガニに較べると短く肉質に富み、比較的小型(約500g)でも食用に供される。500gサイズに養成するのに、水温制御区では3年、季節変化区では5年を要する。

0歳以降の各年齢の生残率は、水温制御区では85, 83, 100, 57, 0%, 季節変化区では75, 87, 86, 100, 71, 76, 31%, 通算の生残率は図5に示す通り、水温制御区では85, 69, 69, 39, 0%, 季節変化区では75, 62, 53, 53, 38, 29, 9%であった。

水温制御区における生残率の低下は脱皮間期の延長に関係している。年間脱皮回数が2回に減少した3歳後半から高い死亡率(年間43%)を示し、その後回復することなく4歳前半ですべて死亡した。ハナサキガニは腹面を海底に接して岩の下に潜伏する習性がある。水槽内でのこの姿勢は、腹部が水槽底に接し汚染に対して無防備である。一方、季節変化区の年間脱皮回

数は2歳以降2回、5歳以降1回に減少したが、生残率は3歳100%で、その低下は6歳(生残率31%)で顕著になった。

2.4 餌料及び水質

上記の飼育実験に使用した餌料は主としてムラサキガイである。なお0歳個体に対しては初めの6ヶ月間クルマエビ用配合餌料を投餌した。また、一般に甲殻類は体蛋白のアミノ酸組成に近似した餌料で優れた成長を示すので、ハナサキガニのアミノ酸組成を分析、イカミール、イカソリュブルなどの配合素材にアミノ酸混合物を添加した餌料を試作、投餌実験を行った。試作餌料は対照餌料に準じた成長及び生残率を示し、ハナサキガニの栄養要求はクルマエビ等の甲殻類に共通していると推定された。しかしクルマエビが数対の歩脚で摂餌するに対して、ハナサキガニは専ら第1歩脚で餌を操るから水中に逸散する割合が高い。これが水質汚染の原因となり、生残率を低下させたと考えられる。

溶存酸素の増加は有効な対策である。

2.5 再生産

水温制御区の個体は3歳末に成熟サイズ(22-23歳, 甲長95mm, 体重771g)に成長したが交尾・産卵を行わなかった。季節変化区の6歳初めの生残尾数は雌7尾,雄6尾であったが,雌4尾(20-22歳, 甲長90mm, 体重772g)が雄2尾(20歳, 100mm, 945g)と2003年4月22日交尾・産卵, 1尾約5,000粒を抱卵した。雌1尾はその後死亡したが,生残した雌3尾から2004年3月5日~31日の期間に約8,750尾のゾエアが孵化した。ゾエアは趨光性,浮遊性に乏しく,体色は赤みを著しく欠いていたが,珪藻及びアルテミアを投餌することにより,約800尾がグロコトエに変態した。2004年4月19日には稚ガニが出現,生残率(グロコトエ及び稚ガニ)は約6%であった。この低生残率は産卵までのハナサキガニの栄養条件および飼育条件が不良であったためと考えられ改善が可能である。

2.6 集団飼育

ハナサキガニ若齢個体100尾(体重2-20g,平均7g)を密度25尾/m²で飼育した。1年後,増重倍率9.35(体重23-114g,平均67g),生残率70%の比較的良い結果が得られた。水槽内に底棲小動物を導入し,ハナサキガニを頂点とする生態系を樹立することができれば成長度および生残率はさらに向上すると考えられる。

3. おわりに

北太平洋のタラバガニ類は,底棲生物群集の構成する食物連鎖の最上位に位置し,北大西洋のロブスターに匹敵する大型甲殻類である。ロブスターの養殖は米国・カナダで研究され,温排水を使用して1ポンド(450g)サイズまでの生育期間を天然の半分(2.5年)に短縮できることが示された。ハナサキガニも水温を制御することにより同様に成長が促進される。ロブスターに関して企業の発展が見られないのは,激しい共食いのために全養成期間個別飼育に頼らざるを得ない点にあると考えられる。タラバガニ類の共食いはシェルターの配置及び餌料生物の繁殖によってかなり防止することが可能である。0-1歳群を集団飼育し,2歳群から個別飼育するのも養殖の一形態と考えられる。

文 献

- 1) 中沢毅一(1933),水産動植物図説(田中茂穂ら分担執筆),374,大地書院,東京
- 2) 橘高二郎(1999),水産業の再生戦略(橘高二郎・出口吉昭・平田八郎・山崎文雄編),タラバガニ・ハナサキガニの生物学的特性とその資源培養における意義,恒星社厚生閣,東京
- 3) Kittaka, J. and Onoda, S. (2001), Fisheries Science, 68 (Supplement I), 921-924

◀地域先端研究▶

非病原性フザリウム菌を用いたサツマイモつる割病の防除

茨城県農業総合センター 農業研究所 病虫研究室

渡 邊 健

サツマイモつる割病防除に有効な非病原性フザリウム菌の生物農薬を開発し、農薬登録を取得するとともに販売を開始した。本剤の作用機作は、サツマイモ植物体に内生する非病原性フザリウム菌を植物体へ接種することによって誘導される抵抗性を利用したものである。使用法は農薬登録されている化学農薬と同じで、所定の希釈液中にサツマイモ苗の切り口を浸漬してから定植する。つる割病防除効果も化学農薬と同等である。

1. はじめに

現在、化学肥料や化学農薬への過度の依存による環境負荷が懸念されている。また、一方では、消費形態が多様化するなかで、安全性に優れた農産物の生産が強く求められている。これらの問題を解決し、環境と調和した持続的な農業生産のため、化学農薬に代わる防除技術として天敵や有用微生物を用いた生物農薬が期待されている。これまで、生物農薬は害虫を対象とした天敵類が主で、病害対象に登録されている生物農薬は極めて少なかった。しかし、近年の精力的な研究の結果、病害を対象とした生物農薬が次々と開発され、実用化に至っている。

サツマイモつる割病は*Fusarium oxysporum* f.sp. *batatas*によって引き起こされる土壌伝染性病害で、発病株はつる割症状を呈し、黄化・萎凋して枯死するので減収の大きな要因となる。小川³⁾は、健全なサツマイモの植物体内に内生する非病原性*F. oxysporum*を見だし、本菌の培養菌体を予めサツマイモ苗の切り口に接種してから定植すると化学農薬(ベノミル剤)と同等の高いサツマイモつる割病防除効果が得られることを明らかにした。

本県では、環境にやさしい農業を推進する技術のひとつとして、非病原性*F. oxysporum*の

実用化を図るため、エーザイ生科研株式会社と共同研究を実施し、平成14年6月に非病原性フザリウム菌水和剤(図1)として農薬登録(登録番号第20848)され²⁾、昨年から販売開始された。

2. つる割病防除の作用機作

非病原性*F. oxysporum*は作物組織に対する攻撃力はほとんどないが、菌体を大量にサツマイモ苗の切り口に接種すると、接種された菌の一部は苗の切り口の傷ついた柔組織に侵入することができる。この感染刺激にサツマイモ植物体が反応して抵抗性が発現する³⁾。これまで、サツマイモの誘導抵抗性は、非病原性*F. oxysporum*の接種によって植物体内で産生された抗菌性物質による病原菌の胞子発芽抑制や病徴軽減等の作用機作によると考えられている³⁾が、非病原性菌が産生する熱に不安定な物質も抵抗性誘導に関与している可能性も示唆されており⁶⁾、サツマイモの誘導抵抗性は、いくつかの複合的な作用によるものである。誘導抵抗性の作用機作の解明は、今後の極めて重要な課題である。仮に誘導抵抗性の作用機作が解明されれば、生物防除効果をさらに高めたり、持続させる技術が開発される可能性がある。

一方、サツマイモ植物体に抵抗性が誘導されている期間は、本菌が植物組織に感染刺激を与

WATANABE Ken

〒311-4203 茨城県水戸市上国井町3402



図1 非病原性フザリウム菌水和剤（左：製剤の包装，右：製剤）

えている間に限られ、誘導抵抗性の持続性は接種後5日までと短い³⁾。しかし、土壌から病原菌に感染する可能性が高い定植直後の苗を誘導

抵抗性で保護でき、抵抗性が誘導されている間に苗の切り口は自然治癒してしまうので、実用的な防除効果が得られる。

表1 サツマイモ苗に前接種した非病原性*F. oxysporum nit* 変異株の再分離

処 理	分離部位	組織分離	ホモジナイザー法
		再分離率 (%)	再分離数(原液) (出現コロニー数/プレート)
<i>nit</i> 変異株処理	苗先端部	0	4
	苗中央部	0	0
	苗基部	60.0	3
	塊根上半部	0	—
	塊根上半部	0	—

注) 組織分離の再分離率は分離数/置床数より求めた。
ホモジナイザー法の数字は5プレートの平均値。
定植144日後に塊根収穫。翌日に調査。
塊根は5サンプル、合計100切片の平均値。

表2 土壤に接種した非病原性*F. oxysporum nit* 変異株の消長

処 理	乾土1gあたりの <i>nit</i> 変異株の菌数 (CFU)		
	接種21日後	接種40日後	接種155日後
<i>nit</i> 変異株接種	6.0×10^5	1.5×10^4	5.0×10^2
菌 無接種	—	0	0

注) サツマイモ栽培条件。—：試験なし。数字は5プレートの平均値。
菌接種量：1m²に製剤12.5g（培養菌懸濁液，10⁷ bud-cells/mlを100ml分）を
土壤混和。

3. 非病原性フザリウム菌の環境中での動向

一般に*F. oxysporum*は、多くの農作物の病原菌として知られている。したがって、非病原性*F. oxysporum*を生物農薬として用いるにあたり、農作物に非病原性であることを実証し、菌の環境中での動態を明らかにする必要があった。そこで、サツマイモつる割病防除効果が優れる非病原性*F. oxysporum* 101-2株を選抜し、本菌株を各種農作物に接種して病原性がないことを確認するとともに、101-2株の*nit*変異株（硝酸塩利用性欠損菌株）を作出してマーカーとし、本菌を接種したサツマイモの植物体内および土壤中における菌の動向を変異株の選択分離培地を用いて調査した。

この結果、苗の切り口に接種した*nit*変異株は苗の先端部まで移動していることを確認したが、その分離数は極めて少なかった。また、*nit*変異株接種苗を栽培して得られた塊根からは*nit*変異株を再分離することはできなかった（表1）。一方、土壤に接種した*nit*変異株の乾土1gあたりの菌数は、接種21日後は 6.0×10^5 CFUであったが、40日後には 1.5×10^4 CFU、155日後には 5.0×10^2 CFUと徐々に減少した（表2）。

このように、非病原性*F. oxysporum* 101-2株は多量にサツマイモ植物体や土壤に接種して

も異常に繁殖することなく、収穫時の塊根からは検出されなかった。したがって、本菌を人為的に使用しても自然生態系をかく乱する恐れがない。

4. 非病原性フザリウム菌の製剤化とつる割病防除効果

非病原性*F. oxysporum* 101-2株の大量培養と製剤化について検討し、ショ糖あるいはブドウ糖を加用したジャガイモ煎汁培地を用いてジャーフェーマンターで攪拌培養する大量培養法を確立し、ゼオライトに菌体を吸着・乾燥させた製剤（自然乾燥製剤）ならびに糖やスキムミルクを分散媒として菌体を凍結乾燥した製剤（凍結乾燥製剤）の2種類の製剤化に成功した⁵⁾。

非病原性フザリウム菌水和剤には、生産コストが低く保存性に優れた自然乾燥製剤を採用し、非病原性*F. oxysporum* 101-2株の生菌を 5×10^8 CFU/g以上含有するよう製造されている。本剤は500倍液を作成し、定植前日にサツマイモ苗の切り口を一晩（17時間）浸漬してから定植する。本剤を水中に入れるとゼオライトに吸着していた菌体は容易に分散するが、良く攪拌して菌の懸濁液を作成する。使用法としてはこれまで使用されてきた合成農薬と同じで、つる割病防除効果もほぼ同等である（図2）。

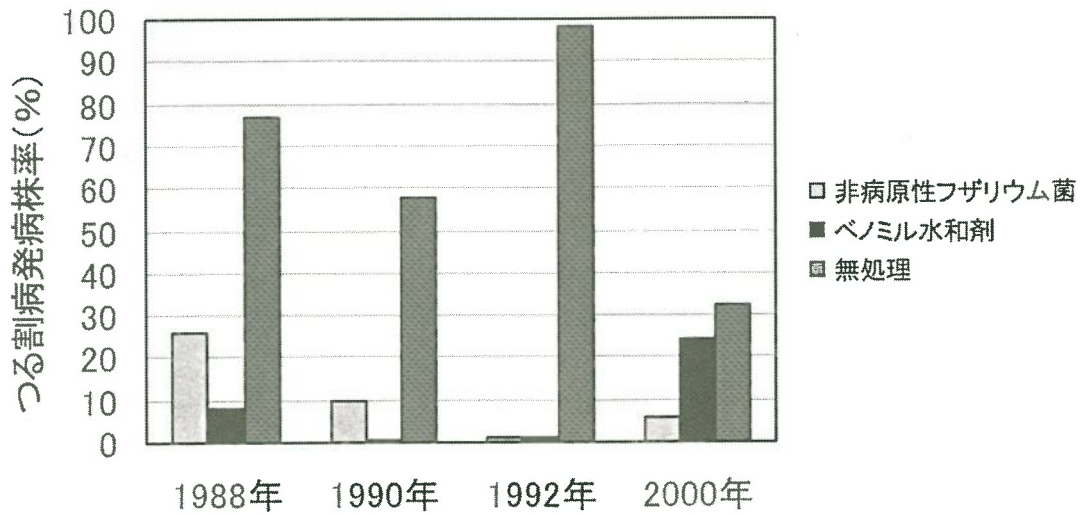
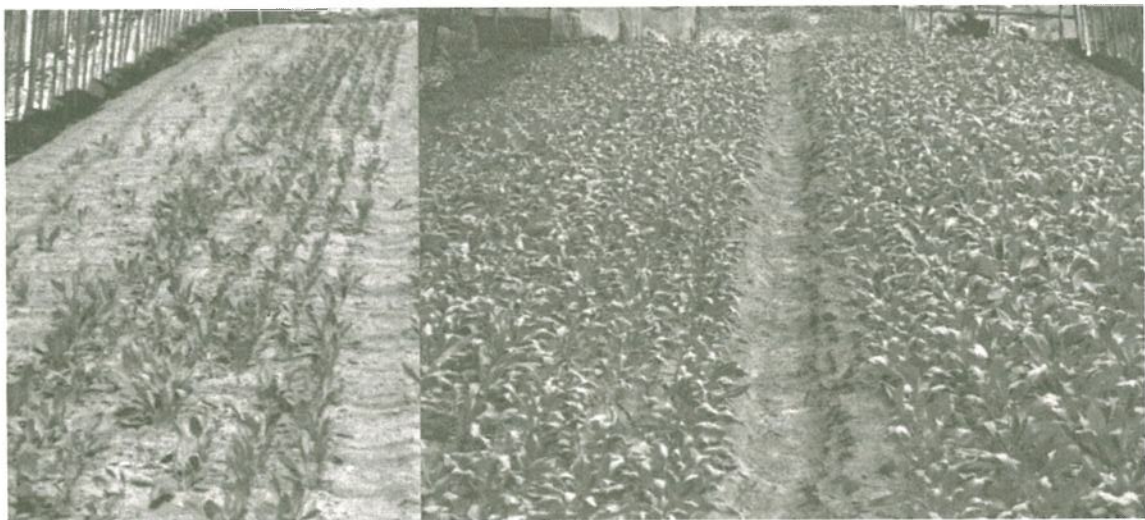


図2 非病原性フザリウム菌のサツマイモつる割病防除効果



直播区 (左)

移植栽培区 (中)

移植+非病原性フザリウム菌処理 (右)

図3 現地における移植栽培と非病原性フザリウム菌の併用によるホウレンソウ萎凋病防除状況

5. 今後の課題

今後の課題は非病原性フザリウム菌水和剤の他作物に対する適用拡大である。我が国では、非病原性*F. oxysporum*を用いた生物防除に関する多くの研究蓄積、成功事例がある⁴⁾。そこで、非病原性*F. oxysporum* 101-2株が他作物・他病害に対して適用拡大が可能かどうか検討した。本菌はダイコン萎黄病、ウリ類つる割病、ハクサイ黄化病に対して防除効果は認められなかったものの、トマト萎凋病 (J1)、ダイズ萎凋病、シュンギク萎凋病、コマツナ萎黄病、ストック萎凋病、アスター萎凋病、カーネーション萎凋病、ハウレンソウ萎凋病に対しても防除効果が認められている⁷⁾。しかし、本菌の接種によって植物体に抵抗性が誘導されている期間は短いので、トマトやカーネーション等、栽培期間の長い作物に対しては防除効果が長続きせず、栽培後期には発病株が増加するケースが多い。したがって、非病原性*F. oxysporum*を用いた生物防除は栽培期間の短い葉菜類等に適用することが有利であると考えられる。

勝部¹⁾は、ペーパーポット苗の移植栽培と非病原性*F. oxysporum*の生物防除の併用によって安定した高いハウレンソウ萎凋病防除効果が得られることを報告している。そこで、勝部の方法に準じて試験を行ったところ、実用的な防除効果が得られた (図3)。このように、非病

原性フザリウム菌水和剤は葉菜類の土壤病害防除に大きな可能性を秘めており、適用拡大を進めたい。

6. おわりに

前述したように、我が国においては非病原性*F. oxysporum*を用いた生物防除に関する多くの研究蓄積があり、当県保有株が最初の非病原性フザリウム菌の生物農薬として農薬登録されたことは生物農薬の将来を考えるうえで意義が大きい。今後、非病原性フザリウム菌が実際の農業生産に貢献することが期待される。

文 献

- 1) 勝部和則 (2001), 岩手農研センター報, 2, 1-60
- 2) 小田正文 (2003), 植物防疫, 57, 119-122
- 3) 小川 奎 (1988), 農研センター報告, 10, 1-127
- 4) 小川 奎 (2002), 植物防疫, 56, 185-188
- 5) 小川 奎・渡辺 健 (1992), 植物防疫, 46, 378-381
- 6) Shimizu, B., et al (2000), J.Pesticide Sci, 25, 365-372
- 7) 渡辺 健ら (1997), 日植病報, 63, 219 (講要)

◀文献情報▶

ウシ卵管内および子宮内の局所pH

In situ oviduct and uterine pH in cattle

S. Hugentobler^{a, b}, D.G. Morris^a, M.T. Kane^b, J.M. Sreenan^a^aDepartment of Physiology, National University of Ireland Galway, University Road, Galway, Ireland,^bDepartment of Animal Reproduction, Teagasc Research Centre, Athenry, Galway, Ireland
Theriogenology, 61, 1419-1427 (2004)

生殖器へのアクセスの困難さ、とりわけ卵管へのアクセスのためには麻酔が不可欠であることから、生きたウシの卵管内あるいは子宮内の局所のpHについては、明らかにされていなかった。吸入麻酔のひとつであるハロセン麻酔は、呼吸機能を抑制して血中CO₂を増加させるとともに、血液のpHを減少させることが知られているため、ハロセン麻酔有りあるいは無しの場合で、卵管内および子宮内のpHを測定した。まず、チオペンタン単独の短時間麻酔を用い、発情周期の2から4日目の卵管内のpH、および6日および8日の子宮内のpHを測定した。その結果、発情周期による差は認められなかったが、卵管内のpH (7.60 ± 0.010) は子宮内のpH (6.96 ± 0.009) より有意に高かった ($P < 0.001$)。また、血液のpH (7.41 ± 0.007) に比べて、卵管内のpHは有意に高く ($P < 0.001$)、子宮内のpHは有意に低かった ($P < 0.001$)。つぎに、チオペンタンとハロセンを用いて麻酔し、発情周期0, 2, 3, 4および6日の卵管内のpHと、6, 8および14日の子宮内のpHを測定した。発情周期によるpHの日間変動は認められなかったが、卵管内のpHは子宮内のpHよりも概して高く、発情周期6日目における比較においては、卵管内のpHは子宮内のpHよりも有意に高かった ($P < 0.001$)。この論文は、我々の知る限り、ウシ卵管内の局所pHを測定した初めての論文である。

ほ乳類においては、排卵卵子は卵管内で受精し、受精卵は卵管から子宮にかけて移動しながら発生をつづける。近年、体外成熟・体外受精・体外培養により胚が生産されるようになってきたが、体外培養による胚の品質は、生体内で発生した胚に比べて、一般的に品質が劣っている。ある種のマウス胚においては卵管内ではおこらない2-cellブロックが体外培養ではおこること、ウサギ胚を卵管液中で培養すると拡張胚盤胞まで発生すること、ウシ体外成熟・体外受精胚は、体外培養よりもヒツジ卵管内で培養した方が胚盤胞期への発生率が高いことなど、卵管や子宮が胚発生に及ぼす役割の重要性は明らかである。体外培養において品質の高い胚を生産するためには、温度、浸透圧、栄養素、酸素分圧、pH等の培養環境の至適化が重要である。ウシ生体内での局所のpHについては、アクセスの困難さからほとんど明らかにされていなかったが、これまでの体外培養の成績から、ウシ胚においてはpH7.1から7.4での培養が一般的に推奨されている。しかし、本論文の結果からすると、受精から初期発生の場合である卵管内のpHは7.60と高く、桑実胚から胚盤胞期胚が発育する子宮内のpHは6.96と推奨値よりも低いことから、体外成熟から8～16細胞期まではpH7.60で、生体内では卵管から子宮へ移行する時期にあたる初期桑実胚から胚盤胞期胚まではpH6.96の条件で培養することにより、ウシ体外成熟・体外受精・体外培養胚の胚盤胞期への発生率や胚の品質を高められる可能性がある。今後、実際にこのようなpHを用いて培養した場合のウシ胚の発生状況についての検討が必要である。

(抄訳：下司雅也, GESHI Masaya, 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所)

◀文献情報▶

脂肪酸および脂質を多く含む魚の摂取と中年層における認識能力の関係

Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age
S. Kalmijn, M.P.J. van Boxtel, M. Ocké, W.M.M. Verschuren, D. Kromhout & L.J. Launer
Neurology, 62, 275-280 (2004)

食事は脳機能との関連が高く、例えば抗酸化物質を多く含む素材や魚由来の ω 3系不飽和脂肪酸の摂取はアルツハイマー病に代表される痴呆症のリスクを低下させることが知られている。本論文は、University Medical Center Utrechtらに所属するオランダの研究者グループとNational Institute on Aging, NIHの共同研究結果であり、痴呆症発症に先立つ脳機能の低下と、食事からの脂肪酸、脂質およびサケ、マグロ、サバのような脂質を多く含む魚の摂取との関係について、中年層を対象に調査したものである。

本研究はオランダに住む1613名の45歳から70歳（平均56.3歳）の男女を対象として行われ、年齢、性別、教育レベル、喫煙、全エネルギー摂取量の影響や心血管のリスク要因を統計処理により排除している。記憶力、思考速度、柔軟性および全体認識力により構成される複合スコアを脳機能の指標として、質問票を用いて被験者より得た食事内容の情報との関係を解析した。

その結果、脂質を多く含む魚や海産物由来の ω 3系不飽和脂肪酸の摂取は全体認識力の減退の危険性を19%低下させ、思考速度の障害発生の危険性を28%低下させた。一方、コレステロールを多く摂った人は記憶力と柔軟性の低下の危険性が有意に高く、飽和脂肪酸の摂取量が多かった人は、有意差は認められなかったものの、記憶力、思考速度、柔軟性が低下する危険性が15から19%高くなった。なお本研究においては、

脳機能を現す前述の複合スコアと全不飽和脂肪酸、リノール酸、 α -リノレン酸、全脂肪摂取量との明確な関係は認められていない。

魚の摂取は痴呆症やアルツハイマー病の低減に有効であり、また全脂質や飽和脂肪酸、コレステロールはそのリスクを上げることに関与することが過去の報文で知られているが、本論文により中年層の脳機能維持にも脂質が多い魚や海産物由来の ω 3系脂肪酸を摂取することが有効であり、コレステロールや飽和脂肪酸は機能低下につながる可能性が示された。（研究者の能力維持のためにも魚の摂取をお勧めします。）（抄訳：高見幸司, TAKAMI Koji, 日本水産株式会社中央研究所）

◀文献情報▶

一酸化窒素は側根発生に関係している

Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato.

N. Correa-Aragunde, M. Graziano and L. Lamattina

Planta, 218, 900-905 (2004)

根は言うまでも無く植物体の支持体であるとともに、水分、養分を吸収する機能を持ち、まっすぐに伸びた直根と直根より放射状に分岐している側根からなる根系を形成している。その側根は分裂組織から直接作られるものではなく、オーキシンに応答して根の内鞘部分に原基が発生、分裂、分化、伸長、やがて根表皮を突き破り、側根が発生することが知られている。他方、一酸化窒素は動物で様々なシグナル伝達物質として働くことが以前より知られていたが、植物においても、アブシジン酸あるいはサイトカイニンなどの植物ホルモンのシグナル伝達物質であることが、21世紀になると相次いで明らかになってきた。今回一酸化窒素がオーキシンのシグナル伝達物質でもあり側根誘導因子であることが明らかにされたので、紹介したい。

著者らは、無菌播種したトマトに各種薬剤を投与し根系の発達具合を観察してみた。まず、オーキシンの1種NAAにより側根が発生し、オーキシンの移動阻害剤NPAにより側根発生が抑制されることを再確認する。次に、一酸化窒素発生剤のSNPを与えると、直根の伸張が抑えられ側根の発生が発生する。一酸化窒素の吸収剤であるC-PTIOを加えると側根が全く誘導されず、NAA及びSNPの効果はC-PTIOによって削減される。ふむ、一酸化窒素が側根誘導に絡んでいるらしい。でも、一酸化窒素は側根誘導時に本当に発生しているのか？ 一酸化窒素の検出蛍光剤DAF-2DAで染色してみると、根内鞘に生じた側根原基が緑に染まり、一酸化窒素が発生していることがわかる。また、NAA投与によって生じる側根の発生初期にも一酸化

窒素が発生していることが確認された。オーキシンというシグナルに応答し、情報伝達物質一酸化窒素が発生、やがて、側根原基が誘導され、側根となるというストーリーを描くことができる。専門外なので断言は出来ないが、一酸化窒素が細胞分化、形態形成にまで絡んでいるということを明らかにした最初の例ではないだろうか（間違っていたら御免なさい）。これで、サイトカイニン、アブシジン酸についてオーキシンにおいても一酸化窒素が情報伝達物質であることが明らかになった。この論文が掲載されている号（Huang et al. 938-946）に、ジャスモン酸の情報伝達物質として一酸化窒素が働いていることが発表されており、一酸化窒素は植物ホルモンに共通する情報伝達物質として作用している可能性が濃厚になってきた。

最後に筆者の一人言。茎を地面に挿す、いわゆる挿し木では茎から側根(?)が発生してくるが、これにも一酸化窒素は関与しているのだろうか。発根促進剤としてオーキシンを利用もしているし、ひょっとしたらそうかな。でも、茎と根は組織学的に随分違うしな。

(抄訳：岩井純夫, IWAI Sumio, 鹿児島大学農学部)

◀文献情報▶

OXI1キナーゼはシロイヌナズナの酸化バーストを介するシグナル伝達に必要である

OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signaling in Arabidopsis

Rentel MC¹, Lecourieux D², Ouaked F², Usher SL³, Petersen L^{1,4}, Okamoto H¹, Knight H¹, Peck SC⁵, Grierson CS³, Hirt H², Knight MR¹

¹Department of Plant Sciences, University of Oxford, UK

²Max F. Perutz Laboratories of the University of Vienna and Gregor-Mendel-Institute of Molecular Plant Biology, Austrian Academy of Sciences, Vienna Biocenter, Austria

³School of Biological Sciences, University of Bristol, UK

⁴Department of Molecular and Cell Biology, University of Cape Town, South Africa

⁵Sainsbury Laboratory, UK

Nature, 427, 858-61 (2004)

刺激に反応して、また発生中の過程で生成する活性酸素種 (AOS) は、真核生物でシグナル伝達分子として機能することがあり、下流で特定の応答を誘導する。植物のこのような下流の応答には、病原体による攻撃、創傷、酸素不足などのストレスへの対処、アブシジン酸によって誘導される孔辺細胞閉鎖、細胞発生 (例えば根の成長) などの多様な過程が含まれる。真核生物ではAOSを介したシグナル伝達が重要であるにもかかわらず、上記の過程のいずれにおいてもAOSの下流で働いているタンパク質成分はほとんど解明されていない。そこで筆者らはプロテインキナーゼに着目し、シロイヌナズナにおけるAOSシグナリングに特異的に関係するキナーゼを同定するため、酸化バーストを模した過酸化水素水処理によって誘導されるキナーゼ遺伝子をスクリーニングした。その結果得られた推定セリン/トレオニンキナーゼをコードする遺伝子をOXI1 (Oxidative Signal-Inducible1) と名づけた。

AOSシグナリングは環境ストレスによって

引き起こされるため、筆者らは創傷やセルラーゼ処理、*P. parasitica*の感染といったストレスに対するOXI1の発現を調べた。その結果、これらのストレスによってOXI1の発現が誘導されることがわかった。これらのストレスによる発現に加えて、OXI1の発現は根において常にみられ、弱いストレスを与えた成長条件下でより高いレベルの発現がみられた。このことは根毛の成長にAOSの産生が必要であることと相関があると思われた。以上の結果から、OXI1の発現は、ストレスや根毛の成長に反応して、AOSの産生を介しておこることが示唆された。

次に筆者らは*oxi1*欠損株 (*oxi1*) と、*oxi1*欠損株に野生型OXI1遺伝子を導入して相補した株 (*oxi1*+OXI1) を用いて、AOSを介した応答におけるOXI1の機能を決定することにした。*P. parasitica*への感受性を調べた結果、*oxi1*は野生株や*oxi1*+OXI1に比べて高い感受性を示した。また、根毛の平均的な長さを調べた結果、*oxi1*は野生株に比べて短かった。さらに、*in vivo*において過酸化水素水処理やセルラーゼ処理によって誘導されるOXI1キナーゼ活性を測定したところ、野生株や*oxi1*+OXI1では活性が誘導されたが、*oxi1*では誘導されなかった。シロイヌナズナにおいてMAPK3とMAPK6の活性は、過酸化水素水への応答におけるシグナル伝達にとって必須である。そこで過酸化水素水処理やセルラーゼ処理によって誘導されるMAPK3とMAPK6の活性を測定したところ、野生株や*oxi1*+OXI1では活性が誘導されたが、*oxi1*ではそれらに比べて低い活性しか誘導されなかった。よってAOSへの応答においては、MAPK3とMAPK6が完全に活性を示すためにはOXI1が必要であり、また、*oxi1*においてはこれらのMAPKのシグナル伝達が弱まったために上記のような表原型を示したと考えられた。

以上の結果から、OXI1は酸化バースト・シグナルと下流の多様な反応を結びつけるシグナル伝達経路の重要な成分であることが示唆された。(抄訳：吉川 彰, YOSHIKAWA Akira, カルピス基盤技術研究所)

生研センターからのご案内

研究開発を対象にした一般・特別融資制度のご案内

制度の概要

貸付利率を低減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。

融資対象者

民間企業、農林漁業団体、公益法人。ただし、特別融資は資本金10億円未満の研究開発型企業です。

対象試験研究

生物系特定産業技術に関する応用研究段階または事業化に結びつく可能性の高い試験研究で、試験研究期間は5年以内です。

融資限度額

研究期間中の各年度ごとに、対象試験研究費の7割を限度としてご融資いたします。

貸付対象経費

試験研究に必要な施設設備費・試験ほ場造成費・物品費・材料費・労務費・外注費等。

貸付条件

- (1) 貸付方法：試験研究終了までの間、支出済み経費に対して貸付
- (2) 基準利率：貸付時点の財政融資資金貸付金利に相当する率
- (3) 償還期間・方法：試験研究終了後10年以内。原則として元金均等年2回分割償還
- (4) 据置期間：研究期間中は元金の償還を据置き、利息も据置くことが可能
- (5) 担保・保証人：原則として必要
- (6) 売上納付金契約：試験研究の成果を事業化した場合、その売上高の一定割合を納付
(特別融資制度のみ)

本資金のメリット

◎研究開発のリスク軽減のために、試験研究の成功度が低くなった場合は、利率を低減<低減率は最大100%>または元本を減免<減免率は最大50%>します。

【一般融資の場合】適用利率 = 基準利率 × 成功度 (1、0.75、0.5、0.25、0のいずれかの数値)

【特別融資の場合】返済元本 = 貸付金額の $1/2$ + 貸付金額の $1/2$ × 成功度 (同上)

◎最長15年の長期・低利(固定制)の資金です。

◎研究によって得られた特許権等、研究成果はすべて融資先企業に帰属します。

詳細は下記へお問い合わせ下さい。

生研センター 新技術開発部 融資課

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3-18-19 虎ノ門マリビル10F

TEL 03-3459-6565 FAX 03-3459-6566 E-mail yushi@ml.affrc.go.jp

編集後記

第103号をお届けします。本号の総説では、三田和英・佐々木卓治両氏（独・農業生物資源研究所）にカイコゲノム塩基配列解読の現況についてご紹介戴いた。総説に関連して、行弘研司氏（独・農業生物資源研究所）、塩月孝博氏（独・農業生物資源研究所）、野田博明氏（独・農業生物資源研究所）らに最近のカイコゲノム研究についてご紹介戴いた。その他の研究情報として、松村英生氏（財・岩手生物工学研究センター）、高橋智氏（筑波大学大学院）、平田晃氏（生研センター）、杉本明氏（九州沖縄農業研究センター）、橘高二郎氏（根室市水産研究所）、渡邊健氏（茨城県農業総合センター）その他の方々にそれぞれ貴重な研究の一端をご紹介戴いた。執筆者各位に深甚の謝意を申し上げます。

なお、本号から、前任の畠山リーダーの後を受けて、渡辺がブレインテクノニュースの編集に携わることになりました。引き続き皆様の御協力方をよろしく御願ひ申し上げます。（渡辺記）

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支援センター（生研センター）の許諾を得て行って下さい。

ブレインテクノニュース 第103号

平成16年5月15日発行

発行人 津賀幸之介

編集人 吉臭 努

発行所 独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構

◎生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）

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

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

e-mail brainki1@ml.affrc.go.jp

URL <http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>

印刷・製本 日本印刷株式会社 〒101-0021 東京都千代田区外神田6-3-3 TEL 03-3833-6971