

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成16年9月15日発行（隔月1回15日発行）

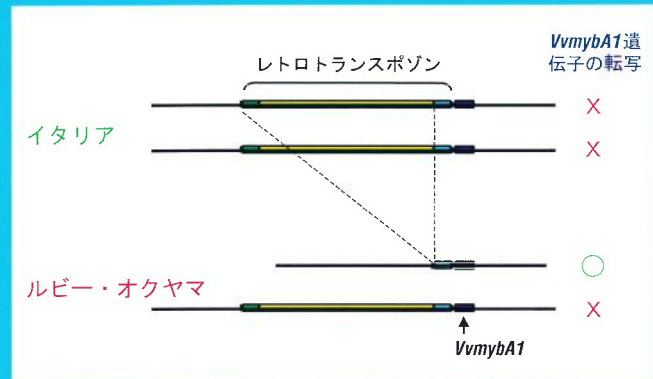
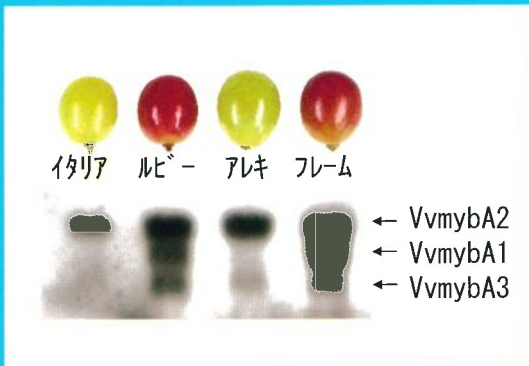
ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.105

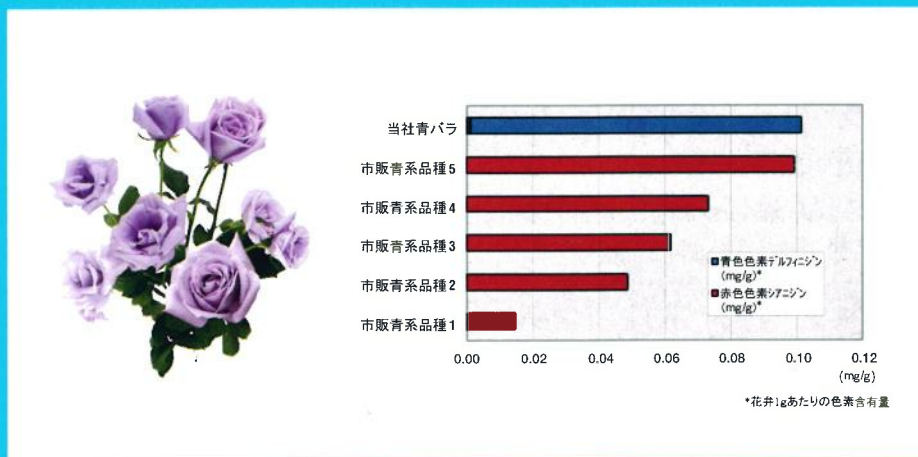
15 SEPTEMBER, 2004

ブレインテクノニュース



ブドウの果皮色変異とレトロトランスポゾン

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 果樹研究所
小林 省 藏



青いバラの創生

サントリー株式会社 先進技術応用研究所
勝元 幸久・田中 良和

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）

目 次

特 集 「植物における色の遺伝子」

- 1 ブドウの果皮色変異とレトロトランスポゾン 1
小林 省藏 ([独] 農業・生物系特定産業技術研究機構 果樹研究所)
- 2 遺伝子組換えによるキクの花色改変に向けて 4
間 竜太郎 ([独] 農業・生物系特定産業技術研究機構 花き研究所)
- 3 青いバラの創生 9
勝元 幸久・田中 良和 (サントリー株式会社 先進技術応用研究所)

国内情報

- －土の健康診断－ 土壌診断用バイオセンサーの開発 12
橋本 好弘¹・軽部 征夫^{2,3} (¹株式会社サカタのタネ、²東京工科大学、³独立行政法人産業総合技術研究所)
- 抗IL-10抗体を用いたヨーネ病の早期診断法の開発 18
百溪 英一・森 康行 ([独] 農業・生物系特定産業技術研究機構 動物衛生研究所)
- 藍色細菌の時計タンパク質KaiAの原子構造と時計機能 25
宇津巻 竜也・石浦 正寛 (名古屋大学 遺伝子実験施設)
- アマモ科の遺伝的多様性と日本の沿岸環境 30
相生 啓子 (元東京大学海洋研究所)
- セルトレイ苗挿し木装置 34
太田 智彦・林 茂彦 ([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)

地域の先端研究

- 少ない窒素肥料で生育可能な作物の創出方法 37
柳澤 修一 (岡山大学 資源生物科学研究所)

文献情報

- ウシ精子へのコレステロール感作が、受精能獲得、先体反応および受精率に及ぼす影響 42
Phillip H. Purdy et al. (*Biology of Reproduction*, 71, 522-527, 2004) 抄訳：下司 雅也
海水に適応したアトランティックサーモンの反復遊泳能力へ及ぼす飼料中の脂肪酸組成の影響 43
G.N. wagner et al. (*Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 137, 567-576, 2004)
抄訳：塩谷 格
- 植物に酒豪遺伝子? 44
N. Fujishige et al. (*Plant and Cell Physiology*, 45(6), 659-666, 2004) 抄訳：岩井 純夫
- 光合成による水の酸化反応中間体の検出 45
J. Clausen et al. (*Nature.*, 430, 480-3, 2004) 抄訳：吉川 彰

- 生研センターからのご案内 (アグリビジネス創出フェアのお知らせ) 46

表紙写真説明

(上段) ブドウの果皮色を決めるアントシアニンの合成制御には転写因子遺伝子 *VvmybA1* が深く関与していること、更に、黄緑色品種の 'イタリア' では *VvmybA1* の5' 上流にレトロトランスポゾンの挿入が見られるが、赤色枝変わり品種である 'ルビー・オクヤマ' ではそのレトロトランスポゾンが消失していることが明らかになった。

(下段) 今回取得した青いバラには、市販青系品種と異なり、青色色素デルフィニジンがほぼ100%含まれている。その詳細については、それぞれ1頁、9頁をご覧ください。

◀特集▶「植物における色の遺伝子」1

ブドウの果皮色変異とレトロトランスポゾン

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構
果樹研究所 ブドウ・カキ研究部
小 林 省 藏

ブドウ果実の果皮色はアントシアニンにより決まっており、Myb様転写因子遺伝子VvmybA1がアントシアニンの合成制御に深く関わっていることが明らかとなった。アントシアニンが合成されない黄緑色品種と黄緑色品種から出現したアントシアニンを合成する赤色枝変わり品種を用いた解析から、黄緑色品種では、VvmybA1の5'上流にレトロトランスポゾンの挿入が見られるが、赤色枝変わり品種ではそのレトロトランスポゾンが消失していることが判明した¹⁾。

1. はじめに

ブドウには黄緑色、黒色、赤色など様々な果皮色の品種があるが、これらの色は果皮に含まれる植物色素「アントシアニン」により決まっている。アントシアニンには色々な種類があり、その種類と含有量の違いによって様々な色合いの果皮となる（黄緑色品種ではアントシアニンが合成されない）。アントシアニンはいくつかのアントシアニン合成系酵素により合成されるが、UDP glucose-flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) がブドウにおけるアントシアニン合成のキイ・エンザイムであると言われて²⁾。これまでに、我々は黄緑色品種の‘イタリア’、‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’ (*Vitis vinifera*) とその赤色枝変わり品種である‘ルビー・オクヤマ’、‘フレーム・マスカット’では、UFGT遺伝子の発現に差がある（黄緑色品種では発現せず、赤色枝変わり品種では発現する）が、塩基配列にはコード領域・プロモーター領域の両方で差がないことを示した³⁾。この結果は、赤色枝変わり品種ではUFGT遺伝子の発現を制御する上位の遺伝子に変異が起こったことを示唆する。トウモロコシ等ではアントシアニン合成系酵素遺伝子の発現制御にMYBおよびMYCと呼ばれる転写因子が

KOBAYASHI Shozo

〒729-2494 広島県豊田郡安芸津町三津301-2

重要な役割を果たすことが知られており⁴⁾、ブドウについても同様の転写因子の関与が予想された。このため、これら転写因子遺伝子の単離・解析を行った。

2. UFGT遺伝子の発現を誘導する転写因子

‘巨峰’ (*V. labruscana*) から転写因子MYBの部分長cDNAを8種類単離して、各々について‘巨峰’果実発育中の遺伝子発現を調べた。その結果、そのうちの一つのMybAは果皮の着色期に発現が急増すること、また、その発現は果実特異的であることが明らかとなった(MYCについても単離してその発現を調べたが、果実発育期間を通して恒常的な発現を示した)。そこで、MybAについてさらに詳しく調べるため、完全長のcDNA (VlmybA1-1, VlmybA1-2, VlmybA2) を単離して構造を解析した。また、これらcDNAをベクターに組み込んで‘巨峰’の体細胞胚に遺伝子銃により導入し、その機能を調べた。その結果、これらcDNAの導入により白色の体細胞胚上にアントシアニンを生産する赤色細胞が形成された⁵⁾。また、もとの体細胞胚ではUFGT遺伝子の発現は認められなかったが、赤色細胞が形成された体細胞胚ではUFGT遺伝子の発現が誘導されていた。さらに、体細胞胚にベクターに組み込んだUFGT遺伝子

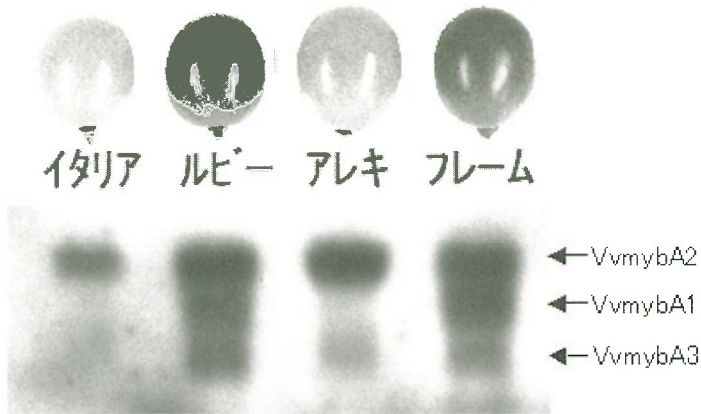


図1 黄緑色品種（イタリア、マスカット・オブ・アレキサンドリア）と赤色枝変わり品種（ルビー・オクヤマ、フレーム・マスカット）における *VlmybAs* ホモログの発現（文献1）

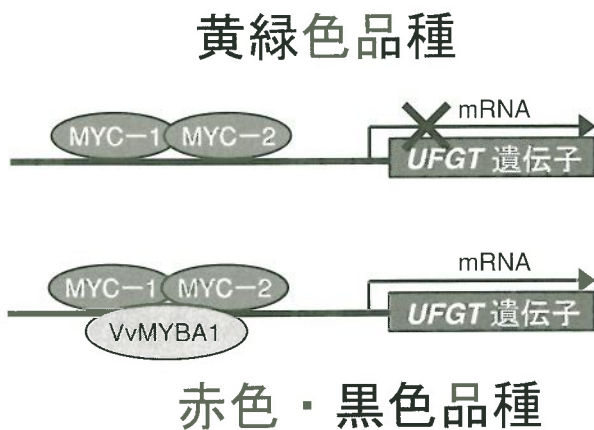


図2 黄緑色品種と赤色・黒色品種における *UFGT* 遺伝子発現と転写因子（MYB, MYC）の関係

を導入して *UFGT* 酵素タンパク質を過剰発現させても同様に赤色細胞が形成された。つまり、*VlmybAs* は *UFGT* 遺伝子の発現を誘導して、転写・翻訳された *UFGT* がアントシアニンを合成するということである。

3. 果皮色変異体における *VlmybAs* ホモログの発現

次いで、黄緑色品種とその赤色枝変わり品種を用いて *VlmybAs* のホモログの発現を調べた。

その結果、赤色枝変わり品種では黄緑色品種では発現していない遺伝子 *VvmybA1* (*VlmybA1-1* と塩基配列が 98.3% 一致) が発現していることが判明した (図1)。また、この *VvmybA1* cDNA を '巨峰' の体細胞胚に導入すると、アントシアニンを生産する赤色細胞が形成されたが、黄緑色品種でも発現している *VvmybA2*, *VvmybA3* にはそのような機能がなかった。さらに、その他の品種においても黄緑色品種では *VvmybA1* 遺伝子が発現しておらず、赤色・黒色品種では発現していた。このことは、黄緑色品種では *VvmybA1* 遺伝子が発現していないため

UFGT 遺伝子も発現せず、アントシアニンも合成されないが、赤色・黒色品種では *VvmybA1* 遺伝子が発現しているため *UFGT* 遺伝子が発現し、アントシアニンが合成されるということを示す (図2)。このように、*VvmybA1* 遺伝子およびそのホモログはブドウのアントシアニン合成制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。最近、我々は、ABA 処理等を行った 'カベルネ・ソービニオン' における *VvmybA1* 遺伝子の発現がアントシアニン蓄積およびアントシアニン合成系酵素遺伝子の発現と一致することを明らかにした⁶⁾。

4. レトロトランスポゾンが果皮色の変異に関わっていた

では、どうして 'イタリア' や 'マスカット・オブ・アレキサンドリア' では発現していない *VvmybA1* 遺伝子が 'ルビー・オクヤマ' や 'フレーム・マスカット' で発現するようになったのであろうか? このことを調べるため、'イタリア' および 'ルビー・オクヤマ' から *VvmybA1* 遺伝子のゲノミック・クローンをそれぞれ 4 クローン単離し、その塩基配列を調べた。その結果、'イタリア' の 4 クローンではすべて *VvmybA1* の 5' 上流に Ty3-gypsy タイプ

のレトロトランスポゾン (*Gret1*)の挿入が見られた。一方、'ルビー・オクヤマ'では*Gret1*が入り込んでいるクローンの他、一方のLTRのみを残して*Gret1*の大部分が消失したクローンがあった(図3)。このように、'イタリア'では*VvmybA1*の5'上流域に*Gret1*が入り込んでいるため*VvmybA1*が転写されずアントシアニンも合成され

ないが、'ルビー・オクヤマ'では*Gret1*が消失したため*VvmybA1*の転写が回復し、アントシアニンが合成されるようになったものと考えられた。'フレーム・マスカット'についても塩基配列解析から'イタリア'から'ルビー・オクヤマ'が出現したのと全く同じ機構で'マスカット・オブ・アレキサンドリア'から出現したと考えられ、*Gret1*はブドウ・ゲノム中に数百コピー存在していることから、自然突然変異の中にはこのようなレトロトランスポゾンが関与している事象が他にも数多く存在するものと思われる。

5. レトロトランスポゾンがブドウの果皮色の進化に果たした役割

黄緑色品種は黒色の野生種から突然変異により出現したとされているが、どのような機構で黄緑色化が起こったかは不明である。ブドウの多くの品種を用いた解析から、黄緑色品種は*Gret1*の挿入がある遺伝子をホモでもっており、赤色・黒色品種は*Gret1*の挿入がある遺伝子とない遺伝子をヘテロでもっていることが判明した¹⁾。それで、我々は、進化の過程で野生種の一方の*VvmybA1*遺伝子に*Gret1*が入り込み、自然交雑によりその遺伝子をホモでもつようになったものが黄緑色品種になったと考えている。その後、黄緑色品種の*VvmybA1*遺伝子が

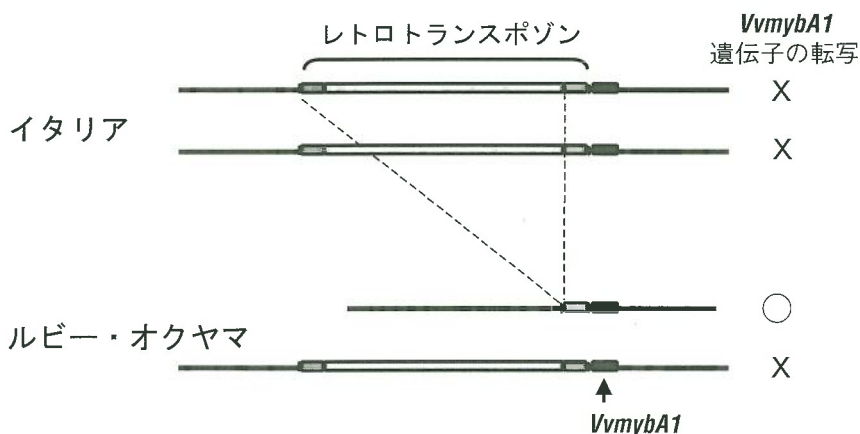


図3 イタリアとルビー・オクヤマにおける*VvmybA1*遺伝子構造の比較(文献1)

ら*Gret1*が抜け出すことによって、赤色に戻った枝変わり品種ができたというわけである(黒色になるか赤色になるかは、独立した別の遺伝子が関与していると考えている)。

*VvmybA1*遺伝子は、上述したようにブドウにおけるアントシアニンの生合成制御に重要な役割を果たしていることから、果実の着色不良の原因を究明するための指標遺伝子として、また、遺伝子工学的にブドウの果皮色を改良するための着色遺伝子として、あるいは、ブドウの果皮色の進化を探る道具としても有用であると考えられる。

文献

- 1) Kobayashi, S. et al (2004) *Science*, 304: 982.
- 2) Boss, P.K. et al (1996) *Plant Mol. Biol.*, 32: 565-569.
- 3) Kobayashi, S. et al (2001) *Plant Sci.*, 160: 543-550.
- 4) Mol, J. et al (1998) *Trends Plant Sci.*, 3: 212-217.
- 5) Kobayashi, S. et al (2002) *Planta*, 215: 924-933.
- 6) Jeong, S.T. et al (2004) *Plant Sci.*, 167: 247-252.

◀特集▶ 「植物における色の遺伝子」2

遺伝子組換えによるキクの花色改変に向けて

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構
花き研究所

間 竜 太 郎

花き研究所において、アグロバクテリウム法による効率の高いキクへの遺伝子導入系とキクにおいて外来遺伝子を効率よく発現させるためのプロモーターを開発した。現在、この技術を応用したキクの花色改変に取り組みつづける。そこで、キクへの遺伝子導入系と遺伝子組換えによるキクの花色改変の可能性について紹介する。

1. はじめに

色とりどりの花を見る時、我々は安らぎを感じる。ネアンデルタール人の墓からヤグルマギクなどの花粉が見つかったことから、人類はその発祥の時から花を美しいと感じており、花の色は人々にとって興味の対象であったと推測される。花きは我々の生活に潤いを与える、なくてはならないものである。

キクは日本国内はもちろん世界的に見ても最も重要な花きの1つである。花の色は観賞価値を左右する重要な形質であり、遺伝子組換え法を用いることで従来に無い花色を作出できれば、キクの育種上たいへん有用である。遺伝子組換え法によるキクの花色改変の取り組みとしては、ピンク色の花卉を白色にしたという報告¹⁾がある程度でほとんど進んでいない。この原因としては、組換え体の作出効率が低いことや導入遺伝子の不活化が生じやすい点があげられる。本稿では、花き研究所において開発したキク遺伝子組換えの実験系について紹介するとともに、遺伝子組換えによるキク花色改変の可能性について述べる。

2. 花き研究所におけるキク遺伝子組換えの実験系の開発について

(1) アグロバクテリウム法による効率の高いキクへの遺伝子導入系の確立

予備実験において高い再分化能を有することが明らかとなったキク品種‘セイマリン’（白、スプレーギク）を遺伝子導入実験の諸条件の検討のための材料に用いた。まず、葉切片からのシュートの再分化条件を明らかにするために、培地に添加する植物ホルモンの組み合わせと濃度条件及び培養時の温度・照度条件の検討を行った。その結果、シュートが最も多く形成されたのは、BA 1.0mg/lとNAA 2.0mg/lを添加した培地で、培養温度20℃、照度7μmol/s/m²（弱光下）において培養した場合であった。次に、選抜用抗生物質について検討した結果、NPT II 遺伝子とパロマイシン25mg/lの組み合わせが、キク組換え体の選抜に有効であることが明らかになった。これらの形質転換条件で実験を行った結果（図1）、2000外植片から69個体（外植片数に対して3.5%）の遺伝子組換え個体が得られた。この遺伝子導入効率は、遺伝子組換えキクを作出するための実験系として使いうるレベルであると考えられた。

(2) キクにおいて外来遺伝子を発現させるためのプロモーターの検討²⁾

キクでは、植物で広く利用されているカリフ

AIDA Ryutaro

〒305-8519 茨城県つくば市藤本2-1

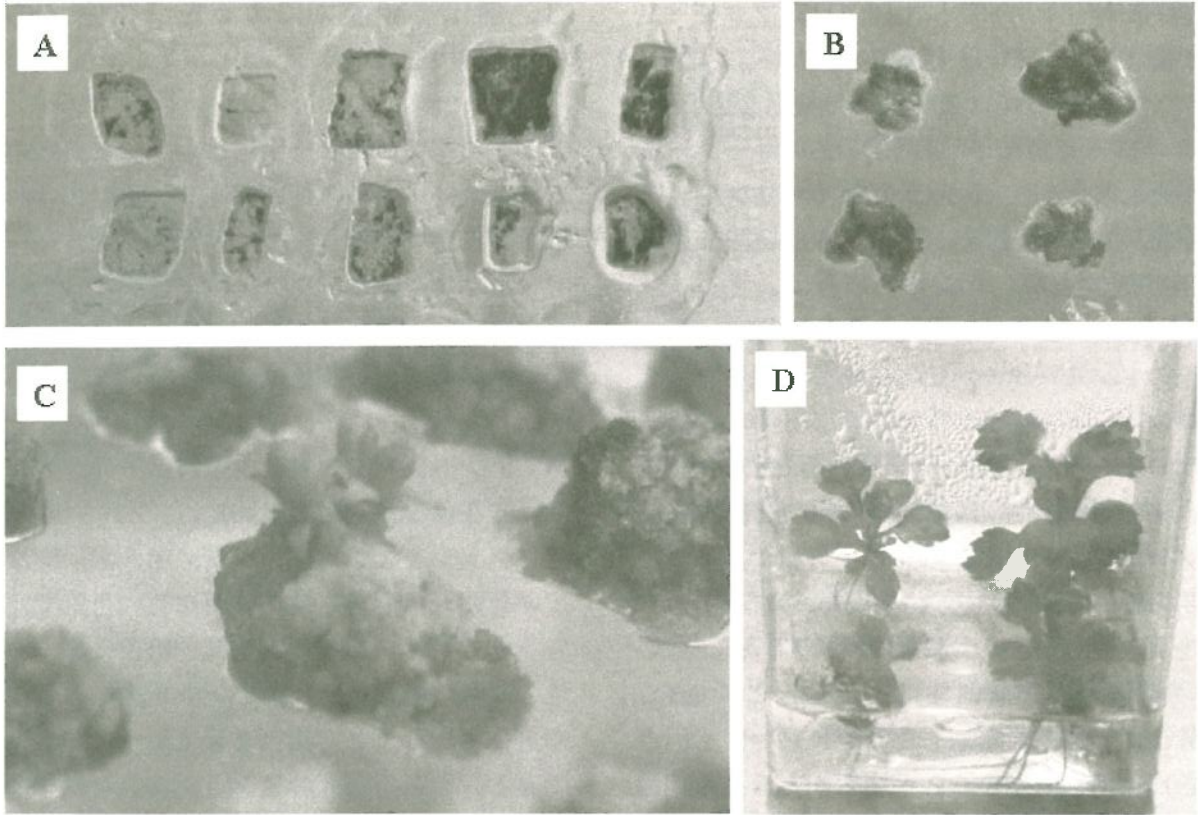
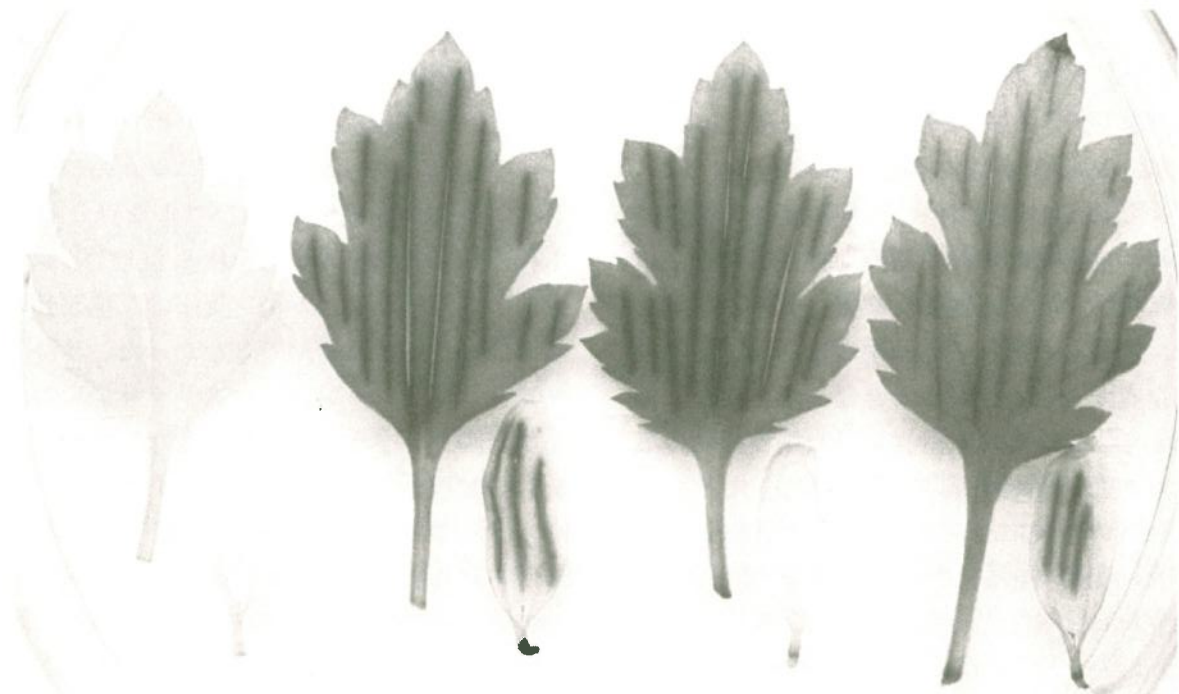


図1 キク組換え植物ができる様子

A. アグロバクテリウム感染から1週間後の外植片のGUS活性（染まっている部分がGUS活性を有する）。
 B. 感染から1か月後、カルスが生じる。C. 感染から2ないし3か月後、カルスから再分化シュートが出てくる。D. 伸長しつつある再分化シュート。



非組換え体 35S/GUS cab/GUS EF1 α /GUS

図2 葉と花弁におけるGUS遺伝子の発現（再分化から20か月）

ラウモザイクウイルス由来の35Sプロモーターが働きにくいことが指摘されている。そこで、キクでよく働くプロモーターの検討を β -グルクロニダーゼ遺伝子(GUS)をレポーター遺伝子として用いて行った(‘セイマリン’)。その結果、1000 pmol 4MU/mg protein/min以上のGUS活性を示した個体の割合は、タバコ・エロンゲーションファクター1a (EF1a) 遺伝子のプロモーター(21%)あるいはキク・クロフィルa/b結合タンパク質(cab) 遺伝子のプロモーター(24%)を用いると35Sプロモーター(9%)を用いた場合よりも高くなり、両プロモーターがキクにおいて有用であることが明らかとなった。また、いずれのプロモーターを用いた場合でも、幼植物の時期に高いGUS活性を示した個体は、ほとんどの場合、再分化から20か月経過した時点においても引き続き高い活性を示すことが明らかとなった。図2に、再分化から20か月後の葉と花弁におけるGUS活性を示した。なお、キクcabプロモーターは花弁では発現しない。

(3) ‘セイマリン’ 以外の品種への応用

‘セイマリン’ 以外の品種に対して、35Sプロモーター、タバコEF1aプロモーターあるいはキクcabプロモーターをGUS遺伝子に連結した遺伝子の導入実験を行った。‘セイマリン’を含めたのべ31系統中、‘秀芳の宝’、‘精興光玉’等、26系統のキクで組換え体(パロモマイシン抵抗性を有する個体)を獲得できた。すなわち、開発した遺伝子導入手順はある程度の汎用性を有することが明らかとなった。また、再分化から1ないし2か月経過した培養植物の葉におけるGUS活性を調査した結果、‘セイマリン’以外の系統においても、タバコEF1aプロモーター及びキクcabプロモーターは35SプロモーターよりもGUS活性を有する個体の割合が高かった。すなわち、タバコEF1aプロモーター及びキクcabプロモーターは‘セイマリン’以外の系統においても有効であることが明らかとなった。

3. 遺伝子組換えによるキク花変色の可能性について

キクの花弁の主な色素には、アントシアニンとカロテノイドの2種類があり、その組み合わせによって色のバリエーションが生まれている。アントシアニンとカロテノイドは異なる生合成系によって生成されるので、各々の生合成系遺伝子の制御による花変色の可能性を示す。

(1) アントシアニン生合成系遺伝子の改変による花変色(図3参照)

アントシアニンはオレンジ、赤、紫、青など広い範囲の色を司る最も重要な花の色素で、現在花きで試みられている遺伝子組換えによる花変色のほとんどは、アントシアニンの種類や量を変えることで花変色を変えようとするものである。キクの花弁のアントシアニンは花の色合いが異なっても同じ(シアニジン3-6"-モノマロニルグルコサイドとシアニジン3-3",6"-ジマロニルグルコサイドの2種類³⁾)であり変化に乏しい。すなわち、アントシアニンの組成を変えることで花の色合いを改変できる可能性は高いと考えられる。

キクを始め、バラ、カーネーションなどでは、本来青い色が存在しない。これは、青い色の花の多くが持っているデルフィニジン系のアントシアニン色素を作ることができないためである。これらの花で青い色を作ろうとする試みは以前から行われてきたが、従来の品種改良の方法では作り出すことができなかった。サントリー(株)とフロリジーン(オーストラリア)は、デルフィニジンを作るために必要なフラボノイド3',5'水酸化酵素(F3',5'H) 遺伝子とデヒドロフラボノール還元酵素(DFR) 遺伝子をペチュニアから取り出し、カーネーションに導入することで青紫色花の系統を作ること成功した⁴⁾。このカーネーションは1997年から‘ムーンダスト’の商品名で市販されている。また、両社は、パンジーから取り出したF3',5'H遺伝子を組み込み、2004年「青いバラ」を作出することにも成

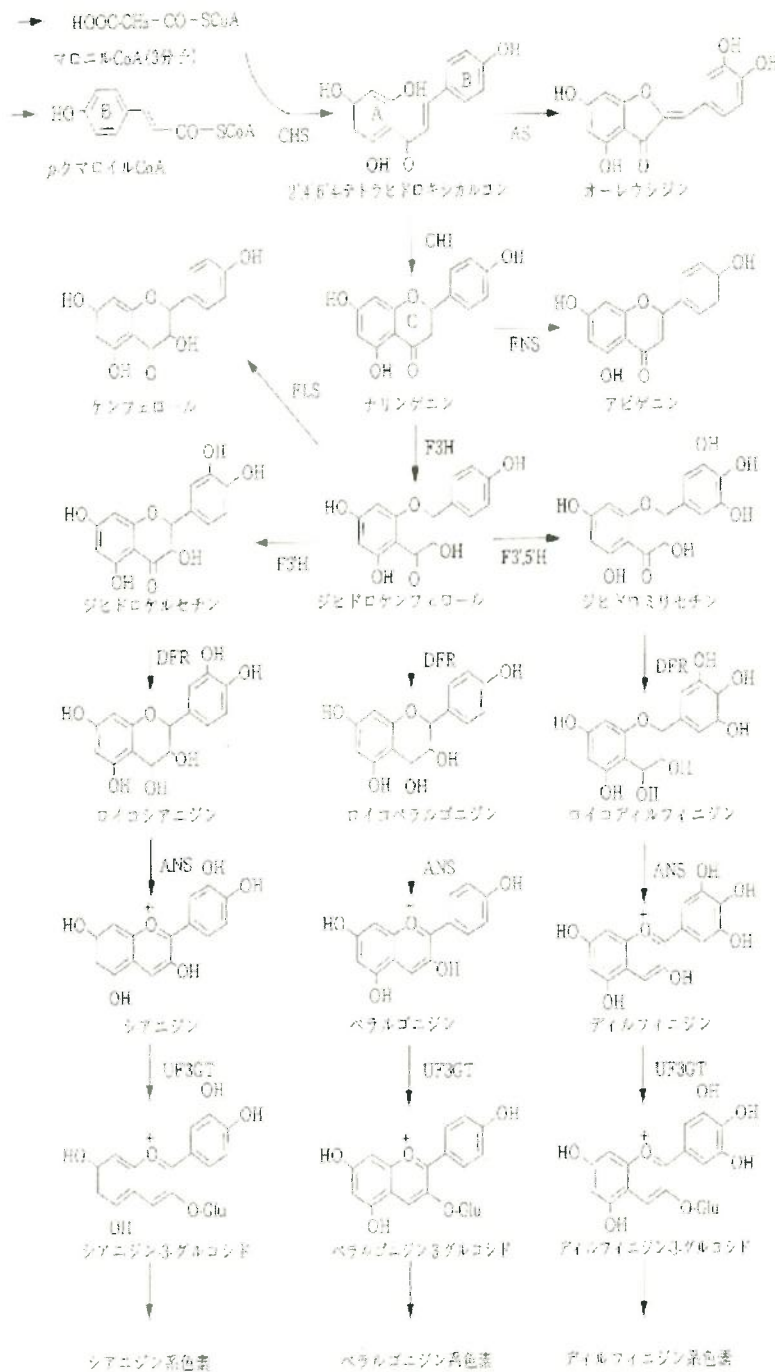


図3 アントシアニンの生合成系

功した。キクにおいても、同様の方法を用いることでデルフィニジンを蓄積させることが可能であると考えられる。ただ、バラではペチュニア由来のF3',5'H遺伝子が機能せず、パンジー由来のものを用いるまで試行錯誤が必要であった。キクにおいても、効率的に働くF3',5'H遺伝子を見つけるまで時間がかかるかも知れない。

また、デルフィニジンが蓄積したとしても、色合いがどの程度変化するかはやってみないとわからない。何故なら、青くなるためには、デルフィニジンのさらなる修飾やコピグメント等色素以外の物質の存在、さらに、アントシアニンが蓄積する花卉表皮細胞の液胞pH等も関係するからである。

一方、キクにはペラルゴニジン系の色素も蓄積していない。ペラルゴニジンを作らせることによって、鮮やかなオレンジ色等の新花色を作出できる可能性もある。例えば、ペチュニアにおいて、ペラルゴニジンを蓄積させてオレンジ系の新花色を作出したという報告がある⁵⁾ (1987年)。キクでペラルゴニジンを作らせるためには、キクで働いているフラボノイド3'水酸化酵素 (F3'H) 遺伝子を抑制することが必要である。近年、ターゲット遺伝子に相同な2本鎖RNAを作るためのDNA配列 (逆向きの反復配列) を導入することで、効率的に遺伝子の発現抑制が生じることが明らかになった。この方法を使うことでF3'H遺伝子の発現を抑制すれば、ペラルゴニジンを蓄積させることができると考えられる。

(2) カロテノイド生合成系遺伝子の改変による花色改変

アントシアニンに比べるとカロテノイドの研究はあまり進んでおらず、遺伝子組換えによってカロテノイドの組成や量を改変させて新花色を作る試みも、今のところほとんど報告されていない。キク花卉において、カロテノイドは単独で存在することで黄色の花色を生じるほか、アントシアニンと同時に存在することによって

橙色系の花色を生じる。

キク花卉に含まれるカロテノイドについては、まだ知見が少ない。最近、花き研究所の岸本らは、キク花卉のカロテノイドの大部分は α -カロテン系（ β -イオノン環と ϵ -イオノン環を1つずつ持つ）であり、他の多くの植物が α -カロテン系と β -カロテン系（両端に β -イオノン環を持つ）の両方を含むのと比較して、特殊な構成を示すこと、また、キク花卉におけるカロテノイド組成の品種間差が小さいことを明らかにした。カロテノイド色素の種類や量を変えることで新しい花色のキクを作出できる可能性がある。例えば、 β -リングサイクレス遺伝子と ϵ -リングサイクレス遺伝子の発現抑制により、 α -カロテンや β -カロテンの前駆物質であるリコペンを蓄積させて、赤みを帯びた花色を作出できるかも知れない。また、蓄積するカロテノイド色素の量を変化させることで、従来存在しない色合いの花色が生じる可能性がある。さらに、アントシアニン色素との共存によって色合いのバリエーションを増やすことができるものと思われる。

4. おわりに

今回紹介したように、キクに外来遺伝子を導

入・発現させて花色を改変することは技術的に可能である。しかしながら、遺伝子導入効率及び導入した遺伝子の発現効率はまだなお低いいため、さらに効率的な遺伝子導入・発現系を開発する必要がある。また、キクの花色を効果的に改変するための方法はまだ模索中であり、カーネーション等で成功した手法がそのまま応用できるかどうかは不明である。近い将来、遺伝子組換え技術を利用した魅力的な新花色を持ったキクが作出されることを期待したい。

文 献

- 1) Couryney-Gutterson, N. et al. (1994), *Bio/Technology*, 12, 268-271
- 2) Aida, R. et al. (2004), *Breeding Science*, 53, 51-58
- 3) Nakayama, M. et al. (1997), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1607-1608
- 4) 田中良和ら (1999), 日本農芸化学会誌, 73, 1035-1038
- 5) Meyer, P. et al. (1987), *Nature*, 330, 677-678.

◀特集▶「植物における色の遺伝子」3

青いバラの創生

サントリー株式会社 先進技術応用研究所

勝 元 幸 久 ・ 田 中 良 和

園芸種のバラ (*Rosa hybrida*) は7~8種の野生種を交配することにより作出された。これらの種は、青色色素を合成するために必要な酵素(フラボノイド3',5'-水酸化酵素, F3'5'H)の遺伝子を持っていないため、交配により青いバラを育種することは不可能であった。バイオテクノロジーの技術を駆使し、パンジー由来のF3'5'H遺伝子をバラに導入・発現することにより、青色色素がほぼ100%となった青いバラを作ることに成功した。

1. はじめに

園芸種のバラ (*Rosa hybrida*) は、花の女王とも呼ばれ世界中で最も愛されている植物である。商業的にも、キク・カーネーションなどとともに、主要な切花であり(世界市場は卸値ベースで3,000から4,000億円程度と推定される)、庭用の苗としても販売されている。

バラの栽培の歴史は5,000年以上前の古代文明にさかのぼるとも言われ、古くからヨーロッパを中心に栽培されてきた。その間にコウシンバラ (*Rosa chinensis*) やノイバラ (*Rosa multiflora*) などのアジアのバラの形質が導入され、人工交配技術が駆使され、現在の栽培バラが誕生したとされる¹⁾。バラの野生種は100~200種あるがその中で栽培バラの作出に利用されたものはわずかに7~8種の野生種とされる。現在までに2万5千種もの品種が作られたと言われている。

その結果、今では赤・白・ピンク・黄色など、様々な色のバラが得られており、近年では、青についても、赤みを押さえたグレー系のバラなどがいわゆる青色系バラとして市販されている。品種名にブルーのついたものも多い。しかしながら、現在まで十分な青い色のバラは作られていない。

なお、「青」は幸福を表す色、神秘の色として、神話や伝説などで紹介されており、また、「ブルーローズ」は英語の辞書で、「不可能、ありえないもの」と紹介されている。青いバラに関する様々な知見・情報については成書に詳しい²⁾。

2. 花の色の決まる仕組み

花色の成分はおもに黄色のカロテノイドと、黄色~青までの広いスペクトルを持つアントシアニンがある。アントシアニンから糖を除いた発色団はアントシアニンと呼ばれる。おもなアントシアニンにはオレンジ色から朱色のペラルゴニン、赤色から紅色のシアニン、紫から青色の色素デルフィニンがある(図1)³⁾。

デルフィニンを合成するために必要な酵素がフラボノイド3',5'-酸水酸化酵素(フラボノイド3',5'-水酸化酵素, F3'5'H)である。

バラ、カーネーション、キクなどには、F3'5'H遺伝子がないため、これらの種はデルフィニンを合成できず、青い色の品種がない。

植物バイオテクノロジーの技術を用いると、交配では利用できない遠縁種の遺伝資源も種の壁を超えて利用できる⁴⁾。サントリーとFlorigene(オーストラリア)は、バイオテクノロジーを利用して、F3'5'H遺伝子を異種植物で発

KATSUMOTO Yukihisa, TANAKA Yoshikazu
〒618-8503 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1

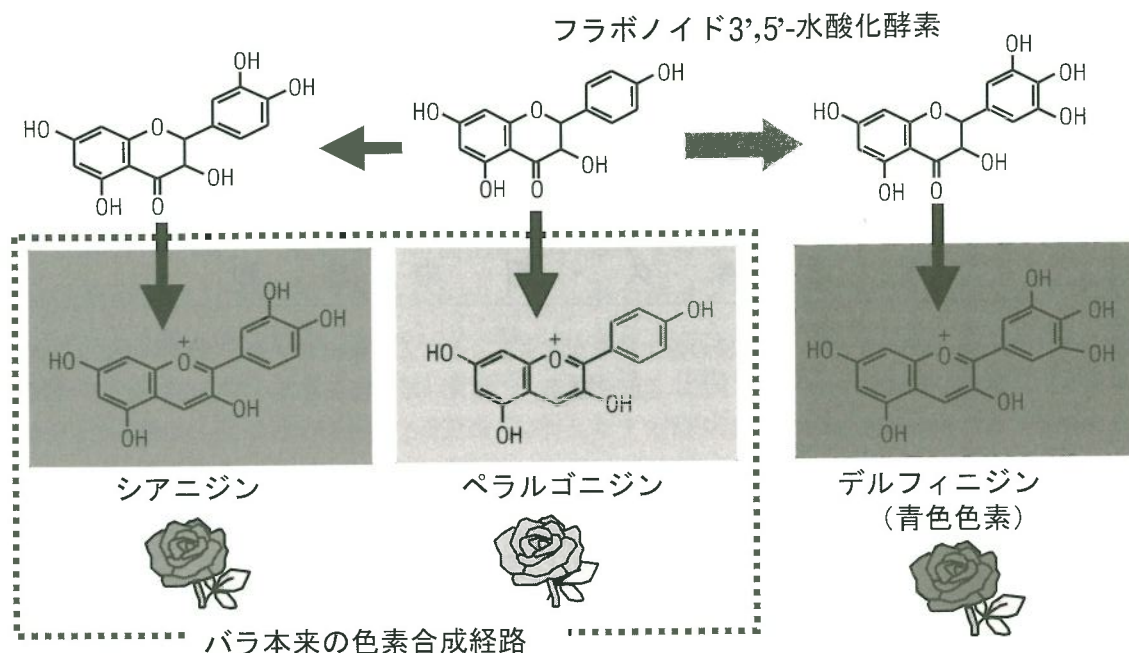


図1 アントシアニジンの合成経路と青いバラ作製の原理

現させデルフィニジンを生産させることにより青い花の創出に取り組んできた。なお、1995年には、同様の技術を用いてデルフィニジンがほぼ100%の青色カーネーション「ムーンダスト」を開発した⁵⁾。ムーンダストは現在、計6品種が日本、アメリカ、オーストラリア、ヨーロッパで市販されている。

3. 青バラの創生

まず、遺伝学的な知見が蓄積されていたペチュニアの青い花からF3'5'H遺伝子をクローニングした。この遺伝子をアグロバクテリウム法によりバラに導入し、形質転換バラを取得したが、F3'5'H遺伝子の発現もデルフィニジンの蓄積も見られなかった。そこで、いくつかの青い花（リンドウ、チョウマメ、ラベンダー、パンジーなど）のF3'5'H遺伝子を、ペチュニアのF3'5'H遺伝子をプローブすることにより取得した。これらをバラに導入したところ、パンジーのF3'5'H遺伝子を導入したバラが大量のデルフィニジンを生産したので、以後、パンジーのF3'5'H遺伝子を利用した。

遺伝子組換え植物を作製する場合、導入遺伝子がどの程度良好に植物体の中で機能するかは、形質転換系統ごとに大きく異なる。実用化を目指すためには、多くの独立した形質転換植物を得て、その中から優良な系統を選抜する必要がある。また、バラといっても遺伝的に多様であるため、デルフィニジンがどの程度蓄積されるか、デルフィニジンが蓄積した場合にどの程度青く見えるかは、バラの品種に依存する。その上、形質転換の容易さも品種に大きく依存する。

したがって、品種に依存しない効率のよい形質転換系を開発する必要があった。サントリーではエンブリオジェニックカルスを用いるバラの形質転換系を開発することにより、40品種以上のバラにパンジーのF3'5'H遺伝子を導入し、のべ10,000系統以上の形質転換バラを開花させた。これらの中からデルフィニジンの含量がほぼ100%のバラを取得することができた(図2)。花色は大きく変化し、従来のバラの品種にはない青い色を呈していた(図2)。このバラを閉鎖系温室(遺伝子組換え植物を栽培するために必要な温室)で約2年間栽培したところ、花の

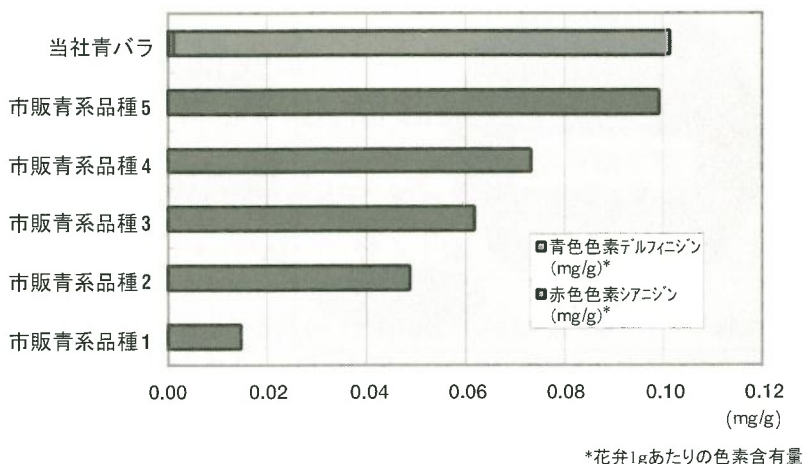


図2 サントリーが開発した青いバラとその色素分析

今回取得したバラ花弁にはデルフィニジンがほぼ100%含まれているのに対し、市販のいわゆる青系のバラは赤色色素であるシアニジンのみを含んでいる。

色は安定していた。栄養増殖を繰り返してもやはり安定な形質を示した。

ちなみに、形質転換系の開発は、バラに限らず、植物バイオテクノロジーの実用化の律速となっていることが多い。

4. 今後の課題

今後は得られた青いバラは遺伝子組換え植物であるので、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法)」に従い、生物の多様性などへの影響を調べた上で、問題がなければ商業生産と販売を行いたい。なお4倍体の栽培バラと2倍体の野生バラの間に自然条件で交雑が起こることはないと考えられる。また、交雑が行われた場合であっても交雑種は稔性がないと考えられる(岐阜大学 福井博一教授、私信)。

花の色が青くなるためには、デルフィニジンの合成のほかに、①アシル基などにより複雑に修飾されたアントシアニンを蓄積させる、②コピグメントと呼ばれるフラボンなどの他の化合物を共存させて青くする、③アントシアニンが

局在する液胞のpHを上昇させるなどの工夫が必要であろうが、バラはどの要件も満たしていない。①と②に必要な酵素遺伝子についてはすでに取得しているため、これらを利用して、さらにバラを青くする研究も継続して行っていきたい。また、今回取得したバラのデルフィニジンを合成する能力は、次世代に伝わる。したがって、今後はバラの花色がもっと多様になることが期待される。

最後に多くに共同研究者の長年にわたる貢献に感謝したい。

文献

- 1) 大場秀章 (1997), バラの誕生, 中公新書
- 2) 最相葉月 (2004), 青いバラ, 新潮文庫
- 3) 斎藤則夫 (2002), 蛋白質核酸酵素, 47 (3), 202-209
- 4) 星野敦 (2002), 蛋白質核酸酵素, 47 (3), 210-216
- 5) 田中良和, 勝元幸久 (2002), 蛋白質核酸酵素, 47 (3), 225-230

◀国内情報▶

—土の健康診断— 土壤診断用バイオセンサーの開発

¹株式会社サカタのタネ, ²東京工科大学, ³独立行政法人産業総合技術研究所
橋本好弘¹・軽部征夫^{2,3}

微生物センサーは、微生物の呼吸活性という指標で水質汚染、有機物、毒物などを計測する原理に基づいている。我々はこのシステムを複雑で多様な土壤に応用し、土壤診断用バイオセンサーを開発した。本機は、病原微生物と、対照微生物を固定化した2本の酸素電極を用意し、これに土壤サンプルを投入し、両微生物の呼吸活性の変化を比較して、現場土壤に対する両微生物の適応性を判定する。

1. はじめに

集約型農業生産において土壤病害は、非常に深刻な問題である。本来、現場土壤にあわせた環境負荷の少ない適切な防除体系の確立が理想であるが、土壤は複雑で多様であるために、その土壤特性を十分把握することなく、一律に土壤燻蒸や殺菌剤投入などによる防除が行われている。しかしながら、これらの化学農薬が環境へ多大な負荷を与えていることが明らかになっている。今後の環境保全型農業生産の推進のためには、いかに土壤病害の発生を事前に予測し、早期防除につなげるかがポイントになる。このためには、多様な現場土壤の病害に対する抵抗性について、その特性を把握することが必要になってくる。このための新しい技術としての土壤診断用バイオセンサーを紹介する。

2. バイオセンサーとは

バイオセンサーとは、生物の持つ優れた分子識別能力を利用した分子識別素子とこれを電気的な信号などに変換する信号変換素子を組み合わせたものである。前者に生物由来のものを用いるために「バイオ」センサーと呼ばれる。その中でも最も早く開発が行われたもののひとつ
HASHIMOTO Yoshihiro, KARUBE Isao
〒224-0041 横浜市都筑区仲町台2-7-1

としてBODセンサーがある。

BOD（生物学的酸素要求量）は、河川水や工業排水の汚れの程度を示す指標であり、従来、5日間かけて測定していたが、BODセンサーの出現により、わずか20分で、より高感度、高精度で測定することができるようになった。BODセンサーは、酸素電極の先端に微生物を固定化したものであり、河川水などの様々な有機物を含む試料液が入ってくると、電極に固定化された微生物は、その試料液中の微生物のエサ（有機物）を食べる。その際に微生物の呼吸活性が高まるが、この呼吸活性の増大による膜の近くの酸素濃度の減少を測定する方法である。河川水や工業排水を、様々な化合物が含まれる複雑系と考えると、BODセンサーは、複雑系を分離・分画して個々の成分分析するのではなく、固定化した生物を利用してそのまま把握する試みとすることができる。我々が調べる目的の土壤試料もまさに様々な化合物を含む複雑系であり、複雑系を個々の成分分析するのではなく、そのまま把握する手段としてBODセンサーを応用することを考えた。

3. 提案仮説

これまでの土壤分析は、主に窒素、リン酸、カリなどの土壤養分分析や土壤の保肥力に関するCECなどの化学性と、保水性、透水性、通

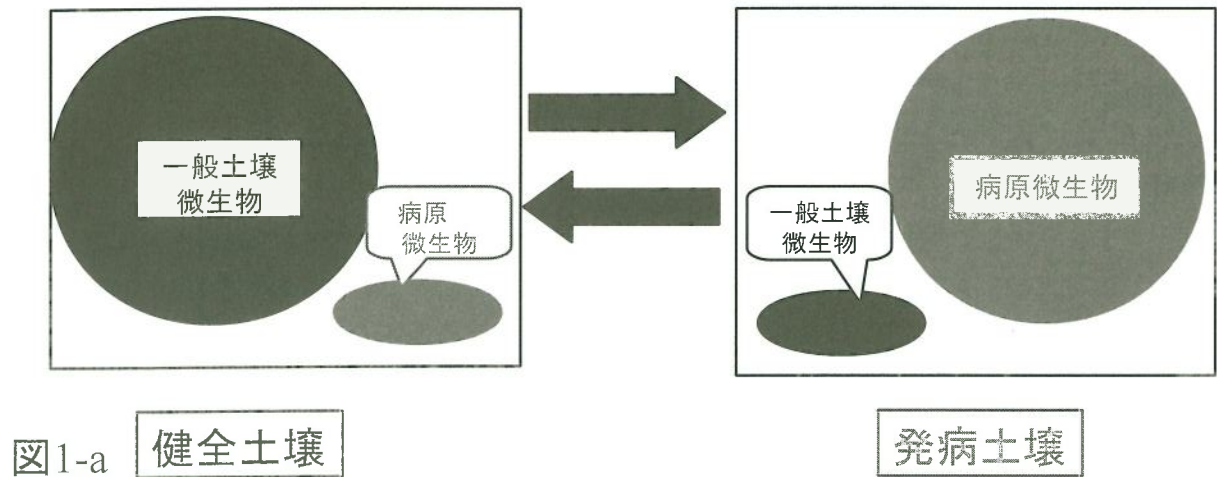


図1-a

健全土壌

発病土壌

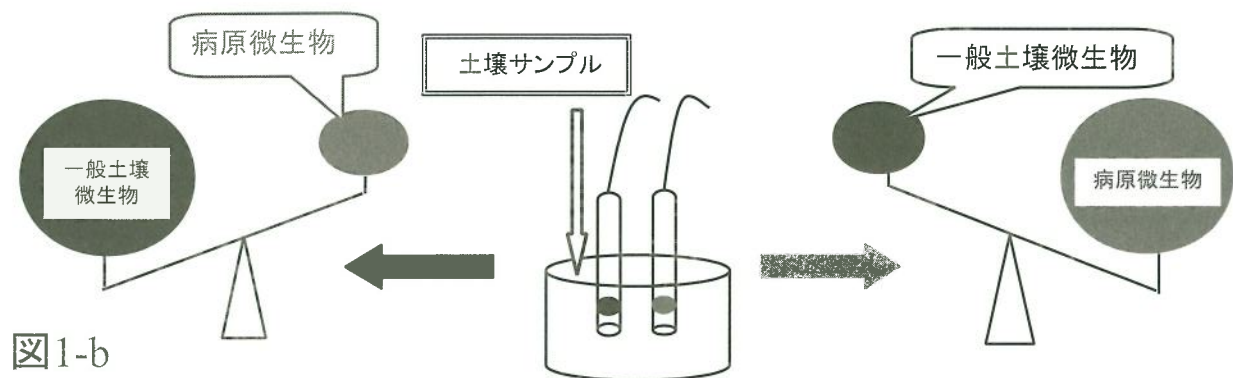


図1-b

図1 提案仮説

図1-a 健全土壌と発病土壌の微生物相の違いに関する仮説

図1-b 土壌試料に対するバイオセンサーの応答に関する仮説

気性、硬度などの物理性の分析が中心であった。これらは、肥料養分および土壌改良資材の施用のために非常に役立つ技術となってきている。しかしながら、土壌生物性の面は、土壌微生物の数・量がともに膨大で複雑であるためにブラックボックスのままである。土壌微生物は、土壌養分を細分化して調べても、どの微生物が増殖しやすい環境であるのかは、結局判らない、複雑系は分解せずに直接微生物に応答を聴いてみる方がよいと考え、下記の仮説に基づき実験を行った。

我々は、病害の発生している発病土壌と病害の発生していない健全土壌の違いを、土壌中の病原微生物と一般土壌微生物の存在比率の違いと考えた(図1-a)。すなわち、発病土壌においては、その土壌環境が、病原微生物の方がその他の一般土壌微生物に比べて住みやすい条件

になっているために、土壌中における病原微生物の存在比率が高くなり、病害の発生率が高くなっていると考えた。一方、健全土壌では、病原微生物の存在比率がその他の一般土壌微生物に比べて低いと考えた。

そこで、一般土壌微生物の代表株と病原微生物の代表株をそれぞれ酸素電極に固定化した。この系に土壌試料を投入した場合、発病土壌由来の試料であれば、病原微生物が住みやすい土壌環境であるために、病原微生物の呼吸活性が高くなり、健全土壌由来の土壌試料であれば、一般土壌微生物が住みやすい土壌環境であるために、一般土壌微生物の呼吸活性が高くなると考えた(図1-b)。

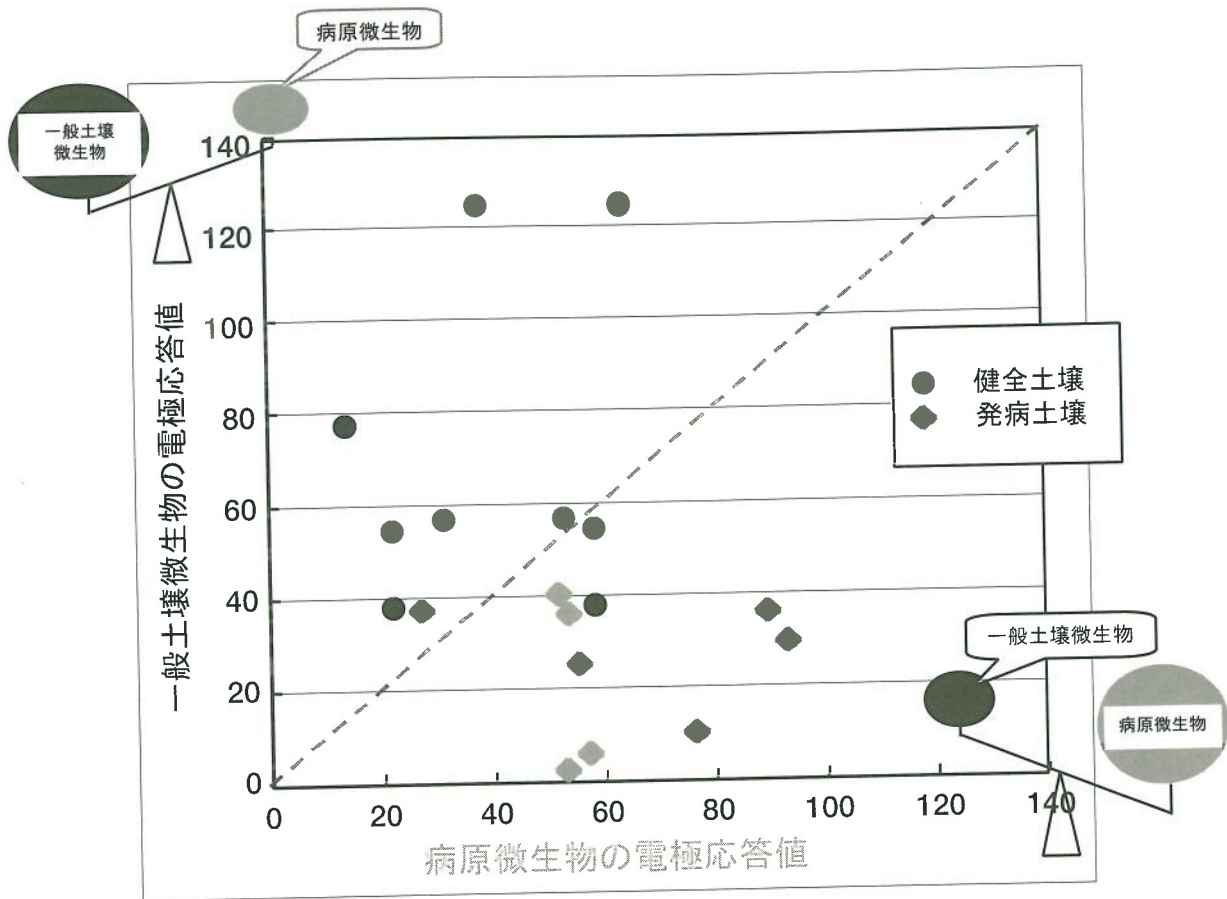


図2 発病土壌と健全土壌における一般土壌微生物の電極応答値と病原微生物の電極応答値の測定結果

縦軸は、一般土壌微生物の電極応答値（呼吸活性）を、横軸は病原微生物の電極応答値（呼吸活性）を示す。点線は、45°線であり、両方の微生物の呼吸活性が等しいことを意味している。プロットが点線より上にある場合には、一般土壌微生物の呼吸活性が病原微生物の呼吸活性よりも高いことを意味し、逆にプロットが点線より下にある場合には、病原微生物の呼吸活性が一般土壌微生物の呼吸活性よりも高いことを意味している。

4. 実証試験

上記仮説を確かめるために、実証試験を行った。発病土壌試料としては、長野県内のレタス根腐病発病土壌およびアブラナ科根こぶ病激発土壌を用いた。健全土壌としては、岩手県西根地区の病害未発生土壌を用いた。病原微生物の代表株としては、レタス根腐病菌、アブラナ科根こぶ病菌を用い、一般土壌微生物の代表株としては、通常の土壌環境で高頻度で分離される *Bacillus* 属の細菌、および現場土壌試料より優先コロニーとして単離した糸状菌および細菌を用いた。その結果を図2に示した。点線は、45°線であり、両方の微生物の呼吸活性が等し

いことを意味している。プロットが点線より上にある場合には、一般土壌微生物の呼吸活性が病原微生物の呼吸活性よりも高いことを意味し、逆にプロットが点線より下にある場合には、病原微生物の呼吸活性が一般土壌微生物の呼吸活性よりも高いことを意味している。図2に示すように、健全土壌の結果は、おおむね一般土壌微生物の呼吸活性が病原微生物の呼吸活性よりも高い傾向を示し、逆に発病土壌の結果は、おおむね病原微生物の呼吸活性が一般土壌微生物の呼吸活性よりも高い傾向を示した。これらの結果は、図1に示した我々の提案仮説とよく一致した。

5. 拮抗微生物を用いた防除試験とバイオセンサー試験の比較

トマト・青枯病，レタス・根腐病，アブラナ科根こぶ病，ハウレンソウ・萎凋病の4つの病害に対して，拮抗微生物資材：細菌（蛍光性 *Pseudomonas* 属 2 菌株，*Bacillus* 属），糸状菌（*Trichoderma* 属，*Pythium* 属），放線菌（*Streptomyces* 属）の6菌株の生物防除効果をポット試験で調べた。ポット試験は，トマト，レタス，コマツナでは，時期を変えて2回行い，ハウレンソウは1回の試験結果をまとめた。また，土壤診断用バイオセンサーを用いて，病原微生物と拮抗微生物の各微生物センサー10種を作製し，ポット試験に用いた土壤サンプルを投入して呼吸活性比を算出した。その結果，ポット試験における防除価が10以上の場合，呼吸活性比は0.6以上となり，防除価が10未満の場合，電極応答比は0.6未満となった。これらの結果から，土壤診断用バイオセンサーを用いた呼吸活性比は，ポット試験における拮抗微生物の防除価の値との関連が認められた（図3）。

これまで拮抗微生物の効果判定には，ポット試験などで数週間から数ヶ月の時間が必要であり，その栽培のための面積も必要であったため，多数の検体・条件を一度に評価することは難しかった。しかし，土壤診断用バイオセンサーは，約30分程度で1つの土壤サンプルの分析が可能であるため，数多くの資材・条件を調べることが可能となった。

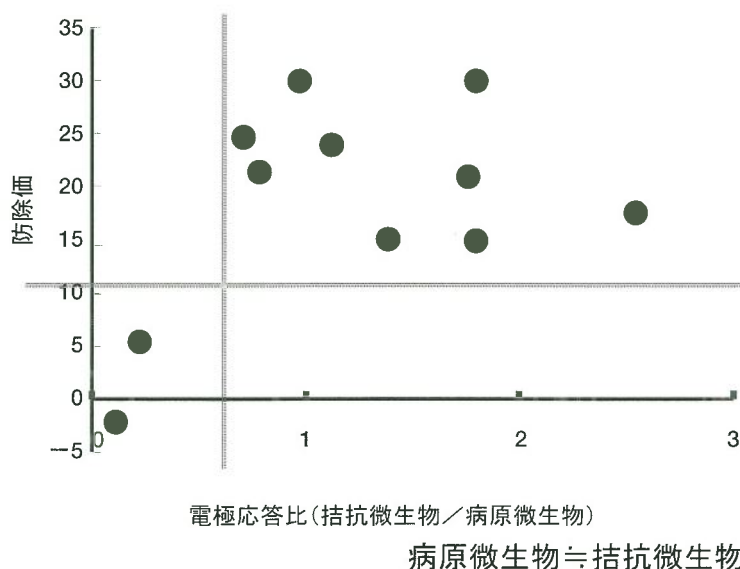


図3 ポット試験による拮抗微生物の防除価検定試験結果および土壤診断用バイオセンサーを用いた呼吸活性比
縦軸は，ポット試験における拮抗微生物の防除価を，横軸は，土壤診断用バイオセンサーの呼吸活性比をプロットした。
呼吸活性比 = 拮抗微生物の呼吸活性 / 病原微生物の呼吸活性

6. 土壤診断用バイオセンサーのシステム

土壤診断用バイオセンサーの構成を図4に示した。装置は，微生物センサーを収納する本体部と，微生物センサーからの信号を受信するトランスデューサー部，およびデータ処理を行うPC部の3つからなる。

6.1 微生物センサーの作製

微生物センサー部分に固定化する微生物の種類は必要に応じて自由に選択できる。通常，培養した対数増殖期の微生物を用いる。胞子を形成する糸状菌の場合には，培養後にガーゼろ過などにより胞子懸濁液を調製する。培養できない微生物の場合には，植物体等から分離・調整したものを使うこともできる。これらの微生物細胞懸濁液の濁度（ OD_{600} ）を測定し，濃度を調製した後，一定量をニトロセルロースフィルター上に吸引ろ過あるいは加圧ろ過により固定化する。酸素電極の表面に微生物を固定化したフィルターを固定具を用いて装着する。新たに

作成した微生物センサーの応答確認は、グルコースや酵母エキスなどの有機物を添加することにより行う。

6.2 土壤懸濁液の作成

土壤試料10～20gに対して、4倍量（40～80ml）の10mM-リン酸緩衝液（pH7.0）を加えて、1～2日間室温で振とうすることにより土壤抽出液を作成する。遠心分離またはろ過により大きな土壤粒子を除去した上清液を試料液として使用する。

6.3 測定方法と装置本体の説明

恒温槽部の中に2本の微生物センサーと土壤試料を投入する容器を入れる。容器には10mMリン酸緩衝液（pH7.0）を150ml入れておき、あらかじめ2本の微生物センサーの先端を浸して

おき、ベースラインが安定するのを待つ。ベースラインが安定したところで目的の土壤試料液を適量投入する。土壤試料投入によりどれだけ微生物の呼吸活性が増加するかを、酸素濃度の減少により計測する。

微生物センサーの電極の位置により線速度は影響を受けるので、固定式とした。また、温度変化により水に溶解する溶存酸素濃度が変化するため、温度一定の条件下で測定する。恒温槽はウォーターバスタイプの恒温槽であり、スターラーを内蔵している。回転数により水中への酸素の拡散速度は影響するため、回転数は一定の条件下で測定する。

6.4 トランスデューサー部

酸素電極からの応答を電気信号に変換して受信する部分である。酸素濃度の表示単位は、①

土壤診断用バイオセンサー装置

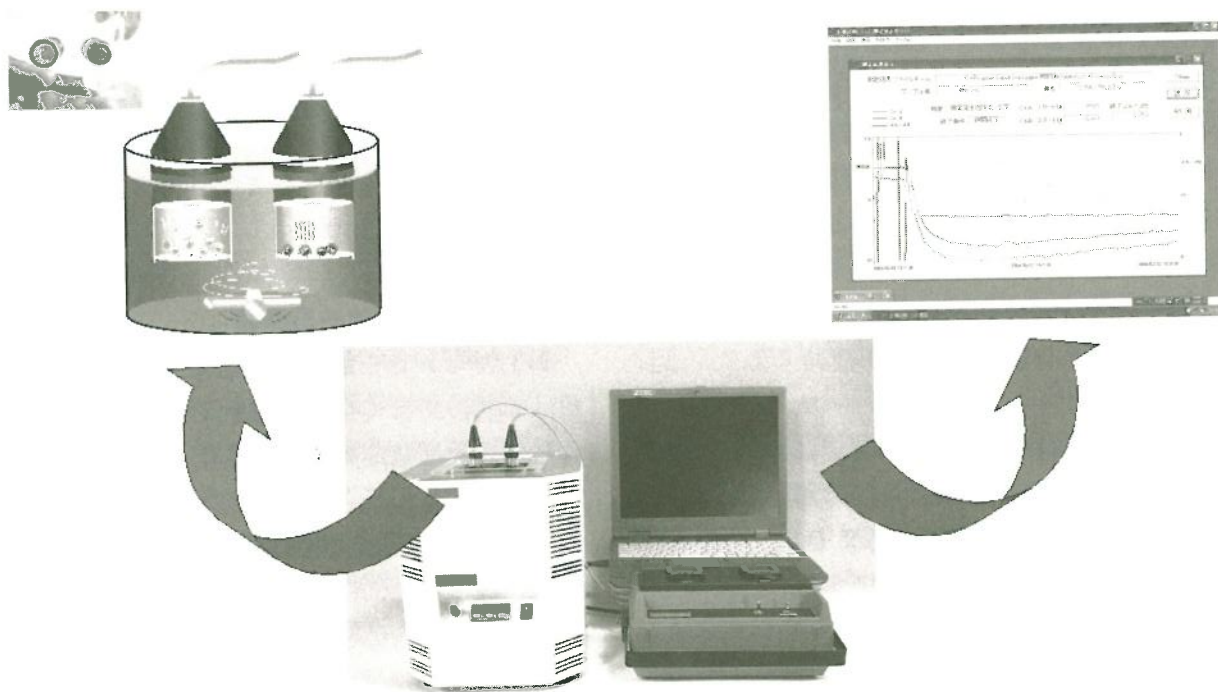


図4 土壤診断用バイオセンサー装置

装置は、微生物センサーを収納する本体部と、微生物センサーからの信号を受信するトランスデューサー部、およびデータ処理を行うPC部の3つからなる。

mg/L, ②%から選択できる。電極の校正は、通常の酸素電極と同様に行う。

6.5 PC部

A/D変換器を介して、トランスデューサーからの信号を受信し、データを処理するためのソフトを組み込んでいる。試料投入時の電極応答値（酸素濃度）から測定終了時の電極応答値（酸素濃度）の差および、両電極の応答比を算出する。その途中のデータも10秒間隔でExcelファイルに変換して表示できる。また、結果表示画面では、グラフだけでなく面積および傾斜のデータも表示する。

7. 今後の展開

現在の土壌病害対策は、病害が発生してから対策を検討することが多く、それではどうしても後手後手に回らざるを得ない。土壌病害発生の危険予知を行うことが、今後病害の早期発見・早期防除への道を開くきっかけとなる。今

回開発した土壌診断用バイオセンサーは、病原微生物が現場土壌に入ってきた場合に、病原微生物が増殖しやすい土壌か、増殖抑制する土壌かを、対照微生物の活性と比較することにより予測するものである。

土壌診断用バイオセンサーを活用することにより、現場土壌について病害発生の危険予知が可能となれば、毒性の強い殺菌剤や土壌燻蒸剤などの化学農薬の使用を減らし、病害に応じた品種・栽培方法・作型・資材などの選定など環境保全型農業に役立つ技術確立をより効率的に進めることができる。土壌診断用バイオセンサーは、測定時間が短時間で、必要な土壌サンプルの量も少量であるために、一度に多数の検体を測定することが可能となり、複雑で多様な現場土壌に対して、より精密な条件検討が可能となる。このことは、これまで経験や勘に頼ることの多かった農業生産の現場に、科学的なメスを入れ、デジタル農業へつなげるための有力な道具になることが期待される。



ブレインテクノニュース
バックナンバーのご案内
第104号
2004年7月15日発行

特集 「エビジェネティクス研究の現状と展望」

- 1 哺乳類におけるエビジェネティクス研究の現状と展望
.....塩田 邦郎
- 2 植物分野におけるエビジェネティクスの現状
.....星野 敦・飯田 滋
- 3 マウス単為発生胚の誕生? 哺乳類の生殖戦略?
.....河野 友宏

国内情報

分画したダイズタンパク質の機能性とダイズ種子プロテオームデータベースの構築.....森山 達哉・丸山 伸之
ABA不活性化酵素CYP707遺伝子の同定と機能解析

—休眠種子の覚醒遺伝子—

.....南原 英司・岡本 昌憲・久城 哲夫
塩素系薬剤によるリグニンの分離に伴うクロロホルムの発生とその拡散防止.....真柄 謙吾
土壌サンプル粉碎篩分け装置
.....後藤 隆志・手島 司・市来 秀之・清水 一史

地域の先端研究

「アクアDNAブック」の作成とその活用について
.....長谷川 理・岡本 信明・藤 加菜子・林崎 良英ほか

文献情報

オプシン処理への腔内留置型黄体ホルモン製剤の併用は、哺乳中の黒毛和種への定時授精における受胎率を向上させる.....(抄訳：下司 雅也)
魚の高活性不凍タンパク質.....(抄訳：千葉 智)
酵母*S. cerevisiae*におけるグルタチオンを介する無毒化経路.....(抄訳：高岡 康道)
一酸化窒素合成酵素、植物でついに発見.....(抄訳：岩井 純夫)

生研センターからのご案内

◀国内情報▶

抗IL-10抗体を用いたヨーネ病の早期診断法の開発

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 動物衛生研究所
 1企画調整部 ヨーネ病炎症性腸疾患研究チーム, 2免疫究部免疫制御研究室
 百 溪 英 一¹ ・ 森 康 行²

我が国のそして欧米の畜産業を妨げる最大の問題である慢性下性伝染病、ヨーネ病の早期診断は困難である。インターフェロンガンマELISA法は早期診断に有効な方法であるが、今回、この反応にインターロイキン-10中和抗体を加え働きを抑えることで、インターフェロンガンマの産生が平均20倍高まり、高感度化できることを明らかにした。これによりヨーネ病の早期診断法の実用化の道を開くことができた。

1. はじめに

牛ヨーネ病は我が国そして、世界中の畜産業に多大な経済的被害を及ぼしている抗酸菌による慢性下痢性伝染病である¹⁻⁴⁾。我が国における本病発生頭数は1990年以降増加傾向にあり昨年の摘発頭数は700頭ほどであるが、無症状で診断も困難な不顕性感染状態の牛が多数存在することが知られている。我が国では年間3億円がこれら淘汰家畜の補償金に支払われており、防疫全体の経費や間接的被害は膨大である。米国におけるヨーネ病に起因する経済的被害は100億ドル相当と報告されており、欧米各国もこの対策に苦慮している。ヨーネ病は科学、生物学の発達した現代においてもなお、診断や防疫が困難な細菌感染症の代表といえるだろう。こういった家畜衛生上の問題に加えて、ヨーネ菌が人のクローン病と関連しているのではないかという仮説が出されており、クローン病の患者の腸組織からヨーネ菌のDNAや希に菌分離がなされている。これはあくまでも仮説であるが、真偽は別として公衆衛生上の疑義に対しては慎重かつ速やかに対策を立てる必要もあり、牛のヨーネ病の制圧を急がねばならない理由の一つとなっている⁵⁾。この感染を早期に診断可能な新しい方法が開発されたので解説してみたい。

MOMOTANI Eiichi, MORI Yasuyuki

〒305-0856 茨城県つくば市観音台3-1-5

2. ヨーネ病の特徴

ヨーネ病は出生後の子牛に経口的に接種され、腸のパイエル板という特別な部位から宿主細胞の手助けを得て侵入し感染を成立させる⁶⁾。通常の急性感染を起こす病原体の場合には、感染後直ちに旺盛な増殖を開始してから発病ということになるが、超慢性感染といわれるヨーネ菌感染の場合には、感染初期に一定程度の細胞性免疫と呼ばれる生体防御能が発揮されヨーネ菌の増殖は抑えられるのである¹⁾。しかし、抑制はされるもののヨーネ菌は殺滅されることなくこの時点から静かに潜伏する状態に移行するのである。ヨーネ菌と同じ抗酸菌の仲間重要な人獣共通の伝染病のひとつ結核がある⁷⁾。健康な宿主は結核菌に感染するが、感染初期に成立する細胞性免疫力で初期の感染を押さえ込み、ほぼ一生にわたって感染防御能を維持する。つまり、細胞性免疫の力で、感染初期の菌の増殖を抑えて、その後もそれを維持できるかが違うのである。読者もご承知のように、結核の診断はほぼ終生ツベルクリン反応で行うことができる。これは一度感染した宿主が、結核菌に対する細胞性免疫反応力を記憶していて、いざというときにこれを惹起できるということなのである。ヨーネ病の特徴の一つに3~6年という長期間の潜伏期間がありこの時期は無症状で不顕性感染と呼ばれる。その後、抗体が上昇して

下痢をして痩せて（図1）放置しておくとうち死亡するのである。これはヨーネ菌がマクロファージという細胞内で増えて肉芽腫という病変により腸粘膜が肥厚して吸収不全に陥るためである（図2）。その際、膨大な数の菌を糞便中に排菌するため（図3）、飼育環境の汚染もひどく、同居牛や子牛に伝染していくのである。

3. ヨーネ病における細胞性免疫診断の弱点

もう少し詳しく書けば、ヨーネ病の場合にも結核の診断に用いるツベルクリン反応と同じヨーニン反応という診断が存在し、法定伝染病の診断基準にも取り入れられている。ヨーニンとツベルクリンはそれぞれの菌を、タンパクを含まない培地で培養し、培地に産生・溶出した菌由来の抗原であり、動物も人も皮内に注射する（皮内反応と呼ばれる）ことにより、その注射部位に起こる炎症の状態を判断して、その宿主がかつてこれらの菌に感染したことがあるかどうかを判定するのである²⁾。



図1 ヨーネ病感染牛
著しく痩せ、糞便中に膨大な量のヨーネ菌を含む下痢をする。



図2 著しく肥厚して、栄養の吸収困難と下痢の原因となる腸粘膜の肥厚病変。

ヨーネ病の場合にはこの反応が感染初期には検出されるが、後に低下する個体が多く、感染中期から後期にかけては陰性化する感染個体が大半である。我が国における乳牛の結核は家畜伝染病予防法の定めに従って、ツベルクリン陽性牛を毎年淘汰してきた。そのため、世界でもまれな、乳牛の

結核発生のない国になっているのである。抗酸菌感染における細胞性免疫診断は本来それくらい有用性が高いものなのである。しか

し、同じ抗酸菌の仲間でありながら、ヨーネ菌の場合には結核のように話が運ばなかったので、我が国も含めて、世界中で防疫に苦慮する事態になっているのである。ヨーネ病の感染ステージと適応可能な診断法を図4に示した。

4. 細胞性免疫能低下のメカニズムを解明する

ヨーネ病の防疫が進まない大きな原因に、早期診断が困難な事はすでに述べたとおりであるが、これはヨーネ菌と宿主動物との相互関係に不明な点が多いということである。著者らは独立行政法人 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の「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」における研究課題「家畜とヒトの炎症性腸疾患の発生機序と関連性の解明」（担当：ヨーネ病・炎症性腸疾患研究チーム）および動物衛生研究所における研究課題「ヨーネ病の免疫学的診断・予防に関する研究」（担当：免疫機構研究室）のなかで、ヨーネ病の病理発生機序（病理の成り立ち解明）と早期診断や防除に関する基礎から応用に至る研究を続ける中で、ヨーネ病感染における細胞性免疫の低下が、インターロイキン10と呼ばれる宿主由来のサイトカインに関連していることを発見した⁸⁾。細胞性免疫の抑制には様々なメカニズムが関与しており、正常であれば高すぎず低すぎずと絶妙なコントロールで生理的状态と生体防御機能が保たれている。我々が着目したのはインターロイキ



図3 糞便中に排菌されたヨーネ菌の菌塊。
発症牛では一日に300億個もの菌が排菌されて汚染を広げる。

非感染牛	ヨーネ病感染牛		
	不顕性感染		発症
健康牛	キャリアー牛	病畜の不顕性感染牛	感染発症牛
血清学的診断 (ELISA法)	検出不可能		検出可能
細菌学的診断 (分離又はPCR法)	希に排泄	間欠的～継続的排菌	
細胞学的診断 (IFN γ ELISA法)	抗IL-10抗体加新型IFN γ ELISA法 オリジナル法		通常は検出困難
免疫学的診断	病畜の検出は困難	多数の宿主動物より検出の可能性は高まるが見つけにくいともあり	病変は必ずある

図4 ヨーネ病の感染ステージと適用可能な診断法

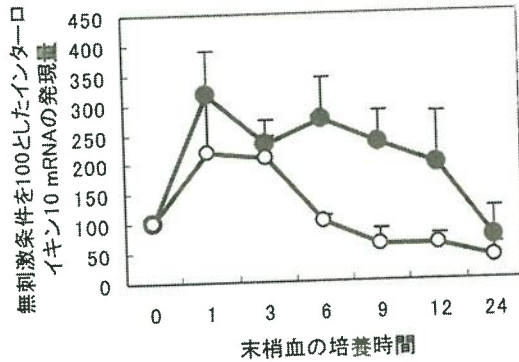


図5 感染牛と清浄牛のヨーネ菌抗原 (PPD) 刺激後のIL-10 mRNAのレベルの経時的変化を示す。

ン10 (IL-10) であった。これがヨーネ病の免疫抑制に重要な役割を持つことを実証する論文はこれまでになく、我々は以下の方法でこれを証明したのである。そして、その結果が今回報告しているIL-10中和抗体を使用した高感度な早期診断法の開発へと直接結びついたのであった。

すでに、ヨーニン反応でヨーネ菌抗原に対する免疫記憶があるか無いかを、皮内の炎症が起こるかどうかで診断できることを説明した。しかし、皮内の反応が目で見える程度に起こらないレベルの場合もあり、このような低反応性の個体診断を行えない場合も多いとされる。この反応の原理を牛の末梢血液中の細胞に対して行うのが、インターフェロンガンマELISA法で

ある。これは牛の新鮮な末梢血にヨーニン PPD (ヨーニン反応で皮内に打つものと同じもの) を加え、これを加えない血液と同様条件で、一晚培養して、培養上清 (血漿) 中のインターフェロンガンマの量を測定するものである。

つまり、感染を経験した宿主の末梢血中にはヨーネ菌を認識する免疫記憶を持つリンパ球 (CD4陽性T細胞と呼ばれる) が存在しており、再度抗原に曝されると、著しい増殖をしてその際、IFNガンマを分泌するのである。IFNガンマは細胞性免疫機構の中核をなす生理活性物質で、マクロファージという菌を殺す細胞の力を著しく高めることができる。IFNガンマELISA法ではこの産生を基準にヨーネ菌感染経過の判断を行うのである。この方法はヨーニン皮内反応に比べて高感度であるが、それでもヨーネ病感染牛では細胞性免疫の低下が起こりやすく、反応性が低下したものは診断困難なのである。

5. IL-10の活性と、これを抑えると起こること

我々は、細胞性免疫の低下がヨーネ病の超慢性感染を起こしていると同時に、ヨーネ病の細胞性免疫診断をも困難にしているという点から、抑制性のサイトカインの一つIL-10に着目し、ヨーネ菌刺激を与えた場合の正常牛と感染牛のIL-10の産生の比較を行い、さらにインターフェロンガンマの産生に及ぼすIL-10の役割を調べるために、牛のIL-10に対する中和抗体を用いてその活性を抑えた場合のIFNガンマの産生量の違いについて調べた。

まず、正常牛とヨーネ病実験感染牛 (感染後4年経過した不顕性感染牛) それぞれ5頭を用いて、その末梢血にヨーニンPPDを加えて、刺激後のIL-10のmRNAの発現を経時的に追ってリアルタイムRT-PCR法で測定した。その結果ヨーネ菌感染動物の血液細胞はより高いIL-10mRNAを示し、その発現時間も正常牛の白血球に比べてより長時間に及ぶことが明らかになった (図5)。これは感染牛ではヨーネ菌の

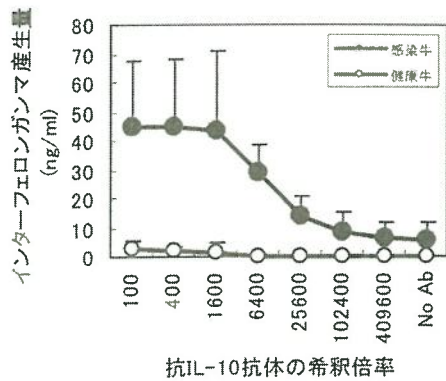


図6 牛IL-10抗体を用いた新型のIFN γ ELISA テストの効果

●で示す感染牛のIFN γ 産生量のみが、中和抗体の濃度に応じて高まっていることが示されている。

刺激により、より多くのIL-10を産生する状態になっている事を示している。

次いで、ヨーニンPPDにより末梢血液を刺激するとき、牛IL-10の中和抗体を異なった濃度で添加して培養後のIFMガンマの産生量をELISA法により調べたところ、IL-10の抗体濃度が高いほど、IFNガンマ産生量が多くなる事が明らかとなった(図6)。このことは、感染動物の場合ヨーニンPPD刺激後に、インターフェロンが産生され始めるが、同時に高濃度のIL-10も作られてしまうためにIFNガンマの産生が抑制されてしまい、産生量が低くなってい

方法

ウシの血液 ヨーニンPPD 抗IL-10抗体

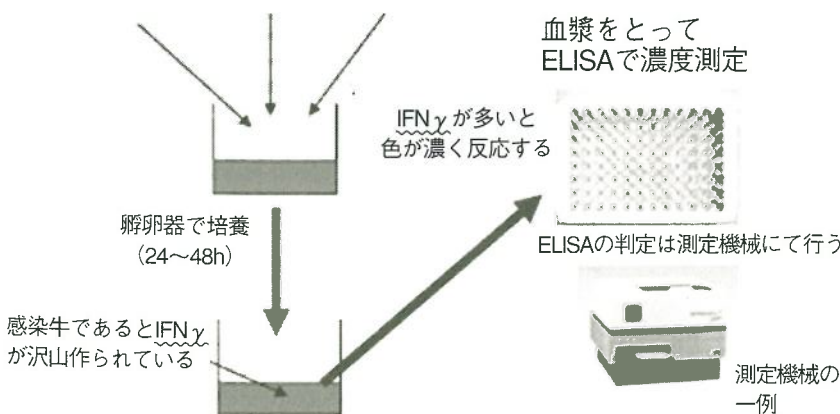


図7 抗牛IL-10中和抗体を用いた、新型IFN γ ELISAの術式

ることがわかったのだ。これにより、ヨーネ病は宿主の持つ重要な生体防御系であるIFNガンマの産生を押さえ込んで殺菌に抵抗している事がわかった。この発見はヨーネ病の細胞性免疫の低下のメカニズムを説明する大きな発見であり、米国微生物学会のInfection and Immunity誌に掲載された。この診断の具体的な方法を簡単に図7示した。

6. IL-10中和抗体の診断への応用について

牛IL-10中和抗体を用いたIFNガンマ産生の亢進はヨーネ病の早期診断法の高感度化に非常に有用であることから、PCT国際特許の出願(アメリカ, ヨーロッパ, オーストラリア, 日本)を2003年秋に行った。これは我が国において応用段階に安く診断システムの安定供給をする狙いである。本技術の元になったIFNガンマ診断法はヨーニン反応に変わる高感度な細胞性免疫診断法として諸外国でも検討されており、そのための牛IFNガンマを検出するELISAキットも市販されている。我々は、動物衛生研究所に飼育している実験感染牛に加えて、ヨーネ病発生の見られた数カ所の農場の牛の血液を用いて、IL-10中和抗体添加法を試しているが、従来法では極めて低いIFNガンマ値しか示さない個体において10倍以上の産生を示す個体の存在を確認している(データ未発表)。

7. ヨーネ病の診断の方法と家畜伝染病予防法

感染初期の診断：これまで、新たな方法を含めた細胞性免疫診断法について解説したように、IFNガンマELISAが、やヨーニン反応はヨーネ

病感染初期から中期までの感染牛の診断に有効な方法である。家畜伝染病予防法の定めでは、ヨーニン反応のみが法定の診断法になっている。IFNガンマELISA法で陽性であっても現行法では殺処分の対象にはならないのである。

感染中期以降の診断：ヨーネ病の診断は一つの方法では成し遂げられず、複数の診断法を用いる必要がある。それは初期の細胞性免疫応答性が感染の経過に伴い、低下してしまい検出され難くなるため、感染が進むと腸管でのヨーネ菌の増殖が軽度起こるようになり、時々糞便中に排菌をするようになる。この排菌は持続的でなく間歇的なため、糞便中からの菌分離はできる時とできない時がある。菌分離により陽性となると法的に感染牛となるが、培養に2～3ヶ月かかる。近年、ヨーネ菌の特異的DNAであるIS900配列をPCR法により検出する技術が発達してきたが、感染初期には菌や菌のDNAが糞便中に出てくるのが希で感染中期以降の診断法として有用であるが、現在はあくまで防疫の参考データとしか用いられず、これによる法的な診断淘汰はできない現状である。

中期以降－後期の診断法：ヨーネ病感染後期には特異抗体の検出が可能になる。抗体の検出にはELISA法が標準法となっており、抗体産生時期の感染牛はこれにより診断が容易である。しかし、感染の早期には抗体が全く作られないため、感染後期以前の不顕性感染と呼ばれるステージの牛に対して抗体検査は有効ではない。

従って、現在ヨーネ病の診断淘汰に用いられている診断方法は、ELISA法による抗体の検出と、糞便培養によるヨーネ菌分離が主たる方法なのである。

ヨーネ病の感染のステージと、適用できる診断法について図4にまとめた。

8. ヨーネ病感染農場における感染牛群の構造解析

ヨーネ病に感染している牛が発見された農場

には、ELISA法や菌分離により診断が可能な「抗体陽性・菌分離陽性牛」、ELISA法で陽性だが、菌分離が陰性の「抗体陽性・菌分離陰性牛」、抗体は陰性だが、菌分離陽性の牛「抗体陰性・菌分離陽性牛」がいる。これらは現行の診断法で診断可能な感染牛である。しかし、ヨーネ病感染が氷山に例えられるように、実際にはこれらの感染牛の下に、さらに不顕性感染ないしはキャリア牛と呼ばれる、菌に間違いなく感染しているものの診断困難な感染牛が存在するのだ。これらの不顕性感染牛は時期によって時に排菌をすることもあり、これが農場の水面下での感染拡大に一役買っているのである。また、こういった農場に対して、抗体検査や糞便培養検査を継続することで、氷山の水面上の部分は次第に削っていけることがわかるであろう。しかし、氷山の水面下の部分に当たる不顕性感染牛の検出は進まず、時間がたつと不顕性感染牛の一部が抗体陽性や排菌のはっきりした状態に移行する。この状態で診断は可能になるが、すでにこの牛による農場内の汚染は進んでおり、不顕性感染牛や陽性牛の候補動物が静かに作られていくのである。こういった現状であるため我が国のヨーネ病の防疫もなかなか進展しないのである。

9. IL-10/IFN γ ELISA法の利用に向けて

現行の法定診断法ではヨーネ病の根絶が不可能である事はすでに述べたとおりであり、現在はより前の時期の感染牛の診断を正確に行う技術の開発と野外試験が進んでいる。菌分離以上に高感度に糞便中にあるヨーネ菌を検出できるPCR法や糞便の精製技術も進展してきたが、糞便が発見される牛の発見ではその時点ですでに他の牛や仔牛に菌が伝染している事をも示すため、さらに前期のステージの感染を診断するIFNガンマELISAや著者らが開発したより高感度なIL-10中和抗体添加IFNガンマELISA法(IL-10/IFN γ ELISA)の実用化が現場から強く望まれているのである。しかし、家畜法定伝

染病の診断基準として実施するためには、本法やPCR法ともに、より多くの診断実績や感染との関連の証明が必要とされる。実験感染牛を用いた実験データでは明確に有用性が認められ、野外例でも同様の反応性の亢進が確認されているIL-10/IFN γ ELISA法であるが、実際にこの時期の感染を証明する既知の診断法が存在しないため、新型診断法の有効性を証明していくために野外の発生農場における各種診断法と陽性結果の解析した診断基準の設定が必要になるため、試験薬としての本方法のキットを市販することが重要な課題となる。

現在までの実験感染牛や野外感染牛で得られた結果から、IL-10/IFN γ ELISA法が従来のIFN γ ELISA法の陽性値を有意に上昇させることは疑いなく、一方で、陰性が明らかな牛においては、いくらIL-10の中和抗体を反応系に加えてもIFNガンマの数値が上がらない事（特異性）も報告済みである。

10. IL-10/IFN γ ELISA法の有用性

PCR法によるヨーネ菌DNAの検出法は、法定診断法にはなっていないが、現在非常に重要な診断法として、不顕性感染牛のチェックや農場の汚染状況の解析に用いられるようになってきた。水面下の感染牛の把握の重要性が本病の防疫に重要であることが理解されるようになってきたと言うことでもある。

IL-10/IFN γ ELISA法ではPCR法より以前に感染牛を診断する可能性があり、菌が感染動物で動く以前の感染牛も補足できる可能性があるため、本診断法は以下の目的で実用性が高い。すなわち、1) 抗体や菌分離などで陽性牛を診断淘汰してきた農場に残る、より初期の段階の不顕性感染牛の発見をすることで、農場の汚染状況の解析ができ、対策がより精密に立てられるようになる。2) 既知の診断法により感染の明らかな動物の淘汰がなされ正常化が進んだ農場に新たに子牛を導入する場合、IL-10/IFN γ ELISA法で陰性の牛を選んで導入することに

より、農場の正常化が促進される。3) IL-10/IFN γ ELISA法陰性の子牛はヨーネ菌に暴露されていない可能性が高く、将来不顕性感染牛や感染牛、発症牛に進行する可能性が極めて低い良質な牛と考えられるので、牛ヨーネ病のリスクの低い牛として付加価値が高まるであろう。現在、子牛を導入する際にはその導入元の農場のヨーネ病の発生状況を確認することをしているが、実際のヨーネ菌に感染したか否か、そのリスクについては灰色としかいえないのである。自家産の子牛を次世代の候補牛として残す場合にも、IL-10/IFN γ ELISA法陰性牛を選ぶことにより、その農場の清浄度はさらに維持されるであろう。

我が国は世界でも希な、乳牛の結核病が清浄化された国である。これは、家畜伝染病予防法により、ツベルクリン陽性牛を徹底的に診断淘汰してきた結果なのである。ツベルクリン陽性牛は直ちに結核感染牛ではなく、結核に感染した経過を示すという意味であるが、疑わしい個体をすべて淘汰するという厳しい姿勢で臨んでいるのである。この成果として世界に誇りうる清浄化の達成をなしとげられた。さらに、ヨーネ病の国家防疫についても、診断基準を設けて、陽性牛の全淘汰を国家補償をして進めている国も我が国だけである。ヨーネ病対策が牛結核のそれと異なる点は、抗体陽性と菌分離陽性牛を中心に診断基準を定めているところである。今後、防疫の方針を見直してヨーネ病の診断淘汰を乳牛の結核と同様の細胞性免疫診断をもとに行うことを推進することで、ヨーネ病感染牛の数は激減し、補償金や防疫対策費も低下していくものと推察される。その意味でも、ここで紹介した新しい高感度診断法の野外応用の早期実現が望まれる。

文 献

- 1) 百溪英一, (2000), 家畜診療 47, 265-278.
- 2) 百溪英一, (1998), 臨床獣医, 16, 24-31.

- 3) 百溪英一, (2003), 肉牛ジャーナル. 16 (3), 28-33.
- 4) 百溪英一, (2003), 肉牛ジャーナル, 16 (4), 40-44.
- 5) 百溪英一, (2001), 臨床獣医 19 (7), 45-61.
- 6) E. Momotani. et al., (1988), Vet Pathol. 25, 131-137.
- 7) J.M. Pollock, (2002), Vet. J. 163, 115-127.
- 8) J.J. Buza et al. (2004) Infect Immun. 72, 2425-2428



ブレインテクノニュース
 バックナンバーのご案内
 第103号
 2004年5月15日発行

総説

カイコゲノム全塩基配列の解説……………三田 和英・佐々木卓治

国内情報

カイコゲノムに散在するトランスポゾン……………行弘 研司
 昆虫ホルモンレセプター研究とカイコゲノム情報…塩月 孝博
 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
 ……………野田 博明・三田 和英・嶋田 透
 SuperSAGE法による真核生物の遺伝子発現解析
 ……………松村 英生・寺内 良平
 遺伝子改変マウスの環境化学物質モニターへの応用

……………高橋 智・本橋ほづみ・伊藤 健・依馬 正次
 搾乳ユニット自動搬送装置の開発……………平田 晃・後藤 裕
 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……………杉本 明

地域の先端研究

ハナサキガニの完全養殖……………橘高 二郎
 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
 ……………渡邊 健

文献情報

ウシ卵管内および子宮内の局所pH ……………(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……………(抄訳：高見 幸司)
 一酸化窒素は側根発生に関係している……………(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……………(抄訳：吉川 彰)

生研センターからのご案内

◀国内情報▶

藍色細菌の時計タンパク質KaiAの原子構造と時計機能

名古屋大学 遺伝子実験施設

宇津巻竜也・石浦正寛

精巧な分子装置である生物時計の作動原理を原子レベルで解明するためには、部品である時計タンパク質の構造と機能を解明することが重要である。我々は、藍色細菌の時計タンパク質KaiAの構造・機能ドメインを解明し、時計発振に必須なC末端時計発振ドメインの原子構造を解明した。原子構造に基づき時計発振機能に必須の残基His270を同定した。既存の一アミノ酸置換変異体において構造変化とリズム変異との相関を解明した。

1. はじめに

多くの生物は地球上の昼夜の交替に合わせて様々な生理活性を24時間周期で変動させており、植物では葉の就眠運動や光合成活性の日周変動が、動物では昼行性、夜行性などの行動リズム等のリズムが知られている¹⁾。これらのリズムは光や温度が一定な恒常環境下においても、まるで昼夜があるかの様に約24時間周期で継続する。このリズムは概日リズムと呼ばれ、このリズムを制御している細胞内の分子機構を生物時計（概日時計）と呼んでいる。これまでに藍色細菌やアカパンカビ、ショウジョウバエ、マウス等で時計遺伝子がクローニングされている²⁾。藍色細菌は、生物時計の存在が知られている最も原始的な生物である。石浦らは常温性藍色細菌 *Synechococcus* sp. strain PCC 7942（以下 *Synechococcus*）から時計遺伝子クラスター *kaiABC* をクローニングし、分子遺伝学的解析により *kaiABC* が藍色細菌の生物時計本体の遺伝子であることを明らかにした³⁾。 *kaiABC* は

UZUMAKI Tatsuya, ISHIURA Masahiro

〒464-8602 名古屋市千種区不老町

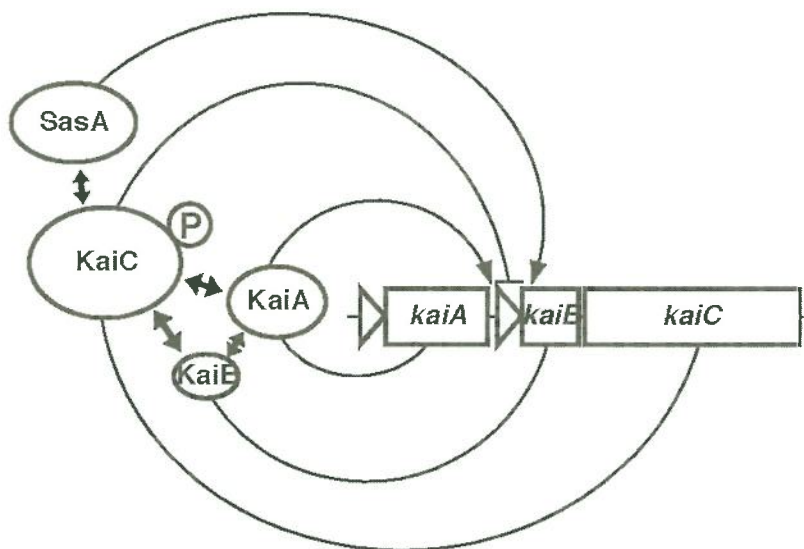


図1 藍色細菌の生物時計のフィードバック制御モデルの概念図

2つのオペロンより構成されており、時計タンパク質KaiAは *kaiBC* オペロンの発現を促進し、もう一つの時計タンパク質KaiCはその発現を抑制する。時計関連タンパク質SasAは *kaiBC* の発現を促進し、時計の発振を増幅する⁴⁾。これらの事実に基づいて、時計発振のメカニズムとして、遺伝子発現のフィードバックモデルを提唱した（図1）³⁾。しかしながら、時計タンパク質がどのような分子機構で時計を発振させ、周期を24時間に調節しているのかは分かっていない。

我々は、生物時計を時計タンパク質や時計関

連タンパク質から構成される精巧な分子装置と捉え、まず時計装置を構成する時計タンパク質や時計関連タンパク質のドメイン構造や立体構造、それらで構成される複合体の立体構造を原子レベルで解明することにした。次に、原子構造に基づいて*in vivo*リズム解析及び*in vitro*生化学解析を行い、各タンパク質の機能ドメインや機能モチーフ、推定される重要アミノ酸残基の役割を解明することにした。我々は、各構成タンパク質の原子構造と時計発振機能との相関を解明することが、生物時計装置の作動原理を原子レベルで解明することにつながると考えている。

本年、我々は時計タンパク質KaiAの構造・機能ドメインを解明し、時計の発振に必須なC末端時計発振ドメインの原子構造を1.8Åの分解能で解明した⁵⁾。本稿では、KaiAの構造・機能ドメインや時計発振ドメインの原子構造に

基づいた時計の発振機構について紹介したい。

2. KaiAの3ドメイン構造

現在までに、好熱性や糸状性などの生育環境や形態が異なる13種の藍色細菌で時計遺伝子クラスター*kaiABC*が見つかっている。これらの藍色細菌のKaiAのアミノ酸配列のアライメント解析により、KaiAは、アミノ酸残基のほとんど保存されていないN末端ドメイン、比較的保存されている中央ドメイン、高度に保存されているC末端ドメインの3つの構造ドメインから構成されていることが明らかになった。13種の全てで保存されている残基は22残基で、全てC末端ドメインに局在していた。糸状性藍色細菌*Anabaena* sp. strain PCC 7120 (以下*Anabaena*)のKaiAは、C末端ドメインのみで構成され、N末端ドメイン及び中央ドメインを

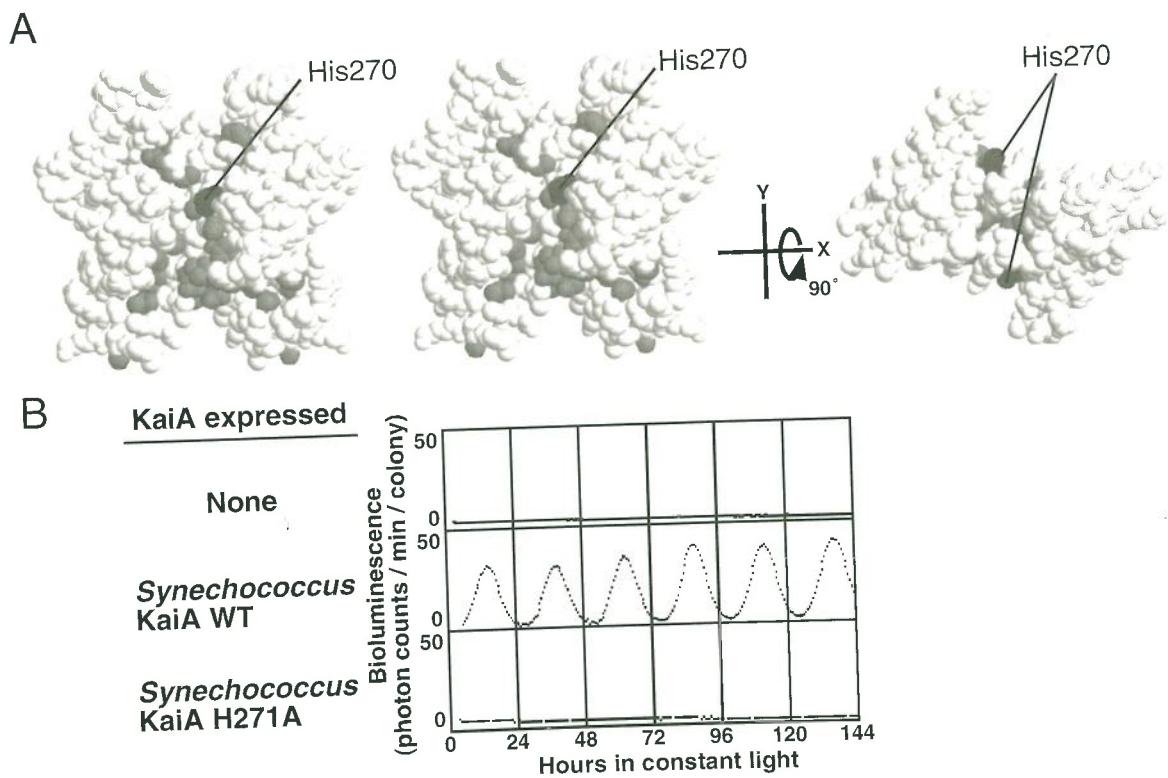


図2 二量体充填モデル(ステレオ図)上の保存残基の位置と機能残基の*in vivo*リズム解析
A. 13種の藍色細菌で保存されているアミノ酸残基は灰色で示してある。ただし、時計発振機能に必須なHis270は黒色で示してある。B. H271A変異体の*in vivo*リズム解析。*Synechococcus kaiA*欠損変異株(宿主; 上段)、野生型KaiA発現株(中段)、KaiA H271A変異タンパク質発現株(下段)のリズム。

欠失していた。別府温泉産の好熱性藍色細菌 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1での KaiAのプロテアーゼ限定分解の結果も、KaiAが3つの構造ドメインから構成されることを支持していた⁵⁾。

次に、*Synechococcus*の *kaiA*欠損変異株で、*Synechococcus* KaiAの各ドメインをそれぞれ発現させ、各構造ドメインの *in vivo*リズム解析を行った。その結果、N末端ドメインは振幅を増幅する機能を、中央ドメインは周期を24時間に調節する機能を、C末端ドメインは時計発振機能を担っていることが明らかになった。*Anabaena* KaiAと *Synechococcus* KaiAの各ドメインとで構成されるキメラタンパク質でも、同様のことを確認した。さらに *Synechococcus* KaiA及び *T. elongatus* KaiAのドメイン欠失タンパク質を用いた *in vitro*生化学解析により、KaiAの生化学活性として知られている、二量体形成能⁶⁾、KaiC結合能⁷⁾、KaiCリン酸化促進能⁸⁾の全てがC末端ドメインに局在することを明らかにした⁵⁾。

そこで、時計発振機能に必須なC末端時計発振ドメインを結晶化し、X線結晶構造解析を行った。大腸菌で大量発現させ、高度精製した *T. elongatus* KaiAのC末端時計発振ドメインを結晶化し、1.8 Åの分解能で原子構造を解明した。KaiA分子の空間充填モデルは2つの凹面を持つ凹レンズ型の形状をしていた (図2 A)。

3. 原子構造と生物時計機能

これまでどの残基がどの様に時計発振に関与しているかは全く分かっていなかった。一般に、進化を通じて保存されている残基は何らかの機能を担っていると考えられる。そこで、C末端時計発振ドメインで保存されている22個のアミノ酸残基を原子構造上にマッピングしてみると、ほとんど全ての保存残基はKaiA分子の凹面中央部に並ぶか、分子の内側に側鎖を伸ばしていた (図2 A)。凹面最深部に位置するヒスチジン残基 (His270) は、分子の外側に側鎖を

伸ばしており (図2 A)、構造維持には関与しておらず、何らかの機能を担っていることが推定された。そこで、このHis270をアラニン残基に置換した一アミノ酸置換変異体を作製し、時計発振機能への影響を調べた。

T. elongatus KaiAを *Synechococcus kaiA*欠損変異株で発現させると、リズム発振が回復したが、そのリズムは非常に低振幅で詳細な解析には適していなかった。そこで、*Synechococcus kaiA*欠損変異株で *T. elongatus* H270A変異に相当する *Synechococcus* KaiA H271A変異を持つ株を作製し、*in vivo*リズム解析を行った。対照の野生型KaiA発現株は正常なリズムを発振したが、この株は全くリズムを発振しなかった (図2 B)。したがって *Synechococcus*の His271は時計発振に必須な残基であることが明らかになった。次に、*T. elongatus* KaiA H270変異タンパク質を用いて、*in vitro*生化学解析を行ったところ、KaiC結合能、KaiCリン酸化促進能が野生型KaiAの3割に減少していた。さらに、円偏光二色計を用いてH270A変異タンパク質の耐熱性を解析したところ、H270A変異は、サブユニット構造や二量体構造にはほとんど影響を与えていなかった。したがって、His270はKaiAの *in vitro*活性に重要な残基であることが明らかになった。この様に、原子構造と *in vivo*, *in vitro*の機能解析とを関連づけることにより、時計発振に必須な残基を世界で初めて同定することができた。

これまでに報告されている概日リズムの周期や振幅に影響を与える *Synechococcus* KaiAの一アミノ酸置換変異体^{3), 9), 10)}が発振するリズムは大きく分けて「長周期・低振幅」と「軽微な周期延長」のリズムに分類できる (図3 A)。しかし、これらの変異がどの様に時計発振に影響を与えているのかは全く分かっていなかった。そこで、KaiAの原子構造に基づいて、一アミノ酸置換変異とリズム変異との因果関係を解析した。その結果、分子の内部に存在し分子構造に大きな影響を与える変異 (F224S, F225S, M241T, C273Y, E274K; 図3 B)は

「長周期・低振幅」の大きなリズム変異を引き起こし、分子内部に存在していても類似残基への置換である変異 (I266V, F244V; 図3C) や、分子表面に存在して構造にはほとんど影響を与えない変異 (E239G, E243A, D242G, D242V, A245D, R249H; 図3C) は「軽微な周期延長」のリズム変異を引き起こすことが明らかになった。

4. おわりに

藍色細菌の生物時計の分子装置は時計タンパク質KaiA, KaiB, KaiCと時計関連タンパク質SasAなどで構成されている。そして主要な時計機能は各時計タンパク質が分担していることが推定される。本研究で我々は、KaiAの3つの構造ドメインがそれぞれ「時計発振の振幅増強」、「周期の24時間への調節」、「時計発振」の3つの時計機能を分担していることを明らかにした。したがって今後、時計タンパク質の機能解析は各ドメインに分解して行えばよいことになった。このようにみごとに生物時計機能が時計タンパク質の各構造ドメインへ割り振られたのはこれが世界で初めてである。さらに、我々はC末端時計発振ドメインの原子構造を解明した。そしてその構造に基づいて*in vivo*リズム解析と*in vitro*生化学解析を行い、各アミノ酸の役割を解明し、時計発振機能を原子レベルで解明する先駆者となった。今後は、他の時計タンパク質や時計関連タンパク質、またそれらの複合体の原子構造を解明し、構造と時計機能との相関を解明したい。

2004年の上半期に、我々の他にも、

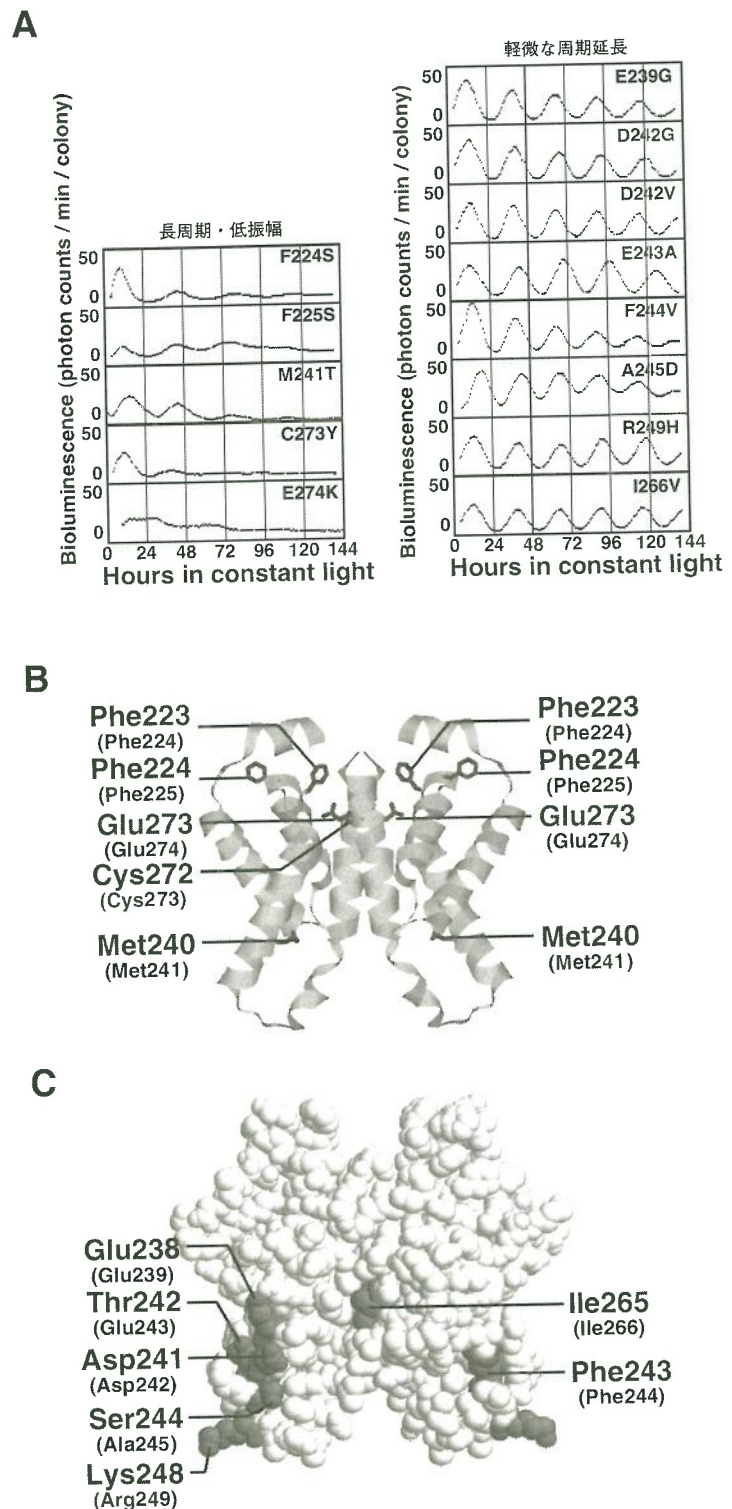


図3 アミノ酸置換変異体のリズムと原子構造上の位置
A. 一アミノ酸置換変異体のリズム。B. 「長周期・低振幅リズム」を引き起こす残基の位置。変異を引き起こす残基を黒色で示してある。C. 「軽微な周期延長リズム」を引き起こす残基の位置。変異を引き起こす残基を灰色で示してある。B, Cに表示してある各残基の下のかっこ内には相当する*Synechococcus*の残基が示してある。

アメリカとカナダのグループ^{11), 12), 13)}が相次いでKaiAの原子構造を報告した。各グループにより報告されたKaiAのC末端ドメインの原子構造は本質的に同じであった。

この半年の間に時計タンパク質や時計関連タンパク質の原子構造が続々と明らかになってきている^{11), 14), 15)}。今後は時計タンパク質KaiA-KaiB-KaiC複合体の原子構造の解明とそれに基づく構造-機能相関の解明が、時計発振の分子機構の解明の鍵となる。また構造解析だけでなく、各時計タンパク質の分子動力学シミュレーションや細胞内における時計タンパク質複合体の形成・解離の時空間変動の解析などの様々な解析を行うことが、時計発振の分子機構の解明に不可欠である。

本研究において、京都大学大学院薬学研究科の加藤博章教授と中津亨助教授、理化学研究所播磨研究所の柴田洋之研究員、名古屋大学遺伝子実験施設の林史夫研究員、藤田真康氏、伊藤典代氏にご協力頂いた。X線回折実験ではSPring8理研ビームラインのスタッフの皆さんにご協力頂いた。この場を借りて感謝の意を表したい。

文 献

- 1) Büning, E. (1973), *The Physiological clock*, 3rd ed. Springer-verlag, New York
- 2) Young M. W. et al (2001), *Nature Rev. Genet.*, 2, 702-715.
- 3) Ishiura M. et al (1998), *Science*, 281, 1519-1523.
- 4) Iwasaki H. et al (2000), *Cell*, 101, 223-233.
- 5) Uzumaki T. et al (2004), *Nature Struct. Mol. Biol.*, 11, 623-631.
- 6) Hayashi F. et al (2004), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 316, 195-202.
- 7) Iwasaki H. et al (1999), *EMBO J.*, 18, 1137-1145.
- 8) Iwasaki H. et al (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99, 15788-15793.
- 9) Nishimura H. et al (2002), *Microbiology*, 148, 2903-2909.
- 10) Taniguchi Y. et al (2001), *FEBS Lett.*, 496, 86-90.
- 11) Garces R. et al (2004), *EMBO J.*, 23, 1688-1698.
- 12) Vakonakis I. et al (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101, 1479-1484.
- 13) Ye S. et al (2004), *J. Biol. Chem.*, 279, 20511-20518.
- 14) Pattanayek R. et al (2004), *Mol. Cell*, 15, 375-388.
- 15) Vakonakis I. et al (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101, 10925-10930.

◀国内情報▶

アマモ科の遺伝的多様性と日本の沿岸環境

元 東京大学海洋研究所
相 生 啓 子

戦後の高度経済成長期に、日本の内湾域では埋め立てや沿岸環境悪化によりアマモ場は衰退、消滅した。アマモ科の遺伝的多様性、アマモ場生態系の重要性、アマモの伝統的な資源利用について考察することにより、持続可能な環境利用と環境保全への指針が示唆される。

1. はじめに

アマモは東京湾や瀬戸内海のような波静かな内湾の奥の砂浜では、どこにでも見られた海草であるが戦後の数10年間で姿を消してしまった。干潟やアマモ場の衰退や消失だけでなく、水産資源の水揚げの減少や、漁業者の高齢化による漁業の衰退が危惧されるようになった。藻場・干潟の環境保全機能と、沿岸漁業との関係についての見直しが迫られている。アマモ場や海藻藻場の消滅と水産資源の減少が連動していることは、漁業者も気がついていた事象である。高度成長期のアマモ場消失の原因は、埋め立て、透明度の低下、化学物質の流入、底曳網などの違反操業による海底の攪乱があげられる。

2002年12月に成立した「自然再生推進法」により、藻場を回復させたり藻場を新たに造成するという取り組みが活発になってきた。市民の間からも高い関心が寄せられ、内湾の環境復元の旗手としてアマモ場造成がとりあげられているが、果たして沿岸環境再生の処方箋となりうるのだろうか。

日本には7種類の温帯種、アマモ科の海草が分布している。日本海を挟んで日本列島周辺は世界一アマモ科の多様性が高い地域で、アマモ科のホットスポットと言える。世界では約60種の海草が存在しているが、近年になり各国で

AIOI Keiko

〒168-0062 東京都杉並区方南2-24-13-105

DNA解析が進められている。日本列島のアマモ科についても遺伝子構造解析が進み、アマモ科の種分化の過程が明らかになった。本稿では、汎世界種（北太平洋と北大西洋に分布）であるアマモを中心にした研究を紹介し、伝統的アマモの資源利用に関する考察を加え、持続可能な環境保全についての指針を提案する。

2. 日本列島のアマモ場

全国規模の藻場の分布と面積に関する調査では、環境庁が実施した自然環境保全基礎調査（1978年および1991年）の調査結果から、13年間の藻場の消失についての結果が得られている。全国の海草藻場面積1978年には51,541haであったが、1991年には49,464haで消滅した海草藻場面積は、2,077haとなっている。この調査では海藻藻場と海草藻場の分布と面積についてのみの調査結果で、種類別の調査はなされなかった。1978年当時までに大都市圏で多くのアマモ場は消失していたが、その実態に関するデータはない。

岡山県児島湾の場合は、世界大戦期を除いた大正14年から平成12年までの推移が解っていて、アマモ場面積の90%が消滅してしまった。化学肥料に切り代わった昭和40年代以後の減少から復活の兆しは見られない。アマモ場面積の減少や消失の原因は、地域により異なると考えられるが、児島湾では、河口堰の構築など海岸

線のコンクリート化による海況変化が大きな要因であろう。加えて陸域からの除草剤などの農薬の流入による負荷により、アマモ場の復活が制限されているものと考えられる。

3. 日本列島に分布する海草の多様性

日本列島周辺には、アマモ科7種（温帯種）、トチカガミ科4種（熱帯種）、シオニラ（ベニアマモ）科5種（熱帯種）、カワツルモ科2種（温帯～熱帯）の計18種類の海草が分布している。オーストラリア周辺では約30種類の海草が分布しているが、日本周辺域はオーストラリアの次に海草の種類が多い。日本に分布している海草の殆んどがレッドリストに指定されているが、調査不足、状況不明の沿岸域が多く基礎調査が必要である。昨年、沖縄本島東海岸にある泡瀬干潟の埋め立て予定地から、新記録のウミヒルモの仲間が発見された。

海草は世界的にも人間の活動による沿岸環境の悪化、温暖化による地球レベルの環境変化による絶滅が危惧されている。その理由は、上陸してイネのような水生植物として進化したものが、再び海に帰環し数千万年かけて多様に種分化したものであり、数十年間の急激な環境の変化に対しては、全く適応能力を持たないからである。

淡水の水草と海草の系統関係が、遺伝子構造解析により明らかになった。うみ草は、水草のヒルムシロ科に最も近く、ヒルムシロ科とアマモ科が分岐したのはおよそ1億年前と推定された。アマモ科のグループが盛んに種分化したのは、3,200～3,600万年前で、アマモとタチアマモは600万年前に分化したと推定された（図1）。朝鮮半島も含む日本列島周辺域で、アマモ科種類

数が最も多い理由は、日本列島や日本海の形成過程、黒潮や対馬暖流や親潮といった海流の影響による多様な環境条件が、アマモの種分化と多様性を促進したと考えられる。

アマモの種内変異と地理的変異に関しては、核遺伝子の塩基配列が決定され、日本列島周辺では日本海側タイプと太平洋側タイプの2つの系統がみられた。これらのハプロタイプの分布と起源についての考察により、塩基配列構造から地域による変異が高く、日本海側タイプの多様性の広がりには太平洋側タイプより古く、先に日本海側で分布が広がり、その後急激に太平洋側で分布が広がったと推定している（図2）。

4. 日本におけるアマモ場造成

これまでに数々の藻場造成事業が各地で実施されてきたが、株移植の手法を始め播種のための発芽実験など、実験技術的側面では進展をみている。しかし、実施する前段階での基礎的な検討、種子を播種する場合の遺伝子攪乱への配慮、適地選定に関する配慮がなされているかが極めて曖昧な場合が多い。実施後のモニタリングが行なわれているケースも少ない。

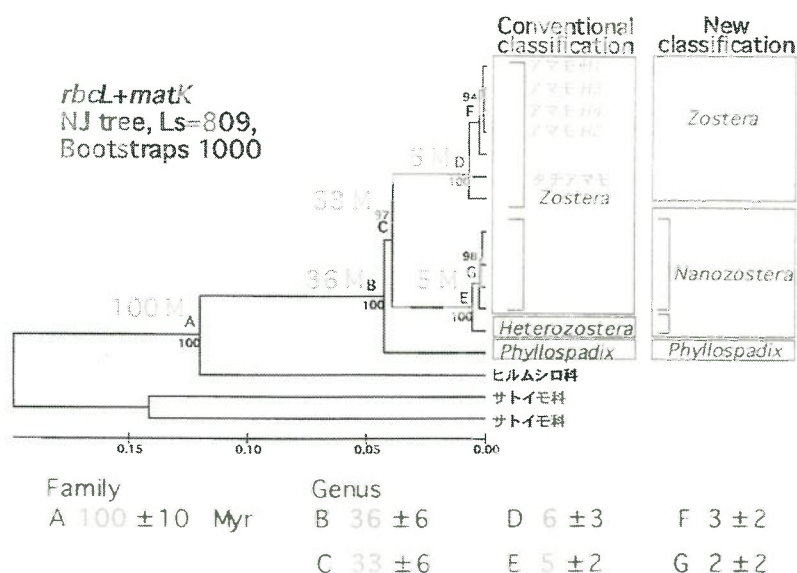


図1 分岐年代の推定と属、亜属の系統関係
アマモ科とヒルムシロ科の分岐は、白亜紀の1億年前、アマモ科の種分化は、3,500万年前後と500万年前後の2回あったと推定。

事業規模でのアマモ場造成の例としては、1993年から1997年まで、段階的に広島県の似島において実施されたものがある。このアマモ場造成は、出島沖の埋め立て認可の条件として、環境庁長官から「消滅する藻場に代わる新たなアマモ場や干潟の造成に努める必要がある」という指示が事業者に対して出されたことから実施されたもので、いわゆる代替措置としてのアマモ場造成事業であった。その結果、部分的には密生しているが、もとの2haのアマモ場面積を再現するまでには至っていない。ちなみにこの事業では、5年間で20億円の費用が投じられた。アマモ場造成事業においては、アマモに適した砂泥底の、環境条件整備などの技術に要するコストがかかることが報告されている。

5. 伝統的アマモ利用と環境保全

伝統的なアマモの資源利用に関する知見がある。嘗て広大な草原のようなアマモ場があった

地域では、全国的に漁業以外の目的でアマモが利用されていた。海草利用は多岐にわたり、北海道や東北地方では、馬の鞍の下に敷くクッションとして利用したり、葉部表面が柵上組織で覆われたスガモを縄のように利用したり、漁に出る時の腰蓑や肩掛として利用していた。愛知県三河湾、神奈川県三浦半島では堆肥として利用していた記録がある。広島県大崎上島町では夏期の大潮を中心に、アマモの刈り取り、陸揚げしたアマモを天日乾燥した後、人糞を混ぜながら堆肥として利用した。肥料として使えるまでには約1年かかったが、アマモ肥料は、麦、ネギ、イチジクに効果があり、ネギには防虫効果があったという。サツマイモ、ジャガイモには、ガラモベースの堆肥を使い分けていた。化学肥料が使用されるようになった昭和30年後半からは、手間のかかるアマモ堆肥は使われなくなった。

静岡県の浜名湖でも戦後の1950年代までモク採りといってアマモを刈りとる操業を行なって

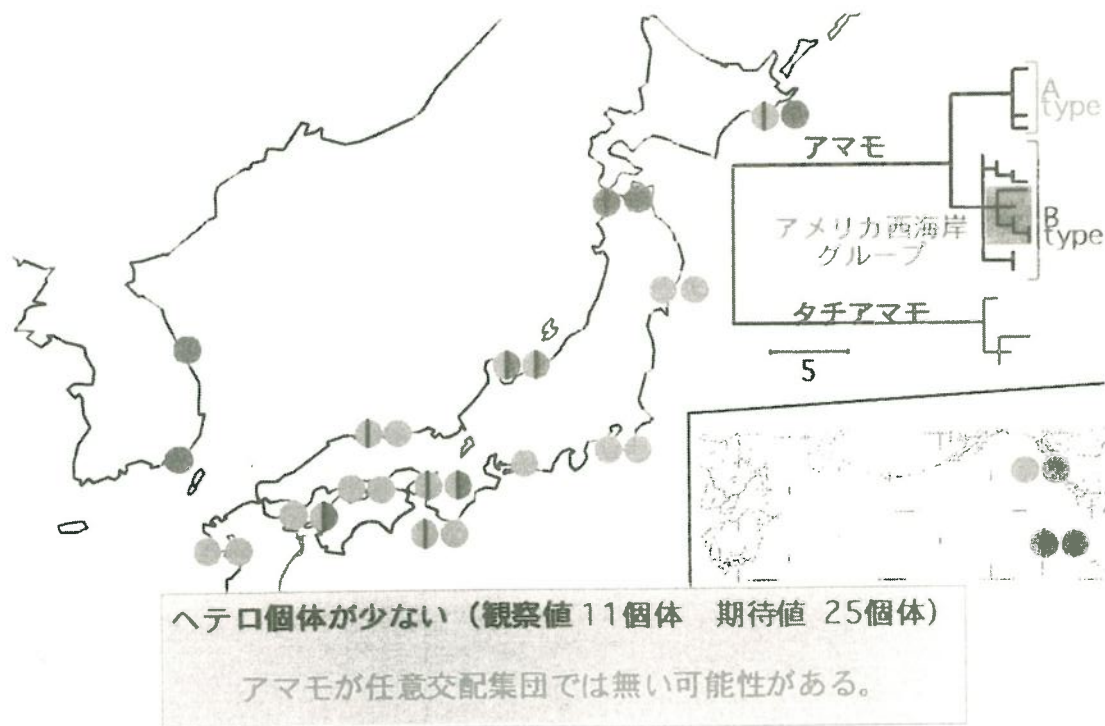


図2 アマモのハプロタイプの地理的分布

太平洋側にAタイプ、日本海側にBタイプという2系列がみられる。アメリカ大陸西海岸ではBタイプの頻度が高く、Bタイプのなかでも単系統が示唆された。

いた。当時は、魚をとる漁業よりもアマモ採草が重視されていた。島根県と鳥取県にまたがって位置する中海においても、1950年代までアマモを大量に採集して沿岸の農地に施肥していた。肥料藻は痩せた砂浜を豊かな農地に変え特産品の綿花栽培を可能にした。施肥量は年間10万トンにも達し、これにともない水域から栄養塩が除去され、人為的物質循環システムによる中海の水質浄化をはじめとする豊かな自然環境が維持されていた。

6. おわりに

60%を占める山間部および、わずかな海岸線に人口がひしめいている狭い日本列島では、欧米のように、人間が立ち入らない保護区を設定することは困難である。縄文の時代から受け継がれてきた智慧と、地域の歴史を紐解くことにより自然との関りかたを見直す必要がある。アマモ場造成をする前に、残されているアマモ場の保護と保全策を優先するべきである。沿岸環境再生の目標は、どこまで再現できれば良いのであろうか。地域レベルでの循環システムの完結は、グローバリズムの流行と対立軸にあるが、持続可能な自然環境とヒトとの関りかたにひとつの示唆を与えてくれる。これまでの生物学、生態学、水産学、化学、物理学、工学など

の科学的知見に加え、民族学、文化人類学などの総合的な学問としての沿岸環境学や、特有の地域学の取り組みが必要になってきた。

文 献

- 1) 相生啓子 (2003), 遺伝, Vol.57, No.2, 53-58.
- 2) 相生啓子 (2004), 海洋と生物150, Vol.26, No.1, 35-42.
- 3) 相生啓子 (2004), 海洋と生物153, Vol.26, No.4, 303-308.
- 4) Kato, Y. et al., (2003), *Genes Genet. Syst.*, 78, 329-342.
- 5) Kato, Y., (2004), PhD thesis, (SOK-ENDAI, The Graduate University for Advanced Studies), 136 pp.
- 6) 川崎保夫 (2003), 海洋と生物145, Vol.25, No.2, 85-91.
- 7) 水土舎 (2004), 平成15年度水産業・漁村の多面的機能支援化委託事業報告書, 313 pp.
- 8) 国際海洋科学技術協会 (2001), 河川整備基金助成事業報告書, 109 pp.
- 9) 平塚純一 (2004), エコソフィア13, 97-112.

◀国内情報▶

セルトレイ苗挿し木装置

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 園芸工学研究部
 太 田 智 彦 ・ 林 茂 彦

キクの穂のセルトレイへの植付作業を省力化するために、手供給された穂をセルトレイへ自動で植付ける装置の開発を行った。開発した装置は標準型と下葉除去型の2機種であり、前者は供給部と植付け部から構成され、あらかじめ下葉除去された穂をセルトレイに植付ける。後者は供給部、下葉除去部および搬送・植付け部から構成され、自動で下葉を除去し、植付けを行う。本装置は農業機械等緊急開発事業の課題として開発されたものであり、平成16年度より市販されている。

1. はじめに

キクの栽培面積は6190haで、出荷量は20億1500万本であり、切り花類のうち最も重要な品目の一つである。作業別の労働時間を見ると、育苗、採穂、植付け作業の占める割合が高く、穂の植付けはすべて手作業で行われている。セルトレイ苗の機械移植体系を確立するためにも、セルトレイへの自動植付け技術の開発が切望されている。そこで、キクの穂の下葉を取り除き、セルトレイへ植付ける装置の開発を行った。本研究開発は平成10年度より、農業機械等緊急開発事業の課題として、井関農機㈱の参画を得て推進してきた。

2. 開発装置の概要

開発したセルトレイ苗挿し木装置（以下、挿し木装置）は標準型（図1，表）と下葉除去型（図2，表）の2機種である。両機種ともに作業者がキクの穂を供給する半自動式であり、対象トレイは200穴のセルトレイである。

2.1 標準型

標準型は、あらかじめ下葉除去された穂をセ
 OTA Tomohiko, HAYASHI Shigehiko
 〒331-8357 さいたま市北区日進町1-40-2

ルトレイに植付ける。供給部と植付け部から構成される。大きさは長さ1190×幅1460×高さ820mmであり、質量は100kgである。装置の駆動は交流100V（消費電力150W）により行う。



図1 セルトレイ苗挿し木装置（標準型）

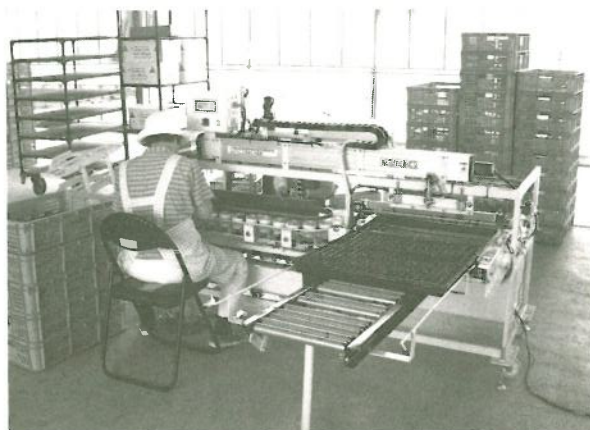


図2 セルトレイ苗挿し木装置（下葉除去型）

表 セルトレイ苗挿し木装置のおもな仕様および性能

	標準型	下葉除去型
大きさ	1190(L)×1460(W)×820(H) mm	1130(L)×2320(W)×1225(H) mm
質量	100 kg	250 kg
供給部	周回カップ	周回カップ
下葉除去部	—	ブラシ、スリット、ハンド
搬送・植付け部	植付けハンド(10連式、搬送機能なし)	植付けハンド(10連式)
所要電力	150 W	本体:400 W、コンプレッサ:1500 W
植付け速度	3段階(1500、3000、4000本/h)	無段階(0~3000本/h)
設定可能植付け深さ	20~30 mm	20~28 mm
対象トレイ	200穴セルトレイ	200穴セルトレイ
欠株率	0.5~2.7 % *1	0.8~4.5 % *2
作業能率	1900~3030 本/h・人 *1	1490~2370 本/h・人 *2
下葉除去枚数	—	0.3~1.2 枚/本 *3
発根指数 *4	6.0 (品種‘ひかる’) 手作業で植付けた穂:6.0	6.0 (品種‘神馬’) 手作業で植付けた穂:6.0

*1:試験7回実施(供試数600本) *2:試験6回実施(供試数600本) *3:試験6回実施(調査数30本)

*4: 植付け2週間後に調査(調査数30本)し、発根状態を1:根原基確認、2:発根確認、3:根長5mm程度、4:根長10mm程度、5:根長15~20mm程度、6:根長25mm以上の6段階の指数で評価した。

作業者が周回するカップに穂を投入した後、植付けハンドでカップから取り出し、そのままセルトレイに植付ける。周回カップ構造により作業者はほぼ定位置にカップを投入することが可能であるので、楽な姿勢で高速に供給することができる。植付け速度を1500、3000、4000本/hの3段階に調節でき、作業者1~2名で穂を供給できる。植付け部のハンドで10株を同時にセルトレイに植付けることで、処理速度の高速化を図っている。セルトレイの供給、排出はコンベアで行う。設定可能な植付け深さは20~30mmである。

2.2 下葉除去型

下葉除去型は供給部、下葉除去部および搬送・植付け部の構成である。大きさは長さ1130×幅2320×高さ1225mmであり、質量は250kgである。駆動には交流100V(消費電力400W)を利用し、加えてエアコンプレッサ(1.5kW)が必要である。供給部は、周回カップ構造であり、作業者は1~2名で穂を供給する。植付け速度は作業者の投入に合わせて無段階(0~3000本/h)に調整することができる。

下葉除去部は、スリット、ブラシ、基

部把持ハンドから構成され、下葉を次の動作により自動で除去する(図3)。①供給部から受け渡された穂をスリットの間に挿入する。②ブラシの回転により穂を下方に送り込み、基部把持ハンドで固定する。③基部把持ハンドを180°回転、下降させ、下葉をスリットの下側に引き込ませる。④スリットを閉じ、受け渡しハンドで穂を引き上げ、下葉を除去する。

下葉除去された穂は、植付けハンドで穂のセ

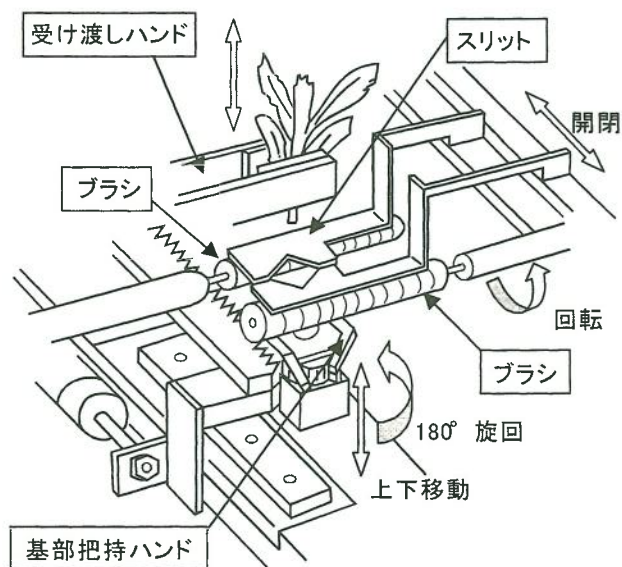


図3 下葉除去部の構造

ンタリングを行い、セルのほぼ中央に植付けられる。下葉除去と植付けを並列して行うことによって、高速に処理する。セルトレイの供給と排出は標準型と同様にコンベアで行う。なお、設定可能な植付け深さは20～28mmである。

3. 開発装置の性能

3.1 標準型

標準型について、輪ギクの‘神馬’、小ギクの‘ひかる’、‘白水’、‘みやび’を供試し、性能試験を実施した。試験の結果、欠株率は0.5～3.1%であり、作業能率は1900～3030本/h・人で、慣行の植付け作業の約1.1～2.4倍であった(表)。

3.2 下葉除去型

下葉除去型については、輪ギクの‘神馬’、スプレーギクの‘プリンス’、小ギクの‘白水’、‘みやび’、‘秋芳’を供試し、性能試験を実施した。試験の結果、欠株率は0.8～4.5%で、下葉除去枚数は0.3～1.2枚/本であり、作業能率は1490～2370本/h・人で、慣行の下葉取り・植付け作業の約1.5～2.4倍であった(表)。

両機種ともに、挿し木装置を用いて植付けたキクの穂の損傷はほとんどなかった。生育、発根も良好であり、手作業で植付けた穂と同等の品質を得て、商品として出荷し、特に問題はなかった。作業や苗業者から実用性について聞き取り調査を行った結果、「作業が楽」、「慣れ

たらもっと速くできる」、「価格条件が合えば購入したい」等の意見があり、概ね良い評価が得られた。また、安全性に関しては特に問題はなかった。

4. おわりに

グローバル化が進む花き産業の中で、国際競争力を強化するため、低コスト生産、高品質生産など革新的な技術の開発が求められている。挿し木装置がキクの育苗作業の省力化・軽労化を実現し、花きの低コスト生産に貢献することが期待される。また、挿し木装置のみによる省力化だけではなく、移植機と組み合わせることにより、さらなる効果が期待できるため、育苗から移植作業までの機械化技術の確立が望まれる。

挿し木装置の使用に当たっては、曲がりがなく、茎長の揃った穂を用いることが望ましい。挿し木装置は高性能農業機械実用化促進事業を経て、平成16年度より市販化されている。今後、普及の拡大を図り、カーネーションなど他作物への汎用化を検討する。

文 献

- 1) 林茂彦ら(2004), セルトレイ苗挿し木装置の開発と実用化, 平成15年度研究報告会資料, 55-60, 生物系特定産業技術研究支援センター

◀地域の先端研究▶

少ない窒素肥料で生育可能な作物の創出方法

岡山大学 資源生物科学研究所
柳 澤 修 一

土壌中の無機窒素を同化してアミノ酸を生合成することは植物の生長に必要な不可欠であり、窒素の利用効率は作物の収量に大きく影響する。高い窒素同化能力を持ち窒素が少ない環境下での生育が改善した作物の創出方法として、転写因子Dof1を利用した方法を開発した。Dof1遺伝子の導入はシロイヌナズナとジャガイモのいずれでも同様の効果をもたらしたことから、この方法は幅広い植物種に応用可能であると考えられる。

1. はじめに

窒素は植物の生育に必要な不可欠な栄養素であり、その必要性は植物の基本生体物質であるタンパク質、核酸、クロロフィルなどが窒素原子を含むことから明白である。無機窒素の同化量は植物の生長や作物の収量に大きく影響するため、近代農業では窒素肥料を大量に施肥することにより高い収量を得ている。しかしながら、高い収量を得るために必要な窒素肥料は、一方で、環境汚染源の一つになっていると考えられている。すなわち、水田や畑に大量に施肥された窒素肥料は、地下水、川、湖や海に流れ出し、水環境の富栄養化をもたらす大きな要因となっていると見られ、また、酸性雨の原因の一つとも考えられている¹⁾。

無機窒素をより効率的に吸収・同化する能力を持ち、より少ない窒素肥料で十分な収量を与える作物の創出は、環境に優しくかつ収量を維持した持続的農業を展開するうえで重要である。このような観点から、過去、植物が持つ窒素同化能の強化を目指した多くの研究がなされてきた。例えば、基本的にマメ科植物だけが持つ空気中の窒素ガスを固定して窒素同化を行う能力を他の有用植物にも付与しようという試みがある。マメ科植物が空気中の窒素ガスを利用

するためには窒素ガスを固定する能力をもつ根粒菌が共生することが必要である。そこで、マメ科植物以外にも根粒菌を共生させる試みがなされているが、未だ成功していない。一方で、全ての植物は土壌中の無機窒素である硝酸イオンやアンモニウムイオンを根から吸収して窒素同化を行う。硝酸イオンは取り込まれた後にアンモニウムイオンに還元されて同化されることから、硝酸還元反応を触媒する酵素の高発現による窒素同化能の強化や、グルタミン合成酵素の発現の強化による窒素同化能の改善なども試みられてきた。ごく最近になって、やっと、グルタミン合成酵素の発現を強化することにより光呼吸によって生成したアンモニウムイオンの再同化を促進して窒素利用効率を改善したという報告がなされたが、同化された総窒素量は変わっていないと見られる²⁾⁻⁵⁾。従って、窒素同化能を強化する有効な方法の開発は今後の課題となっている。

2. 高い窒素同化能力を持つ植物の創出のための方策

植物の窒素同化とは、土壌中の無機窒素（硝酸イオンとアンモニウムイオン）と無機窒素の受け手となる炭素骨格（2-オキソグルタル酸）を用いて、グルタミン合成酵素（GS）とグルタミン酸合成酵素（GOGAT）の共役した反応経

YANAGISAWA Shuichi

〒710-0046 倉敷市中央2-20-1

路によりアミノ酸を生合成することである(図1)。従って、炭素骨格の供給量を増やすことによって窒素同化能を高められることができるのではと考えられていた⁶⁾。しかしながら、図1に示すように、炭素骨格である2-オキソグルタル酸は光合成産物から多くの酵素によって触媒される多段階の反応を経て生合成される。従って、一個の遺伝子の導入によって一つの酵素活性を強化したとしても2-オキソグルタル酸の生成量が有意に変動するかは疑問であり、また、この代謝経路に関わる多くの酵素の活性を増強するために多数の酵素遺伝子を導入することも難しく、炭素骨格の供給量を増加させることにより窒素同化能の強化を行う現実的なアプローチは開発されていなかった。我々は、炭素骨格に生合成に関わる酵素遺伝子の発現を同調的に制御している転写制御因子が存在するならば、その転写因子を用いて炭素骨格生成経路の全体を活性化し同化される総窒素量を増大させることができのではと考え、その可能性を検討した⁷⁾。

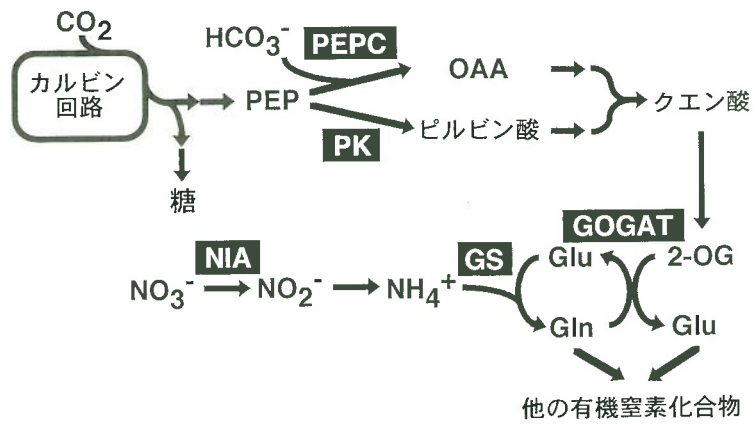


図1 植物における窒素同化のための代謝経路

PEPはホスホエノールピルビン酸を、OAAはオキサロ酢酸を、2-OGは2-オキソグルタル酸を、Gluはグルタミン酸、Glnはグルタミンを示す。また、酵素も略語で示された。PEPCはホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを、PKはピルビン酸キナーゼを、GSはグルタミン合成酵素を、GOGATはグルタミン酸合成酵素を、NIAは硝酸還元酵素を示す。(文献7より改写)

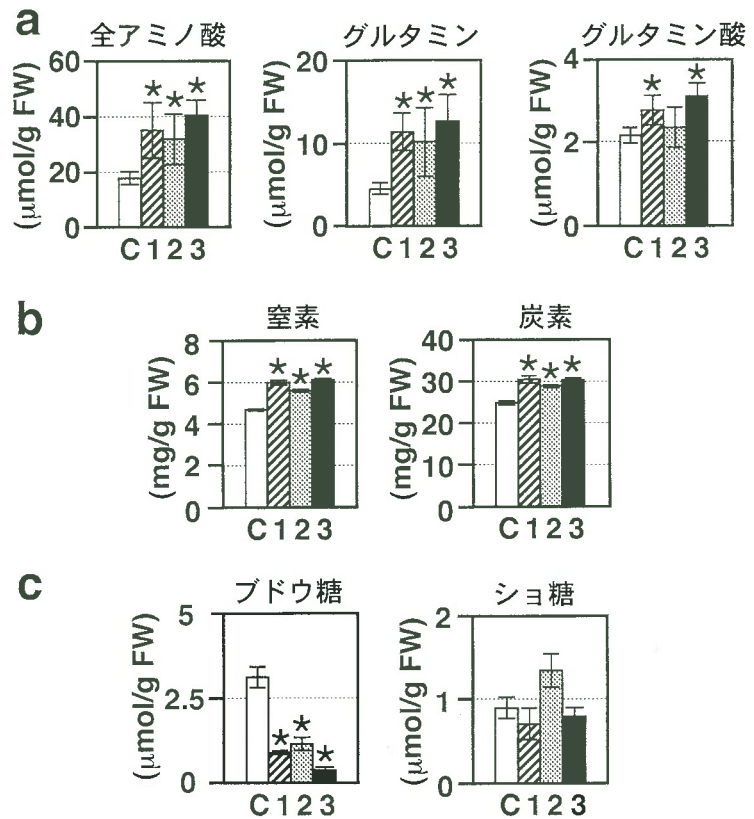


図2 形質転換シロイヌナズナにおける代謝物の含量

a. 湿重量あたりの全遊離アミノ酸量、グルタミン量とグルタミン酸量。b. 湿重量あたりの窒素含量と炭素含量。c. 湿重量あたりのブドウ糖とショ糖の含量。対照植物(C)と形質転換体(1から3)の組織を用いて三回測定し、平均と標準偏差を示した。統計的に対照植物と形質転換体の間で有意な相違がある場合は★印で示した。(文献7より改写)

3. 転写因子Dof1を発現している形質転換シロイヌナズナにおける窒素同化能の強化

現段階で、2-オキソグルタル酸合成経路に関わる酵素の遺伝子の同調的発現に関わっていると推定されている転写因子はトウモロコシのDof1転写因子しかない。そこで、この転写因子の遺伝子をモデル植物であるシロイヌナズナに導入し、この遺伝子導入による窒素同化能の変化を調べた。

改変型35Sプロモーターの下流にDof1遺伝子を接続したキメラ遺伝子を用いて、Dof1を発現している形質転換シロイヌナズナを3系統作成した。この3系統のシロイヌナズナにおいて、

2-オキソグルタル酸合成経路の酵素の遺伝子（ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子群やピルビン酸キナーゼ遺伝子群など）の発現の上昇が確認され⁷⁾、また、いずれの系統においても野生型に比べアミノ酸含量が約2倍となっていた（図2a）。特に、有機窒素の主要なプールであり、窒素利用効率の最も良い指標であるとされているグルタミンの含量の増大は顕著であった（図2a）。さらに、元素分析によって湿重量あたりの元素量を調べたところ、窒素の含量が約30%程度増加しており同化された窒素の総量が増えたことが示唆された（図2b）。一方で、ショ糖のレベルに変動は見られなかったものの、ブドウ糖のレベルは約1/3に低下しており（図2c）、Dof1の発現によって多く

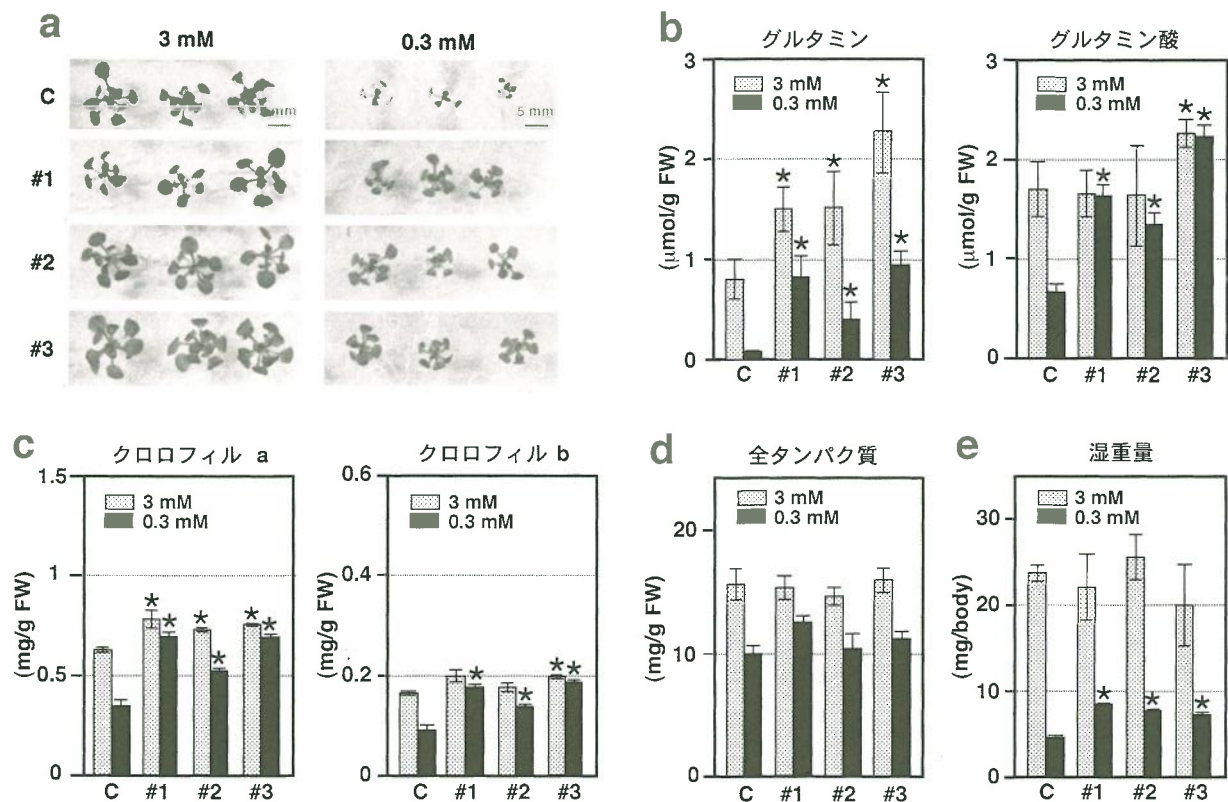


図3 窒素を制限した培地上での形質転換体と対照植物の生長の比較

a. 1 mMの硝酸アンモニウムと1 mMの硝酸カリウムを含む培地上（3 mM）と0.1 mMの硝酸アンモニウムと0.1 mMの硝酸カリウムしか含まない培地上（0.3 mM）で3週間、生育させた対照植物（C）と形質転換体（#1-3）。また、湿重量あたりのグルタミンとグルタミン酸の含量（b）、クロロフィル量（c）、全タンパク質の量（d）と、個体あたりの湿重量（e）も示す。対照植物と形質転換体の間の相違が統計的に有意である場合は★印で示した。（文献7より改写）

の代謝物のレベルが大きく変動することが判明した。さらに、驚くべきことに、形質転換体では窒素含量の増大と共に炭素含量も増えており窒素と炭素の割合を維持していた(図2b)。このことは、窒素と炭素のバランスの維持は植物にとって根源的問題であるという考えと一致するものではあるが、形質転換体で、どの炭素化合物の含量が増えることによって窒素と炭素のバランスが維持されたのかは、今後、明らかにする必要がある。

4. 窒素を削減した条件下での生育改善

同一生育条件下で形質転換体の窒素含量が高いのならば、窒素を制限した生育環境下での生長が改善している可能性がある。このことを検討するために、窒素を制限した培地上での野生型と形質転換体の生長を比較した。窒素が不足した生育環境下では植物個体の大きさは小さくなり、下の方の葉が早く枯れてくる。1 mMの硝酸アンモニアと1 mMの硝酸カリウムを含む培地上で生育させた形質転換体と比較対照植物の間で外見の相違が見られなかったが、窒素を減らし0.1mMの硝酸アンモニアと0.1mMの硝酸カリウムしか含まない培地上では形質転換体のほうが良い生育を示した(図3a)。このことを確認するために、幾つかの窒素利用効率の指標について調べた。培地上の窒素を減らすと、有

機窒素のプールであるグルタミンの含量が極端に低下し、また、クロロフィルや総タンパク質量も減少することが知られている。形質転換体と比較対照植物のいずれでも窒素の削減に応じてグルタミン含量は著しく低下した。しかしながら、窒素を減らした培地上で生育させた比較対照植物ではグルタミンのプールはほぼ空なのに対して、形質転換体ではまだ確かな量のグルタミンが存在していた。(図3b)。さらに、クロロフィルの含量(図3c)、総タンパク質量(図3d)や一個体あたりの湿重量(図3e)などの指標も転写因子Dof1の発現は窒素が少ない時の生育を改善することを示唆した。

5. 形質転換ジャガイモにおけるDof1の発現の効果

単子葉植物であるトウモロコシの転写因子を用いて双子葉植物であるシロイヌナズナの窒素同化能の強化が行えたことから、このDof1転写因子を用いた方法は幅広い植物種に適用可能であることが推察される。そこで、Dof1遺伝子をジャガイモにも導入し、その効果を調べた。8つの形質転換体のラインを作成し、全遊離アミノ酸、グルタミンとグルタミン酸の量を調べたところ、図4に示すように全てのラインにおいてアミノ酸量の増加が確認することができた。このことは、Dof1の発現による窒素同化

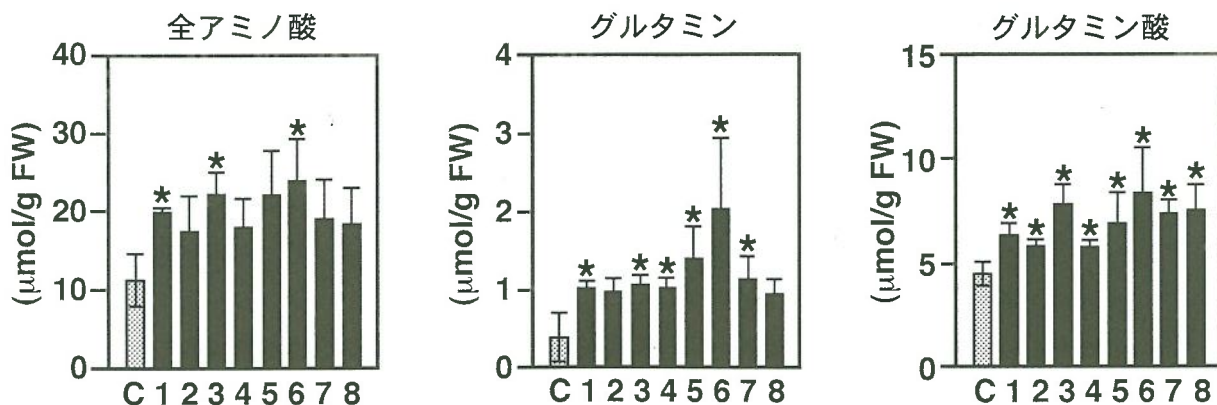


図4 形質転換ジャガイモのアミノ酸含量

野生株(C)と形質転換体(1から8)における全遊離アミノ酸量(a)、グルタミン量(b)、グルタミン酸量(c)。統計的に相違が有意である場合は*印で示した。

能の強化は、多様な植物種で可能であることを示唆した。

6. おわりに

施肥量を減らしても高い収量を維持できる作物の創出は、環境に優しい持続的農業を展開するうえで非常に重要である。加えて、肥料を購入して近代農業を営むのが難しい開発途上国における農業では直接的に収量の改善に結びつくと考えられる。我々の研究結果は、多様な植物種でDof1転写因子の発現により窒素同化能の強化を行える可能性があることを示唆した。しかしながら、形質転換体の分子レベルの解析は未だ不十分であり、窒素含量の増大に伴った炭素含量の増大など予測を超える大きな変化も観察している。今後、Dof1の発現によりイネなどの穀物においても窒素同化能を強化できるかの検討と同時に、形質転換体の詳細な解析によりDof1による窒素同化能の改善の分子的基盤を確立することは非常に重要である。また、自然環境下でDof1の発現の効果を評価することも非常に大切であると考えられる。

本研究は、転写因子を利用すれば窒素同化という植物の代謝の中心をも改変できることを示した。このことは、さまざまな有用形質を植物に付与するために転写因子を利用することは有

効なアプローチであることを強く示唆する。実際、乾燥や塩ストレスなどに対する耐性の強化にCBF/DREBと呼ばれる転写因子を利用した例も既に報告されており^{8, 9)}、今後、さまざまな転写因子の分子育種における利用例が示されるものと考えられる。

文 献

- 1) Nosengo, N. (2003), *Nature*, 425, 894-895.
- 2) Gallardo, F. et al. (1999) *Planta*, 210, 19-26.
- 3) Migge, A. et al. (2000) *Planta*, 210, 252-260.
- 4) Fuentes, S. et al. (2001) *J. Exp. Bot.*, 52, 1071-1081.
- 5) Oliveira, I. C. et al. (2002) *Plant Physiol.*, 129, 1170-1180.
- 6) Foyer, C. H. & Ferrario, S. (1994) *Biochem. Sci., Trans.* 22, 909-915.
- 7) Yanagisawa, S. et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 7833-7838.
- 8) Jaglo-Ottosen, K. R. et al. (1998) *Science*, 280, 104-106.
- 9) Kasuga, M., et al. (1998) *Nat. Biotechnol.*, 17, 287-291.

◀文献情報▶

ウシ精子へのコレステロール感作が、受精能獲得、先体反応および受精率に及ぼす影響

Effect of Adding Cholesterol to Bull Sperm Membranes on Sperm Capacitation, the Acrosome Reaction, and Fertility.

Phillip H. Purdy and James K. Graham

Department of Biomedical Sciences, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523, USA

Biology of Reproduction, 71, 522 - 527 (2004)

凍結保存前の精子にコレステロールを感作させると、細胞膜の性状に変化が起こり、融解後に運動性の高い生存精子が高率で回収されることがこれまでに報告されている。しかしながら、精子の受精能獲得の最初のステップは精子膜からのコレステロールの流出であることから、コレステロール添加は凍結・融解後の精子の生存性を向上させるものの、精子の受精能獲得を阻害する可能性がある。そこで、コレステロール含有シクロデキストリン (CLC) で処理したウシ精子の受精能獲得、先体反応および受精率に関して検討が行われた。対照区 (CLC無処理) あるいはCLC処理区の精子を、ヘパリン、ジラウロイルホスファチジルコリン (PC12) あるいはカルシウムイオノフォアA23187 (A23187) に感作させ、受精能獲得および先体反応を誘起させた。細胞内のカルシウム濃度の上昇を指標とした精子の受精能獲得および先体反応が誘起された精子の割合をフローサイトメーターにより測定した。CLC処理を施した新鮮精子における受精能獲得あるいは先体反応誘起精子の増加速度は、対照区に比べて早く、その差は受精能獲得および先体反応誘起処理方法の違いによっても認められた。しかしながら、凍結・融解後は、受精能獲得および先体反応誘起処理方法の違いにかかわらず、CLC処理区と対照区との間には、受精能獲得あるいは先体反応誘起の差は

認められなかった。また、CLC処理が体外あるいは体内における受精率に及ぼす影響を検討するため、凍結・融解後にパーコール処理によって分離した生存精子を用いて体外受精を実施したところ、体外受精後の卵割率や胚盤胞への発生率には、凍結保存前のCLC処理の有無による差は認められなかった。また、未經産牛への人工授精による受胎率も、対照区 (50%) とCLC処理区 (59%) の間に差は認められなかった。以上の結果から、ウシ精子に対する凍結保存前のCLC処理は、凍結・融解後の受精能を維持した生存性の高い精子の割合を高めることが明らかとなった。

本論文においては、体外受精による受精率に差が認められなかった。これは、凍結・融解後、パーコール処理によって生存精子を分離して体外受精を実施したために、受精率に差が認められなかった可能性があり、精子洗浄のみを実施し、生存精子の分離を行わないで体外受精を実施した場合には、異なった結果が得られた可能性も考えられる。また、人工授精においては、CLC処理精子を用いた場合にわずかに受胎率が高いが、実施頭数が少ないために有意な差とはなっていない。人工授精の受胎率に差が認められるかどうかは、さらなる例数の追加が不可欠である。精子の凍結保存技術は、すでに確立された技術であると考えられるかたも多いかもしれないが、いまだ改善すべき点は残されている。CLC処理により凍結保存後の精子の生存性や人工授精による受胎率の向上が図れるのであれば、CLC処理は、ウシのみではなく他の動物種においても、精子の凍結保存における有効な技術となる可能性がある。

(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▶

海水に適応したアトランティックサーモンの反復遊泳能力へ及ぼす飼料中の脂肪酸組成の影響

Dietary fatty acid composition affects the repeat swimming performance of Atlantic salmon in seawater.

G.N. wagner¹, S.K. Balfry¹, D.A. Higgs², S.P. Lall³, A.P. Farrell⁴

¹Faculty of Agricultural Science, University of British Columbia, 266B-2357 Main Mall, Vancouver, BC Canada V6T 1Z4

²Fisheries and Oceans Canada, West Vancouver Laboratory, 4160 Marine Drive, West Vancouver, BC Canada V7V 1N6

³National Research Council, Institute for Marine Bioscience, 1411 Oxford Street, Halifax, NS, Canada B3H 3Z1

⁴Department of Biological Science, Simon Fraser University, Burnaby, BC Canada V5A 1S6

Comparative Biochemistry and Physiology Part A 137, 567-576 (2004)

筆者らは、アトランティックサーモン (*Salmo salar*) において、飼料中の脂質源 (魚由来、家禽由来、そして植物由来) が運動能力と回復能力へ及ぼす影響について試験を行った。

対照区の飼料にはアンチョビーオイル (AO) を配合した。試験飼料には、家禽の脂肪 (PF)、亜麻仁油 (FO)、ヒマワリ油 (SO) を用い、それぞれAOの75%を代替した。AO飼料は、n-3高度不飽和脂肪酸 (n-3 HUFA) の含有量が多く、オレイン酸とリノール酸の含有量が少なかった。PF飼料はオレイン酸の含有量が多く、SO飼料はリノール酸の含有量が多く、FO飼料はオレイン酸含有量がSO飼料と同程度でリノール酸含有量がPF飼料と同程度であった。

各試験区の魚を用いて繰り返し臨界遊泳能力試験を行った結果、1回目の臨界遊泳速度 (Ucrit1) では、PF飼料給餌魚がAO飼料給餌魚と比べて有意に遅かった。PF飼料給餌魚の

筋肉では、n-3 HUFAと飽和脂肪酸の比率 (n-3 HUFA/SFA)、n-3 HUFAとアラキドン酸の比率 (n-3 HUFA/AA) が低く、オレイン酸含有量が多かった。FOおよびSO飼料給餌魚のUcrit1には、AO飼料給餌魚との間に有意差は無かった。2回目の臨界遊泳速度には試験区間で有意差は認められなかった。n-3 HUFA/SFAとn-3 HUFA/AAには、Ucrit1との間に正の相関が認められた。一方、飼料中のAAとオレイン酸含有量には、Ucrit1との間に負の相関が認められた。

本試験において、飼料中のn-3 HUFA/SFAとn-3 HUFA/AAが低い場合は、遊泳能力に負の影響を及ぼすことが示唆された。このような条件は、例えばSO飼料のように、栄養的に適正なn-3 HUFAの状態でリノール酸を増加させることによって相殺できるかもしれない。そして、飼料中の魚油の大部分を植物油に代替しても、アトランティックサーモンの心臓と呼吸器の生理機能を弱めることはなかった。

飼料の代替原料と魚の生理機能との関係について、さらなる研究の発展と実用化が望まれる。(抄訳：塩谷 格, SHIOYA Itaru, 日本水産株式会社中央研究所)

◀文献情報▶

植物に酒豪遺伝子？

A novel *Arabidopsis* gene required for ethanol tolerance is conserved among plants and archaea.

N. Fujishige, N. Nishimura, S. Iuchi, T. Kunii, K. Shinozaki and T. Hirayama.

Plant and Cell Physiology, 45(6), 659-666 (2004)

「エタノールが植物の体内でもつくられ、生命維持に重要な役を演じている」と聞いて、怪訝な顔をされる読者がいるかも知れない。かく言う筆者もタイトルを見た時、「話としては面白いけど、この論文に一体全体どんな意味があるの？」と首をひねったものだが、読み進むうちに己の浅学を恥じる破目となった。植物組織への酸素供給が抑えられた条件下、例えば、湛水下では、無酸素で反応が進行する解糖系-エタノール生成経路で高エネルギー化合物ATPを生産し、生命活動を維持している。花粉の発達や花粉管伸長にも、低温や乾燥への適応あるいは病害抵抗性の発現にも、エタノール発酵は一役買っている。エタノール発酵を知る事はこれらを知ることになるのである。(詳しくはTadge等(1999)の総説を参照されたい。)

横浜市大と理研のグループは、シロイヌナズナの突然変異体の中からエタノールとその毒性代謝産物アセトアルデヒドに極めて弱い“下戸”変異体 *gek1* を単離し(その経緯は同号のHirayama等の論文に詳しい。), map based cloning (適当な訳がないので)により、GEK1遺伝子を絞り込んだ。*gek1*には*gek1-1*, *gek1-2*, *gek1-3*の3種の突然変異体があるが、*gek1-2*遺伝子は5プライム領域のほぼ前半部が欠質し、*gek1-3*遺伝子ではイントロンが1塩基置換したためにフレームシフトが起きていた。この遺伝子の本体は、エタノール分解系の遺伝子か酵母などで知られている耐性遺伝子のいずれかと普通は考えるのだが、予想に反してそのいずれでもなく、その機能はアミノ酸配列から推定で

きない新規遺伝子である。塩基配列をデータベース上で検索をしてみると、トマト、イネなどの植物および古細菌には類似の塩基配列は見出せるが、大腸菌、酵母、ショウジョウバエ、線虫などには見出せない。

GEK1遺伝子の過剰発現体はエタノール、アセトアルデヒドに対する耐性が増し、この遺伝子が“酒豪”遺伝子であることは明らかである。しかし、エタノール生成を誘導するとされる高低温、低濃度酸素、高濃度塩類などで、アルコール代謝系酵素遺伝子(アルコール還元酵素、ピルビン酸脱炭酸酵素等)の発現が誘導されるのだが、この遺伝子GEK1の発現レベルは変わらず、多くの器官で一定レベル常に発現されている。という訳で、発現パターンからいっても、この遺伝子がどうして酒豪遺伝子なのか、さっぱり分からない。不明ということは、逆に、新規の耐性メカニズムが潜んでいることであり、今後の展開に期待したい。

最後に、この遺伝子は植物と古細菌にのみ存在が確認されることから、古細菌から植物への水平移動を考えているようだが、古細菌に好気性細菌が次いでシアノバクターが寄生して植物が生まれたと考えられており、この遺伝子は古細菌から連綿と伝わってきたものではないのか、酸素発生系を獲得し地球を酸素一杯の惑星にした植物に還元的な太古地球が眠っている。どちらにしても証明できない話ではあるが。

(抄訳：岩井純夫, IWAI Sumio, 鹿児島大学農学部)

◀文献情報▶

光合成による水の酸化反応中間体の検出

Detection of an intermediate of photosynthetic water oxidation

Juergen Clausen & Wolfgang Junge

Division of Biophysics, Department of Biology/
Chemistry, Universitat Osnabruck, D-49069
Osnabruck, Germany*Nature.*, 430, 480-3 (2004)

我々が呼吸する酸素は、シアノバクテリアおよび高等植物の光化学系Ⅱによって産生される。酸素の発生前に触媒中心であるMn₄Caクラスターに4当量の酸化力が蓄積され、そして2H₂O=O₂+4H⁺+4e⁻という1段階の反応によって酸素が発生すると考えられている。この反応のエネルギーおよびサイクリングは光のみによるものである。現在まで水の酸化生成物中間体は見つかっていない。そこで著者らは、酸素分圧を高め、最終反応の平衡を逆方向にずらし、水の酸化生成物中間体を安定化することを試みた。

光化学系ⅡはMn₄Caクラスターとredox-active tyrosin (Y_z) から成り、Mn₄Caクラスターは酸化状態の低い方から、S₀, S₁, S₂, S₃と表される。水から酸素への反応経路はS₃Y_z^{ox}(H₂O)₂=S₂Y_zH₂O₂=S₀Y_z+O₂+protonsと仮定できる。

筆者らは、光を照射して光化学系Ⅱを刺激し、水に結合した電子が触媒中心に移動するのを近紫外スペクトルにおける吸光度変化によって追跡した。光を照射すると一時的に吸光度が上昇するものの、air条件下では酸素の発生に伴って吸光度の低下がみられた。一方、20 bar O₂条件下では吸光度の低下が見られたものの、air条件下に比べて吸光度の低下が抑制された。また、19 bar N₂条件下ではair条件下と同等の吸光度の低下がみられたため、20 bar O₂条件下で吸光度の低下が抑制されたのは酸素分圧が高いため、単に圧力が高いためではないこと

がわかった。次に、反応液にかかる酸素分圧を0 barから徐々に上げていったところ、高い酸素分圧では最大83%まで吸光度の低下が抑制されることがわかり、その半分吸光度の低下が抑制される酸素分圧は2.3barであることがわかった。

以上の結果から、酸素分圧が低い状態ではS₂Y_zH₂O₂→S₀Y_z+O₂+protonsの反応によって電子の移動が起こるが、酸素分圧が高くなるとその反応による電子の移動が抑制されると考えられた。高い酸素分圧でも電子の移動が起こるが、それはS₂Y_zH₂O₂→S₃Y_z^{ox}(H₂O₂)の反応による電子の移動であると考えられた。よって、水からの4個の電子の抜き取りは、触媒中心の最高酸化状態から中間体への温和な吸エルゴン反応と、中間体から酸素に至る発エルゴン反応の少なくとも2段階の電子移動に分けられると考えられた。

これらのことから筆者らは水から酸素への反応経路の中間体の実験的証拠を提示した。光合成生物にとって、大気中の酸素濃度が現在のレベルよりかなり高くなった場合に、酸素発生反応を行う余裕はほとんどないといえる。

(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

Agribusiness Creation Fair 2004

アグリビジネス創出フェア

新産業のアイデアは、ここにある!



農林水産・食品産業関連の技術シーズが盛りだくさん!
産学官連携のための出会いの場です。

- 独立行政法人研究所、大学、民間企業の最近の技術成果の展示、プレゼンテーションがあります。
- 直接研究者とじっくりお話いただけます。
- 具体的な連携を支援する、相談コーナーや国の施策紹介もあります。

2004.10.14(Thu)-15(Fri)10:00-17:00

東京国際フォーラム 展示ホール(地下2階) <http://agribiz.jp/>

主催：農林水産省／独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構／独立行政法人 農業生物資源研究所／独立行政法人 農業環境技術研究所／独立行政法人 農業工学研究所／独立行政法人 食品総合研究所／独立行政法人 国際農林水産業研究センター／独立行政法人 森林総合研究所／独立行政法人 水産総合研究センター
共催：社団法人 農林水産先端技術産業振興センター(STAFF)／社団法人 農林水産技術情報協会／財団法人 食品産業センター／独立行政法人 水産大学校／独立行政法人 産畜改良センター
賛助：全国農学系学部長会議／社団法人 日本経済団体連合会／各種バイオビジネス

アグリビジネス創出フェア事務局：社団法人 農林水産先端技術産業振興センター(STAFF) TEL:03-3586-8544 FAX:03-3586-8277 E-mail:agrifair@staff.or.jp

編集後記

第105号をお届けします。本号の特集では植物の色の遺伝子に焦点を当て、小林省藏氏（独・果樹研究所）にブドウの果皮色変異について、間竜太郎氏（独・花き研究所）にキクの花色改変について、勝元幸久氏（サントリー株式会社）らに青いバラの創生について、ご紹介戴いた。

その他の研究情報として、橋本好弘氏（株式会社サカタのタネ）らに土壌診断用バイオセンサー、百溪英一氏（独・動物衛生研究所）に抗IL-10抗体を用いた牛ヨーネ病早期診断法、宇津巻竜也氏（名古屋大学）らに生物時計のタンパク質の構造、相生啓子氏（元東京大学海洋研究所）にアマモ科の遺伝的多様性、太田智彦氏（独・生研センター）らにセルトレイ苗挿し木装置、柳澤修一氏（岡山大学）に少ない窒素肥料で生育可能な作物の創出方法について、ご紹介戴いた。また、文献情報は、下司雅也氏（独・畜産草地研究所）、塩谷格氏（日本水産株式会社）、岩井純夫氏（鹿児島大学）、吉川彰氏（カルピス株式会社）にそれぞれご紹介戴いた。ご多忙な中お引き受け戴きました執筆者各位に深甚の謝意を申し上げます。

（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105号

平成16年9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