

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成17年1月15日発行（隔月1回15日発行）

ISSN 1345-5958

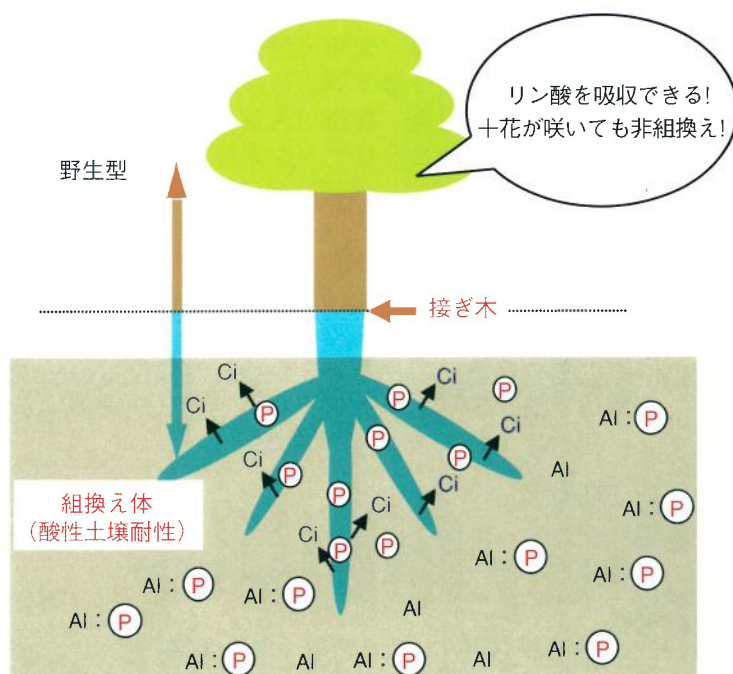
TECHNO NEWS

No.107

15 JANUARY, 2005

ブレインテクノニュース

野生型 組換え体



酸性土壌耐性ユーカリの実用化に向けて

王子製紙株式会社 森林資源研究所

木原 智仁・河津 哲



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

総 説

- コエンザイムQ10の新規な生産方法の開発 1
高橋 咲子・門脇 光一 (独立行政法人 農業生物資源研究所)

国内情報

- 酸性土壌耐性ユーカリの実用化に向けて 5
木原 智仁・河津 哲 (王子製紙株式会社 森林資源研究所)
- Rhizosecretion - 汚染物質分解酵素分泌植物体の環境浄化への応用 10
野尻 秀昭・内田 英二・大森 俊雄 (東京大学 生物生産工学研究センターほか)
- 植物の遺伝子組換え技術を利用した鶏原虫病経口ワクチン素材の開発 16
松村 健 (独立行政法人 産業技術総合研究所 ゲノムファクトリー研究部門)
- 遺伝子発現レベルを利用したコメの食味判定技術の開発 21
宮川 佳子・菅原 宏章・門奈 理佐・美濃部 佑三 (株式会社 植物ゲノムセンター)
- 神経ペプチド「ニューロメジンU」の摂食抑制メカニズムについて 26
花田 礼子・児島 将康 (久留米大学 分子生命科学研究所)
- 複合微生物系を用いたトリアジン系除草剤汚染の原位置バイオレメディエーション 31
岩崎 昭夫¹・高木 和広² (¹筑波大学 生命環境科学研究科, ²農業環境技術研究所 化学環境部)
- レトロトランスポゾンの挿入部位に基づくマツタケの個体識別法 35
村田 仁¹・馬場崎 勝彦¹・山田 明義² (¹独立行政法人 森林総合研究所・²信州大学 農学部 応用生命科学)
- 魚群中の魚の体長, 密度などを精確に計測するための新技術の開発 40
澤田 浩一・高橋 秀行・高尾 芳三・安部 幸樹・渡辺 一俊 (独立行政法人 水産総合研究センター 水産工学研究所)

地域の先端研究

- 体細胞クローン牛同士の交配によるクローン2世牛の誕生 46
笠井 幸治 (静岡県畜産試験場 乳牛部)

文献情報

- フローサイトメトリー／セルソーティングにより性別された精子由来子牛の性状 52
L.M. Tubman et al. (*Journal of Animal Science*, 82, 1029-1036, 2004) 抄訳: 下司 雅也
- ABAによるH⁺-ATPase阻害にはH₂O₂が絡んでいる 53
X. Zhang et al. (*Plant Physiology*, 136, 4150-4158, 2004) 抄訳: 岩井 純夫
- 母乳を介した免疫は授乳マウスの腸内細菌に影響を与える 54
T.J. Koehnle et al. (*Journal of Nutrition*, 134, 2365-2371, 2004) 抄訳: 野中 敦子
- 光周期操作による海水期アトランティックサーモンの筋線維数の可塑性 55
I.A. Johnston et al. (*The Journal of Experimental Biology*, 206, 3425-3435, 2003)
抄訳: 塩谷 格

- 生研センターからのご案内 (2005年度新規研究課題募集のお知らせほか) 56

表紙の説明

王子製紙(株)は、遺伝子組換えによって根から有機酸(クエン酸)を放出する能力を強化したユーカリを開発した。この遺伝子組換えユーカリはアルミニウムを多量に含む酸性土壌でも良好に生育することができる。さらに、接ぎ木技術を利用してこの酸性土壌に強いユーカリの実用化を目指している。

詳細については、5頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

コエンザイムQ10の新規な生産方法の開発

独立行政法人 農業生物資源研究所

高 橋 咲 子 ・ 門 脇 光 一

コエンザイムQ10 (CoQ10) はヒトにとって不可欠な物質である。生体内で合成できるが、その細胞内濃度は加齢に伴い減少するため、健常者も補給が必要である。我が国では最近サプリメントとして人気を集めており、需要増加に生産が追いつかない状況である。我々はグルコン酸菌由来のCoQ10合成関連酵素遺伝子を導入することにより、イネでCoQ10を生産することに成功した。本稿では植物におけるCoQ10の新規な生産方法を紹介する。

1. はじめに

アメリカを中心に世界各国で生産・販売されている遺伝子組換え作物の総耕地面積は、2003年度には6770万haに達しており、我が国の国土総面積3780万haを超えている。開発された組換え作物の大部分は病害虫抵抗性や除草剤耐性能力を付与した作物であり、栽培コストダウンや栽培簡略化など、生産者にメリットをもたらす作物が大部分を占めている。加えて乾燥地など不良環境でも生育が可能な作物の開発研究も行われている。一方で、技術の進歩や遺伝子組換え作物を巡る社会情勢の変化に伴い、その他にも様々な遺伝子組換え作物が様々なユーザーのために開発されつつある。例えば社会全体にメリットをもたらすものとして、重金属等の有害物質を吸収し環境浄化を行う植物や、生分解性プラスチックなどの原料を生産する植物の開発などがある。また消費者にメリットをもたらす作物の開発も進められている。発展途上国の低所得者層向けには、安価な食糧の供給を目指した多収作物や、必要養分の補完を目的とした、カロチノイド・鉄等の養分含量を増加させた作物の開発が行われている。上記に加え、疾病患者向けには症状緩和や治療を目的とした低アレルギー米やワクチン効果のある作物が開発されている。一方、食生活の豊かな先進国の健

TAKAHASHI Sakiko, KADOWAKI Koh-ichi
〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2

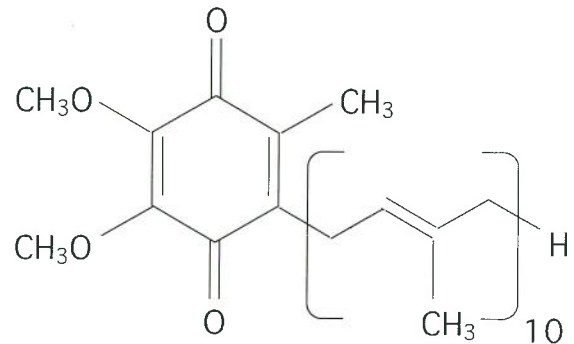


図1 コエンザイムQ10の化学式

常者向けにも、健康増進など生活の質の向上を目的とした作物が開発されつつある。本稿ではこのような生活の質の向上を目的とした組換え作物の一例として、我々が開発を進めているCoQ10を生産するイネについて紹介したい。

2. コエンザイムQ10とその生産法

コエンザイムQ (CoQ) (図1) は生物に普遍的に存在する物質である。ミトコンドリア内の電子伝達系において、ATP産生に関わる必須成分である。その還元型は生体内で抗酸化機能を担っていることから、最近注目を集めている。CoQはベンゾキノン骨格とイソプレノイド側鎖より構成されるが、その側鎖長は生物種によって異なり、例えばヒトは側鎖長10単位のコエンザイムQ10、イネ等の穀類は側鎖長9単位のコエンザイムQ9

を持っている。CoQ10は様々な薬理効果を持つ活性物質で、心疾患を始めガン・高血圧など多くの疾患に対し効果があると評価されている。CoQ10は体内で合成できるが、加齢（図2）や

疲労、ストレスによって細胞内濃度が減少するため、健康者であっても補給が必要である。我が国では、CoQ10は心筋代謝改善薬として長年使用された実績がある。加えて2001年に厚生労働省が食品区分リストを改正し、CoQ10は食品区分に含まれることとなり、サプリメントとしても販売できるようになったことから、近年非常に人気を集めている。CoQ10は肉や青魚、野菜類など様々な食品に含まれるが、その含量は低い。現在CoQ10は植物由来の原料を用いた化学合成法、または微生物を用いた発酵法のいずれかの方法により生産されているが、その需要は増加の一途をたどっており、さらなる増産が期待されている。そこで我々は、これまでにな

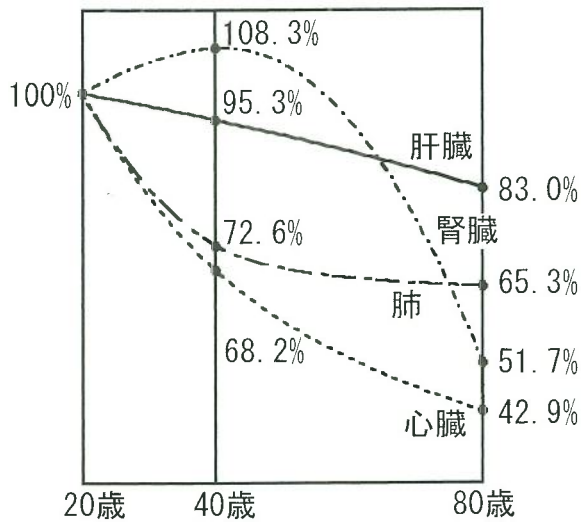


図2 20歳を基準とした場合の加齢に伴う各臓器におけるCoQ10存在率の変化（文献2より作図）

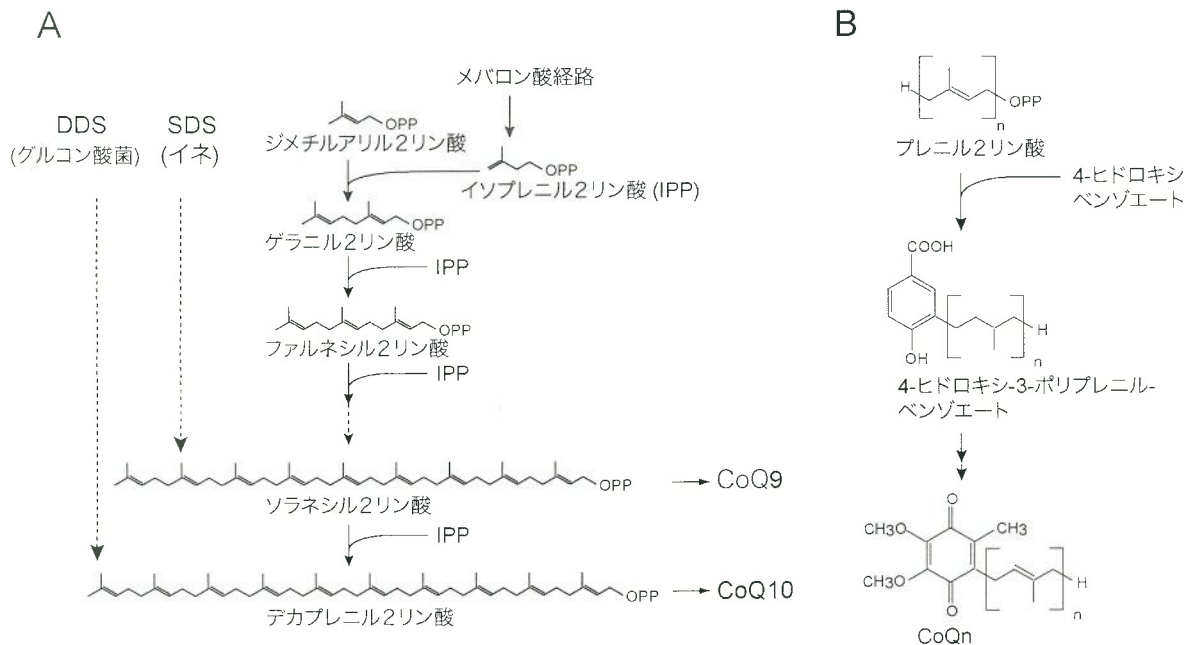


図3 CoQ10の生合成経路
A. イソプレノイドの生合成経路, B. CoQの生合成経路。

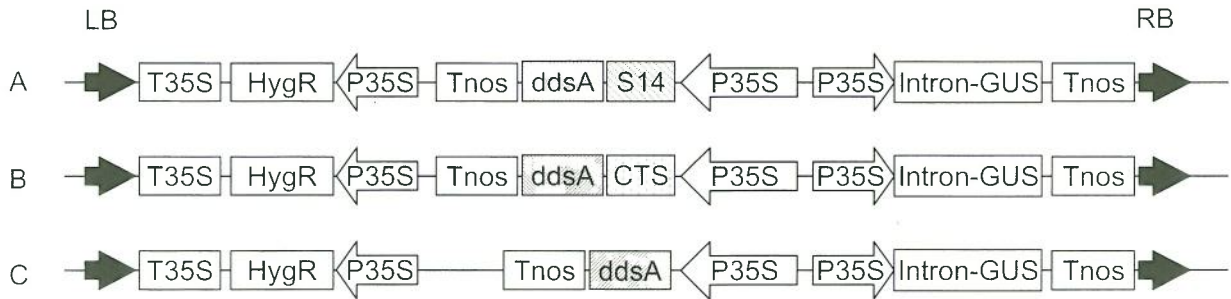


図4 今回の研究に使用したイネ形質転換用ベクターの構造
 A: S14-DdsA, B: CTS-DdsA, C: 35S-DdsA過剰発現用ベクター
 ddsA: グルコン酸菌由来のデカプレニル2リン酸合成酵素遺伝子
 S14: イネ由来のミトコンドリア局在シグナル
 CTS: タバコ由来のゴルジ体局在シグナル

3. 遺伝子組換えイネにおけるCoQ10の生産

微生物を用いた研究から、CoQのイソプレノイド側鎖長はイソプレノイド合成を行うプレニル2リン酸合成酵素の特性により決定されることが明らかにされている(図3)。しかしながら、植物におけるCoQの生合成経路はほとんど明らかにされていない。イネはCoQ9を作ることから、9単位のソラネシル2リン酸の合成酵素を持つと考えられる(図3)。そこで我々は、CoQ10を作るグルコン酸菌(*Gluconobacter suboxydans*)由来の、デカプレニル2リン酸(10単位)の合成酵素(Decaprenyl diphosphate synthase, DdsA)の遺伝子³⁾、ddsAをイネに導入することにより、イネにおいてCoQ10が生産できるのではないかと考えた。

植物においては、CoQは主にミトコンドリアまたは小胞体-ゴルジ系に存在することが知られている。そこで本研究では、DdsA酵素をミトコンドリア(S14-DdsA)、ゴルジ体(CTS-DdsA)、細胞質(35S-DdsA)に配置させるよう設計した3種類のDdsA発現ベクターを作成し(図4)、アグロバクテリウム法によりイネの核ゲノムに導入した。その結果、3種類全てについて複数の遺伝子組換えイネが得られた(PCR解析により確認)。さらにウェスタン解析を行った結果、S14-DdsAイネ及びCTS-DdsA

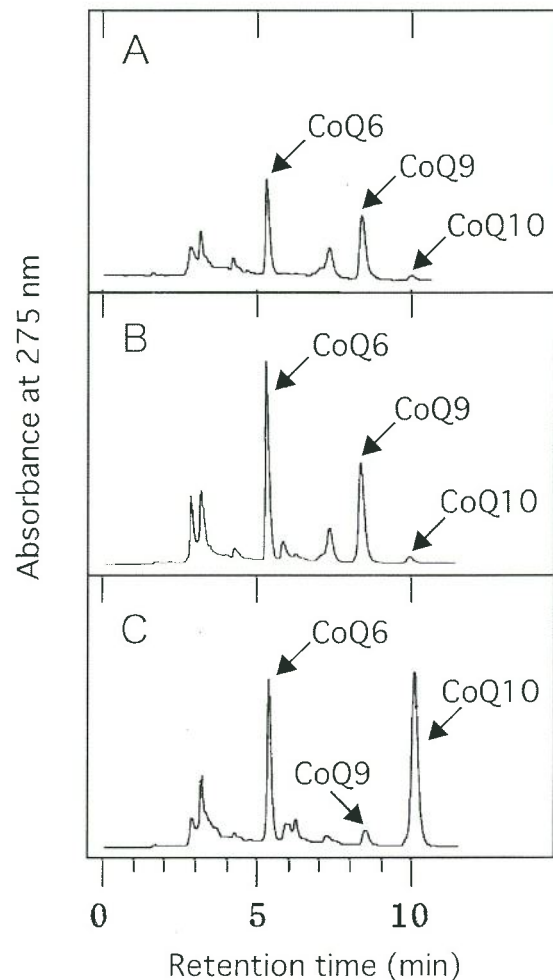


図5 HPLC分析によるイネにおけるCoQ10生産の確認

通常のイネ(A)、CTS-DdsAイネ(B)、S14-DdsAイネ(C)よりCoQを抽出した。CoQ6は内部標準として測定時に添加している。それぞれのCoQのピークを矢印で示した。

イネについては、DdsAタンパク質を高蓄積する個体が複数得られた。一方35S-DdsAイネについては、DdsAタンパク質を蓄積する個体は得られなかった。そこでS14-DdsAイネ及びCTS-DdsAイネの高発現個体について、葉におけるCoQ9及びCoQ10含量を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）解析により測定した（図5）。CTS-DdsAイネは通常のイネと同じく、ほぼCoQ9のみを含んでいた（図5 A, B）。一方、S14-DdsAイネはCoQ9はほとんど含まず、ほぼCoQ10のみを含んでいた（CoQ10含量約50 $\mu\text{g/gFW}$, 図5 C）。このように、DdsA酵素をイネのミトコンドリアで発現させることにより、我々は植物で初めてCoQ側鎖長を変えることを可能にし、イネにおいてCoQ10を生産することに成功した⁴⁾。

4. 今後の展開

今回我々は、本来CoQ9を生産するイネにCoQ10を生産させる基本技術の開発に成功した。CoQ10は熱に比較的安定（240℃以下では

安定）⁵⁾であることから、炊飯などの調理法では分解する心配がない。CoQ10をどのような農作物のどのような器官に蓄積させるのか、またCoQ10を生産する植物をCoQ10の単なる生産工場として利用するのか、そのまま食品の素材として利用するのか、CoQ10をさらに増産するためにはどのような工夫が必要かなどについて、今後さらに研究を深化させたい。

文 献

- 1) バイテク情報普及会ホームページ
(<http://www.cbijapan.com/index.html>)
- 2) Kalen, M. et al (1989), *Lipids*, 24(7), 579-584
- 3) 川向誠 (2002), *化学と生物*, 40(5), 309-315
- 4) 門脇光一ら(平成16年)「植物を用いたユビキノール10の製造方法」特願2004-136906
- 5) Farley, T. M. et al (1968), *J Org. Chem.*, 33(2), 905-907

◀国内情報▶

酸性土壌耐性ユーカリの実用化に向けて

王子製紙株式会社 森林資源研究所

木 原 智 仁 ・ 河 津 哲

木質バイオマスの安定供給と環境に対する配慮から、事業植林が盛んになっており、これまで植林されなかった不良環境でも植林できる技術開発が望まれている。我々は事業植林用のユーカリ交雑種に対して有機酸の代謝経路を改変することにより、酸性土壌耐性を強化できる可能性を示唆する結果を得た。さらに、組換え遺伝子の拡散を防止するために、組換え体の台木に野生型を接ぎ木する方法で実用性の検証を開始した。

1. はじめに

日本の製紙産業が使用する製紙原料の約6割が古紙であり、残りの4割はフレッシュパルプ（新しく製造されて紙に加工されたことのないパルプ）からできており、古紙も含めて製紙原料は地球上における炭素の純生産の約半分を占める森林に依存している。世界的には人口増加と生活水準の向上によって、木材と木質繊維を含む木質バイオマスの需要は高まってきているが、自然環境保護の観点から、天然林に由来する木材の供給を受けることが困難になってきている。この製紙原料を安定供給するため、植林面積の拡大が急務となっており、2010年までにわが国の製紙業界による世界各地での事業植林面積を55万haにまで拡大する計画がある。このような事業植林では短期間に単位面積あたりの収量を増やすために、植林木の生長が早いことが重要な要因となる。そのため、広葉樹ではユーカリ (*Eucalyptus spp.*) とアカシア (*Acacia spp.*)、針葉樹ではラジアータマツ (*Pinus radiata*) 等が世界中で植栽されている。一方、林業では適地適木が大原則であり、乾燥、塩、酸性土壌等の環境ストレスによる不良環境には事業植林を行わないのが常識であったが、地球環境に対する配慮と植林コストを考慮する

KIHARA Tomonori, KAWAZU Tetsu

〒519-0212 三重県亀山市能褒野町24-9

と、このような不良環境でも植林を可能にする技術開発が必要になってきている。

バイオテクノロジーは不良環境での成長性を向上させるという重要課題を解決し得る画期的な技術である。特に遺伝子組換え研究はこれまで食糧の安定生産を目的として作物種において精力的に行われてきており、その可能性の高さが示されつつあることから、木本植物においても先の課題を解決する有効手段となることが期待できる。本稿では、事業植林に利用されるユーカリに対して、不良土壌の1つである酸性土壌に対する耐性を強化する遺伝子組換え技術とその実用化に向けた取り組みについて紹介する。

2. 酸性土壌耐性機構

酸性土壌は世界の耕作可能な陸地面積の30～40%を占めるといわれ、ここにおけるストレスは深刻であるために植物の生産性は極めて低い^{1, 2)}。酸性土壌ストレスは複合的なものであるが、主たるものはアルミニウム (Al) によるストレスである。Alストレスは酸性条件下で遊離するAlイオンそのものの害とAlが間接的に引き起こすリン欠乏に起因する (図1)。表現型として見ることのできる初期のAlイオン害とは根の伸長阻害であり、分裂・伸長組織において細胞内外で影響を与えていることが原

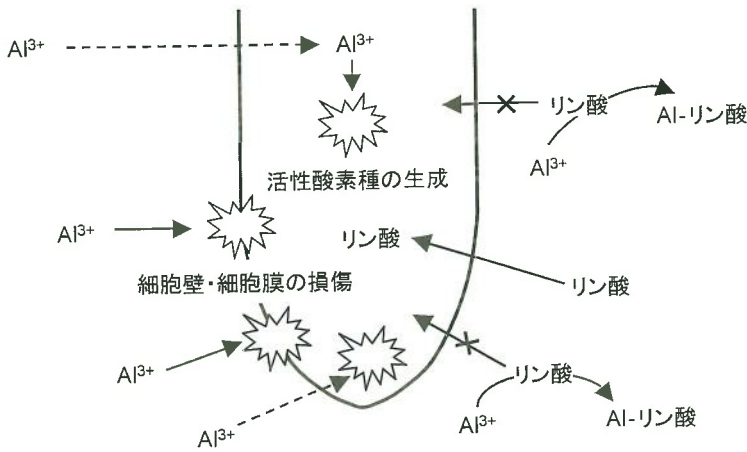


図1 アルミニウムストレス

アルミニウムの害は根の分裂組織，伸長組織において現れ，細胞内外でダメージを与える。また，リン酸と結合して難溶性のリン酸アルミニウムを形成しリン酸欠乏を引き起こす。

困であると考えられている^{1, 3)}。一方，リン欠乏はリン酸イオンがAlイオンと反応して無機態の難溶性リンを形成することによって引き起こされる。これまでの分子生理学的解析の進展に加えて，ゲノム科学の急速な進歩により両ストレスに対する耐性機構は分子レベルで明らかにされつつある^{4, 5)}。その中でも根からの有機酸放出はAlイオン害⁶⁾と低リン酸ストレス⁵⁾に共通の耐性機構であることから植物育種を行う上で重要な性質である。有機酸放出が耐性を付与する要因は有機酸がAlと錯体を形成する能力が高く，根から放出された有機酸が根圏における

Alの解毒や無機態の難溶性リンを可給態化するからである。放出される有機酸の中で最も錯体形成能力の高い有機酸はクエン酸であることから⁷⁾，放出させる有機酸としてクエン酸をターゲットとすることが効果的である。

有機酸放出は細胞内の有機酸代謝と細胞膜の有機酸輸送という2つの生理的要因が絡む複雑な生理現象である(図2)。クエン酸放出能の高い植物や果実等にクエン酸を集積する植物を解析した結果から，クエン酸を放出する局面やクエン酸を集積する局面ではクエン酸の合成経路の酵素活

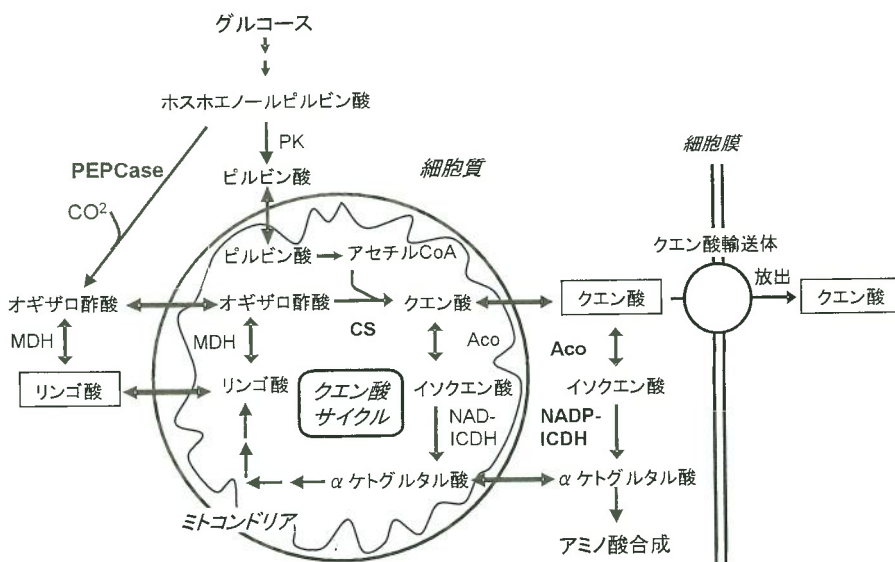


図2 有機酸放出機構

有機酸放出は有機酸の代謝と輸送から構成される。クエン酸の合成活性の増加と分解活性の低下がクエン酸を多量に放出する植物やクエン酸を蓄積する植物において認められる。Aco；アコニターゼ，CS；クエン酸合成酵素，ICDH；イソクエン酸脱水素酵素，MDH；リンゴ酸脱水素酵素，PEPCase；ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ，PK；ピルビン酸キナーゼ

性増加と分解系の酵素活性低下が起きていることが明らかになっている^{5, 8, 9)}。つまり、クエン酸を蓄積する方向へのクエン酸の合成と分解のバランスを制御することが重要であることが示唆された。この情報を元に、まずクエン酸の合成を直接接触媒しているミトコンドリア型クエン酸合成酵素 (CS) を過剰発現させたシロイヌナズナが作製された。この組換え体ではAlに対する耐性度が上昇し、酸性土壌中のリン酸Alからのリン酸の獲得能力が強化されていた¹⁰⁾。このCS過剰発現による効果はナタネでも確認されたことから¹¹⁾、ユーカリにこの方法を適用した。

3. ユーカリの遺伝子組換え

ユーカリはオーストラリアを中心に約500種以上からなる多様性に富んだ樹種である。この中で高い成長性を有して、かつ優れたパルプ特性を兼ね備える、いくつかの樹種が製紙産業向けの事業植林に用いられている。特にブラジルにおいて7年の輪伐期で44m³/ha/年の高い生産性が証明されているユーカリ種間交雑種 *E. grandis* × *urophylla*¹²⁾ に対して酸性土壌耐性を付与することを試みた。

一般的にはユーカリは作物種よりも比較的Alイオン害に強いことが知られている。しかし、このユーカリの有機酸放出能力を調べた例がいくつかあるが、その中でユーカリの有機酸放出量はAl耐性の作物種よりも低いことが報告されている^{13, 14)}。したがって、ユーカリの有機酸放出能力を強化することでユーカリに本来備わった耐性機構とは別の機構で酸性土壌耐性に関与するAl耐性を増強でき、同時に酸性土壌での養分欠乏で問題となる難溶性リンの利用能力を強化できると考えた。そこで、ユーカリ



図3 酸性土壌耐性ユーカリ

難溶性リン酸を含む酸性土壌（宮城県川渡産）で4ヶ月栽培した野生型（左）およびCS過剰発現ユーカリCS19系統（右）

交雑種から誘導した早生分枝にアグロバクテリウム法でカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの制御下に配置したニンジン由来のミトコンドリア型クエン酸合成酵素 (CS) 遺伝子を導入し、苗条原基形成を経由させる形質転換技術¹⁵⁾ を用いてCSを過剰発現する形質転換体を得た。根におけるCS活性が2～3倍に増加した組換え体では、野生型と比較して根からのクエン酸放出レベルが約1.5倍に増加していた。このラインを植物の根の生育を阻害するAlを含みリン酸の吸着量が多い酸性土壌にて4ヶ月栽培したところ、地上部の生長量、特に枝数、葉数において30～35%の改善が認められた（図3）。残念ながら個体間差が大きいために統計的に有意であることを示すには至ってい

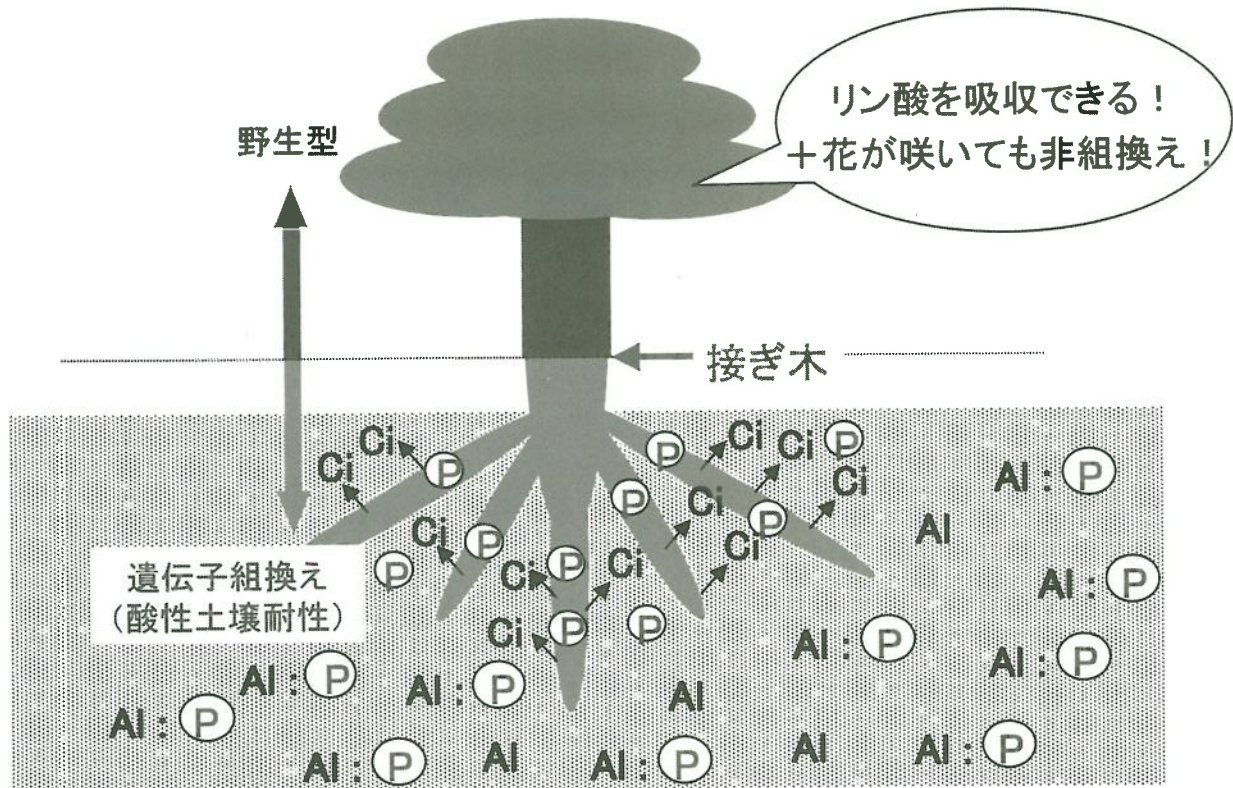


図4 形質転換体による接ぎ木

組換え体の台木（根部）に対して、野生型の穂木（地上部）を接ぎ木することによって、花粉に組換え遺伝子が存在しないようにする。

ないが、注目すべき点は根量が増加（25%増）していることであり、このことはリンばかりではなく他の養分吸収にも貢献すると考えられ、長期栽培により更なる生育改善が期待される。

4. 酸性土壌耐性ユーカリの実証試験

環境ストレス耐性を有する遺伝子組換え樹木を実用化することができれば、これまで利用価値が低かった不良環境での樹木の生産性を高めることができ、天然林を伐採してまでも木質資源を確保しようとする動きを抑制することができるであろう。また、これまで二酸化炭素の固定能力の低い環境において二酸化炭素の固定量の増大が見込めることから、排出権取引のビジネスチャンスにも繋がるとともに、地球環境の改善に貢献することが期待できる。しかし、このような大きなメリットがあるにもかかわらず、現実的には遺伝子組換え樹木の実用化は進んでいない。この実用化を阻害する要因として、

自然環境への組換え遺伝子の拡散、長期評価の不足、開発技術の権利関係が複雑であること等が挙げられる¹⁶⁾。

閉鎖系温室におけるこれまでの実験では酸性土壌においてCS過剰発現ユーカリの生育が改善する傾向にあったことから、実用性の評価段階に移行することにした。特に、遺伝子組換え樹木は天然林に非常に近い環境で植林することが考えられることから、組換え遺伝子の拡散防止措置が必要になる。一方、酸性土壌耐性を獲得するためには根から有機酸を放出する能力があれば十分である。そこで、図4に示すように地下部を組換え体、地上部は野生型にする接ぎ木を利用することによって、組換え遺伝子の拡散防止が可能になるのではないかと考えている。今後、接ぎ木個体を用いて、特定網室試験、隔離圃場試験を実施して、長期間の安全性評価と遺伝子組換えによる様々な酸性土壌に対する生育特性評価を行っていく予定である。

5. おわりに

ユーカリに酸性土壌耐性を付与する目的で、有機酸代謝に関わる酵素の1つの発現を改変することでクエン酸放出能力の強化を試みた。酸性土壌における栽培試験において、この遺伝子組換えユーカリの生育が改善したことから、草本植物において検証された代謝改変によるクエン酸放出能力強化という戦略は木本植物にも適用可能であることを示した。

しかし、CS過剰発現ユーカリの放出レベルはクエン酸放出能力の高い植物のそれに及ぶものではなかった。先に述べたように、有機酸代謝をみてもクエン酸放出には複数の酵素の関与が考えられる。また、クエン酸放出にはクエン酸輸送タンパクの役割も大きいと考えられる。したがって、最高性能のクエン酸放出機構を植物に導入するためにはこういった複数遺伝子の発現を制御する必要があると考えられ、現在、我々はこの技術開発に取り組んでいる。

最後に本研究は、岐阜大学農学部生物機能工学講座の小山博之助教授と鈴木雄二氏（現在、東北大学大学院農学研究科植物環境応答実験施設・助手）との共同研究によって行われたものである。この場を借りて感謝の意を表したい。

文 献

- 1) Matsumoto, H. (2000), *International Rev. Cytol.*, 200, 1-46
- 2) 加藤秀正 (1994), 低pH土壌と植物, 博友社, 東京
- 3) Yamamoto, Y. et al. (2002), *Plant Physiol.*, 128, 63-72
- 4) Kobayashi, Y. & Koyama, H. (2002), *Plant Cell Physiol.*, 43, 1526-1533
- 5) Neumann, G. et al. (1999), *Planta*, 208, 373-382
- 6) Ma, J.F. et al. (2001), *Trends Plant Sci.*, 6, 273-278
- 7) Ryan, P.R. et al. (2001), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52, 527-560
- 8) Takita, E. et al. (1999), *Plant Cell Physiol.*, 40, 489-495
- 9) Kihara, T. et al. (2003), *Plant Cell Physiol.*, 44, 901-908
- 10) Koyama, H. et al. (2000), *Plant Cell Physiol.*, 41, 1030-1037
- 11) Anoop, V. M. et al. (2003), *Plant Physiol.*, 132, 2205-2217
- 12) マイケル・B・ジェンキンスら (2002), 森林ビジネス革命, 225, 築地書館, 東京
- 13) Silva, I.R. et al. (2004), *Tree Physiology*, 24, 1267-1277
- 14) Nguyen, N.T. et al. (2003), *Tree Physiology*, 23, 1041-1050
- 15) Kawazu, T. et al. (2003) United States Patent US 6,563,024 B1
- 16) Sedjo, R.A. (2001) Proceedings of the First International Symposium on Ecological and Societal Aspects of Transgenic Plantations, Stevenson, WA

◀国内情報▶

Rhizosecretion—汚染物質分解酵素分泌植物体の
環境浄化への応用

東京大学 生物生産工学研究センター 環境保全工学部門

†現所属：芝浦工業大学大学院工学研究科

野尻秀昭・内田英二・大森俊雄†

最近、植物の分泌系を利用して外来タンパク質を植物細胞外（アポプラスト画分）に分泌する“rhizosecretion”が、新しいタンパク質生産方法として注目されており、この手法を「植物を用いた環境修復（phytoremediation）」の手法として利用しようとする試みが報告されている。本稿では、筆者らが行った芳香環開裂酵素とハロアルカンデハロゲナーゼのrhizosecretionと、細胞質発現させた場合との比較について紹介する。

1. はじめに ～Phytoremediationへの
形質転換植物体利用の可能性～

生物を用いた環境汚染除去（bioremediation）においては、原油（燃料）・溶剤・農薬等の有機化合物による汚染への対応と、水銀・ヒ素等の（重）金属汚染への対応は、各原因物質の性質の相違により自ずと異なったものになる。有機化合物は多くの場合分解されれば無毒化されるのに対し、金属汚染は元素の性質として毒性を示す場合が多く、系外に持ち出さない限り、毒性の強度が変わることがあっても無毒化されることは少ない。微生物は多くの難分解性物質（多くは非生体成分 [xenobiotics]）に対して驚くほどの分解能を示すため、有機物汚染のbioremediationへの適用が検討されてきた。特に、石油成分、溶剤などによる実際の汚染現場の修復には既に用いられており、効果が実証されている。ところで、過去十年ほどの動きとして、植物をbioremediationに利用しようとする試みが行われてきた。一般に植物体そのもののxenobiotics分解能は低いいため、植物を用いたbioremediation（phytoremediation）としては、植物を生育させることで根圏での微生物量を増加させ、増殖した微生物の分解力を利用するrhizoremediationや、金属の高蓄積性植物を用いて水系・土壌から金属を抽出・濃縮させた後

NOJIRI Hideaki, UCHIDA Eiji, OMORI Toshio

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

に、植物体全体（あるいは一部）を系外へ除くphytoextraction（いわゆる“clean up crop”としての利用）などがよく行われている。

この様な従来のphytoremediationの手法に加えて、微生物由来の各種酵素を植物細胞内で発現させることで新しい酵素活性を植物に付与し、bioremediation用形質転換植物を作出する試みが報告されている。例えば、爆薬成分の細菌由来分解酵素を発現させたタバコは、野生型タバコには毒性を示す濃度の物質に対して高い耐性を示し、かつ分解活性を示すことが報告されている^{1) 2)}。また、細菌由来の有機水銀分解酵素を導入したシロイヌナズナ植物体が、同様な有機水銀耐性・分解性を示すことも報告されている³⁾。

ところで、1999年にBorisjukらにより、細菌由来のxylanase、オワンクラゲ由来green fluorescent proteinを、アミノ末端側に小胞体移行シグナル（ERシグナル）が融合した形でタバコ植物体中で発現させることで、植物細胞外に活性型の両酵素が分泌されることが報告された⁴⁾。Borisjukらは、ヒト胎盤由来のアルカリ性ホスファターゼ（膜結合アンカーを除いたもの）を本来のERシグナルが着いたままの形でタバコ細胞内で発現させ、同様に生細胞外（アポプラスト画分）へとタンパク質が分泌されることも報告している。すなわち、ERシグナルが植物内で機能すれば、小胞体、ゴルジ体を介した植物のタンパク質分泌系に乗って、外来タンパ

ク質が細胞外に分泌されることが可能であることが示された。この様な現象を Borisjukらは“rhizosecretion”と命名し、タンパク質生産系としての有用性を指摘している。確かに、水耕液内に分泌されるタンパク質は、組織を破碎して得られた粗酵素液に比べて遙かに共雑タンパク質の量が少ないため、有用タンパク質の生産という観点では精製ステップを省略できるという利点がある。さらに、医薬品としての薬効あるタンパク質の生産を考えた場合、動物細胞を用いて生産するのに比べて有害なウイルスによる汚染の心配が少ないなど付加的な利点も多い。現在までに、rhizosecretionそのもの、もしくはERシグナルを用いて外来タンパク質を植物細胞内で局在化させようとする研究はいくつか報告されているが、phytoremediationへの応用を意図した研究としては、植物体外に分泌した抗体で有害物質を捕集することにより毒性を軽減しようとするもの^{5, 6)}や、カビ由来のラッカーゼ遺伝子（本来のERシグナルを含む）をタバコ植物体に導入し水耕液中での有機化合物分解能を調べた例⁷⁾がある。

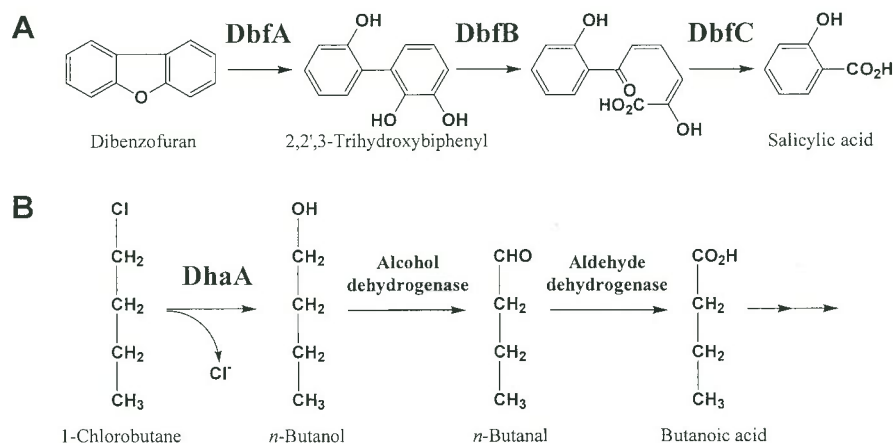


図1 *Terrabacter* sp. DBF63株によるジベンゾフランの推定代謝経路(A)と、*Rhodococcus* sp. m15-3株による1-クロロ-n-ブタンの推定代謝経路(B)

DbfA, dibenzofuran 4,4a-dioxygenase; DbfB, 2,2',3-trihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase; DbfC, 2-hydroxy-6-(2-hydroxyphenyl)-6-oxo-2,4-hexadienoic acid hydrolase; DhaA, haloalkane dehalogenase

細胞質発現用遺伝子カセット

P35S	<i>dbfB</i> or <i>dhaA</i>	<i>c-myc</i> tag	KDEL	T35S
------	----------------------------	------------------	------	------

アポプラスト発現用遺伝子カセット

P35S	LeB4SP	<i>dbfB</i> or <i>dhaA</i>	<i>c-myc</i> tag	T35S
------	--------	----------------------------	------------------	------

図2 細菌由来酵素植物発現用遺伝子カセットの構造

P35S, カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター; T35S, カリフラワーモザイクウイルス35Sターミネーター; *dbfB*, 2,2',3-trihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase遺伝子; *dhaA*, haloalkane dehalogenase遺伝子; *c-myc* tag, 抗*c-myc*モノクローナル抗体認識配列; KDEL, 小胞体残留シグナル; LeB4SP, ダイズlegmin B4由来小胞体移行シグナル。

2. 細菌由来xenobiotics分解酵素のrhizosecretionと分解特性

筆者らは、細菌由来のxenobiotics分解酵素を植物細胞のアポプラスト画分で発現させた場合の分解特性を、同一酵素を細胞質で発現させた場合の分解特性と比較した。Xenobiotics分解酵素としては、ジベンゾフラン・ダイオキシン分解菌である *Terrabacter* sp. DBF63株のジベンゾフラン分解系メタ開裂酵素DbfBと、ハ

ロアルカン資化菌 *Rhodococcus* sp. ml5-3株由来ハロアルカンデハロゲナーゼ DhaA を用いた。DbfB は図 1 A に示す芳香環の開裂反応を触媒する酵素で、触媒する反応は細菌の PCB やダイオキシン分解経路に普遍的に見られる反応である。DhaA は短鎖の 1-ハロ-*n*-アルカン (C₃-C₈) の末端ハロゲン基を加水分解的に脱ハロゲンする反応 (図 1 B) を触媒する。いずれの反応も植物は触媒することができない。細菌は原核生物であるため、当然小胞体、ゴルジ体を介した分泌系は元来持ち合わせていない。従って、我々はダイズ由来の分泌型タンパク質である legumin B4 に由来する ER シグナル (LeB4SP) をアミノ末端に付加することで、両タンパク質を小胞体へと移行させアポプラスト画分に分泌させることにした (図 2)。対照実験として、両酵素を細胞質内で発現させるために、LeB4SP 遺伝子を融合させず 3' 末端側に小胞体残留シグナル (KDEL のテトラアミノ酸) に相当するコドン融合させた形の遺伝子を作製した。KDEL は細胞質発現には必須ではないが、細胞質での外来タンパク質の安定性を増すという報告があったため、付加した形で発現させることにした (図 2)。いずれの融合酵素についても植物細胞内でのタンパク質としての発現量を western blot にて解析するため、c-myc タグを融合させた。さらに、細菌と真核生物である植物では翻訳の機構が基本的に異なるので、植物細胞内での翻訳効率を向上させるため、各酵素発現用遺伝子の開始コドン周辺の配列を、legumin B4 遺伝子の開始コドン周辺の配列を参考に変更した。植物への導入前に、今回用いた修飾酵素が元来の酵素活性を保持していることを、大腸菌を用いた休止菌体反応を用いて確認した。

上記のようにして得られた DbfB 発現植物体の葉より調製した粗酵素抽出液中のメタ開裂活性 (2,3-dihydroxybiphenyl からそのメタ開裂物質 [HOPDA] を生成する活性) と、水耕栽培した場合の水耕液中のメタ開裂活性を各形質転換体のラインについて示したのが図 3 A であ

る。粗酵素抽出液中の活性は概して細胞質発現体の方が高く、この傾向は western blot 解析で検出された粗酵素抽出液中の DbfB タンパク質の傾向 (図 3 B) と一致する。一方、植物体を除いた水耕液中の活性 (分泌されたタンパク質に由来する) は、アポプラスト発現植物体の場合においてのみ検出され、アポプラスト発現植物体から特異的に活性型の DbfB が分泌されていることが示された。

DhaA 発現植物体についても、図 4 に示すように発現 DhaA 量は概して細胞質発現体で大きく、粗酵素抽出液中の DhaA 活性 (1-クロロ-*n*-ブタンを加水分解して 1-ブタノールと塩化物イ

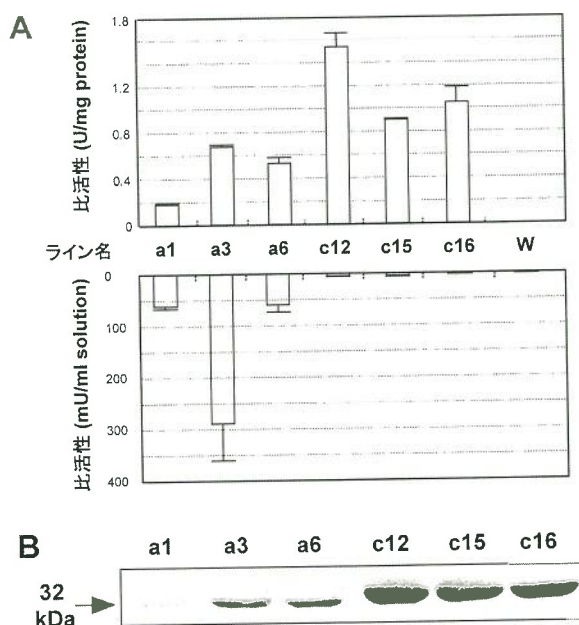


図 3 アポプラスト発現体 (a1, a3, a6), 細胞質発現体 (c12, c15, c16) の各ライン間の DbfB 活性評価 (A) と、ウエスタン解析による DbfB 発現量の比較 (B)

(A) 上側のグラフは葉の粗酵素抽出液を、下側のグラフは水耕液を用いて、HOPDA の最大吸収波長 (434nm, pH7.5) を測定することにより DbfB 活性を検出した。W はネガティブコントロールとして用いた野生型タバコの結果である。(B) では、葉の粗酵素を各レーン 10mg 相等ずつアプライした。一次抗体として抗 c-myc モノクローナル抗体を用いた。

オンを生成する活性)も細胞質発現体の方が大きかった。一方で、DbfBの場合と同様に、水耕液中にはアポプラスト発現体で特異的に活性が検出された(図5)。このことは、アポプラスト発現植物体から特異的に、DhaAタンパク質が活性ある酵素として水耕液中に分泌されていることを示している。図6は、水耕液に基質である1-クロロ-*n*-ブタンを添加した後の1-ブタノールの水耕液中における蓄積量を経時的に調べた結果である。アポプラスト発現体では1-ブタノールの蓄積は添加直後から始まるのに対し、細胞質発現体では1-ブタノールは添加1時

間後に初めて検出された。これは、アポプラスト発現体では水耕液中に存在するDhaAが植物体外で1-クロロ-*n*-ブタンの加水分解反応を触媒するため、基質が植物体中に入る時間が必要ないことによると考えられる。細胞質発現体で検出された1-ブタノールは、一度吸収された基質が細胞内で1-ブタノールに変換された後、細胞外に漏出してきたものと考えられる。一方、図6からわかるように、基質添加25時間後には細胞質発現体での1-ブタノール蓄積量がアポプラスト発現体での場合を上回る。これは、基質・生成物の細胞壁・細胞膜透過性の高さと、細胞質発現体でアポプラスト発現体を大きく上回る量のDhaAタンパク質が発現し粗酵素液でも非常に高い活性が検出されること(図4)に起因すると考えられる。

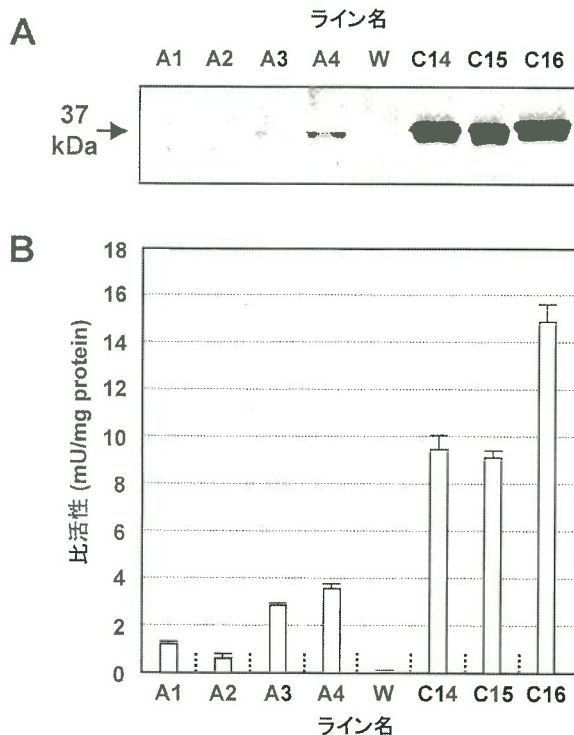


図4 アポプラスト発現体 (A1-4), 細胞質発現体 (C14-16) の各ライン間のウエスタン解析によるDhaA発現量の比較 (A) と、葉の粗酵素抽出液を用いたDhaA活性評価 (B)

(A) アポプラスト発現体では200 μ g, 細胞質発現体では100 μ g相等ずつを各レーンにアプライした。一次抗体としては、抗c-mycモノクローナル抗体を用いた。(B) DhaAの作用で生じた塩化物イオンを、チオシアン酸水銀を用いて比色定量することによってDhaA活性を検出した。Wはネガティブコントロールとして用いた野生型タバコの結果である。

3. 実際のphytoremediationへの応用に向けて

我々のグループの研究成果や紹介した論文の結果から、植物体から汚染物質分解系の酵素を

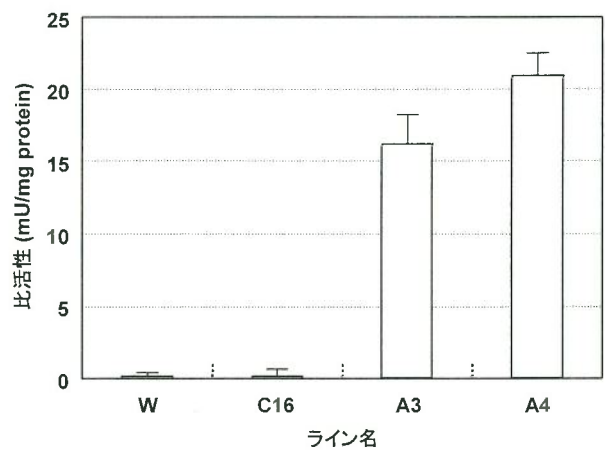


図5 アポプラスト発現体 (A3, A4), 細胞質発現体 (C16) の各ライン間の水耕液を用いたDhaA活性評価

DhaAの作用で生じた塩化物イオンを、チオシアン酸水銀を用いて比色定量することによってDhaA活性を検出した。

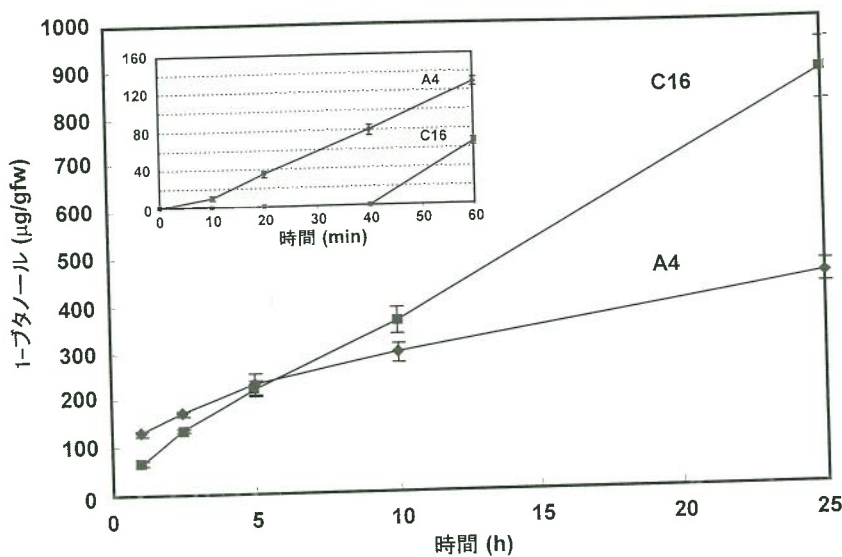


図6 アポプラスト発現体 (A4), 細胞質発現体 (C16) を水耕栽培した場合の, 水耕液中における1-ブタノール生成量の経時的变化
DhaAの作用で1-クロロ-*n*-ブタンより生じた1-ブタノールをGC-MSを用いて検出した。

分泌させ, 植物体の外側で汚染原因となる有機物を分解することは可能であることが証明された。今後, 実用化に向け検討すべき課題は以下のようなものがある。まず, 「処理対象とする物質 (汚染原因物質) は何か」が重要である。図6でもわかるとおり, DhaA発現植物体では, 基質添加後長時間経過した場合は細胞質発現体の分解力が勝る傾向が得られた。これには, 基質の細胞内への移行性が良いことが大きく影響していると考えられる。仮に植物細胞内移行性が低い基質であれば, アポプラスト発現体の優位性は増すものと予想できる。次のポイントとして, 「発現量・活性をどう上げるか」も重要である。我々の結果では, DbfB, DhaAともアポプラスト発現体での発現量が細胞質発現体での発現量を大きく下回っている。より多くの酵素を分泌させることができれば, 植物体外で検出される酵素活性が大きくなるわけであり, 高効率の環境修復を考える上で, 非常に重要な要素となりうる。酵素の発現量はアポプラスト発現させる酵素が「どの様な特徴を持った酵素か」

によっても大きく影響される。当然, 小胞体, ゴルジ体を介する分泌のプロセスの過程での安定性も大きな要因である。それに加えて, 分泌系でのタンパク質の糖鎖修飾などによる不活性化の程度も酵素によってまちまちであり, 同一活性を示す酵素であっても, 一次構造の違いなどによっては不活性化されたり, されなかったりということが起こる可能性がある。さらに, 酵素が活性を持つためには, 補欠分子族の結合, サブユニットの結合, コンポーネントの適切な相互作用などが必要

となりうる。DbfBでは二価鉄が酵素の活性化に必須であり, DbfB, DhaAともmultimer構造をとる酵素と考えられる。今回, 分泌された酵素が活性を保持していたことから, 二価鉄は適正にDbfBに保持され, 両酵素とも適切な4次構造を取っていると考えられ, 両酵素のアポプラスト発現においては, それらの懸念は杞憂であった。ところで, 細菌の芳香族分解酵素に見られるように電子伝達コンポーネントが活性発現に必要な場合などは, アポプラスト空間で適切にコンポーネント間相互作用が行われるかなど, 不確定な要素が多い。また, アポプラスト発現植物体を用いたphytoremediationで処理対象とする環境がどの様な環境なのか, すなわち「処理対象が土壌なのか, 水なのか」も重要な要素となりうる。我々の研究も含め, rhizoremediationの研究では滅菌された水耕液に酵素が分泌され, 活性がある程度維持されることを示してきた。もちろん, 形質転換植物体を実際の土壌処理, 水処理に用いる場合には, 滅菌されてない土壌中, 水中に酵素が分泌される。

その様な環境で酵素がどの程度安定か（その場の物理化学的諸条件下で安定か、あるいは微生物などの存在の影響はあるか、等）は、処理の成否に大きく影響を与えるであろう。

Rhizosecretionは形質転換植物体のphytoremediationへの利用に新たな視点を与えるものとして注目される。現段階では適用例も少ないのが現状であるが、今後、様々な酵素での適用が試みられ知見を集積することによって、大局的な視点で適用可能性や不可能な場合の方策などが議論できるようになるものと期待される。

文 献

- 1) French, C.E. et al (1999), *Nat. Biotechnol.*, 17: 491-494.
- 2) Hannink, N. et al (2001), *Nat. Biotechnol.*, 19: 1168-1172.
- 3) Bizily, S.P. et al (2000), *Nat. Biotechnol.*, 18: 213-217.
- 4) Borisjuk, N.V. et al (1999), *Nat. Biotechnol.*, 17: 466-469.
- 5) Drake, P.M. et al (2002), *FASEB J.*, 16: 1855-1860.
- 6) Drake, P. M. et al (2003), *Plant Mol. Biol.*, 52: 233-241.
- 7) Sonoki, T. et al (2004), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press.



ブレインテクノニュース
バックナンバーのご案内
第106号
2004年11月15日発行

総 説

硝酸同化効率向上による植物の代謝機能の増進—亜硝酸トランスポーター (CsNitr1) の発見とCsNitr1形質転換植物による大気中NO₂の吸収……………高橋 正昭ほか

国内情報

光合成電子伝達の温故知新……………鹿内 利治
植物の自己防衛システムを制御する液胞プロセシング酵素の発見と機能解明……………初谷 紀幸ほか
ニジマスを生むヤマメの作出：魚類始原生殖細胞を用いた発生工学……………吉崎 悟朗ほか

サツマイモ茎からの内生窒素固定細菌の分離・同定と茎中息の確認……………安達 克樹ほか
高品質なたい肥生産を求めて……………原田 泰弘ほか
不定胚経由のスギ個体再生技術の開発……………伊ヶ崎 知弘ほか
地域の先端研究

世界で初、種子なしビワの開発……………八幡 茂木
3倍体無核スタチ新品種‘徳島3X1号’について……………徳永 忠士
倍数性合成周縁キメラによる種なし香酸かんきつの開発……………脇塚 巧ほか

文献情報

大麦のウドンコ病耐性機構とその起源……………(抄訳：岩井 純夫)
3次元ゲル培養システムによるウシ胚盤胞の体外での伸長期胚への発育……………(抄訳：下司 雅也)
酸素濃度を高めた人工海水中でのホタテ閉殻筋の貯蔵……………(抄訳：木村 郁夫)

◀国内情報▶

植物の遺伝子組換え技術を利用した 鶏原虫病経口ワクチン素材の開発

独立行政法人 産業技術総合研究所
ゲノムファクトリー研究部門 植物分子工学研究グループ
松 村 健

近年、植物の遺伝子組換え技術を利用した経口ワクチン開発が試みられており、ヒトや家畜などの哺乳類感染症、特にウイルス病や細菌性毒素をターゲットに行われ、その有効性・可能性が示唆されてきた。我々は、ワクチンとして有効な抗原ペプチドのデリバリーシステムとして、腸管感染症ウイルスのキャプシドを利用し、鶏と原虫病という組み合わせでその有効性を実証したもので、組換え植物利用経口ワクチンの可能性のさらなる展開を期待させるものである。

1. はじめに

ワクチンは、特定の疾病に対して罹患した場合にその症状を軽減させる手段として非常に有効である場合が多く、ヒトワクチンは、インフルエンザワクチンをはじめとして多くの注射型ワクチンが開発、実用化されている。近年、この注射型ワクチンに代わって粘膜免疫、特に腸管粘膜を刺激して感染防御効果を誘導する、いわゆる「食べるワクチン」の開発が望まれており、ヒトではポリオワクチンが既に実用化されている。「食べるワクチン」は、無痛で投与に用いる注射器や針などの医療用廃棄物の軽減もさることながら、粘膜免疫による効果の大きさに注目されている。一般に「食べるワクチン」を含め、多くの実用化されているワクチンは、生ワクチンが殆どであるが、病原微生物の遺伝子解析から、病原性に関わる部分は可能な限り排除し、ワクチンとして効果的な遺伝子断片を有効利用する「サブユニットワクチン」開発も行われている。このサブユニットワクチンを植物の遺伝子組換え技術を利用して、可食性作物に導入して利用する研究が欧米の製薬・種苗企業を中心に行われている¹⁾。

2. 鶏のワクチンと原虫病

養鶏現場では、現在、多くの病気に対して飼料への抗生物質混合投与と平行して、ワクチン注射も行われている。我が国の養鶏規模は、ブロイラーも含めると非常に大きな畜産業であり、生乳を含めた畜産業の中でもトップの粗生産額である。国内の養鶏農家は、小規模でも数万羽、大規模養鶏農家の場合、数十万羽から百万羽を飼育している。これらの鶏全飼育羽数に対して、一羽一羽ワクチンを注射していくのは、非常に大変な労力であることは容易に想像できる。また、畜産業界における注射ワクチン共通で言えることであるが、投与した患畜に苦痛を与え、結果として、飼育不良や産乳量や産卵率の低下を招く(図1)。これらのことから、投与が簡便で苦痛を伴わない「食べるワクチン」、すなわち経口投与型のワクチン素材の開発は、ヒト医療のみならず獣医畜産現場でも強く望まれている。本研究で、その開発対象にしたのは、網戸の目より小さいヌカ蚊に因って媒介される鶏原虫病の一種であるロイコチトゾーン原虫病である。原虫病とは、マラリア原虫に代表されるように媒介虫を介して感染し、貧血や下痢などの症状を引き起こす重篤な病害であるにも関わらず、効果的なワクチン開発が非常に困難な疾病である。鶏ロイコチトゾーン原虫病は、ヒト医療を含めた初めての効果的注射型

MATSUMURA Takeshi

〒062-8517 札幌市豊平区月寒東2条17丁目

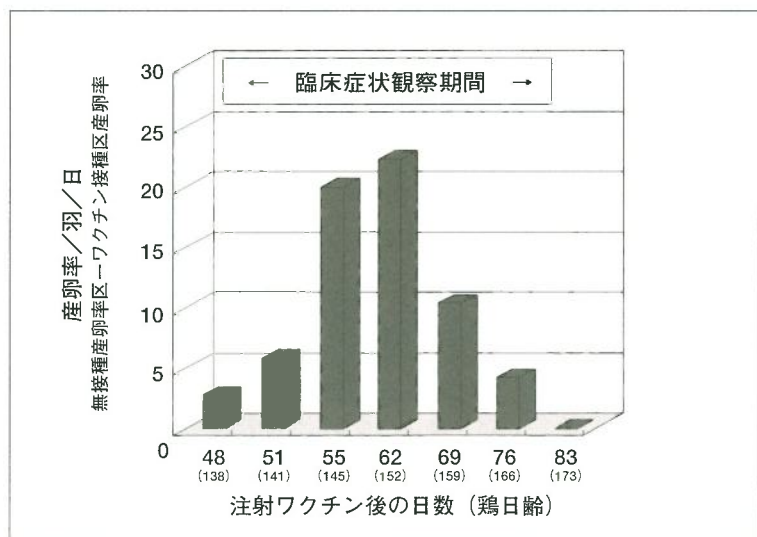


図1 R7抗原を免疫原としたワクチン (LV) の野外感染に対する有効性 (産卵率差/経済性に対する効果)

ワクチンが開発されており、現在、遺伝子組換え大腸菌による生産系で生産、上市されている。しかし、その有効期間が鶏生育期間全部をカバーできるほどではなく、追加のワクチン接種が必要であるが、成鶏舎移動後の注射が作業的に不可能なことから、より強く経口ワクチンの開発が望まれているものである。

3. 組換え植物による経口ワクチン開発の現状と戦略

遺伝子組換え植物を利用した経口ワクチン素材の開発は、大腸菌毒素やB型肝炎ウイルス、狂犬病ウイルスなど一部の細菌性毒素や多くのウイルス病を対象に開発が実施されており、経口投与試験もモデル動物としてのマウスや対象動物であるイヌ、豚を始め、ヒトに対する試験も欧米では実施され、その効果が検証されている²⁾。多くの報告では、ワクチン成分を発現している組換え植物を摂食した区での血清中の抗体価の上昇が確認されている。しかし、今までのワクチン開発対象、報告はすべて哺乳類に対してのみであり、鶏のような哺乳類以外の動物への試験報告は無い。また、これら経口ワクチン共通の課題として、胃などの消化器官でワク

チン成分が分解されず、その効果を発揮する形態のまま腸管粘膜まで到達させるか、のデリバリーシステム開発が課題でもある。デリバリーと言うより、アジュバント効果を狙ったコレラ毒素蛋白質を用いる報告が多々あるが、本研究では、そのシステムに経口感染する下痢症ウイルスの一種であるノーウォークウイルス (Norwalk virus : NV) のキャプシドを利用する戦略を用いた。NVは、ヒトや哺乳類に感染し、下痢や嘔吐を引き起こすウイルスで、その感染経路は主に経口感染である。すなわ

ち、口から入ったウイルス粒子は、胃などの消化管で分解されることなく感染成立の現場である腸管まで到達できる構造を有している。そのウイルス外被蛋白質は、一種類のサブユニットで構成され、その遺伝子を導入・発現させた昆虫細胞や植物体内で粒子を形成することが知られている³⁾。そこで、我々は、このキャプシド遺伝子の一部を欠損させた変異遺伝子でも粒子を形成する能力が損なわれないことを電子顕微鏡観察で確認した上で、欠損部位の代わりにロイコトゾーン原虫病抗原エピトープの遺伝子を結合、融合蛋白質として発現させることで、抗原エピトープをウイルス粒子表面上に突出させたキメラ粒子をワクチン素材として利用する戦略を用いた。NVを用いることで重要な点は、NV自体は、致死性を有しないウイルスであること、鶏には宿主が異なるため何らの影響もないこと、また、ウイルス外被蛋白質自体には何らの病原性もないことである。

4. NVを利用した鶏ロイコトゾーン原虫病ワクチン開発

鶏の経口ワクチン開発にあたり重要なことは、哺乳類での経口ワクチン試験と同様に鶏に

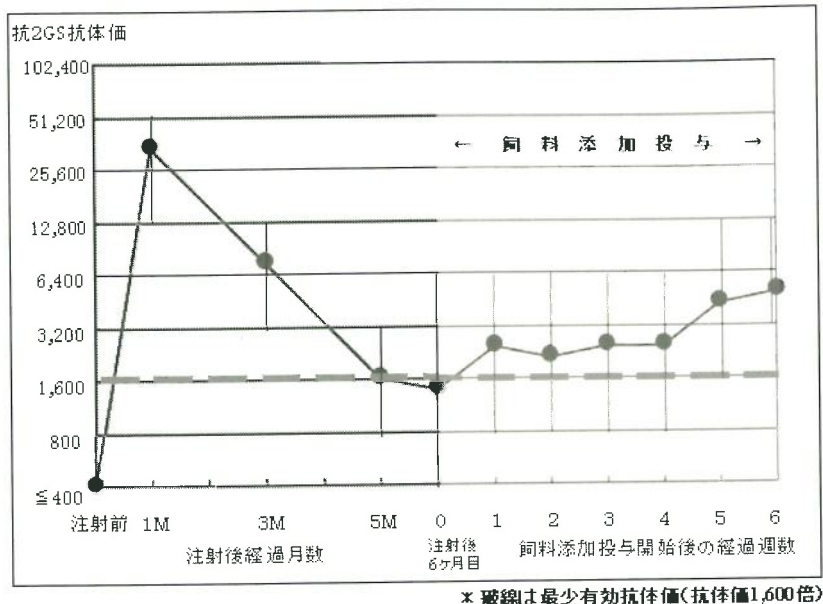


図2 注射ワクチン剤混合飼料経口投与群の結果
B群：ワクチン注射／飼料添加投与(500万単位／羽)／6週間連続投与

においても経口投与で抗体価の上昇が誘導できるか、にある。我々は、現在注射用ワクチンとして市販されているロイコチトゾーンR7抗原蛋白質を飲水、または飼料に混合投与することでその効果の誘導を検証したところ、一回の経口投与に注射ワクチン500～600本分を投与しても、飲水投与では全くの抗体価(2GS抗体)上昇が観察されなかった。一方、飼料との混合投与区では、僅かに抗体価の上昇が確認された。そこで、一度注射ワクチンにより抗体価を上昇させた鶏群、即ち、免疫記憶群を用いて、同様の試験を実施したところ、飼料との混合投与区で明らかに抗体価の再上昇が認められた。この結果から、鶏においても哺乳類と同様に抗原の経口投与で抗体価の上昇が誘導される、即ち、経口ワクチンという手段が有効利用できる可能性が示唆されたことになる。しかし、本試験のように抗原ペプチド単体での有効な一回分の経口投与量が注射ワクチン500本分必要な状況では、コスト面から現実的に利用できない(図2)。一方、NVとR7抗原遺伝子を融合させたキメラウイルス遺伝子をバキュロウイルス発現系を利用して昆虫培養細胞系で発現、粒子形成させ、

簡易精製したキメラ粒子を、飼料と混合後経口投与した結果、同様の抗体価の再上昇が僅か注射一本分の抗原量で認められた。この結果は、NVによるデリバリーシステムが効果的に機能している、即ち、NV上発現させたR7抗原エピトープが、消化管内での分解が抑えられ、腸管粘膜まで抗原性を保持したまま、到達していることが推測される。

この結果から、NVとR7抗原エピトープの融合蛋白質は、経口ワクチン素材として充分有効であると判断した。そこで、このキメラウイルス遺伝子をアグロバクテリウム

法を用い、ジャガイモへ遺伝子導入を行った。得られた形質転換ジャガイモは、キメラウイルス遺伝子の導入、転写を確認後、抗NV抗体および抗R7抗体を用いたELISAおよびウエスタン法でキメラウイルス粒子蛋白質の発現を確認した。これらの形質転換ジャガイモでは、葉および塊茎でほぼ同レベルのキメラウイルス粒子蛋白質の発現を確認することができた。

得られた形質転換ジャガイモは、閉鎖系の遺伝子組換え温室で育成し、葉および塊茎を収穫した。収穫後の葉は、そのまま凍結乾燥を行い、室温で経口投与試験まで保管した。

この凍結乾燥葉を養鶏飼料と混合し(写真1)、自由採餌下で鶏に経口投与した結果、明確な抗体価の再上昇が確認された(図3)。鶏ロイコチトゾーン原虫病は、2GS抗体価と感染防御が非常に密接に関連していることが明らかになっているため⁴⁾、本研究開発で鶏ロイコチトゾーン原虫病に対する経口ワクチン素材が開発できたと言える。

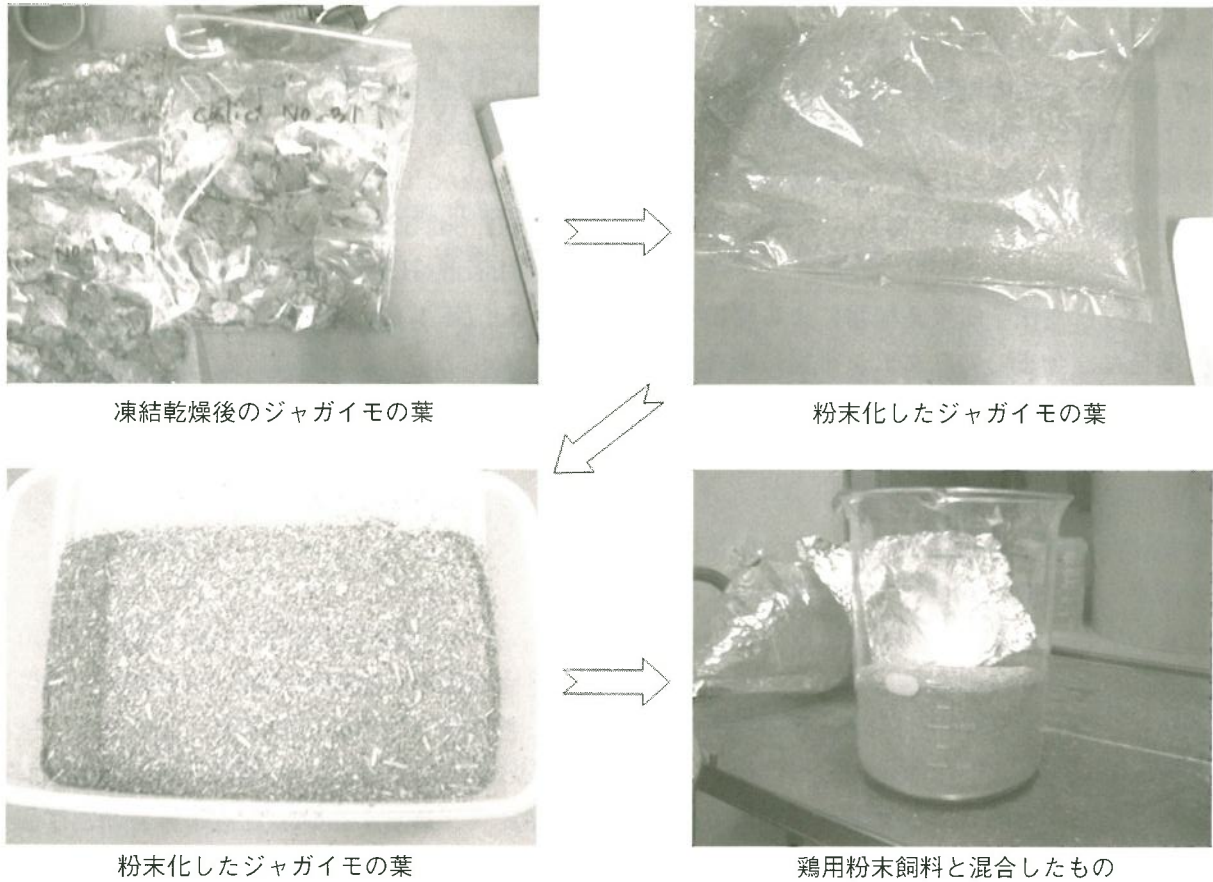


写真1 経口投与材料の調整方法

5. おわりに

植物の遺伝子組換え技術を利用した経口ワクチン開発は、特段の注射設備を必要とせず、患者、患者に苦痛を伴わずに投与可能である。しかも、植物の生産能力をもってすれば、大量生産、拡大生産が容易でもあり、製造設備も不要なことから大幅の製造コストの低減、即ち、ワクチンの低価格化を実現可能にすることで、今までワクチンの普及が困難であった獣医・畜産領域での新たなワクチン利

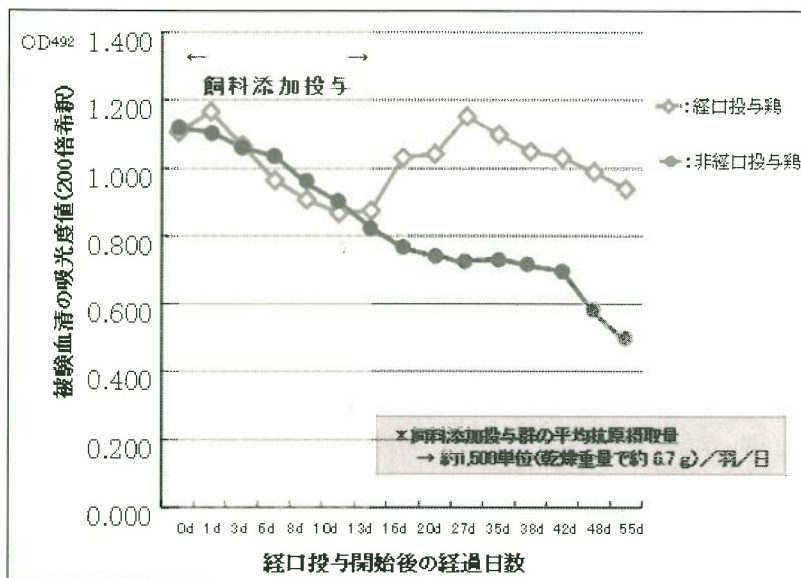


図3 組換え植物経口投与群の抗体価変動

用へとも繋がる。

また、植物にワクチン成分を発現させた場合には、葉やその他の組織を凍結乾燥処理することにより容易に室温保存が可能である。これは、保冷施設などを必要としないで容易に長期間ワクチン備蓄が充分可能であることを示している。

このように遺伝子組換え植物による経口ワクチン開発は、今までのワクチン市場に新たな展開をもたらす技術であると期待している。

文 献

- 1) Daniell, H. et al (2001), *TRENDS in Plant Science*, 6, 219-226.
- 2) Tacket, C.O. et al (2000), *J. Infect. Dis.*, 182, 302-305.
- 3) Mason, H.S. et al (1996), *Proc.Natl.Acad. Sci USA*, 93, 5335-5340..
- 4) Itoh, A. et al (2002), *J. Vet. Med. Sci.* 64, 405-411.



ブレインテクノニュース

バックナンバーのご案内

第105号

2004年9月15日発行

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…小林 省藏
- 2 遺伝子組換えによるキクの花色改変に向けて…間 竜太郎
- 3 青いバラの創生……………勝元 幸久・田中 良和

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
 ……………橋本 好弘・軽部 征夫

抗IL-10抗体を用いたヨーネ病の早期診断法の開発

……………百溪 英一・森 康行

藍色細菌の時計タンパク質KaiAの原子構造と時計機能
 ……………宇津巻 竜也・石浦 正寛

アマモ科の遺伝的多様性と日本の沿岸環境……………相生 啓子

セルトレイ苗挿し木装置……………太田 智彦・林 茂彦

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……………柳澤 修一

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……………(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……………(抄訳：塩谷 格)

植物に酒豪遺伝子?……………(抄訳：岩井 純夫)

光合成による水の酸化反応中間体の検出……………(抄訳：吉川 彰)

生研センターからのご案内

◀国内情報▶

遺伝子発現レベルを利用した コメの食味判定技術の開発

株式会社 植物ゲノムセンター

宮川 佳子・菅原 宏章・門奈 理佐・美濃部 侑三

イネ成熟種子胚乳（米粒）内で発現する遺伝子の転写量に着目し、良食味米と非良食味米との間で胚乳内転写量の差が認められ、且つ、食味と相関性がある複数の遺伝子を選抜した。これら遺伝子の発現量を数値化し、クラスター解析により総合的に評価する方法を開発した。この方法により少量のコメサンプルで、多検体同時に、かつ短時間で官能検査と相関性の高い評価を下すことが可能となった。

1. はじめに

現在、国内では200種をこえるウルチ米品種が栽培されている。農家が栽培する米の品種を選定する際には、地域の気象条件や収量性、耐病性、食味などを考慮し総合的に判断されるが、最近では消費者の良食味嗜好を反映し、食味を第一に考えて選ばれる傾向が強くなっている。このため、特に美味しいとされているコシヒカリの需要に応じて、栽培面積も全稲作面積の約40%を占めるようになった。最近の新品種の多くはコシヒカリの血を引いた良食味品種となっている。それにもかかわらず、一部の米は産地名及び品種名だけがブランド化し、食味の良いものとして高い評価を受けている。例えば、魚沼産コシヒカリは常に良食味とされ、生産量の4～5倍が消費されているといわれており、産地名を記しただけで高価格の取引がなされている。このように米のブランド化は産地偽装表示、過大評価などの問題を引き起こしている。一方で無名米や新品種は魚沼産コシヒカリと同等あるいはそれ以上に良食味であっても消費者に評価されにくいのが現状である。実際の流通過程においては、食味よりも時にはブランド名が優先される傾向がないとは言えず、ブランド名、イコール良食味米という誤解を招いている。以

MIYAGAWA Yoshiko, SUGAWARA Hiroaki,

MONNA Lisa, MINOBE Yuzo

〒305-0856 茨城県つくば市観音台1-25-2

上の事情から、迅速で信頼性の高い食味評価方法による消費者への正しい情報提供、生産者の努力に対する正しい評価が期待されている。

2. 従来の食味判定方法

現在食味を評価する代表的な手法として、次に示す2種類が存在する。1つめは官能検査による食味試験法である。(財)日本穀物検定協会では食味試験実施要領¹⁾に準拠して、毎年、全国の主要な産米について食味試験を行い、その結果をホームページ上²⁾で公開している。この方法では、統一された条件下で炊飯した米をおよそ二十名の試食者が実際に食べ、味、香り、外観、粘り、硬さ等の項目ごとに基準米に対する相対評価を7段階に分けて評価し、総合的に判定する³⁾。官能検査による評価は、味覚による直接的な評価であるため信頼度が高い。しかし問題点として、①人間の感覚を基にして食味の良否を直接的に評価するため、様々な要因により結果に個人差が生じる、②一度に試供できるサンプル数は3点までと限りがあり、多検体同時の評価ができない、③熟練した多数の人材を必要とする、④評価する度に数キログラム単位の多量の米を炊飯しなくてはならない、⑤炊飯条件を厳密にコントロールしなくてはならない、⑥時間および空間的コストを必要とする、などの欠点がある。

2つめは理化学的測定法である。食味に関係

する化学成分として、タンパク質含量、アミロース含量、脂肪の酸化度、水分、無機成分などがあり、これらを測定し数値化することによって食味を評価する方法である。近年では、近赤外分光分析の手法による食味計が開発されている。原理としては、食味がタンパク質、水分、アミロースなどの成分バランスによって決まるという考えに基づくもので、破碎した精米中におけるそれぞれの成分量を検出し、それらの値を独自に開発した食味方程式に当てはめ、食味を点数として算出するものである³⁾。他にも、測定因子は異なるが同一あるいは類似の手法で開発された食味計が市販されている。これらの機器は多くの労力、時間を要せず、成分を非破壊で測定できるため注目を集めているが、機器メーカーによって評価の基準が異なる、正確に測定できない成分がある、食味計と官能検査による評価結果との間には相関関係が認められな

いといった問題がある。この要因の1つとしては、米粒中のアミロースやタンパク質含量などが食味と無関係ではないが、実際には多様な因子が複雑に影響しあって食味が決定されるものであるためと考えられる。またこの他に、米飯の物性や精米粉の糊化特性の測定による評価方法がありこれらも理化学的測定法に含まれる。

最近、官能検査や理化学検査とは別にDNAマーカーを用いた食味判定方法が開発された⁴⁾。この方法は官能検査結果との相関は高いが、遺伝子情報の異なる品種間に対してのみ利用できる、同一品種内における食味判定はできないという欠点がある。

そこで我々は、従来の食味評価方法と全く異なる新しい視点からコメの食味判定方法の開発を行った。

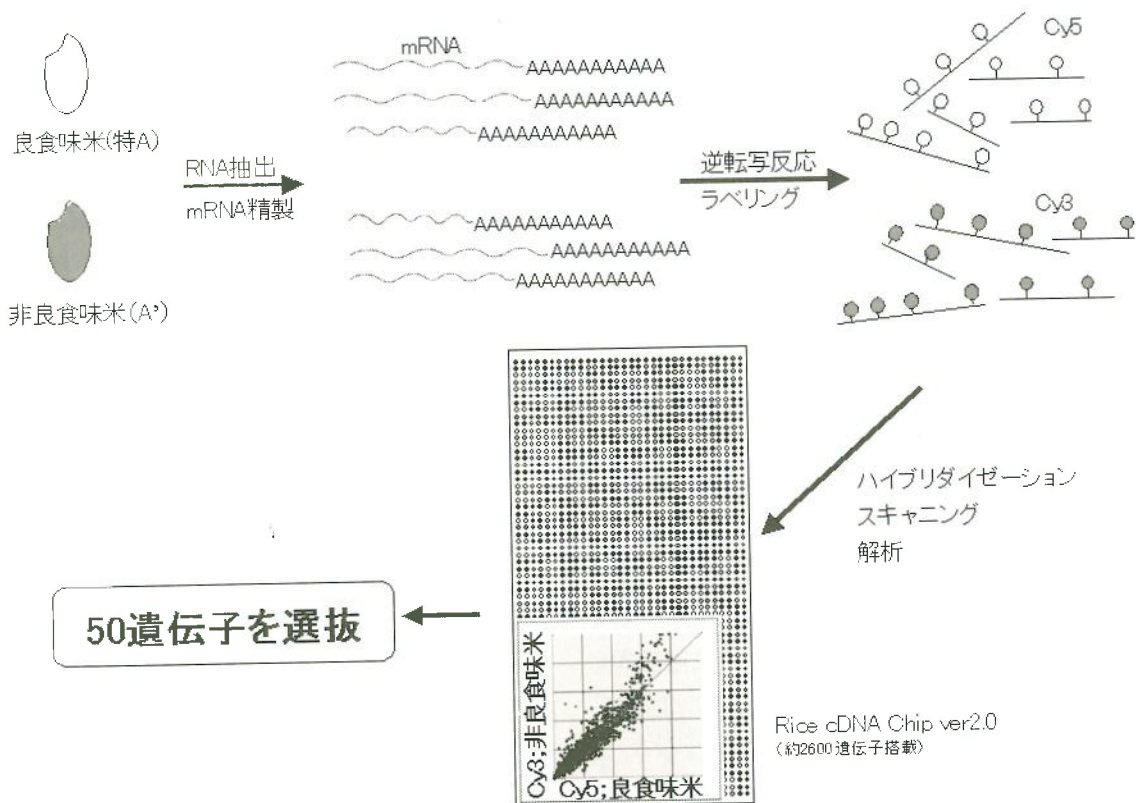


図1 マイクロアレイによる食味関連遺伝子の第一次選抜

非良食味 (A') に対する良食味 (特A) のシグナル値をlog₂比で表し、両者の間で発現量に差のある遺伝子を50個選抜した。

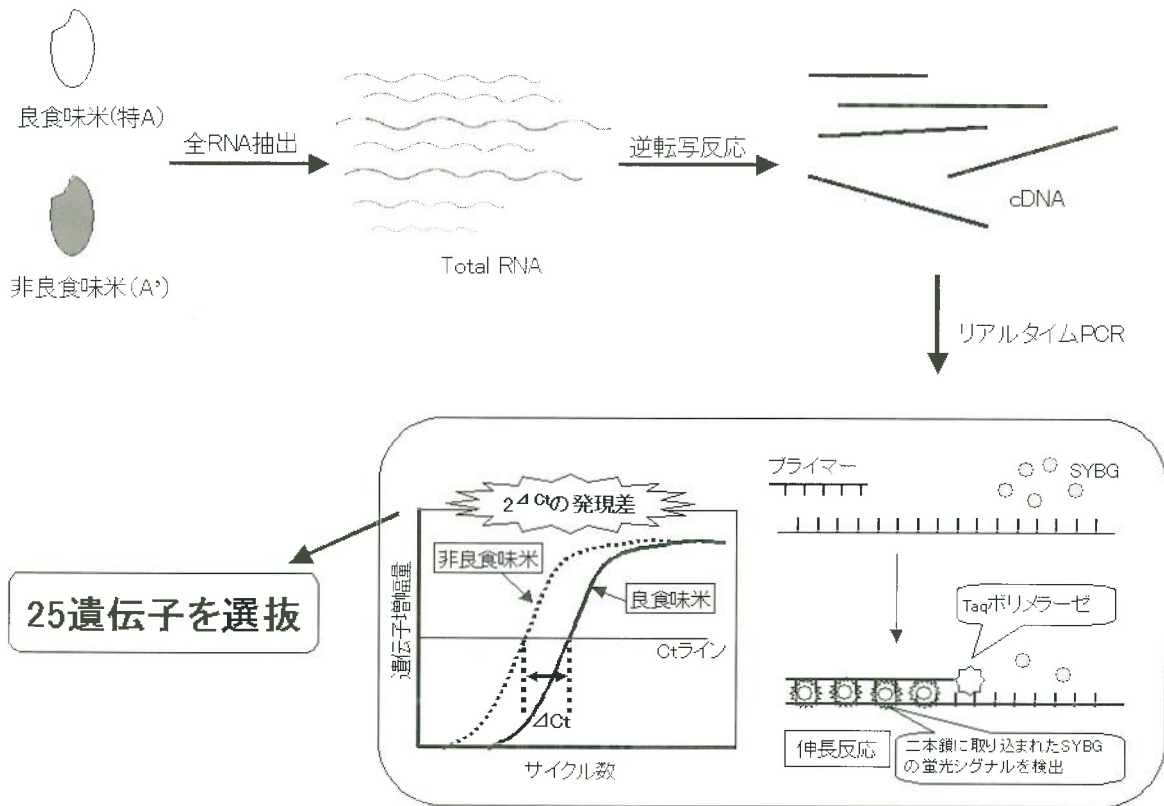


図2 リアルタイムPCRによる食味関連遺伝子の第二次選抜

非良食味 (A') に対する良食味 (特A) の遺伝子発現比を \log_2 で表し、両者の間で発現量に差のある遺伝子を25個選抜した。内部標準遺伝子として18SrRNAを使用した。

3. 遺伝子発現レベルを指標とした食味判定法の開発

コメのおいしさを左右するのはコメの品質、炊飯方法、品種である。遺伝子情報が全く同一の品種であるコシヒカリ間でも産地によって食味が異なったり、同一産地であっても、生育を通しての気象条件によって毎年食味が異なるという事実は、日本人のこれまでの食生活の中で明確に認識されてきた。人間の口に入るまでの過程の中でも、特に、栽培過程における産地ごとの気象条件（日照条件、温度、湿度など）、土壌の特性、栽培方法はコメの食味を形成する主要な因子と考えられる。さらに、コメの収穫時期、収穫後の保存状態等も重要な因子であろう。従って、これら環境要因の影響を受けたイネ胚乳細胞内では、その要因の程度の違いによ

って様々な遺伝子の転写量に違いが生じ、最終的に、食味に反映されるはずだと考えた。そこで、我々は良食味米と非良食味米との間で胚乳内転写量の差が認められる遺伝子をcDNAマイクロアレイおよびリアルタイムPCRにより複数選抜した（図1，2）。cDNAマイクロアレイは一度に数千種類の遺伝子発現解析を大雑把に行うことができ、リアルタイムPCRはわずかな遺伝子転写量の違いを正確に検出できるという特徴がある。良食味米および非良食味米は(財)日本穀物検定協会で官能試験による食味評価を行った平成14年度産の精米と玄米を使用した。良食味米には特A（基準米である近畿圏産の日本晴とコシヒカリのブレンド米よりも特に良好）と評価されたコメを、非良食味米にはA'（基準米とおおむね同等）と評価されたコメを使用した。cDNAマイクロアレイ実験では、約

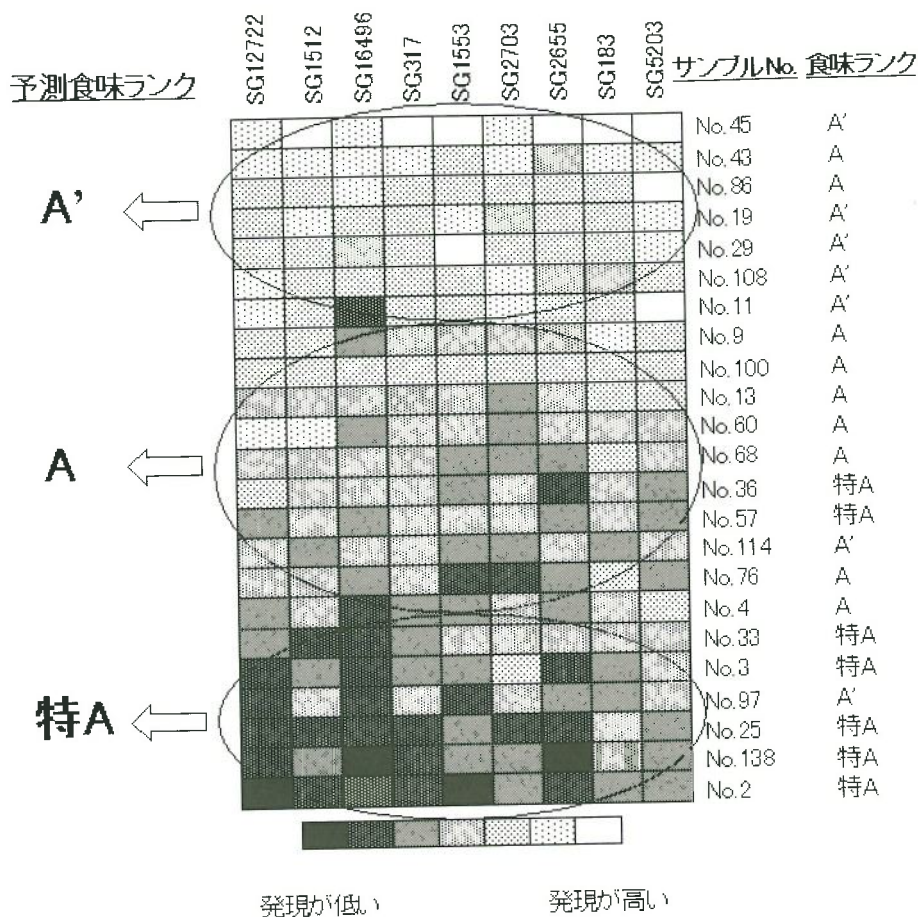


図3 9遺伝子の転写量と(財)日本穀物検定協会の官能試験による食味値との相関性の比較

基準米に対するコメサンプルの遺伝子発現比をlog₂で表し、クラスター解析を行った。内部標準遺伝子として18SrRNAを使用した。

100種類の様々な条件下（低温，酸化的ストレス，発芽時期，カルスなど）にある組織から約7万クロンのcDNAライブラリーを独自に作製し，発現頻度の高いcDNAクローンを約2600クローン（約2600遺伝子）選抜し，定法に従って作製したcDNAマイクロアレイチップを使用した。cDNAアレイ上には機能未知の遺伝子も多数搭載しており，このようなcDNAアレイを利用することで，過去の知見によらない新しい発見の可能性があると考えている。このcDNAマイクロアレイチップにより，良食味米と非良食味米との間で胚乳内転写量の差が認められる遺伝子を50遺伝子選抜した（図1）。次に，リアルタイムPCRによる詳細な解析を行い，それ

ら遺伝子の転写量を数値化し，両者の間で差が明確な遺伝子を25遺伝子選抜した（図2）。さらに，特A，A，A'評価が下げられた平成14年度産精米コシヒカリ12サンプルにおける25遺伝子の転写量と食味評価との関係をクラスター解析し，相関性が認められるものを9遺伝子に絞り込んだ。これら9遺伝子を使って，平成15年度産コシヒカリ精米の食味判定を行ったところ，官能検査による食味評価と高い相関性を示していた（図3）。一方，官能検査による食味評価と一致しない点も一部認められた。この原因としては，冒頭に挙げた官能試

験による食味判定方法の問題点に加え，官能試験終了後から我々が解析するまでの期間におけるコメサンプルの保存条件が一定していなかった可能性や，その期間の長さによる影響などが考えられる。これら9遺伝子の中には，植物細胞内において酸化的ストレス条件下で発現誘導を受けることが報告されている遺伝子や，機能未知な遺伝子などが複数含まれていた。興味深いことに，これら遺伝子の転写量は良食味米で低く，非良食味米で高いという傾向が平成14年度産および15年度産コシヒカリで共通して認められただけでなく，予測した特A，A，A'評価の同一グループ内において遺伝子の転写量に変化があることも認められた。また，同一産地で

あっても年度によって食味評価が異なることも検出されていた。このことは、産地や年度によって変化する気候条件などの環境要因と9遺伝子の挙動が密接に関連していることを示唆しているのかもしれない。現在、これらの環境要因との関連性についても検討中である。

この方法は、それぞれのコメサンプル間で9遺伝子の転写量をリアルタイムPCRにより数値化し、クラスター解析により総合的に評価するシステムで、この手法による食味判定系ではすべての工程を含めて一度に数十サンプルの解析を半日で行うことができる見通しである。さらに、ヒノヒカリやはえぬきなどの他品種間においてもこの方法が利用できることを確認している。

4. 現在の問題点と実用化に向けて

現在の手法では、食味評価を行いたいサンプルが特A, A, A' 評価のどのグループに属しているかを予測するために、常にそれぞれの評価が下されたコメとサンプルのコメとを同時に解析しなくてはならない。食味評価の指標に利用している特A, A, A' 評価のコメは残量に限りがあり、適切な環境の下でそれらを保存するとしても時間経過と共に胚乳細胞内の遺伝子転写産物が分解され、最終的に指標として利用できなくなる可能性が高い。そこでこれらの問題を解決するため、特A, AおよびA' 評価の胚乳細胞内における9個の各遺伝子のコピー数を数年間に渡りデータベース化し、蓄積しているところである。この作業により、目的のコメサンプルが特A, AおよびA' 評価のどのゾーンに属するか、といった食味判定が可能になると考えてい

る。(財)日本穀物検定協会では現在、理化学検査によるコメの分析結果の情報公開⁵⁾を行っているが、将来的には、その一環としてこの方法に基づいたコメの食味判定サービスも加えることを念頭において実用化を目指している。また、この食味判定法はコメの食味だけでなく、ブレンド米の食味予測(配合比率決定等)、栽培条件の評価、新品種開発時の良食味系統の選抜への応用も期待できる。さらに、この手法の開発で確立した考え方はコメ以外の穀類(コムギ, オオムギ, ヒエ, アワ, トウモロコシ等)の評価にも適用できる可能性があると思われる。

5. おわりに

本方法の開発は(財)日本穀物検定協会との共同研究で行われました。本研究の推進にあたり当初より熱心に激励していただいた(財)日本穀物検定協会の浜口義曠会長に心より深謝いたします。

文 献

- 1) 食糧庁(1968), 米の食味実施要領
- 2) <http://www.kokken.or.jp/html/kok03100000.html>
- 3) 竹生新治郎(2000), コメの科学(石谷孝佑・大坪研一編), 第2版, 117-135, 朝倉書店, 東京
- 4) 大坪研一ら(平成15年)「米のDNA食味判定技術及び粳/玄米半粒による良食味米選抜方法」特開2003-79375
- 5) <https://www.kokken-kome.info>

◀国内情報▶

神経ペプチド「ニューロメジンU」の
摂食抑制メカニズムについて久留米大学 分子生命科学研究所 遺伝情報研究部門
花 田 礼 子 ・ 児 島 将 康

ニューロメジンUはブタ脊髄から単離された神経ペプチドであるが、その生理機能は長い間、不明なままだった。最近、ニューロメジンU受容体が同定されると共に、ニューロメジンUが摂食抑制作用を示すことが明らかとなった。さらにニューロメジンU欠損マウスの作成・解析から、このマウスが過食およびエネルギー消費低下によって、肥満となることを見いだした。

1. はじめに

近年のライフスタイルの変化に伴い、肥満症となる人の数は増加の一途をたどっており、重大な社会問題となっている¹⁾。肥満症は生活習慣病を引き起こす主要な原因のひとつであり、耐糖能障害や高脂血症、脂肪肝や冠動脈疾患などの成因と深く関わっている。肥満症の病因としては、遺伝的因子や環境因子によるものなど様々であるが未だ不明な点が多い。このような背景のもと肥満症発症メカニズムは大変注目され、最近までにさまざまな神経ペプチドの関与が報告されてきた。本稿では神経ペプチド・ニューロメジンUの摂食・エネルギー代謝調節機構について概説する。

2. ニューロメジンUとニューロメジンU受容体

ニューロメジンU (Neuromedin U, 以下NMU) は、1985年南野 (現・国立循環器病センター) らにより子宮筋収縮アッセイを用いて、ブタの脊髄から単離された神経ペプチドである (図1)²⁾。その後、ヒトやラットなどの多くの動物種からも同定されたが、その受容体および生理作用の詳細については長い間不明であった。ニューロメジンとは平滑筋収縮アッセイを
HANADA Reiko, KOJIMA Masayasu
〒839-0864 福岡県久留米市百年公園1-1

指標としてブタの脊髄や脳から精製された神経ペプチド群の総称で、現在までに6種類のニューロメジン類が同定されており、そのアミノ酸配列のホモロジーによりタキキニン系 (ニューロメジンKとL)、ボンベシン系 (ニューロメジンBとC)、ニューロテンシン系 (ニューロメジンN) に分類される。NMUは強力な子宮筋収縮活性があるためUterus (子宮) のUからニューロメジンUと名付けられた。しかし、NMUの構造は他の生理活性ペプチドにはホモロジーがない、全く新しい神経ペプチドであった。

2000年に筆者らはオーファン受容体FM3の内因性リガンド検索を行っていて、小腸にみられたリガンド活性を単離・精製し構造決定したところNMUであることを見いだした³⁾。ほぼ同時期にいくつかの製薬企業の研究グループがリガンド・ライブラリーのマッチングからFM3のリガンドがNMUであることを発表し、また引き続いてNMU受容体は2種類存在することが明らかになった。2種類のNMU受容体のうちFM-3 (すなわちNMU1R) は消化管をはじめ末梢組織に広く分布し、もう一方のFM-4 (すなわちNMU2R) は主に視床下部や海馬CA1領域で発現している。

NMUは視床下部、脳幹、脊髄、消化管などに存在し、末梢作用としては平滑筋収縮作用に加え、ACTH分泌や腸管運動の亢進、腸血流増加などの作用が知られていた。脳内においてはNMUmRNAは視床下部弓状核や視交叉上



図1 ニューロメジンUのアミノ酸配列（ラット）

核、腹内側核や背内側核に発現しており、NMU2Rは視床下部室傍核や視床下部弓状核、視交叉上核や腹内側核に発現している。上記の視床下部領域は摂食行動やエネルギー代謝調節に深く関与していることが知られており、このような遺伝子発現の局在は、NMUが視床下部領域の神経ネットワークを介したエネルギー代謝調節機構に関与している可能性を強く示唆するものである。

3. NMUの食欲・エネルギー代謝調節作用とそのメカニズム

食欲・エネルギー代謝調節作用におけるNMUの役割を探るために、我々はまず、ラット視床下部弓状核でのNMUmRNA量を*in situ* hybridizationによって解析した⁴⁾。その結果、絶食群では自由摂食群に比べNMUmRNA量は約67%に減少していた。またラット脳室内にカニューレ挿入後、暗期直前にNMUを投与する

と暗期摂食量は生理食塩水投与群に比べ減少した。一方、抗NMU IgGを暗期直前に脳室内投与し、内因性のNMUの作用をブロックすると、有意に摂食量が増加した。このことから、NMUは内在性の摂食抑制物質であることが示唆された。

ついで、NMU（1 nmol）を1日2回、5日間、ラット脳室内に投与したところ、有意な摂食量と体重の減少を認めた。更にNMU 1 nmolをラット脳室内に投与し運動量を測定したところ、NMU投与群では生理食塩水投与群の約4倍に増加し、体温は1℃以上の上昇を認め、酸素消費量においてもNMU投与群で著しい増加を認めた。これらの結果により、NMUは摂食抑制作用に加え、エネルギー代謝亢進作用を有することが明らかとなった。

4. NMUノックアウトマウスの表現型

我々はNMUのエネルギー代謝調節機構への

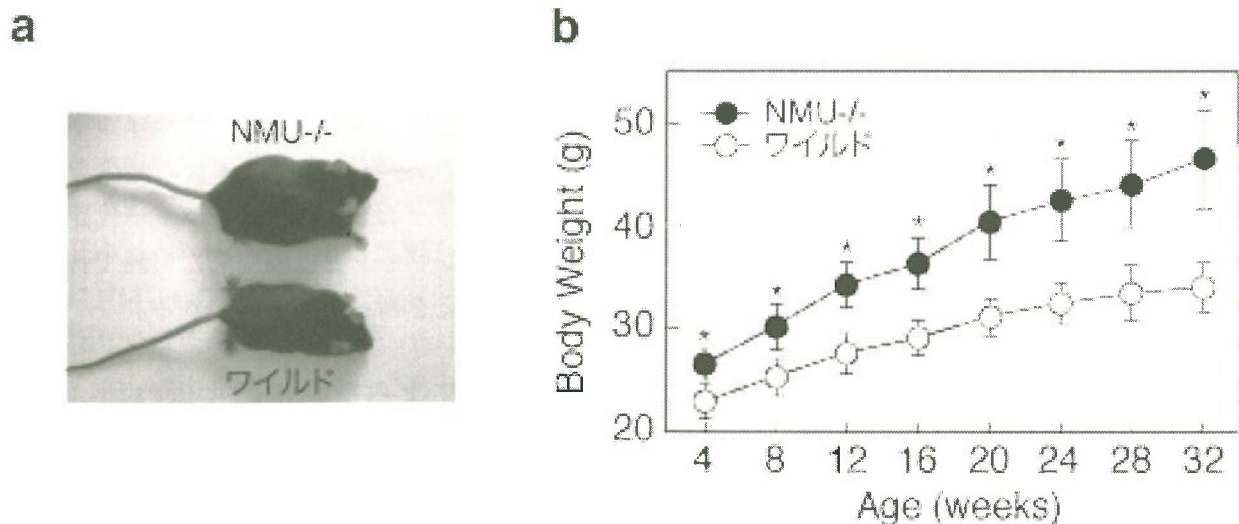


図2 ニューロメジンU欠損マウスとワイルドマウス
(a) 外見, (b) 体重曲線

関与を調べるためにNMU欠損マウス (NMU-KOマウス) を作製し、これが肥満を呈することを見いだした (図2a)⁵⁾。NMU-KOマウスの体重曲線はワイルドマウスと比べ約4週齢から有意な体重の増加を認め、32週齢ではワイルドマウスに比べ約35%の体重増加を認めた (図2b)。NMU-KOマウスのDEXA (dual energy X-ray absorptiometry) 解析では著明に脂肪量が増加しており、組織学的解析では脂肪細胞の増加並びに脂肪肝を認め、血液学的解析では抗インスリン血症、遅発性高血糖、抗レプチン血症、高脂血症を認めた。

通常、生体内においては摂食量とエネルギー消費量のバランスが保たれているが、このバランスが崩れた状態になると肥満症となる。そこで、NMU-KOマウスの肥満の原因をさぐるために、まず、摂食量について解析した。その結果、NMU-KOマウスはワイルドマウスに比べ、明期および暗期での摂食量が増加していた。通常、マウスは覚醒している暗期に摂食量が多く、明期には摂食量が少ないという摂食行動の日内リズムを示すが、NMU-KOマウスでは暗期・明期共に摂食量が多かった。また、摂食量をワイルドマウスとあわせたpair-fed実験を行うと、pair-fedしたNMU-KOマウスにおいてもワイルドマウスに比べ有意に体重が増加していた。これらのデータはNMU-KOマウスの肥満原因は、過食のみではないことを示唆している。

次にNMU-KOマウスとワイルドマウスのエネルギー消費について解析した。NMU-KOマウスではワイルドマウスに比べ運動量・酸素消費量が減少し、体温が低下していた。UCP (uncoupling protein) は交感神経系を介して熱産生やエネルギー消費に関与していることが知られている。そこで、我々は末梢でのエネルギー消費系の指標として褐色脂肪におけるUCP1並びに骨格筋におけるUCP3の遺伝子発現をNMU-KOマウスとワイルドマウスで解析した。NMU-KOマウスにおいて、UCP1 mRNAは約45%に、UCP3 mRNAは約64%に低下していた。更にUCPの機能に関連して、寒冷ストレス

(4℃ 1時間)後の熱産生を調べたところ、ワイルドマウスでは約1時間後には実験前の体温に戻ったが、NMU-KOマウスでは1時間半後まで実験前の体温に戻らず、NMU-KOマウスでは熱産生機構が低下していることが明らかとなった。

以上の結果から、NMU-KOマウスは「過食」と共に「エネルギー消費の減少」により肥満となることが明らかとなった。

5. NMUとレプチンとの関連

多くの摂食関連物質は脂肪細胞由来のレプチンにより制御されていることが知られており、NMU神経細胞とレプチン受容体は共に摂食行動を司る視床下部弓状核に存在していることが知られている。そこで、我々はNMUとレプチンとの相互関連について調べた。まず、ラット脳室内にレプチンを投与し、NMUの遺伝子発現への直接的な作用について検討した。その結果、レプチン投与により、視床下部弓状核でのNMUmRNA量に変化は認められなかった。またレプチン脳室内投与による神経活動の上昇の変化をFos蛋白質の発現で調べたところ、Fos蛋白質陽性細胞はNMU神経細胞とは共存していないことが判明した。加えてレプチン受容体とNMU神経細胞体も共存していないことも判明した。以上から我々はNMUはレプチンの直接的なターゲットではないと判断した。また、NMU-KOとワイルドマウスの腹腔内にレプチンを連続5日間投与したところ、ワイルドマウス、NMU-KOとも同程度の体重の減少を認めた。このデータはNMUがエネルギー代謝調節系においてレプチンとは独立した経路で作用するという考えを指示すると思われる。

6. NMUによるその他の生理作用

NMUの脳内分布を詳細に調べたところ、NMUは視床下部の視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus: SCN) にも存在することがわかった。SCNは生物時計の中心部位として、

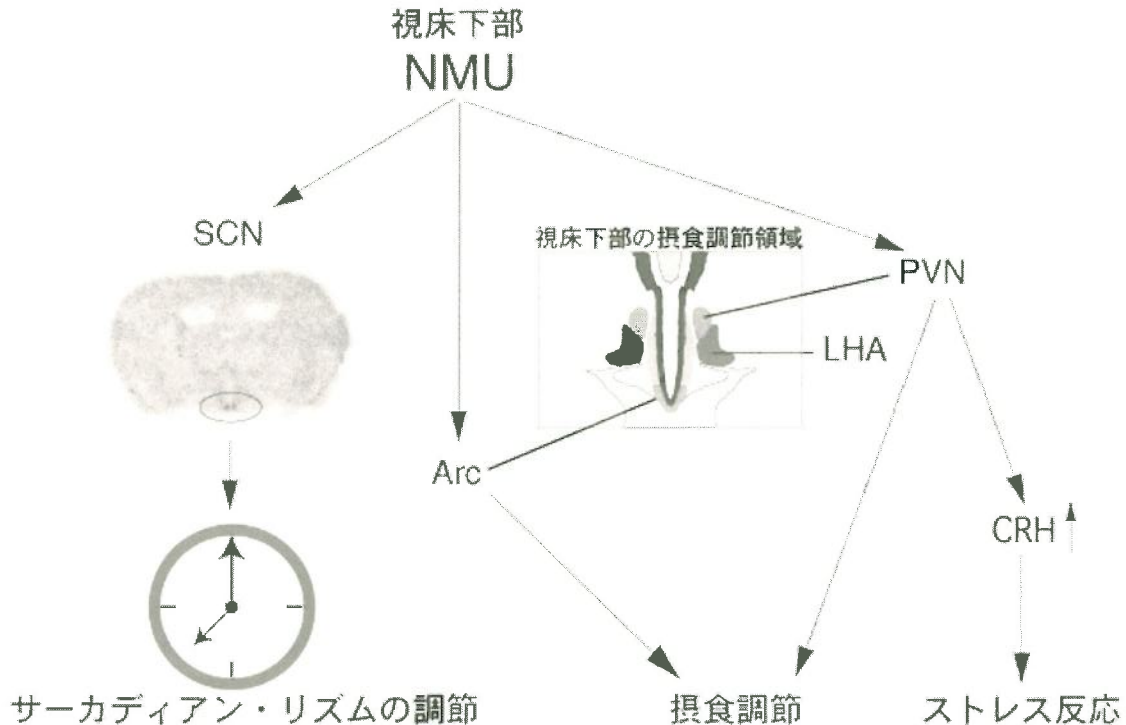


図3 視床下部におけるNMUの役割

SCN (Suprachiasmatic nucleus)：視交叉上核、PVN (Paraventricular nucleus)：室傍核、LHA (Lateral hypothalamic area)：視床下部外側野、Arc (Arcuate nucleus)：弓上核、CRH (Corticotropin-releasing hormone)。

NMUは視床下部に多く存在していて、サーカディアン・リズムの調節や摂食調節作用がある。

生体のサーカディアン・リズムを調節していることがよく知られている。SCNにはNMU受容体も存在しており、さらにNMUの脳室内投与によってSCNでのc-fos発現が亢進することから、NMUによってSCNの神経細胞が活性化されることがわかった。

最近、われわれはNMUの脳室内投与によってラットのサーカディアン・リズムの位相が変位することを見いだした⁶⁾。この位相変位の時間の長さはNMUの投与量に比例し、また主観的昼にNMUを投与した場合に有効で、主観的夜の投与では変化がなかった。光は位相変位を起こす最も強力なファクターであり、主観的夜に照射された光はいくつかの転写因子の発現を誘導する。興味深いことにNMUによる位相変位は、光とはちょうど逆の主観的昼にのみ有効であるにも関わらず、NMUが誘導する転写因子はほぼ同じものであった。このことから、

NMUと光とは、その作用時間が異なっているにも関わらず、共通のメカニズムで位相変位を誘導するのではないかと考えている。生体内リズムは摂食行動と深い関連が示唆されているがその詳細な機序については判明しておらず、NMUの機能解析を通じて、エネルギー代謝調節機構と生体内リズム調節機構との相互作用の解明が期待される(図3)。

7. おわりに

NMUは内因性摂食抑制並びにエネルギー消費亢進作用を有する物質であり、その摂食抑制作用はレプチン経路とは別経路によることが明らかとなった。最近、エネルギー代謝調節機構は他の様々な機能との関連が報告されつつあるが、NMUは前述のようにエネルギー代謝機構のみならず、サーカディアン・リズムの調節や

ストレス行動と関わっており，NMUの機能の解析により脳内の複雑なエネルギー代謝調節機構がより一層解明されることが期待される。

文 献

- 1) Friedman JM. (2003) Science, 299:856-8.
- 2) Minamino N, et al (1985) Biochem Biophys Res Commun 130:1078-85.
- 3) Kojima M, et al (2000) Biochem Biophys Res Commun 276:435-8.
- 4) Nakazato M, et al (2000) Biochem Biophys Res Commun 277:191-4.
- 5) Hanada R, et al (2004) Nat Med 10:1067-73.
- 6) Nakahara K, et al (2004) Biochem Biophys Res Commun 318:156-61.



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 「エピジェネティクス研究の現状と展望」

- 1 哺乳類におけるエピ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ピ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

オブシンク処理への腔内留置型黄体ホルモン製剤の併用は、哺乳類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▶

複合微生物系を用いたトリアジン系除草剤汚染の 原位置バイオレメディエーション

¹筑波大学 生命環境科学研究科,

²農業環境技術研究所 化学環境部 有機化学物質研究グループ

岩 崎 昭 夫¹ ・ 高 木 和 広²

土壌よりトリアジン系除草剤分解新規細菌を含む複合微生物系を単離し、木質炭化素材に集積させてシマジン汚染除去を目的とした長期野外試験（原位置バイオレメディエーション）を実施した。浄化現場土壌中に敷設された微生物集積木質炭化素材は約2年間分解活性を維持し、遺伝子的な解析により複合微生物系の構成も変わっていないことが確認された。本手法は長期間安定なバイオレメディエーション法として種々の応用が期待される。

1. はじめに

近年、土壌残留性の高い農薬については使用禁止策により汚染のリスクが減少したものの、半減期が数ヶ月程度と比較的長い農薬の一部は依然として継続使用されている。これらの農薬は適用現場のみならず、周辺の河川湖沼に流出・残留して自然環境を汚染し、その農薬としての主作用、副作用により生態系に対して少なからぬ影響を与えていると懸念される。環境汚染物質のリスク低減には様々な技法が研究・開発されているが、農薬汚染のような低レベルで且つ継続的に生じる汚染の除去には微生物の分解能を利用するバイオレメディエーションが有効である。

Takagiら⁵⁾は木炭（本研究用に特別に開発されたものであり、本稿では以後、木質炭化素材と称する）を微生物のマイクロハビタットとして農薬分解微生物を集積し、これを利用したバイオレメディエーション法の開発を試みてきた。これまで除草剤シマジン、アトラジン、シメトリン、メフェナセット、殺菌剤キントゼン(PCNB)、ペンタクロロフェノール(PCP)、ヘキサクロロベンゼン(HCB)の分解細菌群を木質炭化素材に集積することに成功している。本稿では、その構成細菌と役割がほぼ解明

IWASAKI Akio¹, TAKAGI Kazuhiro²

¹〒305-8572 茨城県つくば市天王台1-1-1,

²〒305-8604 茨城県つくば市観音台3-1-3

されているシマジン分解細菌群CD7と、これを集積した木質炭化素材を用いた約2年間にわたる長期野外試験の結果を紹介する。

2. シマジン分解複合微生物系

シマジンは側鎖に塩素と2つのN-エチル基をもつトリアジン系除草剤（図1）であり、比較的長い半減期（70日～110日）を示し、光合成系阻害作用と環境ホルモン様作用¹⁾により環境中の動植物への影響が懸念されている。Takagiら⁵⁾は、木質炭化素材をシマジン連用土壌に5%混和し、シマジン5 ppmを含む無機塩培地を還流することにより3週間でシマジン分解細菌群を集積することに成功した。本細菌群をCD7と名付け（以後、複合微生物系CD7あるいは単にCD7と称する）、その構成微生物をシマジン5 ppm含有0.1%トリプトン寒天平板上で分離した。コロニー形状の異なる3種の細菌が得られ、それぞれCD7w株、CSB株、SDB21株（これまでの報告ではCDBあるいはCDB21と称していたが、本稿では特許申請に伴い名称を変更した）と名付けた。16S rRNA遺伝子配列解析により、CD7w株は*Arthrobacter* sp., CSB株は*Bradyrhizobium japonicum*と同定されたが、SDB21株の16S rRNA配列に該当する既知細菌種は存在せず、系統樹解析の結果、*β-Proteobacteria*に属する新属新種の細菌であることが判明した²⁾。

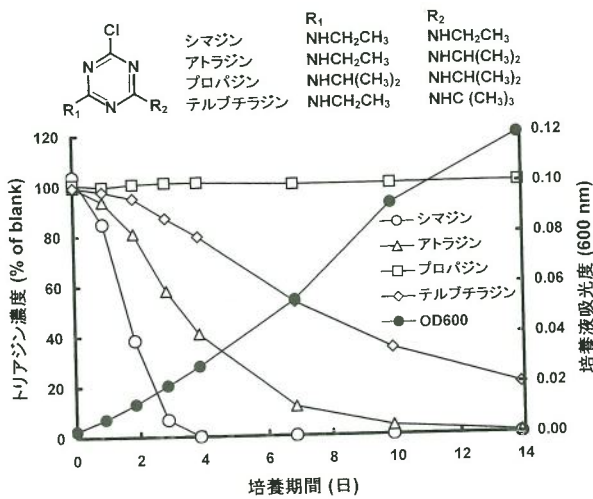


図1 SDB21株によるトリアジン系除草剤の分解

シマジン分解活性はSDB21株にのみ認められ、0.1%トリプトン培地中でシマジンを分解するとともに塩素イオンを放出した。シマジン分解酵素遺伝子の探索を行ったところ、SDB21株は除草剤アトラジン分解細菌*Pseudomonas* sp. strain ADP (ADP株)の持つアトラジン分解酵素遺伝子群 $atzABCDEF$ ⁴⁾を全て保持していることが明らかとなった。両細菌遺伝子の塩基配列を比較したところ、 $atzCDEF$ は全く同一であったが、 $atzA$ と $atzB$ はアミノ酸レベルでそれぞれ2残基と7残基の相違が認められた。これらの酵素群によりSDB21株はシマジンを炭酸ガスとアンモニアに無機化でき、複合微生物系CD7では¹⁴Cでトリアジン環をラベルしたシマジンを用いて無機化が確認されている⁸⁾。SDB21株はシマジン以外にも塩素を持つトリアジン系除草剤アトラジンとテルブチラジンを分解したが、その分解速度はシマジンより遅く、さらに側鎖にN-エチル基を持たないプロバジンを分解しなかった(図1)。このトリアジン分解特異性はCD7でも同様であった。

SDB21株は分解酵素遺伝子群を持つにもかかわらず、シマジン分解代謝物を炭素源として利用できず、複合微生物系CD7と異なり無機塩培地中では生育できない。CD7を構成する3菌

株を種々組み合わせて培養したところ、SDB21株とCSB株の2菌株のみでも無機塩培地中で生育し、シマジンを分解した。これまでの検討ではSDB21株は生育にピルビン酸と微量のビタミンB₁₂を要求する。恐らく、シマジン分解中間代謝物をCSB株が利用し、ビタミンと有機酸を生産してSDB21株に与え、複合微生物系を構成しているものと思われる。CD7w株の役割は現在のところ不明である。

3. CD7を用いたシマジン汚染現場の原位置バイオレメディエーション

トリアジン系除草剤を分解する細菌は数多く報告されているが、温度・水分の変化、環境中の微生物との競合等、野外では細菌の生育条件が季節的、あるいは突発的に大きく変動し、単に分解菌を試験場に散布しただけでは長期のバイオレメディエーションは成功しない。本研究において用いた木質炭化素材は種々の農薬分解細菌群の集積結果からも明らかなように、適度な有機化合物吸着能力を持ち、微生物との親和性に優れている上に、マイクロハビタットとして至適な5~20 μ mの直径を持つ細孔に富んでいる(累積細孔容積の10%以上を占める)。電子顕微鏡観察によるとCD7はマイクロコロニーとしてこの細孔に棲みついでおり、適度な細孔径は環境中の微生物の侵入からCD7を守ってくれるものと期待される。また、木質炭化素材は環境に対する負荷も殆どなく、野外での応用に適した素材である。

以上の考察の下に、ゴルフ場の一角で2000年10月から約2年間木質炭化素材を用いたシマジン分解除去野外実証試験を実施した^{6), 7)}。2 \times 3mのフェアウエーより芝生と表層土を取り除き、深さ15cmの下層土に複合微生物系CD7(分解菌 7.5×10^7 cfu/g乾物を含む)を集積させた木質炭化素材60kgを1cmの厚さで敷き詰めた。再度表層土と芝生で木質炭化素材層を覆い、これを処理区とした。1mの緩衝帯を隔ててCD7未集積の木質炭化素材を同様に敷き

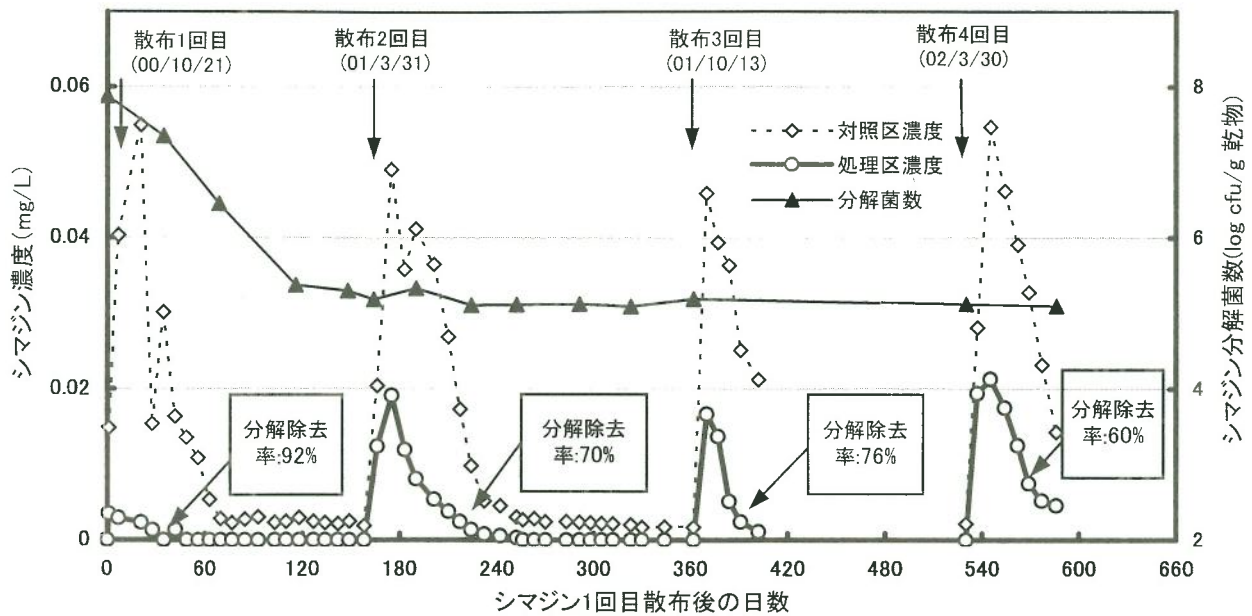


図2 複合微生物系CD7を用いたシマジン分解野外実証試験結果

対象区および処理区浸透水中のシマジン濃度の比較と処理区木質炭化素材中の分解菌数の経時変化を示した。

詰め、これを対照区とした。その後、秋春2回/年のシマジン散布(25g/a)を実施し、浸透水中のシマジン濃度、木質炭化素材層の地温・水分のモニタリングを行った。木質炭化素材層からは定期的にサンプルを採取してシマジン分解菌数を測定し、DNA解析用に凍結保存を行った。図2に示すように木質炭化素材中のシマジン分解菌数は急速に低下し、ほぼ100日後には 10^5 cfu/g乾物レベルに達するが、その後はこのレベルを維持しつづけ、約2年後の試験終了時まで変化は見られなかった。また、浸透水中のシマジン分解除去率も第1回散布後に92%であったものが第2回目には70%に低下したものの、その後、第4回目に至っても60%が維持されていた。しかし、この分解活性が当初集積させたCD7によるものか、土壌中の分解菌と交代した結果であるのか不明であったので凍結保存サンプルからDNAを抽出し、遺伝子レベルの解析を試みた³⁾。PCR/DGGE法による解析結果は処理区においてCD7を構成する細菌群がその構成比を殆ど変えることなく約2年間生存していることを示した(図3A)。さらに、

対照区においてSDB21株およびCSB株と同一の易動性を示すDNAバンドが認められたのでSDB21株特異的PCRにより評価を行った。図3Bに示したように、対照区には特異的PCR産物が認められないのに対し、処理区では全てのサンプルにSDB21株の存在を示す増幅バンドが存在した。以上の結果は、野外においても分解酵素遺伝子をもった微生物複合系が、2年以上の長期にわたって木質炭化素材中に維持され得ることを示している。

4. 今後の展開

土壌中の微生物は様々な難分解性の物質を利用して生存することを余儀なくされており、自ら生産できない栄養素は他の微生物に依存しなければならない。微生物を単離して、このような相互依存関係を断ち切りバイオレメディエーションを実施しても長期間安定な結果は期待できない。本稿に示した結果は、分解菌を単独で使用せず、適切な微生物複合系としてマイクロハビタットと組み合わせることにより野外で長期

間安定なバイオレメディエーションが可能であることを示したものである。現在、研究中の種々の農薬分解菌を組み合わせ、広範囲な農薬を分解可能な複合微生物系の構築を試みている。また、木質炭化素材は有機汚染物質の吸着剤及びマイクロハビタットとしての優れた性能を有している。しかし、汚染が表層土だけでなく下層土や地下水層・地下水にまで及んでいる場合は、今回のような敷設方法では対応できない。汚染現場への分解菌集積炭化素材の敷設方法には改良の余地があり、より簡便かつ経済的な施工方法及び炭化素材の形状を現在検討中である。

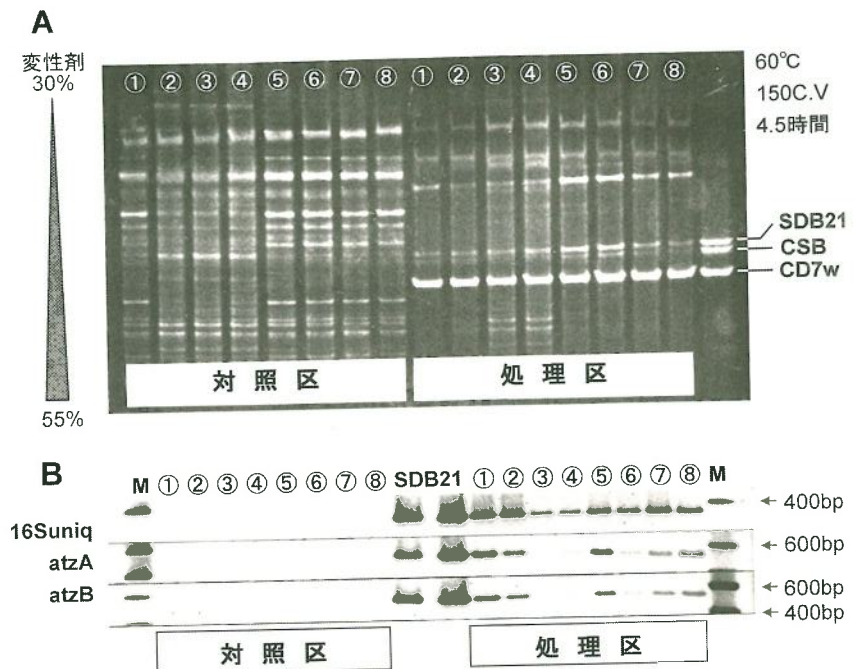


図3 野外実証試験における木質炭化素材中のシマジン分解菌のモニタリング
 サンプル月日：①2000年11月22日，②2000年12月26日，③2001年2月11日，④2001年3月31日，⑤2001年5月2日，⑥2001年10月13日，⑦2002年3月31日，⑧2002年5月25日。
 A. PCR/DGGEによるモニタリング。B. SDB21株特異的PCRによるモニタリング。16Suniq；SDB21株16S rRNA特異的PCR，atzA；既知atzA遺伝子用PCR，atzB；SDB21株atzB遺伝子特異的PCR。

文 献

- 1) Hayes, T. B. et al. (2002), Proceedings of the National Academy of Science, 99(8), 5476-5480
- 2) Iwasaki, A. et al. (2003), Proceedings of the Third International Conference on Contaminants in the Soil Environment in the Australasia-Pacific Region. Beijing, 43
- 3) Iwasaki, A. et al. (2004), Proceedings of the 2nd International Conference on Soil Pollution and Remediation, Nanjing, 235-236
- 4) Martinez, B. et al. (2001), *J. Bacteriol.*, 183, 5684-5697
- 5) Takagi, K. et al. (2000), Abstracts and Final Program of the 3rd International Symposium on Environmental Aspects of Pesticide Microbiology, Leverkusen, 69-70
- 6) Takagi, K. et al. (2002), 10th IUPAC International Congress on the Chemistry of Crop Protection, Book of Abstracts Vol.2, 56
- 7) 高木ら(2003), 植物防疫, 57(9), 24-28
- 8) 高木ら(2004), 農業技術, 59(10), 449-453

◀国内情報▶

レトロトランスポゾンの挿入部位に基づく
マツタケの個体識別法¹独立行政法人 森林総合研究所・²信州大学農学部 応用生命科学村田 仁¹・馬場崎 勝彦¹・山田 明義²

レトロトランスポゾンの挿入部位を遺伝子マーカーに用いることで、個々のマツタケ菌株を識別することが可能になった。この技術は、人工栽培法の開発に適した菌株の選抜、共生する樹木との相性や菌株ごとに適したマツタケの生育環境の解明、さらにはマツタケ山の再生・保全などに役立つ。個体識別が可能になったことで、多様性に目を向けたマツタケの人工栽培技術の開発が可能になった。

1. はじめに

マツタケの国内生産量は、1940年代を境に激減の一途をたどり、2002年の年間生産量はついに52t、つまり1941年に記録した12,000tのわずか0.4%に達してしまった。

マツタケは、マツタケ菌糸が樹木（日本では主にマツ科植物）の根の細胞間隙に宿り、「菌根」と呼ばれる植物—菌糸の共生体を作って生きている。この樹木—マツタケ菌根が、宿主植物の根圏でマツタケ気中菌糸と共に発達し塊状になった集落「シロ」を作る。このシロの成長過程で子実体（きのこ）が発生するが、その人工栽培法は未だ開発できていない。その要因の一つとして、これまでマツタケの個体識別方法が確立されていなかったため、個々のマツタケ菌株の特性が把握できなかったことがあげられる。つまり、どのマツタケも同じ個体として扱われ、菌株間の違いについてはいわば闇雲に人工栽培技術の開発が行われていた。通常、農作物では、遺伝資源の収集、個々の遺伝資源の特性解明、栽培化に適した優良系統の選抜、育種という流れを経て栽培が可能な品種を作製する。個体識別が出来ることにより、今まで一括りにされていたマツタケ遺伝資源の中から栽培

MURATA Hitoshi¹, BABASAKI Katsuhiko¹,YAMADA Akiyoshi²¹〒305-8687 茨城県つくば市松の里1²〒399-4598 長野県上伊那郡南箕輪村8304

化に向けた菌株を見つけだし、系統として押さえることが可能になる。

レトロトランスポゾンはどの真核生物の染色体にも存在するDNA因子であるが、生物種の間で異なるレトロトランスポゾンが存在する。特定の生物種の染色体進化に深く関わったレトロトランスポゾンは、非常に多くのレトロトランスポゾンのコピーを染色体上に残す。つまり、レトロトランスポゾンは、種特異的な遺伝子マーカーである。と同時に、同一生物種でも、個体間で生育環境の違いなどから異なる染色体進化がおこるため、レトロトランスポゾンに連鎖する染色体領域が異なってくる。つまり、レトロトランスポゾンは個体識別にも有効な遺伝子マーカーである。

今回、我々は、マツタケの*marY*と名付けたレトロトランスポゾンの個体識別用遺伝子マーカーとしての有用性に着目した。*marY*は、マツタケの染色体上に特異的に数多く存在する。このレトロトランスポゾンに連鎖する染色体領域を調べることによって、マツタケ菌での個体識別に成功した (Murata et al. in press; 電子版2004.9)。

2. PCR用のプライマー設計

マツタケのレトロトランスポゾン*marY1*は末端反復配列やコート蛋白質、蛋白質分解酵素、逆転写酵素-Rnase H-インテグラーゼなどの翻

訳領域を有するレトロウイルスに酷似した6-kb程度のトランスポソンである(図1)。なお、*marY1*の末端反復配列は単独でも存在することから独立したDNA因子として σ_{marY1} と命名した。*marY1*には、*marY1-v*のような派生型がマツタケ染色体上に存在する(図1)。今回、2つの*marY1*の末端反復配列 σ_{marY1} に挟まれた染色体領域をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法で増幅し、増幅したDNA断片を電気泳動で多型解析する方法を模索した(図2)。

σ_{marY1} の塩基配列より、

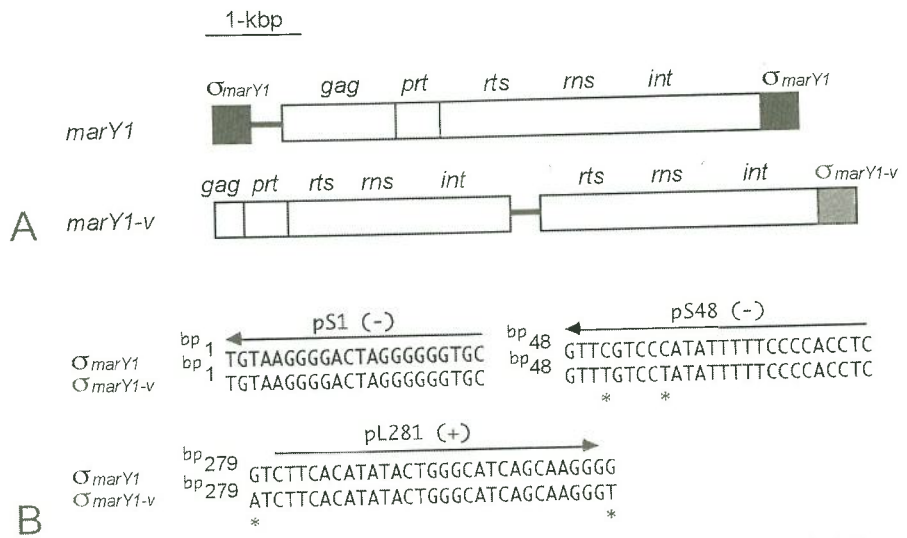


図1 マツタケのレトロトランスポソン*marY1*及び*marY1-v*(A)と設計したプライマーの模式図(B)

(A) ■末端反復配列, □翻訳領域。(B) プライマーに利用したプラス鎖塩基配列のアラインメント解析。アスタリスクは変異部位を示す。プラスとマイナスは、プライマーに用いた塩基配列の由来、つまりプラス鎖とマイナス鎖を示す。

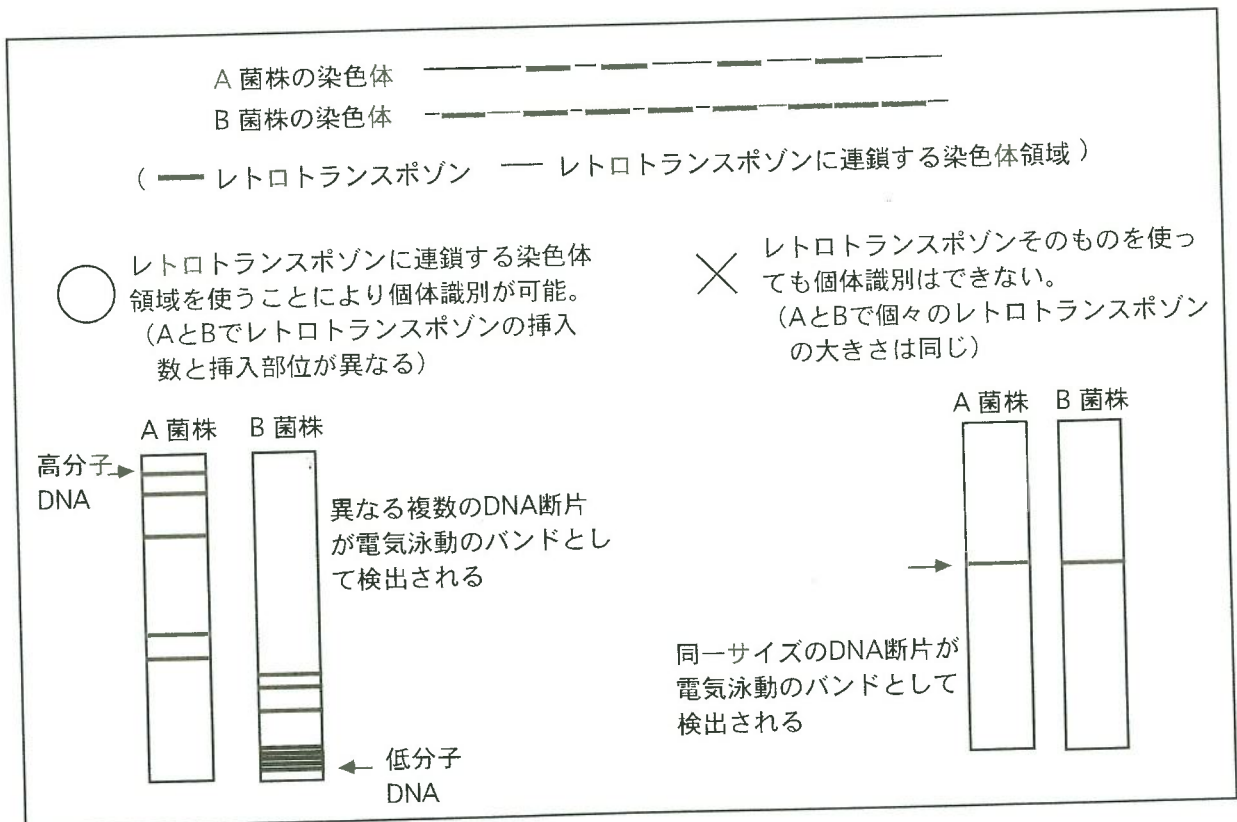


図2 レトロトランスポソンを使った個体識別法の概念図

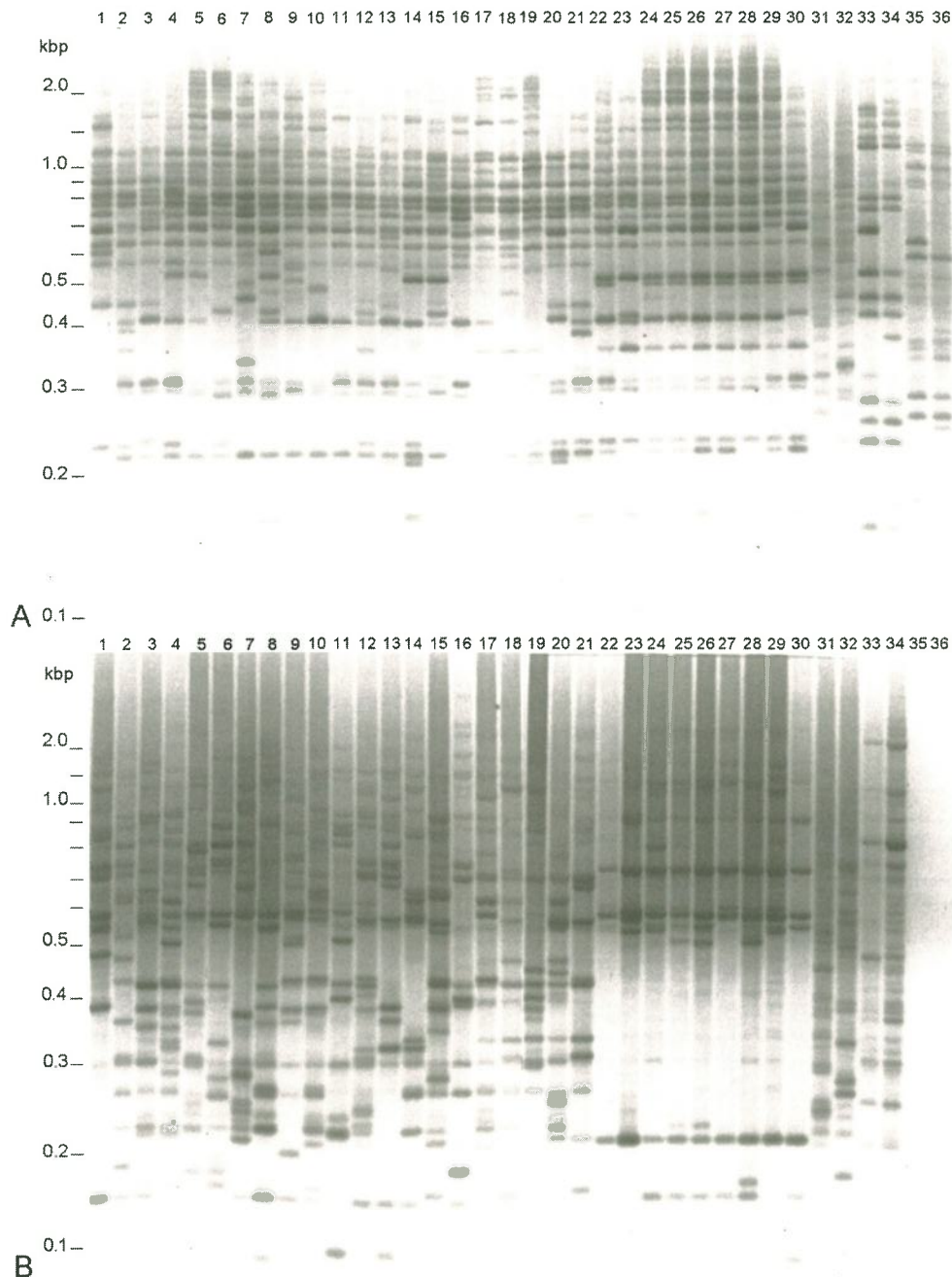


図3 プライマーpS1(A)とpS48/pL281(B)を使ったマツタケとアメリカマツタケの多型解析例 PCR後の電気泳動結果を示す。レーン1~34はマツタケ菌株。レーン35~36はアメリカマツタケ菌株。個々の菌株は以下の通り：1, TM-15 (岩手, アカマツ); 2, IW92602 (岩手, アカマツ); 3, Y1 (茨城, アカマツ); 4, Y4 (茨城, アカマツ); 5, Tm-029 (滋賀, アカマツ); 6, Tm-040 (滋賀, アカマツ); 7, Tm-8 (京都, アカマツ); 8, MR32 (兵庫, アカマツ); 9, OK-T4 (岡山, アカマツ); 10, OK-T5 (岡山, アカマツ); 11, Tm-H001 (広島, アカマツ); 12, Tm-H102 (広島, アカマツ); 13, Tm-Y59AFB (山口, アカマツ); 14, Tm-A59A (山口, アカマツ); 15, Tm-T4 (徳島, アカマツ); 16, K1 (韓国); 17, Tm-K2 (韓国); 18, K3 (韓国); 19, K4 (韓国); 20, Tm-31 (韓国); 21, NK1 (北朝鮮); 22, CHI1 (中国); 23, Tm-9 (中国); 24, CH381 (中国); 25, CH382 (中国); 26, CH383 (中国); 27, CH384 (中国); 28, CH385 (中国); 29, CH387 (中国); 30, BH1 (ブータン); 31, MC1 (モロッコ); 32, TM-5 (モロッコ); 33, MX1 (メキシコ); 34, TM-4 (メキシコ); 35, Tp-C3 (カナダ); 36, TM-10 (カナダ)。

PCRのためのプライマーを2組設計した。これらのプライマーは σ_{marY1} の外方向へ増幅できるように設計されている。一つは、pS1と名付けたプライマーで σ_{marY1} の5'-末端に位置し、 σ_{marY1} 及びその派生型（例えば $\sigma_{marY1-v}$ ）で保存が見られる（図1）。もう一組のpS48/pL281は σ_{marY1} の内部に位置し、 $\sigma_{marY1-v}$ などの派生型で変異が見られる（図1）。それぞれのプライマーの配列は以下の通り：

pS1 = GCACCCCCCTAGTCCCCTTACA
 ($T_m = 64.2$),
 pS48 = GAGGTGGGGAAAAATATGGGACGAAC
 ($T_m = 62.1$),
 pL281 = CTTACATATACTGGGCATCAGCAAGGG
 ($T_m = 63.4$).

3. マツタケの個体識別

多数のマツタケ菌株、及び近縁種であるアメリカマツタケ、バカマツタケ、ニセマツタケ、マツタケモドキなどのDNAサンプルを使って、今回設計したプライマーの有効性を解析した。PCRの反応液の組成は以下の通り：250 μ M dNTP, 0.5 μ Mプライマー, 30ngサンプルDNA, 0.5U Taqポリメラーゼ (Gene Taq NT, ニッポンジーン株式会社), および添付のユニバーサル緩衝液。遺伝子増幅装置 (GeneAmp9700, Applied Biosystems) での反応サイクルは以下の通り：1 \times 94 $^{\circ}$ C / 2 min, 25 \times (94 $^{\circ}$ C / 30sec, アニーリング温度 / 30sec, 72 $^{\circ}$ C / 5 min), 1 \times 72 $^{\circ}$ C / 10min。プライマーpS1のアニーリング温

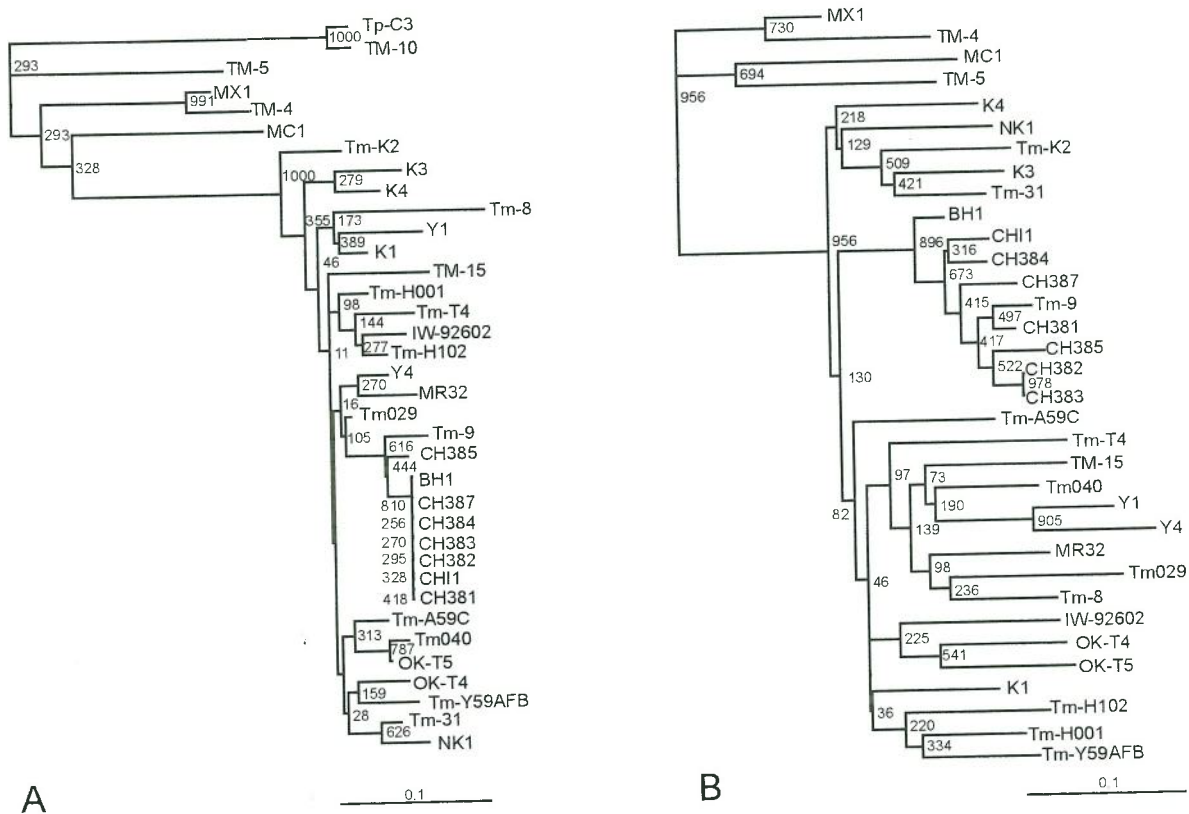


図4 プライマーpS1(A)とpS48/pL281(B)に基づくマツタケ及びアメリカマツタケ菌株の系統解析結果

(A) pS1系に基づく結果。(B) pS48/pL281に基づく結果。菌株は図3を参照のこと。

度は68℃，pS48/pL281は62℃。

PCR後のアガロース電気泳動解析の結果，pS1系ではマツタケ及びアメリカマツタケでDNA断片の増幅が見られ，pS48/pL281系ではマツタケのみで増幅が確認された。バカマツタケ，ニセマツタケ，マツタケモドキなどの近縁種では増幅は見られなかった（図3）。そして，pS1系では，マツタケ及びアメリカマツタケの36菌株間で70種類の信頼できるバンドが，pS48/pL281系ではマツタケ34菌株間で90種類のバンドが認められた（図3）。pS1を例にとると，2つの異なる個体を誤って同一と認識する確率は 9×10^{21} 分の1以下となり（ $=2^{70}$ 分の1；バンドの有無の2通りの可能性が70通り以上あることからこの計算が成り立つ），今回開発した系は個体識別をする上で非常に信頼性が高い。そして，マツタケが遺伝的に多様な生物種であることが明らかになってきた（図4）。また，この手法は，わずかなDNAサンプルがあれば検定可能であり種々の微生物や植物が混在する野外で採集した「シロ」のサンプルなど

でも検定が可能である。

4. 今後の展望

マツタケの個体識別ができることによって，その人工栽培法の開発に適した菌株の選抜が可能になるとともに，共生関係にあるマツとの相性，菌株ごとに適したマツタケの生育環境などを明らかにすることができるようになった。つまり，マツタケの多様性に目を向けた，新たな人工栽培技術の開発の可能性が開けたと考えられる。また，人工栽培法の開発試験ではマツタケ菌糸をマツに接種するが，できたシロが人工接種した菌株なのかを判定することも可能になったことで，マツタケ人工栽培法の開発が一步前進したといえる。

文 献

- 1) Murata, H. et al. *Mycorrhiza* (in press ; 電子版2004.9)



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読……………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パーオキシドを介する

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▶

魚群中の魚の体長、密度などを精確に
計測するための新技術の開発

独立行政法人 水産総合研究センター 水産工学研究所

¹水産情報工学部 資源情報工学研究室, ²漁業生産工学部 機械化研究室,³水産情報工学部 上席研究官澤田 浩一¹・高橋 秀行²・高尾 芳三¹・安部 幸樹¹・渡辺 一俊³

魚種の確認、自然状態でのターゲットストレングス・魚体長・姿勢などの複数情報を精密に計測するために、小型計量魚群探知機および高感度の水中TVカメラ2台をカプセル型の中空耐圧容器に搭載した魚群観測システムの開発を行った。本システムは、調査船から垂下し、魚群に近接させて使用する。海上試験の結果、サンマ、カタクチイワシ、イカなど複数の魚種の計測に成功した。

1. はじめに

再生産が可能である水産資源を将来にわたり持続的に利用するためには、過剰な漁獲を避け、現存量を推定することが必要である。

広域にわたる水産資源調査には、計量魚群探知機（計量魚探機）を用いた音響手法が有効であり、特に、スケトウダラ、ニシン、タラ類などの調査では世界的にも広く利用されている。計量魚探機は、短い音波（超音波パルス）を発生し、魚群などから返ってくるエコーの到達時間と大きさ（エコーレベル）を測定する。魚群からは大きさに応じたレベルのエコーが返ってくるので、そのレベルを測定すれば、魚量がわかる¹⁾。つまり、エコーレベルの測定により、魚群の体積あたりの音響散乱強度（体積散乱強度）がわかる。体積散乱強度は、魚の分布密度と一尾あたりの反射強度（ターゲットストレングス、TS）の積に等しい。そこで、体積散乱強度をTSで割ることにより、魚の分布密度が推定できる。また、TSは体長の2乗にほぼ比例することから、その比例係数がわかっているならば、逆にTSから体長推定が可能である。

SAWADA Kouichi, TAKAHASHI Hideyuki,

TAKAO Yoshimi, ABE Koki,

WATANABE Kazutoshi

〒314-0421 茨城県鹿島郡波崎町海老台

このように、音響手法による資源量推定において、重要なパラメータであるTSは、魚の姿勢、体長、魚の生理状態、魚種により大きく変動することが知られている。より精度の高い資源量推定のためには、TSとともに、魚種、魚

表 J-QUEST諸元

J-QUEST 本体

大きさ（長さ×直径） 1.07m×0.53m

重量 約 350kg

実用最大深度 250m

小型計量魚探機

周波数 70kHz

方式 スプリットビーム

ビーム幅 11.8°

パルス幅 0.6/1.2/2.4ms 選択

ステレオTVカメラ

撮像管 白黒ハープ管

最低照度レベル 0.015Lux

レンズ焦点距離 11mm/23mm

視野 43° /15°

センサ類

水温、深度、

姿勢（ロール、ピッチ）

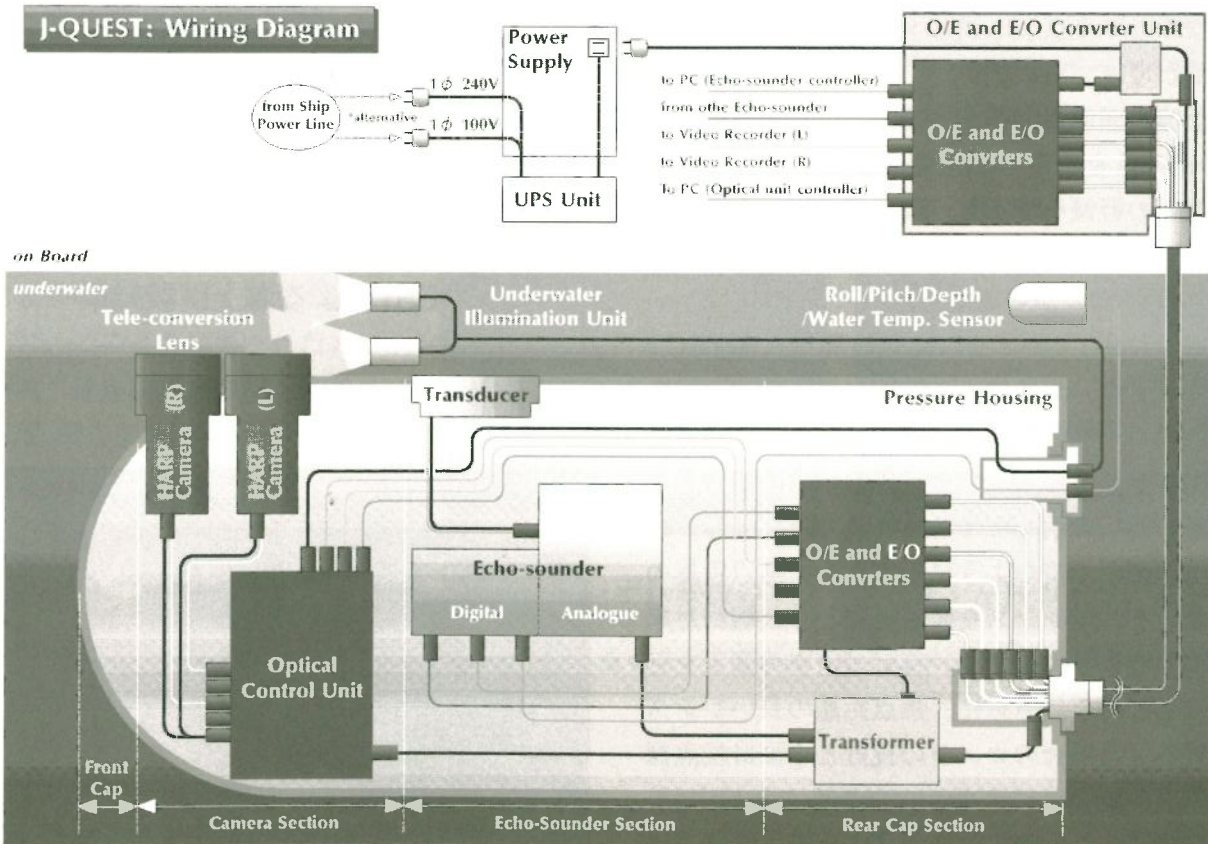
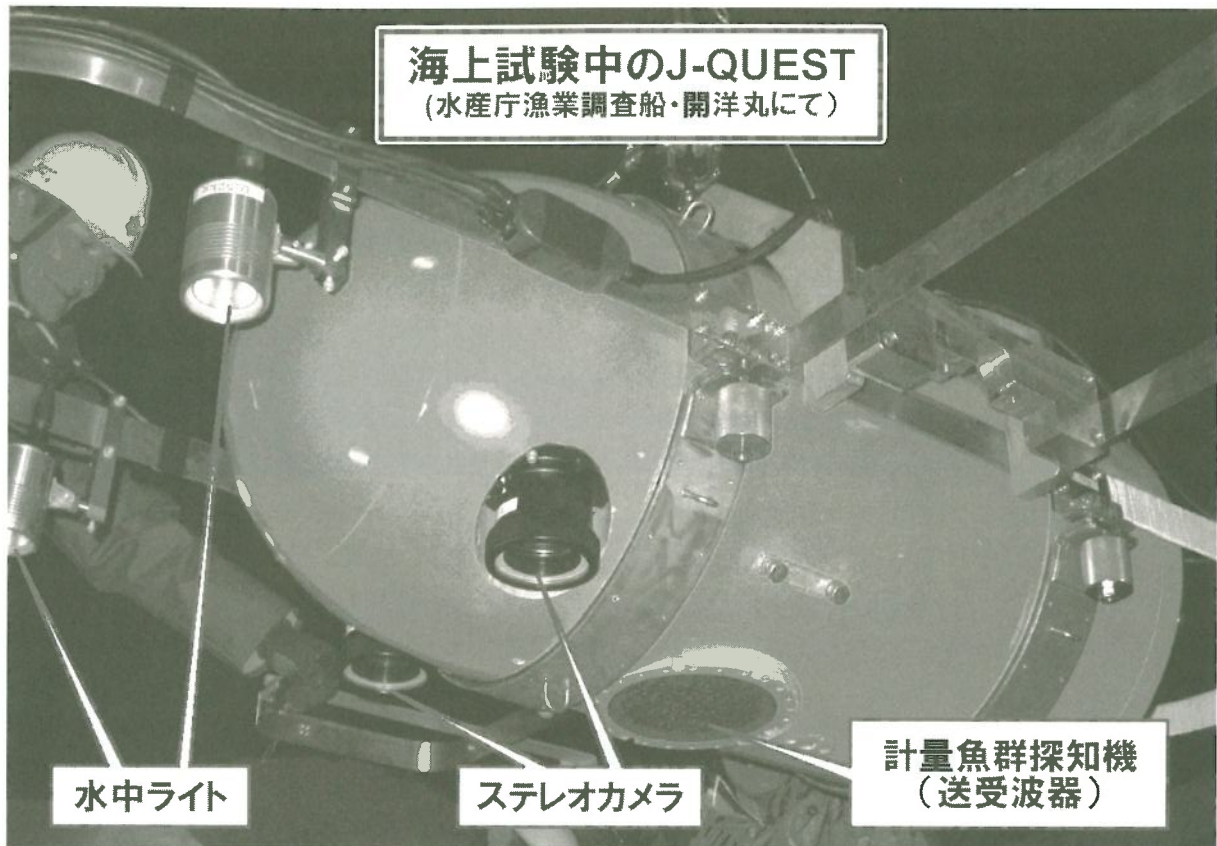


図1 J-QUEST本体（上）と内部配線図（下）

体長、魚の姿勢などを知ることが必要となる。

しかし、密度の濃い魚群や深いところにいる魚群のTS測定に関しては、個々の魚の分解能や信号対雑音比の問題から大きな測定誤差が生じることがわかっている²⁾。そこで、我々は、高い信号対雑音比かつ、高分解能な測定を可能にするために、魚群に近づけて、TS、魚体長、姿勢分布、行動などの精確な測定を行う能力を持つ魚群観測システムの開発を進めている。このシステムは、ほとんど国産技術を用いて開発され、計量魚探機とステレオTVカメラを使用することからJapan QUantitative Echo sounder and Stereo Tv-camera system (J-QUEST) と名付けられている^{3), 4)}。

本稿では、開発したJ-QUESTの概要ならびに調査結果の一部について述べる。

2. J-QUESTの概要と運用方法

表にJ-QUESTの諸元を示す。大きさは1 m程度で、空中重量が約350kgであり、クレーンとウインチを装備した中型の調査船であれば、運用が可能である。

小型計量魚探機は、対象を体長数cmから数十cmの魚を想定し、送受波器の小型化と、測定誤差の軽減を考慮し、周波数70kHzを採用した。また、スプリットビーム方式により、精確に魚のTS測定が可能である。

ステレオTVカメラには、通常の高感度CCDでは見えない光環境でも鮮明に見える超高感度の白黒ハープ管を採用し、できるだけ魚の行動に影響を与えることなく、魚の行動の観察を可能とした。照明レベルも16段階で可変とし、最小限の照明で済むようにしてある。焦点距離の異なる2つのレンズを装着可能とし、観察対象生物の大きさに応じて、視野や倍率の変更を可能にしてある。さらに、焦点距離の長いレンズを装着した場合のカメラの視野と小型計量魚探機のビーム幅をできるだけ揃えることにより、映像で見た魚のエコーが得られるよう工夫がしてある。

図1に、J-QUESTの外観写真および内部配線図を示す。内部配線図からわかるように、J-QUESTは、水中部と陸上部、および、その両者をつなぐ光電力複合ケーブル(300m)から成り立っている。水中部は、300m相当の耐圧を持つ中空容器とその中に格納された3つのセクションからなる。図中で向かって左から、2台の超高感度ステレオTVカメラで構成されるカメラセクション、70kHzのスプリットビーム方式の小型計量魚探機からなる計量魚探機セクション、電源および電気信号を光信号に変換する光/電気、電気/光変換器からなる後方キャップセクションからなる。陸上部は、電源供給部と光/電気、電気/光変換器により構成され、モニター上でTV映像を、PC上でエコーグラムをリアルタイムで観察できる。そして、これらの映像信号や音響データはすべて収録可能である。

音響資源調査中に大きな魚群の反応が現れた場合、停船し、J-QUESTをその魚群の近くに降ろす(図2)。J-QUESTにより、魚群からのエコーやステレオ映像画像を収録し、TS、魚種、魚体長等の情報を得る。対象とした魚群の深度は、調査船装備の計量魚探機でもモニターできるため、J-QUESTの深度を随時変更し、魚群からの連続的な情報を得ることができる。

3. J-QUESTによる海上試験結果^{5), 6)}

2003年12月19日に、水産庁漁業調査船「開洋

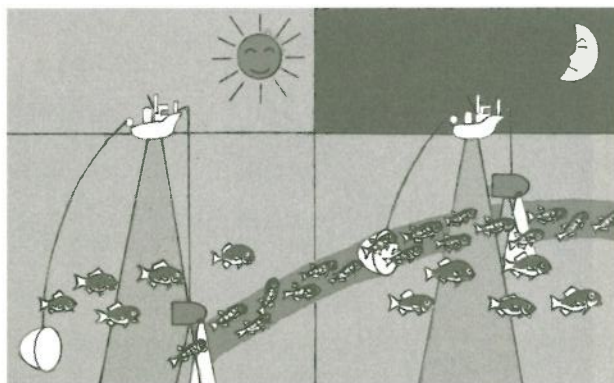


図2 J-QUESTの運用図

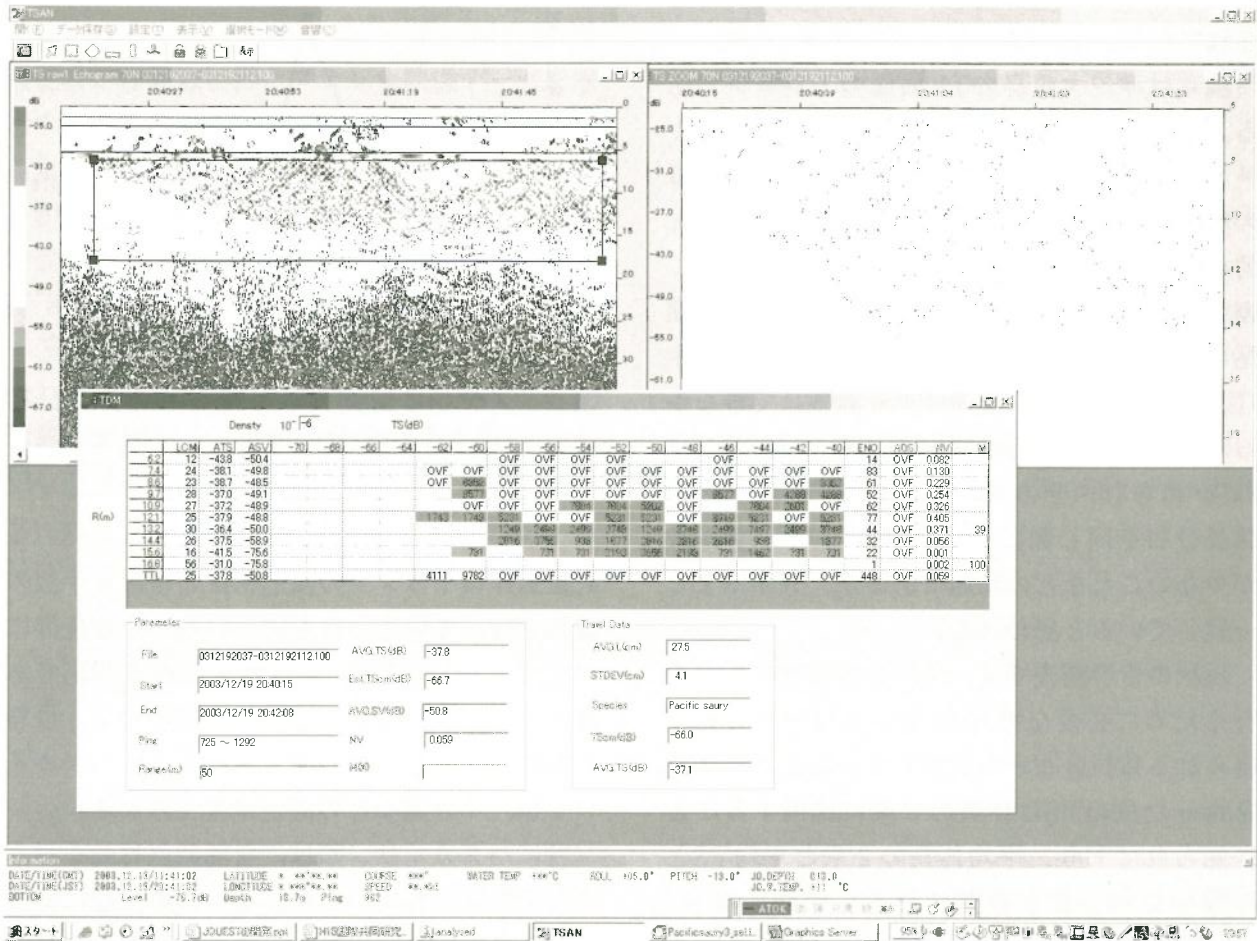


図3 J-QUESTで得られたエコーグラム（左上），エコーグラムから検出した単体エコー（右上），TS解析結果（下）

丸」を用いた調査中に、サンマ魚群に遭遇した。図3の左上に、このときに得られたエコーグラムを示す。縦方向は深度、横方向は時間軸を示し、右側の方が最新のエコーデータである。このエコーグラム中で選択した解析範囲が矩形の枠で示されている。図3の右上は、左上のエコーグラム中から、一尾の魚から返ってきたエコー（単体エコー）を抽出した結果を示す。この単体エコーのエコーレベルからTSの計算が可能になる。図3の下

側に解析範囲についての一次的な解析結果が示

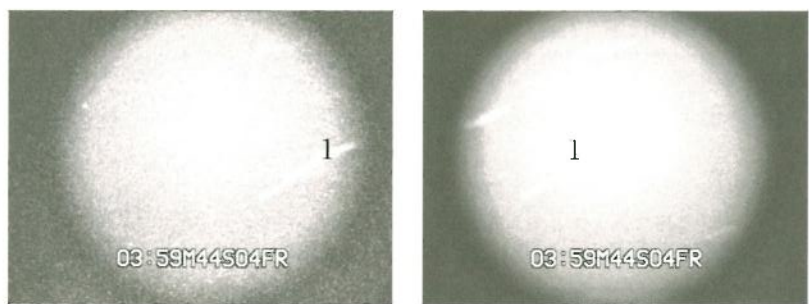


図4 ステレオTv映像の1シーン（左：左Tvカメラ，右：右Tvカメラ）
番号1は同じ魚を示す。図中の下側の文字はフレーム番号を示す。

されている。解析結果のグラフは、縦軸を深度に、横軸を2dBステップのTSとし、深度、TS毎の魚の密度という形式（TSマトリックス）

で表示されている。また，平均TSやTS測定精度の指標などがTSマトリックスの下側に表示されている。

図4はサンマ魚群のTV画像の1シーンである。図中の番号1で示した同じ魚を右と左のカメラで同時に捉えることができれば，三角測量の原理により，この魚の頭と尾の部分の3次元的位置の計測が可能である。これより，体長，カメラに対する姿勢等を計測できる。図5に24尾のサンマについて計算した体長分布を示す（図中で黒丸印）。海況等により漁獲はできなかったが，運良く，鳥が甲板上に落としたサンマ8尾が得られ，その体長の測定ができた。その体長分布を同じ図に示す（白丸）。サンプル数が少ないことなどの問題はあがるが，分布はよく一致していると思われる。

現状の音響調査では，魚の分布密度の推定を行うために必要な平均TSを，トロールなどで得られる体長分布から計算している。ある体長を持った魚のTSは体長の2乗に比例することが知られており，平均体長の2乗と平均TSとの間の比例係数が必要になる。今回の場合，TV画像データの解析により，平均又体長24.2cm，標準偏差2.8cm，(n=24)が得られ，音響データのTS解析により，平均TS=-37.9dB (n=450)を得られた。体長に標準偏差がある場合，比例係数 (T_{scm}) は，平均尾又体長 (\bar{L})，標準偏差 (σ_L) および平均TS (\bar{T}_s) を用いて，下式により求めることができる²⁾。

$$T_{scm} = \bar{T}_s / (\bar{L}^2 + \sigma_L^2)$$

この比例係数は一般にはデシベル値で表され，J-QUESTを用いて測定したサンマについては， $10\log(T_{scm}) = -65.18\text{dB}$ が得られた。サンマは鰾が消化管につながっていない閉鰾魚であり，他の閉鰾魚の値と比較しても妥当な値と思われる⁷⁾。

4. おわりに

今後，引き続き，J-QUESTに搭載した小型

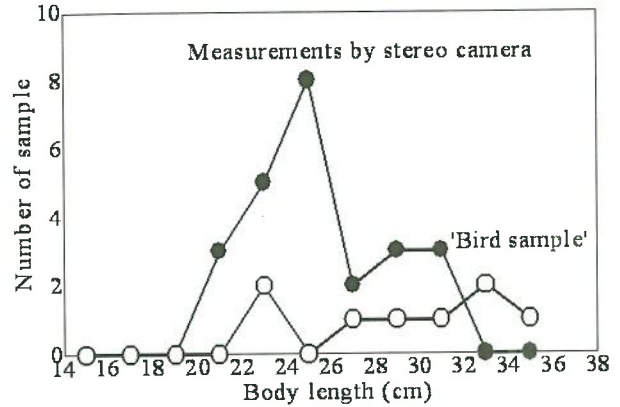


図5 ステレオ計測により得られた体長分布（黒丸：24尾分の解析）と甲板上に鳥が落とした8尾について実測した結果（白丸）の比較

計量魚探機やカメラの測定精度の検証と手法の改良を行っていくとともに，いろいろな魚群について，J-QUESTによる測定を行う予定である。たとえば，表・中層性の魚類の中で，世界の海洋に存在し，その量も極めて多いハダカイワシ類，イカ類などの測定が考えられる。

特にハダカイワシ類は，日周鉛直移動を行うことでも知られているが，その行動生態はあまり知られていない。また，水産有用種の生息深度と重なることも多く，その識別が求められている。たとえば，調査船上で得られる音響データと，J-QUESTの使用によりわかる魚種や魚体長組成との関係が明らかになれば，逆にこの関係から，調査船上で得た音響データを基に，魚種や魚体長の推定が可能になるかもしれない。J-QUESTを改良して，深度600m程度まで使用可能とすることにより，資源量の多いほとんどの魚種について調査が可能になると考えられる。

J-QUESTの一つの応用として，魚種の識別・体長推定を目的とした漁船向けのステレオTVカメラシステムが考えられる。このため，水中照明と市販のCCDカメラでステレオカメラシステムを構成することにより，より安価でコンパクトなステレオTVカメラシステムの構成が可能である。安価なシステムであれば，多数の漁船への搭載が可能になり，漁業者は，魚

種・魚体長を知った上で操業できる。このため、資源への新規加入に重要な若齢魚等の不必要な漁獲をなくすことができる。一方、研究者は、漁業者が魚群毎に得たステレオ映像データを解析することにより、より広範囲な海域に分布する魚群について、詳細で精確なデータを得ることができるようになる。これにより、より精確な資源量の推定が可能となると考えられる。

文 献

- 1) 古澤昌彦, (2001), 青で海を見る, p72-76, 成山堂書店.
- 2) Sawada, K. et al. (1993), *Mar. Acoust. Soc. Jpn.*, 20, 15-21.
- 3) 澤田浩一ら, (2004), 水産工学研究所技術報告, 26, 23-33.
- 4) 高橋秀行ら, (2004), 水産工学研究所技術報告, 26, 35-45.
- 5) Sawada, K. et al. (2004), *Proceedings of OCEANS'04 MTS/IEEE/TECHNO-OCEAN'04*, 395-400.
- 6) Takahashi, T. et al. (2004), *Proceedings of OCEANS'04 MTS/IEEE/TECHNO-OCEAN'04*, 409-414.
- 7) MacLennan D.N. et al. (1991), *Fisheries Acoustics*, Table 6.3, Chapman & Hall, London.



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虫害防除

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
……………沖谷明敏

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

◀地域の先端研究▶

体細胞クローン牛同士の交配による クローン2世牛の誕生

静岡県畜産試験場 乳牛部

笠井幸治

体細胞クローン技術は、畜産分野における生産性向上の有効手段として期待される一方、クローン胚移植における流死産率の高さやクローン産子の分娩後直死の多発などその正常性に関する問題が指摘され、体細胞クローン牛由来畜産物に対する消費者の安心感を得られていないのが現状である。そこで、体細胞クローン牛の正常性・安全性証明の一助とするため、体細胞クローン牛同士の交配によるクローン2世牛を誕生させた。その結果、クローン牛及びクローン牛間の繁殖能力の正常性とクローン2世牛の発育性、生理機能、遺伝的検査等における正常性が確認された。

1. はじめに

わが国では、1998年の体細胞クローン牛（以下、クローン牛）の誕生以来、クローン牛由来畜産物の安全性に関する議論・関心が高まっているが、クローン胚の低受胎率、異常産、クローン産子の分娩後直死など多くの問題点が指摘され、クローン牛由来畜産物に対する安全性を懸念する声が多く、消費者の安心感は得られていない。こうした中、2003年4月、厚労省はクローン牛の食品としての安全性を認める報告を行ったが、クローン技術は新しい技術であることから、安全性について慎重な配慮が必要であることも指摘している。農水省としてもクローン技術の産業利用に向け、さらに、安全性に関するデータの収集強化を図ることとし、当面は、体細胞クローン牛由来畜産物については出荷自粛という状況になっている。

そこで、我々はクローン牛及びそれに由来する畜産物の正常性、安全性の証明の一助とするため、場内で生産したクローン雌牛の遺伝的相似性、発育性、繁殖機能の正常性について検証するとともに、クローン牛の凍結精液を利用してクローン牛同士の産子を誕生させ、その発育性、生理機能の正常性等について検討したので

その概要を報告する。

2. 場産体細胞クローン牛の概要

1) 生産の経緯

場産体細胞クローン雌牛（以下、みゆきクローン）の生産の経緯は以下のとおりである。①平成11年10月、当场飼養の黒毛和種雌牛（みゆき号：8歳）の尾根部から皮膚を採取し、2代継代培養後に凍結保存した。②平成13年6月、同細胞を用いてクローン胚を作出し、受胚牛（交雑種）に移植した。③平成14年3月、本県第1号のクローン牛としてみゆきクローン（黒毛和種、雌、生時体重28.0kg）が誕生した。

核移植用のレシピエント卵子については、当场では、その確保にあたって、近隣と畜場から多数の卵巣を入手することが困難であるという立地上の制約から、長時間保存された卵巣の有効性について検討し¹⁾、今回は20～26時間保存した卵巣から回収した卵子をレシピエント卵子として用いた。また、ドナー細胞については、皮膚細胞、卵丘細胞、子宮内膜細胞の3種について検討し、その移植成績は表1に示すとおりで、皮膚細胞由来の胚からクローン牛の生産に成功した。

KASAI Koji

〒418-0108 富士宮市猪之頭1945

2) 発育成績

発育状況は図1に示すとおりで、飼養管理は当場の通常管理と同様に行った。生時体重は28.0kgで、13か月齢までは標準発育域での増体を示したが、その後、分娩まで標準発育下限値を若干下回る値で推移した。なお、みゆきクローンと同時期に生まれた黒毛和種雌牛2頭(対照①, ②)を対照牛としたが、この2頭についてもほぼ同様な発育成績であったことから、今回の発育の遅れはクローン牛であることに起因しているものではないと考える。

表1 胚盤胞の移植成績

ドナー細胞	移植胚数	移植頭数	受胎頭数 (%)	産子数
卵丘	10	6	1 (16.7)	0
皮膚	9	7	1 (14.7)	1
子宮	1	1	0 (0.0)	-
計	20	14	2 (14.3)	1

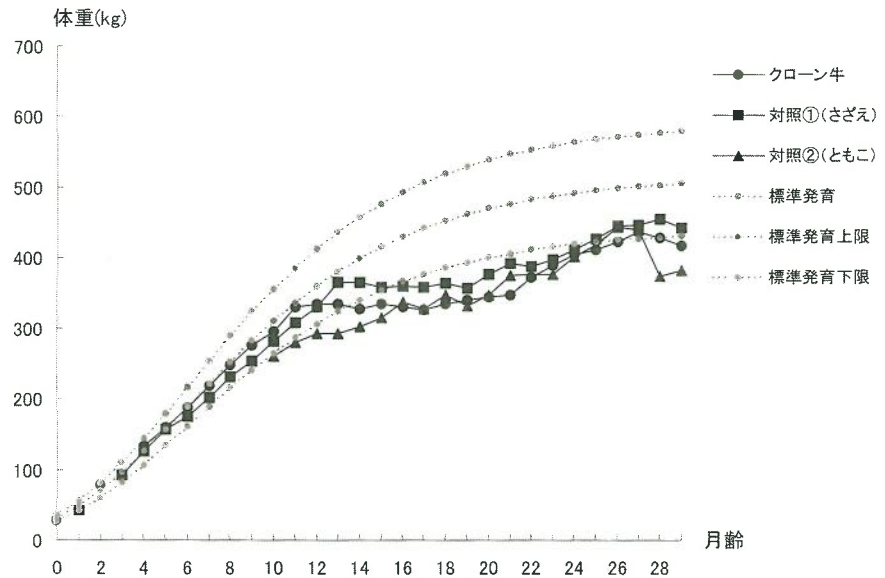


図1 クローン牛発育成績

3) 繁殖状況

みゆきクローンの繁殖状況は、表2のとおりである。発情兆候を初めて確認したのは383日齢(体重334kg)であったが、それ以前の直腸検査の結果、卵巣の動き(良好黄体)を確認していることから春季発動は383日齢以前であったものと考えられる。その後、23.2±2.6日周期(6周)で良好な発情兆候を示し、557日齢で人工授精(CIDR利用、初回授精で受胎)を実施、850日齢で正常分娩(分娩誘起)により、雌子牛(以下、クローン2世牛)を出産した。初産日齢は細胞提供牛(みゆき)の成績(727日齢)を大きく上回るものであったが、これは、雌側の要因ではなく、凍結精液の確保の遅れによるものである。なお、人工授精には、(社)家畜改良事業団から試験提供を受けた体細胞クローン牛(以下、北国クローン)の凍結精液を使用した。以上のとおり、定期的に良好な発情徴候を

示し、初回授精で受胎するなど、クローン牛の繁殖雌牛としての極めて正常かつ良好な繁殖性と種雄牛(凍結精液)としての正常性が確認された。

3. クローン2世牛の概要

1) 生産の目的

クローン牛同士の交配に取り組んだ目的は、クローン牛及びクローン牛間の繁殖機能の正常性や種畜としての有効性を実証することである。また、この交配により誕生したクローン後代産子(以下、クローン2世牛)の順調な成長が、自らの正常性・安全性に併せ、両親(体細胞クローン牛)の正常性・安全性を証明するデータの一助となることを目指して取り組んだ。

表2 クローン牛繁殖状況

	H14. 3. 25	H15. 4. 12	H15. 5. 5	←→	H15. 8. 29	H15. 9. 17	H15. 10. 3	H16. 7. 22
日 齢	0	383	406	この間、 23±2.6日	522	541	557	850
発情周期	—	—	23	周期で良好 な発情兆候 を示す	22	—	—	—
内 容	出 生	初回発情	発 情		発 情	CIDR IN	A I	分娩(初)

2) 生産の経緯

クローン2世牛の生産の経緯は以下のとおりである。①平成15年10月3日、みゆきクローンに北国クローンの凍結精液を用い人工授精を実施した。なお、今回はCIDRを用いた発情誘起を行い、1回の授精で受胎した。(分娩予定日：平成16年7月14日) ②平成16年7月22日、クローン2世牛(雌、生時体重28.7kg)が誕生した。分娩状況は、分娩予定日を7日経過した7月21日から分娩誘起処置を開始し、翌22日17:30、軽度の分娩介助により無事出産が完了した。

なお、両親クローン牛の概要は表3に示すとおりで、母牛(みゆきクローン)は平成14年3月25日生まれ、皮膚細胞由来の黒毛和種で当該生産牛である。父牛(北国クローン)は平成11年4月11日生まれ、皮膚細胞由来の黒毛和種で、(社)家畜改良事業団種雄牛「北国7の8」を細胞提供牛とする同事業団所有牛である。

表3 母牛及び父牛の概要

区 分	母 牛	父 牛
	(みゆきクローン)	(北国クローン)
品 種	黒毛和種(雌)	黒毛和種(雄)
生年月日	平成14年3月25日	平成11年4月11日
生産者	静岡県畜産試験場	(社)家畜改良事業団
細胞提供牛	黒毛和種(みゆき)	黒毛和種(北国7の8)
ドナー細胞	皮膚細胞(尾根部)	皮膚細胞(耳翼)

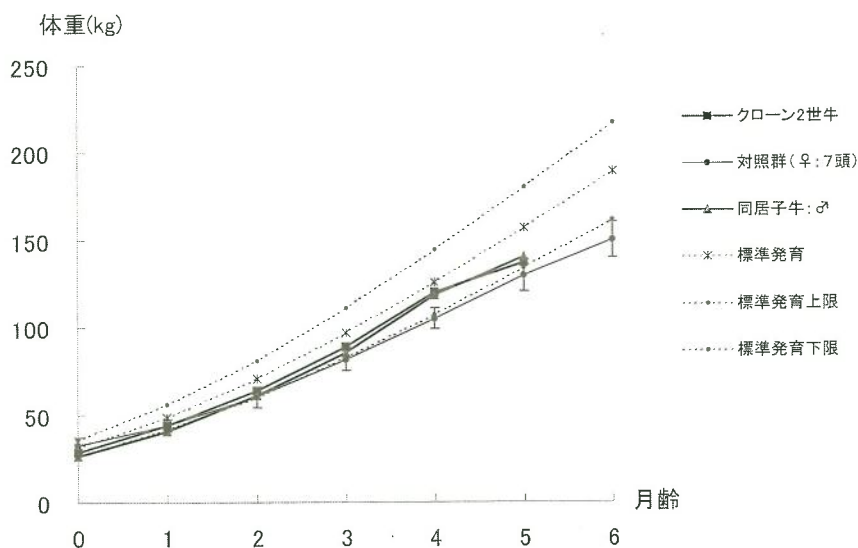


図2 クローン2世牛発育成績

3) 飼養管理

飼養管理は当場の通常管理方法と同様で、1か月齢までは分娩房で親子同居、2→3か月齢までは屋外パドックで他の親子群と同居させ、4か月齢で親子分離(離乳)した。この間は、粗飼料・固形飼料ともに自由採食とした。

表4 血液検査成績（生化学的性状）

調査項目	クローン2世牛			対照牛			クローン
	1ヶ月齢	2ヶ月齢	3ヶ月齢	1ヶ月齢	2ヶ月齢	3ヶ月齢	9ヶ月齢
GOT (U/l)	43.0	59.0	62.0	45.0	50.0	51.0	62.0
GGT (U/l)	39.0	22.0	23.0	24.0	18.0	18.0	38.0
TCHO (mg/dl)	191.0	153.0	117.0	211.0	20.2	106.0	142.0
BUN (mg/dl)	8.5	11.7	16.8	7.3	10.9	10.6	10.0
Cre (mg/dl)	1.1	0.8	1.1	1.1	0.9	0.9	1.4
TP (g/dl)	5.4	5.6	5.9	6.4	5.9	6.0	6.8
Alb (g/dl)	3.3	3.5	3.9	4.0	3.8	3.8	3.5
Ca (mg/dl)	10.8	10.7	10.6	11.9	11.0	10.7	10.0
IP (mg/dl)	12.1	11.2	11.9	12.4	9.2	11.0	7.3
Glu (mg/dl)	112.0	112.0	139.0	99.0	90.0	113.0	-

4) 発育成績

発育成績における対照として、両親クローン牛の細胞提供牛同士の交配（みゆき×北国7の8）による受精卵から生産した雌子牛7頭（対照群）とクローン2世牛と同時期に生まれ同居飼育されている雄子牛（同居子牛）1頭を設定した。成績は図2に示すとおりで、クローン2世牛及び同居子牛は、生時から4か月齢まで標準発育域での順調な成長を示したが、対照群は平均生時体重 32.9 ± 4.2 kgと2世牛を上回っていたがその後は、標準発育下限値を若干下回る値で推移した。この間の臨床的異常は、15週齢でクローン2世牛と同居子牛に軽度の発咳、水様性鼻汁が見られたが、発熱や食欲低下はなく、抗生物質の1回投与により、増体に影響することなく2頭とも回復した。

表5 血液検査成績（一般性状）

調査項目	クローン2世牛			対照牛		
	1ヶ月齢	2ヶ月齢	3ヶ月齢	1ヶ月齢	2ヶ月齢	3ヶ月齢
Ht (%)	35.0	39.3	41.6	34.7	40.1	35.4
Hb (g/dl)	11.4	14.2	14.2	11.3	13.7	12.3
RWC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	9.1	10.6	10.8	8.8	10.8	9.3
MCV (fl)	39.0	37.0	39.0	40.0	37.0	38.0
MCH (pg)	12.6	13.4	13.1	12.9	12.7	13.2
MCHC (%)	32.6	36.1	34.1	32.6	34.2	34.7
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	9.1	7.9	12.3	7.2	9.8	8.2
Plt ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	34.2	35.7	29.7	45.5	37.7	39.0
白血球						
B (%)	0.0	1.0	2.0	0.0	1.0	1.0
E (%)	3.0	0.0	1.0	1.0	0.0	2.0
St (%)	1.0	1.0	2.0	2.0	1.0	2.0
百分						
Seg (%)	62.0	28.0	41.0	37.0	35.0	37.0
L (%)	28.0	64.0	49.0	51.0	52.0	52.0
比						
Mon (%)	6.0	6.0	5.0	7.0	11.0	6.0

4. 生化学的検査及び遺伝学的検査結果

1) 血液検査成績（生化学的性状及び一般性状）

血液検査成績は表4, 5に示すとおりで、クローン2世牛の1か月齢の白血球百分比でリンパ球の比率が28%とやや低い傾向がみられたが、その後は正常値を示すなど、生化学的性状及び一般性状ともに正常範囲で推移した。

2) テロメアの解析

本県のクローン牛に関連するテロメアの解析結果は表6に示すとおりである。細胞提供牛、

みゆきクローンの白血球テロメア長は、19.2kb、19.6kbと通常の変動範囲内であった。クローン牛の白血球テロメア長については、ドナー細胞の種類に影響され、繊維芽細胞や卵丘細胞に由来するものはリセットがかかるとの報告があり²⁾、今回の結果はそれらに一致するものであった。なお、クローン2世牛については、現在、検査中である。

3) ミトコンドリアDNA型の解析

本県のクローン牛等に関連するミトコンドリアDNA型（以下、mtDNA）の解析結果は以下のとおりである。細胞提供牛、ドナー細胞、受胎牛、みゆきクローン、クローン2世牛について、mtDNAの由来マーカーとなるD-loop領域の変異を検査した³⁾結果、みゆきクローンのmtDNA型はクローン2世牛とのみ同じで、ほかの検体とは全て異なっていた。このことから、みゆきクローンとクローン2世牛の親子証明、みゆきクローンと受胎牛の親子矛盾が確認された。

4) 染色体の分析

体細胞クローン牛の場合、ごく稀ではあるが、細胞増殖過程で染色体の分配がうまく行われていない事例が報告されている⁴⁾。しかし、みゆきクローンにおいては、染色体の数的異常や構造的異常は認められず、その核型は $2n=60,XX$ と正常であった。また、細胞提供牛とクローン2世牛についても同様であった。

5) 免疫能の解析

体細胞クローン牛は貧血や胸腺の萎縮が見られることから⁵⁾、その免疫機構に何らかの変化があるのではないかと危惧されている。今回クローン2世牛の免疫能を調べるために、生後1週と3ヶ月齢で末梢血中の白血球とT細胞サブセットの構成割合を同居子牛と比較検討した。1週齢では、クローン2世牛は同居子牛に比べ

表6 白血球テロメア長

区分	年齢	テロメア長
細胞提供牛	1 1 歳	19.2 kb
みゆきクローン	0 歳	19.6 kb

てT細胞とB細胞の割合が低かった。T細胞サブセットの割合では大きな変化は認められなかった。3ヶ月齢で、T細胞の割合は回復したが、 $\gamma\delta$ T細胞の割合は低い傾向を示した。一方、B細胞の割合は1週齢ほどではないが、依然低かった。これらのことから、クローン2世牛では免疫応答が低い可能性はあるが、臨床的に問題になるような状況でないことが確認された。今後、6ヶ月齢での検査及びみゆきクローン（母牛）、細胞提供牛の検査を実施する予定である。

5. おわりに

今回、我々が実施した一連の検査において、クローン牛及びクローン2世牛は、一般牛と何ら変わる事のない正常な値を示しており、この結果がクローン牛等の正常性及び安全性を裏付けるデータの一助になるものと期待している。

しかし、クローン技術の産業利用にあたっては、クローン胚の低受胎率や異常子発生等の多くの問題があり、これらの発現機序の解明、改善など解決しなければならない課題が山積しているのが現状である。

クローン牛の畜産分野における終局的な利用目的は、クローン牛の種畜利用でもなければ、クローン後代産子の畜産物利用でもなく、優良家畜を直接的に大量生産し、良質な畜産物を低価格で提供することこそが最終の目標であると考えている。また、我々、県試験研究機関としても、体細胞クローン牛等の健全性・安全性に関するデータの蓄積、関連研究機関への供試材料の提供に併せ、実証展示を始めとする、積極

的かつ直接的な消費者への働きかけや情報公開をしていくことが重要な責務と考えている。

最後に、体細胞クローン牛の凍結精液を試験提供していただいた(社)家畜改良事業団、クローン牛に関する各種検査や御指導をいただいた農業生物資源研究所、(独)農研機構・畜産草地研究所、東北大学、東京農業大学の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) 佐野文彦ら, (2002), 静岡県畜試研報, 28, 9-12.
- 2) Miyashita, N. et al. (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 1649-1655.
- 3) Takeda, K. et al. (2003), *Mol. Reprod. Dev.*, 63, 429-437.
- 4) Hanada, H. et al. *Mol. Reprod. Dev.*, in press.
- 5) Renard, J.P. et al. (1999), *Lancet*, 353, 1489-1491

本誌第106号掲載論文標記訂正のお知らせ

本誌第106号(2004年(平成16年)11月15日発行)に掲載された高橋正昭氏ほかの論文(p.1)の標記が◀国内情報▶とされていましたが、◀総説▶の誤りでした。お詫びとともに訂正致します。(編集部)

◀文献情報▶

フローサイトメトリー／セルソーティングにより性判別された精子由来子牛の性状

Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting

L. M. Tubman*, Z. Brink*, T. K. Suh†, and G. E. Seidel, Jr.*

*Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Fort Collins 80523-1683 and †XY, Inc., Fort Collins, CO 80526

Journal of Animal Science, 82(2004): 1029-1036

XあるいはY精子のDNA含量の微妙な違いを利用して、DNAに結合するヘキスト33342等の蛍光試薬で染色後にフローサイトメトリー／セルソーティング技術により、X精子とY精子の分離が可能となってきた。性判別技術は、必要とする性の家畜を効率よく生産するために大切な技術であるが、X精子とY精子の分離中には、精子の運動性や生存率の低下、膜の損傷等をひきおこす可能性がある。また、ヘキスト33342は、ある種の条件下で染色体に損傷を起こすことが知られている。本論文の目的は、性判別された精子由来の子牛が無処置の精子（コントロール）由来の子牛と比べて異常を起こしやすいのかどうか、そして、子牛の性の比率が性判別の手法によってどの程度偏るのかを明らかにすることであった。ヘキスト33342染色後のフローサイトメトリー／セルソーティングによって性判別された精子由来の子牛1,169頭、及び、1997年から2001年の試験期間中の性判別を行わなかったコントロール精子由来の子牛793頭からデータを収集した。13の屋外試験における19グループのデータ（コントロール精子と性判別精子）を用いて、最小2乗ANOVAを実施した。分析項目は、妊娠期間、出生体重、分娩の難易度、子牛の強健性、離乳時体重、流産率、新生時あるいは育生時の死亡率等であっ

た。性判別の有無による有意な差は認められず、性判別精子由来子牛は、正常に発育することが明らかとなった。ただ、1カ所の農場においてのみ、コントロール精子由来子牛4頭と性判別精子由来子牛1頭で神経障害が観察された。本試験における子牛には、肉眼的な解剖学所見における異常は認められなかった。一方、農場間には有意な差（流産率 $P < 0.03$ 、他の項目 $P < 0.001$ ）が認められた。また、雌雄間の妊娠期間（278.4日：279.6日）、生時体重（32.8kg：35.2kg）、分娩難易度（1.15：1.30）、離乳時体重（233kg：247kg）に有意な差が認められた。無処理のコントロール精子由来産子では、雄の比率は49.2%であった。X精子として分離された精子由来産子の87.8%が雌であり、Y精子として分離された精子由来産子の92.1%が雄であった。フローサイトメトリー／セルソーティング技術により、約90%の正確度をもって安全に子牛の性をあらかじめ選択することが可能である。

フローサイトメトリー／セルソーティング技術による精子の性判別は、農家にとって非常に有用な技術である。研究の進展により、精子の分離速度や生存性等は向上してきているものの、まだまだ、一般的に利用できる様な分離速度には達していない。また、特許の関係から、コスト的に非常に高いものとなっている。研究の進展により、一般の農家でも利用できるような価格で、分離精子が利用可能となることを期待するものである。

（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▶

ABAによるH⁺-ATPase阻害にはH₂O₂が絡んでいる

Inhibition of blue light-dependent H⁺ pumping by abscisic acid through hydrogen peroxide-induced dephosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase in guard cell protoplasts.

Xiao Zhang, Hengbin Wang, Atsushi Takemiya, Chun-peng Song, Toshinori Kinoshita and Ken-ichiro Shimazaki

Plant Physiology(2004) 136, 4150-4158

気孔は暗闇では閉じ光によって開く。葉は光を浴びると孔辺細胞の細胞膜H⁺-ATPaseを活性化し、プロトン細胞外に汲み出す。その結果、細胞膜内外ではプロトンの濃度勾配を生じ、それを駆動力としてカリウムイオンを孔辺細胞内に取り込み、気孔を開かせる。九州大学の島崎グループは、最近、このポンプ、H⁺-ATPaseの活性化機構を明らかにしてきている。それによると、青色光はH⁺-ATPaseのC-末端のリン酸化を引き起こし、リン酸化されたC-末端に14-3-3タンパクが結合し活性型のH⁺-ATPaseとなる。一方、アブシジン酸 (ABA) は気孔閉孔を促進するばかりでなく青色光誘導性気孔閉孔をも抑制する。それはH⁺-ATPase活性が抑制されるためであるが、シグナル伝達経路および抑制機構は不明のままであった。今回、孔辺細胞での過酸化水素発生機構の研究を進めているZhangが島崎グループとジョイントして、その一端が明らかにしたので紹介したい。

著者らは、まず、青色光によって誘導されるソラマメ孔辺細胞によるプロトンの流出とATPの分解がABAによって抑制されること、すなわち、H⁺-ATPaseの活性が抑制されることを再確認する。不活性型H⁺-ATPaseから活性型H⁺-ATPaseへの変換はリン酸化によってもたらされるのであるから、ABAによってリン酸化が阻害されることがまず第一に想像されるが、ABA添加孔辺細胞では、果たして、青色光によるH⁺-ATPaseのリン酸化は起こらな

い。当然14-3-3タンパクへの結合も起こらず、H⁺-ATPaseは不活性型のままにとどまる。H⁺-ATPaseの抑制機構としてはこれで十分であるが、さて、次はそのシグナル伝達経路である。

孔辺細胞のABAシグナル伝達はいくつも経路が縦横に絡まりあう複雑なネットワークを形成しているが、情報伝達物質の一つに活性酸素がある。気孔閉孔促進の際には活性酸素が関与していることは確認されているが、気孔閉孔阻害にも作用するかは明らかにはされていない。孔辺細胞に活性酸素の一種のH₂O₂を添加してみるとH⁺-ATPaseに対するABAの作用を完全に代替でき、ABAによる気孔閉孔時と同じく気孔閉孔阻害時にもH₂O₂を発生する。また、H₂O₂を小胞体画分に加えた場合にはプロトンポンプの活性は変化しないことから、H₂O₂がH⁺-ATPaseに直接に作用して活性を変動させている訳ではなく、幾段階かのシグナル伝達物質を経由し、間接的に作用していると考えられる。すなわち、ABA→H₂O₂発生→H⁺-ATPaseリン酸化阻害→気孔閉孔阻害という経路が想定される。

さて、問題は過酸化水素の発生系である。植物の活性酸素発生系として考えられるのは、細胞壁パーオキシダーゼ、細胞膜NADPHオキシダーゼ、ミトコンドリアそして葉緑体であるが、細胞壁を取り除いたプロトプラストでもH₂O₂の発生がみられることから、細胞壁パーオキシダーゼの可能性はまず除外できる。蛍光染色の結果をみると、細胞膜ではH₂O₂の発生はほとんど見られず、大部分葉緑体で発生している。この結果は、著者らは慎重な言い回しに徹しているが、今や半ば定説化しつつある細胞膜に存在するNADPHオキシダーゼ主因説に疑問を投げかけるものである。葉緑体の光化学的リン酸化経路がABAにより損傷を受けるか、あるいは、活性酸素消去系が不活性化すると考えるのが、むしろ妥当なのかもしれない。今後の検討の余地があるところであろう。

(抄訳：岩井純夫, IWAI Sumio, 鹿児島大学農学部)

◀文献情報▶

母乳を介した免疫は授乳マウスの腸内細菌に影響を与える

Maternal Adaptive Immunity Influences the Intestinal Microflora of Suckling Mice

Thomas J. Koehnle, Matthew C. Russell, Andrew S. Morin, Lesa F. Ercius, and Dorothy W. Gietzen

Journal of Nutrition 134: 2365-2371 (2004)

消化管内には400種にのぼる細菌が棲息しており、これらのあるものは、宿主の栄養吸収を助け、さらには腸管粘膜ならびに全身性の免疫の成熟に関与していると考えられている。一方、腸管内に存在するIgA分子は、腸内フローラ構成や病原性細菌の排除に関与すると考えられている。母乳中には母親に由来する抗体（IgGならびにIgA）が含まれており、新生児の未発達な免疫系を補う働きをしており、母乳栄養児と育児用粉乳栄養児とでは腸内細菌構成が明らかに異なることが知られている。しかしながら、母乳摂取による受動免疫が腸内細菌叢の構成に与える影響についての正確なメカニズムは未だに明らかとされていない。

筆者らは、母乳を介した受動免疫が哺乳期から離乳期にあるマウスの腸内細菌叢の構成に影響をあたえている可能性を検証するため、正常な免疫系を備える野生型の母マウス（WT）に哺育させた仔マウス（WT/WT）とT細胞およびB細胞機能を欠損し、免疫グロブリンを産生する能力を欠く母マウス（immunodeficient：ID）に保育させた仔マウス（ID/WT）の腸内細菌構成の時系列変化を解析した。10, 18, 25, 40-60日齢の仔マウスの小腸内容ならびに大腸内容中の特定の細菌（*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Clostridium perfringens*, *Bifidobacterium*, ならびに *Bacteroides*）を各々の選択培地を用いて分離・計数した。その結果、WT/WTの小腸における腸内菌の密度はID/WTに比較して抑えられていたものの、大腸では逆に密度が高いことが明らかとなった。詳細には、授乳期

のWT/WTの小腸では、ID/WTの100倍以上にのぼる *Bacteroides* 属細菌の存在が明らかとされた。一方、大腸においては、何れの日齢においてもWT/WTの *Bacteroides* 属細菌数が多いことが明らかとされた。一般に *Bacteroides* 属細菌は粘膜免疫系の発達に関与することが示唆されており、母乳を介した受動免疫が直接的に、また間接的に *Bacteroides* 属細菌の増殖に関与しているものと考えられた。しかしながら、離乳後のWT/WT大腸内容においては、プロバイオティクスとして知られる *Bifidobacterium* 属菌数ならびに *Lactobacillus* 属菌数が低いことも明らかとなった。これらプロバイオティクスの増殖については、抗体の影響以外にも、ラクトフェリンやオリゴ糖含量など、他の母乳成分とその含量の影響を考慮する必要があると思われる。

本成績から、腸内細菌構成は授乳期を通じて変化すること、また、母乳を介した受動免疫により、生活年齢ならびに消化管部位特異的な影響を受けることが明らかとなった。今後、新しい解析技術の開発により、より詳細な情報の入手が可能となることを期待する。

（抄訳：野中 敦子, NONAKA Atsuko, カルピス株式会社 基盤技術研究所）

◀文献情報▶

光周期操作による海水期アトランティックサーモンの筋線維数の可塑性

Plasticity of muscle fiber number in seawater stages of Atlantic salmon in response to photoperiod manipulation

Ian A. Johnston¹, Sujatha Manthri¹, Alisdair Smart², Patrick Campbell³, David Nickell⁴ and Richard Alderson³

¹Gatty Marine Laboratory, School of Biology, University of St Andrews, St Andrews, Fife, KY16 8LB, UK

²Marine Harvest Scotland Ltd, Craigcrook Castle, Edinburgh, EH4 3TU, UK

³BioMar Ltd, North Shore Road, Grangemouth Docks, Grangemouth, FK3 8UL, UK

⁴Roch Vitamins Ltd, Heanor, Derbyshire, DE75 7SG, UK

The Journal of Experimental Biology 206, 3425-3435 (2003)

サケ科魚類への光周期操作は、性成熟や成長の季節的タイミングを調節する主要な方法である。例えば、アトランティックサーモン (*Salmo salar* L.) では、連続的な光処理を施した後、自然光へ魚を戻したときに血中のエストロジオール-17 β 、テストステロンおよび成長ホルモンが増加し、夜間のメラトニンが減少することが知られている。また、光周期操作は海面生簀で養殖しているサケの遊泳行動や摂餌行動に大きな影響を及ぼすことも知られている。

ところで、筋肉の成長には筋線維の漸増と引き続いて起きる肥大を伴う。アトランティックサーモンにおける筋線維数の増加は、摂餌開始期、淡水期、海水期の初期に認められる。

筆者らは、アトランティックサーモンに連続光処理を施し、筋線維、筋原基細胞および筋線維の核の数量変化を調べた。

具体的には、試験魚を自然海水温で60gから5000gに成長するまで飼育し、筋肉の成長における光周期操作の効果を海水移行期の初めから

観察した。冬から春の8ヶ月間の連続光処理は、自然光下で飼育した魚と比べて成長を30%増大させたが、性成熟には影響しなかった。126日後には、連続光処理群は自然光群と比べて有意に成長していた。40日後の魚体の横断面中の速筋線維の数は、連続光処理群で自然光群より28.5%多く、自然光の短日化の時期と一致していた。速筋線維数の増加期の終盤では、筋肉の横断面の速筋線維の最大数は、連続光処理を施した生簀の魚では自然光下の生簀の魚よりも23%多かった。しかしながら、筋線維の肥大の割合は、両処理間で違いは認められなかった。単一の筋線維内の核数と筋線維の直径には、正の相関が認められた。直径150 μ mの筋線維において、連続光処理を施した魚は自然光下の魚よりも核数が27%多かった。連続光処理を施した魚では、筋原基細胞のマーカであるc-metを発現している細胞が自然光下の魚よりも有意に多く、筋管形成と筋線維の核数の増加と一致していた。これらの結果より、短日化は筋原基細胞の増殖を抑制するが、長日化へ魚を移すことによって筋原基細胞数の増加と細胞周期時間を短縮できることが示唆された。筋原基細胞の増加によって筋線維の数や核数増加が生じる。それらの追加された筋線維が引き続き肥大するために、連続光処理で認められた成長期間の延長が生じたと思われる。

人為的な成長性の増大や性成熟の制御は、養殖に関わる様々なメリットの増加、リスクやコストの削減につながり、養殖産業にとって極めて重要な課題である。光周期操作は環境に与える影響が小さいことから、サケ科魚類だけでなく、他の産業的に重要な魚種においても、成長性や成熟制御に関するデータの蓄積が期待される。

(抄訳：塩谷 格, SHIOYA Itaru, 日本水産株式会社中央研究所)

生研センターからのご案内

2005年度 新規研究課題募集のお知らせ

—新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業—

事業の趣旨

生物系特定産業技術研究支援センター(生研センター)では、農林水産業、飲食料品産業等生物系特定産業の分野において、生物の持つ多様な機能を活用することにより、新技術・新分野を創出し、それを通じて農林水産業の発展、地球規模での人口問題、食料問題、環境問題の解決等に資するため、将来の産業技術のシーズとなる基礎的な試験研究を提案公募により実施しています。

2005年度については、研究者の対象年齢を制限しない「一般型」及び39歳以下の若手研究者を対象とした「若手研究者支援型」の新規研究課題を下記により募集します。

■ 研究分野

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

■ 研究枠・研究期間・研究費の規模

(研究費には間接経費を含みます)

○一般型

研究代表者を含む研究チームの構成員の年齢制限なし
 研究期間: 3~5年間
 研究費: 1課題あたり2千万円~1億円程度/年

○若手研究者支援型

研究代表者を含む研究チームの構成員全ての年齢を39歳以下に制限
 研究期間: 3年間
 研究費:

- ・参画機関数1~3の場合;
1課題あたり2千万円~5千万円程度/年
- ・参画機関数4以上の場合;
1課題あたり2千万円~1億円程度/年

■ 応募資格

- ① 日本国内の基礎研究を実施する能力のある機関に所属する常勤の研究者であること。
- ② 若手研究者支援型に応募の場合は、研究代表者を含む研究チームの構成員全ての年齢が、2005年4月1日において39歳以下であること。
- ③ 留意事項
・生研センターで実施している提案公募事業(本事業及び異分野融合研究支援事業)で、2005年度に実施中の課題において、研究の実施に責任を持つ研究者(研究代表者、参画機関の研究責任者)は応募できません。

・本事業で2005年度に応募中の課題における研究代表者/研究分担者は、本事業または異分野融合研究支援事業に重複応募できません。
 ・他の独立行政法人が実施している基礎研究推進制度において既に採択され2005年度においても実施中の研究課題の研究代表者は応募できません。

■ 採択予定課題数

「一般型」・「若手研究者支援型」合わせて
10課題程度

■ 応募期間: 2005年3月1日(火)~

2005年3月15日(火)締切(当日17時必着)

■ 研究課題の決定

学識経験者で構成する課題選考のための委員会が①一次審査(書類審査)、②二次審査(面接審査)の二段階審査により採択候補課題を選定。

生研センターはその結果を踏まえて採択課題を決定。

■ スケジュール

3月1日	受付開始
3月15日	受付終了(17時必着)
4月	一次審査(書類審査)
5月中下旬	二次審査(面接審査)
6月	採択課題決定
8月~	委託試験研究契約締結(研究開始)

♪詳細は応募要領をご覧ください。

♪応募要領・様式は生研センターのホームページよりダウンロードできます。

【問合せ先】 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) 新技術開発部 基礎研究課

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3-18-19 虎ノ門マリビル10階
 TEL: 03-3459-6569 FAX: 03-3459-6594
 URL http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/ (生研センターホームページ)

生研センターからのご案内

2005年度

新規研究課題募集のお知らせ

－生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業－

事業趣旨

生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）では、農林水産業、飲食物品産業等生物系特定産業分野において、新事業の創出や起業化の促進につながる画期的な技術開発を推進しています。

このため、新事業の創出につながる技術開発を行う「異分野融合研究開発型」並びに起業化の促進につながる技術開発を行う「起業化促進型」について、新規研究課題を下記により募集します。

研究分野・応募資格・研究期間・研究費・採択予定課題数

○異分野融合研究開発型

研究分野：新事業創出につながる技術開発

応募資格：民間企業、大学、独立行政法人等が参加し、異分野にまたがる複数の研究者が共同して研究を行う研究共同体（コンソーシアム）

研究期間：原則として3～5年間

研究費：1コンソーシアム当たり年間60百万円程度を上限

採択予定課題数：5課題程度

○起業化促進型

研究分野：独創的な発想や研究シーズを活かしたベンチャー創出につながる技術開発

応募資格：ベンチャー創出を目指す民間企業、大学、独立行政法人等の研究者（個人、複数の別は問わない）

研究期間：原則として2年間

研究費：1課題当たり年間26百万円程度を上限

採択予定課題数：10課題程度

募集期間

2005年3月1日（火）～2005年3月15日（火）17時締切

課題の選定方法

学識経験者等で構成される課題選考のための委員会による第1次審査（書類審査）及び第2次審査（面接審査）を行い、採択課題を選定します。

スケジュール

3月 1日	受付開始
3月15日	受付終了（必着）
4月	一次審査（書類審査）
5月中下旬	二次審査（面接審査）
6月	採択課題決定
7月～	委託試験研究契約締結（研究開始）

応募要領・様式の入手方法

生研センターのホームページ（<http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>）からダウンロードできます。

【お問い合わせ先】 新技術開発部 技術開発課 TEL：03-3459-6567
FAX：03-3459-6577

生研センターからのご案内

平成16年度終了課題 成果発表会の開催について（予告）

生物系特定産業技術研究支援センターでは、現在実施している課題のうち、平成16年度で終了する「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」の9課題と「新事業創出研究開発事業」の6課題について、成果発表会を開催いたします。

入場無料で、どなたでもご参加いただけますので、多数の皆様のご来場をお待ちしております。

開催日：平成17年3月2日（水）～4（金）

場 所：東京国際フォーラム（ホールD7）

[東京都千代田区丸の内3-5-1]

入場無料

なお、プログラムや発表課題等の詳細については、平成16年2月中に生研センターのホームページに掲載するほか、パンフレットやポスターでご案内いたします。

問合せ先：基礎研究課 e-mail kisoken@ml.affrc.go.jp
TEL:03-3459-6569 FAX:03-3459-6594

技術開発課 e-mail kaihatsu@ml.affrc.go.jp
TEL:03-3459-6567 FAX:03-3459-6577
URL <http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>

生研センターからのご案内

出 資 事 業 の ご 案 内

事業の趣旨

バイオテクノロジー等に代表される生物系特定産業技術に関する、企業等の試験研究の促進のため、出資を行う制度です。2つ以上の企業等が新たに設立する研究開発会社を対象にした一般出資制度と、単独の企業等が新たに設立し、大学又は公的研究機関等と共同で試験研究を行う研究開発会社を対象とした特別出資制度があります。

対象となる経費

試験研究に直接必要な施設・設備費、機械装置費、物品費、材料費、人件費等

出資の方法

会社設立時及び第三者割当による増資時に、株式取得により行います。

出資期間・比率

一般出資：出資期間は原則として7年以内。生研センターからの出資は各年度ごとに試験研究に要する経費の7割を限度。

特別出資：出資期間は5年以内。生研センターからの出資は各年度ごとに試験研究に要する経費の5割を限度。

審査

外部専門家による1次、2次審査を経て、採択案件を決定します。

研究課題の意義、研究計画・推進手段の妥当性等の技術的評価の他、事業化計画、市場規模・動向、収益性の見通し等の研究成果の事業性についても評価・審査されます。

募集開始時期

2005年4月～

ご相談は随時受け付けています。詳細は下の窓口にお気軽にお問合わせ下さい。

お問い合わせ先

新技術開発部 出資課

TEL 03-3459-6565

FAX 03-3459-6566

E-mail brainsyu@ml.affrc.go.jp



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
リング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・
種廻博重・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る原始卵胞から得た
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・バダーノ・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

生研機構からのご案内



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
クロアレイ解析.....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

材料科学研究のメッカ、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

編集後記

第107号をお届けします。本号の総説では、高橋咲子氏（独）農業生物資源研究所）らにコエンザイムQ10の新たな生産方法の開発についてご紹介戴いた。その他の研究情報として、木原智仁氏（王子製紙株）らに酸性土壌耐性ユーカリの開発、野尻秀昭氏（東京大学）らに汚染物質分解酵素分泌植物体による環境浄化、松村健氏（独・産業技術総合研究所）に植物の遺伝子組換え技術を利用した鶏原虫病経口ワクチン素材の開発、宮川佳子氏（株植物ゲノムセンター）らに遺伝子発現レベルを利用したコメの食味判定技術の開発、花田礼子氏（久留米大学）らに神経ペプチド「ニューロメジンU」の摂食抑制メカニズムなどについてご紹介戴いた。地域の先端研究では、笠井幸治氏（静岡県畜産試験場）に体細胞クローン牛同士の交配によるクローン2世牛の誕生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）、岩井純夫氏（鹿児島大学）、野中敦子氏（カルピス株）、塩谷格氏（日本水産株）にそれぞれご紹介戴いた。

ご多忙の中玉稿をお寄せ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107号

平成17年 1月15日発行

発行人 津賀幸之介

編集人 吉泉 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