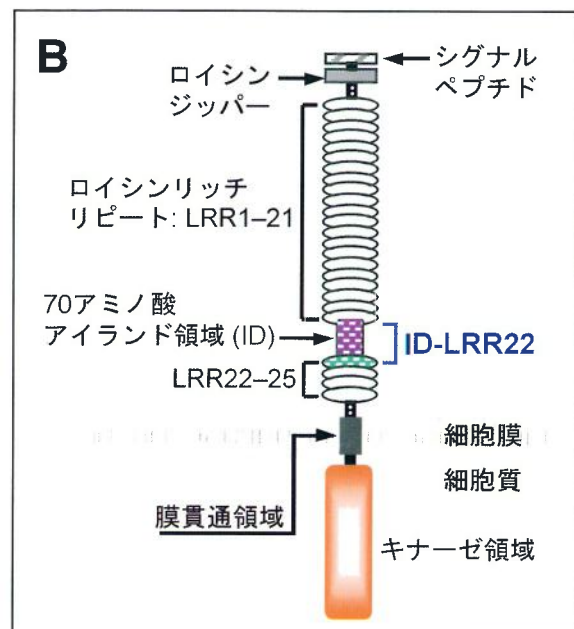




シロイヌナズナの *bri1* 変異体と BRI1 の構造



植物の生長ホルモン・ブラシノステロイドと 受容体BRI1の結合メカニズム

¹ 理化学研究所 中央研究所 ² 九州大学大学院 理学研究院
瀬戸 秀春¹ ・ 木下 俊則²

目次

総説

- 怠け者の小さな植物病原微生物：ファイトプラズマ—初めて入れられた分子生物学的メス … 1
柿澤 茂行・難波 成任（東京大学大学院 農学生命科学研究科）

国内情報

- イネ白葉枯病菌のゲノム構造—なぜ多様なレースが生まれたか— …… 10
落合 弘和¹・井上 康宏²・竹谷 勝¹・加来 久敏¹（¹（独）農業生物資源研究所，²（独）農業・生物系特定産業技術研究機構 中央農業研究センター）
- フォトクロミック蛍光タンパク質，Dronpa（ドロンプア） …… 14
宮脇 敦史・安藤 亮子（理化学研究所 脳科学総合研究センター 先端技術開発グループ）
- 植物の生長ホルモン・ブラシノステロイドと受容体BRI1の結合メカニズム …… 17
瀬戸 秀春¹・木下 俊則²（¹理化学研究所 中央研究所，²九州大学大学院 理学研究院）
- 麻痺性貝毒によるトゲクリガニの毒化 …… 23
及川 寛¹・藤田 恒雄²・齋藤 健³・里見 正隆¹・矢野 豊¹
（¹（独）水産総合研究センター 中央水産研究所，²福島県水産事務所，³福島県水産試験場）
- 無花粉スギ「爽春」とスギ花粉症対策に向けた雄性不稔個体の今後の利用 …… 28
高橋 誠・星 比呂志・岩泉 正和・久保田 正裕・福田 陽子（（独）林木育種センター）
- MRSAに効果のある昆虫抗菌タンパク質を改変した合成ペプチドを含む傷被覆フィブロイン
フィルムの開発 …… 33
山川 稔・坂中（西堂）寿子・石橋 純（（独）農業生物資源研究所）
- 超微小な溶液チャンバーを用いた1分子バイオアッセイの開発 …… 37
野地 博行（大阪大学 産業科学研究所）
- 田植機の苗載せ作業を軽労化する …… 41
小西 達也・窪田 潤・土屋 史紀（（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

- 柿ポリフェノールの高速精製法を用いた機能性食品素材の開発 …… 44
浜崎 貞弘（奈良県農業技術センター 果樹振興センター）

文献情報

- 泌乳初期の搾乳牛における血漿中尿素窒素濃度と卵胞液や子宮腔内の尿素窒素濃度あるいは
アンモニア濃度との関連性について …… 48
D.S. Hammon et al. (*Animal Reproduction Science*, 86, 195-204, 2005) 抄訳：下司 雅也
- アグロバクテリウム以外の細菌で植物の形質転換に成功 …… 49
W. Broothaerts et al. (*Nature*, 433 : 629-633, 2005) 抄訳：岩井 純夫
- イトヒキキントキダイの皮と骨由来の酸溶解性コラーゲンの性質 …… 50
P. Kittiphattanabawon et al. (*Food Chemistry*, 89, 363-372, 2005) 抄訳：大庭 貴弘

- 生研センターからのご案内（研究開発を対象にした一般・特別融資制度のご案内） …… 51

表紙の説明

図の左 (A) はシロイヌナズナの野生種 (WT) とブラシノステロイド非感受性変異体 (*bril*)。矮性などの顕著な表現形を示す。図の右 (B) は原因遺伝子の発現タンパク質BRI1の模式図。筆者らの研究で、ID-LRR22がブラシノステロイドの結合領域であることが明らかとなった。詳細については、17頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

怠け者の小さな植物病原微生物：ファイトプラズマ —初めて入れられた分子生物学的メス

東京大学大学院 農学生命科学研究科

柿 澤 茂 行 ・ 難 波 成 任

40年あまり前に世界に先駆けてわが国で発見された重要植物病原微生物「ファイトプラズマ」に初めて分子レベルでのメスが入った。今回そのゲノムが解読され、他の微生物には認められないような代謝系遺伝子の退行的進化が明らかになった。ファイトプラズマゲノムは、DNA複製や転写、翻訳に必要な基本的遺伝子が認められた一方で、アミノ酸合成系、脂肪酸合成系、TCA回路、酸化的リン酸化、ペントースリン酸回路、PTS、ATP合成酵素に関与する遺伝子を欠いていた。これはファイトプラズマが細胞内寄生性で、栄養豊富な植物節部に生息するため、退行的進化により遺伝子の多くを失ったのであろう。また逆に、膜輸送系遺伝子は多数コードされており、生存に必要な物質の多くを宿主細胞に依存している生存戦略が明らかとなった。これにより、ファイトプラズマの防除法確立に光が見えてきた。

1. はじめに

ファイトプラズマは、1967年に東京大学農学部の土居らにより世界に先駆けてわが国で発見された植物病原微生物¹⁾、農業上重要病害であるクワ萎縮病やイネ黄萎病など(図1)、各種農作物に被害をもたらす病害として永年にわたり原因不明であった病害の病原微生物である。生物界の新ジャンルを開く微生物として当時世界中の注目を集めた。それから4半世紀を経て、農学上のみならず生物学上も重要な微生物でありながら、これまで培養に成功していないことから、遺伝子レベルでの研究は全く進んでいなかった。しかし最近、世界各地において、本微生物により大きな被害を生じている。我が国の同種農業生産への影響も危惧されており、本微生物の早急な究明と耐性戦略の構築が切望されている。

2. 生物としての位置付け

ファイトプラズマは、昆虫と植物の両細胞に
KAKIZAWA Shigeyuki, NAMBA Shigetou
〒113-8657 文京区弥生1-1-1

感染し昆虫により媒介され、植物に病気を引き起こす(図2)。しかし、それぞれの病原同士と比較解析が困難なことから、これまで、植物から一つファイトプラズマ病が見つかるたびに別々の病名と病原名がそれぞれつけられていたため、膨大な数の病名と病原名が登録されていた。そこで、それらを比較整理する目的で、16S rRNA遺伝子の解析という分子生物学的な手法による系統分類法が考案され、ファイトプラズマの分子レベルでの研究が始まった^{2), 3)}。その結果、意外なことに、*Mollicutes*(モリキューテス)綱に属する、細胞壁を欠いた多様性のある微生物群であるが、動物マイコプラズマやスピロプラズマとは大きく異なることが明らかになった。そこで、ファイトプラズマ(マイコプラズマ様微生物: mycoplasma-like organism, MLO)の名称をファイトプラズマ(phyto(植物の)+plasma(もの))に変え、属名をPhytoplasmaとした²⁾。現在最新の分類体系が確立され、また、世界中に発生するファイトプラズマを10グループ(16S-group)、38サブグループ(種に相当する; 16S-subgroup)に分類する「種の標準分類基準」を確立した⁴⁾。その結果、これまで60種類以上あった我が国に

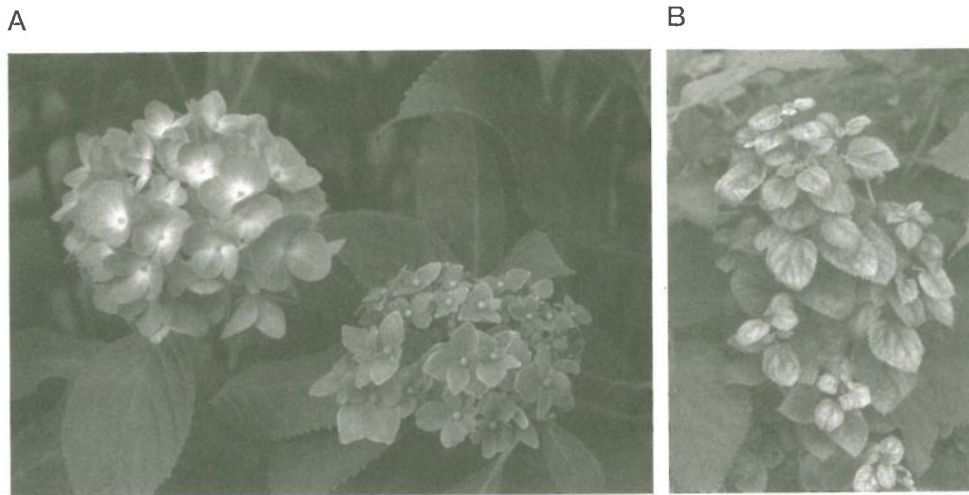


図1 ファイトプラズマ感染植物の病徴

- (A) 右：アジサイ葉化病ファイトプラズマに感染したアジサイの花の葉化症状，左：正常な花。
(B) クワ萎縮病ファイトプラズマに感染したクワの病徴。

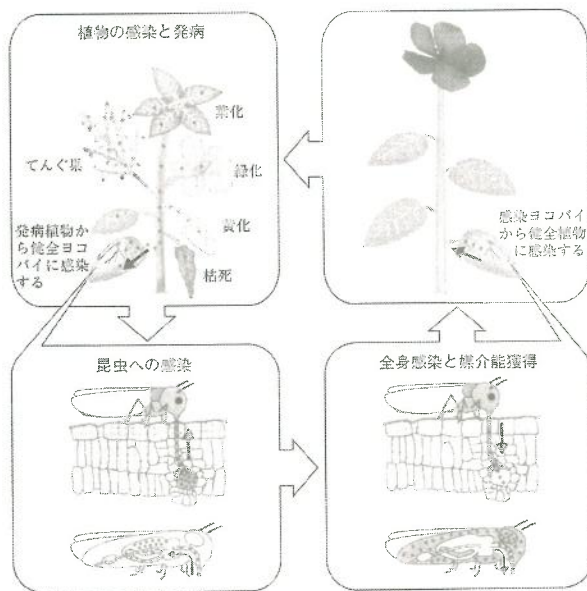


図2 ファイトプラズマの生活環

ファイトプラズマに感染し発病した植物に媒介昆虫（ヨコバイ）が飛来し（左上）、葉脈に口針を差し込み、栄養分を運ぶ通道組織（篩管）より篩管液を吸う（吸汁、左下）。そのときにファイトプラズマと一緒に吸汁される。ヨコバイの腸に到達したファイトプラズマは、腸の内壁から細胞内に侵入して全身に感染し、感染能力を持った保毒虫ができる（右上）。発病した植物はてんぐ巢、花の葉化や緑化、黄化、枯死などの特徴的な病徴を示す。同時に新たな感染源となる。

発生するファイトプラズマ病の病原は、4種のファイトプラズマにまとめられた。一方、ファイトプラズマ感染を16S rRNA遺伝子のPCR増幅により検出する技術は、これまで病徴観察や電子顕微鏡観察、昆虫伝搬試験などに頼ってきたファイトプラズマの検出診断技術を一新させ、現在、高感度かつ簡便な技術として開発途上国をはじめ世界中に普及している。

3. 微生物のゲノム解読

1995年に初めてバクテリアの全ゲノム塩基配列が解読されたのをきっかけに⁵⁾、次々と新たな微生物の全ゲノム塩基配列が解読され、すでに226ものバクテリア・古細菌の全ゲノム塩基配列が解読されている（2005年4月7日現在：http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub_g.htmlや<http://www.genome.jp/>

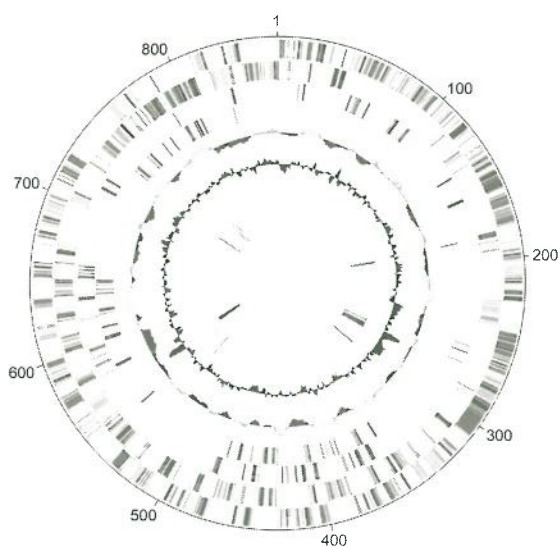


図3 OY-Mのゲノムマップ
全長860,631bpの環状ゲノムで、754個のORFが見出された。

kegg-bin/create_kegg_menuを参照)。

その内訳としては、Proteobacteriaが94と最も多く、ついでFirmicutes (Gram-positive bacteria) が58, Archaea (古細菌) も21の全ゲノムが決定されている。Firmicutesの中では、やはりBacillalesが26と最も多いが、ファイトプラズマやマイコプラズマを含むMollicutes綱においても11の全ゲノムが決定されている。この理由としては、Mollicutes綱細菌は極度に宿主に依存したライフサイクルを持つため、そのゲノムサイズが極端に小さいことが挙げられる(例えば*Mycoplasma genitalium*の全ゲノム塩基配列は580kbであり、これは現在でもバクテリアの中で最小のゲノムサイズである)。

一般に、ファイトプラズマのゲノムサイズは大腸菌に比べれば4分の1以下で、近縁なアコレプラズマやアナエロプラズマよりもさらに小さいが、450~1185kbと幅があり、ゲノムサイズにおいても多様性に富んでいる。このことは、これらの細菌群では、ゲノムの縮小が繰り返し起こったことを示唆している。しかし、ファイトプラズマのゲノム構造の概要は16S rRNA遺伝子以外にはこれまでほとんど分かっていなか

った。

まず、モデル系統 (onion yellows phytoplasma; OY-W) (野生株) を作出し、それをもとに無病徴変異株 (OY-M) や昆虫非伝播変異株 (OY-NIM) など、病原性や宿主特異性の異なる種々の変異株を作出し、遺伝子研究の実験系を構築した⁶⁾。OY-Mではゲノムに約130kbpの欠失が認められ、これがOY-Wの非存在下において安定して維持されることは、欠失DNA領域がファイトプラズマの生存に必須の領域ではなく、変異形質に関連した領域であることが推察される。そして、OY-Mの全ゲノムを解読することに成功した⁷⁾ (図3)。

OY-MはMollicutes綱細菌の中では7番目にその全ゲノム塩基配列が決定された。また、植物病原細菌としても、*Xylella*, *Agrobacterium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Pseudomonas*の6種に次いで7番目にその全ゲノムが決定された。OY-M以前にその全ゲノムが決定された植物病原細菌は、いずれも栄養分の乏しい木部か柔組織に生息する植物病原細菌であることから、本研究は植物篩部に局在する病原細菌では初めての報告となり、また、植物病原性のMollicutes綱細菌としても初めての報告となった。なお、その後、植物病原細菌としてさらに*Erwinia carotovora*⁸⁾, *Leifsonia xyli*⁹⁾, *Xanthomonas oryzae*¹⁰⁾の全ゲノム塩基配列が報告されている。

4. ファイトプラズマゲノムの特徴

OY-Mのゲノムは約860kbpからなり⁷⁾、754個のORFが見出され、コードされる蛋白質のうち、257個は既知の蛋白質とアミノ酸相同性が認められなかった。ファイトプラズマゲノムは既知の代謝系遺伝子の多くが欠損している一方で、複製、転写、翻訳に関与する基本的な遺伝子は認められた (図4)。これは、ファイトプラズマの生息スタイルと密接に関係している。すなわち、代謝系の遺伝子は欠いていても

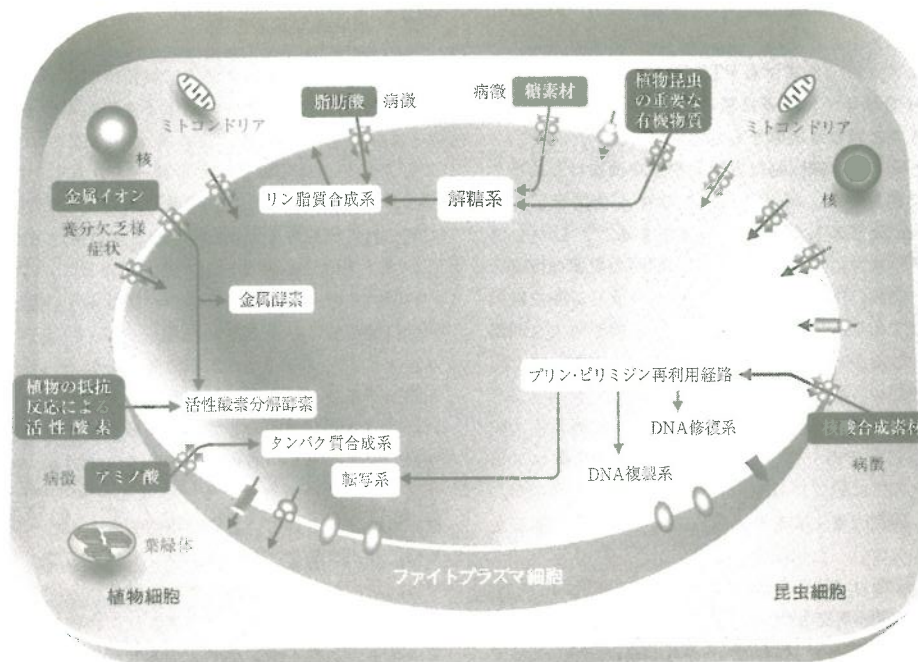


図4 ファイトプラズマの代謝系

ゲノムデータから予測されるファイトプラズマの代謝系を模式化したもの。ファイトプラズマは植物あるいは昆虫の細胞内に寄生するため、細胞内にある状態で書いてある。

最終産物を外から取り込めばよいが、DNA複製などのhouse keeping遺伝子は自身で持っている必要があるためと考えられる。興味深いことに、これらの遺伝子構成はマイコプラズマよりも枯草菌に近い^{11, 12)}。

また、他の細菌では1コピーしか認められないuvrD, hflB, tmk, dam, ssbなどの遺伝子が多コピー認められ、全遺伝子の約18%にも達することが明らかになった。加えて、後で述べるように、輸送系の遺伝子についても多数コピー存在していた(約6%)。このような特徴のためにゲノムサイズが*M. genitalium*より大きくなっているものと思われる。

5. 代謝系遺伝子の欠損

ファイトプラズマゲノムには解糖系や脂質合成、核酸の再利用系であるサルベージ経路に関する遺伝子は存在していたものの、それ以外の代謝系関連遺伝子の多くを欠いており、必要な物質の多くを宿主に依存しているものと考えら

れる。マイコプラズマはTCA回路、酸化リッ酸化経路、アミノ酸合成、脂肪酸合成、コレステロール合成に関する遺伝子を持っていないことが知られているが²⁴⁾、ファイトプラズマにおいてもこれらの遺伝子は認められなかった。ファイトプラズマやマイコプラズマとは対照的に、栄養の少ない木部に生息する植物病原細菌*Xylella fastidiosa*は、解糖系、TCA回路、酸化リッ酸化経路などの遺伝子が揃っており、少ない栄養源を有効に使うことが出来るよう適応しているものと考えられる¹³⁾。

ペントースリン酸経路は大腸菌や枯草菌をはじめ、多くの細菌においても保存されており、ゲノムサイズの小さなマイコプラズマや*Buchnera*等の共生細菌においても存在することがわかっている¹⁴⁾。しかし、ファイトプラズマのゲノムには、ペントースリン酸回路を形成するための遺伝子が全くコードされていなかった(図4)。この回路の重要な役割の一つは、核酸の生合成に必須であるリボース5リン酸の供給を行うことであり、細菌にとって重要な回

路である。核酸の再利用系は持っているながら、ペントースリン酸化回路を持たないファイトプラズマの場合には、未知の経路によりリボース5リン酸を宿主から取り込んでいる可能性が考えられる。

また、ファイトプラズマゲノムには機能未知な遺伝子が多数コードされており、オーソログスではないこれらの遺伝子が失われた遺伝子の代替の機能を担っている可能性も考えられる。ファイトプラズマの生理・生態を明らかにするためには、今後これらの遺伝子の機能を解明する必要がある。

6. ATP合成酵素の欠損

多くの細菌は、F₀F₁-typeのATP合成酵素を持っており、プロトン濃度勾配によるATPaseの逆反応によってATPを合成する。この酵素遺伝子は比較ゲノム解析により提案されている最少遺伝子セットの中にも含まれており¹⁴⁾、生命にとって必須のものと考えられてきた。しかし、ファイトプラズマのゲノムにはATP合成酵素のサブユニットをコードする遺伝子が一つもない(図4)。病原細菌*Chlamydia trachomatis*でもこの遺伝子が無いが、その代わりに古細菌型であるA₀A₁-typeのATP合成酵素を持っており¹⁵⁾、ファイトプラズマはそのいずれも持たない生物として最初の例である。また*C. trachomatis*はATP/ADP translocaseを持ち、宿主のATPを取り込んで利用すると考えられているが¹⁵⁾、ファイトプラズマではそれも見つからない。枯草菌のATP合成酵素オペロンに変異を入れると、グルコースの消費が増加し、ATP合成を解糖系に頼るようになることが知られているが¹⁶⁾、ファイトプラズマは炭素源の豊富な細胞内環境に寄生しており、代謝系遺伝子の多くを適応の結果、退行的進化により失うとともに、ATP合成に関しては解糖系に大きく依存している可能性がある。

7. ファイトプラズマの膜輸送系

このように、ファイトプラズマのゲノムには代謝関連遺伝子が際だって少なく、これまで自律増殖する生物の中で、遺伝子の少なさにおいて代表的存在であったマイコプラズマと比較しても著しく少ない。これは、ファイトプラズマがマイコプラズマと異なり細胞内に寄生しており、特に植物篩部という栄養豊富な環境に生息していることにより、遺伝子の多くを退行的進化により失ってしまった可能性が高い。また、ファイトプラズマがこれまで人工培養に成功していないことも、これら代謝系関連遺伝子が著しく少ないことに関連しているとも見られる。

逆に、ファイトプラズマのゲノムには、アミノ酸や金属イオンなどの取り込みに関与する膜輸送系遺伝子群が多数認められ、*M. genitalium*のゲノムにはコードされていないものも複数存在していた。ファイトプラズマは栄養豊富な篩部細胞環境に適応した結果、代謝系遺伝子の多くを失うかわりに、膜輸送系遺伝子を数多く獲得し、宿主から必要な物質を取り込むようになったと考えられる。また、アミノ酸や糖、リンゴ酸などのほか、マンガンや亜鉛、マグネシウム、コバルトなど金属イオンの取り込みに関与する膜輸送系も数多くコードされ、植物の生育に必要なこれらの金属イオンが、ファイトプラズマの感染により宿主から収奪され、ファイトプラズマ病に特徴的な病徴のひとつである養分欠乏に似た症状を引き起こす一因になっている可能性がある。

8. 病原性関連遺伝子

ファイトプラズマのゲノムには、特徴的な病原性因子は見あたらず、グルカナーゼ遺伝子や溶血毒様遺伝子が認められる程度であった。グルカナーゼは*X. fastidiosa*にもコードされており、セルロース分解への関与が指摘されている¹³⁾。しかし、それ以外に他の植物病原細菌で

知られる病原性関連遺伝子（例えば*hrp*遺伝子群などのタイプIII secretion systemや*avr*遺伝子など）に相同なものは認められなかったことから、機能未知の遺伝子が病原性に関与していると思われる。ファイトプラズマは代謝系の多くを欠く一方で、膜輸送系遺伝子を多くコードしており、宿主細胞質から積極的に必須代謝物質を収奪していると考えられ、これが病原性の一因となっている可能性がある。中でも、マイコプラズマでは認められないトランスポーター遺伝子が15種類もコードされているのも特徴的であった。アミノ酸や糖、リンゴ酸などのほか、マンガンや亜鉛、マグネシウム、コバルトなど金属イオンの取り込みに関与するトランスポーターも数多くコードされ、植物の生育に必要なこれらの金属イオンが、ファイトプラズマ感染により収奪され、養分欠乏に似たファイトプラズマ病に特徴的な病徴の一因となっている可能性がある。

代表的な蛋白質輸送系「Secシステム」を構成する遺伝子として、*secA*, *secY*, *secE*, *yidC*がコードされ、その発現と輸送活性が確認された^{17, 18)}。SecA, SecY, SecEの3蛋白質だけで、*in vitro*で「Secシステム」を再構成できることから、ファイトプラズマにも「Secシステム」が存在することは間違いないと考えられる¹⁷⁾。また、ファイトプラズマの菌体表面の大半を覆うとされる主要抗原性膜蛋白質には、「Secシステム」のシグナル配列が存在し、発現蛋白質がプロセッシングを受けていることが確認されており、「Secシステム」を介して菌体表面に輸送されると考えられる¹⁷⁾。細胞内寄生し、ペプチドグリカン等の細胞壁を持たないファイトプラズマの膜蛋白質や分泌蛋白質は宿主の細胞質に露出あるいは放出されることから、病原性など宿主との相互作用に重要な役割を果たすと思われる。

植物は病原体による感染から自身を守るため様々な防御反応を示すことが知られている。活性酸素の生成を伴うオキシダティブーストは、その初期段階の現象の一つである¹⁹⁾。ファ

イトプラズマゲノムには、マイコプラズマ (*M. genitalium*, *M. pneumoniae*) にはない Mn-SODをコードする*sodA*遺伝子が存在していた。ファイトプラズマはマイコプラズマと異なり、植物を宿主としており、感染時に発生する活性酸素に対して自身を守る必要があるためと思われる。

解読の終了したOY-M lineの染色体サイズ (860kbp) に対し、病徴の激しい分離株である OY-W lineは約140kbp (約1 Mbp) 大きい^{20) 6)}。この領域に病原性を決定する遺伝子の存在する可能性が高く、今後OY-Wとの比較ゲノム解析により、発病機構の解明が期待される。

9. 染色体外DNA

今回ゲノム解読したOY-M line (弱毒株) は同じファイトプラズマ種のOY-W line (強毒株) から突然変異により作出されたものであり、OY-NIM line (昆虫伝搬能を失った株) も作出されている。これらの株は、発病機構や昆虫媒介メカニズムに関わる遺伝子を解明する上で優れた材料と考えられる⁶⁾。これらの分離株からは、それぞれユニークなプラスミドDNAが単離されており、OY-Wには3種類、OY-Mには2種類、OY-NIMには2種類存在することが分かっている²¹⁻²³⁾。

これらはその複製酵素 (Rep) の特徴から、これまでにないユニークなプラスミドであり、2つのタイプに分けられる。①植物や昆虫に感染する環状1本鎖DNAウイルスであるジェミニウイルスのRepと相同性が高いプラスミドと、②pLS1 familyプラスミドのRepのC末端側にさらに約120アミノ酸長く、この領域には哺乳動物のサーコウイルスなどの1本鎖DNAウイルスのRepのヘリカーゼドメインが認められたプラスミドである。OY-MにはEcOYW1に相当する染色体外DNAが存在しないことや、EcOYMにはEcOYW2では見られるORFが2つ欠損していることなどから、これらの遺伝子が病原性に関わっていることも考えられる。

また、pOYのような構造のRepを持つプラスミドはこれまで無く、①pOYプラスミドの祖先がウイルスのヘリカーゼドメインを組換えにより獲得したか、あるいは②真核生物の1本鎖DNAウイルスは原核生物のプラスミドから進化したと考えられており、両者をつなぐMissing Linkにあたる可能性もある²⁴⁾。

約5 kbpのプラスミド (EcOYW2, EcOYM, EcOYNIM) はプラスミド同士のキメラであり、EcOYW2はEcOYW1とpOYWの組換えにより生じたと思われる。これは細菌の進化の過程でダイナミックな組換えを起こした痕跡であり、興味深い^{25, 26)}。

10. ファイトプラズマに対する特異抗原の作出

本研究で見いだされたファイトプラズマの各遺伝子にコードされる各種タンパク質のアミノ酸配列と使用されるコドンとの比較を行った。その結果、動物マイコプラズマやメソプラズマが、UGGコドンからUGAコドンへの置き換えを行って、トリプトファンが、UGGコドンから本来終止コドンのUGAコドンに変わっているのに対し、ファイトプラズマでは、このような現象は認められなかった。すなわち、従来の予想に反し、ファイトプラズマでは真核細胞と同様なコドンシステムを持っていることになり、ファイトプラズマの特異タンパク質の大腸菌等における大量発現が可能となった。

そこで、ファイトプラズマゲノムから見出された複製酵素や膜タンパク質など種々の特異タンパク質をコードする遺伝子より、大腸菌を用いて当該タンパク質を大量発現させ、それぞれの特異抗体を作製し、ファイトプラズマの感染植物体内における発現動態を調べた¹⁸⁾。その結果、OY-Wでは、篩部組織の異常増生とともにファイトプラズマが多量に増殖しているのに対して、OY-MやOY-NIMでは、篩部組織の限られた領域にその発現が認められた⁶⁾。これらの抗体は、すべてのファイトプラズマに存在する

共通抗原に対するものであり、ファイトプラズマの高感度検出抗体としての利用が期待される²⁷⁾。

11. ファイトプラズマの退行的進化

以上のように、ファイトプラズマゲノムの解読により、その極端な退行的進化が示唆された。ファイトプラズマは細胞内寄生性で、栄養豊富な植物篩部に生息するため、不要な遺伝子の多くを失ったのであろう。

この極端な退行的進化は他のMollicutes綱細菌と比較しても顕著である。現在、Mollicutes綱細菌のゲノムを比較するための非常に有用なツールである「MolliGen」が公開されている (<http://cbi.labri.fr/outils/molligen/>)。ここでは、これまでに決定されている11のMollicutes綱細菌のゲノムを様々な角度から解析することができる。ここでの解析においてもやはりOY-Mの特異性が目立ち、OY-M以外の10のMollicutes綱細菌がすべて持ち、OY-Mのみに存在しない遺伝子が41もあることがわかる。同様の解析を他のMollicutes綱細菌について行くと、*M. genitalium* (1 遺伝子)、*M. pulmonis* (2 遺伝子)、*M. penetrans* (0 遺伝子)、*M. pneumoniae* (0 遺伝子)、*M. gallisepticum* (0 遺伝子)、*M. mycoides* (1 遺伝子)、*M. hyopneumoniae* (11 遺伝子)、*M. mobile* (3 遺伝子)、*Mesoplasma florum* (1 遺伝子)、*Ureaplasma urealyticum* (12 遺伝子) であることから、ファイトプラズマがいかにか他の細菌と異なる退行的進化を遂げてきたかが分かる。

12. おわりに

ファイトプラズマは濾過性で純寄生性の植物病原細胞性微生物としては唯一のものである。これらの点で、ファイトプラズマは一般の細菌と異なる。従って、その研究方法もこれまで困難を極め、培養に成功していないことから、これまで分子生物学的な研究はもちろんのこと、

分類も全くなされていなかった。この微生物に分子レベルのメスを初めて入れることにより、これまで知られていなかった種々の知見が得られた。

ファイトプラズマゲノムには、複製や転写、翻訳などに必要な基本的遺伝子が認められる一方、アミノ酸合成系、脂肪酸合成系、TCA回路、酸化リン酸化に関与する遺伝子等を欠いている。これはマイコプラズマ同様、代謝に必要な物質の多くを宿主細胞に依存しているものと考えられる。しかし、ペントースリン酸回路やPTS、ATP合成酵素に関する遺伝子も欠いており、自律増殖する生物で、最少遺伝子を持つとされるマイコプラズマより代謝関連遺伝子が少ない。これはファイトプラズマがマイコプラズマと異なり、細胞内寄生で、栄養豊富な植物節部に生息するため、退行的進化により遺伝子の多くを失ったものと推定される。逆に、ファイトプラズマゲノムには、マイコプラズマには無い多数の膜輸送系遺伝子がコードされている。ファイトプラズマゲノムはエネルギー合成系をも欠き、栄養豊富な環境に適応した、新しいタイプの「最少ゲノム」であり、生物は生活する環境によって想像以上に多様な遺伝子構成で生きてゆけることを示唆している。

今後、比較ゲノム解析により、発病機構の解明が期待される。また、ファイトプラズマゲノムには機能未知な遺伝子が多数コードされており、オーソログスではない遺伝子が失われた遺伝子の代わりに機能している可能性もある。ファイトプラズマの病理を解明することにより、防除技術の確立につながる事が期待される。

以上の研究は、元東京大学教授土崎常男博士、元鯉渕学園教授西村典夫氏、鯉渕学園助手中島智氏、元農業研究センター室長（現独立行政法人農業環境研究所）塩見敏樹博士、元農業研究センター室長松田 泉博士、独立行政法人農業研究センター田中 穰氏、東京大学教授宇垣正志博士、同前助手宮田伸一博士（現果樹研究所主任研究官）、同前助手西川尚志博士らとの共

同研究で行った。また、同時に私が東京大学大学院農学生命科学研究科および東京大学大学院新領域創成科学研究科所属時を通じて、澤柳利実博士（現東京農業大学副手）、大島研郎博士（現本学農学生命科学研究科助手）、鄭 熙英博士、鈴木志穂博士をはじめ多くの方々の御協力の下に遂行したものである。また、本研究の一部は生物系特定産業技術研究推進機構「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」において行ったものである。

文 献

- 1) Doi, Y., et al. (1967), *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 33, 259-266.
- 2) Namba, S., et al. (1993), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43, 461-467.
- 3) Namba, S., et al. (1993), *Phytopathology*, 83, 786-791.
- 4) Jung, H.Y., et al. (2002), *Int J Syst Evol Microbiol*, 52, 1543-9.
- 5) Fleischmann, R.D., et al. (1995), *Science*, 269, 496-512.
- 6) Oshima, K., et al. (2001), *Phytopathology*, 91, 1024-1029.
- 7) Oshima, K., et al. (2004), *Nature Genet.*, 36, 27-9.
- 8) Bell, K.S., et al. (2004), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 11105-10.
- 9) Monteiro-Vitorello, C.B., et al. (2004), *Mol Plant Microbe Interact*, 17, 827-36.
- 10) Lee, B.M., et al. (2005), *Nucleic Acids Res*, 33, 577-86.
- 11) Miyata, S., et al. (2002), *DNA Cell Biol*, 21, 527-34.
- 12) Miyata, S., et al. (2002), *J. Gen. Plant Pathol.*, 68, 62-67.
- 13) Simpson, A.J., et al. (2000), *Nature*, 406, 151-7.
- 14) Shigenobu, S., et al. (2000), *Nature*, 407, 81-6.

- 15) Stephens, R.S., et al. (1998), *Science*, 282, 754-9.
- 16) Santana, M., et al. (1994), *J Bacteriol*, 176, 6802-11.
- 17) Kakizawa, S., et al. (2004), *Microbiology*, 150, 135-42.
- 18) Kakizawa, S., et al. (2001), *Mol Plant Microbe Interact*, 14, 1043-50.
- 19) Doke, N., et al. (1996), *Gene*, 179, 45-51.
- 20) Oshima, K., et al. (2002), *J. Gen. Plant Pathol.*, 68, 225-236.
- 21) Kuboyama, T., et al. (1998), *Mol Plant Microbe Interact*, 11, 1031-7.
- 22) Nishigawa, H., et al. (2001), *Microbiology*, 147, 507-13.
- 23) Nishigawa, H., et al. (2002), *Gene*, 298, 195-201.
- 24) Oshima, K., et al. (2001), *Virology*, 285, 270-7.
- 25) Nishigawa, H., et al. (2002), *Microbiology*, 148, 1389-96.
- 26) Nishigawa, H., et al. (2003), *J. Gen. Plant Pathol.*, 69, 194-198.
- 27) Wei, W., et al. (2004), *Phytopathology*, 94, 683-686.

◀国内情報▶

イネ白葉枯病菌のゲノム構造
—なぜ多様なレースが生まれたか—

¹独立行政法人 農業生物資源研究所,
²独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 中央農業研究センター
落合 弘和¹・井上 康宏²・竹谷 勝¹・加来 久敏¹

世界的に重要なイネの病原微生物であるイネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) のゲノム解析を行った。その結果, *avrBS3/pth*や*Hrp*レギュロンなど病原性に関連する遺伝子の数が他の*Xanthomonas*属細菌と比べて著しく多いこと, さらに遺伝子の転移因子である挿入配列 (IS) がゲノム全体の10%以上になることが明らかとなった。このようなゲノム構造は多様なレース分化が生じた病原微生物の特徴と考えられた。

1. はじめに

近年ヒト, イネなどいろいろな生物でゲノム解析が行われてきた。植物病原微生物では細菌のゲノムサイズが糸状菌の約1/10と小さいことから, *Xylella fastidiosa*を筆頭に次々とゲノム解析が完了している^{2, 3, 6)}。それらの中で*Xanthomonas*属細菌は世界的に重要な植物病原微生物を含み, すでにカンキツかいよう病菌 (*X. axonopodis* pv. *citri*) と十字科野菜黒腐病菌 (*X. campestris* pv. *campestris*) のゲノム解析がブラジルのグループによって完了している。

このような状況の下, 我々はイネ白葉枯病菌 (*X. oryzae* pv. *oryzae*) のゲノム解析に取り組み, その全貌を明らかにした。イネ白葉枯病は近年, ハイブリッド・ライスの普及とともにアジア各国で再び問題となっているが, そのような病原としての重要度に加えて, イネいもち病と並んで夥しい数のレース (病原性が異なる菌系) が存在する, 高度に進化した病原細菌であること, さらに, 宿主であるイネのゲノム解析が完了しているため, 生物間相互作用のモデル系としての意義を有している。

OCHIAI Hirokazu¹, INOUE Yasuhiro², TAKEYA Masaru¹, KAKU Hisatoshi¹

¹〒305-8602 つくば市観音台2-1-2

²〒305-8666 つくば市観音台3-1-1

ここではそのようなイネ白葉枯病菌の高度にレース分化が進んだ病原細菌としてのゲノム構造について述べたい。

2. イネ白葉枯病菌ゲノムの特徴

今回, ゲノム解析に供試した菌株はMAFF311018 (T7174) である。本菌株を用いたのは日本に最も多く分布するレース I の代表菌株であり, イネの抵抗性遺伝子 *Xa1* との関係や病原性の多様化に関わる avirulence gene (*avr*) を多数有することが期待されたためである。

ゲノム解析の結果, 本菌のゲノムは環状染色体で, そのサイズは4,940,217bpであった (図1)。遺伝子領域の予測の結果, 2個のrRNA遺伝子オペロン, 53のtRNA遺伝子と4,372個のタンパク質をコードする遺伝子の存在が推定された。また, 全ゲノムの平均GC含量は63.7%であった。また, 本細菌はプラスミドを保有していなかった。

本細菌のゲノムの第一の特徴は, insertion sequence (IS) などの繰り返し配列が多数存在していた点であった。これらはゲノム内に散在し, 単独で存在する場合も見られたが, 大多数は複数のISが前後に幾重にも挿入されていた。また, それらはISの転移酵素 (トランスポゼース) と部分的に相同性を有する不完全なも

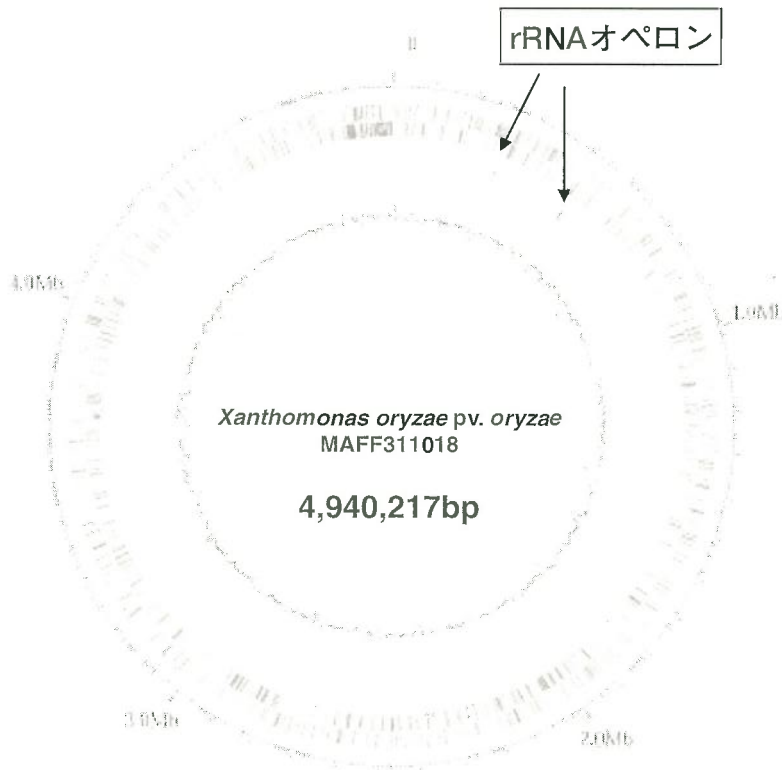


図1 イネ白葉枯病菌環状ゲノム地図

の、所謂、挿入配列 (IS) の残骸がかなり多く、従ってトランスポゼースと推定されたものは計611個にも及び、これらのゲノム配列における割合は実に約10%に達した。トランスポゼースのホモログが幾重にも挿入されていた領域の一例を図2に示した。本図における約30kbの領域には13の完全な転移酵素様配列と6の部分的な配列が幾重にも並んでおり、その中に他の遺伝子が散在していた。

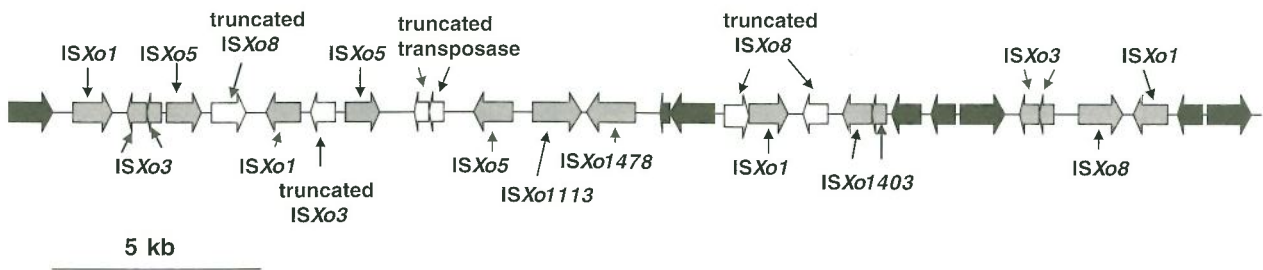


図2 ゲノム内におけるトランスポゼースホモログのホットスポットの例

3. 病原性関連遺伝子群の解析

イネ白葉枯病菌は世界的には30以上のレースが報告されている。このようにレース分化が進んだ植物病原細菌のゲノム解析はこれまで行われておらず、解析により、なぜこれほどまでにレース分化が進んだかを示す、特徴あるゲノム構造が明らかにされることが期待された。ゲノム解析の結果、予想通り、病原性の分化に関連した非常にユニークなゲノム構造が明らかとなった。

1) *avr*遺伝子の特徴

植物病原細菌におけるレース分化等の病原性の多様化には、*avr*遺伝子が関わっていることが知られている^{3, 4)}。イネ白葉枯病菌には、*avrBs3/pth family*^{1, 7)}に属する非病原性遺伝子がゲノム上に17個存在し、しかもゲノムの7カ所に分散して存在していることが明らかになった (図3)。

このような*avrBs3/pth*が多数、しかも散在している構造はイネ白葉枯病菌の高度なレース分化との関連を示唆している。これらは、一部を除き、2つから4つの*avr*遺伝子がタンデム

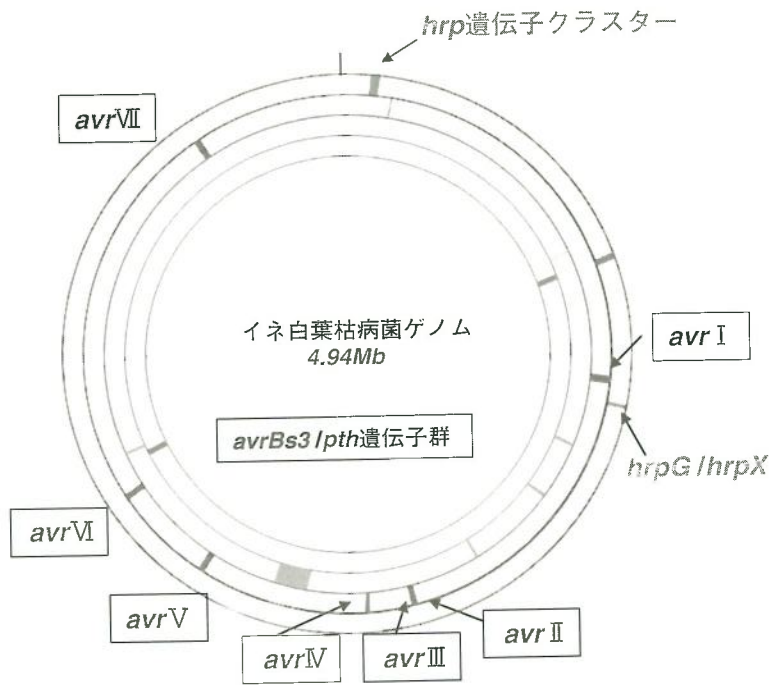


図3 ゲノム上における *hrp* 遺伝子群と *avrBs3/pth* タイプの *avr* 遺伝子の分布

に並んで存在し、また、その近傍には複数の挿入配列やファージ関連の遺伝子が存在していた(図4)。挿入配列やファージは遺伝子の重複に関係することが知られていることから、イネ白葉枯病菌における *avr* 遺伝子の重複は、挿入配列やファージによって引き起こされたものであると考えられた。

avrBs3/pth はロイシンリッチ領域 (LRR)、核移行シグナル (NLS) 及び中央ドメインにおける102塩基 (34アミノ酸残基) の繰り返し配列から成るが、各 *avr* 遺伝子間の構造の差異は主に中央ドメインの繰り返し数のみであり、他の機能ドメインはほぼ完全に保存されていた。また、プロモーター領域

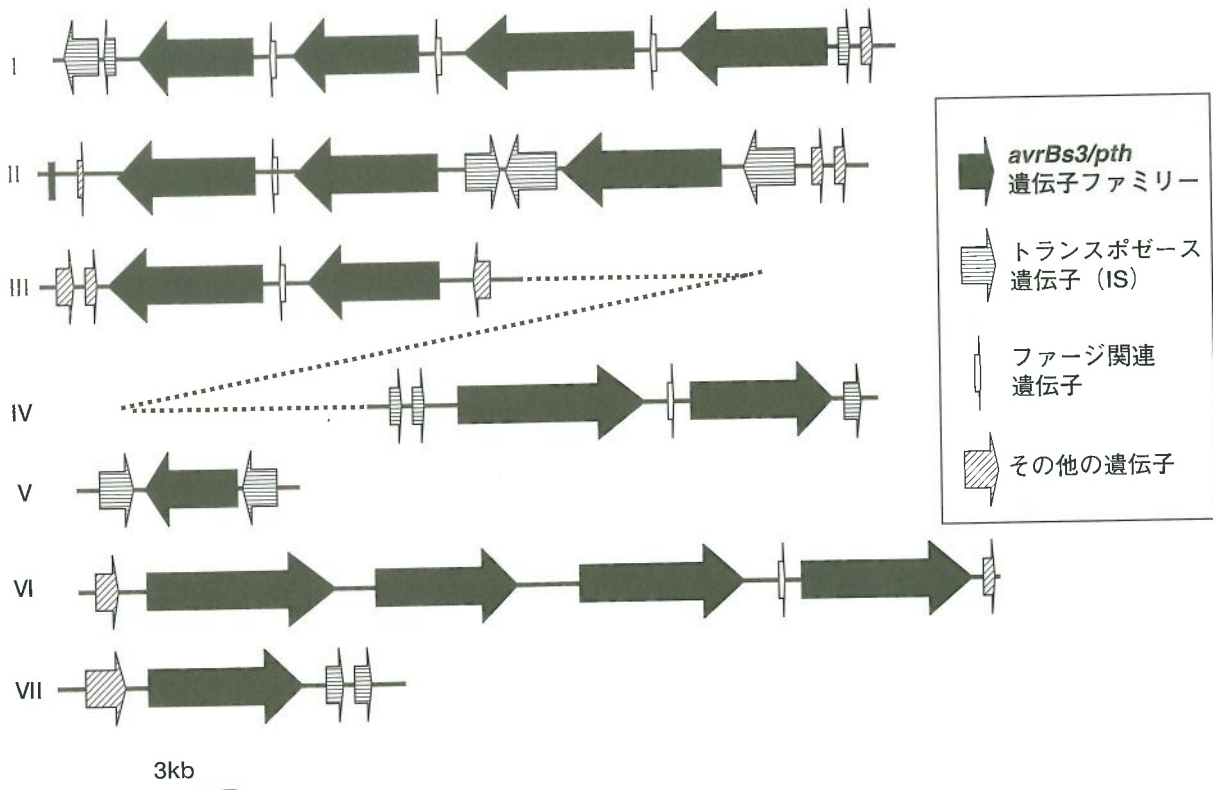


図4 各 *avr* 領域の遺伝子地図

(-10, -35領域) もほぼ同じであった。これら遺伝子群の発現をRT-PCRによって解析した結果、どの遺伝子コピーか同定はできなかったが、遺伝子として発現していることが明らかになった。このことから、これら複数の遺伝子コピーはそれぞれ何らかの役割を果たしていることが示唆された。

2) HrpXレギュロンに属する遺伝子の特徴
病原性に最も重要な *hrp* 遺伝子クラスターと同じように HrpX で発現制御される遺伝子には、plant inducible promotor (PIP) box の塩基配列 (TCCG ...N16... TTCG) の存在が予想される。そこで、ゲノム情報から新規の HrpX レギュロンに属する遺伝子を探索する方法として、PIP box の塩基配列を指標にゲノムデータベースから抽出を行った。その結果、既知の *hrp* 遺伝子を含め 37 個の遺伝子を見出した。それらすべての遺伝子について、*hrp* 遺伝子の発現を誘導する培地を用いて遺伝子の発現パターンの解析を行ったが、必ずしもすべての遺伝子において *hrp* 遺伝子群と同様な発現制御を受けていなかった。このことから、PIP box 以外にも制御領域がある可能性が示唆された。

4. おわりに

以上述べてきたように、イネ白葉枯病菌のゲノムの特徴は、1) 病原性遺伝子でレース分化などに関与する *avr* 遺伝子が多数、しかも pathogenicity island ではなくゲノム全体に散在する形で存在すること、2) HrpX レギュロンに属する遺伝子を同様に多数保有すること、3) ゲノム再編に関わる転移因子である IS など繰り返し配列が極めて多いこと、として集約される。これらは育成された多くの抵抗性品種や導入された新しい品種に対抗して、長い歴史を通じて進化してきたイネ白葉枯病菌の生存戦略を見事に反映したゲノム構造ということが出来る。

はじめに述べたように、イネ白葉枯病菌は生物間相互作用、とくに植物-病原微生物間相互

作用のモデル系として我が国のみならず、米国、中国、フィリピン、インドなどで分子生物学的研究に用いられてきた。この度のイネ白葉枯病菌のゲノム解析により、今後は DNA アレイによる病原性関連遺伝子群の網羅的解析や遺伝子破壊株の作製による機能解析、さらにタイプ III 蛋白分泌装置を介して分泌される病原性エフェクターの解析等によって、宿主との相互認識や病原性遺伝子発現機構の分子レベルでの研究の飛躍的な進展が期待される。

文 献

- 1) Bonas, U., Stall, R. E. and Staskawicz, B. J. (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.* 218 : 127-136.
- 2) da Silva, A. C. R. et al. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417 : 459-463.
- 3) Gabriel, D. W. (1999). Why do pathogens carry avirulence genes? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55 : 205-214.
- 4) Leach, J. E., and White, F. F. (1996). Bacterial avirulence genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34 : 153-179.
- 5) Salanoubat, M. et al. (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415 : 497-502.
- 6) Simpson, A. J. et al. (2000). The genome sequence of plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406 : 151-157.
- 7) Swarup, S., Yang, Y., Kingsley, M. T. and Gabriel, D. W. (1992). A *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhost. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5 : 204-213.

◀国内情報▶

フォトクロミック蛍光タンパク質, Dronpa (ドロンパ)

理化学研究所 脳科学総合研究センター
 先端技術開発グループ 細胞機能探索チーム
 宮 脇 敦 史 ・ 安 藤 亮 子

ウミバラ科サンゴから新規蛍光蛋白質（4量体形成）をクローニングし、遺伝子の改変によって、単量体でフォトクロミックな特性を示すものを作製した。2つの異なる波長の光で蛍光ラベルをオン・オフ制御できる技術を開発した。この技術によって、時間を追って細胞内の分子の動きを繰り返し観測することが可能になった。

1. 生体分子の動きを解析するために

生体分子は、生きた細胞の中で常に動いている。動力の種類によって、“拡散”あるいは“輸送”と呼ばれ、動きのレンジ（幅）によって、“揺らぎ”（幅が小さい場合）あるいは“移行”（幅が広い場合）と呼ばれる。そうした生体分子の動きの時間的・空間的制御が、細胞の増殖、分化にとって重要であることがわかってきた。Green Fluorescent Protein (GFP) など、オワンクラゲやサンゴ・イソギンチャクに由来する蛍光タンパク質を使って、生体分子をラベルして可視化する技術（蛍光イメージング技術）は広く普及している。しかし一般的にはラベルした生体分子の分布の定常状態を観察することしかできない。動きに関する定量的な情報は得られない。生体分子の動きを追跡するために、従来蛍光の褪色を用いる技術が使われていたが、褪色を起こすのに時間がかかるため、遅い動きしか観察できなかった。光を当てることで生体分子の蛍光を瞬時にスイッチオンするような技術（光で任意に分子をラベルする技術）は2002年に始まった。たとえば我々は、紫（外）光で緑から赤に色を変えるKaedeを発表した。しかし、Kaedeの光ラベルは不可逆的である。赤になったKaedeを緑に戻すことはできない。一つの細胞につき一回のラベルしか施行できない。

MIYAWAKI Atsushi, ANDO Ryoko

〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1

生体分子の動きを、ある時間一点でしか追跡できないことになる。生体分子の動きは、刺激の前後などで変化することが予想される。同一の細胞で何回も繰り返して生体分子の動きを観測するためには、定期的のリセットをかけて（以前にラベルした蛍光を消去して）新たに光ラベルし動きを観測できるような技術が必要となる。

2. フォトクロミック蛍光タンパク質の開発

我々は、ウミバラ科の石サンゴ（図1）から、新規の緑色蛍光タンパク質をクローニングした。これに遺伝子変異を加えることによって、単量体でフォトクロミックな性質（物質が光を吸収することによって、色が可逆的に変化する

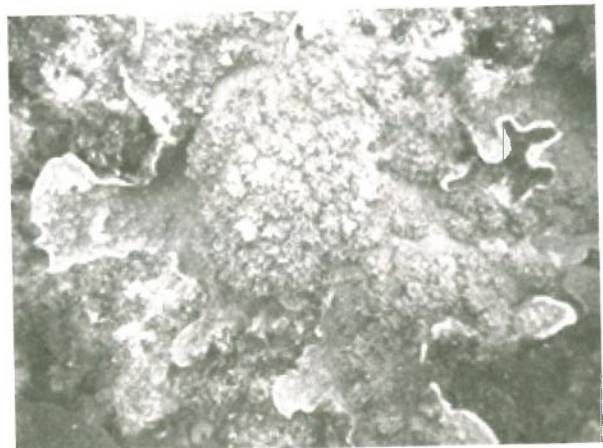


図1 ウミバラ科の石サンゴ

性質)を示す変異体を開発することができた。普段は、青色領域に吸収をもっており、青色のかなり弱い光を当てると明るい緑色の蛍光を発する。ところが、青色の光を非常に強く当てると、その吸収帯がなくなって、代わりに紫色領域に吸収が現れてくる。次に、紫色の光をそっと当てると、瞬時に、最初の状態にもどる。異なる2つの波長の光で、緑色蛍光のオン(青色領域に吸収がある場合)と緑色蛍光のオフ(紫色領域に吸収がある場合)とを繰り返すことができる。緑色蛍光の消失、出現を、それぞれ、“Dron(忍者用語で姿を晦ますこと)”, “pa(光活性化, photo-activationに由来)”になぞらえ、このタンパク質を「Dronpa(ドロンパ)」と命名した。Dronpaをカバーガラスの上に一

様に塗り広げ、アルゴンレーザー(488nm)と半導体レーザー(405nm)を搭載した通常の共焦点レーザー走査顕微鏡を使って、緑色蛍光の消去、書き込み、読み出しを行った実験を示す(図2)。これは、「書き換え可能な分子メモリーシステム」と呼ぶことができる。CD-RWやDVD-RWに相当するものと言える。フォトクロミック分子といえば、ジアリールエテンなどの有機化合物などが光メモリーの新材料として注目されている。しかしフォトクロミック蛍光をタンパク質で実現したのは今回の成果が初めてである。遺伝子導入で発現可能、水環境で動作可能、生分解可能といったバイオマテリアルとしての特長を生かした応用が期待できる。



図2 緑色蛍光の書き込み、読み出し、消去実験

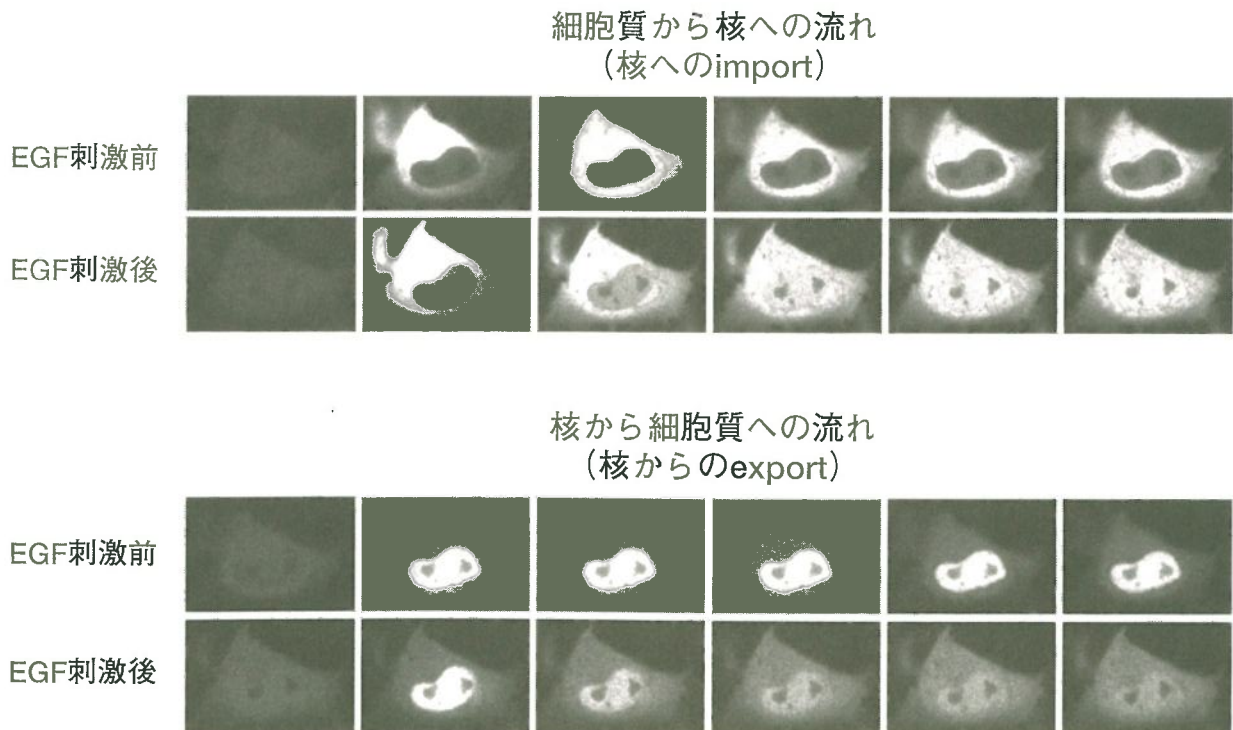


図3 MAPK-Dronpaの細胞質/核間の移行

3. MAPKの核—細胞質間シャトリングの制御

我々は、Dronpaを使った可逆的光ラベル技術を細胞生物学実験に応用した。細胞内には、外界の刺激に応答して、細胞質と核とを行ったり来たりする分子がたくさんある。中でもMAP kinase (MAPK) と呼ばれる酵素は有名だ。増殖因子などの刺激が来ると、細胞質から核へ移行し、様々な転写因子をリン酸化して遺伝子発現を制御すると考えられている。細胞の増殖、分化の過程で中心的な働きをしており、様々な疾病に関わっていることがわかってきている。そこで、MAPKにDronpaを融合したMAPK-Dronpaを培養細胞に発現させた。全体の蛍光を消去したあと、細胞質にあるMAPK-Dronpaを光ラベルし、それらが核へ移行する様を観察し、その後再び全体を消去し、今度は核にあるMAPK-Dronpaを光ラベルし、それらが細胞質へ移行する様を観察した。どちらの移行ともに効率が低いことが認められた (図3,

EGF刺激前)。続いて、同じ細胞に上皮増殖因子をふりかけた上で、上記の細胞質→核、核→細胞質を観る実験を何回も繰り返した。上皮増殖因子添加後10~15分してから、MAPK-Dronpaの移行が両方向性に亢進するのが観察された (図3, EGF刺激後)。核におけるMAPKの情報制御が、この酵素の細胞質—核間のシャトリング (行き来) のスピードによって制御されていることを、初めて証明することができた。

文 献

- 1) Ando, R. et al. (2004), *Science*, 306, 1370-1373
- 2) Miyawaki, A. (2004), *Nature Biotechnology*, 22, 1374-1376
- 3) Miyawaki, A. et al. (2003) *Nature Cell Biology*, Suppl., S1-S7
- 4) Ando, R. et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 12651-12656

◀国内情報▶

植物の生長ホルモン・ブラシノステロイドと
受容体BRI1の結合メカニズム¹理化学研究所 中央研究所 分子昆虫学研究室²九州大学大学院 理学研究院 生物科学部門瀬戸 秀 春¹ ・ 木 下 俊 則²

植物ホルモン受容体は、様々な植物生理現象の発現に至る物質情報伝達ネットワークの起点であり、その受容機構の解明は、植物科学の中心的な研究課題の一つである。最近、米国ソーック生物学研究所と理化学研究所の共同研究によって、植物ホルモンの一つであるブラシノステロイドが他の因子の介在なしに細胞膜1回貫通型受容体BRI1の細胞外の特長領域に直接結合していることが明らかとなった。これによりBRI1の改変による有用な遺伝子組換え作物の作出やBRI1を標的としたSBDD (Structure Based Drug Design) による創農業への展開の可能性が大きく前進した。

1. はじめに

植物ホルモン受容体は、植物の生長過程で観察される様々な生理現象（休眠、発芽、伸長、開花、着果、枯死など）の発現に至る複雑な物質情報伝達ネットワークの起点であり、その解明は、長年、植物科学の中心的な研究課題の一つとなってきた¹⁾。ホルモン受容体が同定され、受容機構の詳細が明らかになれば、ホルモンが関与する情報伝達ネットワークの解明研究が、受容体を起点に、更に進展すると期待される。また、ホルモン受容体は、遺伝子組換え作物や農薬の開発研究で有力な標的となる。即ち、受容体の遺伝子を改変して植物の生長を制御、農業に有利な品種を作り出す分子育種や、受容体を標的とした効果選択性の高い植物生長調節剤（強力なホルモン活性を示す化合物、或いは逆にホルモン活性を阻害する化合物）の開発が可能である。しかし、分子生物学の発展を背景に植物生理現象の分子レベルでの理解が急速に深まってきた現在でも、7種知られている植物ホルモン [オーキシン, ジベレリン, エチレン, サイトカイニン, アブシジン酸, ブラシノステ

ロイド (BR), ジャスモネート] のうち、受容体が明らかにされたのは、エチレン, サイトカイニン, BRに限られている²⁾。

本稿では、最近、進展著しいBR受容体研究の経緯を、筆者らが行ったBRと受容体BRI1の結合メカニズムの解明研究³⁾を中心に紹介する。更に、筆者らが、BR受容体研究の終着点として目指しているBR受容体を標的としたSBDDによる創農業への展開の可能性についても言及する。

2. BRは細胞膜1回貫通受容体型キナーゼBRI1により受容される

BRは50種をこえる一群のステロイド化合物であり、細胞の分裂や伸長、植物の光形態形成、維管束形成などにおいて重要な役割を果たしている²⁾。これまでの研究により、モデル植物であるシロイヌナズナにおいて多くのBRの生合成欠損変異体や非感受性変異体 *bri1* (*brassinosteroid insensitive 1*) が単離されており、これらは矮性、濃緑で丸みのある葉などの顕著な表現形を示す (図1A)。また、暗所では、あたかも光が当たっているような胚軸の伸長抑制、葉の展開など *de-etiolated* の表現形を示す。BRの生合成欠損変異体は外部よりBRを添加す

SETO Hideharu¹, KINOSHITA Toshinori²¹〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1²〒810-8560 福岡市中央区六本松4-2-1

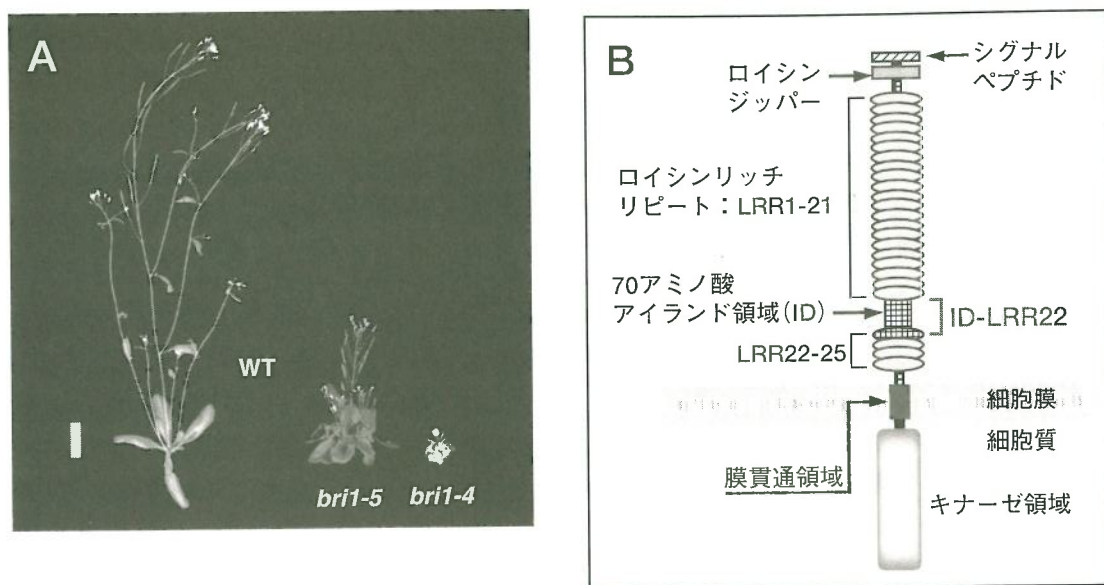


図1 シロイヌナズナの変異体とBRI1の構造

A：野生株（WT）と変異体。**bri1**変異体は矮性などの顕著な表現形を示すが、その程度は変異箇所の違いにより異なる。スケールバーは2 cm。

B：BRI1の構造の模式図。N末端側より、シグナルペプチド、ロイシンジッパー、21個のロイシンリッチリピート（LRR）、70アミノ酸アイランド領域（ID）、4個のLRR、細胞膜貫通領域、セリン/スレオニンキナーゼ領域が存在する。ID-LRR22が筆者らの研究で明らかとなったブラシノステロイドの結合領域。

ることで表現形が野生株のように回復するが、**bri1**はBR添加によってもその表現形は回復しない。

1997年、**bri1**の原因遺伝子が同定され、発現タンパク質BRI1は、その構造特性からBRの受容体である可能性が示唆された⁴⁾。即ち、BRI1は、1つの細胞膜貫通領域を挟んで、N末側の細胞外に25個のロイシンに富んだ繰り返し領域（ロイシンリッチリピート：LRR）を、C末側の細胞内にセリン/スレオニン（Ser/Thr）キナーゼ領域を持ち、シロイヌナズナで大きなファミリーを形成するLRR-受容体型Ser/Thrキナーゼに分類される。その中でBRI1に特徴的なのは、21番目のLRR（LRR21）と22番目のLRR（LRR22）の間に70個のアミノ酸からなるアイランド領域（ID）が存在することである（図1B）。以後、BRI1はBRの受容体候補として、その証明研究が行われ、先ず、イネの受容

体型キナーゼXA21のキナーゼ領域とBRI1の細胞外領域のキメラ受容体を用いた解析から、BRの受容にはBRI1の細胞外領域が関わっていることが示された⁵⁾。更に、2001年、BRの活性本体と考えられているブラシノライド（BL）の高放射活性トリチウム標識体（T-BL）⁶⁾を用いた結合親和実験による速度論的解析を主体とした研究で（図2）、BRI1がBRと細胞外で特異的に結合、BRの情報を細胞内へ伝達していること、即ち、BRI1がBRの細胞膜受容体であること（正確には、BRI1がBRを受容していること）が証明された⁷⁾。

しかしながら、以上の実験では、BRがBRI1の細胞外領域に直接結合しているのか、それとも他の受容タンパク質やペプチドを介して結合しているのか、更に、BRI1のどの部分に結合しているかなどは不明のままであり、その解明は、BRの受容機構を分子レベルで理解する上

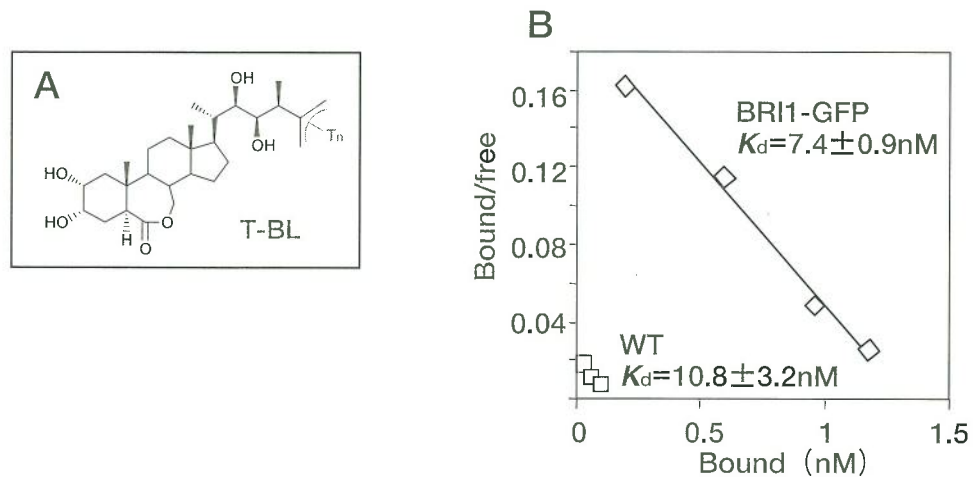


図2 トリチウム標識ブラシノライドの構造とBRI1との結合親和活性

A：トリチウム標識ブラシノライド（T-BL）は 50 Ci mmol^{-1} の放射活性を有する。

B：シロイヌナズナの野生株（WT）およびBRI1-GFP融合タンパク質を高発現した形質転換体のマイクロソーム画分での結合親和実験の結果をスカッチャードプロット解析した [文献7より改変]。

で残された重要な研究課題であった。特に、その結合様式については、それまでリガンドが明らかにされていたLRR-受容体型キナーゼは、全て、タンパク質やペプチドをリガンドとして

いるという前例に照らし、ステロイドであるBRとBRI1の結合に、他のタンパク質やペプチドが介在していると考えの方が、むしろ自然であった。

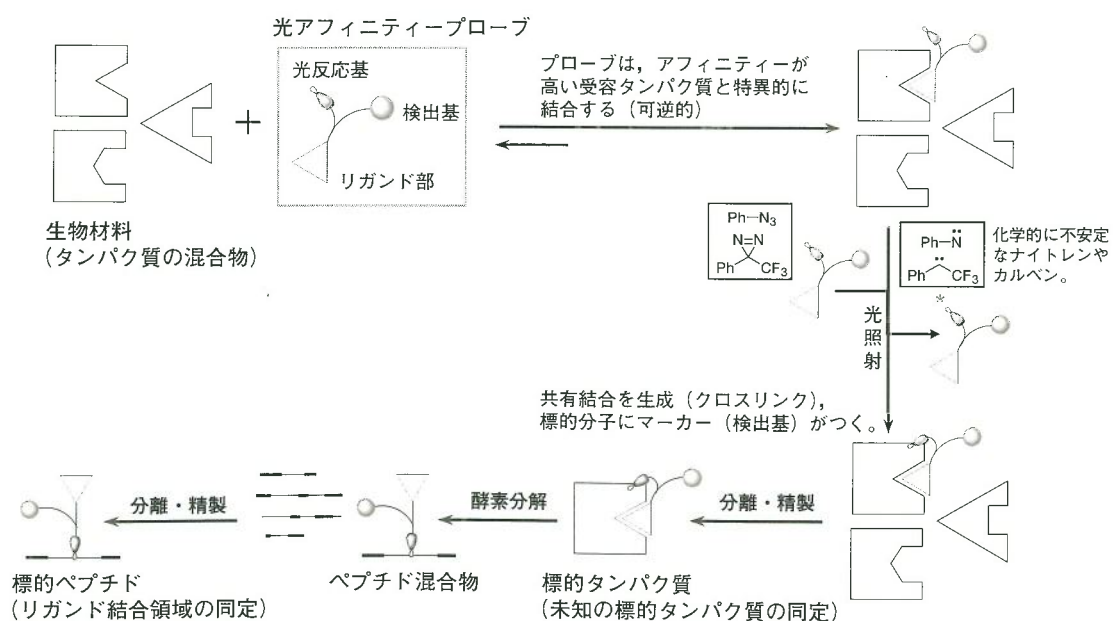


図3 光アフィニティーラベル法の概略

3. BRはBRI1のID-LRR22領域に直接結合する

リガンドを認識する生体高分子を特異的に化学修飾し特定する方法の1つに光アフィニティーラベル法がある(図3)。この方法ではリガンドと結合親和性(アフィニティー)が高いタンパク質やペプチドを、光アフィニティープローブで補足し、これを検出するためのマーカをつける。光アフィニティープローブは、一般にリガンドの誘導体であり、相手方を光反応に

よる共有結合の生成で補足する光反応基(フェニルアジド或はフェニルジアジリン基)と、これを検出するマーカーとなる検出基(放射性同位元素或はビオチン基)を持ち、リガンドの基質特異的結合親和性を保持していることが必要である。この化学的手法を分子生物学的方法と組み合わせることにより、特定のリガンドに対する受容体やその結合領域を同定することが可能となる。そこで、筆者らは、BRとBRI1の結合様式及びその結合領域を明らかにするため、光アフィニティーラベル法を用いて実験を進めた。

まず、本法に必要な光アフィニティープローブとして、biotin-tagged photoaffinity castasterone (BPCS) を合成した。BPCSは、光反応基であるフェニルジアジリン基と検出器であるビオチン基で二重に修飾したカステステロン(BLの生合成前駆体)の誘導体である(図4A)。カステステロン(リガンド)部位のアフィニティーにより受容体と複合体を形成したBPCSを、光照射(365nm)すると、フェニルジアジリン基は、化学的に不安定なカルベンを生成し瞬時に近傍の分子と安定な共有結合を生成(クロスリンク)する。その結果、電気泳動後もビオチン基をマーカーとする検出法により、BPCSと結合したタンパク質を同定することができる。BPCSのBRI1への結合親和性は低下したが、BLの数%の活性を保持していた。

次に、BPCSを用い、BRI1-GFP融合タンパク質を高発現したシロイヌナズナの形質転換体

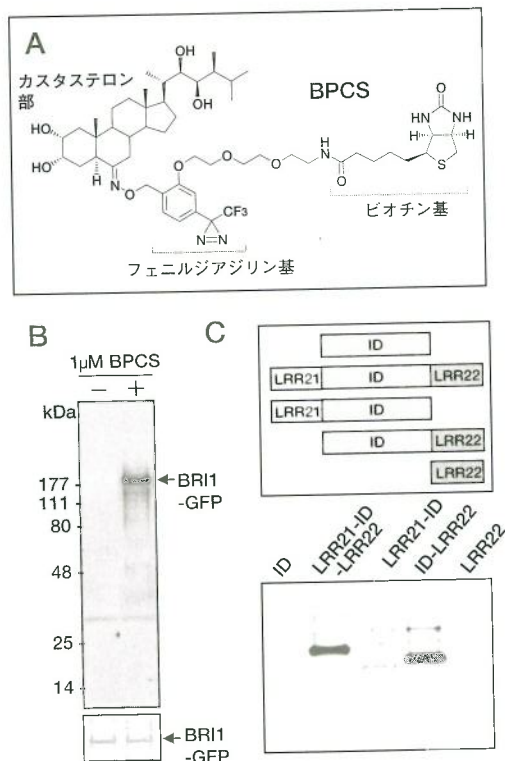


図4 光アフィニティープローブの構造および結合シグナル

A: 光アフィニティープローブであるbiotin-tagged photoaffinity castasterone (BPCS) は、光反応基であるフェニルジアジリン基と検出器としてのビオチン基を持ち、紫外線を照射することによりフェニルジアジリン基を介して受容体と共有結合をつくる。
B: BRI1-GFP形質転換体からGFP抗体を用いて免疫沈降したBRI1-GFP免疫沈降物におけるBPCSの結合。BPCSはBRI1-GFPに特異的に結合した。下のパネルはGFP抗体によるBRI1-GFPのウエスタンブロット。
C: BRI1断片におけるBPCSの結合。上のパネルは実験に用いた組換えBRI1断片の構造図。下のパネルはBPCSの結合シグナル。BPCSはLRR22-ID-LRR22およびID-LRR22と特異的に結合し、ID-LRR22が必須領域であることがわかる。文献3より改変。

のミクロソーム画分、及び、これを精製した BRI1-GFP免疫沈降物を材料として光アフィニティーラベル実験を行った。その結果、BPCS はBRI1-GFPに特異的に結合してクロスリンクすることが明らかとなった（図4B）。更に、BPCSの結合領域を明らかにするため、幾つかのBRI1断片を大腸菌で発現・精製し、それぞれについて光アフィニティーラベル実験を行った。その結果、BPCSが特異的に結合してクロスリンクするのに必要な最小領域として、IDとIDに隣接したC末端側のLRR22からなる94個のアミノ酸領域（ID-LRR22）が必要であることが明らかとなった（図4C）。このことは、T-BLを用いた結合親和実験でも確認され、ID-LRR22断片へのBLの結合親和活性は全長BRI1の場合とほぼ同じ値を示した。従って、BRI1は、BRが他の因子の介在なしに直接結合するBR受容体であり、その結合部位は、BRI1細胞外領域のID-LRR22に存在すると結論した。

LRR-受容体型キナーゼは動植物界に広く存在しているが、BRI1はペプチドやタンパク質以外の低分子化合物をリガンドとするLRR-受容体型キナーゼの初めての例となる。従って、今後、BRがもたらす植物の様々な生理現象について、分子レベルでの解明が受容体BRI1を中心に更に進展するだけでなく、BRI1以外のLRR-受容体型Ser/Thrキナーゼについてもリガンドや機能が明らかにされることが期待される。また、BRI1は、全ての多細胞生物を通じて、ステロイドそのものをリガンドとする膜受容体であることが証明された最初の例だが、ステロイドの細胞膜受容体については、現在までほとんど明らかにされていない。更に、動物では様々なステロイドホルモンに対応して数多くの受容体（核内受容体）が同定されており、それらは例外なく相同性の高いアミノ酸配列からなるステロイド結合領域を持っている。しかし、BRのBRI1結合領域である94個のアミノ酸からなるID-LRR22は、これらのステロイド結合領域とは全く相同性がなかった。従って、ID-LRR22は、動植物を通じて他に類型のない、新

しいステロイド結合領域ということになる。BRI1について明らかにされた以上のような事実は、動物ステロイドの細胞膜受容機構の解明研究に重要な知見を与えていると思われる。

4. SBDDによる創農薬の可能性

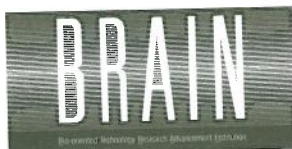
以上の様に、BRが他の因子の介在なしに受容体BRI1のID-LRR22に直接結合することが明らかとなり、BRI1（現在、BRI1のオーソログは、イネ、オオムギ、トマト、エンドウ、ワタなど主要な作物においても同定されている）の改変による有用な遺伝子組換え作物の作出やBRI1を標的とした創農薬への展開の可能性が大きく前進した。特に、全長では困難であった膜貫通型タンパク質BRI1の大腸菌による大量発現が、ID-LRR22断片では可能になったこと、更に、BRの結合領域が131kDaのBRI1全長から11kDaのID-LRR22に絞り込まれたことより、創農薬に至るSBDD研究が現実味を帯びてきた。現在では11kDa程度のタンパク質の構造解析は十分に可能な状況にある。従って、筆者らは、今後、NMRやX線結晶構造解析といった手法により、ID-LRR22やID-LRR22:BR複合体の構造情報を得、ID-LRR22の立体構造とBRが結合しているアミノ酸残基を明らかにしていく予定である。これにより、コンピューター上で、ID-LRR22の立体構造モデルを使ったドッキングシミュレーションによる様々な化合物のバーチャルスクリーニングが可能となり、BRI1を標的とした効果選択性の高い植物生長調節剤、即ち、強力なBR活性を示す化合物、或いは逆にBR活性を阻害する化合物の探索が効率的に進むと考えている。

文 献

- 1) 小柴共一, 神谷雄治編 (2002), 新しい植物ホルモンの科学, 講談社, 東京
- 2) 福田裕穂ら監修 (2004), 植物ホルモンのシグナル伝達 (植物細胞工学シリーズ20),

秀潤社, 東京
 3) Kinoshita, T. et al. (2005), *Nature*, 433, 167-171
 4) Li, J. and Chory, J. (1997), *Cell*, 90, 929-938
 5) He, Z. et al. (2000), *Science*, 288, 2360-

2363
 6) Seto, H. et al. (1998), *Tetrahedron Lett.*, 39, 7525-7528
 7) Wang, Z.-Y., et al. (2001), *Nature*, 410, 380-383



ブレイン テクノニュース
 バックナンバーのご案内
 第108号
 2005年3月15日発行

総説

イネゲノム全塩基配列の解読完了と今後の課題…佐々木 卓治

国内情報

シロイヌナズナの根における幹細胞ニッチの制御機構
 ……相田 光宏

化学発光法による食品の生菌検査

……山庄司 志朗・川崎 晋ほか

ミヤコグサのゲノム分析に基づくプラスチド局在性の根粒・

菌根形成初期シグナル因子の発見

……………川崎 信二・今泉 温子・村上 泰弘
 家畜遺伝情報の産業利用へ向けて一牛肉の質と豚のインフルエンザウイルス抵抗性……………三橋 忠由
 紫外線照射による穀物殺菌技術……………日高 靖之

地域の先端研究

エリンギにおける担子胞子形成欠損突然変異株の作出
 ……角田 茂幸

文献情報

出生後2日以内に死亡したクローンウシの臓器における遺伝子発現の異常……………(抄訳：下司 雅也)
 タイセイヨウマダラの激減に先立って見られた成熟傾向における急速な進化……………(抄訳：岡本 崇)
 ワイン醸造における酵母*Saccharomyces cerevisiae*の酸素消費量, および発酵量への影響……………(抄訳：安達 美和)
 カリウム欠乏のプロテオーム解析……………(抄訳：岩井 純夫)

生研センターからのご案内

◀国内情報▶

麻痺性貝毒によるトゲクリガニの毒化

¹独立行政法人 水産総合研究センター 中央水産研究所 利用加工部 食品安全研究室，

²福島県水産事務所 漁業振興グループ，³福島県水産試験場 漁場環境部

及川 寛¹・藤田 恒雄²・齋藤 健³・里見 正隆¹・矢野 豊¹

麻痺性貝毒は、フグ毒と同様な作用をもつ毒成分であり、これを生産する渦鞭毛藻プランクトンが発生した海域では、プランクトンフィーダーである二枚貝類が毒化することが知られている。同じ海域には二枚貝を捕食する甲殻類や巻貝類も生息するが、これまで国内ではそれらの毒化について注意が払われてこなかった。本稿では、肉食性の高いカニ類であるトゲクリガニの毒化について調査を行い、室内飼育実験で毒化や減毒の詳細を検討した結果について紹介する。

1. はじめに

麻痺性貝毒（PSP）を生産する有毒渦鞭毛藻プランクトンが発生した海域では、プランクトンフィーダーである二枚貝類が毒化し、食品衛生上の大きな問題となるとともに、漁業生産にも大きな被害をもたらしてきた。PSPの本体であるサキシトキシンとその同族体は、フグ毒であるテトロドトキシンと同じく、神経細胞や筋細胞で刺激の伝達を司るナトリウムチャンネルに特異的に結合し、刺激の伝達を遮断することで作用するため、摂取量によってはしびれ、麻痺、けいれんなどの症状が現れ、最悪の場合、呼吸麻痺により死亡する等の重篤な食中毒となる。貝類の麻痺性貝毒の検査法としては、厚生労働省によりマウスアッセイ法が認められており¹⁾、国内で流通する二枚貝類では、可食部1gあたり4.0MU（マウスユニット）を越える毒量のものが食品衛生法に違反するとされる。生産現場でこれを超える毒量が検出された場合には出荷自主規制を含めた対応を行う。したがって、近年は市場に流通した二枚貝類で麻痺性貝

OIKAWA Hiroshi, FUJITA Tsuneo, SAITO Ken,

SATOMI Masataka, YANO Yutaka

¹〒236-8648 神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-4

²〒970-8026 福島県いわき市平梅本15番地

³〒970-0316 福島県いわき市小名浜下神白字
松下13-2

毒による食中毒は発生していない²⁾。一方、二枚貝類が毒化する海域には、それらを捕食する甲殻類や巻貝類が生息しており、なかには食用対象となる種も多く存在している。海外では、そういった生物の毒化が報告されており、一部は毒化モニタリングの対象とされ、実際に食中毒が発生した事例も報告されている³⁾。しかし、国内ではこれまで二枚貝類中心のモニタリングを行ってきたため、それを捕食する生物については規制のための基準値も定められず、毒化実態も不明のままであった。

本稿では、麻痺性貝毒により二枚貝が毒化した海域においてトゲクリガニ（*Telmessus acutidens*、図1）の毒化実態を調べ、室内飼育実

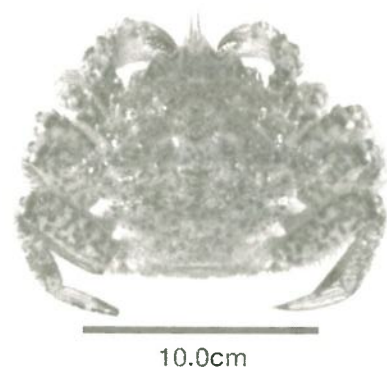


図1 トゲクリガニ（*Telmessus acutidens*）
東京湾以北に分布する。ケガニの近縁種で食用とされる。

表1 小名浜港で採取した魚介類の麻痺性貝毒値(1999年)

試料名	採取日	分析部位	毒性値(MU/g)
アサリ	4/21	可食部	-*
アサリ	4/25	可食部	-
アズマニシキ	4/25	可食部	10.2
キタムラサキウニ	4/21	可食部	-
キタムラサキウニ	4/25	可食部	-
トゲクリガニ	4/19	肝臓部	80.0
トゲクリガニ	4/19	肝臓部	30.0
マガキ	4/21	可食部	<2.0**
マガキ	4/25	可食部	-
マボヤ	4/21	可食部	-
マボヤ	4/25	可食部	-
ムラサキイガイ	4/21	可食部	9.6
ムラサキイガイ	4/25	可食部	<2.0

*毒性不検出。**マウス致死に要した時間が規定時間(15分間)以上。

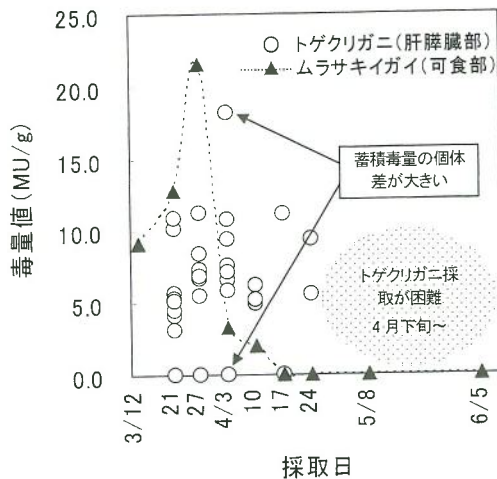


図2 ムラサキイガイとトゲクリガニの毒化(2001年)

トゲクリガニは個体別に、ムラサキイガイは25g(10個体前後)を1試料としてマウスアッセイにより毒量を測定した。

験によりPSP成分の蓄積および排出について定量的に検討した結果を紹介する。

2. 麻痺性貝毒の発生とトゲクリガニの毒化

福島県いわき市の小名浜港では、しばしば麻痺性貝毒の原因プランクトンである *Alexandrium tamarense* が出現し、二枚貝類がPSP成分を蓄積して毒化する。小名浜港で毒化が起こるのは、ほとんどの場合2月から4月にかけて

であるが、筆者らは1999年の4月に潜水により各種魚介類を採取し、マウスアッセイ法によりその毒量を調べた。結果を表1に示したが、プランクトンフィーダーである二枚貝類のほか、肉食性の高いトゲクリガニの肝臓部から二枚貝規制値の20倍にあたる80.0MU/gの毒量を検出した⁴⁾。トゲクリガニは東京湾以北に分布するケガニの近縁種で、大きいものでは600gを越え食用とされる。毒性が確認された肝臓部はいわゆる「かにみそ」として珍重される部位であるが、国内で一般に食用とされるカニ類からこのように高い毒性が検出されたのは初めてのことである。なお、毒性が認められた試料については、PSP成分確認のため、ポストカラム蛍光化検出による高速液体クロマトグラフィーによる分析を行い、7種のPSP成分を検出した。次に、潜水での試料採取では調査できる頻度および試料数ともに限られることから、特別採捕の許可を得て、かご網により継続的に多数の試料を採取し、二枚貝であるムラサキイガイ (*Mytilus galloprovincialis*) の毒化状況と比較した(図2)。その結果、2001年はマウスアッセイで分析した38試料のトゲクリガニ肝臓部のうち、7割以上にあたる28試料が毒化しており、最大毒量値もムラサキイガイ可食部の21.5MU/gに匹敵する18.2MU/gであった。ただし、最大毒量値を示した試料を採取した同じ日に、同じ場所で採捕した試料にも無毒のものがああり、毒量の個体差が大きいのが特徴であった。なお、付属肢の筋肉の毒性もマウスアッセイ法により調べたが、いずれも不検出であった。2002年以降もかご網による調査を続けたが、蓄積毒量に個体差が大きいことには変わりはないが、二枚貝の毒量が高い年はトゲクリガニでも毒化個体の割合が高く、最大蓄積毒量もムラサキイガイと同レベルに高くなることが判った。このことは、肉食性の高いトゲクリガニが、毒化した二枚貝などの餌料生物から食物連鎖を介して毒成分を蓄積したことを示唆する結果であり、小名浜港では二枚貝類と同様にトゲクリガニの毒化にも注意が必要であることを意味す

る。これらの結果をもとに、2004年4月、厚生労働省は二枚貝等の捕食生物についても肝臓臓または可食部で4.0MU/gを越える場合に食品衛生法に違反するものとして扱うことを決め、関係機関に通知したところである⁵⁾。

3. トゲクリガニの毒化および減毒の定量的な検討

天然海域では、トゲクリガニの蓄積毒量に個

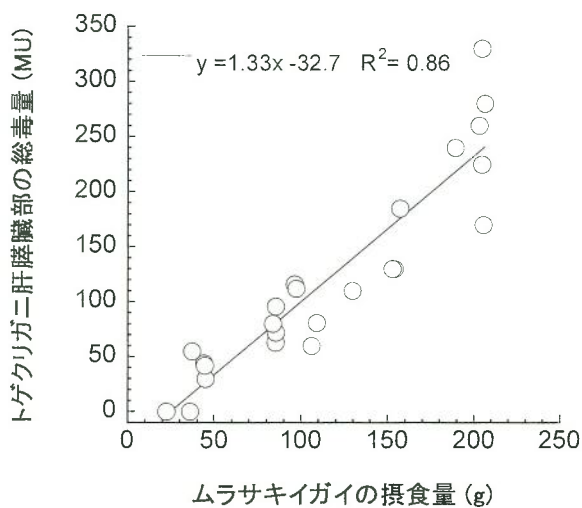


図3 有毒ムラサキガイ給餌によるトゲクリガニの毒化

トゲクリガニに、有毒ムラサキガイ(4.0MU/g)を1日あたり約10g給餌し、5~20日間飼育した。

体差が大きいことから、得られた試料によりPSP成分の蓄積能について定量的に検討することが出来なかった。そこで、毒化したムラサキガイを給餌する室内飼育実験を行い定量的な検討を試みた。トゲクリガニを毒化させるため、体重200~300gのトゲクリガニに対し、4.0MU/gの毒量を持つムラサキガイを1日あたり約10g給餌して5~20日間飼育した。結果を図3に示したが、摂食した毒化ムラサキガイの量と肝臓臓部に蓄積した総毒量は高い相関を示し、トゲクリガニの蓄積毒量は直線的に増加した。また、実験中にトゲクリガニが経口的に摂取した毒量のうち肝臓臓部に蓄積された毒量の平均値は34.7±11.6% (mean±SD, n=24)を示し、見かけ上、摂取した毒量の3割以上を肝臓臓部に蓄積することがわかった。また、両者に高い相関の直線関係があることから、トゲクリガニの麻痺性貝毒成分の蓄積能に個体差は少ないことが示唆され、天然海域で認められた個体差は、捕食する有毒餌料の量や種類が大きく異なったことが原因と考えられた。

一方、図2に示したとおり、二枚貝の毒化が終息する4月の下旬以降に、小名浜港ではトゲクリガニを採捕することが困難になる。トゲクリガニの天然海域での生態について詳しい情報がないため、この理由についてははっきりしな

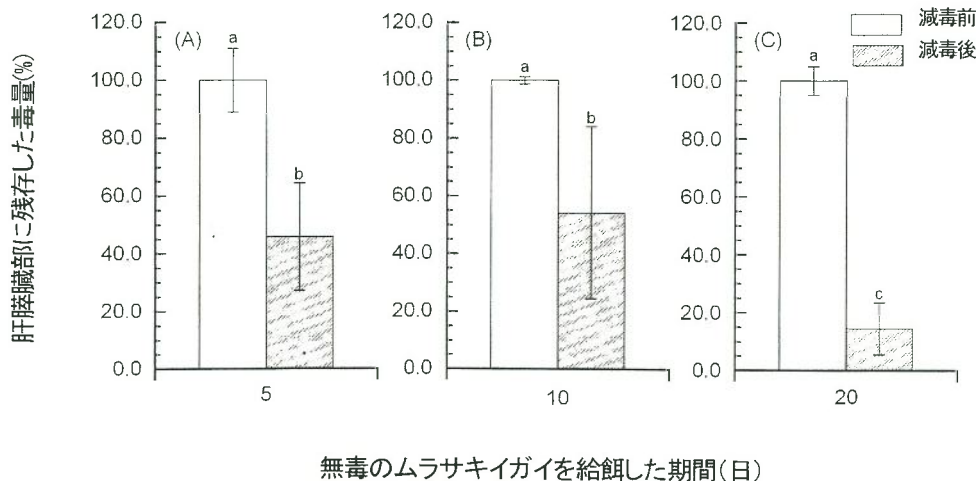


図4 給餌により毒化したトゲクリガニの減毒過程

減毒前のトゲクリガニ毒量は有毒ムラサキガイの摂食量と図3の実験で求めた回帰直線から算出し、それを100%とした。その後、無毒のムラサキガイを一定期間給餌し、残存した毒量を実際にマウスアッセイで測定し、減毒前の毒量に対して残存した毒量の割合を求めた。

いが、いずれにしろ、毒化したトゲクリガニがどのくらいの時間で安全なレベルへと減毒するかについて確認することは出来ない。そこで、有毒餌料の給餌により毒化させたトゲクリガニを用いて減毒過程の検討を行った。すなわち、毒化試験と同様の条件で有毒餌料を20日間与えてトゲクリガニを毒化させ、その後は、無毒のムラサキイガイを一定期間給餌し、肝臓部に残存する毒量を測定した。なお、20日間の有毒餌料給餌によりトゲクリガニが蓄積した毒量は、毒化試験で得られた回帰直線を用いて算出した。結果を図4に示したが、無毒のムラサキイガイを5日間給餌した場合に残存した毒量は $45.8 \pm 18.7\%$ であり、毒量は大きく減少した。このことから、天然海域でも二枚貝類の毒化が終息したあとは、トゲクリガニの毒量は比較的速やかに低下するものと予想される。また、無毒餌料を10日間給餌した場合には $54.1 \pm 29.8\%$ の毒量が残存しており、5日間での結果と有意な差はなかったが、20日間続けたものでは、 $14.5 \pm 9.0\%$ となり、5および10日間給餌した場合に比べて有意に低い毒量となった。これらの結果から、トゲクリガニでは、減毒初期に大きな毒量の低下が起こったあとも、毒成分の排出が緩やかに続くものと推測された。このような二相的な減毒過程は、多くの二枚貝類の減毒過程⁶⁾と共通した特徴であった。

4. おわりに

小名浜港の調査(1999~2004年)において二枚貝類が最も高毒化したのは2003年の春季であったが、このとき調べたトゲクリガニでは、採取した約9割の個体に毒性が認められ、肝臓1gあたりの最大毒量値は85.3MU/gを記録した。また、1個体に蓄積された総毒量においても1,000MUを越えるものが散見され、PSP成分による人間の最小致死量が3,000MUといわれることから⁷⁾、トゲクリガニは人間の健康被害が想定されるレベルまで毒化すると言える。幸い、小名浜港では、トゲクリガニが漁業対象となっ

ていないが、遊漁者などによる採捕は十分に考えられる。また、2004年4月に厚生労働省により基準値が設定されてから、トゲクリガニが漁獲対象となっている宮城県でも調査を行っており、2004および2005年に毒化が確認され、採捕および出荷の自粛が行われた。このことは、トゲクリガニの毒化が小名浜港に特殊な事例ではないことを示している。麻痺性貝毒による食中毒は、事故が起こった場合に重篤な症状をもたらすうえ、その治療法も対症療法に限られる。また事故が起こった場合の産業的な影響も多大であり、事前に危険を回避することが最も重要である。また、前出の厚生労働省通知において、トゲクリガニに限らず二枚貝を捕食する生物について積極的に毒化実態を調べ、安全性を確保することが求められている。我々のグループでも、他のカニ類や巻貝類について調査を行っているが、二枚貝と異なり、生物種や海域によって毒化の実態が大きく異なることが示唆されている。このことから、実態に即した効率的なモニタリング方法を考えていくことが早急に必要であると言える。

最後に、本稿内容の一部は、農林水産省による公募型研究、先端技術を活用した農林水産研究高度化事業「現場即応型貝毒検出技術と安全な貝毒モニタリング体制の開発」のなかで行われたものであり、関係各位に深謝する。

文 献

- 1) 安元健 (1991), 食品衛生検査指針 理化学編, (厚生省生活衛生局監修), 麻痺性貝毒, 社団法人日本食品衛生協会, 東京
- 2) 野口玉雄 (1994), 日本水産学会誌, 60, 677-678
- 3) Shumway, S. E. (1995), *Rev. Fish. Sci.*, 3, 1-31
- 4) Oikawa, H. et al. (2002), *Toxicon*, 40, 1593-1599
- 5) 厚生労働省 (2004), 麻痺性貝毒による二枚貝等の捕食生物の毒化について (医薬食

品局食品全部監視安全課長通知), 食安
監発第0413003号

- 6) Bricelj, V. M. et al. (1998), in Harmful
Algae (Reguera, B. Blanco, J. Fernandez,

M. L., and Wyatt, T., Eds), 431-436,
Grafisant, Santiago de Compostela, Spain

- 7) 橋本周久 (1988), 食衛誌, 29, 280-282

◀国内情報▶

無花粉スギ「爽春」とスギ花粉症対策に向けた
雄性不稔個体の今後の利用

独立行政法人 林木育種センター

高橋 誠・星 比呂志・岩泉 正和・久保田 正裕・福田 陽子

本年1月24日に、独立行政法人林木育種センターは「爽春」という品種名で「無花粉スギ（雄性不稔スギ）」の品種登録を出願した。この系統は、もともと1965年に寒害抵抗性候補木として選抜された個体である。異なる複数の環境下で生育する15ラメートの雄花で同様に正常花粉が認められなかったため、雄性不稔個体と判定した。検定林における24年次の成長を他の系統と比較した結果、成長は平均を下回るが、幹の通直性は他の系統よりも優れていると考えられた。雌花は正常で健全種子が形成されるため、「爽春」を種子親とした後代の育成は可能である。都道府県の要望に応じて「爽春」の穂木の配布を進める一方で、先に発見されている「はるよこい」などの他の雄性不稔個体などとともに、今後雄性不稔遺伝子を保有した個体の遺伝子プールを拡大することが必要である。また、早期に花粉飛散量抑制の効果を実現させるためには、さきに公表されている「花粉の少ないスギ」、今後公表予定の「アレルゲンの少ないスギ」と効果的に組み合わせた施策の立案が望ましいであろう。

1. はじめに

今年春のスギ花粉の飛散については、これまでになく多いのではないかとという予測が昨年末からマスコミにより報道されていた。その予測通り、今年の花粉飛散量はこれまでにない未曾有の量に達したことが各方面から提供されるデータによって裏付けられた。国民の20%近くがスギ花粉症に悩まされているとされており、スギ花粉症の解決は社会的にも大きな問題となっている。

独立行政法人林木育種センターでは、スギ花粉症対策に資することを目的として、本年（2005年）1月24日に雄花から花粉を飛散させない「無花粉スギ（雄性不稔スギ）」を、品種名「爽春（そうしゅん）」でさし木品種として品種登録の出願をした。このような、スギでの雄性不稔個体の出願は、富山県が開発したさし木品種「はるよこい」（2003年12月24日出願）に次いで国内では二例目である。

TAKAHASHI Makoto, HOSHI Hiroshi,

IWAIZUMI G. Masakazu, KUBOTA Masahiro,

GOTO-FUKUDA Yoko

〒319-1301 茨城県日立市十王町伊師3809-1

本報告では、「爽春」の特性や、より広くスギの雄性不稔について、また雄性不稔を用いた今後の育種の展開について述べたい。

2. 無花粉スギ「爽春」

「爽春」の元来の系統名は「高萩CR7」（CRはCold Resistance（寒害抵抗性）の略号）で、寒害抵抗性育種事業の開始以前に、当該事業の選抜方法を検討するための研究の中で選ばれた寒害抵抗性候補木である。高萩CR7は1965年5月に、茨城県高萩市上君田に位置する旧高萩営林署管内国有林の若齢スギ造林地（3年生）から選抜され、その後さし木によりクローン増殖されてクローンとしてこれまで保存されてきた。

多くの作物で雄性不稔個体が存在することはすでに知られていたが、スギでは平教授らを中心とする研究グループが1992年にはじめて富山県の社寺林で雄性不稔個体を発見した。その後も平教授らは、スギ雄性不稔個体の探索を進め、ヤクスギやタテヤマスギ、また新潟県の浅草岳山麓のスギ人工林でも雄性不稔個体を発見し、雄性不稔を有した個体がスギの集団中に一定の割合で存在することを明らかにした。スギ雄性

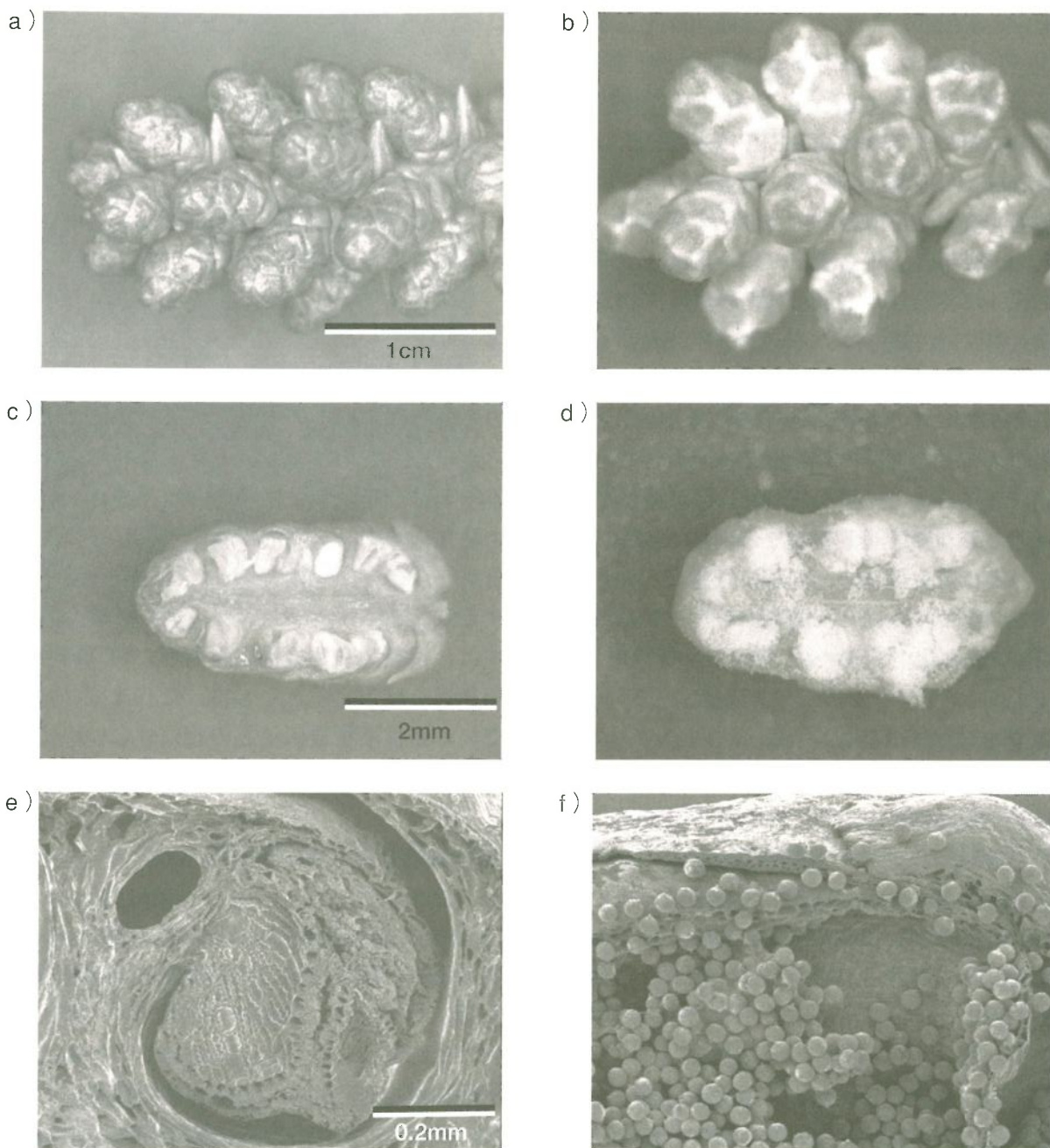


写真1 スギの雄性不稔個体および正常個体の雄花の顕微鏡写真と走査型電子顕微鏡写真
a, cとeは雄性不稔個体の雄花, b, dとfは正常個体の雄花。倍率は, aとbが約2.5倍, cとdが約10倍, eとfが約100倍。

不稔個体は、新潟大学、富山県や林木育種センターの他にも神奈川県や福島県でも発見されており、現在18個体の雄性不稔個体が知られている³⁾。

スギ花粉症は近年大きな社会問題となり、その解決が望まれていることから、林木育種センターでは、育種素材や遺伝資源として当センタ

一本所で保存しているスギ系統中に雄性不稔個体が含まれているかを明らかにするために、スギ雄花の調査を2004年2月より開始した。2004年12月末までに関東育種基本区で保有している約1,400クローンについて調査を終えた（現在、東北・関西・九州育種基本区の系統について同様の調査を進めている）。この調査の中で、昨

年秋、高萩CR7の2ラメートでは、雄花に正常花粉が形成されていないことが判明した（写真1）。

すでに記したように高萩CR7は当初寒害抵抗性候補木として選抜された。このクローンは寒害抵抗性検定を目的とした2箇所の検定林（それぞれ1981年と82年に設定）に合計66ラメートが植栽されており、これらの個体はすでに20年生以上の樹齢に達している。2004年12月から翌年初めにかけて2箇所の検定林で生存していた57ラメートについて着花の有無を調査したところ15ラメートで雄花の着花が認められ、これら全てのラメートで同様に雄性不稔が確認された。このように、複数の異なる環境下において全ての雄花着生個体で、同様に正常花粉が形成されていなかったため、このクローンは雄性不稔個体であると判定した。

3. スギ雄性不稔の特徴

冒頭でも述べたとおり、今回品種登録に出願した「爽春」が、当初「高萩CR7」として選抜されたのは今から40年前のことである。そのクローンは雄性不稔個体であることが判明するまでに長い年月が経過した訳だが、これにはいくつかの理由がある。1) 選抜された当時スギに雄性不稔個体が存在することは知られていなかったこと、2) 花粉症が大きな社会問題となったのは最近の十数年ほどになってからであること、そして最も重要なこととして、3) 雄性不稔個体も正常なスギ個体と同様に雄花を着生するということである（写真1）。このため、外観からは雄性不稔かどうかを判定することはできない。しかし、花粉形成の四分子期が過ぎた秋以降に雄花を鋭利な刃物で割り、その横断面を高倍率の実体顕微鏡や走査型電子顕微鏡で観察すると、本来なら雄花の花粉嚢内に正常花粉が観察されるべきところに、正常花粉が全く観察されないため、「爽春」は雄性不稔であると分かった（新潟大学や福島県で発見した雄性不稔個体の中には花粉形成のもっと後のステージ

になってから雄性不稔が現れるものもある^{1,6)}。

「爽春」の雌花は正常で、「はるよこい」と同様に正常な種子が形成される。2001年10月に採取し、精選後-20℃で貯蔵した種子を、2002年1月に発芽試験した結果、発芽率は25%であった。このため、「爽春」を種子親に用いた後代家系の育成が可能である。

「はるよこい」では、「はるよこい」のF₁個体 (Rr) を「はるよこい」 (rr) に戻し交配することにより、雄性不稔は核遺伝子にある1対の劣性遺伝子によって支配されていることが明らかになっている^{4, 5)}。また、異なるスギ雄性不稔個体やそれらに由来する家系を用いた交配の結果、現在、スギの雄性不稔遺伝子は少なくともms-1からms-3の異なる3遺伝子座が存在することが推定されている³⁾。「爽春」については、現在F₁家系の育成を進めており、今後遺伝様式を確定するとともに、これまでに知られている雄性不稔遺伝子との相同性について検討することとしている。

4. 「爽春」の成長特性

「爽春」の成長特性を明らかにするために、この系統が植栽されている検定林（関耐寒風東京営9号検定林、1982年4月設定）で2005年3月に生育調査を行った。この検定林には寒害抵抗性候補木22クローン638個体が植栽されており、これらの個体の樹高、胸高直径、幹曲がり、根元曲がりなどを調査した。幹曲がりとは根元曲がりは5段階の指数により評価した（1～5の指数とし、値が大きいほど通直であることを意味する）。その結果、各形質についての検定林全体の平均と標準偏差は、樹高が11.8±1.7m、胸高直径は14.2±3.2cm、幹曲がりは3.0±0.7、根元曲がりは3.2±0.8であった。これに対し、「爽春」の平均値は、樹高が10.4m、胸高直径は10.9cm、幹曲がりは3.3、根元曲がりは3.9であった。このことから「爽春」は、成長は平均を下回るが、幹の通直性は平均よりも優れていると考えられた（写真2）。



写真2 検定林に生育する「爽春」

5. 花粉症対策に向けた今後の展開

「爽春」や「はるよこい」をスギ花粉症対策のために今後利用していくことが有効であると考えられるが、現状では1) 雄性不稔の特性を活用するためにはさし木によるクローン増殖か戻し交配によりF₂家系を育成し、F₂家系の個体の雄花を調査して不稔個体をスクリーニングするかのいずれかの方法によらなければならない、2) クローン増殖による場合、2クローンによって大面積造林を行うことはモノカルチャーにつながるので、生態的なリスクが大きい、3) 戻し交配によりF₂家系を育成する場合近交弱勢が生じ、林業上好ましくない影響が出ると考えられる。また、4) スギの人工造林は一部の地域では長年さし木林業が営まれてきたが、大部分の地域では実生林業が行われてきたため、さし木品種がエンドユーザーに受け入れられるかが未知数である。

当面、都道府県の要望に応じて穂木を配布し、さし木苗で増殖・普及を進めていくが、それと平行して今後雄性不稔遺伝子を保有する個体の

遺伝子プールを拡大していく必要がある^{3, 6)}、

1) 現在雄性不稔個体であることがわかっている18個体を種子親とし、優良系統を花粉親とした人工交配によりF₁家系を育成する取り組みや2) 既存の育種素材の中で、雄性不稔遺伝子をヘテロで保有している系統を探索する取り組みが必要となる²⁾。こういった取り組みを行うことにより、雄性不稔遺伝子を保有する集団の遺伝的多様性が高められ、近交弱勢のリスクを回避することができると期待される。

ここに述べた取り組みを進めるためには、なおかなりの年数を必要とする。現存する品種をさし木苗として普及する場合でも、さし木苗の配布の開始まで6～10年程度は要すると思われる。

ところで、林木育種センターでは、スギ花粉症対策に資する品種として、すでに「花粉の少ないスギ」112品種を公表してきた。また、「アレルゲンの少ないスギ」品種も平成17年度末に公表予定である。これらの品種は、スギの優良系統(精英樹)から選ばれた林業用品種であり、「花粉の少ないスギ」については関東地方を中心にすでに造林用として、種苗の供給が開始されている。「無花粉スギ」は、花粉の飛散量が理論的にはゼロであるため、今後の花粉症対策の中で社会的に大きな期待が寄せられている訳だが、早期に花粉飛散量抑制の効果を実現させるためには、「無花粉スギ」だけによるのではなく、「花粉の少ないスギ」や「アレルゲンの少ないスギ」と効果的に組み合わせた施策を立案していくことが望ましいであろう。

文 献

- 1) 五十嵐正徳 (2005), 第116回日本森林学会大会講演集, 88.
- 2) 齊藤真己 (2005), 第116回日本森林学会大会講演集, 87.
- 3) 齊藤真己 (2005), 林木の育種, 216, 印刷中.
- 4) Saito, M. et al. (1998), *J. For. Res.*, 3, 167-

173.

5) Taira, H. et al. (1999), *J. For. Res.*, 4, 271-

273.

6) 平英彰 (2005), 林木の育種, 216, 印刷中.



ブレインテクノニュース
バックナンバーのご案内
第107号
2005年1月15日発行

総説

コエンザイムQ10の新規な生産方法の開発
.....高橋 咲子・門脇 光一

国内情報

酸性土壌耐性ユーカリの実用化に向けて
.....木原 智仁・河津 哲
Rhizosecretion - 汚染物質分解酵素分泌植物体の環境浄化への応用
.....野尻 秀昭・内田 英二ほか
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
.....松村 健
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
.....宮川 佳子・菅原 宏章ほか
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.....花田 礼子・児島 将康
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.....岩崎 昭夫・高木 和広
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.....村田 仁・馬場先 勝彦ほか
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.....澤田 浩一・高橋 秀行ほか

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
.....笠井 幸治

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別された精子由来子牛の性状.....(抄訳：下司 雅也)
ABAによるH⁺-ATPase阻害にはH₂O₂が絡んでいる.....(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.....(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.....(抄訳：塩谷 格)

生研センターからのご案内

◀国内情報▶

MRSAに効果のある昆虫抗菌タンパク質を改変した合成ペプチドを含む傷被覆フィブロインフィルムの開発

独立行政法人 農業生物資源研究所

山 川 稔 ・ 坂 中(西堂) 寿 子 ・ 石 橋 純

カプトムシやタイワンカプトムシの抗菌タンパクを改変した9個のアミノ酸から成る合成ペプチドは、副作用が少なく薬剤耐性病原細菌を殺すことが知られている。我々は当研究所で新しく開発された傷被覆フィブロインフィルムに合成ペプチドの一つを一定量含ませたものを作り、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に対する殺菌効果を調べたところ、強い効果があることがわかった。本稿ではこれらの合成ペプチドの性質と応用利用の一例を紹介する。

1. はじめに

近年社会的に問題になっている薬剤耐性病原細菌の出現は、抗生物質の過剰使用がもたらした結果で、薬剤感受性細菌と耐性細菌の自然界でのバランスを大きく乱したことに起因すると考えられている。薬剤耐性細菌感染に対しては不必要な抗生物質の使用を控えるなどの対策がとられているが、耐性細菌に感染した場合の根本的な治療手段はまだ見出されていないのが現状である。昆虫のもつ抗菌タンパクの殺菌メカニズムは従来の抗生物質のものと全く異なり細菌の膜に作用するという極めてユニークなもので^{1, 2)}、細菌の膜バリアー能を直接破壊するため耐性細菌の出現する可能性は低いと考えられている。そのため薬剤耐性細菌に対する有望な素材として研究者の注目を集めている。本稿では、昆虫の抗菌タンパクの応用利用の一例として、我々が開発したMRSAに効果のある新しい傷被覆フィブロインフィルム³⁾について紹介し、今後の研究を展望する。

2. 合成ペプチドの性質

カプトムシとタイワンカプトムシの抗菌タン
YAMAKAWA Minoru,
SAKANAKA-SAIDO Hisako, ISHIBASHI Jun
〒305-8634 茨城県つくば市大わし1-2

パク、ディフェンシンの活性中心(22A-30R-NH₂)を同定し、それをリードペプチドとして改変を行い5種類の9マーペプチドを合成した。まずこれらのペプチドのグラム陽性細菌の黄色ブドウ球菌、MRSA、グラム陰性細菌の大腸菌、緑膿菌に対する最小増殖阻止濃度を調べてみた。この結果からいずれの改変ペプチドも22A-30R-NH₂リードペプチドより活性が増殖されていることがわかる(表1)⁴⁾。ここで注目したいのは、本来昆虫のディフェンシンはグラム陽性細菌に強い活性を示し、グラム陰性細菌には非常に活性が低いにもかかわらず、活性中心を同定し改変を行った結果、大腸菌や緑膿菌のようなグラム陰性細菌に対しても同等の活性を示すようになったことである。このことは人工的に改変を行うことにより、抗細菌スペクトルを拡大できるということを示している。次にこれらの合成ペプチドに副作用がないかどうかを判断するためウサギ赤血球を用いて溶血活性の有無を調べてみた。ポジティブコントロールとして、強い溶血活性を示すハチ毒のメリチンを用いた。実験結果は、メリチンは低濃度で強い溶血活性を示したが、いずれの合成ペプチドも調べた濃度の範囲内でそのような活性を示さないことが明らかとなった(図1)⁴⁾。さらにネズミの貧食細胞であるマクロファージの増殖に及ぼす影響も調べてみた。2000 μg/mlまでの濃度範囲でAWLLAIRRR-NH₂の配列を持つペ

表1 22A-30R-NH₂を基にした改変ペプチドの抗細菌活性

ペプチド	最小阻止濃度 (μg/ml)			
	黄色ブドウ球菌	MRSA	大腸菌	緑膿菌
AHCLAIGRR-NH ₂ (22A-30R-NH ₂)	6	>64	16	ND
ALRLAIRRR-NH ₂	2	>48	1.5	3
ALLLAIRRR-NH ₂	2	32	2	3
AWLLAIRRR-NH ₂	2	20	3	4
ALYLAIRRR-NH ₂	1.5	24	3	3
ALWLAIRRR-NH ₂	2	32	3	4

MRSA、緑膿菌は臨床分離株

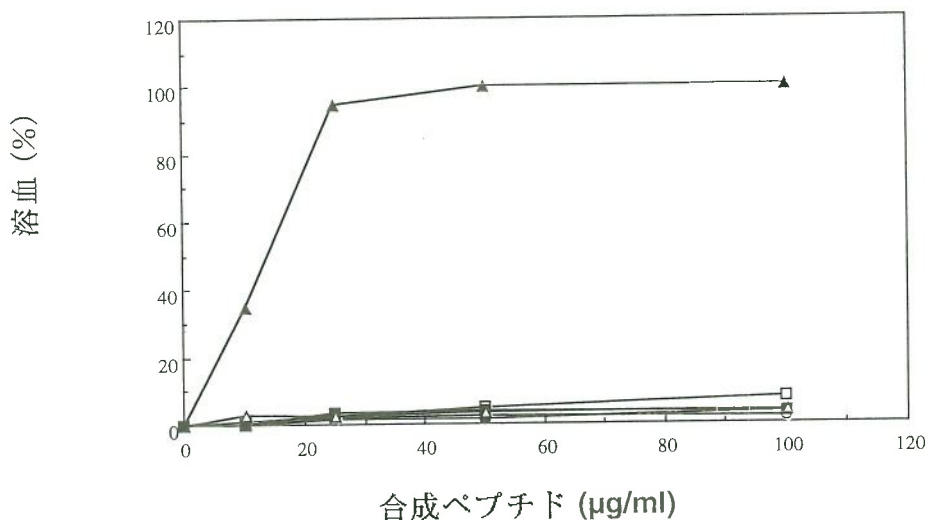


図1 22A-30R-NH₂を基にした改変ペプチドの溶血活性

2%ウサギ赤血球溶液にペプチドを添加した。○はALRLAIRRR-NH₂、●はALLLAIRRR-NH₂、□はAWLLAIRRR-NH₂、■はALYLAIRRR-NH₂、△はALWLAIRRR-NH₂、▲はメリチン。

ペプチドが明らかな増殖阻止を起こしたが、他の4種の合成ペプチドは全くそのような阻害を示すことはなかった。この段階でAWLLAIRRR-NH₂は応用には不適当なペプチドとして除外された。

3. 薬剤耐性病原細菌に効果のある新しい傷被覆フィブロインフィルムの開発

傷被覆フィブロインフィルム⁵⁾は農業生物資源研究所の坪内らによって開発されたもので、

タンパクから成るカイコの繭や生糸をアルカリ処理しセリシンを取り除いた後、残りのフィブロインを塩化カルシウム塩で溶解、脱塩し乾燥してアモルファスフィルムにしたものである。このフィルムは現在医療現場で使われているハイドロコロイド被覆材と比較して治療効果が優れており、豚皮と同等かあるいはそれ以上の効果があることが報告されている⁵⁾。火傷などの治療の場合、細菌感染が起こり易く特に近年増加している薬剤耐性病原細菌の感染は重要な問題となっている。そこで我々は、4種の合成9マーペプチドの中から、ALYLAIARRR-NH₂を選びこのペプチドの3つの異なる濃度をもつフィブロインフィルムを作り、入院患者から分離されたMRSAに対する増殖抑制効果を調べてみた。実験方法としては、寒天培地に2×10³個のMRSAを蒔いておき、その上に1cm²のフィブロインフィルムを乗せ37℃で24時間培養した。フィブロインフィルムは透明のためMRSAのコロニーの出現を直接目で確認することが可能である。実験結果として、まずコントロールとして用いた合成ペプチドを含まないフィブロインフィルムの場合、多数のMRSAのコロニーが観察された（図2 a）。しかしそのペプチドを100, 200, 300 μg/cm²含むフィブロインフィルム下で培養した場合、MRSAのコロニーの出現はみられなかった（図2 b, c, d）。興味深いことにペプチドを高濃度（300 μg/cm²）含むフィブロインフィルムの場合、フィルムの周りに大きな増殖阻止円が観察された（図2 d）。この結果はフィブロインフィルムに含まれたペプチドが徐々に周りに染みだしMRSAの増殖

を阻害していることを示唆している。傷被覆材としての重要な条件の一つとして、細菌感染を防ぐ機能が求められているが、薬剤耐性病原細菌に対して効果のあるものは知られていない。絹糸は本来生体適合性が高く、手術用の縫合糸として長年に亘り使われてきている。絹の成分であるフィブロインを可溶化、フィルムに加工した新しい傷被覆材の治療効果の有用性は証明されているが、MRSAの増殖を防ぐことはできない（図2 a）。そのようなことから、今回我々が開発した昆虫の抗菌タンパクを改変した合成ペプチドを含む傷被覆フィブロインフィルムは新しい機能が付与されたもので昆虫機能利用の良き一例となると思われる。このペプチドの性質からみて、MRSAのみならず、多剤耐

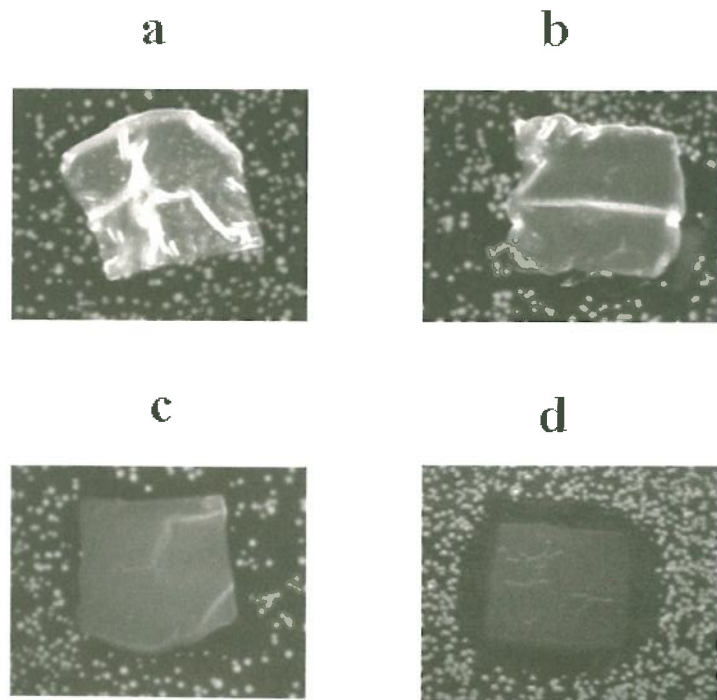


図2 9残基ペプチドを含んだフィブロインフィルムのMRSA増殖の阻害

改変ペプチドALYLAIARRR-NH₂を1cm²あたり0 μg (a), 100 μg (b), 200 μg (c), 300 μg (d) 含んだフィブロインフィルムをMRSAをあらかじめ蒔いた寒天培地に乗せて37℃で一晩培養した。濃度0 μgではフィルムの下にも菌のコロニーが見えるが、ペプチドを含むフィルムの下にはコロニーは見られない。

性緑膿菌やその他の病原細菌にも有効であることが期待できるので、今後多くの細菌に対する実験を重ねていくことが重要である。昆虫の二つの異なる素材のもつ優れた性質をうまく組み合わせたこのフィブロインフィルムはさらに改良を重ねて行けば、近い将来色々な場で応用利用の可能性がでてくるものと思われる。例えば、傷被覆フィルムとしての利用のみならず、床擦れ防止用のマットにうまく組み込むことができれば、免疫力の弱い高齢者の薬剤耐性病原細菌の感染に対し効果を発揮するものと思われる。

4. おわりに

昆虫の抗菌タンパクの多くは、細菌を殺す活性を指標として分離・精製されてきたが、細菌以外の微生物に対する活性についてはまだ十分には調べられていないのが現状である。従って抗菌タンパクという名称はその一部の機能しか表現されていないという指摘もあり、抗微生物タンパクという呼び名が論文の中で使用され始めてきている。我々は9マー合成ペプチドの細菌以外の微生物に対する活性のスクリーニングを行っているが、今のところ調べた範囲ではウイルスの増殖を抑制できるというデータは得られていない。しかしアフリカでツェツェバエが媒介し人畜にねむり病を引き起こす病原虫のトリパノソーマの増殖を抑制するかどうかの調査が最近行われ、その結果、9マーペプチドが原虫を殺す活性をもつことが判明した⁶⁾。トリパノソーマは、ツェツェバエを経てヒトを含む種々の動物体内で増殖をくり返す非常に複雑なライフサイクルをもつ。トリパノソーマに対する有効な治療薬はなく、ワクチン作りも多くの研究者が試みたにもかかわらず、ことごとく失

敗に帰している。アフリカの貧しい人々や家畜に病害を及ぼすこの感染症は、先進国の製薬会社が薬を開発したとしても、貧しい人々にはその薬を買える経済的能力がなく、利益につながらないことから無視され続けてきた。日本国内においてもトリパノソーマに対する治療薬の開発は、ほとんど見当らず、国および民間企業におけるこの分野の研究開発予算もごくわずかである。このような多くの問題を抱えつつ、今後、我々が進むべき研究方向としては、トリパノソーマ以外の原虫が引き起こす種々の感染症に対しても昆虫の抗菌タンパク研究から生まれてきた合成ペプチドが有効であることを証明することであろう。そのことによりこの分野の研究の重要性が多くの人々に理解され、あまり経済利益の見込めない熱帯、亜熱帯における原虫感染症の研究にも国、民間から援助の手がさしのべられ、無視され続けてきた貧しい人々の医療、畜産分野に昆虫機能研究が貢献できる日が来ることを期待したい。

文 献

- 1) 西堂（坂中）寿子ら（1999）, *Bio Industry*, 16, 29-36.
- 2) 勾坂 晶ら（2004）, *Bio Industry*, 21, 36-45.
- 3) Saido-Sakanaka, H. et al. (2005), *J. Insect Biotechnol. Sericol*, 74, 15-20.
- 4) Saido-Sakanaka, H. et al. (1999), *Biochem. J.*, 338, 29-33.
- 5) Sugihara, A. et al. (2000), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 225, 58-64.
- 6) 木谷 裕ら（2005）第139回日本獣医学会学術集会要旨集 p208.

◀国内情報▶

超微小な溶液チャンバーを用いた 1分子バイオアッセイの開発

大阪大学 産業科学研究所
野 地 博 行

大きさミクロン立方，体積わずかフェムトリットルという超微小空間に水溶液を安定に封じ込め，その中に閉じ込められたタンパク質1分子の触媒反応を定量的に計測する方法論を開発した。これは，これまでの1分子計測とは全く原理が異なり，非常に単純な方法である。それゆえ，これを用いた1細胞解析や1分子PCRなど，様々な応用が期待される。

1. はじめに

これまでの生化学におけるタンパク質機能解析では，主に多分子を同時計測し，その集団としての振る舞いの平均化された値を解析してきた。つまり分子個々の性質はこのような平均化によって隠されている。しかし近年，モータータンパク質の研究を中心として，タンパク質やDNAなど生体分子の1分子イメージング・1分子操作技術が開発され，多分子計測に隠されていた分子の様々な性質を明らかにしている^{1), 2)}。これらの1分子計測では，多くの場合，全反射型エバネッセント顕微鏡や共焦点顕微鏡といった特殊な光学システムが用いられており，超微小な空間のみを光照射することによって背景光を下げ，高感度イメージングを達成している。これに対して，今回我々が紹介するのは，反応溶液を物理的に超微小空間に閉じ込めるだけで1分子の酵素活性を検出する方法である。アイデアは極めて単純である。例えば，一般的な酵素タンパク質は，遅くても1秒間当たり10回程度（1分間で600回）の反応を触媒する。この酵素を通常の生化学実験での極少容積である1 μL に1分子だけ投入しても，濃度変化は毎分1 fM (10^{-15}M)であり，いくら待っても検出

NOJI Hiroyuki

〒567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘8-1

は不可能である。しかし，仮に容積1 μL しかない水溶液に封入できたら，600個の反応性生物は1 μM となる。この値は，一般的な生化学アッセイキットの検出範囲内である。体積が小さければ，顕微鏡で見ればよい。このように，反応溶液を極小領域に限定するだけで，1分子の酵素活性検出は原理上可能である。我々は，このような考えに立ち，マイクロ加工技術の専門家と協同で，まずフェムトリットルの超微小溶液チャンバーを作製し，その中に水溶液を閉じ込める方法を確立した。次に，これを用いることで，タンパク質1個の触媒反応を検出することが可能であることを実証した³⁾。

2. 超微小な溶液チャンバーの開発

これまで，フェムトリットルサイズの水溶液を封入する方法としては，リポソーム，オールドロップレットなどが報告されている。しかし，これらの方法では，安定かつ均一な微小溶液を作製するのはほとんど不可能である。また，インクジェットなどを用いてフェムトリットルサイズの液滴を噴霧する方法が確立されているが，これは気化しにくい有機溶媒を用いており，水溶液を噴霧すると瞬時に蒸発してしまう。そこで我々は，マイクロ加工技術に注目した。既に，この技術を用いてミクロンサイズのデバイ

スを作製し、細胞など生体試料を扱うチップの開発がなされている。素材としては、光透過性が高く生体試料と相性が良いPDMSと呼ばれるシリコンゴムを用いた。このシリコンゴムは、ガラスなど表面の滑らかなものに接着させるだけで密着し、これによって簡単にマイクロチャンネルなどが作成できるため、多くのマイクロ流体デバイスで使用されている。しかも、シリコンウェハーで鋳型を一度作成すれば、それを基に量産が可能である点でも優れている。そこで、我々はPDMSシートのマイクロ加工を行った。マイクロフォトリソグラフィーの技術を利用して、マイクロメートルスケールの円柱構造を表面に配置したシリコンウェハーを作製した(図1上左)。これを鋳型とし、その上にPDMS溶液を流し込んだ後固化すると、このPDMSシートの表面には容積が数フェムトリットルしかない窪みが規則正しく整列しているのが確認された(図1上右)。次に、この窪みの中に水溶液を閉じ込めた。スライドガラスとPDMSシートの間、目的の水溶液を挟みこみ加圧するという、極めて単純な方法である(図1下)。これによって、気泡や過剰な水分が取り除かれ、チャンバー内には毛細管現象によって溶液が充填される。その結果、スライドガラス上に多数の形状が均一なチャンバーを作製することができた。

3. 密閉性の評価

各チャンバー内で独立に反応を行うためには、各チャンバーは密閉されてなくてはならない。この押し付け方法では、ガラスとPDMSはファンデルワールス力のみで結合している。これが密閉に十分なのかを実験的に検証した。まず、可視化できるギリギリまで小さい物体を含んだ水溶液をチャンバー内部に閉じ込め、そのブラウン運動を観察した。その結果、直径10nmの量子ドットのブラウン運動が数時間にわたり安定に観察された。しかも、チャンバー間で量子ドットが行き来することは全くなく、

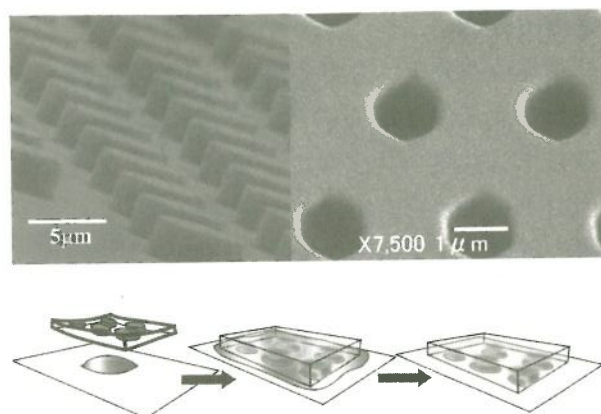


図1 上図は、電子顕微鏡で撮影したシリコンウェハーで作製した鋳型(左)と、これを用いて作製したPDMSシートの表面(右)。下図は、フェムトリッターチャンバー内への溶液の封入方法。



図2 SulforhodamineGによる蛍光消光回復実験(FRAP)

この大きさの物体は完全に密閉できることが確認された。次に、直接観察できないほど小さな化合物も閉じ込められるのか検証した。これは、特に酵素反応などを計測する際には、反応化合物も密閉しなくてはならないため、重要なポイントである。ここでは、蛍光消光回復法(FRAP)を行った。まず、SulforhodamineGをチャンバー内に封入し、そのうち1つのチャンバーにのみ強い光を数秒間のみ照射して消光させた(図2)。そして、20分間、消光したチャンバーに蛍光が回復しないことを確認した。つまり、このチャンバーは少なくとも20分間は完全に周囲のチャンバーから独立しており、直径わずか1 nm程度の水溶性の蛍光物質も、ガラス-PDMSの界面やPDMS中を透過できず、

拡散しないことが示された。これらの結果から、PDMS製フェムトリッターチャンバーは、その内部にタンパク質サイズの物質や、基質ほどの低分子を封入することができ、生化学反応を行うのに十分な時間溶液を維持できることが示された。ただし、いくつか試された蛍光分子のうち、疎水性が強い種類に関しては、PDMSのマトリックス中へ浸透してしまう現象が確認されたことも付記する。

4. 1分子酵素アッセイの実証

次に、超微小溶液チャンバーを用いて1分子酵素計測が可能であることを実証するために、 β -galactosidase活性測定を行った。 β -galac-

tosidaseは生体内の糖を分解する一般的な酵素である。今回は市販の活性測定キットをそのまま用いた。この反応では、フルオレセイン分子の両端に糖を結合させ無蛍光にしたものを基質とし、 β -galactosidaseは、その両端の糖を切断しフルオレセイン1分子を遊離させる(図3A)。その結果、反応と共に蛍光が上昇するため、反応生成物を直接可視化できる。この反応溶液を、容積30fLのチャンバーに閉じ込めた。この際、 β -galactosidase溶液を十分に希釈することで、チャンバー1個あたり1分子以下の β -galactosidaseを閉じ込めた。このとき、基質は十分な量を投入している。各チャンバーは確率的に酵素分子を閉じ込めるため、0個、1個、2個、もしくは3個の酵素分子を閉じ込めることになる。この試料を蛍光顕微鏡下で観察したところ、時間と共にチャンバー内部の蛍光強度は上昇した。そして、予想されたとおり、その蛍光強度はチャンバーごとに異なり、暗い、中間、明るいといった段階的な強度の違いを明瞭に区別することができた(図3B)。これは、酵素が入っていないチャンバー、1個入ったチャンバー、2個以上入ったチャンバーに対応するはずである。これを確認するために、各チャンバーにおける1分間あたりの蛍光上昇量(活性強度)をヒストグラムにした。その結果、4つの明瞭なピークが得られた(図3C)。それぞれの蛍光量に対応するチャンバーの数の分布は、ポアソン分布から予想された酵素0個、1個、2個、3個を含むチャンバーの数の分布とピッタリあった。この場合、ピーク間距離は1個あたりの酵素活性に対応するが、実際のピーク間距離も一定であり、しかも多分子計測から予想された値と一致した。以上から、各チャンバーの蛍光強度変化は、それぞれ0、1、2、3個分の酵素活性に相当することが確認された。ちなみに、酵素の濃度を1チャンバー当たり数個にすると、もはやこのような分離したピークは得られない。これは、各チャンバー中の酵素数が均一化されるためである。このような方法が、他の酵素アッセイにも適応できるのか

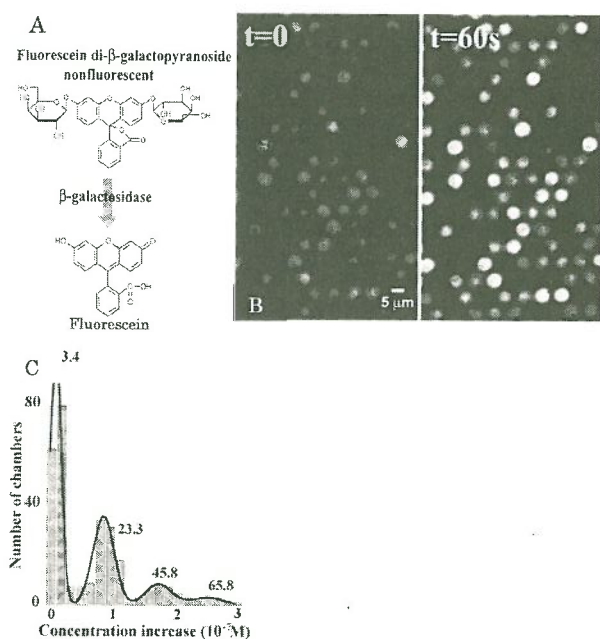


図3 1分子 β -galactosidase活性の検出。Aは、蛍光アッセイにおける反応模式図。Bは、チャンバーに閉じ込められた酵素活性の蛍光イメージ(閉じ込めた直後と、1分後)。Cは、Bのイメージから得た1分あたりの蛍光強度変化のヒストグラム。左から、酵素0個、1個、2個、3個を閉じ込めたチャンバーの蛍光強度に対応する。

確かめるために、Horse Radish Peroxidaseの蛍光アッセイも行ったところ、同様の量子化された蛍光分布が得られ、この方法の有用性が確認された。

5. まとめ

今回、我々はマイクロパターニングしたPDMSシートをスライドガラスに接着することで、フェムトリットルという超微小の反応チャンバーを作製することに成功した。これを用いると、細胞からDNAやタンパク質など殆ど全ての生体分子を閉じ込めることができる。これを、用いて、1分子単位で酵素反応の測定が可能であることを実証した。しかも、使用しているのは市販の酵素キットと蛍光顕微鏡である。あまりにも単純で拍子抜けするほどであるが、我々はこの単純さが重要であると考えている。それは、測定方法が煩雑だったり難しすぎでは他の手法やデバイスと組み合わせることができず、実質上応用範囲が限られてしまうからである。我々は、既にこの手法を活用することで、私たちの主たる研究テーマである分子モーターの効率の1分子測定にも成功することができた⁴⁾。アイデア次第で、まだまだ活用範囲が広がりそうである。

6. 謝辞

本研究におけるマイクロ加工は東大・生産技術研究所の藤田研究室と竹内研究室によって行われた。また、顕微鏡観察はロンドレーズ研究員によって行われた。本研究は生研センターのプロジェクト研究として実施された。これらの関係者各位に厚く感謝する。

文 献

- 1) Yanagida, T. et al. Single-motor mechanics and models of the myosin motor. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355, 441-7 (2000).
- 2) Yildiz, A. et al. Myosin V walks hand-over-hand : single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* 300, 2061-5 (2003).
- 3) Rondelez, Y. et al. Microfabricated arrays of femtoliter chambers allow single molecule enzymology. *Nat Biotechnol* 3, 361-52005.
- 4) Rondelez, Y. et al. Highly coupled ATP synthesis by F1-ATPase single molecules. *Nature* 433, 773-7 (2005).

◀国内情報▶

田植機の苗載せ作業を軽労化する

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

¹現所属：近畿中国四国農業研究センター

²現所属：九州沖縄農業研究センター

小西 達也・窪田 潤¹・土屋 史紀²

乗用田植機による田植え作業の省力化をねらいとして、苗供給を省力化する装置を試作し、効果を確認した。試作した装置は乗用田植機の両側面から前に伸びる苗移送アームと、アーム先端に取り付けた苗テーブルからなり、前部に積載された苗マットを、まとめて田植機後部の苗載せ台上端まで移送することにより、補助者による田植機への苗の供給と田植機上で運転者が行う苗補給作業の両方が省力・軽労化された。

1. はじめに

乗用田植機による田植作業において、苗の補給は作業時間の15～20%を占めており、育苗、苗運搬とならんで省力化が遅れている作業である。マット苗1枚の重量は6～7kg程度なので、人手による運搬が十分に可能であり、このことは田植機が今日のような普及を遂げることが出来たことに大きく貢献しているが、苗の補給作業に限って言えば人手で運搬可能であることが逆に機械化の遅れの原因にもなっている。マット一枚の持ち運びには抵抗がなくとも、1ヘクタール当たりでは約200枚となり、結局1tを超える重量を扱うことから、高齢者や婦女子にとってかなりの重労働となっているのが実情である。このため、田植機への苗補給の省力化については、これまでもいろいろな工夫がなされてきているが、なかなか定着するには至っていない。一方でロックウールなどの軽量マット資材や水耕育苗技術の導入により苗自体を軽量化する試みや、ロングマット化により一筆のほ場を苗補給なしで植付ける技術の開発もなされているが、一般的に普及している土育苗のマット苗については、人手による運搬・補給のほかに

手段がないのが実情である。

この研究に先立ち、大面積のほ場を中心として苗補給作業を調査したところ、過半数の事例において軽トラックに積載された苗を一旦農道などに並べ、主に補助者がそれを田植機に積載し、さらに田植機の上で作業者が苗載台への補給を行っていた。そこで軽トラックや運搬車に積載された苗をそのまま田植機に積載することを前提として、補助者による田植機への苗積載と運転者による苗載せ台への苗補給の両方を省力化・軽労化するために、乗用田植機の前部に積載された苗マットを、まとめて田植機後部の苗載せ台上端まで移送する装置を開発した。

2. 装置の概要

開発した苗供給補助装置付き田植機は、乗用田植機（8条植え）の左右側面から前に伸びる2本の苗移送アームを備えており、その先端には、それぞれ4枚ずつのマット苗が積載可能な苗テーブルが装着されている。苗を移送する際は、このアームが左右側面の基部を支点として油圧力によって左右個別に回転し、苗テーブルが田植機の前部から運転席後方の苗載せ台上端まで、移動する構造である（図1）。苗テーブルは左右にスライドさせることもでき、移送アーム内を通る2本のワイヤーで水平が保持され

KONISHI Tatsuya KUBOTA Jun,

Tsuchiya Shinori

〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

ている。また、苗テーブルのスライドは人手で、苗移送アームの回転は運転者の手元スイッチで行われるが、苗テーブルを一番外側に寄せないと油圧が作動しない安全構造になっている。

このほか、装置には以下のような対策が講じられている。

- (1) 耕深の浅いほ場などで苗載せ台を持ち上げて補給するために、苗載せ台のローリングをロックできるようにした。
- (2) 苗移送時の姿勢保持ワイヤーへの負荷低減と事故防止のために、苗移送アームからの苗テーブルの高さを極力低くし、同時に姿勢保持ワイヤー途中の継ぎ目をなくした。
- (3) 移送時の苗への衝撃を減らすため、移送アーム支え部にダンパを装備した。
- (4) 運転席周りにある苗移送シリンダーに安全カバーを装着した。

3. 装置の特徴と軽労効果

この装置を用いた田植え作業では、まず第一に田植機を農道に正対させ、補助者がほ場の外から苗テーブルに苗を載せる。この時、通常の田植機とは異なり苗テーブルが田植機より前へ大きく張り出していることと、低い位置で横一列になっていることのため、補助者の持ち上げ高さが低くなり、苗積載作業が楽になる(図2)。通常の田植機での補助苗載せ台高さは上段では1,500mmにもなり、婦女子には高すぎたが、この装置によれば楽に積載可能で、特に運搬車やトラックから載せる場合は殆ど持ち上げる必要がなくなる。

田植機上では、苗移送アームが4枚の苗をまとめて苗載せ台上端まで移送するので、運転者は苗を持ち上げあるいは持ち運ぶ労働から解放される。通常では、この作業は腰のひねりや苗の上げ下ろしを伴う上、次の苗補給時に連続して行うため忙しく、一時的に労働負担が高くな

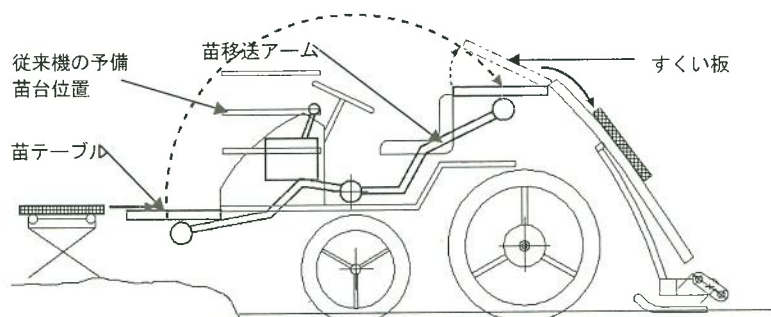


図1 苗供給補助装置付田植機



図2 補助者の苗積載作業



図3 運転者の苗補給作業

る傾向があった。

苗補給に際して、まず運転者は苗テーブルを苗載せ台に合わせてスライドさせるが、これは苗テーブルに取付けた取っ手を握ってブレーキを解除し、そのまま苗載せ台の横位置にあわせるだけでよい。さらに苗載せ台への苗補給は苗テーブル上ですくい板を傾げるだけで行われるので、運転者の苗補給作業が大幅に省力化・軽労化される(図3)。

表 作業中の労働負担と作業時間

被験者	補助装置の有無	苗積載作業(補助者)			苗補給作業(運転者)				
		心拍数増加率 ¹⁾	所要時間	持ち上げ回数 ²⁾	心拍数増加率 ¹⁾	所要時間	持ち上げ回数 ²⁾	腰曲げ回数	腰ひねり回数
		% (拍/分)	秒	回	% (拍/分)	秒	回	回	回
A	有	31 (78-120)	43.0	0	25 (84-120)	45.2	0	0	0
	無	38 (90-126)	56.0	4	44 (96-132)	53.5	8	0	8
B	有	33 (72-102)	35.0	0	29 (72-96)	54.0	0	0	0
	無	32 (72-114)	52.5	4	52 (78-114)	50.5	0	8	8

1) カッコ内は実際の心拍数の範囲, 2) 苗を胸の高さ以上に持ち上げた回数

注) 被験者A: 23歳, 身長170cm, 体重100kg, 安静時心拍数80。被験者B: 32歳, 身長175cm, 体重72kg, 安静時心拍数66。心拍数増加率は同じ作業の平均値。所要時間と持ち上げ回数等は苗8枚あたりの値。苗1枚の質量は6.6kg。

4. 効果確認試験

本苗供給補助装置を使用した場合の作業者の負担と, 通常の子備苗台を使用した場合の作業者の負担をほ場試験により調査した結果, 以下のような省力効果が明らかになった(表)。

- (1) 苗供給補助装置を使用した場合, 田植機運転者の苗補給時心拍数には平常時に比べて25~30%程度の増加が見られたが, 通常の子備苗台方式の場合はその2倍近い値であった。
- (2) この装置に苗を積載する補助者の心拍数増加率は運転者よりもやや大きく31~33%程度で, 通常方式の場合はいずれも2割増加の値となった。
- (3) 作業時間については, 補助者が田植機に苗を載せる時間が23~33%減, また運転者が苗載せ台に補給する時間は作業者によって異なり, 苗載せ台を持ち上げて苗補給をする場合(被験者A)は16%減, 苗載せ台を下に降ろして供給した場合(被験者B)は7%増となった。

- (4) 作業姿勢については, 通常方式の場合, 補助者が胸以上の高さに苗を持ち上げる必要や運転者が腰をひねって苗を高く持ち上げる必要があったが, この装置を使用した場合, どちらも不要となり労働の質が大幅に改善された。

苗移送アームの回転時間は, 安全のため苗積載時で20秒, 空で14秒程度としてある。従って, 苗積載と苗補給を連続して行くと待ち時間が生じるが, アームの移動を田植え作業中に行うことにより, 待ち時間は解消した。

5. おわりに

本装置の給苗補助機能のうち「予備苗台が田植機前方へ移動する」という部分は, 市販田植機の予備苗台に採用され, 実用化している。また, 本装置とは別な方式で, 苗をスライドさせて田植機前方から苗載せ台に移送する方式の田植機も市販されるなど, 徐々にではあるが苗載せ作業の軽労化は進みつつあり, 今後が期待されている。

◀地域の先端研究▶

柿ポリフェノールの高速精製法を用いた
機能性食品素材の開発

奈良県農業技術センター 果樹振興センター

浜崎貞弘

「柿渋」は豊富なポリフェノールを含み、現在、様々な機能性が見直されている。しかし、その伝統的製造法には、専用品種の特定期間の果実しか使えず、1ロット3年を要するなど制約も多い。一方カキの大産地である奈良県では、近年販売に適さない規格外果実が増加し、問題になっている。そこで、品種・熟度を問わず、ポリフェノールを抽出する技術を開発し、規格外果実に含まれるポリフェノールの産業的活用を図る。

1. 伝統的機能性資材「柿渋」の特徴と
問題点

「柿渋」は多くの機能性が経験的に知られ、清酒製造、漁網、傘等の防水・耐久性付与などに利用されてきた歴史はよく知られている¹⁾。また、最近では血圧降下、二日酔い防止等の生理作用、住環境悪化の一因として問題となっている揮発性有機化合物や、環境中の重金属類を吸着除去する作用等が注目され、その応用範囲が拡大している。

しかし、産業としての「柿渋」は、石油化学資材の一般化とともに急速に衰退し、現在では京都府、三重県などで極少量生産されているに過ぎない。その製法は伝統的な発酵法であり、十分な品質のものを得るまで長期間（通常三年程度）を要する。さらに原材料として、タンニンを高濃度に含有する「柿渋」専用品種の、8月中旬に採取される果実が必要とされる。このように現今の「柿渋」製造法は様々な制約要因があり、拡大が見込まれる需要に対応するのは困難と思われる。

2. 産地の課題

奈良県は、栽培面積2,000ha、生産量30,000トン（全国2位）に達する我が国屈指のカキ産地であり、専業農家1戸当り3.6haに達する近代的な省力大規模化と、全国シェアの過半を占めるハウス促成栽培等で、6月～12月まで切れ目無く生産・販売する、先進的総合経営が特長である。生産者の平均年齢も46歳（西吉野果樹研究会）と若く、20、30代の後継者も多数育つ、全国的にもまれな活力ある産地を形成している。

しかし、産地では、消費者の高品質志向や果実価格の低迷により、商品価値を失った多量の規格外果実が発生している。従来、規格外果実は、干し柿、柿酢等の加工食品や柿渋の原料として利用される道もあったが、生果用の規格外果実で商品化出来る品質に仕上げるのは難しい。また、当産地はカキの生果供給に特化した大規模経営が浸透しているため、果実加工に対する知識や経験に乏しく、加工に振り向けられる余剰労力もほとんどない。このため、廃棄以外に規格外果実の現実的な取り扱い方法が無いのが現状である。果実の廃棄は圃場や周辺の山林等で行われることが多く、カラスなどの鳥獣害を誘発したり、環境への負荷要因となる一方で、丹誠込めて栽培した果実を廃棄しなければならない生産者の精神的ダメージは、長期的に

HAMASAKI Sadahiro

〒637-0105 奈良県吉野郡西吉野村湯塩1345

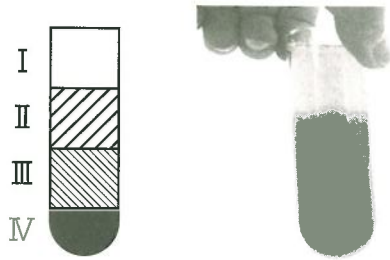


図1 遠心分離による果実破碎物の分離

はその経営意欲を蝕み、地域社会の存続に重大な脅威をもたらす危険性を秘めている。

3. 柿ポリフェノールの高速抽出法の基礎理論

そこで奈良県農業技術センターでは、これら規格外果実を地域に潜在する未利用資源として捉え、その有効活用について検討した。

カキは、品種、成熟度等により異なるが、果実中に0.1~10%のポリフェノールを含有している。「柿渋」は、このポリフェノールを活用した資材であるが、規格外果実からポリフェノールを簡便に抽出する技術を開発すれば、「柿渋」同様の利用価値が生じる可能性がある。カキ果実からポリフェノールを回収する方法として、我々は「タンニン細胞」と呼ばれる組織に着目した。タンニン細胞とは、カキ果実に存在する器官で、ポリフェノールを特異的に集積する性質を持つ。カキを食べるとき、果肉中に茶褐色の斑点が見られることがあるが、あの斑点がタンニン細胞である。我々はこのタンニン細胞を分離・収集し、集めたタンニン細胞からポリフェノールを取り出せば、それだけで容易に高濃度のポリフェノールが抽出できると考えた。通常「柿渋」では、渋カキを収穫後直ちに破碎・搾汁し、ポリフェノールを多量の夾雑物と共に搾汁液中に絞り出す。このとき、原材料に専用品種の未熟果が必要なのは、成熟が進むにつれて、果実に含まれる水溶性ポリフェノールが減少するとともにペクチン質が増加し、優

良な搾汁液を得るのが難しくなるためである。しかし、ポリフェノールを不溶化してから果実を破碎し、タンニン細胞だけを回収すれば、わざわざ搾汁液を得る必要はない。回収したタンニン細胞からは、80℃以上で加熱すれば、細胞中の不溶性ポリフェノールが再び水溶性に戻ることが知られている²⁾。従って、タンニン細胞さえ収集すれば、品種・熟度を問わず全ての果実から、ポリフェノールの回収が理論的には可能である。

4. 高速抽出法の実際

原料として、「刀根早生」の未熟果実を用いた。

果実を採取後、直ちにエタノールで脱渋し、ヘタを除いてジューサーで破碎した。この破碎物を5000rpm/15分で遠心分離したところ、大きく分けて4つの層に分離した(図1)。第1層はやや緑色を帯びた清澄な液体、第2層が乳白色のゾル状、第3層が茶褐色の微粒子、第4層がより荒いオレンジ色の粒子となった(図1)。

それぞれの層を凍結乾燥し、乾燥物各10mgに蒸留水10mlを加え、振とうもしくは121℃で15分加熱し、濾過した濾液のポリフェノール含量を、フォーリン・デニス法で測定した。

その結果を表に示す。

各層とも水溶性ポリフェノールはほとんど検出できなかったが、加熱することで、第3層と第4層から多量のポリフェノールが抽出された。特に第3層のポリフェノール含量は高く、果実全体の85%を占めた。このことから、この第3層にタンニン細胞のほとんどが集積し、容易に回収できること、また、回収したタンニン細胞から、ポリフェノールを抽出できることが分かった。更に抽出したポリフェノールと「柿渋」のポリフェノールの抗酸化活性を、DPPHラジカル消去活性とSOD様活性を指標として比較したところ、非常に強い抗酸化活性があり、それは「柿渋」とほとんど変わらないことが判

表 果実破碎物100g当たりの遠心分離各層の重量とポリフェノール含量

	ポリフェノール含量						
	生重量 g	乾燥重 g	水分 %	乾物 1g当			果実100g当 mg
				水溶性 mg	加熱可溶性 mg	合計 mg	
第1層	20.1	1.9	91.0	2.10	2.11	4.21	8.00
第2層	50.8	5.6	89.3	2.68	4.24	6.91	38.70
第3層	16.3	4.7	71.9	1.28	154.56	155.84	732.45
第4層	6.8	2.6	63.1	0.72	28.90	29.61	76.99

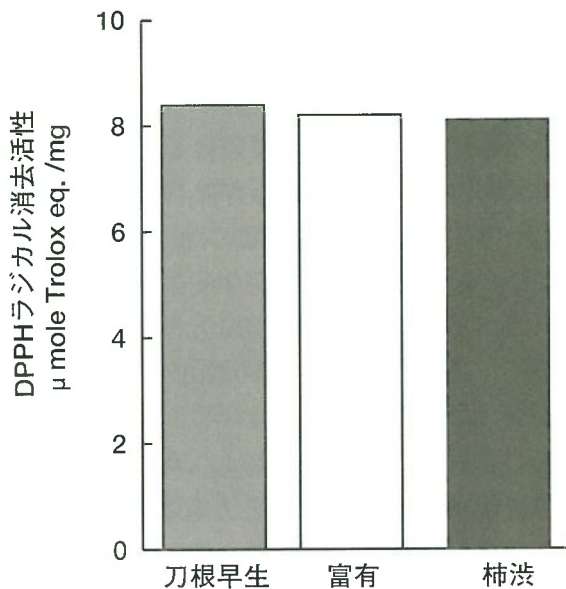


図2 柿果実から抽出したポリフェノール 1mg当たりのラジカル消去活性

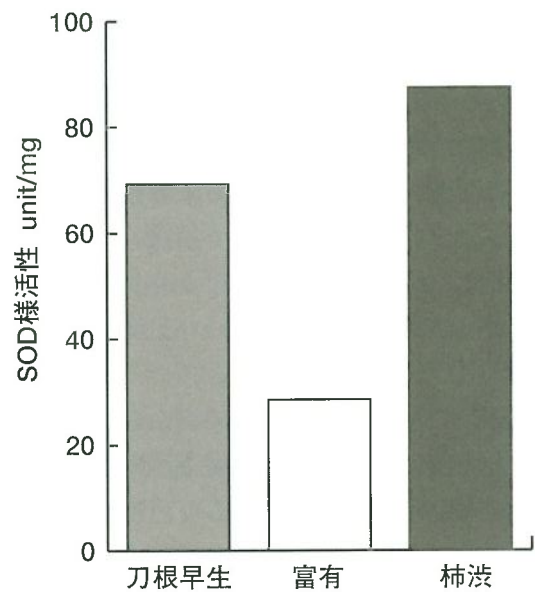


図3 柿果実から抽出したポリフェノール 1mg当たりのSOD様活性

った(図2, 3)。そこでこれらの成果をまとめ、特許出願を行った(特願2004-86351「柿タンニンの抽出方法、及びこの方法で抽出された柿タンニン」)。

5. 期待される成果

現在、この技術の工業的スケールアップと、抽出した柿ポリフェノールの健康機能性を検証することで、規格外果実を用いた新規健康機能性食品素材を開発することを目標に、平成16年

度先端技術を活用した農林水産研究高度化事業の採択を受け、近畿大学農学部、共栄社化学株式会社、江崎グリコ株式会社の3者と、産官学の共同研究事業を実施中である。

この研究の進展により、まず規格外果実が原料に転用され、地域に廃棄される果実がなくなることで、鳥獣害抑止や地域環境の改善につながる。また、商品価値の低い果実も原材料として用いることで、販売される果実の商品性が向上し、産地全体として高品質果実生産体制が推進され、銘柄産地への足場作りが着実に進展す

る。これら成果は、そのまま生産意欲の向上と地域社会の安定化に繋がり、奈良県カキ産地の振興に大きく寄与できるだろう。また、柿ポリフェノールの健康機能性が解明されれば、カキそのものの健康イメージを増幅し、低迷するカキの消費拡大に繋げることも期待できる。

さらに将来的には、柿ポリフェノールの大量供給体制を整備することで、健康機能性だけでなく、VOC吸着機能、天然系有機接着剤への

応用など、柿ポリフェノールの豊かな機能性を活用した異業種産業開拓が可能となり、地域経済に大きな波及効果をもたらすことができると思われる。

文 献

- 1) 今井敬潤 (2003), 柿渋, 法政大学出版局
- 2) 北川博敏 (1969), 園学雑, 38, 202~206

本誌第108号 お詫びと訂正のお知らせ

本誌第108号 (2005年 (平成17年) 3月15日発行) に以下の誤りがありました。
お詫びとともに訂正致します。 (編集部)

	(誤)	(正)
8 頁 上段枠内	独立法人	独立行政法人

◀文献情報▶

泌乳初期の搾乳牛における血漿中尿素窒素濃度と卵胞液や子宮腔内の尿素窒素濃度あるいはアンモニア濃度との関連性について

Association between blood plasma urea nitrogen levels and reproductive fluid urea nitrogen and ammonia concentrations in early lactation dairy cows.

D.S. Hammon^a, G.R. Holyoak^b, T.R. Dhiman^a

^aDepartment of Animal, Dairy and Veterinary Sciences, Utah State University, 4815 Old Main Hill, Logan, UT 84322-4815, USA.

^bDepartment of Veterinary Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Oklahoma State University, Stillwater, OK 74078, USA

Animal Reproduction Science, 86(2005): 195-204

泌乳初期の乳牛への過剰なタンパク質給与や第1胃内分解性タンパク質の多量給与は、血漿中尿素窒素や乳中尿素窒素濃度を高めること、乳中尿素窒素の上昇時には乳牛の受胎率等の繁殖効率が低下することが知られている。過剰なタンパク質の給与による血中あるいは乳中尿素窒素の上昇と繁殖効率低下との関係から、乳中尿素窒素の分析が搾乳牛に導入されているが、血漿中尿素窒素濃度の上昇が繁殖効率の低下を引き起こす要因や、泌乳初期の搾乳牛における血漿中尿素窒素濃度と生殖器官内のアンモニア濃度や尿素窒素濃度との関係についてはいまだ明らかではない。そこで、泌乳初期の乳牛における、排卵前の卵胞液中のアンモニア、尿素窒素、K、Mg、P、Ca、Naの各濃度と血漿中尿素窒素濃度との関連性、および、発情周期の各ステージにおける子宮腔内のアンモニア濃度や尿素窒素濃度と血漿中尿素窒素濃度との関係について検討が行われた。血漿中尿素窒素濃度のレベルにより、20mg/dl以上をHPUN区、20mg/dl未満をLPUN区と、供試牛を2群に分けた。実験1として、泌乳初期の搾乳牛38頭の排卵前

の卵胞液を発情日 (Day0) の給餌4時間後に超音波画像診断装置を利用して採取した。HPUN区の卵胞液中アンモニア濃度 ($339.0 \mu\text{mol/L} \pm 72.2$) は、LPUN区 ($93.9 \mu\text{mol/L} \pm 13.1$) に比べて有意に高く ($P < 0.01$)、HPUN区の卵胞液中尿素窒素濃度 ($22.4\text{mg/dl} \pm 0.4$) も、LPUN区 ($17.0\text{mg/dl} \pm 0.3$) に比べて有意に高かった ($P < 0.001$)。血漿中尿素窒素濃度と卵胞液中尿素窒素濃度との間には、 $r^2 = 0.86$ で相関関係が認められた。実験2として、Day0及びDay7に30頭の搾乳牛から血液及び子宮腔内の液を採取した。Day7におけるHPUN区の子宮腔内アンモニア濃度 ($1,562 \mu\text{mol/L} \pm 202$) は、LPUN区 ($1,082 \mu\text{mol/L} \pm 202$) に比べて有意に高かったが、Day0においてはHPUN区とLPUN区の間には差は認められなかった。Day0及びDay7におけるHPUN区の子宮腔内尿素窒素濃度は $26.9\text{mg/dl} \pm 1.3$ 及び $26.5\text{mg/dl} \pm 1.1$ 、LPUN区の子宮腔内尿素窒素濃度は $20.4\text{mg/dl} \pm 0.7$ 及び $21.4\text{mg/dl} \pm 1.1$ であり、HPUN区がLPUN区に比べて有意に高かった ($P < 0.001$)。また、血漿中尿素窒素濃度と子宮腔内尿素窒素濃度との間には、 $r^2 = 0.17$ で相関関係が認められた。本結果から、血漿中尿素窒素の高い搾乳牛においては、発情期における排卵前の卵胞液、黄体期における子宮腔内のアンモニア濃度や尿素窒素濃度が上昇しており、このような生殖器官内の高いアンモニア濃度あるいは尿素窒素濃度により、繁殖効率の低下が引き起こされる可能性が示唆された。

近年、ウシの受胎率低下が問題となっているが、不適切な飼料給与が受胎率低下の要因のひとつとして考えられている。健康で繁殖効率の高い牛群を維持するためにも、適切な飼養管理が重要となる。

(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▶

アグロバクテリウム以外の細菌で
植物の形質転換に成功Gene transfer to plants by diverse species of
bacteriaWim Broothaerts, Heidi J. Mitchell, Brian
Weir, Sarah Kaines, Leon M. A. Smith, Wei
Yang, Jorge E. Mayer, Carolina Roa-
Rodriguez and Richard A. Jefferson*Nature* (2005) 433 ; 629-633

アグロバクテリウムは植物病原菌の一種で、植物に感染するとプラスミド (Tiプラスミド) の一部 (T-DNA領域) を植物染色体に送り込み植物体に瘤を作る。この細菌の持つ能力は植物遺伝子導入法として活用され、植物バイオテクノロジー分野では基本的な技術となっている。ところが、この手法は十重二十重の特許が張り巡らせ、それだけならいいが、基本特許の真の所有者が誰なのか、争いに決着がついておらず、組換え植物を開発する側としては悩ましい問題を抱えている。そうすると当然、アグロバクテリウム以外の細菌で遺伝子導入は出来なにか考える人は出てくる。Lamabertたち (1990) はTiプラスミドを導入した細菌を植物に感染させると瘤をつくることに成功したが、残念ながら、遺伝子が導入された証拠は提示できなかった。今回、Broothaertsたちはその証拠を示すことに成功したのである。

アルファルファ共生菌の *Sinorhizobium meliloti* と *Mesorhizobium loti*, 更に100種以上の植物に感染するという広い宿主特性を示す *Rizobium* の3種の細菌にハイグロマイシン耐性遺伝子 (HgR) とGUS遺伝子を組み込んだTiプラスミド (毒性を示す部分は除去してある) を導入し、双子葉植物 (アグロバクテリウムによる遺伝子導入が容易) のタバコとシロイヌナズナ, および単子葉植物のイネ (アグロバクテリウムによる遺伝子導入が比較的困難) の3種に感染させた。そうすると、ハイグロマイシン耐性とGUS活性を示す植物体が得られ、

PCR解析をするとHgR遺伝子, GUS遺伝子共に存在が確認できた。すなわち、アグロバクテリウム以外での細菌による形質転換が可能なのが証明されたのである。ただその効率はアグロバクテリウムの100分の1から10分の1と低いことが難点である。この点については著者も言うようにこれから改良を重ねることで効率も上がってくるであろうし、アグロバクテリウムではうまくいかない植物種では試してみる価値はあるかもしれない。

Broothaerts達はこの技術の特許で縛ることはしないから、アグロバクテリウム法の代替法として多くの人に使ってほしいと言っている。特許に悩む人には朗報であろう。しかし、気を付けて欲しいのは、使用しているのはTiプラスミドであり、バイナリーベクターである点である。実はこれがアグロバクテリウム法の基本特許であり、そのくびきからは決して逃れ得ない。諸手をあげてとはいかないのである。

(抄訳：岩井純夫, IWAI Sumio, 鹿児島大学農学部)

◀文献情報▶

イトヒキキントキダイの皮と骨由来の酸溶解性コラーゲンの性質

Characterization of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayaenus*)

Phanat Kittiphattanabawon¹, Soottawat Benjyakul¹, Wonnop Visessanguan², Takashi Nagai³, Munehiko Tanaka⁴

¹Department of Food Technology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat Yai 90112, Thailand

²National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, 113 Phaholyothin Rd., Klong 1, Klong Laung, Pathumthani 12120, Thailand

³Department of Food Science and Technology, National Fisheries University, Shimonoseki, Yamaguchi 7596595, Japan

⁴Department of Food Science and Technology Tokyo University of Marine Science and Technology, Konan 4, Minato, Tokyo 108-8477, Japan

Food Chemistry, 89 (2005), 363-372

タイは東南アジアで最大のすり身生産国の一つであり、すり身生産によって毎年大量の頭部、内臓、皮、骨等の固形の廃棄物が排出されている。これらの廃棄物の栄養価は高いが、価値の低いミール原料や肥料として利用されているのが現状である。

コラーゲンは医薬、化粧品、食品等の分野で広く応用されているが、狂牛病の報告、宗教的な背景により、魚由来コラーゲンの注目が高まってきた。

本研究はすり身原料であるイトヒキキントキダイの骨と皮を由来とする酸溶解性コラーゲンの構造と性質についての報告である。そのコラーゲンは皮と骨からそれぞれ10.94%、1.59%の歩留まりで抽出される（湿重量）。

イトヒキキントキダイの皮と骨から抽出され

たコラーゲンはタイプIに分類されるが、アミノ酸構造が少し異なる。V8プロテアーゼとエンドペプチダーゼで分解したこれらのペプチドマップは少し異なり、アミノ酸配列と構造に多少の相違があることが示唆された。本コラーゲンはpH2~5, NaCl濃度3%以上で高い溶解性を示した。

本研究によって、イトヒキキントキダイの皮と骨の酸溶解性コラーゲンの性質、塩溶解性が明らかになった。イトヒキキントキダイのすり身は高いゲル形成能を持つことで知られており、さらにコラーゲンの性質を解明することによって、水産加工残渣の付加価値向上の可能性も期待される。

(抄訳：大庭 貴弘, OBA Takahiro, 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

研究開発を対象にした一般・特別融資制度のご案内

制度の概要

貸付利率を低減する一般融資制度と、貸付元本を減免する特別融資制度があります。

融資対象者

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

対象試験研究

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

融資限度額

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

貸付対象経費

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

貸付条件

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

本資金のメリット

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

【一般融資の場合】

適用利率 = 基準利率 × 成功度 (1、0.75、0.5、0.25、0のいずれかの数値)

【特別融資の場合】

返済元本 = 貸付金額の1/2 + 貸付金額の1/2 × 成功度 (同上)

- ◎ 最長15年の長期・低利(固定制)の資金です。
- ◎ 研究によって得られた特許権等、研究成果はすべて融資先企業に帰属します。

詳細は下記へお問い合わせ下さい。

生研センター 新技術開発部 融資課
〒105-0001 東京都港区虎ノ門3-18-19 虎ノ門マリビル10F
TEL 03-3459-6565 FAX 03-3459-6566
E-mail yushi@ml.affrc.go.jp



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・同定と茎中生育の確認 ……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
不定胚経路のスキ个体再生技術の開発 ……伊ヶ崎 知弘ほか

地域の先端研究

世界で初、種子なしピワの開発 ……八幡 茂木
3 倍体無核スダチ新品種 '徳島 3 X 1 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)



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

編集後記

第109号をお届けします。本号の総説では、難波成任氏（東京大学大学院）らに植物病原微生物・ファイトプラズマの分子生物学的研究についてご紹介戴いた。総説に関連して、加来久敏氏（農業生物資源研究所）らにイネ白葉枯病菌のゲノム構造についてご紹介戴いた。その他の研究情報として、宮脇敦史氏（理化学研究所）らにフォトクロミック蛍光タンパク質、瀬戸秀春氏（理化学研究所）らに植物生長ホルモン・ブラシノステロイドと受容体BRI1の結合メカニズム、及川寛氏（中央水産研究所）らに麻痺性貝毒によるトゲクリガニの毒化、高橋誠氏（林木育種センター）らに無花粉スギ「爽春」、野地博行氏（大阪大学）に1分子バイオアッセイなど、それぞれ貴重な研究の一端をご紹介戴いた。また、本号の文献情報は、下司雅也氏（畜産草地研究所）、岩井純夫氏（鹿児島大学）、大庭貴弘氏（日本水産（株））にそれぞれご執筆戴いた。

ご多忙な中玉稿をお寄せ頂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109号

平成17年5月15日発行

発行人 津賀幸之介

編集人 吉臭 努

発行所 独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構

©生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3丁目18番19号 虎ノ門マリンビル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