

# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成18年5月15日発行（隔月1回15日発行）

ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.115

15 MAY, 2006

ブレインテクノニュース



## 同質遺伝子系統を活用したイネいもち病の防除

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

<sup>1</sup>東北農業研究センター, <sup>2</sup>中央農業総合研究センター

小泉 信三<sup>1</sup>・安田 伸子<sup>2</sup>



独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

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

- 同質遺伝子系統を活用したイネいもち病の防除 ..... 1  
 小泉 信三<sup>1</sup>・安田 伸子<sup>2</sup> ((独) 農業・食品産業技術総合研究機構 <sup>1</sup>東北農業研究センター, <sup>2</sup>中央農業総合研究センター)

## 国内情報

- 「メンデル優性の法則を分子レベルで解明」—アブラナ科植物の自家不和合性でみられる花粉側S決定因子の優劣性現象について ..... 14  
 柴 博史・高山 誠司 (奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科)
- クワは乳液で昆虫から身を守る—植物の乳液に農薬・医薬の宝庫としての可能性 ..... 19  
 今野 浩太郎 ((独) 農業生物資源研究所)
- ヒストンメチル化酵素Meisetzによる減数分裂の制御 ..... 25  
 松居 靖久<sup>1</sup>・林 克彦<sup>2</sup> (<sup>1</sup>東北大学 加齢医学研究所, <sup>2</sup>University of Cambridge)
- 超チャンネルの分子移植による環境浄化型「スーパー細菌」の創成 ..... 30  
 宮本 裕希子<sup>1</sup>・麻生 祐司<sup>2</sup>・橋本 渉<sup>1</sup>・村田 幸作<sup>1</sup> (<sup>1</sup>京都大学 農学研究科, <sup>2</sup>島根大学 教育学部)
- 農業機械に対する排出ガス規制の動向と排出ガス試験設備 ..... 34  
 清水 一史・杉浦 泰郎・高橋 弘行・積 栄・千葉 大基 ((独) 農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター)

## 地域の先端研究

- 微生物コーティング種子を利用したレタスビッグベイン病の防除法の開発 ..... 38  
 相野 公孝<sup>1</sup>・橋本 好弘<sup>2</sup>・石川 浩一<sup>3</sup> (<sup>1</sup>兵庫県立農林水産技術総合センター, <sup>2</sup>(株)サカタのタネ, <sup>3</sup>(独) 農業・食品産業技術総合研究機構 近畿中国四国農業研究センター)

## 文献情報

- インヒビンに対する能動免疫がウシの発情周期における性腺刺激ホルモンの分泌と卵胞の消長に及ぼす影響 ..... 43  
 M. S. Medan et al. (*J. Reproduction and Development*, 52, 107-113, 2006) 抄訳: 下司 雅也
- 過酸化水素は気孔ABAシグナル伝達経路で一酸化窒素の上流に位置する ..... 44  
 J. Bright et al. (*The Plant Journal*, Vol.45 Issue 1, 113-122, 2006) 抄訳: 岩井 純夫
- Bifidobacterium breve*の発酵上清は、TLR2を介して樹状細胞の成熟、活性化およびその生存を誘導する ..... 45  
 Hoarau C et al. (*J. Allergy Clin. Immunol.*, 117, 696-702, 2006) 抄訳: 畑中 美咲
- 組換え体大豆シスタチンや牛血漿を魚肉フィレに浸漬、もしくはインジェクションすることでプロテアーゼ活性を阻害する ..... 46  
 I. Kang et al. (*J. Agric. Food Chem.*, 53, 9795-9799, 2005) 抄訳: 久保田 光俊

- 生研センターからのご案内 (平成18年度民間実用化研究促進事業のお知らせ) ..... 47

## 表紙の説明

写真左は、中国雲南省におけるイネ品種の混植によるいもち病防除の様子。草丈の低いいもち病抵抗性のハイブリッド4列に対し、草丈の高いいもち病に弱い糯品種1列の割合で混植されている。混植により糯品種のいもち病の発生が抑制される。写真右は、新潟県で育成された「こしひかり新潟BL」の展示圃場 (芦澤武人氏撮影)。

詳細については、1頁をご覧ください。

## ◀ 総 説 ▶

## 同質遺伝子系統を活用したイネいもち病の防除

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

<sup>1</sup>東北農業研究センター, <sup>2</sup>中央農業総合研究センター小 泉 信 三<sup>1</sup> ・ 安 田 伸 子<sup>2</sup>

イネいもち病防除のために用いられる多系品種（マルチライン）は、現在、本病に対する真性抵抗性のみが異なり、他の形質が類似する数種の同質遺伝子系統を混合したものからなり、既に宮城、新潟および富山県で実用化している。しかし、マルチラインを長期間有効に活用するには同質遺伝子系統の数をどれくらいどの様な割合で混合すれば良いのかは、まだ、明らかとはなっていない。本稿ではマルチラインの育成・普及の背景、現状やその問題点について紹介する。

## 1. はじめに

糸状菌の1種により起こるいもち病に対するイネ品種の抵抗性は、その病原菌のレースによってその抵抗性が変動する質的な真性抵抗性とレースによって抵抗性が変動しない量的な圃場抵抗性に分けられる（表1）<sup>2)</sup>。近年、これら抵抗性の遺伝子解析が進み、イネ染色体上での座乗位置が明らかになるとともに一部の遺伝子ではその単離が報告されている<sup>1)</sup>。しかし、本病に対する抵抗性に関する研究がこの様に進んできたのに拘らず、圃場抵抗性については本病に対する強抵抗性と良食味の両方を具備したイネの品種育成が難しいこと、真性抵抗性については本抵抗性を侵害するレースが優先して分布していることから、現在我が国で栽培されているイネ品種の多くは、本病に対して、十分な抵抗性がなく、本病は依然として我が国におけるイネの最重要病害となっている。

圃場抵抗性は、本抵抗性の遺伝子解析がさ

らに進み、本抵抗性と食味に關与する遺伝子との関係が明らかになれば今後その利用が拡大すると考えられるが、圃場抵抗性の本格的な利用にはまだ時間がかかると思われる。一方、真性抵抗性は本抵抗性を有する良食味のイネ品種が多く育成されていることから、いもち病菌のレースの分布が把握できれば、それらに対して有効な遺伝子を用い、その効果的な利用は可能である。しかし、イネいもち病では新しい真性抵抗性を有する品種を普及しても、この抵抗性を侵害できる特定の病原菌レースが選択的に増え、その抵抗性が数年で無効となる（抵抗性品種の罹病化）事例が多く報告されている。そこで、この様な真性抵抗性品種の罹病化を防ぐため、近年、真性抵抗性のみが異なり他の形質が

表1 品種抵抗性の分類（浅賀，1987<sup>2)</sup>を改変）

主働遺伝子支配		微働遺伝子支配	病原菌のレースに対する抵抗性の変動
質 的	真性抵抗性		有り
量 的	高度圃場抵抗性	圃場抵抗性	一般的に無し

KOIZUMI Shinzo<sup>1</sup>, YASUDA Nobuko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>〒014-0102 秋田県大仙市四ツ屋字下古道3

<sup>2</sup>〒305-8666 茨城県つくば市観音台3-1-1



戻し親と同一な数種の同質遺伝子系統を混合した多系品種（マルチライン）が良食味で消費者に人気のあるイネ品種「ササニシキ」、「コシヒカリ」を戻し親として育成された。そして、これらマルチラインを用いたイネの減農薬栽培が農家圃場で既に実用化されている<sup>3, 14)</sup>。

ここではこの同質遺伝子系統を活用したマルチラインによるイネいもち病の防除の現状と問題点について述べてみたい。

## 2. 作付イネ品種の真性抵抗性といもち病菌のレース

現在、我が国ではイネいもち病菌のレースは、これまで我が国で抵抗性品種の育成に使われてきた真性抵抗性遺伝子を個々に有するYamada *et al.* (1976) の9判別品種にKiyosawa (1984) が提案した3品種を適時加え、これら品種のうち罹病性反応を示した品種のコード番号を加算し、決定されている(表2)<sup>8)</sup>。

そして、このYamada *et al.* (1976) の判別品種を用いたイネいもち病菌レース分布の我が国における全国調査は、これまで1976年、1980

年<sup>22)</sup>、1994年<sup>16)</sup> および2001年に行われてきた。この全国調査の結果では、図1に示した様に1980年から1994年にかけて最優先分布レースが003から007に交代し、1994年以降レース005が増加している。レース007と005はいずれも真性抵抗性遺伝子*Pii*を侵害できるレースで、これらのレースの分離率が増加した時期は、抵抗性遺伝子*Pii*を持つ「あきたこまち」、「ひとめぼれ」、「ヒノヒカリ」、「キヌヒカリ」の様な品種の作付けが増大した時期と重なっており(図2)、*Pii*侵害レースの分布の増大は、*Pii*所有イネ品種の作付けの増加によるものと思われる。

一方、我が国のイネいもち病菌のほとんどに対し抵抗性遺伝子を持たない真性抵抗性遺伝子型+の「コシヒカリ」優先栽培地帯ではレース001の分布率が多い。レース007や005は「コシヒカリ」にも病原性がある。なぜ、「コシヒカリ」優先栽培地帯でレース007が優先しないのかという疑問が出てくる。そして、これについては病原菌レースの適応度がイネ品種の真性抵抗性遺伝子型によって異なり、病原菌が余分な抵抗性に対応する病原性に関する遺伝子を持っているときにはそうでない病原菌より適合度が

表2 イネいもち病菌のレース判別体系と判別品種の代表的レースに対する反応

コード番号	判別品種	真性抵抗性 遺伝子型	レース				
			001.0	003.0	005.0	007.0	037.1
001	新2号	+ <sup>1)</sup>	S	S	S	S	S
002	愛知旭	<i>Pia</i>	—	S	—	S	S
004	石狩白毛	<i>Pii</i>	—	—	S	S	S
010	関東51号	<i>Pik</i>	—	—	—	—	S
020	ツユアケ	<i>Pik-m</i>	—	—	—	—	S
040	フクニシキ	<i>Piz</i>	—	—	—	—	—
100	ヤシロモチ	<i>Pita</i>	—	—	—	—	—
200	Pi No.4	<i>Pita-2</i>	—	—	—	—	—
400	とりで1号	<i>Piz-t</i>	—	—	—	—	—
000.1	K60	<i>Pik-p</i>	—	—	—	—	S
000.2	BL1	<i>Pib</i>	—	—	—	—	—
000.4	K59	<i>Pit</i>	—	—	—	—	—

+、我が国に分布するイネいもち病菌株のほとんどに対し、真性抵抗性遺伝子を持っていないことを示す。ただし、新2号は外国産菌株の一部に抵抗性を示す真性抵抗性遺伝子*Pik-s*と同菌株と我が国産菌株の一部に有効な*Pish*を有する。  
S、罹病性反応；—、抵抗性反応

劣り、このために病原性の中の広いレースの分布が限られるという考え（これを安定化選択 stabilizing selection と呼んでいる）があるが、イネいもち病菌にこれが適合できるという証明はまだ完全にはなされていない。

いずれにせよ、イネいもち病菌のレースの分布には作付けされているイネ品種の真性抵抗性遺伝子型の影響を受けていることは確かである。しかし、その分布変動要因については未解明のところも多く、今後さらに検討する必要がある。

なお、2003年の冷夏年には我が国ではいもち病が大発生した。この大きな原因の一つとして、一部のわずかな品種を除き、真性抵抗性についてはこれを侵害するレースが分布していたため、真性抵抗が有効に働かず、圃場抵抗性も不十分であったことがあげられている。以上の様に我が国ではこれまで外国由来の新しい真性抵抗性遺伝子を導入して利用されてきたのに拘らず、それを侵害するいもち病菌のレースが選択的に増殖してきたためにその抵抗性が必ずしも効果的に利用できてこなかったと言える。

### 3. 多系混合方式とマルチライン

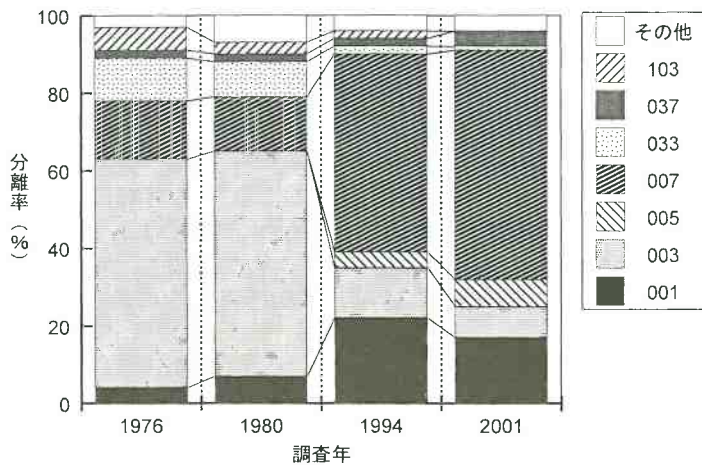


図1 我が国におけるイネいもち病菌レース分布の推移

抵抗性品種の罹病化はイネいもち病だけではなく他の作物の病害にも一般的にみられる。そして、この抵抗性品種の罹病化に対抗し、抵抗性を長く維持するため、遺伝的に異なる系統を混合して栽培する方法（多系混合方式）がJensenにより1952年にエンバクで初めて考えられた<sup>10)</sup>。本方式は複数の系統を混合して栽培することで、病原菌の特定のレースが選択的に増えないようにし、病気の発生を抑制しようとするものである。

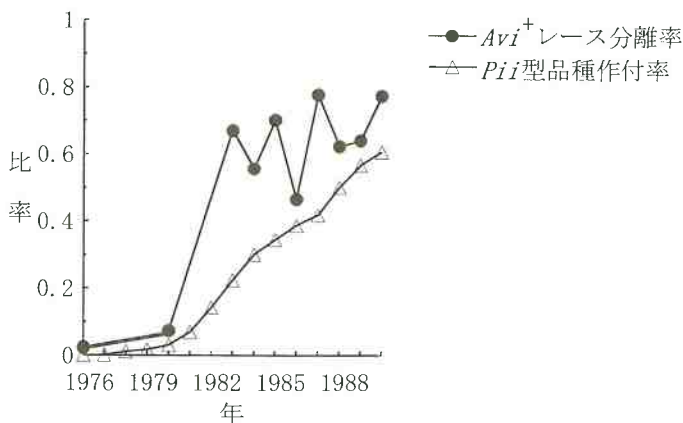


図2 愛知県におけるPiiを有する品種の作付率とPiiを侵害できるイネいもち病菌レース (Avi+レース) の分離率の推移

多系混合方式には種から同質遺伝子系統レベルまでの混合がある（表3）が、本方式は1個体の占有面積が少ないイネ科作物などで、作物の真性抵抗性とそれに対する病原菌のレースの分化がわかっている糸状菌による空気伝染病害で、効果が高い。なお、種レベルの混合栽培は伝統的な農法として行われてきたものが多く、それらの一部は病害防除に寄与している。また、品種の混植は、ドイツでオオムギのうどんこ病、北米でコムギのさび病および中国でイネのいもち病の防除を目的として、実際の農家の圃場で行われており、それぞれ10万ヘクタール以上の

面積でオオムギ，コムギおよびイネの異なる品種が混合栽培されている（図3）<sup>14)</sup>。

マルチラインは多系混合方式の究極をなし，異なる真性抵抗性遺伝子を導入後，戻し親品種に数回戻し交雑することで育成された数種の同質遺伝子系統を混合したものからなる（表3）。そして，既述した様にマルチラインでは数種の同質遺伝子系統が混合されて栽培されるが，これらの系統は病害抵抗性以外は親品種と形質が同一なので1つの品種として取り扱われている。世界で初めてのマルチラインは，コムギでさび病に対する抵抗性のみが異なり，その他の形質が類似する10個の同質遺伝子系統を混合したものからなり，1963年にコロンビア

で育成され，黒さび病と黄さび病の防除に用いられた。そして，本マルチライン育成以後，エンバクで冠さび病，コムギでうどんこ病，赤かび病，ヒマワリでさび病などの防除を目的として，種々のマルチラインが育成された<sup>14)</sup>。



図3 中国雲南省におけるイネ品種の混植によるいもち病の防除  
注) 草丈の高い品種が糯品種で，いもち病に弱い。糯品種は草丈の低いいもち病抵抗性のハイブリッド品種4列に1列の割合で混植されている。ハイブリッド品種の混植により，糯品種のいもち病の発生が抑制される。

表3 多系混合方式の組成の種類と特性<sup>7)</sup>

特性	種の混合	品種の混合	類似系統の混合	同質遺伝子系統の混合 (多系品種)
遺伝的類似性	なし	わずか	50～90%	90～99%
戻し親との交配回数	—	0	1～3	4～8
農業的均一性	なし	わずか	受容可	良
構成種・品種・系統間の競合	強い	相当有り	中程度	弱
対象病害に対する抵抗性	多様	垂直・水平抵抗性ともに多様	垂直抵抗性多様 水平抵抗性ほぼ均一	垂直抵抗性多様 水平抵抗性均一
非対象病害に対する抵抗性	多様	構成品種により垂直・水平抵抗性の多様可	親品種の選択により垂直抵抗性の多様可 水平抵抗性ほぼ均一	垂直・水平抵抗性ともに均一
レース分布に対応した構成の変更	可能、数年の圃場検定が必要	可能、数年の圃場検定が必要	可能、交替系統の保存可、圃場検定がいくらは必要	可能、交替系統の保存可、圃場検定不要
育種の進歩への対応	可能、数年の圃場検定が必要	新品種の利用ができれば可能、数年の圃場検定必要	可能、しかし育成と検定に年数必要	ほとんど不可能、育成に多年必要

注) Groenewegen and Zadoks(1979)を改表。

#### 4. イネいもち病に対するマルチラインと同質遺伝子系統の育成

既述した様に、マルチラインによる防除は既に実用化している。そして、現在までに我が国では代表的な15種のイネ品種・系統から、いもち病に対して異なる真性抵抗性遺伝子を持つ同質遺伝子系統が育成済みあるいは育成されつつある(表4)。

これらのうち「ササニシキ」から育成されたマルチライン「ササニシキBL」は、1995年に我が国で初めて農家の水田で栽培された。本マルチラインは1997年に宮城県で約5,500haの水田で栽培されたが、2004年にはその栽培面積は500haに減少した。なお、「ササニシキBL」では現在4つの異なる真性抵抗性遺伝子を持つ同質遺伝子系統が混合栽培され、水田でのいもち病の農薬による防除は1回だけである。本マルチラインを構成する同質遺伝子系統を侵害するいもち病菌のレースは分離されているが、それらの分布率は低い。このため、現在のところ本マルチラインにおけるいもち病の発生は少ない<sup>3, 14)</sup>。

新潟県で育成された「コシヒカリ新潟BL」は、*Pia, i, ta-2*および*z*系統が1:2:5:2の割合で混合され、2005年から約90,000haに栽培されている(図4)。一方、「コシヒカリ富山BL」は*Piz-t, b*及び*k-p*系統が4:4:2の割合で混植されており、2003年から約400haに栽培されている<sup>3, 14)</sup>。

また、真性抵抗性ではないが穂いもちに対

する圃場抵抗性遺伝子*Pb1*を導入した同質遺伝子系統も育成されている<sup>14)</sup>。そして、海外でもフィリピン(IRRI)、中国および韓国でもいも



図4 「コシヒカリ新潟BL」の展示圃場 (芦澤武人氏撮影)

表4 現在育成中と育成済みの同質遺伝子系統

反復親	反復親品種の真性抵抗性遺伝子型	同質遺伝子系統に導入された遺伝子	育成場所	普及年(登録年)
北海 241号 まいひめ	<i>Pia</i>	<i>Piz, b, ta-2, z-t, t</i> <i>Pii, k-h, k-m, z, ta, ta-2</i> <i>z-t, b</i>	北海道農試 青森農試藤坂支場	*
トヨニシキ あきたこまち	<i>Pia</i> <i>Pia, i</i>	<i>Pii, k, ta, ta-2, z-t</i> <i>Pik, k-m, z, z-t, ta, ta-2,</i> <i>b, t</i>	東北農試 秋田県農試	*
ササニシキ	<i>Pia</i>	<i>Pik-s, i, k, k-m, z, z-t, ta,</i> <i>ta-2, b</i>	宮城県古川農試	1995
ひとめぼれ まなむすめ	<i>Pii</i> <i>Pii</i>	<i>Pik, k-m, z, z-t, b, ta, ta-2</i> <i>Pik, k-m, z-t, b, a</i>	宮城県古川農試 宮城県古川農試	
日本晴	<i>+a</i>	<i>Pii, k, z, z-t, ta-2, b</i>	農研センター	*
キヌヒカリ	<i>Pii</i>	<i>Piz, z-t, ta-2, b</i>	北陸研究センター	
コシヒカリ	<i>+</i>	<i>Piz-t, ta-2, b, k-p, k-m, z</i>	富山県農技センター	2003
コシヒカリ	<i>+</i>	<i>Pia, i, ta-2, z, k, k-m,</i> <i>z-t, b</i>	新潟県農総研	2005
ハナエチゼン	<i>Piz</i>	<i>Pik, z-t, ta, ta-2, (b)</i>	福井県農試	*
越南 157号	<i>Pia</i>	<i>Pii, z, z-t, ta-2</i>	福井県農試	
ミネアサヒ	<i>Pia, i</i>	<i>Pik, k-m, z, z-t, b, ta, ta-2</i>	愛知県農総試山間	
中部 64号	<i>Pii</i>	<i>Pik, k-m, z, z-t, b, ta, ta-2</i>	愛知県農総試山間	
ヒノヒカリ	<i>Pia, i</i>	<i>Pik-m, ta, ta-2</i>	宮崎県農試	
あいちのかおり	<i>Pii</i>	<i>Pb1</i>	愛知県農総試	2000
コシヒカリ	<i>+</i>	<i>Pb1</i>	愛知県農総試	*

\* 育成済み。



ち病真性抵抗性が異なる同質遺伝子系統が育成されている<sup>13)</sup>。

## 5. マルチラインの発病抑制機構

マルチラインあるいは品種の混合栽培によりイネいもち病の発生が抑制されるのは、①抵抗性系統を混合することで全体として病気にかかる系統（罹病性系統）の割合が減少し、病原菌の増殖の場が少なくなる、②病斑から飛んできた病原菌の胞子の罹病性系統への付着を抵抗性系統が邪魔をする、③ある系統に病原性のない病原菌のレースがその系統に侵入しようとした時に誘導されるイネの抵抗性（誘導抵抗性）などによると考えられる。

抵抗性系統の混植による感受性系統の減少は病原菌の増殖の場を減らし、病気の発生の進展を抑制する。また、抵抗性系統は罹病性系統の病斑から離脱した病原菌分生子の罹病性系統への付着を妨げ、発病を抑制する。抵抗性と罹病性系統の混植区では、葉いもちの病勢進展が水

平および垂直方向ともに抑制されるが、この抑制は①や②の作用によるものと推察される。

非親和性菌によって誘導される抵抗性（誘導抵抗性）による発病抑制はその発現部位が限られており、マルチラインのイネいもち病発病抑制に関与する割合は、感受性植物の減少および抵抗性植物によるバリアー効果と比べると低いと考えられる。また、誘導抵抗性が発現するにはマルチラインにおいてある一定程度以上の非親和性菌による発病が必要で、マルチラインで高度な発病抑制を期待すれば、この誘導抵抗性による発病抑制については限界があると思われる。

## 6. マルチラインの発病抑制効果

著者らのいもち病の多発条件下での分布したいもち病菌レースに対して罹病性の「ササニシキ」とその抵抗性同質遺伝子系統（*Piz-t*系統）を混植した試験では抵抗性系統を75%程度混合することで薬剤散布並のいもち病発病抑制効果

表5 ササニシキとその同質遺伝子系統の混植区および殺菌剤の施用区における葉いもちの発生程度<sup>a)</sup>

いもち病の種類	試験年	ササニシキ: <i>Piz-t</i> 系統		全混 <sup>b)</sup>	ササニシキ単植	
		1:1	1:3		殺菌剤処理 <sup>c)</sup>	無処理
葉いもち						
	1994			0.6	0.5	4.2
	1995-1	1.2 <sup>d)</sup>	0.5	0.6	1.7	11.1
	1995-2	1.5		0.8	0.5	6.9
	1996-1	0.5	0.2	0.3	0.1	1.9
	1996-2	1.3		0.7	0.3	6.2
穂いもち						
	1994			15.2	8.6	51.3
	1995-1	34.2	15.5	29.1	16.2	84.2
	1995-2	17.7		12.5	4.0	49.0
	1996-1	27.2	12.9	17.1	13.0	69.3
	1996-2	24.6		25.6	20.5	81.0

a) 比病勢進展曲線下面積：病勢進展曲線下面積を調査日数で割った値。

b) ササニシキとその9種の同質遺伝子系統の等比混植区。

c) 葉いもち防除のためオリゼメート粒剤を3kg/10a 初発前に水面施用後、ビームゾル1000倍液を穂いもち防除のため穂ばらみ期と穂ぞろい期に150l/10a 散布。

d) 下線を付けた区の比病勢進展曲線下面積値はササニシキ単植区の殺菌剤散布区と同値と統計的に有意な差がない。



が得られた（表5）。

しかし、この発病抑制には抵抗性系統そのものによる発病抑制効果が含まれている。そこで、この抵抗性系統そのものによる発病抑制効果を除くため、マルチラインや品種混植を構成する同質遺伝子系統や各品種の単植区の発病値にそれぞれの系統・品種の構成比をかけ、これらを合計した値を基準として我が国で行われた混植試験のいもち病発病抑制を検討した。その結果、マルチラインや品種混植では葉いもちより穂いもちの発病抑制効果が低く、混植を構成する系統・品種の数が多い程、発病抑制効果が高い傾向があった（表6）。

マルチラインによるいもち病の発病抑制効果を種々の条件下で実験的に評価するには限界がある。芦澤（2005）<sup>31</sup>はこの限界を打ち破るため、マルチラインにおける葉いもちの発生推移を予測する計算機モデルBLASTMULを開発した。本モデルは葉いもち病病勢進展を予測する疫学モデルであるBLASTLを基本に構築されている。そして、本モデルは「ササニシキ」と「コシヒカリ」のマルチラインを対象にした抵抗性と罹病性の系統の混合割合を変えた種々の気象条件でその適合性が高いことが証明された<sup>31</sup>。今後、本モデルを用いれば各種条件におけるマルチラインによるいもち病の発病抑制効果を評価できると考えられる。

### 7. マルチラインの効果の持続性

マルチラインにおけるいもち病の発病抑制は、それを構成する抵抗性系統の真性抵抗性に因ることが大きい。このため、抵抗性系統を侵害するいもち病菌のレースの分布率が低いうちは、マルチラインの効果は持続できる。しかし、マルチラインを構成するすべての抵抗性系統を侵害できる“スーパーレース”の様な病原菌のレースが出現すればマルチラインによる有効な病害防除効果は期待できない。

Mundt（1994）<sup>15)</sup>はコムギの品種混植で混植を構成する品種の数が多くなるほどさび病の発病抑制が高くなる傾向があったと報告している。そして、いもち病でも同様なことが認められている（表6）。しかし、我が国では現在利用可能な真性抵抗性遺伝子の数が限られていることもあり、いもち病防除のためのマルチラインの構成同質遺伝子系統数は現在、3～4個となっている。また、その混植方法は、①宮城県や富山県のようにそれぞれの県で分布するイネいもち病菌のレースに対してほぼ抵抗性の系統のみからなり（clean crop法）、比較的小面積で栽培されている場合と②新潟県のように分布するイネいもち病菌レースに対して一部罹病性の系統を混合し（dirty crop法）、大面積で栽培する場合に分けられる。そして、宮城県では既にマルチライン普及後10年以上経過している。しかし、どちらの方法がマルチラインの効果を持

表6 品種混植とマルチラインにおける構成系統・品種の単植区の値から推定したイネいもち病の発病抑制と増収

混植構成 品種・系 統数	試験 例数	抑制率(%)						増収率(%)		
		葉いもち			穂いもち			Min.	Max.	Mean
		Min.	Max.	Mean	Min.	Max.	Mean			
2	27	-51	94	48	-23	77	24	-11.4	28.1	9.7
3	8	-40	93	60	-15	86	39	2.8	16.5	9.7
4	3	28	33	31	-41	37	0	2.0	7.1	5.1
10	4	59	97	74	16	53	41	0.2	14.1	9.2
全体	42	-51	97	52	-44	86	26	-11.4	28.1	9.2

Min., 最小値; Max., 最大値; Mean, 平均値。

続するために有効なのか、また、マルチラインを構成する同質遺伝子系統の数をどれくらいにすれば良いか、さらに、各系統をどの様にどれだけの面積で混植して栽培すれば持続性が高くなるのかはまだ明らかでなく、今後の課題となっている。

## 8. マルチラインにおけるイネいもち病菌のレース分布と種子増殖

「ササニシキBL」では、普及4年後で同マルチラインから分離されたいもち病菌レースすべてに抵抗性を示す構成系統は無くなっている(表7)<sup>18, 21)</sup>。しかし、本マルチラインでは構成系統を侵害できるレースの分布率が低いことも有り、これまでいもち病による著しい被害は報告されていない。

一方、「ササニシキ」マルチラインを用いた著者らの小区画の試験では、2系統から成るマルチラインではそれら両方を侵害できるいもち病菌のレースが栽培2年目で優先したが、「ササニシキ」と9系統を等量混植したマルチラインでは「ササニシキ」の単植区で優先したレースと同一のレースが優先し、構成系統を広く侵害するレースが優先することはなかった。しかし、このような調査は大面積で行われておらず、今後、新潟県のような大規模なマルチラインの栽

培圃場におけるいもち病菌レース分布の動向とその変動要因の解析は今後の検討課題となっている。

マルチラインの種子は種子伝染による構成系統侵害菌の増殖と混合比の変化を防ぐため、毎年全量更新の体制をとっている。また、種子は原種→種子混合→採種圃の行程を得て、農家へ普及されるため、一般品種と比べると種子配布が煩雑である。さらに、混合率を決めてから、農家に普及するまで2年が必要である。このような煩雑さはマルチラインの普及を妨げる要因にもなっており、さらに、マルチラインが罹病化した時に構成系統を変更するなどの対応が直ぐにできない原因となっている。また、この種子増殖の課程で、マルチラインを構成する系統を侵害できるいもち病菌レースが増殖することも考えられ、より効率的な種子配布体制や方法を考えなければならない。

## 9. イネいもち病抵抗性研究の現状

既述したが、現在、イネ品種のいもち病に対する真性および圃場抵抗性遺伝子の解析が進み、これらのイネ染色体上での座乗位置が明らかになるとともに一部の遺伝子ではその単離が報告されている(表8, 表9, 図5)。そして、現在、これら抵抗性遺伝子の染色体でのマッピ

表7 宮城県農家圃場のマルチライン「ササニシキBL」<sup>a)</sup>の穂いもち病斑から分離されたイネいもち病菌のレース

年	調査地点数	レース										
		007	<u>037<sup>b)</sup></u>	<u>047</u>	<u>407</u>	003 007	007 <u>013</u>	007 <u>037</u>	<u>033</u> <u>037</u>	<u>037</u> <u>047</u>	003 007 <u>037</u>	007 <u>037</u> <u>077</u>
1995	20	4 <sup>c)</sup>	7			2	1	4	2			
1996	23	7	4			1		6		1	3	1
1997	3	2	1									
1998	23	18	1	1	1	1		1				

a)ササニシキBLの構成, *Pik* 系統:*Pik-m* 系統:*Piz* 系統 = 4:3:3 (1995); *Pik* 系統:*Pik-m* 系統:*Piz* 系統 = 3:3:4 (1996); *Pik* 系統:*Pik-m* 系統:*Piz* 系統:*Piz-t* 系統 = 1:1:4:4 (1997, 1998)。

b)下線を付けたレースは「ササニシキBL」構成系統の一部に対して病原性がある。

c)各レースが分離された地点数を示す。  
大場ら(1999)<sup>18)</sup>, 辻ら(1999)<sup>21)</sup>より作表。

ングが進展するとともにこれらと密接に連鎖するPCRマーカーが作出・整備されつつある。そして、実際、これらのDNAマーカーを用いた抵抗性遺伝子の選抜(MAS)により抵抗性遺伝子を導入した同質遺伝子系統の育成が行われている<sup>1)</sup>。また、ゲノム情報の解析により、抵抗性遺伝子座乗領域のみが異なり、その他のゲノム領域が戻し親と同一な同質遺伝子系統の育成も容易となることから、圃場抵抗性遺伝子の導入による食味の低下といった心配も今後、軽減されていくと思われる。

いもち病に対する真性抵抗性についてはイネの所有する抵抗性遺伝子と病原菌の有する非病原性遺伝子が組み合わさった時に初めて発現するgene-for-gene theoryが成り立つことが明らかにされている<sup>20)</sup>。そして、最近、一部の圃場抵抗性遺伝子でもこれを侵害できるいもち病菌の間にもgene-for-gene theoryの関係が成り立つことが証明された<sup>24)</sup>。最近、イネゲノムの塩基配列が完全解読される<sup>10)</sup>とともにいもち病菌の塩基配列も完全に解読された<sup>6)</sup>。いもち病菌の非病原性遺伝子については、それらのいもち病菌の染色体上の座乗領域が明らかにされるとともに、その一部は単離されている(表10, 図6)<sup>17, 20, 23)</sup>。しかし、抵抗性の発現機構については、単離された一部のイネといもち病菌の両遺伝子産物の相互関係の解析から、その発現機構が解析されているものの、それがすべてわかっているわけではない。そして、圃場抵抗性の発現についてはそれに関与する遺伝子が最近、単離されたばかりで、その機構はほとんど明らかにされていない<sup>5)</sup>。今後、いもち病抵抗性の発現機構の解明が進むことにより、本抵抗性のより効果的で持続的な利用が可能になることが期待される。

## 10. おわりに

いもち病を目的としたイネのマルチラインは、既述した様に既に宮城県、新潟県および富山県で実用化されており、これら以外の県でも

マルチラインとしての利用を目指した同質遺伝子系統の育成が行われている。そして、マルチラインにおいて抵抗性が有効に働けば、農薬の散布回数が軽減でき、昨今、要望されている環境保全型農業の推進に大きく寄与できる。

しかし、マルチラインの栽培において、我が国で同質遺伝子系統育成のために用いられている真性抵抗性遺伝子の数は限られている。また、我が国で育成中あるいは育成されたイネいもち病防除のための同質遺伝子系統の多くは戻し親に圃場抵抗性の弱い良食味のイネ品種が用いられており、いもち病に対する圃場抵抗性が弱い。このため、今後は、遺伝子解析の情報を有効に用い、同質遺伝子系統の圃場抵抗性程度を高めるとともに病原菌の新レースが増殖した場合に備え、新たな真性抵抗性遺伝子を持つ同質遺伝子系統の育成を早急にはかる必要がある。また、現在、マルチラインの効果を永続的に利用するためには、構成する同質遺伝子系統の数をどれくらいにすれば良く、それらの系統をどのような割合で混植し、どれだけの面積で栽培すれば持続性が高くなるのかはまだ明らかでなく、これらの点が明らかにされないまま、マルチラインが普及されている。

なお、マルチラインを想定した病原菌と宿主の共進化モデル<sup>19)</sup>や格子モデル<sup>11)</sup>が最近、開発され、マルチラインを長期的に有効に用いるための戦略が計算機シミュレーションの中で考えられている。しかし、これらのモデルは現実と異なる部分もあり、今後、これらのモデルを現実と近づけることにより、上記に対する回答が得られることを期待したい。また、最近、スーパーレースの出現とその蔓延防止を目的とし、マルチラインの持続的利用に向けたいもち病流行予測システムを開発しようとする研究プロジェクトが、先端技術を活用した農林水産研究高度化事業の中で提案された。本プロジェクトは、マルチラインにおけるイネいもち病菌の病原性突然変異菌の出現・定着要因を解明して、これらを上述の共進化モデルに反映させ、マルチラインの効果的・持続的な利用をはかるとともに

BLASTMULを用い、マルチラインでの穂いもちの発生予測を行おうとするものである。本研究プロジェクトの遂行と成功により、今後のマルチラインにおける持続的な利用とその利用の拡大がなされることを願いたい。

表8 イネ品種・系統のいもち病に対する真性抵抗性遺伝子

遺伝子	由来品種・系統	座乗染色体
<i>Pish</i>	新2号	1
<i>Pia</i>	愛知旭	11
<i>Pii</i>	石狩白毛	9
<i>Pik</i>	クサブエ	11
<i>Pik-p</i>	HR-22	11
<i>Pik-m</i>	ソユアケ	11
* <i>Pita</i> ( <i>Pi4a(t)</i> )	Pi No.1	12
<i>Pita-2</i>	Pi No.4	12
<i>Piz</i>	フクニシキ	6
* <i>Piz-t</i>	とりで1号	6
* <i>Pib</i>	Tjina	2
<i>Pit</i>	Tjahaja	1
<i>Pik-s</i>	新2号	11
<i>Pik-h</i>	HR 22	11
<i>Pik-g</i>	GA20	11
<i>Pitq1</i>	Teqing	6
<i>Pib2</i>	Lemont	11
<i>Pitq5</i>	Teqing	2
<i>Pitq6</i>	Teqing	12
<i>Pi1</i>	LAC23	11
<i>Pi2(t)</i> ( <i>Piz-5</i> )	5173	6
<i>Pi3</i>	Pai-kan-tao	9
<i>Pi5</i>	Moroberekan	9
<i>Pi6</i>	Apura	12
<i>Pi7</i>	Moroberekan	11
<i>Pi8</i>	Kathalath	6
<i>Pi9</i>	<i>Oryza minuta</i>	6
<i>Pi10</i>	Tongil	5
<i>Pi11(t)</i> ( <i>Pizh</i> )	Zhaiyeqing	8
<i>Pi12</i>	Hong-jiao-zhan	12
<i>Pi13(t)</i>	Mauwangu	6
<i>Pi14(t)</i>	Mauwangu	2
<i>Pi15(t)</i>	GA25	9
<i>Pi16</i>	Aus 373	2
<i>Pi17(t)</i>	DJ123	7
<i>Pi18</i>	Suweon365	11
<i>Pi19</i>	愛知旭	12
<i>Pi20</i>	IR24	12
<i>PiCO39(t)</i>	CO39	11
<i>Pi24(t)</i>	Zhong 156	12
<i>Pi25(t)</i>	Gumei 2	6
<i>Pi25(t)</i>	Yunxi 2	1
<i>Pi27(t)</i>	Q14	1
<i>Pi33</i>	IR64	8
<i>Pi37(t)</i>	St No.1	1
<i>Pi44(t)</i>	Moroberekan (RIL276)	11
<i>PiD1(t)</i>	Digu	2
<i>PiD2(t)</i>	Digu	6

注) 1. 清沢(1997)<sup>12)</sup>および林(2005)<sup>9)</sup>の表を変更。  
2. \* を付けた遺伝子は単離が報告されている。



表9 イネ品種・系統のいもち病に対する圃場抵抗性遺伝子

遺伝子	由来品種・系統	座乗染色体	
<i>Pb1</i>	朝の光	11	穂いもち
* <i>pi21</i>	オワリハタモチ	4	
<i>Pi21(t)</i>	Suweon 365	12	
<i>Pi22(t)</i>	Suweon 365	6	
<i>Pi23(t)</i>	Suweon 365	5	
<i>Pi34</i>	中部 32 号	11	
<i>Pi35(t)</i>	北海 188 号	1	
<i>Pi36(t)</i>	嘉平	4	
<i>Pi37(t)</i>	<i>Oryza rufipogon</i>	4	
<i>Pif</i>	中国 31 号	11	
<i>Pikur1</i>	黒禾	4	
<i>Pikur2</i>	黒禾	11	
<i>Pise1 (Rb1)</i>	戦捷	11	
<i>Rb4</i>	イモチシラズ	11	
<i>qBFR4-2, qBFR4-3</i>	嘉平	4	
<i>qBR4-2</i>	戦捷	4	
<i>qBR11-1</i>	戦捷	11	
<i>qBR12-1</i>	戦捷	12	
	宮崎もち	11	

注) 1. 清沢(1997)<sup>12)</sup>および林(2005)<sup>9)</sup>の表を変更。  
 2. \* を付けた遺伝子は単離が報告されている。

表10 いもち病菌のイネ品種に対する非病原性遺伝子

遺伝子	対応するイネ品種
<i>POS1</i>	5183
<i>POS2</i>	Sha-tiao-tsaio
<i>POS3</i>	K59
<i>POS4</i>	Kinandong
<i>Avr-CO39</i>	CO39
<i>Avr-M201</i>	M201
* <i>Avr1-CO39</i>	CO39
* <i>Avr-Pita (Avr-YM)</i>	ヤシロモチ
<i>Avr-MARA</i>	Maratelli
<i>Avr-TSUY</i>	ツユアケ
<i>Avr-MINE</i>	峰光
<i>Avr-CICA6</i>	CICA6
<i>Avr-MedNo</i>	Med Noï
<i>Avr-Ku86</i>	Ku86
* <i>ACE1</i>	Irat7
<i>Avr-PiNo4</i>	Pi No.4
<i>P11, P12, S11, A12</i>	Katy
<i>Avr-KB</i>	クサブエ
<i>Avr-Pit (Avr-K59)</i>	K59
<i>Avr-Pik-s (Avr-S2)</i>	石狩白毛、新2号
<i>Avr-Pik</i>	関東51号
<i>Avr-Pik-m (Avr-TA)</i>	ツユアケ
<i>Avr-Piz</i>	フクニシキ
<i>Avr-Piz-t</i>	とりで1号
<i>Avr-Pish</i>	新2号
<i>Avr-Pii</i>	石狩白毛
<i>Avr-Pia</i>	愛知旭
<i>Avr-Hattan3</i>	Hattan3
<i>Avr-Pib</i>	BL1

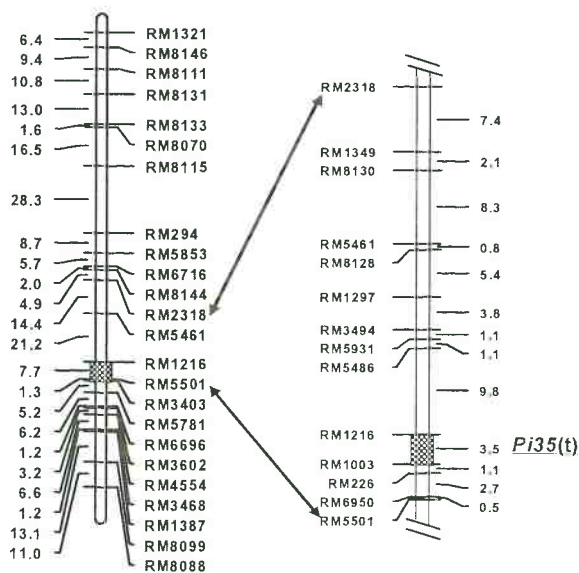


図5 いもち病圃場抵抗性遺伝子*Pi35(t)*領域のマッピング(第1染色体)

注) 1. Nottoghem et al. (1994)<sup>17)</sup>の表に追加・変更。  
 2. \* を付けた遺伝子は単離が報告されている。

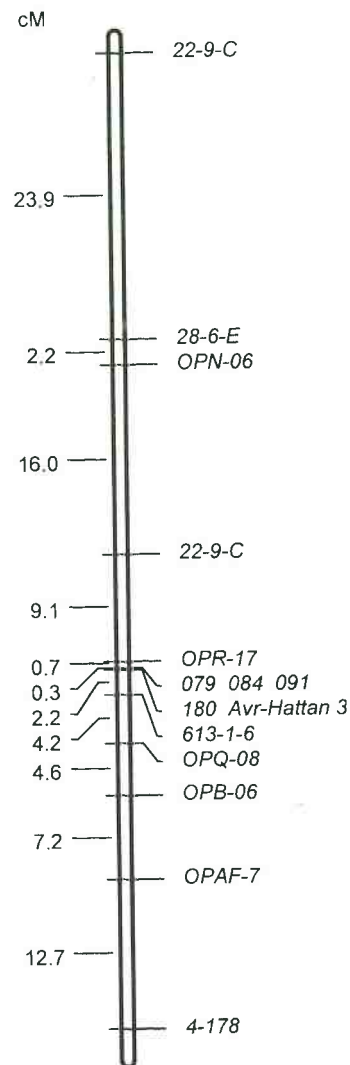


図6 イネいもち病菌の非病原性遺伝子*Avr-Hattan3*の連鎖地図 (Yasuda et al., 2005)<sup>23)</sup>

注) 1. 下線は*Avr-Hattan3*と密接に連鎖しているマーカー。

2. 連鎖解析にはイネいもち病菌株Y90-71 (*Avr-Hattan3*), 3514-R-2およびその交配後代を用いた。

3. OPから始まるマーカーはRAPDマーカー, それ以外はRFLPマーカー。

## 文 献

- 1) 安東郁夫 (2005), 育種学研究, 7(別1・2), 90-91.
- 2) 浅賀宏一 (1987), 稲いもち病 (山中達・山口富夫編著), 216-249, 養賢堂, 東京
- 3) 芦澤武人 (2005), 農業及び園芸, 80, 451-456.
- 4) 藤井 潔ら (2005), 植物防疫, 59, 226-230.
- 5) Fukuoka, S. et al. (2005), 10th International Congress of SABRAO Abstracts, S2-3.
- 6) Dean R. A. (2005), Nature, 434, 980-986.
- 7) Groenewegen, L. J. M. et al. (1979), Indian J. Genet., 39, 81-94.
- 8) 林 長生 (2003) 世界におけるいもち病研究の軌跡 (浅賀宏一・加藤 肇・山田昌雄・吉野嶺一編), 11-15, 日本植物防疫協会, 東京
- 9) 林 長生 (2005), 微生物遺伝資源利用マニュアル, (18), 1-34.
- 10) IRGSP (2005), Nature, 436, 793-800.
- 11) 石黒潔 (2005), 日植病報, 71, 197.
- 12) 清沢茂久 (1997), 分子レベルからみた植物の耐病性 (山田哲治・島本 功・渡辺雄郎編), 56-64, 秀潤社, 東京
- 13) 小泉信三 (2005), 育種学研究, 7(別1・2), 86-87.
- 14) 小泉信三 (2005), 環境保全型農業事典 (石井龍一ら編), 537-542, 養賢堂, 東京
- 15) Mundt, C. C. (1994) Rice Blast Disease (Zeigler, R.S., Leong, S. A. and Teng, P. S. Eds), 293-308, CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK.
- 16) 内藤秀樹ら (1999), 農研センター資料, 39, 1-92.
- 17) Notteghem, J. L. et al. (1994) Rice Blast Disease (Zeigler, R.S., Leong, S. A. and Teng, P. S. Eds), 155-165, CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK.
- 18) 大場淳司ら (1999), 北日本病虫研報, 50, 12-15.
- 19) Sasaki, A. (2000), Proc. Roy. Soc. Lond. B 267, 2183-2188.
- 20) 土佐幸雄・鎌倉高志 (2003) 世界におけるいもち病研究の軌跡 (浅賀宏一・加藤肇・山田昌雄・吉野嶺一編), 11-15, 日本植物防疫協会, 東京
- 21) 辻 英明ら (1999), 北日本病虫研報, 50, 16-20
- 22) Yamada, M. et al. (1985), JARQ, 19 (3), 178-183.
- 23) Yasuda, N. et al. (2005), Phytopathology, 95, 768-772.
- 24) Zenbayashi, S. K. et al. (2005), JGPP, 71, 395-401.

## ◀国内情報▶

# 「メンデル優性の法則を分子レベルで解明」 — アブラナ科植物の自家不和合性でみられる 花粉側S決定因子の優劣性現象について

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

柴 博 史 ・ 高 山 誠 司

有性生殖によって生み出される子孫は、両親の持つ性質のいずれか一方のみを受け継ぐ場合が多く知られている。メンデルが発見した「優性の法則」として古くから知られる遺伝の現象であるが、何故一方の遺伝子の性状のみが現れるのか、厳密に解析された例は意外と少ない。今回我々は、アブラナ科植物の自家不和合性の自他識別に関わる対立遺伝子間の優劣性について解析を進める過程で、劣性側の対立遺伝子のプロモーター領域が、時期・組織特異的にメチル化され、劣性側の対立遺伝子の発現が抑えられるという現象を発見した。優劣性という古典的な遺伝現象に、エピジェネティックな遺伝子発現制御が関与していることを見出した最初の例として注目されている。

## 1. はじめに

多くの植物は、自己の花粉とは受精しない自家不和合性という性質を持つ。いわゆる近親交配を避けるために、また多様な子孫を残して変動する環境を生き抜いていくために、植物にとって極めて重要な性質だと考えられている。アブラナ科植物では、雌ずい先端の細胞（乳頭細胞）にあるSRKというセンサー蛋白質（受容体）が、花粉上のSP11/SCRという自己・非自己のマーカ蛋白質（リガンド）を識別して、花粉の発芽伸長を抑制する<sup>1-3)</sup>。SRKとSP11をコードする遺伝子は強く連鎖しており、一つの遺伝的ユニット（Sハプロタイプ）として後代に伝わる。また両遺伝子は多数の対立遺伝子をもち（約100ものSハプロタイプが自然界に存在するといわれている）、受粉の際、同一Sハプロタイプ上にコードされたSP11リガンドがSRK受容体に出会うと受容体が活性化され、不和合反応が誘起される<sup>2-4)</sup>。

アブラナ科植物の自家不和合性では、花粉の自他を決定するSP11リガンドが一倍体の花粉そのものでなく葯腔の最も内側に位置し、花粉細胞に種々の物質を供給している二倍体の葯タペート組織で生産され、花粉の成熟に伴って花

粉の表層に移行する<sup>5)</sup>。そのため、2種類のSハプロタイプをヘテロに持つ株から作られる花粉は、一倍体であるにも関わらず2種類のSP11リガンドを持つことになる。しかし、実際はさらに複雑で、2種類のSハプロタイプ間に優劣性の関係が生じる場合があり、その場合の花粉は、一方のS遺伝子の性質は示さず、あたかも他方のS遺伝子のみを持っているかのように振る舞う。例えば $S_1S_2$ ヘテロ体の花粉は、通常（ $S_1$ と $S_2$ が共優性の場合） $S_1S_1$ および $S_2S_2$ の雌ずいに対して不和合となるが、 $S_1$ が $S_2$ に対して優性の場合には、 $S_1S_1$ の雌ずいには不和合となるものの $S_2S_2$ の雌ずいに対しては和合となる（図1A）。これまで、東北大の日向先生のグループにより、多数のSハプロタイプ間の優劣性の関係が調べられた結果、一般に花粉優性を示すSハプロタイプのグループとそれらとの組み合わせでは花粉劣性を示すSハプロタイプのグループに大別されることがわかってきた<sup>6)</sup>。また、劣性Sハプロタイプ内においては、相互にlinearな優劣性の関係が見られる場合が多いことも知られてきたが（図1B）、果たしてどうしてこのような優劣性の関係が生ずるのか、その分子機構は長らく不明であった。

SHIBA Hiroshi, TAKAYAMA Seiji

〒630-0192 生駒市高山町8916-5



## 2. 劣性花粉因子 (SP11) の発見と発現様式の解析

筆者らは、花粉の優劣性機構を考える上で劣性を示す花粉因子の発現様式を調べることで機構解明の鍵になると考えた。しかし優劣性の研究を手がけた当時、優性を示すSハプロタイプのSP11は多数クローニングされていたにも拘らず、劣性のSハプロタイプのSP11は一つも見出されていなかった。これは、劣性のSハプロタイプのSP11の塩基配列が優性のものとはかなり異なり、優性SP11の塩基配列を基にしたサザンブロットリングやPCR反応では得られな

かったことに起因する。そこで我々は、花粉劣性を示すSホモ系統株のゲノミックDNAライブラリーを作成してS遺伝子座領域を単離し直すところから、探索をやり直した。その結果、花粉劣性を示すS<sub>60</sub>系統のSRK遺伝子上流6.5kbの位置に、SP11の特徴である8つのシステイン残基をコードしている遺伝子配列を見出すことに成功した<sup>7)</sup>。In situ hybridizationにより当該配列が葯タペト組織で特異的に発現していること、当該配列を元にした縮重プライマーを用いて他の劣性S系統の葯mRNAからも相同な配列が得られたことから、これらを劣性SP11遺伝子とした<sup>7)</sup>。劣性SP11間で推定アミノ酸配列

を比較したところ、劣性系統間における相同性は比較的高かったものの（カブの仲間*Brassica. rapa*で63-73%の相同性）、優性SP11との相同性はほとんど認められなかった。またS遺伝子座の解析から、劣性SP11遺伝子は優性系統と同様、常にSRK遺伝子の近傍に位置し、強く連鎖していることが示された。さらに大腸菌で発現させたSP11タンパク質を用いた受粉アッセイ試験によって、当該遺伝子産物が花粉劣性系統における花粉因子であることが実験的に証明された<sup>7)</sup>。

次に花粉の優劣性出現と劣性SP11遺伝子の発現様式の関係性を明らかにするために、劣性SP11遺伝子の発現様式を詳細に解析した。優性/劣性ヘテロ株および劣性ホモ株の葯切片をin situ hybridizationにより解析したところ、劣性

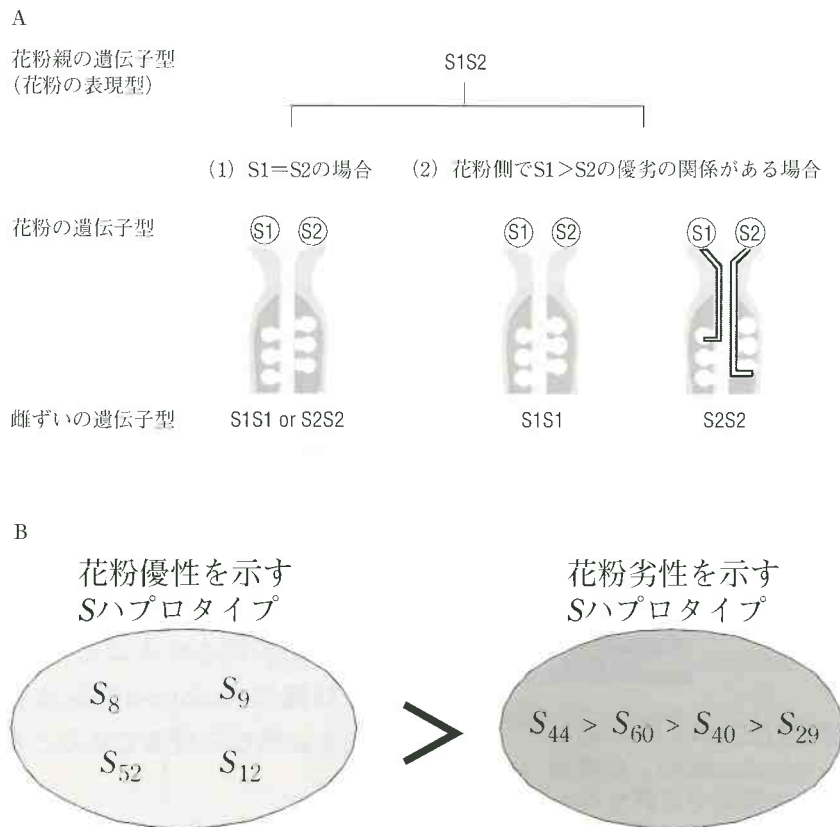


図1 アブラナ科植物の優劣性

- A. 花粉におけるS遺伝子間の優劣性。  
 B. アブラナ科植物における優劣の関係。優性Sハプロタイプ間の組み合わせでは両方のS表現型が現れるが、劣性Sハプロタイプと優性Sハプロタイプとのヘテロ体になると劣性側の花粉S表現型が現れない。劣性Sハプロタイプ間にもlinearな優劣性関係があり、例えばS<sub>60</sub>系統ではS<sub>40</sub>やS<sub>29</sub>とのヘテロ体では優性になるが、S<sub>44</sub>や他の優性Sハプロタイプとのヘテロ体では劣性となる。

*SP11*遺伝子は劣性ホモ株では葯タペート組織で発現するものの、優性/劣性ヘテロ株では発現していないことが示された<sup>7)</sup> (図2A)。一方、優性*SP11*遺伝子はヘテロ株でもタペート組織で強く発現していた。さらにlinearな優劣性関係が認められる劣性Sハプロタイプの組み合わせでも、常に相対的に劣性となる系統の*SP11*遺伝子の発現が抑制されていることが示された<sup>8)</sup>。このように花粉の優劣性は相対的に劣性と

なるSハプロタイプの*SP11*遺伝子の発現が抑制されて生じることが明らかとなった。

### 3. 劣性ハプロタイプ特異的な*SP11*遺伝子発現抑制機構の解明

優性/劣性ヘテロ株で見られる*SP11*遺伝子のmono-allelicな発現抑制がどのようなメカニズムによって起こるのかを明らかにするために、さらなる解析を行った。まず本現象が植物の胚乳発現遺伝子等で報告のあるgenomic imprintingと関連があるかどうかを調べるために、劣性側となるS系統を花粉側あるいは雌ずい側にして優性/劣性ヘテロ株を作成し、得られたそれぞれの後代の花粉の優劣性を調べた。その結果、劣性側の*SP11*は親の雌雄の影響を受けずに常に劣性を示すことが判明し、この優劣性現象がいわゆるimprintingとは別の機構によるものであることが示唆された。またnucleolar dominanceという種間雑種において生じる発現抑制現象が知られているが、これが種間雑種形成後、世代を経て徐々に抑制が強化されていくのに対し、本現象は交雑により優性/劣性の組み合わせが生まれると、直ちに劣性*SP11*遺伝子の発現が抑制されることから、本現象は既知のmono-allelicな発現抑制とは異なる現象であると考えられた。

DNAのメチル化はエピジェネティックな遺伝子発現抑制機構の主原因として動植物を問わず広く知られている。そこで、筆者らは、劣性側の*SP11*遺伝子の発現抑制にゲノムDNAのメチル化が関与している可能性を検討することと

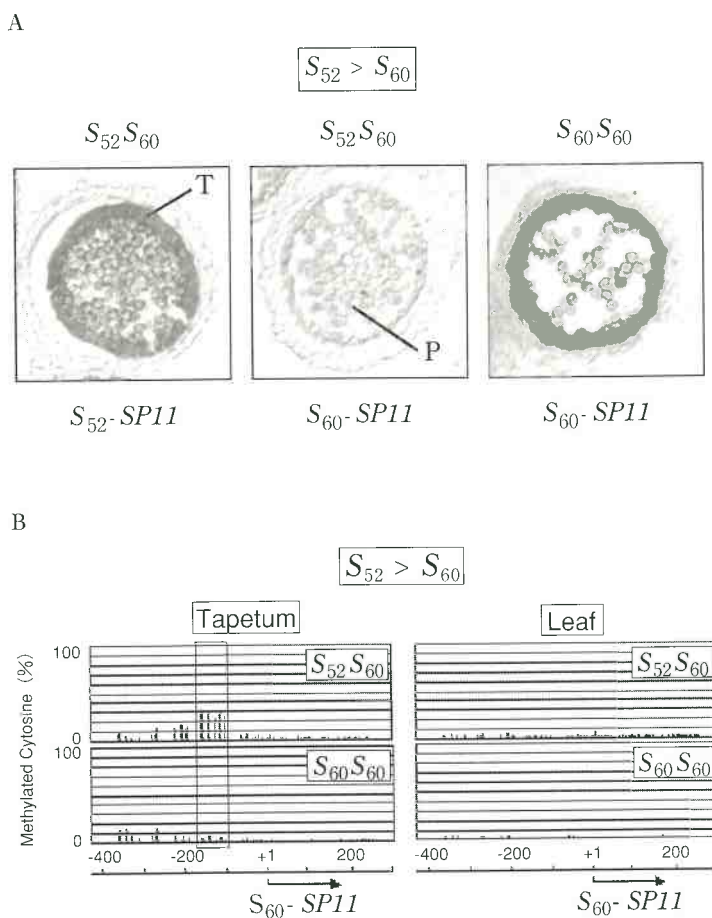


図2 劣性*SP11*遺伝子の発現抑制とDNAメチル化

- A. 劣性*SP11*遺伝子の発現 (*in situ* hybridization)。劣性系統 ( $S_{60}$ ) の*SP11*遺伝子は劣性ホモ個体では葯タペート組織で発現しているが (右)、優性/劣性ヘテロ株では発現が見られない (中央)。一方、優性系統 ( $S_{52}$ ) の*SP11*遺伝子はヘテロ株でも発現が見られる (左)。T, タペート組織, P, 花粉。
- B. 劣性*SP11*遺伝子ゲノム領域のメチル化。優性/劣性ヘテロ株 (上段)、劣性ホモ株 (下段) の劣性*SP11* ( $S_{60}-SP11$ ) 遺伝子ゲノム領域のメチル化をプロットしたもの。優性/劣性ヘテロ株のタペート組織でのみ  $S_{60}-SP11$  遺伝子の5'上流域に高メチル化部位が見られる (枠内)。

した。しかし葯組織全体や葉組織を用いた予備的な実験では、優性/劣性ヘテロ株における劣性SP11ゲノム領域の特異的なDNAメチル化は検出されなかった。しかし、ほ乳類の発生や分化で知られる様な時期・組織特異的なDNAメチル化が起きている可能性が残された。そこで筆者らは葯からタペート細胞を効率よく回収する方法を開発し、得られたタペート細胞からゲノムDNAを抽出してbisulfite法によりDNAメチル化を調べた。その結果、優性/劣性ヘテロ株の劣性SP11遺伝子のcis-element部位およびその周辺領域だけが特異的に*de novo*メチル化されていることを発見した<sup>9)</sup> (図2B)。さらに優劣の関係が明らかになっている多数のSハプロタイプの組み合わせで葯タペート組織におけるSP11遺伝子ゲノム領域のメチル化を調べたところ、全組み合わせでSハプロタイプ間の相対的な優劣の関係に依存した劣性SP11遺伝子特異的なDNAメチル化が認められた。またこのメチル化はタペート組織でSP11遺伝子が発現する直前に特異的に起こり、葉、花卉、雌ずい柱頭、花粉等では見られなかった<sup>9)</sup>。

以上の結果から次のような優劣性機構のモデルが考えられる (図3)。優性/劣性ヘテロ株の場合、劣性側のSP11遺伝子5'上流域のcis-ele-

ment部位がDNAメチル化され、それにより劣性側SP11遺伝子の発現が抑制される。一方、優性側のSP11遺伝子5'上流域のcis-element部位はメチル化されないため、優性側SP11遺伝子は発現する。その結果、優性/劣性ヘテロ体のタペート細胞では優性側のSP11タンパクのみが産生され、優性側のS表現型のみが現れる。

#### 4. おわりに

本研究ではアブラナ科植物の自家不和合性で見られる花粉の優劣性が、時期・組織特異的な*de novo* DNAメチル化によるSP11遺伝子の発現調節によることを明らかにすることが出来た。これは、対立遺伝子間で見られる優劣性という古くから知られる遺伝現象に後天的な遺伝子発現制御機構が関与していることを示した初めての報告である。メンデルの発見した遺伝法則の一つである対立遺伝子間の優劣性は広く生物一般に見られる現象であり、従来その多くは劣性側遺伝子の欠陥等に起因するものと考えられてきた。今回の発見は優劣性に関する知見に新たなモデルを提唱するものであり、これが他の優劣性現象にも認められる普遍的な機構であるかどうかは大いに興味のあるところである。

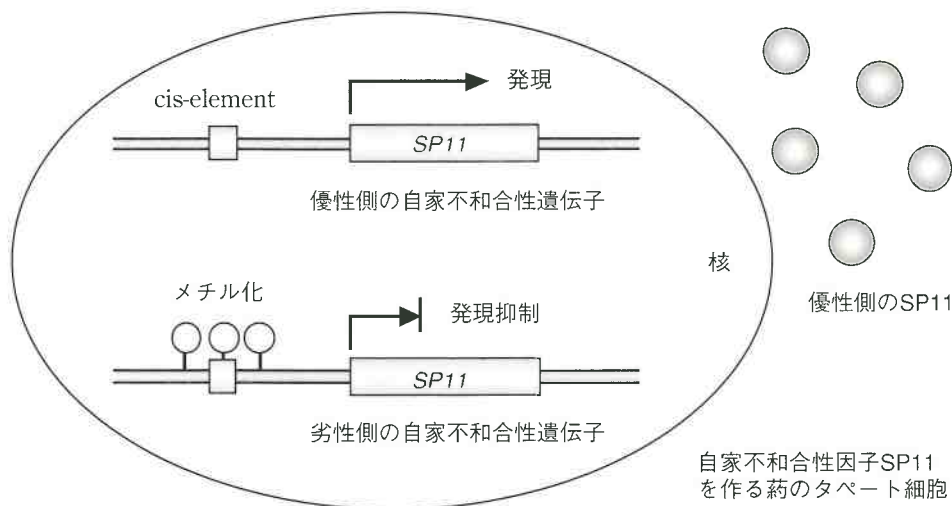


図3 劣性側SP11のメチル化による発現抑制のモデル

また本研究により、植物でも動物と同様に時期・組織特異的なゲノムDNAの*de novo*メチル化が遺伝子発現を制御していることが初めて明らかになった。DNAメチル化を介した時期・組織特異的な遺伝子発現制御は生物の発生や分化、発癌などに関わっていることが示されており、ポストゲノム研究の重要な位置を占めている。しかし植物では一般的にメチル化パターンは世代を超えても変わらないと考えられており、これまでDNAメチル化の消失が胚乳細胞で起こっている例が唯一報告されているに過ぎない<sup>10)</sup>。本研究成果は植物にも時期・組織特異的なゲノムDNAの*de novo*メチル化が存在することを示すものであり、植物における当該分野の研究の発展に役立つであろう。今後はS遺伝子の相対的な優劣性に基づいた時期および部位特異的な*de novo* DNAメチル化がどのようにして起こるのかを明らかにしていく必要がある。

なお、本研究は、文部科学省、日本学術振興会からの科学研究費の助成により成されたものである。

## 文 献

- 1) Takayama, S., et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1920-1925
- 2) Schopfer, C. R., Nasrallah, M. E., and Nasrallah, J. B. (1999) *Science* 286, 1697-1700
- 3) Shiba, H., et al. (2001) *Plant Physiol.* 125, 2095-2103
- 4) Takayama S., et al. (2001) *Nature* 413, 534-538
- 5) Iwano, M., et al. (2003) *Plant Cell Physiol.* 44, 428-436
- 6) Hatakeyama, K., et al. (1998) *Heredity* 80, 241-247
- 7) Shiba, H., et al. (2002) *Plant Cell* 14, 491-504
- 8) Kakizaki, T., et al. (2003) *Plant Cell Physiol.* 44, 70-75
- 9) Shiba, H., et al. (2006) *Nature genetics* 38, 297-299
- 10) Kinoshita, T., et al. (2004) *Science* 303, 521-523



## ◀国内情報▶

クワは乳液で昆虫から身を守る — 植物の乳液に  
農薬・医薬の宝庫としての可能性

独立行政法人 農業生物資源研究所

今野浩太郎

多くの植物が傷口から乳液を分泌するが、乳液や乳液成分の植物にとっての機能に関する研究はこれまで少なかった。我々は最近、クワの葉がカイコ以外の昆虫に対して強い毒性・耐虫性を持ち、それが乳液に多量に含まれる糖代謝の阻害剤として知られ血糖値上昇抑制効果も報告される3種の糖類似アルカロイド物質に起因していることを解明した。本稿では乳液が担う植物の耐虫性と、乳液がもつ農薬・医薬の宝庫としての可能性について最新の知見を解説する。

## 1. 植物の乳液とは

植物の葉脈を傷付けたときに傷口から白色の液体が出てくることを経験した人は多いだろう(図1左)。タンポポ、レタス、パラゴムノキ、インドゴムノキ、イチジク、サツマイモ、ヒルガオ、パパイア、ポインセチア、ケシなど多くの植物が傷を付けたときに白色の液体を分泌するが、これらは乳液(latex)と呼ばれている。(ウリ科植物やキョウチクトウのように透明なものは滲出液(exudate)と呼ばれる。また、樹木が分泌する粘り気のあるものは樹脂(resin)とよばれる。)乳液・滲出液・樹脂を分泌する植物は意外に多くこれまでに3万種の植物(全維管束植物の約8~10%)が報告されている<sup>1)</sup>。また、25科以上の植物に広く散在しており、40回以上も独立に進化したらしい<sup>1)</sup>。一方、植物乳液には様々なタンパク質・酵素が含まれることが天然物化学・食品化学・アレルギー関係の研究から明らかにされている。例として、システインプロテアーゼがパパイア<sup>2,3)</sup>・イチジク<sup>4)</sup>・ガガイモ科植物<sup>5)</sup>の乳液に、キチナーゼがパラゴムノキ<sup>6)</sup>・パパイア<sup>7)</sup>、ガジュマル<sup>8)</sup>の乳液に、青酸配糖体分解酵素のリナマラーゼ(青酸配糖体からグルコースを切り落とす $\beta$ -グルコシダーゼ)がキャッサバ乳液に<sup>9)</sup>。

KONNO Kotaro

〒305-8634 茨城県つくば市大わし1-2

<sup>10)</sup>、それぞれ多量に含まれていることが報告されている。この他にも、パパイアに繰り返し傷害を与えることにより、グルタミニルシクラーゼ(パパイア)やプロテアーゼインヒビターが乳液中に誘導されてくるという報告が最近なされた<sup>11)</sup>。これらのタンパク質・酵素は乳液乾重の数~数十%と極めて多量に含まれているものがあるにも拘わらず、植物にとっての本来的存在理由・機能は不明であった。

## 2. 植物乳液の機能—昆虫の食害に対する「防衛仮説」

このように、広範に分布する点、何回も独立に進化している点、またわざわざ乳液のような複雑な仕組みが存在している点、種々の二次代謝物質や酵素などが含まれる点などから、乳液には植物にとってなんらかの役割を果たしていると推測されてきた。役割に関する仮説として、「傷口の保護」「植物の老廃物の貯蔵」「病虫害に対する防御」等の仮説が存在していたが<sup>1)</sup>、必ずしも定説が存在しないのが現状であった。諸仮説のうち実験的根拠が多少でもあるのは、「植物の乳液は植食昆虫に対する防御機構である」という「防衛仮説」である<sup>1, 12, 13)</sup>。この仮説の根拠は、1. 昆虫が食害した瞬間に食害場所に滲出する(図1右)、2. 体のサイズが小さい昆虫は体の体積に比べて大量の乳液に直面

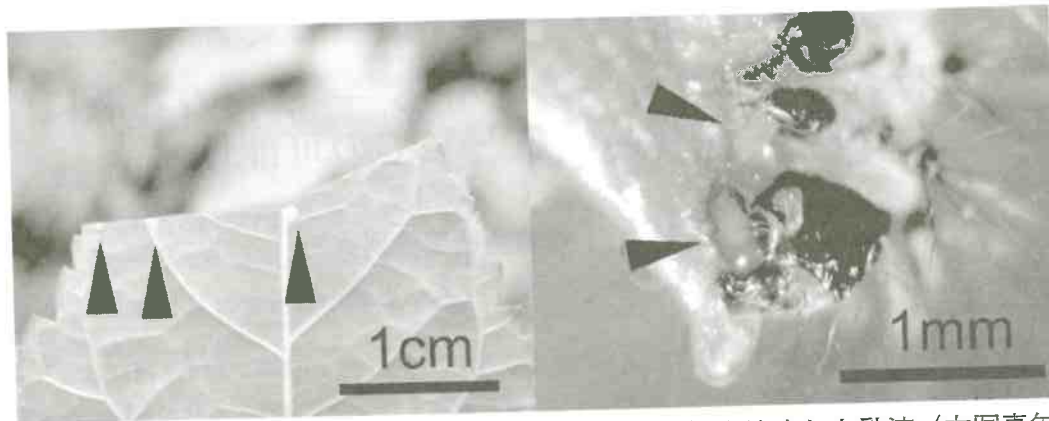


図1 クワの葉の切り口から滲出する乳液（左写真矢印）と滲出した乳液（右写真矢印）を体の大きさに比較して大量に飲みながらクワ葉を食べるエリサン1 齢幼虫

する（図1右），3．しばしばアルカロイド（ケシ）や強心配糖体（トウワタ・キョウチクトウ）などの有害化学物質を含む，4．しばしば粘着性があり昆虫の口器を固着させる可能性があり，そのような実例も知られている，5．野外または実験室において乳液を除去した植物体はより多くの食害を受ける，6．乳液植物を専門に食べる昆虫には，葉脈切断・乳管破壊など乳液の摂食を回避する行動がしばしば存在する，などである<sup>1, 12, 13)</sup>。しかし，「防衛仮説」の弱点は，乳液植物が多い割に，植食昆虫に対する顕著な毒性を持つ物質が乳液中から報告されている例が比較的少ない点である。また，「防衛仮説」では，「毒なしでも，乳液の粘着性自体が防御活性を持つ」と説明されていたため<sup>1, 12, 13)</sup>，昆虫に対する毒性成分についてはあまり詳しく探究なされてこなかった。

我々は最近になり，植物乳液やそこに含まれる物質・酵素などが植物の耐虫性に決定的な役割を果たす例をパパイアやイチジク類において発見した<sup>14)</sup>。パパイアやイチジク類の乳液にはシステインプロテアーゼに分類されるタンパク質分解酵素のパパインやフィシンが大量に含まれることは以前から知られており，食肉の軟化剤として工業的に利用されてきたが，パパインなどが植物にとってどのような本来の役割を持つかは不明であった。そこで我々は，パパイアの乳液や乳液中のシステインプロテアーゼが昆虫

に対する耐虫性に何らかの役割を果たしているかどうか調べるため，エリサンというガの幼虫（*Samia ricini*やママユガ科，本来の食草のヒマ以外の植物葉も与えれば積極的に食べるが，その植物に含まれる防御物質や毒に対応した成長阻害や中毒症状を示すため，植物の耐虫防御活性をバイオアッセイするのに適した優れた実験昆虫）を用いてパパイアの乳液が鱗翅目幼虫に対して持つ生理作用や防御活性を調べた<sup>14)</sup>。パパイア葉を与えるとエリサン幼虫はよく食べるが，ほとんど成長せず，1～4日で死亡した<sup>14)</sup>。乳液の生理作用を調べるため，葉を線切・水洗し，乳液を抜く操作をした葉を摂食させると，大変順調に成長した<sup>14)</sup>。この操作で，パパイア活性の約半分が失われていた。乳液中パパイアの役割を調べるため，システインプロテアーゼ特異的阻害剤E-64を葉に塗って食べさせると，毒性は消失しエリサンは本来の食草ヒマを食べさせた時とほぼ同様に順調に成長した<sup>14)</sup>。E-64塗布でパパイアの活性は90%以上阻害されていた。E-64自体には成長促進活性は全く無かった。市販のパパイン・ブロメライン・フィシンなどのシステインプロテアーゼはみなエリサンに対し毒性を示した<sup>14)</sup>。これらの結果は乳液中システインプロテアーゼが植物の耐虫防御物質としての働きを持つことを示していた。同様の結果が昆虫をヨトウガやハスモンヨトウに変えても観察された。また，パパイア同様に乳液中にシ

ステインプロテアーゼを持つ沖縄産野生イチジクのハマイヌビワもエリサンに対して同様な実験結果を示した<sup>14)</sup>。このことは、植物乳液に含まれるこれまで植物の耐虫性を担うと考えられて来なかった物質・酵素・タンパク質が植物の耐虫性・防御活性に決定的に重要であることを明確な形で示していた。

### 3. クワ乳液に高濃度で含まれる糖類似アルカロイドの耐虫性に果たす役割

クワ葉はカイコの好適な餌として養蚕に用いられてきたためか、クワの葉に毒性があるとは考えられてこなかったが、クワ葉はエリサンやヨトウガに対して顕著な毒性を示すことが最近の我々の研究によって明らかになった<sup>15)</sup>。クワ

の葉をエリサンやヨトウガに食べさせても成長せず4日以内に死亡する（図2上、中の写真のそれぞれ左側）<sup>15)</sup>。クワ葉は葉脈を傷つけると比較的少量（しかし小さな虫にとっては大量の）の白い乳液を出す（図1）。クワ葉を細切水洗処理し乳管を破壊し乳液を洗い流して除去してからエリサンやヨトウガに食べさせるとクワ葉の毒性は消失した（図2上、中の写真のそれぞれ右側）<sup>15)</sup>。この結果は、クワ乳液がクワ葉の毒性・耐虫性を担っていることを示している。興味深いことにカイコは無傷の葉でも乳液を除去した葉でも順調に生育した（図2下）<sup>15)</sup>。このことは、クワの乳液が担うクワの葉の耐虫性に対し、進化の歴史のなかでクワの葉を専門に食べ続けてきたカイコは、すでに適応してしまっていて中毒症状を示さないことを示唆していた。また、クワ乳液を餌に加えて食べさせる実験をしたところクワ乳液自体に毒性があった（図4A）<sup>15)</sup>。そこで乳液成分を分析したところ糖分解酵素を始め種々の糖代謝酵素の阻害剤であり、血糖値上昇抑制効果も報告される3種の糖類似アルカロイド、すなわち1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (D-ABI), 1-deoxynojirimycin (DNJ) や1,4-dideoxy-1,4-imino-D-ribitol (図3) などが高濃度で含まれていた<sup>15)</sup>。糖類似アルカロイドの構造は一見して糖に類似しているが、環上の酸素原子が窒素原子に置き換わっていることが異なる。種々の糖代謝酵素

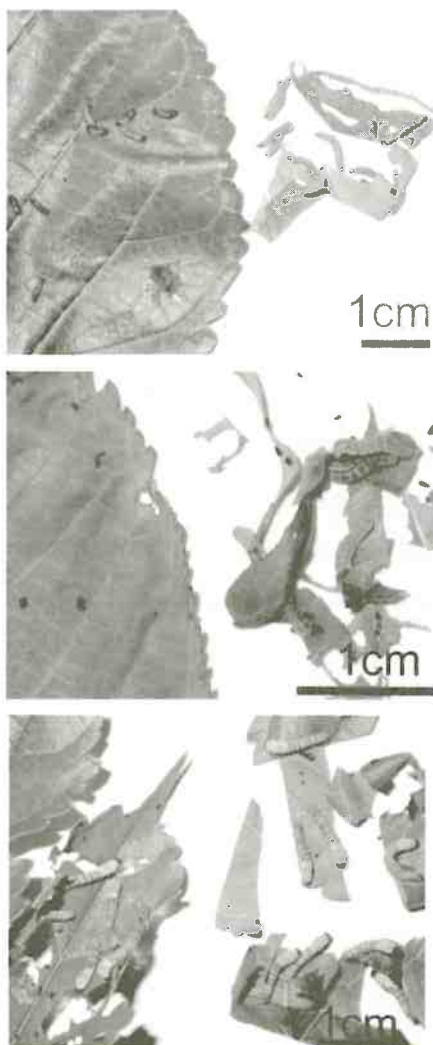


図2 クワ乳液が担うクワ葉の耐虫性<sup>15)</sup>

無傷のクワ葉（各写真左）はエリサン幼虫（上）とヨトウガ幼虫（中）に毒性を示し成長せず死亡したが乳液除去をするため細切水洗処理（各写真右）をすると毒性は失われエリサン幼虫（上）やヨトウガ幼虫は死亡せず順調に成長した。カイコ（下）ではクワ無傷葉（左）でも乳液除去葉（右）でも全く同様に順調に成長した。試験開始4日後の写真

は糖と糖類似アルカロイドをその類似性のため謝って認識するため種々の糖代謝を阻害するものと考えられている。これら糖類似アルカロイドはこれまでもクワ組織や他の植物に少量存在することが以前から報告されていたが<sup>16)</sup>、その

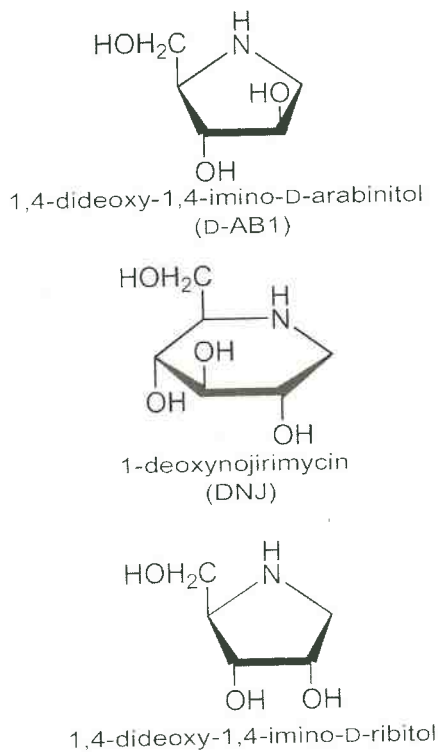


図3 クワ乳液中に高濃度で存在する3種の糖類似アルカロイド<sup>15)</sup>

濃度は乾物当たり0.01%~0.1%と少量であった<sup>17)</sup>。また糖類似アルカロイドは血糖上昇抑制効果が報告されているため糖尿病予防効果の研究が行われ試薬として市販もされているが100mgで数万円と大変高価なものである。ところがクワ乳液中、特に沖縄石垣島産や本土産の野生クワでは濃度が高く、糖類似アルカロイド3種の合計で乳液湿重の1.5~2.5%、乾重の8~18%が含まれていた(表1)<sup>15)</sup>。この濃度はこれまでの報告例の約100倍にも達する高濃度であった。実際クワの乳液を舐めるとほのかな甘苦い味がするが、この味はショ糖などの普通の糖ではなく、糖類似アルカロイドの味であり、味覚でわかるほど高濃度の糖類似アルカロイドが乳液に存在していたことになる。糖類似アルカロイドの乳液中濃度はクワの野生個体群や品種の間で差があり、沖縄や本州の野生クワや本州の野生グワから育成された栽培品種「ゆきしらず」「市平」などで高い値を示し、これらのクワではD-AB1が主成分であるのに対し、中国の野生クワから育成された品種「しんいちのせ」では濃度が低くDNJのみが存在していた(表1)<sup>15)</sup>。

D-AB1やDNJなどの糖類似アルカロイドはエリサン幼虫に対し毒性・成長阻害活性を示した

表1 クワ乳液中の糖類似アルカロイド濃度<sup>15)</sup>

種、個体群および品種	乳液中濃度 (%)		
	D-AB1	DNJ	1,4-dideoxy-1,4-imino-D-ribitol
<i>M. australis</i> (あるいは <i>M. bombycis</i> )			
沖縄県石垣島野生個体群	1.63 ± 0.21	0.36 ± 0.09	0.48 ± 0.03
茨城県つくば市野生個体群	1.28 ± 0.46	0.45 ± 0.23	0
品種 “ゆきしらず”	1.41 ± 0.26	0.35 ± 0.04	0
品種 “市平”	1.04 ± 0.02	0.47 ± 0.07	0
<i>M. alba</i>			
品種 “しんいちのせ”	0	0.32 ± 0.00	0

数値は 平均 ± SD (野生個体群については  $n = 4 \sim 5$ , 品種については  $n = 2 \sim 3$ )



が (図 4 B, C), カイコに対しては全く毒性・成長阻害活性を示さなかった (図 4 D) <sup>15)</sup>。糖類似アルカロイドは乳液からイオン交換樹脂カラムを用いて簡単に精製可能であった<sup>15)</sup>。クワ乳液中には糖類似アルカロイドの他にも高分子性の耐虫因子 (毒) が存在していることも示唆されている (図 4 E) <sup>15)</sup>。

以上の結果は一体何を意味しているだろうか。一般の昆虫がクワの葉を食べた場合, 傷口から出てくる乳液とその中の糖の偽物である糖類似アルカロイドを一緒にとり入れざるをえず (図 1 右), 糖分の消化・吸収・代謝が阻害されるため生育できないと考えられる。クワ葉では乳液や乳液成分 (糖類似アルカロイド) が一般の昆虫に対する耐虫性を担っていたのだ。一方, 長い進化の過程でカイコはこのクワの防御機構を克服し適応したと考えられる。数千年の養蚕の歴史において人類に大変なじみ深いカイコとクワの間には, これまで気付かれることが無かった乳液や乳液中の物質を仲立ちとした「食う

か食われないか」の非常に複雑な攻防関係が存在していたのだ。

#### 4. 今後の展望

これまでの我々の, クワ乳液の糖類似アルカロイドが担う耐虫性<sup>15)</sup> やパイア乳液中のパイアインが担う耐虫性<sup>14)</sup> に関する発見からも, 植物乳液が植物の耐虫性機構を担い, そこに含まれる物質が他の生物 (主に昆虫などの植物を食害する生物) をターゲットとした防御の役割を持つ生理活性物質であることが明らかになってきたと思う。またこれらの結果は, 植物の乳液が農薬・医薬として, あるいは作物の耐虫性育種に利用できる可能性をもった有用な生理活性物質の宝庫であることを示唆している。事実, ケシの乳液に含まれるモルヒネ (morphine) は現在まで最も有効な鎮痛剤として医学で用いられてきた実績がある。植物乳液は有用物質探索の標的を絞りやすく, 比較的少数の物質が高濃

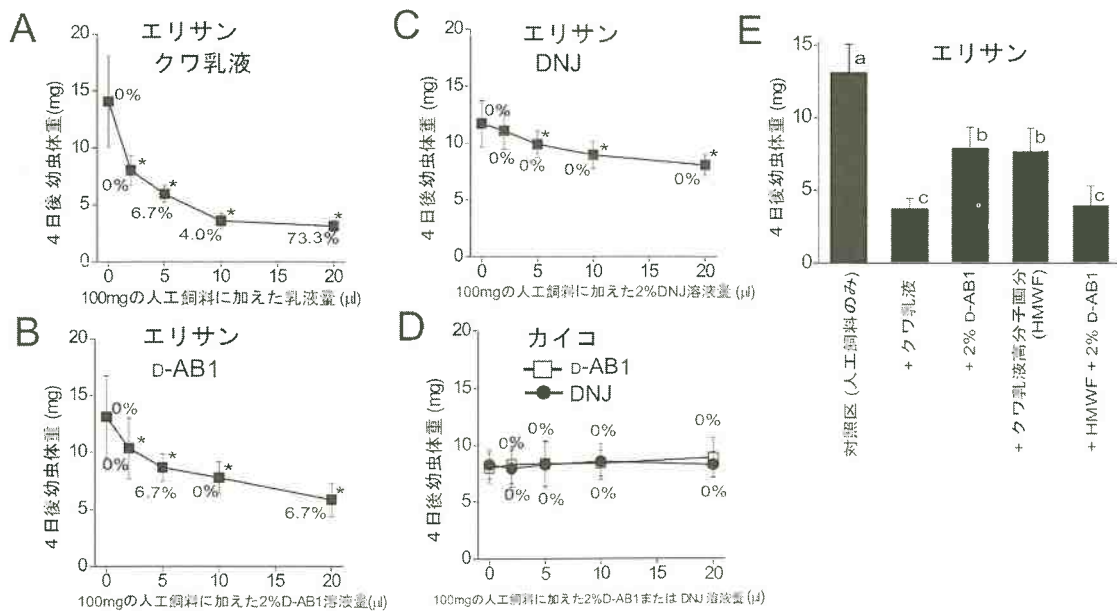


図 4 クワ乳液および糖類似アルカロイドのエリサンに対する成長阻害効果<sup>15)</sup>

クワ乳液はエリサンに対し顕著な成長阻害活性を示す (A)。糖類似アルカロイド自体もエリサンに対し顕著な成長阻害活性を示す (B, C)。カイコは糖類似アルカロイドで全く成長を阻害されず (D) 糖類似アルカロイドに生理的に適応している。クワ乳液の耐虫性は糖類似アルカロイドと未知の高分子因子によって担われている (E)。試験開始後 4 日目の幼虫体重 (mg) と死亡率 (%) を測定した。

度で含まれるため、物質の精製が容易であると考えられ、このため今後世界に何万種類も存在している乳液を出す植物の乳液から、数多くの有用な生理活性物質が発見されるものと期待される。

## 文 献

- 1) Farrel, B. D. et al. (1991), *Am. Nat.*, 138, 881-900
- 2) Cohen, L. W. et al. (1986), *Gene*, 48, 219-228
- 3) Kimmel, J. R. et al. (1954), *J. Biol. Chem.*, 207, 515-531
- 4) Kramer, D. E. et al. (1964), *J. Biol. Chem.*, 239, 2178-2183
- 5) Arribere, M. C. et al. (1998), *Phytochem. Anal.*, 9, 267-273
- 6) O'Riordain, G. et al. (2002) *Clin. Exp. All.*, 32, 455-462
- 7) Azarkan, M. et al. (1997), *Phytochemistry*, 46, 1319-1325
- 8) Taira, T et al. (2005), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 811-818
- 9) Haque, M. R. et al. (1999), *Food Chem.*, 67, 305-309
- 10) Nambisan, B. (1999), *J. Agric. Food Chem.*, 47, 372-373
- 11) Azarkan, M. et al. (2004), *Phytochemistry* 65, 525-534
- 12) Dussourd, D. E. (1993), in *Caterpillars: Ecological and Evolutionary Constraints on Foraging* (Stamp, N. E. and T. M. Casey, T. M., Eds.), 92-131, Chapman & Hall, New York
- 13) Dussourd, D. E. et al. (1987), *Science*, 237, 898-901
- 14) Konno, K. et al. (2004), *Plant J.*, 37, 370-378
- 15) Konno, K. et al. (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 1337-1341
- 16) Asano, N. et al. (2000), *Tetrahedron Asymmetry*, 11, 1645-1680
- 17) Asano, N. et al. (2001), *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4208-4213

## ◀国内情報▶

## ヒストンメチル化酵素Meisetzによる減数分裂の制御

<sup>1</sup>東北大学 加齢医学研究所 医用細胞資源センター,<sup>2</sup>Wellcome Trust/Cancer Research UK Gurdon Institute of Cancer and Developmental Biology, University of Cambridge松 居 靖 久<sup>1</sup> ・ 林 克 彦<sup>2</sup>

減数分裂の初期過程を制御する分子として、ヒストンメチル化酵素のMeisetzを同定した。MeisetzはヒストンH3の4番目のリジン（K4）を特異的にトリメチル化することで、減数分裂前期に起こる相同染色体の対合と相同組み換えに必要な遺伝子の発現を活性化する働きがあると考えられる。減数分裂には複数のヒストンメチル化酵素によるエピジェネティックな制御が不可欠であると思われる。

## 1. はじめに

生殖細胞が次世代の個体を作り出す能力は、様々な分子によって制御されている。配偶子へ分化する過程で起こる減数分裂は、生殖細胞のみが起こす特別な分裂様式で、これによりゲノムが2倍体から1倍体に半減することは、配偶子が受精により正常な個体に発生するために必須である。酵母や線虫といったモデル実験生物では、細胞外からのシグナルを受けて体細胞分裂から減数分裂への切り替えが起こることが知られていたが、ほ乳動物の減数分裂開始の制御機構はこれまでよくわかっていなかった。マウスの雌の始原生殖細胞は胎齢中期に減数分裂を開始する。一方、雄の始原生殖細胞も同じ時期に減数分裂を開始する性質を持つが、培養実験等から減数分裂の開始を阻害する細胞外からのシグナルにより、実際には胚のなかではその開始が抑制され、生後になって初めて減数分裂を起こすことが示唆されてきた<sup>1)</sup>。減数分裂を誘導する因子の有無についてはこれまではっきりしていなかったが、最近になってレチノイン酸が減数分裂を始原生殖細胞に誘導することが示され、雄の胎仔生殖巣ではレチノイン酸の分解酵素が発現・機能することにより減数分裂の開始が抑制されることが報告された<sup>2)</sup>。

MATSUI Yasuhisa<sup>1</sup>, HAYASHI Katsuhiko<sup>2</sup><sup>1</sup>〒980-8575 仙台市青葉区星陵町4-1<sup>2</sup>Tennis Court Road, Cambridge, CB2 1QN, UK

減数分裂が誘導因子の働きで開始するにしても、その前段階として様々な準備が生殖細胞内でなされていることが必要であることが予想される。また誘導因子により生殖細胞内のどのような制御機構が働き、減数分裂に特徴的な相同染色体の対合、相同組み換え、連続した2回の細胞分裂によりそれぞれ起こる相同染色体の分離と姉妹染色体の分離といった現象が引き起こされていくのかも十分に理解されていない。我々は、こういった減数分裂の開始やそれに引き続いて働く制御分子を同定し、減数分裂の制御機構を解明することをめざして研究を行っている。

## 2. 減数分裂期に特異的に発現する遺伝子の同定

減数分裂の開始や初期の進行の制御に係わる候補遺伝子を同定するために、減数分裂を開始する前の11.5日胚と、開始した直後の13.5日胚の雌の始原生殖細胞を精製して、減数分裂の開始により発現が上昇する遺伝子をサブトラクションcDNAスクリーニングにより同定することを試みた(図1)<sup>3)</sup>。始原生殖細胞の精製は、この細胞で特異的に蛍光タンパク質GFPを発現するOct3/4-GFPトランスジェニックマウス胚を材料に、GFPの発現を指標にセルソーターを用いて行った。cDNAのサブトラクションには様々な方法が用いられるが、我々は市販のキッ

ト (SMART™ PCR cDNA synthesis Kit: Clontech) を利用して、比較的少数の細胞から合成したcDNAをPCRにより増幅した後にサブトラクションを行った (CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit: Clontech)。得られたcDNA断片をベクターにクローニング

後、ランダムに拾ったcDNAクローンの塩基配列を解析した。さらにそれらについて、遺伝子のデータベースに対して既知の遺伝子との相同性を調べることによりコードされている可能性のあるタンパク質の構造上の特徴を予想するとともに、様々な組織等のESTに含まれるか否

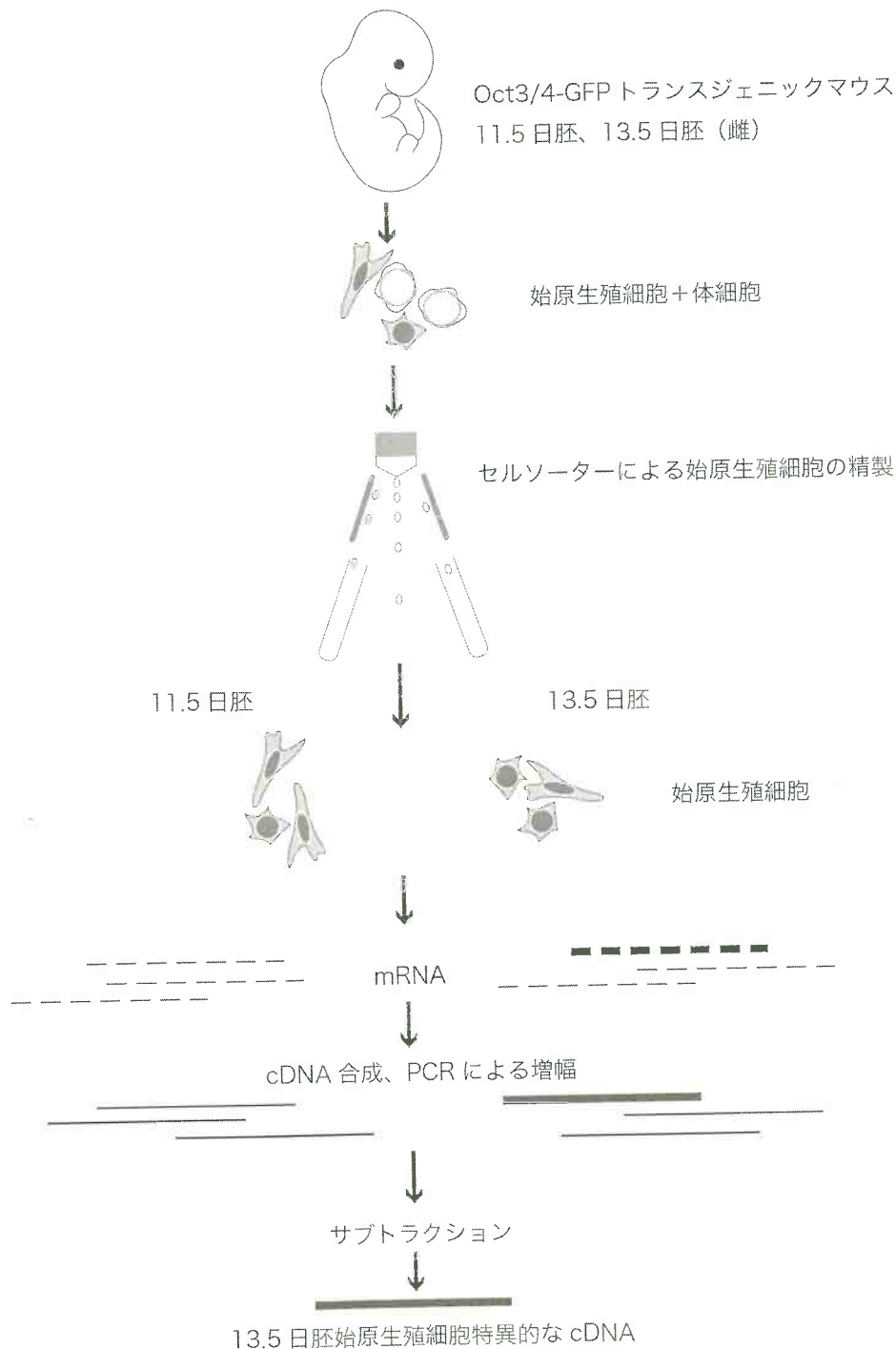


図1 減数分裂開始期に発現が上昇する遺伝子のクローニング

Oct3/4-GFPトランスジェニックマウス胚よりセルソーターを用いて、11.5日胚の体細胞分裂期、雌の13.5日胚の減数分裂開始直後の始原生殖細胞を精製した。それぞれの細胞からcDNAを合成しPCRで増幅後、サブトラクションスクリーニングにより、減数分裂とともに発現が上昇する遺伝子を単離した。



か調べ、生殖巣のESTに特異的に含まれる遺伝子を同定した。このようにして生殖巣で特異的に発現し、コードされているタンパク質の構造が興味深い遺伝子として、我々がMeisetzと名前を付けた新しい遺伝子に注目した<sup>3)</sup>。

### 3. 新規のヒストンメチル化酵素, Meisetz

Meisetzは、減数分裂期の生殖細胞にのみ発現している。またヒストンメチル化酵素に特徴的に見られるSETドメインと類似性をもつPRドメインを有し、またC末端部分にはC2H2型のZnフィンガーマチーフが存在する(図2)。さらにスプライシングの違いにより、このZnフィンガーを持たない短いタンパク質をコードするmRNAも存在することがわかった。大腸菌で合成した組み換えタンパク質を用いた生化学的な実験、および培養細胞への遺伝子導入実験により、Meisetzタンパク質は、PRドメインに依存してヒストンH3の4番目のリジン(K4)を特異的にトリメチル化する活性を持ち、このメチル化に依存して遺伝子の転写を活性化する働きがあることが明らかになった(図2)<sup>3)</sup>。またZnフィンガーはMeisetzタンパク質の核移行に係わることがわかった。

ヒストンH3K4のメチル化は転写活性化と深く関わっていることがこれまでに示されており<sup>4)</sup>、発現パターンと生化学的な性質から、Meisetzタンパク質はヒストンH3K4のトリメチル化により減数分裂期に遺伝子を活性化する働きがあることが予想された。

### 4. Meisetzの減数分裂における役割

次にノックアウトマウスを作成し、減数分裂におけるMeisetzの役割を明らかにすることを試みた(図2)<sup>3)</sup>。ヘテロ変異マウスでは異常は見られなかったが、ホモ変異マウスでは雌雄ともに生殖能力がなく、精巣と卵巣が矮小化していた。さらに詳しい組織解析から、精巣、卵

巣ともにパキテン期で減数分裂が停止し細胞死を起こしていることがわかった(図2)。減数分裂前期はレプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期と進みやがて第1減数分裂を起こす。またザイゴテン期からパキテン期にかけては、相同染色体の対合と相同組み換えが起こる。この相同組み換えに先立って染色体上にDNAの2本鎖切断が多数形成され、それを修復する際に相同組み換えが起こる。2本鎖切断部分や対合部分に局在するタンパク質に対する抗体を用いて減数分裂前期の生殖細胞の免疫染色を行った結果、Meisetz変異マウスではDNAの2本鎖切断は正常に起こっているが、その修復が十分に進まないこと、また相同染色体の対合も不完全になることがわかった(図2)<sup>3)</sup>。これらの異常により減数分裂が停止すると考えられる。

一方、メチル化されたヒストンH3K4を特異的に認識する抗体を使った免疫染色により、Meisetz変異マウスでは正常マウスに比べて、パキテン期精母細胞でのヒストンH3K4のトリメチル化が低下していることが観察された<sup>3)</sup>。この結果は先に述べた生化学的な実験により明らかになったMeisetzのヒストンメチル化酵素としての酵素活性に対応している。さらに変異マウスと正常マウスの精巣での遺伝子発現をDNAマイクロアレイにより比較したところ、多くの遺伝子の発現が変異マウスでは低下していることが確認され、その中には相同組み換えに係わる可能性のある遺伝子をはじめ、減数分裂に関与する遺伝子が含まれていた。また実際にMeisetzが、そういった遺伝子の発現制御領域のヒストンH3K4のトリメチル化を引き起こすことがわかった<sup>3)</sup>。

以上のような結果を考え合わせると、Meisetzは減数分裂前期に必要なとされる遺伝子周辺のヒストンH3K4をトリメチル化し、それらの発現を活性化することにより、減数分裂前期の進行に必須な役割を果たしているものと考えられる(図2)。このように、Meisetzタンパク質の性質を生化学的に調べることで、ノックアウトマウスで起こった異常を分子レベルで

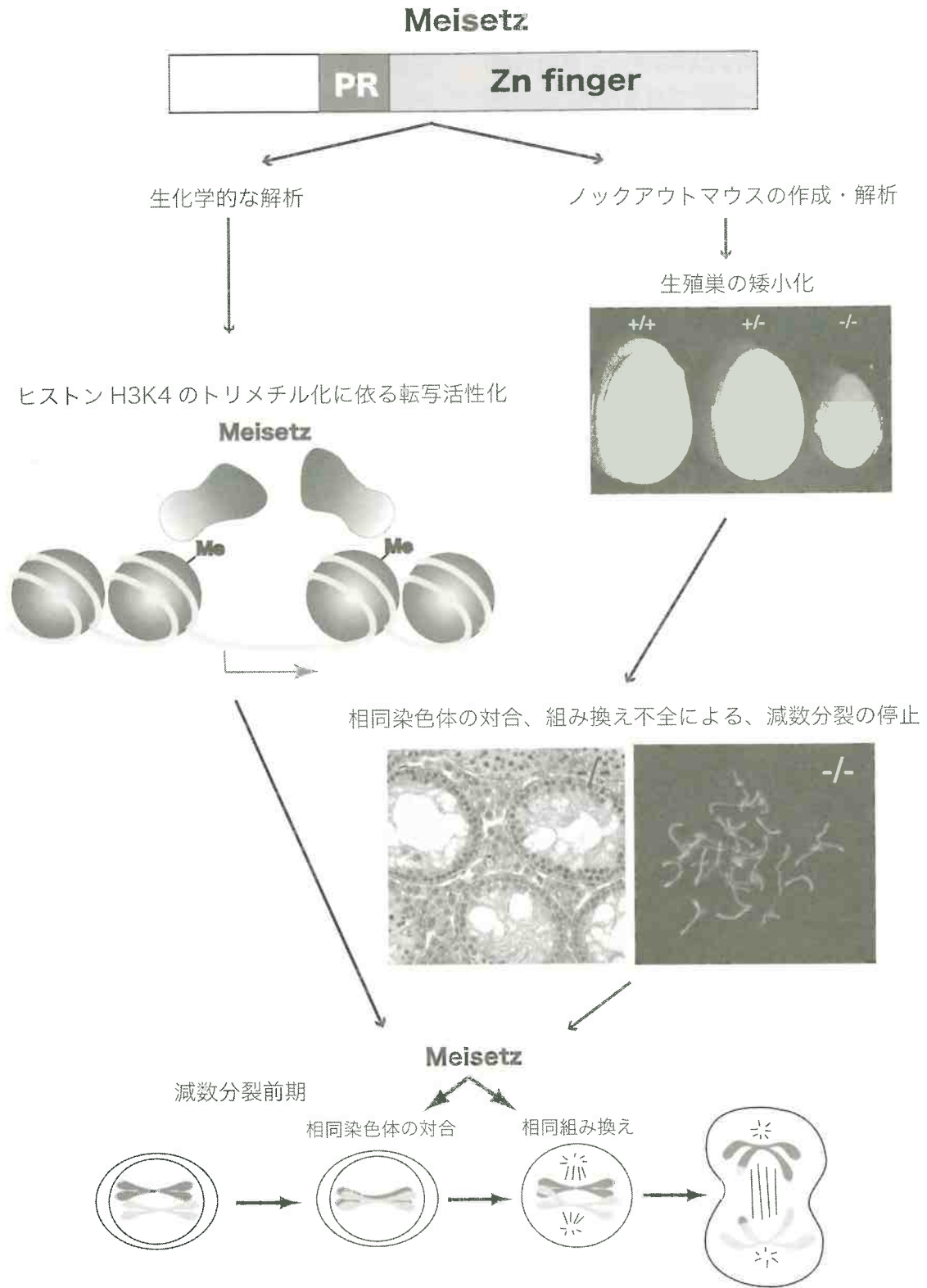


図2 Meisetzの機能解析

生化学的な解析からMeisetzがヒストンH3K4のトリメチル化を介して転写を活性化することがわかった。またノックアウトマウスの解析により、Meisetz遺伝子が欠損すると生殖巣が矮小化し、減数分裂前期に起こる相同染色体の対合と相同組み換えの不全により、減数分裂が停止すると考えられた。これらの結果から、Meisetzは減数分裂前期に必要な遺伝子周辺ヒストンH3K4をトリメチル化することでその発現を活性化し、減数分裂を制御していることがわかった。

詳細に調べることにより、Meisetzを軸とした減数分裂初期段階の制御機構の一端に切り込むことが可能になった。

## 5. ヒストンメチル化による減数分裂の制御

Meisetzはジメチル化ヒストンH3K4を基質に特異的にトリメチル化する活性を持つので、減数分裂の開始に先立って必要な箇所にジメチル化が起こっている必要がある。実際に始原生殖細胞の分化過程におけるヒストンの修飾状態を調べると、H3K4以外にもメチル化の特徴的な変化が見られ、例えばH3K9のジメチル化は周囲の体細胞に比べて低下し、またH3K27のトリメチル化は上昇している<sup>5)</sup>。ヒストンの修飾はクロマチン構造の変化を介して転写を制御すると考えられており、始原生殖細胞では体細胞とは異なる特異的なクロマチン状態をもつことが減数分裂に必要な遺伝子が発現するための前提になっている可能性が考えられる。一方、ヒストンの修飾によるクロマチン構造の変化は、転写ばかりでなく染色体構造の変化にも係わると考えられている。減数分裂の前期では染色体の凝集に引き続き、相同染色体を探す過程を経て対合にいたると考えられ、その間に染色体構造の大きな変化が起こる<sup>6)</sup>。Meisetzはこういった染色体構造変化の制御にも係わっている可能性もあり興味を持たれる。

Meisetz変異マウスの精母細胞では、ヒストンH3K4のトリメチル化は低下しているが、なお見られるので、Meisetz以外にも精母細胞で同様の酵素活性を持つ分子が存在すると思われる<sup>3)</sup>。またヒストンH3K9のメチル化酵素であるSuv39h1, Suv39h2をコードする遺伝子のダブルノックアウトマウスの精巣ではMeisetzノックアウトマウスと同様、パキテン期で減数分裂が停止し、これらの分子によるヒストンH3K9のメチル化も減数分裂前期の進行に必要

であることがわかる。さらにこのダブルノックアウトマウスでも、なおヒストンH3K9のメチル化が見られることから、同様な酵素活性を持つ他の分子が減数分裂期の生殖細胞で発現しているものと考えられる<sup>7)</sup>。このように、複数の分子による異なるヒストンリジンのメチル化が減数分裂の制御に欠かせないことがわかる。今後、そういった減数分裂に係わるヒストンメチル化酵素群が同定され機能が解析されることにより、減数分裂の制御機構がさらに明らかになることが期待される。

MeisetzはヒトのPRDM9と高い相同性がある<sup>3)</sup>。ヒトPRDM9がMeisetzと同様の働きをしているかは今のところわからないが、不妊の一部は遺伝的な要因に依っていると考えられ、またMeisetz変異マウスと同様に、減数分裂期以降の生殖細胞が欠落または減少する症例もあることから、PRDM9遺伝子の変異が不妊症の原因になっている可能性もあり、今後の解析が待たれる。

## 文 献

- 1) McLaren, A. and Southee, D. (1997), *Dev. Biol.*, 187, 107-113.
- 2) Koubova, J. et al. (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103, 2472-2479.
- 3) Hayashi, K. et al. (2005), *Nature*, 438, 374-378.
- 4) Santos-Rosa, H. et al. (2002), *Nature*, 419, 407-411.
- 5) Seki, Y. et al. (2005), *Dev. Biol.*, 278, 440-458.
- 6) Dawe, R.K. et al. (1994), *Cell*, 76, 901-912, 1994.
- 7) Peters, H.F.M. et al. (2001), *Cell*, 107, 323-337.

## ◀国内情報▶

超チャネルの分子移植による  
環境浄化型「スーパー細菌」の創成<sup>1</sup>京都大学 農学研究科 生物機能変換学分野<sup>2</sup>島根大学 教育学部 人間生活環境教育講座宮本 裕希子<sup>1</sup>・麻生 祐司<sup>2</sup>・橋本 渉<sup>1</sup>・村田 幸作<sup>1</sup>

*Sphingomonas*属細菌A1株は、細胞表層に巨大な体腔を形成し、菌体外の高分子多糖を直接細胞質内に取り込む。この特殊な高分子物質輸送器官を「超チャネル」とよぶ。超チャネルを有害物質分解菌に分子移植することによって、その細胞表層の構造を大きく変化させ、有害物質の取り込みと分解能を劇的に向上させた環境浄化型「スーパー細菌」の創成に成功したので報告する。

## 1. はじめに

環境浄化・修復に対する関心が高まる中、微生物の持つ有害物質の分解機能を利用した環境浄化技術（バイオレメディエーション）が大きな注目を浴びている。このような生物学的環境浄化法は、物理・化学的環境浄化法に比べ、環境中に低濃度かつ広範囲に分布する汚染物質を効率的に回収・除去できるとともに、消費エネルギーが少なく環境への負荷も低いなどの利点がある。このような理由から、バイオレメディエーションを利用した環境浄化法の実用化が進められている。

現在、有害物質分解菌に関する研究は、特定の有害物質に対して分解能を示す微生物のスクリーニングや、その生化学的性状の解析（有害物質代謝経路の解明や分解酵素の特性解析など）が中心である。しかし、自然界から単離した有害物質分解菌の分解能は一般に低く、バイオレメディエーションへの利用に結びつかないことが多い。効率のよいバイオレメディエーションを確立するためには、遺伝子組み換え技術を用いて、従来自然界には存在しなかった高い環境浄化能を有する微生物を創成し、バイオレメディエーションに適応することが重要である

MIYAMOTO Yukiko<sup>1</sup>, ASO Yuji<sup>2</sup>,HASHIMOTO Wataru<sup>1</sup>, MURATA Kousaku<sup>1</sup><sup>1</sup>〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄<sup>2</sup>〒690-8504 島根県松江市西川津町1060

と考えられる。

そこで、筆者らは*Sphingomonas*属細菌A1株（A1株）の「超チャネル」を、ダイオキシン分解菌である*Sphingomonas wittichii* RW1（RW1株）へ分子移植することによって、RW1株のダイオキシン分解能を向上させることを試みた。

## 2. 体腔を形成する細菌（A1株）

筆者らが土壌より分離したA1株は、アルギン酸を資化する*Sphingomonas*属細菌である。*Sphingomonas*属細菌は、*Pseudomonas*属から再分枝された細菌群である。*Sphingomonas*属細菌はグラム陰性細菌に分類されるが、他のグラム陰性細菌と異なり特徴的な膜構造を有する。一般的に、グラム陰性細菌は外膜の外側にリポ多糖を含んでいるが、*Sphingomonas*属細菌はリポ多糖を持たず、代わりに真核細胞の膜成分であるスフィンゴ糖脂質を持つ。このスフィンゴ糖脂質はリポ多糖よりも高い疎水性を示す。これまでに、有害物質分解菌として多くの*Sphingomonas*属細菌が同定されているが、一般に疎水性の高い有害物質の分解には上記のような外膜の特性が寄与すると考えられている。また、原核細胞から真核細胞への進化や、真核細胞の細胞表層の構造と機能を理解する上でも、*Sphingomonas*属細菌の膜構造は重要な研究対象となっている。



A1株は、高分子多糖であるアルギン酸（平均分子量26kDa）を栄養源・エネルギー源として利用できる。一般に、微生物は、高分子物質を栄養源・エネルギー源として利用する際には、細胞外に分解酵素を分泌し、高分子物質を酵素反応で低分子化してから細胞質へと取り込む。しかし、A1株のアルギン酸分解酵素（アルギン酸リアーゼ）は、A1株の細胞質内に局在し、機能する。つまり、A1株は、高分子多糖であるアルギン酸を細胞外で低分子化せずにそのまま細胞質へと取り込み、細胞内で低分子化するのである。このようなアルギン酸の直接的な取り込みは、微生物の新しい高分子物質の輸送機構の存在を示唆している。

A1株の細胞表層は、巨大な襞（pleat）分子で覆われており、培地中にアルギン酸が存在すると、襞分子の再編により細胞表層に体腔（pit）を可逆的に形成する（図1）。細胞表層の陥入により形成される体腔は、直径0.1~0.2  $\mu\text{m}$ にも達する巨大な孔である。このような体腔を形成する細菌の発見は、微生物学の歴史の中でA1株が初めてである。A1株は、体腔でアルギン酸を濃縮して直接菌体内に取り込む。筆者らは、これを可能にする高分子物質輸送器官を、新たに「超チャネル」と定義した。

これまでに、A1株の全ゲノム配列（4.6Mb）を決定し（未公表）、超チャネルに関与する遺伝子およびタンパク質の機能を網羅的に解析した。これまでに明らかとなっている超チャネル

の全体像を図2に示す。体腔に濃縮されたアルギン酸は外膜を通過後、ペリプラズムに局在するアルギン酸結合タンパク質（AlgQ1, AlgQ2）を介して、内膜に局在するABCトランスポーター（AlgM1-AlgM2/AlgS-AlgS）に受け渡される。透過酵素AlgM1とAlgM2は、AlgSのATP加水分解により生じるエネルギーを利用してアルギン酸を細胞質へと輸送する。細胞質に輸送されたアルギン酸は、細胞質局在性のアルギン酸リアーゼによって低分子化される。培地中の高分子アルギン酸の存在により超チャネル遺伝子群の発現が誘導される。また、ABCトランスポーターはアルギン酸に結合したAlgQ1とAlgQ2によって活性化され、さらに体腔形成は内膜ABCトランスポーターにより制御されている。

### 3. ダイオキシンを分解する細菌（RW1株）

ダイオキシソ類とは、ポリ塩化ジベンゾフランとポリ塩化ジベンゾ-*p*-ジオキシソを指す。高い安定性と強い環境ホルモソ作用を示すダイオキシソ類は、現在、汚染環境中からの効率的な除去法の確立が急務となっている有害物質の一つである。これまでに、ダイオキシソを分解する種々の細菌が自然界から分離されており、バイオレメディエーションへの利用に向けた研究がなされている。なかでも、ドイツのエルベ

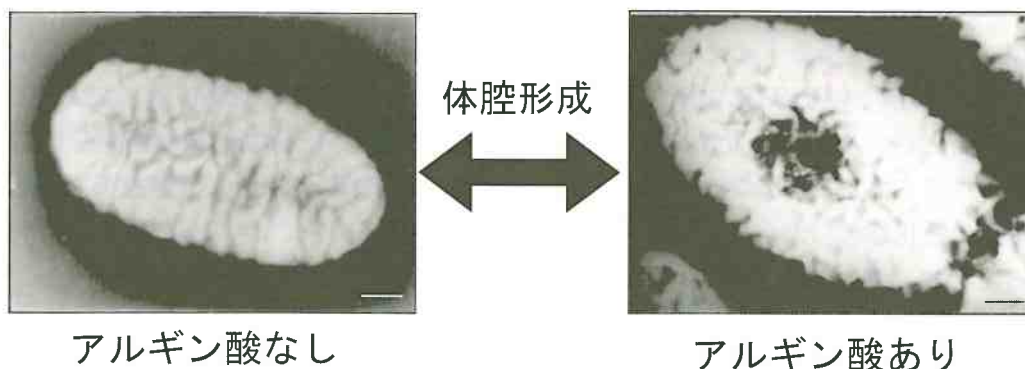


図1 電子顕微鏡によるA1株の細胞表層観察  
A1株は、培地中にアルギン酸が存在すると、直径0.1~0.2  $\mu\text{m}$ もの巨大な体腔を形成する。

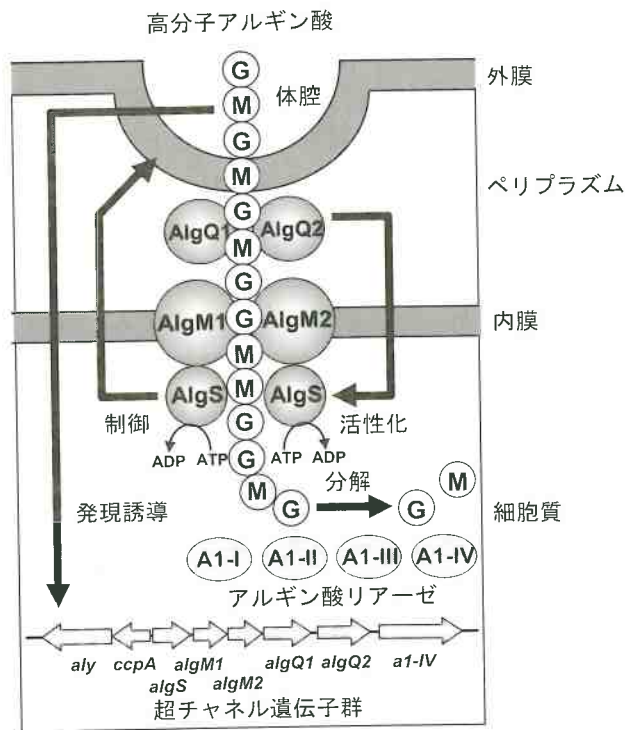


図2 超チャネルの全体像

体腔に濃縮されたアルギニン酸は、アルギニン酸結合タンパク質 (AlgQ1, AlgQ2) を介して、ABCトランスポーター (AlgM1-AlgM2/AlgS-AlgS) に受け渡され、細胞質へと輸送される。

川よりダイオキシン分解菌として分離されたRW1株は、ダイオキシン分解酵素や代謝経路、生育特性などの解析が最も詳細に行われてきた細菌の一つであり、これまでにRW1株を用いたバイオレメディエーションに関する研究例が数多く報告されている。

#### 4. 「スーパー細菌」の創成

A1株由来の超チャネルをダイオキシン分解菌RW1株に分子移植し、RW1株の細胞表層の構造を大きく変化させることにより、ダイオキシン類のアナログであるジベンゾフランの取り込み・分解能の強化を図った。超チャネルを分子移植するために、まず、A1株の「超チャネル」遺伝子群を広宿主域コスミドベクターpKS13にクローニングし、プラスミドpBE11を構築した。次に、pBE11を接合導入法(トリペアレンタルメイティング)によりRW1株へと

導入しRW1 (pBE11) を得た。10mMジベンゾフランを含む培地で2日間培養したRW1 (pBE11) の細胞表層を、透過型電子顕微鏡を用いて観察したところ、体腔が構成的に形成されていることが確認された(図3(a))。また、ウエスタンブロット解析により、同条件で培養したRW1 (pBE11) において超チャネルを構成するタンパク質が構成的に発現していることが分かった。培地に10mMジベンゾフランを添加し分解速度を調べたところ、RW1 (pBE11) は、RW1野生株に比べて約2倍のジベンゾフラン分解能を示すことが明らかとなった。また、RW1 (pBE11) を、50ppmジベンゾフランを含む土壌に添加し分解速度を調べたところ、RW1 (pBE11) は、RW1野生株よりも土壌中のジベンゾフランを速やかに分解した(図3(b))。従って、土壌中においても、RW1 (pBE11) はRW1野生株よりも高いジベンゾフラン分解能を示すことが明らかとなり、バイオレメディエーションに有用であることが示された。以上の結果から、「超チャネル」をRW1株へ分子移植することによりダイオキシン分解能を劇的に高めた「スーパー細菌」を創成することができた。

#### 5. おわりに

超チャネルの分子移植は、RW1株以外の *Sphingomonas* 属細菌に対しても可能である。様々な *Sphingomonas* 属細菌を分子移植のターゲットとし、各細菌に体腔を形成させることによって、ポリプロピレングリコールや人工多糖、天然多糖など、分子量の大小を問わず多様な物質を効率的に取り込み資化する新たな「スーパー細菌」の創成に成功している。

これまで、超チャネルの分子移植は *Sphingomonas* 属細菌に対してのみ行われてき

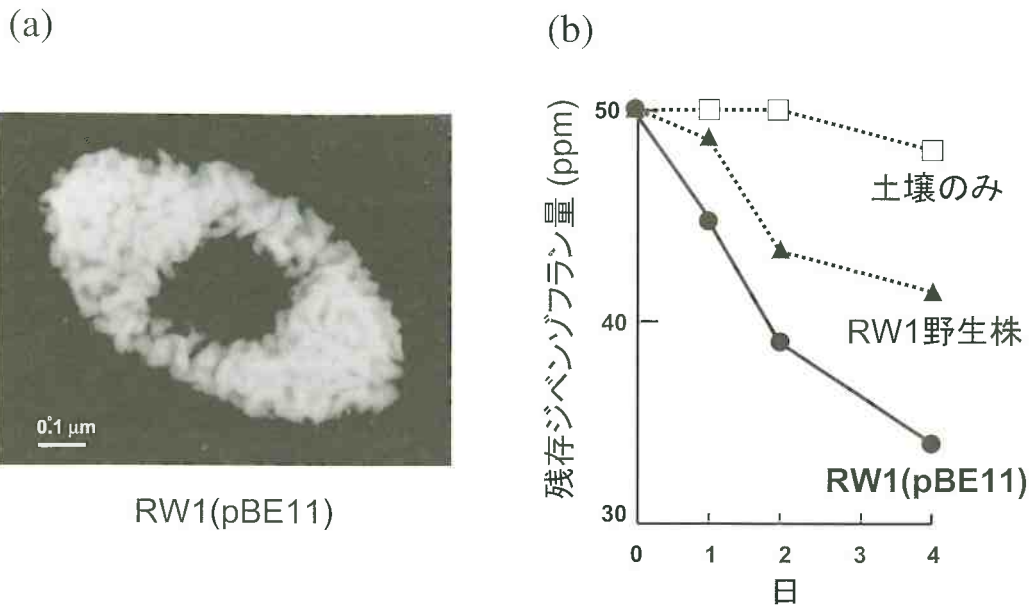


図3 「スーパー細菌」RW1 (pBE11) の特性

(a) 10mMジベンゾフランを添加した培地で2日間培養したRW1 (pBE11) の細胞表面 (b) 50ppmジベンゾフランを添加した土壌におけるRW1野生株およびRW1 (pBE11) のジベンゾフランの分解

たが、今後の課題は、他種属の細菌、特に *Pseudomonas* 属細菌に対して分子移植を成功させることである。環境有害物質分解菌の多くは *Pseudomonas* 属細菌に分類されている。 *Pseudomonas* 属への種属を超えた分子移植が可能となれば、有機溶媒や重金属、残留農薬などさらに広範囲の環境有害物質に対しての効率的なバイオレメディエーションが可能になると考えられる。

本研究により、A1株以外の細菌でも超チャネル遺伝子群の導入によって細胞表面に体腔を形成できることが確かめられ、同様の手法によって新たな「スーパー細菌」を創成することが可能であると考えられる。しかし、超チャネルの詳細な分子メカニズムは未だ不明であり、超チャネルの機能解析を継続する必要がある。超チャネル遺伝子群がどのような発現調節を受け、発現したタンパク質がどのようにして細胞表面の構造を変化させるのかを分子レベルで明らかにすることは、生物学的な基礎知見を得るのみならず、より広範囲の細菌種への分子移植を目指した研究の進展にも重要となるであろう。

環境破壊や地球温暖化など地球規模の環境問

題が今後ますます深刻化することが予想されている。これらの問題を一挙に解決するヒントを「スーパー細菌」が与えてくれる。「スーパー細菌」は無数の可能性を秘めている。従来の生物の常識を超えた機能を持つ「スーパー細菌」を上手にコントロールし、その機能を社会に還元することで、より豊かな未来型バイオを構築することが可能となる。まさに、「スーパー細菌」の今後の展開が人類の運命の一端を握っていると言って良いのかもしれない。

なお、本研究は生研センタープロジェクトの一環として行われた。

## 文献

- 1) Armengaud, J. et al. (1998), *J. Bacteriol.*, 180, 3954-3966
- 2) Aso, Y. et al. (2006), *Nature Biotechnol.*, 24, 188-189
- 3) Hashimoto, W. et al. (2005), *Biochemistry*, 44, 13783-13794
- 4) Wittich, R.-M. et al. (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1005-1010

## ◀国内情報▶

農業機械に対する排出ガス規制の動向と  
排出ガス試験設備独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
生物系特定産業技術研究支援センター

清水 一史・杉浦 泰郎・高橋 弘行・積 栄・千葉 大基

トラクタやコンバインなどエンジン定格出力が19kW以上560kW未満の公道を走行するディーゼル特殊自動車に対する排出ガス規制が、2003年10月より導入された。2006年以降、更に規制が強化されるなど、今後の規制の動向についても明らかとなってきた。また、生研センターにおいても、排出ガス規制の動向等にあわせて排出ガス測定装置の拡充を図ってきた。そこで、本報告では、排出ガス規制の現状と今後の動向、生研センターの排出ガス測定装置などについて紹介する。

## 1. はじめに

我が国における排出ガス規制は、1966年にガソリン自動車の一酸化炭素（以下、CO）に対して導入されて以降、時代とともに順次強化されてきた。このような中、これまで排出ガス規制の対象とされていなかった農業機械、建設機械などディーゼル特殊自動車についても、自動車の構造や装置について国土交通省令で定める保安上又は公害防止その他の環境保全上の技術基準について定めた「道路運送車両の保安基準」の一部改正に伴い、排出ガス規制が導入されることとなった。これに伴い、生物系特定産業技術研究支援センター（以下、生研センター）においても、農業機械に搭載されるディーゼルエンジンに対して、国土交通省が定める排出ガス測定方法に基づく試験が実施できるよう排出ガス試験設備を整備した。

本報では、農業機械に搭載されるエンジンに対する排出ガス規制の動向と生研センターの排出ガス試験設備について紹介する。

## 2. 農用エンジンに対する排出ガス規制の動向

エンジンの定格出力が19kW以上560kW未満の公道を走行する農業機械（農耕トラクタ、農業用薬剤散布車〔スピードスプレーヤ〕、刈取脱穀作業車〔コンバイン〕など）に対して、新型車については2003年10月より、継続生産車については2004年9月より排出ガス規制が適用されることとなり、ディーゼル特殊自動車全般の排出特性を把握する測定モードとして国際的に広く採用されているディーゼル特殊自動車8モード法（以下、D8モード法）（表1）により、CO、炭化水素（以下、HC）、窒素酸化物（以下、NO<sub>x</sub>）、粒子状物質（以下、PM）及び黒煙、また無負荷急加速時の黒煙が測定され、規制値（表2）をこえない排出ガス規制適合エンジンが搭載されている。

更に、2006年～2008年にかけて、エンジンの定格出力が19kW以上560kW未満の公道を走行する農業機械に対して、排出ガス規制が強化されるとともに、公道を走行しない農業機械についても、エンジンの定格出力が19kW以上560kW未満のものに対して、公道走行する農業機械と同様の排出ガス規制が導入されることとなった。具体的には、エンジンの定格出力が130kW以上560kW未満の新型車については2006年10月、継続生産車については2007年8月末より、

SHIMIZU Kazufumi, SUGIURA Yasuro,

TAKAHASHI Hiroyuki, SEKI Ei,

CHIBA Masamoto

〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2



表1 ディーゼル特殊自動車8モード法の運転条件

運 転 モード	運 転 状 態		重み係数(WF)
	機関回転速度 (min <sup>-1</sup> )	機関負荷率 (%)	
1	定格回転速度	100	0.15
2		75	0.15
3		50	0.15
4		10	0.10
5	中間回転速度 注)	100	0.10
6		75	0.10
7		50	0.10
8	アイドリング回転速度	—	0.15

注) 中間回転速度：最大トルク回転速度が定格回転速度の60～75%の範囲にある場合、中間回転速度はその回転速度となる。最大トルク回転速度が定格回転速度の60%未満の場合、中間回転速度は定格回転速度の60%となり、最大トルク回転速度が定格回転速度の75%以上の場合、中間回転速度は定格回転速度の75%となる。

表2 ディーゼル特殊自動車排出ガス規制値 (2003年規制値)

エンジンの 定格出力	測 定 モード	CO	HC	NOx	PM	黒煙
19kW 以上 37kW 未満	ディーゼ ル 特 殊 自 動 車 8 モード	5.00g/kWh	1.50g/kWh	8.00g/kWh	0.80g/kWh	40%(8モード 運 転 時 及 び 無 負 荷 急 加 速 時)
37kW 以上 75kW 未満		5.00g/kWh	1.30g/kWh	7.00g/kWh	0.40g/kWh	
75kW 以上 130kW 未満		5.00g/kWh	1.00g/kWh	6.00g/kWh	0.30g/kWh	
130kW 以上 560kW 未満		3.50g/kWh	1.00g/kWh	6.00g/kWh	0.20g/kWh	

エンジンの定格出力が19kW以上37kW未満のもの及び75kW以上130kW未満の新型車については2007年10月、継続生産車については2008年8月末より、エンジンの定格出力が37kW以上75kW未満の新型車については2008年10月、継続生産車については2009年8月末より、強化された排出ガス規制が適用されることとなっている(表3)。現行と同様のD8モード法によりCO、HC、NOx、PM及び黒煙、無負荷急加速時の黒煙が測定されるほか、使用過程において排出ガス低減装置が排出ガスを悪化させない耐久性を有するよう、定められた運転条件により、エンジンの定格出力が19kW以上37kW未満のものについては5000時間、37kW以上560kW未満のものについては8000時間運転を行い、表3

に示す規制値を満たすことが必要となった。

### 3. 生研センターの排出ガス試験設備

生研センターでは、2004年度、国土交通省が定める排出ガス測定方法、具体的には新型自動車試験方法に記載される、排出ガス試験に供試するディーゼル機関の基本的な性能を把握するためのTRIAS 3-5-2003「原動機車載出力試験方法」、D8モード法により排出される排出ガスに含まれるCO、HC、NOx、PMの排出量、黒煙濃度及び仕事率の測定を行い、各排出ガス成分の平均排出量(単位時間及び単位仕事率あたりの排出ガス質量)を把握するためのTRIAS 24-8-2003「ディーゼル特殊自動車8モード排

表3 新たなディーゼル特殊自動車排出ガス規制値

エンジンの 定格出力	測定 モード	CO	HC	NOx	PM	黒煙
19kW 以上 37kW 未満	ディーゼル 特殊自動 車8モード	5.00g/kWh (0%)	1.00g/kWh (-33%)	6.00g/kWh (-25%)	0.40g/kWh (-50%)	40%
37kW 以上 56kW 未満		5.00g/kWh (0%)	0.70g/kWh (-46%)	4.00g/kWh (-43%)	0.30g/kWh (-25%)	35%
56kW 以上 75kW 未満		5.00g/kWh (0%)	0.70g/kWh (-46%)	4.00g/kWh (-43%)	0.25g/kWh (-38%)	30%
75kW 以上 130kW 未満		5.00g/kWh (0%)	0.40g/kWh (-60%)	3.60g/kWh (-40%)	0.20g/kWh (-33%)	25%
130kW 以上 560kW 未満		3.50g/kWh (0%)	0.40g/kWh (-60%)	3.60g/kWh (-40%)	0.17g/kWh (-15%)	25%

注) 表中の ( ) 内の値は2003年規制値からの削減率

出ガス試験方法」, 供試機関を動力計から切り離し, ローアイドルからハイアイドルへ急加速する際(2秒間)の黒煙濃度を把握するための TRIAS 24-9-2003「無負荷急加速黒煙の測定試験方法」に基づく各試験が実施できるよう, 動力計測部, 排出ガス計測部, 周辺設備より構成される排出ガス試験設備(図1)を整備した。

供試機関に対して所要の回転速度, 負荷の設定と測定を行う動力計測部は, 動力計, 動力制御盤, データ処理装置からなり, 動力計は, 交流式で吸出力200kW(回転速度1000~4000

rpm)であり, 各試験方法に応じた機関の運転を, またデータ処理装置は, 供試機関の仕様や試験条件の入力等の初期設定や, 機関回転速度, 機関トルク, 各排出ガス成分濃度, 燃料及び吸入空気の流量, 潤滑油, 燃料, 排出ガスの温度や圧力といった各種測定データの記録, 演算処理を行う。

CO, HC, NOx, PMの排出量や黒煙濃度の測定を行う排出ガス計測部は, 排出ガス分析装置, 希釈トンネル, PM採取装置, PM秤量装置, 黒煙測定装置からなり, 排出ガス分析装置

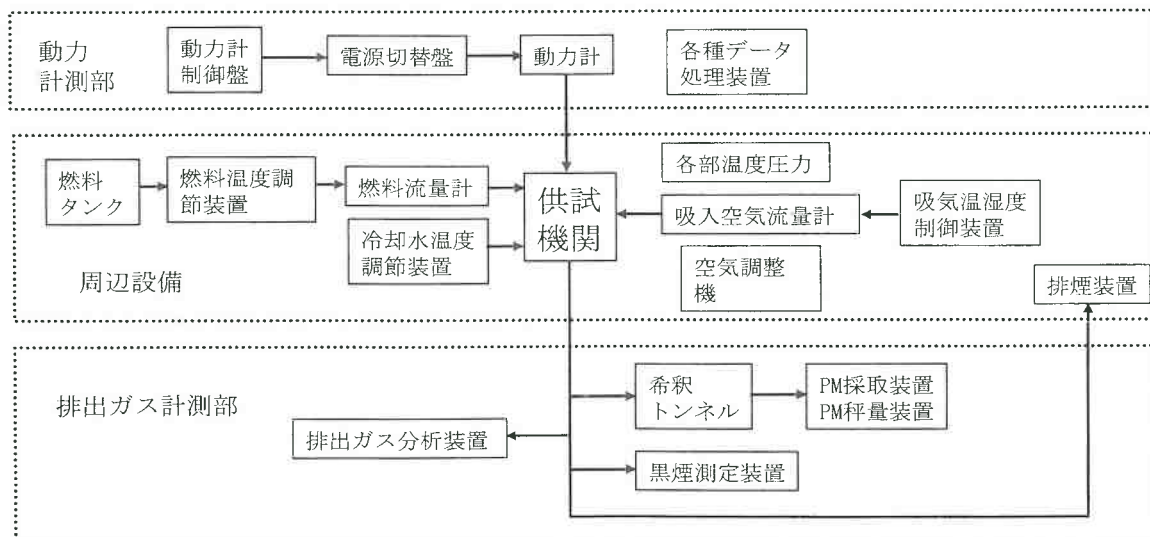


図1 排出ガス試験設備の概要

は、排出経路より排出ガスを直接採取することにより、CO、HC、NO<sub>x</sub>などの濃度測定を、希釈トンネルは、排出ガスの一部を採取し、採取した排出ガスを空気により希釈し（希釈排出ガス）、希釈排出ガスの全量をPM採取装置のフィルタに通してPMを採取し、PM採取装置の秤量天秤により、フィルタに採取されたPMの質量測定を、また黒煙測定装置は、採取した排出ガスをろ紙に通して吸引し、反射光により黒煙によるろ紙の汚れ度合い（黒煙濃度）の測定を行う。

その他、エンジンの運転状態を安定させて排出ガス、PM等の測定を精度よく行う上で必要となる主な周辺の設備は、燃料タンクを備える燃料供給装置、供試燃料の温度を制御する燃料温度調節装置、冷却水の温度を制御する冷却水温度調節装置、吸入空気の温度及び湿度を制御する吸気温湿度制御装置、吸入空気流量計、運転室内の温度を制御する空気調整機、各部の温度センサや圧力センサ、排出ガスを屋外に排出する排煙装置などから構成される。

#### 4. おわりに

2006年以降、定格出力19kW以上560kW未満のディーゼル特殊自動車に対し、現行の排出ガス規制と比較して、NO<sub>x</sub>及びPMで15～50%低減した排出ガス許容限度をエンジンの定格出力に応じて順次達成することとなっている。更に、大幅な排出ガス低減に向け、2010年頃を目前に、PMを除去するために排気管の一部に装着されるフィルタ装置、いわゆるディーゼル排気微粒子除去装置（DPF：Diesel Particulate Filter）など後処理装置の装着を前提とした規制、後処理装置の評価に適した新たな排出ガス試験方法の導入、またエンジンの定格出力が19kW未満及び560kW以上のディーゼル特殊自動車に対

する排出ガス規制の導入について検討が行われていることから、農業機械に搭載されるディーゼルエンジンについても、トラックなどディーゼル自動車の排出ガス低減技術の活用を含め、様々な排出ガス低減技術の開発や改良が進んでいくことが期待される。

今後も新たな排出ガス規制や試験方法等の導入、排出ガス低減技術の開発などに対応しながら、排出ガス測定に係わる検査・鑑定や試験研究を実施する予定である。

#### 文 献

- 1) 中央環境審議会：「今後の自動車排出ガス低減対策のあり方について」(第二次答申)，1997.11
- 2) 中央環境審議会：「今後の自動車排出ガス低減対策のあり方について」(第四次答申)，2000.11
- 3) 中央環境審議会：「今後の自動車排出ガス低減対策のあり方について」(第六次答申)，2003.6
- 4) 中央環境審議会：「今後の自動車排出ガス低減対策のあり方について」(第八次答申)，2005.4
- 5) 清水一史：「トラクター」，2005.5，機械化農業6月号，P180～181，新農林社
- 6) 生研センター：「機関排出ガス測定技術の確立」，2005.3，平成16年度事業報告，P154～155，生研センター
- 7) 杉浦泰郎：「ディーゼルエンジン排出ガス測定設備の概要」，2005.9，農機研ニュースNo.43，P6，生研センター
- 8) 清水一史，杉浦泰郎，高橋弘行，積栄，「農用エンジンに対する排出ガス規制について」，2006.3，平成17年度研究報告会資料，P53～61，生研センター

## ◀地域の先端研究▶

微生物コーティング種子を利用した  
レタスビッグベイン病の防除法の開発

<sup>1</sup>兵庫県立農林水産技術総合センター, <sup>2</sup>株式会社サカタのタネ,  
<sup>3</sup>独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 近畿中国四国農業研究センター  
相野公孝<sup>1</sup>・橋本好弘<sup>2</sup>・石川浩一<sup>3</sup>

微生物,特に耐久体を作らない細菌類を生きのまま種子にコーティングし保存することは不可能と言われていた。そこで減圧接種と低温除湿乾燥を組みあわせて,最長3ヶ月間生存可能な技術を開発した。本技術を用いて,レタスビッグベイン病を媒介する*Olpidium*菌の感染阻害効果を示す内生細菌をコーティングし,育苗したレタス苗を発病圃場に定植した結果,レタスビッグベイン病の被害回避効果が確認された。

## 1. はじめに

環境にやさしい農業技術開発のために,多くの研究者が生物的防除の開発に力を注ぎ,数種の生物農薬が登録され,利用されるようになった。しかし,これらの多くは種子消毒や空気伝染性病害に対する生物農薬であり,土壌病害に対しては内生細菌を利用したシュードモナスフロレッセンス剤(商品名:セル苗元気)1剤のみである。この現象は,生物的防除の特質である効果の「不安定さ」や防除に対する「コスト高」が土壌病害防除には顕著に表れるからである。特に,単価が安く,栽植本数の多い作物については生物農薬の利用が不可能といえる。また,内生細菌等の微生物を植物に定着させるためには,生育の初期段階,できるだけ早く接種する方法が好ましく,そこで,種子にコーティングする方法が最も効率の良い方法と考えられる。しかし,耐久体を作らない内生細菌(*Pseudomonas fluorescens*)を生きのまま種子コーティングしペレット化させることは不可能とされている。これはペレットを造粒するとき乾燥や高温などのストレスを内生細菌にかけるためである。この状況をブレイクスルーしな

AINO Masataka<sup>1</sup>, HASHIMOTO Yoshihiro<sup>2</sup>,  
ISHIKAWA Koichi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>〒679-0198 兵庫県加西市別府町南ノ岡甲1533

<sup>2</sup>〒224-0041 横浜市都筑区仲町台2-7-1

<sup>3</sup>〒765-8508 香川県善通寺市仙遊町1-3-1

い限り,防除効果の高い菌株を見つけても,実用的に使用することができないと考える。農林水産省「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」の1プロジェクトとして「内生細菌利用を基幹としたレタスビッグベイン病防除技術の開発」の中で内生細菌コーティングペレット種子の開発を行ったのでその概要を報告する。

## 2. ビッグベイン病とは

レタスビッグベイン病の発生が報告されている県は,和歌山県をはじめとし,長野県,静岡県,埼玉県,香川県,徳島県,岡山県,兵庫県,千葉県,沖縄県である。特に兵庫県では,1994年頃から淡路島の三原郡南淡町で発生し始め,2004年には島内栽培面積(約1100ha)の31.7%に拡大したが2005年1月30.6%,12月27.2%とやや減少傾向を示している。また,当初,軽微な発生の圃場がほとんどであったが,2002年頃から,減収が甚だしい圃場も散見されるようになった(図1)。

ビッグベイン病は,土壌中の糸状菌である*Olpidium brassicae*により媒介されるウイルス病で,病原ウイルスは,主に*Mirafiori lettuce virus*(MiLV)である<sup>4)</sup>。進行すると葉縁部分から葉脈が透け,編み目状になり,やがて葉脈に沿った部分の色が薄くなり葉脈(vein)が大きく(big)見えるようになることからビッグベイン(big-vein)と名付けられている(図2)。



レタス自身は、この病気によって枯死することはないが、結球しないため商品価値が低下する。また、オルピディウムは耐久器官（休眠孢子）を形成し、土壤中で10年以上生存し、しかもウイルス自体は、オルピディウムの体内で保護されているため、一度発病した圃場での撲滅は難しいのが現状である（図3）。この病害は、1934年にアメリカで初めてその発生が報告されて以来<sup>3)</sup>、世界中のレタス産地で問題となっていて、国内でも冬春作のレタス産地を中心に主要産地の多くが病害に見舞われるなど深刻な被害が出ている。

害が出ている。

### 3. 内生細菌の利用

トマト青枯病や萎凋病、ナス青枯病、ピーマン青枯病に対する内生細菌の利用が報告されて<sup>1), 2)</sup>、生物農薬として登録されている。そこで、レタスビッグベイン病を媒介する *Olpidium* 菌に対して同様の効果を示す内生細菌が存在するかどうか疑問であった。そこで、*Olpidium* 菌の遊走子の感染を阻害する細菌の検索と、それを用いたレタスビッグベイン病の発病抑制効果を検討した。検定菌株は、アブラナ科野菜及びレタスの根内から分離した蛍光色素を産生する細菌を用い、レタスビッグベイン病汚染圃場から採取した土壌を接種源とし、シードリングバイオアッセイチャンバー法で *Olpidium* 菌の遊走子感染阻害効果を検討した。その結果、無処理区の *Olpidium* 菌感染数を1/10~1/200に有意に減少させる菌株の存在が明らかになった（図4）。発病抑制効果は、供試した株のほとんどで認められたが、効果の高い株では発病を完



図1 レタスビッグベイン病発生圃場での被害状況  
不結球及び結球不良による放任レタス



図2 レタスビッグベイン病の病徴



図3 *Olpidium*菌の遊走子のうと休眠孢子  
右上の円形状のものが遊走子のう、中央やや左の厚い膜に覆われたものが休眠孢子

全に抑えることができた。

#### 4. 内生細菌含有ペレット種子の製造

特定の病原微生物に対し優れた抵抗性を発揮する内生細菌の選抜，定着化に成功しても，実際の農業生産の現場で活用するためには，その応用技術の開発が不可欠である。想定される内生細菌の活用方法としては，圃場に全面散布する方法，植物の株元局所に散布する方法，育苗中の苗に塗布する方法などがあるが，厳しいコスト環境の下で農作物を生産している農家にとっては，どれも労力や経費の点で現実的とは言えない。そこで，最も適した方法として内生細菌の含有したペレット種子の製造法開発に着手した。

内生細菌を種子コーティングしペレット化した種子を乾燥させずに保存（含水量28.3%）後，内生細菌の生存率を調べると，4℃で20日間保存しても100%の種子から内生細菌が検出可能であった。しかし，30.2%の種子が発芽し，種子の品質に悪影響を示した。また，水分含量を

表1 ペレットの含水率と内生細菌の定着量及びレタス種子の発芽

含水率	内生細菌 検出率		発芽率
	5日後	20日後	20日後
28.3 %	100.0%	100.0%	30.2%
25.3	100.0	100.0	41.7
21.6	100.0	100.0	3.1
10.3	53.1	66.7	0.0
5.5	20.8	12.5	0.0
2.2	0.0	0.0	0.0
0.9	0.0	0.0	0.0

10.3%まで乾燥させると，発芽はおこらないが，内生細菌の検出率が約66.7%となった（表1）。このようにペレット化を成功させるためには，種子の品質と内生細菌の生存と言う相反した命題を満足させなければならないことになる。自然界でおこっている種子伝染を考えると，種皮と種子の間に病原菌が侵入し，病原菌は外界から種皮に守られて長期間生存することができる。このことを利用し，レタス種皮と種子の間に内生細菌をもぐり込ませる方法をとれば，これまでよりも安定して定着可能となると予想した。そこで，減圧処理を行い通常のペレット製造工程で造粒を行った。その結果，水分含量を1.1%まで乾燥させても80%の種子から内生細菌を検出することが可能となった。しかし，商品としてはまだ不完全である。また，通常に内生細菌を接種し造粒後，低温除湿乾燥を行うと，内生細菌の生存率が93%まで向上することが判明した。しかし，これも商品化を考えると，さらに高い生存率が要求される。そこで，減圧接種と低温除湿乾燥を組みあわ

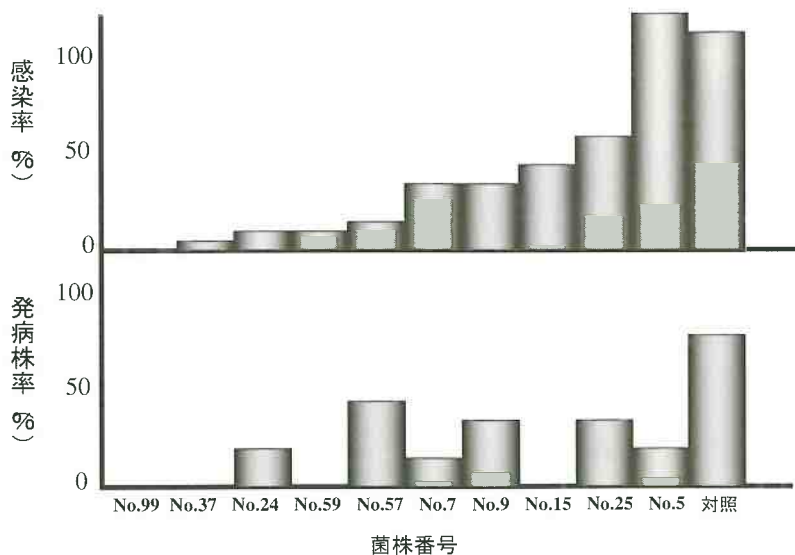


図4 分離細菌によるレタス根への*Olpidium brassicae*感染阻害効果及びレタスビッグベイン病発病抑制効果

せて造粒すると、内生細菌の生存率が100%となった（図5、表2）。本方法を用いて作られたペレット種子は、4℃で約3ヶ月間保存可能であった。

## 5. 内生細菌含有ペレット種子の効果

内生細菌含有ペレット種子をビッグベイン病汚染土壤に播種し、20℃、20000LUX、16時間照明で育苗、接種20日後にレタス苗の根から放出される *O. brassicae* の遊走子数を調べ、40日後にビッグベイン病の発病を肉眼で調査した。その結果、内生細菌のレタス根への定着量は  $3.0 \times 10^3$  CFU/g根であり、十分定着していることが判明した。また、放出された遊走子数は無処理  $5.1 \times 10^4$  個/根に比べ内生細菌コーティングペレット種子では  $0.5 \times 10^4$  個/根と低く抑えられ

ていた（表3）。発病株率は、無処理70.0%に比べ内生細菌含有ペレット種子では14.3%と低く、高い発病抑制効果が認められた。

現地試験においては、培土を充填したセル成型トレイに内生細菌含有ペレット種子を播種、一般慣行に従って育苗後、現地汚染圃場に定植した。9月下旬定植-11月中旬収穫の作付け時期のレタスでは比較的ビッグベイン病の発生は少なく、この時期に試験を行うと、防除価45.8と発病抑制効果を示した。11月下旬定植-2月収穫の栽培型では、最もビッグベイン病の発生が激しく、この時期に試験を行ったが、完全に感染を防ぐことができず、処理・無処理区ともに100%の発病となった。しかし、内生細菌含有ペレット種子区では発病程度が無処理区よりも低く抑えられ、無処理区の商品化率81.0%に比べ98.9%とビッグベイン病の被害を回避することができた（表4）。発病を防ぐことができなかった理由として、内生細菌の効果持続期間が約2ヶ月であるため、栽培後半に感染・発病した個体があったものと考えられる。このため発病株率は高いが、被害が軽減されたと考えられる。内生細菌含有ペレット種子の防除効果は十分に認められるが、さらに高い効果が要求される。そのため幾つかの作用機構の異なる防除手段を併用することが重要となる。体系化したレタスビッグベイン病の防除における1要素として使用するのが望ましい。



図5 レタス種子（左）と内生細菌含有ペレット種子（右）

表2 接種方法及び乾燥方法の違いと *Pseudomonas fluorescens* の検出率

処 理	蛍 光 強 度			検出率 (%)
	+	++	+++	
スプレー接種+通常乾燥(40℃)	1.0	0.0	0.0	1.0
減圧接種+スプレー接種+通常乾燥(40℃)	83.3	0.0	0.0	83.3
スプレー接種+低温除湿乾燥(7℃)	0.0	96.9	0.0	96.9
減圧接種+スプレー接種+低温除湿乾燥(7℃)	1.0	98.0	1.0	100.0

\* 菌の検出は、紫外光(360nm)を照射し、蛍光を発したものを陽性とした。

\* 蛍光強度+：かすかに蛍光が見られる。++：蛍光がみられる。+++：強い蛍光が確認される。

\* ペレット種子水分含量：各処理とも1.1%以下に調整。

表3 開発したペレット造粒技術を用いて作製した*P. fluorescens*コーティング  
種子の*Olipidium*菌の感染及びレタスビッグベイン病発病抑制効果

	<i>P. f</i> 定着数 (10 <sup>3</sup> CFU/g 根)	遊走子数 (10 <sup>4</sup> 個/ml)	発病株率 (%)
内生細菌コーティング種子	3.0	0.5	14.3
内生細菌無処理コーティング種子	—	5.1	70.0

注：*P. f*定着数は根部をエタノールで表面殺菌し、摩砕後、抗生物質加用キングB培地を用いて希釈平板法で菌数を計測した。

表4 *Olipidium*菌感染阻害内生細菌の圃場での効果（ペレット種子使用）

	発病株率(%)	発病度*	防除価	商品化率(%)
内生細菌処理区	100.0	29.3	37.8	98.9
無処理区	100.0	43.6	—	81.0

\*：発病度 = ((A\*4+B\*3+C\*2+D)/N\*4)\*100

A：ビッグベイン症状が見られ、結球しない。

B：ビッグベイン症状が見られ、結球するが出荷できない。

C：ビッグベイン症状が見られ、小玉になるが出荷できる。

D：ビッグベイン症状が見られ、結球には影響しない。

## 6. おわりに

今回開発した生きたまま微生物をコーティングする技術は、レタス種子-*Pseudomonas*属細菌間のみだけでなく、多くの作物や微生物の間で利用可能である。本技術を積極的に活用することにより、生物的防除の発展に寄与できると考えられる。

## 文 献

- 1) AINO, M. (1997). 4th PGPR Workshop, 120-123.
- 2) 岩本豊ら (2000). 日植病報, 66, 177.
- 3) Jagger, I. C. and Chandler, N. (1934): *Phytopathology* 24 : 1253-1256.
- 4) Lot, H. et al. (2002): *Phytopathology* 92 : 288-293.



◀文献情報▶

インヒビンに対する能動免疫がウシの発情周期における性腺刺激ホルモンの分泌と卵胞の消長に及ぼす影響

The Effect of Active Immunization against Inhibin on Gonadotropin Secretions and Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in Cows.

Mohamed S. Medan<sup>1, 2)</sup>, Toshiro Takedomi<sup>3)</sup>, Yoshito Aoyagi<sup>3)</sup>, Masato Konishi<sup>3)</sup>, Shigeto Yazawa<sup>4)</sup>, Gen Watanabe<sup>1, 5)</sup> and Kazuyoshi Taya<sup>1, 5)</sup>

<sup>1)</sup> Tokyo University of Agriculture and Technology

<sup>2)</sup> Suez Canal University

<sup>3)</sup> Embryo Transfer Center, ZEN-NOH

<sup>4)</sup> Institute of Animal Health, ZEN-NOH

<sup>5)</sup> Gifu University

*Journal of Reproduction and Development*,  
52, 107-113 (2006)

インヒビンに対する能動免疫が内因性インヒビンを中和し、羊、山羊、牛等の多くの動物種において排卵数を増加させることが報告されている。しかしながら、インヒビンに対する能動免疫が卵胞波に及ぼす影響は明らかではない。そのため、インヒビンに対する能動免疫がウシにおける卵胞の消長や排卵率にどのような影響を与えるかの検討が行われた。13頭のウシに対してインヒビンの $\alpha$ サブユニットを用いた免疫が、6頭の牛に対してはプラセボ処理が実施された。両グループとも最初の注射から7, 14, 21, 34週後に計4回追加免疫が実施された。2回目, 3回目及び4回目の追加免疫後, 25日間にわたり超音波画像診断装置を用いて卵胞の消長等が調査された。また, 4回目の追加免疫後, 卵胞刺激ホルモン及び黄体形成ホルモン濃度の測定のために, 発情周期の一周期の間, 採血が行われた。ウシへのインヒビン投与によりインヒビンに対する抗体が産生されるとともに, イ

ンヒビン免疫牛においては, 対照区に比べて卵胞刺激ホルモンの濃度が高まった。インヒビン免疫牛における発情周期中の卵胞波の回数(3~4回)は対照区(2~3回)よりも多くなり, また, インヒビン免疫牛の発情周期中の卵胞数も対照区に比べて多かった。第1卵胞波における卵胞数はインヒビン免疫牛 $14.8 \pm 1.7$ 個, 対照区 $5.4 \pm 0.2$ 個であり, 排卵時の卵胞波においてはインヒビン免疫牛 $13.9 \pm 1.9$ 個, 対照区 $5.6 \pm 0.7$ 個であった。インヒビン免疫牛において複数排卵する個体が増加したものの, 排卵率の変動は大きかった。以上の結果をまとめると, インヒビンに対する能動免疫は, 発情周期中の牛の卵胞刺激ホルモンの分泌を増加させ, さらに, 発情周期中の卵胞波の回数を増加させるとともに発育卵胞数も増加させた。

胚移植を効率的に行うためには, 卵巣中の多数の卵胞を発育させ, 発育能の高い卵子を数多く生産する必要がある。インヒビンに対する能動免疫により, 多数の卵胞を発育させることが可能であることが明らかとなったが, 排卵率の変動が大きく, 人工授精をして受精卵を回収するという方法では安定した胚生産は難しいと考えられる。しかしながら, インヒビン免疫後に発育した卵胞中の卵子を, 生体内卵子吸引法(OPU)などによって吸引採取し, 体外受精によって移植可能胚を生産することは可能であることから, 体外受精に用いる卵子の供給源として, インヒビン免疫は有効な手法となる可能性がある。

(抄訳: 下司雅也, GESHI Masaya, 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所)

## ◀文献情報▶

### 過酸化水素は気孔ABAシグナル伝達経路で一酸化窒素の上流に位置する

ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis

Jo Bright, Radhika Desikan, John T. Hancock, Iain S. Weir, Steven J. Neill

*The Plant Journal*, Vol. 45 Issue 1, 113-122 (2006)

活性酸素 (ROS) と一酸化窒素 (NO) は生体に対し様々な障害をもたらしもするが、生体内の半減期が数秒以内と短い拡散性のガスであることから一過性のシグナル伝達のセカンド・メッセンジャーとして利用されている。植物は乾燥に遭遇すると根でABAを生成し、葉にABAが運ばれ、孔辺細胞はABAシグナルを受容すると気孔を閉鎖し、葉から水分の蒸散を抑制する。その際にNOとROSが共にセカンド・メッセンジャーとして重要な役割を演じていることが、2000年以降相次いで発見されてきたが、両メッセンジャーが同一経路に属するのか、それとも別経路で働いているのかは、明らかではなかった。ただ何となく、両者は別経路で複雑に絡まり合い巧妙なネットワークを形成していると想像していた研究者が多かったのではないだろうか。

ところが、活性酸素の一種過酸化水素は孔辺細胞でNOの発生を誘導し、過酸化水素による気孔の閉鎖はNO吸収剤PTIOによって阻害されるのである。逆にNOによって過酸化水素が発生することもなく、NOによる気孔閉鎖は過酸化水素消去剤アスコロビン酸やカタラーゼによっても阻害はされないのである。また、過酸化水素合成酵素欠損変異体ではABAによるNO発生は見られない。つまり、ABA-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NO-気孔閉鎖という経路の存在が想定されるのである。

植物孔辺細胞でのNO発生系としては硝酸還元酵素 (NR) と一酸化窒素合成酵素 (NOS) が報告され、共にこちらが主要発生経路と言ひ、互いに譲らないという状況にあるが、さてこの場合はどうなのか？ 過酸化水素によるNO発生はNR阻害剤のタンゲステン酸で阻害されるが、NOS阻害剤のL-NAMEでは効果がない。また、NOS欠損変異体では過酸化水素によるNOの発生誘導がみられるが、NR欠損変異体ではNOは発生しない。つまり、過酸化水素によるNO発生を触媒する酵素はNRということになる。ところが、NOS欠損変異体でのABAによるNO発生は野生型に比べると少ないというデータも同時に出しており、NOSは過酸化水素によらないNO発生経路に関係しているのだろうか？ この点著者は余り議論していないが、今後の課題ということだろうか。

(抄訳：岩井純夫, IWAI Sumio, 鹿児島大学農学部)

◀文献情報▶

*Bifidobacterium breve*の発酵上清は、TLR2を介して樹状細胞の成熟、活性化およびその生存を誘導する

Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway.

Hoarau C, Lagaraine C, Martin L, Velge-Roussel F, Lebranchu Y.

Universite Francois-Rabelais de Tours, JE2448 Cellules Dendritiques & Greffes, France.

*J. Allergy Clin. Immunol.*, 117, 696-702 (2006)

腸内細菌は、腸管免疫の発達や維持に必須の働きをしていると考えられている。特に、*Lactobacillus*属や*Bifidobacterium*属に属するいくつかの株では、アレルギーや炎症性腸疾患を抑制する作用が報告されている。腸内細菌と腸管免疫の相互作用を包括的に説明しうる程の知見の蓄積はないが、あるプロバイオティクス乳酸菌においては、樹状細胞 (DC) を介して抗アレルギー作用や抗炎症作用を示す報告がなされている。

近年、*Bifidobacterium breve* C50 (BbC50) 株の生産物が小腸上皮細胞と相互作用を持つ可能性が報告されたことから、筆者らは、BbC50株の発酵上清を限外ろ過後、透析を行い、凍結乾燥粉末とした上清画分 (BbC50SN) を調製し、ヒト樹状細胞の成熟、活性化、ならびに生存性に与える影響について検討を行った。

ヒト末梢血単核球 (PBMC) をIL-4, GM-CSF存在下で5日間培養し、BbC50SNでさらに2日間培養したときの成熟したDC割合を、CD83, CD86, HLA-DRの発現を指標としてフローサイトメトリー法で検討した。その結果、コントロール群と比べてBbC50SNを共培養した細胞のほうが、成熟したDCの割合が高いことが示された。また、この系に、NF- $\kappa$ B経路の阻害剤であるlactacystinを添加してDCの成

熟度を評価したところ、lactacystin共存下で培養したPBMCでは十分なDCへの成熟が起らなかったことから、BbC50SNによるDC成熟化のためのシグナル伝達はNF- $\kappa$ B経路に依存していることが示唆された。

BbC50SNによって成熟化したDCの性状解析を行ったところ、高いIL-10生産性を示し、一方、IL-12の生産量は低く、CD4<sup>+</sup> T Cellの増殖を促進することが明らかとなった。また、抗アポトーシスタンパク質である、Bcl-2, Bcl-xLおよびリン酸化Badをコントロール群にくらべて多く生成し、アポトーシスによるDCの減少を抑える働きがあることが明らかとなった。

DCの細胞表面にはToll-like Receptor (TLR) と称する菌体成分などを認識する一群のレセプターが発現していることが知られており、そのアイソフォームとしてTLR1からTLR9が報告されている。そこで筆者らは、BbC50SNがどのTLRアイソフォームに認識されてDCを活性化しているかを明らかにするため、各TLRアイソフォームをトランスフェクションした細胞を用いて、それぞれのアゴニストとBbC50SNの影響を調べることにした。その結果、BbC50SNはTLR2によって認識されていることが示唆された。TLR2中和抗体を共存下でのDCの成熟度を調べたところ、成熟したDCの割合が減少し、IL-10の産生も減少することから、BbC50SNによるDCの成熟促進作用は、TLR2を介したシグナル伝達系によることが明らかとなった。

以上の結果から、BbC50SNはTLR2を介してDCの成熟を促し、アポトーシスを抑制することでDC数を増加させていることが明らかとなった。さらにIL-10を多く産生する性状から、BbC50SNによって成熟したDCは抑制性DCであると考えられた。以上の知見により、今後のアレルギー研究領域での展開が期待される重要な知見が得られたと考えている。

(抄訳：畑中美咲, HATANAKA MISAOKI, カルピス株式会社 健康・機能性食品開発研究所)

## ◀文献情報▶

**組換え体大豆シスタチンや牛血漿を魚肉フィレに浸漬，もしくはインジェクションすることでプロテアーゼ活性を阻害する**

Inhibition of protease in intact fish fillets by soaking in or injection of recombinant soy cystatin or bovine plasma.

I. Kang and T. C. Lanier

Research and Development, Kraft Foods, Madison, Wisconsin 53704, USA.

*J. Agric. Food Chem.*, 53, 9795-9799 (2005)

アブラガレイ (AF; Arrowtooth flounder) は筋肉内にシステインプロテアーゼを有している。このプロテアーゼは白身魚の一種であるパシフィック・ホワイティングが有しているシステインプロテアーゼと同様に，加熱調理時に働きタンパク質を分解するので調理品の物性低下原因物質として知られている。

大腸菌により組換え体として生産した大豆由来のシスタチンはパシフィック・ホワイティングに含まれるプロテアーゼを阻害することはすでに報告されていたが，今回の報告では，アブラガレイのフィレに対して浸漬処理，もしくはインジェクション処理により組換え体大豆シスタチンを添加し，フィレの物性改善効果を観察している。また，同じくアブラガレイのプロテアーゼを阻害する作用のある牛血漿タンパク質も添加し物性改善効果の比較も行っている。

組換え体大豆シスタチンと牛血漿タンパク質のプロテアーゼ阻害活性を算出し，同等のプロテアーゼ阻害活性となる濃度で浸漬処理にてフィレに添加した場合，両者は加熱調理後のフィレの物性の低下を同じ程度抑制していた。また，組換え体大豆シスタチンは添加濃度依存的に，フィレの物性低下を抑制していることが観察された。

次にSDS-PAGE分析によりミオシン等のタンパク質分解の様子を観察することで浸漬処理と

インジェクション処理の比較を行っている。プロテアーゼ阻害溶液でフィレを浸漬処理した場合は，フィレの内部よりも外部の方がタンパク質の分解が抑制されていた。一方，インジェクション処理を行った場合はフィレの内部と外部に差が無くタンパク質の分解が抑制されていた。よって，シスタチンなどの高分子の物質を魚肉に作用させる場合はインジェクション処理の方が有効であることが推察された。以上のようにシスタチンはシステインプロテアーゼの作用により品質が低下する水産物に対しては，添加することで高品質化に寄与し，魚肉すり身だけでなくフィレのような形状の素材に対しても作用させることが可能であることが示された。

プロテアーゼによるタンパク質分解を阻害することは食品加工を行う際に重要な技術の一つである。従来は牛血漿タンパク質や卵白などが使用されていたが，BSE問題，卵白アレルギー問題があり，食品として安全である新しい素材の開発が求められている。

(抄訳：久保田光俊，KUBOTA Mitsutoshi，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

## 平成18年度民間実用化研究促進事業のお知らせ

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構生物系特定産業技術研究支援センターでは、平成18年度より新たに、農林水産研究基本計画に即して農林水産業、食品産業、醸造業等の向上に資する画期的な生物系特定産業技術の開発を促進することを目的として、民間における実用化段階の研究開発に資金を提供する事業を開始することとしました。この事業は、提案公募による委託方式（日本版バイ・ドール条項の趣旨を踏まえた委託方式）で行うもので概要は以下のとおりです。

- 対象研究分野：農林水産業、飲食料品産業、醸造業等の向上に資する画期的な生物系特定産業技術の開発を目指した、生産現場、食品製造等現場への移行が可能な実用化段階の研究であって、製品化に向けた明確な計画（当該製品の実用化にあたり必要となる特許権等を既に有している等）が明らかなもの
- 研究期間：原則として3年間。ただし、研究終了時に行う評価結果によっては2年まで延長
- 研究費の規模：1課題あたり1億円程度／年が上限
- 提案資格：生物系特定産業技術の実用化段階の研究開発を行っている民間の登記法人
- 募集期間：平成18年5月18日（木）～6月27日（火）

募集要領等の詳細につきましては、下記のホームページをご覧ください。

<http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/marumin/kouboannnai/annnai.htm>

<お問い合わせ先>

新技術開発部 民間研究促進第1課

電話：03（3459）6565 FAX：03（3459）6566

E-mail：[minkanken@ml.affrc.go.jp](mailto:minkanken@ml.affrc.go.jp) URL：<http://brain.naro.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114号  
2006年3月15日発行

**特集 「メタボローム解析」**

- 1 メタボローム解析—基本原理と代謝物分析・データ解析技術の現状……………草野 都・斉藤 和季
- 2 ツールとしてのメタボロミクス—ゲノム機能科学への応用と今後の展望……………平井 優美・峠 隆之・斉藤 和季

**国内情報**

花芽形成メカニズムの理解にむけて……………阿部 光知・荒木 崇  
生体分子のデジタル精密計測—ライフサイバヤー……………松永 是・田中 剛  
倒伏抵抗性極強の水稲長稈品種の育成経過および水稲育種における作物学の果たす役割……………大川 泰一郎

森林セラピーの生理的リラックス効果ならびにガン抑制効果……………李 卿・川田 智之・朴 範鎮・宮崎 良文  
有毒アオコ原因藍藻マイクロキスティス属に感染するウイルスの発見……………長崎 慶三・高島 ゆかり・外丸 裕司・白井 葉子・高尾 祥丈・広石 伸互・吉田 天士  
農業機械の性能と価格の統計的分析……………大西 正洋

**地域の先端研究**

低グルテリン米新品種「ゆめかなえ」の育成……………齋藤 幸一・林 玲子・西川 康之・長島 正・渡邊 智子・土橋 昇

**文献情報**

加熱乾燥精子頭部のウシ成熟卵子細胞質内への顕微授精後の体外での発生能……………(抄訳：下司 雅也)  
耐塩性モデル植物 ソルトクレス……………(抄訳：岩井 純夫)  
X線小角散乱を用いた、セルラーゼの多面的な立体構造分析……………(抄訳：目瀬 友一朗)  
コイ骨格筋由来普通筋及び血合筋の生化学的性状……………(抄訳：水口 亨)

**本誌第114号 お詫びと訂正のお知らせ**

本誌第114号（2006年（平成18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)
24頁，右段，上から7行	1.17t/ha	11.7t/ha

## 編集後記

組織の統合・再編により4月1日、新たに「独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構」として発足しましたが、生研センターでは今後ともブレインテクノニュースにおいて新鮮でホットな研究情報の提供に努めてまいりますので、引き続きよろしくお願ひ致します。

さて、第115号の総説では、小泉信三氏（現東北農業研究センター：前中央農業総合研究センター）らに「同質遺伝子系統を活用したイネいもち病の防除」と題して、通常の文献の約3編分に相当する大作をご寄稿戴き、いもち病防除のためのマルチライン育成の経緯、発病抑制機構、普及の現状等、多岐にわたりご紹介戴きました。

その他の研究情報としては、柴博史氏（奈良先端科学技術大学院大学）らにメンデル優性の法則の分子レベルでの解明、松居靖久氏（東北大学）らにヒストンメチル化酵素による減数分裂の制御、宮本裕希子氏（京都大学）らに環境浄化型「スーパー細菌」の創成、相野公孝氏（兵庫県立農林水産技術総合センター）らに微生物コーティング種子を利用した病害防除法の開発など、それぞれ貴重な研究の一端をご紹介戴きました。

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）、畑中美咲氏（カルピス（株））、久保田光俊氏（日本水産（株））にご執筆戴きました。

ご多忙な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115号

平成18年5月15日発行

発行人 朝比奈 清

編集人 石川 清康

発行所 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

©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