

# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成19年11月15日発行（隔月1回15日発行）

ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

**No.124**

15 NOVEMBER, 2007

ブレインテクノニュース



## ミツバチゲノムの解読完了と今後の展望

<sup>1</sup>名古屋大学 大学院生命農学研究科

<sup>2</sup>(独)農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所

門脇辰彦<sup>1</sup>・木村澄<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

- ミツバチゲノムの解読完了と今後の展望 ..... 1  
 門脇 辰彦<sup>1</sup>・木村 澄<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>名古屋大学 大学院生命農学研究科, <sup>2</sup>(独)農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所)

## 総説関連情報

- ミツバチゲノム解析と養蜂への応用 — 抗菌ペプチドの理解とその応用 — ..... 6  
 芳山 三喜雄<sup>1</sup>・木村 澄<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>(独)農業生物資源研究所 昆虫科学研究領域, <sup>2</sup>(独)農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所)

## 国内情報

- コールドチェーンフリー経口ワクチンとしてのワクチン発現米の開発 ..... 11  
 幸 義和<sup>1</sup>・野地 智法<sup>1</sup>・高木 英典<sup>2</sup>・高岩 文雄<sup>2</sup>・増村 威宏<sup>3</sup>・田中 國介<sup>3</sup>・清野 宏<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>東京大学 医科学研究所, <sup>2</sup>(独)農業生物資源研究所, <sup>3</sup>京都府立大学)
- 植物バイオマスへの<sup>13</sup>C代謝・分解過程の追跡 — 高分解能マジック角回転 (hr-MAS) 法によるアプローチ — ..... 16  
 菊地 淳<sup>1,2,3</sup>・森 哲哉<sup>3</sup>・雪 真弘<sup>3</sup>・西原 崇<sup>3</sup>・佐藤 一<sup>4</sup>・甲野 裕之<sup>4</sup> ( <sup>1</sup>(独)理化学研究所 植物科学研究センター, <sup>2</sup>名古屋大学, <sup>3</sup>横浜市立大学, <sup>4</sup>ブルカー・バイオスピン(株))
- 超音波を利用した動物細胞への核酸導入技術の開発 ..... 22  
 根岸 洋一<sup>1</sup>・遠藤 葉子<sup>1</sup>・鈴木 亮<sup>2</sup>・滝澤 知子<sup>2</sup>・山本 松男<sup>3</sup>・丸山 一雄<sup>2</sup>・新植 幸彦<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>東京薬科大学 薬学部, <sup>2</sup>帝京大学 薬学部, <sup>3</sup>昭和大学 歯学部)
- マルカメムシがダイズ上で繁殖できる能力を腸内共生細菌が規定する ..... 27  
 深津 武馬・細川 貴弘 ((独)産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門)
- 乗用型トラクタの安全キャブ・フレームの効果とシートベルトの使用実態に関する農業者調査結果 ..... 31  
 富田 宗樹・水上 智道・高橋 正光・塚本 茂善 ((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

- 北海道産サケの品質等級判別システムの開発 ..... 36  
 宮崎 俊之 (北海道立工業試験場 技術支援センター)

## 文献情報

- 二母性胚由来マウスの高率生産 ..... 41  
 M. Kawahara et al. (*Nature Biotechnology*, 25, 1045-1050, 2007) 抄訳: 下司 雅也
- 受容体様キナーゼFERONIAは花粉管を胚珠が受け入れる際の雌雄相互作用を取り持つ ..... 42  
 J. -M. Escobar-Restrepo et al. (*Science* 317, 656-670, 3 August, 2007) 抄訳: 久保山 勉
- 末端にシアル酸が付加された糖タンパク質を生産する酵母 ..... 44  
 S. R. Hamilton et al. (*Science*: 313. no.5792, 1441-1443, 8 September, 2006) 抄訳: 平野 拓也
- ニジマスの視床下部, 菱脳, ブロックマン体にはグルコセンサーが存在している ..... 45  
 S. Palakof et al. (*Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292: R1657-R1666, 2007)  
 抄訳: 川中子 誠

## 表紙の説明

ミツバチは農作物の花粉媒介昆虫として、また、蜂蜜等の生産の担い手として重要である上、ヒトに匹敵する社会性行動や高い認知能力などの興味深い特徴をもつことから、ゲノム解読のモデル生物に選ばれ、昨年秋にその解読結果が発表された。ゲノム情報を利用して、ミツバチの機能の遺伝子レベルでの解明が進められている他、アメリカ腐蝕病や、近年とくに問題化しているCCD (Colony Collapse Disorder) など、養蜂産業上重大な疾病の原因解明、さらには、抗菌ペプチドを利用した抗病性育種への応用が期待される (写真は木村澄氏提供)。詳細については、1頁及び6頁をご覧ください。



## ◀ 総 説 ▶

## ミツバチゲノムの解読完了と今後の展望

<sup>1</sup>名古屋大学 大学院生命農学研究科,  
<sup>2</sup>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  
門脇 辰彦<sup>1</sup> ・ 木村 澄<sup>2</sup>

ヒトに匹敵する社会性行動を示し、また特定の脊椎動物と同等な高い認知能力を持つミツバチのゲノム解読結果が昨年発表された。ミツバチとその他の昆虫、及びヒトを代表とする脊椎動物との比較ゲノム解析が可能となり、動物の社会性行動と認知能力を支える遺伝子基盤の解明、農業生産と地球環境に多大な影響を及ぼす受粉動物としてのミツバチの機能の解明、およびCCDを代表とする様々な疾病の原因解明の手がかりとなる。

## 1. はじめに

ミツバチは約10万種から成る膜翅目昆虫に属し、既にゲノムプロジェクトが完了している双翅目昆虫のショウジョウバエやハマダラカと約2.8～3億年前に分枝したと推定される。膜翅目にはアリやハチ等、真社会性構造を発達させた昆虫が含まれ、その特徴は、生殖カーストの分化、世代の重複、共同育児である。すなわち、同じゲノムDNAを持つ個体から幼虫の栄養環境に基づく異なる遺伝子プログラムの発現によって、形態及び生態的に異なる女王蜂と働き蜂が分化する (Polyphenism)。女王蜂は1日に2000個の産卵を行うが、働き蜂より10倍以上長く生存する (通常1～2年) 等、他の昆虫と大きく異なる。さらに、働き蜂自身は産卵をせず、女王蜂の産卵と幼虫の世話して一生を終える。これは、ダーウィン進化論の基本原則と一致せず (ダーウィンの進化論では、適応度は「生物個体が生んだ次世代の子の数」と定義され、働き蜂は自分の子孫を残さないため適応度は0となり進化しないことになる)、ハミルトンの血縁淘汰説等を代表とする新たな社会性進化理論を生み出した<sup>1)</sup>。

働き蜂は、脳内において約100万の神経細胞しか持たないが、高い記憶・学習能力、及び脊

KADOWAKI Tatsuhiko<sup>1</sup>, KIMURA Kiyoshi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>〒464-8601 名古屋市千種区不老町

<sup>2</sup>〒305-0901 茨城県つくば市池の台2

椎動物と同等な高い認知能力 (例えば、概念の学習)を示す。ミツバチの生存は、時間および空間的に限定された資源である花に完全に依存している。したがって、働き蜂は、花の色、形、位置、および周囲の風景を記憶・学習することが必須であり、さらに良い花の位置を収穫ダンスによって巣仲間に伝達することにより、群単位で効率的な花粉と花蜜の収穫を可能としている。

このようにミツバチは、動物の社会性進化、ゲノムによる社会性行動の制御、社会環境によるゲノム構造と機能の制御、認知能力、Polyphenism、寿命等を遺伝子レベルで解明するためのモデルシステムと考えることができる。また、ミツバチが受粉動物として農業生産および地球環境において重要な役割を担うことは明らかである。さらに、1956年にブラジルで誕生した、セイヨウミツバチとアフリカミツバチのハイブリッド、通称キラービーは、攻撃性が極めて高く、かつ、アメリカ大陸において、在来種を駆逐し急速にその生息範囲を拡大している。この現象を解明するため、セイヨウミツバチとキラービーのゲノム配列の比較に基づくSNPマップの作成は有用である。

以上の背景に基づき、ミツバチゲノムプロジェクトが2003年から米国で開始され、昨年国際ミツバチゲノム解読コンソーシアムによりその解読結果が報告された<sup>2)</sup>。ショウジョウバエ、ハマダラカ、カイコガに続くゲノムの解読であり、昆虫ゲノム研究の新たな展開が予想される。

## 2. ミツバチゲノムの特徴と進化

1匹の女王蜂に由来する複数の雄ミツバチ(1倍体)からゲノムDNAが抽出され、WGS(Whole genome shotgun)とBACライブラリー配列の組合せにより、最終的に231 MbのゲノムDNA配列が決定された。この配列には、99%のSTSマーカー、及び98%のEST配列が含まれていることから、ミツバチの全ゲノムサイズ(ライブラリーとしてクローニング可能なもの)は231 Mb/98%=236 Mb(EST配列に基づく)と推定される。これは、核のフローサイトメトリー解析から予想された1倍体ゲノムサイズ(約260 Mb)の91%に相当する。また、ミツバチの非常に高い相同組替え頻度(19センチモルガン/Mb)に基づく連鎖地図上のマイクロサテライトマーカーの位置を利用し、79%(186 Mb)のゲノム配列が16本の染色体上にマップされた。

ミツバチゲノムDNAのAT含量は他の昆虫ゲノムに比べ非常に高い(ミツバチのAT含量は73%、ショウジョウバエが68%、ハマダラカが66%)。したがって、遺伝子もゲノム中のATに富む領域に存在する傾向が高く、ミツバチ、ショウジョウバエ、ハマダラカのゲノム中で遺伝子が存在するDNA領域の平均AT含量は、それぞれ71, 56, 53%である。これらの特徴は、ミツバチが3つのDNAメチル化酵素遺伝子を持つことが1つの要因として考えられる(ショウジョウバエとハマダラカでは1遺伝子のみ存在する)。

ミツバチの各染色体の長腕末端に存在するテロメア配列は、各テロメア間で70~92%の相同性を示す3~4 kbのサブテロメア領域と、数kbのTTAGG反復配列から成る。これは、多数の非LTR型レトロトランスポゾンが挿入した複雑なショウジョウバエ<sup>3)</sup>やカイコガ<sup>4)</sup>のテロメア配列と対照的であり、昆虫の中で最も簡略かつ一定な構造を持つ。ミツバチゲノムにはMarinerファミリーに属するトランスポゾンのみが存在し(ゲノムの1%を占める)、

PiggyBac, P因子等の主要なトランスポゾンは存在しない。また、数種のレトロトランスポゾン(LTRと非LTR型の両方)のDNA断片はゲノム中に検出されるが、転移活性を持つレトロトランスポゾンは存在しない。これは、多くの活性型レトロトランスポゾンを持つ他の昆虫ゲノムと対照的である。

昆虫ゲノム間における遺伝子の並びはランダムであり、進化上の選択圧は殆ど存在しなかったと考えられる。ミツバチとショウジョウバエ、または、ハマダラカとの間で、遺伝子の局所的な並び(Microsynteny)が保存されているケースは10%にすぎず、3種間の比較では7%以下である。これはDNA配列からみてショウジョウバエとミツバチ間に匹敵する進化距離を持つニワトリとヒトのゲノムでは85%が保存されているのと対照的である<sup>5)</sup>。しかし例外として、ホメオボックス遺伝子と幾つかの嗅覚受容体遺伝子の染色体上の位置は、ミツバチとショウジョウバエで良く保存されている。

ミツバチの全遺伝子の中で、約30%は全ての動物において1コピーが存在し、これらが動物のコア遺伝子である。また、1052個の遺伝子が、ミツバチ、ショウジョウバエ、ハマダラカのゲノム中にのみ保存されており、これらは昆虫特異的な機能を担うと推定される。同様に、3816個の遺伝子がヒトを含む3種の脊椎動物にのみ保存されており、脊椎動物に特異的な遺伝子プールは昆虫に比べ複雑であることがわかる。上記3種の昆虫とヒトで保存されている2404個の遺伝子に関して、ミツバチとヒトの相同性は47.5%、ショウジョウバエとヒトの相同性は44.5%、ハマダラカとヒトの相同性は46.6%である。この結果は、ショウジョウバエの進化速度が最も速く、ミツバチが最も遅いことを示唆する。さらに、ヒトと3種いずれかの昆虫ゲノム中で保存されている遺伝子の割合は、ミツバチで最も高い。同様に、脊椎動物と3種の昆虫で保存されている特定の遺伝子において、双翅目昆虫では非常に多くのイントロンが欠失しているが、ミツバチでは80%のイントロンが残存

している。以上の結果は、動物の起原となった生物のゲノムにはイントロンに富む多くの遺伝子が存在していたが<sup>6)</sup>、進化速度の速い昆虫ではこれらの遺伝子の欠失または簡略化（イントロンの除去）が進行し、この過程がミツバチに

おいて最も遅かったと推定される（図1）。

ミツバチの遺伝子を機能により分類し、他の昆虫と比較した結果が図2である。ミツバチでは、嗅覚受容体、ローヤルゼリータンパク質遺伝子の増加が顕著である。ミツバチでは、フェ

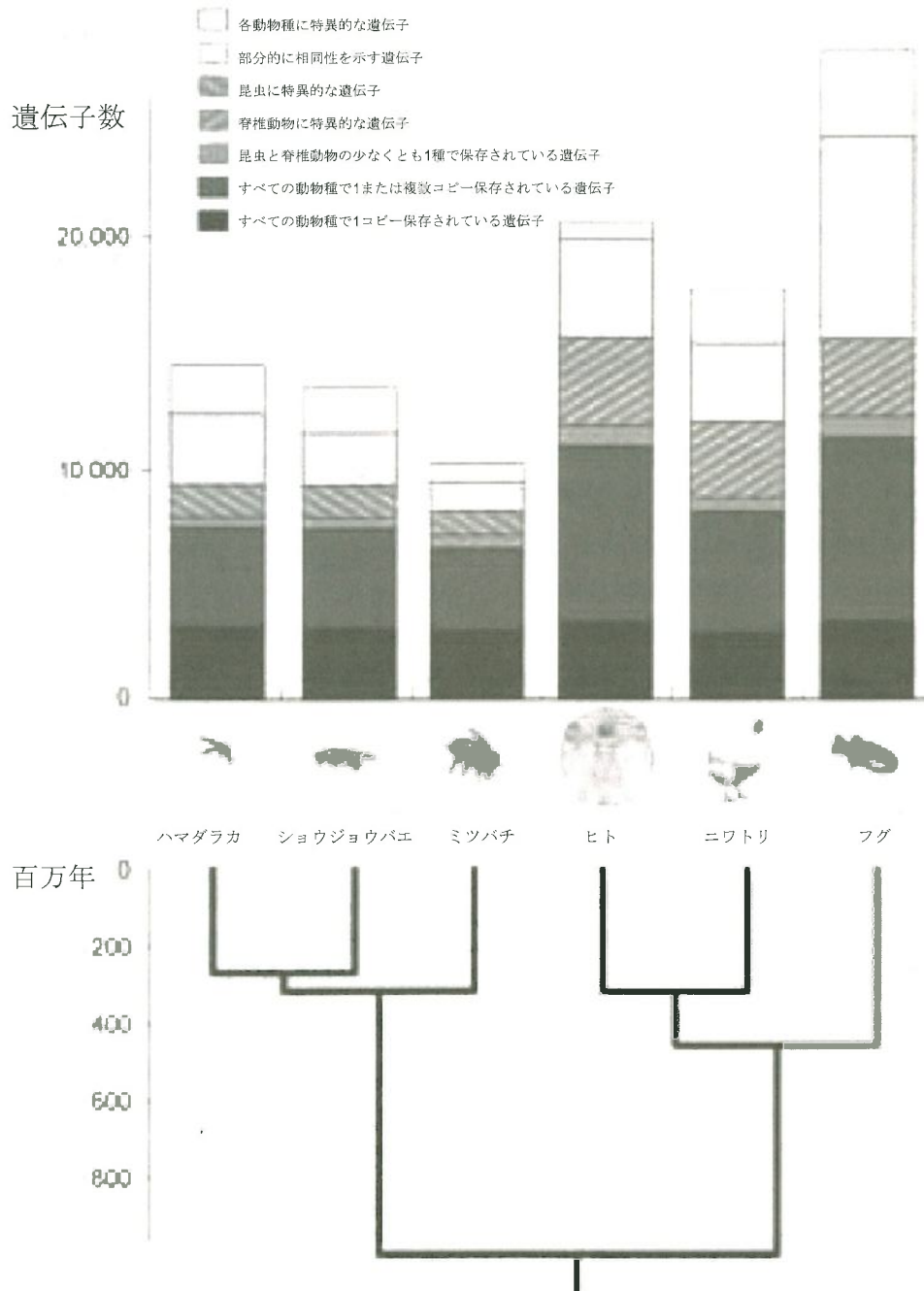


図1 昆虫と脊椎動物の遺伝子相同性に基づく分類

ハマダラカ、ショウジョウバエ、ミツバチ、ヒト、ニワトリ、フグのタンパク質をコードする全遺伝子について、種間の相同性に基づき分類した結果。グラフ中の下2つのカテゴリーは、全ての動物に共通する遺伝子を示す。昆虫に特異的な遺伝子の数は、脊椎動物に特異的な遺伝子に比べ少ない。また、特定の脊椎動物と昆虫でのみ保存されている遺伝子の割合は、昆虫の中ではミツバチで最も高い。各動物種の系統樹と進化距離も示す。文献2)より転載、改変。



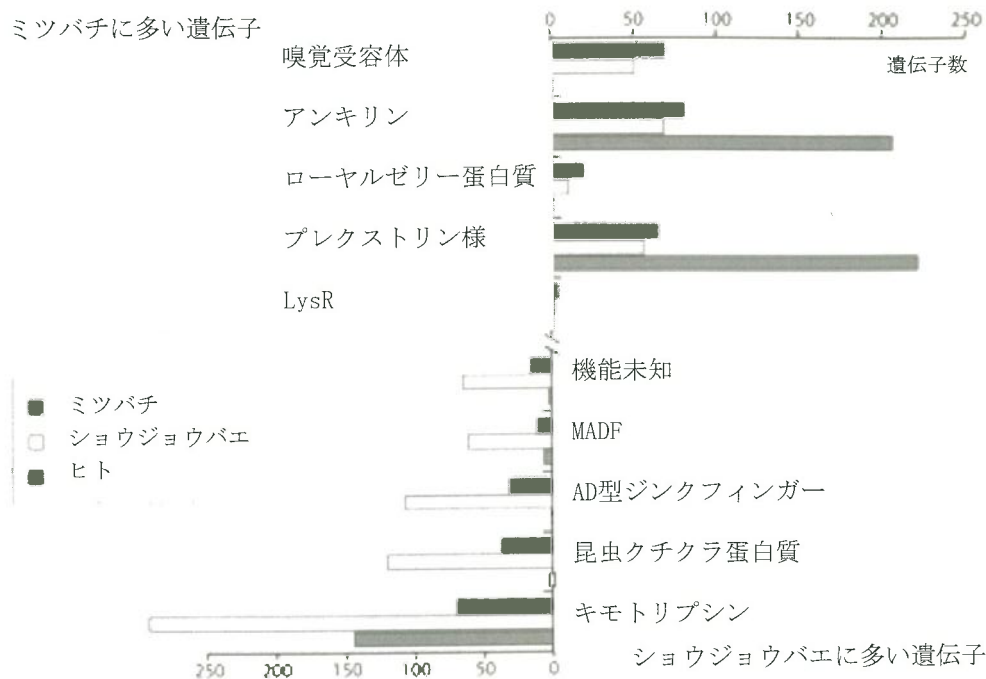


図2 ミツバチとショウジョウバエで増減しているタンパク質ファミリーまたはドメイン

ミツバチ、ショウジョウバエ、及びヒトにおいて、最も増減が顕著な10個のタンパク質ファミリーまたはドメインを示す。上下それぞれ5つのタンパク質ファミリーとドメインは、ショウジョウバエに比べミツバチで増加（上）、あるいは、減少（下）しているものを示す。文献2）より転載、改変。

ロモンを代表とする匂いを介する個体間コミュニケーションや、様々な花の香りの識別を支えるため、多数の嗅覚受容体遺伝子が存在すると考えられる。ローヤルゼリータンパク質は女王蜂幼虫の生育に必須な栄養源である。また、ミツバチでは、味覚受容体、クチクラタンパク質、解毒酵素、免疫系タンパク質をコードする遺伝子が減少している。これらは、ミツバチの幼虫が巣内という働き蜂により厳密にコントロールされた環境下で養育されるためであると推定できる。以上の結果は、動物種特有の形質（多様性）の進化過程において、特定の遺伝子の増加と減少を伴うことを示す。

### 3. ミツバチの新しい疾病CCDについて

2006年秋から2007年春にかけて、米国の22の州において、養蜂家が管理、飼育しているミツバチコロニーの大規模な消滅（30～90%）が報告された。この消滅現象は、現在、Colony Collapse Disorder (CCD) と呼称されている。

さらに、CCDと同様な現象が米国だけでなくヨーロッパにおいても報告されていることから、CCDは世界各国において認知され始めている。CCDの症状は、現在までに確認されているミツバチの病気や感染症と明らかに異なっている。すなわち、コロニー内には、女王蜂、大量の幼虫、蛹、蜂蜜、および花粉が存在するにも関わらず、非常に少数の働き蜂しか見出されない（図3）。最近、CCDの原因としてオーストラリアから大量輸入されたミツバチに由来するIsraeli acute paralysis virus of bees (IAPV) による感染が示唆されたが<sup>7)</sup>、様々な矛盾する点が指摘されており<sup>8)</sup>、確実ではない。CCDのその他の原因として、1) コロニーの栄養不足、2) 害虫駆除用の農薬の影響、3) ウイルス、細菌、カビ、ダニ等の感染と寄生による病気、および免疫力の低下、4) 遺伝子組み換え作物の影響、5) 農作物の受粉を目的としたコロニーの長距離移動の影響、が想定されている。今回のゲノムプロジェクトによりミツバチの免疫やストレス反応に関与する遺伝子が

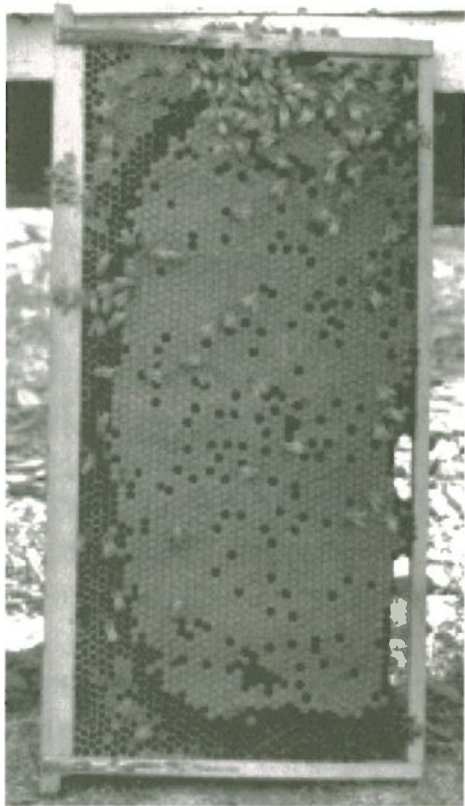


図3 CCD症状のコロニーの巣板

巣板には多数の蛹が存在しているが、非常に少数の働き蜂（羽化直後の若い働き蜂）しか見出されない。Oldroyd, B. P. (2007), *PLoS Biol.*, 5, e168より転載。

同定されているので、CCDコロニーのミツバチにおけるこれらの遺伝子の発現解析等からCCDの原因解明が可能であろう。

#### 4. おわりに

ミツバチの示す幾つかの社会性行動には顕著な個体差が存在する。例えば、外勤蜂による花粉と花蜜の採取指向性や防御行動等であり、これらの行動に影響を及ぼす幾つかのQTLも既にマッピングされている<sup>9)</sup>。したがって今後、ミツバチゲノムDNA配列を利用することにより、これらQTLの候補遺伝子を同定することができる。また、ミツバチの社会形成に参与する多くの複雑な形質の遺伝子基盤の解明が期待でき、さらに、動物の社会性の起原と維持のメカニズムに関しても遺伝子レベルで解析することが可能となる。これらの結果は、地球環境と

農業生産に大きな影響を及ぼす受粉動物としてのミツバチの機能向上にも適用できる。また、アメリカ大陸におけるキラービー生息域の拡大のメカニズムは、我が国における特定外来種の拡大及びその防止策に応用可能である。

ミツバチでは、染色体倍数による雌雄決定、女王蜂の空中における多回交尾等により、通常の遺伝学的解析（変異体の分離と維持、トランスジェニックの作製）は極めて難しい。したがって、現在までに報告されているRNA干渉法の成功例は非常に少なく<sup>10~13)</sup>、特定遺伝子の機能解析のためにRNA干渉法の確立は今後の重要な課題である。

#### 文 献

- 1) Hamilton, W. D. (1964), *J. Theor. Biol.*, 7, 1-52
- 2) The honey bee genome sequencing consortium. (2006), *Nature*, 443, 931-949
- 3) Fujiwara, H. et al. (2005), *Chromosome Res.*, 13, 455-467
- 4) Biessmann, H. et al. (2005), *Genetics*, 171, 1767-1777
- 5) Zdobnov, E. M. et al. (2005), *FEBS Lett.*, 579, 3355-3361
- 6) Raible, F. et al. (2005), *Science*, 310, 1325-1326
- 7) Cox-Foster, D. L. et al. (2007), *Science*, 318, 283-287
- 8) Stokstad, E. (2007), *Science*, 317, 1304-1305
- 9) Ruppell, O. et al. (2004), *J. Hered.*, 95, 481-491
- 10) Beye, M. et al. (2002), *Insect Mol. Biol.*, 11, 527-532
- 11) Amdam, G. V. et al. (2003), *BMC Biotechnol.*, 3, 1-8
- 12) Beye, M. et al. (2003), *Cell*, 114, 419-429
- 13) Farooqui, T. et al. (2004), *J. Insect Physiol.*, 50, 701-713

## ◀総説関連情報▶

## ミツバチゲノム解析と養蜂への応用 — 抗菌ペプチドの理解とその応用 —

<sup>1</sup>独立行政法人 農業生物資源研究所 昆虫科学研究領域  
生体防御研究ユニット 日本学術振興会特別研究員、

<sup>2</sup>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  
家畜育種増殖研究チーム みつばちグループ

芳山 三喜雄<sup>1</sup>・木村 澄<sup>2</sup>

ミツバチは農業昆虫として、また学習、記憶のモデル動物として、その重要性からゲノム解読を進めるべき生物に選ばれ全塩基配列が解読された。解読終了から一年近くたち、本格的にゲノム情報を利用した研究が進んできた。ゲノムの成果を活かす一つの方法として、抗菌（性）ペプチドを利用した抗病性育種への応用の可能性について紹介する。

### 1. はじめに

養蜂業において最も重要な生産物は現在でも、蜂蜜であり、生産量も増加傾向にある。また、蜂蠟、ローヤルゼリー、プロポリスなどの養蜂産物も自然食品として注目されている。さらに、ミツバチは農作物の花粉媒介昆虫として重要な働きも担っている。アメリカでは90種以上の主要な商業作物がミツバチの花粉媒介に依存しており、その経済価値は14億ドルと推定されている<sup>1)</sup>。我が国においても、イチゴ、メロンなどの施設園芸、ミカンなどの路地栽培の花粉媒介昆虫として広く利用されている。また園芸現場で広く使われているセイヨウオオマルハナバチが外来生物法（特定外来生物による生態系等に係わる被害の防止に関する法律）施行により、逃避への対策が一層求められるようになり、今までマルハナバチによって受粉していたナスなどで、ミツバチを代替利用できないかが検討されている<sup>2)</sup>。

このようにミツバチは、その重要性が昨今再認識されているにもかかわらず、その健全性に YOSHIYAMA Mikio<sup>1</sup>, KIMURA Kiyoshi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>〒305-8634 つくば市大わし1-2

<sup>2</sup>〒305-0901 つくば市池の台2

についての研究が十分に進んでいるとはいえない。今後20年間で、主に感染によりミツバチのコロニーは約30%減ると推測されている<sup>3)</sup>。なかでもアメリカ腐蛆病（American Foulbrood: AFB）は、ミツバチの病害虫では最も大きな被害を引き起こしている。また、ミツバチヘギイタダニの寄生によって、養蜂業は大きな打撃を被っている。さらに総説（1ページ）でも触れたようにCCDが新たな問題として生じてきた。

このように養蜂における最も早急に解決すべき問題の一つが健全性の問題であることが明らかである。その対策のなかでも特にゲノムの全解読をうけゲノムからのアプローチに期待が集まっている。今まで遺伝情報の不足から健全性の問題に対して、遺伝子からのアプローチは殆ど不可能であったが、ゲノム情報を得たことで疾病などに関与する遺伝子の解析が行えるようになった。他の昆虫同様、疾病には先天性免疫（innate immunity：自然免疫ともいう）関連遺伝子が大きく関係していることが明らかであるので、これらの遺伝子群を解析することで、抗病性をミツバチに付加するなど有望な抗病性育種が可能である。特に抗菌ペプチドは先天性免疫遺伝子カスケードの最終産物で、病気への防



御に最も重要な役目を担っているので、ミツバチの抗菌ペプチドの発現プロファイルを明らかにすることは、抗病性育種に資すると考えられる。

## 2. ミツバチの抗菌ペプチド

### (1) ミツバチゲノムで明らかになった先天性免疫遺伝子の特徴

ゲノム解析によっていくつかの興味深いミツバチゲノムの特徴が明らかになった。最も際だった特徴の一つに、先天性免疫関連遺伝子などの生体防御関連遺伝子の総数が非常に少ないということがあげられる。ミツバチは一つの巢内に数万の個体が、常に35℃前後に保たれた多湿な閉鎖環境にいることから、病原菌等の感染に好都合であり、その防御のため、先天性免疫関連遺伝子などが他の昆虫より多いと考えられていた。しかし、ミツバチではショウジョウバエなどの他の昆虫で知られている多くの免疫遺伝子が発見されなかった。これはただ単にゲノムには存在していても、現在のデータベースから欠落していたり、アノテーションのプロセスで拾えなかった可能性も否定できないが、むしろこれは、ミツバチは社会性昆虫であるので、清掃行動や互いのグルーミングなどの行動を通しコロニー全体としての外敵に対する防衛の働きを持つということも大きいと考えられる。しかし、清掃行動のみではすべての防御機構システムを説明できないことは明らかである。ミツバチは他の昆虫と異なった遺伝子発現をしている可能性や、新たな免疫系の存在の可能性も否定できない。更にミツバチは、“巣”という特殊な閉鎖環境下で特定の病原菌をターゲットにした免疫システムを共進化させてきたためかもしれない。何故数が少ないかは、更なる研究の深化が必要である。

### (2) 昆虫の抗菌ペプチドによる防御反応とミツバチ抗菌ペプチドの特徴

昆虫の生体防御機構は脊椎動物にみられるよ

うな抗原抗体反応ではなく、強力な先天性免疫機構を備えており、この防御系を進化させることで外敵から身を守っている。この免疫機構は、細胞性防御反応と液性防御反応という2つの大きなグループに分けられる。前者として、食細胞による貪食や血球の包囲化作用などが挙げられる。後者としては抗菌ペプチドやメラニン化がある<sup>4)</sup>。抗菌ペプチドは、先天性免疫機構の中で最終産物であり防御系で最も重要な役割を担っている。抗菌ペプチドは低分子のタンパク質で、細菌の侵入に対して脂肪体や血球で発現誘導され体液中に分泌される。耐熱性で、幅広い抗菌スペクトルを持つことが特徴である。

### (3) 抗菌ペプチドの種類

現在まで180種以上の抗菌ペプチドが様々な昆虫種から発見されている。一般に抗菌ペプチドは構造からいくつかのグループに分けられる(表1)<sup>5)</sup>。代表的なものは以下の4つのタイプである。それぞれのタイプは共通した抗菌スペクトル等を有するが、個別に異なった機能を持つ場合も多い。

#### 1) セクロピンタイプ

セクロピア蚕の抗菌ペプチドであるセクロピンに類似した抗菌ペプチドで、主にグラム陰性菌に抗菌活性を示すものが多い。双翅目と鱗翅目から単離されているが、現在までミツバチからは報告されていない。

#### 2) 高システイン含有タイプ

このグループは昆虫ディフェンシンとも呼ばれ、最も多くの昆虫種から単離されているものである。ミツバチのディフェンシン1は当初はロイヤリシンという名で、ロイヤルゼリーから分離、同定されたペプチドでありグラム陽性菌に強い殺菌効果を示す。またディフェンシン1と同じ長さだが、1残基のアミノ酸置換が生じているディフェンシン2も単離されている。

#### 3) 高グリシン含有タイプ

このグループはアタシタイプとも呼ばれる。増殖期のグラム陰性細菌の細胞壁合成阻害を引き起こすことが分かっている。ミツバチで

表1 昆虫から単離された主な抗菌ペプチド

タイプ	ペプチド名	昆虫種	アミノ酸数	構造特徴, 分子量
セクロピン	セクロピン A, B, D~G	セクロピア蚕	37	両親媒性
	ザルコトキシシン IA, IB, IC	センチニクバエ	39	$\alpha$ ヘリックス
	セクロピン A1, A2, B	キイロショウジョウバエ	34	(4kDa)
高システイン含有	ディフェンシン 1(defensin)	セイヨウミツバチ	51	ループ, $\alpha$ ヘリックス
	ディフェンシン 2(defensin)	セイヨウミツバチ	43	$\beta$ シート
	ザーベシン, ザーベシン B, C,	センチニクバエ	34, 40	ジスルフィド結合
	ドロソミシン	キイロショウジョウバエ	44	(4kDa)
	ディフェンシン	カブトムシ	43	
高グリシン含有	ヒメノプタエシン(hymenoptaecin)	セイヨウミツバチ	93	高グリシン含有率
	アタシン	カイコ	188	システイン含まず
	アタシン	キイロショウジョウバエ	190	(10kDa)
	コレオプテリシン A, B	カブトムシ	72	
高プロリン含有	アバエシン(abaecin)	セイヨウミツバチ	34	高プロリン含有率
	アピダエシン(apidaecin)	セイヨウミツバチ	18	システイン含まず
	レボシン 1~4	カイコ	32	(2-3kDa)
	ドロソシン	キイロショウジョウバエ	19	

発見されたヒメノプタエシンは93残基と分子量が大きく、グラム陰性、陽性細菌双方に対してよく機能する。他の抗菌ペプチドと異なり、昆虫体液に近い高塩濃度でも活性が落ちないという大きな特徴を持っている。

#### 4) 高プロリン含有タイプ

このタイプの多くがグラム陰性細菌に活性を持つペプチドで、ミツバチではアバエシンとアピダエシンがここに分類される。アバエシンは34アミノ残基のうち10のプロリンを含むペプチドで、グラム陰性菌に弱い効力を示す。アピダエシンは、分子量 2 kDaの18アミノ残基からなる短いペプチドで主にグラム陰性菌に作用する。他の抗菌ペプチドと比べ36時間以上と発現時間が長いという特徴も持つ。

#### (4) 発現誘導機構

殆どの抗菌ペプチド遺伝子は、通常は発現しておらず、体表の損傷、細菌の侵入に際し、短時間で主に脂肪体や血球において誘導発現する。細菌の細胞壁構成成分であるリポポリサッカライド、ペプチドグリカンなどが引き金とな

り、いずれかの経路によってシグナルが伝達され、抗菌ペプチドが発現する。

昆虫で最も研究の進んでいるショウジョウバエの抗菌ペプチド遺伝子のシグナル伝達機構のうち、代表的なToll経路、imd経路の2つの系を図1, 2に示した。

グラム陽性菌によるToll経路の活性化は、PGRPやGNBP1によるペプチドグリカンの認識から始まり<sup>6) 7) 8)</sup>その後、下流へのシグナルが伝達され最終的な抗菌ペプチド遺伝子の発現へと続く。

グラム陰性菌にはimd経路が機能し、自然免疫が賦活化する。imd経路で活性化される抗菌ペプチドは現在まで報告されていない。

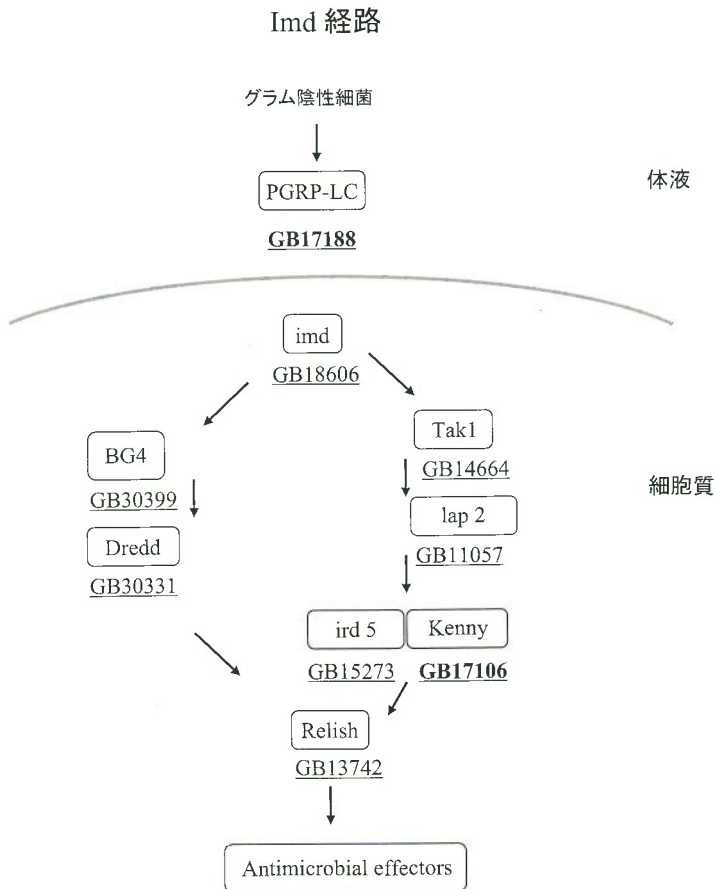
ミツバチにおいても(図中でGB番号で表記)ショウジョウバエと同様の遺伝子が存在し、同様の経路でシグナルが伝達されると考えられる。

### 3. アメリカ腐蛆病をどう克服するか

先にも述べたようにアメリカ腐蛆病は世界の







Evansら(2006)から改変

図2 ミツバチにおけるimd経路の候補因子

GBはショウジョウバエ遺伝子に対するミツバチホモログのゲノムの登録番号、太字は感染後、転写が上昇した因子を示す。

#### 4. 終わりに

ミツバチ免疫系遺伝子を利用し免疫機能を向上させることで、病虫害を予防し、群勢の向上や活発な受粉活動など養蜂生産に活かす事が実際に可能な段階に入ってきている。このようなゲノムをベースにした遺伝改良のアプローチは他の分野にも応用が可能である。例えば、本稿ではアメリカ腐蛆病へのアプローチのみについて触れたが、ヘギイタダニの寄生でアバエシンとディフェンシンの発現が抑制されるという報

告もあり<sup>13)</sup>、養蜂におけるもう一つの障害である、ミツバチヘギイタダニの防除にも利用できる可能性がある。さらにCCDの原因の一つとして免疫の低下の可能性も指摘されており<sup>14)</sup>、同様なアプローチでCCDの解明も期待される。

#### 文献

- 1) Morse, R. A. and Calderone, N. W. (2000), *Beeculture*, <http://www.masterbeekeeper.org/pdf/pollination.pdf>
- 2) 宮本 雅章ら (2006), *日本応用動物昆虫学会誌*, 50, 297-304
- 3) Check, E. (2006), *Nature*, 443, 893
- 4) Gillespie, J. P. et al. (1997), *Annu. Rev. Entomol.*, 42, 611-643
- 5) 古川誠一, 山川稔 (2004), *化学と生物*, 42, 15-21
- 6) Gottar, M., et al. (2002), *Nature*, 416, 640-644
- 7) Pili-Floury, S. et al. (2004), *J. Biol. Chem.*, 279, 12848-12853
- 8) Bischoff, V., C. et al. (2004), *Nat. Immunol.*, 5, 1175-1180.
- 9) Evans, J.D. (2003), *J. Invertebr. Pathol.*, 83, 46-50
- 10) Spivak, M and Reuter, G. S. (2001), *Apidologie*, 32, 555-565
- 11) Aronstein, K. et al. (2006), *J. Apic. Res. and Bee World*, 45, 20-24
- 12) Evans, J.D. (2004), *J. Invertebr. Pathol.*, 85, 105-111
- 13) Gregory, P.G. et al. (2005), *J. Insect Sci.*, 5, 1-5
- 14) Oldroyd, B. P. (2007), *PloS Biol.*, 5, e168

◀国内情報▶

## コールドチェーンフリー経口ワクチン としてのワクチン発現米の開発

<sup>1</sup>東京大学 医科学研究所 炎症免疫学分野，  
<sup>2</sup>独立行政法人 農業生物資源研究所 遺伝子組換え作物開発センター，  
<sup>3</sup>京都府立大学 大学院農学研究科 遺伝子工学研究室  
幸 義和<sup>1</sup>・野地 智法<sup>1</sup>・高木 英典<sup>2</sup>・高岩 文雄<sup>2</sup>・  
増村 威宏<sup>3</sup>・田中 國介<sup>3</sup>・清野 宏<sup>1</sup>

ワクチン接種を世界規模で実施するには注射の必要のない長期常温保存可能なワクチンを開発する必要がある。我々は、今回イネ種子にワクチン抗原としてコレラ菌が産生するコレラ毒素構成成分で、無毒のコレラトキシンBサブユニット（CTB）を発現・集積させた遺伝子組換え米を作出し、その米粉末を経口投与することで毒素防御免疫を誘導することに成功した。精製の必要のない米型ワクチンは投与時に注射針・注射器を必要とせず、保存時にも冷蔵庫を必要としないコールドチェーンフリー経口ワクチンであり、感染症やバイオテロ対策ワクチンとして使用できるグローバルワクチンとなりうる可能性が示された。

### 1. はじめに

インフルエンザ，SARS（Severe Acute Respiratory Syndrome：重症急性呼吸器感染症），エイズ，結核，コレラ菌・病原性大腸菌等の新興再興感染症を引き起こす病原微生物は，呼吸器・消化器・生殖器などを被う粘膜面を介して侵入してくる。感染防御戦略を考えると，それら感染源の最初の侵入部位である粘膜面での防御が必須である事は言うまでもない。にもかかわらず，現在主流である注射によるワクチンでは，体の中には防御免疫が誘導できるが，侵入門とである粘膜には効果的に免疫を誘導できないため，これら多くの感染症を引き起こす病原微生物をその入口である粘膜で防御することができない。

YUKI Yoshikazu<sup>1</sup>，NOCHI Tomonori<sup>1</sup>，  
TAKAGI Hidenori<sup>2</sup>，TAKAIWA Fumio<sup>2</sup>，  
MASUMURA Takehiro<sup>3</sup>，TANAKA Kunisuke<sup>3</sup>，  
KIYONO Hiroshi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1

<sup>2</sup>〒305-8602 つくば市観音台2-1-2

<sup>3</sup>〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町1-5

粘膜ワクチンは粘膜面に感染源侵入阻止と体内防御の両方が誘導できるため，エイズ等の新興・再興感染症はもとより天然痘やボツリヌス毒素等のバイオテロにも使用が危惧される病原微生物対策確立の切り札となるグローバルワクチンとして注目されている<sup>1, 2)</sup>。実際，ビル&マリンダ・ゲーツ財団や米国NIHは将来のグローバルワクチンとして粘膜ワクチンの可能性に大きな期待をもってその開発を促す提案をしている<sup>3)</sup>。現行のワクチンが低価格になりえない原因の一つに常温で保存できないこと，即ち冷蔵保存・冷蔵輸送（コールドチェーン）の必要性が挙げられている。コールドチェーンに必要なコストは年間約300億円程度が見積もられている。粘膜ワクチンのもうひとつの利点は注射器や注射針が必要ないことで，注射ワクチンは医療産業廃棄物としての環境汚染そして発展途上国での不適切な再使用での二次感染が問題になり，その社会的・経済的損失も計りしれない。この課題を克服したグローバル経口ワクチン開発に向けて植物発現システムの応用は魅力的である。

## 2. なぜ米型ワクチンなのか？

粘膜ワクチン抗原の植物での製造は多くの利点がある。まずは従来の培養タンクでの組換えワクチン抗原の製造に比して、低コストで製造できる。次に、植物で製造する場合、ワクチンを精製せずにそのまま経口投与が可能となる。さらに、植物発現系は一般に動物に感染する細菌・ウイルスの感染がなく、生物学的汚染を少なくできる。その為、90年代からタバコ・ジャガイモ等の植物で、細菌下痢抗原、B型肝炎ウイルス抗原およびノロウイルス抗原等の多くの抗原が発現され、“食べるワクチン”の可能性が示されてきた<sup>4)</sup>。しかしながら、これらの植物型ワクチンは常温で長期間保存することはできないし、経口投与した場合、胃腸での過酷な消化条件での安定性にも問題があり、効果的に粘膜免疫を誘導するために腸管粘膜に散在する腸管関連リンパ組織にワクチン抗原を送達することが難しい。さらに、ワクチンが医薬品であることを考慮すると医療関係者の指導・監督がない状況で、一般的感覚の「植物を食べる」という形式での接種は難しい。

我々は今回、米の有する蛋白発現貯蔵システムに注目し、米にワクチン抗原を発現させた経口ワクチンを開発した<sup>5)</sup>。この米型経口ワクチンは他の植物生産型ワクチンを含む既存の粘膜ワクチンに比べて実用上多くの利点がある。米型ワクチンは常温で長期安定であり、消化酵素に対して耐性が付与され、経口投与された場合に、効果的に発現ワクチン抗原を腸管関連リンパ組織に送達することにより、抗原特異的の中和抗体を誘導することができる。つまり、冷蔵・注射器・注射針不要ワクチンとして使えることになる。

## 3. コレラトキシンBサブユニット (CTB) 発現米の作出

腸管感染症の一つであるコレラの病原因子として知られているコレラ毒素の構成成分で、無毒のCTBを、粘膜免疫と全身系の免疫の両方を誘導でき且つイネ胚乳細胞特異的発現系での抗原の発現・蓄積の可能性を調べるプロトタイプ用ワクチン抗原として選択した。図1に示すようにコドンを一ネ種子に最適化したCTB遺

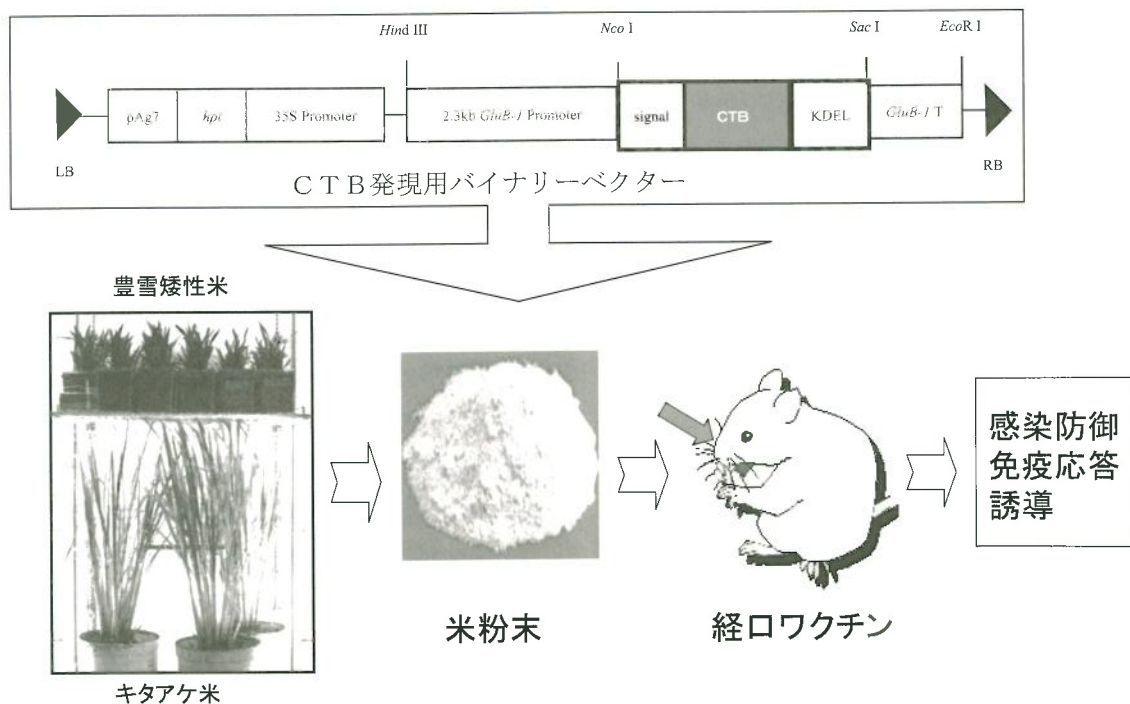


図1 CTB発現米の作出とワクチン米粉末の投与実験



伝子に胚乳特異的プロモーター及びシグナルペプチドを結合させたDNA配列を含むバイナリーベクター（pGPTV-35S-HPT）を運ぶ *Agrobacterium tumefaciens* を、イネカルスに遺伝子導入することで、CTB発現米（キタアケ及び豊雪米）を作出した。豊雪米はジベレリン合成系の自然変異体で草丈20cm、3ヶ月で完熟種子が収穫可能な矮性米である（図1）。両者とも作出された遺伝子組換え米のゲノムにはCTBの遺伝子が導入されていること、更に、CTBのmRNAの高発現されていることが確認された<sup>5)</sup>。さらに米にCTBが発現されていることをSDS-PAGEおよびCTB特異的抗体を用いた抗体染色により確認した。CTBは本来5量体を形成しているが、米に発現しているCTBも5量体を形成していることを非還元条件下のSDS-PAGEおよび抗体染色により確認できた<sup>5)</sup>。

#### 4. CTB発現米はペプシン消化耐性である

CTBの発現はイネ胚乳細胞特異的発現プロモーターの制御下にある。そこで、実際に発現された米の胚乳細胞におけるCTBの局在を電子顕微鏡下での抗体染色にて確認したところ、蛋白貯蔵体に特異的に発現していることが確認できた<sup>5)</sup>。イネの胚乳細胞には通常見られる酸・アルカリに良く溶ける蛋白であるグルテリンやグロブリンが蓄積している2型貯蔵体のほかに、イネ特異的な有機溶媒系にしか溶けない蛋白であるプロラミンが蓄積している1型所蔵体があるが、CTBはその両方の蛋白所蔵体に発現・蓄積されていた。特に1型所蔵体にはCTBがその表層に局在を示しているのに対して、2型貯蔵体にはその内部にも局在が確認された。経口でワクチンを投与した場合に、胃腸での蛋白分解酵素で分解をうける可能性が従来から指摘されているが、蛋白貯蔵体に蓄積しているCTBが消化耐性を示すかどうかを調べるために、試験管内で米粉末の懸濁液に消化酵素であるペプシンを加えては反応させた後に、CTB、グルテリン、プロラミン各々に特異的

な抗体を用いてSDS-PAGEおよび抗体染色を行なった。その結果、グルテリンは90%以上消化されており、プロラミンはほとんど消化されないことが確認されたが、興味あることにCTBの大半（約75%程度）は消化されずに残っており、消化酵素耐性が蛋白貯蔵体の局在に依存していることが裏付けられた<sup>5)</sup>。

#### 5. CTB発現米は粘膜誘導組織から取り込まれ毒素中和抗体を誘導する

イネ種子胚乳細胞の蛋白貯蔵体の中でも1型の大半は胃での消化分解を免れて腸管に到達すると考えられる。粘膜免疫を介して効率よく抗原特異的免疫応答を誘導するためには腸管の粘膜誘導組織であるパイエル板の特殊上皮層に存在する抗原取り込み細胞であるM細胞から取り込まれることが必要である。そこで、CTB発現米を微粉末化して懸濁した後に、腸管に直接投与後、30分で組織を取り出して、洗浄・固定してCTB特異的抗体で組織染色を行なった。同時にM細胞の位置を同定するために、同細胞に親和性の強いUEA-1レクチンで連続組織片を染色した。その結果、CTB発現米がM細胞から取り込まれている事を確認した<sup>4)</sup>。このM細胞に認められたCTBが1型蛋白所蔵体であることを証明することは今後の課題である。蛋白貯蔵体は1型が1~2  $\mu\text{m}$ 、2型が2~3  $\mu\text{m}$ 程度であり、このサイズはM細胞から効率よく取り込まれることが知られており、その点からも米蛋白貯蔵体の有用性がうかがえる。

CTB発現米が腸管の粘膜誘導組織から取り込まれる事が証明されたので、次にCTB発現米懸濁液及び比較対照として組換えCTB単品をそれぞれマウスに経口免疫して、血清中の抗原特異的IgG抗体及び糞便中の抗原特異的粘膜IgA抗体を測定した。その結果、血清中の抗原特異的IgG抗体は、両者とも免疫したCTB量に依存して同レベルの抗原特異的抗体も誘導された。一方、抗原特異的粘膜IgA抗体価はCTB発現米のほうが組換えCTBに比較して有意に低

濃度のワクチン投与で有効なレベルの抗原特異的IgA抗体誘導が可能であった<sup>5)</sup>。さらに、図2に示すように、CTB発現米を経口免疫したマウスはコレラ毒素を経口攻撃された場合でも下痢を発症しなかったが、CTBを発現していない米を投与されたマウス群は下痢を発症し、腸管から回収された水分量も多量であった。CTB発現米で免疫した場合は下痢症抑制を反映して、回収水分量は有意に低下していた<sup>5)</sup>。以上のことから、CTB発現米は、粘膜免疫誘導に適したワクチン担体であることが証明された。

## 6. CTB発現米は常温で18ヶ月以上安定である

CTB発現米は作出した時に、定量免疫染色で定量した場合1粒あたりCTBとして10~30  $\mu\text{g}$ を含有していたが、これは全種子蛋白の約2%に当る。導入されたCTB遺伝子のコドンイネ種子に最適化したことにより、導入遺伝子由来の蛋白の高発現が得られた。さて、こうして得られた米を低温(4℃)及び常温(25℃)条件下において18ヶ月乾燥状態で保存して、定期的にその含有量及び抗原特異的粘膜IgAの誘導能を調べたところ、常温18ヶ月保存しても含有量及びIgA抗体誘導能とも、低温保存群に比

較してまったく遜色なかった(表1)。このことからCTB発現米は常温でも乾燥状態であれば長期間安定であることが判明した<sup>4)</sup>。これは世界保健機関(WHO)やビル&メリンダ・ゲイツ財団が求めている注射不用で低温保存施設不要(ニードル及びコールドチェーンフリー)ワクチンの開発概念に当てはまると考えられる。

## 7. 今後の展開

米にワクチン抗原を発現させることで、消化酵素耐性を付与し、粘膜免疫の誘導に有利な特性もち、常温で長期安定な経口ワクチンを開発する理論・技術基盤の確立に成功した。今後、選択マーカーとして使用しているハイグロマイシン耐性遺伝子を取り除いたマーカーフリーワクチン発現米を開発し、さらに発現蓄積量を上げイネ蛋白貯蔵体の特異性の一つであるPB1型により特異的に蓄積されたワクチン発現米を作出することが課題となる。加えて実用化の面では組換えイネの栽培環境および発現ワクチン量の変動を極力抑えるために、完全また部分的(例:特定網室)閉鎖型で且つ管理可能な水耕栽培のシステムを導入した分子農業工場の実用化が次なる課題である。ワクチン発現米を医薬品として開発していく上では、発現されたワク

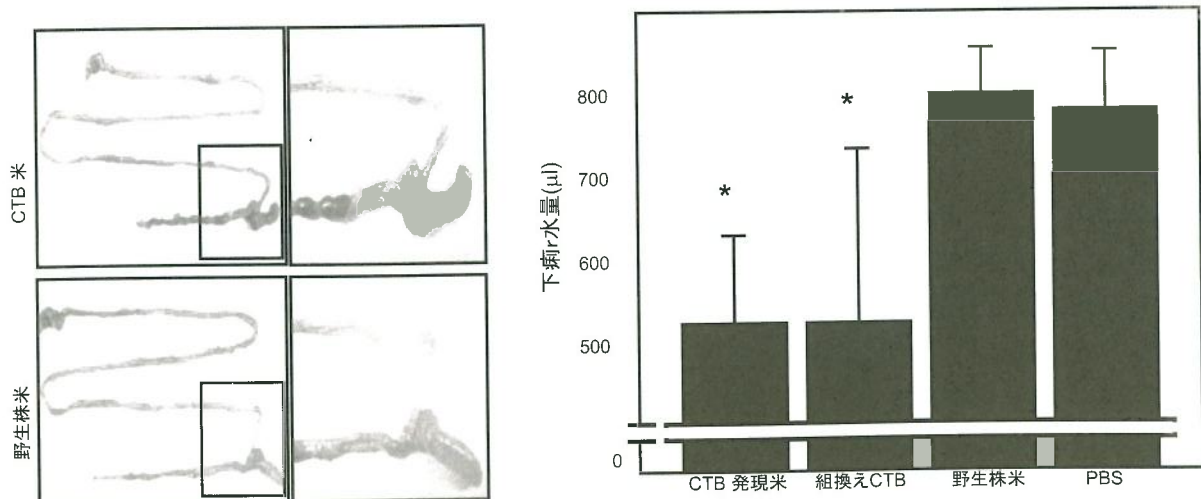


図2 CTB発現米の下痢予防効果

表1 CTB発現米の温度長期安定性と毒素特異的IgA抗体誘導能

保存条件	CTB 量 ( $\mu\text{g}$ /粒)	抗原特異的 I g A 誘導効果 (抗体価)
0	29 $\pm$ 4	4.2 $\pm$ 1.5
6 ヶ月 (25 C)	29 $\pm$ 2	-
12 ヶ月 (25 C)	29 $\pm$ 1	4.0 $\pm$ 0.5
12 ヶ月 (4 C)	30 $\pm$ 4	-
18 ヶ月 (25 C)	28 $\pm$ 3	4.2 $\pm$ 0.6
18 ヶ月 (4 C)	30 $\pm$ 3	4.0 $\pm$ 0.5

チンの構造決定、定量法などの規格及び試験法の確立が、トランスレーショナルリサーチに持っていく上で重要な課題である。

#### 文 献

- 1) 幸 義和ら (2004) 細胞工学 23 801-805.
- 2) Y. Yuki et al., (2007) *Tuberculosis*. 87 : S35-44.
- 3) H. Varmus et al. (2003), *Science* 302 : 398-399 (2003)
- 4) 幸 義和 (2003) 科学療法の領域19 : 71-76.
- 5) T. Nochi et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104 : 10986-10991.



◀国内情報▶

## 植物バイオマスへの<sup>13</sup>C代謝・分解過程の追跡 —高分解能マジック角回転 (hr-MAS) 法によるアプローチ—

<sup>1</sup>独立行政法人 理化学研究所 植物科学研究センター,

<sup>2</sup>名古屋大学 大学院生命農学研究科,

<sup>3</sup>横浜市立大学 大学院国際総合科学研究科,

<sup>4</sup>ブルカー・バイオスピン株式会社

菊地 淳<sup>1,2,3</sup>・森 哲哉<sup>3</sup>・雪 真弘<sup>3</sup>・西原 崇<sup>3</sup>・佐藤 一<sup>4</sup>・甲野 裕之<sup>4</sup>

地球環境の激変に伴い、炭素資源の物質循環を見据えた研究開発が望まれている。筆者らは無機安定同位体の<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>から、植物が生産する<sup>13</sup>C有機物群を核磁気共鳴 (NMR) 法で一斉計測する技術を高度化してきた。この<sup>13</sup>C植物を消費者、分解者の栄養源とすることで、生物間での物質循環へと迫ることができる。特にNMR法は、可溶性低分子物質のみならず、インタクトな動植物組織や不溶性バイオマス成分の計測も可能という特徴を有する。

### 1. 植物バイオマスの時代

植物は大気中の炭素循環に極めて重要な役割を果たしており、光合成で吸収したCO<sub>2</sub>を葉、枝、茎、根の中にバイオマスとして蓄積する。さらに、効率的に炭素の吸収と根や土壤への貯蔵を繰り返し、大気中に含まれる炭素の除去が促進される。このように植物はCO<sub>2</sub>を固定化し、バイオマスを大量に生産する優れた代謝能力を有する。バイオマスのうちでも特に、草木の茎部を木質系バイオマスと呼び、デンプン等とは異なり食糧との競合がない。これを有効活用し、環境問題に貢献しようという事業が世界中で進められている。

昨今の環境問題は、エネルギー生産・消費共に高い諸国での対応が重要である。既にアメリカでは比較的CO<sub>2</sub>固定能が高く、施肥に高エネルギーを要しないポプラやエレファントグラス

等を土壤・気候に合わせて植生し、2025年までに輸送燃料の1/3をこれらの木質系バイオマスから得るための研究が本格化している<sup>1)</sup>。これらの樹木や多年草は、個体内、あるいは個体の生存圏内で落ち葉等から窒素や炭素をリサイクルすることができる<sup>2)</sup>。従ってバイオマス用の植物を大量に栽培する時代が来ても、土壤の有機化合物 (Soil Organic Compounds : SOC) の減少量は少なく、施肥等で無駄なエネルギーを労しないと考えられている。

このように植物はCO<sub>2</sub>を固定化し、バイオマスを大量に生産し、一方で土壤とSOCの循環をする能力があるため、光合成・根圏からの代謝動態を解析する技術の構築は重要である。そこで、前述の石油代替エネルギー用植物の中で、昨年ゲノム解析が終了したモデル樹木であるポプラを用い<sup>3)</sup>、代謝産物の解析を行うこととした。

### 2. 核磁気共鳴 (NMR) 法のポテンシャルに着目

エネルギー用植物の代謝解析技術開発の範囲をCO<sub>2</sub>固定から木質系バイオマス生産、その材料評価、そして根圏循環へと広げれば、NMR

KIKUCHI Jun<sup>1,2,3</sup>, MORI Tetsuya<sup>3</sup>,  
YUKI Masahiro<sup>3</sup>, NISHIHARA Takashi<sup>3</sup>,  
SATO Hajime<sup>4</sup>, KONO Hiroyuki<sup>4</sup>

<sup>1</sup>〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22

<sup>2</sup>〒464-8601 名古屋市千種区不老町

<sup>3</sup>〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29

<sup>4</sup>〒305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5

法は多様な試料状態を捉えることができるため、各種の分析技術中でも有用な手法である。また、試料を安定同位体で均一に標識すれば、タンパク質の立体構造解析<sup>4)</sup>で用いられてきた種々の多次元NMRパルスシーケンスを適用していくことも可能である。既に我々のグループでは、シロイヌナズナ等の植物で均一安定同位体標識化する技術を開発してきた<sup>5~7)</sup>。モデル樹木であるポプラについては、体系的に安定同位体標識技術を高度化した試みが報告されておらず、本研究が初めての試みとなる (図1左)。その安定同位体標識技術と、多次元NMR法の高い物質同定能・非侵襲計測能といった潜在能力を惹き出せば、ポプラの炭素代謝過程をより包括的に捉えることが可能となるはずである。

特にNMR法では抽出した試料溶液以外にも、不溶物質やインタクト組織を計測することができる。それを可能とする方法はマジック角回転 (MAS) 法で、hR-MAS、固体NMRの2種類の

方法論がある。その詳細は拙著に譲るもの<sup>8)</sup>、<sup>13</sup>C安定同位体標識化した植物バイオマスから調整した<sup>13</sup>Cセルロースの計測や、これを餌として摂食させたシロアリを非侵襲計測したり、不溶性排泄物を計測することも可能である (図1右)。以下に、まず生産者である植物側 (ポプラ) の例について述べる。

### 3. ポプラへの<sup>13</sup>C均一安定同位体標識とその各種NMR解析

<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Glcの根圏吸収、<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>の光合成による<sup>13</sup>C取り込みの経時変化を溶液NMR法により追跡すると、個体全体への炭素代謝速度は遅く、定常状態に達するまでに1ヶ月近くを要することがわかった。これらの疎抽出物の溶液NMR解析により、エネルギー代謝に関わる鍵物質群を追跡できた。しかし木質系バイオマスまでの炭素代謝を追跡するためには、高分子合成の原料

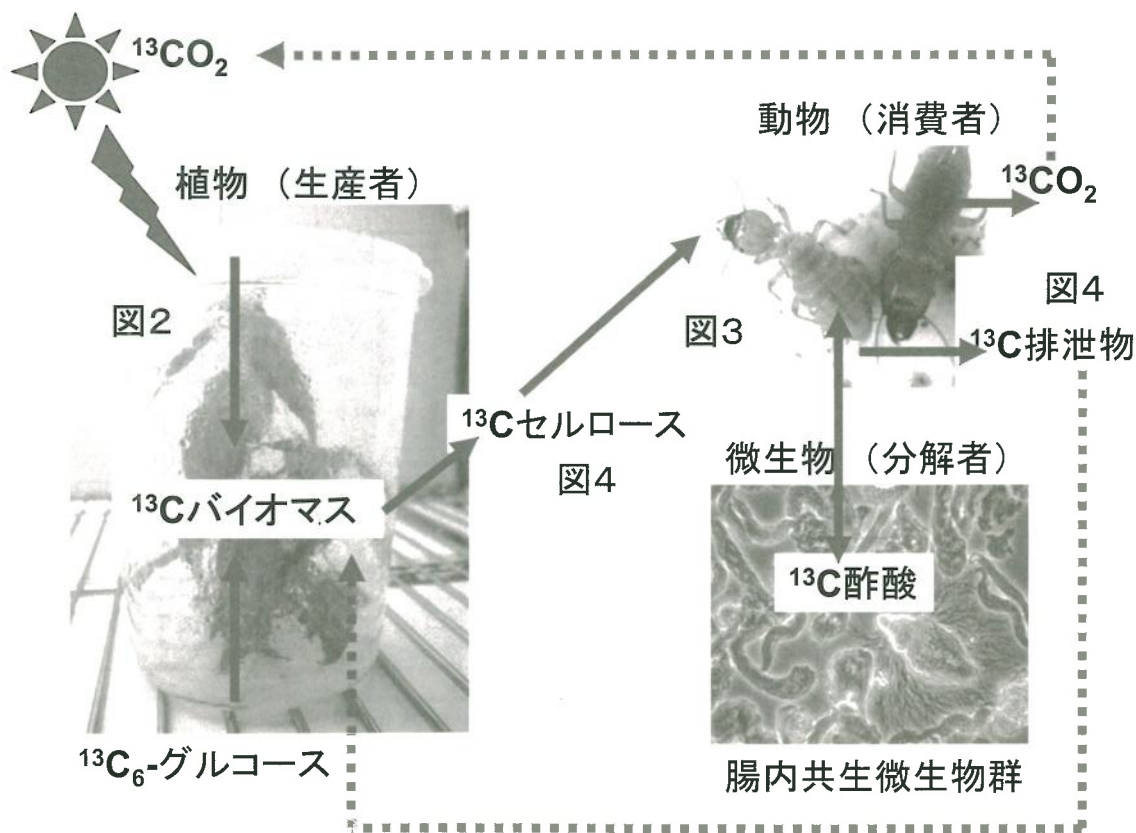


図1 本稿で紹介する各実験系とhr-MASスペクトルとの関係  
 植物 (生産者) から生合成させていくことで、比較的安価に安定同位体標識を追跡することができる。

となる多糖類の計測も必要である。しかし、これらの多くは不溶物質であるため、固体試料を扱うことができ、かつ高分解能なスペクトル計測が可能なhr-MAS法を試みた。

インタクトなポプラ試料のhr-MAS <sup>13</sup>C HSQCスペクトルを図2に示す。これらのシグナルの物質同定は3D-HCCH-COSY計測によって行った。また、抽出物の溶液NMR計測と比較した結果、抽出物の計測で課題となっている溶解度の問題が解消され、可溶、不溶性の代謝産物群を一斉に観測できた。さらに不溶性細胞壁成分を調製し、hr-MAS計測した結果、非侵襲計測と同じシグナルを観測したことから、不溶性多糖類（標品との比較から、ヘミセルロース、ペクチン構成成分）の計測も可能であることがわかった。

加えて、木質系バイオマスの材料としての優れた特性は、高分子成分の構造と物性に強く依存しているため、これを解析し得る固体2D-

NMR計測を試みた。<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-Refocused INADEQUATE, <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-RFDR, <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-PDSD, <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HMQC-J, <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HETCOR等パルスシーケンスを駆使することで、ポプラ茎のような多成分系のサンプルでも、化学構造の違いによる原子選択的な相関シグナルを観測できた。

#### 4. シロアリ共生系による<sup>13</sup>Cセルロース分解

木質系バイオマスからの効率的なバイオ燃料生産を行うためには、木質系バイオマスを糖質に変換する過程が大きな障壁となっており、この障壁を乗り越えるため、自然環境中から木質系バイオマス分解酵素の探索が進められている<sup>9, 10)</sup>。その中で注目を集めているのがシロアリ共生系である。シロアリは腸内に共生する微生物叢と協調して木質系バイオマスの高効率な分解を達成している。DOE傘下のJoint Genome

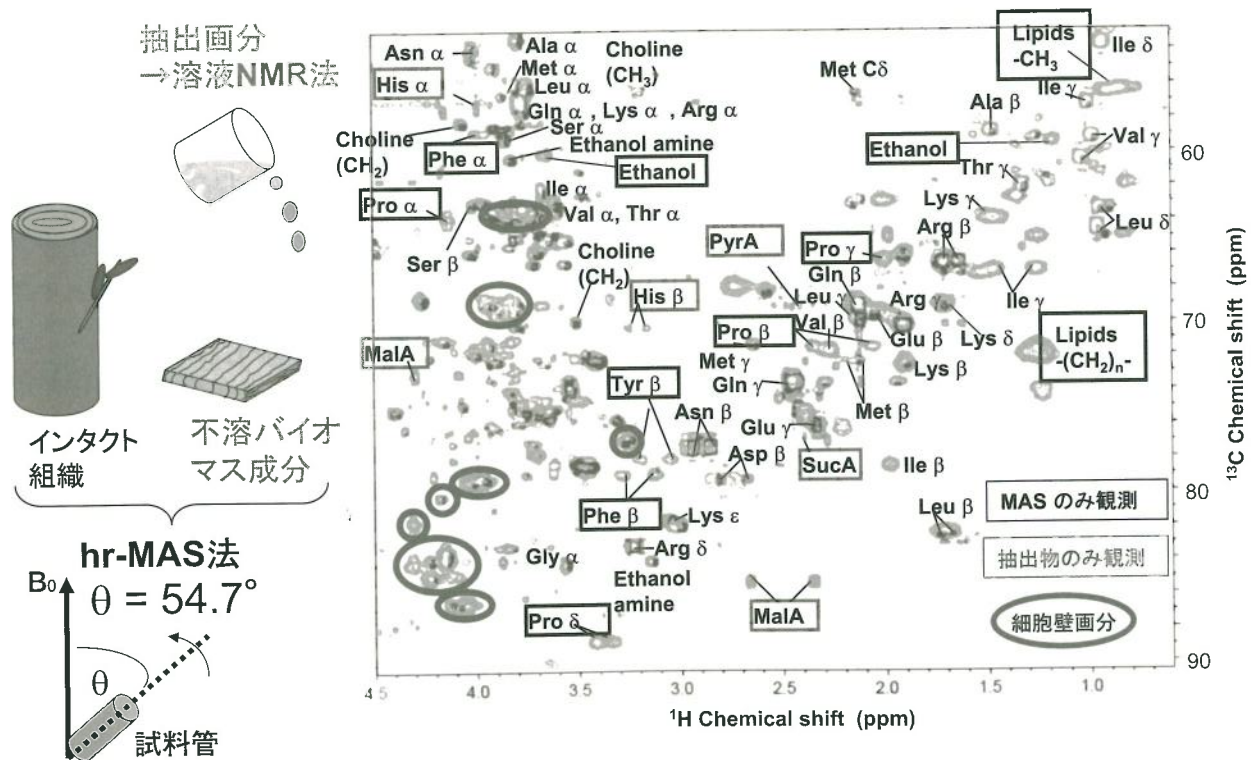


図2 ポプラへの溶液・hr-MAS NMR法計測(左)と、両者の2D-<sup>13</sup>C-HSQCスペクトルの重ね合わせ(右) 溶液/hr-MASのみで観測された物質、不溶性のバイオマス成分のみを調整した場合のシグナルを四角、丸で囲って示した。



Institute (JGI) では、シロアリ腸内バクテリアをターゲットとして、セルロース分解酵素以外にも、水素・メタン生産等に関わる遺伝子をメタゲノム解析により網羅的な取得を進めている。JGIではヒューマスも栄養とする *Nasutitermes sp.* という高等シロアリを用いているが、我々は木質系バイオマスへの栄養依存度が高い下等シロアリである、オオシロアリを実験に用いた。図3には、<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>標識化植物より調整した<sup>13</sup>Cセルロースをシロアリ共生系に4日間摂食させた場合の、インタクトなシロアリと、そのKPi溶液抽出物のhr-MAS <sup>13</sup>C HSQCスペクトルを重ね合わせてある。まず、抽出物のシグナル分散から、<sup>13</sup>Cセルロースが腸内微生物により分解され、<sup>13</sup>C酢酸として渡されて各種アミノ酸等に代謝されていった様子が伺える。一方、もう一つの大きなメッセージは、インタクトなシロアリとKPi溶液抽出物とで、か

なりスペクトルパターンが異なる点である。ポプラでもMASのみで観測される物質や、抽出物のみで観測される物質があることは既に述べたが、シロアリの場合はその差が極端である。これは、植物細胞の場合には脂質や蛋白質のパッキングが少なく、低分子代謝産物の拡散が比較的自由なのに対して、動物細胞の方が制限されていることに由来しているのではないかと考えている。なお、上述のポプラ、オオシロアリ共にhr-MAS回転に伴う組織の損傷は全くなかったことを付記する。

図4には、餌として用いた<sup>13</sup>Cセルロースと、これを摂食したシロアリからの<sup>13</sup>C排出物の<sup>13</sup>C HSQCスペクトルを重ね合わせてある。筆者らが蓄積するNMR化学シフトデータベースに存在する、20程の糖骨格の値を用いても、帰属できないシグナル (U) があるのは残念であるが、いずれにしても餌から糞へ、糖鎖として分解し

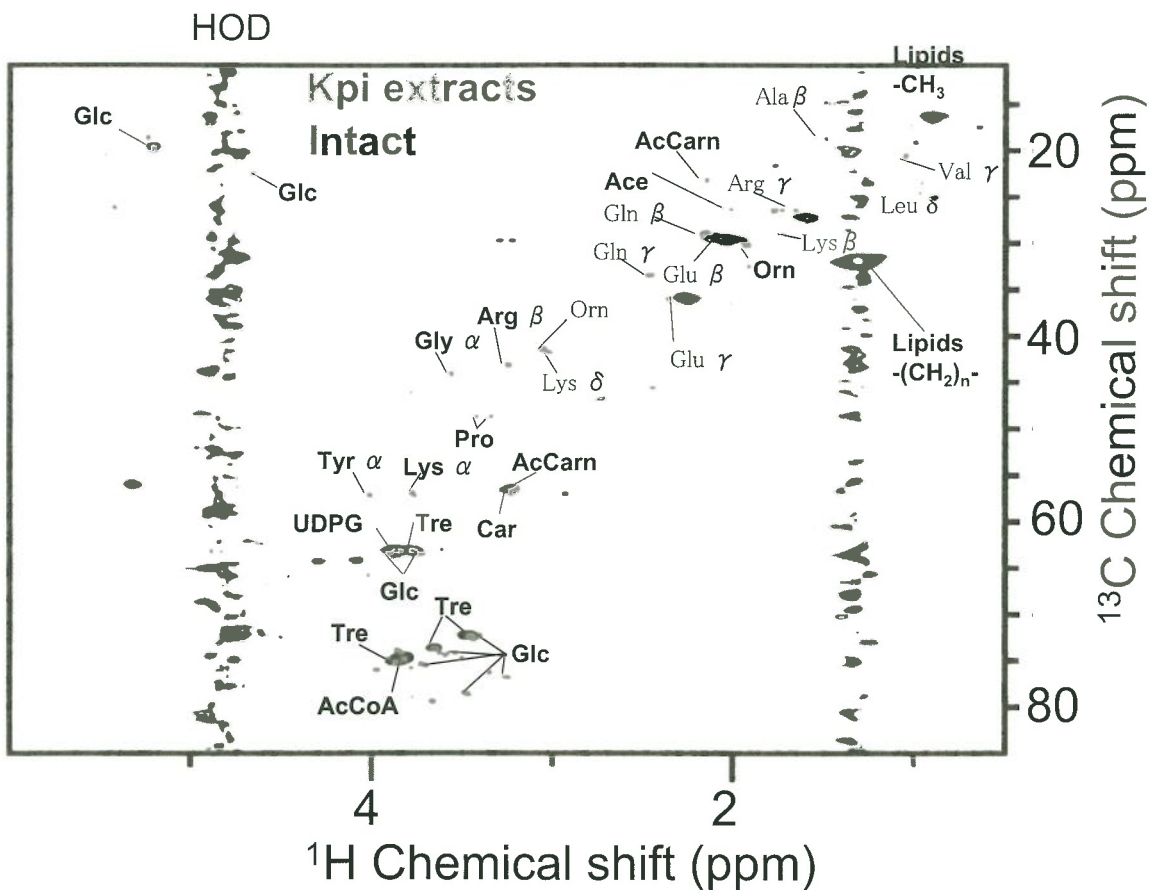


図3 <sup>13</sup>C-セルロースを摂食させたインタクトなオオシロアリ (黒) とそのKPi抽出物 (灰色) のhr-MASスペクトルの比較

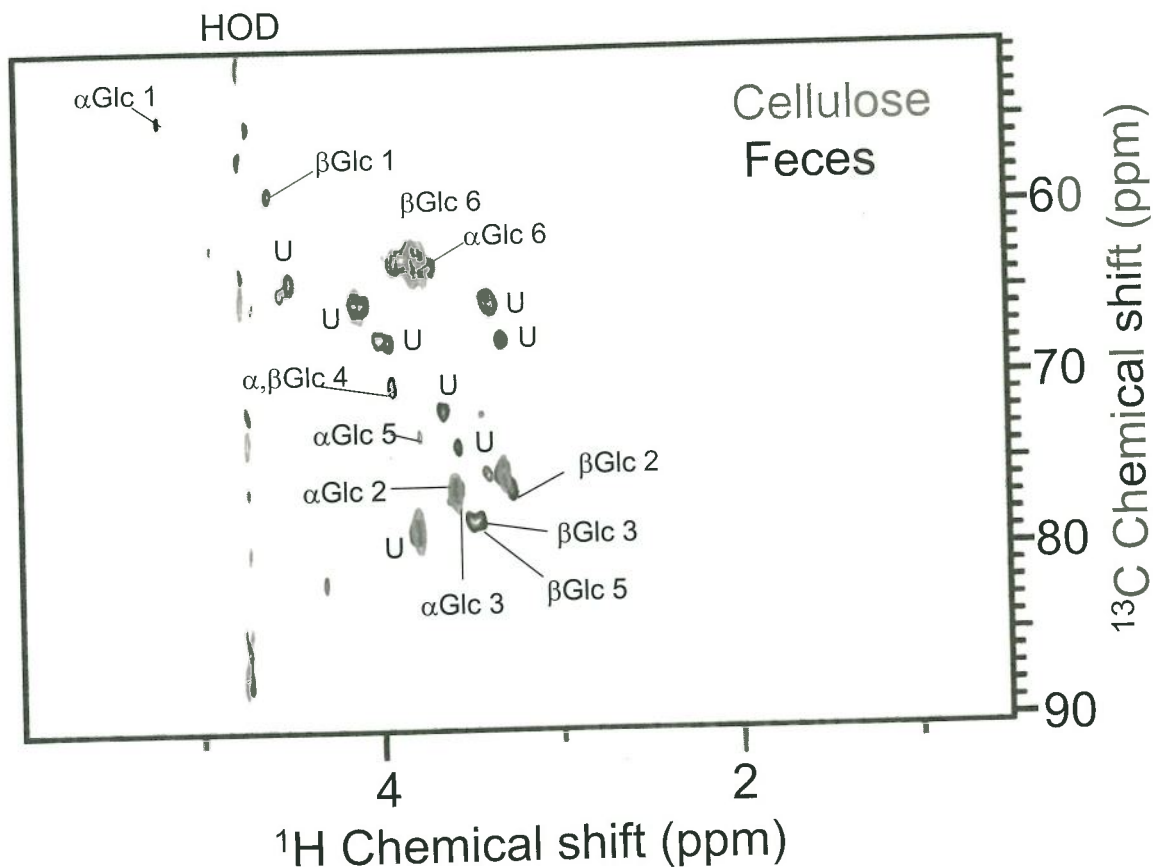


図4 植物バイオマス由来<sup>13</sup>C-セルロース（灰色）と、これをオオシロアリに摂食させた後の排泄物（黒）のhr-MASスペクトルの比較

て排出されていることがわかる。また、図3のシロアリ自身に見られたようなアミノ酸、有機酸等が排出物に観測されていないことから、この昆虫が如何に炭素資源を有効に利用しているかが伺える。

## 5. 今後の展望

生命科学において、代謝反応の追跡技術は基礎、応用の両面から重要である。例えば、菌体によるエタノール発酵の反応を追跡するために、安定同位体を利用した代謝フラックス解析が利用されている<sup>10)</sup>。この方法は、単に個々の代謝産物の量を示すのではなく、複雑な代謝反応の向き、動態情報を有しているため、我々はその代謝動態を調べるための多次元NMRフラクソーム技術<sup>11)</sup>を高度化している。現在、実験が終了した後の安定同位体試料をSOCにして、

リサイクルする試みを始めている。将来的には簡単なバイオスフェアを再現することで、図1の点線で示したような生産者、消費者、分解者からなる地球上で行われている物質循環を人工的に模倣した、生物間の代謝追跡システムを構築したいと考えている。加えて、新規プロテオーム/メタボローム相関法による有用酵素探索法の開発<sup>12)</sup>等、複雑な生物叢での物質循環解析に向けた計測・解析技術開発も推進していることを付記する。

## 文 献

- 1) Tilman, D. et al., Science, 2006. 314 (5805) : p.1598-600.
- 2) Parton, W., et al., Science, 2007. 315 (5810) : p.361-4.
- 3) Tuskan, G.A., et al., Science, 2006. 313

- (5793) : p.1596-604.
- 4) 畠中秀樹ら, 蛋白質核酸酵素, 2002. 47 (8 Suppl) : p.1038-44.
- 5) Kikuchi, J., et al., Plant Cell Physiol, 2004. 45(8) : p.1099-104.
- 6) Kikuchi, J. and T. Hirayama, Methods Mol Biol, 2007. 358 : p.273-86.
- 7) Tian, C., et al., J. of Biol. Chem., 2007. 282 (25) : p.18532-18541.
- 8) 菊地淳, 赤嶺健二, *in vivo* NMR. 分光研究, 2006. 55 : p.320-330.
- 9) Service, R.F., Science, 2007. 315 (5818) : p.1488-91.
- 10) Stephanopoulos, G., Science, 2007. 315 (5813) : p.801-4.
- 11) Sekiyama, Y. and J. Kikuchi, Phytochemistry, 2007. 68 (16-18) : p.2320-9.
- 12) 菊地淳ら, 蛋白質または遺伝子の機能探索法. 特願2007-232792



## ◀国内情報▶

## 超音波を利用した動物細胞への核酸導入技術の開発

<sup>1</sup>東京薬科大学 薬学部 薬物送達学教室，<sup>2</sup>帝京大学 薬学部 生物薬剤学教室，<sup>3</sup>昭和大学 歯学部 歯周病学教室根岸 洋一<sup>1</sup>・遠藤 葉子<sup>1</sup>・鈴木 亮<sup>2</sup>・滝澤 知子<sup>2</sup>・山本 松男<sup>3</sup>・丸山 一雄<sup>2</sup>・新槇 幸彦<sup>1</sup>

近年、超音波造影剤であるマイクロバブルへの超音波照射により、植物からヒトに至る細胞内へ薬物や遺伝子を送達する方法が注目されている。これは超音波照射を併用することで効率よくバブルが崩壊し、それに伴う一過性のマイクロジェット流を駆動力に、細胞外に存在する核酸（プラスミドDNAやsiRNA）を細胞内へと瞬時に送達させる方法である。我々は、組織特異的な分子で表面修飾可能なリポソームに超音波造影ガスを封入した「バブルリポソーム」を作製し、それをを用いた*in vitro*、*in vivo*での簡便な核酸導入法を開発した。

## 1. はじめに

超音波は組織ダメージが極めて低く安全性が高いことから、既に医療分野で非侵襲的な超音波診断・治療などに利用されている。近年では、超音波エネルギーのドラッグデリバリーシステム（DDS）への応用が考案され、実際に超音波造影剤であるマイクロバブルと導入遺伝子の共存下に治療用超音波を照射することでバブルが崩壊し、同時にキャビテーション（衝撃波）が生じ、その駆動力を利用して薬物や遺伝子を細胞内に導入する試みが、基礎研究で成功を取っている<sup>1-3)</sup>。この方法は、超音波照射した部位にのみ効率よく導入可能であり、臓器・組織特異的に遺伝子導入する方法として期待されている<sup>4)</sup>。しかし、これまで報告されているマイクロバブルは直径4～6 μmと粒子サイズが大きい

ため、組織深部への移行性が悪く、血管内投与に最適なサイズとは言えない。また、表面

NEGISHI Yoichi<sup>1</sup>, ENDO Yoko<sup>1</sup>, SUZUKI Ryo<sup>2</sup>,

TAKIZAWA Tomoko<sup>2</sup>, YAMAMOTO Matsuo<sup>3</sup>,

MARUYAMA Kazuo<sup>2</sup>, ARAMAKI Yukihiko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>〒192-0392 東京都八王子市堀ノ内 1432-1

<sup>2</sup>〒199-0195 神奈川県津久井郡相模湖町寸沢嵐 1091-1

<sup>3</sup>〒145-8515 東京都大田区北千束2-1-1

修飾ができないため、標的指向性が得られないなどの改善すべき課題が残されている。

そこで本研究では、これまでに生体適合性・血中安定性・滞留性に優れ、深部組織にまで十分到達できることが報告されている、粒子サイズ約100～200nmのポリエチレングリコール修飾リポソーム（PEG-リポソーム）<sup>5)</sup>に注目し、PEG-リポソームに超音波造影ガスであるパーフルオロプロパンを封入したバブルリポソームを調製した<sup>6, 7)</sup>。リポソームはリン脂質により構成されるため生体適合性が高く、様々な修飾をすることで標的指向性を付与できることが知られている。以上より、バブルリポソームはマイクロバブルの問題を解決し得る新規の遺伝子送達ツールとなると考えられる。さらに、標的指向性を付与したバブルリポソームを調製することで、超音波診断と超音波遺伝子導入を同時に行うシステムを構築することも可能となると考えられる。

今回、我々が開発に着手している超音波造影ガスを封入したバブルリポソーム（図1）は、以下の点で従来のマイクロバブルの問題点を克服できると考えられる。

①生体親和性の高い脂質を用いているので安全性が高い。②粒子サイズが既存のバブルより小さい（0.5～1 μm）。③薬物や遺伝子の内封が

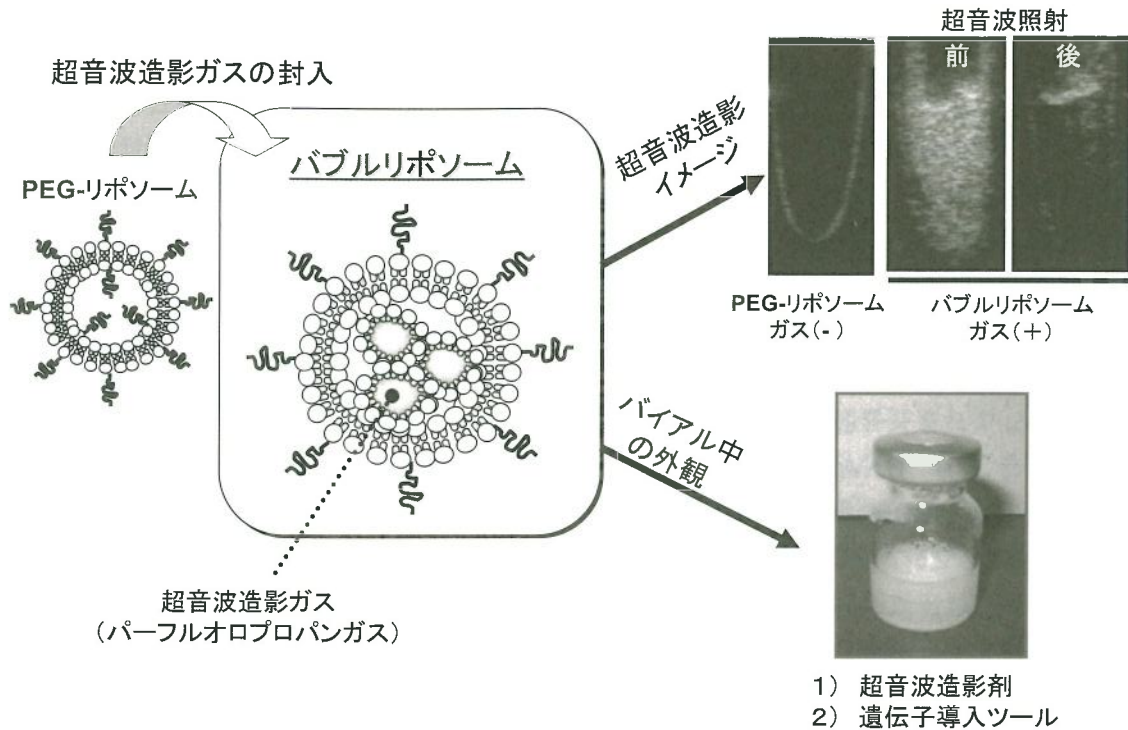


図1 バブルリポソームについて

可能。④polyethylene glycol (PEG) 修飾されているので生体内での標的指向性を持たせることで細胞選択的に薬物や遺伝子の導入が可能。⑤さらに超音波造影剤としても機能するなどの多くの利点を持つと考えられる。

よって本バブルリポソームの利用によって標的部位をモニタリングしながら、標的深部組織の周辺細胞にのみ遺伝子導入することも可能となると予想される。

## 2. バブルリポソームの調製

そこでまずはじめに、DPPC (dipalmitoyl-phosphatidylcholine) やDSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) を基本脂質としたPEG-リポソームに超音波造影ガス (パーフルオロプロパン) を封入し、バブルリポソームを調製した<sup>6, 7)</sup>。そのバブルリポソームは、白濁の懸濁液であった。また、このバブルリポソームを静置すると、マイクロバブルと同様に水相上部に浮上する性質を有していた。なお、この浮上したバブルリポソームは、混和により容

易に再懸濁可能であった。さらに、このバブルリポソームへのガス封入を確認する目的で、超音波診断装置 (9 MHz) による超音波造影を行ったところ、ガス未封入りポソームでは陰影像 (黒色部) のみしか認められなかったのに対し、バブルリポソームの超音波造影では、リポソーム存在部において造影シグナルの増強が確認され、ガスの存在が確認できた (図1)。このバブルリポソーム懸濁液に超音波照射用プローブ (直径 6 mm) を入れ、超音波照射 (Frequency: 2 MHz, Intensity: 2.5 W/cm<sup>2</sup>, Time: 10 sec.) することで、造影シグナルが減弱し、バブル崩壊に伴うキャビテーション誘導が観察された (図1)。以上より、バブルリポソームは超音波診断装置による新規超音波造影剤として利用可能であることが示唆された。

## 3. バブルリポソームを利用した超音波遺伝子導入—*in vitro*

近年では、超音波照射に伴い生じるキャビテーションにより薬物や遺伝子を細胞内に導入す

る方法が報告されていることからバブルリポソームは、超音波造影剤としてのみでなく、超音波照射との併用により簡便な遺伝子送達ツールとなる可能性が考えられる（図2）。

そこでバブルリポソームと超音波照射の併用によるキャビテーションを利用した遺伝子導入が可能か否かをアフリカミドリザル腎ガン細胞由来であるCOS7細胞を用いて調べた。方法としては、超音波造影ガスが封入されたバブルリポソームとルシフェラーゼ遺伝子をコードしたレポータープラスミドDNA（pDNA）を培地中に添加し、直ちに超音波照射（Frequency：2 MHz, Intensity：2.5 W/cm<sup>2</sup>, Time：10 sec.）を行った。なお、超音波照射装置には、ネッパジーン社製Sonopore 3000を使用した。その結果、ルシフェラーゼ活性の上昇が認められ、細胞内への遺伝子導入は、わずか10秒という超音波照射時間で効率よく達成できることが判明した。この効果は、超音波の未照射の群に比べ、pDNAとバブルリポソームの混合液に超音波照射した場合において、1000倍近い遺伝子発現の上昇が認められた。ガス未封入りポソームと超音波照射を併用した場合では、十分な導入効果

は得られなかった。また、COS7細胞以外のガン細胞（HepG2, Colon26, KBなど）や一般遺伝子導入試薬では比較的困難とされている初代培養系細胞（血管内皮細胞、関節滑膜細胞、骨芽細胞など）においても導入効果が示され、バブルリポソームと超音波照射の併用による有意な遺伝子導入効果が明らかになった。さらに遺伝子導入の際には、血清の影響を受けなかったことから10秒間という非常に短い時間で細胞への遺伝子送達が達成されるために導入遺伝子は培地中の血清の影響を受けないものと考えられた。このことよりバブルリポソームと超音波照射による遺伝子導入は*in vivo*でも十分機能し得ることが推測された。

#### 4. バブルリポソームを利用した超音波遺伝子導入—*in vivo*

超音波照射を併用したバブルリポソームの*in vivo*での機能評価をするために、筋組織を標的にし、超音波遺伝子導入効率について検討した。方法としてマウスの頸部筋組織にバブルリポソームとpDNAの混合溶液を局所筋肉内投与し、

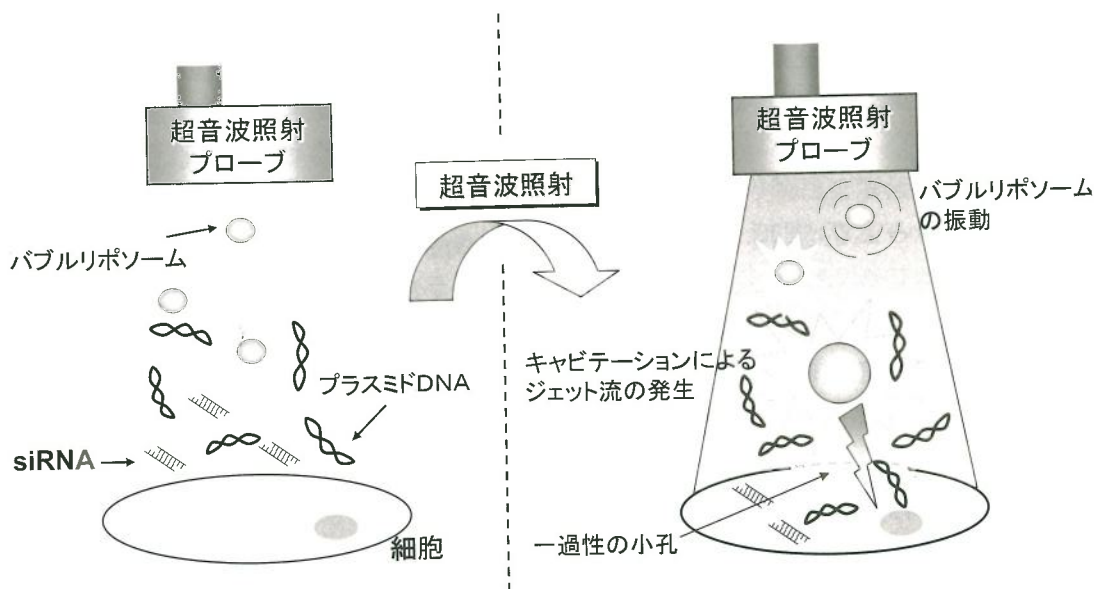


図2 バブルリポソームと超音波照射による導入

バブルリポソームへ超音波照射することにより、それ自身がキャビテーション核となって崩壊すると共にジェット流が生じる。それによって細胞膜に一過性の小孔が発生すると同時に細胞外に存在するプラスミドDNAやsiRNAが、細胞質へと送達される。



直ちに、体外から超音波照射（1 MHz, 50% duty, 2 W/cm<sup>2</sup>, 60 sec.）し、5日後の摘出組織をホモジネートしてルシフェラーゼ活性測定を行った。その結果、pDNA単独、pDNAに超音波照射、pDNAとバブルリポソーム混合液を添加した群では、ほとんど遺伝子発現に顕著な差が認められなかったのに対し、pDNAとバブルリポソームを混合し、さらに超音波照射した群では、pDNAなどの上述の群に比べ10倍以上の高い遺伝子発現が認められた。さらに遺伝子導入後のpDNAの体内動態ならびに発現分布を解析するために、経時的にマウスを麻酔し、腹腔内にルシフェラーゼの基質としてルシフェリンを投与し、10分後に*in vivo*ルシフェラーゼイメージングシステム（IVIS社）を用いた全身での発現分布を解析した。その結果、pDNAのみを導入した場合に比べ、pDNAとバブルリポソーム混合液を局所投与し、さらに超音波照射したマウス頸部筋組織において局在化したルシフェラーゼの遺伝子発現の増強が観察された（図3）。その発現は、少なくとも4週間は持続していた。また、同様の遺伝子導入効果がマウス膝関節や口腔歯肉においても適用可能であることが明らかとなった。また、既存の遺伝子導入試薬として幅広く用いられている Lipofectamin 2000（インビトロジェン社）では、ほとんど遺伝子導入活性が認められなかったことから、バブルリポソームの*in vivo*での高い有用性が示された。

## 5. バブルリポソームによるsiRNAの細胞内導入

バブルリポソームと超音波照射を併用することで発生するキャビテーションエネルギーを利用して効率よく細胞に遺伝子導入可能であることが明らかとなった。本法は細胞外の物質を細胞質内に直接導入可能であるため、細胞質内にターゲットが存在するsiRNAに対して理想的な導入ツールになると期待される。そこで、標的遺伝子の発現を特異的に抑制することができるsiRNAの細胞内導入効果について検討を行った。その結果、バブルリポソームと超音波照射との併用によってルシフェラーゼ遺伝子の発現を塩基配列特異的に抑制するLucGL3 siRNAを10 nM濃度の条件で細胞内導入を行った場合では、遺伝子発現を80%抑制することが確認できた（図4）。それに対し、非特異的な

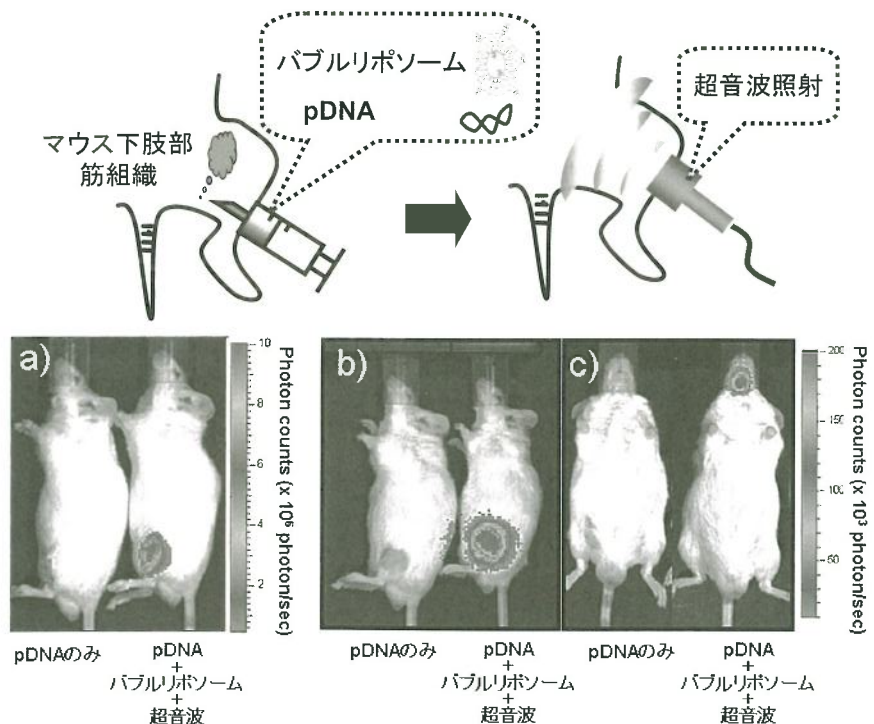


図3 バブルリポソームを利用した超音波遺伝子導入  
バブルリポソームとルシフェラーゼをコードした発現プラスミドDNAをマウスの各目的部位に直接局所投与し、ただちに超音波照射し、ルシフェラーゼ*in vivo*イメージングシステムにて発現解析を行った。それぞれ投与部位である頸部筋組織（a）、関節組織（b）、口腔歯肉組織（c）における局在化した遺伝子発現が観察されている。

GFPsiRNAを用いて同様の導入実験を行った場合には、そのようなルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制効果は認められなかった。以上のことから、バブルリポソームは、遺伝子導入ばかりでなくsiRNAの細胞内導入キャリアとしても機能することが示された。

## 6. おわりに

以上、超音波造影ガスを封入したバブルリポソームにより、超音波造影、さらには遺伝子やsiRNAが細胞内導入可能であることが明らかとなった。今後は、実用化に向けた*in vivo*での効果をさらに明らかにしていくとともにバブルリポソームに遺伝子やsiRNAなどを内封し、標的指向性を付与した機能性バブルリポソームの創製に向けた研究を進めていきたいと考えている。最後に今回開発されたバブルリポソームが、医療分野における薬物・核酸導入を目的としたDDS製剤のみにとどまらず、農業、畜産、水産業など幅広い分野で応用されることを期待したい。

## 謝 辞

本研究は独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）（Industrial Technology Research Grant Program (04A05010)）、文科省科研費：萌芽研究（18650146）の研究助成により遂行されたものであり、ここに深甚なる誠意を表します。また、超音波照射に関する技術的なご指導を頂きました福岡大学医学部解剖学教室・立花克郎教授、ネッパジーン（株）・早川靖彦氏、山内貴博氏、鈴木孝尚氏に深謝致します。

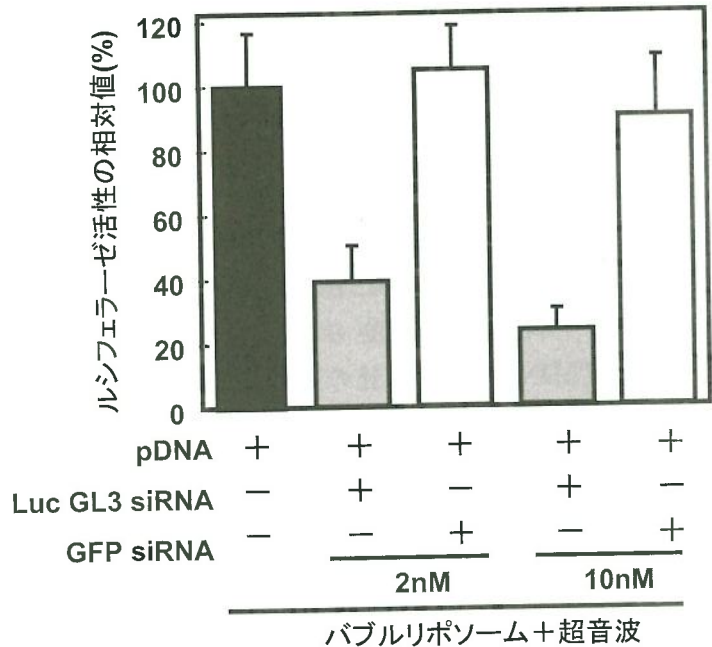


図4 バブルリポソームを利用したsiRNAの細胞内導入による遺伝子発現抑制効果

バブルリポソームとルシフェラーゼをコードした発現プラスミドDNAとsiRNAをCOS7細胞に添加し、ただちに10秒間超音波照射し、48時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ遺伝子に特異的なLucGL3siRNAにより、80%の発現抑制効果が認められた。

## 文 献

- 1) Tachibana K. et al. (1999), Jpn. J. Appl. Phys., 38, 3014-3019
- 2) Mitragotri S. et al. (2005), Nature Rev. Drug Discov., 4, 255-259
- 3) Liu Y. et al. (2006), Biotechnol Adv., 24, 1-16
- 4) Lawrie A. et al. (2000), Gene Ther., 7, 2023-2027
- 5) Maruyama K. et al. (2004), J Control Release, 98, 195-207
- 6) Suzuki R. et al. (2007), J Control Release, 117, 130-136
- 7) Suzuki R. et al. (2007), J Control Release, *in press*

## ◀国内情報▶

## マルカメムシがダイズ上で繁殖できる 能力を腸内共生細菌が規定する

独立行政法人 産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門  
深津 武馬・細川 貴弘

マルカメムシという豆類の害虫について、ダイズなどの作物を食物として利用できる性質が、昆虫自身の遺伝子ではなく腸内共生細菌によって決まることを明らかにした。体内に共生する微生物が害虫化の原因になりうることを示す世界初の報告であり、昆虫の進化や害虫化の起源に新たな視点をもたらす発見である。さまざまな農業害虫の中には、もしかすると共生細菌が変異したり、新規な共生細菌に感染したりすることによって農作物を加害する能力を獲得し、害虫化したものもあるかもしれない。

### 1. はじめに

昆虫の食害による農業生産への被害は甚大であり、その防除と対策は大きな課題である。農学や育種学、害虫防除学は、そのような課題に対する対策を体系化した学問分野といえる。

農作物は原種から高度に品種改良され、しばしば原産地とは遠く離れた世界各地で栽培される。したがって多くの重要な害虫は、もともとそれらの農作物を食物としていたわけではない。土着の野生植物に依存して生活していた昆虫の系統の一部が、多量かつ単一に栽培される農作物を利用する能力を獲得し、『新興害虫』として蔓延する場合も少なくないと考えられる。育種学ではそのような害虫系統に対する抵抗性の農作物系統を開発して圃場に投入し、害虫防除学ではそのような害虫に効果的な殺虫剤を開発して散布する。かくして一時は害虫が制圧されたように見えるが、遅かれ早かれこれらの抵抗性作物を打破したり、殺虫剤への耐性を獲得した新たな害虫系統が進化して、再び圃場に蔓延する。害虫防除の歴史は、まさにこのようないたちごっこの繰り返しであった。

すなわち、昆虫類が農作物を食物として利用

FUKATSU Takema, HOSOKAWA Takahiro  
〒305-8566 つくば市東1-1-1

する能力の獲得過程およびその具体的なメカニズムの解明は、新興害虫の起源の理解および制御への戦略に資すると期待される。従来、昆虫類が新たな植物を食物として利用できる能力は、昆虫自身の遺伝的変異から生じると考えられてきた。

### 2. マルカメムシのカプセル共生細菌

マルカメムシ（図1）は、路傍や空き地にはびこる雑草のクズを主な食草とする、ごく普通種のカメムシである。丸っこい体型はちょっとテントウムシに似ていなくもないが、やはりカ



図1 交尾中のマルカメムシ成虫



メムシらしく、小粒ながらもとつても臭い。人家の近くにもしばしば大量発生して、洗濯物に群がったり、秋口に室内に入り込んできたりするので、不快害虫として嫌われている。

ところが、このマルカメムシにとつても変わった習性があることはあまり知られていない。繁殖期の5月から6月頃に発生地のクズの芽をさがすと、2列にきれいに並んだマルカメムシの卵塊がよくみつかれるが(図2A)、ペリッと剥がして裏側からみると、黒っぽい塊がくっついて(図2B)。この塊が、実は共生細菌の封入された“カプセル”なのである(図2C)。マルカメムシ類は後部中腸内に大量のγプロテオバクテリアに属する腸内共生細菌“*Candidatus Ishikawaella capsulata*”を共生させており、

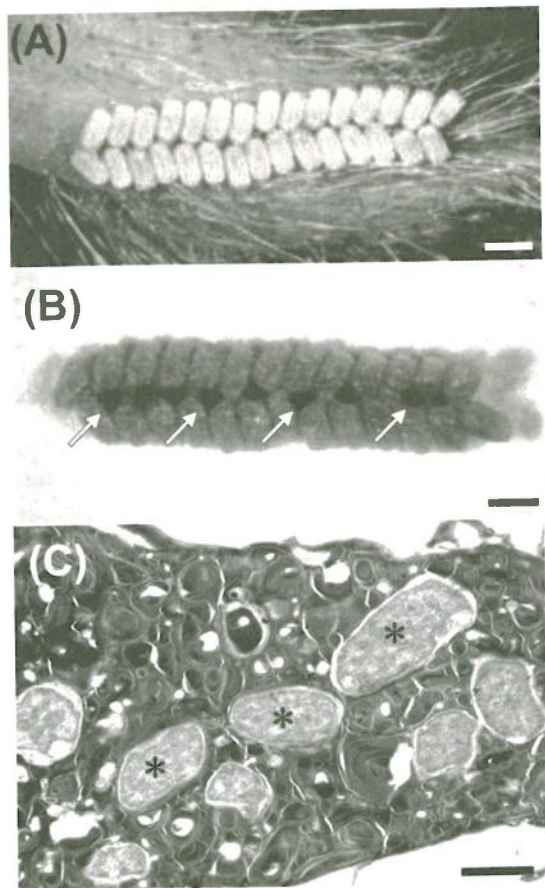


図2 マルカメムシ卵塊の上面(A)と下面(B)バーは1mm。矢印で示した褐色の塊が共生細菌カプセルである。(C)カプセル中の共生細菌(\*)の透過電子顕微鏡像。バーは1 $\mu$ m。

この細菌なしでは成長が著しく阻害され、成虫になっても完全に不妊となってしまう(図3)。卵から出てきた幼虫は、ただちにカプセルに口吻を突き立てて中身を摂取し、生存に必須な共生細菌を獲得する(図4)<sup>1-3)</sup>。

### 3. マルカメムシと台湾マルカメムシ

マルカメムシ(図1, 図3左)は本州から屋久島にかけて広く分布しており、普通は野生のクズに依存して暮らしているが、しばしばダイズ畑などがあると大挙して侵入し、害虫として問題になる。一方、南西諸島にはごく近縁の別種である台湾マルカメムシ(図3右)が分布するが、台湾クズという雑草上で暮らし、ほとんど農業被害を起こすことはないといわれる<sup>4)</sup>。



図3 マルカメムシ(左)と台湾マルカメムシ(右)

上段は正常な成虫。下段はカプセル除去によって得られた共生細菌なしの成虫で、体の小型化、淡色化、軟弱化がみられ、不妊である。

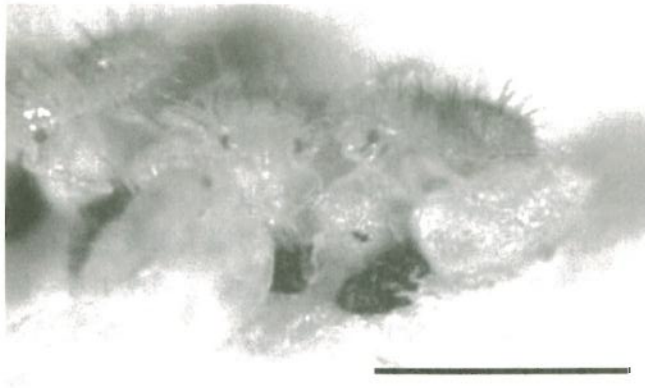


図4 カプセルから共生細菌を獲得するマルカメムシ孵化幼虫  
バーは1mm。

#### 4. ダイズ上での飼育実験：マルカメムシは正常孵化，台湾マルカメムシは孵化不全

なぜマルカメムシは農業被害を引き起こすのに，近縁の台湾マルカメムシはそうでないのか。実験室の同一条件下においてダイズ鉢植えで飼育したところ，両種ともちゃんと成長して産卵したものの，次世代の卵の孵化率がマルカメムシでは正常なのに，台湾マルカメムシでは大きく低下した（図5，6）。つまり，台湾マルカメムシはダイズを食物とすると，繁殖がうまくいかないことが判明したのである<sup>5)</sup>。

#### 5. カプセル交換実験：マルカメムシが孵化不全に，台湾マルカメムシの孵化は正常に

マルカメムシ類では，実体顕微鏡下でピンセットを用いて，卵塊から卵とカプセルを簡単に分離することができる。したがって，卵あたりの共生細菌の量を増減させたり，種間で共生細菌を入れ換えたりといった，他では決してできないような操作実験をおこなうことが可能である。そこでカプセル交換実験によって，

両種の間で共生細菌を入れ換えて，ダイズ鉢植えで飼育してみた。すると驚くべきことに，次世代の卵の孵化率が台湾マルカメムシでは正常に回復したのに対して，マルカメムシの孵化率は大きく低下した（図5，6）。すなわち共生細菌を種間で入れ換えることにより，非害虫種と思われていた台湾マルカメムシがダイズを利用できるようになり，害虫種と思われていたマルカメムシのダイズ上での繁殖が阻害されたのである<sup>5)</sup>。

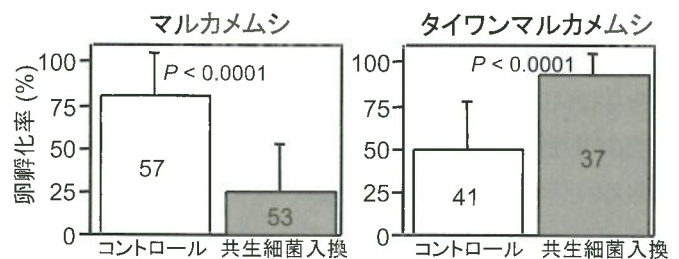


図5 ダイズ上で飼育したマルカメムシおよび台湾マルカメムシの卵孵化率  
腸内共生細菌の入れ換えにより，卵孵化率が完全に逆転する。

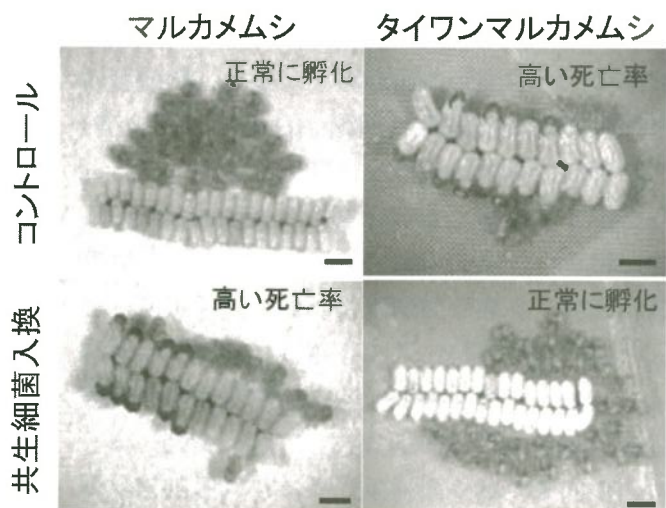


図6 ダイズ上で飼育したマルカメムシおよび台湾マルカメムシの卵孵化の様子  
正常な孵化は，マルカメムシ由来の共生細菌を持った場合のみ観察される。バーは1mm。

## 6. 農作物利用能力に関与する腸内共生細菌

これらの実験結果より、マルカメムシがダイズを食物として利用できる性質が、カメムシ自身の遺伝子型ではなくて、その腸内共生細菌によって決定されていることが明らかとなった。本研究により、体内に共生する微生物が害虫化の原因になりうるということが世界で初めて証明された。さまざまな農業害虫の中には、もしかすると共生細菌が変異したり、新規な共生細菌に感染したりすることによって農作物を加害する能力を獲得し、害虫化したものもあるかもしれない。このような観点からさまざまな害虫を見直してみると、新たな発見につながる可能性もありうる。昆虫の進化や害虫化の起源に新たな視点を与えるのみならず、害虫防除の新規標的としての共生細菌という観点からも興味深い知見である。

## 7. おわりに

我々は主として視覚で世界を認識している。だから目に見えないものはしばしば認識の枠外

におかれ、その重要性を正しく評価しそこねる場合がある。微生物とはそういった、目に見えない、しかし可視的な現象にきわめて大きな影響をあたえうる存在であることを忘れてはならない。ほとんどすべての昆虫類のみならず動物は、腸内にそれぞれに特有の微生物叢を保有している。1匹の昆虫は、生態系を構成する一員であるのみならず、それ自身が多数の生物からなるコンパクトな生態系を構築しているのである。

## 文 献

- 1) Fukatsu, T. and Hosokawa, T. (2002), *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 389-396.
- 2) Hosokawa, T. et al. (2005), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 54, 471-477.
- 3) Hosokawa, T. et al. (2006), *PLoS Biol.* 4, e337.
- 4) 友国雅章 他 (1993) 日本原色カメムシ図鑑, 全国農村教育協会, 東京
- 5) Hosokawa, T. et al. (2007), *Proc. R. Soc. B* 274, 1979-1984.



◀国内情報▶

## 乗用型トラクタの安全キャブ・フレームの効果と シートベルトの使用実態に関する農業者調査結果

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  
富田 宗樹・水上 智道・高橋 正光・塚本 茂善

生研センターでは、農業機械事故の減少を目的として、型式検査・安全鑑定を通じた各種の安全装備の装着を推進してきたが、さらなる農業機械事故の減少を図るためには、事故の現状を踏まえた型式検査・安全鑑定基準の見直しや安全装備の改善、追加等の検討が必要である。そこで、安全装備の事故に対する効果を定量的に把握、分析し、これにより型式検査・安全鑑定の農業機械事故軽減における効果を明らかにし、有効性の検証と基準の改善を図る研究を行った。その一環として、乗用型トラクタの転落転倒時に運転者保護効果が期待される安全キャブ・フレームの効果と、これを補完するシートベルトの使用実態に関し、農業者調査を実施したので、その結果を報告する。

### 1. はじめに

現在、農林水産省の調査によると、我が国の農作業死亡事故は、年間およそ400件発生している<sup>1)</sup>。そのうち、農業機械によるものは約280件で、全事故の約70%を占めている<sup>1)</sup>。近年、その事故件数はほぼ横ばいであり、減少が求められている。また、65歳以上の高齢者が全死亡事故件数に対し7割を占めている<sup>1)</sup>。これには、65歳以上の高齢者が、基幹的農業従事者(16歳以上の世帯員で、自営農業だけに従事した者と、自営農業とその他の仕事の両方に従事した者のうち、農業が主であるものの合計)において、約6割<sup>2)</sup>と非常に高い割合を占めることが影響していると考えられる。

さらに、死亡事故が発生した農業機械の機種の内訳をみると、約50%が乗用型トラクタ、次いで約15%が歩行型トラクタ、約15%が農用運搬車となり、この3機種で約80%を占める<sup>1)</sup>。従って、これらの機種は、特に対策が必要と考えられる。更に乗用型トラクタの事故形態をみると、転落・転倒事故が約70%を占めている<sup>1)</sup>。

TOMITA Muneki, MIZUKAMI Tomomichi,  
TAKAHASHI Masamitsu, TSUKAMOTO Shigeyoshi  
〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

そこで、農業機械死亡事故の主たる機種である乗用型トラクタに関して、転落・転倒事故の際に運転者保護の観点から有効と期待されている安全キャブ・フレームの効果と、シートベルトの使用実態に関し、農業者調査を行った。

### 2. 安全キャブ・フレームの概要

安全キャブ・フレームを総称して、ROPS (roll-over protective structure) [転倒時保護構造] という。これらは、主に乗用トラクタが転落転倒した際に、運転者の周囲に一定の空間(安全域)を保ち、機械の下敷きとなる事態を防ぐことにより、運転者を保護する構造物である<sup>3)</sup>。安全キャブ(図1)は、屋根、ドア及び窓ガラス等で、運転者を被い囲んでいる構造のものであり、一般的に気密性が高く、防音、防寒及び防塵等の役割もあり、安全性だけでなく、運転者の作業環境も向上させている。安全フレーム(図2)は、2柱式や4柱式等の鉄製の骨組で構成されており、果樹園やハウス内での作業時または格納時に全高を低くするためのフレーム折曲げ機能や、日よけを有するものもある。

一方、シートベルトには、運転者が安全域外に投げ出されないよう保持する役割がある<sup>3)</sup>。



図1 安全キャブ装着トラクタの1例



図2 安全フレーム装着トラクタの1例

そのため、今日では、全ての検査合格ROPSにシートベルトが装備されている<sup>4)</sup>。

現在、新車として販売される乗用型トラクタでは、出荷台数ベースで約95%以上にROPSが装着されている<sup>5)</sup>。しかし、我が国の乗用型トラクタのROPS装着率は、2002年時点で約40%と推定されている<sup>6)</sup>。これは、乗用型トラクタは更新年数が長く、ROPSが装着されていない古いものが現在も使用されているためであり、将来的には、次第に装着率が上がり、死亡事故件数が減少するものと期待できる。

当センターは、ROPSの型式検査として、4つのコードを設けて実施している<sup>4)</sup>。乗用型トラクタの大きさや車輪式、履帯式の違いにより、適用されるコードが区別されている。各コードにそれぞれ試験方法及び手順が定められており、試験の最中に安全域が侵されないかをチェックしている。また、4つのコードのうち3つはOECDのテスト<sup>7)</sup>にも準拠しており、日本国内のみならず、世界各国で通ずる検査を行っている。

### 3. 調査目的

紹介したROPSの事例にみられるように、当センターは、型式検査・安全鑑定の実施を通じて、事故減少を図ってきた。しかし、死亡事故に顕著な減少がみられない現状を踏まえると、これまでの安全対策の効果を評価し、その結果に基づいて、それらの改善や追加等を検討する

ことが必要と考えられる。これには定量的なデータに基づいた検証が必要である。そのためには、死亡者数に加え、その背後に多数存在する農作業事故及び関連する安全装備の実態等を多くの標本から抽出することが求められる。そこで、農用トラクタの安全キャブ・フレームの効果及びシートベルトの使用実態に関する農業者調査を行った。

### 4. 調査方法

本調査は平成17年9月から平成18年1月にかけて、アンケート形式で実施した。調査対象は、乗用型トラクタを日常的に使用している農業者とし、全国26道府県の2618戸に調査票を配布した。回答方法は、回答者自身が調査票に記入する方式とした。

調査内容は、所有する乗用型トラクタの仕様、ROPSとシートベルトの装備状況並びに評価、及び事故事例とした。事故事例は、転落・転倒とその他に分類し、転落・転倒事故について事故機のROPSの有無を調査した。

### 5. 調査結果

#### 1) ROPSの装着状況及び農業者の評価

調査の有効回答戸数は1428戸、回収率は55%であった。また、回答者の所有する乗用型トラクタの延べ台数は2303台で、ROPS装備機は1584台(69%)であった。ROPSの内訳は、安

全フレーム45%、安全キャブ24%であった（図3）。

ROPSの装着率は、使用年数が短くなるに従い向上しており、使用年数20年超では31%であったが、5年以下では92%であった。これより、ROPSの装着は拡大傾向にあることがわかった。しかし、乗用型トラクタは耐用年数の長い機械であり、装着率向上を促進するためには、更新によるのみでなく、中古未装着機への装着推進が必要と考えられる。

一方、ROPSに対する農業者の評価として、転落・転倒事故における死亡事故抑止効果についての認識を調査した結果、「効果がある」と回答した者が85%であった。

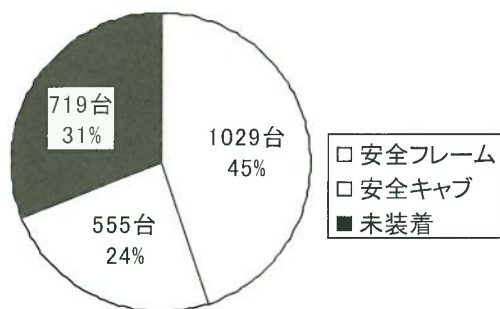


図3 ROPSの装着状況

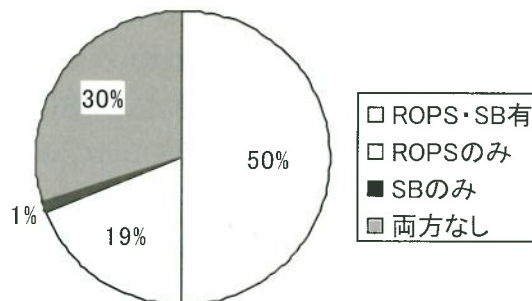


図4 シートベルトの装備状況

過ぎなかった（図5）。そこで、使用しない理由を調査したところ、最も多いものは、「装着が面倒」（48%）であり、走行速度が低い等の理由で「乗用型トラクタには不要」とした回答者も16%いた。

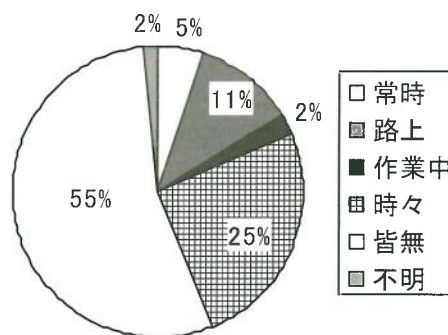


図5 シートベルトの使用状況

## 2) シートベルトの装備状況及び使用状況

シートベルトはROPSとの関係が深いことから、両者を関連させて装備状況をみた。その結果、ROPSとシートベルト（図中、SBと表記）の両方を装備している乗用型トラクタはほぼ半数であった。また、ROPSを装着しているがシートベルトを装備していない乗用型トラクタが19%あった（図4）。

シートベルトを装備した乗用型トラクタを1台以上所有している回答者（900戸）について使用状況を調査した結果、「全く使用しない」（図中、皆無と表記）が55%であった。また、「常に使用している」（同、常時）「路上走行中は使用する」（同、路上）を合わせた、少なくとも路上走行中に使用している回答者は16%に

これらの結果より、シートベルトについては、装備、使用の割合及び農業者の評価がいずれも低いといえた。そのため、使用の推進には、巻き取り式シートベルトの採用等、装着の手間や着用感を改善する改良と、ROPSの安全域内に運転者を保持するというシートベルトの意義について理解を得ることが必要と考えられる。

## 3) 転落・転倒事故の事例

本研究が目的とする、事故事例における安全装備の効果の検証にあたっては、可能な限り多くの事例を収集することが重要である。そこで、本調査では、回答者本人だけでなく、家族、知り合い等の事例を含めて収集した。この場合、複数の回答者から同一の事例が報告される可能



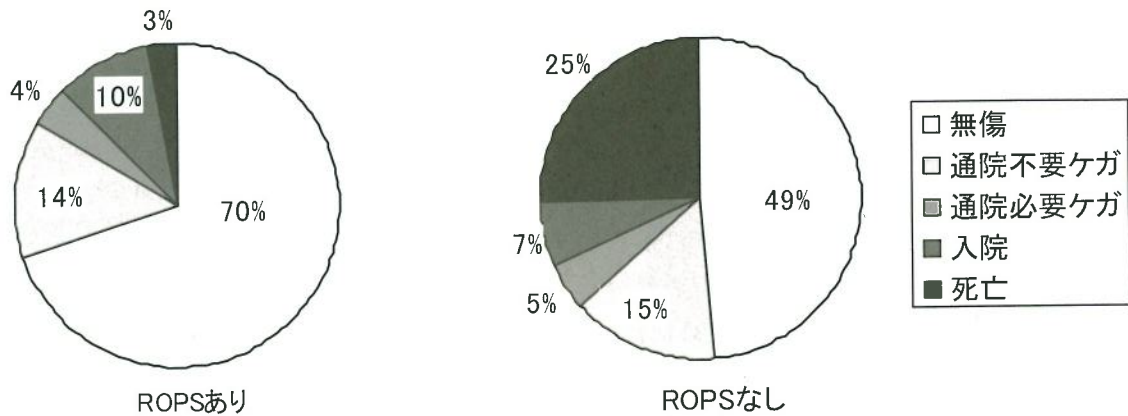


図6 ROPSの有無による転落・転倒事故におけるケガの程度の差異

性があるため、同じ県内で事故の内容に関する回答が同じものを同一事故と判断し、一方のみを集計の対象とした。

転落・転倒事故は208件の報告があった。それらでのケガの程度は、無傷が108件であったが、入院が19件、死亡が39件あった。ROPSの有無が判明したものは180件であり、ROPSありが73件(安全キャブ37件,安全フレーム36件),ROPSなしが107件であった。ROPSの有無によりケガの程度をみると、ROPSありでは無傷が70%、死亡が3% (2件)であったのに対し、ROPSなしでは無傷49%、死亡25%で、死亡事故割合をみると、ROPSなしはありの約8倍と大幅に高かった(図6)。

報告された事例のうち、事故状況に回答があったものは206件であった。最も多かった事故状況は、ROPSの有無によらず、「路上走行中または作業中の脱輪」であり、事故全体の46%及び死亡事故の54%を占めた。

## 6. おわりに

以上の結果より、我が国における全国規模の実数調査において、初めて乗用型トラクタ転落・転倒事故におけるROPSの防護効果が示された。ROPSの死亡事故抑止効果は明らかであり、身を守るために必須の装備といえる。また、ROPSについては農業者の評価も高く、認知及び普及が進んでいると判断できた。今後は、中

古機械等も視野に入れた更なる促進が求められる。

一方、転落・転倒事故においてROPSが十分な効果を発揮するためには、シートベルトの装着が必要であるが、農業現場においては、その装備、使用及び評価がいずれも不十分であった。また、その向上には、機械の構造と農業者の意識の両面から改善が必要と考えられる。

転落・転倒事故の内容をみると、約半数は脱輪事故であり、作業者においては路肩やほ場の隅を走行する際には特に注意することが必要である。さらに、脱輪事故の発生そのものを防止する対策として、農道の整備や路肩等の検出・警告技術の開発が待たれる。

なお、今回の調査にあたっては、ご協力いただいた全国の農業者の皆様をはじめとして、社団法人日本農業機械化協会、全国農業機械士協議会並びに各道府県の農業機械士協議会の各位に多大なご指導、ご協力を賜った。この紙面を借りて深謝申し上げる。

## 文献

- 1) 農林水産省 (2007) : 農作業事故調査結果, 平成17年度
- 2) 農林水産省 (2007) : 第81次農林水産省統計表, 42
- 3) Murphy D.J. et al. (2003) : Rollover Protection for Farm Tractor Operators.

Pennsylvania State University, University  
Park, PA, USA.

- 4) 平成17年5月25日付官報(2005): 農用トラクタ(乗用型)用安全キャブ及び安全フレームの型式検査の主要な実施方法及び基準
- 5) 農林水産省(2005): 主要農業機械の出荷

状況について, 平成16年1月~12月

- 6) 中野ら(2005): 農機研研究成績16-4, 1-8
- 7) OECD(2005): OECD Standard Codes for the Official Testing of Agricultural and Forestry Tractors, OECD, Paris, France.



ブレインテクノニュース

バックナンバーのご案内  
第123号

2007年9月15日発行

#### 特集 最近の $\beta$ -クリプトキサンチン研究の動向

- 1 ウンシュウミカンで特異的に $\beta$ -クリプトキサンチンが多量に集積する生合成調節機構……………生駒 吉識
- 2  $\beta$ -クリプトキサンチンの多様な生理機能—疫学研究から明らかになったこと……………杉浦 実

#### 国内情報

イネの花成ホルモンHd3a……………玉置 祥二郎・島本 功  
微生物の「休眠遺伝子」を活性化し抗生物質などを作り出す  
技術を開発……………越智 幸三  
鳥とヒトのインフルエンザワクチン株ライブラリー……………喜田 宏  
カイコが黄色の繭を作るメカニズム—カロチノイドの選択的  
輸送機構の解明

……………土田 耕三・作道 隆・中島 健陽・藤本 浩文・  
高田 直子・片岡 宏誌・瀬筒 秀樹・田村 俊樹  
乗用型水田用除草機を利用した水田内複合除草技術の開発  
……………宮原 佳彦

#### 地域の先端研究

デジタルビデオ録画像の利用により牛超音波肉質診断の脂肪  
交雑推定精度の向上を図る……………川田 智弘

#### 文献情報

泌乳牛への脂肪酸給与が卵子の品質や胚発生に及ぼす影響  
……………(抄訳: 下司 雅也)  
ブラシノステロイドのシグナル伝達で働くBAK1は, フラジェ  
リンによる誘導でFLS2と複合体を形成し, 植物の防御反  
応を開始する……………(抄訳: 久保山 勉)  
HIV-1抗ウイルス薬Cyanovirinを分泌する乳酸菌に  
ついて……………(抄訳: 芦田 延久)  
イガイとヤモリにヒントを得た着脱可能な水中接着因子  
……………(抄訳: 足立 亨介)

#### 生研センターからのご案内

## ◀地域の先端研究▶

## 北海道産サケの品質等級判別システムの開発

北海道立工業試験場  
技術支援センター 技術支援第一科  
宮崎 俊之

北海道産サケの輸出量は年々増加している。サケの品質等級は身色により決まり、水産加工工場で熟練者が感覚と経験に基づき等級判断を行っているが、個人差・地域差等による等級誤認が発生し、海外の加工業者からのクレームが多発している。本研究では輸出の主形態であるドレス加工状態のサケを解体することなく身色計測できる計測技術を開発し、加工業者や産地市場で使用可能な等級判別装置を製作、評価を行った。

## 1. はじめに

平成17～18年度に北海道立工業試験場(工試)では北海道重点領域特別研究「北海道産鮭の品質等級判別システムの開発」を実施した。本研究では、北海道漁業共同組合連合会(道ぎょれん)や北海道大学水産学部、網走水産試験場紋別支場(網走水試)、早坂理工株式会社(札幌)、株式会社エスイーシー(函館)と共同で、熟練者の感覚に基づく判別法に代わる、新しい北海道産サケの等級判別方法と装置の開発を目指し、サケの身色計測手法およびアルゴリズムの開発、水産加工工場等の現場で使用可能なサケ等級判別システムの開発を行った。

## 2. 研究の背景と概要

海外(特に欧州)ではBSE問題や健康志向から、天然物である北海道産サケの需要が高まっており、道ぎょれんでは海外への積極的な販路拡大を図っている。サケの輸出は、ここ数年で急激に増加し、平成17年度には、輸出量では66千トン(原魚換算82千トン)と、すでに国内漁

MIYAZAKI Toshiyuki  
〒060-0819 札幌市北区北19条西11丁目

獲量の1/3以上を占めるようになった。輸出金額は146億円であり、その殆どがドレス加工(頭・内臓を落とした状態)され、二次加工である中国へ輸出され、等級に応じてサーモンスターキやフレック等への加工が行われた後、欧州へと再輸出されている(図1)。

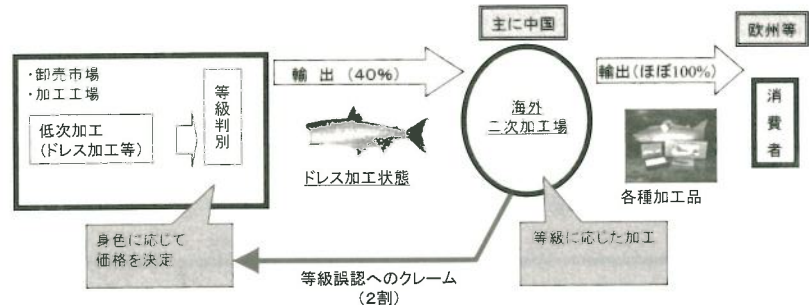


図1 北海道産サケの流通形態(輸出)

サケの品質で最も重要な項目は身色であるが、輸出形態は身色が直接見えないドレス状態が主であるため、漁獲時期による推定やエラの目視や身締めなどの人間の感覚による判断では等級誤認によるクレームが発生し(2割程度)、北海道産サケのブランド力や市場競争力強化の妨げとなっている。また個人差や地域差による判断基準の差違も大きく、これらの要因による品質のばらつきも問題となっている。

これらの問題を解決するために、平成16年に道ぎょれんより技術相談があり、翌年より研究開発をスタートした。開発にあたり必要とされ



たのは、下記の3点である。

- ①測定の際に魚体の商品価値を損なわない事
- ②現在の等級判別基準に則した物である事
- ③水産加工工場の現場で使用可能である事

①では、予備試験で魚体にあける穴の大きさを変えた試験を行い、直径2mm程度では問題が無いことを確認した。そこで本研究では、この微小な穴を通して、内部の身色を安定的に計測する技術を開発することを目指した。②では同一のサケサンプルを熟練者と色測定器の双方で評価し、両者の比較により等級判別基準を決定する事とした。また③では開発した計測技術と判別基準を評価し、実用化に向けた問題点を洗い出すための試作機を開発し、水産加工工場にて現場試験を行うこととした。

上記に基づき決めた開発項目および担当機関は、以下の3項である(図2)。

- ①プローブを用いたサケ品質計測技術の開発  
(工試、北大)
- ②サケ身色をベースとした品質評価基準の確立  
(網走水試、道ぎょれん)
- ③試作機の開発と評価  
(工試、道ぎょれん、民間企業2社)

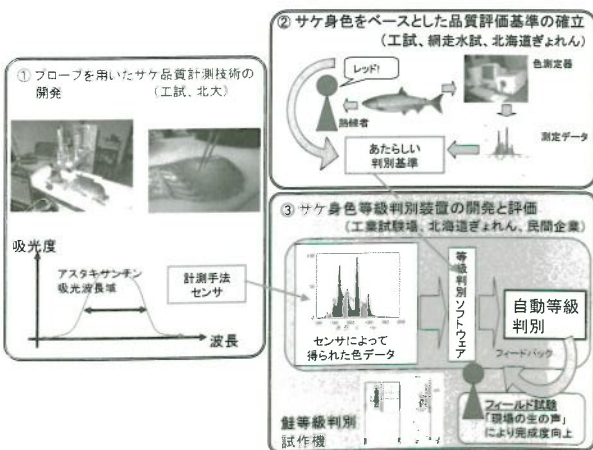


図2 開発体制

### 3. サケ品質計測技術の開発

ドレス状態で身色を測定するために、体表に穴を開けて光ファイバを挿入、サケ内部に光を照射・受光し、身色に関する特徴量を計測可能な測定系を開発した(図3)。光源には十分な光量を確保でき、連続したスペクトルをもつハロゲン光源を、また分光器には高い感度が確保できる背面入射CCD型を採用した。

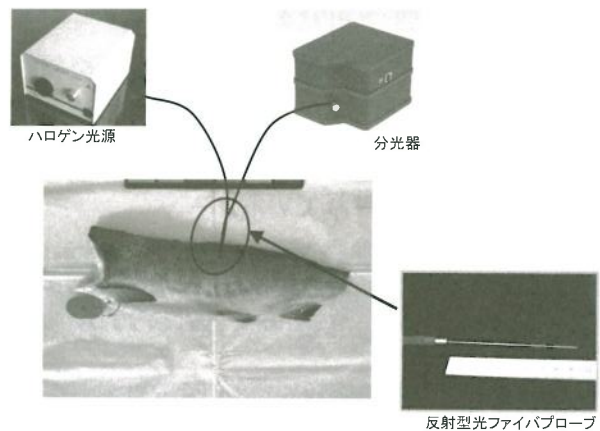


図3 開発した計測系

サケ体内には筋と呼ばれる筋肉間結合組織や骨、水分、血合肉などがあり、挿入箇所によら存在すると計測誤差が発生する。本研究では計測技術開発用のプロトタイプを製作し(図4)、キャリブレーション方法やプローブ形状等の改良を行い、これらの影響を排除する手法



図4 計測技術開発用プロトタイプ

を開発することで、安定した計測結果を得ることが可能となった。

#### 4. 身色に基づく品質評価基準の確立

サケ身色内にはカロテノイドのひとつであるアスタキサンチン色素が存在し、その含有量(≒身の赤さ)と味覚には強い相関関係が存在する<sup>1)</sup>。道ぎょれんではサケの身色をレッド、ピンク、ホワイトの3段階(または20~34の15段階)で区分し、これに基づくカラーチャート(サーモンチャート)を現場に配布、等級判断を行っている(図5)。この等級により輸出価格は決定され、最上級のレッドはホワイトの倍以上の値段で取引されている。



図5 サーモンカラーチャート

本研究では、同一のサンプルに対し、

- (1) ドレス状態でのプローブによる計測
  - (2) フィレ加工後、熟練者による身色判断(図6)
  - (3) 分光測色計を用いた身色計測
- を行い、実際に現場で使用されている判断基準を明らかにした上で、現在の判断基準と整合性がとれた3段階、および15段階の品質評価基準の確立を行った(図7)。

#### 5. サケ身色等級判別装置の開発と評価

本研究で開発した計測手法、等級判別アルゴリズムの妥当性を検証するために、等級判別装置の試作機を開発した。製作した試作機を図8に示す。本装置には光源や分光器、判別用PCを搭載し、開発したアルゴリズムに基づく等級判別が可能となっている。またエアピストンを用いたプローブ挿入機構やシーケンサ制御部、魚体の保持機構等を開発し、一定の場所に一定

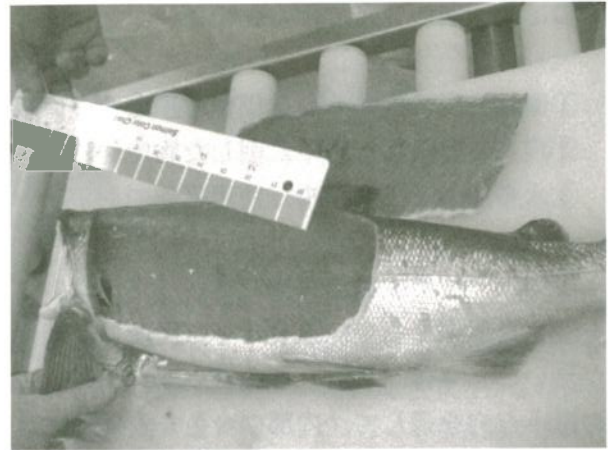


図6 熟練者による身色判断

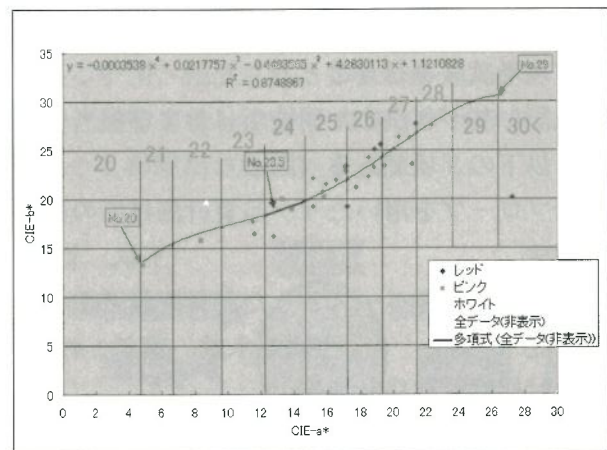


図7 作成した等級判別基準

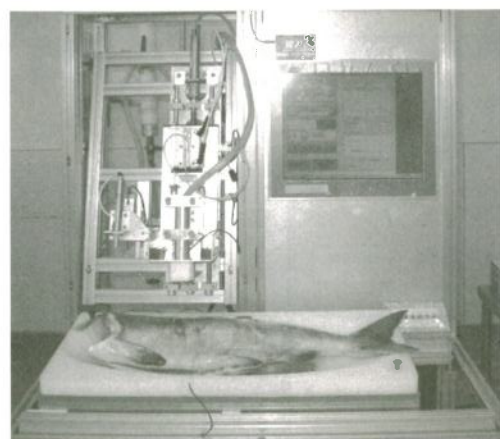


図8 サケ等級判別装置(試作機)

深さまでプローブを安定して突き刺す事ができる。さらにプローブ先端部の洗浄機構やタッチパネルを用いたユーザインターフェスを開発することで、現場で連続して安定的に自動等級判別をすることが可能となった。

また同装置を用いて、水産加工工場において実測試験を行い、計測精度の評価と、ユーザインターフェス部の改良、工場内使用における問題点の洗い出し等を行った(図10)。判別結果(装置により計測した色と、実際の身色の比較)は図11となり、非常に高い精度で色判別を行える事が確認できた。

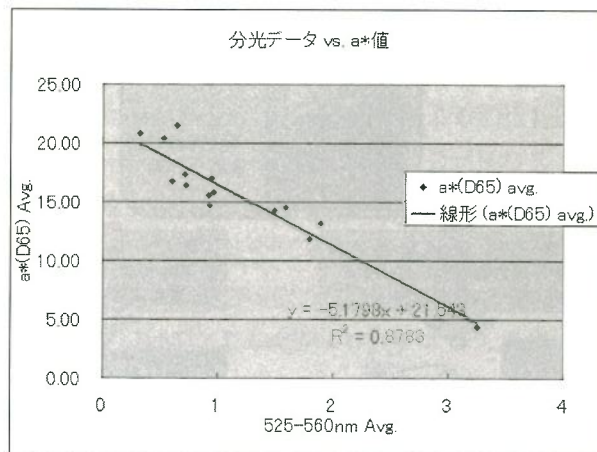


図11 判別結果の評価

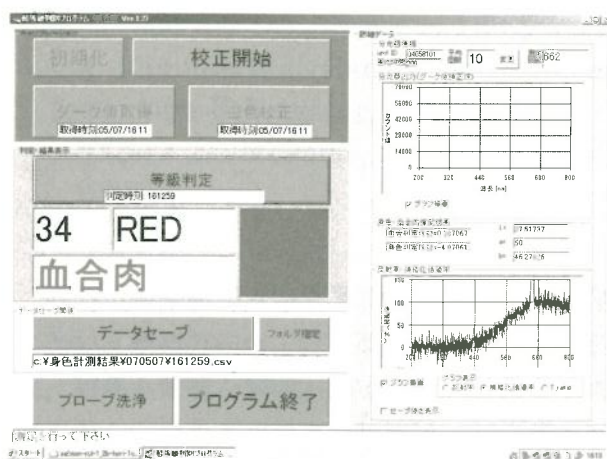


図9 等級判定ソフトウェア



図10 現場試験

## 6. おわりに

本研究では、プローブを用いたサケ品質計測技術を開発し、サケ身色をベースとした品質評価基準を確立することで、北海道産サケを客観的に等級判別する手法の開発を行った。また等級判別装置(試作機)を開発し、等級判別手法の妥当性を確認するとともに、水産加工工場において本装置が有効であることを確認した。今後はさらなる判別精度の向上を図るとともに、生産ライン向けのシステムやハンディ型等級判別装置の開発を予定し、早急な現場導入を目指していく(図12)。

また今年度より実施している「農林水産省・平成19年度先端技術を活用した農林水産研究高度化事業 サケ輸出促進のための品質評価システムの開発と放流技術の高度化」において、品質分析および製品管理・供給システムの開発として身色計測技術の精度向上、および他の品質分析技術の開発を行う予定である。






図12 今後の開発予定

文 献

- 1) 羽田野六男, 高橋是太郎, 高間貞敏, 中島登三 (1987), 秋サケ肉質の官能評価, 北海道大学水産学部研究彙報, 北海道大学, 北海道



**ブレイン テクノニュース**

バックナンバーのご案内

第122号

2007年 7 月15日発行

---

**総 説**

致死性人獣共通感染症, 狂犬病の研究に関する歴史・現状・今後の展開……………源 宣之

**国内情報**

デンプン合成酵素の変異を利用して開発された甘味種コムギ……………中村 俊樹・新畑 智也・齊藤 美香

ジベレリンを不活性化する新しい酵素を発見—植物の大きさを制御……………山口 信次郎

シロアリセルラーゼの微生物生産—シロアリ消化系のバイオマス変換への応用を目指す……………渡辺 裕文

エゾアワビのゲノム連鎖地図の作成……………関野 正志・原 素之

農業機械のユニバーサルデザイン……………菊池 豊

**文献情報**

有糸分裂中のマウス受精卵への染色体移植後の発生のリプログラミング……………(抄訳: 下司 雅也)

葉から茎頂へ伝達され花を誘導するシグナルの正体はFTタンパク質である……………(抄訳: 久保山 勉)

リーシュマニアの代謝と毒性におけるメチレンテトラヒドロ葉酸リダクターゼの解析……………(抄訳: 金井 宗良)

CD36は, 口腔感覚系における食物油の検知と自然誘発的な脂肪の好みそして消化分泌に関与する…(抄訳: 下野 将司)

## ◀文献情報▶

## 二母性胚由来マウスの高率生産

High-frequency generation of viable mice from engineered bi-maternal embryos

Manabu Kawahara<sup>1,2</sup>, Qiong Wu<sup>1,2,4</sup>, Nozomi Takahashi<sup>1</sup>, Shinnosuke Morita<sup>1</sup>, Kaori Yamada<sup>1</sup>, Mitsuteru Ito<sup>3</sup>, Anne C Ferguson-Smith<sup>3</sup> & Tomohiro Kono<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of BioScience, Tokyo University of Agriculture, Japan.

<sup>2</sup>Bio-oriented Technology Research Advancement Institution (BRAIN), Japan.

<sup>3</sup>Department of Physiology, Development & Neuroscience, University of Cambridge, UK.

<sup>4</sup>Present address: Department of Life Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Heilongjiang.

*Nature Biotechnology*, 25, 1045-1050 (2007)

雌の生殖細胞のみから子孫を生み出す単為発生という繁殖方法は、ほ乳類では過去に放棄され、利用不可能な繁殖方法である。これまでの研究から、マウスの単為発生胚は、10日齢で死ぬことが知られていた。これは、配偶子形成の際に遺伝子に親特異的なエピジェネティックな修飾がおこるため、雌雄両性による生殖が不可欠であるためと考えられている。このようにインプリンティングされた遺伝子は、雌親あるいは雄親の対立形質から不均一に発現することとなる。2004年、Konoらは、H19遺伝子の13k塩基を削除した変異マウス由来の非成長期卵母細胞 (non-growing oocyte) と成熟卵子 (fully grown oocyte) 由来の2セットの半数体雌性遺伝子を用いて再構築した卵子から、二母性胚由来マウス (発表時には単為発生と表現されていたが、その後、内容を正確に表現するために二母性胚という表現が使用されている) を誕生させることに成功した。ただ、この時点では、371個の胚の移植によって、2匹の生存産子 (うち一匹が「かぐや」) が得られたのみであり、生存産子の生産率は非常に低いものであった。

その後、ゲノムのメチル化解析の結果等をもとに研究が継続され、今回、H19 Differentially methylated region (DMR) およびDlk1-Dio3 intergenetic germline-derived DMRの2カ所の領域を欠損している非成長期卵母細胞と成熟卵子をもとに二母性胚が作製された。323個の再構築胚のうち286個が胚盤胞期まで発生し、29匹への移植により42匹の生存マウスを得ることに成功した。42匹のうち38匹が仮親に哺育させることに成功し、体重1.1kg以上であった27匹が成体にまで発育した。二母性胚由来マウス胎子が満期まで正常に発生するのを妨げる父性側の障害が、H19 DMR及びDlk1-Dio3 intergenetic germline-derived DMRの2種類の父性ゲノムインプリンティング制御領域以外には無いことを示す証拠となると論文上では考察されている。

ほ乳類が成体に成長するためには、一般には母性ゲノムと父性ゲノムの両方が必要である。それは、ほ乳類の発育がゲノムインプリンティングにより厳重に制約されているためであり、そのため単為発生は確実に妨げられている。本論文において、体外受精により得られる正常胚に匹敵する高い確率で二母性胚の作製が可能であり、この二母性胚由来マウスは、生殖可能なメス成体にまで成長することが明らかとなった。マウス以外のほ乳類にはすぐには応用できないであろうが、ほ乳類においても雄なしで子孫をのこせる可能性が示された。本研究の成果は、ほ乳類の発生に対する雌性および雄性遺伝子の役割やインプリンティングの機構を解明するための足がかりになるものと期待される。ただ、この分野の研究は、倫理面に十分な注意を払いながら進めていく必要がある。

(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▶

## 受容体様キナーゼFERONIAは花粉管を胚珠が受け入れる際の雌雄相互作用を取り持つ

The FERONIA Receptor-like Kinase Mediates Male-Female Interactions During Pollen Tube Reception

Juan-Miguel Escobar-Restrepo, Norbert Huck, Sharon Kessler, Valeria Gagliardini, Jacqueline Gheyselinck, Wei-Cai Yang, Ueli Grossniklaus

Institute of Plant Biology and Zürich-Basel Plant Science Center, University of Zürich, *Science* 317, 656–670, 3 August, 2007

被子植物では花粉が雌しべの柱頭で発芽し、自分では動くことができない2つの精細胞が伸長する花粉管によって雌性配偶子（胚嚢）へと運ばれる。正しい花粉管の誘導には雌性配偶子から出される走化性シグナルが必要であり、これらのシグナルによって花粉管は珠孔へ誘導される。シロイヌナズナを含む多くの被子植物では、雌性配偶子は卵細胞、2つの助細胞、中央細胞、3つの反足細胞の7つの細胞からなり、助細胞が花粉管の誘導に必要であることが示されている。ほとんどの被子植物では、花粉管が珠孔に入るか入らないうちに片方の助細胞が壊れ、花粉管は織形装置を通して、壊れた助細胞に入る。花粉管は胚珠に入ると花粉管は伸長を停止し、破裂し、精細胞が放出される。花粉管が破裂すると、新たな花粉管の誘導は阻害され、各珠孔には1つの花粉管だけが入ることになる。これまで、雌性配偶子における花粉管の受け入れが分子レベルでどのように制御されているのかについては知られていなかった。シロイヌナズナでは、雌性配偶子の因子 *feronia* (*fer*) や *sirene* (*sir*) によって花粉管を受け入れるかどうかが決まることが示されている。著者らは、この論文で、この遺伝子産物が細胞膜に存在する受容体キナーゼであり、助細胞の線型装置にあることを示した。また、このタンパク質の受

容体とリガンドの相互作用が種間交雑における生殖隔離に関わっているかもしれないことを示した。

*fer*や*sir*において、雌性配偶子は正常に形成されるが、雌性配偶子に入っても花粉管は伸長が止まらず、破裂せず、精細胞の放出も生じない。これらの遺伝子をポジショナルクローニングすると、*fer*と*sir*は同じ遺伝子の異なる部位に変異の入った変異体であることが明らかになった。また、*FER*は、CrRLK1L-1と同じ遺伝子族に属するセリン-スレオニン型の受容体様キナーゼをコードしていた。GST融合タンパク質を発現して調べたところ、*FER*はキナーゼ活性を持ち、リン酸化を受けることが明らかになった。RT-PCRによって発現パターンを調べると、葉、芽、花、実で発現が見られた。さらに、組織切片上でmRNAを検出すると花の頂端分裂組織、胚珠の若い原基、未熟な花粉を含んだ若い葯で発現が見られたが、成熟した花粉を含む葯では発現が見られなかった。除雄した花では、胚珠での*FER*の発現はとても弱いものであったが、助細胞で強い発現が観察された。また、受精後の胚では、球状胚のステージから発現が検出され、遺伝的な解析結果と合わせて、*FER*は胚発生においても必要な遺伝子であると考えられる。さらに、レポーター遺伝子を用いた解析から、*FER*は細胞膜に局在し、助細胞で強く発現することが確認された。また、*FER*のプロモーターで誘導された*FER*とGFPの融合タンパク質の蛍光は、助細胞の下部で強く見られた。この非対称的な発現パターンは通常の細胞膜局在タンパク質では見られず、*FER*に特異的なものであり、*FER*が織形装置の付近に多く存在することが明らかになった。この発現パターンは、*FER*が織形装置にあって、雄性配偶子から出されるリガンドの受容に関与しているというモデルによく合うものであった。*FER*とそのリガンドの相互作用が受精に必要ななら、これらの部品の変化は生殖隔離の形成につながると考えられる。このモデルが正しいければ、シロイヌナズナと近縁のアブラナ科



の植物を交雑したときにferで見られたような表現型が観察されるであろうと考えられる。そこで、*Arabidopsis lyrata*と*Cardamine flexuosa*で調べると、ferのように雌性配偶子内で過剰に伸長している花粉管が観察された。一方、これらの近縁種間で、FERについて同義置換(Ks)と非同義置換(Ka)を調べたところ、細胞外に位置し、リガンドと相互作用すると考えられるアミノ酸配列でKa/Ks値が高くなっていた。そのため、これらの部位が2つの種間での

生殖隔離に関わっている可能性が示された。FERの細胞情報伝達に関する今後の研究は、植物の受精や生殖隔離といった問題を分子レベルで解き明かすのに役立つだろう。また、FERの遺伝経路を操作すれば、これまで得ることが難しかった組み合わせで雑種が得られるようになるかもしれない。

(抄訳：久保山勉, KUBOYAMA Tsutomu, 茨城大学農学部)



ブレインテクノニュース

バックナンバーのご案内  
第121号

2007年5月15日発行

総説

植物の誘導抵抗性—広範な病原体に有効な植物独自の自己  
防御システム—……………高橋 英樹

総説関連情報

植物の全身獲得抵抗性……………瀬尾 茂美・光原 一朗  
植物の誘導全身抵抗性……………有江 力  
ジーンサイレンシングによる植物のウイルス抵抗性…増田 税

国内情報

アカネズミが有するタンニン無害化メカニズムを解明  
……………島田 卓哉・齊藤 隆・大澤 朗  
ブタにおいて椎骨数を増大させ体を長くした遺伝子の解明  
……………美川 智

繋ぎ飼い飼養における新酪農システム実証試験

……………道宗 直昭・志藤 博克・高橋 仁康・平田 晃・  
後藤 裕・川出 哲生・原田 泰弘・皆川 啓子・  
山名 伸樹

地域の先端研究

LAMP法と黄化葉巻病常発地域を活用した抵抗性トマトの  
選抜技術の確立

……………福田 至朗・加藤 政司・穴井 尚子・矢部 和則

文献情報

体細胞核移植後のトリコスタチンA処置によるクローズド  
コロニーマウスのクローン作出……………(抄訳：下司 雅也)  
Gタンパク質連結型ABA受容体の発見……………(抄訳：久保山 勉)  
乳酸菌のS-layerタンパクを被覆したリボソームの特徴づけ  
……………(抄訳：芦田 延久)  
シロアリに共生している原生物は、やはりセルラーゼ産生  
に関与している……………(抄訳：鈴木 賢一)

## ◀文献情報▶

## 末端にシアル酸が付加された糖タンパク質を生産する酵母

Humanization of Yeast to Produce Complex Terminally Sialylated Glycoproteins

Stephen R. Hamilton,<sup>1</sup> Robert C. Davidson,<sup>1</sup> Tillman U. Gerngross<sup>1,2\*</sup> et. al

<sup>1</sup> GlycoFi Inc., 21 Lafayette Street, Suite 200, Lebanon, NH 03766, USA

<sup>2</sup> Thayer School of Engineering, Department of Biological Sciences and Department of Chemistry, Dartmouth College, 8000 Cummings Hall, Hanover, NH 03755, USA

*Science* 8 September, 2006 : Vol.313, no.5792, pp.1441-1443

酵母を宿主としたタンパク質生産系は、動物細胞を用いた生産系と比較してコストや時間、収量などの点において大きな利点を持っている。しかし酵母は治療に用いられるタンパク質の生産には向かず、現在そのほとんどが動物細胞を宿主とした生産系で生産されている。その理由の一つに、酵母が人間と同様のタンパク質へのN型糖鎖付加を行うことができないことが挙げられる。治療に用いられるタンパク質はほとんどが糖タンパク質であり、その機能の維持に正確な糖鎖付加を要求する。特に糖鎖末端へのシアル酸の付加は重要であり、末端へのシアル酸付加を持たないタンパク質は生体内において抗原抗体反応の標的となる。

N結合型糖鎖付加は小胞体からゴルジ体に輸送された段階では動物細胞と酵母の糖鎖付加の間に違いはない。小胞体からゴルジに運ばれ糖鎖が更なる修飾を受けるときに、哺乳類と酵母で違いが現れる。酵母では一般的にマンノース転移酵素により  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,6-結合でマンノースが付加する高マンノース型N結合型糖鎖を生産する。

一方哺乳類の糖鎖形成は一般的にマンノシダーゼによるマンノースの除去の後にN-アセチルグルコサミン、ガラクトースなど様々な糖が付加され、最後のステップとしてシアル酸付加

が起き複合型N結合型糖鎖を生産する。この糖鎖付加経路の違いが人間用の糖タンパク質を酵母で生産させる際に大きな障害となる。これを乗り越えるため筆者らは、酵母 *Pichia pastoris* の糖鎖付加経路を人間と同様の糖タンパク質が生産できるように遺伝的に改変した。

そこで筆者らはまず *P. pastoris* の糖鎖付加経路を破壊し、糖鎖付加に関わる輸送体や糖鎖付加酵素など様々な高等生物由来の計14個の遺伝子を導入することで人間と同様の糖鎖付加経路を作成した。特に糖鎖付加酵素をコードする遺伝子には、これらの酵素が *in vivo* において適当な場所で機能するようにゴルジ体膜への局在シグナルを融合した。またシアル酸付加に関わる遺伝子を導入することで糖鎖末端へのシアル酸の付加にも成功した。

これら人間の糖鎖付加経路を導入した *P. pastoris* において、ラットの造血因子であるエリスロポエチン (rEPO) を生産させた。rEPO は重度にグリコシル化されるたんぱく質であり、その安定性と効果にはグリコシル化が不可欠である。この株において生産させた組み換え rEPO は90%以上のものが末端にシアル酸をもち、これをラットに投与したところ有意に赤血球形成の増加が観察できた。

これら一連の研究により糖タンパク質を酵母細胞で大量生産できる可能性が得られた。将来は動物細胞による発現系は使われなくなるかもしれない。

(抄訳：平野拓也, HIRANO Takuya, 広島大学大学院 生物圏科学研究科)

## ◀文献情報▶

## ニジマスの視床下部，菱脳，ブロックマン体にはグルコセンサーが存在している

Evidence for the presence of a glucosensor in hypothalamus, hindbrain, and Brockmann bodies of rainbow trout

Sergio Palakof<sup>1</sup>, Jesus M. Miguez<sup>1</sup>, Thomas W. Moon<sup>2</sup>, and Jose L. Soengas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fisiologia Animal, Departamento de Biologia Funcional e Ciencias da Saude, Faculdade de Biologia, Universidade de Vigo, Spain;

<sup>2</sup>Department of Biology and Centre for Advanced Research in Environmental Genomics, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada

*Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007 292: R1657-R1666

摂食行動とエネルギー恒常性はグルコースなどの栄養素によって制御されている。哺乳類のグルコセンサーは膵臓の $\beta$ 細胞などに見出され、ヘキソキナーゼIV (HK-IV) とグルコキナーゼ (GK) が中心的な役割を担っている。グルコースの受容機構は血中グルコース濃度の増加により、グルコースが $\beta$ 細胞の細胞膜に存在するGLUT-2を介して取込まれることに始まる。このグルコースはGKによるリン酸化を受け、解糖系からTCAサイクルへ流入し、細胞内ATP濃度を増加させる。すると、ATP感受性 $K^+$ チャンネルが開いて細胞内へ $K^+$ 濃度を増加させ、細胞膜が脱分極することで $Ca^{2+}$ の流入とインスリン放出が起こる。

また、哺乳類の脳領域（視床下部，延髄，中脳）では、グルコースはシグナル伝達分子として機能する。つまり、グルコースにより興奮するGlucose-Excited (GE) ニューロンと、グルコースにより抑制されるGlucose Inhibited (GI) ニューロンが存在し、血中のグルコース濃度変化により応答することで、摂食行動等を調節している。

魚類では膵臓細胞は消化管に沿って分散して存在しているが、特に胆嚢付近に集合しているものをBrockmann体 (BB) と呼んでいる。BBは主に内分泌細胞である $\beta$ 細胞や少数の $\alpha$ 細胞、 $\delta$ 細胞で構成されており、ランゲルハンス島の構成に似ている。しかし、グルコセンサーに関する知見は少なく、絶食や再給餌などに応じてBBや視床下部のGK活性が変化することなどの報告に限られている。

そこで本研究では、ニジマスの各脳領域とBBにおけるグルコセンサーの存在を確かめることを目的とした。まず、ニジマスにウシグルカゴンとウシインスリン、2-デオキシ-D-グルコース (2-DG), D-グルコースを投与し、投与6時間後の各脳領域（視床下部，終脳，菱脳，中脳）とBBを採取した。この中で、視床下部と菱脳，BBにおいては哺乳類のグルコース応答と同様の変化が観察された。まず、血中のグルコース濃度の増加に伴い（グルカゴン，2-DG，グルコース投与群にて），GLUT-2 mRNA発現変化と，HK-IV，GK活性，グリコーゲン濃度の増加がみられた（インスリン投与群に対して）。これは哺乳類のGEニューロンや $\beta$ 細胞における変化と同様であった。このことは、血中グルコース濃度に応答するグルコセンサーが、視床下部や菱脳，BBに存在する証拠となりうる。今後は、魚類におけるグルコースによるGK活性化後のシグナル伝達機構と哺乳類のそれとを比較することが必要である。また、魚類用飼料中にはグルコースがほとんど存在しないことと、アミノ酸（アルギニンやリジン）がグルコースよりも強力なインスリン分泌誘導因子であることから、グルコース受容とアミノ酸受容の機構を調べることや、インスリン分泌との関連を検討することが求められる。

（抄訳：川中子誠，KAWANAGO Makoto，日本水産株式会社 中央研究所）





ブレインテクノニュース

バックナンバーのご案内

第120号

2007年3月15日発行

特集「DNAマーカー選抜による効率的育種」

- 1 DNAマーカー選抜による高度病害虫抵抗性ダイズの育成  
.....石本 政男
- 2 ハクサイ根こぶ病高度抵抗性系統の効率的選抜技術の開発  
.....松元 哲
- 3 おいしく、食べやすく、病気に強い果樹の品種開発の効率化  
.....山本 俊哉

国内情報

イネキチンエリシター受容体の発見と同定  
.....賀来 華江・渋谷 直人  
植物の新規ペプチドホルモンの発見とその利用の可能性

.....福田 裕穂  
スズメバチの繭から創る新シルク素材の開発—ホーネット  
シルク研究の最前線—.....亀田 恒徳・玉田 靖  
いも類の収穫前茎葉処理機の開発

.....貝沼 秀夫・青木 循・久保田 興太郎・安食 恵治

地域の先端研究

静電気を利用して農薬の付着性向上に役立つ散布機を開発  
.....山根 俊

文献情報

ブタ卵子からのデモコルシン処理を併用したハンドメイド除核  
.....(抄訳:下司 雅也)  
葉緑体は一酸化窒素の給源.....(抄訳:岩井 純夫)  
老化研究モデルとしての長寿命酵母.....(抄訳:家藤 治幸)  
飼料中の脂質量及び共役リノール酸がアトランティックサー  
モンでの脂質代謝酵素活性及び遺伝子発現に及ぼす影響  
.....(抄訳:竹村 秀平)

生研センターからのご案内



ブレインテクノニュース

バックナンバーのご案内

第119号

2007年1月15日発行

総説

発熱植物ザゼンソウに見出された非線形体温制御システム  
.....伊藤 孝徳・伊藤 菊一

総説関連情報

極小サイズ時系列のアンサンブル再構成による生態ダイナミクス  
推定法—農学における決定論的非線形予測とカオス制御の  
可能性—.....酒井 憲司

国内情報

コムギの低温適応においてRNAの働きを助けるタンパク質  
.....中南 健太郎・Dale Karlson・今井 亮三  
黄色フラボノイド、オーロンによる黄色花の分子育種  
.....小埜 栄一郎・中山 亨

自然免疫における病原体認識蛋白質の多機能性

.....倉田 祥一朗  
昆虫のステロイドホルモン合成を抑制する神経支配の発見  
.....田中 良明・山中 直岐・片岡 宏誌

地域の先端研究

細胞剥離法を用いたウシ性判別産子の生産に成功  
.....尾形 康弘・日高 健雅・松重 忠美

文献情報

細胞質内精子注入時に原形質膜と先体を同時除去した精子を用  
いることにより、卵子の活性化率と胚発生率が向上する  
.....(抄訳:下司 雅也)  
一酸化窒素合成酵素はまた振り出しに.....(抄訳:岩井 純夫)  
回腸部に病変が認められるクローン病患者においてパネート細  
胞の産生する $\alpha$ デフェンシンは減少している  
.....(抄訳:芦田 延久)  
レスベラトロールは、高カロリー餌摂取マウスの健康および寿  
命を改善する.....(抄訳:秦 淳一郎)

生研センターからのご案内

## 編集後記

124号をお届けします。本号の総説では、昨年発表されたミツバチゲノムを取り上げ、門脇辰彦氏（名古屋大学）らにゲノム解読の結果と今後の展望についてご紹介戴くとともに、総説に関連して、木村澄氏（畜産草地研究所）らにミツバチの抗菌ペプチドとその養蜂への応用について解説して戴きました。

その他の研究情報としては、幸義和氏（東京大学医科学研究所）らに常温保存可能な経口ワクチン・ワクチン発現米の開発、菊地淳氏（理化学研究所）らにNMRと<sup>13</sup>C安定同位体を活用した植物バイオマスの代謝・分解過程の追跡、根岸洋一氏（東京薬科大学）らに超音波を利用した動物細胞への核酸導入技術、深津武馬氏（産業技術総合研究所）らにマルカメムシの大豆害虫化と腸内共生細菌との関係、富田宗樹氏（生研センター）らに乗用型トラクタの使用者安全に関する調査結果、宮崎俊之氏（北海道立工業試験場）にサケの身色計測による品質等級判別システムの開発と、本号もバラエティに富み、それぞれ興味深い研究情報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）、久保山勉氏（茨城大学）、平野拓也氏（広島大学）、川中子誠氏（日本水産）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。

## 生研センター 業務のご案内

～研究開発を強力に支援いたします～

### 提案公募型の委託研究制度

- 民間企業の実用化段階の研究支援なら **民間実用化研究促進事業**
- 基礎研究のご提案なら **新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業**
- 異分野の共同研究や起業化を目指すなら **生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業**

### その他の支援制度

- 「共同研究先のあっせん」、「遺伝資源配布先のあっせん」などもお気軽にご相談下さい。

詳細は、生研センター企画部企画第1課までお問い合わせください。

## ブレインテクノニュース 第124号

平成19年11月15日発行

発行人 朝比奈 清

編集人 加藤 俊典

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