

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成20年7月15日（隔月1回15日発行）
ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No. 128

15 JULY, 2008

ブレインテクノニュース



閉花受粉性イネの穂
左：台中65号，右：閉花受粉性イネ



閉花受粉性イネの花の内部構造
左：台中65号，右：閉花受粉性イネ

特集 「イネをめぐる先端研究」 3
開花せずに受粉するイネとそのしくみ

¹ (独) 農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業総合研究センター，
² 東京大学 大学院農学生命科学研究科
吉田 均¹・長戸 康郎²

目 次

特集 「イネをめぐる先端研究」

- 1 ジーンターゲットングによるイネの分子育種 1
土岐 精一¹・清水 力²・遠藤 真咲¹・雑賀 啓明¹・阿部 清美¹・刑部 敬史¹
(¹(独)農業生物資源研究所, ²クミアイ化学工業(株))
- 2 RNAサイレンシングの経路を介したイネの茎頂分裂組織構築機構 6
佐藤 豊¹・野坂 実鈴¹・伊藤 純一² (¹名古屋大学 大学院生命農学研究科, ²東京大学 大学院農学生命科学研究科)
- 3 開花せずに受粉するイネとそのしくみ 11
吉田 均¹・長戸 康郎² (¹(独)農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業総合研究センター, ²東京大学 大学院農学生命科学研究科)

国内情報

- クモが出す糸の成分を蚕に組み入れ, 強度や伸縮性に優れた「スパイダーシルク」を開発 15
中垣 雅雄 (信州大学 繊維学部 応用生物学系 生物資源・環境科学課程)
- 簡便で高感度なフタトゲチマダニの小型ピロプラズマ原虫保有率検査法 20
寺田 裕¹・金平 克史²・大田 方人²・神尾 次彦² (¹(独)農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 東北支所, ²同 動物衛生研究所)
- 魚や肉の鮮度を簡便・迅速に測定する「鮮度チェッカー」 24
佐藤 実 (東北大学 大学院農学研究科 水産資源化学分野)
- 野菜接ぎ木装置用自動給苗ユニットの開発 30
小林 研¹・石綿 陽子¹・重松 健太²・大越 崇博³ (¹(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, ²現農林水産省 生産局, ³井関農機(株))

地域の先端研究

- 農作物を病害から護る「乳酸菌農薬」の開発 34
津田 和久¹・小坂 能尚¹・梅村 賢司²・三富 正明²・辻 元人³・久保 康之³ (¹京都府 農業資源研究センター, ²明治製菓(株) 生物産業研究所, ³京都府立大学大学院)

文献情報

- 新鮮な卵丘細胞の核と体内成熟卵あるいは体外成熟卵の細胞質を用いたウシの核移植 38
S. Akagi et al. (*Cloning and Stem Cells*, 10(1), 173-180, 2008) 抄訳: 下司 雅也
- シロイヌナズナでの減数分裂を伴わない配偶子形成 39
M. Ravi et al. (*Nature*, 451, 1121-1124, 2008) 抄訳: 高田 美信
- 麹菌の非相同組み換え修復に関与する *ligD* 遺伝子の欠損は遺伝子ターゲットング効率を著しく上昇させる 40
O. Mizutani et al. (*Fungal Genetics and Biology*, 45, 878-889, 2008) 抄訳: 水谷 治
- キンギョでのニワトリ生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンIIによる摂食への抑制効果 41
K. Matsuda et al. (*Hormones and Behavior* 54(1):83-9, 2008) 抄訳: 奥野 敦朗

- 生研センターからのご案内 (平成20年度 生研センターUR対策現地検討会) 42

表紙の説明

筆者らによって見出された「閉花受粉性イネ」は, 開花せずに受粉し正常に稔実する突然変異体である。遺伝子解析の結果, 「鱗被」と呼ばれる器官とおしべの形づくりを決定する *SPWI* 遺伝子の変異により, おしべは正常だが鱗被が変形して膨らまないため, 開花しなくなったものと考えられた。この変異体の発見により, 遺伝子組換えイネだけでなく, 紫黒米や赤米といった有色素米品種, 特定の成分含量を変化させた機能性品種, さらには, 原種や原原種段階での純度維持など多様な場面において, 花粉飛散による交雑を抑制する技術の開発が期待される。

詳細については, 11頁をご覧ください。

◀特集▶「イネをめぐる先端研究」1

ジーンターゲッティングによるイネの分子育種

¹独立行政法人 農業生物資源研究所 遺伝子組換え技術研究ユニット，
²クミアイ化学工業株式会社 生物科学研究所 バイオテクノロジー研究室
土岐 精一¹・清水 力²・遠藤 真咲¹・雑賀 啓明¹・阿部 清美¹・刑部 敬史¹

著者らはジーンターゲッティングにより、イネ染色体上の特定遺伝子に点変異を導入し、除草剤耐性のイネを育成することに成功した。本稿ではその育成過程について説明する。また今後ジーンターゲッティングをイネの分子育種において活用するためには、その効率向上が課題である。現在効率向上に向けて、どのような取り組みを行っているかについても解説する。

1. はじめに

近年のゲノム研究の成果を受け、イネにおいて農業上有用な遺伝子の同定とその機能解析が進み、育種のターゲットがDNAの塩基配列のレベルで明らかになりつつある。また今後のタンパク質の構造科学の進展により、改良型タンパク質（遺伝子）の設計も夢ではなくなってきた。従って植物の内在性の遺伝子を、塩基配列レベルで正確に改変する技術が確立できれば、直接的かつ効率的なイネの分子育種が可能になる。

改良したい遺伝子（標的遺伝子）に狙いを付けて改変する技術はジーンターゲッティング（GT）と呼ばれる。最近、GTが生じた植物の選抜法の改良や、GTの頻度自体を向上させることにより、モデル植物であるシロイヌナズナやイネにおいては再現性の高いGTの成功例が報告されるようになってきた。本稿では著者らの研究成果を紹介しながら、GT技術の課題と将来性に関して述べたい。

2. ジーンターゲッティング（GT）はどのようにして起こるのか？

高等動植物の細胞の中に、外から遺伝子（外来DNA）を人為的に入れた際、通常外来DNAは非相同組換えと呼ばれるシステムにより、染色体DNAにランダムに挿入される。これに対し外来DNAと染色体DNAとの間で、DNAの塩基配列の相同性に基づいた組換え（相同組換え）が生じる場合があり、これをジーンターゲッティング（GT）と呼ぶ。尚、高等動植物では非相同組換えが相同組換えに対して優位に働くために、GTの頻度が低い（ランダムな遺伝子導入の頻度がGTの1,000～10,000倍高い）。

3. イネにおけるGTによる遺伝子改変の実例

GTが極めて低頻度でしか起こらないため、GTにより標的遺伝子を改変したイネを作出するためには、イネ細胞への遺伝子の導入効率を向上させることと、GTが起きた細胞を効率良く選び出すことが、研究のポイントになると考えた。そこでモデル系かつ実用化を目指した研究として、GTにより除草剤の標的タンパク質の遺伝子に点変異を導入し、除草剤耐性のイネを作出することを試みた。

TOKI Seiichi¹, SHIMIZU Tsutomu², ENDO Masaki¹,
SAIKA Hiroaki¹, ABE Kiyomi¹, OSAKABE Keishi¹

¹〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2

²〒436-0011 静岡県掛川市満水276

イネにおける遺伝子導入法に関しては既に再現性の高い実験系が報告されていたが¹⁾、著者らはイネ完熟種子をプロリンを含む培地上で33-37℃で培養することにより、アグロバクテリウムの感染に適したカルスを迅速に誘導できることを見出し、最終的に高効率でかつ一ヶ月以内に形質転換イネの作出可能な実験系を確立した²⁾。

次にビスピリパックナトリウム塩（BS）という除草剤に対する耐性形質をGTによりイネに付与することを試みた。本研究では先ずBS耐性型のALS遺伝子領域をBS耐性イネ培養細胞よりクローン化し、タンパク質のN末端をコードする部分を削除することによって、ランダムな遺伝子導入ではBS耐性が付与されず、GTが起きたときのみBS耐性が付与されるベクターを作成した。これを上記の遺伝子導入法によりイネに導入し、BSに耐性を示すイネを選抜した（図1）。その結果得られた66個体の耐性イネを解析したところ、約2/3の耐性イネでは、相同組換えにより2点の変異のみが導入されていることが明らかとなった。また、次世代においては、BS耐性型のALS遺伝子のみを持つイネが、メンデルの法則に従って出現し、このイネはBSによる生育阻害を殆ど受けなかった

（図2，図3）。この極めて強力なBS耐性は、BSに感受性の内在性（野生型）ALSが排除されたことによって初めて獲得した形質だと考えられた³⁾。

除草剤耐性だけでなく、毒素耐性、耐塩性、色素合成能力等も、付与された形質の選抜が培養細胞レベルや幼植物体レベルで可能であり、本研究と同様のGTによりそれらの形質を導入できると考えられる。一方、付与された形質の直接的な選抜が困難な場合は、GTが生じた細胞を、GTによって付与される形質とは無関係に選抜しなければならない。この点において、動物細胞のGTで行われているポジティブ・ネガティブ選抜法は、植物のGTでも有効であることが既に報告されている⁴⁾。しかしながら一方で、最終的に変異のみを導入したい場合は、GT後にマーカー遺伝子を除去する手法の開発も必要である。

また以下に述べるように、相同組換えの効率を遺伝子の導入時に顕著に向上させることができれば、薬剤耐性遺伝子を持つベクターとGTベクターを共導入し、薬剤選抜後に、GTの生じた細胞・植物体をPCRによって同定することも、現実的なアプローチになると考えられる。

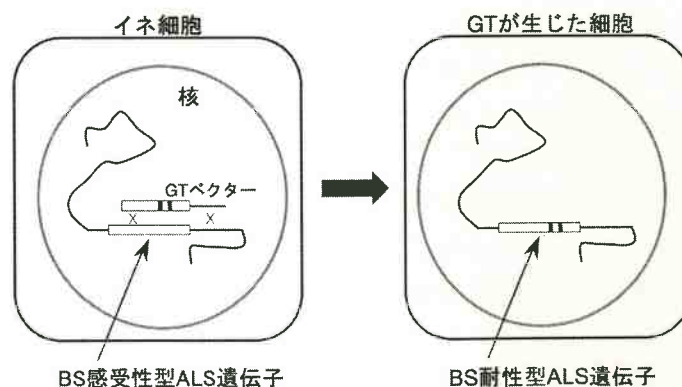


図1 ジーンターゲティングによるイネALS遺伝子の改変

イネゲノム中のALS遺伝子とベクター上のALS遺伝子間で相同組換えが生じた場合のみ、機能的なBS耐性型ALS遺伝子ができる。

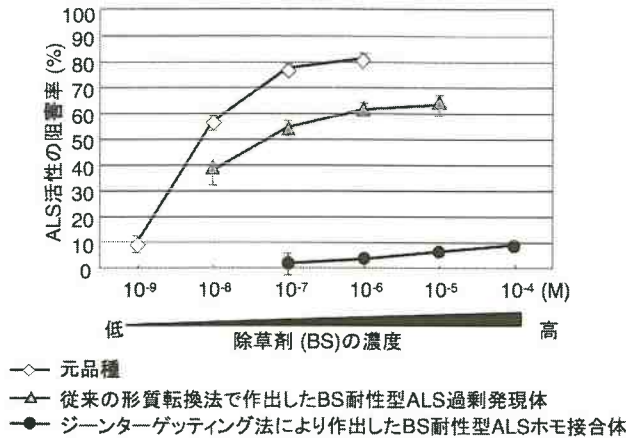


図2 ALS酵素活性の阻害率

ジーンターゲティング法により作出したBS耐性型ALSホモ接合体では、高濃度のBS添加時もALS酵素活性の阻害は殆ど生じない。

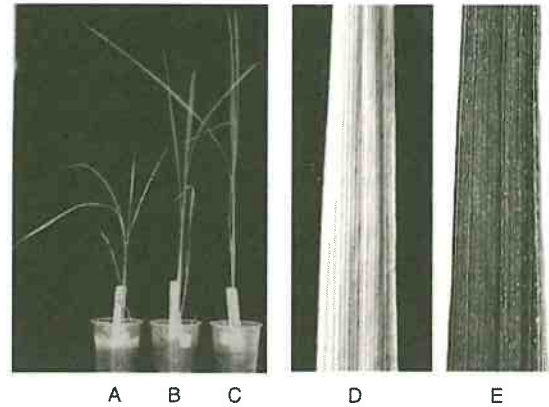


図3 BS剤散布試験

野生型 (A, D) はBS感受性であるが、ジーンターゲティング個体 (B, C, E) はBS耐性を獲得している。

4. GTの頻度を向上させるための研究

GTは宿主の相同組換えによるDNA修復機構を利用して行われる。従って、染色体上の標的遺伝子特異的にDNAの2重鎖切断 (DSBs) を導入できれば、GTの頻度を向上できると考えられる。また、相同組換えは多くの因子が関与するシステムであり、これらの因子を染色体上のDSBs部位に効率的にリクルートするためには、密に畳み込まれた染色体構造は障害になり、これを緩めなければならない。従って著者等は下記に示すようなアプローチでGT効率の向上を目指している。

5. Zinc-finger-nucleases (ZFN) の利用

標的遺伝子特異的にDSBsを導入するためには、任意の18塩基前後の塩基配列を特異的に認識し切断する制限酵素が必要になる。この目的において、転写因子のDNA結合モチーフの一種Zinc-fingerモチーフに特異的な塩基配列を認識させ、nucleaseドメインで切断させる人工制限酵素Zinc-finger-nucleases (ZFN) の設計・開発が進んできている。高等植物において

は内在性遺伝子のGTにZFNを活用してGT頻度を向上させた報告例は未だないが、今後有望な手法になると思われる。著者らは現在、ZFNの酵素活性や切断特異性を植物細胞内でアッセイする実験系の構築を検討しており、この系を用いてZFNを最適化し、実際のGTに適用していく予定である。

6. クロマチンリモデリング因子の利用

相同組換えに関与する因子の中でRad54と呼ばれるタンパク質は、クロマチンリモデリング活性を持つことが予想されていた (最近その活性も報告された)。従ってRad54の発現量を上げることにより、他の相同組換え因子のDSBs部位へのアクセシビリティを向上させ、結果的にGT効率を向上させることができるのではないかと期待される。著者らはシロイヌナズナの変異体を用いた解析により、植物においてRad54が相同組換えに重要な役割を持つことを初めて報告した⁵⁾。またイスラエルのLevyらの研究グループは、酵母のRad54タンパク質をシロイヌナズナで強制発現させることにより、GT頻度を10倍以上向上できることを報告した⁶⁾。

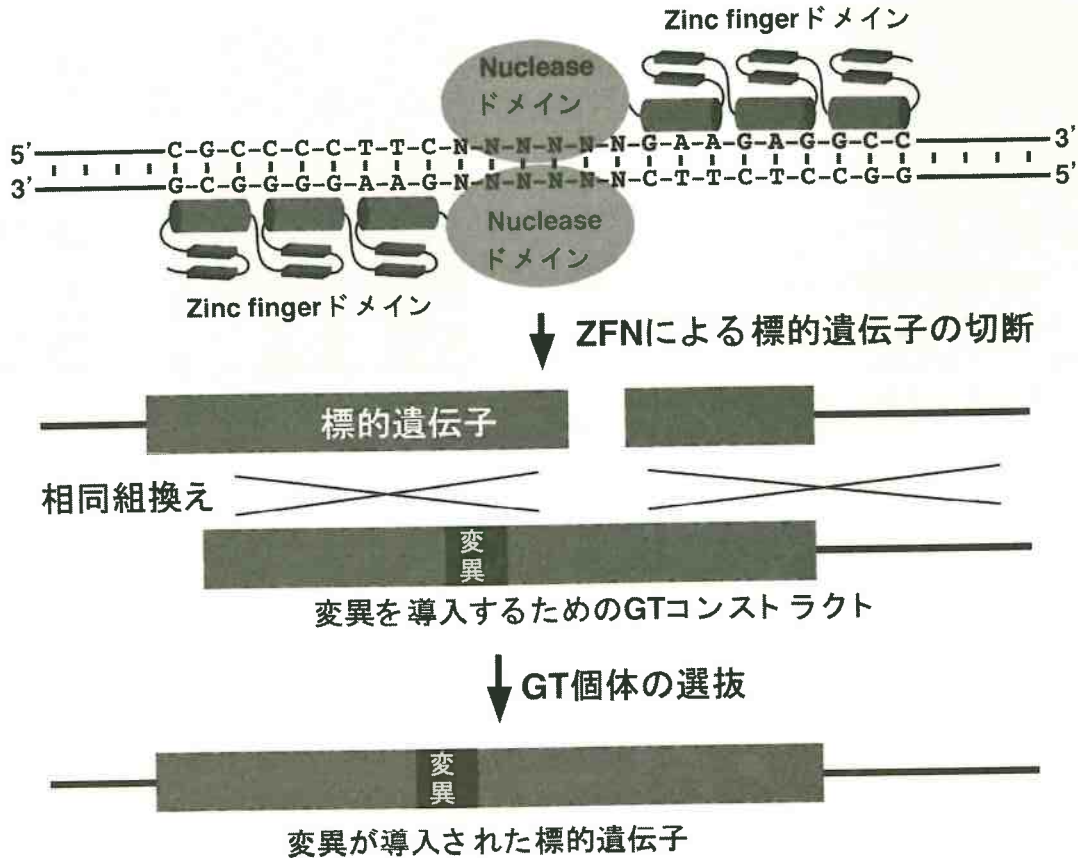


図4 ZFNを利用したGT

ZFNはホモあるいはヘテロダイマーとしてDNA切断に働く。図上段のZFNは5'-CGC CCC TTC NNNNNN GAA GAG GCC-3'配列を切断するZFNの例。図の例では上側ZFNのzinc fingerドメインは5'-GAAGAGGCC-3'配列に結合し、下側ZFNのzinc fingerドメインは5'-GAAGGGGCG-3'配列に結合する。DNAに結合しダイマーを形成したZFNは、認識配列に挟まれた任意の4-6塩基（図中では6塩基）を切断する。

従ってRad54を利用してGT頻度を向上させる試みは植物で有望だと考えられる。

7. 細胞周期制御によるGT効率の向上

DNA複製期（S期）は、DNAが一過的に裸に近い状態になることから、細胞周期のこの時期を狙って外来DNAを導入すればGTが生じ易いと考えられる。従って植物の培養細胞を同調化させ、S期に遺伝子導入を行えば効率的なGTが行えると考え検討が行われているが、成功には至っていない。これに対し著者等はDNA複製後のヌクレオソームの再構成に関与するシャペロンであるCAF-1（Chromatin Assembly Factor-1）のシロイヌナズナ変異体を用いた解

析により、この変異体ではS期の遅延に伴うDNA損傷の増加と、相同組換え関与因子の発現上昇が見られ、相同組換え頻度が顕著に向上することを見出した⁷⁾。従って細胞周期を制御し、S期を遅延させることはGT効率の向上に繋がると考え、現在検討を行っている。

おわりに

上記のGT効率を向上させるいくつかのアプローチを組み合わせることにより、近い将来、高等植物のGT技術が実用化されると思われる。

遺伝子組換え技術を活用して画期的な植物を開発することは、今後の食糧問題や環境問題を解決する切り札になると考えられるが、現在日

本国内では遺伝子組換え作物は未だ消費者から警戒されている。この警戒感は科学的な根拠によるものではなく、新規のものを警戒する心理から生まれるのであろう。この点GTを用いた育種は必要最小限の遺伝子改変であることから、計画された突然変異育種とも捉えることができ、従来育種の延長線上にある。従って消費者からも受け入れられ易いのではないだろうか。GTの手法で育成した作物の受容が進み、さらにそのことをきっかけとして、遺伝子組換え作物全体についての正しい理解と受容が進むことを期待している。

文 献

- 1) Hiei et al. (1994) *Plant J.* 6, 271-282
- 2) Toki et al. (2006) *Plant J.* 47, 969-976
- 3) Endo et al. (2007) *Plant J.* 52, 157-166
- 4) Terada et al. (2002) *Nature Biotechnol.* 20, 1030-1034
- 5) Osakabe et al. (2006) *Plant J.* 48, 827-842
- 6) Shaked et al. (2005) *PNAS* 102, 12265-12269
- 7) Endo et al. (2006) *EMBO J.* 25, 5579-5590

◀特集▶「イネをめぐる先端研究」2

RNAサイレンシングの経路を介したイネの 茎頂分裂組織構築機構

1名古屋大学 大学院生命農学研究科,
2東京大学 大学院農学生命科学研究科
佐藤 豊¹・野坂 実鈴¹・伊藤 純一²

茎頂分裂組織は植物体地上部の頂端部に位置し、そこにある未分化な幹細胞から茎葉が連続的に形成される。茎頂分裂組織はイネをはじめとするほとんどあらゆる作物にとってその生産性を大きく左右する葉や花などの器官の数や大きさに多大な影響を与えるものであり、その形成機構の解明は生産性の向上を目指して植物の地上部形態を戦略的に改良する上でも新たな方策の糸口となる可能性がある。

1. はじめに

植物の形を構成する基本的な要素となる葉・茎・枝は植物の軸の先端（植物の一番先端とは少し異なるが、ここでは詳しい説明は省略する）にある茎頂分裂組織と呼ばれる未分化細胞の集まりから作られる（図1）。茎頂分裂組織にある未分化細胞の一部が葉などの器官を作るのに使われる。このままだと、葉などの器官を沢山作っているうちに茎頂分裂組織の細胞はだんだん少なくなってしまうと思うかもしれないが、そこはうまくしたもので、茎頂分裂組織では、器官を作るのに使って減ってしまった細胞を補いながら新たな器官を作っている。このように、自分自身の性質を維持しながら新たな性質を持った細胞を生み出すことができる点が、しばしば茎頂分裂組織が幹細胞のような性質を持った細胞の集団と呼ばれる所以である。また、このような性質により、植物は一生のほとんどを通じて新たな器官を作り続けている。逆に考えると、植物によっては動物と比べものにならないくらい長生きするものもあるが、このような植物が毎年沢山の葉を作ることができるのも、茎

SATO Yutaka¹, NOSAKA Misuzu¹, ITOH Jun-ichi²

¹〒464-8601 名古屋市千種区不老町

²〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

頂分裂組織が持つ幹細胞のような性質によるといえる。

このように、茎頂分裂組織は植物が形を作る上で中心的な役割を果たしており、植物の形作りの仕組みを明らかにするために多くの研究者

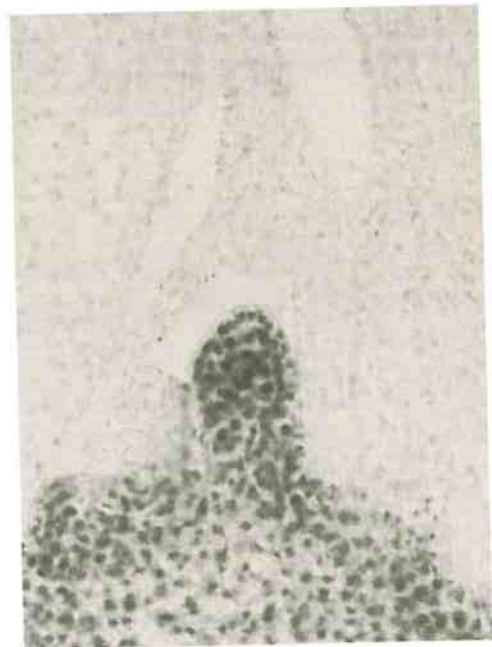


図1 イネの茎頂分裂組織

イネの茎頂分裂組織の縦断切片を未分化細胞のマーカーである OSH1 タンパクを認識する抗 OSH1 特異抗体を用いた免疫染色像。

が茎頂分裂組織に着目した様々な研究を行っている。筆者らの研究グループでは茎頂分裂組織が形成される仕組みに着目しイネを材料に研究を行っている。茎頂分裂組織は種子の中にある胚が形成されるごく初期の過程で作られる。そこで、胚形成の過程で、茎頂分裂組織を特異的に欠失する突然変異体の解析を行い、分子遺伝学的な手法によりこのプロセスを明らかにすることを旨とした。

2. イネの茎頂分裂組織構築に関わる突然変異体

イネではこれまでに多数の胚発生関連突然変異体が長戸らにより収集されており、その中には茎頂分裂組織を特異的に欠失する突然変異体として、少なくとも三つの *shootless* 変異体 (*shl1*, *shl2*, *shl4*) の存在が明らかにされている¹⁾ (図2)。一方、*shoot organization* 突然変異体 (*sho*) は茎頂分裂組織の構造と機能の異常により、糸のように細い葉を無秩序に作り出す²⁾ (図2)。*sho* 遺伝子座はこれまでに二つ (*sho1*, *sho2*) 知られているが、その後の解析により、*sho2* が *shl4* の対立遺伝子であることが明らかにされた。また、*shl2* の表現型の弱い対立遺伝子も同定され、これらが *shoot organization* 変異体と酷似していることから、*shoot organization* 突

然変異は *shootless* 変異の表現型の弱い対立遺伝子であると考えられた³⁾。そこで、これらの変異体において機能欠損を起こした遺伝子を同定することにより、逆に茎頂分裂組織構築に必要な遺伝子の同定を試みた。その結果、同定した3つの遺伝子 (*SHL2*, *SHL4/SHO2*, *SHO1*) はいずれも2006年度ノーベル医学生理学賞受賞研究であったことでも有名なRNAサイレンシングを起こすのに必須の因子であることが明らかになった⁴⁾。このことは、イネの茎頂分裂組織の形成がRNAサイレンシングと類似した経路により制御されていることを意味している。これまでに、シロイヌナズナを始めいくつかの植物種で茎頂分裂組織の形成に関わる因子が同定されているが、RNAサイレンシングに関わる因子が直接茎頂分裂組織構築に関わるという報告はなく、イネを材料にした本研究により初めて明らかになった茎頂分裂組織構築の経路だといえる。

3. 植物の内在性小分子RNAによる遺伝子発現制御

RNAサイレンシングは外来遺伝子由来の21nt前後の小分子RNAにより内在性遺伝子の発現が抑制される現象としてよく知られている。この現象自体は、人為的な遺伝子発現抑制技術

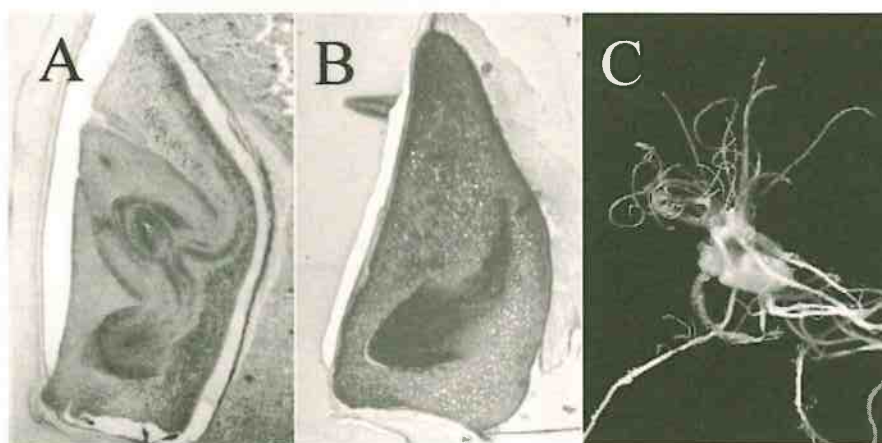


図2 イネの *shootless* および *shoot organization* 突然変異体
A. 野生型イネ胚 B. *shl2-4* 胚 C. *sho1-1* 幼苗

(RNA干渉法)として利用されている一方で、ウイルスの感染やトランスポゾンの転移といった外来遺伝子やゲノム寄生因子の侵入に対するホストの防御機構の一部であると理解されている⁵⁾。最近、内在性の遺伝子由来の小分子RNAも多数存在することが明らかにされている。内在性の小分子RNAは主に2つの種類に分類される。一つがmicroRNA (miRNA)と呼ばれる内在性小分子RNAで、ヘアピンループ構造を取り得る non-codingRNA に由来することが知られている。他方が、small interferingRNA (siRNA)である。内在性小分子RNAの生成経路やそれによる遺伝子発現制御が果たす役割が動植物で盛んに研究されている。植物においても、小分子RNAによる遺伝子発現制御が発生や環境応答などさまざまな場面で機能していることが知られているし、植物に独特の小分子RNA生成経路が存在することも知られている。これらの小分子RNAはRNaseIIIドメインを持つDICERと呼ばれる酵素が長い2本鎖RNAをさいの目状に切断することにより作られる。また、DICERの基質となる長い2本鎖RNAはRNA依存的RNA合成酵素 (RdRP)により作られる。DICERにより作られる小分子RNAはRISC (RNA induced silencing complex)と呼ばれるタンパク-核酸複合体に取り込まれ、そこで配列相補性を利用して特異的なmRNAを認識し、植物の場合主にRNAの切断により標的遺伝子の発現を抑制することが知られている。ARGONAUTE (AGO)タンパクはRISC複合体の主要な構成要素であり、小分子RNAとの結合ならびに標的の切断に関わると考えられている (図3)。筆者らが同定したSHL/SHO遺伝子はSHL2がRdRP, SHL4がAGO, SHO1がDICERタンパクをそれぞれコードしていた。こ

のようにSHL/SHO遺伝子は小分子RNAの生産と、小分子RNAによる遺伝子発現抑制に関与するタンパクをコードしていたことから、イネでは小分子RNAによる遺伝子制御が茎頂分裂組織の構築に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

4. イネのシュート構築を制御する小分子RNA生成経路

筆者らのグループはこれまでにshl2, shl4sho2, sho1突然変異の原因遺伝子を同定した⁴⁾。SHL2, SHL4/SHO2, SHO1はそれぞれシロイヌナズナのRDR6/SDE1/SGS2, AGO7/ZIPPY, DCL4のオルソログをコードしていた。これらはいずれもta-siRNAと呼ばれる一連の小分子RNA生産

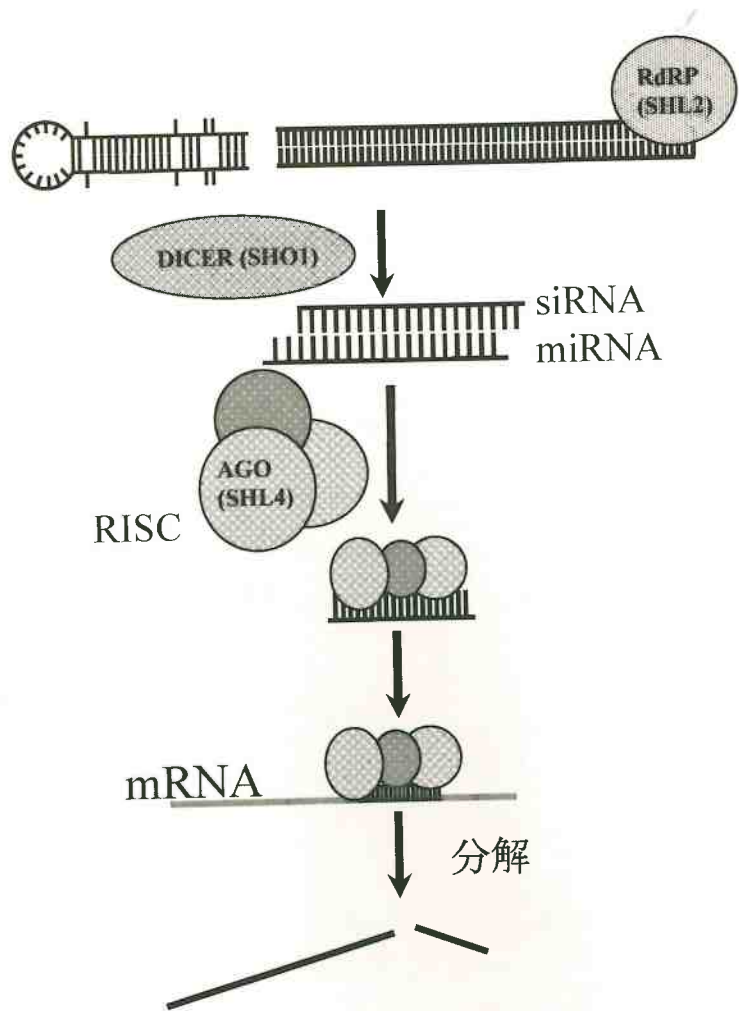


図3 RNAサイレンシング経路の模式図

に関わるコンポーネントであることがシロイヌナズナを用いた研究により明らかにされている。このため、イネではシュート構築に *ta-siRNA* 経路が働いていることが強く予想される。シロイヌナズナではこれまでに4つの *TAS* 遺伝子座が同定されている⁶⁾。このうち *TAS3* 遺伝子はイネにも存在する。*TAS3* 遺伝子は *tasiR-ARF* を作り出す前駆体である。そこで、*tasiR-ARF* の標的となる *ARF* 転写因子の発現を *shl/sho* 変異体で調べてみると発現が上昇していた。また、*tasiR-ARF* による標的の分解産物を RT-PCR により検出すると、変異体で減少していた。このことは、*shl/sho* 変異体において確かに *ta-siRNA* 経路の働きが低下していることを示している。トウモロコシにおいても *sho* と葉の表現型が類似した変異体 *leaf bladeless1 (lbl1)* が存在し、その原因遺伝子はシロイヌナズナにおいて *ta-siRNA* 経路に関わることが知られている *SGS3* と高い相同性を有していた⁷⁾。*lbl1* 突然変異体において *ta-siRNA* とは別の種類の小分子 RNA である *miR166* の発現上昇とその標的である *HD-ZIPIII* の発現低下が観察されている。イネの *shl/sho* 変異体においても *miR166* の発現上昇とその標的である *HD-ZIPIII* の発現低下が観察されている。このことは、イネとトウモロコシにおいて *miR166* の発現が *ta-siRNA* 経路の因子により制御されることを示唆している。しかしながら、筆者らの解析においても、トウモロコシの *lbl1* の解析においても *miR166* を介した *HD-ZIPIII* の発現制御と *tasiR-ARF* による *ARF* の発現制御がどのように結びつくのか明らかになっていない。

5. 茎頂分裂組織構築の多様性

筆者らの研究から、イネの茎頂分裂組織構築に小分子 RNA 生成経路（おそらくは *ta-siRNA* 経路）が必須の役割を果たしていることが明らかになった。同時に大きな疑問も湧き上がってきた。シロイヌナズナにおいて *ta-siRNA* 経路は茎頂分裂組織の構築に関与しない。このことは、

シロイヌナズナの *ta-siRNA* 経路の突然変異体がシュートレスにならないことから明らかである。茎頂分裂組織は幹細胞とも呼ばれる未分化細胞の集団からなり、植物体の地上部を作り上げる源となる。従って、その形成過程は陸上植物で保存されていて不思議はない。実際、これまで同定されてきた茎頂分裂組織構築に関わる転写因子やそのファミリーは陸上植物に保存されており、*HD-ZIPIII* も例外ではない。

筆者らの研究から茎頂分裂組織の構築における *HD-ZIPIII* の発現制御にシロイヌナズナと異なりイネでは *ta-siRNA* 生産経路が関与することが明らかとなった。このことは、発生の過程で器官や組織の分化機構を考えると、分化のスイッチとなる因子（例えば転写因子など）が適切な場所とタイミングで発現し機能するケースはよく知られているが、このような因子は発現パターンが同じであればその制御が異なっても、結果に影響はないのかもしれない。

一部の *microRNA* (*miRNA*) など、いくつかの低分子 RNA による遺伝子発現調節は多くの植物に普遍的に存在することが知られている。一方で、他の多くの低分子 RNA は進化の過程で新たな出現と消失を繰り返す進化の速い遺伝子と考えられている。このため、小分子 RNA を介した遺伝子発現調節のいくつかは種に特異的な遺伝子発現に関与していると私たちは考えている。逆に言えば、このことが *HD-ZIPIII* の発現制御の多様性を生み出しているのかもしれない。

6. まとめ

植物の場合、小分子 RNA 生成経路は動物に比べ多様で複数存在する。それぞれの経路に関わるコンポーネントである *DICER* や *AGO* をコードする遺伝子の数も多い。このため、植物には多様な内在性小分子 RNA が存在する。内在性小分子 RNA の多様性はタンパク質をコードする遺伝子よりも遙かに大きいことも最近明らかになってきた。植物の小分子 RNA 生産やそ

れによる遺伝子発現制御は、まだ解析が始まったばかりである。今後解析が進むにつれ、形態形成機構に限らず小分子RNAの果たす思いがけない役割が明らかになるに違いない。一方、小分子RNAはRNAサイレンシングを引き起こすトリガーとしても知られており、機能が明らかになった内在性小分子RNAを遺伝子発現抑制のトリガーとして利用し、作物の生産性向上につながることを期待している。

文 献

- 1) Satoh, N. et al. (1999), *Dev.* 126, 3629-3636
- 2) Itoh, J-I. et al. (2000), *Plant Cell* 12, 2161-2174
- 3) Satoh, N. et al. (2003), *Genetics* 164, 335-346
- 4) Nagasaki, H. et al. (2007), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 14867-14871
- 5) Matzke, M. et al. (2001), *Science* 293, 1080
- 6) Yoshikawa, M. et al. (2005), *Genes Dev.* 19, 2164-2175
- 7) Nogueira, F. T. S. et al. (2007), *Genes Dev.* 21, 750-755

◀特集▶「イネをめぐる先端研究」3

開花せずに受粉するイネとそのしくみ

¹独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業総合研究センター、

²東京大学 大学院農学生命科学研究科

吉田 均¹・長戸 康郎²

イネの花では、「鱗被（りんび）」という器官が膨らんで穎（えい）を外側に押し出して花が開く際におしべが花の外に出るため、花粉が飛散して自然交雑の原因となる。筆者らは、開花せずに正常に稔実するイネ突然変異体 *spw1-cl5* を発見した。この変異体では、鱗被の形を決定する *SPW1* 遺伝子の変異により、鱗被が変形して膨らまないため、花が開かない。遺伝子組換えイネをはじめとする多様な場面において、花粉飛散による交雑を抑制する技術としての活用が期待される。

1. はじめに

自花のおしべから放出された花粉がめしべに付着して受粉し、種子を作る性質を「自殖性」と呼ぶ。日本で栽培されているイネの大部分はきわめて自殖性が高いため、品種の純度が高度に維持されている。にもかかわらず、イネの花（小花）が開くときにおしべが花の外まで伸び出て花粉を飛散させるため、最も交雑しやすい隣接個体間でも1%以下という低頻度ではあるものの、自然交雑が起きる。遺伝子組換え農作物等の研究開発・実用化を進めていく過程においては、消費者の選択権を保障しつつ、生産者が安心して栽培できる状況を作ることが重要である。そのため、遺伝子組換えイネの花粉が飛散し、一般イネと自然交雑することを抑制する必要がある。植物の自然交雑を抑制する技術として、雄性不稔性や葉緑体形質転換など、様々な技術が提唱されているが、個々の技術の適用範囲は、対象となる植物の性質によって異なる¹⁾。イネの交雑を抑制するための技術の一つとして、開花せずに受粉・稔実するイネ（閉花受粉性イネ）を開発することが有効と考えられる。閉花受粉性植物は外部に花粉を飛ばさないだけ

YOSHIDA Hitoshi¹, NAGATO Yasuo²

¹〒943-0193 新潟県上越市稲田1-2-1

²〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

でなく、外部からの花粉も花の中に入り込まないため、さまざまな場面での自然交雑を抑制することができる。そのため、遺伝子組換えイネだけでなく、紫黒米や赤米といった有色素米品種、特定の成分含量を変化させた機能性品種、あるいは原種や原原種段階で種子の純度維持が強く求められる品種など、花粉飛散による交雑に対して注意が必要とされる場面での利用も期待できる。本稿では、農業・食品産業技術総合研究機構、東京大学、九州大学による筆者らの共同研究グループが新たに発見した閉花受粉性イネ突然変異体の特徴とその原因遺伝子、さらには作用メカニズムについて紹介する²⁾。

2. イネの花が開くしくみ—鱗被の重要な役割—

「花を開かずに受粉するイネ」を開発するためには、イネの花が開くしくみを特異的に阻害すればよいはずだが、そもそもイネの花はどのようにして開くのだろうか。イネの花は外側から、外穎と内穎の2つの穎（登熟後に「もみから」となる部分）、2つの鱗被、6本のおしべ、1本のめしべ、によって構成されている（図1）。おしべはさらに、先端部の「葯（やく）」と呼ばれる部分と、それを支えている「花糸（かし）」からなっており、1個の葯当たり千個以上の花粉

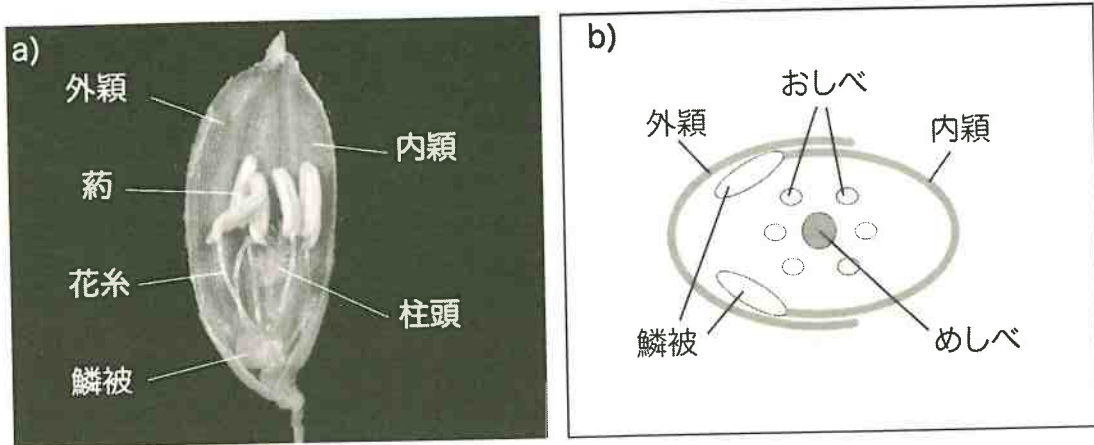


図1 イネの花の構造

a) イネの花の内部のようす。内部構造が見えるよう、外穎(左)と内穎(右)の手前側を取り除いてある。
b) イネの花の断面模式図

が詰まっている。外穎と内穎の先端が開いて離れることを「開花」と呼ぶが、開花を引き起こす原動力となっているのは、イネの花の中でも最も目立たない器官である「鱗被」である。鱗被は外穎の基部にある丸く小さな器官であるが、開花の直前から急激に膨らみ始め、外穎を外側に押し出すため、開花が起きるのである。鱗被は、花の中での位置や表面の細胞の形態、遺伝子の発現パターンなどから、イネの「花びら(花弁)」に相当すると考えられている。バラやサクラのような美しい花びらとはイメージがかけ離れているが、「花を開かせる機能」は共通していると言えよう。鱗被の内部には多くの維管束があり、ここに開花の直前から水が流れ込み、鱗被の膨張を起こすと考えられる。鱗被の膨張と同調しておしべの花糸も伸び始め、葯が花の頂上に向かって上がっていく。開花の始まる瞬間前後に葯が割れ、内部の花粉が自花の柱頭へと降り注がれて受粉する。葯が割れた後も花糸は伸び続けるが、やがて鱗被は萎んでしまい、花は閉じてしまう。花が閉じた後には、ほぼ空になった葯が外部に取り残され、枯れてしまう。萎んでしまった鱗被は再び膨張することができないので、一度閉じた花は二度と開かない。このため、穎にはさまれた葯の有無によって、花が開いたかどうかを判断することができる。

花粉飛散を防ぎつつ、稔実した種子を得るた

めには閉花受粉性が有効であるが、イネに閉花受粉性を付与することは可能なのだろうか？雨の日などにはイネは花を開かずに内部で花粉を放出して閉花受粉することが知られていることから、イネは潜在的に閉花受粉する能力を備えていると考えられる。また、閉花受粉性のイネもいくつか報告されているものの、矮性等の劣悪な農業形質を伴うため、実用には至っていない³⁾。一方、イネ科の作物であるオオムギやコムギなどでは、すでに閉花受粉性の品種が存在し、閉花受粉性のオオムギでは「鱗被」が小さいために外穎を押し出すことができずに、閉花性となることが示唆されている⁴⁾。これらの知見から、鱗被の形態だけを変化させることができれば、イネにおいても実用的な閉花受粉性を付与することが可能と考えられる。こうしたことから、鱗被の形態形成機構に着目して研究を進めることにした。

3. 実用的な閉花受粉性イネ突然変異体の発見

そこで筆者らのグループは、日本型(ジャポニカ種)のイネ品種「台中65号」の突然変異体集団を用いて、東京大学の圃場において閉花受粉性イネのスクリーニングを行った。はじめに、開花期に穎の外に葯が出ていないものを数

系統選抜したが、多くのものは不稔であったものの、花を開かずに正常に稔実するものを1系統見出すことができた²⁾。仮にこの変異体を、「閉花受粉性」を意味する「*cleistogamy*」(「クライストガミー」と発音する。略称：*cls*)と呼ぶことにした(図2)。遺伝子組換えイネの母本など、実用場面で利用するためには、低稔実率や矮性などの劣悪な農業形質を示さないことが必須となる。また、*cls*では葯がもみ殻の内部に残るため、米粒の外観等に悪影響が及ぼされる可能性も考えられた。そこで、*cls*がこうした劣悪形質を持っていないことを確認するため、中央農業総合研究センター・北陸研究センターと東京大学の圃場で*cls*を栽培し、出穂日、草丈、穂数、穂長、1穂粒数、稔実率、粒重、粒の形状や外観などの農業形質を調査した結果、原品種である「台中65号」と顕著な差が見られないことが明らかとなった。このことから、本変異体は実用的な閉花受粉性イネを開発するための遺伝資源として有望であると考えられた。*cls*の花では、おしべやめしべの形態には変化がないが、鱗被が平らで細長い穎状の器官に変化して膨らむことができなくなったため



図2 閉花受粉性イネの穂

左：台中65号，右：閉花受粉性イネ
閉花受粉性イネではおしべが花の外に出ない。

に、開花しなくなったものと考えられる(図3)。

4. 閉花受粉性の原因遺伝子の同定

さらに解析を続け、閉花受粉性の原因遺伝子が、鱗被とおしべの形作りを決定する *SUPERWOMAN1* (*SPW1*) 遺伝子であることをつきとめた²⁾。そこで、この閉花受粉性イネを *superwoman1-cleistogamy* (*spw1-cls*) と呼ぶことにした。*SPW1* 遺伝子は鱗被とおしべの形作りに関わる遺伝子群の発現を制御する転写因子をコードしており、*SPW1* 遺伝子の機能欠失型突然変異体では、鱗被だけでなく、おしべの形も変化してしまい、完全不稔となることが報告されていた⁵⁾。従来報告されていた *spw1* 変異体のアレルでは、「おしべ」が「めしべ」に転換することから、「*superwoman*」という名前がつけられていたのだが、同じ遺伝子が原因である *spw1-cls* 変異体でおしべが正常に形成され、正常に稔実するのは、なぜだろうか？筆者らの解析から、*spw1-cls* 変異体の *SPW1* タンパク質では1つのアミノ酸だけが性質の異なる別のアミノ酸に変異しており、それがタンパク質の微

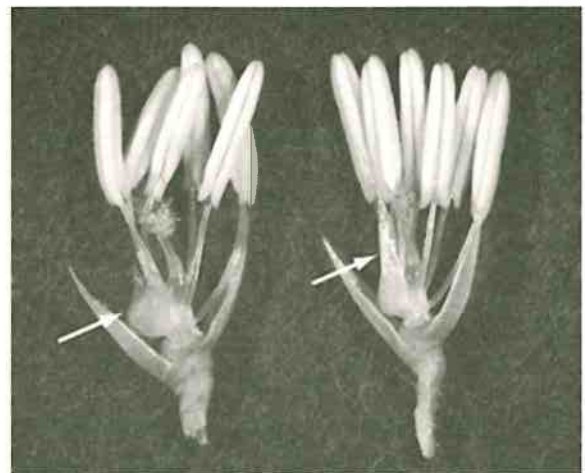


図3 閉花受粉性イネの花の内部構造

左：台中65号，右：閉花受粉性イネ
閉花受粉性イネでは、おしべは正常だが、鱗被(矢印)が細長く伸長している。
(内部が見やすいように、外穎と内穎を取り除いてある)

妙な構造変化につながり、SPW1タンパク質の機能が低下していることがわかった。このことから、*spw1-cla*変異体ではSPW1タンパク質の機能低下により、鱗被にだけ形態変化を生じ、閉花受粉性となったものと考えられた。

5. 今後の研究展開

*spw1-cla*変異体は実用的な閉花受粉性イネ品種を育成するための有望な遺伝資源として期待される。これまで、中央農業総合研究センター・北陸研究センターと東京大学で数年間の栽培を行ったところ、*spw1-cla*は安定して閉花受粉性を示しているが、環境の異なる地域でも閉花受粉性を示すかを慎重に確認する必要がある。そのため、今後はさまざまな地域でこの変異体を栽培し、閉花受粉性の安定性をさらに検証していく予定である。閉花受粉性イネを信頼できる技術として確立するためには、こうした知見を積み重ねていくことが重要であろう。また、原因遺伝子が明らかになったことにより、DNAマーカーを利用した通常の交配によって閉花受粉性を他の品種に効率的に導入することも可能となった。現在、*spw1-cla*変異体をさまざまな実用品種と交配し、閉花受粉性の準同質遺伝子系統(NIL)の育成を進めている。冒頭で述べたように、こうした系統は遺伝子組換え

イネの母本としての利用はもちろん、それ以外の多様な場面でも利用が期待される。また、鱗被の形態形成が閉花受粉性に重要な役割を果たすことが分子レベルでも明らかになったので、こうしたメカニズムを応用することによって、人為的に閉花受粉性イネを作出する技術の開発にも取り組んでいきたいと考えている。

謝 辞

本研究は農林水産省研究プロジェクト「遺伝子組換え生物の産業利用における安全性確保総合研究」ならびに文部科学省「科学研究費補助金」によって行われた。

文 献

- 1) Daniell, H. (2002) *Nature Biotechnol.*, 20 : 581-586.
- 2) Yoshida, H. *et al.* (2007) *Plant Biotechnol. J.*, 5 : 835-846.
- 3) Turuspekov, Y. *et al.* (2004) *Theor. Appl. Genet.*, 109 : 480-487.
- 4) Nagao, S. and Takahashi, M. (1963) *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.*, 53 : 72-130.
- 5) Nagasawa, N. *et al.* (2003) *Development*, 130 : 705-718.

◀国内情報▶

クモが出す糸の成分を蚕に組み入れ、強度や伸縮性に優れた「スパイダーシルク」を開発

信州大学繊維学部 応用生物学系 生物資源・環境科学課程

中垣 雅雄

蚕にスパイダーシルク遺伝子を導入することによって、スパイダーシルクを10%含む糸を作ることに成功した。この遺伝子導入蚕が吐くシルクは、蚕の絹糸にスパイダーシルク（クモ糸）の成分を混ぜた生物繊維で、両者の特徴を持ち合わせた新しい産業素材である。この技術は、スパイダーシルクの特徴を備えたシルクの量産を可能にするものである。2007年12月、奈良の靴下メーカーと共同でスパイダーシルクを10%含む糸でソックスを試作した。

1. はじめに — スパイダーシルクとは

スパイダーシルク（クモ糸）とは、どんな糸なのだろうか？映画『スパイダーマン』は、手首からクモ糸を発射できるという超能力を得た主人公が、そのクモ糸を使ってビルからビルへ自由自在に飛び移って悪者と闘う話である。芥川龍之介の小説『蜘蛛の糸』は、お釈迦様が極楽から地獄の底に垂らしたクモ糸をよじ登って地獄から這い上がろうとする罪人の話である。「こんな話は映画や小説の中の絵空事。現実には、クモ糸に人がぶら下がるわけがない！」と思いついでいる方も少なくない筈である。体重数gのクモは、注意深く凝視しなければ見落とすような極細の糸を命綱（牽引糸）にしてぶら下がっている。体重60kgの人がぶら下がるには、計算上では直径0.5mm程度の太さのクモ糸（命綱）があればよいそうである。奈良県立医科大の大崎茂芳教授（生体高分子学）は、新聞報道（2006年05月23日付け読売新聞）によると、コガネグモの糸を束ねて太さ2.6ミリのロープ（理論上は600kgまで耐えられるロープ）を製作し、ハンモックを吊るすひもの一部にそのロープを使い、体重65キログラムの大崎教授自身が5分以上ぶら下がることに成功したという。

NAKAGAKI Masao

〒386-8567 長野県上田市常田3-15-1

簡単に破れそうに見えるクモの巣は、時速30kmで飛ぶミツバチが衝突しても切れることはなく、衝撃をうまく吸収する。もし、鉛筆の太さのクモ糸で大きなクモの巣を張れば、時速800kmで飛んで来るジャンボ・ジェット機を止め得るといえる。クモはハエ・ガ・ゴキブリなどの害虫を捕食して益虫の役割を果たすが、その容姿を忌み嫌う人が多いことから、日本では不快害虫のカテゴリーに入れられることが多い。ところが、その不快なクモが作る糸（スパイダーシルク）が今、極めて強い糸として世界中で注目されている。

2. 「クモの巣」を構成するクモ糸の種類

「クモの巣」と私たちが呼ぶのは、クモが餌となる虫を捕らえるための網のことである。多くの人が「クモの巣」として思い浮かべる網は、図1に示すような円網であろう。円網では、中心から放射状に引かれた糸（縦糸）に同心円状（正確には螺旋状）の糸（横糸）が張られる。横糸は縦糸の1/4程度の引張り強度で切れてしまうが、破断時の伸びは200%以上もある。横糸の表面は粘着性の糸（粘球）で覆われている。円網の中心付近には横糸がなく、「こしき」と呼ばれる縦横に糸が絡んだ部分がある。クモはここで逆さまになって、餌となる獲物をじっと

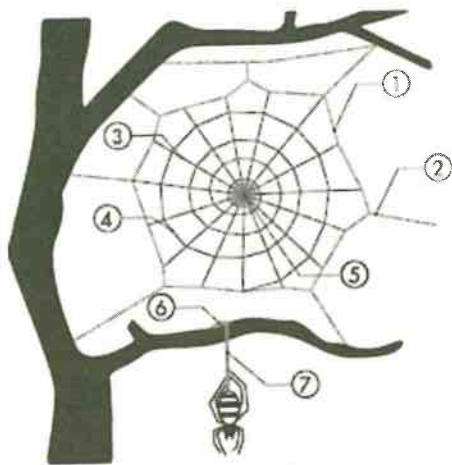


図1 クモの作る円網の構成
 (1) 枠糸 (2) 繋留糸 (3) 縦糸 (4) 横糸
 (5) こしき (6) 付着盤 (7) 牽引糸

待つ。網の外枠は、「枠糸」によって作られており、外枠から中心に縦糸が張られる。網を吊るしているのは「繋留糸」で、クモの命綱が「牽引糸」である。繋留糸や牽引糸などの端を枝などに接着するのが「付着盤糸」で、クモの巣にかかった獲物をぐるぐる巻きにするのは「捕帯糸」である。卵塊を包むのは「卵囊糸」である。粘着性の糸で覆われた横糸を張る時の足場として使うのが「足場糸」である。足場糸の引張り強度は横糸のものとはほぼ同じであるが、破断時の伸びは5%しかない。蚕の作る絹(シルク)は一種類だが、クモは性質の異なる何種類もの糸(シルク)を作り、それらを用途により巧みに使い分けている。

3. 「クモ糸」と他繊維との性能比較

いろいろな糸の引張り試験の結果(応力-ひずみ曲線)を図2に示す。強度と弾性の点においてクモの縦糸に匹敵する生物繊維はない(図2)。縦糸の引張り強度は同じ重量で比べれば、

鋼鉄より5倍も強くバイオスチールとも呼ばれる。縦糸は引張り強度、破断時の伸び、破断吸収エネルギー、弾性率においてナイロンの性能を上回っている。クモ糸の牽引糸、枠糸、繋留糸も、縦糸とほぼ同じ物性を持つ。

図2に示したケブラーは、アラミド繊維(芳香族ポリアミドの一種)で、防弾チョッキに使われていることで有名な強靱な繊維である。ケブラーの破断時の伸びは約3%だが、縦糸のそれは約30%である。縦糸の引張り強度はこのケブラーに並ぶほど強く、破断するまでの吸収エネルギーで比べると縦糸はケブラーより3倍も強靱である。弾力性に富む縦糸は銃弾が当たった時の衝撃吸収効果が大きいので、防弾チョッキ用の新素材として有望視されている。

4. スパイダーシルクの想定される用途

スパイダーシルク(クモの縦糸)は防弾チョッキ用繊維としてだけでなく、生分解性釣り糸、ロープ、網、シートベルト、パラシュート、耐久性軽量衣料、航空機や宇宙ステーションのコーティング素材などの防護用、産業用の用途が想定される。また、人体組織と共存できる特徴のため、傷用の包帯、手術用縫合糸(眼科用や神経外科用の生物分解可能な極細縫合糸)、

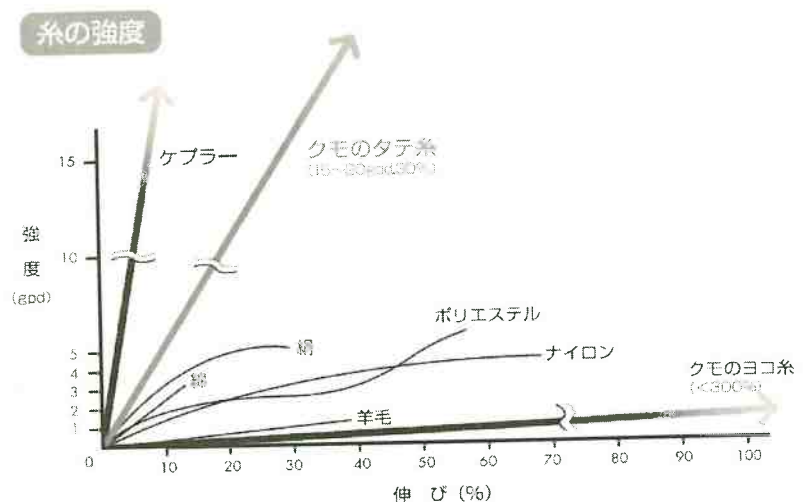


図2 糸の強度の比較

人工腱や靭帯など医療用の用途、また、他材料との複合化などによりさらに多方面の用途への可能性を秘めている。例えば、最近ではスパイダーシルクと生物シリカとを遺伝子工学的手法により組み合わせた非常に強力な合成ナノ材料が作り出されている。産業用および医療用応用技術や新たな合成物質の作成に利用でき、従来の工業手法では作成が難しい強靱な材料や合成物（人工骨用の新たな生体材料など）を作り出せるという。

5. スパイダーシルクの量産

需要が期待される素材が、量的に安定供給できるかどうかは重要である。しかし、スパイダーシルクの量産化は簡単ではない。クモは「縄張り」を持つ肉食性の生き物である。仲間のクモが縄張りに侵入すると共食いが始まる。この性質はシルク量産のためのクモの大量飼育を困難にしている。仮にクモを大量飼育したとしても、クモが作る糸は蚕のように1種類ではなく、強度や伸縮性の異なった種々の糸を作っており、目的にあった糸だけを回収することは困難である。この困難が、スパイダーシルクの工業的生産の障害となっている。

ところで、クモの作る種々の糸や蚕の作る絹は皆、シルクと呼ばれるタンパク質である。クモの縦糸が強く、横糸が伸縮性に富むという性質の違いは、両者のシルク・タンパク質の立体構造の違いが影響しているものと考えられる。タンパク質の立体構造は、そのアミノ酸配列（一次構造）により決定されている。

例えば、Gly-Pro-Gly-Xaa-Xaaという5つのアミノ酸からなるペプチドは、 β ターン構造を作る。このペプチドの連続反復は、バネのような β ターンスパイラルを形成する。スパイラルが長いほど、タンパク質の伸張性が増すといわれている。このペプチドは、伸縮性に富んだタンパク質に多く見られる。スパイダーシルク・タンパク質は、タンパク質エレメントのほぼ完全な反復から成る大きなタンパク質であ

る。200%以上の伸張性を持つ横糸タンパクのエレメント1個中には、少なくとも43の連続ペプチドがあるのに対し、30%の伸張性しかない縦糸タンパクの1つ（MaSP2）のエレメント1個中には、多くても9つのペプチドしかない。

poly-Alaモチーフとpoly-(Gly-Ala)モチーフは、繊維軸に平行に整列して β シートを形成し、強度を付与する。クモの縦糸のタンパク質はpoly-Ala反復を持ち、カイコの絹タンパク質はpoly-(Gly-Ala)反復を持つ。この違いが縦糸と絹糸の引張り強度の差に影響していると考えられている。

シルク・タンパク質の性質がアミノ酸配列（一次構造）により決定されるのならば、アミノ酸配列を支配する遺伝子の操作によって、クモ糸タンパクを作り出すことができる。

「クモ糸よりも細く、鉄よりも強い」をキャッチフレーズにナイロンを発売した米国の化学大手メーカーのデュポン社は、クモ糸こそが世界最強の繊維であるとの発想から遺伝子組換え技術を駆使して、クモに頼らないスパイダーシルクの開発に着手した。

同社の発想はスパイダーシルク遺伝子を大腸菌などに組み込んで、スパイダーシルク・タンパク質に似た物質（バイオシルク）を生成し、この物質を溶剤で溶かして糸を紡いで繊維化することであった。しかし、大腸菌は高分子量の高度繰り返しアミノ酸配列を持つシルク・タンパク質を作るのは得意ではない。

動物細胞ならば、シルク・タンパク質を上手に翻訳すると考えたNexia Biotechnologies社（カナダ）と米軍の共同研究グループは、牛の乳房からの培養細胞に高分子量のスパイダーシルク遺伝子を組み込み、シルク・タンパク質の生産に成功した。クモが作る糸は、体内のゾル状タンパク質が細い出糸管を移動して体外に出糸する際に、タンパク質分子が一直線に並ぶことを強いられて β シートを形成する。出糸されたシルク・タンパク質は、空気に触れるとゾル状態からゲル状態となり、繊維化する。この過程

を真似るため培養細胞で作ったスパイダーシルク・タンパク質を水中で濃縮後、別のメタノール溶液中に注射器先端の穴から発散して溶液紡糸し、世界初の人造スパイダーシルク繊維の製造に成功した。しかし、この繊維の強さはクモが作る糸に及ばなかった。防弾チョッキに必要な強度を持つ繊維への改良は今後の課題である。

スパイダーシルク遺伝子を持つ世界初のクローンヤギをNexia Biotechnologies社が遺伝子操作した核の移植によって誕生させた。このヤギが出すミルクにはスパイダーシルク・タンパク質を含んでいる。ヤギのミルク中にシルク・タンパク質を作らせたのは、クモ糸分泌腺とヤギ乳腺の上皮細胞が機能的に似ており、水溶性の複合タンパク質を大量に作って分泌する乳腺に注目したためである。牛ではなくヤギを使った理由は、出生後早い時期にミルクを出し始め、粗食に耐えて餌代が安いこととである。生産コストを下げることは、シルク生産にとって重要である。この方法により1着2.3kgの防弾チョッキを作る場合、シルク・タンパク質を含む約2,300 lのヤギ・ミルク(200匹から採乳したミルク一日分)が必要だという。ヤギで作った防弾チョッキの原価はあまり安くないようである。

ドイツの研究チームはスパイダーシルク遺伝子をジャガイモに組み込んだ。得られたシルク・タンパク質は可溶性タンパク質の2%であり、大腸菌やヤギに比べて生産コストが大幅に下がるという。

しかし現時点では、クモが作る糸のような強いシルク繊維を作る紡糸法が確立できていない。紡糸法の確立が今後の課題である。

6. クモ糸遺伝子の蚕への導入

蚕もクモと同様に環境に優しいシルクの糸作りをする。蚕はシルクというタンパク質を大量生産する能力に優れている。蚕はクモとは異なり、共食いはしない。蚕は繭生産を行うため大

量飼育できるおとなしい虫であり、スパイダーシルクが吐けるように蚕の遺伝子操作を行うと人為的な紡糸操作が不要になり、その分生産コストも安くなる。十分な強度を持った人造スパイダーシルク繊維は現在のところ完成の報告はまだないが、蚕の口からスパイダーシルクを吐かせることにより、これを成し遂げ得る。そこで筆者の研究室では、10年ほど前から蚕にスパイダーシルクを吐かせることに挑戦している。

転移因子を利用した蚕での遺伝子組換え手法が2000年に確立し¹⁾、これまでに様々な遺伝子組換え蚕が作出された。作出された蚕は、主に遺伝子の機能解析^{2~5)}や有用物質生産^{6~9)}のために利用されてきている。そこで、筆者の研究室では、その転移因子を利用して蚕にスパイダーシルク遺伝子を導入し、「スパイダーシルク・タンパク質を生産してそれを絹として口から吐く」蚕を作り出した。現在、育成した蚕は蚕絹成分とクモ糸成分が混合したシルクを吐く。蚕の生理学的負担を軽減するため、絹糸腺だけでスパイダーシルク・タンパク質を生産するように設計した。このスパイダーシルク遺伝子は、世代を越えて遺伝する。繭シルクに含まれるスパイダーシルクの比率は、現時点で10%まで上昇している。現在、スパイダーシルク繭の品質を詳細に調査するとともに、さらにスパイダーシルクの比率を高めることに挑戦している。

遺伝子組換え技術を用いて、クモの縦糸や横糸などのシルク遺伝子を蚕ゲノムに導入すると、蚕で種々のスパイダーシルクを作らせることができる。蚕のシルク(絹)とスパイダーシルクの混合物として作らせると、両者の特徴を持ち合わせた新しい産業素材を生産することができる。蚕本来の絹遺伝子をノックアウトすれば、スパイダーシルク100%のシルクが量産できるものと考えられる。この技術は、スパイダーシルクの特徴を備えたシルクの量産を可能にするものである。

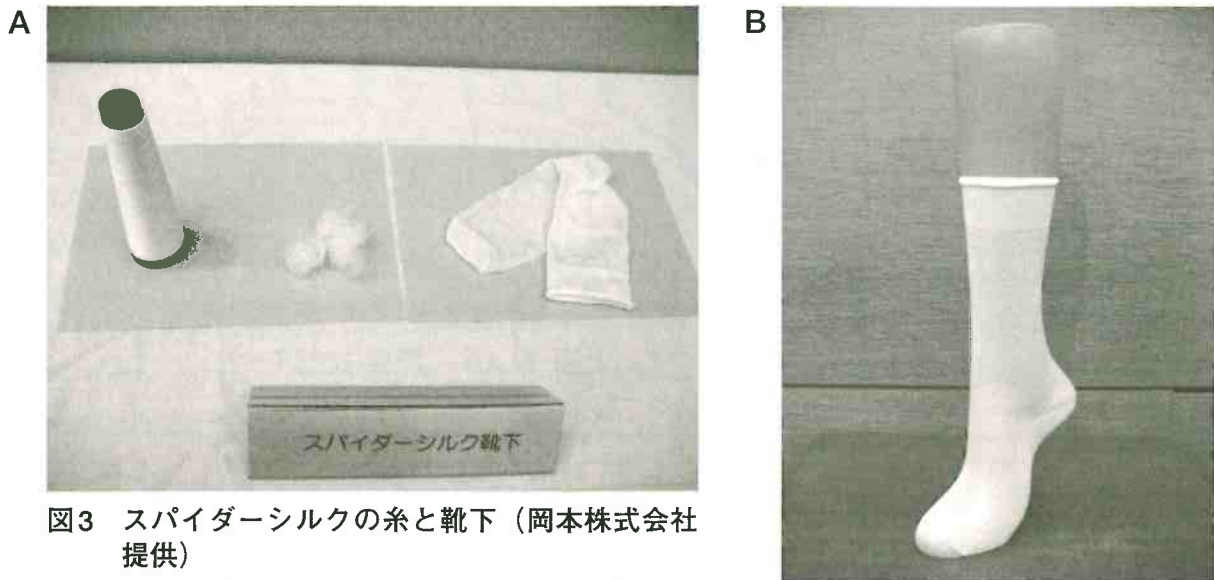


図3 スパイダーシルクの糸と靴下（岡本株式会社提供）

(A) スパイダーシルク糸 (B) スパイダーシルク靴下

7. スパイダーソックスの試作

クモ糸の成分を約10%含有する絹糸『スパイダーシルク』の開発に成功し、靴下メーカー「岡本株式会社」（奈良県広陵町）と共同で作った靴下の試作品を、2007年12月6日に公開した（図3A-B）。靴下の試作に用いたシルクの強度や伸縮性は、まだデータにばらつきがあるが、従来の絹糸より丈夫で柔らかい。現在、従来の絹糸の2倍の強度、2～3倍の伸縮性を目指してさらに研究を進めている。

8. 今後の展開

近年、急速に進展しているバイオテクノロジーを利用することにより、これまで不可能であった新しい性能を付与することが可能となる。産業用の新しい素材開発のために、蚕のシルク・タンパク質を改変して、物性が向上したシルク、機能性を付加したシルクを設計することが可能となった。この技術に応用することによってエネルギー消費を抑え、なおかつ環境に配慮した繊維を基本としてこれまでの技術では成

し得なかった機能を付与した夢の繊維、スパイダーシルクの誕生に挑戦したい。

文献

- 1) T. Tamura et al.(2000), *Nat. Biotechnol.*, 18(1), 81-84.
- 2) M. Uhlirova et al.(2002), *Dev. Genes Evol.*, 212(3), 145-151.
- 3) M. Imamura et al.(2006), *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36(5), 429-434.
- 4) R. Isobe et al.(2004), *Arch. Virol.*, 149(10), 1931-1940.
- 5) M. G. Suzuki et al.(2005), *Evol. Dev.*, 7(1), 58-68.
- 6) T. Adachi et al.(2006), *J. Biotechnol.*, 126(2), 205-219.
- 7) S. Inoue et al.(2005), *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 35(1), 51-59.
- 8) C. Royer et al.(2005), *Transgenic Res.*, 14(4), 463-472.
- 9) M. Tomita et al.(2003), *Nat. Biotechnol.*, 21(1), 52-56.

◀国内情報▶

簡便で高感度なフタトゲチマダニの
小型ピロプラズマ原虫保有率検査法¹独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 東北支所,²独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所寺田 裕¹・金平 克史²・大田 方人²・神尾 次彦²

牛の小型ピロプラズマ病対策のため、媒介者フタトゲチマダニにおける小型ピロプラズマ原虫保有率のPCRを用いた新たな検査法を開発した。本法は検出感度が従来のメチルグリーン・ピロニンによる唾液腺の核酸染色法に匹敵し、1匹のマダニから短時間で原虫遺伝子を検出することが可能であり、これを利用した本病の汚染実態の解析や発生予察は、効率的かつ効果的な対策に有効である。

1. はじめに

牛の放牧は飼料自給率を高める上で有効な飼養形態であるが、放牧特有の疾病があることからその予防や治療対策には莫大な労力・費用が費やされている。放牧病の中でも、貧血や発育停滞を主徴とするマダニ媒介性原虫病の小型ピロプラズマ（小型ピロ）病は、近年の調査では全国の放牧場の約3割に直接的な被害が発生しているとされ¹⁾、くわえて最近、専用治療薬である8-アミノキノリン製剤の販売が中止されたことから現場では危機感が高まっている。さらに、本病に対するワクチンが市販されていないことや、マダニ対策で主流となっている殺ダニ剤のフルメトリン製剤は発売以来20年近くが経ち、マダニの薬剤抵抗性獲得の心配があるなど、本病に関しては課題が残されている。

小型ピロ病対策としては現在、継続的なマダニ駆除および定期的な放牧衛生検査による早期発見・早期治療が主体となっている。これらを効率的かつ効果的に進めるためには、各々の放牧場の状況に合わせて、殺ダニ剤投与や放牧衛生検査

TERADA Yutaka¹, KANEHIRA Katsushi², OHTA Masato², KAMIO Tsugihiko²¹〒039-2586 青森県上北郡七戸町海内31²〒305-0856 茨城県つくば市観音台3-1-5

生検査の回数や時期を決定する必要がある、そのためには放牧場における本病の汚染実態を解析し、発生予察を行うことが重要である。

2. 小型ピロ病の発生予察

本病の発生予察については、宿主（牛）および媒介者（マダニ）、それぞれの観点から考えられる。

宿主側では、牛の本病感染歴や品種などが発病との関係でポイントとなる。本病の感染歴のある牛では再発病の可能性は低い。また、黒毛和種はホルスタイン種に比べて抵抗性が高い²⁾。すなわち、本病の感染歴のないホルスタイン種を放牧する場合には発病して重篤化する危険性が高いので³⁾、放牧時の衛生検査の回数を増やし、その間隔を短縮するなどして、早期に発病徴候の発見に努める必要がある。

媒介者側からみると、放牧場のマダニ生息数、とりわけ小型ピロ原虫の主媒介者であるフタトゲチマダニの生息数、また、フタトゲチマダニの小型ピロ原虫保有状況がポイントとなる。マダニが吸血する時に牛体内に侵入する小型ピロ原虫の数と発病の割合や症状の程度との間には正の相関があるため、放牧場におけるフタトゲチマダニの生息数が多いほど、またフタトゲチ

マダニが保有する小型ピロ原虫が多いほど、その放牧場は本病の発病と重篤化の危険性が高いことになる。

放牧場におけるマダニ生息状況については、牛体で吸血しているマダニを直接観察する方法と草の上にいるマダニをフランネル布を用いた旗ずり法によって調べる方法がある。これは単位面積の放牧場の草地を一定時間フランネル布を引きずり、それに付着するマダニ数により生息密度を推定する（図1）。

3. マダニにおける小型ピロ原虫の検出方法

マダニ体内の小型ピロ原虫を検出する方法として従来は、マダニを家兎に48～72時間付着して吸血させた上でその唾液腺を摘出、メチルグリーン・ピロニン（MGP）染色し、スポロゾイト原虫塊を確認していた⁴⁾（MGP染色法、図2）。この方法の利点は、実体顕微鏡以外には特別な器具・機材を必要としないこと、マダニの原虫保有状況を定性的かつ定量的に把握できることである。その反面、顕微鏡下でマダニから唾液腺を摘出する技術に熟練を要することや、家兎を使ってマダニを半飽血状態にしなければならぬために手間がかかることなどから普及しづらい点があった。そこで、近年多くの疾病検査に利用されている Polymerase Chain Reaction（PCR）法の応用を試みた。

1) 人工的に感染させたマダニから小型ピロ原虫遺伝子の検出

フタトゲチマダニの幼ダニおよび若ダニを小型ピロ原虫に感染したホルスタイン種牛に付けて吸血させ回収した。脱皮後に得られた若ダニおよび成ダニのうち、若ダニ20匹、成ダニ4匹について、その1匹ずつを液体窒素で凍結し、タングステンビーズまたはステンレスクラッシャーを入れたプラスチックチューブ内で手動振盪法により破碎した。破碎した各マダニから常法により核酸を抽出し、各マダニが保有する本



図1 放牧場におけるマダニ調査（フランネル布の旗ずり法）

フタトゲチマダニ若ダニが多数採れた（矢印）。

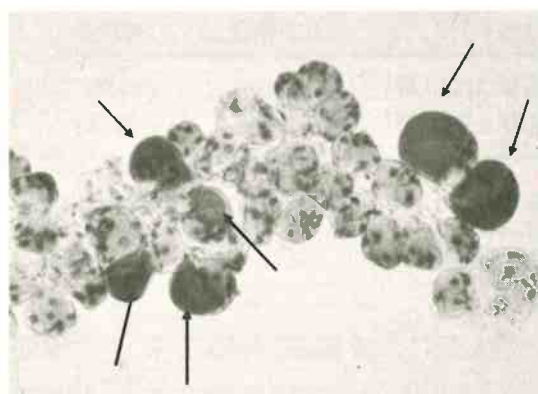


図2 マダニ唾液腺胞内のスポロゾイト原虫塊（矢印）

MGP染色：1腺胞あたり原虫約 10^6 個が入っている。

原虫の主要抗原蛋白（p33）の遺伝子をPCR法で検出した⁵⁾。その結果、若ダニ、成ダニともにPCR法により小型ピロ原虫遺伝子が検出された。PCR法による原虫保有率は若ダニで65%（20匹中13匹）、成ダニで25%（4匹中1匹）であった（図3、4）。

また、PCR法とMGP染色法の検出感度を比較するため、原虫保有率が異なる2群の若ダニの原虫保有率をPCR法とMGP染色法で調べたところ、MGP染色法では若ダニ1匹あたり1～16個の原虫感染腺胞が検出され、全体の原虫保有率は両法で同等の値を示した（表1）。このことより、PCR法による原虫検出感度の実用性が確認された。

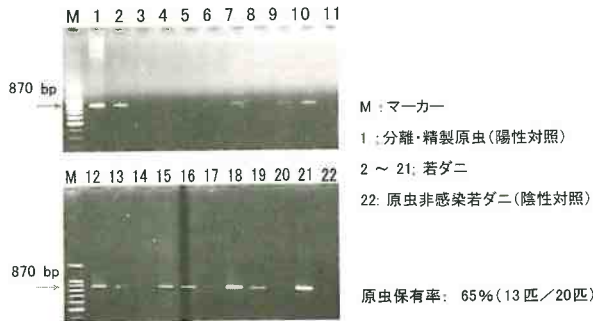


図3 若ダニ体内の原虫遺伝子検出

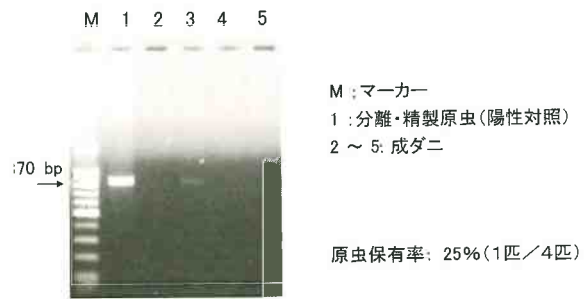


図4 成ダニ体内の原虫遺伝子検出

表1 MGP染色法とPCR法による若ダニの原虫保有率の比較

	MGP染色法	PCR法
若ダニ[第1群]	60.0%	65.0%
若ダニ[第2群]	83.3%	76.1%

小型ピロプラズマ原虫寄生率の異なる2頭の感染牛から作製した2群の原虫感染若ダニについて、MGP染色法とPCR法により原虫保有率を調べた。

2) 放牧場で採集したマダニからの小型ピロ原虫遺伝子の検出

放牧場でフランネル布の旗ずり法により草上から採集したマダニについて、小型ピロ原虫遺伝子を前記のPCR法で検出した。その結果、未寄生期の成ダニ4匹中1匹から小型ピロ原虫遺伝子が検出された(図5)。このPCR法により、野外の未寄生期のマダニからも小型ピロ原虫遺伝子が検出できることが示され、野外応用の実用性が確認された。

3) より簡便な小型ピロ原虫遺伝子の検出法

上記PCRをより簡便に行うために、市販の簡易核酸抽出キット(FTAカード)の利用を試みた。小型ピロ原虫感染ホルスタイン種牛を吸血したフタトゲチマダニ9匹をFTAカード上で破壊し、添付説明書に従い核酸抽出を行った後、PCR法にて小型ピロ原虫遺伝子の検出を行った。その結果、7匹の若ダニから原虫遺伝子が

検出された(図6)。同一群の感染若ダニを使って、簡易抽出PCR法、従来のPCR法およびMGP染色法により原虫保有率を調べたところ、簡易抽出PCR法では77.8%、従来のPCR法では76.1%、MGP染色法では83.3%に原虫が検出され、簡易抽出法の検出感度はPCR法およびMGP染色法とほぼ同等であることが示された。また、本法はカード上でマダニの破碎から核酸抽出までを連続して実施できるため、PCRの前処理を大幅に省力化することができ、一連の操作時間は、従来のPCR法の約50%(7~8時間)に短縮された。

4. おわりに

以上のように、小型ピロ病発生予察の柱となるマダニの原虫保有率検査について、今回開発した方法により、時間・労力ともに短縮・軽減することが可能となった。本法は通常のPCR

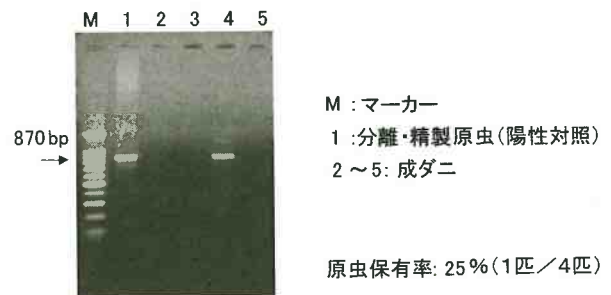
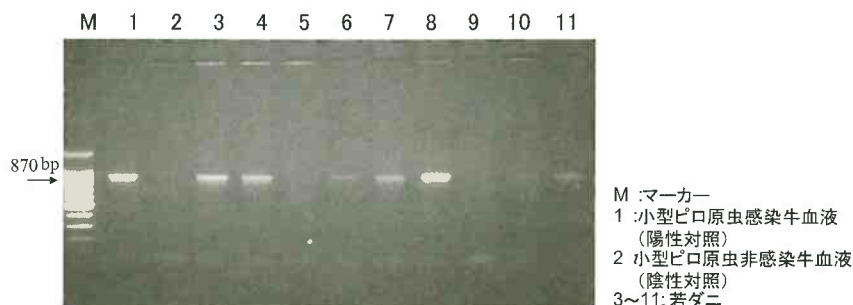


図5 放牧場より採集した成ダニ体内の原虫遺伝子検出



原虫保有率: 77.8% (7匹/9匹)

* 同一群の若ダニは PCR法では, 原虫保有率=76.1%
MGP染色法では, 原虫保有率=83.3%

図6 簡易抽出PCR法による若ダニ体内の原虫遺伝子の検出

に必要な器具機材, 市販のキットで対応できることから, 家畜保健衛生所を中心とした広い機関での応用および普及が見込まれる。また, 本法は原虫以外にもマダニにおける病原微生物の媒介能を検討する上でも有効な手法となる可能性がある。

一方, 本法はマダニの原虫保有について定性的に判定することはできるが, 定量については対応できない。リアルタイムPCR等を用いた定量法の開発が今後の課題である。

文 献

- 1) 動物衛生研究所 (2002), 牛の放牧場の全国実態調査 (2000年) 報告書
- 2) Terada, Y. et al. (1995), *J. Vet. Med. Sci.*, 57, 1003-1006
- 3) 南哲郎 (1988), 牛病学, 第2版, 379-387, 近代出版, 東京
- 4) 神尾次彦 (1986), 獣医住血微生物病, 285-287, 近代出版, 東京
- 5) Kawazu, S. et al. (1992), *Mol. Biochem. Parasitol.*, 56, 169-175

◀国内情報▶

魚や肉の鮮度を簡便・迅速に測定する「鮮度チェッカー」

東北大学 大学院農学研究科
水産資源化学分野
佐藤 実

食の安全を脅かす事例が国内外でおき、消費者は食材の品質に大きな関心を持つようになった。食材の品質には、安全に関わる品質と機能に関わる品質があるが、いずれにも鮮度が重要な鍵を持つ。鮮度測定法の中で最も信頼がおかれている方法は、核酸関連化合物の変化を数値化するK値である。魚や肉のK値をろ紙電気泳動分離と紫外線検出を組み合わせて、簡便・迅速に測れる「鮮度チェッカー」を開発したので紹介する。

1. 鮮度の重要性

食品の安全を脅かす事例がわが国内外で数多くおきている。その結果、消費者は食材に対する不安を高め、食材の品質に大きな関心を寄せるようになった。食材の品質には、安全に関わる品質と機能（食材の価値）に関わる品質がある。前者は食材に有害物質が含まれていないことで、魚の場合は、元々海にいるときから持っている有害物質（例えばフグ毒、シガテラ毒、水銀など）と漁獲した後に生じる有害物質（例えばヒスタミン、細菌毒など）を含んでいないことである。元々含まれる有害物質は鮮度とは関係ないが、漁獲した後に生じる有害物質は鮮度と深く関係する。一方、後者の機能に関わる品質は、栄養機能、嗜好（官能）機能、健康維持（生体調節）機能で、いずれも鮮度が低下するとこれらの機能も失われ、食材としての価値がなくなる。すなわち、食材の鮮度は安全面でも機能面でも非常に重要と言える¹⁾。

魚は日本食ブーム、健康ブームもあり世界的に需要が増している。一方、魚は海水を介して微生物と同居していること、組織が軟らかく細菌の攻撃を受けやすいこと、自己消化作用が強いこと、鮮度が低下しやすいなどの理由で、潜在的有害食品ともされる。生食する機会の多い

SATO Minoru

〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1

わが国では、魚の鮮度管理が非常に重要である。

これに対し、畜肉の死後変化（死後硬直から解硬まで）は魚より遅いとのイメージがある。確かに牛肉や豚肉では、解硬に要する日数（5℃貯蔵）は、牛肉で8～10日、豚肉で4～6日と長い。鶏肉では0.5～1日で魚肉と大差ない。従って、変化の早い鶏肉は魚と同様に鮮度が重要視される。一方、牛肉や豚肉は解硬を待って、熟成させてから出荷されるので、鮮度より熟成の状態（熟度）の判断が重要とされる²⁾。

2. 鮮度の判定法

ここでは魚の鮮度判定法を紹介する。鮮度は魚にとって特に重要で、様々な判定方法が用いられている。大別すると、感覚評価法（官能評価法）、化学的方法、物理的方法、微生物的方法である^{1, 3, 4)}。それぞれに利点、欠点がある。

感覚評価法（官能評価法）は器具などを必要とせず、迅速に判断が可能である。一般に、鮮度は魚の外見、色、臭い、弾力性などの感覚的情報を基に判断しており、絶対的な基準がない。判断基準がヒトにより一定しないことで、結果的に鮮度評価もバラつくことが多い。バラつきを小さくするため、評価担当者に対し評価方法の徹底、評価基準の明確化などの教育訓練が必要になる。その他、評価項目と判断基準を数値化する表（デメリットスコア）を用いて平準化

の試みがなされている。

化学的方法は、魚の成分が死後経過時間とともに変化することに着目し、変化する成分を特定し分析装置を用いて測定し、鮮度とする方法である。着目する成分は、ヒスタミン、揮発性塩基（アンモニア、トリメチルアミン）、核酸関連化合物などである。最も客観的で、正確に結果が得られるが、分析には機器が必要で、煩雑な処理操作、時間や費用もかかることが多いのが難点である。

物理的方法は、多くの場合魚肉を採取することなく、魚体の表面から直接計測する非破壊測定が可能である。測定原理は、硬直指数、テクスチャー、トリーメータ、インピーダンス、色差計、近赤外分光法など様々なものが提案されている。ただし、死後に魚体が硬直することを利用して鮮度とする硬直指数法以外は、いずれも測定装置を必要とすること、魚種や部位により測定値にバラつきが生じることである。その理由としては、魚皮や皮下脂肪の影響などが考えられる。正確に鮮度を求めようとする、魚種毎に測定部位を特定し、予め化学分析値と物理的測定値との検量線を作成するなど、煩雑な準備が必要である。

微生物法の大きな問題点は、クリーンベンチ、オートクレーブやインキュベータなど一定の実験装置と施設が必要なこと、肉眼でコロニーを観察できるまでに長い培養時間が必要なこと、微生物数と鮮度の関係が明確に定まっていないことなどがある。ただ、疾病予防のためには病原性微生物の観察は欠かせない。

3. K値による鮮度判定

化学的方法による鮮度判定で、最も信頼がおかれているのが核酸関連化合物濃度を用いて算出するK値による鮮度判定である。魚肉や畜肉の細胞にはエネルギー貯蔵物質アデノシン三リ

ン酸（ATP）が含まれ、死後にアデノシン二リン酸（ADP）、アデノシン一リン酸（AMP）、イノシン酸（IMP）を経て、イノシン（HxR）、ヒポキサンチン（Hx）に分解される。これらの分解反応は全て酵素で行われるが、IMPからHxRへの分解を触媒する酵素（5'-ヌクレオチダーゼ）は活性が弱く、ほとんどの筋肉ではIMPが著しく蓄積し、時間とともに少しずつHxR、Hxに転換される。すなわち、死後の経過に比例してIMPが減少し、逆にHxRとHxは増えるのである。この点に着目したのが、北海道大学水産学部の齋藤恒行教授らで、式（1）に従い、全核酸関連化合物濃度に占める死後産物HxRおよびHx濃度の割合を算出し、K値とした⁵⁾。

$$K \text{ 値}(\%) = \frac{HxR + Hx}{ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx} \times 100 \quad (1)$$

齋藤恒行教授が提唱した最初のK値測定法は、魚肉を過塩素酸で処理し、エキス成分を抽出し、それを強塩基性陰イオン交換樹脂Amberlite IRA-400カラムに添加し、0.01N塩化アンモニウム溶液でHxRおよびHxを回収した。分画前の抽出液（A）および分画後のHxR・Hx画分溶液（B）の250nmの吸光度を測定し、式（2）でK値を求めている。

$$K \text{ 値}(\%) = \frac{B}{A} \times 100 \quad (2)$$

K値が低いほど死後経過時間が短い、すなわち鮮度が良いとされる。核酸関連化合物を個別に分離することなく、グループ分けしてK値を求める簡便法である。

K値測定はその後簡便化と迅速化、自動化が図られ様々な方法が提案されている（詳細は“水産物の鮮度保持（太田静行）参照”⁶⁾。大きく分けて、核酸関連化合物を分離（グループ分離、個別成分分離）する方法と分離せず特定

成分を酵素で定量する方法である。前者はやや大がかりな装置が必要で大学、研究機関での利用に限られる。後者は、大がかりな装置を必要とせずに、より現場対応型の簡易K値測定器を目指して開発されている。原理は共通して核酸関連化合物の中の特定成分を酵素で分解し、分解産物を発色法や電極法で測定する方法である。この方法の欠点は、魚種や部位により、筋肉成分が異なり元々含まれる核酸関連化合物濃度に差があり、鮮度低下による変化以外のファクターが加わり、正確なK値は求められない可能性がある。また、酵素を利用する方法の欠点は、コスト、酵素の安定性の問題などがある。そのためか、簡易K値測定器もそれほど普及しているとは言えない。

4. 生産、流通、消費の現場におけるK値測定

K値はその後様々な魚介類や食肉について調べられ、動物の種類により上昇速度に差はあるものの、逆戻りすることなく確実に上昇することが確認され、鮮度指標として有効であることが確かめられた。世界の研究者が行った鮮度を扱う論文には必ずと言ってK値が記載されていることから分かる。しかし、研究室では広く日常的に測定されているK値であるが、漁獲、加工、流通、消費の現場ではほとんど利用されていない。その理由は、操作の煩雑さ、所要時間、正確さ、機器や消耗品のコストなどであろう。

装置・機器のない現場では、外部公的機関への依頼分析の道もあるが、費用の問題に加え、結果が届くまでの日数も問題になる。鮮度が命の鮮魚では、その場で自らが使える測定装置が求められる。その際、たずさわるとの多くはこれまで化学分析作業を経験したことない方と思われ、容易に操作できること、分析時間が短いこと、安価で堅牢なこと、同時に多検体の分析が可能なこと、ランニングコストが安いことなどが必要になる。

5. 「鮮度チェッカー」の概要と開発経緯

筆者が開発した鮮度チェッカーによるK値測定の流れは次のようである。小指の先程度の肉片（約200mg）から5%過塩素酸溶液600 μ lを用いてエキス抽出液を調製する。緩衝液で湿らせたろ紙にエキス抽出液を一滴（5 μ l）落とす。直流電気（800V）を5分間流す。この段階では目に見えないが、スポットした抽出液に含まれる核酸関連物質が酸性物質グループ（ヌクレオチド）と中性物質グループ（ヌクレオシド・塩基）に分離している。紫外線をあてると、分離したそれぞれのスポットが青く浮かび上がる（鮮度が見える）。デジタルカメラでスポット画像を撮影し、専用計算ソフトで処理すると自動的にK値が表示される。原理は極めて簡単である。これまでK値の概念が提案されて50年になるが、誰も考えなかった方法である。鮮度はリアルタイムに観察でき、慣れると電気泳動から10分以内にK値が求められる。同時に複数（現在のろ紙では最大5サンプル）のサンプルが分析可能で、総合的にみて非常に迅速にK値が測定できる。

核酸関連化合物がろ紙電気泳動により互いに分離することは、筆者が北里大学水産学部にいた30代前半には知っていた。軟体動物のエキス成分を研究し、オピン類と言われる新アミノ酸類を発見した時である。アミノ酸を発色させるニンヒドリン試薬に反応しないが、紫外線で青く浮かび上がる物質があり、イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーで単離した。その一つがAMPであった。アミノ酸とは異なることもあり、その後それについては研究を進めることはなかった。

最近になり、(独)水産総合研究センター開発調査センターからの依頼を受け、マグロの鮮度(K値)を測定する機会があった。測定は常法の高速度液体カラムクロマトグラフィーで行った。報告会か懇親会の席で、ある船長さんから「船の上でもK値が測れる方法はないですかね?」と聞かれたことがこの装置の開発の

きっかけである。

大がかりな装置は研究室では問題なく使えるが、船上ではスペースがなく、揺れもあり、コンパクトで簡単に操作し、短時間（出来ればリアルタイム）に結果が得られる方法が求められていると思った。その時、30年前のろ紙電気泳動の結果を思い出し、あの方法が応用できそうと咄嗟に思ったのである。

研究室にもどり、すぐに中国からの留学生陶志華さん、彭露艶さん、アシスタントの山内晶子さん、研究室職員、学生さんらにお手伝いしてもらいながら測定法を開発した。初めは、スポットが出ませんとの報告があったが、そんなことはない、以前自分で確かめてあるから必ず検出できると自信を持ってアドバイスした。

当初は多数に分かれていたスポットを、電気泳動緩衝液のpH（水素イオン濃度）を工夫して酸性物質グループ（ヌクレオチド）と中性物質グループ（ヌクレオシド・塩基）の二つに収斂することに成功した。前者は鮮度が良い魚肉や食肉に含まれるもので、後者は鮮度が低下したものに含まれるものである（図1）。この結果は、実に都合が良く、HPLCのように多数のピークに分かれことで小さなピークはピークとして認められなくなるケースがあるのとは異なり、ピークがまとまることで検出が容易になる。K値は、二つのスポットの数値の合計値に対する鮮度が低下した時に出る中性物質グループのスポットの数値の割合で求められる（図2）。この方法の良い点は、どのような魚肉・食肉でも、どの部位（脂肪分が多くても、スジ

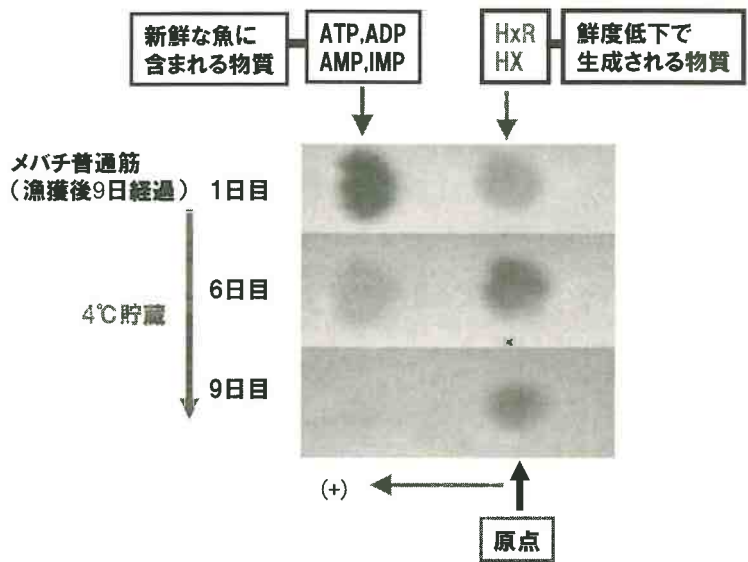
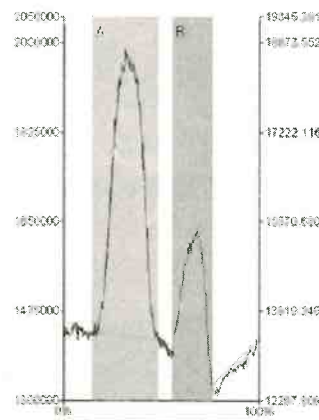


図1 電気泳動法による鮮度判定 (K値測定)

Sample name : イカ1日



Spot	Intensity	%
A	25445993	
B	8937833	
K_Value		26.0

K値 26.0

図2 泳動画像からK値を自動的に計算

が多くても、皮が入っても)、スポットの大きさや濃さは異なっても、常に二つのスポットが出ることで、K値は確実に求められることである。

分析方法開発と平行して、ハードのろ紙電気泳動装置、スポットの検出装置、泳動ろ紙の乾燥器、K値計算ソフトの開発を友人、知人、会社などに頼んだ。こちらの要望をまとめて具体化、図案化し、試作と改良を繰り返し、何とか完成にこぎ着けた(図3)。大学知財本部へは特許申請申込をしたが、この発明は大学には帰属しないとの判定をもらい、費用は個人負担で申請した。幸い、ここでも以前から知り合いの弁理士さんに快く引き受けていただき、短期間で申請にこぎ着けた。ここまでの段階で、資金面を中心に全面的に協力してくれた妻には深く感謝している。このように、多くの方々のお世話になり、販売までたどり着けた。皆さんに深く感謝している。

6. 今後の展望

魚は世界をめぐり、流通形態も鮮魚、冷凍魚、活魚、形状もラウンド、フィレー、ドレス、パック詰めなど様々になっている現在では、従来の外見、色、臭いなど官能による鮮度判定は困

難になっている。消費者の安全を守るためにも、科学的根拠に基づく、簡便で、迅速な魚の鮮度測定法が求められている。しかも、鮮度が命の水産現場では、手元にあって、自ら操作して鮮度が測定できる装置が望まれる。その点、科学的に最も信頼されている鮮度指数K値が簡便・迅速に、様々な流通形態の魚を、あらゆる場面で測定できる「鮮度チェッカー」は最適で、鮮度測定法のグローバルスタンダードになる可能性がある。

食肉でも鶏肉のように鮮度変化の早いものでは、魚と同様鮮度による管理は重要で鮮度チェッカーが活躍する場面が十分考えられる。死後変化の緩やかな牛肉では、鮮度より熟度が重要とされるが、実際は熟度の判定にK値が提案されて久しい⁷⁾。これまで現場で使えるK値測定器がないことで普及が遅れていると考える。鮮度チェッカーを用いることでと畜から、冷蔵保管(熟成)、流通、消費の各段階で簡単にK値が測定できるようになり、牛肉の鮮度とともに、正確な熟度、美味しさなどを客観的に評価できるようになると考えられる。また、この方法で各組織の核酸関連化合物総量も定量可能であることより、健康状態(BSE判定も?)の簡易迅速判定にも応用できるのではないかと考えられる。様々な利用が期待できる。

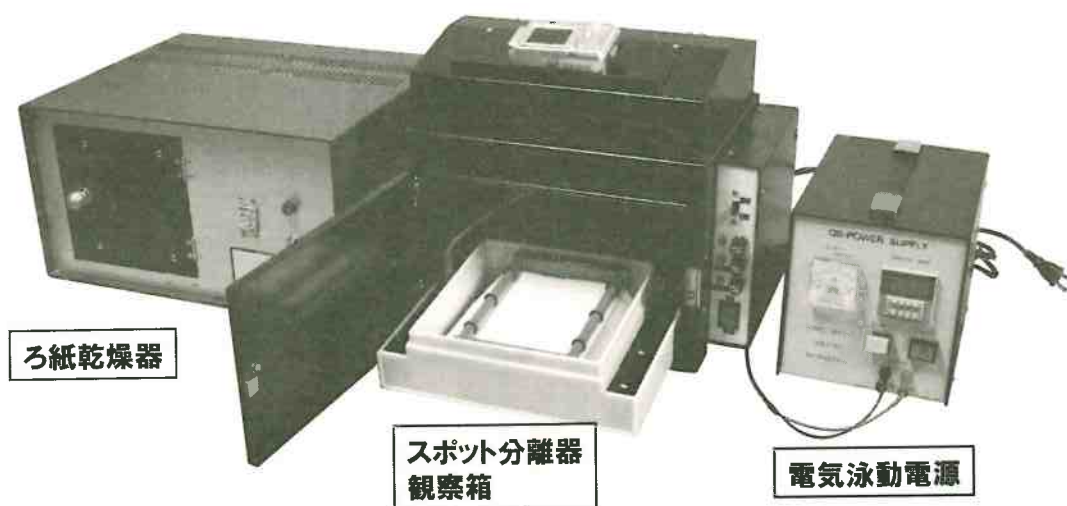


図3 鮮度チェッカー

食材の新鮮さは、鮮度チェッカーでほぼリアルタイムに測定可能になった。一方、安全性の確認は、先に筆者が開発した「ヒスタミンチェッカー」⁸⁾で魚肉の化学的有害因子ヒスタミンが簡便迅速に測定できる以外、現場対応の機器、測定法が未だ開発されていない気がする。中国ギョーザ事件などもあり、一日も早い開発が待たれる。

文 献

- 1) Sato M. (2004), Fish Inspection Freshness Assessment, in Encyclopedia of Meat Science (Jensen W., Devine C. and Dikemann M., eds), 474-482, Elsevier, Oxford
- 2) 根岸晴夫 (2006), 中部大学応用生物学部紀要, 5, 3-9
- 3) 坂口守彦 (1997), 魚の鮮度とおいしさ, 水産振興, 358号
- 4) 渡邊悦生ら (2007), ビジュアルでわかる魚の鮮度, 成山堂書店, 東京
- 5) Saito T. et al. (1959), Japan. Soc. Sci. Fish., 24, 749-750
- 6) 太田静行 (1991), 水産物の鮮度保持, 筑波書房, 東京
- 7) 根岸晴夫ら (1994), 日畜会報, 65, 882-889
- 8) Sato M. et al. (2006), Fish. Sci., 72, 889-892

◀国内情報▶

野菜接ぎ木装置用自動給苗ユニットの開発

¹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、

²同上、現農林水産省 生産局園芸課、³井関農機株式会社 施設事業部

小林 研¹・石綿 陽子¹・重松 健太²・大越 崇博³

農業機械等緊急開発事業で実用化したウリ科野菜用接ぎ木ロボット（「緊プロ機」）の省力化を図るため、自動給苗ユニットを開発した。本ユニットを緊プロ機に取り付けることで、苗供給者2名が不要となり、接ぎ木作業の大幅な省力化が可能となる。接ぎ木苗生産施設で実施した性能試験では、1人当たり接合作業能率は手接ぎ木区の5倍以上であり、作業精度も実用的なレベルに達していることを確認した。

1. はじめに

接ぎ木苗は、果菜類生産において不可欠なものとなっており、その利用割合は約60%、ウリ科のスイカとキュウリに限れば約80%に達している。近年では、農薬使用量を低減できる環境に負荷を与えない栽培技術として、接ぎ木栽培への関心が世界的に高まっている。また、平成6年に農業機械等緊急開発事業で、ウリ科野菜用接ぎ木ロボット（以下、「緊プロ機」と呼ぶ。）が実用化されて以降、ウリ科野菜類の栽培では接ぎ木苗を購入する農家が増加しており、現在では、接ぎ木栽培面積の35%で購入苗が利用されている¹⁾。現在、緊プロ機は、国内の接ぎ木装置の約80%のシェアを占めている²⁾が、苗を手で供給する半自動型であるため、装置の運転には少なくとも元苗運搬等の補助者1名と装置への苗供給者2名の計3名が必要になる。購入苗の需要が増加する中、苗生産施設では接ぎ木装置への期待が高まっている一方で、緊プロ機を含めた既存の接ぎ木装置に対して、価格に比べ省力効果が不十分であるとの評価も多く、一層の性能向上の要望がある。そ

KOBAYASHI Ken¹, ISHIWATA Yoko¹, SHIGEMATSU Kenta², OKOSHI Takahiro³

¹〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

²〒100-8950 千代田区霞が関1-2-1

³〒791-2193 愛媛県伊予郡砥部町八倉1

こで、次世代農業機械等緊急開発事業の課題として、緊プロ機に取り付けて使用する自動給苗ユニットを開発した。

2. 開発目標

開発した自動給苗ユニット（以下、「開発機」と呼ぶ。）は、セルトレイで育苗した苗をトレイごと装置にセットすることにより連続自動給苗を行うもので、セルトレイから苗を取り出し、子葉方向揃え及び高さ揃えを自動で行って接ぎ木装置に供給するものである。研究開始にあたり、接ぎ木苗生産者を対象にアンケート調査及び現地調査を実施し、以下の開発目標を設定した。

- ① ウリ科野菜の苗（キュウリ、スイカ及びその台木）を対象とする。
- ② 適応セルトレイは72穴及び128穴とする。
- ③ 接ぎ木装置と組み合わせたシステムの運転は、セルトレイ補給者1名で行う。
- ④ 給苗作業能率は、緊プロ機の接合作業能率に対応する毎時800本以上とする。
- ⑤ 緊プロ機本体にも改良を加え、自動接ぎ木システムとして高い作業精度を確保する。

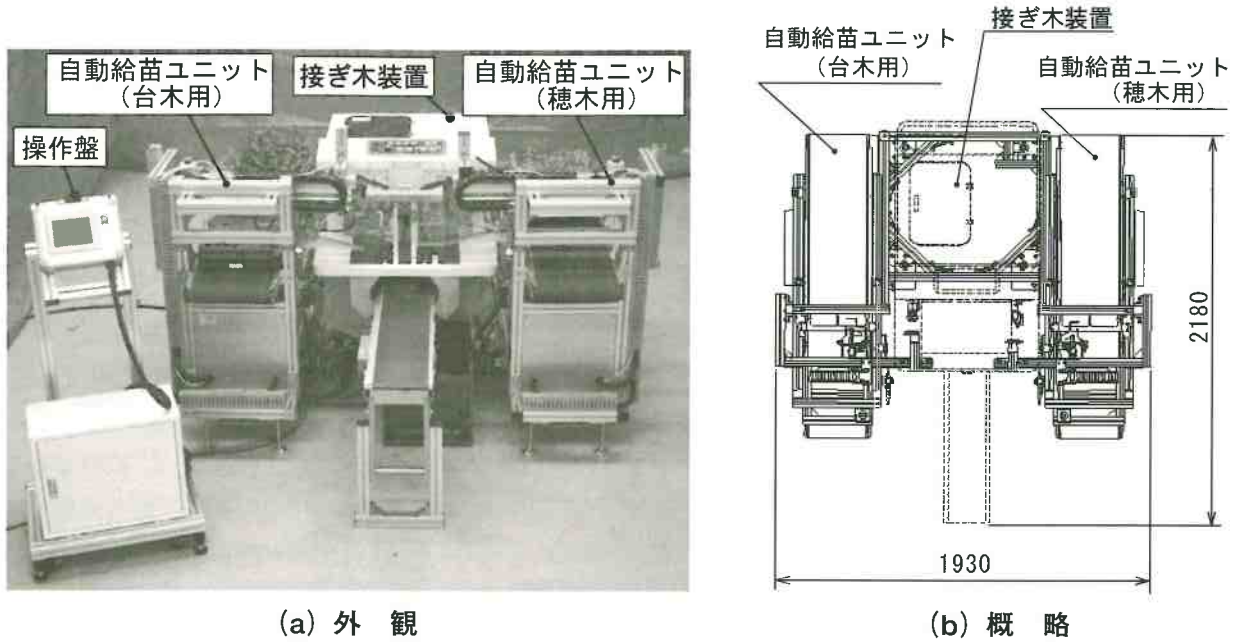


図1 接ぎ木装置に接続した自動給苗ユニット

3. 開発機の構造と作用

開発機（図1）には、穂木用と台木用があるが、両者の構造及び作用は基本的に同じである。その構造は、セルトレイ搬送部、苗取出し搬送部、制御部に大別される。苗取出し搬送部は、①苗を子葉展開基部で懸架するためのスリットを持つ保持ハンド、②対象とする苗のみを保持ハンドに分離・誘導するための分草桿、③セルトレイ中の苗を地際近傍で切り取るカッタ、④苗搬送スライダから構成される。装置に元苗が栽植されたセルトレイを装填すると、一連の給苗動作が自動で行われる。苗の高さ揃えは、子葉展開基部を基準とし、同部を保持ハンド先端のスリットに吊り下げることで行う（図2）。台木及び穂木のスイカの子葉方向揃えは、接ぎ木装置の苗受け部及びそれに対向する位置に設けられた一対の子葉方向揃えガイド間で、苗を保持した状態で保持ハンドを前後に揺動させ、ガイドに子葉を接触させることで、子葉展開方向が揺動方向と直角になるように行う（図3（a））。一方、キュウリでは、苗受け部のガイドを90°回転して取り付け、保持ハンドの揺動

時に子葉がガイドに接触することで生じる摩擦により、子葉展開方向が揺動方向と平行になるように揃える（図3（b））。さらに、欠株への対応として、接ぎ木装置の苗受渡し部において、光電センサを用いた苗の有無検出を行い、欠株の場合は、再度給苗動作を行うようになっている。これらの動作は、プログラマブルコントローラで制御され、運転モード（セル数、作物）

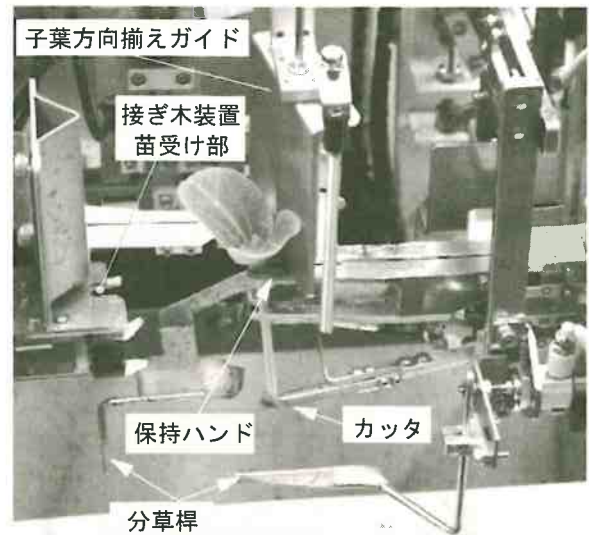


図2 自動給苗ユニットの主要部

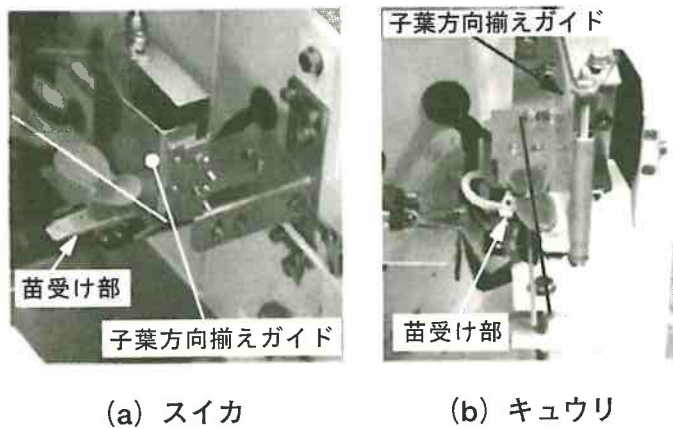


図3 給苗時の子葉展開方向

の切り替えは、操作盤のタッチパネル上で行えるようになっている。

4. 開発機の性能³⁾

開発機を緊プロ機と接続し、128穴セルトレイで育苗したスイカとユウガオ及びキュウリとカボチャを供して、JA 苗センター等で性能試験を実施し、作業能率及び作業精度等を測定した。その結果を表に示す。開発機の運転は、セ

ルトレイ補給者1名で行え、接合された苗の手直し・植え付けのための要員を含め2名の作業員で接ぎ木作業が可能であった。開発機の平均正味給苗作業能率は、穂木用、台木用とも毎時830本以上であり、開発目標を達成できた。給苗後の接ぎ木までを含めた接合作業能率は、作業中断の有無やセルトレイ内の欠株数により変動したが、スイカ及びキュウリとも平均で毎時810本程度となった。スイカを供した試験における1人当たり接合作業能率は、半自動型接ぎ木装置による手給苗区の3倍、接合後の植え付けまでを含めた1人当たり接ぎ木作業能率は毎時355本であり、手給苗区の2倍となった。キュウリを供した試験における1人当たり接合作業能率は、手接ぎ木区の5.5倍、接ぎ木作業能率は毎時276本であり、手接ぎ木区の3.5倍となった。接ぎ木成功率は、作物間及び試験間での変動が小さく、平均96%となった。さらに、養生・順化終了後の活着率は、いずれも90%を超え、実用的な作

表 自動給苗ユニットの性能

(a) 作業能率

試験区 作物		自動給苗 ^{*1}		手給苗	手接ぎ木
		スイカ	キュウリ	スイカ	キュウリ
接合作業能率	[本/h]	811	813	771	—
1人あたり接合作業能率	[本/h]	811 ^{*2}	813 ^{*2}	257 ^{*3}	141 ^{*4}
正味給苗作業能率・穂木	[本/h]	845	849	—	—
正味給苗作業能率・台木	[本/h]	862	839	—	—

*1：各3回の試験の平均値。 *2：セルトレイ補給1人。 *3：元苗切り取り1人，苗供給2人。

*4：作業中のタイムスタディ調査（作業員2名，延べ接ぎ木数476本）より算出。

(b) 作業精度

作物		スイカ	キュウリ
接ぎ木成功率 ^{*1}	[%]	96	96
活着率	[%]	95 ^{*2}	92 ^{*3}

*1：各3回の試験（スイカ：n=1685，キュウリ：n=1744）の平均値。

*2：n=553。 *3：n=430。

業精度を有していた。

現地試験実施先での評価として、全体では肯定的な意見が出された一方、作業性や機能向上への改良要望が出された。主な意見及び要望を以下に示す。

- ① 作業精度は、手給苗の緊プロ機よりも向上している。
- ② 接ぎ木後の植え付けまで含めて2ないし3人で十分に作業が行える。
- ③ 接がれた苗の穂木の本葉方向が揃っていないなど、手給苗または手接ぎ木と比べ接がれた苗の揃いが悪いため、植え付け作業がやりづらい。
- ④ 接がれた苗の植え付けはテーブル上で行うので、苗が手元に供給されるよう、接ぎ木苗搬送コンベアの高さを上げて欲しい。

5. おわりに

開発した自動給苗ユニットは、ウリ科野菜の接ぎ木作業の省力化に貢献できると考えている。現在、接ぎ木苗生産現場での連用試験を実

施しているが、ここでは、耐久性や取扱性の確認とともに、上述した意見・要望も含めた問題点への対応を行い、平成21年度からの実用化を図る予定である。

本研究の実施にあたっては、共同研究参画企業の井関農機株式会社をはじめ、現地試験において、愛知県農業総合試験場、長野県南信農業試験場、JAあいち経済連苗生産センター並びにJA全農長野野菜種苗センター等の関係各位に多大なるご協力を賜った。ここに記して改めて感謝の意を表する。

文 献

- 1) 農林水産省 野菜・茶業試験場 (2001), 野菜の接ぎ木栽培の現状と課題, 野菜・茶業試験場研究資料第9号, 1-128
- 2) 小林 研 (2005), 農林水産技術研究ジャーナル, 28 (11), 15-20
- 3) 小林 研ら (2008), 第67回農業機械学会年次大会講要, 91-92

◀地域の先端研究▶

農作物を病害から護る「乳酸菌農薬」の開発

¹京都府農業資源研究センター，²明治製菓株式会社 生物産業研究所，

³京都府立大学大学院

津田 和久¹・小坂 能尚¹・梅村 賢司²・三富 正明²・辻 元人³・久保 康之³

環境保全型農業の推進や、安全・安心に対する消費者ニーズの高まりにより、化学合成農薬の使用量の節減が求められている中、その代替として微生物農薬の開発が進められている。そこで、産学公連携研究により、消費者に安全性を保証するだけでなく安心感をも提供できる乳酸菌を使った微生物農薬「乳酸菌農薬」の開発に取り組んだ。

1. はじめに

近年、環境に対する負荷の軽減を図る環境保全型農業が推進され、化学合成農薬の使用量を節減する方向にある。また、消費者の食に対する安全・安心志向が高まる中、化学合成農薬を散布して栽培された農作物は敬遠される傾向にある。このため、化学合成農薬の代わりに病気を防ぐ有用な微生物を使う生物的防除研究が盛んに行われている。その中で、いくつかの実用的な病害防除効果を示した微生物は、ヒトや環境に対する安全性の確認を経て、微生物農薬として登録後に市販されている。しかし、農作物に微生物を直接処理する微生物農薬では、消費者に対して、その微生物について安全性を保証するだけでなく、安心感を持ってもらうことも重要である。

消費者が安心と感じる微生物として、乳酸菌に注目した。乳酸菌は乳製品や漬物などの発酵食品に含まれる微生物として長い食経験があるとともに、最近ではプロバイオティクスとして

TSUDA Kazuhisa¹, KOSAKA Yoshitaka¹, UMEMURA Kenji², MITOMI Masaaki², TSUJI Gento³, KUBO Yasuyuki³

¹〒619-0244 京都府相楽郡精華町北稲八間

大路74

²〒222-8567 横浜市港北区師岡町760

³〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町1-5

も注目を集めている。プロバイオティクスとは、「腸内細菌叢を改善することによって宿主に有益な作用をもたらす微生物」¹⁾をさし、乳酸菌は免疫賦活作用や制ガン作用等²⁾を有するプロバイオティクスの代表的な微生物である。このような乳酸菌であれば、消費者は安心感を持つてると考えた。

そこで、食品などから分離・収集した乳酸菌の中から植物病害を防除する有用乳酸菌株を選抜し、これを用いた「乳酸菌農薬」（ここでは、乳酸菌を用いた微生物農薬を言う）の開発に取り組んだ。

2. ホウレンソウ萎凋病を防除する乳酸菌の選抜

ホウレンソウ萎凋病は、土壤中の *Fusarium oxysporum* f.sp. *spinaciae* によって引き起こされる土壤伝染性病害であり、全国の夏採りホウレンソウ生産で大きな問題となっている。そこで、乳製品や漬物などから分離した乳酸菌を対象に、ホウレンソウ萎凋病を防除する有用乳酸菌の探索を行った。

乳酸菌懸濁液にホウレンソウ種子を浸漬し、汚染土壌を詰めたポットに播種して栽培する方法により有望菌株を選抜した。さらに、これらの防除効果を汚染圃場において検討した結果、最も高い効果を示す *Pediococcus pentosaceus*

(ペディオコッカス・ペントサセウス) KMC05株を選抜した(図1)。*P. pentosaceus*は植物性乳酸菌であり²⁾、本菌株は市販のキムチから分離した菌株であることから、消費者が安心感を持てる微生物であると考ええる。

3. ホウレンソウにおける *P. pentosaceus* KMC05株の定着性

10^7 及び 10^9 cfu/mlに調製したKMC05株懸濁液にホウレンソウ種子を浸漬処理してポットに播種し、経時的にホウレンソウにおけるKMC05株の定着性を調査した。播種時の種子では、それぞれ、約 10^7 、 10^9 cfu/gのKMC05株が検出された。播種後の根では菌密度は低下したが、30日後でもそれぞれ約 10^2 、 10^3 cfu/g検出された(図2)。一方、地上部では、 10^9 cfu/mlに浸漬処理した場合、10日後には約 10^3 cfu/gになり、20日後には検出されなかった。これらの結果から、ホウレンソウ種子に処理したKMC05株は、根では低密度ながら比較的長期間定着するが、地上部での定着性は低いことが明らかになった。

4. *P. pentosaceus* KMC05株による防除機構

一般に微生物農薬の作用機構としては、耐病性誘導といった植物との相互作用と、抗菌作用や競合といった病原微生物との相互作用が考えられる。

KMC05株が植物に与える影響を明らかにするため、モデル植物シロイヌナズナを用いて、既知の防除応答関連遺伝子PR-1及びPDF1.2遺伝子の発現動向を調べた。その結果、KMC05株を噴霧処理した植物体では、未処理のものと比較して、病原菌接種後の両遺伝子の速やかな発現

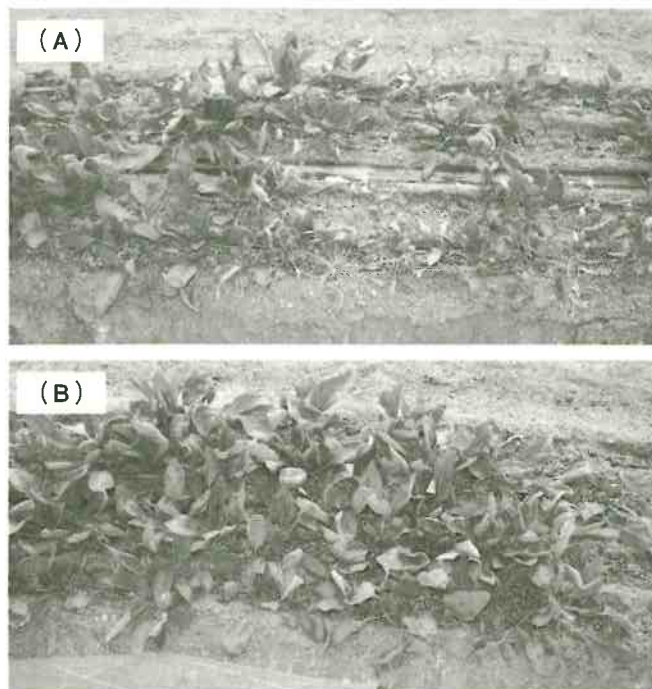


図1 ホウレンソウ萎凋病に対する *Pediococcus pentosaceus* KMC05株の防除効果
(A) 対照区 (B) KMC05株処理区

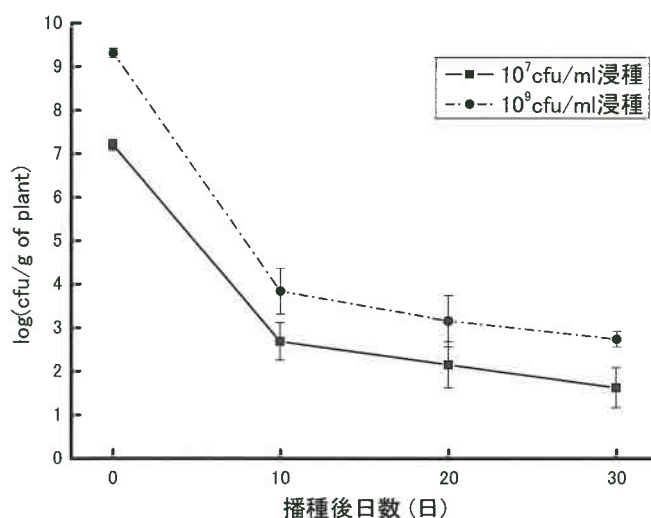


図2 ホウレンソウ種子に処理した *Pediococcus pentosaceus* KMC05株の定着性
播種時は種子、播種10、20、30日後は根のKMC05株密度を調査した。

が認められた。また、シロイヌナズナのマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析から、KMC05株処理区と植物抵抗性誘導剤（プロベナゾール）処理区には、発現遺伝子群の類似性が認められた。これらのことから、KMC05株がシロイヌナズナの防御応答系を刺激し、病原菌に対する応答性を高める働きがあることが示唆された。

さらに、KMC05株が病原微生物に与える影響については、富栄養条件下においてKMC05株は数種の病原糸状菌や病原細菌に対して抗菌作用を示すことがわかった。また、その抗菌作用には、KMC05株が産生する乳酸によるpHの低下が関与することが明らかになった。しかしながら、貧栄養条件下ではpHの低下や抗菌作用は認められなかった。これらの結果から、KMC05株が貧栄養状態である無傷の植物体表面上で抗菌作用を発揮し、病害抑制に寄与している可能性は低いものの、自然開口部や傷口、感染部位など比較的栄養分を獲得しやすい条件下では抗菌作用を発揮して病害抑制に寄与している可能性が示唆された。

5. *P. pentosaceus* KMC05株の保健機能性

KMC05株の乳酸菌としての有益性を明らかにするため、保健機能の一つと考えられている免疫賦活作用について調べた。免疫に関する最大の器官は腸管であり、抗体全体の60%は腸管でつくられている¹⁾。この腸管免疫系において重要な働きをしているのが、小腸パイエル板細胞で産生されるIgA抗体である。

KMC05株乾燥菌体をマウスに経口投与したところ、小腸パイエル板細胞のIgA抗体産生量及びパイエル板を除く腸管の総IgA抗体産生量は、生理食塩水投与区と比較して有意な増加が認められた（図3）。これらの結果から、KMC05株は免疫賦活作用を有しており、ヒトに対しても保健機能を有する可能性が示された。このような保健機能を解析していくことにより、乳酸菌農薬の安全性を高めて安心感を醸成するだけでなく、乳酸菌農薬を処理した農作物自体の付加価値を高めることも期待できる。

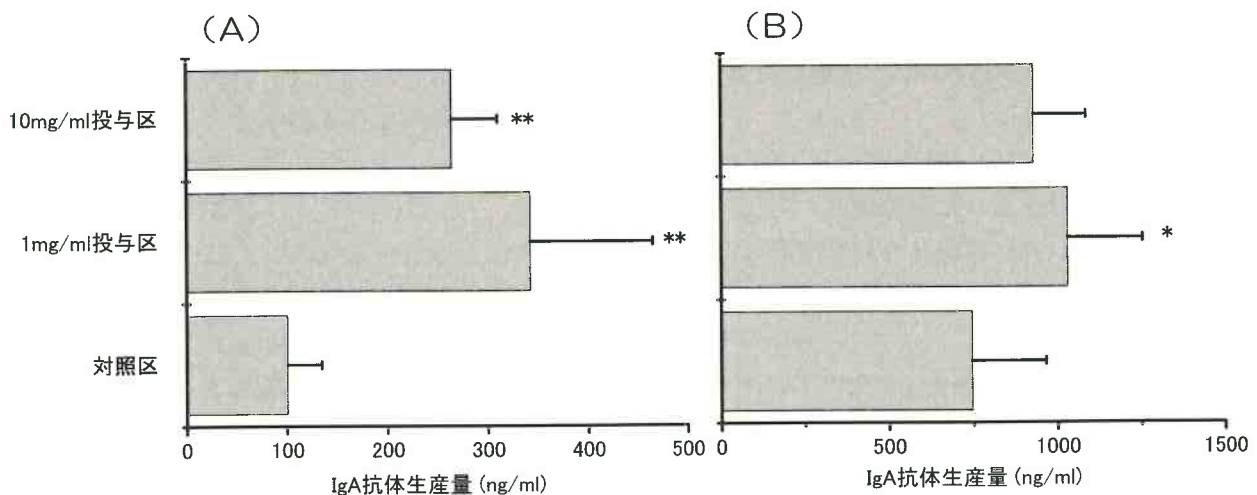


図3 *Pediococcus pentosaceus* KMC05株のマウスに対する免疫賦活作用

(A) 小腸パイエル板細胞のIgA抗体産生量 (B) 腸管総IgA抗体産生量

*, **: 対照区と比較し, t-検定によりそれぞれ5, 1%水準で有意差あり。

6. 今後の展望

現在、KMC05株を製剤化し、その効率的・効果的な処理方法を検討している。また、ハウレンソウ萎凋病以外の病害に対する有用乳酸菌の探索も実施し、これまでにいくつかの有望な菌株を選抜した。現在、その製剤の実用性を検討している。これらの取り組みにより、開発された世界初となる乳酸菌農薬が、安全・安心に対する消費者ニーズに応えた国内農産物の安定供給に貢献することを期待している。

本研究は、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「人の健康に有益な乳酸菌を使った世界初の微生物農薬を開発する」(平成17~19年度)により実施した。

文 献

- 1) 上野川修一 (2003), 免疫と腸内細菌, 初版, p40-46, p142-144, 平凡社, 東京
- 2) 岡田早苗 (2003), 乳酸菌の科学と技術 (乳酸菌研究集談会), 初版, p13-16, p322-334, 学会出版センター, 東京



バックナンバーのご案内
第 127 号
2008 年 5 月 15 日発行

総 説

トレハロースを細胞の内外に輸送する遺伝子 - トレハローストランスポーターの発見と応用の可能性について -
..... 黄川田 隆洋

国内情報

花粉制御への一歩 - 花粉成熟に必要なシロイヌナズナ MS1 転写因子の同定 伊藤 卓也・篠崎 一雄
半乾燥地の不良土壌に多く見られるホウ酸過剰に耐性な植物の作出に成功 三輪 京子・藤原 徹
低濃度エタノール水溶液を用いた新しい土壌消毒法の開発 小原 裕三
通電処理による鶏胸肉の物性と食味性の向上技術
..... 坂田 亮一・押田 敏雄・辻 聡・樋口 清志

果樹園用せん定枝粉碎搬出機の開発
..... 金光 幹雄・太田 智彦・山本 聡史

地域先端研究

カンキツグリーンング病の簡易診断法 (スクラッチ法) の開発 澤岬 哲也

文献情報

肉用未経産牛における妊娠 3 日目からのプロゲステロン濃度の上昇が胚の生存性及び胚発育に及ぼす影響 (抄訳: 下司 雅也)
シロイヌナズナで見いだされた減数分裂を伴わない配偶子形成変異体 (抄訳: 久保山 勉)
バクテリアの大きさを制御するメタボリックセンサー (抄訳: 安田 源太郎)
苦味ペプチドに対するヒト苦味レセプターhTAS2Rs の応答 (抄訳: 大嶺 啓介)

◀文献情報▶

新鮮な卵丘細胞の核と体内成熟卵あるいは体外成熟卵の細胞質を用いたウシの核移植

Bovine Nuclear Transfer Using Fresh Cumulus Cell Nuclei and *In Vivo*- or *In Vitro*-Matured Cytoplasts

S. Akagi¹, K. Kaneyama², N. Adachi³, B. Tsuneishi⁴, K. Matsukawa¹, S. Watanabe¹, M. Kubo⁵ and S. Takahashi¹.

¹National Institute of Livestock and Grassland Science, Tsukuba, Ibaraki

²National Livestock Breeding Center, Nishigo-mura, Fukushima

³Ibaraki Livestock Research Center, Ishioka, Ibaraki

⁴Kochi Prefectural Livestock Experiment Station, Takaoka-gun, Kochi

⁵National Institute of Animal Health, Tsukuba, Ibaraki

Cloning and Stem Cells, 10(1), 173-180, 2008

体細胞核移植によって多くのクローン牛が作出されてきているが、生産効率はいまだに低い。レシピエント卵細胞質の品質が核移植胚の作出効率に影響を及ぼすことが知られており、山羊や羊の核移植においては、レシピエント卵子として体内成熟卵あるいは体外成熟卵を用いた場合に発生率に大きな差があることが報告されている。また、ウシの体外受精においても、食肉処理場由来卵巣から作出した体外成熟卵よりも、生体内卵子吸引法によって採取した体内成熟卵を用いた場合に発生率が高いことが報告されている。ウシの核移植においては、食肉処理場由来卵巣から作出した体外成熟卵が一般的にレシピエント卵子として用いられており、体内成熟卵を用いたウシ体細胞核移植はこれまで報告されていない。さらに、活性化のタイミングが核移植胚の作出効率に影響を与えることが知られており、継代培養した体細胞を核移植した場合には、融合直後よりも、融合数時間後に活性化処理を行う方が発生率が高まる

ことが報告されている。そこで、本論文では、生体内卵子吸引による採取直後の卵丘細胞を用いて、レシピエント卵子の由来あるいは融合・活性化処理のタイミングがウシ核移植胚の発生能に及ぼす影響が検討された。レシピエント卵細胞質としては、ホルモン処理後に生体内卵子吸引法により採取した体内成熟卵、あるいは食肉処理場由来卵巣から作出した体外成熟卵が用いられた。核移植胚は、融合直後に活性化（FA区）あるいは融合2時間に活性化（DA区）処理が行なわれた。体外成熟卵をレシピエント卵細胞質として用いた場合には、DA区の胚盤胞への発生率（23%）は、FA区（15%）に比べて高くなる傾向が認められた。一方、体内成熟卵を用いた場合の胚盤胞への発生率は46%と高かった。35日での妊娠率は、融合・活性化のタイミングやレシピエント卵子の由来による差は認められなかった。体内成熟卵を用いた場合には流産は認められなかったが、体外成熟卵を用いた場合には流産が高率（妊娠牛のうち88%）に発生した。妊娠牛のうち3頭が分娩に至ったが、すべて死産であった。以上の結果から、生体内成熟卵をレシピエント卵細胞質として用いることにより、ウシ核移植胚の発生能を改善できることが明らかとなった。

ウシの体外受精技術が開発・改良されてきているが、体外成熟卵の品質は体内成熟卵と比べて劣ることが知られている。本報告においても、体外成熟卵の利用が核移植胚の作出効率の低さや流産多発の原因の一つとして考えられている。核移植技術の効率化のためには体内成熟卵の利用が現時点では有効であるが、核移植技術や体外受精・培養技術の進展のためにも、高品質な成熟卵が得られる体外成熟培養技術のさらなる改良が望まれる。

（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▶

シロイヌナズナでの減数分裂を伴わない配偶子形成

Gamete formation without meiosis in *Arabidopsis*
 Maruthachalam Ravi, Mohan P. A. Marimuthu and
 Imran Sddiqi
 Centre for cellular and molecular biology, India
Nature, 451, 1121-1124 (2008)

アポミクシスは、種子による単為生殖を行うことで、母親と全く同じクローンが形成される生殖様式である。アポミクシス個体を用いることにより、遺伝的に母親と全く同じ集団を作ることが可能である。農作物に対して、このアポミクシス形質を導入することにより、育種期間を大幅に削減することが可能であり、さらには育成された雑種強勢作物をその形質を変えることなく、半永久的に増殖させることが可能となる。アポミクシスにおいては胚嚢母細胞の減数分裂時に還元型分裂が起こらず、均等分裂が行われ、その結果 $2n$ の卵細胞を持つ胚嚢が形成される（アポマイオシス）。その後、この非減数性卵細胞からの単為発生によって、親と遺伝的に全く同一の胚が生じる。このアポミクシスが、どのような遺伝子によって制御されているかに関しては、現在までほとんど分かっていない。本論文では、シロイヌナズナ *DYAD/SWITCH1* (*SWII*) 遺伝子の突然変異体において、減数分裂の異常による均等分裂によって、アポマイオシス様配偶子が形成され、さらに自家受精の結果、三倍体の種子が生産されることを報告している。

シロイヌナズナにおいて *SWII* は相同染色体の対合と動原体領域の構成に必須の機能を果たすと考えられている。*swii* 機能欠失型突然変異体では、減数分裂時の還元分裂がうまく起こらないため、その結果雌雄ともに完全な不稔となる。本論文において解析がなされた *dyad* 突然変異体は、*SWII* の弱い突然変異型対立遺伝子（不完全な短いタンパク質が生じると考えられる）をもつ植物であるが、1個体に数粒の自殖

種子をつけることが分かった。この種子を育成したところ、多くの自殖種子が野生型に比べて萎縮して小さく、またこの小さい種子の80%以上が三倍体であったことから、母方染色体の増加によって三倍体化したものと考えられた。これを検証するため、*dyad* 変異体と抗生物質耐性遺伝子導入個体、ならびに生態型の異なる野生型シロイヌナズナを用いた交雑試験を行った。マーカー遺伝子、分子マーカーの分離様式から、いずれの場合でも三倍体植物が母方のアポマイオシスによる $2n$ 配偶子と $1n$ の花粉との受精により生じたことが明かとなった。

一方、アポミクシスを有するトウモロコシの仲間 *Tripsacum dactyloides* から単離されたアポミクシス関連遺伝子 *AM1* は、シロイヌナズナ *SWII* の相同遺伝子であることが明らかになっている。つまり、自然のアポミクシス個体においても *SWII* 遺伝子族が重要な機能を持っていることが示唆される。

以上のように、正常な減数分裂に必須の遺伝子 *DYAD/SWII* に起こった単一の突然変異によって、非常に少ない割合ではあるがアポマイオシスを介した $2n$ の機能的な雌性配偶子が形成され、さらには、現状では受精を介してではあるが、胚発生を行うことが示された。これは、アポミクシスの分子制御機構解明だけでなく、人為的にアポミクシス植物を作り出すという応用面でも非常に重要な発見と思われる。

（抄訳：高田美信, TAKADA Yoshinobu, 東北大学大学院生命科学研究科）

◀文献情報▶

麴菌の非相同組み換え修復に関与する *ligD* 遺伝子の欠損は遺伝子ターゲティング効率を著しく上昇させる

A defect of LigD (human Lig4 homolog) for nonhomologous end joining significantly improves efficiency of gene targeting in *Aspergillus oryzae*

Osamu Mizutani,¹ Youhei Kudo,¹ Akemi Saito,¹ Tomomi Matsuura,¹ Hirokazu Inoue,² Keietsu Abe,³ & Katsuya Gomi¹

¹ Laboratory of Bioindustrial Genomics and ³ Laboratory of Enzymology, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Japan

² Laboratory of Genetics, Department of Regulation Biology, Faculty of Science, Saitama University, Japan

Fungal Genetics and Biology, 45, 878-889 (2008)

全ての生物はDNA二本鎖切断 (DNA double strand breaks : DSBs) が生じた際、DNA配列の相同性に依存した、相同組換え (homologous recombination : HR) か、依存しない非相同末端結合 (non-homologous end joining : NHEJ) によって修復することが知られている。また、外来DNAの染色体への導入もHRとNHEJの2つの経路によって行われると考えられている。酵母はDSBsの修復を主にHRにより行っているため、相同配列を持つ外来DNA断片は染色体上の相同部位と組換えを起こし、導入される。そのため、酵母の標的遺伝子特異的な相同組み換え効率、即ち遺伝子ターゲティング効率は非常に高い。対照的に麴菌を含む酵母以外の真核生物の多くは、DSBsの修復を主にNHEJにより行っている。これにより、外来DNA断片が長い相同配列を有していたとしても、DNA断片は染色体上の任意の部位に導入されることが多い。

しかしながら、近年、アカパンカビにおいてNHEJに関与する *ku* 遺伝子の破壊をすると、ターゲティング効率が上昇することが井上らによ

り報告された。これに続き、多くの真菌において、*ku*破壊株が作成され、そのターゲティング効率は飛躍的に上昇した。一方、麴菌 *ku*破壊株のターゲティング効率はある程度の改善は見られるものの、他の真菌などと比較して低いものであった。そこで本論文では、NHEJ経路においてDNA結合反応に関与する *lig4* 遺伝子の破壊も、遺伝子ターゲティング効率の飛躍的な上昇を引き起こすという井上らの報告を基に、麴菌において、*lig4* ホモログ遺伝子の破壊及びそのターゲティング効率の検証を行った。

麴菌ゲノムデータベース中より *lig4* ホモログ遺伝子を探索し、*ligD* と命名した。作成された *ligD* 破壊株の表現型は、プレート培養、液体培養ともに親株と比較してほとんど変化はなかった。また、DSBsを引き起こす薬剤に対する感受性テストを行った所、メチルメタンスルホニルにおいて低濃度では親株と同程度の感受性を示したが、高濃度では親株よりも感受性を示した。エチルメタンスルホニルやフレオマイシンでは、どの濃度でも感受性は親株と同等であった。

ligD 破壊株のターゲティング効率の検討は、菌体外プロテアーゼの発現に関与する転写因子 *priR* を用いて行った。この時、*priR* の相同配列の長さは、マーカー遺伝子の両端に1kbの長さで行った。その結果、親株では28%だったのに対し、*ligD* 破壊株では、100%であった。これらの結果から、麴菌 *ligD* はアカパンカビの *lig4* と同様にNHEJに関与している事が示唆された。さらに相同配列の長さを0.5, 0.1, 0.05kbと短くした場合のターゲティング効率は、親株では13%, 0%, 0%であったのに対し、*ligD* 破壊株では、0.5kbでも100%であった。また、興味深いことに相同配列が0.1, 0.05kbと短い場合、*ligD* 破壊株では形質転換体がほとんど得られなかった。以上の結果から、相同配列が0.5kb以上の長さである場合において、麴菌 *ligD* 破壊株は、高頻度相同組み換え宿主として非常に有用であることが示された。

(抄訳：水谷 治, MIZUTANI Osamu, 独立行政法人酒類総合研究所)

◀文献情報▶

キンギョでのニワトリ生殖腺刺激
ホルモン放出ホルモンIIによる
摂食への抑制効果

Inhibitory effect of chicken gonadotropin-releasing hormone II on food intake in the goldfish, *Carassius auratus*

Kouhei Matsuda^a, Kouta Nakamura^a, Sei-Ichi Shimakura^a, Tohru Miura^a, Haruaki Kageyama^b, Minoru Uchiyama^a, Seiji Shioda^b and Hironori Ando^c

^aLaboratory of Regulatory Biology, Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, 3190-Gofuku, Toyama 930-8555, Japan

^bDepartment of Anatomy, Showa University School of Medicine, Tokyo 142-8555, Japan

^cLaboratory of Advanced Animal and Marine Bioresources, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

Hormones and Behavior 54(1): 83-9 (2008)

動物にとって摂食行動は生命の維持と個体活動を支えるエネルギー獲得のため欠くことのできない重要な本能行動である。脊椎動物において、間脳の視床下部領域は体内外の情報を収集・統合して摂食調節に重要な役割を演ずる中枢として機能している。ラットやマウスにおける最近の研究成果によれば、摂食行動は、視床下部を中心とした脳各領域に発現・分布する多数の神経ペプチドおよびモノアミン・カテコールアミン作動性ニューロン群の協調、または拮抗作用によって促進的あるいは抑制的に制御されている。空腹時には、オレキシン、グレリン、神経ペプチドY、メラニン凝集ホルモンなどの摂食亢進性の神経ペプチド作動性ニューロン群が興奮して摂食行動を誘発する。一方、満腹時には、コルチコトロピン放出ホルモン、黒色素胞刺激ホルモン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドおよび血管作動性腸ポリペプチドなどが摂食を抑制する。また、これらの神経ペプチド作動性ニューロン群は相互作用しながら、摂食行動を制御・最適化している。

さらに摂食行動を調節する神経ペプチドは生殖行動や情動行動にも深く影響を与えるようである。

本論文の富山大学松田教授らは魚類の摂食制御機構の解明を目指すために、生理学的知見が数多くある金魚を使って神経ペプチドによる摂食行動の脳制御機構の研究を進めている。このグループは神経ペプチドの脳室内投与後に摂餌量を計測する生物検定法を確立した。さまざまな神経ペプチドの脳室内投与によって摂餌量が顕著に変動することを見出した。例えば金魚の摂食量はオレキシン、グレリンおよび神経ペプチドYによって有意に増加する。一方、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド、血管作動性腸ポリペプチド、コルチコトロピン放出ホルモン、黒色素胞刺激ホルモン、ジアゼパム結合阻害物質由来ペプチドおよびニューロメジンUなどの脳室内投与は金魚の摂食量の低下を引き起こす。これらの結果は摂食行動の複雑な調節を司る脳神経機構の進化の過程における貴重な知見となっている。

本論文では、金魚を用いて生殖内分泌系の調節や性行動への関与が強く示唆されているニワトリ型生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンII (GnRHII) による摂食行動に及ぼす影響を探った。GnRHIIの脳室内投与により摂餌量は低下することがわかった。この摂食抑制作用は雌雄による差はなく同様に抑制された。また、この抑制作用は、金魚の生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体であるGfA型受容体とGfB型受容体に非選択的なI型受容体アンタゴニストのAntideによって完全にブロックされる。しかし、摂食抑制経路の要とされるコルチコトロピン放出ホルモンや α -黒色素胞刺激ホルモンによる神経伝達経路を介することはなく、これらの経路とは独立して摂食抑制作用を誘導する。またもう一方の生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンであるサケ型生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンの投与は摂食行動には影響はなかった。つまり、金魚ではGnRHII単独で独自の摂食抑制作用があることがわかった。今後、水産増養殖対象魚種や原始的な魚類などでの応用が期待される。(抄訳：奥野敦朗, OKUNO Atsuro, 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 20 年度 生研センターUR 対策現地検討会 「ハウスにおける耐暑栽培技術および作業環境の好適化技術」

主 催： (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
後 援： (独)農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター
協 力： MKV プラテック株式会社

開催日時： 平成20年9月12日(金) 午前 11 時 00 分～16 時 05 分
開催場所： 現地見学会 トマト促成栽培ハウス 住所:熊本県八代市昭和同仁町養生
技術検討会 八代ロイヤルホテル会議室 (<http://www.yroyal.com/>)
住所:熊本県八代市本町 2-1-5 電話:0965-34-1111

集合出発時間:

- (1)貸切バス利用の場合 午前 10 時 00 分発 ・ 八代ロイヤルホテル前
午前 10 時 30 分発 ・ 新八代駅東口駐車場
(2)自家用車等利用の場合 各会場に直接お越し下さい。

参加費： 無料 (昼食代:1,500 円、希望者は申込み時にご予約下さい)

開催内容:

- I. 現地見学会 ----- 11 時 00 分～11 時 45 分
熱線遮蔽フィルムを使ったトマト促成栽培ハウス
- II. 技術検討会 ----- 13 時 10 分～16 時 05 分
1. ハウスにおける耐暑栽培技術および作業環境の好適化技術
野菜茶業研究所 高収益野菜研究チーム長 高市益行
 2. 熊本県の施設園芸における温暖化の影響と対策
熊本県農業研究センター 農産園芸研究所 野菜研究室長 小野 誠
 3. 夏場におけるトマト栽培技術
トマト促成栽培生産者 高濱 泰
 4. 熱線遮断農POフィルムの研究開発 熱線遮蔽フィルム「メガクール」
MKV プラテック株式会社 技術顧問 宍戸良洋
 5. 総合討論

申込み方法

平成 20 年 8 月 20 日(水)までに、必要事項(連絡先、氏名、部署・役職名、貸切バス利用の有無、昼食の利用の有無)を記入したEメール(ktsuga@affrc.go.jp)、又はFAX(03-3459-6577)にてお申し込み下さい。受付後、参加登録番号をお知らせ致します。

なお、参加申し込み等詳細は、<http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>にて、「新着情報」の「平成 20 年度生研センターUR対策現地検討会について」をご覧下さい。

問い合わせ先

生物系特定産業技術研究支援センター UR対策研究開発成果普及業務担当
プロジェクトリーダー 津賀幸之介 E-mail: ktsuga@affrc.go.jp
TEL: 03-3459-6568 FAX: 03-3459-6577
〒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)

編集後記

128号をお届けします。本号では「イネをめぐる先端研究」を特集に取り上げ、土岐精一氏（農業生物資源研究所）らにジーンターゲットングによるイネの分子育種、佐藤豊氏（名古屋大学）らにRNAサイレンシングの経路を介したイネの茎頂分裂組織構築機構、吉田均氏（中央農業総合研究センター）らに開花せずに受粉するイネについてご執筆戴きました。最近の世界の食糧需給状況に鑑み、イネを始めとする食糧作物に係る研究の重点化、加速化が益々重要と考えられます。

その他の研究情報としては、中垣雅雄氏（信州大学）にクモの糸の成分を蚕に組み入れ、強度や伸縮性に優れた「スパイダーシルク」、寺田裕氏（動物衛生研究所）らに牛の小型ピロプラズマ病の媒介者マダニ中の原虫保有率の簡易検査法、佐藤実氏（東北大学）に魚や肉の簡便・迅速な「鮮度チェッカー」、小林研氏（生研センター）らに野菜接ぎ木装置用自動給苗ユニット、津田和久氏（京都府農業資源研究センター）らに農作物を病害から護る「乳酸菌農薬」と、今回もバラエティに富み、且つ、興味深い研究情報をそれぞれご紹介戴きました。

また、本号の文献情報は、下司雅也氏（畜産草地研究所）、高田美信氏（東北大学）、水谷治氏（酒類総合研究所）、奥野敦朗氏（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。

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**
- 技術シーズ開発のための基礎研究や
応用・発展研究及びベンチャー創業を目指すなら **イノベーション創出基礎的研究推進事業**

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128号

平成20年7月15日発行

発行人 曾根 則人

編集人 浅野 将人

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/>