

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

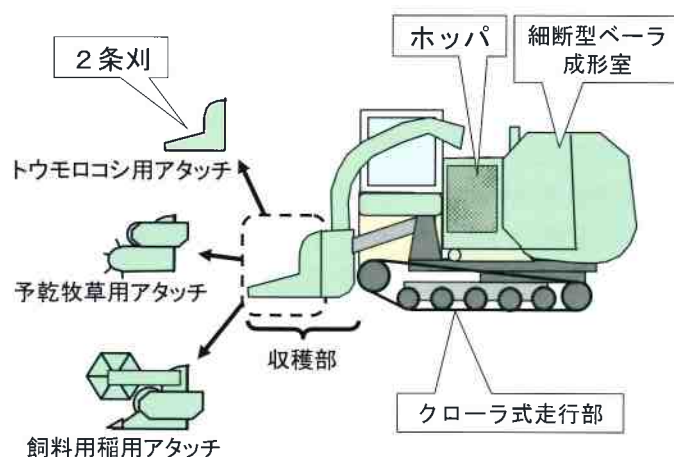
平成21年3月15日（隔月1回15日発行）
ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.132

15 MARCH, 2009

ブレインテクノニュース



汎用型飼料収穫機のご概念



牧草収穫作業風景



飼料イネ収穫作業風景

汎用型飼料収穫機のご開発

— 圃場を選ばず、一台三役の府県コントラクター向け機械

(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 畜産工学研究部

志藤 博克・橋 保宏・川出 哲生

目 次

総 説

- 天敵昆虫サビマダラオオホソカタムシによるカミキリムシ被害対策手法の開発 1
 浦野 忠久 ((独)森林総合研究所 森林昆虫研究領域)

国内情報

- イネいもち病菌及びアルタナリア菌の生育を抑制するマイコウイルスを世界で初めて発見 5
 森山 裕充・青木 菜々子・加藤 幸栄・鈴木 佑・浦山 俊一・浮池 孔洸・児玉 基一郎・
 有江 力・寺岡 徹・福原 敏行 (東京農工大学 大学院共生科学技術研究院 他)
- イネの穂ばらみ期耐冷性を強くする遺伝子の同定 10
 斎藤 浩二・早野 由里子・黒木 慎・佐藤 裕 ((独)農業・食品産業技術総合研究機構
 北海道農業研究センター)
- 海水でも育つマングローブから耐塩性遺伝子を同定 15
 多田 雄一 (東京工科大学 応用生物学部)
- BSE罹患牛における脳幹機能障害の特徴 20
 新井 鐘蔵 ((独)農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所)
- 汎用型飼料収穫機の開発 - 圃場を選ばず、一台三役の府県コントラクタ向け機械 24
 志藤 博克・橘 保宏・川出 哲生 ((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

- 単為結果性とげなしナス‘試交05-3’の育成 29
 穴井 尚子 (愛知県農業総合試験場 園芸研究部)

文献情報

- 凍結保存・融解後に生存性の低いブタ精液において、精漿は凍結時の精子に障害を与えるが、
 融解時に精漿が存在することで、融解後の精子の品質と受胎率が向上する 32
 T. Okazaki et al. (*Theriogenology*, 71, 491-498, 2009) 抄訳：下司 雅也
- シロイヌナズナにおいて重複した遺伝子の多様な進化が遺伝的不適合を引き起こす 33
 D. Bikard et al. (*Science*, 323, 623-626, 2009) 抄訳：高田 美信
- ドコサヘキサエン酸は細胞表面のマイクロドメインのサイズと分布を変化させる 34
 R. S. Chapkin et al. (*Biochimica et Biophysica Acta*, 1778 (2), 466-471, 2008) 抄訳：池本 英生

- 生研センターからのご案内 (平成21年度民間実用化研究促進事業のお知らせ) 35
 (平成20年度研究成果発表会の開催について (予告)) 36

表紙の説明

飼料自給の重要性が益々クローズアップされる中であって、府県におけるコントラクタ (飼料生産受託組織) の一層の普及に資するため、筆者らは、トウモロコシ、牧草、飼料イネなどの多様な飼料作物を1台で収穫・細断・ロール成形でき、地盤が軟弱な水田基盤や狭い圃場でも機動性に優れた汎用型飼料収穫機を開発した。開発機で作られたロールペールサイレージは、従来のロールペールよりも高密度なため発酵品質が高く、1年程度貯蔵しても品質の低下がほとんどない。

詳細については、24頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

天敵昆虫サビマダラオオホソカタムシによる
カミキリムシ被害対策手法の開発

独立行政法人 森林総合研究所 森林昆虫研究領域

浦野 忠久

サビマダラオオホソカタムシはマツ材線虫病を伝搬するマツノマダラカミキリの天敵昆虫である。この虫を室内で増殖し、被害マツ林に放飼することによりマツノマダラカミキリを防除する手法を考案した。また国内における代表的な樹木害虫とされている広葉樹穿孔性カミキリムシ2種の幼虫、蛹に対する室内寄生試験を行った結果、いずれのカミキリムシについても効果があることが判明した。

1. はじめに

サビマダラオオホソカタムシ *Dastarcus helophoroides* (FAIRMAIRE) (以下ホソカタムシ) は鞘翅目(甲虫目)ムキヒゲホソカタムシ科 Bothrideridae に属する捕食寄生性昆虫で、おもにカミキリムシ類の幼虫と蛹に寄生する。本種は年1化で7~9月に羽化した後成虫で越冬し、翌年4月頃から枯死樹木の樹皮亀裂内等に産卵する。孵化幼虫は樹幹内部の寄主孔道に侵入し、寄主に到達して麻痺させた後外部から摂食を開始し、蛆虫型の2齢幼虫へと脱皮して発育する(図1)。成熟した幼虫は繭を作ってその中で蛹化し、成虫が羽化する。

本種は1980年前後に広島、岡山両県でマツ材線虫病の伝播者であるマツノマダラカミキリ *Monochamus alternatus* HOPE への寄生が確認された^{1,2)}。この当時天敵としての有効性は解明されなかったが、約20年後に岡山県内のマツ林において、本種が枯死木樹幹内のマツノマダラカミキリに50%以上という高率で寄生していることが確認された³⁾。また同じ時期に中国寧夏自治区で、ポプラなどの緑化木を食害するツヤハダゴマダラカミキリ *Anoplophora glabripennis* MOTSCHULSKY の防除にホソカタムシが利用さ

URANO Tadahisa
〒305-8687 茨城県つくば市松の里1

れ、人工飼料を用いた大量増殖法の開発が進んだ^{4,5)}。このような状況の中、森林総合研究所では交付金プロジェクト研究「サビマダラオオホソカタムシを用いたマツノマダラカミキリ防除技術の開発」(平成14~18年度)を開始し、マツ材線虫病被害地におけるホソカタムシ放飼試験および生態解明のための研究が行われた。

2. マツ材線虫病被害林分における放飼試験

試験は滋賀県野洲市の近江富士花緑公園と希望ヶ丘文化公園(2002~2005年)および岡山県笠岡市(2006年)のアカマツ林で行った。滋賀県の試験地ではホソカタムシ土着個体の生息は確認されなかったが、岡山県の試験地内では土着個体が採集された。

実験室でホソカタムシを飼育し、毎年4月下旬~5月上旬に前年の枯死木樹幹上に成虫を放飼した。2003年は供試木1本あたりの放飼成虫数を50, 100, 200頭の3通りとし、2004年は20, 40, 80頭の3通りとした。それ以外の年は1本あたり40~60頭を放飼した。6~7月に供試木を伐倒後割材調査し、材内のマツノマダラカミキリ死亡要因と死亡率を調査した。供試木の一部は無放飼区(対照区)とし、放飼試験と平行して放飼成虫の立木間における移動分散を、

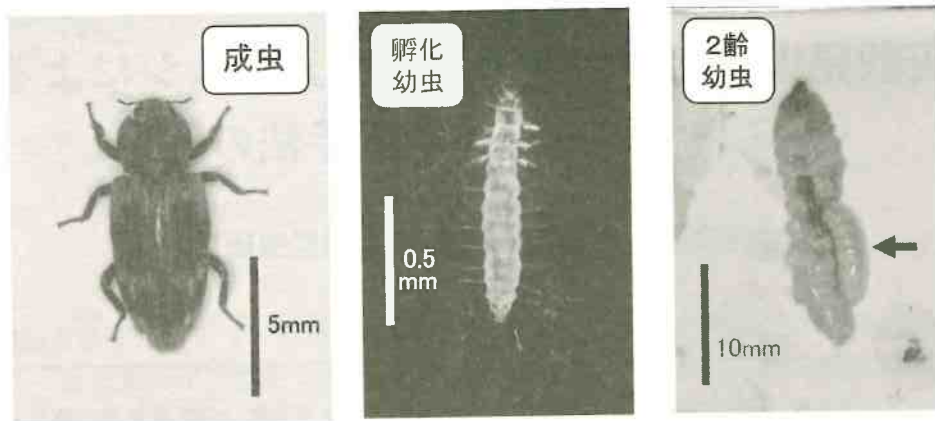


図1 サビマダラオオホソカタムシの発育ステージ

左：成虫，中央：孵化幼虫，右：マツノマダラカミキリ幼虫に寄生する2齢幼虫（矢印）

無放飼木における寄生の有無によって調査した。

放飼試験の結果を図2に示した。材内蛹室には (A) マツノマダラカミキリ生存個体（含脱出口）、(B) ホソカタムシによる被寄生死亡個体、(C) 原因不明死亡個体および (D) オオコクヌスト *Trogossita japonica* REITTER およびキツツキの捕食による死亡個体が認められた。双方の試験地において、ホソカタムシの寄生によって樹幹内のマツノマダラカミキリの36%ないし58%が死亡し、原因不明の死亡を加えた死亡率は64%ないし80%に達した。寄生率および死亡率を対照区と比較した結果、どちらの試験地においても放飼区が無放飼区より有意に大きかったことから、防除効果は認められたものと考えられる。原因不明死亡120個体を検鏡した結果、10個体でホソカタムシの孵化幼虫等の死骸が確認され、不明死亡個体の中には実際に寄生を受けたものが含まれることが明らかになった。供試木1本あたりの放飼頭数を3通りとした結果、2003年は捕食者による高い死亡率が原因で放飼成虫数と寄生率の間には明らかな関係は認められなかった。2004年には20頭放飼の場合は、40頭および80頭放飼の場合に比べマツノマダラカミキリ死亡率が低くなった。

滋賀県の対照区においては、2002年と2003年には寄生は認められず、マツノマダラカミキリの生存率は高かった。各対照木の最も近い放

飼木からの距離は最小1.4 m、最大660 mであったが、供試木間の成虫の移動はなかったと考えられる。2004年と2005年にそれぞれ対照木1本においてホソカタムシの寄生が認められた。2004年の木は最も近い放飼木から265m、2005年はそれ以上離れていたため、前年あるいは前々年の放飼残存成虫およびその次世代による寄生の可能性もある。両年とも他の対照木では寄生が認められなかった。以上のことから放飼個体が試験地内で分散・繁殖している可能性は高いものの、かなり局在するものと考えられた。2003年放飼試験後の試験地内で、放置されたアカマツ枯死伐倒木樹幹と切り株の樹皮下より、11月12日および21日に当年放飼の残留個体と思われる成虫2頭を採集した。これにより、放飼成虫の一部は少なくともその年の冬までは林内で生き残ることが確認された。本種の試験地内での定着を確認するためには、さらなる調査を必要とするものと考えられる

3. 広葉樹穿孔性カミキリムシ防除の可能性

マツ材線虫病の生物的防除に関する問題点のひとつは、防除対象であるマツノマダラカミキリが被害の直接原因ではなく、病原体であるマツノザイセンチュウ *Bursaphelenchus xylophilus*

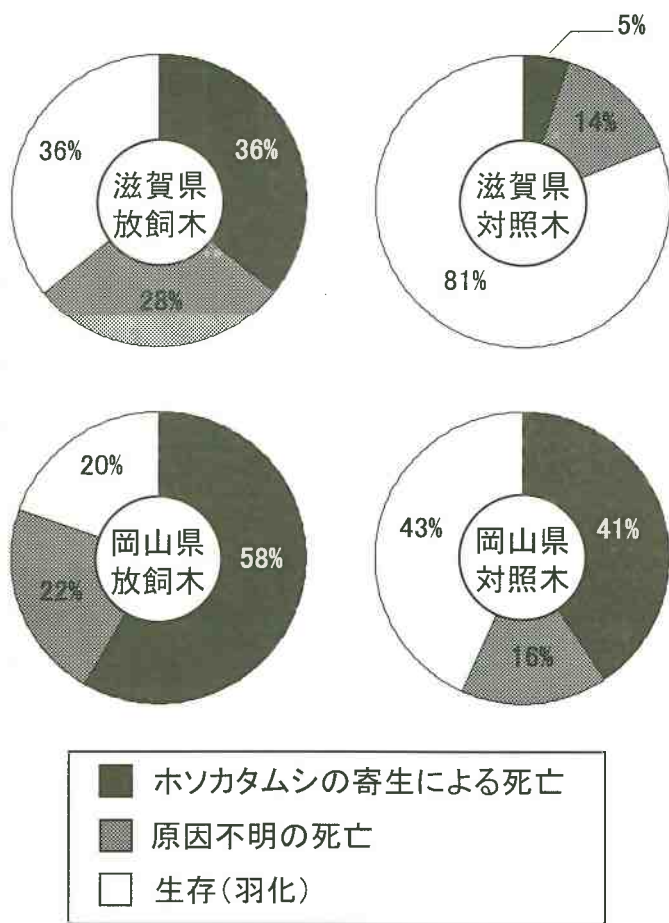


図2 2002～2006年のサビマダラオオホソカタムシ放飼試験による放飼木および対照木（無放飼木）内でのマツノマダラカミキリ各死亡要因の占める割合

(STEINER et BUHRER) NICKLEの運搬者に過ぎないため、ある程度防除できたとしても、それに比例してマツ枯れが減少するわけではないということである。すなわち少数でも生き残ったマツノマダラカミキリが高い線虫伝播能力を持っていれば、枯損被害は減少しない可能性がある。したがってすでに枯損率の上昇し始めた林分においては、天敵昆虫単独で被害拡大をくい止めるような能力は期待できないため、予防薬剤散布のような現行防除法で被害が低レベルに抑えられている場所での利用法を考えるべきである⁶⁾。

一方ホソカタムシは人工飼料での飼育が可能で、成虫の寿命が長く産卵数も多いという、室内増殖に適した昆虫である。また本種は他のカミキリムシ類にも寄生可能であることから、よ

り効果の得やすい種への転用を考えることができる。現在、国内で広葉樹に対する被害の認められているカミキリムシの代表種として、ゴマダラカミキリ *Anoplophora malasiaca* THOMSON とクワカミキリ *Apriona japonica* THOMSON を挙げることができる。ゴマダラカミキリは柑橘の大害虫であるとともに様々な種類の樹木を穿孔加害する。クワカミキリはかつては名の通りクワの害虫であったが、近年ケヤキなどの緑化木に対する被害が顕著になっている。これら2種の幼虫および蛹に対するホソカタムシの室内寄生試験を行った。小型のプラスチックケースの中に寄主を1個体ずつ、ホソカタムシ孵化幼虫とともに入れて数日間置いたところ、ゴマダラカミキリ幼虫の85%、同蛹100%、クワカミキリ幼虫93%、同蛹77%が寄生によって死亡した。

上記2種はいずれもマツノマダラカミキリとは異なり、生木を直接加害するので、防除した分だけ被害の減少を見込むことができる。またこれらのカミキリムシがおもに生息するのは果樹園、公園等の森林に比べて面積が小さい

場所であるため、分散能力の低いホソカタムシであっても高い効果を期待できるであろう。その他、ハラアカコブカミキリ *Moechotypa diphyis* (PASCOE) などシイタケほだ木の害虫、さらにチャイロホソヒラタカミキリ *Phymatodes testaceus* (LINNAEUS)⁷⁾ など乾材害虫としてのカミキリムシ類防除への利用の可能性もある(図3)。我々は現在ゴマダラカミキリ防除のための網室内放飼試験を始めたところであるが、今後上記のような広葉樹食害性カミキリムシ類防除のための野外試験を行っていきたいと考えている。



図3 今後の防除対象として予想されるカミキリムシ被害の種類

文 献

- 1) 竹常明仁 (1982), 森林防疫, 31, 228-230
- 2) 井上悦甫 (1993), 森林防疫, 42, 171-175
- 3) 岡本安順 (1999), 森林応用研究, 8, 229-232
- 4) Ogura, N. et al. (1999), *BioControl*, 44, 291-299
- 5) 小倉信夫 (2000), 森林防疫, 49, 51-54
- 6) 浦野忠久ら (2007), 森林防疫, 56, 224-232
- 7) 岩田隆太郎ら (2007), 日本昆虫学会第67回大会講演要旨, 80

◀国内情報▶

イネいもち病菌及びアルタナリア菌の生育を抑制するマイコウイルスを世界で初めて発見

¹東京農工大学 大学院共生科学技術研究院 生命農学部門

細胞分子生物学研究室, ²同 植物病理学研究室,

³鳥取大学 農学部 植物病理学研究室

森山 裕充¹・青木 菜々子¹・加藤 幸栄¹・鈴木 佑¹・浦山 俊一¹・

浮池 孔洸¹・児玉 基一朗³・有江 力²・寺岡 徹²・福原 敏行¹

菌類に広く存在するマイコウイルスは2本鎖RNAをゲノムとし、その大半は潜伏性であるが、中には宿主菌の生育を抑制して病原性を著しく低下させる弱毒化マイコウイルスも存在する。我々は未だ報告事例のないイネいもち病菌やアルタナリア菌から、生育抑制をもたらすマイコウイルスを見出した。これらマイコウイルスの生化学的な特徴を示し、稲作、野菜や果樹栽培の病害防除に適用される新たな生物防除資材としての展望を紹介する。

1. はじめに

マイコウイルスは2本鎖RNAをゲノムとするウイルスが多くを占めており、ほとんどのウイルスは潜伏性で機能不明であるが、中には宿主菌の生育を抑制して病原性を著しく低下する弱毒化マイコウイルスが存在し、実際に植物病原菌防除資材として実用化された例もある。マイコウイルスの作用により弱毒化された植物病原菌を用いる防除法は、欧米諸国ではクリ胴枯れ病菌で1990年代頃から実用化されており^{1), 2)}、国内では最近になってリンゴに感染する紫紋羽病菌が実用化の検討段階にある^{3), 4), 5), 6)}。我々は未だ弱毒化ウイルスが見つからないアルタナリア・アルタナータ菌 (*Alternaria alternata*) とイネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) の2種の植物病原菌を対象として、弱毒化ウイルスのスクリーニングを行ってきた。

MORIYAMA Hiromitsu, AOKI Nanako, KATO Sachie, SUZUKI Yu, URAYAMA Shunichi, FUKE Kuko, KODAMA Motoichiro, ARIE Tsutomu, TERAOKA Tohru, FUKUHARA Toshiyuki

〒183-8509 東京都府中市幸町3-5-8

2. アルタナリア・アルタナータ菌の生育を抑制する新規マイコウイルス

アルタナリア・アルタナータ菌 (以下アルタナリア菌) はヒトに対するアレルゲンとして生活環境に広く存在し、且つ果樹、野菜、備蓄中の穀類などに感染する植物病原菌としても重要である。我々は現在までに10種類のアルタナリア菌株から2本鎖RNAゲノムを有するマイコウイルスを単離している。そのうち1種類の宿主菌については、気中菌糸の成長抑制、溶菌化、異常な色素沈着などの著しい成長抑制が起きていることが確認され、弱毒化現象を引き起こすマイコウイルスを分離することに成功した (図1)。このマイコウイルスのゲノムは4成分の2本鎖RNAから構成され、このうち最も分子量の大きいdsRNA1鎖はRdRp4グループに分類されるRNA依存RNAポリメラーゼ (RdRp) 保存モチーフをコードすることが確認され、菌類や原虫などに感染するトチウイルス科やクリソウイルス科と進化的に関係があることが分かってきた。またマイコウイルスに感染したアルタナリア菌に対して治療処理を施すことにより、マイコウイルスを著しく減少さ

せる手法も確立しており，菌糸成長や色素沈着，気中菌糸数などが正常に戻り，生育抑制が解除された治癒菌株も樹立している（図1 (A)）。このマイコウイルスを AaV-1 (*Alternaria alternata virus*) と命名した。マイコウイルスとしては稀である長いポリ (A) 構造（約50塩基数）を有することも明らかにした。このウイルスは33nmで正多面体構造をしており，各RNA成分は別々にウイルス粒子にパッケージされる特徴をもつ（図1 (B)）。不完全子嚢菌であるアルタナリア菌は分生子を形成するが，このマイコウイルスの分生子を介した伝播率は100%と宿主菌中に安定に存在することを確認している⁷⁾。この高効率な伝播率は弱毒化ウイルスを含むアルタナリア菌を防除資材として利用する際に，極めて適した性質となるであろう。

3. イネいもち病菌の生育を抑制する新規マイコウイルス

国内外のイネいもち病菌68菌株からマイコウイルスの感染状況について，ウイルスゲノムである2本鎖RNAの有無を指標としてスクリーニングを行ったところ，11株のマイコウイルス保有菌株が検出された。この中からイネいもち病菌の生育を抑制，即ち気中菌糸の生育抑制，溶菌化，異常な色素沈着などの要因となるマイコウイルスも見つかり，イネいもち病菌を弱毒化するマイコウイルスの分離に成功した（図2(A)）。イ

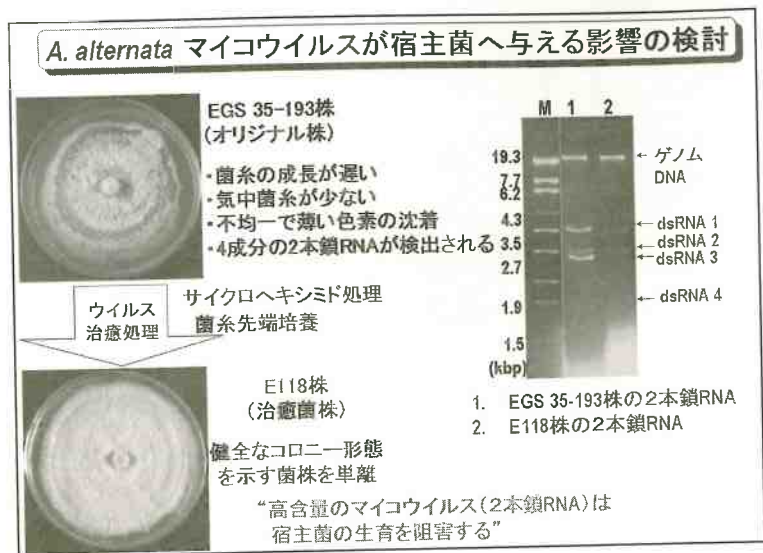


図1 (A) *A. alternata* 2本鎖RNAが宿主菌に与える影響の検討

左上のプレートはマイコウイルスが細胞内に多く存在するアルタナリア菌。左下のプレートは、治療処理によって細胞内でのマイコウイルスが少なくなったアルタナリア菌。治療処理を施した左下のプレートと比較して、左上のプレートからはマイコウイルスのゲノム2本鎖RNAが多く検出される。

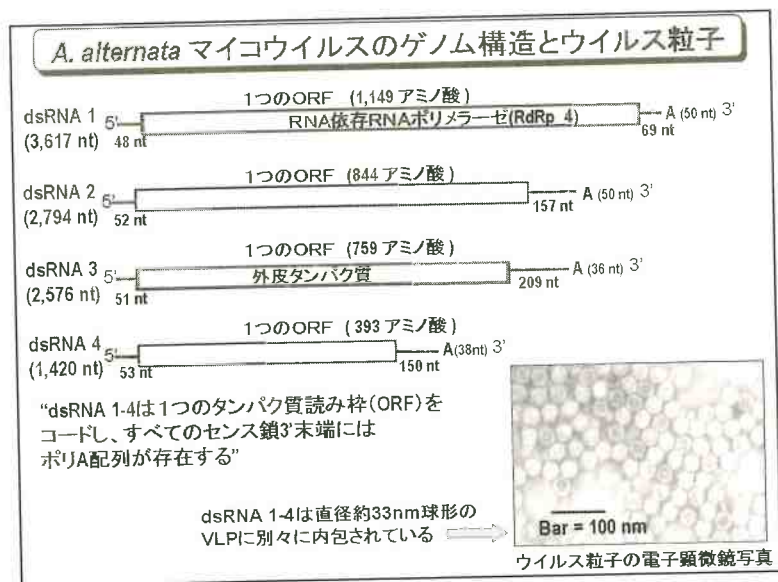


図1 (B) *A. alternata* マイコウイルスのゲノム構造とウイルス粒子

アルタナリア・アルタナータマイコウイルス (AaV-1) は，4成分の2本鎖RNAゲノムを有し，dsRNA1はRNA依存RNAポリメラーゼ (RdRp) をコードし，dsRNA3は外皮タンパク質をコードする。すべての2本鎖RNAゲノムは3'末端にポリ (A) 配列をもつ。ウイルス粒子の直径は約33nmで正多面体構造をもつ。

イネいもち病菌マイコウイルスは4成分の2本鎖RNAゲノムを有するものが多いが、中には2種のウイルスが混合感染して8成分のウイルスゲノムが存在する菌株もある。これらマイコウイルスのうち、3.6kbp, 3.2kbp, 2.9kbp, 2.8kbpのサイズの2本鎖RNAは分節パターンからクリソウイルス科に分類されることが示唆され、MoCV (*Magnaporthe oryzae* Chrysovirus) と称した。(図2 (B))。2.0kbp, 1.8kbp, 1.5kbpの2本鎖RNAゲノムに関しては、シーケンス解析の結果、アマさび病菌内在性2本鎖RNAと相同性があることが判明し、MoEV (*Magnaporthe oryzae* Endogenous Virus) と称している。MoCV1, MoCV2の2本鎖RNAゲノムのシーケンス解析を行ったところ、クリソウイルス科 (*Chrysoviridae*) のRdRp (RNA依存RNAウイルスポリメラーゼ) と約30%の類似性をもつことが示された。これらの結果から、MoCVやMoEVはこれまでにイネいもち病菌マイコウイルスとして報告のあるトチウイルス科のウイルス (*Totiviridae*)^{8), 9)} とは異なるウイルス種であることが示された。2種のマイコウイルス (MoCV2, MoEV) が混合感染している場合、顕著な溶菌化現象が観察される。MoEVのみの単独感染株や、治療処理により完全にウイルスが除去された治癒菌株の単離にも成功しているが、治療処理によりマイコウイルスが除去されたイネいもち病菌は再び旺盛な生育力を回復する。さらにマイコウイルスに混合感染したイネいもち病

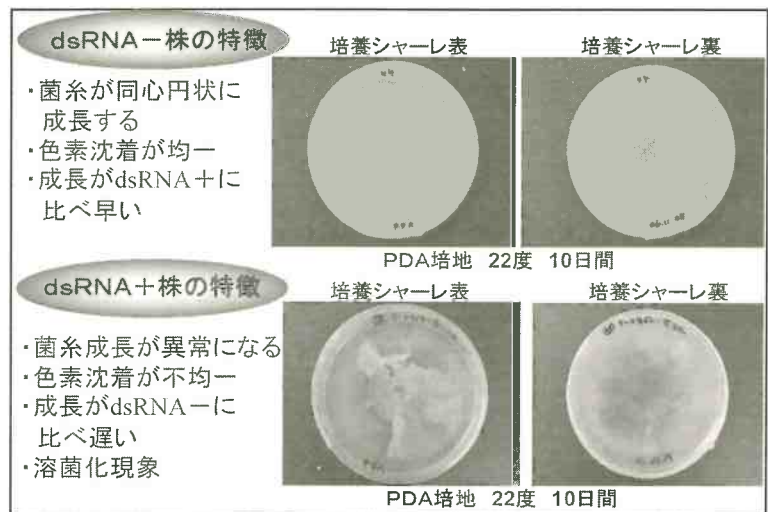


図2 (A) マイコウイルスに感染されたイネいもち病菌 (下段) とマイコウイルスに感染されていないイネいもち病菌 (上段) の生育の比較

マイコウイルスの感染はdsRNA (double-stranded RNA, 2本鎖RNA) の存在の有無で判断される。

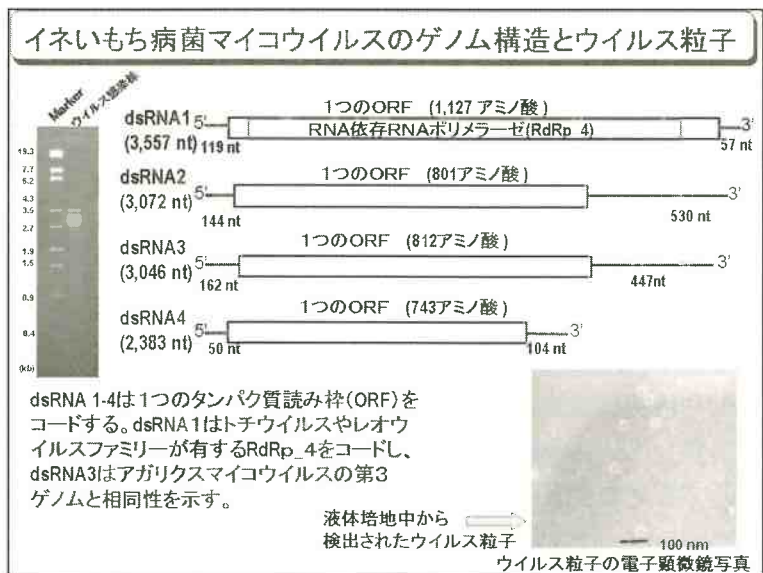


図2 (B) イネいもち病菌マイコウイルスのゲノム構造とウイルス粒子

イネいもち病菌マイコウイルス (MoCV1) は4成分の2本鎖RNAを有し、dsRNA1はRdRpをコードする。液体培養中にはウイルス粒子が浮遊しており、その大きさは約30nmで正多面体構造をもつ。

菌は、著しく分生子形成能力が低下するという結果も得ている（図3）。イネいもち病菌は分生子の飛散による空気伝染によりその被害が拡大されることを特徴とするが、この分生子形成を抑制する性質は有力な防除手段となりうる。

一般にマイコウイルスは細胞外では存在できず、細胞から細胞へと伝達されて繁殖する。しかし本イネいもち病菌マイコウイルスに関してはウイルス保有菌株を液体培養すると、数種類のマイコウイルスは菌細胞外である培養上清中から検出され、さらに、このウイルスを含む培養上清をサイクロヘキシミド処理で作製したウイルスフリーの治癒菌株に接種すると、この治癒菌株の菌糸は萎縮し生育が抑制されることを確認している（図4）。これは当該マイコウイルスが細胞外でも存在することができ、且つ細胞外からのウイルス接種により菌糸を著しく損傷しうることを示している。ほ乳類細胞のウイルス感染ケースとは異なり、マイコウイルスでは細胞外感染経路が報告された例がなく、この現象は新しい知見であり、またイネいもち病菌に対する防除資材として当該ウイルスを活用する際には極めて有効な性質といえる。

4. おわりに

アルタナリア・アルタナータ菌やイネいもち病菌を弱毒化し得るマイコウイルスは、新たな環境調和型の生物防除資材としての利用が可能である。マイコウイルスは菌類に特有に感染することを特徴

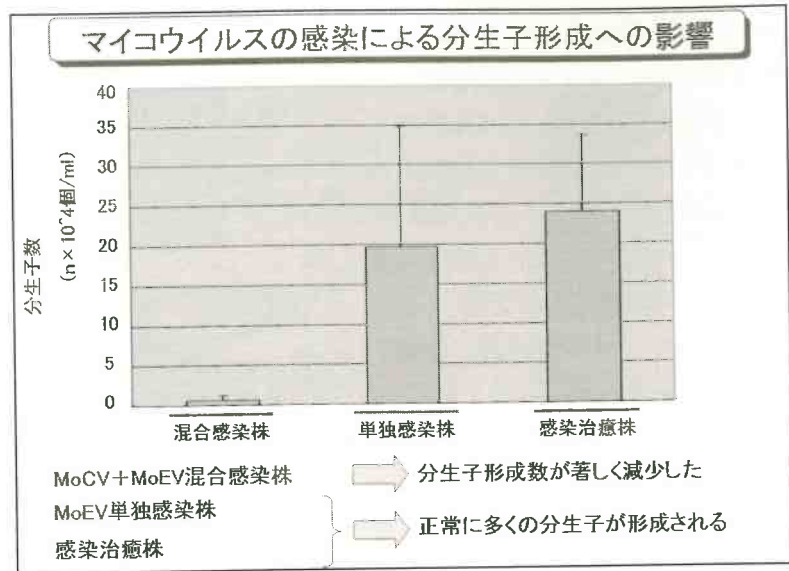


図3 マイコウイルスの感染による分生子形成への影響

PDA (Potato dextrose agar) 培地で2週間培養した後、直径4ミリのコルクボーラーで菌を回収して1mlの蒸留水にいれ、水中に浮遊する分生子数を計測した。MoCVとMoEVが混合感染した菌株では、分生子形成効率が著しく低下した。

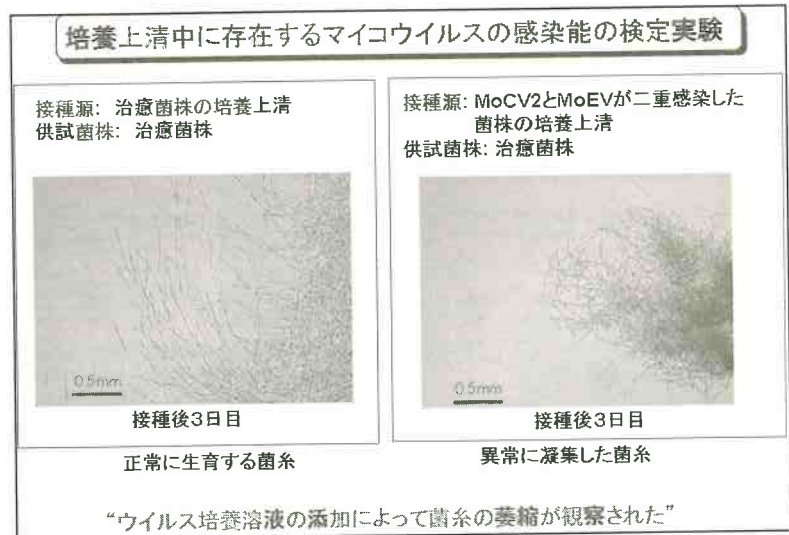


図4 培養上清中に存在するマイコウイルスの感染能の検定実験

MoCVとMoEVが感染した菌体を長期間液体培養すると、培養上清中にMoCVとMoEVに浮遊する現象が見られる。これらマイコウイルスを含む培養上清を、ウイルスフリー株に接種すると、菌糸の異常な凝集が観察された。

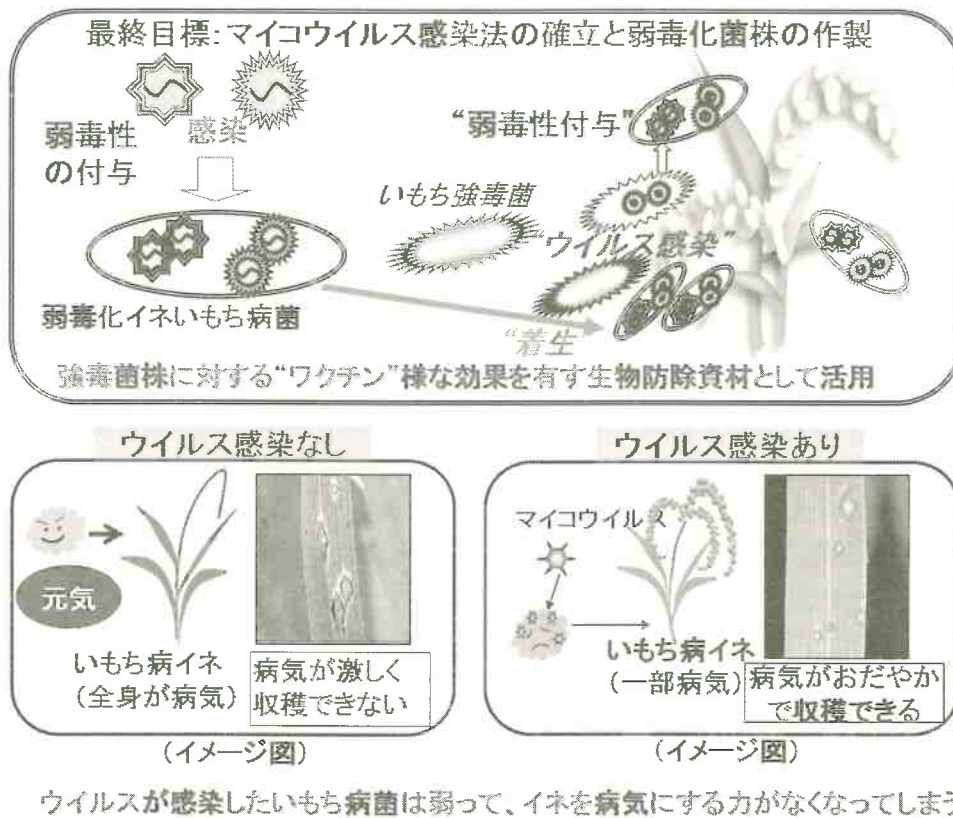


図5 マイコウイルス感染法の確立と弱毒化菌株の作製の概略図

としており、動物や植物には感染しない。実際にマイコウイルス感染菌株のイネへの病原性試験の結果、マイコウイルスに感染したイネいもち病菌のイネに対する感染能力は病班の数や大きさが低下することも明らかにされており、稲作の病害防除分野において国際競争力のある知的財産権として期待される (図5)。

文献

- 1) Suzuki N, Nuss DL (2002), J. Virol. 76, 7747-7759
- 2) Nuss, D.L., (2005), Nat. Rev. Microbiol. 3,

- 632-642.
- 3) Ikeda, K. et al. (2003), J. Gen. Plant Pathol. 69, 385-390.
- 4) Kanematsu. S. et al. (2004), Phytopathology 94, 561-568.
- 5) Sasaki, A. et al. (2006), Arch. Virol. 151, 697-707.
- 6) Osaki, H. et al. (2006), Virus Res. 118, 143-149.
- 7) Aoki, N. et al. (2009), Virus Res. in press
- 8) Yokoi T. et al. (2007), Arch. Virol. 152, 2265-9
- 9) Maejima K. et al. (2008), Arch. Virol. 153, 389-91

◀国内情報▶

イネの穂ばらみ期耐冷性を強くする遺伝子の同定

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター
齋藤 浩二・早野 由里子・黒木 慎・佐藤 裕

イネは穂ばらみ期の低温によって不稔を発生する。筆者らは穂ばらみ期耐冷性遺伝子 *Ctb1* について同定を進め、*Ctb1* が F-box タンパク質の遺伝子であることを明らかにした。F-box タンパク質は細胞内で不要となったタンパク質の分解に係わっている。耐冷性遺伝子の機能解明は冷害被害軽減技術の開発につながる可能性がある。また、DNA マーカー選抜によって耐冷性遺伝子を育種へ利用する試みを行っている。

1. 穂ばらみ期耐冷性とは

北海道や東北地方では平均すると数年に1度の頻度で水稻の冷害が発生している。冷害を発生させる要因の1つは、花粉形成期に当たる穂ばらみ期の低温である。イネがこの時期に低温に遭遇すると、成熟花粉の量が少なくなり、不稔粒が多発して、収量が減少する。穂ばらみ期の低温による被害の恐ろしさは、その後に天候が回復しても被害は回復しないことである。北日本では7月中旬から8月上旬に穂ばらみ期を迎えるが、この時期はオホーツク海高気圧の出現による異常低温が発生しやすい時期でもある。被害が無かった年でも「間一髪だった」という状況は決して稀ではない。地球温暖化が叫ばれる昨今ではあるが、温暖化によってオホーツク海高気圧の勢力が強まるとする報告もあり、穂ばらみ期の低温に対する強さ（穂ばらみ期耐冷性）は北日本の稲作にとって引き続き重要な課題である。

穂ばらみ期耐冷性の強さは品種によって異なる。また、この形質はある程度遺伝する。しかし、例えば花の色のように、明確に遺伝する形質ではない。これは、穂ばらみ期耐冷性に複数の遺伝子が複雑に係わっているためと考えられている。また、穂ばらみ期耐冷性という形質の

SAITO Koji, HAYANO Yuriko, KUROKI Makoto,
SATO Yutaka

〒062-8555 札幌市豊平区羊ヶ丘1

発現は、環境要因のわずかな変動などに影響される。そのため、遺伝的に持つ耐冷性の強さを正確に評価すること自体が容易ではない。これらの事情により、穂ばらみ期耐冷性に係わる遺伝子の研究は非常に遅れている。近年、イネゲノム研究の進展により、たくさんのDNAマーカーが遺伝解析の道具として利用できるようになった。これにより遺伝解析の精度が飛躍的に向上し、穂ばらみ期耐冷性のような形質についても国内外で遺伝解析が進められるようになった。ここでは、このような研究によって私たちが同定した穂ばらみ期耐冷性に係わる遺伝子について紹介する。

2. 「水稻中間母本農8号」という品種

冷害の克服は栽培管理だけでは難しく、耐冷性品種の開発が有効である。そのため、耐冷性育種に多大な努力が払われ、現在では「ひとめばれ」や「ほしのゆめ」などの耐冷性品種が育成されて、冷害被害の軽減に貢献している。これらの品種は国内の耐冷性遺伝資源を利用して育成されたものであるが、今後、さらに耐冷性を向上させるためには、国外の遺伝資源を導入することが有効であると考えられる。そのような試みの一つが「水稻中間母本農8号（中母農8号）」である。スマトラ島北部高地（標高約1,300 m）原産の熱帯ジャポニカ品種「Silewah」は高い穂ばらみ期耐冷性を持つことが国際イネ研究

所の調査で示された。そこで、北海道農業試験場（現北海道農業研究センター）の安部らは「Silewah」に当時の優良育成系統である「北海241号」を連続戻し交配し、「中母農8号」を育成した¹⁾。「北海241号」の穂ばらみ期耐冷性があまり強くないのに対し、「中母農8号」は北海道でも最高レベルの穂ばらみ期耐冷性を示したため、「中母農8号」の穂ばらみ期耐冷性は「Silewah」に由来すると考えられた。そこで、私たちはDNAマーカーの遺伝子型分析から、12本の染色体のどの辺りに「Silewah」由来の染色体領域が存在するかを調べた。その結果、「中母農8号」は第1, 3, 4, 8染色体に「Silewah」由来の染色体領域を持つことがわかった(図1)²⁾。その後、「中母農8号」と「きらら397」の交配後代を用いて遺伝解析を進め、第4染色体の「Silewah」由来領域が穂ばらみ期耐冷性と関係していること、この領域内には少なくとも2つの耐冷性遺伝子が存在していることを明らかにして、それぞれを*Ctb1*、*Ctb2*と名付けた³⁾。

3. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子 *Ctb1* の同定

私たちがこのような研究を進めている間にもイネのゲノム研究は急速に進展し、ついにゲノムの全塩基配列が解読されるに至った。この情報を利用すると、対象とする染色体領域についてより精密に遺伝解析するためのDNAマーカーを比較的簡単に作成できるようになる。これらのDNAマーカーを用いて、私たちはさらに詳細に*Ctb1*の遺伝解析を行い、最終的には約17,000塩基対のDNAで構成される染色体領域内に*Ctb1*が存在することを示した。この17,000塩基対の塩基配列情報からどのような遺伝子が存在しているかを推測すると、この領域内にはF-boxタンパク質の遺伝子とタンパク質リン酸化酵素の遺伝子が含まれていた。F-boxタンパク質は細胞周期、概日リズム、花芽分化や植物ホルモン応答など様々な細胞内反応に重要な役割を果たしているユビキチン-プロテアソーム経路に必要なタンパク質である。また、タンパク質リン酸化酵素は様々なストレスに対する細

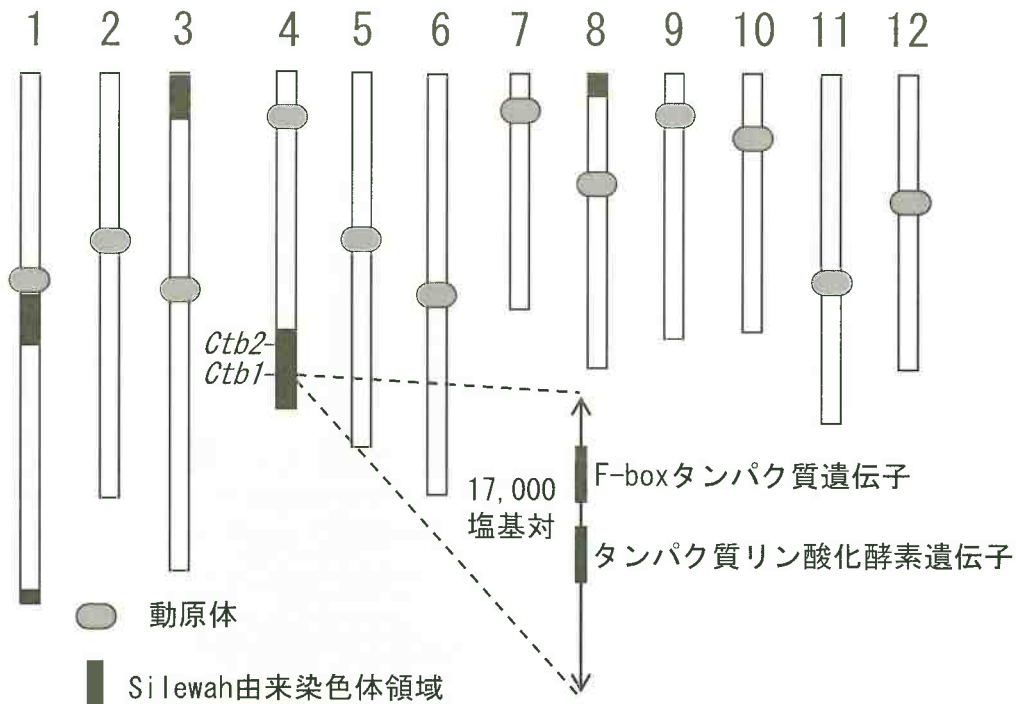


図1 「中母農8号」染色体中の「Silewah」由来染色体領域

胞内のシグナル伝達に重要な役割を果たしている。いずれも植物の生理反応にとって非常に重要なタンパク質であり、どちらが穂ばらみ期耐冷性に係わっているかを機能の面から推測することは出来なかった。

そこで、「中母農8号」の染色体DNAからそれぞれの遺伝子を単離し、「北海241号」に遺伝子導入して、遺伝子組換えイネを作成した。導入遺伝子は2本の相同染色体の一方に挿入されるので、遺伝子組換えイネの後代では導入遺伝子が分離し、導入遺伝子を保持している個体と導入遺伝子を保持していない個体が発現する。それらの個体間で穂ばらみ期耐冷性を比較して、導入遺伝子の穂ばらみ期耐冷性に対する効果を調べた。耐冷性検定には恒温深水法を用いた。この方法は花粉形成期の幼穂を水温19℃程度の深水（水深約25 cm）で約1ヶ月間冷やし、稔実率で穂ばらみ期耐冷性を評価するものである。その結果を図2に示す。F-boxタンパク質遺伝子を導入した系統では、5系統中4系統で導入遺伝子を保持している個体が高い耐冷性を示した。一方、タンパク質リン酸化酵素遺

伝子を導入した2系統では導入遺伝子の穂ばらみ期耐冷性に対する効果は認められなかった。耐冷性検定法としては、恒温深水法の他に穂ばらみ期に12℃の育成室で数日間処理する方法（短期冷温処理法）がある。低温感受性は出穂の約10日前に最も高くなるため、その時期に集中して強めの冷温処理を行う方法である。処理のタイミングは冷温処理の中心日から出穂までの日数で判定する。この方法による耐冷性検定結果を図3に示す。やはり、F-boxタンパク質遺伝子については耐冷性向上効果が認められたが、タンパク質リン酸化酵素遺伝子では耐冷性向上効果は認められなかった。以上の結果から、F-boxタンパク質遺伝子が穂ばらみ期耐冷性遺伝子*Ctb1*であると考えられた。

4. *Ctb1* タンパク質の機能

それでは、*Ctb1* 遺伝子を基に作られるタンパク質（*Ctb1* タンパク質）の機能はどのようなものであろうか？ F-boxタンパク質は細胞内で不要になったタンパク質にユビキチンというタ

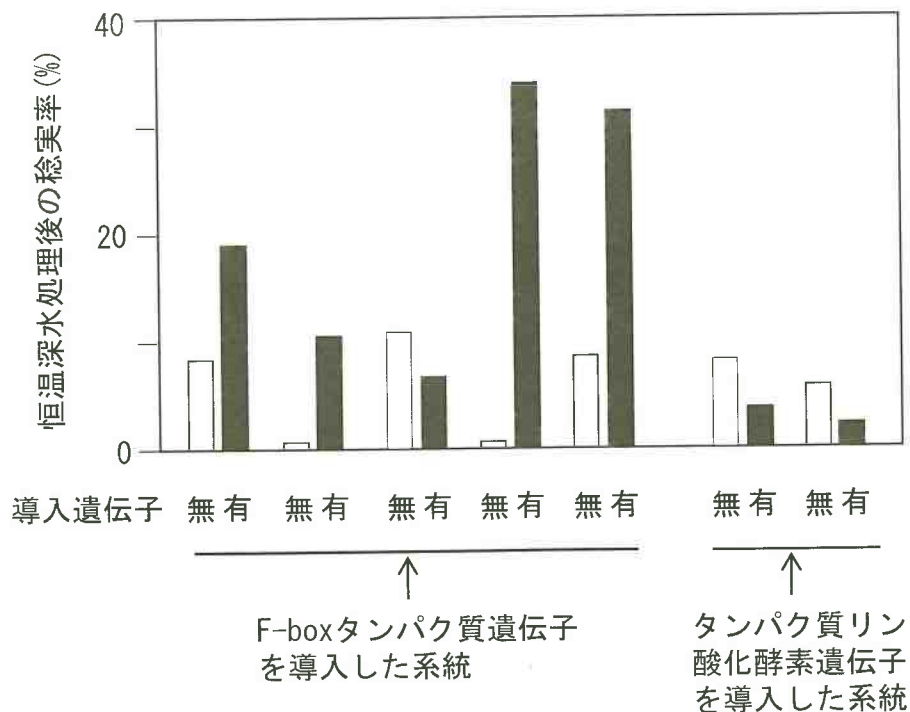


図2 恒温深水法による遺伝子組換えイネの耐冷性検定結果

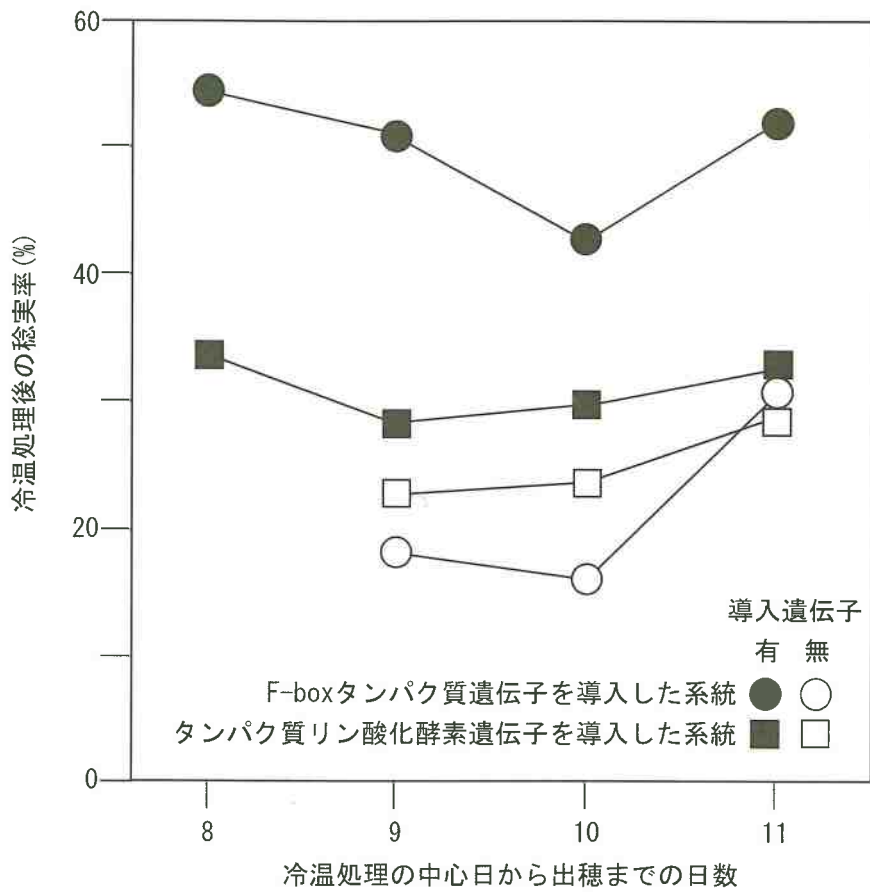


図3 短期冷温処理法による遺伝子組換えイネの耐冷性検定結果

ンパク質を結合させるSCFコンプレックスの一部を構成している(図4)。この中でF-boxタンパク質は標的タンパク質を認識する役割を担っている。ユビキチンを結合されたタンパク質は、その後、タンパク質分解酵素によって分解される。Ctb1タンパク質と結合するタンパク質をTwo-hybrid法という方法で探索すると、Skp1というタンパク質と結合することがわかった。Skp1はSCFコンプレックスの土台になるタンパク質であり、Ctb1タンパク質が実際にSCFコンプレックスの一部として働いていることを示している。実は、イネゲノム中には約700個のF-boxタンパク質がコードされており、それぞれが個別の標的タンパク質に対応していると考えられている。Ctb1タンパク質はその1つということになる。Ctb1タンパク質の標的タンパク質を明ら

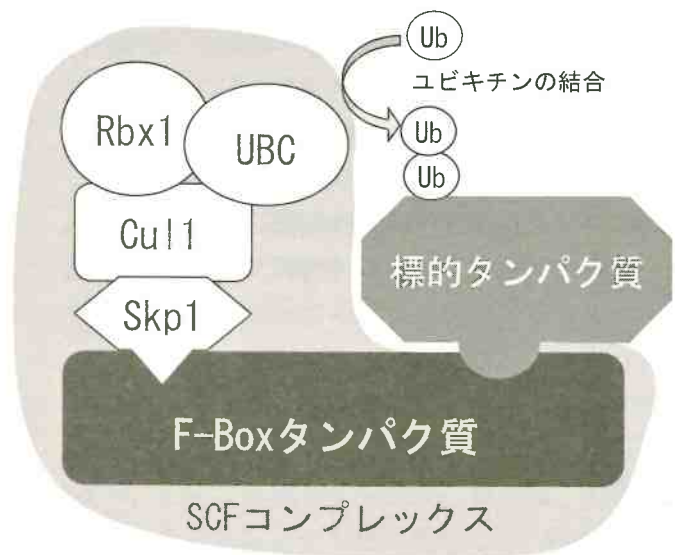


図4 SCFコンプレックスの構造

かにすることが、Ctb1タンパク質の機能解明につながると考えている。また、このような研究を進めることによって穂ばらみ期耐冷性の生理生化学的な仕組みを解明すれば、例えば、穂ばらみ期耐冷性を向上させる薬剤の開発につながる可能性もある。

5. 耐冷性育種への応用

穂ばらみ期耐冷性遺伝子を同定したことにより、遺伝子組換え技術によって耐冷性を強化出来る可能性も出てきた。遺伝子の機能を解明して、その効果を強めるような遺伝子改変が出来れば、画期的な耐冷性品種を開発できるかもしれない。イネは自殖作物であるが、穂ばらみ期の低温による被害を受けると他殖率が高くなる⁴⁾。したがって、遺伝子組換えによって穂ばらみ期耐冷性を強化する場合には、閉花受粉性⁵⁾の導入などにより冷害年における交雑抑制方法を検討する必要性があるだろう。

「中母農8号」が育成されてから20年以上が経過した。この間、「中母農8号」の耐冷性を育種に利用する試みがなされ、「中母59」のような耐冷性系統が育成されたが、品質や出穂性等の問題により実用品種の育成に至っていない。この原因の一つは不良形質の連鎖であると思われる。耐冷性遺伝子が同定されたことにより、交配育種とDNAマーカー選抜によって耐冷性遺伝子が存在する染色体領域のみを高精度に優良品種に導入することが可能になった。しかし、穂ばらみ期耐冷性は複数の遺伝子の効果が積み上がって成り立っている形質であり、耐冷性遺

伝子を1つ導入するだけで実用的に十分な効果を期待することは出来ない。穂ばらみ期耐冷性遺伝子については、他にも「ふ系212号」が第6染色体に持つ $qFLT6$ ⁶⁾や「北海PL9」が第8染色体に持つ $qCTB8$ ⁷⁾などがある。これらについては原因遺伝子の同定に至っていないが、DNAマーカー育種への利用は可能な段階にある。そこで、これらの遺伝子と「中母農8号」のCtb1やCtb2をDNAマーカー育種によって優良品種へ導入・集積することにより、実用的な耐冷性品種を育成できるかどうか、現在、その試みを行っているところである。

謝 辞

本研究は農林水産省研究プロジェクト「アグリ・ゲノム研究の総合的な推進」(QT-3005)によって行われた。

文 献

- 1) 安部信行ら (1989), 北農試研報, 152, 9-17
- 2) Saito, K. et al. (1995), *Breed. Sci.*, 45, 337-340
- 3) Saito, K. et al. (2001), *Theor. Appl. Genet.*, 103, 862-858
- 4) 佐藤裕ら (2008), 育種学研究, 10, 127-134
- 5) Yoshida, H. et al. (2007), *Plant Biotech. J.*, 5, 835-846
- 6) 須藤充ら (2004), 育種学研究, 6 (別1), 89
- 7) Kuroki, M. et al. (2007), *Theor. Appl. Genet.*, 115, 593-600

◀国内情報▶

海水でも育つマングローブから耐塩性遺伝子を同定

東京工科大学 応用生物学部

多田 雄一

オヒルギの耐塩性遺伝子を同定するために、塩応答性遺伝子の選抜とアグロバクテリウムでの機能解析を組み合わせた方法、およびアグロバクテリウムを宿主としたcDNA発現ライブラリーの耐塩性スクリーニングという二通りの方法で候補遺伝子を選抜し、次にシロイヌナズナに導入して耐塩性の機能解析を行った。その結果、既知の耐塩性遺伝子のホモログに加えて、オヒルギ特有の遺伝子を含む5種の耐塩性遺伝子を同定した。

1. はじめに

地球上の陸地の約3割は乾燥地域であり砂漠、あるいは砂漠化が進行している。砂漠化の主要な原因の一つとして不適切な灌漑等に起因する土壌表層への塩類集積が挙げられる。このような土壌では一般の植物は生育できないため、砂漠化だけではなく食糧を生産する耕地の減少をもたらし、結果として世界の食糧不足に拍車を掛けることになる。耐塩性植物を開発できれば、これらの砂漠地域を耕地化・緑化することで食糧問題の解決、二酸化炭素の固定による温暖化防止、環境の修復と保全にも貢献することができる。そのため、植物の耐塩性遺伝子を同定する研究は、モデル植物であるシロイヌナズナをはじめとして精力的に行われてきた。筆者らは、高度な耐塩性を有する塩生植物であるマングローブの耐塩性機構を解明し、耐塩性の分子育種に利用することを目的として研究を行ってきた。はじめに、海水でも生育可能なオヒルギ (*Bruguiera gymnorhiza*) の耐塩性遺伝子を同定するために、オヒルギの Expressed Sequence Tag (EST) 解析¹⁾ と、それらのデータに基づいて作成したマイクロアレイを用いた塩応答性遺伝子の選抜を行った。これは、耐塩性に関与する遺伝子は塩応答性を示すであろうという推測に基づいている。次に、それらの遺伝子をアグ

TADA Yuichi

〒192-0982 東京都八王子市片倉町1404-1

ロバクテリウムとシロイヌナズナに導入して機能解析を行なった^{2), 3)}。また、耐塩性に関与する遺伝子が必ずしも塩応答的な発現をしない可能性も考慮して、オヒルギcDNAを網羅的に過剰発現させたアグロバクテリウムの耐塩性のスクリーニングを行なうことで耐塩性候補遺伝子を絞り込み、次にシロイヌナズナで機能解析する方法も並行して実施した⁴⁾。本稿では、これらの手法によりオヒルギの耐塩性遺伝子を同定した研究について紹介する。

2. マイクロアレイによる塩応答性遺伝子の同定

EST配列情報を基にオヒルギの12000遺伝子を搭載したオリゴDNAマイクロアレイを作製した。

塩ストレスはイオンと浸透圧の2種の複合的なストレスから構成されていると考えられることから、イオンストレスに対する耐性機構と浸透圧ストレスに対する耐性機構を区別して解析するために、海水相当の塩濃度である500mM NaClとそれと等張の1Mソルビトールで処理して6、24時間後のオヒルギの葉の転写プロファイル、および各種イオン含量、糖含量、光合成速度、水ポテンシャルを比較した²⁾。筆者らは、浸透圧処理に反応する遺伝子群は塩処理に反応する遺伝子群に含まれると考えて実験を行なったが、実際には両群の遺伝子の重なりは少なく、

クラスター解析でも両処理に対するオヒルギの反応は大きく異なることが明らかになった。その原因として、オヒルギは、低いNaCl濃度の環境下でも積極的にNa⁺、Cl⁻を吸収・蓄積し、500mM NaCl条件下ではそれぞれのイオンを300, 800mMという高濃度まで蓄積することで細胞内浸透圧を維持して、それにより浸透圧ストレスを軽減していることが推測された。塩処理後の葉の「しおれ」の程度を測定した結果からも、処理後6時間でしおれの程度が最大になるが、12時間後までには9割程度まで回復していることから、葉では速やかな浸透圧ストレスへの適応が起きていることが示された。結果として、塩処理したオヒルギの葉では浸透圧ストレスに応答することが知られている遺伝子の発現増強が認められず、転写因子などのストレス応答に重要な役割を果たすと考えられる塩応答性遺伝子を見出すことはできなかった。

そこで、葉に加えて塩ストレスに直接曝されている根の発現プロファイリングを500mMのNaClで処理後12日間にわたり行った³⁾。葉においては全処理期間を通して2倍以上に発現が上昇しているクローンはなく、前述の結果を再現していた。また、塩処理後12時間までの初期に限ると2倍以上に発現が上昇している3つの遺伝子が同定された。そのうちの2つは光周性に関係があると報告されているCCR proteinであり、残るひとつはhypothetical proteinであった。根においては塩処理1時間後から12日後までのすべてのタイムポイントで2倍以上に上昇している遺伝子が31種あり、塩処理後24時間までに限ると、2倍以上に上昇している遺伝子が127種あった。このように塩分と直接に接している根ではダイナミックな遺伝子発現の変動が認められた。すべてのタイムポイントで2倍以上に発現が上昇している31種の遺伝子産物の中には、既に塩応答性が報告されているオヒルギに特異的なタンパクであるBg70, peroxidase, hexose transporterなどが含まれていた。また、塩処理後24時間まで2倍以上に上昇している遺伝子産物には、耐塩性に深い関係が深い

late embryogenesis abundant protein (LEA)やaquaporin (水チャンネル) などに加えて、転写因子が多数含まれていた。

3. 塩応答性遺伝子の機能解析

塩応答性遺伝子の中から転写因子遺伝子を中心に塩処理後24時間以内に強く転写誘導されている遺伝子を28種選抜し、35Sプロモーターの下流につないで発現ベクターを構築した。次に、これらの発現ベクターをアグロバクテリウムに導入した。本来はこれらをシロイヌナズナに感染させて組換え植物を作製して耐塩性検定を行うところであるが、多数の組換え植物の作出には時間と労力がかかる。そこで耐塩性遺伝子のスクリーニングを効率化するために、アグロバクテリウムを宿主とした耐塩性スクリーニングを試みた。図1に示すように、3種の遺伝子(STZホモログ, ankyrin repeatタンパク遺伝子, lipid transfer protein)を導入したアグロバクテリウムはコントロールのGUS遺伝子を導入したアグロバクテリウムが生育できない300mMのNaClを含むLB培地で増殖が認められ、耐塩性が高まっていることが確認された³⁾。アグロバクテリウムは原核細菌であるが、CaMW35Sプロモーターは原核細胞でも発現するため、導入遺伝子によって発揮される耐塩性機構が原核細胞と真核細胞に共通な機構で細胞

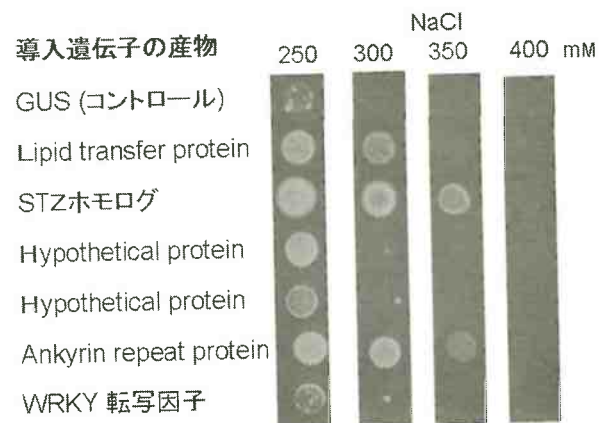


図1 オヒルギの塩応答性遺伝子を発現するアグロバクテリウムの耐塩性検定

レベルで機能する場合には、アグロバクテリウムにおいても耐塩性スクリーニングが可能であると考えられる。

次に、これらの3種の遺伝子をシロイヌナズナに導入して耐塩性検定を行った。播種4日後の組換え系統と野生型の芽生えを150mMのNaClを含む培地に移植したところ、ankyrin repeatタンパクの遺伝子を導入したシロイヌナズナは野生型に比べて有意に良好な生育を示した(図2)。また、STZホモログとlipid transfer proteinの遺伝子を導入したシロイヌナズナも野生型に比べて良好な生育を示した。これらの結果から、発現プロファイリングとアグロバクテリウムを宿主とする機能解析を組み合わせることで効率よく耐塩性遺伝子のスクリーニングが可能であることが示された。同様な例として、大腸菌を宿主とした耐塩性スクリーニングにより、ロッカクヒルギの耐塩性遺伝子*mangrin*を同定した報告がある⁵⁾。

4. アグロバクテリウムを宿主としたオヒルギcDNAの網羅的機能解析

一方で、これまでに他の植物で過剰発現により耐塩性が向上するという報告がある液胞型Na⁺/H⁺アンチポーター遺伝子の発現増強は、塩処理したオヒルギでは見られなかった。従って、転写量の増強を指標にしたスクリーニングでは必ずしも全ての耐塩性遺伝子の同定はできないと考えられる。そこで、オヒルギの遺伝子の機能を網羅的に解析すること目的に、塩処理したオヒルギの葉と根由来のcDNAの発現ライブラリーを、アグロバクテリウムを宿主として構築した。ここでもシロイヌナズナへの導入に先立ち、アグロバクテリウムでの耐塩性スクリーニングを実施した⁴⁾。その結果、300mM NaClを含むLB培地で生育するクローンが51個得られた。これらの中には450, 400mMのNaClに耐性を示すクローンも存在した(図3)。これらのアグロバクテリウムがもつcDNAをシーケンスしたところ、44種のcDNAに分類され、オヒルギ

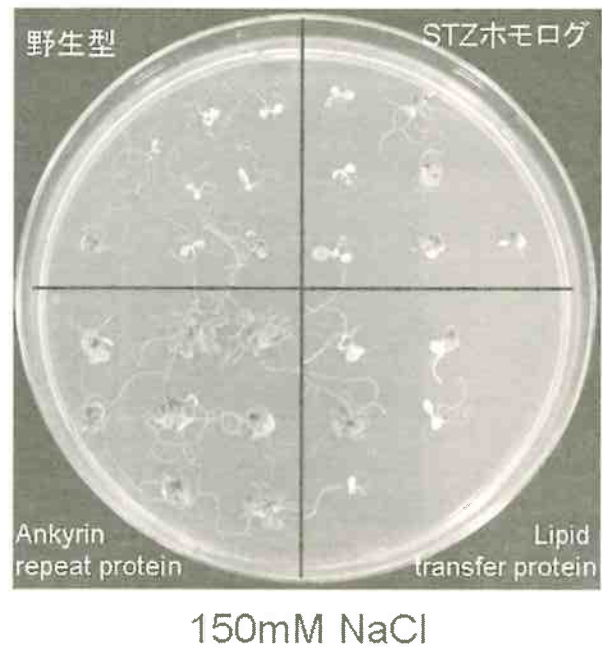


図1 野生型シロイヌナズナと組換え体の150mM NaClを含む培地上での生育
播種4日後の芽生えを移植してから10日後の写真

特異的な機能未知の膜タンパク質であるBg70ファミリーに属する新規な遺伝子やオヒルギ、メヒルギ、ニチニチソウの3種の植物にのみ見つかっている分泌ペプチド(cyc02ホモログ)などが含まれていた。手始めに、これらの中からBg70遺伝子とcyc02ホモログ遺伝子を導入したシロイヌナズナを作成して、耐塩性検定を行った。組換え系統と野生型の種子を125mMのNaClを含む培地に播種して根の生育を調べたところ、どちらの組換え系統も野生型に比べて良好な生育を示した(図4)。地上部の生長も同様の傾向を示した。アグロバクテリウムに耐塩性を付与した他の遺伝子についても順次組換えシロイヌナズナを作成と耐塩性検定を実施中であり、予備的な試験ではいくつかの新たな耐塩性遺伝子を確認している(未発表)。

5. まとめ

以上のように、塩性植物であるオヒルギから、遺伝子の発現プロファイリングを基にした候補

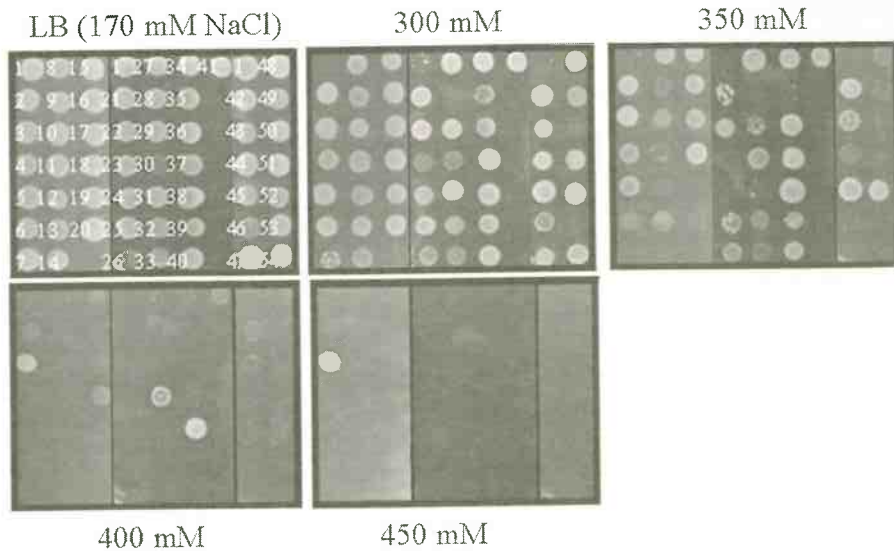


図1 オヒルギcDNAを発現するアグロバクテリウムの耐塩性
各種塩濃度の培地にアグロバクテリウムけん濁液をスポットして30℃で2日間培養した。
No.1 コントロール (GUS遺伝子), Nos 2-54 オヒルギcDNA

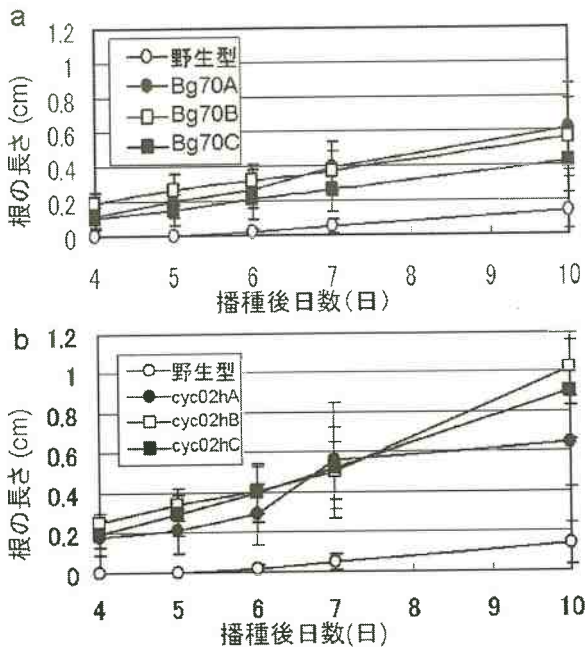


図4 150mM NaClを含む培地に播種した野生型とBg70 (a), cyc02ホモログ (b)を導入したシロイヌナズナの根の生育

遺伝子の選抜と、アグロバクテリウムを宿主としたcDNA発現ライブラリーの耐塩性スクリーニングの二つの戦略を適用して耐塩性遺伝子を同定した。これまでに前者の方法で3種、後者の方法で2種の遺伝子を同定し、オヒルギの高

度な耐塩性機構の一部を分子レベルで明らかにすることができたと考えている。二つの方法を比較した場合に、遺伝子の発現プロファイリングを基にした耐塩性遺伝子の同定と比較して、cDNA発現ライブラリーの耐塩性スクリーニングによる耐塩性遺伝子の同定の方が効率の点では優れているといえる。これまでに、マイクロアレイを利用したストレス応答性遺伝子の同定は多くの研究が行われているが、その中からストレス耐性遺伝子を同定した例は筆者らの例を含めて数例程度である。一方で、様々な宿主を用いたcDNA発現ライブラリーの機能スクリーニングによるストレス耐性遺伝子の同定については多数の報告がある。この中で、アグロバクテリウムを宿主としたスクリーニング方法は、真核細胞特異的な遺伝子などの取りこぼしが予想されるとはいえ、植物用の発現ベクターをそのまま利用できるため労力、コスト、効率の面で優れている。そのため、大規模な予算と人員を投入できないマイナーな植物のストレス耐性遺伝子の研究においては有効な選択肢となりうるであろう。

今後は、同定済みの遺伝子産物を介した耐塩性機構の解明を行うとともに、アグロバクテリ

ウムと組換え植物での耐塩性の機能スクリーニングを継続して、新たなオヒルギの耐塩性遺伝子を同定する予定である。さらに、筆者らは塩処理したオヒルギのプロテオーム解析から塩応答性タンパク質の同定も行っており⁶⁾、これらの成果を統合してオヒルギの耐塩性機構の全容を明らかにしたいと考えている。また、同定された耐塩性遺伝子を集積することで、より高度な耐塩性を付与することを目指している。

これらの成果を応用することで塩類集積によって砂漠化した地域の緑化や耕地化を可能にし、地球温暖化の防止や食糧問題の解決に貢献したいと考えている。さらに筆者は、「海水を利用した農業」の実現を目指している。地球上の水の97%は海水であり、氷河などを除いた利用可能な水は0.1%と言われている。近年の異常気象によって、これらの貴重な水の循環に異変が起き、食糧生産にも影響が生じている。耐塩性作物を開発し、豊富に存在する海水を灌漑用水として利用できれば、水不足による既存の耕地での生産性の低下の解消や乾燥が原因で生じた砂漠の緑化と耕地化も可能であろう。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省の「私立大学学術研究高度化推進事業（産学連携研究推進事業）」、および「科学研究費補助金」によって行なわれた。

文 献

- 1) Miyama, M. et al. (2006), *Plant Sci.*, 171, 234-241
- 2) Miyama, M. and Tada, Y. (2008), *Plant Mol. Biol.*, 68, 119-129
- 3) Yamanaka, T. et al. (2009), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 80513-1-7 (早期公開)
- 4) Ezawa, S. and Tada, Y. (2009), *Plant Sci.*, 176, 272-278
- 5) Yamada, A et al. (2002), *Plant Cell Physiol.*, 43, 903-910
- 6) Tada, Y. and Kashimura, T. (2009), *Plant Cell Physiol.*, 50(2), 1-8

◀国内情報▶

BSE罹患牛における脳幹機能障害の特徴

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 生産病研究チーム
新井 鐘蔵

牛海綿状脳症（BSE）は異常プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）の伝達によって生じる牛の致死性の神経変性疾患である。現在、BSEの確定検査は死後の牛の脳を用いて行われている。今回、我々は実験的に作出したBSE罹患牛について、脳幹機能の神経生理学的評価法の一つである聴性脳幹誘発電位（BAEP）を用いて波形解析を行い、BSE罹患牛の脳幹機能障害の特徴について興味深い結果を得たので紹介する。

1. はじめに

牛海綿状脳症（BSE）は、異常プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）の伝達によって生じる牛の致死性の神経変性疾患で、2008年12月までに我が国でのBSE検査陽性牛は35頭が確認されており、世界的には約19万頭の発生が報告されている。現在、BSEの確定検査は死後の脳材料を用いた生化学的あるいは免疫組織化学的手法によるPrP^{Sc}の検出によって実施されている。BSEにおけるPrP^{Sc}の蓄積は脳幹や脊髄などの部位に局在しており、これらの部位を牛が生きたまま採取して診断に用いることは極めて困難なことから、現在のところ有用なBSEの生前診断技術は確立されていない。またBSE罹患牛では体重の減少や泌乳量の低下などの生産性低下の他に、起立不能や異常行動、刺激に対する過剰反応等の臨床症状が認められることが報告¹⁾されているが、これらの臨床所見が必ずしもBSE罹患牛に特異的に認められる症状という訳ではないため、臨床症状の観察のみでBSEを臨床診断することは極めて困難である。

BSE罹患牛では、特に脳幹においてPrP^{Sc}の蓄積や脳組織の空胞変性等の病変形成が顕著で、左右対称性に病変が形成される等の特徴がある。このため比較的簡便に牛の脳幹機能を評価でき

ARAI Shozo

〒305-0856 茨城県つくば市観音台3-1-5

る検査法を開発し、BSEに特徴的な脳幹機能障害を評価することができれば、BSEの臨床診断法として有望な検査法になり得ると考えられる。我々は牛の脳幹機能を客観的に評価する方法として、牛の聴性脳幹誘発電位（Brainstem auditory evoked potentials: BAEP）測定法を開発してきた^{2), 3)}。本稿では、BAEPを用いたBSE罹患牛の脳幹機能障害の特徴と臨床診断の可能性について紹介する⁴⁾。

2. 聴性脳幹誘発電位測定による牛の脳幹機能検査

脳幹機能を客観的に評価する方法として、聴性脳幹誘発電位（BAEP）測定法が知られている。BAEPは外耳から音刺激を与えることによって得られる誘発電位で、音刺激から10/1000秒（10msec）以内に4～7個の波形が出現する。この波形は脳幹聴覚路に由来することが知られており、I波は第8神経（聴神経）、II波は延髄の蝸牛神経核、III波は橋の上オリーブ複合核、IV波は橋の外側毛帯、V波は中脳の下丘核の誘発電位を示していると考えられている。各波の潜時（音刺激開始から各波のピークが検出されるまでの時間）には個体差が少なく再現性が良いことから、BAEP測定により脳幹の各部位の機能検査を行うことが可能である。機能障害の程度は、BAEP各波の潜時と振幅（電位）の数

値として計量的に示すことができる⁵⁾。

牛のBAEP測定は、牛を立たせたままで非侵襲的に安全に実施することができる(図1)。まず牛に軽い鎮静処置をした後、頭部の皮膚表面(4カ所)に電極を取り付け、牛用の音刺激用イヤホンを取り付けた後、クリック音で音刺激を行う。音刺激は2,000回行い波形の加算平均処理を行うと必要な牛のBAEP波形を得ることができる。1回の測定に要する時間は3分程度で、必要に応じて刺激音圧の強度を変えて測定をする。牛のBAEP波形はI, II, III, V波の4つの陽性波形が検出されIV波は欠損する特徴がある。牛のBAEPの測定数値(各波の潜時)は、鎮静剤投与の影響を受けないため²⁾、神経症状を示して取扱いが危ない牛についても鎮静処置による制御が可能なることから、安全に牛のBAEP検査を実施することができる。

3. BSE罹患牛におけるBAEP波形の特徴

国内には研究に用いるBSE自然感染牛がほとんどいないことから、まず我々はBSE自然感染牛由来の脳乳剤を牛の脳内に接種して実験的BSE罹患牛を作製した。BSE脳内接種から約18ヶ月後までは特段の臨床症状は認められない。接種から18-22ヶ月後頃に姿勢異常や挙動変化などの初期の臨床症状がみられ、接種から22-24ヶ月後頃に前肢の震えや起立不能などの神経症状が発症した。一方、健康牛由来の脳乳剤を接種した牛(対照牛)では、これらの臨床症状は現れない。

脳内接種後に経時的にBAEPを測定し、BSE罹患牛と対照牛のBAEP波形の潜時や波形形状について比較検討をした。BSE罹患牛におけるBAEP波形のIII波とV波の潜時は、対照牛と比べて左右両側性に遅延し、各波形の電位も対照牛と比べて低下していた(図2)。また、BSE脳内接種から20ヶ月後と24ヶ月後の同一牛のBAEP波形を比較すると、接種24ヶ月後のBAEP波形のIII波とV波の潜時は、接種20ヶ月後に比べて左右両側性に遅延が進行しており、



図1 牛のBAEP測定風景

各波の電位も低下していた。一方、対照牛において脳内接種から20ヶ月後と24ヶ月後のBAEP波形を比較したところ特段の変化は認められない(図2)。

BSE罹患牛のIII波とV波の潜時は、脳内接種から14ヶ月以降で左右両側性の進行性の遅延が認められる(図3)。特にBSE罹患牛のV波の潜時は、脳内接種から22ヶ月以降で対照牛と比べて左右ともに有意($P < 0.05$)な遅延を示す。一方、BSE罹患牛のI波とII波の潜時は脳内接種後の実験全期間を通して特段の変化は認められない(図3)。以上のように、BSE罹患牛ではBAEP波形のIII波とV波の潜時が左右両側性に進行性に遅延し、電位が低下する特徴が認められる。またBSE罹患牛のBAEP潜時の遅延と電位の低下の程度は、臨床症状の悪化と平行して進行した。BAEPのIII波とV波の発生起源はそれぞれ脳幹の上オリブ核と中脳下丘と考えられており⁵⁾、この部位に障害を受けると何らかの異常波形が導出されることが考えられる。BSE罹患牛では脳幹のオリブ核や中脳に左右対称性の空胞変性やPrP^{Sc}の蓄積病変を形成する特徴を持つことが知られており^{6), 7)}、我々が実験的に作製したBSE罹患牛において、オリブ核や中脳を発生起源とするIII波とV波に見られた左右両側性の遅延は、脳幹のそれぞれの部位における組織障害を反映しているものと考えられる。

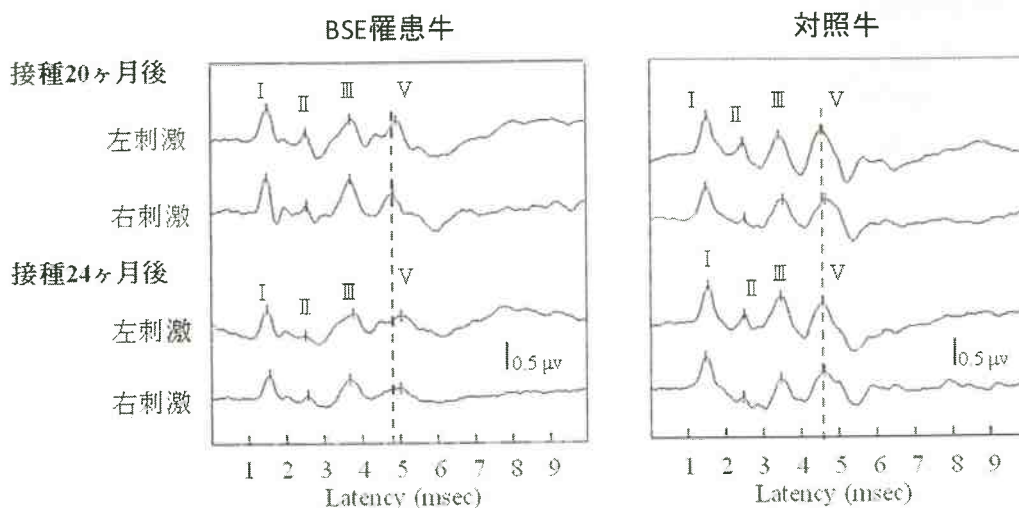


図2 プリオン脳内接種20, 24ヶ月後のBSE罹患牛並びに対照牛のBAEP波形形状の変化

I：第8神経（聴神経），II：蝸牛神経核，III：上オリブ核，V：中脳下丘
 刺激音圧：105 dBnHL
 Latency（潜時）：刺激から各波形のピークが出現する時間
 msec：1/1000秒
 点線：脳内接種20ヶ月後のV波のピーク

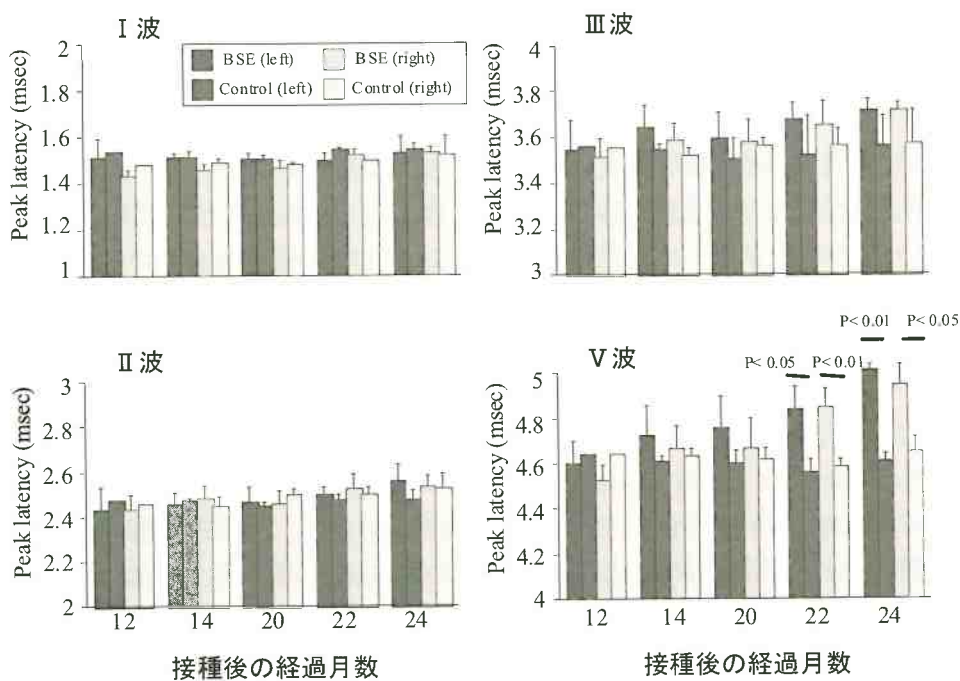


図3 プリオン脳内接種後のBSE罹患牛並びに対照牛のBAEP各波の潜時の変化

I：第8神経（聴神経），II：蝸牛神経核，III：上オリブ核，V：中脳下丘
 刺激音圧：105 dBnHL
 Peak latency（潜時）：刺激から各波形のピークが出現する時間

BSE末期に前肢の震え等の神経症状を発症したBSE罹患牛では、刺激音圧が105 dBnHLではBAEP波形は検出されるが95 dBnHL以下ではBAEP波形は消失する。一方、神経症状が認められないBSE罹患牛と対照牛では刺激音圧が75-105 dBnHLの範囲でBAEP波形は検出される。健康なホルスタイン種成牛のBAEP波形の出現閾値は65-75 dBnHLであるが^{2), 3)}、重篤な神経症状を発症したBSE罹患牛のBAEP波形の出現閾値は95-105 dBnHLで、BAEP波形の出現閾値の上昇が認められた。BAEP波形の出現閾値の上昇は聴覚障害を反映していることから、震え等の神経症状を発症した末期のBSE罹患牛では聴覚障害を併発していることが示唆されている。

4. 課題と展望

BSE罹患牛における脳幹病変や臨床症状の進行段階などを神経生理学的に評価する上で、BAEPの測定・解析は有用な臨床診断技術であると思われる。牛におけるBAEPの測定は、牛を立位のままで非侵襲的に比較的簡便に実施することができるため、農場段階で神経症状を呈している牛についてBSEの疑いがあるか否かを絞り込む臨床診断技術として将来的に有用であると考えられる。

牛の脳幹機能検査法としてのBAEPの利用は、まだ始まったばかりで臨床診断技術として実用・普及化するためにはBSE以外の中枢神経疾患や代謝性疾患等との類症鑑別に関する研究を重ねる必要がある。今後、牛のBAEP研究が進

展することで、牛の感染性並びに非感染性の脳神経疾患に対する診断など臨床応用への展開が期待される。

謝 辞

本研究は農林水産省の「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」により実施した。また、本研究の推進にあたり様々なご協力を頂きました農研機構 動物衛生研究所並びに北海道立畜産試験場の関係職員各位に深謝いたします。

文 献

- 1) Konold, T. et al. (2004), *Vet. Rec.*, 20, 659-666.
- 2) Arai, S. (2008), *Can. J. Vet. Res.*, 72, 287-290.
- 3) Arai, S. et al. (2008), *J. Vet. Med. Sci.*, 70(10), 1139-1142.
- 4) Arai, S. et al. (2008), *Res. Vet. Sci.*, doi:10.1016/j.rvsc.2008.10.019.
- 5) Chiappa, KH. (1997), *Evoked Potentials in Clinical Medicine*, 3rd ed, 157-197, Lippincott-Raven, New York.
- 6) Casalone, C. et al. (2006), *Acta. Neuropathol.*, 111, 444-449.
- 7) Wells, GAH. et al. (1995), *Brain. Pathol.*, 5, 91-103.

◀国内情報▶

汎用型飼料収穫機の開発

— 圃場を選ばず、一台三役の府県コントラクタ向け機械

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 畜産工学研究部
志藤 博克・橘 保宏・川出 哲生

府県におけるコントラクタの一層の普及に資するため、多様な飼料作物を1台で収穫・細断・ロール成形でき、軟弱圃場での機動性に優れた自走式収穫機を開発した。開発機は、収穫部の3種類のアタッチメントを着脱交換することにより、トウモロコシ、牧草、飼料イネなどに対応可能である。開発機で作られたロールバールサイレージは、従来のロールバールよりも高密度なため発酵品質が高く、1年程度貯蔵してもほとんど品質が劣化しない。

1. はじめに

飼料用穀物価格の世界的な高騰により、我が国の酪農畜産はまさに危機的状況に晒されている。こうした中で、飼料自給の重要性が益々クローズアップされているが、経営規模が小さく飼料生産用機械の新規導入や更新が困難な肉牛生産農家や酪農家、あるいは経営規模が大きくても飼養管理で手一杯の農家にとっては、自給飼料生産がままならない状況にある。そこで、新たな担い手として注目されているのがコントラクタと呼ばれる飼料生産受託組織である。全国のコントラクタ組織数は、平成9年度では122であったのに対し、平成17年度では437に増加しており、利用農家数も平成9年度の6,020戸に対して17,900戸と3倍に増えている（平成19年農林水産省畜産振興課調べ）。数字の上では全国的にコントラクタ組織が順調に普及してきているように見えるが、地域別に見ると北海道と九州といった大規模生産地域が全体の約3分の2を占めており、他の府県での伸びはまだこれからと言った状況である。

府県におけるコントラクタ組織の伸び悩みの
SHITO Hirokatsu, TACHIBANA Yasuhiro, KAWAIDE
Tetsuo

〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

要因を考えると、第一に圃場一筆当りの面積が小さく、分散しているために自走式ハーベスタのような大型機械の導入が困難で、能率的な作業が期待できないことが挙げられる。また、府県の自給飼料作付面積の約3分の1を占めるのが転作水田や水田裏作であり、降雨後の圃場条件の回復が遅く、作業スケジュールが遅延しがちになる。さらに、コントラクタ組織では利用農家から要望される多様な飼料作物の収穫に対応するために、トウモロコシならばコーンハーベスタ体系、牧草ならばロールバール体系、飼料イネならば専用収穫機体系、と多くの機械を揃えなければならず、組織設立時の機械投資額が大きな負担となる問題もある。せっかく多額の投資をして機械を揃えたとしても、上記に述べたように作業スケジュールが遅れて、投入した資金を回収するために必要な処理面積を稼ぐことができなければ組織としての運営は困難である。

そこで生研センターでは、府県のコントラクタを対象として、地盤が軟弱な水田基盤や狭い圃場でも機動性が高く、1台でトウモロコシ、牧草、飼料イネなどの多様な飼料作物に対応することができる「汎用型飼料収穫機」を農機メーカーと共同開発した。

2. 汎用型飼料収穫機の概要

汎用型飼料収穫機は、収穫部、ホッパ、成形室、ネット結束装置、走行台車から構成される(図1)。収穫部は、シリンダ型カットヘッドを有するハーベスタ本体とアタッチメントからなり、トウモロコシ用、牧草用、飼料イネ用の

各アタッチメントは工具なしで容易に5分程度で着脱することができる。また、トウモロコシでは1cm、牧草と飼料イネでは3cmに切断長の設定を変えることができる。成形室の呼び直径は1m、幅は0.85mである。ロールベール結束用のネットは1m幅と1.2m幅の両方が使用可能である。試作機の主要諸元を表1に示す。

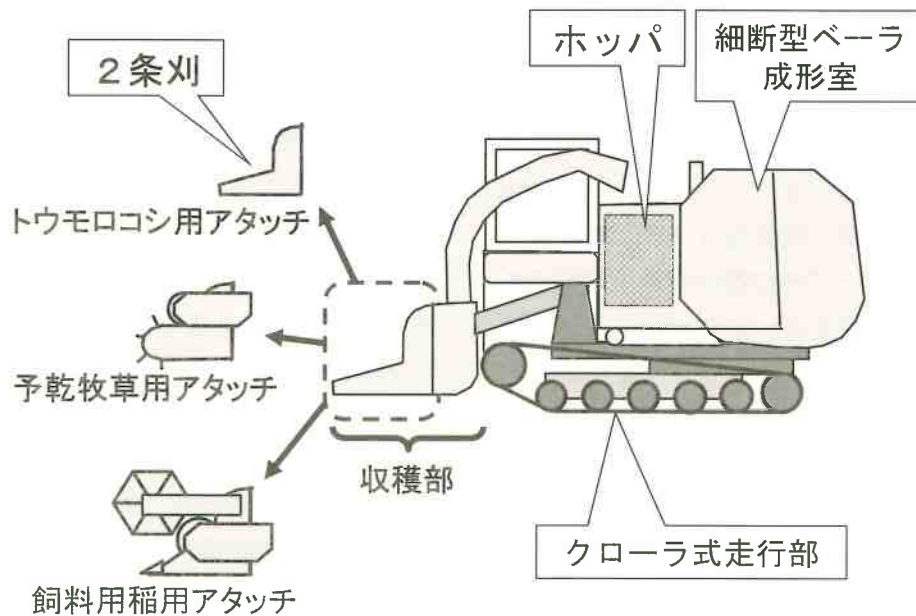


図1 汎用型飼料収穫機のご概念

表1 汎用型飼料収穫機の主要諸元

		トウモロコシ収穫時	予乾牧草収穫時	飼料イネ収穫時
機体の 大きさ	全長 (mm)	6,500	6,180	6,810
	全幅 (mm)	2,000	2,000	2,340
	全高 (mm)	3,460	3,460	3,460
	質量 (kg)	4,990	4,920	5,220
収穫部	作業幅 (m)	1.5	1.6	2.0
走行部	クローラ接地圧(kPa)	28.8	28.4	30.1
成形室	形式	特殊バーチェーン式		
	直径×内幅(mm)	φ 1,000×850		
ホッパ容量	(m ³)	1		
機関出力	(kW)	72.1		

3. 開発機による収穫作業

開発機での作業は、収穫部で飼料作物を収穫・細断した後、運転席の後方、成形室の前方にあるホッパに材料を吹き込み、ホッパ底部のコンベアで成形室に材料を送り込んでロール成形し、満量となった時点でネットを外周に巻き付けて放出する、といった手順で行う。開発機の最大の特徴は、1cmないし3cmに細断した飼料作物を高密度なロールベールに成形できることであり、これにより、後述するように長期保存が可能で高品質なサイレージを調製することができる。また、ロールベールのネット結束中にはホッパに材料を一時貯留するため、従来のロールベラのようにその都度作業を中断する（大抵30秒程度を要する）必要がなく、ノンストップで収穫作業を行なうことができる。

開発機は、クローラ式走行部を持つ市販の自走式ベールラップとのコンビで作業体系を構成することを想定しているが、所有する機械や作業条件に合わせた作業体系の構築も可能である。

1) トウモロコシ収穫時の性能

トウモロコシ用アタッチメントは2条刈であり、中割作業ができるので手作業による枕地処理はほとんど不要となる。また、その場での旋回ができるため、転換畑などの小区画圃場でも手際良く作業することができる。100×30m区画の圃場で、収量5.6t/10a、材料含水率70%の条件で行った収穫試験では、枕地開けも含めた作業を42a/hの作業能率でできることを確認した。枕地開けでは、手刈りによる作業は一切行わなかった。この時に作られたロールベールの重さは平均458kgであった。開発機によるトウモロコシ収穫作業風景を図2に示す。

なお、条播したソルガムもこのアタッチメントで収穫することができる。

2) 予乾牧草収穫時の作業性能

牧草収穫作業は、従来の牧草用機械体系で刈取り・転草・集草を行った後、拾い上げ・細断・



図2 トウモロコシ収穫作業風景

ロール成形を開発機で行う。牧草用アタッチメントは、拾い上げ幅1.6mのピックアップ式であり、府県で主に普及している作業幅3～4mクラスのレーキで集草したウインドローに対応できる。100×30m区画の圃場で、収量5.6t/10aのイタリアンライグラス1番草を、平均含水率52%に予乾して集草した条件（集草列間隔約5m）で行った収穫試験では、作業能率が89a/hであった。ただし、開発機的能力を引き出すには、材料含水率が70%未満になるまで予乾する必要がある。

従来の成形室直径1mのカッティングロールベラ（設定切断長35cm）と比較したところ、従来機は1.5m/sの速度で作業可能であったが、ベール放出のための停止時間を含めると平均0.9m/sとなり、開発機平均作業速度0.7m/sと比較して若干上回るものの、その差は小さかった。

ロールベールの重量は、収穫時の材料含水率によって大きく変動し、含水率が37%から77%の範囲では、316kgから562kgまで変化した。含水率55%では平均416kgであった。イタリアンライグラスの収穫作業風景を図3に示す。

なお、本開発機の予乾牧草収穫機能は、転換畑における冬作牧草や水田裏作を対象としており、永年草地での牧草収穫は目的としていない。また、集草列に石などの夾雑物が多く含まれることが予想される河川敷では、ハーベスタを損



図3 牧草収穫作業風景



図4 飼料イネ収穫作業風景

傷する恐れがあるため、本機の使用には適さない。

3) 飼料イネ収穫時の作業性能

飼料イネ用アタッチメントは、作業幅2m（6条刈り）のリール式であり、刈り落としたイネでも着実に拾い上げることができる。本開発機は飼料イネ用アタッチメントを装着した時に機体全長と重量が最大となるが、3～5aの小規模圃場でも平均14a/hの能率で作業可能であり、人が長靴を捕られながらもやっと歩ける状態の軟弱圃場（円錐貫入抵抗値0.36MPa）でも十分に作業できることをこれまでの試験で確認した。ちなみに25a圃場での作業能率は約30a/hであった。ただし、降雨直後や著しい倒伏のために材料草に表面水が付着している状態では、アタッチメントの掻き寄せオーガの部分で詰まりが生じ易いため注意が必要である。

含水率48～72%の条件で調製したロールベールの平均重量は314kgであった。収穫作業風景を図4に示す。なお、このアタッチメントを使えば、草丈が160cm程度の長稈品種のムギも収穫可能である。

4. 開発機によるサイレージの品質

開発機で調製したロールベール（以下、細断ベール）は、170～250kg/m³という高い乾物密

度になる。サイレージの発酵品質は高く、1年間貯蔵した後でも品質の低下がほとんどない。また、二次発酵等によって生じるロスも極めて少ない。従って、収穫適期に適切な条件で収穫されていれば、これまで発酵品質の向上や安定化を図るために必要とされていた添加剤が不要となる。例としてイタリアンライグラス及び飼料イネの発酵品質を表2に示す。

5. 開発機の利用が想定される場面

酪農畜産農家を母体とする府県のコントラクタ組織は、特にトウモロコシや牧草収穫においてトラクタを基軸とする機械体系で作業している場合がほとんどである。例えば、転換畑で夏作にトウモロコシ、冬作にイタリアンライグラスの二毛作を行っている地域では、開発機を導入することによってコーンハーベスタとそのためトラクタ、ロールベアラを省略することが可能となる。また、専用収穫機を購入しなくても飼料イネ収穫への受託範囲拡大が可能となる。

稲作農家を母体とするコントラクタ組織では、主に専用収穫機で飼料イネを収穫しているが、生産コストの低減化が迫られていることから、専用収穫機の負担面積をできるだけ拡大して機械償却費を圧縮する努力が払われているものの、機械の耐久面で限界に達している状況である。専用収穫機では、トウモロコシや兼用型ソルガ

表2 開発機によるロールベールサイレージの発酵品質事例

	含水率 (%)	pH	現物割合 (FM%)			VBN/TN (%)	V-score
			乳酸	酢酸	酪酸		
イタリアン ライグラス*1	54	5.09	1.31	0.26	0.00	8.00	99
飼料イネ*2	59	4.01	1.16	0.26	0.00	1.96	99.5

* 1 調製7カ月後の発酵品質

* 2 調製12カ月後の発酵品質

ムといった長大型作物への対応は困難であるため、適用作物の拡大によるコスト削減ができない。開発機を導入すれば、多大な機械コストを抱えずに自給飼料生産に本格的に参入することが可能となり、コントラクタ組織の経営効率化にも寄与することが期待される。

近年、集落営農法人が増加しつつあるが、稲作における転作だけでなく、野菜や根菜作でも連作障害回避のためのクリーニングクロープとして様々な飼料作物を取り入れ、ブロックローテーションを組んでいる。こうした集落営農法人とコントラクタ組織が連携を図ることにより、あるいは集落営農法人自体が自給飼料生産も手がけることにより、自給飼料の生産と利用が一層活性化することが期待できる。また、コントラクタと連携して、TMRに自給粗飼料を積極的に取り入れている農場制型TMRセンターにおいても、開発機の導入によって長期保存性に優れたサイレージが手に入ることになり、年間を通して安定した品質のTMRを生産・供給することが可能になる。

開発機は、農家による共同作業体系や酪農組

合等においての利用も十分に考えられる。TMRを利用している農家にとっては、牧草サイレージでも予め細断されているため給与前に再切断する手間が省け、給与前の調製作業を大幅に省力化できるうえ、切断機能がないTMRミキサにもそのまま投入することができ、混合時間も短縮できる。泌乳牛用のTMRには輸入乾草を使っていたというケースでは、TMRに自給サイレージをふんだんに使えるようになり、購入価格が上昇している輸入乾草の使用量を抑制できるというメリットも提供できる。

6. まとめ

汎用型飼料収穫機は、1台で多様な飼料作物に対応できることから、コントラクタ等の機械コストを抑え、軟弱圃場や小区画圃場においても能率的な作業が可能となることから、府県のコントラクタ組織の普及や飼料生産を行っている組合組織の一層の活性化に寄与することが期待される。本機は、平成21年6月から市販化予定である。

◀地域の先端研究▶

単為結果性とげなしナス ‘試交05-3’ の育成

愛知県農業総合試験場
園芸研究部 野菜グループ
穴井尚子

愛知県農業総合試験場は、(独)農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所と共同で、わが国で初めて単為結果性ととげなし性を併せ持つ、省力・快適化品種を育成した。本品種は、とげなし性を有し植物体のいずれの部分にもとげの発生は見られず、栽培管理を快適に行うことができる。また、単為結果性を有し、訪花昆虫の利用や植物ホルモン剤処理作業を省くことができ、作業の省力化が可能である。

1. はじめに

愛知県のナスは、ハウスで生産する促成栽培と半促成栽培、そして露地で生産する夏秋栽培がある。促成および半促成栽培をあわせた冬春ナス栽培が、本県の収穫量全体(16,800t)の3分の2を占めており、本県の主力な作型となっている。全国の冬春ナス作付け面積1,450haに対し、愛知県は97haと第5位の有数な産地となっている。

しかし、県内の冬春ナスの生産者数および栽培面積の推移を見ると、いずれも減少傾向にある。作業中に「とげ」でケガをすることが多い、単位面積当たりの労働時間が長い等がこの減少を招いていると考えられる。ナス生産の振興を図るために、生産者からは作業の快適化と省力化を求める声が強く出されている¹⁾。

ナス栽培の快適化を図るために、愛知県農業総合試験場ではナスの「とげ」をなくす品種改良に取り組み、平成15年にとげなし性ナス品種‘とげなし紺美’を育成した。

また、冬春ナス栽培は施設内で行われており、風もなく訪花昆虫もいないため受粉には植物ホルモン剤処理作業が必要である。この作業は開花した花ごとに処理しなければならず、負担が

ANAI Naoko

〒480-1193 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字
三が峯1-1

大きい。マルハナバチ等の訪花昆虫の利用も進んでいるが、導入価格が高く、農薬散布にも様々な制限が伴う。特に、セイヨウオオマルハナバチは特定外来生物に指定され、外部流出防止のためネット展張等が義務づけられているなど、導入しにくい状況となっている。

そこで、これまで育成したとげなし性ナスに、受粉作業を削減するため、単為結果性をさらに付与する品種改良に平成14年から取り組んだ。

2. とげなし性の遺伝子とその発現

愛知県農業総合試験場育成品種である‘とげなし紺美’および愛知県農業総合試験場・野菜茶業研究所共同育成の‘試交05-3’は、オランダの‘Freia’から由来するとげなし性遺伝子を保有している。このとげなし性遺伝子は、単一ではなく複数の劣性遺伝子で、ナスのへた・果梗・茎および葉等、植物体のいずれの部分でも発現するため、全身にとげの発生は見られない¹⁾。実用場面では、栽培作業の快適化に効果が大きい。

3. 単為結果性の遺伝子とその発現

高知県育成の‘はつゆめ’²⁾、野菜茶業研究所育成の‘あのみり’³⁾および愛知県農業総合試験場・野菜茶業研究所共同育成の‘試交05-3’は、

オランダの‘Talina’が有する単為結果性遺伝子を保有している。この‘Talina’由来の単為結果性には、不完全優性遺伝子が関与すること⁴⁾、果実が正常に肥大する単為結果性には少なくとも2つ以上の遺伝子が関与すること⁵⁾、が報告されている。

通常ナス品種における受粉後の果実肥大は、柱頭に付着した花粉に含まれる少量のオーキシンが子房内のオーキシン生成を誘発する。さらに、受精が完了して種子が形成されると、子房や胚からのオーキシン生成が旺盛となり、果実の発育はいっそう促進される⁶⁾。

それに対し、単為結果性ナスでは、受粉や受精にかかわりなく、子房の内生IAA含量が高く維持されていることにより、果実肥大に必要なオーキシン量が充分であるため⁷⁾、受粉や種子形成にかかわらず果実肥大が進むと考えられている。

4. ‘試交05-3’の特性

(1) 形態的・生態的特性

単為結果性を有し、高温期の一部を除き着果促進処理作業をしなくても果実は正常に肥大する。

愛知県の9月定植の促成栽培において、全ての花を柱頭除去処理した柱頭除去区と無処理区を設け、時期別に着果率を調査したところ、定植後から10月下旬および5月以降に落花が観察された。このように、高温期には単為結果性が若干不安定になる場合がある。しかし、11～4月は両処理区ともほぼ100%の着果率であり、安定した単為結果性を示した。

とげなし性を有し、へた・果梗・茎および葉のいずれの部位にも全く「とげ」の発生がない。また、果形はボリューム感のある楕円形で、果実の揃いが良い(図1)。果皮の黒紫程度はやや淡いが、光沢が良く、日焼け果の発生もほとんどない。年間を通して、曲がり果や電球果が少なく高い秀品率を示す。

(2) 収量性

総収量は‘千両’より2割程度少ないが、上物収量はほぼ同等である。また、時期別に可販果収量を見ると、年内収量が‘千両’より2割程度多い(図2)。



図1 試交05-3の果実

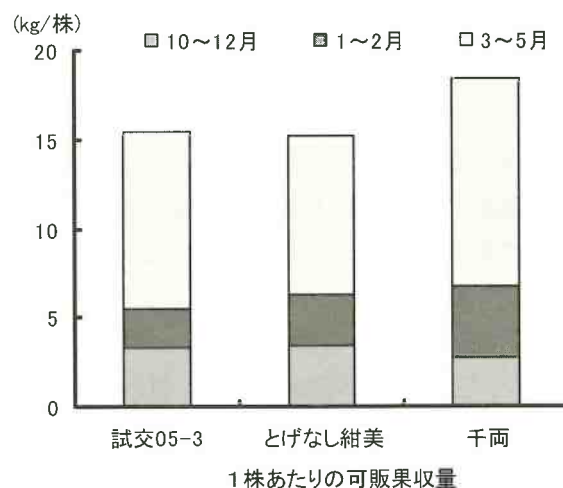


図2 時期別可販果収量

5. ‘試交05-3’の導入効果

本品種を栽培した場合、以下のような効果が期待できる。

低温期（11～4月）の植物ホルモン剤処理作業が不要になり、本県の促成栽培における全労働時間（1,860時間）の15%が削減でき、省力栽培が可能となる。また、生産者が「とげ」に刺さる心配がなく、栽培管理作業や調理が快適になるとともに、流通段階での「とげ」による品質低下も防げる。

6. 今後の研究について

ナスの育種は、民間の種苗会社とともに都道府県の試験研究機関でも進められている。従来は収量性の向上が目標であったが、最近、作業の快適化や省力化を育種目標にした品種改良が進められ、‘はつゆめ’（高知県）、‘あのみり’（野菜茶業研究所）などが育成されている。また、並行して、単為結果性に連鎖するDNAマ

ーカーの開発も進められている。このようなナス育種の発展にあわせ、本県では野菜茶業研究所と共同で単為結果性ととげなし性を併せ持つ、日本初の品種‘試交05-3’を育成した。今後はDNAマーカーを利用した選抜および世代促進を積極的に導入して育種の効率化を図り、生産者の要望に合わせた迅速な品種改良を進めていきたい。

文 献

- 1) 堀田行敏ら（2003），園学研，2，1-4
- 2) 松本満夫ら（2007），高知県農技セ研報，16，53-58
- 3) 齊藤猛雄ら（2007），野菜茶研研報，6，1-11
- 4) 吉田建実（1998），平成10年度日種協育技研シンポジウム資料，13-21
- 5) 齊藤猛雄ら（2005），野菜茶研集報，2，29-35
- 6) 農業技術体系 野菜編5，基97
- 7) 池田 敬ら（1998），園学雑，67別2，123

◀文献情報▶

凍結保存・融解後に生存性の低いブタ精液において、精漿は凍結時の精子に障害を与えるが、融解時に精漿が存在することで、融解後の精子の品質と受胎率が向上する

Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality.

T. Okazaki^{a,b}, S. Abe^a, S. Yoshida^a and M. Shimada^b

^aSmaller Livestock and Environment Section, Livestock Research Institute, Oita Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Research Center, Bungo-ono, Oita 879-7111

^bDepartment of Applied Animal Science, Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8528

Theriogenology, 71, 491-498, 2009.

ブタ精子の凍結保存は、貴重な遺伝資源の長期保存のためにも重要である。これまでの技術開発により、ブタ精子の凍結保存が可能となってきているが、凍結保存・融解後の精子の品質や受胎性は個体ごとに大きく異なり、この個体差は、遺伝的なバックグラウンドによってもたらされていることが知られている。また、ブタの精巢上体精子は、射出精子よりも凍結保存・融解後の生存性が高いことが知られている。さらに、ミニブタにおいては、射出後すぐに精漿を除去して凍結保存することにより、凍結保存・融解後の運動性と体外受精能が向上することが報告されている。しかし、ブタにおいては、凍結保存・融解後の精巢上体精子は、必ずしも体外受精能が高いわけではない。さらに、融解過程において、精漿は、精子の自発的な受精能獲得を抑えることが報告されている。そこで、凍結時の精漿の存在は、融解後の精子の品質に

は影響を与えないが、融解時の品質の維持には不可欠であるとの考えから、本論文の実験が行われた。すなわち、採精後すぐに精漿を除去あるいは除去せずに、精子を冷却・凍結保存した。耐凍性の高いブタの精子においては、精漿の除去は、凍結保存・融解後の精子の運動性に影響を与えなかった。耐凍性の低いブタ精子においては、精漿を除去しない対照区に比べて精漿除去区が、有意に凍結保存・融解後の運動性が高かった。精漿を除去して凍結した精子においては、融解後の先体帽の損失と受精能獲得の指標となる15kDa tyrosine-phosphorylated proteinの発現が、精漿を除去していない対照区に比べて増加した。融解液へ精漿を10%添加することにより、融解後の先体帽の損失や15kDa tyrosine-phosphorylated proteinの発現が抑制されるとともに、人工授精における受胎率が向上した。以上の結果から、採精直後に精漿を除去して凍結保存し、精漿を添加した融解液を用いて融解した精子を用いることにより、凍結保存・融解ブタ精子、特に凍結保存・融解後の精子性状の悪いブタ精子における人工授精による受胎率を向上させることが明らかとなった。

ブタにおいても、凍結保存・融解精子を用いた人工授精技術は、飼養コストの低減、優良系統の効率的利用、遺伝資源の長期保存のために重要な技術である。耐凍性の高い雄ブタもいるが、ブタ精子は一般的に耐凍性が低く、そのため凍結保存・融解精子の人工授精においては、受胎率が低いことや一腹産子数が少ないことが問題となり、凍結保存・融解精子による人工授精を普及させるための大きな障害となっている。今後、今回提示された凍結保存・融解方法が、数多くのブタ精子に有効かどうかの検討は必要であるが、有効性が明らかとなれば、凍結保存・融解ブタ精子を用いた人工授精が広く普及する可能性がある。今後のフィールドでの広範な検討を期待したい。

(抄訳：下司雅也, GESHU 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▶

シロイヌナズナにおいて重複した遺伝子の多様な進化が遺伝的不適合を引き起こす

Divergent evolution of duplicate genes leads to genetic incompatibilities within *A. thaliana*

D. Bikard,¹ D. Pate^{1,2} C. L. Mett ,¹ V. Giorgi,¹ C. Camilleri,¹ M. J. Bennett,² O. Loudet¹

¹Genetics and Plant Breeding, INRA, Versailles, France.

²Centre for Plant Integrative Biology, University of Nottingham, Loughborough, UK.

Science, 323, 623-626 (2009).

異なる遺伝子座間の相互作用によって引き起こされる遺伝的不適合は、種内、種間における生殖後隔離の原因の一つと考えられることから、進化における重要な要因となりうる。よって、植物における遺伝的不適合を解析することは、遠縁交雑を可能にするなどの育種としてはもちろんのこと、植物の進化的にも非常に重要であるといえる。本論文では、シロイヌナズナ生態型間交雑時に生じる分離の歪みを指標に、原因遺伝子の特定を行い、最近重複した遺伝子への多様な変異によって種内系統間遺伝的不適合が引き起こされたことを報告している。

シロイヌナズナの Columbia-0 系統(Col)と Cvi-0 系統(Cvi)間の交雑時に生じる分離の歪みの一つが、Col の第1染色体上部(LD1.1)と Cvi の第5染色体下部(LD1.5)にそれぞれ座乗する遺伝子座間の相互作用によって引き起こされることを明らかにした。この分離の歪みは、Col 型の LD1.1 と Cvi 型の LD1.5 がそれぞれホモ型となったとき、その種子は致死にいたることから生じるものであった。次に、LD1.1, LD1.5 に関して精密マッピングを行い、その領域の解析を行った。この結果、候補遺伝子として LD1.1, LD1.5 でパラログの関係にある一組の遺伝子を見いだした。この遺伝子は、ヒスチジンの生合成系で働くヒスチジノールリン酸アミノ基転移酵素(HPA)をコードしていた。Col において

LD1.1 は At1g71920, LD1.5 は At5g10330 と特徴づけられた遺伝子であり、両遺伝子はコード領域内に2カ所の同義置換が存在し、最近の遺伝子重複により生じていると考えられた。また、At5g10330 の T-DNA ノックアウト株は胚致死になることが知られているとともに、この胚致死がヒスチジンを外的に加えることによって相補されることが明らかとなっていた。

Col, Cvi 両生態型の At1g71920, At5g10330 遺伝子の解析を行ったところ、まず Col では、LD1.5 にあたる At5g10330 は正常に発現していたものの、LD1.1 にあたる At1g71920 が発現していなかった。次に Cvi では、At1g71920 は正常に発現していたものの、At5g10330 領域に欠損があり同遺伝子は存在しなかった。以上の結果から Col 型の LD1.1 と Cvi 型の LD1.5 がそれぞれホモ型でそろったとき、植物体から HPA の機能が失われるため胚致死となることを明らかにした。さらに本論文では、シロイヌナズナの異なる30の生態型において LD1.1, LD1.5 領域を調査するとともに、それぞれの系統間交雑を行った。この結果、LD1.1, LD1.5 領域には少なくとも6パターンの多様性が存在しており、Col と Cvi の組み合わせの様に遺伝的不適合が起こる組み合わせが多数存在していた。

このように遺伝子重複後、パラログの関係にある遺伝子に対して起こった多様な変異が結果的に系統間の遺伝的不適合を引き起こし、さらにはこれが、生殖的隔離機構として機能しうる可能性を示した。

(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▶

ドコサヘキサエン酸は細胞表面のマイクロドメインのサイズと分布を変化させる

Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell surface microdomains

Robert S. Chapkin^{a,b}, Naisyin Wang^{a,c}, Yang-Yi Fan^b, Joanne R. Lupton^{a,b}, Ian A. Prior^d

a Center for Environmental and Rural Health, Texas A&M University, College Station, Texas, USA

b Faculty of Nutrition, Texas A&M University, College Station, Texas, USA

c Department of Statistics, Texas A&M University, College Station, Texas, USA

d The Physiological Laboratory, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom

Biochimica et Biophysica Acta, 1778 (2), 466-471 (2008)

ドコサヘキサエン酸 (DHA) は様々な生理機能を持つが、二重結合の多さから取り込まれた生体膜の性質を変化させ、シグナル伝達や膜融合、タンパク質の輸送などの細胞機能を調節していることが近年明らかになりつつある。

生体膜はリン脂質、コレステロールを主とした脂質二重層とタンパク質で構成されている。膜中には、脂質、タンパク質の物理的な相互作用により、不均一な微小構造 (マイクロドメイン) が形成され、様々な機能を発現していると考えられている。マイクロドメインとしては、膜の一部がフラスコ状の構造を形成しているカベオラなど形質的な特徴のあるものと、膜中でコレステロールとスフィンゴ脂質がより集まり形成される形質的な特徴の無いコレステロール依存性の領域 (ラフト構造) が存在する。

本論文で著者らは、GFP標識したコレステロール依存性のタンパク質 (GFP-tH) および非コレステロール依存性のタンパク質 (GFP-tK) をマーカートンパク質としてHeLa細胞に発現させ、抗GFP抗体結合金粒子を用いて免疫電子顕微鏡法にて膜中の空間的な分布を直接観察、

解析した。この手法により、コレステロール依存性のラフト構造を高分解能で可視化し、DHAなど各種脂肪酸処理によるマイクロドメイン構成の変化を *in situ* で探索した。

HeLa細胞をオレイン酸 (OA)、リノール酸 (LA)、DHAで処理し、原形質膜中のマーカートンパク質の分散パターンの解析を行った。結果は、DHAまたはLA処理によりコレステロール依存性GFP-tHのクラスター化が有意に誘起された。非コレステロール依存性GFP-tKはOA処理、LA処理によりクラスター化が阻害され、DHA処理ではクラスターのサイズが微小化されていた。このことから、高度不飽和脂肪酸 (PUFA) は特徴的に原形質膜の性質を大きく変化させている直接的な証拠が得られたとしている。

過去において、生体膜は均一なリン脂質二重膜にタンパク質が浮いているというモデルのみで理解されていたが、現在では機能性のマイクロドメインが存在するというモデルが浸透しつつある。だが、物理的な駆動力や空間的な構造に由来するその性質を正しく捉えるためには、膜のナノスケールでの物質の物理的状态を把握することが不可欠である。本論文で用いられた手法は、DHAを含めPUFAの複雑な細胞機能調節機構の理解への有効な試みであり、今後の進展に期待したい。

(抄訳：池本英生, IKEMOTO Hideo, 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21年度民間実用化研究促進事業のお知らせ

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構生物系特定産業技術研究支援センターでは、平成18年度より、農林水産研究基本計画に即して農林水産業、食品産業、醸造業等の向上に資する画期的な生物系特定産業技術の開発を促進することを目的として、財政投融资資金を原資とした、民間における実用化段階の研究開発に資金を提供する事業を開始しており、平成21年度においても、引き続き本事業を実施することとしています。この事業は、提案公募による委託方式（日本版バイ・ドール条項を適用した委託方式）で行うもので概要は以下のとおりです。

- 対象研究分野：農林水産業、飲食品産業、醸造業等の向上に資する画期的な生物系特定産業技術の開発を目指した、生産現場、食品製造等現場への移行が可能な実用化段階の研究であって、製品化に向けた明確な計画（当該製品の実用化にあたり必要となる特許権等を既に有している等）が明らかなもの
- 研究期間：原則として3年間。ただし、研究開発終了時に行う評価結果によっては2年まで延長可能
- 研究費の規模：1課題あたり1億円程度／年が上限（下限は定めていないので小規模の提案も可能）
- 提案資格：生物系特定産業技術の実用化段階の研究開発を行っている民間の登記法人
- 募集期間：平成21年3月23日（月）～4月10日（金）

募集要領等の詳細につきましては、下記のホームページをご覧ください。

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

<お問い合わせ先>

新技術開発部 民間研究促進第1課

電話：03（3459）6565 FAX：03（3459）6566

E-mail：minkanken@ml.affrc.go.jp URL：http://brain.naro.affrc.go.jp/

生研センターからのご案内

平成20年度 研究成果発表会の開催について（予告）

生物系特定産業技術研究支援センターでは、「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」及び「生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業」の終了課題の成果発表会を、これまで当該年度の3月上旬に開催していましたが、平成20年度の研究成果発表会については、本年の7月に開催することとなりました。

開催日：平成21年7月13日（月）～15（水）

場 所：東京国際フォーラム（ホールD7）

[東京都千代田区丸の内3-5-1]

入場無料

なお、プログラムや発表課題等の詳細については、平成21年6月中に生研センターのホームページに掲載するほか、パンフレットやポスターでご案内いたします。

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

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

技術開発課 E-mail kaihatsu@ml.affrc.go.jp
TEL:03-3459-6567 FAX:03-3459-6577

URL <http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>

編集後記

132号をお届けします。本号の総説では浦野忠久氏（森林総合研究所）に天敵昆虫サビマダラオオホソカタムシによる、マツノマダラカミキリをはじめとするカミキリムシ被害対策の手法開発についてご紹介戴きました。

その他の研究情報としては、森山裕充氏（東京農工大学）らにイネいもち病菌などの生育を抑制するマイコウイルスの発見、斎藤浩二氏（北海道農業研究センター）らにイネの穂ばらみ期耐冷性を強くする遺伝子の同定、多田雄一氏（東京工科大学）に海水でも育つマングローブからの耐塩性遺伝子の同定、新井鐘蔵氏（動物衛生研究所）にBSE罹患牛における脳幹機能障害の特徴、志藤博克氏（生研センター）らに府県コントラクタ向け汎用型飼料収穫機の開発、穴井尚子氏（愛知県農業総合試験場）に単為結果性とげなしナスの育成について、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）、池本英生氏（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。

なお、私事ですが、渡辺による本誌の編集業務は132号が最後となりました。長い間皆様から多大なご支援、ご協力を賜り、この欄を借りて厚く御礼申し上げます。また、今後ともブレインテクノニュースご愛読のほどをよろしくお願いいたします。（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132号

平成21年3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/>