

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成22年5月15日(隔月1回15日発行)

ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.139

15 MAY, 2010

ブレインテクノニュース



オオメカメムシ成虫

広食性土着天敵オオメカメムシの生態と その害虫防除資材としての活用

千葉県農林総合研究センター
大井田 寛

目 次

総 説

- 有用物質・遺伝子・形質の探索と応用を目指した植物ケミカルバイオロジー研究
～植物ステロイドホルモン制御剤による光合成司令塔遺伝子の発見～ 1
中野雄司^{1,3}・浅見忠男²（¹（独）理化学研究所・基幹研究所、²東京大学大学院農学
生命科学研究科、³（独）科学技術振興機構－さきがけ）

国 内 情 報

- 無線センサネットワークによる鶏健康監視システムの開発 8
塚本健司¹・鈴木耕太郎¹・多田達哉¹・岡田浩尚²・梅田智広³・須藤正巳⁴・
伊藤寿浩²（¹（独）農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所、
²（独）産業技術総合研究所、³東京大学工学系研究科、⁴茨城県畜産センター）
揮発性静菌物質生産糸状菌による有害糸状菌の抑制 15
小板橋基夫（（独）農業環境技術研究所）
バイオマスを完全分解・糖化する革新的微生物前処理技術に向けて 20
植田充美¹・黒田浩一¹・三宅英雄²・田丸 浩²（¹京都大学大学院農学研究科
応用生命科学専攻、²三重大学大学院 生物資源学科）
イオンビーム照射による芳香シクラメンの花色変異体の作出 28
近藤恵美子・亀有直子・石坂宏（埼玉県農林総合研究センター 園芸研究所）
小麦のふすまから血圧降下ペプチドの製造法を開発 33
野方洋一（（独）農業・食品産業技術総合研究機構 近畿中国四国農業研究センター）
輸出用果実のハダニ類を除去する連続搬送式果実洗浄機の開発 37
宮崎昌宏¹・青木 循¹・金光幹雄¹・齋藤秀文²・中村ゆり³（（独）農業・食品産業
技術総合研究機構 ¹生物系特定産業技術研究支援センター、²中央農業総合研究
センター、³果樹研究所）
地域の先端研究
広食性土着天敵オオカメムシの生態とその害虫防除資材としての活用 42
大井田寛（千葉県農林総合研究センター）
文献情報
子宮静脈へのインターフェロンタウの注入はヒツジの黄体寿命を延長させる 47
Rebecca C. Bott et al. (*BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 82, 725–735, 2010)
抄訳：下司雅也
シロイヌナズナにおける花粉特異的遺伝子への突然変異による自家和合性進化 49
T. Tsuchimatsu et al. (*Nature*, 2010, Advance online publication, doi:10.1038/nature08927)
抄訳：高田美信
肥満に伴うメタボリックシンドロームと腸内細菌の関係 50
Vijay-Kumar M et al. (*Science*. 2010 Mar 4) 抄訳：柳原沙恵

表紙の説明

近年、安全・安心な農産物生産に寄与する有効な害虫防除手段として、生物農薬（天敵製剤）の利用が拡大している。筆者らは、広食性土着天敵のオオカメムシ（注：表紙写真）を生物農薬として増殖し、施設栽培のイチゴやピーマンなどの色々な害虫に対する防除資材として活用する技術を開発した。

詳細については42頁をご覧下さい。

◀ 総 説 ▶

有用物質・遺伝子・形質の探索と応用を目指した 植物ケミカルバイオロジー研究

～植物ステロイドホルモン制御剤による光合成司令塔遺伝子の発見～

¹独立行政法人 理化学研究所・基幹研究所,

²東京大学大学院農学生命科学研究所,

³独立行政法人 科学技術振興機構－さきがけ

中野 雄司^{1, 3}・浅見 忠男²

生物の仕組みを解明することを目的として、生物活性を示す有機低分子化合物を積極的に生物学へと応用する「ケミカルバイオロジー」という研究分野が近年、一般的になりつつある。筆者らは、植物ステロイドホルモンであるプラシノステロイドの制御剤を用いて、この新しい手法を植物研究に適用することにより、光合成制御に関する重要な遺伝子の発見に成功した。ケミカルバイオロジーの近年の進展を概説すると共に、筆者らの最新の研究成果を紹介したい。

1. はじめに

～植物ケミカルバイオロジー序論

ケミカルバイオロジーはすべての生物種を対象とする学問分野であるが、我々は特に植物研究に有効であると考えている。その理由の一つとして、植物は複雑な形態を有する高等生物であるために、多様な形態変化を引き起こす活性化合物（タンパク質機能制御剤）の探索が容易である点を挙げることができる。植物の形態を変化させるような新しい化合物を発見・創製できた場合、次の段階の有力な方法としてこれら化合物の遺伝学への応用研究を挙げることができる。この場合、標的タンパク質が変異した結果抵抗性を示す変異体の探索に成功し、標的を明らかにできる可能性がある。一方、生物活性を示す化合物が生体内の生理活性物質の生合成や情報伝達を制御した結果として形態変化を引き起こしている場合、抵抗性変異体の原因遺伝子は生理活性物質の情報伝達に関連し

NAKANO Takeshi^{1,3}, ASAMI Tadao²

¹〒351-0198 和光市広沢 2-1

²〒113-8657 文京区弥生 1-1-1

³〒332-0012 川口市本町 4-1-8

た場合が多い。例えば、理研・東大の共同研究グループでは、植物において伸長成長、光形態形成に関与しているプラシノステロイドに注目し、その生合成阻害剤を開発し利用する事で、プラシノステロイドに関する変異体、遺伝子に関する新たな知見を得ることができた。本成果は本稿後半において詳述する。

2. 植物ケミカルバイオロジーにおける 新規化合物創製の重要性とその展望

現在、モデル植物であるシロイスナズナ、イネをはじめとして多くの植物ではノックアウト体、遺伝子高発現体の整備が進んでいるため、これらラインに生物活性化合物を処理するだけで新しい変異体探索と迅速な原因遺伝子同定が可能になっている。そのために化学遺伝学は植物研究では一般化しており、活性化合物を用いた変異体探索法や変異体解析法は多くの研究グループが採用している。以上の状況から、研究の目的に適合した有用な生物活性物質を発見・創製する技術が重要となってきている。我々研究グループも古典的な方法から最新の方法まで多様な手法を用いて薬剤創製に取り組んでいる。

中野 雄司・浅見 忠男
有用物質・遺伝子・形質の探索と応用を目指した植物ケミカルバイオロジー研究
～植物ステロイドホルモン制御剤による光合成司令塔遺伝子の発見～

また日本では得られた活性化合物を実際に応用する事は、遺伝学的な成果である新しい有用遺伝子の利用という事と比較して、技術的にも、世論的にも容易なため、農業に対する寄与の面から考えても、化合物を使った研究方法は実用化の可能性が高いと考えている。

3. ブラシノステロイドの機能制御剤の創製

筆者らの研究対象としてきた多くの植物制御剤の中で、研究の中心としてきたものの一つであるブラシノステロイド機能制御剤について簡単に紹介する。

文献1から3の化合物はアゾール型の生合成阻害剤であり、作用部位はブラシノステロイド側鎖22位の水酸化に関わるチトクロームP450酸化酵素であるDWF4である（図1）。Brz91,2001,220は我々の研究室で生み出された化合物であるが、その後のブラシノステロイド研究に広く使われており、Brz91は試薬として市販されている。文献4のSpironolactoneは上記アゾール型の化合物と作用部位が異なることから、阻害剤抵抗性変異体の性状解析を行う場合アゾール型と併用することにより、作用部位の変異により抵抗性を示しているのか情報伝達の変異により抵抗性を示しているのかを容易

に判断することが可能である。

他の研究グループによる創製研究では、Endosidin1はブラシノステロイド受容体であるBRI1のリサイクリングに関わる過程を阻害する化合物、Bikininはブラシノステロイド情報伝達因子であるリン酸化酵素BIN2タンパク質を作用部位とする化合物が同定されている。これらは化合物ライブラリーからのスクリーニングにより見出されてきた化合物であり、今後受容体やリン酸化酵素の立体構造が明らかにされることにより、受容体阻害剤のインシリコスクリーニングによる発見も期待できる。次項ではこれら阻害剤がどのように使われたか、もしくは使うことができるかを遺伝学への応用を中心にして紹介したい。

4. ブラシノステロイド研究は分析化学、分子遺伝学からケミカルバイオロジー（化学生物学）の時代へ

ブラシノステロイド研究は1970年代後半に第一期の黄金時代を迎え、東京大学農学部やアメリカ農務省においてブラシノステロイドの発見と構造決定がなされた。その大きな推進力となつたのは「分析化学」の力に依る。

続いて、1990年代に入って世界共通の実験植物として認定されはじめたアラビドプシス（和

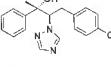
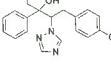
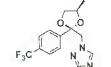
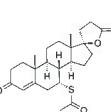
化合物名	構造	作用部位	参考文献
Brassinazole (Brz91)		DWF4 (cytochrome P450)	1)
Brassinazole (Brz2001)		DWF4 (cytochrome P450)	2)
Brassinazole (Brz220)		DWF4 (cytochrome P450)	3)
spironolactone		DET2?	4)

図1 主なブラシノステロイド生合成制御剤の化学構造と作用部位

名シロイヌナズナ) を用いた「分子遺伝学」が広がり始めると、葉の長さが短くなり、茎も太く短い矮性形態を示す突然変異体の中から、プラシノステロイド生合成欠損変異体 *det2* (*de-etiolation2*) が見つかった。この生合成欠損による劇的な形態変化はプラシノステロイドが植物成長に非常に重要であるという認識を植物研究の世界に与えた。この後、同じ矮性形態の変異体の研究によって、プラシノステロイドの生合成酵素はほぼ明らかになり、また、膜貫通型の Ser/Thr カイネース BRI1 がプラシノステロイド受容体として単離された。この 1990 年代中盤の数年間の内に第 2 期の劇的な進歩を遂げたプラシノステロイド研究だが、それ以降、生合成、受容体以降の情報伝達因子の発見においては停滞期が訪れた。

その停滞期を打破したのが、プラシノステロイド生合成阻害剤 Brz を用いた「ケミカルバイオロジー(化学生物学)」と位置づけられるのではないか、と考えている。実際の実験には、Brz 存在下で暗所発芽したシロイヌナズナ野生型株はプラシノステロイド欠損突然変異体と同様に暗所光形態形成を示すことが確認された事に基づき、この Brz 条件下においても胚軸徒長かつ子葉閉鎖の形態を示す復帰突然変異体が単離さ

れ得れば、その変異体はプラシノステロイド情報伝達もしくは生合成の最下流付近が活性化した突然変異体と位置付け得ると着想し、Brz 耐性胚軸徒長突然変異体 *bil* (*Brz-insensitive-long hypocotyl*) の探索を行った(図 2)。この手法によって 2002 年に筆者らが単離した転写因子 BZR1/BIL1 は⁵⁾、その後、BZR1/BIL1 タンパク質の相同性遺伝子として *bes1* (*bri1 EMS suppressor1*) から同定された BES1 タンパク質⁶⁾ の双方が、bHLH 型の転写因子としてプラシノステロイドによる形態形成に関わる遺伝子である事、フィードバック的に制御されるプラシノステロイド生合成遺伝子の転写制御に関わっている事、プラシノステロイド刺激により細胞質から核へ移行する性質を持つ事などが次々に明らかにされ、プラシノステロイド情報伝達経路の主要転写因子としての地位は揺るがないものとなりつつある⁷⁾。また、遺伝子単離には化合物は使わなくとも、他の生化学的手法や分子生物学的手法によって得られたプラシノステロイド情報伝達因子においても、そのコードするタンパク質の機能解析に Brz を用いることによって、プラシノステロイドとの関わりを精査するタイプのケミカルバイオロジー的解析が有効であるとの考え方も広がってきてている。

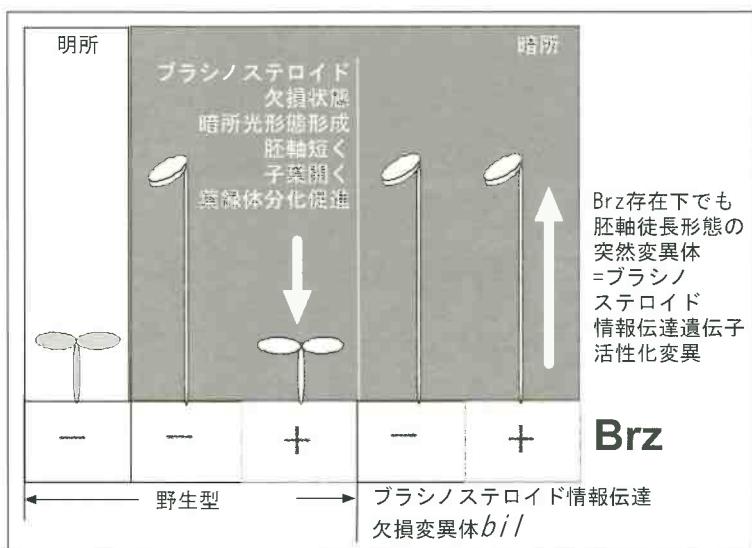


図2 ブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz による植物胚軸伸長制御活性を指標としたケミカルジェネティクス研究戦略

5. ブラシノステロイド生合成阻害剤の葉緑体機能制御に着目した新しいケミカルバイオロジー研究による葉緑体制御の司令塔遺伝子の発見

既存の研究では、ブラシノステロイドによる植物形態形成に関する制御機構に着目した Brz が活用され、幾つかの形態制御に関わる遺伝子が単離されてきた。実はブラシノステロイドは形態形成制御以外にも、葉緑体の制御機能、という植物にとって非常に重要な制御機能を持っている事が明らかになっている。筆者らは、通常暗所発芽した植物体は徒長した胚軸形態を示すが、Brz 存在下で発芽した野生型植物は胚軸の短化と子葉の開化に代表される暗所光形態形成を引き起こし、この際に、通常暗所下では極めて発現の少ない葉緑体内で光合成を行う酵素群の遺伝子発現が誘導されることを既に明らかにした⁸⁾。そこで、続いて、胚軸の形態制御と平行して、Brz による葉緑体制御に着目したケミカルジェネティクス研究を試みた。

Brz 存在下で数日間かけて暗所発芽したアラ

ビドプシスは光条件に移動後、通常培地存在下で生育した植物よりも早い速度で子葉の緑化が促進することが目視出来る。この緑化の促進は発芽開始から光条件下で生育した植物においても緑化の向上化という形でやはり目視可能である。そこで、この Brz 光発芽条件下でも緑化促進が生じない突然変異体を単離出来れば、それはブラシノステロイドによる葉緑体制御へ向かう情報伝達経路上の機能因子の欠損した変異体と位置付け得ると着想し、Brz 耐性低緑化突然変異体 *bpg* (*Brz-insensitive-pale green*) の探索を行った(図3)。

得られた変異体 *bpg* は、土壤生育した成熟個体においても低緑化を示したが、実際のクロロフィル分析においても、Brz によって野生型植物のクロロフィル含量が上昇するのに対して、*bpg* 変異体では Brz によっても増加しない状態のままであることが明らかとなった。変異原因遺伝子は、一つの zinc finger ドメインと 4 つの GTP 結合ドメインを持ち、多くの高等植物から緑藻類、さらに枯草菌なども含む原核生物にまで広く保存され、高等植物においても研究報告

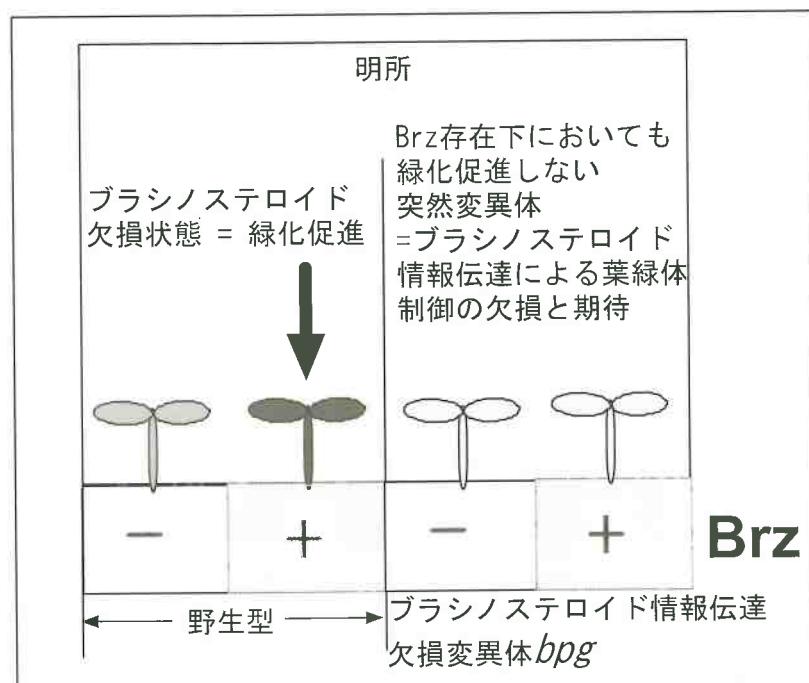


図3 ブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz による葉緑体機能制御活性を指標としたケミカルジェネティクス研究戦略

例のない新規な遺伝子であったが、*PGP2-GFP* 融合タンパク質を用いた解析によって葉緑体内に局在すること、*BPG2 mRNA* の遺伝子発現の光応答性や Brz 応答性がメジャーな光合成遺伝子の発現パターンと協調していたこと、そして *bpgr2* 変異体の葉緑体の電子顕微鏡観察によって光合成の場であるチラコイド膜の発達不全や過剰なデンプン粒の蓄積などが観察された事などから、*BPG2* 遺伝子は葉緑体において重要な機能を持つことが類推された（図 4）⁹⁾。

葉緑体機能への *BPG2* の関与の分子機構について詳細に解析を進めた結果、*bpgr2* 変異体において葉緑体ゲノム上にコードされる葉緑体 rRNA のスプライシングに異常が生じ、野生型では見られない未スプライシング状態の長鎖葉緑体 rRNA が多く残存蓄積していることが明らかとなった。rRNA はタンパク質合成装置であるリボソーム複合体の集合に重要な働きをしており、続いて葉緑体内におけるタンパク質合成について解析を進めた結果、葉緑体ゲノムにコードされる遺伝子の中でも光合成に主要な機能を果たしているタンパク質 2 種、光合成反応で大気中の CO₂ を回路内に固定する重要な鍵ステ

ップの反応を担う RubisCo L タンパク質、光合成反応のエネルギー源を産生する光化学系反応の中心タンパク質である D1 タンパク質、について 2 種各々が野生型における Brz 処理でタンパク質蓄積が促進するものの、*bpgr2* 変異体ではそれらのタンパク質合成が約 10% 程度に低下した上、Brz によっても全く蓄積の促進が生じないことが明らかにされた。同時に行つた解析において、核ゲノムにコードされて転写翻訳後に葉緑体へ移行してくるタンパク質であり、光エネルギーを吸収するクロロフィルと結合する機能を持つ集光性クロロフィル結合性タンパク質 LHCP のタンパク質蓄積量も *bpgr2* 変異体において同程度に低下し、さらに Brz による蓄積の促進が生じないことも明らかになった。このことは、*BPG2* が、葉緑体ゲノム上からのタンパク質合成だけでなく、核から葉緑体へ移行してくるタンパク質の安定化もしくはフォールディングなどにも関与し、*BPG2* は植物における光合成制御により広く関わっている可能性を示唆しているのではないかと考えられた（図 5）⁹⁾。今後、この *BPG2* 高発現株作出の検証により、*BPG2* が高光合成活性植物、高収量植物、高バ

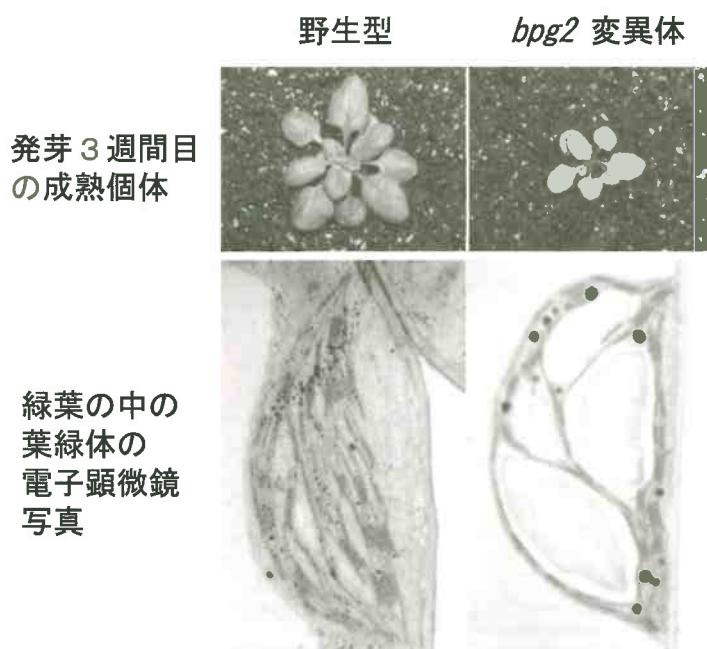


図 4 ブラシノステロイド生合成阻害剤非感受性低緑化変異体 *bpgr2* における緑化と葉形態
(上) と電子顕微鏡観察により明らかになった葉緑体構造の異常

イオマス植物などの作出への基盤遺伝子となる可能性を期待し、さらに機能解析を進めて行きたいと考えている。

6. 植物ケミカルバイオロジー研究の今後の展望

以上、プラシノステロイド情報伝達の分子機構について、プラシノステロイド生合成阻害剤 Brz の活用法の観点から整理し概説してきた。このように、ケミカルバイオロジーと遺伝学を組み合せる研究の生物材料として植物を用いることの利点は、植物の恒常性（ホメオスタシス）の高さも挙げられるかと思われる。つまり、哺乳類などに比べると、植物は 1 遺伝子の破壊による致死性率が低いと考えられている。プラシノステロイドの欠損変異体の中でシビアなものでは、成熟野生型株の数十分の 1 程度の大きさにしか成長出来ない相当な矮性形質になるが、

哺乳類において、それほどの矮性形質になっても成熟個体まで生育し、次世代以降の子孫を残す生殖能力を維持出来ていることは、まず見られないであろう。現在の植物遺伝子の研究に最も多く用いられている実験植物アラビドプシスは、和名シロイスナズナと呼ばれるナズナの一種であり、日本国内の道端にも見られる植物である。このシロイスナズナの強い生命力、語意と事実が偶然重なるかのような、この「雑草魂」も植物ケミカルバイオロジーの大変な利点だと筆者らは考えている。

また、植物ケミカルバイオロジー研究の今迄の成果の多くは実験植物アラビドプシスを用いた研究であるが、今後、植物ケミカルバイオロジー研究の重要性は基礎研究に留まらない可能性を秘めている。2008 年にアメリカの穀物企業であるセレス社は、理化学研究所の藤岡らと共に、プラシノステロイド生合成遺伝子 *DWF4* を緑化組織特異的プロモーター *AS* に接続したイ

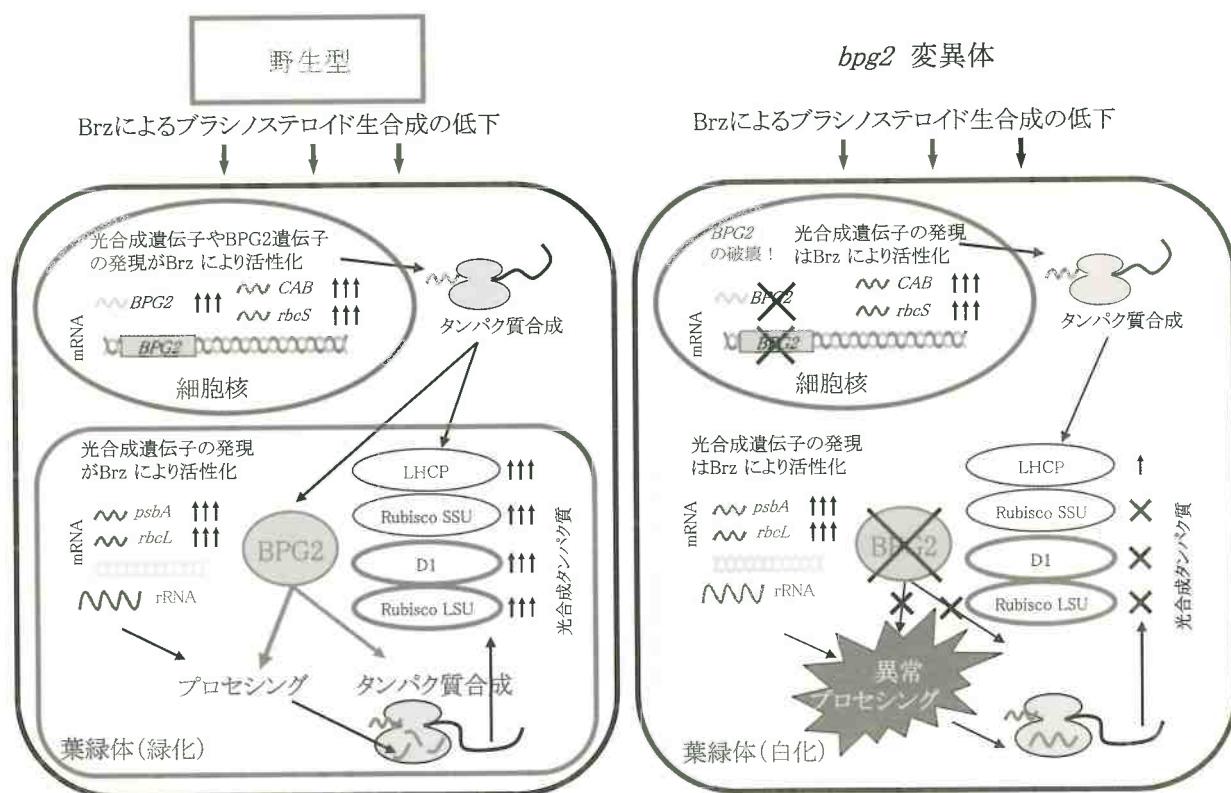


図 5 プラシノステロイド情報伝達因子 BPG2 の葉緑体制御における分子機構モデル

ネ形質転換体を作成した。この *DWF4* 高発現イネは、圃場における直植え栽培試験においても、1 植物当たりの花序の増加と種子粒数の増加、1 種子当たりの粒重量の増加をもたらし、最終的な 1 植物当たりのイネ種子収量が形質転換イネにおいて非形質転換イネに比べ 144%となる収量増、圃場面積当たりのイネ種子収量においても 158%への増収に成功している。緑葉の成長促進ももたらされ、種子を除く葉部重量が形質転換イネにおいて非形質転換イネに比べ 144%となるバイオマス増産にも成功している。これらは農業上の表現では、耕地面積当たり 58%の収量増、という表現となる驚くべきレベルの有用形質の付与に成功したことになる。¹⁰⁾

これらはブラシノステロイド生合成遺伝子によって行われた画期的な研究成果であるが、現在までに得られた遺伝子、今後得られてくる遺伝子を含めて Brz を用いたケミカルバイオロジー研究を機能解析の手掛かりにしてきたブラシノステロイド情報伝達関連遺伝子の応用も現在試行中である。同時に、現在、主に東京大学において、他の植物ホルモン生合成制御剤、植物ホルモン情報伝達制御剤の創製研究を進めている。これらの研究の中から、より良い穀物増産、より良いバイオマス増産に役立つ遺伝子や制御剤が得られることを期待したい。

謝 辞

本稿の内、筆者らの研究に関わる部分は、「生物系特定産業技術支援センター（PROBRAIN）」、「科学技術振興機構-さきがけ（JST-PRESTO）」の助成を受けてなされたものである。ここに深く感謝申し上げたい。

<引用文献>

- 1) Asami, T. et al. (1999) *Trends Plant Sci.*, 4, 348-353
- 2) Sekimata, K. et al. (2001) *Planta*, 213, 716-721
- 3) Sekimata, K. et al. (2002) *J. Agr. Food Chem.*, 50, 3486-3490
- 4) Asami, T. et al. (2004) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 91, 41-47
- 5) Wang, Z., Nakano, T. et al. (2002) *Dev. Cell*, 2, 505-513
- 6) Yin, Y. et al. (2002) *Cell*, 109, 181-191
- 7) 中野雄司、浅見忠男 (2004) 植物細胞工学別冊, 20, 176-186
- 8) Nagata, N. et al. (2000) *Planta*, 211, 781-790
- 9) Komatsu, T. et al. (2010) *Plant J.*, 61, 409-422
- 10) Wu, C. et al. (2008) *Plant Cell*, 20, 2130-2145

◀ 国内情報 ▶

無線センサネットワークによる 鶏健康監視システムの開発

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,

²独立行政法人 産業技術総合研究所, ³東京大学工学系研究科,

⁴茨城県畜産センター

塚本健司¹・鈴木耕太郎¹・多田達哉¹・岡田浩尚²・
梅田智広³・須藤正巳⁴・伊藤寿浩²

鶏の体温と運動量の変化を把握できる小型無線センサ(3g)を鶏に装着し、これを無線ネットワークと結ぶことによって、鶏舎で飼育されている多くの鶏の健康状態を、コンピューター上で日夜監視できるシステムが開発された。このシステムを利用すれば、病気を起こした鶏の鶏舎内の飼育位置はもちろん、鶏舎内での伝染病の広がりや、死亡鶏の病態変化の推移を1週間前に遡って再現することもできることから、大規模養鶏場で手薄となっている鶏の健康管理の向上や、養鶏場にとって最も驚異となる高病原性鳥インフルエンザの早期摘発に有用と期待されている。

1. はじめに

養鶏場の大規模化の流れは、平成に入っても続いている。全飼育羽数が1億4千万羽と変わらないのに、採卵養鶏場の戸数はH3年度に約10,100戸であったものが、H20年度には3,300戸に減少しており、この傾向は今後も続くと考えられる。養鶏場の大規模化は生産コストの削減につながる反面、1羽1羽の鶏の健康状態の把握を難しくする。飼育羽数の増加と労働者の減少が進んでも、鶏の健康状態を高いレベルで把握できるようにしなければならない。このような中で、2004年に79年ぶりに高病原性鳥インフルエンザが国内で発生し、本病が我々の生

TSUKAMOTO Kengi¹, SUZUKI Koutarou¹, TADA Tatsuya¹, OKADA Hironao², UMEDA Tomohiro³, SUDOU Masami⁴, ITOH Toshihiro²

¹〒305-0856 茨城県つくば市観音台3-1-5

²〒305-8564 茨城県つくば市並木1-2-1

³〒113-8658 東京都文京区弥生2-11-16
武田先端知ビル201号室

⁴〒315-0132 茨城県石岡市根小屋1234

活を脅かす身近な脅威であり、早期通報の重要性が浮き彫りになった。

センサネットワークは、道路交通網の監視、自動車の安全走行、地震予知などに利用され、大きな成果を上げている。我々はこの技術を畜生現場に利用するために、鶏用小型センサを開発し、鳥インフルエンザウイルスに感染した鶏の病態変化を日夜監視できるネットワークを構築したところ、発生農場の早期摘発が可能であることが明らかになった。

2. センサネットワークシステムの構成(伊藤寿浩 産総研)

図1はこの3年間で我々が開発したプロトタイプの小型無線センサと、鶏への装着方法、端末からのデータの受信の様子を示している³⁾。電池込みの重さ3gの無線センサ端末には、体温センサであるサーミスタと、3軸加速度センサが搭載されており、電波状態が良ければ半径20m程度の範囲内でデータの無線送信が可能である。この端末を保護用のプラスチックケース

に入れ、図に示すようにスポーツテープや翼章を利用して鶏に装着しているが、将来的には翼帯、或いは牛などに使用される耳標のように簡単に装着できることを目指している。連続使用

時間、受信端末数は、データの送信頻度により、例えば20秒に1回データを送信する場合には、連続使用時間は2-4週間程度であり、100個程度の端末からのデータの受信が可能である。

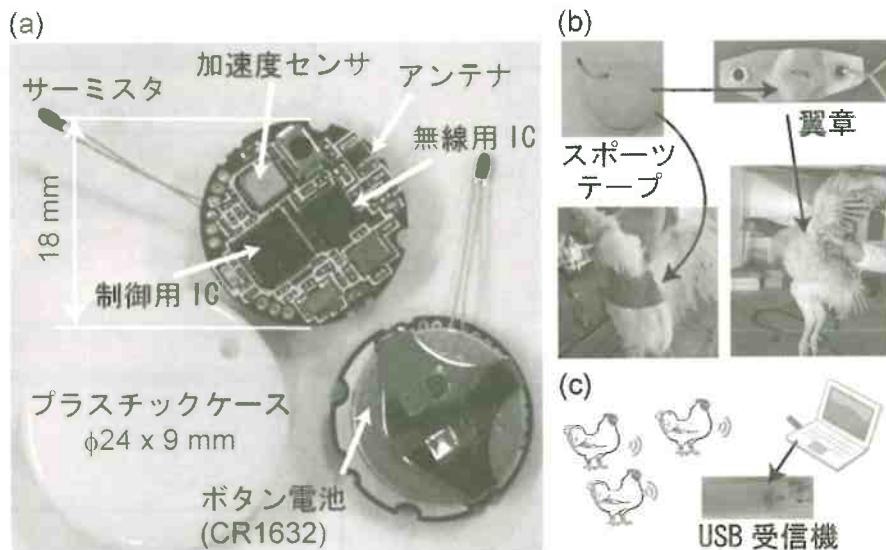


図1 (a)無線センサ端末 (b)鶏への装着方法、(c)受信の様子

3. 鳥インフルエンザ感染鶏の病態変化

(1) 病原性と病態変化の関係

(鈴木耕太郎 動衛研)

鳥インフルエンザウイルスは、鶏に感染させても症状、病変をほとんど示さない株から、死亡率が100%に至る株まであり、病原性的程度はウイルスの株によって大きく異なる。株毎の病原性と病態変化の関係をデータベース化するために、鶏に無線体温センサを装着し、病原性が異なる3株のウイルスを鶏にそれぞれ感染させた。その結果、発熱をほとんど伴わずに短時間で鶏を死亡させる山口株(図2a)、微熱後に鶏を死亡させる宮崎株(図2b)、高熱を伴い長時間かけて鶏を死亡させる横浜株(図2c)に分かれた⁴⁾。このことから、センサを使用することで、株毎の病原性的違いを客観的且つ正確に識別できることがわかった。

(2) 成鶏の病態変化 (鈴木耕太郎 動衛研)

農場で飼育されている鶏は雛よりも成鶏が多いことから、野外発生を早期に摘発するためには、成鶏の病態変化についても知る必要があった。感染実験の結果、ウイルスに感染した成鶏では、雛に比べて、高い発熱(図3a)、死亡時間の延長(図3b)、ウイルス増殖の低下、強い生体反応が観察された。また、成鶏の病変は雛と比べ基本的には強まるこどもわかつた。つまり、雛の場合には感染後早期に死亡するため症状、病変は出にくいが、成鶏の場合には、長時間をかけて死亡するため、症状、病変が顕在化する傾向があった。これらの知見は、野外での早期摘発に有益である。

(3) 病原性と伝播性の相関

(鈴木耕太郎 動衛研)

大規模養鶏場では、鶏が密集した状態で飼育されているため、ウイルスが鶏舎内に侵入すると急速に広がっていくが、伝播速度はウ

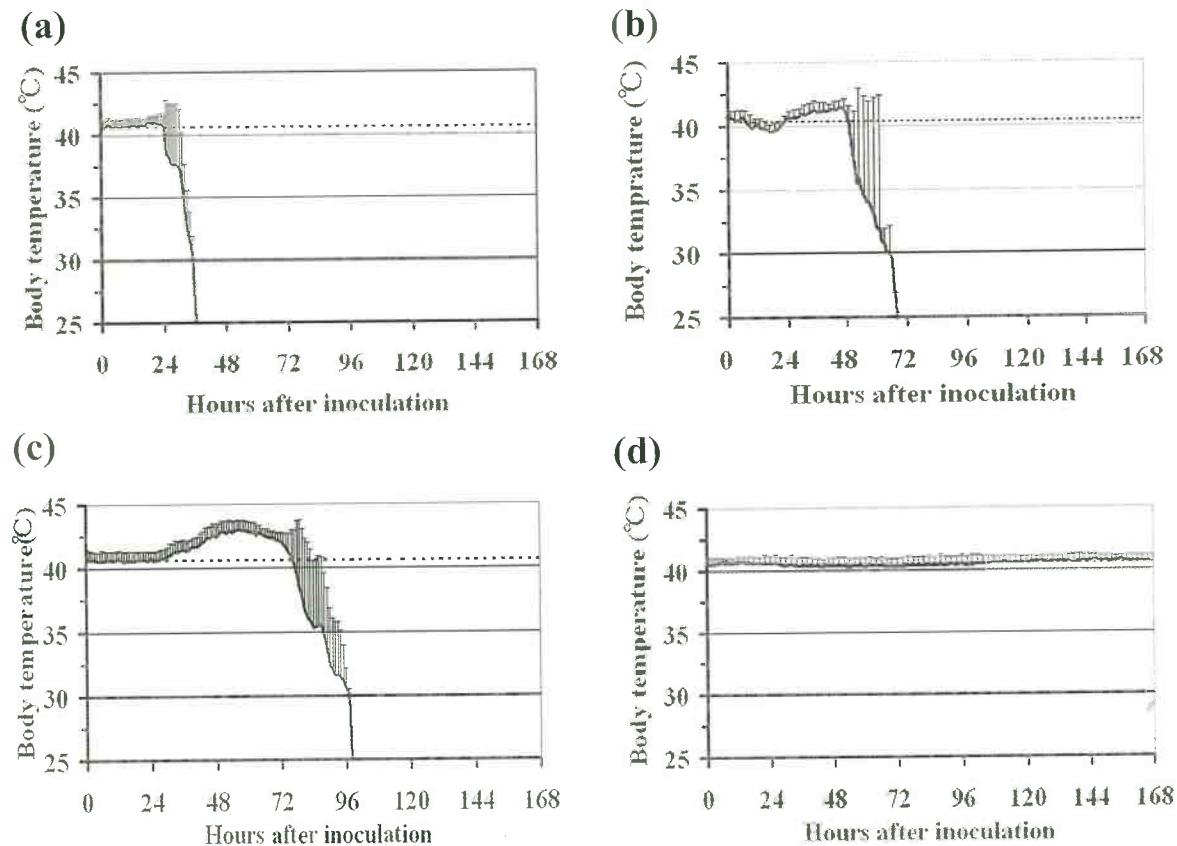


図2 ウィルス感染鶏の体温変動 (a)山口株,(b)宮崎株,(c)横浜株,(d)非感染鶏

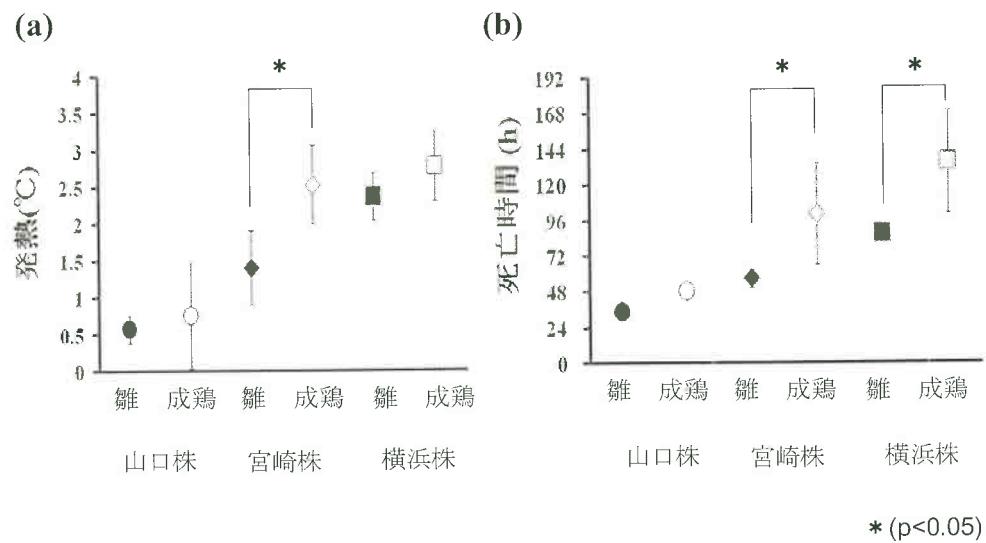


図3 ウィルス感染した雛と成鶏の発熱 (a), 死亡時間 (b) の比較

イルスの病原性によって異なることが想定された。そこで、センサを用いて、病原性が異なる3株の鳥インフルエンザウイルスを用いて鶏伝播性を比較した結果、ウイルスの伝播速度は株毎に異なり、病原性が強い株ほど伝播速度が速いことがわかった⁵⁾。18羽全ての鶏が死亡するのに要した時間は山口株で97時間、宮崎株で166時間、横浜株で376時間であった。この伝播実験成績は本病に感染した鶏の監視システムの確立に有用である。

(4) 運動量の減少（岡田浩尚 産総研）

図4は、鳥インフルエンザウイルスに感染した鶏の体温（赤線）と運動量（青点）の変化の推移を、病原性が異なる3株のウイルスについて調べた結果である。ウイルスに感染した鶏は、ウイルスの病原性の程度によって異なるパターンを示したが、どのウイルスに感染した場合でも、死亡の数時間から数十時間前から活動量の低下が共通して認められた³⁾。

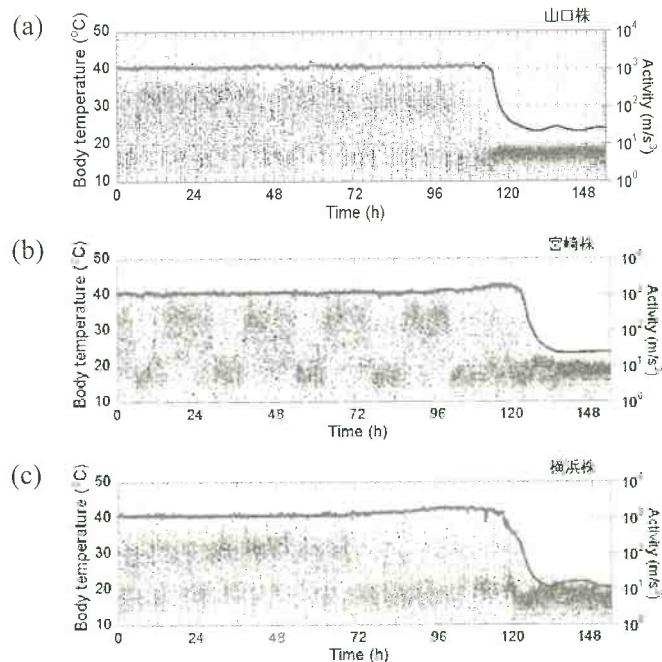


図4 体温（赤線）と活動量（青点）の変化 (a)山口株, (b)宮崎株, (c)横浜株

4. 農場監視プログラムの開発 (岡田浩尚 産総研)

この農場監視プログラムでは、図5に示すように、鶏舎単位でセンサを装着した鶏の情報がコンピューター画面で確認できるようになっており、センサを装着された個々の鶏の体温と活動量が、鶏の位置情報や鶏舎内の環境情報（室温、風向など）と共にリアルタイムで表示されるように設計されている。

「体温グラフ」の部分では、平熱は青線で、1度以上の発熱は長い赤線で表示され、「位置情報」の部分では、発熱を示す鶏や死亡鶏の位置を確認することができる。また、「個別体温履歴」の部分では、個々の異常鶏の体温履歴を1週間前に遡って表示でき、「体温履歴比較」を参照すれば、感染実験で得られた成績と比較することも可能である。このことによって、鳥インフルエンザウイルスの感染を疑うケースなのかの判断や、それが疑われた場

合にはウイルスの病原性の程度を推定することが可能と期待されている。さらに、本プログラムでは、感染が鶏舎の中で拡大する様子を過去に遡って再現することができ、利用価値は高い。

異常の判別は体温と活動量の2つの指標を用いて行われる。発熱や活動量の低下などが

通常とは異なる状態になることを異常と判断し、異常鶏と近接する数羽が同様の変遷を経て異常に至ったときには感染症が疑われ、警報が発せられる。本システムは、鳥インフルエンザの早期摘発に有用であると共に、多くの感染症の監視や、熱射病などの環境疾病対策にも利用できると期待されている。

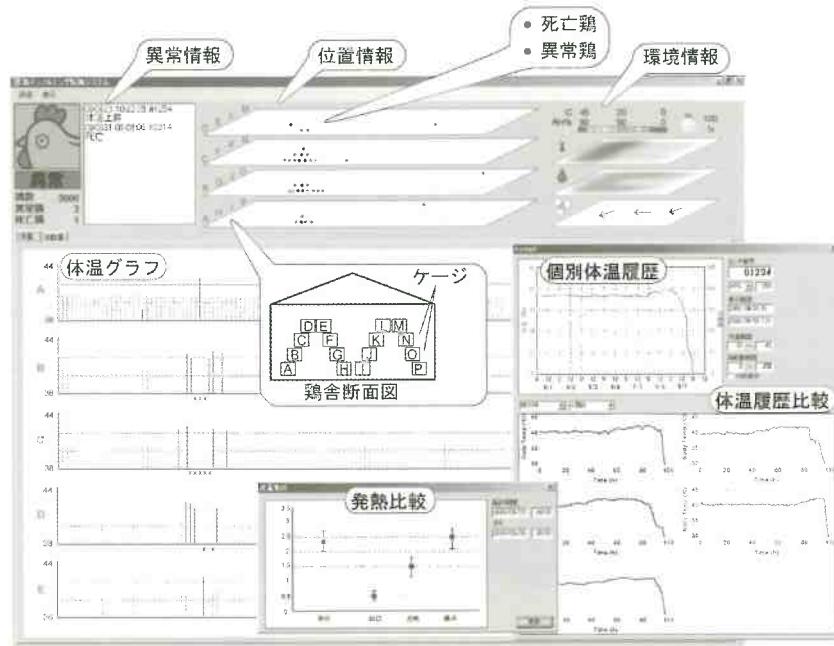


図5 農場監視プログラムの画面

5. 農場実証試験（須藤正巳 茨城県畜産センター）

茨城県畜産センターでは、開発中のセンサについて耐久性や稼働性の実証試験が行われている。先ず問題となったのは、多くの鶏にセンサを装着する方法を確立することであった。いろいろな方法が検討された結果、個体識別に用いる翼章を加工して、センサを上腕部に装着させれば、センサが脱落することではなく、体温と加速度を安定的に測定できることが解かり、現在この条件下でセンサの耐久性や稼働性の実証試験が行われている。

また当センターでは、新しい養鶏技術の開発を目指して、センサを用いた暑熱ストレスの対

策技術が研究されている。これまでに、夏場に鶏舎内の気温を低く維持するには、ミストの噴霧と送風機の併用が効果的であり、暑熱ストレスによる鶏の体温上昇と生産性低下を未然に防止できることが明らかになった。

6. 基礎研究における利用

(1) 鳥インフルエンザウイルスの病原性解析 (多田達哉 動衛研)

2004年以降、アジアを中心に流行が続いているH5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスは鶏に対して病原性が非常に高いことで知られており、パンデミックウイルスに変異する可能性も指摘されている。この高病

原性ウイルスの病原性に関与する遺伝子を特定できれば、遺伝子解析から病原性の推定が可能となると考えられる。小型無線センサを装着した鶏を用いた感染実験によって、感染後の体温変動や正確な死亡時間からウイルスの病原性の程度を正確に比較することができる(図6)。現在、動物衛生研究所では、センサを用いた、遺伝子改変した種々のウイルス

の病原性試験から、病原性の分子基盤の解明を進めており、これまでにNP遺伝子とPB2遺伝子が鶏病原性に関係することが明らかにされた⁶⁾。横浜株に山口株のPB2またはNP遺伝子を入れ変えたりアソータントウイルスの鶏病原性は、親株である横浜株よりも高く、鶏を短時間に死亡させることができた。

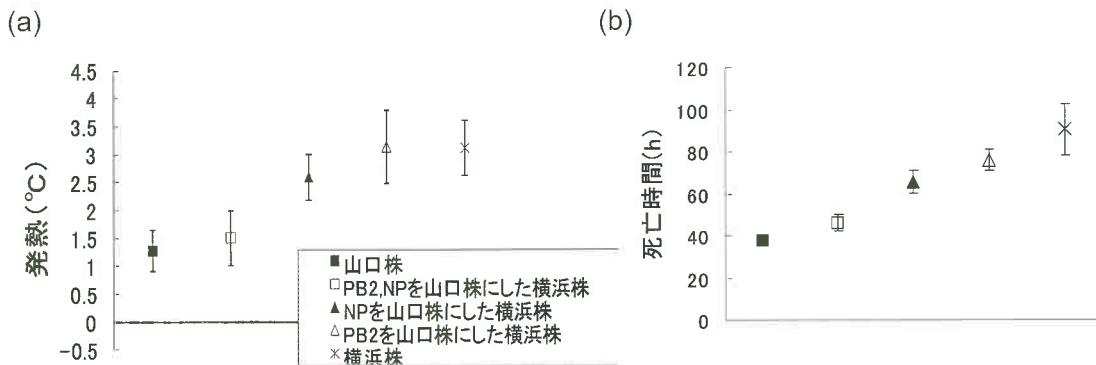


図6 リアソータントウイルスの鶏病原性の比較 (a)発熱 (b)死亡時間

(2) 鶏ストレスの研究

(梅田智広 東大工学部)

動物への過度なストレスは生育状態へ影響を及ぼし、疾患の発症、罹患率および死亡率の増加にも繋がることが知られており、そのメカニズムの解明、効果的な予防対策の構築が急務である。本研究では、最先端技術により作られた小型アニマルウォッチセンサを用いて、ストレスが鶏の生理動態に与える影響を、温度、活動量、自律神経系活動の変化を通して検証した。その結果、本センサを用いればバイタルサインの安定かつ連続的な計測が可能で、ストレス指標となる自律神経系の活動が、個体差が大きいものの、ストレスの補助的な指標として有用であることが確認された。本センサは生理動態への影響を非侵襲的かつ客観的に評価できる点で優れている。

7. 展望と課題 (伊藤寿浩 産総研)

研究プロジェクトでは、2011年度末に重量1g程度・末端寿命2年以上の翼帯型無線センサ末端を使った実用レベルの鶏健康モニタリングシステムを完成させることを目指している。そのため、デジタルMEMSセンサと呼んでいる新開発のセンサ等^{1, 7)}を組み込むとともに、イベントドリブン型と呼ばれる、測定対象から必要な入力があったときのみ動作し、通常は最低限の電力で待機する末端制御方法を導入することにより、超低消費化が可能になる²⁾。また、末端から送信される通信電文を最短にするとともに、設置後におおよその末端位置同定を可能にする受信システムの開発を行っている。

今回紹介したシステムは、鶏向けに開発しているものであるが、他の産業動物や愛玩動物の健康モニタリングへの応用も期待できる。特に愛玩動物はしばしば高齢者や障害者を精神的にも支える存在であり、その健康管理は、飼い主のQuality of lifeの維持・向上にとって重要である。さらに将来的には、広域をカバーする通信

システムを導入して、野生動物の健康をモニタリングできる自然環境保全分野にも取り組んでいきたいと考えている。

8. 終わりに

鳥インフルエンザの国内発生が発端となって、工学分野と動物衛生分野が連携して、現行よりも早期に鳥インフルエンザを摘発できる、動物用の小型センサネットワークが、世界に先駆けて開発されようとしている。最終的には、重さが1gで2年間稼働する安価なセンサが開発される見込みであり、ウイルスの病原性基盤の解明もさらに進むと期待されている。ユーザーの要望と工学分野の技術を融合させた新しい展開の下で、両分野が発展し、若手が育つことを経験できたことは幸いであった。

9. 謝辞

本プロジェクトは、文部科学省の戦略的創造研究推進事業 Crest によって進められている。本研究を支援して頂きました関係者にこの場をお借りして深謝致します。

10. 参考文献

- 1) Kobayashi, T. et al. (2008), *Proc. of Eurosensors XXII*, 1569-1572
- 2) Okada, H. et al. (2009), *Jpn. J. Appl. Phys.*, 48, 070222-1~070222-3
- 3) Okada, H. et al. (2009), *Proc. of IEEE Sensors 2009*, 1374-1377
- 4) Suzuki, K. et al. (2009), *J. Virol.*, 83:15, 7475-7486.
- 5) Suzuki, K. et al. *J. Gen. Virol.*, (投稿中)
- 6) Tada, T. et al. (投稿中)
- 7) Zhang, Y et al. (2009), *Dig. of 22nd Int. Microprocesses and Nanotechnol. Conf.*, 84-85

◀ 国内情報 ▶

揮発性静菌物質生産糸状菌による有害糸状菌の抑制

独立行政法人 農業環境技術研究所

小板橋 基夫

各種作物に病気を引き起こすうどんこ病菌の拮抗微生物を葉面微生物から選抜したところ、非常に強い発病抑制能力を有する菌株が選抜された。本菌の持つ発病抑制効果は、菌体から生産される二種類の揮発物質に由來した。両物質はペンテニルフルフラールとペンチルフルフラールと同定され、特にペンテニルフルフラールは新規の抗菌物質であった。本菌培養物を施設栽培のパセリに設置したところ、うどんこ病の発病を強く抑制した。

はじめに

従来より多くの病害において、拮抗微生物を用いた生物防除の研究が行われている。各種作物に発生して難防除となっているうどんこ病に対する生物防除試験例も多い。うどんこ病菌は生きた植物体の上でしか生育できないため、培地上における拮抗微生物の選抜が行えない。そのため、うどんこ病の生物防除の研究はうどんこ病菌に重複寄生する微生物を用いたものが主流となっている。うどんこ病菌類の生育する場所は葉面であるため、葉面の微生物による影響は他の病害に比べて大きいと考えられる。そこで、コムギ葉から分離された葉面微生物を用い、従来の方法とは異なる非接触型手法によりコムギうどんこ病菌に抑制的に働く菌株の選抜を行った。その結果、うどんこ病の発病を強く抑える糸状菌が選抜され、引き続いて、その抑制要因の解明、抑制作用のスペクトラム、抑制物質の分析、圃場における病害防除試験等の本菌を用いた一連の生物防除技術の開発試験を実施した。さらに本菌を用いた室内などの有害菌類の制御試験にも取り組んだ。

1. 拮抗微生物のスクリーニング

1989年から1991年の3年間に福岡県筑後市のコムギ圃場のコムギ葉面から分離された1848菌株から菌叢の異なる371の糸状菌と37の酵母、計408菌株を供試した。人工気象器中で育苗した播種8日後のコムギの子葉から、5~6cmの葉片を切って実験に供試した。湿らせたろ紙を敷いた直径9cmのペトリ皿に5枚の葉片の裏面を上にして並べ、うどんこ病に感染したコムギ葉を切り葉の上で激しく振って分生子を落下、付着させて接種を行った。その上からPDA培地に10日間培養したスクリーニングの対象菌株をかぶせ20°Cの室内に置き、10日後にうどんこ病の発病を調査した。その結果、接種10日後においてもうどんこ病菌の菌叢や分生子形成がほとんど認められない発病を強く抑える菌株が認められた（図1）。本菌の菌叢は白色で、菌体からは強い芳香性の香りが感じられた。本菌は隔壁のある菌糸体のみを形成し、種々の胞子形成誘引試験においても胞子形成が認められず、種の同定ができなかったため菌株名をKyu-W63とした。

KOITABASHI Motoo

〒305-8604 茨城県つくば市観音台3-1-3

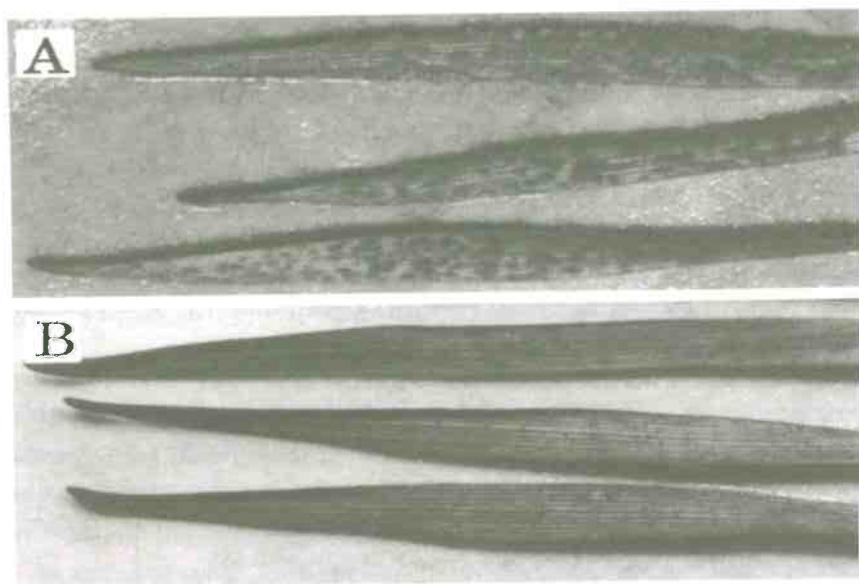


図1 コムギうどんこ病抑制菌株の選抜 A: 無処理 B: 菌処理

2. うどんこ病発病抑制要因の解析

本菌のうどんこ病発病抑制効果の要因を検討した。先のスクリーニング実験と同条件の試験で、菌叢と葉片の間に孔径 $0.5\text{ }\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターを挿入し、うどんこ病発病をみたが、完全に発病を抑制した。しかし、菌体とコムギ葉の間に活性炭を挿入したところ多量の菌叢と分生子の形成が認められた。培養30日後の臭気発生の認められなくなった本菌の古くなった菌叢では、うどんこ病は激しく発病し、抑制効果は認められなかった。以上の結果から、本菌のうどんこ病発病抑制には何等かの化学物質が関与していると考えられた。

次に、うどんこ病発病抑制効果がどの様な機作によって引き起こされるのかを知るために、うどんこ病菌の分生子の発芽の状態を顕微鏡下で調査したところ、本菌を処理すると胞子から伸張する付着器の形成が全く認められなかった。この結果から、うどんこ病菌の分生子の付着器形成が阻害されるためうどんこ病の発病が抑制されることが明らかになった。

3. GC-MSを用いたうどんこ病発病抑制物質の分析

本菌の生産するうどんこ病発病抑制物質についてGC-MSによる分析を行った。本菌を培養したペトリ皿を捕臭袋にいれ、袋内部のガスをガスサイトシリンジで採取しGCに注入した。その結果、リテンションタイム23分付近に試料由来と考えられる2つのピークが得られた。両物質の分子量は164および166と推測された(図2)。本菌の生産する抗菌物質を液体クロマトグラフィーで分収し、核磁気共鳴装置を用いた解析を行い、物質Aがペンテニルフルフラール、物質Bがペンチルフルフラールであることを明らかにした¹⁾。両物質は、Hayashiらにより担子菌の一種*Irpex lacteus*から抗線虫成分として抽出されているが、抗菌性については触れられていない²⁾。その後の解析により、両物質の抗菌活性特性やペンテニルフルフラールが新規の抗菌物質であることが明らかとなった。また、本菌はrRNA遺伝子のITS領域の解析から*Irpex lacteus*に近縁であると推測された。

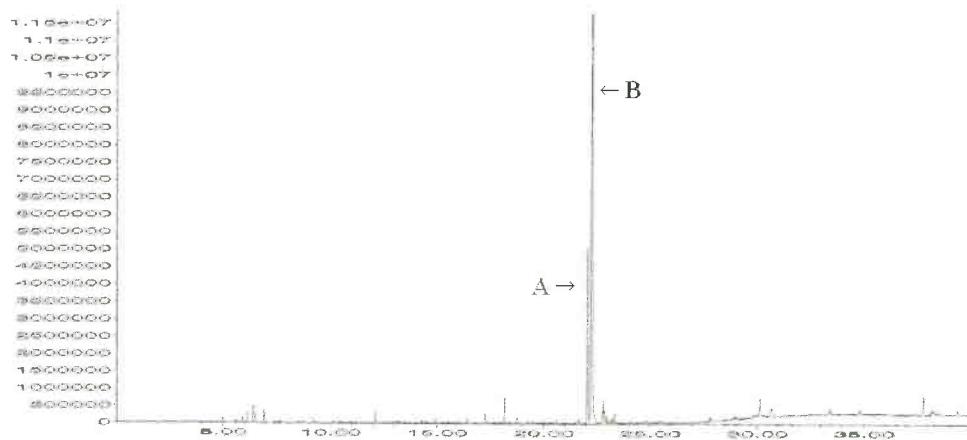


図2 抑制物質のヘッドスペースのガスクロマトグラム

(A: 分子量164, B: 分子量166)

4. 抑制菌株の植物病原菌に対する影響試験

本菌のうどんこ病菌に対する抑制効果が、他の植物病原菌にも有効であるかを調査した。PDA培地を流し込んだ9cmペトリ皿に、本菌の菌叢が全面を覆うまで生育させた後、直径4mmのコルクボーラーで打ち抜いたイネいもち病菌、イネ紋枯病菌、コムギ赤かび病菌、メロンつる割病菌、トマト灰色かび病菌、キュウリつる枯病菌、イチゴ炭疽病菌 (*Glomerella cingulata* および *Colletotrichum acutatum*) の8種類の病原菌を置床したペトリ皿に上からかぶせて密封し、25°Cの恒温器に置いて経時的に菌叢の直径を測定した。その結果、本菌は8種類の植物病原菌の培地上における生育も強く抑制した。全ての病原菌において、本菌のペトリ皿を除去した結果、菌糸の伸長が始まったことから、本菌の持つ抑制作用は殺菌的ではなく静菌的であり、その抗菌スペクトラムが幅広いことが明らかとなった。

5. パセリうどんこ病の圃場における防除効果

パセリのうどんこ病は登録農薬が少ないとや、抵抗性品種がないことから難防除病害となっている。本菌の持つ発病抑制効果は、菌体から生じる揮発性成分に含まれているため、施設内における防除に適していると考えられた。そこで、本菌を用いた野菜病害の生物防除法の開発を目的とし、施設内のパセリうどんこ病の防除試験を行った。

縦17m、横5.4mのパイプハウスに、パセリ苗を1997年9月29日に株間35cm、条間20cmで定植した。1998年4月3日にパセリうどんこ病の自然発生を確認したので4月10日に試験を開始した。本菌の処理法は100mlのPDA培地の入ったポリカーボネート製ポット (100×110×100mm) で本菌を7日間培養し、口を二重のガーゼで覆ったものを一畝の中央に30cm間隔に設置し、10日に一度交換した。パイプハウスの換気は慣行栽培と同様に昼は開放し、夜間には閉鎖した。

パセリうどんこ病は無処理区においては急速に蔓延したが本菌処理区では菌設置後7日目には明らかに発病が抑えられており(図3)，その効果は最終調査の5月1日まで継続した。本試験は三年間にわたって行い、いずれの年も本菌の処理効果が認められた³⁾。

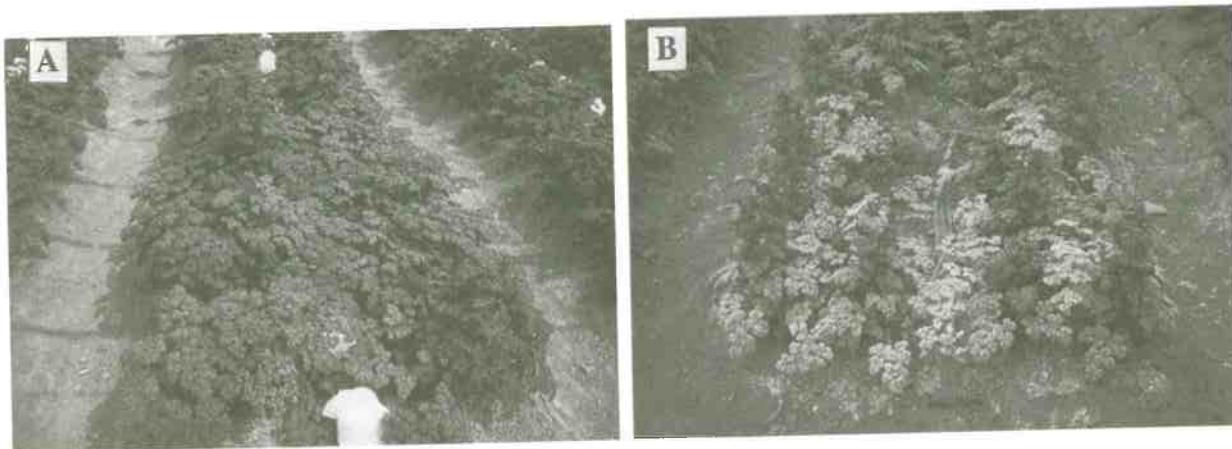


図3 パセリうどんこ病抑制効果 A: 菌処理 B:無処理

6. 環境リスク菌の制御

食生活や住環境において、カビ毒生産菌やアレルゲンとして有害糸状菌が環境リスク上問題となり、これら有害菌類の制御技術が求められている。本菌の生産する物質は揮発性であり、密封条件下では抗菌物質の散逸が起こらず、抗菌効果が高いことが推測される。そこで、本菌の環境リスク菌に対する抑制効果を調査した。PDA培地を流し込んだ9cmペトリ皿に本菌を4日間培養し、別のPDA平板の中心にバイ

オセーフティーレベル2の*Penicillium islandicum* (NBRC 5234), *Aspergillus fumigatus* (NBRC 31952), *A. restrictus* (NBRC 31385) および疊などの変色原因菌である*Wallemia sebi* (NBRC 32277)を置床したものにかぶせて密封し、25°Cの恒温器に置いて経時的に菌叢の直径を測定した。その結果、処理開始から本菌は4種類の環境リスク菌の培地上における生育を強く抑制し、その効果は10日以上継続した⁴⁾。ここでは、*A. fumigatus*の抑制効果についての写真(図4)を示した。

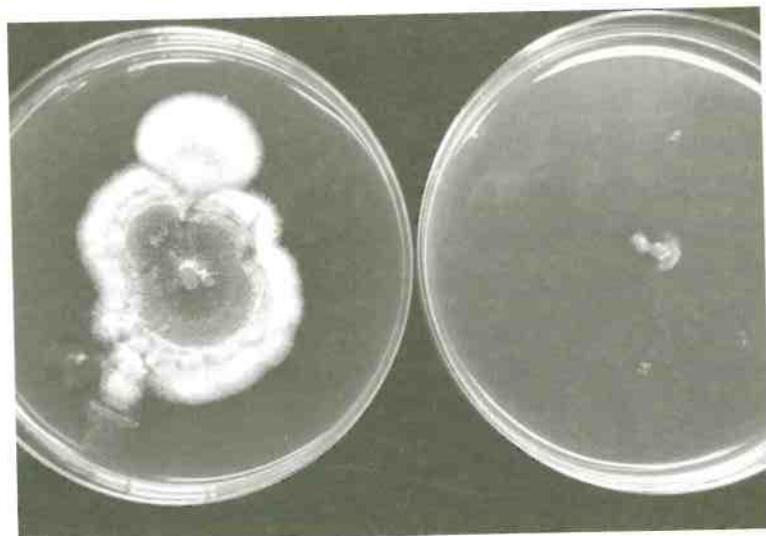


図4 *Aspergillus fumigatus* の生育抑制
左:無処理 右:菌処理

おわりに

このような、糸状菌の生産する揮発物質による病害の発病抑制や環境リスク菌抑制の報告は世界中においてもほとんど見受けられない。今回は紙面の都合上割愛したが、本菌はカンキツや野菜の貯蔵病害にも効果を示した⁵⁾。今後は、実際の圃場における簡便かつ効果的な本菌の施用法を検討し、本菌を用いた地上部病害の生物防除技術の開発やホームユースを目指した商品開発などの研究を進めていきたい。

引用文献

- 1) Koitabashi M. et al. (2004), *J. Gen. Plant. Pathol.* 70, 124-130
- 2) Hayashi M. et al. (1981), *Agric. Biol. Chem.* 45, 1527-1529
- 3) Koitabashi M. (2005), *J. Gen. Plant. Pathol.* 71, 280-284
- 4) Koitabashi, M. et al. (2007), *Japan Agricultural Research Quarterly* 41, 261-265
- 5) 小板橋基夫 (2009), 微生物と植物の相互作用－病害と生物防除－(百町満朗・対馬誠也編) 第一版, ポストハーベストの生物防除, 336-340, ソフトサイエンス社, 東京

◀ 国内情報 ▶

バイオマスを完全分解・糖化する 革新的微生物前処理技術に向けて

¹京都大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻 ,

²三重大学大学院 生物資源学科

植田充美¹・黒田浩一¹・三宅英雄²・田丸 浩²

合成生物学的革新技術であるアーミング技術とソフトバイオマスのセルロースやヘミセルロースを完全分解・糖化能力のあるセルロソームをもつ *Clostridium cellulovorans* のゲノムの完全解析は、シュガープラットフォームとフェノールプラットフォームの構築を推進し、これまでの石油におけるオイルリファイナリーに代わる新しいプラットフォームであるバイオリファイナリーのコアとなり、バイオマスの高度利用へのスキヤフォールド構築に大いに寄与していくであろう。

1. はじめに

1997年に採択された「京都議定書」では、歴史上初めて、地球規模で、国際的な目標として二酸化炭素の排出を抑制することが掲げられ、環境問題が国際化した。また、ポスト京都議定書の国際会議も始まり、国際的な環境問題は国や地球の存亡とも関連してきている。日本においては、2002年に策定された「バイオマス・ニッポン総合戦略」に基づき、化石資源への依存から脱却し、バイオマスの利活用によるバイオマスエネルギーの導入が掲げられ、2010年には、民主党政権により、「地球温暖化対策基本法案」も上程されている。世界では、太陽光、風力などの自然エネルギーの利用とともに、特に、バイオマスから作られるバイオエタノールは原油代替の内燃機関用液体燃料になることから、アメリカ、ブラジルをはじめ世界的に導入が進んでいる。ところが、アメリカではトウモロコシなど食糧と競合するバイオマスが主原料として用いられており、国際的な食糧価格の上昇を招

UEDA Mitsuyoshi¹, KURODA Kouichi¹,

MIYAKE Hideo², TAMARU Yutaka²

¹〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

²〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577

く要因となっている。そこで、このような食糧と競合する原料からバイオエタノールを生産する(第1世代バイオエタノール)のではなく、食糧と競合しないセルロース系バイオマスを原料としたバイオエタノール生産(第2世代バイオエタノール)を目標とした技術開発が急速に進展しつつある¹⁾。

2. 食糧とエネルギーの非競合共役増産

バイオエタノールの原料となるバイオマスは、穀物系バイオマスとセルロース系バイオマスの2種類に大きく分けることができる。穀物系バイオマスとして、糖質の原料である廃糖蜜やサトウキビ、スイートソルガム、てんさい、デンプン質の原料であるキャッサバ、トウモロコシ、サツマイモなどが挙げられる。糖質原料からのエタノール生産は前処理が容易であるため有利であるが、デンプン質原料では糖化が必要でありエタノール生産に要するエネルギーが大きくなる。しかし、穀物系バイオマスを原料とした場合、食糧との競合は避けられず、食糧増産と共にエタノール生産への技術転換が図られている。穀物系バイオマスの主要成分であるデンプンは、

アミロースとアミロペクチンの二つの高分子からなっている。これらの高分子は水素結合が少なく、熱、酸、塩基などによる攻撃を受けやすく、比較的容易にエタノールに変換することができる。酵母はデンプンを直接利用することができないため、醸造においては麹菌のアミラーゼを用いてデンプンをグルコースに変換し、得られたグルコースを酵母がエタノール発酵することになる。一方、世界で革新的合成生物学的先駆技術として高い評価を受けている細胞表層工学（アーミング技術、図1）^{2,3)}によって酵母の細胞表層に各種アミラーゼを提示し、可溶

性デンプンや低温蒸煮あるいは無蒸煮デンプンを直接資化しエタノール生産することができる新機能アーミング酵母の創製により^{4,5)}、デンプンから直接エタノール生産を行える新手法も発展してきている（図2）。これは、麹菌を併用した複数のプロセスを单一のプロセスとして行うことを可能にした。また、アミラーゼは細胞表層上に集積しているため、デンプン分解産物であるグルコースは生成後迅速に酵母内に取り込まれ、培地中のグルコース濃度は常に低濃度に維持される。したがって、雑菌汚染を未然に防ぐことができるといった利点を併せ持つ。

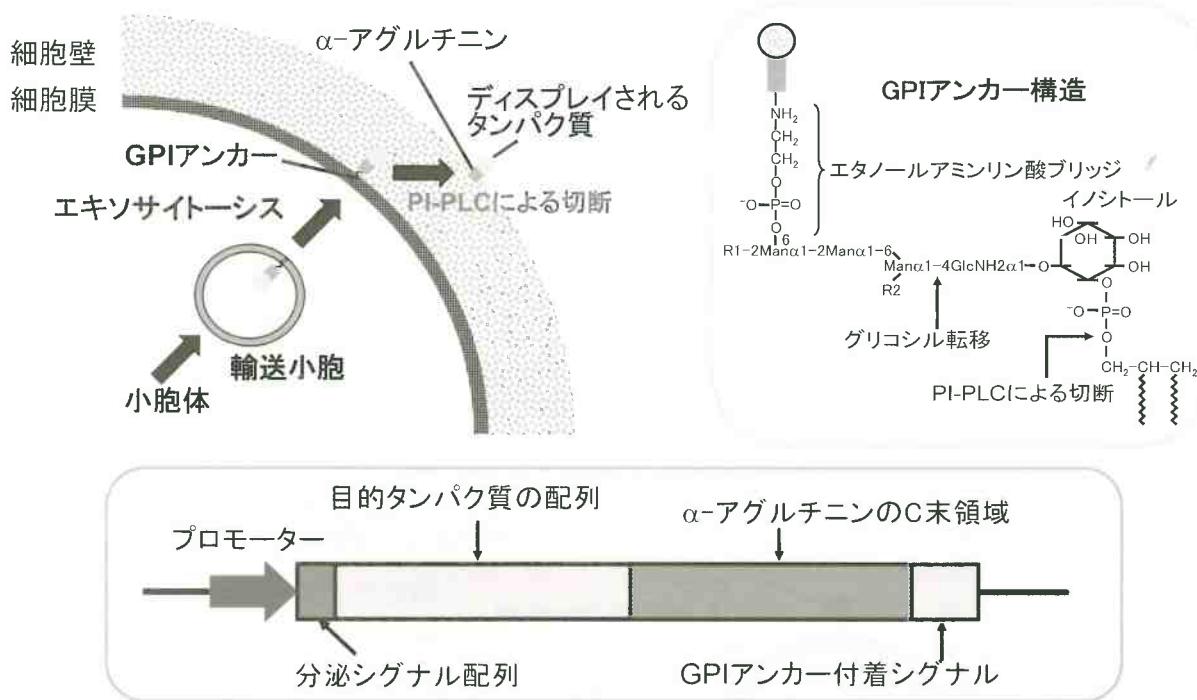


図1 細胞表層に目的の酵素などを提示した細胞触媒を創製する細胞表層工学（アーミング技術）

一方、セルロース系バイオマスのセルロースからのエタノール生産においては、まず、反応効率を低下させるリグニンを前処理でいかに除去するかが大きな課題として挙げられている。このセルロース系バイオマスの「前処理・糖化」法として、希硫酸法、アンモニア法、水酸化ナトリウム法、水熱処理法、機械的微粉砕法、イオン液体法や酵素添加処理法がある（図3）⁶⁾。これらの物理学的や化学的手法は、エネルギー

的にもコスト的にも、また、環境保全的にも、セルロース系バイオマスからのエタノール生産への道を遠くしている。なぜなら、セルロース系バイオマスを原料としたバイオエタノール生産を行う上で、大きく分けて2つの阻害要因が生じるからである。1つは糖化効率に対する阻害、もう1つは酵母の発酵速度に対する阻害である。パルプ製造時に見られる黒液に似たリグニン由来の物質は、セルラーゼなどの糖化酵素

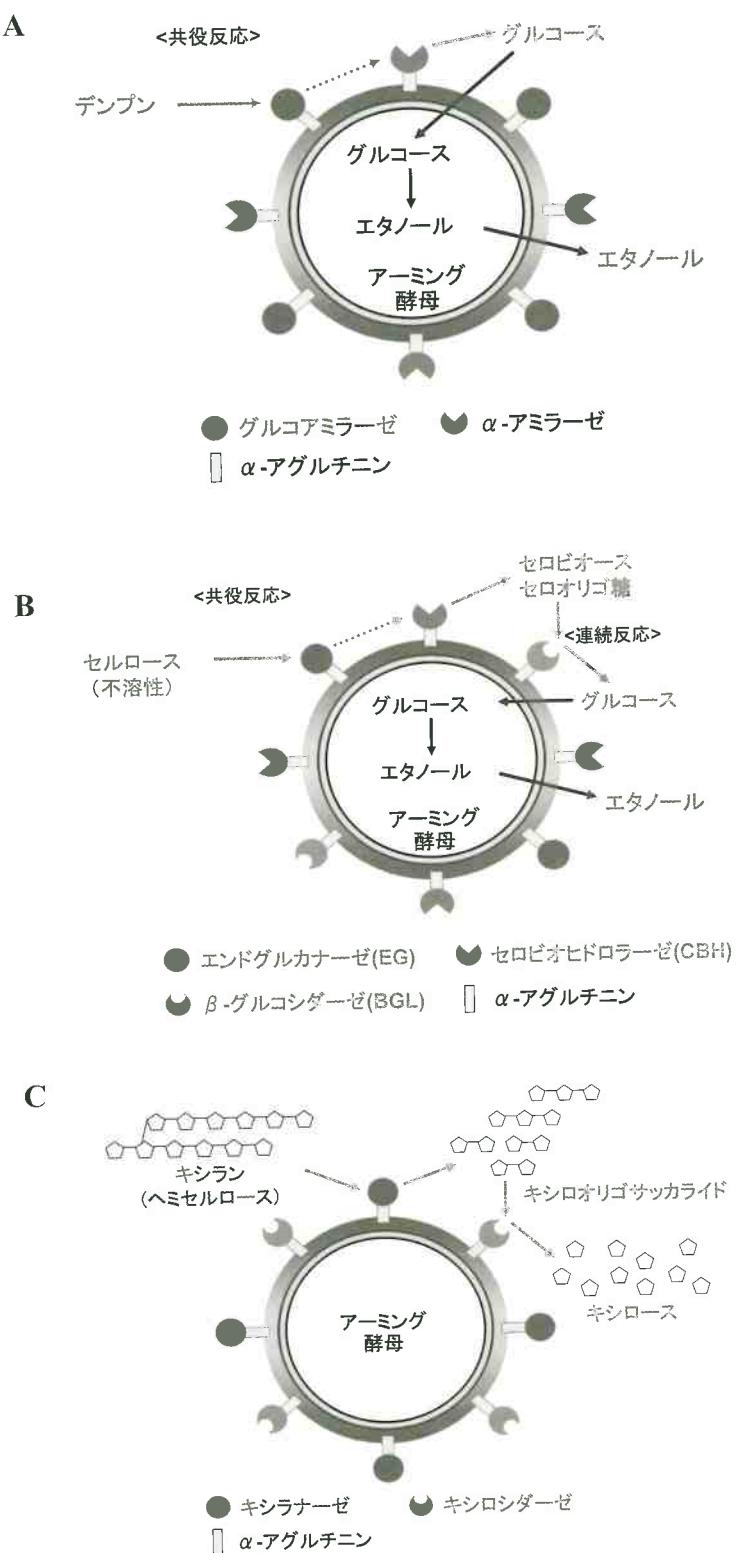


図2 アーミング酵母のモデル図

- A, デンプンからエタノールを直接生産するアーミング酵母；
 B, 3種のセルラーゼの細胞表層提示によるセルロースからエタノールを直接生産するアーミング酵母；C, キシラナーゼとキシロシダーゼ共発現細胞表層提示によるキシランからキシロースへの分解を触媒するアーミング酵母

を吸着してしまい糖化効率を低下させる。また、多糖は前処理において強酸性下で加熱処理すると、加水分解により生じた単糖がさらに過分解する。これらの過分解物質は発酵阻害の原因となる。さらに、重金属、ギ酸、酢酸、有機溶媒も発酵阻害物質として挙げられる。前処理後、セルロース系バイオマスから微生物によりエタノール生産を行う際、大きく分けてセルラーゼ・ヘミセルラーゼの生産、セルロース・ヘミセルロースの加水分解、6炭糖発酵、5炭糖発酵といった4つのバイオプロセスに分けることができる。エタノール生産プロセスに必要な上記のプロセスを1つの発酵槽にて同時に行うプロセスは、Consolidated bioprocessing (CBP)と呼ばれている(図4)⁷⁾。現行のエタノール発酵プロセスでは、並行複発酵 (Simultaneous saccharification and co-fermentation; SSCF)が中心となっているが、これはバイオマスの糖化と発酵という2つのプロセスが、並行して進行していく方法である。伝統的な日本酒の醸造がまさにSSCFの代表例であり、麹菌のアミラーゼによる糖化反応と清酒酵母のエタノール発酵が同時並行する。しかし製造コストを考え、プロセス全体をより簡便なものにしていくためには、CBPのような1つの発酵槽にて生産可能なプロセスが望ましい。SSCFでは酵素生産のためのプロセスが別個に必要であるのに対し、CBPでは酵素生産も同時にを行うため、より効率的なエタノール生産が期待できるとともに、発酵槽自体の大きさもより小さくすることができるので、設備コストの面で有利となる。このようなCBPプロセス

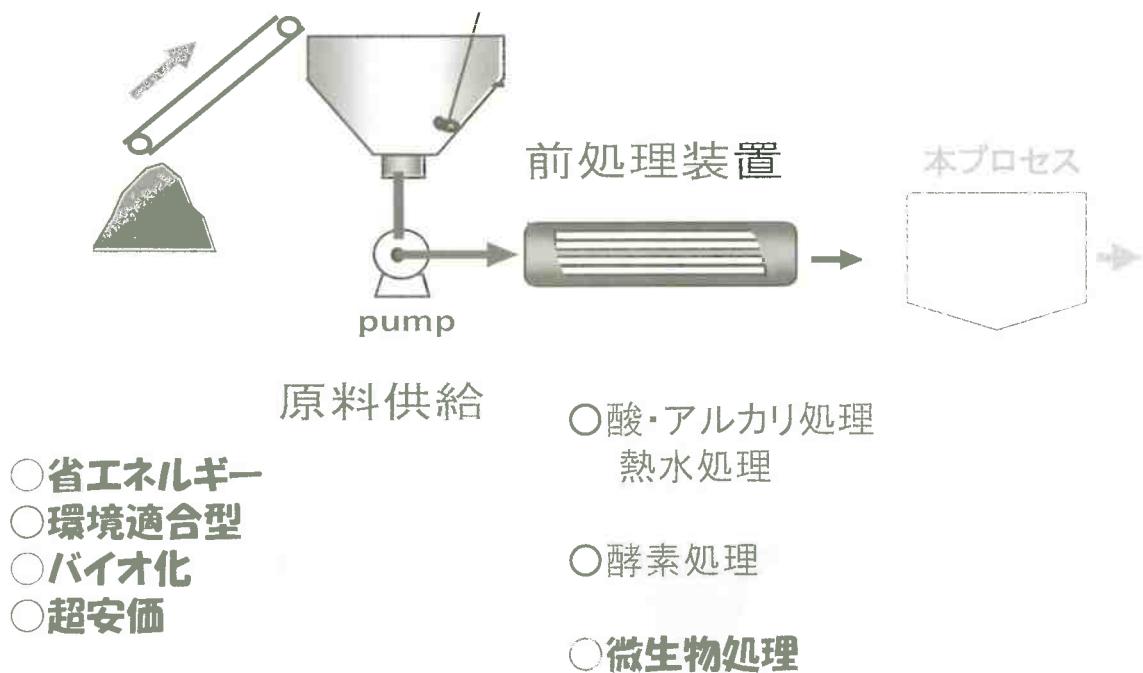


図3 セルロース系バイオマスの前処理操作法

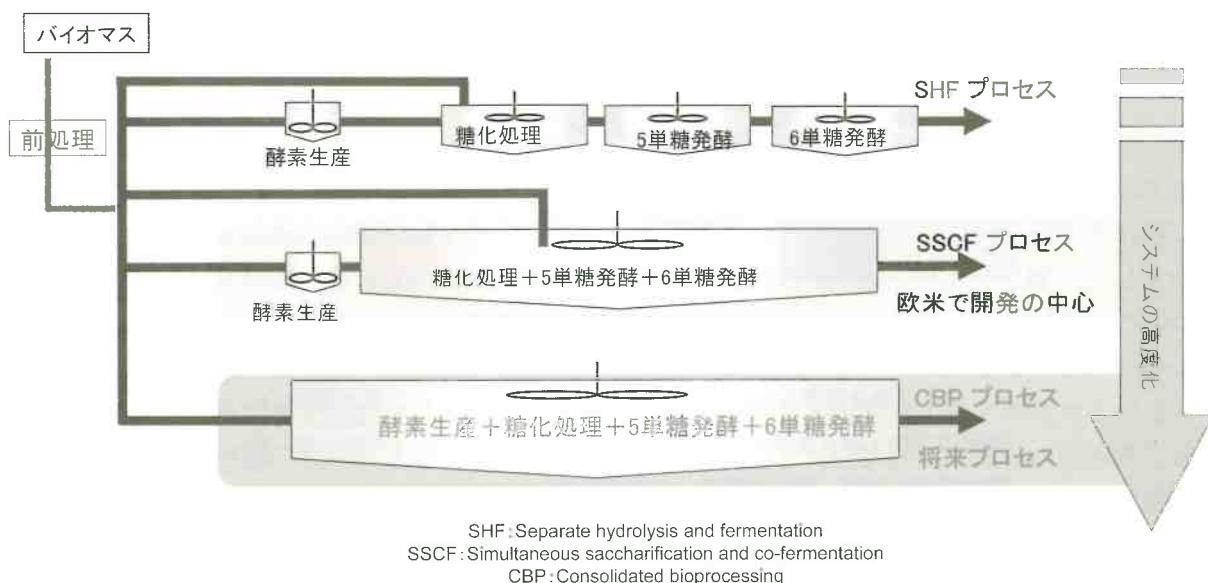


図4 Consolidated bioprocessing (CBP)へのシステムの高度化

を実現するためには、糖化反応に必要な酵素群の生産、さらに糖化により得られる様々な糖類の発酵を1つの微生物にて行うことが求められる(図2)。酵母は糖類のエタノール発酵を行うことができるが、バイオマスの糖化反応を行う

ことができないため、前述のアーミング技術を用いて、CBP微生物として酵母に糖化能を付与する合成生物学的手法が実用的技術として確立した(図2)⁸⁻¹¹⁾。

ところで、自然環境下では、「前処理」として

白色腐朽菌によるリグニン分解が行われているが、その速度は非常に遅いため、実用化には至っていないのが現状である。そこで、リグニン分解に関わる酵素群であるラッカーゼやリグニンペルオキシダーゼやマンガンペルオキシダーゼなど白色腐朽菌の有用機能酵素を、培養が簡便で既に様々な産業利用がなされている酵母に導入することによって、バイオエタノール生産の効率向上の試みが始まっている¹²⁾。リグニンはセルロース、ヘミセルロースといったエタノール生産の原料となる多糖を覆い、糖化酵素の反応性を低下させる。そのため、セルロース系バイオマスからエタノール生産を行う際、糖化に必要なセルラーゼ、ヘミセルラーゼといった酵素だけでなく、リグニンの除去も重要な課題なのである。

3. バイオマスの完全糖化が可能な、世界が注目する微生物ゲノムの完全解読の成功とそのシステムの合成生物学的創製に向けて

セルロース系バイオマスの前処理として、これまでの物理的・化学的手法のうち、酵素処理法が現在の主流の技術であるが、これに、勝るものとして、「微生物前処理法」が注目を集め始めている。これは、セルロース系バイオマスのセルロースやヘミセルロースを完全分解・糖化するというエネルギー・コスト・環境保全の面から「未来型の革新的前処理法」として世界からの期待が大きい。自然界では、*Clostridium* 属微生物群がバイオマス分解の最前線で活動しており、アメリカエネルギー庁（DOE）もこの微生物群すべてのゲノム完全解析制覇を目指んで国家プロジェクトを着々と進めている。*Clostridium* 属微生物群は、その多くは、細胞表層に木材チップなどを直接分解できる各種セルラーゼ・ヘミセルラーゼの超複合体であるセルロソームを生産し（図5）、そのセルロソームには、これまで述べてきた複雑で化学連携するすべての酵素群を操作することなく、ほとんどす

べてが内在し、その微生物がバイオマスを分解して生育するための前処理をしているのである。この素晴らしい自然の、そして生物の叡智に注目すべき時はきており、アメリカはその先頭を駆け始めている。

我々は、このセルロソームにおいて、もっとも進化した型、すなわち、ソフトバイオマスのセルロースやヘミセルロースの完全分解・糖化能力のあるセルロソームをもつ *Clostridium cellulovorans* のゲノムの完全解析を、この微生物の専門家であるアメリカ・カリフォルニア大学デービス校の R. H. Doi 教授の支援と、さらに、住友商事の資金援助をうけて、アメリカに先駆けて完成させた^{13), 14)}。この成果により、ソフトバイオマスの完全分解・糖化能力のあるセルロソームの全貌を世界で初めて明らかにするとともに（図5）、特許化にも成功した。この過程において、前述のアーミング技術と共に役させて、多くの重要な遺伝子群とその機能を自在に操作できるようになった。実際この微生物を用いることにより、まだ予備的ではあるが、いわゆる、革新的微生物前処理法として、稲わらや古紙を裁断したものをこの微生物と混ぜて貯留するだけで、完全分解・糖化できることを実証した（図5）。この *Clostridium cellulovorans* および、そのゲノム解析から合成生物学的につくられるアーミング細胞による前処理法は、石油に替わってセルロースからエネルギーだけでなく現在の化成品のすべてを産出する井戸を掘り当てたも同然であり、セルロースの前処理法として、エネルギー・コスト・環境に負担をかけない点からも革新的な手法であり、今後の支援体制いかんでは、アメリカの国家プロジェクトの先を越した世界に冠たる国産エネルギー源開発の先端技術となる。

4. 低炭素社会の新しいプラットフォーム：シュガープラットフォームとフェノールプラットフォームの形成

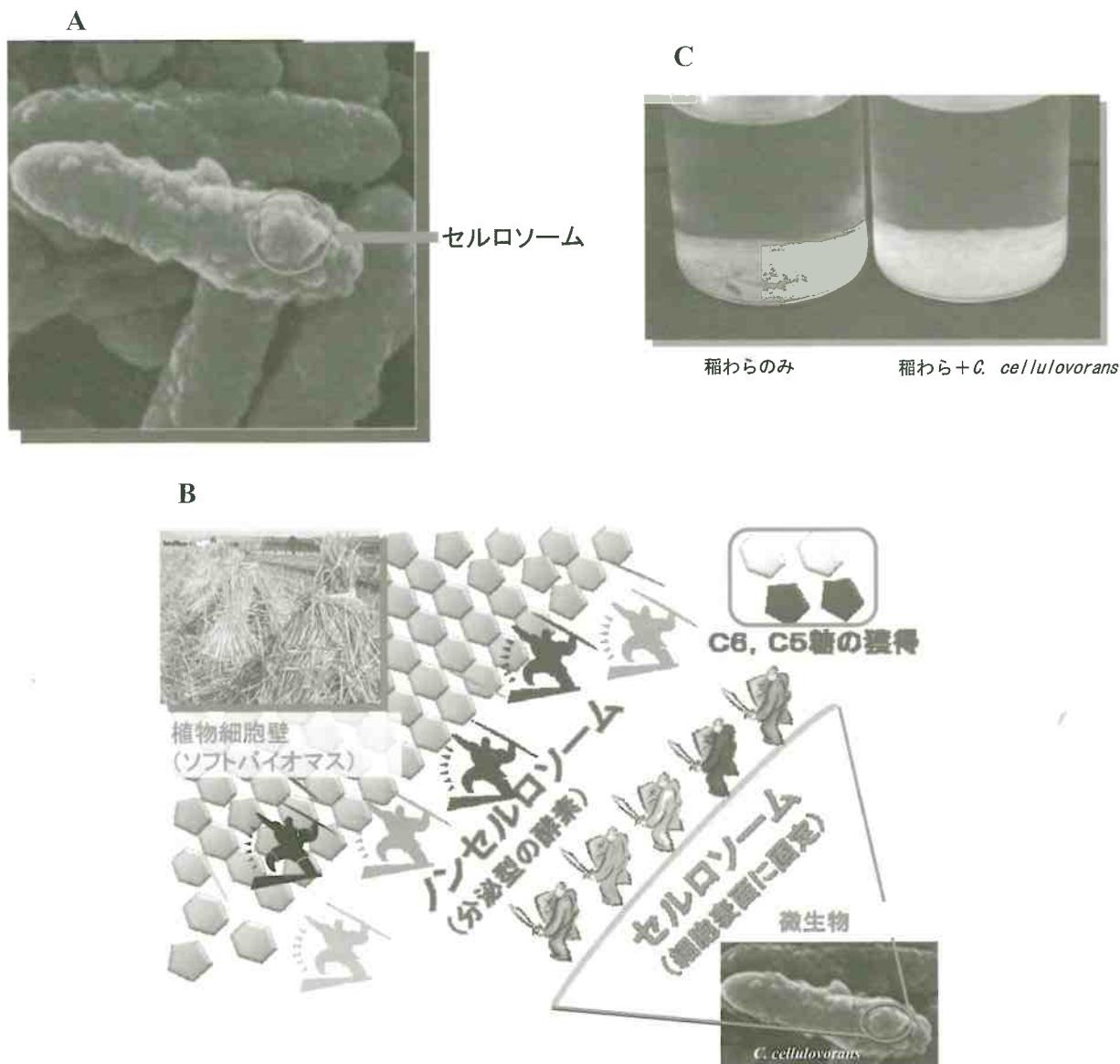


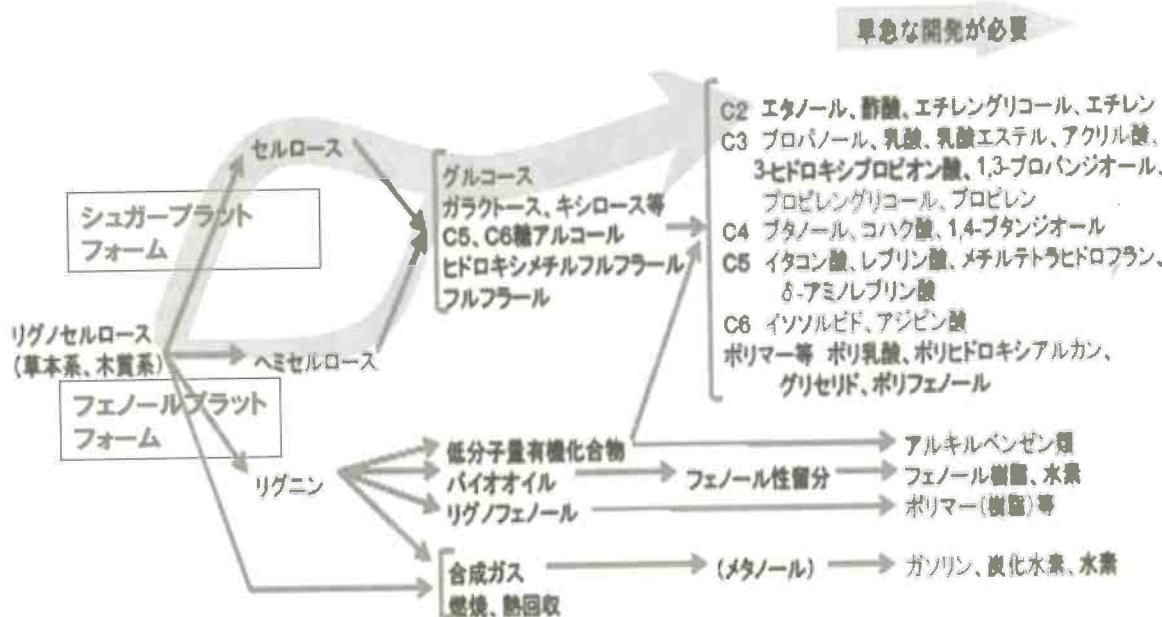
図5 *Clostridium cellulovorans* の セルロソームの機能
A, 細胞表層にみられるセルロース分解超タンパク質複合体セルロソーム
B, *Clostridium cellulovorans* のソフトバイオマス完全分解・糖化の戦略
C, *Clostridium cellulovorans* による稲わらの完全分解・糖化の実証実験

セルロースバイオマスのエタノールへの変換の最先端 CBP プロセスを実現するためには 1 つの細胞にて多段階の反応を進行させる細胞の分子育種としての細胞表層工学（アーミング技術）による各種酵素の細胞表層提示は、CBP 微生物の構築において有用なストラテジーとなっている。セルロース分解には用いる酵素種の組み合わせや、その量比が相乗的な分解効率に大きく影響すると考えられる。そのため、今後さ

らに効率的なエタノール生産システムを構築していくためには、細胞表層提示する酵素群の組み合わせやその相乗共役効果を最適化していくことが必要である。セルロース系バイオマスのセルロースやヘミセルロースなどからの直接エタノール生産において、前述のアーミング技術によるリグニンの除去と有効利用、さらに、細胞表層に木材チップなどを直接分解できる各種セルラーゼ・ヘミセルラーゼの超複合体である

セルロソームを生産させ、そのセルロソームを基盤にした「微生物前処理法」は、今後、化石燃料からバイオマスへの社会・産業構造の大転換への新しいプラットフォーム構築に、重要な貢献をしていくことであろう(図6)。これにより、グルコースやキシロースを基盤としたシュガープラットフォームとリグニンの分解によるフェノールを基盤としたフェノールプラットフォームの構築は、これまでの石油における、いわゆるオイルリファイナリーに代わる新しいプ

ラットフォームであるバイオリファイナリーのコアとなる。その意味で、合成生物学的革新技術であるアーミング技術とソフトバイオマスのセルロースやヘミセルロースを完全分解・糖化能力のあるセルロソームをもつ *Clostridium cellulovorans* のゲノムの完全解析は、メイドインジャパンの技術として日本再生復活の推進力となり、さらに、その先にある木質(ハード)バイオマスの利用への大きなスキヤフォールド構築に寄与していくであろう。



出典:バイオ燃料技術革新協議会資料より

図6 石油に代わるバイオマスからの新しいシュガーとフェノールプラットホームの形成

文 献

- 1) 植田充美ら (2009), 第二世代バイオ燃料の開発と応用展開, シーエムシー出版, 東京
- 2) Murai, T. et al. (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 1362-1366
- 3) Murai, T. et al. (1999), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 65-70
- 4) Ueda, M. et al. (2004), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 28-40
- 5) Shigechi, H. et al. (2004), *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 5037-5040

- 6) 植田充美ら (2010), セルロース系バイオエタノール製造技術—食料クライシス回避のためにー, (株)エヌ・ティー・エス, 東京
- 7) Lynd, L. R. et al. (2005), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16, 577-583
- 8) Murai, T. et al. (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 4857-4861
- 9) Fujita, Y. et al. (2004), *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 1207-1212
- 10) Katahira, S. et al. (2004), *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 5407-5414
- 11) Katahira, S. et al. (2006), *Appl. Microbiol.*

- Biotechnol.*, 72, 1136-1143
- 12) 中西昭仁ら (2008), 微生物によるものづくり一化学法に代わるホワイトバイオテクノロジーの全てー, 288-294, シーエムシー出版, 東京
- 13) Tamaru, Y. et al. (2010), *J. Bacteriol.*, 192, 901-902
- 14) 植田充美ら (2010), 配管技術, 日本工業出版(株), 印刷中

◀ 国内情報 ▶

イオンビーム照射による芳香シクラメンの花色変異体の作出

埼玉県農林総合研究センター 園芸研究所

近藤恵美子・亀有直子・石坂 宏

埼玉県ではシクラメン園芸品種 (*Cyclamen persicum*) と芳香性野生種 (*C.purpurascens*) の種間交雑により芳香シクラメンを育成した。これらの芳香シクラメンの中からマルビジン 3,5-ジグルコサイドを主要色素とする‘香りの舞い’にイオンビームを照射し、M₂集団から赤紫色の変異体を選抜した。この変異体の主要色素はデルフィニジン 3,5-ジグルコサイドであった。これまでシクラメン属植物にはデルフィニジン系色素は見いだされておらず、新品種となり得ると共にシクラメン育種の貴重な遺伝資源となる。

1. はじめに

現在市販されているシクラメンの園芸品種は、1700年頃に原種 (*Cyclamen persicum*) が西ヨーロッパに導入されて以来、自然突然変異の選抜と変異体間の交配により発達してきた¹⁾。原種は二倍体 ($2n=2x=48$) であるが、園芸品種には二倍体の他に同質四倍体 ($2n=4x=96$) がある。これらは *C.persicum* のみに由来し、花の香りは決して良いとはいえない。そこで、埼玉県農林総合研究センター（埼玉農総研）は二倍体園芸品種と香りの良い二倍体の野生種 (*C.purpurascens*, $2n=2x=34$) を交配し、胚珠培養とコルヒチン処理を経てバラ、スズラン、ヒアシンスの様な香りを持つ異質四倍体 ($2n=4x=82$) の芳香シクラメンを育成した^{2,3,4)}。現在までに‘麗しの香り’、‘孤高の香り’、‘香りの舞い’の3品種(図1)の品種登録が完了し、埼玉県内の農家により生産・販売されている。

以上のように、芳香シクラメンは園芸品種に比較して香りの質は改善されたが、花の色が紫とピンクに限られている。そこで花色のバラエティーを広げて商業価値を高めるために、突然

KONDO Emiko, KAMEARI Naoko, ISHIZAKA Hiroshi
〒346-0037 埼玉県久喜市六万部 91

変異育種を試みた。

突然変異育種ではガンマ線、エックス線および化学物質が用いられ、成果を上げてきた。近年、イオンビームはその変異スペクトルの広さと、少数の点突然変異を誘発することから、新しい遺伝資源の創出に有用であることが明らかにされるようになった^{5,6)}。そこで、埼玉農総研と日本原子力研究開発機構(原子力機構)は、芳香シクラメン（‘孤高の香り’、‘麗しの香り’、‘香りの舞い’）にイオンビームを照射し、新規の花色をもつ突然変異体の育成を目指し、平成14年から共同研究を開始した。ここでは、‘香りの舞い’へのイオンビーム照射とそこから得られた変異体の特徴について概要を説明する。

2. 期待される効果

‘香りの舞い’の花色は紫で、色素はマルビジン 3,5-ジグルコサイドであることが明らかになっている。この結果と既知のアントシアニン生合成経路から、‘香りの舞い’の花弁細胞では図2に示すような生合成が行われていると考えられる。アントシアニン生合成経路は、フェニルアラニンからカルコンまでの経路とカルコンからマルビジン 3,5-ジグルコサイドまでの経

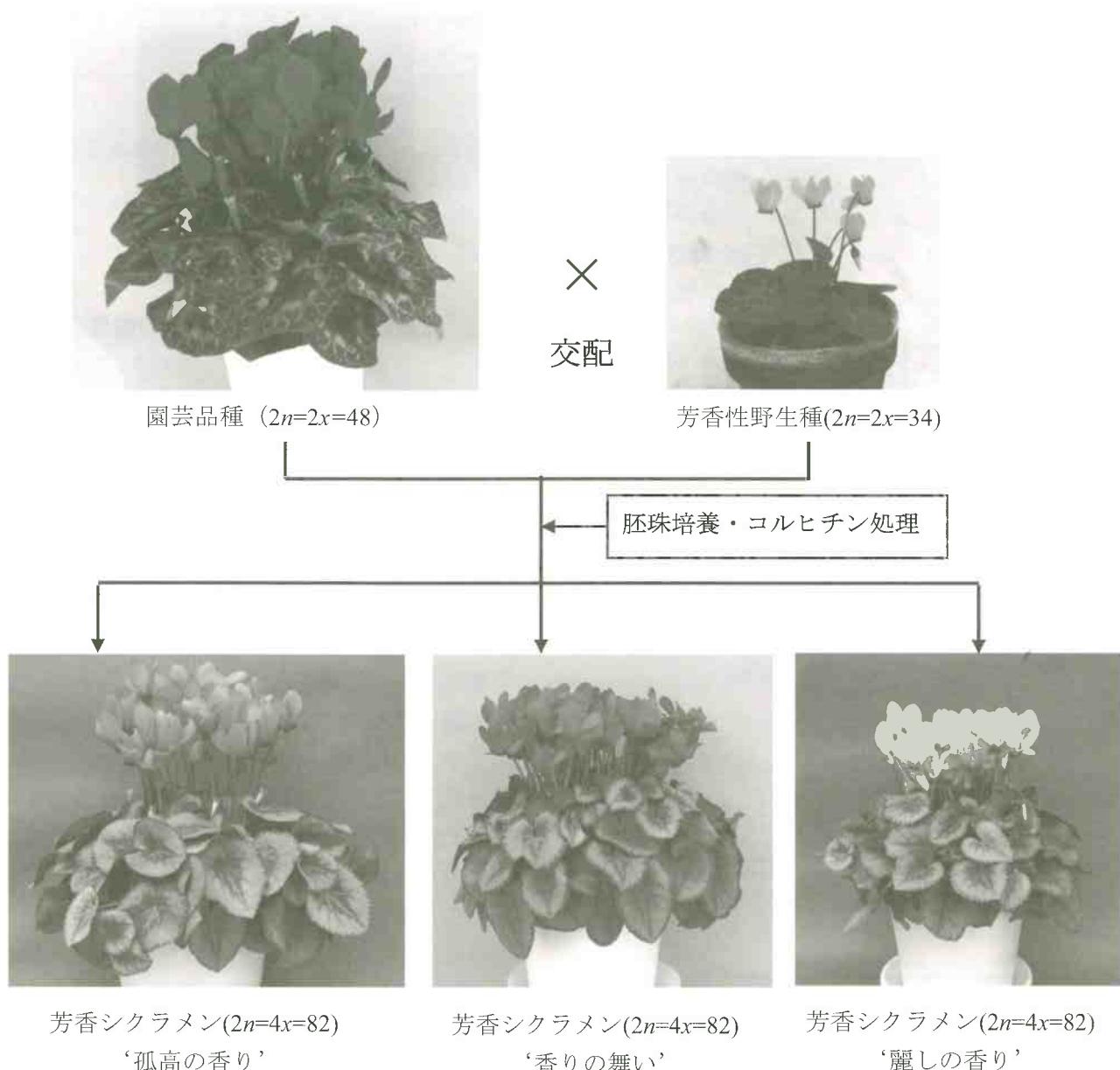


図1 園芸品種と芳香性野生種の交配による芳香シクラメンの育成

路に分けられ、花色の発現に影響する中間代謝産物は後者の生合成経路に多く存在する。後者の生合成経路には9段階の酵素反応があり、それぞれの酵素は遺伝子の制御を受けている。ここで、イオンビーム照射により酵素遺伝子を破壊し、生合成を途中で止めることができれば中間代謝産物が蓄積し、花色を変えることができると考えられる。CHIをコードする遺伝子を破壊できれば、カルコンが蓄積した黄色花が期待できる。また、MT₁をコードする遺伝子を破壊できれば、デルフィニジンが蓄積した青色花が

期待できる。

3. イオンビーム照射方法と得られた変異体の特徴

‘香りの舞い’の種子を無菌的に培地上には種し、暗黒で培養を行うことによりもやし状に伸長した黄化葉柄を育成した。黄化葉柄は3mm程度の長さに切断し、プラスチックシャーレに置床してカプトン膜で覆った。1,647の葉片を培地上に置き、原子力機構高崎量子応用研究

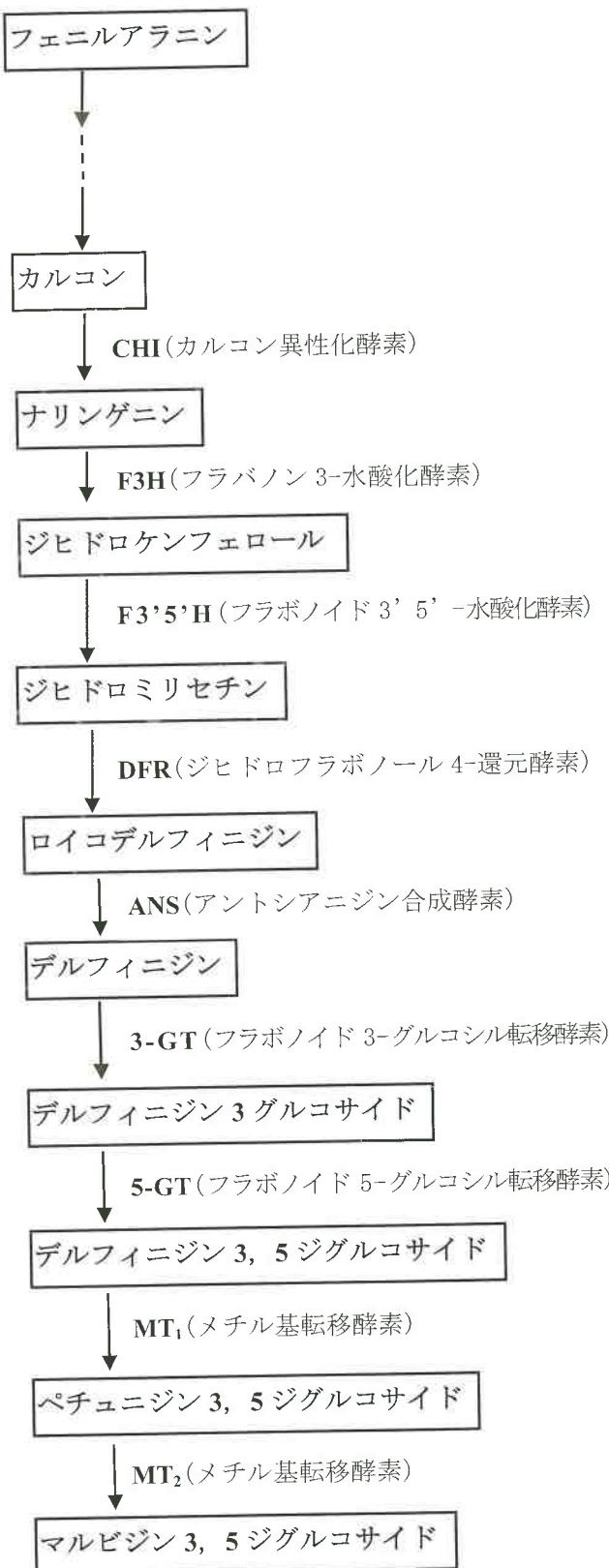


図2 芳香シクラメン‘香りの舞い’で推定されるアントシアニン色素の合成経路

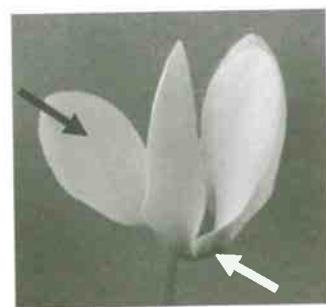


図3 芳香シクラメンの花の部位
黒矢印：スリップ、白矢印：アイ

所イオンビーム照射研究施設 (TIARA)において、320 MeV の炭素イオンビームを 0~16Gy の線量で照射した。照射後は、組織培養により再分化個体を獲得し、M₁ (照射当代) 集団を育成した。その結果、1,210 個の植物体を再生させ、そのうち、222 個体が開花したが、M₁ 集団では形態的変異は認められず、すべての形質が‘香りの舞い’と同様であった。M₁ 個体の自家受粉により 2,936 粒の M₂ 種子を採取し、このうち、各線量区 200 粒を播種し、271 個の M₂ 個体を育成した。その中で、2Gy 照射の 68 個体から 9 個の花色変異体を選抜した。これらの変異体は、花の色が赤紫色に変異していたが、花の形態や大きさ、葉色及び香りに変異は見られなかった。このことより、花色変異体を得るための適正線量は 2 Gy であると考えられた (表1)。

‘香りの舞い’と花色変異体の花弁は基部の濃く着色する部位 (アイ: 図3 白矢印) とその他の部位 (スリップ: 図3 黒矢印) に分かれる。‘香りの舞い’のスリップは紫であるのに対して、変異体のスリップは赤紫であった。

‘香りの舞い’と花色変異体の色調の変異を調べるために、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 (農研機構) 花き研究所において色素分析を行った。花弁はアイとスリップに切り分けて、10%酢酸でアントシアニンを抽出し、530 nm の吸光検出を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。‘香りの舞い’のスリップの主要色素はマルビジン 3,5-ジグルコサイドであり (図4A)，花色変異体の主要色

表1 芳香シクラメン (*Cyclamen persicum* × *C. purpurascens*) ‘香りの舞い’ の再分化と変異体誘導に及ぼすイオンビーム照射の影響

線量 (Gy)	照射黄化 葉柄数	再分化数 (%)	開花 M ₁ 個体数	M ₂ 種子数 (播種数)	開花 M ₂ 個体数	花色 変異体数
0	294	270(92)	58	767(200)	52	0
0.5	396	372(94)	53	740(200)	61	0
1	526	452(86)	75	892(200)	90	0
2	240	196(82)	30	537(200)	68	9
4	81	54(67)	3	0	—	—
8	74	39(53)	1	0	—	—
16	36	7(19)	2	0	—	—

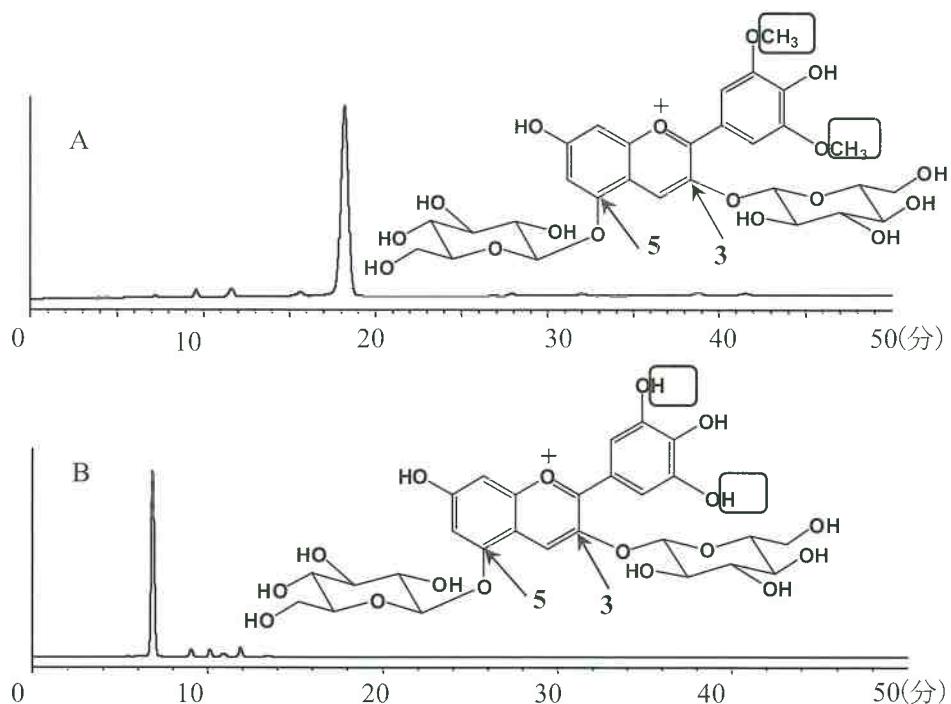


図4 ‘香りの舞い’と変異体の花弁に含まれるアントシアニンのHPLCのクロマトグラム

A : ‘香りの舞い’から検出されたマルビジン 3,5-ジグルコサイドの HPLC のクロマトグラムと構造式

B : 変異体から検出されたデルフィニジン 3,5-ジグルコサイドの HPLC のクロマトグラムと構造式

表2 芳香シクラメン (*Cyclamen persicum* × *C. purpurascens*) ‘香りの舞い’と変異体のアントシアニン比較

供試系統	部位	アントシアニン		RHS カラーチャート
		種類	濃度(μmol/g f.w.)	
‘香りの舞い’	スリップ	マルビジン 3,5-ジグルコサイド	3.2±0.3	72A,N74A
	アイ	マルビジン 3,5-ジグルコサイド	4.8±0.2	71A
変異体	スリップ	デルフィニジン 3,5-ジグルコサイド	4.3±0.4	61A,61B
	アイ	デルフィニジン 3,5-ジグルコサイド	6.8±0.6	59A

素はデルフィニジン 3,5-ジグルコサイドであつた(図4B)。‘香りの舞い’と花色変異体のアイの主要色素の種類もスリップの主要色素と同じであった。アイからも‘香りの舞い’、変異体共に同様の色素が検出されたがその濃度はスリップより増加していた。また‘香りの舞い’と花色変異体の間に色素量の変化は見られなかつた⁷⁾(表2)。

以上のことより、花色変異体はMT₁をコードする遺伝子が影響を受けることによりマルビジンへの代謝が阻害され、デルフィニジン 3,5-ジグルコサイドが蓄積したことを示唆している。このことについて現在、分子レベルの解析を行っている。

4. 成果の意義と今後の展望

‘香りの舞い’の変異体で発現したデルフィニジン 3,5-ジグルコサイドは赤紫色を示すことがこの研究によって初めて明らかになった。デルフィニジンは、青い色素と思われているが、実際には糖、有機酸、金属イオンなどの結合により青色だけでなく、紫色や赤色を発現することが最近の研究で明らかになりつつある。今後、変異体へのイオンビーム再照射によりデルフィニジンと糖、有機酸、金属イオンの結合様式に変異が起これば、青色の芳香シクラメン育成に近づくことができるものと思われる。

イオンビーム照射により得られた赤紫の変異体は、芳香シクラメン品種の中には見られない

新規の花色を有することから、変異体の世代を更新し、赤紫色が安定した段階で新品種として消費市場に供給する予定である。また、変異体と既存の芳香シクラメン(‘麗しの香り’、‘孤高の香り’、‘香りの舞い’)との交配による新品種育成を検討している。他方で、シクラメン属植物においてデルフィニジン系色素をもつ園芸品種および野生種はないことから、今回得られた変異体はシクラメンのアントシアニン研究に大きな役割を果たすと考えられる。

以上のことから、イオンビームは芳香シクラメンの突然変異育種を行う際の有益な突然変異原であると言える。

参考文献

- Grey-Wilson,C.(2002), *Cyclamen*, B.T. Bastsford, England
- Ishizaka H.et al.(1995), *Euphytica*, 82,31-37
- Ishizaka H.et al.(1995), *Euphytica*, 86, 211-218
- Ishizaka H. (2008), *Plant Biotechnology*, 25,511-519
- Tanaka A.et al.(1999), *Gamma Field Sym.*, 38,19-27
- 田中淳ら(1999),ラヂオアイソトープ, 52,186-194
- Kondo E.et al.(2009) , *Plant Biotechnology*, 26,565-569

◀ 国内情報 ▶

小麦のふすまから血圧降下ペプチドの製造法を開発

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 近畿中国四国農業研究センター

野方 洋一

小麦ふすまの新たな用途を開発するために、アンジオテンシンⅠ変換酵素(ACE)阻害ペプチドの簡易な製造法を検討した。ふすまを水に懸濁し、pHと温度を制御すると、自己消化によりACE阻害ペプチドが生成した。反応液には、新規なイソロイシルグルタミルプロリンを含めた6種類の阻害ペプチドが含まれた。粗精製ペプチドは、高血圧自然発症ラット(SHR)の血圧降下作用をもち、ふすまからの収量は2~3%であった。

1. はじめに

小麦の一次加工副産物であるふすまは、食品リサイクル法の中の食品廃棄物に該当する。ふすまは一般的に配合飼料の原料として利用され、その製粉工場販売価格は30kg当たり511~675円(平成15~19年)であるが、年次変動が大きいために採算性が不安定である。また、遠隔地の製粉工場では、販売価格が配送コストに見合わないために廃棄処分するケースも見受けられる。それゆえ、ふすまにより高い利用価値を生み出す手法の開発が望まれている。ACEは生体内の昇圧系であるレニン-アンジオテンシン系の構成単位であり、ACEの阻害剤は高血圧症の治療薬となっている。また、多様な食品素材からプロテアーゼ処理により生成するACE阻害ペプチドは、健康食品の素材として開発、販売されている。ふすまのタンパク質含量は15~20%であり、高いプロテアーゼ活性を保有することから、自己消化反応を利用したACE阻害ペプチドの生産が考えられた。本稿では、ふすまから簡易な操作でACE阻害ペプチドを製造する取り組みについて報告する。

2. 自己消化反応によるACE阻害活性の獲得

自己消化反応とは、自己のもつ酵素で自体の組織が分解することをいう。実験にはビューラーテストミルで製粉した小麦種子のふすま画分を用いた。ふすまを10倍容の水に懸濁し、異なるpHと温度で一定時間反応した。遠心分離後、上清のACE阻害活性を測定したところ、弱い阻害活性が確認された(IC_{50} : 940 μg/mL)。ふすまには食物纖維が約50%含まれるため、水溶性のアラビノキシラン等の細胞壁多糖類を除去すれば比活性が増加すると予想された。そこで、上清をODSカラムに通し、水洗後10%エタノール水溶液の溶出画分の阻害活性を調べると、強い阻害活性を示した(IC_{50} : 80-90 μg/mL)。以後、阻害活性の測定には、ODSカラムによる粗精製物を用いた。ACE阻害率獲得の至適な条件は、pH3.2, 40°C, 反応時間はおよそ12時間であった(図1-A, B, C)。一方、回収されるタンパク質量の至適な条件は、pH3.6, 40°Cであり、ACE阻害活性の至適条件とは一致しなかった。なお、30kGyの電子線で滅菌処理したふすまで同様の試験をしたところ、未処理のものとACE阻害活性に相違は認められなかった。この結果、ふすまからのACE阻害ペプチドの生成には、内在性プロテアーゼの関与が推定された。

NOGATA Yoichi

〒721-8514 広島県福山市西深津町6-12-1

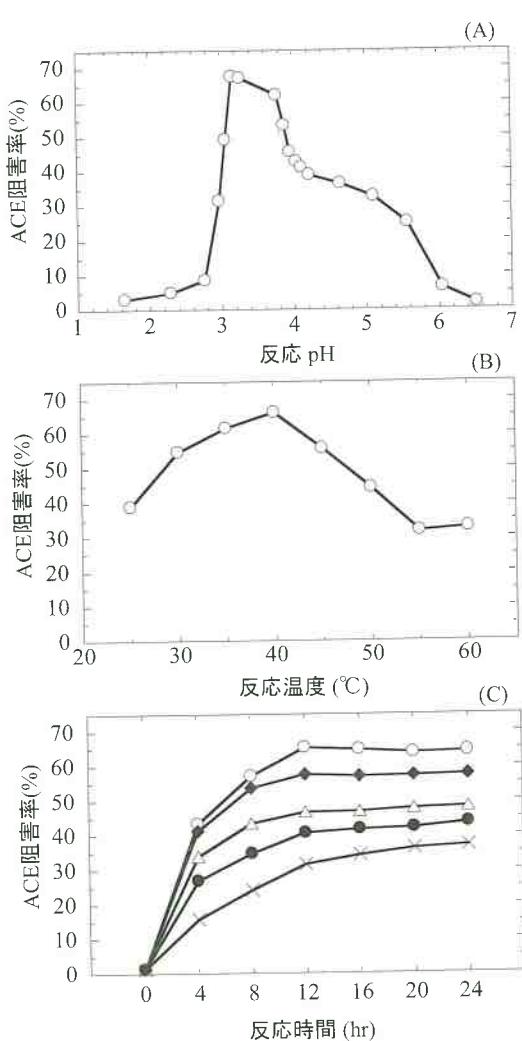


図1 小麦ふすまからのACE阻害ペプチドの生成条件の検討

(A) : 40°C, 12時間反応におけるpHの影響。
 (B) : pH3.2, 12時間反応における温度の影響。
 (C) : 40°CにおけるpHと反応時間の影響。

○, pH3.2 ; ◆, pH3.7 ; △, pH4.2 ; ●, pH4.7 ;
 ×, pH2.7.

ACE阻害率は、167 μg/mLでの阻害率を示す。

自己消化によるACE阻害活性の獲得能を製粉画分ごとにみると、副産物画分である小ふすま(IC_{50} : 80 μg/mL), 大ふすま(IC_{50} : 140 μg/mL), 末粉(IC_{50} : 240 μg/mL)の順に強く、小麦粉(60%粉)の阻害活性は極めて弱かった(IC_{50} : 2,100 μg/mL)。また、全粒粉は、末粉と同レベルの阻害活性を示し(IC_{50} : 320 μg/mL)，発芽処理

による阻害活性の変化は小さかった(IC_{50} : 300 μg/mL)。

3. 自己消化反応に関するふすまのプロテアーゼ

ふすまでは、アスパラギン酸プロテアーゼ¹⁾およびカルボキシペプチダーゼ²⁾の報告がある。報告によると、アスパラギン酸プロテアーゼの至適pHは3.3、カルボキシペプチダーゼには3種類のアイソザイムがあり、至適pHは4.4から5.8の間である。ACE阻害活性の至適pHは3.2であり、アスパラギン酸プロテアーゼの至適値に近似した(図1-A)。また、グラフではpH4.0から5.6の間にショルダーが見られることから、ACE阻害活性の獲得におけるカルボキシペプチダーゼの関与も推測された。そこで、プロテアーゼの阻害剤を添加して、ACE阻害活性に及ぼす影響を調べた。阻害剤として、Pepstatin A(酸性プロテアーゼ阻害剤), PMSF(セリンプロテアーゼ阻害剤), E-64(システインプロテアーゼ阻害剤), EDTA(メタロプロテアーゼ阻害剤)を試験した。この結果、Pepstatin AおよびPMSFはACE阻害活性をそれぞれ95.7%および14.6%低下させ、E-64およびEDTAによる活性の低下は認められなかった。阻害剤の結果と至適pHの結果を併せると、自己消化反応によるACE阻害ペプチドの生成には主にアスパラギン酸プロテアーゼが関与し、セリンプロテアーゼの一種であるカルボキシペプチダーゼも一部関与すると結論づけられた。小麦種子では、発芽時に貯蔵タンパク質の分解のためにシステインプロテアーゼが発現するが、発芽小麦全粒粉の自己消化反応で阻害活性が増加しない結果も併せて、当プロテアーゼはACE阻害活性の獲得に関与しないと判断された。

4. ACE阻害ペプチドの分離と同定

ふすま 100g から得られた自己消化液を用いて、阻害活性を指標にして ACE 阻害ペプチドの分離、精製を行った。反応液の pH を 6.0 に調整し、遠心分離で沈殿を除去後、水で平衡化した ODS カラムに添加した。カラムを水で洗浄後、10%, 20%, 50%, および 95%エタノール水溶液を通して、それぞれの画分を回収した。これらのうち、10%エタノール溶出画分の阻害活性が最も強かった (IC_{50} : 86 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。当画分からエタノールを除去し pH を 9.0 に調整後、陰イオン交換樹脂 (AG MP-1) のカラムに添加し、非吸着画分を回収した (IC_{50} : 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。続いて、30%アセトニトリル、1% TFA の水溶液で平衡化した Superdex 75HR カラムを用いた HPLC ゲルろ過により阻害活性を示す 2 つの画分を得た (IC_{50} : 44, 76 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。これらの画分をさらに Jupiter C₁₈ および C₄ カラムを用いて阻害ペプチドを精製した。精製ペプチドは、N-末端アミノ酸配列分析および MALDI TOF-MS による分子量分析で同定した (表 1)³⁾。収量は、バリルチロシン、イソロイシルグルタミルプロリン、ロイシルグルタミルプロリンの順に多く、ふすま 100 g から、それぞれ 19.2, 15.1, および 15.0 mg 得られた。また、小麦タンパク質の配列データベース検索から、これらはいずれもグリアジンの部分配列であると推定された。グリアジンの加水分解物由来の阻害ペプチドとしては、イソロイシルアラニルプロリンが報告されているが、同定したペプチドには含まれていなかった⁴⁾。これらのペプチドのうち 5 種類は既報であり、ロイシルグルタミルプロリンおよびロイシルアルギニルプロリンはトウモロコシ、バリルチロシンはイワシ、ワカメ、およびダイズ、イソロイシルチロシンはワカメ、カツオ節、およびローヤルゼリー、スレオニルフェニルアラニンはコムギ胚芽等で報告がある。また、バリルチロシンやイソロイシルチロシンはヒト血圧に対する有効性が検証され、特定保健用食品の有効成分として公表されている⁵⁾。

表 1 ふすまから生成する ACE 阻害ペプチド、阻害活性、および収量

ペプチド名	IC_{50} (μM)	収量(mg) ¹⁾
ロイシルグルタミルプロリン	2.2 ± 0.08	15.0
イソロイシルグルタミルプロリン	3.8 ± 0.13	15.1
ロイシルアルギニルプロリン	0.21 ± 0.01	12.5
バリルチロシン	21 ± 0.67	19.2
イソロイシルチロシン	3.4 ± 0.11	5.8
スレオニルフェニルアラニン	18 ± 0.62	3.1

¹⁾ 「ふくさやか」小ふすま 100g からの収量。

5. ラットを用いた血圧降下試験

ふすま 1 kg から自己消化液を調製し、ODS カラムクロマトグラフィーで粗精製したペプチドを試料とした。11 週齢の高血圧自然発症ラット (SHR) を室温 21±3°C, 相対湿度 50±20%, 照射時間 12 時間／日 (7:00～19:00)，喚起回数 10-15 回／時間の条件下で予備飼育し馴化して、16 週齢で収縮時血圧が 180 mmHg 以上を示すものを試験に供した。SHR (体重 : 340-370 g) を血圧と体重が各群で平均化するように 4 群 (各群 6 匹)，すなわちコントロール群、10 mg/kg 投与群、50 mg/kg 投与群、200 mg/kg 投与群に分けた。所定量を蒸留水で溶解した各被験液を午前 10-12 時に、それぞれの投与群にゾンデによる強制経口投与を行った。コントロール群には同量の蒸留水を投与した。各群について投与前および投与後 2, 4, 6 および 8 時間後、測定前に 15 分間の前保温 (38°C) を施した後、非観血式血圧心拍測定装置 (ソフトロン社、BP-98A) を用いて尾静脈圧を測定した。試験結果を図 2 に示す。コントロール群の投与前の血圧は 215.8±11.0 mmHg であった。コントロール群の投与 2-8 時間に血圧の有意な低下は認められなかった。10 mg/kg 投与群は、投与前 214.4±13.2 mmHg から投与 2 時間後 195.9±12.1 mmHg に血圧が有意に低下した (投与前に對して降圧値-18.4 mmHg; $p < 0.05$)。その後血圧は若干増加するものの投与後 6 時間まで投与前との有意な降圧作用が認められた。50 mg/kg

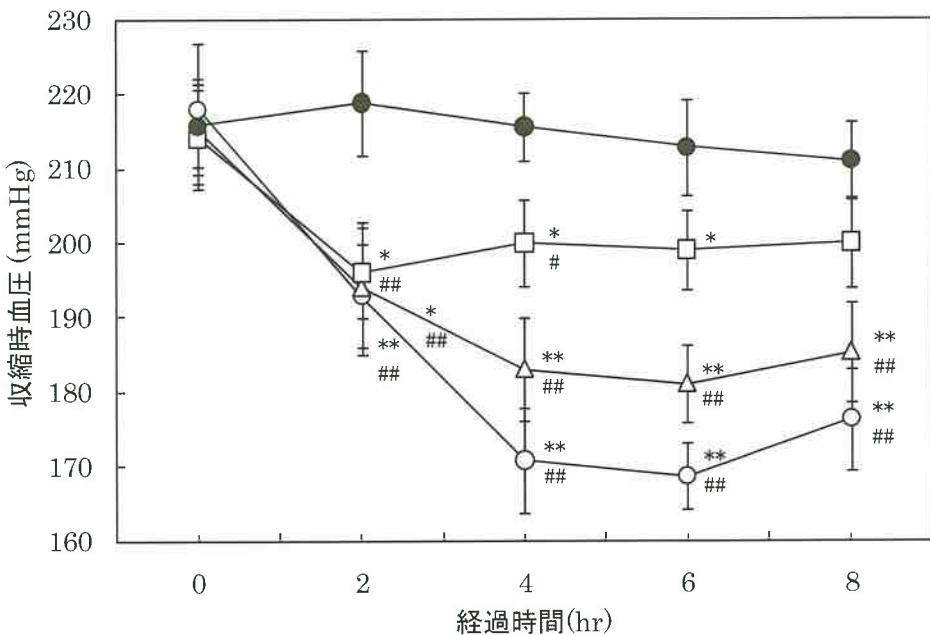


図2 粗生成ペプチドの SHR の血圧に及ぼす単回投与の影響

●, 0mg/kg; □, 10 mg/kg; △, 50mg/kg; ○, 200 mg/kg。

投与 0 時間との有意差 : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

各時間のコントロールとの有意差 : # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$

および 200 mg/kg 投与群も同様に投与 2 時間後に血圧の有意な低下が認められ ($p < 0.05$)、その後降圧は持続し、投与 8 時間後も有意な降圧作用が認められた。以上の結果、自己消化反応で得られた粗精製ペプチドは 10-200 mg/kg 投与量の範囲では用量依存的に血圧降下作用をもつことが明らかになった。

6. おわりに

これまでに、ふすま成分の利用に関して、セラミドやフィチン酸等が検討してきた。本稿では、簡易、低コスト生産を考慮した自己消化反応による ACE 阻害ペプチドを製造する取り組みを紹介したが、同時に分岐鎖アミノ酸 (BCAA) や GABA 等も生成する⁶⁾。また、アラビノキシラン等の食物繊維には免疫力増強作用や血糖値の低下作用等の報告がある。阻害ペプチドの製造過程では反応渦が発生するため、

廃棄量の低減や多面的な付加価値化に向けて、上記化合物の利用やペプチドの新たな機能性の検索等の検討を行っていきたい。

文献

- Umetsu, H. et al. (1981), *Food Chem.*, 7, 125-138
- Galleschi, L. et al. (1994), *Plant Sci.*, 98, 15-24
- Nogata, Y. et al. (2009), *J. Agric. Food Chem.*, 57, 6618-6622
- Motoi, H. et al. (2003), *Nahr./Food*, 47, 354-358
- Kawasaki, T. et al. (2000), *J. Hum. Hypertens.*, 14, 519-523
- Nogata, Y. et al. (2009), *J. Agric. Food Chem.*, 57, 1331-1336

◀ 国内情報 ▶

輸出用果実のハダニ類を除去する 連続搬送式果実洗浄機の開発

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

¹生物系特定産業技術研究支援センター, ²中央農業総合研究センター,
³果樹研究所

宮崎昌宏¹・青木 循¹・金光幹雄¹・齋藤秀文²・中村ゆり³

国産果実の輸出促進のため、リンゴ・ナシなど輸出果実の表面に付着しているハダニ等の害虫を素早く確実に除去する連続搬送式果実洗浄機を開発した。害虫が付着している果実の上下2ヶ所のくぼみに水滴を含んだ圧縮空気の旋回流を同時噴射して害虫を除去する。洗浄ノズルは剥離力が大きいフレキシブルノズルを採用し、果実の大きさに合わせてノズル位置が自動調整できる。エアガンを用いた手作業と同等の除去精度を有し、処理果数は手作業の約3倍と高い処理能力を示す。

1. はじめに

経済発展が続く東アジア諸国への国産果実の輸出が活発である。特に、台湾のWTO加盟以降、リンゴの輸出額は大幅に伸びた。国産リンゴは、美味しく大玉で外観が美しいことから高級品として取り扱われており、春節などの贈答用としての需要が高い。しかし、輸出の増加に伴って、リンゴに付着する害虫の駆除が問題になっている。リンゴに付着するハダニ類は検疫対象ではないが、付着が目立つ場合には輸出入の検疫で不合格になることがある。しかも、ブランドイメージを著しく損なうことから、貿易業者は箱詰め前のハダニ類の除去作業を強く求める。しかし、産地ではハダニ類を除去する果実洗浄機がなかったため、エアガンによる手間のかかる手作業で処理しており、その経費が果実輸出促進の障害になっている。

そこで、果樹研究所と中央農業総合研究センタ MIYAZAKI Masahiro¹, AOKI Jun¹, KANAMITU Mikio¹, SAITO Hidemoto², NAKAMURA Yuri³

¹〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

²〒305-8666 つくば市観音台3-1-1

³〒305-8605 つくば市藤本2-1

一では、平成18年度に搖動噴射式果実洗浄機を開発した。本機の害虫除去性能は高かったが、果実を一つ一つ機械にセットする必要があり、産地からはより高能率な果実洗浄機の開発が強く求められている。その要望に応え生研センターでは、平成20年度から、連続的に処理ができる洗浄機の開発に着手し、連続搬送式果実洗浄機を開発した。ここでは開発機の特徴と性能を紹介する。

2. 果実に付着するハダニ

果実の表面に付着している害虫で最も問題になるのがハダニ類である。ハダニ類は増殖率が高く、栽培中の薬剤散布で完全に防除するのは困難であり、樹体だけでなくリンゴやナシなどの果実にも付着する。リンゴ果実に付着するハダニ類の多くはナミハダニ休眠態雌成虫やリンゴハダニの休眠卵である。ナミハダニの休眠態雌成虫は体長が0.5mm前後とやや大きくて鮮やかなオレンジ色をしている。リンゴハダニの休眠卵は赤色で0.1mmと小さいが、卵塊状態では容易に見つけることができる。このため、ハダニの付着は著しく果実の外観品質を低下させ

る。また、付着場所は洗浄し辛い果実の「ていあ部」や「こうあ部」の凹部である。しかも休眠態雌成虫は、自らの糸で作成した立体網の中で休眠し、リンゴハダニの卵は親雌が放射状の網をかけており果皮への付着力は大きい。このため、吸引除去、温湯処理、低温処理ではハダニ類の効率的な駆除はできず、開発機では圧縮空気の噴射による吹き飛ばし除去を採用している。

3. 開発機の構造と作用

開発した連続搬送式果実洗浄機（以下、連続搬送式）の外観を図1、主要諸元を表1に示す。果実の供給方法には横向きと上下向きがあるが、果実の横向き投入では害虫が付着する果実の凹部をノズルに正対して置くのは難しい。しかも、正対しなかった場合、極端に害虫の除去精度は低下するため、果実の供給は上下向きとした。

連続搬送式は選果ライン原料供給部又は箱詰め部の設置を想定して、全長76cm、幅101cm、高さ125cmと小型化し、果実の搬送はターンテーブル式とした。なお、輸出用果実は大玉であることから、果径、果高ともに80～110mmの範囲の果実を対象とした。

ターンテーブルは0.1kWのギヤモータで駆動され、インバータ制御で果実へのハダニ類の付着状態や作業人数に合わせて調整でき、最速で1秒間に0.9果を処理できる。搬送トレイは、果実の供給、取り出し時の損傷防止と搬送中の果実保持から果実の4方向から挟持するクッシ

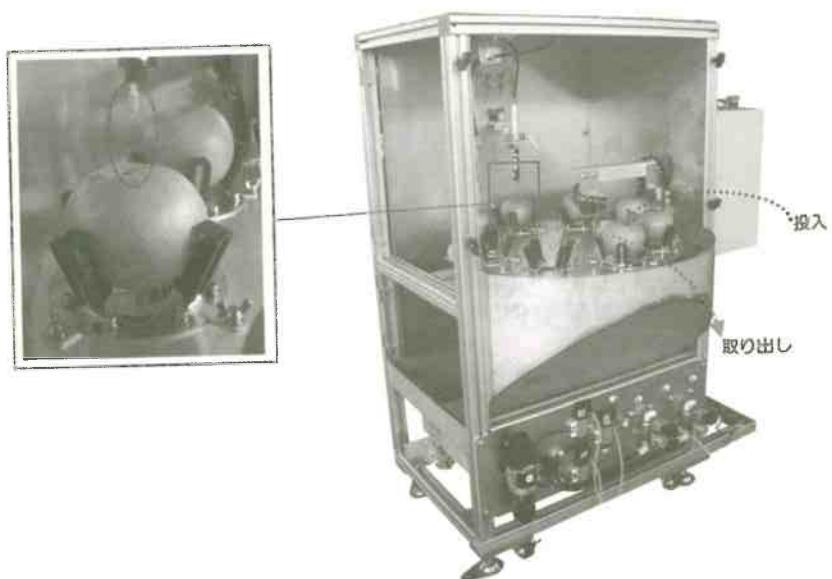


図1 連続搬送式果実洗浄機の外観

表1 連続搬送式果実洗浄機の諸元

全長×全幅×全高、質量	755×1005×1250mm, 126 kg
洗浄部位	「こうあ部」、「ていあ部」の同時2ヶ所
果実の供給・取出し	手作業、上下向きの供給
果実搬送方式	ターンテーブル式、0.1kWギヤモータ
搬送トレイ	洗浄用穴開きクッションカップ、8個
搬送部 トレイ中心周速	0.02～0.19m/s (0.1～1.1果/s), インバータ制御
果実有無検出	光電センサ
果高計測	光電センサ、10mmピッチ、4段階
洗浄ノズル	フレキシブルノズル2本、使用空気量175 L/min、水吐出量: 0～50mL/min
洗浄部 ノズル高さ調整	エアシリンダ式、果高による自動調節 高さ(85, 95, 105, 115mm)
洗浄時間設定	タイム設定(0.15～3.0s)
使用電源	200V(三相)
適用エアコンプレッサ	出力2.2kW、圧力制御0.78～0.93MPa

ョンカップとした。搬送トレイの果実の有無を光電センサで検出し、ノズルからの圧縮空気の噴出のオンオフを制御した。

ノズルには自励的にノズル自体が50rps程度で回転し、洗浄面が広く、洗浄面で大きな剥離力が生じるフレキシブルノズルを採用した。果

実下側の凹部とノズルの位置は相対的に変わらないが、果実上側の凹部とノズルの距離は果実の大きさで変化する。果実凹部とノズルとの距離を一定にして安定した洗浄力をえるため、果高を光電センサで計測し、果高計測値からエアシリンダを用いて果実上側のノズルの位置を4段階に自動調整できるようにした。

4. 開発機の性能

1) 害虫除去精度

連続搬送式の害虫除去精度を明らかにするため、エアガンを用いた手作業の慣行作業、バッヂ式の揺動噴射式果実洗浄機（以下、揺動噴射式）と比較して除去果数割合を調査し、その結果を図2に示す。なお、除去果数割合は、害虫が付着している果実を供試して、処理後の果実表面を実態顕微鏡で観察し、害虫の付着が認められなかった果数の割合を示したもので、次式から求められる。

$$\text{除去果数割合 (\%)} = [(A - B) / A] \times 100$$

A : 処理前の害虫が付着している果数

B : 処理後も害虫が付着している果数

リンゴ表面に付着した休眠態ナミハダニ雌成虫の連続搬送式の除去果数割合は、揺動噴射式と同様の95%を示し、慣行作業の90%より高い値を示した（図2）。また、コナカイガラムシが付着した「二十世紀ナシ」に対する連続搬送式の除去果数割合は、揺動噴射式や慣行作業と同

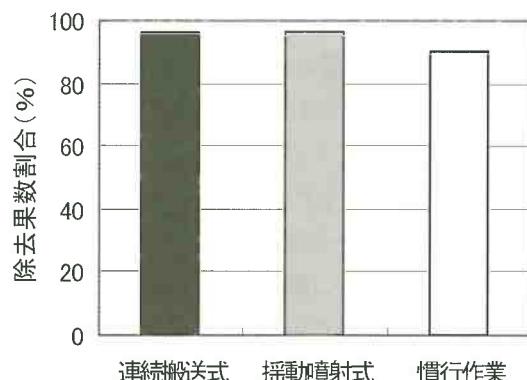


図2 リンゴ表面に付着した休眠態ナミハダニ雌成虫が付着したリンゴの除去果数割合

（リンゴ「フジ」、空気圧 0.8MPa、1ヶ所当たりの噴射時間 0.6s、慣行作業はエアガンを使用）

等の100%と高い値を示し、慣行作業と同等の除去精度が得られる。

2) 作業能率試験

ハダニが付着した貯蔵リンゴを供試し、連続搬送式と慣行作業によるハダニ除去作業時間を調査した。連続搬送式はターンテーブルの回転速度を4.5rpmとした。

この条件での果実の供給、取り出しに問題はなく、搬送トレイへの充填率は89%であった。連続搬送式の1分間当たりの処理果数は、慣行作業の2.8倍の32果と多く高い処理能力を示した（表2）。

表2 作業方法別の処理果数

品種	供試リンゴ		作業機	作業	処理時間	処理果実数
	果径 (mm)	果高 (mm)				
フジ	89	83	連続搬送式	1人	1.9	32.4(278)
				慣行作業	5.1	11.7(100)
金星	99	87	連続搬送式	2人	2.1	29.3(371)
				1人	4.8	12.4(157)
			揺動噴射式	1人	7.6	7.9(100)

3) 実証試験

リンゴの輸出実績のある片山リンゴ株式会社（青森県弘前市）の選果場において実証試験を行った。供試したリンゴは、平均果径 99 mm、平均果高 87 mm の大玉の中国輸出向けの「金星」であった。比較した作業方法は、①1 回当たり

の洗浄時間を 0.8 秒とした揺動噴射式による 1 人作業、②果実 1 果当たりの洗浄時間を 0.8 秒とした連続搬送式の 1 人作業、③洗浄時間は同じであるが、果実の供給と取り出しを別々に行う 2 人組作業の 3 方式である（図 3）。



図 3 実証試験風景

高級リンゴの「金星」であることから、ハンドリングには細心の注意が払われた。連続搬送式の 1 人作業は、果実 8 個を搬送トレイへ連続投入し、洗浄後その 8 個を順次取り出したため、単位時間数当たりの処理果数は揺動噴射式に比べて 1.6 倍になった。連続搬送式の 2 人組作業では、投入と取り出しが連続してできるため処理速度は速くなり、単位時間数当たりの処理果数は揺動噴射式の 3.7 倍、連続搬送式 1 人作業の 2.4 倍と多く、高い処理能力を示した（図 4）。

実証試験において操作上のトラブルはなく、取扱性についても問題はなかった。また、エアガンを用いた手作業の慣行作業では、ノズルを果実に当たり、果実を落としたりして果実を損傷させる危険性があったが、連続搬送式では果実を取扱いが単純化したため、そのリスクは大幅に軽減するとともに、作業が楽になったとの評価を得ている。

5. おわりに

本研究は、国産果実の輸出促進を図るため、従来労力を多く要していた果実に付着している

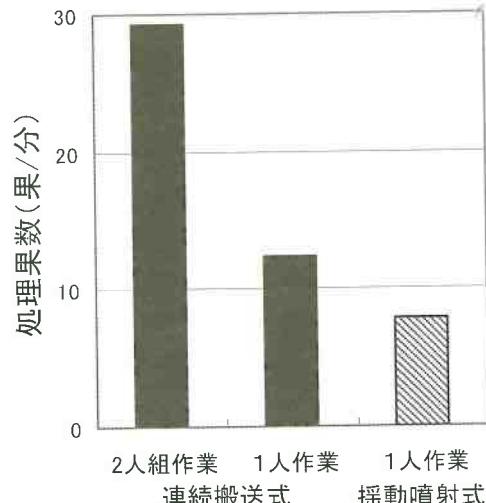


図 4 実証試験結果
(リンゴ「金星」, 空気圧 0.8MPa)

ハダニ類の除去作業の高能率化に取り組み、連続処理で果実の上下 2ヶ所の凹部を同時洗浄する連続搬送式果実洗浄機を開発した。開発機は、慣行作業と比べて 2.8 倍の処理能力で慣行作業と同じようにハダニ類を除去でき、除去作業の省力・低コスト化に貢献できると考えている。今後は、市販化に向けて情報提供を行っていきたい。

なお、本機の留意事項は、①果実リンゴのがく窪内に生息しているハダニ成虫類は除去できないこと、②ハダニの越冬卵については処理時間を3秒程度長くする必要があること、③除去精度を安定させるためには、果実の凹部がノズルへ正対するように搬送トレイへ注意を払って供給する必要があることなどである。

また、本研究の推進に当たって、片山リンゴ株式会社、青森県産業技術センターりんご研究所、岩手県農業研究センター、秋田県農林水産技術センター果樹試験場、山形県農業総合研究センター園芸試験場、埼玉県農林総合研究センター園芸研究所、石川県農業総合研究センター、鳥取県農林総合研究所園芸試験場、農研機構東

北農業研究センターの方々には供試果実の提供、実証試験で多大なご協力を賜った。記して深甚なる謝意を表する。

参考文献

- 1) L.G. Neven et al.(2006) : *Postharvest biology and Technology* 40, 230-235
- 2) 宮崎昌宏ら (2007) : 果実に付着した微小害虫除去装置、特開 2007-228907
- 3) 宮崎昌宏・齋藤秀文・中村ゆり.2009.輸出用果実のハダニ類除去技術.農業技術 64 (3) 104-107.

◀地域の先端研究▶

広食性土着天敵オオメカムシの生態と その害虫防除資材としての活用

千葉県農林総合研究センター

大井田 寛

近年、安全・安心な農産物生産に寄与する有効な害虫防除手段として、生物農薬（天敵製剤）の利用が拡大している。既存の生物農薬には外国産の種を用いたものが多いが、最近は国内に生息する種を実用化して利用する動きも活発化している。筆者らは、広食性土着天敵のオオメカムシを生物農薬として増殖し、施設栽培のイチゴやピーマンなどの色々な害虫に対する防除資材として活用する技術を開発した。その概要を紹介する。

1. はじめに

オオメカムシ類は広食性の捕食者として知られ、国内外に多くの種類が生息している。従来本種群は、害虫も含まれる大きなグループであるナガカメムシ科 (Lygaeidae) に分類されてきたが¹⁾、海外での最新の分類体系²⁾に従い、本科を細分化したオオメカムシ科 (Geocoridae) の下に置かれることになった。また、日本で記録のあるオオメカムシ、ヒメオオメカムシ、ミナミオオメカムシ(仮称)、チビオオメカムシおよびクロツヤオオメカムシの5種については *Geocoris* 属に統一された。

筆者らが取り組んだ共同研究（中核機関：千葉県、共同機関：千葉大学、(独) 中央農研、(株)アグリ総研）では、本州の農業生態系でみられ、農業害虫の天敵としての機能が期待される、オオメカムシおよびヒメオオメカムシを研究対象とした。本研究では、両種の生態解明、大量増殖法の確立および増殖個体を用いた害虫防除法の開発を行い、現在はオオメカムシを生物農薬として登録するための手続きが進行中である。本稿では、オオメカムシおよびヒメオオメカムシの生態の概要に加え、オオメカムシの放飼による害虫防除効果について解説する。

OIDA Hiroshi

〒266-0006 千葉市緑区大膳野町 808

2. オオメカムシ *Geocoris varius*

成虫（図1）は体長4.3～5.3mm、体色は光沢のある黒色で、頭部と脚は黄色い³⁾。国内では本州、四国および九州^{4), 5)}、海外では中国、韓国および台湾に分布する²⁾。

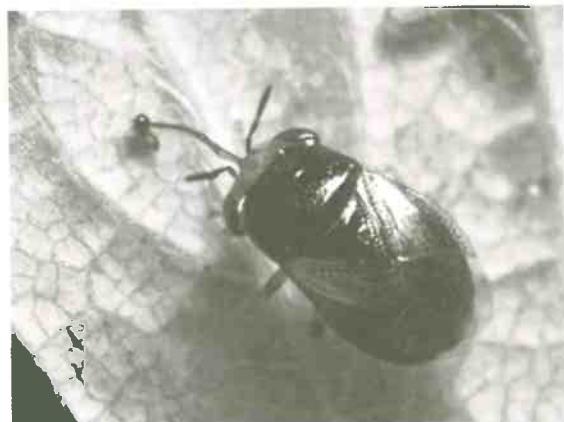


図1 オオメカムシ成虫

本種は関東地方では年1世代（一部2世代）を経過して主に5～11月頃に野外の植物上で活動し、成虫で越冬する⁶⁾。野外ではクズやシソ、イチゴなど多くの植物上に生息し、多様な餌種を捕食しながら^{6), 7)}、葉裏など植物体表面の毛茸が密に生えた部分に好んで産卵する⁸⁾。また、スジコナマダラメイガの卵を餌とした累代飼育法が確立されている⁸⁾。さらに、ハダニ加害植物の臭いに対して本種が反応すること⁹⁾、

イチゴなどの植物への高い定着性¹⁰⁾、本種 1 齢幼虫が 2 齢へ発育するために必要な餌数¹¹⁾、植物の蜜や花粉の摂取による幼虫の生存期間延長効果¹²⁾などが解明されたほか、増殖した本種幼虫の放飼により、施設栽培のイチゴ、スイカおよびピーマンで高い害虫防除効果が得られることも明らかとなっている^{13), 14)}。さらに、イチゴなどの生産現場で使用頻度が高い殺虫剤を中心に、本種の発育や生存に及ぼす影響が調査された。この他、本種の発育・増殖特性、捕食能力なども明らかとなっている。

3. ヒメオオカメムシ *Geocoris proteus*

成虫は体長約 3mm で³⁾、全体に黒みを帯びた体色である。オオカメムシとともに、害虫防除への活用を検討する目的で応用的な研究が進められてきた。累代飼育法が開発され⁸⁾、害虫加害葉由来の臭いに対する反応⁹⁾や各種植物に対する定着性¹⁰⁾、発育・増殖特性、捕食能力などが調査された。一方、害虫の存在するイチゴやスイカに本種を放飼しても植物上への定着率は低く、その多くが株元の地表面で観察され、オオカメムシと比較して害虫防除効果が低かった¹³⁾。本種はオオカメムシよりも大量増殖が容易であるが、このような事情により、現在のところ生物農薬化は見送られている。しかし、露地栽培のネギやサツマイモ、カボチャなどの圃場では、しばしば本種がみられ、多様な露地作物の害虫に対する土着天敵として機能している可能性がある。今後、露地作物における保護などを含めて、本種の活用場面を再検討すべきであろう。

4. オオカメムシによる生物的防除

オオカメムシについては、圃場での害虫防除効果試験を行い、複数品目で複数種の害虫に対する防除効果が確認された。ここでは、イチゴのナミハダニおよびピーマンのアザミウマ類に対する試験事例を紹介する。

(1) イチゴのナミハダニに対する防除効果

連棟ガラス温室の 2 室を用い、オオカメムシ放飼区および無処理区を設けた。2002 年 11 月 14 日にイチゴを定植し、ナミハダニの自然発生を確認した後、オオカメムシ放飼区には、2003 年 1 月 31 日、2 月 7 日および 25 日の 3 回、プラスチックボトルに入れたオオカメムシの 3 齢幼虫を担体のバーミキュライトとともに株上に放飼した。放飼密度は各回 2 頭／株とした。

指定した株の全葉についてナミハダニの雌成虫数、オオカメムシの個体数、定着部位、発育ステージを記録した。

両区のナミハダニおよびオオカメムシ放飼区におけるオオカメムシの密度推移を図 2 に示した。無処理区では、試験開始直後からナミハダニが増加し、3 月 12 日には 324 頭／株と高密度に達するとともに、葉の表面が白化し、ハダニの吐糸で覆われるなど、甚大な被害が生じた。4 月 1 日の調査では、無処理区で株の状態の悪化によるナミハダニ密度の低下が認められたため、同区でのそれ以降の調査を打ち切った。一方、オオカメムシ放飼区では、3 月下旬までナミハダニの寄生密度が約 60 頭／株に抑えられ、試験終了時まで目立った被害は生じなかった。オオカメムシは、放飼開始から約 50 日後の 3 月下旬まで、1 頭／株以上の密度で推移した。それ以降密度は低下したが、調査期間を通じて常に植物上、特に花とハダニの寄生部位である葉において高い割合で観察された（図 3）。4 月末には成虫もみられた。

(2) ピーマンのアザミウマ類に対する防除効果

単棟ハウスを 2 棟用い、オオカメムシ放飼区および慣行防除区を設けた。2005 年 4 月 18 日にピーマンを定植し、アザミウマ類の自然発生を確認した後、オオカメムシ放飼区には、6 月 2 日、8 日および 15 日の 3 回、イチゴと同様の方法でオオカメムシの 2 齢幼虫を放飼した。放飼密度は各回 5 頭／株とした。両区には、定植時にイミダクロプリド粒剤を処理し、生育期には、トリフルミゾール水和剤、バチルス・ス

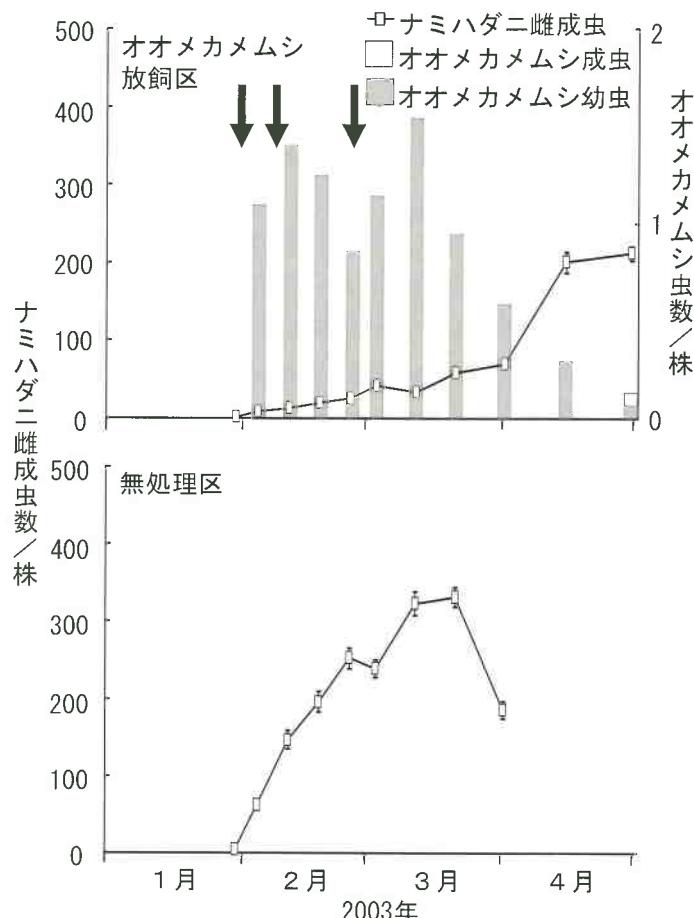


図2 施設栽培イチゴにおけるナミハダニおよびオオカメムシの密度推移

- 1) 黒矢印はオオカメムシの放飼を示す
- 2) 調査株の全葉で確認された個体数を株当たり虫数とした
(値は20株の平均、エラーバーは標準誤差を示す)
- 3) 品種:「とちおとめ」
- 4) 最低夜温:7.0°C、平均気温:13.0°C(2月)~19.3°C(4月)

ブチリス水和剤、シフルフェナミド水和剤、炭酸水素カリウム水溶剤、炭酸水素ナトリウム水溶剤、フェナリモル水和剤等の殺菌剤を散布した。

アザミウマ類については、指定した株の開花中の全花を対象に寄生数を調査した。また、オオカメムシについては、開花中の全花および1株につき1分間の株全体の見取り調査を行い、個体数、定着部位および発育ステージを記録した。

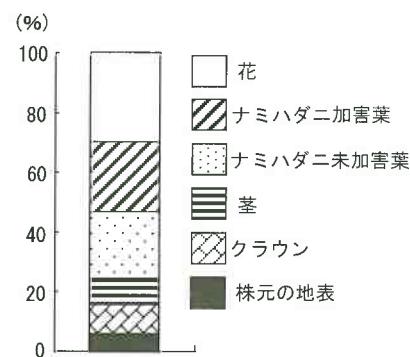


図3 施設栽培イチゴ（オオカメムシ放飼区）の各部位におけるオオカメムシの生息割合
調査時に観察されたオオカメムシの総個体数は197頭

両区のアザミウマ類およびオオカメムシ放飼区におけるオオカメムシの密度推移を図4に示した。オオカメムシ放飼区では、試験開始直後にアザミウマ類密度がわずかに増加したが、6月8日の1.6頭／株をピークとしてその後減少し、試験期間を通じて極めて低い密度で推移した。一方、慣行防除区では、徐々にアザミウマ類の密度が増加し、6月29日には14頭／株に達したため、果実への被害を防ぐ目的で、7月5日にクロルフェナピル水和剤を散布した。その結果、アザミウマ類は減少したが、試験終了までオオカメムシ放飼区と比較して常に高い密度で推移した。なお、試験期間を通じ、両区ともヒラズハナアザミウマおよびミカンキイロアザミウマの2種が混在していたが、主体はヒラズハナアザミウマであった。

本試験は各種殺菌剤が頻繁に散布される条件下で実施したが、オオカメムシは常に植物上で観察された。7月以降は徐々にオオカメムシの密度が低下したが、調査期間を通じて常に植物上、特にアザミウマの寄生部位である花、

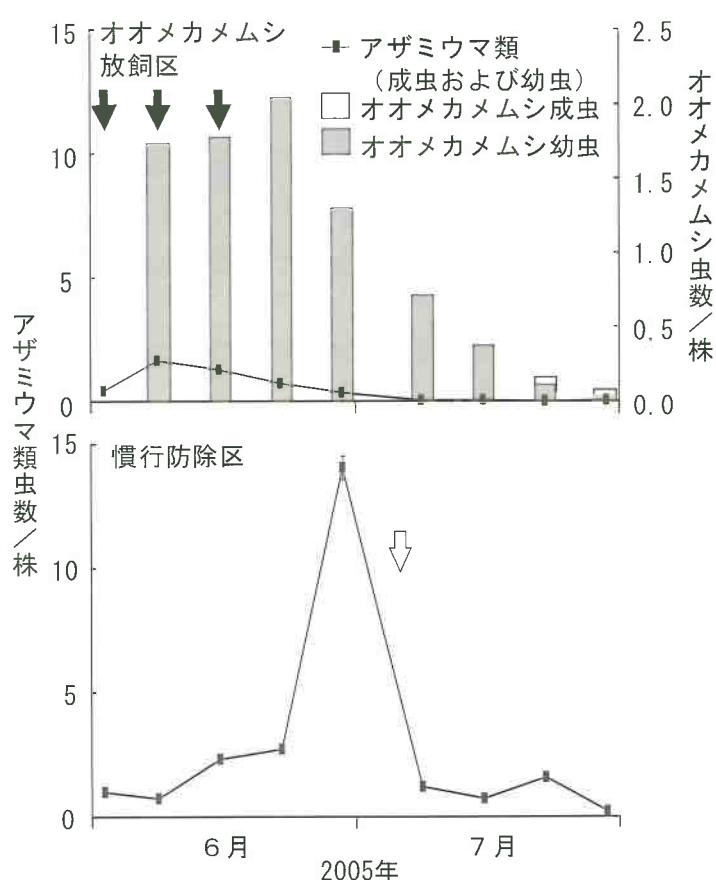


図4 施設栽培ピーマンにおけるアザミウマ類およびオオメカムシの密度推移

- 1) 黒矢印はオオメカムシの放飼、白矢印はクロルフェナビル水和剤の処理を示す
- 2) アザミウマ類については、調査株の全花で確認された個体数を株当たり虫数とした
(値は24株の平均、エラーバーは標準誤差を示す)
- 3) オオメカムシについては、調査株全花の調査と株全体の1分間の見取り調査で確認できた個体数を株当たり虫数とした
(値は24株の平均)
- 4) 品種：「京鉢」
- 5) 平均気温：24.4°C(6月)～25.2°C(7月)

蕾および幼果において高い割合で観察された。
また、7月22および29日には成虫がみられた。

(3) 今後の課題

前述のように、放飼したオオメカムシの幼虫は長期間植物上に定着し、害虫密度を抑制した。ただし、いずれの場合も後半に定着数が減

少し、成虫は少数観察されるに留まつた。その原因は特定できていないが、一つの可能性として羽化後の逃亡が挙げられる。

より長期間栽培される作目および作型では次世代の個体による捕食が重要視されるため、今後、高い定着率を長期間維持する方法の開発や次世代虫による害虫防除効果の確認など、さらに研究を重ねる必要がある。

5. おわりに

オオメカムシについては、イチゴのアザミウマ類に対する農薬登録の手続きが進んでおり、まもなく実用化される見込みである。また将来的に、本種はイチゴ以外の品目や他の害虫の防除にも適用できる可能性がある。

今後、農薬登録取得と並行してこれまでの知見を整理し、指導機関および生産者向けのマニュアルを作成して、スムーズな普及のための準備を進める予定である。また農薬登録取得後は、普及機関と連携して現地試験を行い、利用方法のさらなる効率化をはかりたい。

謝 辞

本研究の主要部分は、農林水産省委託「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業（平成14～16年度；課題番号1415）」により実施した。

文 献

- 1) 大井田寛（2009），植物防疫，63，258-261
- 2) Aukema, B. and C. Rieger (eds.) (2001), Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic Region. Vol. 4, Pentatomorpha I, The Netherlands Entomological Society, Amsterdam
- 3) 安永智秀ら（1993），日本原色カメムシ図鑑（友国雅章監修），全国農村教育協会，東京
- 4) 宮本正一・安永智秀（1989），カメムシ亜目，日本産昆虫総目録，（平嶋義宏監修），九州大学農学部昆虫学教室・日本野生生物研究セ
- 5) Miyamoto, S. et al. (2003), *Jpn. J. Syst. Entmol.*, 9, 117-119
- 6) 務川重之ら（2006），応動昆，50，7-12
- 7) 後藤千枝（2006），今月の農業，50(2), 67-71
- 8) 大井田寛ら（2008），千葉農総研研報，7, 53-61
- 9) 下田武志ら（2003），関東病虫研報，50, 157-160
- 10) 斎藤奈都子ら（2005），応動昆，49, 231-236
- 11) 小山田浩一ら（2007），関東病虫研報，54, 105-108
- 12) 下田武志ら（2008），関東病虫研報，55, 107-111
- 13) 大井田寛・上遠野富士夫（2007），関東病虫研報，54, 133-138
- 14) 大井田寛ら（2007），関東病虫研報，54, 139-142

◀ 文献情報 ▶

子宮静脈へのインターフェロンタウの注入はヒツジの黄体寿命を延長させる

Uterine Vein Infusion of Interferon Tau (IFNT) Extends Luteal Life Span in Ewes.

Rebecca C. Bott,¹ Ryan L. Ashley,¹ Luiz E. Henkes,¹ Alfredo Q. Antoniazzi,^{1,2} Jason E. Bruemmer,¹ Gordon D. Niswender,¹ Fuller W. Bazer,³ Thomas E. Spencer,³ Natalia P. Smirnova,¹ Russell V. Anthony,¹ and Thomas R. Hansen¹

¹Colorado State University, Fort Collins, Colorado,

²Universidade Federal de Santa Maria, Santa

Maria, RS, Brazil, ³Texas A&M University, College Station, Texas.

BIOLOGY OF REPRODUCTION, 82, 725–735 (2010)

ヒツジインターフェロンタウは、妊娠 10~12 日頃から胎仔栄養膜細胞から分泌されはじめ、妊娠 15~17 日に分泌量が最大となる妊娠に必須のタンパク質である。インターフェロンタウを 1 日 2 回・2~8 日間ヒツジ子宮内に注入することにより黄体寿命を延長させうることから、インターフェロンタウはパラクラインとして子宮内膜に作用し、子宮内膜からのプロスタグランジン F2 α の放出を変化させ、黄体退行を抑制すると考えられてきた。最近、妊娠ヒツジ子宮静脈中の抗ウイルス活性や黄体中の Interferon-stimulated gene 15kDa (ISG15) の mRNA 発現量は、非妊娠ヒツジよりもはるかに高いことが明らかとなった。そこで、インターフェロンタウは子宮静脈中の抗ウイルス活性に関与しており、黄体に対し内分泌的に作用しているとの仮説をもとに実験が行われた。組換えヒツジインターフェロンタウに対する抗血清を用いたインターフェロンタウ中和試験の結果から、妊娠ヒツジ子宮静脈中の抗ウイルス活性はインターフェロンタウによりもたらされていることが明らかとなった。また、24 時間あたり 200

μg の組換えヒツジインターフェロンタウあるいはウシ血清アルブミン (BSA) をミニ浸透圧ポンプを用いて発情後 10 日から 11 日の非妊娠ヒツジ子宮静脈中に注入し、インターフェロンタウの内分泌作用を検討した結果、組換えヒツジインターフェロンタウを 24 時間注入したヒツジ黄体中の ISG15 の mRNA 発現量とタンパク量は、BSA 注入群よりも有意に多かった ($P<0.05$)。ミニ浸透ポンプによる BSA 注入 12 時間後でのプロスタグランジン F2 α 注射によって、6 から 12 時間後に血清中プロジェステロン濃度は減少したが、組換えヒツジインターフェロンタウ注入ヒツジにおいては 6 時間までは低下したもののが 12 時間後にはもとのレベルに回復した。次に、発情周期 10 日目から 7 日間、1 日あたり 200 μg の組換えヒツジインターフェロンタウあるいは BSA を子宮静脈内に注入したところ、BSA 注入ヒツジ全頭が発情後 19 日で発情を回帰したが、組換えヒツジインターフェロンタウ注入ヒツジの 80% で Day32 まで黄体期レベルのプロジェステロン濃度が維持された。以上の結果から、インターフェロンタウは子宮から子宮静脈に移行し、内分泌作用として黄体中のインターフェロン誘導遺伝子群 (ISGs) を発現させ、黄体の退行を抑制することが明らかとなった。

反芻動物における妊娠認識物質であるインターフェロンタウは、胎仔栄養膜細胞から分泌されて子宮内膜に作用して黄体退行を抑制するが、血液中のインターフェロンタウを直接測定で検出できなかったことから、血液循環には移行しないと考えられてきた。近年、妊娠ヒツジ子宮静脈中の抗ウイルス活性が高いことから、インターフェロンタウが血液中に移行し、直接黄体に作用している可能性が報告された。インターフェロンタウの測定感度が十分ではなく、また、血液中へ移行したとしても移行量が極めて少ないために、これまで血液中インターフェロンタウを直接測定で検出できなかった可能性が考えられる。今回、抗体を用いた中和試験という間接的な形ではあるが、インターフェロンタウの血液中への移行の可能性が示された。子宮内から血液中への移行が事実であれば、イン

インターフェロンタウの子宮外での作用機序等の新たな研究の進展が期待される。

(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 ▶

シロイヌナズナにおける花粉特異的遺伝子への突然変異による自家和合性進化

Evolution of self-compatibility in *Arabidopsis* by a mutation in the male specificity gene.

T. Tsuchimatsu^{1,2}, K. Suwabe^{3,4}, R. Shimizu-Inatsugi¹, S. Isokawa³, P. Pavlidis⁵, T. Stadler⁶, G. Suzuki⁷, S. Takayama⁸, M. Watanabe² and K.K. Shimizu¹

¹Institute of Plant Biology, University of Zurich,

²Department of General Systems Studies,

University of Tokyo, ³Graduate School of Life

Sciences, Tohoku University, ⁴Graduate School of

Bioresources, Mie University, ⁵Section of

Evolutionary Biology, University of Munich,

⁶Plant Ecological Genetics, ETH Zurich,

⁷Division of Natural Science, Osaka Kyoiku

University, ⁸Graduate School of Biological

Sciences, NAIST.

Nature, 2010, Advance online publication,

doi:10.1038/nature08927

多くの植物において、他殖性から自殖性への進化は自家不和合性の欠失、生殖器官を含む花の形や形質の変化を経て起こって来たことが知られている。自家不和合性は、自殖を防ぐための主要な機構として多くの植物種に見られる。アブラナ科の自家不和合性は、*S* 遺伝子座に座乗する花粉側認識因子 SCR, 柱頭側認識因子 SRK ならびに自家不和合性関連因子によって制御されている。SCR と SRK が遺伝子型特異的に結合し、自家不和合性を引き起こすことが分かっている。また、この *S* 遺伝子座領域は非常に多型に富んだ構造をしており、それらの遺伝子型は *S* ハプログループと呼ばれている。交配相手がいないなどの、自殖が他殖に対して有利に適応する環境下においては、花粉側の突然変異による植物の自殖化は、雌側に対するものよりも、集団内に広がりやすいと考えられるが、実際にそれが実証された例はなかった。本論文

において材料としたシロイヌナズナはアブラナ科に属する自家和合性植物であるが、和合性への変化は比較的に近い年代で起こったものと考えられてきた。事実、シロイヌナズナ近縁種で自家不和合性の *A. lyrata* の SRK, SCR を導入することによって不和合性を誘起することができると報告されていた。シロイヌナズナでは、現在までに 3 種類の *S* ハプログループしか見つかっておらず、それぞれのハプログループでの和合性への進化は独立に起こったものと考えられている。また、シロイヌナズナでは自家不和合性の花粉、柱頭因子だけでなく、自家不和合性関連因子などに対して、多様な突然変異が起こっていることも明らかとなっており、自殖への進化がどの突然変異に起因するかは不明であった。

著者らはまず、シロイヌナズナの多数のエコタイプを使って、*S* 遺伝子座領域の塩基配列を決定したところ、ヨーロッパ由来系統の 95%において、SCR 遺伝子に同じ 213bp の逆位が存在することを見いだした。さらに、それらエコタイプの中に、SRK の塩基配列中に機能消失ともなう変異がない系統が存在することを明らかにした。これら SRK を持つ系統を用いて、自家不和合性の近縁種 *A. halleri* との種間交雑を行ったところ、少なくとも 7 系統においては、雌側の自家不和合性が機能していると考えられた。次に、SRK 遺伝子が機能しているエコタイプの一つ Wei-1 系統を使って、SCR 遺伝子の逆位を元に戻したもの導入したところ、自家和合性であった Wei-1 系統は自家不和合性となった。このことから、Wei-1 では SRK を含む全てのめしべ側自家不和合性関連因子が機能していることが明らかとなった。

これらの結果から、シロイヌナズナでは自家不和合性花粉側認識因子 SCR 遺伝子に生じた逆位が原因で自家不和合性から自家和合性となり、ヨーロッパ各地に広がって現在に至ることを明らかにした。

(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 ◆

肥満に伴うメタボリックシンドロームと腸内細菌の関係

Metabolic Syndrome and Altered Gut Microbiota in Mice Lacking Toll-Like Receptor 5.

Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, Sitaraman SV, Knight R, Ley RE, Gewirtz AT.

Department of Pathology, Emory University, Atlanta, GA 30322, USA.

Science. 2010 Mar 4.

近年増加しているメタボリックシンドロームは、一般的に過食によるエネルギーの過剰摂取や運動不足が原因であると考えられてきた。2006年に米ワシントン大のチームが「腸内細菌の構成比率が太りやすさに関係する」と発表し、話題になったことは記憶に新しい。本報告では、腸内細菌叢とメタボリックシンドロームの関連性について着目し、「腸内細菌とそれを制御する免疫系がメタボリックシンドロームに関係する」と結論付けている。

腸内細菌の構成には、宿主の遺伝的性質と自然免疫の両方が関与することが知られている。中でも Toll-like receptor 5 (TLR 5)は主に腸で発現し、腸に侵入してくる微生物病原体を感じることで自然免疫に重要な役割を持っていると考えられる。遺伝子操作によって TLR 5を欠損させたマウスを作製して実験を行った結果、正常マウスと比較して TLR 5欠損マウスは食事摂取量が増加し、体重が約 20%増加して肥満となった。さらに TLR 5欠損マウスは、内臓脂肪量、血中の中性脂肪やコレステロール量の増加、血圧の上昇などのメタボリックシンドロームの症状を示した。TLR 5欠損マウスはインシュリン抵抗性の症状を示し、血糖値のコントロール能力も低下していた。また、TLR 5欠損マウスの脂肪組織からは、正常マウスと比較して IFN γ や IL-1 β といった炎症性サイトカインが高レベルで分泌しており、脂肪量の増加した TLR 5欠損マウスでは弱い炎症が慢性化することを示唆した。

つづいて、正常マウスと TLR 5欠損マウスに高脂肪食を摂取させた結果、どちらのマウスも血中の中性脂肪やコレステロール量、インシュリン量が増加した。特に TLR 5欠損マウスでは糖尿病、膵臓の炎症、脂肪肝などの深刻な症状を示し、メタボリックシンドロームの症状が顕著に悪化した。

次に、TLR 5欠損による腸内細菌叢の変化がメタボリックシンドロームを引き起こしたのではないかと考えた著者らは、広域スペクトルの抗生物質を TLR 5欠損マウスに投与した。その結果、抗生物質投与 TLR 5欠損マウスは腸内細菌が 90%まで減少し、メタボリックシンドロームの症状が改善した。ピロシーケンス法による 16S rRNA 解析によって腸内細菌の構成比率を調べた結果、TLR 5欠損マウスの腸内細菌は門レベルでは変化していなかったが、種レベルでは大きく変化していた。さらに、腸内細菌の構成比率の変化はメタボリックシンドロームの原因なのか結果なのかを明らかするために、TLR 5欠損マウスの腸内細菌を無菌マウスに移入して実験を行った。その結果、細菌を受け取ったマウスに、過食、肥満、炎症性サイトカインレベルの上昇やインシュリン抵抗性などのメタボリックシンドロームの症状が現れた。よって、腸内細菌の変化がメタボリックシンドロームの原因であることが明らかとなった。

結論として、「自然免疫系の異常がまず腸内細菌叢の変化を引き起こし、誘導された弱い炎症シグナルが膵臓の弱い炎症をもたらし、膵臓のインシュリン受容体シグナルを鈍化させることで過食と肥満につながり、やがてメタボリックシンドロームの諸症状を示すのであろう。」と著者らは提唱した。

現在、腸内細菌がヒトの健康と深く関わっているという考えは広く支持されている。本報告のように腸内細菌と我々宿主との相互作用を解明することで、我々は腸内細菌と今後より良い共生関係を築くことができるかもしれない。

(抄訳：柳原沙恵, YANAGIHARA Sae, カルピス株式会社 健康・機能性食品開発研究所)

編集後記

139号をお届けします。本号の総説では中野雄司氏(理化学研究所等)らに有用物質・遺伝子・形質の探索と応用を目指した植物ケミカルバイオロジー研究についてご紹介戴きました。

その他の研究情報としては、塚本健司氏(動物衛生研究所)らに無線センサネットワークによる鶏健康監視システムの開発、小板橋基夫氏(農業環境技術研究所)に揮発性静菌物質生産糸状菌による有害糸状菌の抑制、植田充美氏(京都大学)らにバイオマスを完全分解・糖化する革新的微生物前処理技術に向けた研究、近藤恵美子氏(埼玉県農林総合研究センター)らにイオンビーム照射による芳香シクラメンの花色変異体の作出、野方洋一氏(近畿中国四国農業研究センター)に小麦のふすまから血圧降下ペプチドの製造法の開発、宮崎昌宏氏(生研センター)らに輸出用果実のハダニ類を除去する連続搬送式果実洗浄機の開発、大井田寛氏(千葉県農林総合研究センター)に広食性土着天敵オオメカメムシの生態とその害虫防除資材としての活用について、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)、柳原沙恵氏(カルピス(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。 (佐々木記)

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139号

平成22年5月15日発行

発行人 前川 泰一郎

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 虎ノ門マリンビル10階

TEL 03-3459-6565 FAX 03-3459-6566

e-mail brainki1@ml.affrc.go.jp URL <http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>