

# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成23年7月15日(隔月1回15日発行)  
ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.146

15 JULY, 2011

ブレインテクノニュース



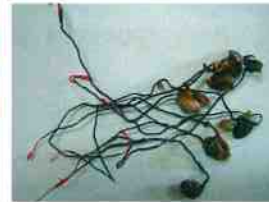
シネンシス  
(*Cordyceps sinensis*)



サナギタケ  
(*Cordyceps militaris*)



【左】ハナサナギタケ (*Isaria japonica*)



【中】カメムシタケ (*Cordyceps nutans*)



【右】セミタケ (*Cordyceps sobolifera*)



クモタケ  
(*Isaria atypicola*)



ツクツクボウシタケ  
(*Isaria sinclairii*)

## 冬虫夏草各種

## 冬虫夏草など希少キノコの生理活性と新規栽培法の開発

九州大学 大学院農学研究院 環境農学部門 森林環境科学講座

大賀祥治・楊 柏松・成 漢功・高野克太・孫 竹・チャンドラ ポクレル・  
孟 天暁・フェルザナ イスラム・楊 仲凱・アーメッド イムティアジ

## 目 次

## 特 集

## 「きのこの最先端研究」

- (総説) きのこに関する研究動向・・・健康素材としての栽培から効能解析を中心に・・・ ..... 1  
江口文陽 (高崎健康福祉大学 健康福祉学部 健康栄養学科)
- 食品中のきのこの DNA 鑑定 ..... 8  
會見忠則 (鳥取大学 農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター 菌類きのこ分子  
遺伝学研究部門)
- 冬虫夏草など希少キノコの生理活性と新規栽培法の開発 ..... 14  
大賀祥治・楊 柏松・成 漢功・高野克太・孫 竹・チャンドラ ポクレル・孟 天暁・  
フェルザナ イスラム・楊 仲凱・アーメッド イムティアジ (九州大学 大学院農学  
研究院 環境農学部 森林環境科学講座)
- シイタケゲノム解読とその利用 ..... 23  
宮崎安将<sup>1</sup>・金子真也<sup>2</sup>・高野麻理子<sup>1</sup>・中村雅哉<sup>1</sup>・村田 仁<sup>1</sup>・馬場崎勝彦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>(独) 森林総合研究所, <sup>2</sup>東京工業大学大学院 生命理工学研究科)
- マイタケ抽出成分の血糖値抑制機能 ..... 30  
田中昭弘 (株式会社 雪国まいたけ 研究開発室)

## 国内情報

- 堆肥原料の簡易な通気抵抗測定装置 ..... 35  
原田泰弘・皆川啓子 ((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

- デュアル抵抗性遺伝子システムの発見と病害抵抗性作物の創製に向けた技術開発 ..... 40  
鳴坂義弘 (岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所)

## 文献情報

- プロスタグランジンは羊における胚の伸長とインターフェロンタウの子宮内膜への  
作用を調整する ..... 45  
Piotr Dorniak et al. (*BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 84, 1119-1127, 2011)  
抄訳: 下司雅也
- CLV3ペプチド-FLS2シグナル伝達系による幹細胞の免疫機構 ..... 46  
H. Lee et al. (*Nature*, 473, 376-379, 2011) 抄訳: 高田美信
- トランスクリプトーム解析によるエタノールストレスに対する一倍体, 二倍体酵母の  
応答の違い ..... 47  
Bing-Zhi Li et al. (*Journal of Biotechnology*, 148, 194-203, 2010) 抄訳: 金井宗良

## 表紙の説明

筆者らは、希少キノコである、冬虫夏草類の生産システムの研究開発を行っており、シネンシスやセミタケなど有用性が高いものについて、天然素材を中心とする培地での栽培化に成功した。さらに、電気パルス印加によって子実体の発生が安定化し生産量が増加すること、また、電気パルスの刺激処理で生理活性がみられる有効成分の含有率が増加することが明らかになった。本論文では冬虫夏草菌の生態および栽培、さらに生理活性についての成果を概説している。表紙写真は各種の冬虫夏草を示す。

詳細については14頁をご覧ください。

## ◀ 特集 総説 ▶

# きのこに関する研究動向

## …健康素材としての栽培から効能解析を中心に…

高崎健康福祉大学 健康福祉学部 健康栄養学科

江口 文陽

わが国では、高齢社会の到来で医療費の負担が巨大化することから予防の観点から国民の生活習慣の改善を進めている。近年、このような背景をもとにきのこの機能性にも期待が寄せられている。特定のきのこで医療科学的評価をもとに効能が確認されても同一名のきのこすべてに対しての科学的保証とはならない。すなわち、きのこなどの天然素材は、品種、栽培法によってもその効能が大きく異なるからだ。健康素材としての観点から、きのこの栽培、効能解析、消費者が食するためのポイントに関する研究も現在実施されているのでその一端を紹介する。

### 1. はじめに

日本人がきのこを食べる習慣は古く、縄文時代にはすでに食していた形跡がある。また、「日本書紀」や「万葉集」などの古い書物にもきのこを食べた記録がある。その時代は、自然に生えているきのこをとって食べていたのであろう。きのこを人工栽培するようになったのは、江戸時代初頭といわれている。豊後国（現在の大分県）の炭焼き職人である源兵衛が、炭焼きで残った丸太にシイタケが発生しているのを見つけ、人工栽培することを思いついた。しかし、当時のシイタケ栽培は、丸太に鉋で傷（鉋目）をつけ、自然界に飛んでいるシイタケの胞子が鉋目に付くの待つかという方法だったため、農家の収入は安定しなかった。

きのこを育てるための原木に種ごま(菌糸が繁殖した円錐の駒)を植え付け、きのこを人工栽培する方法は1943年に森喜作博士が発明した。この発明により、本格的な原木栽培が始まり、シイタケが安定して生産されるようになった。

野外で行われる原木栽培は、自然に近い栽培方法のため天候によって収穫される量や品質が左右されやすいことが欠点であることから、原

EGUCHI Fumio

〒370-0033 群馬県高崎市中大類町 37-1

木を室内栽培に用いることも昭和50年代後半からは多く見られるようになった。しかし、原木はその重量が重いことから、労働者の高齢化や作業効率を考慮し現在は、オガクズと栄養剤を固めたブロックでの栽培(菌床栽培)が多く導入されている。シイタケのみならず多くのきのこで菌床栽培が可能となっている。生シイタケの場合は、7割以上が菌床栽培でつくられている。

かつて菌床栽培が導入された頃は、原木シイタケと菌床シイタケでは形状や成分にも違いがみられ原木栽培が優良とした見方もあった。近年は、生産技術の向上や種菌の開発によって菌床シイタケの品質も良好である。

現在は、原木、菌床という区別ではなく、国産、海外産という考え方できのこを認識すること、さらには菌床栽培であるならばその利点を生かして菌床培地に機能性を高めることが可能な栄養剤や機能性物質を添加した栽培法の研究開発も行われている。きのこの総生産額は、ここ10年以上目立った増額がないことから、生食や乾燥品としての一般的な食材としての利用のみならず機能性に特化した高付加価値化の研究なども先端的研究として実施されることが望まれる。

## 2. 健康増進を考えたきのこ研究の在り方

きのこは、食物繊維、ビタミン、ミネラルなどの栄養素を多く含む有用な食糧資源である。さらに、ヒトの身体に作用して病気の予防や治療に作用する薬となる成分も持っている。中国では、チョレイやブクリョウ、冬虫夏草、靈芝（マンネンタケ）やシロキクラゲなどのきのこが生薬、漢方薬、民間薬として珍重されてきた。2千年以上前の中国の皇帝、秦の始皇帝が探し出した不老長寿の薬は靈芝だったとも伝えられている。また、中国の書物には「シイタケは気を益し、飢えず、風邪（かぜ）を治し、血を破る」とシイタケが身体の調子を整えることが書かれている<sup>2)</sup>。

近年、きのこの品種や栽培法にこだわった研究も実施され始めている。機能性食品としてその品種が目ざされると同一名のきのこ全てに当てはまるかのごとくヒトはその品種に殺到する。同一名のきのこであっても数十から数百の品種があるとともに栽培方法も千差万別であり、その機能性は大きく異なることもある。

生薬や漢方の基盤をもった研究者であれば、天然素材であるきのこの複合成分が如何に効果を示すかとした理論を検証し、エビデンスを構築するであろう。しかしながら、特定成分が同定されない機能性きのこは、サイエンス性が無いとした見解を示す研究者がいることも事実である。その背景としては、これまでの食品化学や医薬品開発の研究は、成分を抽出して、その成分の持つ機能性効果を最も発現する特定物質を同定し、その物質を安価に合成する研究が展開してきたからである。

きのこの機能性効果の評価は、機能性効果を発現する品種や栽培方法にもこだわりを持って、その複合的な成分の評価をすることも日常的な健康増進のためには極めて重要である。

創薬ならぬ創食の研究ストラテジーは、氏素性のはっきりした品種をどんな栽培方法で生産し、一般の食べ方や抽出物としての摂食、加

工処理においても機能性成分が変性しないことを明確にすることが肝心である。将に、きのこは天然資源の中でも生薬や漢方としての領域に含まれるものであることからこの点に最大限の配慮を持って研究展開することが必要であろう。

## 3. 健康増進に役立つきのこ

### (1) 抗高血圧効果

循環器系疾患の中でも高血圧症は、肥満や運動不足から増加する傾向にあり、遺伝的要素と日常生活上の不摂生以外に高血圧の原因が見つからない場合は、本態性高血圧症と診断される。このタイプ高血圧症は、一般的に中年以降に発症することが多い。さらに糖尿病、耐糖能障害および脂質異常症などを伴いやすいことが知られている。高血圧疾患に対する治療法としては、Ca拮抗薬、β受容体作動薬、アンギオテンシン転換酵素(ACE)阻害薬を用いる治療が効果的である。しかしながら、これらの薬物による長期治療での副作用の発現は患者にとって治療を拒否する原因となっている。また、軽度高血圧症では食事療法や運動療法があるが継続が困難である。そのため副作用を生じる可能性が低い機能性食品に対する関心が高まっている。

ヒメマツタケ CJ-01 株子実体(写真1) 熱水抽出物質は、ACE阻害活性試験において活性が確認された。したがって、サトウキビ茎頂部を堆



写真1 ヒメマツタケ (*Agaricus blazei*) CJ-01 株の子実体

肥化した菌床培地を利用して栽培したヒメマツタケ CJ-01 株子実体熱水抽出物質の投与方法(用法, 用量)を変えて本態性高血圧症のモデル動物(SHR)に対する降圧効果を検討した。

SHR は, WKY と比較して血圧値は顕著に高値であったが, SHR 間での血圧値は, ヒメマツタケ無投与群と比較して投与群は血圧の降下が確認された。血圧の上昇抑制効果は, 図 1 に示したように子実体熱水抽出物質 50~250mg/kg/day を投与したすべての群で確認されたが, その効果発現は, 逆釣鐘型現象を呈した。すなわち, 100~200mg/kg/day の用量が 50mg および 250mg/kg/day の用量よりも血圧抑制効果が高い結果であった。また, 元々正常血圧である WKY においては, 血圧の降下(異常)は確認されなかった。このことからヒメマツタケ CJ-01 株は, 従来の高血圧治療薬のように単に血圧を下げるのではなく血圧を正常値に近づける効果があり, 安全に服用できることが確認された。SHR は, WKY と比較して A/G 比, 尿素窒素, 尿酸, 中性脂肪の値が高く, 総コレステロール, HDL-コレステロール,  $\beta$ -リポタンパク, 白血球数が低いことが知られている。この検査項目の値がヒメマツタケ CJ-01 株を投与した SHR では, 顕著に改善することも確認された。特に, 脂質代謝異常の改善を有する良好な成績であった<sup>3)</sup>。これらの前臨床試験の成績は, ヒト試験においても観察されたが, ヒメマツタケ CJ-01 株熱水抽出物質を分子量分画によって解析したり, 脱糖・除タンパク処理などを行って得た精製物では効果が大幅に減弱する結果も観察された。これらの結果から, ヒメマツタケ CJ-01 株の降圧効果の活性本体は熱によって粗抽出された物質に含まれることは確認できた。しかしその物質の特定には至っていない。

さらに, ヒメマツタケ CJ-01 株の子実体熱水抽出物質は少なくとも腎不全(写真 2), 糖尿病等に効果を有することが動物試験によって確認されている<sup>4,5)</sup>。また, 医薬品や他の食品との相互作用の解析では, 肝の薬物代謝酵素に影響を及ぼすことはきわめて少なく機能性を発現すること<sup>6)</sup>, 免疫機能に対してもヘルパー T 細胞の I

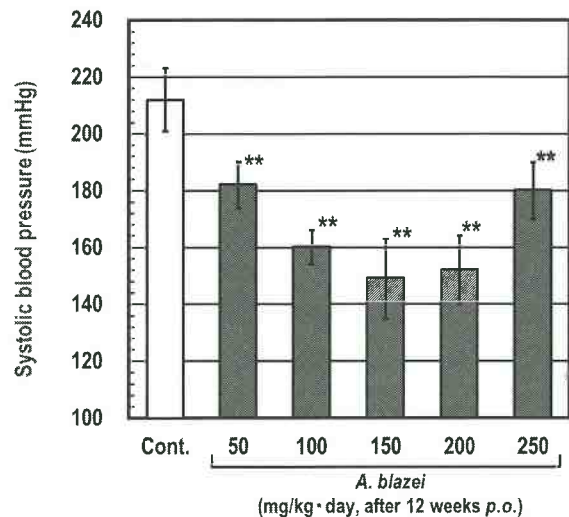


図 1 ヒメマツタケ CJ-01 株の子実体熱水抽出物質の投与による SHR に対する降圧効果 (\*\* $P < 0.01$ )

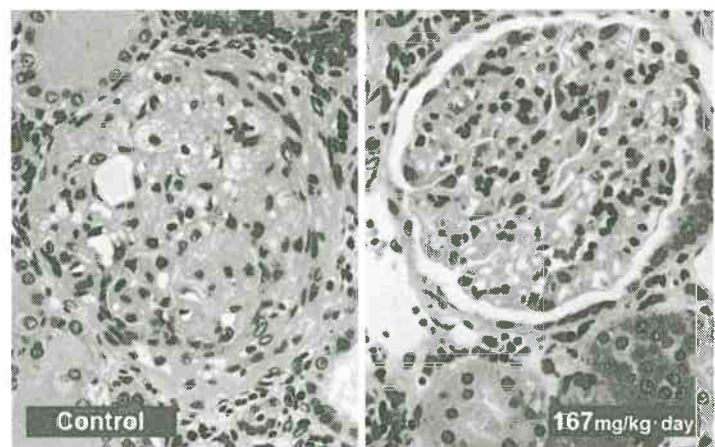


写真 2 ヒメマツタケ CJ-01 株子実体熱水抽出物質の投与による腎系球体に対する保護作用

Note : DOCA-NaCl 左腎摘出ラットに抽出物質を予防的に投与し腎機能不全の抑制効果を観察した。

型Ⅱ型の活性調節を行うこと、 $\text{INF-}\gamma$ や $\text{TNF-}\alpha$ の放出を促進させることが明らかとなっている<sup>7)</sup>。

こうした医療科学的なエビデンスを構築し、食生活の中できのこを上手に食品素材として取り入れるための正しい情報を消費者に発信する研究もきのこ業界において注目されている。

## (2) 脂質異常症及び肥満の改善効果

バイリング (*Pleurotus eryngii* var. *touliensis*) FERM P-19370株(写真3)は、近年栽培されるようになったきのこの一種である。バイリングが血清脂質項目と肝組織への脂肪沈着抑制に及ぼす効果についてヒト脂質異常症と類似したZuckerラットによって解析した。

Zucker-fattyラットの肥満抑制効果は、子実体熱水抽出物質 50~200 mg/kg/day を投与した群で投与開始4週間後から体重増加の抑制として観察された。この抑制効果は、本実験の用量設定群では用量の多い群ほど高い結果を示した。また、正常モデルであるZucker-leanラットにおいても正常な範囲内での体重の抑制が確認された。本モデル動物の病態の特徴である腎臓や肝臓などの機能低下に関与する尿素窒素、総コレステロール、遊離コレステロール、 $\beta$ -リポタンパク、中性脂肪、総脂質、リン脂質、AST、ALT、クレアチニン、尿酸、HDL-コレステロール、遊離脂肪酸などの検査項目は、統計的に有意な改善効果として用量依存的に確認された。さらに、病理組織の解析の結果、写真4に示したようにバイリング FERM P-19370株子実体熱水抽出物質の服用は、肝臓の脂肪滴数を著しく減少させる肝組織脂肪沈着抑制効果を認めた。また、グリコーゲンや脂肪の蓄積、ケトン体低下、タンパク質合成に関与し糖代謝異常の指標となるインスリン値は用量依存的に低下し正常値へと近づいた。インスリン分泌に関与する血管内カリウムの動態

から判断するとバイリング FERM P-19370株の脂質異常症と肥満の改善における作用機序の一つは、糖や脂質の代謝改善、過剰脂質の体外排泄促進によるものであり、有効成分として食物繊維、ミネラル、低分子領域のタンパク質などが総合的に関与しているものと推察する。なお、動物で観察された改善効果は、ヒト臨床試験の結果とも一致した<sup>7)</sup>。

## (3) 強迫性障害改善効果

ヒカゲシビレタケ (*Psilocybe argentipes*)は、日本を代表する催幻覚性きのこの1種である。ヒカゲシビレタケは、催幻覚性物質であるシロシビンとシロシンを産生する。これらは血液脳

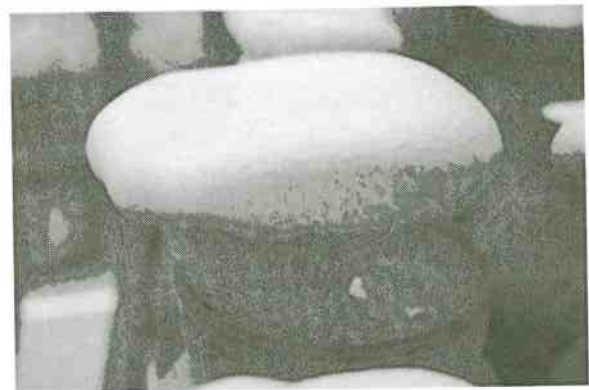


写真3 バイリング (*Pleurotus eryngii* var. *touliensis*) FERM P-19370株の子実体

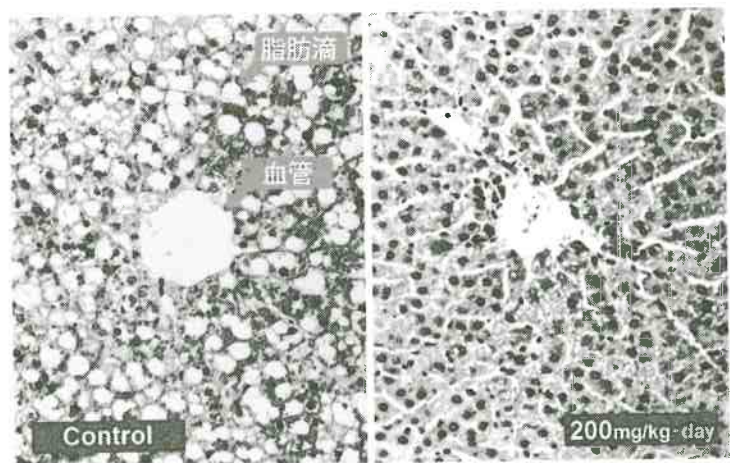


写真4 バイリング FERM P-19370株の子実体熱水抽出物質の投与による肝小葉中心帯への脂肪沈着抑制効果

関門を通過することが可能であり、脳内のセロトニン(5-hydroxytryptamine: 5-HT)<sub>1A</sub>受容体、5-HT<sub>2A/2C</sub>受容体へ選択的に亢進作用を呈する。なお、シロシビンとシロシンによる催幻覚作用は、5-HT<sub>2A</sub>受容体に対する亢進作用が大きく関与することも明らかとなっている。シロシビン群産生きのこが強迫性障害(Obsessive compulsive disorder: OCD)の治療に効果を示した研究は知られている。OCDは、強迫的な観念により特定の行動を一定の回数行わなければならない特徴を持ち、重篤な症状では一般生活を送ることが困難となる難治療性の神経系疾患である。現在OCDの薬物治療には、選択的セロトニン再取り込み阻害薬が第一選択薬として用いられているが、半数近くの患者において満足な治療結果は得られていない。したがって有用な新規医薬品の開発が望まれている。ヒカゲシビレタケに代表される催幻覚性きのこはシロシビンとシロシンをはじめとしてブフォテニン、ベオシスチン等脳内神経系へ影響を与える物質を複数産生するという特徴を持ち、難治療性の神経系疾患治療における新たな選択枝となりうるものと考えられる。しかし、催幻覚性きのこは食用としての利用が期待できない(ヒカゲシビレタケは、日本では「麻薬及び向精神薬取締法」により採取、所持、培養などが規制されている)ため、研究対象とされることは稀であり、医薬品としての可能性はこれまでは検討されてこなかった<sup>8)</sup>。著者らの研究グループは、きのこでの創薬研究の一端としてヒカゲシビレタケが脳内モノアミンに与える影響の解明、OCDの動物モデルであるげっ歯類の玉覆い隠し行動へ与える影響と各種受容体亢進作用への影響について検討している。

OCDの動物モデルとして広く使用されるマウスの玉覆い隠し行動試験(本試験は、マウスが覆い隠すガラス玉の個数の抑制率と自発行動量への影響の有無により抗

OCD能の指標とする行動薬理的試験である)を用いてヒカゲシビレタケの抗OCD能を測定した。ヒカゲシビレタケは0.1g-1g/kgの投与量において、図2に示したように自発運動量は減少しないものの、図3に示したようにマウスの

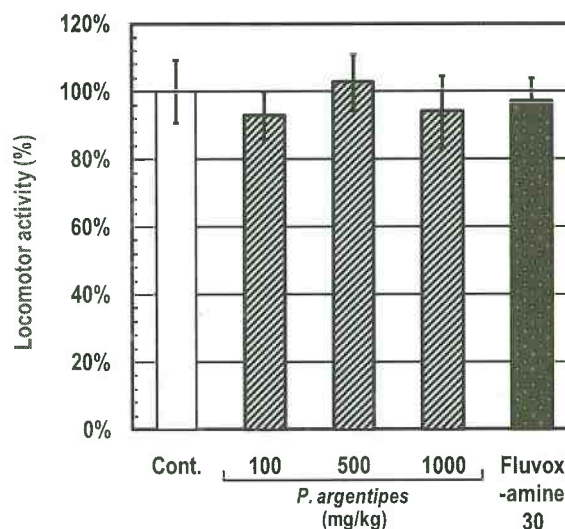


図2 ヒカゲシビレタケの投与によるマウスの自発運動量への影響

Note :Controlの自発運動量を100%として投与による変化を確認した。

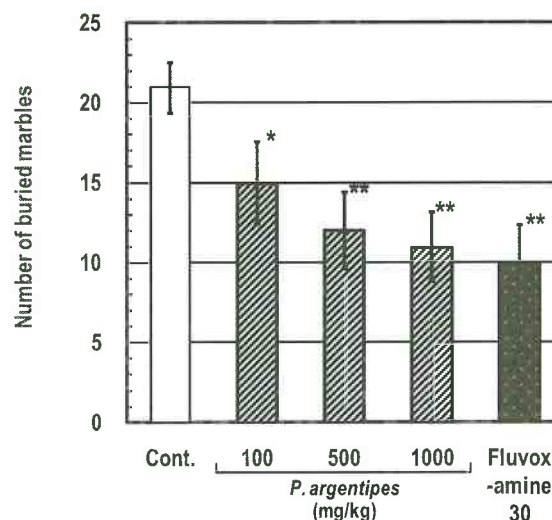


図3 ヒカゲシビレタケの投与によるマウスの玉覆い隠し行動(隠し玉数)への影響 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

ガラス玉覆い隠し行動(隠した玉の数)が有意に減少する効果をもたらした。薬剤コントロール(Fluvoxamine)と比較するとヒカゲシビレタケの投与量は粗抽出物質であるため多いもののその効果は同等であった。以上の結果は、ヒカゲシビレタケが OCD の臨床治療物質として有用であることを示唆するものである。また、5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A/2C</sub> 受容体拮抗剤は、それぞれヒカゲシビレタケの効果を抑制した。ヒカゲシビレタケのメタノール抽出物質は、投与後一時的にマウスとラットの脳内モノアミン含有量を減少させる傾向を示した。しかし、これらの影響は投与 12 時間後までに回復した。この脳内モノアミンの変動時間は、催幻覚性きのこによる肉体的、身体的症状の持続時間と類似しており、両者の相関関係を示唆した<sup>9)</sup>。なお、本研究は麻薬研究者江口文陽(群馬県第 9010 号)および松島良紘(群馬県第 9013 号)によって実施されたことを明記する。

#### 4. 機能性効果を食卓で引き出す方法

上述したように高血圧症や肥満・脂質異常症などのヒトの疾患と類似した病態のラットやマウス、さらにはヒトにきのこを食べさせた研究で、生活習慣病が予防できることがわかると、健康増進効果を引き出す摂食量やきのこの保存法、調理法が気になる。そのような研究も現在実施されつつあり以下のことがわかっている。

きのこの一日の摂取量は、生のきのこの状態で毎日 50~150g 程度を摂食することがベストである。さらに、きのこの力を最大限に引き出すには、生きのこならば新鮮な子実体を利用することである。きのこも生物なので自己消化反応が起きるからであり、自己消化はきのこの成分を分解する。その一例として国内産のシイタケと比較すると時間がかかって輸入される海外産のシイタケは血漿コレステロールを低下させる機能成分のエリタデニン含有量が平均で約半分という結果であった。生産される海外の現地で分析すればその量は日本のものと遜色ない。

この場合での差は、品種や栽培法ではなく流通にかかった時間の長さや輸入に伴うポストハーベスト処理が関与成分を減少させたと考えられる。すなわち、生のきのこを室温あるいは冷蔵保蔵する場合には、収穫されたきのこを出来るだけ早く食べる方が良い。さらに日本の農産物や特用林産物をいわゆる地産地消で利用することも大切である。

また、近年のきのこ利用に関する研究から一度に使い切れないきのこの保存方法としては、乾燥保存のみならず料理メニューをイメージして、きのこをその具材の大きさに切って冷凍することが良い。冷凍は、きのこの細胞壁を膨張・破壊させ、細胞壁中の有効成分が調理時に細胞外へ多く分泌されることもわかっている。天ぷらなどの新鮮さを活かす料理には不向きであるが、煮物やカレー、みそ汁の具などには冷凍保蔵がおすすめである<sup>10)</sup>。なお、料理レシピについては、参考文献No.10 のレシピ本を参照いただきたい。

#### 5. おわりに

きのこの機能性解析に関する真の科学研究は、数種のきのこで開始されてはいるものの解決しなくてはならない課題が山積している。その課題を少しずつ解明すれば 21 世紀の新規医薬品がきのこから開発されることにも期待がもたれる。

特用林産物であるきのこは、まだまだ未同定の品種があるとともに、機能性効果が明確になっていない天然資源でもあり、農科学の研究を持続的に実施していけば大きな成果が得られるものと考えている。

私は、品種、栽培、加工(料理)、科学的機能解析、利用の汎用性の開拓などの一連の仕事を推進することが天然物であるきのこの先端研究をさらに躍進させるものと確信している。



## 参考文献

- 1) 江口文陽(2006), きのこを利用する, 地人書館, 東京
- 2) 江口文陽(2001), キノコを科学する-シイタケからアガリクス・ブラゼイまで-, 地人書館, 東京
- 3) 江口文陽ら(1999), 和漢医薬学雑誌, 16(5),201-207
- 4) 江口文陽ら(1999), 和漢医薬学雑誌, 16(1),24-31
- 5) 桧垣宮都ら(2000), 和漢医薬学雑誌, 17(5),205-214
- 6) 山田静雄ら(2003), 和漢医薬学雑誌, 20(5),221-229
- 7) Miyamoto, K.et al. (2002), *J.Trad.Med.*19(4), 142-147
- 8) Matsushima,Y.et al.(2009), *Inflammation and Regeneration*, 29(1)38-47
- 9) Matsushima,Y.et al.(2009), *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(8), 1866-1868
- 10) 江口文陽ら(2010), からだに美味しいきのこ料理 115, 理工図書, 東京

◀ 特集 ▶

## 食品中のきのこの DNA 鑑定

鳥取大学 農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター  
菌類きのこ分子遺伝学研究部門

會見 忠則

きのこの種の同定は子実体の形態により分類・同定されているが、正確な同定には、高度な熟練した技術を要する。しかし、食品表示偽装の監視、救急医療、麻薬取締等の現場におけるきのこの同定は、本来の形態を留めていないものが中心となるため、形態による同定はほぼ不可能である。そこで本研究では、「状態を問わず」、「迅速に」、「簡単に」、「誰でも」、「どこでも」、「安価に」、「再現性良く」、きのこの種の同定を行うために、DNA 解析技術の応用を検討した。

## 1. はじめに

食品の偽装表示は、製品の外見だけで見破ることが極めて困難なもの、すなわち、生物本来の形態を留めていない精肉や魚の切り身等で行われる。しかし、きのこに関しては、生の形態を保持したものですら表示の偽装を外見だけで見破ることが難しい。もう 8 年以上前になるが、2003 年 4 月 19 日の朝刊に、【東京・築地市場に 18 日、「人工栽培のマツタケ」が初入荷した。】なる記事が掲載された<sup>1)</sup>。しかもその「人工栽培のマツタケ」の評価は、【1 キロ当たり 1 万円の値が付いた。昨年秋の国産天然物相場の 5 分の 1 以下だが、中国産などの輸入品と同等かやや高めの評価を得た。】とのことであった。しかし、これは実際にはシイタケであったことが DNA 鑑定により判明した。このような表示偽装どころか、詐欺ではないのかと思われる事件はあとを絶たず、2011 年になっても筆者のところに、似たような情報が入り、徐々に「人工栽培マツタケ」という言葉を耳にした。一般に生物の種は、生物固有の形態学的特徴により同定されるが、「きのこ」の場合、その正確な同定には、かなりの専門知識と熟練を要するため、だまされやすい。このことは、野生の毒きのこ

を食用きのここと誤同定して食することが原因の中毒患者は毎年発生し、2010 年は 200 人超であることから同定の難しさが解る。

このように、完全な形態を保持しているきのこですら困難な同定は、加工調理により生物本来の原形を留めていない食品中のきのこの場合は、不可能に近く DNA 鑑定が必要となる。きのこの種の DNA 鑑定のニーズは、加工・健康食品の表示等を監視する監督官庁や、保健所や救急医療の現場では毒きのこ中毒様患者の診断、科学捜査の現場では麻薬取締等が考えられる。しかし、この場合の DNA 鑑定に求められることは何であろうか？

図 1A に rDNA-ITS の塩基配列比較によるきのこの種の同定を想定した場合のフローを示した。省略可能な操作もあるが、結果を得るまでに約 10 時間かかる。もし仮に、救急医療の現場を想定した場合どうであろうか？もし一刻も早く、患者が食べた毒きのこを特定したい場合、図 1A に示した様な通常の手順を踏んでいては、到底間に合いそうにない。従って、「どこまで時間の短縮ができるのか？」が、まず第 1 番目の改善点であると考えた。2 番目に、「どこでも誰でもできる様にする」ことが求められる。例えば、ある特殊な分析機器が必要であるとか、きのこの形態学者の様な特殊な技能を持つ人が必要となると、サンプルの輸送にかかる時間が余計に

AIMI Tadanori

〒680-8553 鳥取市湖山町南 4 - 101

必要になる。近年、珍しくなくなった AED（自動体外式除細動器）とまではいかないにしても、検査室を持つ大病院や保健所程度の施設には設置できる程度のシンプルかつ安価なシステムがよいし、それが、多少の訓練で誰でも実施可能である必要がある。また、直接塩基配列を決定する方法では、サンプル中のカビのコンタミネーションやきのこサンプル中の対立遺伝子間の塩基の欠失や挿入により、塩基配列の解読が不能となれば、同定不能の事態になる（図1）。三番目に、加熱・調理、乾燥、粉碎等の加工をしたきのこから得られる低分子化しているであろう DNA でも供試できる高感度な検出方法の必要性が考えられる。

## 2. 加熱調理ときのこのDNA<sup>2)</sup>

食品中の DNA 鑑定の是非を確認するため、日本国内で広く流通しているツクリタケいわゆる

マッシュルームをモデルケースとして、様々な製品を加熱調理し、抽出可能な DNA の質について検討を行った。さらに、抽出した DNA を鋳型として rDNA-ITS 領域が増幅可能であるかについて検討した。

まず、きのこの子実体を 3 mm 程度にスライスした。それを“焼き”や“炒め”や“揚げ”，さらに“茹で”などの方法により調理した。レトルトパウチ食品については、沸騰水中で6分間加熱し、中身からきのこの子実体のみを取り出した。きのこは軽く水洗し DNA を抽出し、その質をアガロース電気泳動により確認した。その結果、生の子実体に関しては“焼き”や“炒め”や“揚げ”の調理をしたものでは、20 kbp 程度のサイズの大きな DNA が確認できた。“茹で”の調理をしたものは“焼き”，“炒め”，“揚げ”の調理をしたものよりも DNA の断片化が激しかった。これは“焼き”，“炒め”，“揚げ”の調理は高温ではあるが、短時間しか熱にさらされないのに対し，“茹で”

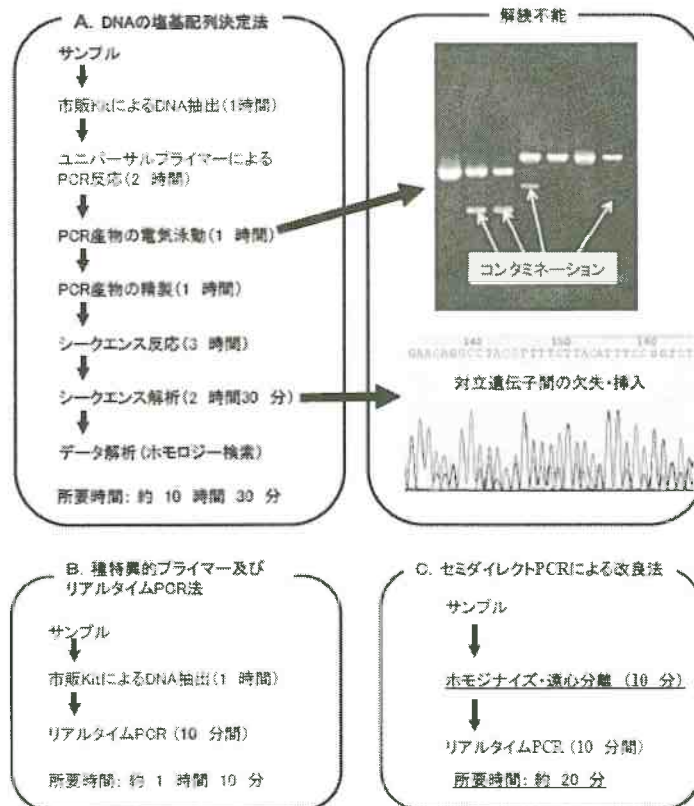


図1 rDNA-ITS の塩基配列比較による種の同定

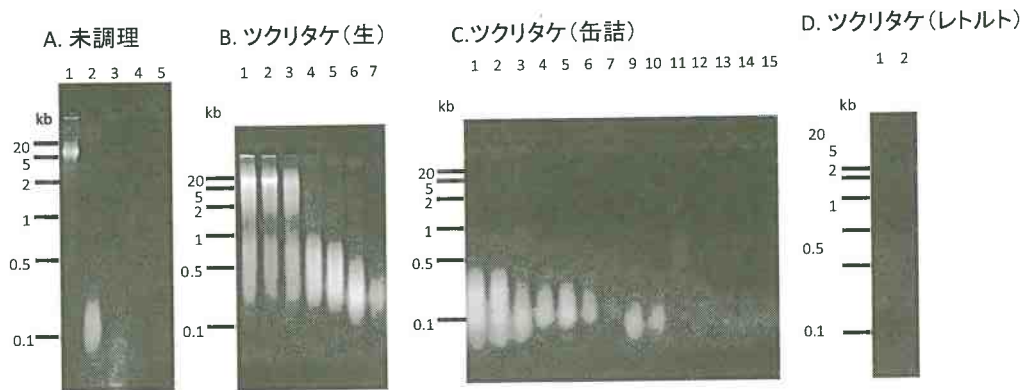


図2 きのこ（ツクリタケ）から抽出した DNA の 2%アガロース電気泳動図

- A, 生及び加工品の未調理品から抽出した DNA の電気泳動図。レーン 1, 生; 2, 缶・ホール; 3, 缶・スライス; 4, レトルト・スライス; 5, レトルト・ホール
- B, 調理したツクリタケ（生）から抽出した DNA の電気泳動図。レーン 1, “焼き”; 2 “炒め”; 3, “揚げ”; 4, “茹で” 30 分; 5, “茹で” 60 分; 6, “茹で” 120 分; 7, “茹で” 180 分の各調理をしたもの
- C, 調理したツクリタケ（缶詰）から抽出した DNA の電気泳動図。レーン 1, 8, “焼き”; 2, 9, “炒め”; 3, 10, “揚げ”; 4, 11, “茹で” 30 分; 5, 12, “茹で” 60 分; 6, 13, “茹で” 120 分; 7, 14, “茹で” 180 分の各調理をしたもの。レーン 1~7, ツクリタケ（缶・ホール）; 8~14, ツクリタケ（缶・スライス）
- D, 包装容器ごと“茹で”たレトルト製品中のツクリタケから抽出した DNA の電気泳動図。レーン 1, 2, 包装容器ごと 6 分間沸騰水中で加熱調理したもの。レーン 1, ツクリタケ（レトルト・スライス）; 2, ツクリタケ（レトルト・スライス）

は長時間熱にさらされたためであると考えられた。一方、缶詰に関しては未調理を含め全ての調理法において DNA は分解されていたが、100~300 bp の間で確認できた。レトルトに関しては、DNA の存在を確認することができなかった（図 2）。

次にこれらの DNA を鋳型として PCR 反応により、DNA が増幅できるかを調べた。その結果、生のきのこを出発材料とした場合、“焼き”、“炒め”、“揚げ”に加え 60 分までの“茹で”であれば、問題なく ITS4-ITS5 プライマー<sup>3)</sup>の間、約 700 bp の完全な rDNA-ITS 領域が増幅できた。120 分以上“茹でた”生のきのこでも、ITS2 と ITS5 プライマーの組合せにより最低でも 350 bp の領域が増幅できた。一方で、抽出段階で DNA が確認し難かった缶詰、レトルト製品の場合でも、その後の調理に関わらず、250 bp 程度の断片が増幅可能であった。以上のことから、加工食品中のきのこの DNA 鑑定の場合、250 bp 以下の DNA 断片の増幅で同定可能なシステムが必要であることが解った。今回は試験して

いないが、今後必要な検討事項として、嘔吐物や便中のきのこが同定の可否がある。これについては、人工胃液や人工腸液等により処理した後のきのこを使って検討していきたい。

### 3. 特異的プライマーの設計による同定<sup>4)</sup>

加工食品中のきのこから 250 bp 程度の PCR 産物が得られたということは、これらの塩基配列を決定すれば、同定は可能である。しかし、このままでは、増幅産物が得られた後に、同定までに 6 時間程度必要である（図 1A）。そこで、本研究では、時間の短縮及び高額機器を必要としない手法の開発のために、i) 種特異的プライマーを設計し、PCR 後の増幅産物を検出することによる塩基配列決定操作の省略、ii) PCR 反応後の電気泳動等の手順を省略するために、リアルタイム PCR を用いて行うことを考えた。

今回は、材料として、日本における毒きのこによる食中毒発生件数の原因の 77% を占める、ツキヨタケ、クサウラベニタケ、ドクササコ、

カキシメジのみを検出するための種特異的なプライマーを rDNA-ITS 領域内に設計し、それを使ったリアルタイム PCR それぞれを特異的に検出することにより、時間の短縮の可能性について検討した。なお、設計したプライマーは、全て増幅産物が 200 bp 以下になる様に設計した。それは、きのこは、必ずと言っていいほど鍋などの加熱調理をして食べるのが基本であるためである。結果を図 3 に示す。国内における主な毒きのこの中毒の原因となっている 4 種類の毒きのこそれぞれを特異的に検出することに成功し(図 3)、ここには示していないが、調理したものからでも検出可能であった。従って、この方法では、1 時間 10 分前後で全行程が完了す

る。また、鋳型となる DNA の質と量にもよるが、リアルタイム PCR の 5 サイクル目で既にシグナルが検出できているサンプルもある(図 3)。この PCR の反応条件は、1 分の熱変性 1 サイクルの後、5 秒の熱変性、5 秒のアニーリング、15 秒の伸長反応を 1 サイクルとして行っている。実際には、PCR 反応開始後、最短で約 3 分程度で、結果が出始めていることになる。従って、同定までの所要時間は約 1 時間程度まで短縮できたことになる (図 1B)。

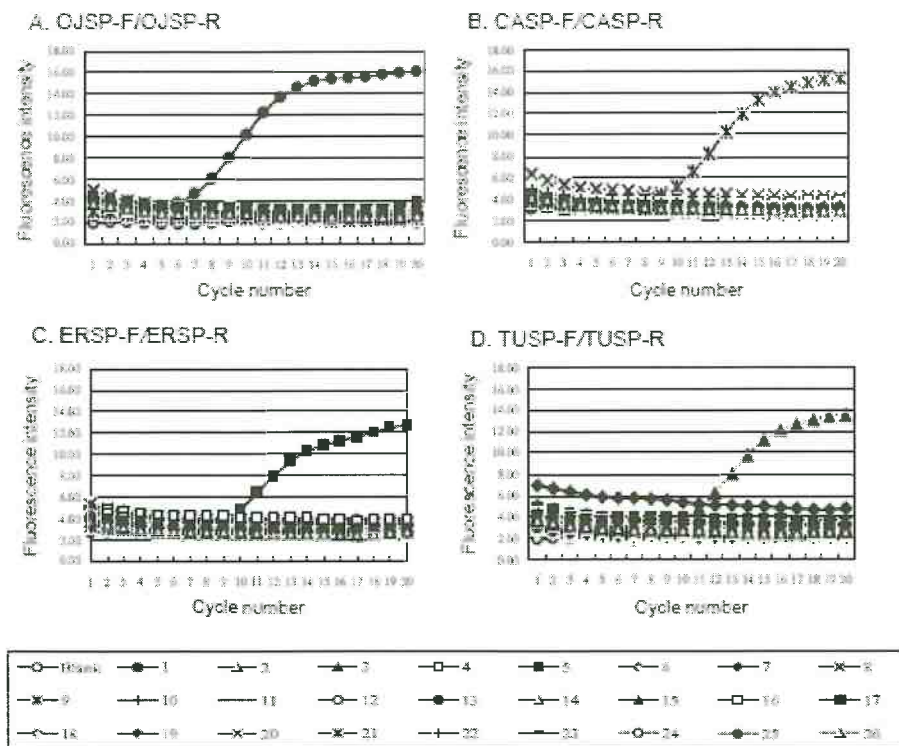


図 3 種特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR のプロフィール

Panel A, OJSP-F/OJSP-R (ツキヨタケ); Panel B, CASP-F/CASP-R (ドクササコ); Panel C, ERSP-F/ERSP-R (クサウラベニタケ); Panel D, TUSP-F/TUSP-R (カキシメジ). PCR の鋳型に用いたきのこは、以下の通りである。  
 1, *O. japonicus*; 2, *L. edodes*; 3, *P. ostreatus*; 4, *P. serotinus*; 5, *E. rhodopolius*; 6, *E. sarcopus*; 7, *L. shimeji*; 8, *L. decastes*; 9, *C. acromelalgae*; 10, *A. mellea*; 11, *C. clavipes*; 12, *C. gibba*; 13, *L. akahatsu*; 14, *L. chrysorrhoeus*; 15, *L. hatsudake*; 16, *T. ustale*; 17, *T. matsutake*; 18, *P. lubrica*; 19, *C. tenuipes*; 20, *A. auricula*; 21, *A. bisporus*; 22, *F. velutipes*; 23, *G. frondosa*; 24, *H. marmoreus*; 25, *P. nameko*; 26, *P. eryngii*.



図4 ホモジナイズの様子

#### 4. DNA 抽出法の簡便化<sup>5)</sup>

ここまでくると、DNA 抽出に見積もった 1 時間がとても長く感じてくる。そこで、この DNA 抽出をもっと簡単にできないか? と考えた。様々な DNA 抽出キットを試すことも考えたが、あるときコロニーダイレクト PCR<sup>6)</sup> という記事が目につき早速やってみることにした。当初は、子実体片をそのまま PCR 反応液に入れて PCR を行ってみたが、試した 7 種類のきのこの子実体組織および菌糸体（シイタケ、ツクリタケ、マイタケ、エリンギ、ブナシメジ、エノキタケ、ナメコ）、3 種類の菌根性きのこの菌糸体（マツタケ、ホンシメジ、ショウロ）のうち、ブナシメジ、ナメコ、エノキタケ、ツクリタケの菌糸体からのみ、PCR による増幅が可能であった。そこで次に、子実体組織および菌糸体を 2% Triton X-100 を含む TE バッファー中でホモジナイズ（図 4）するという工程を加えて、粗 DNA 抽出液を調整し、それを鋳型として PCR を行った（セミダイレクト PCR 法）。その結果、実験に供した全ての子実体組織および菌糸体から目的とするサイズの DNA の増幅が確認できた。以上の結果から、PCR 法に用いる鋳型 DNA 溶液は、上記の粗抽出液で十分であり、約 10 分でリアルタイム PCR まで到達可能となった。言い換えると、所要時間約 20 分のシステムが完成した（図 1C）。

#### 5. 今後の展望

本研究の当初の目的は、「毒きのこ中毒の迅速な診断法の開発」であり、なかなか手に入らない毒きのこ子実体の代わりとして、市販の食用きのこを予備実験的に使った結果を使っているため、まとまりにかけていることを御容赦願いたい。しかし、本研究のコンセプトである「状態を問わず」という点は、各種の加工や調理後のきのこからも使用に耐えうる DNA が得られたことによりクリアできた。そして最終的に提案したシステムにより、「迅速に」、「簡単に」、「誰でも」というコンセプトは少なくとも実現できたと考えられる。「どこでも」、「安価に」というコンセプトも、最近では、リアルタイム PCR 装置やその試薬もかなり安価になっており、本研究の成果ではないが、実現されつつあるのではないであろうか。

今後の課題は、やはり、同時検出可能な種数がどこまで増やせるかであろう。まず、検出方法についてであるが、本研究では、最も安価な SYBR Green I によるインターカレーター法により、各チューブ 1 組のプライマーペアでリアルタイム PCR の検出を行ったが、複数の遺伝子領域を同時に増幅する方法であるマルチプレックス PCR 法や多蛍光の蛍光標識プローブで検出を行うなどの方法を組み合わせれば、1 度の反応で検出できる種数が大幅に増加させることができる。また、特異的なプローブをマイクロアレイ化するなどの更なるハードウェアの改良によっても同時検出可能な種数も増やすことができるであろう。

厚生労働省の統計によると国内の毒きのこ中毒の原因となる主なきのこは、最も多いツキヨタケなど 9 種であり、また、食用きのこで種苗登録されているものも 32 種類程度である。目的にもよるが、これら約 40~50 種類のきのこを完全に同定することができるように設計することが今後の課題である。いずれにしても、多くのきのこの DNA 配列のデータを蓄積し、その中から特異的なプライマーやプローブとなり

得る配列を見つけ出すことが、今後の課題である。現在、筆者の所属する鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センターでは、菌類きのこ遺伝資源評価保存研究部門の早乙女梢先生、白水貴先生、中桐昭先生、菌類きのこ環境生態研究部門の前川二太郎先生の4名の先生方を中心としたプロジェクトチームにより、本センターの保有するきのこの菌株およびさらに今後収集するきのこの菌糸体および子実体標本と rDNA-ITS の塩基配列を組み合わせたデータベース作成を進めており、向こう5年間で約5,000株以上のきのこの DNA 塩基配列のデータベース化を目標にしている。また、このデータベースは、2012年度内の学外公開も目指しており、これの利用によりさらに精度の高い、属レベル、種レベルで同定可能なプライマー・プローブが効率よく設計できるようになると期待している。最後に、本研究の成果が、きのこの正確な同定が誰でもできる様なる技術開発の一助になれば幸いである。

## 引用文献

- 1) 日本経済新聞 2003年4月19日朝刊
- 2) 前田和彦ら, 加工調理したきのこの DNA 鑑定, 日本きのこ学会誌, 16, 123-128 (2008)
- 3) White et al., Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315-322. In M. A. Innes, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed), PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, California, USA (1990)
- 4) Maeta et al., Rapid species identification of cooked poisonous mushrooms by using real-time PCR, Appl Environ Microbiol, 74, 3306-3309 (2008)
- 5) 日高史典ら, きのこのセミダイレクト PCR 法の開発, 日本きのこ学会誌, 18, 13-16 (2010)
- 6) Alshahni et al., Direct colony PCR of several medically important fungi using Ampdirect plus. Jpn J Infect Dis, 62(2):164-167 (2009)

◀ 特 集 ▶

冬虫夏草など希少キノコの生理活性と新規栽培法の開発

九州大学 大学院農学研究院 環境農学部門 森林環境科学講座

大賀祥治・楊 柏松・成 漢功・高野克太・孫 竹・チャンドラ ポクレル・  
 孟 天暁・フェルザナ イスラム・楊 仲凱・アーメッド イムティアジ

希少キノコである、冬虫夏草類の生産システムの研究開発を行っている。シネンシスやセミタケなど有用性が高いものについて、天然素材を中心とする培地での栽培化に成功した。さらに、電気パルス印加によって子実体の発生が安定化し、生産量が増加することが明らかになった。さらに、電気パルスの刺激処理で生理活性がみられる有効成分の含有率が増加することが分かった。ここでは、冬虫夏草菌の生態および栽培、さらに生理活性についての成果を概説する。

## 1. はじめに

冬虫夏草菌の生理活性は古来より広く知られており、東洋医学における重要な役割を演じてきた。近年の東洋医学への再評価やきのこの生理活性への期待から、冬虫夏草菌に高い関心が向けられるようになってきている。需給バランスの観点から信頼性の高い品種系統の確立と、安定栽培での供給体制の確立が望まれている。このような背景から、冬虫夏草菌に関する研究に着手して、生態、生育特性、栽培方法や生理活性について検討を重ねてきた。さらに最近、電気パルス印加による刺激によって得られた子実体は、生理活性成分の含有量が増大することが明らかになった。今回、これらの研究成果を網羅して希少キノコのうち、冬虫夏草類について紹介する。

## 2. 背景

冬虫夏草菌は、バツカクキン（麦角菌）科冬虫夏草属の子のう菌である。昆虫などに寄生してその体内に内生菌核をつくり、有柄でこん棒、球形などの子座（子実体）を生じる菌である。属名は冬には虫となり夏は草になる意味の古語である。冬虫夏草（シネンシス）はコウモリガ科の幼虫の一種に寄生したもので、チベット、ネパールの高山地帯に生息している。広義には多くの昆虫に寄生したものを含めて冬虫夏草菌と総称し、約400種類が知られている（図1）<sup>1)</sup>。

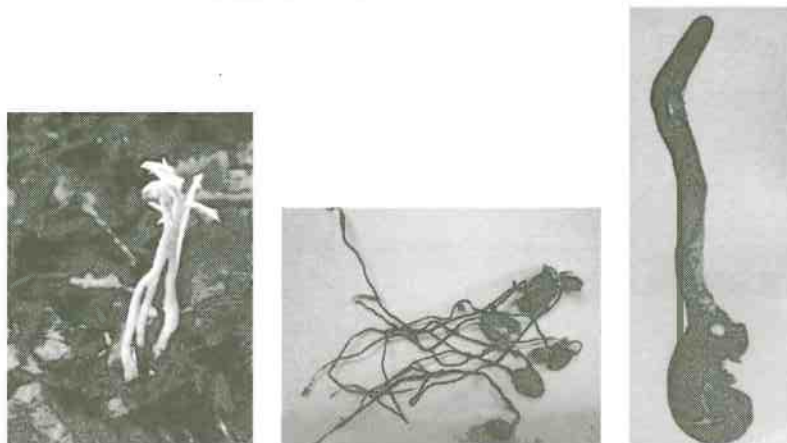
東洋医学では、漢方薬として古来より医薬に重用され、結核、黄疸、アヘン中毒の解毒薬としても用いられてきた。一方、近年の臨床実験の結果、鎮静作用、抗腫瘍作用、免疫増強作用を示すD-ポリサカロイド、コルジセピン、メラトニンなどの機能性成分が報告され、世界中で注目されている（図2）。中国の馬氏が指導した陸上競技選手たちが、「冬虫夏草エキス」を飲んで次々に好記録を出したのは有名な逸話である。このように、不老長寿、強精強壯薬、また薬膳料理の食材として広く知られるようになってきた。特に、シネンシスは野生種に限られるため、乱獲による資源の枯渇で需給バランス

OHGA Shoji, YANG Baisong, CHENG Hangong,  
 TAKANO Katsuhiko, SUN Zhu, POKHREL  
 Chandra, MENG Tianxiao, ISLAM Ferzana,  
 YANG Chungkai, IMTIAJ Ahmed  
 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1





シネンシス (*Cordyceps sinensis*) サナギタケ (*Cordyceps militaris*)



ハナサナギタケ(*Isaria japonica*) 【左】 カメムシタケ (*Cordyceps nutans*) 【中】  
 セミタケ (*Cordyceps sobolifera*) 【右】



クモタケ (*Isaria atypicola*) ツクツクボウシタケ (*Isaria sinclairii*)

図1 冬虫夏草各種

が崩れ約 50,000 元/kg の高値で取引されている。

冬虫夏草菌のうち、よく見られるのはサナギタケ、ハナサナギタケ、コナサナギタケ、カメムシタケ、クモタケ、ハチタケおよびツクツクボウシタケなどである。発生場所は、河川敷、寺社境内あるいは腐朽木材など多様である。これらは宿主である昆虫へ寄生して、菌糸蔓延過程を経て子実体発生に至るが、孢子や菌糸の存在様式や感染経路などの詳細については今後の検討課題である。シネンシスやサナギタケは薬膳料理の食材として珍重され、また最近では、抽出物を添加した焼酎飲料が市販されている。

### 3. 生態

ツクツクボウシタケは、スギ人工林や広葉樹林で発生が確認された。下層植生がほとんどない環境で子実体発生がみられる傾向が強い。

森林での生態を解析するため、ツクツクボウシタケ菌から直接抽出した DNA を鋳型として、特異的プライマーを設計した。PC-F (5'-CCAGAAAGCCGACCACTTGAA-3')・PC-R (5'-GCTTGGTATCGTTGGCTCATT-3') が調製され、子実体発生土壌から高い信頼性で本菌が検出できた。

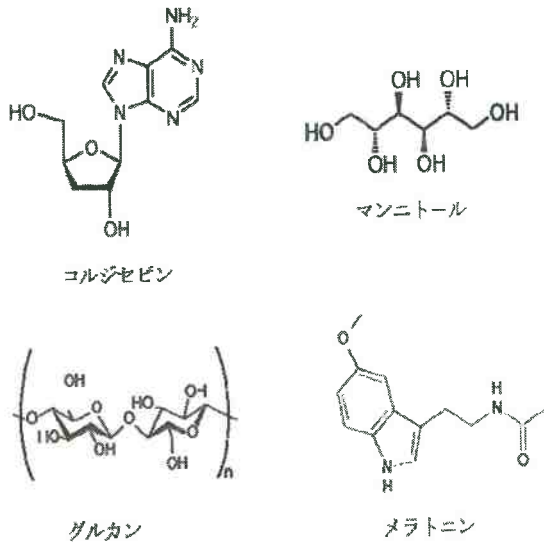


図2 冬虫夏草菌の生理活性成分

2 m 間隔の 3 か所で森林土壌を採取して、季節、深度についてツクツクボウシタケ菌の有無を解析した。8 月に検出ピークが認められ、表層土から 30cm まで本菌が存在していることが明らかになった (表 1) 2, 3)。

4. 生育

シネンシス, カメモシタケ, コナサナギタケ, ハナサナギタケ, ハナヤスリタケ, クモタケ,

セミタケの 7 種類について生育試験を行った。ハナヤスリタケ, クモタケの菌糸伸長が PDA 培地上で早く, 他のものは同程度の生育をみせた (図 3)。生育には, 炭素源としてグルコース, サッカロースが適しており, 窒素源は酵母エキス, ペプトンで良好である。

5. 栽培

セミタケは, ニイニイゼミの幼虫に寄生して子実体を形成する。本草綱目(1578)に「四川で生え, セミから一角が出て花の冠のようで, 蟬花と謂われる」と記載されている。

昆虫に依存しない栽培方法として, 天然物培地による成功した。液体種菌を接種後, 25°C で暗黒培養し, 青色 LED 照明のもとで原基形成を誘起する。米を主体とした培地では, 子実体形成に卵黄が効果的である (図 4) 4-6)。

なお, 菌株は産総研に寄託され (FERM P-21569), 栽培および利活用方法の一部は国際特許として出願中である (九州大学, FA5002-09065)。

子実体熱水抽出物を凍結乾燥した粉末に, デキストリン, ビール酵母などを混合して健康食品製品を調製する (図 5)。

表 1 時期と深度別のツクツクボウシタケ菌の検出

Soil depth (cm)	Sample available (month)			
	June	August	October	December
5		***		
10	*	***	**	
15	**	***	**	*
20	**	***	**	*
25	*	**	**	
30		**		

\* : 33% 検出, \*\* : 67% 検出, \*\*\* : 100% 検出

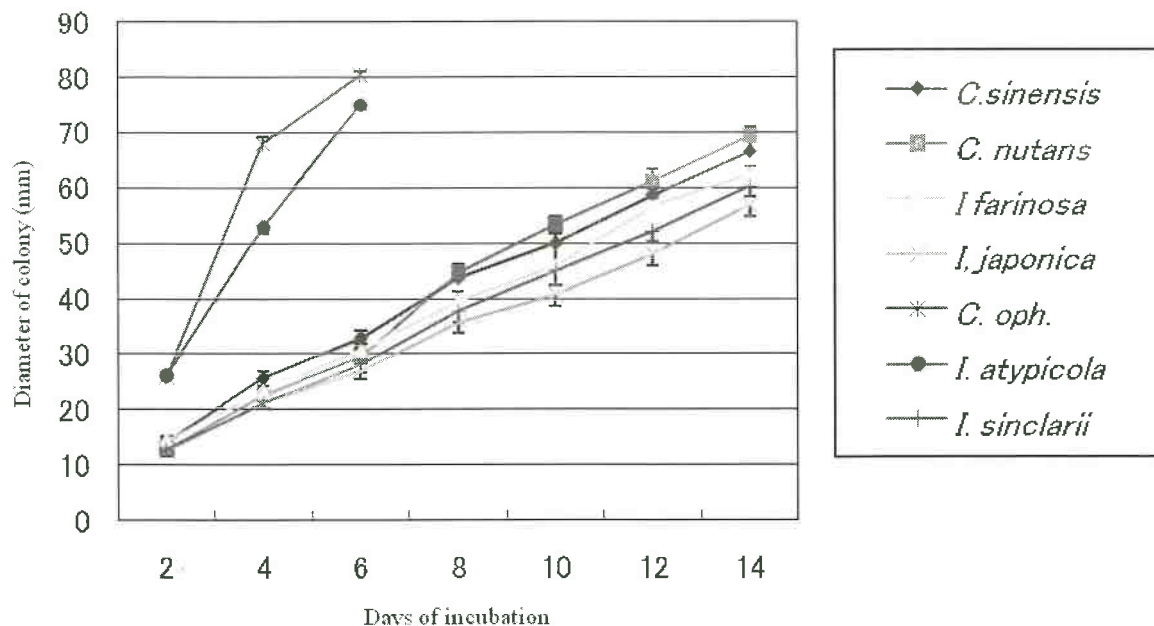


図3 冬虫夏草菌の菌糸伸長 (PDA)

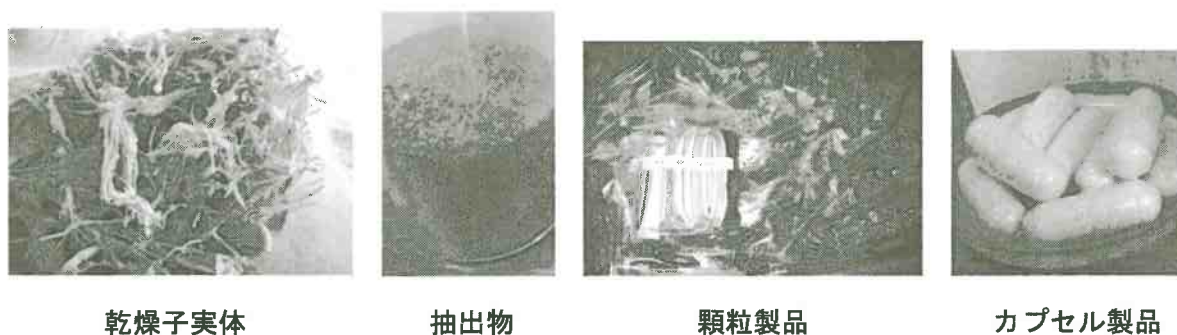


セミタケ

シネンス冬虫夏草

サナギタケ

図4 栽培



乾燥子実体

抽出物

顆粒製品

カプセル製品

図5 子実体および製剤

## 6. 電気パルス印加による刺激

電気パルス印加による刺激を食用担子菌のマイタケ、ナメコ、エノキタケ、ブナシメジ、ヒラタケ、エリンギ、クロアワビタケ、ヤナギマツタケなど、機能性が期待されているハナビラタケ、ヤマブシタケ、ヒメマツタケなどで試験し、効率よく子実体を得ることを明らかにしている<sup>7,8)</sup>。さらに、アカマツ人工林の林床に電気インパルス印加して、約2ヶ月経過後に野生きのこの発生量と分布について調査した。その結果、キツネタケの発生様式に独特の傾向が観察されている<sup>9)</sup>。

安定的な生産システムの一つとして、電気刺激を取り上げた結果、冬虫夏草菌類の発生が促進された。特に、シネンシスの安定栽培が可能となった。電気刺激により子実体発生数が増加し、菌床あたりの総発生量が増えることが明らかになった。そして、マンニトールの含有量が増加することが分かった<sup>10)</sup>。サナギタケでも電気パルス刺激は有効に働き、しかも、有効成分のコルジセピンの含有量が増加することが明らかになった。(図6)。

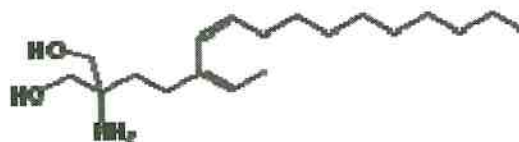
## 7. 生理活性

ツクツクボウシタケの培養液から、生体免疫を抑制するミリオシンが単離されている。ミリ

オシンは人の免疫を抑制するばかりではなく、強い毒性も示したため、化学修飾した製剤フィンゴリモド (FTY720) が調製されて、細胞障害を引き起こすT細胞に直接作用することが明らかにされた(図7)。これを単独もしくは免疫抑制剤と併用することにより、臓器移植の拒絶反応抑制や、自己免疫疾患などの治療薬としての効果が示されている。

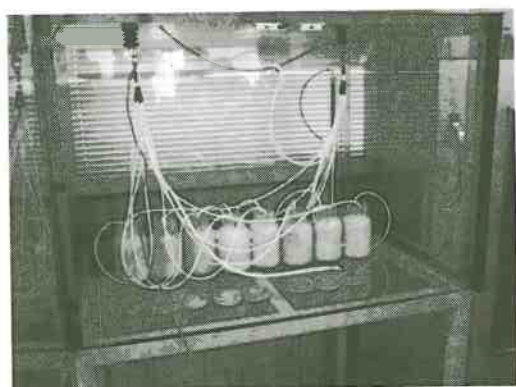
一方、リンゴ、モモ、ナシなどの害虫であるモモシクイガに対しての高い駆除性を示し、微生物的防除の素材としても期待されている。

セミタケは、アラキドン酸と PAF の両方を抑制することから、関与する作用機序として両者の上流に位置するホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の阻害を示唆している。セミタケは血流改善やアンギオテンシン転換酵素系に作用する、高血圧の予防と治療のための食品、ならびにその素材としての可能性が示唆された(図8)。



フィンゴリモド (FTY720)

図7 ツクツクボウシタケの活性成分



大型固定印加装置



小型携帯印加装置

図6 電気パルス印加

抽出液投与群では、レニン値はすべての用量群で上昇し、アンジオテンシンII値はすべての用量群で顕著な低下が認められた。セミタケ抽出物投与群では、アンジオテンシン系が関与する臓器組織修復による腎機能改善が期待できる(図9)。

セミタケ抽出物の投与により腎性高血圧症モ

デル動物の腎臓の組織障害の改善が確認された(図10)。

血圧降下作用がSHRで認められ、通常血圧のWKYでは影響を及ぼさないことが分かった。SHRでは、2, 4, 8%と投与濃度に依存して血圧降下が認められた(図11)。

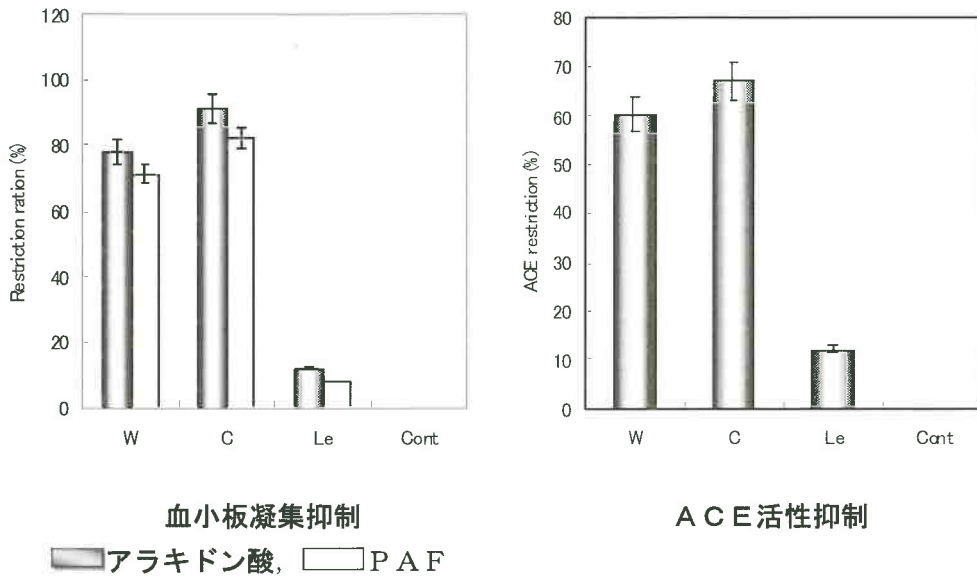


図8 セミタケ熱水抽出物の血小板凝集抑制とACE阻害活性

W: 野生, C: 栽培, Le: シイタケ

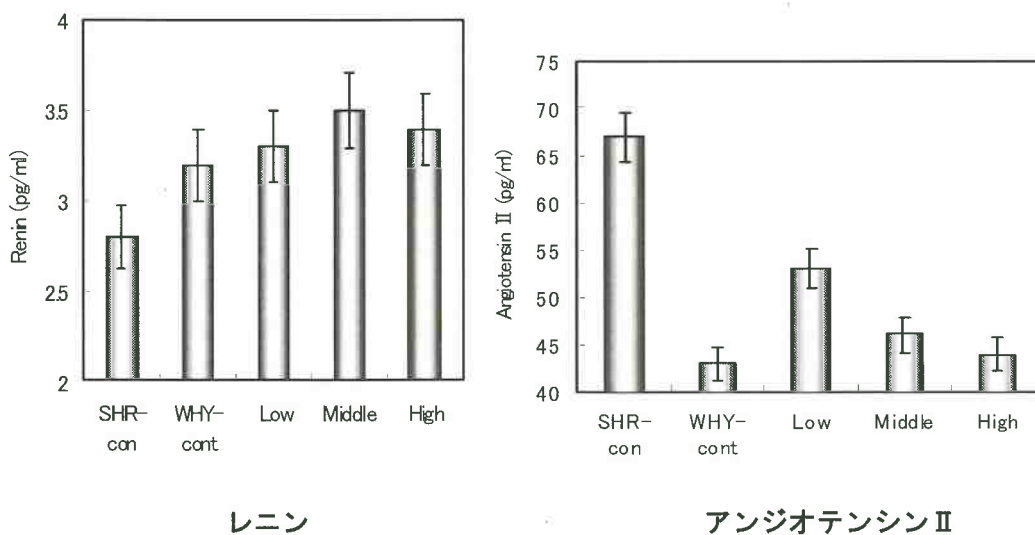


図9 セミタケ熱水抽出物のレニン・アンジオテンシン系への影響

SHR: 自然発症高血圧ラット, WHY: ウィスター京都ラット

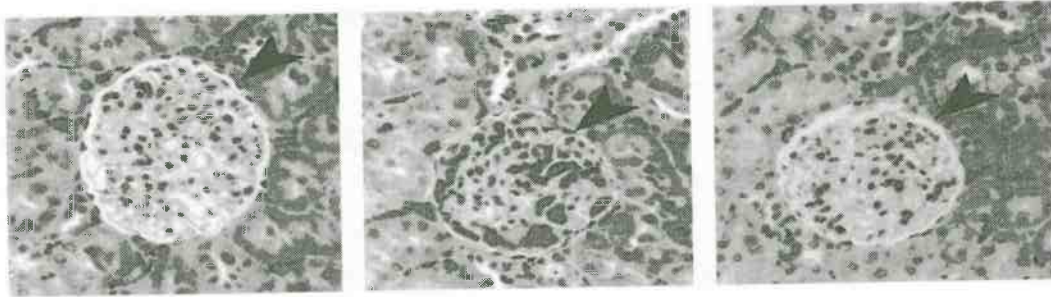


図 10 腎臓の病理学的解析 (DOCA-NaCl ラット)

左：正常ラットの腎系球体（セミタケ抽出物未投与），中央：腎性高血圧症のモデルラットの腎系球体（セミタケ抽出物未投与）であり尿管上皮脱落，硝子円柱，間質炎の組織所見が散見され腎硬化病変を呈する。右：腎性高血圧症のモデルラットの腎系球体（セミタケ抽出物投与）であり，腎病変の改善効果が認められる。

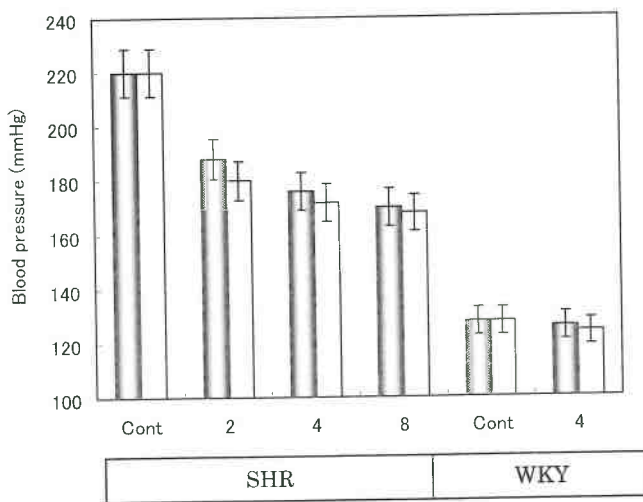


図 11 セミタケ熱水抽出物のSHRでの血圧降下作用

SHR: 自然発症高血圧ラット,

WKY: ウィスター京都ラット

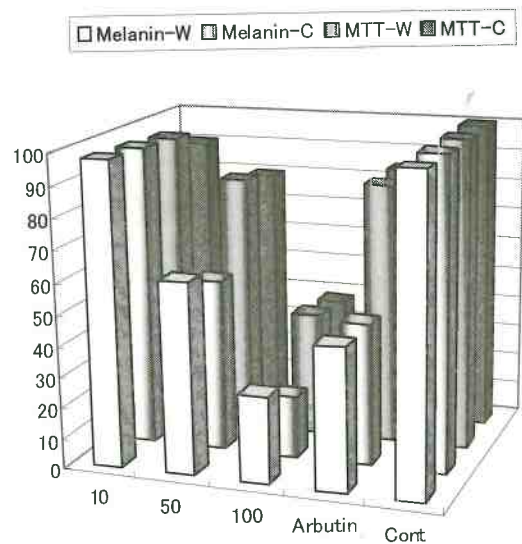


図 12 セミタケ子実熱水抽出物のメラノーマ細胞に対する効果および細胞毒性

W: 野生, C: 栽培, Cont: 蒸留水

セミタケ熱水抽出物の B16 メラノーマ細胞への阻害作用がみられた。アルブチンでの活性と同程度であり，しかもチロシナーゼ阻害活性がないため，天然物由来の新規の美白剤としての期待がもたれる (図 1 2)。メラノーマ細胞への形態変化が認められ有効性が確認された (図 1 3)<sup>11)</sup>。

さらに，ヒトによる臨床試験でセミタケ熱水抽出物の肌荒れ防止効果が認められた (図 1 4)。

## 8. おわりに

キノコの生理活性は，マンネンタケや冬虫夏草菌など古来より漢方薬として高い評価を受け



コントロール

処理区

図 13 セミタケ子実体熱水抽出物のB16メラノーマ細胞への形態変化

(位相差顕微鏡) スケール=150 μm

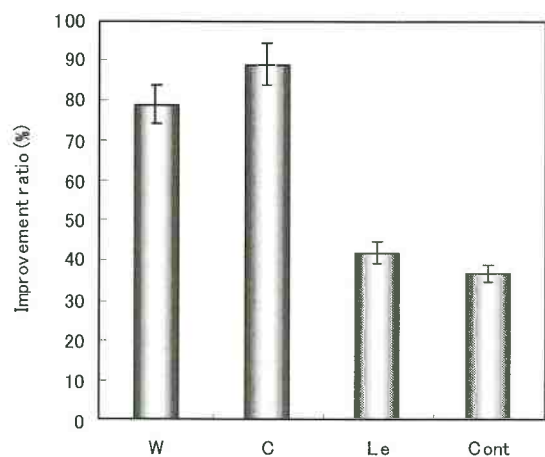


図 14 セミタケ熱水抽出物の肌荒れ防止効果

W: 野生, C: 栽培, Le: シイタケ

てきた。近年の東洋医学への期待の高まりに伴って、キノコを素材とした健康食品への期待度が増すであろう。今後は、生理活性を精査し、多くのエビデンスを蓄積することが肝要である。そして、有効な培地組成や形態を見出し、環境条件を整えた安定生産システムの構築が望まれる。

トレーサビリティが保障された有用キノコの製造に向けて、多方面からの技術革新が必要であろう。さらに、世界的規模での情報収集ならびに普及への展開戦略が不可欠となるものと思われる。

## 9. 総括と今後の展開

希少キノコの安定栽培での電気パルスの有効性が明らかになり、しかも生理活性成分の増加が期待できることが分かった。これからは、世界水準として有用キノコである冬虫夏

草菌やマンネンタケに加えて、新たにカバノアナタケ、ベニクスノキタケ、タモギタケなどについて健康食品の創出を推進したい。

## 10. 謝辞

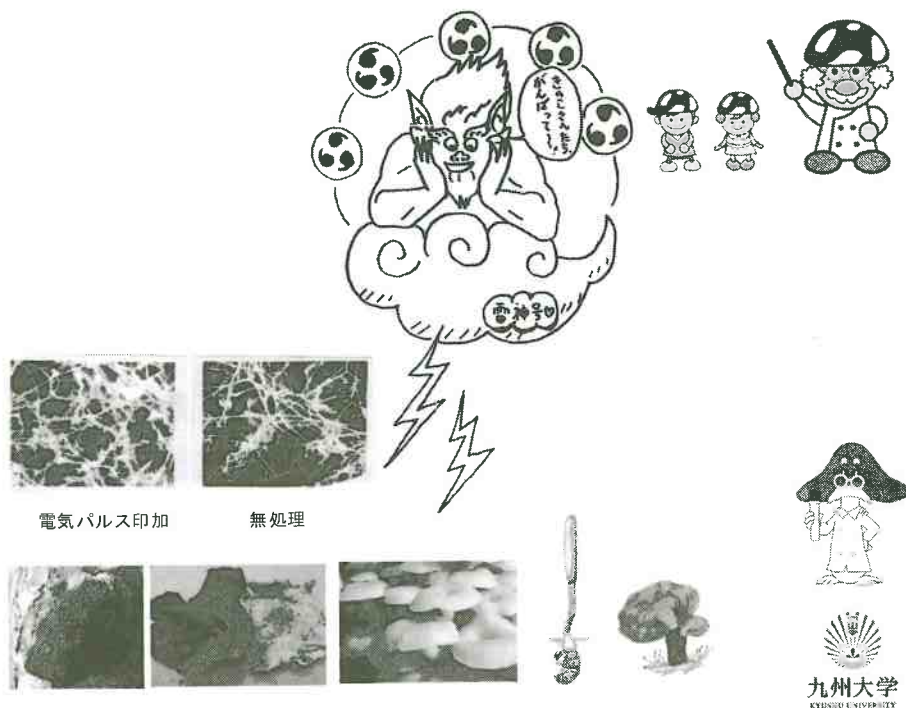
本研究は、(独) 農業・生物系特定産業技術研究機構生物系特定産業技術研究支援センター「生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業」平成 17 年度採択課題名「希少なキノコ新規栽培法の開発」の一環として行ったものである。担当研究リーダーの永富成紀博士には、2 カ年の研究期間中、適切なるご助言と暖かい励ましをいただいた。ここに謹んで感謝の意を表したい。

また、貴重なご意見をいただいた九州大学大学院医学研究院中西洋一教授、農学研究院清水義邦助教ならびに共同研究を実施した高崎健康福祉大学江口文陽教授に感謝する。

さらに、電気パルス印加装置を供与された株式会社指月電機製作所ならびに友信工機株式会社に深謝する。

## 11. 引用文献

1. 大賀祥治編, キノコ学への誘い. 海青社, 大津 (2004)
2. 大賀祥治, 高野克太, 孫 竹, ツクツクボウシタケ菌の森林土壌内での時空間分布. 九州大学演習林報告 92: 4-7 (2011)



3. Imtiaj, A., Hosoda, S., Takano, K., Sun, Z. and Ohga, S., Detection of cicada parasitic fungus (*Isaria sinclairii*) in the forest soil. International Journal of Arts and Sciences, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, USA (2011)
4. Ohga, S. and Ashitani, T., Cultivation of insect mushrooms on polyurethane form prepared from liquefied sugi bark. Mushworld 3: 159-166 (2004)
5. Pokhrel, C.P., Yang, B., Sumikawa, S., Mae, M. and Ohga, S., Cultural characteristics for inducing fruit body of various insect mushrooms on polyurethane foams. Bull. Kyushu Univ. Forest 87: 9-21 (2006)
6. 楊 栢松, 成 漢功, 大賀祥治, ツクツクボウシタケの生態および生育特性. 日本きのこ学会誌 14: 191-196 (2006)
7. Ohga, S., Iida, S., Koo, C.-D., Cho, N.-S., Effect of electric impulse on fruit body production of *Lentinula edodes* in the sawdust-based substrate. Mushroom Sci. Biotechnol. 9: 7-12 (2001)
8. 大賀祥治, キノコの生育と栽培, 九州大学演習林報告 85, 11-45 (2004)
9. Ohga, S., Iida, S., Effect of electric impulse on sporocarp formation of ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in Japanese red pine plantation. J. For. Res., 6: 37-41 (2000)
10. Ohga, S., Effect of electric pulsed treatment on cultivation system of caterpillar fungus, *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc., a means of promoting mannitol production. The 7<sup>th</sup> International AFAS Joint Symposium between Korea and Japan. Current Status and Perspectives of Agriculture, Forestry and Animal Sciences in 2010. Chuncheon, Korea (2010)
11. 楊 栢松, 成 漢功, 孟 天暁, 孫 竹, 李 玉, 图力古尔, 趙 南爽, 金 東勲, 大賀祥治, セミタケ子実体の野生および栽培種における薬理効果. Food Function 4: 28-38 (2008)



## ◀ 特集 ▶

## シイタケゲノム解読とその利用

<sup>1</sup>独立行政法人 森林総合研究所, <sup>2</sup>東京工業大学大学院 生命理工学研究科宮崎安将<sup>1</sup>・金子真也<sup>2</sup>・高野麻理子<sup>1</sup>・中村雅哉<sup>1</sup>・村田仁<sup>1</sup>・馬場崎勝彦<sup>1</sup>

きのこ類は林業総生産額の半分以上を占め、その関連産業は日本の農村地域の生活を支える一方で、国際競争の渦中にある。より効率的な育種による品種開発に必要な遺伝情報を収集するためには、生物のゲノム DNA を解読することが有用である。そこで、国内で最も生産されている栽培きのこであるシイタケに焦点を当て、近年実用化された「次世代シーケンサー」を利用することにより、コスト等の面で従来困難であった全ゲノム解読を行った。

## 1. はじめに

きのこは我々日本人が好んで食し、食卓に彩りを添える親しみやすい食材の一つである。きのこ類の国内産出額は年間 2000 億円を超える<sup>1)</sup>。その産業規模は国内産牛肉に比較して半分程度、野菜類においてはトップテンに入る大きな市場である。特に、農山村地域の経済と人口の維持・確保に大きく貢献する重要な産業の一分野をきのこ類が担っている。しかし今日に至っても、市場に好まれる栽培きのこを作出するための方法は未だ経験に頼るところが大きく、従来からの育種・栽培法が用いられているのが現状である。そのため、メーカーや生産者にとっては、生産現場の問題に即応する品種や将来展望を持つ戦略的な品種の開発が要望され続けており、きのこ生産における画期的なブレークスルーが待ち望まれている。きのこ類の中でも特に、シイタケ(*Lentinula edodes*)は最も生産量が多く<sup>1)</sup>、そのニーズも多種多様な日本を代表するきのこである。

この一世紀にわたって日本は国内のみならず世界へとシイタケの需要を拡大し、常にその市

場をリードしてきた<sup>2)</sup>。様々な試行錯誤を経て、新品種作出や生産技術の開発・改良を重ねた結果、国内外を問わず食材としてのシイタケの位置は確固たるものとなった。現在でもシイタケ栽培をはじめとするきのこ産業は日本に多くの富をもたらしているが、その一方、その高い商品価値故に世界各国を巻き込んだきのこ生産のグローバル化を引き起こしている<sup>3)</sup>。日本のシイタケ産業を苦しめた輸入シイタケ等増加の問題<sup>4)</sup>はその顕著な例であり、未だ記憶に新しい。

作物の品種開発では一般的に、新たな特性の付加や市場価値を向上させるために「育種」が効果的な一手段である。効率の良い育種を実現させるためには、新品種開発のターゲットとなる生物が持つ遺伝情報が非常に重要な鍵を握っている。しかし栽培きのこ類においては、育種に利用しうる遺伝情報はほとんど皆無であった。また、シイタケを含む多くの栽培きのこは、性を決定づける不和合性因子を 2 種類もつ四極性(tetrapolar)の担子菌であり<sup>5)</sup>、そのため通常の生物と比較して育種や遺伝学的解析が難しい<sup>6)</sup>。我々のグループでは、きのこ類の育種に資せる科学的根拠に基づいた遺伝学的知見を収集するため、シイタケをはじめとするきのこの子実体(いわゆるキノコ)が形成されるメカニズムの解明を目指してきた。これまでに数百種以上の子実体形成に関わる遺伝子群<sup>7,8)</sup>や子実体形成に作用する因子など<sup>9-11)</sup>について、分子レベル

MIYAZAKI Yasumasa<sup>1</sup>, KANEKO Shinya<sup>2</sup>,TAKANO Mariko<sup>1</sup>, NAKAMURA Masaya<sup>1</sup>,MURATA Hitoshi<sup>1</sup>, BABASAKI Katsuhiko<sup>1</sup><sup>1</sup>〒305-8687 茨城県つくば市松の里 1<sup>2</sup>〒226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259

での解析を行ってきた。また、それら遺伝子の機能を分子遺伝学的に解析するために、マツタケのレトロトランスポゾン様配列を有する DNA 断片を利用することにより、従来難しいとされてきたきのこ類における高効率な形質転換系を開発するに至った<sup>12)</sup>。

生物の遺伝情報を蓄積・収集するには、染色体上全ての DNA 塩基配列情報を網羅出来る全ゲノム解読が有用である。ただし従来のゲノム解読においては、例えきのこのゲノムサイズでさえも一億円程度のプロジェクトを計画する必要があった。しかし近年、大規模なゲノム解読をはじめとする遺伝情報の網羅的収集に大変有用な機器が次々と実用化された。いわゆる「次世代シーケンサー」と呼称される一連の DNA 解析機器<sup>13)</sup>である。本機器の最大の特徴は、従来よりも驚くべき低コスト・短時間で大量の DNA 配列データが得られることにある(表 1)。次世代シーケンサーの登場は、今まで困難とされてきた生物種や研究分野においても、ゲノム解読など網羅的解析への飛躍的な可能性をもたらした<sup>14)</sup>。そこで本機器によるシイタケのゲノム解読を行い、育種等に必要の遺伝情報の収集を試みることにした。

## 2. シイタケゲノム解読への道のり

つい近年まで、生物の DNA の塩基配列を解析するためには、英・ケンブリッジ大学のサンガー博士がその発明により二度目のノーベル化学賞を受賞した通称「サンガー法」<sup>15)</sup>が最も効率が良いとされ、四半世紀以上にわたって基礎・応用分野を問わず専ら本法が用いられてきた。1998年にゲノム解読の専門ベンチャー企業として設立された米・セセラ社は、サンガー法

を用いた自動 DNA シーケンサーを複数・並列に活用するショットガン法<sup>16)</sup>により、2000年3月にモデル生物の一つであるショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の全ゲノム情報を解読、同年6月にはヒト (*Homo sapiens*) のドラフト・ゲノム解読に成功し、翌年2001年2月にその詳細が報告された<sup>17)</sup>。これらのゲノム解読における急展開を皮切りに、いわゆる「1000ドルゲノム」に関するグラントが2004年より米国立ヒトゲノム研究所から授与されるようになり<sup>18)</sup>、ヒトのゲノム解読を将来的に1000米ドルで行うべく次世代の DNA シーケンシング研究が加速された。

1000ドルゲノム計画の成果もあり、2006年にサンガー法とは全く異なる新しい原理を利用した DNA 解読装置、次世代シーケンサーが開発された。実用化に至った次世代シーケンサーは現在複数のメーカーにより提供されており、それぞれに反応原理が異なるため得られる DNA データの量・質ともかなりの違いがある<sup>13)</sup>。我々のグループでは2007年よりイルミナ社製の次世代シーケンサーを用いてシイタケのゲノム解読に着手したが、その当時はまだ次世代シーケンサーが実用化されたばかりであり、得られる個々の DNA 読み取り配列長はわずかに数十～百塩基と短いものであった(従来法では300～1000塩基程度、表1参照)。対象のゲノムサイズにもよるが、新規生物種の全ゲノム解読には次世代シーケンサーは不向きであるとされた。実際、シイタケをはじめとするきのこ類は高等真核微生物に分類され、酵母の数倍、細菌の10倍以上のゲノムサイズを有し<sup>19,20)</sup>、大きなものではモデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に匹敵する<sup>21)</sup>。

次世代シーケンサーで得られるデータ型の基

表1 次世代シーケンサーと旧来シーケンサー(サンガー法による)との比較(2011年6月現在)

機器	コスト(1億塩基あたり)	時間	1ランのサンプル数	解読DNA鎖長
次世代	○: ~1,000,000円	○: ~数日	○: 80,000,000以上	×: 35~400塩基
旧来	×: ~100,000,000円	×: ~数年	×: ~100	○: 300~1,000塩基

本は、従来のショットガン・シーケンシング法<sup>16)</sup>におけるそれと大きく変わるところはない。しかしながら、次世代シーケンサーを用いた生物のゲノム情報構築のためには、そのデータ量が非常に膨大なため、大規模なDNA配列の連結・統合(アセンブル)を行う必要が生じる。場合によっては数ギガ塩基を超えるDNA配列情報を一括で処理せねばならず、シイタケにおいても *de novo* (新規) のゲノム情報を構築するまでにはかなりの困難が伴うことが予想された。

ゲノム解読を含めたゲノミクス、同様に遺伝子転写産物解析を行うトランスクリプトミクス、タンパク質解析を指すプロテオミクス及び化合物(代謝産物)を解析するメタボロミクスなどは、オミクス(網羅的)研究<sup>22)</sup>と呼称される。オミクス研究で扱うデータは通常非常に大きく、それらのバイオインフォマティクスの解析のためにはワークステーション(高性能なコンピ

ュータの総称)を用いることが多い。しかし我々がシイタケのゲノム解読に着手した当時、次世代シーケンサーのデータのみを用いた *de novo* ゲノム解読・情報構築に関しては、ワークステーションによるゲノムサイズの小さな細菌における成功例<sup>23)</sup>が報告されるにとどまっていた。そこで我々のグループではシイタケのゲノム解読・構築を行うにあたって、ワークステーションの代わりにさらに高速演算が可能なスーパーコンピュータ **TSUBAME**(Tokyo-tech Supercomputer and **UB**iquitously **A**ccessible **M**ass-storage **E**nvironment)<sup>24)</sup>を利用することにより、この困難を回避することに成功した(図1)。また、近い将来広く一般的な技術として多くの人が利用出来るよう、ユニバーサルなコンピュータのOS(オペレーティング・システム)の1つであるUnix上で作動するオープンソース(無償配布)のソフトウェアのみを用いてDNAデータのアセンブルを行い、新時

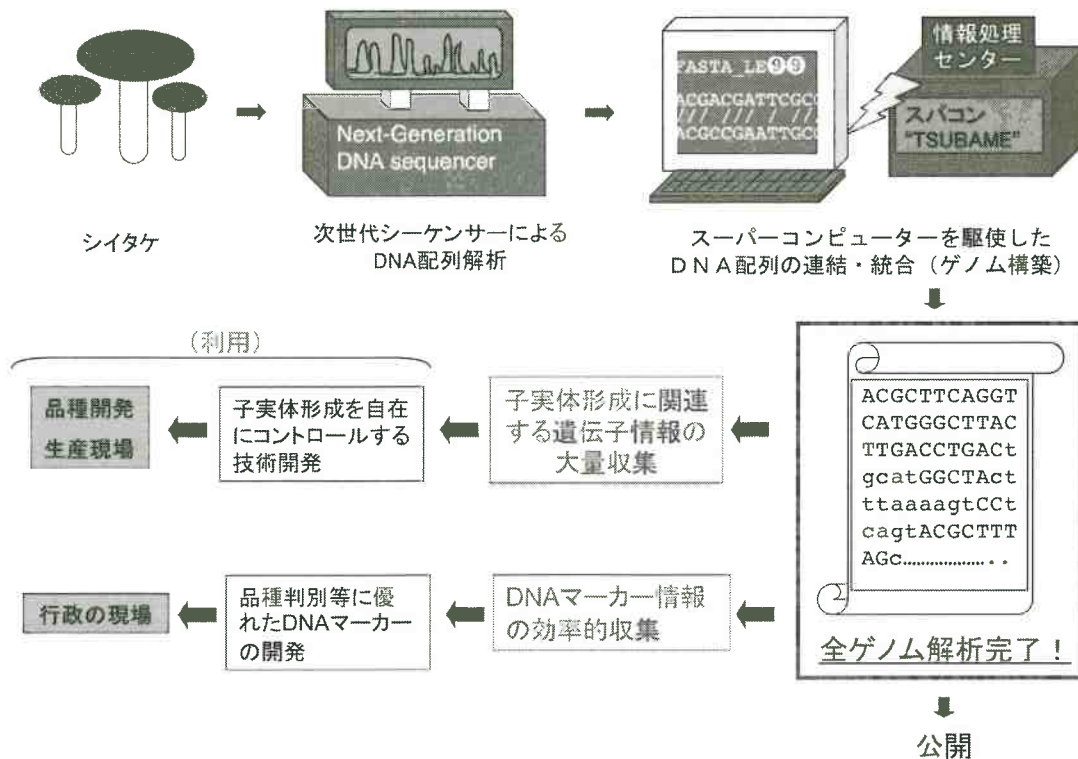


図1 シイタケゲノムの解読とその利用

代へ向けたゲノム解読法を確立することを目指した。

### 3. De novo ゲノム情報構築のためのゲノムアセンブラー

現在、各社の次世代シーケンサーの性能は技術的改良が加えられ続けており、得られるデータの各リード長とデータ総量も向上している。しかし、我々のグループが 2008 年初頭にイリミナ社の次世代シーケンサーにより得たデータのリード長は 35 塩基と短かったため、まずゲノム情報構築のために短鎖長に向いていると考えられるアセンブラー（コンピュータ上で用いる DNA 連結・統合アプリケーション）をいくつか試用し、シイタケのゲノム構築に適合するか検討してみることにした（表 2）。その結果、処理も軽くて速く、アセンブル結果も良好な Velvet<sup>29)</sup>が、シイタケの *de novo* ゲノム構築のために最も良いゲノムアセンブラーであるという結論を得た。

### 4. 得られたシイタケゲノム情報の特徴

Velvet アセンブラーとスーパーコンピュータ TSUBAME を用いて得られたシイタケゲノム情報の特徴を表 3 に示す。シイタケの総ゲノム長は約 3,600 万塩基であり、得られた DNA 塩基配列情報はゲノムのほぼ全域をカバーしていると推定された。ゲノム情報が公開されているきのこ類のゲノム情報<sup>19,20,31-34)</sup>との比較を表 4

表 3 構築されたシイタケゲノムの特徴

Assembler	velvet 0.7.18
Hash長	21
Contigの特性	
総塩基数(b)	36,180,304 (36.2Mb)
100b以上	32,241,904 (32.2Mb)
総数(本)	143,401
1000b以上	5,738
Contig length	
最大長(b)	10,354
最小長(b)	41
平均長(b)	252
N50値(b)	572 (約16,700本)
Coverage depth	
最大	297.8
最小	1.05
平均値	9.72

に示す。シイタケとの相同遺伝子は、各きのこ類で 50~80%存在していることが明らかになった。また、GenBank 等データベース上で公開されている既知のシイタケの EST に対しては、それらの 97.2%にあたる 20,076 種の DNA 情報が本解読結果に含まれていた。

品種開発においては子実体形成に関わる遺伝子の情報は特に重要であり、本解読結果により子実体形成の誘導期に発現している 341 種の遺伝子の情報を新たに得ることが出来た。また、シイタケの品種判別用 DNA マーカー約 50 種<sup>35)</sup>のゲノム上での位置情報も明らかとなった。

今回の解析では、シイタケのゲノムサイズの 30 倍程度、約 1 ギガ塩基をゲノム構築に用いている。今後、新たな株のシイタケのゲノム解読を行う場合には、本解読

よりも格段に容易になると予想される。本ゲノム情報をリファレンス（基準）配列として利用すること<sup>36)</sup>により、本解析の 10 分の 1 程度、約 100 メガ塩基程度の解析データで、異なる株のゲノム構築

表 2 スーパーコンピュータ-TSUBAME 上での各アセンブラーの特徴

プログラム	言語	必要メモリ(Gbytes)	演算時間	サイズ(Mbase)
Abyss <sup>25)</sup>	C	ND	ND	ND
Edena <sup>26)</sup>	C	2	50min	26.5
Sharcgs <sup>27)</sup>	Perl	>102	>1week	ND
Ssake <sup>28)</sup>	Perl	17	8hr	60.8
Velvet <sup>29)</sup>	C	2	12min	39.3
Vcake <sup>30)</sup>	Perl	6	15hr	201.6

表4 きのご類のゲノム情報に含まれるシイタケとの相同遺伝子

生物種	和名	全遺伝子数	ホモログ遺伝子数(%)
<i>C. cinerea</i>	ネナガノヒトヨタケ	13,394	8,209 (61.3)
<i>L. bicolor</i>	オオキツネタケ	20,614	11,149 (54.1)
<i>S. commune</i>	スエヒロタケ	13,208	8,625 (65.4)
<i>P. ostreatus</i>	ヒラタケ	11,603	8,516 (73.4)
<i>P. chrysosporium</i>	(和名なし)	10,048	7,459 (74.2)
<i>T. mesenterica</i>	コガネニカワタケ	8,313	4,271 (51.4)

注)解析は期待値 $e < 10^{-6}$ 以下で行った。

を行えるであろう。特に、生物の遺伝的多様性解析等で良く用いられる一塩基多型(SNP:Single Nucleotide Polymorphism)解析<sup>37)</sup>などは、リファレンス配列を利用した次世代シーケンシング解析のもっとも得意とするところであり、株間の特性差異の原因を特定できるかもしれない。

今後はイルミナ社以外の次世代シーケンサーを用い、より長いリード長からなるデータを加えて再アセンブルすることを計画している。異機種次世代シーケンサーを組み合わせること<sup>38)</sup>により、さらに安価でかつ効率の良いゲノム構築法の確立を目指すとともに、現在得られているものよりも高精度なゲノム配列を公開出来るものと考えている。現在、ピロシーケンシング法<sup>39)</sup>を用いたロシュ社の次世代シーケンサーによるさらなるシイタケゲノムの解読を続行している。未だ解析中ではあるが、本データを合わせることで、シイタケのゲノム情報のコンティグ数が現在の10分の1以下に減少すると見積られる。今後、より正確でかつ扱いやすい遺伝情報を公開出来るものと考えている。

## 5. きのごのゲノム情報の活用

ゲノムの解読から得られる莫大な遺伝情報は、学問分野では分子生物学や遺伝学に、応用分野では育種・品種開発をはじめとする様々な分野で大いに活用されることが期待される(図1)。

全ゲノム配列を同種の異なる株同士間で比較、あるいは他のきのご類との比較ゲノム解析を行うことにより、個々の種を特徴付けている遺伝的要因が明らかになっていくであろう。子実体形成というマクロな形態変化を示すきのこのゲノム解読は、新たな菌類学の側面を見出す可能性を大いに秘めている。シイタケにおいては、現在までの遺伝子やタンパク質の分子レベルでの解析結果と本ゲノム情報とを組み合わせることにより、子実体形成のメカニズムの解明によりせまりつつある。

我々のグループでは今後、シイタケのみならず日本国内で生産されるきのこ(エノキタケ、ブナシメジ、ナメコ、エリンギ、マイタケなど)のさらなるゲノム解読も視野に入れている。

## 6. おわりに

2011年6月現在、既に次世代の発展型あるいは次々世代型と呼ばれるDNAシーケンサーが続々と考え出されている。シリコン・チップにより水素イオン濃度を検出するイオン・半導体法<sup>40)</sup>、ローリングサークル型DNA複製を利用したDNAナノボール法<sup>41)</sup>、DNAアレイを利用したハイブリダイゼーション法<sup>42)</sup>、質量分析器を用いた方法<sup>43)</sup>などが代表的なところであり、将来的により短時間・低コストを目指す方向に進んでいる。

育種のみならずきのこ産業及び生物学的側面

から考えると、栽培きのこ以外のマツタケなどのゲノム解読も非常に大切である。マツタケを含む菌根菌は植物との共生を行うことによって植物をより生育させる<sup>40</sup>ため、森林を育み地球環境の維持にも大いに貢献している。一方シイタケなど、木材腐朽菌であるきのこの知られざる一面として、有機物の最終的な分解者であり地球上の炭素循環の根底を担っていることがあげられる。つまり、きのこはとても「環境にやさしい生物」なのであり、その生態解明に環境から食料までと関心が高まってきている。きのこのゲノム解読によってもたらされる遺伝情報が、より様々な分野で貢献していくことを期待したい。

## 7. 参考文献

- 1) 農林水産省統計 (平成 21 年度) より抜粋.
- 2) Chang, S. T. & Miles, P. G. (1991), *Mush. J.*, 503, 15-18
- 3) Kües, U. & Liu, Y. (2000), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 141-152
- 4) ねぎ等に対して暫定的に課する緊急関税に関する政令(平成 13 年 4 月 20 日政令第 167 号)
- 5) 時本景亮 (1992), きのこの増殖と育種 (西貞夫編), 第 1 版, 交配系, 113-116, 農業図書, 東京
- 6) 宍戸和夫 (編) (2002), キノコとカビの基礎科学とバイオ技術, アイピーシー, 東京
- 7) Miyazaki, Y. et al. (2005), *Fungal Genet. Biol.*, 42, 493-505
- 8) Miyazaki, Y. et al. (2010), *FEMS Microbiol. Lett.*, 307, 72-79
- 9) Miyazaki, Y. et al. (2007), *Curr. Genet.*, 51, 367-375
- 10) Miyazaki, Y. et al. (2004), *Biochim. Biophys. Acta*, 1680, 93-102
- 11) Miyazaki, Y. et al. (2004), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 1898-1905
- 12) Murata, H. & Miyazaki, Y. (2004), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 218-221
- 13) Schuster, S. C. (2008), *Nat. Methods*, 5, 16-18
- 14) Hall, N. (2007), *J. Exp. Biol.*, 210, 1518-1525
- 15) Sanger, F. et al. (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467
- 16) Fleischmann, R.D. et al. (1995), *Science*, 269, 496-512
- 17) Venter, J. C. et al. (2002), *Science*, 291, 1304-1351
- 18) 米・NIH(National Institute of Health). (2004), <http://www.genome.gov/12513210>
- 19) Martin, F. et al. (2008) *Nature*, 452, 88-92
- 20) Stajich, J. E. et al. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 11889-11894
- 21) Martin, F. et al. (2010) *Nature*, 464, 1033-1038
- 22) Lederberg, J. & McCray, A. T. (2001), *The Scientist*, 15, 8
- 23) Farrer, R. A. et al. (2009), *FEMS Microbiol. Lett.*, 291, 103-111
- 24) 東京工業大学学術国際情報センター, <http://www.gsic.titech.ac.jp/>
- 25) Simpson, J. T. et al. (2009), *Genome Res.*, 19, 1117-1123
- 26) Hernandez, D. et al. (2008), *Genome Res.*, 18, 802-809
- 27) Dohm, J. C. et al. (2007), *Genome Res.*, 17, 1697-1706
- 28) Warren, R. L. et al. (2007), *Bioinformatics*, 23, 500-501
- 29) Zerbino, D.R. & Birney, E. (2008), *Genome Res.*, 18, 821-829
- 30) Jeck, W. R. et al. (2007), *Bioinformatics*, 23, 2942-2944
- 31) Ohm, R. A. et al. (2010), *Nat. Biotechnol.*, 28, 957-963
- 32) 米・JGI (DOE Joint Genome Institute). (2009), [http://genome.jgi-psf.org/PleosPC9\\_1/](http://genome.jgi-psf.org/PleosPC9_1/)

- PleosPC9\_1.info.html
- 33) Martinez, D. et al. (2004), *Nat. Biotechnol.*, 22, 695-700
- 34) 米・JGI (DOE Joint Genome Institute). (2009), <http://genome.jgi-psf.org/Treme1/Treme1.info.html>
- 35) (独)森林総合研究所 (2007), <http://www.ffpri.affrc.go.jp/labs/shiitake/index.html>
- 36) Smith, D. R. et al. (2008), *Genome Res.*, 18, 1638-1642
- 37) Nielsen, R. et al. (2011), *Nat. Rev. Genet.*, 12:443-451
- 38) Harismendy, O. et al. (2009), *Genome Biol.*, 10, R32
- 39) Nyrén, P. (2007), *Methods Mol. Biology*, 373, 1-14
- 40) Rusk, N. (2011), *Nat. Methods*, 8, 44
- 41) Porreca, J. G. (2010), *Nat. Biotechnol.*, 28, 43-44
- 42) Drmanac R et al. (2002), *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 77, 75-101
- 43) Edwards, J. R. et al. (2005), *Mutat. Res.*, 573, 3-12
- 44) Guerin-Laguette, A. et al. (2004), *Mycorrhiza*, 14, 397-400

## ◀ 特集 ▶

## マイタケ抽出成分の血糖値抑制機能

株式会社 雪国まいたけ 研究開発室

田中 昭弘

マイタケの食後血糖値抑制機能を健常人で検証。次いで、系統的に抽出した画分を糖尿病モデル動物に長期摂取させた。その結果、繊維分を多く含有する画分 (YM-11) および $\alpha$ -グルカン (YM-2A) に血糖値抑制およびインスリン感受性向上機能を認めた。特にYM-2Aはでん粉やグリコーゲンと同様の構造であるにもかかわらず、経口的にその機能を発揮。また、側鎖の分岐比率でその機能が変化することが判明した。

## 1. はじめに

マイタケ (舞茸, *Grifora frondosa*) は温帯以北, 9月下旬から10月上旬にブナ科の大木の根もとに発生する。

舞茸の名の由来には次の逸話がある。

江戸時代, 東北地方のある大名がからだの調子がよくなるキノコを見つけ, 幕府に献上したところ評判を呼び, 再度の所望があった。簡単には入手できないので村人に, キノコと同じ重量の銀を与えるという褒美つきで探させたところ, 村人は競い合うように山に入り, 見つけたときは舞い上がって喜び, その名「舞茸」がついた。

同じ重量の銀の価値があったマイタケは, 現在では栽培が可能となり, 深山幽谷に入らずとも手軽に入手可能となり食卓に上っている。また, 入手し易くなったことで機能研究も盛んに行われている。マイタケには様々な機能性があることが判明しているが, 血糖値抑制ならびにインスリン抵抗性を改善する機能があり, 飽食の時代に生きる現代人にとって優れた食材といえる。

## 2. 健常人における食後血糖値抑制機能

マイタケやその抽出物には血糖値抑制作用があることが, 主にげっ歯類の薬理試験結果として報告されている<sup>1)~4)</sup>が, ヒトにおける作用は, 2型 (インスリン非依存性) 糖尿病患者でその可能性が示唆された以外にほとんど報告はない<sup>5)</sup>。そこで我々はまず, 健常人におけるマイタケおよびマイタケ粒 (マイタケを熱風乾燥し粉末化した後に錠剤化した当社製品) の食後血糖値抑制作用について検証した。即ち, 健常男女13名に対し, 朝9時に米飯 (糖質量50g) のみを摂取した際の血糖値と, 米飯 (同糖質量) とマイタケ (60g, 調理法: ホイル焼き) を同時に摂取した際の血糖値の経時変化を比較した。その結果, マイタケを米飯と同時に摂取した場合, 摂取30分後の血糖値が米飯単独摂取より有意に低くなることを確認した。さらに, 3時間後の昼12時に共通食として被験者全員に米飯のみ (糖質量65.8g) を摂取させ血糖値を測定した。その結果, 朝に米飯とマイタケを同時に摂取した被験者の血糖値上昇が有意に低くなることが判明した<sup>6)</sup> (図-1)。このように, 最初の食事が次の食後の血糖値に影響を及ぼす効果, 即ちセカンドミール効果<sup>7)</sup>が, マイタケ同時摂取時にあることが判明した。なお, セカンドミール効果はマイタケ粒 (10粒合計3.0g; 生まいたけ27g相当) の摂取においても

TANAKA Akihiro

〒949-6695 新潟県南魚沼市余川89



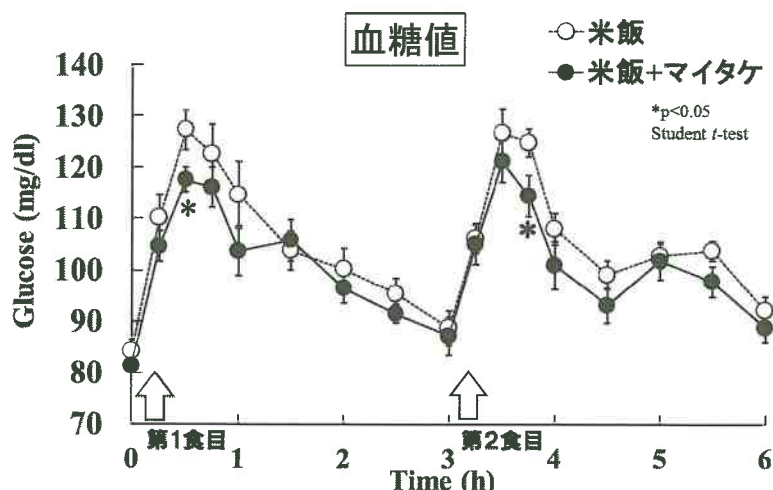


図-1 焼マイタケ (60g) の血糖値上昇抑制効果とセカンドミール効果

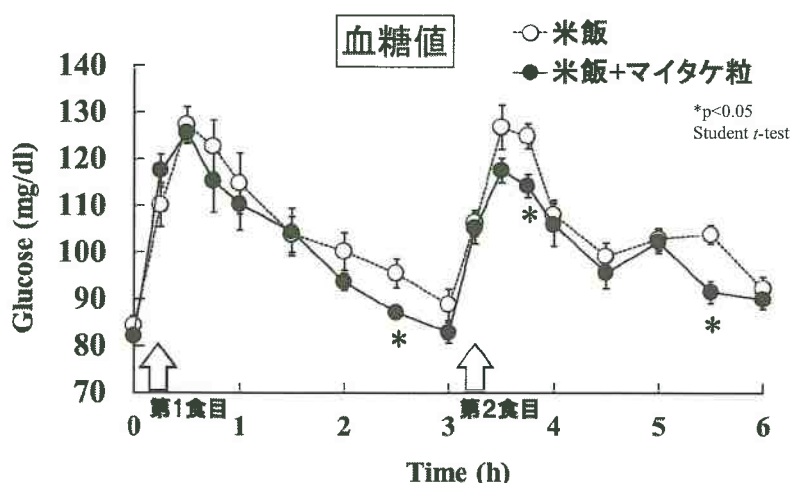


図-2 マイタケ粒 (3g) の血糖値上昇抑制作用とセカンドミール効果

認められた<sup>5)</sup> (図-2)。

### 3. セカンドミール効果とマイタケ

セカンドミール効果は、1982年にトロント大学のJenkinsによって定義されたもので、一般的には、血糖値上昇が穏やかな低GI (Glycemic Index<sup>7)</sup>：対象となる糖質50gを含有する対照食品に対するブドウ糖50g摂取時の2時間までの血糖値曲線下面積の割合) 食品は摂取後の血糖値を抑制するだけでなく、次の食事の血糖値抑制効果もある<sup>8)</sup>。今回の試験では、マイタケ

を米飯と一緒に食べるとGI値の高い米飯があたかも低GI食品のように食後血糖値抑制機能を示す点が注目になる。

### 4. 系統的抽出画分の抗糖尿病機能

マイタケには食後血糖値の抑制作用のみならず、抗糖尿病機能があることが報告されている<sup>1)~4)</sup>。そこで我々は、マイタケに含まれる機能性物質あるいは画分を系統的な分画方法により得て評価することとした。即ち、マイタケ熱風乾燥粉末を熱水にて抽出 (121°C, 30分間) し、これをろ取して乾燥したマイタケ繊維を主成分 (繊維分約64%) とするYM-11を、また、ろ液に同量のエチルアルコールを加えたときに浮遊する物質 (Xフラクション) を除去し、濃縮後粉末化したMDフラクション® (当社で販売中の健康食品；以下MDF) を調製した。Xフラクション

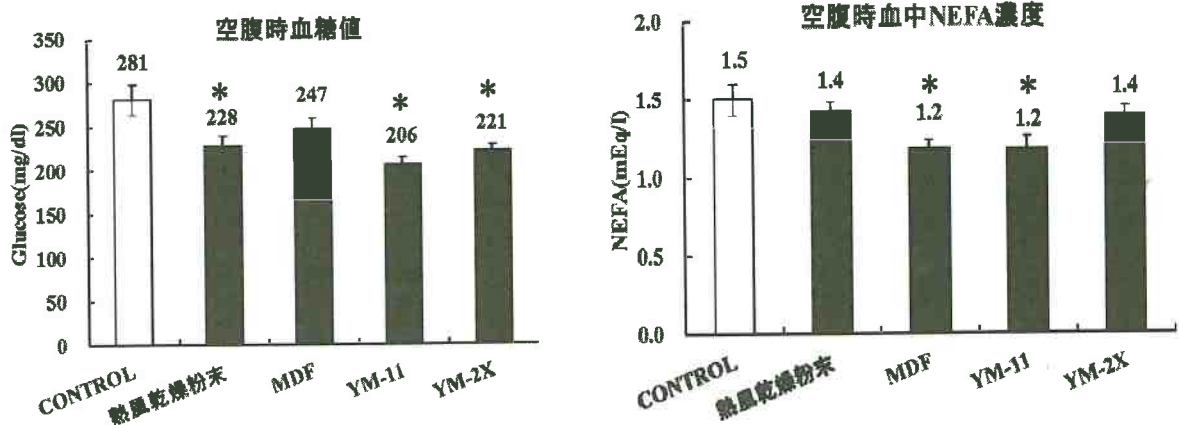
については、その主成分がα-グルカンであることが特徴なので、これを単離し、糖尿病モデル動物で評価した。モデル動物としては日本人に多いとされる肥満を伴わない2型糖尿病のモデルであるGK (Goto-Kakizaki) ラットを選択し、各画分を長期間摂取させて血糖値上昇に対する抑制機能あるいはインスリン抵抗性に対する改善機能等について検討した。

5. 各画分のGKラット長期摂取効果

GKラットに、調整した4種の画分(熱風乾燥粉末, MDF, YM-11およびYM-2)を、セルロースを対象としてそれぞれ5%混餌飼料として与え、長期飼育(100日間)した。長期飼育後に血糖、血漿中インスリン、遊離脂肪酸、中性脂肪濃度の変動を測定するとともにグルコースおよびインスリン負荷試験を行い、インスリン抵抗性に対する改善機能を検討した。その結果、YM-11を長期間摂取させたGKラットの血糖値ならびに遊離脂肪酸値は、対照であるセルロー

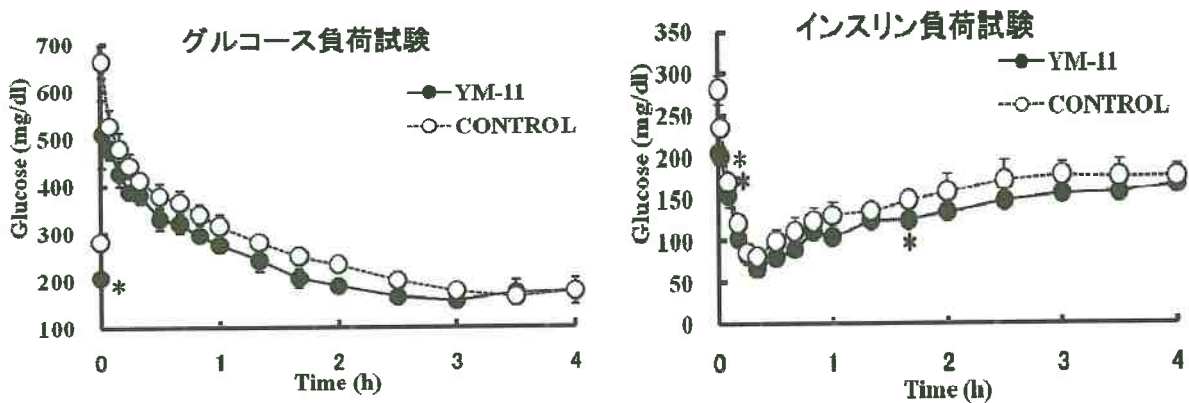
スを摂取させた群よりも有意に低下した(図-3)。また、長期摂取させた後にグルコースあるいはインスリンを負荷した場合の血糖値は、コントロールの血糖値よりも低値で推移し、YM-11はインスリン抵抗性に対する改善機能を有することが明らかとなった<sup>9)</sup>(図-4)。

尚、でん粉やグリコーゲンと構造的に近似のα-グルカンであるYM-2Xは一般的に酸加水分解や消化酵素で分解しやすいと考えられるが、長期経口摂取(100日間)において血糖値抑制作用を示すのは非常に興味ある現象である。



\*Significant difference from the control group(p<0.05) Student t-test

図-3 血液生化学検査 (GK ラット、投与 100 日後空腹時)



\*Significant difference from the control group(p<0.05) Student t-test

図-4 YM-11 摂取後のグルコースならびにインスリン負荷試験

## 6. まいたけに含有される $\alpha$ -グルカン

YM-2Xが $\alpha$ -グルカンであるにもかかわらず、長期摂取における血糖値抑制機能があることに着目し、生マイタケの各成分を保持する乾燥法である凍結乾燥を行い、粉末化して熱水抽出（121°C、30分間）したところ、図-5に示すように、特に $\alpha$ -グルカンのピークであるYM-2において熱風乾燥粉末の熱水抽出体と異なったクロマトグラム（GPC）が得られた。

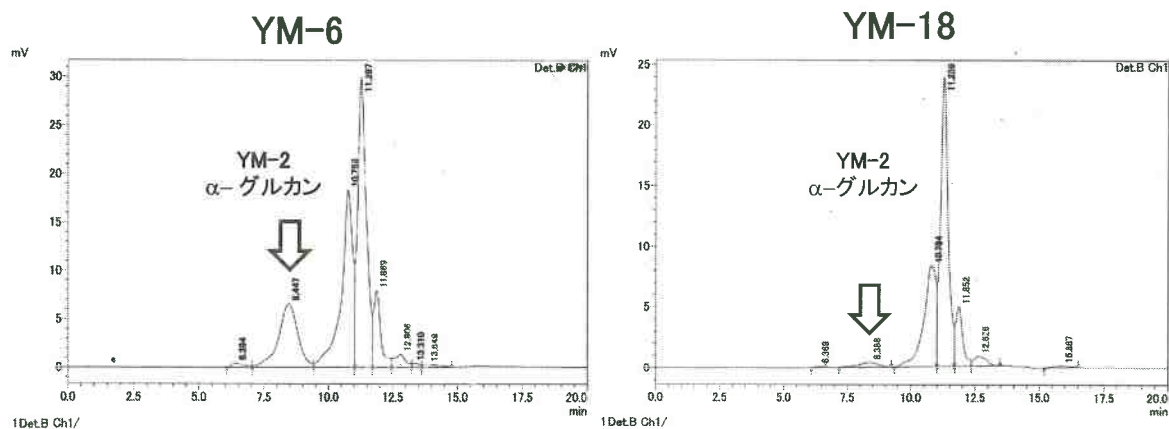
YM-2はYM-6から水とエタノールを用いた沈殿化法により、純粋な $\alpha$ -グルカンとして分離でき、その構造は $\alpha$ -(1→6)分岐鎖を有する $\alpha$ -(1→4)-D-グルカンであると同定された。この構造はでん粉やグリコーゲンと同様の構造である。マイタケには強いグルコシダーゼ活性があり、本酵素を作用しないよう、80°C以上の熱水に凍結乾燥粉末を投入して2気圧121°Cで30分間抽出することによりYM-2A【 $\alpha$ -(1→4)： $\alpha$ -(1→6)=約12:1】を得ることができ、また、同凍結乾燥粉末中の内在酵素を作用（55°C、30分）させた後、同様に抽出した場合、

分岐比率の高いYM-2G【 $\alpha$ -(1→4)： $\alpha$ -(1→6)=約6:1】が得られる。

## 7. $\alpha$ -グルカンの構造と抗糖尿病機能

GKラットを用い、YM-2X（熱風乾燥まいたけ由来；分岐比率はYM-2Gと近似）とYM-2A（凍結乾燥まいたけ由来）の長期投与（100日間）試験を実施した。その結果、YM-2Xおよび-2Aにグルコース負荷時の血糖値抑制作用が有意差を持って示された。このとき、インスリン負荷時の血糖値抑制作用はYM-2Aの方が強力であった（図-6）。

この結果は、まいたけに含まれる栄養物質と考えられる $\alpha$ -グルカンはでん粉やグリコーゲンと同様の構造でありながらインスリン抵抗性の改善作用（感受性向上作用）があるということ、しかもその分岐比率により活性が異なることを示し、このことは栄養科学的に新規な発見と考えられる。今後はメカニズム研究を進めるとともに糖尿病予防あるいは進展防止用食品として展開したい。



原料：凍結乾燥まいたけ

原料：熱風乾燥まいたけ

YM-6、YM-18の各水溶液をHPLC（下記条件）にて分析。

- \* 溶離液：0.1M NaNO<sub>3</sub>(0.02% Na<sub>3</sub>)水溶液
- \* 検出器：示差屈折計
- \* 分析カラム：SB-806M HQ（カラムオープン温度：40.0°C）
- \* 流速：1.000mL/min

図-5 乾燥方法による抽出成分の違い

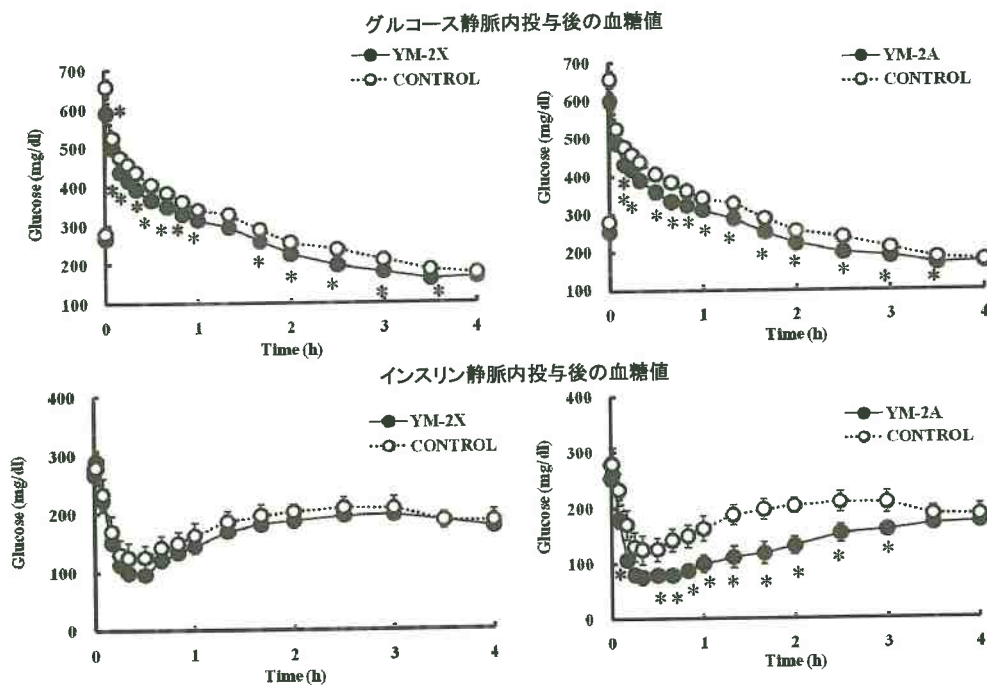


図-6 YM-2A と 2X のグルコースおよびインスリン投与後血糖値

## おわりに

マイタケの血糖値抑制およびインスリン感受性向上機能について、得られた知見について述べたが、その機序はまだまだ解明できていない。当社もマイタケおよびマイタケ由来健康食品の供給者として機序解明の一端を担い、安全かつ高機能なマイタケ成分あるいは画分を探索し提供することで、また、その機序解明から得られる知見で人々の健康に寄与したい。

尚、本研究は(独)農研機構生物系特定産業技術研究支援センター「民間実用化研究促進事業(平成20年度採択課題)」によって行われた。殊に同センター、研究担当リーダー、矢野昌充博士には終始有用なご助言をいただき、ここに謹んで感謝の意を表する。

## 参考文献

- 1) Kubo, K. et al. *Biol. Pharm. Bull.*, 1994;17:1106 - 10.
- 2) Horio, H. et al. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 2001;47:57 - 63.
- 3) Hong, L. et al. *Pharm. Pharmacol.*, 2007 Apr;59(4):575 - 82.
- 4) Lo, HC. et al. *Am. J. Chin. Med.*, 2008;36(2):265 - 85.
- 5) Konno, S. et al. *Diabet Med.*, 2001 Dec;18(12):1010
- 6) 川面香奈ら 第65回日本栄養・食糧学会大会(2010)講演要旨集, 3K - 04a
- 7) Jenkins, DJ. et al. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 362 - 366, 1981
- 8) Salmeron, J. Et al. *Diabetes Care.*, 20, 545 - 550, 1997
- 9) 川面香奈ら 日本薬学会第131年会(2011年;東日本大震災により中止)要旨集, 30P - 0804

## ◀ 国内情報 ▶

## 堆肥原料の簡易な通気抵抗測定装置

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

原田 泰弘・皆川 啓子

家畜ふん尿の堆肥化において、生ふん尿等の通気性を改善する作業（副資材の混合）を支援するため、堆肥原料の通気性を簡易に評価できる測定装置を開発した。測定装置は、試料を充填する容器と試料の通気抵抗を測定する計測部で構成し、計測部に内蔵した送風用ポンプと圧力計により、通気しながら抵抗を測定する。堆肥原料に求められる通気性は堆肥化装置毎に異なるが、堆肥化の良否と通気抵抗値との関係を予め把握しておくことにより、副資材の混合量の目安を得ることができると判断された。

## はじめに

家畜排せつ物の堆肥化に関する作業を簡単に表せば、畜舎からの生ふん等の搬出に始まり、その生ふんの通気性を改善して堆肥原料とし、堆肥化装置に投入して堆肥化（一次処理）を行い、堆肥化装置から搬出された後は利用されるまで堆肥置場に静置する（二次処理）ということになる。一次処理では、堆肥舎でショベルローダによって切返しを行う方式、これに加えて強制的に空気を供給するための通気装置を備えた通気型堆肥舎、さらにショベルローダの代わりに機械で攪拌を行う攪拌装置付きの堆肥化装置、機械による攪拌を密閉された槽の中で行う密閉型堆肥化装置など様々な方式によって行われる。いずれも生ふん等の堆肥原料に空気を供給し、酸素が十分ある環境下で有機物を分解する好気性微生物の活動を利用する方法である。効率的に堆肥化を行うためには、空気が供給されやすいように生ふん等の堆肥原料の通気性を改善することが重要である。そのため、オガクズやモミガラといった副資材を生ふんに混合すること（以下「堆肥原料の調製」という。）や、

機械で強制的に圧搾して液状分を分離・除去することなどが行なわれる。このとき、通気性が改善された（空気が通過しやすくなった）ことを判断するために、これまで「堆肥原料の水分を55～72%程度に調整する」ことが指標とされてきた。しかし、堆肥化の現場では、水分を把握することが難しい。また、農家に設置されている堆肥化施設は、堆積する高さ、通気用の送風機の性能、通気床の構造等が様々であり、堆肥原料に求められる通気性も現場毎に異なる。これらのことから、堆肥原料の通気性や通気量（空気の供給量）の適正範囲を一律的に示すこと等は困難であり、堆肥原料の調製は作業者の経験に基づいて行われているのが実状である。

これらのことから、生研センターでは、家畜ふん尿の堆肥化を支援するため、堆肥原料の通気性を把握し、堆肥原料の調製の目安を施設毎に簡単に把握できる技術の開発を目標として、堆肥原料の通気抵抗測定装置を開発してきた。適切な目安を得ることでオガクズ等の副資材を過不足なく混合することができ、効率的な堆肥化を行なうことができる。ここでは、開発を行ってきた堆肥原料の通気抵抗測定装置を紹介する。

HARADA Yasuhiro, MINAGAWA Keiko

〒331-8537 さいたま市北区日進町1丁目-40-2

## 1. 堆肥原料調製の問題点

先ずは、堆肥原料の調製に必要な副資材の量について述べる。これまでも指摘されているとおり、オガクズなどの副資材は、価格の高騰や入手が困難な地域がある。そのため、古紙、剪定残さ、コーヒー粕、キノコの廃菌床などが副資材として検討されている（市川ら、1999 ほか）ほか、最近では、蕎麦殻、落花生の殻なども使用されている。そのときどき入手可能な副資材を用いて調製を行っている例もある。

図1は、乳牛の生ふん（水分86%）にオガクズ（水分25%）を混合して堆肥原料を調製した例である。前述のとおり、これまでの指標のとおり堆肥原料の水分を72%まで低減するというになると、仮にオガクズ1m<sup>3</sup>当たりの重量を250kgとすれば、100L程度の乳牛ふんを72%にするために120L程度のオガクズが必要となる。しかし、既に述べたとおり、堆肥原料に必要な通気性は、堆肥化の現場毎に異なる。通気床等の圧力損失がほとんどなく、静圧の高い送風機が設置されている場合など、堆肥原料の水分が多少高く、若干通気抵抗が高くても通気が可能となる。75%でも良い現場の場合、混合するオガクズの量は72%に調整する場合と比較して23%程度削減できる。全体の量が減る分、労力も減らせる。このように、堆肥原料に求められる通気性は個々の堆肥化施設ごとに

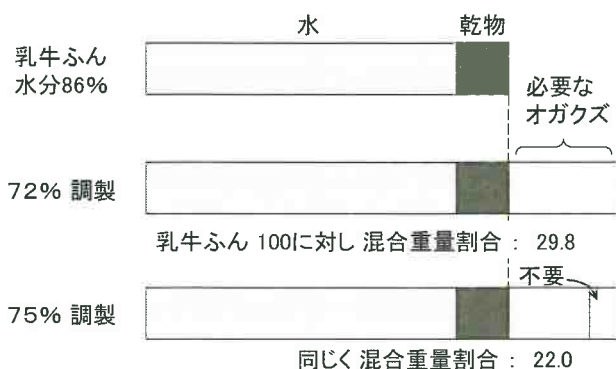


図1 オガクズ（水分25%）必要量の比較

違うため、それぞれ別に把握できるほうが無駄を省くことにもつながる。

一般に、堆肥化装置は、畜舎から搬出されたふん尿の水分の変動、堆肥化時の乾燥しやすさなどが原因となって、夏季と冬季とでは堆肥化処理能力に差が生じる。よって、堆肥原料の調製もその変動する処理能力に合わせた調製が求められることになる。一般に、堆肥化の通気装置として、堆肥原料1m<sup>3</sup>あたり100L/min程度の空気を供給でき、1.0~2.5kPa程度の静圧を有する送風機が推奨されている（中央畜産会、2000）。堆肥原料を完全に均一な状態に調製することは困難であり、また乾燥などの季節的な変動もあり、これらに対応するためには、静圧に余裕のある送風機を選択する方法もあるが、静圧が高いほど送風機の運転費（電気代）が高くなるため、通気床構造や堆肥原料は通気性が良いほうが望ましい。

## 2. 評価技術に求められる機能と検討事項

1) 目標は、堆肥原料の通気性そのものを簡単に評価する技術の開発である。乾燥炉や天秤等の分析機器を使用して時間をかけて行う水分測定のような方法ではなく、バケツによる測定から容積重を求める方法などと同様に、1回あたり数分の作業で終了できるような手軽さが必要である。また、どれ

ほど混合しても、堆肥原料中には必ずムラが存在するため、そのムラを含めて評価できるように、ある程度の量をまとめて評価できなければならない。使用される副資材も多く種類があるため、様々な副資材を対象にできることが望ましい。

2) 開発に際しては、乳牛ふん尿を対象に通気量と堆肥原料の通気抵抗の関係などの基礎データを得ることから始めた。大泉ら（1983）の行っ

た測定方法を参考に、堆肥原料を容器に充填して荷重を加えて堆積高さを推定し、そのまま荷重を加えた状態で通気を行い、そのときの通気抵抗を測定した。堆肥原料は、乳牛ふん尿に対し、副資材の混合量を変えたものを供試した。副資材として、オガクズ、モミガラ、戻し堆肥等を用いた。そして、これらの知見をもとに、堆肥原料の通気性を把握する測定装置を試作し、その性能や取扱い性等を調査しながら改良を行い、営農現場の通気型堆肥舎とそこに投入される堆肥原料を供試して現地試験を行った。

### 3. 通気抵抗測定装置の概要

- 1) 測定装置は、現場で数値などの判断しやすい評価値で判定し、堆肥原料の調製に活用できることが必要である。ただし、判定するためには、各現場毎に堆肥化を行おうとする堆肥原料の通気性と、測定装置による通気抵抗値との関係を予め把握しておくことが必要である。例えば、通気が十分行われている発酵槽や、或いは堆肥化が良好に進行している発酵槽の堆肥原料で、測定装置によるデータの蓄積を図り、これから投入を予定している堆肥原料に対して、そのデータを活用するといった方法が考えられる(図2)。そこで測定装置は、その現場において通気性が良いと判断される堆肥原料の通気性のデータを基に、これから投入する堆肥原料の通気性を確保できるような装置として開発した。
- 2) 測定装置は、通気性そのものを評価する装置であるが、一般に堆肥化現場では、堆肥原料1m<sup>3</sup>あたり100L/min程度の空気が供給される。本測定装置は、測定装置に充填されたサンプル(2L程度)に対し、この条件で通気したときの通気抵抗を測定する構造である(図3)。

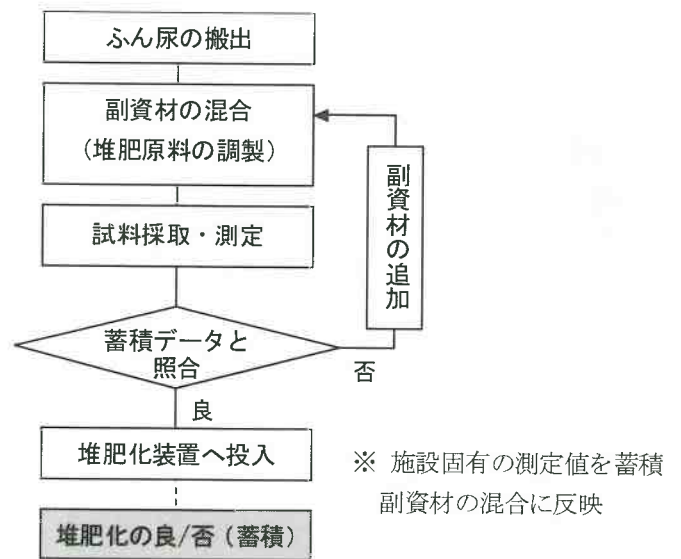


図2 本測定装置を活用した評価方法

### 4. 通気型堆肥舎で行った性能試験

測定装置で通気型堆肥舎に投入される堆肥原料の通気抵抗を測定し、通気型堆肥舎に堆肥原料を堆積して通気したときの通気床の静圧(下部静圧)と比較した。通気型堆肥舎の通気床は清掃して目詰まりを除去し、先ず空状態で風量と通気抵抗の関係を調査した。その後、堆肥原料を0.5m、1.0m、1.5m堆積し、通気量(風量)を変えながら下部静圧を測定した。また、同時に堆肥原料から試料を採取し、測定装置で通気抵抗を測定した(表)。

表に示した試験の結果では、下部静圧は堆積高さが高くなるほどより大きくなる傾向が示されたが、これは堆積により自重が加わり、下層になるほど圧密が生じたことが原因と考えられた。1.5m堆積した状態でも1kPaを大幅に下回り、床構造も堆肥原料も通気性が良いことが示された。測定装置による通気抵抗値は、下部静圧が高い現場の堆肥材料の方が高い値となり、他の現場でも同様の傾向が得られた。測定装置は、堆積時の圧密を想定した構造としているが、堆積高さに相当する通気の幅が小さいため、下

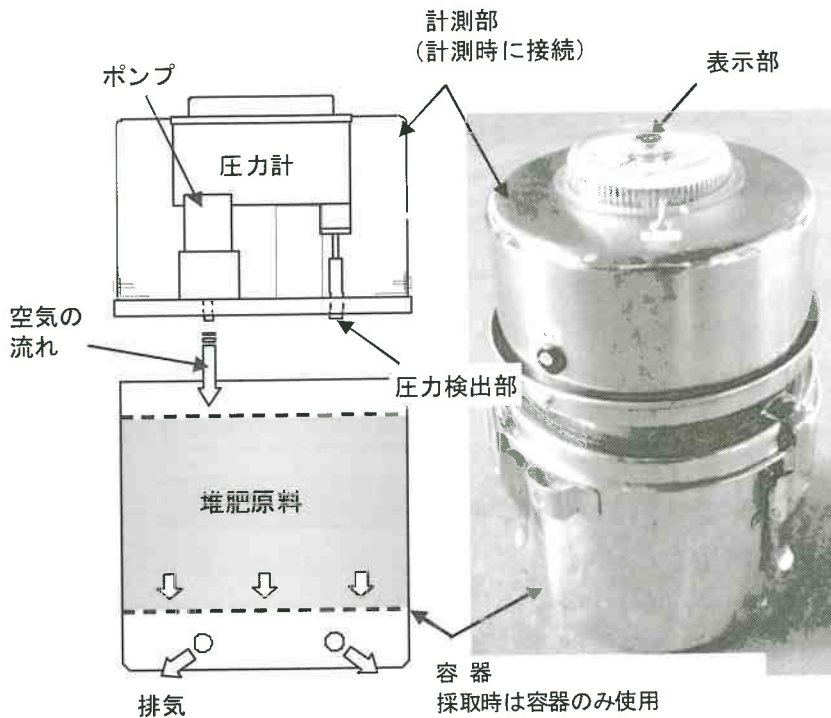


図3 堆肥原料の通気抵抗測定装置の概要

表 通気型堆肥舎で行った試験結果例 <sup>1)</sup>

	測定装置の 通気抵抗値 (Pa)	測定時間 (s/点)	発酵槽の下部静圧 <sup>2)</sup> (Pa)	原料の種類 (副資材)
試験 1	10.8 標準偏差 2.6 n=10	145	0.5m 堆積 20 1.0m 堆積 63 1.5m 堆積 124	肉用牛ふん (戻し堆肥)
試験 2	35.8 標準偏差 7.7 n=10	210	0.5m 堆積 43 1.0m 堆積 189 1.5m 堆積 448	乳牛ふん, 豚ふん 鶏ふん (戻し堆肥)

1) いずれも堆肥化が良好に開始された。

2) 測定装置と同じ通気条件のときの値。1m 堆積時に 1m<sup>3</sup>あたり 100L/min に相当。

部静圧の値とは異なる。なお、表に示した通気型堆肥舎では、通気床構造の抵抗がほとんどない良好な構造であり、いずれも堆肥化が良好に開始された。これらの結果から、測定装置の活

用方法、性能、取扱性等について、以下のとおり判断された。

1) 測定装置は、堆肥原料の通気性の評価に活用できる。



- 2) 使用に際しては、実際に堆肥化が良好に進行しているときにデータを蓄積しておく。通気性が悪い堆肥原料に対しては、良いと判断される通気抵抗値に下がるまで副資材を混合する。
- 3) 堆肥原料からサンプルを採取し、測定するまでの時間は、1回あたり3.5分程度である。一般に堆肥原料にはムラが多く、堆肥原料全体の通気性を評価するため、測定点数は多い方が望ましい。試験では10点測定した。
- 4) 本装置の構造上、長稈の稲ワラ、麦稈などを主要な副資材として混合した堆肥原料には適さない。

なお、試験を行った現場（表には示していない）では、堆肥原料の通気性が良好であるにもかかわらず、通気床構造の圧力損失（抵抗）が非常に大きいことが明らかとなる現場もあった。圧力損失が大きい床構造は、十分な空気の供給が行われない、或いは電気代がかかるなどの問題が発生するため、簡単であるが通気床の構造についてアドバイスをを行った。本測定装置を使用して測定を行うことにより、通気抵抗を測定値として確認することができるため、現場の方に対してこのような指導を行う際にも、本測定装置は有効と思われた。

## おわりに

堆肥原料の通気性そのものを評価できる装置として一定の開発目標に達したと考えている。受注生産体制に入りつつあり、今後は、現場に近い指導的立場の方々が、各農家の堆肥原料の調製に活用できるように、評価・作業手順等のマニュアルをさらに充実させていく予定である。

## 参考文献

- 1) 市川ら：牛ふんの堆肥化における粉碎古紙利用の影響，愛知農総試研報，1999
- 2) 大泉ら：堆積した堆肥の容積重推定法に関する一考察，千葉畜セ研報，1983
- 3) 中央畜産会：堆肥化施設設計マニュアル，2000
- 4) 原田ら：平成20年度生研センター研究報告会資料，2009

## ◀地域先端研究▶

デュアル抵抗性遺伝子システムの発見と  
病害抵抗性作物の創製に向けた技術開発

岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所

鳴坂 義弘

シロイヌナズナのゲノム上で隣接する異なる2つの抵抗性遺伝子 *RPS4* と *RRS1* が、異なる3種の病原体(アブラナ科野菜類炭疽病菌(炭疽病菌), トマト斑葉細菌病菌, 青枯病菌)の攻撃を認識して抵抗反応を起動することを発見した。さらに, シロイヌナズナ由来の *RPS4* と *RRS1* はコマツナやタバコにおいても機能することを明らかにした。“デュアル抵抗性遺伝子システム”の作用機作の解明により, 病害抵抗性作物の創製に貢献することが期待される。

## 1. はじめに

病害による世界の農業生産被害は10~20%といわれており, これは8億人の食糧に値する。世界の飢餓人口が8億人と見積もられていることから, 病害を防ぐことは食糧の安定供給において最も重要な課題の一つである。このような植物の感染症の80%以上は糸状菌(カビ・菌類)によって引き起こされ, 残りは細菌, ウィルス, ウイロイド, ファイトプラズマ, リッチケア様微生物, 線虫, 原虫などが原因である。地球上には十万種の糸状菌が存在するが, そのほとんどは植物に感染せず, 植物病原菌は約8000種である。これらのうち, 1つの植物種に激害を起こすものは10種もない。このことは, 植物は大方の病原体に抵抗性を示し, わずか一握りの病原菌種によって病害を受けることを意味している。

植物の病原体の認識機構は, 抵抗性遺伝子産物の作用機作として, 病原体由来分子と直接結合する場合(レセプター-リガンドモデル; 遺伝子対遺伝子説), 病原体によって影響を受ける他の宿主因子の状態変化を認識する場合(ガードモデル)によって説明されている。私たちが

NARUSAKA Yoshihiro

〒716-1241 岡山県加賀郡吉備中央町吉川  
7549-1

発見した“デュアル抵抗性遺伝子システム”は, これら2つの説を含有した第3の説として位置づけられる。本稿では, “デュアル抵抗性遺伝子システム”について概説し, 本システムを利用した病害抵抗性作物の開発研究について紹介する。

## 2. 植物による病原体の認識機構

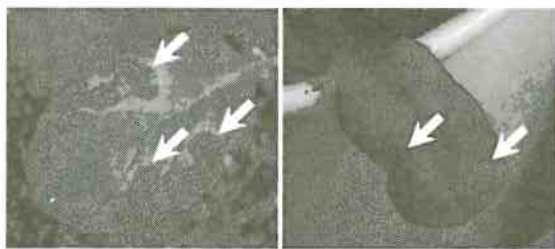
植物の病原体に対する抵抗反応は, Flor が唱えた遺伝子対遺伝子説により, 植物の抵抗性遺伝子(*R*-遺伝子, 病原体を認識する植物側の受容体)と, 対応する病原体の非病原力遺伝子(*Avr*-遺伝子)の1対1の組み合わせによって決定されると考えられている。しかし, 主要なクラスの抵抗性遺伝子であるNB-LRR遺伝子は, モデル実験植物シロイヌナズナのゲノム上には150個, イネにおいても400~600個しか存在しない。このため, わずかの抵抗性遺伝子で, 数十万の病原微生物にどのように対応しているのかの説明が困難であった。これに対して, ガードモデルとは, 抵抗性遺伝子産物は病原菌が放出する病原性因子を直接認識するのではなく, その攻撃のターゲット分子をモニターすることにより, 病原性因子を間接的に検出するというものである。この説に従うと, 限られた数の抵抗性遺伝子産物によって, 多くの病原菌を認識

することが可能となる。

### 3. アブラナ科野菜類炭疽病菌に対する抵抗性遺伝子の発見

筆者らは、植物の病原体の認識機構および、それに続く抵抗性誘導機構を明らかにすることを目的として、アブラナ科植物に感染する炭疽病菌(*Colletotrichum higginsianum*)に着目し研究を開始した。近年、ハクサイセル成型苗やコマツナにおいて、炭疽病が発生している。本病害は従来の育苗現場および圃場において問題とされてきた病害ではないため、抵抗性品種の育種や防除剤の開発および農薬の登録が遅れている。筆者らは、炭疽病菌がモデル実験植物シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のゲノム配列が決定した生態型 Columbia (Col-0) に感染することを明らかにした (図 1)。100 種類以

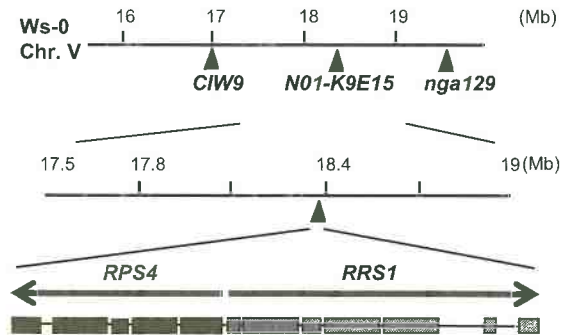
図 1 アブラナ科野菜類炭疽病菌を接種して 6 日後の病斑



ハクサイ シロイヌナズナ(Col-0)

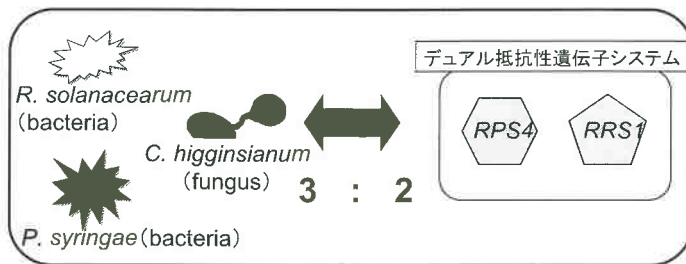
上のシロイヌナズナの生態型について感染生理学および遺伝学的な解析を行った結果、この病原菌に抵抗性を示す 11 種類の生態型を得、生態型 Wassilewskija(Ws-0)における抵抗性遺伝子は 5 番染色体上に存在することを明らかにした (図 2) <sup>1)</sup>。炭疽病菌に抵抗性のシロイヌナズナ生態型 Ws-0 において詳細に抵抗性遺伝子を探索した結果、目的の遺伝子は十数個の抵抗性遺伝子がクラスターを形成している領域 (MRC-J 領域) に位置することが明らかとなった。そこで、Ws-0 に T-DNA を挿入した変異体ライブラリー(3 万ライン)を用いた逆遺伝学解

図 2 炭疽病菌に対するシロイヌナズナ抵抗性遺伝子のマッピング結果



析により、炭疽病菌に対して抵抗性から感受性へ表現型が変化した変異体をスクリーニングした。得られた 8 つの変異体について T-DNA 挿入部位および変異部位を解析したところ、感受性変異体は *RPS4* または *RRS1* 遺伝子に変異を有しており、炭疽病菌に対する抵抗性誘導のためには、*RPS4* と *RRS1* 遺伝子の両方が必要であることが明らかとなった<sup>1)</sup>。興味深いことに *RPS4* は Gassmann 氏らによりトマト斑葉細菌病菌 (病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) に対する抵抗性遺伝子として既に同定されていた<sup>2)</sup>。一方で、その隣に存在する *RRS1* 遺伝子は Deslandes 氏らにより、ナス科およびアブラナ科植物に感染する青枯病菌 (土壌病原細菌 *Ralstonia solanacearum*) に対する抵抗性遺伝子 *RRS1-R* として同定されていた<sup>3)</sup>。このように、全く異なる病原体の抵抗性遺伝子として同定された 2 つの遺伝子が、病原糸状菌炭疽病菌に対する抵抗性遺伝子として機能することは驚くべき発見であった。筆者らは、これらの病原細菌に対しても *RPS4* と *RRS1* 遺伝子の両方が必要であることを明らかにし、2 つの抵抗性遺伝子が異なる 3 種の病原体の認識に関わっていることを証明した (図 3)。また、筆者らは、この“デュアル抵抗性遺伝子システム”は、さらに多くの病原体の認識に関わっていると考えている。

図3 デュアル抵抗性遺伝子システムによる異なる3つの病原体の認識



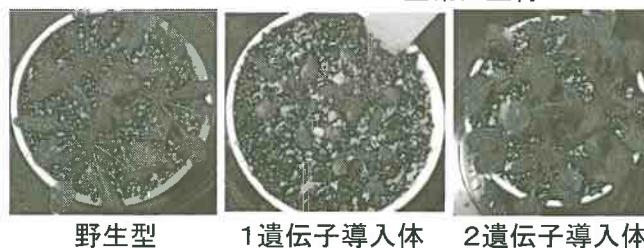
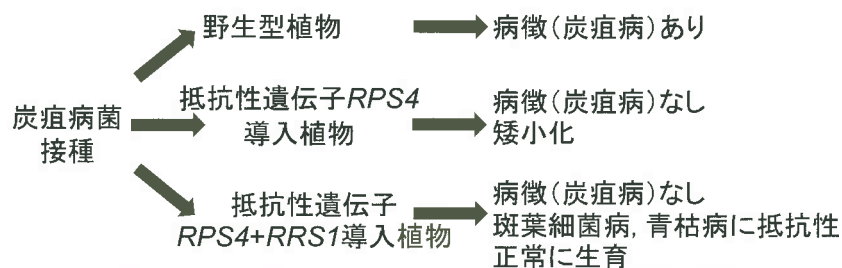
筆者らが発見した炭疽病菌に対する2つの抵抗性遺伝子はシロイヌナズナの5番染色体下流の *MRC-J* 領域において5'末端を付き合わせた状態で隣接して存在している。つまり、お互いのコード領域が相手方のプロモーター領域を兼ねている。機能遺伝子が隣り合って存在していることに必然性があるのか、ゲノムの構造上、ゲノム進化上においても非常に興味深い遺伝子である。また、病原糸状菌、病原細菌、病原土壌細菌という、全く性質の異なる3種の病原体の攻撃を隣り合った2つの抵抗性遺伝子が一对で認識するシステムは世界初の発見である。これまで、1つの抵抗性遺伝子または非常に相同性の高い遺伝子が2つの病原体に対応するという報告(アリマキと線虫,病原ウイルス)があるが、

隣接した2つの抵抗性遺伝子が一对で異なる3つの病原体に対応しているという報告はない。今後、これら2つの抵抗性遺伝子産物が抵抗性誘導において相加的に働いているのか、複合体を形成して2つで1つの機能を担っているのかを明らかにする必要がある。

#### 4. デュアル抵抗性遺伝子システムの病害抵抗性育種への応用技術の開発

病害抵抗性育種では、抵抗性遺伝子を発見し、作物に導入することが伝統的に行われてきた。しかし、抵抗性遺伝子を対象作物に単独で形質転換しても、抵抗性が安定的に発揮できない例が数多く報告されており、病害抵抗性の分子育種における障害となっている。この度発見した2つの抵抗性遺伝子のうち、*RPS4* 遺伝子を単独で炭疽病菌に感受性のシロイヌナズナ生態型(Col-0)に導入した場合、導入植物の生育に異常をきたし、病害に対する抵抗性の発現が不安定であるなどの現象がみられた。これに対して *RRS1* 遺伝子を単独で感受性シロイヌナズナに導入しても病害抵抗性を安定的に付与できな

図4 2つの抵抗性遺伝子を導入したシロイヌナズナ(Col-0)における病原菌に対する応答



った。しかし、2つの抵抗性遺伝子を同時に感受性のシロイヌナズナに導入した場合、抵抗性が付与され、生育も正常であることが明らかとなった(図4)。このことから *RPS4* は抵抗性発現において主たる役割を担い、*RRS1* は *RPS4* を制御する因子であることを意味している。このような遺伝子セットはシロイヌナズナゲノム上に9セット存在しており、“デュアル抵抗性遺伝子システム”の普遍性を示唆している。

次いで、野菜茶業研究所と共同で、シロイヌナズナと同じアブラナ科植物のコマツナの形質転換を実施した。炭疽病菌および青枯病菌に感受性のコマツナの組織片をアグロバクテリウム *RPS4* 導入株と *RRS1* 導入株の混合液と共存培養することで本菌を組織片に感染させた。さらに、共存培養後の組織片からカルスを誘導し、得られたカルスを再分化することにより、形質転換コマツナを得た。

形質転換コマツナの葉に炭疽病菌を噴霧接種し、本菌に対する耐病性を検定した。その結果、*RPS4* と *RRS1* の両方が形質転換された形質転換植物のみが炭疽病菌に対して強い耐性を示し、どちらか1つのみの抵抗性遺伝子が導入されたコマツナは野生型と同様の激しい病徴を示した(図5)。以上により、コマツナにおいてもシロイヌナズナ由来の“デュアル抵抗性遺伝子システム”が機能すること、さらに、*RPS4* と *RRS1* の両方が抵抗性発現には必須であることが明らかとなった。

次いで、*RPS4* と *RRS1* の両方、もしくはどち

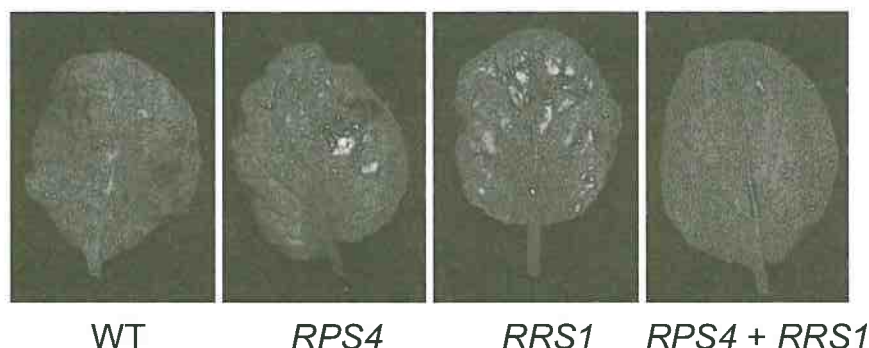
らか一方が形質転換されたコマツナに青枯病菌を断根接種し、本菌に対する耐病性を検定した。その結果、*RPS4* と *RRS1* の両方が形質転換されたコマツナのみが青枯病菌に対して強い耐性を示し、どちらか1つのみの抵抗性遺伝子が導入されたコマツナは青枯れ症状を示した。

さらに、*RPS4* と *RRS1* の両遺伝子をタバコに導入した結果、形質転換タバコがトマト斑葉細菌病菌の非病原力遺伝子 *avrRps4* および、青枯病菌の非病原力遺伝子 *popP2* に応答することを明らかにした。シロイヌナズナ由来の抵抗性遺伝子が科を超えて機能した貴重な知見である。

以上のように、抵抗性遺伝子が他の植物種において機能した例はほとんど無く(例;イネにおける野生イネ *Xa21* の導入)、学術的および応用的な価値が高い知見である。

最近、2つの抵抗性遺伝子によって病原体を認識する例が複数報告されている<sup>4)</sup>。特に、イネいもち病に対する抵抗性遺伝子として同定された *Pik* 遺伝子ファミリーに属する *Pik1Pikm* 遺伝子はそれぞれ2つの抵抗性遺伝子から構成され、イネゲノム上において5'末端を付き合わせた状態で隣接して存在している<sup>5)</sup>。さらに、イネいもち病に対する抵抗性の誘導には、両方の遺伝子を必要とすることが明らかにされている。しかし、これらの報告では、1つの病原菌の認識に2つの抵抗性遺伝子を必要とし、数少ない抵抗性遺伝子のレパートリーを減じる結果となっている。今後の研究の進展に期待したい。

図5 コマツナ形質転換体に炭疽病菌を噴霧接種して6日後の病斑



## 5. おわりに

“デュアル抵抗性遺伝子システム”の発見により、植物はわずかな数の抵抗性遺伝子で無数の病原体に対応するメカニズムを有しており、植物の免疫系も動物と同様に少ない遺

伝子を組み合わせることで多様な病原体を認識して防御系を発動していることが明らかとなった。動物と植物が生存するためには、病原体を認識し、排除するシステムが不可欠である。動物と植物において高く保存された免疫の基本システムを解明することで、生命現象の普遍性を論じることができるようになった。

多くの抵抗性遺伝子産物は進化系統上離れた植物に導入しても機能しない。しかし、今回発見したシロイヌナズナ由来の *RPS4* と *RRS1* を導入したコマツナや、ナス科植物のタバコにおいて、これら抵抗性遺伝子産物が機能したことは非常に興味深い知見である。現在、様々な作物に“デュアル抵抗性遺伝子システム (*RPS4*, *RRS1*)”を導入し、*RPS4* と *RRS1* および本システムの普遍性を解析している。今後、“デュアル抵抗性遺伝子システム”の作用機作の解明により、病害抵抗性作物の創製に貢献することが期待される。

本研究は、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の実施する「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」の委託研究課題「アブラナ

科作物ゲノムリソースおよびプラントアクティベーターを利用した新規病害防除法の開発」(平成 19~21 年度) および、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の実施する「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の委託研究課題「病原糸状菌の分泌戦略を標的とする作物保護技術の基盤開発」(平成 22 年度採択) による成果である。本研究の推進に関連して研究にご協力頂いた研究者を含め、関係者各位に深く感謝する。

## 文 献

- 1) Narusaka, M. et al. (2009), *Plant Journal*, 60, 218-226
- 2) Gassmann, W. et al. (1999), *Plant Journal*, 20, 265-277
- 3) Deslandes, L. et al. (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 2404-2409
- 4) Eitas, T.K. et al. (2010), *Current Opinion in Plant Biology*, 13, 1-6
- 5) Zhai, C. et al. (2011), *New Phytologist*, 189, 321-334

◀ 文献情報 ▶

プロスタグランジンは羊における胚の伸長とインターフェロンタウの子宮内膜への作用を調整する

Prostaglandins Regulate Conceptus Elongation and Mediate Effects of Interferon Tau on the Ovine Uterine Endometrium.

Piotr Dorniak, Fuller W. Bazer, and Thomas E. Spencer

Center for Animal Biotechnology and Genomics, Department of Animal Science, Texas A&M University, College Station, Texas, USA.

*BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 84, 1119–1127 (2011)

反芻獣の子宮内膜と胚栄養外胚葉は、妊娠初期にプロスタグランジン類を産生する。マウスやヒトにおいては、プロスタグランジン類は子宮内膜の機能や胚の着床を調節することが知られている。そこで、実験1として、プロスタグランジン合成酵素阻害剤である meloxicam を交配後8～14日の羊子宮内に注入、14日目に子宮内を灌流して胚を回収しその形態が調査された。その結果、対照区の羊すべてから12～14cmの伸長胚が回収されたが、meloxicam注入区における回収胚の多くは、卵形あるいは管状の胚であった。また、子宮内膜のプロスタグランジン合成酵素活性及びプロスタグランジン類の量は、meloxicam注入区の子宮灌流液において低かった。胚及び子宮内膜、特に上皮には、プロスタグランジン E<sub>2</sub> 及びプロスタグランジン F<sub>2α</sub> のレセプターが存在した。次に、実験2として、発情後10～14日目の羊子宮内に賦形剤（対照区）、meloxicam、組換え羊インターフェロンタウ、あるいは meloxicam 及び組換え羊インターフェロンタウが注入された。その結果、meloxicam 注入により子宮内のプロスタグランジン類の量と、プロゲステロンに誘導され

る子宮内膜遺伝子、特に IGFBP1 と HSD11B1 の発現量が減少した。また、組換え羊インターフェロンタウの注入により、子宮内膜のプロスタグランジン合成酵素活性と子宮内のプロスタグランジン類の量は増加した。一方、組換え羊インターフェロンタウ注入により増加する多くの遺伝子（FGF2, ISG15, RSAD2, CST3, CTSL, GRP, LGALS15, IGFBP1, SLC2A1, SLC5A1, SLC7A2）は、組換え羊インターフェロンタウと meloxicam の同時注入により減少した。以上の結果から、プロスタグランジン類は、羊子宮においては、胚の伸長及びプロゲステロンやインターフェロンタウに対する子宮内膜の反応性を調整する重要な因子であることが明らかとなった。

伸長胚への発育に対する母体のサポートは、反芻獣の妊娠認識や着床に不可欠である。交配後8日目頃に透明帯から脱出した胚は、11～12日後には卵形あるいは管状に発育、12日目頃から伸長が始まり、16日目には14cm以上に伸長する。反芻獣においては、妊娠初期には、子宮内膜機能はプロゲステロンとインターフェロンタウにより調整されており、インターフェロンタウは妊娠成立に不可欠である。インターフェロンタウは、栄養外胚葉の単核細胞から分泌されるが、胚の伸長に影響を及ぼす因子については不明な点が多い。本研究から、プロスタグランジン類は、羊子宮においては、胚の伸長及びプロゲステロンやインターフェロンタウに対する子宮内膜の反応性を調整する重要な因子であることが明らかとなった。今後、胚や子宮内膜から分泌されるどのプロスタグランジンが、着床までの期間に、栄養外胚葉や子宮内膜機能や栄養外胚葉の分化を調整しているのかを明らかにする必要がある。

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

## ◀ 文献情報 ▶

## CLV3ペプチド-FLS2シグナル伝達系による幹細胞の免疫機構

Stem-cell-triggered immunity through  
CLV3p-FLS2 signalling.

H. Lee, O-K, Chah and J Sheen

Department of molecular biology and center  
for computational and integrative biology,  
Massachusetts general hospital, and  
department of genetics, Harvard medical  
school, Boston, USA

*Nature*, 473, 376-379 (2011)

植物における茎頂分裂組織(SAM)は未分化な細胞からなる幹細胞であり、葉、茎、花芽分裂組織は SAM から分化する。他の組織に病害などの感染があった場合でも、SAM から無病の植物体の再生させる方法が確立されており、園芸分野などでは 10 年以上にわたって利用されている。しかしながら、SAM における先天性免疫(自然免疫)の分子機構に関しては、これまで明らかにされていなかった。

本研究では、SAM での自然免疫機構に、植物全身で発現する FLS2 シグナル伝達系と、SAM 特異的に発現し、SAM の維持・調節に関わる分泌型ペプチド CLV3 が関わっていることを報告している。FLS2 は、ロイシンリッチリピート(LRR)を細胞外領域に持ち、細胞内にキナーゼ領域を持つ典型的な植物の受容体型キナーゼをコードしており、病原細菌のべん毛タンパク質に含まれるタンパク質フラジェリンと結合することで、シグナル下流の MAPK カスケードや、活性酸素生成反応系の活性化を促し、さらに防御遺伝子群の発現誘導などを通して、自然免疫機構を誘導することが明らかになっている。一方、CLV シグナル伝達系は分泌型ペプチドである CVL3 が FLS2 と同様に LRR 受容体型キナーゼである CLV1、細胞外受容体領域のみの CLV2 とともに、SAM の維持に重要な働きをする。著

者らは、植物での受容体型キナーゼによるシグナル伝達系のスクリーニング系開発の過程において、FLS2 による下流因子の活性化を指標に実験を行っていたところ、驚くべきことに FLS2 に CLV3 ペプチドが結合することを発見した。この結合活性は、フラジェリンエピトープ Flg22 と FLS2 の結合とほぼ変わらない強いものであった。さらに、CLV3p-FLS2 の結合により、植物細胞内で自然免疫機構に関わる様々な反応が実際に誘起されることを見いだした。また、FLS2 シグナル伝達系にみられる植物の矮小化は、SAM での FLS2 シグナル系ではみられなかった。次に、実際の植物 SAM において発現する FLS2 と CLV3 が、SAM における免疫機構として働いているかどうかを調査したところ、SAM に病原細菌を摂取した際、*fls2* あるいは *clv3* 突然変異体では感染・増殖がみられたが、*clv1* 変異体では検出できなかった。つまり、SAM においては、恒常的な免疫機構を得るために CLV3-FLS2 というシグナル系を用いながらも、通常 FLS2 を介した免疫系でみられる成育障害からは独立した機構を獲得したと考えられる。今回の報告は、FLS2 が非自己のフラジェリンを特異的に認識して自然免疫機構を誘起するというこれまでの定義付けを覆すものであった。

実際の生態系においては、常に細胞分裂・分化を続ける幹細胞組織への病害がどの程度の頻度で起こりうるものなのか、また、植物の発達・進化においてどのような影響を及ぼすものなのかについての知見はほとんど見あたらない。しかしながら、FLS2 が内生の CLV3 と外生のフラジェリンとを両方とも認識して情報を伝達するという結果は、植物において、LRR 型受容体キナーゼとそのリガンドとなるペプチドシグナルとが共進化してきたことを示すものであった。(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 ▶

## トランスクリプトーム解析によるエタノールストレスに対する一倍体、二倍体酵母の応答の違い

Transcriptome analysis of differential responses of diploid and haploid yeast to ethanol stress

Bing-Zhi Li, Jing-Sheng Cheng, Ming-Zhu Ding, Ying-Jin Yuan

Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, P.O. Box 6888, Tianjin 300072, PR China

*Journal of Biotechnology*, 148, 194-203 (2010)

エタノール発酵時において、高濃度のエタノールは酵母に対する重大なストレス要因の1つで、細胞増殖や生存率に重大な負の効果をもたらす。そのため、酵母のエタノール耐性という特性は、エタノール生産の効率性・コスト面を改善する上で、最も重要な課題の1つである。エタノール耐性機構に関してはまだまだ不明な点が多いが、現在までに得られている知見は、エタノール刺激に対する細胞内での一時的な応答に関するものが主である。しかし、現場においてエタノールは発酵過程の初期の段階より蓄積するため、実際に酵母菌体は、発酵過程において継続したエタノールストレスを受けている。そこで、エタノールに対する酵母の作用・耐性機構をより理解するために、エタノールストレスに順応させた後の酵母の全体的な応答を解析した。また、一倍体と二倍体株は、様々なストレスに対してしばしば異なる耐性を示すため、ストレス耐性のメカニズムを理解する比較研究のために重要なツールである。本論文では、二

倍体株と2つのホモログスな一倍体株について、異なるエタノール濃度でDNAマイクロアレイ、定量RT-PCRを行い、遺伝子発現解析を行った。

3つ全ての株（アルコール耐性を有する二倍体と孢子形成により分離した2つの一倍体）において、エタノール存在化で発現上昇した遺伝子群は、リボソーム生合成の調節、脂質合成（*FAA1*, *FAA3*）、エルゴステロールの取り込み（*SUT1*, *DAN1*）、イノシトール生合成（*INO2*, *INO4*, *INO1*, *INM1*）に関与する遺伝子だった。一方、発現減少した遺伝子群は、アミノ酸合成（チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニン、アルギニン、リジン、ヒスチジン）、ビオチン（*BIO3*, *BIO4*, *BIO5*）と葉酸の代謝に関与する遺伝子だった。これらの応答は、エタノール刺激に対する細胞内での一時的な応答を解析していた以前までのゲノムワイドな解析ではほとんど抽出されない。

また、エタノールストレスに対して変化はないが、異なる倍数性（二倍体、一倍体）の違いで異なる発現挙動を示した遺伝子群は、フェロモン応答、接合、エネルギー、ストレス応答、金属イオンの輸送（銅、亜ヒ酸塩）や細胞壁（*CTS1*, *DSE1*, *DSE2*, *MTL1*, *SCW11*）に関与する遺伝子だった。さらに、エタノールへの順応後における挙動と、短時間のエタノール刺激に応答する挙動との間に顕著な差があることも示した。これらの結果は、一倍体と二倍体酵母のアルコール耐性の差に関わる分子的知見、あるいは酵母におけるエタノール耐性機構をより理解するための有用な情報となる。

（抄訳：金井宗良, KANAI Muneyoshi, 独立行政法人 酒類総合研究所）



バックナンバーのご案内  
 第 145 号  
 2011 年 5 月 15 日発行

**特集 「マグロ養殖の最先端研究」**

- (総説) クロマグロの増養殖に関する研究の現状と今後の展望 ..... 升間主計
- (総説) クロマグロ完全養殖の技術開発の動向と展望  
 ..... 宮下 盛・村田 修・岡田貴彦・澤田好史・熊井英水  
 クロマグロの資源量を知るための資源評価  
 ..... 竹内幸夫

- 魚類の生殖細胞移植による新たな種苗生産技術の開発  
 ークロマグロを生むサバの作出をめざしてー .....  
 吉崎悟朗・矢澤良輔・岩田 岳・樋口健太郎・竹内 裕  
 地下海水を用いたクロマグロの陸上養殖  
 ..... 秋山信彦  
 クロマグロ種苗生産に対する民間企業の取り組み～現状と課題～ ..... 伊藤 暁

**国内情報**

- 高精度高速施肥機の開発 .....  
 ..... 紺屋秀之・林 和信・堀尾光弘・重松健太・吉野知佳



バックナンバーのご案内  
 第 144 号  
 2011 年 3 月 15 日発行

**特 集**

- 稲わらからバイオエタノール製造のための前処理技術  
 「CaCCO 法」の開発と応用展開 ..... 徳安 健  
 食料とエネルギーの同時的増産技術を開発 ..... 石田哲也・  
 小原 聡・寺島義文・樽本祐助・寺内方克・杉本 明  
 微生物機能を利用した未利用バイオマス資源リグニンの化学  
 原料への変換とその活用技術 ..... 中村雅哉・大塚祐一郎・  
 大原誠資・政井英司・敷中一洋・重原淳孝・片山義博

- CBP 用スーパー酵母を用いたバイオエタノール生産技術の  
 開発 ..... 蓮沼誠久・荻野千秋・近藤昭彦  
 地域資源を利用したバイオプラスチックの開発 ..... 大野 孝

**国内情報**

- 高機動型果樹用高所作業台車  
 ..... 太田智彦・山田祐一・猪之奥康治
  - 文献情報  
 母体の年齢がミトコンドリア DNA コピー数、ATP 含量及び  
 体外受精成績に及ぼす影響 ..... (抄訳: 下司雅也)  
 Ice-COLD-PCR は、低度、未知の DNA 変異を迅速に増幅し、  
 強力に濃縮することができる ..... (抄訳: 高橋正之)
- 生研センターからのご案内

## 編集後記

146号をお届けします。本号では特集として「きのこの最先端研究」を取り上げました。

総説で江口文陽氏（高崎健康福祉大学）に健康素材としての栽培から効能解析を中心にきのこのに関する研究動向についてご執筆戴くとともに、會見忠則氏（鳥取大学）に食品中のきのこのDNA鑑定、大賀祥治氏（九州大学）らに冬虫夏草など希少キノコの生理活性と新規栽培法の開発、宮崎安将氏（森林総合研究所）らにシイタケゲノム解読とその利用、田中昭弘氏（(株)雪国まいたけ）にマイタケ抽出成分の血糖値抑制機能について、それぞれご執筆戴きました。

その他の研究情報としては、原田泰弘氏（生研センター）らに堆肥原料の簡易な通気抵抗測定装置、鳴坂義弘氏（岡山県農林水産総合センター）にデュアル抵抗性遺伝子システムの発見と病害抵抗性作物の創製に向けた技術開発について、それぞれご執筆戴きました。

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）、金井宗良氏（酒類総合研究所）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）

## 前回 145 号訂正のお詫び

ブレインテクノニュース 145 号の 8 頁右段 7～9 行目のうち、「共喰いによる減耗期（写真 C～E）」及び「衝突多発期（写真 E～F）」は、「共喰いによる減耗期（写真 C～D）」及び「衝突多発期（写真 D～F）」の誤りでした（論文名「クロマグロ完全養殖の技術開発の動向と展望」（著者：宮下盛氏他））。謹んでお詫び申し上げますとともに、訂正をさせていただきます。

## 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 146 号

平成 23 年 7 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/>