

# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

## TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

### ブレインテクノニュース

# 第 85 号

MAY 15, 2001



背景は低温による穂の退化現象（白ふ）を示し、左下は冷害時に“葉いもち”から“穂いもち”に進展した水田、右下は生産農家におけるWebサイトの活用状況を示す。

水稲冷害対策のWebサイト活用 (独立行政法人 農業技術研究機構 東北農業研究センター 鳥越洋一氏原図)

## 目 次

### 総 説

- 情報化時代の水稻冷害対策技術 ..... 1  
 鳥越洋一 (独立行政法人農業技術研究機構 東北農業研究センター地域基盤研究部)

### 国内情報

- イネの形態シミュレーション ..... 6  
 渡邊朋也 (独立行政法人農業技術研究機構 中央農業総合研究センター虫害防除部)
- C3植物へのC4光合成回路の付与 ..... 10  
 徳富光恵<sup>1</sup>・松岡信<sup>2</sup>・趙徹<sup>3</sup> (独立行政法人農業生物資源研究所 <sup>1</sup>名古屋大学  
 生物分子応答研究センター <sup>2</sup>株式会社ジェイター)
- 匂いセンサを用いた匂いの記録・再生システム ..... 15  
 中本高道・森泉豊栄 (東京工業大学理工学研究科)
- SPR法による遺伝子の人工合成 ..... 19  
 土屋佳紀 (独立行政法人農業技術研究機構 動物衛生研究所海外病研究部)
- 稚魚にも応用できる高感度自動給餌システムの開発 ..... 22  
 鈴木伸洋・山本剛史・島隆夫 (独立行政法人水産総合研究センター 養殖研究所)

### 地域の先端研究

- イネ種子伝染性病害を防除する生物農薬の開発 ..... 25  
 市川健 (静岡県農業試験場病害虫部)

### 文献情報

- 未成熟卵母細胞の凍結保存 ..... 29  
 J. Wu et al. (Reproduction, 121, 389-393, 2001)  
 抄訳: 横尾正樹 (東北大学大学院農学研究科)
- お茶のサポニンが酵母の耐塩性を破壊する ..... 30  
 M. Tomita et al. (Journal of Bioscience and Bioengineering, 90, 637-642, 2000)  
 抄訳: 楠田大輔 (カルピス株式会社基盤技術研究所)
- 黄色い花を作る遺伝子はポリフェノール酸化酵素のホモログだった ..... 31  
 T. Nakayama et al. (Science, 290, 1163-1166, 2000)  
 抄訳: 清水圭一 (鹿児島大学農学部)
- イネの *brassinostroid insensitive 1* 相同遺伝子の機能欠損は、節間伸長とラミナジョイント  
 の屈曲を阻害する ..... 32  
 C. Yamamuro et al. (The Plant Cell, 12, 1591-1605, 2000)  
 抄訳: 春原英彦 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
- 日本のタイも残留孤児だった ..... 33  
 K. Tabata et al. (Fisheries Science, 66, 9-18, 2000)  
 抄訳: 清水興介 (マルハ株式会社中央研究所)

### 海外便り

- パデュー大学での1年8ヶ月 ..... 34  
 西村麻理江 (独立行政法人農業生物資源研究所)

### 特別情報

- BRAIN国際テクノフォーラム「動物のプリオン病研究の最前線」概要紹介 ..... 37

#### 表紙写真説明

東北地域の稲作は過去に度々過酷な冷害を被っており、近くは平成5年の大冷害によってわが国の社会・経済が混乱に陥ったことは記憶に新しい。農林水産省では「早期警戒システムを基幹とする冷害克服型営農技術の確立」研究プロジェクト(平成8—12年)を実施したが、このなかでインターネットのWebサイト(ホームページ)活用によるシステムが確立され運用されている。詳細は、総説(1—5頁)に紹介されているのでご覧下さい。

◀ 総説 ▶

## 情報化時代の水稲冷害対策技術

独立行政法人 農業技術研究機構  
東北農業研究センター・地域基盤研究部  
鳥 越 洋 一

東北地域は頻発する冷害に苦しめられてきたが、現在では全国で生産される玄米の約30%を生産する良質米の穀倉地帯となってきた。冷害対策技術の開発の歴史を概観し、それら成果を生かした水稲冷害早期警戒システムを紹介する。インターネットなどの普及により、自由に情報が入手できる時代になってきたが、農業技術研究者には生産者とのFace to Faceの活動が求められることには変わりはない。

### 1. はじめに

東北地域の稲作は冷害克服の歴史であったといっても過言ではない。1884年(明治17年)から1913年(大正2年)までの30年間における冷害発生年は7回。最近の1971年~2000年までの30年間でも同じく7回となる。冷害に遭遇する頻度は4, 5年に一度であり、過去も現在も大きな変化はみられない。冷害は低温に遭遇する時期とその程度によって被害の様相は異なる。被害は大きく遅延型、障害型、混合型の3つのタイプに類型化される。遅延型冷害は雪解けの遅れや生育期間を通して断続的に低温に見舞われ、生育が遅れて秋冷時に正常な玄米を生産できないもの。障害型冷害は花粉の形成過程や出穂・開花期に強い低温に遭遇し、受精障害(不稔)を起こすものをいう。混合型冷害は遅延型と障害型が併発したものである。近年の被害の実態を図1に示す。東北地域の冷害は、地球規模で毎年起こる東アジアのモンスーン(雨期)、わが国では梅雨の現象に起因することが多い。梅雨前線は冷涼な北のオホーツク海高気圧と温暖な南の太平洋高気圧という2つの気団が衝突するところに形成される。したがって、当地域は常にオホーツク海高気圧から吹き出す多湿で冷涼な偏東風(やませ)の影響を受ける宿命にあるといえる。

TORIGOE Yoichi

〒020-0198 盛岡市下厨川字赤平4

### 2. 最近の冷害対策技術の開発経過

#### 1) 保護苗代の進歩と早植栽培

長野県軽井沢の篤農家荻原豊次によって考案され、県農事試験場岡村政勝の協力で1942年(昭和17年)に原型が完成した「油紙保温折衷苗代」は、ビニールやポリエチレンの開発に伴って技術化が一層加速化され、普及に移されたのは1950年(昭和25年)であった。この技術は今までよりは1か月も早く播種、田植ができるようになり、明治時代からの一つの目標であった早植栽培を可能とした。これにより遅延型冷害の被害はかなり軽減されるようになった。

#### 2) 安全作期策定手法

戦後、早生で多収の耐冷性品種(「藤坂5号」など)が育成され、育苗法もビニール畑苗代などの保護苗代が開発され、早い時期に発根力の強い健苗ができるようになった。しかし極端な早植えでは、穂ばらみ期が梅雨期の低温に遭遇して不稔を発生する。秋冷による登熟障害と梅雨末期の不稔障害という二つの障害が問題となった。八柳三郎(1960)は「東北地方における稲作の計画栽培について」を発表し、安全出穂期・好適出穂期を中心とする計画栽培の基本的な考えを提案した<sup>2)</sup>。この考えは後に内島立郎(1983)によって安全作期の策定手法として体系化され、東北稲作の安定多収に貢献し、同時に冷害による被

## 2 総説

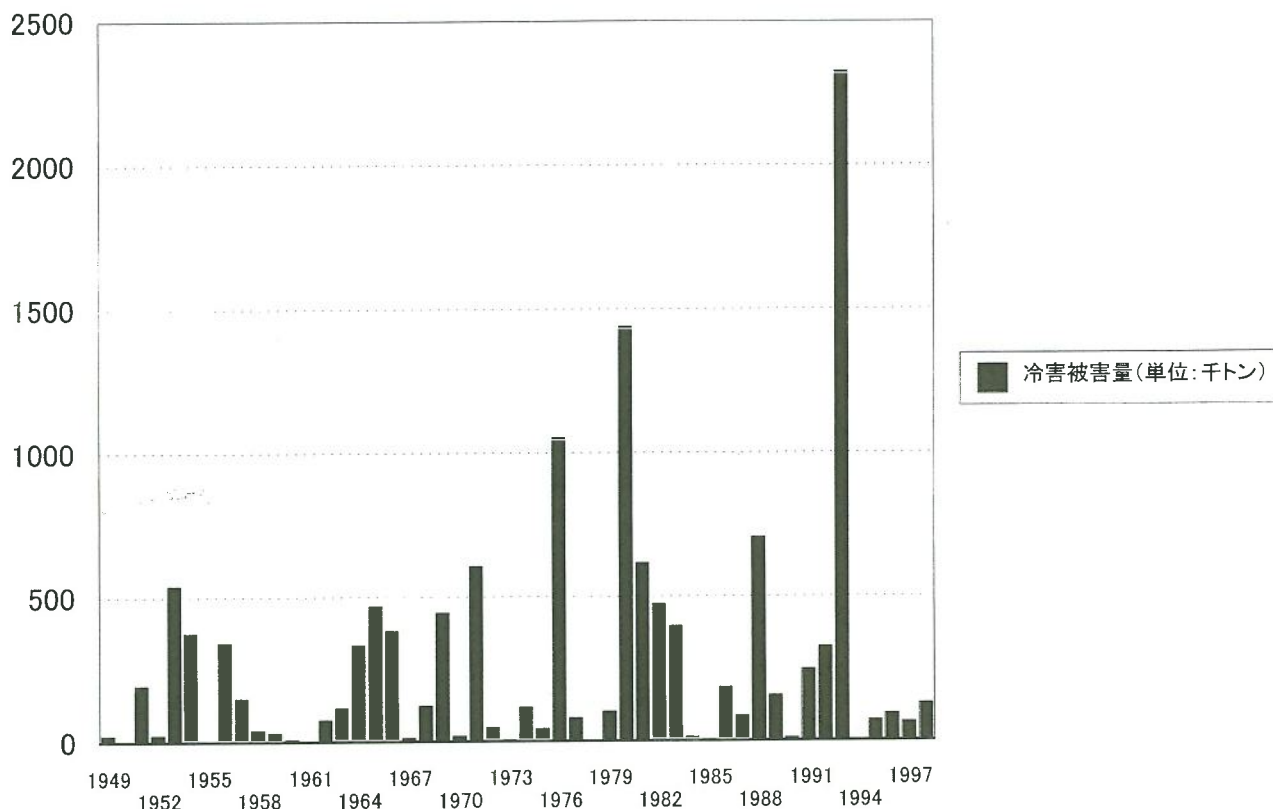


図1 冷害被害量の経年推移 (昭和24年～平成10年)  
資料：農林水産省統計情報部(平成11年)「平成10年産作物統計」

害をも軽減してきた<sup>3)</sup>。

### 3) 耐冷性品種の育成

東北地域の稲作は、1980年以降頻発する障害型冷害に見舞われた。その解決には耐冷性育種が大きく貢献した。宮城県古川農業試験場で開発された耐冷性検定法「恒温深水法」は、処理用水の水温を19℃に制御し、20cm以上の水深を保ち、強制循環させて水温のムラをなくして検定できる。それにより、障害不稔発生の再現性が高く、小面積で多数の育種素材を精度高く検定できるようになった<sup>4)</sup>。耐冷性が強く、また良食味で多収の品種は育成が困難といわれていたが、1980年冷害で「コシヒカリ」やその近縁品種の被害が軽微であったことが契機となって、1991年に古川農業試験場で「コシヒカリ」の血を継ぐ「ひとめぼれ」が育成された。同品種は普及直後の1993年大冷害時に、壊滅的な被害を受けた「ササニシキ」に比べて被害程度は半減され、その後普及面積が急増した。現在では、検定

水温を18.5℃、さらには18.0℃にして、耐冷性のより強い系統や品種の育成が行われている。

### 4) 水管理

低温障害の発生機構が最も複雑な時期は、幼穂分化から出穂・開花・受精期である。それに関連する要素の関係を図2に模式的に示す。特定要素の直接的効果と他の要素を経由する間接効果が複雑に作用していることが分かる。各要素の連結点として重要なのは水温と地温である。すなわち、水管理はこの系を制御する重要な技術である。したがって、水管理は昔から稲作りの基本的な技術として重要視されてきた。昼間止水・夜間灌漑は水温上昇のための基本技術として、また穂ばらみ期深水管理は障害型不稔防止の応急技術として冷害軽減に役立ってきた。最近では、穂ばらみ期以前の前歴水温の効果、すなわち幼穂形成期から穂ばらみ期までの前歴深水管理による不稔防止効果が顕著であることが示された<sup>5)</sup>。

前歴期間と危険期間の深水管理を組み合わせることで、障害不稔発生を大きく軽減できるため、冷害危険度の高い地域や耐冷性の弱い品種については、基本技術として位置づけられる。

5) 生育予測と診断技術

冷害発生を予測し、被害程度を診断する技術を開発するためには、精度の高い生育予測手法が不可欠となる。冷害タイプ別の被害は、収量を構成する4要素に分解すると理解しやすい。

$$\text{収量} = \text{穂数} \times 1 \text{穂} \times \text{穂数} \times \text{登熟歩合} \times 1 \text{粒重}$$

水稻は収量成立過程において低温に遭遇すると、収量構成が直接あるいは間接的に影響を受ける。直接的なものは次の2つに整理できる。穂が出る前の低温によって出穂期が遅れたり、また登熟期間中の低温で秋冷までに正常な玄米までに育たない遅延型冷害の場合、被害は登熟歩合や1粒重に現れる。もうひとつは、幼穂形成期～穂ばらみ期や開花・受精期に低温に遭遇すると不稔や奇形穎花が多発する障害型冷害の場合、被害は1穂数や登熟歩合に現れる。現在、生育ステージ、乾物生産量や不稔発生などを予測する各種モ

デル<sup>6)</sup>が開発されているが、実用レベルでかつリアルタイムな情報として提供されている事例はほとんどない。また広域的な診断に活用が期待されるメッシュ気候値は当初気象生産力の広域的評価に利用され、最近では農業立地評価、水田微気象予測、作物の生育予測、病虫害発生予測等に活用され始めている。

3. 情報化時代の冷害対策技術：水稻冷害早期警戒システムを例に

インターネットを中心とした情報技術革新が急速に進展している。本技術は、水稻冷害早期警戒システム概念に最も適合する。開発の考え方は次の二点にある。すなわち、①気象、水稻生育といもち病の発生予測に関する情報を東北の稲作関係者にリアルタイムに提供すること、②一般の人たちにも東北の稲作の実態を理解して頂き、冷害時の社会的な混乱を最小限に止めることにある。そのため、本システムは1996年からホームページ (<http://ss.tnaes.affrc.go.jp/~reigai/htbin/reigai.cgi>) で一般に無料で公開されている(表紙：図3)。本システムの最大の特徴は、モニター情報ネットワークを活用しているこ

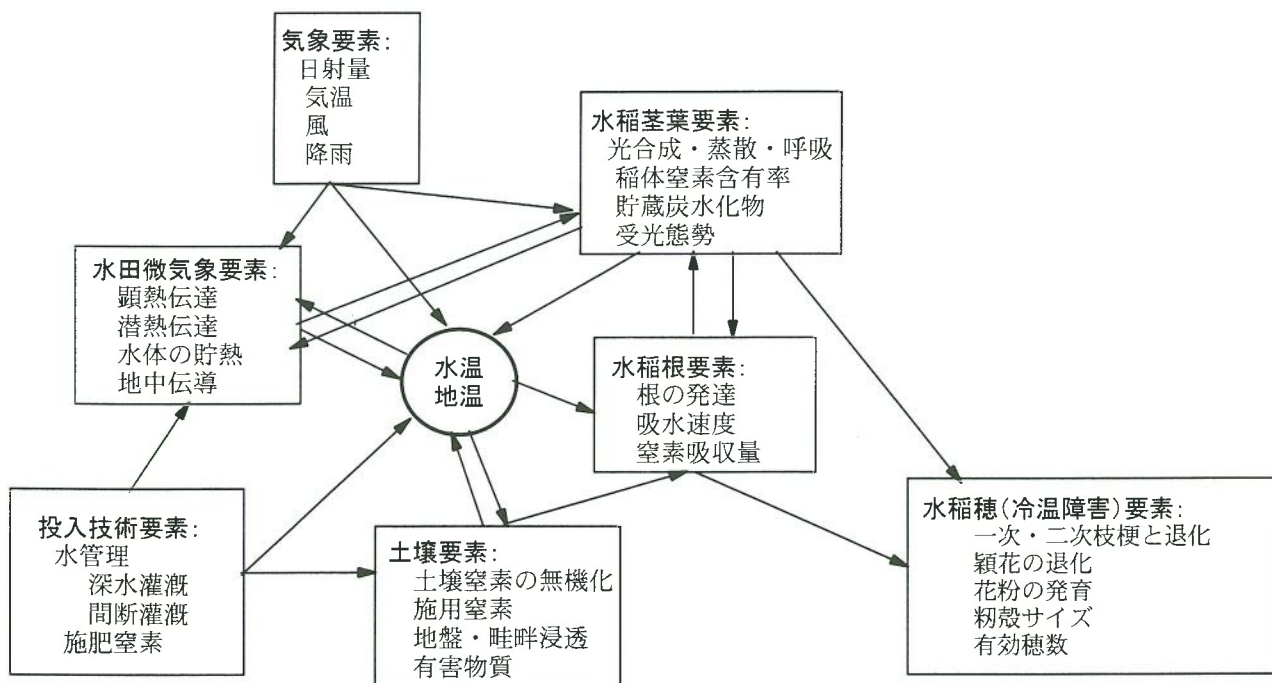
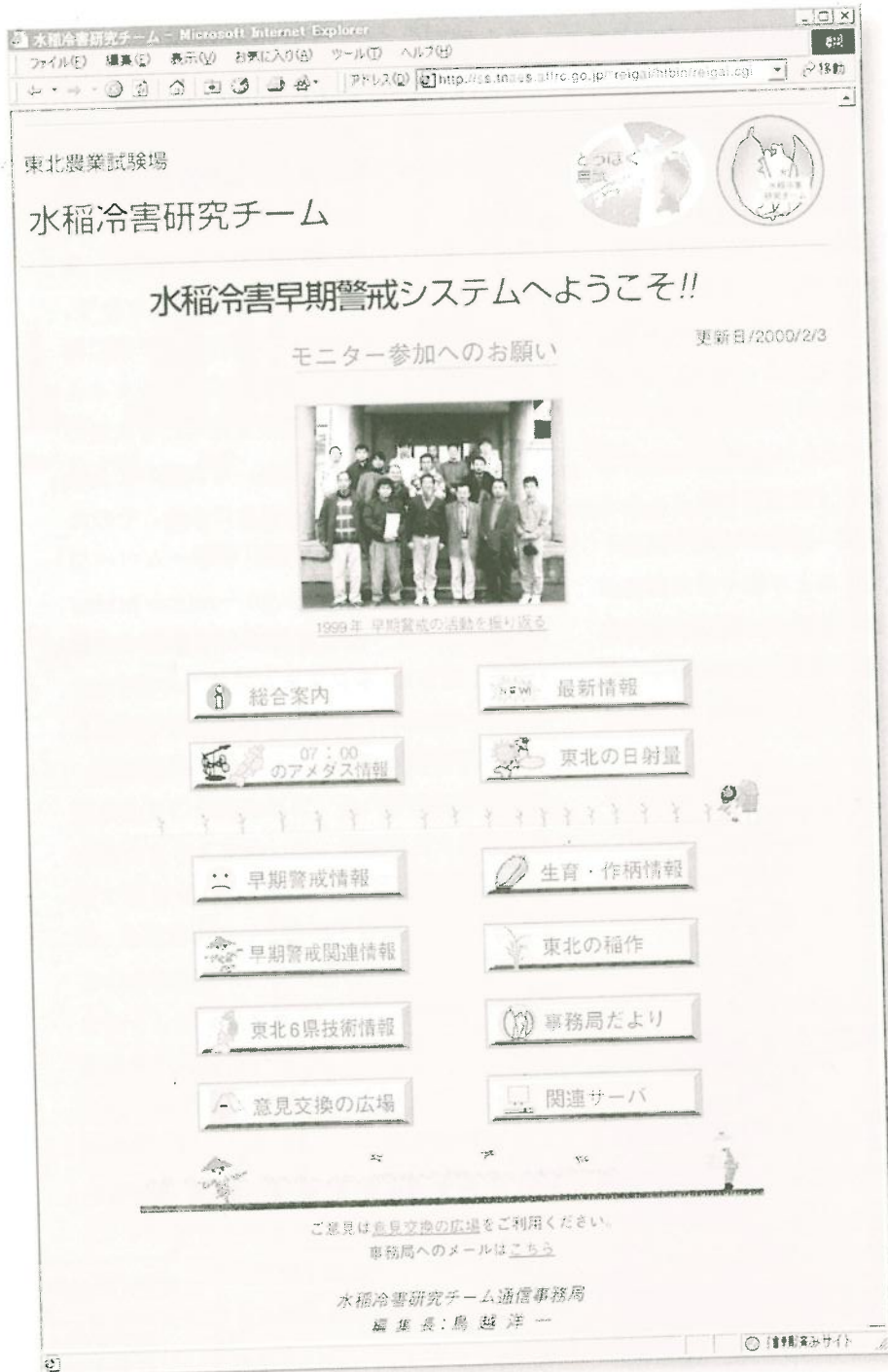


図2 幼穂分化期から出穂期までの冷温障害発生問題構造モデルの要約

インターネット活用

# ホームページのアイコンが導く 水稲冷害対策



農林水産省東北農業試験場

図3 水稲冷害対策のホームページ

とである。本ネットワークの双方向性の機能は、①地域内稲作の動向、②各種予測モデルの精度検証、③冷害回避技術の科学的評価、④提供情報の評価などに活かされている。情報交換の様子は編集長日誌や意見交換の広場のコーナーに記録され、一般の閲覧者も加わる。宮沢（1989）<sup>7)</sup>は経済社会のネットワークについて、次の3点を重視する。すなわち、①情報の発生・利用における「シナジー効果（相乗効果）」、②主体の行動様式における「ラーニング効果（学習効果）」、ならびに③「信頼」という財の創出効果である。強調すべきは③にある。ノーベル経済学賞を受けた数理経済学者K.J.アローは“信頼というのは、たやすく購入できる財ではないが重要な値打ちを持ち、それが存在するとシステムの効率を高める上で大変な役割を果たす”という。このように、本システムのモニター情報ネットワークは、一般の閲覧者に対して信頼性や客観性を付与するきわめて重要な役割を果たしていると思われる。

情報化時代といえども、情報を発信する側にもまた受ける側にも、そこには人がいる。それらを連結するにも、依然として顔と顔をつき合わせたFace to Faceの接触が重要であり、情報・通信技術は有力な補助手段の役割を果たすものであると痛感する。今、生産者は自由に情報を入手できる時代を迎えたが、冷害を回避するための基本および応急技術は変わるものでもなく、研究者には水田に向

いて稲をみて生産者と技術を語る姿勢が今までと同様に求められるのである。

## 文献

- 1) 川田信一郎（1976），荻原豊次等による油紙保温折衷苗代の発明，日本作物栽培論，52-54，養賢堂，東京
- 2) 八柳三郎（1960），東北地方における稲作の計画栽培について（1～6），農業および園芸 35，931-934，1095-1098，1248-1252，1425-1428，1565-1569，1717-1722
- 3) 内島立郎（1983），北海道，東北地方における水稲の安全作期に関する農業気象学的研究，農業技術研究所報告A第31号，23-113
- 4) 佐々木武彦（1996），近年の耐冷性育種，東北の稲研究，36-41，東北農業試験場稲作研究100年記念事業会，盛岡
- 5) 佐竹徹夫ら（1988），新水管理法による冷害防止，日本作物学会紀事，57，234-241
- 6) 矢島正晴（1994），水稲の生長・収量の農業気象的予測，平成の大凶作，67-81，農林統計協会，東京
- 7) 宮沢健一（1989），『業際化と情報化—産業社会へのインパクト—』，有斐閣リブレ20，50，有斐閣，東京

## ◀国内情報▶

## イネの形態シミュレーション

独立行政法人 農業技術研究機構 中央農業総合研究センター  
 虫害防除部虫害防除システム研究室  
 渡 邊 朋 也

作物の3次元形態とその成長過程をコンピュータ画面上に再現する手法（仮想植物）を応用して、イネの3次元形態シミュレーションモデル（virtual rice, 仮想イネ）を開発した。Lシステムにより記述された生育ルールと3次元コンピュータグラフィックスの組み合わせによるこのモデルは、病害虫管理、育種、栽培、普及・教育などさまざまな分野への応用が期待できる。

## 1. はじめに

植物の葉や花の形状、あるいはそれらの空間配置は、生長・繁殖にかかわる重要な要素である。現在、世界的な食糧確保や生産コスト削減に対応するため、イネにおいても革新的な草型品種の育成、安定した直播技術の開発などが各国で研究されている。また近年イネの形態形成に関与する遺伝子の単離、同定が進められており、有用遺伝子の育種場面への応用が期待されている。イネ形態が受光体勢、倒伏、病害虫被害などに与える効果の評価は、新草型品種育成上も重要であるが、異なる草型をもつイネを実際に栽培して、このような影響評価を行うのは多大な労力を必要とする。コンピュータシミュレーションを用いて、イネ形態と環境要因の相互作用が事前に評価できれば、野外実験や育種過程の効率化につながるであろう。また新たな品種や栽培方法を農家が導入する際に、栽培方法のシミュレーション、あるいは気象変動や病害虫の影響予測ができれば、リスク回避の点から有用である。

作物の3次元形態をコンピュータ内で再現する技術を仮想植物（virtual plant）と呼んでいる。詳細な3次元形態モデルは、3次元形態の測定方法やモデリングの困難性から、これまであまり検討されてこなかった。しかし、計測技術およびコンピュータのめざまし

WATANABE Tomonari

〒305-8666 茨城県つくば市観音台3-1-1

い発達により、これらの問題は大幅に改善されつつある。筆者らはイネの3次元形態情報の収集とそのモデル化を行い、次世代稲研究の強力な支援ツールとなりうる3次元形態生長モデル（仮想イネ）を開発した。

## 2. 仮想イネ

複雑に見える植物の形態も、葉、茎、根、芽（成長点）などから構成される基本構造が何度も繰り返すことで形成されている。イネでは要約すると各節間と葉鞘、葉身、分けつ芽をそれぞれ1組と複数の根をもつ基本セットが何度も繰り返され、分けつ芽は分けつとなり、親の茎と同じ生長を始める、といった特徴を持っている。この生育ルールを、植物の形態生長を記述するのに適した数学アルゴリズムであるLシステム<sup>1)</sup>と呼ばれる方法で書き表すと、以下ようになる。この方法では矢印の左側にある構造が単位時間（たとえば葉原基の形成間隔、1プラストクロン）後に右の構造に変化することを記述している。

頂芽は、節間、分けつ芽、葉鞘葉身を1組生成するので、

頂芽 → 節間 [分けつ芽] [葉鞘・葉身]  
 /180頂芽

また、分けつ芽は一定期間後分けつとして生長を開始するので、

分けつ芽 → 節間 [分けつ芽]  
 [葉鞘・葉身]/180頂芽

と表現することができる。



なお、生育ルール内の [ ] は、ひとつの構造から派生する別の構造の意味である。また「/180」は、稲の葉鞘、葉身、分けつ芽が節ごとに互い違いに（180度回転して）出現（互生葉序）することを表している。

イネが栄養生長から生殖生長に切り替わると、頂芽は葉の原基の代わりに穂の原基を形成する。これは

頂芽 → 節間・穂

と書き表せる。基本的にイネは、この3つのルールに従って生長しているのである。もちろん実際には遺伝的な制約やさまざまな環境条件の影響を受けている。たとえば頂芽の出現間隔（実際には葉身の出現間隔）及び生殖生長の開始時期が、発芽後の気温及び日長時間の関数として、モデルに組み込まれている。

現実感のある仮想イネを作成するには、とくに葉身の形態が重要である。筆者らはまずこれまでに発表された文献から形態情報の収集を試みたが、モデル化に利用できる情報はわずかであった。そこで3次元デジタイザを利用してイネの3次元形状を測定し、その結果にもとづいて、各分けつ・葉位別の葉身の形態を表す数式を作成した。

Lシステムは様々な植物の形態形成、生長パターンの記述に応用されている。カナダの

カルガリー大学では、Lシステムによって表現された植物の生長をコンピュータグラフィックス（CG）と組み合わせることにより、現実感のある植物生長を再現するコンピュータ環境を開発した<sup>2)</sup>。これを仮想植物実験室（virtual plant laboratory, vlab）と呼んでいる。

図1は実測した形態情報からvlabにより作成した異なる葉位の葉身の3次元CG画像である。このCG画像と先ほどの生育ルールを組み合わせ、3次元生長を行う仮想イネ（virtual rice）を作成した（図2）。この仮想イネは、発芽から分けつ、出穂、収穫まで、実際には数ヶ月を要するイネの一生を1分ほどの間に再現することができる。また毎日の気温と日長時間を変化させることにより、出葉スピードや出穂期の違いも表すことができる。現在のところ作成された仮想イネは、1品種1作期の計測データにもとづいているが、葉の形や長さ、節間伸長量、分けつの開始と終了節などの情報、さらに発育指数に関するパラメータがあれば、品種や栽培条件による草型の変化を表すことも可能である。またこのモデルでは個葉の葉色の変化や枯死は出葉後の積算温度に依存すると仮定しているが、これについても葉身窒素濃度と葉色との

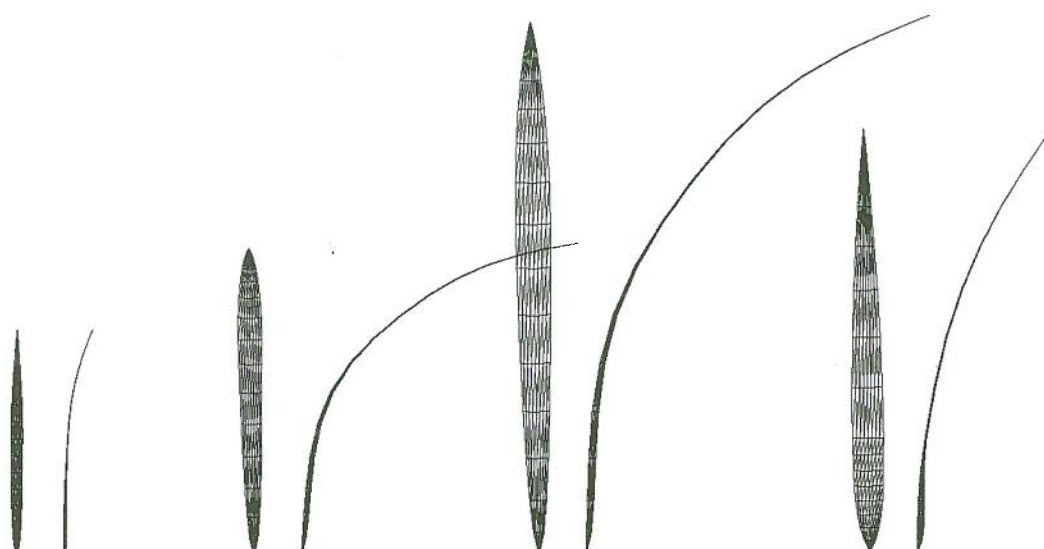


図1 葉位別の傾斜角度、葉身、葉幅の実測値にもとづく葉身曲面の作成例  
それぞれ正面と側面。一番右側が止葉（最上位葉）

関係式などを導入すれば施肥反応などを表示することもできる。

イネは各節にひとつの分けつ芽を形成するため、もしすべての分けつ芽が分けつとして生長すると、1本の苗から数百本の分けつが生産されることになるが、実際には最高でも2, 30本にとどまっている。これは遺伝的背景や、利用できる資源の量、生育ステージなどの制約によるものと考えられるが、この制約条件を定量的に仮想イネに組み込むためには情報がきわめて不足している。また、葉身の幅、長さは環境要因の影響を受けることが知られているが、その変異幅や予測方法に関する研究はほとんどない。このように仮想イネを現実のイネに近づけていくためには、さらに多くの知見の積み重ねが必要である。

### 3. その他の仮想植物研究

上に紹介した仮想イネの開発は科学技術振興事業団の支援を受け、オーストラリア連邦科学産業研究機構との共同研究により開発した。現在共同研究者らはクイーンズランド大学に移籍し、植物形態情報解析研究センターを設立し、数学、植物、昆虫などさまざまな分野の研究者との共同研究を進めている。彼

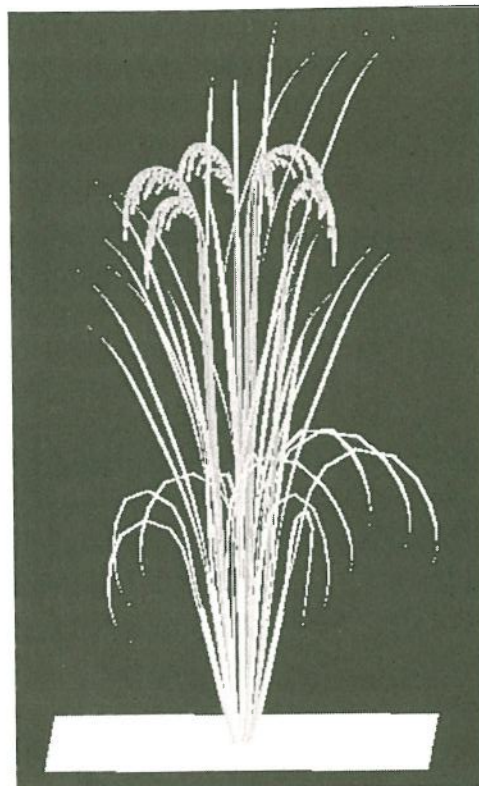


図2 「仮想植物実験室」を利用して作成した仮想イネ

らはすでにワタ、トウモロコシ、マメ科牧草、ソルガムなど主要農作物の仮想植物を完成させており、その成果の一部をアニメーションとして<http://www.cpai.uq.edu.au/virtualplants/ipimovies.html>から見ることができ

表1 想定される仮想イネの応用場面

#### 病虫害・雑草管理

病虫害による加害とそれに対する補償的生長プロセス解析  
農薬の葉面への付着状況シミュレーション  
害虫、天敵昆虫の作物個体、群落内での寄主探索行動、移動  
葉面あるいは群落内の微気象と病原菌の定着、侵入プロセス  
雑草との競合シミュレーション

#### 育種

最適な受光体勢、倒伏耐性、収穫適性の視覚化  
形態関連遺伝子と表現型の関係表示

#### 栽培

植物体の構造、葉の配置による光反射特性シミュレーション  
物質生産シミュレーションモデルとの結合

#### 教育・普及

新品種の草姿や成育過程のアニメーション  
作物生育過程の理解

る。またフランスで開発された仮想植物モデルAMAP (Advanced Modelling of Architecture of Plants) は、わが国でも景観シミュレーションや植再配置等にも応用されている。AMAPのWebサイト (<http://iris8.cirad.fr/index.htm>) には多くの植物の出力例が登録されている。

#### 4. おわりに

一部はすでに述べたが、ここで紹介した仮想イネの応用場面として、表1のようなものが想定されている。

これらの実現においては、さまざまな分野の協力が必要である。すでに筆者らは、物質生産モデルと仮想イネを結合させる共同研究

を北海道大学、京都大学、富山県農業技術センターと開始しており、品種による草姿の違いや収量の予測などへの応用を進める予定である。また形態に関与する遺伝子の機能やネットワークに関する研究がすすめば、仮想イネの応用場面も広がっていくのではないかと考えられる。

#### 引用文献

- 1) Lindenmayer, A. (1968), *Journal of Theoretical Biology*, 18, 280-315
- 2) Méch, R. et al (1996), in *Proceedings of SIGGRAPH'96*, 397-410, ACM SIGGRAPH, New Orleans, New York



ブレイン テクノニュースの  
バックナンバーご案内

## 第 84 号

2001 (平成13) 年 3 月15日発行

#### 総 説

- マックベースクローニング法による  
イネの遺伝子解析 ……………矢野昌裕
- 国内情報  
遺伝子破壊を利用したイネの機能解析 ……廣近洋彦  
食害ストレスおよび揮発性情報シグナルで誘導  
される植物の防衛機構 ……有村源一郎・高林純示  
味覚センサーを用いた食品の味の  
識別と定量化 ……………都甲 潔  
体細胞クローン技術を応用した遺伝子組換え  
ヤギの作出に向けて ……………大越勝広・徳永智之  
DNA分析による放流ヒラメの  
出身地の特定 ……………藤井徹生  
地域の先端研究  
複合交信攪乱剤を利用した  
モモ害虫防除と殺虫剤削減 ……………荒川昭弘

#### 文献情報

- 卵子と顆粒膜細胞間のギャップ結合が卵子の核  
および細胞質における減数分裂能獲得に  
必要である ……………(抄訳: 木村直子)  
DNAマイクロアレイ解析により明らかに  
された酵母染色体の異数性化 ……(抄訳: 王 茜)  
植物ゲノム初の完全解読なる ……(抄訳: 岩井純夫)  
バクテリアは、付着生物の初期幼体の餌と  
成り得るか? ……………(抄訳: 山本 久)  
海外便り  
飼料作物の硝酸塩蓄積に対するゲノム学的  
アプローチ—ケンブリッジ大学の1年間—  
……………原田久富美  
生研機構からのご案内  
平成13年度募集について

## ◀国内情報▶

## C3植物へのC4光合成回路の付与

独立行政法人 農業生物資源研究所  
名古屋大学生物分子応答研究センター  
株式会社ジェイツー

徳 富 光 恵<sup>1</sup>  
松 岡 信<sup>2</sup>  
趙 徹<sup>3</sup>

C3植物へのC4光合成回路の付与は、C4光合成回路の発見以来、C3植物の光合成能改良の戦略として多くの研究者によって取り組まれてきた。C4植物の光合成酵素遺伝子の進化のメカニズムを考慮した遺伝子導入戦略により、C4光合成回路の構成に必要なC4光合成酵素それぞれをC3植物内で高発現させることが可能となった。また、単一のC4光合成酵素の高発現でイネの諸特性が変化することが明らかにされた。

## 1. はじめに

地球上に最初に出現した光合成生物は、大気中の二酸化炭素をまずC<sub>3</sub>化合物に固定するC3型光合成を行った。現存する陸上植物種の90%以上はこのC3型光合成を行うC3植物であり、イネ、ムギ、ダイズ、イモなど重要作物のほとんどがこれに含まれる。一方、トウモロコシ、サトウキビに代表されるC4植物は、二酸化炭素の初期固定産物がC<sub>4</sub>化合物であるC4型光合成を行う。C4植物は地球環境の変動に呼応して600—800万年前にC3植物から進化したと考えられており、C3光合成回路に加えて独自のC4光合成回路を併せ持つ(図1)。この回路はC3光合成回路近傍の二酸化炭素濃度を高める「CO<sub>2</sub>ポンプ」として働き、C3光合成回路の欠点である酸素による光合成阻害を抑制し、高い光合成効率を実現している<sup>1)</sup>。

C3植物へのC4光合成回路の付与は、C4光合成回路の発見以来、C3植物の光合成能改良の戦略として多くの研究者によって取り組まれてきた。交配によりC4植物の諸特性をC3植物に付与する試みが行われてきたが、

<sup>1</sup>TOKUTOMI Mitsue

〒305-8602 つくば市観音台2-1-2

<sup>2</sup>MATSUOKA Makoto

〒464-8601 名古屋市千種区不老町

<sup>3</sup>CHO Chol

〒245-0051 横浜市戸塚区名瀬町344-1

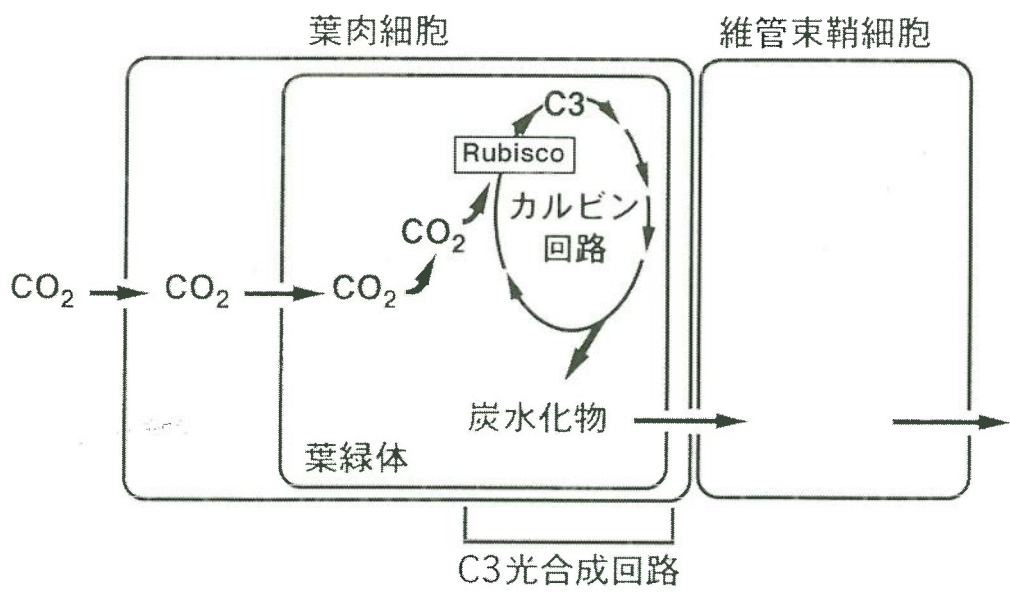
得られた雑種が不稔を示すケースが多く実用化には至っていない。一方、昨今飛躍的に進歩した遺伝子導入技術は、目的の酵素を目的の場所で目的レベルで発現させることを可能にしつつある<sup>2)</sup>。

## 2. C4光合成酵素の高発現手法の開発

我々は、C3植物であるイネの葉肉細胞にトウモロコシ型(NADP-ME型)C4光合成回路を付与するプロジェクトを行っている。閉じたC4光合成回路を駆動させるためには、PEPC、PPDK、NADP-MEの最低3種類の酵素を導入する必要がある。トウモロコシの遺伝子を導入したイネの葉肉細胞では、トウモロコシ同様、PPDKとNADP-MEは葉緑体内に移行しPEPCは細胞質内にとどまると予想される(図1参照)。これら3種類の酵素以外の反応系はイネの酵素がそのまま利用でき、C4光合成回路が構築されると期待される。

C3植物内でC4光合成酵素を高発現させる試みは、植物への遺伝子導入が可能となって以来多くの研究者によって行われてきた。これまでの試みの多くはC4光合成酵素のcDNAに高発現用プロモーターを連結したキメラ遺伝子をC3植物に導入するというものであったが、C4光合成酵素の高発現には至らなかった。我々は光合成遺伝子の進化のメカニズムの解析を行い、C4植物のC4光合成遺伝子は

**C3 光合成回路 (イネ)**



**C4 光合成回路 (トウモロコシ)**

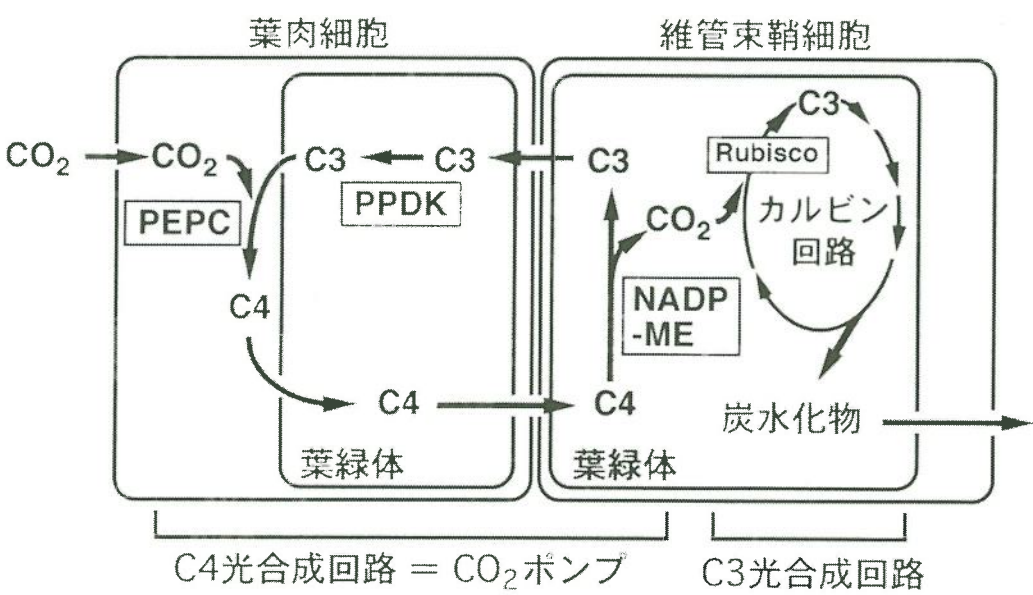


図1 C3植物とC4植物の光合成回路

C3植物の光合成回路とトウモロコシに代表されるNADP-ME型C4植物の光合成回路を示す。PEPC、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ；PPDK、ピルビン酸、Piジキナーゼ；NADP-ME、NADPリンゴ酸酵素。

C3植物の遺伝子に高発現のための機構が付加されただけである可能性を突き止めた<sup>3-5)</sup>。そこで、C4植物のC4光合成遺伝子はC3植物内でも機能しうると予測し、C4植物のゲノム遺伝子をそのままイネに導入することとした。

PEPC<sup>6)</sup> 転写調節 (プロモーター) 領域、エキソンとイントロンを含む全転写領域、転写終結領域を含むトウモロコシPEPC遺伝子をそのままイネに導入した。形質転換イネ緑葉のPEPC活性は最高で非形質転換イネの120倍 (トウモロコシの活性の約4倍)。

PEPC蛋白質含量は最高で全水溶性蛋白質の約15%に達した。導入されたPEPC遺伝子のコピー数, mRNA含量, PEPC蛋白質含量とが正の相関を示す(図2)ことから, PEPC蛋白質発現量は導入遺伝子のコピー数で決まることがわかった。また, 半数染色体あたり1コピーの導入遺伝子をもつ形質転換イネのmRNA含量がトウモロコシとほぼ等量であることから, トウモロコシPEPC遺伝子はイネ緑葉内でもトウモロコシ内とほぼ同程度の発現活性を示すことがわかった。

**PPDK**<sup>7)</sup> PPDKについてもトウモロコシゲノム遺伝子の導入で高発現に成功した。形質転換イネ緑葉のPPDK活性は最高で非形質

転換イネの約40倍(トウモロコシの約50%), PPDK蛋白質含量は最高で全水溶性蛋白質の約20%に達した。あるT2世代ホモ系統では, PPDK蛋白質含量は緑葉全水溶性蛋白質の約35%, 緑葉全窒素の16%に達した。PEPCの場合と同様に, PPDK蛋白質発現量は導入遺伝子のコピー数で決まることがわかった。

ゲノム遺伝子導入によるC4光合成酵素の高発現がC4光合成遺伝子のプロモーターの発現活性に起因するのかを明らかにするため, イネ*Cab*プロモーターにトウモロコシPPDK cDNAを連結させたキメラ遺伝子とトウモロコシPPDKプロモーターにトウモロコシPPDK cDNAを連結させたキメラ遺伝子それ

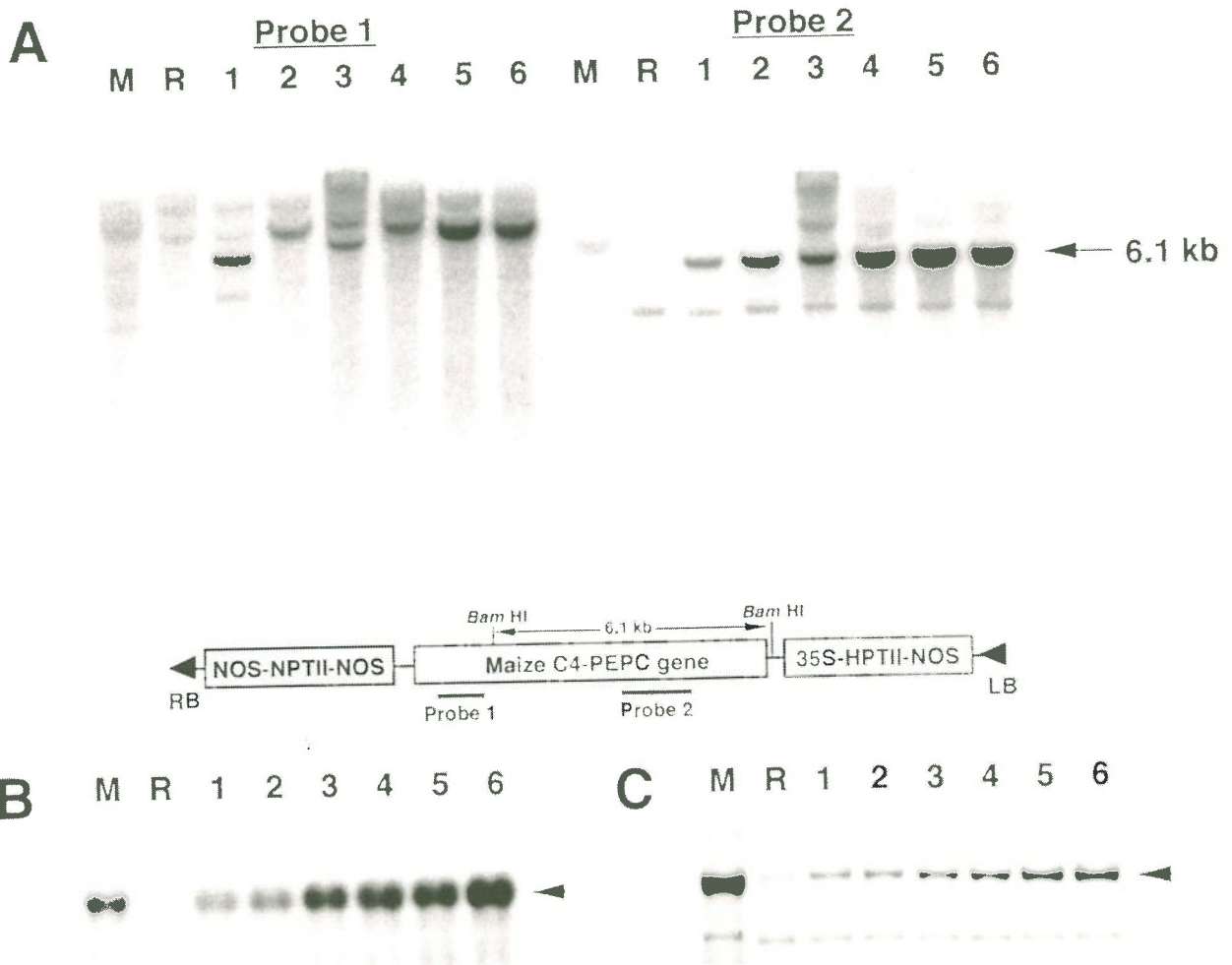


図2 PEPCゲノム遺伝子導入イネのサザン解析, ノーザン解析, 蛋白質解析  
 (A) サザン解析。ゲノムDNAを*Bam*HIで消化した。使用したプローブを下図に示す。(B) ノーザン解析。(C) SDS-PAGE (Coomassie染色)。R, 非形質転換イネ; M, トウモロコシ; 1-6, PEPC遺伝子導入イネ。PEPC遺伝子導入イネ1-6のPEPC活性はそれぞれ, 非形質転換イネの13, 20, 39, 64, 70倍。

それをイネに導入した。どちらの場合も形質転換イネ緑葉のPPDK活性は最高でも非形質転換イネの数倍程度であった。この結果は、ゲノム遺伝子のプロモーター以外の因子（エキソン-イントロン構造または3'非転写領域）もC4光合成酵素の高発現に関与していることを示している。

以上のように、PEPC、PPDKともに、トウモロコシゲノム遺伝子の導入で酵素蛋白質をイネ葉肉細胞内で高発現できることがわかった。C3型イネ科植物であるベントグラスの場合もゲノム遺伝子の導入でPEPC蛋白質が高発現したことから、この手法は他のC3植物にも適用可能と考えられる。ただし、イントロンのスプライシング機構が双子葉植物と単子葉植物とで大きく異なることから、進化系統学的に近縁なC4植物の遺伝子を用いる必要がある。

**NADP-ME<sup>8)</sup>** 本酵素はC4植物の維管束鞘細胞に局在する。PEPC、PPDKの場合と異なり、イネ葉肉細胞内で本酵素を高発現させるためには、イネ*Cab*プロモーターにトウモロコシNADP-ME cDNAを連結させたキメラ遺伝子の導入が有効だった。一方、イネ*Cab*プロモーターにイネNADP-ME cDNAを連結させたキメラ遺伝子を導入しても、高発現は認められなかった。このことは、イネ内在性のNADP-MEはイネに本来備わっている何らかの制御機構によってその発現が抑制されるのに対して、トウモロコシNADP-MEはこの制御を免れることを示している。

最近になって、トウモロコシNADP-ME遺伝子をイネに導入すると酵素蛋白質は維管束および維管束鞘細胞に発現することを示す実験結果が得られている。同様の結果は維管束鞘細胞局在性の他のC4光合成酵素でも得られている。このことは、維管束鞘細胞局在性酵素の遺伝子についても、進化の過程で高発現のための機構が新たに付加されただけである可能性を示している。

### 3. C4光合成酵素を高発現する 形質転換イネの特性

PEPCあるいはPPDKを高発現させても、イネの光合成特性は何ら変化しなかった。一方、NADP-MEを高発現させると、光合成光阻害が起こりやすくなることがわかった。これは、トウモロコシNADP-MEの働きで葉緑体にNADPHが蓄積し光阻害を促進するためである。

光合成特性は変化しなかったものの、PEPCの高発現でイネの酸性土壌抵抗性（リン欠乏耐性とアルミニウム耐性）が改良されることがわかった。C3植物内でPEPCはTCA回路の補充反応（anaplerotic reaction）に関与しており、PEPC活性が増大すると有機酸合成が促進される。酸性土壌抵抗性には根から分泌される有機酸が関与することが知られており、PEPCの高発現で有機酸分泌量が増大した可能性が考えられる。現在酸性土壌抵抗性獲得のメカニズムを検討中である。

### 4. おわりに

以上のように、トウモロコシ型C4光合成回路の構成に必要な3種類のC4光合成酵素それぞれをイネ葉肉細胞内で高発現させることが可能となった。3種類のC4光合成酵素を併せ持つ形質転換イネの作出に当たっては、生育の良好なPEPC高発現イネとPPDK高発現イネを交配し、交配イネホモ系統にNADP-ME遺伝子を導入することとし、現在NADP-ME遺伝子を交配イネに導入中である。3種類の酵素の導入でイネの炭素代謝を大きく変えることができれば、C4光合成酵素の含量比等を検討することにより光合成機能を改良できるのではないかと期待している。

当初は単一のC4光合成酵素を高発現させてもイネの生理特性は何等変化しないものと予想していたが、様々な特性が変化しうることがわかった。C3植物にも活性は低いもののこれらの酵素は存在しハウスキーピング機

能を担っている。単一酵素を高発現する形質転換イネはC3植物におけるこれら酵素の機能解明に好適な材料と期待される。

文 献

1) Edwards, G.E. et al (1983), C3, C4: Mechanisms, and Cellular and Environmental Regulation, of Photosynthesis, Blackwell, London  
 2) Matsuoka, M. et al (2001), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52, 297-314  
 3) Matsuoka, M. et al (1993), *Proc. Natl.*

*Acad. Sci. USA*, 90, 9586-9590  
 4) Matsuoka, M. et al (1994), *Plant J.*, 6, 311-319  
 5) Nomura, M., et al. (2000), *Plant J.*, 22: 211-221  
 6) Ku, M.S.B. et al (1999), *Nature Biotech.*, 17, 76-80  
 7) Matsuoka M. et al (2000), in *Redesigning Rice Photosynthesis to Increase Yield* (Sheehy, J.E., Mitchell, P.L. and Hardy, B. Eds.), 167-175, IRRI and Elsevier, Amsterdam  
 8) Tsuchida et al. (2001), *Plant Cell Physiol.*, 42, 138-145



ブレイン テクノニュースの  
 バックナンバーご案内  
**第 83 号**

2001 (平成13) 年1月15日発行

巻頭言

21世紀の門出 .....堤 英隆

総 説

生鮮野菜・果物の微生物学的安全性確保に  
 関する最近の研究動向 .....一色賢司

国内情報

食品に応用できる可能性を持つ  
 新規殺菌技術について .....五十部誠一郎  
 絹の繊維化前の構造と巧みな繊維化の  
 メカニズム .....朝倉哲郎  
 体細胞クローン豚の作出 .....大西 彰  
 分解菌集積木質炭化素材を用いた難分解性  
 有機化合物のバイオレメディエーション .....高木和広  
 地域の先端研究  
 ジャガイモほ場におけるウイルス病の簡易・  
 迅速診断法の実用化 .....三澤和央

文献情報

ヒアルロン酸のアポトーシス  
 抑制効果 .....(抄訳：横尾正樹)  
 菌体内にトレハロースを蓄積することで酵母は  
 エンドサイトシスのエタノール耐性を獲得する  
 .....(抄訳：楠田大輔)  
 高温ストレスで光化学系IIが損傷する  
 メカニズムが明らかに .....(抄訳：岩井純夫)  
 エンドウマメの複葉の構造は、遺伝子群  
*UNIFOLIATA*, *COCHKEATA*, *AFILA*,  
*TENDRIL-LESS*の相互関与によって制御される  
 .....(抄訳：木苗貴秀)  
 ニジマス鰓上皮細胞が産生する水酸化脂質  
 による抗炎症作用 .....(抄訳：玉井忠和)  
 海外便り  
 カスパーゼの調節を介した食品成分の  
 新たな機能性－ハーバート大学医学部  
 における一年半－ .....小堀真珠子



## ◀国内情報▶

## 匂いセンサを用いた匂いの記録・再生システム

東京工業大学理工学研究科  
中本 高道・森泉 豊栄

匂いセンサを用いて匂いレシピを電子的に記録し、ブレンダにより再生させるシステムを開発した。この装置は能動センシング法により1分以内で匂いレシピを決定することができる。開発したシステムにより、りんご臭のレシピ決定実験を行ない4要素臭からなるレシピを精度よく決定することに成功した。また、内蔵しているブレンダにより、対象臭と同じ匂いが再生されることを確認した。

## 1. はじめに

匂いを記録する際、人は通常言語表現を用いる。調香師間の会話では言語のみでも実際の匂いを思い浮かべることが可能なようであるが、それ以外の人間にとっては言葉だけで対応する匂いを相手に伝えることは至難のことである。まして、その匂いを嗅いだときと同じように再現するにはどうしたらよいであろうか。

匂いを記録するには客観的な手法が必要であり、本稿では匂いセンサによる方法を述べる。匂いセンサは、特性の異なる複数センサの応答パターンをパターン認識することにより匂いの種類を識別するセンサである<sup>1)</sup>。この原理は生体内で多くの嗅細胞の応答を脳の嗅覚神経系でパターン認識しているのを真似たものである<sup>2)</sup>。筆者のグループは10年来匂いセンサの研究を行ない、微妙な洋酒やフレーバの匂いの違いを識別できることを示した<sup>3-5)</sup>。また、識別だけでなく複数の匂いが混ざった混合臭の成分濃度を定量するのに、能動型匂いセンシングシステムという新しい方法を提案した<sup>6-8)</sup>。

そこで、匂いセンサの次の段階として、匂いをはかるだけでなく作り出すのに応用することを考え、ビデオテープで画像を記録し再生するように匂いを再生するシステムの研究  
NAKAMOTO Takamichi, MORIIZUMI Toyosaka  
〒152-8552 東京都目黒区大岡山2-12-1

に着手し、“匂いの記録・再生システム”(英語名: Odor recorder) という名前をつけた<sup>9)</sup>。匂いの記録・再生が可能になると、人工現実感、映画、テレビの料理番組やCM、ゲーム等多くの分野で新しい領域が開けてくるであろう。

一方、昨年あたりからインターネットにおける香りの配信技術の可能性が議論され、商業ベースの実現を目指す企業も登場した<sup>10,11)</sup>。コンピュータ上でマウスをクリックするとインターネットを介して遠隔地で匂いを再生させる装置であり、多数の匂い要素(液体)の入ったカートリッジを用意する。対応する匂いの液体を加熱して気化させて、外に噴射するものである。しかし、これらの装置ではあらかじめ決められた種類の中で匂いを発生させることはできても匂いを検出する手段は持たないので、匂いの記録・再生・通信などは現状ではできない。

匂いの記録・再生をすべての匂いを対象に行なう場合には、色の3原色のように匂いの原臭が必要になる。原臭に関してはAmooreの説があるが、まだ十分に確立されていない<sup>12)</sup>。そこで、現状では匂いの範囲を限定して、範囲内の匂いを実現することを目指し、今後データを蓄積しながら次第にその範囲を広げていくことにする。この場合、人の官能検査に頼って原臭を探していくのは気が遠くなるような労力を要する。匂いセンサを用いれば、膨大な客観的な情報を自動化された測定によ

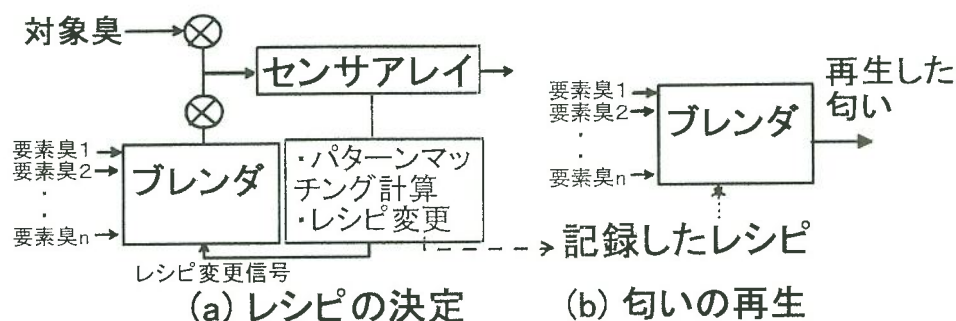


図1 匂いの記録・再生システムの原理図  
(a) レシピ決定, (b) 匂いの再生

り蓄積していくことが可能になる。

本稿では、匂いの記録・再生システムの原理と実験例を紹介することにする。

## 2. 原理

匂いの記録・再生システムの原理を図1に示す。同図内のセンサアレイは特性の異なる複数のセンサである。まず、対象となる匂いをセンサアレイに電磁弁を介して導入し、その応答パターンを記録する。次に装置内にあるブレンダーにより、複数の要素臭を混ぜる比率（レシピ）を決めて調合し、センサアレイに導入する。両者のセンサアレイ出力パターンがマッチングするかを計算し、出力パターンが一致すればブレンダーで調合したレシピが対象臭のレシピとなる。一致しなければ両者の出力パターンが近づくように非線形最適化アルゴリズムや適応制御理論により変更すべきレシピを計算し、レシピを変更して再びセンサアレイの応答パターンを測定する。レシピ変更を繰り返すとパターンマッチングが得られて、得られたレシピを電子的に保存する。

一方、再生側ではブレンダーのみあればよい。決定したレシピをもとに再生側のブレンダーで要素臭を調合し、対象臭と同じ匂いを再び発生させる。

筆者らはこのレシピ決定の方法を能動センシング<sup>13)</sup>と呼んでいる。それは複数の要素臭からなる空間上で対象臭に相当するレシピを能動的に探索することを行なっているからである。

ひとつのセンサに関して各要素臭に対する応答が正確に線形重ね合わせで表せるのであれば、上記のような繰り返し処理は不要であり回帰分析法等の多変量解析を用いれば容易に各要素臭の濃度を決定できる。しかし、線形重ね合わせですべての応答を説明できないことが多く、温度や湿度の影響を受けたりセンサ応答がドリフトすることもある。本手法は、相対測定法のためにこれらの影響を受けにくいという長所がある。

センサ素子としては、匂いを吸着する感応膜を塗布した水晶振動子を用いた。ブレンダーは複数のMFC（マスフローコントローラ）を用いる方法で実現した。レシピは各MFCの流量比によって決まる。各要素臭はサンプリングバッグに用意し、それをポンプで吸引してセンサアレイに導入する。

## 3. 匂いレシピの記録実験

比較的少ない数で匂いをつくることができるものとしてりんご臭がある。ここでは、りんご臭の匂いの記録・再生実験を紹介する<sup>9)</sup>。ここでは4つの要素臭を用意し、それを調合してりんご臭をつくり、そのレシピを決定する実験を行なった。用いた要素臭は、要素臭1（Trans-2-hexenyl acetate, 柔らかいグリーンノート）、要素臭2（Trans-2-hexenal, 青臭い匂い）、要素臭3（Isobutylic acid, 甘酸っぱい匂い）、要素臭4（Ethyl valerate, フルーティな果肉感を与える匂い）である。その他にブロックという匂いの骨格を与える

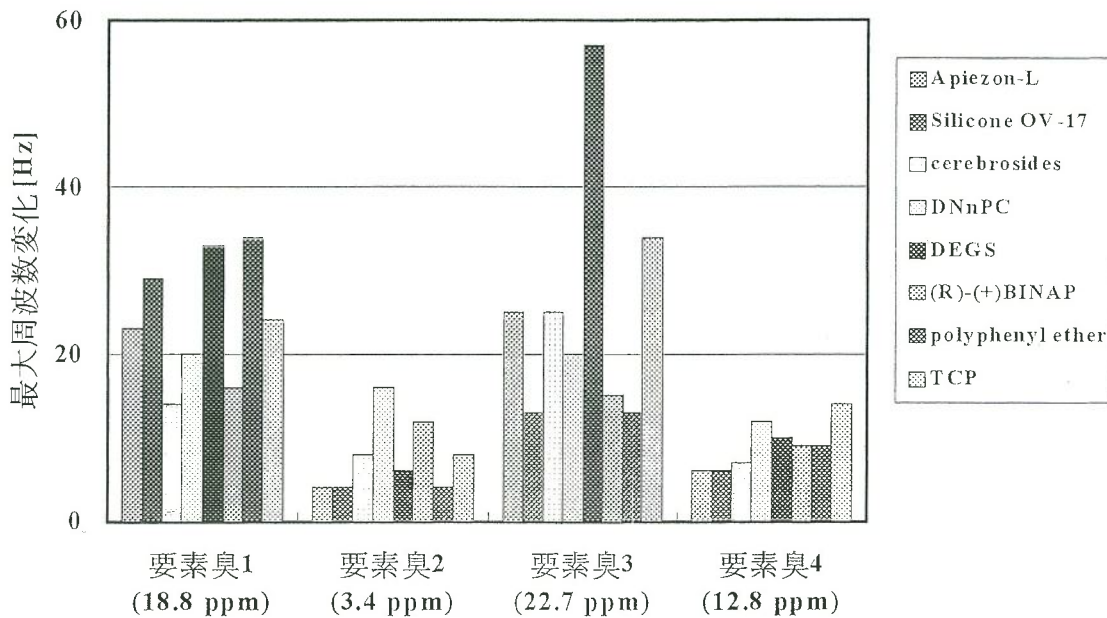


図2 水晶振動子ガスセンサアレイの各要素臭に対する応答パターン (DNnPC: Dinolenoyl phosphatidyl choline, DEGS: Diethylene glycol succinate, R-(+) BINAP: R-(+)-2,2'-bis (diphenylphosphire)-1,1', TCP: tricresyl phosphate)

要素も準備した。予備実験ではブロックも用いたが、以下の実験ではブロックがなくてもりんごの匂いが作れたので、ブロックは省略した。

センサとしては8個の水晶振動子(AT-CUT, 20MHz)にGC(Gas Chromatograph)固定相材料や脂質膜を塗布して用いた。そのセンサアレイの各要素臭に対する応答パターンを図2に示す。また、センサ及びサンプルの温度管理は行っていない。図2に示すように、各要素臭に対するセンサアレイ応答パターンは異なっており応答パターンで各要素臭を区別することができる。

レシピ決定には適応制御理論を用いている。制御対象のシステムの入力(フィードバックコントローラ出力)は各要素臭の濃度変化、システム出力は各センサ出力で多入力-多出力のフィードバック制御を行なう。そのためにフィードバックゲイン行列が必要となり、システムの状態方程式を抽出した後最適制御入力の手法により行列決定を行った。

レシピ決定の様子を図3に示す。図3の縦軸は相対濃度であり、典型的なりんごの匂いレシピの一つ(要素臭1:18.8ppm, 要素臭

2:3.4ppm, 要素臭3:22.7ppm, 要素臭4:12.8ppm)の各要素臭濃度を100として表示した。また、相対濃度100の線は対象臭の各要素臭濃度がすべて相対濃度100であることを示している。横軸はブレンダーで調合したレシピの時間的推移を表す。同図によりほぼ40秒程度でブレンダーで調合した匂いのレシピは対象臭のそれにほぼ等しくなって収束した。レシピを変え対象臭を用意して同様の実験を行なったところ、同じように良い収束が

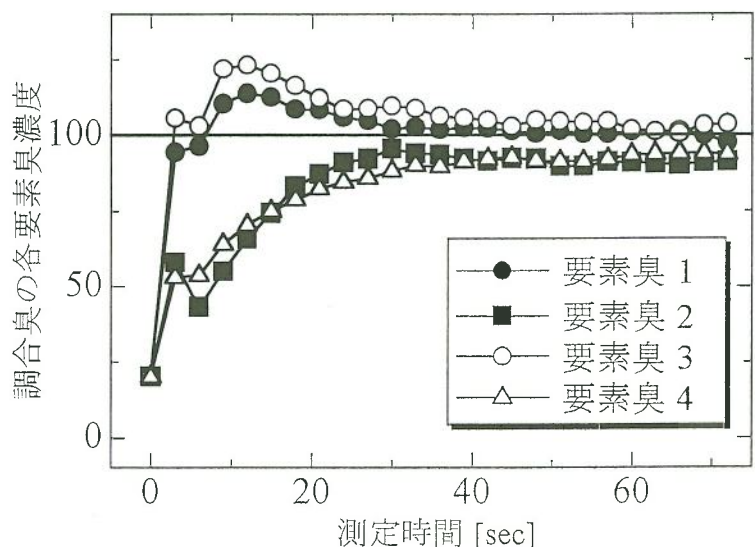


図3 りんご臭の典型的なレシピが決定される様子

得られた。また、再生した匂いを12人のパネル（研究室の学生）が嗅いだところ、再生した匂いは対象臭の匂いと同じであるという回答が得られた。再生臭の官能検査による評価は今後さらに進める必要がある。

#### 4. まとめ

匂いの記録・再生システムの原理，りんご臭を対象とした実験例を紹介した。現状ではまだ，すべての匂いを対象にするには至っていないが，今後対象を広げていく。その際，対象に合わせた要素臭の決定方法が重要になるであろう。実際にインターネットを介した遠隔地における匂い再生についても，ぜひ実験を行ないたい。匂いセンサを利用した匂いの記録・再生技術はまだ始まったばかりであるが，今後の発展が期待できる。

#### 参考文献

- 1) 森泉，中本，センサ工学，昭晃堂，1997.
- 2) G.M.Sherpherd, Neurobiology, Oxford Press, p.238, 1988.
- 3) 中本，森泉，応用物理，58 (1989) 1045.
- 4) T. Nakamoto, A. Fukuda and T. Moriizumi, Sensors and Actuators B, 10 (1993) 85.
- 5) 中本，森泉，電子情報通信学会論文誌，82-C-I (1999) 156.
- 6) T.Nakamoto, S.Utsumi, N.Yamasita, T.Moriizumi and Y.Sonoda, Sensors and Actuators B, 20 (1994) 131.
- 7) T. Nakamoto, N. Okazaki and T. Moriizumi, Sensors and Actuators B, 41 (1997) 183.
- 8) 中本，フレーグラランスジャーナル，6 (1997) 49.
- 9) T.Nakamoto, Y.Nakahira, H.Hiramatsu, T.Moriizumi, Sensors and Actuators B, in press.
- 10) <http://www.digiscents.com>
- 11) [http://www.francetelecomna.com/nr/nr\\_prre\\_09-27-00\\_smells.htm](http://www.francetelecomna.com/nr/nr_prre_09-27-00_smells.htm)
- 12) E.アムーア，原訳，匂い—その分子構造，恒星社厚生閣，1972, p.29.
- 13) 電気学会能動化学センサシステム調査専門委員会，進化した化学センサを目指して—能動化学センサー，電気学会技術報告第817号，2000年，電気学会.

## ◀国内情報▶

## SPR法による遺伝子の人工合成

独立行政法人 農業技術研究機構  
動物衛生研究所 海外病研究部  
土 屋 佳 紀

遺伝子の人工合成はポストゲノムにおける基幹技術になると言われている。しかしこれまで行われて来た方法では作業工程が煩雑で、作製までに長時間を要し、実用化が進んでいなかった。そこで新しい手法としてSPR法を開発した。2本のDNAを互いを鋳型として部分的に結合させ、残りを酵素で補填させることによって完全な2本鎖遺伝子が完成した。家畜や農作物の育種から、医薬品の生産や遺伝子治療などの医学分野に至る幅広い応用が期待される。

## 1. はじめに

人工的に作製された遺伝子のことを人工遺伝子という。しかしけっして特殊なものではない。配列が同じなら、天然型遺伝子も人工遺伝子も全く変わりがない。細胞内では同じように機能し、情報提供を行う。人工遺伝子の利点は配列を自由に設計できることである。アミノ酸配列を自由に改変して蛋白質やペプチドに新しい機能を付与したり、異種蛋白質を融合させてハイブリッド蛋白質を作製したり、あるいは全遺伝子が全て人為的に設計・合成された人工生命体など、自然界に存在しないものを創生する無限の可能性を有している。しかしこれまで人工遺伝子の作製は作業工程が煩雑で数ヶ月から数年という長時間を必要とする方法しかなく、実用化が遅れていた。そこで筆者らは新しい方法をいくつか考案し、人工遺伝子作製の簡略化・迅速化を図っている。

## 2. 人工遺伝子の作製

人工遺伝子は化学的に合成された1本鎖DNAを連結して作製される。1本鎖DNAはかつてはフラスコ内での有機合成で作製されていた。効率が非常に悪く、5～8塩基程度の長さまでが有機合成できる限度であり、1

TSUCHIYA Yoshinori

〒187-0022 小平市上水本町6-20-1

本を作るのに数日間もかかっていた。例えば800塩基の長さの遺伝子を作製するとして、原料の1本鎖DNAを200本も有機合成し、さらにこれらを一本ずつ根気よく連結して行かなければならなかった。莫大な手間と費用と長い年月を要する大事業だったのである。それが劇的に改善されたのは十数年前にDNA合成機が登場してからである。最初の頃は機械の性能も試薬の品質も不十分で、合成されるDNAの品質も今に比べると格段に劣っていたが、それでも30塩基の1本鎖DNAを十時間ほどで合成できたことは非常に画期的であった。やがて機械も試薬類も格段に進歩し、今では100塩基を越す長鎖DNAを非常に低コストで合成できるようにまでなっている。

## 3. 遺伝子合成法の比較

図1に一般に行われている遺伝子合成法を示す。いまだに多くの研究者たちはこの方法で遺伝子を人工合成している。おそらく過去の文献を参考にしているからであろうと考えられる。しかしけっして良い方法ではない。原料の1本鎖DNA同士を酵素で繋いで、そして正しく繋がったものを分離精製して回収して次の反応に使うという作業を延々と繰り返すことになる。非常に煩雑で時間のかかる方法である。また、原料の末端が欠けていてもそのまま連結されてしまうので、遺伝子情

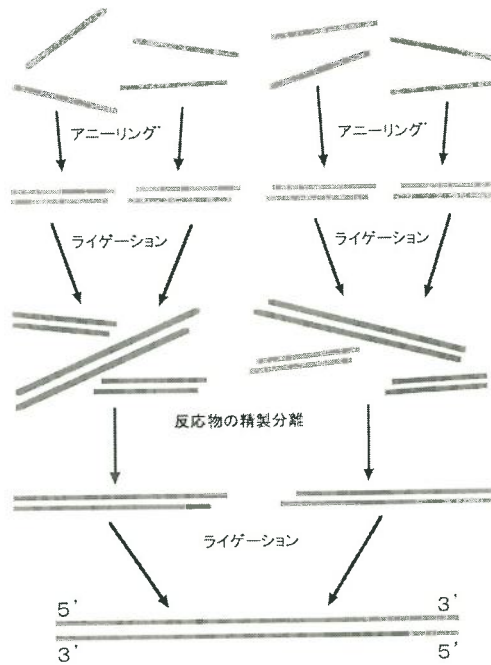


図1 従来の方法による遺伝子の人工合成

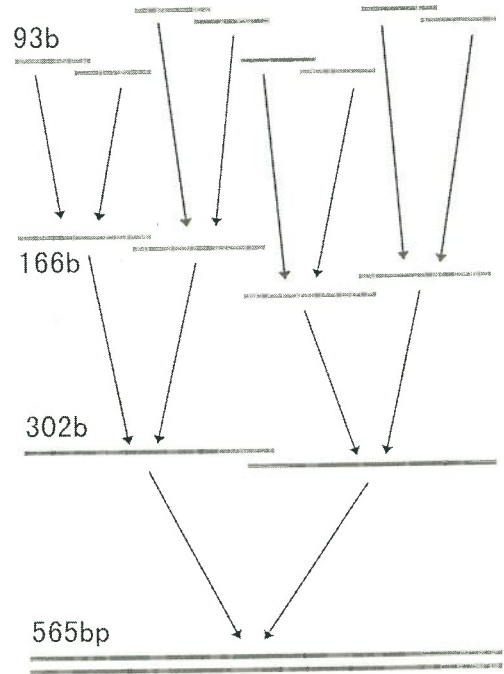


図3 SPR法によるウマインターフェロンの遺伝子の人工合成

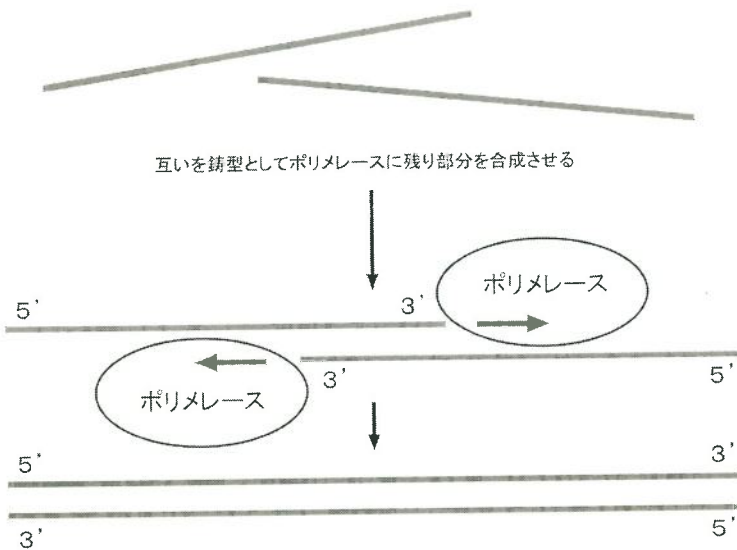


図2 SPR法による遺伝子の人工合成

報に欠損が入りやすいという致命的な欠陥がある。

そこで筆者らはSPR法という新しい手法を開発して人工遺伝子を作製している。SPRとは、「Self」、「Polymerase」、「Reaction」のそれぞれの頭文字を取って命名したものである。図2を参照していただきたい。原理は非常にシンプルである。2本のDNA鎖の末端同士を自然に水素結合させ、残りの空白部分はポリメラーゼという酵素によって合成させ

て補填して、完全な2本鎖DNAとする。

図1と2を比較対照していただきたい。SPR法の作業工程が従来法に比べて非常に少ないことが一目瞭然であろう。実際、遺伝子の作製に要する時間は短い。200bpの遺伝子であれば2～3時間で完成する。従来法では少なくとも数週間から1ヶ月はかかるから、それに比べると100倍以上も早いことになる。しかも、SPR法ではチューブに試薬と酵素を入れて一定時間反応させるだけなので、難しい実験操作過程が無い。ゆえに誰でも簡単に遺伝子を合成できる。

図3はウマインターフェロン $\gamma$ 遺伝子を人工合成した時の作業工程を示している。93塩基の長さの1本鎖DNAを8本使った行った(Tsuchiya et al. 1999)。最終的な塩基配列の確認も含めて、作業は数日で完了した。

SPR法の利点は早さや容易さだけではない。原料である1本鎖DNAの末端が多少欠けていても、完全な遺伝子が作製されることである。既に述べたように人工遺伝子作製の原料となる1本鎖DNAはDNA合成機を用いて作製するが、長くなるほど不良DNA(末端の欠損など)の含有率が高くなる。前項で

述べたように従来法ではそのまま連結されてしまうので、苦勞して完成した遺伝子のあちこちに欠損変異が入ってしまう。そのため、従来法の場合には40~50塩基以上の長い1本鎖DNAを使うのは難しかった。SPR法を開発するまでは筆者も従来法で遺伝子を合成していた。ウシインターフェロン $\beta$ 3遺伝子を作製した時には、当初は50塩基以上の長い1本鎖DNAを材料として使ってみたが遺伝子が全くできなかった。そこで15~40塩基の短い1本鎖DNAを30数本も合成し、それらを連結して1年くらいかけてやっと完成した。しかし遺伝子中に平均6カ所も変異があり、完全な遺伝子は作製できなかった。同法で再度ブタリゾチーム遺伝子を作製した時には9ヶ月ほどかかり、平均11カ所も変異が入っていた。もちろん完全な遺伝子は作製できなかった。これに対して、SPR法でウマインターフェロン $\alpha$ 1遺伝子はわずか数日で完成し、変異の無い完全な遺伝子が得られている。従来法では変異は原料DNAの連結部に集中しており、末端部の欠損を反映していた。しかしSPR法では末端部欠損によると思われる変異は認められなかった。SPR法では原料DNAの品質に左右されないのので長い1本鎖DNAを使用できる。筆者の経験で300塩基の長さまでを試して成功している。数千塩基でも大丈夫と考えている。長いDNAを使えるので、作業工程はさらに簡略化され、数万でも数十万塩基対でも、より長い遺伝子を人工合成することが可能である。将来的にはウイルスや微生物遺伝子の全合成、さらにはヒトを含めた哺乳類染色体の人工合成も視野に入ってきている。

#### 4. 人工遺伝子の応用

遺伝子の発現量が多くなるように設計することによって組換え蛋白質の生産量が増強されるので、人工遺伝子は既に医薬品蛋白質の生産に応用されている。また蛋白質やペプチドのアミノ酸配列を自由にデザインして、新

しい機能を与えることも行われている。筆者は酵素によるペプチドの切断点を人為的に制御すること<sup>1)</sup>や、蛋白質の分泌量を増加させることに成功している<sup>2) 3)</sup>。可能性はさらに無限大に広がってきている。イネ・ゲノムなどのプロジェクトによって微生物から植物、ヒトに至る様々な生物種の遺伝子配列が明らかになってきているが、これらの情報を元にして、微生物の全遺伝子を設計し、人工合成して完全な人工生命体を創生しようというプロジェクトが始まりつつある。環境汚染の原因となっているプラスチックなどの有害廃棄物を微生物によって分解して、食用蛋白質や飲料水に転換させることもできるようになるかもしれない。もちろん、ゲノムデザインは微生物に留まらない。植物にも家畜にもヒトにも及ぶだろう。北極や南極、砂漠などの不毛の地でも生育できる作物や、ヒト型臓器を持つ移植用家畜の開発も考えられる。遺伝病や癌の原因となる異常遺伝子をまるごと人工遺伝子と交換する遺伝子治療も有望である。またマンモスや恐竜など、過去に絶滅した生物の遺伝子を人工遺伝子で修復して復活させることも技術的には不可能ではなくなっている。21世紀はゲノム・デザインの世紀になるだろう。

今回の成果は、農林水産技術会議事務局による畜産対応研究「組換えサイトカインによる家畜疾病防除技術の開発」によって得られた。

#### 参考文献

- 1) Tsuchiya Y. et al. (1993) *Biochem. Cell Biol.* 71: 401-405
- 2) Tsuchiya Y. et al. (1999) *Cytokine* 11: 927
- 3) 土屋佳紀, 白井淳資, 特許第3136356号, 改変型シグナルペプチドをコードするDNA, 登録日2000年12月8日

◀国内情報▶

## 稚魚にも応用できる 高感度自動給餌システムの開発

独立行政法人 水産総合研究センター 養殖研究所  
鈴木 伸洋・山本 剛史・島 隆夫

魚の摂餌要求に正確に反応する稼働性とその魚がもつ摂餌行動に合致した操作性を兼ね備え、かつ稚魚でも操作可能なスイッチを開発した。これにより、配合飼料に餌付く時期から出荷サイズに成長するまでの養殖の全過程で、魚が自発的にスイッチの先に噛みつくとき給餌機が作動して投餌される自動給餌が可能になった。毎日の摂餌量や摂餌リズムを調べるとかなり変動したので、手撒きや自動給餌機での給餌では、これらの変動に適切に対応できていないと思われる。この新しい魚類の給餌システムは、残餌が少なく、養殖場の環境改善と生産性向上が図れる飼養技術として期待されている。

### 1. はじめに

近年、生産量の増大を目的とした過密養殖や過剰な餌飼料投与による養殖場の環境悪化と、これに起因する生産性の低下がみられるようになった。魚の食欲に応じて自動的に給餌するシステムを開発することで、給餌作業の省力化と無駄な給餌の減少等によって養殖コストの削減が図られ、残餌が生じないことによる養殖場の環境改善も行われ、同時に効率的な成長を得ることが期待されている。魚の自発的な食欲行動に基づく新しい給餌方法のシステム開発とそのシステムを用いた最近の研究の概略を紹介する。

### 2. 稚魚にも応用できる自発摂餌式給餌システムの開発

魚が自発的に餌を捕るためには、給餌機とそれを魚自身が作動させるスイッチが必要である。これにデータロガーとコンピュータを併設すれば、魚自身が入れるスイッチの信号から摂餌回数やその時刻などの食欲の生物リズムを解析することが可能となる(図1)。本給餌システムの養魚への実用化には、いろ すずき Nobuhiro, YAMAMOTO Takeshi, SHIMA Takao  
〒519-0423 三重県度会郡玉城町昼田224-1

い

ろな魚種に対応し、しかも稚魚から成魚までのサイズでも使用可能で、摂餌要求で生じた食欲応答だけを電氣的に給餌機に伝達するような精巧なスイッチの開発が課題であった。そこで、稚魚の極めて微細で複雑なスイッチへの入力と魚の成長に伴って変化する負荷に対応するように感度を自在に調節でき、魚が餌を捕るときの習性に合わせられるように、「引っ張る」かあるいは「押し上げる」かの入力の方向性を容易に変換できるスイッチの開発に成功した(図2)。このスイッチは、餌を食べ始める時期の体重0.1gのニジマスがスイッチを引っ張るときに出す入力(27.4mN)より遥かに小さい力(最小感度1.98mN)で応答可能である。また、材料費が数百円/台と安価であり、市販の自動給餌機に容易に接続して使用できる汎用性も備えている。

### 3. 自発摂餌式給餌と自動給餌での魚の成長比較

魚の食欲の生物リズム(摂餌日周リズム)に合致した時刻の給餌は優れた成長をもたらすとされ、ニジマスの場合、摂餌日周リズムのピークである明け方に給餌すると、夜間に給餌した場合よりも摂取されたタンパク質が効率よく成長に使われるために、成長が優れ



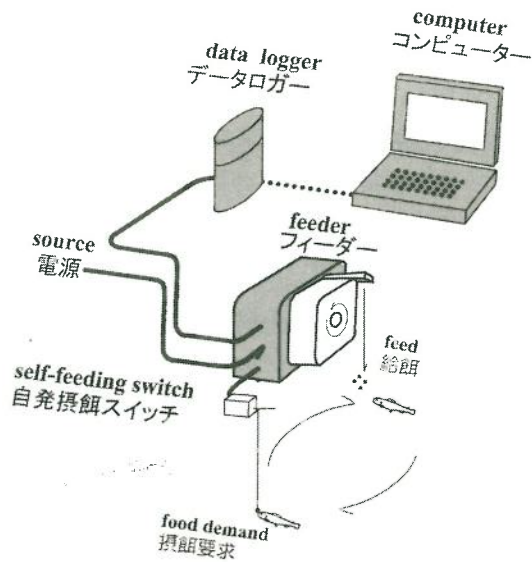


図1 自発摂餌式給餌システム

ることが実験的に明らかにされている。

平均体重 5 g の 15 尾のクエ稚魚の群れに自発摂餌と自動給餌機による 24 時間連続給餌（給餌量は初期体重の 3.5%）の実験を行った。自発摂餌区の摂餌行動はほとんど明期中の 12 時間（07:00 から 19:00）の間にみられ、明期開始から 1.5 時間以内に 1 日の摂餌量の約 30% を摂餌した。50% が暗期に給餌された自動給餌区に比べて自発摂餌区の方が総摂餌量が多く、また、自発摂餌区は実験終了時の平均体重も大きく、個体による成長差も小さかった。次に、餌付け間もないニジマス稚魚（平均体重 0.3g）に水産庁内水面養殖指針が定める餌量を自動給餌機を用いて 12 時間あるいは 24 時間連続して給餌した場合と自発摂餌による給餌で成長を比較した。総摂餌量や日間成長率は両者で変わらず、成長量も同じであったが、自発摂餌では体重や肥満度の個体間変動が小さく、死亡も少なかった。

このようなことから、自発摂餌システムを用いれば、魚の摂餌日周リズムに合致した時刻に適正な餌量が自動的に給餌されると考えられる。また、餌付け期の稚魚は、胃や消化管が小さいので頻繁に給餌することが好ましいとされ、自発摂餌式給餌はこの点でも優れた給餌方法と言える。

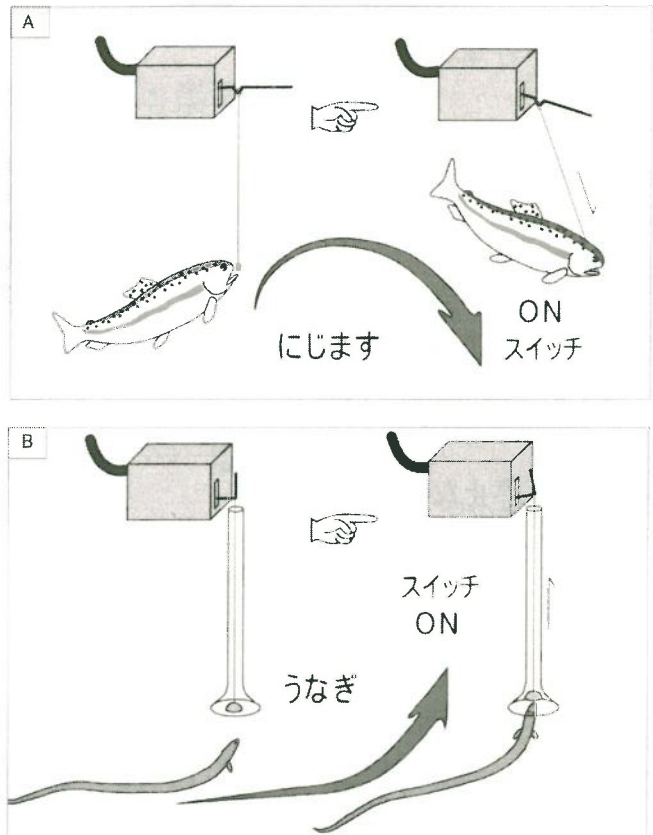


図2 高感度自発摂餌スイッチ（特願平11-332901号）の使用例

A：プルダウン型，B：プッシュアップ型

#### 4. 今後の課題と研究の発展

自発摂餌ならば、環境が変動して食欲が変わっても、魚自身が摂餌量をコントロールして、栄養生理に合致した摂餌パターンを示すことが期待される。また、我々は、ヒラメが赤潮発生時に自発的に摂餌を停止し、水質が元に戻ると再び摂餌が開始されたという情報を得ている。加えて、コイでは注水停止に伴って自発的に摂餌が止まり、注水が開始されると同時に摂餌を再開する摂餌パターンを記録した（図3）。このように、環境変動が摂餌リズムの変化に敏感に反映する。したがって、飼養技術の高度化には、水温、光、潮汐などの季節的な年周期の環境変動に対する魚種毎の摂餌の日周リズムの変化に加えて、突発的な環境変動が起きたときの摂餌の変化を自発摂餌を使って明らかにして行くことが有効であろう。

海面養殖などでは、海水の飛沫などに対す

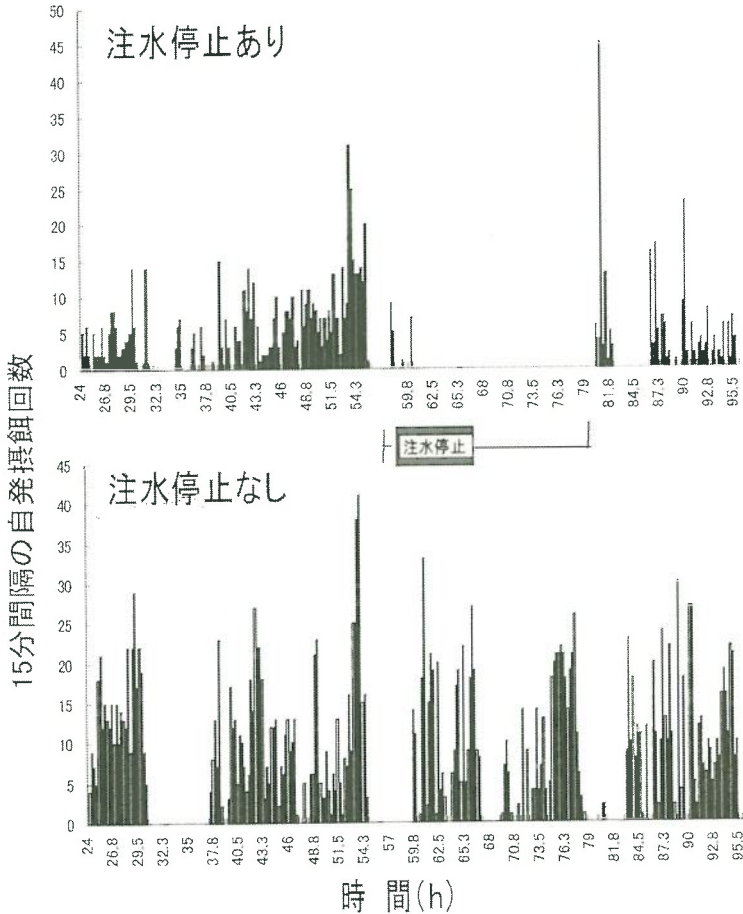


図3 コイの自発摂餌リズムと注水停止の影響

るスイッチの防蝕性が重要になるが、養殖研究所では、防水型の長寿命の構造的耐久性を備えたスイッチの開発にも成功した(特願2000—236628号)。このスイッチは、大型魚の使用でも長期の安定した作動性能が確保されているので、先の高感度スイッチと併用することで、アマゴ、イワナ、コイ、ウナギ、ヒラメ、シマアジ、クエ、トラフグなどの養殖魚で、配合飼料に餌付く頃の小さい稚魚から商品サイズに成長するまで飼育することができた。これらの魚種は、養殖対象魚のもつ摂餌行動を殆ど網羅しているので、多様な魚種で稚魚などの小さいサイズから出荷サイズ

までの養殖の全過程で自発摂餌式給餌が適用できるものと考えている。今後は海面養殖の発展型として、海洋牧場などへの活用も期待される。

魚のエネルギー要求量の把握や魚粉に代わる飼料の植物性原料の利用性などの研究に、自発摂餌システムの導入が役立っている。このシステムを用いると、魚がどのような状態のときに、いつ、どれだけの量の餌を摂取したいかが把握できるので、魚のエネルギー摂取量調整能力の評価が容易になった。これまで主にニジマスを使って、エネルギー含量、エネルギー源、脂質含量、脂質と炭水化物の配合比率、などが異なるそれぞれの飼料を自発摂餌させてみたところ、体重当たりの可消化エネルギーの摂取量に差はなく、魚類も高等動物同様、エネルギー摂取量を調整できること、また、コイでは水温によってタンパク質への依存度が変化することも示唆された。これらのことは、嗜好性の優れた、より安価な高品質飼料の開発にも自発摂餌システムの活用が有効であることを示している。

参考文献

- 1) 島 隆夫 (2001), ハタ類の自発摂餌行動, (田畑満生編) 魚類の自発摂餌—その基礎と応用 (水産学シリーズ128), 恒星社厚生閣, 東京, 35-42.
- 2) T. Boujard (鈴木伸洋訳) (2001), 摂餌と代謝リズム, (田畑満生編) 魚類の自発摂餌—その基礎と応用 (水産学シリーズ128), 恒星社厚生閣, 東京, 79-90.
- 3) 山本剛史 (2001), 摂餌と栄養, (田畑満生編) 魚類の自発摂餌—その基礎と応用 (水産学シリーズ128), 恒星社厚生閣, 東京, 108-118.

## ◀地域の先端研究▶

## イネ種子伝染性病害を防除する生物農薬の開発

静岡県農業試験場病害虫部

市川 健

水稻の種子伝染性病害を防除する非病原性の糸状菌を選抜し、生物農薬として開発している。水稻の種子伝染性病害には、糸状菌によるばか苗病など、細菌によるもみ枯細菌病、苗立枯細菌病などがあり、現在は化学合成農薬により防除されている。選抜された菌株は、1種類の菌で糸状菌病、細菌病の両方に高い防除活性を持ち、廃液などの環境負荷も小さいものと思われる。開発の経過、防除効果、安全性などについて紹介する。

## 1. はじめに

化学合成農薬は長らく農作物病害虫防除の主力であり、現在も農業生産安定の大きな役割を担っている。しかし近年、環境に対する関心の高まりや化学農薬偏重による様々な問題点が顕在化したために、化学農薬に代わるものとしての生物農薬の開発が急である。生物的防除技術の実用化は、虫害防除が先行していたが、病害の生物的防除技術開発も進行しており、いくつかの生物農薬がすでに世に出ている。

水稻の種子伝染性病害は、稲の機械移植とそれに伴う箱育苗技術によって育苗中に多発するようになったいくつかの病害の総称である。筆者らは、これらの病害の生物的防除を目指し、クミアイ化学工業㈱と共同で、菌株の収集、スクリーニング、防除効果の検討などを分担して進めてきた。一連の検討の中で最終的に選抜されたのは、生物防除のエージェントの中では古株ともいえるトリコデルマ属菌であった。

## 2. 菌株の収集とスクリーニング

候補となる菌株の収集は、1994年より開始した。静岡県内各地のトマト、メロン等のほ場のうち、長期間土壌病害の発生を見ていな

ICHIKAWA Takeshi

〒438-0803 静岡県磐田郡豊田町富丘678-1

いほ場を選び、栽培終了時に根部を採集した。一方、土壌病害の多発ほ場で発病を免れた株の根部を採取した。また、県内各地のゴルフ場、公園等のシバ地よりシバの根部を採集した。

採集した根部は、流水中でざっと洗浄した後滅菌水中で摩砕し、駒田培地またはローズベンガル培地により主として糸状菌を選択分離した。分離した糸状菌の株数は2500ほどで、フザリウム属、トリコデルマ属等が主であった。

採集された菌株は、イネの種子伝染性病害、メロンつる割病および日本シバ葉腐病に対する防除効果のスクリーニングに供した。

イネではPD液体培地で培養した供試菌の菌液に、ばか苗病保菌もみを浸漬し、その後の育苗中の発病状況を調査することにより、防除効果を持つ菌を選抜した。数次の検定により、ノシバ根圏より分離した *Trichoderma atroviride* SKT-1菌株およびトマト根圏より分離した *Fusarium oxysporum* SNF-356菌株を選抜した。次いで、各種イネ種子伝染性病害に対する防除効果を検討したところ、両菌株ともばか苗病以外にもみ枯細菌病、苗立枯細菌病および褐条病に対し高い防除効果が認められた。

ばか苗病防除にあたり、SKT-1株の方がより低菌量まで高い防除効果を示した。また、細菌病に関してもSKT-1株の方が防除効果が安定していた。

表1 *Trichoderma atroviride* SKT-1菌株によるイネ種子伝染性病害の防除効果

| 病害                         | 処理菌株 (薬剤)   | 濃度              | 反復数 | 調査株数 | 発病株率 (%) | 防除価  |
|----------------------------|-------------|-----------------|-----|------|----------|------|
| ばか<br>か<br>苗<br>病          | SKT-1       | 10 <sup>6</sup> | 3   | 380  | 1.1      | 98.9 |
|                            | SKT-1 (製剤)  | 200倍            | 3   | 420  | 0.6      | 99.4 |
|                            | ペフラゾエート水和剤  | 200倍            | 3   | 418  | 0.7      | 99.3 |
|                            | イブコナゾール銅水和剤 | 200倍            | 3   | 437  | 0.6      | 99.4 |
|                            | 無処理         |                 | 3   | 423  | 100.0    | —    |
| 苗<br>立<br>枯<br>細<br>菌<br>病 | SKT-1       | 10 <sup>6</sup> | 3   | 337  | 5.7      | 75.2 |
|                            | SKT-1 (製剤)  | 200倍            | 3   | 341  | 5.2      | 77.4 |
|                            | オキシロニック酸水和剤 | 200倍            | 3   | 347  | 11.1     | 51.7 |
|                            | イブコナゾール銅水和剤 | 200倍            | 3   | 370  | 5.3      | 77.0 |
|                            | 無処理         |                 | 3   | 310  | 23.0     | —    |

注) 水洗した籾を供試薬剤に24時間浸漬した後、常法に従い浸種、催芽、は種、出芽、緑化を行った。  
は種20日後に、処理区のすべての苗数と発病苗数を計数した。

### 3. イネ種子伝染性病害に対する SKT-1株の防除効果

ばか苗病および苗立枯細菌病に対する防除効果を、表1に示した。試験は水洗した籾を、供試薬剤に24時間浸漬した後、浸種、催芽を行い、その後は種する手順で実施した。は種20日後に試験区の苗数および発病苗数を調査した。供試したイネ籾はいずれも開花時に病原菌を噴霧接種して調整した重度の汚染籾である。SKT-1株はPDAプレート上で胞子を形成させ、これを集めて滅菌水中に懸濁し10<sup>6</sup>cells/mlに濃度を調整した。また、生物農薬としての製剤の試作品も供試した。対照とする化学農薬は、現在一般的に使用されているものを選んで供試した。

SKT-1株の培養胞子および製剤は、2種類の病害に対し比較した化学農薬と同等の高い防除効果を示した。ばか苗病に対しては無処理区で100%と激発条件であったにもかかわらず、防除価で培養胞子98.9、製剤99.4と、ほぼ完全に発病を抑制した。苗立枯細菌病に対しても、培養胞子75.2、製剤77.4と、供試薬剤と同等かむしろ上回る効果を示した。

SKT-1株は、上記の病害に加え、いもち病、ごま葉枯病にも防除活性を有する。浸漬処理を行う場合の各種病害に対する有効処理濃度は、ばか苗病に対して1.0×10<sup>6</sup>cfu/ml以上、苗立枯細菌病およびもみ枯細菌病に対して

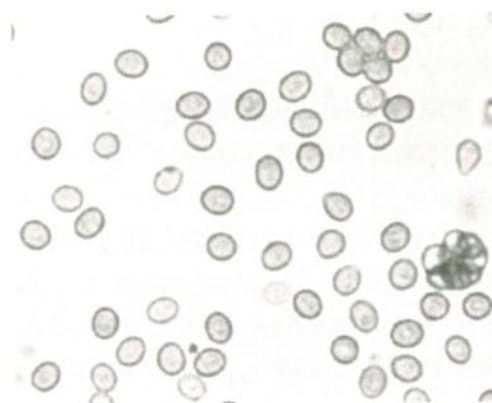


図1 *Trichoderma atroviride* SKT-1菌株の胞子懸濁液

1.0×10<sup>6</sup>cfu/ml以上、いもち病およびごま葉枯病に対して1.0×10<sup>6</sup>cfu/ml以上で、病害の種類により差が認められた。

また、浸漬処理以外にも高濃度懸濁液による塗沫処理、乾燥した胞子による粉衣処理でも防除効果を確認している。SKT-1株の防除活性は、生菌体および遠沈洗浄菌体で認められた。しかし、オートクレーブ処理した死菌体や、菌体からの抽出分画は防除活性を示さなかった。このことから、SKT-1株の防除活性は生きた菌体によるものと考えられたが、詳細は今後の検討事項である。

### 4. 他の作物の土壌病害に対する 防除効果

イネ種子伝染性病害以外の、数種の作物の土壌伝染性フザリウム病に対する防除効果を

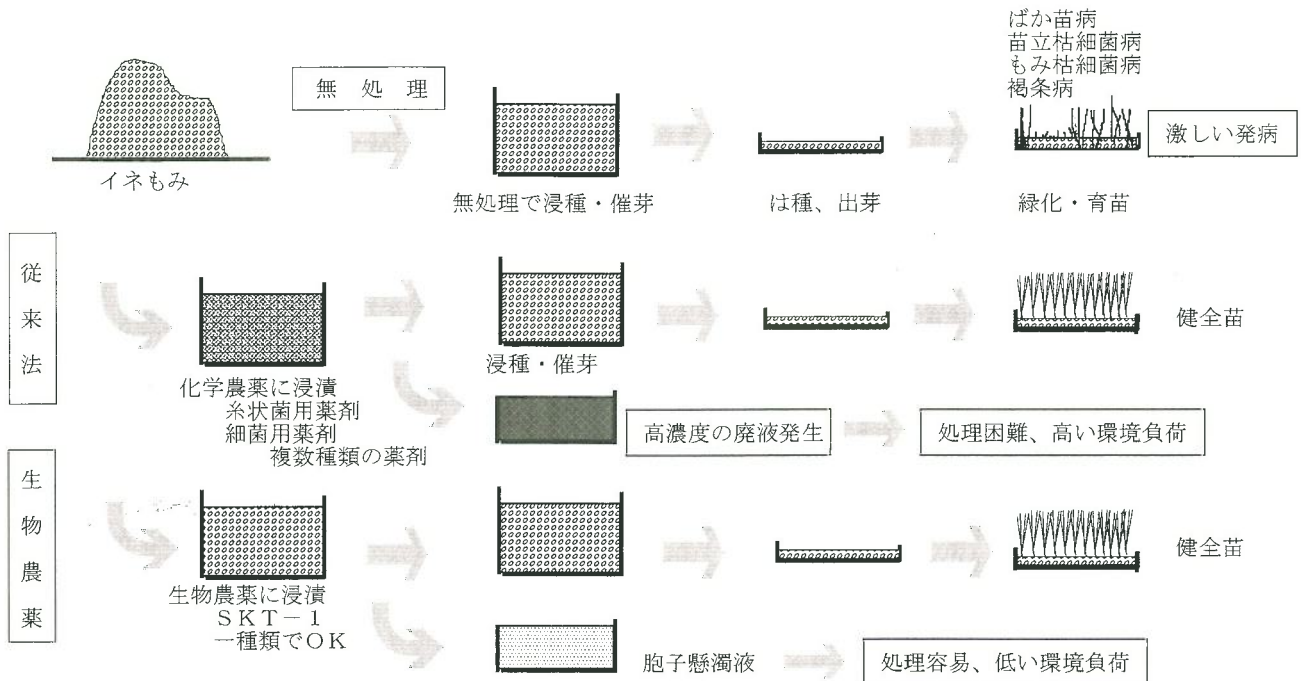


図2 *Trichoderma atroviride* SKT-1菌株製剤の使用イメージ

検討した。

養液栽培サラダナの根腐病の防除効果は、SKT-1株の胞子懸濁液を養液に接種し、数日後病原菌の分生胞子懸濁液を接種する方法で検討した。病原菌量が多いと効果は不十分であったが、病原菌量が少ない場合には高い防除効果を示した。

メロンつる割病の防除効果は、ふすまで培養したSKT-1株を混和接種した用土にメロンをは種し、後に病原菌を接種したポットに移植する方法で検討した。病原菌の接種量の多い激発区では、SKT-1株の接種量の多寡（2%、10%）に関わらず防除効果は不十分であったが、多発区では68および69と十分な防除価であった。

イチゴ萎黄病に対しては、胞子懸濁液（胞子数で $10^9$ 程度）を育苗中の株周辺に灌注し、この苗を汚染土壤に移植する方法で防除効果を検討した。定植2ヶ月後には、ほぼすべての株で発病が確認され、防除効果は認められなかった。

SKT-1株はいくつかの作物のフザリウム病に防除活性を持つことが確認された。しかしながら、処理方法、処理量などに関しさらに

検討する余地が残されている。イチゴのように栄養繁殖性の作物に対しては、処理法を中心に検討の余地はさらに大きい。

## 5. SKT-1株製剤の安全性

我が国においては、微生物農薬の登録は平成9年に定められた「微生物農薬の登録申請に関わる試験成績の取り扱いについて」に基づいて実施されており、SKT-1株製剤もこれに従って開発を進めている。

安全性については、ラットを用いた経口急性毒性、ウサギを用いた眼一次刺激性およびコイを用いた魚毒性試験でいずれも問題を生じていない。

他の作物に対する病原性の有無は、コムギ、ハウレンソウ、トマトなど10科25種の作物を対象に、SKT-1菌株を接種した用土には種もしくは苗を移植する方法で評価した。SKT-1株は調査したすべての作物に病原性を示さなかった。イネの他品種については、コシヒカリ、あきたこまちなど11の品種で、発芽阻害などの障害を発生させていない。

これらのことより、毒性、魚毒性、他の農

作物への影響などいずれも問題となることなく、安全にまた環境に負荷をかけずに使用できるものと思われる。

製剤は、 $1 \times 10^8$ cfu/mlの胞子を水中に懸濁させたもので、200倍に希釈して粉の浸漬処理を行う。流通、保管に当たっては冷蔵設備を必要とする。

## 6. おわりに

化学農薬によりイネの種子消毒を行った場合、高濃度の廃液処理が問題となっている。種子消毒に使用した薬剤の廃液は、土壌表面に散布するなどして処理することとされているが、近年、各地で展開している大規模な育苗センターにおいては、発生する農薬の廃液はかなりの量に上り、その処理には専用の設備と経費を必要とする。筆者が2~3の農家や技術者と話した限りでは、防除効果もさることながら安全性と廃液処理についての関心が最も高いようであった。

SKT-1株は、元々静岡県内のノシバ根圏より分離されたものであり、他作物への病原性や毒性もないことから、廃液の環境負荷は小さく、処理は容易であると考えられる。

また、近年栽培が増加している有機栽培米や、減農薬栽培米においても、1種類の製剤で糸状菌病、細菌病の両方に防除効果を示す特性は有用である。

SKT-1株製剤は、平成12年度より(社)日本植物防疫協会による生物農薬連絡試験において防除効果の実証を行っている。早期に必要な試験例数を確保し、新しい生物農薬として実用化されることが望まれる。

## 文 献

- 1) 公開特許公報, 特開平11-89562, (1999)
- 2) 公開特許公報, 特開平11-253151, (1999)
- 3) 公開特許公報, 特開平11-225745, (1999)
- 4) 日本植物防疫協会, 平成12年度生物農薬連絡試験成績, (2000)



## ブレイン テクノニュースの バックナンバーご案内 第 82 号

2000 (平成12) 年11月15日発行

### 総 説

花粉特異的プロモーターの単離とそれを利用した  
雄性不稔植物の開発 ……………光田展隆・佐藤雅彦

### 国内情報

高温高圧水処理による廃棄物の資源化技術  
……………佐藤伸明・大門裕之・藤江幸一

アンチセンス遺伝子を用いた酒造用  
低グルテンイネの育種 ……………丸田嘉幸・井上 剛

カイコの3眠化剤利用による

細くしなやかな絹の生産 ……………木内 信  
緊プロ型ロックウール脱臭装置の

開発と実用化……………道宗直昭

### 地域の先端研究

イネ葉より分離した葉面菌による  
イネいもち病の防除 ……………河又 仁

天然由来の保存性向上物質によるカンキツ果実  
腐敗防止への新しい取り組み ……………三好孝典  
文献情報

成体体細胞の核移植により得られた  
クローンブタ ……………(抄訳: 木村直子)

酵母の代謝工学 ……………(抄訳: 家藤治幸)  
摂食によって誘導される揮発性物質は

リマメ葉の防御遺伝子を活性化する  
……………(抄訳: 鈴木章弘)

魚類養殖における給餌管理システムへの  
摂食音の利用 ……………(抄訳: 椎名康彦)

海外便り

ペプチドの二次構造構築と応用の試み  
—ワシントン大学での一年半—

……………野方洋一

## ◀文献情報▶

## 未成熟卵母細胞の凍結保存

*In vitro* maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes.

J. Wu, L. Zhang and X. Wang

Department of Obstetrics and Gynecology, The Third Clinical Medical College, Beijing Medical University, China

*Reproduction*, 121, 389-393 (2001)

精子や初期胚の凍結保存は実用段階まで進んでいるにもかかわらず、卵母細胞の凍結保存は現在でも大変困難である。この卵母細胞の保存技術が確立すれば、雌単独の遺伝資源が確保できるばかりではなく、核移植におけるレシピエント卵の安定供給の可能性なども期待される。また、胚保存の代わりに行うことで、胚保存における倫理的、合法的な多くの問題の克服にもつながることが考えられる。本研究では、ヒトの未成熟卵の超急速凍結保存後の成熟能、発生能について調べている。

卵巣囊の患者から未成熟卵母細胞を採取し、その中から卵丘細胞が密に付着した卵丘-卵子複合体(COC)を選別した。凍結保存には5.5molエチレングリコールおよび1.0molスクロースを含むPBSを凍結液として使用した。2—3個のCOCを電子顕微鏡用グリッド上の微量な凍結液中に移し、その状態で直ちに液体窒素にて急速凍結した。保存は液体窒素中で20—105日間行った。COCの融解は、凍結させたグリッドを37°Cに保温した0.5, 0.25, 0.125, 0.0625molのスクロース液、最後にPBSと段階的に移すことで行った。融解したCOCはピペッティングによってグリッドから回収した。回収したCOCは成熟培養および体外受精を行い、成熟率、受精率および発生率を観察した。その結果、凍結保存した未成熟卵母細胞のうち59%が生存しており、その卵母細胞は正常な細胞膜を保っていた。また、凍結保存卵の成熟率、受精率、早期胚盤胞への発生率はそれぞれ69%, 80%,

7%で、凍結処理を行わなかったコントロール卵との間に有意差は認められなかった。

この結果はヒトの未成熟卵母細胞が凍結保存後も生存でき、成熟能、受精能さらには早期胚盤胞への発生能を維持していることを明らかにした。一般的に凍結保存を行った場合、凍結に使用する耐凍剤の毒性や浸透圧の変化などにより、保存後の卵母細胞に著しいダメージが与えられるとされている。しかし、本研究では成熟率や受精率、発生率を見る限り凍結保存によるダメージは認められない。その理由としてはグリッド上の微量な凍結液中にCOCを保存し、液体窒素により急速に凍結を行っており、また、未成熟卵を使用することで温度変化による紡錘体の損傷が最小限に抑えられたためとしている。ただし、この手法では直接卵母細胞を液体窒素内に入れるため、コンタミネーションの危険性が考えられ、実際に他の細胞ではそのような報告も見られる。この超急速凍結法による未成熟細胞の凍結保存を臨床へ応用するために、まずこの問題を解決する必要があるかもしれない。(抄訳：横尾正樹, Yokoo Masaki, 東北大学農学部)

## ◀文献情報▶

## お茶のサポニンが酵母の耐塩性を破壊する

Theasaponin E1 Destroys the Salt Tolerance of Yeasts

Minoru Tomita,<sup>1</sup> Sumito Yamamoto,<sup>1</sup> Kanoko Yamaguchi,<sup>2</sup> Hajime Ohigashi,<sup>2</sup> Tadashi Yagi,<sup>3</sup> Katsunori Kohata,<sup>4</sup> and Jan A. Berden<sup>5</sup>

Industrial Technology Center of Tokushima, Saika-cho, Tokushima 770-8021,<sup>1</sup> Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502,<sup>2</sup> Department of Bio and Geo Sciences, Graduate School of Science, Osaka City University, Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8585,<sup>3</sup> National Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea, Kanaya, Shizuoka 428-8501,<sup>4</sup> Japan, and Swammerdam Institute for Life Sciences (formerly E.C. Slater Institute), University of Amsterdam, Plantage Muidergracht 12, 1018 TV Amsterdam, The Netherlands<sup>5</sup>

*Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90, 637-642 (2000)

茶由来のサポニンはいくつかの生理活性を示す事から現在注目を集めている。各種酵母に対して抗菌活性を示すことも報告されている。*Zygosaccharomyces rouxii*は味噌・醤油等の製造に重要な役割を果す耐塩性酵母であり、耐塩性の機構に関する研究も比較的広く行われている。本報告は、サポニンの抗菌性に関して掘り下げる意味で、*Z. rouxii*のNaCl耐性に及ぼす茶種子由来サポニン混合物(TSS)の影響に焦点を絞ったものである。TSSが*Z. rouxii*の耐塩性調節に及ぼす影響の検討、およびTSS中の主要な阻害物質の分離・同定を行っている。耐塩性調節に及ぼす影響に関しては、現象として、培地中のTSS濃度が高い程生育阻害NaCl濃度が低いこと、および高NaCl濃度培地中でTSSが殺菌的に作用することを示している。その機構として、

次の2つの可能性を検証している。即ち、*Z. rouxii*の細胞膜ATPase活性(イオン調節に関係: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポータとの関連が研究されている<sup>1)</sup>)に対するTSSの阻害活性、および高浸透圧培養条件での菌体内グリセロールの蓄積(浸透圧調節に関係)に及ぼすTSSの影響を検討している。その結果、TSSは細胞膜ATPaseの阻害活性を示さないこと、および高塩濃度培養条件での菌体内のグリセロール蓄積がTSSの存在により劇的に阻害されることを確認している。また、TSSを含む高塩濃度培養条件での菌体内のグリセロール蓄積量と菌体の生残率に相関があったことから、TSSの耐塩性阻害機構としてはイオン調節よりも浸透圧調節に関連するところが大きいと結論している。しかし、著者らが同時に行った、塩の代わりにグルコースなどの非イオン性分子が高濃度存在する条件での検討ではTSSによるグリセロール蓄積阻害は観察されなかったのにも関わらずそれに対する考察は無かった。次いでTSS中の成分から、*Z. rouxii*の耐塩性阻害活性でのスクリーニングによりテアサポニンE<sub>1</sub>とE<sub>2</sub>を選択、化学構造を決定している。E<sub>1</sub>とE<sub>2</sub>の構造の差異はトリテルペン構造のE環に結合したアセチル基の位置のみ、また立体化学特性の差異は2つのアシル基がE環に対して平行に並んでいるか否かのみであった。その差異が標的部位(分子)との相互作用の大きさを規定しているというのが考察であったが、実際の検討は今後の課題ということである。TSS中の種々の成分の化学構造とグリセロール蓄積阻害活性を通じた耐塩性阻害活性との関係が深耕されれば、非常に興味深い。本題は化学構造の決定であるのだが、私は耐塩性阻害の現象・機構証明の項を興味深く読んだ。非常にシンプルなデータによって目的の結論にたどり着いていると感じた。*Z. rouxii*の耐塩性についてもレビューされている<sup>1)</sup>ので、併せて一読頂ければと考える。

参考文献: 1) 渡部保夫ら, 日本醸造協会雑誌, 96, 23-32 (2001) (抄訳: 楠田大輔, KUSUDA Daisuke, カルピス(株)基盤技術研究所)



## ◀文献情報▶

## 黄色い花を作る遺伝子はポリフェノール酸化酵素のホモログだった

Aureusidin Synthase: A Polyphenol Oxidase Homolog Responsible for Flower Coloration

T. Nakayama,<sup>1</sup> K. Yonekura-Sakakibara,<sup>2</sup> T. Sato,<sup>1</sup> S. Kikuchi,<sup>1</sup> Y. Fukui,<sup>2</sup> M. Fukuchi-Mizutani,<sup>2</sup> T. Ueda,<sup>3</sup> M. Nakao,<sup>2</sup> Y. Tanaka,<sup>2</sup> T. Kusumi,<sup>2</sup> and T. Nishino<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University, <sup>2</sup>Institute for Fundamental Research, Suntory Ltd. <sup>3</sup>Kobe Gakuin University.

Science, 290: 1163-1166 (2000)

キンギョソウ (*Antirrhinum majus*) やコスモス (*Cosmos bipinnatus*) などの観賞植物では花卉の黄色の発現はオーロンと呼ばれる植物色素のフラボノイドによって起こっている。本論文では、オーロンを、その前駆体のカルコンから合成する酵素を単離し、遺伝子をクローニングすることに成功した。

黄色花のキンギョソウの発色はオーロン配糖体のオーロシジンとブラクテアチンによって行われる。オーロシジンは2',4',6',4-tetrahydroxychalcone (THC) 或いは2',4',6',3,4-penta-hydroxychalcone (PHC) から合成され、また、ブラクテアチンはPHCから合成されるが、これらの反応は1種類の酵素によって触媒されることが知られている。

本論文では黄色花のキンギョソウを用いて、オーロン生合成に関与する酵素(オーロシジン合成酵素)を取り出すことを試みた。まず、32kgのキンギョソウの蕾から、オーロシジンの合成活性に基づいて、90 μgの酵素を精製した。この酵素の活性はTHCを基質とした時、578 units mg<sup>-1</sup>で分子量は39KDであった。また、ペプチドの断片からアミノ酸配列を決定し、これを基にキンギョソウ(品種イエローバタフライ)の花弁より作成したcDNAライブラリーから、オーロシジン合成酵素をコードしていると思われるcDNAを単離した。この単離されたcDNA (AmAS1と呼称)は1686塩基からなり、562個のアミノ酸をコードしていた。また、予想されるア

ミノ酸配列は植物のポリフェノール酸化酵素(PPO)と高い相同性があった。アミノ酸配列から予想される分子量は64KDで、実際に得られたタンパク質の分子量(39KD)より大きかった。これは他のPPO同様、タンパク質の成熟の過程でペプチドが除去されるためと考えられる。THCからのオーロシジンの生合成はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によって促進された。これは一般的なPPOの性質とよく一致している。しかしながら、PHCからのオーロシジンとブラクテアチン生合成にはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は阻害的に働いた。また、THCとPHCの4'位配糖体もオーロシジン合成酵素の基質となった。オーロシジン合成酵素以外のPPOでもTHCからのオーロシジン合成活性があることが、真核微生物*Neurospora crassa*のPPOを使った実験によって確かめられた。多くのPPOは、アミノ基末端のトランジットペプチドによって、プラスチドのチラコイド膜内ルーメンに局在するようになっているが、AmAS1にそのような配列はない。オーロシジン合成酵素の基質であるTHCやPHCの4'位配糖体は液胞に存在し、本酵素の至適pHは液胞のpHに近いから、オーロシジン合成酵素は液胞に存在していると考えられる。ノーザンブロット法による解析の結果、AmAS1はオーロンを蓄積する花卉で発現しており、その発現量は花の発育ステージによって異なった制御を受けていた。また、黄色の花の方が、オーロンを少量含むピンクの花弁より、より多くAmAS1を発現していた。これに対して、オーロンを全く含まない白、ピンク及び赤色の品種や、オーロシジン合成酵素活性がない茎や葉ではAmAS1は全く発現していなかった。以上の結果、オーロシジン合成酵素は植物PPOのホモログであり、キンギョソウの黄色花の遺伝子であると結論された。

単離された遺伝子AmAS1を他の植物に導入することで、黄色の花のない植物、例えばアサガオなどで黄色花の品種を作ることが可能になるとと思われる。

(抄訳:清水圭一, SHIMIZU Keiichi, 鹿児島大学農学部)

## ◀文献情報▶

## イネの *brassinosteroid insensitive1* 相同遺伝子の機能欠損は、節間伸長とラミナジョイントの屈曲を阻害する

Loss of function of a rice *brassinosteroid insensitive1* homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint

C. Yamamuro, Y. Ihara, X. Wu, T. Noguchi, S. Fujioka, S. Takatsuto, M. Ashikari, H. Kitano, M. Matsuoka

Nagoya University, BioScience Center, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan

*The Plant Cell* 12, 1591-1605 (2000)

イネの矮性変異体は、農業上の重要性から、多くの研究者により精力的に解析されている。これらの矮性変異体は、上位5つの節間の伸長パターンから6つのグループに分類されている。しかし、イネの稈（茎のこと）の節間伸長のメカニズムはほとんど明らかになっていない。

最近の分子遺伝学的アプローチから、ジベレリンやブラシノステロイドのような植物ホルモンの生合成、あるいは感受性の欠損による矮性変異体が見つかってきている。ブラシノステロイドの解析は、シロイヌナズナなどの双子葉植物において変異体を用いた分子生物学的、生化学的な解析が進められており、通常の発生のみならず、光形態形成にも重要な役割を果たしていると考えられている。

シロイヌナズナや他の双子葉植物での研究と比べ、単子葉植物の発生にブラシノステロイドがどのような影響を与えているのか、についての報告は現在の所少ない。イネにおけるラミナジョイント（葉身と葉鞘の連結部）の屈曲への影響はよく知られており、ブラシノステロイドの生化学検定に用いられている。また、低濃度、高濃度のブラシノステロイド処理は、それぞれイネの根の発生を促進、阻害した、という報告もされている。

本文献では、新規にスクリーニングされたイネのブラシノステロイド非感受性変異体 *d61* を用いて、イネにおけるブラシノステロイドの役割について、考察を行っている。

著者らが単離した新規の矮性変異体 *d61* は、特異的な節間のみが短化する変異体である。*d61* の weak タイプは第2節間（上から2つ目の節間）のみの短化を示し（上記した6つの分類群の一つの *dm* タイプ）、strong タイプは最上位の第1節間以外のすべての節間が短化を示した（*d6* タイプ）。この変異体は一遺伝子座劣性変異体であり、一遺伝子座のみで、稈の節間伸長パターンが制御される点は、農業上非常に興味深い。

また、シロイヌナズナのブラシノステロイド非感受性変異体を引き起こす *BRI* 遺伝子と相同性の高い、イネの遺伝子 *OsBRI1* を単離した。*BRI* は、ブラシノステロイドレセプターキナーゼをコードしていると考えられており、*OsBRI1* でも同様にコードしていると考えられている。

この *OsBRI1* 遺伝子と *d61* 遺伝子座間の連鎖解析を行ったところ、この2者間は密接に連鎖していることが示唆された。さらに、*d61* 変異体に5' と 3' flanking 領域を含む *OsBRI1* の完全なコード領域を導入したところ、矮性を示す変異体は野生型の形態へと補完され、*OsBRI1* の転写因子のアンチセンスをもつトランスジェニック個体では、*d61* 変異体と同様、あるいはよりシビアな形態を示した。つまり、*d61* 変異体は *OsBRI1* 欠失変異体であることが示された。

この変異体の生化学的、分子生物学的な解析から、*OsBRI1* は (1) 介在分裂組織の形成と節間細胞のシュート軸方向への伸長による節間伸長、(2) ラミナジョイントの屈曲、(3) 暗条件下における形態形成、に重要な役割を果たしているものと考えられた。

単子葉植物におけるブラシノステロイドの解析はまだ始まったばかりであり、今後の展開が期待される。

(抄訳：春原英彦, SUNOHARA Hidehiko, 東京大学農学生命科学研究科)

## ◀文献情報▶

## 日本のタイも残留孤児だった

Differences between *Pagrus major* and *Pagrus auratus* through mainly mtDNA control region analysis

Kazuo TABATA\*<sup>1</sup> and Nobuhiko TANIGUCHI\*<sup>2</sup> [田畑和男, 谷口順彦]

\*<sup>1</sup> Hyogo Prefectural Fisheries Research Institute (兵庫水試)

\*<sup>2</sup> Faculty of Agriculture, Tohoku University (東北大院農)

FISHERIES SCIENCE, 66, 9-18, 2000

名前は個体の姿, 形を表すものであり, 個体を特定するものである。だから何の根拠もなく名前を付けられることはない。日本人なら日本人らしい, 女性であれば女性らしい名前を付けるように, 魚もその特徴, 分布を考慮し, きちんと分類された上で名前が付けられるのである。

マダイは日本の代表的な魚であり, 魚と聞けばこの名前を思い浮かべる方も多だろう。マダイは標準英名では red sea bream と呼ばれ, 学名は *Pagrus major* という。その分布は日本沿岸から東シナ海, 南シナ海と広きにわたる。また, 本種に極めて類似するゴウシュウマダイ (標準英名: snapper, 学名: *Pagrus auratus*) はオーストラリア南方沿岸からニュージーランド沿岸にわたる亜熱帯から温帯海域に分布する種で, 1801年に Blochらによって記載された。現在は独立した種として扱われている両種であるが, 記載された当時は同一種 *P. auratus* として扱われていた。その後, Gunther (1859) により豪州に分布する *P. auratus* と日本沿岸に分布する *P. major* に分類された。その後地理的変異であるとの見解をもつ研究者もいたがはっきりと結論づけられることはなかった (赤崎, 1964)。

近年になり, Paulin (1990) は形態学的再検討により *P. auratus* は独立した種であり, *P. major* は *P. auratus* のシノニム (同物異名)

であるとの報告を行った。一方, 谷口ら (1986) は, 両種のアインザイム電気泳動的解析から, Paulinの見解とは異なり, 日本沿岸産 *P. major* は独立した種として扱うべきであるとした。このように “マダイ” と “ゴウシュウマダイ” の種間差を巡る問題は混乱しており, 詳細な遺伝学的, 形態学的な再検討が望まれていた。著者らはこの *P. major* と *P. auratus* の関係を明らかにするために, *P. major* と *P. auratus* の遺伝変異レベルをミトコンドリアDNAの部分領域のRFLP (restriction fragment length polymorphism) 分析と塩基配列の解析によって比較した。また同時に2種の形態学的比較検討も行った。

その結果, 遺伝子レベルでは, *P. major* と *P. auratus* の遺伝的変異性が認められたが (3.48%), その差は種間レベルにしては低く, 地理的隔離に起因するレベルのものであるとも考えられた。また, 形態的には上後頭骨の隆起に差が認められた以外には両者を有意に区別する外部形態学的な差は認められなかった。このように, 遺伝子レベルあるいは形態レベルで認められた *P. major* と *P. auratus* の差は亜種程度であることが考えられ, *P. major* は *P. auratus major*, つまりマダイはゴウシュウマダイの亜種であるとするのが妥当と結論された。遺伝学的系統樹による詳細な解析結果が待たれるが, 大昔, 親子離ればなれになった悲しいマダイもいたに違いない。

(抄訳: 清木興介, SEIKI Kosuke, マルハ(株)中央研究所)

◀海外便り▶

## パデュー大学での1年8ヶ月

独立行政法人 農業生物資源研究所  
西村 麻里江

## 1. パデュー大学の紹介

長期・オールギャランティー在外研究で滞在したパデュー大学はアメリカ中西部インディアナ州にある。大学の周辺でもインディアナ州の他の町と同様、トウモロコシ畑と大豆畑がそれぞれ地平線まで広がっている。大学のあるウエストラフィエットは駐車違反・スピードオーバー程度の犯罪しかおこらない、実に平和な町である。大学自体はアメリカ中西部でビッグ10と呼ばれる大学のうちの1つに数えられており、規模の大きな州立大学で理科系学部が中心となっており、工学部・農学部はかなりレベルが高い。特に航空工学・コンピューター関係は有名で、アポロの阿姆斯特朗船長をはじめ、多数のNASA宇宙飛行士を輩出している。またスポーツも盛んでリーグが始まると、強豪のバスケットボールチームの応援に熱狂する。

## 2. 在外研究について

このトウモロコシと大豆に囲まれた場所で、イネ(!?) いもち病菌の孢子形成・感染時のシグナル伝達に関連した研究を行ってきた。自然界では空中を飛んでいるいもち病菌孢子のうち、幸運にも無事イネ表面に着陸したものが感染を開始する。イネの表面に付着した孢子は菌糸を伸ばし、そこがイネの表面であることを認識し、菌糸の先端に感染時特異的器官である付着器をつくり、そこからイネの中に侵入していくと考えられている。在外研究の前半では孢子形成に関連した転写因

NISHIMURA Marie

〒305-8602 つくば市観音台2-1-2



写真1 インディアナ出身の有名人、ジェームス・ディーンのお墓  
彼の出身地の村にある墓地で両親の隣に眠っている。

子とそれに制御されている遺伝子群のクローニング・機能解析を行い、後半で孢子形成・付着器形成に関与していると考えられるシグナル伝達系遺伝子について解析を行った。イネいもち病菌は、アメリカを中心としたグループによって分子生物学研究、ゲノム解析が進められており、病原糸状菌のモデルとしての地位を獲得している。指導教官をはじめとするアメリカの研究者達の研究の進め方、論理の展開法、論文の読み方、書き方は非常に勉強になった。論理に乗っ取って展開される研究には、これぞサイエンスだと感じさせるものがあつた。また、アメリカで教育を受け



写真2 友人の研究室  
研究室は日本とあまりかわらない

た人はプレゼンテーションが非常にうまい。その裏には、常日頃からの訓練に加え、必死の練習と暗記があることを友人のおかげで初めて知った。加えて、ジョークの準備には涙ぐましいものがあった。

### 3. 研究予算について

研究予算は一般的に生物系研究室ではNSF（科学技術省）、NIH（厚生省に相当）、USDA（農務省）、州・大学などの委託研究費、そして企業から等が主なようである。予算の種類によるが、数10%から半分近くは大学に税金として支払う。現状から判断するに、平均的な研究室でも1研究室で最低1千万円以上の研究費を持っているということだろうか。研究予算には大学院生・ポストドク・テクニシヤンの給料、実験機器、試薬その他、諸々の費用が含まれている。実験機器、試薬、人件費（ポストドク・テクニシャン）が日本の約1/2程度であることが多く、日本の予算と比較すると1.5—2.0倍に相当することになる。また、顕微鏡室、ゲノムセンター等、実費を払えば誰でも使える研究支援部門、情報解析部門が充実しており、時間と研究費を節約できるというのは非常にうらやましい環境だと感じた。

### 4. ポスドクと給料・就職

多少、翳りがでてきているもののアメリカはまだ経済的に非常によい状況にある。そのため企業、国立研究所への就職はこれまでになく容易であり、アメリカ人であればポストドクを経験しなくても、外国人でもポストドク1回で企業に職を得ることができるようである。企業でポストドクをし、そのまま就職するか、同種の企業に就職という人もいる。好景気のため、企業へ人が流れ、大学の方は有名研究室でない限りポストドク不足に悩んでいるらしい。そのためか、大学でのポストドクは中国本土・インド人を中心とする外国人率が非常に高い。とはいうもののアメリカの大学教官の職を得るためにはやはり大学でポストドクを経験することが必須であり、大学での職探しは景気と関係なく競争が厳しい。今、任期付き助教授になっている幸運と実力に恵まれた人たちは平均4年のポストドクを経験しているようである。大学のポストドクの給料は、地域・経験によって異なるが、ポストドク1年生で生活費の安い中西部だと年間2万5千ドル、東海岸、西海岸の生活費の高い地域で3万ドル前後が相場である。もちろん、人気の研究室だとポストドク代がさらに低くなる場合が多い。2万5千ドルというのは、贅沢をしなければ一人で生活するには困らないが、余裕がほとんどないという金額である。労働ビザであればこの給料からさらに税金で25%程

度が差し引かれる。低賃金・長時間労働で、基本的にボスに逆らえないため、よく冗談でポストクのことを「奴隷」と表現したりするが、彼らがアメリカのサイエンスを支えている。夢と希望と実力に満ちあふれたポストク達を支えているのは、サイエンティストとしてのアメリカンドリーム、成功への野望、ボスになりたいという心の叫びのように感じた。もっとも、運良く任期付き助教授になっても厳しい審査を受けてパーマネントなポジションをとるまでの最初の6, 7年ぐらいはプレッシャーが大きく、針のむしろに座っているように感じるらしい。

## 5. 研究室の選び方

よく言われるポストク先の研究室の選び方に、経験がほしければ中堅どころを選び、ネームバリューが欲しければ大御所を選ぶというのがある。例えば、1回目のポストクでは色々、勉強したほうがいいので研究室運営が軌道に乗っていて論文も何報か出ており、しかもポストクを直接指導する時間のあるassociate professorクラスがよい。もし、実力を蓄えたポストクであれば就職の助けになるような有名な先生のところに行くというのもよくある話であるが、有名な先生はたいがい忙しくて指導時間がないというのはどこの国も同じようだ。アメリカのラボであれば学生やポストクでアメリカ人が1人以上いるラ

ボを選ぶほうが良いという話もある。ボスに非条理なところがある、住環境が悪い等、問題があれば、他に選択肢のあるアメリカ人は居着かないし、逆にアメリカ人が居着くラボというのはそれなりに得るものが大きいということを示しているからだ。

## 6. その他

一般に大学関係者、都市・観光地の人は外国人慣れしていて、たとえ人種差別意識があっても表面には出さないの、日本人が不快な目に遭うことはほとんどない。ただ、英語に関しては、外国人だからといって特別扱いをしてくれないので要注意である。彼らはアメリカ英語が世界の共通語だと信じている。逆に英語力に問題がなくなれば、気の合う友人達と生活を楽しむことができるし、うわさ話から役に立つ情報をキャッチできる(かもしれない)。もし、国内外の学会に参加できる機会があれば積極的に参加して、いろいろな人に話しかけてみることをお勧めする。他大学の友人が増えると、有効な情報を交換できるし、なによりもよい現地ガイドになる。

以上、参考になれば幸いである。最後に、渡米中にいろいろとお世話になった技術会議事務局、生物研企画調整部、研究室の皆様と友人達に心からお礼を申し上げたい。

## ◀特別情報▶

## BRAIN国際テクノフォーラム

## 動物のプリオン病研究の最前線

日時 2001年3月23日(金) 13:00-17:30

場所 TEPIA (機会産業会館) 4階ホール

主催 生物系特定産業技術研究推進機構 (生研機構)

後援 農林水産省家畜衛生試験場, (社)畜産技術協会

去る3月23日, 上記テーマのBRAIN国際テクノフォーラムが下記次第により開催されました。当日の参加者は304名(農水省及び関係機関関係者42名, 文部科学省及び大学関係者19名, 厚生労働省及び関係機関関係者6名, 国際機関OIE関係者2名, 地方公共団体家畜衛生機関関係者67名, 民間獣医・畜産関係機関関係者31名, 民間医薬品関係機関関係者63名, 民間食品関係機関関係者22名, 民間化粧品関係機関関係者13名, 民間肥料関係機関関係者4名, 座長・講師・生研機構18名, その他17名)で, 70名の方々のご諒解を得てTVモニター室での参加となりました。また, 会場の都合でやむなく参加申し込みをお断りした方も少なくありませんでしたので, 以下にフォーラムの概要をご報告いたします。

## 次 第

開 会 13:00

主催者挨拶 堤 英隆 (生物系特定産業技術研究推進機構理事長)

後援者挨拶 寺門誠致 (農林水産省家畜衛生試験場長)

座長紹介並びに座長講演 13:20-13:50

牛海綿状脳症 (BSE) と変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) を巡る問題

山内一也 ([財]日本生物科学研究所理事・主任研究員, 東京大学名誉教授)

講演1 13:50-14:30

プリオン遺伝子 (*Prnp*) 欠損マウスを用いた抗プリオン蛋白質 (PrP) 特異抗体の作製

横山 隆 (農林水産省家畜衛生試験場総合診断研究部)

講演2 14:40-15:10

プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) を指標にしたプリオン試験系の課題と展望

堀内基広 (帯広畜産大学原虫病研究センター)

休 憩 15:10-15:30

講演3 15:30-16:10

フランスにおける牛海綿状脳症の病理学

Anna BENCSIK (フランス食糧衛生安全省神経ウイルス・神経科学研究所)

講演4 16:10-16:50

ヨーロッパにおける動物の海綿状脳症とプリオン蛋白質 (PrP) について

James HOPE (米国V.I.テクノロジー研究所, 英国動物衛生研究所)

総合討論 16:50-17:25

閉会挨拶 貝沼圭二 (生物系特定産業技術研究推進機構理事)

閉 会 17:30

## 山内一也博士（座長，（財）日本生物科学研究所理事・主任研究員）の講演

今日の演者の方々は最先端のプリオン病研究者ですが、ご参集の中には専門でない方も居られると思いますし、主催者からの要請もありますので、各講師の講演の前に予備知識として総論的な事項を紹介します。

**プリオン病の概念** 牛海綿状脳症（BSE，「狂牛病」は俗称であって正式な病名ではない）、ヒツジ海綿状脳症（別名スクレイピー）、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病（vCJD）等はいずれも原因はプリオンと考えられ、一般に「プリオン病」と呼ばれている。プリオンはウイルスや細菌と同様に病原体の総称で、本体は異常プリオン蛋白と見なされ核酸を含まない。この病原体は、通常の物理・化学的処理に抵抗性を示す。異常プリオン蛋白 PrP<sup>Sc</sup>は、体細胞遺伝子がつくる「正常プリオン蛋白 PrP<sup>C</sup>」が構造変化したものと考えられ、ウイルスなどの外来性異物とは異なる。異常プリオン蛋白が何らかの原因で神経組織に蓄積して空胞を形成し、海綿状脳症が発病すると考えられている。発病様式は、感染、プリオン遺伝子変異の遺伝性、孤発性の3つのタイプがあるが、動物のプリオン病はすべて感染であり、vCJDも同様である。本病の特徴は、数年又はそれ以上に及ぶ長い潜伏期、高感度の診断法が無いこと、治療・予防法が無いこと、発病すると必ず致死すること等のため、これらが家畜衛生、公衆衛生面の不安の要因になっている。

**BSEの出現とその後の経過、対策** 1985年4月英国ケント州で最初の発生があったのではと推測されているが、病理学的に確認されたのは1986年11月である。疫学調査の結果から翌年、反芻動物由来の「肉骨粉」を飼料として反芻動物に与えることを禁止、1989年人への影響を考慮して、6か月齢以上の牛の骨髄、胸腺、扁桃、腸の食用を禁止した。1996年3月人のvCJD発病を英政府が認めたことから、肉骨粉の家畜飼料としての利用全面禁止、30か月齢以上の牛の殺処分対策がとられた。vCJDの発生は、2000年末までに英国88名、

アイルランド1名、フランス3名の患者発生となっている。

**英国のBSE調査員会報告（2000年）** 従来BSEの発生は、ヒツジのスクレイピー肉骨粉由来説が一般的であったが、本報告では、BSEは恐らく1970年代に遺伝子変異の1頭の牛に出現し、肉骨粉を介して牛の間に広がったとする牛由来説を提出している。これは疫学的な仮説であり、BSEのvCJDへの移行説もやはり疫学仮説であるが、BSEの広がり、食用と畜のレンダリング後の肉骨粉を蛋白資源として飼料利用する近代畜産のリサイクリングに原因があることは間違いないと思われる。

**異常プリオン株のタイピング** 人のプリオン遺伝子を導入したトランスジェニックマウスへ各種異常プリオン材料接種による臨床症状と脳病変の比較実験、並びに牛のプリオン遺伝子を導入したトランスジェニックマウスへの接種による潜伏期と脳病変の比較実験により、BSEプリオンとvCJDプリオンがほぼ一致することが明らかにされている。更に、異常プリオン蛋白のウエスタンブロット分析、プリオン遺伝子の糖鎖付加部位の比較によりBSEとvCJD、牛肉骨粉を与えた猫の海綿状脳症、猿の実験的海綿状脳症等のパターンが一致することが確認されている。

**プリオン病診断法開発の現状** 最も普通に実施される病理組織学的検査は、特徴的な海綿状脳症病変を確認することであるが、これは死後診断であくまでも補助診断である。また、被検材料をマウスの脳に接種し感染性を確認する方法があるが潜伏期が1年以上と現実的でない、それから髄液の神経蛋白をマーカーとする検査もあるが特異的でない。本病の確定診断は、異常プリオンの検出・証明であるが、これには免疫組織染色法と生化学的試験法の二つがある。

免疫組織染色法は一般に脳の剖検材料で行うが、スクレイピーに関しては隣膜リンパ節や扁桃のバイオプシーによる生前診断が可能



である。

正常及び異常プリオンは、アミノ酸配列が同じで区別できない。しかし、一定の条件下で蛋白分解酵素で分解した場合、異常プリオンはコアの部分が残るのでこれを検出する（ウエスタンブロット法又はELISA法による）のが生化学的試験法の基本である。現在ヨーロッパではこの検査法の四つのキット（英国、スイス、アイルランド、フランス）

が作製・公表されている。これらのキットについてベルギーの研究所で比較試験を行っており、スイス、アイルランド、フランスの3キットは感受性、特異性の点で優れており、フランスのものは希釈しても検出感度が落ちないと報告されているが、最近の「ネイチャー」へのレターでフランスのキットは偽陽性の感度も高いとの報告があり、これらのキットの評価は未だ流動的であると言ってよい。

### 横山 隆博士（農林水産省家畜衛生試験場）の講演

**プリオンの性状と機構** 正常プリオン(PrP<sup>C</sup>)と異常プリオン(PrP<sup>Sc</sup>)の性状は、次の通りである。①PrP<sup>C</sup>は正常細胞に存在するが、PrP<sup>Sc</sup>はスクレイピー、BSCに感染した動物の脳細胞に蓄積し、正常細胞には存在しない。②両者の分子量に差はないが、山内先生が紹介したように蛋白分解酵素プロテナーゼ抵抗性に差があり、PrP<sup>Sc</sup>はPrP27~30のコア部分が残存し、これが診断の指標になっている。③PrP<sup>C</sup>では $\alpha$ -ヘリックス構造に富み、 $\beta$ -シート構造は殆ど無いが、PrP<sup>Sc</sup>では $\alpha$ -ヘリックス構造が減少し $\beta$ -シート構造が増加し両者の立体構造のちがいが示唆されている。④PrP<sup>C</sup>には感染性が無いが、PrP<sup>Sc</sup>は伝達性がある。PrP<sup>C</sup>の機能は未だ明確ではないが、正常なシナプス機能への関与、*in vitro*でのニューロンの生存への関与、銅の代謝への関与、SOD活性への影響、シグナル調節等々多くの報告があるが、それらについて確定的な結論は得られていない。

**PrP<sup>Sc</sup>、PrP<sup>C</sup>の立体構造解析のための抗体作製** PrP<sup>C</sup>は相同性が高く、多くの動物種の脳細胞や免疫系細胞が持っているため抗体を作るのが困難であった。そこで私どもはPrPを持たないトランスジェニックマウスの作出から始めた。野生型プリオン遺伝子のオープンリーディングフレームを含む領域をネオマイシンで置換し、ミュータントマウスを作成し、細胞融合によりモノクローナル抗体を作成した。全部で七つのモノクローナル抗体が得られ、組換えバキュロウイルス感染SAF21細胞での間接蛍光抗体法で染色性の異なる

4A-3を含む四つのクローンと、11H-1を含む三つのクローンの2つのパターンに分かれた。免疫沈降反応では、モノクローナル抗体はPrP<sup>C</sup>に、ポリクローナル抗体はPrP<sup>C</sup>、PrP<sup>Sc</sup>の両方に特異的に結合する。

**PrP<sup>Sc</sup>の蓄積とPrP<sup>C</sup>の動態** ポリクローナル抗体によるプロテナーゼ処理の有無の全PrP、PrP<sup>Sc</sup>を定量してみると、スクレイピー感染マウスで15週からPrP<sup>Sc</sup>の増加がみられ20週で明瞭な蓄積が認められ、モノクローナル抗体による免疫沈降反応では、感染末期の20週で11H-1と結合するPrP<sup>C</sup>の減少が確認された。今までの通説では、PrP<sup>C</sup>は常に作られそれにPrP<sup>Sc</sup>が加わって蓄積される考えられたが、この結果は感染末期にPrP<sup>C</sup>が減少、消失することを示している。

モノクローナル抗体4A-3、11H-1等で沈降反応後の上清をポリクローナル抗体で沈降反応を行うと、検出されるPrP<sup>C</sup>があることからそれぞれ異なるサブフラクションを認識していると考えられた。モノクローナル抗体はアセトン未固定抗原のPrP<sup>C</sup>を認識しないが、ポリクローナル抗体は未固定の細胞膜表面のPrP<sup>C</sup>を認識することから、モノクローナル抗体は膜表面に出ている未成熟な合成段階のPrP<sup>C</sup>を認識していると思われた。このことはハムスターを用いた脳の生切片によるヒストプロット法（オートクレーブ処理とプロテナーゼ処理の組み合わせ）で*in situ*レベルでも確認できた。これは、PrP<sup>Sc</sup>の変換機構、発病機構が膜表面のPrP<sup>C</sup>との結合・変換・蓄積によって起こるのか、合成初期のPrP<sup>C</sup>

に關与して起こるのか現在解析中である。  
 モノクローナル抗体は間接蛍光抗体法で示された二面性によって、PrP<sup>C</sup>だけでなくPrP<sup>Sc</sup>とも結合することから、PrP<sup>C</sup>の異常化は複数の細胞や過程を経て生ずると推定される。  
**モノクローナル抗体のエピトープ分析** モノクローナル抗体は、面白いことに複数のリニアペプチドを認識していることわかった。スイスの研究で、15B-3というPrP<sup>Sc</sup>を特異的

### 堀内基広博士（帯広畜産大学原虫病研究センター）の講演

**プリオン病の診断法** プリオン病では、病原体に特異的免疫応答が無く血清診断ができないし、病原体に特異的なゲノムも無いからゲノムの増幅もできない。診断法の概要は山内先生が紹介されたように、確定的な診断法として神経細胞の空胞変性やアストロサイトーシスが用いられ、感染末期にミエロイド系細胞で激減するトランスクリプト等のマーカーによる補助診断法がある。プリオン病の確定診断はPrP<sup>Sc</sup>の検出であるが、病畜の脳にはPrP<sup>C</sup>とPrP<sup>Sc</sup>の両方があり、PrP<sup>C</sup>を除去するために非イオン系界面活性剤や酵素処理をし、PrP抗体によりイムノプロット法、ELISA法、免疫組織染色法等によりPrP<sup>Sc</sup>を検出するのが一般的である。最近PrP<sup>C</sup>を除去しないで行う方法も報告されている。

実用面からPrP<sup>Sc</sup>の検出を考えてみると、プリオン病を食肉の流過程から排除するためには食肉検査所レベルでの検査が重要になってくる。そのためには、多検体処理、簡便迅速で感度がよいことが必要である。他方、医薬品や他の食品のプリオン汚染検出もあるが、前者への対応としてEUで4社の診断キットが作製されており、スイスのキットはウェスタンプロット法、他の3キットはELISA法である。これらのEUでの比較試験は1999年7月に公表され、Webサイトでもみることができ、内容は山内先生が紹介した通りである。

**帯広畜産大学で開発した検査法** 帯広畜産大学の公衆衛生学教室では、食肉検査所レベルでの検査法（ELISA法）を開発し1997年に

に認識する抗体はPrnpのC末端側が特異エピトープに關与していることを報告している。私どもの研究では、Prnpの特異エピトープはPrnpのN末端側に關与しており、N末端側はフレキシブルな構造で銅が介在して四つ葉のクローバ構造をとり、銅の代謝への關与が示唆された。

以上、進行中の研究であるが今まで得られた結果を紹介した。

発表している。検体調整は、脳を界面活性剤の中で乳剤化しプロテナーゼ処理して遠心し、3Mのグアニジン・チオシアン酸で変性させプレートに吸着させる。この処理行程は3時間程度。感染マウスの脳で感度試験をした結果、イムノプロット法で $2 \times 10^7$ まで陽性、ELISA法で $2 \times 10^8$ まで陽性を示し、化学発光基質に変えると約10倍に感度が上がる。しかしこの検査法は、簡便・迅速という点はクリアしているが、感度の点で問題が残る更なる改善が必要である。

**プリオン試験系の検討** 今日の私のもう一つの課題である、プリオンという一風変わった病原体をどのように研究すべきかという問題に触れてみたい。試験系としては実験動物を使う*in vivo*の方法、プリオンの持続感染細胞を用いる*x-vivo*の方法、そしてPrP<sup>C</sup>、PrP<sup>Sc</sup>を直接扱う*in vitro*の方法の三つがある。

***in vivo*法** この分野は、トランスジェニックバイオロジーとも呼ばれている。初期の頃はPrnpを発現したトランスジェニック動物（マウス、ハムスター）を用い、プリオンの伝達には動物の種特異性があること、そしてこれはPrnpのアミノ酸配列に起因していることなど重要な知見が得られている。1992年にはPrnpノックアウトマウスが作製され、以後多用され、PrP<sup>C</sup>の役割の解析が進展した。更にPrnp遺伝子を他のPrnp遺伝子と置き換えたPrnpノックインマウスが作出され、遺伝性プリオン病や動物プリオン病のマウスモデルがつくられている。

***x-vivo*法** 感染脳乳剤や精製プリオンを神

経芽細胞に接種し継代、クローニングすると、持続感染細胞が得られる。ウエスタンブロット解析を行い、細胞から検出されたPrP<sup>Sc</sup>をマウス接種することで感染性を調べることができる。また、PrP<sup>Sc</sup>への変換メカニズム、抗プリオン化合物のスクリーニング及びその機構の解析等で有用な知見が得られている。

**in vitro法** この系では精製したPrP<sup>C</sup>にアイソトープ標識をし、感染動物の脳由来のPrP<sup>Sc</sup>と混ぜて酵素（PK）処理をしてPK抵抗性プリオン検出に利用できる。PrP<sup>Sc</sup>存在下でPK処理をすると7 kDのPK抵抗性分子が出てくるが、この現象は脳のN末端トリミングと一致すること、PrP<sup>Sc</sup>に依存しないこと等、この系ではin vivoの現象をほぼ忠実に再現できる。ここでは、プリオンの伝達に

種特異性（スピーシスバリア）があるという問題について私どもが行った研究を紹介する。

マウスとハムスターのPrP<sup>C</sup>、PrP<sup>Sc</sup>のホモ、ヘテロの組み合わせによるin vitro実験で伝達の種特異性が完璧に再現できた。更にPrP<sup>C</sup>とPrP<sup>Sc</sup>の結合と転換という2段階を調べると、種特異性は結合の段階でなく転換の段階に制御されていること、この制御はほんの少しのアミノ酸配列に由来していること、そしてPrP<sup>C</sup>が侵入してくるPrP<sup>Sc</sup>のレセプターになり得ること、その結合はC末端に近い領域が関与していること、等が明らかにされた。この試験系は、プリオン病の不可解な部分を解明するのに極めて有用であると期待している。

### アンナ ベンシック博士（フランス食糧衛生安全省）の講演

私はフランスのリヨンにある研究所から参りました。牛の病理組織学を担当しています。フランスにおけるBSEの発生 初めに、私が属している研究所が実施しているBSEのサーベイランス結果を報告する。山内先生が紹介したように英国のBSE発生は1986年、フランスでサーベイランスが始まったのが1990年である。フランスのBSEの症例は、1989年までは年間10頭以下の低い数字であるが1999年30頭、2000年60頭と急増し、疑似患者も増大している。フランスにおける症例増加は、一般的に飼料による媒介と考えられ、疫学的にも英国からの牛の輸入との関連は無い。それから重要なことであるが、フランスはスイスやポルトガルに比べると発生が少ない。

**パイロット研究** フランスでは、2000年から山内先生が触れたフランスの診断キット「プリオニックテスト」によるパイロット調査が畜産地帯である西部地域を対象に行われている。このパイロットテストは、BSEの有病率を明らかにすることが目的で、リスクのある牛の脳を検査（ELISA法）し、陽性になったものは再検査して、更にウエスタンブロット法、免疫組織化学法で確認し決定する。このパイロットテストの先週までの結果では、

15,000頭の検査で32頭の陽性（有病率0.21%）を示し、スイスの有病率0.30%と大差がない。また、サーベイランスの先週までの発生総数は、パイロットテストを含め真症BSE287頭、疑似患者973頭となる。有病率は、分母となるリスクのある牛の飼養頭数の影響を受けるが、フランスの北部、リヨン近くの西部は畜産地帯でBSEに遭遇する地域である。なお、パイロット研究の一部はJ. Vet. Rec.（英獣医師会誌）に投稿されているので機会があったらご覧ください。

**BSEにおける脳の組織学的研究** これは研究室で私が責任をもつ仕事であるが、この研究の前提となるのは異常プリオン株の問題である。英国の発生では一つの株であると言われており、汚染源が同じで結果も同じということになるが、組織学的には確認が必要である。

**免疫組織化学的研究** 検体の前処理は、オートクレーブ、蛋白分解酵素処理をする。抗体は、モノクローナル抗体（4F-2, 12F-10, SAF84）を使用している。検知は、ABC法でAEC基質により赤色沈着物（ときにニッケルにより黒色染色をする）として観察する。プリオン病の場合、三叉神経孤束核が大きな影響を受けるのでこの部位を主対象にする

が、異常プリオンは空胞病巣に顆粒状に観察される。この場合、モノクローナル抗体としてSAF84を使用すると好結果が得られることがわかり、EUのプロジェクトではこれを使うことになっている。私どもの研究プロジェクトは、標準化された診断法の確立を目指している。

さて、組織を扱う場合に避けられないのが自家融解の問題である。これについては、自家融解した脳の50標本について検討したが、異常プリオンの染色が認められ予想に反して検査可能であることがわかった。自家融解が進んだ液状の材料では、非常に大変であったが詳細は時間の関係で省略する。

免疫組織化学法では、94頭（フランスの発生例の1/3に相当）の脳を観察したが、結果は既に英国で発表されているものと同様であった。

**マウスによる病変プロファイル** BSEの3つの株をマウス（C<sub>3</sub>Black）に感染させ、生存曲線をみると545～575日と3株とも類似して

### ジェームス ホープ博士（米国V.I.テクノロジー、英国動物衛生研究所）の講演

私は蛋白質学者ですが、過去17年間動物衛生研究所でBSE、スクレイピー、vCJDに関わってきました。昨年暮れからアメリカの民間研究所にも関係することになりました。私はプリオン病についてはいろいろ話ができますが、今日は主催者から与えられたテーマに沿って話します。

**プリオン病について** これに関しては、山内先生始め各講師の方が述べているので、若干の補足に止める。プリオン病は、BSE、スクレイピー、vCJDのほか猫のGerstmann-Straussler-Scheinker症候群、FFI、家族性、不眠性症候群も含まれる。病像は、ベンシック先生が美しい画像で説明された通りで、ニューロンの肥大、過形成、アストロサイト、アミロイドーシスも随伴するようである。ヒツジのスクレイピーは、2～3歳齢で発病するが出生時に感染するばかりでなく、出生以前に感染している可能性が考えられる。また、典型的なvCJDの潜伏期は、数か月から数10

いる。免疫組織化学法により9か所の脳灰白質部を系統的に観察しているが、マウスの次世代への移行も観察対象にしているので今の時点で結論的なことは言えない。

**空胞変性の定量的自動画像解析法** これには脳組織のヘマトキシリン・エオジン染色標本を用いる。観察には、バイオカムのワークステーションとリンクした顕微鏡を使用し、ソニーのCCDカメラとソフトウェアを用いている。空胞変性を検出するために、標本のすべての中空のものを捉え、サイズ、形状、表面積をパラメーターとして血管を識別していく。そのために私どもが開発した関数計算を行い、閾値を決めてソフトウェアで判別していく。この空胞のパラメーターと病変の密度等から0～5のスコアに類別する。この方法は、マウスの脳病変で確認し好結果を得ている。この画像解析法は、結果がデジタル数値で示され、再現性があり、統計解析もでき、将来有用な組織検査のツールになるものと期待している。

年と考えられる。

**ヨーロッパにおけるBSEの発生状況** 1週間前にOIE（国際獣疫事務局；本部パリ、アジア事務所；東京）のWebサイトから収集したBSEのデータを示す。まず英国であるが、1986年の初発生確認から92年36,000件、93年37,000件のピークを迎え以後減少し、2000年は1,100件となっている。87年に感染源と思われる肉骨粉が牛等で禁止されるが、BSEの潜伏期間を4年とすると、それ以前の肉骨粉使用でピークの発生を迎えたと考えられる。96年英議会における人のvCJD発生の承認以後、家畜への肉骨粉全面禁止等がその後のBSE減少の要因と思われる。しかし、依然として発生がゼロにならないのは、使用禁止にも拘わらず漏れがあるかもしれないという危惧がある反面、母子伝達の可能性も否定できない。80年代以降の英国の累積発生は、8万件に達する。

英国に次いで発表された件数の多いところ

は、ポルトガル、スペイン、アイルランド等となっている。フランスについては、先ほどベンシック先生が述べた通り。また、少々気になる点はドイツとスペインである。ドイツでは2001年に急に増えたこと、スペインは10年間に2件であったのがここ3か月で31件に増えたことで、これはEUが新しい診断テストでサーベイを行っている結果なのか、だとすればもしかして、今まで見逃してきたことになるかもしれないということである。

**vCJDをめぐる問題** エジンバラにあるvCJDサーベイランスのWebサイトから、3月2日までのデータを示した。ここには後発性CJD（発生率85%）、医原性CJD、家族性（遺伝性）CJDは除外されている。疑似例を含め英国では合計95例の発生が認められている。上述のvCJDでないCJDは、スクレイピーの発生のある国も無い国も同じ発生率で、伝達性がなく動物のプリオン病とは関連性が無いと考えられている。しかし、vCJD、BSEは、山内先生も指摘しているように、それらのプリオン株によるマウスやハムスターの実験で潜伏期、症状、病像が類似し、1万/ml単位の感染性、伝達性を示すことから、輸血による感染の可能性が出てきている。

**輸血による伝達のモデル実験** この研究は、私も参画し現在続行中で、一部が雑誌に短報

で発表されている。この機会に詳しく紹介したいと思う。

実験動物としてヒツジを用いた。ヒツジのプリオン病はプリオン蛋白の遺伝子型に依存することが判っており、感受性のARQジェノタイプのヒツジを使用した。このヒツジの原産地はスクレイピーの発生が無いニュージーランドであるので、実験にはニュージーランドのヒツジを用いた。予備試験としてBSEの脳乳剤を対象ヒツジにiv接種し、2年後に感染発病を確認した。本試験では、ドナーヒツジに感染材料を飼料と共に経口的に与えて感染させ、潜伏期の中期（318日目）に採血し、末期（612日目）にと殺して全血とパuffyコートを採取し、対象ヒツジに輸血した。7頭中4頭はBSE感染の徴候を示しているが、1000日経過しても死亡したものはない。この研究は、5年位かかると思われる。

**グリコール・タイピング** 伝達、輸血感染の確認には、山内先生が触れたプリオン株のタイピングが重要である。それには蛋白のウエスタンブロット分析、免疫組織学法があるが、私どもが発見したグリコール・タイピングも有用である。これはプリオンの糖鎖形成を調べ、3つの糖鎖構造を検討することにより株のタイピングを行う方法である。

### 質疑応答（個別、総括）

Q 末期のPrP<sup>c</sup>の減少と症状との関係は？

A(横山) マウスでもハムスターでも症状の出現とパラレルで一致している。

Q モノクローナル抗体がIgMであることは抗原に糖鎖が含まれていると思われるが？  
また、糖鎖が無い場合の抗体の反応性は？

A(横山) ネイティブな抗体を得る目的で抗原（脳乳剤、胸腺）の精製はしていないので当然糖鎖はふくまれている。糖鎖を除いた抗原は使っていないのでわからない。

Q *in vitro*のPrP<sup>Sc</sup>の転換メカニズムは？

A(堀内) PrP<sup>c</sup>のPrP<sup>Sc</sup>への転換構造はまだわかっていない。

Q *in vitro*のPrP<sup>Sc</sup>の転換で、感染性のある

PK抵抗性のものが出てくるのか？

A(堀内) 英国で失敗例の報告があるが、現在のプリオン仮説が正しければそれはいずれ証明されると思う。

Q フランスで2000年にBSEが急増した原因は？

A(ベンシック) 大変よい質問です。私どもも予想していなかったが、急激な増加の原因は、政府が2000年から始めた新しい診断法によるパイロットテストが考えられます。

Q 自動画像解析診断は、ヒツジにも使えますか？

A(ベンシック) BSEのヒツジへの伝達を検

討しており、それに使う予定です。

Q 自動画像解析診断と症状との関係は？  
HE標本以外でも可能か？

A(ベンシック) 症状が出たものを採材している。空胞は後期に形成され、PrP<sup>Sc</sup>の蓄積と空胞の形状は直接に相関はしてないように思われる。この分析は免疫組織染色標本でも行う予定です。

Q 潜伏期の血液中のPrP<sup>Sc</sup>の検出はできるのか？ PrP<sup>Sc</sup>を特異的に認識する抗体が15B-3しかないのは何故か？

A(堀内) ウエスタンブロットやELISAの検出限界は $10^3 \sim 10^4$ LD<sub>50</sub>程度で脳材料(10<sup>7</sup>LD<sub>50</sub>)では十分であるが、血液では感度が足りず検出できない。現在作製されている抗体は、変性させたPrP<sup>Sc</sup>を使っているのが抗体ができにくいこと、それにスクリーニング法の改善も必要と思われる。

Q 研究室や検査室において異常プリオンを含む試料や臓器などの取り扱い法、注意点を教えてください。

A(ホープ) 人の試料についてのWHOの基準があります。私も異常プリオン材料を長年大量に扱ってきたが、ルーチンには酸化剤、塩素で処理し、オートクレーブ(135℃, 20分)で不活化している。この方法は実験的にも確認されている。その他の関連廃棄物や汚染材料等は焼却し、環境への飛散に注意することが必要です。

Q 牛の飼養者や食肉処理場職員の感染の証拠はないが、人へのプリオン病原体の伝播、伝達の経路について教えてください。

A(ホープ) 自然発生のスクレイピーについてさえ、その伝達経路が議論されているのが現状です。私も長い間プリオン病原体に

接してきたが、今のところ感染の証拠はない、しかしこの問題は10~20年程度では判断できないのではないかと考えられる。理論上人への危険性がある以上、考えられる限りの万全の対策が必要であることは言うまでもない。

Q 医薬品などがプリオン病原体に汚染していないことを証明する方法は？ また、潜伏期は何故長いのか？

A(堀内) 今日紹介したような検査法は、医薬品などの微量の病原体を検出する感度が無く、現時点では陰性証明はできない。

A(山内) 脳でのプリオン病原体の蓄積が何故長い時間を要するのかが判っておらず、したがって潜伏期が何故長いのかも判っていない。

Q 輸血による感染に関連してミルクでは？

A(山内) ミルクによるBSEの伝達は多くの報告があるがいずれも陰性で、WHOはミルクでは伝達しないと確認している。日本で母親の初乳から感染性のプリオンが検出されたとの報告があったが、厚生省の研究班の研究でそれは間違いであったことが確認されている。

Q BSEプリオンのヒツジへの病原性は？

A(ホープ) BSEの脳を経口的にヒツジに与え、780日後にと殺して調べると、脳のほか扁桃、脾、リンパ節などからプリオンが証明されます。

A(ベンシック) 私から追加します。フランスでのBSEプリオンのヒツジ感染実験は、ホープ先生と同じARQジェノタイプของヒツジを用い、腹腔接種で感染させ、次世代への伝達も考慮して現在観察中です。

(以上、文責；編集部 畠山)

#### 編集後記

- ◆ブレイン・テクノニュース第85号をお届けします。
- ◆4月1日から、国立試験研究機関の多くが独立行政法人に移したことに伴い、本号から、多くの執筆者の所属の紹介に独立行政法人という言葉が繰り返され、研究を取り巻く環境も新たな時代に入ったことが感じられます。
- ◆本号の総説は独立行政法人農業技術研究機構東北農業研究センターの鳥越洋一氏に「情報化時代の水稲冷害対策技術」を紹介していただきました。また、表紙写真についても鳥越氏のご好意により、水稲冷害の例としての、低温による穂の退化現象（白ふ）及び冷害時の“葉いもち”から“穂いもち”へ進展した写真及び水稲冷害早期警戒システムのWebサイトの活用状況の写真を掲載させていただきました。
- ◆国内情報では、独立行政法人農業技術研究機構中央農業総合研究センターの渡邊朋也氏に「イネの形態シミュレーション」を、独立行政法人農業生物資源研究所の徳富光恵氏、名古屋大学生物分子応答研究センタ

ーの松岡信氏、株式会社ジェイターの趙徹氏に、共同研究による「C3植物へのC4光合成回路の付与」を、東京工業大学理工学研究科の中本高道氏、森泉豊栄氏に「匂いセンサを用いた匂いの記録・再生システム」を、独立行政法人農業技術研究機構動物衛生研究所の土屋佳紀氏に「SPR法による遺伝子の人工合成」を、独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所の鈴木伸洋氏、山本剛史氏、島隆夫氏に「稚魚にも応用できる高感度自動給餌システムの開発」をそれぞれ紹介していただきました。

- ◆地域の先端研究では、静岡県農業試験場の市川健氏に「イネ種子伝染性病害を防除する生物農薬の開発」について紹介していただき、海外便りでは、独立行政法人農業生物資源研究所の西村麻理江氏に執筆していただきました。執筆研究者各位に改めてお礼申し上げます。

- ◆次号では、マイクロチャンネルによる食品の機能性の測定方法の開発（総説）他、各分野の先端的研究を取り上げる予定です。

(西元記)

#### 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推進機構（生研機構）の許諾を得て行って下さい。

ブレインテクノニュース（第85号）

平成13年5月15日発行

編集兼発行者 堤 英 隆

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構（生研機構）

〒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10F

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

e-mail kikaku@tokyo.brain.go.jp

URL <http://www.tokyo.brain.go.jp/>

©Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 2001