

# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

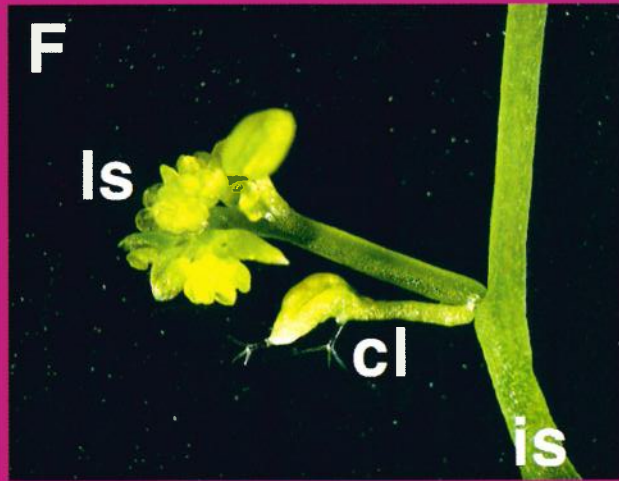
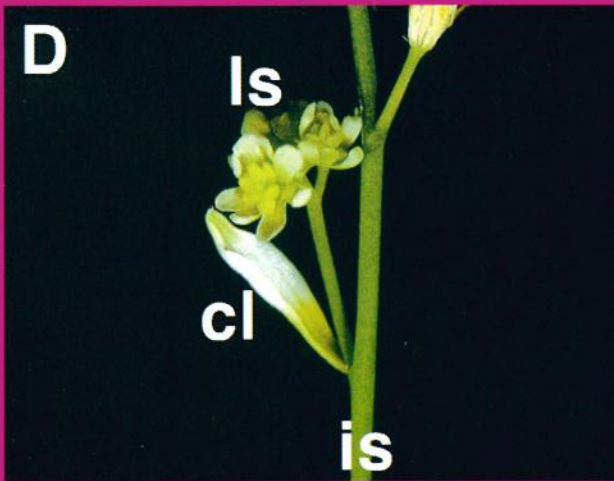
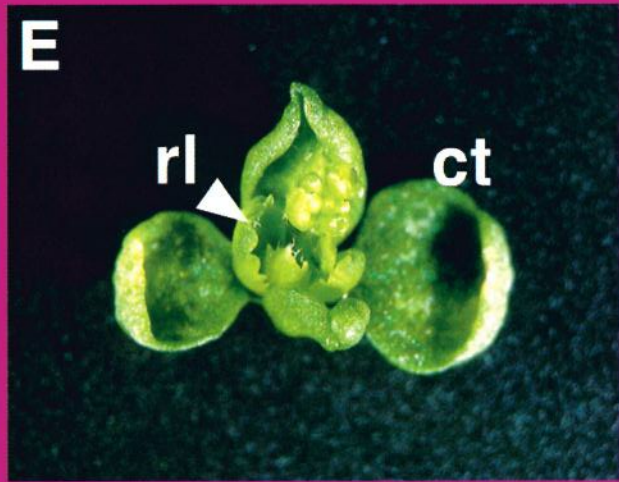
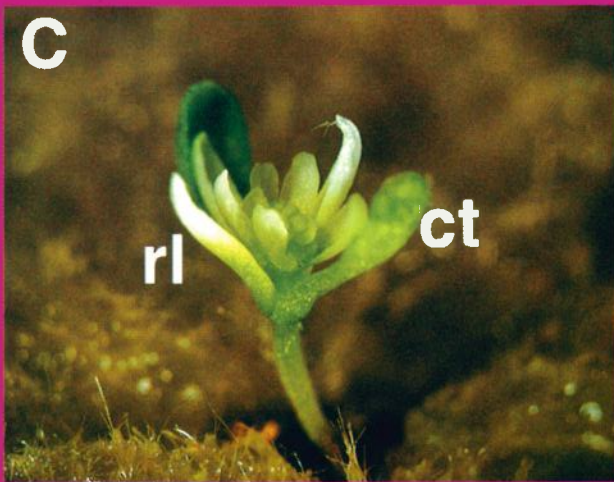
## TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

# 第 87 号

SEPTEMBER 15, 2001



形質転換シロイヌナズナの表現型

(岡山県生物科学総合研究所 後藤弘爾氏原図)

## 目 次

総 説	
清酒酵母とは－その研究動向と現状－	1
石川雄章 (財団法人日本醸造協会)	
国内情報	
アミン酵母によるバイオマスからのバイオエタノール生産	
－バイオ燃料実用化に道－	5
近藤昭彦・福田秀樹 (神戸大学工学部応用化学科・神戸大学大学院自然科学研究科)	
酵母によるサイレージの変敗を「キラー」酵母で防止する	11
北本宏子 (独立行政法人農業生物資源研究所)	
植物によるマウスモノクローナル抗体分子の発現	16
杉本千尋 (帯広畜産大学 原虫病研究センター)	
葉を花の器官に転換する転写因子複合体	20
後藤弘爾 (岡山県生物科学総合研究所)	
牛乳に含まれる乳塩基性タンパク質 (MBP) の新たな骨代謝改善作用の発見	24
山村淳一・高田幸宏 (雪印乳業株式会社技術研究所)	
地域の先端研究	
ハウス内の気温と葉菜類の耐凍性および糖・ビタミンC含量	29
田村 晃 (秋田県農業試験場)	
文献情報	
核移植胚由来ES細胞の分化	33
T. Wakayama et al. (Science, 292, 740-743, 2001)	
抄訳: 横尾正樹 (東北大学大学院 農学研究科)	
$\beta$ カゼイン由来ペプチドを用いた乳酸菌ペプチダーゼ活性の新規情報	34
S.M. Deutsch et al. (Applied and Environmental Microbiology, 5360-5367, Dec. 2000)	
抄訳: 水野征一 (カルピス株式会社基盤技術研究所)	
新DNAマーカー・システム－SRAP	35
G. Li et al. (Theoretical and Applied Genetics, 103, 455-461, 2001)	
抄訳: 岩井純夫 (鹿児島大学 農学部)	
シロイヌナズナのEMF1はシュートの構築とfloweringを制御する	
新規のタンパク質である	36
D. Aubert et al. (Plant Cell, 13, 1865-1875, 2001)	
抄訳: 春原英彦 (東京大学大学院 農学生命科学研究科)	
魚類は本当に耐糖能が低いのか?	37
Thomas W.M. (Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 129, 243-249, 2001)	
抄訳: 椎名康彦 (マルハ株式会社中央研究所)	
海外便り	
ストレス誘導性不定胚発生の分子生物学的解析	38
オランダPlant Research Internationalでの一年間	
福岡浩之 (独立行政法人農業技術研究機構 近畿中国四国農業研究センター)	
生研機構からのお知らせ	41
新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業の採択課題の決定について	41
新事業創出研究開発事業 (地域型) の採択課題の決定について	42
機械化促進業務のビデオによる紹介について	46

### 表紙写真説明

Cは普通葉 (rl) が、またDは茎生葉 (cl) がともに花弁様器官化した場合、Eは普通葉 (rl) が心皮化した場合、Fは茎生葉 (cl) と側枝 (ls) の花の器官がすべて雄しべ化した場合を示す。子葉 (ct) では用いたプロモーターの発現が弱い場合、殆ど変化しない。これら形質転換植物の分子生物学については、国内情報20頁の論文をご覧ください。

## ◀総説▶

清酒酵母とは  
—その研究動向と現状—財団法人日本醸造協会  
石川 雄章

清酒酵母について、最近の研究動向と話題の中から、清酒酵母の分類学上の位置、泡なし酵母と高泡形成に関与するAWAI遺伝子、芳香エステル高生産酵母の育種による清酒の高級多様化志向への対応、さらに酵母のアルコール耐性機構解明へのアプローチと現状について、その概略を紹介した。

## 1. はじめに

清酒醸造に用いられる酵母を清酒酵母と呼んでいるが、現在のところ分類学上はパン酵母などと同じ*Saccharomyces cerevisiae*に属している。*S. cerevisiae*の中でも、清酒醸造における酒母やもろみでよく生育・発酵し、良質の清酒を醸し出す性質を持つ酵母として選抜されつづけ、遺伝的に固定された一群である。近年、嗜好の多様化や高級化に応じて、多種多様な清酒酵母の研究や開発が各方面で活発に行われている。ここでは、清酒酵母に関する最近の話題の中から幾つかを採り上げて、その研究動向と現状を紹介する。

## 2. 純粋培養した清酒酵母の頒布

製成酒の酒質には用いる清酒酵母の性質が大きく反映する。したがって、優良清酒酵母の育種・選抜と全国各地の酒造メーカーへの頒布の歴史は古く、日本醸造協会の前身である醸造協会によって1906年（明治39年）から「きょうかい酵母」として号数を付けて始められ、現在までにその数は15号に至っている。本年中に16、17号（以下、きょうかい酵母をK-に番号を付けて表示する）が新たに加わる予定である。ただし、「泡なし株」（後の項で説明）は号数の末尾に01を付けて「泡あり株」と区別されており、K-16、K-17はいず

ISHIKAWA Takeaki

〒114-0023 東京都北区滝野川2-6-30

れも泡なし株なので、それぞれK-1601、K-1701となる。K-15も現在頒布されているのはK-1501である。最近では各県の工業技術センターや大手企業でも独自の清酒酵母の育種と実用化が行われている。なお、分子遺伝学的手法を用いる育種も各方面で研究されているが、食品としての安全性を保証するためのガイドラインが現在のところ確立されておらず、遺伝子組換えにより造成された清酒酵母は実用化されていない。

## 3. 分類学的にみた清酒酵母

清酒酵母が*S. cerevisiae*に分類されることは前にもふれたが、*S. cerevisiae*とは異なる性質も多く、別の種であり、*S. sake*として独立させるべきとの意見がある<sup>8)</sup>。DNAの多型をAFLP（Amplified Fragment Length Polymorphism）法により解析した結果<sup>9)</sup>によると、図に示すように、*Saccharomyces*属の中では**bayanus**や**pastorianus**、**paradoxus**に比べると**cerevisiae**種に属するといえるが、*cerevisiae*の中で、清酒酵母はパン酵母やワイン酵母、ビール酵母とは明らかに異なるクラスターをつくる。清酒酵母に近いのは焼酎酵母である。また、きょうかい酵母の中でも、K-7、K-9、K-10など（図のK-7 group）はかなり似ており、K-6やK-11はそれらよりやや距離をおく。一方、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法によると、K-10はVとXI番染色体との間にさらに1本のバンドが見ら





## 5. 芳香エステル高生産酵母

最初にもふれたように、嗜好の多様化や高級化に応じて、主な芳香（吟醸香）成分である酢酸イソアミルやカブロン酸エチルを高生産する清酒酵母が多数育種された。これらの芳香成分を高生産させるためには、前駆体であるイソアミルアルコールやカブロン酸生成における負の制御機構を解除する必要がある。ロイシンのアナログである5,5,5-trifluoro-DL-leucineや脂肪酸合成系を阻害するセルレニンに対する耐性株を取得し、さらにこれらの中からエステル高生産株を選抜する手法が採られる。ところで酢酸イソアミルは、酵母細胞内でアセチルCoAのアセチル基をイソアミルアルコールに転移する反応により生成されるが、この反応に関与する酵素がアルコールアセチルトランスフェラーゼ (AATase) である<sup>21)</sup>。AATase活性は通気や不飽和脂肪酸により1/5に減少するが、AATaseをコードする遺伝子*ATFI*は酸素や不飽和脂肪酸によって転写が抑制され、窒素源により転写が活性化される。さらに脂肪酸の不飽和化遺伝子*OLE1*との協調的な調節機構が明らかにされたことから、*ATFI*は芳香成分の生成の他に、酵母細胞の脂質代謝にも重要な生理的役割があると推察されている<sup>22)</sup>。

芳香エステル高生産酵母の実用化は、それまで経験と勘に頼るだけであった不安定な吟醸香の発現を確実にし、馥郁とした吟醸酒の普及に大きく貢献した。

## 6. 酵母のアルコール耐性

酒類醸造に用いられる酵母や細菌 (*Zymomonas mobilis*) には高いアルコール耐性がある。特に清酒酵母は20% (v/v) 前後までアルコール発酵を続ける。清酒の中で増殖し、清酒の香味を劣化させる「火落ち」の原因微生物である火落菌 (*Lactobacillus homiochii*や*L. fructivorans*) も高いアルコール耐性を有する。清酒酵母において、アルコール存在下やアルコール耐性の特に高い菌株で

特異的に発現している遺伝子群が明らかにされた<sup>23)</sup>。すなわち、種々のストレスで誘導発現される遺伝子、*GPD1* (浸透圧)、*CTT1* (酸化)、*HSP12* (熱ショック) と*YER150w* (細胞壁タンパク質の一つ) である。ほかに*ELG6* (エルゴステロール合成系の一つ) の関与もある。酵母細胞にとってアルコールはストレスであり、これらを高発現させてアルコール耐性を獲得していると推察されるが、その詳しい機作は不明であり、多くの興味ある課題を残している。その一つは、酵母細胞内からのアルコールの排出は能動的なものか、単純拡散によるものかということである。アルコールを細胞外へ能動輸送する証拠はなく、細胞内から濃度勾配に逆らって輸送しないとの報告がある。単純拡散なら、もろみ末期の酵母細胞内アルコール濃度は20%に近いことになり、これまた驚異であるが、解糖系-アルコール発酵に関わる酵素群の活性を阻害するアルコール濃度はかなり高い<sup>24)</sup>ので、増殖を伴わない状態では、細胞内のアルコール濃度が仮に20%でも発酵は可能であろう。一方、酵母が高アルコール環境に順応するために、細胞膜脂質における飽和脂肪酸やエルゴステロール (*Zymomonas mobilis*では同機能をもつポパンテロール) を増加させて膜流動性を小さくし、補酵素など各成分の漏出防止のためのバリアを築くという証拠が得られている<sup>25)</sup>。このようなバリア構築は、もろみ末期まで順調な発酵が持続する生醗造りにおいて特に顕著であること<sup>26)</sup>は興味ぶかい。

## 7. おわりに

ここでは、清酒酵母を中心に興味ある幾つかの話題に限って紹介した。酒造りの現場から眺めると、清酒酵母をはじめ酒造りには、まだまだ多くの魅力ある研究テーマが残されており、今後の研究の進展と美味しいお酒が醸し出されることを期待したい。

文 献

- 1) Azumi, M. and Goto-Yamamoto, N. (2001), *Yeast*, in press.
- 2) 石川雄章ら (1984), 醸協, 79(1), 62-66
- 3) Miller, D. G. et al. (1982), *Biotechnol. Lett.*, 4, 601-606
- 4) 溝口晴彦 (1997), 醸協, 92(2), 86-95
- 5) 小川義明 (2001), バイオサイエンスとインダストリー, 59(1), 37-38
- 6) Ouchi, K. and Akiyama, H. (1971), *Agric. Biol. Chem.*, 35, 1924-1029
- 7) 下飯 仁 (1999), 生物工学, 77, 67-69
- 8) 竹田正久 (2001), 温故知新, No.38, 1-16
- 9) 善本裕之ら (2001), 生物工学, 79(2), 33-40

## ◀国内情報▶

## アーミング酵母によるバイオマス からのバイオエタノール生産 ～バイオ燃料実用化に道～

<sup>1</sup>神戸大学工学部応用化学科 <sup>2</sup>神戸大学大学院自然科学研究科

近藤 昭彦<sup>1</sup>・福田 秀樹<sup>2</sup>

酵母の細胞表層にアミラーゼやセルラーゼをディスプレイした“アーミング酵母”は、細胞表層でデンプンやセルロースをグルコースに分解できるため、酵母は直ちにこれを取り込み、代謝系によってエタノールまで変換できる。このアーミング酵母を活用したバイオマスからのエタノール（バイオエタノール）製造プロセスの開発から、バイオ燃料実用化への道が見えてきた。

### 1. はじめに

バイオマスは生成過程で多くのCO<sub>2</sub>を吸収してくれるため、これを資源に利用して、生体触媒を使って各種の化学品や燃料を生産すれば、CO<sub>2</sub>を無限循環でき、地球温暖化を防ぐのに貢献する。バイオマスは、大きく言って、森林などに貯えられる木質系バイオマス（セルロース系）と穀物由来の糖質系バイオマス（デンプン系）にわけられる。木質系バイオマスだけでも、その生産量は年間約800億トン程度と見積もられ、人類の年間消費化石エネルギーの7～8倍と言われる。アメリカでは、クリントン政権時代、バイオマス研究を国家戦略に位置付け、2010年にエネルギーと化学品の10%をバイオマス由来に転換することを目指すという。この様なバイオマスの燃料や化学原料への変換と、その利用が本格化すれば、ポスト石油化学に向けた大きな弾みとなるだろう。バイオマス変換の要となる技術の一つが、バイオマスからのエタノール製造である。バイオマスから発酵法により製造されるエタノールはバイオエタノールとよばれる。バイオエタノールは多様な液体燃料として利用できるとともに、多くの基幹化学品の出発原料となる。アメリカでは現在、コーンデンプン原料より、年間500万<sup>トン</sup>以上のバイオエタノールが生産され、ガソリンに10%程度混合して自動車用の燃料に利用され

ている。これは、遺伝子組換え作物の普及から穀物の生産性が大幅に向上したことにより、余剰生産物のバイオエタノールへの大規模な変換が可能となったことによる。また、穀物価格の安定の面からも重要な用途となつつある。バイオエタノール需要は今後急速に拡大するとみられる。需要を満たすために、将来的（2010年頃）にはセルロース系バイオマスの大幅導入が不可欠であるが、当面はデンプン系バイオマスからのバイオエタノール生産が中心になると考えられる。

バイオエタノール普及における最大の問題は、その製造コストである。アメリカでは現在、税制等の優遇措置によって何とか成立しているものの、経済的に成立するコストでバイオエタノール生産を行うには、革新的な技術開発が不可欠である。エネルギーや資源を海外に依存せざるを得ない日本にとって、経済的に成立するバイオエタノール生産技術を開発して、国内のみならず、アメリカ、ブラジル、東南アジア諸国等のバイオマス資源の豊富な地域に供与していくことが、ポスト石油化学時代において、新しいエネルギー・資源供給体制を切り開くとともに、世界規模でのCO<sub>2</sub>排出量の削減に貢献する上で重要であると言える。ここでは、我々の取り組んでいるアーミング酵母を活用した革新的なバイオマスからのバイオエタノール生産技術の開発について紹介したい。

KONDO Akihiko, FUKUDA Hideki

〒657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1

2. 従来のデンプン原料からの  
バイオエタノール生産法

従来法でのデンプン系バイオマスからのバイオエタノール生産においては、まず、穀物を破碎して得られる固体粉末のデンプン原料を水に懸たくしたスラリー（生デンプン）に液化型の $\alpha$ -アミラーゼを加えて液化を行う。これを140~180℃程度の高温で処理（蒸煮処理という）することで、デンプンを溶解させるとともに原料に含まれる細菌の殺菌を行う。その後、グルコアミラーゼを加えて糖化することでグルコースとして、酵母にエタノール発酵させる。この方法では、蒸煮処理が大量のエネルギーを消費する（アルコール製造に必要な総エネルギーの20~30%程度）ことが、大きな問題であった。そこで、蒸煮

処理を省いて、酵素による液化・糖化を行いながら酵母によりエタノール発酵を行う無蒸煮プロセスの開発が行われた<sup>1)</sup>。このプロセスでは、生デンプンの液化・糖化力に優れた酵素を用い、かつ糖化速度を調節して発酵液中のグルコース濃度を抑えて細菌の増殖を防ぐことで、無蒸煮発酵に成功している。無蒸煮化によってバイオエタノール生産の省エネルギー化、コスト削減には成功したが、酵素コストが製造に占める比率が大きいため、製造コストを劇的に低減させるにはいたらなかった。この点を解決するためには、酵母にデンプン分解力を付与することが不可欠である。酵母にアミラーゼを分泌生産させて、デンプン分解力を与えようとする試みは従来よりなされてきたが、分泌量が少なく十分な成果を得ることができなかった。そこで、我々

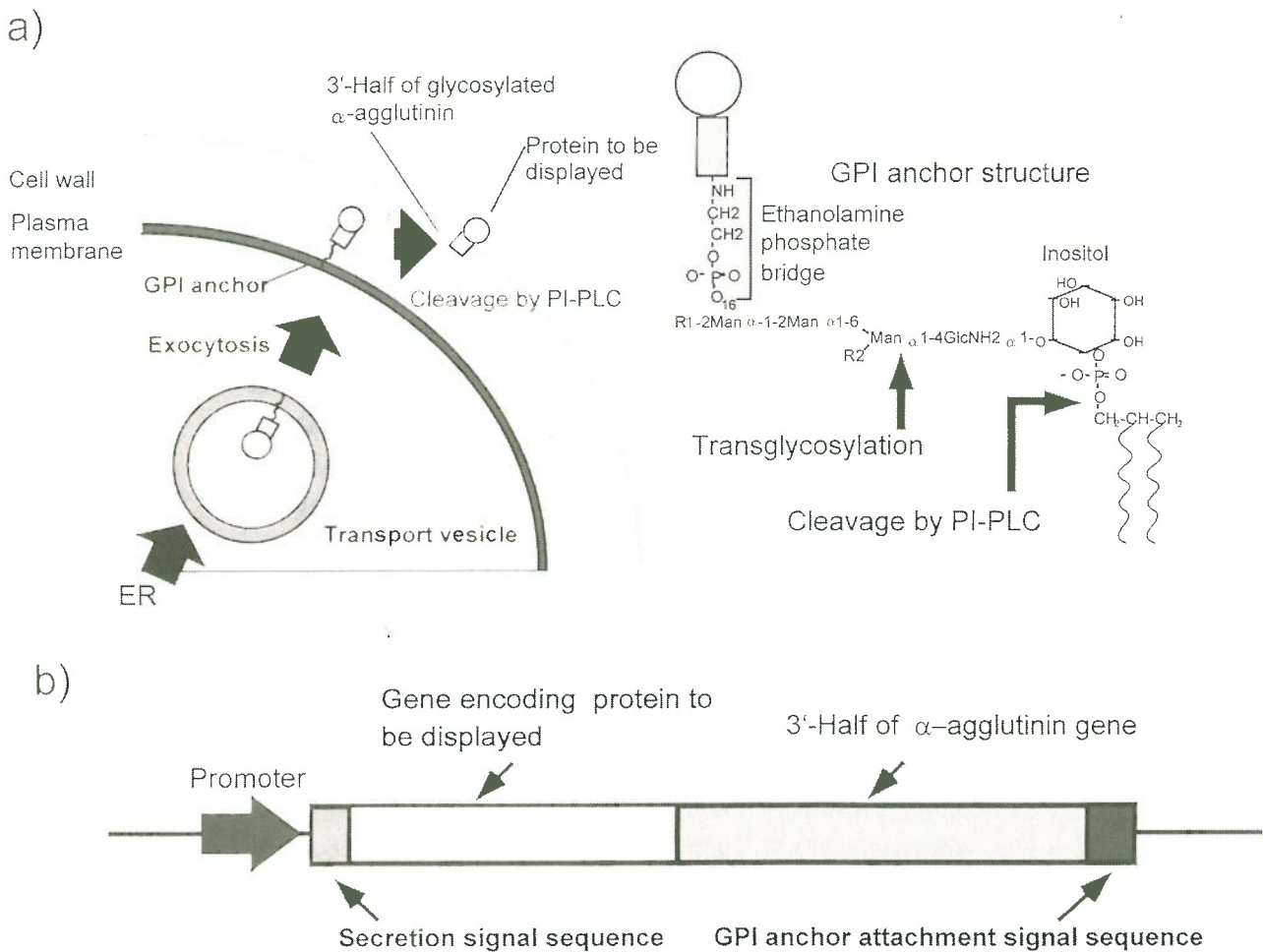


図1  $\alpha$ -アグクチニンのC-末端半分を利用した機能性タンパク質の細胞表面ディスプレイシステム  
(a) 細胞表面への輸送メカニズム, (b) 細胞表面ディスプレイのための分子デザイン



は以下に述べる細胞表層工学の手法により、酵母の細胞表層にアミラーゼを集積させた“アーミング酵母”を創製することで、デンプンから直接バイオエタノールを生産するプロセスの開発を行っている。

### 3. 細胞表層工学による アーミング酵母の創製

細胞表層（細胞壁，細胞膜）は細胞の構造や形態を維持するだけでなく，物質の認識やシグナルの伝達，酵素反応などの場として重要な役割を果たしている。この細胞表層に種々の機能性タンパク質やペプチドをディスプレイして，新しい機能を持った細胞を創製することが活発に行われ，細胞表層工学として展開してきている<sup>2-5)</sup>。特に酵母を使った細胞表層ディスプレイ系は，酵母が遺伝的解析の進んだ真核細胞であり，安全性が高く，堅牢な細胞壁構造を持つこと等，利点が多い。

各種機能性タンパク質の酵母細胞表層ディスプレイは，GPI（グリコシルフォスファチジルイノシトール）アンカーを介して細胞壁グルカン層に共有結合している表層タンパク質（ $\alpha$ および $\alpha$ -アグルチニン，Flo1p，Cwp1p，Tip1p，Tir1p，Sed1p等が代表的）のC-末端領域に，目的タンパク質を融合して発現させることで行われる（図1）。筆者らは主に性凝集タンパク質 $\alpha$ -アグルチニンのN-末端側の320残基をディスプレイの足場として，多彩な機能性分子（ペプチドから分子量が100 kDa以上のタンパク質まで）を細胞一つあたり $10^4$  -  $10^6$ 個程度ディスプレイすることに成功している<sup>6, 7)</sup>。この様に細胞表層工学の手法を用いることで，機能性タンパク質を酵母細胞表層に高密度に集積したアーミング酵母を創製することができる。細胞表層工学は，世界的に見ても日本がリードする分野であり，その展開が期待されている。

### 4. アーミング酵母によるデンプン系 バイオマスからのバイオエタノール生産

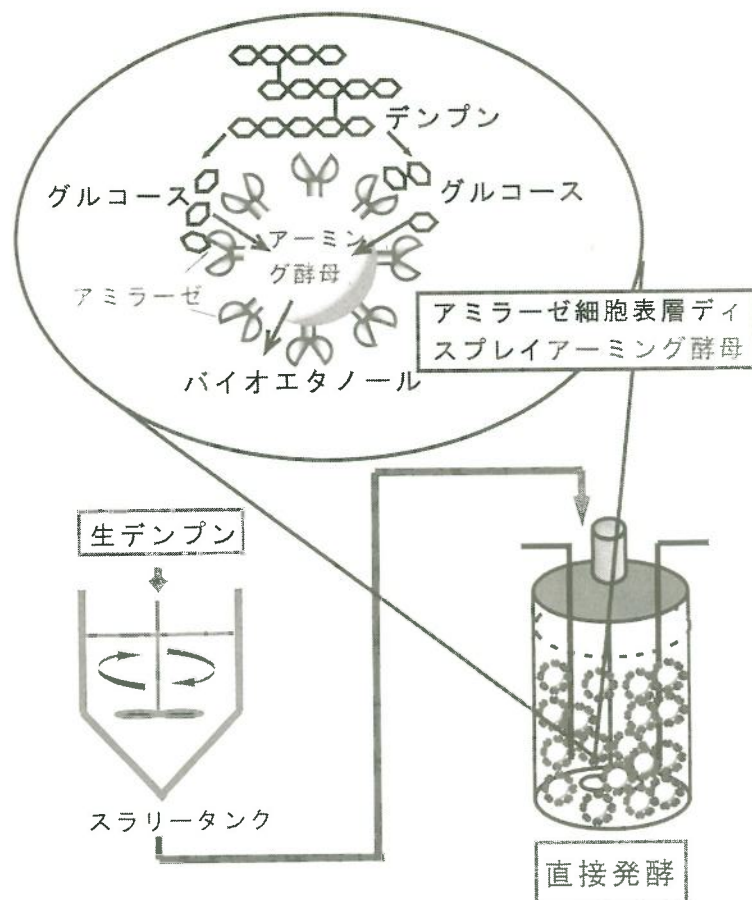


図2 アーミング酵母を活用した生デンプンからの無蒸煮・直接バイオエタノール生産プロセス

図2に示す様に，アミラーゼを細胞表層工学の手法でディスプレイした新機能酵母（アーミング酵母）を創製すれば，デンプンから直接バイオエタノール生産できると考えられる<sup>8-10)</sup>。すなわち，細胞表層に集積されたアミラーゼによりデンプンはグルコースまで分解され，直ちに酵母に取り込まれて，代謝系によりエタノールに変換される。今回は，その第一歩として可溶性デンプンからの発酵実験を行ったが，最終的には図2に示す様に，生デンプンから直接アーミング酵母によるバイオエタノール生産プロセスを確立することを目指している。そこで，まず糸状菌*Rhizopus oryzae*グルコアミラーゼを $\alpha$ -アグルチニンと融合させた形で発現するプラスミドを構築し，凝集性酵母*S. diastaticus* YF207の細胞表層にグルコアミラーゼをディスプレイさせた<sup>9, 10)</sup>。この凝集性アーミング酵母を，

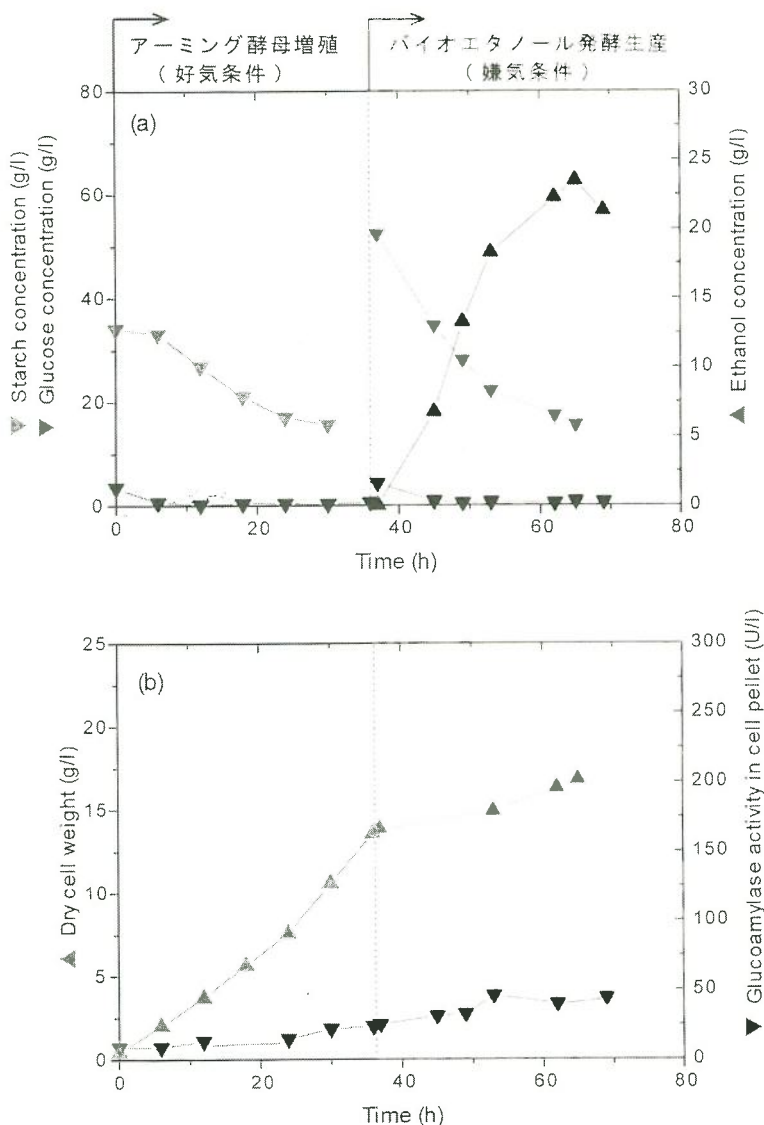


図3 グルコアミラーゼを細胞表層ディスプレイしたアーミング酵母による可溶性デンプンからの直接バイオエタノール生産  
破線左側は好気条件でのアーミング酵母の増殖、破線の位置で増殖した酵母を集菌して新鮮なデンプン培地に移し、破線右側は嫌気条件でのエタノール発酵

可溶性デンプンを炭素源とする培地（デンプン培地）を用いて好気条件下で生育させた後、菌体を集めて（グルコアミラーゼは菌体上に結合しているため、同時に回収できる）新鮮なデンプン培地中に懸濁して嫌気条件下でエタノール発酵を行った。図3に示す様に、アーミング酵母は好氣的な条件で、デンプンを利用して迅速に生育し、嫌氣的な発酵条件に移すと、効率よくバイオエタノールを生産した。凝集性アーミング酵母によるデンプンか

らのバイオエタノール生産速度は、過去に報告されてきたものを凌駕した。図中には、培養および発酵時の培地中のグルコース濃度を併せて示すが、濃度はほぼゼロに近いことが分かる。酵母細胞表層に高密度に集積されたアミラーゼによってデンプンから生成するグルコースは、直ちに酵母に取り込まれるため、効率よく発酵が進むものと言える。この点は雑菌汚染を防ぐ観点からも好ましいと考えられる。また、アーミング酵母菌体は長期間にわたるデンプンからのエタノール発酵にも、安定に繰り返し利用できた<sup>10)</sup>。ここで、デンプンからのバイオエタノールの収率は、50～60% (g/g) 程度の高い値であった。

この様にアーミング酵母の有用性が明らかとなり、バイオエタノール実用化への道が見えてきたと言える。今後、生デンプン分解能力のより強力なアミラーゼを創製し、これをより高密度に細胞表層に集積していくことで、図2に示した生デンプンからの直接発酵プロセスの実用化を目指す。

## 5. アーミング酵母によるセルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産

セルロースは結晶領域と非結晶領域をもった強い繊維であり、さらに古紙や木材チップ等の実際のセルロース資源はリグニンやヘミセルロースとの複合体である。したがって、セルロース変換技術は、デンプンの場合とはまったく異なる研究開発であり、効率的な利用には検討すべき課題が多い。アメリカでも国立再生可能エネルギー研究所 (NREL) やベンチャー企業を中心として、実用化にむけた長期的な研究開発が続けられている。

純粋なセルロースにおいても、その分解には複数の酵素の関与が必要である (図4a)。まずエンド型セルラーゼであるエンドグルカナーゼが非結晶領域を分解し、生じた末端からエキソ型セルラーゼであるエキソセロビオヒドラーゼが結晶領域を分解する。さらに両セルラーゼの相乗作用で、セルロースはセ

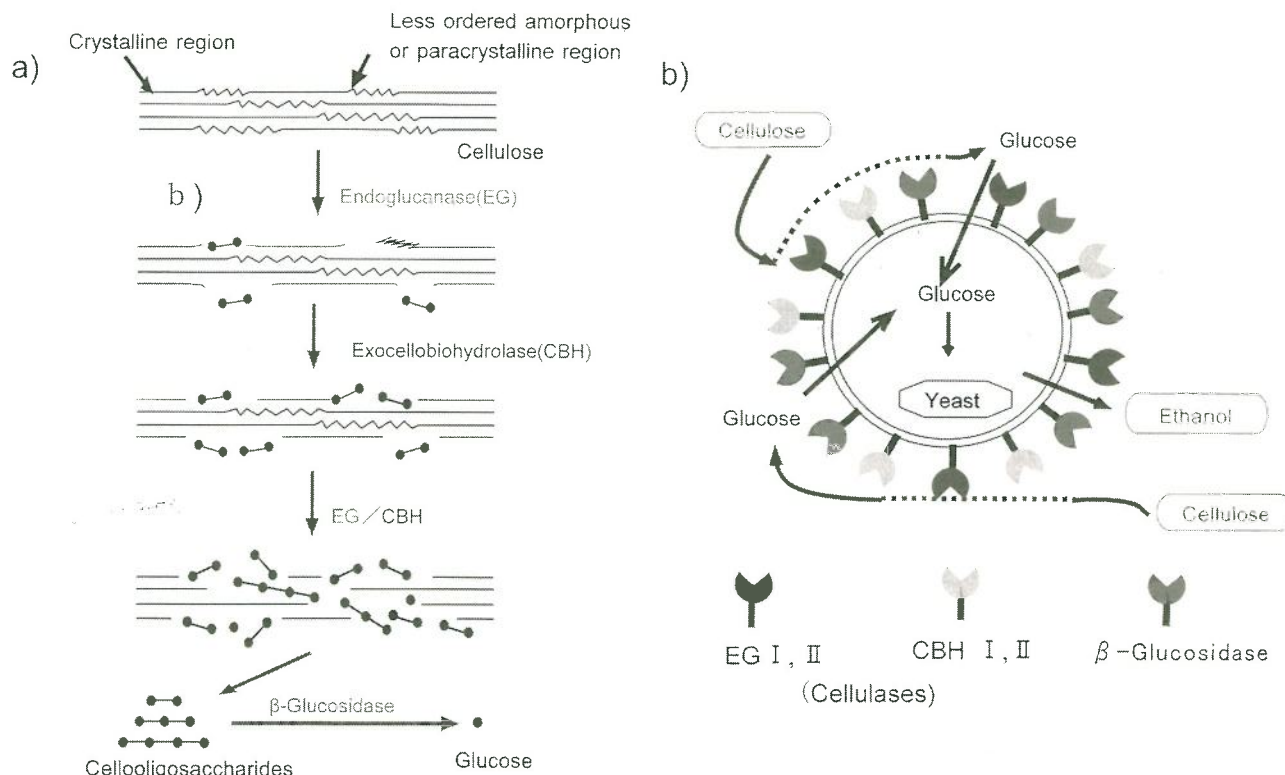


図4 セルロースの酵素による分解 (a) およびセルラーゼを細胞表面ディスプレイしたアーミング酵母によるセルロースのバイオエタノールへの変換 (b)

ロピオースを主生成物とする可溶性のセルオリゴ糖にまで分解された後、 $\beta$ -グルコシダーゼによってグルコースへと変換される。したがって、各種セルロース資源から直接バイオエタノール生産できる酵母を創製するには、いくつかのセルラーゼを細胞表面にディスプレイして集積する必要がある (図4b)。筆者らは、まず細胞表面にエンドグルカナーゼと $\beta$ -グルコシダーゼとを、 $\alpha$ -アグルチニンを用いてディスプレイすることを試みた<sup>11)</sup>。両酵素の細胞表面へのディスプレイがプレートアッセイで確認できたため、大麦 $\beta$ -グルカン (可溶性のセルロース繊維) を唯一の炭素源として発酵実験を行ったところ、効率よくバイオエタノールの生産を行えることが確認された<sup>12)</sup>。これは、酵母によるセルロース原料からの直接エタノール発酵としては、世界初の成果である。また、細胞表面に複数の酵素を集積して協同的に作用できることを示せた点でも、大きな一歩となった。

古紙や木材チップ等のセルロース資源から

のバイオエタノール生産を考えた場合、アーミング酵母単独では実用的なバイオエタノール生産速度を達成することは難しい。より強力なセルロース分解アーミング酵母を創製し、有効な物理化学的な前処理を組み合わせた総合的なプロセス開発が鍵となるとは言え、今後、実用化に向けた重点的かつ組織的な研究開発が必要である。また、古紙や木材チップを対象とするコア技術開発に加え、ローカルで多彩な廃棄セルロース資源に対応した技術開発も、実用的なプロセスを確立していく上では重要である。

## 6. おわりに～アーミング酵母によるグリーンバイオイノベーション～

以上、バイオマスからのバイオエタノール生産に向けたアーミング酵母を活用した革新的な技術開発について紹介した。多彩な酵素を細胞表面ディスプレイしたアーミング酵母は、そのまま多彩な生体触媒として利用でき

る。細胞内酵素の利用と異なり、酵素の基質や生成物が細胞壁を拡散する必要がなくなるため、酵素の反応性を最大限に引き出せる。さらに細胞内には拡散できない高分子や固形物も基質にできる。また、細胞表層にディスプレイした酵素と、細胞内の代謝系や細胞内に発現させた別の酵素との反応を組み合わせれば、多段階からなる複雑な触媒反応を行える。この考えを推し進めれば、一つ一つの細胞を工場的に機能させうる（細胞工場）と期待される。多彩な酵素を表層ディスプレイしたアーミング酵母の開発が進められていることから、化学工業生産におけるファイン製品や基幹化学品製造のバイオプロセスへの転換を大きく促進するものと期待される。アーミング酵母は、グリーンバイオイノベーションの要となる、“経済的にも成立可能な生体触媒”の創製において、切り札の一つとなると期待される。

### 謝 辞

本研究は京都大学大学院工学研究科の田中渥夫教授、植田充美助教授、長岡科学技術大学の森川康教授、岡田宏文助教授、大阪府立大学の荒井基夫教授、川口剛司助教授を始めとする多くのグループとの共同研究の成果で

ある。ここに深く御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) 松元信也ら (1985), 日本農芸化学会誌, 59, 291-299
- 2) Ueda, M., Tanaka, A. (2000), J. Biosci. Bioeng., 90, 125-136
- 3) 近藤昭彦, 植田充美 (2001), 遺伝子医学, 5, 299-304
- 4) 植田充美, 田中渥夫 (2001), バイオインダストリー, 6, 49-55
- 5) 藤田靖也ほか (2001), バイオインダストリー, 6, 56-63
- 6) Shibasaki, S. et al. (2001), Appl. Microbiol. Biotechnol., 55, 471-475
- 7) Nakamura, Y. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., in press
- 8) Murai, T. et al. (1997), Appl. Environ. Microbiol., 63, 1362-1366
- 9) 茂地寿頼ほか (2001), 化学工学会66年会, O206
- 10) Kondo, A. et al., submitted
- 11) Murai, T. et al. (1997), Appl. Environ. Microbiol., 64, 4857-4861
- 12) 藤田靖也ほか (2001), 化学工学会66年会, O204 (2001)



## ◀国内情報▶

## 酵母によるサイレージの変敗を 「キラー」酵母で防止する

独立行政法人農業生物資源研究所  
北 本 宏 子

私たちにとって役に立つ酵母と迷惑な酵母がいる。サイロ内で牧草を乳酸発酵させた飼料である「サイレージ」は、密閉が悪いと酵母によって変敗してしまい大きな問題となっている。そこで、酵母を選択的に殺すタンパク質を生産する「キラー酵母」を使って、サイレージ発酵中に変敗酵母の数を減らし変敗を防止する技術を初めて開発した。

### 1. はじめに

牧草を生のままサイロ内で嫌気乳酸発酵させたサイレージは「無塩漬け物」のようなもので、「嫌気」と「酸性」を維持すれば保存性が高い飼料である。牧草収穫時に雨の多い日本では人気が高く、現在酪農家が用いる自給飼料の7割を占めているが、そのうち約2割がサイロの密閉が不完全だったり、給餌のために開封した後、好気的に変敗しているといわれる。

この変敗は、草に付着していた野生酵母がサイレージ中の乳酸を好気的に消費した結果、サイレージのpHが上昇することに起因し、最終的に細菌が増殖して変敗してしまう。

変敗したサイレージは栄養価と嗜好性、安全性が低いために廃棄されており、有効かつ安価で安全性が高い変敗防止技術の開発が望

まれている。好気的変敗抑制を目的としたサイレージ添加剤として、プロピオン酸や蟻酸のアンモニウム塩や乳酸菌製剤が販売されている。しかし、いずれの方法も酵母の種類によって効果の差があるだけでなく、有機酸製剤は微生物製剤よりコストが3～4倍高い。

こういった状況下、筆者らは微生物によるサイレージ発酵の制御に主眼を置き、サイレージ調製時にキラー酵母を添加してサイロ内で変敗酵母の数を減らし、酵母によるサイレージの変敗を遅延する方法を考案した(図1)。

### 2. サイレージ中の酵母

サイレージ調製中に出現する酵母は発酵能と乳酸消費能で3種類に分けられる(図2)<sup>4,5)</sup>。牧草に付着している酵母(タイプI)は、発酵能が無いものが主体でサイロ内で速やかに

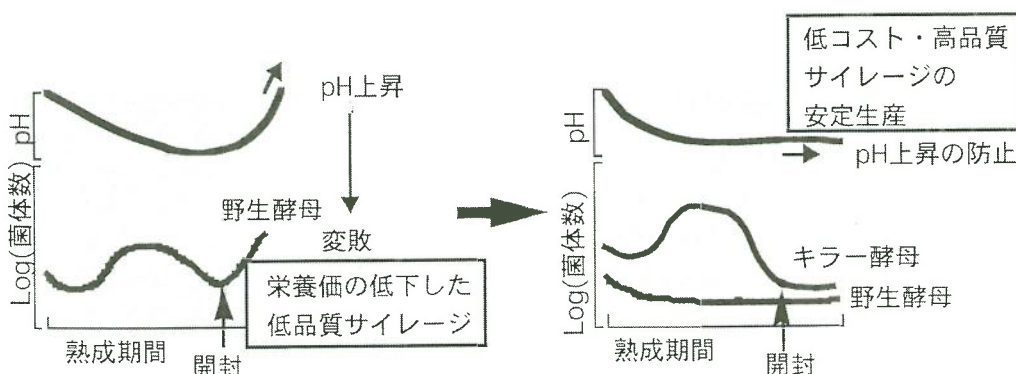
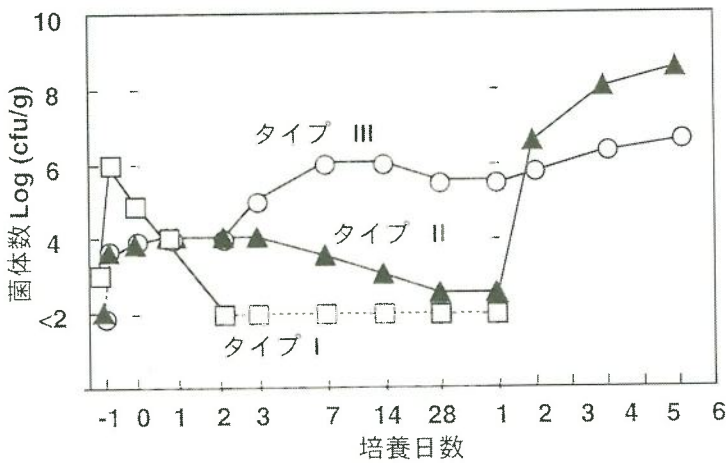


図1 キラー酵母によるサイレージ好気的変敗の防止法

K. KITAMOTO Hiroko

〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2



	発酵能	乳酸消費能
タイプ I	-	+,-
タイプ II	+	++
タイプ III	++	+,-

図2 予乾・サイレージ発酵・開封後の酵母の動向

いなくなる。サイレージ中に見いだされる酵母は、発酵能が高く乳酸消費能があまり高くないタイプⅢと、発酵能は低い乳酸消費能が高いタイプⅡがある。前者はサイロ内で数が多いが、開封後の増殖は遅い。後者はサイロ内で数が少ないものの、開封後乳酸を消費して急増殖することから、タイプⅡの酵母が好気的変敗の主な原因と考えられる。

### 3. キラー酵母で変敗抑制できるか？

清酒やワイン醸造中に、材料から持ち込まれた好ましくない酵母が優良酵母のかわりに増える現象が見られた。解析された結果、変敗酵母が他の酵母を殺すようなタンパク質を生産して他の酵母に比べて優位に立つことがわかり、殺す側の酵母を「キラー酵母」、生産するタンパク質を「キラータンパク質」と呼んだ。キラー遺伝子を持った酵母はそのキラータンパク質に免疫を持つため、優良醸造酵母にキラー遺伝子を付与して、発酵を順調に進める方法が開発された<sup>1)</sup>。

サイレージも清酒やワインもろみと同様に乳酸菌が増殖したのち酵母が生育してくる。液体と固体では状況が異なるが、キラー酵母を添加してサイレージの変敗野生酵母の数を減らせるのではないかとこの観点から我々は研究に着手した。

### 4. サイレージ発酵モデル系の構築

サイレージ発酵の研究を進める上で、材料草の物理化学的性質と付着微生物相が常に異なるために、再現性の高い結果を得るのが困難である。そこで、共同研究者らによりサイレージ発酵をモデル化した実験系の構築が検討された<sup>6)</sup>。密閉性の高いプラスチック製の袋に滅菌した材料草の乾燥粉末を入れ、糖、水、乳酸菌およびそのほかの検討すべき微生物を添加し、吸引密閉後培養する系が考案され、サイレージ添加用微生物の開発が可能になった。

### 5. キラー酵母の検索

サイレージの変敗に関わるタイプⅡの野生酵母を広範囲で抑制するキラー酵母を検索した結果、*Kluyveromyces lactis* IFO1267株が選抜された。この酵母は、他の酵母がほとんど利用できない乳糖を利用できる。サイレージ調製の時に乳酸菌活性化のために糖を添加することがあるが、グルコースのかわりに乳糖を加えると、サイレージ発酵モデル系で高い抗菌活性が得られた。

*K. lactis*は安全性の高い酵母として海外の食品産業で使われている。牛乳からチーズを生産した残りのホエーと呼ばれる廃液は乳糖が主成分であるが、ホエーから生産された*K. lactis*の菌体（キラー遺伝子欠損株）は安全性が高いタンパク質製剤としてアメリカ食品医薬品局（FDA）に認められている。また、*K. lactis*は異種タンパク質分泌能力が高いため、組換えチーズ凝乳酵素（牛キモシン）生産も実用化されている。ホエーをキラー*K. lactis*菌体生産とサイレージ添加剤に利用す

れば、酪農地域での未利用資源の再利用と飼料の安定生産が可能になると考えた。

ところが、*K. lactis*そのものが乳酸を消費する能力が高かったため、変敗の原因になる可能性があり、添加剤として用いるには乳酸で生育しないキラ酵母の育種が必要となった。

## 6. 遺伝子組換えによる キラ酵母の作出

先に選抜されたキラ酵母から、乳酸を消費する能力を下げた株を育種した。酵母が乳酸を利用して増殖するときには、糖新生系（解糖系の逆反応）で糖を再合成する。そのため糖新生系の鍵となる酵素（ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ）の遺伝子欠損株は乳酸などの非糖質系炭素源で増殖できない。*K. lactis*酵母の鍵酵素遺伝子（*KIPCK1*）を単離し、この遺伝子を試験管内で破壊したのち酵母に戻すと、染色体上の同遺伝子と壊れた遺伝子が相同組換えを起こして、鍵酵素遺伝子が壊れた染色体を持つキ

ラ酵母が作成された。遺伝子破壊を遺伝子レベル、酵素レベル、乳酸を炭素源として生育しない表現形として確認した。またこの株のキラ活性、糖を炭素源とした生育速度は親株と変わらず、遺伝子破壊は継代培養後も安定であった<sup>2)</sup>。

## 7. 組換えキラ酵母のサイレージ への添加効果

サイレージ発酵モデル系と、生の材料草を用いた実験室規模のサイレージ調製で、組換えキラ酵母の添加効果を調べた。材料草は、変敗を起こしやすいトウモロコシを用いた<sup>3)</sup>。

まずモデル系において、組換え体は親株と異なり、サイロ開封後も乳酸を消費しないことが確認された。また、組換え体と変敗酵母の代表である *Pichia anomala* を混合培養したところ、変敗酵母はキラ酵母添加によって明らかに増殖が抑制され（図3A）、乳酸と糖の消費も押さえられた。それでは、この抑制はキラ酵母がキラータンパク質を生産し

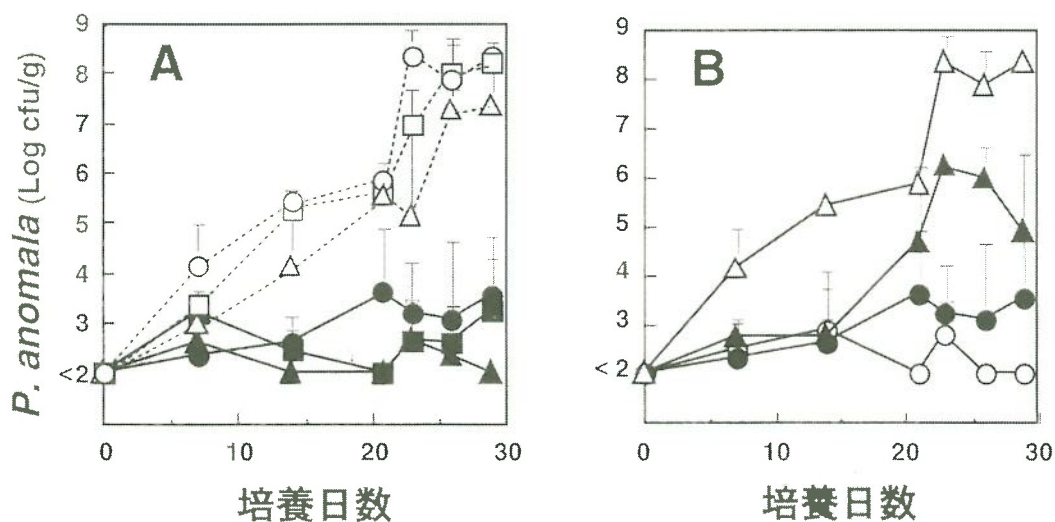


図3 変敗酵母 *P. anomala* の増殖に対する、キラ効果（サイレージモデル発酵系）

A. *P. anomala* 3株に対する添加効果

(●▲■)：キラ添加あり，(○△□)：キラ添加なし

B. 遺伝子保有株とキラ遺伝子欠損株の添加効果

キラ遺伝子欠損株添加 (▲)，キラ遺伝子保有・組換え株添加 (●)，キラ遺伝子保有親株添加 (○)，*K. lactis* 無添加 (△)

嫌気・好気培養は各々陰影と白抜きの部分で示した。

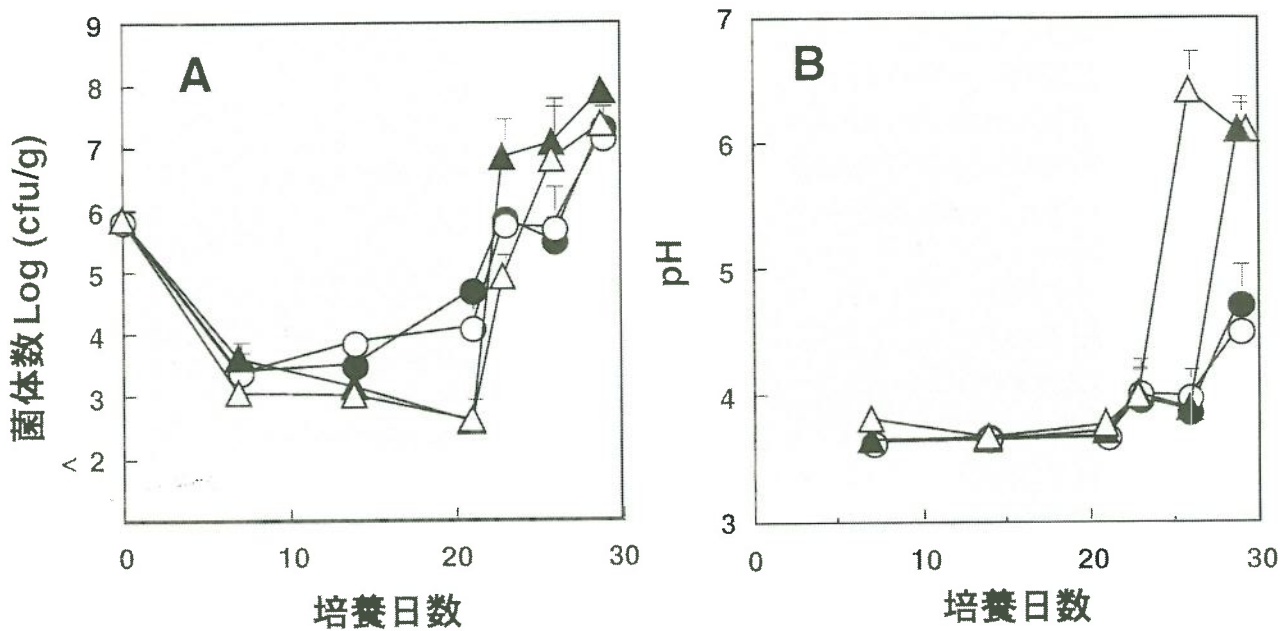


図4 実験室規模のサイレージ調製における組換えキラー酵母の添加効果

A: *K. lactis* 以外の乳酸資化性酵母, B: pHの変化

乳糖と組換え体添加(●), 乳糖と親株添加(○), 乳糖添加(▲), 無添加(△)のサイレージ嫌気・好気培養は各々陰影と白抜きの部分で示した。

たためか、キラー酵母と変敗酵母の栄養やスペースの取り合いによるためなのだろうか。これを調べるために、変敗酵母をキラー遺伝子欠損*K. lactis*と混合培養してみた。その結果、変敗酵母の増殖は、単独に培養したものに比べてキラー遺伝子欠損*K. lactis*を添加すると若干押えられた。一方、キラー*K. lactis*を添加した場合は明らかに強く抑制された(図3B)。このことから、キラー酵母がサイロ内でキラータンパク質を生産して、変敗酵母の増殖を抑制している可能性が示された。

最後に、生の材料草から調製したサイレージにキラー酵母を添加してみた。50gの切断した青刈りトウモロコシに乳糖とキラー酵母を添加して、モデル系と同様にバッグ内で培養し解析した。

キラー酵母は、サイレージ発酵初期に増殖した後消失し、組換え、親株に関わらず開封後キラー酵母自身による乳酸消費は無かった。それにもかかわらず、キラー酵母添加効果が確認された。すなわち、キラー酵母添加区では開封後の乳酸資化性酵母の増殖と、変

敗の指標であるpH上昇が明らかに遅延された(図4)。また、キラー酵母添加によりサイレージ中の酵母のフロラが変わった。キラー酵母を添加しない場合は、サイロ密閉中の酵母総数は少ないものの、開封後急増し、その増殖曲線は図2タイプII酵母のものに似ていた。また、開封後はほとんどの酵母が乳酸を利用できるものであった。一方、キラー酵母を添加した区では、サイレージ発酵後期に酵母総数が増えるが、開封後急増殖せず、その曲線は図2タイプIII酵母のものに近かった。さらに、開封後ほとんどの酵母が乳酸を利用できなかった。

キラー酵母はタイプIIの酵母に対して効果の高い株を選抜しているため、通常のサイレージでは変敗の原因となるタイプIIの酵母が主となるのに対し、キラー酵母を添加するとタイプIIの酵母が抑制されて、かわりに変敗に深く関与しないタイプIIIの酵母が増殖し、開封後乳酸消費能の低い酵母がゆっくり増殖したため、変敗が遅れたと推察された。また、キラー酵母の添加は、乳酸菌や細菌に対して



は大きな影響を与えなかった。

## 8. おわりに

サイレージ好気的変敗を防止する新しい方法として、乳酸消費能力を抑えた組換えキラー酵母を添加して、変敗酵母を抑制する方法を考案した。これをもとに、大量生産させた組換えキラータンパク質をサイレージ添加剤に用いる研究などが海外でも開始されている。サイレージは材料草の物理化学的性質や付着微生物数が変化するために、発酵制御は難しい。いままでの研究で、サイレージ添加用酵母として求められる能力が見えてきた。今後、セルフクロニングなど安全性を考慮した手法を取り入れつつ、材料草の条件に左右されないキラー酵母を開発し、農家が使いやすいサイレージ添加剤に改良する必要がある。

以上の研究は農業生物資源研究所、畜産草

地研究所および山梨大学の共同研究で行った。

## 文 献

- 1) 大内弘造 (1990) 酵母のニューバイオテクノロジー (秋山裕一監修), 47-72, 医学出版センター, 東京
- 2) Kitamoto, H. K. et al (1998) Biotechnol. Lett. 20, 725-728
- 3) Kitamoto, H. K. et al (1999) Appl. Environ. Microbiol. 65, 4697-4700
- 4) 佐々木博 (1972), 北海道大学農学部邦文紀要, 8, 188-251
- 5) McDonald, P. et al (1991) The biochemistry of silage. 2nd ed. 122-129, Chalcombe publications, Great Britain
- 6) Tanaka, O. et al (1994) Biosci. Biotech. Biochem. 58, 1412-1415



## 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▶

## 植物によるマウスモノクローナル抗体分子の発現

帯広畜産大学 原虫病研究センター

杉 本 千 尋

植物発現系は、環境低負荷かつ低コストの大量生産系で、「食べるワクチン」としての展開も可能であることから、医療用、獣医療用蛋白質などの生産系として着目されている。今回、食中毒原因ウイルスに対するマウスモノクローナル抗体遺伝子をタバコに導入し、発現させることに成功した。植物による抗体産生技術は今後診断薬、治療薬開発などへの展開が期待できる。

## 1. カリシウイルスとは

ヒトカリシウイルスは、冬季に多発するウイルス性食中毒や乳幼児のウイルス性胃腸炎の原因である<sup>1)</sup>。わが国では小型球形ウイルスとも呼ばれてきた。主に海産物（養殖牡蛎等）が原因となる本ウイルスによる食中毒が近年増加しつつあり、平成9年には食品衛生法改正によりヒトカリシウイルスを原因物質とする食中毒事件票による報告が義務づけられ、食中毒統計に集計されることとなった。ちなみに、2000年1～11月の厚生労働省統計では本ウイルスが原因と特定された例は197件、患者数6,392人で、これは食中毒全体の発生件数の約1/10、患者数の1/6を占める。カリシウイルスの感染経路は、主として海産物を介した感染で、ヒトにおいてはウイルス汚染を受けた海産物の摂取により感染する。あるいは患者の便に触れた手、指を介して伝播する。1～10個の感染ウイルス粒子の侵入で感染が成立するほど感染力は強い。また、本ウイルスの試験管内培養法や実験動物モデル感染系は確立されておらず、ウイルス検出に一般的に用いられる組織培養法やマウス等への接種によるウイルス検出、同定が行えないことも本ウイルス検出を困難にしている。

現在では、患者の診断には電子顕微鏡によるウイルス粒子検出が行えるが $10^6$ /ml以上のウイルス濃度が必要であり、検出感度は高く

SUGIMOTO Chihiro

〒080-8555 北海道帯広市稲田町西2線13番地

ない。また形態的にウイルス粒子が検出されてもヒトカリシウイルスと直ちに同定できるわけではない。原因食物中のウイルスはきわめて低濃度であるため、遺伝子増幅反応(PCR)によるウイルス検出が信頼できる唯一の検出法である。しかしこれらの方法の欠点は、判定結果を得るため時間がかかること、高額で特殊な検査装置（電子顕微鏡、遺伝子増幅検出装置）が必要であること、また検査法が複雑で熟練した技術者を要することである。従って、臨床検査現場あるいは食品加工、検査の現場からは、より簡易に実施しうる検査方法開発が切望されてきた。

ヒトカリシウイルスは主にポリメラーゼ遺伝子の塩基配列からGenogroup I (Norwalk-like virus), Genogroup II (Snow Mountain-like virus), Genogroup III (Sapporo-like virus) の3種の遺伝子型に分類されてきた。血清型を規定する構造蛋白質遺伝子に基づく分類でも、この3群に分類されるが、さらにGenogroup Iに4血清型、Genogroup IIに7血清型、Genogroup IIIに3血清型が存在すると考えられる。すでに本ウイルスに対してはモノクローナル抗体が作出されており、これらがウイルスの抗原型を決定するのに有効であることは報告されている。これらの抗体はウイルス外被蛋白質を認識するものであり、ウイルス血清型により抗体との反応性は異なる。

当研究グループでは、カリシウイルスに対するモノクローナル抗体を遺伝子組換え技術

により植物で大量発現させ、さらに植物体から精製した抗体を微生物モニタリング用バイオセンサーとして利用し、食品加工現場などで簡易に利用できる検査薬の実用化を目指している。特に組換え植物での外来タンパク質発現系は、エネルギー低消費型かつ低コストの物質生産技術として世界的に注目されており、このような視点から植物による革新的な物質生産技術を確立することをも意図している。

## 2. モノクローナル抗体遺伝子解析と植物発現

抗体はH鎖、L鎖の2分子がジスルフィド結合により共有結合することで完成分子となり、H鎖、L鎖中に各3箇所存在する抗原結合領域が空間的に正しく配置されることにより抗原との特異的結合性が発揮される。従って、抗原結合活性を持った抗体を組換え蛋白質として植物体で発現するためには、両鎖が

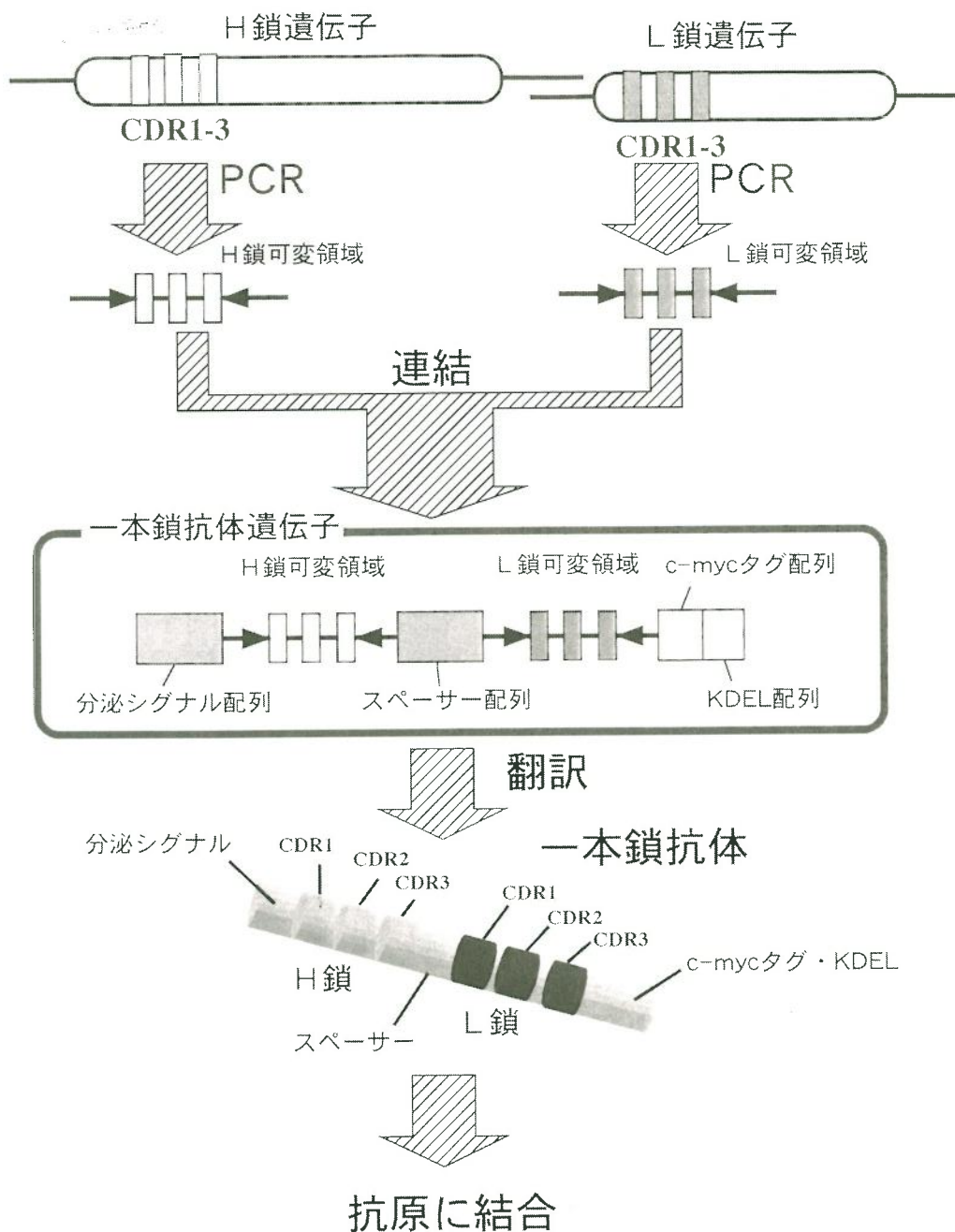


図 抗体遺伝子解析と植物発現用抗体遺伝子の構築

1 : 1 のモル比で会合し、かつ抗原結合部位の立体構造が正しく再現されなくてはならない。H鎖、L鎖を正しく会合させ、立体構造を正しく再現させるため、両鎖遺伝子をスペーサー配列を介して結合させ一本鎖遺伝子として合成した構築物を各種遺伝子発現系に導入し、H鎖、L鎖を融合蛋白質（一本鎖抗体）として発現させる技術は、抗原結合活性を持った抗体分子の作製に有効であることが知られている。

本研究では、抗カリシウイルスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマからmRNAを精製、cDNAを合成した。これを鋳型にマウス抗体遺伝子の保存領域をプライマーとしてPCRを行い、H鎖遺伝子とL鎖遺伝子をクローニングした。それらの塩基配列を決定し、それぞれの抗原結合部位（CDRI-3）の存在を確認した。その塩基配列を解析、得られた遺伝子情報に基づいて、必要な遺伝子改変、人工合成を行い、植物発現に至適化された構築物を作り出した。すなわち、H鎖/L鎖遺伝子間にリンカーを結合させ、一本鎖として発現できるよう遺伝子構築を行った。一本鎖化同時にN-末端側に分泌シグナル、C末端側にER保持シグナル（KDEL）および検出、精製用タグ配列（cMyc）を付加した。これをバキュロウイルスベクター系で発現させ、目的産物の合成を確認した。バキュロウイルスベクター系で発現させた一本鎖抗体とバキュロウイルス発現カリシウイルス蛋白質を用いた酵素抗体法で試験したところ、一本鎖抗体の抗原結合活性が確認できた。方法の概略は図に示した通りである。

ついで、カリシウイルス抗原遺伝子および単離された抗体遺伝子構造を解析した結果、植物細胞中で正しく転写、翻訳されることが予想できたため、バキュロウイルス系と同様の構築物をアグロバクテリウム形質転換用ベクターに組み、アグロバクテリウム法でタバコに遺伝子導入した。選択薬剤耐性個体を再分化させ、葉磨液をcMyc抗体を用いた酵素抗体法で検出、一本鎖抗体の発現を確認した。カリシウイルス抗原遺伝子についても同様に

タバコに遺伝子導入し、ELISAにより抗原発現を確認した。これらの結果に基づいて、植物発現抗体を大量発現させ、高感度検出系に利用し、カリシウイルス定性、定量系試薬のキット化と市場化に向け開発をさらに進めている。

### 3. 抗体製剤開発と植物発現系

米国で開発された乳ガン治療抗体が国内でも最近認可され、抗体医薬品のトップバッターとして登場することとなった。抗体製剤は市場規模の大きい新規製剤として期待され、ガン、リウマチ、HIV感染、アレルギーなどに対する治療用抗体の研究開発が国内の製薬会社でも盛んに行われている<sup>2)</sup>。抗体遺伝子導入マウス開発、マウス抗体の人型化技術など市場化に向け技術開発も盛んである。しかし、抗体製剤は、治療用に日本でも既に数種類認可されているインターフェロンなどのサイトカイン製剤に比較して、同じ動物由来生理活性蛋白質であるといっても、数千倍の投与量が必要になる。上記抗ガン抗体の場合、1ヶ月の薬剤代が30万円にも上ると算定される。したがっていかに低コストで生産できるかが医薬用抗体の普及と市場拡大の鍵を握っている。この点で植物発現系は一つの生産手段として有効であり、TIBTECH誌（1999）による試算では、動物細胞系で5万円/g、微生物系で170円/gに対して植物では50円/gで抗体が生産可能とされ、プリオンなど動物病原体の混入が避けられるなどの安全性に加え、製造コストの面からも植物発現系は従来の製造方法に勝っている。

遺伝子組み換え食品が我が国では容易には受け入れられがたい状況にある中、生産者、消費者ともにメリットが明らかな医療用蛋白質などの生産基盤として植物バイオテクノロジーを活用することは社会的にも意義の大きいことではなからうか。当研究チームではインターフェロンなどサイトカイン類、下痢症ウイルス抗原などの発現に既に成功しており、今後とも積極的に植物バイオによる有用



物質生産に取り組み、我が国の第一次産業の発展に貢献したいと考えている。

なお本研究は平成11年度NEDO地域コンソーシアム研究開発事業(中小企業創造基盤型)として実施した。

(共同研究者;北海道グリーンバイオ研究所 松村健,北海道大学大学院獣医学研究科 大橋和彦,同農学研究科 上田一郎,サイエンスタナカ 伊藤敬三,堺市衛生研究所 田中智之,国立感染症研究所 武田直和)

## 文 献

- 1) 武田直和, 名取克郎, 宮村達夫 (1999) 「ヒトカリシウイルスによる急性胃腸炎」モダンメディア 45, 1-11
- 2) 横山勇生, 増田知子 (2001) 「次世代バイオ医療の本命 抗体医薬」日経バイオビジネス2001年8月号18-61



ブレイン テクノニュースの  
バックナンバーご案内

## 第 85 号

2001 (平成13) 年 5 月15日発行

### 総 説

情報化時代の水稻冷害対策技術 ……………鳥越洋一

### 国内情報

イネの形態シミュレーション ……………渡邊朋也

C3植物へのC4光合成回路の付与

……………徳富光恵・松岡 信・趙 徹

匂いセンサを用いた匂いの記録・再生システム

……………中本高道・森泉豊栄

SPR法による遺伝子の人工合成 ……………土屋佳紀

稚魚にも応用できる高感度自動給餌システムの

開発……………鈴木伸洋・山本剛史・島 隆夫

### 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

……………市川 健

### 文献情報

未成熟卵母細胞の凍結保存 ……(抄訳:横尾正樹)

お茶のサポニンが酵母の耐塩性を破壊する

……………(抄訳:楠田大輔)

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 ……(抄訳:清水圭一)

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 ……(抄訳:春原英彦)

日本のタイも残留孤児だった ……(抄訳:清水興介)

### 海外便り

パデュー大学での1年8ヶ月 ……西村麻理江

### 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 ……編集部

## ◀国内情報▶

## 葉を花の器官に転換する転写因子複合体

岡山県生物科学総合研究所

後 藤 弘 爾

花のABCモデルは多くの教科書にも記載され、広く受け入れられている。このモデルが提案されてから約10年が経ち、その間花の形態形成に関して、実に多くのことが明らかにされた。A, B, Cの遺伝子活性によって、花器官の形成が決定される。しかし、A, B, C遺伝子活性だけでは、葉を花の器官に換えることができなかった。今回我々は葉を花の器官に換えるのに必要な最後のピースを見つけることに成功した。

## 1. 花のABCモデル—研究の背景

1990年代の初頭、カリフォルニア工科大のMeyerowitzのグループによって、シロイヌナズナの分子遺伝学的解析に基づいた、花の形態形成のABCモデルが発表された。このモデルは次の3つの仮定からなる<sup>1,2)</sup>。(1)花芽にはがく、花弁、雄しべ、心皮が発生する4つの同心円領域(whorl)がある。(2)隣り合う2つの領域にA, B, Cの遺伝子活性が働き、A単独でがく、A+Bで花弁、B+Cで雄しべ、C単独で心皮の形成を制御する。(3)A活性とC活性は互いにその機能を抑制する(図1A)。ABCモデルは、その後Meyerowitzおよびジョン・イネスセンターのCoenのグループによって、シロイヌナズナとキンギョソウとを用いて精力的にその証明がなされた<sup>3,4)</sup>。さらにABCモデルは、ほとんどの被子植物に適用できることが明らかにされた。そしてABCモデルはその簡潔さと汎用性から、今日花の形態形成の基本モデルとして広く受け入れられている。

## 2. 花からABC活性が欠如すると葉になる

ABCモデルを証明するもっとも象徴的な実験結果として、A, B, Cすべての遺伝子

Goro Kouji

〒716-12 岡山県上房郡賀陽町吉川7549-1

活性を失った三重突然変異体の花がある(図1C)。

この“花”は、すべての花の器官が“葉”様の器官から出来ており、A, B, Cの遺伝子活性が無くなると花の器官が葉に転換するというを示唆している。しかしながら、クローニングされたA, B, C活性を持つ遺伝子を、いろいろな組み合わせで構成的に植物体全体で発現させても、葉を花の器官に変化させることは出来ず、花における器官の形成をホメオティックに換えることが出来たに過ぎなかった。すなわち、ABC遺伝子群は、花の器官形成の必要条件ではあるが、十分条件とはいえなかったのである。

3. ABC複合体を構成する  
残りの1ピース

我々は、花の器官形成にはABC遺伝子の他に花器官特異的に働く未知の因子がさらに必要であると考えた。ABC遺伝子群は、その殆ど全てがMADSドメインを持つ相同性タンパク質をコードしている。MADSタンパク質は複合体を作ってDNAに結合する転写因子であることから、欠けている因子はA, B, Cタンパク質と結合するコファクターのようなものではないかと予想した。

実験的にも、次のようなことが明らかとなった。シロイヌナズナのB活性を持つ遺伝子には、PIとAP3があり、そのタンパク質はへ

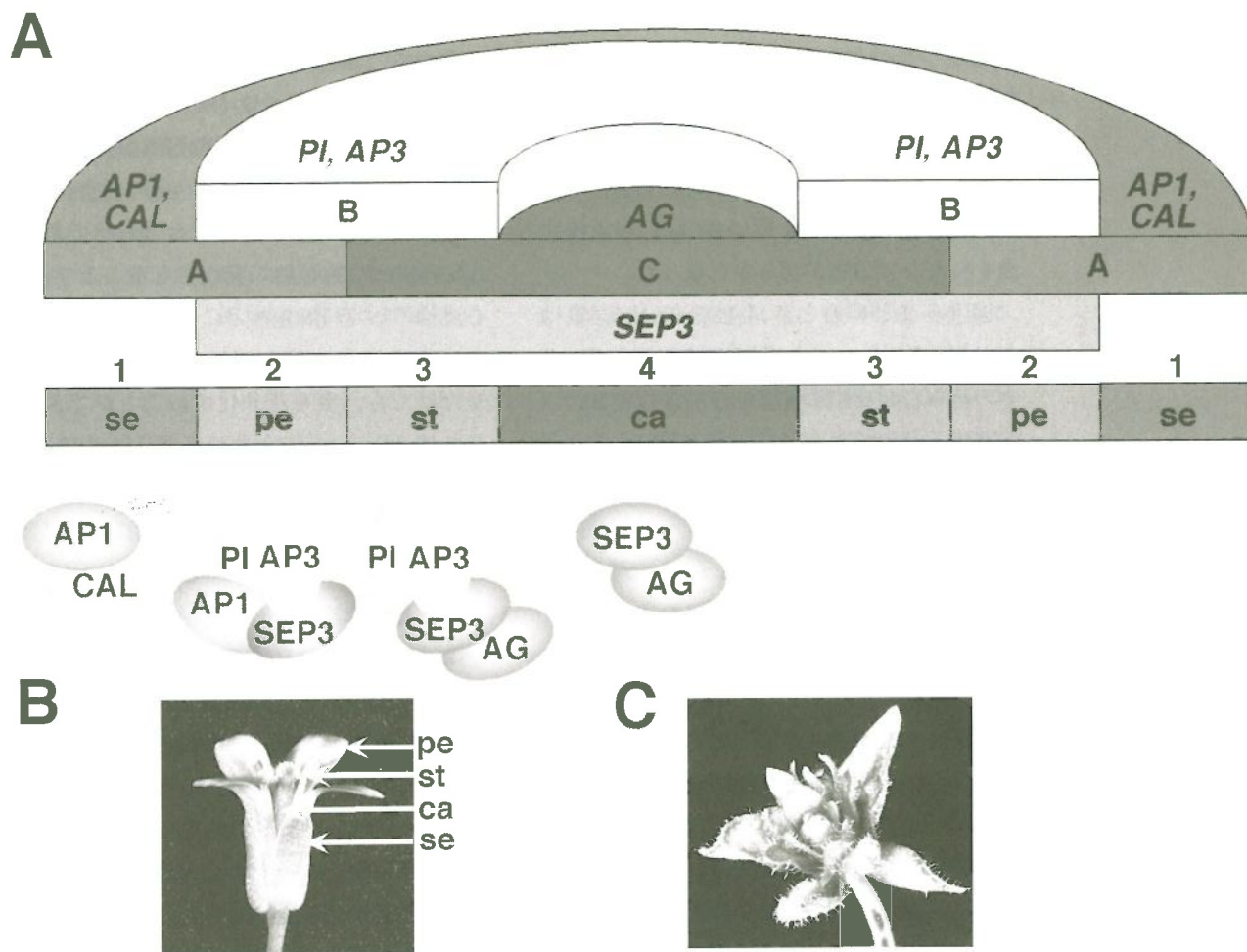


図1 SEP3を加えた新しいABCモデル

A) は花芽におけるABC遺伝子の発現領域を示している。中は同心円領域 (whorl) とそれぞれに発生する器官 (se; がく, pe; 花弁, st; 雄しべ, ca; 心皮)。下はタンパク質の相互作用に基づいた, ABC, SEP3タンパク質複合体を示す。重ねて描いたタンパク質同士は相互作用している。B) はシロイヌナズナの野生型の花。C) はABC 3つの遺伝子活性を失った三重突然変異体の花。

テロダイマーを作ってDNAに結合する<sup>5)</sup>。

AP3のプロモーターにはMADS転写因子の認識配列があることや、転写誘導系を用いた研究から、AP3はPI/AP3複合体が直接転写制御しているターゲット遺伝子であることが分かっている<sup>6)</sup>。ところが、AP3プロモーターにGUSレポーター遺伝子をつなげた遺伝子 (AP3::GUS) を、PI, AP3を構成的に発現するトランスジェニック植物 (35S::PI; 35S::AP3) に導入しても、レポーター遺伝子の活性は花以外ではみられない。一方、ウイルス由来の転写活性化ドメイン (VP16) を融合させたPI遺伝子を持つ植物 (35S::PI-VP16; 35S::AP3) においては、AP3::GUSの発現は植物体全体で観察された。

以上のことから、Bタンパク質複合体 (PI/AP3) と相互作用し、転写活性化能を担う第3の因子を見つけるため、酵母2ハイブリッド法を応用してスクリーニングを行った。その結果、PI/AP3と相互作用するタンパク質としてクローニングできたのは、A活性を持つAP1と、SEP3というABCタンパク質と相同なタンパク質であった<sup>7)</sup>。つまり、MADSタンパク質同士の相互作用しか検出できず、コファクター様のタンパク質はみつからなかった。

さらにSEP3タンパク質は強い転写活性化能を持つことが明らかとなった<sup>7)</sup>。PI/AP3複合体は、転写活性化能を持たないことから、SEP3と複合体を作ることによって、転写活



性化能を獲得するということがいえる。高い相同性を持つMADSタンパク質であるが、転写活性化能の有無をみると、A活性を持つAPIとCAL, SEP遺伝子群は、レベルの多少はあるが、転写活性化能を持ち、B活性を持つPI, AP3, C活性を持つAGは転写活性化能を持たないことが明らかとなった。

以上をまとめると、MADSタンパク質は主にMADSタンパク質同士で相互作用し、その組み合わせによって転写活性化能を持つ転写因子として働くようになるということがいえる。

#### 4. 葉を花の器官に換える

先に述べたように、ABC遺伝子を植物体全体で発現させてみても、花において器官の形成がホメオティックに変化するのみで、葉を花の器官に換えることには成功していなかった。そこでABC遺伝子に加え、SEP3遺伝子を異所的に発現させることを試みた。第2同心円領域（花弁）における遺伝子の組み合わせ、API+PI+AP3+SEP3遺伝子を構成

的に発現させてみると、果たして普通葉が全て花弁様の器官に変化した。同様に、第3同心円領域（雄しべ）の組み合わせである、PI+AP3+AG+SEP3を構成的に発現させることで葉（茎生葉）を雄しべ様の器官に、第4同心円領域（心皮）の組み合わせである、AG+SEP3を構成的に発現させることで葉を心皮様の器官に転換することに成功した（図2）<sup>7, 8)</sup>。また、PI+AP3+SEP3の組み合わせだけでも、葉を花弁化することができた。これはAPIとSEP3が共に転写活性化能を持つ同じ単系統に属する遺伝子であることなどから、機能的な冗長性を持ち、過剰発現したSEP3がAPIの機能の一部を補ったためであると考えられる。

このようにA, B, C遺伝子に加え、SEP3遺伝子を異所的に発現させることで、葉を花の器官に転換できることが示された。つまり、A, B, C遺伝子活性にSEP3遺伝子活性を加えることによって、葉から花の器官へ転換する十分条件がそろったのである。このように植物の器官が葉に分化するか、花の器官に分化するかは（これを器官のアイデンティティ

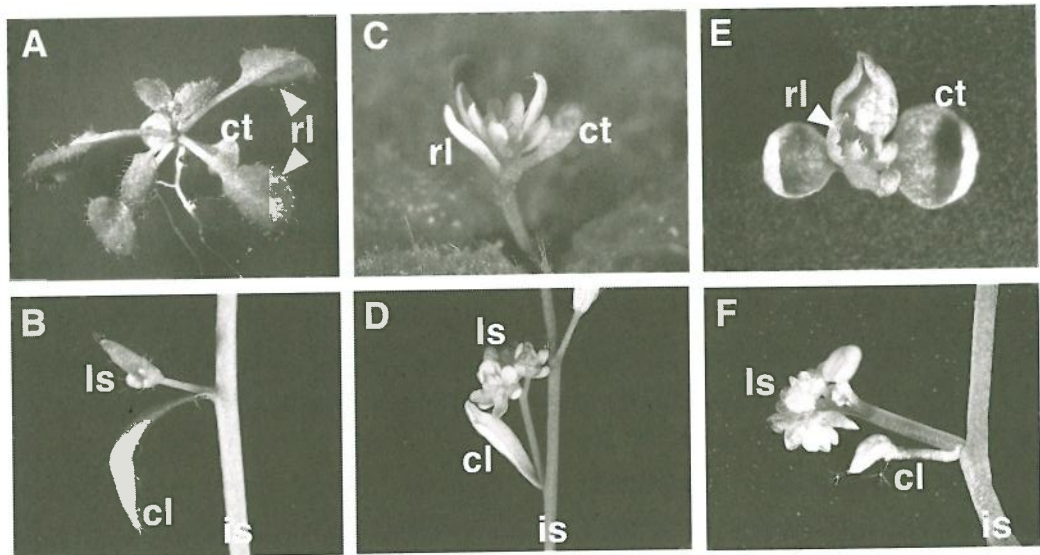


図2 野生型 (A, B) と形質転換植物 (C-F) の表現型

A, C, EとB, D, Fはほぼ同じ発生時期の植物を示す。植物体全体で (C) PI+AP3+SEP3, (D) API+PI+AP3, (E) AG+SEP3, (F) PI+AP3+AG+SEP3を発現する植物。(C) すべての普通葉(ロゼット葉; rl)が花弁様の器官に変化。(D) 茎生葉(花茎にできる葉; cl)が、花弁様の器官に変化。(C)と(D)とを掛け合わせることで、葉がより強く花弁化する植物が得られる。(E) 多くの普通葉(rl)が心皮化している。(F) 茎生葉(cl)および側枝(ls)の先端にできる花のすべての器官が雄しべ化している。子葉(ct)の器官アイデンティティが変化しないのは、用いたプロモーター(CaMV35S)が子葉では発現が弱いためと考えられる。is; 花茎。



の決定という), わずか数種類の転写因子がどのように組み合わせるかによって決定されるということが明らかになったのである。つまり, 栄養器官の葉と生殖器官である花の器官のアイデンティティの転換は花芽誘導とは独立しているということでもある。別の見方をすれば, *SEP3*遺伝子の発現領域が花に限られていることで, 葉と花の器官のアイデンティティが区別されているとも考えられる。

## 5. おわりに

花器官のアイデンティティを決めるA, B, C, *SEP3*タンパク質は, DNA結合ドメインである, MADSドメインなど相同な構造を持っている。機能的には, A, *SEP3*タンパク質は転写活性化能を持ち, B, Cタンパク質はそれを持たない。そしてこれらのタンパク質は, ABCモデルから予想される組み合わせによって複合体を作り, 転写活性化能とDNA結合(ターゲット遺伝子)の特異性を獲得する, ということがいえる。

「花は葉のような基本的な器官が変化(metamorphosis)して出来たものと考えられる」といったのは, ドイツの作家Goetheである。それから200年以上の歳月を経て, 遺伝学的に花器官を葉に換え, 逆遺伝学的手法を用いて葉を花の器官に転換することで, 我々はこのGoetheの洞察が正しかったことを証明することができたのである。

またABC遺伝子に加えて*SEP3*遺伝子があれば, 葉が花の器官に換わることから, これを応用して花卉植物の品種改良に役立てることができる。カラーやミズバショウ, ドクダミなどの白く花卉のように見える部分は, 実は苞葉であることを考えると, 同様に苞葉, 茎生葉を花卉化した見栄えのする花を作ることとも可能となろう。

以上の研究成果の中で特に興味深いのは, 栄養葉(普通葉)と生殖器官である孢子葉(雄しべ, 心皮)とのアイデンティティが数種類の転写因子によって決められていることである。それらはMADSドメインを持った相同タン

パク質であることから, タンパク質の機能分化が起こる一方で, それらを組み合わせることにより多くの機能的バリエーションを生み出すという, 巧妙な進化の仕組みが見えてくる。

## 文 献

- 1) 後藤弘爾 (1994) 花の形態形成—花開く植物分子遺伝学—。細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ 1: 植物の形を決める分子機構—遺伝子から器官形成へ— (秀潤社) 52-61.
- 2) 酒井 一 (2000) 花の形態形成の分子遺伝学。細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ 12: 新版・植物の形を決める分子機構 (秀潤社) 150-163.
- 3) Coen, E. S. & Meyerowitz, E. M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353, 31-37 (1991).
- 4) Weigel, D. & Meyerowitz, E. M. The ABCs of Floral Homeotic Genes. *Cell* 78, 203-209 (1994).
- 5) Goto, K., and Meyerowitz, E. M. (1994). Function and regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene *PIS-TILLATA*. *Genes & Development*. 8: 1548-1560.
- 6) Honma, T. and Goto, K. (2000). The Arabidopsis floral homeotic gene *PIS-TILLATA* is regulated by discrete cis-elements responsive to induction and-maintenance signals. *Development*. 127: 2021-2030.
- 7) T. Honma and K. Goto: Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 2001, 409: 525-9.
- 8) S. Pelaz, R. Tapia-Lopez, E. R. Alvarez-Buylla and M. F. Yanofsky: Conversion of leaves into petals in Arabidopsis. *Curr Biol* 2001, 11: 182-184.

## ◀国内情報▶

牛乳に含まれる乳塩基性タンパク質 (MBP) の  
新たな骨代謝改善作用の発見

雪印乳業株式会社技術研究所

山村 淳一・高田 幸宏

乳塩基性タンパク質 (MBP) は、骨組織に由来する骨芽細胞の増殖および分化を促進し、破骨細胞に対しては骨吸収および分化を抑制した。有効成分の中からキニノーゲンフラグメントとHMG様タンパク質、そしてミルクシスタチンが発見された。MBPを成長期、若齢期、更年期のモデル動物に経口投与することにより、様々なモデルの骨代謝に効果的であることが示され、また腸管吸収性も示された。MBPは骨形成促進と骨吸収抑制といった複数の機能を有する新規の天然機能成分であると考えられる。

## 1. はじめに

骨は活発に代謝している「有機的でダイナミックな組織」である。すなわち、骨は成長後も一定の形、大きさを保ちながら、骨を「造る」骨形成と、骨を「壊す」骨吸収を行いながら、絶えずリモデリングしている。近年、高齢化に伴い、骨の代謝疾患の一つである骨粗鬆症が深刻な問題となっている。骨粗鬆症予防のためには、骨量を若い時期に増やして、その後の骨量の減少を抑えることが重要である。それは人の一生において、成長期に骨形成を高め、成人してからは運動や適切な栄養により骨量を維持し、閉経後や高齢者においては骨吸収を緩やかに抑えて骨量の急激な低下を抑制することが望ましい<sup>1)</sup>。骨のリモデリングは絶えず行われているが、骨のターンオーバーは比較的緩やかであるため、栄養成分による予防および改善は比較的安全で自然であるといえる。牛乳が骨の健康に優れていることは広く認識されているが、我々は、明海大学歯学部口腔解剖学講座の久米川教授らと共同研究を行い、乳中から骨の材料となるカルシウム以外に、骨の代謝に影響し骨の健康に優れた成分が存在することを明らかにしてきた<sup>2)</sup>。これまでの研究で、乳塩基性タンパク質 (MBP) が、骨の形成を促進

YAMAMURA Junichi, TAKADA Yukihiko  
〒350-1165 埼玉県川越市南台1-1-2

すると同時に骨吸収 (骨の破壊) を抑制する両者の作用を持っていることがわかり、骨代謝を改善することを見出した<sup>3), 4)</sup>。本稿では共同研究で得られた結果から、まず骨の細胞である骨芽細胞と破骨細胞におけるMBPの効果とその機構について述べ、さらに様々なステージの動物実験で得られた結果を述べ、最後にヒトにおける作用を述べて、MBPの有効性を紹介する。

## 2. 乳塩基性タンパク質 (MBP)

MBP (Milk basic protein) は、牛乳または乳清を陽イオン交換クロマトグラフィーに供して、吸着する塩基性の等電点を持つタンパク質の集合体である。MBPは、乳清タンパク質中に存在し、極微量しか存在しないが非常に多くの生理活性成分を含んでいる。さらにMBPは母乳にも含まれていることがわかっており、赤ちゃんをすくすく育てるための神秘的な成分とも考えられる。

## 3. 骨芽細胞に対するMBPの作用

骨を造る細胞である骨芽細胞に及ぼすMBPの効果を株化骨芽細胞を用いて検討した。マウス頭頂骨由来のMC3T3-E1細胞はディッシュ上でカルシウムの石灰化能を有する骨芽細胞様細胞である。MBPは、骨芽細胞

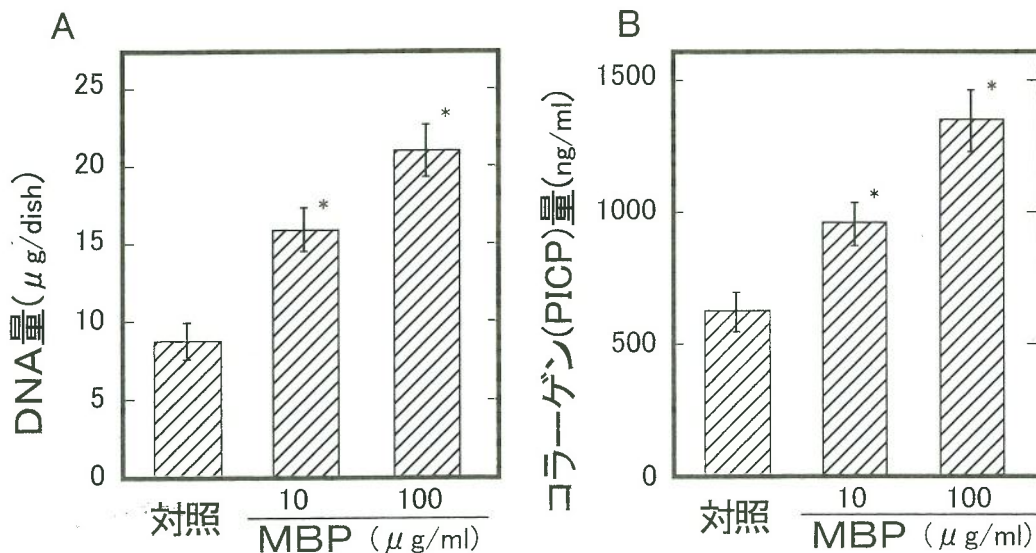


図1 MBPによる骨芽細胞の増殖促進活性(A), およびコラーゲン合成促進活性(B)  
\*対照群に対して有意差あり (p<0.05)

の増殖を促進し、さらに骨芽細胞の分化の指標であるコラーゲン産生を濃度依存的に高めた(図1)。そこで骨芽細胞に対する増殖活性を指標にして、MBPから各種クロマトグラフィーを用いて有効成分の単離同定を試みた。その結果、二つのタンパク質を精製することに成功し、それらのアミノ酸配列から、分子量17kDaのキヌノーゲンフラグメント、ならびに分子量10kDaのHMG様タンパク質の二つの有効成分が確認された<sup>5, 6)</sup>。キヌノー

ゲンフラグメントは血液凝固因子として知られる高分子キヌノーゲンの分解物であり、一方、HMG様タンパク質は核内DNA結合タンパク質であるHMGタンパク質と相同性が非常に高い。

MBPの骨芽細胞に対する作用機構は、増殖を促進し、骨形成を行う骨芽細胞数を増やす。そして、分化を促進してコラーゲンを産生し、骨基質の合成を高めていると考えられる。これらの作用は生体における骨形成の促

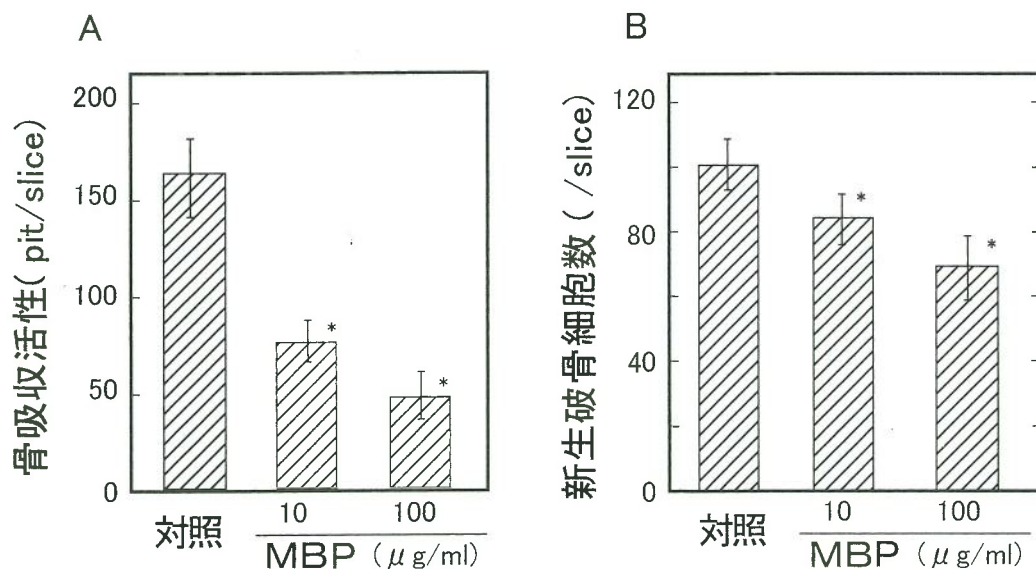


図2 MBPによる破骨細胞の骨吸収抑制活性(A), および破骨細胞分化抑制活性(B)  
\*対照群に対して有意差あり (p<0.05)



進を反映していると考えられる。

#### 4. 破骨細胞に対するMBPの作用

骨を壊してカルシウム量を調節する破骨細胞に及ぼすMBPの効果を検討した。破骨細胞を含む未分画の骨髄細胞に対して、MBPは濃度依存的に骨吸収活性を抑制した<sup>4)</sup>。また単離した破骨細胞に対しても濃度依存的にその活性を抑制した。このことは、MBPが破骨細胞に直接作用して骨吸収活性を抑制していることを示すものである。また、MBPが破骨細胞の形成と分化のいずれに作用しているかを確認するため、造血幹細胞から分化した芽球細胞を用いて検討した。その結果、破骨細胞の形成数はMBPの濃度依存的に減少したことから、MBPは分化を抑制していることが明らかとなった(図2)。

有効成分について調べたところ、破骨細胞の骨吸収活性を抑制する成分は、骨を破壊する酵素(カテプシンK)を阻害するミルキシスタチンであることが明らかとなった。MBPの破骨細胞に対するメカニズムは前破

骨細胞から破骨細胞への分化を抑制すること、さらに、単離した破骨細胞の活性を抑制することから、カテプシンK活性を阻害することで骨吸収活性を抑制することが示唆された。

#### 5. 反転腸管および腸管投与によるMBP活性成分の吸収性

MBPに含まれる活性成分が腸管から吸収されるか否かをラット小腸を用いた反転腸管法により検討した。その結果、反転腸管内液は、MBPのペプシンなどの消化酵素による処理、未処理に関係なくいずれも骨芽細胞の増殖を促進し、破骨細胞の骨吸収活性を抑制した<sup>4)</sup>。この結果は、MBPの活性成分が消化酵素処理により活性阻害されず、腸管から吸収されて作用することを示唆するものである。

また、ラット腸管にMBPを投与し腸管門脈血を調べたところ、有効成分が検出された。このことから、MBP中の有効成分は腸管を透過して、血中に移行することが確認された。

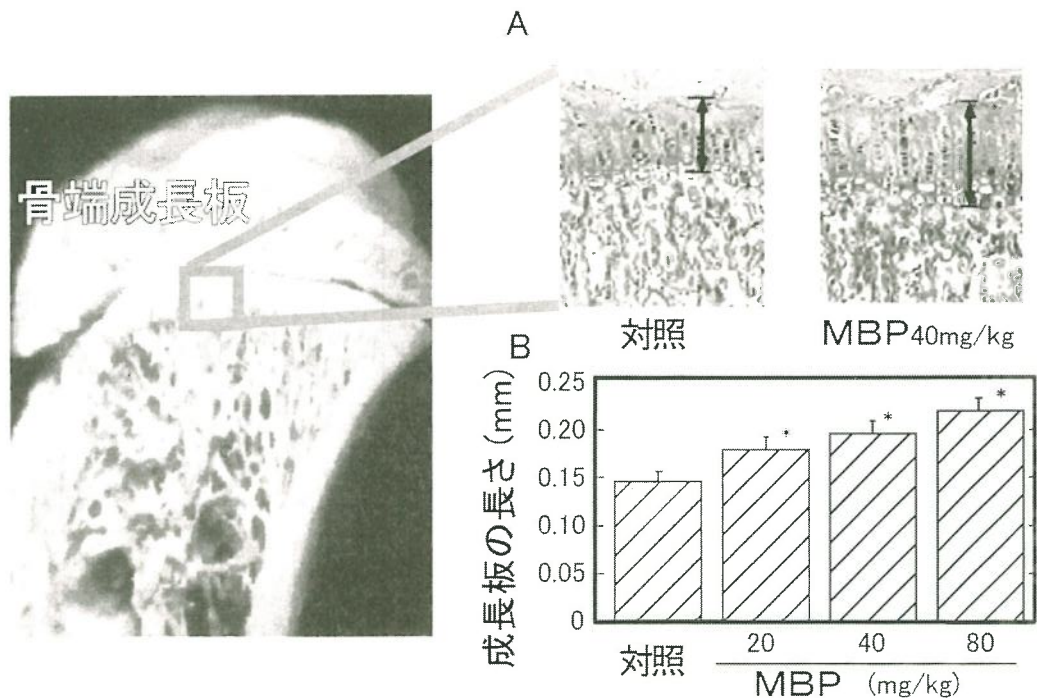


図3 MBPによる成長期ラットの骨端成長板の組織図(A)と伸長促進作用(B)

\*対照群に対して有意差あり (p<0.05)



## 6. 成長期モデルラットに及ぼすMBPの作用

成長期の動物モデルを用いて、MBPの骨形成と骨量増加ならびに骨端成長板に及ぼす効果について調べた。成長期には、骨が伸びる時期であり、骨形成とともに骨量も大幅に大きくなり、また体重が4週間で約2倍になる。5週齢の成長期のラットに、MBPを4週間投与した。その結果、MBP投与群は、大腿骨の骨密度と骨強度が増加した。そして、骨形成の指標である血中骨型アルカリホスファターゼ活性が上昇した。脛骨の切片を作製し、組織学的に解析すると、海綿骨が増加し、骨端成長板を有意に伸長したことから、軟骨性の骨化、骨成長にもMBPは有効であることが強く示唆された(図3)。このことからMBPは、成長期において骨形成と骨量増加に優れた効果を示すことが確認された。

## 7. 若齢OVX骨量回復モデルに及ぼすMBPの作用

骨量回復ラットを用いて、MBPの骨代謝に及ぼす効果について検討した。このラットでは、低カルシウム食で飼育することにより、およそ半分の骨量(骨密度)が失われる。このモデルは、無理なダイエットや骨折によって骨の健康が失われた状態と考えてもよく、骨回復の効果を調べることができる。まず6週齢ラットの卵巣を摘出(OVX)し、5週間低カルシウム飼料を与えて作製した低骨量ラットに、MBPを配合した飼料を3週間与えた。その結果、MBP投与群は、大腿骨の骨強度が高くなった。そして、大腿骨のハイドロキシピロリンおよびプロリン量が有意に増加したことから、コラーゲンなどの骨基質を高めることにより骨強度を上昇したものと考えられた。MBPは骨回復にも優れた効果があると考えられる<sup>7)</sup>。

## 8. 加齢OVX更年期モデルに及ぼすMBPの作用

さらに、加齢ラットの卵巣摘出手術(OVX)により作製した骨量減少モデルラットを用いて検討した。閉経後はエストロゲンが失われることで骨吸収が急速に進むため、この時期に骨量(骨密度)の減少が抑えられれば、女性における骨粗鬆症はかなり防げると考えられる。この実験は、わずか16週間で約30%の骨が失われるモデルを使ってMBPの効果を調べた。MBP添加食を55週齢の更年期モデルラットに与えると、MBPは骨密度の減少を有意に抑制し、大腿骨の骨強度を高く保持した。組織学的解析から海綿骨の減少抑制効果も確認された。MBP投与で、骨吸収マーカーであるデオキシピリジノリンが有意に減少することも併せて確認された<sup>8)</sup>。MBPは、直接破骨細胞に作用してその骨吸収活性を抑制することにより骨量の減少を抑えたものと考えられる。このことから、閉経に伴う骨の急激な減少に対しても、MBPは骨量(骨密度)減少と骨吸収抑制に優れた効果があることが確認された。

## 9. おわりに

紀元前4,000年に古代エジプト人によって乳牛が飼育されて以来、牛乳は人類の健康に大きく貢献してきた。我々は、MBP中の骨芽細胞に対する有効成分の中からキニノーゲンフラグメントとHMG様タンパク質を発見し、それらは骨芽細胞の増殖を促進する活性成分であると考えている。また、破骨細胞に対する有効成分の一つとしてミルクシスタチンを同定した。ミルクシスタチンは、カテプシンを阻害することにより骨吸収を抑制する活性成分のひとつであると考えている。

MBPはそれ自体が複合体であり、多くの有用な生理活性物質を含み、乳の神秘ともいえる画分である。MBPは骨形成の促進と骨吸収の抑制の両面に作用する複数の活性成分を含んでいるため、MBPの骨の健康に及ぼす効果は単一成分の効果にとどまらず、それぞれの活性成分の効果の総和であると推察される。その結果、様々なモデル動物において

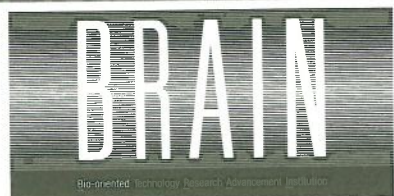
効果が認められたと考えられる。さらにヒトにおいても、二重盲検法による6ヶ月間の飲用試験の結果、MBP摂取により骨密度が有意に高い上昇率を示した。加えて尿中の骨吸収マーカーであるI型コラーゲンのN末端テロペプチドとデオキシピリジノリンが有意に低下し、骨吸収が抑えられていることが示された。その際、MBPは骨のリモデリングのバランスを保ちつつ骨代謝に影響を与えることが示唆された<sup>9)</sup>。

このように牛乳や母乳に含まれるMBPは骨形成促進と骨吸収抑制といった複数の機能を有する新規の天然機能成分であると考えられる。

最後に本研究を進めるにあたり御指導いただきました明海大学歯学部久米川正好教授に心より感謝いたします。

文 献

- 1) 板橋明 (1996), 治療, 78, 58-61
- 2) 高田幸宏ら (1993), 牛乳成分の特性と健康 (山内邦夫他編), 171-185, 光生館, 東京
- 3) Takada, Y. et al (1996), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 223, 445-449
- 4) Takada, Y. et al (1997), *Int. Dairy J.*, 7, 821-825
- 5) Yamamura, J. et al (2000), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 269, 628-632
- 6) Yamamura, J. et al (1999), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 261, 113-117
- 7) Kato, K. et al (2000), *J. Food Biochemistry*, 24, 467-478
- 8) Toba, Y. et al (2000), *Bone*, 27, 403-408
- 9) Aoe, S. et al (2001), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 913-918



ブレイン テクノニュースの  
バックナンバーご案内

第 86 号

2001 (平成13) 年 7 月 15 日 発行

総 説

マイクロチャネルアレイを用いた  
血液レオロジー計測による健康の評価 … 菊池佑二  
国内情報

マイクロチャネルを用いた単分散マイクロ  
スフィア作成技術 …………… 中嶋光敏・小林 功  
生きた植物における水のイメージング … 中西友子  
環境負荷化学物質モニタリング及び環境汚染  
浄化を目的とした遺伝子組換え植物 …………… 大川秀郎  
地域の先端研究

完熟収穫型単為結果性トマト  
「試交99-2」の育成 …………… 大藪哲也  
生物間相互作用を利用した土壌細菌群集  
多様性の簡易診断法 …………… 森川千春  
文献情報

DNAマイクロアレイを用いた卵胞発育  
における遺伝子発現解析 …………… (抄訳: 木村直子)

ゲノム発現解析により明らかとなった出芽酵母  
(*Saccharomyces cerevisiae*) のリン酸蓄積と  
ポリリン酸の代謝システムにかかわる新しい  
コンポーネント …………… (抄訳: 岩下和裕)  
有機リングは甘いのか、酸っぱいか  
…………… (抄訳: 岩井純夫)  
シロイヌナズナのAsymmetric leaves 1は  
葉パターン形成とStem cellの機能を仲介する  
…………… (抄訳: 春原英彦)  
腸管出血性大腸菌O157:H7のゲノム  
塩基配列 …………… (抄訳: 室田一貴)  
海外便り  
積雪・凍結地帯における土壌・根圏の水・熱の  
季節変化の動態予測手法の開発 - カナダ・サスカ  
チュワン大学における一年四か月 …………… 広田知良  
生研機構からのお知らせ  
融資事業 (一般, 特別融資制度) のご案内

## ◀地域の先端研究▶

## ハウス内の気温と葉菜類の耐凍性 および糖・ビタミンC含量

秋 田 県 農 業 試 験 場  
田 村 晃

北東北地域において、冬期に無加温ハウス内で葉菜類を生産する技術を確立することを目的に、ハウス内気温とホウレンソウ、コマツナの耐凍性および糖・ビタミンC含量との関係を調査した。両作物の耐凍性は、耐凍性測定前7日間の平均最低気温と密接な関係が認められた。また、糖とビタミンC含量は低温ストレスを与えることにより、より高まった。

### 1. はじめに

北東北日本海側は夏期には稲、果樹、野菜、花き等、農家にとって栽培作物の選択肢は豊富にあるが、冬期には気象的な制約（多雪、低温、寡日射）を受けるため、選択肢が非常に少ない。このため、農家は出稼ぎや季節的な在宅他産業就労を余儀なくされている。このことから、周年農業生産体系の確立は農業試験場の重要なテーマの一つになっている。

近年、この地域においてもパイプハウスを主体にして、施設栽培が普及しつつある。しかし、これらのハウスは冬期には雪に埋もれ、ほとんどが遊休化している。これらのハウスを有効利用した低コストな葉菜類栽培は、周年農業生産体系の一翼を担いうる有力な手段である。秋田農試では冬期無加温ハウスを利用した葉菜類栽培に関する研究に取り組んでいるので、その内容を報告する。

### 2. 葉菜類の耐凍性

北東北地域の冬期の気温は、沿岸部で $-8 \sim -10^{\circ}\text{C}$ 、内陸部で $-15 \sim -18^{\circ}\text{C}$ 程度になる。このため、農家の葉菜類栽培に取り組む意欲を喚起するためには、葉菜類の凍結傷害に関する誤解や不安を除去する必要がある。そこで、葉菜類の耐凍性に関する調査を実施した。

#### 1) 秋から冬にかけての耐凍性の変化

TAMURA Akira

〒010-1231 秋田県雄和町相川

ホウレンソウ等の葉菜類は、夏には凍結に耐えることはできないが、秋から冬にかけて低温に馴らされると耐凍性が增大する。耐凍性の継時的な変化を示す場合、個体の生存割合 ( $LT_{50}$ , median lethal dose temperature) や、細胞・組織からの電解質漏出割合 ( $T_{EL50}$ , temperature at which 50% electrolyte leakage occurred) で評価する方法が研究者の中で広く採用されている。本報告では、実際の葉菜類栽培を勘案し、「栽培継続が可能な軽微な凍結傷害を受ける範囲内の温度」で耐凍性を評価するため、 $T_{EL15}$ で耐凍性を表示した<sup>3)</sup>。

1998年11月から1999年3月にかけてのハウス内気温とホウレンソウの耐凍性の変化を図1に示す。ホウレンソウの耐凍性は11月初旬には $-5^{\circ}\text{C}$ 程度であったが、1月から2月上旬には $-14^{\circ}\text{C}$ 程度まで増大した。しかし、耐凍性は秋から冬にかけて単調に増大するわけではない。すなわち、耐凍性が11月19日には約 $-6^{\circ}\text{C}$ であったが、その後の気温低下により24日には約 $-10^{\circ}\text{C}$ になり、5日間で約 $4^{\circ}\text{C}$ も増大している。また、12月10日には約 $-11^{\circ}\text{C}$ であったが、その後、やや気温が上昇したため、12月16日には約 $-9^{\circ}\text{C}$ に減少している。

次に、低温ストレスの大きさの違いがホウレンソウとコマツナの耐凍性に及ぼす影響を図2に示す。両作物ともにハウス内に冷たい外気を導入して、大きな低温ストレスを与えた場合に、耐凍性がより増大することが示された。



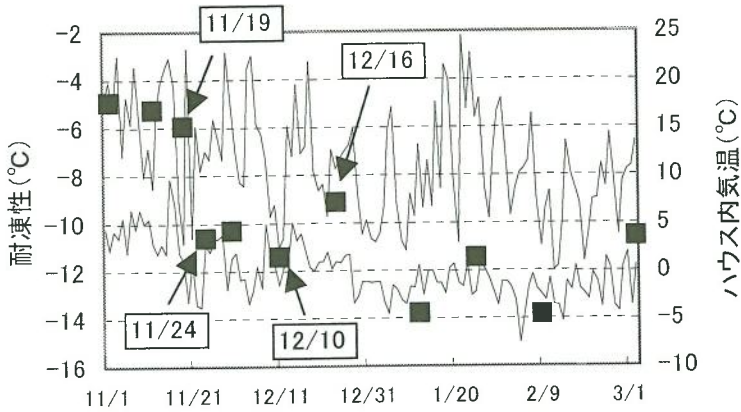


図1 ハウス内気温とハウレンソウの耐凍性の変化  
折れ線グラフ(実線)の上が最高気温, 下が最低気温  
■印は耐凍性(T<sub>EL15</sub>)

ハウレンソウを1998年9月14日, 10月5日, 10月15日, 10月23日に秋田農試内のハウスに播種した。耐凍性の測定には, 生育ステージの違いに由来する耐凍性程度之差を排除するため, 草丈が20~30cmの個体を供試した。品種は'ソロモン'を用いた。

これらのことから, 耐凍性はハウス内気温の影響を受け, 増大あるいは減少すること(図1), また, 大きな低温ストレスにさらすと耐凍性がより増大すること(図2)が明らかになった。

2) ハウス内の気温と耐凍性との関係

我々は, 秋から冬にかけて徐々に気温が低下すると考えがちである。しかし, 実際のハウス内の気温は, 日変化が非常に大きい(図

1)。植物の耐凍性が気温の影響を受けて変化することは明らかであるが, 気温と耐凍性との定量的な解析はこれまでに葉菜類では試みられていなかった。そこで, 無加温ハウスにおけるハウレンソウとコマツナの秋から早春にかけての耐凍性の変化を1996/97年, 1997/98年および1998/99年の3カ年にわたって調査し, 耐凍性とハウス内気温との関係を解析した<sup>5)</sup>。

耐凍性測定前3日, 7日および10日間のハウス内の最高, 最低および平均気温と耐凍性との間の関係を解析し, 2次回帰式により求めた決定係数(R<sup>2</sup>)を表1に示す。両作物ともに最低気温と耐凍性との間において最も高い相関関係が認められ, 中でも, 耐凍性測定前7日間および10日間の平均最低気温と耐凍性との間に極めて高い相関関係が認められた。

次に, 耐凍性測定前7日間の平均最低気温とハウレンソウ, コマツナの耐凍性との関係を図3に示す。平均最低気温が8℃から2℃程度に低下するにつれて, ハウレンソウの耐凍性は-5℃から-7℃程度, コマツナの耐凍性は-4℃から-6℃程度まで緩やかに増大し, 平均最低気温が2℃以下になると, 両作物ともに耐凍性が急激に増大した。

北東北地域において, 無加温ハウス内の平

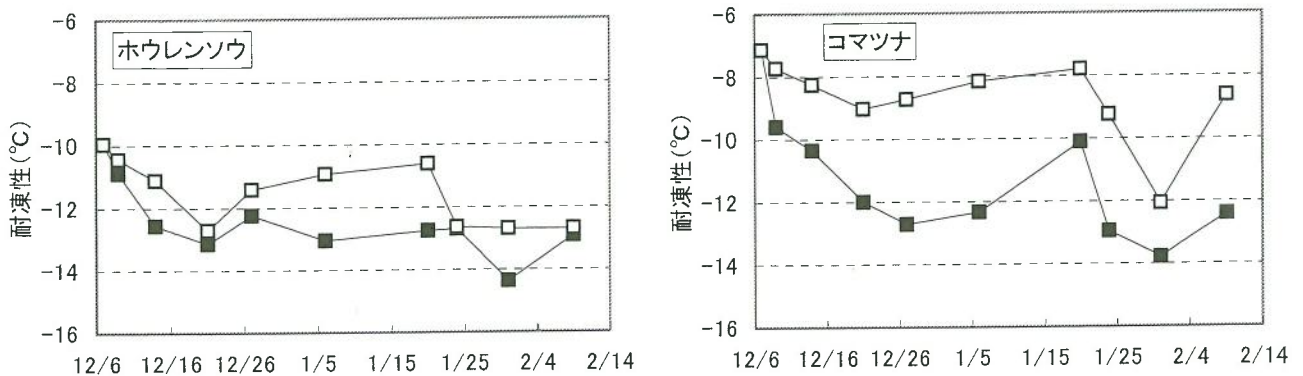


図2 ハウスを開放した時と密閉した時の耐凍性の変化

■, 開放 □, 密閉

ハウレンソウを1999年10月21日に, コマツナを10月28日にそれぞれ2棟のハウスに播種した。品種はハウレンソウでは'ソロモン', コマツナでは'せいせん7号'を用いた。耐凍性の測定には図1と同様に草丈が20~30cmの個体を供試した。両作物ともに草丈が約20cmに達した1999年12月9日に一方のハウスを開放して冷たい外気をハウス内に導入した。なお, 他方のハウスは密閉管理を継続した。



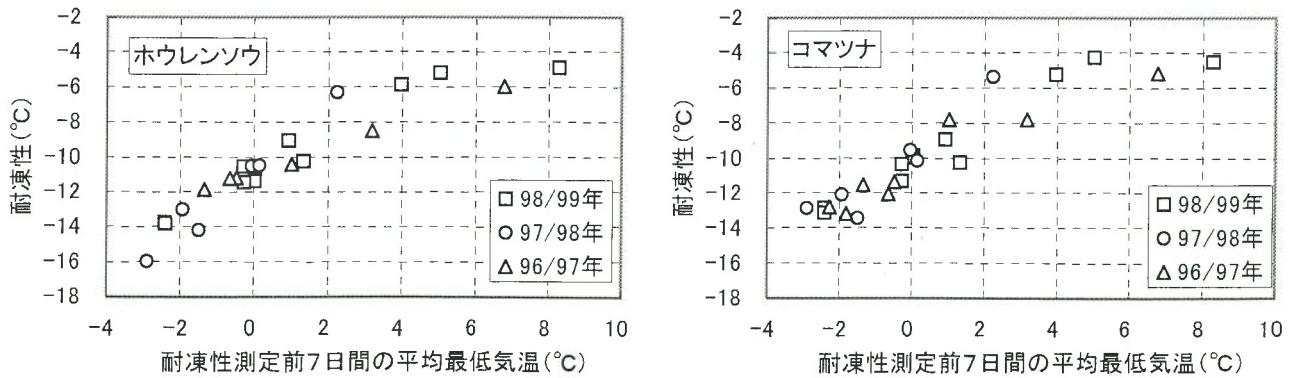


図3 耐凍性測定前7日間の平均最低気温とホウレンソウ、コマツナの耐凍性との関係

均最低気温が氷点下になるのは、概ね12月上旬以降で、耐凍性はホウレンソウ、コマツナともに12月下旬には-10℃以下まで増大する(図1)。このことから、厳寒期には両作物ともに十分に低温馴化しており、凍結傷害を受ける危険性は少ない。むしろ、11月中旬から12月中旬にかけての急激な寒波の到来時や、2月下旬から3月にかけて日射量が豊富になり、日中のハウス内気温が上昇する時期に凍結傷害を受ける危険性がある。したがって、これらの凍結傷害を回避するためには、11月中旬から12月中旬の最低気温が0～-2℃程度になる時期の夜間にハウスを開放して耐凍性を増大させ、また、2月中旬以降においてはハウス内気温を上昇させないように、ハウスを開放して脱馴化を防止することが重要であると考えられる。

3) ハウス内での保温と耐凍性

冬期に日射量の多い太平洋側では、無加温ハウス内での葉菜類栽培において、保温資材を使用することにより生育促進効果の高いことが報告されている<sup>1)</sup>。秋田県内でも生育促進や凍結傷害防止をねらいとして、保温資材を使う農家が多い。しかし、保温資材を用いると生育の徒長傾向や凍結傷害がしばしばみられる。したがって、日射量の少ない地域での保温資材の使用には疑問がある。そこで、コマツナの耐凍性に及ぼす保温資材の影響を調査した<sup>2)</sup>。

保温資材を用いることにより、不織布トンネル、不織布べたがけ、ビニルトンネル区で日平均気温がそれぞれ約1.5℃、1℃、2℃、最

表1 ハウス内の平均、最高および最低気温とホウレンソウおよびコマツナの耐凍性との間の相関

気温	ホウレンソウ			コマツナ		
	3日	7日	10日	3日	7日	10日
平均最高気温	0.367 <sup>(R<sup>2</sup>)</sup>	0.516	0.618	0.261	0.371	0.469
平均最低気温	0.852	0.904	0.907	0.862	0.899	0.897
平均気温	0.826	0.866	0.897	0.781	0.815	0.853

注：耐凍性測定前3日間、7日間および10日間の平均最高気温、平均最低気温および平均気温とホウレンソウ、コマツナの耐凍性との関係を解析し、2次回帰式により求めた決定係数(R<sup>2</sup>)。

低気温がそれぞれ約0.5℃、0.5℃、1℃、無保温区よりも高まる(データ略)。しかし、保温資材を用いるとT<sub>EL15</sub>は無保温区に比べ、各保温区では2～3℃高くなる(表2)。このことから、保温することにより、凍結傷害を受ける危険性が高まることが明らかとなった。

3. 冬期の葉菜類栽培における糖とビタミンC含量

北東北地域における冬期の葉菜類栽培には夏期栽培の通常作業に加え、厳しい寒さの中

表2 ハウス内の保温とコマツナの耐凍性、糖およびビタミンC含量

処理区	耐凍性 T <sub>EL15</sub> ℃	糖含量			ビタミンC含量		
		葉身 g/100gFW	葉柄 g/100gFW	個体当たり g/100gFW	葉身 mg/100gFW	葉柄 mg/100gFW	個体当たり mg/100gFW
不織布トンネル	-11.0	3.4	3.5	3.4	99	33	74
不織布べたがけ	-10.5	3.3	2.1	3.1	104	36	83
ポリビニルトンネル	-10.1	2.1	1.0	1.6	103	29	73
保温なし	-13.4	4.9	4.6	4.8	142	46	111

(1998年1月29日調査)

1997年11月4日にコマツナ‘せいせん7号’をハウスに播種した。施肥量は窒素、りん酸、加里をそれぞれ1kg/a施用し、栽植密度は条間20cm、株間5cm(100個体/m<sup>2</sup>)とした。処理区として不織布べたがけ、不織布トンネル、ポリ塩化ビニル(φ0.07mm)トンネル(以後ビニルトンネルと表現)の3つの保温区を設け、対照として無保温区を設けた。保温は播種直後から実施し、1998年2月19日まで継続した。

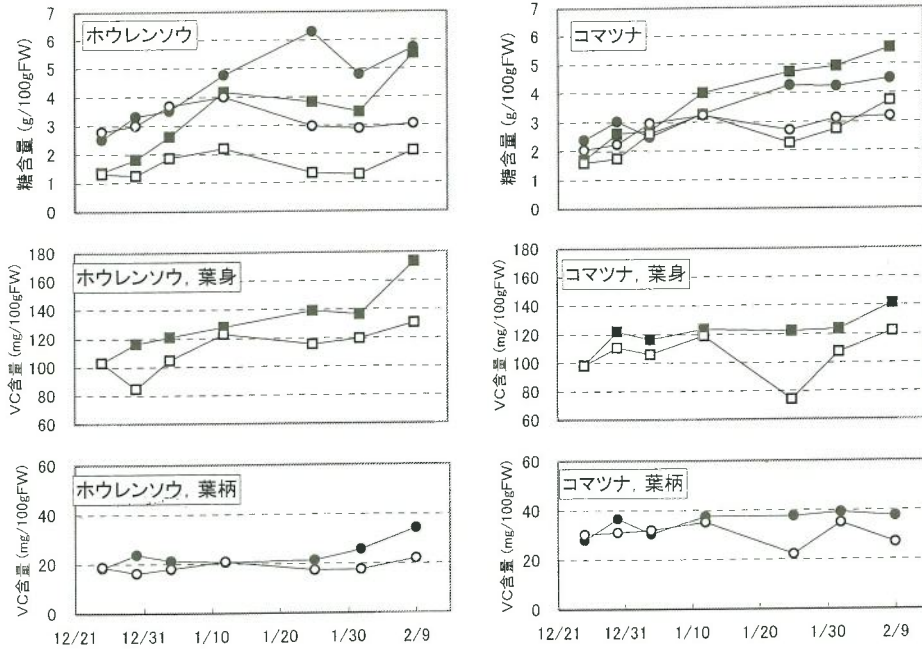


図4 糖およびビタミンC含量に及ぼすハウス内への外気導入の影響

ホウレンソウ、コマツナともに上段Aは糖含量、中段Bは葉身ビタミンC (VC) 含量、下段Cは葉柄ビタミンC (VC) 含量。葉身部 (■, 開放; □, 密閉) 葉柄部 (●, 開放; ○, 密閉) ホウレンソウ 'ソロモン' を1998年10月15日に、コマツナ 'せいせん7号' を10月23日にそれぞれ2棟のハウスに播種した。ホウレンソウ、コマツナともに収穫期に達した12月25日に一方のハウスのサイドを開放し、外気導入を開始した。また、他方のハウスは密閉管理を継続した。

での収穫作業や、ハウス周辺の除雪作業等が伴う。したがって、農家の冬期葉菜類栽培に取り組む意欲を喚起するためには、凍結傷害を回避した葉菜類栽培が可能であることを示すのみでは必ずしも十分でなく、さらに、冬期の低温条件が葉菜類の品質を高めるための利点であることを示す必要がある。そこで、ハウス内の気温管理方法が糖およびビタミンC含量に及ぼす影響について調査した。

1) 保温と糖およびビタミンC含量<sup>2)</sup>

各保温区は、ともに無保温区よりも糖およびビタミンCの含量が低下した (表2)。このことは、保温すると、冬期の低温を活かした品質の高い葉菜類生産ができないことを示している。したがって、日射量の少ない日本海側においては、保温により生育の促進を図るのではなく、播種期を少々早めることにより、厳寒期の前に生育量を確保することが望ましいと考えられた。

2) ハウスへの外気導入と糖およびビタミンC含量<sup>1)</sup>

低温ストレスの大きさの違いが糖およびビタミンC含量に及ぼす影響を図4に示す。ハウスのサイドを開放して外気をハウス内に導入し、大きな低温ストレスを与えると、糖、ビタミンC含量がホウレンソウ、コマツナと

ともにハウスを密閉した時よりも高まった。このことから、冬期の低温を積極的に活かして、糖とビタミンCの含量の高い葉菜類を生産することが可能であることが示された。

4. おわりに

北東北地域は気象的な制約を受け、冬期の野菜生産が極めて少ない。しかし、当地域において、凍結傷害を回避した葉菜類栽培が可能であり、また、低温を活かして糖やビタミンC含量の高い葉菜類を生産することができる。今後は、中山間地域等で現地試験を実施し、地域農業普及センターと協力して生産現場での課題を解決しながら、冬期野菜生産振興に寄与したいと考えている。

文 献

- 1) K. Ozawa (1997), Farming Japan, 31 (1), 40-45
- 2) 田村 晃 (1999), 平11園学東北支, 77-78
- 3) 田村 晃 (2000), 園学雑, 69 (3), 332-338
- 4) 田村 晃 (2000), 東北農研, 53, 185-186
- 5) 田村 晃 (2002), 園学雑, 71 (1), 印刷中

## ◀文献情報▶

## 核移植胚由来ES細胞の分化

Differentiation of Embryonic Stem Cell Lines Generated from Adult Somatic Cells by Nuclear Transfer.

Teruhiko Wakayama, Viviane Tabar, Ivan Rodriguez, Anthony C. F. Perry, Lorenz Studer and Peter Mombaerts.

Laboratory of Stem Cell and Tumor Biology, Neurosurgery and Cellular Biochemistry and Biophysics, The Rockefeller University, USA

SCIENCE 292, 740-743 (2001)

胚性幹細胞（ES細胞）は、胚盤胞内部の未分化幹細胞である内部細胞塊に由来する株化された細胞のことである。そのため、ES細胞は「分化の全能性」を有しており、あらゆる器官に分化することが可能であることから、移植が困難な細胞・組織の生産などへの利用が期待されている。通常、ES細胞は受精卵から作製するため、他人の細胞からつくるほかに、このようなES細胞由来の細胞・組織を移植したとしても、免疫学的に拒絶されてしまうという問題点が残されている。しかし、自分の細胞からES細胞をつくることができれば、この問題の解決策の一つとなりうると考えられる。本論文では、体細胞クローン作出技術を利用した、核移植胚由来ES細胞の樹立とその分化能について報告している。

筆者らは5系統の成体マウスの体細胞を用いて核移植を行い、核移植胚由来ES細胞（ntES細胞）の樹立を試みた。その結果、合計35のntES細胞の樹立に成功し、すべてのntES細胞はアルカリ性フォスファターゼやOct-3/4といった未分化細胞マーカーに陽性を示していた。また、ES細胞は体外における種々の細胞への分化能を有することが知られているが、筆者らは特に医療的な目的から、これらntES細胞の一部を神経細胞へ分化させることを試み、実際に中脳ドーパミン産生神経細胞への分化を確認し、ドーパミンを合

成・分泌できたことも報告している。また、このntES細胞は生殖細胞系列へ寄与することも確認したと報告している。さらに筆者らは、ntES細胞をドナーとした核移植を行い、ntES細胞由来クローンマウスの作出にも成功しており、それらは生存可能で、かつ生殖能力も持っていた。これらのことは、今回樹立されたntES細胞が完全な多能性を有していること、さらにntES細胞が他の細胞同様に核の再プログラム化が可能であることを示唆している。

近年、ES細胞の研究はその分化誘導に関する研究が盛んに行われており、特にヒトES様細胞株の樹立が報告されてからは、分化誘導技術の移植再生医療分野への応用に関心が寄せられている。本論文で行われたES細胞と核移植を組み合わせた技術は、体細胞から分化の全能性を有する細胞をつくり出すという画期的な技術であると言え、この方法でつくられたES細胞は自分自身の細胞由来であるため、移植した際に拒絶反応の少ない細胞・組織をつくるのが可能である。ヒトへの臨床応用までには、倫理的な面、安全性の面などで数多くの問題が残されているが、この技術がこれからの移植再生医療への応用の第一歩となることは間違いのないであろう。

（抄訳：横尾正樹, YOKOO Masaki, 東北大学大学院農学研究科）



## ◀文献情報▶

## βカゼイン由来ペプチドを用いた乳酸菌ペプチダーゼ活性の新規情報

Hydrolysis of Sequenced β-Casein Peptides Provides New Insight into Peptidase Activity from Thermophilic Lactic Acid Bacteria and Highlights Intrinsic Resistance of Phosphopeptides

STEPHANIE-MARIE DEUTSCH,<sup>1</sup> DANIEL MOLLE,<sup>1</sup> VALERIE GAGNAIRE,<sup>1</sup> MICHEL PIOT,<sup>1</sup> DANIELE ATLAN,<sup>2</sup> AND SYLVIE LORTAL<sup>1</sup>

Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Recherches de Technologie Laitiere 35042 Rennes Cedex,<sup>1</sup> and Unite de Microbiologie et de Genetique (CNRS-UMR 5577), Universite de Lyon I, 69622 Villeurbanne Cedex,<sup>2</sup> France

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 5360-5367 (DEC 2000)

好熱菌である *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus* はスイスタイプチーズのスターターとして重要である。チーズ製造過程で原料乳中のカゼインはまずプロテアーゼおよびレンネットなどにより中間サイズのペプチドに分解される。その後の熟成過程でスターター由来のペプチダーゼにより小サイズのペプチドもしくはアミノ酸へ分解される。これらのペプチドやアミノ酸はチーズの風味に大きな影響を及ぼす。

今回著者等はカゼイン分解の疑似モデルとしてβカゼインをトリプシン/キモトリプシン処理したものを用い、それにスターター(3菌種, 10菌株)から抽出したペプチダーゼを反応させ、生成する遊離アミノ酸の種類と濃度を調べた。さらに、未分解のペプチドの配列を決定することで各種菌体のペプチダーゼ活性についての評価を行った。

遊離アミノ酸を測定したところ、*L. hel-*

*veticus*抽出液で最も高濃度で測定された。このことから *L. helveticus* が高いペプチダーゼ活性を持っていることが示唆された。また、生成するアミノ酸を調べたところ、*L. helveticus*, *L. delbrueckii* はプロリン(Pro)を多く遊離させていたが *S. thermophilus* ではほとんど遊離していなかった。スイスチーズ中には特にProが多く含まれており、チーズの甘味を引き出していることが知られている。βカゼインにはPro-Proの結合を有する部位が多く含まれており、プロリルアミノペプチダーゼ(PepIP)が唯一この結合を加水分解することができる。また、乳酸菌のペプチダーゼ(PepX, PepQ)の働きによってペプチドのN末端からProが遊離する。今回の結果から *S. thermophilus* はこれらのペプチダーゼを生産する能力が低いことがわかった。また、スイスチーズ中の遊離Proのほとんどが *L. helveticus*, *L. delbrueckii* によるものだということがわかった。

また、未分解のペプチド配列を調べたところ、リン酸化部位を含むペプチドが多数を占めていた。ペプチダーゼへの耐性に対する詳細なメカニズムの解明が期待される。

今回の著者らの研究では報告されていないが、アミノ酸の影響だけでなく、今回報告されたペプチドが風味に与える影響についての関心も持たれる。また、各種乳酸菌由来のペプチダーゼによるアミノ酸やペプチドの生成パターンなどの情報のデータベース化が出来れば、目的のアミノ酸やペプチドを高濃度に生成させるためのスターターの組み合わせを容易に決定することができ、好みの風味を持ったチーズの製造に役立つかもしれない。さらにペプチドについて考えると、近年さかんに研究が行われている様々な機能性ペプチド(オピオイド, ACE阻害等)を選択的に生成させ、機能性を付加したチーズ等の製造も今後可能になってくると考えられる。そういう観点で見ると本研究は非常に興味深く、今後の報告に期待したい。

(抄訳: 水野征一, MIZUNO Seiichi, カルピス(株)基盤技術研究所)



## ◀文献情報▶

新DNAマーカー・システム  
—SRAP

Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new maker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*.

G. Li · C. F. Quiros

*Theoretical and Applied Genetics* (2001)  
103, 455-461

ゲノムDNAの塩基配列や発現遺伝子の違いを検出するフィンガープリンティングは、連鎖地図の作成、育種、分類、進化研究、遺伝子クローニングに、今や欠かせないものとなってきている。現在、RFLP、RAPD、SSR、AFLPがよく利用されているが、簡便であれば再現性に問題があったり、再現性があれば手順が煩雑であったり、コストが膨大であったりと、いずれも一長一短があり、研究者は特色に応じて使い分けざるをえない。今回使い勝手の良い新システムSRAP (sequence-related amplified polymorphism) が開発されたので紹介することにする。

SRAPはPCRを利用する点ではRAPD、AFLP、SSRと同じであるが、primerの設計とPCRのコンディションにこのシステムの特徴がある。まず、primerの設計について紹介しよう。Forward primerは彼らがfiller sequenceと呼ぶ配列を特定せず単なる鎖長を長くするための部分とCCGG+selective sequence (3bp)のコア配列からなる。この配列はゲノム中に偏ることなく染色体全域に分布するのORF (Copenhaver et al. 1999) を優先的に増幅することを狙ったものである。アラビドプシスの2番、4番染色体のエクソン部分のGC含量は44%、対してイントロン部分は33%前後である (The EU Arabidopsis Genome 1999)。また、著者がGenbank のdatabaseから20のBACクローンをランダムに選び塩基配列をチェックしてみると、エクソンの実に66%にCCGG motifが存在していた。CCGG primer setを用いること

によりエクソン部分を優先的に増幅できることになるが、ご存知のようにエクソン部分は進化的に保守的であり多型を得る可能性が小さいと思われる。そこで、個体に変異があるとされるイントロン、プロモーター部分をreverse primerにし、エクソン部分を含み多型性に富むDNAを増幅させようとする。この部分はAT-richであることから、AATT motifをreverse promoterとして用いることにした。CCGG (AATT) の後の3bpはCCGG (AATT) 配列を持つものの中から特定の塩基配列を持つDNAのみを増幅するselective primerとして働いている。ここはAFLPの思想を受け継いでいる。また、両primerの塩基長は17-18bpが最適であった。

次にPCRコンディションであるが、最初の5cycleはannealing温度を35度の低温に設定し、部分的にでもマッチする塩基配列があれば結合するように仕向け、その後35cycleをかけた50度まで徐々に上昇させていくことにより再現性を担保している。AFLPではannealing温度を66度前後から徐々に下げていっており、対照的な考え方をとる。

このシステムにより獲得されたマーカー (約20%が共優性マーカー) を用いて *Brassica oleracea* 連鎖地図を作成しているが、染色体全般に広がりAFLPと遜色ないことを示している。glucosinolateを不飽和化する酵素遺伝子を36個体のRIラインの分離実験一発で簡単にtaggingに成功している。Brassica属以外のトマト、イネ、レタス、ニンニク、セロリでも再現性の高い多型バンドが得られており、アラビドプシスの塩基配列を基に考えだされたものではあるが、広範囲の種に適応可能である。また、蕾の発育ステージ特異的遺伝子のスクリーニングができ、発現解析にも応用可能である。

このようにSRAPは、ゲノム解析技術としてのRAPD、AFLPに、発現解析手段としてのdifferential displayに取って代る可能性を秘めており、多くの種で試みられ、より高度化されることを期待する。(抄訳：岩井純夫, IWAI sumio, 鹿児島大学農学部)

## ◀文献情報▶

## シロイヌナズナのEMF1はシュートの構築とfloweringを制御する新規のタンパク質である。

EMF1, a novel protein Involved In the control of shoot architecture and flowering In arabidopsis

D. Aubert, L. Chen, Y.-H. Moon, D. Martin, L.A. Castle, C.-H. Yang, Z.R. Sung

Department of Plant and Microbial Biology, University of California, Berkeley, California 94720

*Plant Cell*, 13, 1865-1875 (2001)

高等植物には、茎頂分裂組織 (shoot apical meristem: SAM) への外的、内的因子によって制御される発育相の変化が生じる。シロイヌナズナでは、メインシュートの発育は、ロゼット/栄養生長相 (長い葉柄を持つ葉を含むロゼットシュートを形成) で始まり、栄養生長から生殖生長への転換は、節間伸長の伴う花序シュートの形成をもたらす。メインシュートはその発育を止めるが、その頂端に花は付けない。

環境的、内的合図が各発育相の長さを制御している。シロイヌナズナでは、40個程の遺伝子がfloweringへの転換の制御に関与していると考えられている。CONSTANS (CO), EARLY FLOWERING3 (ELF3), FLOWERING LOCUS T (FT) のようなearly-あるいはlate-flowering遺伝子の欠損は、ロゼット相から花序発生への転換を促進あるいは遅延する。APETALA1 (API) やLEAFY (LFY) のような花分裂組織決定遺伝子の変異体は花序発生を延長し、花の発生の開始が遅れている。

TERMINAL FLOWER (TFL1) 遺伝子と2つのEMBRYONIC FLOWER (EMF) 遺伝子 (EMF1とEMF2) は、栄養生長から生殖生長への転換と花形成の開始の両方を遅延させるのに関与している。TFL1の欠損変異体

はロゼット発生期と花序発生期の両方を短くする。劣性変異体emfはさらに劇的な相短縮的な表現形を示し、ロゼットシュート発育が見られず、花卉の無い花がいくつか着いた短縮した花序のみが存在している。

TFL1とEMF1遺伝子の変異体は、もう一つよく似た表現形を示す。シュートの頂端に花を付けることによって花序を無限生長性から有限生長性へ変換しているのだ。キンギョソウのTFL1のオーソログ、CENTRORADIALIS (CEN) もまた、シュートの無限性特異的な機能を担っている。いくつかの報告からキンギョソウとシロイヌナズナの無限生長性のメカニズムは共通であると考えられている。シュートの有限性は花序構築の多くの点に影響している。例えば、terminal flowerの発育は、頂芽優勢を減少させ、二次的花序の発生や劇的な花序形態の変化を導く。EMF1とTFL1遺伝子は高等植物の2つの花序タイプ、有限花序と無限花序、を特定する重要な役割を担っているのかもしれない。

EMF1の分子的な機能を解析するために著者らはポジショナルクローニングによりEMF1遺伝子のクローニングを行った。EMF1遺伝子は新規の制御タンパクをコードしており、単子葉のイネでも見つかった。これらのポリペプチドには、核局在シグナルのP-loopとLXXLL因子を含むモチーフが存在していた。トランスジェニック個体によるEMF1活性の操作から、EMF1活性はシュート無限性とflowering timeを制御していると考えられた。EMF1の考えられる機能とロゼット、花序発育を制御する役割について考察している。

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

## ◀文献情報▶

## 魚類は本当に耐糖能が低いのか？

Glucose intolerance in teleost fish : fact or fiction ?

Thomas W. Moon

Department of Biology, University of Ottawa, Canada

*Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 129 : 243-249 (2001)

魚類は哺乳動物に比べ糖代謝機能が弱く、飼料中の炭水化物を効率良く利用できないと言われている。魚類の糖代謝機能は魚種によって差異があり、ハマチやサケのような肉食性の強い魚種は、コイなどの雑食性魚種よりさらに糖代謝機能が劣り、飼料中の炭水化物の利用性は低い。このため、これらの魚種の飼料には畜産用飼料とは比べものにならない程の高タンパク質・高カロリー（高脂質）が要求される。従って、養殖対象となる肉食性魚種の飼料では魚粉や魚油が多く含まれることになり、飼料コストの増大や魚粉由来の窒素、リンによる養殖環境の汚染が問題となる。

魚類の糖代謝に関する初期の研究では、血中へのインシュリン分泌の絶対的不足が魚類の低い耐糖能（血糖値の上昇に対する糖代謝能が低く、高血糖が長く続く糖尿病的状态）の原因とされている。本論文では、哺乳動物におけるインシュリン分泌と作用機序を踏まえ、これまでの魚類の糖代謝に関する研究を、最新の研究成果も含めてレビューし、魚類の低い耐糖能が本当にインシュリンの絶対的不足に起因するものなのかどうか問題提起している。

魚類に対してグルコース負荷試験を行うと、長時間（6～36時間）にわたって高血糖状態が続き、哺乳動物での糖尿病的な血糖値変動を示す。このとき、インシュリンを投与すると高血糖状態が解消されることから、魚類ではインシュリン分泌能力が弱く、耐糖能が低いと考えられていた。しかし、ラジオイムノアッセイを用いた血中インシュリン濃度

の測定では、魚類の血中インシュリン濃度は0.2～5 nMの範囲にあり、哺乳動物での値より高い傾向にあることが明らかとなった。また、アメリカナマズのブロックマン小体（哺乳動物における膵臓ランゲルハンス島に相当する内分泌組織）では、血中グルコース濃度の上昇に伴ってグルコキナーゼ活性が上昇し、インシュリン分泌が行われることが報告されている。

一方、末梢組織でのグルコース利用に関する研究では、骨格筋組織にインシュリンレセプターが存在するが、その数は哺乳動物に比べて少ないこと、草食性および雑食性魚類では肉食性魚類よりも多くのインシュリンレセプターを有することなどが明らかとなっている。また、細胞膜におけるグルコースの拡散輸送に参与する糖輸送担体（Facilitative glucose transporter : GLUT-4）の遺伝子発現がブラントラウトの骨格筋組織で確認されているが、インシュリンレセプターを介したシグナル伝達によってGLUT-4がどのように機能するのかは明らかとはなっていない。

これらの研究成果から、魚類の低い耐糖能はインシュリンの絶対的不足によるものではなく、むしろ末梢組織におけるグルコースの取り込み・利用に参与するシグナル伝達経路に原因があるのではないかとの仮説を提唱している。魚類におけるインシュリン分泌やその作用機序に関する分子生物学的解明は緒に就いたばかりであり、哺乳動物とは異なった魚類特有の糖代謝機構が存在するかも知れない。養魚飼料による水圏環境の汚染を防ぐため、また、糖尿病の養殖魚が食卓に上ることのないよう、更なる研究の進展を望まずにはいられない。

（抄訳：椎名康彦，SHINA Yasuhiko，マルハ株式会社中央研究所）



◀海外便り▶

## ストレス誘導性不定胚発生の分子生物学的解析 —オランダPlant Research Internationalでの一年間—

独立行政法人農業技術研究機構 近畿中国四国農業研究センター  
福岡 浩之

### 1. はじめに

1999年8月から一年間、科学技術庁長期在外研究員としてオランダのワーゲニンゲンに滞在して研究を行う機会を得た。ワーゲニンゲンはヘルダーランド州に属し、アムステルダムから80kmほど内陸のオランダ中央部に位置する。教会広場を中心として石造りの建物が並ぶ典型的なオランダの小都市であるが、農科大学や農業関係の公的研究所、ベンチャー企業などが集中しており、オランダだけでなくEUにおける農業研究の一拠点となっている。私の滞在したプラントリサーチインターナショナルはゲノミクス、プロテオミクス、発生・生殖、生物多様性、生物間相互作用、遺伝育種、耕地生産環境、農業システム、生物情報の9つの研究部門（ビジネス・ユニット）をもち、農業研究の広範な分野を網羅している。私が所属した発生・生殖研究部門は花器官形成に関わるMADS-box遺伝子の解析で知られるDr. Gerco Angenentがマネージャーを務めており、オランダ、カナダ、中国、インドなど多様な国籍を持つ10名ほどの常勤研究者がそれぞれテクニシャン、ポスドク、大学院生らを抱え、独自のプロジェクトを企画して研究を行っていた。

### 2. 未熟花粉からの胚発生誘導に関わる転写因子BABYBOOM

ナタネ、ハクサイなどのブラシカ属作物は、未熟花粉を蕾から取り出し適当な培地条件下で短期間の温度処理を行うことによってその分

FUKUOKA Hiroyuki

〒721-8514 広島県福山市西深津町6-12-1

化プログラムを成熟花粉形成から胚発生へと変換できる。半数性の完全な胚が効率的に得られるという利点からこの技術は育種および遺伝解析のための有用なツールとして用いられていると同時に、胚発生、再分化といった基礎・応用両面で重要な現象を研究するための格好のモデル系を提供する。私はこれまでナタネ未熟花粉由来の不定胚誘導系を用いて、胚発生過程の窒素同化についての分子的な解析や半数体の利点を生かした形質転換法の開発を行ってきた。それと平行して、単細胞からの植物体再分化のメカニズム解明につながる知見を得る目的で不定胚誘導時に特異的に発現する遺伝子の単離と機能解明を試みていた。このような背景から同様のアプローチで研究を行っていたDr. Boutilierらのグループに参画したいと考えたのであるが、滞在先では幸運にもその時期に彼女らによって単離された興味深い遺伝子BABYBOOM (BBM) の機能解析を行うことができた。BBMは当初ナタネの未熟花粉培養系における胚発生誘導時特異的遺伝子BNM3として報告されたもので、AP2ドメインを持つ転写因子様のタンパクをコードしている。最近、CaMV35Sプロモータを用いてBBMを強制発現させるとその形質転換植物の栄養器官上に無数の不定胚が形成されることが明らかになった。このことはBBMが植物の胚発生を誘導する上で重要な役割をもつことを強く示唆しており、さらにこの形質転換植物体がサイトカイニン過剰合成変異体に類似した表現型を示すことから、サイトカイニンの関与する遺伝子発現系に関わりをもつと予想されている。



### 3. BBMの転写活性化ドメイン

BBMが転写因子として機能するか否かのひとつの指標として、酵母を用いた実験系によって転写活性化ドメインの探索を行った。その結果、BBMにはタンパク質の両端にそれぞれ独立した2つの独立した転写活性化ドメインが存在することが明らかになった。さらに、懸濁培養細胞や不定胚を用いた形質転換実験によってこの2つのドメインは酵母細胞だけでなく植物細胞においてもそれぞれ独立に転写活性化能を持つことが確かめられた。同じAP2ドメインを持つシロイヌナズナの既知の転写因子AP2およびANTには複数の転写活性化ドメインは認められなかった。2個の転写活性化ドメインが異なる分化経路をそれぞれ独立に制御している例として神経細胞分化に関わる転写因子Brn3などが報告されているが、BBMも2つの転写活性化ドメインを介して同様の機能分担を行っているのかもしれない。

### 4. BBMと相互作用する タンパク因子の検索

一般に、転写因子は他の因子と相互作用してその機能発現が時空間的に制御されているものと考えられる。そこで、タンパク質間の相互作用を生物学的に検出できるtwo-hybrid法を用いてBBMと相互作用する未知の因子の単離を試みた。BBMの2つの強力な転写活性化部位が実験の大きな障害となったが、最終的に数回の大規模スクリーニングといくつかの確認実験を経てBBMと細胞内で相互作用する因子をコードしていると考えられる2種類の遺伝子が単離できた。AP2ドメインを持つ転写因子が他のタンパク因子と細胞内で相互作用していることが示唆されたのはこれが初めてだと思われる。さらに、これら2種のタンパク質はBBMの2つの独立な転写活性化領域のおのおの一方と特異的に相互作用することも明らかになった。これら2つの相互作用因子の機能解明はこれからの解析を



写真1 プラントリサーチインターナショナルの  
メインビルディング

待たなければならないが、この結果はBBMが関わる胚発生関連遺伝子の発現制御に対して2つの転写活性化ドメインが機能分担を行っているという前述の仮説につながる可能性があるかと期待している。今後はこの2つの因子の発現パターン解析や形質転換実験による機能解析、BBMをふくめた3因子の遺伝的上下関係等について解析を進める必要がある。

### 5. 研究所について

プラントリサーチインターナショナルはオランダ農業省農業研究局(DLO)の3つの研究所(CPRO-DLO, AB-DLO, IPO-DLO)が統合し、2001年1月に発足した非営利研究所である。この改組はおおざっぱに言ってほぼ日本の独立行政法人化のようなもので、さらに組織運営の一部はWageningen URという組織のもとでワーゲニンゲン農科大学も含めた統合化が行われた。私の滞在中に改組が行われたため、帰国後の独法化の予習にもなるなどと冗談半分に考えていたが、実状は(少なくとも現状の)日本の独法に比べずっと厳しいものであった。未だその半分はEUなどの政府系資金であるとはいえ、研究所の運営費は人件費からなから全てを研究者がグラ



写真2 オランダ人の毎日に欠かせないコーヒータイム。10時と3時の2回あるが、忙しくてこれに参加できないのは仕事の要領が悪いせいとのこと(?)。

ントとして得た競争的外部資金によっている。研究所に「マーケティング」という部門があり、私はてっきり農業経営関係の研究部門かと思っていたのだが、実際は研究を「売る」ための「営業」を行っている部門であった。それぞれの研究者は企業主導の研究を強いられることとその見返りに研究費を得ることとの間に生じる様々な矛盾を抱えて試行錯誤しているようであった。

## 6. おわりに

一年は長いようで短く、あっという間に過ぎてしまった。オランダは治安もよく、ほぼ全ての人が驚くほど流暢に英語を話し外国人

にもフレンドリーで、日常生活は非常に快適だった。研究環境は厳しさを増しているとはいえ、基本的に週末はプライベートを楽しみ、平日も夕方は早めに家に帰って庭の手入れをしたりサイクリングを楽しんだりという生活パターンであり、ワークシェアリングの思想からか研究者でもテクニシャンでも週3.5日から4日という勤務形態で仕事をしている人が多く見受けられた。オランダの人々は新しい文化を受け入れる寛容さと積極性が強い一方で自国の文化を大切にする気風もバランスよく持ち、美しい国土と成熟した福祉社会を保ちながら質素かつ堅実に人生を楽しむ秘訣を知っているという印象を受けた。オランダには超一流の名の売れた研究機関とは言えないかも知れないがワールゲン農科大、ライデン大、アムステルダム大などをはじめとして堅実に独自の研究を進めているグループが多く、また、園芸・酪農・畜産の先進国として、実利的な研究開発を進め高い技術力を持つ企業も多い。多少マイナーな印象をお持ちの方もおられると思うが、留学や共同研究をお考えの方の選択肢の1つとしてお勧めしたいと思う。

最後に、本長期在外研究の貴重な機会を与えていただいた科学技術庁、農林水産技術会議事務局および中国農業試験場（当時）の方々に深く謝意を表したい。また僭越ではあるが、これまでの科学技術庁長期在外研究員制度と同様あるいはそれ以上のチャンスが、今後も何らかの形で若手研究者に与えられるよう関係各位のご配慮をお願いして、本稿の終わりとしたい。

## 生研機構からのお知らせ

新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業

新技術開発部基礎研究課

### 一般型・平成13年度採択研究課題

研究課題名 〔研究代表者氏名及び所属〕	研究チーム構成	分野
家畜とヒトの炎症性腸疾患の発生機序と関連性の解明 百溪 英一（独立行政法人農業技術研究機構 動物衛生研究所）	尾崎 博 （東京大学大学院農学生命科学研究科）	①
化学環境認識に基づく「昆虫型行動決定スイッチングシステム」の解明 尾崎 まみこ（京都工芸繊維大学繊維学部）	中村 整 （電気通信大学電気通信学部） 朝岡 潔 （独立行政法人農業生物資源研究所）	④
昆虫の抗微生物タンパク質の特性解明と利用基盤技術の開発 山川 稔（独立行政法人農業生物資源研究所）	森 肇 （京都工芸繊維大学繊維学部） 廣田 好和 （独立行政法人農業技術研究機構 動物衛生研究所）	③
細菌「超チャネル」の構造生物学的解析と環境浄化型「スーパー細菌」の創成 村田 幸作（京都大学大学院農学研究科）		④
植物ホルモンアブシジン酸の制御機構の解明とバイオテクノロジーへの応用 篠崎 一雄（理化学研究所）	篠崎 和子 （独立行政法人国際農林水産業研究センター）	①
人工制御酵素を用いた高等生物の遺伝子操作とニュー・バイオテクノロジーの創成 小宮山 真（東京大学先端科学技術研究センター）		⑥
タンパク質工場としての糸状菌の高度利用に関する基盤的研究 北本 勝ひこ（東京大学大学院農学生命科学研究科）	秋田 修 （独立行政法人酒類総合研究所）	①
ナノプローブによる生物機能のナノ領域でのアクティブ計測 下山 勲（東京大学大学院情報理工学系研究科）	神崎 亮平 （筑波大学生物科学系）	⑥

注) 1. 分野欄の○の中の数字は、それぞれ次の研究分野を示す。

- |                  |                        |
|------------------|------------------------|
| ①：生物機能解明・生産力向上分野 | ④：生物機能利用による環境改善分野      |
| ②：高機能・高品質食品分野    | ⑤：工学・環境学的手法による生物機能向上分野 |
| ③：生物系素材分野        | ⑥：共通基盤に関する研究分野         |

2. 採択課題の並びは研究課題名の五十音順である。



## 生研機構からのお知らせ

## 若手研究者支援型・平成13年度採択研究課題

研究課題名 〔研究代表者氏名及び所属〕	研究チーム構成	分野
行動特性の育種改良を目指した、家畜の脳内物質関連遺伝子の解析 村山 美穂（岐阜大学農学部）		⑥
ザゼンソウを模倣した温度制御アルゴリズムの開発とその生物系発熱制御デバイスへの応用 伊藤 菊一（岩手大学農学部附属寒冷バイオシステム研究センター）		⑥
肉食性昆虫の共生微生物が産生する殺虫性タンパク質に関する基礎研究 松田 一彦（近畿大学農学部）		③
非メチオニン型翻訳開始機構の解析とその利用法の開発 中島 信彦（独立行政法人農業生物資源研究所）		⑥
微生物による昆虫の生殖操作機構の解明と利用 深津 武馬（独立行政法人産業技術総合研究所）		①

注) 1. 分野欄の○の中の数字は、それぞれ次の研究分野を示す。

- ①：生物機能解明・生産力向上分野      ④：生物機能利用による環境改善分野  
②：高機能・高品質食品分野      ⑤：工学・環境学的手法による生物機能向上分野  
③：生物系素材分野      ⑥：共通基盤に関する研究分野

2. 採択課題の並びは研究課題名の五十音順である。

(問合せ先)

新技術開発部基礎研究課（担当：渡辺，高瀬） Tel：03-3459-6569 Fax：03-3459-6594  
URL：http://www.tokyo.brain.go.jp/

## 新事業創出研究開発事業（地域型）

新技術開発部技術開発課

生物系特定産業技術研究推進機構（理事長 堤 英隆）では、新事業創出研究開発事業において、新たに、地域特性を活かした研究分野を対象に、民間企業を主体とした地域研究共同体（地域コンソーシアム）を形成し、地域における新事業、新雇用の創出につながる研究開発を推進することとしました。

このため、各地域において幅広く募集を行い、5月の締切まで、全国から地域コンソーシアムとして49、参加機関数延べ258の応募がありました。

これらの提案について、学識経験者から構成される選考委員会において、①地域における新事業創出及び産業発展基盤形成への貢献、②研究の新規性・獨創性、③研究計画の妥当性等の観点から審査を行い、その結果、次の6つの地域コンソーシアム（参加機関延べ34機関）を採択することとしました。

平成13年 8月



## 生研機構からのお知らせ

### 北海道産の超強力・強力小麦粉を用いた新高付加価値食品の開発

技術コーディネーター：横田 篤（北海道大学大学院農学研究科）

山内 宏昭（(独)農業技術研究機構北海道農業研究センター）

これまでうどんに利用されていた北海道産秋播小麦の用途を広げるため、超強力・強力小麦品種の開発、その特性を活かした各種食品の専用粉の調製技術の開発等を基礎にして、100%国産小麦のパン、利便性の高い即席めん等の新食品の開発を行う。

これにより、北海道における小麦生産の活性化、食品産業の創出に貢献するとともに、地域の農産物を利用した食品を求める消費者の要望に応える。

- めんじ風味等を与えるアルカリ耐性発酵微生物の分離、育種 ……………（北海道大学大学院農学研究科）
- 超強力・強力小麦粉に含まれる特異的なタンパク質の特定及び解析 ……（株北海道グリーンバイオ研究所）
- 超強力・強力小麦粉の加工適性の解明と用途別の最適ブレンド技術の開発  
……………（(独)農業技術研究機構北海道農業研究センター）
- 超強力・強力小麦の製粉技術、各種食品用途別の専用小麦粉の調製技術の開発 ……………（江別製粉(株)）
- すぐに食べられて、のびない即席めん（発酵めんも含む）の開発 ……………（東洋水産(株)）
- 熟期が早く、多収量で、加工適性のある超強力・強力秋播小麦の開発  
……………（(独)農業技術研究機構北海道農業研究センター）

### カドミウムを除去するファイトレメディエーション技術の開発

技術コーディネーター：住田 弘一（(独)農業技術研究機構東北農業研究センター）

Cd（カドミウム）を農地から除去するための経済的で環境に優しいファイトレメディエーション（植物による土壤環境浄化）技術を実用化するため、Cdを高度に吸収・蓄積するカラシナ等を選抜・強化しつつ、土壤から植物への移行を促進する技術等を開発し、体系化する。また、蓄積されたCdの安全な処理技術等を開発する。

これにより、修復に必要となる植物の種子・苗の生産、農地からCdを浄化する事業、植物からの重金属の回収・処理のための事業等が創出される。

- 土壤中のCdを可溶化し、植物に効率的に吸収させるための技術開発  
……………（(独)農業技術研究機構東北農業研究センター）
- Cdを効率的に吸収・蓄積する植物の選抜とその栽培技術等の体系化 ……………（秋田県農業試験場）
- 植物体内でCdを根から地上部へ移行させるための技術開発 ……………（秋田県立大学）
- カラシナ等を用いたCdを蓄積する能力の高い植物の開発 ……………（株植物工学研究所）
- 植物体焼却処理の際にCdを全て回収し、安定化させるための技術開発 ……………（株新菱）

生研機構からのお知らせ

葛巻バイオガス高度利用コジェネレーションシステムの開発

技術コーディネーター：野池 達也（東北大学大学院工学研究科）

酪農が盛んな岩手県葛巻町において発生する家畜ふん尿，食品残さ等を発酵して生産されたメタン，水素等のバイオガスを回収・濃縮精製し，熱と電気を同時に高効率に産生する燃料電池を用いたコジェネレーションシステムにおいて利用できるようにするため，地域に適合したトータルシステムを開発する。

これにより，地域社会に新エネルギーが安定供給でき，農業現場等で利用されることが期待される。さらに，他の酪農が盛んな地域で広く採用されることが期待される。

- メタン発酵と水素発酵の基礎研究，比較検討及びトータルシステムの評価 …(東北大学大学院工学研究科)
- 家畜ふん尿等の調査，コジェネレーションシステムの有効利用法の確立 ……………(社)葛巻町畜産開発公社)
- エネルギー転換率を向上させた発酵システムの開発及びトータルシステムの検討 ……………(清水建設(株))
- バイオガスの原料・プロセスと発生ガスの関連の解明 ……………(オリオン機械(株))
- 燃料電池に利用可能なメタンガスの回収・濃縮精製技術の開発 ……………(岩谷産業(株))
- バイオガスを用いる農業用燃料電池の開発 ……………(三洋電機(株))

カンキツの機能性成分を活用した保健機能食品の開発

技術コーディネーター：矢野 昌充 ((独)農業技術研究機構果樹研究所)

がん，糖尿病等の予防が期待されるカロテノイドの一種であるβ-クリプトキサンチンや，がん，糖尿病，高血圧等への効果が見出されたカンキツ特有のノビレチン等について，ウンシュウミカン，沖縄特産のシイクワシャー等を対象に，疾病予防機能を解明し，カンキツに含まれる機能性成分を活用した食品の開発を行う。

これにより，カンキツの健康増進機能が消費者にも理解され，西南暖地地域のカンキツ栽培が活性化されるとともに，カンキツ果汁産業等の新規事業の発展が期待される。

- 機能性成分に富むカンキツ系統の探索及び機能性成分の蓄積機構の解明  
……………((独)農業技術研究機構果樹研究所)
- ミカンに含まれるβ-クリプトキサンチンを有効利用するための加工法の検討  
……………(愛媛県農業協同組合連合会)
- シイクワシャーに含まれるノビレチンを有効利用するための加工法の検討  
……………(沖縄県経済農業協同組合連合会，琉球大学)
- β-クリプトキサンチンによるがん予防効果のヒトでの解明 ……………(京都府立医科大学)
- カンキツによる糖尿病，高血圧症予防効果のヒトでの解明 ……………(中村学園大学)

## 生研機構からのお知らせ

### 茶の抗アレルギー作用を利用した食品の開発

技術コーディネーター：山本(前田) 万里 ((独)農業技術研究機構野菜茶業研究所)

一部の品種の茶葉から見出した抗アレルギー成分(メチル化カテキン, ストリクチニン)について, その効果, 作用機作等を明らかにするとともに, それら茶特有の優れた機能性成分を活用した新たなアレルギー予防飲料や菓子等の食品の開発を行う。

これにより, 茶の消費が拡大され, 既存の茶産地及び新興茶産地の活性化, 茶産業・食品産業の発展, 消費者の健康な生活等へ貢献することが期待される。

- 抗アレルギー成分を含有した茶の製造法の開発及びそれら成分の簡易分析法の確立  
 .....((独)農業技術研究機構野菜茶業研究所)
- ストリクチニンの作用機作及び最適な摂取形態の解明 .....(九州大学大学院農学研究院)
- 抗アレルギー成分の効率的抽出法の開発及びヒトでの吸収・代謝機作の解明 .....(静岡県立大学薬学部)
- 抗アレルギー成分含有茶を用いたアレルギー患者への効果の確認 .....(東京大学保健管理センター)
- 抗アレルギー成分の加工特性の解明, 飲料への応用・試作 .....(アサヒ飲料(株))
- メチル化カテキンの苦味改善と食品への応用・試作 .....(森永製菓(株))

### 有明海における底質改善と底棲生物回復のための技術開発

技術コーディネーター：林 重徳 (佐賀大学低平地研究センター)

底質が急速に悪化している有明海では, 底棲生物の生息数が激減している。底質改善と底棲生物回復のために, 潜り囲繞堤(海面下にある囲繞堤)工法, 新たな底質改善材, 固結した底質層・干潟を耕耘する機械の開発等を含むシステムを開発する。

これにより, 底質改善事業の創出による各種底棲生物の回復が期待されるとともに, 特産のアゲマキ, タイラギ, アサリ等の底棲魚介類の新たな増養殖事業創出に貢献する。

- 底泥・底質等の調査, 潜り囲繞堤工等の底質改善工法の開発 .....(佐賀大学低平地研究センター)
- 底棲生物の生息調査及び潜り囲繞堤工に適應する底棲生物の解明 .....(佐賀県有明水産振興センター)
- 底泥を浚渫-脱水する装置, 固結した底質層を耕耘する機械等の開発 .....(株)ワイビーエム)
- 発泡廃ガラス材等を用いた底質改善材及び工法の開発 .....(日本建設技術(株))
- 開発された機械を用いる底泥浚渫-囲繞堤築造, 固結底質耕耘等の施工技術の開発 .....(松尾建設(株))

(問合せ先)

新技術開発部技術開発課 (担当: 田村, 村井) Tel: 03-3459-6567

E-mail: kaihatsu@tokyo.brain.go.jp

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

## 生研機構からのお知らせ

## 機械化促進業務のビデオによる紹介

企画部企画第2課

## 1. 趣 旨

当機構農業機械化促進業務では、各農機メーカー等との共同・協力体制の下、農業機械等緊急開発事業（略称緊プロ）を始めとして農業現場で待ち望まれている機械の開発を鋭意、実施しているところです。これら開発機を現場に浸透させ、農業生産性の向上等を図っていくためには研究開発のみならず、その普及に関しても従来にも増して力を入れていく必要があると考えています。

そのため、緊プロ開発機を中心に、最新の研究成果等をビデオに取りまとめ、広く農業関係者一般のご理解に役立てることといたしました。さらに、近年、特に国際競争が問題となっているネギの新しい機械化体系についてもビデオ化しています。（作成：本年7月）

## 2. ビデオの構成

## 【BRAIN2001】

第1章 水田作の機械開発「明日を切り開く水田農業のニューフェイス」6'40"

第2章 野菜の機械開発「日本の野菜作りを変えよう」6'00"※

第3章 果樹の機械開発「高品質果実の低コスト生産を目指して」4'00"

第4章 畜産の機械開発「畜産を支える技術開発」6'00"

第5章 基礎的技術の開発「農業の飛躍的な発展に向けて」4'40"

第6章 機械の評価と試験「優良な農業機械の普及に貢献」7'30"

## 【ねぎの機械化体系について】

「国際競争に打ち克つネギ作りを目指して」6'00"※（以上合計41分）

## 3. 配付

上記のうち※のみのネギ・野菜バージョン（12分）については、5000本を作成し、農林水産省の野菜新政策の説明会等を通じて全国の都道府県・市町村・普及センター・農協に配付済みです。それ以外も含めた全体バージョン（41分）については農業関係行政機関、教育機関、報道機関、関係メーカーその他に約300本をお配りしています。なお、ご要望の向きは、下記までお問い合わせ下さい。

企画部研究調整役 気多 正（けた ただし）Tel：048-654-7026 E-mail：tketa@iam.brain.go.jp



#### 編集後記

◆発行日はちょうど「敬老の日」に当たりますがブレインテクノニュース第87号をお届けします。

◆本号の総説は、清酒酵母（石川雄章氏・日醸造協会）を取り上げましたが、酵母に関連した話題としてバイオ燃料（近藤明彦・福田秀樹両氏・神戸大学）、サイレージ変敗防止（北本宏子氏・農業生物資源研究所）を、その他の国内情報では、食中毒ウイルスの抗体をタバコで発現させる「食べるワクチン」の可能性（杉本千尋氏・帯広畜産大学）、葉を花の器官に転換する技術（後藤弘爾氏・岡山県生物科学総合研究所）、牛乳の乳塩基性蛋白による骨代謝改善法（山村淳一・高田幸宏両氏・雪印乳業技術研究所）の研究をそれぞれご紹介いただいた。地域研究として、葉菜類の耐凍性を利

用した寒冷地の周年生産体系技術の研究（田村 晃氏・秋田県農業試験場）を、さらに海外便りとしてオランダにおけるストレス誘導性不定胚発生の分子生物学的解析（福岡浩之氏・近畿中国四国農業研究センター）、また文献情報では横尾正樹氏（東北大学大学院）、水野征一氏（カルピス基盤技術研究所）、岩井純夫氏（鹿児島大学）、春原英彦氏（東京大学大学院）、椎名康彦氏（マルハ中央研究所）にそれぞれご紹介いただいた。

お忙しい中をご執筆下さった研究者各位に、改めて深甚の謝意を申し上げます。

◆次号は、総説として“野菜作の機械化”を取り上げ、関連の研究情報を掲載する予定です。ご期待下さい。

（畠山記）

#### 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87号）

平成13年9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

BRAINテクノフォーラム  
「ヒトゲノム研究の新展開と今後の家畜ゲノム研究戦略」  
開催のお知らせ

主催：生物系特定産業技術研究推進機構、(社)畜産技術協会

後援：農林水産省（予定）

協賛：(社)農林水産先端技術産業振興センター（STAFF）

日時：平成13年10月9日(火) 13:00~17:00

場所：虎ノ門パストラル 新館1階 鳳凰の間東

東京都港区虎ノ門4-1-1

講演内容および講師：

(同時通訳付き)

1) 「ヒトESTのマッピング：Gene Resource Locator Project」

森下 真一 (東京大学大学院新領域創成科学研究科助教授)

2) 「ヒト完全長cDNAとゲノム研究」

菅野 純夫 (東京大学医科学研究所附属ヒトゲノム解析センター助教授)

3) 「ヒツジCallipyge (筋肉倍増形質) の解析：Comparative sequencing of a 250 kb new imprinted domain reveals six co-regulated imprinted genes whose expression levels are affected by the clpg mutation」

Carole Charlier (ベルギー・リエージュ大学助教授)

4) 「米国農務省における家畜ゲノム研究の現状と展望：Current Status and Future Perspective of USDA-ARS Livestock Genomics Research」

Steven Kappes (米国・農務省肉畜研究センター所長)

総合司会：東條 英昭 東京大学大学院農学生命科学研究科教授

参加費：無 料

お申し込み方法：FAX、e-mailまたは郵送にてお名前、勤務先、所属、住所、お電話番号をお知らせください。準備の都合上、お申込み・キャンセルは 10月2日(火)までをお願いいたします。なお、お申し込みは定員になり次第締め切らせていただきますので、予めご了承ください。

お申し込み先：〒105-0001

東京都港区虎ノ門3-18-19 虎ノ門マリビル10階

生研機構 企画部 企画第1課 (西元, 稲田, 中里)

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

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