

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

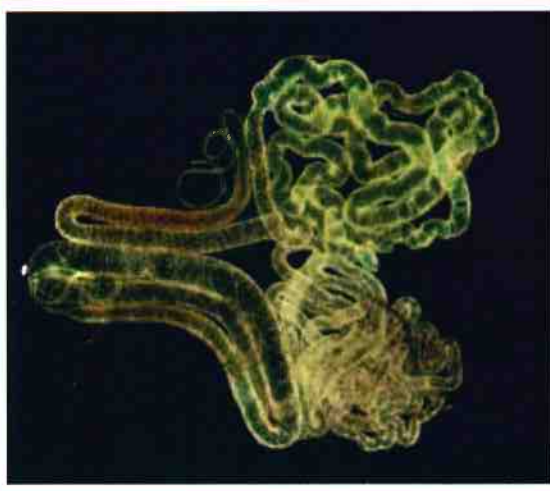
TECHNO NEWS

〈生研機構〉

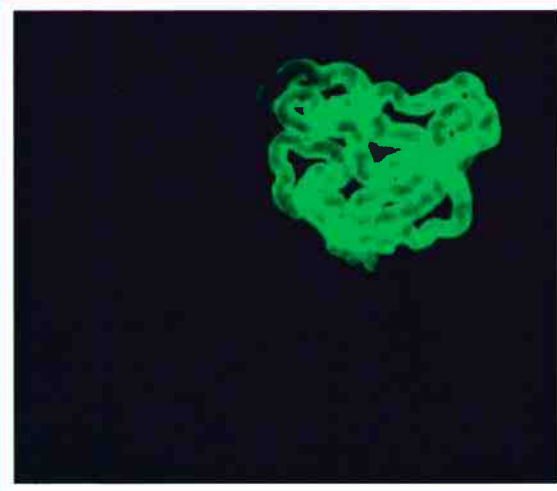
ブレインテクノニュース

第97号

JULY 15, 2003



通常光線下における組換えカイコの絹糸腺全体像



紫外線照射下の後部絹糸腺で、繭糸に組換え蛍光タンパク質が発現していることを示す

繭糸に外来タンパク質を発現した遺伝子組換えカイコの絹糸腺

独立行政法人 農業生物資源研究所 田村俊樹

目 次

総 説

- 昆虫テクノロジー研究について 1
川崎建次郎 (独立行政法人 農業生物資源研究所)

国内情報

- 絹糸中に生理活性タンパク質を生産する組換えカイコの作出 6
山田勝成¹・田中 貴¹・平松紳吾²・田村俊樹³ (¹東レ株式会社 化成成品研究所, ²同社 先端研究所, ³独立行政法人 農業生物資源研究所)
- 植物が生産した薬効成分を特異的器官・細胞に蓄積する分子機構 11
土反伸和¹・佐藤文彦²・矢崎一史¹ (¹京都大学 木質科学研究所, ²京都大学 生命科学研究所)
- 抗生物質耐性遺伝子を使わない新しい遺伝子組換えイネ選抜技術の開発 15
大島正弘 (独立行政法人 農業技術研究機構 作物ゲノム育種センター)
- 家畜における卵胞閉鎖抑制・発育促進技術の開発と卵成熟誘起機構の解明 20
佐藤英明・清水 隆・横尾正樹 (東北大学 大学院農学研究科 動物生殖科学分野)
- 海苔の粘質多糖・ポルフィリン 27
濱 洋一郎・常田尚正・杉本良子・常岡 史・小谷正幸¹・墨 利久² (佐賀大学農学部, ¹福岡県水産海洋技術センター 有明海研究所, ²佐賀県地域産業支援センター)
- 高精度水田用除草機の開発 32
宮原佳彦 (生物系特定産業技術研究推進機構 生産システム研究部)

地域の先端研究

- 魚油の生物学的脱臭法 —パン酵母を用いる新しい方法— 36
檜山圭一郎 (有限会社バイオシステム研究所・前大阪市立工業研究所生物工学研究室)

文献情報

- マウスおよび霊長類胚性幹細胞からの末梢神経系ニューロンおよび床板細胞への分化誘導 39
K. Mizuseki et al. (*Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 100, 5828-5833, 2003)
抄訳: 下司雅也 (独立行政法人 農業技術研究機構 畜産草地研究所)
- 酵母のエタノール耐性はオレイン酸に依存する 40
You KM et al. (*Appl Environ Microbiol.*, 69(3), 1499-1503, 2003)
抄訳: 澤田大輔 (カルピス株式会社 基盤技術研究所)
- あいた口がふさがらない話 41
A. Mustlil et al. (*The Plant Cell*, 14, 3089-3099, 2002)
抄訳: 岩井 純夫 (鹿児島大学 農学部)
- イネにおける分けつの制御 42
X. Li et al (*Nature*, 422, 618-621, 2003)
抄訳: 丸尾嘉宏 (東京大学 大学院農学生命科学研究科)
- 捕食性魚類群の世界的規模の急速な減少 43
R. Myers et al. (*Nature*, 423, 280-283, 2003)
抄訳: 森 徹 (日本水産株式会社 中央研究所)

海外便り

- パラグアイのダイズ生産と研究
—地域農業研究センターにおける2年間— 44
豊田政一 (独立行政法人 農業技術研究機構 北海道農業研究センター畑作研究部)

- 生研機構からのご案内 47

表紙写真説明

繭糸に外来タンパク質を発現した遺伝子組換えカイコの絹糸腺: 写真左は、通常光線下の組換えカイコの絹糸腺全体像を示し、写真右は同一絹糸腺の紫外線照射像を示すが、後部絹糸腺部のみが映し出され、ここに組換え外来タンパク質であるクラゲ蛍光タンパク質を発現混合した繭糸のあることが明らかになる。この手法を適用して、繭糸に混合した目的とするタンパク質を作出回収することができる。この「昆虫テクノロジー」については、本誌1頁の総説、並びに国内情報6頁をご覧ください。

◀総説▶

昆虫テクノロジー研究について

独立行政法人 農業生物資源研究所

川崎 建次郎

昆虫の機能を利用する昆虫テクノロジー研究の中で、多様な昆虫からユニークな機能を見つけ出し、遺伝子を解明して機能を利用する方向が、ゲノム研究の進む中で見えてきている。また、昆虫特異的機能を支配する物質も遺伝子組換えによって作ることができるようになり、昆虫を資源として利用できる環境が整いつつある。これらの研究を進めるため、昆虫テクノロジー研究がスタートしている。

1. 昆虫テクノロジーとは

昆虫というと、子供の頃好きだったカブトムシ、トンボ、チョウ、農作物や花の害虫のヨトウムシやアブラムシ、人を刺すカ、台所に出没するハエ、ゴキブリ等を思い浮かべても、「昆虫テクノロジー」と言われても何だかわからない、という人がほとんどではないだろうか。昆虫は種の数が多いということは良く知られており、世界中に100万種以上いるといわれている。それらの種をながめてみると、姿形や大きさ、食物、生息する環境、生態系での役割、体の構成成分等は多様であり、その中には人間が利用できる機能を持つものや、役に立つ物質を作り出すものもある。このような多様な昆虫の機能や産生物を利用し、役立てて産業に結びつける技術が、昆虫テクノロジーである（表1）。

2. 昆虫の物質生産機能を利用する

昆虫の持つ物質生産機能の利用としては、古くから養蚕による絹、養蜂によるハチミツやローヤルゼリーの生産等がある。このうち養蚕業は、カイコが桑の葉を食べて成長し、繭を作ることを利用している。これはカイコが桑の栄養成分を体の中で絹タンパク質に変換する機能を利用していることになり、まさに昆虫機能の利用といえる。近年の遺伝子組

KAWASAKI Kenjiro

〒305-8634 つくば市大わし1-2

換え技術の発達によって、このカイコがタンパク質を生産する能力を人為的に改変して、人間に有用なタンパク質を作らせる技術が開発されている。この手法は、昆虫の体を物質の生産工場として利用することから、昆虫工場と呼ばれている。

(1) カイコとバキュロウイルスの系を利用した物質生産

バキュロウイルスは、昆虫の仲間に特有な病原ウイルスであるが、カイコ幼虫に感染して増殖すると多角体と呼ばれる自分自身を保護するための外皮タンパク質を大量に生産する。この多角体のタンパク質遺伝子を組換えることによって別の有用な物質をカイコ幼虫の体液中に生産させることができる。この方法の難点としては、体液中にはいろいろなタンパク質が含まれており、精製が困難なことがあげられる。しかし、組換え体ウイルス接種後4日程度で目的物質を回収できるため効率がよいことや、封じ込め期間が短くて済むといった利点がある。この方法を利用することによって、東レ(株)はネコインターフェロンを生産することに成功し¹⁾、商品化されている。

(2) 組換え体カイコを利用した物質生産

昆虫の遺伝子組換えは最近までショウジョウバエでしかできなかったが、カイコでもトランスポゾン（動く遺伝子）の1種である *piggyBac* を利用する遺伝子組換え技術が開

表1 昆虫産業の全体像

昆虫利用の対象	分野	主な市場、製品の例
生理機能の利用	代謝機能 (昆虫工場)	医療
		工業
	代謝・行動・休 眠等機能	農業 (創農薬)
	生体防御機能等	農業
産生物質の利用	絹タンパク質	養蚕
		医療
		化粧品
		食品等
	ミツバチ産生物	養蜂
ロウ物質	工業	
	食品	
キチン	工業	
信号化学物質	医療	
生態系の機能の利用	天敵昆虫	農業
	花粉媒介昆虫	農業
	食糞性昆虫	畜産
関連微生物の利用	天敵微生物	農業
	関連微生物 (昆虫工場)	医療

平成14年度 昆虫テクノロジー研究の産業利用への可能性と市場規模予測調査報告書
(平成15年3月 社団法人 農林水産先端技術産業振興センター) の表を改変

発された²⁾ (図1)。この方法は、一度組換え体カイコを作出すると系統として維持することができ、安定した発現系として確立(品種化)できる利点もある。また、最大の特徴は絹タンパクであるフィブロイン、セリシンのプロモーターと組み合わせることによって絹糸腺のみで目的物質の遺伝子を発現させ、繭糸の中に目的物質を作らせる所にある。繭から回収すると、目的物質と絹タンパク以外の夾雑物を大幅に少なくできること、そしてたとえば抗菌タンパク質の遺伝子を発現させると、抗菌性の繊維ができるというように、新機能を付与した絹糸を得ることができるなど、他の方法にはない優れた点を持っている。この技術によって作られた製品はまだないが、これらの利点を活用するメリットは大きく今後の技術確立と利用が期待されている。

3. 昆虫の生理機能を利用する

昆虫はほ乳類と大きく異なる生理機能を持

っている。その1つは、病原菌に対する防御機構である。昆虫は外来の病原菌に対しては乳類のような抗原抗体反応は示さず、殺菌力のある抗菌タンパク質で身を守っている。この物質は、抗生物質と異なり、細胞壁に穴をあけるなどのメカニズムで病原菌を殺すため、抗生物質に耐性を示す菌にも有効である。抗菌タンパク質の難点は、そのままは乳類の体内に注入すると抗原抗体反応を引き起こすことである。しかし、抗菌活性を保ったまま物質の分子量を小さくして抗原抗体反応をなくす研究が続けられており、利用の可能性が開けつつある。

昆虫は、食餌の範囲が広く、植物の生葉、落ち葉、花の蜜、材木、他の昆虫、動物の死骸、ロウ物質、ケラチン等、多種多様であり、それに応じた消化酵素、代謝系を持っている。また様々な環境に適応するために耐寒性、耐乾燥性や、休眠性を示すものもある。遺伝子の解析技術と遺伝子を導入する技術が進み、特定の機能を他生物で発現できるようになっ

ている現在では、これらの昆虫に見られるユニークな機能を利用することにより、利用できる資源の範囲が広がり、より低投入の工業生産技術開発につながるものと期待されている。

4. 害虫を防除するために昆虫の機能を利用する

昆虫にはユニークな機能があることを述べ

たが、特定の害虫種に固有の代謝系が発見できれば、その代謝系を標的とした昆虫制御剤開発につなげることができる。良く知られているように、昆虫はほ乳類と異なり、脱皮変態を行う（図2）。脱皮変態は脱皮ホルモンによって引き起こされるが、このホルモンは昆虫の仲間特有なものである。また、ホルモンの情報を受け取るホルモン受容体（レセプター）は、昆虫のグループによって特異性があることがわかってきているので、ホルモ

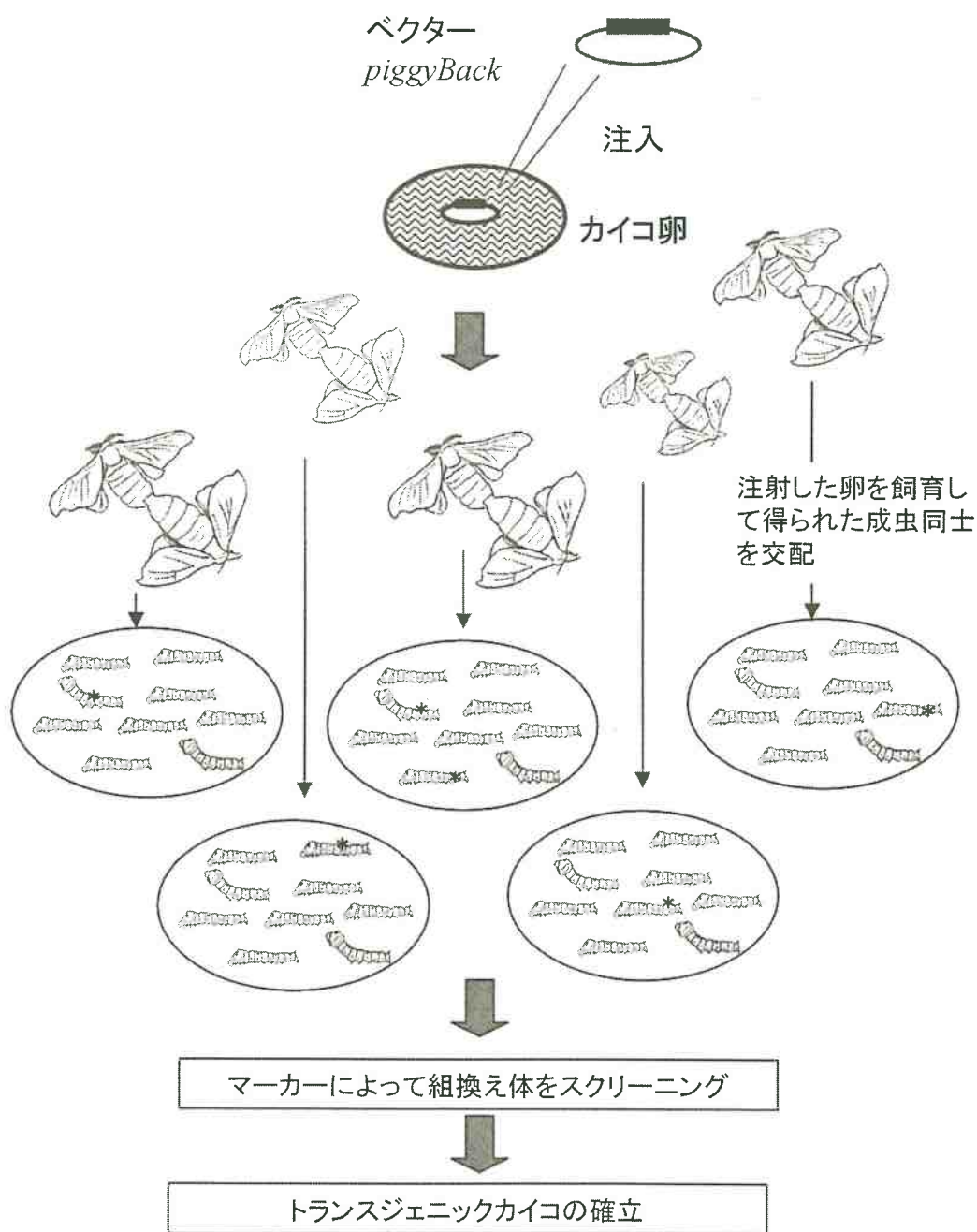


図1 トランスジェニックカイコの作出

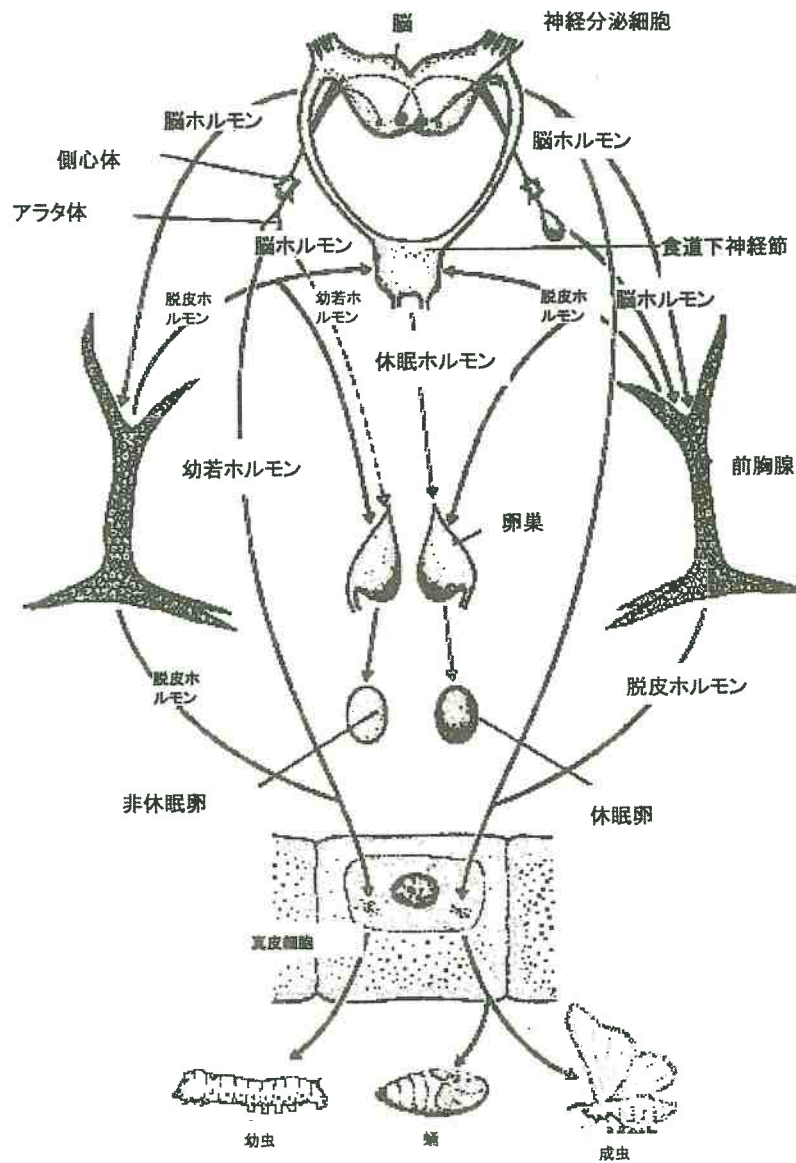


図2 カイコの脱皮変態，休眠に関わるホルモン作用の模式図 (Tazima 1978)

ンレセプターを標的とする化合物を開発すれば、ほ乳類には影響がなく、たとえばりん翅目昆虫にのみ効果のある薬剤の開発も可能と考えられている。

この他にも昆虫はほ乳類が利用していないトレハロースという糖を利用しており、また外骨格はキチンで構成されている。このような物質の代謝系も昆虫制御剤開発の標的とすることができる。ゲノムの解読が進めばこのような代謝系だけでなく、休眠、寄主選択行動、摂食行動、配偶行動などを制御する系も明らかになっていくと考えられるので、その制御系を標的とする昆虫制御剤の開発も将来

は可能となるだろう。

5. 昆虫の産生物や体を構成する物質を利用する

従来、絹は繊維や衣料品として利用されてきたが、絹を純粋なタンパク質のかたまりと見れば、物理的・化学的に加工できる材料として考えることができる。絹タンパクはフィブロインとセリシンという2種類のタンパク質で構成されているが、そのうちのフィブロインを物理的に1 μm程度の微粉末化する技術が開発された。これによって得られた粉末

は、フィブロインの結晶構造を保っており、絹繊維に見られる性質を保持している上に成形性に優れているため、絹粉末100%の化粧品が開発可能となり、商品化されている。また、フィブロインを加工して作ったフィルムは傷口の被覆剤として優れた性質を示すことや、フィブロイン、セリシンには細胞増殖活性があることもわかっている³⁾。また、フィブロイン、セリシンとも硫酸化によって抗血液凝固作用を示す物質を作れることがわかっており、化学的な改変も含めて、素材としての絹タンパクの利用が広がってきている。

6. その他の昆虫機能利用

昆虫は生態系で様々な役割を果たしている。この中に天敵昆虫があげられるが、世界的に天敵昆虫は害虫制御用に増殖販売されるようになってきており、日本でも国産のヒメハナカメムシなどがアザミウマなどの害虫防除用に販売されるようになってきている。マルハナバチ等の昆虫は花粉媒介者として利用が進んでおり、ハエなどの昆虫を畜糞処理に用いる例もある。

また、昆虫の体の構造や動きを解析・模倣する研究も行われており、モルフォチョウやタマムシの光沢を模倣した繊維等や、カブトムシ等甲虫類のはねの開閉を模倣した構造物、昆虫がフェロモンを感知してフェロモン源に到達する動きを模倣するロボット等の研究も進められている。

7. これらの機能を利用するための研究 —昆虫テクノロジープロジェクト—

昆虫テクノロジープロジェクト（正式名称は、21世紀最大の未利用資源活用のための「昆虫・テクノロジー」研究）は、農林水産省の委託プロジェクトとして、平成15年から18年までの4年間の計画で開始されている。研究内容は、次の3つとなっている。（1）

農業用・衛生害虫用「ゲノム創薬」の開発（本稿中の「害虫を防除するために昆虫の機能を利用する」に相当。以下同）、（2）ゲノム情報を活用した有用物質生産工程の高度化（「組換え体カイコを利用した物質生産」および「昆虫の生理機能を利用する」）、（3）昆虫のみが獲得した材料の改変・加工利用（「昆虫の産生物や体を構成する物質を利用する」）。このプロジェクトは、近年のゲノム解析技術の発展を背景としており、平成14年度の補正予算で実現したカイコのゲノムの全塩基配列解析結果を利用して研究を加速化し、産業活性化に結びつけることを目的としている。

昆虫は養蚕と養蜂以外には今まであまり産業と縁がなく、学問の世界や趣味の世界というイメージが強かった。しかし、ゲノム情報の利用が急速に進んでいる現在、昆虫はゲノム情報等を橋渡しとして産業との接点を増やすことによって、その機能の利用が進むものと思われる。そのためには、昆虫の持つユニークな現象を明らかにし、アピールして素材としてより認知度を高める必要がある。

文献

- 1) Sakurai, T. et al. (1992) J. Vet. Med. Sci., 54 : 563-565
- 2) Tamura, T. et al. (2000) Nature Biotechnology, 18 : 81-84
- 3) Tsubouchi, K. et al. (2003) J. Insect Biotech & Seri., 72 : 65-69
- 4) 昆虫産業 地上最大の未利用資源の活用 (1997) 梅谷 献二 編 (社)農林水産技術情報協会 東京
- 5) 昆虫機能利用学 (1997) 鈴木 幸一 他 朝倉書店 東京
- 6) 平成14年度 昆虫テクノロジー研究の産業利用への可能性と市場予測調査報告書 平成15年3月 (社)農林水産先端技術産業振興センター

◀国内情報▶

絹糸中に生理活性タンパク質を産生する
組換えカイコの作出¹東レ株式会社 化成品研究所 ²同社 先端研究所³独立行政法人 農業生物資源研究所山田 勝成¹・田中 貴¹・平松 紳吾²・田村 俊樹³

トランスジェニックカイコ技術を利用して、絹糸腺および絹糸中に生理活性タンパク質を産生する組換えカイコの作出に成功した。バキュロウイルスを用いる従来技術では、生理活性タンパク質をカイコ体液中に産生させるが、本手法では夾雑タンパク質の少ない絹糸腺や絹糸中に産生させるため、目的生理活性タンパク質の精製が容易になると期待できる。また、組換えウイルスの不活化、組換えウイルスの接種が必要ないなど多くのメリットが期待できる。

1. はじめに

生理活性タンパク質の産生方法として、動物細胞や大腸菌、酵母などの微生物を用いる方法と並んで昆虫細胞を利用する方法が広く行われている。カイコを用いた生理活性タンパク質の産生は、前田ら¹⁾によって開発されたカイコ核多角体病ウイルスを利用するもので、カイコ幼虫をウイルスの宿主とすることができ生理活性タンパク質の大量生産に適している²⁾。カイコ体内で発現させた場合、組換え蛋白質の発現量は十分に高く、複合糖鎖付加を除いて動物細胞とほぼ同等な蛋白質の修飾も行われることが知られており、発現された蛋白は、本来の生理活性を保持している場合が多い。また、カイコは、人畜共通の感染症が知られていないことから、安全な宿主であることが知られている。これまでに、マウスIL-3、ヒトGM-CSF、ヒト β -インターフェロン、ヒトM-CSFなどをはじめ、ヒト成長ホルモンやイヌバルボウイルス抗原、マラリア抗原などがカイコを用いた発現について報告されている。東レ(株)は、1994年にカイコを用いて生産したネコインターフェロン³⁾ YAMADA Katsushige¹, TANAKA Takashi¹, HIRAMATSU Shingo², TAMURA Toshiki³

¹〒455-8502 名古屋市港区大江町9-1²〒248-8555 鎌倉市手広1111番地³〒305-8634 つくば市大わし1-2

を、コンパニオンアニマル用医薬品として製品化した。

生理活性タンパク質を医薬品として開発する場合、大きな課題の一つに高純度化がある。目的タンパク質の純度に加えて、工程由来不純物、目的タンパク質由来不純物などについて、詳細に調べる必要があることから、実用的な精製方法を確立することが重要である。バキュロウイルスを用いたカイコでの生理活性タンパク質の生産は、上記のような優れた特徴を持つが、多種多量のタンパク質からなるカイコ体液中に目的タンパク質が産生されるため、精製が難しいという課題がある。

最近、田村らによって形質転換カイコを作出する技術が確立された⁴⁾。本技術を利用して、生理活性タンパク質を、夾雑タンパク質の少ない絹糸腺に大量に発現させることができれば、目的とするタンパク質の精製が容易になると考えられる。生理活性タンパク質としてネコインターフェロンをモデルに取り上げ、絹糸腺で特異的に発現するフィブロインまたはセリシンのプロモーター支配下にネコインターフェロン遺伝子を持つトランスジェニックカイコを作出したところ、絹糸腺および絹糸中にネコインターフェロンを産生させることができたので報告する。

2. カイコにおける絹タンパク質の合成

絹タンパク質の主成分であるフィブロインタンパク質は、カイコの後部絹糸腺で合成された後、中部絹糸腺で特異的に合成されるセリシタンパク質と混合され、前部絹糸腺へと移動して、カイコの口から吐糸されて繊維化して絹糸となる。絹糸は、2本のフィブロイン繊維の芯部分とそれを包み込むセリシタンパク質からできた表層部分からなるタンパク質であり、フィブロインとセリシタンパク質がほぼ97%を占める。セリシタンパク質は、絹糸の約20%を占める可溶性のタンパク質である。絹糸は、通常カイコ1頭あたり約0.5gであることから、カイコの絹糸腺は極めてタンパク合成能に優れた器官とすることができる。そこで、絹タンパク質であるセリシタンパク質とフィブロイン遺伝子のプロモーターを利用して、田村らが確立したトランスポゾン (*piggyBac*) を用いたトランスジェニックカイコを作出し (図1)、ネコインターフェロンを絹糸腺で発現させる検討を行った。

3. セリシタンパク質プロモーターを利用したネコインターフェロンの産生

約1.0kbのセリシタンパク質プロモーター領域の下

流にネコインターフェロン遺伝子およびウシ成長ホルモンpolyA領域を連結した遺伝子をもつプラスミドpPIG-SIFN (図2) を作製し、トランスポゾンの転移酵素を発現させるヘルパープラスミド (図1) とともに、発生初期のカイコ卵に注射した。注射した1218個の卵から502頭が孵化し、人工飼料で飼育した結果321頭の成虫が得られた。雌雄を交配し、得られた158蛾の卵から孵化した幼虫を蛍光顕微鏡でスクリーニングした結果、12蛾区から蛍光を発する個体を得られた (表1, S-1)。再度、1375個の卵について同様な実験を行った結果、再現性よく12蛾区から蛍光を発するトランスジェニックカイコが得られた (表1, S-2)。

実験S-1およびS-2で得られたトランスジェニックカイコから、それぞれ3個体と2個体のゲノムDNAを調製し、ネコインターフェロンcDNAをプローブとしてサザンブロットを行った結果、これらのカイコのゲノムにネコインターフェロン遺伝子が挿入されていることが確認できた (図3)。また、これらのカイコの中部絹糸腺からmRNAを調製し、ネコインターフェロン特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行ったところ、ネコインター

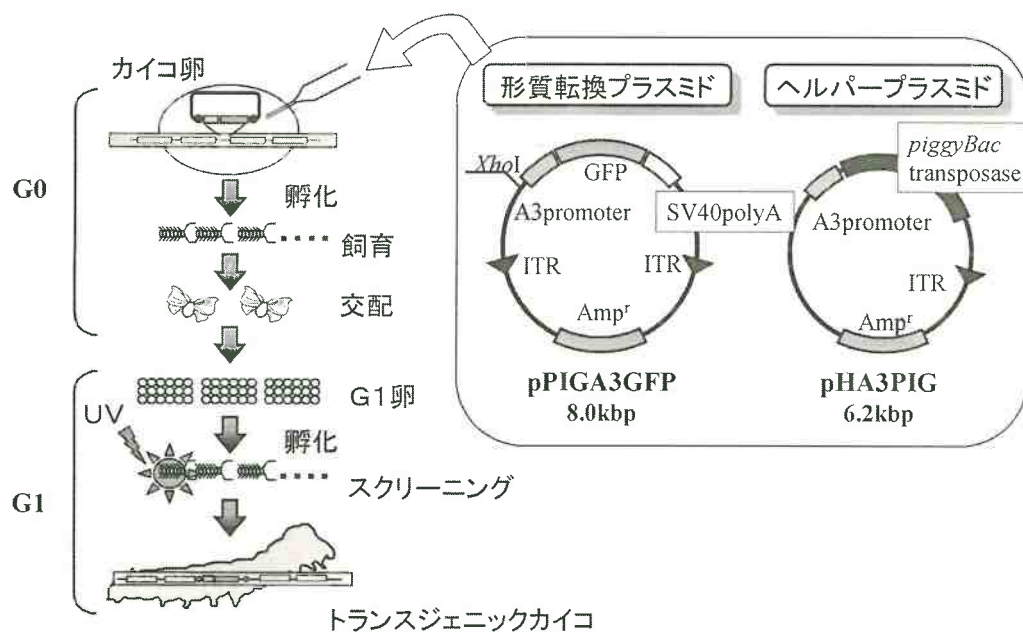


図1 トランスポゾンを利用したトランスジェニックカイコ作出法
(By TAMURA et al., Nature Biotechnology, 2000)

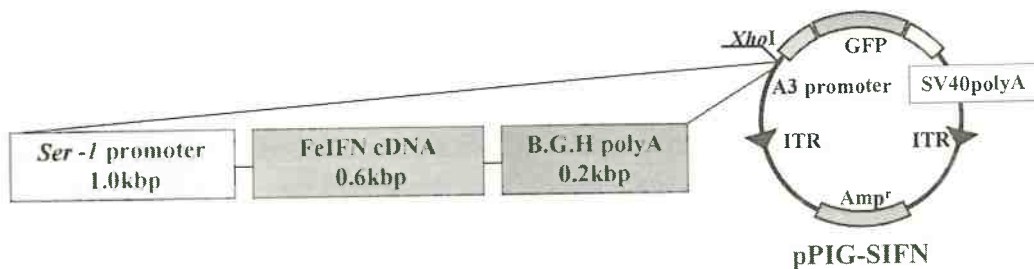


図2 セリシンプロモーターを利用したネコインターフェロン発現用ベクター

表1 セリシンプロモーターを利用したトランスジェニックカイコの取得

実験区	注射卵数	孵化卵数	成虫数	同胞交配 蛾数	蛍光個体が得られた蛾数	形質転換頻度 (%)
S-1(1st.)	1218	502	321	158	12	3.8
S-2(2nd.)	1375	540	488	225	12	2.4

フェロン遺伝子が転写されていることが分かった。しかし、中部絹糸腺抽出液について、ウエスタンブロットを行ったが、ネコインターフェロン抗体に反応するシグナルは検出できなかった。そこで、タンパク発現量が低レ

ベルであると考え、ネコインターフェロンの高感度な検出が可能である抗ウイルス活性を用いて、発現を確認することにした。

中部絹糸腺を摘出しPBS中でホモジナイズして得た抽出液について、ネコ培養細胞FC-9に対するウシ水疱性口内炎ウイルス (VSV) の細胞変性作用に対する阻害活性を測定したところ、トランスジェニックカイコ由来の中部絹糸腺抽出液にのみ抗ウイルス活性が検出された(図4)。カイコ1頭あたりの抗ウイルス活性は、4,000~10,000Uであった。

また、得られたトランスジェニックカイコの繭をPBSで抽出したところ、この抽出液にも300~600Uの抗ウイルス活性が検出された(図4)。

4. フィブロインプロモーターを利用したネコインターフェロンの産生

フィブロインH鎖遺伝子のプロモーターの下流に、ネコインターフェロン遺伝子とウシ成長ホルモンpolyA領域を連結した遺伝子を持つプラスミドpPIG-HIFNを作製し、セリシンプロモーターの場合と同様にしてトランスジェニックカイコを作出したところ、プラスミドを注射した卵1326個から、1蛾区においてトランスジェニックカイコが得られ

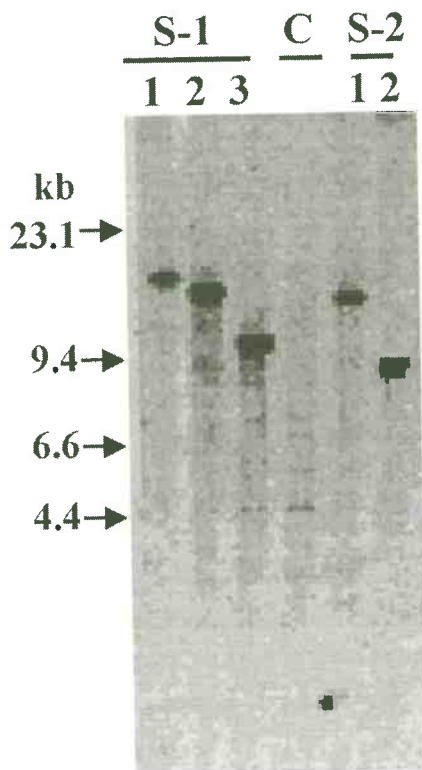


図3 サザンブロット解析
S-1, S-2; トランスジェニックカイコ
C; 野生型カイコ (コントロール)

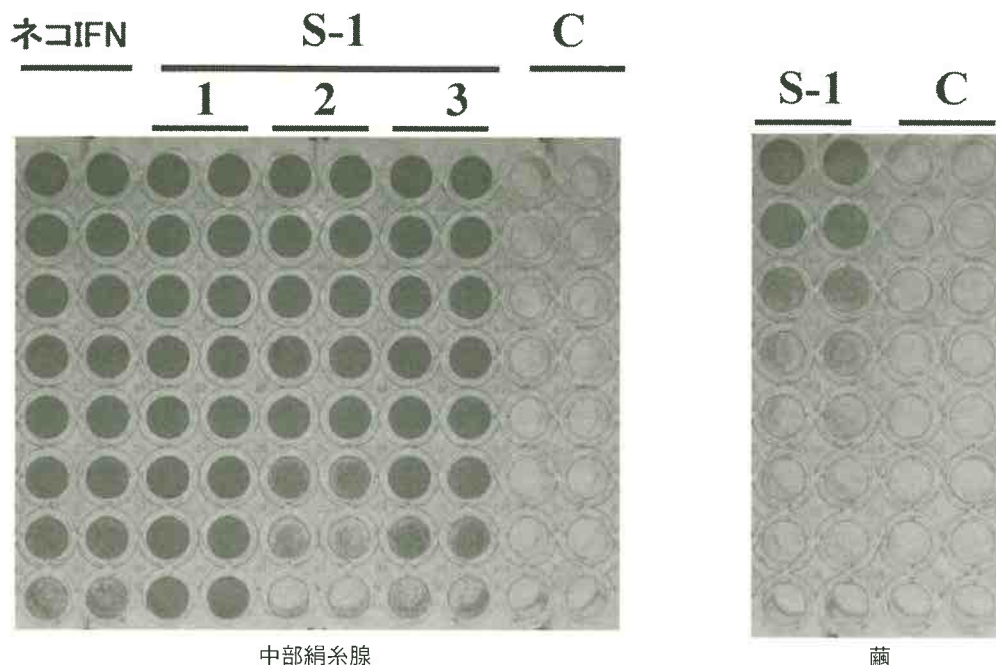


図4 ネコインターフェロン抗ウイルス活性の検出

ネコIFN；精製ネコインターフェロン（標準品）
 S-1；トランスジェニックカイコ
 C；野生型カイコ（コントロール）

た。

得られたトランスジェニックカイコは、セリシンプロモーターの場合と同様に、ゲノム中にネコインターフェロン遺伝子が挿入されており、後部絹糸腺においてネコインターフェロン遺伝子がmRNAに転写されていることが確認できた。ネコインターフェロンタンパク質は、ウエスタンブロットでは検出することができなかったため、抗ウイルス活性を測定したところ、後部絹糸腺と中部絹糸腺において1頭あたり約1,000Uの抗ウイルス活性が検出された。中部絹糸腺において抗ウイルス活性が検出された原因の解明は今後の課題であるが、後部絹糸腺で発現したネコインターフェロンが、中部絹糸腺に移動している可能性が考えられる。このトランスジェニックカイコから得られた繭には、抗ウイルス活性は認められなかった。

5. おわりに

トランスジェニックカイコ作出技術を利用して、ネコインターフェロンの産生について

検討した結果、セリシンプロモーター、フィブロインH鎖プロモーターを利用することで、それぞれ中部絹糸腺および後部絹糸腺にネコインターフェロンを産生させることに成功した。これは、トランスジェニックカイコ技術で生理活性タンパク質を産生させた最初の例と考えている。特に、セリシンプロモーターを利用した場合には、繭中にも活性を維持した状態でネコインターフェロンが産生されたことは、生理活性タンパク質の産生手法として新しい可能性を示すものとして興味深い。

今回の検討におけるネコインターフェロンの産生量は、まだ低レベルであり今後改良する余地があるが、本技術を利用した生理活性タンパク質産生方法は、以下の特徴を持っており、生理活性タンパク質産生方法として高いポテンシャルを有すると考えられる。

- (1) 繭を回収することで、目的の生理活性タンパク質が得られる合理的なプロセスである。
- (2) トランスジェニックカイコは、生理活性タンパク質を産生する性質を子孫に伝

えることができるため、毎回遺伝子組換えを行う必要がなく、普通のカイコを飼育する場合と同じように容易に大量飼育ができる。

(3) 余分な成分である夾雑タンパク質が少ない絹糸腺または絹糸中に、目的の生理活性タンパク質を産生させることができるため、精製が容易となる。

今後、他の生理活性タンパク質の発現検討、タンパク産生量の向上および絹糸腺または絹糸中からのタンパク質精製基礎技術を確立することで、さらに有用な生理活性タンパク質産生技術とすることが期待されている。

最後に、本研究にあたり技術的なご指導を

いただいた農業生物資源研究所・神田博士に心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) Maeda, S. et al (1984), *Proc. Japan Acad. Sci.*, 60 (Ser.B), 423-426
- 2) 前田進 (1985), *細胞工学*, 4 (9), 767-780
- 3) Ueda, Y. et al (1992), *J. Vet. Med. Sci.*, 55 (2), 251-258
- 4) Tamura, T. et al (2000), *Nature Biotechnology*, 18, 81-84



ブレイン テクノニュースの
バックナンバーご案内
第 96 号

2003 (平成15) 年 3 月15日発行

総 説

作物のDNAマーカー育種の現状と展望
.....井邊時雄

国内情報

- うどんの“こし(粘弾性)”とDNAマーカー
.....中村俊樹・齊藤美香・
Patricia Vrinten・石川吾郎
- かんきつ類の合成周縁キメラ研究と新しいキメラ
品種の開発 …協塚 巧・菅原邦明・西山 聡・
稲田絵理子・大和田 厚
- 異常プリオン蛋白質を分解する新規酵素について
.....三輪岳宏・村山裕一・吉岡 都・横山 隆
三浦克洋・黒川 知・西澤耕治
- 海藻クロメ由来フロロタンニンの殺菌作用
.....長山公紀・岩村善利・中村 孝
- 穀物自動乾燥調製装置(グレインプロセッサ)の開発
.....久保田興太郎・日高靖之・市川友彦

地域の先端研究

羊毛防縮加工に有用な新規酵素を生産する微生物の
探索 …茶谷悦司・安田(吉野)庄子・山本周治・
北野道雄・北本則行

文献情報

- 長期間培養におけるウシA型精祖細胞の増殖と分化
.....(抄訳：下司雅也)
- グルタチオンと初期対数増殖期を利用した酵母の
簡便、迅速、高効率な形質転換法
.....(抄訳：家藤治幸)
- 植物MITEは薬培養で動き出す …(抄訳：岩井純夫)
- 主要な交差反応性魚アレルギーである組換え
コイパルプアルブミン：魚アレルギーの診断
.....(抄訳：沖田裕司)

海外便り

家畜の遺伝子探索と家族の生活
—ロスリン研究所での1年半—
.....長嶺慶隆

◀国内情報▶

植物が生産した薬効成分を特異的器官・細胞に蓄積する分子機構

¹京都大学 木質科学研究所, ²京都大学 生命科学研究科
士反伸和¹・佐藤文彦²・矢崎一史¹

植物は様々な二次代謝産物を生産するが、その細胞内輸送あるいは転流に関する分子機構はほとんど未解明である。我々は、アルカロイドのベルベリンを生産するオウレンをモデルとし、そのベルベリンの輸送にABC蛋白質のCjMDR1が関与することを示した。CjMDR1は細胞膜局在であり、根茎においては維管束、特に道管近傍において発現していることを明らかとした。これらの知見より、ABC蛋白質がオウレン根茎におけるベルベリン蓄積に関与していることを初めて明らか

1. はじめに

高等植物は極めて多彩な化学構造の二次代謝産物を生成する。我々は生活の中で、これら植物の生産する二次代謝産物とその化合物の特性に応じて、天然色素として食品着色料や衣類の染色に、また芳香料としてスパイスや香水原料に、あるいは医薬品製造原料などとして活用してきた。一方で、有用二次代謝産物の大量かつ安定供給を目的とし、生合成経路の解明や植物培養細胞による物質生産、あるいは分子育種による大量生産が試みられてきた。しかしながら、生合成酵素やそれをコードする遺伝子の研究が広く展開されているのに対し、二次代謝産物の植物細胞における集積や膜輸送、あるいはシンク組織への転流の機構に関しては研究例が極めて少なく、そこに関与する蛋白質や遺伝子の同定はほとんど行われていないのが現状である。我々は、これら物質の輸送機構の解明なくしては、真に実用的な二次代謝産物の生産制御は不可能であると考え、アルカロイドをモデルとした系でその機構解明を行っている。

キンボウゲ科の薬用植物オウレン (*Coptis japonica*) は、その根茎を生薬として、苦味性健胃剤、殺菌、整腸等の目的で利用する

¹ 〒611-0011 宇治市五ヶ庄

² 〒606-8502 京都市左京区北白川

(図1)。その薬効本体は黄色のイソキノリン系アルカロイドの一種、ベルベリンであるとされ、薬用部位である根茎が主な蓄積組織である。一方、生合成酵素の高発現部位は根茎ではなくそこから多数発生する根であるとされ¹⁾、ベルベリンは根で生合成された後、根茎へ輸送されてそこで濃縮蓄積されていると予想される。また、オウレンの選抜培養細胞は多量のベルベリンを生産してこれを特異的に液胞に蓄積するが²⁾、この細胞はさらに培地中に添加されたベルベリンをも積極的に吸収し、液胞内に輸送・蓄積する³⁾。本研究ではオウレン培養細胞を用い、ベルベリンの膜輸送に関わる蛋白質の実体を明らかとし、その解析を通じて植物における物質輸送の分子機構を解明することを目的とした。

2. オウレン培養細胞を用いたベルベリン輸送活性の解析

オウレン培養細胞で見られたベルベリン取り込みを輸送活性とし、これを阻害する薬剤をスクリーニングした。その結果、本細胞のベルベリン取り込みはATPに依存的であること、ATPase阻害剤であるvanadateに感受性であること、nifedipineやcyclosporine Aなどで特異的に強く抑制されることなどが判明した³⁾。これらの薬剤に共通するキーワードが、ガン細胞の多剤耐性の原因とされるABC (ATP-binding cassette) 蛋白質の一種

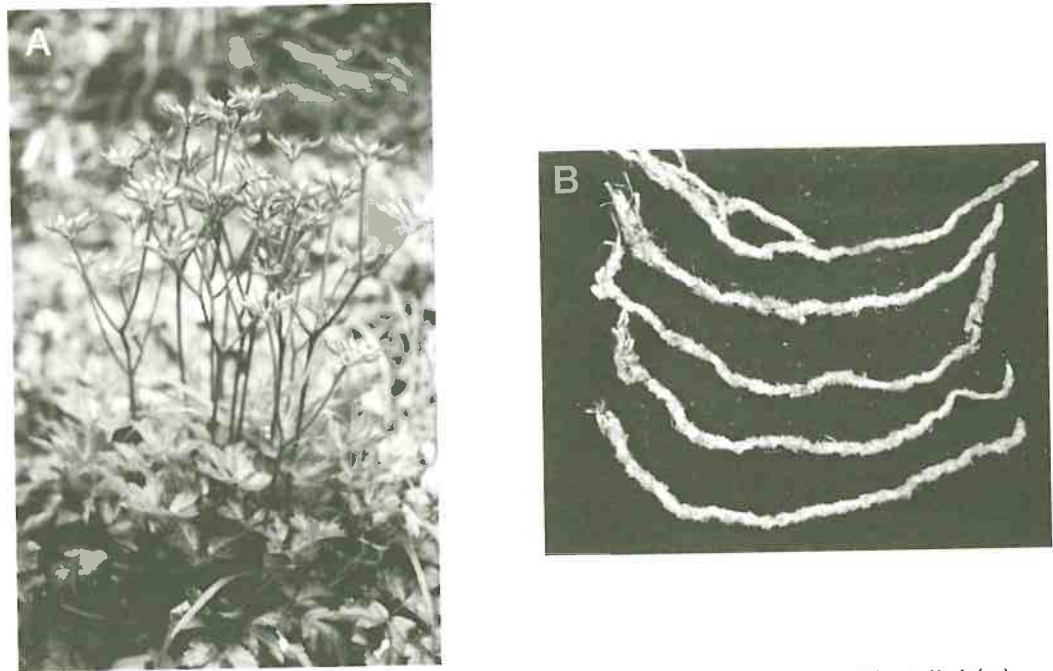


図1 オウレン植物体(A)と生薬(根茎からひげ根を除き乾燥させたもの)の黄連(B)

MDR (multidrug resistance protein) であり¹⁾, 上記薬剤はいずれも動物細胞で, ABC蛋白質の輸送機能を阻害するとして知られる化合物であった。これらの知見を元にさらに解析を進めたところ, ベルベリン輸送にMDR様ABC蛋白質が関与する可能性が非常に高いことが示唆された。そこで, ベルベリン輸送体の候補として, オウレン培養細胞からMDR様ABC蛋白質遺伝子のクローニングを試みた。

3. *Mdr* 様遺伝子のcDNAクローニングと発現解析

ABC蛋白質には分子内に, NBF (nucleo-

tide-binding fold) と呼ばれる高度保存配列が1ないし2つ存在する²⁾。そこでこの保存配列に対する縮重プライマーを作成し, 培養細胞より単離したtotal RNAを鋳型にRT-PCRを行った。増幅された断片がNBFの一部であることを確認し, さらにRT-PCR, 5'-および3'-RACEを行い, *mdr*様遺伝子の全長cDNAを2種類単離した。本稿では先に解析を行ったクローンCjmdr1について述べることにする³⁾。

Cjmdr1は全長約4.2kbで1289アミノ酸をコードしており, その配列からABC蛋白質スーパーファミリーの内, MDRサブファミリーに属する分子であることが明らかとなった。さらにその疎水性プロット, および膜貫

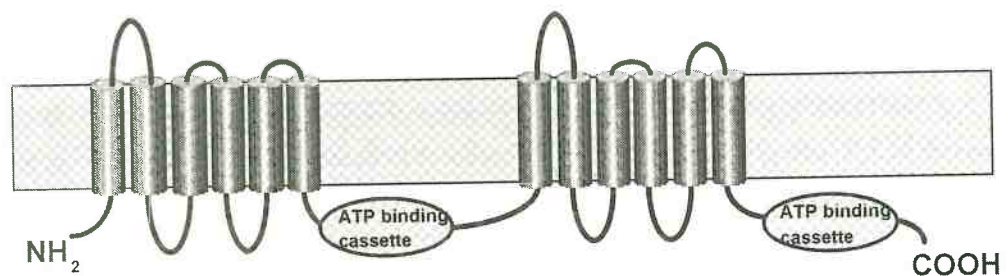


図2 CjMDR1の予想構造

12回膜貫通ドメインと細胞質側に2つのATP結合領域を持つN-末端半分はC-末端半分と相同性が高く, タンDEM・リピートとなっている。

通ドメインの解析の結果、その構造はヒトMDR1に類似しており、本分子種もMDR1同様、12回の膜貫通領域と2個のNBFからなるリピート構造を有することが予想された(図2)。またその3'-UTRをプローブに用いた植物体各組織におけるノーザン解析の結果、Cjmdr1はベルベリン高蓄積部位である根茎で高発現し、その他の組織である葉柄、葉、花柄、花、種子では発現が低く、特に根ではほとんど発現していないことが明らかとなった⁶⁾。

4. CjMDR1の輸送機能の解析

Cjmdr1の遺伝子産物の機能を明らかにするため、アフリカツメガエル卵母細胞にこれを発現させることとした。Cjmdr1 cDNAを鋳型とし、*in vitro*で転写してそのmRNAを得、これを卵母細胞に注入した。3日後、卵母細胞を1 mMベルベリン存在下18°Cで培養し、

蛍光顕微鏡によるベルベリン取り込みの観察とHPLCによる定量を行った。対照としてはH₂Oを注入した卵母細胞を用いた。その結果、CjMDR1発現卵母細胞は対照に比べ、取り込まれたベルベリンによる蛍光を強く発し、CjMDR1タンパク質がベルベリンの取り込み活性をもつことが示唆された⁷⁾。さらに、ベルベリン取り込みの経時的変化を調べたところ、時間経過と共にベルベリンの細胞内含量は増加し、CjMDR1タンパク質がベルベリンを輸送基質と認識して、細胞内に取り込んでいることが確認された。

このベルベリンの取り込みに関し、ATPase阻害剤であるvanadate、また代表的ABCタンパク質阻害剤であるnifedipineなどを投与したところ、取り込み活性は顕著に阻害され、ベルベリンの輸送活性がCjMDR1のABCトランスポーター活性によることを明らかにした。

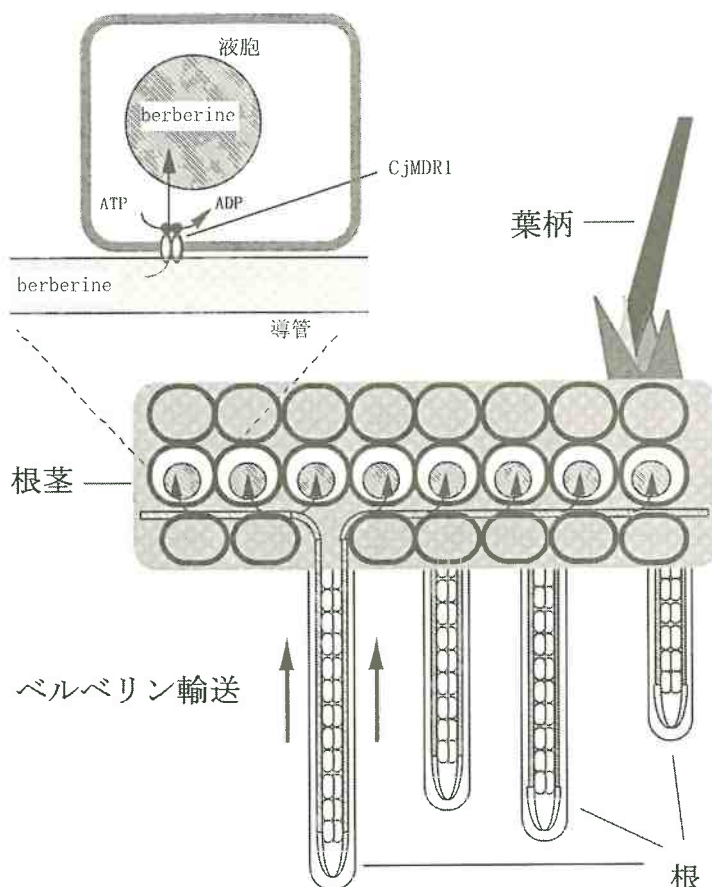


図3 オウレン植物体におけるベルベリンの転流モデルとそれに関わるCjMDR1の役割

5. *In situ* hybridizationによるCjMDR1の発現組織の解析

二層分配法、不連続シヨ糖密度勾配法の二法を用い、細胞膜、液胞膜、小胞体膜を分離して、CjMDR1抗体および指標酵素に対する抗体を用いウェスタン解析を行った結果、CjMDR1タンパク質は細胞膜に局在することが明らかとなった⁷⁾。

さらに、*in situ* hybridizationによりCjmdr1の組織内の発現部位について解析を行った。その結果、本遺伝子は根においてはほとんど発現せず、ノーザン解析により高発現が観察された根茎においては、維管束組織の道管付近において強く発現していること、また皮層の柔組織においてもわずかに発現していることを確認した⁷⁾。

6. まとめ

以上の結果を総合し、植物体におけるCjMDR1の生理的役割を以下の様に推定した。ベルベリンは根で生合成された後、道管を経由して上方の根茎に輸送される。その際、根茎の道管組織の細胞膜で高発現しているCjMDR1タンパク質が、道管内腔からベルベリンを細胞内にトラップし、おそらくは根茎におけるベルベリンの高蓄積に直接関与しているであろう。これは、植物における物質の

転流に関わるABCトランスポータとして初めての例であり、有用二次代謝産物のシンク器官における集積メカニズムとして興味を持たれる。シロイヌナズナには100以上のABC蛋白質が存在しており、その内機能が報告されたものは未だ数えるほどしかない。今後、植物における物質の輸送や転流のメカニズムを研究する上で、これらABC蛋白質が様々な形で関与してくることが予想される。植物のABC蛋白質研究は、まだ始まったばかりである。

文 献

- 1) Fujiwara, H. et al (1993), *Phytochemistry*, 34, 949-954
- 2) Sato, H. et al (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 133-136
- 3) Sakai, K. et al (2002), *J. Exp. Bot.*, 53, 1879-1886
- 4) Ueda, K. et al (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 84, 3004-3008
- 5) Higgins, C. F. (1992), *Annu. Rev. Cell Biol.*, 8, 67-113
- 6) Yazaki, K. et al (2001), *J. Exp. Bot.*, 52, 877-879
- 7) Shitan, N. et al (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100, 751-756

◀国内情報▶

抗生物質耐性遺伝子を使わない 新しい遺伝子組換えイネ選抜技術の開発

独立行政法人 農業技術研究機構 作物ゲノム育種センター
大 島 正 弘

従来の抗生物質耐性遺伝子を用いた形質転換体選抜に代わる技術として、イネに内在するアセト乳酸合成酵素遺伝子の変異型を選抜マーカーとして、カルス特異的プロモーターによって駆動し、ビスピリバックナトリウム塩によって選抜を行う新しい方法を開発した。この方法によって、選抜マーカー遺伝子の発現が最初の選抜時に限られ、葉や米では発現しない組換えイネを開発することができる。

1. はじめに

最近の統計によると遺伝子組換え作物(GMO)の作付けは拡大を続けており、大豆では総生産量の51%にまで達している³⁾。我が国にもGMOが様々な形の食材として輸入されている。しかし、その普及に関して国民的な理解が得られているとはいえない状況が依然として続いている。提起された論議の中で抗生物質耐性を指標とする選抜マーカー遺伝子の存在と可食部での高発現が大きな問題点として指摘されている。遺伝子組換えは非常に稀にしか起こらない現象であるため、形質転換細胞だけを選抜するマーカー遺伝子の使用は必須であるが、これまでに実用化された組換え体では、バクテリア等に由来する抗生物質耐性遺伝子を植物体全体で高発現する構造とした選抜マーカー遺伝子を用いたものが多い。当然ながら選抜マーカー遺伝子が可食部でも発現するため、GMOに対する消費者の忌避理由の一つになっている。この点についてはCODEX委員会等の国際機関の報告の中でも、今後の普及の観点から代換え技術の開発と、それを用いた組換え体の作出が求められている⁵⁾。この問題の解決策としては選抜マーカー遺伝子が残らない遺伝子組換え技術の開発¹⁾と共に、我々にとって食経験のある作物から取った遺伝子を選抜マーカー化

OHSHIMA Masahiro

〒305-8518 つくば市観音台2-1-18

することも重要である。我々はこのような観点から、従来の抗生物質耐性遺伝子に代わり、全ての構成要素がイネ由来であり、しかも米では発現しない形にした新規選抜マーカー遺伝子を構築し、これによる形質転換システムを開発した。

2. 2点変異型ALS遺伝子とカルス特異的プロモーター

新規選抜マーカー遺伝子として着目したのは農業生物資源研究所とクミアイ化学工業(株)の共同研究により取得された2点変異型アセト乳酸合成酵素遺伝子(mALSと略す)である。アセト乳酸合成酵素は植物におけるバリン、ロイシン、イソロイシン等の分岐鎖アミノ酸合成系の酵素であり、その重要な調節ポイントである。また、様々な除草剤の作用点であることが知られており、人には存在しない。ビスピリバックナトリウム塩(BSと略す)はmALSを阻害する作用を持ち、除草剤の主成分の一つとして広く用いられている。天然型のALSはイネ(品種:金南風)の細胞培養中に生じた自然変異系統から分離されたものであり、天然型のALSに比べて2個のアミノ酸が置換されているためBSによる阻害を受けなくなっている⁶⁾(図1)。我々はこのmALSを適切なプロモーターによってドライブし、BSで選抜することによって形質転換細胞を選抜できると考えた。mALSはイネ

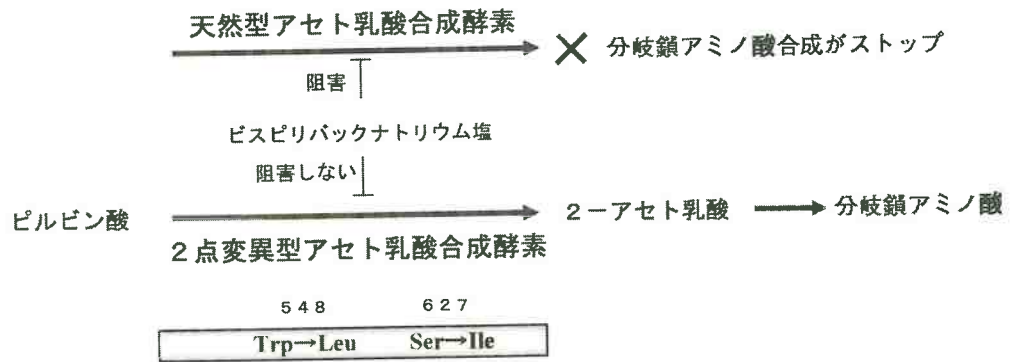


図1 2点変異型アセト乳酸合成酵素遺伝子

自然変異体由来であり、このものが何らかの問題を起こす可能性は極めて考えにくいですが、前記の開発コンセプトから、可食部（イネの場合は米粒）での発現を避けることによって、より安全性を高め、パブリックアクセプタンスの醸成にも寄与しうることを目的とし、プロモーターとしてはイネのカルス特異的プロモーターを用いた。このプロモーターは増殖中のカルスではカリフラワーモザイクウイルス35S遺伝子プロモーターに匹敵する強度で発現するが、再分化植物ではほぼ完全に発現が抑制される。また、ターミネーターとしては、やはりイネ由来の10Kプロラミン遺伝子由来のものを用いた。これらの構成要素を組み込んだ極めてシンプルな構造のバイナリーベクター、pTA1を構築した。更に、このベクター上のクローニング用のサイトに導入効

率のモニターのため、構成的に発現するGFP遺伝子も組み込んだpTA1/GFPを構築し（図2）、このベクターを用いて条件設定を行った。

3. 選抜について

イネへの導入条件の検討は、農業生物資源研究所が開発した超迅速形質転換法⁷⁾により行った。最初に選抜薬剤であるBSによる細胞増殖の抑制について検討した。イネ種子（品種：どんとこい）を2,4-Dを含むN6D培地に置床し、5日目に前記のpTA1/GFPを導入した*Agrobacterium tumefaciens* EHA105株を感染させ、4日間の共存培養後、BSを含むN6培地に置床し、細胞の増殖と形質転換されてGFP蛍光ポジティブとなった細胞の

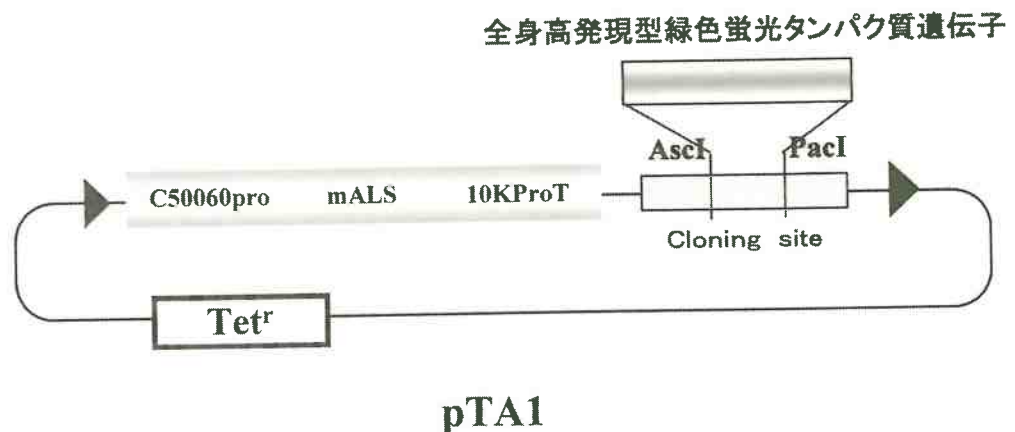


図2 形質転換用ベクター、pTA1/GFPの構造

C50060pro：カルス特異的プロモーター mALS：2点変異型アセト乳酸合成酵素遺伝子
 10KProT：10Kプロラミン遺伝子ターミネーター

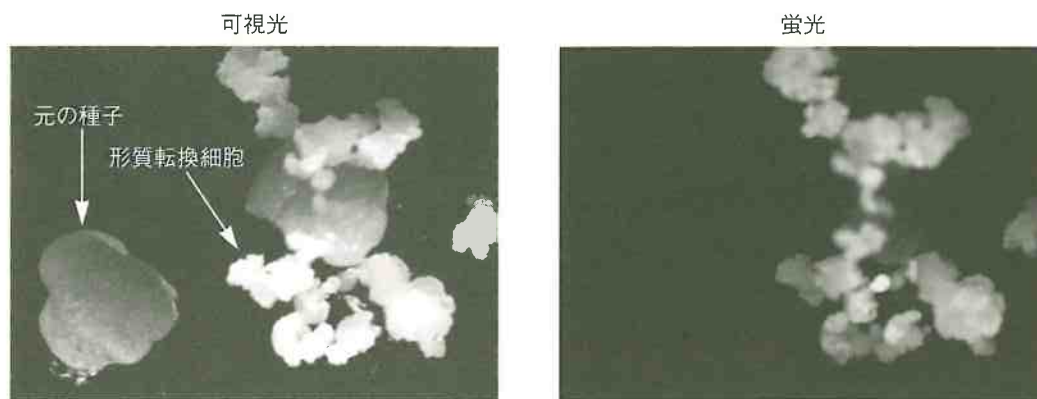


図3 ビスピリバックナトリウム塩による選抜
ビスピリバックナトリウム塩で選抜すると形質転換細胞のみが増殖する。

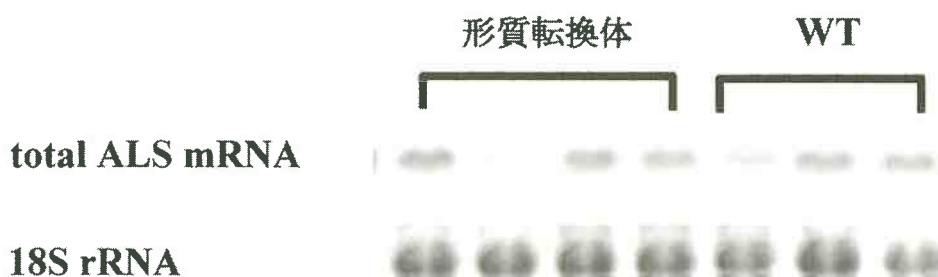


図4 再分化イネの葉におけるALS (天然型ALS+mALS) の発現

出現を観察した。BSを含まない培地では細胞は旺盛に増殖するが、蛍光を発する細胞は全く出現しない。同様に $0.05 \mu\text{M}$ または $0.1 \mu\text{M}$ のBSを含む培地では少数であるが蛍光を発する細胞が出現するものの、エスケープ細胞も増殖し、選抜は不完全だった。一方、 $0.25 \mu\text{M}$ または $0.5 \mu\text{M}$ のBSを含む培地では、増殖してくる細胞は例外なく蛍光を発しており、形質転換細胞であることが確認された(図3)。形質転換細胞が出現するまでに要する期間は抗生物質耐性遺伝子を用いた場合に比べてやや長く、4週間以上必要とした。一方、増殖中のカルスに導入する従来法²⁾でも試したところ、 $1 \mu\text{M}$ 以上のBSを添加しても非形質転換細胞の増殖をほとんど抑制することができず、蛍光を発する細胞はごく少数しか得られなかった。従ってmALS-BSの選抜システムでは超迅速形質転換法との組み合わせが必須であるといえる。このシステムでは選抜マーカー遺伝子は再分化した植物体では発現しないと考えられるので、選抜された細胞をBSを含まない再分化培地に移したと

ころ、従来の抗生物質耐性遺伝子を用いた場合と全く同様に再分化イネを得ることができた。この方法は「どんとこい」以外の品種にも問題なく適用できた。導入効率については導入する遺伝子にもよるが、通常100粒ほどの種子から2~30本の形質転換イネを得ることができる。

4. 導入遺伝子の発現について

pTA1ベクターでは使用したプロモーターの発現特性から、再分化したイネでの選抜マーカー遺伝子の発現は抑制されているものと予想されたが、実際にノーザンブロット法で葉での発現を検討したところ、形質転換体におけるALS遺伝子の発現量は非形質転換体と同じレベルであることが確認された(図4)。mALSと本来のALS遺伝子の構造上の差異は僅かであるため、ノーザン法での両者の識別はできず、両者の発現量の和を見ていることになる。この結果から葉におけるmALS遺伝子の発現は多くはないと推論できた。実際、

表1 選抜マーカー遺伝子の発現パターンの比較

選抜マーカー遺伝子のタイプ	カルス	葉	米
従来の選抜マーカー遺伝子 (CaMV35Sプロモーター+抗生物質耐性遺伝子)	++	++	++
新規開発の選抜マーカー遺伝子 (カルス特異的プロモーター+変異型ALS遺伝子)	++	-	-

酵素化学的な測定によっても、BS感受性の天然型ALSの活性は検出できたが、BS非感受性のmALSは発現していないことが示された。更に形質転換体の米粒でのmALSの発現量を定量的PCR法で評価したところ、米粒中での発現レベルはカルス中での発現レベルに比べて500分の1から2000分の1程度であり、ほぼ無視できるレベルであることが確認された。これらの結果は選抜マーカー遺伝子としてのmALSがプロモーター特性を反映して再分化植物体ではほとんど発現していないことを示している。一方、同時に導入されたGFP遺伝子は再分化した植物体の全組織で発現しており、次世代にも正常に遺伝することが確認できた。

5. おわりに

以上の結果は、開発したmALS-BS選抜法がイネの形質転換法として望ましい特性を持ち、前記CODEX報告にも沿ったものとなりうることを示している(表1)。パブリックアクセプタンスを獲得していく上でも有利なものであると考えている。BSの作用はアミノ酸合成の阻害であり、細胞内のアミノ酸プールのサイズによっては感受性の細胞でもすぐには死滅せず、その見かけの作用は緩やかである。実際、旺盛に増殖しているカルスに導入を試みても、ほとんど選抜できないことが示された。この点で本法は、細胞増殖開始時点から選抜圧がかけられる超迅速形質転換法との組み合わせが必須であると考えられる。

最近、positive selectionという考え方が注目されている。抗生物質の様な細胞毒性を持つ薬剤を作用させると非形質転換細胞が選抜

初期に一度に死滅するため(ここでは、このような選抜手法をnegative selectionと呼ぶ)、その内容物などが生存した形質転換細胞にも悪影響を与え、その結果、形質転換効率や再分化効率が低下する。それに対し形質転換細胞に対して代謝上の利点を与えることによって緩やかな選抜を行うpositive selectionの系では、このような悪影響がないため形質転換効率が改善される、とされている⁴⁾。BSは除草剤であり、アミノ酸合成を阻害するが、その作用は緩やかであり、両者の中間に近い性質を有する可能性が考えられる。今後も様々なタイプの非抗生物質耐性選抜マーカー遺伝子が開発されるものと思われるが、同じ様に、選抜圧のかけ方と選抜方法に関して、使用する遺伝子ごとの検討が必要であろう。なお、今回開発された選抜システムは今のところイネのみを対象としているものであり、プロモーターの適用の可否も含めて、その他の作物への適用は今後の課題である。

この研究は、吉田均、松村葉子、黒田昌治、大槻寛(中央農研北陸)黒田秧(現作物ゲノム育種センター長)、田中喜之、田中宥司、大竹祐子、番保徳(生物研)、井沢典彦、清水力、角康一郎、永山孝三(クミアイ化学工業株式会社)の各氏との共同で実施されたものである。

文 献

- 1) Endo S. et al., (2002), *Plant J.*, 30, 115-122
- 2) Hiei Y. et al. (1994), *Plant J.*, 6, 271-282
- 3) ISAAA report : Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2002 (<http://www.isaaa.org/>)

- 4) Joersbo M. et al. (1998), *Molecular Breeding*, 4, 111-117
- 5) Report of the third session on the CODEX AD HOC intergovernmental task force on foods derived from biotechnology (2002), Codex Alignment Commission, pp. 55
- 6) Shimizu T. et al. (2002), ALS inhibitors in Herbicide Classes in Development (Boeger P et al, Eds) 1-41, Springer-Verlag, Berlin, Heiderberg.
- 7) 田中宥司ら 特許3141084号明細書 (2000)



ブレイン テクノニュースの
バックナンバーご案内

第 95 号

2003 (平成15) 年 3 月15日発行

総 説

イネゲノム塩基配列重要部分の高精度解読
終了とその意味 ……………佐々木卓治

国内情報

イネミトコンドリアゲノムの全構造決定
……………西川智太郎・門脇光一

ホウ素トランスポーターの同定と植物のホウ素
輸送における役割 ……………三輪京子・藤原 徹
コメの糊化特性にアミロペクチンの側鎖構造を
支配する遺伝子が関与していることを解明

……………中村保典
珪藻に感染する新奇ウイルスの発見 ……………長崎慶三

催涙因子合成酵素「LFS」の発見と、「涙の出ない
新しいタマネギ」の開発 ……今井真介・柘植信昭・
朝武宗明・永留佳明・澤田 博

細断型ロールペーラの開発 ……………志藤博克
地域の先端研究

新しい肉用アヒル「大阪種」…出雲章久・笠井浩司
文献情報

異なる細胞種由来のクローンウシにおける
テロメア長の著しい違い ……………(抄訳：下司雅也)

ポリアクリルアミド及びアルギン酸に固定化
したβ-グルコシダーゼの熱及びタンパク質

分解安定性 ……………(抄訳：西村新吾)
タコ筋肉中のタンパク質分解酵素の性状と

超高压処理による影響 ……………(抄訳：木村郁夫)
海外便り

潮間帯湿地雑草における植食性昆虫と天敵類の
群集生態学—米国メリーランド大学における

半年間— ……………松村正哉

◀国内情報▶

家畜における卵胞閉鎖抑制・発育促進技術の
開発と卵成熟誘起機構の解明

東北大学 大学院農学研究科 動物生殖科学分野
佐藤 英明・清水 隆・横尾 正樹

卵巣内の血管系に關与する血管新生因子遺伝子を調節することで、卵胞の閉鎖を抑制し、卵胞発育を促進する新しい技術を開発した。また、卵成熟誘起機構の解析を行い、ヒアルロン酸-CD44のシグナルが卵成熟誘起に重要な役割を果たしていることを明らかにした。今後、これらの研究成果をさらに発展させ、閉鎖する卵胞の血管新生を特異的に促進させて卵胞発育させる技術と卵成熟を制御する技術を開発し、これら2つの技術を融合することによって、受精可能な質の高い卵子を大量に生産する技術を開発できることが期待される。

1. はじめに

雌家畜は卵巣に多くの卵子をもつが、その大多数は死滅する。現行の排卵誘発法や卵子の体外成熟・体外受精技術では、卵子の死滅は予防できず、また、きわめて少数の受精可能卵子しか作ることができない。優良雌家畜を使って家畜の改良を図るためには、卵巣にある多くの卵子を有効利用し、受精可能な卵子を大量に生産する技術の開発が必要である。そこで、新しい発想に基づいた卵巣の血管系を調節する卵胞閉鎖抑制・発育促進技術の開発および卵成熟制御技術の開発をめざした卵成熟誘起機構の解明を行った。

2. 血管増殖促進因子を用いた新しい
卵胞閉鎖抑制・発育促進技術の開発
～卵胞発育過程の血管網の発達に
関わる血管増殖促進因子の同定～

現在、ホルモンによる誘起排卵技術が普及しているが、より多くの正常な卵子を得るため、新しい発想にもとづく技術の開発が求められている。そこで、卵巣内の卵子（卵胞）の発育と血管網の発達に強い相関のあることを明らかにするとともに、卵胞の血管網の増

SATO Eimei, SHIMIZU Takashi,

YOKOO Masaki

〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1

殖に関わる血管増殖促進因子とその受容体の同定を行った^{1)~3)}。ゴナドトロピン処理して誘起したブタ卵胞発育過程において、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF)、上皮細胞増殖因子 (epidermal growth factor: EGF)、アンギオポエチン-1 (angiopoietin-1: Ang-1) およびアンギオポエチン-2 (angiopoietin-2: Ang-2) とこれらの受容体のmRNA発現解析を行うことによつて、これらの血管新生因子が卵胞発育時の血管網の構築に關与するの否かについて調べた。卵胞は発育段階別に小卵胞 (< 4 mm)、中卵胞 (4 ~ 5 mm) および大卵胞 (> 5 mm) の3つに分けた。ブタ卵胞の場合、VEGFのアイソフォームはVEGF120およびVEGF164 (ブタVEGFはヒトVEGFよりアミノ酸が1つ少ない) のみが発現していた。その発現は、中および大卵胞で増加していた。bFGFの発現は、VEGFと同様に中および大卵胞で発現が増加していた。しかし、EGFは、小、中および大卵胞のすべての発育段階において発現が増加していた。VEGFの受容体であるFlt-1およびFlk-1 (fetal liver kinase-1) の発現は、VEGFの発現と同期化しており中および大卵胞で増加していた。bFGFの受容体の発現は、VEGFの受容体と同様に中および大卵胞で増加していた。しか

し、EGFの受容体の発現はどの発育段階の卵胞においても増加していなかった。これらのことから、卵胞の選抜に關与する局所的な血管増殖には、VEGFおよびbFGFが強く關与することが明らかとなった。また、VEGF、bFGFおよびEGFが卵胞内の顆粒層細胞の分化・増殖を刺激することから、間接的に卵胞内卵子の死滅予防に關与している可能性も示唆される。Ang-1およびAng-2の発現に關して、小卵胞ではAng-1の発現がAng-2に比べ増加していたのに対し、中および大卵胞では発現が低下していた。中および大卵胞ではAng-1よりAng-2が優勢となり、かつVEGF

の発現が増加していることから、卵胞周囲の血管ではペリサイトの離脱が起これ、血管新生を積極的に誘導していることが示唆される。これらの研究から、卵子（卵胞）の発育と血管網の発達に強い相関のあることを明らかにするとともに、血管網の増殖に係わる血管増殖促進因子とその受容体を同定した。

3. 遺伝子導入法を用いた卵胞閉鎖抑制・発育促進の戦略と実践

血管新生に強く關与するVEGF遺伝子が臓器で発現できるように加工したベクターを構

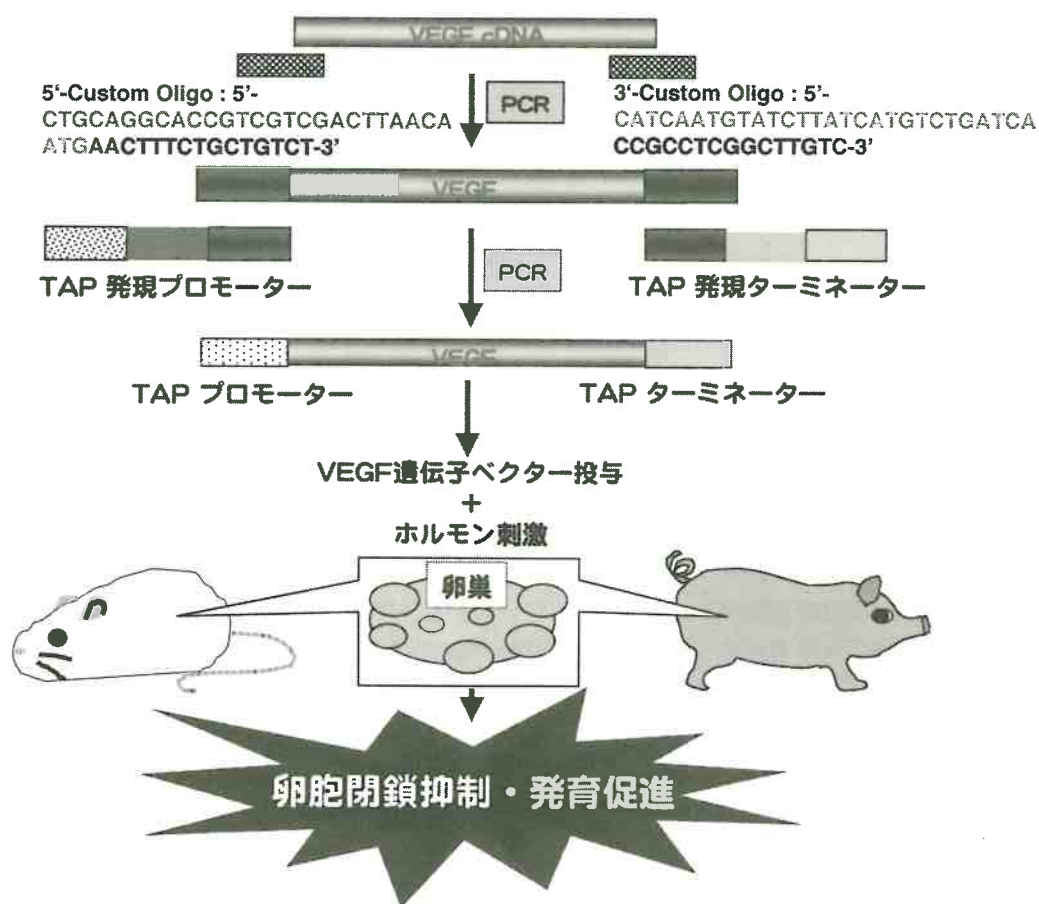


図1 VEGF遺伝子ベクターの作製と卵巣投与

顆粒層細胞から抽出したRNAにRTを行ってcDNAを作成した。このcDNAにVEGF遺伝子配列を含んだ5'-Custom Oligo Primerおよび3'-Custom Oligo Primerを用いてPCRを行い1回目のPCR産物を作製する。ついで、1回目のPCR産物にGene Therapy System社のTAP Express Promoter およびTAP Express Terminator とTAP Express 5' PrimerおよびTAP Express 3' Primerを用いて2回目のPCRを行い、VEGF遺伝子配列を含むPCR産物を作製する。作製されたPCR産物（VEGF遺伝子ベクター）を卵巣に導入し、ホルモン刺激を加えることで、卵巣内の卵胞閉鎖を抑制し、卵胞発育を促進できる。

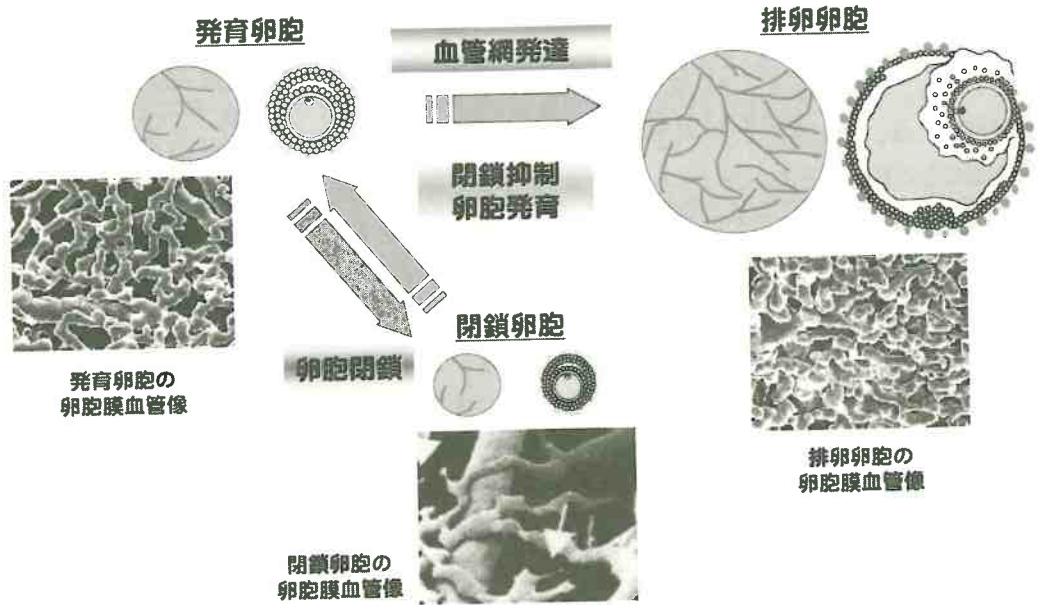


図2 VEGF遺伝子ベクター投与による卵胞閉鎖抑制・卵胞発育促進

VEGF遺伝子投与により卵胞周囲の血管網が発達し、これにより卵胞閉鎖が抑制される。さらに発育卵胞は、VEGF遺伝子の影響により血管網を発達させ、排卵卵胞へと発育が促進される。

築し、これを卵巣へ直接導入し発現させることにより卵胞周囲の血管新生を促進させ、このような状態にホルモン刺激を加えれば、より多くの健全卵胞が発育するのではないかとこの仮説をたてた(図1)。すなわち、卵巣へ導入したVEGF遺伝子とその産生細胞である顆粒層細胞に取り込まれ、発現することにより卵胞周囲の血管網が発達し、卵胞閉鎖を抑制し、発育卵胞数および排卵卵胞数が増加するのではないかと考え(図2)、実際にVEGF遺伝子を卵巣へ直接投与し、良好な成績を得ることができた。

VEGF遺伝子をミニブタ卵巣に直接投与すると卵巣表面

には大卵胞が多く出現し、これにより卵巣の容積が増大した。卵巣におけるVEGF遺伝子投与の影響を組織学的に観察すると、卵巣内には健全卵胞(最大のもので直径9mm)が多く存在し、その卵胞周囲には多くの毛細血

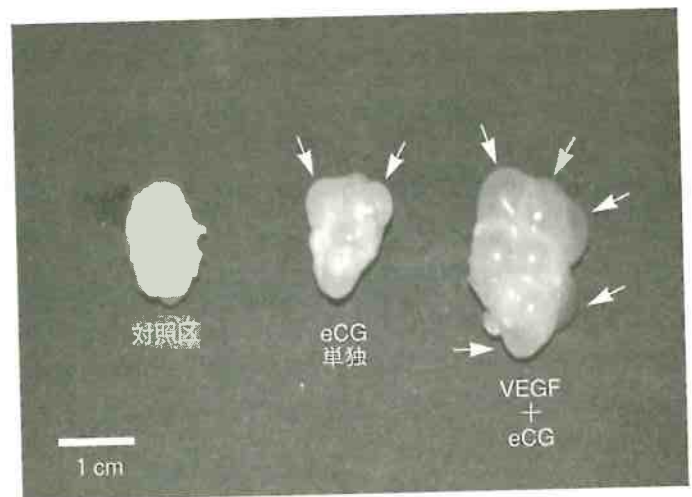


図3 VEGF遺伝子投与ミニブタ卵巣

eCG単独処理を施した卵巣においても、対照区と比較して前排卵卵胞数の増加がみられたが、VEGF遺伝子と複合処理した卵巣では、eCG単独処理を施した卵巣と比較して、さらに前排卵卵胞数が増加した。また、VEGF遺伝子投与によって出現した前排卵卵胞の周囲には赤血球を含有した多数の血管が認められた。矢印は前排卵卵胞を示している。

管が発達していた。VEGF遺伝子を投与した卵巣では、投与していない卵巣に比べ閉鎖卵胞の出現率が減少した。導入したVEGF遺伝子はその発現部位である顆粒層細胞で発現が認められ、卵胞液中ではVEGFタンパク質濃

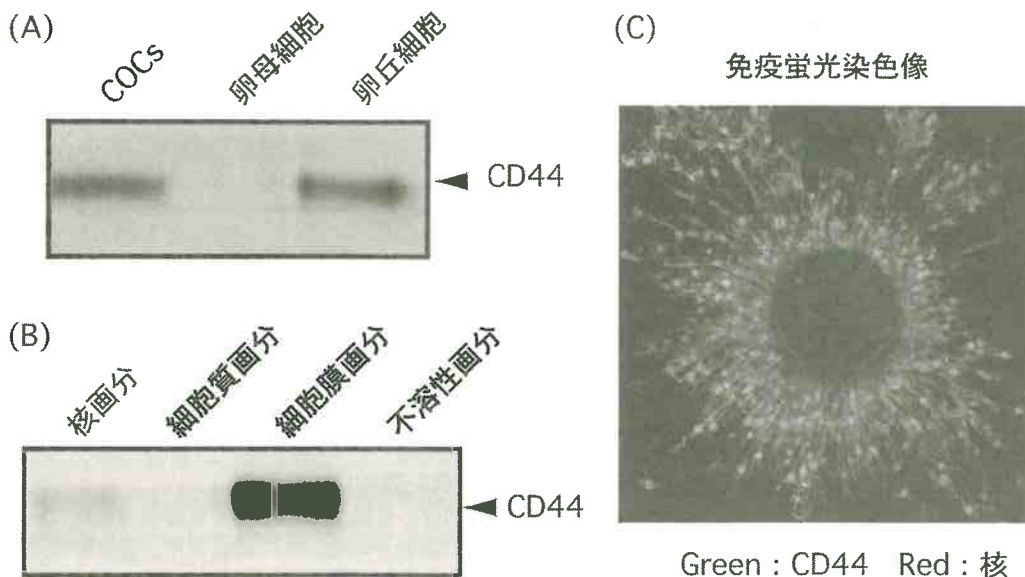


図4 ブタCOCsにおけるCD44の局在

(A) Western Blot法を用いたCD44の局在の解析, (B) 細胞分画法を用いたCD44の局在の解析, (C) 免疫蛍光染色法を用いたCD44の局在の解析。COCsで発現するCD44は、卵子では発現しておらず、卵丘細胞で発現していた。特に、細胞分画法の結果より、卵丘細胞の細胞膜に局在していることが明らかとなった。

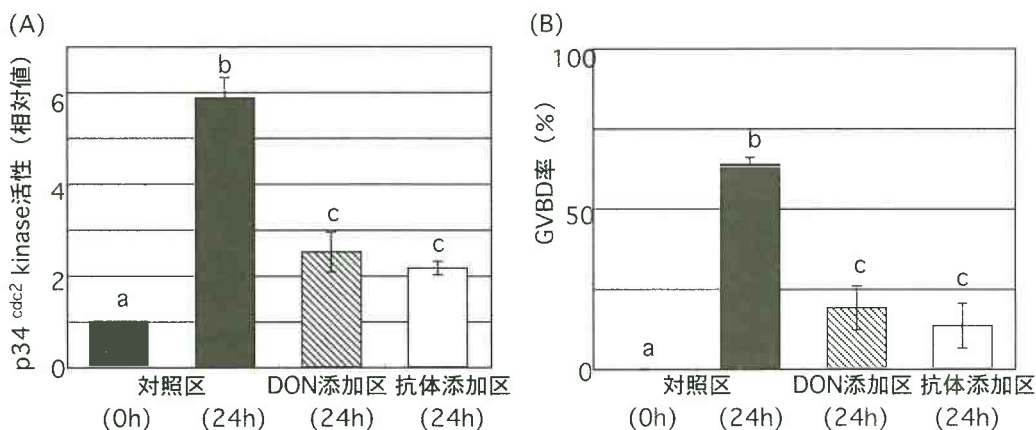


図5 卵成熟に及ぼすヒアルロン酸-CD44の影響

(A) 卵子内MPF活性, (B) 減数分裂再開。培養24時間後、对照区のMPF活性およびGVBD率は培養0時間と比較して有意に上昇するが、これらの変化はヒアルロン酸合成阻害剤 (DON) の添加およびヒアルロン酸とCD44の結合を阻害する抗体の添加によって有意に抑制された。この結果より、卵成熟誘起にヒアルロン酸-CD44が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

度の増加を認めた。このように、卵巣への VEGF遺伝子投与は卵胞周囲の血管新生を促進し、卵胞閉鎖を抑制することにより、より多くの正常な卵胞の発育を促進することに成功した (図3)。卵胞の閉鎖・退行は、卵胞の周囲で起こる血管網の発達不全であるために引き起こされることが示唆されている。今

後、この時期の卵胞に特異的に血管新生を行わせる新しい技術を開発することで、これらの卵胞を閉鎖・退行させずに発育させ、卵胞を救助することができ、より効果的に卵胞発育を促進する技術が確立できることが期待される。

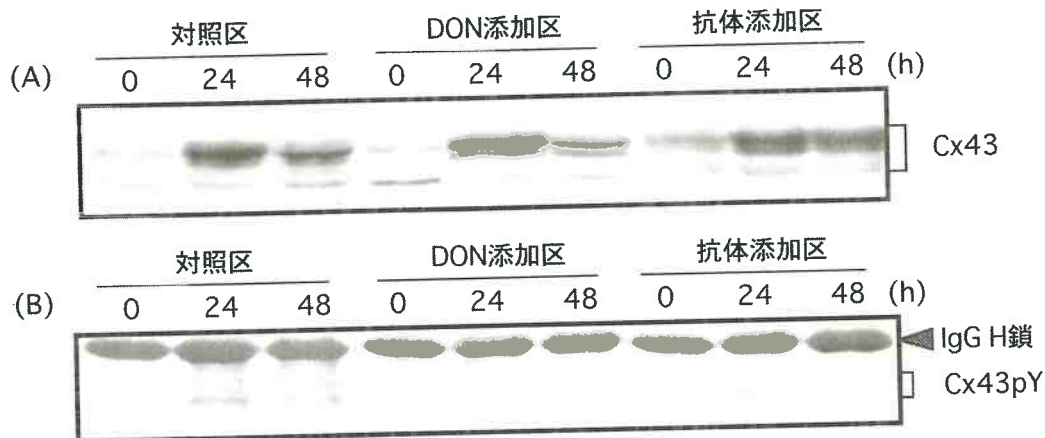


図6 Cx43発現に及ぼすヒアルロン酸-CD44の影響

(A) total Cx43発現, (B) チロシンリン酸化Cx43 (Cx43pY) 発現。DONおよび抗体の添加は, total Cx43の発現に影響はなかったが, Cx43pYの発現は有意に抑制された。この結果より, 卵丘膨化時のヒアルロン酸-CD44はCx43のチロシンリン酸化を引き起こすことが明らかとなった。

4. 高品質卵子大量生産のための卵成熟制御技術の開発をめざした卵成熟誘起機構の解明

今日, 卵子の体外成熟培養・体外受精技術は家畜の改良・増産への利用に重要な技術として世界的に広く普及している。これらの技術では, 卵巣内で排卵まで至らない卵胞内卵子や食肉処理場で屠殺された家畜の卵巣内卵子を利用することが可能であるため, 材料となる卵子を大量にかつ安定して確保できることが利点であるとされている。しかし, 実際に体外培養技術で得られた成熟卵子の受精率・発生率は低く, 決して満足のいく成績は得られていないのが現状である。現在, この問題に関しては, 体外成熟培養の段階における卵成熟の質の低さが原因であると考えられている。しかし, 現在まで, 家畜に限らず哺乳動物の卵成熟誘起機構の詳細は解明されていないため, 体外成熟培養技術の根本的な改良は行われていない。すなわち, 哺乳動物の卵成熟誘起機構が明らかにすることで, 卵子の成熟を人為的に制御することが可能となり, 質の高い受精可能な卵子を大量に, かつ安定して得られる新しい体外培養技術の開発が可能になることが期待される。

一般に, 哺乳動物の卵成熟機構は次のように考えられている。卵丘-卵子複合体 (COCs) のギャップ結合が卵成熟に伴って閉鎖し, 卵丘細胞で産生されたcAMPをはじめとする卵成熟抑制物質の卵子への供給が遮断される。その結果, 卵子内の卵成熟促進因子 (MPF) 活性が上昇し, 卵核胞崩壊 (GVBD) が起こり, 卵成熟が誘起される。この卵成熟過程において, 卵丘膨化とよばれる現象が観察される。卵丘膨化は卵丘細胞から合成・分泌されたヒアルロン酸が卵丘細胞間隙に蓄積することによって誘導されることが明らかとなっている。卵丘膨化は, ほとんどの哺乳動物の卵成熟過程で観察される現象であることから, 哺乳動物の卵成熟と相互に関連した現象であると考えられているが, 卵成熟機構における卵丘膨化の関与についてその詳細は明らかになっていない。そこで, 卵丘膨化現象に着目し, 卵成熟誘起機構の解析を行った。まず, COCsにおけるヒアルロン酸の主レセプターであるCD44タンパク質の発現と局在を調べた。その結果, 分子量85kDaのバンドが卵成熟に伴い検出された。また, CD44の発現は卵丘細胞のみで検出された。これらの結果は, 以前報告されたRT-PCR法によるCD44 mRNA発現の結果と一致する⁵⁾。さらに,

CD44は細胞分画法により分画された細胞膜画分にのみ強い反応がみられた。これらの結果から、ブタCOCsにおいて、CD44は卵丘細胞の細胞膜に局在していることが明らかとなった⁴⁾(図4)。

CD44が卵成熟に伴い発現し、その発現が細胞膜に局在していたことから、卵成熟過程においてCD44はヒアルロン酸のシグナルを細胞内に伝達している可能性が高いと考えられる。そこで次に、卵成熟におけるヒアルロン酸-CD44の影響について調べた。ヒアルロン酸の卵成熟に及ぼす影響を調べるため、成熟培地へヒアルロン酸合成阻害剤(DON)あるいはCD44とヒアルロン酸の結合を阻害する抗体を添加した培地でCOCsを培養し、培養24時間後の卵子内MPF活性(p34^{cdc2} kinase活性)およびGVBD率を調べた。対照区(無添加)における培養24時間の卵子内MPF活性は、培養0時間のMPF活性と比較して有意に上昇したが、DON添加区およびCD44抗体添加区の培養24時間では卵子内MPFの活性化は阻害され、対照区と比較して有意に低かった。また、GVBD率も同様に対照区と比較して、DON添加区およびCD44抗体添加区では有意に減少した(図5)。これらの結果から、ヒアルロン酸がCD44を介してMPF活性を上昇させ、卵成熟を誘起していることが明らかになった。しかし、図4に示したようにCD44の発現は卵丘細胞に局在していることから、ヒアルロン酸-CD44の卵成熟誘起作用は卵子に直接作用するのではなく、卵丘細胞を介していると考えられる。COCsは卵丘細胞間および卵丘細胞-卵子間をギャップ結合で結合している。COCsで発現するギャップ結合タンパク質の中でCx43は卵巣内の発現量が最も多く、生殖機能に重要であることが報告されている。そこで次に、Cx43に着目して、卵成熟機構に及ぼすヒアルロン酸-CD44の影響について解析を行った。Cx43の発現は対照区、DON添加区および抗体添加区いずれの実験区においても大きな変化はみられなかった。しかし、培養に伴って検出されたCx43のチロシンリン酸化は、

DONおよび抗体により有意に阻害された(図6)。最近、Cx43で形成されるギャップ結合は、Cx43のチロシン247とチロシン265の2カ所のチロシンがリン酸化されることで閉鎖することが報告されていることから、ブタ卵成熟過程において、ヒアルロン酸-CD44はCx43のギャップ結合が閉鎖させる働きをしていることが示唆された。したがって、これらの研究結果から、ブタ卵成熟は卵丘膨化時のヒアルロン酸-CD44によるCOCsギャップ結合の閉鎖により、卵子内へのcAMP流入が低下し、そのことが卵子内MPF活性を上昇させて卵成熟を誘起することが示唆された。今後、卵成熟過程におけるヒアルロン酸-CD44下流のシグナル伝達をより詳細に調べることで、家畜のみならずヒトを含めた哺乳動物全般の卵成熟機構が解明できると考えている。さらに、これらの知見をもとに、卵成熟制御技術を開発することで、高品質卵子を大量に生産する体外成熟培養技術が確立できるものと考えている。

5. おわりに

本研究では、卵胞血管系を調節する新しい卵胞閉鎖抑制・発育促進技術の開発に成功し、また卵成熟誘起にヒアルロン酸-CD44のシグナルが重要であることを解明した。近年、体外培養技術、胚移植技術は、家畜の改良・増産の手段として成果を上げつつあり、さらに、体細胞クローン作出の研究もあいまって、品質の高い受精可能な卵子の需要は年々増加している。本研究はこれらに大きく貢献できると考えている。今後、本研究で得られた研究成果をさらに発展させ、閉鎖する卵胞の血管新生を特異的に促進させることによる、より効果的な卵胞閉鎖抑制・発育促進技術の開発と、さらに体外培養システムによる卵成熟制御技術の開発を行い、これら2つの技術を融合することによって、本研究の最終目標である品質の高い受精可能な卵子の大量生産を可能とする技術が確立できるものと期待している。

文 献

- 1) Jiang, JY. et al. (2002), *Cell Tissue Res.*, 310, 93-101.
 2) Jiang, JY. et al. (2003), *Reproduction.*, 125, 211-223.
 3) Shimizu, T. et al. (2002), *Biol. Reprod.*, 67, 1846-1852.
 4) Shimizu, T. et al. (2003), *Biol. Reprod.*, 69, in press.
 5) Kimura, N. et al. (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 707-717.
 6) Yokoo, M. et al. (2002), *Biol. Reprod.*, 67, 1165-1171.



ブレイン テクノニュースの
バックナンバーご案内

第 94 号

2002 (平成14) 年11月15日発行

総 説

日本産乾シイタケと中国産乾シイタケとの
判別手法の開発 ……………時本景亮・寺島和寿
国内情報
米のDNA品種判別技術の開発ーコシヒカリ判別用
プライマーセットの開発……………大坪研一・中村澄子
DNAマーカーによるイグサ品種「ひのみどり」の
識別技術開発 ……斎藤 彰・飯牟禮和彦・奥泉久人
高純度の絹蛋白質セリシンを産生する蚕品種
「セリシンホープ」の育成
……………山本俊雄・宮島たか子・間瀬啓介・飯塚哲也
すり身排液からのDNA及びEPA含有油脂の
新規回収法……………高橋カエ
千葉県かん水抽出フルボ酸の水稲苗生育へ与える
諸効果 ……………山田パリーダ・山口達明

地域の先端研究

花色素分析を活用したトルコギキョウ
新花色品種の育成
……………間藤正美・柴田 浩・佐藤孝夫・檜森靖則

文献情報

ヒツジの子宮内膜におけるGM-CSF量の調節
……………(抄訳：下司雅也)
酵母における窒素制御 ……………(抄訳：家藤治幸)
rheinはTGF- β によって誘導される尿細管上皮
細胞の肥大や細胞外マトリックス産生制御する
……………(抄訳：織田浩司)

海外便り

反芻動物における脂肪組織分泌ホルモン(レプチン)
に関する研究ー西オーストラリア大学と
CSIROでの1年間ー ……………角川博哉

◀国内情報▶

海苔の粘質多糖・ポルフィラン

佐賀大学 農学部,¹福岡県水産海洋技術センター 有明海研究所,
²佐賀県地域産業支援センター
 濱洋一郎・常田尚正・杉本良子・常岡 史・小谷正幸¹・墨 利久²

海苔の主成分の一つである粘質多糖ポルフィランは、上等、下等海苔にかかわらず、海苔乾重量の20%以上を占めていた。ポルフィランは、紅藻独特の粘稠な性質を示す多糖で、水溶性食物繊維、保湿剤、増粘剤として利用できるだけでなく、様々な生理活性を有することが報告されている。

1. はじめに

海藻は古来より日本人に親しまれている食品の一つであり、国内での生産量、生産額は海藻中で最も多く、乾海苔として年間100億枚前後が生産され、その生産額は1,000億円に達している¹⁾。しかし、佐賀県だけでも年間1,000万枚前後の入札最低限度額に達しない下等海苔が生産され、その多くは利用されずに廃棄されている。生産から焼却廃棄に至るまでに必要な費用の合計は、佐賀県内だけで年間数億円にも達すると見積もられており、大量の資源的、経済的損失が発生している。

日本で海苔養殖に主として用いられているスサビノリ (*Porphyra yezoensis*) は、糖質、タンパク質を主成分として含有し、糖質のほとんどはポルフィランと呼ばれる多糖で占められている。ポルフィランは、海苔の細胞間を充填する粘稠な物性を示す紅藻特有の多糖であり、乾海苔製品においては、それらの光沢や口溶けの善し悪しを左右すると考えられている²⁾。

ポルフィランは、D-ガラクトース (D-Gal) とL-Galが反復結合した直鎖のガラクトタンで、HAMA Yoichiro, TSUNEDA Yoshimasa, SUGIMOTO Ryoko, TSUNEOKA Fumi, KOTANI Masayuki¹, SUMI Toshihisa²

〒840-8502 佐賀市本庄町1番地

¹〒832-0055 福岡県柳川市吉富町728-5

²〒849-0932 佐賀市鍋島八戸溝114

L-Galはアンビドロ化または硫酸化のいずれか、D-Galの6位の水酸基の一部はメチル化している (図1)。このため、ポルフィランの構造は非常に不均一で、同一種においても、産地や摘採時期などに応じて含量や糖組成が大きく変動する。

本稿では、著者らが開発したポルフィランを含む紅藻粘質多糖の分析法を紹介すると共に、海苔の摘採時期、産地による多糖含量の変動を示す。さらに、色落ち海苔など商品価値に乏しい下等海苔中にも、上等海苔に匹敵する量のポルフィランが含まれていることを紹介する。

2. AG含有多糖の分析

ポルフィランや寒天、カラギーナンなど紅藻ガラクトタンの主要構成糖である3,6-アンビドロガラクトース (3,6-anhydrogalactose, AG) は生来非常に不安定で、酸加水分解やメタノリシス中に容易に破壊されるので、試料中のAGをクロマトグラフィーにより直接分析することは困難であった。それゆえ、AG含有多糖の詳細な構造については、未だ不明な点が残されている。著者らは、AGを含むガラクトタンを無水条件下でメルカプトリシスすることにより、AGおよびその他の構成糖をジエチルメルカプタール (ジエチルジチオアセタール) 誘導体として定量的に遊離させ得ることを見出した。この性質を利用し、生じた単糖誘導体をGLCまたはHPLCで分離

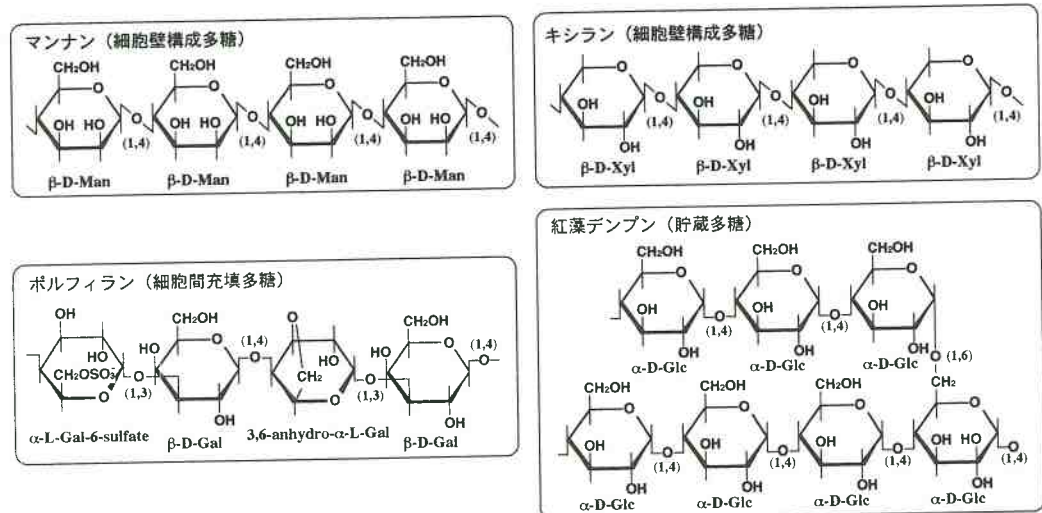


図1 海苔に含まれる多糖

定量する方法を開発し報告した^{3, 4)}。分析法の概略を以下に記載するが、詳細は文献を参照していただきたい。乾燥多糖試料 (AG含有ガラクトサン, 200 μg) を 0.5M HCl/[ethanethiol: methanol (2:1, v/v)] 中 60℃ で 6 時間加熱することにより, AGを含む全ての構成糖はジエチルメルカプタール誘導体として定量的に遊離した。遊離した単糖誘導体を GLC および HPLC で分離定量した。

- ①GLCによる定量：得られた単糖ジエチルメルカプタール誘導体を、トリメチルシリル化し、キャピラリーガスクロマトグラフで分析した。単糖誘導体はそれぞれ単一ピークを与え、メチルシリコンカラムで相互分離した。
- ②HPLCによる定量：得られた単糖ジエチルメルカプタール誘導体を水溶液とし、逆相HPLCに供した。単糖ジエチルメルカプタール誘導体は、逆相HPLC-アセトニトリル/水系で相互分離し、またそれらには新たに紫外吸収が付与されたため、UV検出器により高感度で定量できた。

3. 海苔粉末の分析

本法を、乾燥海苔粉末の分析にも応用した。乾燥海苔粉末 (200 μg) を、同様に無水条件下でメルカプトリス (0.5M HCl/[ethanethiol: methanol (2:1, v/v)]、

60℃, 12時間) することにより, 多糖より構成単糖が定量的に遊離した。それらを上述の方法で定量することにより, 海苔に含まれる全ての多糖を同時に定量することができた³⁾。図2にGLCによる分析例を示している。海苔にはポルフィランに加え, 細胞壁構成多糖であるマンナン, キシラン, さらに貯蔵多糖である紅藻デンプンなどが存在している (図1)。すなわち, ポルフィランの含量は, その構成糖であるGal, 6-O-Me-GalおよびAG量の総和により, また細胞壁構成多糖であるマンナン, キシラン含量は, それぞれマンノース, キシロース量から, デンプン含量はグルコース量から算出可能であった。本法は非常に少量の試料で分析できるので, 一枚の海苔葉体があれば, 部位別に多糖含量を求めることも可能である。また, 海苔以外の海藻の糖質分析にも適用できる。

4. 海苔多糖含量と収穫時期

福岡県水産海洋技術センター有明海研究所にて試験栽培され, 乾海苔に加工されたものを試料とした。乾海苔を, 乾燥, 秤量後, 水を加え膨潤させた。これをホモジナイズ後, 凍結乾燥し, 海苔乾燥粉末を調製した。平成11年度に試験栽培された海苔 [秋芽網1回摘み (H11.11.12摘採), 秋芽網2回摘み (H11.11.25摘採), 冷凍網1回摘み

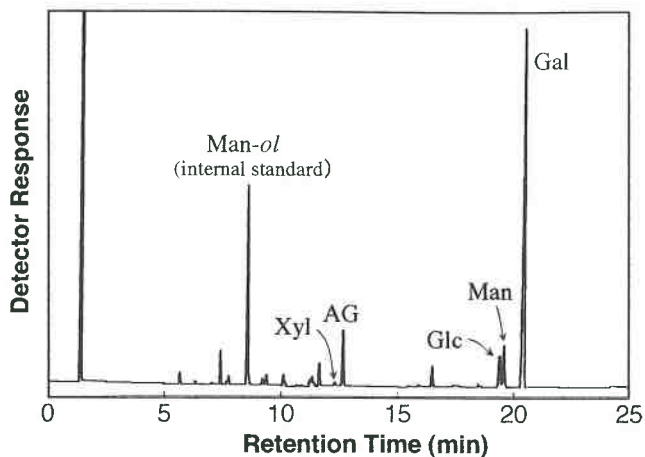


図2 GLCによる海苔粉末の糖質分析

試料；福岡県垣，冷凍網一回摘み，特等海苔。カラム；DB-1。
カラムオープン温度；180→230℃，2℃/min。

(H11.12.14摘採)，冷凍網3回摘み (H12.1.6摘採)，冷凍網4回摘み (H12.1.20摘採)]を分析した結果を図3に示している。多糖の中では、ポルフィラン含量が飛び抜けて多く、乾海苔1gあたり201~297mg含まれていた

(注：メルカプトリシス中に脱硫酸が起こるため、硫酸化GalはGalとして検出される。ポルフィランの5~10%は硫酸基が占めている)。同様に、キシランは7.8~11.8mg，マンナンは30.5~35.7mg，紅藻デンプンは~15.8mg含まれていた。一般に、摘採回数が増加するにつれて生産される海苔品質は劣化するが、図3

に示すように、海苔のポルフィラン含量は初回の摘採でも少なく、二回目以降の摘採では増加する傾向が見られた。この傾向は、他の年度および他の共販海苔試料においても観察された。また、平成12年度に有明地区で大規模な色落ち海苔被害が発生したことは記憶に新しいが、入手した色落ち海苔試料中に

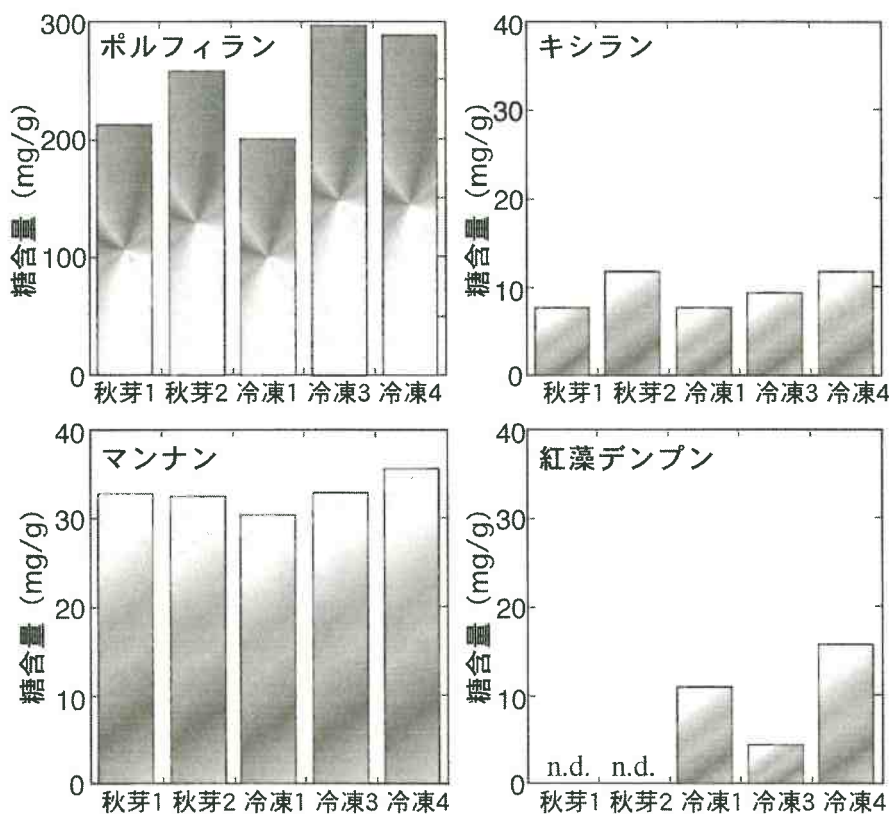


図3 摘採時期による海苔多糖含量の変動

試料には平成11年度に福岡県水産海洋技術センター有明海研究所にて試験栽培された海苔を使用した。
秋芽1；秋芽網1回摘み 冷凍1；冷凍網1回摘み 冷凍4；冷凍網4回摘み
秋芽2；秋芽網2回摘み 冷凍3；冷凍網3回摘み

も同程度 (220mg/g) のポルフィランが含まれていた。

5. 海苔多糖含量と産地

平成13年度に製造された有明 (福岡皿垣, 冷凍網一回摘み, 特等), 三重 (桑名赤須賀, 秋芽網一回摘み, 優上), 兵庫 (神戸, 冷凍網一回摘み, 特等) 産の乾海苔を入手し, 同様に分析した (図2, 図4)。それぞれの産地で最高ランクに位置づけられるこれら海苔製品中のポルフィラン含量は, 乾海苔1gあたり200~300mgで, 図3とほぼ同様の結果が得られた。神戸産の海苔では, ポルフィラン, キシラン, マンナンいずれも含量が最も多く, また初回の摘採にもかかわらずポルフィランは272mg/gと高含量を示した。今回使用した福岡および桑名産の海苔は支柱式海苔養殖により製造され, 神戸産の海苔は浮き流し法により養殖されたものである。糖含量

の増加は, 海苔の「堅さ」と密接に関与すると考えられている。

6. おわりに

ポルフィラン同様, 紅藻由来の多糖である寒天の主成分アガロースは, D-GalとL-Gal (L-AG) が反復結合した中性ガラクトンで, そのゲル化する性質を利用し多方面で汎用されている。例えば, 食品においては羊羹やゼリーなどに, 理化学的には微生物培養や電気泳動などの支持体として使用されている。一方ポルフィランもD-GalとL-Galが反復結合したガラクトンであるが, アガロースのように一義的な構造を取らず, 非常に不均一な酸性ガラクトンで, 粘稠な溶液であるがゲル化しない, という独特な性質を有している。代表的な不溶性食物繊維である寒天とは異なり, ポルフィランは水溶性食物繊維としての機能を持つほか, その物性を利用し増粘剤, 保湿

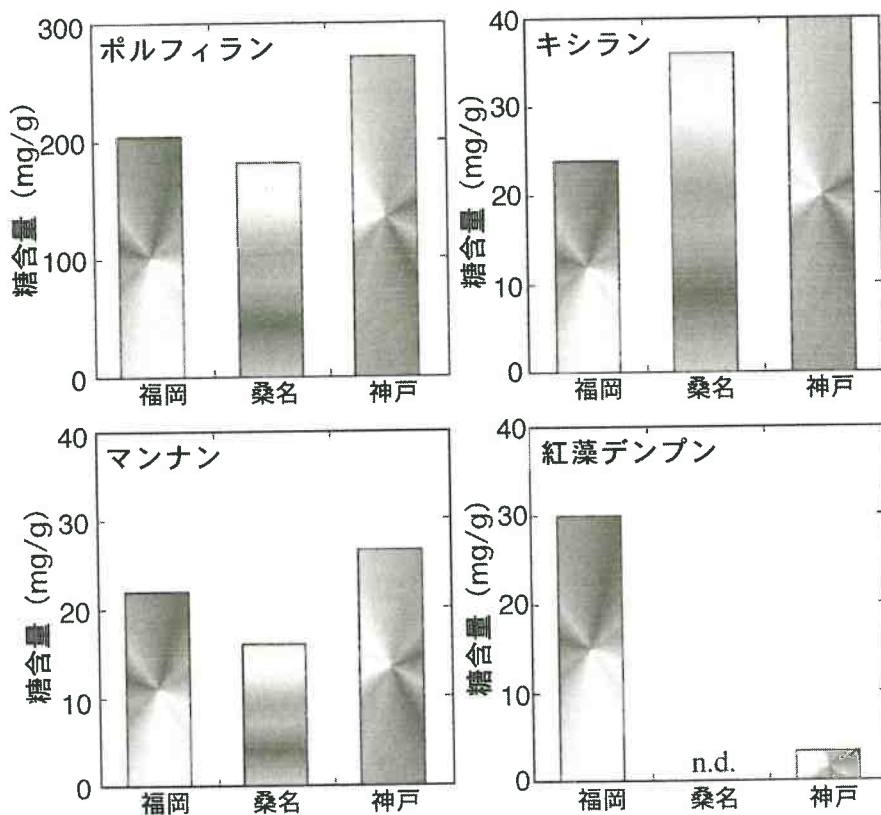


図4 産地による海苔多糖含量の変動

福岡; 福岡四垣, 冷凍網1回摘み, 特等 桑名; 桑名赤須賀, 冷凍網1回摘み, 優上 神戸; 神戸, 冷凍網1回摘み, 特等

剤などとして食品、化粧品などに応用することが期待できる。また、ポルフィランはその分子中に硫酸基を多数もつ高分子ポリアニオンであり、ポルフィランおよび誘導されたオリゴ糖が抗腫瘍活性、血圧降下作用、免疫賦活活性などの生理活性を示すことが報告されている²⁾。ポルフィランが持つこれらのユニークな機能は、ポルフィラン分子の構造に依存しているので、今後その構造をより詳細に解明する必要がある。

文 献

- 1) 田島正喜 (2001), 加工海苔入門, 119-141, 日本食糧新聞社, 東京
- 2) 天野秀臣 (2000), 海苔の生物学 (能登谷正浩編著), 142-154, 成山堂書店, 東京
- 3) Hama Y. et al (1998), *Anal. Biochem.*, 265, 42-48
- 4) Hama Y. et al (1999), *J. Biochem.*, 125, 160-165



ブレイン テクノニュースの バックナンバーご案内 第 93 号

2002 (平成14) 年 9 月15日発行

総 説

メタン発酵法によるバイオマスエネルギーの生産に関する研究の現況……………野池達也

国内情報

草や木を原料としたメタノール燃料合成技術の開発と検証機「農林グリーン1号機」の誕生……………坂井正康・中川 仁

超臨界メタノール処理による木質系バイオマスの液化技術……………坂 志朗・南 英治

In vitro重複受精系の開発による花粉管誘導機構の解明とその背景……………黒岩常祥

体外成熟卵子への顕微授精による子豚の誕生……………菊地和弘・中井美智子・柏崎直巳

メダカの性決定遺伝子の発見……………長濱嘉孝

産業廃棄物を利用した環境循環型非塩素系凍結防止剤に関する研究開発……………花松憲光

文献情報

クローン牛におけるX染色体不活性化の異常パターン……………(抄訳: 下司雅也)

アトピー性疾患予防におけるプロバイオティクスの効果……………(抄訳: 西村新吾)

除草剤耐性ナタネの花粉は3 kmも飛ぶ……………(抄訳: 岩井純夫)

トウモロコシSEMAPHORE1はknox遺伝子とオーキシン極性輸送を制御する……………(抄訳: 丸尾嘉宏)

魚油をベースとした構造脂質の酸化特性に対する乳化剤の影響……………(抄訳: 室田一貴)

海外便り

大規模専業農家を高度に支援する作物生産機械の通信・制御技術の開発-米国カーネギーメロン

大学での1年間-……………村上則幸

生研機構からのご案内

新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業における平成14年度採択課題。

新事業創出研究開発事業(地域型)における平成14年度採択課題。
融資制度のご案内。

◀国内情報▶

高精度水田用除草機の開発

生物系特定産業技術研究推進機構 生産システム研究部

宮原佳彦

近年、除草剤を使用しない水稲栽培における雑草管理技術として、アイガモ飼育、紙マルチ田植および機械除草等が関心を集めている。しかし、機械除草については、株間の除草、能率の向上および労働負担の軽減等が課題であった。生研機構では農機メーカーと共同して、水稲の条間と株間を同時に除草できる乗用型の水田用除草機を開発した。本除草機により、除草剤を使用しない水稲栽培における雑草管理作業の省力化、さらに、高付加価値米生産における規模拡大等が可能となる。

1. はじめに

農薬や化学肥料等の化学資材は、生産性や品質の維持・向上、あるいは、農作業の効率化、省力化等のために大きな貢献をしてきた。しかし、現在では、いわゆる環境問題として、環境中に放出・蓄積された各種の化学物質の影響が問題となっており、これらを多用してきた農業分野において速やかな対応が求められている。このため、農薬や化学肥料等に依存した従来の農業技術から脱却し、環境負荷を低減しつつ、持続的生産を可能にする新たな農業技術の確立が求められている。

2. 除草剤を使用しない水稲栽培における雑草防除技術

水田における最も一般的な雑草防除の手段は、いうまでもなく、除草剤である。除草剤は、水田内、畦畔および農道など様々な場所で広く使われており、特に水田内では、水稲総作付面積（約170万ha）に対して平均で年間1.6回分程度が散布されている¹⁾。このように広く普及した除草剤は、水稲作における雑草管理作業の省力化に大きく貢献してきたが、前述のように、除草剤が環境中に放出さ

れることによる環境負荷をいかに低減するかが現在の課題となっている。

このため、除草剤以外の除草技術が注目されるわけであるが、既存の除草手段としては、人力除草、歩行用手押し除草機、歩行用動力除草機（中耕除草機）、生物利用（アイガモ、淡水魚他）等であり、いずれも、除草効果の不安定性、作業能率や省力性の低さ、労働負担の大きさ等多くの問題点を抱えている²⁾。

このような状況を踏まえて、田植と同時に紙マルチを敷設することで雑草発生を抑制する「再生紙マルチ田植機」が鳥取県での産官学の共同研究により開発された。しかし、同技術では、マルチ用紙の重さや補給回数等に改善を望む声も聞かれた。そこで、生研機構では、農業機械等緊急開発事業において、三菱農機(株)及び三洋製紙(株)と共同で、紙の軽量化とこれを敷設するための田植機（軽量紙マルチ敷設田植機）の開発を行った³⁾。開発された6条用軽量紙はロール1本で125m敷設でき、10a当たりで4.4本を使用する（従来機の必要量の2/3）。同用紙は、田植え同時敷設後40～50日間田面に存在し、雑草の発生を抑制するため、通常はその後も収穫作業までさらなる除草作業を必要としない。また、軽量紙マルチ敷設田植機（6条植）は、同用紙を用いた田植え作業を従来機の約2倍で行うことができる。なお、本田植機は通常の田植作業も可能である。

MIYAHARA Sumihiko

〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

軽量紙マルチ敷設田植機は、平成11年より市販が開始され、平成14年度までに約120台が普及している。さらに、この田植機を用いて、より高い収益性を得るためには、高付加価値米として通常より高い価格で販売することが必要となる。

3. 水田における機械除草技術

水稲用除草剤の普及する以前は、手押し式人力除草機等による機械除草が行われていた時代があった。その後、除草爪の付いた横軸回転ロータで条間を除草する歩行用の自走式動力除草機（中耕除草機とも呼ばれる）が開発され、現在まで除草剤を使用しない水稲栽培における除草手段の一つとして普及している。この歩行用除草機は、作業条数は2～4条程度の機種が市販されているが、いずれも、高速回転するロータで条間のみを除草する機構であり、株間除草機構をもたないため、除草効果が不十分である、作業能率が低い、労働負担が大きい等の問題点が指摘されていた。

そこで、生研機構では21世紀型農業機械等緊急開発事業において、(株)クボタおよび井関

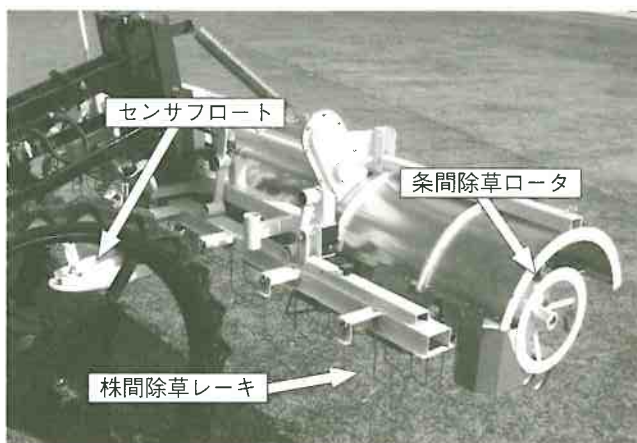


図1 高精度水田用除草機の外観
(回転・揺動式除草機構)

農機(株)と共同で、水稲の条間および株間を同時に除草できる乗用型の除草機、すなわち「高精度水田用除草機」の開発を行った。

4. 開発機の概要

開発した「高精度水田用除草機」は、機体後部に各種の作業機を搭載可能な乗用管理車両（乗用田植機走行部に相当、以下では本機という）に除草装置（6条または8条用）を搭載したものである。

この除草装置には、高速回転する横軸回転ロータ（条間除草ロータ）で水稲の条間を除草し、水平左右に揺動するレーキ（株間除草レーキ）で株間を除草する方式（回転・揺動

式）の除草機構を採用している。図1に除草装置の外観を、表1にその主要諸元を示す。

本装置の特徴を列記すると以下のとおりとなる。

1) 作業条数は6条と8条（最外側のロータおよびレーキの着脱により変更）である。

2) 条間ロータは条間毎に1個が対応

表1 開発機の主要諸元

車 両		乗用田植機走行部	
作業条数		6条, 8条	
除 草 装 置	条 間	方 式	ロータ回転式
		回転数	100~200rpm
		ロータ径	380mm
		ロータ幅	180mm
	株 間	方 式	ツース揺動式
		揺動数	220~440サイクル/分 (3.7~7.3Hz)
作 用 深 さ	調 節 方 式	センサフロートによる 油圧昇降調節方式	
	条間	40~60mm (作業時)	
	株間	20~40mm (作業時)	
作業速度		0.4~0.6m/s	

し、その外周6カ所に除草爪を持ち、作業速度に比例して、毎分100~200回の回転で田面に作用し除草する。

3) 株間レーキは、稲株列(株間)毎に1組が対応し、作業速度に比例して、毎分220~440回揺動して田面に作用して除草する。

4) 除草の作用深さは、条間ロータが40~60mm、株間レーキが20~40mmの範囲で5段階に設定可能である。なお、作業中は、除草装置中央に設置したセンサフロートにより、田面の凹凸を検知し、本機の油圧昇降装置が制御され、設定作用深さを維持するよう自動的に調節される。

5) 本除草機は乗用型であるため、既存の歩行用除草機(2~4条用)に比べて、作業能率の向上と労働負担の軽減が図れる。

5. 開発機による機械除草作業の方法

図2に本除草機による標準的な除草作業スケジュールを示す。さらに、本除草機を用いた作業方法の概要について列記すると以下のとおりとなる。

(1) ほ場の準備と田植作業

- ① 本除草機を使用する場合は、田植と除草などで計4回程度、本機が同じ位置(条間)を走行するため、これに耐える耕盤を有することが望ましい。
- ② 代かきと田植との間隔は可能な限り短期間にして雑草の発生および生長を抑制する。また、雑草の発生密度を低下するため、代かきを2回以上行うことも

効果的である。

- ③ 田植作業は、除草機の作業条数に合った条数(6または8条)の田植機で行う。本除草機の最外側の条間ロータは、隣接する行程の間隔が狭い場合には、稲株に接触して損傷を発生させることがある。このため、稲の損傷を未然に防ぐため、田植え時に行程の間隔を一定に保つよう留意する。

(2) 除草作業

- ① 田植え後の稲が活着した段階で、早めに1回目の作業を行い、以後、雑草の発生状態を見ながら2回程度の作業を行う(図2)。1回目まで日数が開くと雑草が増え、以後の除草作業によっても十分な除草ができない場合がある。
- ② 作業時の水深は3~5cm程度が適当である。これよりも浅い場合は、車輪への泥付着、除草装置への負荷増大等が発生する恐れがある。また、深すぎる場合には、水の抵抗により、ロータやレーキの田面への作用が弱まる場合がある。
- ③ 作用深さ(特に株間レーキについて)は稲の損傷に配慮して、深くなり過ぎないように設定する。除草作業にあたっては、稲の損傷程度と除草作用の強さを常に観察しながら、必要に応じて設定を変更しながら作業を進めることが望ましい。
- ④ 作業速度は、稲の損傷に配慮しながら設定する(通常は0.4~0.6m/秒程度)。特に、1回目には稲が小さいため、速度を

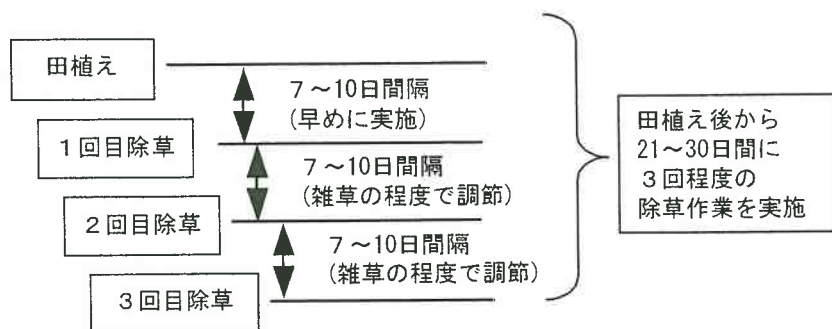


図2 標準的な除草作業のスケジュール

落として作業することが望まれる。

- ⑤ 農道ターンができない場合には、本除草機は枕地で旋回する必要がある。したがって、車輪通過部分の稲株の踏み倒し、埋没等の発生はある程度は避けられない。そこで、損傷をできるだけ少なくするために、枕地での急旋回や頻繁な切り返し等は避け、可能な限り大きな半径で円滑に旋回するように努める。

- ⑥ 車輪の沈下が激しい軟弱ほ場で除草機を利用する場合には、後輪に補助車輪を利用することで、ある程度走行を安定化することが可能である。

6. 開発機の性能

ほ場試験（生研機構附属農場，埼玉県川里町）の結果では，3回作業（10日間隔）通算の除草本数割合は約60%（条間と株間の平均）で歩行型除草機の約20%を大きく上回り，実用上十分な性能であった。一方，稲の損傷および埋没等の発生は少なく，収量への影響はわずかであった。また，作業能率は6条で20，8条で35a/h程度（平均速度0.5m/s）であり，市販の3条用歩行型除草機の4～5倍であった。

図3に全国各地で行われた試験における作業風景の一例を示す。試験結果からは，前記の方法で作業すれば，本除草機を用いて十分な除草効果が得られることが報告されている。さらに，耕起や代かき回数を増やす等の耕種的手段との併用により除草効果の向上・安定化も期待できる。

7. おわりに

今回紹介した「高精度水田用除草機」は，



図3 開発機による除草作業の状況(宮城県中新田町)
(平成14年5月25日 除草作業1回目)

平成10～12年度での開発研究および13年度の現地試験（開発促進評価試験）を経て，14年度より市販化されている。市販に当たっては，6条植乗用田植機走行部を本機（メーカーによる呼称は「多目的田植機」）とし，これに搭載する作業機として，今回の除草機の他に，田植機，湛水直播（条播）機，溝切り機等が用意されている。さらに，15年度には8条用の本機，田植機および湛水直播機が新しい機種に追加されている。

除草剤に頼らない水稻栽培に取り組む農家にとっては，雑草管理作業の省力化や経営規模拡大をいかに行うかであった。本稿で紹介した高精度水田用除草機は，その課題を解決し得る性能を有することから，今後の普及が期待されるところである。

文 献

- 1) 竹下 孝史 (2000), 農薬グラフ, 153, 6-15
- 2) 高松 修 (1996), 関東雑草研究会報, 7, 9-19
- 3) 窪田 潤 (1999), 機械化農業, 1999(3), 11-13
- 4) 宮原 佳彦 他 (2002), 高精度水田用除草機（開発促進評価試験）, 平成13年度研究報告会資料, 61-71, 生研機構

◀地域の先端研究▶

魚油の生物学的脱臭法 —パン酵母を用いる新しい方法—

有限会社バイオシステム研究所 (前 大阪市立工業研究所 生物工学研究室)

檜 山 圭 一 郎

機能性食品素材として重要なDHAやEPAを多く含む魚油の精製には、脱臭工程が不可欠である。従来の水蒸気蒸留法あるいは吸着法に代わる生物学的な脱臭法として、食品に使われるパン酵母が糖のアルコール発酵の際に働くアルコール脱水素酵素を使って悪臭物質を還元する新しい方法が開発された。この方法は安全性が高く、設備費や人件費も少なく行えることから、小規模工場にも適用することが期待される。

1. はじめに

魚油には、海生微生物が生産する高度不飽和脂肪酸が多く含まれ、これが低温の海水中でも魚の細胞膜の流動性を保つ働きをしている。これらの高度不飽和脂肪酸の中でもドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) は、人の脳の発達、血栓予防など色々な生理作用を有することが近年明らかとなってきた。したがって、これらの高度不飽和脂肪酸を多く含む魚油を加えることによって機能強化した特定保健用食品が注目されるようになった。しかしながら、これらの不飽和結合は空気酸化を受け易く、それらを含む魚油あるいはその魚油を添加した食品がしばしば特有の悪臭を発するようになる。そこで、悪臭物質を除去する方法として、1) 水蒸気蒸留で追い出す¹⁾、2) 活性炭に吸着させる²⁾、3) 多孔性樹脂やポリオレフィン系精密ろ過膜に吸着させる³⁾、4) カテキン、トコフェロール、アスコルビン酸などで還元する⁴⁾などの方法が考案された。ところが、これらの物理的方法で悪臭物質のみを分離することや化学的方法で悪臭物質を特異的に変化させることはいずれも管理が困難で、特殊な設備も必要になることから、特異性を有する酵素や微生物を用いる生物学的な方法が望まれる。そこで、高度不飽和脂肪酸の空気酸化

HIYAMA Keiichirou

〒567-0887 茨木市西中条町8-19

化によって生成する悪臭物質を調べ、これを特異的に無臭あるいは好ましい臭気の物質に変化させ、しかも油脂には影響を与えない生物学的脱臭方法を検討し、パン酵母を用いる方法を開発するに至った。

2. 魚油に含まれる悪臭物質の構造と生成機構

タラ、ニシン、マグロ、イワシ、サンマ、サケなどの魚油には、それぞれ表1に示すような不飽和脂肪酸が多く含まれており、これらの構造中の不飽和結合は魚油の精製工程で空気中の酸素によって(1)式に示す反応経路で容易に酸化を受ける。こうして生じる酸化生成物のアルデヒド類およびその異性化したケトン類のうち、 $C_5 \sim C_9$ の直鎖アルデヒド(パレルアルデヒド、カプロンアルデヒド、ペラルゴンアルデヒド、2-ペンテナール)、2-ケトン(2-ヘプタノン、2-オクタノン、2-ノナノン)は特有の魚油臭を有する⁵⁾。

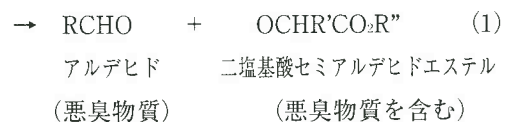
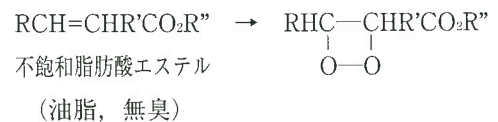


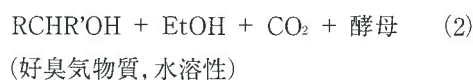
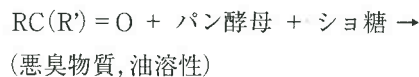
表1 魚油に含まれる不飽和脂肪酸の種類

高度不飽和脂肪酸：		
ドコサヘキサエン酸 (DHA)		$C_{22}^{\Delta 4, 7, 10, 13, 16, 19}$
イワシ酸		$C_{22}^{\Delta 4, 8, 12, 15, 19}$
エイコサペンタエン酸 (EPA)		$C_{20}^{\Delta 5, 8, 11, 14, 17}$
エイコサテトラエン酸		$C_{20}^{\Delta 5, 8, 11, 14}$
その他の不飽和脂肪酸：		
ジエコリン酸		$C_{18}^{\Delta 9, 11, 13}$
リノレン酸		$C_{18}^{\Delta 9, 12, 15}$
リノール酸		$C_{18}^{\Delta 9, 12}$
オレイン酸		$C_{18}^{\Delta 9}$

3. 悪臭物質の還元脱臭

魚油中の悪臭物質のみを特異的に変化させて脱臭する生物学的手段としては、酵素的に悪臭物質を無臭の物質へ変換することが考えられる。悪臭物質がアルデヒドやケトン類であることから、これらを還元してアルコールにすると無臭または好ましい臭気物質に変換することができ、これに適した酵素、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) が有効であると想定される。しかしながら、反応系に還元型の補酵素NADHを必要とするので、これの供給を続けるか再生を行うことが必要であることや、酵素の再利用が困難であることなど技術的にもコスト的にも難しい。そこで、ADHを生産してアルコール発酵を行う食品用微生物である酵母を取り上げ、悪臭物質を含む魚油にショ糖と酵母菌体の懸濁液 (約 10^8 cfu/ml) を加えて27℃で一晩振盪または攪拌したところ、表2の結果が得られた。マグロ油やイワシ油についても同様の結果が得られた。

この試験により、用いた菌株のうちパン酵母が油脂の脱臭に優れていることが判った。パン酵母には、*S. cerevisiae*の中でもバターなどの油脂を変質させず、しかも発酵によってフレーバーが良くなる菌株が一般に使われており、そのADHは、炭素数が8個位まで鎖長のケトンやアルデヒドを還元することができるので⁶⁾、アルコール発酵の際(2)式のようにADHによって魚油中の悪臭物質が還元され、好ましい臭気物質に変わるものと考えられる。



4. 脱臭工程

脱臭の効率を上げるため、反応初期には油

表2 各種酵母による魚油の脱臭

試験区分	菌株	油脂の臭い
パン酵母	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 2044	臭い顕著に減少
アルコール製造用酵母	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4126	アマニ油様臭
酒造用酵母	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 0234	魚油臭残存
飼料用	<i>Candida utilis</i> IFO 0626	魚油臭残存

マルトース-酵母エキス (MY) 培地で培養した各酵母菌体の懸濁液 (10^7 - 10^8 cfu/ml) に10%相当のショ糖を加えた水溶液50mlにイカナゴの油脂10gを添加して27℃で3日間振盪した後、油分中の臭気の官能試験 (5人) を行った。

脂層と酵母菌体層との界面付近で激しく攪拌して分散状態で界面を増やし、悪臭物質が水層に移って酵母菌体に取り込まれ、還元を受け易い条件を作ることが必要である。ある程度アルコール発酵が進むと悪臭物質は水層に移行しやすくなり、反応は進行する。この時、炭酸ガスが発生するので反応容器内が嫌気条件になり、反応中に不飽和結合がさらに酸化されることを防ぐことができる。しかしながら、炭酸ガスの出口を作っておくことが必要である。反応後静置または遠心分離をして水層と油層を分ける。回収された菌体は新しい糖液に懸濁して再利用することができる。油層は、新たに水を加えて攪拌、静置または遠心分離を行い、数回洗浄する。脱臭反応後のこれらの操作は、回収された油脂の不飽和結合が酸化されないように窒素気流中で行うことが望ましい。元々油脂中の悪臭物質の濃度は、0.1～数ppm程度であるので、脱臭操作後の油脂の回収率が99%以上で、損失がなくほぼ定量的に回収することができる。

5. おわりに

このパン酵母による魚油の脱臭方法は、1) 食品に使われる安全な微生物と糖を使う工程、2) 油脂が変化を受けない(油脂加水分

解酵素(リパーゼ)を細胞の外につくらない)、3) 反応中に再酸化を受けない(アルコール発酵で炭酸ガスが発生し、嫌気条件の工程となる)などの特長がある。そして、従来の水蒸気蒸留による脱臭法に比べて、i) 工程が安全、ii) 必要なエネルギーが少なくて済む、iii) 大規模な設備投資が不要、iv) 小規模生産に対応できる、v) 人件費が少なくて済む(他の作業と併行して行える)ことなどから、中小企業に適した技術であると言える。

文 献

- 1) 小原 哲二郎 (1992), 食用油脂とその加工, 最新食品加工講座, 68-74, 建帛社, 東京
- 2) 特開平 05-331487
- 3) 特開平 06-299188
- 4) 特開平 05-287294
- 5) 日本油化学協会編 (1971), 改訂二版油脂化学便覧, 75-77, 丸善, 東京
- 6) Schmburg, D., Stephan, D., Eds. (1995), Enzyme Handbook, Vol.9, class1.1, EC1.1.1.1, 1-23, GBF Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Springer-Verlag, Berlin

◀文献情報▶

マウスおよび霊長類胚性幹細胞からの末梢神経系ニューロンおよび床板細胞への分化誘導

Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells.

Kenji Mizuseki¹, Tatsunori Sakamoto², Kiichi Watanabe^{1,2}, Keiko Muguruma³, Makoto Ikeya¹, Ayaka Nishiyama¹, Akiko Arakawa², Hirofumi Suemori², Norio Nakatsuji², Hiroshi Kawasaki², Fujio Murakami³, and Yoshiki Sasai^{1,2}

¹RIKEN, Kobe, Japan, ²Kyoto University, Kyoto, Japan, ³Osaka University, Toyonaka, Japan.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 5828-5833 (2003)

胚性幹細胞は、胚盤胞の内部細胞塊から取り出され、継代培養により未分化状態を保ったまま増殖し続ける細胞で、あらゆる細胞に分化できる全能性、多分化能を持っている。近年、医療現場では臓器移植に代わる治療法として再生医療が注目されているが、胚性幹細胞から分化誘導した細胞を移植して損傷臓器を再生させるなど、胚性幹細胞の再生医療への応用が期待されている。しかしながら、再生医療への臨床応用のためには、機能的細胞への分化誘導を確実に行う必要があり、培養法と誘導因子の検討が不可欠である。

著者らは、マウス胚性幹細胞をPA6間質細胞上で培養することにより、90%以上の効率で神経細胞へ分化可能という分化誘導法を以前報告し、このPA6間質細胞表面に存在する誘導因子をSDIAと命名した。近年、胚性幹細胞の分化誘導に関する研究が広く行われているが、体外で形成した胚性幹細胞由来神経系前駆細胞を広範囲の神経外胚葉系の希望する細胞へと確実に分化させられるかは不明で

ある。そこで、SDIA処理胚性幹細胞の背側（神経稜）および腹側（床板）細胞への体外での分化誘導を試みた。

第1期（培養開始から3日目まで）において、SDIA処理は外胚葉系への分化を促進する。この第1期にBMP4感作を開始するとSDIA処理胚性幹細胞は皮膚細胞へと分化するが、BMP4感作が無ければ神経外胚葉系の前駆細胞へと分化する。

第2期（培養4から7日目）は、神経外胚葉前駆細胞における背側あるいは腹側神経細胞への分化の臨界期である。BMP4感作が無ければ、SDIA処理胚性幹細胞は、中脳のドーパミン神経などの中枢神経系の種々の細胞へと分化する。Shh添加は、床板細胞、Nkx2.2細胞、脳幹型運動神経等の腹側中枢神経系細胞への分化を促進し、高濃度のShhは床板細胞へと分化誘導する。SDIA/Shh処理により分化した運動神経は、体外で筋肉を収縮させるなど、機能的運動神経である。一方、第2期におけるBMP4感作は、腹側神経系への分化を抑制し、背側神経系への分化を促進する。この時期にBMP4を感作させたSDIA処理胚性幹細胞は、神経稜前駆細胞および背側中枢神経系細胞へと分化する。さらに、高濃度のBMP4感作は自律神経系へ分化させるが、低濃度のBMP4感作は知覚神経系へと分化させる。また、SDIA/BMP4処理胚性幹細胞を第2期の後にフィブロネクチン上でBMP4を除いて継代培養すると、平滑筋細胞へと分化する。

本論文は、外来誘導因子の処置時期、濃度、組み合わせによって、体外において胚性幹細胞から皮膚、神経稜、蓋板、中枢神経系神経細胞、床板等の主要な外胚葉系細胞に分化誘導可能であることを明らかにした画期的な報告である。神経系の発生メカニズムはいまだ不明な点が多いが、SDIAを用いた胚性幹細胞の分化誘導法の確立により、胚性幹細胞の神経系再生医療への応用へとつながる可能性が示唆された。

（抄訳：下司 雅也，GESHI Masaya，独立行政法人 農業技術研究機構 畜産草地研究所）

◀文献情報▶

酵母のエタノール耐性はオレイン酸に依存する

Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content.

You KM, Rosenfield CL, Knipple DC.

Department of Entomology, Cornell University, USA.

Appl Environ Microbiol 2003 Mar ; 69 (3): 1499-503 (2003)

恒常性を維持するため環境に適応することは、生命の生存にとって極めて重要なことである。微生物の増殖を抑制する環境因子の1つとしてエタノールが挙げられる。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をエタノール存在下で培養した場合、膜脂質中の単価不飽和脂肪酸の量が増加することが知られている。しかしながら、エタノール耐性と膜脂質の脂肪酸不飽和化の増加との相関は確証に至っていない。そこで、筆者らは増殖抑制性があるエタノール環境下での、*S. cerevisiae* の不飽和脂肪酸組成の違いにおける適応性を調べた。

S. cerevisiae の不飽和脂肪酸組成は、単価不飽和脂肪酸であるパルミトオレイン酸 (Delta(9)Z-C(16:1)) とオレイン酸 (Delta(9)Z-C(18:1)) によってのみ構成されており、両不飽和脂肪酸はそれぞれパルミチン酸 (C(16:0)) とステアリン酸 (C(18:0)) を酸素及びNADH依存的に不飽和化することで合成される。この反応はOLE1遺伝子がコードする脂肪酸不飽和化酵素によってのみ触媒される。

筆者らはまず、以下の方法で *S. cerevisiae* の不飽和脂肪酸組成を変化させた。ole1ノックアウト株に、*S. cerevisiae* とは異なる二重結合の位置選択的 (Delta(9)とDelta(11))、基質の鎖長選択的 (C(16:0)とC(18:0)) 特性を有する昆虫の脂肪酸不飽和化酵素を発現させることにより、自然状態 (Delta(9)Z-C(16:1)優勢) とは異なった不飽和脂肪酸

組成 (Delta(11)Z-C(16:1)、またはDelta(9)Z-C(18:1)優勢) を有する遺伝的背景を着せ替えた株を作製した。これらの株のうち、エタノール抵抗性を示したのは、オレイン酸 (Delta(9)Z-C(18:1)) 優勢な特性を有する形質転換体のみであった。また、この株は5%エタノール存在下ではパルミトオレイン酸 (Delta(9)Z-C(16:1)) に対するオレイン酸 (Delta(9)Z-C(18:1)) の割合が4倍に増加した。

次に、様々な不飽和脂肪酸を入れた5%エタノールを含む培地でのole1ノックアウト株の増殖を見ても、オレイン酸がエタノール耐性に関与していることが示された。

これらの結果より、*S. cerevisiae* のエタノール耐性には不飽和脂肪酸組成が重要な決定因子であり、特にオレイン酸がエタノール耐性を獲得するのに適した不飽和脂肪酸であることが示された。このことより、膜脂質中へのオレイン酸の取り込みが、膜の流動性を増加させるエタノールの効果を無効にする効果、つまり、膜の流動性を下げる効果を有すると考えられる。さらには、不飽和脂肪酸組成の遺伝的改変は、商業的酵母の環境ストレス耐性の点で実用的価値があるかもしれない。

(抄訳：澤田 大輔, SAWADA Daisuke, カルピス株式会社 基盤技術研究所)

◀文献情報▶

あいた口がふさがらない話

Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production.

A. Mustlil, S. Meriot, A. Vavasseur, F. Fenzi and J. Giraudat

The Plant Cell (2002) 14, 3089-3099

気孔は葉表皮に存在しその開度を調節することにより、光合成の際のCO₂の取り入れと蒸散による水分損失を制御している。水分欠乏下ではアブシジン酸 (ABA) が生成される。孔辺細胞に達したABAが未同定の受容体に結合すると、そのシグナルは次々に伝達され、最終的には、K⁺、陰イオンがイオンチャンネルより流出し、膨圧が低下、気孔は閉じる。この孔辺細胞でのABAシグナル伝達カスケードは、植物では例外的に研究が進んでいるもので、大きさに言えば、国際的な基礎植物学関連の雑誌には関連する論文を各号の一つは見つけることができる。阻害剤あるいは中間伝達物質と想定される化合物を投与する、いわゆる“薬理学的研究”と並んで、突然変異体 (*abi*, *era*, *gca*, *aapk*, *abh* etc.) の解析が経路解明に大いに役立っている。今回、そこにABAが存在しても気孔を閉じない変異体が新たに加わった。*ost1, 2* (Open Stomata) である。Stóma (複数 stomata) はギリシャ語で口を意味する Stóma に由来するもので、正に“あいた口がふさがらない”変異体である。うまい名前をつけるものである。筆者もABA非感受性のソラマメ変異体を見つけているが *fia* (fava bean insensitive to ABA guard cell signaling) などというしまらない名前をつけ後悔している。第一、OPEN STOMATA open the door to ABA signaling (Assam 2003) という文章ならいいが、Mutant *fia* open the door to—じゃねえ。

ぼやきはさて置き、本題である。まず、変異体の選抜法であるが、なかなか巧妙な方法を用いている。これは、RoskinとLadyman

(1988) がオオムギの変異体を選抜するのに使った方法で、赤外カメラで葉温測定するものである。水分欠乏下に置くと野生型は気孔を閉じるが、変異体は気孔を閉じないので蒸散が起こり気化熱で温度が下がり、1℃程度葉温が低くなる。この方法では一度に多数の個体を選抜できる利点があり、後で紹介するクローニングもこの方法があって初めて可能となった。こうして選抜された変異体 *ost1, 2* はABAに誘導される気孔閉口は起こらず、ABAと並ぶ気孔閉口の要因であるCO₂と暗所には正常に反応する。今まで単離されたABA非感受性変異体は全てCO₂と暗所に対しても非感受性であり、変異点は今まで違うことが想定される。

次は変異点の解析であるが、Map-based cloningによっている。*ost1, 2* と野生型のF2の葉温と分子マーカーとの分離を調べ、変異点を第4染色体の119 kbpまで絞り込み、その部分の塩基配列を調べると、シグナル伝達に関与すると予想される遺伝子 protein kinase At4g33950が存在し、この遺伝子が候補遺伝子となる。変異体 *ost1* では想定開始コドンより1488bp下流でGからAへの、*ost2* では97bpでGからAへの置換が起こっていた。OSTはserine-threonine kinaseの1種で、先にソラマメでABAシグナル伝達経路の要素の一つとされていたAAPKと同一の遺伝子であると思われる。

Ca²⁺とH₂O₂はABAシグナル伝達の間伝達物質として働いている。この *ost* ではこれらにより気孔を閉じるが、H₂O₂の発生は見られない。ABAとH₂O₂との間が欠損している事を示している。また、同じくABAに対して非感受性である *abi* ではOST kinaseの活性化が起こらず、ABI (protein phosphatase) はOSTkinaseはその上流に位置するが明らかになった。

このように、ABAシグナル伝達カスケードの要素の一つが決められたが、明らかになればなるほど、複雑さも露にあってくる。まだ、まだ、ゴールは遠い。(抄訳：岩井 純夫, IWAI Sumio, 鹿児島大学 農学部)

◀文献情報▶

イネにおける分けつの制御

Control of tillering in rice

Xueyong Li¹, Qian Qian², Zhiming Fu¹,
Yonghong Wang¹, Guosheng Xiong¹, Dali
Zeng², Xiaoqun Wang¹, Xinfang Liu¹,
Sheng Teng², Fujimoto Hiroshi², Ming
Yuan³, Da Luo⁴, Bin Han⁵ and Jiayang Li¹¹Institute of Genetics and Developmental
Biology, Chinese Academy of Sciences²China National Rice Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural
Sciences ³China Agricultural University⁴Institute of Plant Physiology and
Ecology, Chinese Academy of Sciences⁵National Center for Gene Research,
Chinese Academy of Sciences*Nature* 422, 618-621 (2003)

穀類であるイネにおいて、分けつ数の制御は、その収量を決定するに当たって非常に重要であり、農業の意味も大きい。筆者らは、分けつを分化せず主茎のみが成長するイネの自然突然変異体 *monoculm 1* (*moc1*) の単離・解析を行い、*MOC1* 遺伝子が分けつの制御に重要な役割を果たすことを示した。

ファインマッピングの結果、この遺伝子は第6染色体長腕、R1559とS1437マーカーに挟まれた20kb以内に座乗することがわかった。この配列内には、トマトの腋芽形成に関わる遺伝子 *LATERAL SUPPRESSORS* (*LS*) と高い相同性を持つORFが1つ含まれており、シークエンスの結果、*moc* 変異体ではこのORFの中に1.9kbのレトロトランスポゾンの挿入が見つかった。このORFを用いたコンプリメンテーションテストで、変異体の表現が回復したことから、*LS* と相同なこのORFが *MOC1* 遺伝子であると確認された。

ホモロジー解析からは、*MOC1* タンパク質が、*LS* タンパク質同様、植物に特有なGRASファミリーに属することが示された。GRASファミリーのいくつかの遺伝子は転写因子として機能することが既に知られている。筆者らは *MOC1* も核に局在するかをGFP-*MOC1*

を用いて調べ、その結果、核での局在が確認された。このことは *MOC1* が転写因子として機能していることを示唆している。

野生型の上位節間では分けつの伸長は抑制され、同時に3次分けつ以上の高次分けつはほとんど分化しない。一方、コンプリメンテーションに用いた *MOC1* 形質転換体では、節間伸長した上位節間でも分けつ芽が分化し、成長を続けた。また、3次から5次にかけての高次分けつも分化し、いくつかの葉腋では2個以上の分けつ芽ができていた。これらの表現型は、導入された遺伝子のコピー数が多いほど、顕著であった。以上から、*MOC1* 遺伝子は分けつ芽の誘導と成長の両方に機能していることが示唆される。また、分けつを多数分化する形質転換体では、植物体が矮化しており、*MOC1* は分けつの制御だけでなく、植物体の高さにも関与することが示唆される。

RNA *in situ* ハイブリダイゼーションによる結果では、*MOC1* 遺伝子は野生型イネの形態的变化の現れる以前の、葉腋の表皮および表皮下の数細胞で発現が見られた。続いて発現は分けつの突起全体に広がり、分けつの分裂組織及び若い葉原基全体で発現するようになった。その一方で、主茎の茎頂分裂組織 (SAM) での発現は抑制されていた。

OSHI 遺伝子は、野生型では主茎及び分けつの分裂組織でその発現が確認され、分裂組織の分化と維持に重要な働きをしている。この遺伝子は *moc1* 変異体では、葉腋での発現が抑えられるが、主茎の分裂組織では発現が維持される。また、分けつの成長に関わる *OsTBI* 遺伝子も野生型では葉腋で発現が確認されるが、*moc1* ではその発現が抑制される。つまり、分けつの分化及び成長において、*MOC1* はこれら2つの遺伝子より上流で機能していることになる。

以上の結果から *MOC1* はトマトの *LS* のイネオーソログと考えられ、分けつの分裂組織の分化および成長に不可欠な機能を持つことを強く示唆している。

(抄訳：丸尾嘉宏, MARUO Yoshihiro, 東京大学大学院 農学生命科学研究科)

◀文献情報▶

捕食性魚類群の世界的規模
の急速な減少Rapid worldwide depletion of predatory fish
communities

Ransoma Myers & Boris Worm

Biology Department, Dalhousie University,
Halifax, Nova Scotia, Canada*Nature* 423, 280-283 (2003)

海洋動物は食物連鎖で成立しており、捕食性魚類（肉食性魚類）の資源量は大型魚類ほど少ない。特に、マグロ類、カジキ類、タラ類など産業的に重要な大型捕食性魚種は、種々の漁獲規制に基づいて漁獲を行っているものの生物資源量に対して漁獲過多に陥っており、将来の資源量に危機感を示す研究者も少なくなく、健全な水準への回復を目指した国連決議が急がれている。

歴史的にみて、沿岸域の大型捕食性魚類に関するデータは、その生態系や機能の改善に役立ってきたが、大陸棚や外洋での生態系に関するデータは不足しているため、単一魚種が減少していることは分かるものの包括的には回答できない状態である。

そこで著者らは、漁業が産業化され始めた頃からの信頼性の高いデータを用いて解析することを試みた。まず、大陸棚の生態系に関しては、調査トロール船の調査結果を使用した。これは北部大西洋、タイ湾、サウスジョージア周辺の大西洋で、タラ類、ヒラメ類、エイ類などの底棲魚に関する。一方、海洋の生態系の解析には日本式延縄の漁獲データを使用した。すなわち、海域を5°×5°マス目に分画し、延縄針100本当たりで漁獲されるマグロ類、カジキ類、メカジキ類などの尾数（catch per 100 hooks=c.p.h.h）を1952～1999年にかけて解析した。

その結果、外洋の魚群では漁業の産業化直後6～12c.p.h.hであったものが、開始後10年で0.5～2c.p.h.hに急激に減少しており、多くの魚類群で同様の傾向が認められた。また、延縄漁法が世界に広まった1950年代から1960

年代にかけて、漁場には豊富なマグロ類やカジキ類が認められ、また新しい漁場でも操業当初は高い漁獲率を示すことが分画解析で確認されたが、数年後には低いレベルに減少している。その結果、全ての漁場で低レベルの漁獲となり開発された漁場は捨てられてしまっている。一方、大陸棚の魚群でも外洋域と同じ傾向を示している。タイ湾では漁業の産業化当初に比して、回遊魚やサメ・エイ類は60%減少しており、狭い大陸棚を有するサウスジョージアでは漁場開発から2年で著しく減少している。

総合的に見ると、漁業産業化当初の資源平均減少率は16%で、漁業が産業化されると15年以内に80%減少することとなり、現在では大型捕食性魚類の90%以上が世界の海洋から消えたこととなる。ただし、大型捕食性魚類の漁獲過多は、その餌である対象魚類や競合魚類の増加をもたらす。この現象は延縄での漁獲魚種が、時代を経るにつれてマカジキ、バショウカジキ、メカジキに移行した事実からも分かる。

これらの結果から、著者らが提唱しているのは、

- ① 大型捕食性魚類の90%を喪失したことによる生態系への潜在的な影響
- ② 深刻な資源減少が意味する魚群の絶滅
- ③ 魚資源の減少による漁業活動の維持や経済的収益への影響

である。

（抄訳：森 徹，MORI Tetsu，日本水産株式会社 中央研究所）

◀海外便り▶

パラグアイのダイズ生産と研究 —地域農業研究センターにおける2年間—

独立行政法人 農業技術研究機構 北海道農業研究センター 畑作研究部
豊田 政一

1. はじめに

昨年の9月末まで2年間、南米パラグアイの地域農業研究センター（CRIA、写真1）で国際協力事業団（JICA）が実施している「ダイズ生産技術研究プロジェクト」に参画し、ダイズを中心とした畑輪作に関する技術移転を担当した。

パラグアイは、南米の真中に位置する内陸国で、産業は農業、牧畜を中心とする。先住のインディオとヨーロッパからの移民の混血が国民の大多数を占め、また、近年ヨーロッパ、アジア諸国からの移住者を数多く受け入れている。亜熱帯の恵まれた気候のせい

か、国民は、温厚でのんびりとしている。かつては、綿の輸出が盛んであったが、今ではダイズがこれに置き換わり、年間300万トンを超えるダイズを生産、輸出している。南米はアメリカ、中国と並ぶダイズの大生産基地となっており、パラグアイはブラジル、アルゼンチンに次いで、南米ダイズ生産国の一角を占めている。

CRIAは、パラグアイ南東部のイタプア県カピタミランダ市に所在する同国畑作研究の中核機関である。ここでは、ダイズ、コムギ、ヒマワリなどの育種を中心に、栽培、土壌、

TOYODA Masakazu

〒082-0071 河西郡芽室町新生南9線4

雑草、病理など11研究室があって、約30人の研究者が畑作に関する研究を実施している。

CRIAでは1979年以降、JICAの3つのプロジェクトが実施された。今回の「ダイズ生産技術研究プロジェクト」は、その第3プロジェクトとして同国のダイズ生産の増進、安定化を目指すと共に、CRIAの研究機関としての自立を図るために位置付けられたものである。

わたしはここで1987年にもコムギの物質生産研究をテーマとして技術移転に携わった経験があり、今回はおよそ15年ぶり2度目の派遣となった。

ここには、長期にわたるJICAプロジェクトの実施

を通じて、日本での研修を経験したメンバーが多数研究に従事している。わたしの前回のカウンターパートのエミリオさん（約20年前にパラグアイの畑作研究関係者として、初めて日本で研修を受けた）をはじめ、今回のカウンターパートのパラシオさんも日本での研修中に知り合いになっていた。このため、CRIAでの仕事への取り組みは大変順調に進んだ。

2. パラグアイのダイズ作

パラグアイの農業は南東部、アルゼンチンとの国境を流れるパラナ河西岸に広がる緩や



写真1 パラグアイ地域農業研究センター

かな起伏の続く丘陵地を中心におこなわれている。なかでも畑作は豊かなテラロシア土壤に恵まれたイタプア県やアルトパラナ県で盛んである。そしてここでは日本人移住者が導入し、苦労の上、普及させたダイズが中心作物になっている(写真2)。

現在、パラグアイのダイズ生産量は年間300万トンを超して世界の第6位、単収は2.5~3トン/ヘクタールに達し世界のトップクラスである。生産したダイズの大半はヨーロッパ方面に輸出しており、ダイズは同国の輸出品の第1位となるほどの重要な位置を占めている。

この国のダイズ生産技術の特徴は、不耕起栽培の普及にある。この技術は同国のダイズ産地としては後発地であるアルトパラナ県イグアス移住地の日系農家がブラジルから試験導入した(写真3)。この導入は当初の不安をよそに好成績を上げたため、1980年代の半ばからアルトパラナ県、イタプア県に所在する日系移住地はもとより、ブラジル系、ドイツ系、ロシア系の移住地に広く普及した。

この方法は、ダイズの前作物であるコムギの収穫後の耕起を省くことでコムギ残さを圃場の表面に残し、そのまま次作のダイズを播種する方法である。亜熱帯のトルメンタと呼ばれる集中豪雨によるエロージョンから畑土壌を保全し、また、収量も従来の耕起栽培と

同等かそれ以上に得られるため、省力的な技術として高く評価されている。

前回訪れた1987年時点では、CRIAに近いイタプア県の日系移住地ラパス、ピラポでは、

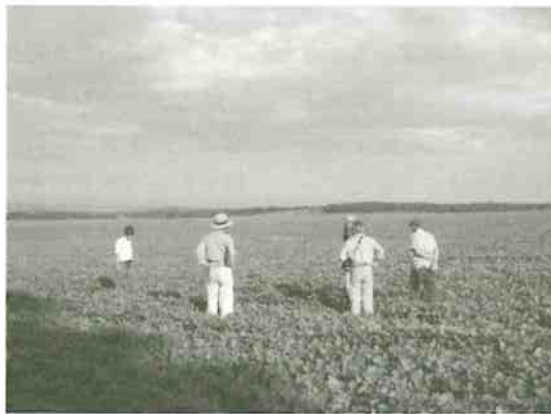


写真2 イタプア県の大地に広がるダイズ畑

豪雨による土壌の流亡防止を目的として不耕起栽培の導入を検討中であった。当時一緒に試みられていた大きなテラスを形成する等高線栽培の圃場では、集中豪雨によって等高線ののり面が大きく崩壊した現場を何度か目撃した。そして、これを修復するのは大変なことだろうという思いを抱いた記憶がある。今では、かつての等高線栽培の跡を観察することはできるが、大規模に実施している例は少ない。

不耕起栽培技術の普及は、土壌のエロージョン防止と共に耕起の省略による作業体系の簡易化を実現した。このため、ダイズの適期播種作業期間の幅を広げることが可能になり、これがまた地域全体の収量を上げることに貢献している。

ダイズ生産は1990年代に入っても栽培面積を拡大して、現在では150万ヘクタール

に達しようとしている。

3. 遺伝子組換えダイズの栽培

同国のダイズ生産のもうひとつの特徴は、遺伝子組換えダイズへの取り組みにある。



写真3 イグアス移住地に建立されたダイズ不耕起栽培発祥の地の記念碑

パラグアイでは除草剤耐性を導入した遺伝子組換え品種が一定割合で栽培されているが、遺伝子組換え品種の栽培は公式には認められていない上に、生産統計も完備していないので普及の実態は明らかではない。

イタプア県北部で、技術導入に関して地域のリーダー的な役割をしている農業企業のキメックス社で見た事例では、2002年産はダイズ作付けの20%を遺伝子組換え品種で栽培し、2003年産では40%の作付けを予定しているということであった。同社の栽培する遺伝子組換え品種はアルゼンチンで育成されたものであった。

なお、遺伝子組換えダイズの栽培が認可されているアルゼンチンでは、作付面積の95%以上で組換え品種が栽培されている。また、組換え品種の利用を認めていないブラジルにおいても、ダイズ育種を実施している研究機関では、交配組み合わせの約半分が遺伝子組換えを目的としたもので、組換え品種の実用化に向けて準備は整っているようであった。これらの周辺事情から、パラグアイにおいても、遺伝子組換え品種の利用が認可されるのはそう遠くないのではないかと思われた。

4. ダイズシストセンチュウの侵入

隣国のブラジル、アルゼンチンでは、ダイズシストセンチュウによる被害が大問題となっており、地続きの未汚染地パラグアイへの侵入は、時間の問題といわれていた。このため、CRIAでは、JICAとの間でセンチュウ抵抗性の品種育成を課題化しており、ブラジルの農業研究公社（EMBRAPA/SOYA）の協力を得て、抵抗性系統の選抜を実施していた。この結果、2002年時点でシストセンチュウ抵抗性を導入した有望系統が数系統得られている。

予防的な見地から育種目標を設定し、シストセンチュウの侵入前に汚染国の協力を得て、汚染圃場における抵抗性系統の選抜をおこなうというやり方は、研究体制や課題化の体系的な整備が遅れた同国にとっては、課題の設定の重要性を認識してもらおうという観点からも画期的な成果だと感じた。

また、プロジェクトの終了後、今年1月になって、ブラジルのシストセンチュウ発生地帯であるパラナ州と地続きのアルトパラナ県でシストセンチュウの発生が確認されたとの情報が帰国後の関係者にもたらされた。さっそく抵抗性系統の有効性が試されることが期待されている。

5. おわりに

以上のようにパラグアイは、比較的新しい南米ダイズ生産国の一員として活発な生産展開をしており、新技術の導入や開発にも大変積極的に取り組んでいる。

生産の拡大に伴い、新たな問題が生じるのは当然のことであり、先に紹介したシストセンチュウや2002年に初めて確認されたダイズサビ病の発生などに対しても、今後の対策が一層強く求められている。しかし、その一方で研究予算の確保や、職員の給与の保証など、途上国一般が抱える問題にCRIAが悩んでおり、その克服には困難が伴うと考えられているのも現実である。

日本とパラグアイの研究者が互いに研鑽しあって、新しいダイズ生産地の形成に寄与したことは大きな成果である。目前に横たわる困難を克服しつつ、23年間の成果の延長上に、今後の研究対応、技術対応がパラグアイの研究者により自立的に展開されることを期待している。

生研機構からのご案内

融 資 制 度 の ご 案 内

制度の概要

貸付利率を低減する一般融資制度と、貸付元本を減免する特別融資制度があります。

融資対象者

民間企業、農林漁業団体、公益法人。ただし特別融資は資本金10億円未満の研究開発型企業です。

対象試験研究

生物系特定産業技術に関する応用研究段階または事業化に結びつく可能性の高い試験研究で、試験研究期間は5年以内です。

融資限度額

研究期間中の各年度ごとに、対象試験研究費の7割を限度としてご融資いたします。

貸付対象経費

試験研究に必要な施設設備費・試験ほ場造成費・物品費・材料費・労務費・外注費など。

貸付条件

- (1) 貸付方法：試験研究終了までの間、支出済み経費に対して貸付
- (2) 基準利率：貸付時点の財政融資資金貸付金利に相当する率
- (3) 償還期間・方法：試験研究終了後10年以内。原則として元金均等年2回分割償還
- (4) 据置期間：研究期間中は元金の償還を据置き。研究期間中は利息を据置くことも可能
- (5) 売上納付金契約：試験研究の成果を事業化した場合、その売上高の一定割合を納付
(特別融資制度のみ)

本資金のメリット

- ◎研究開発のリスク軽減のために、試験研究の成功度合いに応じて、
利率を低減 〈低減率は最大100%〉または 元本を減免 〈減免率は最大50%〉

一般融資の場合

適用利率 = 基準利率 × 成功度 (1, 0.75, 0.5, 0.25, 0 のいずれかの数値)

特別融資の場合

返済元本 = 貸付金額の1/2 + 貸付金額の1/2 × 成功度

- ◎最長15年の長期・低利（固定制）の資金です。
◎研究によって得られた特許権等、研究成果はすべて融資先企業に帰属します。

詳細は窓口にお気軽にお問合わせ下さい。

生研機構 融資課 〒105-0001 東京都港区虎ノ門3-18-19 虎ノ門マリビル10F
TEL 03-3459-6565 FAX 03-3459-6566 E-mail yushi@tokyo.brain.go.jp

生研機構からのご案内

出 資 事 業

1. 事業の趣旨

企業等のバイオテクノロジー等に関する試験研究の促進のため、出資を行う制度です。2つ以上の企業等が新たに設立する研究開発会社を対象にした一般出資制度と単独の企業等が新たに設立し、大学又は公的研究機関等と共同で試験研究を行う研究開発会社を対象とした特別出資制度があります。

2. 募集開始時期：

募集開始時期：平成15年4月～（ご相談は随時受け付けております。）

《お問い合わせ先》

出資課

電話 03-3459-6565 FAX 03-3459-6566 E-mail : syussi@tokyo.brain.go.jp

編集後記

第97号をお届けします。本号の総説には、昆虫テクノロジーの問題を取り上げました。人類によって産業目的で利用されてきた昆虫にカイコとミツバチがあり、とくに前者でドメスティケートされたものは家蚕、野生のものは天蚕と呼ばれている。現在、これら昆虫の既知および未知の機能・生産物を活用する新しい産業技術としての「昆虫テクノロジー」研究が、農林水産省の委託プロジェクトとして展開されている。その概要を、川崎健次郎氏（独立行政法人 農業生物資源研究所）に紹介して戴いた。また、本誌に、新鮮な研究情報をご執筆下さった研究者各位に、深甚の謝意を申し上げます。（島山記）

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97号）

平成15年7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, 2003