

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

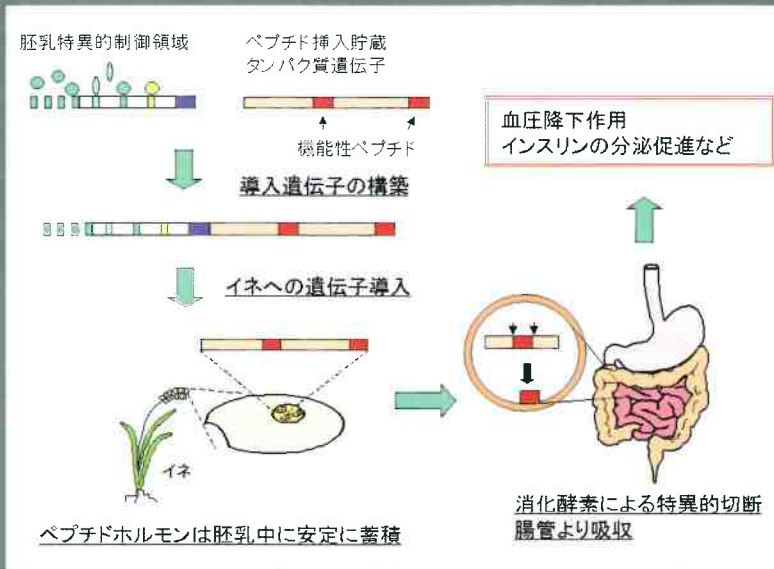
TECHNO NEWS

〈生研機構〉

ブレインテクノニュース

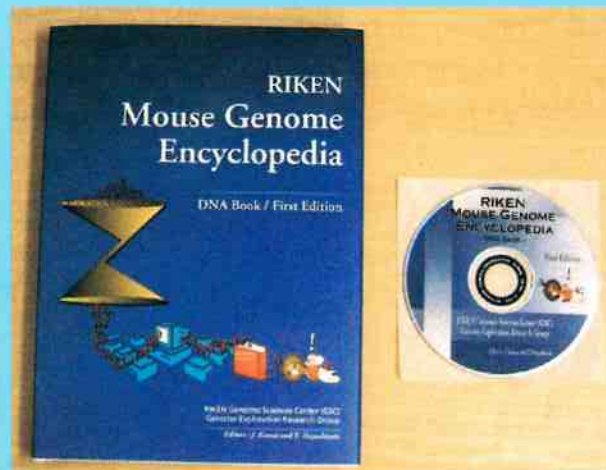
第99号

SEPTEMBER 30, 2003



遺伝子組換えにより健康機能性を付与したイネの開発

独立行政法人 農業生物資源研究所 高岩文雄



DNAブック

理化学研究所 河合 純・林崎良英

目 次

総 説

- 健康機能性を付与した遺伝子組換えイネの研究開発の現状 1
高岩 文雄 (独立行政法人 農業生物資源研究所 新生物資源創出研究グループ)

国内情報

- スギ花粉症に効果のあるペプチド含有米の開発 6
高木 英典・高岩 文雄
(独立行政法人 農業生物資源研究所 新生物資源創出研究グループ)
- 血糖コントロール作用を持つペプチド含有米の開発 10
城森 孝仁¹・小原由香里²・田下 聡²・林 裕二²
(三和化学研究所 ¹研究部 ²創薬研究所)
- ウシ卵母細胞を受精可能な卵子まで効率よく長期培養する技術の開発 14
平尾 雄二 (独立行政法人 農業技術研究機構 東北農業研究センター)
- 麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻*Alexandrium*シストの休眠・発芽生理の解明 18
山口 峰生・板倉 茂 (独立行政法人 水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所)
- ピロロキノリンキノンを補酵素として利用する哺乳類の酵素の発見 22
加藤 忠史・笠原 和起
(理化学研究所脳科学総合研究センター 精神疾患動態研究チーム)
- スギ採種圃の遺伝子流動の実態把握と最適採種圃の提案 26
津村 義彦¹・谷 尚樹¹・森口喜成²・平 英彰²
(独立行政法人 森林総合研究所 ¹新潟大学 自然科学研究科)
- DNAブックイネの遺伝子資源 (完全長cDNAクローン) 頒布の可能性— 30
河合 純・林崎 良英 (理化学研究所ゲノム科学総合研究センター)
- 自動直進田植機の開発 36
松尾 陽介 (生物系特定産業技術研究推進機構 基礎技術研究部)

文献情報

- 遺伝子が同一な母ウマからの体細胞クローン仔ウマの誕生 40
C. Galli et al. (*Nature*, 424, 635, 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)
- 鉛の腸管吸収と組織蓄積におけるラムノガラクトン- II 二量体の影響 41
Tahiri M. et al. (*J. Nutr.*, 130(2), 249-253, 2000)
抄訳: 松浦 啓一 (カルピス株式会社 基盤技術研究所)
- 早すぎた死 42
S. Ku et al. (*Planta*, 217, 559-565, 2003)
抄訳: 岩井 純夫 (鹿児島大学 農学部)
- 循環器系疾患の予防を目的とした抗酸化ビタミンの使用 43
D.P. Vivekananthan et al. (*Lancet*, 361, 2017-2023, 2003)
抄訳: 神野 修次 (日本水産株式会社 中央研究所)

海外便り

- ストレス応答機構の細胞周期への影響—パターソン癌研究所での1年間— 44
濱松 潮香 (独立行政法人 食品総合研究所)

表紙写真説明

【上段】 遺伝子組換えにより健康機能性を付与したイネの開発: 生活習慣病予防やアレルギー反応緩和の機能成分 (生理活性ペプチド、抗原あるいは酵素など) を可食部に発現・集積させる遺伝子を導入した遺伝子組換え米が着々と開発されつつあり、表紙写真の図はその原理を示したものである。この遺伝子組み換え米開発の詳細については、本誌総説 (1頁)、並びに国内情報6頁、10頁をご覧ください。 【下段】 DNAブック: 遺伝子クローンを書籍の形で印刷した情報で、CD-ROMが付与されている。写真はマウスのcDNAクローンのものであるが、生研機構の委託プロジェクト「イネ・ゲノムの完全長cDNAライブラリー整備事業」でイネ・DNAブックが作成されつつある。その詳細については、本誌・国内情報30頁をご覧ください。

◀総説▶

健康機能性を付与した 遺伝子組換えイネの研究開発の現状

独立行政法人 農業生物資源研究所 新生物資源創出研究グループ

高岩 文雄

お米に、高血圧や糖尿病、高脂血症、肥満、ガンといった生活習慣病に対して予防効果のある機能性成分や花粉症等のアレルギー疾患を緩和する成分を付与した、新規な医食同源的機能をもつ遺伝子組換え米が、次々に開発されようとしている。お米は日本人の主食であり、こうしたお米を毎日食べることで生活習慣病の予防やアレルギー疾患を予防・緩和できるなら、高齢化社会を迎え今後益々増加すると予想される医療費の削減にも大いに貢献できると期待される。さらに消費者に利点があることから、現在多くの消費者が抱く遺伝子組換え作物に対する否定的なイメージも払拭できる可能性も高い。

1. はじめに

現在、商業栽培され日本に輸入されている遺伝子組換え作物は、除草剤耐性や害虫抵抗性のナタネやトウモロコシなどであり、生産者のみにしか利点が見えないため、多くの消費者にはほとんど受け入れられていない。遺伝子組換え作物が消費者に受け入れられるには、消費者ニーズにあった、消費者が利点と感じる形質の付与が不可欠ではある¹⁾。

近年、日本では食生活や生活スタイルの変化から、高血圧、糖尿病、高コレステロールなどと言った生活習慣病患者が急激に増加している。こうした中で、食品から派生する多種類の生理機能性成分を健康維持に生かそうとする機運がかつてなく高まっており、政府が設置したバイテク戦略会議でも重点分野として機能性食品が取り上げられている。我々は2000年より、生研機構のミレニアムプロジェクト新事業創出研究開発事業の中で“健康機能性作物の開発”を推進している。このプロジェクトを担当しているコンソーシアムチームでは、可食部に外来遺伝子を特異的に発現させるシステムとマーカーフリーの組換え作物作出技術を基盤技術とし、糖尿病や抗肥満、感染症予防、花粉症緩和などの健

TAKAIWA Fumio

〒305-8602 つくば市観音台2-1-2

康機能性米の開発を実施している。実用化が可能になれば、こうした健康機能性を付与した遺伝子組換え作物には消費者利点がはっきりしていることから、現在停滞している遺伝子組換え作物開発の突破口になるのではないかと期待している。

2. 米の健康機能性成分と新規健康機能性成分の付与

突然変異を利用した育種や遺伝資源による遺伝的多様性を利用した交配育種だけでは、作物への健康機能性の強化はもはや限界にきているとあって良いだろう。米の機能性成分には、血圧降下作用のあるGABA (γアミノ酪酸) や赤米や黒米に見られるポリフェノール、フィチン、イノシトール、γオリザノールなどが知られているにすぎない。しかも、これらの機能性成分は可食部の胚乳にはほとんど含まれていない。たとえば、GABAはほとんどが胚芽中にあり、胚乳中の含量は胚芽中の10%以下に過ぎない。従って、今後上記以外の新規の機能性をコメに付与するためには、遺伝子組換え手法による新規健康機能性成分の導入に頼らざるを得ない。すなわちイネ等の作物のみならず多様な生物より有用な機能性成分を探索し、それら遺伝子を単離後、米の可食部である胚乳中に発現・集積を行う

というプロセスを経る必要がある。

健康機能性成分の付与は大きく2つに大別できる²⁾。1つは生理活性ペプチドや機能性タンパク質また病原菌やアレルゲンなどの抗原を直接可食部に発現・集積させることである。もう一方は、代謝産物が機能性を有していることから、機能性のある代謝産物を代謝工学的手法で可食部に蓄積させることである。この場合、律速になっている酵素遺伝子や目的の代謝産物を合成するために必要な新規酵素遺伝子を付加したり、発現を高めたりといった手法で、機能性のある代謝産物を可食部に蓄積を図ることになる。

3. 健康機能性ペプチドやタンパク質を導入した新健康機能性米

食品には食べて胃や腸で消化され、小腸で吸収される10アミノ酸残基以下の小さなペプチドになった時に、機能性を発揮する数多くの生理活性ペプチドが明らかにされてきた。こうしたペプチドはコレステロール値低下作用や、高血圧低下作用、免疫賦活作用、抗菌活性、抗酸化作用、学習能など多様な機能を有していることが知られている³⁾。これら機能性ペプチドの利点は、内因性のペプチドホ

ルモンほど低濃度で生物活性はないが小さなサイズであるが故、消化酵素に耐性であり、小腸から吸収され易いという特徴を有していることである。また食品由来であることから導入遺伝子に対する抵抗感も比較的少ない。しかし、機能性成分の効果を発揮させるには、これらの機能性成分を含む食品を多量に摂取しなければならないという欠点がある。そこでこうした機能を高めるために、一部アミノ酸を置換し、高機能化する必要がある。たとえば卵白アルブミンのキモトリプシン処理から派生するオボキニンと呼ばれる6アミノ酸からなる生理活性ペプチドは、血管を広げることで特異的な血圧降下作用を持っているが、その効果を発揮させるためには、卵白アルブミン2g/kg体重程度を摂取しなければならない。これは卵数十個をいっきに食べることに相当する。現在アミノ酸の置換により、高機能化が図られており、2個のアミノ酸を置換することで、約120倍程度生理活性の強い改変オボキニンペプチドが分子設計されている。

そこで我々は、高血圧予防米を開発する目的で上記の改変オボキニンをイネの主要な貯蔵タンパク質であるグルテリンの酸性サブユニットや塩基性サブユニットの可変領域に挿

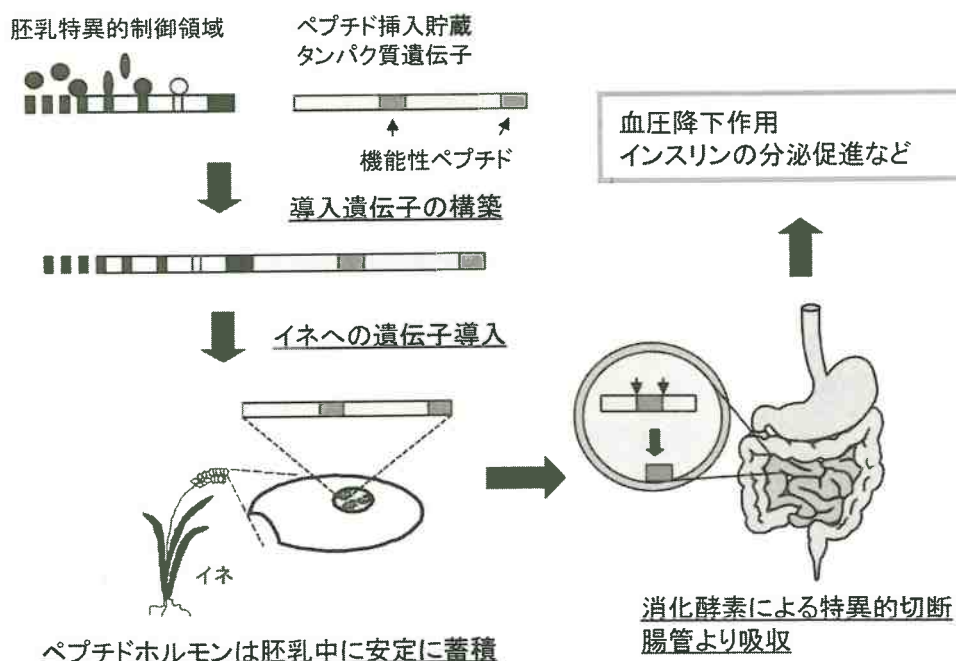


図1 機能性ペプチドを種子中に安定的に集積させる技術

表1 健康機能性米の開發現状

目的	導入遺伝子産物	発現レベル
○ 生活習慣病予防		
血清コレステロール値低下機能	ダイズグリシニン	種子タンパク質の8~10%
糖尿病予防		
インスリン分泌促進	ヒト GLP-1 (グロブリンに挿入)	種子タンパク質の約3%
高血圧予防		
血圧降下機能	卵白改変オボキニンペプチド (グルテリンに挿入)	種子タンパク質の0.4~0.6%
肥満・内臓脂肪防止	機能性共役脂肪酸(共役リノール酸、共役リノレン酸) コンジュゲース、イソメラーゼ	種子脂肪酸の約4%
貧血予防	ダイズフェリチン鉄貯蔵タンパク質	種子タンパク質の0.3%
腎臓病対策	グルテリンアンチセンス	グルテリン約30%程度に減少
○ 免疫系改善・感染症予防		
スギ花粉症緩和	スギアレルゲン特異的T細胞抗原決定基(7crp)	種子タンパク質の2~3%
ハウスダストアレルギー緩和	ダニアレルゲン特異的T細胞抗原決定基 ダニアレルゲン部分配列	
米アレルギー予防	16kDa アレルゲンアンチセンス	16 k Da アレルゲン約20%程度に減少
抗菌・免疫賦活作用	ヒトラクトフェリン	種子タンパク質の約1%
コレラ予防	コレラ菌毒素B鎖(CT-B)	種子タンパク質の約2%

入し、グルテリンの一部として、発現集積させることを認めている。その際、改変オボキニンが小腸でトリプシン等により効率的に切り出されるように切断認識配列をペプチドの両末端に配置した。現在1個のグルテリンに4~5個の改変オボキニンを挿入した遺伝子組換えイネを作出している(図1)。

一方、血液中の血糖値に依存してインスリン分泌を促進する作用を有するヒトの内在性生理活性ペプチドグルカゴン様ペプチド(GLP-1)を胚乳中に集積させたイネの開発も進めている。GLP-1は30個のアミノ酸残基からなり、この配列中にはトリプシンによる認識サイトも存在するので、活性を保った形で、トリプシンによる切断を受けないようにアミノ酸置換を行う必要があった。この改変GLP-1ペプチドをグルテリンの酸性サブユニットの可変部やグロブリンの可変部に挿入し、これら貯蔵タンパク質の一部として種子中に集積させた。現在、GLP-1を種子タンパク質あたり3%程度と高度に蓄積させたマーカーフリー遺伝子組換えイネの開発に成功している。このGLP-1集積コメからのトリプシン処理した粗抽出液には、すい臓ランゲルハンス島のβ細胞を用いたin vitroアッセイでインスリン分泌促進活性が認められた。

一方、機能性タンパク質としてコレステロール値低下機能をもつダイズグリシニンや鉄の貯蔵機能を有するフェリチンを直接可食部

に発現させることで、血清コレステロール値低下機能や鉄含量を高めたイネの開発も進めてきた⁴⁾。また抗菌活性のある母乳由来のラクトフェリンを胚乳中に集積された米も開発されており、抗菌や抗ウイルス活性、食べることで免疫系の賦活が確認されている。

新しい流れとして、アレルギー疾患の緩和を目的に、花粉アレルゲンに特異的なヘルパー2型T細胞の複数の抗原決定基(T細胞エピトープ)を連結した人工ペプチドを米の胚乳中に発現させ、経口免疫寛容の手法でアレルギー反応の緩和を目的としたペプチドワクチン米を最近開発した⁵⁾。さらに、病原性のあるバクテリアやウイルスの抗原そのものを可食部で発現させ、食べることでこれら抗原に対するIgAやIgGなどの中和抗体の産生を誘導させたり(能動免疫)、病原菌やウイルスの抗原に対するヒト抗体を種子中で発現・集積させておき、受動免疫することで感染を防御するといった手法にも米が利用されようとしている(表1)。

4. 代謝工学的手法を用いた健康機能性米

代謝工学的アプローチから機能性を高める手法は、ポストゲノム研究として最も注目すべき分野の1つである。マイクロアレー技術により、目的産物を発現させた可食部で、ど

の代謝ステップが律速になっているか、欠失しているのか明らかにすることができる。

また多くの生物のゲノム解析が進む中で、外来の代謝酵素遺伝子を同定・導入することも容易である。こうした手法を用いることで代謝過程を付加したり、補強することで、本来発現していない組織に目的の代謝産物を任意に蓄積させることが可能になってきた。またマイクロアレー技術は、新規の代謝産物を導入したとき、本来の代謝プロセスに対してどのような負荷を与えるかという疑問に答えることもできる。すでにイネ種子で発現していないゲラニルゲラニル2リン酸からβカロチンに至る3段階のステップに関わる代謝遺伝子を導入・発現させることでプロビタミンA(βカロチン)の蓄積されたゴールデンライスが開発されている。一方、共役脂肪酸が抗肥満、抗ガン、抗動脈硬化作用等幅広い作用を有していることから、リノール酸を不飽和化する酵素を種子で発現させ、機能性共役脂肪酸を蓄積されたナタネやイネの開発も積極的に進められている。今後、ビタミンEやC、また骨粗しょう症に効果の期待できるマメのイソフラボン、抗酸化作用を通じて抗ガン効果の期待できるポリフェノールやフラボノイドを高めた遺伝子組換え米の開発も進むと期待される。

5. 健康機能性米作出に不可欠な技術 —可食部への高度発現—

機能性作物開発には、食する組織に、有用遺伝子産物をどのようにしたら高度に蓄積させることができるかということがキーポイントになる。たとえばイネやコムギ、トウモロコシなどの穀類では可食部である種子(特に種子の主要な部分を占める胚乳)に、トマトなら果実に外来の有用成分を高度集積させなければならない。特異的組織への発現には組織特異的プロモーターの単離が不可欠である。すでにイネの種子では、グルテリンの*GluB-1*や26kDのグロブリンのプロモーターが、胚乳中で極めて高いプロモーター活性を有していることを明らかにしてきた⁶⁾。さらに外来遺伝子の発現の目的に応じて、種子の任意の部位に発現させることのできるプロモーターセットも準備できている。

一方、外来遺伝子産物の蓄積レベルは転写の段階で第一義的に決定されるが、転写後の制御としてmRNAの安定性、コドン、サブユニット間の会合また集積部位(空間)など様々な局面で制御を受けていることが近年明らかになってきた⁶⁾。

特に外来遺伝子産物を高度に集積させるためには、外来産物を集積させる空間を確保するなどの工夫が重要であることが示されてきた。たとえば貯蔵タンパク質の含量の低下している突然変異体に外来遺伝子を導入すると、

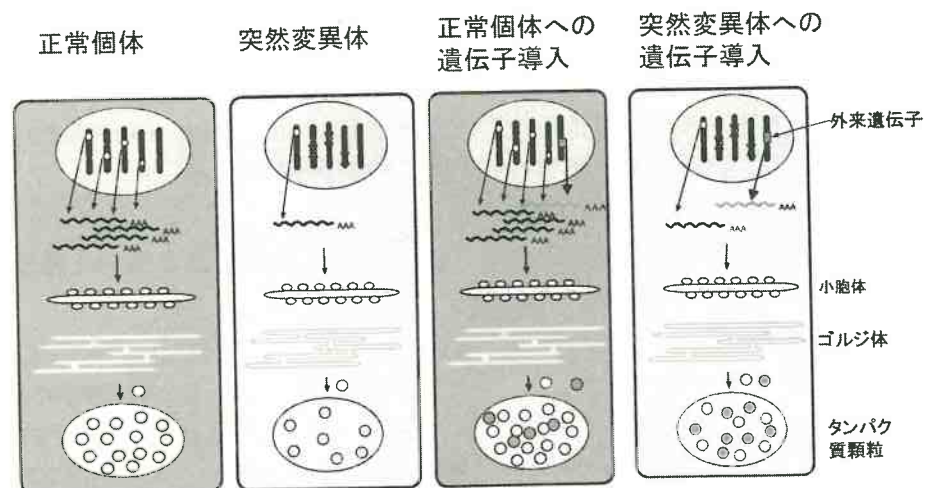


図2 突然変異体を利用した高度集積

普通のイネに導入する時よりも約2倍量外来遺伝子産物を蓄積させることができた(図2)。一方、プロモーター活性を上げ、外来遺伝子のmRNAの含量を5倍程度高めても、普通のイネに導入した場合、集積量の増加はわずかに20%程度しか高められない場合もある。これらの結果は、外来の遺伝子産物を高度に集積させるには、集積させるための空間の確保が重要であり、ない場合には翻訳された外来遺伝子産物の大部分はプロテアソームなどを介して分解されてしまい、わずかなスペースに外来産物が蓄積されるに過ぎないことを意味している。さらに、高蓄積には細胞内のどの部位に外来遺伝子産物を蓄積させるかという視点もまた重要である。タンパク質顆粒、アポプラスト、葉緑体、液胞、小胞体、細胞質など目的の外来遺伝子産物ごとに集積に適した細胞内小器官を探す必要がある。一般的に、タンパク質のC末端にKDELの小胞体係留シグナルを付加しておくことタンパク質の集積が高まる傾向が見られる。効果的な場合には5~10倍程度高まることが報告されている。さらに、遺伝子のコドンの選択性も極めて重要になる場合も度々ある。コドンの使用頻度は導入する作物や組織により異なるのでこの点も注意しなければならない。

遺伝子の導入には、今後目的の遺伝子だけを導入するマーカーフリーの遺伝子導入技術が、商品開発上で不可欠となってくる。すでに本コンソーシアムでは選抜マーカー遺伝子(多芽体の形成に関与するサイトカイニン合成酵素遺伝子や抗生物質耐性遺伝子)と細胞の酵素遺伝子の外側に組換え酵素遺伝子のターゲット配列を配置しておき、植物体の再分化過程で、マーカー遺伝子が除去され、目的の遺伝子のみが導入されるMATベクターシステムをイネで開発している。このMATベクターシステムで遺伝子導入することで、外来遺伝子産物の集積が高まる例も知られている。

6. おわりに

種子は健康機能性成分を集積させる部位と

して優れた組織である。まず他に組織で発現させるとほとんど蓄積されない外来遺伝子産物でも種子で発現させると蓄積が見られることが多く、集積量も高い。種子に蓄積させた機能性成分は室温で1年以上放置しても安定であり、貯蔵や輸送といった取り扱いも他の組織より容易である。また精製することなく機能性成分の強化されたお米を炊飯してそのまま食べることができる利点も大きい。さらに、ヒトに感染するウイルスやプリオンなどの混入は皆無であり、安全性にも優れている。そして何よりも高機能性成分の付与されたお米は世代を重ねるごとに大量に増殖でき、最終的には普通のお米と同じ価格で生産できる点である。お米は日本で自給できる数少ない作物である。農作物のグローバリゼーションの中で、日本の米の高機能化は先進国の農業が生き残るために避けて通れないプロセスである。今後、遺伝子組換えイネであるという表示が高付加価値ブランド米を意味し、輸出できるようイネを開発することが筆者らの夢である。

文献

- 1) 高岩文雄 消費者の観点に立った組換え作物の開発(2000), バイオサイエンスとインダストリー, 58, 731-734.
- 2) 高岩文雄(2001), 予防医療に期待される遺伝子組み換え食品, InterLab, 39-40.
- 3) 吉川正明(1977), 食品および一般タンパク質から派生する生理活性ペプチド, 科学と工業, 71, 310-316.
- 4) 高岩文雄(2000), 健康機能性組換えイネの開発, 農業および園芸, 75, 947-952.
- 5) 高岩文雄(2002), 第2世代遺伝子組換え作物開発の現状, 農業技術, 57, 289-294.
- 6) 高岩文雄, 多田欣史(2002), 種子を利用した組換えタンパク質生産システムの開発, 育種学研究, 4, 33-42

◀国内情報▶

スギ花粉症に効果のあるペプチド含有米の開発

独立行政法人 農業生物資源研究所
 新生物資源創出研究グループ 遺伝子操作研究チーム
 高木 英典 ・ 高岩 文雄

T細胞エピトープの経口投与により抗原特異的T細胞の不活化を誘導する免疫療法は、安全でかつ治療効果の高い根治的治療法であることが知られている。本研究では、スギ花粉アレルゲンのヒトT細胞エピトープを連結させてワクチンとしての機能を高めた人工ペプチドをイネ種子で生産する系を構築して、経口粘膜免疫寛容のメカニズムに基づいて、食べることでスギ花粉症の予防、治療効果が期待できるお米（食べるワクチン）を開発した。

1. はじめに

スギ花粉症は、全国民の20%、都市部では40%の人が罹患しているとされるアレルギー疾患であり、新たな国民病の1つとして認識されつつある。現在、スギ花粉症に対する治療法として、花粉の粗抽出液を注射で投与する減感作療法が実施されている。しかし、アナフィラキシーショックなどの全身的な副反応を引き起こす危険性があることや、治療期間が数年間に渡ることなどの問題点が指摘されていた。

これらの欠点を克服する治療方法として、T細胞により認識されるアレルゲンのペプチド（T細胞エピトープ）を経口投与する免疫療法が開発された。T細胞エピトープの投与により、アレルゲンの特異的なT細胞の不活性化、不応答化が誘導され、アレルゲンに対する免疫応答が抑制されることが治療メカニズムとして考えられている。本治療法の利点としては、IgEとの結合能を持たないT細胞エピトープを投与するため、アナフィラキシーショックなどの副反応が少ないことや、その結果、高濃度のT細胞エピトープペプチドの投与が可能になるため、短期間の投与で高い治療効果が期待されることなどが挙げられている。

これまでの研究により、スギ花粉症を引き

TAKAGI Hidenori, TAKAIWA Fumio

〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2

起こすアレルゲンとして2種類の蛋白質、Cry j I, Cry j II が単離され、マウスやイヌ、サル、ヒトなどのT細胞エピトープが解析されている。モデルマウスを用いた実験では、マウスT細胞エピトープペプチドの経口投与により、アレルギー反応の指標であるT細胞の反応性やIgE抗体の産生量などが抑制されることが示された¹⁾。この結果から、スギ花粉症の治療に対しても、スギアレルゲンのT細胞エピトープが免疫反応の抑制に有効に作用することが期待された。

一方、ヒトT細胞エピトープに関する研究も進められており、スギアレルゲンから合計7種類のヒトT細胞エピトープ領域が同定されている。さらに、これら7種類のエピトープを連結した人工ペプチド（7Crp）を合成して免疫活性を評価したところ、副反応の要因であるIgEとの結合活性を示さないことに加えて、7種類のエピトープペプチドの混合標品と比較して、より高いT細胞刺激活性を示すことが分かった²⁾。この様に、ヒトT細胞エピトープを連結した7Crpが経口ペプチドワクチンとして安全かつ有効に作用することが示唆されたことから、7Crpを利用したスギ花粉症治療法の実用化へ向けた研究が強く期待されている。そこで本研究では、イネの可食部である種子に7Crpを生産、集積させる系を構築して、スギ花粉症に対して予防、治療効果が期待できるお米（食べるワクチン）を開発した。

2. イネ種子における7Crp発現系の構築

スギアレルゲンのヒトT細胞エピトープは、アミノ酸残基数12から19の長さのペプチド領域としてCry j Iに3箇所、Cry j IIに4箇所、合計7箇所同定されている。これら7種類のエピトープを連結させ、96アミノ酸残基から成る人工ペプチド(7Crp)をイネ種子で発現させるため、まず、T細胞エピトープのアミノ酸配列に従って、7Crpをコードする人工遺伝子を合成した。その際、イネ種子の主要な貯蔵蛋白質をコードする遺伝子群の中で使用頻度の高いコドンを選択した。次に、種子胚乳において高い転写活性を示すイネグルテリン遺伝子(GluB-1)のプロモーターの下流に7Crp遺伝子を連結した。この合成遺伝子をバイナリーベクターに挿入した後、アグロバクテリア法によりイネゲノムへ導入して、ハイグロマイシン耐性を指標として形質転換体を選抜した。

得られた形質転換体の種子を解析したところ、7Crpの転写産物は検出されたものの、期待に反して7Crp産物の集積は認められなかった。この理由として、7Crp翻訳産物が細胞質に集積して分解を受けていることが考えられた。そこで、7Crp遺伝子の上流にグ

ルテリンのシグナル配列を挿入して、翻訳産物を分泌系へと移行させる系を試みた。その結果、形質転換体種子に集積した7Crp産物を検出することに成功した。さらに、集積量の向上を目的として、7CrpのC末端に小胞体の係留シグナルである4残基のアミノ酸(KDEL)を付加した発現系を構築した。その結果、7Crp集積量の顕著な増加が認められ、最も集積量の高い系統では種子1粒あたり60 μ gを超える7Crpを検出した。以上の結果から、7Crpの集積にはシグナル配列が必須であること、そして、KDEL配列の付加により7Crpの集積量が向上することが分かった。

また、形質転換体イネのゲノムへの7Crp遺伝子の導入を確認するため、形質転換体の葉からゲノムDNAを調製してサザンブロット解析を行った。7Crp遺伝子の全領域をプローブとしてシグナルを検出した結果、1コピーから4コピーの7Crp遺伝子がイネゲノムに導入されていることが確認された。

3. イネ種子に集積した7Crpの特性

イネ種子における7Crpの集積部位を解析するため、登熟種子を胚、胚乳、穎に分離した後、それぞれの画分から蛋白質を抽出して、

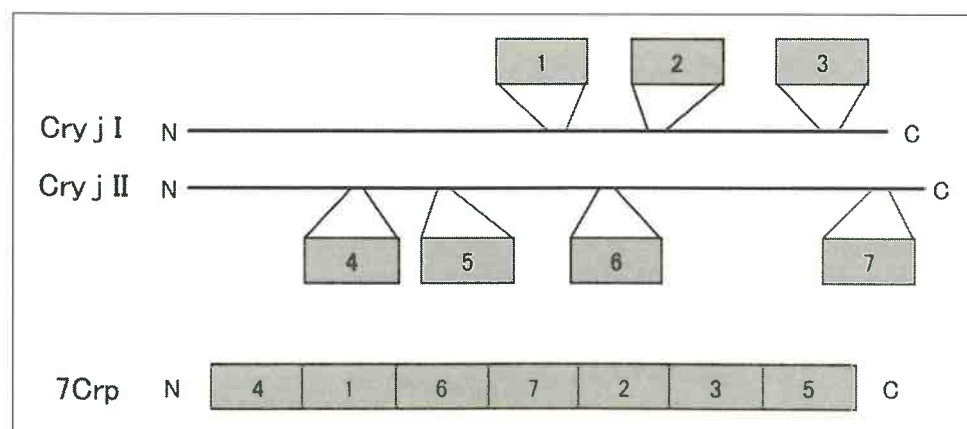


図1 スギ花粉アレルゲンヒトT細胞エピトープと7Crpの構造

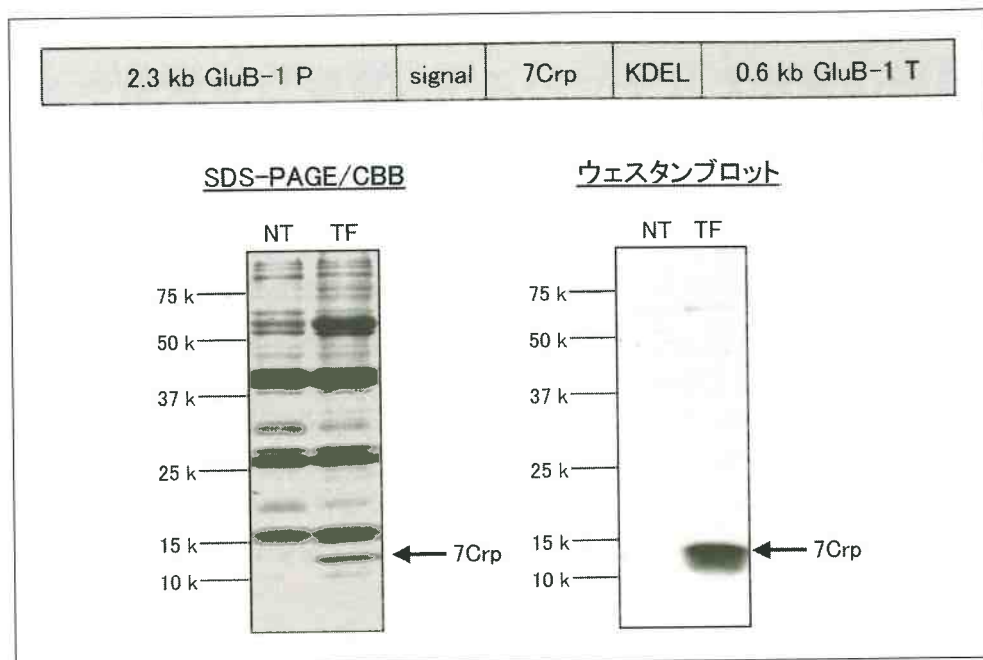


図2 発現プラスミドの構造とイネ種子での7Crpの集積

ウェスタンブロット解析を行った。その結果、7Crpのシグナルは、胚乳にのみ検出され、胚、穎、葉から抽出した試料では検出されなかった。また、形質転換体種子の断面切片を調製して特異抗体を用いた組織免疫染色解析を行ったところ、やはり7Crpのシグナルは、胚乳でのみ検出され胚では検出されなかった。以上の結果から、7Crpは形質転換体種子の胚乳組織に特異的に集積することが分かった。

一方、いくつかのアレルゲン蛋白質では、アレルゲンに結合している糖鎖がアレルギー反応を引き起こす主要な原因であることが指摘されている。7Crpについては、一次構造配列上N-型糖鎖結合配列は存在せず糖鎖は結合していないと考えられるが、イネ種子に集積した7Crpに結合する糖鎖の有無を、ペプチドレベルで解析した。N-型糖鎖が結合している蛋白質をエンドグリコシダーゼと反応させると、蛋白質から糖鎖が遊離され、反応の前後で電気泳動における蛋白質の移動度に変化する。そこで、イネ種子から蛋白質画分を抽出してエンドグリコシダーゼと反応させた後、ウェスタンブロットにより7Crpの

移動度を解析した。その結果、反応の前後で7Crpの移動度に変化が認められなかったことから、イネ種子で生産された7CrpにはN-型糖鎖は結合していないことが分かった。

また、イネ種子を沸騰水中で20分間加熱処理したときの種子中の7Crpの安定性を検討した。その結果、加熱処理の前後で7Crpに変化が認められないことから、お米を炊飯しても種子中の7Crpは安定であることが分かった。さらに、7Crp遺伝子の導入によるイネ種子の主要なアレルゲン蛋白質への影響を調べるため、アレルゲンに対する特異抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。その結果、アレルゲン蛋白質の発現への影響は認められなかった。以上の結果から、本研究で開発したお米を炊飯して日常の食生活を通して消費することにより、手軽にかつ安全に7Crpを摂取することが可能になると期待される。

4. ヒトのスギ花粉症に対する有効性

現時点では、スギ花粉症を治療するためにヒトへ経口投与されるT細胞エピトープペプ

チドの必要量に関する知見は得られていない。しかし、モデルマウスを用いた経口投与実験では、40 μ gのマウスT細胞エプトープペプチドの投与により免疫寛容が誘導されることが示されている¹⁾。そこで、マウス重量を30g、ヒトの重量を60kgと仮定して、重量比に基づいてヒトでの必要量を試算すると、免疫寛容を誘導するために必要な7Crpの量は80mgと推定される。この必要量は本研究で作出したお米1600粒で摂取できることから、日頃の食生活を通して効果が期待できる量の7Crpを消費することが十分可能であると考えられる。従って、本研究で開発したイネは、ヒトのスギ花粉症を予防、治療する食べるワクチンとして有効に作用することが期待される。

5. おわりに

本研究では、スギ花粉症の予防や治療に効果が期待できるお米の開発に成功した。植物で機能性ペプチドや蛋白質を生産する系は、微生物や動物などの系と比較して、スケールアップが容易であり、かつ、安全性が高いこ

とが知られている³⁾。加えて、イネの可食部である種子での生産系の利点として、生産物の精製を行わずに経口投与することが可能であるため、注射などの医療行為が不要になることや、さらには、室温での保存が可能であるため保存、運搬時の冷蔵、冷凍費用を削減できることなどが挙げられる。従って、イネ種子で生産する系の開発により、機能性ペプチドや蛋白質をより低コストで生産、供給することが可能になると期待されている。今後は、本研究で作出した形質転換体の安全性試験やヒトに対する有効性の解析を進め、スギ花粉症に対する食べるワクチンの実用化を目指す。

文 献

- 1) Hirahara, K. et al (1998), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 102, 961-967
- 2) Hirahara, K. et al (2001), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108, 94-100
- 3) Daniell, H. et al (2001), *Trends in Plant Science*, 6, 219-226



ブレイン テクノニュース

バックナンバーのご案内
第98号
2003年9月15日発行

総 説

アルコール濃度の低い清酒の開発……………木曾邦明

国内情報

酸性土壌における生産性の向上をめざして—アルミニウム

耐性機構と耐性遺伝子の解析……………松本英明・佐々木孝行
果樹のDNA鑑定……………山本俊哉
デシケータ法を利用した木質建材からの放散アセトアルデヒド
の簡易測定法……………塔村真一郎・井上明生・宮本康太
マダイ養殖漁場における海水中の細菌群集の有機物分解活性
と群集組成の変動……………坂見知子
畜舎排水浄化処理装置の開発と実用化……………道宗直昭

地域の先端研究

新規酵母を用いた低アルコール濃度清酒の開発
……………橋本建哉・伊藤謙治
小麦タンパク質「グリアジン画分」による国産小麦粉を用いた
パンの大量生産技術の開発
……………新井千秋・廣瀬理恵子・柴田朋子・丹下幹子
高精度水田用除草機の開発……………宮原佳彦

文献情報

卵丘細胞を用いた核移植胚由来子牛におけるドナー細胞由来
ミトコンドリアDNAの増加……………(抄訳：下司雅也)
糸状菌 *Neurospora crassa* のゲノム配列……………(抄訳：織田 健)
都会のポプラと田舎のポプラ……………(抄訳：岩井純夫)
OsTBI はイネの分けつ成長を負に制御する (抄訳：丸尾喜宏)
粉末モデルにおけるゼイン二次構造におよぼす水分活性と脂質
の影響……………(抄訳：郡山 剛)

海外便り

ウンカの飛来を高精度に予測せよ
—米国国立大気研究センターでの1年間—……………大塚 彰
生研機構からのご案内

◀国内情報▶

血糖コントロール作用を持つ ペプチド含有米の開発

株式会社 三和化学研究所¹研究部²創薬研究所

城 森 孝 仁¹・小 原 由香里²・田 下 聡²・林 裕 二²

糖濃度依存的にインスリンを分泌するホルモンGLP-1のアミノ酸配列を変換しプロテアーゼ耐性にした。この改変体はGLP-1と同等の活性を保持しており、遺伝子組換えにより米に発現させた。米中のGLP-1は1粒あたり50 μ g発現しており生物活性も示した。動物試験で血糖低下作用を示すためにはさらに高発現の米の開発が必要である。

1. はじめに

厚生労働省の平成14年統計によると、糖尿病が強く疑われる人は約740万人で、糖尿病の可能性を否定できない人を合わせると約1,620万人である。まさに国民病と言っても過言では無く、糖尿病は現代の社会問題になりつつある。そこでこの糖尿病に焦点を当て、作物の中でも日本人が毎日食べることができる米で糖尿病状態の改善やひいては治療につながる蛋白質を組換えることができればと思ひ、独立行政法人農業生物資源研究所の高岩文雄博士と開発に着手することになった。

遺伝子組換え作物については、消費者の不安が払拭されず受け入れには強い抵抗感があるのが現状である。このような現実、まず安全性についての議論、あるいは情報提供が不足していること、それに加え遺伝子組換え作物の開発が生産者の論理で進められており、消費者にメリットのあるものを提供できていないことがその背景にあるのではと考える。したがって消費者にとって魅力ある組換え作物をどう提供していくかが、この現状を打破できる1つのキーポイントであると思う。

本稿では、我々がどのような戦略でこれを見現化しようとしているかを紹介し、現状と課題について概説する。

JOMORI Takahito, KOBARA Yukari,

TASHITA Akira, HAYASHI Yuuji

〒511-0406 三重県員弁郡北勢町塩崎363

なお、本開発は、生物系特定産業技術研究推進機構が政府のミレニアム・プロジェクトの一環として平成12年から「新事業創出研究開発事業」を実施する中で、健康機能性作物開発のコンソーシアムとして採択され委託研究として実施中である。また本研究はこれまで、独立行政法人農業生物資源研究所と日本製紙株式会社との共同で行っている。

2. インスリン分泌促進ペプチド

糖尿病に有効な蛋白質として患者に提供されているものにはインスリンがある。現在インスリンは食後の高血糖を是正するために患者自らが毎日決められた量を注射しており、しかも投与が長年にわたることから注射以外の方法の開発が強く望まれている。例えば埋め込み型のポンプが既に製品化されており、経肺スプレーや経口剤なども現在世界中で競って開発されているがこちらはまだ実現していない。インスリンの副作用は低血糖であり、余分に入り過ぎると昏睡に陥ることもある。従ってインスリンを米に発現させうまく経口吸収されるものを開発したとしてもその量の調節が難しいので、安全性に問題が出てくる。

そこで膵臓からのインシュリンの分泌を促進するペプチドホルモンに着目した。これらのホルモンはインクレチンと呼ばれ、食後に消化管から分泌され膵臓に働きインシュリンを分泌させる¹⁾。インクレチンとしてはGLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1) とGIP (Glucose-

dependent Insulinotropic Polypeptideまたは Gastric Inhibitory polypeptide) の2つが知られている。インクレチンの特徴は、血糖が高い時にのみインシュリンを分泌促進させ、低血糖の時には分泌させないという非常に都合な性質を持っていることである。従って必要な時にだけインシュリンを分泌させる為、このインクレチンであれば米に発現させ体内に吸収されてもインシュリンのような低血糖を起こすリスクは低いと予想される。

インクレチンの中でもGIPの方は、京都大学医学部清野裕教授らと我々の共同研究によりレプチン欠損肥満モデルマウス (ob/ob)

の血中GIP含量がやせ型マウスの20倍に達すること、及びこのマウスのGIPレセプターをノックアウトすると、マウスの体重が23%低下しインスリン抵抗性を改善することが明らかとなり²⁾、GIPが逆に肥満を促進する可能性があることが示唆された。さらにGIPはGLP-1よりインスリン分泌活性が弱いことから、最終的にはGLP-1の方を組換えの標的分子として決定した。GLP-1は、その改変体や修飾ペプチドが医薬品として世界で少なくとも9社により競って開発されている。注射剤の臨床試験データはその有効性が証明されており薬として有望視されている。また、このGLP-1は経鼻や経口剤としても開発されている。

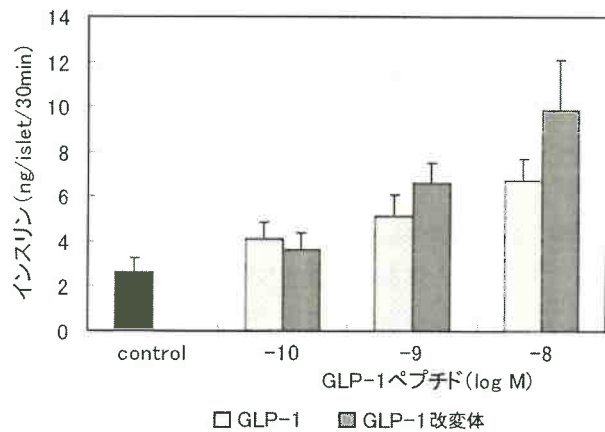


図1 マウス・ラ氏島を用いたGLP-1改変体のインスリン分泌活性

3. GLP-1改変ペプチドのデザインと活性

一般に生理活性ペプチドを経口で摂取すると、胃ではペプシン、腸ではトリプシンなどの酵素が作用して切断され失活するというのが常識である。従ってGLP-1にはトリプシン切断部位があるので、少なくともトリプシン耐性にするのが必須である。我々はいくつかのアミノ酸改変体を作製しプロテアーゼ耐性を検討

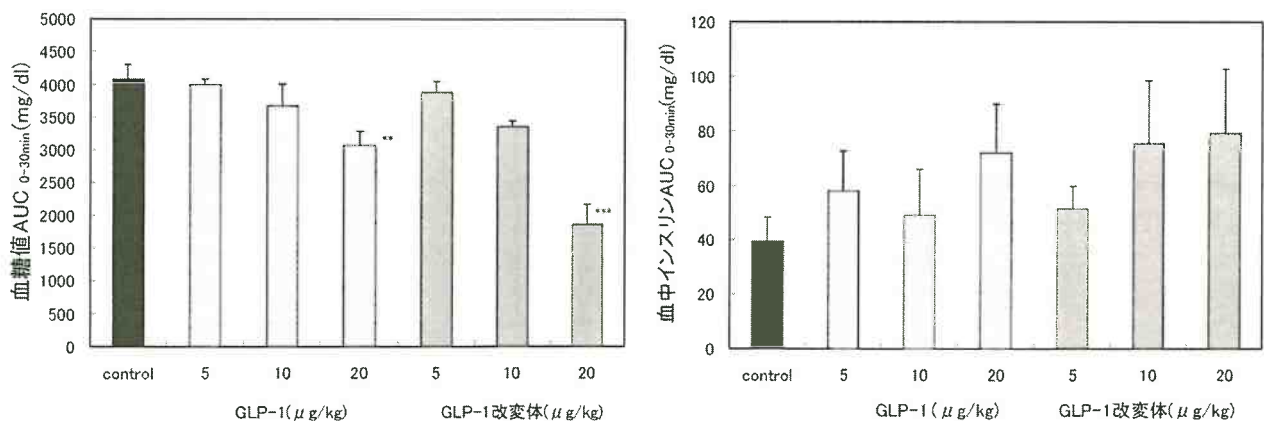


図2 GPL-1改変体のマウス血糖低下作用

マウスにGPL-1を皮下投与5分後、尾静脈からグルコース0.5g/kgの負荷を行うことにより調べた。

した。特許の関係でまだその配列は開示できないが、アミノ酸を改変することでトリプシン耐性は確認された。また改変GLP-1はマウス膵臓由来のラ氏島細胞を用いたインスリン分泌試験においてもとのGLP-1と比較してインスリン分泌活性に差が無いことも確認されている(図1)。さらに本ペプチドは米として炊飯されることから、熱耐性であること、また注射で投与したところインスリン分泌が見られ、十分に血糖を低下させる作用を持つことも確認されている(図2)。

4. 組換え米作製

改変GLP-1を遺伝子組換えにより米のどこに、どういう形で発現させるかは重要な課題である。我々は改変GLP-1を単独で発現させる系と米の貯蔵蛋白であるグルテリン及びグロブリンとの融合、挿入あるいは置換して発現させる系をいくつか検討している。現段階ではどの系が最適であるかの最終的な結論は得ていない。

さらに組換え体の構築で考慮すべき点は、いかにペプチドが生体内でうまく切り出されるようデザインするかである。GLP-1はN末

端のHisが活性発現に重要であり、その前にアミノ酸が入ると失活するのでここにはトリプシンで切断されるようLysかArgを入れて構築した。それに合わせてC末端もトリプシン切断されるようデザインした。その結果改変GLP-1が腸において、主要プロテアーゼであるトリプシンでうまく切り出され吸収されて、効果を発揮することが期待できると考えた。

ここでは詳しく述べないが、遺伝子組換え体のコンストラクトや米での発現確認は農業生物資源研究所で実施され、その後Hm-MATベクターによる選抜マーカー・フリー遺伝子組換えイネの作製と、イネの育成、発現確認は日本製紙で実施されている^{3, 4)}。

5. 組換え米由来GLP-1ペプチド

いくつかの作製された組換え米の中で、改変GLP-1をグロブリン蛋白に挿入したイネの種子について含量と活性を解析した。方法は組換え米を粉末処理し水酸化ナトリウム溶液で貯蔵蛋白を抽出後トリプシンにより完全消化し、ラジオイムノアッセイ(RIA)による蛋白定量とGLP-1レセプター発現細胞による

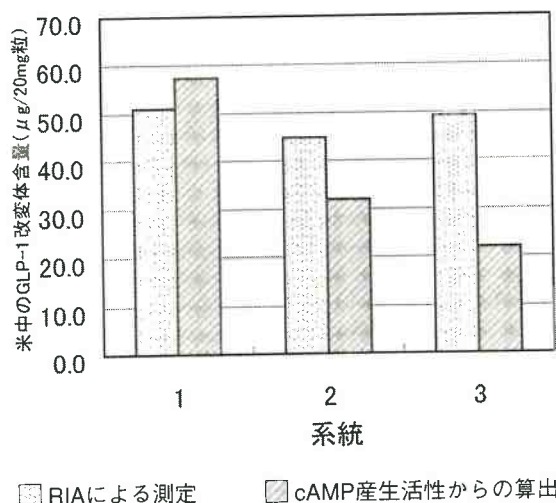


図3 米中のGLP-1改変体含量

cAMPの上昇を指標に生物活性を測定した。いくつかの系統の米粒を調べた結果、最高で約50 μg/米粒子のGLP-1が発現し活性も保持されていることが明らかとなった(図3)。この量は基本的にまだ薬効を発現するには十分とは言えず、現在さらに高GLP-1発現米の獲得に取り組んでいる。

6. おわりに

今後の課題としては、まず高GLP-1発現米の取得と、この米による動物での有効性の確認が必須である。この秋には組換え米が十分な収穫されるので本格的な動物試験を実施する予定である。腸からのペプチドの吸収率は1%未満であるので、ハードルは高いができれば胃で消化されず腸でうまく吸収される組換え米を選択すれば、成功する可能性はあ

る。今年5月にGLP-1組み換え米ができたとのプレスリリース後、多くの糖尿病患者の方から早く提供して欲しいとの問い合わせを頂いた。ニーズはあるので現在の課題を解決し血糖コントロール作用を持つ米の開発を是非実現させたい。

文 献

- 1) Creuzfeldt, W. (1979) *Diabetologia*, 29, 75-85
- 2) Miyawaki, K. et al (2002) *Nature Med.*, 8, 728-742
- 3) 遠藤さおりら (2003), 第21回日本植物細胞分子生物学会要旨集
- 4) 杉田耕一ら (2003), 第21回日本植物細胞分子生物学会要旨集



ブレイン テクノニュース

バックナンバーのご案内

第97号

2003年7月15日発行

総 説

昆虫テクノロジー研究について……………川崎建次郎

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……………山田勝成・田中 貴・平松紳吾・田村俊樹
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……………土反伸和・佐藤文彦・矢崎一史
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……………大島正弘
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……………佐藤英明・清水 隆・横尾正樹

海苔の粘質多糖・ポルフィラン

……………濱 洋一郎・常田尚正・杉本良子・常岡 史・小谷正幸・墨 利久

高精度水田用除草機の開発……………宮原佳彦

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

……………檜山圭一郎

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……………(抄訳：下司雅也)

酵母のエタノール耐性はオレイン酸に依存する……………(抄訳：澤田大輔)

あいた口がふさがらない話……………(抄訳：岩井純夫)

イネにおける分げつの制御……………(抄訳：丸尾喜宏)

海外便り

パラグアイのダイズ生産と研究

—地域農業研究所センターにおける2年間—……………豊田政一

◀国内情報▶

ウシ卵母細胞を受精可能な卵子まで
効率よく長期培養する技術の開発

独立行政法人 農業技術研究機構東北農業研究センター
平 尾 雄 二

卵巣内には卵子の「もと」となる卵母細胞が大量に蓄えられている。自然では少数のみが成熟し、受精後、個体となるが、多くが体内で失われる。その卵母細胞を利用するためには、体外に取り出した後、一人前の卵子になるまで培養する必要がある。ウシ卵母細胞を長期培養することは難しかったが、培養液を工夫し、従来のコラーゲンのゲルに埋め込む操作を省き、培養皿の表面で発育させることのできる、簡単な方法の開発に成功した。

1. はじめに

優秀なウシを生産するには、良い形質を持つ雄と雌との交配が重要であるが、卵子は精子ほど簡単に、大量に選べない。それは子ウシになる数だけ卵子は作られて、卵巣から放出される仕組みがあるからである。このようなことから、ウシの改良は大量に入手が容易な精子で進められており、それに比べると入手の困難な卵子はほとんど利用されていない。

卵巣内には卵子の「もと」となる卵母細胞が大量に蓄えられている。ウシの卵母細胞は、最初は直径30 μ m程度で、その数は実に1頭当たり数万個に上る。発育期に入ると少しずつ直径を増大させて、約125 μ mに達すると成熟して卵子となる。自然では一定の周期をもって卵母細胞の集団が発育し、少数が卵子になるように調整され、その都度100個以上が無駄になる。卵巣内の大量の卵母細胞を利用できれば、良質な体外受精卵の大量生産につながり、改良はさらに効率的に進むと考えられる。しかし、通常のウシの体外受精では、直径125 μ m前後に育った卵母細胞を取り出して、1日間培養して成熟卵子としたものを利用しており、サイズの小さい発育途上の卵母細胞の利用は行われていない。小さい卵母細胞では成熟できないため、子ウシになることはおろか、受精すらできないためであ

HIRAO Yuji

〒020-0198 盛岡市下厨川字赤平4

る。そこで、卵母細胞を培養して発育させたのち、体外受精させ、子ウシを生ませようとする技術に取り組んだ(図1)。

2. 卵母細胞の培養で直面する難問

マウスでは、1989年にEppigら¹⁾によって、培養で10日間発育させた卵母細胞に由来する産子が得られている。しかし、その培養方法を参考にして、マウス以外の動物種で培養を行っても、期待されたような卵母細胞の生存率や発育は得られなかった。

培養システムについて詳述する前に、生体内で卵母細胞を取り囲む組織について触れる必要がある。卵母細胞は卵胞と呼ばれる構造の中に収まっており、外側から順に卵胞膜細胞層、基底膜、顆粒膜細胞層が重なり、最内部に卵母細胞が位置する。卵母細胞の発育に伴い卵胞も発達し、最後には卵胞の一部が破れてそこから排卵が起こる。卵胞の細胞は内分泌にも深く関係し、精緻な卵巣機能の一端を担う。一方、卵母細胞は周囲の顆粒膜細胞から送り込まれる材料に依存して発育するが、そのことを逆手にとると、密接する顆粒膜細胞さえその役割を果たすことができれば、卵胞の外であろうと卵母細胞は発育を続ける可能性がある。それを実証したのが上述のマウスを使った実験である。彼らは、顆粒膜細胞層のみに包まれた卵母細胞を分離して、培養皿に張り付けた状態で発育させた。

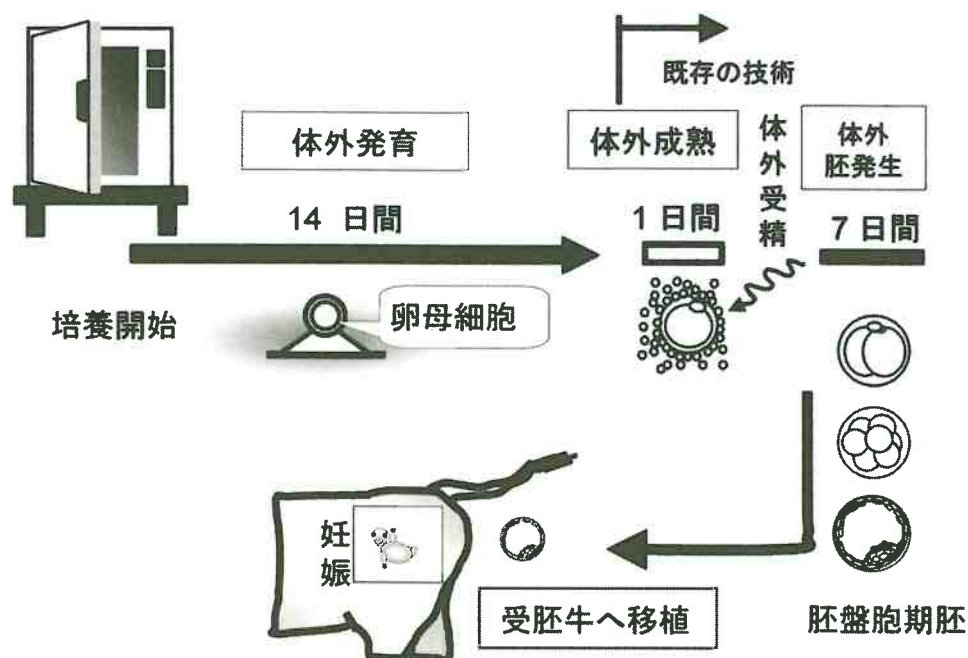


図1 子ウシ誕生までの概略図

ところが、この方法で他の動物種の卵母細胞を培養すると、顆粒膜細胞は培養皿に出した途端に、その役割を放棄して「逃走」してしまう。その結果、卵母細胞が裸化し、発育が中止されることが最大の問題であった。裸化を防ぐ目的で、顆粒膜細胞の塊に包まれるような条件下で卵母細胞を培養すると、その内部で卵母細胞は退行した。いずれにしても、卵母細胞を中心とする適切な3次元構造が維持されていないことが原因と考えられた。

3. ポリビニルピロリドンの利用による打開

従来培養液では、卵母細胞と顆粒膜細胞の状態を制御することは極めて難しいと考えられた。そこで、培養液へ種々の分子化合物を添加してその効果を検討したところ、高濃度の高分子化合物を添加した場合に、卵母細胞を包む顆粒膜細胞の形態が、マウス卵母細胞の培養で良好とされている形態に類似することを突き止めた。

実験について具体的に述べると、ウシの卵巣皮質部分から、直径0.4~0.7mmの卵胞を切り出し、さらにその中から発育途上卵母細胞と顆粒膜細胞の複合体を切り出して14日間培養した。培養前における卵母細胞の平均直径は95 μ mで、ウシ卵母細胞の最大直径の約75%であった。基本培養液には、TCM-199に5%ウシ胎児血清、4mMヒポキサンチン等を加えたものを使用した。さらに、高分子化合物としてポリビニルピロリドン (PVP, 平均分子量36万) を0~4% (w/v) の濃度で添加した。

PVP 0%区では、培養が進むにつれて多くの卵母細胞が顆粒膜細胞の塊に埋没し、観察が困難であったのに対し、PVP 4%添加区では、卵母細胞を緊密な顆粒膜細胞層が取り囲み、その周囲に他の顆粒膜細胞が広がる形態を観察することができた(図2)。一方、培養後に裸化状態であった卵母細胞の割合は、PVP 0%区において42%と高く、PVP 2%および4%添加区ではそれぞれ31%および12%で、PVPによって複合体が良好に維持さ

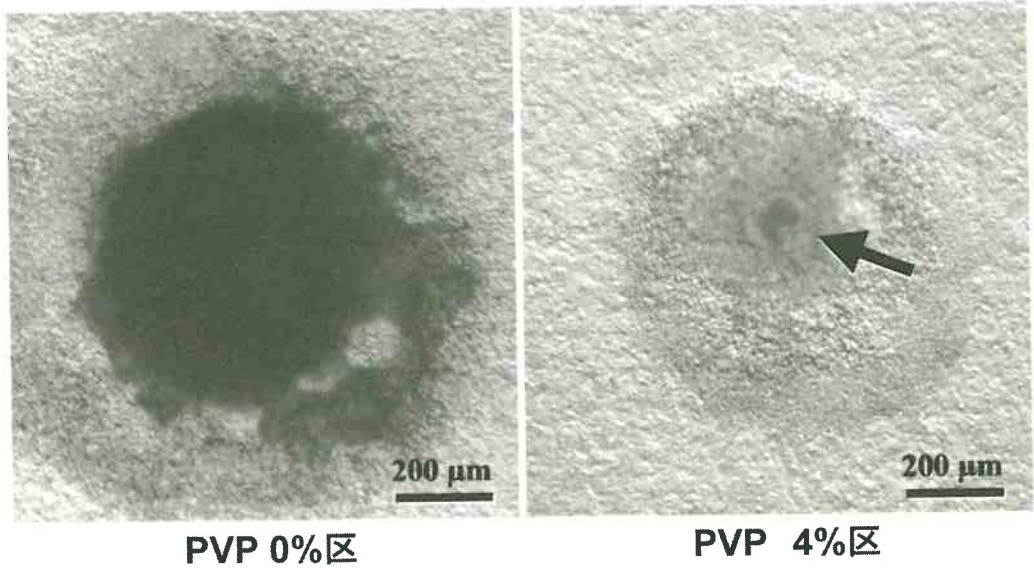


図2 培養2週間後における複合体の形態
 PVP 4%区において矢印で示すのが卵母細胞。PVP 0%区では、卵母細胞は細胞の塊に埋もれ、確認することができない。

れることが明らかとなった。さらに、卵母細胞の平均直径も、PVP 0%、2%および4%添加区でそれぞれ105、108および113 μmと、4%添加区において最大値が得られた。通常、卵子の培養液にはPVPなどの高分子が添加されるが、その濃度は高くても0.4%程度に過ぎず、今回はその10倍以上を添加することによって、新たな効果を導き出すことができた。

培養後の卵母細胞に成熟培養と体外受精を行った結果、発育培養に供した卵母細胞数に対する胚盤胞期への発生率は、PVP 0%および4%添加区において、それぞれ2%および12%であり、4%添加区において有意に高い値を示した(図3)。このことにより、卵母細胞の生存率、直径の増大および胚発生率の全ての項目において、PVP 4%添加区が優れていることが明らかとなった。さらに、東北農業研究センターとともに機能性ペプチド研究所の共同研究チームは、その培養システムをもとに受精卵を作成し、山形県農業研究研修センターにおいて新鮮胚4個

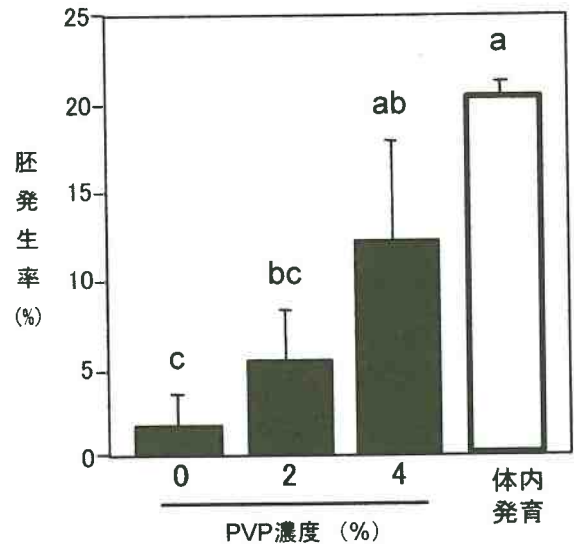


図3 培養に供したウシ卵母細胞数に対する胚盤胞期への発生率

14日間の培養で発育させた後、1日間で成熟させ、体外受精を行って、胚盤胞期への発生を確認。体内発育区では、成熟の段階から体外培養。PVP 4%添加培養液で発育させた卵母細胞の胚発生率が高かった。

を4頭の仮腹ウシに移植した結果、1頭が出産に至った²⁾。

今回、細胞を付着させるための基質として、

コラーゲンのゲルによる表面加工が施された製品（組織培養用インサートメンブレンおよび96穴型培養プレート）を使用し、良好な細胞接着と増殖を得た。一方、培養用製品のカタログに目を通すと、他にも種々の細胞接着因子によって表面加工された培養皿が製品化されており、それらの有効性については今後検討される必要がある。

4. 新技術の利点と展望

前述したように、ほとんどの動物種では、マウスの卵母細胞のように培養できない、というところから研究が始まった。多くの研究者によってとられた対策は、卵胞の構造を維持したまま培養しようとするものであった。今回の、卵母細胞と顆粒膜細胞で構成されるシステムを「開放型培養システム」とすると、卵胞の構造を維持する方法は「閉鎖型培養システム」と呼ぶことができる。これまで、閉鎖型のシステムで発育途上卵母細胞を培養して成熟した卵子を作り、子ウシの出産に至った例は、平成10年4月、徳島県肉畜試験場、神戸大学の研究グループによる1頭が報告されているのみである³⁾。その成功例で使われたコラーゲンゲルに組織を包埋する方法は、卵胞構造を忠実に再現することができる点において有効である。その一方で、操作が複雑であり、大量培養に向かないなどの面がある。また、培養の途中で卵母細胞を観察することが難しく、発育の程度を確認することが出来ないまま、切開した時点で培養を終了しなければならない。その点、開放型システムでは、卵母細胞の発育を追跡して観察することが可能であり、培養後の卵母細胞の回

収操作も簡便である。従来よりも高い胚発生率を得ることのできる培養成績の良さに加え、このような利点を有することから、開放型培養システムは卵母細胞の簡便かつ大規模な培養技術へ結びつくものと期待される。

今回の培養システムによって、従来雌ウシ1頭から10個程度しか利用することのできなかった卵子を、数倍に増やすことが可能になる。実用化のためには、卵母細胞の培養から出産に至るまでのプロセスを、確実に達成できるシステムへと改良することが重要である。また、卵巣内には、今回使用した卵母細胞よりもさらに小さい発育段階のものが多数存在する。それらを有効利用するために、効率的な採取方法とともに、さらに長期間にわたる培養システムを開発してゆく必要がある。

なお、この研究の分担は次のとおりである。独立行政法人農業研究機構東北農業研究センターが発育途上卵母細胞の培養技術の開発及び培養を担当。(株)機能性ペプチド研究所及び東北大学の共同研究チームが、発育途上卵母細胞の培養及び受精卵（胚）の作成を担当しそれには生物系特定産業技術研究推進機構基礎研究推進事業から資金提供がされた。

文 献

- 1) Eppig, J. J. et al (1989), *Biol. Reprod.*, 41, 268-276.
- 2) Hirao, Y. et al (2004), *Biol. Reprod.*, in press.
- 3) Yamamoto, K. et al (1999), *Theriogenology*, 52, 81-89.

◀国内情報▶

麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻*Alexandrium*シストの 休眠・発芽生理の解明

独立行政法人 水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所
山口 峰生・板倉 茂

毎年発生し水産業に被害をもたらす貝毒。このうち麻痺性貝毒は、人間などに有害な毒を作るプランクトンである*Alexandrium*という渦鞭毛藻が主な原因となっている。この有毒プランクトンについて、これまで不明であったシスト（有毒プランクトンのタネ）の分布及び休眠・発芽メカニズムが明らかになりつつある。この成果は有毒プランクトンの発生予察に極めて重要な手がかりを与えるものであり、今後の予察手法の確立や防除技術への開発へ向けての研究進展が期待されている。

1. はじめに

貝毒とは、有毒プランクトンが生産する毒が食物連鎖を通して貝類中に蓄積され、その貝を食べた人間が中毒症状を起こす現象である。貝毒にはいくつかの種類が知られているが、日本で問題になるのは麻痺性貝毒と下痢性貝毒の2つである。麻痺性貝毒の毒性はフグ毒テトロドトキシンに匹敵するものであり、中毒症状は運動神経麻痺が主で、重篤の場合は死に至る。麻痺性貝毒を生産する海産プランクトンとしては、渦鞭毛藻類の*Alexandrium*属や*Gymnodinium catenatum*などが知られている。

我が国における麻痺性貝毒は、北は北海道から南は九州沿岸までその発生が見られるが、とくに近年西日本での発生頻度の増加や発生海域の拡大が顕著である。このような発生頻度の増加や広域化は我が国のみならず、地球規模で起こっており、その原因として、科学的な関心の増大、養殖漁業による沿岸水域の利用拡大、排水（家庭、産業、農業）による水域の富栄養化、地球規模の気候変動による環境変化、発生源となる休眠期細胞の他海域への移動、などがあげられている。

我々の研究所が臨む広島湾では、1992年に*Alexandrium tamarense*による貝類毒化が報
YAMAGUCHI Mineo, ITAKURA Shigeru
〒739-0452 広島県佐伯郡大野町丸石2-17-5

告されて以降、ほぼ毎年本種のブルーム（大量発生）が春先に起こり、貝類の毒化が確認されるようになった。そこで著者らは、広島湾において*A. tamarense*の栄養細胞およびシストの分布・出現動態についての調査を継続するとともに、シストの休眠・発芽生理に関する研究を実施してきた。ここでは、これらの研究で明らかになった本種のシストの生理・生態について概説する。

なお、水産庁および各県水産試験場などにより、貝毒検査態勢が確立されており、毒化した貝が店先に並ぶことはまずないが、貝類の出荷停止などにより水産業は多大な被害を被っている。貝毒の発生が心配される時期には、潮干狩りや個人的に採取した二枚貝を食べる場合は注意が必要であり、新聞や自治体から流される貝毒情報に留意頂きたい。

2. シストとは？

有毒プランクトンによるブルームの発生は無性的に分裂・増殖する栄養細胞によって引き起こされる。一方で、有毒プランクトンを含む植物プランクトンが、生活史の一時期に栄養細胞とは異なる生理・生態学的特徴を持つ休眠期細胞を形成することが明らかにされてきた。休眠期細胞とは、不適な環境に対する耐性が高く、通常の栄養細胞では生残できないような環境下でも比較的長期間生残が可

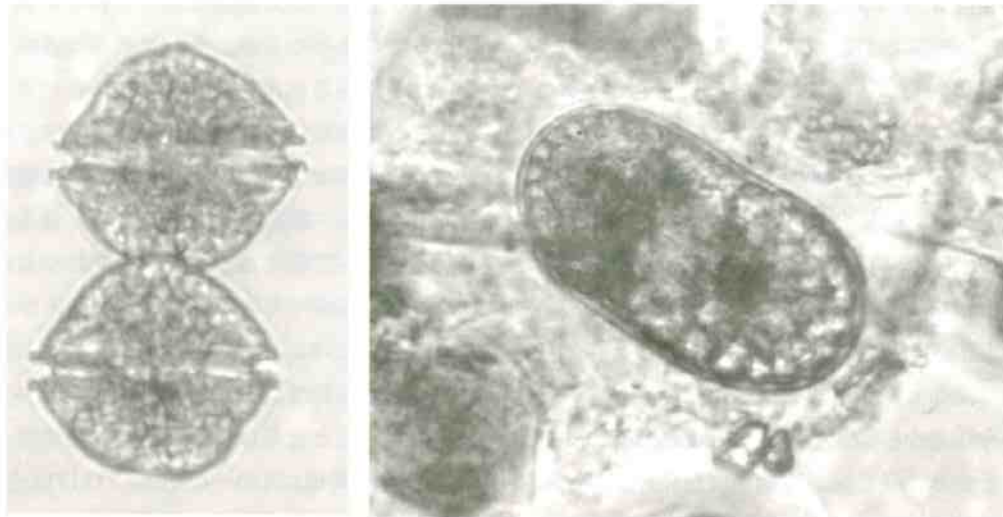


図1 有毒プランクトン*Alexandrium tamarense*の栄養細胞（左；2連鎖細胞）とシスト（右）

能な不動細胞（運動性をもたない細胞）の総称である。その呼び名はプランクトンの分類群によって異なり、渦鞭毛藻類ではシストと呼ばれている（図1）。シストの生態的な役割としては、(1) 栄養細胞で生存不可能な環境を乗り切る、(2) 海底で越冬することにより同一海域内に保持されブルームの発生源となる、(3) 捕食や破損などに対する抵抗力によって種の分布域が拡大できる、(4) 休眠期を持つことで発芽の時期を調節できる、(5) 有性生殖による遺伝子の組み換えが行われ遺伝的多様性を維持できる、などが挙げられる。したがって、有毒プランクトンによるブルームの発生機構を明らかにするためには、栄養細胞のみならずシストを含む生活史の全体像を把握する必要がある。これにより、ブルームのタネ場の特定、貝類毒化モニタリング海域の選定、有毒プランクトン分布域拡大の解明、有毒プランクトン出現の履歴の推定、未毒化海域における毒化の可能性の予測、ブルームの発生時期、規模の特定などが可能になることが期待される。

3. *Alexandrium*シストの分布密度

有毒プランクトンの個体群動態を明らかにする上で、海底泥中に存在するシストの現存量や分布に関する情報は不可欠である。しか

し、海底泥中には多くの泥粒子やデトライタスが存在するため、シストを通常の光学顕微鏡を用いて計数することは非常に困難であった。そこで、蛍光染料と落射蛍光顕微鏡を用いて海底泥中のシストを直接計数する方法を検討した結果、シストをグルタルアルデヒドで固定し、メタノール処理後、蛍光染料Primulineで染色することにより*Alexandrium*のシストが計数可能となることが判った¹⁾。

この蛍光染色法を用いて広島湾における*Alexandrium*シストの水平分布を調査した。その結果、シストは全調査点から検出されたが、その高密度域は栄養細胞が高密度で出現する海域と良く一致していた。このことは、栄養細胞から形成されたシストが速やかに堆積すること、シストが翌春のブルームのシードポピュレーションとして機能することを示していると考えられた。

瀬戸内海全域で*Alexandrium*シストの分布調査を実施した。その結果、東部海域ではほとんどの定点でシストが検出され、とくに播磨灘では高い密度で分布していた。西部海域では、周防灘、伊予灘におけるシストの分布範囲は狭くその密度も低かったが、燧灘、備後灘では分布密度は低いものの、広範囲に検出された。徳山湾と広島湾では全調査点でシストが検出され、その最大密度も4,000cysts/cm³を超える高い値であることが判明した²⁾。

その後も同様な調査を実施し、西日本海域におけるシストの分布状況がほぼ把握されている。

4. シストの休眠・発芽生理

広島湾から採集した現場シストを用いて発芽実験を行った結果、シストの発芽率は底層水温が10~16.5℃の範囲にある12月から4月には高かったが、夏季には全く発芽しないという顕著な季節性を示すことが判った。このことから、発芽には好適温度範囲、いわゆる“Temperature Window”が存在することが示唆された。シストの発芽特性は現場水温の季節変化にうまく適応しており、それにより春先にブルームを形成することを可能にしているものと考えられた³⁾。

つぎに、実験室内でシストの休眠と発芽に及ぼす環境条件を検討した。その結果、シストは形成直後には発芽できず、ある程度の休眠期間を経なければ発芽できないことが判った。この休眠期の長さは温度によって異なり、現場水温下では約6ヶ月必要であった。すな

わち、広島湾で5月末頃に形成されるシストは12月頃によく休眠から覚める（成熟する）ことになる⁴⁾。

シストは休眠から覚めても周囲の温度が高すぎると発芽せず、発芽に好適な温度範囲(7.5~17.5℃、最適温度12.5℃)があることが判った⁴⁾。広島湾で発芽最適温度になるのはほぼ3月末頃であり、この頃にシストが盛んに発芽していると考えられる。シストは暗黒下でもある程度発芽したが、ごく少量の光が照射されると発芽は促進された。発芽に有効な光の波長域は530~640nm（ほぼ緑色）にあり、これは現場海底付近の波長とほぼ一致することも明らかとなった⁵⁾。したがって、海底泥の表面付近に堆積しているシストがより発芽しやすいと考えられる。また、シストの発芽には2日以上の上の光照射が必要であった。さらに、シストはそれ自身に年周期性の体内時計を有しており、発芽のための特別の刺激がなくとも春から初夏に発芽しやすいようにプログラムされていることが判った⁶⁾。

シストは発芽に好適な条件(温度、光)に置かれると約10日後に発芽した。また、発芽

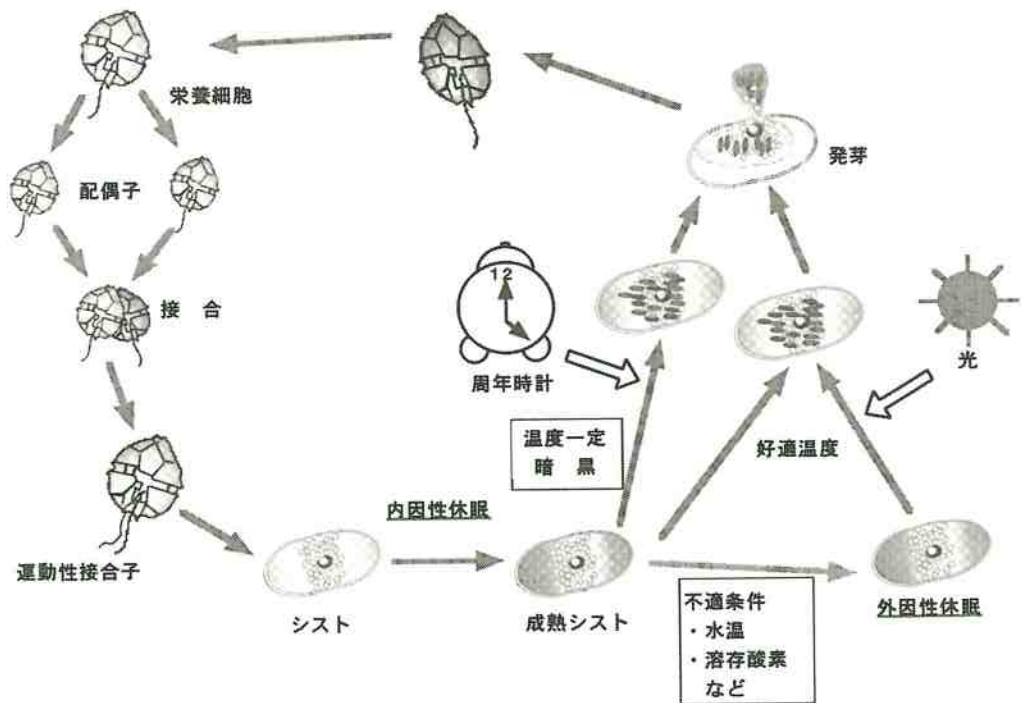


図2 *Alexandrium tamarense*の生活史とシストの発芽生理

の約3日前から葉緑体由来の自家蛍光が観察されるようになった。現場海底中にも自家蛍光も持つシストが春先に増加することが明らかになった⁴⁾。

このように、シストは発芽に必要な幾つかの条件（休眠、温度、光、体内時計）を現場環境の変化に巧みに適応させていることが判った（図2）。広島湾では栄養細胞が春先のみに出現するが、このような季節性にはシストの休眠・発芽生理が大きく影響しているものと考えられる。

5. 今後の課題・展望

以上のように、貝毒の原因となる*Alexandrium*シストの生理・生態に関する知見がかなり集約されてきた。これらの成果は有毒プランクトンの発生予察に重要な手がかりを提供するものであり、栄養細胞の個体群動態の知見と総合することにより、ブルームの予察技術や防御技術への開発に向けての研

究進展が期待される。また、渦鞭毛藻の生活史にみられる様々な現象は極めて興味深く、今後それらを発現・調節している機構を分子レベルで理解することが大きな課題になると考えられる。

文献

- 1) Yamaguchi, M. et al. (1995), *Phycologia*, 34, 207-214
- 2) Yamaguchi, M. et al. (2002), *Fisheries Science*, 68, 1012-1019
- 3) Itakura, S. & M. Yamaguchi (2001), *Phycologia*, 40, 263-267
- 4) 板倉 茂, 山口峰生 (2003), 日本藻類学会第27回大会講演要旨, 97
- 5) 板倉 茂, 山口峰生 (2003), 2003年度日本水産学会大会講演要旨, 190
- 6) 山口峰生, 板倉 茂 (2002), 2002年度日本水産学会大会講演要旨, 152



ブレイン テクノニュース
バックナンバーのご案内
第96号
2003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

…脇塚 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バルブアル

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▶

ピロロキノリンキノンを補酵素として利用する 哺乳類の酵素の発見

理化学研究所脳科学総合研究センター 精神疾患動態研究チーム
加藤 忠史・笠原 和起

ピロロキノリンキノン (pyrroloquinoline quinone; PQQ) は、細菌で酸化還元補酵素として働くこと、PQQ欠乏食を与えたマウスが種々の異常を呈することから、哺乳類でもビタミンである可能性が考えられていた。我々は、PQQを補酵素として利用する哺乳類の酵素を発見し、少なくとも、マウスにとってPQQがビタミンであることを示した。今後、PQQがヒトにとってもビタミンであるかどうかの検証が必要である。

1. はじめに

ピロロキノリンキノン (pyrroloquinoline quinone; PQQ) は、ある種の細菌において、ニコチンアミドとフラビンとは異なる未知の酸化還元補酵素として存在が予測されていた。そして1979年、C1化合物資化性細菌 (メチロトローフ) のメタノール脱水素酵素から、その構造が同定された。

その後、続々と他の細菌の酵素もPQQを利用してることが判明したが、一部の微生物の特殊な酵素に含まれる補酵素である可能性もあった。しかし、PQQ欠乏食を与えたマウスが種々の異常を呈することが1989年にカルフォルニア大学のRuckerらのグループによって報告されると、PQQが哺乳類でも補酵素として働いているのではないかと想像された。もしPQQ依存性酵素が存在するならば、PQQは哺乳類にとってビタミンだろうと考えられ、PQQ依存性の酵素を探す試みが行われたらしい。しかしながら、哺乳類のPQQ依存性酵素が見つからないまま10年以上が過ぎていた。

2. 偶然の発見の経緯

我々は、躁うつ病にミトコンドリアのカルシウム取り込み機構が関係するであろう、と
KATO Tadafumi, KASAHARA Takaoki
〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1

の仮説をもち、ミトコンドリアのカルシウム取り込み分子ないしその合成酵素を探索していた。我々は、種々の理由から、アミノ酸を引き寄せる構造であるAdenylationドメイン (Aドメイン) とThiolationドメイン (Tドメイン) のセットが、複数連なっている酵素があるはずであると予測し、こうしたドメイン構造を持つ新規遺伝子をマウスのcDNAライブラリーからクローニングした。ところが、残念ながら、このドメインは1セットしかなく、我々の期待した酵素をコードする遺伝子ではないことが分かった。本当はそこで研究は終わりになるはずであったが、念のためこの遺伝子産物全体の構造を調べてみると、後半部分 (C末端側) に、PQQ結合ドメインが存在することが分かった (図1)。PQQ結合ドメインとは、これまで知られている全ての微生物のPQQ依存性酵素に保存されている構造で、この部分でPQQと結合していることが明らかになっている。文献調査の結果、PQQを補酵素として利用する哺乳類の酵素の発見により、PQQが哺乳類にとってビタミンであることを結論づけることができることが分かり、この仕事の完結を目指すことになった。

3. AASDH

我々のクローニングした遺伝子は、酵母のLys2という遺伝子とホモロジーを持っている

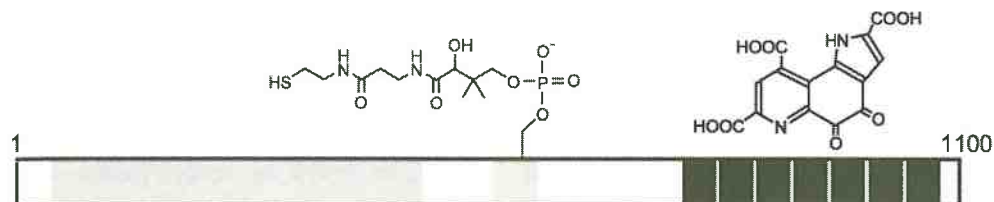


図1 アミノアジピン酸セミアルデヒド脱水素酵素(AASDH)の構造

マウスの場合には1100アミノ酸残基からなるタンパク質。N末端に一对のAドメイン、Tドメイン(灰色)があり、Tドメインが翻訳後修飾を受ける。C末端にPQQ結合モチーフ(黒)の7回繰り返し構造がある。この部分でPQQと結合すると考えられる。

た。このLYS2蛋白質が、NADPHを補酵素とする還元反応により、リジンを合成する経路で働いていること、LYS2を特殊な翻訳後修飾する酵素のホモログがヒトでも存在するにもかかわらず、LYS2ホモログが見つかっていなかったことから、この遺伝子は、LYS2の逆反応を担う酵素、すなわちリジンの分解にかかわるアミノアジピン酸セミアルデヒド脱水素酵素(AASDH)をコードするであろうと推測された(図2)。

そこで、この酵素を精製し、活性を測定することを旨とした。精製自体は、困難に直面しながらも何とか完成したが、PQQの高い酸化作用が酵素活性の測定系に影響するこ

と、酵素の基質が不安定な物質であること、活性には翻訳後修飾(4'-ホスホパンテテイン化)が必要であることなど多くの難問があり、酵素活性の証明は困難を極めた。そこで、発想を転換し、PQQを欠乏させたマウスで、反応生成物が減少していることを確認することとし、PQQを除く既知の栄養素全てを含む餌を、特級規格以上の多数の試薬を買って混ぜ合わせて作製し、マウスに与えた。アミノ酸分析でAASDHの代謝物である、アミノアジピン酸が減少していることを見出し、この遺伝子の産物が、PQQを補酵素として利用するAASDHをコードしていると結論したのである。

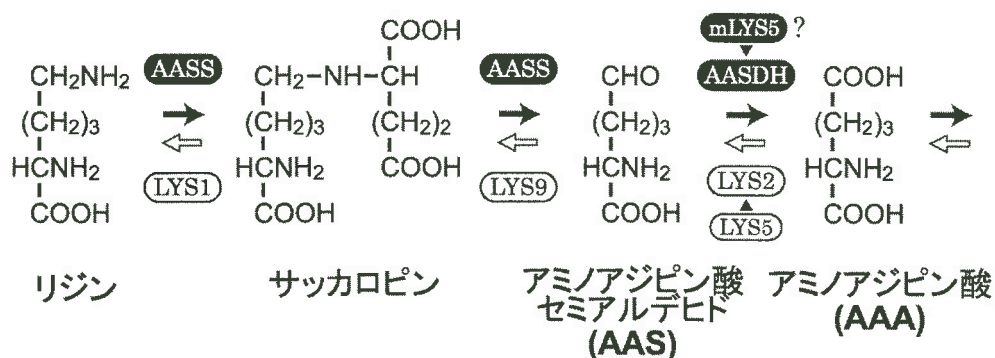


図2 動物のリジン分解経路の初期過程

リジンは、サッカロピンを経て、アミノアジピン酸セミアルデヒド合成酵素(AASS)によってアミノアジピン酸セミアルデヒド(AAS)に酸化された後、さらに、AAS脱水素酵素(AASDH)によって酸化される。この2番目のステップにおいてPQQが酸化還元補酵素として機能する。

4. 発表とその反響

投稿時、我々の論文のタイトルは、「ピロロキノリンキノンは哺乳類における新しい酸化還元補酵素である (Pyrroloquinoline quinone is a novel redox cofactor in mammals)」であったが、このタイトルは、Nature 編集部により、「哺乳類の新しい酸化還元補酵素ビタミン (A new redox-cofactor vitamin for mammals)」とリライトされ、そのためもあってか、「PQQは半世紀ぶりに発見された14番目のビタミン」と新聞等で報道され、国内外で大きな反響を呼び起こした。納豆やお茶など、PQQが多く含まれるとされる食品の業界から種々のコンタクトをいただいたり、テレビのバラエティー番組で取り上げられるなど、予想もしない反響にはとまどいを覚えるほどであった。

しかしながら、医師である筆者にとっての最大の関心事は、ヒトで欠乏症が存在するのか、生じるとするとどんな症候群なのか、であった。マウスにおける欠乏症は、毛並みが悪い、繁殖能力が悪い、免疫力が低い、といった症状を引き起こす。PQQ欠乏によりこうした症状を呈している人がいるとしたら、現在、原因不明の治療困難な疾患と考えられているはずである。

5. 今後の研究へ向けて

何とかして、こうした症状を呈する人たちの血液などを調べて、PQQ欠乏症が存在するのかどうかを確かめたいと思ったが、そのためには、定量法の開発が必要である。これまで、PQQの定量には、高速液体クロマトグラフィー法、ガスクロマトグラフィー/質量分析法、PQQ依存性酵素によるバイオアッセイ、酸化還元サイクリング法など、種々の方法が試みられているが、これらにより測定された値には大きなばらつきがある。最も感度が高く信頼できるとされるガスクロマトグラフィー/質量分析法でも、ヒトサンプルでのPQQ濃度は痕跡程度にしか測定でき

ず、こうした方法では欠乏症を同定することはできないと考えられた。ヒトサンプルで測定するためには、1, 2桁高い感度で測定できる方法を開発する必要がある。

しかしながら、筆者の研究室は精神疾患研究のための研究費をいただいております、ビタミン研究室ではない。そこで、この研究を進めるべく、我々は生研機構による基礎研究推進事業の研究費を申請させていただいた。幸いこの研究を行った笠原研究員と筆者はいずれも39歳以下だったため、「若手研究者支援型」に応募した。

しかし残念なことに、審査員の先生方より、誰がビタミンと決めたのか、日本ビタミン学会は認めていない、との厳しいご指摘をいただき、結局申請は採択されなかった。日本ビタミン学会は、ビタミンを「微量で体内の代謝に重要な働きをしているにもかかわらず自分でつくることができない化合物」と定義していることから、今回の発見により少なくともマウスにおいてはPQQがこの基準を満たしたと我々は考えたのであるが、ご専門の先生方には、認めていただけなかったようであった。例えば、新しい転写因子を発見したと報告した場合、分子生物学会が認めていないから転写因子とはいえない、ということにはならないと思われるが、なぜビタミンの場合、このような議論になってしまうのであろうか？ ビタミンを認定する機関が存在する訳ではないし、存在したとしても日本国内で決める種類のものではなさそうである。どうやら、日本ビタミン学会のビタミンの定義とは、既に存在しているビタミンについての説明であって、これを満たす物質はビタミンである、という逆は成り立たないらしい。このような議論が巻き起こる現実自体が、ビタミン概念の位置づけを示している。すなわち、ビタミンとは、科学的な概念であると同時に、社会的概念でもあり、科学的にはビタミンといえども、社会的に幅広く認められるまでは本当のビタミンではない、ということなのだろう。

6. 学際的な研究体制の必要性

今回の哺乳類におけるPQQ依存性酵素の発見は、蛋白質の質量分析、アミノ酸分析等、高度な解析設備と人材のそろった、理化学研究所という環境で初めて成しえたものだと思う。今後の定量系の開発に関しても、最新の高速度液体クロマトグラフィー／質量分析(LC/MS/MS)装置や、遺伝子改変細菌を用いた微生物学的定量など、幅広い領域の知識と経験を結集することが必要であり、ビタミ

ンの研究には学際的な研究体制が必要であることを痛感している。

生研機構の研究費は残念な結果に終わったが、今後は別の研究費を申請して、この研究プロジェクトを推進することで、厳しい審査員の先生方がこっそり理研製のPQQ入りビタミン剤を服用したくなるような結果を目指して、本当のビタミンと認められるまで研究を進めるべく、決意を新たにしている次第である。



ブレインテクノニュース
バックナンバーのご案内
第95号
2003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
タ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



ブレインテクノニュース
バックナンバーのご案内
第94号
2002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—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
……………高橋力一
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
……………山田バリーダ・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—西オーストラリア大学とCSIROでの1年間—
……………角川博哉

◀国内情報▶

スギ採種園の遺伝子流動の実態把握と
最適採種園の提案

¹独立行政法人 森林総合研究所・²新潟大学自然科学研究科
津村 義彦¹・谷 尚 樹¹・森 口 喜 成²・平 英 彰²

スギの苗の安定供給のために構築されたスギ採種園での遺伝子流動の実態を明らかにした。その結果、外部花粉混入率は5カ所の採種園で35%から68%と予想以上に高く、自殖率は1.4%から4.4%と差が見られたものの低い値を示した。また花粉親としての貢献は大きな偏りがあった。これらの結果から最適な採種園のあり方について議論を行う。

1. はじめに

スギ採種園はスギ植林用の苗を安定的に供給するために設定されている。その採種園とは成長、形質の優れた個体または病害抵抗性の個体を挿し木によって増殖し、これらと同じ場所に植栽し効率的に種子生産を行うところである。しかし優れた個体間の任意交配を期待して放任受粉で種子生産が行われているために、実際にはどのような交配が行われているか分かっていなかった。これらの実態を調査するために多型性の高いマイクロサテライトマーカーの開発を行い、それらを用いて採種園での遺伝子流動を調査した。具体的には外部花粉流入率、自殖率、花粉親としての貢献度である。また現在使われている採種園には2つの形態があり、最近是小面積で生産性及び作業効率のよいミニチュアタイプの使用が推奨されている(図1)。しかし、この形態の違いが外部からの花粉混入率及び自殖率に与える影響は不明であったため、それも考慮に入れて3カ所の従来型の採種園と2カ所のミニチュア型の採種園の調査を行った。これらのデータから採種園産の種子の遺伝的な評価を行い、さらに遺伝的保証のある効率的な種子生産ができる採種園の提案を行うことを目的として本研究を実施した。

TSUMURA Yoshihiko¹, TANI Naoki¹,
MORIGUCHI Yoshinari², TAIRA Hideaki²

¹〒305-8687 茨城県つくば市松の里1

²〒950-2181 新潟市五十嵐2の町8050

2. マイクロサテライトマーカー開発
と連鎖地図上へのマッピング

効率的に遺伝子流動解析が行えるように濃縮法によるマイクロサテライトの開発を行った(Moriguchi et al. 2003)。これまでに86遺伝子座のマイクロサテライトマーカーを開発した。開発したマイクロサテライトマーカーをCAPSマーカーを主体としたスギの基盤連鎖地図にマッピングを行った(Iwata et al. 2001, Tani et al. in press)。80遺伝子座のうちマッピング集団で分離が確認できたのは42遺伝子座で、連鎖地図上にマップされたのは37遺伝子座であった。連鎖地図上にマップしたマイクロサテライトは、どの遺伝子座も遺伝分離の歪みはなく、11連鎖群に散在していた。

3. 採種園内での遺伝子流動解析

開発したマイクロサテライトの中でもっとも多型性が高く安定したパターンが得られる6遺伝子座を用いて、5個所のスギ採種園での遺伝子流動解析を行った。各採種園の区画内の全クローンの遺伝子型を決定し、その中の12母樹についてそれぞれ30種子の分析を行った。その結果、外部花粉混入率は採種園によって大きく異なり、35%から68%と幅があった(表1)。周囲環境(スギの植栽面積)と外部花粉混入率との関係を調べるために、採種園を中心として半径1~10kmでのスギ

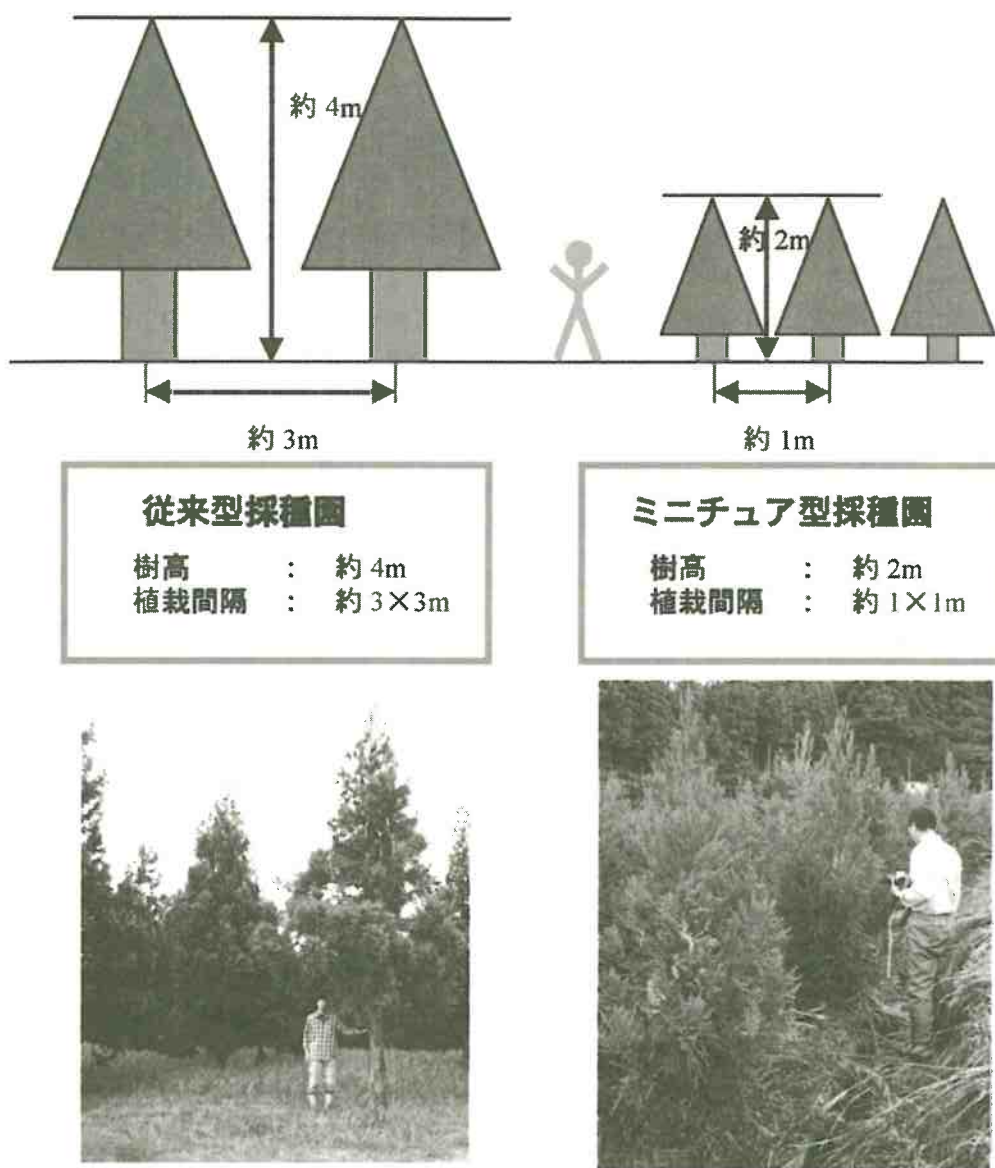


図1 わが国にある針葉樹採種園の二つの形態

ミニチュア型は小面積と省力化のために考えられた比較的新しいタイプの採種園である。しかし、植栽間隔が狭いこと、同じクローンの植栽本数が増えることがあるため、自殖の割合が高くなるのではないかと懸念されている。自殖が多くなると、結果として種子生産量を下げることになる。

表1 5カ所の採種園の外部花粉混入率、自殖及び採種園内での交配

	Aミニチュア	Bミニチュア	C一般	D一般	E一般
外部からの花粉混入(%)	40.8	50.0	65.8	35.0	47.8
自殖(%)	1.7	4.4	1.4	4.4	2.2
内部での交配(%)	57.5	45.6	32.8	60.6	50.0

植栽面積を調査した。その結果、スギ植栽面積と密接な相関があることが明らかとなった

(図2)。また周囲にほとんどスギ林が存在しなくても30%程度の花粉混入が見られること

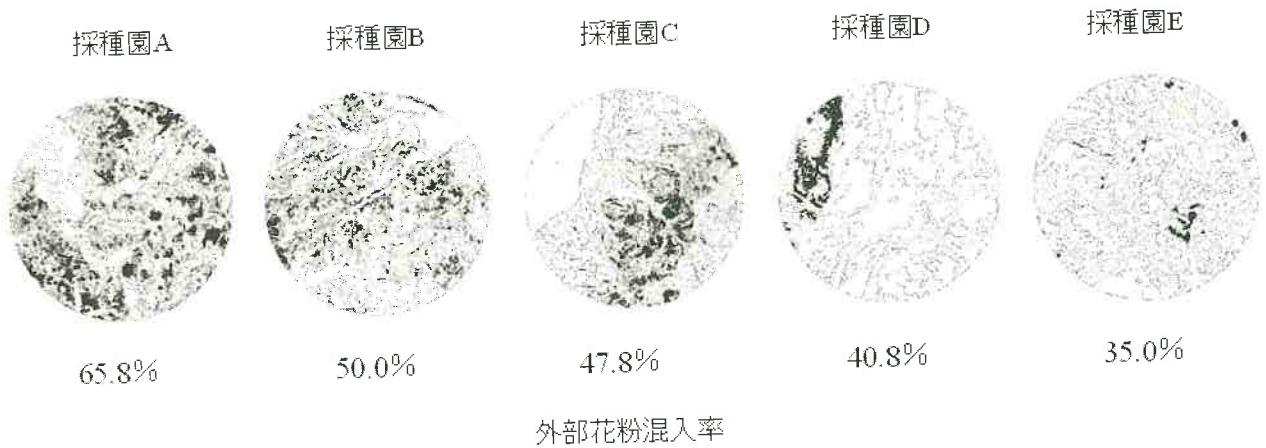


図2 探種園の周辺のスギ林の面積と外部花粉混入率との関係

探種園から半径10kmのスギ林を黒で表示。探種園周囲のスギ林面積が増加すると外部からの花粉の流入も増加することが分かる（この図は、環境省自然環境局生物多様性センター発行の自然環境情報GISの植生図からArcGISソフトウェアを用いて作成した）。

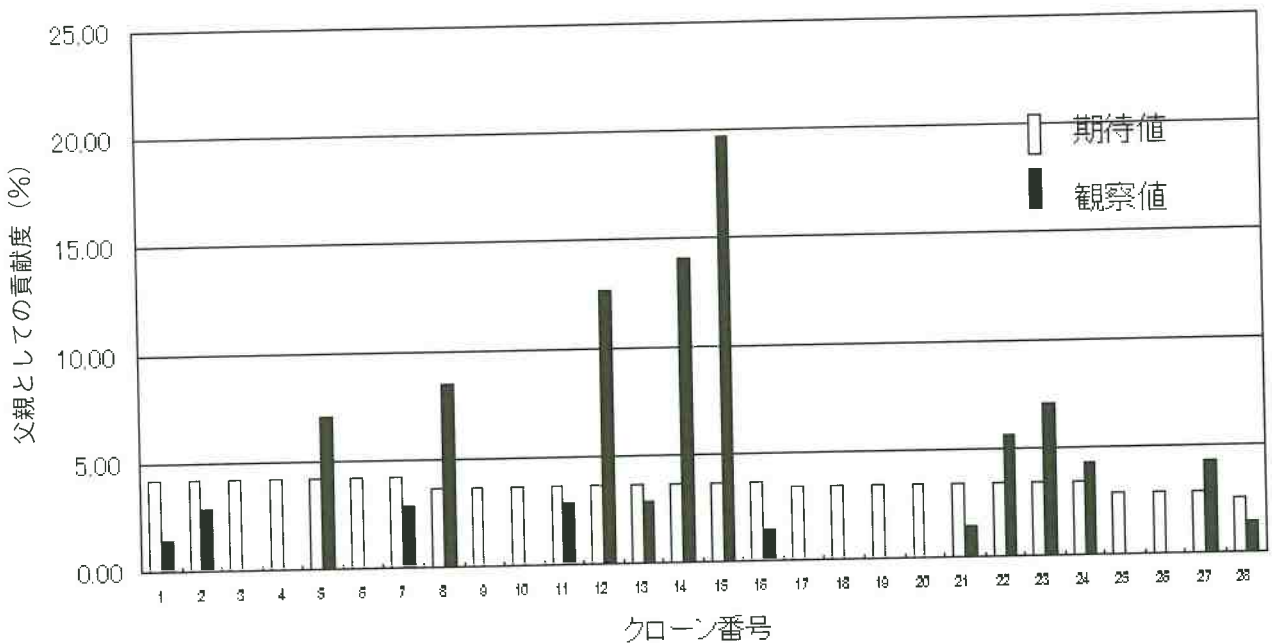


図3 各クローンの父親としての貢献度の期待値と観察値

クローンごとに貢献度に大きな違いがある。期待値の3～4倍も貢献しているものもあれば、全く貢献していないクローンもある。

も明らかとなった。このことからスギの受粉可能な花粉流動距離の大きさがあらためて確認された。また自殖率は5カ所の探種園で1.4%から4.4%と差が見られた。この値は植栽されているクローン数及び平均ラメート数と関係があることが明らかとなった。

調査した5個所の探種園で花粉親としての貢献度を調査した結果、各クローンの貢献度は一応でなく有意に偏っていることが明らかとなった(図3)。5カ所の探種園とも少数のクローンが生産される種子の半数以上に貢献している結果であった。また全く花粉親と

して貢献していないクローンも多く見られた。これは本来、均等な花粉親としての貢献を期待してクローンが植栽されているのに著しく偏った結果である。この偏りは花粉生産量及び開花フェノロジーの違いにより生じていることが示唆された。

また今回調査した採種園は一般型（樹高約4 m, 植栽間隔約4 m）3カ所とミニチュア型（樹高約1 m, 植栽間隔約2 m）2カ所であった。ミニチュア型は省力化のために設定された新しいタイプの採種園で将来の普及が期待されている。しかしミニチュア採種園は植栽間隔が狭いことと同一クローンの繰り返し数が多いことから自殖率が高くなるのではないかと懸念されていた。これら2つのタイプの採種園間では外部花粉混入率、自殖率及び花粉親としての貢献度ともに有意な違いは見られなかった。

4. 最適採種園の提案

以下に採種園のそれぞれの問題についての実態を述べ、その解決策について議論する。

(a) 外部花粉混入率：外部花粉混入率は周囲のスギ植栽面積と密接な関係があることが明らかになった。採種園Dのように周辺にスギ林がほとんどない条件の良い採種園でも約30%の混入があることが分かったので、ハウス採種園等の室内採種園の造成を行うべきである。

(b) 自殖率：自殖率は採種園に植栽されているクローン数及びそれらの平均ラメート数と関係があり、クローン数が少なく1クローンのラメート数が増加すると自殖が増える傾向がある。そのため40クローン以上の精英樹を植栽した方が自殖率を抑えることができると考えられる。

(c) 植栽クローン：採種園に植栽してあ

るクローンを開発したマイクロサテライトマーカーで再調査してみると、少なからず植栽ミスまたはクローンの取り違えがあることが明らかになった。そのため材料の管理を厳密に行う必要がある。また確認のために植栽ごとなどにDNAによるクローンの同定を行うべきである。

(d) 花粉親としての貢献度：植栽クローンの花粉親としての貢献度に大きな差があったことは、それぞれのクローンの花粉生産量及び開花時期のずれによる可能性が高い。生産される実生の遺伝的な多様性をなるべく高くするためには花粉生産量がほぼ同程度で開花フェノロジーが同調するクローン群で構成された採種園を造成すべきである。

(e) 採種園形態：現在存在する採種園は一般採種園とミニチュア採種園の二形態がある。この形態の異なる採種園間での自殖及び外部花粉混入率には有意な差は見られなかった。しかし、実際には自殖率は植栽クローン数と関係があることが明らかになったため、ミニチュア採種園でも40クローン以上を植栽すれば自殖を抑えることができるため今後は小面積で生産性の高く、しかも植栽後4年で種子生産が可能なミニチュア採種園の活用を積極的に行うべきである。

なお、本研究は農林水産技術会議パイオニア特別研究及び生研機構プロジェクトの支援を受けて実施された。

文 献

- 1) Moriguchi, Y. et al. (2003) *Theor. Appl. Genet.* 106, 751-758
- 2) Iwata et al. (2001) *Theor. Appl. Genet.* 103, 881-895
- 3) Tani, N. et al. *Genetics* (in press)

◀国内情報▶

D N A ブ ッ ク

—イネの遺伝子資源(完全長cDNAクローン)頒布の可能性—

理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター (GSC)
 遺伝子構造・機能研究グループ
 河合 純・林崎良英

DNAブックは、遺伝子クローンを書籍の形で、書籍に印刷された情報とともに、研究者に届けるものである。固相化された遺伝子クローンは、PCRにより容易に回収、入手でき、研究者は即座に研究を開始することができる。DNAブックは研究を進展させる技術であると同時に、印刷物に遺伝子クローンという物質を運搬するあらたな役割を与える、革新的なコンセプトである。

1. はじめに

ゲノム解析技術の進歩とあいまって、さまざまな生物のゲノム塩基配列が決定されている。2002年にはイネゲノムのドラフトシーケンスが決定され⁵⁾、今年(2003年)4月にはヒトゲノムの完全解読が宣言された。それにより、遺伝子研究は急速に遺伝子の機能解析に焦点を移しつつある。しかし、遺伝子やタンパクの機能解析には、ゲノム配列のみならず、タンパクを発現できる遺伝子クローン、つまり完全長cDNAクローンが必須である。そのために、われわれは、イネ、マウス等の生物の完全長cDNAクローン資源の整備を進め、大規模なクローンバンクを構築してきた^{4, 6, 7)}。ところが、ここで新たな問題に直面している。それはcDNAクローンを、遺伝子の機能解析を行う研究者のもとに届ける頒布に多大な労力と時間が掛かる状況である。本稿では、われわれが参画したイネ完全長cDNAクローンバンク整備事業の概要と、cDNAクローンの頒布のために新たに開発したDNAブックの技術について紹介する。

2. イネ完全長cDNAバンク整備事業

(1) 省庁の壁を超えたプロジェクト

わが国は、これまでに完全長cDNAを作製、解析する技術の開発において、世界をリード
 KAWAI Jun, HAYASHIZAKI Yoshihide
 〒320-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22

してきた。中心となる技術の1つはカルニンチラ(理化学研究所)により開発されたキャップトラッパー法であり、もう1つは菅野ら(東京大学医科学研究所)により開発されたオリゴキャッピング法である。このわが国の世界に対する優位性に着目した農林水産省は、イネ・ゲノムプロジェクトの一環として、1999年から2003年まで「イネ・ゲノムの完全長cDNAライブラリー整備事業」を実施した。実際には生物系特定産業技術研究推進機構(生研機構)から研究委託を受けた3つの研

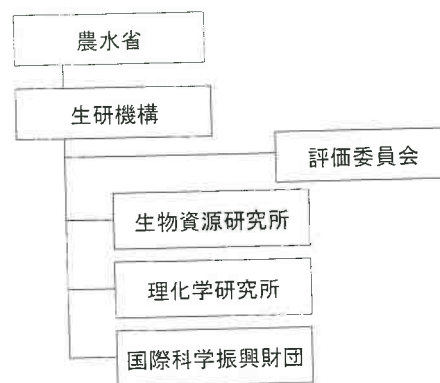


図1 「イネ・ゲノムの完全長cDNAライブラリー整備事業」の研究体制

生物系特定産業技術研究推進機構(生研機構)から研究委託を受けた3つの研究機関(農業生物資源研究所、理化学研究所、国際科学振興財団)が実行した。遂行にあたっては、評価委員会のアドバイスを受けた。

究機関（農業生物資源研究所，理化学研究所，国際科学振興財団）により行われた（図1）。3つの研究機関はそれぞれの強みを生かし，イネ生物学の専門家集団である農業生物資源研究所（菊池ら）がイネ試料を調整し，キャップトラッパー法技術を有する理化学研究所（林崎ら）が完全長cDNAクローンの作製とシーケンス決定，さらに国際科学振興財団はオリゴキャッピング法による完全長cDNAクローンの作製とシーケンス決定を担当した。高精度（精度99.99%以上）に決定された約3万2千種類のcDNAのシーケンスは，農業生物資源研究所により解析され機能情報の付加，データベース化が行われた。本プロジェクトの特筆すべき特徴は，従来の省庁の縦割り行政の枠を超え，農水省系の研究機関（農業生物資源研究所）と文科科学省（文科省）系の研究機関（理化学研究所）が，農水省の発案のもと大同団結し，1つの大きな成果を達成した点である。このように省庁の壁を超えた国家プロジェクトは，かつてなかったのではなかろうか。農水省，文科省の卓見と，プロジェクトを推進した生研機構の尽力を書き添える。

(2) イネ完全長cDNA解析から得られた研究成果⁴⁾

塩基配列決定した約3万2千種類のcDNAのうち，約2万8千種について，詳細解析を行ったところ，以下のことが明らかとなった。イネのゲノム配列との比較から，完全長cDNAクローンは約2万1千種類のゲノム上の遺伝子をカバーしていた。残りの約7,000個はそのうちのどれかと重複しており，これはイネの一部の遺伝子から数通りに遺伝情報が転写され，その結果1つの遺伝子から数種類のタンパク質ができる可能性を示している。また，既に公開されているさまざまな生物由来の遺伝子配列と比較したところ，今回収集したcDNAのうち，約1/4が新規のものであった。とくにイネ（単子葉植物）とシロイヌナズナ（双子葉植物）の間での遺伝子の相同性を調べたところ，今回収集した遺伝子

のうち約64%はシロイヌナズナにも類似した遺伝子が見つかったが，約36%はイネに特異的な遺伝子であり，それらは種子や花粉といった組織で発現しているタンパク質の多くで見いだされ，穀物の実験モデルとしてのイネゲノム研究の重要性を示している。これらの情報（2万8千の完全長cDNAクローンの配列情報，マップ情報，相同性検索結果，コードされるタンパク質に関する情報〔細胞内局在性，膜貫通構造等〕，遺伝子機能情報等）はデータベース化され，農業生物資源研究所のウェブページで公開されている¹⁾。また，cDNAクローンの頒布は近く（2003年10月），農業生物資源研究所イネゲノムリソースセンターで開始される予定である。

2. イネ完全長cDNAクローンの重要性和と，頒布の難しさ

以上のように収集，解析されたイネ完全長cDNAを用いれば，イネをはじめとする様々



図2 遺伝子クローンを輸送する際に必要なパッケージ

マウスの60,770個の完全長cDNAクローン（FANTOM2クローンセット）を凍結大腸菌の形で発送するためには，多量のドライアイスが必要とし，非常に大きなパッケージが必要であった。

な作物（植物）の重要な機能・形質に関与する遺伝子の研究を進めることができ、たとえばイネの食味の向上、耐病性の獲得、低温などのストレス耐性の向上等、農業上有用な形質の獲得や、新しい植物の利用法の開発なども進むことが期待できる。しかし、そのためには、個々の学術研究を行う研究者に応じて彼らが必要とする完全長cDNAクローンを提供しなければならない。収集された遺伝子クローンの数は数万になり膨大であるし、遺伝子クローンは、通常 -80°C で凍結保存しなければならないので、特定の遺伝子を研究する研究者が、すべての遺伝子クローンを保有し、管理することは労力がムダになるだけで意味がない。そこで、従来は、遺伝子リソースセンターのようなバンク事業を行う機関が、研究者の求めに応じて、希望の遺伝子クローンを選り出し、凍結大腸菌やDNAとして提供してきた。しかし、いかに中央で一括して行うとしても、これらの管理、発送などの作業には、多くの労力、経費、時間がかかり、結果としてクローンを欲しい研究者は、入手まで長期間、待ったりしなければならなかった。そのたいへんさを示す例として、図2には、理化学研究所が収集したマウスの60,770個の完全長cDNAクローン（FANTOM2クローンセット）を、凍結大腸菌の形で発送する際のパッケージを示した。凍結状態で輸送するためには、多量のドライアイスが必要となり、そのためパッケージが非常に大きくなっている。この状況を打破すべく開発されたのがDNAブック技術である。

3. DNAブック^{2, 3)}

(1) DNAブックとは

もともとDNAブックの発想は、百科事典のイメージから生まれた。理化学研究所が推進してきたマウスのすべての遺伝子を完全長cDNAクローンとして収集し、1つの大きな遺伝子リソースとして整備するマウスゲノムエンサイクロペディア（マウス遺伝子百科事典）プロジェクトは、1冊の百科事典の中に

すべての遺伝子の情報に加え、すべての遺伝子クローンをDNAとして収録し、バンクとして完成させるイメージと重なっていた。つまりDNAブックは、遺伝子クローンと遺伝子情報の両方を、書籍の形態で、研究者など利用者に提供する形をめざしていた。図3は理化学研究所で試作したマウスDNAブックである。ここには図2と同じ60,770個の遺伝子クローンを1冊のDNAブックに非常にコンパクトに収録されている。DNAブックの画期的な特徴は、これまで情報の媒体であった書籍を、物質を運搬する媒体として利用する点にある。利用者は書籍を購入する手軽さでDNAブックを発注し、クローンを頒布する機関は在庫のDNAブックを宅配便で発送し、利用者は受け取ったDNAブックから遺伝子情報だけでなく、遺伝子クローンそのものを容易に取り出し、即座に自分の実験を始めることができる（図4）。あらかじめDNAブックを1冊購入して実験机に常備しておけば、実験のアイデアを思いついたその日に、実験を始めることも可能になる。DNAブックは、遺伝子クローンが整備されたポストゲノム時代の遺伝子研究の新しいスタイルを可能にする。

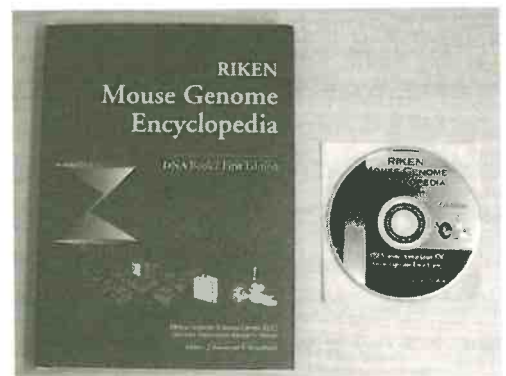


図3 マウスDNAブック

マウスの完全長cDNAクローン、60,770個の遺伝子クローンが、DNAブックに非常にコンパクトに収録されている。遺伝子に関する情報はCD-ROMとして添付されている。

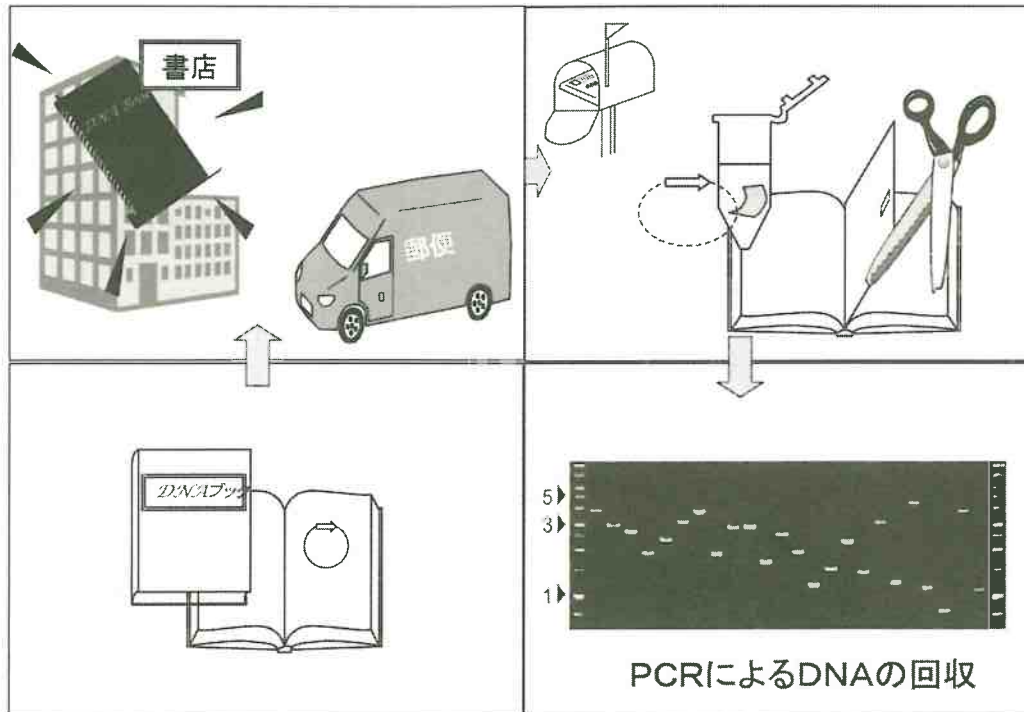


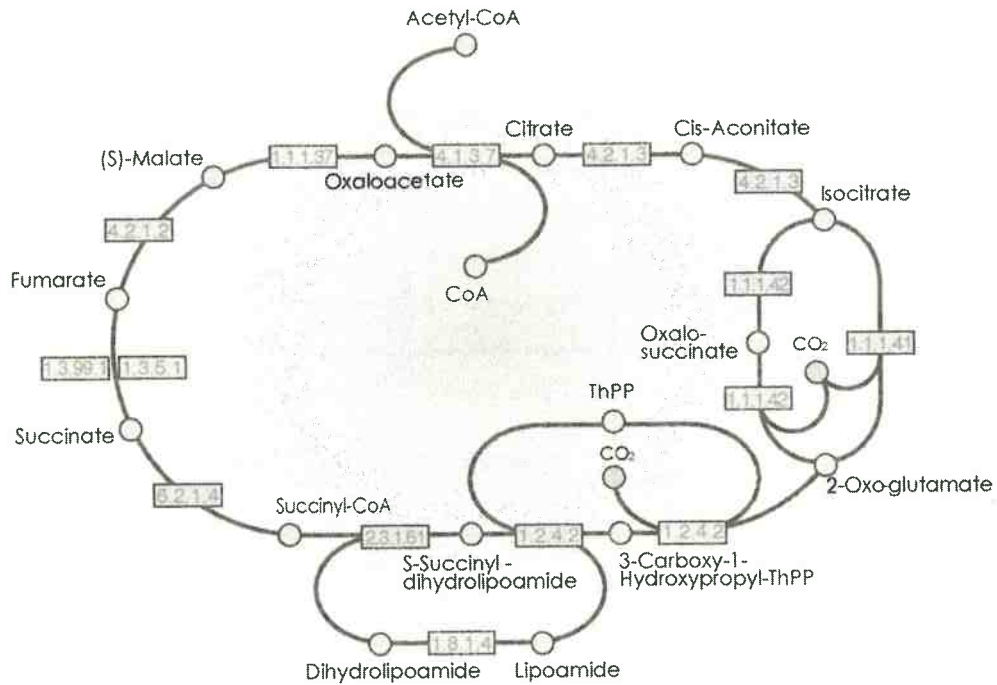
図4 DNAブックの概念図

DNAブックは、遺伝子クローンを書籍の形で、書籍に印刷された情報とともに、宅配便などで研究者に届ける。利用者は書籍を購入する手軽さでDNAブックを発注し、クローンを頒布する機関は在庫のDNAブックを宅配便で発送し、利用者は受け取ったDNAブックから遺伝子情報だけでなく、遺伝子クローンそのものをPCRで容易に取り出し、即座に自分の実験を始めることができる。

(2) DNAブックの技術

DNAブックの1ページの見本を図5に示した。この見本には、上段に情報として、クエン酸回路とそこで働く酵素の酵素番号が印刷されている。そして下段の、酵素番号で整理された表には遺伝子名に加え最右端のカラムに物質である遺伝子クローン(DNA)がページに染み込ませてある。DNAの回収には、あらゆる研究室で当たり前に行われている技術であるPCRを用いる。これらを実現するためにページとして使用している用紙は、印字できることは当然であるが、DNAを安定に保持することができること、かつその用紙から容易にDNAを溶出し、PCRにより増幅できることも必要である。そのために、用紙が酵素反応を阻害することがあってはならない。以上の条件を満たすものとして、現在は、市販の水溶紙を利用している。実際の

DNAブックのページの作製とDNAの回収は次の通りである。遺伝子の情報を印刷した水溶紙に、遺伝子のDNA(5 ng)を、マイクロピペットや96または384ピンの剣山を使ってスポットする。96または384ピン剣山を使えば、ほぼ一定量(0.2マイクロリットル)のDNA溶液を、所定の場所に整列させて、正確にスポットすることができる。DNA溶液は、あらかじめ赤色色素で着色されているので、スポットしたところは一目瞭然である。DNAブックからDNAを回収するためには、カッターや市販の皮細工用のポンチで目的のDNAスポットを直径約2 mmの大きさに切り抜き、PCRチューブに移す。その後、PCRに必要なすべての試薬(プライマー、酵素、バッファー、基質)を含んだ反応液を加え、サーマルサイクラーでPCR反応を実行すれば、DNAシートから溶け出したDNAを鋳型



Annotation Table

EC number	Gene name	R KEN Clone ID	Accession Number	Length (bp)		DNA Spot
				cDNA insert	After PCR	
1.1.1.37	malate dehydrogenase	1500012M15	AK005237	1758	1959	●
1.1.1.41	isocitrate dehydrogenase (NAD)	1500012E04	AK117103	2440	2641	●
1.1.1.42	isocitrate dehydrogenase (NADP)	E030024J03	AK087063	2160	2438	●
1.2.4.2	oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide)	E430020N12	AK088582	3554	3832	●
1.3.5.1	succinate dehydrogenase (ubiquinone)	9430063I08	AK034928	2860	3138	●

図5 DNAブックのページの例

上段に情報として、クエン酸回路とそこで働く酵素の酵素番号が印刷されている。下段の、酵素番号で整理された表には遺伝子名に加え、最右端のカラムに物質である遺伝子クローン (DNA) がページに染み込ませてある。

にしてPCR反応が進む。PCRチューブに入れた水溶紙は溶解するので、PCR反応を実施するときにも除去する必要はない。図4の右下は、PCRによりDNAがDNAブックから回収できたことをアガロース電気泳動により確認したものである。ランダムに選んだ理研の完全長cDNAクローン (93個) を使った実験では、DNAブックからDNAが高率に (93%以上) 回収できることも確認できた。さらにDNAブックが、その作製、運搬、保管過程

で受けるさまざまなストレス (高温、低温、圧力、擦過) にも耐えることが確認されている。実験室の窓際に置いたDNAブックで行っている長期保存テストでは、これまで6カ月間の保管でも良好な結果が得られており、さらに長期のテストを継続中である。

3. おわりに

DNAブックは生まれて間もない技術であ

る。遺伝子クローンの頒布に広く使われるためには、今後、DNA溶液をDNAブックにスポットする機械（DNAプリンター）の技術開発などが必要である。また、利用者がどの情報とどの遺伝子クローンを求めているかを把握しDNAブックを編集、出版することも課題であろう。しかし、その潜在的な可能性を生かし広く利用されるようになることを期待している。そしてイネDNAブックが作製され、多くの植物の研究者の研究の推進に貢献できることを期待している。

（謝 辞）

「イネ・ゲノムの完全長cDNAライブラリー整備事業」は生物系特定産業技術研究推進機構の事業の一部として実施された。DNAブックの開発プロジェクトは、理化学研究所ゲノム総合科学センター和田昭允所長のサポートにより実施された。イネ完全長cDNAバンク整備事業をともに実行した菊池尚志氏（農業生物資源研究所）、村上和雄先生（国際科学振興財団）らプロジェクトに参加したすべてのメンバー、プロジェクト推進に尽力いただいた貝沼圭二氏（生研機構）、桂 直樹氏（生研機構）、榊佳之先生（評価委員会委

員長）に感謝します。また、DNAブックプロジェクトをともに進めてくれた中村光江氏、友次亜希子氏とプロジェクトのすべてのメンバーに感謝します。

文 献

- 1) <http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/>
- 2) <http://genome.gsc.riken.go.jp/DNA-Book/>
- 3) Kawai, J and Y. Hayashizaki (2003) *Genome Research*, 13, 1488-1495
- 4) Kikuchi, S. et al (2003), *Science*, 301, 376-379
- 5) Sasaki, T., et al (2002) *Nature*, 420, 312-316
- 6) The FANTOM Consortium and The RIKEN Genome Exploration Research Group Phase I & II Team, (2002) *Nature*, 420, 563-573
- 7) The RIKEN Genome Exploration Research Group Phase II Team and the FANTOM Consortium, (2001) *Nature*, 409, 685-690

◀国内情報▶

自動直進田植機の開発

生物系特定産業技術研究推進機構 基礎技術研究部

松 尾 陽 介

乗用田植機による田植え作業で、往復の直進作業行程におけるハンドル操作を自動で行うことができる自動直進田植機を開発した。本田植機による作業により、オペレータは忙しい条合わせのハンドル操作から暫し解放され、また、走行・作業中に苗マット等の資材補給や作業状況の確認、作業部の調整などが可能となり作業の能率や精度が向上する。さらに、深水でマーカ跡が見難くても作業が容易に行えることから、田植え前の落水による環境水系の汚濁を防止するという効果も期待される。

1. はじめに

乗用田植機による作業は、圃場の外周部(枕地)を除き、ほとんどが圃場端でUターンを行う往復の直進作業の繰り返しで行われる。その往復直進作業では、各行程が平行で隣接行程間を30cm条間に合わせるように、条合わせ運転が行われるが、水田内での田植機の直進走行性はあまり良くないため、オペレータは操向操作に専念する必要がある、ハンドルから手を離すことはできない。

また、オペレータは、条合わせの運転に専念しながらも、植付けが正常に行われているかの確認や田植機上の苗残量にも気を遣う必要があり、田植え作業におけるオペレータの負担は大きい。さらに、田植え作業では、苗マット等の運搬や田植機への積込みなどの補助作業も多く、他の機械作業に比べ労力と時間を要する作業となっている。

そこで、乗用田植機による田植え作業で、オペレータの労働負担を軽減すると共に、走行・作業中に苗マット等の資材補給や作業状況の確認、作業部の調整などを可能にして、作業の能率や精度を向上させることを目標に、往復の直進作業行程におけるハンドル操作を自動で行うことができる自動直進田植機(以下、直進田植機)の開発を行った。

MATSUO Yosuke

〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

ここでは、21緊プロ事業として、井関農機(株)、日本航空電子工業(株)、およびヤンマー農機(株)の協力を得て開発を行い、実用化の見通しが得られた直進田植機について、その構成や性能、導入効果などを紹介する。

2. 直進田植機の概要

直進田植機は、田植え作業における往復直進作業行程で、事前に取得した目標進行方位(目標方位)への自動直進走行が行える田植機であり、自動操舵ができるようにした田植機に、車両の進行方位(車両方位)を検出する航法センサ、操舵制御等を行うコントローラ及び操作盤により構成される直進装置を装備したものである(図1)。

(1) 直進装置の構成

直進装置の構成等を以下に示す。

- ① ボンネット上方のフレーム上に取り付けられた航法センサは、地磁気方位センサ(3軸)や傾斜角センサ、角速度センサ、信号処理回路等から構成され、100mm角の筐体に納められている。
- ② コントローラは、航法センサや車両からの情報を入力し、操舵制御信号を出力するもので、シングルチップマイコンと周辺回路で構成され、ボンネット内に装備されている。

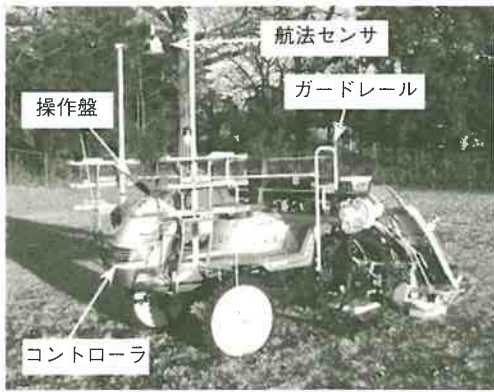


図1 直進田植機の外観



図2 直進田植機の操作盤

- ③ コントローラに組み込まれた制御ソフトは、自動直進の目標方位を取得するティーチングソフトと、目標方位への直進制御（操舵制御）を行う直進制御ソフト、及びシステムの自己診断などの付加機能ソフトから構成されている。
- ④ 操作盤は、使用頻度の多い自動直進ボタンや左右経路修正ボタンを前面に大きめに配置し、操向ハンドル右下に装備している（図2）。

(2) 直進制御方法

直進田植機では、自動直進のための航法センサとして、GPSのような位置検出センサではなく、地磁気方位センサをベースに方位センサを構成、適用している。

方位センサにより車両方位を検出して、平行な直進走行を実現するためには、最初に取り得・設定された目標方位に対し、田植機車両

を常にその目標方位と一致する方向に走行させるよう操舵を制御する必要がある。本直進装置では以下の制御ループ構成を適用した。

車両方位角制御ループは、目標方位と現在の車両方位の差に方位角ゲインを乗じた量を角速度指令として、車両方位角速度を制御する角速度制御ループに与える構成を採用した（図3参照）。車両方位角速度は角速度センサを使って検出している。

車両を常に目標方向に走行させるためには、目標方位と車両方位の差（制御偏差）が常に小さくなるように制御することが必要である。つまり、方位角ゲインを大きくし、車両方位角制御ループの応答性を高くする必要がある。そのためには、車両方位角制御ループの応答性に比較し、その内側にある角速度制御ループの応答性が十分に高くなくてはならない。そこで本装置では、操舵アクチュエータの特性や車両運動の特性を考慮し、角速度制御ル

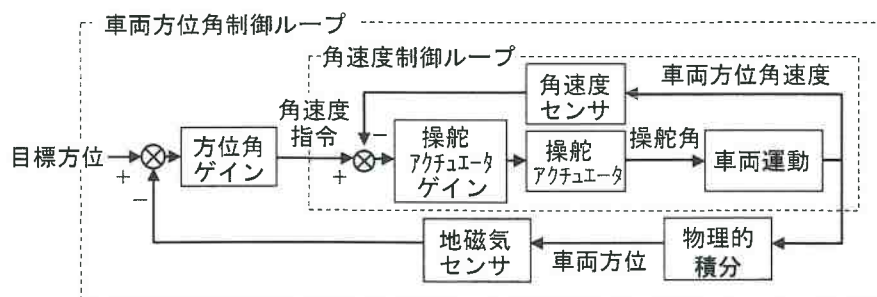


図3 車両方位角制御ループ

ープ内の操舵アクチュエータゲインが、操舵アクチュエータに対して最適な制御指令を与えるように配慮して、角速度制御ループの応答性向上を図った。その結果、方位角ゲインを大きくし、車両方位角制御ループの応答性を高くすることができた。

一方、単純な方位角制御では、目標方位と車両方位の差を許容した上で、その差をゼロにする操舵を行うこととなるので、一度大きめの制御偏差が発生すると目標の経路に戻らない（横ずれが残ってしまう）状況が発生する。そのため、方位角ゲインには、このような現象に対する補償も加え、目標ラインに戻るようにした。この補償を追加することにより、直進性を向上させることができた。

(3) 操作方法と機能

直進田植機の操作方法や機能は以下のとおりである。

- ① 自動直進のための目標方位は、自動直進開始前の手動運転中に自動的に取得、設定され、最初の往復行程を手動運転により作業して目標方位を取得する方式と、各行程の作業初期に目標方位を取得する方式を選択できる。
- ② 自動直進は、操作盤の自動直進ボタンを押すことにより随時実行／解除される。
- ③ 自動直進中に経路修正ボタン（左右）を押すと、自動直進を継続したまま進行横方

向のずれを一定量修正できる（一定量の幅寄せが行われる）。

- ④ 自動直進中に行程終端に近づくと警報が発信され、終端で植付けが終わると自動直進は解除される。

3. 直進田植機の作業性能

埼玉県吹上町や山形市の農家圃場において作業性能を試験、調査した。試験結果（表1）から、その作業性能は以下のようであった。

- ① 直進性能について、直進田植機は少なくとも30m以上の自動直進が行え、その精度は30m走行して目標経路から進行横方向に5cmずれる程度であった。
- ② 山形県の農家圃場（30×100m）での実用作業試験の結果、圃場の凹凸により横ずれが生じる場合や、長い距離の自動直進では横ずれが大きくなる場合があったが、経路修正ボタンにより適宜ずれ修正を行うことで、往復作業行程の7割程度を自動直進作業することができた。
- ③ また、同作業試験で、自動直進中に走行しながら苗補給が行えた（計5回）ことから、作業時間が約8%短縮できることを確認した（図4）。

表1 自動直進田植機の試験結果例

試験 *1	設定速度 (m/s)	行程数	ティーチング行程に対する平行度 *2				経路修正実行回数		
			絶対値平均 (°)	~0.1° 行程数	~0.2° 行程数	~0.3° 行程数	~0.4° 行程数	右	左
①直進性能試験	0.5	12	0.12	8	2	1	1	—	—
	0.9	11	0.08	7	3	1	0	—	—
	1.1	11	0.16	2	6	2	1	—	—
②実用作業試験	0.5~1.0	12	0.08	9	3	0	0	6	6

*1：①は埼玉県吹上町と山形市の農家圃場での試験。30～80mを自動直進。

②は山形市の農家圃場30×100mで、全面作業を実施。経路修正ボタンを適宜使用。

*2：測量装置で計測した作業軌跡の平行度（偏差）であり、平行度（偏差）の0.1°は30m走行して横ずれ約5cmに相当する。

4. 直進田植機の導入効果

直進田植機による作業では、下記のような効果が期待される。

- ① 往復直進作業時の条合わせハンドル操作から暫し解放されるので、オペレータの労働負担が軽減される。
- ② 走行・作業しながら苗補給ができるので、作業時間が短縮できる。また、植付け状況等の確認も、走行・作業しながら余裕を持ってできるので、欠株などが生じた時の対応が速やかにできる。
- ③ 大区画の作業では、田植機に補助者が同乗する場合があるが、上記効果により、補助者が同乗する必要がなくなる。
- ④ 深水でマーカー跡が見難くても、直進作業が容易に行え、田植え前の落水による環境水系の汚濁を防止する。

これらの導入効果が期待される直進田植機は、現在、来春以降の市販化に向け、開発参画企業による実用試験等が進められている。



図4 自動直進中の苗補給

文献

- 1) 松尾陽介ら (2002), 自動直進田植機, 平成13年度生研機構研究報告会資料, 45
- 2) 増田雄一 (2003), 自律直進装置の開発, 農業機械学会誌64巻5号, 30-31



ブレインテクノニュース
バックナンバーのご案内
第93号
2002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

地域の先端研究

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。

◀文献情報▶

遺伝子が同一な母ウマからの体細胞クローン仔ウマの誕生

A cloned horse born to its dam twin

Cesare Galli, Irina Lagutina, Gabriella Crotti, Silvia Colleoni, Paola Turini, Nunzia Ponderato, Roberto Duchi, and Giovanna Lazari

Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani, 26100 Cremona, Italy.

Nature, 424, 635 (2003)

ヒツジ、マウス、ウシ、ヤギ、ウサギ、ブタ、ラバなど数多くの動物において、体細胞クローン個体の誕生がこれまでに報告されている。今回、著者らは、体細胞クローン胚作成のための核を提供した雌ウマを受胎ウマ（代理母）としても用いて、再構築胚を移植し、母ウマと同じ遺伝子を持つ体細胞クローン仔ウマを得ることに世界で初めて成功した。

アラビアンサラブレッド種の雄1頭及びハフリンガー種の雌1頭から、それぞれバイオプシにより皮膚を採取し、継代培養により線維芽細胞のセルラインを得た。次に、食肉処理場由来卵巣より未成熟卵子を採取し、成熟培養を行った。その体外成熟卵子を用い、除核後に除核卵と線維芽細胞を融合させた。融合した胚（97%）のみに対して活性化処置を行い、胚盤胞期まで体外で培養した。雄及び雌由来細胞を用いて、それぞれ513個及び328個の融合・再構築胚を培養し、8個の雄細胞由来胚と14個の雌細胞由来胚、計22個の胚盤胞を得た。8個の雄細胞由来胚盤胞と9個の雌細胞由来胚盤胞を9頭の受胎ウマに非外科的に移植した。また、雌細胞由来再構築胚2個を線維芽細胞を採取したハフリンガー種雌ウマに移植した。超音波画像診断装置による妊娠診断の結果、21日目において4頭が単胎で妊娠していた。2頭はその後すぐに、1頭は187日目に流産した。しかしながら、残り

の1頭は妊娠を継続し、336日目にあたる2003年5月28日に生時体重36kgの健康な雌仔ウマを出産した。この体細胞クローン仔ウマは線維芽細胞を採取した雌ウマから生まれ、「Prometea」と命名された。このクローン仔ウマと母ウマとの遺伝子の同一性を確認するために、白血球及び胎盤のDNAを分析した。12カ所のマイクロサテライト分析により、仔ウマ及び胎盤のDNAは、受胎ウマ（代理母）と同一であることが明らかとなった。卵割期から胚盤胞期への発生率や初期の着床率が低いものの、妊娠4頭中正常仔ウマが1頭生まれたことから、今回用いたクローニング技術は非常に有効な方法であると著者らは述べている。健康な仔ウマが、同一の遺伝子を持つ母ウマから生まれたということは、母親によって胎仔が免疫学的に認識されるために妊娠が維持され、胎仔抗原の不十分な認識のために流産が起こるというこれまでの考えと相反するものである。また、性格や運動能力が実際に同一のものとなるかどうかはわからないが、クローン技術によって、去勢されたチャンピオンの遺伝子を子孫に残せる可能性が生まれた。

ウマの体外受精技術はまだまだ改良段階であるが、その中で体細胞クローンウマが得られたのは驚きである。ただ、核の遺伝子は同一であるかもしれないが、細胞質は異なる個体由来であり、ミトコンドリアDNA等には違いがある可能性がある。ほんの1頭の成功例だけでは、母ウマと胎仔の遺伝子の同一性がクローン仔ウマの誕生にどのように影響したのかは不明である。ウマの妊娠認識機構の検討のためにも、さらなる例数の追加が必要である。

（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▶

鉛の腸管吸収と組織蓄積におけるラムノガラクトツロナン-II二量体の影響

The rhamnogalacturonan-II dimer decreases intestinal absorption and tissue accumulation of lead in rats.

Tahiri M, Pellerin P, Tressol JC, Doco T, Pepin D, Rayssiguier Y, Coudray C.

Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne CRNH, Unite Maladies Metaboliques et Micronutriments, INRA, Saint Genes Champanelle, France.

J Nutr. 130(2), 249-253 (2000)

鉛は毒性の金属元素であり、微量ながら人体のすべての臓器や組織に存在する。その中毒症状は血液、神経、平滑筋、腎臓、消化管などの障害として現れる。これまで動物を用いた試験においてクエン酸、アスコルビン酸、ビタミンDなどは消化管における鉛の吸収を促進し、カルシウム、鉄、亜鉛といった陽イオンは鉛吸収を阻害することが示されている。また、食物繊維はミネラルの吸収に作用しており、その含量、性状により吸収作用は左右される。ラムノガラクトツロナン-II (RG-II) は高等植物細胞壁に存在するペクチン質多糖(食物繊維)の一種である。主に二量体 (dRG-II) として存在している。また、in vitroでの実験から、dRG-IIは鉛、ストロンチウム、バリウムなどと強く結合しており、マグネシウム、亜鉛、鉄との結合は弱いことが示されている。本研究では、in vivoで鉛の腸管吸収や組織での蓄積におけるdRG-IIの影響を評価している。

ヒトとラットでは鉛の動態が類似していることから、筆者らはラットを用いて以下のような実験を行った。40匹のWister系ラット(♂)を4群に分け、それぞれの集団に同一の食餌と以下のように調製した水を3週間与えた。1) コントロール、2) 酢酸鉛を3 mg Pb/Lを添加 (Pb群)、3) 鉛が結合したdRG-

IIを0.5g/L添加 (Pb/ RG-II群)、4) Pb/RG-IIを0.5g/LとdRG-IIを4.5g/L添加 (Pb/RG-II + RG-II群)。ここで、0.5g/LのPb/RG-IIは約3 mg/Lの鉛を含む。試験終了までに、どの群においても生育、血中成分ともに鉛毒性は観察されなかった。試験終了5日前から鉛の腸管吸収を評価していった。その結果、見かけの腸管吸収率はそれぞれ62.3, 15.2, 11.8, -0.1%であった。また、鉛の収支はそれぞれ+1.9, +9.6, +5.6, -0.2 μg/dayであった。Pb/RG-II群ではPb群に比べて血液や組織のPbレベルが低く、Pb/RG-II中の鉛は酢酸鉛よりも吸収されにくいことが示された。また、Pb/RG-II + RG-II群の結果から分かるように、鉛が結合していないdRG-IIを上記の容量で添加すると、鉛の腸管吸収率がほぼ0になることも示された。さらに筆者らは、鉛処理やdRG-II添加によってマグネシウム、亜鉛、鉄などのカチオンの腸管吸収が影響されないことを確認した。よって、dRG-IIは鉄などの必須元素を交換することなく、鉛由来の毒性を減少させるのに有益であることが示唆された。鉛は主に十二指腸で吸収され、回腸以降ではほとんど吸収されない。Pb/RG-IIはpH2-8で安定であり、消化管内での環境でも強い結合を維持していると考えられる。結腸ではdRG-IIは微生物由来の酵素により完全に分解して、結合していた鉛を遊離してしまうが、鉛はほとんど吸収されないと考えられている。

上記のRG-II設定量0.5, 5.0g/Lという値をヒトでの摂取に換算すると1 g/dayに相当するが、例えばワインや果汁は100~400mg/LのdRG-IIを有しており、今回の設定値はまずまず妥当であったといえる。しかし、続報 (Br J Nutr. 2002 Jan; 87(1): 47-54.) によると、ラットにおける慢性的な中毒の解毒には効果がなかったようであり、今後さらに検討が行われるであろう。dRG-IIと同様に、毒性元素の吸収阻害が期待される食物繊維がほかにも存在するかもしれない。

(抄訳: 松浦啓一, MATSUURA Keiichi, カルピス株式会社 基盤技術研究所)

◀文献情報▶

早すぎた死

Male-sterility of thermosensitive genic male-sterile rice is associated with premature programmed cell death of the tapetum

Sujin Ku, Hyejin Yoon, Hak Soo Suh, Yong-Yoon Chung

Planta (2003) 217: 559-565

冷夏でお米の出来が心配ですね。冷害の要因にはイモチ病もありますが、その多くは花粉が低温のため成熟できないことによるものです。一方、穀物業者はアメリカの夏の温度に一喜一憂します。こちらは、高温でトウモロコシの花粉ができずに実が成らなくなるのです。このように花粉は温度に非常に弱いものです。今回は、32℃になると花粉ができなくなるイネについて紹介しましょう。

雄性不稔、その名の通り、雄性配偶子、花粉が稔性を失った（機能しなくなった）ことを言いますが、F1ハイブリッド育成に重要で、タマネギ、ナタネ、イネなどに利用されています。これには細胞質遺伝（母性遺伝）する細胞質雄性不稔と、核遺伝子に支配される核遺伝性雄性不稔があります。F1ハイブリッドの採種に利用されるのは前者で、ミトコンドリア遺伝子に変異し葯のミトコンドリアが正常に機能しないためだとされています。後者の核遺伝性雄性不稔では不稔遺伝子は稔性遺伝子とヘテロでしか存在し得ず、また劣性であることが多いために、播いた種子の3分の1しか雄性不稔とはなり得ず、実際の採種には使えません。ところが、感温性雄性不稔では所定の温度に達した時のみ不稔となるため、感温性雄性不稔遺伝子をホモに持つ系統を育成することが可能となり、F1ハイブリッドに利用できないかと期待されています。この論文では32℃になると稔性を失う系統を使い、花粉が正常に発達する昼温26℃夜温20℃で生育した個体と不稔となる昼温32℃夜温26℃で育成させた個体を比較しています。

花粉は葯室の中で周囲の絨氈組織から養分を受け、花粉母細胞、四分子、小胞子、2細胞性花粉、成熟細胞へと発達していきます。

各々の発達ステージ毎に光学顕微鏡及び透過型電子顕微鏡で観察してみます。花粉母細胞の段階ではまだ差はありませんが、四分子の段階では既に高温栽培個体の葯に異常が現れます。絨氈組織細胞で液胞が巨大化しているのです。小胞子になると絨氈組織の細胞膜が破れかけ細胞質の崩壊が始まり、葯室内に細胞質が放出されます。絨氈組織の死です。ついで小胞子も崩壊を始めます。低温栽培個体では花粉が成熟すると絨氈組織はその役割を終え崩壊し始めるのですが、高温により崩壊時期が早まるのです。四分子という胎児の時期に、臍の緒ともいべき絨氈組織が早すぎる死を迎えてしまい、母体からの栄養の補給が途絶え花粉は発達を停止します。

ま、ここまでは、過去の不稔の研究にも同様な結果があり、この系統でも起こるであろうことは予想の範囲なのですが、この論文の肝はこの現象をprogrammed cell death (PCD)と結びつけたことにあります。細胞の形態変化、即ち、細胞質の収縮、液胞の崩壊、ミトコンドリア・マトリックス密度の減少は、PCDによく見られる変化に共通の現象なのです。PCDでは核DNAの断片化が起こることが知られていますが、TUNEL法で調べると、高温栽培個体の絨氈組織ではやはり核DNAが切断されていることが確認されました。そこで、雄性不稔は早すぎたPCDによるものだと結論づけます。高温シグナルがどう伝わり、雄性不稔系統では何故PCDの発現時期が早まるのかが、次の課題となるのでしょうか。

面白く読みましたが、気になるところを少し。著者らは絨氈組織からスポロポレニンが供給されないから小胞子が壊れるという論理を展開している。だが、小胞子を単離培養するとスポロポレニンの絨氈細胞からの供給はないが、2細胞性花粉まで正常に成育する。前述した様に、栄養の補給が絶たれるからと考えるべきではないのか。

(抄訳：岩井純夫, IWAI Sumio, 鹿児島大学農学部)

◀文献情報▶

循環器系疾患の予防を目的 とした抗酸化ビタミンの使用

Use of Antioxidant Vitamins for the Prevention of Cardiovascular Disease: Meta-Analysis of Randomised Trials

Deepak P Vivekananthan, Marc S Penn, Shelly K Sapp, Amy Hsu, Eric J Topol

Department of Cardiovascular Medicine, Cleveland Clinic Foundation, 9500 Euclid Avenue, NC-10, Cleveland, OH 44195, USA

Lancet, 361, 2017-2023 (2003)

ガン、動脈硬化、糖尿病をはじめとする生活習慣病に対して、疫学研究や動物試験の結果から特定の食品による予防が注目され、食品成分の生理機能に関する研究が盛んに行われている。しかしながら、米国で行われたβ-カロテンによる肺ガン予防の臨床試験が失敗に終わるなど、ヒトへの応用はまだまだ難しい状況に有る。

著者らは、ビタミンEやβ-カロテンによる循環器系疾患に対する予防効果を検証した臨床試験について、数万人規模でのデータ解析を行っている。酸化を受けたLDL（低比重リポタンパク質）が動脈硬化をもたらし、循環器系疾患の原因になると考えられている。このLDLの酸化を防ぐ抗酸化物質が、循環器系疾病の発病と進行の予防につながるのではないかということで、抗酸化ビタミンであるビタミンEやβ-カロテンを用いた介入試験が行われている。健常人（1次予防）あるいは喫煙者や心臓病を患ったことのある人など循環器系疾患に対して高いリスクを有するヒト（2次予防）を対象として、1.4～12年間追跡調査された1,000人以上の大規模無作為化臨床試験12例についてデータをまとめている。7機関で40,890人（プラセボ40,898人）に対して50～800 IUの投与量で実施されたビタミンE投与試験では、ビタミン

E投与群と対象群とでは全死亡率（11.3 vs 11.1%, $p=0.42$ ）及び循環器系の疾患による死亡率（6.0 vs 6.0%, $p=0.94$ ）には差がなく、脳血管障害（3.6 vs 3.5%, $p=0.71$ ）に対するリスクの低減も認められなかった。また、2次予防に対する効果に着目しても差は認められなかった。

8機関で69,327人（プラセボ58,786人）に対して15～50mgの投与量で実施されたβ-カロテン投与試験では、β-カロテン投与群で対象群と比較して全死亡率（7.4 vs 7.0%, $p=0.003$ ）が僅かではあるが有意に増加した。また、循環器系の疾患による死亡率（3.4 vs 3.1%, $p=0.003$ ）もβ-カロテン投与群で有意に増加した。一方、脳血管障害（2.3 vs 2.3%, $p=0.92$ ）については差が認められなかった。これらの解析結果から著者らは、β-カロテンを含むサプリメントを用いた介入試験については中断すべきであると提唱している。また、ビタミンEについては、*in vivo*で潜在的な抗酸化物質としての効果を支持するメカニズムが明確でないことを考え合わせ、ビタミンEの常用は推奨できない。さらに、心臓病に対して高いリスクを有する患者にビタミンEの予防効果を検証する介入試験についても将来にわたり実施すべきではないとしている。

今後も、ビタミンEやβ-カロテンなどの抗酸化ビタミンに限らず、様々な食品素材から新しい成分が、「生活習慣病」に対して予防的な機能を有するものとして注目を集めるであろう。しかしながら、喫煙者などの生活習慣病高リスク群に対する2次予防だけでなく、健康な人を対象とした1次予防の場合も含め、これら機能性成分あるいは食品素材の疾病予防効果が科学的根拠を伴ってどこまで証明できるかが、機能性食品が認められ、定着していく鍵になるものと思われる。

（抄訳：神野修次, JINNO Shuji, 日本水産株式会社中央研究所）

◀海外便り▶

ストレス応答機構の細胞周期への影響 —パターソン癌研究所での1年間—

独立行政法人 食品総合研究所
濱 松 潮 香

1. はじめに

2002年4月からの1年間、食品総合研究所職員長期在外研究制度により、英国マンチェスターにあるパターソン癌研究所にて在外研究を行う機会を得た。独立行政法人化後の海外留学の第1号として、上記制度の規定など関係各位にご迷惑をおかけしながら、直前に決裁を頂いての出発となった。

マンチェスターは、英国北西部にある英国有数の都市である。産業革命やコンピュータの発祥地であり、英国が不況であった時代の大波をかぶった古い工業・貿易都市でもある。近年はグレーターマンチェスターとして、ロンドン同様周辺の街々が集合して1つの行政区を作っている。湿度の高い英国の中でも一番降雨量が多いことでも有名であり、地元の人達もしばしば雨の話題をジョークにしていた。滞在した2002年は、イギリスではエリザベス女王戴冠50周年Golden Jubileeであり、また、その栄えある年に開催されるCommonwealth game (英連邦での小オリンピックのようなスポーツ祭典)がマンチェスターで開催され、開会式では地元プロフットボール・マンチェスターユナイテッドのDavid Beckhamが最後の聖火ランナーに付き添って現われ、女王陛下が開会を宣言し、大変華やかな発会となった。

HAMAMATSU Shioka

〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

2. パターソン癌研究所

滞在したパターソン癌研究所 (<http://www.paterson.man.ac.uk/>) は、英国の癌研究基金の研究所の1つであり、学生などすべて含めて総勢200人程度、15の研究グループ

があり、研究所の規模は小さいが、世界でも初めて癌の放射線治療をしたという歴史のあるNHS癌専門病院Christie Hospitalに付属して建てられている。私の受け入れ先のIain Hagan教授は、マンチェスター大教授を兼任しており、丁度1

年前にパターソン研究所に研究室を移動してきたところであった。学生や大学側で雇っていたポストドク、パターソン研究所で雇ったポストドク等を含め常時11人程度であった。同じ研究所の基礎研究をしている研究室では比較的大きなグループであり、分裂酵母を用いた細胞周期制御におけるキナーゼ群の遺伝学的・生化学的な研究を行っている。分裂酵母によるこの分野の研究が日本でも盛んであることから、Hagan教授は京都でポストドクとして働いた経験もあり、日本語も話し、日本に対し、大変親しみがあつた。研究室も人数が多いと共に、国籍もそれぞれで、日本、デンマーク、ハンガリー、エストニア、オーストラリア、中国(香港)、スペイン、アメリカで、イギリス人は学生数人とポストドク1人という研究所の中でも国際色豊かな研究室であった。また、研究所内の日本人は、滞在時が



写真1 パターソン癌研究所

偶然とても多い時期に重なったのだが、6人のポストドクと1人のグループリーダーが在籍しており、イギリス人について多いのは、スペイン人か日本人かという冗談もあった。しかし、帰国して4カ月ほど経った現在は日本人は3人しかおらず、そのうち2人も近いうちに他へ移るらしいということで、一気に少なくなるようである。

3. 在外研究

私の担当したプロジェクトは、Hagan教授と同研究所のグループリーダー兼研究所長のNic Jones教授との共同研究のプロジェクトとして設定された。どちらも分裂酵母を材料として細胞周期研究をバックグラウンドとしており、Jones教授は細胞の細胞毒性や遺伝毒性を持つストレスの応答制御機構を、Hagan教授は細胞周期制御の制御キナーゼの働きについて研究していたことから、2人とも機会があるときにはその関連がどこにあるのかについて討論し、それぞれに興味はあったらしい。しかし、今回が初めて真っ向からの共同研究プロジェクトであった。私は、Hagan教授の豊富な細胞周期変異株のストックを利用して免疫蛍光顕微鏡技術を用い、そのストレス応答を調べたり、Jones教授のストレス応答機構の中心的な役割を果たすストレス応答性MAPキナーゼの変異株と細胞周期変異株との二重、三重変異株を作成して、ストレス応答を見るという古典的で、それでもなぜか他の人はやっていない基本的で地味な仕事であった。しかし、マーカー遺伝子が少ないことやプラスミドの性質の違いで、分裂酵母が出芽酵母とはかなり異なるということを実感するうちに、「他の人がやっていない」難しさが身に染みることとなった。



写真2 病院を慰問に訪れた女王と花束を渡した小さなSarah

子供は、病院職員の子供のための付属保育所に通った。Sarahは子供と同じクラスで、いつも一緒に遊んでいた大変可愛い子である。

ストレス応答性MAPキナーゼ (*sty1/spc1/phh1*) 遺伝子は、何気ない実験中の操作でもストレスとして感知し、その転写が活性化される。その遺伝子欠損株は致死ではないがあらゆるストレスに弱く、細胞周期のG2期停止を起こして細胞が長く伸びてしまうのである。この細胞が伸びるのはなぜなのか？ が興味の対象であったわけだが、まずはストレスの影響の少ない条件づくりが必要であった。さらにこれに細胞周期調節変異の二重、三重変異株となると、何が起こるか予想

がつかない。ストレス感受性株は、扱う相手にもストレスの元となりつつも、何とか扱いを会得し、結果として起こる現象を把握できるようになった。そうしたなかプロジェクトに参与していたJones教授側の方がカナダに帰国することになり、途中から定期的に所長室で分裂酵母研究の英国での重鎮である教授2人を相手に経過報告とディスカッションするという恩恵にも浴した。

ストレス応答に関する研究は、いかに細胞にとって世の中がストレスに満ちているかということを変更して考察する場であった。最後にさしかかって確かな

手応えのあるデータが続いて出たことで、現在Hagan教授は新たにストレス応答と細胞周期調節プロテインキナーゼの影響についての研究を特に集中して進めていると聞いている。地道な仕事ではあったが、1つのブレイク・スルーとなったことは嬉しいものである。

4. イギリスにおける研究の交流

研究所では、実に多くのセミナーが開かれていた。毎週研究グループ持ち回りで研究紹介をしております(昼食時、お茶・お菓子付き)、他にも夕方には地元大学や招待したEU内の

研究者のセミナーもほぼ毎週ある。グループリーダーへの応募者だけでなくポストドク応募者のセミナーもあれば、年に一度研究所全体での泊まりこみの研究発表会もあり、さらにバターソン研究所が所属するCancer Research UKの3研究所合同の研究発表会（これも泊まりこみ）もあった。分裂酵母の研究分野では、ロンドン近郊でEU諸国からも研究者が集まる隔月での研究集会があるのだが、12月にはバターソン研究所でロンドン以外で初めて開かれた。その他にも、バターソン研究所は大学ではないが、所属する学生達の3カ月や1、2年目などの区切りでの研究発表会があり、この他にも研究室それぞれで週に1度はミーティングがある。もちろん研究所全体が癌研究ということで共通する部分が多いのであろうが、こうした交流の機会が多いというのは、研究の場でも生かされ、試薬や機械の貸し借りが容易になり、お茶を飲みに行った休憩室で、顔だけ知っている人との何気ない会話から研究の話へと自然に移っていき、討論や情報交換ができるというメリットもあった。この他にも国内、EU諸国での研究集会や学会は多く、研究を基本とした人の交流は、研究所内だけでなくイギリス国内全体、EU諸国全体と広がることになり、

研究において人との付き合いや自分の研究をうまく発表できることが重要であることが、研究所にいただけでも実感できる。これらのことから、日本が言語的にも地理的にも（精神的にも？）離れた場所にあるとつくづく感じさせられた。

5. おわりに

滞在した2002年から2003年は、世界的なテロ活動の活発化やイラク戦争があり、イギリス国内でもテロ警報が出たことがあり、地下鉄テロの未遂事件やこれに関する逮捕で警官が死亡するなど（これはマンチェスターで起きた）暗い影もさしていた。また、イギリスはヨーロッパでも盗難の被害件数は有数で、昼間の研究所前的大通りでの車上荒らしを目撃したり、住んでいたフラットの窓を割られる事件なども起こった。これらは日本では感じられない世界の現実であったと思う。

日本とは異なる環境での体験は、研究においても、生活においても、大変貴重な経験となった。このような在外研究の機会を与えて頂いた食品総合研究所企画調整部、研究室の方々はこの場を借りて深くお礼を申し上げます。

編集後記

第99号をお届けします。本号の総説には、遺伝子組換え技術を利用した新機能食品の開発について取り上げました。特に日本人の主食である米を中心に研究開発の最前線をご紹介します。その概要を高岩文雄氏（独立行政法人 生物資源研究所）に紹介して頂いた。これらの研究は当方の新事業創出研究開発事業で実施している研究課題でもあり、今後実用化が期待されます。

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。ブレインテクノニュースも今回で99号、次号はいよいよ100号です。

既にご存知の方も多いかと存じますが、生物系特定産業技術研究推進機構は10月1日より独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構として再出発いたします。現在の業務は新法人に引き継がれ実施されます。今後ともよろしくお願いいたします。（吉ざわ記）

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ください。

ブレインテクノニュース（第99号）

平成15年9月30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