

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成17年 3月15日発行 (隔月 1回15日発行)

ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.108

15 MARCH, 2005

ブレインテクノニュース



エリンギにおける担子胞子形成欠損突然変異株の作出

長野県農業総合試験場 バイオテクノオジー部

角 田 茂 幸

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構

生物系特定産業技術研究支援センター (生研センター)



目 次

総 説

- イネゲノム全塩基配列の解読完了と今後の課題 1
 佐々木 卓治 ((独)農業生物資源研究所 ゲノム研究グループ長)

国内情報

- シロイヌナズナの根における幹細胞ニッチの制御機構 4
 相田 光宏 (奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科)
- 化学発光法による食品の生菌検査 8
 山庄司 志朗¹・川崎 晋²・川本 伸一²・浅川 篤³ (¹株式会社 日研生物医学研究所, ²(独)食品総合研究所, ³アトー株式会社)
- ミヤコグサのゲノム分析に基づくプラスチド局在性の根粒・菌根形成初期シグナル因子の発見 12
 川崎 信二・今泉 温子・村上 泰弘 ((独)農業生物資源研究所 生理機能研究グループ)
- 家畜遺伝情報の産業利用へ向けて—牛肉の質と豚のインフルエンザウイルス抵抗性— 18
 三橋 忠由 ((独)農業生物資源研究所 生体機能研究グループ 動物遺伝子機能研究チーム長)
- 紫外線照射による穀物殺菌技術 24
 日高 靖之 ((独) 農業・生物系特定産業技術研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター)

地域の先端研究

- エリンギにおける担子孢子形成欠損突然変異株の作出 28
 角田 茂幸 (長野県農業総合試験場 バイオテクノロジー部)

文献情報

- 出生後2日以内に死亡したクローンウシの臓器における遺伝子発現の異常 32
 S. Li et al. (*Biology of Reproduction*, 72, : 258-265, 2005) 抄訳: 下司 雅也
- タイセイヨウマダラの激減に先立って見られた成熟傾向における急速な進化 33
 E. M. Olsen et al. (*Nature*, 428, 932-935, 2004) 抄訳: 岡本 崇
- ワイン醸造における酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の酸素消費量, および発酵量への影響 ... 34
 E. Rosenfeld et al. (*Applied and Environmental Microbiology*, vol.69, 113-121, 2003)
 抄訳: 安達 美和
- カリウム欠乏のプロテオーム解析 35
 J. G. Kang et al. (*Proteomics*, 4, 3549-3555, 2004) 抄訳: 岩井 純夫

- 生研センターからのご案内 (研究開発を対象にした一般・特別融資制度のご案内) 36

表紙の説明

エリンギ栽培において、エリンギから発生する胞子は人間に胞子アレルギーを起こさせたり、栽培施設を汚染するなどの問題を引き起こす。長野県では、紫外線照射処理を行ったエリンギ約2500株を検索し、その中から担子孢子形成欠損株を1株得ることができた。図の上段は、胞子が黒い紙の上に落下するか否かの検索(中央の子実体からは胞子の落下がない)、下段は担子孢子形成欠損株の写真である。詳細については、28頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

イネゲノム全塩基配列の解読完了と今後の課題

独立行政法人 農業生物資源研究所 ゲノム研究グループ長
佐 々 木 卓 治

基幹食料「コメ」を産み出す植物「イネ」の全遺伝情報の完全解読が終了した。しかし、この情報獲得は「終了」ではなく、イネの科学的研究の「はじまり」であり、厳しい国際的競争研究の場に、従来は地域性の色濃いイネが否応なく登壇させられたことを意味する。この機会を好機と捕らえるか、危機と捕らえるか、わが国の研究者集団の才能を引き出す研究戦略の企画立案が重要になる。

1. はじめに

2004年12月、7年間にわたる努力が実を結んだ。国際イネゲノム塩基配列解読プロジェクト(IRGSP)による「日本晴」ゲノム塩基配列が完全解読されたのである。ここに至るには幾多の山坂があった。国際協力体制の確立、最新技術の習得、多額予算の確保、他の組織との競争と調和など、この研究に携わることで初めて経験する局面ばかりであった。しかし、これらを通して多くを学ぶことができた。イネ研究はともすればわが国内で完結すると考えていた人々にとって、ゲノム塩基配列解読はわれわれが国際舞台に立つことだと認識を改めさせた。今後わが国のイネ研究や植物研究が世界に認められるのか、それとも己が井蛙であることを思い知らされるだけで終わるのかは、いかに多くの才能を次々に国際舞台にデビューさせられるかにかかっている。本稿では塩基配列情報からみたイネゲノム構造の特徴と、それに基づく今後のイネ機能解明にむけた戦略を述べる。

2. 配列情報の概要

IRGSPが獲得したゲノム塩基配列の特徴は、BACやPACといったクローンを、遺伝解析により正しくゲノム上に場所を定めたDNAマーカー

SASAKI Takuji
〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2

カーを使って特定し、各12本の染色体上に整列化した地図(物理地図)を作製し、その後これらのPAC/BACの塩基配列を99.99%以上の精度で決定したことである。この方法はホールゲノムショットガン法とよばれる、物理地図作製過程を省略して、多数のランダムなゲノム塩基配列の共通部分を探して重ねあわせ連結する方法に比べると時間や経費がかかるが、得られた配列情報の正確さとそれに伴う使用範囲ははるかに広い。後述する遺伝解析や遺伝子破壊法による遺伝子単離戦略の拠り所となるだけではなく、今後の重要課題となる、配列を比較することによる新たな遺伝要素の発見や遺伝子発現制御配列の解明、あるいはイネ科植物全体のゲノム構造の理解のために必須なデータベース構築の情報資源となる。今回の解析の結果、イネ「日本晴」のゲノムは3億9千万塩基対から成ること、遺伝子数は4~5万個であること、染色体上で類似遺伝子の約30%が並列して重複していること、いくつかの染色体間で重複がみられること、第4と第8染色体のセントロメアにおける繰り返しの構造単位CentOの数と配置が大きく異なること、テロメア隣接領域は解読した約半数については特にトランスポゾンが多いなどの特徴はないこと、などが明らかになった。また、単純繰り返配列(SSR)やインディカ品種との配列比較により一塩基多型(SNP)の存在箇所など、今後育種選抜に利用できる情報も収集した。詳細は近々論文として出版される

予定なのでご覧いただきたい。

3. 機能解析への利用

まず、多くの研究者が高い関心をもつ、形質に対応した遺伝子の遺伝学的手法による同定であるが、高精度ゲノム塩基配列の獲得と相俟って、わが国で多くの成功事例が報告されはじめた。世界におけるわが国の本分野のレベルは高い。ゲノム塩基配列情報の獲得以前にも病原抵抗性遺伝子、*Xa1*や*Pib*の単離といった先駆的業績はあったが、時間もかかり、特別な技能集団でのみ可能な研究と考えられていた。しかし、これらの経験の公開・伝授と遺伝マーカーの充実、ならびにゲノム塩基配列が徐々に公開されるにしたがって、イネの草丈や草型に関連する遺伝子、*d1*、*d2*、*d11*、*sd1*、*gid2*、*moc1*や稔性回復遺伝子*Rf1*などの単離が続々と報告され、それらの分子機能の詳細な研究が開始されている。さらに特筆すべきは多くの遺伝子産物がネットワークを形成して現れる表現型の分子遺伝解析の成功である。この表現型はQTL（量的形質）とよばれ、統計遺伝学的には従来から詳細な解析が行われていたが、遺伝子の実体は不明であった。戻し交配による染色体置換系統群の作出と、それらを利用したDNAマーカーによるQTL存在領域の正確な判定により、単一遺伝子としての単離戦略が適用でき、ゲノム塩基配列情報の利用等により材料作出に費やされた努力が報われ始めた。形質の重要性と評価の確実性から出穂期（開花期）QTLのうち、感光性遺伝子が対象に選ばれ、これまでに*Hd1*、*Hd3a*、*Hd5*、*Hd6*、*Ehd1*、および*Lhd4*が単離され、それらの遺伝子産物の特性や相互の遺伝的関係、あるいは長日植物であるシロイヌナズナの感光性遺伝子との類似性の比較研究が詳細に行われている。特に1個の遺伝子の突然変異ではなく、各品種の当該遺伝子に存在するわずかな配列上の差異を検出する、QTLに基づく遺伝子検出法は多くの農業上重要な形質について汎用性が高い。実際に、イネ感光性遺伝子の

同定に用いられたのと同様な戦略によって、いもち病圃場抵抗性、低温発芽性、穂ばらみ期耐冷性、あるいはアルミニウム耐性に関連する遺伝子の単離・同定が着々と進んでいる。結果の公表が待たれる。また、これからは遺伝解析の対象となる多様な品種あるいは近縁野生種などの遺伝資源の整備と利用が要点となる。

遺伝解析法以上にゲノム塩基配列情報に依存している遺伝子機能同定法が、逆遺伝学解析法である。イネに関して、これまで人工的に遺伝子を破壊する方法として化学変異剤、アグロバクテリウムを介したT-DNA導入、トウモロコシ由来のトランスポゾン*Ac/Ds*の利用と並んで、わが国で独自に発見されたイネ固有のレトロトランスポゾン*Tos17*が利用されている。いずれの方法を用いる場合も変異箇所を正確・迅速に同定し、表現型と関連づけたデータベース作製が要点となる。外来遺伝子導入イネの厳しい栽培規則により、わが国では*Tos17*以外の生物的因子利用は実際的でない。イネ品種「日本晴」は偶然*Tos17*の転移が適度に起こる品種であり、ゲノム塩基配列決定にも用いられており、挿入部位情報は正確に得られる。これまでに約5千系統について合計約5万件の*Tos17*挿入部位隣接塩基配列が決定されており、また、表現型の調査も約3万系統行われているので、これらをまとめたデータベース構築が今後重要になる。隣接配列に関しては今後さらに解析数を増やす計画になっており、今後この分野の国際競争の激化を考えると、早期完了が望まれる。*Tos17*の転移は細胞培養時に起こるために、培養に伴う*Tos17*転移以外の諸々の染色体変異は避けられず、今後遺伝子破壊率を上げるために、培養を介さない手段の併用、例えば放射線や化学変異剤による変異系統の作出と変異箇所解析データベースの整備が望まれる。*Tos17*による遺伝子機能同定例の論文報告はまだ少なく、関係者の一層の努力に期待したい。

4. 育種への利用

育種への利用として、まず考えられるのは交配後代から望ましい形質を選抜する際に用いるDNAマーカーの設計である。マーカーの設計には配列上の多型情報が豊富であることが望まれる。今回高精度解析が行われたのはジャポニカ品種「日本晴」であるが、最近インディカ品種「93-11」塩基配列の改訂版が公開された。こちらはホールゲノムショットガン法により得られた情報であり、各集合配列のゲノム上への帰属については注意を要する。ジャポニカとインディカ間では部分的にゲノムに挿入・欠失が存在するといわれているが、現時点では正確な情報はなく、インディカ・ジャポニカ間の配列多型を利用してDNAマーカーを設計する場合には、まず「日本晴」の配列を下敷きにして、「93-11」の配列のゲノム上での存在箇所を推定するしかない。別のインディカ品種「カサラス」については、そのBACライブラリー中のクローンの末端塩基配列78,000個を「日本晴」配列を下敷きにしてゲノム上に配置し、主に1塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) の存在頻度を求めているが、情報量は十分ではない。ただ、手法としてBACライブラリーの構築と末端塩基配列の獲得が行われれば、信頼度の高い物理地図が迅速に作製できることを示しており、今後多様な品種において利用できる。

ジャポニカ品種間での多型頻度は、その育種された地域と歴史からみて高いとは思えない。このような状況下であってもDNAマーカーを育種選抜の手段として利用し、育種精度と達成速度を上げるためには、SNPの利用しかないで

あろう。ただし、上述したようにインディカを含めても、SNP情報の収集は十分ではない。わが国では来年度から開始される農水省の新規プロジェクトで、ゲノムワイドではないが、これまで同定された感光性遺伝子など、重要な形質についてSNPの収集を行う計画である。これは品種間での塩基配列の自然変異とその変異が育種の過程でどのように集積されたのか、あるいは連鎖不平衡が観察されるのかといった新たな研究の一環として行われる。国際的にも各国では、それぞれの地域性の高い品種間での多型を得るために、やはりSNPの収集を企画しており、ここ数年の間に育種目的に利用できるSNPデータベースが構築されよう。

5. おわりに

イネ「日本晴」ゲノム基準塩基配列の解読は成功裏に完了した。この情報は上述した以外にもイネ科穀類から植物全般の広範囲にわたる比較ゲノムあるいは情報解析など、これからの科学研究の基盤となる。そこからどんな新しい研究が誕生するか楽しみでもあるし、また一方、わが国が海外に先んじられるのではないかとという不安もある。わが国では残念ながらイネ研究者以外の穀類研究者層は薄く、海外に主導権をとられがちである。唯一イネについては、ここ数年間の研究の発展は目覚ましいものがある。真剣に研究に取り組んでいる研究者には、女神が微笑むことを我々は知っている。これからの5年、あるいは10年間は国際的なイネ研究の進展が確実に期待できるのであり、わが国の多くの研究者の姿がその第一線にあることを信じて本稿を終える。

◀国内情報▶

シロイヌナズナの根における幹細胞ニッチの制御機構

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科
相 田 光 宏

高等植物の根の成長は、根端分裂組織に存在する少数の幹細胞に大きく依存する。幹細胞の活性維持には、ニッチと呼ばれる周囲の微小な細胞環境が重要であることが多くの例で知られている。シロイヌナズナの根では幹細胞群に隣接する静止中心が、ニッチの主な構成要素として幹細胞の維持に働く。静止中心の機能に重要な因子とそれらの相互作用の解析から、根の幹細胞ニッチの位置決定メカニズムについて、重要な示唆が得られた。

1. はじめに

高等植物の体を構成する器官は、大きく地上部のシュートと地下の根に分けられる。シュートは葉や花を含み、それぞれ光合成と生殖に機能する。また、根は地下に張り巡らされて水分・養分の吸収に働くとともに植物体を支える。種子から発芽したばかりの芽生えは、子葉・胚軸・幼根という、ごく少数の器官しか持たないが、その後植物体の成長と共に多数の器官が形成される。このような、一生にわたって新しい器官を作り続けるという発生様式は植物の重要な特徴の一つであり、一般的な動物の発生様式とは大きく異なっている。発芽後に行われる器官形成では、植物体の上端部と下端部にそれぞれ存在する茎頂分裂組織と根端分裂組織が主要な役割を果たす(図1)。分裂組織では細胞が盛んに増殖し、新しい器官・組織が植物体に付け加えられていく。分裂組織がどのようにして決まった位置に形成され、またその後の発生においてどのように維持されているかは、植物の発生・成長を理解するうえで重要な問題である。

それぞれの分裂組織は幹細胞(stem cell)を含む。幹細胞は分裂を繰り返し、自身を未分化な状態に維持しながら、分化する細胞を長期にわたって生み出し続ける。シロイヌナズナの根

AIDA Mitsuhiko

〒630-0192 奈良県生駒市高山町8916-5

端分裂組織では、静止中心と呼ばれる特殊な細胞群の周囲を幹細胞がぐるりと取り囲む(図1, 右)。幹細胞の分裂により、静止中心の側方および下方に生み出された娘細胞は、根冠の細胞に分化し、分裂組織の保護に働く。一方、静止中心の上側に生み出された娘細胞は数回分裂を繰り返した後、根の本体を構成する細胞に分化することで、根の成長に寄与する。幹細胞の活性維持には周囲の微小な細胞環境が重要な役割を果たしていることが、動物および植物の多くの例で報告されており、この微小環境のことを幹細胞ニッチ(niche)と呼ぶ⁵⁾。シロイヌナズナの根の場合は、静止中心が幹細胞ニッチの主要な構成要素であると考えられている。このことは、静止中心の細胞をレーザーで破壊した植物体や、突然変異により静止中心の機能が損なわれた植物体では、根の幹細胞が維持されずに分化してしまうという実験結果に基づく^{1, 3, 6)}。シロイヌナズナの突然変異体を用いた解析から、静止中心の形成に働く主要な因子が同定され、それらの因子の相互関係の解析から、根の幹細胞ニッチを調節するメカニズムの一端が明らかになった。

2. *SHR*・*SCR*遺伝子とオーキシンの役割

静止中心と幹細胞は胚発生において、胚の基部側の決まった位置に形成される(図1, 左)。

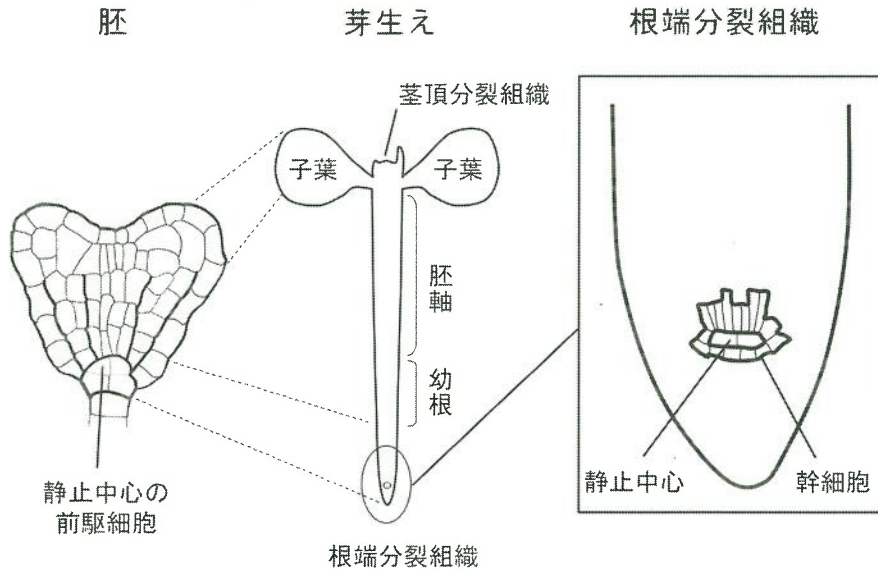


図1 根の幹細胞ニッチの形成過程

これまで、静止中心の形成・維持に働く因子として、GRASファミリーに属する転写因子型タンパク質であるSHORT-ROOT (SHR) と SCARECROW (SCR)，および植物ホルモンであるオーキシンが知られていた (図2)。SHRとSCRのどちらか一方が突然変異により損なわれると、正常な静止中心が形成されず、その結果幹細胞がすべて分化して根の成長が停止する。このことから、これらの遺伝子が静止中心の形成、ひいては根の幹細胞の維持に必須であることが分かる³⁾。SHRおよびSCRの発現パターンと両者の相互作用の解析から、静止中心

の位置決定メカニズムについて重要な示唆が得られた²⁾。まず、SHRの転写および翻訳は静止中心そのものでは起こらず、すぐ上の中心柱と呼ばれる領域で行われる (図2左)。合成されたSHRタンパク質は静止中心を含む一層外側の細胞層へ移動し、この領域でのSCR遺伝子の転写を活性化する。そして、SCRの発現領域に含まれる細胞のうちで最も下端に位置する細胞が、SHRとSCRの活性により静止中心の性質を付与される。以上のことから、中心柱で合成されたSHRタンパク質が一層だけ外側へ移動することが、静止中心の位置の主要な要因の一つ

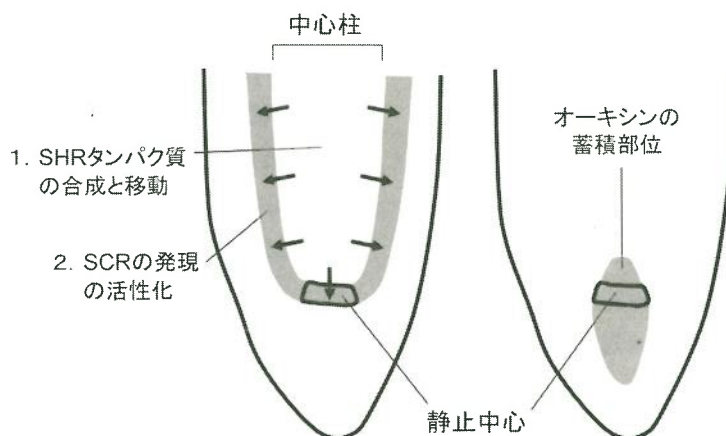


図2 SHR・SCRの発現領域とオーキシンの分布

であると考えられる。

一方、オーキシンは胚および発芽後の根端分裂組織において、静止中心を含む領域に蓄積すること（図2右）、およびこの蓄積のパターンは極性輸送と呼ばれる細胞間の輸送システムに依存していることがわかっている¹¹。高濃度のオーキシンや極性輸送阻害剤の処理により、オーキシン分布が根端部の広い範囲に広がるが、このとき静止中心が異所的に形成される。そして、この異所的な静止中心が形成される領域はちょうど中心柱の一層外側の細胞層、つまりSCRの発現領域と一致する。これらのことから静止中心の形成は、SCRの発現領域とオーキシンのピークがちょうど重なったところで起こることが示唆される。しかし、オーキシンの下流でどのような因子が働いているかは不明であった。

3. 幹細胞ニッチの新しい制御因子 PLETHORA

筆者はオランダユトレヒト大学のBen Scheresのグループと共にPLETHORA1および2(PLT1, PLT2) 遺伝子の解析をおこなった¹²。これらの遺伝子はどちらもAP2/EREBP転写因子ファミリーに属するタンパク質をコードしており、胚発生期には静止中心を含む基部側の領域で発現し、発芽後の根端分裂組織では静止中心と周囲の幹細胞で発現する。PLT1やPLT2の単独変異体は、野生型に比べて根の成長がごくわずかに遅いものの、静止中心と幹細胞の活性は野生型と同様に長期間維持されていた。ところが、両者の二重変異体では根の成長が極端に遅くなり、発芽後8日目までには根端分裂組織のすべての細胞が分化して成長を停止した（図3A）。また、根の成長停止に先立って、静止中心特異的マーカーの発現の減少あるいは消失が見られた。これらのことは、PLT1とPLT2が機能的に重複した遺伝子で、正常な静止中心の形成に必須であることを示している。

続いてPLTとSHR・SCRとの関係について調

べた。まず*plt1 plt2*二重変異体の根ではSHRおよびSCRともにほぼ正常に発現しており、両遺伝子の発現にPLT1とPLT2が必須ではないことが分かった。また、逆についても同様で、*shr*変異体および*scr*変異体においてPLT1の発現がみられた。さらに*plt1 plt2 shr*三重変異体は、*plt1 plt2*二重変異体や*shr*単独変異体よりもさらに早く根の成長が停止した。同様のことは*plt1 plt2 scr*三重変異体でも観察された。これらの結果は、一方の経路、例えばPLT1・PLT2が変異により消失しても、他方の経路であるSCR・SHRの活性は残っており、逆にSCR・SHRの経路が消失してもPLTの活性が残っていることを意味している。以上から、PLTの経路とSHR・SCRの経路は独立に根の幹細胞ニッチの形成を促進することが示唆された。

次にニッチの形成に関与するもう一つの経路であるオーキシンとPLTとの関係について検討した。PLT1・PLT2の発現パターンとオーキシンの蓄積パターンは、完全には重ならないものの、静止中心の近傍においてピークを示すという点で良く似ており、何らかの関連が予想された。そこで、まず根を高濃度のオーキシンで処理すると、PLT1・PLT2共に発現の上昇が見られた。また、オーキシン誘導性の遺伝子発現を仲介する転写因子であるMONOPTEROS (MP) の変異体の胚においては、PLTの発現が維持されずに途中で消失した。これらのことから、PLT遺伝子の発現がオーキシンに依存していることが示唆される。また、*plt1 plt2*二重変異体に高濃度のオーキシンで処理しても、静止中心および幹細胞の活性は回復しなかったことから、オーキシンがPLT1およびPLT2を介して幹細胞ニッチの形成を促進することが示唆される。さらにPLTを胚全体で恒常的に発現する形質転換体を作製したところ、植物体全体で静止中心マーカーの発現を伴った異所的な幹細胞ニッチがスポット状に形成された（図3B）。そして、この異所的なニッチでは、根端分裂組織で特異的に発現するオーキシン誘導性

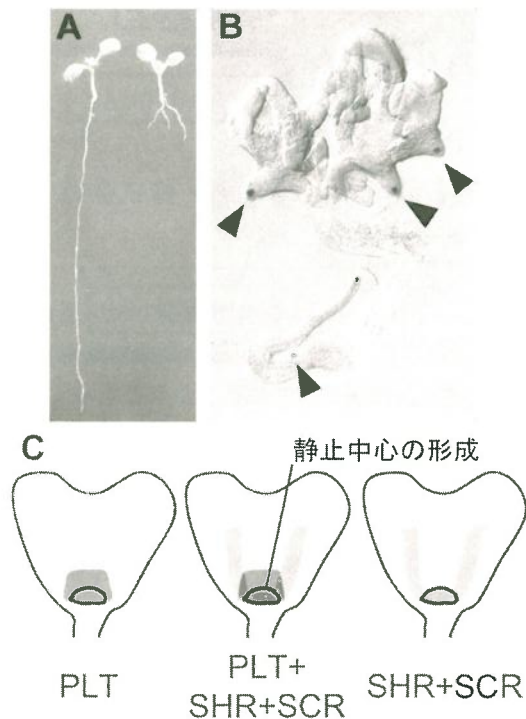


図3 *PLT*遺伝子の機能

(A) 野生型 (左) および *plt1 plt2* 二重変異体 (右) の芽生え。(B) *PLT1* を恒常的に発現させた植物体。濃く染まって見えるのは、異所的な静止中心マーカーの発現部位 (矢尻)。(C) 胚における静止中心形成のモデル。

遺伝子 *IAA2* の発現が起らなかったことから、*PLT* によるニッチの誘導はオーキシンの蓄積や応答を必要としないことが示唆された。以上の結果は、*PLT* がオーキシンの下流でニッチの形成に働くことを支持するものである。

以上をまとめると、根の幹細胞ニッチの主要な要素である静止中心の位置は、主に二つの経路によって決定されると考えられる (図3C)。一つは *PLT1*・*PLT2* の経路で、これらの発現領域はオーキシンの依存して決定されていると考えられる。もう一方の経路は *SHR*・*SCR* で、こちらは中心柱で合成された *SHR* タンパク質が一層外側へ移動することが重要である。そし

て、これら二つの経路が重なる場所で静止中心の形成が誘導される。

4. おわりに

以上、根の幹細胞ニッチの形成に関わる主要な因子とそれらの相互関係について概説した。*PLT*, *SHR*, *SCR* は全て転写因子型タンパクをコードしていることから、今後はこれらの因子の下流で働く遺伝子の同定と機能の解析が、幹細胞ニッチの分子の実体を明らかにするために極めて重要であると考えられる。また、オーキシンの不等分布がどのようにして *PLT* の発現領域に変換されるかについては、おそらく *MP* が関与していると思われるが、詳しいことは今後の解析を待たねばならない。オーキシンを介したシグナル伝達は、根の幹細胞ニッチ以外にも、初期胚やシュートの器官のパターン形成、維管束の分化、側根の形成など、様々な場面で繰り返し用いられており、高等植物の形態形成に欠かせない発生上のツールキットとなっている。*PLT* の発現を制御するメカニズムの解析は、オーキシンの基づいたパターン形成機構の問題を考える上で、よいモデルケースとなるであろう。

文 献

- 1) Aida, M. et al. (2004), *Cell*, 119, 109-120
- 2) Nakajima, K. et al. (2001), *Nature*, 413, 307-311
- 3) Sabatini, S. et al. (2003), *Genes Dev.*, 17, 354-358
- 4) Sabatini, S. et al. (1999), *Cell*, 99, 463-472
- 5) Sablowski, R. (2004), *Trends Cell Biol.*, 14, 605-611
- 6) van den Berg, C. et al. (1997), *Nature*, 390, 287-289

◀国内情報▶

化学発光法による食品の生菌検査

¹株式会社 日研生物医学研究所, ²独立法人 食品総合研究所, ³アトー 株式会社
山庄司 志朗¹・川崎 晋²・川本 伸一²・浅川 篤³

細菌の培養液にキノンを投与すると、膜および細胞質に存在するNAD(P)H：キノ還元酵素がこれを還元する。さらに還元されたキノンによって、培地の溶存酸素は活性酸素に還元される。この一連の反応は数分で最大になり、発生した活性酸素は化学発光反応で数秒以内に定量できる。化学発光の強度は生菌数と比例することから、食品のための迅速な生菌測定法として化学発光法が開発された。

1. はじめに

生きて細菌の数を測定する方法として、寒天培地に菌液を混ぜ、数十時間後に形成されるコロニーの数を計測する方法が最もよく使用されている。ひとつの細菌が増殖して、目視観察できるコロニーまで増殖する間の数十時間は、多くの食品会社の品質管理部門・製造部門・流通部門にとっては、大きな負担である。新鮮な食品をもとめるユーザーと、早く安全を確認したいメーカーにとって、迅速な細菌検査の確立は、共通の課題でもある。

これまで、多くの迅速方法が提案され、商品化されてきたが、公定法と新規の迅速方法を並行して行える体力のある会社でしか普及していない。また、HACCPの普及に伴い、製造や流通の各工程での細菌検査のニーズが大きくなりつつあるが、製造や流通のスピードに公定法が追いついていけないのが現状である。HACCPの達成のために、自主的な迅速細菌検査方法を大企業だけでなく中小企業ももっている。

公定法と並行して行う自主的細菌検査法は、低コスト、簡便性、迅速性がもとめられている。

YAMASHOJI Shiro¹, KAWASAKI Susumu²,
KAWAMOTO Shin-ichi², ASAKAWA Atsushi³

¹〒613-0046 京都府久世郡久御山町大橋辺堤
外縁23番地

²〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

³〒113-8425 東京都文京区本郷1-25-23

このようなニーズに応えるために開発された化学発光法は、10分で測定でき、1検体のコストが1枚のディスクタイプのシャーレよりも安く、培地容量も100分の1以下であり、コンパクトに測定できる特色を持っている。毎日、検査によって廃棄される培地や容器の削減が、環境への負荷の低減につながることから、化学発光法はこのような時代のニーズにも合致していると考えられる。

2. 測定原理

細菌は他の生物と同様に、呼吸によるエネルギー代謝で増殖を可能にしている。細菌の呼吸の場合は、酸素以外に硝酸イオン、硫酸イオン、炭酸イオンなどの無機物や有機物を電子受容体として利用している。そして、電子伝達系には、フラビンタンパク質、補酵素Q、チトクロムが関与しており、特に補酵素Qとしてさまざまなキノンが機能している。

このような細菌の電子伝達系に外部からキノンであるメナジオンを添加すると、図1のように細菌内部のNAD(P)HとNAD(P)H：キノ還元酵素 (EC1.6.99.2) により、メナジオンが還元され、メナジオール (2電子還元生成物) やセミキノン (1電子還元生成物) ができる。これらからさらに培地の溶存酸素に水素および電子が移動し、活性酸素が発生する¹⁾。更にルミノールを加えると、活性酸素はルミノールと

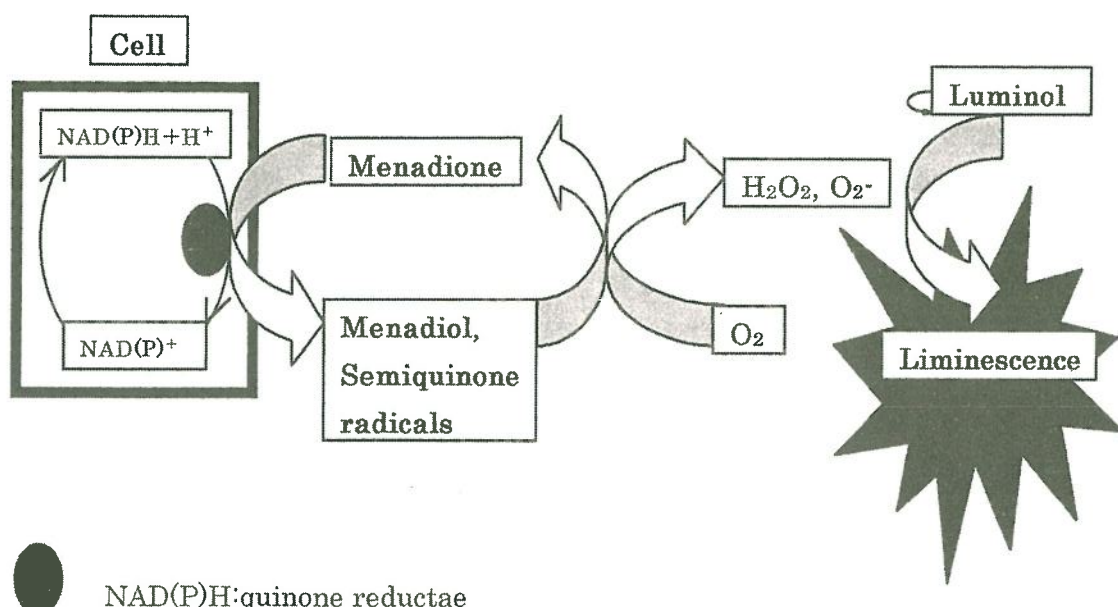


図1 メナジオンを介した細菌による活性酸素の生成とルミノール発光反応

反応し発光する。このときの発光強度は生菌数と比例する²⁾。

しかし、細菌がNAD(P)Hを持続的に生産する能力と、NAD(P)H:キノン還元酵素の活性を維持できる環境が細胞内外で整わないと、細菌から溶存酸素へのメナジオンを介した電子伝達が行われぬ。例えば、細胞膜の機能を破壊すると、速やかに活性酸素の生成が停止し、分単位で活性酸素依存の化学発光が減少するのが観察される¹⁾。また、タンパク質合成阻害物質によっても、時間単位で化学発光が減少する¹⁾。前者の場合は、NAD(P)H生成関連の酵素とNAD(P)H:キノン還元酵素の活性が、膜機能の破壊によりNAD(P)H、イオン・基質・酵素等の流出やpHの変動で速やかに低下したものと推測される。後者の場合は、酵素の再生維持ができなくなり全体の代謝活性がゆっくり低下したものと推測される。

3. 測定方法

用意すべき試薬は、触媒入りのメナジオン溶液とルミノール試薬である。これらはキットとして市販されている。操作は下記の順序で行う。

- (1) 食品から調製した検体（菌液） $50\ \mu\text{l}$ を96ウェルのプレートに分注する。
- (2) メナジオン溶液（ 10mg/l ） $50\ \mu\text{l}$ を混合する。
- (3) 37°C で10分間インキュベートする（この間に活性酸素が生成する）。
- (4) $100\ \mu\text{l}$ の発光試薬を添加し、即2～5秒間の発光強度を測定する。

4. 検出感度

上記の測定方法で検出できる細菌および酵母の検出限界値は、細菌の場合は数千から数万CFU (colony-forming units)/mlであり、酵母の場合はこれよりも一桁低い（表1）²⁾。

この検出感度は、生物発光法で有名なATP-ルシフェラーゼ法とほぼ同程度の感度である。しかし、化学発光法や生物発光法は、食品の成分等の影響を受けるため、検出感度は細菌の場合、数万CFU/mlになる。検出限界値に達しない菌濃度の場合は、増菌培養が必要になる。図2に示すように、初発菌数が約1CFU/mlの大腸菌の場合、6時間の培養で検出できる。培養の途中で、遠心分離操作で菌を100倍濃縮すれ

表1 細菌と酵母の検出限界値

	Detection limit ($\times 10^3$ CFU/ml)	
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	4.2	
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	6.1	
<i>Enterobacter cloacae</i> IFO13536	25.4	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC13883	7.7	
<i>Citrobacter freundii</i> IFO13546	14.2	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	2.7	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	5.0	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	5.7	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO2044	1.1	
ATCC18789	0.9	
ATCC18790	1.1	(1.1)
<i>Hansenula anomala</i> LKBT-1	0.5	
<i>Candida maltosa</i> CHA1	0.3	
<i>Yarrowia lipolytica</i> CXAU1	9.0	(0.3)

括弧内の数値は、メナジオンの代わりにコエンザイム Q1 を使用したときの値である。

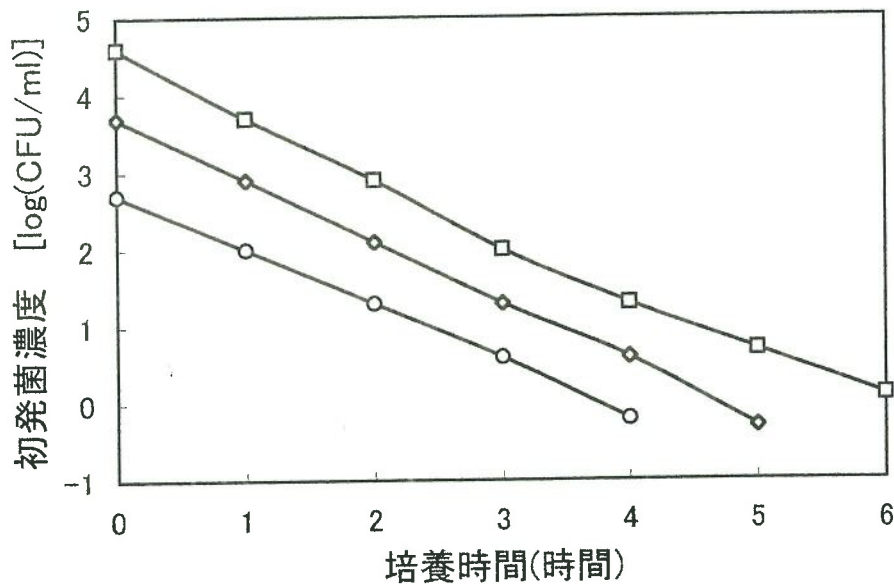


図2 増菌培養後に検出された初発菌数

- 濃縮操作なしの場合
- ◇ 遠心分離で10倍濃縮した場合
- 遠心分離で100倍濃縮した場合

ば、4時間の培養で大腸菌が検出できる²⁾。しかし、増菌培養を阻害するような成分が食品から混入している場合は、ろ過操作で菌を洗ってから培養すればよい³⁾。

5. 応用分野

化学発光法の検出感度に合せて、増菌培養操作を用いれば、無菌試験に利用できる。特に食品で問題になるのは大腸菌(群)の有無の判定であるので、これらの選択培地を用いた増菌培養による検出が可能になる。また、汚染指標菌を含めた生菌数測定の場合は、希釈度の異なる菌液を複数の試験管で培養し、化学発光強度の増加が認められた試験管の組み合わせから、最確数法(MPN法)で初発生菌数を換算することができる⁴⁾。

また、特定の食中毒菌の選択培地で増菌培養し、化学発光強度の増加がみとめられた場合、

該当する食中毒菌の増殖が推定できる。今後は、寒天培地では検出できない損傷菌の生存率と増殖能力の早期測定や、薬剤耐性菌の早期検出のための培地開発も課題となっている。

既に、上記の化学発光法の原理を応用して、臨床細菌学検査で薬剤感受性試験に使用され、早期診断と化学療法に貢献している。従って、食品の微生物検査の分野での応用も期待されている。

文 献

- 1) Yamashoji S. et al. (2001), *Microbiol. Immunol.* 45, 333-340.
- 2) Yamashoji S. et al. (2004), *Anal. Biochem.* 333, 303-308.
- 3) Kawasaki S. et al. (2004), *J. Food Prot.* 67, 2767-2771.
- 4) 浅川 篤ら(2003), *食品工業*, 46(16), 32-38.



ブレインテクノニュース
バックナンバーのご案内
第107号
2005年1月15日発行

総 説

コエンザイムQ10の新規な生産方法の開発
.....高橋 咲子・門脇 光一

国内情報

酸性土壌耐性ユーカリの実用化に向けて
.....木原 智仁・河津 哲
Rhizosecretion - 汚染物質分解酵素分泌植物体の環境浄化への応用.....野尻 秀昭・内田 英二ほか
植物の遺伝子組換え技術を利用した鶏原虫病経口ワクチン素材の開発.....松村 健
遺伝子発現レベルを利用したコメの食味判定技術の開発
.....宮川 佳子・菅原 宏章ほか
神経ペプチド「ニューロメジンU」の摂食抑制メカニズムに

ついて.....花田 礼子・児島 将康
複合微生物系を用いたトリアジン系除草剤汚染の原位置バイオレメディエーション.....岩崎 昭夫・高木 和広
レトロトランスポゾンの挿入部位に基づくマツタケの個体識別法.....村田 仁・馬場先 勝彦ほか
魚群中の魚の体長、密度などを精確に計測するための新技術の開発.....澤田 浩一・高橋 秀行ほか

地域の先端研究

体細胞クローン牛同士の交配によるクローン2世牛の誕生
.....笠井 幸治

文献情報

フローサイトメトリー/セルソーティングにより性別された精子由来子牛の性状.....(抄訳: 下司 雅也)
ABAによるH⁺-ATPase阻害にはH₂O₂が絡んでいる.....(抄訳: 岩井 純夫)
母乳を介した免疫は授乳マウスの腸内細菌に影響を与える.....(抄訳: 野中 敦子)
光周期操作による海水期アトランティックサーモンの筋線維数の可塑性.....(抄訳: 塩谷 格)

生研センターからのご案内

◀国内情報▶

ミヤコグサのゲノム分析に基づくプラスチド局在性の
根粒・菌根形成初期シグナル因子の発見独立行政法人 農業生物資源研究所 生理機能研究グループ
川崎 信二・今泉 温子・村上 泰弘

マメ科植物の持つ根粒バクテリアとの共生による窒素固定能力は他に例が少ないが、糸状菌である菌根菌との共生による菌根は陸生植物の多くでリン酸等無機塩類の吸収向上に役だっている。マメ科のモデル植物、ミヤコグサでは複数の根粒形成初期過程の変異体が得られているが、その多くでは菌根の形成能も失われており、これから根粒形成のための初期のシグナル伝達系を構成する因子の多くは菌根形成にも共通する共通共生経路 (common symbiotic pathway) に属する事が知られる。こうした変異体の一つ *Ljsym71* からゲノム解析の手法で原因遺伝子を単離したところ、シグナル伝達因子ではおそらく初めての、プラスチドに局在するイオンチャネルをコードしていることが示された。

1. はじめに

マメ科植物が根粒菌 (バクテリア) との共生により根粒を形成して空中窒素を固定する能力は、種子植物では極めて限られたものでマメ目の植物をはじめとしてごく一部で報告されているに過ぎない (ハンノキ等一部の木本類では放線菌 (*Frankia*) との根粒形成による共生窒素固定が知られている)。一方、菌根菌 (糸状菌) との菌根形成による共生は陸生植物の8割に見られて養分吸収に役立っているが、樹木等では外生菌根の例が多いのに対し、細胞内に菌糸が入る内生菌根は草本等に多いとされる。特に嚢状体 (vesicule) や樹枝状体 (arbuscule) を形成するVA菌根 (vesicular arbuscular mycorrhiza) (嚢状体を作らぬ種類もあるので最近では単にarbuscular mycorrhiza (AM) と呼ぶことが多い) では宿主植物がリンを始め溶解度の低い無機塩類や乾燥時の水分の吸収等に役立っている。こうした共生の現象については古くから良く知られているにも関わらず、分子レベルでの形成機構は永らく解析の手段が無く不明のままであった。

KAWASAKI Shinji, IMAIZUMI-ANRAKU Haruko,
MURAKAMI Yasuhiro

〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2

根粒菌とマメ科植物の共生による根粒形成から窒素固定に至る過程の分子レベルでの機構解明については、90年代に根粒菌の側で、菌からの種特異性を決定するシグナル物質Nod factorの合成経路の解明などで大きな進歩があったが、植物側での機構解明は遅れていた。しかし、真核生物でもゲノム解析の手法が90年代に飛躍的に進歩したのに伴い、これを利用して植物における根粒形成過程解明に向けた試みが始められるようになった。EMS等の変異原によりミヤコグサ (*Lotus japonicus*)、ないしは *Medicago truncatula* (タルウマゴヤシ) で多数の変異体を作製し、その中から根粒形成や窒素固定能に異常を来したもののスクリーニングが行われた。ミヤコグサは東アジアの固有種で夏に黄色の目立つ花を沢山付けるので、我が国の野草としては広く親しまれているものである。サイズが小さく多数の個体を扱いやすいことと、野草としては珍しく自殖で繁殖するため遺伝的背景が比較的良く固定されており、数回の自殖でかなり純系に近い系統が得られるために、遺伝学等の技法を適用するためのマメ科のモデル植物として提唱されるようになったものである¹⁾。

2. ミヤコグサのゲノム分析基盤の整備

根粒形成ができなくなった変異体の原因となった遺伝子は、根粒形成に不可欠な遺伝子のはずである。特に、根粒着生が全く見られなくなるような変異体 (Nod-) は、植物が根に近づいた根粒菌を認識してから根粒形成のための細胞分裂を開始するまでの極めて初期のシグナル伝達の過程を構成している遺伝子と考えられる。こうした遺伝子を図1に示したが、図で示すようにかなりのNod-変異体では同時にVA菌根の形成も抑えられてしまうことが明らかになった。根粒・菌根両者の形成に必須のこうしたシグナル伝達経路を共通共生経路 (common

sym pathway) と呼ぶが、これらは恐らくはマメ科以外の被子植物でも菌根形成に必須のものと考えられる。

これらの遺伝子のコードしているタンパク質は極めて少量しか発現されないので、遺伝子を単離するためにはその形質と染色体上の分子遺伝マーカーとの連鎖関係をもとに単離を行うポジショナルクローニングによらざるを得ない。単離の試みを始めた頃にはミヤコグサにはほとんどゲノム分析の基盤はなく、全てゼロから始める必要があった。まず、ゲノムサイズをセルソーターにより決定したが、交配による遺伝子マッピングに適した組み合わせとして標準的に使われるようになったエコタイプのGifuと

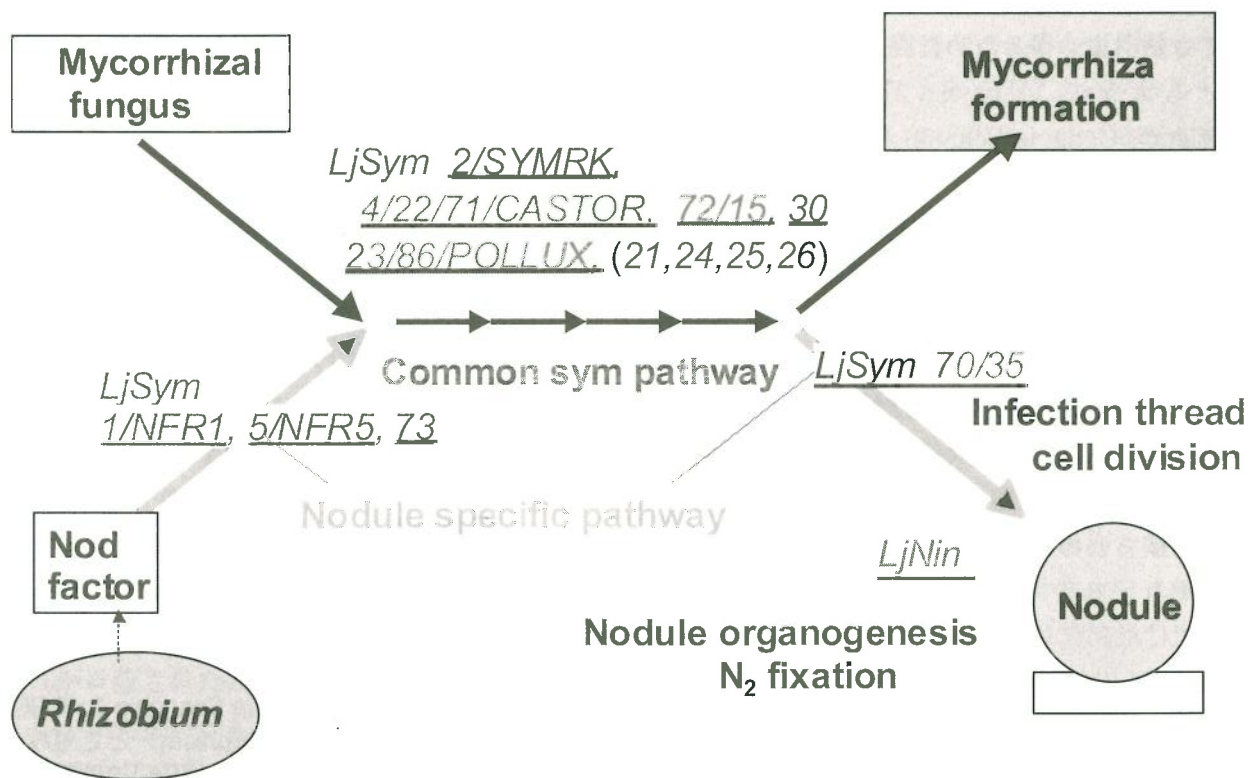


図1 ミヤコグサで得られた根粒・菌根形成初期シグナル伝達過程の変異体群

根粒を全く形成しない変異体 (Nod-) の原因遺伝子は、根粒形成初期過程のシグナル伝達因子をコードしていると考えられ、ミヤコグサでこれまでに知られているNod-の変異体に対応するものを示した。かなりの変異において内生菌根 (VA菌根/ arbuscular菌根) の形成もできなくなることから、これらの遺伝子は根粒・菌根両者の形成に必須と考えられ共通共生経路と呼ばれるものを構成していると考えられる。/で区切られた一団は同一遺伝子であることが示されており、下線の遺伝子は既に単離されている。今回、我々のグループで単離したものを で示した。() 内の遺伝子については他の遺伝子との異同については明確でない。主立ったNod-遺伝子群はほぼ単離されたものと考えられる。

Miyakojima²⁾でそれぞれ、478MB、495MBであった^{3, 4)}。さらに、イネで我が国初の植物のBACライブラリーを作製した経験を生かして、遺伝子単離の最重要の基礎となるゲノムライブラリーの作製を進め、平均インサートサイズ138kbで32000クローンからなる約8.6ゲノム相当の高品位ゲノムライブラリーを作製した⁴⁾。こうしたライブラリーは根粒過剰着生変異の原因遺伝子HAR1の単離等⁵⁾、我が国独自の根粒形成関連遺伝子群の単離に大きく貢献した。

さらに、目標とする遺伝子に近接する分子マーカーを小さな研究室でも効率よく得るために高能率ゲノム走査法 (HEGS: High Efficiency Genome Scanning) の手法を開発し、1718マーカーからなる全長1560cMのミヤコグサの高密度地図を作製した (図2)。これによるマーカー密度は平均278kb/マーカーであり、これらのツールを元に、根粒形成に特異的な遺伝子*LjSym70*、共通経路を構成する遺伝子である*LjSym71*、*72*の単離を進めて約4~5年をかけてそれぞれの単離に成功した。ここでは最初に単離された共通経路遺伝子*LjSym71*遺伝子とその関連遺伝子について述べる⁶⁾。

3. *CASTR*, *POLLUX*遺伝子の単離とその機能

*Ljsym71*の原因遺伝子は第1染色体長腕末端部のマーカーからのwalkingによりテロメア側約240kbの領域に絞り込まれた。こ

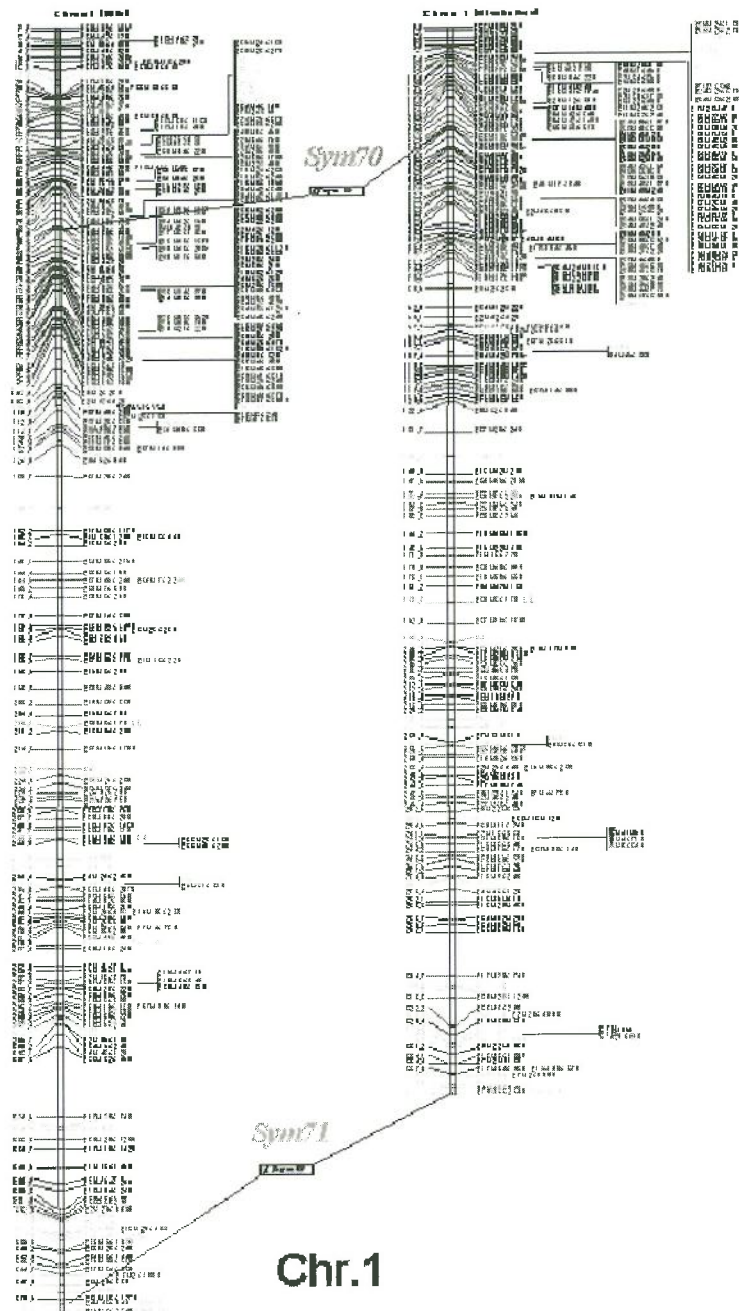


図2 ミヤコグサのHEGS/AFLPを用いた高密度マップ (染色体1のみ表示)

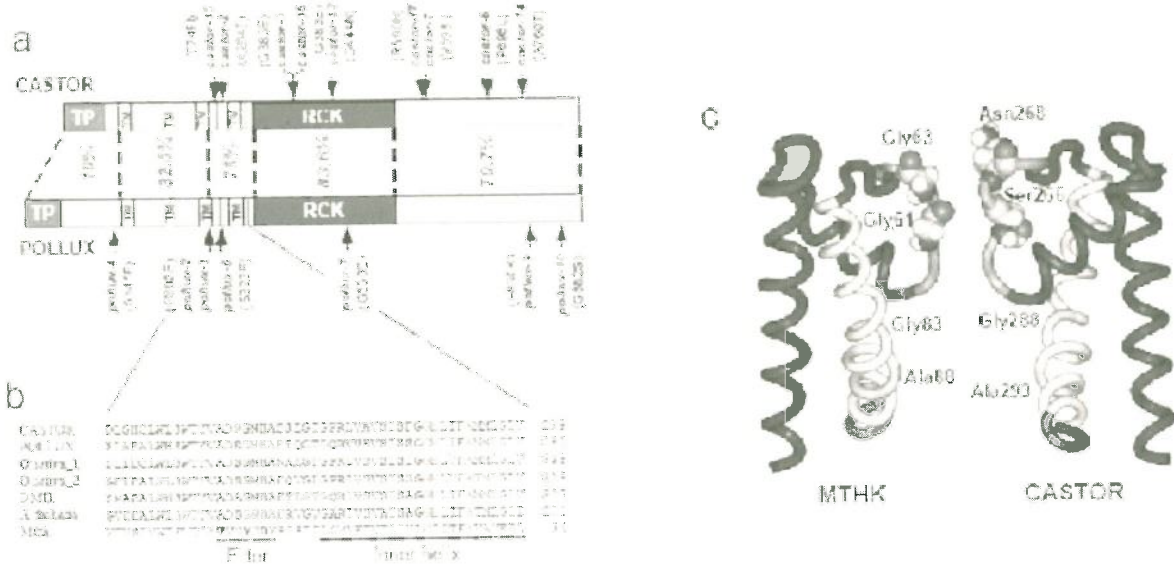
高能率ゲノム走査法 (High Efficiency Genome Scanning: HEGS) とAFLP (Amplified fragment length polymorphism) とを組み合わせることにより、GifuとMiyakojimaの交配後代F6-F9の組換え自殖系統を用いて1718マーカーからなる1560cMの高密度遺伝子地図を1名の研究者により1年足らずで完成した。約半分が共優性マーカーであるが、優性マーカーの精度を上げるためGifu (左) とMiyakojima (右) のマップを別々に構成した。*LjSym71*、*70*遺伝子の位置も示した。

の領域には変異体のGifuB-129系統と遺伝解析のための交配を行ったMiyakojimaMG-20系統との間で染色体の逆位部分があり、これにより分子マーカーの整列化に手間取ったが、この領域の全配列を決定して、存在する遺伝子枠(ORF: open reading frame)を決定した後、それぞれについて変異体と野生型とで遺伝子内での変異の有無を調べていったところ、これまで同じ座位の変異と考えられていた17変異の全てが一つのORFで有意なアミノ酸置換や塩基の欠失等を起こしていることが示された。特にLjsym22,4等はJohn Innes研究所のグループもこの変異体遺伝子の単離を試みていたので、最終的には共同で成果を発表することとなった。また1つの培養変異収集の試みで得られた6つの根粒形成の培養変異のうち4つの変異がこの座位で起きており、本遺伝子が非常に変異を起こしやすい特異な部位に存在することが示された。

本遺伝子のサザン分析ではよく似た遺伝子が第6染色体に存在することが知られたが、この位置はLjsym86,23等の変異体の原因遺伝子がマップされており、実際にこの領域からLjSym71のホモログとして得られた遺伝子には、この座位で知られている10の変異体において全て有意な変異が見出された。この2つの遺伝子は互いによく似ていることからCASTOR, POLLUXと命名したが、それぞれに変異体があり、どちらが欠けても根粒形成ができなくなる。ライバルのモデル植物の*M. truncatula*ではDM11の名で同じ頃POLLUXに似た1遺伝子だけが単離されたが、サザンの結果でも1バンドしか見えない。エンドウやダイズ、さらにはイネでも2つのバンドが確認されているが、*Arabidopsis*でも1遺伝子が見出されており菌根を形成しない数少ない植物であるアブラナ科の植物にも発現されている相同な遺伝子があるのは興味深い。両遺伝子は、根に限らず葉や花芽、莢、根粒などでも大差のないレベルで発現しているが、唯一POLLUXの発現だけが、根粒で2倍強に増加している。

遺伝子の構造は図3に示すように、4回の膜貫通領域とCa²⁺イオンとの結合でK⁺イオン透過性を制御する:RCK (regulation of conductance of potassium) ドメインを持ち膜局在性のイオンチャネルであることが分かった。特に好熱性メタン細菌 (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) のK⁺チャネル (MthK) と相同性が高いことが示された。CASTOR, POLLUXタンパク質間のアミノ酸の相同性は特にRCKドメインと、MthKのX線回折からチャネルのフィルターと内部ヘリックスとされた最後の膜貫通領域で高いのが目に付く。MthKの立体構造を元に組み立てた予想構造ではフィルター部にGly>Asn等の大きな変異があり、チャネルを通るイオンはK⁺ではない可能性も高い。CASTOR, POLLUXの変異では、根粒菌接種時の初期現象として重要なCaスパイキングと呼ばれる核周辺でのCa²⁺の周期的な変動が見られなくなることから、これらのタンパク質はこのCaスパイキングの上流で重要な役割を担っていることが予想される。また、MthK等は四量体として機能していることから、CASTOR, POLLUXもヘテロポリマーとして機能していると考えられ、お互いに相手の機能は代替できないものと考えられる。

CASTOR, POLLUX遺伝子のN末端にはプラスチドへのシグナルペプチド (TP) が存在していることから、タンパク質の細胞内での局在を確認するために、GFPとの融合遺伝子を金粒子と共に細胞に打ち込んで共焦点蛍光顕微鏡によりその発現部位を調べた (図4)。プラスチドへの局在が確認されている*At rec2*遺伝子のシグナルペプチドと赤色蛍光タンパク質 (DsRed2) とを融合したものを標準として (Ar), 比較するとCASTOR, POLLUX両遺伝子ともGFPの緑色蛍光 (Ag) は赤色蛍光の分布 (Ar) と良く一致した。さらに、自家蛍光の少ないエンドウの根毛での同様な試験でもプラスチドタンパク質と同じ局在が確認された。このように、CASTOR, POLLUXが構成するイオンチャネルは根粒形成への感受性を持つ根



- 図3 *CASTOR*, *POLLUX*遺伝子の構造と好熱性メタン細菌の K^+ イオンチャネルとの類似性
- CASTOR*, *POLLUX*遺伝子のドメイン構造と変異の場所, アミノ酸置換。TP: transit peptide for plastid localization, TM: trans-membrane domain, RCK: regulation of conductance of K^+ domain, %: 両遺伝子間でのアミノ酸の一致度
 - 好熱性細菌 (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) の K チャネルMthkを含めての同イオンチャネルのフィルター部及びインナーチャネル部分のアラインメント
 - MTHKの立体構造モデルを元に作製したCASTOLのイオン通路部分の構造。フィルター部のAsn268等がイオンの特異性を変えている可能性が示唆される。

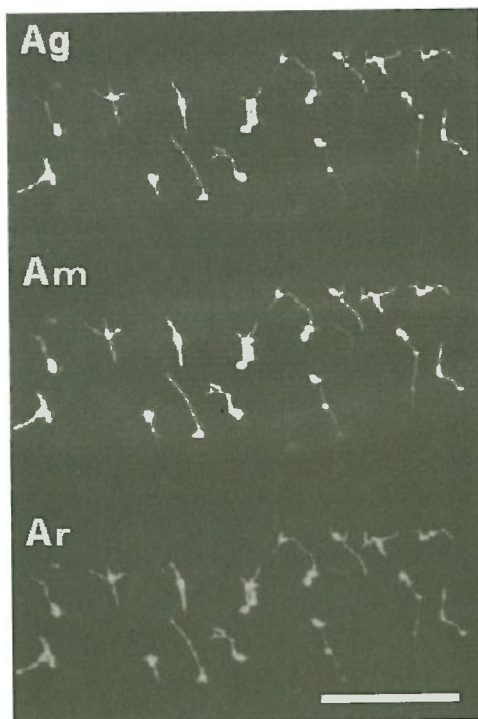


図4 *CASTOL*タンパク質の細胞内局在
*CASTOL/GFP*の接合遺伝子と (Ag), plastid局在性の *AtrecA* transit peptideと赤色蛍光タンパク質 DsRed2との接合体 (Ar) とをタマネギの表皮細胞に粒子銃で打ち込んだ。全ての発現がプラスチドに局在している。ひも状に見えるのはプラスチドから伸び出しているstomule。Ag: 緑色蛍光像, Ar: 赤色蛍光像, Am: Ag+Arの融合像。3者はほとんど一致している。

毛や根の部分でもプロプラスチドに局在すると考えられるが、プラスチドはこれまで光合成を始め澱粉やアミノ酸、ビタミン等の合成を主な機能とするオルガネラと考えられてきており、シグナル伝達の構成因子がプラスチドに局在することが示されたのは極めて珍しい。

我々は、この他に共通経路変異体*Ljsym72*と根粒形成特異的変異体*Ljsym70*それぞれの原因遺伝子を単離したが、いずれもCaスパイクのすぐ下流に存在する因子と考えられる。根粒形成初期のシグナル伝達に関わると考えられる変異体は図1に示したように、ほぼ出尽くしていると考えられ、我々がこの度の生研センターの基礎研究推進事業で行った研究により根粒形成初期シグナル伝達の根幹部分が明らかにされたと考えられる。今後これより詳しいシグナル伝達系の分析は、これまでに得られた因子群との相互作用などを元に探索する手法が主になると予想され、これらシグナル伝達系の主要因子を日本で独自に単離できたことは、これからの根粒形成過程解析の研究においても大きな強みになることが期待される。

文 献

- 1) 川口正代司, 安楽温子, 村上泰弘, 本村知樹, 川崎信二, マメ科のモデル植物ミヤコグサ, 細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ 14, 14 : 140-148 (2001)
- 2) Kawaguchi M., Motomura T., Imaizumi H., Akao S., Kawasaki S., Providing the basis for genomics in *Lotus japonicus* : the accessions Miyakojima and Gifu are appropriate crossing partners for genetic analyses., *Molecular Genet Genomics*, vol.266 : 157-166 (2001)
- 3) S. Kawasaki, Y. Murakami, *Genome Analysis of Lotus japonicus*, *J. of Plant Research* 113 : 497-506 (2000)
- 4) Kawasaki S., Murakami Y., Imaizumi-Anraku H., Shimizu A., Mikami I., Construction of High-Density Map, Genome Library, and Saturation Mapping of Nodulation Genes, *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol.52, Nagata/Tabata (Eds.) *Brassicas and Legumes*. 183-202 (2003)
- 5) Nishimura R., Hayashi M., Wu G-J., Kouchi H., Imaizumi-Anraku H., Murakami Y., Kawasaki S., Akao S., Ohmori M., Nagasawa M., Harada K., Kawaguchi M., *HARI* mediates systemic regulation of symbiotic organ development., *Nature* 420 : 426-429 (2002)
- 6) Imaizumi-Anraku*, N. Takeda*, M. Charpentier, J. Perry, Y. Umehara, H. Kouchi, Y. Murakami, L. Mulder, K. Vickers, J. Pike, H. Miwa, A. Downie, T. Wang, S. Sato, E. Asamizu, S. Tabata, M. Yoshikawa, Y. Murooka, G-J. Wu, M. Kawaguchi, S. Kawasaki (Corresponding Author), M. Parniske, M. Hayashi, *CAS-TOR* and *POLLUX*, a pair of plant proplastid localized ion channels at the gateway to bacterial and fungal symbiosis, *Nature*, 433 : 527-531 (2005) (2004 Dec.22. : on line)

◀国内情報▶

家畜遺伝情報の産業利用へ向けて —牛肉の質と豚のインフルエンザウイルス抵抗性—

独立行政法人 農業生物資源研究所 生体機能研究グループ
動物遺伝子機能研究チーム長

三 橋 忠 由

我が国では、これまでに家畜ゲノム研究が行われてきた。その最終目的は、生産性を支配する責任遺伝子およびこれに存する遺伝子変異を明らかにし、この情報を家畜生産に応用することにある。近未来における家畜ゲノム研究の成果は膨大なものになるであろう。その情報を利用する「家畜の遺伝子診断」は緒についたばかりであるが、他の手法では不可能な、劣性不良遺伝子の抽出も容易に行うことが出来、費用対効果の点から今後ますます利用が盛んになるであろう。ここでは、著者が考えるその利点と現在行われている2つの遺伝子診断「肉牛の脂肪交雑能力診断」と「豚におけるインフルエンザ抵抗性遺伝子Mx1の診断」について説明した。

1. 遺伝子診断による選抜の利点

育種選抜によって家畜を改良する過程では、種畜から生産されるいわゆるコマーシャル個体の成長が良く、強健性を持ち、生産される肉、卵が高品質となると期待される個体が選ばれる。この選抜には多くの時間と費用が必要である。

肉牛では、後代検定といって、複数の候補種雄牛から少なくとも10頭ずつ以上の産子を作り、これを20か月齢以上まで育てて成長能力を調査し、屠殺し肉質の評価を行う。牛の妊娠期間は人間とほぼ同じであるので、これに10か月をプラスして少なくとも30か月間、2年半以上の時間が必要である。この間、牛舎施設を用い、毎日の飼養管理を行うための人員が必要となる。そして、良い成績が得られた種雄牛からは精液が採取され凍結され広く用いられることになる。

産肉能力について、ゲノムからの情報を用いて何らかの評価を事前に行うことができれば、育種に必要な時間と費用を大幅に節減することができる。それが遺伝子診断である。

産肉能力を決める遺伝的影響の半分は雌側からもたらされる。雌側についてのシステム化さ

MITSUHASHI Tadayoshi

〒305-0901 茨城県つくば市池の台2

れた選抜は行われていないが、ゲノムからの情報は雌牛の評価にも有効であろう。

いままでに既に実用化されているが、劣性遺伝病の原因となる遺伝子の変異が同定されるなら、その因子をヘテロで保持しているため外見上は正常型と見分けがつかない時でも、遺伝病因子保有個体を識別するのに非常に有効である。

ゲノムからの情報、ここでいう遺伝子の診断は、家畜の毛や羽（毛根部を含む）が数本あれば、これよりDNAを抽出して行うことができる。肥育牛や特に雄種牛からの採血には危険が伴うが、毛を抜くだけなら大幅に危険は減少する。また、いちいちロープで嚴重に保定する労力も必要ない。

何から何まで良いことづくめ、を紹介したが、特定の優良遺伝子をホモ化するのを急ぐあまりに近親交配が進みすぎ、未知の不良遺伝子がホモ化し他の重要形質の退化を招くことがあることも考慮しなければならない。遺伝子診断による選抜育種は、単独でこれまでの数理統計育種を凌駕するものではない。あくまで、これまでの成果と融合しながら進めてゆくべきであり、研究者は既にこれを諒解していると思うが、実用段階では数理統計育種分野との共同作業が十分とはいえない。

2. 成長ホルモン遺伝子と脂肪交雑との関係

脂肪交雑と成長ホルモン遺伝子の多型との関係は、いわゆるCandidate Gene Analysis（候補遺伝子の解析）から明らかになった。それも生理学分野の知見から、成長ホルモン（タンパク）が脂肪細胞からの脂肪酸放出に直接関与していることが考えられ、その後、遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異が認められたことから両者の関係が解析された。

牛成長ホルモン遺伝子はウシ第19番染色体にある。アミノ酸に翻訳されるエキソンを5つ持つ。この第5エキソンには塩基置換を伴う変異、アミノ酸番号（コドン）で言えば127位と172位相当部分、が存在し3つのアレルが存在する。成長ホルモンは脂肪組織中の脂肪を脂肪酸とグリセリンへ分解しこれを細胞外へ放出させる効果をもつ（図1）。このことから、成長ホルモンの働きが強いと脂肪細胞からの脂肪酸放出が上昇しその結果筋肉中に蓄積された脂肪である脂肪交雑は低くなる、ということが仮想された。

また、成長ホルモン分子の中のアミノ酸が替われば成長ホルモンとしての効果に変化することが考えられ、脂肪酸放出能力に差があるのではないかと推察された。このような仮想の下に、黒毛和種間接検定牛約190頭を用いて、このうち2カ所の塩基置換と生産性との関係を調べた。

調査した2つの塩基置換のうち172位のアミノ酸置換（スレオニンかメチオニン）に相当する塩基置換（ACGかATG）は現在のところ和牛（黒毛和種、褐毛和種）にのみに認められている。この変異は畜産草地研究所の千国らによって見出されたものである¹⁾。また172番目アミノ酸のメチオニン型は127番目のアミノ酸置換（ロイシンかバリン）（塩基型CTGかGTG）のうちのバリン型と連鎖している。すなわち、2カ所の塩基置換によって3つの遺伝子型が存在する。

127位の型、172位の型と脂肪交雑（BMS）あるいは日増体量（DG）との関係を調査したところ、127番目の多型は脂肪交雑ととの間に有意な関係が、また172番目の多型は日増体量

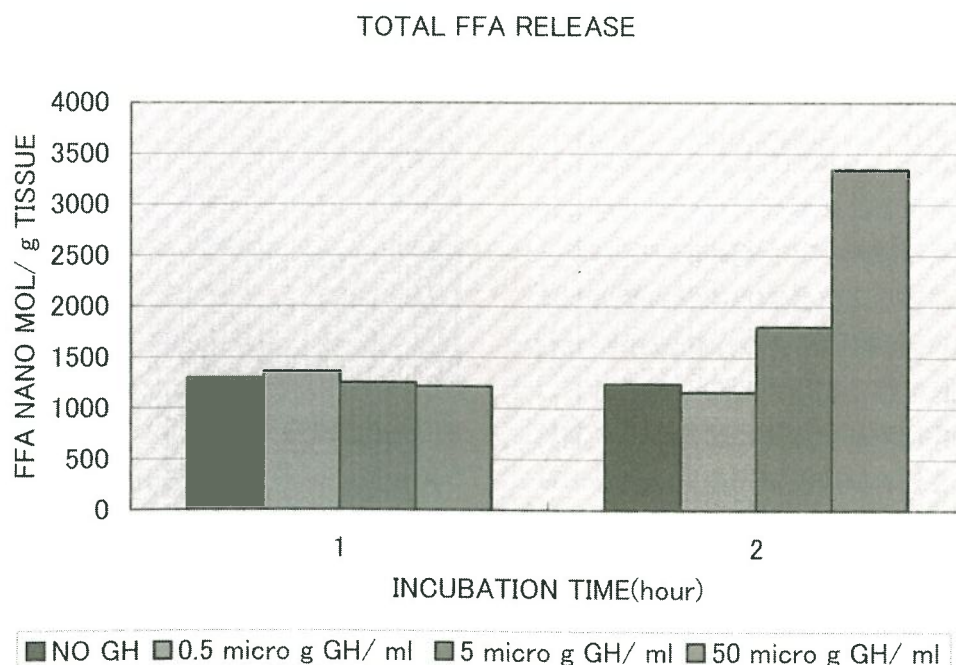


図1 ウシ成長ホルモンによるウシ脂肪組織からの脂肪酸放出

* 2時間の培養により、より高い成長ホルモン濃度で高い脂肪酸の放出が認められる。

ととの間に有意な関係が見出された。

アレル型A, B, Cと遺伝子の塩基置換との関係は以下のようなものである。

遺伝子型	コドン127	コドン172
A	CTG (Leu)	ACG (Thr)
B	GTG (Val)	ACG (Thr)
C	GTG (Val)	ATG (Met)

BMSについては127位がバリンのホモ型（塩基配列はGTG）である場合、他の場合より有意に脂肪交雑が高かった（Val/Val>Val/Leu, Leu/Leu）。これをあえて3つのアレル型で言うならBかCの遺伝子型を持つとAA, AB, ACよりも高い、ということになる。

	BB, BC, CC 対 AA, AB, AC	平均値間差の有意性	
BMS	4.46 ± 2.15	3.85 ± 0.16	0.023
DG	0.87 ± .013	0.88 ± .010	0.549

また、日増体量については172位がスレオニンのホモ型（塩基配列はACG）である場合、他の場合よりも高かった（Thr/Thr>Thr/Met, Met/Met）。

	AA, AB, BB 対 AC, BC, CC	平均値間差の有意性	
BMS	3.84 ± 0.17	4.35 ± 0.19	0.054
DG	0.89 ± .010	0.86 ± .011	0.035

ウシ成長ホルモンの多型は、ペプチドホルモンである成長ホルモンのアミノ酸組成を変える。このことにより、成長ホルモンのレセプターへの親和性や血液中内での分解速度が変化し、結局は脂肪蓄積に影響することが考えられる。なお、成長ホルモンは脂肪細胞からの脂肪酸放出を増加させる。成長ホルモン遺伝子の多型部分が脂肪細胞のレセプター接合部位に相当し、アミノ酸が替わることにより親和性が変わるのなら、脂肪蓄積に影響していると考えられる。

また、成長ホルモン遺伝子と同じ染色体上に、しかも近い距離に脂肪蓄積に影響する遺伝子が

あり、この遺伝子の多型と成長ホルモン遺伝子の多型が連鎖しているなら、成長ホルモン遺伝子は脂肪蓄積のDNAマーカーとなっているということになる。いずれにせよ、成長ホルモンの遺伝子型から脂肪交雑や成長能力をある程度推定することができ、異なる遺伝子型間で脂肪交雑は統計的にも有意な差が認められた。

3. 家畜豚のインフルエンザ抵抗性遺伝子Mx1に見出される11塩基欠損と抗病性との関係

Mx遺伝子はマウスのインフルエンザ抵抗性遺伝子として発見された。Mx1と書いてエムエックスワンと読む。Mxはmyxovirus（ミクソウイルス）の頭文字に由来する。ブタやニワトリのインフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス（直鎖状1本鎖RNAウイルス）に属する。ブタにはMx1, Mx2の2つがある。西欧で家畜化されたブタの中には、Mx1遺伝子の最終エクソンに11塩基の欠損を持つものがある。これまでにSTAFF研究所と畜産試験場のグループは協同で欠損型の存在とその存在割合を報告した。その中で、世界で最も広く用いられているランドレース種に11塩基欠損型が高い頻度で認められた（表1）。ランドレース種は肥育生産用の3元交雑ブタを作るのに広く用いられている。なお、この11塩基の欠損は、ニホンイノシシや中国の梅山豚からは今のところ見つかっていない。

11塩基の欠損では3塩基が1単位となるコドンがずれ、終止コドンが大きく後方へシフトし、Mx1タンパクは性状型（野生型）のそれと分子量も構造も大きく異なり、その機能を失っている可能性が考えられた。

11塩基の欠損をヘテロで持つ豚はたくさんいるが、欠損型をホモで持つ豚の割合は非常に少ない（図2）。このことから、11塩基の欠損型は何らかの形で生存に不利をもたらしていることが考えられた。

特に、インフルエンザを含むRNAウイルス

表1 ブタの各品種における異なるMx1遺伝子型を持つ頭数と遺伝子型

Breed	Total No.	a/a	a/b	b/b	a/c	c/c
Landrace	87	23	0	0	50	14
Middle Yorkshire	4	4	0	0	0	0
Large White	42	42	0	0	0	0
Berkshire	38	32	0	0	6	0
Duroc	29	25	0	0	4	0
Hampshire	19	10	0	0	9	0
Clawn miniature pig	4	4	0	0	0	0
Göttingen miniature pig	2	2	0	0	0	0
Yucatan miniature pig	2	1	0	0	1	0
Japanese Wild Boar	42	42	0	0	0	0
Jinhua	4	4	0	0	0	0
Meishan	38	5	23	10	0	0
Mongcai	12	8	4	0	0	0
Homong	9	9	0	0	0	0
I' pig	9	0	4	5	0	0
Total	341					

a：野生型（欠損無し）， b：1bp silent mutation， c：11bp 欠損型

```

Amino acid sequence  K S N Q Y F L S S P A P S S D
ACC # 65087          AAATCAAACCAGTACTTTCTGTCTGCTCGCCGGCCCTCCTCAGAC
(position 1672 - 1716) *****
Meishan              AAATCAAACCAGTACTTTCTG TCGCCGGCCCTCCTCAGAC

Amino acid sequence  Q A R R R L A K F P G *
ACC # 65087          CAGGCTCGGCGCCGGCTCGCCAAGTCCAGGCTGA
(position 2051 - 2082) *****
Landrace             CAGGCTC GCCAAGTCCAGGCTGAACCGGACTCTCCAGGCGCCGGGGTCTCCAGGGCACGTCT
                   Q A R Q V P R L N R T L Q A A R G L Q G T S

CCAGGCAACGAGGACCAACCTCCTCCCTAACAGACTAG
P G N E D Q P P S L T D *
    
```

梅山豚のMx1に認められる3塩基欠損とランドレース種に認められる11塩基欠損

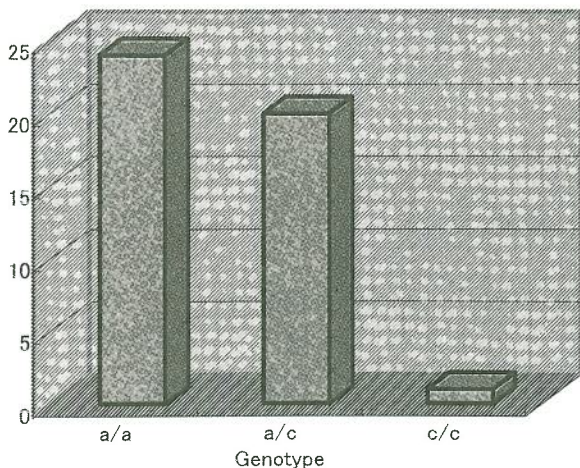


図2 R県で維持している大ヨークシャー種における遺伝子型別頭数

5年間の合計頭数を示した。a/a：野生型ホモ， a/c：野生型・11塩基欠損型ヘテロ， c/c：11塩基欠損型ホモ。

由来の疾病抵抗性について、正常型と11塩基欠損型では大きく異なることが予想された。

ランドレース種内でヘテロの存在割合に対して11塩基欠損のホモ型が少ないこと、他の品種ではヘテロはいてもホモ型がないことから、11塩基のホモ型は生存に不利である、と推察された。なお、旧畜産試験場で2000年にランドレースを含む白色性用品種約40頭を調査したときには11塩基欠損のホモ型は1頭も存在していなかった。

そこで、正常型（野生型）の遺伝子、11塩基欠損型、exon13の3塩基欠損型（これも現実に存在する。）をベクターのみをマウス3T3細胞（Mx活性を持たない）に導入し、インフル

エンザA型の感染試験を行った。

その結果（図3），野生型および3bp欠損型では24時間目までウイルス増殖は観察されなかったが，11塩基欠損型では12時間目からウイルス増殖が観察された。このことから

- ①11塩基欠損のMx1遺伝子の産物はウイルス抑制能を失っている。
- ②3塩基の欠損はウイルス抑制能に影響しない。

と推察された。なお，ウイルス感染濃度はもう1段階低いレベル（MOI=1）でも行い同様の結果を得た。

ニホンイノシシ，梅山豚など野生又は半野生の品種には11塩基欠損型はこれまで見出されていない。

ランドレース種内でヘテロの存在割合に対して11塩基欠損のホモ型が少ないこと，他の品種ではヘテロはいてもホモ型がないことから，11塩基のホモ型は生存に不利である，と推察された。なお，旧畜産試験場で2000年にランドレースを含む白色西洋品種約40頭を調査したときには11塩基欠損のホモ型は1頭も存在していなかった。

矛盾するようだが，実験室での*in vitro*の結果はドラスティックであったが，それがそのまま生産現場に反映されるとは言えない。色々な場合がある。ここで引用した表においては，ランドレース種に11塩基欠損型ホモ個体が見られ

る。しかし他の西洋品種，パークシャー，デュロック，ハンプシャー種にはヘテロ型はいるがホモ型はいなかった。種畜生産を行う場所では11塩基ホモ型が残っている場合もあった。衛生状態が良いのかもしれない。また，かなり大きな規模の養豚場で約200頭を調査したが，11塩基欠損のホモ型は1頭も存在していなかった，という例もある。

Mx1はインフルエンザウイルスが細胞に感染し増殖する際，ほぼ最初にこれと戦うタンパクであろう。他にもそのようなタンパクがあるであろう，未知のタンパクもあるであろう。Mx1が大きな欠損を持っているからといって，このことだけで実際の個体が感染に弱く非常に早く死亡する，と考えるのは早計である。しかし，その程度は小さくとも生産に影響があり，その理由が遺伝子レベルで分かるのなら，遺伝子タイプを“好ましい型”に揃えることは可能であり，生産に利用するのが良いと思うのである。

家畜群がウイルスに感染した場合，家畜群におけるウイルスの存在時間は，病気に強い個体がいれば長くなってしまふ，という意見をどこかで聞いた。すなわち，感染が広がらないためには弱い個体の方が良い，ということなのだろうか。いくら病気に弱いといっても感染後数秒で死ぬわけではない。ウイルスが増殖するから死ぬのであり，このウイルスを他の個体へまき

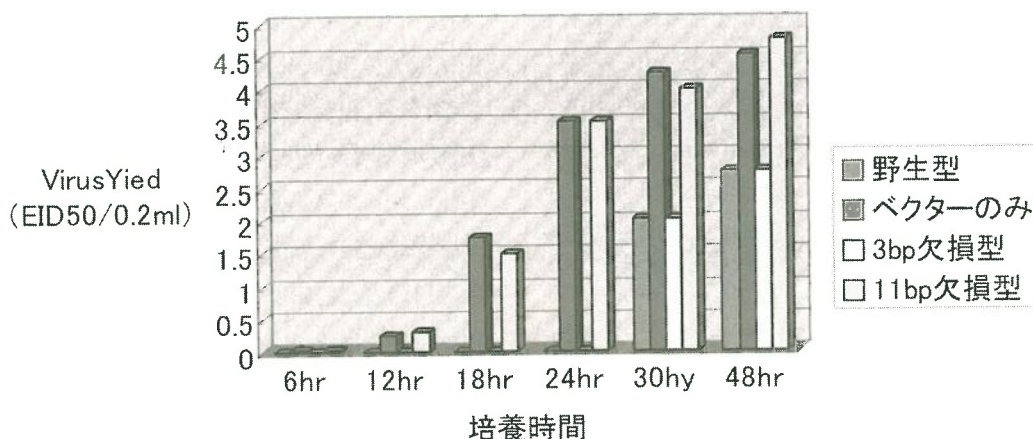


図3 異なる型のMx1遺伝子に対するインフルエンザウイルスの増殖
マウス3T3細胞に異なる配列を持つブタMx1遺伝子を導入し，MOI=10において感染試験を行った。

散らす時間を十分経てから死亡するのであろう。こう考えると、弱い個体が揃っていた方がよい、のであろうか疑問に思う。また、日本国中が全て弱い個体で疾病により全て死滅したら、生産現場はどうなるのだろうか。

家畜群の全ての個体がウイルス増殖抑制能を持つならば、外部からウイルスがもたらされた場合、感染は生じるが個体にダメージを与えるほどは増殖せず体内からウイルスは消滅し、その間空気中のウイルス濃度もそれほど増加せず、感染は広がらないか、感染しても疾病症状を呈するほどではない、ということにならないのであろうか。

付記：1917年～1918年、歴史に残る最大のインフルエンザが全世界で流行した。スペイン皇室の人々が罹患したためスペイン風邪と呼ばれているそうである。全世界では2千万人から4千万人が死亡した。我が国でも30万人以上が死亡した。米国内でも南北戦争や第2次世界大戦での死亡者数よりも多い約60万人が死亡した。

スペイン風邪は米国北西部から始まった。そのとき、ブタの集団にも風邪が流行していた、との報告がある。また、当時死亡した兵士のホルマリン漬け試料から取り出したRNAウイルスの系統解析では、このインフルエンザウイルスはブタのH1ウイルスグループに属していた³⁾、と報告されている。

米国北西部、アイオワ州などは現在でも養豚が盛んな地域である。当時の養豚がどのような状況であったのか。既にランドレース種やこれを交配した交雑種が集約的に飼われていたとしたら、インフルエンザウイルス感受性を大きい割合で保持するブタ集団こそが、新たなウイルス発生の温床となり世界的疫病 (Pandemic) を流行させたことも考えられる。または、比較的抵抗性であっても新型ウイルスの発生頻度は変わらないものなのであろうか。

文 献

- 1) 千国幸一・長妻常人・田畑利幸・門間美千子・斎藤昌義・小澤 忍・小堤恭平. 和牛において見出された成長ホルモン遺伝子の多型, 日畜会報, 65, 340-346, 1994.
- 2) Morozumi T., et al., Three types of polymorphisms in exon 14 in porcine Mx1 gene. *Biochemical Genetics*. 39: 251-260 (2001).
- 3) Jeffery K. Taubenberger, Ann H. Reid, Amy E. Krafft, Karen E. Bijwaard, Thomas G. Fanning. Initial Genetic Characterization of the 1918 "Spanish" Influenza Virus. *SCIENCE* Vol. 275, 21 March 1997.

◀国内情報▶

紫外線照射による穀物殺菌技術

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構
 生物系特定産業技術研究支援センター
 日 高 靖 之

紫外線を利用した、穀物直接殺菌技術の開発を行った。紫外線を均一に照射するために、循環型紫外線照射装置を試作した。装置2台の内1台は紫外線照射部に二酸化チタンを塗布し、二酸化チタンによる相乗効果も検討した。紫外線のみでも殺菌効果を確認したが、さらに二酸化チタンにより殺菌時間の短縮が可能であった。90%殺菌に要するエネルギーは穀物1t当り2.8MJとなった。また紫外線照射した小麦の品質に問題はなかった。

1. はじめに

食品の安全性が注目されている中、農産物の段階からの食品衛生を考える必要性が出てきている。穀物の場合、生鮮物と異なり、乾燥作業を行うため、水分活性が低くなり、微生物の繁殖はある程度抑制される。また、病原性の菌が少ないうえ、直接喫食するものではないため深刻な問題ではない。しかし、一度かび毒の生成があると、炊飯等の加熱処理では消失しないという危険性もある。また、温度管理が徹底している政府倉庫においても、かびによる品質被害が出るなど問題視されている。他方、炊飯加工業者では、*Bacillus*等の耐熱性菌を問題視し菌制御を行っているものの、できるだけ初期菌数の少ない原料を望む声もある。穀物においても微生物制御技術は今後重要になると考える。

殺菌は大きく加熱殺菌と冷殺菌に分けられる。主な食品の殺菌は加熱殺菌が主流である。穀物に付着する菌は耐熱性のものが多く、その上、穀物などの乾燥した農産物は熱伝導率が小さいため、加熱による殺菌を行おうとすると農産物自体が変質してしまう問題があり利用できない¹⁾。一方、冷殺菌の一つである薬剤については、日本におけるポストハーベスト農薬の使用が、食品衛生法により、貯蔵中に発生した害

HIDAKA Yasuyuki

〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

虫のみの使用に限定されており、利用できない現状である²⁾。

このような背景をうけ、ここ最近穀物を直接殺菌する研究が試みられている。濱中ら³⁾は赤外線を利用したコムギ及びダイズの表面殺菌を行っている。赤外線による殺菌は他の加熱殺菌とは異なり、放射による菌体への直接加熱を行えるため、農産物への影響が少なく短時間で殺菌することができる。林⁴⁾と等々力⁴⁾は、エネルギーの小さい電子ビームであるソフトエレクトロンを使った穀物の殺菌を行っている。ソフトエレクトロンは紫外線よりも殺菌力が高く、ガンマ線よりも透過力が小さい特徴を持っている。そのため、品質になんら影響を与えることなく、無菌状態まで殺菌することができ、小麦のミゾのような凹凸にも対応することができる。長谷川ら⁵⁾は高電圧パルスによる穀類の殺菌を行っている。この方式では、高電圧パルスを印加することにより、細胞膜内外に電位差が生じ細胞膜が破壊され死滅するという直接的作用と空気中の酸素等が活性化されOHラジカルやオゾンを生成し殺菌する間接的作用の2つの作用による。この他、土戸ら⁶⁾は紫外線を使って、コシヨウ等の粉末食品の殺菌を試みている。ここでは、その一例として、生研センター⁷⁾で行った、紫外線と二酸化チタンによる穀物特に小麦について、付着する細菌及びかびの殺菌実験結果を紹介する。

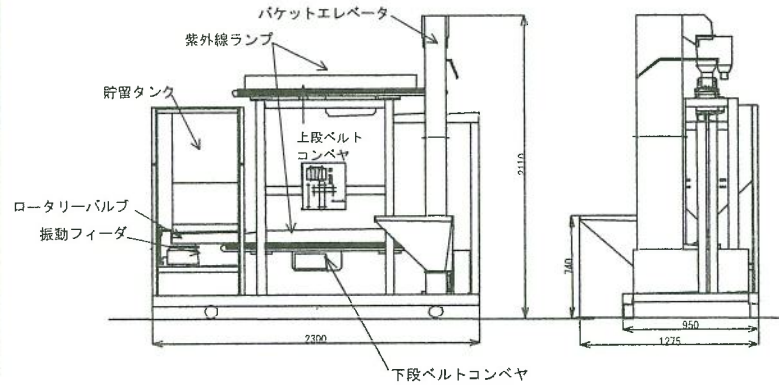
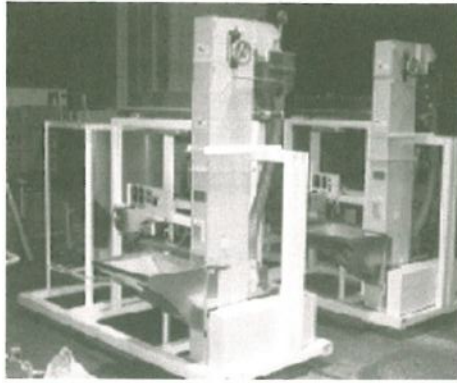


図1 穀物循環型紫外線照射実験装置

2. 殺菌のメカニズム

1) 紫外線殺菌

紫外線の殺菌メカニズムは、紫外線が微生物のDNAを構成する塩基の一つであるチミンに直接作用することによりチミン二量体を形成し、遺伝情報の読取りができなくなり、死滅するというプロセスをたどる。このように、紫外線は、DNAに直接作用するため、殺菌スペクトルが広く、ほとんどの微生物に作用する。しかも、殺菌による対象物の温度上昇がなく、残留農薬の心配がないのが特徴である。また、広範囲な分野で実用化されているため、比較的安価に装置を構築できるのも特徴である。

2) 二酸化チタン

二酸化チタンは塗料や化粧品の白色顔料として使用されてきており、1983年に食品添加物として使用が許可され、ホワイトチョコレート等の着色料としても使用されている。1967年に藤嶋ら⁸⁾により光触媒としての性質が発見されると様々な分野で応用され、抗菌タイルや防曇ガラス等が製品化されている。二酸化チタンの殺菌メカニズムは、その結晶構造による。紫外線が照射されると結晶中の電子が飛出し表面がn型半導体となる。そのため、その周辺では強い酸化還元作用が発生し、殺菌に寄与する。これにより、紫外線との相乗効果でより高い殺菌効果が期待できる。

3. 穀物循環型紫外線照射実験装置

紫外線殺菌は、紫外線が当たっている部分は殺菌されるが、陰になった部分では殺菌は行われない。そのため本実験装置は、穀物に紫外線を均一に照射させるため、穀物を循環させながら紫外線照射を行う構造とした。紫外線照射は、上段及び下段のベルトコンベヤ上方に設置した65Wの紫外線ランプ(岩崎電気製)により行った(図1)。穀物循環量は500kg/hで、照射部となるベルトコンベヤ上での穀層は2粒弱の薄い層となる(図2)。穀物層と紫外線ランプとの距離は2cmである。また、1循環当りの実紫外線照射時間は4秒で、紫外線照度は97W/m²であるため、1循環当りの紫外線照射量は<紫外線照度×紫外線照射時間=388J/m²>

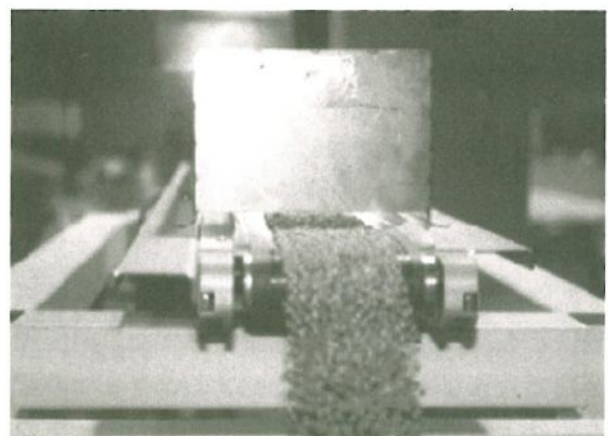


図2 紫外線照射の様子

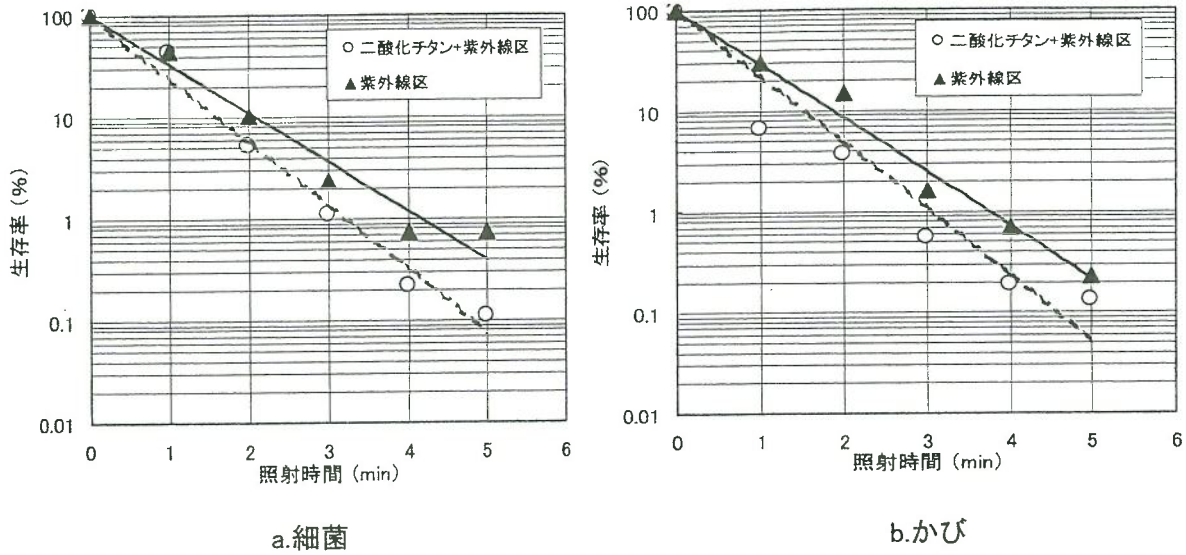


図3 紫外線照射時間と穀物付着菌の生存率

となる。なお、実験には2台の装置を用い、内1台は紫外線照射部の内側に二酸化チタンを塗布した。

4. 細菌、かびの殺菌率及び穀物の品質

1) 殺菌

細菌は*Bacillus*, *Pseudomonas*, かびは麹かび類の*Aspergillus*, 青かび類の*Penicillium*が確認された。細菌及びかびは、紫外線照射時間が増すに従って減少した。細菌の場合、90%の殺菌率を得るために必要な実照射時間は、紫外線処理区で2.1分、二酸化チタン塗布—紫外線処理区で1.6分であった(図3-a)。同様にかびの場合、紫外線区で1.9分、二酸化チタン塗布—紫外線処理区で1.5分であった(図3-b)。紫外線と二酸化チタンを併用した方が、殺菌時間を短縮することができた。

2) 品質

紫外線処理区、二酸化チタン塗布—紫外線処理区とも、発芽率の低下はなく、また、両処理区間で大きな差はなかった。アミログラフの測定値は、紫外線照射量と測定値との間に一定の関係は認められなく、品質の変化は確認されな

かった。

5. 実用規模エネルギー試算

実験の結果、90%の殺菌率を得るため必要な紫外線放射エネルギーは、穀物1t当り2.8MJであった。実用乾燥施設内に、実験機をスケールアップした、多段式紫外線照射装置を設置した場合、穀物30tに対し、90%の殺菌率を得るために必要な紫外線放射エネルギーは、84MJと推定された(表1)。

表1 実用装置導入試算

		実験装置結果	実用装置導入試算
UV	照 度	W/m ²	97
	照 射 面 積	m ²	0.12
	照 射 段 数	段	2
	総 照 射 面 積	m ²	0.24
	UV 出 力	W	23.3
	穀 物 貯 留 量	kg	100
	毎 時 循 環 量	kg/h	500
	循 環 時 間	h/回	0.2
	1 段 当 り 照 射 時 間	sec	2.0
	1 循 環 当 り 照 射 時 間	sec/回	4.0
	1 循 環 当 り 照 射 穀 物 質 量	kg	0.8
	90%殺菌するのに必要な時間	h	4.8
	90%殺菌するのに必要な実照射時間	sec	96
	穀物1t当り90%殺菌率を得るために必要なエネルギー	MJ/t	2.8
	貯留穀物を90%殺菌するのに必要なエネルギー	MJ	0.3

6. 今後の課題

実験の結果、紫外線のみでも穀物付着菌への殺菌効果は認められたが、二酸化チタンと紫外線を利用した方が、その効果は大きかった。また、本実験の範囲で、紫外線照射による品質の影響は少ないと考えられた。

穀粒の直接殺菌技術に関する研究は始まったばかりであり色々な適用場面が考えられる。そのため、今後生産現場を考慮し、適切な利用場面を考えつつ、装置開発をする必要がある。

文献

- 1) 林 徹, (1998), ソフトエレクトロンによる穀物の殺菌, 米麦改良, 31-39.
- 2) 食品衛生研究会監修, (2004), 新訂早わかり食品衛生法 (社)日本食品衛生協会.
- 3) 濱中大輔ら, (2003), 赤外線を利用したコムギおよびダイズの表面殺菌, 農業機械学会誌, Vol.65(2), 64-70.
- 4) 等々力節子, (2004), ソフトエレクトロンによる殺菌技術, 食糧その科学と技術42, 食品総合研究所, 85-95.
- 5) 長谷川秀翁ら, (2001), 高電圧パルスを応用した殺菌技術, 三洋電機技報Vol.33, No.2, 92-100.
- 6) 土戸哲明ら, (2001), 連続式紫外線照射装置を用いた粉末食品の殺菌, 防菌防黴, Vol.29, No.5, 305-309.
- 7) 日高靖之, (2004), 紫外線と二酸化チタンを用いた穀物殺菌技術, 農業機械学会誌, Vol.66(2), 24-25.
- 8) Fujishima, A. et al., (1972), Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode. Nature, 238, 37-38.



ブレインテクノニュース
バックナンバーのご案内
第106号
2004年11月15日発行

総説

硝酸同化効率向上による植物の代謝機能の増進-亜硝酸トランスポーター (CsNitr1) の発見とCsNitr1形質転換植物による大気中NO₂の吸収……………高橋 正昭ほか

国内情報

光合成電子伝達の温故知新……………鹿内 利治
植物の自己防衛システムを制御する液胞プロセシング酵素の発見と機能解明……………初谷 紀幸ほか
ニジマスを生むヤマメの作出：魚類始原生殖細胞を用いた発生工学……………吉崎 悟朗ほか

サツマイモ茎からの内生窒素固定細菌の分離・同定と茎中生息の確認……………安達 克樹ほか
高品質なたい肥生産を求めて……………原田 泰弘ほか
不定胚経由のスギ個体再生技術の開発……………伊ヶ崎 知弘ほか

地域の先端研究

世界で初, 種子なしビワの開発……………八幡 茂木
3倍体無核スタチ新品種‘徳島3X1号’について……………徳永 忠士
倍数性合成周縁キメラによる種なし香酸かんきつの開発……………脇塚 巧ほか

文献情報

大麦のウドンコ病耐性機構とその起源……………(抄訳：岩井 純夫)
3次元ゲル培養システムによるウシ胚盤胞の体外での伸長期胚への発育……………(抄訳：下司 雅也)
酸素濃度を高めた人工海水中でのホタテ閉殻筋の貯蔵……………(抄訳：木村 郁夫)

◀地域の先端研究▶

エリンギにおける担子胞子形成欠損突然変異株の作出

長野県農業総合試験場 バイオテクノロジー部

角 田 茂 幸

きのこは胞子を出して子孫を増やすが、この胞子がきのこ栽培をするうえで、作業に従事する人間に対し胞子アレルギーを起こさせたり、栽培室を汚染したりする。さらに、エリンギは日本に自生しないきのこのため多量の胞子の飛散は生態系を攪乱する危惧がある。そのため、胞子を形成しない担子胞子形成欠損株の作出は大きな期待がある。今回、エリンギのプロトプラストに対し紫外線を照射して突然変異を起こさせる技術により担子胞子形成欠損株を作出することができたので報告する。

1. はじめに

エリンギ (*Pleurotus eryngii*) は1993年に愛知県 (愛知県林業センター) が台湾から導入して栽培されたのがはじめてであり、今日では確実に消費者に浸透して、生産量は年をかさねるごとに増大し、長野県きのこ生産においては第4の品目に成長した。

本県のエリンギ栽培は、1996年頃から開始されている。1996年の全国生産高は1,910t (長野県298t) で2002年には19,472t (長野県5,100t) となり6年間で10倍 (長野県では17倍) となっている。きのこ需要が低迷していると言われるなか新品目エリンギの躍進はきのこ消費の掘り起こしに大きく貢献している。

しかし、一方生産面ではエリンギ特有の「立ち枯れ症状」により生産が不安定な面があり、多くの生産者が栽培を行ったにもかかわらず現在では限られた生産者により生産されているのが現状である。

また、きのこ栽培においてきのこから発生する胞子は、人間に胞子アレルギーを及ぼし、きのこ栽培施設の汚染等の影響も大きい。また、自然界に多量の胞子を飛散することは生態系の攪乱が危惧される。そのため、きのこ栽培において担子胞子形成欠損 (無胞子性) 品種の育成

TSUNODA Shigeyuki

〒381-1211 長野市松代町大室2206

は重要な課題である。

奈良県森林技術センターと日本きのこセンター菌草研究所は、2002年にエリンギの担子胞子形成欠損変異株の作出にいち早く成功している。この作出にはプロトプラストに対しN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 及び紫外線照射による突然変異処理を行い、それぞれ約5000株、約8000株のきのこを検索した結果、紫外線照射処理したものから2株の担子胞子形成欠損株が作出したものである¹⁾。

本県でも2003年2月にエリンギ担子胞子形成欠損株を1株作出することができた。作出方法は、プロトプラストに対し紫外線照射処理を行い約2500株のきのこを検索し、その中から1株得たものである。

2. 突然変異の作出方法

きのこの突然変異を起こさせる方法は、プロトプラストに対し紫外線を照射するものとNTGで処理をする方法が一般的に行われている²⁾。また、他の方法としては放射線照射も考えられる。ここでは、プロトプラストに対し紫外線照射を行う方法をとった。操作方法は次のとおりである。

まず、エリンギ菌糸体から次のプロトプラスト調整条件によりプロトプラストを作出する。品種・系統により収率が異なるので注意が必要

である（表1）。前培養として、PDA培地（Potato Dextrose Agar (Nissui)）スラント5本/24℃10日間行い、そのスラントにPD液体培地（Potato Dextrose Broth (DIFCO) pH6.0）7ml程度入れて培養した菌糸を白金耳等で細かく掻き取る。ナイロンメッシュにより掻き取った菌糸を濾過する。濾過した菌糸体をその液体培地のまま24℃で6日間程度培養する。細かい再生菌糸が液体培地中に培養されるので、遠心分離により菌糸を集積する。これにより50mg程度の菌糸を取得することができる。その取得した菌糸に細胞壁溶解酵素1.0ml（1.0% Novozym 234, 0.1% CHITINASE, 1.0% CELLULASE “ONOUZUKA” RS, 1M-Mannitol, 200mM-Maleate buffer (pH5.5)）をいれウォーターバス等で30℃60～90分間振とうしプロトプラストを作出する。収率は4～10×10⁶個程度となる（表1）。ナイロンメッシュにより濾過し、菌糸断片等をできる限り除去する。

次に変異処理の行程となるが、プロトプラストの濃度を10⁵～10⁶個/mlに調整し、プロトプラスト再生培地（0.6% malt extract, 0.4% yeast extract, 0.4% peptone, 0.4% glucose, 0.4% サンパールCP, 1.0% agar・0.5M-Sucrose 培地シャーレ）に0.1mlコンラージ棒で塗布する。

プロトプラストを塗布した再生培地に対し紫外線を照射するが、紫外線ランプ（日立GL15,

15W）からプロトプラストを塗布した再生培地までの距離10cmとして、照射時間10～15秒の条件で照射する。この照射時間で致死率94.4～99.9%となる（表2）。処理したら直ちに24℃程度暗黒化で培養を行う。

プロトプラストから生長する再生菌糸を実体顕微鏡で観察しながら培地ごと切り取り、得られた再生菌糸はPDA培地等で培養を行う。再生した菌糸は見逃すことなく全て取ることが必要である。

3. 突然変異体の検索

培養した菌糸をきのご栽培培地に接種し、きのご子実体を作り、担子胞子形成欠損の突然変異体を選抜する。栽培は、800ml容量のポリプ

表2 エリンギ系統NARC0211及びCRS0205の紫外線照射によるプロトプラスト再生率^Y及び致死率^W（2002年）

系統名・照射時間	再生率	致死率
秒	%	%
NARC0211		
10	0.1	94.4
20	0	100
30	0	100
cont	1.8	—
CRS0205		
10	0.29	96.2
15	0.0048	99.9
cont	7.7	—

※再生培地プロトプラスト添加個数
 処理時間10秒；10⁶個/シャーレ
 処理時間15,20,30秒；10⁶個/シャーレ
 ※再生培養期間 NARC0211；23日間,
 CRS0205；71日間

Z：紫外線照射条件

- 1 紫外線ランプ（日立GL15,15W）からシャーレまでの距離；10cm
- 2 照射時間 NARC0211；10秒, 20秒, 30秒
 CRS0205；10秒, 15秒

Y：再生率(%)=再生菌糸個数/再生培地プロトプラスト添加個数×100

W：致死率(%)=100-(再生菌糸個数/(再生培地プロトプラスト添加個数×無処理再生率)×100)

表1 エリンギ菌糸体からのプロトプラストの収率及び再生率^Z（2002年）

供試系統	収率	再生率
	個/ml	%
NARC0201	4.0 × 10 ⁶	3.7
NARC0202	7.3 × 10 ⁶	10.6
NARC0203	6.4 × 10 ⁶	8.8
NARC0204	9.9 × 10 ⁶	2.3
NARC0211	5.7 × 10 ⁶	1.0

Z：再生率(%)=再生菌糸個数/再生培地プロトプラスト添加個数×100

ロピレン栽培ビンを使用して、培地にはスギオガコ（水分率72%の場合）130g/800ml，コーンコブミール28.4g/800ml，コメヌカ56.5g/800ml，フスマ28.4g/800ml，ビート28.4g/800mlを混合し，水を添加して65～66%に調製し，滅菌を行う。

再生菌糸を栽培培地菌床面に接種し，培養は培養温度22～23℃，湿度60%で60日間程度で行う。発生方法は，菌かきを行った後に生育温度16～17℃，湿度98%で10日間生育を行い，子実体が20mm程度になったら生育温度16～17℃，湿度95%，光照射15分を5回/日行い4～10日間生育する。その間傘が8分程開いた時点で黒色の紙を傘周囲にヒダが隠れるように巻き孢子が落下するか否かを検索する（図1）。肉眼で孢子の有無を確認し孢子が確認できない場合は



図1 孢子落下の検索
中央の子実体からは孢子の落下がない



図2 担子孢子形成欠損変異株 UV444

顕微鏡で孢子形成の有無を確認する。孢子が確認できない場合は，その子実体の組織を分離して再度栽培を行い孢子形成の有無を確認する。

約2500株を検索し，担子孢子形成欠損変異株が1株（図2），担子孢子形成不完全欠損変異株を13株作出した（表3）。取得した変異株は全てが正常な形質を整えているわけではない。変異は様々なところに出てくるので，直ちに品種として出せるわけではない。

4. 担子孢子形成欠損変異株の遺伝的解析

担子菌きのこは2種類の異なった2つの核で子実体を形成している。そのため，遺伝的解析をするには2種類の核を別々に取得することが必要となってくる。これまで，担子孢子形成欠損変異株の遺伝的解析を行うために構成一核菌糸を取得する作業を行ってきた。2種類の核の内1種類の核を取得することができ，検定を行うため全く異なった構成一核菌糸と交配を行い子実体を得た。交配株も担子孢子形成欠損であることから，この変異は優性の突然変異であることが推察される。もう一方の構成一核菌糸が取得できれば確実な解析ができるのであるが，一核の状態では菌糸が伸長せず，菌糸伸長に異常をきたしたものと考えられる。現在は，担子孢子形成不完全欠損株を素材として担子孢子形

表3 エリンギのプロトプラストに紫外線照射を行うことにより発生した有用変異体菌株数（2002～2003年）

検定数	担子孢子形成	
	欠損	不完全欠損 ^Z
菌株 2558	菌株 1	菌株 13

Z：不完全欠損；肉眼による孢子形成の確認は困難だが，顕微鏡の観察において孢子形成が確認できるもの

成に関連する遺伝的解析を行っている。

5. おわりに

栽培きのこ生産現場では、栽培に従事する人が胞子を吸引することによりアレルギーを持つことは珍しいことではないが、それはあくまできのこ生産に従事している人に限り、きのこを食べる一般消費者におよぶものではない。しかしアレルギーの症状は、クシャミや鼻水がでるものから肺疾患におよぶものもあるといわれている。このようなことから、きのこの担子胞子

形成欠損の育種はたいへん重要な課題であることが理解できる。今後は、作出した担子胞子形成欠損株を品種として現地で栽培してもらえよう育種を行っていくものである。

文 献

- 1) Obatake, Y. et al., (2003), *Mycoscience*, 44, 33-40
- 2) 大政正武 (1992), きのこの増殖と育種 (最新バイオテクノロジー全書編集委員会), 第1版, 155-157, 農業図書, 東京.

◀文献情報▶

出生後2日以内に死亡したクローンウシの臓器における遺伝子発現の異常

Aberrant Gene Expression in Organs of Bovine Clones That Die Within Two Days after Birth
Shijie Li^{1, 2}, Yanxin Li¹, Weihua Du¹, Lei Zhang¹, Shuyang Yu¹, Yunping Dai¹, Chunjiang Zhao¹, and Ning Li¹

¹The State Key Laboratory for Agrobiotechnology in Livestock and Poultry, China Agricultural University, Beijing 100094, China.

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Life Science, Hebei Agriculture University, Baoding 071002, China

Biology of Reproduction, 72(2005) : 258-265

種々の動物種において体細胞核移植によるクローンが作出されてきているが、現在のところ、体細胞核移植により作出した胚のうち、成体まで発育するものはごくわずかである。このことは、今後、医学や農学分野においてクローン技術を利用しようとした場合に大きな障害となる。体細胞核移植においては、ドナー核は全能性を確保するためのエピジェネティックなリプログラミングが不可欠であるが、実際には不十分なリプログラミングのために発育に重要な遺伝子の発現に異常が起こり、出生後早期に死亡したり臓器に異常をきたして、クローン動物作出効率の低下をまねている可能性がある。そこで、生後直死や臓器異常をもたらす遺伝子の発現異常を明らかにするために、出生直後に死亡したクローンウシ9頭とコントロールとして人工授精によって生まれた正常なウシの心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓及び脳の6臓器における8種類の発育に重要な遺伝子(PCAF, Xist, FGFR2, PDGFRa, FGF10, BMP4, Hsp70.1, VEGF)の発現状況をリアルタイムRT-PCR法

により測定・比較した。また、体細胞核移植におけるドナー核としては線維芽細胞がしばしば用いられることから、ドナー核として用いる線維芽細胞を採取した個体の年齢がクローン産子の遺伝子発現に及ぼす影響をあわせて検討した。体細胞核移植によるクローンにおいて、今回調査した8種類の遺伝子のうち7種類の遺伝子に発現異常が認められた。発現異常を示した遺伝子の多くのは、成体の線維芽細胞由来クローンと胎子の線維芽細胞由来クローンに共通に認められたが、いくつかの遺伝子については、成体の線維芽細胞由来クローンと胎子の線維芽細胞由来クローンとの間で発現状況に差が認められた。今回調査した遺伝子の範囲内で、最も遺伝子の発現不良が少ない臓器は腎臓であり、最も異常が多かったのは心臓で、5個の遺伝子に発現異常が認められた。また、遺伝子発現に異常が認められた19例中12例においては遺伝子発現量の増加が認められたが、PDGFRa遺伝子においては発現量の低下のみが認められた。VEGF, BMP4, PCAF及びHsp70.1遺伝子において極めて多くの臓器に遺伝子発現の異常が認められたが、これら以外の4遺伝子については発現異常の程度は小さかった。今回、生後直死したクローンウシの多くの臓器において遺伝子発現の異常が起こっていることが明らかとなった。また、核移植によってもたらされる発現異常を示す遺伝子の種類は、臓器ごとに特徴的なものであった。遺伝子発現は胚の発育や器官形成に重要な役割を果たすことから、クローン動物における遺伝子の発現状態のさらなる検討を行うことにより、クローン動物の生後直死において認められるような臓器の異常を防ぎ、正常産子を効率よく得るための体細胞核移植技術の確立が促進されるであろう。

(抄訳：下司雅也, GESHI Masaya, 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構 畜産草地研究所)

◀文献情報▶

タイセイヨウマダラの激減に先立って見られた成熟傾向における急速な進化

Maturation trends indicative of rapid evolution preceded the collapse of northern cod

Esben M. Olsen¹, Mikko Heino^{1, 2}, George R. Lilly³, M. Joanne Morgan³, John Bratney³, Bruno Ernande¹ & Ulf Dieckmann¹

¹Adaptive Dynamics Network, International Institute for Applied Systems Analysis, A-2361 Laxenburg, Austria

²Institute of Marine Research, P.O. Box 1870 Nordnes, N-5817 Bergen, Norway

³Northwest Atlantic Fisheries Centre, Department of Fisheries and Oceans, P.O. Box 5667, St John's, Newfoundland, Canada A1C 5X1

Nature, 428, 932-935 (2004)

大西洋西岸のタイセイヨウマダラは過去数百年にわたって同海域の漁業を支え続けてきたが、1980年代後半から1990年代初頭にかけて99%以上個体数が減少した。それは成熟個体の若年齢化、成長および生残率の低下をともなっていた。商業的に漁獲される魚では成熟の早期化がしばしばみられるが、それが選択による遺伝的な変化によるものか、表現型の可塑性によるものかは明らかでなかった。

Olsenらは1977年からの継続的な調査結果を、死亡率変化と成長による表現型可塑性の影響を考慮に入れた新しい方法によって解析した。その結果、雌の個体の半数が成熟する年齢が1980年には6歳であったが、1987年には5歳に低下していた。さらに、雌の個体の半数が成熟する時点での体長は漁が禁止される1992年までは減少傾向を示し、逆に1993年からは増加していることが明らかになった。今後、大西洋西岸のタイセイヨウマダラ資源回復期での調査結果が待たれる。この解析方法では死亡率変化と成長による表現型可塑性を考慮に入れているため、以上の結果は遺伝的な変化が起こったことを示唆する。こうした変化は必ずしも差し迫っ

た資源の崩壊を意味するものではないが、生活史の変化を早期に察する警戒信号として有効であるとOlsenらは結論している。

この研究によって、個体群の資源量以外の、いわば質的な変化の重要性が浮き彫りになり、海洋資源に対する漁業の影響が新たな一面を見せた。継続的な漁業運営の方法についての議論は、資源量変動に影響する因子の複雑さから結論を得ていないが、成熟傾向の変化の資源量あるいは成長率の変化への影響が明らかになることによって、より適切な資源管理が可能になることが期待される。

(抄訳：岡本 崇, OKAMOTO Takashi, 日本水産株式会社 中央研究所)

◀文献情報▶

ワイン醸造における酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の酸素消費量、および発酵量への影響

Oxygen Consumption by Anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under Enological Conditions: Effect on Fermentation Kinetics

Eric Rosenfeld¹, Bertrand Beauvoit², Bruno Blondin¹, Jean-Michel Salmon¹

¹Laboratoire de Microbiologie et de Technologie des Fermentations, Unité Mixte de Recherches "Sciences pour l'œnologie," Institut National de la Recherche Agronomique, F-34060 Montpellier Cedex1, France

²Institut de Biochimie et Génétique cellulaires du CNRS, Université Victor Segalen, Bordeaux II, 33077 Bordeaux Cedex, France

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol.69, p.113-121 (2003)

酵母 *S. cerevisiae* の発酵活性を制御している生理的機構は、完全にはわかっていない。これまでの研究で、脂質合成に必要とされる酸素が増殖やアルコール発酵の維持のために必要であることが示されている。実際に、発酵量とエタノール耐性は関与しており、このエタノール耐性は①細胞膜中のエルゴステロール含量の増加、②細胞膜を構成する鎖長の長い不飽和脂肪酸（オレイン酸等）の増加により高められる。

ワイン発酵においては酸素の添加を行うことで、発酵量を高めている。また、添加された酸素は不飽和脂肪酸とステロール合成に使われていることで、エタノール耐性が高まる。しかし、発酵に使われる酸素量は、不飽和脂肪酸とステロール合成に使用される量よりも多く、このことは不飽和脂肪酸とステロール合成経路以外の酸素を消費する経路の存在を示唆した。

酸素添加による新規の脂質合成経路がエタノール耐性の増加に関与している可能性があるため、ステロールと不飽和脂肪酸の栄養要求株 (*erg1Δ*, *ole1Δ* 破壊株) を作成し、その影響

について検討した。酸素を添加しない場合、この2つの変異株は通常の変異株を示した。一方、定常期に酸素を添加した場合、*erg1Δ* 破壊株は通常の変異株を示したが、野生株と *ole1Δ* 破壊株の発酵量は増加した。これは酸素添加による新たなステロール合成により発酵量が増加したことを示唆している。

また、これまでの研究において、脂質がない培地への酸素添加により、ステロールと不飽和脂肪酸が合成されることがわかっている。本研究では、嫌気条件下での酸素添加による増殖や発酵量への効果、および酸素消費経路について検討した結果、培地中に多量のエルゴステロールとオレイン酸が存在する際、定常期の酸素添加は発酵量と生菌率を高め、発酵期間を短くすることが明らかになった。また、呼吸鎖阻害剤やタンパク質合成阻害剤やステロール合成阻害剤により酸素消費量が低下しなかったことから、新たに呼吸鎖やタンパク質合成経路やステロール合成経路以外の新規の酸素消費経路の存在を示唆した。

以上の結果から、エルゴステロールが多く存在する場合、酸素添加により発酵量と生菌率が増加することが明らかにされた。酸素添加により新たなステロールが合成され、生菌率や発酵量を高めているようである。また、酸素添加による発酵期間の短縮も示された。また、ステロール合成、タンパク質合成、不飽和脂肪酸合成経路や呼吸経路以外の新たな酸素消費経路の存在が示された。この経路は発酵量に影響を与えず、酸素を消費しているようである。

この新規の酸素消費経路の生理的機能の解明は、醸造・発酵分野への応用が期待されている。(抄訳：安達美和, ADACHI Miwa, 広島大学大学院 生物圏科学研究科)

◀文献情報▶

カリウム欠乏のプロテオーム解析

Comparative proteome analysis of differently expressed proteins induced by K⁺ deficiency in *Arabidopsis thaliana*.

Jeong Gu Kang, Young Jae Pyo, Jin Won Cho and Myeon Haseng Cho

Proteomics (2004) 4, 3549-3555

今、世はオーム流行りである。オームといっても抵抗でもなければ、真理教でもない。曰く、genome, proteome, metabolome, transcriptome。個々のgeneやproteinではなく、総体として捉えるという意味らしいが、なかでもプロテオームは注目を浴びている。手許のデータベースによると、今までに公表されたプロテオームに関する論文の総数9,193編、うち植物は僅か364編（平成17年2月3日現在）。植物プロテオームではどんなところが話題になっているかなと2000年に創刊された“Proteomics”というその専門誌をパラパラとめくってみると、材料こそシロイヌナズナを使うことが大半（8割強）であるが、方向はテンデンバラバラである。その中で、“植物栄養”とプロテオームという結びつきが面白く目に付いたので紹介したい。

窒素，リン酸，カリといえは肥料の三要素として知られ，なかでも，カリは根肥と言われ，細胞伸長，向屈性，発芽，浸透圧調節，気孔開閉等に作用し，その欠乏は作物に甚大な影響を与え，収量および品質の低下をもたらす。カリ欠乏下で短時間（3時間）と長時間（7日間，欠乏症状が見られる）栽培したシロイヌナズナからタンパク質を抽出し二次元電気泳動後，正常植物体と欠乏植物体との間で差の現れるタンパク質をMALDI-TOF-MSで同定している。

欠乏3時間で早くも出現するタンパク質に差が現れ，熱ショックタンパク質が姿を消し，シグナル伝達に関係の深いヘテロメトリックGタンパク質が現れ，光合成炭酸ガス固定の鍵酵素Rubiscoの等電点が変わる。カリ欠乏が植物体

に感知され，対応策の一つとして光合成能力を変化させていることが分かる。7日間カリ欠乏下で栽培した場合には，シグナル伝達関連のタンパク質脱リン酸化酵素PP2AとABAシグナル伝達の際その下流で作用するATHB6やイオンチャンネル活性を制御している14-3-3タンパク質が出現する。外界のカリイオンの濃度変化に対応してイオン輸送が活発化し，細胞内のイオン環境を一定に保とうとしていることが垣間見える。イオン濃度変化という環境ストレスに対して，防御物質のポリアミン，プロリンの合成が起こり，植物ホルモンであるオーキシン合成が活発化する。また，プロテオソームが活発化しタンパク質分解が活発になり，タンパク質の代謝回転が早まるのかも知れない。ともあれ，この解析から浮かび上がってくるのは，養分欠乏という異常事態に，持っている全ての機能を使って必死に立ち向かう植物の姿である。

マイクロアレイの場合にも言えることではあるが，プロテオーム解析の膨大なデータの中から何を読み取るかが問題である。ややもするとデータを出すことだけに満足してしまう危険性は無きにしもあらず。研究者の本当の力量が試されるのはその先なのかも知れないし，他の研究と違って，研究者の個性や関心により，データから様々な物語を語ることも可能である。それも，この種の研究の楽しみかもしれない。著者や筆者は「環境適応」という立場からこの結果をみているが，「欠乏症状発現のメカニズム」という物語を紡ぐことだって可能ではあろう。（抄訳：岩井純夫，IWAI Sumio，鹿児島大学農学部）

生研センターからのご案内

研究開発を対象にした一般・特別融資制度のご案内

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・外注費等。

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、利息も据置くことが可能
- (5) 担保・保証人：原則として必要
- (6) 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、試験研究の成功度が低くなった場合は、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%〉します。
 - 【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。

詳細は下記へお問い合わせ下さい。

生研センター 新技術開発部 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@ml.affrc.go.jp

編集後記

第108号をお届けします。本号の総説では、佐々木卓治氏（(独)農業生物資源研究所）に現下のホットな話題である、イネゲノム全塩基配列の解読完了と今後の課題についてご紹介戴いた。その他の研究情報として、相田光宏氏（奈良先端科学技術大学院大学）にシロイヌナズナの根における幹細胞ニッチの制御機構、山庄司志朗氏（(株)日研生物医学研究所）らに化学発光法による食品の生菌検査、三橋忠由氏（(独)農業生物資源研究所）に家畜遺伝情報の産業利用などについてご紹介戴いた。地域の先端研究では、角田茂幸氏（長野県農業総合試験場）にエリンギにおける担子胞子形成欠損突然変異株の作出についてご紹介戴いた。また、文献情報は、下司雅也氏（(独)畜産草地研究所）、岡本崇氏（日本水産(株)）、安達美和氏（広島大学）、岩井純夫氏（鹿児島大学）、にそれぞれご紹介戴いた。

ご多忙な中お引き受け戴きました執筆者各位に深甚の謝意を申し上げます。 (渡辺記)

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支援センター（生研センター）の許諾を得て行って下さい。

ブレインテクノニュース 第108号

平成17年3月15日発行

発行人 津賀幸之介

編集人 吉奥 努

発行所 独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構

©生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3丁目18番19号 虎ノ門マリビル10階

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

e-mail brainki1@ml.affrc.go.jp

URL <http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>

印刷・製本 日本印刷株式会社 〒101-0021 東京都千代田区外神田6-3-3 TEL 03-3833-6971