

# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成18年1月15日発行（隔月1回15日発行）

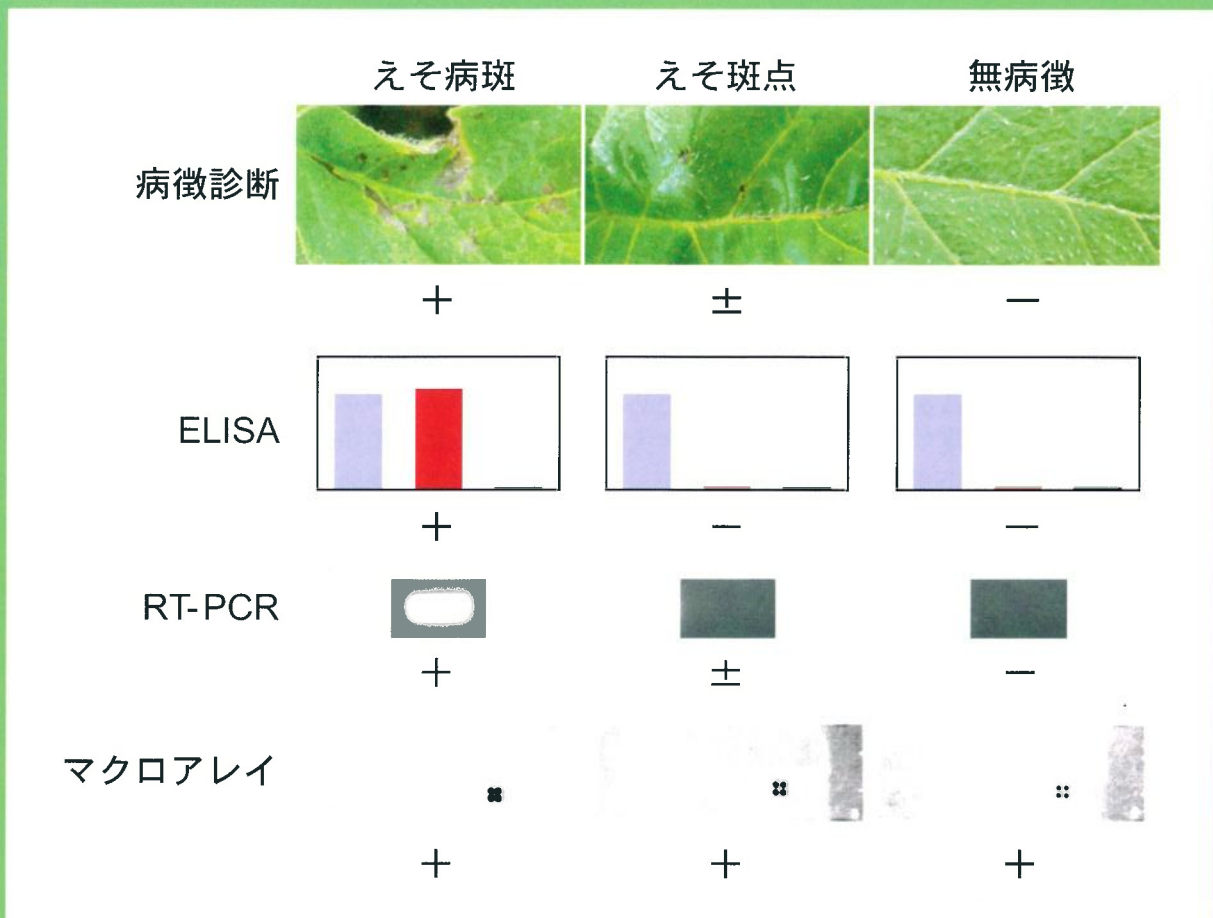
ISSN 1345-5958

## TECHNO NEWS

# No.113

15 JANUARY, 2006

### ブレインテクノニュース



トマト輪点ウイルス (ToRSV) 感染葉からのウイルスの検出例

## ジャガイモ生産をサポートする マクロアレイ病害虫診断技術

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構

北海道農業研究センター

眞岡哲夫

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

- 新規オリゴ糖の開発に向けた酵素の遺伝子レベルでの改変 ..... 1  
 林 清<sup>1</sup>・北岡 本光<sup>2</sup> (<sup>1</sup>農林水産省 農林水産技術会議事務局, <sup>2</sup>(独) 食品総合研究所 酵素機能研究室)

### 総説関連情報

- 新たな遺伝子ランダム変異導入技術 ..... 5  
 北岡 本光<sup>1</sup>・藤井 亮太<sup>1</sup>・小林 厚志<sup>1</sup>・林 清<sup>2</sup> (<sup>1</sup>(独) 食品総合研究所 酵素機能研究室, <sup>2</sup>農林水産省 農林水産技術会議事務局)
- オリゴ糖とその機能性の開発 ..... 9  
 窪田 英俊・中村 博文・河野 敏明・荒森 幾雄 (明治製菓 (株) 食料健康総合研究所)

### 国内情報

- 幼若ホルモン分解酵素の過剰発現でカイコを2回の脱皮で蛹へ誘導 ..... 16  
 塩月 孝博・譚 安江・田村 俊樹 ((独) 農業生物資源研究所)
- イネ (日本晴) ゲノム塩基配列から解析された3万7千個の遺伝子とその特徴について ..... 21  
 松本 隆・佐々木 卓治 ((独) 農業生物資源研究所)
- 原子間力顕微鏡による抗体抗原反応測定のための新しい方法 ..... 26  
 若山 純一・赤沼 哲史・関口 博史・大谷 敏郎・杉山 滋 ((独) 食品総合研究所 食品工学部 計測工学研究室)
- ステンレススチール標識およびIC標識を利用したアワビの情報管理技術 ..... 32  
 山川 紘 (東京海洋大学 社会連携推進共同研究センター)
- ジャガイモ生産をサポートするマクロアレイ病害虫診断技術 ..... 38  
 眞岡 哲夫 ((独) 農業・生物系特定産業技術研究機構 北海道農業研究センター)

### 地域の先端研究

- バイオフィトンによる病害抵抗性誘導物質の探索とその過程で得られた抗菌物質 ..... 43  
 加藤 公彦<sup>1</sup>・山口 亮<sup>1</sup>・影山 智津子<sup>1</sup>・稲垣 栄洋<sup>1</sup>・伊代住 浩幸<sup>1</sup>・渡辺 哲<sup>2</sup>・尾崎 剛一<sup>2</sup> (<sup>1</sup>静岡県農業試験場 病害抵抗性誘導プロジェクト, <sup>2</sup>クミアイ化学工業 生物科学研究所)

### 文献情報

- 15℃での羊精子の固形化保存が生存性及び精子進入率に及ぼす影響 ..... 47  
 J. Yániz et al. (*Theriogenology*, 64 : 1844-1851, 2005) 抄訳: 下司 雅也
- 生後4ヶ月までの乳児におけるオリゴ糖と乳酸菌の効果 ..... 48  
 Bakker-Zierikzee AM et al. (*Br J Nutr. Nov* ; 94 (5): 783-90, 2005) 抄訳: 畑中 美咲
- 160kDa蛋白質はエビのヘモシアニン誘導メラニン沈着に必須である ..... 49  
 K. Adachi et al. (*Journal of Food Science* 68, 765-9, 2003) 抄訳: 杉山 公教

- 生研センターからのご案内 (2006年度新規研究課題募集のお知らせほか) ..... 50

#### 表紙の説明

ToRSV (トマト輪点ウイルス) 感染ジャガイモの「えそ病斑」, 「えそ斑点」, 「無病徴」部分を選び, マクロアレイ法と他の方法で検出感度を比較した。その結果, マクロアレイ法ではこれら全てから明瞭にToRSVの特異的シグナルが検出でき, 他の方法に比べ本法が高い検出感度を有していることが証明できた。

詳細については, 38頁をご覧ください。

## ◀ 総 説 ▶

新規オリゴ糖の開発に向けた  
酵素の遺伝子レベルでの改変<sup>1</sup>農林水産省 農林水産技術会議事務局 首席研究開発企画官<sup>2</sup>独立行政法人 食品総合研究所 酵素機能研究室林 清<sup>1</sup> ・ 北 岡 本 光<sup>2</sup>

我が国では国民の高い健康志向もあり、世界に先駆け各種の生理機能性を有するオリゴ糖が開発・上市されている。オリゴ糖は非常に多様であるものの、効率的な調製に必要な酵素が無いこともあり、未開発のものが大半である。遺伝子レベルでの酵素改変技術とあいまって、今後、新たな機能を有するオリゴ糖の開発が大いに期待されている。

## 1. はじめに

酵素は、触媒機能を有する蛋白質であり、生命活動には不可欠である。生体内で生ずる化学反応は、すべて酵素の触媒作用によるものであり、酵素が生体触媒と呼ばれる所以である。酵素は生物を構成する物質の合成・分解、エネルギー発生を司り、生命活動の根元でもある。酵素には、特定の反応だけを触媒する選択性（反応特異性）と特定の物質だけを触媒する選択性（基質特異性）など極めて優れた触媒特異性があり、生体内と同じ温和な環境下で作用することから、酵素利用技術はバイオテクノロジーの要とも言える。

一方、オリゴ糖などの糖質には、生理機能性をはじめとする各種の機能が認められるものの、これら糖質の秘められた可能性を引き出す上で最も重要な因子は酵素である。遺伝子レベルで改変した酵素を活用することにより新たなオリゴ糖を開発する道が開かれつつあり、注目されている。

## 2. 多種多様な酵素

多種多様な酵素が存在することから、国際生化学・分子生物学連合 (International Union of HAYASHI Kiyoshi<sup>1</sup>, KITAOKA Motomitsu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>〒100-8950 東京都千代田区霞ヶ関1-2-1<sup>2</sup>〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

Biochemistry and Molecular Biology) の酵素委員会 (Enzyme Commission) では、酵素を系統的に分類している (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>)。すなわち、触媒反応の様式から酸化還元酵素、転移酵素、加水分解酵素、脱離酵素、合成酵素、異性化酵素の6種類に分類し、さらに反応機構等を含め4つの要素からなる番号で分類している。例えば、デンプンを分解する $\alpha$ -アミラーゼはEC 3.2.1.1に分類されている。最初に分類した1961年では712種類であったものが、1992時点では3196種類に増加し、現在では約4000種類に及んでいる。

このうち、食品産業等で利用されている酵素は、デンプン分解酵素やタンパク質分解酵素などの加水分解系の酵素が大半であり、わずか40種類ほどであり、その内の半数が糖質に作用する酵素である。なお、分類上は同じ酵素でも、作用温度やpH等の特性が異なる各種の酵素剤が上市されており、 $\alpha$ -アミラーゼでは56種もの商品が販売されている (<http://www.nfri.affrc.go.jp/yakudachi/koso/index.html>)。

一方、酵素遺伝子の塩基配列を解読することが容易となったことから、糖質を加水分解する酵素では、アミノ酸配列の相同性に基づいて2万あまりの酵素を104種類のファミリーに分類している (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/acc.html>)。このアミノ酸配列に基づくファミリー分類では、酵素の特性ばかりでなく、進化的関連性や立体構造等と密接に関係することか



図1 アミノ酸配列のホモロジーの高い部位での遺伝子置換による酵素改変の例  
耐熱性が85°C (Tm)と35°C (Cg)の2種類のグルコシダーゼの遺伝子を対象に、2カ所の  
部位で置換した4種のキメラ酵素を作出したところ、2種 (Tm578/606Cgと  
Tm638/666Cg)が活性型として得られ、耐熱性は65°Cと70°Cであった<sup>5)</sup>。

ら、近年、多用されている。

### 3. 酵素の遺伝子レベルでの改変技術

酵素は、アミノ酸が200～数百個直鎖状に結合したものであり、それがラセン状やシート状に折りたたまれ特有の立体構造を形成している。アミノ酸をコードしている遺伝子を改変すれば酵素を構成するアミノ酸が代わり、酵素の立体構造が変化し、最終的には酵素の特性に影響を及ぼす。そこで、酵素遺伝子に変異を導入する様々な手法が開発されているが、現時点では、どのようなアミノ酸配列がいかなる3次元形状、あるいは酵素特性に結びつくかに関する情報はきわめて限られており、アミノ酸置換による構造や酵素特性の変化を予測することは

困難である。そのため、予測に基づく酵素の特性改変ではなく、変異を効率よく酵素遺伝子に導入し、得られた変異酵素の特性を解析しながら必要とする変異酵素を作出する必要がある。

大型のタンパク質では、その立体構造はドメインと呼ばれる単位的構造の組み合わせでできている。ドメインは、約70～100残基のアミノ酸から構成されており、酵素全体で1000種類程度のドメインが存在すると推定されている。セルラーゼ等の不溶性基質に結合するドメインと、加水分解を司る活性ドメインとを結合し、不溶性基質に対する活性を増強した例をはじめ、ドメイン単位で遺伝子を融合<sup>1)</sup>あるいは分断<sup>2)</sup>し、酵素を改変することが行われている。このドメイン単位での改変は、1つのドメインが固有の機能を発揮している場合が多いことか

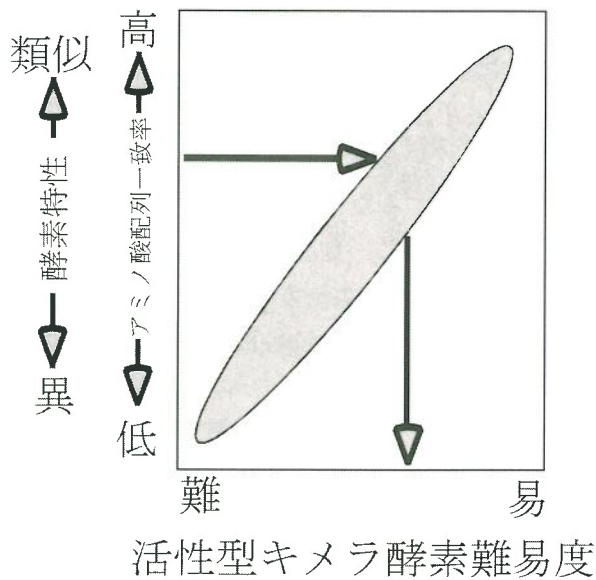


図2 活性型キメラ酵素を得る難易度

ら、酵素の性質を大きく変えることには向いていないが、特定の機能を付与するには好適な手法である。また、ドメインよりも小さな単位としてモジュールが提唱されており<sup>3)</sup>、モジュール単位で置換したキメラ酵素を作出し、耐熱性を向上させる等、酵素の特性改変に成功している<sup>4)</sup>。

また、アミノ酸配列のホモロジー解析から、配列が良く一致している部位で酵素遺伝子を置換する手法も効率的な酵素の改変に有用である(図1)。アミノ酸配列が保存された領域では、その立体構造も保存されており、遺伝子置換による不必要なひずみの発生を低減できることが期待できる。この手法では、アミノ酸配列のホモロジーが重要である。ホモロジーが高いほど活性型のキメラ酵素を得ることは容易となるが、ホモロジーが高いと酵素の特性も類似しており、キメラ化により酵素の特性を大きく改変することは容易ではない。一方、ホモロジーが低いほど酵素の特性が異なり、キメラ化により酵素特性を大きく改変することが期待できるが、活性型のキメラ酵素を得るのは困難となる。筆者らの100を越えるキメラ酵素作出の経験か

らは、アミノ酸配列のホモロジーが3割以下では、前述のファミリー分類で異なる分類となり、酵素特性も大きく異なるが活性型のキメラ酵素はほとんど得られない。アミノ酸配列のホモロジーが5～8割程度のもを対象にキメラ酵素を作出することにより、特性を改変した酵素を得ることに成功している(図2)。なお、この場合でも、活性型の酵素が得られる割合は、3割程度である。

酵素を構成する最小単位がアミノ酸であり、アミノ酸レベルでの改変手法は、「遺伝子のランダム変位導入技術」をはじめ、種々のものが提唱されている。アミノ酸残基の置換による改変では、経験則である「曖昧な加算性」を活用することがポイントである。そのためには、変位の導入割合を酵素遺伝子全体で1箇所にとどめる必要がある。「曖昧な加算性」とは、Aのアミノ酸残基置換により2℃、Bのアミノ酸残基置換により3℃、Cのアミノ酸残基置換により4℃耐熱性が向上した場合、A、B、Cの3箇所のアミノ酸残基置換を同時に導入すると6℃程度の耐熱性向上が期待できる(2+3+4=9であるがきっかりと9とならないので、「曖昧な加算性」と表現する)。こうした、加算性は耐熱性以外にも、分子活性をはじめとする種々の酵素特性で成り立つことが報告されている。

#### 4. 多種多様なオリゴ糖とその可能性

ブドウ糖や果糖など、分子構造的な最小単位である単糖が2～10分子結合したものが「オリゴ糖」である(少糖類ともいう。オリゴとは「小数」という意味)。単糖が結合している数により、二糖類(麦芽糖、蔗糖、乳糖、トレハロース、セロビオース等)、三糖類(ラフィノース、パノース等)、四糖類(スタキオース等)など、あるいは単糖がリング状に結合した環状オリゴ糖(シクロデキストリン等)などがあり、水溶性のものが多く。また、フラクトオリゴ糖、ダイズオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖等のように、

二糖類，三糖類等の混合物もある。オリゴ糖を構成する単糖は非常に多様であり，炭素数が6つの中性糖に限っても理論上34種類存在するが，天然にはごくわずかしかな存在しない稀少糖も少なくない。また，糖の結合様式も多様であることから，極めて多種多様なオリゴ糖が存在するが，これらのうちには天然に存在しないものもある。これらのオリゴ糖を効率よく調製できる酵素の開発と，調製したオリゴ糖の生理機能を効率的に解明することにより，新規オリゴ糖の利活用が期待できる。とりわけ，オリゴ糖を構成する単糖は，無毒であり，オリゴ糖の食品としての安全性は高いことから，機能性食品素材として有望視されている。また，オリゴ糖は一部には苦味を呈するものもあるが，一般には甘味を有している。今後，酸味，塩味等を呈するオリゴ糖が開発されればさらにその用途は拡大されよう。

## 5. おわりに

ピコタイタープレートを使用することにより，1台の装置を5時間運転すれば2000万塩基を解読できる高速機器が発売された。微生物ゲノムであれば1回の運転で塩基配列の解読が完了してしまうほどの能力である。これまでに，膨大な遺伝子情報が公開されているが，今後，こうしたデータの蓄積と利用がいっそう加速されることが想定される。

一方，機能性食品の開発におけるボトルネックは，生理機能性の解明ならびに安全性の事前予測である。オリゴ糖では，食品としての安全性が極めて高いため，生理機能性の解明がネックとなるが，新たな手法として注目されるのがニュートリゲノミクス（Nutrition（栄養）+

Genomics（遺伝学））である。ニュートリゲノミクスは食品成分の摂取に伴って生ずる，mRNAやタンパク質の発現量の変動を網羅的に解析する手法であり，分子栄養学の研究によって蓄積されてきた栄養素のシグナル伝達機構の仮説を検証するための強力なツールとなるものである。さらに，食品の生理機能性の目安となる新たなバイオマーカーを効率良く探索でき，新たな原理の発見にも寄与するものと注目されている。

我が国は，フラクトオリゴ糖をはじめ，世界に先駆けトップレベルのオリゴ糖製造技術を開発し，様々なオリゴ糖を市場に送り出してきた。遺伝子レベルでの酵素改変技術とオリゴ糖の生理機能性の効率的解明技術とがあいまって，新たな生理機能性を有する様々なオリゴ糖が開発されることが期待される。

最後に，「新事業創出研究開発事業 コンソーシアム4 食品の機能を高めるための新機能酵素の開発」推進に当たり多大なご支援を賜りました，生研センターに深謝いたします。

## 文 献

- 1) Kittur, F. S., et al. (2003) *FEBS Lett.*, 549, 147-151
- 2) Kim, B. J., et al. (2005) *FEBS Lett.*, 579, 3075-3080
- 3) Go, M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80, 1964-1968
- 4) Kaneko S., et al. (1999) *FEBS Lett.*, 460, 61-66
- 5) Goyal, K., et al. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.*, 407, 125-134

## ◀総説関連情報▶

## 新規な遺伝子ランダム変異導入技術

<sup>1</sup>独立行政法人 食品総合研究所 酵素機能研究室<sup>2</sup>農林水産省 農林水産技術会議事務局北岡 本光<sup>1</sup>・藤井 亮太<sup>1</sup>・小林 厚志<sup>1</sup>・林 清<sup>2</sup>

分子進化工学的手法により酵素の特異性を改変するためには、酵素をコードするDNAにランダムに変異を導入する技術が必要である。遺伝子へのランダム変異導入法として従来からエラープローンPCR法がもっぱら用いられてきた。筆者らは従来法と異なる新規なDNA変異導入法の開発を行ってきたのでここに紹介する。

## 1. はじめに

新規な酵素を得るためには自然界から新規な酵素をスクリーニングする方法が従来から用いられてきた。自然界では酵素などのタンパク質は長い年月をかけて進化して現在の姿になったと考えられる。進化の過程ではタンパク質アミノ酸配列の変異と淘汰による選抜が繰り返された。最近の遺伝子工学的手法の進歩により、自然に長時間かけて行われてきた進化の過程を模倣し、実験室内において短期間でタンパク質の改変を行うことが行われるようになった。これを分子進化工学と呼ぶ。分子進化工学においては遺伝子へのランダム変異導入によるランダム変異タンパク質ライブラリーの作成と、特性の改変されたタンパク質の選抜を繰り返すことにより目的のタンパク質を取得する。タンパク質の選抜技術は個々のタンパク質の特性に依存しており、個別のタンパク質によりその技術を開発する必要がある。しかしながら、遺伝子へのランダム変異導入技術は目的タンパク質に全く依存せず一度技術を開発すればすべてのタンパク質に用いることができる基盤的技術となる。

遺伝子にランダム変異を導入する技術として  
KITAOKA Motomitsu<sup>1</sup>, FUJII Ryota<sup>1</sup>,

KOBAYASHI Atsushi<sup>1</sup>, HAYASHI Kiyoshi<sup>2</sup><sup>1</sup>〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12<sup>2</sup>〒100-8950 東京都千代田区霞ヶ関1-2-1

PCR (Polymerase Chain Reaction) 中にランダムエラーを取り込ませるエラープローンPCR法がもっぱら用いられている。PCRはDNAを、両端のDNA配列に相当する二種のプライマーおよびDNAポリメラーゼを用いた鋳型依存的増幅反応を繰り返し行うことにより増幅する方法である。通常DNA配列は忠実に増幅されるが、DNAポリメラーゼの選択や反応条件を工夫すれば任意の確率で増幅されたDNAに変異を取り込ませることができる。この方法をエラープローンPCR法と呼ぶ。得られたDNA増幅断片を適宜ベクターに組み込むことにより変異遺伝子ライブラリーを作成する。発現ベクターに組み込んで大腸菌などの宿主に導入すれば変異タンパクライブラリーになる。

エラープローンPCR法は既に多くのタンパク質変異に用いられている既に確立された方法である。しかしながらこの方法にはいくつかの欠点が存在する。まずエラープローンPCRの変異の入り方は、DNA塩基であるATGCがランダムに変異するわけではなくA→G, T→C変異を起こしやすい癖がある。これにより変異しやすいアミノ酸残基に偏りが生じる。そこで異なる癖の変異導入法があればお互いに補完可能になり、変異タンパクライブラリーのサイズを大きくすることができる。また、エラープローンPCRでは、その最適化に労力と時間を要するなど操作上改良すべき点も残されている。さらに、

隣接した塩基が同時に変異を起こす確率はほぼ0であり、変異可能なアミノ酸の種類は7.5種類程度に限定されるという制約がある。

我々は酵素の特性改変を目指して新規なDNAランダム変異導入法の開発を行ってきた。その中でエラープロンPCR法を補完することが可能な方法について紹介する。

## 2. 脱塩基部位を利用したPCRによる変異導入<sup>1)</sup>

生体内の酸化やアルキル化により損傷したDNA塩基は、DNAグリコシラーゼによる加水分解反応を受け脱塩基部位が発生した後、校正活性を持つDNAポリメラーゼにより元の塩基に修復される。我々はこの脱塩基反応が試薬と酵素の組合せにより種々の塩基に対して特異的に行わせることが可能である(表1)ことを考慮し、脱塩基後に修復無しにPCR反応を行うことによりDNA配列に変異を導入できるのではないかと考えて検討を行った。

本研究では、人為的に発生させた脱塩基部位を含むDNAをPCRの鋳型として用いた。脱塩基部位は、DNA上に本来存在しないウラシルを導入し、ウラシル塩基に特異的に作用するウラシルDNAグリコシラーゼで処理することにより得た。

脱塩基部位を含むDNAを鋳型としたPCR反応はTaqDNAポリメラーゼのような校正活性を持たないDNAポリメラーゼを用いることに

より進行することがわかった。塩基配列の解読結果から、脱塩基部位は主にチミン、次にシトシンに変換され、プリン塩基であるアデニンまたはグアニンには変換されにくいことが判明した。また、一塩基欠失も11.2%の割合で生ずることが判明した。残念ながら二塩基連続変異は得られなかった。

先に述べたとおり脱塩基部位の作成はDNAの化学処理による損傷+脱塩基酵素による反応の二段階で行うことが可能である。この方法を用いれば特定の塩基をターゲットにして脱塩基部位を創出することが可能であり、変異導入の癖を制御することが可能になる。そのため脱塩基部位を利用した変異導入法は従来法であるエラープロンPCRを補完する技術として用いる可能性が考えられる。

## 3. エラープロンRCA法による簡便な変異DNAライブラリーの作成<sup>2-4)</sup>

エラープロンPCR法による変異酵素ライブラリーの作成は、特定プライマーを用いたDNA断片の増幅(変異取り込みをかねる)、増幅断片の精製、ベクターへの挿入(ライゲーション)、大腸菌へのベクター導入のステップにより行われる。これらの操作には、精密に温度コントロールを行うためサーマルサイクラーが必要である。また、操作のステップ数を考慮すると実際に操作を完了するのに2日必要である。

表1 DNA塩基の損傷と脱塩基酵素

損傷塩基	元の塩基	損傷の方法	脱塩基酵素
ウラシル	C	亜硝酸	ウラシルDNAグリコシラーゼ
ウラシル	T	PCR	ウラシルDNAグリコシラーゼ
ヒポキサンチン	A	亜硝酸	ヒポキサンチンDNAグリコシラーゼ
8-オキシグアニン	G	金属による酸化	8-オキシグアニンDNAグリコシラーゼ
3-メチルアデニン	A	酵素反応	3-メチルアデニンDNAグリコシラーゼ



ローリングサークル増幅法（RCA）は、一定温度で環状DNAを鋳型、ランダムヘキサマーDNAをプライマーとして用い、 $\phi$ 29DNAポリメラーゼによる伸長反応により環状DNA配列を直鎖状に反復した配列を持つDNAとして増幅する方法である。RCA法はDNAシーケンシング反応において、プラスミドDNAを調製するステップを省く目的で特に大規模シーケンシングなどにおいて使われていた。RCA増幅に用いられる試薬はアマシャムバイオサイエンス社よりTemplphiというキット名で市販されている。

我々はプラスミドを鋳型としたRCA増幅産物が菌体内で自動的に環化することにより元のプラスミドを形成しそのまま大腸菌の形質転換に用いることができることを発見した<sup>5)</sup>。RCA増幅産物の大腸菌への導入にはエレクトロポレーションなどの従来法を用いることができる。さらにRCA増幅の際に反応液にマンガンを追加することによりランダム変異を導入できる条件を見だし、エラープローンRCA法と命名した。

エラープローンRCA法は、市販キットにマンガンを追加するだけで行うことができる。増幅は一定温度で行われるためPCRのようなサーマルサイクラーは不要であり、またランダムヘキサマーDNAをプライマーとして用いるため特異的プライマーの設計も全く必要がなく、キットに添付されているプライマーを用いてあらゆる種類の環状DNAを増幅することができる。更に、増幅終了後はライゲーションが必要なく、そのまま大腸菌に導入するだけの非常にシンプルな方法である（図1）。この方法は現在知られている変異ライブラリー作成法の中でも明らかに最も簡便な方法である。

変異導入効率はマンガン濃度に依存しており、最大で3/kbp程度の変異効率を得た。変異箇所を調べてみると環状DNA中全体にはほぼランダムに分布していた。エラープローンRCA法ではベクター内の挿入断片のみならずベクター配列そのものにも変異を生じる。しか

しながらベクター配列に生じた変異によりプラスミドの再生に影響を及ぼす場合は結果的にはプラスミドとして再生されないためライブラリーの構築には大きな影響はないものと考えられる。また、変異導入の癖はG→A, C→T変異が優性でありエラープローンPCR法とは明確に異なっていた。この意味でエラープローンPCRを補完する技術として使用することも考えられる。

#### 4. 連続塩基ランダム変異導入法の試み

エラープローンPCRをはじめとする従来のDNAランダム変異導入技術は二塩基連続でDNAに変異が導入される確率はほぼ0である。ところが、アミノ酸配列はDNAの三塩基によりコードされているため、一塩基変異では変異されるアミノ酸の可能性は平均7.5程度に過ぎず19種類の変異の可能性の内ごく一部をカバーしているに過ぎない。そこで通常は良い変異が入ったアミノ酸残基に対してサチュレーション変異と呼ばれる方法ですべてのアミノ酸変異が入ったライブラリーを作成してさらなる特性改変を目指している。もし、DNAにランダムに

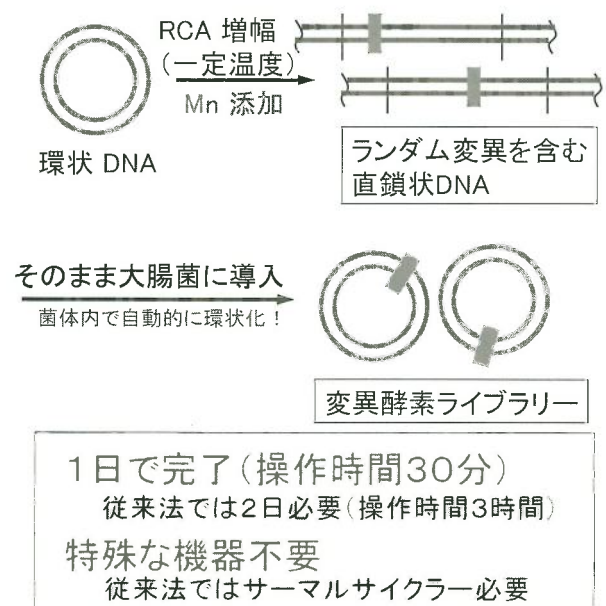


図1 エラープローンRCA法によるランダム変異導入

二塩基連続変異を導入することが可能になれば大部分の変異をカバーすることが可能になる。ランダムに二連続塩基変異を導入する方法自体の報告例はあるが合計9ステップを要する非常に煩雑な方法<sup>6)</sup>であり、実用化を行うためにはより簡便な方法を開発する必要がある。そこで我々はPCRを応用したランダムな二塩基連続変異を導入する方法を検討した。

プライマーの3'末端側にミスマッチを起こす配列を付加してPCRを行うことにより変異が導入できないか検討を行った。テンプレートに対して3'末端に2塩基のミスマッチ (G-G, G-A) を持つプライマーを合成し、伸長反応が起こる条件を決定した。その結果、マンガン<sup>2+</sup>を0.4mM加えてVent(exo<sup>-</sup>) DNAポリメラーゼを反応させる条件で置換変異が導入されることを確認した。

得られた増殖条件を基に遺伝子シャッフリング法<sup>7)</sup>と組み合わせることによりランダム化を検討した(図2)。変異を導入する遺伝子をDNA分解酵素で部分分解しその3'末端に鋳型非依存性DNAポリメラーゼによりランダムな2~3塩基のDNA配列を付加した。得られた付加断片を用いて得られたPCR条件によりセルフプライミング法により元のDNAを再構築したところ、その結果18%程度の確率でランダムに二塩基連続変異が導入された。

## 5. おわりに

酵素は種々のオリゴ糖などの物質生産に有用であり、技術の進歩のためには新規な特性を持

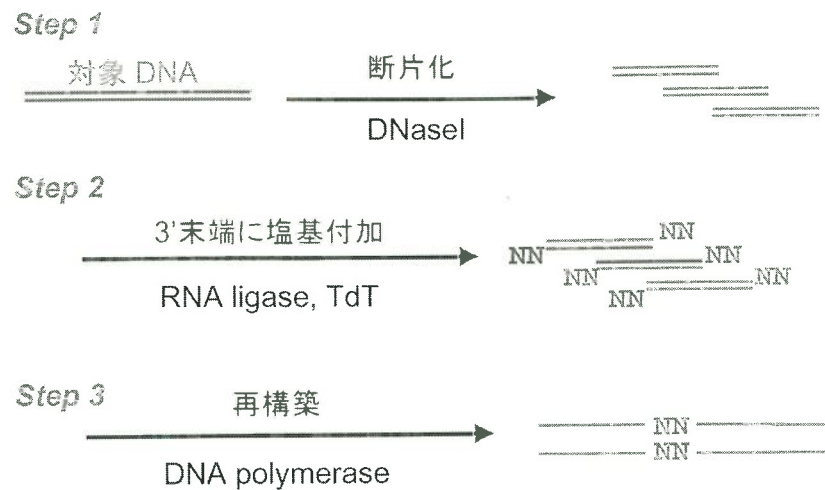


図2 ランダム二塩基連続変異導入方法

つ酵素の取得が常に求められる。新規酵素のスクリーニングは時間と手間を要する方法であり、分子進化工学的手法による酵素の改変は短期間で目的酵素を取得するために重要な技術である。我々の開発した国産のランダム変異導入技術が今後の酵素工学の発展に役立つことを期待している。

## 文献

- 1) Kobayashi, A., et al. (2005) *J. Biotechnol.*, 116, 227-232
- 2) Fujii, R., et al. (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32, e145
- 3) 藤井亮太ら (2005) バイオテクノロジージャーナル, 5, 200-202
- 4) 藤井亮太ら (2005) 実験医学, 23, 2493-2497
- 5) 「環状DNAの増幅方法」特開2005-229950
- 6) Murakami, H., et al. (2002) *Nat. Biotechnol.*, 20, 76-81
- 7) Stemmer, W.P.C. (1994) *Nature*, 370, 389-391

## ◀総説関連情報▶

## オリゴ糖とその機能性の開発

明治製菓株式会社 食料健康総合研究所

窪田 英俊・中村 博文・河野 敏明・荒森 幾雄

自然界に広く分布するオリゴ糖は、酵素反応を利用した工業化の確立により新規の食品素材として世に登場した。また、特定保健用食品制度（トクホ）に代表される行政の整備に呼応し、整腸作用に代表される機能性開発が積極的に展開され、新たな健康訴求市場の開拓が期待されている。本稿では、オリゴ糖の製造方法、機能性の開発状況について概説する。また、オリゴ糖の課題であった物性の改善を狙った結晶フラクトオリゴ糖の開発について近年の成果について述べる。

## 1. オリゴ糖と整腸機能

1986年フラクトオリゴ糖が上市されて以来、種々の酵素反応を活用したオリゴ糖が上市されている。現在では、応用商品として400億円程度の国内市場を形成しているとされている。オリゴ糖は、低重合度の糖質を定義する言葉であるが、現在市場では「機能性」を持つ糖と位置づけられている<sup>1)</sup>。

フラクトオリゴ糖（以下FOSと記す）は、蔗糖にフラクトースが $\beta$ 2, 1結合で重合した化合物群を示す。明治製菓(株)は酵素法によるFOSの製造方法を開発し工業化に成功した。図1に反応のスキームを示した。即ち、高濃度の蔗糖溶液に黒コウジカビの一種であるアスペルギルス属菌の生産する $\beta$ -フラクトフラノシダーゼ（以下FFaseと記す）を作用させ調製する。工業生産には、位置選択性や立体選択性に優れるFFaseが選抜され用いられるが、その酵素反応は蔗糖のみならず生成したFOSが基質（ドナー及びアクセプター）となりその反応は逐次的に進行する。希薄な蔗糖溶液では、アルコール性水酸基や水がアクセプターとなるため加水分解が優先し起こる。

本酵素反応の生成物は、1-kestose, Nis  
KUBOTA Hidetoshi, NAKAMURA Hirofumi,  
KONO Toshiaki, ARAMORI Ikuo  
〒350-0028 埼玉県坂戸市千代田5-3-1

トース, 1-フラクトシルニストースなどのFOS群と副生物であるグルコース及び未反応の蔗糖の混合物となる。また、位置選択性や立体選択性の低い酵素を用いた場合には、さらに異性体が産生することとなる。

実際のFOSの生産にはFFaseの生産性に優れた生産菌が用いられる。市場に流通するオリゴ糖は、でんぷん、蔗糖などの分解酵素反応を活用し製造されるため、反応生成物はおおむね種々の重合度を持つ糖でありFOSの場合と同様の特徴を持つ。表1に現在市場に上市されているオリゴ糖とその原料、製造酵素を示した。種々の糖質を原料として、各社が工夫を凝らした生産酵素を用いオリゴ糖の製造を行っている。

開発当初、オリゴ糖の生理機能は一般には知られておらず、市場への浸透は困難であった。種々の機能性の探索検討が行なわれた結果、腸内細菌群とりわけビフィズス菌に代表される有用菌群がオリゴ糖を選択的に消費することが見出されると共に、これらの現象に基づく生理機能、即ち整腸機能が明らかとなった。その機能特性は特定保健用食品制度で確認され広く人々に認知されるに至っている。多くのオリゴ糖は、砂糖や澱粉とは異なり小腸で吸収されず大腸に至り、ビフィズス菌に代表される有用な腸内細菌群に選択的に消費されSCFA（短鎖脂肪酸）へと変換される。図2には、ラベル化FOSを

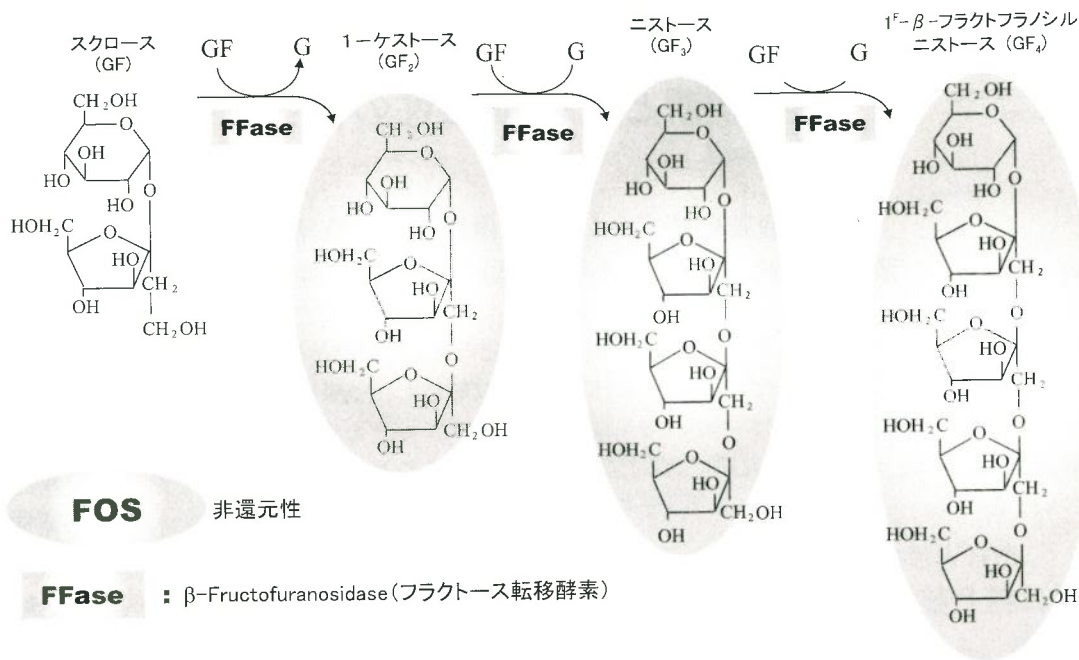


図1 FOSの構造と酵素反応

表1 市販オリゴ糖一覧

原料	オリゴ糖名	構造(略号)	製造用酵素	重合度
砂糖	結晶 1-ケストース	GF <sub>2</sub>	FFase	3
	フラクトオリゴ糖	GF <sub>n</sub>	FFase	3-5
	パラチノース	Glc α-1,6Fru	GTase	2
	グリコシルスクロース	Glc α-1,4GF	CGTase	4-5
	ラクトスクロース	Gal α-1,4GF	FFase	3
乳糖	ガラクトオリゴ糖 (ガラクトシルラクトース)	Galn β-1,4G	β-Galase	2-6
	ラクチュロース	GalFru	アルカリ異性化	2
デンプン	イソマルトオリゴ糖	Glc(α-1,6)	α Glcase(transGlcase)	2-4
	ニゲロオリゴ糖	Glc(α-1,3)	β Glcase	2-4
	パノース	G(α-1,6) G(α-1,4)G	MalTransGlcase	3
	マルトオリゴ糖	Glc(α-1,4)	アミラーゼ、プルラーゼ、 イソアミラーゼ	3-7
	ゲンチオオリゴ糖	Glc(β-1,6)	β-Glcase	2-4
キシラン	キシロオリゴ糖	Xyl <sub>n</sub>	xylanase	2-7
キチン	キチンオリゴ糖	GlcNAc <sub>n</sub>	部分加水分解	2-6
	キトサンオリゴ糖	GlcN <sub>n</sub>	部分加水分解、 (キトサナーゼ)	2-6、(2-7)
大豆	大豆オリゴ糖(スタキオース)	Gal α-1,6Gal α-1,6GF	大豆ホーの塩析	3-4
廃糖蜜	ラフィノース	Gal α-1,6GF	ビート廃蜜から分離	3

注：FFase フラクトフラノシダーゼ、GTase グルコシルトランスフェラーゼ、CGTase サイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、β-Galase β-ガラクトシダーゼ、α Glcase (transGlcase) α-グルコシダーゼ、β Glcase β-グルコシダーゼ、MalTransGlcase マルトシルトランスグルカナーゼ、xylanase キシラナーゼ

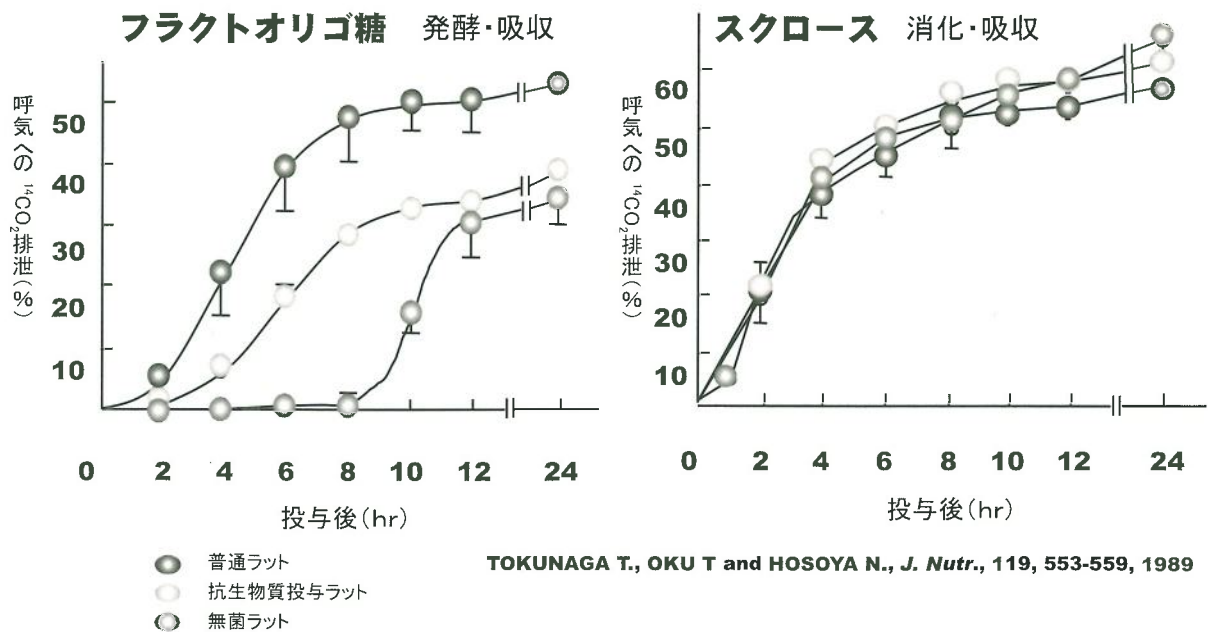


図2 フラクトオリゴ糖とスクロースの代謝の違い

摂取させた種々のラットにおける呼気中のラベル化二酸化炭素の排出を示したが、FOSは腸内細菌の存在状態により呼気へのラベル二酸化炭素の回収に差異があることを示している。即ち、腸内細菌に資化されることで間接的に動物により消費されることを示す。生成SCFAは大腸を刺激し蠕動運動を起こし整腸機能、即ち便秘の解消を促す。通常、特定保健用食品表示申請ではヒト試験により有効性、安全性を確認する必要がある。すなわち、整腸機能を発揮するために必要な用量や下痢などおなかがゆるくなるに要する最大の施用量（最大無作用量）などの設定である。また、安全性の確認も必須である。特定保健用食品表示は関与成分を含有する食品

毎に許可されるものである。

平成17年の2月には、これまでの特定保健用食品制度におけるオリゴ糖の許可実績が認められ、指定されたオリゴ糖を含有する食品では、食品の安全性を確認すれば特保表示が認められる特定保健用食品制度（規格基準型）がスタートした。本制度が広く活用されオリゴ糖応用食品が増えることが期待される。表2に特定保健用食品（規格基準型）の関与成分に認可されたオリゴ糖をまとめた。

オリゴ糖は、一般にプレバイオティクスと呼ばれる。一方、乳酸菌などはプロバイオティクスと呼ばれ整腸機能素材の双壁である。プロバイオティクスは乳製品を活用するヨーグルト、

表2 規格規準型特定保健用食品 関与成分

オリゴ糖	オリゴ糖種類	一日摂取目安量
	大豆オリゴ糖	2～6 g
	フラクトオリゴ糖	3～8 g
	乳果オリゴ糖	2～8 g
	ガラクトオリゴ糖	2～5 g
	キシロオリゴ糖	1～3 g
	イソマルトオリゴ糖	1 g

チーズ、酸乳などに多く利用され、近年、整腸作用、胃がん抑制作用や酸乳に含まれるペプチドの降圧作用などの機能性がクローズアップされ市場が活性化している。国内市場を比較するとプレバイオティクスに比べてプロバイオティクスは大きな市場をその機能性の活用で造出している。オリゴ糖に代表されるプレバイオティクスは機能性の活用が十分であるとは言いがたい現状といえる。このように、オリゴ糖産業は酵素技術を活用した工業化技術の開発と機能性の開拓が車の両輪となり拡大している現状にある。

## 2. オリゴ糖の他の生理機能

オリゴ糖の生理機能は整腸作用のみにとどまらない。ミネラルの吸収促進作用は、Ohtaらにより発見されフラクトオリゴ糖の生理機能として特保表示を得ている<sup>2)</sup>。ミネラル吸収促進機能は、日本人に不足しがちであるカルシウムに代表される2価のミネラルの吸収を促進する。先に述べた様にフラクトオリゴ糖は摂取後大腸に到達し腸内細菌によりSCFAに変換される。大腸内でSCFAは大腸に吸収されるが、このとき大腸内の2価のミネラルと塩を形成し体内に取り込まれる。カルシウムのみならず、鉄、マグネシウムなどで効果が認められている。

また、フラクトオリゴ糖はビフィズス菌の増殖を促す結果、種々の免疫機能を増進することが知られている。即ち、食物アレルギーの抑制作用などがすでに報

告されている<sup>3)</sup>。また、ビートから得られるラフィノースでは、アレルギー抑制作用を支持するヒト試験結果が得られている<sup>19)</sup>。整腸、ミネラル吸収促進、アレルギー抑制機能以外に、十分なヒト試験でのエビデンスはないが報告されている機能として、血清コレステロールの低下作用、血清脂質低減作用、制がん機能（大腸がん、食道がん）、抗う蝕機能などである。

一方、物理機能の開発も進んでおり、退色防止機能、凍結防止機能、水分活性維持機能など食品応用上重要な機能が報告されている。表3にオリゴ糖とこれまでの確認された機能性及び各オリゴ糖関連文献をまとめた。これらのうちいくつかは、ヒト試験によりその有効性が認められるものであるが、多くはヒト試験など有効性試験は十分とは言いがたく、今後の研究の進展に期待したい。

表3 各種オリゴ糖の機能性

オリゴ糖	整腸以外の機能性	関連文献
フラクトオリゴ糖	抗アレルギー	4
バラチノース	耐酸性、体脂肪蓄積抑制	5
グリコシルスクロース	離水・結晶析出防止	6
ラクトスクロース		7
ガラクトオリゴ糖(ガラクトシルラクトース)	血清脂質改善	8
ラクチュロース	耐酸性	9
イソマルトオリゴ糖	保湿性	10
ニゲロオリゴ糖	免疫賦活、保湿性	11
パノース	保湿性	12
マルトオリゴ糖	保湿性	
ゲンチオオリゴ糖	苦味、保湿性	13
キシロオリゴ糖	水分活性低下	14
キチンオリゴ糖	免疫活性	15
キトサンオリゴ糖	抗菌性、免疫活性	16
大豆オリゴ糖(スタキオース)	デンプン老化防止	17
ラフィノース	結晶性、アトピー抑制	18

### 3. 結晶オリゴ糖開発の背景

明治製菓は、酵素を除いた反応液を当初フラクトオリゴ糖シロップとして商品化した。この後、オリゴ糖の用途を広げる目的から、擬似移動床クロマトグラフィーによる分画方法を導入し、酵素反応で副生するグルコースや5糖以上の高分子FOSを除いた高純度FOSを調製したのち乾燥させた粉状の製品を上市した。商品名「メイオリゴP粉末」は、約46%のニストース（GF3と記す）と約42%の1-kestose（GF2）を含有する。メイオリゴP粉末を原料にGF2及びGF3をクロマトグラフィーを用い含有成分を純化精製するとGF2、GF3とも結晶させることができる。GF2はグルコースに類似の斜方晶、GF3は針状晶である。GF2の結晶写真を図3に示した。いずれの成分の結晶化も製糖産業で通常行われる方法で行うことが可能である。FOSの構成オリゴ糖はいずれも非吸湿性の結晶となるものの2種以上の成分を含むメイオリゴP粉末はどのような乾燥法を用いてもアモルファスにしかならず、吸湿性又は潮解性を示し商品としての使用場面が限られてきた。例えば、水分の含有を嫌う商品群、チョコレートやクリーム、湿度の高い地方での使用などへの応用が困難であった。これらの高純度FOS（GF2、GF3）は、従来FOSで確認されてきた整腸機能、難う蝕機能、を維持しつつ吸湿性のない物理性

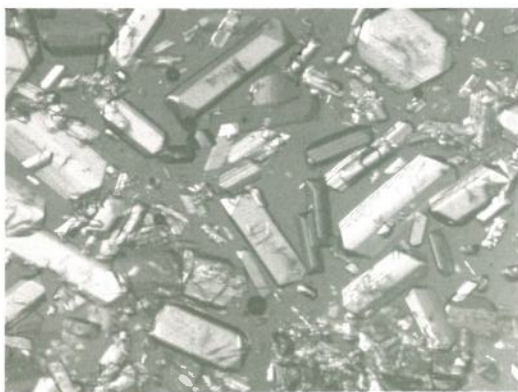


図3 1-kestose結晶

能を備え持つことがわかる。結晶オリゴ糖は、従来知られた生理機能に加え、食品産業上重要であるハンドリング性を兼ね備える特徴的な糖であるといえる。以上の背景を踏まえ、結晶オリゴ糖（1-kestose）の製造方法の検討を行った。

### 4. 結晶オリゴ糖の製造用酵素の創出

GF2の製造に適する酵素は、蔗糖からGF2のみを生成するものであることは言うまでもないが、目的に適する酵素は植物起源のSST（シュクロースーシュクローストランスフェラーゼ）が知られるが、安定に酵素反応に用いることは困難であることから、現行のGF2製造に利用するFFaseの性質を、以下の様に改良することで目的を達することが可能である。即ち、酵素特性を種々の手法により改質し逐次的に進行する反応を制御し目的とするGF2のみを製造できる様に改変させることである。ドナーおよびアクセプターとして蔗糖しか利用できない酵素と行うことができる。

2000年より始まった「新事業創出研究開発事業 コンソーシアム4 食品の機能を高めるための新機能酵素の開発」に参加し、種々の酵素改質手法を展開した。ポイントミューテーション、シャッフリング、ランダム変異など種々の手法で改質されたFFaseコード遺伝子を用い蔗糖資化性を欠損した酵母を形質転換させたのち、蔗糖やGF2を単一炭素源とした寒天培地上に増殖させ、そのコロニーの増殖速度によりスクリーニングを行った。図4にスクリーニング寒天の一例を示した。増殖速度は、FFaseの基質特異性により変化する。即ち、GF2をよく認識するものの増殖速度は速く、GF2を認識できないものは増殖速度が遅くなる。以上の手法を用い、酵素の特性を変える種々変異箇所を同定した。表4に同定された変異点をまとめた。即ち、GF2の変換率が上昇する点、GF3の変換率が低下する点などである。以上の変異点を重ね合わせるにより、GF2製造に適したFFase

FFase遺伝子へのランダム変異の導入  
 ↓ 変異導入率：3変異/1962bp  
 スクロース非資化性の酵母（*S. cerevisiae*）で発現  
 ↓  
 スクリーニング GF<sub>2</sub>を単一C源  
 ↓ コロニーの大きさで選別  
 培養上清の回収，FFase活性の測定  
 ↓  
 酵素反応（pH 7，40℃，40% sucrose）  
 ↓  
 野生型FFase反応液の糖組成と比較，変異点の確認

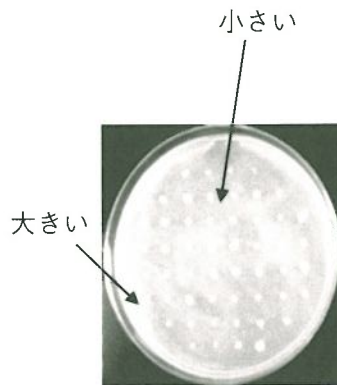


図4 改良FFaseのスクリーニング法概略

を創生した。最終的には得られた遺伝子を，異種生物の遺伝子を含まない組み換え技術である「セルフクロニング」技術を活用し結晶オリゴ糖製造用の酵素を作出することに成功した。

## 5. 今後の展開

オリゴ糖の開発経緯を追いながら，オリゴ糖の機能性，製造方法を概説するとともに，従来のオリゴ糖の機能性に結晶性という物理特性を加味した結晶オリゴ糖の有用性及び製造に適した酵素の創成を中心にフラクトオリゴ糖の主成分である1-kestoseの製造法検討について概説した。今後は，結晶オリゴ糖を生かした商品作りや量産化，低コスト化などの解決を通じ消費者に種々の機能性を持つオリゴ糖をご提供したいと考えている。

最後に，「新事業創出研究開発事業 コンソーシアム4 食品の機能を高めるための新機能酵素の開発」推進に当たり多大なご支援を賜りました，（独）食品総合研究所，（独）農業・生物系特定産業技術研究機構，農林水産省に深謝いたします。

表4 FFase反応特性の改良に有効なアミノ酸置換の分類

改良効果	変異点	FOS 製造条件下での成分比率 (%)				
		Fru, Glc	GF	GF <sub>2</sub>	GF <sub>3</sub>	GF <sub>4</sub>
—	wild type	22.7	20.5	45.1	11.3	0.3
GF <sub>2</sub> が増加	H313K	23.6	16.1	53.3	6.4	0.7
	E386K	24.1	18.6	49.1	7.9	0.3
GF <sub>3</sub> が減少	G300V	22.5	21.7	46.4	9.4	0.0
	F170W	22.7	20.9	45.8	10.3	0.3
	V165F	24.6	19.7	46.1	9.5	0.2
	H221Y	24.4	20.1	45.8	9.5	0.2
	Q395L	22.7	21.4	46.5	9.1	0.2
GF <sub>3</sub> が増加	T381M	31.0	15.5	25.3	22.7	5.3



## 文 献

- 1) 食品と開発編集部 (2004), 食品と開発 39, 59-65
- 2) Ohta, A. et al. (1995), *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 41, 281-286
- 3) 三本木千秋ら (2002), 腸内細菌学雑誌, 16, 21
- 4) Hidaka, H. et al. (1991), *Bifidobacteria Microflora.*, 10, 65-79
- 5) Lina, BA. et al. (2002), *Food Chem. Toxicol.*, 40, 1375-1381
- 6) Takazoe, I. (1985), *Nippon Shika Ishikai Zasshi*, 38, 701-706
- 7) 藤田孝輝ら (1991), 澱粉科学, 38, 1-6
- 8) 小沢修 (1989), 日本食品工業学会誌, 36, 898-902
- 9) Schumann C. (2002), *Eur. J. Nutr.*, 41 Suppl. 1, 117-125
- 10) Chen HL et al. (2001), *J. Am. Coll. Nutr.*, 20, 44-49
- 11) Konishi, Y., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 439-442
- 12) Koga T. (1988), *Microbiol. Immunol.*, 32, 25-31
- 13) Rycroft CE et al. (2001), *Lett. Appl. Microbiol.*, 32, 156-161
- 14) 安田隆 (1998), キシロオリゴ糖.オリゴ糖の新知识 (早川幸男編), 261-271, 食品化学新聞社
- 15) Suzuki K. et al. (1986), *Microbiol. Immunol.*, 30, 777-787
- 16) 梶本修身ら (1999), 日本臨床栄養学会雑誌, 21, 41-47
- 17) 渡部恂子 (1998), *New Food Industry*, 40, 9-16
- 18) 藤崎裕之ら (1994), ビフィズス, 8, 1-5
- 19) 松田三千雄 (1998), アレルギーの臨床, 18, 1092-1095

## ◀国内情報▶

幼若ホルモン分解酵素の過剰発現で  
カイコを2回の脱皮で蛹へ誘導

独立行政法人 農業生物資源研究所

塩月 孝博・譚 安江・田村 俊樹

幼若ホルモン (JH) の作用, およびその制御の機構を解明するため, JH分解に関与するエステラーゼ (JHE) を過剰発現するためのトランスジェニックカイコを作出した。酵母の発現制御系UAS-JHE/GAL4交配系の中で, UAS-JHEとGAL4の両遺伝子を持っている系でのみJHEのmRNAとタンパク質が過剰発現していた。その結果, 2回脱皮後の3齢までは正常に成育したが, その後, 蛹になる早熟変態や発育異常が誘導された。

## 1. はじめに

昆虫の脱皮と変態は, 主に2種の低分子ホルモン, すなわちステロイド骨格を持つエクダイソン (脱皮ホルモン) とセスキテルペノイドの幼若ホルモン (JH) によって制御されている。一般に, JHの存在下で脱皮ホルモンが作用すると幼虫脱皮が誘導され, JH濃度が低下した状態で脱皮ホルモンが作用すると変態が起こるとされている。JHはアラタ体で合成され, 血液中を移動, 標的器官へ到達し情報を伝達した後は細胞内, あるいは血液中の酵素によって分解され, 生合成と分解によって体内濃度が調節されている。これらは昆虫に特異的であるため, その分子作用と調節に関わる機構は, 昆虫に特異的な制御剤のターゲットとして有望である。その中でも分子作用機構の研究が遅れているJH活性の発現と調節に関わる分子を明らかにすることは, 昆虫生理を理解する上で不可欠で, かつ, 新たな昆虫制御剤のターゲットとしての可能性が期待される。

これまでに, JHを特異的に分解するエステラーゼ活性がカイコの終齢である5齢になって高くなることを見だし<sup>1)</sup>, 本酵素をコードするcDNAの単離と配列決定も行った<sup>2)</sup>。ここで

SHIOTSUKI Takahiro, TAN AnJang,

TAMURA Toshiki

〒305-8634 茨城県つくば市大わし1-2

はJH濃度を低下させる分解系の役割からカイコにおけるJHの作用と制御の機構を解明するため, 胚期からJHエステラーゼを強制的に過剰発現するトランスジェニックカイコを作出した。この過剰発現個体においてJH濃度を低下させた場合の胚発生, 幼虫成長に与える影響を調べた結果を報告するとともに, 昆虫制御剤を開発する上での利用について考察する。

## 2. JHエステラーゼを過剰発現するトランスジェニックカイコの作出

種々のホルモン関連分子の機能解析を行うためには, それら分子をRNA干渉法による発現抑制やトランスジェニックによる強制発現を行う技術が必要となる。最近, 当研究所の田村らによってカイコにおけるトランスジェニック作出技術が確立し, 目的とするタンパク質を過剰に発現させることが可能となった<sup>3)</sup>。昆虫におけるトランスジェニック作出技術では, ショウジョウバエが群を抜いており, 他にも数種で確立されているが, 鱗翅目では現在のところカイコだけである。ショウジョウバエではJHに対する反応性が低いこと, 虫体が小さなため器官ごとの取り扱いが困難なこと, 等の理由からJH作用の研究に適しているとはいえ, ホルモン作用研究成果の蓄積のある鱗翅目, 特にカイコを用いられるようになったことは大きな進

展である。まず酵母の転写制御因子Gal4-UASの系を用いるこの技術を応用して、アクチンプロモータにGal4を繋いだものに蛍光マーカーDsRed遺伝子(D)を持つもの、Gal4の標的配列であるUASの下流に強制発現を行うカイコのJHエステラーゼ遺伝子を繋いだものに別の蛍光マーカーECFP遺伝子(E)を持つもの、の二つのトランスジェニック系統を作出した<sup>4)</sup>。続いて、これら2系統を交配させ得られた雑種(F<sub>1</sub>)では、いずれの遺伝子も持たない個体[マーカーのパターン：E(-)D(-)]、Gal4遺伝子だけを持つ個体[E(-)D(+)]、UAS-JHエステラーゼ遺伝子だけを持つ個体[E(+ )D(-)]、両者の遺伝子を持つ個体[E(+ )D(+)]の4つのグループが理論通りに同じ割合で出現した(表

1)。これらの蛍光マーカーは胚発生の途中で識別が可能となるので、それぞれのグループに分け飼育した。

### 3. 過剰発現系統のJHエステラーゼをコードするmRNA発現量と発育特性

得られたトランスジェニックカイコで、Gal4とUAS-JHエステラーゼの両遺伝子の発現パターンによる4つのグループのJHエステラーゼ遺伝子のmRNAの発現をリボソームタンパク質(rp49)を基準とする定量的PCR法により比較した。予想通り、両者の遺伝子を持つ個体[E(+ )D(+)]でのみ高い発現が観察された(図1)。また、その発現は胚、及び1齢～3齢

表1 各表現型 [(E) ; UAS-JHエステラーゼ, (D) ; A3-GAL4] の発現率

	Total	E(+ )D(+)	E(+ )D(-)	E(-)D(+)	E(-)D(-)	P value (1:1:1:1)
実験1	322	79	84	82	77	0.95
実験2	276	64	70	73	69	0.89
実験3	360	87	92	96	85	0.84

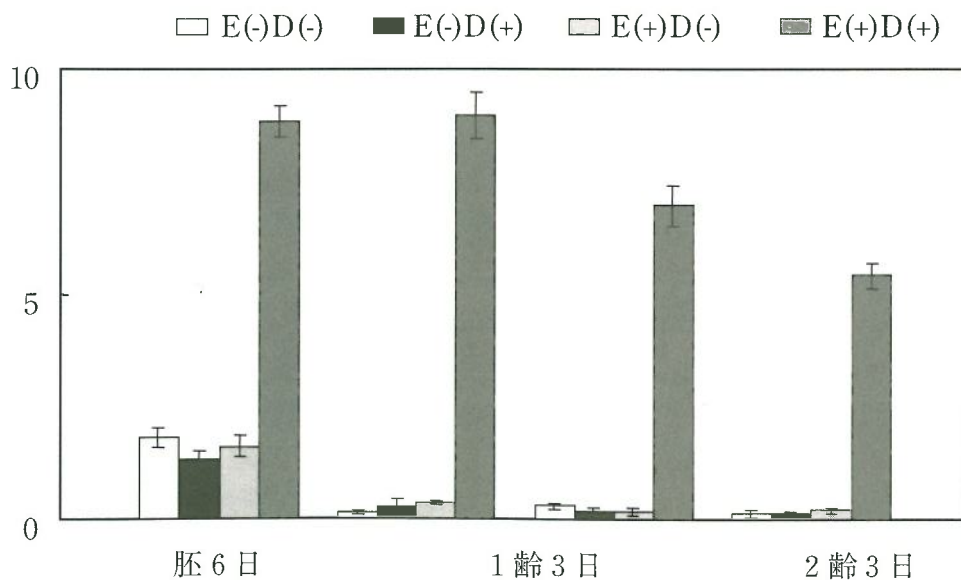


図1 定量PCRによるmRNA発現量の解析  
リボソームタンパクrp49の発現量に対する相対値

幼虫の期間を通じて高かった。各グループの飼育を続けたところ、両者の遺伝子を持つもの以外の3グループ [E(-)D(-)], [E(-)D(+)], [E(+D)(-)] では、対照区と同様のタイミングで正常に5齢を経て蛹になり、成虫へ羽化した。一方、両者の遺伝子を持つグループ [E(+D)(+)] では、2回の脱皮後の3齢脱皮後までは他のグループと差がなく正常に成長したが、4齢へ幼虫脱皮した個体はなかった。これを詳しく観察したところ、幼虫の途中で致死したものが34%、幼虫・蛹中間体38%の他、早熟変態して小さいが完全に蛹になったものが28%生じた(図2, 表2)。この2回脱皮後の早熟変態蛹は、5齢から変態する正常な蛹に比べて、長さで約2分の1、重さで約10分の1であった。

#### 4. 過剰発現系統のJHエステラーゼの酵素活性

前述の4つの遺伝子発現パターンの異なるグループごとにJHエステラーゼ活性を測定した。2齢後半になるまでは血液を採取することが困難なため、胚から3齢までは全虫体ホモジネートを、2齢の後半以降は血液を酵素活性の測定に供した。mRNAの発現と同様に、両者の遺伝子を持つ個体 [E(+D)(+)] でのみ、胚の時期から1~3齢通じて、常に高い酵素活性が認められた(図3)。正常個体では5齢中期から後期での活性が一生涯を通じて最も高い活性を示す<sup>2)</sup>。両者の遺伝子を持つもの以外の3グループ [E(-)D(-)], [E(-)D(+)], [E(+D)(-)] で



図2 トランスジェニックカイコの蛹

表2 UAS-JHエステラーゼ (E), GAL4(D), (E) (D) 両者を発現した組換えカイコの幼虫発育と変態

遺伝子 <sup>a</sup>	各齢期の起蚕数					3齢幼虫発育異常個体数の内訳 <sup>b</sup>		
	1齢	2齢	3齢	4齢	5齢	幼虫致死	蛹・幼虫中間体	早熟変態
E(-)D(-)	60	57	54	54	53	0 (0)	0 (0)	0 (0)
E(+D)(-)	60	55	53	53	52	0 (0)	0 (0)	0 (0)
E(-)D(+)	60	57	55	53	51	2 (3.6)	0 (0)	0 (0)
E(+D)(+)	60	56	53	0	0	18 (34)	20 (38)	15 (28)

<sup>a</sup> (E) ; UAS-JHE、(D) ; A3-GAL4。

<sup>b</sup> カッコ内は%。

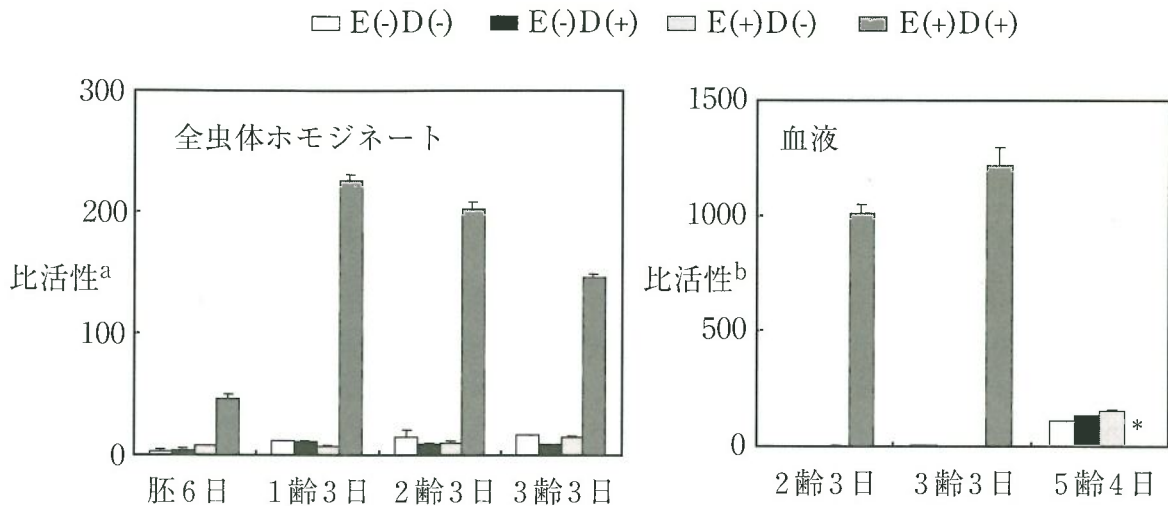


図3 JHエステラーゼ酵素活性の比較

<sup>a</sup> 酵素比活性 (ホモジネート) : nM/min/mgタンパク質

<sup>b</sup> 酵素比活性 (血液) : nM/min/ $\mu$ l血液

も同様に、その5齢期に高い活性が観察され3齢期以前には活性がほとんどなかったのに対し、過剰発現している個体の3齢での血液中酵素の比活性は、正常個体、および両者の遺伝子を持つもの以外の3グループの個体の5齢期に現れるピーク時活性のさらに8~10倍という高い活性を示した。その結果として、血液中のJH濃度は低く抑えられているものと考えられる。

## 5. おわりに


カイコの早熟変態は、JHの生合成器官であるアラタ体の摘出、あるいは、イミダゾール誘導体KK-42など昆虫生育制御剤の投与により、誘導されることが知られている。それらの場合はいずれも処理した齢(3齢、あるいは4齢)が終齢となり、その齢の期間が延長して蛹へ早熟変態し、完全な繭を作って成虫へ羽化するのに対して、JHエステラーゼ過剰発現個体では、早熟変態する直前の齢(3齢で終齢)の期間延長がなく、繭を作らず成虫へ羽化できなかった。このJHエステラーゼ過剰発現個体では胚期から酵素活性が高いのに胚発生から3齢への脱皮

までは正常に成長したことに加えて、2齢でのアラタ体摘出には誰も成功していないこと、2齢でのKK-42投与は致死効果を示すことから、これまでの通説とは異なり、3齢脱皮までの成長には必ずしもJHを必要としないか、あるいは、蛹化システムは3齢以降に構築されるのではないかという可能性を示唆している。しかしこれらの仮説を検証するためには、体内のJH濃度を測定することが不可欠となる。

これまで、JHアナログの投与により人為的に幼虫体内のJH活性を上げることはできたのに対し、低く抑えることは技術的に熟練を要するアラタ体摘出の方法のみであったが、今回得られたトランスジェニック技術によるJHエステラーゼ酵素の過剰発現により、それが容易となった。この系は、昆虫の成長を制御する機構を明らかにする上で、有効かつ重要な実験系となるであろう。特に、JH濃度を低下させた場合での各種昆虫成育制御剤の作用性を調べることで、JHの分子作用機構の解明と未だ明解には単離・同定されていないJHレセプターの発見につながるものと期待される。

文 献

- 1) Characterization and Affinity Purification of Juvenile Hormone Esterase from *Bombyx mori*, T. Shiotsuki, B. C. Bonning, M. Hirai, K. Kikuchi, and B. D. Hammock, *Biochem. Biotech. Biosci.* 64, 1681-1687 (2000).
- 2) cDNA Cloning and Characterization of *Bombyx mori* Juvenile Hormone Esterase : An Inducible Gene by the Imidazole Insect Growth Regulator KK-42, M. Hirai, M. Kamimura, K. Kikuchi, Y. Yasukochi, M. Kiuchi, T. Shinoda, and T. Shiotsuki, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32, 627-635 (2002).
- 3) Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*, M. Imamura, J. Nakai, S. Inoue, GX Quan, T. Kanda, and T. Tamura, *Genetics*, 165, 1329-1340 (2003).
- 4) Precocious metamorphosis in transgenic silkworms overexpressing juvenile hormone esterase, A. Tan, H. Tanaka, T. Tamura, T. Shiotsuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 11751-11756 (2005).



**ブレインテクノニュース**  
バックナンバーのご案内  
第112号  
2005年11月15日発行

ミトコンドリアDNA変異とアポトーシスの老化機構への関与  
..... 染谷 慎一・田之倉 優  
アグロバクテリウムT-DNAに秘められた「もう一つのチカラ」  
—細菌遺伝子産物の色素体移行と代謝バイパス形成—  
..... 榎原 均・笠原 博幸  
マツタケは遺伝的にモザイク  
..... 村田 仁・太田 明・山田 明義・  
成松 眞樹・二村 典宏  
ねぎ収穫機の開発と利用状況..... 青木 循

**総 説**  
家畜ゲノム解析とその応用研究の最前線..... 佐々木 義之

**総説関連情報**  
家畜遺伝性疾患に関するゲノム解析の現状と今後の展望  
..... 国枝 哲夫  
ブタゲノム解析とその応用研究の現状と展望..... 栗田 崇

**国内情報**  
卵から雄のみがふ化する特別な蚕品種の育成  
..... 大沼 昭夫・井上 元

**文献情報**  
暑熱感作はウシ卵子の発生能を低下させるとともに紡錘体の形  
状を変化させる..... (抄訳：下司 雅也)  
酵母 *Pichia pastoris* を用いた酸性フィターゼの高発現  
..... (抄訳：和田 純平)

◀国内情報▶

## イネ（日本晴）ゲノム塩基配列から解析された 3万7千個の遺伝子とその特徴について

<sup>1</sup>独立行政法人 農業生物資源研究所 ゲノム研究グループ

<sup>2</sup>独立行政法人 農業生物資源研究所 理事

松 本 隆<sup>1</sup> ・ 佐 々 木 卓 治<sup>2</sup>

昨年末解読が完了したジャポニカイネ品種「日本晴」のゲノム塩基配列を基に、37,544個のイネ遺伝子が予測された。本稿では現在までに解析されたこれらのイネ遺伝子の特徴についてまとめ、併せてこの人類共通の財産をどのように植物科学や農学に活用していくべきかを述べる。

### 1. 全ゲノム塩基配列の再構成とイネの 遺伝子の解析

2004年12月、国際イネゲノム塩基配列解読プロジェクト（IRGSP）はジャポニカイネである「日本晴」の完全解読の終了を宣言した。このゲノム情報の重要性や意義については本誌108号の佐々木の総説<sup>1)</sup>に詳しいが、IRGSPにおいては参加各国がそれぞれイネの12本の染色体（または領域）を分担しており、さらにPAC、BAC、fosmidといった大腸菌にクローン化した染色体断片を解読してきたため、それらがすべて終了した後イネゲノムの再構成を行った。具体的にはまずパズルにたとえるとピースにあたる各クロンの位置を再度確認し、公的データベース（DDBJ, GenBank, EMBL）に提出されたクロンの塩基配列をつないで各染色体の配列を作製した。表1に示すように、イネゲノムにはセントロメアやヘテロクロマチンなどのように大腸菌にクローン化できず、塩基配列が得られていないギャップが染色体あたり数個あり、そこは長さを染色体上で測定した上で未知塩基を表すNを挿入してすべての配列を一本にした。このようにして得られたのがNを除いて3億7千73万塩基に及ぶイネゲノム配列である

MATSUMOTO Takashi, SASAKI Takuji

〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2

る。未だギャップとなっている長さを加えるとイネゲノムの長さは3億8千882万塩基（388.82Mb）と推定され、従来の推定（430Mb）よりも10%近く小さくなった。ここからタンパク質に翻訳される遺伝子を予測する場合、最も障害になるのはイネの中に数多く存在する転移因子（トランスポゾン）である。転移因子はイネの3分の1の領域を占める上、転移に必要なタンパク質をコードしているため、遺伝子予測のソフトウェアは転移因子由来のタンパク質コード領域もイネ遺伝子として認識してしまう。これを防ぐために、まず専門家によって転移因子のアノテーション（どこにどのような転移因子が存在するかを調べる）を行い、その領域をゲノム上でマスクして、残りの領域に対してFgeneshというソフトウェアを用いて遺伝子予測を行った。結果をまとめたものを表2に示す。予測された37,544個の遺伝子は12本の染色体上でほぼ平均的に分布していた（遺伝子密度は染色体毎で殆ど変わらない）。イネ遺伝子の統計値を双子葉植物のシロイヌナズナと比較してみると、イネの遺伝子密度（9.9kbに1遺伝子）はシロイヌナズナの半分であるということ、これは平均遺伝子長がイネの方が35%長いことだけでは説明がつかない。イネの総遺伝子領域は1億塩基程度であり、ぎゅうぎゅうに詰まっているわけではなさそうだ。これはイネの方が

表1 IRGSPが解読したイネゲノム配列長

染色体番号	解析したクローン数	配列塩基数	セントロメア以外の ギャップの個数	ギャップ長(百万塩基)	セントロメア(○ は解析済み、 ×はギャップ)	全長(百万 塩基)	カバー率(%)
1	397	43260640	5	0.33	×	45.05	96.0
2	359	35954074	3	0.10	×	36.78	97.7
3	330	36189985	4	0.96	×	37.37	96.8
4	291	35489479	3	0.46	○	36.15	98.2
5	278	29733216	6	0.22	○	30	99.1
6	281	30731386	1	0.02	×	31.6	97.2
7	286	29643843	1	0.31	×	30.28	97.9
8	277	28434680	1	0.09	○	28.57	99.5
9	223	22692709	4	0.13	×	30.53	74.3
10	205	22683701	4	0.68	×	23.96	94.7
11	258	28357783	4	0.21	×	30.76	92.2
12	268	27561960	0	0.00	×	27.77	99.2
All	3453	370733456	36	3.51		388.82	95.2

表2 イネゲノム予測遺伝子の統計値の  
シロイヌナズナとの比較

	日本晴全染 色体	シロイヌナズ ナ全染色体
配列全長(塩基)	3億7千万	1億1千5百万
予測遺伝子 個数	37,544	25,498
遺伝子密度(遺伝子あたり千塩基)	9.9	4.5
遺伝子の平均長(塩基)	2,699	1,992
GC含量(%)		
エクソン部	54.2	44.1
イントロン部	38.3	32.7
遺伝子間部	42.9	
遺伝子全体	45.3	
ゲノム全体	43.6	34.7

<sup>a</sup>Arabidopsis Genome Initiative. *Nature* 408, 796-815 (2000).

シロイヌナズナより遺伝子間に転移因子などの配列が数多く挿入されたためと考えられる。実際に個々の遺伝子の状態を詳細に見てみると、タンパク遺伝子の近傍に必ず転移因子が挿入されていることがわかる。なお染色体毎の塩基配列、予測された遺伝子のアミノ酸配列情報は農業生物資源研究所に設置されたIRGSPのウェブサイト(<http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP/Build3/build3.html>)よりダウンロード可能である。

## 2. 全遺伝子比較によるイネ遺伝子の特徴付け

イネの遺伝子を他の生物と比較することにより、イネあるいは単子葉類に特異的な遺伝子が見えてくる。これらを調べるために、まず全遺伝子から予測されたタンパクのアミノ酸配列を他の生物と比較してみた。その結果シロイヌナズナとは71%、ヒトとは41%、ハエとは38%が似ているという結果になった。これを遺伝子が発現していることが確実な23,000個の遺伝子で

見ると、88%がシロイヌナズナと同じであった。この結果はタンパク構造(プロテオーム)という点から見た場合にはイネとシロイヌナズナでは大きな変化がないという結論を示す。それでは形態(単子葉・双子葉)の面からもまた生物機能(たとえばイネが短日植物なのに対してシロイヌナズナは長日植物)の面でも明らかに異なる形質の差違はどこから来ているのだろうか。一つの手がかりは、少ない(2,800個)ながらもイネでしか見つからない遺伝子があることでこれらの機能は殆どが未知だったが、中には貯蔵タンパクやストレス反応遺伝子(キチナーゼ, PR遺伝子, プロテアーゼインヒビター)



など既知の遺伝子も存在していた。しかし遺伝子のタンパク部分を比較するだけでは十分ではないかもしれない。後述するように植物には同じ遺伝子がduplicateして存在することが多く、この結果冗長性を獲得した遺伝子はその発現調節部位を変化させることによって機能分化を起こすと言われている<sup>2)</sup>。今後は遺伝子の内タンパクをコードしている領域だけでなく個々の遺伝子の発現調節領域の比較も重要であり、イネの全ゲノム配列はまさにこの情報を与えてくれるだろう。

### 3. 遺伝子機能の推定

遺伝子の機能を調べるための第1歩として、予測された全遺伝子のアミノ酸配列に対して既知の機能ドメインを検索した。発見された機能ドメインを頻度順に並べたものが表3である。おどろくべきことに1~5位までをタンパク質リン酸化に関する酵素ドメインで占めた。その他ロイシンリッチタンパクドメイン、転写因子DNA結合ドメインなど情報伝達に関わるドメインが上位を占めた。移動が不可能な植物にとって情報伝達は環境への素早い対応への武器となるのだろうか。すべての遺伝子の少なくとも

も14%（広くとれば30%）は近接して存在しており、植物ゲノム進化の過程で遺伝子増幅が起こったことを窺わせて興味深い。それではどんな遺伝子が繰り返しているかと調べると、今度はベスト50位中42個までタンパク質リン酸化ドメインであった。イネの進化の過程で、他種のリン酸化ドメインを寄せ集めたのではなく、数種類のドメインを繰り返し増幅することによって現在の遺伝子（ドメイン）多様性を作り出したと考えられる。

### 4. 遺伝子以外のゲノム配列の解析

ゲノムを研究する意義としては通常のタンパク遺伝子以外に見つかる遺伝単位の重要性にも目を向ける必要がある。イネは先に遺伝子予測の障害となった大量の転移因子群に対して、外敵あるいは植物への寄生体として不活化する機構（メチル化など）を身につけたと考えられる。しかし同時に、証明はされていないが、これらの転移因子が遺伝子を破壊したり、あるいはゲノムサイズの増大の引き金になったりすることにより植物ゲノム進化の原因になった可能性はある。植物には現在も多くの転移因子が飛び交っており、現在も進化を続けている。たとえば

表3 イネ遺伝子から検出された機能ドメイン（1~10位）

順位	遺伝子機能(発見された機能ドメイン)	遺伝子数
1	タンパク質リン酸化様	1425
2	タンパク質リン酸化	1366
3	Ser/Thr リン酸化	1286
4	Tyrリン酸化	1264
5	Ser/Thr リン酸化,活性化部位	1075
6	ロイシンリッチリピート	837
7	サイクリン様 F-box	620
8	tetratricopeptide repeat (TPR)モチーフ(タンパク間相互作用)	572
9	ロイシンリッチリピート、植物特異的	431
10	ホメオドメイン様	425

イネには3,000以上のPack-MULEといわれるDNA型の転移因子が存在し、これらは転移時にイネの遺伝子をも転移させる可能性があることが発見された。これらは転移因子がより積極的にgene shufflingに関わっている可能性を示唆するのかもしれない。これ以外にもイネゲノムには巨大なオルガネラ遺伝子領域の挿入が観察されており、現存のゲノム構造が決して最終型ではないことが推定された。また最近、タンパク質に翻訳されない遺伝子（非翻訳RNA）の存在が注目を集めており<sup>3)</sup>、IRGSPはこれらの解析についても一部行っている。しかしこの分野は現在なお混沌としており、将来イネの非翻訳RNAの網羅的解析によって遺伝子制御の概念が一変する可能性もある。

以上述べてきた解析結果はNature誌2005年8月11日<sup>4)</sup>号で発表されている。著者として名前が挙げられた264名の7年間に及ぶ共同研究の成果であり、その内容は37,544の遺伝子について以外に、機能ゲノム学 (functional genomics) での解析、イネ育種の道標となるべきDNAマーカーの位置情報など、包括的なイネゲノム情報が記述されている。是非本文だけでなく補遺部分もダウンロードして参照していただきたい。

## 5. おわりに

イネゲノム配列決定、イネ遺伝子解析は非常に大きな一歩ではあるがそれでもやはり一歩に過ぎない。イネのすべての遺伝子の特徴づけるには、さらなる詳細な解析が重要である。すべての遺伝子予測が正しいとは限らない。1つ1つの遺伝子について、転写物、タンパク質など存在証明を丁寧に行うこと（アノテーション=注釈）が決定的に重要である。我が国が主導してこのようなイネアノテーションプロジェクト (RAP1) が平成2004年12月に茨城県つくば市で行われ、その結果が2005年12月15日に公開されたばかりである (RAP-DB, <sup>5)</sup>)。しかし目

に見える遺伝子の機能は実は多くの遺伝子の相互作用の結果であり、desk-top scienceでは解明できない。イネにはすでに多くの自然突然変異体が存在するが、これに加えて人為的突然変異体、いわゆる遺伝子破壊株の作製が着々と進められている。また逆に遺伝子の過剰発現によって表現型を付与する手法も行われ、酵母細胞で行われている変異体の網羅的解析も可能になると思われる。イネの遺伝子機能の解析についてはここ数年まず単遺伝子の機能解明が行われ、ついで複数の遺伝子の関与する複雑形質の解明へと進むだろう。これに関して様々な条件における遺伝子の発現をマイクロアレイ等によってモニターすることによって個別の遺伝子発現の解析から系 (System) としての遺伝子ネットワークの解明が可能となり、全体の中での個々の遺伝子の位置づけが明らかになる。言うまでもなくこれらの解析には個々の遺伝子やゲノム塩基配列が確定されていることが大前提であり、これにあてはまる高等生物はきわめて少ないと言わざるを得ない。かつてイネは大きなブラックボックスとして存在していた。それは例えば光・温度・施肥・病虫害などの刺激によって出力が変化する箱であり、経験則や遺伝学がその法則性を明らかにしてもなお、現実の圃場で役に立つ結果の予測は難しかった（今でも難しい）。イネゲノム、そしてイネ遺伝子の姿が明らかになるという事態は、イネがもはやブラックボックスではなく中身の見える（半）透明の箱であり、それらの中身のうちいくつかは役目を調べたり取り外したり、別な部品と付け替えたりできる状態へと進んだことを意味する。

世界には多くのイネを主食にする人々がいる。これらの人々が飢えることなく生活するためには不断の食糧増産が必須である。現存のイネの栽培種や野生種の中には背が高い・低い、収量が多い・少ない、乾燥に強い・弱いなど様々な形や性質を持ったものが存在する。これらの自然変異・遺伝資源を利用して、人間が栽

培上理想とするイネを育種することが重要であり、ゲノムや遺伝子の研究はその基本である。またゲノム上の特定のDNA配列をマーカーとして利用する技術は従来の目に見える形質を標識にする手法の数倍の精度で交配結果をモニター可能である。このような膨大なゲノムの知識・手法と遺伝子組み換え技術などの新しいバイオテクノロジー技術とが結びついたとき、育種技術はさらに効率化するに違いない。イネの新育種開発の新しい時代がそこまで来ている。

イネゲノム全塩基配列解読完了は1998年－2004年まで継続した農林水産省「イネ・ゲノム

の全塩基配列の解明」プロジェクトの成果である。

## 文 献

- 1) 佐々木卓治 (2005), ブレインテクノニュース, 108, 1-3
- 2) Moore, R. C. et al. (2005), *Curr. Op. Plant Biol.* 8, 122-8
- 3) Mattick, J. S. (2005), *Science* 309, 1527-8
- 4) International Rice Genome Sequencing Project. (2005), *Nature*. 436, 793-800
- 5) <http://rapdb.lab.nig.ac.jp/>



ブレインテクノニュース  
バックナンバーのご案内  
第111号  
2005年9月15日発行

### 特 集 「匂いとフェロモンの科学」

- 1 匂いとフェロモン受容の分子メカニズムとその研究の現状  
.....佐藤 幸治・東原 和成
- 2 嗅覚系における神経細胞の個性獲得と多様性識別  
.....坂野 仁
- 3 哺乳類におけるフェロモン研究の現状と展望.....森 裕司
- 4 昆虫の脳におけるフェロモンと匂いの情報処理と行動発現  
機構.....加沢 知毅・岡田 公太郎・神崎 亮平

### 国内情報

レドックス制御を包括的に解析できるジスルフィドプロテオーム—ポストゲノム研究の有効なツール：原理と応用—  
.....矢野 裕之・黒田 秋

砂糖及びセルロースを原料とした酵素合成アミロースの製造と  
利用.....鷹羽 武史・和田 守・北村 進一  
カシノナガキイムシ集合フェロモンの化学構造決定—ナラ類  
集団枯死の回避を目指して.....中島 忠一  
携帯式作物生育情報測定装置の開発  
.....堀尾 光広・紺屋 秀之・西村 洋・林 和信

### 地域の先端研究

バラのアントシアニン生合成における新規糖転移酵素の発見  
.....緒方 潤・菅野 善明・鈴木 正彦

### 文献情報

搾乳牛の第1卵胞液における卵胞への血液供給量の変化  
.....(抄訳：下司 雅也)  
ブルーティラピア (*Oreochromis aureus*) の性別を支配する  
二つの非連鎖遺伝子座 .....(抄訳：Chen Weimin)  
DC-SIGNを介した樹状細胞の機能調節によりIL-10を産生する  
調節性T細胞を誘導する乳酸菌.....(抄訳：野中 敦子)  
花成ホルモン発見か? .....(抄訳：岩井 純夫)

### 生研センターからのご案内

## ◀国内情報▶

原子間力顕微鏡による抗体抗原反応  
測定のための新しい方法独立行政法人 食品総合研究所 食品工学部 計測工学研究室  
若山 純一・赤沼 哲史・関口 博史・大谷 敏郎・杉山 滋

私たちは、食品中に含まれるアレルゲンなど微量成分の迅速検出のための基盤技術として、原子間力顕微鏡による抗体抗原反応測定手法の開発を進めている。従来、抗体抗原の分子間相互作用と物理吸着などの非特異的相互作用による吸着力を区別して測定することは難しかったが、測定条件やAFMの探針制御の工夫により、非特異的吸着と区別して抗体抗原反応を明確に検出することが可能になった。

## 1. はじめに

現在アレルゲンの検出には、免疫反応を利用してアレルゲン物質そのものを検出するELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) 法やアレルゲンが由来する生物のDNAを増幅して検出するPCR (Polymerase chain reaction) 法が主流となっている。しかしながら、ELISA法やPCR法は、検出のために数時間程度の時間が必要であり、またある程度の量の試料を必要とする。そこで、私たちは、原子間力顕微鏡 (AFM, Atomic force microscopy) を利用して、微量な試料で迅速に食品中のアレルゲンを検出する方法の開発を進めており、現在、そのための基盤技術であるAFMによる抗体抗原分子間相互作用の明確な検出手法の確立に取り組んでいる。

AFMは、特別な前処理なしに、大気中または液中で試料を電子顕微鏡以上の高い分解能で観察することが可能であり、生体分野では細胞、染色体、DNA-タンパク質複合体などの微細構造をナノレベルの分解能で観察するために用いられている。AFMは、また、観察のみでなく、WAKAYAMA Jun'ichi, AKANUMA Satoshi, SEKIGUCHI Hiroshi, OHTANI Toshio, SUGIYAMA Shigeru  
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

探針と試料の間に働く微弱な力 (nN以下) を検出することも可能であり、この機能を利用して探針に結合させた分子と基板に固定された分子の間に働く力学相互作用も計測することができる。AFMによる抗体抗原分子間力の測定は、これまでも行われているが<sup>1, 2)</sup>、探針と基板の間には、抗体抗原相互作用による特異的な分子間力 (抗体抗原分子間に働く分子間力) のみでなく、物理吸着などの無視し得ないほど大きな非特異的な相互作用力も働くため、両者を明確に区別して測定することは困難であった。そこで、私たちは、基板への抗原の固定方法、実験溶液、カンチレバーの移動速度を工夫することにより、非特異的な相互作用による吸着力を大幅に減少させて計測することに成功した。本稿では、特異的な抗体抗原分子間相互作用力と、非特異的相互作用を明確に区別して計測するための、私たちの開発した新しい手法について紹介する。

## 2. 原子間力顕微鏡

Binnigらによって1986年に発明されたAFM<sup>3)</sup> は、カンチレバーとよばれるシリコン製の探針で試料表面を二次元走査することにより、物体表面の凹凸を等高線としてデータ化し、コンピュータ上でそのデータを画像化する顕微鏡であ

る(図1)。AFMは、走査型電子顕微鏡と同レベルの分解能を持ち、当初は材料科学の分野で主に利用されていたが、電子顕微鏡が真空中で観察するのに対し、大気中や液体中での観察が可能であり、金属被覆や染色が不要で電子顕微鏡に比べて試料の前処理が容易なため、近年では生命科学の分野でも多く使用されている。

また、AFMは画像化だけではなく、前述のように、試料とカンチレバー間の相互作用も計測することができる。力学的相互作用の計測では、カンチレバーを垂直方向に移動させ、カンチレバーを引き離した(または押し付けた)際に生じるカンチレバーのたわみを測定し、カンチレバーのバネ定数から試料にかかる力の大きさを求めることができる。通常のAFMの場合、pNからnN程度の大きさの力

(1~10個程度の分子が相互作用する際に働く力と同程度)を測定することができる。また、カンチレバーの先端径は約10~30nm程度であり、そのサイズはタンパク質などの生体分子1~10個程度である。即ち、カンチレバー先端に結合した少数の生体分子と基板に固定した分子との間に働く力を測定することができる。これらのことから、AFMは生体分子の一分子計測のツールとして使われている。

### 3. 抗体抗原相互作用の検出

#### 3.1 基板への抗原の固定

本研究では、モデル系として、抗原には鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンを、抗体としては抗フェリチン抗体(ポリクロナール)を使用した。抗体は、抗原表面のエピトープを認識し

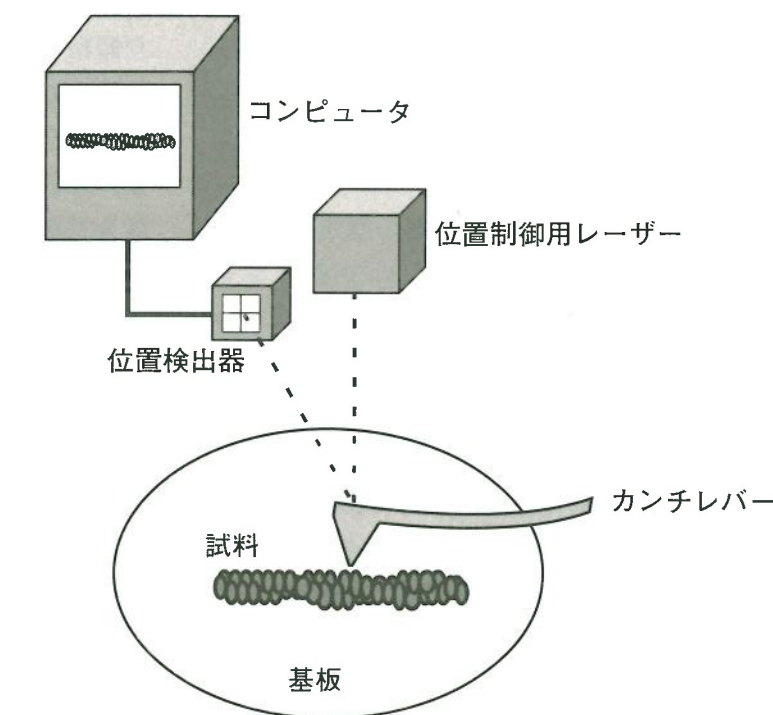


図1 AFMの仕組み

カンチレバーで試料表面の近傍を走査すると、試料の凹凸に応じてカンチレバーがたわむ。カンチレバーの表面は鏡になっており、この鏡に位置制御用レーザー光線を当てて、その反射光を検出器で受ける。レバーのたわみに応じて鏡の傾きが変わるので反射光の向きが変わる。その向きを検出器で検出して、カンチレバーのたわみを求める。求められたたわみから試料の凹凸を計算し、コンピュータ上に記録して画像化する。

て結合する。したがって抗原の基板への固定は、抗原の表面が実験溶液に対して露出していればよく、原則的には抗原の活性を考慮する必要がない。

今回の計測では、抗体を固定したカンチレバーを基板上の抗原と短時間接触させ、その後カンチレバーを垂直方向へ移動させたときにカンチレバーに働く力から、抗体抗原分子間の結合力を測定する。そのため、抗原の基板への固定が弱いとカンチレバーの移動により抗原が剥がれる可能性がある。そこで、3-aminopropyltriethoxysilan (APTES) 修飾マイカ基板の上にフェリチンを静電吸着によって固定した後、グルタールアルデヒドを介して基板に導入したアミノ基とフェリチン表面のアミノ基とのクロスリンクを行い、共有結合によりフェリチンを確実に固定した。AFMによる計測においては、基

板表面が分子レベルでフラットであることが重要になるため、マイカ基板のAPTES修飾は、窒素雰囲気中で気相法により行い<sup>4)</sup>、表面荒さ1 nm以下の平坦性を実現している。

### 3.2 カンチレバー上への抗体の固定

抗体のカンチレバーへの固定は、直接カンチレバーの表面に抗体を固定した場合、表面との物理的相互作用により、抗体の活性（抗原への結合能力）が阻害される可能性がある。そのため、両面が金コートされているカンチレバー（OMCL-TR400PB, オリパス）の表面を末端にカルボキシル基をもつアルカンチオール（7-Carboxy-1-heptanethiol）と反応させて自己組織化単分子膜を形成させた後、NHS（N-Hydroxysulfosuccinimide）とEDC（1-Ethyl-3-[3-dimethylamino]propyl carbodiimide）を介して、抗体表面のアミノ基とクロスリンクさせ、抗体をカンチレバー表面に結合させた。

次にカンチレバーに結合している抗体が活性を有しているかどうかを確かめるために、蛍光色素（Cy3）を標識した抗原タンパク（フェリチン）と非抗原タンパク（BSA, アビジン）

を探針と反応させて探針表面を蛍光顕微鏡により観察したところ、フェリチンのみが表面に結合することが確認できた。このことは、探針表面へのタンパク質の結合は非特異的吸着ではなく、抗体による特異的なものであり、抗体の機能を損なうことなくカンチレバー表面に固定できていることを意味する。

### 3.3 AFMによる抗体抗原反応の計測

AFM（Nano Wizard, JPK instruments）を用いて、カンチレバーの表面に結合した抗体と、基板に固定された抗原タンパク質間に働く力を計測し、Force-Distance curveを求めた。Force-Distance curveとは、AFMの試料台上の基板とカンチレバーを互いに近づけたり遠ざけたりして距離を変えたときに、カンチレバーにかかる力を距離に対してプロットして得られるカーブのことである。Force-Distance curveの模式図を図2に示す。まず遠ざけた状態（点a）からカンチレバーを基板に近づけていくと、点bで、カンチレバーに固定された抗体と基板に固定された抗原もしくは非抗原タンパク質が結合する。さらに押しつけると、カンチレバー

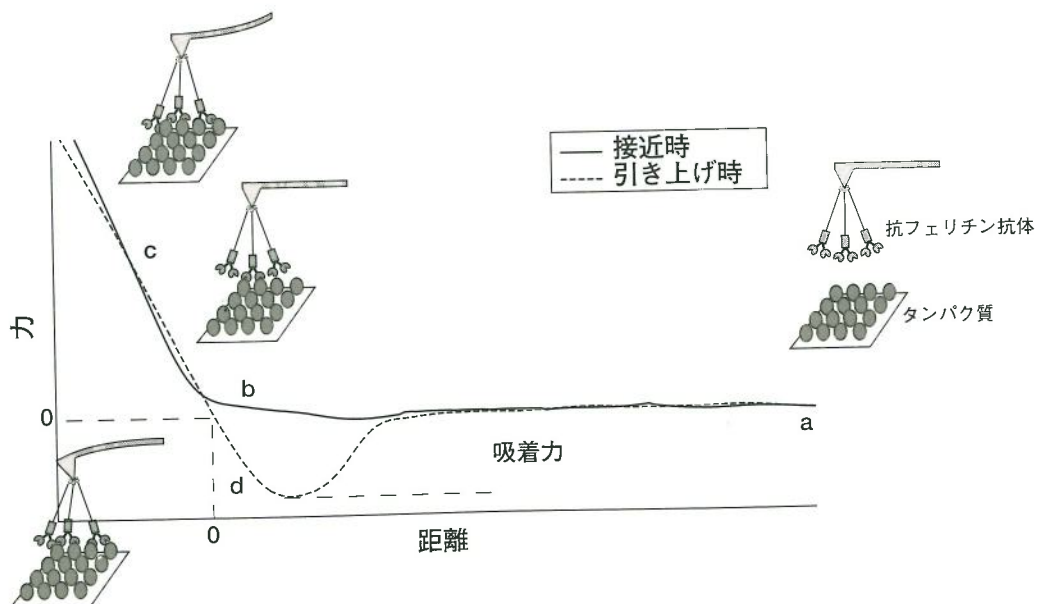


図2 Force-Distance curveの模式図

横軸は、抗原タンパク質表面とカンチレバーとの距離を、縦軸はカンチレバーのたわみから求めたカンチレバーにかかっている力を表わしている。

は押し上げられ上にたわみ始める（点c）。上に大きくたわんだ状態から今度は徐々に遠ざけていくと、カンチレバーのたわみは解消されていく。点bからカンチレバーは抗体分子と抗原分子との相互作用により下にたわみ始める（点d）。下に最もたわんだときの力が抗体抗原相互作用による分子間力（吸着力）と思われる。

基板にフェリチン（抗原），もしくはBSA（非抗原）を固定して，リン酸化緩衝化生理食塩水中（PBS）のみで計測して得られたForce-Distance curveの例を図3Aに示す。PBSのみでは，BSA（非抗原）においてもフェリチン（抗原）と同程度の吸着力がみられた。今回用いたカンチレバーの直径（約20nm）と抗体分子の大きさ（数nm）から，Force-Distance curveにみられた吸着力は10個程度の抗体分子

と抗原分子の相互作用によるものと考えられる。このような少数の分子数の場合，分子のまわりの熱揺らぎの影響により，その相互作用は確率的におこる。そのため，今回の吸着力の測定においても，複数回行う必要がある。そこで，300回測定して得られた吸着力のヒストグラムを図3Bに示す。このヒストグラムからわかるように，フェリチン（抗原）とBSA（非抗原）では，吸着力の分布にそれほど大きな違いがみられなかった。これらのことは従来から行われてきた計測結果<sup>1,2)</sup>に一致する。また，従来から抗体抗原間，リガンド受容体間などの非共有結合は，その非共有結合を引き離す速度を速くするにつれて，結合強度が増大することが知られているが<sup>3)</sup>，カンチレバーの移動速度を速くしても吸着力の分布に大きな違いがみられな

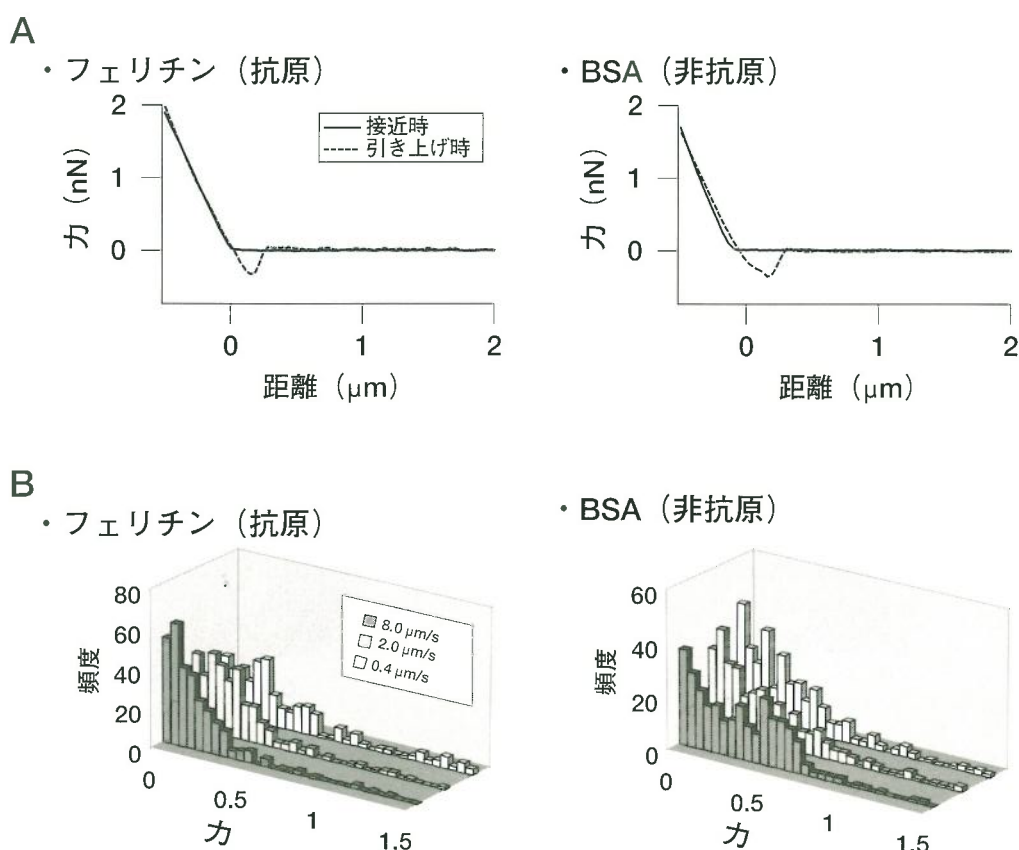


図3 リン酸化緩衝化生理食塩水中のみで計測したときの結果  
Aは，抗体付きカンチレバーを基板に固定された抗原に8.0  $\mu\text{m/s}$ の速さで接近させたり遠ざけたりした場合に得られたForce-Distance curveの1例。Bは，吸着力のヒストグラム。

った。これらの結果は、PBSのみで計測した吸着力には、抗体抗原反応に由来する特異的相互作用だけではなく、物理吸着などの非特異的相互作用による吸着力も多数含まれていることを示唆している。

### 3.4 測定溶液条件の検討

PBS中の計測では、抗体抗原反応を明確に検出することが困難であったため、非特異的吸着力を抑えることを目的に、測定溶液に界面活性剤Tween 20とブロッキング試薬 (Blocking reagent, Roche) を添加して計測を行った。得られたForce-Distance curveの例を図4Aに示す。Tween 20とブロッキング試薬存在下で

は、非存在下に比べて、フェリチン (抗原) の吸着力は増大しBSA (非抗原) の吸着力は減少した。吸着力の分布 (図4B) において、フェリチン (抗原) では特異的と思われる吸着力の頻度が増加し、BSA (非抗原) では非特異的と思われる吸着力の頻度は減少し、双方のヒストグラムには大きな違いがみられた。また、PBSのみの場合とは異なり、カンチレバーの移動速度を速くすると、吸着力の分布がフェリチンでは大きくなる方 (右側) に、BSAでは小さくなる方 (左側) にシフトし、非共有結合を引き離すのに必要な力は引き離す速度を速くすると増大するという従来の結果に一致した<sup>5)</sup>。

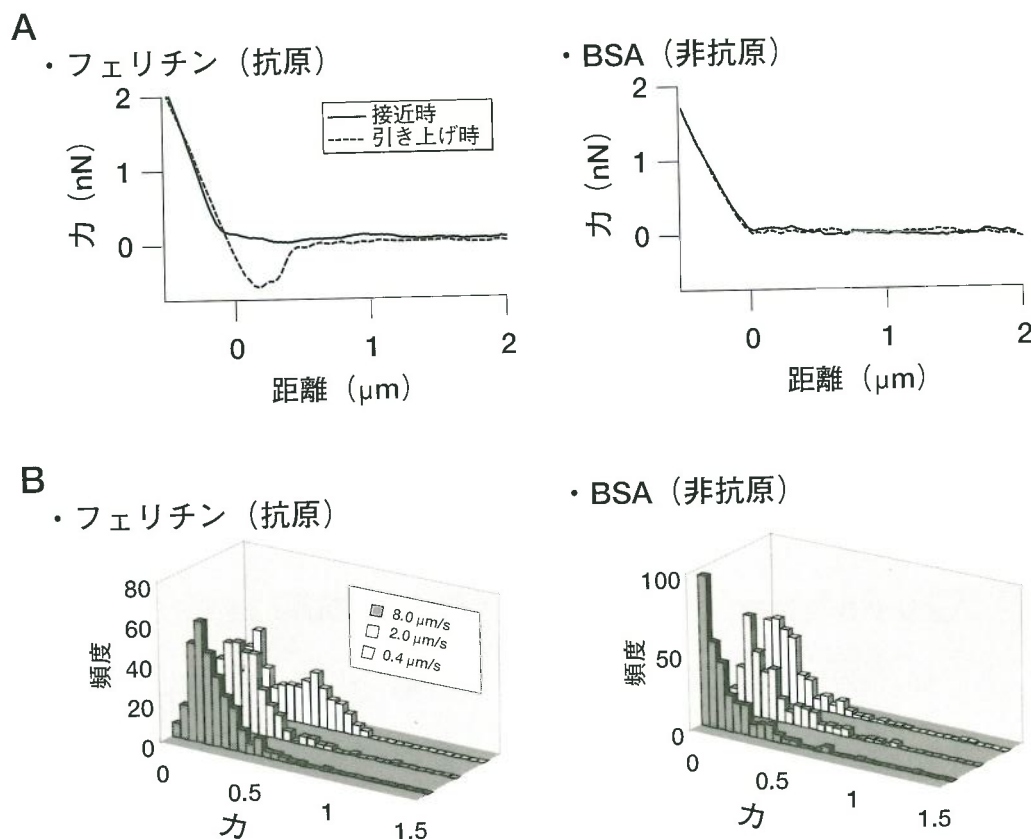


図4 リン酸化緩衝化生理食塩水中にTween 20およびブロッキング試薬を添加したときの計測結果

Aは、抗体付きカンチレバーを基板に固定された抗原に8.0  $\mu\text{m/s}$ の速さで接近させたり遠ざけたりした場合に得られたForce-Distance curveの1例。Bは、吸着力のヒストグラム。



#### 4. おわりに

今回、私たちは、界面活性剤とブロッキング試薬の使用及びカンチレバーの移動速度を大きくすることにより、非特異的相互作用を大幅に減少させて、AFMを用いて特異的抗体抗原反応を明確に計測するための方法を開発した。今回開発した手法は、抗体抗原反応を利用した様々な物質の検出にそのまま応用が可能である。現在、本手法によるアレルゲン物質の検出・同定法の開発に着手しており、モデル系のフェリチンに加えて、卵白の主要アレルゲンタンパク質であるオボムコイドについての計測実験を行っている。本手法では抗体付きのカンチレバーと抗原を含有する試料を固定した基板を用意できれば、Force-Distance curveを1回計測してデータを得るまでの時間はわずか0.5～1秒程度ですむ。実際の検出には、計測を複数回行う必要があるものの、この繰返しステップは自動化が可能であり、従来から行われてきたELISA法やPCR法に比べて大幅に時間を短縮することができる。また一方で、本手法は、タンパク質科学の基礎的研究においても有効な手段と考えられる。生体一分子計測が最も進んでいるモータータンパク質の研究分野では、従来の生化学による多分子の同時計測及び平均化さ

れた値の解析ではわからなかった、分子個々の性質が近年明らかになってきている<sup>6)</sup>。AFMによる抗体抗原相互作用の一分子解析が進めば、抗体抗原反応に携わる分子個々の性質の解析にも貢献が可能であろう。

#### 謝 辞

本稿で紹介した研究はNEDO基盤技術研究促進事業及び生研センター基礎研究推進事業により行われている。

#### 文 献

- 1) Allen, S. et al. (1999), *Biochem. J.*, 341, 173-178
- 2) Brogan K. L. et al. (2004), *Langmuir*, 20, 9729-9735
- 3) Binnig, G. et al. (1986), *Phys. Rev. Lett.*, 56, 930-933
- 4) Sasou, M. et al. (2003), *Langmuir*, 19, 9845-9849
- 5) Evans, E. et al. (1998), *Faraday Discuss.*, 111, 1-16
- 6) Yanagida, T. et al. (2000), *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 355, 411-417

## ◀国内情報▶

## ステンレススチール標識およびIC標識を利用したアワビの情報管理技術

東京海洋大学 社会連携推進共同研究センター 客員教授  
山 川 紘

貝類の貝殻形成の生理的な特性を利用して、貝殻硬組織に標識を結晶構造の中に組み込ませた。標識は①ステンレススチール、②ICチップである。前者は硬組織の末端部の貝殻成長点に装着し、後者は、内面の真珠層に貼付した。ステンレススチール標識では、基部となる部分は真珠層に被覆され、他の数値・記号の情報部分は外部に表示した状態である。ICチップは全面的に貝殻の真珠層に取り込まれ、組織的に完全に真珠層内に組み込まれた。この状態で、ステンレススチール標識では4年以上、ICチップではすでに10ヶ月の間、生体の貝殻で情報機能を維持しており、標識の機能は安定的に保たれている。

## 1. はじめに

アワビの水産資源の現状はかなり厳しい状況にある。その主な理由は大別して、陸上活動の活性化に伴う沿岸浅海域の汚染や漁場喪失によること、漁業者や密漁者の漁獲努力が強すぎるため、資源の再生産活力が低下していることにあること、水温異常や植生変化など自然環境の変異が資源を圧迫していることなどがある。他方、アワビ資源の育成のための管理手法としては、アワビの種苗を放流すること、また、漁獲規制や保護水面の確保により資源の厚みを増すこと等の努力を行っている。しかし、現状では、なかなか経済的な効果が判明せず、漁業者自身が放流貝の回収率を自覚する技術がない。これは、磯焼け等の環境悪化に対する対策に苦慮していることと合せて、資源の再生の重い課題となっている。

今回の技術開発の課題は、アワビ個体群を生産対象として考える場合に、個体の認識技術を確立することであり、その用途としては、種苗生産時の親個体の生物学的・遺伝学的特性や履歴をICタグの入れ、それらの親から適切な種苗生産と育成を行うこと、およびステンレススチール標識（以下、ステンレス標識）を稚貝放

YAMAKAWA Hiroshi

〒108-8477 東京都港区港南4-5-7

流群やアワビの自然個体群に施してコホート群を管理すること、また漁獲後は、トレーサビリティにより食の安全の判る流通管理を目指すことにある。

## 2. 貝殻への標識の装着の原理

## 1) 貝殻形成の生理的特徴

貝類の貝殻は主としてコンキオリンおよび無機質の炭酸カルシウム（リン酸カルシウムと炭酸マグネシウムが数%）からなる。貝殻表面は殻皮層が薄く覆っており、次に貝殻の中心となる殻質層（稜柱層）、内部に殻質層を覆っていく殻下層（真珠層）からなる。軟体部の貝殻との接合部付近に外套膜という軟組織があり、外套膜の端で殻皮層が、その内側付近で殻質層が、また、殻下層（真珠層）は殻質層形成外套膜より奥側部分全体で形成される（図1）。

この硬組織組織形成のシステムを利用して、古くは15世紀からアジアで淡水真珠貝に貼付した核を基に、ブラスター真珠を作る技術がある。また、Linne (1761) に半型真珠の施術に成功した記録がある。アワビに関してはMikimoto & Booutanが貝殻外部から穿孔した記録がある。1) その後、技術の検討が行われ、2) その結果は、長崎県五島列島の小値賀町に技術移転され、町の産業となっている。

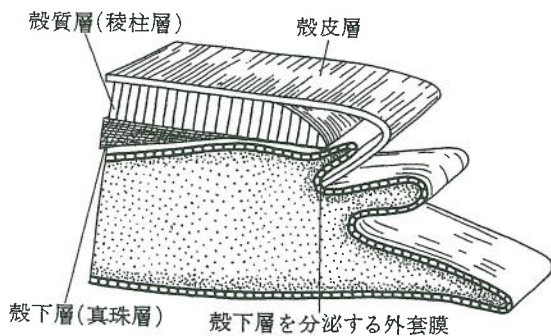


図1 軟体動物の貝殻形成組織

## 2) ステンレス標識の装着

ステンレス標識は、アワビ稚貝の殻皮層と殻質層の成長点を挟み込むように装着されるので、外套膜を挟み込まないように注意が要る。ステンレス標識の短片は、硬組織の真珠層で包埋される必要があるため、石灰化活力のない稚貝の腹足筋肉部の基部に近づけない工夫がいる。標識の有効なサイズと貝殻の強度から、標識を付けるには殻長30mm以上の個体の使用が望ましい。このサイズでやっと自然環境内でも生理的にも生態的にも対応できる。

アワビの貝殻が形成が正常であれば、成長がスチール標識の厚み0.2mmを越す段階から殻内に標識が取り込まれ、周辺の硬組織と一体化する。この間、ステンレス標識の短片部は、殻質層の炭酸カルシウムの薄膜で覆われ始め、水温20℃付近では20日程度で安定して固着し、封入される。長片部は埋没することなく、貝殻表面で情報を読める形で貝殻に固着している。さらに殻内の短片部は、やがて硬質な真珠層で覆われ、特に障害的な痕跡も残さない。

## 3) IC標識の装着

IC標識はチップとアンテナ部分とで形成されているため、小型化するには限度がある。材質もアンテナには銅金属を使用し頭髪並みの細さであるため、特殊な溶接などの工夫が必要である。今回の実験用にICチップはアンテナ

を含め直径7～9mmの製品が作られた。そのICタグは単体では材質の特性上、海水中で容易に腐食するので、ポリエチレン樹脂のラミネートフィルムでポーチ状に封入し、その全体を貝殻内部に貼付状態で装着した。このような貼付スペースが小型貝にはないので、ICチップは、殻長10cm以上の個体を対象とした。装着手順は、貝殻裏面の装着点付近を定めた後、外套膜が傷つかないように注意しながら、装着点付近を速やかにアルコールで拭き、直ちにカルシウム類に親和性のある歯科用の瞬間接着剤をIC標識入りポーチの表面に塗布し、真珠層表面に貼付した。しばらく組織同志が触れないように気をつけながら経過させ、接着剤が硬化した後、上に外套膜を被せて水中に戻した。その間、施術から終了まで5分程度を要した。貼付部分が奥部であるため真珠層の被覆に時間が必要であったが、6ヵ月後にも実験用のタグは全て正常に機能し、真珠層による正常な結晶構造的な融合が行われていた(図2-A, B))。

ICタグのデータは、当初、飼育水温・殻長・総体重・性別・生殖腺発達指数のデータに入れ、2月間隔で書き込んでいった。実験期間は2005年3月に装着し、7ヵ月後の2005年9月にはいずれも正常であり、各計測値のデータを加えることができた。2006年1月現在のところ、外観上にも異常が生じていない。

## 3. 標識の特徴

### 1) 標識の情報の内容

ステンレス標識の普及段階のものでは、材質はステンレススチールの中で、長期に錆を招かず、かつ金属探知機のセンサーに対応して鉄含有成分の比較的多い、Sus-430のタイプを使用した。標識の形状は長片部10.0mm、短片部6.5mm、幅3mm、厚さ0.2mm、両片の間隙(内径)0.8mmである。長片部に短片に向かってくの字様にカーブを持たせ、貝殻に挿入した折に、長片の先端部のフックで貝殻表面を捕捉し、そのカーブでもって貝殻を短片を支点とし

A)



B)



図2 A) 貼付直後のICチップ  
B) 真珠層に包埋されたICチップ

たてバネのように貝殻を挟む形式となる(図3)。金属長片側には長表面に7桁の刻印を入れ、数字の組合せによりトレーサビリティの機能を持たせている。各漁場への放流後は、基本的にはアワビ類は生活史を放流地点から100m程度の移動をするので、その範囲で、各放流水域産としてタグ番号によって情報が管理される。例えば、標識上に7桁の記号・番号がTK0153であれば、TK：東京(漁船登録用公的略号)、01：東京都下漁協一覧からの登録、2桁)、5：西暦2005年漁場番号、3：漁場に今年度3回目の放流もしくは放流月、(他に7桁目を漁場図別に放流の際に数字で登録)である。このデータは、放流前の計画段階からアワビ管理情報センターに伝えられ、製作番号と漁

場図(これは公開しない)を確認してデータを管理することを期待している。漁獲後は、集荷場で標識が金属探知機で発見される。通常、附着生物によって標識がほとんど確認できない場合が多いが、その情報が6年程度の間蓄積されて、アワビ情報管理センターから経済的効果や次回放流への施策を提案することができるようになる<sup>3)</sup>。

IC標識は、Philips Semiconductors製のI-CODE SLIを使用した。チップおよび周辺アンテナの直径は7~9mm程度である。本ICチップの規格は、周波数帯13.56MHz、メモリー容量128byte、通信規格ISO 15693である。このタグはアンチコリジョンが可能で、リード/ライトの機能を有している。ただし、この性能では情報の認識のためにセンサーを数センチ以内に接近させなければならなかった。



アパロン ステンレス製タグ

クロアワビへの装着例  
(放流後1年)

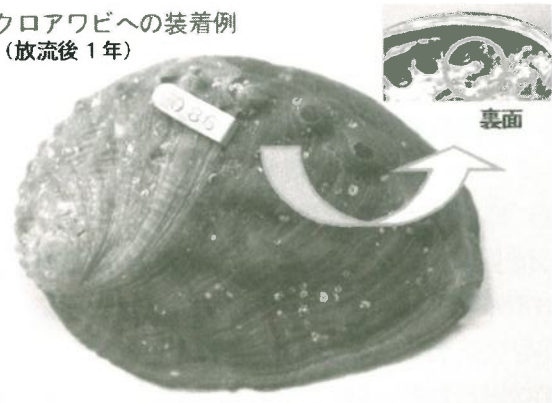


図3 標識の装着例

## 4. アワビ類への情報システム

### 1) ステンレスタグによる放流群の資源管理

生物個体群に対し、標識コホートを作って調査することは、生態学者・資源学者の期待するところである。しかし、個体に対する標識の影響が少なからず生じ、また、野生群を飼育して標識をつけると飼育期間が長くなればなるほど野生的資質を攪乱させる結果となり、自然環境に戻すことの難しさが伴うのが常であった。今回の試みは、従来は無理と考えられる種類に、ストレスなどの生物的な影響のないタグを開発し、標識による情報管理を行った。

例えば放流に伴う情報としては、親の形質や発育環境、放流水域等を記録し、標識の番号により後述する情報管理センター（公的組織）で保管する。ステンレス標識は、生理的にも生態的にも支障をきたさない材質と、必要最低限の量質を備えている。履歴の明らかな種苗は、漁業者が自らの畑と考える岩礁海岸の浅海各域に放流され、餌料藻類等の植生、棲息動物の種類や生息量による環境容量の差異から、アワビの生残や成長への影響を解析することができる。これらの情報は、標識付きの放流個体により、漁業者が科学的なデータとして効果を判定することができる。

資源を育成する保護水面を設ける場合にも、個体群の動態を知るためにはスキューバ潜水等により容易にステンレスタグを取り付け、各個体の生命表を作ることが理論的に可能となる。資源量の推定が標識個体群により可能となることから、乱獲の象徴が認められるときにはただちに操業を禁止したりする数的根拠を求めることができる。

ステンレスタグは、ステンレススチール Sus430 であるので、漁獲されるまでの4年ほどの期間も錆ることなく、集荷場で金属探知機などで回収される。従来の放流魚類が漁業者の権利に属さないままに無主物として扱われる状態と異なり、ステンレスタグによる管理が発展すれば、沿岸域の放流資源に対して一層明確な

所有権が主張できることになる。このような状況を作り、密漁行為に歯止めをかけることが期待できる。

### 2) ICタグによる情報管理

養殖種苗の生産に当っては、①短期間に大型に成長すること、②病気に耐性がある個体、③諸形質を遺伝的に選抜した個体が親貝として利用される。④場合によっては遺伝子操作された例えば3倍体等の個体、⑤アワビ間の養殖用交雑種、⑥養殖段階で記録されるべき薬品処理などを行った場合、なども「養殖」に限って行われる。これらの親にはICタグ上にその特性が記録され、水槽内で混同することなく取り扱われることが期待される。このようは情報が伝えられるべき物に関しては外部取り付けタグではアワビの呼吸孔をふさぐようなタイプしかないため、生理的にストレスとなると思われる。さらに、データの改ざんなどが行われる可能性があることから、内部取り付けの価値がある。

現在、アワビの種苗生産では育種的な手法や発想が必要となっている。現状では種苗生産の母貝には、①放流種苗起源の個体を親としない。（貝殻の稚貝の頃の飼育履歴が貝殻にグリーンの単色の色彩となっているので、明確に判別できる。）②種類判定形質のより明確な個体を親とする。③年毎に採苗用親体の半分を交換する。④100個体以上の親個体を使用する。⑤多個体から得た精子を混ぜ込む、などの遺伝的劣化が起こらない工夫を柔軟に行っている。⑥親貝は、県内周辺から選別されるようにして遺伝的な地方特性を大切にす。その中には、高成長個体や耐病性の高い個体、成熟速度・放出された卵質・卵量・受精率等の優れた個体が存在するから、これらの個体の持つ特性を情報として重視し、管理することが必要となる。今回のICタグはこのような種苗の生産管理に有効な手法となる。さらに、保護水面における行動や生残が判明するようにした資源集団の残し方にも標識が取り入れられていいであろう。

漁獲された個体には、ICタグを取り付けて

以後のデータの書き込みを図ることができる。従来は漁獲後蓄養を行い、数週間から長期には10ヶ月近く蓄養することがある。その段階で直接もしくは間接にICタグを取り付け、データの書き込みを必要に応じて行うことができる。従来から、間接的にビニール帯等で取り付ける事例がイメージできるが、今回の事例は生体の貝殻に直接取り付けることに特徴がある。

流通段階では大量の商品が流れるために、内部取り付け技術が革新されないと作業性に無理がある。外部取り付け標識では、取り外しが行えないような製品開発が必要となる。

### 3) アワビ情報管理センター

各流通段階は危機管理上、通過するものを管理しなければならない。したがって、各流通段階に確認されたデータはNPO法人「海事・水産振興会」のアワビ管理情報センターに送り、生産者から流通組織、消費者段階への危機管理を含めた情報をセンターに集中するシステムを提起していく。アワビ情報管理センターでは、

とりあえず東京海洋大学との連携で専門家集団で情報管理と解析を、(社)漁村文化協会が普及活動等を、(株)フィスコが情報システムの管理と技術革新、標識の流通部門の管理・販売等を主として行う計画である。この三者で行うシステムは、今年度から機能している。もちろん、BSE問題の解決のために、情報センターが個別別に肉牛の情報を管理したように、発展的に公共性の高い水産情報センター的な機関が設立されれば、その役割を速やかに移行させることもできる(図4)。

### 5. おわりに

国際化に伴い、全ての食品の輸出物にはトレーサビリティ・システムのもとで多種のICタグが使用されるであろう。現在ではICチップ本体とアンテナで大体100円前後の価格である。しかし、この5年後には20円程度に商品化するのが努力目標となっているので、装着技術を含めた技術の簡易化と一般化が期待される。水産

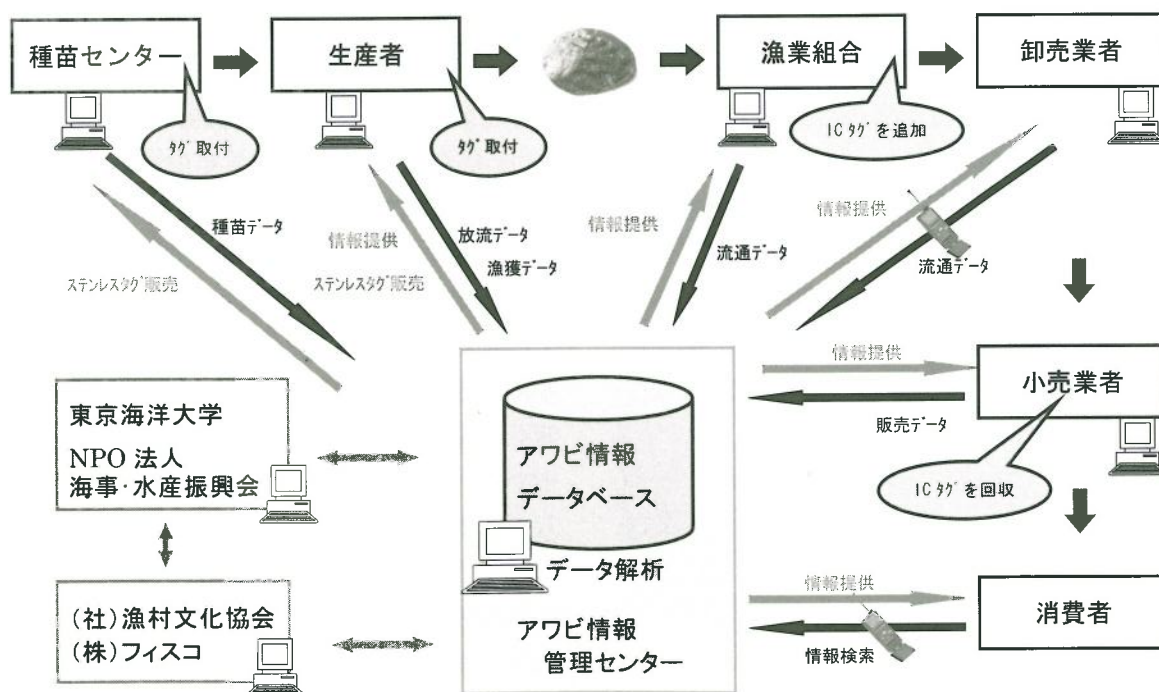


図4 アワビのトレーサビリティシステム

物としては単価の高いアワビであるだけに、資源管理から流通にいたる多くの課題が残されている。とりあえず今回の結果から、貝殻の形成機構を利用して、標識を貝殻に取り込ませることが可能であることが判明した。巻貝以外でも硬質の結晶構造を外部で巻き込んでいく生物には自らの組織活動を利用した内部標識や結晶物の形成を行わせることができる。当初の目的は、密漁に対するトレーサビリティの確立を求めたものである。とりあえずアワビの履歴を明確にして、科学的なデータを漁業者が得て、資源をより有効に管理するさきがけとなることを期待している。

ステンレス標識に関しては、東京水産大学名誉教授宇野寛博士の示唆によることが大きく、小池康之博士の積年の努力によるところがある。また、東京海洋大学社会連携推進共同研究センターの中村宏博士、河口真紀氏とのトレーサビリティに関する検討の成果を反映している。大学発の技術が、(社)漁村文化協会および

(株)フイスコに移転され、NPO法人「海事・水産振興会」に「アワビ情報管理センター」を設立し、三者で資源管理から流通にいたるデータの管理・分析の組織を作ることになった。また、今回の小型ICチップの技術開発には凸版印刷(株)ICビジネス本部RFIDソリューション部の方々の開発意欲が大きな契機となっている。このICチップが職人芸的に小型化され、技術開発を通じてアワビのICチップの流通に係る課題に新たな展望を開くことができた。ここに中畑寛、浮千秋、小林燃の各氏のお名前を記し、ご支援に深く感謝する次第である。

## 文 献

- 1) Crofts D. R. (1929), *Haliotis L.M.B.C. Memoirs*, 29, 36-37.
- 2) 宇野寛 (1957), *水産増殖*, 3(4), 92-95.
- 3) 山川紘 (2003), *漁村*, 12(23), 12-34.

## ◀国内情報▶

## ジャガイモ生産をサポートする マクロアレイ病害虫診断技術

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 北海道農業研究センター  
眞 岡 哲 夫

2.5cm×6.5cmのナイロンメンブレンに12種のウイルス遺伝子を植えつけたマクロアレイを使って、これまで不可能だったわが国の全ジャガイモウイルスの一括同時検出法を開発した。この技術を応用して、線虫、細菌病を含む、全ジャガイモ病害虫の網羅的検出に取り組んでいる。

### 1. はじめに

わが国のジャガイモ生産量はおよそ300万tで、水稻に次ぐ基幹作物として農業経営上重要な地位を占め、平成22年度における生産努力目標は350万tとされている。ジャガイモは種子でなく種いもを畑に植えて子いもを収穫するので、いったん種いもにウイルスが感染すると、いもを介してウイルスが蔓延し、大きな被害をもたらす。このためわが国では、植物防疫法に基づく無病種いもの増殖・供給体制がしかれている。日本で発生が確認されているジャガイモウイルスは12種あるが（表1）、このうち効率的な検出法が確立されているのは4種にすぎないため<sup>3)</sup>、検疫、育種、種いも生産に支障が生じている。特に、検疫や種いもの原原種生産においては、ウイルスが「存在しない」ことを高い精度で確認できる技術が必要となる。そこで、検出特異性に優れるマクロアレイ法を用いて、全ジャガイモウイルスを高感度かつ迅速に検出できる遺伝子診断法を開発した。現在進めている、ウイルス以外のジャガイモ重要病害虫を一括して検出する試みとともに紹介したい。

### 2. マクロアレイ法の原理と普及性

マクロアレイ法は、良悪性を識別することが困難なヒトの肉腫の病理診断等に使用されている技術である<sup>2)</sup>。ナイロンメンブレン上に検出したい遺伝子の一部（キャプチャープローブ）を植え付け、試料中から増幅して標識したcDNAとメンブレン上のキャプチャープローブの結合により、目的遺伝子の検出を行う（図1）。マクロアレイ法に用いるメンブレン（以下アレイメンブレン）の作製には特殊設備が必要とされるが、委託製作が可能である。また本法は、バイオサイエンス系の研究では一般的な技術であるRT-PCRとハイブリダイゼーションを組み合わせたものであり（図2）、試薬類も市販のキットが各社から販売されているので、入手も容易である。さらに、判定を肉眼で行うことができ、高価な解析機器を必要としない。本法は、高い精度を要求される医学分野で使用されているながら、ランニングコストが比較的安価なため、農業分野での応用や普及が充分可能である。

### 3. ジャガイモウイルスを検出するマクロアレイの作製とウイルスの検出

アレイメンブレンを作製するためには、検出の対象となるウイルス遺伝子を確保する必要がある。ところが、わが国のジャガイモに発生し

MAOKA Tetsuo

〒062-8555 札幌市豊平区羊ヶ丘1



表1 わが国に発生する12種のジャガイモウイルスとマクロアレイの作製に用いた分離株

略称	ウイルス名	分離株名	記載文献
AMV	アルファルファモザイクウイルス	北大保存株 14	
CMV	キュウリモザイクウイルス	北農研保存株IC	佐藤 (2001)
PAMV	ジャガイモ黄斑モザイクウイルス	北大保存株	
PLRV	ジャガイモ葉巻ウイルス	種苗管理センター保存株	
PMTV	ジャガイモモップトップウイルス	ID0126	井本ら (1986)
PVA	ジャガイモAウイルス	MAFF307028	
PVM	ジャガイモMウイルス	MAFF307027	堀尾ら (1969)
PVS	ジャガイモSウイルス	北農研保存株M	
PVX	ジャガイモXウイルス	北農研保存株0-IC249	
PVY	ジャガイモYウイルス	北農研保存株0	
ToRSV	トマト輪点ウイルス	MQ	佐藤 (2001)
TSWV	トマト黄化えそウイルス	Pt1	松尾 (2003)

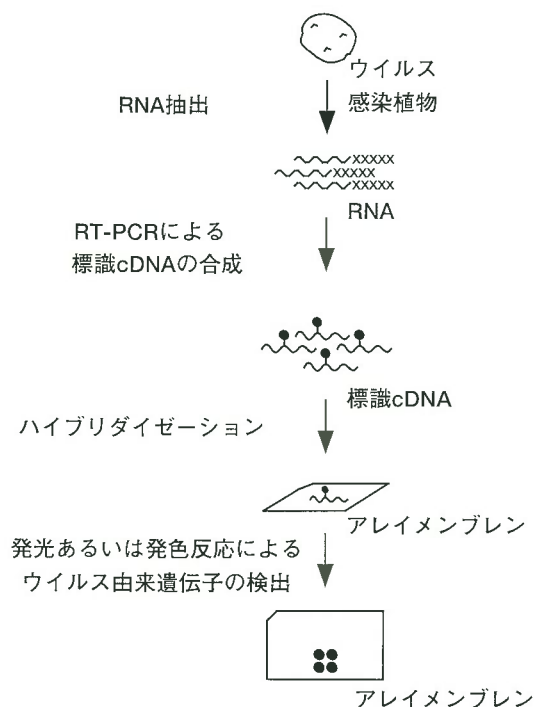


図2 マクロアレイによるジャガイモウイルス検出の手順

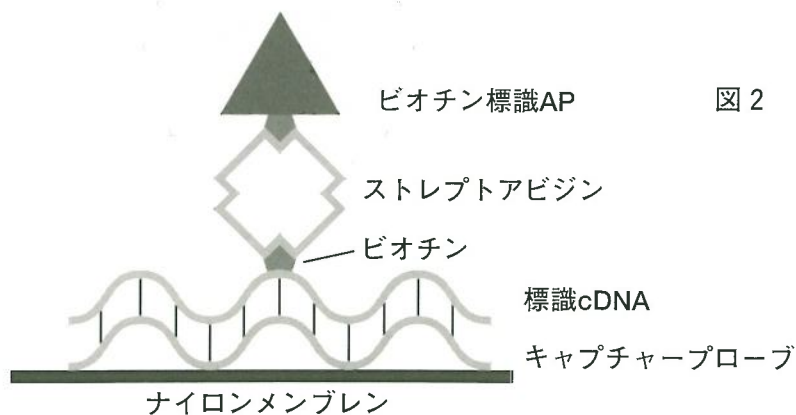


図1 マクロアレイの原理

たことのあるウイルスをすべて保有している研究機関・組織はなかった。そこで、(独)農業生物資源研究所ジーンバンクや北海道大学、(独)種苗管理センターなど関係各機関の協力を仰ぎ、これら12種のジャガイモウイルス株の収集をまず行った(表1)。

これらのウイルスはすべて遺伝子としてRNAを持つことがわかっている。そこで、収集したウイルスを植物に接種するなどして増殖し、感染植物からRNAを抽出して、あらかじめ選定しておいたウイルスの特定に使用できる領域を大腸菌に形質転換してクローニングした。プラスミドに組み込まれたウイルス由来遺伝子を鋳型に、PCRで300~800bp程度のcDNA(キャプチャープローブ)を増幅して、2.5cm×6.5cmのナイロンメンブレンに1ウイルスあたり4個所スポットしたアレイメンブレンを作製した(表2, 図3)。

ウイルス感染植物50mgからRNAを抽出し、各ウイルス遺伝子の特異的に増幅するプライマーセットを用いてRT-PCRを行うと同時に、増幅cDNAをビオチンで標識した。次に標識cDNAを含む溶液をアレイメンブレンに添加してハイブリダイゼーションを行い、化学発光または発色により反応の判定を行った。これらの実験には市販のRNA抽出、RT-PCR、ビオチン標識、発光発色検出キットを組み合わせて使用した(図2)。

解析を行った結果、アレイメンブレン上の発光反応あるいは発色反応として各ウイルスを検出できた(図4)。標識遺伝子は他のウイルスのスポットに全く反応せず、各ウイルスを特異的に検出できることが明らかになった。

マクロアレイの検出感度を他の検出法と比較した。ToRSV(トマト輪点ウイルス)感染ジャガイモから、病徴の強い順に、「えそ病斑」、

表2 ウイルスのクローニング部位と増幅cDNA断片の分子量

ウイルス名	感染植物	クローニング部位	cDNA (bp)
AMV	<i>Nicotiana benthamiana</i>	RNA3の外被タンパク質	820
CMV	タバコ ( <i>Xanthi nc</i> )	RNA2の2aタンパク質	570
PAMV	<i>Nicotiana occidentalis</i>	外被タンパク質	460
PLRV	ジャガイモ (トヨシロ)	外被タンパク質	470
PMTV	不明 (原株アンプル)	RNA2のリードスルータンパク	470
PVA	<i>Nicotiana benthamiana</i>	外被タンパク質~3' UTR	800
PVM	<i>Nicotiana occidentalis</i>	外被タンパク質	600
PVS	ジャガイモ (男爵薯)	外被タンパク質~ORF6	426
PVX	ジャガイモ (男爵薯)	外被タンパク質	337
PVY	タバコ ( <i>Xanthi nc</i> )	外被タンパク質	470
ToRSV	センニチコウ (原株アンプル)	外被タンパク質~3' UTR	540
TSWV	<i>Nicotiana rustica</i>	S RNA segmentのNタンパク質	400

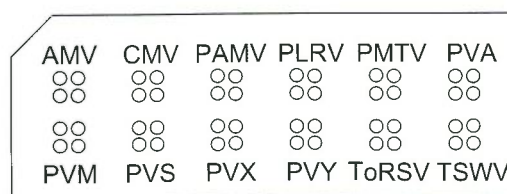


図3 マクロアレイのキャプチャープローブ配置 (実寸大)

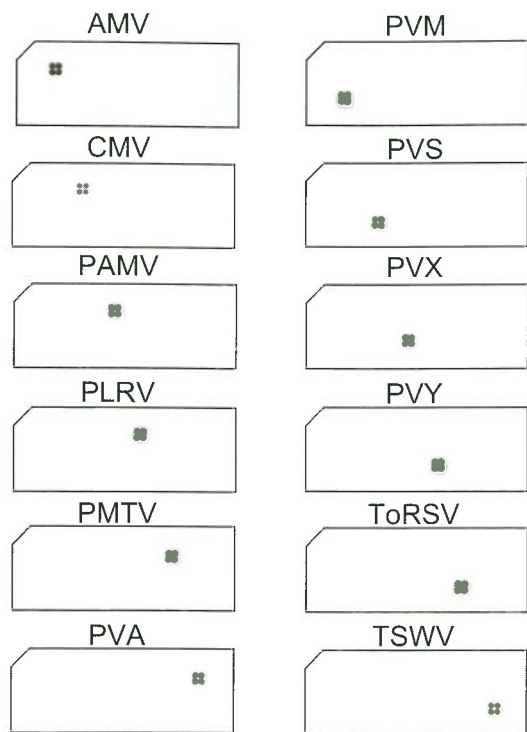


図4 マクロアレイによる各ジャガイモウイルスの検出例

「えそ斑点」, 「無病徴」部分を選び, ELISA法, RT-PCR法, マクロアレイ法でウイルスの検出を試みた。その結果, 病徴観察でもToRSVの感染がはっきりとわかる「えそ病斑」では全ての方法でウイルスが検出されたが, 「えそ斑点」ではELISA法ではウイルスを検出できず, RT-PCR法では判定が不明瞭だった。さらに, 観察上健全に見える「無病徴」では, ELISA法, RT-PCR法ともまったく反応が見られなかった。しかしながらマクロアレイ法では, これら全てから明瞭にToRSVの特異的シグナルが検出でき, 他の方法に比べ本法が高い検出感度を有していることが証明できた(図5)。

以上述べたように, マクロアレイ法は, 小型のメンブレン1枚で, わが国に発生する全てのジャガイモウイルスを高感度かつ簡易に検出することができる。さらに, 検定に要する時間も, RNA抽出から反応の判定まで最短28時間程度であることから, 例えば植物を栽培して病徴観

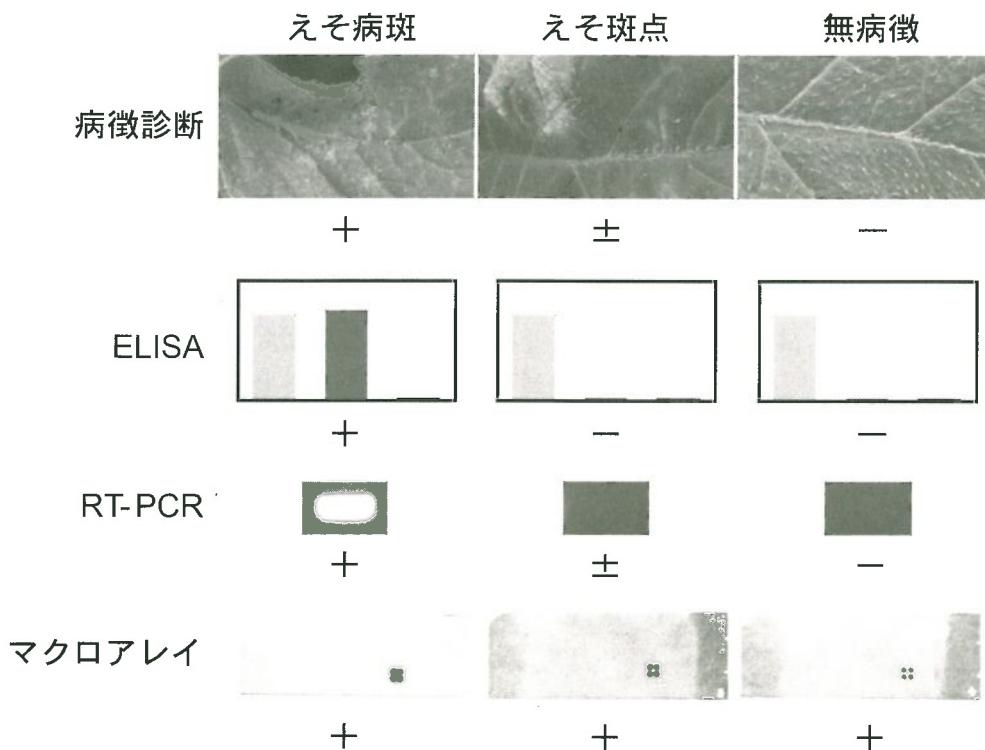


図5 トマト輪点ウイルス (ToRSV) 感染葉からのウイルスの検出例

各診断法の下部に診断結果(+, 陽性; ±, 擬陽性; -, 陰性)を記した。ELISAの棒グラフは, 左からToRSV感染植物, 供試サンプル(上記病徴部分), 健全植物。えそ斑点および無病徴ではマクロアレイ法でのみウイルスが検出されている。

察によりウイルス感染の有無を確認するバイオアッセイ等の従来法と比較して、はるかに迅速に診断を行うことができる。現在全国から採集したジャガイモ試料を用いて、マクロアレイ法の実用性を検証している。その過程でAMVやToRSVなどこれまで見過ごされてきたと思われるジャガイモウイルスの検出に成功しており、本技術の有益性も確認された<sup>1)</sup>。

#### 4. マクロアレイを利用したジャガイモ病害虫の網羅的検出—まとめにかえて—

ジャガイモの生産を脅かす問題は、ウイルス病だけではない。例えば、2003年に北海道十勝地方で発生したジャガイモシストセンチュウは、その発生圃場では法律上種いも栽培ができなくなる特定重要病害虫である。この他にも、細菌によって起こる輪腐病や、ウイロイドの *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) など、常に発生や侵入を警戒すべき重要病害虫が多い。著者らは、平成17年度先端技術を活用した農林水産研究高度化事業に参画し、診断法未確定の病害虫に対する個別検出技術の開発、生産現場で利用可能な簡易検出システムの開発、マ

クロアレイを用いた高精度診断技術の開発等の研究課題を実施している。北海道は種いも生産の94%を担っていることから、この研究は特に道内所在の北海道大学、北海道立農業試験場、道内企業が協力し、北海道の産学官組織を挙げた体制で取り組んでいる。ジャガイモの全病害虫を対象とした高精度診断技術と、特定の重要病害虫を対象に大量検体への対応を可能とした簡易検出技術の開発を並行して進め、3年後にはこれらを統合した線虫、ウイルス病、細菌病総合診断システムを確立することを目標としている。

この成果が、ジャガイモ生産をサポートできる技術として北海道をはじめ全国の生産現場に普及し、次世代の農林水産業を支える革新技術となることを願っている。

#### 文 献

- 1) 眞岡哲夫ら (2005), 日本植物病理学会報, 71, 236
- 2) 元井亨 (2004), 臨床検査, 48 (9), 1059-1065
- 3) 佐藤仁敏ら (2000), 北日本病虫研報, 51, 87-92

◀地域の先端研究▶

## バイオフィトンによる病害抵抗性誘導物質の探索と その過程で得られた抗菌物質

<sup>1</sup>静岡県農業試験場 病害抵抗性誘導プロジェクト

<sup>2</sup>クミアイ化学工業 生物科学研究所

加藤 公彦<sup>1</sup>・山口 亮<sup>1</sup>・影山 智津子<sup>1</sup>・稲垣 栄洋<sup>1</sup>・  
伊代住 浩幸<sup>1</sup>・渡辺 哲<sup>2</sup>・尾崎 剛一<sup>2</sup>

病害抵抗性誘導剤の作用によりバイオフィトンがプライミングを受ける現象を利用して、病害抵抗性誘導物質のスクリーニングシステムを構築した。このシステムを利用して新規の誘導物質を探索する過程で、ササクレシロオニタケよりキュウリ炭そ病に特異的な活性を持つ物質、2-アミノ-3-シクロプロピルブタン酸を発見した。この物質は細菌に対しても抗菌活性を持ち、それはアミノ酸代謝拮抗作用によることが判明した。

### 1. バイオフィトンとは

微生物も含めて総ての生物はバイオフィトン (Biophoton) と呼ばれる極微弱な光を恒常的に放射している<sup>1)</sup>。バイオフィトンの発光強度は数~数十光子数/cm<sup>2</sup>・secondしかなく、蛍の発光の1千万分の1以下で非常に弱い。バイオフィトンは、幅広い波長域 (紫外域~近赤外域) で観察され、生体の活動レベルの変化や外部からの刺激によって量や波長組成 (スペクトル) が変化することが知られている。現在までの研究により、バイオフィトンの生成には、酸素を必要とすること、多くの場合に生体内での活性酸素種の生成が関与すること及び酸化反応を行う酵素の関与が明らかになっている。つまり、バイオフィトンは、蛍の生物発光のメカニズムである luciferin-luciferase システムのような発光効率が高く発光が目的の生化学反応ではなく、生命活動に必須の酸化的代謝反応に基づき発生すると考えられている<sup>1)</sup>。発光のソースとしては、活性酸素種により蛍光性物質 (不飽和

脂肪酸, 核酸, アミノ酸, ポリフェノール他) が過酸化を受けて励起する場合や励起カルボニルなどからの蛍光性物質へのエネルギー移行の他, 一重項酸素そのものの発光, DNA分子の巻き戻しなども推定されている<sup>2), 3)</sup>。しかしながら, 一重項酸素そのものの発光を除き, これらは *in vitro* の実験からの推定で, 生体内でのバイオフィトンの詳細な発光メカニズムは明らかにされていない。もし, バイオフィトンの発光反応が特定でき, その反応の発光スペクトルを明らかにできれば, バイオフィトンのスペクトル情報がある特定の生化学反応の指標として使えるが, この解析は難しく, これに成功した例は僅かである。

バイオフィトンは, ホトンカウンター (光電子増倍管を備えた最も高感度な光検出装置) があれば測定可能で, 非破壊でリアルタイムに測定できるため, 生物の代謝変動を捉える新しい生体情報としての利用研究が盛んである。バイオフィトンは生体の酸化的ストレス状態の指標として用いられるほか, 人間では脳活動のモニタリング, 腎不全の診断等への適用も試みられている。また, 植物では, 生理的変化を伴う各種の外的ストレス, 例えば, 嫌氣的処理, 塩ストレス, 温度ストレス, 乾燥ストレスなどに応答したバイオフィトンの増加が観察され, ストレス状態をモニターする指標としての利用が検

KATO Kimihiko<sup>1</sup>, YAMAGUCHI Akira<sup>1</sup>,  
KAGEYAMA Chizuko<sup>1</sup>, INAGAKI Hidehiro<sup>1</sup>,  
IYOZUMI Hiroyuki<sup>1</sup>, WATANABE Satoshi<sup>2</sup>,  
OZAKI Koichi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>〒438-0803 静岡県磐田市富丘678-1

<sup>2</sup>〒439-0031 静岡県菊川町加茂3360

討されている<sup>4)</sup>。

## 2. 病虫害抵抗反応とバイオフィトン

筆者らは、大きな生理変化を伴う場面として植物の病虫害抵抗反応に着目し、バイオフィトンと植物の病虫害抵抗反応について研究を続けている。その過程で、サツマイモと非病原性フザリウム菌との相互作用による強いバイオフィトン発生の発見を皮切りに、病害抵抗性品種と罹病性品種での病虫害抵抗反応に伴うバイオフィトンの差異、さらにマツノザイセンチュウ感染やオオタバコガ幼虫の食害に伴うバイオフィトンについて明らかにした。また、病虫害抵抗反応に伴うバイオフィトンのスペクトルは、通常の状態の時に発生しているものとは異なり、低波長領域のバイオフィトンの割合が増加することも明らかにしている。このように、バイオフィトンは病虫害の攻撃に反応して発生量が増加し、スペクトルが変化することを解明したが、この病虫害に反応して発生するバイオフィトンがプライミング (priming) を受けることを最近になり見いだした<sup>5)</sup>。病虫害抵抗反応におけるプライミングとは、植物が病虫害に対抗する戦略で、植物が病虫害の攻撃を受ける前に、病虫害に攻撃される危険性を察知すると、いざ病

害虫の攻撃を受けたときに、抵抗反応が強く、早く起きる現象のことである<sup>6)</sup>。病原菌の攻撃に対して、植物をこの状態にする物質は病害抵抗性誘導剤と呼ばれ、新しいタイプの病害防除農薬である。つまり、病害抵抗性誘導剤を処理した植物では、病原菌に反応して発生するバイオフィトンの発生量が多くなる(プライミング)現象が観察される。イネ培養細胞を用いてバイオフィトンがプライミングを受ける例を図1に示した。アシベンゾラル-S-メチル (ASM) はイネに強い病害抵抗性を誘導できる病害抵抗性誘導剤であるが、この物質をあらかじめイネ培養細胞に作用させた後にエリシターを処理すると、病害抵抗性誘導剤の無処理に比較しバイオフィトン発生量が数倍に高まる。同様なエリシター反応発光の増強現象が、イネに抵抗性を誘導することが知られているASM以外の病害抵抗性誘導剤でも観察され、病害抵抗性誘導時に普遍的な現象ではないかと筆者らは考えている。

## 3. バイオフィトンによる病害抵抗性誘導剤のスクリーニング方法

筆者らは、バイオフィトンが病害抵抗性誘導剤の作用によりプライミングを受ける現象を利用して、イネで病害抵抗性誘導剤の新しいスクリーニング方法の開発に成功している<sup>7)</sup>。その方法は、①イネ培養細胞をMS改変液体培地で培養、②培養細胞と培養液を測定用シャーレに分注、③被検物質を培養細胞に処理、④2時間、インキュベーションし、培養細胞に病害抵抗性を誘導、⑤キチンエリシターを培養細胞に処理し、バイオフィトンを測定、⑥バイオフィトンの増強程度等を指標に候補物質を選抜の6段階で行う。スクリーニングに必要な消耗品は培養細胞、シャーレ及びエリシターのみで、ランニングコストは非常に安く、かつ、培養細胞さえ準備

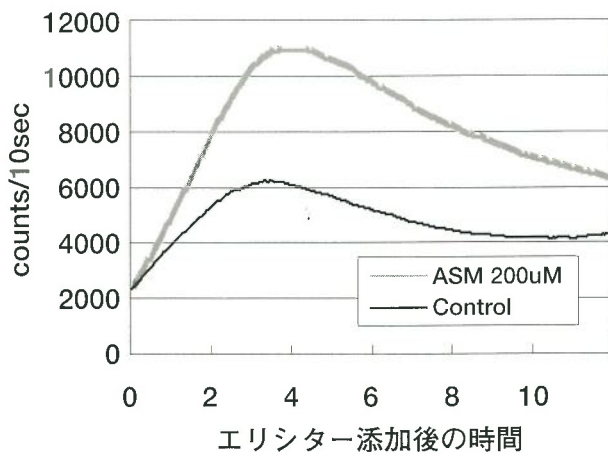


図1 病害抵抗性誘導剤の作用によるバイオフィトン発生量の増加  
エリシター添加の2時間前に病害抵抗性誘導剤ASMを処理した。

できていれば、検定に要する時間は実験準備や解析時間を含めても7時間で終了し、かなり迅速な方法と言える。

#### 4. 病害抵抗性誘導物質の探索とササクレシロオニタケから分離した抗菌物質

筆者らは、バイオフィトンによる病害抵抗性誘導剤のスクリーニング方法を用いて、化学合成物質の中から新たな病害抵抗性誘導物質の探索を行っている。一方、当然ながら自然界には、より多岐にわたった構造を持つ物質が存在する。きのこは、自然界では様々な酵素などで有機物を分解し、無機物に変換するという分解者の役割を担う。この点は、生産者である植物や消費者である動物とは全く異なる特徴であり、各種有用物質の資源として注目されてきた。きのこの中では、担子菌類に属するものが最も進化したグループであるとされ、難分解物質であるリグニンやダイオキシン類などを分解できることが知られている。しかし、採取や培養の困難さなどから含有成分まで研究されているきのこはごくわずかであり、きのこ中に含まれる植物の病害抵抗性誘導活性を研究した例は報告されていない。また、静岡県内には海岸地帯や富士山、南アルプスといった山岳地帯があり、変化に富んだ自然が存在する。これは、多種多様な森林が存在することを意味し、それらと密接な関係を持つきのこも極めて多種に富んでいる。そこで、筆者らは担子菌類を中心としたきのこに着目し、病害抵抗性誘導剤の新たな基本骨格を探索する研究も行っている。

実験は多くのきのこを収集することから始めた。野生きのこは、富士山や南アルプス、県立森林公園などを中心に約1,000サンプルを収集した。続いて、収集したサンプルを磨碎し、キュウリの子葉に塗布した。数日間の病害抵抗性誘導期間を置いた後、炭そ病菌胞子懸濁液をキュウリ子葉及び本葉に噴霧接種した。接種の数日後に病徴を観察し、発病を抑制しているもの

を選抜した。現在、病害抵抗性誘導活性が強いきのこが数種得られている。

一方、この試験では、病害抵抗性誘導以外で防除活性を示すものについても同時に検定を行っている。この病害抵抗性誘導活性の検定に付随した防除活性の調査で、非常に強い活性を持つきのこ1種を発見した。そのきのこがササクレシロオニタケ *Amanita cokeri* (図2) である。ササクレシロオニタケは、夏から秋にかけてアカマツ・コナラ林やモミ・シイ林に発生する中型のきのこである。食毒は不明であるが、近縁に毒きのこが多いため食べない方が望ましい。筆者らは活性物質の本体を突き止めるべく、多くの子実体を収集し、水抽出後、分画し、精製した。得られた精製品はFAB-MSとNMRにより構造を決定した。その結果、活性物質は2-アミノ-3-シクロプロピルブタン酸 (図3) で<sup>8)</sup>、発芽レタス根の生育抑制活性物質として近縁のコシロオニタケから分離された物質と同一であった<sup>9)</sup>。試験した約1,000のきのこサンプルの中で最も抗菌活性が強かったため、天然物由来の有用な農薬になり得ると考え、本物質の各種植物病害に対する防除効果を調査した。イネいもち病、キュウリべと病、キュウリ灰色カビ病、コムギうどんこ病やコムギふ枯病に対する防除効果はなく、キュウリ炭そ病に特異的な活性を



図2 ササクレシロオニタケ  
*Amanita cokeri*の子実体

持つ物質であることが分かった。また、各種細菌類では *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* や *Pseudomonas putida* などに対して合成培地上で抗菌性が見られた。栄養寒天培地上では抗菌性は見られず、また、各種アミノ酸の添加により阻止円の回復が見られたことから、本物質はアミノ酸代謝拮抗作用を持っていることが明らかとなった<sup>8)</sup>。

## 5. おわりに

バイオフィトンによる病害抵抗性誘導剤のスクリーニング方法について解決すべき課題は、バイオフィトンがプライミングを受けるメカニズムの解析で、今後、この研究に着手する予定である。また、天然物質から同定できた活性成分は、現在のところ、ササクレシロオニタケからの抗菌物質2-アミノ-3-シクロプロピルブタン酸のみである。しかし、当初の目的である病害抵抗性誘導活性についても、数種の有望なきのこが見つかり、物質同定の作業を進めている。近いうちに、これらのきのこが持つ病害抵抗性誘導物質を明らかにできると考えている。

## 文 献

- 1) 渡辺治夫ら (1991), *O plus E*, 142, 112-123
- 2) 渡辺治夫ら (1991), *O plus E*, 143, 139-153

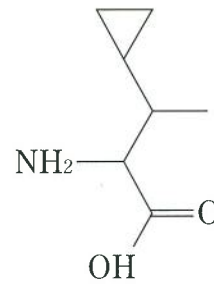


図3 ササクレシロオニタケから分離した抗菌物質2-アミノ-3-シクロプロピルブタン酸の構造式と分子式

- 3) Popp, F.A. et al. (1988), *Experientia*, 44, 543-630
- 4) Radotic, K. et al. (1998), *Gen. Physiol. Biophys.*, 17, 289-308
- 5) Iyozumi, H. et al. (2005), *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 66, 68-74
- 6) Conrath, U. et al. (2002), *Trends Plant Sci.*, 7, 210-216
- 7) 加藤公彦ら (2005), 日本植物病理学会・バイオコントロール研究会レポート, 9, 55-65
- 8) 尾崎剛一ら (2005), 日植病報, 71, 243
- 9) Hongo, Y. et al., (2002), *Chem. Commun.*, 42-43



## ◀文献情報▶

**15°Cでの羊精子の固形化保存が生存性及び精子進入率に及ぼす影響**

Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15°C on their survival and penetrating capacity

J. Yániz<sup>a</sup>, J.I. Martí<sup>b</sup>, M.A. Silvestre<sup>a</sup>, J. Folch<sup>b</sup>, P. Santolaria<sup>a</sup>, J.L. Alabart<sup>b</sup> and F. López-Gatiús<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Departament of Animal Production, University of Zaragoza, Huesca, Spain

<sup>b</sup>Center for Agricultural Research, Department of Animal Production, P.O. Box 727, Zaragoza, Spain

<sup>c</sup>Department of Animal Production, University of Lleida, Lleida, Spain

*Theriogenology*, 64 (2005) : 1844-1851

凍結保存・融解ヒツジ精子の頸管経由法による人工授精時の受胎率は低く、ヒツジにおける凍結保存精子を用いた人工授精は、広く普及するには至っていない。腹腔鏡を用いた凍結保存・融解精子の子宮内注入法により受胎率は高まるものの、手間とコストがかかる。また、地中海沿岸地域では、ミルクで希釈し15°Cで保存したヒツジ精子が人工授精に多く用いられているものの、8から10時間の保存により受胎性が低下するという問題がある。著者らは、ウサギ精子をゼラチン添加希釈液を用いて保存することにより、72時間受精能を保持することをこれまでに報告している。そこで、今回の論文では、ヒツジ精子をゼラチン添加希釈液を用いて15°Cで固形化保存した場合の精子の運動性や受精能への影響について検討が行われた。対照区では標準的なミルク希釈液を、固形化区では1.5gゼラチンを100mlのミルク希釈液に添加したものの用い、最終濃度 $400 \times 10^6$ 精子/mlに調整した。実験1においては、15°Cで保存した精液を保存開始から2, 24, 48時間後に取り出して精子の性状を調査した。保存2時間後の運動性においては両区に差は認められなかったが、それ以外

のサンプルにおいては、液状保存精子の運動性や生存性は、固形化保存精子に比べて有意に低かった。また、保存後に37°Cで2時間培養したときの運動精子率や膜の正常性は、保存期間の全てにおいて液状保存区が固形化保存区に比べて低かった。実験2においては、体外成熟ヒツジ卵子を3区に分け、液状保存2時間区、液状保存24時間区、固形化保存24時間区の保存精子を用いて体外受精を行った。その結果、固形化保存区の精子の精子進入率は、液状保存精子の精子進入率に比べて高かった。以上の結果から、ヒツジ精子をゼラチン添加希釈液で希釈し低温保存することにより、保存後の精子の生存性や体外受精における精子進入率が改善することが明らかとなった。固形化保存法は、ヒツジ新鮮精子の保存期間を延長する有効な手段となる可能性がある。

ヒツジ精子の凍結保存法についても多くの研究が行われているが、ウシ精子のように効果的な凍結保存法は開発されていない。そのため、精液の効率的な利用のためには、低温保存可能な時間を延長することが重要である。ゼラチンを用いて精液を固形化して低温保存することで保存可能期間が延長するのであれば、ヒツジの人工授精普及のためにも有効な技術となる可能性がある。しかしながら、ゼラチン添加ミルク希釈液で低温保存したヒツジ精子を人工授精した場合に、受胎率の向上が認められるかの検討が今後必要である。また、凍結保存が難しいブタ精子などへの応用も検討する価値があるであろう。

(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▶

生後4ヶ月までの乳児における  
オリゴ糖と乳酸菌の効果

Effects of infant formula containing a mixture of galactic- and fructo-oligosaccharides or viable *Bifidobacterium animalis* on the intestinal microflora during the first 4 months of life.

Bakker-Zierikzee AM, Alles MS, Knol J, Kok FJ, Tolboom JJ, Bindels JG.

*Br J Nutr.* 2005 Nov ; 94 (5) : 783-90.

プロバイオティクスやプレバイオティクスは、育児用加工乳で育てた乳児の腸内細菌叢に劇的な変化を与える。いくつかの会社では、すでにこの効果を利用した育児用加工乳を市場に送り出している。しかし、プロバイオティクスとプレバイオティクスそれぞれの効果を比較したデータは得られておらず、筆者らは、*Bifidobacterium animalis* strain Bb-12 (Bb-12) と、ガラクトオリゴ糖 (GOS) とフルクトオリゴ糖 (FOS) の混合物それぞれが乳児にどのような影響を与えるか、検討を行っている。

出生前に、57人の乳児を19人ずつランダムに3群に振り分け、Bb-12生菌を $6.0 \times 10^{10}$ 個混合した育児用加工乳を与えるプロバイオティクス群、GOS:FOS (9:1) を6g/L混合した育児用加工乳を与えるプレバイオティクス群、何も加えない育児用加工乳を与える群をコントロール群とした。また、母乳で育てた63人の乳児を対照群とし、出生後5日、10日、4、8、12、16週において、それぞれの糞便サンプルを採取し、腸内細菌数に対する*Bifidobacterium*の割合、pH、乳酸濃度、短鎖脂肪酸濃度を測定した。

その結果、プロバイオティクス群、スタンダード群、プレバイオティクス群を比較した場合、16週目のサンプルにおいてプレバイオティクス群のみ、短鎖脂肪酸中の酢酸含有率 (69.7%, 69.9%, 82.2%) と、乳酸濃度 (11.3, 3.1, 34.7mmol/kg faeces) とが共に高く、pHは低

く推移する (6.6, 7.1, 5.6) ことが明らかとなった。これらの現象は、出生後10日目以降、プレバイオティクス群においてのみ、有意差が認められた ( $P < 0.05$ )。腸内細菌数に対する*Bifidobacterium*の割合については、16週目のサンプルにおいてプレバイオティクス群 (59.2%)、プロバイオティクス群 (52.7%)、スタンダード群 (51.8%) の順となったが、統計的な有意差は得られなかった。以上のことからBb-12を混合した育児用加工乳は、コントロールの育児用人工乳と比較して、腸内での代謝活性に影響を与えないことが明らかとなった。

さらに、プレバイオティクス群を母乳摂取群と比較すると、短鎖脂肪酸中の酢酸含有率、乳酸濃度、pH値において類似した数値を示すことが明らかとなり、乳児においてGOSとFOSを混合した育児用加工乳を摂取することにより、腸内における代謝活性は母乳摂取時と近似しうることが明らかとなった。短鎖脂肪酸中の酢酸含有率が高く維持され、乳酸濃度も高く、低いpH値を示す環境は、日和見病原体 (*Bacteroides*や*Clostridium*など) にとって好ましい環境ではないことから、これらの利用により、病原菌の数を減らし、乳児の免疫力を高める効果につながることを示唆された。

今回の知見から、今後、乳児の健康を考える上で、腸管内でのたんぱく質分解能や糖分解能を重視していく必要があるのではないかと考えられる。

(抄訳：畑中美咲, HATANAKA Misaki, カルピス株式会社 健康・機能性食品開発研究所)

## ◀文献情報▶

**160kDa蛋白質はエビのヘモシアニン誘導メラニン沈着に必須である**

A 160-kDa Proteins Is Essential for Hemocyanin-derived Melanosis of Prawn.  
K. Adachi, T. Hirata, A. Fujio, T. Nishioka, M. Sakaguchi  
Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan  
*Journal of Food Science*, 68 (2003) 765-9

水産物の中でエビ・カニを中心とする甲殻類は高級食材の1つとして多くの消費者から支持されている。特にエビに関しては近年、養殖事業の拡大化・低価格化が進むとともにその消費量は急速に拡大している。これら甲殻類を流通・販売する際に大きな課題となるのが甲殻類の黒変現象である。エビは海外の大規模養殖場にて生育・加工され搬送・国内消費となる。凍結状態で数ヶ月間保存されることがあるが、解凍後、しばしば黒変することがあり、商品価値を著しく低下させることになる。

これらの現実的な対処法として甲殻類への酸化防止剤の添加が行われている。長期冷凍流通で品質を維持するのは、非常に困難であり、アスコルビン酸等の黒変防止剤の使用が行われているのが実情である。

著者らは特にクルマエビに関してその黒変現象解明を進めている。原因物質であるメラニンの生成にはフェノール酸化酵素（ポリフェノールオキシダーゼ）が関与していると長い間考えられていた。

ポリフェノールオキシダーゼ前駆体の一次構造が明らかとなり、酸素運搬蛋白質であるヘモシアニンと近縁の関係にあることが示されており、著者らはこのヘモシアニンがフェノール酸化酵素として機能することを明らかにしている。これは特にエビの黒変に悩まされてきた我々水産業界にとって大きな発見であり、黒変

防止方法に関する開発・研究に新しい観点が加わった。

ヘモシアニンは血リンパ中の全活性がポリフェノールオキシダーゼと比較して非常に強いこと、また、冷凍耐性に関してもポリフェノールオキシダーゼが凍結1週間で失活するのに対して、ヘモシアニンは凍結2ヶ月後も活性を保持している。

更にこの文献ではクルマエビ表皮中の160kDa蛋白質がヘモシアニンと共存することによりフェノールオキシダーゼ活性を発現することを明らかとした。これはヘモシアニン単独では黒色素の生成が行われなかったことから黒変現象の制御因子であると考えられる。この蛋白質は-25℃で3ヶ月保存後も80%の酵素活性を維持している。

これらの事実はクルマエビのみではなく、一旦、黒変機構が解明されれば、多種エビ或いはカニ類等にてどのような機構・相違があるかを明らかにするヒントとなる。著者らが明らかにしつつあるヘモシアニンをキーとする黒変機構により新たな抑制・制御方法を開発する道が開けることに期待している。

(抄訳：杉山公教, SUGIYAMA Kiminori, 日本水産株式会社 中央研究所)

## 生研センターからのご案内

## 2006年度 新規研究課題募集のお知らせ

## —新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業—

## 事業の趣旨

生物系特定産業技術研究支援センター(生研センター)では、農林水産業、飲食料品産業等生物系特定産業の分野において、生物の持つ多様な機能を活用することにより、新技術・新分野を創出し、それを通じて農林水産業の発展、地球規模での人口問題、食料問題、環境問題の解決等に資するため、将来の産業技術のシーズとなる基礎的な試験研究を提案公募により実施しています。

2006年度については、研究者の対象年齢を制限しない「一般型」及び39歳以下の若手研究者を対象とした「若手研究者支援型」の新規研究課題を下記により募集します。

## ■ 研究分野

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

## ■ 研究枠・研究期間・研究費の規模

(研究費には間接経費を含みます)

## ○一般型

研究代表者を含む研究チームの構成員の年齢制限なし  
研究期間: 3～5年間  
研究費: 1課題あたり2千万円～1億円程度/年

## ○若手研究者支援型

研究代表者を含む研究チームの構成員全ての年齢を39歳以下に制限  
研究期間: 3年間  
研究費:

- ・参画機関数1～3の場合;  
1課題あたり2千万円～5千万円程度/年
- ・参画機関数4以上の場合;  
1課題あたり2千万円～1億円程度/年

## ■ 応募資格

- ① 日本国内の基礎研究を実施する能力のある機関に所属する常勤の研究者であること。
- ② 若手研究者支援型に応募の場合は、研究代表者を含む研究チームの構成員全ての年齢が、2006年4月1日において39歳以下であること。
- ③ 留意事項
  - ・生研センターで実施している提案公募事業(本事業及び異分野融合研究支援事業)で、2006年度に実施中の課題において、研究の実施に責任を持つ研究者(研究代表者、参画機関の研究責任者)は応募できません。

・同一の研究代表者/研究分担者が2006年度に本事業に応募いただけるのは、1研究課題に限ります。また、本事業に応募いただく場合には、生研センターで実施している「生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業」には応募できません。

## ■ 採択予定課題数

「一般型」・「若手研究者支援型」合わせて10課題程度

## ■ 応募期間: 2006年3月1日(水)～

2006年3月15日(水)締切(当日17時必着)

## ■ 研究課題の決定

学識経験者で構成する課題選考のための委員会が①一次審査(書類審査)、②二次審査(面接審査)の二段階審査により採択候補課題を選定。

生研センターはその結果を踏まえて採択課題を決定。

## ■ スケジュール

3月1日 受付開始  
3月15日 受付終了(17時必着)  
4月 一次審査(書類審査)  
5月中下旬 二次審査(面接審査)  
6月 採択課題決定  
8月～ 委託試験研究契約締結(研究開始)

♪詳細は応募要領をご覧ください。

♪応募要領・様式は生研センターのホームページよりダウンロードできます。

<http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/marumoto/up/h18boshu/top/>

## 【問合せ先】 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) 新技術開発部 基礎研究課

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3-18-19 虎ノ門マリビル10階  
TEL: 03-3459-6569 FAX: 03-3459-6594  
URL <http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/> (生研センターホームページ)

## 生研センターからのご案内

2006年度  
**新規研究課題募集のお知らせ**  
 —生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業—

## 事業趣旨

生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）では、農林水産業、飲食物品産業等生物系特定産業分野において、将来的に新しい産業の創出や起業化の促進につながる画期的な技術開発を推進しています。

このため、新しい産業の創出につながる技術開発を行う「異分野融合研究開発型」並びに起業化の促進につながる技術開発を行う「起業化促進型」について、新規研究課題を下記により募集します。

## 研究分野・応募資格・研究期間・研究費

## ○ 異分野融合研究開発型

**研究分野**：将来的に新しい産業の創出につながる技術開発

**応募資格**：民間企業に加え、大学、独立行政法人等が参画し、異分野にまたがる複数の研究者が共同して研究を行う研究共同体（コンソーシアム）

**研究期間**：原則として3～5年間

**研究費**：1コンソーシアム当たり年間60百万円程度を上限

## ○ 起業化促進型

**研究分野**：独創的な発想や研究シーズを活かしたベンチャー創出につながる技術開発

**応募資格**：ベンチャー創出を目指す民間企業、大学、独立行政法人等の研究者（個人、複数の別は問わない）

**研究期間**：原則として2年間

**研究費**：1課題当たり年間26百万円程度を上限

## 採択予定課題数

「異分野融合研究開発型」・「起業化促進型」合わせて10課題程度

## 募集期間

2006年3月1日（水）～2006年3月15日（水）17時締切（当日必着）

## 課題の選定方法

学識経験者等で構成される課題選考のための委員会による第1次審査（書類審査）及び第2次審査（面接審査）を行い、採択課題を選定します。

## スケジュール

3月 1日	受付開始
3月15日	受付終了（必着）
4月	一次審査（書類審査）
5月	二次審査（面接審査）
6月	採択課題決定
8月～	委託試験研究契約締結（研究開始）

応募要領・様式は生研センターのホームページからダウンロードできます。

## 【問い合わせ先】

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）新技術開発部 技術開発課  
 〒105-0001 東京都港区虎ノ門3-18-19 虎ノ門マリビル10階  
 TEL：03-3459-6567 FAX：03-3459-6577  
 URL <http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>（生研センターホームページ）

-----  
生研センターからのご案内  
 -----

平成17年度 研究成果発表会の開催について（予告）

生物系特定産業技術研究支援センターでは、現在実施している課題のうち、平成17年度で終了する「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」の12課題と「異分野融合研究支援事業」の13課題及び、平成16年度に終了しました「出資事業」の3課題の成果発表会を開催いたします。

入場無料で、どなたでもご参加いただけますので、多数の皆様のご来場をお待ちしております。

開催日：平成18年3月8日（水）～10（金）

場 所：東京国際フォーラム（ホールD7）

[東京都千代田区丸の内3-5-1]

入場無料

なお、プログラムや発表課題等の詳細については、平成18年2月中に生研センターのホームページに掲載するほか、パンフレットやポスターでご案内いたします。

問合せ先：基礎研究課 e-mail [kisoken@ml.affrc.go.jp](mailto:kisoken@ml.affrc.go.jp)  
 TEL:03-3459-6569 FAX:03-3459-6594

技術開発課 e-mail [kaihatsu@ml.affrc.go.jp](mailto:kaihatsu@ml.affrc.go.jp)  
 TEL:03-3459-6567 FAX:03-3459-6577

出 資 課 e-mail [brainsyu@ml.affrc.go.jp](mailto:brainsyu@ml.affrc.go.jp)  
 TEL:03-3459-6565 FAX:03-3459-6566

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

## 編集後記

第113号をお届けします。本号の総説では、林清氏（農水省 農林水産技術会議事務局）らに新規オリゴ糖の開発に向けた酵素の遺伝子レベルでの改変についてご紹介戴きました。また、総説関連情報として、北岡本光氏（(独) 食品総合研究所）らに新規な遺伝子ランダム変異導入技術について、窪田英俊氏（明治製菓（株））らにオリゴ糖とその機能性開発についてご執筆戴きました。

その他の研究情報として、塩月孝博氏（(独) 農業生物資源研究所）らにカイコを2回の脱皮で蛹へ誘導する技術について、松本隆氏（(独) 農業生物資源研究所）にイネゲノム塩基配列から解析された3万7千個の遺伝子について、若山純一氏（(独) 食品総合研究所）らに原子間力顕微鏡による抗体抗原反応測定のための新手法、眞岡哲夫氏（北海道農業研究センター）にジャガイモ生産をサポートするマクロアレイ病害虫診断技術、加藤公彦氏（静岡県農業試験場）らにバイオフィトンによる病害抵抗性誘導物質の探索など、それぞれ貴重な研究の一端をご紹介戴きました。

また、本号の文献情報は、下司雅也氏（畜産草地研究所）、畑中美咲氏（カルピス（株））、杉山公教氏（日本水産（株））にご執筆戴きました。

ご多忙な中玉稿をお寄せ頂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113号

平成18年1月15日発行

発行人 朝比奈 清

編集人 吉泉 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