

# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成18年7月15日発行（隔月1回15日発行）

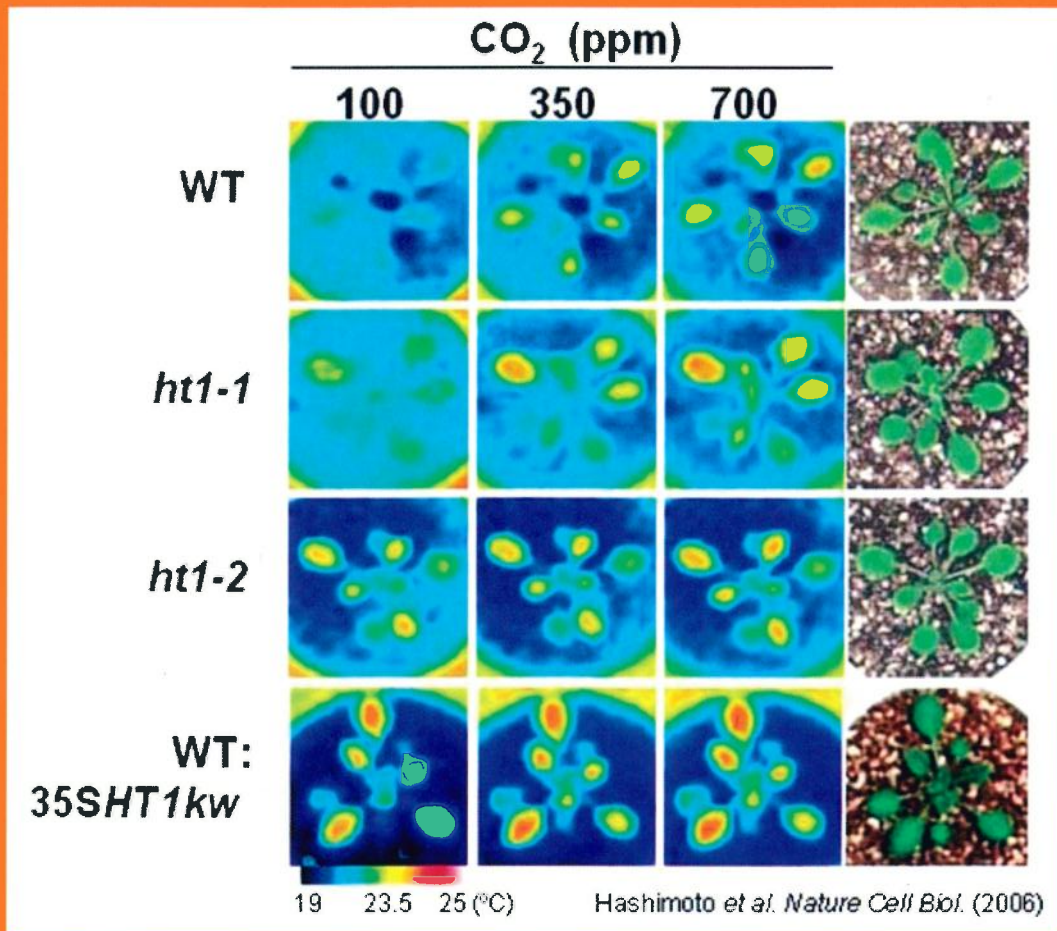
ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.116

15 JULY, 2006

ブレインテクノニュース



CO<sub>2</sub>応答性突然変異体のサーモグラフィー画像

## 植物のCO<sub>2</sub>感知機構解明に向けて

九州大学 大学院理学研究院 生物科学部門

橋本 美海・射場 厚



独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

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

- 真核生物としてはじめて100%ゲノム解読されたシゾンの植物科学への展開 ..... 1  
 黒岩 常祥<sup>1, 2</sup>・三角 修己<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>立教大学 理学部生命理学科, <sup>2</sup>立教大学 極限生命情報  
 研究センター)

## 総説関連情報

- 植物の研究を支える100%解読されたシゾンのゲノム情報 ..... 6  
 三角 修己<sup>1</sup>・黒岩 常祥<sup>1, 2</sup> ( <sup>1</sup>立教大学 理学部生命理学科, <sup>2</sup>立教大学 極限生命情報  
 研究センター)
- 植物の環境耐性に関するシゾン研究の現状と展望 ..... 11  
 黒岩 常祥<sup>1, 2</sup>・三角 修己<sup>1</sup>・黒岩 晴子<sup>1</sup>・八木沢 美美<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>立教大学 理学部生命理学科,  
<sup>2</sup>立教大学 極限生命情報研究センター)

## 国内情報

- 植物のCO<sub>2</sub>感知機構解明に向けて ..... 16  
 橋本 美海・射場 厚 (九州大学 大学院理学研究院 生物科学部門)
- 葉の角度を変えてイネの収量を増やす ..... 20  
 坂本 知昭 (東京大学 大学院農学生命科学研究科)
- レトロトランスポゾン由来の遺伝子*Peg10*による哺乳類の胎盤形成 ..... 24  
 石野 史敏<sup>1</sup>・小野 竜一<sup>1</sup>・金児-石野 知子<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>東京医科歯科大学 難治疾患研究所  
 エピジェネティクス分野, <sup>2</sup>東海大学 健康科学部)
- 1 精子から母性遺伝の分子機構に迫る ..... 29  
 西村 芳樹<sup>1, 2</sup>・成瀬 清<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>東京大学 大学院理学系研究科, <sup>2</sup>前 Cornell University)
- ウナギ大回遊の謎はどこまで解けたか? ..... 34  
 塚本 勝巳・青山 潤 (東京大学 海洋研究所)
- ブームスプレーヤ用ドリフト低減型ノズルの開発 ..... 39  
 宮原 佳彦 ((独)農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター)

## 地域の先端研究

- おいしい鶏卵を目指して一卵黄割合が極めて高い新緑色卵の開発 ..... 44  
 西藤 克己 (青森県農林総合研究センター 畜産試験場)

## 文献情報

- 遺伝子組換えニワトリ始原生殖細胞の生殖細胞系列への移行 ..... 49  
 M. C. Lavoie et al. (*Nature*, 441, 766-769, 2006) 抄訳: 下司 雅也
- 組換え体酵母によるD-乳酸の発酵 ..... 50  
 Ishida N. et al. (*J. Biosci. Bioeng.*, 101(2), 172-177, 2006) 抄訳: 家藤 治幸
- 糖類や多価アルコールによる魚油に添加した抗酸化剤の保護 ..... 51  
 H. Faraji et al. (*J. Agricultural and Food Chemistry*, 53, 736-44, 2005) 抄訳: 岡野 淳

## 表紙の説明

CO<sub>2</sub>応答性突然変異体のサーモグラフィー画像: 野生株 (WT) ではCO<sub>2</sub>濃度変化によって顕著に葉温が変化しているが、CO<sub>2</sub>応答性突然変異体である*ht1-1*では変化が小さく、*ht1-2*では全く変化しない。この変異体の原因遺伝子はキナーゼをコードしており、このキナーゼ活性を阻害した形質転換植物WT: 35SHT1kwでは*ht1-2*と同様CO<sub>2</sub>非感受性になっている。350ppmが大気中のCO<sub>2</sub>濃度に相当し、100ppmが低CO<sub>2</sub>、700ppmが高CO<sub>2</sub>となる。詳細については、16頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

## 真核生物としてはじめて100%ゲノム解読された シゾンの植物科学への展開

<sup>1</sup>立教大学 理学部生命理学科,

<sup>2</sup>立教大学 極限生命情報研究センター

黒 岩 常 祥<sup>1, 2</sup> ・ 三 角 修 己<sup>1</sup>

最近、生研センターの協力を得て、極限環境に棲息する原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シゾン) で真核生物として世界ではじめて100%ゲノム解読を終えた。当初はゲノム解読の結果にそれほど大きな期待をよせてはいなかったが、得られた情報は筆者らの研究を格段に推進させている他、国内外の多くの研究者にも利用され成果が急増してきた。10年余り前、筆者らがイタリアの温泉藻の混合液から純化した時、シゾンに注目する研究者はほとんど皆無であったが、論文発表後2年間を経た今、シゾンのネット検索ヒット件数は200万件に迫っている。シゾンの特徴と今後の研究の展開を予測してみたい。

### 1. ゲノム情報を基盤に

今日、人類社会の発展により、温暖化、砂漠化、酸性雨、食糧難など多くの負の問題が世界規模で噴出しているが、これらの解決には植物の保全と育種の問題が深く関わっており、基礎研究に基づく応用研究を推進する必要性が生じてきた。こうした研究の基盤となるのがゲノム情報である。そのため21世紀に入り、ゲノム解読競争はますます盛んになってきた。NCBIの情報によると、既に概要を含めヒト、イネなど真核生物のゲノムで解読(塩基配列決定)されたものが16種、現在解読が進んでいるものが360種になる。実際にはNCBIに未登録のものも相当あると考えられるので、その数は真核生物としても膨大になろう。しかしながら、解読終了と言っても、どの生物のゲノムにおいても解読困難な箇所があちこちに点在しているため、これまでに真核生物の全ゲノム情報として発表されたものは、未解読の部分を含む、いわば未完の状態のままである。

我々は2004年春に、極限環境に棲息するシゾンの全ゲノム解読を終え、発表した。現在のこの  
KUROIWA Tsuneyoshi, MISUMI Osami  
〒171-8501 東京都豊島区西池袋3-34-1

ゲノム情報は様々な分野の研究者に利用されている。

その後更に、解読が困難であったために残されていた48ヶ所のギャップを読み進め、極く最近、全ゲノムの100%解読に成功した。(現在ゲノム情報が100%解読された真核生物はシゾンのみである。)

シゾンのゲノム解読の特徴は、我が国の研究者グループだけで、しかも1研究室が中心となり進められたこと、当初の目的が細胞小器官の増殖機構の解明というオーダーメイド的要素を含んで進められたこと、また既に筆者らの研究室でミトコンドリアと葉緑体の全ゲノムを決定しており、核ゲノムが解読されれば1生物の全ゲノムが明らかになる、などであった。

シゾンはその体制が単純で、真核細胞の基本構成単位を最小限しか含んでいないなど、最も始源的な形態をもつこと、また棲息域は高温、強酸性(42℃, pH1.5-2.5)の極限環境であることから、シゾンが地球上に出現した最も古い真核生物の性質を保持し続けている可能性が高い。実際にこのことはゲノム解析からも確かめられ、遺伝子にほとんどイントロンがないことや、基本遺伝子セットが最少単位であるなど、多くの点で支持された。そのためシゾンのゲノ



ムを使って真核細胞や細胞小器官の起源と基本構造構築についての解析が始まった。また生育環境に関しても、高温で棲息しているためタンパク質が安定であり、結晶化もし易いことが確かめられ、プロテオミクスをはじめ、ポストゲノム研究の発展に寄与する可能性が高くなった。次にシゾンゲノム解読に至る経緯と今後について簡単に紹介したい。

## 2. 高等植物からシゾンへ

高等植物の機能を高めたり、環境変動に対する耐性能を獲得させるといった育種には、葉緑体などの細胞小器官や細胞の制御にはじまり、胚乳や葉など高次な器官レベルでの制御まで、いくつかの階層がある。生産性の向上には、背丈の低い倒れ難いイネの品種や健康米の作出など、器官や組織レベルでの改良が進み、成功を取っている。一方全ての植物の機能の中心は、細胞内の葉緑体で行われる光合成であり、その研究は国内外ともに盛んになされ、光合成性能を高め、それを直接育種に結びつける努力が払われてきた。また光合成の原理に関わる研究も進展し、ミカエルらの研究を発端として構造生物学的研究へと展開している。

ところが、葉緑体がどのように分裂増殖し、分化し成長して機能を果たすかについてはほとんど研究がなされていなかった。その一因は、葉緑体のDNAを観察することができなかったからである。1980年筆者らは葉緑体内のDNA分子とタンパク質の複合体である「葉緑体核(核様体)」を観察する方法を開発するとともに、褐藻から葉緑体核を単離し、葉緑体(色素体)核の概念を確立した。つまり全ての葉緑体のDNAはタンパク質と結合して核構造を形成すること、葉緑体は「細胞内の細胞」のように振る舞い、核分裂を伴いながら分裂・増殖し、成長分化してはじめて光合成する葉緑体になるという考えである。この概念を基本に葉緑体の仲間を総称として「核を含む色素体」として定義しなおし、色素体は原色素体から核分裂を伴い

ながら分裂増殖し、白色体、有色体、葉緑体へと分化し独自の機能を果たすものであることを明らかにした。筆者らは、ゼラニウム、シロイヌナズナ、ムギ、イネなどの高等植物を用いた研究から、茎頂組織の葉原基では色素体は細胞核、ミトコンドリアなどの他の細胞小器官が増えない時でも、選択的に色素体核分裂を伴いながら分裂増殖すること、及び急激な細胞増殖を行う胚では多分裂法で葉緑体数を増やすことなどを明らかにした。原色素体はDNAの複製とともに核分裂をしながら増殖、増大し続けて、成長すると、植物の種類で固有の色素体核型をもつようになる。単細胞の紅色植物の紅藻類では、色素体核は色素体の中心にあるが、多細胞の紅藻では色素体の周辺に分散した。褐色植物では葉緑体核は葉緑体の周辺にリング状に局在した。緑色植物では、単細胞から高等植物まで葉緑体核は葉緑体体内に分散し、ピレノイドのある色素体では、色素体核はピレノイドの周辺に局在した。

またムギ、イネなど単子葉植物で色素体の分裂増殖分化の過程を明らかにし、イネの細胞の老化機構についても葉を用いて解明を進めた<sup>1-3)</sup>。特に注目すべきは、色素体のDNA合成は若い色素体では活発に行われるが、光合成が最も活発に行われ、所謂炭水化物の合成が盛んになる頃には、既に多くの葉内で色素体核の分解が始まっていることが明らかになったことである<sup>2)</sup>。この老化過程は、イネの鞘葉ではっきりと現れる<sup>3)</sup>。色素体の選択的増加や老化の機構の解明に基づく、新たな植物育種への可能性が検討された。しかしながら結局は、色素体がどのように増えるのかが分からなければ制御の全体像は解明できないとの結論に至った。

しかしほとんどの高等植物では、①細胞当りの色素体が数十個と数が多い、②個々の色素体がランダムに分裂する、③葉緑体核が分散型であり、DNAの合成を捉え難く、葉緑体核分裂を観察することが難しいなど、葉緑体の分裂増殖機構の研究には不適切である。そこで先ず単純な系で葉緑体の分裂増殖の機構を明らかに

し、その成果をイネなど高等植物に戻す戦略を考えた。上記の条件を満足する植物を探した結果、高温強酸性温泉に棲息する単細胞の原始紅藻が候補に挙げられた。原始紅藻Cyanidium属は、*Galdieria sulphuraria* (ガルデリア), *Cyanidium caldarium* (シアニジウム), そして*Cyanidioschyzon merolae*の3種からなる。ガルデリア, シアニジウムはそれぞれ16分裂と4分裂で、シゾンは2分裂で増殖する。1981年にシアニジウムとガルデリアを得て研究材料とした。しかしこれらは厚い細胞壁を持つこと、4個以上の内生孢子を形成することから、細胞小器官の単離や核酸を抽出することが難しかった。そこでシゾンをイタリアに採集にゆき、単離、培養に成功したので色素体研究の中心材料とした。シゾンを使って明らかになったことを次に挙げる。①シゾンのゲノムサイズは16.5Mbで、シアニジウム, ガルデリアと比較すると、約1:2:4であった。②シゾンは直径1.5 $\mu$ mと細菌に近いサイズにもかかわらず、真核植物に含まれる基本細胞小器官をすべて保有している。即ち複膜系の細胞核, ミトコンドリアと葉緑体を1個ずつ含んでいる他、単膜系のマイクロボディ, リソソーム, ゴルジ体, ERなどを1個または最少数で含む。③核をはじめ細胞小器官を光の明暗で完全に同調的に分裂させることができる。④細胞壁がないため分子生物学的及び生化学的研究が容易である。こうした条件に加えて、⑤色素体とミトコンドリアが大きな分裂装置 (PDリング, MDリング複合体) を使って分裂することを発見した。

この分裂装置の構造と機能の全貌を解明するには、PD及びMD分裂装置を取り出し、それを構成する全タンパク質を解明し、そこから関連する全遺伝子を同定する戦略を考えた。ところが、これらの分裂装置は細胞小器官が小さい上、分裂中にしか現れないことから、10リットルもの大量培養からも極く僅かしか得られなかった。また得られた分画も膜のコンタミネーションがあり、分裂周期を通じて変化する主バンドのタンパク質について抗体を作製して確認し

てみると、ほとんど分裂装置と関係ないものであった。少量のタンパク質から遺伝子解析に進める唯一の方法はMALDI-TOFMSで分析することであった。それにはゲノム情報が必要であった。このような訳でシゾンのゲノム解析を計画した。まさにオーダーメイドのゲノム解析であった。ゲノム解析をしてみると、非常に興味深いことが次々と明らかになった。その内容に関しては関連記事で次に述べる。

### 3. シゾンから高等植物へ

シゾンのゲノム解読を開始し多くの遺伝子を使った比較ゲノムに基づく系統学的研究から、シゾンが真核生物として最少の遺伝子数を持ち、それらはイントロンをほとんど含まないことが分かった。これはMALDI-TOMS解析に非常に好都合であった。遺伝子の解析が進むとシゾンが真核生物と古細菌, 真正細菌の交差点に近い生物であることが分かってきた。そこでシゾンで明らかになった現象や遺伝子を高等動植物に適応し、その機能を同定することができるようになった。既に幾つかの現象が高等動植物の問題解明へと貢献しはじめている。

こうした例として葉緑体の分裂機構の研究がある。葉緑体の分裂を形態学的及び生化学的・分子生物学的に解析するには、葉緑体の分裂を同調化する必要がある。高等植物では葉緑体の分裂を同調化することができない。一方単細胞の緑藻のクロレラでは光の明暗により細胞分裂が同調的に進行することが古くから知られていた。そこで、この方法をシゾンに適用したところ、葉緑体の分裂は高い同調率を示した。この方法を利用し、電子顕微鏡観察により大きな色素体分裂リング (PDリング) とミトコンドリア分裂 (MD) リングを発見した。PDリングは、細胞質側の外PDリング, と基質側にある内PDリングからできている。その後高等植物ゼラニウムでも同様な構造が葉緑体の分裂初期から存在することが明らかになった。

ダイナミンが色素体の分裂に関与しているこ

とが最初に発見されたのもシゾンである。ダイナミンはGTPaseのスーパーファミリーである。シナプシス小胞の形成をはじめゴルジ小胞、細胞板の形成など多くの小胞形成に関与し、更にミトコンドリアの分裂への関与も見つかった。従って高等動植物のゲノムには多くのパラログがあるがシゾンには僅か1遺伝子しかなかった。詳細に解析してみるとこのダイナミンはミトコンドリアの分裂に関係していた。更にこのゲノム情報からこのダイナミンに少し配列が似ているが、動物菌類（オピストコンタ）になく、植物（バイコンタ）のみにある配列が見つかった。このタンパク質を解析してみると、色素体の分裂直前に細胞質からPDリングの表面に移動した。次にPDリングと包膜の間に入り、

膜を分断し、娘色素体は二つになった。後にこの色素体タイプのダイナミン遺伝子がシロイヌナズナにも見つかり、ARC5遺伝子であった。

#### 4. おわりに

以上のように、ここでは植物に共通の葉緑体の解析について述べたが、他の様々な細胞小器官の解析についてもシゾンを使った解析法が圧倒的に有利になることが分かる。現在、葉緑体の他に、ミトコンドリアやマイクロボディの分裂機構、更にリソソームの分配機構など細胞小器官の基本挙動及びユイノウ（GCSI）遺伝子<sup>6)</sup>や雄性決定遺伝子などシゾンから高等植物まで共通性の高い重要な遺伝子が明らかとなってきた。また技術的にも、ポストゲノム解析即ちシゾンのゲノム情報、分裂の同調化に基づくプロテオーム解析、3ゲノム同時マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析、そして遺伝子破壊技術を加え、諸現象を構造生物学、さらにオミクス解析できる準備が整ったと考えている（図1）。

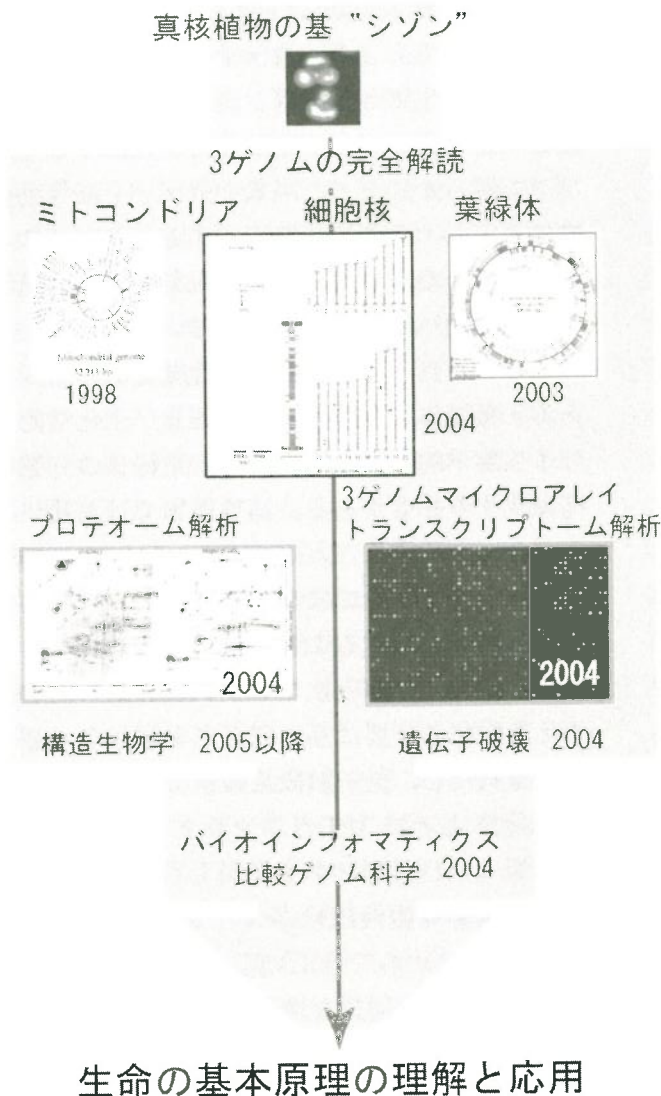


図1 ポストゲノム時代における生命原理を解析する戦略

生命現象の解析においてゲノムが完全解読された材料では、生物個体の全転写（トランスクリプトーム）、全翻訳（プロテオーム）、全代謝（メタボローム）、全形態構造（フェノーム）解析が可能となる。これらを駆使して生命現象を解読し、その情報を応用に用いる。年号は準備完了年。



一方シゾンが誕生した原始環境は放射線や紫外線も強く、高温酸性であったと予測されている。シゾンは現在でもこのような高温酸性(42°C, pH2.5)下で棲息し、予備実験では、こうした環境に対する耐性を備えていることが分かってきた。

次に、先ずシゾンのゲノムの特徴について述べ、現在取り組み始めた環境適応研究について紹介したい。

## 文 献

- 1) Miyamura, S., et al. (1990) Multiplication and differentiation of plastid nucleoids during development of chloroplast & etioplasts from proplastid in *Triticum aestivum*. *Plant Cell Physiol*, 31, 597-602.
- 2) Sodmergen, et al. (1991) Degradation of the chloroplast DNA in second leaves of rice (*Oryza sativa*) in advance of senescence. *Protoplasma* 160, 89-98.
- 3) Inada, N., et al. (2002) Three-dimensional progression of programmed death in the rice coleoptile. *Int. Rev. Cytol.* 218, 221-253.
- 4) Matsuzaki, M., et al. (2004) Genome sequence of the ultra-small unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428, 653-657.
- 5) Misumi, O., et al. (2005) *Cyanidioschyzon merolae* genome: A tool for facilitating comparable studies on organelle biogenesis in photosynthetic eukaryotes. *Plant Physiol.* 137, 567-585
- 6) Mori, T., et al. (2006) GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization. *Nature Cell Biology* 8, 64-71.

## ◀総説関連情報▶

## 植物の研究を支える100%解読されたシゾンのゲノム情報

<sup>1</sup>立教大学 理学部生命理学科,<sup>2</sup>立教大学 極限生命情報研究センター三 角 修 己<sup>1</sup> ・ 黒 岩 常 祥<sup>1, 2</sup>

2004年4月、最も原始的と考えられる真核光合成生物*Cyanidioschyzon merolae*ゲノムの全塩基配列が解読された。この高温・強酸性の温泉に生息する単細胞藻の細胞特性やゲノム情報は、現在、我々が直面している酸性雨等の植物科学をとりまく諸問題に対して、新たな解決の糸口を与えるものと考えられる。シゾンのゲノム組成や遺伝子の特徴、ならびに今後の植物研究の応用に向けた取り組みについて報告する。

## 1. 細胞の採取からゲノム解析まで

*Cyanidioschyzon merolae* (以下シゾンとする)は、高温(45℃)、高硫黄、強酸性(pH1.5-2.5)の、いわゆる極限環境の温泉に生息する原始紅藻である。シゾンは黒岩がミトコンドリアと色素体の分裂の研究のためにイタリアで採取して混合藻として持ち帰り、分離した株(10D株)であり、それまでは国内外に於いて研究材料としてはほとんど使われていなかった。分類学的には紅色植物門(Rhodophyta)イデユコゴメ綱(Cyanidiophyceae)イデユコゴメ目(Cyanidiales)イデユコゴメ科(Cyanidiaceae), *Cyanidioschyzon merolae*と分類される。日本の草津温泉などには近縁種の*Cyanidium caldarium*が生息していることが知られているがシゾンは見つかっていない。細胞は直径が僅か1~2 μmとバクテリアに近いサイズであるが、真核生物特有の複膜系(細胞核, ミトコンドリア, 葉緑体)と単膜系(小胞体, マイクロボディ, ゴルジ体, リソソーム)の細胞小器官をそれぞれ1~数個ずつ持っている。2001年度より、生研機構と文部科学省の特定領域研究の支援を受けて、ゲノム解読とは無縁であった我々の研究室を中心にプロジェクトグループが

MISUMI Osami, KUROIWA Tsuneyoshi

〒171-8501 東京都豊島区西池袋3-34-1

結成され、解読作業がスタートした。シゾンのゲノム解読は、真核生物のゲノムとしては初めて一国(我が国のみ)の研究者による解読完了であり、また、研究目的(当初はオルガネラの分裂増殖に関して)に応じて研究材料の探索・分離からゲノム解読までを一貫して行った「オーダーメイドゲノム解読」という特色がある。その詳細な道のりは別紙の総説に詳しい<sup>1)</sup>。

## 2. 塩基配列の完全解読

このシゾンのゲノム解読に先だって判っていたことは、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)の結果により染色体数は17本であるということと、ゲノムサイズはおよそ14.2M塩基対ということであった。また、同定されている遺伝子は僅か6個であり、遺伝地図や物理マップなどは当然存在していなかった。ゲノム解読はこれらの事情を勘案してホールゲノムショットガン(WGS)法を採用することとした。国立遺伝学研究所(小原雄治教授)のシーケンシングセンターに於いて、WGSクローンを取り始めてからおよそ3ヶ月で、当面の目標としていた30万リード、いわゆるドラフト配列である総延長314メガ塩基対の塩基配列の解読を終えた。Phrapによるアセンブルの結果、928のコンティグが形成され、この時点での推定ゲノム



サイズはおよそ17.3メガ塩基対であった。次に染色体とコンティグの関係を明らかにするために、それぞれのコンティグの末端領域にプローブを設計して、PFGEで分離した染色体に対してサザンハイブリダイゼーションを行った。この地道な作業の結果、コンティグと染色体との対応関係が明らかとなり、また、染色体数は当初の予想の17本ではなく20本であることが判明した。しかしながら染色体上におけるコンティグの向きと位置関係、その間のギャップ領域の配列は依然不明のままである。これらを解決するために慶應大学医学部分子生物学教室（清水信義教授、浅川修一講師）との共同研究でBACライブラリの構築を行った。平均インサートサイズが50キロ塩基対と100キロ塩基対のライブラリを構築し、クローンの末端配列を解読して各染色体上にコンティグを配置していった。このようにして染色体上に整列化されたコンティグ間のギャップについては、PCRによりブリッジングを進めた。実際にはミスアセンブルで出来上がった不良コンティグの修正作業なども伴ったため、結果的にこの作業に約3年を費やすこととなり、2004年4月の論文発表までにサイズが約0.42-1.6Mbの20本の染色体、16,520,305塩基対の配列が決定された<sup>2)</sup>（推定解読率99.98%）。その後、世界に先駆け真核（光合成）生物の完全なゲノム情報を明らかにするために、未解決であった46カ所の推定ギャップ

を2年間かけて解読し、2006年初頭、真核生物としては初めてのギャップのない塩基配列の完全解読を終えた（16,546,747塩基対、表1※テロメアリピート含まず：投稿準備中）。

各染色体がギャップなしで解読されているということは、多くの生物では困難とされているセントロメア領域に関しても配列が読まれているということであるが、明確な繰り返し配列をもつ、所謂セントロメア領域は認められていない。しかし、それぞれの染色体上の局所的な1領域に周辺よりもGC含量の低い、すなわちATリッチな領域が存在することから、この領域がセントロメアとして機能している可能性が考えられる。細胞生物学的なセントロメア領域の同定に関しては、現在CENP-A遺伝子産物を指標に解析が進められている。一方、テロメア配列は各染色体末端でAATGGGGGGというリピートであることが明らかとなった。これは高等植物に見られる典型的なTTTAGGGという配列とは全く異なっており、ユニークなりピートである。テロメア領域の近傍には特定の決まった遺伝子・配列が規則的に出現するエレメント構造をもつサブテロメア領域が認められた。紅藻の二次共生によって生じたと考えられるクリプト藻のヌクレオモルフにも、類似のサブテロメア構造が認められるため、この点をシゾンと比較解析することによって紅藻の染色体構造との関連性、進化などが議論できると思われる。更

表1 シゾン、シロイヌナズナ、イネのゲノム概要

	シゾン	シロイヌナズナ	イネ(日本晴)
<b>細胞核</b>			
配列全長(bp)	16,546,747*	115,409,949	約370,000,000
遺伝子数	5,335*	25,498	37,544
遺伝子密度(kbp/gene)	3.1	4.5	9.9
遺伝子の平均長(bp)	1,552	1,992	2,699
GC含量(%)	55	35	44
<b>色素体</b>			
配列全長(bp)	149,987	154,478	134,525
遺伝子数(CDS)	208	79	107
GC含量(%)	37	36	38
<b>ミトコンドリア</b>			
配列全長(bp)	32,211	366,924	490,520
遺伝子数(CDS)	34	117	56
GC含量(%)	27	44	44

\*2006年3月、100%解読データ

にシゾンの全ゲノム解読を行って分かったことは、ゲノム中に転移因子（トランスポゾン等）が非常に少ないことである。イネではゲノムのおよそ3分の1を、シロイヌナズナではゲノムの約10分の1を転移因子が占めることが明らかとなっているが、シゾンのゲノム中にはトランスポゾンが8個、レトロトランスポゾン（レトロエレメント）が26個のみで、全ゲノムに占める割合は0.1%程度である。イントロンが殆ど無いこととも併せて、シゾンのゲノム構造がどのように構築されてきたのか大変興味深い。

### 3. シゾンが持つ遺伝子の特徴

一方、ギャップブリッジングの作業に並行してアノテーションの作業も進めた。既知の遺伝子情報が極めて乏しいシゾンにおいて、効率よく遺伝子の特徴付けを進める為には、転写領域情報の取得が有効な手段と考えられた。そこで、東京大学医科学研究所（現東京大学大学院新領域創成科学研究科）の菅野研究室（菅野純夫教授，鈴木穰助教授）との共同研究で、シゾンの完全長cDNAライブラリの構築を行った。対数増殖期，明期，暗期の細胞からRNAを抽出し，これらを基に50万クローンからなる完全長cDNAライブラリが作製された。このうち4万クローンについては末端配列を解読し，転写領域を検出した。その結果，驚いたことにシゾンの遺伝子にはイントロンが殆ど存在しないことが明らかとなった。イントロンを持つ遺伝子は総計26個で，それは全遺伝子の0.5%に過ぎなかった。このようなゲノム特性の為，遺伝子検

索用のイントロンの存在を前提とした一般的な真核生物の遺伝子予測プログラムはシゾンには有効に機能しなかった。最終的には転写領域，他生物の遺伝子との配列類似性が認められる領域で，300塩基（100アミノ酸）以上のORFを遺伝子と定義することとした。その結果，シゾンには5331個（論文発表時）の遺伝子が存在し，そのうちタンパク質遺伝子をコードするものは4771個であり，その内訳は既知遺伝子のホモログが2700個，機能未知遺伝子のホモログが902個，そして新規遺伝子が1169個であった。葉緑体を保持しているにもかかわらず，この遺伝子数は現在までに解析されている真核生物の中でも最小クラスである。また，タンパク質をコードしないが転写は行われている，いわゆるnon-coding RNAに相当する遺伝子が518個あった。上記のEST解析より，同定された遺伝子の86.3%から転写産物が検出された。シゾンの遺伝子をeukaryotic clusters of orthologous groups (KOGs) に当てはめて，酵母とシロイ

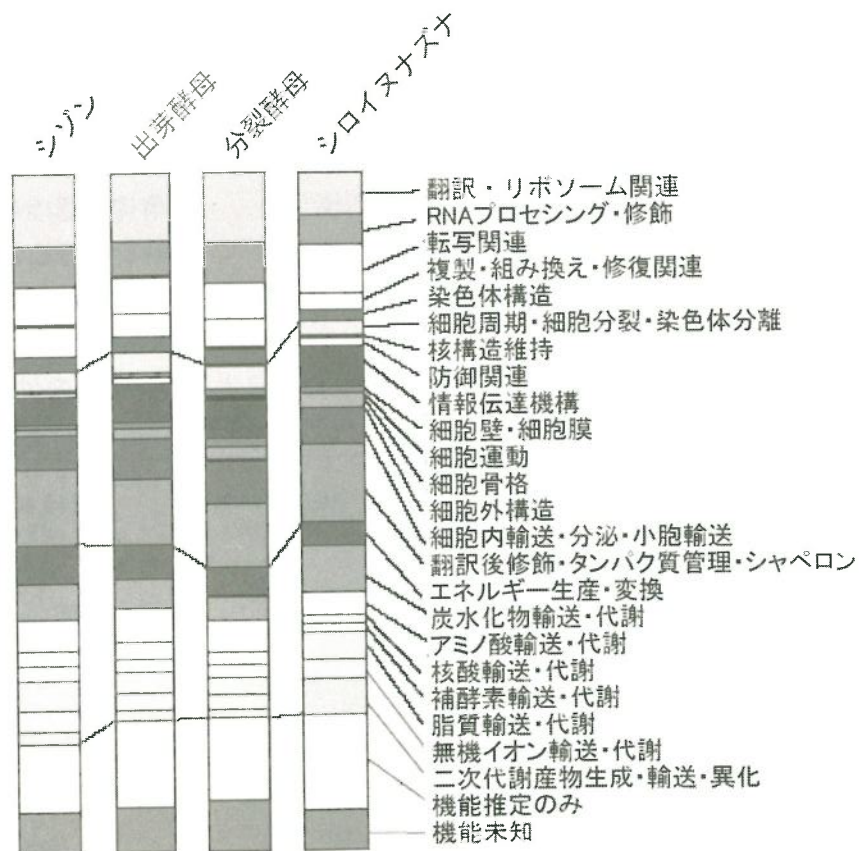


図1 KOG解析による遺伝子の分類と比較

ヌナズナと比較した結果が図1である。他の真核生物と比較してシゾンの遺伝子にはパラログが少ないことが明らかとなっているが<sup>4)</sup>、一方で遺伝子のレパートリーに関しては遜色なく保存されていることが判る。このシゾンが必須遺伝子を最小セットで保持している性質をうまく利用すれば、高等植物の遺伝子の機能解析の際にしばしば問題となるパラログ問題を回避でき、遺伝子機能の本質の理解に早く迫れることが期待される。

シゾンゲノムの大きな特徴の1つとしてrRNA遺伝子が挙げられる。通常、多くの真核生物ではrRNA遺伝子は多コピーのクラスターを形成し、核内では核小体という構造を作って活発にrRNAの転写を行っている。しかし、シゾンは明瞭な核小体構造をもつにもかかわらず18S-5.8S-28Sのセットが2本の染色体上の異なる3箇所それぞれ1コピーずつあるのみであった<sup>3)</sup>。また5SのrRNA遺伝子も3コピーであった。このような僅かな鋳型を基に、シゾンではrRNAの供給や核小体の構築がどのように行われているのか大変興味深い。また、完全解読によってヒストン遺伝子群に関する特徴的な構造が明らかとなった。ヒストン遺伝子も多くの真核生物では多コピーで存在していることが知られているが、シゾンでは14番染色体に限られた1領域にクラスターを形成してH1, H2A, H2B, H3, H4遺伝子が1~3コピー存在するのみであった。このように全コンポーネントがまとまって存在している例はこれまでになく、

ヒストン遺伝子の重複と進化を考察するよいモデルとなるであろう。

シゾンのそれぞれのタンパク質遺伝子に対して最も類似した相同遺伝子を与える分類群を調べると、551遺伝子は明らかに緑色植物の遺伝子に類似しているのに対して、ほぼ同数の537遺伝子が明らかに動物の遺伝子に類似であることが判明した。この結果はシゾンが系統的に後方鞭毛生物界 (Opisthokont) と植物界 (Plantae) の分岐した直後に位置することを示唆していると同時に、紅色植物と緑色植物の間には高等動物と紅色植物との間に匹敵する程の差異があるという可能性も示唆している。一方、光合成のカルビン回路の遺伝子群について、シアノバクテリア由来か、宿主由来かというモザイク性を高等植物 (シロイヌナズナ) と比較したところ、シゾンとシロイヌナズナで全く同一の遺伝子組成 (由来) を示したことから、このモザイク性は緑色植物と紅藻の共通祖先の段階で既に確立していたと考えられた (表2)。すなわち、現存する色素体が過去に1度だけ生じたシアノバクテリアの細胞内共生に由来するという、色素体の単一起源性を強く示唆した。また、色素体へのタンパク質輸送に関わるTic/Toc複合体の組成も基本的には高等植物と共通であることが明らかとなり、これも色素体の単一起源説を支持した。このように、シゾンゲノムから得られた知見が藻類や高等植物の研究に有益であるというのみならず、真核生物全般の成立や進化、共通性や多様性の起源を議論

表2 カルビン回路酵素の由来

カルビンサイクルの酵素(遺伝子)	シロイヌナズナ		シゾン	
	色素体	細胞質	色素体	細胞質
ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (large)	シアノバクテリア	none	horizontal transfer	none
ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (small)	シアノバクテリア	none	horizontal transfer	none
3-phosphoglycerate kinase	シアノバクテリア	シアノバクテリア	シアノバクテリア	none
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	シアノバクテリア+真核	真核	シアノバクテリア	真核
triosephosphate isomerase	真核	真核	真核	none
fructose-1,6-bisphosphate aldolase	真核	真核	真核	真核
fructose-1,6-bisphosphatase	真核	真核	真核	真核
sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	真核	none	真核	真核
transketolase	シアノバクテリア	none	シアノバクテリア	none
ribulose-5-phosphate 3-epimerase	シアノバクテリア	真核	シアノバクテリア	シアノバクテリア+真核
ribose-5-phosphate isomerase	真核	真核	真核	none
phosphoribulokinase	シアノバクテリア	none	シアノバクテリア	none



する上で極めて重要な特徴を備えているということが出来る。

#### 4. おわりに

ゲノムが完全解読された現在、今後はこの情報を生物現象の解明や応用的利用にいかにして活用するかということが重要な課題となる。シゾンのポストゲノム解析としては、現在、3ゲノムの発現を同時にモニタリングできるマイクロアレイのシステムが稼働しており、特にイントロンを殆ど持たないシゾンに於いては、このトランスクリプトーム解析が様々な研究に有効に機能することを確認している。特に、各種環境変動実験におけるトランスクリプトーム解析から、興味深い実験結果が得られており、高等植物への応用に向けた基礎実験が進められている（生研センター基礎研究推進事業）。また、シゾンの同調培養系を用いて単離された細胞小器官の分裂装置に関するプロテオームも、MALDI-TOF-MSを導入したことによって超微量のサンプルで解析ができるようになり、それを構成するタンパク質遺伝子を従来の方法と比べて飛躍的に迅速に決定することが可能となった。この手法は、他の研究にも応用可能な強力な研究手法である。このように、ゲノム情報を基盤にしたポストゲノム解析の手法とリソースは一通り完備されたといつてよい。

この先の課題としては、シゾンの細胞を用いて遺伝子の機能解析を可能にすることである。すなわち、遺伝子の導入や破壊などの形質転換技術の開発である。これに関しては、先行研究においてシゾンのin vivoで外来DNAの相同組み換えが起きているという実験結果を報告しており<sup>5)</sup>、今後、選抜マーカーや有用プロモーターの開発、効率的な遺伝子導入法を検討するこ

とによって、近い将来、シゾンの細胞を用いた遺伝子機能解析が可能になると考えられる。

尚、シゾンゲノムプロジェクトに関するデータ（アノテーション、配列情報など）は下記のサイトから参照・ダウンロードできる（<http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/>）。

最後に、シゾンゲノムの100%解読は、現在進行中の生研センター「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」の支援により、複数の共同研究者の協力によって行われた成果である。

#### 文 献

- 1) 黒岩常祥 (2005), 蛋白質核酸酵素, 50, 97-110
- 2) Matsuzaki, M. et al. (2004) Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428, 653-657
- 3) Maruyama, S. et al. (2004) The minimal eukaryotic ribosomal DNA units in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *DNA Res.* 11, 83-91
- 4) Misumi, O. et al. (2005) *Cyanidioschyzon merolae* Genome: A Tool for Facilitating Comparable Studies on Organelle Biogenesis in Photosynthetic Eukaryotes. *Plant Physiol.* 137, 567-585
- 5) Minoda, A. et al. (2004) Improvement of Culture Conditions and Evidence for Nuclear Transformation by Homologous Recombination in a Red Alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Plant Cell Physiol.* 45, 667-671

## ◀総説関連情報▶

## 植物の環境耐性に関するシゾン研究の現状と展望

<sup>1</sup>立教大学 理学部生命理学科,<sup>2</sup>立教大学 極限生命情報研究センター黒岩 常祥<sup>1,2</sup>・三角 修己<sup>1</sup>・黒岩 晴子<sup>1</sup>・八木沢 美美<sup>1</sup>

高熱環境に棲息する細菌類は高温でもタンパク質が安定であることから、それらのゲノム情報はPCRや構造生物学などの分野で利用され現代生命科学の発展を支えている。一方、真核生物では高熱強酸性環境に棲息する原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* “シゾン” で、はじめて全ゲノムが解読され、極限環境への適応機構の解明とその応用研究が開始された。

## 1. シゾン類の棲息環境

シゾンは高温強酸性そして高硫黄の環境に棲息する原始紅藻のシアニジウム属に分類される。シアニジウム属は、シゾン、*Cyanidium caldarium* RFK, *Gardieria sulphuraria* の3種が含まれている。シアニジウムとガルデリアは草津、箱根など高温酸性温泉に広く棲息しているが、伊豆河津のようなアルカリ性の温泉には棲息しない。またシゾンはトカラ列島の子宝島に棲息すると聞かすが、現在その培養株はない。我が国ではシアニジウム類の分類学的研究は、1940年、江本義数らによりなされ、79℃の高温でも棲息する類もあるとの報告がある。しかし、シアニジウム類の細胞が“イデユコゴメ（出湯小米）”と言われるように小さく、観察しにくいこともあり最近まで原核生物と思われていた。1984年筆者らはシアニジウムが細胞核、ミトコンドリア核、葉緑体核を含んでいることを明らかにし、真核植物であることを確認した<sup>1)</sup>。

好アルカリ菌酵素の洗剤への応用、また好熱性原核生物の酵素類が、PCRをはじめバイオテクノロジーを拓き、現在の生命科学の発展を支えているなど、極限環境に棲息する細菌の利用は新たな社会への貢献を生んでいる。更に期待

KUROIWA Tsuneyoshi, MISUMI Osami,

KUROIWA Haruko, YAGISAWA Fumi

〒171-8501 東京都豊島区西池袋3-34-1

されているのが真核生物のタンパク質の構造生物学的研究であるが、多くは真核生物固有であるため、これら好熱性細菌の成果では適用できない問題点がある。最近真核生物としてゲノムが完全解読されたシゾンは高温強酸性に棲息する真核生物であるため、真核生物固有の構造生物学的研究への寄与において発展性がある。また極限環境生物が獲得してきた性質は変動する環境に耐性の生物の作出に応用できる可能性を秘めている。

## 2. 比較ゲノムとEST

環境変動のストレスは、同じ環境に棲息する全ての生物に一樣に働く。従って環境変動に適応する能力は、単細胞から高等植物まで共通に存在すると考えられる。環境変動要因としては、高温、酸性、乾燥、紫外線など多様である。シゾンのゲノム解析の結果、シゾンが真核生物の系統樹の根本に近いところに存在することが明らかとなり、進化の過程でかなり早い時期に誕生したことが推定される。15~20億年前の地球環境は、オゾン層もなく強い放射線、強い紫外線、高温、強酸性など過酷であり、更には高温強酸性の温泉水は地殻を通過する途中で様々な金属を溶かしイオン化するため、温泉は高イオン状態にあったと推定される。シゾンなど原始藻類がもつこうした極限環境に対する高い適応

能力を利用し、変動する環境に適応力のある植物などの作出に向けて新たなプロジェクトを開始した<sup>2)</sup>。

一方別の角度から環境変動に関する高等植物の研究は進んでいる。主に酸性、耐高温、耐乾燥、耐塩など各種ストレス耐性に関与する遺伝子などに関してである(表1)。ほとんどの関連遺伝子はシゾンにもあるが、耐酸性に関してコムギで報告があったリンゴ酸トランスポーターに関する遺伝子はない。土壌が酸性になるとアルミをイオン化するため、雨で溶けたアルミイオンが作物をいため、植物枯死の原因となると考えられている。岡山大学などのグループによってコムギでアルミイオンに耐性の植物が作出されたが、これはリンゴ酸トランスポーター遺伝子に関わるものであった。リンゴ酸がアルミイオンのキレート剤として作用し、それを排出することによって植物を酸耐性に行っているとの説明である。

もう1つ注目すべきは細胞膜に存在するプロトンポンプ(プロトン輸送性ATPase)の遺伝子に関する研究である。東京理科大学の榎並勲博士らは長らくシアニジウムを使って細胞生理学的研究を続け、細胞内が中性に保たれていることを見つけた。このことはシアニジウムが細胞内外の大きなpH勾配を維持するために細胞内から細胞外へプロトンを排出する機構を持っているためと考えた。また細胞内のATPが減少すると、プロトンは細胞内に流入し細胞内pHは酸性になるという。そこで、シアニジウムの細胞膜に存在する強力なプロトンポンプが活動し、細胞内を中性に保つと考え、その遺伝

子をクローニングした<sup>3)</sup>。シゾンのプロトンポンプ系は細胞膜のみならず、細胞小器官のリソソームにもある。リソソームはプロトンポンプを使ってその内部を酸性に保ち、様々な物質の分解を司っている。こうした意味で、我々はプロトンポンプ関係の遺伝子は注目すべき研究ターゲットと考え研究を進めている。

シゾンのEST解析については、シゾンが酸性環境に棲んでいるため、硫黄やプロトンの代謝に関わる遺伝子の活性が高く、現在10個の遺伝子を耐酸性に関連する遺伝子候補として考え解析を進めている。

### 3. 100%解読されたゲノム情報をもとにしたマイクロアレイの作製

基本戦略として、比較ゲノム、EST解析から環境変動に関わる遺伝子候補を推定するとともに、模擬環境変動実験を行い、環境変動耐性に関わる遺伝子を同定する計画である(図1)。この解析には転写産物をみるマイクロアレイとタンパク質の変動から遺伝子を探るMALDI-TOFMSがある。ここではマイクロアレイから述べる。マイクロアレイには解析する遺伝子に洩れがでないように、先ずゲノムの全塩基配列情報が完全であることが前提となる。シゾンでは、ゲノム解析の研究を2004年にネイチャー誌に発表した時には、46カ所のギャップがあった。その後解析を進め、現在では100%細胞核ゲノムの解読に成功している。既にミトコンドリアと葉緑体ゲノムも100%解読されていることから、一つの真核生物ではじめて全遺伝子が解読

表1 環境ストレスに関連する代表的な遺伝子

遺伝子	シゾン	シロイヌナズナ	イネ
Plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase	+	+	+
Malate transporter (aruminum-activated)	-	+	+
Vacuolar-type H <sup>+</sup> -translocating pyrophosphatase	+	+	+
Plasma membrane calcium/proton antiporter	+	+	+
Ascorbate hydrogen peroxidase	+	+	+



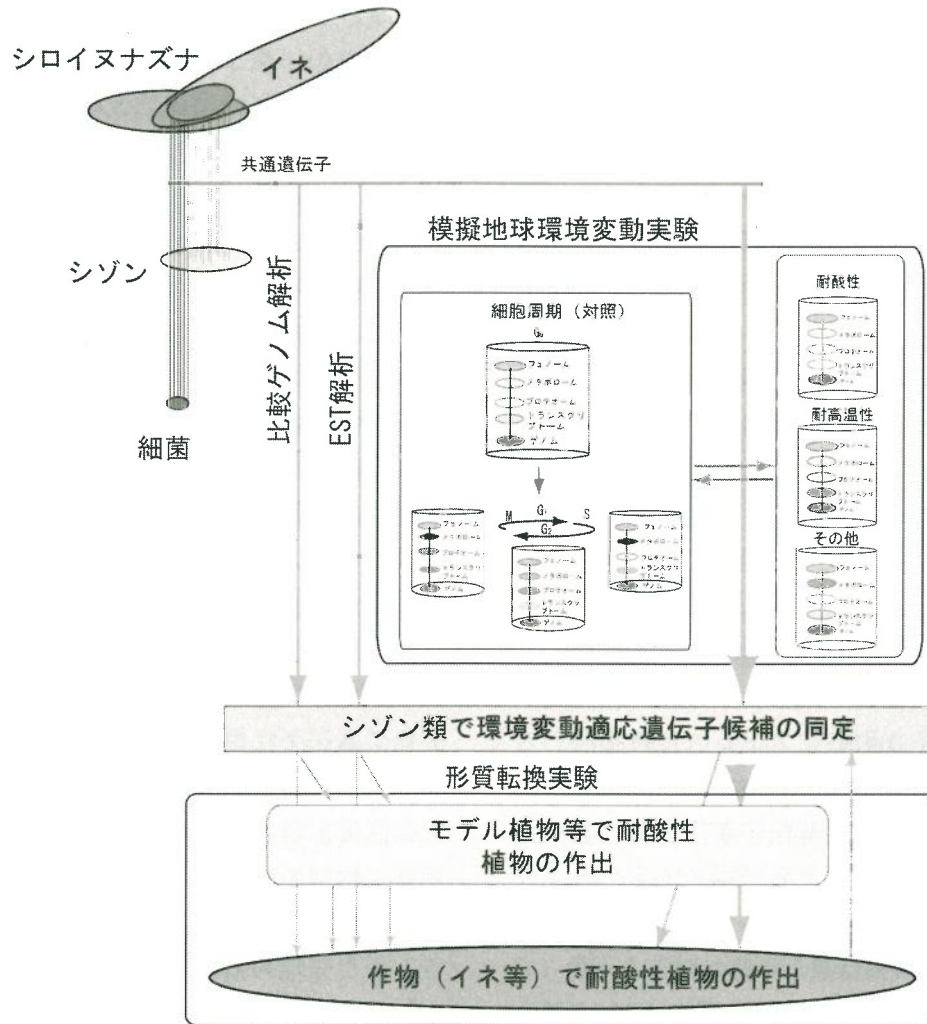


図1 極限環境に棲息する生物を使った環境変動耐性植物を作出する戦略

されたことになる。

46ギャップがあった段階で先ず4586個の遺伝子について50merのオリゴマイクロアレイを作製し実験を行い、多くの環境変動に関する遺伝子候補を得た。現在では、更に精密な細胞核、ミトコンドリア、葉緑体の3ゲノムの全遺伝子のオリゴマイクロアレイを作製し、九州大学の田代康介博士によりスポッティングが完成した。完全なマイクロアレイを使用するのに際し細胞核の遺伝子は全てポリAをもっていることからmRNAを回収することができるが、ポリAがない葉緑体とミトコンドリアの遺伝子に関してはユニークなプライマーを設計し同時に解析する系を開発した。この作製過程で、シゾンと高等動植物のマイクロアレイ系の比較を考えてみた。特に高等植物のマイクロアレイ系は全遺伝

子が対象となっていないこと、また植物の器官ごとに調べられていないことから、本質に迫るのはかなり困難を要する。しかしこのシゾンの系は全遺伝子を対象としていること、単細胞であるので個体として扱うことができる点で評価できる。

シゾンの系でマイクロアレイの模擬環境変動実験等を始めてみると、二つの問題に突き当たった。実験に伴い光と細胞周期に依存して活性化される遺伝子が多く出現したことである。

#### 4. 光と細胞周期の問題

どの実験でもコントロールが重要な意味をもつ。特にコントロールを得るのが難しいのがマイクロアレイの実験と考えられる。細胞分裂を

同調化させるために光の明暗周期を使った。しかし間もなく環境変動実験では、この光の影響や細胞周期に依存的に発現する遺伝子の影響があることが分かった。そこで予め細胞周期の各期に選択的に発現する遺伝子を調べる必要が生じた。細胞分裂を高度に同調化させ、各時間毎に発現する遺伝子をマイクロアレイで解析した。その結果マイクロアレイによって、オルガネラの分裂周期と細胞周期（G<sub>0</sub>期、G<sub>1</sub>期、S期、G<sub>2</sub>期、M期）の各期に選択的に発現する遺伝子が150から200個存在していることが明らかとなった。

## 5. スクリーニング法

環境変動実験を行い、そこから光や細胞周期に関わる遺伝子を引いてストレスに直接関わる遺伝子候補を同定する。その結果、それぞれのストレスに関わる候補遺伝子が得られると、それらの遺伝子をPCRにより増幅しイネ、ムギなどの作物で形質転換をする。一方、マイクロアレイで得られる候補は数十単位で増える。従って高等植物にクローニングする前段階で候補を絞り込む作業が必要となるが、現在最適な系がない。この系の開発も重要であるので進めている。

## 6. 環境変動要因に関する遺伝子

シゾンで酸性、温度、紫外線、塩や金属イオン耐性に関わる実験を行っている。ここでは、代表例として酸性と温度に関わる耐酸性遺伝子候補を同定する実験について述べる<sup>4)</sup>。まずマイクロアレイ解析を行ううえでの解析点を決めた。シゾンを各pHで6日間培養し、生存率を測定した。その結果、生育pHは1.5から4.7であり、至適pHは2.3であった。興味深いことにpH4.7で培養すると、培地のpHは数日で下がりpH2.3に達した。こうした結果を基本に、各点からRNAを抽出しマイクロアレイ解析を行い、得られたデータを用いてスキッタープロット解析を行った。その結果、pH2.3を基準に

pH4.7で2倍以上発現する遺伝子数は260個、逆に2分の1以下の発現を示す遺伝子数は212個であった。またpH4.7に入れ替え後2時間後と6日後では2倍以上の発現を示す遺伝子数が397個、2分の1以下の発現を示す遺伝子数は451個であった。発現比の上位及び下位20位までの遺伝子を並べたところ、pH4.7の時ヒートショックプロテイン関連の遺伝子がpH2.3の時より多く発現していた。pHが下がった6日後をみるとヒートショックプロテイン関連の遺伝子は逆に少なくなっている。つまり、環境に順応するに従ってこれらの遺伝子の発現も正常化していったと考えられる。逆にpH4.7の時に発現が非常に少ない遺伝子には葉緑体の構成タンパク質や光合成関係の遺伝子があった。このことはシゾンにとって過酷な状態になると光合成関係の遺伝子に影響がすぐにでることを示唆している。この結果は、環境ストレスが細胞小器官へ直接影響ももたらしていることを示唆しており、細胞の膜系だけでなく、細胞小器官についても詳細に調べる必要があることを示している。また発現の差が大きい遺伝子の中には機能未知の遺伝子も多数含まれていた。このような発現の差が大きい遺伝子がpHの自己調節や耐強酸性に関連があると推測されるので現在更に詳しく解析を進めている。

温度に関しても同様な方法で解析を進めている<sup>5)</sup>。環境変動実験では、まず0から70℃まで生育温度と生存率の関係を調べた。予想に反して、シゾンは4℃でも増殖はしないが生育できることが分かった。至適温度は42℃で、生育最高温度は50℃である。シゾンは一般に濃緑色で卵形をしているが、温度の変化とともに細胞の形や大きさ、そして色に大きな影響が現れた。一般に温度が高くなると細胞は大きくなり色が薄くなりやがて破碎された。また温度が低くなると、葉緑体が小さくなり、その結果として全体が小さくなった。この各温度環境で発現している遺伝子をマイクロアレイで解析し、その特徴をスキッタープロット解析した。各温度での変化の代表として4℃と42℃で発現している

遺伝子の比較について述べる。4℃で42℃に対して4倍以上で高発現している遺伝子は40個余りあり、シゾン特有と他の生物にも存在する機能未知遺伝子が多かった。既知遺伝子としてはやはり、ヒートショックタンパク質などストレス応答に関わる遺伝子が多く見られた。

50℃の高温領域に関しても高温特有に4倍以上発現している遺伝子は20個ほどあり、興味深いことに、ヒートショックタンパク質が高い発現を示しているが、これは4℃で選択的に発現しているヒートショックタンパク質遺伝子と異なるものであった。温度に対する適応は、類似だが異なる遺伝子を上手く使うことによって行われていることを示唆している。また高い発現を示す既知・未知の遺伝子について、現在更に詳細な解析を行っている。pHの変化の時と同様に、先ず影響が葉緑体の分裂やサイズに現れることから、細胞小器官への影響の観点からも解析しているが、各種ストレス応答には過酸化水素が関係するマイクロボディなどの関与が示唆されている。こうした結果を総合的に解析し、植物へ導入するための最終候補遺伝子を絞り込んでいる。

一般的に動物体でもストレスタンパク質は通常でもある程度合成されているが、高温におかれると高い発現を示す。ストレスタンパク質の機能は他のタンパク質を正しい立体構造をとらせたり、細胞膜を横切って移動させたりする介添え役の機能を果たし、総称してシャペロンと呼ばれている。ここで、大事な点は、こうした環境変動(ストレス)に関する遺伝子が、細胞、個体を問わず、また動物植物を問わず、同じようなストレス環境におかれたときに、類似の遺伝子が発現していることである。これは環境変動に関する遺伝子をシゾンで探す重要な根拠である。

## 7. 高温安定のタンパク質の利用他

真核生物のタンパク質の結晶化は細菌や常温に棲息する酵母などを使っても難しいと聞く。このような場合シゾンのゲノムを検索し、類似

の遺伝子があれば、このタンパク質をシゾンで結晶化する方がし易いと考えられる。既に、国内外でこのような視点で研究が進んでおり、特に成人病に関するタンパク質で成功していると聞く。

また、極限環境に棲息しているシゾンを使って環境に放出された有害物質を分解する研究もはじまっている<sup>6)</sup>。今後、こうしたシゾンの棲息特性を利用した研究が急激に進むものと期待している。

## 文 献

- 1) Nagashima, H., Kuroiwa, T. and Fukuda, I. (1984) Chloroplast nucleoids in a unicellular hot spring alga *Cyanidium caldarium* and related algae. *Experientia* 40, 563-564.
- 2) 三角修己, 八木沢扶美, 黒岩晴子, 黒岩常祥, 酸性環境に応答する *Cyanidioschyzon merolae* の新規遺伝子の解析, 日本植物学会第70回(熊本)大会 2006年9月。
- 3) Ohta, H., Shirakawa, H., Uchida, K., Yoshida, M., Matuo, Y. and Enami, I. (1997) Cloning and sequencing of the gene encoding the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from an acidophilic red alga, *Cyanidium caldarium*. *Biochim. Biophys. Acta* 1319, 9-13.
- 4) 阪後貴之, 杉山健, 三角修己, 森稔幸, 藤原崇之, 橋本正樹, 黒岩常祥, *Cyanidioschyzon merolae* のpH変化と塩ストレスでの遺伝子発現プロフィール, 日本植物学会第70回(熊本)大会 2006年9月。
- 5) 橋本正樹, 三角修己, 森稔幸, 藤原崇之, 阪後貴之, 黒岩常祥, 原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の温度変化による遺伝子発現のプロフィール, 日本植物学会第70回(熊本)大会 2006年9月。
- 6) Utsukihara, T., Misumi, O., Kato, N., Kuroiwa, T. and Horiuchi, C. A. (2006) Reduction of various ketones by red algae. *Tetrahedron: Asymmetry* 17, 1179-1185.



## ◀国内情報▶

植物のCO<sub>2</sub>感知機構解明に向けて

九州大学 大学院理学研究院 生物科学部門

橋本美海・射場厚

植物は、体表面に点在する気孔からCO<sub>2</sub>を取り込み、光合成を行う。効率よく光合成を行うために、気孔は光照射下や低CO<sub>2</sub>濃度条件下で開く。また、乾燥や高CO<sub>2</sub>条件下では余分な水分の放出を抑えるために気孔は閉じる。光や乾燥による気孔開度調節シグナリングに比べると、CO<sub>2</sub>シグナリングに関しての知見は非常に少ない。本稿ではサーマルイメージングを用いた遺伝学的手法によって初めて単離されたCO<sub>2</sub>シグナル因子について紹介する。

## 1. はじめに

植物には気孔があり、ガス交換の出入り口となっている。気孔開度は周囲の環境に応じて厳密に調節されており、例えばCO<sub>2</sub>濃度が低いと気孔は開き、高いと気孔が閉じることが知られている<sup>1)</sup> (図1)。植物は日中、光合成を行うのでCO<sub>2</sub>を消費し、夜は呼吸を行うのでCO<sub>2</sub>を放出する。このため葉内のCO<sub>2</sub>濃度は一日のうちでも大きく変化する<sup>2)</sup>。また、現在地球上では大気中のCO<sub>2</sub>濃度の上昇が続いており、21世紀後半には産業革命以前の2倍のCO<sub>2</sub>濃度になることが予想されている。したがってこのようなCO<sub>2</sub>濃度変化がどのようにして植物に感知され、そのシグナルが伝達されているのかを理解することは、植物のCO<sub>2</sub>環境適応能力の向上を目的とした技術開発に寄与すると思われる。

HASHIMOTO Mimi, IBA Koh

〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1

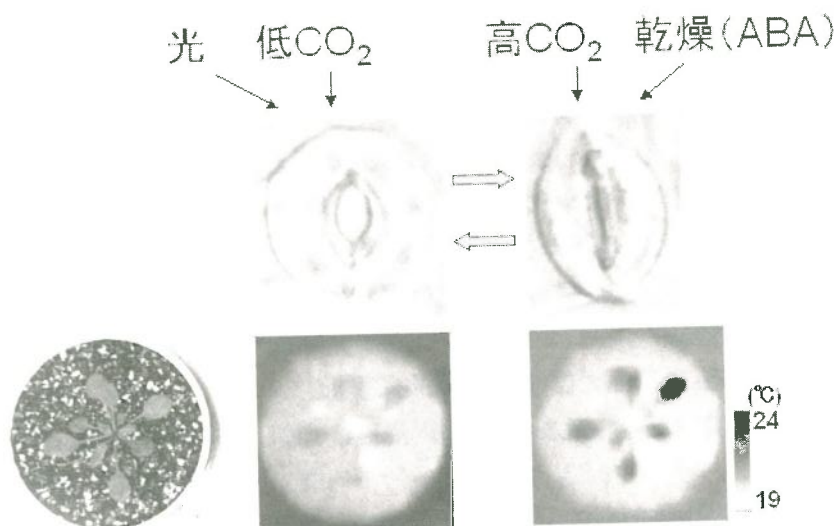


図1 気孔の開度変化によって葉温は変化する  
光、低CO<sub>2</sub>条件下で気孔は開き（左上）、アブシジン酸（ABA）、高CO<sub>2</sub>条件下で気孔は閉じる（右上）。野生株の植物体（左下）を低CO<sub>2</sub>条件におくと気孔が開く。気孔が開くと蒸散が盛んとなり気化熱が奪われるので葉温は低下する（中央下）。逆に気孔が閉じると葉温は上昇する（右下）。

2. 気孔におけるCO<sub>2</sub>シグナリング

気孔は2つの孔辺細胞（図1）によって形作られている。気孔の開閉はこの孔辺細胞における膨圧の変化が可逆的な変形を引き起こすことによってもたらされる。植物が刺激を感知すると孔辺細胞内でシグナルが伝わり、細胞内外でイオンや有機物の出入りが起こる。これによって浸透圧が変化し、水の出入りが生じるので細胞内の膨圧が変化するのである（図2）。

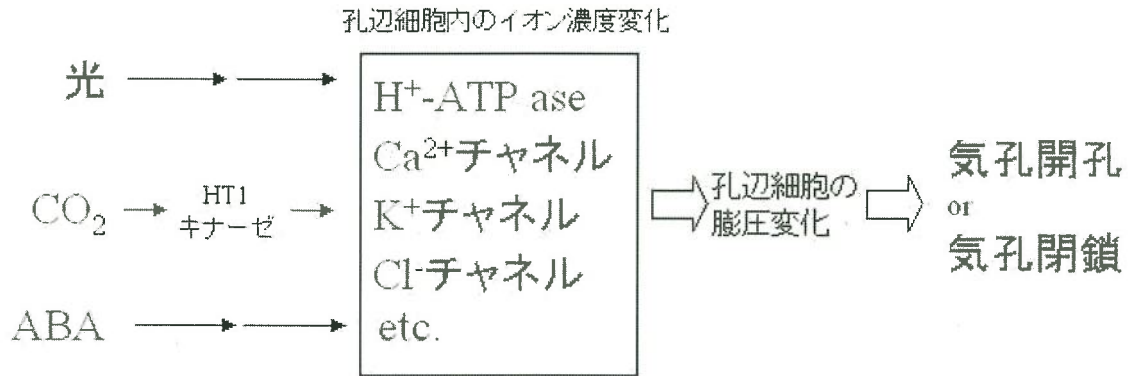


図2 孔辺細胞におけるシグナリングのモデル図

光、CO<sub>2</sub>、ABAなどのシグナルはシグナル伝達系によってイオン透過性の輸送体へと伝えられる。イオン濃度が変化すると、浸透圧変化により孔辺細胞において水が流入あるいは流出する。最終的な膨圧の変化によって気孔が開くか閉じるかが決定される。

気孔のCO<sub>2</sub>感知に関する研究は、電気生理学的手法を用いたものが主であった。これによって、CO<sub>2</sub>シグナルが細胞内のカルシウムイオン増加や、カリウムイオン、陰イオンチャネルの活性化を引き起こすことが明らかとなり<sup>3), 4)</sup>、これらのイオン濃度の変化によって孔辺細胞内の膨圧が変化すると考えられている。しかし、CO<sub>2</sub>シグナリングの上流で機能するCO<sub>2</sub>レセプターやシグナル伝達因子に関する知見はこれまで得られていない。そこで、ハイスループットなサーマルイメージングの技法を用いて、CO<sub>2</sub>応答性突然変異体を単離し、原因遺伝子の解析からCO<sub>2</sub>シグナル伝達に関わるキナーゼを同定した<sup>5)</sup>。

### 3. CO<sub>2</sub>応答性突然変異体の単離

分子遺伝学的手法を用いて高等植物の解析を行う際は、モデル植物であるシロイヌナズナを用いることが多い。シロイヌナズナはゲノムサイズが非常に小さく、全ゲノムの塩基配列も決定されている。また、個体サイズが小さい、世代時間が短い、形質転換植物の作出が容易であることも大きな利点として挙げられる。CO<sub>2</sub>応答性突然変異体は、CO<sub>2</sub>濃度を変化させたときの気孔開度の変化が野生株と異なるはずである。このような変異株を単離するためには、従来のアプローチでは数多くの植物の気孔開度を

顕微鏡で測定しなければならないが、これは非常に時間と労力を要する。

気孔が開くと植物内部から水分が放出されるために気化熱が奪われ、葉温が下がることが知られていた。したがって、CO<sub>2</sub>濃度依存的な葉温変化を検出することができれば、サーモグラフィを用いることによって一度に多くの個体の気孔開度を知ることができるのではないかと考えた。シロイヌナズナは個体サイズが小さく葉温変化も小さいので、多くの植物個体に対し同じ環境条件を提供しつつ、精密に葉温を測定する系の開発が必要であった。私たちはこのような測定系を立ち上げ、CO<sub>2</sub>応答性突然変異体の単離を行った。*ht1* (*high leaf temperature 1*) 変異体は低CO<sub>2</sub>条件下でも高温を示す変異体として単離された<sup>5)</sup> (図3)。

### 4. *ht1*変異体を用いた解析

スクリーニングによって2つのアレルを持つ*ht1*変異体 (*ht1-1*および*ht1-2*) を単離した。*ht1*は低CO<sub>2</sub>条件下でも気孔の開度が小さいために葉温が高いことが明らかとなった<sup>5)</sup>。また、*ht1-1*ではCO<sub>2</sub>濃度変化に伴う気孔開度の変化が低下しており、*ht1-2*ではCO<sub>2</sub>濃度変化に伴う気孔開度の変化は見られなかった。つまり、*ht1-1*はCO<sub>2</sub>応答性が低下しており、*ht1-2*はCO<sub>2</sub>非感受性であることが明らかとなった<sup>5)</sup>。

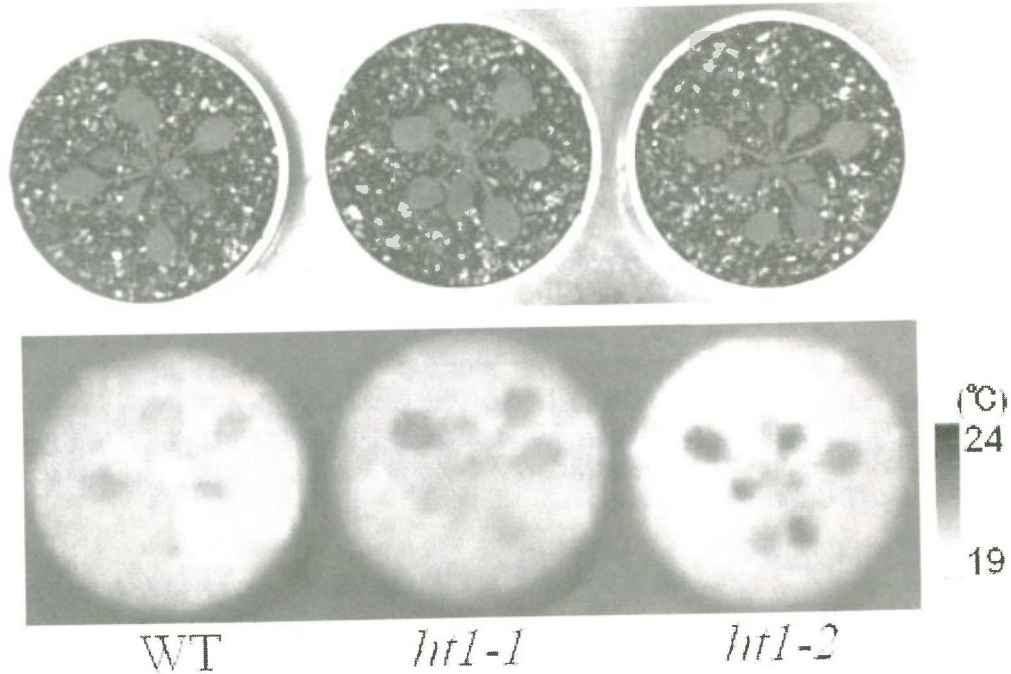


図3 CO<sub>2</sub>応答性突然変異体 (*ht1*) の単離

CO<sub>2</sub>濃度が100ppmの低CO<sub>2</sub>条件下において、植物体をサーモグラフィーで撮影したもの。野生株 (WT) と比べると、*ht1-1*および*ht1-2*では葉温が高いことがわかる。

さらにこのCO<sub>2</sub>非感受性変異体である*ht1-2*が他の刺激に対して応答性を示すのかどうかを調べた。青色光は気孔を開かせる働きがあるので、青色光を照射したときに*ht1-2*の気孔が開くのかどうかを検証した。その結果、*ht1-2*でも青色光に応答して気孔が開くことが確認された。さらに、気孔開孔にはプロトン-ATPaseの活性化が関与していることが知られているが、プロトン-ATPaseの活性化を引き起こすフシコクシンを処理することによっても*ht1-2*における気孔開孔を誘導することができた<sup>5)</sup>。したがって*ht1-2*においても気孔開孔を引き起こす装置自体が壊れているわけではないことが示された。乾燥による気孔閉鎖には植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) が関与していることが知られており、アブシジン酸の投与によって気孔閉鎖を誘導することができる。私たちは*ht1-2*においてアブシジン酸による気孔閉鎖反応を調べ、野生株と同様の閉鎖反応が生じることを確認した<sup>5)</sup>。したがって、*ht1-2*において青色光による気孔開孔反応もアブシジン酸による気孔閉

鎖反応も生じることから、*ht1-2*はCO<sub>2</sub>応答性に特異的な変異を持つと考えられた。このことはHT1遺伝子産物が、光やABAのシグナリングとは基本的に独立したCO<sub>2</sub>シグナリング経路の上流で機能していることを示唆している。

## 5. HT1キナーゼの働き

*ht1*変異体の原因遺伝子をマッピングによって調べたところ、キナーゼ (リン酸化酵素) と相同性の高い遺伝子であることが明らかとなった<sup>5)</sup>。*ht1-1*変異はキナーゼ活性部位の1アミノ酸置換を引き起こす変異であり、*ht1-2*変異は14アミノ酸の欠失を引き起こす変異であった。この、キナーゼと相同性が高い遺伝子がHT1遺伝子であるということは、相補性検定によって確認された。HT1遺伝子の発現部位はRT-PCR、アレイ解析、HT1プロモーター：GUS形質転換植物を用いた解析によって、地上部では孔辺細胞特異的に発現していることが明らかとなった<sup>5)</sup>。



次に実際にこのHT1遺伝子産物がキナーゼとして働くのかどうかを*in vitro*キナーゼアッセイによって調べたところ、正常なHT1ではキナーゼ活性を持つことが確認された<sup>5)</sup>。さらに、*ht1-1*型の変異を導入したものではキナーゼ活性が低下しており、*ht1-2*型の変異を導入したものではキナーゼ活性が消失していた<sup>5)</sup>。このことはHT1のキナーゼ活性と、植物におけるCO<sub>2</sub>応答性が密接にリンクしていることを示している。

これをさらに検証するために野生株においてHT1の機能を阻害し、CO<sub>2</sub>応答性がなくなるかどうかの実験を行った。キナーゼにはキナーゼ間で極めて保存性の高いリジン残基があり、このリジンを他のアミノ酸に変えるとキナーゼ活性を失うことが知られている。この改変HT1 (HT1: kw) がキナーゼ活性を持たないことを*in vitro*キナーゼアッセイで確認した後、HT1: kw遺伝子を野生株において過剰発現させた。これにより、正常なHT1が競争阻害されHT1キナーゼ活性が抑制されることが予想される。実際、このような形質転換植物は低CO<sub>2</sub>条件下でも高温を示し、CO<sub>2</sub>濃度変化に伴う葉温変化も見られなかった<sup>5)</sup>。これは植物のCO<sub>2</sub>応答にはHT1のキナーゼ活性が重要であり、HT1キナーゼがCO<sub>2</sub>シグナリングにおける鍵酵素であることを示している。

## 6. 研究の今後の展望

植物に限らず、動物においても幅広くキナーゼは細胞内のシグナル伝達因子として働くことが知られており、受容体から受け取ったシグナルを細胞内に伝える働きをしている。HT1は*in vitro*のアッセイより、自己リン酸化能および、他のタンパク質もリン酸化する能力を持つことが確認された<sup>5)</sup>。今後は植物の生体内で実際に

HT1キナーゼが何をリン酸化しているのか、またこのリン酸化がCO<sub>2</sub>濃度変化に依存してどのように変化するのかを中心に解析を進めていきたいと考えている。さらに、私たちの研究室ではCO<sub>2</sub>応答性突然変異体の単離を継続して行っており、現在までに20余りの変異体を単離している。これらの原因遺伝子の解析は新規のCO<sub>2</sub>シグナル因子やCO<sub>2</sub>センサーの実態の解明に寄与するのではないかと考えている。

今後大気中のCO<sub>2</sub>濃度が急激に上昇すると予想されているが、これらCO<sub>2</sub>変異体が長期間高CO<sub>2</sub>濃度条件下に晒されたとき光合成活性がどのように変化するのか、水利用効率はどうか、生育は良くなるのかということについても調べたいと考えている。また、植物におけるCO<sub>2</sub>感受性は光の強さや乾燥度合いにも依存することがこれまでの知見により明らかとなっている。これらの環境シグナルがどのように相互作用しているのか、分子レベルで明らかにすることにより、それぞれの環境において適応できる植物の開発につながることを期待される。

## 文 献

- 1) Morison, J. I. L. (1987), in *Stomatal Function*. (Zeiger, E., Farquhar, G. D. and Cowan, I. R., Eds), 229-251, Stanford Univ. Press, California
- 2) Hanstein, S. M. et al. (2001), *Sensors Actuators B* 81, 107-114
- 3) Schroeder, J. I. et al. (2001), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52, 627-658
- 4) Vavasseur, A. et al. (2005), *New Phytol.*, 165, 665-682
- 5) Hashimoto, M. et al. (2006), *Nat. Cell Biol.*, 8, 391-397

## ◀国内情報▶

## 葉の角度を変えてイネの収量を増やす

東京大学 大学院農学生命科学研究科  
坂 本 知 昭

作物のバイオマス生産を高めるには、光合成を高める必要がある。葉の総面積が同じでも、個々の葉の着生角度によって上位葉による下位葉への光遮蔽の程度が異なり、個体群の光合成量は変わる。植物ホルモンの1つブラシノステロイドはイネの葉の角度を制御しており、その働きが抑えられた変異体は葉が直立する。これにより太陽光を受ける効率が向上し、施肥量を増やさなくても密植栽培することによって収量を増やすことができた。

## 1. はじめに

現在、世界人口は爆発的なスピードで増加しており、2050年までに89億人を突破すると予想され、それに伴って約5割の食糧増産が必要であると試算されている。一方で耕作可能な土地面積の世界的な減少に伴い、主要穀物生産量の増加傾向は頭打ちとなっており、作物生産性の飛躍的向上は喫緊の重要課題である。

1960年代の「緑の革命」では、半矮性品種と窒素肥料の多施用を組み合わせ、作物の収量を倍加させることに成功した。コムギとイネの「緑の革命」遺伝子は単離されており、それぞれジベレリンの情報伝達因子、生合成酵素をコードしていた<sup>1), 2)</sup>。すなわち植物ホルモンの1つであるジベレリンが、実用的な半矮性形質を付与するためには最適のターゲットであったことを、育種の歴史が証明していると考えることができる。実際に、ジベレリン代謝酵素のキメラ遺伝子を導入し、ジベレリンの生合成を人為的に調節することによって、既存イネ品種を効率的に半矮性化することができた<sup>3)</sup>。

しかし、草丈の減少は光合成器官である葉の面積も減少させることから、物質生産の観点からは不利とも考えられ、半矮性品種を利用した収量の増加には限界があるとされる。さらなる

SAKAMOTO Tomoaki

〒259-0131 神奈川県中郡二宮町中里518番地

多収の追求には、光合成を高めてバイオマス生産を増やす必要性が指摘されている<sup>4)</sup>。

## 2. バイオマス生産に有利な直立葉

個体群の光合成を考える上で、葉面積の総和と土地面積の比、すなわち葉面積指数は大きな要因の1つである。個体群が生育途上で葉面積指数が小さいときは、光合成は葉面積指数に比例して高まるが、葉面積指数がある値以上になると過繁茂の状態となり、葉が相互に光を遮蔽して光合成は増加しなくなる。一方で葉面積指数の増加に伴って葉の呼吸量も増加するため、個体群の純光合成はある葉面積指数のときに最大となる。

葉面積指数と光量が同じでも、受光態勢によって光合成は異なる。すなわち個々の葉の着生角度が水平に近いほど上位葉による光の遮蔽が大きく、下位葉が受ける光量は少なくなり光合成ができなくなる。葉の着生角度が垂直に近い直立葉では、上位葉による光の遮蔽が少なくなることにより個体群内部へも十分な光が進入し、上位葉と下位葉を合わせた光合成は水平に近い葉を持つ個体群のそれよりも高くなる。つまり直立葉という形質により光の利用効率が向上し、同一葉面積指数の条件下でも光合成は高まる。同じ理由から、純光合成を最大にする葉面積指数も、直立した葉を持つ個体群の方がよ

り高くなる。

すなわち、既存の品種に直立葉形質を付与し、密植栽培などによって葉面積指数を高めることにより、バイオマス生産および収量を高めることができると考えられた。

### 3. ブラシノステロイド欠損による直立葉変異体イネ

イネの葉は葉鞘と葉身から構成され、その繋ぎ目にラミナジョイントがある。ラミナジョイントはブラシノステロイドの生物検定に利用されてきたように、ブラシノステロイドに対して鋭敏に反応し、向軸側と背軸側の細胞が偏差的に伸長すると考えられている。実際にブラシノステロイドを処理すると、向軸側の細胞が伸長し、その結果葉身は付け根から屈曲する。一方で、葉身が全く屈曲しない直立葉は、ブラシノステロイド欠損または非感受性変異体の典型的な表現型である（図1）。そこで、ブラシノステロイド欠損に起因する直立葉変異体を選抜し、圃場での栽培試験を行った<sup>5)</sup>。

供試した変異体 *osdwarf4-1* は、独立行政法人農業生物資源研究所が作出した遺伝子破壊系統群「ミュータントパネル」から得られた。イネ品種「日本晴」由来の変異体で、ブラシノステロイド生合成酵素遺伝子 *OsDWARF4* のコード領域にレトロトランスポゾン *Tos17* が挿入されているため、*OsDWARF4* の機能が失われている。

*osdwarf4-1* 変異体は、葉が直立し草丈がやや減少する以外には形態異常を示さなかった。

実際にこの *osdwarf4-1* 変異体を通常の2倍の栽植密度で栽培したところ、同じ栽植密度で栽培した原品種「日本晴」の約1.2倍、慣行法で栽培した「日本晴」と比べると約1.3倍の収穫量を得ることができた（図2）。地上部乾物重も同様に、同じ栽植密度で栽培した「日本晴」の13%増、慣行法で栽培した「日本晴」と比べると34%増えていた。草丈は同じ栽植密度で栽培した「日本晴」の3%減、慣行法で栽培した「日本晴」の6%減であったことから、地上部乾物重および収量の増加には穂数（有効分げつ数）の増加（それぞれ1.3倍、1.6倍）が奏効していると考えられた。バイオマス生産が増加したメカニズムを明らかにするためにはさらに詳細な調査が必要であるが、同様の結果はブラシノステロイド非感受性変異体 *d61* を用いた栽培試験でも得られている<sup>5)</sup>。したがって葉を直立させて受光態勢を高め、さらに密植によって最適な葉面積指数に近づけることにより、施肥量を増やさなくても株あるいは群落全体の物質生産を増加させ、その結果として収量を増やせられることが実証できた。

### 4. イネにおけるブラシノステロイド生合成

イネのブラシノステロイド関連変異体は、解

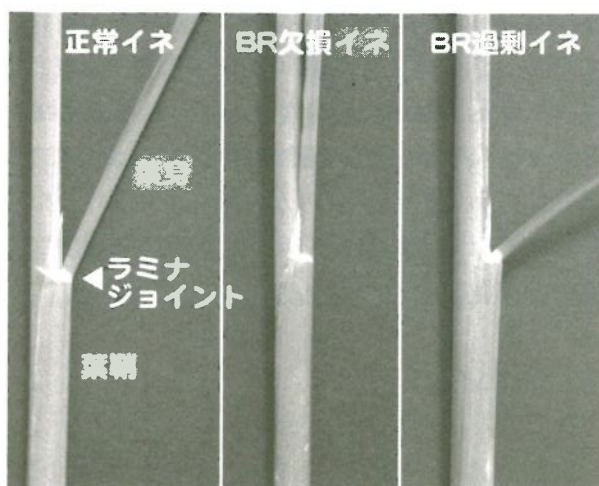


図1 葉身の屈曲とブラシノステロイド

イネの葉は葉身と葉鞘に分けられ、その間にラミナジョイント（葉関節）がある。イネの葉は通常ラミナジョイントの部分から屈曲しているが（写真左）、ブラシノステロイド（BR）の内生量が低下した場合は屈曲が生じない（写真中央）。一方BRを過剰に蓄積すると屈曲の程度も増大する（写真右）。



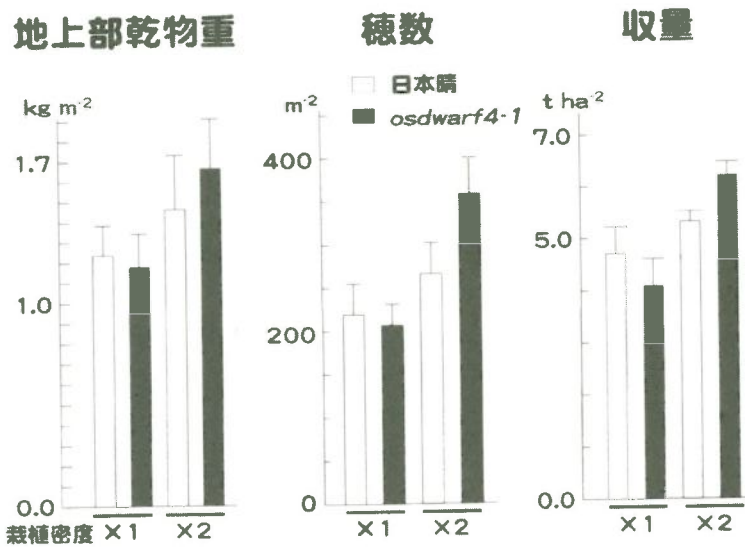


図2 ブラシノステロイド欠損変異体 *osdwarf4-1* の密植栽培試験

直立葉変異体イネ *osdwarf4-1* を通常の2倍の栽植密度で栽培すると、原品種の「日本晴」と比べて地上部乾物重(左)、穂数(有効分げつ数, 中央)、収量(右)のいずれもが増加した。

析中のものも含めて数十系統得られている。それらのほとんどは直立葉以外にも、葉身のねじれ、葉鞘の伸長抑制、矮性、不稔、短粒化など様々な形態異常を示した。したがって、直立葉と軽微な矮性以外には形態異常が認められなかった *osdwarf4-1* 変異体は、既知のブラシノステロイド関連変異体イネのなかで最も弱い表現型を示していると考えられる。その理由は *osdwarf4-1* 変異体の原因遺伝子の解析によって明らかとなった<sup>5)</sup>。

*osdwarf4-1* 変異体の原因遺伝子 *OsDWARF4* は、ブラシノステロイド生合成酵素の1つ CYP90B2 をコードしていた。CYP90B2 はシトクロムP450モノオキシダーゼの1種で、シロイヌナズナにおける同種の酵素 CYP90B1 は、ブラシノステロイド生合成の鍵酵素である。CYP90B1 の機能が失われたシロイヌナズナ変異体は生育が著しく阻害され、強い矮性を含む様々な形態異常が観察された。ところがイネでは、同じ機能を持つ別種のシトクロムP450モノオキシダーゼ CYP724B1 が存在し、CYP90B2 と共にステロイド骨格の22位の炭素の水酸化に関わっていた。

興味深いことに、CYP724B1 の機能が失われた変異体 *d11* では、直立葉や矮性のほかに米粒が短く小さくなるなどの形態異常も生じたが、CYP90B2 の機能が失われた変異体 *osdwarf4-1*

では、前述の通り直立葉と軽微な矮性以外には形態異常が認められなかった(図3)。さらに *osdwarf4-1* と *d11* の二重変異体では活性型ブラシノステロイドが全く検出されず、極めて強い矮性や葉身のねじれ、完全な不稔などの表現型が観察された。すなわち、シロイヌナズナでは CYP90B1 が単独で機能している22位の炭素の水酸化は、イネでは CYP90B2 と CYP724B1 の2つの酵素が冗長的に触媒しており、イネの正常な生育に必要なブラシノステロイド生合成に対しては、CYP724B1 の方が CYP90B1 より強く寄与していることがそれぞれの変異体の表現型から明らかとなった。

実はこのような酵素遺伝子の冗長性は、イネでは他のステップを触媒する酵素にも認められたが、分担の程度はそれぞれの組み合わせで異なっており、1遺伝子の機能欠損によってバイオマス生産の向上に利用可能な表現型を示した変異体は *osdwarf4-1* のみであった。したがって、イネが CYP90B2 と CYP724B1 をどのように使い分けているのかを明らかにすることが、ブラシノステロイドの機能を利用した直立葉品種育成の効率化に役立つものと考えられる。

## 5. おわりに

冒頭で述べたように、「緑の革命」の立役者

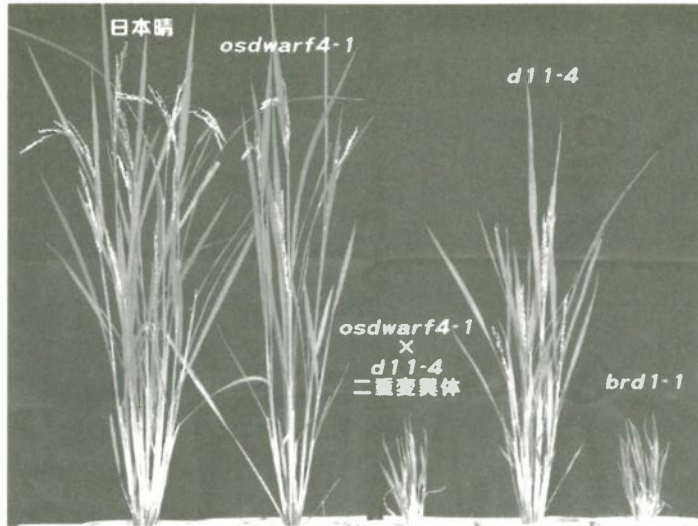


図3 *osdwarf4-1*と*d11-4*および二重変異体の表現型

*osdwarf4-1*と比べて*d11-4*の方が強い矮性を示し、米粒の形も異常となった。写真右端の*brd1-1*は活性型ブラシノステロイドを作れない変異体。*osdwarf4-1*と*d11-4*の二重変異体は*brd1-1*とよく似た表現型を示した。

であった半矮性品種の育成には植物ホルモンのジベレリンが利用されていた。これからの多収性品種育成を考える上で重要な要因の1つであるバイオマス生産の増加には、光合成を高めてソース能力を増強する必要があるが、植物ホルモンのブラシノステロイドを利用した直立葉化による受光態勢の向上は有効な手段の1つであることが示された。さらに最近、イネの一穂あたりに着生する籾数を決定する量的遺伝子座の1つが、植物ホルモンのサイトカイニンを分解する酵素をコードしていることが報告された<sup>7)</sup>。したがって、幼穂におけるサイトカイニンの分解を抑えることにより、一穂あたりの籾数、すなわちシンクサイズを拡大することが可能であることが明らかとなった。ソース能力の増強とシンクサイズの拡大を組み合わせたとき、どれだけの増収が期待できるかは現時点では明らかでない。植物ホルモン間のクロストークが負に働く可能性も否定できない。ただ、イネを材料に用いた植物ホルモン研究の進捗が、各植物ホ

ルモンの機能解明に結びつく基礎生物学的な知見の集積ばかりでなく、農業的な応用に直接結びつくような成果を生み出す可能性が高いことは、最近の研究成果が物語っていると言えるのではないだろうか。

## 文献

- 1) Peng, J. et al. (1999), *Nature*, 400, 256-261
- 2) Sasaki, A. et al. (2002), *Nature*, 416, 701-702
- 3) Sakamoto, T. et al. (2003), *Nature Biotechnology*, 21, 909-913
- 4) Mann, C. C. (1999), *Science*, 283, 310-314
- 5) Sakamoto, T. et al. (2006), *Nature Biotechnology*, 24, 105-109
- 6) Morinaka, Y. et al. (2006), *Plant Physiology*, 141, in press
- 7) Ashikari, M. et al. (2005), *Science*, 309, 741-745

## ◀国内情報▶

レトロトランスポゾン由来の遺伝子*Peg10*  
による哺乳類の胎盤形成

<sup>1</sup>東京医科歯科大学 難治疾患研究所 エピジェネティクス分野,  
<sup>2</sup>東海大学 健康科学部

石野史敏<sup>1</sup>・小野竜一<sup>1</sup>・金児一石野知子<sup>2</sup>

胎盤は哺乳類の“胎生”という個体発生様式とは切り離せない重要な臓器である。わたしたちのグループは、この哺乳類に特徴的とも言える臓器の形成に必須な遺伝子の中に、レトロトランスポゾンに由来し、哺乳類特異的に存在するものを発見した。これは、哺乳類の進化上胎盤形成能力が外来の遺伝子を取り込むことによって獲得されたことを意味している。

## 1. はじめに

胎盤は胎仔と母体と繋ぎ、栄養補給とガス交換を行っている哺乳類の個体発生に重要な臓器である。また、胎仔の子宮内成長不全等には胎盤の異常が深く関係していると考えられる。しかし、いったん子供が生まれてしまえば不要になる臓器であるため、必ずしも多くの注目を集めていたわけではない。われわれの研究室では“哺乳類特異的ゲノム機能”という観点から哺乳類の個体発生を研究しているが、胎盤という“哺乳類特異的臓器”の形成機構は、まさにこの“哺乳類特異的ゲノム機能”が集約される臓器の一つと言っても良いであろう。本稿の主題である*Peg10*は“哺乳類特異的遺伝子発現調節機構”であるゲノムインプリンティングに関わる遺伝子の一つとして、われわれが分離したものである。興味深いことに*Peg10*はレトロトランスポゾン由来の遺伝子であり哺乳類の共通祖先のゲノムに挿入された、いわば、“哺乳類特異的遺伝子”であった。この遺伝子をノックアウトしたマウスの解析から、この“哺乳類特異的遺伝子”は“哺乳類特異的臓器である胎盤”の形態形成に必須の機能を持つことが明らかになった。哺乳類ゲノムの1/3以上は、レトロト

ISHINO Fumitoshi<sup>1</sup>, ONO Ryuichi<sup>1</sup>,

KANEKO-ISHINO Tomoko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台2-3-10

<sup>2</sup>〒259-1193 神奈川県伊勢原市望星台

ランスポゾンの残骸で占められ、これらはこれまではゲノム中のゴミ、または厄介者として片付けられていた。しかし、われわれの実験結果は、この中には哺乳類の進化に重要な役割を果たしたものが存在していることを明らかにした。

2. *Peg10*の発見

*Peg10*とはPaternally expressed (gene) 10の意味であり、父親性発現インプリンティング遺伝子の一つとして、2001年にわれわれがヒトにおいて初めて報告した遺伝子である<sup>1)</sup>。ゲノムインプリンティングは、父親由来・母親由来で伝わる2つの対立遺伝子のうち一方のみを発現させる機構である。これは“哺乳類特異的な遺伝子発現調節機構”であり、なぜ、この機構が哺乳類全体に保存されているのかは、生物学上の大きな謎であった。われわれは、ゲノムインプリンティングの生物学的意義という謎にアプローチするために、最近では幾つかの個体発生に必須のインプリンティング遺伝子に標的を絞ってスクリーニングを行ってきた。

*PEG10*はそのうちのひとつで、母親性重複になると初期胚致死を起こすことが知られているマウス染色体6番近位部のインプリンティング領域と相同性を有するヒト染色体7番q21部位の探索から同定した遺伝子である<sup>1, 2)</sup>。これは父親性発現インプリンティング遺伝子*SGCE*



(sarcoglycan epsilon) の近傍に位置しており、非常に変わった性質を有する遺伝子であった。それは哺乳類の遺伝子としては奇妙なことに、2つのオープンリーディングフレーム (ORF) を有すること、そして第一ORF (ORF1) の最後と第二ORF (ORF2) の始まる部分が重複し、しかも-1フレームずれる構造をしていたことである (図1)。タンパク質の相同性検索をするとORF1, ORF2はそれぞれレトロトランスポゾンの持つGAGとPOLタンパク質と相同性をもっていた (図1)。また、このORF1, ORF2が-1フレームずれる構造は、実はレトロトランスポゾンがGAGとPOLの融合タンパク質を生成する際に使う特徴的な機構であり、実際にそのような機構でORF1とORF2の融合タンパク質が生成する。真核細胞生物でこのようなフレームシフトにより生成する融合タンパク質の例はなく、これらの事実が *Peg10* はレトロトランスポゾンに由来することの決定的な証拠となった。

しかし、*Peg10* の遺伝子配列を調べると、レトロトランスポゾンに特徴的な long terminal repeat (LTR) がその前後には見つからず、またレトロトランスポゾンに必要なPOLタンパク質の逆転写酵素活性部位やインテグラーゼ活性部位等が欠けていた (図1)。すなわち、現在ではこの遺伝子はレトロトランスポゾンと

してではなく、内在性の遺伝子として機能していることが予想された。

もう一つの重要な点は、哺乳類 (正確には真獣類) でこの遺伝子は高度に保存されていることである (図2)。GenBankの登録を調べると、この領域が解析されたすべての哺乳類で *PEG10* 相同遺伝子は見つかり、しかも常に *SGCE* 遺伝子の隣というように位置も保存されていた。これは、*PEG10* の元となったレトロトランスポゾンは現生の哺乳類の共通祖先動物のゲノム中に挿入されたことを意味している。そして、内在遺伝子化して哺乳類に必須の機能を持ったために高度に保存されたものであることが予想された。

### 3. 胎盤

一般にレトロトランスポゾン由来の配列は、ゲノム中で高度にDNAメチル化を受け不活性化されている。しかし、*PEG10* はヒトでもマウスでも胎盤で高発現をしていた。マウスでの解析からの胎仔の脳と脊椎にも発現が見られるが、胎盤での発現量が最も顕著に見られることから、この遺伝子は確かに発現し、おそらく胎盤において重要な機能を果たすと予想された。

マウスにおいて *Peg10* は染色体6番近位部の初期胚致死性を示すインプリンティング領域に

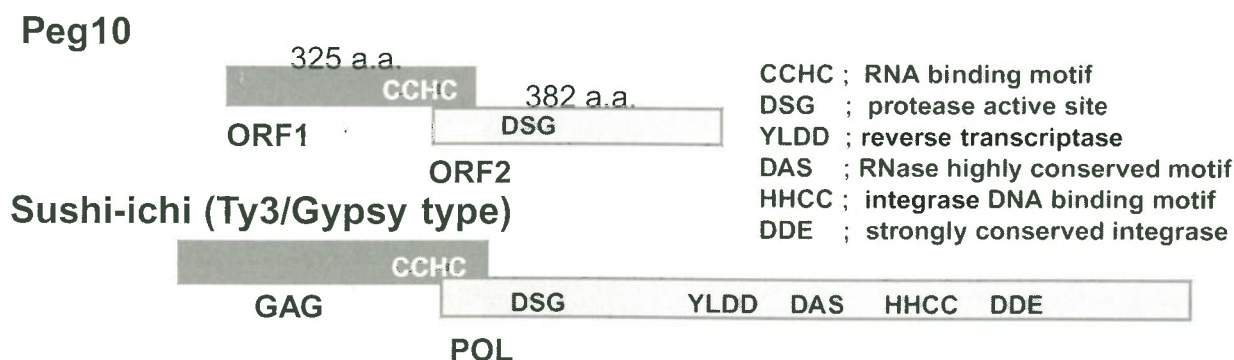


図1 *Peg10* タンパク質の構造

*Peg10* は2つのORFをコードするが、それらはSushi-ichi retrotransposonのGAGとPOLタンパク質に最も高い相同性を示す。RNA結合モチーフ (CCHC)、プロテアーゼ活性中心 (DSG) は保存されているが、POLの後半に存在する逆転写酵素ドメイン (YLDD) 等の幾つかの機能ドメインは欠失している。

ヒト	DWNEPALIDQ	YHEGLSDHIQ	EELSHLEVAK	SLSALIGQCI	HIERRLARAA	245
ヒビ	DWNEPALIDQ	YHEGLSDHIQ	EELSHLEVAK	SLSALIGQCI	HIERRLARAA	245
チンパンジー	DWNEPALIDQ	YHEGLSDHIQ	EELSHLEVAK	SLSALIGQCI	HIERRLARAA	225
ネコ	DWNEPALIDQ	YHEGLSDHIQ	AELSRLEVAK	SLSALIGQCI	HIERRLARAA	225
イヌ	DWNEPALIDQ	YHEGLSDHIQ	AELSRLEVAK	SLSALIGQCI	HIERRLARAA	225
ウシ	DWNEPALIDQ	YHEGLSDHIQ	AELARLEVAK	SLSALIGQCI	HIERRLARAA	300
マウス	DWTEPALMDQ	FOEGLNPDIR	AELSRQEAFF	TLAALITACI	HIERRLARDA	300
consensus	DWNEPALIDQ	YHEGLSDHIQ	AELSRLEVAK	SLSALIGQCI	HIERRLARAA	
ヒト	AARKPRSPPR	ALVLPDVASH	HQVD--PTEP	VGGARMRLTQ	EKERRRKLN	293
ヒビ	AARKPRSPPR	ALVLPDIASH	HQVD--PTEP	VGGARMRLTQ	EKERRRKLN	293
チンパンジー	AARKPRSPPR	ALVLPDIASH	HQVD--PTEP	VGGARMRLTQ	EKERRRKLN	293
ネコ	AARKPRSPPR	ALVLPDIASH	HQVD--PTEP	VGGARMRLTQ	EKERRRKLN	273
イヌ	AARKPRSPPR	ALVLPDIASH	HQVD--PTEP	VGGARMRLTQ	EKERRRKLN	273
ウシ	AARKPRSPPR	ALVLPDIASH	HQVD--PTEP	VGGARMRLTQ	EKERRRKLN	275
マウス	AARKPRSPPR	ALVLPDIASH	HQVD--PTEP	VGGARMRLTQ	EKERRRKLN	344
consensus	AARKPRSPPR	ALVLPDIASH	HQVD--PTEP	VGGARMRLTQ	EKERRRKLN	350
ヒト	LCLYCGTGGH	YADNCPAKAS	KASPAGNSPA	PL-----	-----	325
ヒビ	LCLYCGTGGH	YADNCPAKAS	KASPAGNSPA	PL-----	-----	325
チンパンジー	LCLYCGTGGH	YADNCPAKAS	KASPAGNSPA	PL-----	-----	305
ネコ	LCLYCGNGGH	YADNCPAKAS	KASPAGNSPA	PL-----	-----	305
イヌ	LCLYCGNGGH	YADNCPAKAS	KASPAGNSPA	PL-----	-----	307
ウシ	LCLYCGNGGH	YADNCPAKAS	KASPAGNSPA	PL-----	-----	376
マウス	LCLYCGNGGH	FADTTPAKAS	KNSPEGNSPA	PL-----	-----	400
consensus	LCLYCGNGGH	YADNCPAKAS	KASPAGNSPA	PL-----	-----	

図2 *Peg10* タンパク質は哺乳類に高度に保存されている

*Peg10* のORF1 (GAG相当の部分) のアミノ酸配列の比較。真獣類に属する各種でタンパク質が高度に保存されている。濃い灰色で示したのはRNA結合モチーフ (CCHC) に相当している。ORF2 (POL相当の部分) も長さが短くなっているものの同様の保存性を示す。

存在することは前述したが、この場合、初期胚致死とは“胎児期11.5日には生存している胎児が見つからない”という意味であり、実際にはどのような形で致死性が現れているのか、その詳細は知られていなかった。しかし、母親由来のゲノムのみをもつ雌性単為発生胚は胎盤形成不良のため初期胚致死となることは、ゲノムインプリンティング現象が発見されるもととなった有名な事実であり<sup>3, 4)</sup>、初期胚致死の原因として胎盤形成不全の可能性は高く、*Peg10* が胎盤で高発現することは、このインプリンティング領域の原因遺伝子候補として非常に有望であると思われた。

#### 4. *Peg10* KOマウス

*Peg10* の存在するインプリンティング領域は

少なくとも1 Mbにおよび、少なくとも4つの母親性発現遺伝子 (*Neurabin*, *Pon3*, *Pon2* および *Asb4*) と2つの父親性発現遺伝子 (*Sgce* と *Peg10*) が含まれる<sup>5)</sup>。この中から初期胚致死の原因遺伝子の候補としてわれわれは *Peg10* のKOマウスの作製・解析を行った。*Peg10* と *Sgce* はプロモータ領域が近接し、それから逆方向に転写される。この複合プロモータ領域には、このインプリンティング領域全体を制御するDMR配列 (differentially methylated region) が存在している。そのため *Peg10* KOマウスでは、この領域に影響を与えないよう *Peg10* タンパク質のコーディングフレーム (ORF1とORF2) のみを除いたコンストラクトを使用した。

*Peg10* をノックアウトしたES細胞からは、幸運なことに非常に良いキメラマウス (オス)

が2匹得られ、数度の交配によってES細胞に由来することを示すアグーチ色の毛を持つ仔が高頻度で生まれた。しかし、すべて野生型のマウスばかりで、*Peg10* KO遺伝子をオスキメラマウスから受け取ったものは一匹もいなかった。*Peg10*は父親性発現インプリンティング遺伝子であるため、父親由来の遺伝子のみしか発現しない。このため、オスキメラマウスから *Peg10* KO遺伝子が伝わっただけ（ヘテロな状態）で致死になる可能性は予想された。実際、毎回の出生数をみると4-5匹と正常の出生数の半分であり、約半数が出生前に死んでいる可能性が高まった。そこで、このオスキメラマウスと正常メスを交配し、色々な妊娠時期に解剖してみた。その結果、胎仔期9.5日目までは *Peg10* KOマウスは正常マウスと成長に全く差はなく子宮内に存在していること、しかしこの時期で発生が止まるため10.5日目では胎仔、胎盤ともに成長に大きな差が生じていることが明らかとなった<sup>6)</sup> (図3)。*Peg10* KOマウスの胎盤では迷路部と海綿状栄養膜層が欠落しており、胎盤機能を全く果たしていないことが予想された。その結果、初期胚致死が起こるといふ当初の予想通りの結果が得られた。しかし、これの最終証明のためには正常な胎盤機能を持たせた場合には、*Peg10* KOマウスが生まれることを確認する必要があった。

野生型の受精卵を2細胞期で細胞融合すると4倍体の細胞ができる。この4倍体細胞は胎仔には分化できないが、胎盤にはなることができるため、胎盤形成不全のマウスの間でキメラを作製すると、その致死性を救うことができる。これはテトラプロイドレスキュー法と呼ばれる発生工学的手法であるが、これを *Peg10*

KOマウスに応用したところ、途中経過として胎仔期の12.5日目、15.5日目まで成長している胎仔が存在すること、そして最終的に数匹が出生まで至ることを確認した。これらは出生時には70%位の小さい仔として生まれたが、3ヶ月程で正常体重に追いついた。メスの *Peg10* KOマウスはオスと正常に交配し正常に出産した。メスからは *Peg10* KO遺伝子は問題なく伝わるため、*Peg10* KOマウスのラインも確立できた。この家系から *Peg10* KOがオスから伝わる時に、再び胎盤形成不全による初期胚致死が現れることも確認できた<sup>6)</sup>。

## 5. おわりに (*Peg10* KOマウスが明らかにしたこと)

*Peg10* 遺伝子はレトロトランスポゾンに由来する哺乳類特異的遺伝子であり、これが哺乳類特異的臓器である胎盤の形成に必須の機能を果たしていたことが、今回の実験で明らかになった。これにはいくつか重要な意味が含まれてい

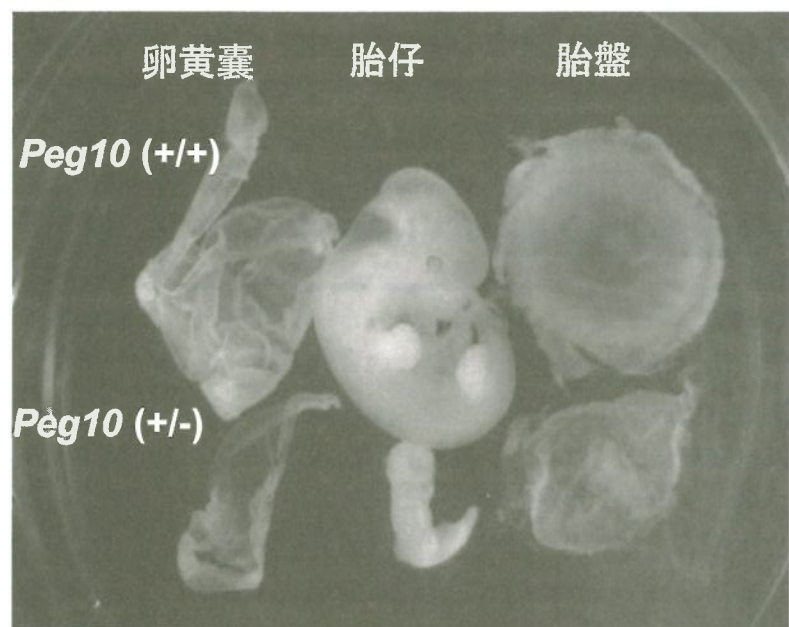


図3 *Peg10* KOマウスの初期胚致死性  
*Peg10* KO遺伝子を父親から受け継ぐと、胎盤形成不全のため胎仔期9.5日目で発生が止まる。写真は胎仔期11.0日目のもので、胎児、胎盤の成長に大きな差が出ていることがわかる。



るであろう。哺乳類ゲノムの1/3以上を占めるレトロトランスポゾン由来の配列の中に、哺乳類の機能に必須なものが存在していたこと。また、それが哺乳類に特異的な機能をもつことは、レトロトランスポゾンが哺乳類の胎盤形成、ひいては胎生機構の獲得を通じて哺乳類という生物の誕生に大きな役割を果たしたということである。これまで、生物の進化は、ダーウィン流の漸進的で連続的な変化によって起きると考えられてきた。しかし、今回の実験は、哺乳類の胎盤形成という新規ゲノム機能の獲得には、レトロトランスポゾンの挿入という不連続点が存在することを明らかにした。これは、今後、多くの生物においてレトロトランスポゾンが進化に重要な寄与を果たした証拠が見つかる可能性

を示唆していると考えている。

## 文 献

- 1) Ono, R. et al. (2001) Genomics 73, 232-237.
- 2) Beechey, C. et al. (2003) <http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/research/imprinting/>
- 3) Surani, M. A. et al. (1984) Nature 308, 548-550.
- 4) McGrath, J. et al. (1984) Cell 37, 179-183.
- 5) Ono, R. et al. (2003) Genome Res. 13, 1696-1705.
- 6) Ono, R. et al. (2006) Nat. Genet. 38, 101-106.



ブレインテクノニュース  
バックナンバーのご案内  
第115号  
2006年5月15日発行

### 総 説

同質遺伝子系を活用したイネいもち病の防除  
.....小泉 信三・安田 伸子

### 国内情報

「メンデル優性の法則を分子レベルで解明」—アブラナ科植物の自家不和合性でみられる花粉側S決定因子の優劣性現象について .....柴 博史・高山 誠司  
クワは乳液で昆虫から身を守る—植物の乳液に農薬・医薬の宝庫としての可能性 .....今野 浩太郎  
ヒストンメチル化酵素Meisetzによる減数分裂の制御  
.....松居 靖久・林 克彦  
超チャネルの分子移植による環境浄化型「スーパー細菌」の創成  
.....宮本 裕希子・麻生 祐司・橋本 渉・村田 幸作

農業機械に対する排出ガス規制の動向と排出ガス試験設備

.....清水 一史・杉浦 泰郎・高橋 弘行  
.....積 栄・千葉 大基

### 地域の先端研究

微生物コーティング種子を利用したレタスビッグベイン病の防除法の開発 .....相野 公孝・橋本 好弘・石川 浩一

### 文献情報

インヒビリンに対する能動免疫がウシの発情周期における性腺刺激ホルモンの分泌と卵胞の消長に及ぼす影響

.....(抄訳：下司 雅也)

過酸化水素は気孔ABAシグナル伝達経路で一酸化窒素の上流に位置する .....(抄訳：岩井 純夫)

*Bifidobacterium breve*の発酵上清は、TLR2を介して樹状細胞の成熟、活性化およびその生存を誘導する

.....(抄訳：畑中 美咲)

組換え体大豆シスタチンや牛血漿を魚肉フィレに浸漬、もしくはインジェクションすることでプロテアーゼ活性を阻害する

.....(抄訳：久保田 光俊)

### 生研センターからのご案内

## ◀国内情報▶

## 1 精子から母性遺伝の分子機構に迫る

<sup>1</sup>東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻,<sup>2</sup>前 Boyce Thompson Institute at Cornell University西村芳樹<sup>1, 2</sup>・成瀬清<sup>1</sup>

今回我々は精子のミトコンドリア核様体を可視化する技術の開発をとおり、精子のミトコンドリア核様体が精子の発達過程で減少し、受精直後に消滅する様子を観察した。さらに赤外線レーザー顕微鏡（光ピンセット）で回収した1精子の分子解析により、核様体消滅に伴うミトコンドリアDNAの完全な破壊を確認した。片親ミトコンドリア/葉緑体DNAの積極的破壊は真核生物に広く共通する普遍的な母性遺伝の分子機構であるのかもしれない。

## 1. はじめに

有性生殖にあつて、両親の遺伝子はメンデルの法則に従つて子孫に寄与される。しかし、このほぼ普遍的な法則においても例外は存在する。

1909年、ドイツの遺伝学者CorrensとBaurは、それぞれ独立に非メンデル遺伝を発見した。Corrensはオシロイバナ (*Mirabilis jalapa*) の葉の斑入りの遺伝様式に着目し、これが母親のみから遺伝することを見いだした<sup>1)</sup>。そして一方Baurはゼラニウム (*Pelargonium zonale*) の斑入りが両性遺伝することを示した<sup>2)</sup>。その後の詳細な電子顕微鏡観察より、この奇妙な遺伝様式が、細胞核ではなく葉緑体に由来するのではないかという仮説が得られた<sup>3)</sup>。遺伝情報の担体として葉緑体DNAの存在が証明されたのは、それよりほぼ半世紀経た1963年のことである<sup>4)</sup>。

葉緑体における研究とは独立に、1950年代、ミトコンドリアもまた非メンデル遺伝因子として、アカパンカビや酵母を材料として盛んに研究された<sup>5)</sup>。そして1970年代、ほ乳類（ロバ、ウマ）におけるミトコンドリアDNAの母性遺伝が発見されたことを皮切りに<sup>6)</sup>、マウス<sup>7)</sup>、

NISHIMURA Yoshiki<sup>1, 2</sup>, NARUSE Kiyoshi<sup>1</sup><sup>1</sup>〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1<sup>2</sup> Ithaca, NY 14850, USA

ショウジョウバエ<sup>8)</sup>、さらにヒト<sup>9)</sup>等において次々に報告され、今日ではミトコンドリアや葉緑体遺伝子の非メンデル遺伝はほぼ全ての真核生物に共通する普遍的な現象であることが明らかになっている。

## 2. 母性遺伝研究の現在

非メンデル遺伝のうち、代表的なのは母性遺伝である。今日、母体遺伝を基盤とする様々な技術が実用化されている。たとえば、ミトコンドリア遺伝子の情報は、母性遺伝するという特徴から実用面では親子鑑定や犯罪捜査の手がかりとして<sup>10)</sup>、学術的には様々な生物種の分子系統解析やヒト集団間の遺伝関係解析のための資料として、さらには人類の進化と起源（ミトコンドリア・イブ）を探る手段<sup>11)</sup>として様々な活用されている。一方葉緑体は、遺伝子改変による有益蛋白質の大量生産が比較的容易であることから、遺伝子改変作物開発の上での新たな鍵として欧米で注目されているが、その大きな利点は、葉緑体遺伝子が母性遺伝するため、改変遺伝子が花粉を通して外界を汚染することがなく、より環境に安全である点であると言われている<sup>12)</sup>。

しかしなぜミトコンドリア (mt) や葉緑体 (cp) のDNAは母性遺伝するのだろうか？ これまで、「雄配偶子（精子）のサイズは雌配偶

子（卵子）に比べて圧倒的に小さいため、精子はごく少量のmt/cpDNAしか持ち込まない、「受精の際、精子のミトコンドリア／葉緑体（色素体）は卵に侵入しない」といった仮説があった<sup>13)</sup>。しかしこれに対する大きな矛盾として、単細胞緑藻クラミドモナス<sup>14)</sup>や細胞性粘菌<sup>15)</sup>では雄と雌が全く同じ大きさの配偶子で生殖を行うにも関わらず、mt/cpDNAが母性遺伝することが知られていた。近年までに、これらの生物では片親のmt/cpDNAが積極的に破壊されてしまうことが明らかになってきた。卵子-精子で生殖を行う動物（マウス）においても、雄のmtDNAが受精後に分解されることが示され<sup>16)</sup>、そして排除のメカニズムとして、精巣におけるmtDNAの複製が抑制されたり、精子のミトコンドリア蛋白質がユビキチン-プロテアソーム蛋白質分解系により破壊される可能性が提唱されてきた<sup>17)</sup>。しかしその詳細については、未だその一角が見えてきたというにすぎない。

### 3. ミトコンドリア／葉緑体核様体を観る

mt/cpDNAは細胞あたり多コピーで存在する。しかしそれらは裸で存在するわけではなく、幾つかのコピーが蛋白質と結合してmt/cp核様体とよばれる複合体をつくる。mt/cp核様体は、mt/cpDNAの複製、転写、翻訳、組み替え、遺伝の基本的なユニットであると考えられている。

mt/cp核様体は、DNAを染色する色素（DAPI, SYBR Green Iなど）を用いることで可視化することができる。mt/cp核様体の挙動の観察は、これまで母性遺伝の研究において有効な手段として活用され、その中で多くの興味深い観察が報告されてきた。たとえば単細胞緑藻クラミドモナス（*Chlamydomonas reinhardtii*）において、cp核様体はDNA特異的蛍光色素DAPI（4,6-diamino-2-phenylindole）染色法により観察されるが、雄のcp核様体は接合後1時間以内に完全に見えなくなってしまう

う<sup>18)</sup>。粘菌も同型配偶子が融合することで生殖をおこなうが、接合後片親由来のミトコンドリア核様体が選択的に消失してしまう<sup>19)</sup>。また藻類、シダ、コケ、高等植物といった様々な生物では、多くの場合ミトコンドリアや色素体（葉緑体）の核様体が雄配偶子（精子、花粉）の成熟過程で消失する<sup>20)</sup>。

一方、動物のmt核様体の可視化は難しく、これまで殆ど報告が無かった。ミトコンドリアはダイナミックに融合分裂を繰り返す、それぞれがお互い相補しあうことで一つのユニットとして機能しているといわれる<sup>21)</sup>。その柔軟性を実現するため核様体構造は簡素で脆弱であるのかもしれない。それらを可視化するためには、化学固定をせずに生きた細胞で、しかもより高感度でDNAを染色する技術の開発が必要とされた。様々な色素を検討した結果、高感度なDNA特異的色素SYBR Green Iと、ミトコンドリア膜電位感受性色素Mitotrackerの二重染色により、メダカの生きた精子でミトコンドリア構造とmtDNAを同時に観察することに成功した<sup>22)</sup>。

メダカでは精子形成過程について詳細な観察がなされてきた<sup>23)</sup>。この手法でまずメダカの精子形成過程を観察したところ、精細胞に比べて成熟した精子ではmtDNAコピー数は1/5程度に減少して、およそ50~100コピーになることが示された。そして受精後の精子を観察すると、ミトコンドリア膜構造は依然としてはっきり観察されたにも関わらず、mt核様体は消失していた（図1）。

### 4. 1精子から母性遺伝の分子機構に迫る

核様体の蛍光シグナルの消失に関しては、DNAの分解ではなく拡散、あるいは蛍光色素の退色のためであるとする反論があった。この議論について決着をつけるため、mt核様体をもつ精子、もたない精子を顕微鏡で観察した後、1精子を赤外線レーザー顕微鏡「光ピンセツ



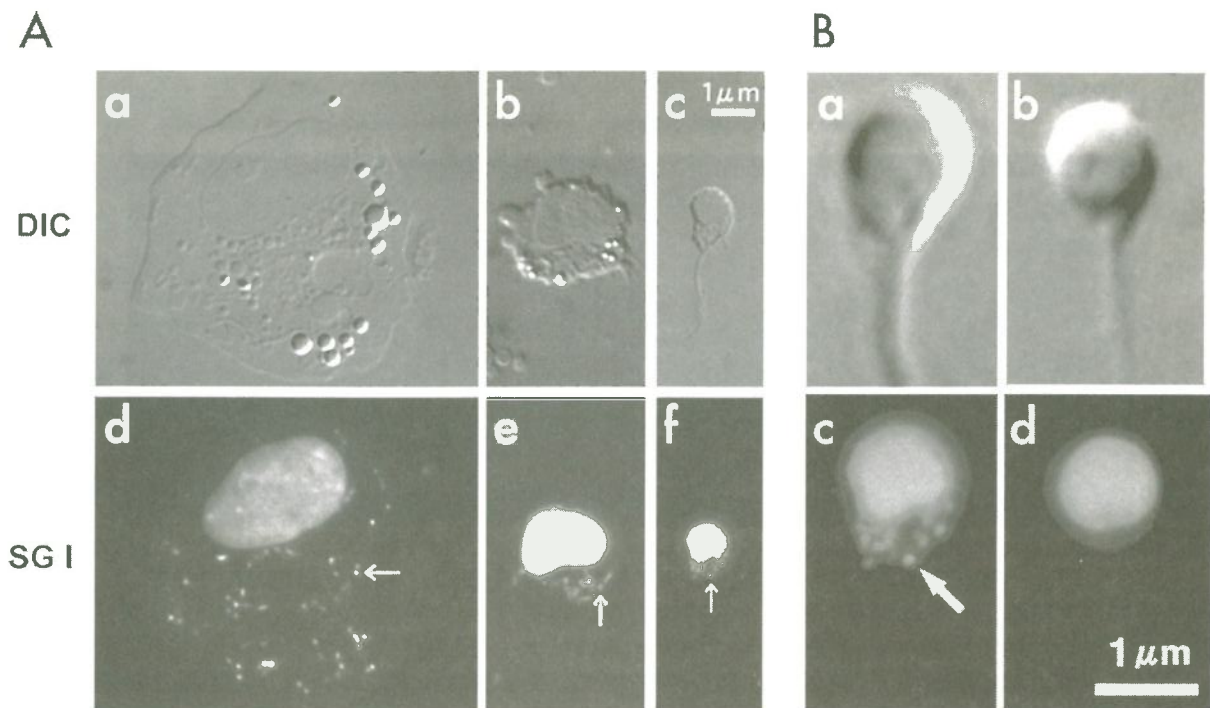


図1 受精前後における精子ミトコンドリア核様体の動態

受精前 (A) と後 (B) の精子の明視野像 (DIC) と SYBR Green I 蛍光像 (SGI)。(A) 未成熟な細胞では、mt核様体 (矢印) が明瞭に観察されたが、精子の成熟に従って著しく数が減少し、成熟した精子では細胞核あたりの mtDNA 量は 1/5 程度まで減少して 50~100 コピー程度になった。(B) 受精直後、mt核様体の蛍光 (矢印) は依然として明瞭に観察されたが (c)、約 1 時間後には観察されなくなった (d)。

ト」で捕捉して試験管内に回収して解析することを試みた。

光ピンセットとは、強力に集光された赤外線レーザーを細胞に照射すると、細胞と光子の相互作用の結果として、細胞が赤外線レーザー光の焦点に捕捉される現象を利用し、顕微鏡下で細胞を非接触的にピンセットのように操作できる技術のことである。この技術を用いて、我々は狙った細胞を光ピンセットによって単離し、そのまま試験管内に回収する技術の開発に成功していた<sup>24)</sup>。

今回我々はまず精子を蛍光顕微鏡で観察し、mt核様体のある精子、ない精子を狙って試験管に回収した。そして mtDNA の有無を高感度な nested PCR 法により解析した結果、蛍光顕微鏡で観察された mt核様体の消失とともに、

mtDNA が完全に分解されてしまうことを分子レベルで確認することができた (図 2)。

精子ミトコンドリアは、動物では受精後卵内で分解される。興味深いことに、今回精子の mtDNA の破壊はその他の構造の分解よりも早く観察された。何故 mtDNA は他の構造よりも先に破壊されなければならないのだろうか？この疑問に対する明確な説明は得られていないが、一つの可能性として次のようなものが考えられる。

精子は精巣において酸化ストレスに曝されると考えられている<sup>25)</sup>。mtDNA は細胞核に比べて酸化ストレスに対してより脆弱であり、それゆえ mtDNA は酸化ストレスの「見張り番」として働くという説も提唱されている<sup>26)</sup>。雄 mtDNA の損傷が次世代に遺伝することを防ぐ

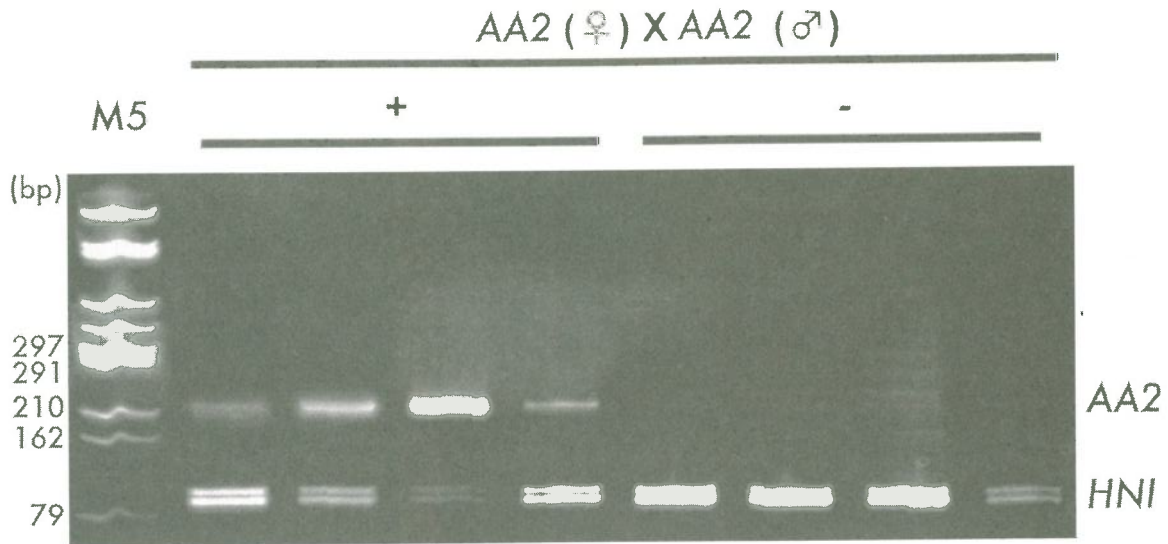


図2 受精後の精子ミトコンドリア核様体の消失にともなうmtDNAの分解

ミトコンドリア核様体のある精子（+）と核様体のない精子（-）を光ピンセット法により選り分けて試験管内に回収し、精子1個からmtDNA（NADHデヒドロゲナーゼ配列）をシングルセルPCRにより検出した。交配はメダカAA2系同士で行ったが、PCRの内部ポジティブコントロールとして、異なる*HinfI*認識部位をもつ*HNI*系の配列を用いた。mtDNAの配列は、ミトコンドリア核様体のある精子からはほぼ確実に検出されたが、ミトコンドリア核様体の消失とともに、AA2系のmtDNA配列は全く検出されなくなった。

ためには、雄mtDNAをミトコンドリアに閉じ込めたまま速やかに破壊することは有効な策なのかもしれない。

## 5. おわりに

今回の研究から、ヒトを含む動物から粘菌、シダ、コケ、藻類、高等植物にいたるまで、片親のmt/cpDNAの破壊が真核生物に広く共通する母性遺伝の分子機構である可能性が見えてきた。一方で、当然それぞれの生物種が独自の機構を発達させている可能性も想像に難くない。片親のmt/cpDNAの破壊を担う酵素群、および破壊を制御する分子機構の解析を進め、さらに様々な生物間における共通点や相違点を一つ一つ明らかにしていくことで、母性遺伝機構の全体像が理解出来るのではないかと思われる。

## 文 献

- 1) Correns, C. (1909) *Z. Vererbung* 1, 291-329.
- 2) Baur, E. (1909) *Z. Vererbung* 1, 330-351
- 3) Kirk, J. T. O., Tilney-Bassett, R. A. E. (1978) *The plastids 2nd ed.*, (Elsevier, Amsterdam).
- 4) Sager, R. & Ishida, M. R. (1963) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 50, 725-30
- 5) Gillham, N. W. (1994) *Organelle genes and genomes*, (Oxford University Press, New York) .
- 6) Hutchison, C. A., 3rd, Newbold, J. E., Potter, S. S. & Edgell, M. H. (1974) *Nature* 251, 536-8
- 7) Hayashi, J. I., Yonekawa, H., Gotoh, O., Watanabe, J. & Tagashira, Y. (1978) *Biochem Biophys. Res. Commun.* 83, 1032-8
- 8) Reilly, J. G. & Thomas, C. A., Jr. (1980)

- Plasmid* 3, 109-15
- 9) Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M. & Wallace, D. C. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 77, 6715-9
- 10) Budowle, B., Allard, M. W., Wilson, M. R. & Chakraborty, R. (2003) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 4, 119-41
- 11) Cann, R. L., Stoneking, M. & Wilson, A. C. (1987) *Nature* 325, 31-6
- 12) Daniell, H., Khan, M. S. & Allison, L. (2002) *Trends Plant Sci.* 7, 84-91
- 13) Ankel-Simons, F. & Cummins, J. M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 13859-63
- 14) Sager, R. & Lane, D. (1972) *Proc Natl. Acad. Sci. U S A* 69, 2410-3
- 15) Kawano, S., Anderson, R. W., Nanba, T. & Kuroiwa, T. (1987) *J. Gen. Microbiol.* 133, 3175-82
- 16) Kaneda, H. et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92, 4542-6
- 17) Sutovsky, P. et al. (1999) *Nature* 402, 371-2
- 18) Kuroiwa, T., Kawano, S., Nishibayashi, S. & Sato, C. (1982) *Nature* 298, 481-3
- 19) Moriyama, Y. & Kawano, S. (2003) *Genetics* 164, 963-75
- 20) Kuroiwa, T. (1991) *Int. Rev. Cytol.* 128, 1-60
- 21) Hayashi, J., Takemitsu, M., Goto, Y. & Nonaka, I. (1994) *J. Cell Biol.* 125, 43-50
- 22) Nishimura, Y. et al. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103, 1382-7
- 23) Iwamatsu, T. (2004) *Mech. Dev.* 121, 605-18
- 24) Nishimura, Y. et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 12577-82
- 25) Bennetts, L. E. & Aitken, R. J. (2005) *Mol. Reprod. Dev.* 71, 77-87
- 26) O'Connell, M., McClure, N. & Lewis, S. E. (2002) *Hum. Reprod.* 17, 1565-70



### ブレインテクノニュース

バックナンバーのご案内

第114号

2006年3月15日発行

#### 特集 「メタボローム解析」

- 1 メタボローム解析—基本原理と代謝物分析・データ解析技術の現状……………草野 都・斉藤 和季
- 2 ツールとしてのメタボロミクス—ゲノム機能科学への応用と今後の展望……………平井 優美・峠 隆之・斉藤 和季

#### 国内情報

- 花芽形成メカニズムの理解にむけて……………阿部 光知・荒木 崇  
 生体分子のデジタル精密計測—ライフサーベイヤー  
 ………………松永 是・田中 剛  
 倒伏抵抗性極強の水稲長稈品種の育成経過および水稲育種に  
 おける作物学の果たす役割……………大川 泰一郎

森林セラピーの生理的リラックス効果ならびにガン抑制効果

……………李 卿・川田 智之・朴 範鎮・宮崎 良文  
 有毒アオコ原因藍藻マイクロキスティス属に感染するウイルスの  
 発見……………長崎 慶三・高島 ゆかり・外丸 裕司・

白井 葉子・高尾 祥丈・広石 伸互・吉田 天士  
 農業機械の性能と価格の統計的分析……………大西 正洋

#### 地域の先端研究

低グルテリン米新品種「ゆめかなえ」の育成

……………齋藤 幸一・林 玲子・西川 康之・  
 長島 正・渡邊 智子・土橋 昇

#### 文献情報

加熱乾燥精子頭部のウシ成熟卵子細胞質内への顕微授精後の  
 体外での発生能……………(抄訳：下司 雅也)

耐塩性モデル植物 ソルトクレス……………(抄訳：岩井 純夫)

X線小角散乱を用いた、セルラーゼの多面的な立体構造分析  
 ………………(抄訳：目瀬 友一郎)

コイ骨格筋由来普通筋及び血合筋の生化学的性状  
 ………………(抄訳：水口 亨)



## ◀国内情報▶

## ウナギ大回遊の謎はどこまで解けたか？

東京大学 海洋研究所

塚 本 勝 巳 ・ 青 山 潤

2005年6月7日、学術研究船「白鳳丸」(海洋研究開発機構)はマリアナ沖スルガ海山付近で、眼も口も出来ないニホンウナギ *Anguilla japonica* の孵化仔魚(プレプトセファルス)を多数発見した。世界初、ウナギの産卵現場をピンポイントで特定した瞬間であった。この発見はテレビ、新聞、雑誌に大きく報道された。しかしこれは単に産卵場の位置が明らかになったに過ぎない。これからが本当の研究の始まりである。どんなルートを通って産卵場にやってくるのか？産卵水深は？オリエンテーションのメカニズムは？ペア産卵か集団か？そもそもウナギはなぜ何千キロも離れた産卵場まで回遊しなくてはならないのか？興味は尽きない。

## 1. ウナギ産卵場調査

一般にウナギの生態は謎に包まれているといわれるが、中でも第一級の謎が産卵場問題である。20世紀の初頭、海洋学の巨人ヨハネス・シュミットは、大西洋のアメリカウナギ *A. rostrata* とヨーロッパウナギ *A. anguilla* は共にサルガッソー海で産卵することを突き止めた。これに触発されて我国におけるウナギの産卵場調査もすでに1930年代から散発的に行われていたらしい。しかし1973年になると、東京大学海洋研究所の白鳳丸を用いて、いよいよ本格的なウナギの産卵場調査が始まった(第1次白鳳丸ウナギ航海)。1991年の第5次ウナギ航海では、10mm前後のレプトセファルス(アナゴ、ハモ、ウツボなどウナギの仲間の透明な柳の葉状の仔魚の総称)が約1000尾採集され、産卵場はマリアナ諸島西方海域にあることがほぼ確定した<sup>1)</sup>。この時点で太平洋のウナギ産卵場研究も大西洋のそれに並んだ。

しかしここで注意しなくてはならないことがある。ヨハネス・シュミットの発見があまりにもインパクトが強かったので、人々は皆ウナギの産卵場問題はすっかり解明されたと思ってしまった。しかし現実には、サルガッソー海とい

TSUKAMOTO Katsumi, AOYAMA Jun

〒164-8639 東京都中野区南台1-15-1

う百万平方キロ以上もの広い範囲を産卵の可能性のある海域として推定したに過ぎず、卵や生まれたての孵化仔魚を採集して実際にウナギの産卵現場を押さえたわけではなかった。サルガッソー海ほど広くはないがニホンウナギの場合もやはり同様で、1991年の時点では産卵地点をピンポイントとして特定できてはいなかった。

## 2. 二つの仮説

そこで我々は、ニホンウナギについて産卵の現場をピンポイントで特定するために、二つの仮説を考えた<sup>2)</sup>。場所を特定する「海山仮説」と産卵のタイミングを決める「新月仮説」である。海山仮説はこれまでの全ての調査から得られたニホンウナギのレプトセファルスの分布データに体サイズ、海流、海底地形の情報を総合して導き出された(図1)。すなわち、ニホンウナギは西マリアナ海嶺の北緯15°東経142.5°前後の3つの海山(スルガ、アラカネ、パスファインダー)のいずれかで産卵するというものである<sup>2)</sup>。一方新月仮説は、内耳にある耳石(じせき)の日周輪に基づく孵化日解析から出てきた説で、ニホンウナギは産卵期に毎日だらだらと産卵するのではなく、各月の新月前後に、同期して一斉に産卵するというものである<sup>2)</sup>。同様の解析はまだ大西洋のウナギ2種について行

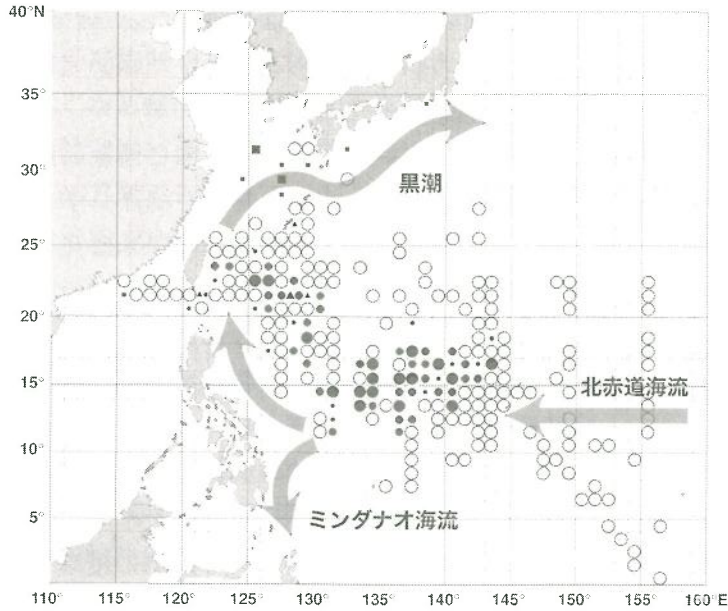


図1 外洋におけるウナギ仔稚魚の分布  
1956—2002年までに行われた31回の研究  
航海で採集された計2418個体の採集測点を  
示す。●はレプトセファルス、▲は変態仔  
魚、■は海洋シラスの採集測点をそれぞれ  
示す。記号の大きさはその測点の採集個体  
数に対応する（小：1個体，中：2—9個  
体，大10個体以上）。○は採集努力を払っ  
たにもかかわらず、ウナギの仔稚魚が採集  
されなかった測点を示す。海山仮説の3つ  
の海山（スルガ海山，アラカネ海山，パス  
ファインダー海山）はおよそ北緯15° 東経  
142.5°にある。

われてはいないけれども、おそらく大西洋のウナギもサルガッソー海で新月に産卵しているに違いない。

ではなぜ海山なのか？これらの海山はどれも水深3000～4000mの海底から海面下10～40mの表層まで、海中にそびえ立つ富士山（3776m）クラスの高い山々である。これらの海山は東アジアから約3000kmの大回遊をしてきたニホンウナギの雌と雄が集合する「約束の地」であり、「出会いの場」である。また、新月のあとに遅れて産卵場へ辿りついたウナギが次の新月の日まで待機する「待合所」でもある。さらに、これら西マリアナ海嶺の海山はかつて火山であったことから、ここには磁気異常が生じている。東アジアから南下して産卵場へ至るウナギが、これらの海山列を「道標」として使っている可能性もある。また新月の夜の一斉産卵は受精率を高め、被食を減らして有利である。このように考えると、ウナギの産卵回遊生態は何千万年もかけて実に巧妙に仕組まれたシナリオであることがわかる。

さらに、特定の海山という狭い地点でニホンウナギの産卵が行われるのには、また別の意味がある。海山は東アジアの全域に広がっている親の分布域と比べると、広い海の中ではほとん

どピンポイントともいえる。海の中には特定の海流によって構成される「回遊の道」があり、遊泳力の乏しいウナギのレプトセファルスはこの道を辿って回遊している<sup>1)</sup>。ニホンウナギの仔魚にとって回遊の道とは、北赤道海流とそれに続く黒潮である（図1）。産卵が通常より南で起こった場合は、ミンダナオ海流に取り込まれてしまう<sup>2)</sup>。北過ぎると、黒潮に乗り換える前に黒潮逆流の渦の中に取り込まれて、いずれの場合も死滅回遊（無効分散）となってしまう。子供のレプトセファルスが細い道を辿って首尾よく東アジアにやってくるには、親ウナギは決まった道の上流部のピンポイントに、正確に卵を産み出してやらねばならない。ニホンウナギの産卵場が海山であるのは種の歴史的必然である。

### 3. 産卵地点の特定

上記2仮説を着想した1994年から、これに基づいて調査を継続してきたが、10年余り目覚ましい成果は得られなかった。1998年にはドイツ・マックスプランク研究所の小型潜水艇JAGO（ヤーゴ）号（2人乗、最大潜水深度400m）で、産卵中の親ウナギを海山斜面で探

索したが、これも空振りに終わった。

しかしついに昨夏、第12次白鳳丸ウナギ航海でBig Fishと名付けた大型プランクトンネットを開発して調査に臨み、まだ眼も口も未発達の前レプトセファルス（2日齢）を約400匹採集することに成功した（図2）<sup>4)</sup>。それは6月7日の新月、スルガ海山の西方約100kmの地点であった。海山周辺で産卵された卵は西向きの海流で流されるので、二つの仮説は正しかったとあってよい。

今回の発見により、我が国70余年のウナギ産卵場調査に幕が引かれた。新聞やテレビの取材で「産卵場がわかってよかったですね。ウナギの仕事が終わると、次は何をするんですか？」とよく聞かれる。しかし、実はウナギ研究はこれからが本番なのである。今回明らかとなった産卵場を基点に、様々な方向に研究が発展する。産卵水深は？ペア産卵か、集団か？親ウナギの回遊ルートは？なぜ何千キロも旅をしなくてはならないのか？資源変動はどうして起こるか？問題は山積している。これらを解くには、生態学、生理学、水産学のみならず、地球科学、海洋物理学、海洋化学、分子生物学など、総合的な知識と人々の協力が必要だ。ひたすら産卵場

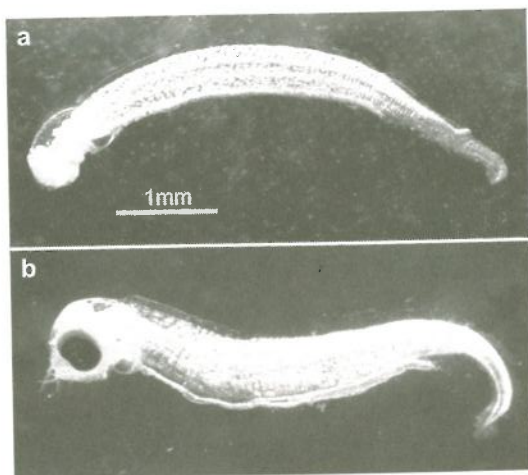


図2 2005年夏の研究航海で採集されたウナギの前レプトセファルス (Aoyama et al., unpublished)

a: 全長5.0mm (2日齢)。目や口が未発達で大型の油球を持つ。b: 全長4.2mm (4日齢)。目や口が発達し油球は小さくなっている。

を求め続けた冒険の時代は終わった。これからが真の科学の始まりである。ウナギの研究はいよいよ佳境に入ったといえる。

我々がやっているウナギの産卵と回遊に関する生態学的研究は、基礎生物学や海洋科学の発展に寄与するだけでなく、40年の開発研究にもかかわらず依然として実用化が難しい、ウナギの完全養殖技術の確立に大きく貢献する。親ウナギの生理状態、卵や仔魚の環境条件、仔魚の初期餌料など、生態調査から得られる知見は貴重である。一般に誤解が多いのであるが、現在我々が蒲焼きで食べている養殖ウナギは卵から育てているのではなく、すべて天然の接岸してきたシラスウナギを厳冬の河口域で採集して、これを種苗として養殖したものである。だからある意味、元を正せば我々の食しているウナギはすべて天然のものであるといえる。人の手でウナギを卵からシラスウナギまで育てることが順調にできるようになったら、養殖用種苗の安定供給ができるようになるばかりか、その分天然のシラスウナギ個体群にあたる漁獲圧が減り、資源の保全につながる。また当然のことながら、マリアナ沖で行われているウナギ産卵場調査は資源変動機構の解明につながり、ウナギ資源の保全管理と増殖対策の立案の際に信頼できる科学的根拠を与える。つまりウナギ産卵場調査は社会への貢献も大いに期待できるのである。

#### 4. 海ウナギの発見

もうひとつ最近の成果は「海ウナギ」の発見である（図3）。沿岸で採集される産卵回遊中の銀ウナギ（ニホンウナギとヨーロッパウナギ）について耳石の微量元素分析を行ったところ、海と川を行き来する回遊魚であるはずのウナギの中に、河川には遡上せず、一生を海で過ごす“海ウナギ”が多数いることがわかった<sup>5)</sup>。これは遡河回遊魚のサケ科魚類における河川残留型に対応する非回遊型の個体群である。海ウナギの存在はウナギの回遊行動の進化における



“先祖返り”と解釈できる生活史多型である。また、高緯度域へいくほど、海ウナギの出現率が高くなる傾向が認められ、サケ科魚類のスマルト降海率の変化と丁度逆の緯度クラインをもつものと考えられた。さらに驚くことには、この河川遡上しないニホンウナギは日本沿岸の銀ウナギ全体の中で85%もの高率を占めていることがわかってきた。これは本種のマリアナ沖の産卵場における再生産が、現在は主にこれら非回遊型の個体群によって支えられていることを示唆している。海ウナギの発見はその回遊が可塑性に富んだものであることを示すだけでなく、魚類の回遊行動の進化過程を考察する上で重要な示唆を与える。さらにこうした海ウナギに関する知見は、本種の増殖、保全対策を立案する際に重要な基礎資料となり、また河川環境の保全指標ともなる。

## 5. 大回遊の進化

一方で、ウナギ全18種・亜種を世界中から集めてきて、分子系統解析を行ったところ、ウナギはいまから約1億年前の白亜紀に、外洋中深層性のノコバウナギやフクロウナギと共通の祖先を持つ海産魚から、現在のインドネシア・ボルネオ島付近の熱帯で起源したものとわかってきた(図4)<sup>6)</sup>。昔は全てのウナギが熱帯の沿岸域に産卵場をもち、局地的な小規模回遊を行っていたらしい<sup>7)</sup>。レプトセファルス<sup>8)</sup>の長距離・長期間の浮遊分散により、熱帯海域に産卵場を残したまま、成育場が温帯や亜寒帯の高緯度域にまで拡大された結果、何千キロにも及ぶ大回遊が成立したと考えられる<sup>8)</sup>。およそ3000万年前に派生した当初は、我が国のニホンウナギも当時近距離にあった産卵場と東アジアの成

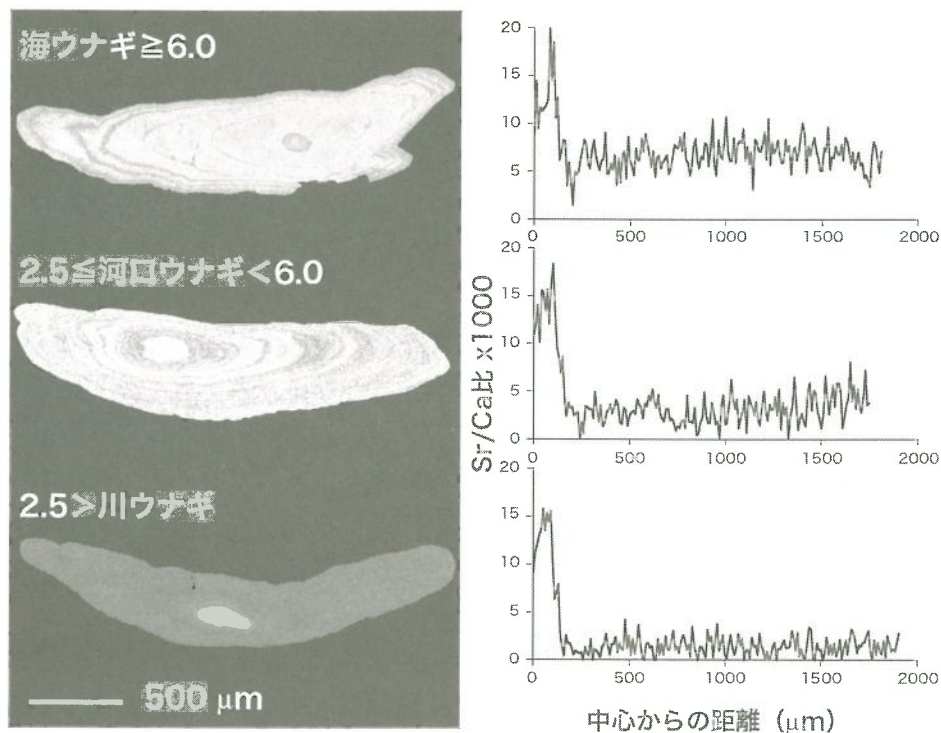


図3 日本沿岸域で採集された産卵回遊中の銀ウナギの耳石Srの分布(左)と、線分析結果(右, Kotake et al., unpublished)

耳石中心部はレプトセファルス期に海洋中で形成されるのでSr濃度は高い値を示し(中心部の明部)、シラスウナギへの変態に伴って急減する。その後、上段の海ウナギではSr/Ca比が7前後の高値を維持して、終生海域で過ごしたことを示すのに対し、下段の川ウナギは、2前後以下の値を示し、長い淡水生活期を表している。中段の河口ウナギはこれらの中間的な値を示す。

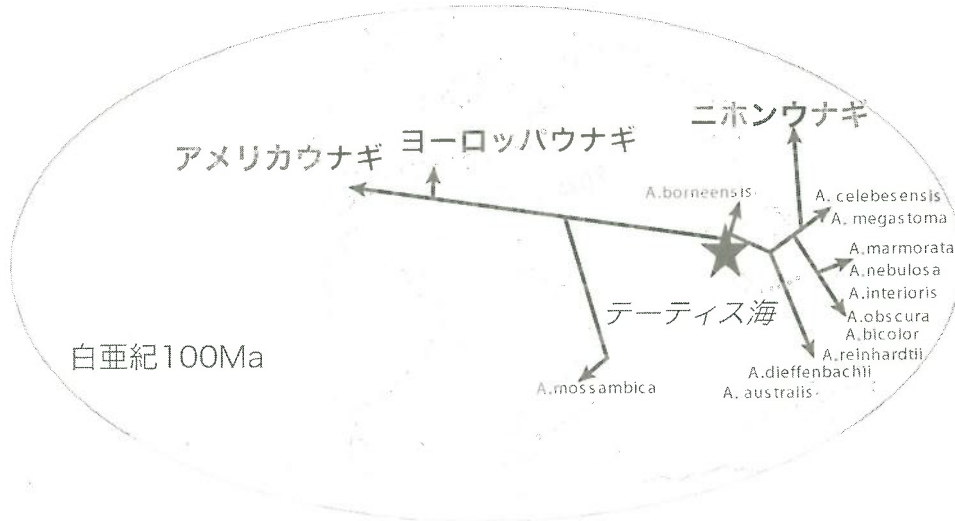


図4 ウナギ属魚類の起源と進化

ウナギ属魚類の祖先種は、今から約1億年前の白亜紀に、現在のインドネシア・ボルネオ島周辺の海産魚から起源した。そのレプトセファルス幼生が古環赤道海流に乗って西へ輸送され、回遊環が西へシフトしていくことによりテーティス海を通過して北大西洋へ侵入し、現在のアメリカウナギとヨーロッパウナギへ分化していったと考えられる（テーティス海仮説）。

育場の間を小規模回遊していたが、フィリピン海プレートの拡大にともなって現在のような3000kmもの大回遊を行うようになったものと推測される。今、温暖化が急激に進む地球において、今後こうしたウナギの回遊パターンがどのように変化していくか注意深く見守る必要がある。

この20年間の研究で、回遊生態のほかにもウナギの生物学は大きく進んだ<sup>9)</sup>。分類、形態、分布、行動、集団構造、系統関係、浸透圧調節など、様々な分野に新展開を見せた。今回の発見も手伝って、今、ウナギ研究は熱い。しかしこれらの紹介はまた別の機会に譲る。

## 文献

- 1) Tsukamoto, K. (1992), *Nature*, 356, 789-791
- 2) Tsukamoto, K. et al. (2003), *Environ. Biol. Fish.*, 66, 221-229
- 3) Kimura, S. et al. (1994), *Mar. Biol.*, 119, 185-190
- 4) Tsukamoto, K. (2006), *Nature*, 439, 929
- 5) Tsukamoto, K. et al. (1998), *Nature*, 396, 635-636
- 6) Aoyama, J. et al. (2001), *Mol. Phylog. Evol.*, 20, 450-459
- 7) Kuroki, M. et al. (2006), *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 309, 233-246
- 8) Tsukamoto, K. et al. (2002), *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 59, 1989-1998
- 9) Aida, K. et al. eds (2003), *Eel Biology*, Springer

## ◀国内情報▶

## ブームスプレーヤ用ドリフト低減型ノズルの開発

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
生物系特定産業技術研究支援センター  
宮 原 佳 彦

食品残留農薬基準のポジティブリスト制（本年5月29日施行）の下で、農薬の飛散（ドリフト）がほ場に近接する他作物での農薬残留基準値超過を及ぼす可能性があり、現場での懸念が高まっている。生研センターでは、次世代緊プロ開発事業の中で、ドリフト及び作業被曝の低減を目的とする散布装置の開発を進めているが、ドリフト防止対策の緊急性を踏まえて、現行国産ブームスプレーヤに装着してドリフトを大幅に低減しつつ、慣行と同等の作業能率と実用的な防除効果を確保できる「ドリフト低減型ノズル」を開発・実用化した。同ノズルは本年3月より市販化され、現在普及が進んでいる。

## 1. はじめに

現在、農業現場では、農薬の飛散（ドリフト）防止あるいは抑制への対応が強く求められている。これは、食用農作物に対する残留基準値が使用可能な全ての農薬成分について設定される制度（ポジティブリスト制）が本年5月末より開始されたことによる。この制度では、ある食品において、現時点で国内外に残留基準値が設定されていない農薬成分には0.01ppmと非常に微量の基準値（いわゆる一律基準）が設定され、これを超過した食品の出荷や流通は停止される。その一方、農業現場でドリフト実態調査等からは、ほ場に近接して栽培される他の農作物へのドリフトは現状ではかなり発生しており、条件によっては、ドリフトを原因とする農薬残留基準超過の可能性も示唆されている。このため、現場においてのドリフト防止対策が急務となっている。

このような状況を踏まえ、独立行政法人農業・食品産業技術総合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）では、農薬及び防除機関係の公的機関並びに防除機メーカー各社と連携・協力しつつ、ドリフト防止対策を目的とした技術開発や試験研究を進めて

MIYAHARA Sumihiko

〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

きた。特に、次世代緊プロ開発事業において、ドリフト及び作業被曝の低減を目的とする散布装置の開発を進めており、今回、ドリフト防止対策の緊急性を踏まえて、現行国産ブームスプレーヤに装着してドリフトを大幅に低減できるノズルを開発・実用化した。以下にその概要を紹介する。

## 2. 農薬散布時のドリフト発生要因

農薬散布時のドリフトを調査した事例を見ると、現在一般的に行われているブームスプレーヤやスピードスプレーヤ（SS）においては、それらを用いた通常の農薬散布作業時にある程度のドリフトが発生している可能性が高いことが示唆されている<sup>1)~3)</sup>。ここで、ドリフト低減を図ることを考えるとき、複雑な現象ではあるものの、ドリフトが発生する際に大きく影響する要因を分析し、把握することが非常に重要である。

ドリフトという現象は、ほ場外に飛散した農薬が地表に落下し、対象外のものに付着する現象（いわゆる直接的なドリフト）と、これに加えて、大気中への拡散や蒸散、土壌中への浸透等も含まれる。今回、食品残留基準のポジティブリスト化で問題となるのは、ドリフトした農薬が散ほ場外の他作物等に付着する、直接的な



ドリフトである。この直接的なドリフトを対象に検討された結果からは、その発生要因として、①薬剤粒子の粒径、②散布の高さ、③風（風速）、④散布幅、⑤粒子の縮小（希积水の蒸散）、⑥薬剤の物理性（粘弾性、表面張力、比重等）、⑦散布機器の機械条件（散布速度、放出角度等）等があげられている。さらに、これらの要因の内、特に粒径、散布高さ、風速の3要因が最も影響が大きいとされる<sup>4)</sup>。

国産ブームスプレーヤの慣行ノズルの噴霧平均粒径（体積中位径、Volume Median Diameter, VMD）は60~90 $\mu\text{m}$ 程度で、噴霧中の50 $\mu\text{m}$ 以下粒子の体積割合は50%（100 $\mu\text{m}$ 以下は90%）程度である。ここで、慣行ノズルの主体である100 $\mu\text{m}$ 以下の噴霧粒子は10m以上のドリフトを発生する危険がある。また、SSでは粒径90~100 $\mu\text{m}$ 程度とブーム用よりは大きな粒径の粒子が噴霧されるノズルが慣行に用いられているが、噴霧を機体に装備した大型送風機で放射状に拡散して散布する機構をもつため、ブームスプレーヤ以上にドリフト発生の懸念は大きい。

### 3. ドリフト低減技術

ドリフトを防止する上で基本的な対策は、①風速、風向、②散布方向や位置、③適切な機器操作（適正圧力）、④適正な散布量、⑤薬液タンク、ホース等、散布機器内の洗浄等に十分配慮した散布作業を行うことである。この基本的な作業方法を徹底することで、ドリフトによる

近接作物へ農薬残留リスクは大きく低下する<sup>1)</sup>。

しかし、前記のように、既存の散布技術が課題とするドリフト低減した散布を実現する防除機を開発することで、ドリフトを積極的に防止・抑制することが可能となるものと考えられる。そこで、ドリフト発生要因から見て、最も技術的に効果的と考えられるのは、従来よりもドリフトしにくい粒径の大きな粒子（すなわち粗大粒子）からなる噴霧を生成するノズルを散布機に使用することである。これを踏まえて、生研センターでは次項に述べるように、農薬散布作業時のドリフトを低減しつつ、高精度な散布を可能にする液剤散布装置（トラクタ搭載式及び乗用管理機搭載式）と、さらにこれに装着する「ドリフト低減型ノズル」の開発を防除機及びノズルメーカーと共同で進めてきた。

### 4. 生研センターにおける「ドリフト低減型ノズル」の開発<sup>5)</sup>

今回開発したドリフト低減型ノズル（2種類）は、いずれも、慣行ノズルに比べてドリフトし難い噴霧粒子を多く発生するノズルである。その特徴は以下のとおりである。

- 1) 開発ノズル（I及びII型の2種類）の常用圧力、噴霧量、取付部管用ねじ等の仕様は慣行ノズルと同等であり、既存の国産ブームスプレーヤに装着して、慣行と同等の作業方法及び能率での作業が可能である（表1）。
- 2) I型は、噴霧平均粒径が慣行の約2倍（100 $\mu\text{m}$ 以下粒子体積割合は1/2~1/3）で、

表1 開発ノズルの主な仕様

種類(噴板呼称)	I型(φ0.8)	II型(φ0.8)	参考:慣行(φ1.3)
装着可能散布機	トラクタまたは乗用管理機搭載式ブームスプレーヤ (ノズル取り付け間隔:30cm)		
装着部の規格(管用ネジ)	SW13.8またはW20		W20
噴霧形状	扇形		中空円錐形
噴霧角 (度)	70	100	80
噴霧生成方式	空気非混入	空気混入	空気非混入
噴霧圧力(常用) (MPa)	1.0~2.0		同左
噴霧量(常用) (L/min)	1.0~1.4	0.9~1.3	0.8~1.2
粒径(体積中位径:VMD) ( $\mu\text{m}$ )	110~180	240~330	60~80
100 $\mu\text{m}$ 以下粒子体積割合 (%)	20~45	5~15	65~90
散布量(適応範囲) (L/10a)	75(作業速度0.7m/s)~200(同0.3m/s)		同左

ドリフトを低減しつつ、薬液の付着性能を重視した仕様である。一方、Ⅱ型は、粒径が慣行の3～4倍（ $100\mu\text{m}$ 以下粒子体積割合は $1/4\sim 1/10$ ）と微細粒子をⅠ型よりも削減し、ドリフト低減効果を重視した仕様である（表1）。

3) ほ場境界から距離3～20mの調査区に設置した感水紙への付着液斑を目視判別指数（付着液斑の被覆面積に対応した0～10の11段階

の指数、生研センター作成標準付着度指標に準拠）の合計で比較した場合、Ⅰ型は慣行に比べて約 $1/2$ （キャベツ、散布量 $150\text{L}/10\text{a}$ 、追風 $2\text{m/s}$ の場合）に、Ⅱ型は、慣行に比べて約 $1/5$ （水稻、散布量 $100\text{L}/10\text{a}$ 、横風 $4\text{m/s}$ の場合）にドリフトを抑制することが可能であった（図2）。

4) 開発ノズルは、キャベツの防除効果試験において、慣行と同じ方法（農薬の種類、希釈



開発ノズル（Ⅱ型）



開発ノズル（Ⅰ型）



慣行ノズル（中空円錐形）



図1 開発ノズル及び慣行ノズルの外観と噴霧状況（キャベツ、散布量 $200\text{L}/10\text{a}$ ）

濃度、散布量)で使用した場合の実用性が確認されており(表2)、対象作物及び病害虫が類似し、散布方法等が同等であれば、ほぼ同様の効果が期待できる。

以上の開発ノズルは、ポジティブリスト制施行を踏まえ、農家レベルでの積極的なドリフト防止対策に寄与できると判断されたことから、実用化され、本年3月初旬よりノズルメーカー及び主要防除機メーカーより市販されている。

## 5. ドリフト防止対策の取り組みについて

### 1) 「地上防除ドリフト対策マニュアル

((社)日本植物防疫協会編)」について

農薬取締法改正によりドリフト防止対策が必要との情勢から、平成15年5月、農薬及び防除機に関する公的機関及びメーカーが連携して「ドリフト対策連絡協議会」が発足し、同年7月ドリフトの実態把握とその防止対策の必要性を啓発、周知することを目的として、「農薬散布時のドリフト防止対策ガイダンス」がとりまとめられた。

その後さらに、ポジティブリスト制導入が明示され、本格的な防止対策が不可欠となったことを受け、平成16年から国の補助事業が開始され、これを受けた(社)日本植物防疫協会(日植防)が防除機メーカーを含む検討チームを編成し、全農、公立試験研究機関及び生研センター等の関係機関と連携しつつ、ドリフト防止及び低減に向けた調査及び試験研究を実施してき

表2 キャベツ害虫防除効果試験結果<sup>注)</sup>

ノズル	散布量 (L/10a)	食害度 <sup>2)</sup>	防除効果	
			防除価 <sup>3)</sup>	対比
I型	200	1.7	54	90
II型	200	1.8	52	87
慣行	200	1.5	60	100
無散布	—	3.8	0	0

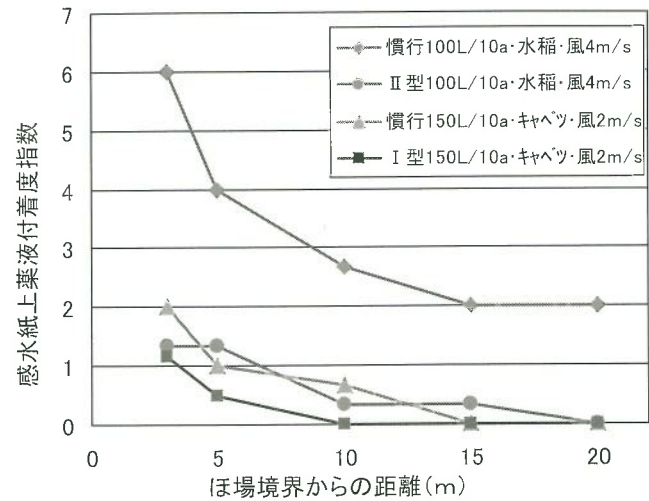


図2 薬液付着度指数を用いたドリフト低減効果の相対比較

た。そこで得られた知見をもとに、平成17年12月に「地上防除ドリフト対策マニュアル(以下、マニュアル)」がとりまとめられた<sup>1)</sup>。

### 2) 各種ドリフト低減ノズルを利用する上での注意事項

ドリフトを従来よりも低減可能なノズルは、前記開発ノズル以外にも、手散布用あるいはSS用のノズルが市販されている。それらは、製品として既に市販されていた各種ノズルの中から、ドリフト低減効果が高く、慣行防除に利用可能な製品を選択したもの、あるいは、メーカーがこれまでに独自開発した製品等である。これらは、通常散布に適した使用条件下で使用する場合には、従来に比べてドリフト発生リスクを低減することが可能となる。しかし、いずれのノズルも強風下、あるいは、微風下であっても散布地点から至近距離に別ほ場や作物があ

注1) 群馬高冷地野菜研究センター(群馬県嬲恋村)  
品種: 岳陽, 防除対象: コナガ, タマナギンウワバ  
調査日: H17.9.8(収穫時)

2) 食害度(群馬県)  
0: 食害なし, 1: 外葉に食害あり  
2: 結球葉から2枚目の外葉に食害あり  
3: 結球葉から1枚目の外葉に食害あり  
4: 結球部に食害あり

3) 防除価: 「食害なし」を100とした指数



る場合等は微細な粒子を若干は含んでいることから、ドリフトを完全に抑制することは困難と考えられている。また、ドリフト低減ノズルの噴霧は粗大粒子が主体であり、微細粒子の多い慣行ノズルよりも作物の細部への付着が劣る場合があり、対象作物、病害虫及び農薬の種類等によっては防除効果が劣る場合も想定される。したがって、散布における基本的注意事項を遵守することを優先しながら、現場の状況に応じて最適な機種を適宜選択して利用することが重要である。

### 3) 果樹園用防除機におけるドリフト低減技術について

果樹園で広く利用されているSSについては、ブームスプレーヤ以上にドリフト発生が懸念されている。このため、ノズルメーカー及び一部防除機メーカーでは、本稿で述べたブームスプレーヤ用ドリフト低減型ノズルと同じく、ドリフトを低減するために慣行SS用ノズルよりも大きな粒径の噴霧を発生するドリフト低減型ノズルを市販化している。しかし、SSは送風を利用する散布機構であるため、それらのノズルのみでのドリフト低減効果には限界がある。そこで、生研センターでは、防除機及びノズルメーカーと共同で、ドリフトを低減しつつ、高精度の散布を可能にする「果樹用農薬飛散制御型防除機」の研究開発を進めているところである。

## 6. おわりに

ドリフト防止対策が本当に必要となるのは正にこれからであり、農業現場における今後の対応が急がれる。問題となるドリフトは、散布機、ほ場、作物、あるいは、気象等の複雑な要因から生じる予測困難な現象である。さらに、散布される農薬の成分も多種多様である。このため、ドリフトを事前に予測し、防止する技術の確立までには未だ道のりは遠く、今後もドリフトの実態を科学的に把握し、解明していく努力を積

み重ねていくことが必要である。今後、各方面で検討されているドリフト防止あるいは低減への対策が実を結び、一刻も早く、農業生産現場における懸念が払拭されることが強く望まれる。その一方で、今回の問題を一つの契機として、農業生産における安全と安心の保証、あるいは、環境への十分な配慮といった面を重視した新たな防除技術への転換が推進されることに大いに期待している。もし、これが実現されれば、必ずや消費者に信頼され、支持される、新たな農業生産技術が確立され、さらには各地の特色ある地域農業の活性化にも繋がっていくものと考えている。

## 文 献

- 1) (社)日本植物防疫協会編(2005), 地上防除ドリフト対策マニュアル, (ホームページ: <http://www.jppa.or.jp/doriftmanual.pdf>)
- 2) (社)日本植物防疫協会編(2006), 平成17年度農薬飛散対策に関する調査研究報告書, (ホームページ: [http://www.jppa.or.jp/hisantaisaku\\_17.pdf](http://www.jppa.or.jp/hisantaisaku_17.pdf)) (<http://www.jpnpn.ne.jp/jpp/public/sanp.html>)
- 3) (社)日本植物防疫協会編(2005), 平成16年度農薬飛散防止技術の開発に関する調査研究報告書, (ホームページ: [http://www.jpnpn.ne.jp/jpp/data/nou\\_hbgi\\_h16.pdf](http://www.jpnpn.ne.jp/jpp/data/nou_hbgi_h16.pdf))
- 4) 斎藤武司(2002), 施用法(航空防除等)からの農薬環境負荷軽減対策, 第22回農薬製剤・施用法シンポジウム講演要旨, 41-63, 農薬製剤・施用法委員会(日本農薬学会)
- 5) 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「農薬散布時のドリフトを大幅に低減するブームスプレーヤ用ノズル」ホームページ: [http://brain.naro.affrc.go.jp/iam/Urgent/iam\\_upro127.htm](http://brain.naro.affrc.go.jp/iam/Urgent/iam_upro127.htm)

## ◀地域の先端研究▶

## おいしい鶏卵を目指して — 卵黄割合が極めて高い新緑色卵の開発

青森県農林総合研究センター 畜産試験場

西 藤 克 己

卵用鶏における卵重を大きくする改良効果は著しいが、卵黄割合（卵黄重÷卵重）あるいは卵黄卵白重比（卵黄重÷卵白重）が低下している。そこで卵黄卵白重比を高くした選抜系統を交雑利用することによって、ヘンダイ産卵率が80.2%、43週齢の卵重及び卵黄重がそれぞれ57.3g及び18.5gで、卵黄割合が32.2%、卵黄卵白重比が55.3%の緑色卵を産む実用鶏を開発した。開発鶏種の卵は市販卵に比べ、卵黄割合が極めて高いことから、高付加価値卵として販売できる。

### 1. 開発の背景

表1 卵黄と卵白の栄養成分量<sup>1)</sup>

食品名	水分 (g/100g)	たんぱく質 (g/100g)	脂質 (g/100g)	エネルギー (kcal/100g)
卵黄 (生)	48.2	16.5	33.5	387
卵白 (生)	88.4	10.5	Tr	47

1) 五訂増補日本食品標準成分表<sup>1)</sup>

#### 1) 卵の栄養

卵は「完全栄養食品」といわれるほど、私たちの体に不可欠な栄養素が詰まっている。ところが卵黄と卵白では栄養成分量に違いがある。すなわち、卵黄は48.2%の水分と、16.5%のたんぱく質、33.5%の脂質を含み、エネルギーは387kcalである（表1）。炭水化物は少ないが、鉄、カルシウム、リンなどのミネラルに富み、ビタミンA、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>などが含まれている。卵黄のたんぱく質にはイソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、バリンなどの必須アミノ酸をはじめ、ほとんどすべてのアミノ酸が含まれている。一方、卵白は88.4%の水分と10.5%のたんぱく質、脂質はほとんど含まない。エネルギーは47kcal、カルシウム、鉄、リンなども含むが、卵黄中より含量が低い。ビタミンAは含まず、B<sub>1</sub>の含量は卵黄より低い。このように卵の栄養価値は卵黄の割合に大きく

SAITO Katsumi

〒039-3156 青森県上北郡野辺地町字枇杷野51

影響される。

#### 2) 卵黄の好み

日本人は卵を生で食べる習慣を持っていて、「玉子ご飯」を好む人は多い。ご飯の上に卵を割り落とし、醤油を差す単純な食べ方ではあるが卵黄のおいしさが醤油によって引き立てられ味わい深い「玉子ご飯」になる。また「すき焼き」に生卵を付け、納豆やとろろ芋に卵黄を落とす。あるいは「うどん」や「月見そば」、「ラーメン」に入れる「月見料理」などごく手軽に生卵を使っている。欧米人はエグノックなど卵を生で食べる例がないわけではないが、卵を生で食べることを概して嫌う（今井・南羽1989）<sup>2)</sup>。

日本人の卵の食べ方では、卵白が多いと水っぽくなり、おいしさが半減するため、卵黄割合（卵黄割合）の高い卵が自然に好まれる。ゆで

卵や卵豆腐、茶碗蒸しなどの卵料理でも卵黄が大きいと見栄えが良いことからやはり卵黄割合の高い卵が好まれる。日本人は卵黄への嗜好性が極めて高い民族といえる。

### 3) 最近の鶏卵

最近の卵用鶏のデータによると、成熟時の卵重は64.5g、構成比で約63%の卵白、約27%の卵黄、約10%の卵殻をもっている（表2）。これに対し、昔の鶏の代表として薩摩鶏（サツマドリ）の卵重は52.3g、卵黄割合は約30%であった（山上2004）<sup>3)</sup>。「昔の卵はおいしかった」という声はよく聞かすが、卵黄割合が高かったことが関係していると思う。

最近の卵用鶏の卵黄割合が低くなった理由は、卵白が卵黄より遺伝的に変化する易いという特性をもつため、卵重を大きくする遺伝的改良が卵黄より卵白をより大きく変化したことによるものである。表3は、卵重に対して選抜された卵用鶏の卵重および構成成分の変化を示している（三好・光本1994）<sup>4)</sup>。1973年から1992年の間に、卵重は6.7g増加した。しかし卵黄重は0.5gしか増加せず、卵白重は6.8gも増加した。その結果、卵黄割合は28.4%から26.0%まで2.4%減少した。

このように、卵用鶏では卵白を含めたトータルの生産量を高める改良が行われてきた結果、卵白重が増え、卵黄割合は低下している。特に「玉子ご飯」や「ゆで卵」に適する55g前後のMS規格の卵黄割合の低下は著しく、20%前半の数値も珍しくなくなった（表7）。これは現在の卵用鶏では55g前後の卵を採るためには180日齢前後の若雌から採らざるを得ないが、若雌の卵黄割合は極めて低いためである

表2 薩摩鶏と卵用鶏の卵の比較<sup>1)</sup>

形質	薩摩鶏	卵用鶏	差（卵用鶏-薩摩鶏）	
卵重（g）	52.3	64.5	12.3	
卵黄重（g）	15.9	17.4	1.5	
卵白重（g）	31.2	40.8	9.6	
卵殻重（g）	5.2	6.3	1.1	
構成比	卵黄（%）	30.4	27.0	-3.4
	卵白（%）	59.6	63.1	3.5
	卵殻（%）	10.0	9.8	-0.2

1) 山上善久（2004）<sup>3)</sup>から抜粋

表3 卵重に対する選抜例<sup>1)</sup>

形質	1973年	1992年	差（1992-1973）	
卵重（g）	53.2	59.9	6.7	
卵黄重（g）	15.1	15.6	0.5	
卵白重（g）	31.0	37.8	6.8	
卵殻重（g）	7.1	6.5	-0.6	
構成比	卵黄（%）	28.4	26.0	-2.4
	卵白（%）	58.3	63.1	4.8
	卵殻（%）	13.3	10.9	-2.4

1) 三好俊三・光本孝次（1994）<sup>4)</sup>から抜粋

（表7）。

### 4) 卵黄重を考慮した卵重選抜

青森県農林総合研究センター畜産試験場養鶏部では1984年から、卵黄割合を低下させない卵黄重と卵重を共に大きくする鶏の遺伝的改良を行っている（西藤・吉田2000, 西藤2004）<sup>5, 6)</sup>。

その結果、改良前に卵重61.5g、卵黄重17.5g、卵黄割合28.5%であった鶏が15世代後の2001年には卵重64.1g、卵黄重19.2g、卵黄割合29.9%の鶏となった（表4）。改良前に比較すると、卵重で2.6g、卵黄重で1.7g、卵黄割合で1.4%の改良量が得られた。つまり、卵黄重を考慮した卵重の改良を行うことによって、卵黄割合の低下は防げることが明らかである。改良された鶏は薩摩鶏並みに卵黄割合が高く、しかも実用鶏として通用する大卵鶏であることから、特産鶏の卵黄重および卵重の改良素材鶏として利用されている。



表4 卵黄重を考慮した卵重選抜<sup>1)</sup>

形質		1984	2001	差 (2001-1984)
卵重 (g)		61.5	64.1	2.6
卵黄重 (g)		17.5	19.2	1.7
卵白重 (g)		38.2	39.1	0.9
卵殻重 (g)		5.8	5.8	0.0
構成比	卵黄 (%)	28.5	29.9	1.4
	卵白 (%)	62.1	61.0	-1.1
	卵殻 (%)	9.4	9.0	-0.4

1) 西藤克己・吉田晶二 (2000) <sup>5)</sup>および西藤克己 (2004) <sup>6)</sup>

### 5) 卵黄割合の改良目標

卵黄割合そのものを遺伝的に高くする改良は「あすなろ卵鶏」で行っている。「あすなろ卵鶏」は青卵殻色遺伝子をもっており、青森県の木「あすなろ」の葉の色に似た緑の卵殻色をもつインパクトのある卵を産む。この鶏は元々卵黄割合が高い特長をもつが、さらに卵黄割合を高くし、おいしい卵を産む鶏になるように組合せ検定を実施している。

「あすなろ卵鶏」の改良目標は、具体的に言えば、卵重はご飯をよそったとき、お茶碗から内容物がこぼれない大きさとし、重量規格でMS (56g前後) の重さとする。卵黄重はL規格 (64g以上) の大卵でしか得ることができない18g前後の重さとする。結果的に卵黄割合は薩摩鶏を超える33%前後になるはずである。この卵黄割合は卵が非常においしいとされるホロホロ鳥における卵黄割合とほぼ同じになる。この目標値は鶏では不可能と思われるかもしれないが、三好・光本 (1980) <sup>7)</sup> の選抜実験などの結果から達成可能である。

筆者は帯広畜産大学の三好俊三先生が造成した卵黄卵白比高選抜系統を2000年に譲り受け、独自に卵黄重と卵黄割合に対する選抜を行っている。その結果、卵黄卵白重比が約60%と極めて高い卵黄卵白比高選抜系統を造成している。

さらに造成した鶏種の組合せ検定を行い、前述の改良目標に近い卵黄割合をもつ緑色卵を産み、かつ雑種強勢 (雑種の能力が両親の水準以上に高まる遺伝的現象をいう) による生産性の改善が得られる新緑色卵鶏を開発したので以下に紹介する。

## 2. 新緑色卵鶏の交配様式および特徴

### 1) 新緑色卵鶏 (図1) の交配様式

あすなろⅡ系 (雄) × 卵黄卵白比高選抜系 (雌)

### 2) 新緑色卵鶏の平均能力および特徴

#### (1) 平均能力

表5 新緑色卵鶏の平均能力

形質	新緑色卵鶏	あすなろ卵鶏 (旧鶏種)
① 育成率 (1~20 週齢) %	95.0	97.0
② 生存率 (21~64 週齢) %	95.8	96.9
③ 50%産卵日齢	149	151
④ ヘンデイ産卵率 (21~64 週齢) %	80.2	79.8
⑤ 飼料日量 (21~64 週齢) g/羽	107.7	109.8
⑥ 飼料要求率 (21~64 週齢)	2.41	2.37
⑦ 体重 (43 週齢) g	1,869	2,016
⑧ 卵殻色	青色	青色
⑨ 卵重 (43 週齢) g	57.3	59.3
⑩ 卵黄重 (43 週齢) g	18.5	17.8
⑪ 卵白重 (43 週齢) g	33.6	35.9
⑫ 卵黄割合 <sup>1)</sup> (43 週齢) %	32.2	30.0
⑬ 卵黄卵白重比 <sup>2)</sup> (43 週齢) %	55.3	49.6

1) 卵黄割合: 卵黄重 ÷ 卵重 × 100

2) 卵黄卵白重比: 卵黄重 ÷ 卵白重 × 100

#### (2) 特徴

- ① 青色卵を生産する (図2)。
- ② 強健・多産, MS規格卵 (52~58g) を生産する (表5)。
- ③ 卵黄割合および卵黄卵白重比が市販卵より極めて高い (表6, 表7)。
- ④ 販売価格は市販卵の1.5~3倍が想定さ

れ1.5～4.5倍の利潤が見込まれる(表8)。

### 3) 素ヒナの入手先

青森県農林総合研究センター畜産試験場

TEL: 0175-64-2231

### 4) 飼養上の留意点

(1) 一般鶏卵とは異なる卵殻色・優れた卵黄特性をもつため差別化生産に使える。

(2) 小軀・多産のため卵用鶏の栄養要求量を満たす完全配合飼料を不断給餌する。

## 3. おわりに

わが国では、養鶏生産のもととなる種鶏の大部分を海外の育種会社に依存している。このため、わが国特有の消費者ニーズに対応した鶏の

改良は難しい現状にある。卵用鶏については、上述のとおり、卵白を含めたトータルの生産量を高める改良が行われてきたため、卵重は極めて大きくなったが、卵黄卵白重比は約50%から30～40%台へと低下する結果となった。これは日本人特有の卵黄に対する嗜好を無視する改良といえる。日本人の嗜好にあった鶏肉・鶏卵の改良を進め、食文化を守り育てるためには、国産鶏の育種改良事業が極めて重要といえる。

さらにまた、養鶏業界は鳥インフルエンザの脅威にさらされている。2006年4月30日付け朝日新聞によると英国でH7N3型が確認されたことを受け、農林水産省は家禽の輸入停止を決めた。他にもフランス、オランダ、ドイツからの輸入も2006年2月以降相次いで停止された。これらの国々はわが国で食肉や採卵用として飼育されている鶏の親鶏(種鶏)の輸出国であった

ため、輸入種鶏のうち約80%が輸入できなくなり、輸入停止が長期化すればわが国の鶏肉、鶏卵の供給に影響が出るおそれもあるとされた。鶏の育種や種鶏の供給の大部分を海外の育種会社に頼っていることがこのような事態を招いている。国、各県が行っている国産鶏の育種改良事業は、食文化を守り育てるとともに、食料の安定的供給のためにも必要であり、継続的に発展させることが極めて重要といえる。

表6 市販パック卵との卵構成比較

銘柄(表示規格)		測定個数	卵重(g)	卵黄重(g)	卵黄割合(%)	卵黄卵白重比(%)
新鶏種 <sup>1)</sup> (無選別)		216	57.3	18.49	32.3	55.3
市販パック卵 <sup>2)</sup>	A(S)	10	46.7	9.63	20.6	30.2
	B(M)	5	63.5	17.72	27.9	44.3
	C(M・L混合)	8	65.2	18.02	27.6	44.3
	D(M・L混合)	8	66.2	17.99	27.2	42.7
	E(L)	10	67.4	18.83	27.9	45.0
	F(LL)	8	72.8	18.06	24.8	37.6

1) 2004年ふ化鶏の43週齢の卵

2) 青森県野辺地町内スーパーマーケットで購入したS～LL規格卵  
2005年6月3日および同年6月6日調査

表7 既報市販銘柄との卵構成比較

形質	新鶏種 43週齢	市販銘柄G <sup>1)</sup>			市販銘柄H <sup>2)</sup> 48週齢
		180日齢	270日齢	330日齢	
卵重(g)	57.3	56.0	63.9	64.9	64.6
卵黄重(g)	18.5	12.8	16.6	17.4	17.5
卵黄割合(%)	32.3	22.9	26.0	26.8	27.1
卵黄卵白重比(%)	55.3	35.2	41.3	43.2	42.8

1) 三好俊三(2000): 個人的情報

2) 山上善久(2004): 日本家禽学会誌41巻, J2号, J104-J110

表 8 販売価格を市販卵の1.5～3倍としたときの成鶏1羽当たり年間経営収支の試算

鶏種	鶏卵生産量(a) kg	販売価格(b) 円/kg	粗収益(c=a×b) 円	経営費 <sup>1)</sup> (d) 円	利潤(c-d) 円	算定基礎
新緑色卵鶏	16.8	300～600	5,040～10,080	2,364	2,676～7,716	産卵率 80.2%, 卵重 57.3g, 飼料 日量107.7g
市販赤玉銘柄 <sup>2)</sup>	20.7	200	4,140	2,424	1,716	産卵率 87.9%, 卵重 64.5g, 飼料 日量110.0g

1) 飼料単価40円/kg, 飼料費の経営費に占める割合0.66 (平成15年農林水産省農業経営部門別統計)

2) 平成17年度養鶏関係全国会議資料



図1 新緑色卵鶏(雌)

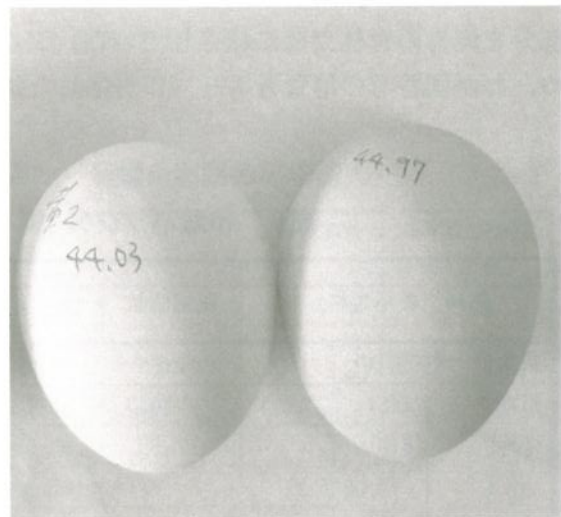


図2 新緑色卵鶏の緑色卵(右)

## 文 献

- 1) 香川芳子監修(2005), 五訂増補食品成分表2006年, 216, 女子栄養大学出版部, 東京
- 2) 今井忠平・南羽悦悟(1989), 「タマゴの知識」, 38-118, 幸書房, 東京
- 3) 山上善久(2004), 日本家禽学会誌, 41, J104-J110
- 4) 三好俊三・光本孝次(1994), 日本家禽学会誌, 31, 287-297
- 5) 西藤克己・吉田晶二(2000), 東北畜産学会報, 49(3), 22-29
- 6) 西藤克己(2004), 東北畜産学会報, 54(2), 35
- 7) 三好俊三・光本孝次(1980), 日本家禽学会誌, 17, 219-227
- 8) 三好俊三(2000), 個人的情報



## ◀文献情報▶

**遺伝子組換えニワトリ始原生殖細胞の生殖細胞系列への移行**

Germline Transmission of Genetically Modified Primordial Germ Cells.

Marie-Cecile van de Lavoie<sup>1</sup>, Jennifer H. Diamond<sup>1</sup>, Philip A. Leighton<sup>1</sup>, Christine Mather-Love<sup>1</sup>, Babette S. Heyer<sup>1</sup>, Renee Bradshaw<sup>1</sup>, Allyn Kerchner<sup>1</sup>, Lisa T. Hooi<sup>1</sup>, Terri M. Gessaro<sup>2</sup>, Susan E. Swanberg<sup>2</sup>, Mary E. Delany<sup>2</sup> & Robert J. Etches<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Origen Therapeutics, 1450 Rollins Road, Burlingame, California 94010, USA.

<sup>2</sup> Department of Animal Science, 1 Shields Avenue, University of California, Davis, 2131D Meyer Hall, Davis, California 95616, USA.

*Nature*, 441, 766-769 (2006)

始原生殖細胞は、精子や卵子の前駆体である。多くの動物において、一般体組織を構成する体細胞系列からの生殖細胞系列の分離は、発生のごく初期の段階でおこる。ニワトリ胚においては、始原生殖細胞は、孵卵開始18時間後に生殖三日月環において初めて確認され、その後血液循環系に入って、孵卵50～55時間後に始原生殖細胞は生殖腺へと移動し、ここで機能を持った精子や卵子を作り出す。これまで、生殖系列の性質をかえずに始原生殖細胞を培養することは、いかなる動物種においても不可能であった。しかし、本論文において、著者らは、生殖系列の性質を保持したままのニワトリ始原生殖細胞の分離、培養、凍結保存、始原生殖細胞由来品種の個体作出及び遺伝子組換えを成功するとともに、体細胞へと分化可能な胚性幹細胞へと体外培養によって誘導可能なことを明らかにした。長期間の培養によっても、あるいは遺伝子に改変を加えても、ニワトリ始原生殖細胞は生殖系列の性質を保持し、体外培養において体細胞に分化誘導可能であったことから、今回の実験系は発生生物学の新しいモデルとなる可能性がある。ニワトリ胚は、発生のごく初期での扱

いが容易であり、始原生殖細胞をニワトリ胚の血管系へ簡単に戻せるため、このモデルの有用性は非常に高いものである。今後、ニワトリにおける遺伝子操作を農業や薬学分野へ応用するための新たな道をひらくこととなろう。

胚性幹細胞や始原生殖細胞は未分化の幹細胞であり、様々な細胞へと分化する能力を持つ。これら幹細胞を体外で効率よく保存、増殖、分化させることができれば、組織、臓器、個体の再生や体外での遺伝子組換え操作等の可能性もひらける。また、鳥類においては受精卵の凍結保存法は確立されていないため、遺伝資源の長期保存法が問題となっていた。今回、始原生殖細胞を用いた個体再生の可能性が示されたことから、鳥類の遺伝資源の長期保存のための始原生殖細胞の凍結保存法の利用等が期待される。(抄訳：下司雅也, GESHU Masaya, 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所)

## ◀文献情報▶

## 組換え体酵母によるD-乳酸の発酵

D-lactic acid production by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*.

Ishida N., Suzuki T., Tokuhiko K., Nagamori E., Onishi T., Saitoh S., Kitamoto K., Takahashi H.

Biotechnology Laboratory, Toyota Central R&D Labs Inc., 41-1 Nagakute-yokomichi, Aichi 480-1192, Japan

*J. Biosci. Bioeng.*, 101 (2), 172-177 (2006)

石油資源の将来的枯渇への対策として、燃料はもちろん、化成品原料としてのバイオマス資源の変換利用が、重要な科学技術として位置づけられている。そうした中、石油系プラスチックに代替できる最も有力な素材として、デンプン、糖の発酵により得られた乳酸より製造されるポリ乳酸 (poly -lactic acid) (PLA) プラスチックが注目されている。その原料となる乳酸は、主に様々な *Lactobacillus* 属の乳酸菌により生産されている。しかし乳酸菌は低pHに感受性であり、そのため産業的な乳酸生産には多量の  $\text{CaCO}_3$  や他の中和剤を必要とし、生産プロセスの複雑化と多量の副産物を生じさせている。また、乳酸菌は高密度培養が困難で、さらに増殖に高い栄養要求性を示す (= 厳密な培地組成を要求され、高価な培地が必要) ことも欠点といえる。一方、酵母は低pH条件での増殖が可能であり、その上に *Saccharomyces cerevisiae* は遺伝学的研究が容易である。そこで、酵母を乳酸の生産に使用することで、中和剤量の低減化と生産コストの低下が可能と考えられ、現在、酵母による乳酸生産技術の開発が注目されている。ちなみに、酵母自体はもともとL-乳酸、D-乳酸どちらもほとんど生産しない。

さて、ポリ乳酸の利用が普及してくるにともない、L-乳酸によるポリL-乳酸は熱に弱く約58°C以上で不安定になる欠点の克服が重要な問題となっている。一方、ポリL-乳酸にポリD-乳酸をブレンドしたものは“stereo-complex”と

呼ばれる複合体/ラセミ体結晶を形成する。このような複合体樹脂は融点がポリL-乳酸に比べ50°Cも高くなることが知られている。この複合方法でポリ乳酸の改善が期待されるが、ポリD-乳酸を作成するためには、高純度のD-乳酸を使用する必要がある。

酵母によるL-乳酸発酵生産の試みについては多くの研究があるが、D-乳酸の生産に関する報告はほとんど無い。そこで本報文では、酵母でのD-乳酸生産を検討した。

宿主酵母をワイン酵母OC2, D-乳酸をピルビン酸から変換生成させるための遺伝子として *Leuconostoc mesenteroides* NBRC3426由来のD-lactate dehydrogenase (D-LDH) を使用し、pyruvate decarboxylase I (PDC1) のプロモーターの下流にD-LDH遺伝子を接続し、宿主酵母に導入した。

本形質転換体による、糖含量100g/L、中和剤  $\text{CaCO}_3$  を添加しない条件でのD-乳酸の生産を調べた。72時間目でのD-乳酸生産量は53.2g/Lであり、また20.7g/Lのエタノールを生産した。グルコースは完全に消費され、培地の最終pHは2.8であった。またD-光学純度は99.9%であった。本研究により、酵母によるD-乳酸の生産が良好に行える可能性が示された。

(抄訳：家藤治幸, IEFUJI Haruyuki, 独立行政法人 酒類総合研究所)

## ◀文献情報▶

**糖類や多価アルコールによる魚油  
に添加した抗酸化剤の保護**Antioxidant Protection of Bulk Fish Oil by  
Dispersed Sugars and Polyhydric Alcohols

H. Faraji, R. C. Lindsay

Department of Food Science, University of  
Wisconsin-Madison, Wisconsin 53706*Journal of Agricultural and Food  
Chemistry*, 53, (2005) 736-44

DHAやEPAを含む魚油は様々な生理作用が知られ、特にDHAは乳幼児期に必要とされる栄養素で日本では育児用粉乳にも添加されており、諸外国においてもその必要性が認識されてきていることから添加される傾向にある。原料としては魚油のみならず、遺伝子組み換え技術を用いたn-3系油脂高含有大豆も実用段階の開発ステージにある。2004年にFDAは冠動脈疾患低減に関するヘルスクレームを認めており、今後ますますその使用が期待される。この様に高い有用性が知られつつも、食品分野においてはまだまだ利用例が少ない。その理由として、DHAやEPA等のn-3系油脂はその構造から酸化されやすく、また酸化された油脂の分解物が不快臭となるため、食品としての品質を保つのが困難であることが挙げられる。このことから、n-3系油脂の食品利用には、酸化防止あるいは酸化に由来する不快臭発生防止方法の確立が必要とされる。一般的に油脂にはトコフェロールをはじめとする抗酸化剤が添加されているが、ラジカルスカベンジャーという役割から保存により経時的に減少しその効果を失うものであり、またn-3系油脂の酸化、不快臭発生抑制という観点からはトコフェロール単独での効果としては不十分である場合が多い。

筆者らは食品素材である糖類や他価アルコールの使用により、抗酸化剤の効果を高める、あるいは、酸化に由来する二次生成物である不快臭の原因物質の発生を低減させる検討を行っている。評価も脱臭した魚油を用いて、酸化の指

標である過氧化物価 (PV)、酸化二次生成物の理化学分析である各種揮発性成分の定量に加え、不快臭の評価に精通したパネルを用いた官能評価も併用している。またバルク魚油のみならず魚油エマルジョンでの評価も行っており、実際の食品応用を考慮した検討となっている。これらの検討でソルビトールやマンニトールの添加がPVの低下と共に、(Z)-4-heptenalや(E,E,Z)-2,4,7-decatrienal, (E,Z,Z)-2,4,7-decatrienalといった不快臭成分の発生を低減させることを明らかとしている。

筆者らが検討に用いている抗酸化剤は、BHAやTBHQといった合成系のものが中心であるが、構造のはっきりしたこれら合成系抗酸化剤を用いた実験でメカニズムを明らかとした上で今後はビタミン類やポリフェノール類といった天然系の抗酸化剤を用いた際の効果が明らかになるとより応用しやすいデータになると考える。こうした検討が進むことで、サプリメントのみでなく食品の形態で今後ますますn-3系油脂の利用が増え、有用な効果が広く用いられることが期待される。

(抄訳：岡野 淳, OKANO Jun, 日本水産株式会社 中央研究所)





ブレイン テクノニュース  
バックナンバーのご案内  
第113号  
2006年1月15日発行

**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  
……………林 清・北岡 本光

**総説関連情報**

新規な遺伝子ランダム変異導入技術  
……………北岡 本光・藤井 亮太・小林 厚志・林 清  
オリゴ糖とその機能性の開発  
……………窪田 英俊・中村 博文・河野 敏明・荒森 幾雄

**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……………塩月 孝博・譚 安江・田村 俊樹  
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……………松本 隆・佐々木 卓治

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  
……………若山 純一・赤沼 哲史・関口 博史  
……………大谷 敏郎・杉山 滋  
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……………山川 紘  
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  
……………真岡 哲夫

**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  
……………加藤 公彦・山口 亮・影山 智津子・稲垣 栄洋  
……………伊代住 浩幸・渡辺 哲・尾崎 剛一

**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……………(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  
……………(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……………(抄訳：杉山 公教)

**生研センターからのご案内**

……………大沼 昭夫・井上 元  
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 真樹・二村 典宏  
ねぎ収穫機の開発と利用状況……………青木 循

**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)



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

**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

## 編集後記

第116号をお届けします。本号の総説、総説関連情報では、高温、強酸性等の極限環境に棲息する原始紅藻“シゾン”（真核生物として初めて全ゲノムの解読完了）を取り上げ、黒岩常祥氏（立教大学）、三角修己氏（同）らに、その植物科学への展開、シゾンのゲノム情報、環境耐性への応用研究の展望等について詳説して戴きました。

その他の研究情報としては、射場厚氏（九州大学）らに植物のCO<sub>2</sub>感知機構、坂本知昭氏（東京大学）にイネの葉を直立させることによる収量増加、石野史敏氏（東京医科歯科大学）らに哺乳類の胎盤形成に欠かせないレトロトランスポゾン由来の遺伝子、西村芳樹氏（東京大学）らにミトコンドリアDNAの母性遺伝機構、塚本勝巳氏（東京大学）らにウナギの大回遊の謎解明に向けた研究、宮原佳彦氏（生研センター）にドリフト低減型ノズルの開発、西藤克己氏（青森県農林総合研究センター）に卵黄の大きな新緑色卵鶏の育成など、それぞれ貴重な研究情報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）、家藤治幸氏（（独）酒類総合研究所）、岡野淳氏（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戴きました執筆者各位に深甚の謝意を申し上げます。

なお、次号の総説等では、植物の環境耐性を別の視点から捉え、植物ホルモン（ABA）の制御と環境耐性作物の分子育種をめぐる動向などについてご紹介戴く予定です。（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116号

平成18年 7月15日発行

発行人 朝比奈 清

編集人 石川 清康

発行所 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

◎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 虎ノ門マリンビル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