

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成18年9月15日発行（隔月1回15日発行）

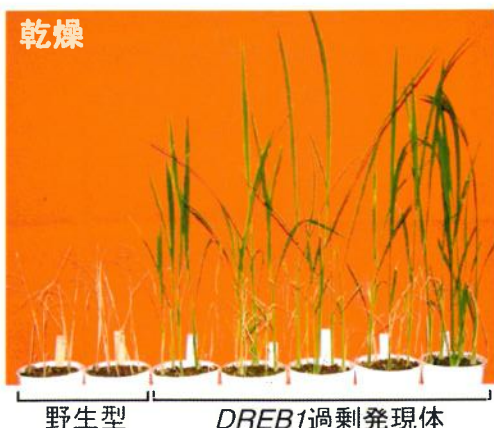
ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.117

15 SEPTEMBER, 2006

ブレインテクノニュース



*DREB1*遺伝子組換えイネが示した乾燥・塩・低温耐性

環境耐性作物開発のための制御因子の探索と分子育種への利用 (1) レギュロンバイオテクノロジーを利用した 環境ストレス耐性作物の開発の現状と展望

¹ 独立行政法人 国際農林水産業研究センター 生物資源領域,

² 独立行政法人 理化学研究所 植物科学研究センター,

³ 東京大学 大学院農学生命科学研究科

中島 一雄¹・篠崎 一雄²・篠崎 和子^{1, 3}

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

環境耐性作物開発のための制御因子の探索と分子育種への利用

- (1) レギュロンバイオテクノロジーを利用した環境ストレス耐性作物の開発の現状と展望 … 1
 中島 一雄¹・篠崎 一雄²・篠崎 和子^{1,3} (1(独) 国際農林水産業研究センター,
 2(独) 理化学研究所 植物科学研究センター, 3東京大学 大学院農学生命科学研究科)
- (2) アブシジン酸の制御因子, シグナル伝達因子を用いたネットワーク制御による環境
 ストレス耐性の付与 …………… 8
 片桐 健¹・梅澤 泰史^{1,2}・篠崎 和子^{3,4}・篠崎 一雄^{1,2} (1(独) 理化学研究所 筑波研
 究所, 2(独) 理化学研究所 植物科学研究センター, 3(独) 国際農林水産業研究センター,
 4東京大学 大学院農学生命科学研究科)

国内情報

- イネ脱粒性遺伝子の単離と栽培化における役割 …………… 14
 小西 左江子¹・井澤 毅²・矢野 昌裕² (1(社) 農林水産先端技術研究所, 2(独) 農業
 生物資源研究所)
- 脳内プロスタグランジンによる新しい食欲調節経路を活性化する低分子ペプチド …………… 19
 大日向 耕作・吉川 正明 (京都大学 大学院農学研究科)
- 霜降りになる遺伝子の一つを特定—上質牛肉の効率的生産が可能に …………… 24
 佐々木 義之 (ビッグ研究所 (株))
- 有害・有毒微細藻の分子モニタリング法の開発 …………… 28
 神川 龍馬^{1,3}・田辺 (細井) 祥子²・左子 芳彦¹ (1京都大学 大学院農学研究科, 2神戸
 大学 内海域環境教育研究センター, 3日本学術振興会特別研究員DC)
- 収量コンバインの開発 …………… 32
 日高 靖之・栗原 英治・牧野 英二・杉山 隆夫 ((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

- マルチプレックスPCRによるイチゴ品種識別技術の開発 …………… 37
 田崎 公久¹・柏谷 祐樹²・天谷 正行¹ (1栃木県農業試験場, 2芳賀農業振興事務所)

文献情報

- 豚精子における耐凍性及び原形質膜の脂肪酸組成の品種内及び品種間差 …………… 42
 K. E. Waterhouse et al. (*Reproduction*, 131, 887-894, 2006) 抄訳: 下司 雅也
- 植物による垂鉛無毒化の新しいメカニズム …………… 43
 G. Sarret et al. (*Plant Physiol.* 141, 1021-1034, 2006) 抄訳: 岩井 純夫
- パイエル板におけるH₂レセプターを介したヒスタミンのシグナルは, *Yersinia enterocolitica*
 の感染制御に重要である …………… 44
 S. A. Handley et al. (*PNAS*, 103, 9268-9273, 2006) 抄訳: 畑中 美咲
- 塩蔵魚卵食品のイクラ, たらこ, トビコ, カズノコの脂質部類および脂肪酸組成の分析 …… 45
 N. SHIRAI et al. (*Food Chemistry*, 94, 61-67, 2006) 抄訳: 那須 雅之

- 生研センターからのご案内 (平成18年度 生研センターUR対策現地検討会) …………… 46

表紙の説明

*DREBI*過剰発現イネの環境ストレス耐性を調べたところ, 形質転換イネは野生型のイネに比べて, 乾燥, 塩, 低温ストレス下で高い生存率を示し, *DREBI*遺伝子を過剰発現することでイネの環境ストレス耐性が向上することが明らかとなった。(図は, Ito, Y. et al. (2006), *Plant Cell Physiol.*, 47, 141-153 から許可を得て転載。) 詳細については, 1頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

環境耐性作物開発のための制御因子の探索と分子育種への利用 (1)
レギュロンバイオテクノロジーを利用した
環境ストレス耐性作物の開発の現状と展望

¹独立行政法人 国際農林水産業研究センター 生物資源領域,

²独立行政法人 理化学研究所 植物科学研究センター,

³東京大学 大学院農学生命科学研究科

中島 一雄¹・篠崎 一雄²・篠崎 和子^{1,3}

シロイヌナズナの転写因子DREB1を過剰発現させた植物では高いレベルの乾燥、塩、低温耐性が付与される。転写因子の遺伝子操作を通じてその制御下にある遺伝子群を調節する技術：レギュロンバイオテクノロジーを用いた環境ストレス耐性植物の開発が進んでいる。本稿では、環境ストレス応答に関わる転写因子、特にDREBとAREBに関する研究と、それらを利用した環境ストレス耐性作物の開発について紹介する。

1. はじめに

陸上植物は自由に移動することができないため、環境条件が悪化した場合、その環境に適応しなければ生き延びることができない。最近の分子レベルの研究から、植物は乾燥、塩、低温といった「環境ストレス」に対して多くの遺伝子を発現させ、それらのはたらきにより適応していることがわかってきた。私たちのグループでは、主にモデル実験植物であるシロイヌナズナを用いて、環境ストレス応答性遺伝子の発現機構を明らかにしてきた(図1)。さらに、DREB1Aなどのストレス応答に関わる転写因子の遺伝子操作により、その制御下にある多くのストレス応答性遺伝子の発現を変化させ、環境ストレス耐性のレベルを向上させることに成功した。ある転写因子により発現が制御されているオペロンの総体をレギュロン (regulon) と呼び、1つの転写因子の遺伝子操作により制御下にある多くの遺伝子の発現を変化させる技

NAKASHIMA Kazuo¹, SHINOZAKI Kazuo²,

YAMAGUCHI-SHINOZAKI Kazuko^{1,3}

¹〒305-8686 茨城県つくば市大わし1-1

²〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22

³〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

術は「レギュロンバイオテクノロジー (regulon biotechnology)」(図2)と呼ばれているが、本稿では、ストレス応答に関わる転写因子DREBとAREBに関する研究の現状と、レギュロンバイオテクノロジーによる環境ストレス耐性植物の開発に関して紹介する。詳細については他の総説を参照願いたい^{2), 11), 12), 17), 20), 21)}。

2. 転写因子DREBが関わる経路

(1) DREBは、どのようにして見出されたか

私たちは、培地あるいは土で栽培していたシロイヌナズナを引き抜き、空のシャーレで風乾させる「乾燥処理」を行い、発現が変化する遺伝子をディファレンシャル・スクリーニング法で単離した。得られたcDNAはRD (response to dehydration) 遺伝子と名付けられた。そのうちの1つRD29A (親水性タンパク質をコード) は、乾燥だけでなく、塩、低温にも応答して、素早く多量のmRNAを蓄積する遺伝子であることが明らかになった。私たちは、この遺伝子がどのような仕組みでストレスに応答して発現するのかに興味を持ち、転写を制御していると推定される転写調節領域 (プロモーター) に欠失や変異を入れることで、プロモーター上

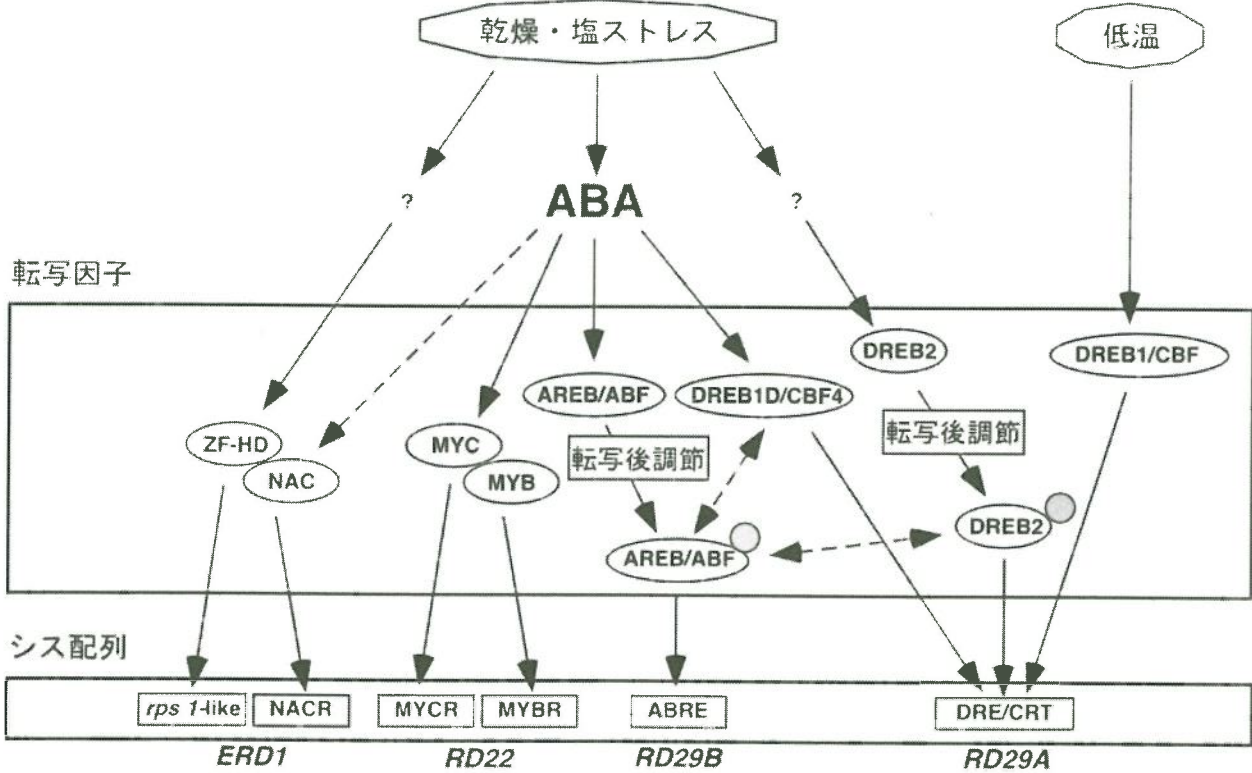


図1 乾燥・塩・低温ストレス応答のシグナル伝達・遺伝子発現ネットワーク
シス配列はボックスで、転写因子はサークルで示した。小さな丸はリン酸化などの修飾を示す。破線の片側矢印は推定される調節を示し、破線の両端矢印は相互作用の可能性があることを示す。詳細については、本文あるいは他の総説を参照願いたい^{2), 11), 12), 17), 20), 21)}。

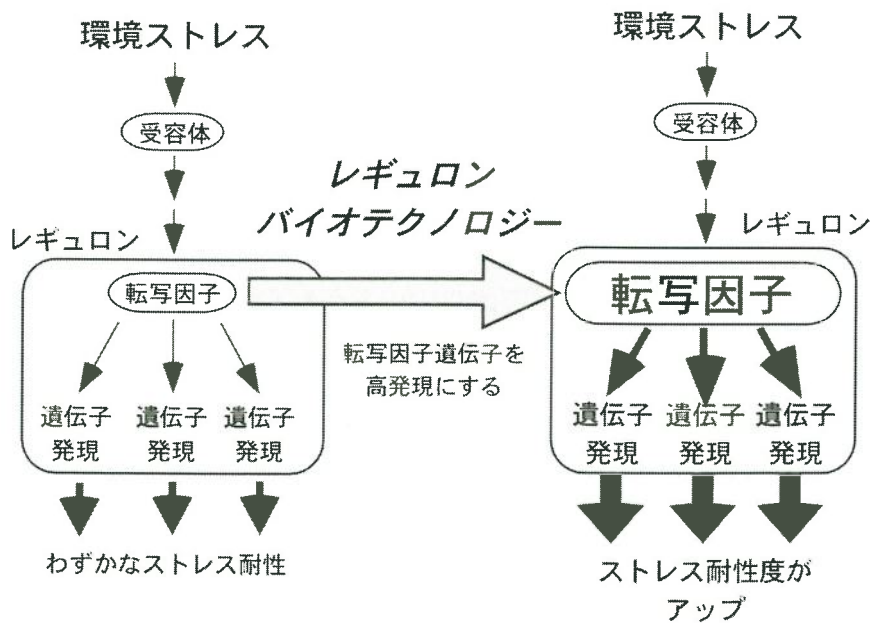


図2 レギュロンバイオテクノロジーによる環境ストレス耐性度向上のモデル
特定の転写因子を高発現にすることで、その制御下にある複数の遺伝子の発現を統合的に制御し、大幅なストレス耐性度アップが期待できる。

に繰り返し存在するTACCGACATという配列が、乾燥、塩、低温応答性シス配列としてはたらいっていることを明らかにし、DRE (Dehydration Responsive Element; CRT, C-repeatとも呼ばれる) と名付けた¹⁹⁾。この配列は、他の多くの乾燥あるいは低温応答性遺伝子のプロモーター上にも存在していた。

さらに私たちは酵母のワンハイブリッド法により、DRE配列に結合して転写を活性化する植物タンパク質をコードするcDNAを同定することに成功した。得られたタンパク質は、DREに結合するタンパク質 (DRE-binding protein) ということによってDREBと名付けられた⁹⁾。実際に得られたDREBは2種類、すなわちDREB1AおよびDREB2Aである。2つのDREBは植物特有のERF/AP2タイプのDNA結合ドメインを有していた。いずれのDREBタンパク質もDRE配列と特異的に結合し、DREを介して転写活性化能を上昇させた。さらに、DREB1Aには少なくとも2つ (DREB1BとDREB1C)、DREB2Aには1つのホモログ (DREB2B) が存在し、DREB1ファミリーの遺伝子群はいずれも低温で誘導されるが、乾燥・塩では誘導されないこと、DREB2ファミリーの遺伝子群は乾燥・塩で誘導されるが、低温では誘導されないことが明らかになった。なお、DREB1については、ほぼ時を同じくして米国ミシガン州立大学のThomashowらによってもCRTに結合するファクターとして単離され、CBF (C-repeat binding factor) と命名された。

(2) DREB1をシロイヌナズナで過剰発現させるとマルチストレス耐性が向上した

私たちはDREBの植物内における機能を明らかにするために、植物における恒常的高発現用プロモーターであるカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーターを用いて、DREB1A cDNAをシロイヌナズナに過剰発現させた。DREB1A過剰発現体では、DREB1Aのターゲット遺伝子であるRD29A遺伝子などプロモーター上にDREを持つ多くの遺伝子

(LEAタンパク質や糖代謝関係の酵素などの遺伝子) の発現量が、乾燥や低温処理をしていない時にも高くなっていることが、ノーザン解析やマイクロアレイ実験によって明らかになった^{10), 16)}。さらにDREB1A過剰発現体では、乾燥、塩、凍結に対して、野生型の植物より強くなっていることが明らかになった。DREB1Aの下流にある多くの遺伝子群のはたらきにより、強い耐性が得られたと考えられる。

ところがDREB1Aを恒常的に過剰発現させた植物には問題点があった。全体的に矮化や成長の遅れが見られたのである。DREB1の制御を通じて作られた産物中に、生育を妨げるものがあるためではないかと考え、非ストレス時には発現がオフになっているが、ストレス時に発現がオンになるRD29AプロモーターにDREB1A cDNAを結合してシロイヌナズナに導入した。得られた形質転換体では、ストレスがない時には野生型と同様の成長を示した⁷⁾。導入遺伝子であるDREB1Aやターゲット遺伝子であるRD29A等の発現量は、35Sプロモーターを用いた場合に比べて非ストレス処理時には弱く、ストレス時には強くなった。さらにこれらの植物では、乾燥、塩、低温に対して、35Sプロモーターを用いた時よりも高い耐性を示した。RD29Aプロモーターを用いることにより、そのプロモーター上にあるDREにDREB1Aタンパク質が結合し、自己増幅したためと考えられる。

(3) DREB1を利用した環境ストレス耐性作物の開発

私たちはDREBの手法を作物にも応用できないか検討した。最初に行ったのは、形質転換が容易なタバコを用いた実験である⁸⁾。35Sプロモーターを利用してシロイヌナズナのDREB1を過剰発現したタバコでは、環境ストレス耐性が向上した。しかしシロイヌナズナと同様、生育阻害が確認された。そこでシロイヌナズナのストレス誘導性プロモーターRD29Aを用いてシロイヌナズナのDREB1をタバコに導入して

みた。得られた形質転換体は、ストレスがない時には野生型と同様の成長を示した。すなわち、DREB1はシロイヌナズナ以外の双子葉植物でもストレス耐性を向上させること、シロイヌナズナのRD29Aプロモーターは、シロイヌナズナ以外の双子葉植物でも利用できることが示唆された。

一方、イネはアジアにおいて最も重要な作物であると同時に、単子葉植物のモデル実験植物としても分子レベルで研究が進んでいる。私たちのグループでは、イネのDREB遺伝子を同定してOsDREB遺伝子と名付けた (Osは*Oryza sativa*に由来)¹⁾。トウモロコシのユビキチンプロモーターを利用し、イネのOsDREB1AやシロイヌナズナのDREB1A遺伝子等を過剰発現する形質転換イネ (品種：キタアケ) を作出した²⁾。得られた形質転換イネは、DREB1遺伝子を過剰発現するシロイヌナズナと同様に、生長の遅れや矮化を示した。このことは、イネにとってもDREBタンパク質が生育にとってネガティブな影響を与えていることを示している。DREB1過剰発現イネの環境ストレス耐性を調べたところ、形質転換イネは野生型のイネに比べて、乾燥、塩、低温ストレス下で高い生存率を示し、DREB1遺伝子を過剰発現することでイネの環境ストレス耐性が向上することが明らかとなった (図3)。次に、全ゲノム配列が決定されているイネの品種 (日本晴) を用いて、イネのOsDREB1A、シロイヌナズナのDREB1A遺伝子を過剰発現させた。得られた形質転換イネを用いて、マイクロアレイ及びノーザン法により解析し、 α -アミラーゼなど12個の標的遺伝子が過剰発現していることを明らかにした。イネでの成功を受け、同じ単子葉植物である、コムギやトウモロコシなどの主要穀物においても、DREB1はストレス耐性の付与に利用できるかと期待される。しかし、イネにおいてもDREB1遺伝子を過剰発現した形質転換体では生育阻害が確認され、これを防ぐためには、ストレス誘導性プロモーターの利用やDREB1の改良を図る必要がある。

(4) 活性型DREB2はストレス耐性を向上させる

前述のようにDREB2は、DREに結合する転写因子としてDREB1と同時に単離された。DREB2A遺伝子を過剰発現したシロイヌナズ

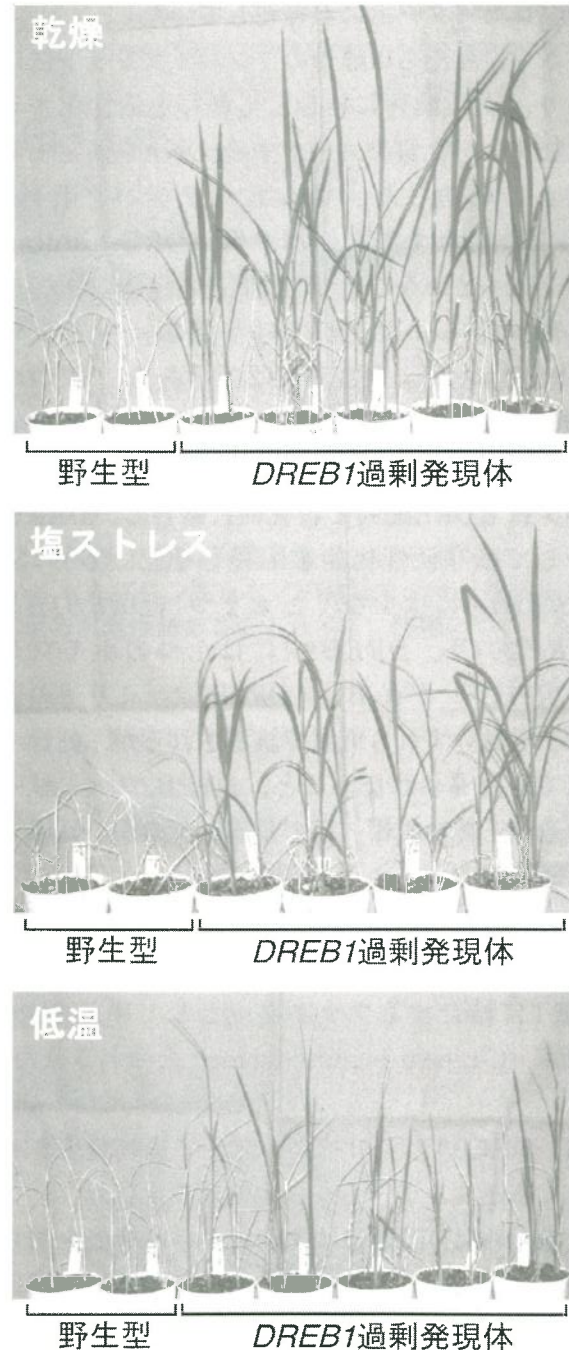


図3 DREB1遺伝子組換えイネが示した乾燥・塩・低温耐性

シロイヌナズナのDREB1遺伝子あるいはイネのOsDREB1遺伝子を、トウモロコシのユビキチンプロモーターで過剰に発現させた。Ito et al (2006)³⁾ から許可を得て転載。

ナにおいては*RD29A*遺伝子発現量も低く、形態上の表現型も弱かった。ストレスに対する耐性も野生型と同程度であった。よって、*DREB2*遺伝子の転写が活性化されるだけではストレス耐性遺伝子群を発現させるには十分ではなく、*DREB2*の転写活性化には他の因子やタンパク質の修飾が必要であると考えられていた。

最近私たちのグループでは、*DREB2A*遺伝子を部分的に欠失させることで活性型*DREB2A*を作出することに成功した¹⁴⁾。*35S*プロモーターを用いて活性型*DREB2A*を過剰発現したシロイヌナズナでは乾燥耐性が向上した。しかし、この植物では*DREB1A*を過剰発現した場合と同様、生育遅延が確認された。これを回避するために、*RD29A*プロモーターを用いて活性型*DREB2A*を過剰発現させた。その結果、生育遅延は見られなくなり、種子の生産量も野生型と同等であった。この植物でも乾燥耐性の向上が確認され、活性型*DREB2A*をストレス誘導性プロモーターで過剰発現させる手法は、ストレス耐性の向上に有効であることが明らかになった。活性型*DREB2*の標的遺伝子群は、*DREB1*の標的遺伝子群に比べて乾燥耐性に関わるものが多いことから、乾燥耐性作物を作出するには*DREB1*よりも活性型*DREB2*を利用した方が適していると思われる。また、興味深いことに、活性型*DREB2*の過剰発現体では熱ショックタンパク質遺伝子の発現が上昇しており、高温に対する耐性も向上している事も明らかにされた¹⁵⁾。

3. 転写因子AREBが関わる経路

シロイヌナズナから単離した乾燥応答性遺伝子である*RD29B*（親水性タンパク質をコード）は、植物ホルモンのアブシジン酸（ABA）によっても発現が誘導される。前述のように*RD29B*は*RD29A*とタンデムに並ぶ相同な遺伝子であり、プロモーター領域も非常によく似ている。*RD29B*のプロモーター解析を行った結

果、*ABRE* (*ABA Responsive Element*) 配列が乾燥誘導性に関わっていることが示された。更に酵母のワンハイブリッド法を用いて、この領域に結合するタンパク質のcDNAが単離された。それらを解析した結果、新規の*bZIP*型タンパク質コードしていることが明らかになり、*AREB1* (*ABA Responsive Element Binding Protein 1*) と名付けられた¹⁸⁾。

しかし、*AREB1*についても*DREB2*と同様に、ネイティブな状態で植物に過剰発現させても機能が発現しなかった。そこで、*AREB1*がABAによりリン酸化されることに着目して、*AREB1*のリン酸化に関わるアミノ酸を置換した活性型*AREB1*を作成した。その一方で、活性化ドメインに着目して活性型*AREB1*を作成した。これらの活性型*AREB1*を過剰発現したシロイヌナズナを解析したところ、いずれの過剰発現体においても、*RD29B*等の遺伝子発現レベルが上昇し、乾燥耐性能が向上していることが明らかになった^{31), 41)}。

4. おわりに

私たちのグループでは、国内外の多くのグループと共同でシロイヌナズナの*DREB1*あるいはイネの*OsDREB1*を種々の農作物、花、樹木などに導入し、環境ストレス耐性植物の開発へ向けた応用研究も行っている¹¹⁾。例えばフィリピンのIRRIでは、インディカのイネに、メキシコのCYMMITではコムギに*DREB1*を導入している。すでに、*RD29A*プロモーターを用いて*DREB1A*を過剰発現させたコムギでは、乾燥ストレス耐性が向上することが示されている¹³⁾。

また、前述のように*DREB1*だけでなく、*DREB2*や*AREB1*といった転写因子もストレス耐性を向上させることを明らかにしてきた。レギュロンバイオテクノロジーを用いた環境ストレス耐性の向上は、他の研究グループからも報告されている（表1）。しかし、多くの場合、生育阻害を伴うというネガティブな側面を持つ

表1 レギュロンバイオテクノロジーを利用した環境ストレス耐性植物の作出例

転写因子の種類	遺伝子の由来	形質転換体	発現方法	耐性
AP2/ERF ファミリー				
DREB1A/CBF3	シロイヌナズナ	シロイヌナズナ コムギ タバコ <i>Brassica napus</i> イネ	CaMV 35S, <i>RD29A</i> <i>RD29A</i> CaMV 35S, <i>RD29A</i> CaMV 35S トウモロコシ <i>Ubi</i>	乾燥、塩、凍結 乾燥 乾燥、凍結 乾燥、凍結 乾燥
DREB1B/CBF1	シロイヌナズナ	シロイヌナズナ トマト イチゴ <i>Brassica napus</i>	CaMV 35S CaMV 35S, <i>HVA22</i> CaMV 35S CaMV 35S	凍結 乾燥、低温、酸化ストレス 凍結 乾燥、凍結
DREB1C/CBF2	シロイヌナズナ	<i>Brassica napus</i> シロイヌナズナ	CaMV 35S ノックアウト	乾燥、凍結 乾燥
DREB1D/CBF4	シロイヌナズナ	シロイヌナズナ	CaMV 35S	乾燥、凍結
DREB1F/DDF1	シロイヌナズナ	シロイヌナズナ	CaMV 35S	塩
ZmDREB1	トウモロコシ	シロイヌナズナ	CaMV 35S	乾燥、凍結
OsDREB1A	イネ	シロイヌナズナ イネ	CaMV 35S トウモロコシ <i>Ubi</i>	乾燥、塩、凍結 乾燥、塩、低温
DREB2 (内部欠失による活性型)	シロイヌナズナ	シロイヌナズナ	CaMV 35S, <i>RD29A</i>	乾燥
ベーシック・ロイシン・ジッパー(bZIP) ファミリー				
AREB1/ABF2	シロイヌナズナ	シロイヌナズナ	CaMV 35S	乾燥、塩、熱、酸化ストレス
AREB1/ABF2 (内部欠失による活性型)	シロイヌナズナ	シロイヌナズナ	CaMV 35S	乾燥
AREB1/ABF2 (リン酸化部位変異による活性型)	シロイヌナズナ	シロイヌナズナ	CaMV 35S	乾燥
AREB2/ABF4	シロイヌナズナ	シロイヌナズナ	CaMV 35S	乾燥、塩、低温、凍結、熱、酸化ストレス
ABF3	シロイヌナズナ シロイヌナズナ	シロイヌナズナ イネ	CaMV 35S トウモロコシ <i>Ubi</i>	乾燥、塩、低温、凍結、熱、酸化ストレス 乾燥
MYC ファミリー				
AtMYC2	シロイヌナズナ	シロイヌナズナ	CaMV 35S	浸透圧(マンニトール)
MYB ファミリー				
AtMYB2	シロイヌナズナ	シロイヌナズナ	CaMV 35S	浸透圧(マンニトール)
Osmyb4	イネ	シロイヌナズナ	CaMV 35S	低温、凍結
Znフィンガー				
SCOF-1	ダイズ	シロイヌナズナ タバコ	CaMV 35S CaMV 35S	低温 低温
STZ	シロイヌナズナ	シロイヌナズナ	CaMV 35S	乾燥
NAC				
ANAC019/ANAC	シロイヌナズナ	シロイヌナズナ	CaMV 35S	乾燥
ANAC055/AtNAC3	シロイヌナズナ	シロイヌナズナ	CaMV 35S	乾燥
ANAC072/RD26	シロイヌナズナ	シロイヌナズナ	CaMV 35S	乾燥

ている。今後は、転写因子の機能解析などを通じて、各転写因子が生育に及ぼすネガティブな影響を排除する技術を開発する一方で、適当な時期、適当な組織で発現するようにプロモーターを改良する必要がある。実際に干ばつ等の試験を行った結果を実験室にフィードバックさせ、改良していくことも重要である。遺伝子組換え作物は、世界的には拡大の方向にあり、特に開発途上地域における遺伝子組換え作物の栽培面積は急増している⁶⁾。DREB等を利用したレギュロンバイオテクノロジーが、開発途上地域で今後ますます深刻になることが予想される食料問題や、砂漠化、森林破壊といった環境問題の解決のために少しでも貢献することを期待している。

謝 辞

本研究は(独)生研センターの委託研究として行われたものであり感謝する。また、本研究は国際農林水産業研究センター、理化学研究所の共同研究で行われた。

文 献

- 1) Dubouzet, J. G. et al. (2003), *Plant J.*, 33, 751-763
- 2) Fujita, M. et al. (2006), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9, 1-7
- 3) Fujita, Y. et al. (2005), *Plant Cell*, 17, 3470-3488
- 4) Furihata, T. et al. (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 1988-1993
- 5) Ito, Y. et al. (2006), *Plant Cell Physiol.*, 47, 141-153
- 6) James, C. (2005), ISAAA Briefs No. 34, ISAAA, Ithaca, NY.
- 7) Kasuga, M. et al. (1999), *Nature Biotechnol.*, 17, 287-291
- 8) Kasuga, M. et al. (2004), *Plant Cell Physiol.*, 45, 346-350
- 9) Liu, Q. et al. (1998), *Plant Cell*, 10, 1391-1406
- 10) Maruyama, K. et al. (2004), *Plant J.*, 38, 982-993
- 11) Nakashima, K. et al. (2005), *JARQ*, 39, 221-229
- 12) Nakashima, K. et al. (2006), *Physiologia Plantarum*, 126, 62-71
- 13) Pellegrineschi, A. et al. (2004), *Genome*, 47, 493-500
- 14) Sakuma, Y. et al. (2006), *Plant Cell*, 18, 1292-1309
- 15) Sakuma, Y. et al. (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press
- 16) Seki, M. et al. (2001), *Plant Cell*, 13, 61-72
- 17) Umezawa, T. et al. (2006) *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17, 113-122
- 18) Uno, Y. et al. (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 1632-1637
- 19) Yamaguchi-Shinozaki, K. et al. (1994), *Plant Cell*, 6, 251-264
- 20) Yamaguchi-Shinozaki, K. et al. (2005), *Trends Plant Sci.*, 10, 88-94
- 21) Yamaguchi-Shinozaki, K. et al. (2006), *Ann. Rev. Plant Biol.*, 57, 781-803

◀ 総 説 ▶

環境耐性作物開発のための制御因子の探索と分子育種への利用 (2)
アブシジン酸の制御因子、シグナル伝達因子を用いた
ネットワーク制御による環境ストレス耐性の付与

¹独立行政法人 理化学研究所 筑波研究所 植物分子生物学研究室,

²独立行政法人 理化学研究所 植物科学研究センター 機能開発研究グループ,

³独立行政法人 国際農林水産業研究センター 生物資源部,

⁴東京大学 大学院農学生命科学研究科 植物分子生理学研究室

片桐 健¹・梅澤 泰史^{1,2}・篠崎 和子^{3,4}・篠崎 一雄^{1,2}

作物の収量を上げるために、遺伝子操作を利用して乾燥、低温、塩害など環境ストレスに強い作物の開発が期待されている。我々は、モデル植物を利用して乾燥ストレス耐性獲得に深い関係のある植物ホルモンアブシジン酸(ABA)の合成や代謝に関わる酵素、さらにシグナル伝達に関わる制御因子に注目して乾燥ストレス応答の分子レベルでの研究を進めてきた。本稿では、環境ストレス応答の制御因子の機能解析と、制御因子を用いて行った環境ストレス耐性の遺伝子組換え作物の開発に関わる研究成果に関して概説する。

1. はじめに

アブシジン酸(ABA)は別名ストレスホルモンとも呼ばれ、植物における様々な環境応答に関与している。特に、ABAは乾燥ストレスに対する応答において、気孔の閉鎖や乾燥応答性遺伝子の発現を制御しており、乾燥耐性獲得に関与する主要な因子である。また、ABAは種子休眠や発芽過程の制御や葉の老化にも必須であり、さらに開花制御に関与することも知られている。

植物中のABA量はダイナミックに変動しており、ABAの作用と内生量の増加との間にはしばしば相関が見られる。たとえば、植物が乾燥ストレスを受けるとABAが急速に合成されるとともに、葉の気孔が閉鎖され水分の蒸散が抑えられる。一方、乾燥ストレスを受けた植物が再吸水によって回復する過程では、ABA分

KATAGIRI Takeshi¹, UMEZAWA Taishi^{1,2},

YAMAGUCHI-SHINOZAKI Kazuko^{3,4},

SHINOZAKI Kazuo^{1,2}

¹〒305-0074 茨城県つくば市高野台3-1-1

²〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22

³〒305-8686 茨城県つくば市大わし1-1

⁴〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

解が促進される。また、種子が成熟して休眠性を獲得する登熟後期にかけて内生ABA量が顕著に増加するが、種子が発芽するときにはABAが分解される。こうした内生ABA量の変化は、細胞に影響を与え、さらにシグナル伝達系によって細胞内に伝えられ、遺伝子発現を含む様々な生理応答が誘発される。したがって、ABAの合成・分解の制御やABAの細胞内シグナル伝達系に関わる制御因子の同定およびそれらの機能解析は、ストレス耐性の獲得や種子休眠など、ABAに関わる植物の形質を人為的に制御するための研究基盤を確立する上で重要である。本稿では、ABAの合成・分解および細胞内シグナル伝達に関与する因子の環境ストレス応答における役割について、筆者らのグループの研究成果を中心に概説するとともに、それらの制御因子を用いた環境ストレス耐性形質転換植物作製への応用例について紹介する。なお、詳細については最近の総説を参照されたい¹⁾。

2. ABAの生合成および分解経路

ABAの生合成および分解経路については、近年の分子遺伝学的な解析から詳細が明らかになってきた²⁾。最近では、ABA合成・分解に

関わる遺伝子を操作して、植物中のABA量を調節し、乾燥耐性を付与する試みがなされている。図1はABA合成および分解に関する代謝経路を示したものである。ABAはゼアキサントチンから合成されるが、この生合成経路では、9-*cis*-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼ (NCED) が律速段階とされているため、NCEDの活性がABA量の増減に効果的であると考えられた(図1)。我々は乾燥ストレス時のシロイヌナズナにおいてAtNCED3の遺伝子発現が誘導されることを見だし、AtNCED3を過剰に発現させたシロイヌナズナ形質転換植物を複製して、内生ABA量の増加および乾燥耐性の向上を確認した³⁾。同様の結果が、タバコを用いた場合でも報告されている。しかしながら、

NCEDを過剰発現させたときの問題として、ABA量の増加が期待していたほどではないことが挙げられた。ABAの増加は2倍程度にとどまっており、ABA分解系により増加量が抑制されていると考えられた。

最近、ABA分解の初発反応を触媒するABA 8'-ヒドロキシラーゼの実体が、チトクロムP450の一種のCYP707Aファミリーであることが報告された(図1)。シロイヌナズナのゲノム上には、4つのCYP707Aファミリー(CYP707A1~4)が存在するが、そのうちCYP707A3が乾燥ストレスおよびその後の再吸水処理によって顕著に誘導されることが明らかとなった⁴⁾。CYP707A3の遺伝子破壊株では内生ABA量が増加しており、その差は乾燥ストレスを受けた

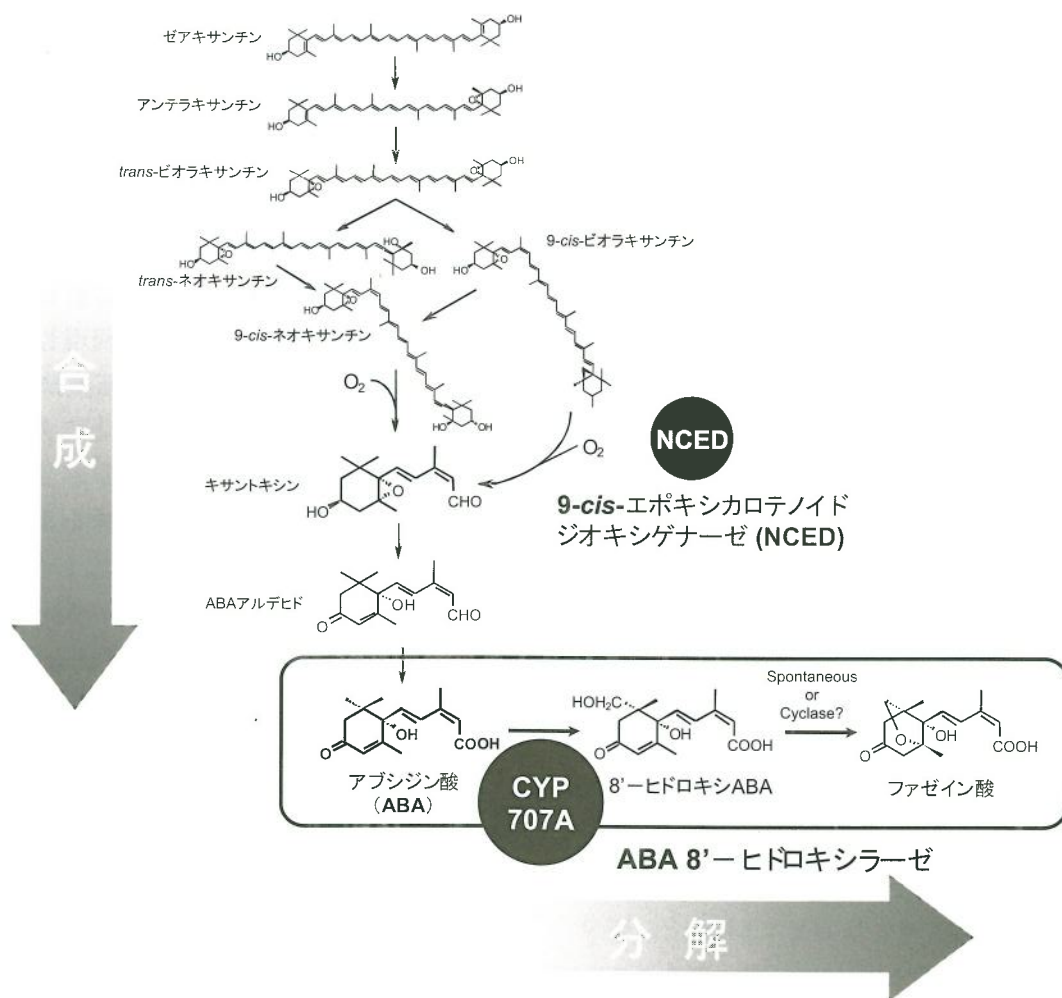


図1 植物におけるアブシジン酸の生合成および分解経路

ABAの合成系では、NCEDによるカロテノイドの開裂反応が律速段階であるとされている。一方、分解系では初発のABA8'位水酸化反応を触媒するCYP707Aがもっとも重要と考えられている。

ときにさらに拡大した。また再吸水後のABA量の減少も野生型に比べると緩やかである。したがって，CYP707A3は植物の乾燥ストレス時に働く主要なABA 8'-ヒドロキシラーゼであることが示された。実際，内生ABA量が増加したCYP707A3遺伝子破壊株では，乾燥耐性が有意に向上していた。また，CYP707A3を過剰発現させると，植物の内生ABA量が減少することが確認されたことから，CYP707Aファミリーを用いたABA量の制御への利用の可能性が示された。

植物の内生ABA量を人為的に制御して，植物の乾燥耐性や種子休眠性を改変することはバイオテクノロジーの面から魅力的な課題である。現在，そのためのツールとしてABAの生合成および分解の両方の酵素遺伝子が同定されて利用可能となり，植物の内生ABA量をよりきめ細かに制御するための技術開発が可能となった。今後は，上記のABA生合成および分解の研究成果を，他の作物などを用いて実用化に

結びつける努力が必要である。また，環境ストレス耐性に関する分子育種への利用だけでなく，種子の休眠の制御にも利用できると期待される。

3. ABA受容体の候補遺伝子同定の試み

乾燥，塩などの環境ストレスに対する植物の応答にABAは重要な働きをしている。したがって，植物の環境ストレス応答におけるABAのシグナル伝達系の理解には，ABAの受容機構を明らかにすることが重要な課題である。植物の細胞が環境ストレスにより産生するABAのシグナルをどのように受容しているかに関して，現在精力的に研究が進められている。

植物ホルモンのブラシノステロイドの受容体が，受容体型プロテインキナーゼであることから，我々は，ABA存在下で発現量が増加する受容体型キナーゼRPK1に着目して研究を行った（図2）。RPK1タンパク質の細胞内での局在を調べると，細胞膜上で機能していることが示唆された。さらに，RPK1の機能を明らかにするために形質転換植物や，遺伝子破壊変異体を利用した。まず，アンチセンスRPK1形質転換植物のABA感受性について解析したところ，発芽及び成長の両過程でABA非感受性を示した⁵⁾。RPK1遺伝子破壊株を用いた実験でも同様な結果を得た。したがって，RPK1はABAの初期応答に関与する可能性は高いが，現在までのところRPK1タンパク質とABAの直接的な結合に関しては観察されていない。受容体型キナーゼ遺伝子は植物ゲノム中に600以上存在することが明らかにされている。受容体はヘテロ2量体で機能することが多いこ

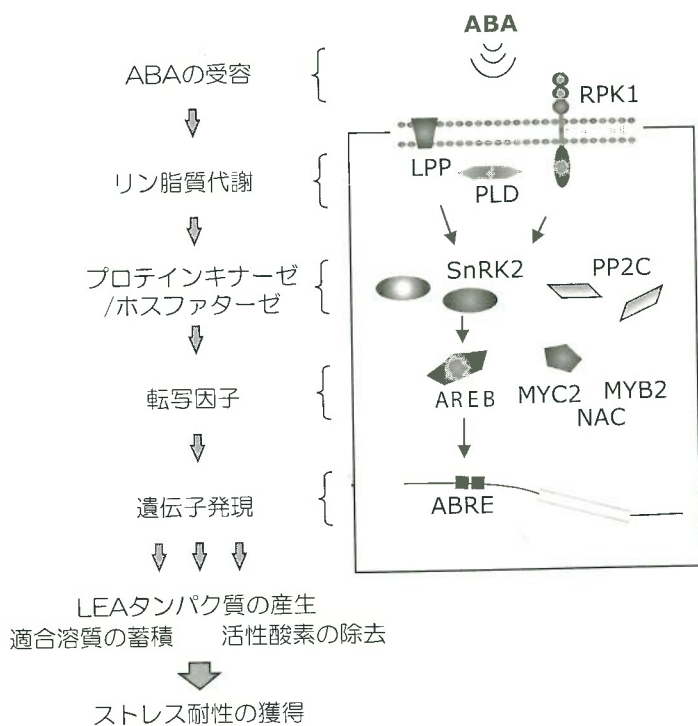


図2 ABAの細胞内シグナル伝達に関わる制御因子と環境ストレス応答と耐性の獲得

ABAのシグナルは，細胞レベルで受容されリン脂質代謝やプロテインキナーゼなどの細胞内シグナル伝達系により核内の転写因子に伝えられ，遺伝子発現により種々の代謝産物が産生する。本研究では，ABAの制御因子やシグナル伝達因子を用いて，細胞内のシグナルの流れを人為的に改変し，ストレス耐性作物の作出を目指した。

とから，RPK1以外にも，細胞膜上で機能しうるABAの受容体の候補因子は複数存在する可能性も考えられる。受容体型キナーゼ遺伝子の中で，ABAに対する応答性に強い影響を与える遺伝子を同定することは重要な課題である。

近年花成誘導に関与するRNA結合タンパク質FCAに強いABA結合活性があることが発見され，このFCAが花成誘導時のABAシグナリングに関わりABA受容体として機能しているという報告がなされている⁶⁾。したがって，環境ストレス応答に関しても可溶性タンパク質がABA受容体として機能する可能性があり，解析が必要である。

4. ABAのシグナル伝達とタンパク質のリン酸化・脱リン酸化反応

ABAが受容体によって認識された後は，細胞内シグナル伝達系を介して環境ストレスの信号が伝えられ，遺伝子発現などの応答が誘導される(図2)。この過程にタンパク質のリン酸化・脱リン酸化が関与することは古くから知られており，近年になってABAのシグナル伝達に関わるプロテインキナーゼ，およびプロテインホスファターゼが次々に明らかになってきた。たとえば，シロイヌナズナのABA非感受性変異体として単離された*abi1*および*abi2*の原因遺伝子はいずれも相同性の高いプロテインホスファターゼ2C型(PP2C)をコードしていた。シロイヌナズナの他のPP2C(*AtPP2CA/AHG3*, *HAB1*など)についても，ABAのシグナル伝達因子であることが明らかとなっている。また，プロテインホスファターゼ2A型のサブユニットであるRCN1が孔辺細胞におけるABAシグナリングに関与しているという報告がある。

一方，ABAシグナルに関わるプロテインキナーゼについても複数の遺伝子が単離されている。まず，ソラマメの孔辺細胞よりABA依存的に活性化するプロテインキナーゼAAPKが精製され，気孔の制御に関与することが示唆さ

れた。また，我々はシロイヌナズナ培養細胞からABAによって活性化するプロテインキナーゼであるSRK2Eを単離した⁷⁾。SRK2Eは，AAPKと同じくSNF1-related protein kinase 2(SnRK2)ファミリーと呼ばれるグループに属し，シロイヌナズナに10個存在するSnRK2の1つである。SRK2Eの遺伝子破壊株ではABA依存的な気孔閉鎖が抑制されたことから，SRK2EはABAによって活性化するプロテインキナーゼであり，気孔の閉鎖を制御していることが明らかとなった(図2)。またSRK2Eは，赤外線カメラによって蒸散能に異常を来した変異体としてスクリーニングされた*ost1*変異株の原因遺伝子OST1と同一のものであり，両者はほぼ同時期に報告された⁸⁾。

SnRK2ファミリーのプロテインキナーゼはABAだけでなく高浸透圧によっても活性化することから，ABAとは別のシグナル伝達系にも関与していることが予想された。SRK2Cは，高浸透圧によって強く活性化するプロテインキナーゼの1つであり，SRK2Eとは異なる機能を持つことが示された。SRK2Cを過剰発現させた形質転換植物を作製したところ，顕著な乾燥耐性の向上が認められた(図3)⁹⁾。さらなる解析からストレス処理条件下で，この過剰発現体では野生型と比較してストレス応答性遺伝子群が顕著に発現誘導されていることが明らかとなった。したがって，SRK2Cがそれら遺伝子群の発現を制御するシグナルスイッチとして機能すると考えられた。特筆すべきことは，SRK2Cを過剰発現させても非ストレス条件下では活性化しないため，通常の生育にはほとんど影響を及ぼさないことである。このことは分子育種において都合のよい形質であるため，現在実用化に向けた研究が進行中である。

他にも，SnRK2と相同なキナーゼドメインを持つSnRK3ファミリーにおいて，ABAシグナルに関与する因子がいくつか報告されている。SnRK3はシロイヌナズナゲノム上に25個存在し，PKSあるいはCIPKとも呼ばれる。これまでに，このファミリーの中からPKS3

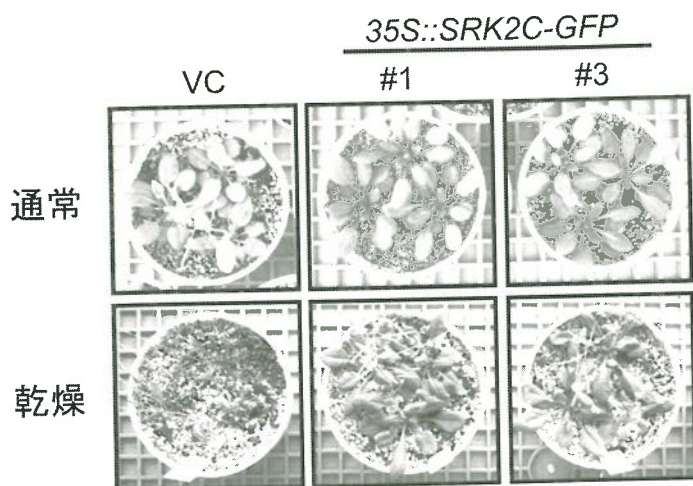


図3 *SRK2C*遺伝子過剰発現体の乾燥ストレス耐性試験
 ベクターコントロール (VC) と *SRK2C* の過剰発現体 (#1 および #3) について通常の灌水と灌水停止14日を行うことで乾燥耐性を評価した。

(CIPK15/SnRK3.1) や CIPK3 (PKS12/SnRK3.16) が、ABA のシグナル伝達因子として報告されている。SnRK3 は、 Ca^{2+} 結合タンパク質である CBL ファミリーが相互作用して機能するという特徴を持っている。シロイヌナズナに 10 個存在する CBL ファミリーのうち、CBL9 が ABA シグナルに関与することが報告されている。最近、CIPK23 (PKS17/SnRK3.23) が CBL1 あるいは CBL9 と相互作用し、カリウムトランスポーターである AKT1 を制御していることが報告された¹⁰⁾。CBL9 は ABA シグナルにも関与していることが報告されているため、カリウムトランスポーターとの関連は注目すべき知見である。

上記のように、タンパク質のリン酸化による ABA のシグナル伝達は、乾燥や塩ストレスの場合と類似あるいは同一の因子が利用されている場合があり、種々のシグナルのクロストークが予想される。これらの因子が複雑に絡み合ったシグナル伝達経路の全貌を解き明かすのは容易なことではないが、今後の研究の進展が期待される場所である。SnRK2 の例に示したように、シグナル伝達因子には広範囲の細胞内応答を制御でき、またその出力を ON/OFF できるという特徴があるため、植物の分子育種にきわめて有効であるといえる。

5. リン脂質代謝を介した ABA シグナル伝達系の解析

リン脂質は、細胞膜の構成成分と考えられていたが、外界からの種々の刺激によりいくつかのリン脂質が代謝されることが発見されるなど、研究の進展に伴ってリン脂質がシグナル伝達に関与していることがわかってきた。さらに動物の系ではリン脂質代謝を介したシグナル伝達に不具合が生じると、重大な疾病を引き起こすことが医学的な研究から明らかにされている。最近、高等植物においてもリン脂質の代謝は、ストレス

応答や形態形成のシグナル伝達に関与していることが明らかにされている。

リン脂質の 1 つ、ホスファチジン酸 (PA) は、シロイヌナズナにおいて乾燥ストレス処理によって産生することが筆者らの研究によって明らかにされた。したがって、PA が乾燥ストレスのシグナリングに関わり、何らかの機能を持っていると予想し、人為的に PA の代謝を制御することにより、乾燥耐性の付与などが可能かを検討した。PA は、大部分が脂質の代謝酵素ホスホリパーゼ D (PLD) により産生されるので、PA の代謝制御する酵素として PLD に着目した。乾燥ストレス時に機能する遺伝子は、乾燥処理時に遺伝子発現が誘導されることが多いので、乾燥処理により発現誘導される PLD 遺伝子を単離し、これを *AtPLD δ* と名付けた。*AtPLD δ* 遺伝子の発現量を減少させることで、PA の代謝を制御できるのかを調べるために、*AtPLD δ* アンチセンス形質転換植物を作製し、乾燥処理による PA の産生量を調べたところ、*AtPLD δ* が乾燥ストレスにより活性化し PA を産生していることを明らかにした¹¹⁾。後の研究で、この *AtPLD δ* は、乾燥ストレスのみならず低温ストレスにも関与していることがわかり、PA の代謝を制御することにより植物に耐凍性を付与しうることが報告されている¹²⁾。

このようにPAの代謝を制御する技術は農業的にも応用可能であり, 将来的にストレス耐性作物の作出に役立つことが期待される。

発芽過程のPAの産生量を調べたところ, 発芽の初期過程においてPAが蓄積しており, 発芽過程が進むとPA量が減少することを新たに発見した。そこでPAを分解する酵素, リン酸化脂質ホスファターゼ (LPP) に着目して, この遺伝子破壊株を用いた解析から, 発芽過程でPAが過剰に蓄積するとABAに対する感受性が上昇することが明らかとなった。このことは, 発芽過程でPAがABAのシグナルの正の制御因子であることを示している。したがってPAは植物の種子発芽においても機能していることが明らかとなった¹³⁾。このようにPAの代謝を制御する技術は農業的にも応用可能であり, 将来的に作物種子の発芽制御に役立つことが期待される。

6. おわりに

植物の細胞内シグナル伝達ネットワークの中で機能する制御因子は, 複数の遺伝子発現や植物ホルモン, 代謝産物をコントロールすることによって植物の機能を高めうる新たなツールとして利用できることがわかった。本研究で示したように, ABAの合成・分解系のキー酵素, ABAのシグナル伝達に関わるプロテインキナーゼなど制御因子を利用して乾燥ストレス耐性を付与することが可能になった。これらの制御因子はシグナル伝達の下流で多くの遺伝子発現やタンパク質の活性化を進め, 細胞の環境ストレス耐性を制御できることを明らかにした。

温暖化による環境問題や人口爆発による食糧, 資源エネルギー問題など, 現在人類が直面している地球規模での問題は深刻である。食糧や有用物質の生産者である植物の高度利用は, これら諸問題の克服に貢献しうる重要課題といえ, 植物科学研究を基盤とした植物機能の向上技術は, それに大きく寄与するものと期待され

る。現在, モデル植物シロイヌナズナにおいて得られた環境ストレス耐性機構の基礎的な研究成果が, 有用作物へ応用・展開されつつあり, さらにゲノム研究の成果が有用遺伝子の探索に重要な役割を果たすことが期待されている。

謝 辞

本研究は (独) 生研センターの委託研究として行われたものであり感謝する。また, 本研究は理化学研究所, 国際農林水産業研究センターの共同研究で行われた。

文 献

- 1) Umezawa, T. et al. (2006), *Curr Opin Biotechnol* 17, 113-122
- 2) Nambara, E. et al. (2005), *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 165-185
- 3) Iuchi, S. et al. (2001), *Plant J* 27, 325-333
- 4) Umezawa, T. et al. (2006), *Plant J* 46, 171-182
- 5) Osakabe, Y. et al. (2005), *Plant Cell* 17, 1105-1119
- 6) Razem, F. A. et al. (2006), *Nature* 439, 290-294
- 7) Yoshida, R. et al. (2002), *Plant Cell Physiol* 43, 1473-1483
- 8) Mustilli, A. C. et al. (2002), *Plant Cell* 14, 3089-3099
- 9) Umezawa, T. et al. (2004), *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17306-17311
- 10) Xu, J. et al. (2006), *Cell* 125, 1347-1360
- 11) Katagiri, T. et al. (2001), *Plant J* 26, 595-605
- 12) Li, W. et al. (2004), *Nat Biotechnol* 22, 427-433
- 13) Katagiri, T. et al. (2005), *Plant J* 43, 107-117

◀国内情報▶

イネ脱粒性遺伝子の単離と栽培化における役割

¹社団法人 農林水産先端技術研究所,

²独立行政法人 農業生物資源研究所

小西 左江子¹ ・ 井澤 毅² ・ 矢野 昌裕²

穀物の栽培化において、種子（穀粒）の脱粒性を失うことは、重要なステップの1つである。我々は、イネのジャポニカ品種日本晴とインディカ品種カサラスの品種間差を利用した遺伝解析により、脱粒性遺伝子 $qSH1$ の単離に成功し、栽培化の過程で生じた脱粒性喪失の原因となる1個のSNP（single nucleotide polymorphism；一塩基多型）を同定した。また、このSNPが12kb離れた領域に存在する $qSH1$ 遺伝子本体の離層（脱粒を引き起こす組織）における転写を妨げ、そのことによって、種子が難脱粒性になることを明らかにした。

1. はじめに

主要穀物の栽培化は約1万年前に起こったと考えられる¹⁾。栽培化の過程では、人によって農業上重要な形質についての選抜が比較的短期間に行われたと考えられている。イネにおいて、栽培化による人為的な選抜を受けたと推定される形質としては、出穂期、草型、草丈、種子サイズ、ノゲ、根系、粒色、でんぷん組成および脱粒性^{2), 3)}などがあげられる。そのなかでも脱粒性の喪失は、栽培化にとって、最も重要な変化の1つである。

野生イネは強い脱粒性を持ち、種子が成熟するにつれて自然脱粒する。この性質は、効率的な種子飛散には不可欠で、ノゲの存在と共に、自然界での子孫存続においては重要であると考えられる。しかしながら、作物としてみると、収穫減につながることから、脱粒しにくいことが栽培化されたイネには必要な性質となる。一方、脱粒性の違いに合わせて、様々な脱穀方法が生まれてきたことから、脱粒性は今日でも重要な農業形質の1つである。

KONISHI Saeko¹, IZAWA Takeshi², YANO Masahiro²

¹〒305-0854 茨城県つくば市上横場字一杯塚446-1

²〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2

我々は、このイネの脱粒性に着目し、自然変異（品種間差）を利用した遺伝解析により脱粒性に関与する遺伝子を単離することで、栽培化過程で生じた遺伝子変異をとらえ、ひいては脱粒性の分子機構の理解を深めたいと考えて研究を行った。

2. イネ脱粒性遺伝子の単離

インディカ品種カサラスは、登熟すると容易に脱粒する。一方、ジャポニカ品種の日本晴は、登熟しても脱粒しない（図1A）。

脱粒性に関与する遺伝子の染色体上での位置を決定するために、まず、日本晴とカサラスのF2集団を用いた量的形質遺伝子座（QTL）解析を行った。その結果、5カ所の染色体領域に、関与するQTLの存在が示唆されたが、第1染色体長腕上に見いだされたQTLが最も大きな作用力を示した（図1B）⁴⁾。そこで、このQTLに着目し、*QTL of seed shattering on chromosome 1 (qSH1)*と名付けて解析を進めた。

$qSH1$ の遺伝子作用の違いを調べるために、 $qSH1$ 領域のみをカサラス型に、それ以外の領域を日本晴型に固定した準同質遺伝子系統NIL（ $qSH1$ ）を作成し、日本晴との形態比較を行った（図1C）。一般に、脱粒性は、種子と枝梗

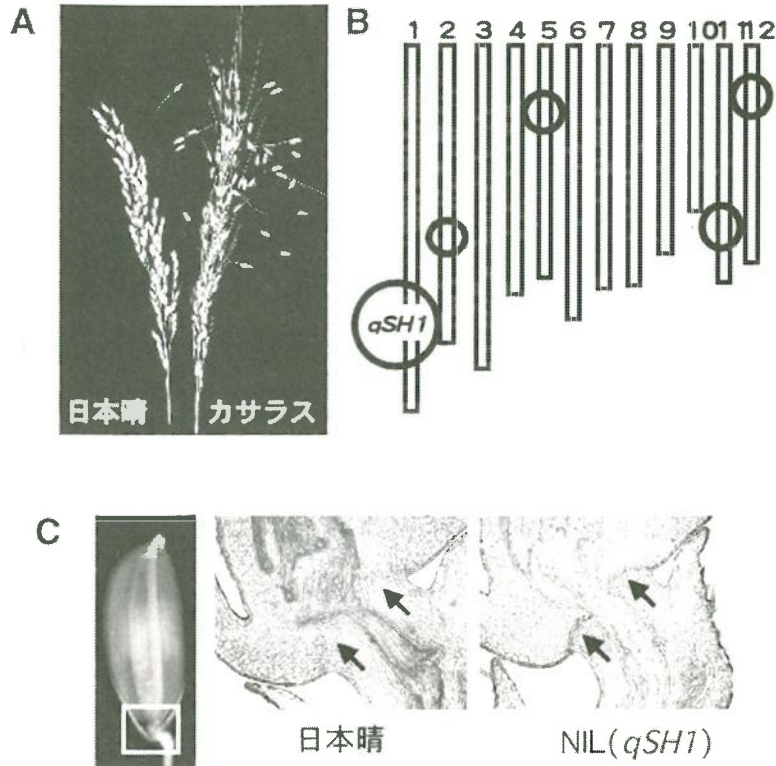


図1 イネの脱粒性

A：遺伝子単離に用いた親品種のイネの穂。左はジャポニカ品種の日本晴，右はインディカ品種のカサラスの登熟後の穂を示す。日本晴は登熟後に穂を握っても脱粒しないが，カサラスは穂を軽く握っただけで脱粒する。B：日本晴とカサラスのF₂を用いたQTL解析で検出された脱粒性QTL。丸で示した5個所に脱粒性QTLが検出された。C：籾の基部の離層形成程度の比較。左はイネの籾を示す。四角で囲んだ部分の縦軸方向の切片を作成し，日本晴とNIL (*qSH1*) で籾の基部の離層形成程度を比較した。矢印は，離層形成部位を示す。

の接合部分に生じる特別な組織（以下，離層）の有無によって，その程度に差がでる。この離層ができる部位を比較したところ，日本晴では離層が全く形成されないが，NIL (*qSH1*) では明瞭な離層が観察された。この差が，日本晴とNIL (*qSH1*) との脱粒性の違いを決定し，*qSH1*は離層形成に必須であることが明らかとなった。

*qSH1*遺伝子の単離を進めるために，さらに大規模な連鎖解析を行った。*qSH1*領域の分離集団10,388個体から，遺伝子近傍に生じた4種類の染色体組換え個体を選抜することができた（図2）。これら4個体の後代をさらに解析して，組み換え個体の*qSH1*遺伝子座に関する遺伝子型を決定し，*qSH1*遺伝子が存在するゲノム領域を絞り込んだ。その結果，*qSH1*の脱粒性の喪失の原因となる領域を612bpに絞り込むこと

ができ，日本晴とカサラスの塩基配列の比較により，脱粒性の喪失の原因となる変異を1個のSNPに限定することに成功した（図2）。

限定した*qSH1*遺伝子の候補ゲノム領域周辺の遺伝子予測を行ったところ，特定したSNP周辺領域には遺伝子は予測されず，SNPから約12kb離れた領域にシロイヌナズナのさやの離層形成に必須な遺伝子*REPLUMLESS* (*RPL*)⁵⁾に相同性の高い遺伝子 (*Os-RPL*) が予測された。そこで，機能型のアリルをもつカサラスのゲノムからSNP領域と*Os-RPL*領域を含む約30kb内に含まれるゲノム断片（平均サイズ約10kb）シリーズを，機能欠損型のアリルをもつ日本晴に導入して相補性試験を行った。その結果，*Os-RPL*を完全に含むクローンの場合，部分的な相補を示したが，それ以外では，脱粒性を相補することができなかった。そこで，

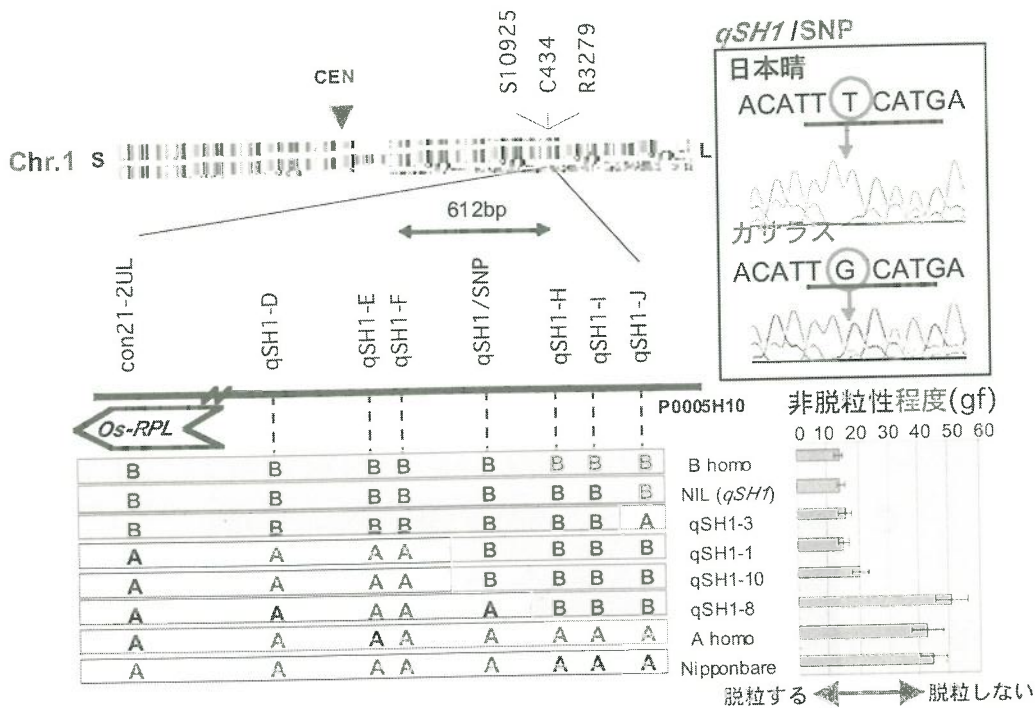


図2 脱粒性遺伝子*qSH1*の高精度連鎖解析とSNPの同定

図の上には連鎖解析で用いたマーカーおよび*qSH1*近傍マーカーを示す。図の下には、高精度連鎖解析により選抜された組換え個体後代の組換え固定系統の遺伝子型および非脱粒性程度を示す。高精度連鎖解析により、候補領域をマーカー*qSH1-F*と*qSH1-H*の間の612bpに絞り込んだ。この領域の日本晴とカサラスの塩基配列の比較により、脱粒性の喪失の原因となる多型を1個のSNPに特定できた(右上)。右上図の下線は、シスエレメントであるRYリピートを示す。

*qSH1*の原因となるSNP領域と*Os-RPL*領域の両方をいっしょに含む26kbのゲノム断片をクローン化し、相補性試験を行ったところ、作出したすべての形質転換個体で脱粒性が相補された。以上の結果から、特定したSNP領域と*Os-RPL*領域の両方が完全な相補に必要であることが分かった。

3. 脱粒性遺伝子*qSH1*の構造

脱粒性遺伝子*qSH1*は、全長612アミノ酸の*BEL1*タイプのホメオボックス遺伝子⁶⁾をコードしていた。イネとシロイヌナズナの*BEL1*タイプの遺伝子をゲノム塩基配列のデータベースから相同性検索より選び出し、ホメオドメイン領域の63アミノ酸のアライメントを用いて系統樹を作成した。その結果、*qSH1*は*RPL*の同祖遺伝子(分子系統樹で同じ分岐に属する)であることが分かった。シロイヌナズナの*RPL*はメ

リステムの維持や節間伸張など、離層形成以外にも重要な機能をもつ、多機能遺伝子であることが明らかになっている^{5), 7)}。また、*RPL*と冗長な機能をもつ*POUNDFOOLISH (PNF)*が同じ分岐に存在し、その二重変異体は極端な矮性を引き起こすことも明らかとなっている⁷⁾。イネにおいても、*qSH1*遺伝子と高い類似性を示す機能未知の遺伝子がゲノム中に存在していることから、イネの*qSH1*も多面的な作用を持つ可能性が示唆される。

4. 発現解析

*qSH1*の組織特異的な発現パターンを調べるために、日本晴とNIL (*qSH1*) の幼穂で*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。その結果、*qSH1*はNIL (*qSH1*) でのみ離層特異的に発現しており、日本晴では離層組織での*qSH1*の発現は観察できなかった。しかしながら、穂の先

端分裂組織では、日本晴およびNIL (*qSH1*)の両者において、*qSH1*の発現が認められた。これらの結果は、*qSH1*遺伝子の本体である*Os-RPL*は、離層ばかりでなく、その他の組織の形態形成にも重要な役割を担っていることを示し、今回の連鎖解析において特定したSNPは、離層特異的な発現を担う*Os-RPL*の発現調節領域に生じた変異であると推定される (図3)。

5. イネとシロイヌナズナの離層形成についての比較

イネでは、将来、糊になる花の基部に横方向に離層が形成される。一方、シロイヌナズナでは、雌しべが、受粉後に分化してできる器官であるさやに、縦方向に離層が形成される。どちらの離層も、繁殖戦略として種子を飛散させるために必要な組織であるが、形成される場所が解剖学的に異なっている。それにもかかわらず、本研究によって、イネの脱粒性遺伝子*qSH1*とシロイヌナズナのさやの離層形成に必須な遺伝子である*RPL*が同祖遺伝子であることが明らかとなった。進化的にはなれたイネとシロイヌナズナでは、離層を作るために必要とされる遺伝子の構造と機能がある程度保存されていることは極めて興味深い。この両遺伝子の発現組織の違いをもたらす原因の1つとしては、*qSH1*と*RPL*の発現制御機構、つまり、プロモーター上の違いが挙げられる。脱粒性の喪失の原因となる*qSH1*のSNP領域は、RYリピート⁸⁾と呼ばれる6 bpのシス配列が存在し、*qSH1*が機能型のカサラスでは正常型を、*qSH1*が機能欠損型の日本晴では変異型を示す (図2)。RYリピートは、シロイヌナズナのABI3タイプのB3ドメインタンパク質が下流の遺伝子を転写調節する際に認識するシス配列として知られている⁹⁾。イネの脱粒性遺伝子*qSH1*とシロイヌナズナの*RPL*遺伝子周辺のRYリピートの分布を調べたところ、*qSH1*のSNP周辺では、非常に多くのRYリピートの存在が認められるものの、シロイヌナズナの*RPL*では、RYリピートの数は少

ない。この分布頻度の違いが、イネとシロイヌナズナでの同祖関係にある遺伝子*qSH1*と*RPL*の発現場所が異なる原因の1つとなっている可能性がある。また、シロイヌナズナのゲノム中には、ABI3タイプのB3ドメインをもつものが3つ存在する¹⁰⁾一方、イネのゲノム中には4つ存在することから、これらの遺伝子のどれかが、*qSH1*の上流で働くことが示唆される。今後、離層形成をモデルとして、イネとシロイヌナズナにおける比較生物学的な解析を行うことで、植物の形態的多様性の獲得に関する分子レベルでの理解が深まると期待される。

6. 脱粒性の喪失の原因となったSNPの役割

本研究によって、イネ脱粒性の有無が*qSH1*遺伝子の転写調節領域のSNPによる組織特異的な発現の違いによって決定されていることが明らかとなった。特に、このSNPが*qSH1*遺伝子の転写開始部位から約12kbも離れた領域に存在することは、遺伝子発現調節メカニズムの研究において興味深い。これまで、植物においては、遺伝子の転写制御領域が離れて存在する事例はほとんど報告されていなかったが、最近になって、遺伝子本体から離れた領域に存在する制御領域についての報告例が数例ある。シロイヌナズナの*FLOWERING LOCUS T (FT)* 遺伝子では、転写開始部位の上流約9 kb¹¹⁾、トウモロコシの*teosinte branch 1 (tb1)* では、上流約58~69kb¹²⁾の転写調節への関与が示唆されている。また、転写調節領域における変異がイネの耐病性に影響を与えている事例も報告されている。

前述のように、イネの脱粒性遺伝子*qSH1*は、シロイヌナズナと同祖遺伝子である*RPL*と同様に、離層形成のみならず、多面的な機能を持つ可能性がある。これはさらなる実験によって証明されるべき点ではあるが、現時点でもこの仮説は、*qSH1*遺伝子が多面発現であるシロイヌナズナの*RPL*遺伝子と同祖遺伝子であることや

*in situ*ハイブリダイゼーションによる*qSH1*の発現解析結果からも支持される。仮に*qSH1*遺伝子の多面的な機能を想定した場合、今回同定した調節領域に生じたSNPは、*qSH1*遺伝子のすべての機能に影響を与える発現調節領域ではなく、脱粒性の有無（離層形成の有無）のみに影響を与える領域に生じたものではないかと考えられる。これまでのイネの栽培化の歴史のなかで、この*qSH1*遺伝子にさまざまな変異が生じたと推定されるが、それらの変異の多くは、植物の形態に大きな影響を与えたと想像され、それらの変異は、作物としてのイネにおいては淘汰されるべき変化であったと考えられる。すなわちイネの脱粒性をなくすために、古代人は、*qSH1*の変異の中で、多面的な機能変化をおこす変異ではなく、離層形成のみに影響が出る制御シス配列変異、すなわち今回同定したSNPを選抜した可能性がある。

栽培化遺伝子であるトウモロコシの*tb1*は、分けつ制御だけでなく穂・小花の形態制御といった多面的な機能をもっている¹⁾。また、*tb1*の栽培化に関与したDNA変異は、タンパクをコードする領域の変異ではなく遺伝子本体から約58~69kb上流の発現調節領域にあることが報告されている¹²⁾。この例が示すように、遺伝子本体が多面的な機能をもつ場合は、機能完全欠損変異になると、植物体において栽培化に適さない表現型の変化も生じる可能性が高く、そういった個体は栽培化の過程で淘汰されると考えられる。実際に栽培化において、選抜された遺伝子の多くは、*qSH1*遺伝子のように発現特異性が変化したり、微妙な機能低下が生じたりするような特殊なタイプであったと考えられる。自然に生じて、選抜された栽培化に関する遺伝子の単離とその機能解析は、複雑な遺伝子発現調節機構を紐解く、数少ない機会を提供してくれるのかもしれない。今後の栽培化に関連する遺伝子の研究に期待したい。

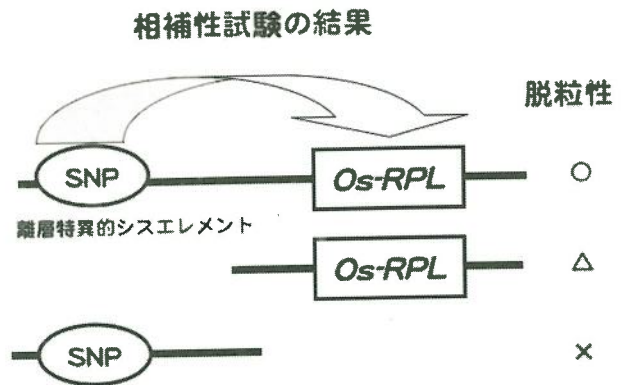


図3 脱粒性の喪失の原因となったSNPの役割

文献

- 1) Doebley, J. (2004), *Annu Rev Genet.* 38, 37-59
- 2) Li, C. et al. (2006), *Science*, 311, 1936-1939
- 3) Konishi, S. et al. (2006), *Science*, 312, 1392-1396
- 4) 福田 善通 (1994), 岡山大学 農学部 学位論文
- 5) Roeder, A.H. et al. (2003), *Curr Biol.*, 13, 1630-1635
- 6) Reiser, L. et al. (1995), *Cell*, 83, 735-742
- 7) Smith, H.M. et al. (2003), *Plant Cell*, 15, 1717-1727
- 8) Baumlein, H. et al. (1992), *Plant J.*, 2, 233-239
- 9) Ezcurra, I et al. (2000), *Plant J.*, 24, 57-66
- 10) Kagaya, Y. et al. (2005), *Plant Cell Physiol.*, 46, 399-406
- 11) Takada, S. et al. (2003), *Plant Cell*, 15, 2856-2865
- 12) Clark, R.M. et al. (2006), *Nat Genet.*, 38, 594-597

◀国内情報▶

脳内プロスタグランジンによる新しい 食欲調節経路を活性化する低分子ペプチド

京都大学 大学院農学研究科 食品生物科学専攻 食品生理機能学分野
大日向耕作・吉川正明

プロスタグランジン (PG) E_2 には4種類の受容体サブタイプ (EP_1 ~ EP_4) が知られている。我々は、 PGE_2 の摂食抑制作用が EP_4 受容体を介することを初めて見出すとともに、 PGE_2 - EP_4 受容体経路を活性化する経口投与で有効な低分子の摂食抑制ペプチドを開発することに成功した。また、 PGE_2 の構造異性体である PGD_2 が摂食促進作用を示すことを見出した。

1. はじめに

「食欲」は脳で調節されるが、その調節機構はこれまで未知の部分が多かった。近年、レプチンやグレリンに代表される数多くの摂食調節ペプチドとそれらに対する受容体が同定され、ペプチド性の摂食調節システムの重要性が指摘されている。我々は、脳内に存在する生理活性脂質であるプロスタグランジン (PG) E_2 が、 EP_4 受容体を介して摂食抑制作用を示す一方、 PGE_2 と同じ前駆体から合成される構造異性体の PGD_2 は、 DP_1 受容体を介して摂食促進作用を示すことを見出した (表1)。これらのPG摂食調節システムは、既知のペプチド性の摂食調節経路ともクロストークすることが判明し、複雑な食欲調節機構が次第に明らかになりつつある。

一方、日本人の体重は増加の一途をたどり、Body Mass Index (BMI) 25以上を肥満と判定すると、4人に1人は「肥満」状態である。肥満は糖尿病をはじめとする生活習慣病のリスクを高めることから摂食抑制作用を有する食品や医薬品の開発が期待されている。今回我々は、 PGE_2 - EP_4 受容体経路を活性化することによって、摂食抑制作用を示す低分子の生理活性ペプチドを初めて見出した。本稿では、まず、中枢

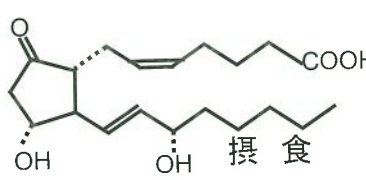
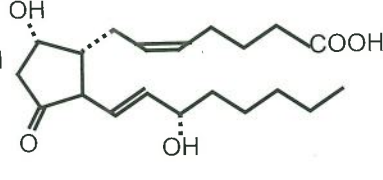
OHINATA Kousaku, YOSHIKAWA Masaaki
〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄

神経系における PGE_2 の新しい摂食調節経路と、この経路を活性化する2種類の低分子ペプチドについて紹介し、最後に、 PGE_2 の構造異性体である PGD_2 が、 PGE_2 とは逆に摂食促進作用を示すことについて述べる。

2. 新しい摂食抑制経路「 PGE_2 - EP_4 受容体」

PGE_2 は脳内に存在する生理活性脂質の一種で、覚醒や体温上昇、摂食抑制作用など多彩な生理作用を示すことが知られている (表1)。 PGE_2 には EP_1 、 EP_2 、 EP_3 および EP_4 という4種類の受容体サブタイプが知られているが、いずれも7回膜貫通型G-タンパク質共役受容体であり、迅速な生体調節に関与している。近年、脳内の EP_3 受容体が体温上昇に、 EP_4 受容体が覚醒作用に関与することが判明し、中枢神経系における PGE_2 受容体サブタイプの生理的役割が明らかにされつつある (表1)。しかしながら、 PGE_2 の摂食抑制作用が4種類の受容体サブタイプのうち、いずれを介するかは、これまで明らかではなかった。そこで、 EP_1 ~ EP_4 受容体に対する選択的アゴニストをマウスに脳室内投与したところ、 EP_4 アゴニストのみが摂食抑制作用を示すことがわかった¹⁾。さらに、 PGE_2 および EP_4 アゴニストによる摂食抑制作用が EP_4 ア

表1 プロスタグランジン (PG) E₂とPGD₂の中樞作用

中樞作用	PGE ₂	PGD ₂
		
睡眠	↓ (EP ₄)	↑ (DP ₁)
体温	↑ (EP ₃)	↓
摂食	↓ (EP ₄)	↑ (DP ₁)

括弧内は作用を仲介する受容体

ンタゴニストにより阻害されたことから、PGE₂の摂食抑制作用はEP₄受容体を介することが判明した¹⁾ (表1)。

3. PGE₂-EP₄受容体経路を活性化する 摂食抑制ペプチド

3-1. ノボキニン (novokinin)

摂食調節作用を示す内因性の神経ペプチドが多数知られているが、経口投与で有効なものは皆無である。これは内因性のペプチドホルモンが、迅速な生体調節を行うために体内酵素で分解されやすくデザインされているためと考えられる。一方、我々は食品タンパク質の酵素消化により派生する低分子の生理活性ペプチドを単離してきたが、これらの中には消化抵抗性を有するものが存在し、経口投与で様々な生理作用を示すことを見出している。さらに、これらの生理活性ペプチドの一次構造をもとに高機能な低分子ペプチドをデザインしてきた。これら低分子ペプチドの摂食調節作用を検討したところ、ノボキニン (Arg-Pro-Leu-Lys-Pro-Trp) が経口投与 (100 mg/kg) および脳室内投与 (3 - 100 nmol/mouse) により摂食抑制作用

を示すことを見出した (図1)。ノボキニンは卵白アルブミン由来の動脈弛緩ペプチドのオボキニン (Arg-Ala-Asn-His-Pro-Phe) のアミノ酸を4残基置換して得られた高機能化ペプチドで、動脈弛緩、血圧降下、育毛促進、抗脱毛作用を示すことを既に見出している^{2), 3)}。また、ノボキニンはアンジオテンシンAT₂受容体に親和性を示し、その脳室内投与による摂食抑制作用がアンジオテンシンAT₂アンタゴニストで阻害されたことから、ノボキニンの摂食抑制作用はAT₂受容体を介していることが判明した。なお、内因性ペプチドホルモンのアンジオテンシンIIは、AT₁およびAT₂受容体の両サブタイプに親和性を示し、脳室内投与により摂食抑制作用を示すが、さらに、その摂食抑制作用はAT₁アンタゴニストで阻害されず、AT₂アンタゴニストでのみ阻害されたことから、中枢神経系においてAT₂受容体が摂食抑制に関与することが初めて明らかとなった (図1)。

次に、AT₂受容体の下流の作用機構について検討した。ノボキニンの脳室内投与による摂食抑制作用はインドメタシンで阻害され、EP₄アンタゴニストによってもブロックされた。したがって、ノボキニンはAT₂受容体に結合した後、



図1 PGE₂-EP₄受容体経路を介する摂食抑制ペプチド

PGE₂を放出し、EP₄レセプターを介して摂食抑制作用を示すことがわかった。また、アンジオテンシン II による摂食抑制作用もEP₄アンタゴニストの投与により阻害されたことから、AT₂受容体→PGE₂→EP₄受容体という新しい摂食抑制経路が明らかとなった (図1)。

3-2. WPLPR (Trp-Pro-Leu-Pro-Arg)

WPLPRは米アルブミン由来の回腸収縮ペプチドであるオリザテンシン (Gly-Tyr-Pro-Met-Tyr-Pro-Leu-Pro-Arg) のC末端側5残基のアミノ酸配列をもとに設計した生理活性ペプチドで、経口投与により抗鎮痛および抗健忘作用を示し、補体C3aアゴニストとして作用することが判明している^{4), 5)}。補体C3aそれ自身の脳室内投与により摂食抑制作用を示すことから⁶⁾、WPLPRが摂食抑制作用を示すかを検討した。WPLPRの経口投与 (300 mg/kg) により摂食量の低下が認められ、WPLPRが経口投与で有効な摂食抑制ペプチドであることがわかった (図1)。WPLPRの腹腔内投与 (30-300 mg/kg) でも用量依存的な摂食抑制作用を示

した。また、WPLPRの摂食抑制作用は、ノボキニンと同様に、シクロオキシゲナーゼの阻害剤であるインドメタシンにより阻害され、EP₄受容体に選択的なアンタゴニストでも阻害されたことから、WPLPRはPGE₂の放出とEP₄受容体の活性化を介して摂食抑制作用を示すことがわかった。

4. 新しい摂食促進経路「PGD₂-DP₁受容体」

PGD₂はPGE₂の構造異性体で、脳内に最も多く存在するPGである。PGD₂は睡眠誘発作用や体温低下作用を示すのに対し、PGE₂は覚醒作用および体温上昇作用などPGD₂とは反対の中樞作用を示すことが知られている (表1)。PGE₂は摂食抑制作用を示すが、PGD₂は摂食調節に関してどのような作用を示すかは、これまで明らかではなかった。PGD₂ (6 nmol/mouse) をマウス脳室内に投与したところ、摂食量が増加し、PGD₂が摂食促進作用を示すことを初めて見出した (表1)。PGD₂には、DP₁とDP₂受

容体という2種類のサブタイプが知られているが、DP₁受容体選択的アゴニストのみが摂食促進作用を示し、PGD₂の摂食促進作用がDP₁受容体アンタゴニストで阻害されたことから、PGD₂の摂食促進作用はDP₁受容体を介することが明らかとなった。さらに、DP₁受容体に対するアンチセンスODNを脳室内投与することにより、摂食量のみならず体重や脂肪重量の減少が認められたことから、DP₁受容体はエネルギー代謝のホメオスタシスに重要な役割を果たしている可能性が考えられる。したがって、DP₁受容体は肥満や摂食調節異常の予防や治療の新しいターゲットとして期待できる。

次に、DP₁受容体の下流のメカニズムについて検討したところ、PGD₂は、強力な摂食促進作用を示す神経ペプチドのニューロペプチドY (NPY) に対する5種類の受容体サブタイプのなかで、NPY Y₁受容体を活性化し、摂食促進作用を示すことがわかった。なお、NPYは摂食調節に重要な視床下部に局在することが知られているが、PGD₂合成酵素とDP₁受容体も視床下部にも存在することから、視床下部領域で合成されたPGD₂は近傍のDP₁受容体を活性化し、NPY神経に作用するものと推察される。

さらに、どのような内因性摂食促進物質がPGD₂-DP₁受容体経路を活性化するかを検討したところ、補体C5a (74アミノ酸残基のポリペプチド) の摂食促進作用がPGD₂-DP₁受容体経

路を介していることを見出した。近年、若年性の神経性摂食障害や高齢者における食欲不振なども増加しているが、これらの予防や治療に有効な摂食促進物質の開発が期待されている。補体C5a受容体に作用するアゴニストペプチドも摂食促進物質のひとつの候補であろう。

5. おわりに

中枢神経系に存在するプロスタグランジン (PG) E₂がEP₄受容体を介して摂食抑制作用を示し、このPGE₂-EP₄受容体経路を活性化する経口投与で有効な2種類の低分子ペプチド (ノボキニンとWPLPR) を見出した。一方、PGE₂の構造異性体であるPGD₂がDP₁受容体を介して摂食促進作用を示し、補体C5aはPGD₂-DP₁受容体経路を活性化することがわかった。今後、PGE₂-EP₄受容体およびPGD₂-DP₁受容体などの新しい摂食調節システムを活性化する摂食調節ペプチドの開発が期待できる。

さらに、食欲は睡眠や情動、記憶学習などの高次機能と密接に関連していることが知られている。PGD₂とPGE₂が睡眠誘発作用と覚醒作用という逆の作用を示し、それらの作用を仲介する受容体は、食欲調節と同様にDP₁受容体とEP₄受容体というのも興味深い。今後、食欲調節作用だけでなく優れた中枢作用を有する生理活性ペプチドの開発を目指したい。

表2 新しい摂食調節ペプチドと作用機構

摂食調節	ペプチド	ペプチド受容体	情報伝達経路
摂食抑制	ノボキニン WPLPR RIY	AT ₂ 受容体 補体C3a受容体 ?	PGE ₂ -EP ₄ 受容体 PGE ₂ -EP ₄ 受容体 CCK-CCK ₁ 受容体
摂食促進	補体C5a	補体C5a受容体	PGD ₂ -DP ₁ 受容体

なお、PG以外の摂食調節経路を介する食品タンパク質由来の摂食抑制ペプチドとしてRIY (Arg-Ile-Tyr) を見出している。RIYはナタネタンパク質のサブチリシン消化物からアンジオテンシン変換酵素阻害活性を指標に単離した生理活性トリペプチドで、血管弛緩作用、血圧降下作用を示す生理活性ペプチドである⁸⁾。RIYは経口投与により摂食抑制作用と消化管抑制作用を示し、これらはCCK分泌促進を介していることがわかった⁹⁾。

文 献

- 1) Ohinata, K. et al. (2006), *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, in press
- 2) Matoba, N. et al. (1999), *FEBS Lett.*, 452 (3), 181-184.
- 3) Yamada, Y. et al. (2002), *Biosci Biotechnol Biochem.*, 66 (6), 1213-1217.
- 4) Takahashi, M. et al. (1996), *Peptides*, 17 (1), 5-12.
- 5) Jinsmaa, Y. et al. (2001), *Peptides*, 22 (1), 25-32.
- 6) Ohinata, K. et al. (2002), *Peptides*, 23 (1), 127-33.
- 7) 大日向耕作ら (2003), *化学と生物*, 41 (1), 7-8.
- 8) Marczak, ED. et al. (2003), *Peptides*, 24 (6), 791-798.
- 9) Marczak, ED. et al. (2006), *Peptides*, 27 (9), 2065-2068.

◀国内情報▶

霜降りになる遺伝子の一つを特定 — 上質牛肉の効率的生産が可能に

ビッグ研究所株式会社
佐々木 義之

mRNA発現量の差に基づく遺伝子同定戦略により、ウシ脂肪交雑の責任遺伝子同定を行った。材料としては脂肪交雑能力の高いことが判明している体細胞クローン去勢牛とその能力の低いホルスタイン種去勢牛を用いた。ディファレンシャルディスプレイ法によりmRNAの発現量を調べ、発現パターンに差のあった74個のバンドをシーケンスし、ホモロジー検索・機能検索によって4個の遺伝子に絞り込み、それらについて多型解析を行い、一塩基多型 (SNP) の見つかったものについて相関解析を行った。その結果、脂肪交雑責任遺伝子の一つとしてEDGIを特定した。このような責任遺伝子の同定は上質牛肉の効率的生産への第一歩になると期待される。

1. はじめに

「霜降り」や「サシ」と称される脂肪交雑は牛肉の価値を決定する重要な因子である。そのため、和牛においては脂肪交雑を遺伝的に改良する取り組みが活発に行われてきた。古くは資質形質を中心とする外貌審査であり、昭和43年からは産肉能力検定間接法いわゆる間接検定が行われている。その後、食肉市場で得られる肥育牛の枝肉形質記録を利用したフィールド方式の、BLUP法による育種価評価が行われるようになり、脂肪交雑の改良が計画的にすすめられるようになった。

さらに、近年分子生物学的手法の進展によって、量的形質遺伝子座（これをQTLと呼んでいる）にある生産形質の責任遺伝子を同定することが可能になってきた。そこで、mRNA発現量の差から責任遺伝子に迫る遺伝子発現プロファイリングアプローチにより、脂肪交雑責任遺伝子の同定に取り組んだ。

2. 候補遺伝子の探索

脂肪交雑能力の高いウシ（高脂肪交雑能力牛）と低いウシ（低脂肪交雑能力牛）との間で、mRNAの発現パターンに差のある遺伝子を探す戦略をとった。前者には脂肪交雑に関する育種価の非常に高い黒毛和種種雄牛「糸福」由来の体脂肪クローン牛2頭を、また後者には脂肪交雑能力が極めて低いと考えられるホルスタイン種去勢牛2頭を用いた。これら4頭のウシの最長筋から、脂肪交雑が入り始める10ヶ月齢をはさんだ8, 10, 12および14ヶ月齢に、バイオプシーにより筋肉サンプルを採取した（図1）。これらの筋肉中に発現しているmRNAの発現量をディファレンシャルディスプレイ法（DD法）を用いて比較することにより、高脂肪交雑能力牛と低脂肪交雑能力牛との間で、mRNAの発現パターンが異なる遺伝子を調べた。DD法に種々のプライマーペアを用いて、ゲル上に検出された2,114個のバンドのうち、発現パターンが異なっている74個（このうち3つのバンドについては2つの遺伝子が重なっていた）を選択した。これら77個の遺伝子の塩基配列を決定し、さらにホモロジー検索を行うことにより、ヒトなどで機能が既知となっている35個の遺伝

SASAKI Yoshiyuki

〒520-0865 滋賀県大津市南郷2-36-6

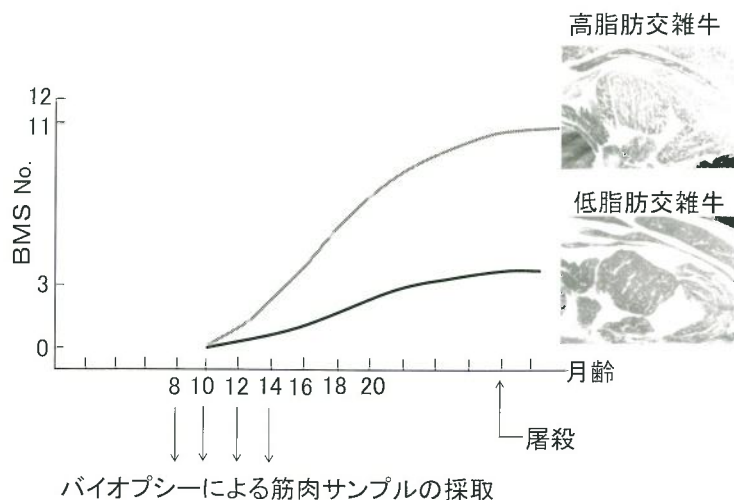


図1 mRNA発現量の差に基づく脂肪交雑責任遺伝子同定の戦略

子と未知である42個の遺伝子を明らかにした。既知遺伝子についてはリアルタイムPCRにより発現パターンを確認するとともに機能面から検討することで、35個の中から5つの遺伝子 (*BTG2*, *EDG1*, *TTN*, *VAPA* (その後の解析でXM611598であることが分かった) および *WBP2*) を脂肪交雑責任遺伝子の候補として選んだ¹⁾。

3. 多型の検出

これらのうち4つの候補遺伝子 (*BTG2*, *EDG1*, XM611598および *WBP2*) について、クローニングおよび塩基配列の決定、並びにデータベースの検索を行うことによりウシゲノム構造を明らかにした。さらに、ゲノム構造に基づき、エキソンおよびプロモーター領域 (約2 kb) をカバーするプライマーの設計を行い、PCRダイレクトシーケンスによる高脂肪交雑能力牛と低脂肪交雑能力牛間のゲノム塩基配列の比較を行った結果、*EDG1*に2個 (5'非翻訳領域の+166bpと3'非翻訳領域の+3,698bp)、XM611598に3個 (プロモーター領域の-1,723bp, 翻訳領域の+524bp, 3'非翻訳領域の+1,192bp)、および *WBP2*に2個 (プロモーター領域の-72bpと-1,702bp) の一塩基多型

(SNP) が検出された。

4. *EDG1*遺伝子におけるSNPの相関解析

これらについて、予備的に「糸福」およびその後代種雄牛17頭を用いて遺伝子型間の差の検定を行った結果、*EDG1*のみで脂肪交雑との相関が予想された。この*EDG1*において検出されたSNP (一方をG対立遺伝子、他方をA対立遺伝子とする) について、黒毛和種種雄牛63頭についてSNPと脂肪交雑に関する育種価との間の相関解析を分散分析法により行った。その結果、

第1エキソン内の+166bpにおけるSNPの遺伝子型間の変動が5%有意水準に近かった。また、脂肪交雑の育種価に関して上位20頭と下位20頭との間で、遺伝子頻度に危険率1%水準以下で有意な差が認められ、G対立遺伝子頻度は上位群で高いことが分かった。

これらの結果はG対立遺伝子が脂肪交雑形成に対してプラスに働いていることを示唆していたが、63頭の種雄牛は色々な系統に属しており、SNPと脂肪交雑との間の相関が集団の構造化と関連していることが考えられたので、特定の種雄牛の後代肥育牛を用いて、さらに頭数を増やした相関解析を行った。種雄牛「糸福」を父に持つ種雄牛4頭 (遺伝子型はいずれもGAヘテロ型) の半きょうだい肥育牛283頭の脂肪交雑および皮下脂肪厚の育種価について、遺伝子型を母数効果、種雄牛を変量効果とするモデルで最小二乗分散分析を行ったところ、脂肪交雑についてのみ危険率5%以下で遺伝子型間の変動が有意であった (表1)。そこで、遺伝子型間の差の有意性検定を行うと、遺伝子型GGと遺伝子型AAとの間の差が統計的に有意であった ($P < 0.05$)。さらに、脂肪交雑の育種価にもとづき上位および下位それぞれ85頭の肥育牛における遺伝子型頻度並びに遺伝子頻度の独立性検定を行った結果、後者では5%水準で有意性が

表1 脂肪交雑および皮下脂肪厚に関する
最小二乗分散分析による相関解析

最小二乗分散分析表					
変動因	自由度	脂肪交雑		皮下脂肪厚	
		平均平方	P値	平均平方	P値
遺伝子型	2	2.62	0.049	17.9	0.30
種雄牛	3	4.27	0.002	813.1	0.0001
残差	277	0.86		14.8	

遺伝子型ごとの最小二乗平均値			
遺伝子型	頭数	脂肪交雑(BMS No.)	皮下脂肪厚(mm)
GG	84	2.39 ^a	-0.80 ^a
GA	138	2.30 ^{a,b}	-0.29 ^a
AA	61	2.10 ^b	-1.50 ^a

a,b : 同じ肩文字をもたない同列の平均値間の差が有意 (p<0.05)

表2 脂肪交雑の育種価に基づく上位
群および下位群における遺伝子
頻度の独立性検定

群	対立遺伝子		計
	G	A	
上位	102	68	170
下位	84	86	170
計	186	154	340

 χ^2 検定 : P = 0.0499

認められた (表2)。以上の結果から、EDGIが脂肪交雑責任遺伝子であり、G対立遺伝子が脂肪交雑形成に対してプラスの効果をもっていることが示された。

5. 今後の取り組み

EDGI遺伝子についてはホルスタイン種集団

における遺伝子頻度や異なる黒毛和種集団における相関解析を行うことにより遺伝子効果を確認する。一方、EDGI遺伝子は血管伸長に関わる遺伝子であることが知られている²⁾。脂肪交雑は脂肪組織が筋肉組織の中に網目状に延びていって形成されると考えると、脂肪交雑の形成過程におけるEDGIの役割が容易に想像できる。しかし、そのメカニズムを解明することが今後の課題である。

さらに、ここで用いた戦略 (図1) では、脂肪交雑形成に関わる責任遺伝子の多くに網がかけられている¹⁾ のので、今後、さらに分析をすすめれば、第2、第3のウシ脂肪交雑責任遺伝子を同定することができると考えている。そこで、EDGI以外の既知遺伝子 (とくに、前述の候補子についてはプロモーター領域の2 kbよりさらに上流) におけるSNPの検出、相関解析、さらには42個の未知遺伝子についての解析をすすめる。未知遺伝子についてはすべてがRHマップされている³⁾ のので、脂肪交雑のQTL領域に一致するか、あるいは、その近傍にあるものを優先して解析をすすめる予定である。

6. 研究の展開と方向

複数の脂肪交雑責任遺伝子が同定され、それらの遺伝子診断によって脂肪交雑における遺伝的変異のかなりの部分が把握されるようになると、脂肪交雑形成能力の高い個体とそうでない個体を肥育開始前に判定し、それらの能力に合った肥育計画を立てることができ、効率的な牛肉生産をすすめる上で非常に望ましい。さらに、その遺伝的能力を若齢時に判定することができ、育種改良に多大の貢献をする。

本研究は、高脂肪交雑能力牛を選択するのに、

あるいは相関解析における対象形質として、育種価を利用したことにみられるように、統計遺伝学的アプローチと分子遺伝学的アプローチが密接に連携することによって成り立っている。また、大学（京都大学動物遺伝育種学研究室）と生産現場の試験研究機関（大分県畜産試験場）がそれぞれの持ち味を活かして共同研究を行ったことも、大きく今回の成果につながっている。これらのことは家畜育種研究の今後のあるべき方向を強く示唆していると筆者は考える。

なお、本研究は、大分県農林水産研究センター畜産試験場と京都大学大学院農学研究科遺伝

育種学研究室との共同研究により行ったもので、文部科学省、日本学術振興会からの科学研究費の助成によりなされたものである。

文 献

- 1) Sasaki, Y. et al. (2006), Anim. Gen. 37, 40-46
- 2) Liu, Y. et al. (2000), J. Clin. Invest. 106, 951-961
- 3) Yamada, T. et al. (2006), Anim. Gen. 37, 179-188



ブレインテクノニュース
バックナンバーのご案内
第116号
2006年7月15日発行

総 説

真核生物としてはじめて100%ゲノム解読されたシソンの植物科学への展開……………黒岩 常祥・三角 修己

総説関連情報

植物の研究を支える100%解読されたシソンのゲノム情報……………三角 修己・黒岩 常祥
植物の環境耐性に関するシソソ研究の現状と展望……………黒岩 常祥・三角 修己・黒岩 晴子・八木沢 美美

国内情報

植物のCO₂感知機構解明に向けて……………橋本 美海・射場 厚
葉の角度を変えてイネの収量を増やす……………坂本 知昭

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……………石野 史敏・小野 竜一・金見-石野 知子
1精子から母性遺伝の分子機構に迫る……………西村 芳樹・成瀬 清
ウナギ大回遊の謎はどこまで解けたか？……………塚本 勝巳・青山 潤

ブームスプレーヤ用ドリフト低減型ノズルの開発…宮原 佳彦
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……………西藤 克己

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……………(抄訳：下司 雅也)
組換え体酵母によるD-乳酸の発酵……………(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……………(抄訳：岡野 淳)

◀国内情報▶

有害・有毒微細藻の分子モニタリング法の開発

¹京都大学 大学院農学研究科 応用生物科学専攻,²神戸大学 内海域環境教育研究センター,³日本学術振興会特別研究員DC神川 龍馬^{1,3} ・ 田辺（細井）祥子² ・ 左子 芳彦¹

微細藻は海洋の生態系における一次生産者として重要な役割を果たしているが、ある種の微細藻はしばしば異常増殖して赤潮を引き起こし魚類の斃死や貝類毒化の原因となり、人の健康や水産業に対し深刻な被害を引き起こす。このような微細藻は有害・有毒微細藻と呼ばれ、経済的影響や食品衛生上の観点から正確なモニタリングおよび発生の子察が必要とされている。著者らは、形態分類が困難である代表的な有害・有毒微細藻6属10種について、real-time PCR法を用いた分子モニタリング法を開発した。本稿では、本法の基本的な解説と将来的な研究展望を概説する。

1. はじめに

近年においても、赤潮による養殖魚介類の大量斃死や二枚貝毒化の被害が深刻である。特に2004年、赤潮が原因となり香川県の養殖ハマチ20,000匹が斃死したのは記憶に新しい。また、2006年4月には北海道から九州にわたる広い範囲で麻痺性貝毒（Paralytic Shellfish Poisoning；PSP）が発生した。これらの現象はそれぞれ、赤潮藻*Chattonella ovata*および麻痺性貝毒原因藻*Alexandrium tamarense*が主に引き起こしたと考えられている。このほかにも、日本沿岸には多数の有害・有毒微細藻が存在しており、日本のみならず世界中の養殖業は赤潮発生の脅威にさらされている。

そのため現在、各地の水産試験場等において微細藻のモニタリングが行われている。このモニタリング法は、海水中に存在する生物の形態的特徴を光学顕微鏡下で観察するというものであるが、藻類の形態における微細な違いから種を同定することは多大な労力と時間、そして熟

KAMIKAWA Ryoma¹, HOSOI-TANABE Shoko², SAKO Yoshihiko¹

¹〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

²〒658-0022 神戸市東灘区深江南5-1-1

練した技術と経験が必要である。また微細藻の多くは環境要因やその増殖段階において形態が変化することが培養実験等で知られており¹⁾、このことが形態観察による有害・有毒微細藻の同定をより困難なものにしている。さらには近年、形態学的分類情報に乏しい新型の外国産赤潮藻が日本沿岸域でも赤潮を形成するようになり、その対応が急務となっている。このような現状から、沿岸や養殖海域に存在する微細藻の種や細胞密度を正確に把握し、有害・有毒微細藻による被害を防除するために、より客観的で正確な基準による種の同定および定量が必要となっている。

このような背景の下、著者らは環境要因や増殖段階によって変化することがない遺伝情報を同定基準としたreal-time PCR法に着目し、種の同定および定量法の開発を行った。Real-time PCRにおいては、遺伝子増幅を蛍光検出によりトレースし、その蛍光量が閾値に達するまでのサイクル数をCt値と定義する(図1(A))。様々なDNA量の鋳型をreal-time PCRに供し、それぞれについて得られたCt値と初期DNA量との間の相関関係を求め、図1(B)のような検量線を作成する。この検量線を用いて目的とするサンプルの定量を行う。

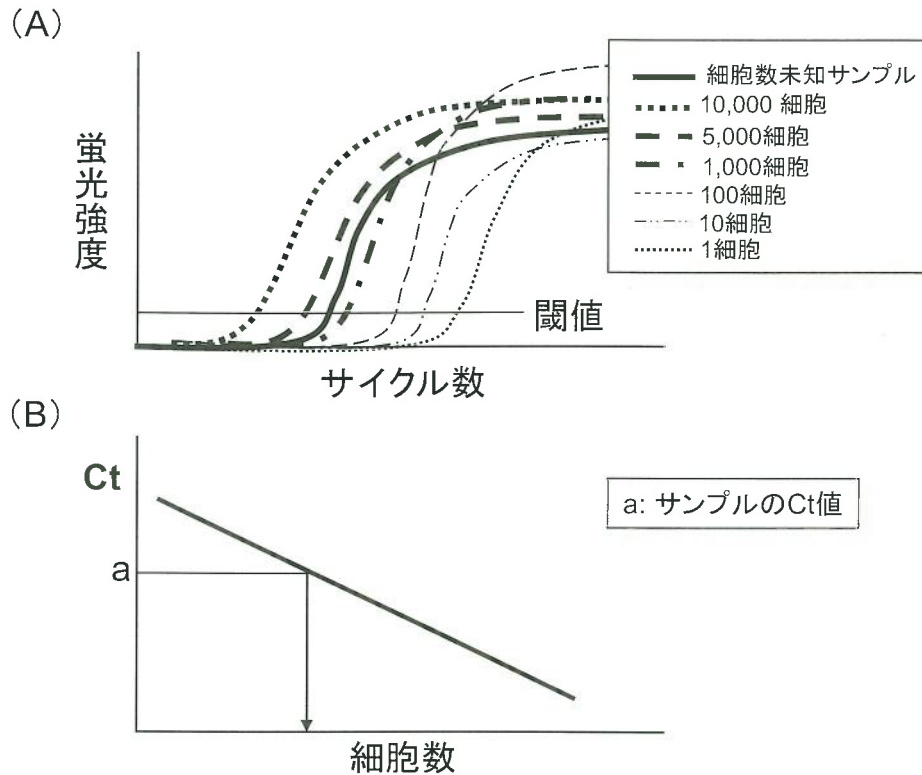


図1 real-time PCRにおける定量の原理
(A) 蛍光増幅曲線 (B) 検量線

Taq manプローブを利用したreal-time PCRにおいては、①2本鎖DNAの変性、②遺伝子増幅に必要なプライマーとTaq manプローブの結合、③遺伝子の増幅、という3つの過程を1サイクルとして通常40サイクル程度増幅反応を行うものである(図2)。②で1本鎖DNAに結合した蛍光プローブが③のDNA合成反応においてDNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼにより分解され、このとき発せられる蛍光量を測定する²⁾。

Real-time PCR法の原理を利用し定量を行うという手法は、既にいくつかの微細藻を対象に開発されてきた^{3), 4), 5)}。しかしながらそのすべてが1属または1種を対象としており、日本沿岸域のように複数の種が混在した赤潮を形成する海域において汎用性の高いモニタリング法とは言えないのが現状であった。そこで著者らは麻痺性貝毒原因藻*Alexandrium*属3種(*A. tamarense*, *A. catenella*, *A. tamiyavanichii*)、赤潮形成藻*Cochlodinium polykrikoides*,

Karenia mikimotoi, *Chattonella* spp. (*C. antiqua*, *C. marina*, *C. ovata*), *Heterosigma akashiwo*, 二枚貝斃死原因藻*Heterocapsa circularisquama*を対象とした包括的モニタリングにreal-time PCR法を導入することを試み、そのプロトコールを開発した。

2. Real-time PCRによる微細藻の同定・定量

まずはじめに著者らは、有害・有毒種の同定に有効な遺伝子の塩基配列を探索した。タンパク質の合成に必須であるリボゾームRNA(rRNA)の遺伝子は、古細菌や真正細菌、そして真核生物すべてが有している遺伝子であり様々な生物の系統分類に利用されている。微細藻を含む真核生物のrRNAは小サブユニット(small subunit: ss) rRNA, 大サブユニット(large subunit: ls) rRNA, そして5.8S rRNAの3ユニットに分かれているが、その中でもls

rRNA遺伝子の塩基配列は変異が多いことが知られている。さまざまな有害・有毒微細藻の本遺伝子の塩基配列を比較した結果、D1/D2とよばれる領域に種特異的な塩基配列が認められた。そこで同部位にプライマーおよびTaq manプローブを設計した結果、標的とする種のDNAのみの検出が可能となった。

Real-time PCRにおける正確な定量および感度の高い検出を行うための最大のポイントは使用するDNAの純度である。微細藻の多くが多糖をはじめ多様な細胞内物質を有しており⁶⁾、PCR反応の阻害を引き起こし正確な定量的検出が困難となることが知られている。そこで細胞を100℃で加熱という簡便な方法からキットを用いたものまで計6種類のDNA抽出法における検出感度を比較検討した。その結果、界面活性剤であるCTAB (cetyltrimethylammonium bromide) を用いて抽出したDNAは、real-time PCRにおける検出感度が高く、本DNA抽出法は対象とした有害・有毒微細藻の包括的な検出において効果的であると考えられた。

上述したCTABを用いたDNA抽出法を使用して細胞数（DNA量）とreal-time PCRにおけるCt値の間の相関関係を調べたところ、すべての種において図1(B)と同様な直線関係が得られたため、real-time PCRにおける定量が可能となった。またこの検出感度はすべての培養株において1細胞まで定量可能であり、発生初期の低密度時での検出が期待される現場海水において極めて有用である。またこの高い検出感度ならびに定量性は、すべての培養株を用いた様々な増殖段階および複数他種の混在状態においても影響を受けなかった。このことは珪藻などの非標的種が現場海水中で優先していても、養殖魚介類に有害な微細藻や貝毒

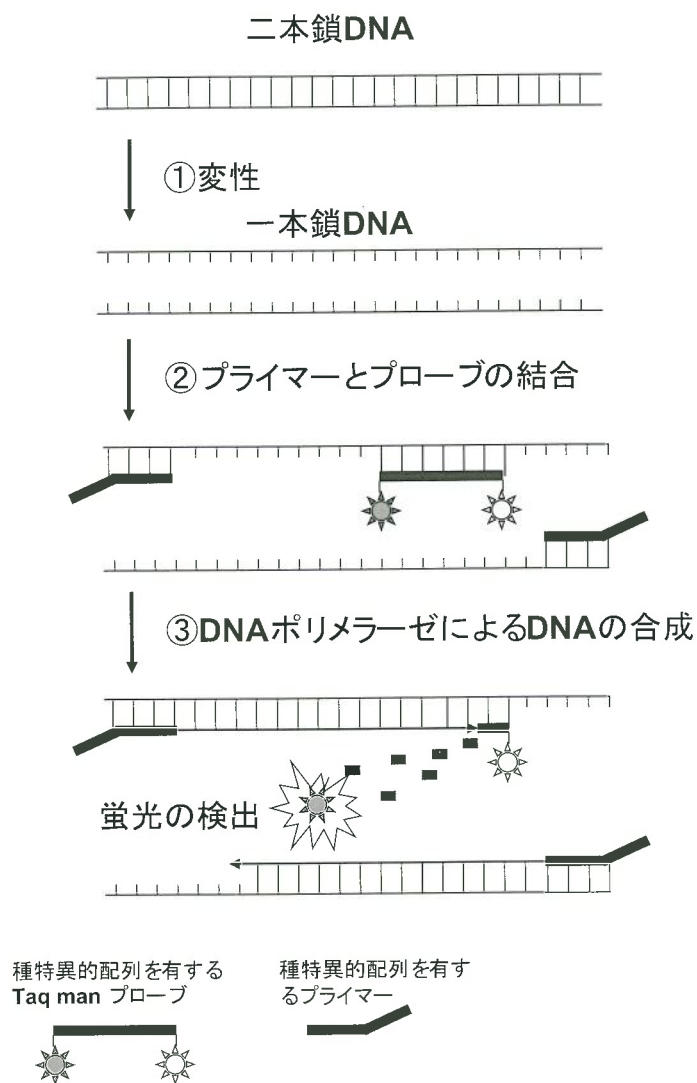


図2 Taq man プローブによるreal-time PCRにおける蛍光検出の原理

原因藻といった標的種のみを特異的に検出可能であること、そして赤潮発生前から収束・消滅に至るまでを正確に分類・定量可能であることを示唆するものであった。

そこで現場海水から抽出したDNAを用いて本手法による有害・有害藻の検出・定量を試みた。その結果、顕微鏡下での観察結果とreal-time PCRの結果はほぼ同じ定量値であり、また顕微鏡観察では検出できなかった種も定量的に検出することができた（表1）。このことから本real-time PCR法は、現場サンプルにおいても高い検出感度で正確に種の同定・定量を行うことができ、今後の現場モニタリングにおい

表1 現場サンプル中における有害・有毒微細藻の直接検鏡とreal-time PCR法による検出・定量結果

地点	採取日	直接検鏡(細胞数/mL)/real-time PCR(細胞数/mL)								
		<i>A. tamarense</i>	<i>A. catenella</i>	<i>C. polykrikoides</i>	<i>H. circularisquama</i>	<i>K. mikimotoi</i>	<i>Chattonella</i> spp.	<i>H. akashiwo</i>		
周防灘 S-11	04/9/22	N	N	-/+	-/-	-/-	27/25	-/-		
周防灘 S-19	04/9/22	N	N	-/+	-/-	-/-	80/63	-/-		
周防灘 高田港	05/6/16	N	N	-/-	-/-	395/233	-/0.6	18/83		
周防灘 S-19	05/6/16	N	N	-/-	-/-	55/53	-/-	3/8		
周防灘 高田港	05/6/15	N	N	-/-	-/-	60/56	-/-	-/-		
播磨灘 K1	05/6/13	N	N	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+		
鹿児島湾 S-5	05/8/16	N	N	500/320	-/-	-/-	-/-	-/22		
英虞湾 赤碕	05/7/19	N	N	-/-	992/1055	-/-	-/-	-/-		
英虞湾 金床	05/7/19	N	N	-/-	207/340	-/-	-/-	-/-		
呉港	99/4	0.3/0.3	-/-	N	N	N	N	N		
徳山湾	00/5	-/-	129/97	N	N	N	N	N		
杵築湾	01/4	0.04/0.02	-/-	N	N	N	N	N		

+; 1Lあたり数細胞 -; 非検出 N; 非調査

て重要な役割を果たすことが可能であることが示された。

3. 今後の研究の展望

上述のとおり世界各地の沿岸海域において貝毒・赤潮被害を引き起こし問題視されている6属10種の微細藻に対して定量的に検出可能な分子モニタリング法が開発された^{3), 7)} (神川ら 未発表)。現在行われている主観的な形態判断に基づく赤潮原因藻の現場モニタリングにおいては、属の同定までは可能でも種の正確な同定は行われない場合があるのが現状である (例: *Alexandrium* sp.などとして記録)。PSP原因渦鞭毛藻 *Alexandrium* のように同属内でも有毒種と無毒種が存在する場合、そしてその毒性が人の命に関わる場合は、同定の誤りが特に深刻となる。より客観的判断基準である「遺伝子」に基づいたモニタリング法は非常に短時間に少ない労力で正確な同定を行うことができ、今後現場海域におけるモニタリングシステムの革命的な迅速かつ高精度化を図ることが可能である。

さらには、未だその大部分が謎に包まれている有害・有毒微細藻の発生・消滅機構の解明へ向けて、本手法の貢献が期待される。微細藻の発生・消滅にはさまざまな環境要因や共存している他の生物が関与していると考えられており、これらの相関関係を赤潮発生前後において

綿密に調査することは発生・消滅機構の解明に結びつく。中でも、有害・有毒微細藻の正確な同定および定量は最重要調査項目であり、本稿で報告した正確性および定量性の高いreal-time PCR法は、その解明に大きく寄与できる。その結果、詳細な環境データや他生物との共存関係をも総合して新たな赤潮の予察や対応策を見出し、安全で豊かな漁場構築の一助に貢献できるのではないかと期待される。

文 献

- 1) 今井一郎 (2000), 日本プランクトン学会誌, 47, 55-64
- 2) Abe, A. et al. (1999), *J. Clin. Microbiol.*, 37 (9), 2899-2903
- 3) Hosoi-Tanabe, S. et al. (2005), *Mar. Biotechnol.*, 7 (5), 506-514
- 4) Kamikawa, R. et al. (2005), *Fish. Sci.*, 71 (5), 987-991
- 5) Kamikawa, R. et al. (2006), *Harmful Algae*, in press
- 6) Okamoto, T. et al. (2000), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64 (8), 1767-1770
- 7) Kamikawa, R. et al. (2006), *Microbes Environ.*, 21 (3), in press

◀国内情報▶

収量コンバインの開発

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

日高 靖之 ・ 栗原 英治 ・ 牧野 英二 ・ 杉山 隆夫

米麦の収穫と同時に、簡単な操作で、収量、水分などの収穫情報を測定できるコンバイン（以下：収量コンバイン）を開発した。本機は、市販の自脱コンバインに搭載された質量測定部、水分測定部、制御・表示部により構成される。制御・表示部では、通常の作業と同時工程で収穫情報を表示・記録する。その情報を元に帳票や収量マップ等の作成が可能である。各測定部についてはさまざまな方式を検討した結果、質量測定部は、グレンタンク下に設置したロードセルにより測定し、傾斜センサによって測定値を補正する方式とした。また、水分測定部は、グレンタンク内に設置し、測定中の振動や温度変化等の測定ノイズを考慮し電気抵抗式とした。

1. はじめに

近年、我が国の農業生産における大きな構造変化の中で、平成17年の「食料・農業・農村基本計画」においては、基本的な方針の一つとして、農業生産の全体のあり方を環境保全に貢献する営みに転換していくこととしている¹⁾。このような取り組みは、農家の長年の経験に基づいて積み上げられた技術を、農家の自主性により推進してきたものである。しかしながら農家数は確実に減少しており、その結果、受託作業の増加や法人化による効率的な作業推進は当然の流れと考えられる。このような状況下において、従来からの経験的な情報だけでは、十分といえない状況が生じており、より正確で定量的な情報が必要となっている。そのため農林水産省では「IT活用型営農成果重視事業」を起ち上げ、センサ技術、情報処理技術と従来の農業生産を融合させて、肥料成分や生育状態のばらつきを数値情報として把握し、収量の極大化や施肥量の極小化等の目的別に平準化させるための農作業の選択、実施を可能にしていく技術の推進を図ろうとしている¹⁾。精密農業

HIDAKA Yasuyuki, KURIHARA Eiji, MAKINO Eiji, SUGIYAMA Takao

〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

(Precision Agriculture : PA) もしくは精密農業 (Precision Farming : PF) は、重要なキーテクノロジーになるものと考えられる。

2. 生研センターにおける精密農業の取り組み

生物系特定産業技術研究支援センター（以下：生研センター）では21世紀型農業機械等緊急開発事業（通称：21緊プロ）の中で精密農業技術の確立のために、可変施肥機、作物生育情報測定装置そして収量コンバインを開発してきた。その後、平成15年から日本型水稲精密農業実証試験の中で（平成15～18年）、これらの情報を統括するシステム作りを行うとともに、これら精密農業機器の現地導入を図りデータの蓄積を行っている。

生研センターでは、精密農業の概念を、①ほ場毎の土壌や作物の状態などを的確かつ詳細に把握し（センシング装置）、②施肥等を過不足なく効率的に行うことにより（アプリケーション）、③環境負荷の低減、収量の増加・品質の向上・生産コストの削減を同時に可能にする栽培管理技術と定義している²⁾。この定義の中で、収量等の収穫情報を測定できる収量コンバインは、センシング装置として必要不可欠な装置だと言

える。

また、日本型水稲精密農業の管理単位の定義として、①広域管理：対象となる経営体の全ほ場をほ場単位で捉える、②局所精密管理：造成後の地力むらが大きいほ場を対象にきめ細やかな管理を行う、の二つに分類して定義している。前述した受託作業などは、広域管理の一つと考えられ、現在、生産現場からの要望が大きい管理方法である。また、局所精密管理は、よりきめ細やかな情報を栽培に活用していくという意味で、様々な可能性を持つ新しい管理技術である²⁾。

3. 収量コンバインの開発目標

欧米諸国では、収量モニタ等がすでに市販されているが、それらは一般的に欧米で普及している大型の普通コンバイン用であり、計測方法および機器の設置位置、ほ場条件、対象作物、作物条件等が異なるため、日本での収穫作業への適応が困難である^{3), 4)}。そのため、我が国における収量測定に関して、多くの研究開発が行われている^{4), 5), 6), 7), 8)}。しかしながら、これらの研究開発は、試験用のものや、相対的な流量測定を行うものであったり、収量を評価する

ための重要な項目である水分測定システムが欠落したりしているため、前記したような、生産現場で要望される情報、諸条件に対応しておらず、普及までに至っていないのが現状である。

また、収穫作業は従前通り、作物条件や天候に左右されるため、どうしても能率優先になりやすく、ほ場ごとの収量や水分等について、客観的な情報を得ることは難しいのが現実である。

以上のような背景から、生研センターでは、次にあげる点に着目した。①日本で最も普及している自脱コンバインに搭載可能なもの、②測定精度が高く、出来るだけ安価なシステムであること、③操作が簡単であること、これらの開発目標のもと、収量コンバインの開発を行った。

なお、本機の開発にはヤンマー農機㈱と静岡製機㈱の協力を得た。

4. 収量コンバインの構造

(1) 全体構成

収量コンバインは、市販の6条自脱コンバインに搭載された質量測定部、水分測定部、制御・表示部により構成される(図1)。これら各測定部での測定値から得られる収穫情報は、

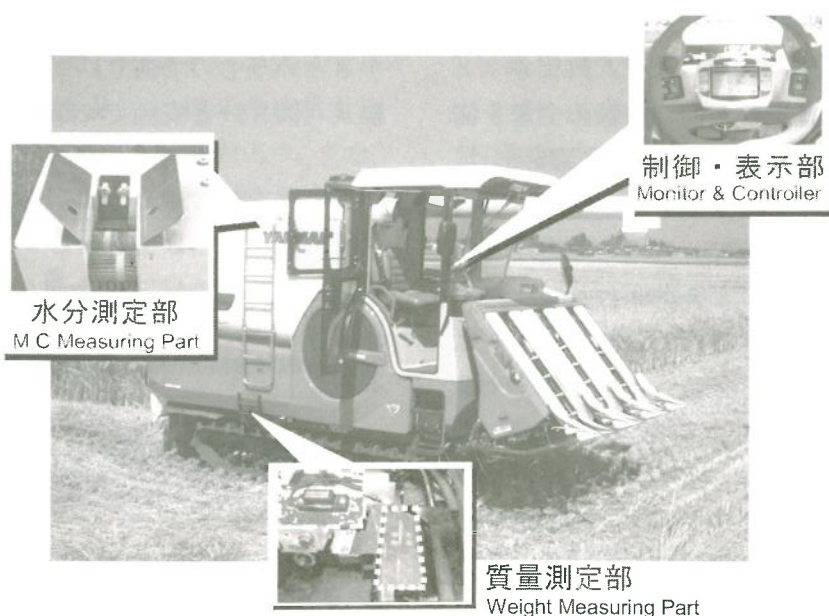


図1 開発した収量コンバインの外観

収量（質量および反収）、水分、作業時間などである。操作はハンドル中央にあるセンターメータで行い、収穫情報ボタン、ほ場選択、作物選択の3ステップで簡単に行える。作業終了後には一筆毎の穀物質量、穀物の平均水分、反収が表示され、印刷ボタンによりその場で印刷可能である。また、1シーズン分のデータは保存することができ、適宜通信ポートからデータを収集し、帳票や収量マップの作成等に利用できる。

(2) 質量測定部

前述したように、欧米で市販されている質量測定部は、衝撃式や光学式のセンサによって、収穫した穀粒の流量をその搬送経路途中で測定し、質量換算する方式である。しかし、日本で一般に普及している自脱コンバインは、脱穀選別後の穀粒をスクリュオーガによって搬送し、タンク内に拡散するため、その搬送経路において収穫した穀粒の全量を検出することは困難である。また、流量を測定する方式では、低流量時に検出不能な場合が多く、大きな誤差の要因になるとの報告があり、流量が非常に小さい自脱コンバインでは、この方式には限界があると考えられる⁸⁾。この他、コンバインの走行部に使用されている油圧を利用する方法、揚穀筒の圧力を測定する方法等の試みもあるが実用化には至っていない¹⁴⁾。

そこで、本機ではタンク内の穀粒の全量を測定する方式を採用した。試作した質量測定部は、穀粒タンク的一端を支持するロードセルへの荷重により、タンク内の穀粒の質量を測定する方式である。また、ロードセル荷重は、コンバインの傾斜によって変動するため、ロードセル近傍に設置した傾斜センサによって、ロードセル測定値の傾斜補正を行う機能を付加した¹¹⁾（図2）。

タンク内の穀粒の全量を測定する方式の利点は、①タンク内の穀粒質量を直接、測定対象としている、②タンク内質量全体を測定するため、測定値を積算していく流量測定方式のような誤

差の累積が少ない、③収穫物の性状に左右されにくい、④装置が比較的単純である、⑤センサ部への直接的な粉の衝撃や粉塵がないため耐久性を比較的高くできることが挙げられる。

(3) 水分測定部

欧米では、水分計として静電容量式の水分計を採用している。サンプリング方法には若干の相違があるが、穀粒流量センサと同様に搬送経路内で測定を行っている。しかし、それらの水分計は、25%w.b.以上の比較的高水分の穀粒用であることや、密度の違いによって大きい誤差が生じることなどが報告されている³⁾。また、国内において、かさ密度補正電極と穀物重量補正によって、密度補正と32%w.b.程度の粉を高い精度で測定できるコンバイン用の静高周波静電容量式の開発が行われているが、機構が複雑なためコンバインに搭載して実用的に測定するまでには至っていないのが現状である⁹⁾。水分測定部は、①15~35%w.b.の水分測定が可能であること、②比較的構造が簡素で小型であること、③コンバインで収穫された時の穀物の状態（比重や夾雑物等）の影響を受けにくいことが必要であることから、新たに開発する水分測定部には、電気抵抗式を採用した。電気抵抗式水分計の測定原理は、二つのローラ電極にて穀物を圧碎したときの電気抵抗により、水分を測定するというものであり、局所精密に対応した複粒式（図3）と安価で一筆管理に対応した単粒

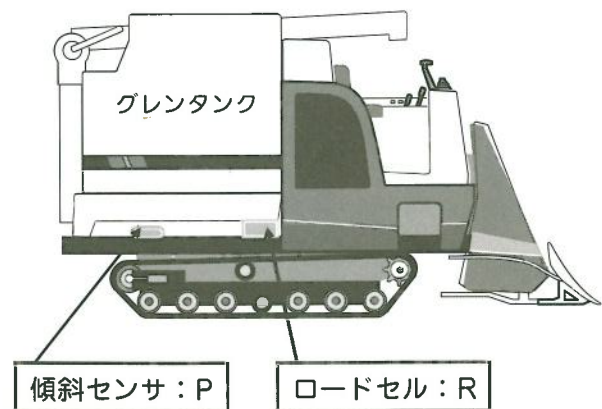


図2 穀物質量測定部概要

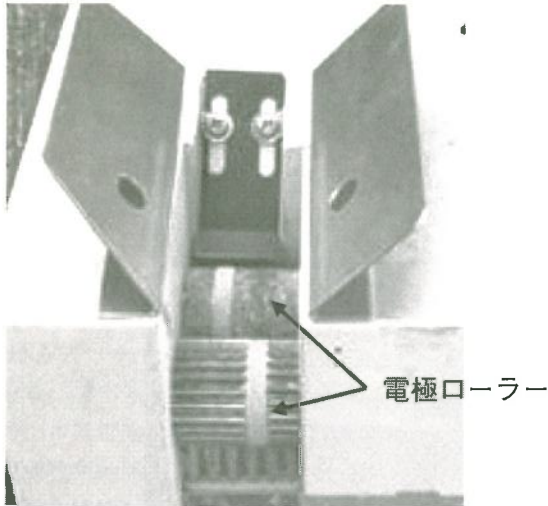


図3 水分計外観（複粒式）

式を開発した¹³⁾。水分測定部は、グレンタンク内に配置し、タンク内に拡散された直後の粉をサンプリングし測定する。

5. 日本型水稻精密農業実証試験での評価と今後の予定

平成15年から実施している日本型水稻精密農業実証試験においては、ほ場を一筆毎に管理する広域管理中心に試験を実施している。平成17年度は、新潟の生産組合及び宮城の生産農家において、83ha、333筆のほ場で問題なく稼働し収穫情報を得ている。収量測定の精度は-2.5～-4.1%程度の誤差で、モニターの意見では満足なものであった（表1）。欧米の成果と比較しても高い精度であると考えられる¹⁴⁾。また、簡単操作で作業負担にならないとの意見も得ている。さらに、プリンタの装備について、その場で情報を印刷できるため記録が紙として残ることや、委託農家への説明に利用できるなど好評価であった。図4に収穫情報で作成した収量マップの一例を示す。

今後は、収量コンバインの実用化に向けて、現場使用での問題点などモニターの意見集約や更なるデータ収集を行って本機の完成を図るとともに、製造コストを下げるための検討を行う予定である。

表1 日本型水稻精密農業実証試験結果（H17年度）

試 験 地		新 潟	宮 城
作 業 面 積	ha	13.6	29.2
作 業 筆 数	筆	59	146
作 業 日 数 ¹⁾	日	29	23
総収量 ²⁾	実測値	37	182
	測定値	36	175
	誤 差	%	-2.5

*)新潟では他のコンバインとの併走作業を除外した値

1)延べ日数

2)生もみでの質量

文 献

- 1) 農林水産省生産局（2006），http://www.maff.go.jp/soshiki/seisan/it_katuyou/index.html
- 2) 西村 洋ら（2004），生研センター平成15年度研究報告会資料，2-10.
- 3) 後藤隆志ら（2000），生研機構海外調査報告書，11-15.
- 4) 帖佐 直ら（2002），農業機械学会誌，64（6），145-153.
- 5) 松井正実ら（2000），第59回農業機械学会講演要旨，149-150.
- 6) 建石邦夫ら（1999），第58回農業機械学会講演要旨，283-284
- 7) 李 忠根ら（2000），農業機械学会誌，62（4），81-88.
- 8) 飯田訓久ら（2006），農業機械学会誌，68（2），84-87.
- 9) 加藤宏郎ら（2002），農業機械学会誌，64（5），68-75.
- 10) Colvin, T.S., Arslan, S., (1999), Site-Specific Management Guidelines. Potash & Phosphate Institute. SSMG-9.
- 11) 牧野英二ら（2001），第60回農機学会講演要旨，391-392.
- 12) 牧野英二ら（2000），第59回農機学会講演要旨，309-310.



図4 収量マップ作成例

◀地域先端研究▶

マルチプレックスPCRによるイチゴ品種識別技術の開発

¹栃木県農業試験場 生物工学部,²芳賀農業振興事務所 経営普及部田崎 公久¹ ・ 柏谷 祐樹² ・ 天谷 正行¹

DNAマーカーによる品種識別は、迅速かつ客観的に行えることが特徴であり、様々な農作物において開発されている。栃木県では、イチゴの育種を行っており、‘女峰’や‘とちおとめ’などの優良品種を作出している。そこで、本県育成品種の海外での違法な農産物生産、輸入への対応、ならびに育成者権保護を目的として、イチゴ品種識別技術の開発に取り組んだ。その結果、マルチプレックスPCRにより、最大3回のPCR反応で25品種を識別する方法を開発した。対応できる品種の国内作付けシェアは約94%である。

1. はじめに

国内で育成された優良品種が違法に国外へ持ち出され、増殖・栽培され、輸入される育成者権侵害の事例は後を絶たず起きている。最近では、インゲンマメ‘雪手亡’、イグサ‘ひのみどり’、オウトウ‘紅秀峰’などが話題となった。栄養繁殖性のイチゴも例外ではなく、多数の品種が違法に海外へ持ち出され、その収穫物が輸入される事例が報告されている。

栃木県育成品種である‘とちおとめ’は、大果、高糖度で国内市場においても大変評価が高い品種で、国内作付面積の約30%を占めている。‘とちおとめ’の種苗生産・販売は、国内の3社14団体のみに許諾しており、海外の企業・団体へは一切許諾を行っていない。しかし、平成13~14年に外国産‘とちおとめ’が国内市場に流通し、問題が発覚した。そこで、育成者権を保護するため農林水産省の先端技術を活用した農林水産研究高度化事業における「野菜・茶およびウメの原産地表示判別技術の開発」プロジェクトの「品種識別技術の開発」(平成14~16年)に参加し、(独)野菜茶業研究所、福岡県、TASAKI Kimihisa¹、KASHIWAYA Yuuki²、AMAGAI Masayuki¹

¹〒320-0002 栃木県宇都宮市瓦谷町1080²〒321-4305 栃木県真岡市荒町5197

奈良県と共にイチゴの品種識別技術開発に取り組んだ。その結果、‘とちおとめ’および‘とちひめ’（栃木県育成品種）を1回のPCR (Polymerase Chain Reaction) 反応で識別可能なRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)-STS (Sequence Tagged Site) 化マーカー、ならびにイチゴ17品種を識別可能なRAPD-STS化マーカーの開発に成功した¹⁾。その後、県単独で研究を進め、従来のマーカーと、新たに開発したAFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)-STS化マーカーを加えてマルチプレックスPCR条件を確立した。その結果、最大でも3回のPCR反応で25品種を識別できる方法を開発したので紹介する。

2. DNAマーカーによるイチゴ品種識別技術

DNAマーカーによる品種識別技術は、すでにコメ^{2), 3)}、インゲンマメ⁴⁾、イグサ⁵⁾等において開発されており、特に、コメにおいては、他品種の混入防止や偽装表示防止のため実用化されている。イチゴでも、同様に育成者権侵害の問題が発生したことから、上述の農産物とほぼ同時並行で技術開発が行われており、現在までに、CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) 法による品種識別技術が確立され

ている^{6), 7)}。このCAPS法による品種識別技術は、国内で栽培されている品種をほとんど網羅しており、64品種の識別が可能で⁷⁾、品種同定に必要なDNAマーカーの選定⁸⁾および複数の試験研究機関による妥当性試験も実施されている品種識別技術⁹⁾である。しかし、識別にはプライマーに加えて制限酵素も常備しておくなど、初期投資も必要である。また、PCR増幅後に制限酵素処理が必要なことから、DNAマーカー検出までに時間やコストがかかる。そこで、簡易かつ効率的にDNAマーカーを検出するため、①操作性の簡易化（PCRベースのDNAマーカーの検索）②識別の効率化（‘とちおとめ’、‘とちひめ’識別用のDNAマーカーの検索）、を目標として開発を行った。

開発には、比較的品種間多型が得られやすく、検出が容易なRAPD法によりDNAマーカーを検索し、再現性および視認性を高めるため、STS化を行うこととした。この結果、前段で述べたようなRAPD-STS化マーカーの開発に成功したものである。RAPD-STS化マーカーによる品種識別技術は、奈良県でも同様に開発を行っており、‘アスカルビー’を1回のPCR反応で識別できるマーカーが開発されている¹⁰⁾。一方、福岡県では、これらの手法とは異なるAFLPおよびSSR（Simple Sequence Repeat）法により、‘あまおう’の識別技術を開発しており^{11), 12)}、同じく1回のPCR反応で識別可能なマーカーが開発されている。

3. マルチプレックスPCRによるイチゴ品種識別

本県が開発した品種識別用RAPD-STS化マーカーは、‘とちおとめ’および‘とちひめ’に関しては、1回のPCRで識別することができ、検出の効率化が図られた。しかし、17品種（‘とちおとめ’、‘さちのか’、‘さがほのか’、‘とよのか’、‘あまおう’、‘女峰’、‘章姫’、‘紅ほっぺ’、‘とちひめ’、‘アスカルビー’、‘レッドパール’、‘濃姫’、‘栃の峰’、‘はるの

か’、‘麗紅’、‘久留米49号’、‘苺香（メイヒャン：韓国育成品種）’）を識別する場合は、最低でも6組のプライマーセットを用いてPCRを行う必要があった。そこで、識別をより簡略化するために、コメの品種識別^{2), 3)}にも用いられている、マルチプレックスPCRによるDNAマーカーへの改良を行った。

既存のイチゴ品種識別用RAPD-STS化プライマーをマルチプレックスPCR用プライマー化するためには、T_m値およびマーカーの分子量を考慮しながら、プライマーを再設計することが必要であった。また、各プライマーの最終濃度も微妙に異なっており、最適な条件を検討した。これらに‘とちおとめ’および‘栃の峰’のみバンドが検出されるAFLP-STS化マーカーを加えて開発を行った。この結果、3セット（プライマーセット①（プライマー1～3）、プライマーセット②（プライマー4～7）、プライマーセット③（プライマー8～10））に集約することができた。特に、プライマーセット①は、‘とちおとめ’、‘とちひめ’、‘メイヒャン’を同時に識別できるプライマーセットである。

マルチプレックスPCR用プライマーセット①～③を用いた結果を図1および表1に示す。マルチプレックスPCR用プライマーセット①～③を用いると、既報の17品種に新たに8品種（‘とちひとみ’、‘ひのしずく’、‘さつまおとめ’、‘とねほっぺ’、‘やよいひめ’、‘サンチーゴ’、‘宝交早生’、‘アスカウェイブ’）を加えた25品種すべてが識別可能である。特定の品種を識別する場合は、全セットのプライマーを用いる必要はなく、1ないし2種類のプライマーセットを用いれば識別可能である（表2）。

‘女峰’を識別したい場合は、プライマーセット②および③のみ使用すれば識別することが可能である。なお、1回のPCR反応で識別が可能な品種は、プライマーセット①で‘とちおとめ’、‘とちひめ’、‘栃の峰’、‘メイヒャン’、プライマーセット②で‘あまおう’、‘さがほのか’、‘アスカルビー’、‘宝交早生’、プライマーセット③で‘サンチーゴ’である。

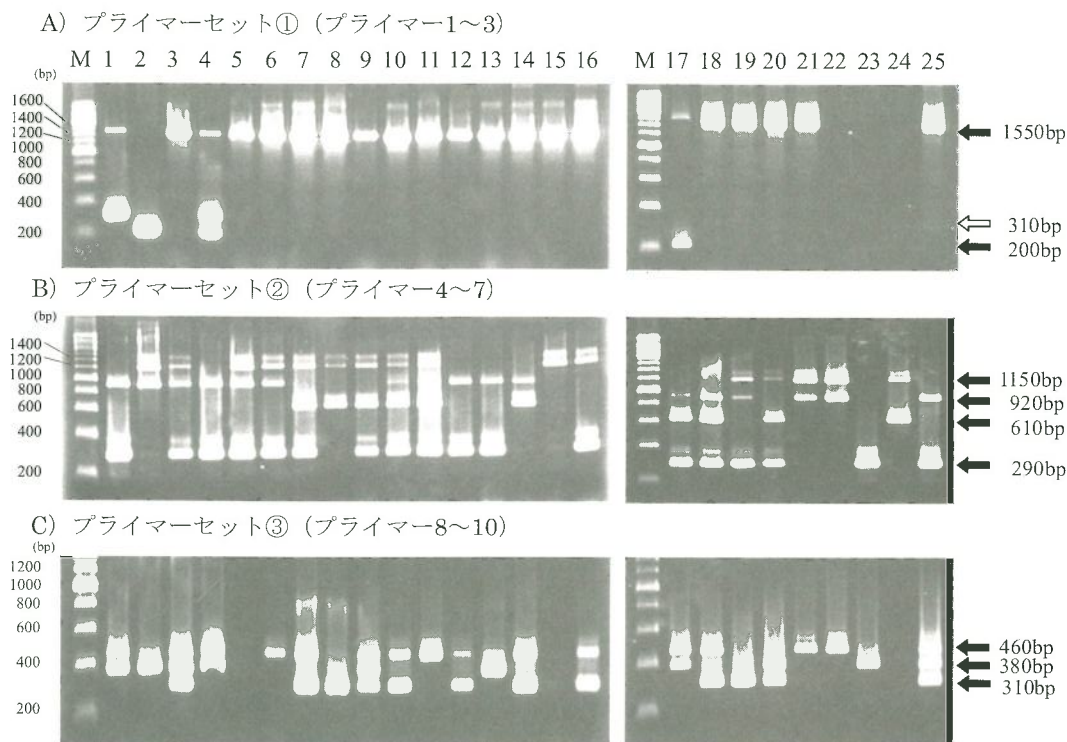


図1 イチゴ25品種に対するマルチプレックスPCR用プライマーセット①～③による電気泳動結果
 供試品種：1. とちおとめ, 2. とちひめ, 3. 女峰, 4. 栃の峰, 5. 久留米49号, 6. 麗紅, 7. さちのか, 8. とよのか, 9. はるのか, 10. 章姫, 11. 紅ほっぺ, 12. レッドパール, 13. 濃姫, 14. アスカルビー, 15. あまおう, 16. さがほのか, 17. メイヒャン, 18. ひのしずく, 19. さつまおとめ, 20. サンチーゴ, 21. とねほっぺ, 22. やよいひめ, 23. 宝交早生, 24. アスカウェイブ, 25. とちひとみ
 M：200bp DNA Ladder, 黒矢印：RAPD-STS化マーカー由来, 白矢印：AFLP-STS化マーカー由来

表1 イチゴ25品種に対するマルチプレックスPCR用プライマーセット①～③によるバンドの有無

品種名	プライマーセット①			プライマーセット②				プライマーセット③		
	プライマー-1	プライマー-2	プライマー-3	プライマー-4	プライマー-5	プライマー-6	プライマー-7	プライマー-8	プライマー-9	プライマー-10
	1550bp	310bp	200bp	1150bp	920bp	610bp	290bp	460bp	380bp	310bp
とちおとめ	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
とちひめ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
女峰	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
栃の峰	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
久留米49号	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
麗紅	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
さちのか	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+
とよのか	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
はるのか	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
章姫	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
紅ほっぺ	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
レッドパール	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
濃姫	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
アスカルビー	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
あまおう	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
さがほのか	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+
メイヒャン	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
ひのしずく	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
さつまおとめ	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
サンチーゴ	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
とねほっぺ	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
やよいひめ	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
宝交早生	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
アスカウェイブ	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
とちひとみ	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+

注1) +はバンド有、-はバンド無を示す。

表2 識別可能なイチゴ品種のマルチプレックスPCR用プライマーセットの組合せ

プライマーセット名	品種名	合計
プライマーセット①	とちおとめ, とちひめ, 栃の峰, メイヒャン	4品種
プライマーセット②	アスカルビー, あまおう, さがほのか, 宝交早生	4品種
プライマーセット③	サンチーゴ	1品種
プライマーセット①, ②	とちおとめ, とちひめ, 栃の峰, メイヒャン, アスカルビー, あまおう, さがほのか, 宝交早生, とよのか, ひのしずく, とねほっぺ, やよいひめ, アスカウェイブ	13品種
プライマーセット①, ③	とちおとめ, とちひめ, 栃の峰, メイヒャン, サンチーゴ, とねほっぺ, やよいひめ, 濃姫, 宝交早生, アスカウェイブ	10品種
プライマーセット②, ③	アスカルビー, あまおう, さがほのか, 宝交早生, サンチーゴ, とちひめ, 女峰, 久留米49号, 麗紅, さちのか, とよのか, はるのか, 章姫, 紅ほっぺ, レッドパール, 濃姫, メイヒャン, ひのしずく, さつまおとめ, とちひとみ, アスカウェイブ	21品種
プライマーセット①, ②, ③	とちおとめ, とちひめ, 栃の峰, メイヒャン, アスカルビー, あまおう, さがほのか, 宝交早生, サンチーゴ, 女峰, 久留米49号, 麗紅, さちのか, とよのか, はるのか, 章姫, 紅ほっぺ, レッドパール, 濃姫, ひのしずく, さつまおとめ, とねほっぺ, やよいひめ, アスカウェイブ, とちひとみ	25品種

このマルチプレックスPCRによるイチゴ品種識別技術については、現在、「イチゴ品種のDNA配列差異を利用したマルチプレックスPCRに基づく識別方法」として特許出願中である（特許出願2006-083274）。

4. 今後の活用および開発の方向性

今回開発したマルチプレックスPCRによるイチゴ品種識別技術は、25品種を効率的に識別することができる。現在、国内で作付されている上位8品種（‘とちおとめ’、‘さちのか’、‘さがほのか’、‘とよのか’、‘あまおう’、‘章姫’、‘女峰’、‘紅ほっぺ’）で約93%を占めているが（平成17年JA全農調べ）、これらすべての品種について識別することができる。また、本技術の使用は、育成者権侵害以外にも、種苗生産、栽培圃場、流通加工の段階で他品種との混入防止、偽装表示防止にも用いることができる。特に、規模にもよるが数品種の識別で済む種苗生産、栽培圃場におけるチェック等の実際の現場レベルでの利用には、本技術が実用的であると考えている。

今後は、簡易に多サンプルを処理できるDNA抽出方法や、加工品においても検出できるDNAマーカーの開発が必要であると考えている。特に、加工品におけるDNAは、熱処理

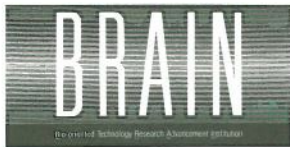
等の物理的条件によりDNAが短く断片化されているため、短い断片でも検出できるDNAマーカーが必要である。また、加工品には複数の品種が混入されていることが推測されるため、複数の品種の品種が混入していても検出できるDNAマーカーの開発も併せて必要である。

現在、我々は、イチゴにおける連鎖地図の作製のため、SSR濃縮ライブラリーを構築し、大量にSSRマーカーの開発を進めている¹³⁾。SSRマーカーは、増幅断片が短いため、加工品におけるDNAマーカー検出に有効であり、今後、SSRマーカーによるイチゴ品種識別も検討していきたい。

文 献

- 1) 田崎公久ら (2004), 育種学研究, 6 (別2), 357
- 2) 大坪研一ら (2000), 日本農芸化学会誌, 76, 388-397
- 3) 新村和則ら (2005), 育種学研究, 7, 87-94
- 4) 紙谷元一 (2004), 農業および園芸, 79, 185-189
- 5) 齋藤彰 (2004), 農業および園芸, 79, 168-174
- 6) Kuniyama, M. et al. (2003), *Euphytica*,

- 134, 209-215
- 7) Kuniyoshi, M. et al. (2005), *Theor. Appl. Genet.*, 110, 209-215.
- 8) 松元哲ら (2006), 園芸学会雑誌, 75 (別1), 323
- 9) 上田浩史 (2006), 園芸学会雑誌, 75 (別1), 324
- 10) 野村貴浩ら (2005), 近畿中国四国農研, 7, 37-40
- 11) 下村克己ら (2005), 福岡県農業総合試験場研究報告, 24, 43-47
- 12) 下村克己・平島敬太 (2004), 園芸学会雑誌, 73 (別2), 551
- 13) 田崎公久ら (2006), 育種学研究, 8 (別1), 61



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

同質遺伝子系統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—植物の乳液に農業・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

◀文献情報▶

豚精子における耐凍性及び原形質膜の脂肪酸組成の品種内及び品種間差

Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm

K. E. Waterhouse^{1, 2}, P. O. Hofmo³, A. Tverdal⁴ and R. R. Miller, Jr⁵

¹ Team Semin, PO Box 8146 Dep., N-0033 Oslo, Norway, ²The Norwegian School of Veterinary Science, Department of Production Animal Clinical Sciences, PO Box 8146 Dep., N-0033 Oslo, Norway, ³ Norsvin (Norwegian Pig Breeders Association), PO Box 504, N-2304 Hamar, Norway, ⁴ The Norwegian School of Veterinary Science, Department of Basic Sciences and Aquatic Medicine, PO Box 8146 Dep., N-0033 Oslo, Norway and ⁵ Hillsdale College, Biology Department, 33 E College, Hillsdale, Michigan 49242, USA

Reproduction, 131, 887-894 (2006)

液状保存精子を人工授精した場合に比べて、凍結・融解精子を豚に人工授精した場合の豚の分娩率は10～25%低下するとともに一腹産仔数も1～3頭減少することから、現状では豚の生産現場においては凍結・融解精子はあまり使われていない。しかしながら、遺伝資源の保存や広域流通のためには、豚精子の凍結保存は不可欠な技術である。凍結操作は精子に多大なストレスを与え、半数以上の精子は死滅する。また、凍結保存に対する精子の反応性や凍結・融解精子の受精能は動物種により異なることが知られているが、動物種により不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸の比率やコレステロールの含有量が異なることから、部分的にはあるが原形質膜の脂肪酸組成が精子の生存性に影響を及ぼすと考えられている。しかしながら、このような種間の脂肪酸組成の差では、品種間あるいは個体間の耐凍性の差を説明することはできない。そこでこの

論文においては、ランドレース種とデュロック種の品種間及び品種内において、冷却、再加温、凍結・融解が原形質膜や先体の正常性に及ぼす影響とともに、凍結・融解後の精子の生存性と原形質膜の脂肪酸組成との関係について検討が行われた。精子原形質膜と先体の正常性をフローサイトメーターを用いて解析した結果、ランドレース種とデュロック種との間に品種間差は認められなかった。しかしながら、凍結・融解後の精子生存性においては、個体間に有意な差が認められた。ランドレース種とデュロック種の両品種とも原形質膜に最も豊富に存在する脂肪酸は、パルミチン酸(16:0)、ステアリン酸(18:0)、オレイン酸(18:1, n-9)、ドコサペンタエン酸(DPA; 22:5, n-6)、ドコサヘキサエン酸(DHA; 22:6, n-3)であった。DPA及びDHAの総量がDPA及びDHA以外の脂肪酸の総量に対する割合と凍結・融解後の生存率(原形質膜の正常性)との間には、ランドレース種(相関係数 $r=0.64$)においてもデュロック種(相関係数 $r=0.67$)においても有意な相関が認められた。以上の結果から、個体間の凍結・融解後の精子生存性の差は、精子原形質膜が含有する長鎖多価不飽和脂肪酸の比率が部分的にはあるが関与していることが明らかとなった。

精子の凍結保存技術は、遺伝資源の保存や精子の広域流通のために不可欠な技術である。凍結保存技術の進歩により豚精子の凍結保存も可能となってきたが、凍結・融解後の生存性については個体差が大きく、普遍的な凍結保存技術は確立されていない。精子原形質膜の脂肪酸組成が凍結・融解後の生存性に部分的であっても関係することが明らかとなり、このような情報をもとに豚精子の凍結保存技術が進展することを期待する。

(抄訳：下司雅也, GESHI 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▶

植物による亜鉛無毒化の新しいメカニズム

Trichomes of Tobacco Excrete Zinc as Zinc-Substituted Calcium Carbonate and Other Zinc-Containing Compounds

Géraldine Sarret, Emiko Harada, Yong-Eui Choi, Marie-Pierre Isaure, Nicolas Geoffroy, Sirine Fakra, Matthew A. Marcus, Mandy Birschwilks, Stephan Clemens, and Alain Manceau

Plant Physiol. (2006) 141, 1021-1034

植物の葉を手で触れてみるとざわざわとした感触が伝わり、表面に産毛のようなものが生えていることが分かる。これを毛茸（毛状突起、トリコーム）と言ひ、葉を機械的に保護するばかりでなく、その先端から様々な物質（テルペン、防御タンパク質、糖アルコール等）を分泌しており、動物昆虫を引き寄せたり忌避したり、病原菌の進入を阻止したりする役割を果たしている。タバコには長短2種の毛茸があるが、同様の役割を果たすとともに味や香りの素となるアルカロイドやテルペンを分泌し、タバコ品質に大きな役割を果たしている。タバコ葉表面に炭酸カルシウムを主成分とする無機物の顆粒が沈着しているのが時に観察されるのであるが、これも毛茸が分泌している。しかも、高濃度のカドミウムに暴露されると、カドミウムをこの無機物の顆粒として排出することが明らかにされてきた（Choiら、2004、2005）。今回、亜鉛も同様な機構があることが明らかにされ、カドミウムばかりでなく重金属一般に対する植物の防御機構として毛茸が機能している可能性が浮上してきた。

高濃度（3 mM）亜鉛を含む培養液でタバコを水耕栽培すると地上部・地下部共に成長が抑制される。カルシウムを加えると毒作用は軽減されるが、このとき、毛茸の数は2～3倍、葉表面の顆粒数は実に10倍にも増加し、地上部に吸収された亜鉛の実に16.9%（亜鉛単独施用で

は9%）が葉表面に顆粒として分泌される。この顆粒は10～150 μmと大きさは様々であるが、炭酸カルシウムを主成分とし、亜鉛、マグネシウム、カリウム、塩素、リン、珪素、マンガンを含む1 μm以下の粒子が寄り集まったものである。また、葉内の亜鉛分布を染色剤、μXRFで調べると、その大半が葉脈と毛茸先端細胞に集積していた。亜鉛は毛茸より分泌され、それはカルシウムにより促進されると考えられる。

本論文は亜鉛の無毒化の新しいメカニズムを提唱するものである。勿論、その意味で評価されるのは間違いないが、喫煙による重金属暴露のリスクを低減する方策を示唆し、タバコによるカドミウムや亜鉛などの重金属汚染土壌浄化の可能性を示すものとなっている。

（抄訳：岩井純夫、IWAI Sumio、鹿児島大学農学部）

◀文献情報▶

パイエル板におけるH₂レセプターを介したヒスタミンのシグナルは、*Yersinia enterocolitica*の感染制御に重要である

From the Cover: Histamine signaling through the H₂ receptor in the Peyer's patch is important for controlling *Yersinia enterocolitica* infection.

Scott A. Handley, Peter H. Dube, and Virginia L. Miller

Departments of Molecular Microbiology and Pediatrics, Washington University School of Medicine, 660 South Euclid Avenue, St. Louis, MO 63110

PNAS, 103, 9268-9273 (2006)

*Yersinia enterocolitica*のような腸内病原菌は、容易に腸管に定着し、小腸のリンパ器官内で増殖する。しかし、その際、宿主がどのような応答反応をしているのか、いまだ詳細が知られていない。そこで、宿主の応答反応を総括的に見るために、*Yersinia enterocolitica*をマウスに経口投与し、腸のリンパ器官に感染させたときの転写因子の変化をDNAマイクロアレイ法で解析した。その結果、パイエル板と腸間膜リンパ節において、サイトカインであるIL-11とIL-17の上昇が見られた。さらに、今まで感染による変化が知られていなかった因子の中で、ヒスタミン産生に必須な酵素であるhistidine decarboxylase (*Hdc*)の上昇が観察された。

そこで筆者らは、この点に着目し、*Y. enterocolitica*感染におけるパイエル板でのヒスタミン産生について検討した。その結果、PBS投与ではパイエル板に変化は見られなかったが、*Y. enterocolitica*に感染した場合、パイエル板で強くヒスタミンが産生されることが明らかとなった。この結果、*Hdc*の上昇は、ヒスタミン産生に関与していることが示唆された。

このことから、ヒスタミン受容体を刺激また

は阻害した時に*Y. enterocolitica*感染応答に変化があるか否か、検討を行った。4～6週齢のC57BL/6マウスに5～8×10⁸ cellの*Y. enterocolitica*を経口投与し、ヒスタミン受容体アイソフォームの一つであるH₂レセプターのアゴニスト、アンタゴニストを腹腔内投与したマウスの生存率について、検討を行った。その結果、H₂レセプターのアントゴニストであるシメチジンを投与した群は、コントロール群に比べて*Y. enterocolitica*感染による生存率が有意に減少し、逆に、H₂レセプターのアゴニストであるディマプリトでは有意に増加した。同じく胃酸分泌に深く関係があるプロトンポンプの阻害剤であるオメプラゾールを投与したマウスでの生存率は、コントロール群と変化がなかった。このことから、*Y. enterocolitica*の感染に胃酸分泌量やpHは関係せず、ヒスタミンのH₂レセプターを介した刺激が重要であることが示唆された。

次に、*Y. enterocolitica*を投与したときのマウス腸管内での定着性や増殖性を調べるために、*Y. enterocolitica*を経口投与し、腸間膜リンパ節での定着性及び増殖性を検討した。マウスに、*Y. enterocolitica*を経口投与し、投与後3日目の腸間膜リンパ節における*Y. enterocolitica*のCFU値を比較して検討したところ、シメチジンを腹腔内投与したマウスでは、コントロール群に比べ有意にCFU値が高く、ディマプリトを腹腔内投与したマウスでは有意に低いことから、生存率と比例した結果が得られた。同様に、*Y. enterocolitica*を経口投与してから6日後のマウスでも、同様の結果が示された。

これらの結果から、H₂レセプターを介した刺激が*Y. enterocolitica*感染に何らかの影響を与えていることが示され、ヒスタミンを介した自然免疫応答を検討する上で、有用な知見が得られたものと考えられる。

(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▶

塩蔵魚卵食品のイクラ、たらこ、トビコ、カズノコの脂質部類および脂肪酸組成の分析

Analysis of lipid classes and the fatty acid composition of the salted fish roe products, Ikura, Tarako, Tobiko and Kazunoko

SHIRAI Nobuya, HIGUCHI Tomoyuki, SUZUKI Hiramitsu

Physiological Function LAB, National Food Res. Inst., 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Food Chemistry, 94, (2006) 61-67

この研究では、日本の魚卵製品であるイクラ、たらこ、トビコ、カズノコの総脂質類 (TL)、ステロールエステル類 (SE)、トリグリセロール類 (TG)、リン脂質類 (PL)、ホスファチジルコリン (PC) およびホスファチジルエタノールアミン (PE) の脂質部類および脂肪酸組成を明確にしようと試みた。総脂質の含量はイクラが約14.5%、たらこが約3.7%、トビコが約3.2%、カズノコが約3.0%であった。イクラのTL、総コレステロール、TG、およびPL含量はたらこ、トビコ、カズノコのそれらより高い値であった。カズノコは今回の4種類の魚卵製品中で最も低いコレステロール含量であった。PCは各魚卵製品の総脂質類における主要成分であった。主要脂肪酸はパルミチン酸(16:0)、オレイン酸(18:1n-9)、エイコサペンタエン酸(EPA, 20:5n-3)、ドコサヘキサエン酸(DHA, 22:6n-3)であり、EPAとDHAの合計割合はいずれの魚卵製品も30%を超えていた。全体の脂肪酸組成は各魚卵製品原料の親魚の脂肪酸組成と類似していたが、EPAとDHAの合計割合がいずれも魚卵製品の方が上回っていた。トビコは他の魚卵製品よりもEPA含量が低く、DHA含量が高かった。飽和脂肪酸の割合はトビコが他の魚卵製品より高かった。その要因として、トビコの親魚であるトビウオはインドネシアに生息しているのに対し、他の3

魚卵製品の親魚であるスケトウダラ、サケ、ニシンは高緯度の地域で生息していることが、魚卵の脂肪酸組成にも影響を与えているものと推察された。DHAは各魚卵製品のTL、SE、TG、PCおよびPE画分にて高含量であった。特にトビコのPCおよびPE画分のDHA比率は、イクラ、たらこ、カズノコのそれらよりも高い値であった。これらの結果を総合すると、製品による多少の違いはあれ、日本の代表的な4種類の魚卵製品はEPA、DHA、PCを豊富に含むことが明らかとなった。この魚卵製品由来の脂質含量、組成は例えば心臓血管疾患の予防といったヒトの健康を維持する、あるいは学習能力の向上のための有用な食品源である可能性を秘めている。今回は日本の魚卵食品であるイクラ、たらこ、トビコ、カズノコの測定結果を示したが、世界中で漁獲される魚の未利用の魚卵もEPA、DHA、PCの宝庫である可能性が高いと予想される。今後、各種魚卵の栄養成分の検討ならびに加工方法の研究が期待される。

(抄訳：那須雅之, NASU Masayuki, 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

平成18年度 生研センターUR対策現地検討会
「高品質堆肥製造と環境保全への役割」

主 催：(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
後 援：(独)農業・食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター
協 力：岩手県雫石町、新岩手農業協同組合、日本システム化研株式会社

開催日時：平成18年11月7日

集合時間・場所：午前10時10分(貸し切りバス出発) 盛岡駅西口バスターミナル乗り場

見学会場：しずくいしアグリリサイクルセンター 岩手県岩手郡雫石町南畑第28地割343番地2

検討会場：ホテル森の風 会議室 岩手県岩手郡雫石町鶯宿10-64-1

開催内容：

I. 現地見学会 -----11時00分～12時00分

場所：しずくいしアグリリサイクルセンター

II. 技術検討会 -----13時10分～16時30分

1. 微生物を活用した堆肥化の現状と今後の方向

東北大学大学院農学研究科教授 中井 裕

2. 堆肥の利用の現状と問題点

畜産草地研究所研究管理監 羽賀 清典

3. 堆肥化施設のあり方

生研センター畜産工学研究部長 道宗直昭

4. 堆肥化施設の稼働事例(UR研究成果含む)

1)しずくいしアグリリサイクルセンターの稼働状況

岩手県雫石町 農林課長 櫻田 久耕

2)加圧混練式高品質堆肥製造装置の導入事例

日本システム化研株式会社 代表取締役社長 井上 敏

5. 総合討論

申し込み方法

平成18年10月20日(金)までに、必要事項(氏名、部署・役職名、貸切バス利用の有無、昼食の利用の有無)を記入したEメール(ktsuga@affrc.go.jp宛)又はFAX(03-3459-6577)にてお申し込み下さい。なお、参加申し込み等詳細は、<http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>にて、「新着情報」の「平成18年度生研センターUR対策現地検討会について」をご覧ください。

問い合わせ先

生物系特定産業技術研究支援センター UR対策研究開発成果普及業務担当

プロジェクトリーダー 津賀幸之介 E-mail: ktsuga@affrc.go.jp

TEL: 03-3459-6568 FAX: 03-3459-6577

〒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)

編集後記

第117号をお届けします。本号の総説では、中島一雄氏（国際農林水産業研究センター）、片桐健氏、篠崎一雄氏（理化学研究所）らに「環境耐性作物開発のための制御因子の探索と分子育種への利用」と題して、2つの観点から環境ストレス耐性作物開発の現状と展望について概説して戴きました。温暖化や砂漠化の進行など、地球規模の環境変化が深刻さを増している今日、環境ストレスに強い耐性をもつ植物の開発が、世界の食糧問題、環境問題の双方にとって大変重要なテーマだと思います。

その他の研究情報としては、矢野昌裕氏（農業生物資源研究所）らにイネの脱粒性遺伝子の単離、大日向耕作氏（京都大学）らに食欲調節経路を活性化する低分子ペプチドの発見、佐々木義之氏（ビッグ研究所(株)）に霜降り牛になる遺伝子の特定、神川龍馬氏（京都大学）らに有害・有毒微細藻の分子モニタリング、日高靖之氏（生研センター）らに収量コンバインの開発、田崎公久氏（栃木県農業試験場）らにイチゴ品種識別技術の開発と、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）、岩井純夫氏（鹿児島大学）、畑中美咲氏（カルピス(株)）、那須雅之氏（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。 (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117号

平成18年9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