

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成18年11月15日発行（隔月1回15日発行）
ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

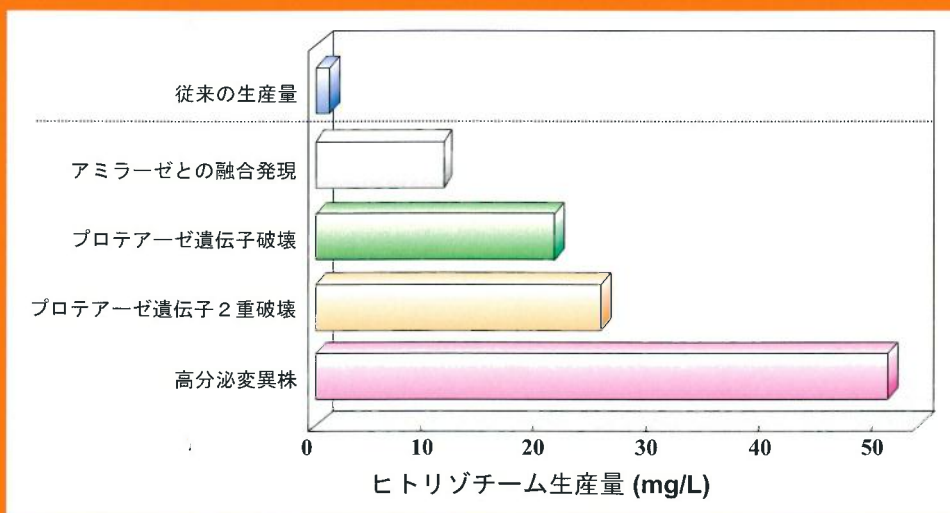
No.118

15 NOVEMBER, 2006

ブレインテクノニュース



麹菌 (*Aspergillus oryzae*)



麹菌によるヒトリ
ゾチーム生産量

タンパク質工場としての麹菌の利用に関する研究

東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻

北本 勝ひこ



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

- 麹菌ゲノム解析の完了と今後の展望 1
町田 雅之 ((独) 産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門)

総説関連情報

- タンパク質工場としての麹菌の利用に関する研究 6
北本 勝ひこ (東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻)
麹菌の固体培養環境下でのタンパク質生産機構の解析と新規生産システムの構築 12
岩下 和裕 ((独) 酒類総合研究所 醸造技術基盤研究部門, 広島大学 先端物質科学研究科)

国内情報

- イネケイ素吸収遺伝子の同定 17
馬 建鋒 (岡山大学 資源生物科学研究所)
アワヨトウはトウモロコシが出すかおりで昼夜の別を判断 22
高林 純示・塩尻 かおり・小澤 理香 (京都大学 生態学研究センター)
哺乳類の冬眠をコントロールするホルモン—新たな冬眠の視点— 26
近藤 宣昭 (株式会社 三菱化学生命科学研究科)
ICSI-mediated gene transfer法によるトランスジェニックブタの作出 30
長嶋 比呂志・池田 有希・斉藤 仁・松成 ひとみ・黒目 麻由子 (明治大学 農学部 生命科学科 発生工学研究室)
作業ナビゲータ 35
濱田 安之 ((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

- 名古屋コーチンのDNA識別法を開発 39
中村 明弘¹・木野 勝敏¹・峰澤 満²・野田 賢治¹・高橋 秀彰³ (¹愛知県農業総合試験場, ²(独) 農業生物資源研究所, ³(独) 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

- 凍結保存マウス生殖器あるいはマウス個体から回収した精子あるいは精子細胞を用いて正常な産子を得ることができる 43
N. Ogonuki et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 13098-13103, 2006) 抄訳: 下司 雅也
PDI過剰発現による *Pichia pastoris*でのタンパク質分泌性向上 44
M. Inan et al. (*Biotechnology and bioengineering* Vol.93, No.4, 771-778, 2005)
抄訳: 和田 純平
リパーゼを用いた選択的エステル化によるエイコサペンタエン酸 (EPA) の濃縮 45
Medina A. et al. (*Journal of American Oil Chemists' Society*, 83(3), 215-221, 2006)
抄訳: 山口 秀明

表紙の説明

(上段)「国菌」とも呼ばれる麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の顕微鏡写真 (筆者提供)。分生子 (胞子) を形成した部分から菌体を採取して観察した。

(下段) 本研究では、ヒトリゾチームをモデルタンパク質として、まず、ヒトリゾチームを生産する麹菌株を取得し、次に、これを用いて、筆者らが開発した方法によりプロテアーゼ遺伝子多重破壊株を作製し、更に、これを親株としてリゾチームを高分泌生産する変異株の取得にも成功した。詳細については、6 頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

麹菌ゲノム解析の完了と今後の展望

独立行政法人 産業技術総合研究所
セルエンジニアリング研究部門
町 田 雅 之

日本の伝統的発酵食品である清酒、醤油、味噌などの製造に用いられている麹菌 (*Aspergillus oryzae*) のゲノム解析が完了した。麹菌と他の糸状菌との比較解析により、麹菌は発酵に重要な加水分解酵素やアミノ酸の代謝系などの遺伝子が豊富に有することが明らかとなった。麹菌のゲノム塩基配列を基盤として、DNAマイクロアレイによる発現解析、プロテオーム解析、代謝物質の解析など、ゲノム科学的な様々な解析が開始されており、今後、麹菌の特長を生かした新たな産業利用につながると期待される。

1. はじめに

麹菌 (学名: *Aspergillus oryzae*) は、日本の伝統的発酵食品である清酒、醤油、味噌、甘酒、みりんなどの製造に用いられる糸状菌 (カビ) の一種であり、「国菌」とも称される日本の発酵産業の代表的な微生物の一種である。麹菌は、これまでに1000年以上も発酵食品の製造に利用されてきた長い歴史があり、米国FDA (食品医薬品局) によるGRAS (Generally Recognized As Safe) にも麹菌を用いた製造方法が記載されるなど、食しても安全な微生物であることが世界的に広く認知されている。麹菌は、多種類の加水分解酵素を大量に分泌生産することが知られており、近年のバイオテクノロジーによる酵素生産などにも利用されている。筆者らの研究室で麹菌のEST解析が開始されたのは1996年であるが、当時は麹菌の遺伝子の塩基配列としては、主にアミラーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼなどの加水分解酵素が中心であり、公共の塩基配列データベースのエントリー数も数十以下であった。このような状況の中で、麹菌の遺伝子の塩基配列を決定することは、学術研究と産業の両面から重要な課題であった。遺伝学が使えることで学術研究に広く用いられていた *Aspergillus nidulans* のゲノム解

MACHIDA Masayuki

〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6

析が開始されたのは1998年であるが、同年には、日本の国立研究所、大学、企業の連携によって、麹菌の大規模なEST解析が開始された。これにより、2001年までに約17,000のESTが解析され、麹菌の約4,000の遺伝子の部分塩基配列が決定された。その後、酒類総合研究所によって米麹のESTが追加され、現在までに約22,000のEST解析がなされている。

2. 麹菌のゲノムの特徴

麹菌のゲノム解析は、EST解析に参加した研究者が中心となり、製品評価技術基盤機構をシーケンスセンターとする共同研究によって開始された。麹菌のゲノムサイズは、大腸菌の約7.5倍の35Mbと予想されており、技術的にはホールゲノムショットガンで解析できることはほぼ確実であった。しかし、遺伝解析による遺伝子地図や制限酵素地図は一切無く、最終的に8本の染色体の配列を完全に決定することができかどうかは楽観できない状況であった。麹菌のゲノム解析は2001年に開始され、大規模なホールゲノムショットガンライブラリーのシーケンス、BAC (バクテリア人工染色体) およびコスミドライブラリーの両末端塩基配列解析により、約37Mbの塩基配列が決定されていた (図1)。また、食品総合研究所の楠本らにより麹菌のテロメアの塩基配列が決定されて

いたことから、PCRなどを駆使して16個のテロメアの塩基配列が決定され、塩基配列を8本の染色体に構成するための有力な手がかりとして利用された。相同性に基づいた塩基配列の連結によって得られたコンティグは、サザン・ハイブリダイゼーションによって染色体にマッピングされ、フィンガープリンティングやPCRによって隣接するコンティグの接続がなされた。塩基配列の決定と平行して、産業技術総合研究所の浅井らのグループによって、GeneDecoderやALNなどのソフトウェアを用いて遺伝子の予測が行われた。さらに、上記の研究所、東京大学、東京農工大学、東北大学、名古屋大学、コンソーシアム企業メンバーらによって、専門家によるアノテーションの修正が行われた。

2003年には、ほぼ同時期にゲノム解析が進んでいた欧米の *A. nidulans* および *Aspergillus fumigatus* のグループと連携し、アノテーションの修正と各 *Aspergillus* 種のゲノム構造の特徴の解析を開始した。麹菌は、発酵産業に用いられている安全な種であるが、上記の2種はそれぞれ、遺伝学が使える学術研究用、ヒト感染性という麹菌とは異なるそれぞれの特徴を有している。比較解析の結果、麹菌、*A. nidulans*、*A. fumigatus* のゲノムサイズは、それぞれ、37Mb、30Mb、28Mbであり、麹菌が他の2種

に比較して25%~30%ゲノムサイズが大きく、遺伝子数も他の2種が約9,000であるのに対して、麹菌は約12,000の遺伝子を有していることが明らかとなった。また、麹菌は他の2種に比較して、プロテアーゼなどの分泌性の加水分解酵素の遺伝子が約1.5倍も多く存在することが明らかとなった。このことは、麹菌が多種類の加水分解酵素を多量に分泌し、日本の伝統的発酵的産業に利用されていることをよく説明する。また、麹菌は、他の2種に比較して、代謝系の遺伝子を多く有すること(図2)、この増加は一連の代謝パスウェイを構成する遺伝子にまとめて生じていることが明らかとなった。麹菌は、発酵産業において、米や大豆などの表面で固体培養という形態で生育する。この状態では大量の栄養源が存在するが、発酵の開始時にはこれらの栄養素が分解されていないこと、液体培養に比較して水分活性が低いことから、麹菌は十分に栄養分を吸収できていないことが予想される。実際、EST解析およびその後のcDNAマイクロアレイを用いた液体培養と固体培養の比較によって、麹菌は固体培養時には飢餓状態に近い遺伝子発現プロファイルを示すことが分かっている。麹菌の代謝系の遺伝子が増強されていることは、栄養分が不足しているときにこれを合成するためや、発酵が進んで栄養

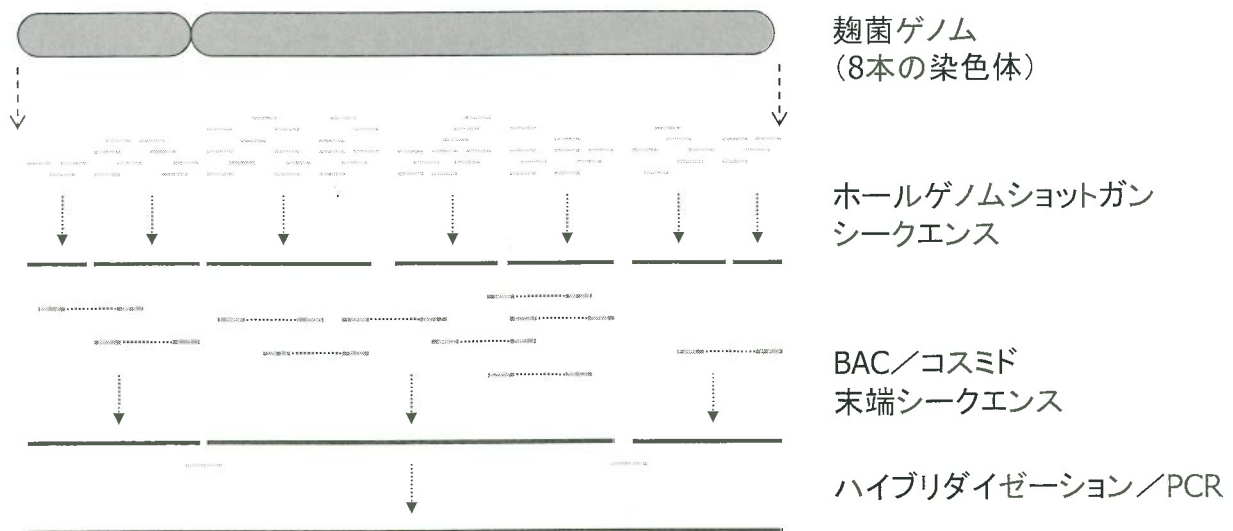
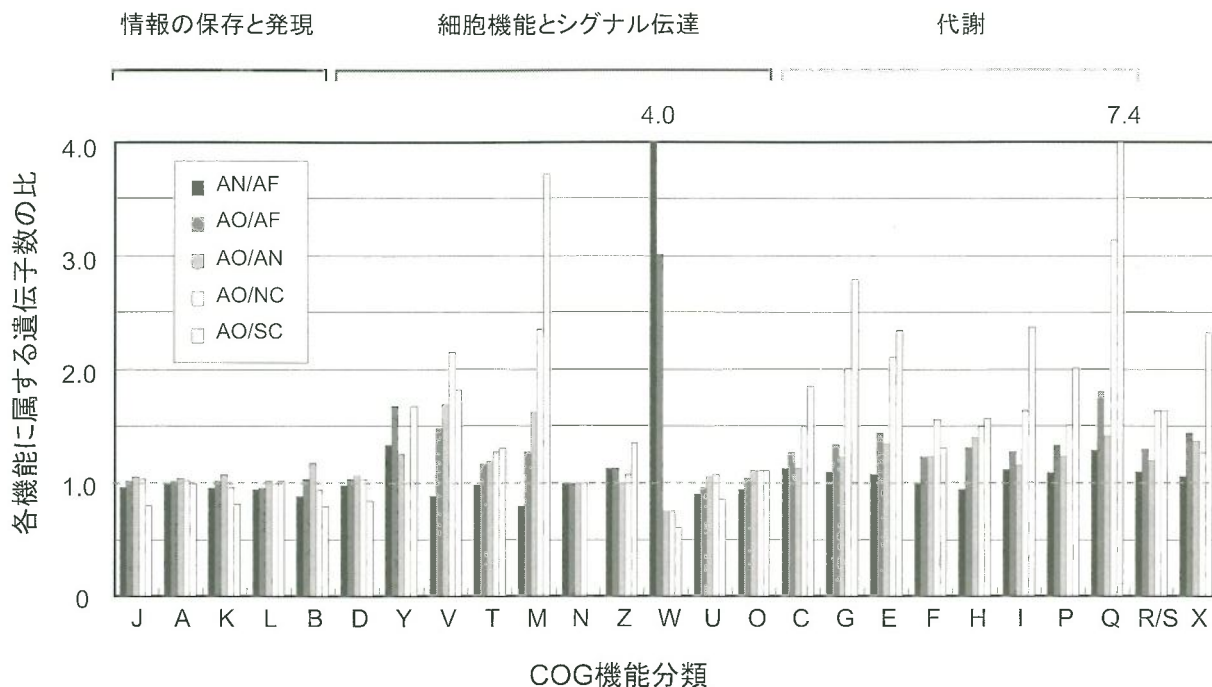


図1 麹菌ゲノム塩基配列の決定



Machida et al., *Nature*, 438, 1157-1161 (2005)

図2 麹菌遺伝子の機能と増加の関係

分が十分に供給された状態において様々な代謝物質を生産するために用いられることを想像させる。

*A. nidulans*と*A. fumigatus*とのゲノム構造の比較解析により、麹菌のゲノムは、他の2種との間でシンテニーが存在する領域（シンテニー領域）と存在しない領域（非シンテニー領域）がモザイク状に分散して構成されていることが明らかとなった。シンテニー領域とは、2種の比較するゲノム上でオーソログ（最も相関性が高い対応する遺伝子）の並びが保存されている領域である。麹菌の非シンテニー領域には麹菌特有の遺伝子が存在するが、機能的に見た場合、代謝系の遺伝子が多く、中でも二次代謝系の遺伝子が多く含まれていることが明らかになった。また、EST解析やDNAマイクロアレイの解析によって、非シンテニー領域に存在する遺伝子は、固体培養を含めた通常の培養条件において、シンテニー領域に存在する遺伝子よりも明らかに転写発現が低いことが明らかとなった。二次代謝系の遺伝子は、植物への感染性に関係するものもあることから、発酵に用いられ

家畜化される以前の麹菌の祖先は、植物表面などで生育していたことを想像させる。これらの遺伝子は、発酵産業に用いられるようになってからは不要となり発現しなくなったか、あるいは、発現しなくなった変異株が選択的に発酵産業に用いられるようになったのかもしれない。麹菌のゲノムから、アグロバクテリアと非常に相関性が高く、同じ順序と向きで並んだ2つの遺伝子が見つかった。これらの麹菌ゲノム上の遺伝子は、既知の配列との進化系統解析でいずれもバクテリア由来の遺伝子のクラスター内に位置し、アグロバクテリアと進化的に最も近いことが明らかとなった。このことは、麹菌が植物表面で生育していたときに、同様の環境で生育していたバクテリアとの間で遺伝子の水平伝播が起こったことを示しているのかもしれない。

3種の*Aspergillus*種のゲノム塩基配列の比較の過程で、麹菌のゲノムは他の2種と比較して、塩基配列の変化よりもリアレンジメントが有意に高い頻度で起こっていることが明らかとなった。また、部分的にAT含量が非常に高い

表1 麹菌ゲノムに存在する遺伝子数の増加の例

遺伝子の種類	麹菌 (<i>A. oryzae</i>)	<i>A. nidulans</i>	<i>A. fumigatus</i>
エクソ型ペプチダーゼ	69	44	48
エンド型ペプチダーゼ	66	46	51
ペクチン分解酵素	20	9	11
トランスポーター	610	474	548
シトクローム P450	149	102	65
ポリケチド合成系	30	28	14

領域や長いATの連続配列が他の2種に比較して明らかに多いことが明らかとなった。これらの原因や意味は明らかになっていないが、麹菌のゲノムサイズの増加や高いリアレンジメントの頻度に関係があるかもしれない。酵母での研究により、飢餓状態で生育を繰り返すと染色体レベルのリアレンジメントが起こりやすくなることが報告されている。また、リアレンジメントは、AT含量が高い領域やtRNAが存在する領域で起こりやすいことが報告されている。麹菌は、発酵産業での固体培養により、飢餓状態で大規模に培養されてきた歴史がある。また、家畜化される以前には、植物表面などで飢餓状態で生育していたと予想される。麹菌のゲノム塩基配列は、植物表面での生育や発酵産業での利用によって、遺伝子が水平伝播されたり、多数のリアレンジメントを受けてきたことを物語っているのかもしれない。

3. 今後の展望

麹菌のゲノム解析と平行して、DNAマイクロアレイによる解析やプロテオームなど、麹菌のゲノム塩基配列を利用した機能ゲノム科学的な解析が進められてきた。DNAマイクロアレイは、麹菌が有する全遺伝子の転写発現を一斉にモニタすることができる強力なツールである。ゲノム解析以前には、東北大学の阿部らに

よって、約2,000の遺伝子を搭載するcDNAマイクロアレイが開発された。このマイクロアレイは、代謝パスウェイの制御や生分解性プラスチックの能動的分解によるリサイクリングの研究開発に利用され、短期間でキーとなる遺伝子の同定の成功に導いた。また、近年では、筆者らの研究室と金沢工業大学との共同研究によって、ゲノム塩基配列とアノテーションに基づいたオリゴヌクレオチドマイクロアレイが開発され、培養条件の違いによる代謝パスウェイの制御の解析や、転写制御因子の過剰発現変異株の遺伝子発現プロファイルの解析などに用いられている。酒類総合研究所では、オリゴヌクレオチドを用いたタイリングアレイによって、麹菌株間のゲノムを構成する遺伝子の違いの解析がなされている。さらに、東京農工大学および金沢工業大学では、様々な生育条件の違いによるタンパク質の発現の解析（プロテオーム解析）が行われている。これらの解析結果は、ゲノム塩基配列とともにゲノム科学を用いた研究方法を支える情報基盤であり、麹菌に関するあらゆる研究を加速する可能性を持っている。

ゲノム科学を利用した最もゲノム科学らしい研究対象のひとつとして、代謝パスウェイ制御の解明とシミュレーションが挙げられる。これは、主に麹菌の遺伝子発現やタンパク質発現に基づいて、麹菌が有する全ての代謝パスウェイの活性を予測し、細胞内のエネルギー状態も含

めて物質の流れを予測しようとするものである。この分野は代謝工学の延長とも考えられ、システムズバイオロジーの分野に属するものである。現状では、不明な代謝パスウェイの存在、遺伝子が同定されていない代謝パスウェイ、遺伝子産物である酵素の基質特異性やキネティクスの情報の不足、酵素レベルでのアロステリックな制御、転写から翻訳への時間的なずれ、翻訳後修飾による活性の変化など、克服しなければならない課題が山積しているが、発酵産業に用いられる麹菌の研究対象として最も重要な研究分野である。上記の様々な困難を克服するひとつの方法として、メタボロームに代表される代謝物質の同定と定量が上げられる。DNAマイクロアレイなどによる遺伝子の発現レベルでの解析だけから代謝物質の流れを予測することは困難であるが、その結果である実際の代謝物質の量的変化で傍証を取りながら解析することにより、麹菌細胞内での代謝の様子をかなりの程度理解することができると考えている。筆者

らの研究室と金沢工業大学との連携で行っている解析では、培地中の窒素源量の違いによるアミノ酸代謝の変化の解析を行い、遺伝子発現による代謝パスウェイの制御と細胞内のアミノ酸量の変化について合理的な結果が得られつつある。

ゲノム塩基配列を基礎とするゲノム科学では、全遺伝子、全タンパク質、全代謝産物など、網羅的な解析から得られる情報を用い、様々な情報処理と生物学的な解析を組み合わせることによって、生命をシステムとして理解することを特徴としている。上記に述べたように既に様々な麹菌のゲノム情報が蓄積されつつあり、これらを用いて、高機能な麹菌の育種や抗真菌剤の開発など、伝統的発酵産業の枠を超えた産業分野への利用のための研究が進められている。今後、ゲノム情報から、発酵を始めとする様々な研究と産業に重要なキーとなる情報の発見が重要になると考えられる。

◀総説関連情報▶

タンパク質工場としての麹菌の利用に関する研究

東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻
北 本 勝 ひ こ

麹菌はアミラーゼなどの酵素生産に利用されているように、高いタンパク質分泌能力をもつ。また、最近、全ゲノム解析が完了したことから、分子レベルでの菌株育種が効率的に進められるようになった。筆者らが開発した4重栄養要求性宿主・ベクター系と破壊用プラスミドの迅速作成法を用いて、セルフファクトリーシステムの基本となるプロテアーゼ遺伝子多重破壊株の作製及び、これを親株としてリゾチームなどを高分泌生産する変異株の取得にも成功した。

1. はじめに

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、我が国で古くから日本酒、味噌、醤油などに使用されてきた産業上重要な微生物であり、「国菌」とも呼ばれている。真核微生物のなかでひとときわ高いタンパク質分泌生産能力をもつため、これまで様々な酵素生産に利用されている。また、発酵醸造食品の製造に利用されてきたことから、安全が保証されている微生物であり、近年、遺伝子組換えによる異種有用タンパク質生産の宿主としても世界的に注目が集まっている。

従来、組換えタンパク質を生産する際には大腸菌や酵母などを宿主として行う場合が多かったが、近年では動植物細胞や昆虫細胞、動植物個体などの高等真核生物もタンパク質の生産宿主として利用されるようになってきている。大腸菌を宿主とする場合には、大量培養が可能で簡便であり、安価かつ短期間で行えるという利点があるが、一方で真核生物特有の翻訳後修飾が起らないなどの問題点もある。他方、昆虫、培養細胞、植物を宿主として用いると、真核生物特有の翻訳後修飾は起こるものの、培養コストがかかる、生産までに時間がかかる、大規模生産に向かないなどの問題がある。このようなことから、タンパク質生産能力が高くかつ生育の

速い真核微生物である麹菌を宿主として、より簡便、迅速に組換えタンパク質を生産する系を構築することは、麹菌をタンパク質工場として利用しようとした場合きわめて重要である。

本稿では、麹菌を宿主として実際に生産実験を行い、異種タンパク質を培地に高生産する株の取得について紹介する。菌体外に生産された異種タンパク質は麹菌自身の生産するプロテアーゼによって分解される。そのため異種タンパク質の培地中への高生産・蓄積のためには、関与するプロテアーゼ活性をいかに低下させるかは、まず始めに解決すべき問題である。しかし、麹菌を用いた異種タンパク質生産においてプロテアーゼ遺伝子を破壊することは、遺伝子破壊が困難であったことなどからこれまでほとんどなされていなかった。そこで、筆者らが開発した4重栄養要求性宿主・ベクター系と破壊用プラスミドの迅速作成法^{1, 2)}を用いることでセルフファクトリーシステムの基本となるプロテアーゼ遺伝子多重破壊株の作製を行った。さらに、これを親株としてランダム変異を導入することにより、より高分泌能を持つ変異株の取得にも成功した。

2. ヒトリゾチームを生産する麹菌の取得

図1に示すように、キャリアタンパク質とし

KITAMOTO Katsuhiko

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

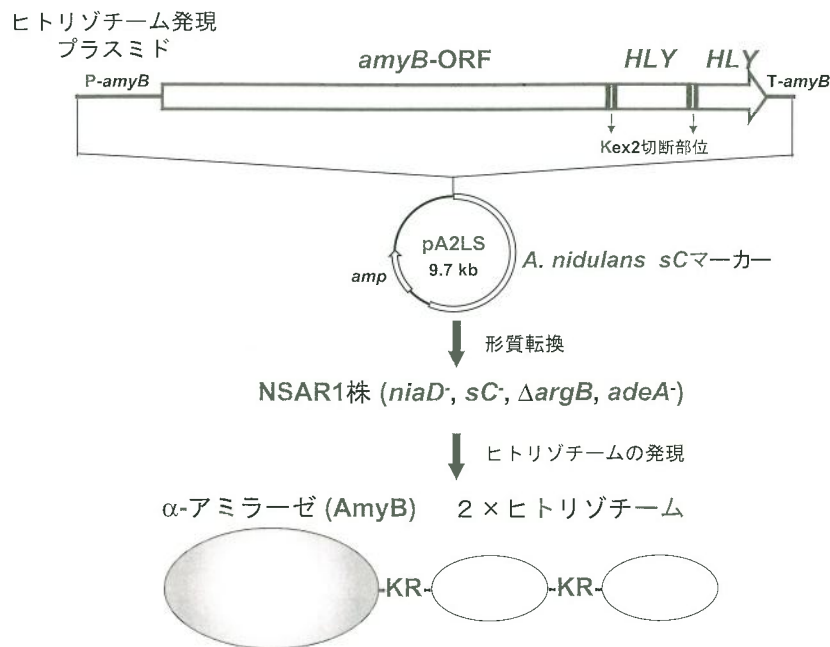


図1 麹菌におけるヒトリゾチームの発現

て α -アミラーゼ (AmyB) の下流にタンデムに2コピーのヒトリゾチーム (HLY) を連結し、つなぎ目にはゴルジ体に局在するKexBにより切断されるリジン、アルギニンの配列を挿入した発現プラスミドを作製した。つづいて、4重栄養要求性をもつNSAR1株^{1, 2)}に本プラスミドを形質転換した。このようにして取得したNAR-2L-7株は、活性から約12mg/Lのリゾチームの生産性を示した。また、期待されるサイズのヒトリゾチームが生産されていることをウエスタン解析で確認している。

3. プロテアーゼ遺伝子破壊によるヒトリゾチームの高生産

上記のようにして取得したヒトリゾチームを生産するNAR-2L-7株を宿主として用いて、下記の5種類のプロテアーゼ遺伝子の単独破壊株を作成した。これらの破壊株のリゾチーム生産性から各プロテアーゼの効果を検証した。

①菌体外酸性プロテアーゼ (PepA) : *Aspergillus niger*において異種タンパク質の培養上清での分解に関与することが報告されている。

②菌体内酸性プロテアーゼ (PepE) : *pepE*遺伝子は*A. oryzae* EST情報において最も発現頻度が高いプロテアーゼをコードする遺伝子であり、*A. niger*の破壊株では菌体内酸性プロテアーゼ活性の大部分が消失すると報告されている³⁾。酵母のPEP4遺伝子のホモログであり、Pep4は、液胞に局在し、プロテアーゼBやカルボキシペプチダーゼYなどの液胞プロテアーゼの活性化に必要とされる。

③菌体外アルカリプロテアーゼ (AlpA) : *alpA*遺伝子

は*A. oryzae*において既にクローニングされているが、これまでに異種タンパク質生産に関連する報告はない。

④トリペプチジルペプチダーゼ (TppA) : *tppA*遺伝子は筆者の研究室においてクローニングおよび機能解析された。緑色蛍光タンパク質をコードするEGFP遺伝子と融合して発現すると液胞に緑色蛍光が観察され、また遺伝子破壊株により菌体内のトリペプチジルペプチダーゼ活性が低下することを確認している。これまでに異種タンパク質生産に関連する報告はない。

⑤カルパイン様プロテアーゼ (PalB) : PalBはアルカリ性での環境応答に関与するシステインプロテアーゼで、*Aspergillus nidulans*においてアルカリ条件で転写因子PacCを活性化し、アルカリ性で必要とされる様々な遺伝子の発現に関与することが知られている。*A. oryzae*の*palB*遺伝子は筆者の研究室においてクローニングされた。これまでにこの変異株では異種タンパク質 (糸状菌 *Thermomyces lanuginosa*由来のリパーゼ) の生産が上昇することが報告されているが⁴⁾、その原因についてはよくわかっていない。

上記の5種のプロテアーゼをコードする遺伝子について、隣接する領域の配列を *A. oryzae* ゲノム配列情報 (http://www.bio.nite.go.jp/dogan/MicroTop?GENOME_ID=ao) より取得し、破壊用のDNA断片をfusion PCR法およびMultiSite Gateway™システムにより構築した^{5,6)}。これらの破壊用断片を、ヒトリゾチーム生産株NAR-2L-7株に形質転換した。選択マーカーとして *adeA* 遺伝子を用いた。形質転換体のゲノムDNAを回収したのち、PCRおよびサザン解析により各々の遺伝子が破壊されていることを確認した。また、プロテアーゼ遺伝子破壊株に対して、該当するプロテアーゼ活性の低下も確認された。

プロテアーゼ遺伝子の破壊によるヒトリゾチーム生産への影響を調べるために、各破壊株を5×DPY液体培地 (pH 8.0) で培養したのち培地上清のリゾチーム活性を測定した (図2)。その結果、いずれのプロテアーゼ遺伝子破壊株においても生産量の増加が認められた。このうち、*tppA* 遺伝子破壊株では生産量が約21mg/Lまで上昇した。

さらに、プロテアーゼ遺伝子を2重破壊することにより、ヒトリゾチーム生産量の増加を試みた。これまでに選択マーカーとして、ヒトリゾチーム生産には *sC* 遺伝子、プロテアーゼ遺伝子破壊には *adeA* 遺伝子を用いたので *argB* 遺伝子を用いた。上記と同様にして、*tppA* 遺伝子破壊用DNA断片を作成し、*palB* および *pepE* 各遺伝子破壊株に形質転換し、目的の遺伝子破壊株を取得した。これらの株を用いてヒトリゾチーム生産を行ったところ、*tppA*、*pepE* 遺伝子2重破壊株が最も高い生産量 (約25mg/L) を示した (図3)。

4. ヒトリゾチーム活性を指標とした分泌タンパク質高生産株の取得

上記のプロテアーゼ遺伝子破壊の結果をもとに、他の異種タンパク質も発現・生産することができる汎用の高生産宿主の育種を試みた。こ

こではヒトリゾチーム活性によりハコが形成されることを利用して、汎用性のある分泌タンパク質高生産株の育種を行った。前述の実験では、ヒトリゾチームを生産する株を用いているので、他の異種タンパク質を生産する株としては望ましくない。そこで、プロテアーゼ遺伝子破壊株に、ヒトリゾチーム発現プラスミドを脱落可能なかたちで導入した株を親株として、汎用

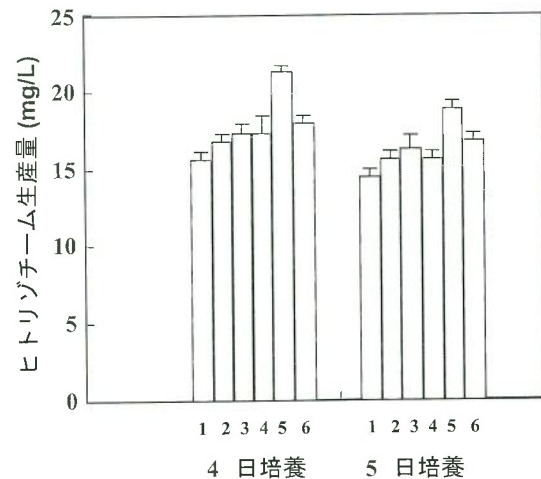


図2 ヒトリゾチーム生産量に及ぼすプロテアーゼ遺伝子破壊の効果

1; コントロール株, 2; $\Delta pepA$, 3; $\Delta pepE$, 4; $\Delta alpA$, 5; $\Delta tppA$, 6; $\Delta palB$

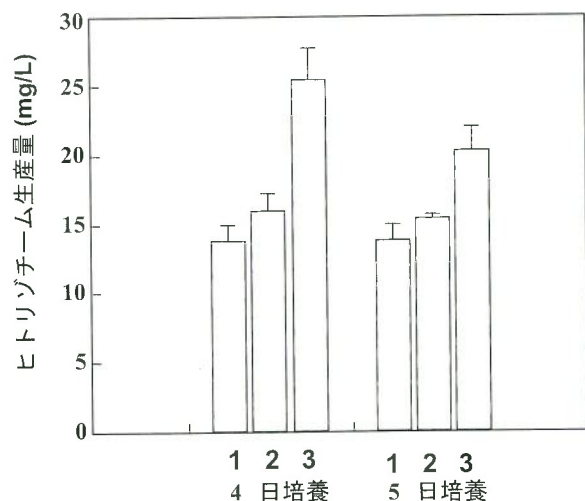


図3 ヒトリゾチーム生産量に及ぼすプロテアーゼ遺伝子2重破壊の効果

1; コントロール株, 2; $\Delta palB$, $\Delta tppA$ 株, 3; $\Delta pepE$, $\Delta tppA$ 株

分泌タンパク質高生産株の育種を試みた。

最初に、ヒトリゾチームの生産で最も効果のあった2つのプロテアーゼ遺伝子を、4重栄養要求性株において同時に破壊した。4重栄養要求性NSAR1株 (*niaD*⁻ *sC*⁻ Δ *argB* *adeA*⁻) を親株として、*pepE*、*tppA*両遺伝子をそれぞれ *adeA* および *argB* マーカーで破壊した。取得した *pepE*、*tppA* 遺伝子2重破壊株を宿主として、ヒトリゾチーム発現プラスミドを *niaD* 遺伝子座に単コピーで導入した。さらに、ポジティブセクション培地である改変塩素酸培地⁷⁾ にこの株を植菌することにより、*niaD*⁻ となるとともに発現プラスミドを脱落させることができることを確認した。

次に、リゾチーム活性を指標としたハロアッセイにより、高生産変異株をスクリーニングした。ヒトリゾチーム生産株の分生子を紫外線照射し、リゾチームの基質である *Micrococcus* 菌体入り寒天培地に100~200コロニー/枚となるようにまいた。生育した約8万の株についてハロとコロニーの直径の比を計算し、2倍以上になった株を選抜した。取得した50株を液体培地で培養した結果、ほとんどの株で親株より生産量が増加した。これらの変異株をHHL (Hyper producing strain of human lysozyme) 株と命名した。親株の生産量は約27mg/Lだったのに対し、HHL22株は約51mg/Lと1.9倍の生産量を示した。

さらに、生産量が上位の変異株をポジティブセクション培地である改変塩素酸培地に植菌し、ヒトリゾチーム発現プラスミドを脱落させ *niaD*⁻ になった株 (AUT株) を取得した。高生産の原因が発現プラスミドの変異でないことを確認するために、これらの株にヒトリゾチーム発現プラスミドを再導入した形質転換株を取得した。これら再導入株での生産実験を行った結果、親株よりも生産量が多いことが確認されたことから、変異は変異株の染色体上に起こっていることが確認された。これらの分泌タンパク質高生産株 (AUT1~AUT8株) については特許出願中である。また、汎用宿主としての確認

のため、他の異種タンパク質としてウシキモシンを発現するプラスミドを形質転換して生産量を検討している。

5. プロテアーゼ遺伝子2重破壊株 (NS-tApE株) によるウシキモシンの高生産

キモシンは仔ウシの第4胃において産生される凝乳酵素であり、牛乳中の κ カゼイン中のPhe105-Met106の結合を特異的に切断する。古くからチーズ製造に使用されてきた重要な酵素であるが、近年、チーズ生産量の増加から遺伝子組換えにより大腸菌や酵母などにより製造されたキモシンも多く使用されている。麴菌によるキモシン生産実験のために、キャリアタンパク質としてグルコアミラーゼ (GlaA) 及び α -アミラーゼ (AmyB) を用いた発現プラスミドを作製し、プロテアーゼ遺伝子2重破壊株 (NS-tApE株) に形質転換した。取得した株を5×DPY液体培地 (pH 5.5) で30℃、4日間培養したのち、培地上清について凝乳活性測定 (図4)、およびウエスタン解析を行った。生産量は約60mg/Lであった。これは、これまでの液体培養での報告値 (0.3mg/L)⁸⁾ に比べて約200倍もの高い生産性を示したことから、菌体内酸性プロテアーゼ (PepE) とトリペプチジルペプチダーゼ (TppA) が生産されたキモシンの分解に大きくかかわっていることが示された。

6. 今後の展望 (麴菌による異種タンパク質生産のための残された問題)

今回、麴菌を用いた異種タンパク質生産の例として、ヒトリゾチームをモデルタンパク質として研究を行った。これまで、麴菌での有用タンパク質生産に関してはかなりの報告がなされているが、今回のように多種類のプロテアーゼ遺伝子破壊株の作製、それを親株として高分泌生産株取得などの一連の系統的な研究は初めて

の例である。今回の結果をまとめたものが図5である。単に強力なプロモーターの下流にヒトリゾチーム遺伝子を連結して形質転換した株⁹⁾に比べて、キャリアタンパク質として α -アミラーゼとの融合タンパク質としての発現により約10倍に、さらに $pepE$, $tppA$ 遺伝子の2重破壊により約21倍に、高分泌生産変異種AUT1株により約42倍と生産量が向上することが明らかとなった。プロテアーゼ2重破壊株はヒトリゾチームのみではなく、キモシンも生産量が増加

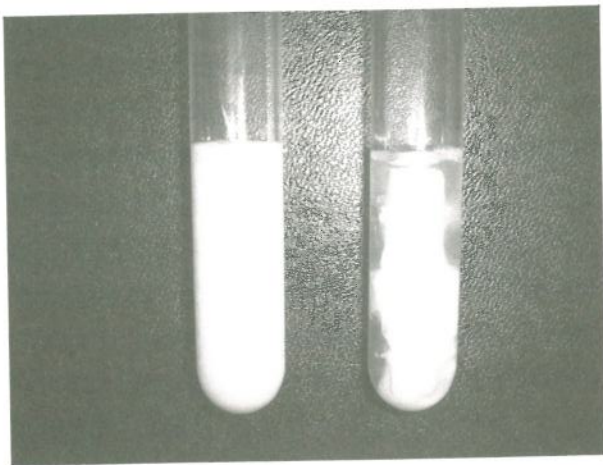


図4 麹菌により生産されたキモシンによる凝乳
スキムミルク溶液 5 ml にキモシン生産麹菌培養上清 500 μ l を添加したもの (右) とコントロールの無添加 (左)。添加後、6 時間後に撮影

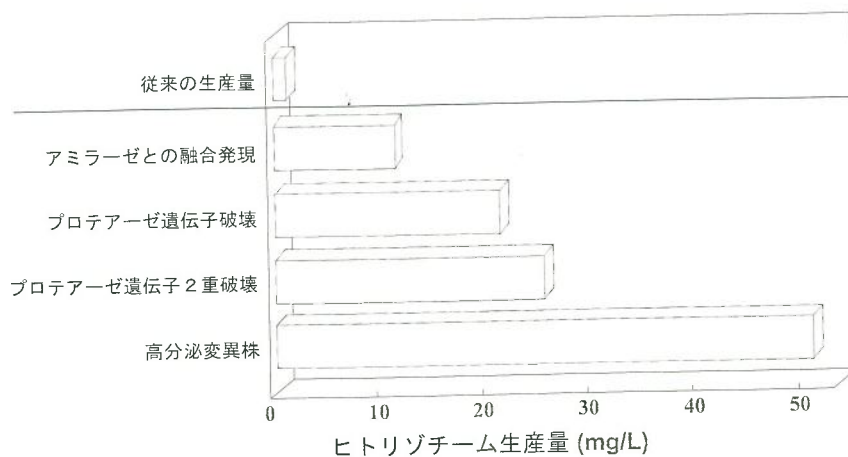


図5 麹菌によるヒトリゾチーム生産量

することを確認しているの、これを親株として取得した高分泌生産変異株AUT1株は、様々な異種タンパク質生産のための優れた宿主として期待される。

しかしながら、今回、育種したプロテアーゼ2重破壊株においても、培養日数が長くなると生産されたタンパク質が分解されることが観察される。従って、これらに参与するプロテアーゼを特定し、活性を低下させることも必要である。麹菌ゲノム解析から麹菌は約130ものプロテアーゼ遺伝子をもつことが推定され、今回のような遺伝子破壊による方法には限界があると思われる。最近、東北大学の五味らは、プロテアーゼ遺伝子群の発現制御に参与する転写因子 ($prtR$) について報告している。今後は、このようなアプローチも有効かもしれない。また、マイクロアレイによるプロテアーゼの発現解析から、培養条件により様々な応答をしていることも示唆されている。麹菌が培地中の栄養源を常に感知して、必要な状況になるとプロテアーゼを生産することがゲノムワイドに調べられるようになってきているので、プロテアーゼの発現を抑えられる培養条件の探索なども有効かと思われる。今回、筆者らが使用した栄養リッチな5倍に濃縮されたDPY培地や、すでに、経験的に行われている、ショ糖などの栄養分を経時的に補給する方法などは、これに該当すると思われる。

また、キャリアプロテインとの融合タンパク質として発現させる方法は、麹菌での有効な生産方法として常法となりつつあり、我々は、最近この方法により植物由来の味覚修飾タンパク質であるネオクリンの生産に成功した¹⁰⁾。しかし、経験的にこれによっても生産できないタンパク質も存在する。これらは、転写産物の不安定性のために

mRNAが分解されている, また, 翻訳産物が分泌ストレスにより小胞体での品質管理を受け, プロテアソームでの分解を受けることなどによると考えられる。今後は, 今回, 取得した株を用いて育種を続けるとともに, 分泌生産経路におけるボトルネックの解明を目指すことにより, 麹菌による有用タンパク質生産システムがさらに洗練されたものになるものと期待される。

文 献

- 1) 麹菌の4重栄養要求性宿主・ベクター系の開発, 北本勝ひこら, 生物工学会誌, 83, 277-279 (2005)
- 2) Development of a novel quadruple auxotrophic host transformation system by *argB* gene disruption using *adeA* gene and exploiting adenine auxotrophy in *Aspergillus oryzae*.
F.J. Jin et al. *FEMS Microbiol. Lett.*, 239, 79-85 (2004)
- 3) Disruption of three acid proteases in *Aspergillus niger*--effects on protease spectrum, intracellular proteolysis, and degradation of target proteins.
J.P. van den Hombergh et al. *Eur. J. Biochem.*, 247, 605-613 (1997)
- 4) Using DNA-tagged mutagenesis to improve heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*.
D.S. Yaver, M et al. *Fungal Genet. Biol.*, 29, 28-37 (2000)
- 5) ポストゲノム時代を迎えた麹菌, 北本勝ひこ, 生物工学会誌, 84, 361-363 (2006)
- 6) Development of a versatile expression plasmid construction system for *Aspergillus oryzae* and its application to visualization of mitochondria.
Y. Mabashi et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 1882-1889 (2006)
- 7) Development of a modified positive selection medium that allows to isolate *Aspergillus oryzae* strains cured of the integrated *niaD*-based plasmid.
K. Ishi et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 2463-2465 (2005)
- 8) High level secretion of calf chymosin using a glucoamylase-prochymosin fusion gene in *Aspergillus oryzae*.
K. Tsuchiya et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 895-899 (1994)
- 9) High level expression of the synthetic human lysozyme gene in *Aspergillus oryzae*.
K. Tsuchiya et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 109-114 (1992)
- 10) Extracellular production of neoculin, a sweet-tasting heterodimeric protein with taste-modifying activity, by *Aspergillus oryzae*.
K. Nakajima et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 3716-3723 (2006)

◀総説関連情報▶

麹菌の固体培養環境下でのタンパク質生産機構の 解析と新規生産システムの構築

独立行政法人 酒類総合研究所 醸造技術基盤研究部門,
広島大学 先端物質科学研究科

岩 下 和 裕

麹菌は世界最大級のタンパク質生産能を有するが、その能力は固体培養を行ったときに最大限に発揮する。本研究では、麹菌の固体培養時のタンパク質生産機構について解析するために、プロテオーム解析により生産される全タンパク質とその挙動の全体像を明らかにした。さらに、発現レベル、転写後レベルの挙動を解析することにより、タンパク質生産には転写後レベルでの制御が重要であることを明らかにした。固体培養特異的に生産されるタンパク質をマーカータンパク質として、液体培養での局在性を解析することにより、タンパク質生産のボトルネックを明らかとし、その一つである細胞壁ボトルネックを解消した。

1. はじめに

麹菌は「国菌」と称され、清酒や醤油などの伝統的な醸造産業や酵素産業を通して我々の文化や生活に密接に関わりのある重要な微生物である。麹菌は、著量のタンパク質生産能を有しており、各種産業において最も重要な特性の一つである。さらに、麹菌は我々の長い食経験から安全性が高い微生物であり、異種タンパク質生産のホストとしても注目されている¹⁾。我が国の醸造産業の成り立ちから、麹菌の培養には、「米麹」や「麦麹」など穀物を原料とした固体培養法が利用され、酵素産業においても小麦ふすま等を用いた固体培養法が利用されている。このことから、固体培養環境下での麹菌のタンパク質生産について検討することは重要であり、培養工学上の検討が多くなされてきている。また、一般の微生物の培養では液体培養が良く使用されるが、麹菌のタンパク質生産能は液体培養よりも固体培養を行ったときに最大限に発揮される例が多い^{1), 2)}。しかしながら、固体培養法では、米や麦等の天然物が培地として使用され、培地そのものが物理的、化学的に不均一であるとともに、温度等の培養環境制御も難しいなど、生化学的、分子生物学的解析が難しく、

IWASHITA Kazuhiro

〒739-0046 広島県東広島市鏡山3-7-1

産業上も制御に高度なノウハウを要する。

その一方で、1998年から麹菌EST解析コンソーシアムが組織され大規模なEST解析が始まり³⁾、さらに2001年には、麹菌ゲノム解析コンソーシアムが組織されるとともに全ゲノム解析が始まった。麹菌のゲノム情報は飛躍的に増加することとなり^{3), 4), 5)}、DNAマイクロアレイ解析やプロテオーム解析などの網羅的な解析を行うことが可能となってきた。このような背景から、我々のグループでは固体培養、液体培養環境下でのタンパク質生産機構についてEST情報、ゲノム情報を用いて解析し、固体培養環境下でのタンパク質高生産機構について解析を行った。さらに、得られた情報をもとに、これまでタンパク質生産が難しかった液体培養法でのタンパク質生産法の改良を試みた。

2. 液体培養、固体培養環境下での麹菌 タンパク質生産

これまで述べてきたように、麹菌が固体培養において多くのタンパク質を生産することは、経験的によく知られていることである。しかし、これまでの研究は酵素活性測定を中心としたもので個々の酵素での検討は多くなされていたが、意外にも液体培養、固体培養環境下での全タンパク質生産量およびそのプロファイルを比

較した例は無かった。そこで、まずは固体培養、液体培養間の麹菌のタンパク質生産全体を比較し、さらに挙動が異なるタンパク質をマーカーとして転写レベルの制御、転写後レベルでの制御について検討することとした。

はじめに、小麦ふすまを用い、固体培養及び液体培養法により32, 40時間でのタンパク質生産の全生産量について比較を行った。その結果、固体培養では培養32時間、40時間でそれぞれ53.7, 77.3mg/dry myceliumであったのに対し、液体培養では13.2, 11.9mg/dry myceliumであった。培養40時間の固体培養条件では、液体培養の約6倍のタンパク質が生産されていることが明らかになった。このように、タンパク質生産量そのものについても固体培養では多くのタンパク質が生産されることが確認された²⁾。続いて、2次元電気泳動により培養40時間でのタンパク質生産プロファイルについて、固体培養、液体培養間で比較を行ったところ、タンパク質のスポットパターンはまったく異なるものであった(図1)。CBB染色により可視化されたスポットについて、In gel deglycosylation法及び

Peptide mass finger printing (PMF) 解析を用いたタンパク質同定を行ったところ、液体培養で110スポット中37スポット(21タンパク質)、固体培養で85スポット中43スポット(24タンパク質)の同定を行うことが出来た。同定出来たスポットについて、PDQuestにより定量化を行ったところ、それぞれ全タンパク質量の60%以上を占めていた。以上のことから、固体培養、液体培養とも、本条件で生産される主要なタンパク質を同定出来たものと考えられる。

麹菌が固体培養時に菌体外に生産するタンパク質のいくつかは、液体培養時には細胞壁にトラップされていることが明らかになっている^{6, 7)}。そこで、液体培養時に細胞壁中にトラップされているメジャーなスポットについて分析を行ったところ、 α -アミラーゼと β -グルコシダーゼが同定された。供したタンパク質量及び各スポットの定量結果から、液体培養で生産される多くの α -アミラーゼと β -グルコシダーゼは細胞壁にトラップされているものと考えられた。

なお、同定出来たサンプル数が少ないのは、

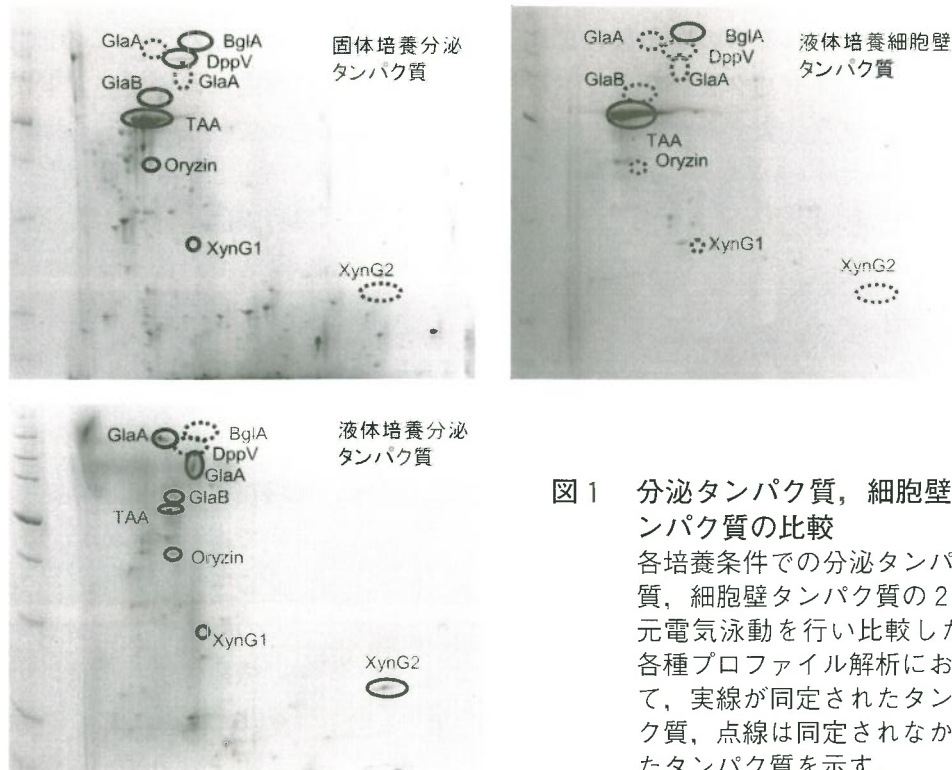


図1 分泌タンパク質，細胞壁タンパク質の比較
各培養条件での分泌タンパク質，細胞壁タンパク質の2次元電気泳動を行い比較した。各種プロファイル解析において、実線が同定されたタンパク質，点線は同定されなかったタンパク質を示す。

麹菌が生産するタンパク質はプロテアーゼ耐性が高いことと、酸性タンパク質が多く解析に用いたトリプシンの切断点が少ないこと、プロファイル解析を行った時点では、ゲノム解析が進行中で配列情報、遺伝子予測の精度が十分に得られていなかったこと、同定をPMF解析のみで実施したことなどがあげられる。現在も遺伝子予測の精度、機能予測の精度とも十分ではないため、ゲノム情報の質の向上が求められる。

固体培養、液体培養それぞれで検出されたタンパク質は、グループ1として、固体培養特異的に検出されたタンパク質群（グルコアミラーゼB (GlaB), アラニルペプチジルペプチダーゼ (DppV) など)。グループ2として、液体培養特異的に検出されたタンパク質群（グルコアミラーゼA (GlaA), キシラナーゼG2 (XynG2) など）、グループ3として両培養条件下で検出されたタンパク質群（キシラナーゼF3 (XynF3), オリヰンなど）、グループ4として固体培養では菌体外タンパク質として、液体培養では細胞壁タンパク質として検出されたタンパク質群（ α -アミラーゼ (TAA), β -グルコシダーゼ (BglA) など）に分類された（図2）。また、グループ1に含まれるタンパク質には、細胞質由来のタンパク質と思われるものが多数含まれていた。各グループのタンパク質群から、生産量が多く、各グループを代表するタンパク質を

マーカータンパク質とし、遺伝子発現解析を行ったところ、グループ1に含まれる遺伝子は、固体培養で特異的な発現を示すが、グループ2, 3, 4に含まれる遺伝子群は、液体培養、固体培養ともほぼ同等の発現を示した。以上の結果から、液体培養特異的に検出されたタンパク質の遺伝子は固体培養でも発現していることや、グループ4のタンパク質は培養条件によりその局在性が変わることから、転写レベルの制御だけでなく、翻訳後のレベルの制御も重要であることが明らかとなった。

3. マーカータンパク質の局在解析

本研究及びこれまでの研究から、 α -アミラーゼ遺伝子 (*amyB*) は固体、液体両培養環境下で同程度に強く発現することが明らかである。そこで、各グループを代表する7種類のマーカー遺伝子について、*amyB*プロモーター制御下でEGFPとの融合遺伝子を発現させ、液体培養環境下での融合タンパク質の局在性を解析した。得られた融合遺伝子発現株を小麦ふすま抽出液中で培養を行い、菌体内と培養上清について分画を行うことでEGFP融合タンパク質の局在を解析した。7種類全てのEGFP融合タンパク質は、菌体内においてバンドが確認されたことから、すべて転写、翻訳の段階まで行われていることが、確認された。固体培養特異的に培地中に生産されるグループ1マーカータンパク質 (GlaB, DppV) についても液体培養では菌体内にだけバンドが検出され、培地中には検出されなかった。以上のことから、液体培養では、遺伝子の発現量だけでなく、翻訳以降の制御が重要であることが示された。

そこで、特にグループ1, グループ4の融合タンパク質を中心に、蛍光顕微鏡により菌体内のどの器官に局在化しているのかを探った。その結果、プロテオーム解析において固

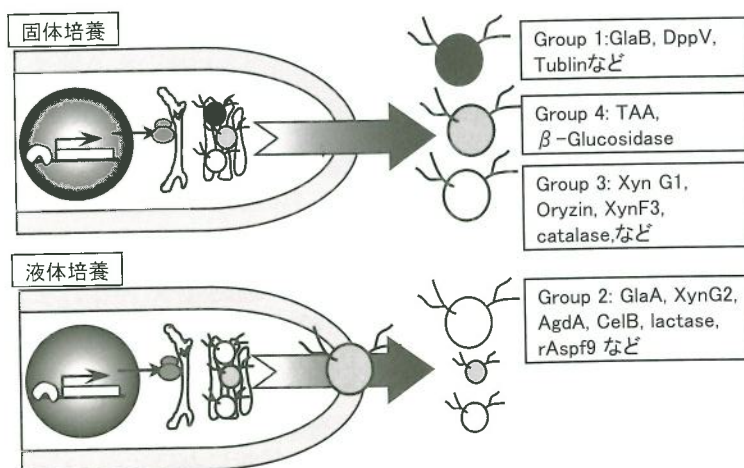


図2 麹菌が生産するタンパク質の生産パターンによるグルーピング

体培養でのみ同定されたグループ1では矢印で示した隔壁や細胞内小器官に蛍光が観察された。DppVでは細胞内小器官および隔壁、液胞に蛍光が蓄積しているのが観察され、GlaBではERと考えられる網状の構造物での蓄積および隔壁、細胞内小器官に蓄積している様子が確認された(図3)。液体培養特異的なグループ2においては、分泌がスムーズに行われているためか菌体内の蛍光は暗く、細胞質全体に散在して観察された。グループ3では小胞内に蓄積している様子が観察された。

液体培養条件下で細胞壁にトラップされていたグループ4では、はっきりと細胞壁に沿った形で局在しており、また隔壁、液胞にも蓄積している様子が確認された。液胞と考えられる巨大な空胞の構造物を確認するために液胞特異的染色試薬CMAC-Argを用いたところ、Bgl::EGFP株において局在が一致し、液胞であることが明らかとなった(図3)。以上のマーカータンパク質による局在解析の結果を図4にまとめた。

4. 細胞壁変異株の作成とタンパク質生産

以上のとおり、液体培養においては、転写後制御がタンパク質生産において重要なボトルネックであることが示された。特に、グループ4のマーカータンパク質の解析から、固体培養、液体培養間では、タンパク質の細胞壁の透過性に違いが見られることが明らかとなった。また、ここでは詳細は記さないが、固体培養および液体培養でのトランスクリプトーム解析においても細胞壁合成に関与すると考えられる遺伝子に発現の違いが見られた。さらに、市販の細胞壁溶解酵素を用いて液体培養で細胞壁にトラップされたBgl::EGFPタンパク質の遊離実験を行ったところ、キチナーゼとグルカナーゼを組み合わせることで菌体が保持している全体の38%の活性を菌体外に可溶化できることが明らかとなった。以上の結果から、細胞壁が重要なボトルネックの一つであることが明らかであることから、細胞壁ボトルネックの解消を行った。

BglA活性、EGFP融合タンパク質の局在性を指標に細胞壁変異株の取得を試みた。プレー

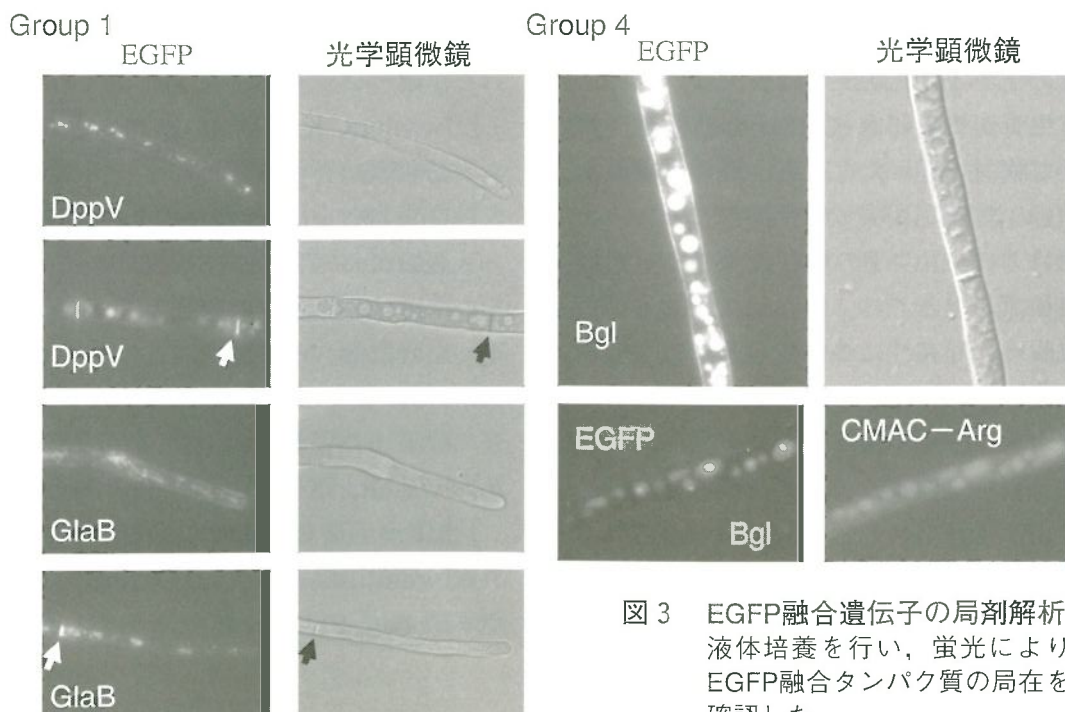


図3 EGFP融合遺伝子の局在解析
液体培養を行い、蛍光によりEGFP融合タンパク質の局在を確認した。

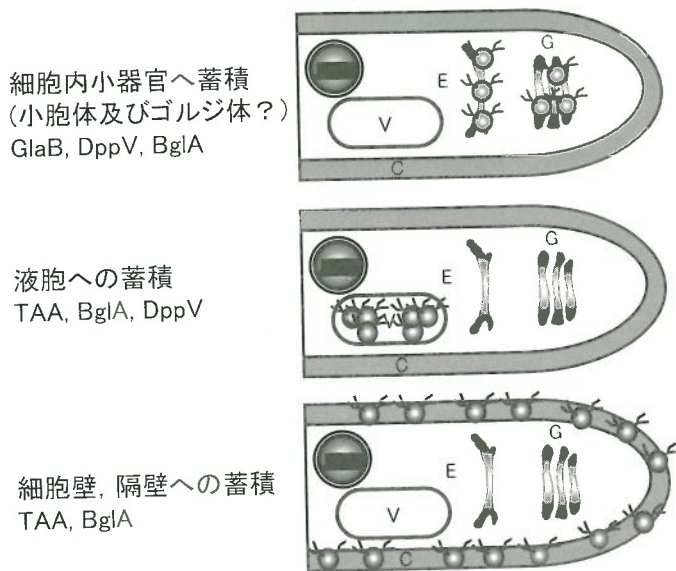


図4 液体培養でのタンパク質生産のボトルネック
C: 細胞壁, E: 小胞体, G: ゴルジ体, V: 液胞

ト法により約26256株から1次スクリーニングを行い、96株のハロー形成株を選抜した。96株をさらにEGFP融合タンパク質の蛍光強度を指標に2次スクリーニングに供し、培養上清中の蛍光強度が親株の2倍以上を示す株が8株得られた。この8株について実際に液体培養を行い、 β -glucosidase活性を測定したところ、Mu39株において培養上清中の活性が親株の23倍を示した。また、EGFP蛍光については、約5倍の蛍光強度の上昇を示した。Mu39株は、親株と比較して生育がやや弱かったことから浸透圧耐性について検討を行ったところ、浸透圧調整剤(Sorbitol)の添加により生育が回復した。また、菌体におけるBgl::EGFPの局在について蛍光観察により検討したところ、細胞壁には全く存在せず、液胞への局在性についても若干減少していることが観察された。以上のことから、実際に細胞壁ボトルネックが解消され、液体培養でのタンパク質生産性が改善された菌株を分離出来ることが示された。詳細は記さないが、すでに我々は本Mu39株を利用して、これまで生産されなかった異種タンパク質を100mg/Lのオーダーで生産している。

これまでの結果を総合すると、液体培養では発現量を単純に上昇させただけでは、タンパク質分泌生産量の大幅な改善は見出されず、翻訳後の分泌制御が液体培養でのタンパク質生産を考える上での重要なボトルネックになっていることが明らかとなった。さらに、マーカータンパク質の種類によって、細胞質全体に均一に分布するものや液胞、細胞壁、ERやゴルジ体と考えられる小器官、隔壁など、生産されるタンパク質それぞれで様々な局在が見出された。つまり、生産する個々のタンパク質についてボトルネックが異なる可能性があることが示された。しかしながら、今回行ったMu39株の例から、EGFP等をタグマーカーとした同様の戦略により、各タンパク質に固有のボトルネックを解消した高分泌株の分離をすることが可能であることが示唆された。今後は、同様の戦略により様々なボトルネックを変異株作成し、異種タンパク質も含めて、生産しようとするタンパク質のボトルネックに合わせて、最適化菌株を選択することが可能になるものと考えられる。

文献

- 1) Iwashita, K. (2002) *J. Biosci Bioeng.*, 94, 530-535
- 2) Oda, K. et al. (2006) *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3448-3457
- 3) 秋田, 醸協, (2001) 96, 14
- 4) Machida, M. et al. (2005) *Nature*, 438, 1157
- 5) 秋田, 醸協, (2006) 101, 536-548
- 6) Iwashita, K. et al. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 5546
- 7) Iwashita, K. et al. (2001) *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 134

◀国内情報▶

イネケイ素吸収遺伝子の同定

岡山大学 資源生物科学研究所

馬 建 鋒

ケイ素は植物の有用元素で、特にイネの安定多収に不可欠であることから、日本では農業上の必須元素とされている。イネは地上部に乾物重あたり10%以上のケイ素を集積でき、またその高集積能力が根のケイ素吸収能力に起因することは古くから知られている。しかし、その吸収を司る遺伝子は長い間明らかにされていなかった。我々は低ケイ素吸収イネ突然変異体を用いて、ケイ素の吸収に関与する遺伝子を同定することができた。この遺伝子はアクアポリン様タンパク質をコードしており、根の外皮と内皮細胞膜の遠心側に構成的に発現している。

1. はじめに

ケイ素 (Si) は地殻中に2番目に多い元素で、 SiO_2 として土壌質量の50~70%を占める。したがって、土壌に根を下ろしているすべての植物には必ずケイ素が含まれる。ケイ素は植物生理学的な観点からはまだ植物の必須元素として認められていないが、多くの植物の生育に対して有益作用が認められているため、有用元素と位置づけられている。特にイネの安定多収に不可欠なため、日本ではケイ素に農業上の必須元素としての地位を与えている。また1955年には世界ではじめてケイ素を肥料成分として認め、その後稲作の一環としてケイ酸質肥料が施用されてきた。

植物の生育に対するケイ素の有益作用は様々あるが、近年特に注目されているのは生物的ストレス及び非生物的ストレスを含む複合ストレスを軽減できることである。ケイ素の効果はストレスのある条件下で現れやすい特徴を持っている。根によって吸収されたケイ素 (ケイ酸) は地上部に運ばれ、茎や葉、籾殻など組織の表面に沈積し、それが物理的な障壁となり、病原菌 (例えばいもち菌) や害虫の侵入を阻止し、また過蒸散を抑制する。特に籾殻の場合、気孔がなく蒸散はクチクラ層を介して行われるた

MA Jian Feng

〒710-0046 岡山県倉敷市中央2-20-1

め、そこに多量のケイ素の沈積がないと過蒸散が起こり、また病原菌にも犯されやすくなり、その結果不稔になる。そのほかにも、ケイ素は倒伏や低温、高温、乾燥、塩ストレスなどの軽減、養分のアンバランスの是正、金属毒性の軽減などの有益効果がある¹⁾。

2. イネ低ケイ素突然変異体の単離

ケイ素の有益効果は組織に沈積しているシリカ (ケイ酸の重合体) を介して現れるので、地上部のケイ素の沈積量が多ければ多いほど効果が大きいという特徴がある。しかし、植物の種類によってケイ素の集積能力は大きく異なり、0.1~10% Siの幅がある。このような大きな違いは植物の根の吸収能力の違いに起因する²⁾。イネは典型的なケイ素集積植物で、地上部に必須元素の窒素やリン、カリウムよりも数倍のケイ素を集積する。イネの根のケイ素吸収能力は他のイネ科作物であるオオムギ、小麦、トウモロコシ、ソルガム、ライ麦、ライ小麦よりもはるかに高い³⁾。イネは電荷を持たないケイ酸の形態でケイ素を吸収し、生理学的な研究からケイ酸の吸収は一種のトランスポーターを介して行われているとされている³⁾。しかし、このトランスポーター遺伝子は長い間同定されてこなかった。この原因の一つはケイ酸吸収におけるイネの品種間差が小さいため、品種間差を利用

したケイ酸吸収遺伝子の単離が困難なことであり、またケイ酸吸収遺伝子は珪藻以外に動物、酵母、微生物から同定されておらず、珪藻から単離されたケイ酸吸収遺伝子はイネゲノム上に存在しないため、相同遺伝子を利用した遺伝子の単離法も使えなかった。そこで我々はイネの高いケイ酸吸収能に関与する遺伝子を単離するために、イネのケイ酸吸収欠損突然変異体をまずスクリーニングした。

イネのケイ酸吸収欠損突然変異体の単離はゲルマニウム耐性を検定することによって行った。ゲルマニウムはケイ素と同属の元素で、イネの根は吸収においてケイ素とゲルマニウムを区別することができない。しかし、ケイ素とは違い、体内に吸収されたゲルマニウムは植物にとって毒性を示す。この毒性の典型的な症状は葉や茎に褐色の斑点として現れる。この特徴を利用して、化学変異原（アジ化ナトリウムやMNU）やガンマー線照射で変異させたM₂やM₃種子からゲルマニウムを吸収しない突然変異体の選抜を行った。その結果、いくつかの突然変異体を単離することができた。そのうちのひとつ *lsi1* (low silicon 1) について生理学的な解析と遺伝子の同定がすでに終わっているため、ここ

で紹介する。

変異体 *lsi1* は野生型と比べ、ケイ素の吸収が著しく低下していた⁴⁾。圃場条件下で栽培した結果、変異体の根の生育は野生型と比べ、ほとんど変わらなかったが、地上部の乾物重は野生型の80%、特に籾の収量は野生型の10%しかなかった。収量構成因子を解析した結果、特に稔実歩合が非常に低くなっていた。また変異体の籾は黒ずんでいた（図1）。これらの結果から改めてイネの生育及び生産性に対するケイ素の高集積の重要性が示された。

3. ケイ素吸収遺伝子の単離と機能解析

lsi1 変異株の原因遺伝子はマップベースクローニング法によって単離された。この遺伝子は染色体2番に座乗し⁵⁾、五つのエクソン、四つのイントロンからなる。全長cDNAは1409bpで、296残基のアミノ酸からなる六つの膜貫通ドメインを持つ膜タンパク質をコードしていると予測された。Blastサーチの結果、驚いたことに、この遺伝子はアクアポリンのNIP (Nod26-like-intrinsic protein) サブグループに属していた。この遺伝子と特に相同性の高い遺伝子はイネゲ

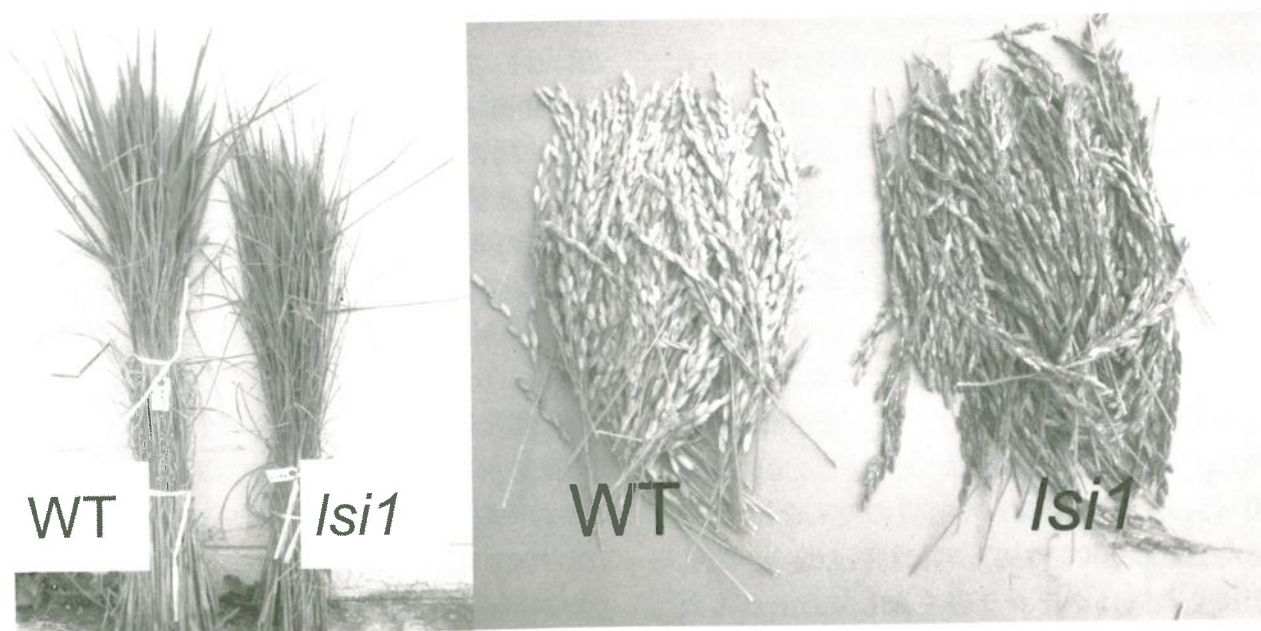


図1 変異体 *lsi1* と野生型の収穫時の表現型
変異体のケイ素含量が低いため、地上部の生育が低下し（左）、穂が黒ずんでいる（右）。

ノム上にもう一つ、トウモロコシでは三つ存在していた。また変異体と野生型の塩基配列を比較した結果、一塩基置換が起こり、その結果、132番目のアミノ酸がアラニンからスレオニンに変わっていることがわかった。このアミノ酸の置換はタンパク質の立体構造を大きく変化させていた⁶⁾。RNA干渉法 (RNAi) を用いてこの遺伝子の発現を抑制したところ、ケイ酸吸収能の減少が確認された⁶⁾。またアフリカツメガエルの卵母細胞によるアッセイの結果、この遺伝子によってコードされているタンパク質はケイ酸に対して特異的に輸送活性を示した⁶⁾。これらの結果はLsi1タンパク質がイネのケイ酸吸収に関与していることを示している。

Lsi1遺伝子は根で構造的に発現しているが、十分なケイ酸を与え続けた場合には約1/4に発現が減少した⁶⁾。根の部位別にLsi1の発現を定量RT-PCRを用いて調べたところ、分裂組織と伸長領域を含む根端から約15mmまでの未成熟な領域ではほとんど発現がみられず、より成熟した領域において発現していた。根のケイ酸吸収活性もLsi1の発現がみられた部位で高く、根

端付近では活性が低かった。またアブシジン酸 (ABA) の影響を調査したところ、Lsi1の発現、ケイ酸吸収ともにABA濃度の上昇によって顕著に抑制された。さらにLsi1の発現には顕著な日周性は見られなかったが、生育時期別のLsi1の発現量は出穂期に一過的に増大していた。これはイネが生殖生長の初期 (穂の形成から出穂にかけて) に特に多量のケイ素を吸収し、この時期のケイ素欠乏が種子の収量を大きく低下させることと一致している。

Lsi1と緑色蛍光タンパク質 (GFP) との融合遺伝子を一過的に導入したタマネギ表皮細胞では細胞膜に局在する蛍光が観察された。またGFP融合タンパク質を導入した形質転換イネ、*in situ* hybridization, 抗体染色によって組織局在性が調査され、いずれの方法でも根の外皮 (表皮と接している皮層の最外層) と内皮 (皮層の最内層, 中心柱と接する) の2層に発現が検出された (図2参照)。これまでに組織局在が報告されているいずれのトランスポーターとも異なる、ユニークなパターンである。さらに抗体染色では、Lsi1タンパク質はいずれの層で

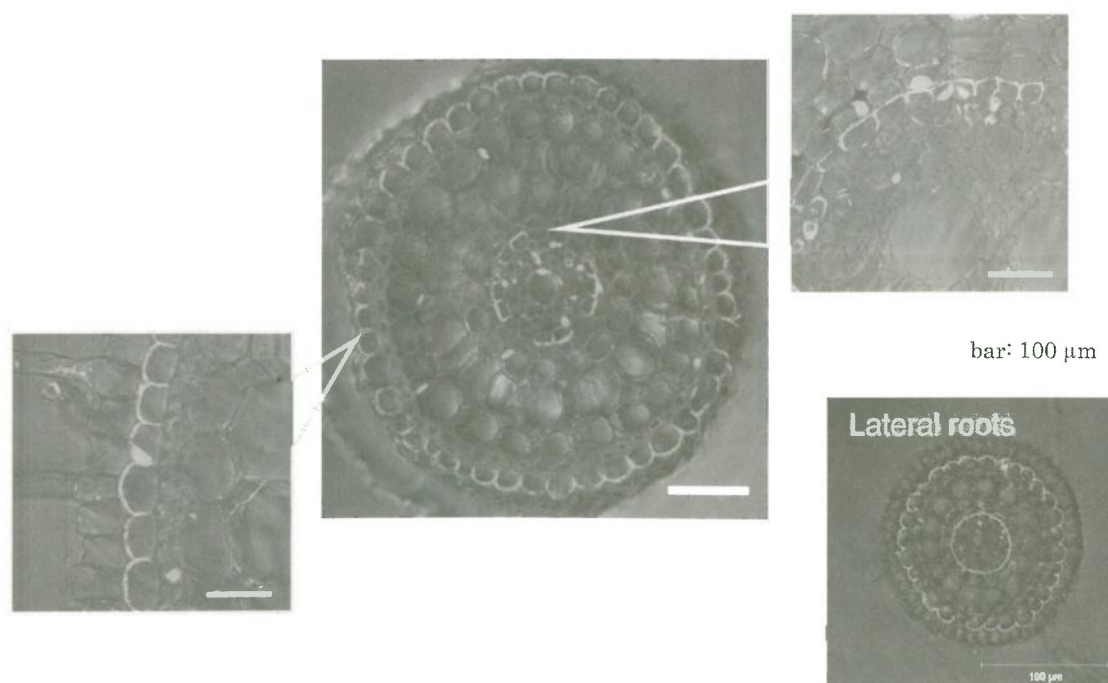


図2 イネケイ酸トランスポーターLsi1の細胞局在性
抗体染色による。Lsi1は根の外皮と内皮細胞膜の遠心側に局在している。

も細胞の遠心側に偏在していることが明らかになった⁶⁾。この特徴的な局在は種子根、冠根、側根に共通していた。根の外皮と内皮の細胞壁にはいずれも、根の発達に伴って親油性のスベリンやリグニンが蓄積したカスパーリー線が形成され、水や溶質がアポプラスト（細胞膜外の領域）を透過することを妨げる。事実ケイ素は外皮と内皮に蓄積されていることが報告されている⁷⁾。したがって、Lsi1タンパク質はこの2つの細胞層において、ケイ酸の細胞内への取り込みを担っていると考えられる。

水や多くの必須元素の土壌からの吸収には表皮と表皮細胞に形成される根毛が重要な役割を果たすと考えられており、表皮細胞で発現するそれらのトランスポーターも多数報告されている。ところが、ケイ酸の場合には、根毛が形成されないイネの変異株を用いた解析によって、根毛の有無はケイ酸吸収能に影響しないことが確かめられている⁸⁾。Lsi1の発現が表皮ではなく、より内側の外皮にみられたことから、イ

ネの根の表皮細胞はケイ酸の積極的な吸収には関与せず吸収の障壁にもならないと推定される。

4. おわりに

イネのケイ素吸収、輸送、集積過程は図3に模式的に示している。以上述べたような解析結果から、Lsi1はケイ酸を外液から細胞の中へ取り込むトランスポーターである。ケイ酸を地上部に高濃度で集積させるためには、図に示すようにほかのケイ酸輸送体が必要であるが、関与している遺伝子はまだ単離されていない。幸いなことに、新規の低ケイ酸吸収突然変異体をすでにいくつか取得しているので、今後これらの変異体を用いて、ケイ酸吸収に関与する新規遺伝子の同定を行い、イネの高いケイ酸吸収機構の全容の解明が期待される。

前述したように、ケイ素の有益効果は主に地上部の各器官に大量に沈積することを介して発

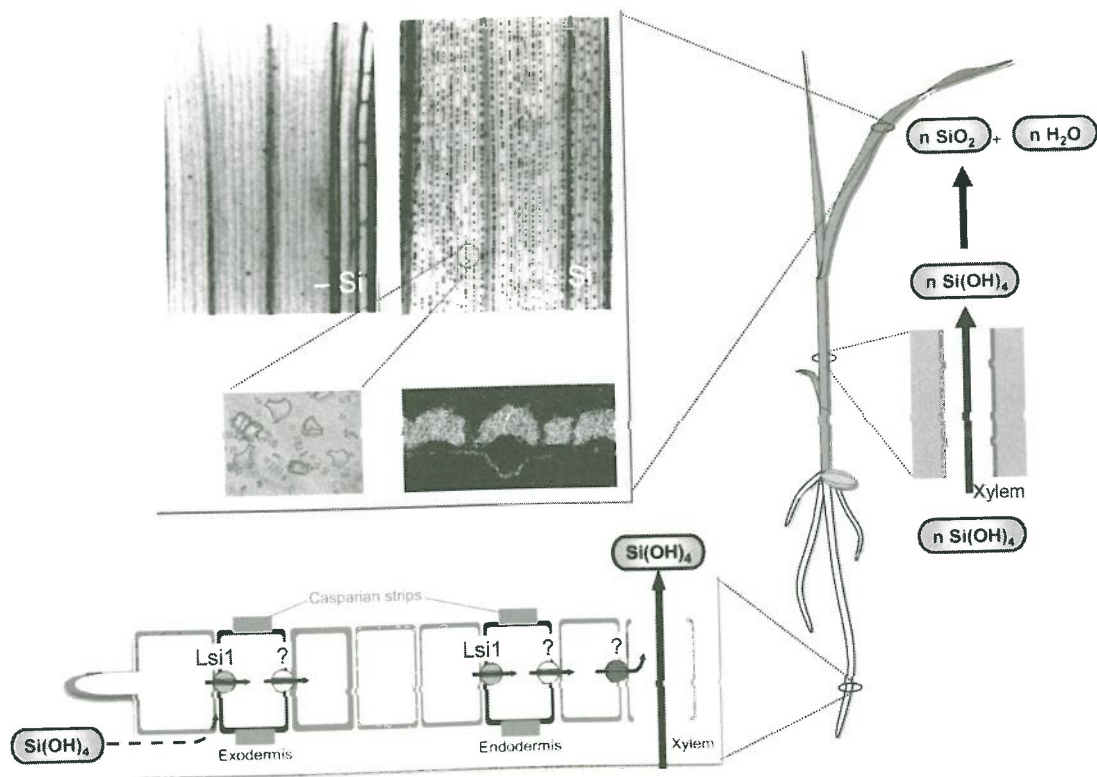


図3 イネにおけるケイ酸の吸収、輸送及び集積の模式図

揮される。したがって、イネのケイ酸トランスポーターを単離することは大変大きな意味を持つ。例えば、イネのトランスポーター遺伝子を他の植物に導入し、これらの植物のケイ素吸収能を遺伝的に改変すれば、土壤に豊富に存在するケイ素を吸収し、複合ストレスに強い作物の作出が可能である。また、アンチセンスやRNAiの手法を用いて、イネのケイ素吸収能を抑制すれば、低ケイ素含量の飼料用イネの作出が可能である。さらに、低ケイ素含量の稲わらを作れば、製紙などの原料に使う場合、機械の損耗を軽減することができる。

苔類やトクサ類、シダ植物の多くはケイ素を集積する。被子植物では単子葉植物のうちイネ科やカヤツリグサ科でケイ素の蓄積が多い。これらのケイ素集積に関与するケイ素吸収遺伝子を明らかにすることも今後の課題である。

文 献

- 1) Ma, J. F. and Yamaji, N. (2006) *Trends Plant Sci.*, 11, 392-397
- 2) Takahashi, E. et al. (1990), *Comments Agric. Food Chem.*, 2, 99-122
- 3) Tamai, K. and Ma, J. F. (2003), *New Phytol.*, 158, 431-436
- 4) Ma, J. F. et al. (2002), *Plant Physiol.*, 130, 2111-2117
- 5) Ma, J. F. et al. (2004), *Plant Physiol.*, 136, 3284-3289
- 6) Ma, J. F. et al. (2006) *Nature*, 440, 688-691
- 7) Gong et al. (2006) *Plant Cell Environ.*, 29, 1970-1979
- 8) Ma, J. F. et al. (2001) *Plant Physiol.*, 127, 1773-1780

◀国内情報▶

アワヨトウはトウモロコシが出す
かおりで昼夜の別を判断

京都大学 生態学研究センター

高林純示・塩尻かおり・小澤理香

アワヨトウは夜行性のチョウ目ヤガ科幼虫であるが、この夜行性を決定する要因は光ではなく、アワヨトウの食草であるトウモロコシ株のかおりの昼間と夜間での変化であった。アワヨトウの天敵である寄生蜂カリヤコマユバチは昼行性であり、アワヨトウが食害したトウモロコシ株が昼間に出すかおりを手がかりに寄主を探索する。アワヨトウが光ではなく植物のかおりの昼夜変動を利用して夜行性を示す理由として、寄生蜂を呼び寄せる危険な日中のかおりを避け、夜間に摂食する可能性が考えられる¹⁾。

1. はじめに

アワヨトウ幼虫はイネ科を食害するチョウ目ヤガ科の害虫である。たまに大発生すると大きな被害を与えるが、通常はむしろ目立たない程度の発生である。アワヨトウ幼虫が夜行性であるという事実は、佐藤ら(1980)の論文に詳しい²⁾。それによると若令期は、葉の鞘部分において、3令ごろになると明確な夜行性のリズムを刻むようになる。昼間は葉の合わさったところや土の中に隠れる。

数年前に我々の研究室の研究員である本稿第二著者にアワヨトウの実験をお願いしたことがある。彼女はアワヨトウとその寄生蜂〔カリヤサムライコマユバチ〕を用いて実験していたが、ある日面白いことを言った。

塩尻「人工飼料でアワヨトウを飼っていると、昼夜別なく飼料を食べているように思えます。夜行性なのに不思議ですね。」

私「なるほど」

TAKABAYASHI Junji, SHIOJIRI Kaori,
OZAWA Rika
〒520-2113 滋賀県大津市平野2-509-3

2. 植物の効果

「不思議ですね」「なるほど」という会話からしばらくして最初の2つの結果が得られた(図1)。まずプラスチックカップにアワヨトウ3令を1匹入れ、人工飼料と隠れ場所(ろ紙を蛇腹に折っただけ)を入れた。このようなカップを120個ほど用意して、半分を明るい状態、半分を暗い状態に置いた。その後8時間、隠れているアワヨトウ数を調べたところ、明るかろうと暗かろうと同じであった。人工飼料で飼っている限り、隠れる行動は光と無関係に一定の割合で起こっている。飼育していて感じた不思議な行動が、データとして出てきたことになる。

2番目の結果は、さらに興味深いものであった。同じ実験を行ったが、その際植物を周囲に配置する、というアレンジを入れた(図2)。その結果、アワヨトウの隠れ数には顕著な差が、明条件と暗条件で得られた。この2つの実験から興味深い事実がわかる。まず

- (1) アワヨトウは一定の比率で隠れたり餌を食べたりするが、光はアワヨトウの隠れる行動に関係ない。
 - (2) 明るい状態での植物の存在は、隠れ率を有意に向上させる(図2の点線間の比較)。
 - (3) 暗い状態での植物の存在は、隠れ率を減少させる(図2の実線間の比較)。
- さて、植物を周囲に置いた効果は、視覚的な

ものの可能性と、嗅覚的な可能性の2つが考えられる。つまり、アワヨトウはトウモロコシ株が見える、見えないと言うような情報を利用しているか、トウモロコシ株の放出するかおりの昼夜変化を情報として利用しているか、の2つである。

スイスのTed Turlings博士らの報告では、トウモロコシ葉がシロイチモジヨトウ幼虫の被害を受けると、その幼虫の捕食性天敵である寄生蜂 (*Cotesia marginiventris*) を誘引する成分を食害誘導的に生産し始める。その誘引成分の生産は夜間に著しく減少するという³⁾。トウモロコシ株—アワヨトウの系でもかおりの昼夜の変化があるかどうか調べて見ると、たしかに夜のトウモロコシからは被害未被害にかかわらずかおり量が低下していた (未発表)。これらの結果は、アワヨトウの行動が、トウモロコシの昼夜の香りの違いで説明できる可能性を示唆

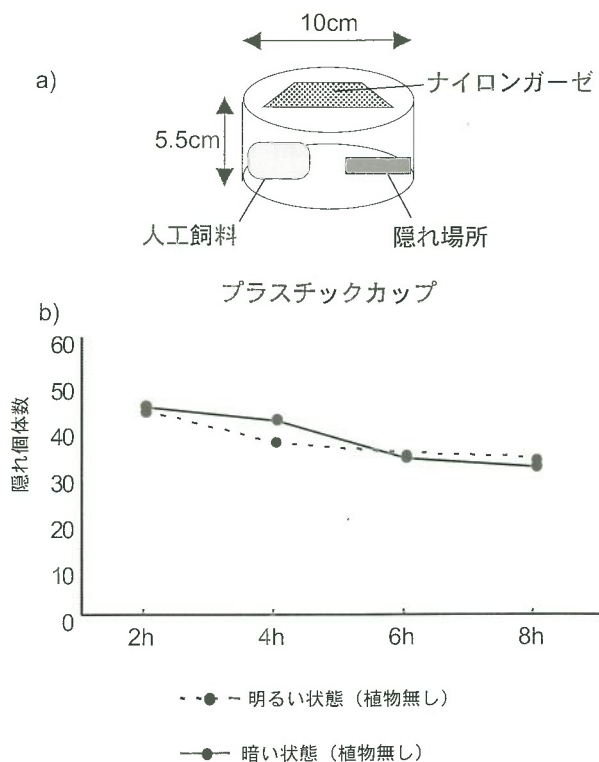


図1 実験に用いたカップ (a) と人工飼料で飼育したときの隠れた個体数 (b) 各時間における明条件と暗条件で隠れ数に差がない。

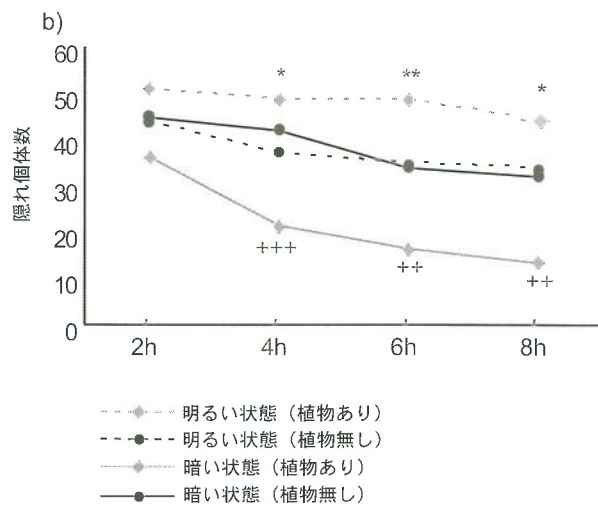
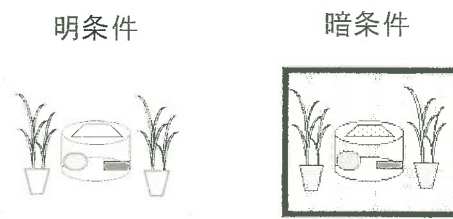


図2 植物を周囲に配置し、人工飼料で飼育した場合の隠れ個体数 図1と同じデータを載せた (黒線)。*印及び+印は各時間における明条件下あるいは暗条件下で、植物の有無による隠れ数に統計的な有意差があることを示す。

した。

3. 植物のかおりの効果

図3Aの実験系は植物を明 (左)、あるいは暗条件 (右) に設定し、その株から放出されるかおり成分を別のチャンバー内のアワヨトウ幼虫に暴露する設定である。アワヨトウ幼虫も明条件と暗条件を設定するので、都合4通りの実験区となる。まずはトウモロコシ未被害株 (健全株) を用いて実験を行った。結果を先に述べると、我々の予想通りであった (図3B)。

まず明るい条件下の健全植物が放出するかおりに暴露されたアワヨトウ幼虫は、その幼虫自身が暗条件であっても明条件であっても、同じように高い隠れ率を示した。逆に、暗い条件の

健全植物が放出するかおりに暴露されたアワヨトウ幼虫は、それらが暗条件であっても、明条件であっても同じように低い隠れ率を示した。この実験系から、図3の結果は、アワヨトウがトウモロコシ株由来のかおり成分に反応して隠れ率=夜行性を決定していることを示している。

さて図3の結果をもたらした要因の一つとしてトウモロコシ株のかおりを見出した。これまでの実験では健全株を用いてきた。しかしアワヨトウの間近にあるトウモロコシ株は、そのアワヨトウが食害した株であろう。そこで次に食

害株を用いて同様の実験を行った(図3C)。その結果は健全株を用いた場合よりも良好で、明るい条件下で被害植物が放出するかおりに暴露されたアワヨトウ幼虫は、その幼虫自体が暗条件であっても明条件であっても、同じように高い隠れ率を示した。逆に、暗い条件の被害植物が放出するかおりに暴露されたアワヨトウ幼虫は、それらが暗条件であっても、明条件であっても同じように低い隠れ率を示した。アワヨトウ幼虫の夜行性を決める要因として、健全株由来のかおりだけでなく、被害株由来のかおりも重要であることがわかった。明期の植物のかおりが積極的にアワヨトウ幼虫を隠れさせ、また暗期の植物のかおりが積極的にアワヨトウに隠れ家から外に出させる効果がある。

4. 被害葉から放出されるかおりの機能について

アワヨトウ幼虫の天敵は、カリヤサムライコマユバチ(以下カリヤと省略)という体長が3ミリほどの幼虫内部多寄生蜂である。この蜂はアワヨトウにのみ寄生することができる。アワヨトウ2令から6令初期までの幼虫ステージに寄生する。カリヤは、寄主アワヨトウ幼虫をなんとかしてその成虫寿命(約7日)の間に発見しなければならない。カリヤは昼行性であるため、株に潜むアワヨトウを見つけなければならない。

いったんカリヤが寄主の潜んでいる食害株を発見した後は、その上の食い跡、脱皮殻等を手がかりに被害株をくまなく探索することで効率よく寄主を発見する^{1,4)}。問題となるのは、どのように被害株を発見するのだろうか? という点である。結論のみ簡単に述べると、カリヤの寄主発見には、アワヨトウが食害した

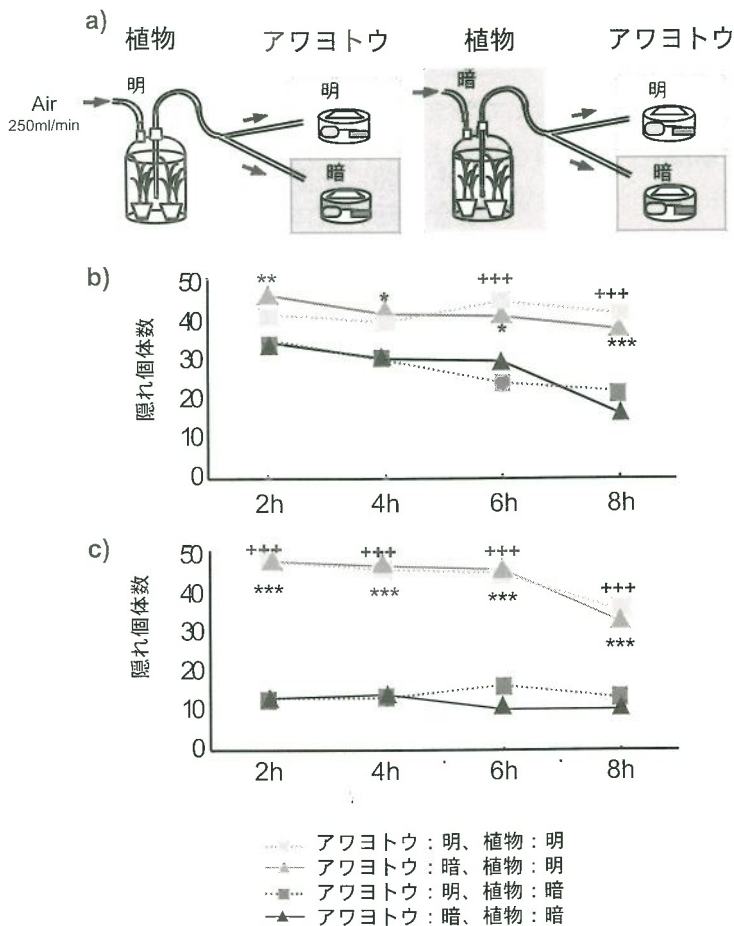


図3 植物由来のかおりが夜行性に及ぼす影響を調べる装置 (a)、健全株を用いた場合 (b)、アワヨトウ被害株を用いた場合 (c)

*印は各時間における植物明条件下と暗条件下で、アワヨトウ明条件で隠れ個体数に統計的な有意差があることを示す。+印は各時間における植物明条件下と暗条件下で、アワヨトウ暗条件で隠れ個体数に統計的な有意差があることを示す。

植物のかおりを利用して被害株を発見している。トウモロコシ側の立場からすれば、被害葉から放出されるかおりの機能の一つは、カリヤを誘引するというものである。

5. なぜアワヨトウは光ではなくトウモロコシ葉のかおりを「夜になった」という情報として使うのか？

1日24時間、その中での明暗の周期というのは、地球上で最も安定したサイクルである。アワヨトウはこのような安定なリズムを利用しないで、なぜトウモロコシ株のかおり変化を利用しているのだろうか？ 日周性リズムの研究は当然のことながら実験室内で行われ、16時間明、8時間暗などといった実験では、明暗が蛍光灯のような照明器具のスイッチオンオフで断続的に変わる。ところが野外ではだんだん暗く、あるいは明るくなる。どこまで暗くなったら夜と認識して活動するのか、というのは個々の生物にとって思ったより難しい問題なのかもしれない。

アワヨトウ幼虫の主要な天敵カリヤサムライコマユバチは昼行性であり、昼の被害株のかおりに頼りに寄生発見という離れ業をこなしている。この成分を調べて見ると、少なくとも青葉アセテートというかおり成分がカリヤを誘引する成分であることが分かった（投稿準備中）。青葉アセテートの生産は夜になると被害株でも著しく低下することがわかった。その他のかおり成分も押しなべて低下していることから、夜の被害株からのかおりにはカリヤを誘引する成分が著しく低下していることになる。そこで興味深い仮説が浮かび上がる。それは、昼間カリヤを誘引する香りがトウモロコシ株から出ている限りアワヨトウは隠れており、夜になってそのかおりが出なくなったら現れるという

仮説である。これは今のところあくまで仮説であり、検証が必要である。

6. 「面白い現象」の一般化から害虫管理へ

先の仮説の検証のみならず、このような現象がどの程度普遍的であるのか、どの程度の植食性昆虫で類似の現象が認められるのか興味あるところである。また、アワヨトウ幼虫がどのようなかおり成分を利用して隠れる行動を示したり、隠れ家から出て植草を食べようになるのかについても明らかにしないといけない。

このような解析は、本現象を一般化する過程であり、基礎生物学的に重要である。さらにこのような解析は同時に害虫管理技術開発にもつながる。たとえば、アワヨトウに隠れる行動を解発させる成分を利用して、夜間の食害量を減少させることができるかもしれない。そのまま餓死するだろうか。これは基礎的な研究への投げ返しにもなっている。つまり、どの程度のこの匂いシグナルに依存しているのか。餓死するまでこのシグナルを尊重するのか、あるいはある一定の空腹レベルに達するとシグナルを無視するのか、という点はアワヨトウと植物間の相互作用の視点からも興味深い。

文 献

- 1) Shiojiri, K. et al. PLoS Biol. 4: 1044-1047 (2006)
- 2) Sato, Y. et al. Kontyu 51, 128-139 (1983)
- 3) Turlings, T.C.J. et al. Proc. Natul. Acad. Sci. USA 92, 4169-4174 (2004)
- 4) Takabayashi, J. et al. J. Chem. Ecol. 20, 373-386 (1994)

◀国内情報▶

哺乳類の冬眠をコントロールするホルモン
—新たな冬眠の視点—株式会社 三菱化学生命科学研究所
近 藤 宣 昭

冬眠には多くの応用の可能性が秘められている。0℃近くまで低下する体温により消費するエネルギーは極度に節減されるし、病気の進行も停止する。さらに、低温はもちろん病気への抵抗性も増すと報告がある。この利用を目指して冬眠の仕組みは探求されてきた。長年の間探し求めてきた冬眠をコントロールする物質が発見され、冬眠の謎が明らかになるうとしている。

1. はじめに

生物の生存にエネルギーは不可欠である。植物や多くの変温性動物では細胞の活動性は外気温に依存して変化するので、外気温が下がると活動も低下し生存に必要なエネルギーはわずかですむ。ところが、恒温性である哺乳類や鳥類の細胞は37℃付近の高い温度でしか機能できず、エネルギーを消費して常に体をあたためていなければ生存できない。外気温が下がるほど多くのエネルギーを消費することになり、変温性生物とは対照的である。

このようなちがいは、両者の体を構成する細胞や組織において温度変化を許容する程度に差があるために生ずる。つまり、ヘビやカメなどの変温性動物では、細胞は0℃近くの低い温度まで体温が低下しても温度に見合った代謝機能が維持される。しかし、ヒトや実験動物であるラットなどの通常の恒温性動物では、このような低い温度では細胞は短時間で機能できなくなり早期に致命的な傷害を受ける。

ところが、哺乳類でも冬眠動物は0℃近くまで体温が低下しても生存できる不思議な能力をもつ。最近、この能力は生体のエネルギー制御や医学の領域に画期的な応用をもたらすとして注目されつつある。

2. 冬眠という能力

冬眠動物は哺乳類の7目にわたって存在しており¹⁾、なかでもゲッ歯目のジリスやシマリスは低い体温で長期間冬眠することで知られる。通常では37℃の体温が冬季には5～6℃にまで低下して著しく代謝を抑制するため、エネルギー消費は1/50～1/100にまで節減される²⁾。つまり、この程度のエネルギーで、生命はもちろんのこと正常な生理機能が維持されるのである。しかも、シマリスなどでは冬眠は冬の限られた時期だけ起こることから、年周性に冬眠を調節する機構の存在が示唆されている。

もし、冬眠できない恒温性動物（哺乳類や鳥類）に冬眠状態を起こすことが可能になれば、冬季の家畜（例えば、ウシやブタ、鶏など）の飼育状況は一変し、ほとんど餌を必要とせず、生体での保存や長距離輸送の技術にも革新的な影響を与えるだろう。既に、ヒトの医療分野では、脳や心臓の治療に軽度な低体温が利用され傷害の進行を防止するのに役立っているし、冬眠動物を用いた研究からは、冬眠中には感染症やガン、虚血などの深刻な病気に対する抵抗性が増大すると報告がある。動物に限らず植物などでも、低温や病気に対する抵抗性を増大させるために冬眠が応用できるかもしれない。

このように、哺乳類で観察される冬眠は、生体を低温傷害から保護するだけでなく、種々の病因に対する抵抗性を増進させる能力と考え

KONDO Noriaki

〒194-8511 東京都町田市南大谷11号

ることができ、冬眠動物の体内には年周性にこの能力を制御して冬眠を可能にする機構が存在するとの推測ができる。そのため、この機構の理解は極限状態での生命の維持と保存を可能にし、多くの分野に計り知れない応用を拓くと期待されている。筆者らの長年の研究から、生体を冬眠可能な状態へと調節する蛋白質がシマリスの体内から初めて発見された³⁾。

3. 年周リズムにより調節される分子

この蛋白質はシマリスの血中から複合体として見出され、冬眠特異的蛋白質 (Hibernation-specific Protein : HP) 複合体と命名された⁴⁾。三種の互いに類似したアミノ酸構造をもつHP20ファミリー蛋白質 (HP20, HP25, HP27) がN末端側に存在するコラーゲン様ドメインで三重らせんを形成してヘテロ三量体 (HP20c) となり、それにHP55 (プロテアーゼ阻害因子) が会合している。この各成分は肝臓で特異的に産生され、複合体となって血中に分泌される^{4, 5)}。

HP複合体の発見がもたらす重要性の一つは、体内の年周時計機構により制御される初めての分子が同定されたことにある^{3, 4)}。シマリスの冬眠は、一定の低温環境下 (5℃, 恒暗) において年周期で起こり、この冬眠に相関して肝臓でのHP遺伝子の発現が抑制され、血中HP量は減少する。この相関は10年以上生存したシマリスで一生涯を通じて維持されることが確認された。さらに、一定の温暖環境下 (23℃, 12時間明暗周期) で冬眠時期に起こる体温低下を妨げても、血中HP量は同様に年周期で変化し、減少した時期には低温暴露により直ちに冬眠が開始される。この事実、HP複合体の年周性変化が環境や体温の変化によらないことを示しており、体内にHPの遺伝子発現を調節する年周時計機構が存在すること、HPが減少すると冬眠が可能になることが分かる。このことから、冬眠を制御する情報が体内で産生され、肝臓へと伝達されてHPを調節し冬眠を可能にするとの推測ができる (図1)。即ち、HPは、冬眠を

制御する年周リズムとそのリズムを伝達するネットワークの支配下であり冬眠に密接に相関する分子と考えられる。HPの発見は、この年周リズムネットワークへの分子のアプローチを可能にするという重要な意味を持っている。

4. 冬眠ホルモンとしてのHP複合体

冬眠とHP調節の関係から、HP産生が負に調節されて血中HPが減少する時期には体の機能は冬眠可能な状態へと切り替えられているとの推測ができた。しかし、冬眠発現と血中HP量の負の相関からは、常識的には、冬眠発現におけるHPの重要性は否定的に見える。この見方は、HP遺伝子の発現が抑制されてHP産生量自体が減少するとの結果によって一層強まることになる。しかし、この否定的見解には思わぬ真相が潜んでいた。遺伝子発現量と蛋白量との相関を逆転させる機構が見出されたのである。

上述の否定的予想に反してHPの重要性を明らかにしたのは脳への着目だった。つまり、冬

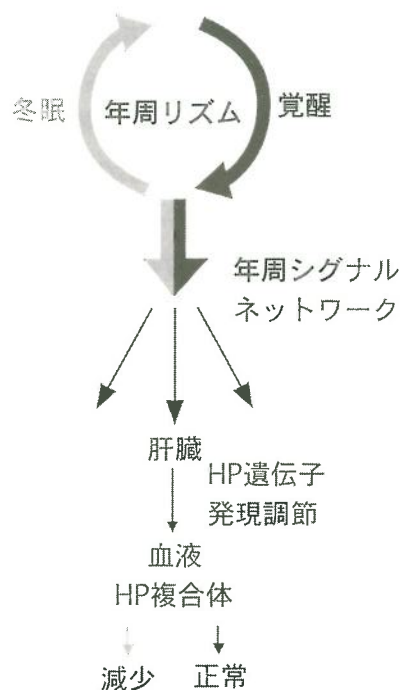


図1 体内で働く年周リズムとリズムを伝達するネットワーク
これによって、冬眠とHP複合体の肝臓での発現が制御される。

眠を制御する年周リズムにより調節されるHPの重要性を考えると、どこかで増えて働くとの強い思いがあった。もしそうなら、“血中でのHP減少を反映しない部位”，即ち、血液成分と組織とが関門によって隔てられ物質移動が厳しく制限されている脳以外には考えられなかった。そこで、脳室を満たし血液から脳実質へと物質を輸送する脳脊髄液を調べた結果、抗体を用いた免疫化学的方法でHPが検出された。冬眠をしていない時期には微量（数nM）しかなかったHP複合体が、冬眠開始数日前には有意に増加し、その後増加を続けて冬眠が最も深くなる中期には10～20倍にまで達した。これをピークに後期にかけて減少に転じて脳内HP量が僅かになると冬眠が終了する（図2）。脳脊髄液中への輸送は血液-脳脊髄液関門である脈絡叢を介してなされており、輸送されたHP複合体はHP20cとHP55へと解離していることも明らかになった（図3）。つまり、両者が会合した血中のHP複合体は不活性化状態にあり、脳に輸送されて活性化され機能すると考えられた³⁾。

この考えを証明したのが抗体を用いて脳内HP20cの機能を抑制する実験である。冬眠中のシマリスの脳室内に抗体を2週間投与することによって、冬眠している時間が投与中著しく短

縮され、冬眠を停止させたり早期に終了させることにも成功した。さらに、この冬眠時間の短縮は抗体濃度に依存していた³⁾。

この結果から、脳内でHP複合体が機能できなくなると、その程度に比例して冬眠できる時間（低体温に耐えられる時間）が短くなることが明らかになり、HPは肝臓で産生され脳で機能する冬眠に必須の蛋白質ホルモンと考えられた^{3, 6)}。すなわち、脳で増加したHPは生体を低温に耐えて機能できるように調節する画期的分子の初めての候補となったのである。実際、冬眠中のシマリスの心臓研究から、低温で機能するのに重要と考えられるカルシウムイオン調節の変化が既に見出されている^{7, 8)}。心臓以外の他の主要な組織でも、同様の低温に耐える調節がなされていると考えられる。今後、血中HP複合体を脳型へと活性化する機構を明らかにできれば、これを用いて生体を冬眠可能にする機構を究明できるだろう。

5. HP研究の展望

冬眠を可能にする物質、いわゆる冬眠物質は、ほぼ一世紀にもわたって探索されてきた。神経伝達物質やホルモン、冬眠中に発現が変化している遺伝子を中心に調べられてきたが^{9, 10)}、冬

眠に特異的な因子や冬眠を誘導する物質を見出すことはできなかった。ここで述べたHPの発見は、冬眠を制御する年周シグナルの産生と伝達ネットワーク、さらに、それに支配された冬眠の核心をなす低温耐性機構を解明する鍵として注目されている¹¹⁾。冬眠は、脳や心臓の虚血、感染症、ガンなどに強い耐性を示すとの報告があるので、HP研究は、これらの予防や治療に新たな手法や戦略をもたらすとの期待が大きい。実際、シマリスの寿命の研究からは、10年を超える驚異的な長寿（ラットの4～5倍）にHPが深く関わるこ

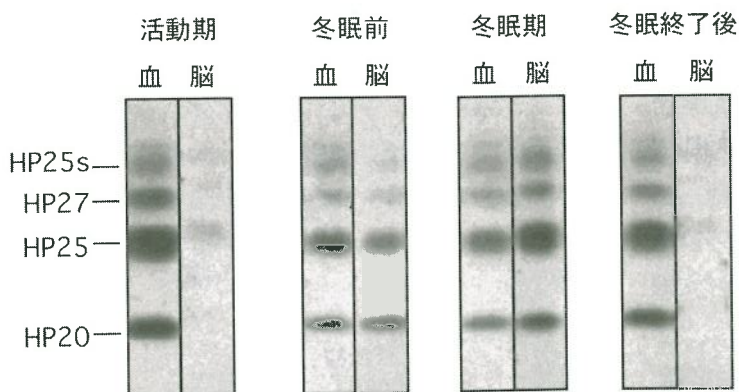


図2 冬眠に関して変化する血中（血）及び脳脊髄液中（脳）のHP複合体

非冬眠時期（活動期）から冬眠期を経過して冬眠終了までのHP20cの各成分の変化を示したwestern blot。HP25sはHP25に糖鎖が付加されて高分子に移動した分子種を示す。

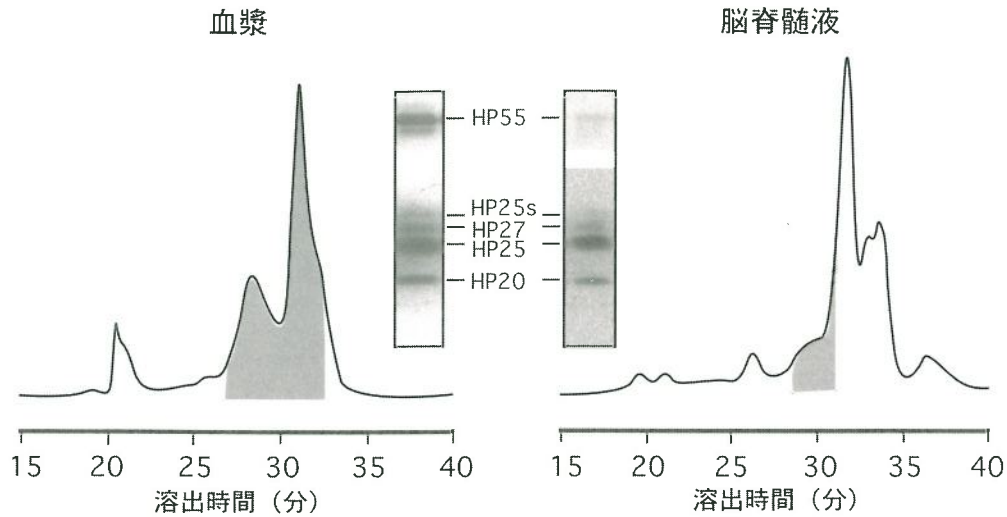


図3 血中と脳脊髄液中のHP複合体の相違

血漿（左図）と脳脊髄液（右図）をゲルろ過クロマトグラフィーで分離するとグレーの部分でHP20cが検出される。分離したHP20c画分のwestern blotを比較すると、血漿中ではHP55と複合体を形成しているので同一画分に溶出するが、脳脊髄液中では解離しているためHP55は共存していない。

とが明らかになっているので⁶⁾、寿命を制御する機構に参与するのは勿論だが、この間に起こるであろう致死性疾患を予防して長寿に貢献するとの考えもできる。

これまで述べてきたように、HPは低温に対する生体の耐性を増大すると考えられる。通常、低温は代謝を抑制することで細胞や組織を傷害することが知られているので、HPは代謝を強化するとの重要な推測が得られる。さらに、ここでは冬眠を“体温が低下する現象”としてではなく“生体を保護するシステム”として捉えることが可能になったので、低温にとどまらず生命を脅かすあらゆる要因からの保護システムと考えることができる。恒温性は変温性から進化したものなので、変温性生物にその起源が見出せる可能性もある。このような観点から、冬眠の分子的理解はヒトへの医療応用のみならず、家畜や農作物などの寒冷や病気に対する耐性強化への応用にも新たな可能性を拓くかもしれない。

文 献

- 1) 川道武男 (2000), 冬眠する哺乳類 (川道武男, 近藤宣昭, 森田哲夫編), 31-99, 東京大学出版会, 東京
- 2) 近藤宣昭 (2000), 冬眠する哺乳類 (川道武男, 近藤宣昭, 森田哲夫編), 262-294, 東京大学出版会, 東京
- 3) Kondo, N. et al. (2006), *Cell*, 125, 161-172
- 4) Kondo, N. et al. (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 473-478
- 5) Takamatsu N. et al. (1993) *Mol. Cell. Biol.*, 13, 1516-1521
- 6) 近藤宣昭 (2006), 科学 76(9), 934-941
- 7) Kondo, N. et al. (1984), *Science*, 225, 641-643
- 8) 近藤宣昭ら (1998), 日経サイエンス, 28(2), 64-72
- 9) Wang, L. C. H. (1988), in *Advances in Comparative and Environmental Physiology 2* (Gilles, R., Ed.), 1-44, Springer-Verlag, Berlin
- 10) 近藤宣昭 (2006), 蛋白質 核酸 酵素, 51(13), 1847-1853
- 11) Hastings M. H. et al. (2006), *Cell*, 125, 21-23

◀国内情報▶

ICSI-mediated gene transfer法による
トランスジェニックブタの作出

明治大学 農学部生命科学科 発生工学研究室

長嶋 比呂志・池田 有希・斉藤 仁・松成 ひとみ・黒目 麻由子

受精によって父親の遺伝子を卵に運び込むことは、精子の重要な役割である。この役割に加えて、精子を遺伝子組換えの主役として利用することができる。導入したい遺伝子を頭部に付着させた精子を卵にマイクロインジェクションすることによって、卵の染色体上に遺伝子を導入することができる。精子を遺伝子の運び屋として使うこの方法は、トランスジェニックブタ生産の実用的手段として期待される。さらに、体細胞核移植との組み合わせによって、トランスジェニック・クローン個体の反復的再生産も可能である。

1. はじめに

従来、トランスジェニックブタは、微量の遺伝子DNAを受精卵の前核にマイクロインジェクションする方法によって作られてきた。この方法は「前核注入法」と呼ばれ、実験動物の遺伝子組換えに、現在でも実用的に用いられているが、ウシやブタなどの家畜にはあまり効果的でない。これに対して、頭部にDNAを付着させた精子を卵にマイクロインジェクションするICSI-mediated gene transfer法 (ICSI法) によって、トランスジェニックブタを効率的に生産することが可能である^{1)~3)}。特に体外成熟卵をICSI法と組み合わせることで、実用的なトランスジェニックブタ生産システムが構築される。さらに、このICSI法で得られたトランスジェニック胎仔から細胞を採取し、体細胞核移植を行うことで、トランスジェニック・クローンブタの生産が可能となる⁴⁾。

2. ICSI法の概略

ICSI法によるブタ体外成熟卵への遺伝子導入を、図1にまとめた。

NAGASHIMA Hiroshi, IKEDA Yuki,
SAITO Hitoshi, MATSUNARI Hitomi,
KUROME Mayuko
〒214-8571 川崎市多摩区東三田1-1-1

1) 卵の調製:

食肉処理場で回収したブタ卵巢から未成熟卵を採取し、それらを培養して成熟 (第2減数分裂中期) 卵を調製する。

2) 精子への遺伝子の付着とマイクロインジェクション

- ①凍結融解したブタ精子を、約10万個 (10 μ l 中) ずつ小試験管に分注する。
- ②精子に超音波処理を加え、頭部と尾部を分離した後、導入したい遺伝子のDNA (25 ng) を加えて約5分間置き、頭部にDNAを付着させる。
- ③体外成熟卵に直流電気刺激 (DC 150V, 100 μ sec) を加えて、活性化を誘起する。
- ④DNAの付着した精子を、マイクロマニピュレーターを用いて、1匹ずつ活性化後の卵の細胞質内に注入する。精子注入は、卵の活性化後30分以内に行う。
- ⑤精子を注入した卵を1~2日間体外培養した後、レシピエント雌の卵管内に移植する。

3. 精子の凍結方法が卵への遺伝子導入効率に及ぼす影響

ICSI法においては、精子頭部細胞膜にある程度の損傷があることによって、精子頭部へのDNAの付着が促進される。実際は、細胞膜下

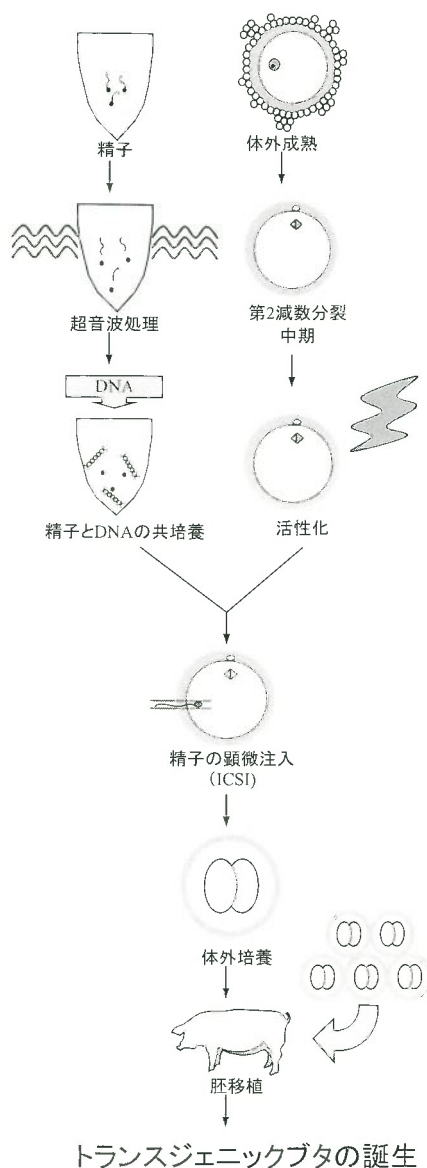


図1 ICSI-mediated gene transfer法によるブタ体外成熟卵への遺伝子導入

にDNA分子が入り込んだ状態になっていると考えられる。表1には、2種類の凍結精子を用いて、ICSI法でGFP遺伝子を導入した実験の成績を示す⁵⁾。用いた凍結保存液はBF5⁴⁾およびBTS⁴⁾である。前者は凍害保護効果を有し、後者は保護効果を持たないので、後者の液で凍結された精子の細胞膜の障害程度はより重度である(この差は生死染色によって明らかに検出される)。このような精子細胞膜損傷程度の違いにもかかわらず、DNA導入効率(GFP陽性胚)は、両者で同等であった。凍害保護効果のある保存液を用いた場合でも、凍結融解精子は先体に障害を受けやすいので、これが精子頭部へのDNAの付着を促進しているのであろう。

表1 ICSI-mediated gene transfer法によるブタ体外成熟卵への遺伝子導入効率

精子凍結保存液	DNAとの共培養	培養卵数	分割胚数(%)	胚盤胞数(%)	GFP発現胚数(%)
BF5	+	100	47 (47.0)	21 (21.0)	10/21 (47.6)
BF5	-	72	40 (55.5)	15 (20.8)	0/15 (0)
BTS	+	152	67 (44.0)	37 (24.3)	20/37 (54.0)
BTS	-	49	26 (53.0)	14 (28.5)	0/14 (0)

4. ICSI法によるGFP遺伝子導入トランスジェニックブタの作出

表2に、ICSI法によるトランスジェニックブタ作出成績をまとめた。GFP遺伝子を導入した実験では、合計466個の胚を移植した4頭のレシピエントから、35頭の胎仔が得られ、そのうち2頭がトランスジェニック個体であった。口腔粘膜に強くGFPを発現するトランスジェニックブタの例を、図2に示す。

表2 ICSI-mediated gene transfer法によるトランスジェニックブタ胎仔・産仔の作出

レシピエント	移植胚数	胎仔・産仔総数	トランスジェニック胎仔・産仔数
NO.1	113	12	1
NO.2	112	14	0
NO.3	87	6	0
NO.4	154	3	1

レシピエント No.1～3 は妊娠 20～28 日で剖検、No.4 は分娩

5. トランスジェニックブタからのクローンブタの複製

ICSI法で得られたトランスジェニック胎仔あるいは産仔から初代培養細胞を樹立し、それを体細胞核移植に用いることで、トランスジェニック・クローンブタを複製再生産することができる。図3に示すのは、ICSI法で得られたGFP遺伝子導入トランスジェニック産仔から樹立した初代培養細胞 (a) と、それから作製された核ドナー細胞 (b)、クローン胚盤胞 (c)、さらにクローン胎仔 (d) である。当然のことながら、ドナー細胞を提供したトランスジェニック個体と同様に、GFPを全身性に発現するトランスジェニック・クローンの複製再生産が可能である。このような、ICSI法と体細胞クローニングを組み合わせたトランスジェニックブタ作出の効率を示したのが、表3である。レシピエントの妊娠率は100%であり、トランスジェニック・クローンの再生産効率は非常に高いことが分かる。

6. おわりに

トランスジェニックブタの生産は、研究段階から実用段階に移行しつつある。病態モデル、異種移植用臓器ドナー、人工臓器生産など、多くの領域でトランスジェニックブタの利用が期待される。将来は、抗病性や環境耐性など、より農業生産に関連が深い能力の改善を目的として、トランスジェニックブタが生産・利用される可能性がある。現時点では、主に医学生物学的領域への貢献を目指して進められているブタの発生工学研究であるが、その成果は、将来の



図2 ICSI-mediated gene transfer法で作出されたトランスジェニックブタ (導入されたGFPを口腔粘膜に強く発現している)

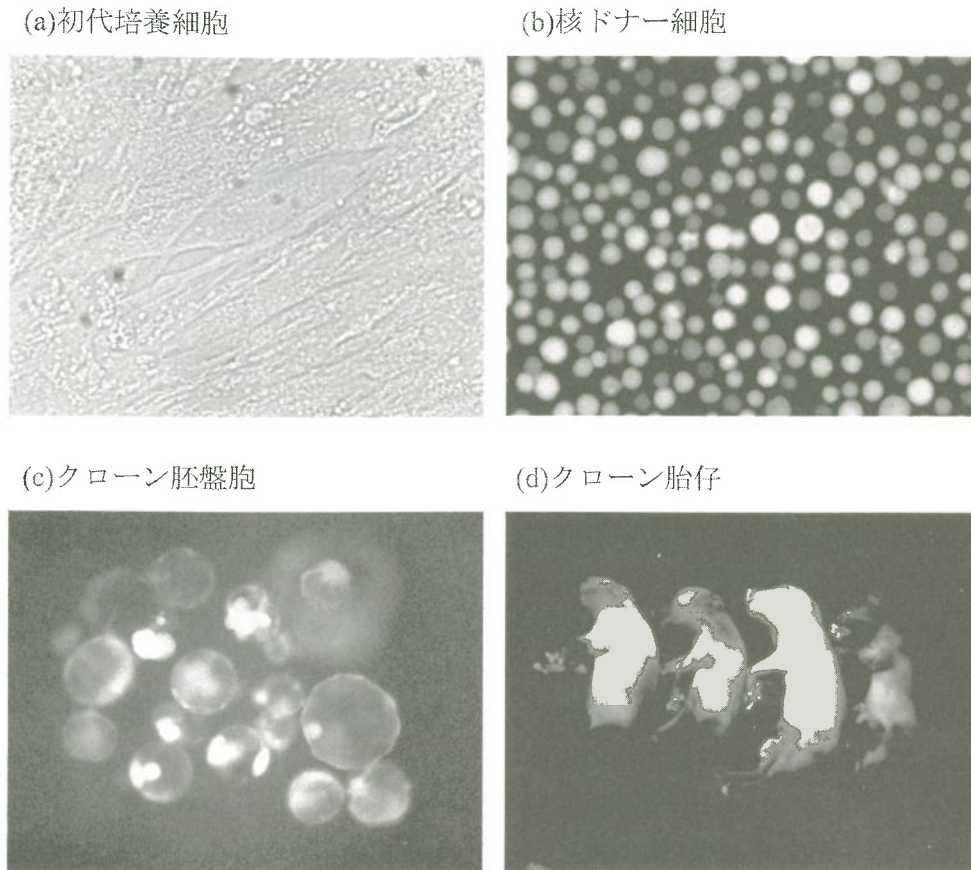


図3 ICSI-mediated gene transfer法で得られたトランスジェニックブタの体細胞を核ドナーとするトランスジェニック・クローンブタの再生産

表3 ICSI-mediated gene transfer法によって得られたトランスジェニックブタからのクローンブタの再生産

ドナー細胞の種類	再構築胚の胚盤胞への発達(%)	移植したクローン胚数	妊娠/レシピエント	トランスジェニック・クローンブタ(流産・死産)
腎臓	12/81 (14.8) ^a	352	2/2	2(0)
肺	17/86 (19.8) ^a	415	3/3	4(11)

^a 有意差なし

農業への利用に向けても着々と蓄積されている。

文 献

- 1) Kurome, M. et al. (2006) Transgenic Research 15: 229-240
- 2) Lai, L. et al. (2001) Zygote 9: 339-346
- 3) Chang, K. et al. (2002) BMC Biotechnol 19: 5-17
- 4) Pursel, G. et al. (1975) J Anim Sci 40: 99-102
- 5) Nagashima, H. et al. (2003) Theriogenology 59: 95-106



ブレインテクノニュース

バックナンバーのご案内
第117号

2006年9月15日発行

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

……………中島 一雄・篠崎 一雄・篠崎 和子

(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

……………片桐 健・梅澤 泰史・篠崎 和子・篠崎 一雄

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

……………小西 左江子・井澤 毅・矢野 昌裕

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……………大日向 耕作・吉川 正明

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……………佐々木 義之
有害・有毒微細藻の分子モニタリング法の開発
……………神川 龍馬・田辺(細井)祥子・左子 芳彦
収量コンバインの開発
……………日高 靖之・栗原 英治・牧野 英二・杉山 隆夫

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

……………田崎 公久・柏谷 祐樹・天谷 正行

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……………(抄訳：下司 雅也)

植物による亜鉛無毒化の新しいメカニズム……………

……………(抄訳：岩井 純夫)

パリエル板における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

……………(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……………(抄訳：那須 雅之)

生研センターからのご案内

◀国内情報▶

作業ナビゲータ

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
濱 田 安 之

作業ナビゲータは、GPS及び方位センサからの情報を基に、車両の現在位置、作業軌跡、推奨経路等の地図情報や作業情報をトラクタ等のオペレータに分かりやすく表示するもので、トラクタ等による広幅の薬剤等散布作業などに適用して無駄のない高精度な作業の実施を支援する。農家は場におけるモニタ試験の結果、実用性及び取扱い性はいずれも良好であることが確認され、近々、実用化（市販化）を予定している。

1. はじめに

トラクタ等の農用車両を用いた作業においては、次の作業へ配慮してできるだけほ場内をまっすぐに運転し、かつ作業能率や投入する資材の最適な施用といった観点から、未作業部分や作業重複を極力減らすよう一定の作業間隔で運転・作業することが重要である。しかしながら農用車両がより高速化し、作業幅も拡大傾向にあることから、このような高精度・高能率作業を行うオペレータの負担は大きいものとなっている。

このような状況の中、欧米では適正な作業経路からの距離や方向をLED等で表示するライトバーを始めとした運転支援機器が開発され、一部が輸入・販売されているが、欧米農業と日本農業の経営規模やほ場一筆の面積、作業方法の違いなどから、必ずしも使い易いものではないのが現状である。

そこで、オペレータの負担を軽減し、無駄のない高精度な作業の実施を支援する日本農業用の作業ナビゲータ（以下ナビゲータ）を開発した。

2. ナビゲータの構成

ナビゲータは、GPSや方位センサといった航
HAMADA Yasuyuki
〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

法センサと、センサ情報を処理・表示するノートPCにより主に構成される（図1）。

GPSはNMEA-0183フォーマットで位置情報等を出力するものであれば適用可能であり、要求される精度に応じて選択・適用する。方位センサ及びI/Oコントローラは、生研センターが農水省の21世紀型緊急開発事業で開発したものを適用している。

ノートPCはMicrosoft. Net Framework 2.0, Microsoft Managed DirectX 1.1などのライブラリに加え、後述するナビゲータ用ソフトウェアをインストールしたものを適用する。また、ノートPCの操作を手元で簡単に行えるように、市販のゲーム用コントローラを遠隔操作盤として接続・使用できる。

3. ナビゲータ用ソフトウェア

(1) ソフトウェアフレームワーク

ナビゲータ用ソフトウェアは車面上の機器との通信や地図情報を取り扱うなどの多様な情報の入出力とその処理機能を必要とする。このソフトウェアを適用する農用車両や対象とする作物、行う作業・機能（情報表示による運転支援や精密農業支援、自動走行制御）に応じて個別に開発するのは無駄が多い。このため、ナビゲータ用ソフトウェアを開発するに当たって、機能の構成、設定、結果の表示、情報の記録・管理などの共通する基本部分を取りまとめ、効率

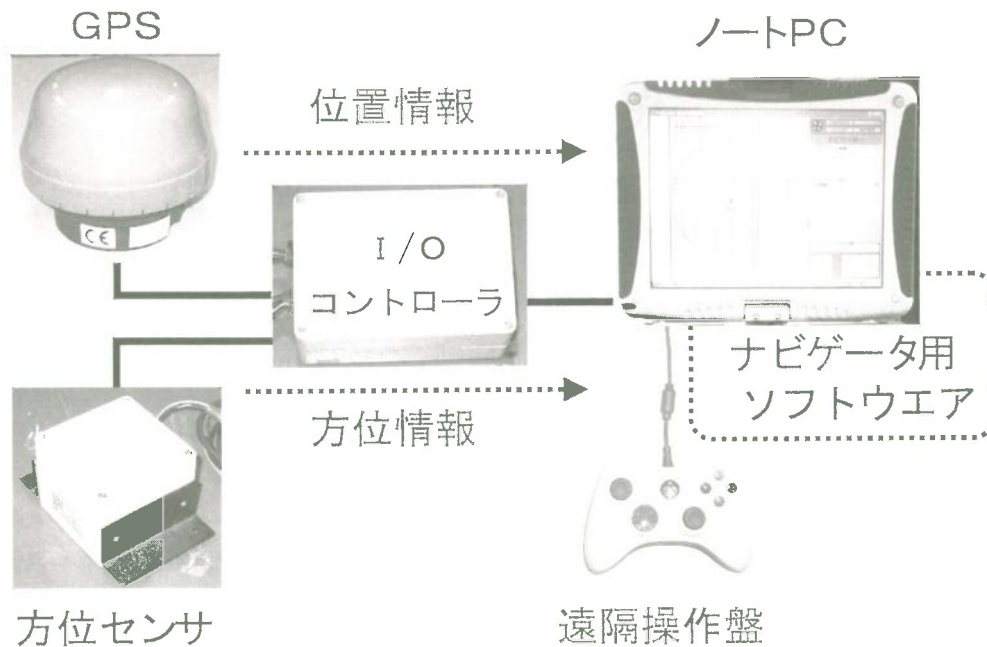


図1 ナビゲータの構成例

的なナビゲータ用ソフトの開発と柔軟な機能拡張を実現できるように、汎用的なソフトウェアフレームワーク（以下フレームワーク）をあらかじめ開発した。開発したフレームワークはナビゲータ用ソフトウェアの一部を構成するクラスライブラリであり、車両や作業機の仕様、PC上のインターフェース、地図情報等のナビゲータを構成する要素をそれぞれモデル化したモジュールとモジュールの生成、編集、保存等の統括、管理を行うモジュールコントローラの2つの要素から構成される。ナビゲータ用ソフトウェアは、このフレームワークのモジュールを拡張するとともに画面に情報を表示する機能及びユーザーインターフェースを追加して開発したものである。また、機能拡張は既存のモジュールを基に新しい機能を追加することにより可能なほか、外部の開発者も機能拡張ができるようになっている。

(2) ナビゲータ用ソフトウェアの機能

ナビゲータ用ソフトウェアは大きく分けて、これから行う作業・機能を選択するメニュー画面、外部との入出力条件の設定や地図情報の読み込み等を行う設定画面、作業中に表示される

ナビゲータ画面の3つの画面から構成されている。

ナビゲータ画面（図2）は車両の現在位置や走行・作業の軌跡、ほ場の区画、推奨経路等の地図情報を表示するマップ部と設定情報等を表示するインジケータ部で構成されている。推奨経路（目標経路）は作業中のほ場の基準方向と外形の頂点、任意の作業幅を基に格子（メッシュ）状に設定・表示され、車両の速度等を考慮して推奨経路に対する車両の相対的な向きと横方向のずれ及び推奨するステアリングの角度を算出し、図示する機能も有している。走行軌跡や航法センサからの情報等の作業情報はすべて記録することができ、作業後にこれらの情報を表計算ソフトやGIS（地図情報）ソフトウェア等で利用することができる。また、ナビゲータ用ソフトウェアにおける一連の操作は遠隔操作盤を使用してオペレータの手元で操作することが可能であり、振動が多く操舵や作業機の操作に集中する必要がある作業中にも容易に操作することが可能になっている。

その他、精密農業支援機能として、収穫時に収量のマップの生成を行い、その結果等を基に施肥作業時にはほ場中の現在位置に応じて施肥量

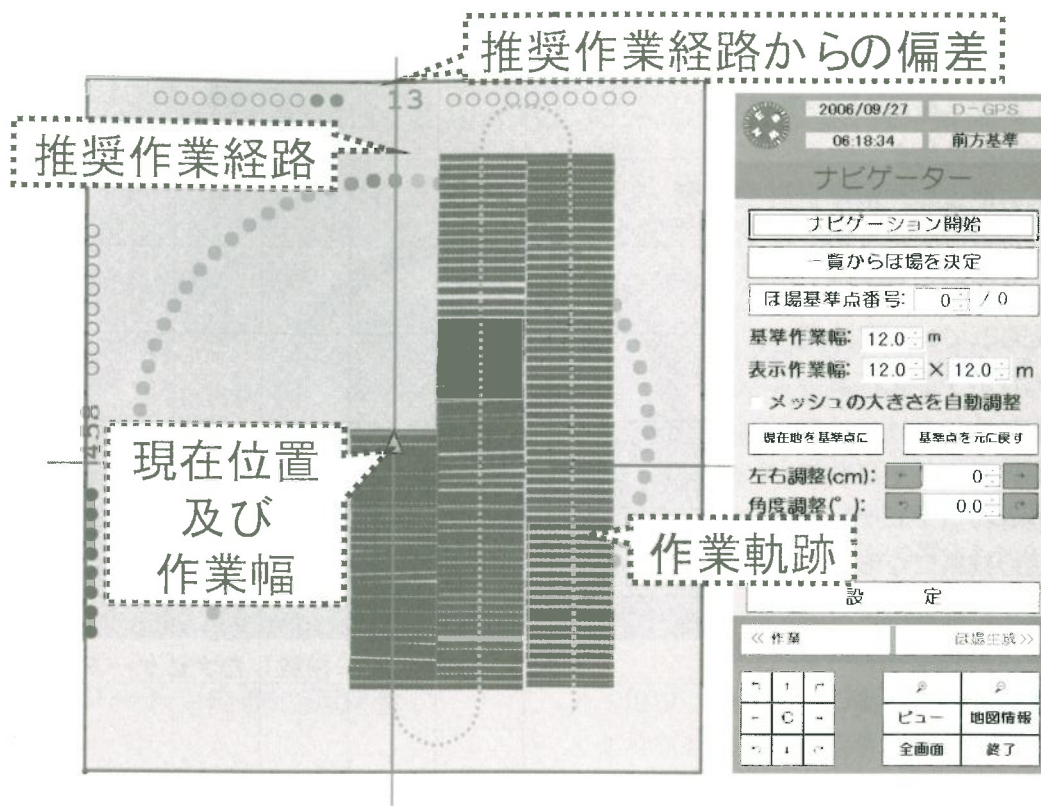


図2 ナビゲータ画面の例

の自動調整を行ったり、水田を均平にする作業において、ほ場中の高低差を表示してより効率的な作業を支援することや、自動走行制御機能として、操舵機構等の自動制御が可能な車両に搭載・接続して、航法センサ等からの情報に基づき自動走行制御を行うことも、本ナビゲータ用ソフトウェアの拡張機能として実施可能となっている。

4. ナビゲータのモニタ試験

ナビゲータの実用性や取扱い性を評価・実証するために、北海道東川町の水稲農家においてモニタ試験を実施した。ナビゲータの構成については、GPSは米Navcom社のStarFireGPSを適用し、ノートPCにはPanasonic ToughBook CF-18を適用した(図3)。延べ約100haの稲作における施肥作業、耕うん作業及び代掻き作業にナビゲータを適用したモニタ試験の結果、ナビゲータは安定して動作・機能することを確認

し、取扱い性についても大きな問題はなく概ね良好な取扱い性を有することを確認した。

試験を行った農家オペレータからは、「ナビゲータは有用であり、今後とも継続して使用したい。」との評価を得た。

5. おわりに

以上、地図情報や作業情報等を運転者に分かりやすく表示して、無駄のない高精度な作業の実施を支援する作業ナビゲータを開発し、農家ほ場においてモニタ試験を行った結果、良好な動作・機能や有用性を確認した。現在、その市販化に向け、ソフトウェアの最終的な改良とGPSや方位センサ等の選定を行っているところである。

ナビゲータは農用車両作業におけるオペレータの負担を軽減すると同時に、作業情報を基にした集落営農や農業法人における共同作業の支援やトレーサビリティへの活用等、農作業の

「見える化」においても大きな役割を果たすものと考えている。また、農業生産においては生産性の向上に加えて安全性や環境への配慮等、相反する課題の解決を同時に求められており、その解決の手段の一つと考えられている農作業の自動化・ロボット化において、運転支援機能だけではなく精密農業支援機能や自動走行制御機能も持つナビゲータはその中核の技術になるものと考えている。今後、ナビゲータをさらに進化させてゆきこれらの課題を実現することで、農業生産への貢献を果たしたいと考えている。

文 献

- 1) Hamada, Y. et al (2004), International Conference "Automation Technology for



図3 トラクタに搭載したナビゲータ

- Off-Road Equipment 2004", P283~291
- 2) 濱田安之ら (2004), 農業機械学会第63回
年次大会講演要旨, P235~236
- 3) 後藤隆志ら (2000), 北米における精密農
業技術の調査, 生研機構, 埼玉

◀地域の先端研究▶

名古屋コーチンのDNA識別法を開発

¹愛知県農業総合試験場, ²独立行政法人 農業生物資源研究所,
³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
 中村 明弘¹・木野 勝敏¹・峰澤 満²・野田 賢治¹・高橋 秀彰³

BSEやトリインフルエンザ, 食肉の偽装販売などといった, ここ数年の畜産物に関わる社会問題により, 消費者の畜産物に対する安全性・信頼性への関心は年々高まっている。こうした中, 黒毛和種や黒豚といった高級ブランドの食肉では, DNAによる識別法がすでに開発され, 偽装表示に対する抑止力や品質保証に役立てられている。そこで, 愛知県の特産地鶏である名古屋コーチンにおいても消費者からの信頼を維持し, さらに高めていくには, DNA識別法の確立が不可欠であったため, その開発に着手した。ここでは, 名古屋コーチンの歴史的背景や生産・普及体制, さらに著者らが共同研究で取り組んできた名古屋コーチンのDNA識別法の開発とその展開について概説する。

1. 名古屋コーチンの歴史的背景

名古屋コーチン（正式な品種名：名古屋種, 図1）は, その美味しい肉と卵で高級ブランドの地鶏として全国的に知られている。この名古屋コーチンは, 明治15（1882）年頃に, 旧尾張藩士の海部莊平・正秀兄弟が, 中国から入手したバフコーチンと尾張地方の地鶏をかけ合わせて生まれた雛の中から, 羽毛が淡い黄褐色（バフ色）の個体だけを選んで作り出されたのが始まりである。その後, 海部兄弟を中心とした養鶏家によって名古屋コーチンの改良は続けられたが, 明治36（1903）年からは, 愛知県が育種改良を担うようになり, 品種としての確立が図られた。その結果, 名古屋コーチンは羽装が固定され, 産卵性能のばらつきも減り, 明治38（1905）年に日本家禽協会によって国産実用品種第1号の鶏として公認された。その後も, 脚毛が除去され, 脚色が鉛色に固定されて, 大正

¹〒480-1193 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字三ヶ峯1-1

²〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2

³〒305-0901 茨城県つくば市池の台2

8（1919）年に中央畜産会によって「名古屋種」と改称された。現在, 名古屋コーチンの育種改良は愛知県農業総合試験場へと引き継がれ, 肥育と採卵の2方向での改良が実施されている。これまでに, 肉用系統2系統（NG2, NG3）と卵用系統2系統（NG1, NG4）の計4系統が確立され¹⁾, それらを系統間で交配した産業用の名古屋コーチンが一般に普及されている。

2. 名古屋コーチンの生産・普及体制

現在, 愛知県における名古屋コーチンの生産・普及体制は, 農業総合試験場畜産研究部が



図1 名古屋コーチン（名古屋種）

育種改良と飼養・衛生の試験研究を、畜産総合センター種鶏場が系統の保存と種鶏の供給を分担して行っている。県から供給された種鶏を使って、名古屋市農業センターと「愛知県重点指導孵化場」と指定された県内5ヶ所の民間孵化場で産業用の雛が生産され、愛知県内の生産者を中心に供給している。生産された肉や卵は、名古屋市を中心とした中京圏はもちろんのこと、関東、関西方面にも出荷され、鶏卵肉販売店、百貨店、大手スーパーを通じて販売、もしくは専門料理店へと運ばれている。

3. 名古屋コーチンDNA識別法の開発

1) 開発に至った経緯

他の農畜産物と同様、消費者の名古屋コーチン鶏肉に対する安全・安心への関心が高まっていく中、一部の名古屋コーチン鶏肉の流通業者では、鶏肉のパック上のラベルに記載された記録からパソコンや携帯電話で生産者を検索できるシステムを導入したり、鶏肉と一緒に名古屋コーチンの特徴である鉛色の脚を付けて販売したりして、品質を保証する取り組みがみられるようになってきた。しかしながら、一方で、多くの流通業者からは黒毛和種²⁾や黒豚³⁾の事例のようにDNAを用いた科学的な検査データで名古屋コーチン鶏肉を証明できないかという声が聞かれるようになっていた。そこで、この要望に応じて、名古屋コーチンのDNA識別法の開発に着手した。

2) 開発にあたっての視点

鶏は牛や豚と異なり一頭当たりでの経済価値が低く、さらに大群で飼育管理されているので、牛肉のトレーサビリティ制度の中で実施されている個体識別によるDNA検査を鶏肉で適用すると、検査作業や費用が膨大となり、現実的ではない。そのため、鶏肉のトレーサビリティにおいては、系統や品種といった大きな集団単位でのDNA識別法が実用的であると考えられた。

そこで、著者らはDNAを用いて名古屋コー

チンと他の鶏を見分けることができるか検討するため、初めに、名古屋コーチンに特有なDNA配列が存在するか調査した。まず着目したのが、黒豚の識別法で用いられた毛色関連遺伝子³⁾のような、名古屋コーチンの身体的特徴に関わる遺伝子であった。しかしながら、名古屋コーチンに特徴的な形質である鉛色の脚色や黄褐色（バフ色）の羽色は他の実用品種の中にも存在することが知られていて、候補となる形質が見当たらなかった。また、鶏は牛や豚よりも数多くの実用品種が存在し、さらにお互いの遺伝的類縁関係も比較的近いこともあって、特定のDNA配列に焦点を絞ることは極めて困難な状況であった。

3) マイクロサテライトDNAマーカーへの着目

次に、著者らは鶏の遺伝的類縁関係を調査するツールとしても広く利用されているマイクロサテライトDNAマーカーに着目して、名古屋コーチンのDNAに特徴が見られるか調査した。そこで、産業用の名古屋コーチンの生産に利用している4系統（NG1, NG2, NG3, NG4）を用いて、マイクロサテライトDNAマーカー25個（それぞれのマーカーが異なる染色体に存在する）のアレル（対立遺伝子）タイプを調査した。その結果、5つのDNAマーカーで、それぞれ1種類のアレルに固定していることを発見した（表1）。そして、これらの5つのマーカーを用いて、名古屋コーチンと他の鶏とのアレルタイプを比較することで、それらの間にDNAレベルでの差異が見られるのではないかと、という考えが生まれた。

4) 名古屋コーチン識別用DNAマーカーの発見

この考えを証明するため、名古屋コーチン以外の純粋種（7種）、名古屋コーチン交雑種（8種）及び市場のプロイラー鶏肉の計448サンプルにおいて、5つのマイクロサテライトDNAマーカーのアレルタイプを調査した。そ

して、その調査データをもとに、5マーカーのうちで表1に示すアレルと異なるものが一つでも検出されたら、「名古屋コーチンではない」と判定する方法をとった。その結果、表2に示すように、すべてのサンプルにおいて、名古屋コーチンと異なるアレルが一つ以上検出され、「名古屋コーチンではない」と判定された。以上のことから、5つのマイクロサテライトDNAマーカーを用いることで、高精度に名古屋コーチンか否かをDNA識別できることが明らかになった。

表1 名古屋コーチンのDNA識別に利用可能なマーカー

マーカー	マーカーの存在する染色体	アレルの長さ(塩基対)
ABR0495	10	230
ARB0257	17	327
ADL0262	23	106
ABR0015	27	262
ABR0417	Z	122

4. 今後の展開について

著者らの報告にも詳細に記述されているように、開発された名古屋コーチンのDNA識別法は100%の精度ではないが、高い信頼度での識別を行うことが可能である。そのため、この方法は、黒毛和種や黒豚の事例と同様、検査データを名古屋コーチン鶏肉の品質保証として利用したり、偽装販売に対する「抑止力」としてのDNA検査に活用されたりしていくものと考えられる。今後、この技術が普及すれば、名古屋コーチン鶏肉の流通過程（農場～食鳥処理場～卸売業者～小売業者）の透明化が進み、その結果、消費者はこれまで以上に名古屋コーチンに対して厚い信頼を寄せるようになって、名古屋コーチンのブランド力はより強固になると期待される。このようにして、この技術は名古屋コーチン関連産業全体の更なる活性化と発展に大きく貢献できると考えられる。

表2 実証試験結果

サンプル	調査羽数	判定		識別率
		名古屋	名古屋でない	
純粋種 (7種)	130	0	130	100%
名古屋コーチン交雑種 (8種)	223	0	223	100%
市販プロイラー	95	0	95	100%

純粋種：白色レグホーン、ロードアイランドレッド、白色プリマスロック (2系統)、レッドコーニッシュ、横斑プリマスロック、ニューハンプシャー

名古屋コーチン交雑種：白色レグホーン♂×名古屋♀、ロードアイランドレッド♂×名古屋♀、白色プリマスロック (2系統)♂×名古屋♀、レッドコーニッシュ♂×名古屋♀、名古屋♂×白色レグホーン♀、名古屋♂×ロードアイランドレッド♀、名古屋♂×白色プリマスロック (1系統)♀

5. おわりに

この名古屋コーチンのDNA識別法は、「愛知県が開発し、普及している名古屋コーチン」とはっきりと証明できるツールとして活用してもらうために開発された。従って、「愛知県が開発し、普及している名古屋コーチン」を扱っている生産者や流通業者がこの手法による検査結果を商品の証明として有効に活用し、ブランド価値を高めていくことを期待している。

本研究は、財団法人伊藤記念財団研究助成金「地域特産鶏肉のDNA識別手法の開発」及び農林水産省委託プロジェクト「食品の安全性及び機能性に関する総合研究」の助成によって実施された。ここに深く感謝いたします。

文 献

- 1) 中村明弘ら (2001), 動物遺伝資源探索調査報告, 12, 77-97
- 2) Sasazaki, S. et al. (2004), *Meat Science*, 67 (2), 275-280
- 3) Okumura, N. et al. (2000), *Animal Science Journal*, 71 (8), J222-J234
- 4) Nakamura, A. et al. (2006), *Poultry Science*, 85, in press



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ンの研究の現状と展望……………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・金児-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)

◀文献情報▶

凍結保存マウス生殖器あるいはマウス個体から回収した精子あるいは精子細胞を用いて正常な産子を得ることができる

Spermatozoa and spermatids retrieved from frozen reproductive organs or frozen whole bodies of male mice can produce normal offspring.

Narumi Ogonuki¹, Keiji Mochida¹, Hiromi Miki¹, Kimiko Inoue¹, Martin Fray², Takamasa Iwaki³, Kazuo Moriwaki¹, Yuichi Obata¹, Kazuto Morozumi⁴, Ryuzo Yanagimachi⁴, and Atsuo Ogura¹

¹Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN) Bioresource Center, Tsukuba, Ibaraki 305-0074, Japan; ²Medical Research Council Mammalian Genetics Unit, Oxfordshire, OX11 0RD, United Kingdom; ³Jikei University School of Medicine, Tokyo 105-8461, Japan; and ⁴Institute for Biogenesis Research, University of Hawaii School of Medicine, Honolulu, HI 96822

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 13098-13103 (2006)

雄生殖細胞の凍結保存技術は、生体医学研究に重要な動物種や系統を保存するための手段として不可欠であるとともに、動物の増殖のためにも広く用いられている。今日まで多数の遺伝子改変マウス等が生み出されているが、多数の系統を保存していくためには、単純、低コスト、省スペースの観点から、マウス精子の凍結保存が不可欠となっている。マウス精子の凍結には、一般的にはラフィノースとスキムミルクが凍結保護剤として用いられているが、ある系統の精子は凍結融解後に受精能を失うことが知られている。ただし、成熟卵子透明帯に切り込みを入れて体外受精を実施することによって、あるいは、凍結融解精子や凍結乾燥精子を顕微受精することによって産子を得ることは可能となっている。マウス精子の最も単純な凍結方法は、凍

結保護剤を用いずに単純組成の溶液で凍結することである。もちろん、このような方法で凍結後に融解した精子は運動性を失っているため体外受精等では産子を得ることはできないが、遺伝情報は保持しているため、顕微受精によって産子を得ることは可能である。そこで、Ogonukiらは、精巣上体、精巣あるいは個体を凍結保護剤を用いずに単純に凍結することによって、マウス雄生殖細胞を凍結保存可能かどうかの検討を行った。すなわち、マウスから生殖器を取り出し、1週間から1年間、-80度で凍結保存した。その後、融解した生殖器から精子や精子細胞を回収し、顕微受精を実施したところ、系統(ICR及びC57BL/6で検討)に関係なく、正常な産子が得られた。また、凍結し、海外の研究室に空路輸送した精巣上体及び精巣を用いて、C57BL/6の純系産子が得られた。さらに、-20度で15年間凍結保存したBALB/c nude及びC3H/He系統の個体から回収した精巣精子の顕微受精によって正常産子が得られた。以上の結果から、雄生殖器あるいは雄個体の凍結保存は、雄生殖細胞の保存方法として最もシンプルな方法であることが明らかとなった。

精子の長期保存技術は、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。今回、生殖器や個体を単純に凍結保存し、そこから回収した精子や精子細胞由来を用いた顕微受精により産子が得られることが明らかとなったこと、また、冷凍庫があればどこでも保存可能であることなどから、生殖器や個体の凍結保存は、雄生殖細胞の簡易な保存方法のひとつとして期待される。今回はマウスにおける実験であったが、他の動物種においても再現可能かどうかの検討が今後必要である。

(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▶

PDI過剰発現による*Pichia pastoris*でのタンパク質分泌性向上

Enhancement of Protein Secretion in *Pichia pastoris* by Overexpression of Protein Disulfide Isomerase

Mehmet Inan, Dinesh Aryasomayajula, Jayanta Sinha & Michael M. Meagher

Biological Process Development facility, Department of Chemical Engineering, University of Nebraska

Biotechnology and bioengineering Vol.93, No.4, 771-778 (2005)

メタノール資化性酵母, *Pichia pastoris*は, タイトに制御可能なAOX1 Promoter, 高密度培養などの特徴から異種タンパク質の発現系として高い成功を取めている。また, S-S結合等の転写後修飾を必要とする治療用タンパク質の生産にも適している。

多くのタンパク質において発現形式は, 精製の容易さや分泌経路を通しての翻訳後修飾の点から, 目的タンパク質を細胞外に分泌することが理想的である。組み換えタンパク質の発現向上のための基本的な操作は使用コドン最適化や遺伝子量の増加である。しかし, 非適正環境でのタンパク質過剰発現は, タンパク質のミスフォールディングに帰着する, 分泌経路の飽和等の有害な問題になりうる。分泌経路に向かうタンパク質のフォールディングはER内で起こる。フォールディング過程の初期段階で起こるS-S結合はたびたび誤っている (システインが誤対合するか, S-Sが異なった時間的順序で形成し, 埋もれたシステインの酸化を困難にするため)。これらのエラーを修正するため, 誤ったS-Sを破壊し, 新たに異なった形態として形成させなければならない。Protein Disulfide Isomerase (PDI) は57kDaのタンパク質で, CGHCドメインと基質結合部位によるイソメラーゼ活性により, リフォールディング経路を根本的には変更することなく, 誤ったS-S結合を再構築する。

PDIを過剰発現することにより酵母や大腸菌

で発現した組み換えタンパク質の分泌は向上したとの報告がある。

鉤虫感染に対するワクチンとして期待される *Necator americanus* secretory protein (Na-ASP1) ;アメリカ鉤虫分泌タンパク質は*P. pastoris*で生産されている。

Na-ASP1は20個のシステインを含む45kDaのタンパク質である。*P. pastoris*においては, *S. cerevisiae*の *amating-factor* pre-pro配列と結合させ細胞外へ分泌した。

シングルコピークローンで生産されたタンパク質の大部分は細胞外へ分泌されるが, *P. pastoris*ゲノム内のNa-ASP1のコピー数が増加すると分泌能力のキャパシティーが飽和状態となり, マルチコピーであるクローンにおいて分泌されるタンパク質の量は逆に減少することを確認した。そこで, マルチコピーのNa-ASP1を持つ*P. pastoris*株にマルチコピーでPDIを導入した際の効果について検討を行った。

Na-ASP1コピー数1~4の株において, いずれもPDIコピー数増加により元の株と比べて分泌量は増加を示した。最も高い分泌量を示したものは, Na-ASP1が2コピーだが, PDIを8コピー持つ株であり, Na-ASP1を4コピー・PDIを4コピー持つ株よりも高い値を示した。しかし, PDI過剰発現により最も分泌の向上性がみられたのはNa-ASP1を4コピー持つ群であった。しかし, Na-ASP1とPDIを過剰発現させた*P. pastoris*クローン内でさえ, Na-ASP1の細胞内蓄積は起こっていた。

本研究でS-S結合を含む組み換えタンパク質の分泌のためには, PDIのRefolding活性が重要であることが明らかとなった。PDIの過剰発現は小胞体で起こる一般的なミスフォールディングを改善できるかもしれない。

さらに今回開発した技術は*P. pastoris*での他のタンパク質発現に応用できるであろうし, *P. pastoris*の分泌経路を理解する手助けになるであろう。

(抄訳: 和田純平, WADA Junpei, 広島大学大学院生物圏科学研究科)

◀文献情報▶

リパーゼを用いた選択的エステル化によるエイコサペンタエン酸 (EPA) の濃縮

Concentration of Eicosapentaenoic Acid by Selective Esterification Using Lipases

Ramirez Fajardo A., Esteban Cerdan L., Robles Medina A., Munio Martinez M.M., Hita Pena E., Molina Grima E.

Departamento de Ingenieria, Universidad de Almeria, Almeria, Spain

Journal of American Oil Chemists' Society, 83 (3), 215-221 (2006)

DHA, EPA等の魚介類に豊富に含まれる高度不飽和脂肪酸は、動脈硬化や高脂血症の改善等の有益な生理作用で知られている。このため、以前よりこれら高度不飽和脂肪酸の効率的な利用について多くの研究がなされてきた。酵素リパーゼを利用してDHA, EPAの含量の低い油脂からDHA, EPAを濃縮することについても多くの報告例があり、この度紹介するFajardoらの研究もリパーゼによるEPAの濃縮を試みたものである。

この研究でFajardoらは、脂肪酸 (FFA) 混合物とラウリルアルコールをリパーゼにより選択的にエステル化させ、EPAをFFA中に濃縮させた。リパーゼについては市販されている9種類 (Lipase QLMex, Lipase OFex, Lipase EU-034, Lipase EU-093, Lipase M, Lipase D, Lipase AK, Lipozyme RMIM, Novozym 435) について試験を行い、Lipase AKがEPA濃度の上昇率並びにEPA収率の観点から最も効率良くEPAを濃縮できることを見出し、温度、基質モル比、溶媒/基質比について同酵素によるEPA濃縮を最も効率良く行う条件を求めた。

この研究における最も効率の良いリパーゼ反応条件の導き方はとても興味深い。Fajardoらは、今回のEPA濃縮系においてリパーゼの基質選択性に注目した。基質選択性すなわち酵素反応の進行度合い (エステル化率) により

FFA中のEPA濃度及びEPA収率が決定されるとし、まず最も効率良くEPAを濃縮できるエステル化率を決定している。EPA濃縮の効率については、EPA濃度上昇及びEPA収率の積を指標とすることで、エステル化率に対して一元的に評価できた。市販されている高濃度のEPA魚油 (EPA43%) におけるEPA濃縮ではエステル化率60%程度でEPA濃縮の効率を最大化でき、EPA濃度、EPA収率ともに約70%程度を得た。温度、基質モル比、溶媒/基質比等の諸条件は酵素の基質選択性に関与するものではないとし、各々最も酵素反応に適した条件で目的とするエステル化率になるよう条件を調整して最もEPA濃縮に効率の良い反応条件を求めた。

温度、基質モル比、溶媒/基質比等の各条件についてEPA濃度、EPA収率を求め多元的評価して反応条件を決定する従来の手法に比して、Fajardoらの手法は非常に効率的である。同様の手法を取り入れることで、リパーゼを用いた油脂加工における研究開発の速度、効率性が向上することを期待したい。

(抄訳：山口秀明, YAMAGUCHI Hideaki, 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



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—ライフサイバヤー……………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ミ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 友一朗)
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)

編集後記

第118号をお届けします。本号の総説等では、わが国の食品産業、酒造業に馴染みの深い麹菌を取り上げ、町田雅之氏（(独)産業技術総合研究所）に麹菌ゲノム解析の完了と今後の展望、北本勝ひこ氏（東京大学）にタンパク質工場としての麹菌の利用、岩下和裕氏（(独)酒類総合研究所）に麹菌の固体培養環境下でのタンパク質生産機構の解析等について概説して載せました。

その他の研究情報としては、馬建鋒氏（岡山大学）にイネケイ素吸収遺伝子の同定、高林純示氏（京都大学）らにアワヨトウの昼夜判別に関する新発見、近藤宣昭氏（(株)三菱化学生命科学研究所）に哺乳類の冬眠をコントロールするホルモン、長嶋比呂志氏（明治大学）らに新たな方法によるトランスジェニックブタの作出、濱田安之氏（生研センター）に作業ナビゲータ、中村明弘氏（愛知県農業総合試験場）らに名古屋コーチンのDNA識別法の開発と、それぞれ興味深く貴重な研究情報をご紹介載せました。

また、本号の文献情報は、下司雅也氏（畜産草地研究所）、和田純平氏（広島大学）、山口秀明氏（日本水産(株)）にご執筆載せました。

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118号

平成18年11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