

# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成19年3月15日発行（隔月1回15日発行）

ISSN 1345-5958

## TECHNO NEWS

# No.120

15 MARCH, 2007

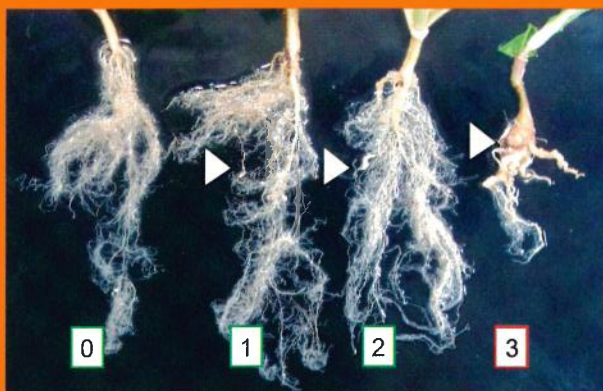
### ブレインテクノニュース



根こぶ病に罹病したハクサイ



抵抗性系統G004（上）とマーカー選抜により、2個の抵抗性遺伝子を導入したハクサイ（右）



根こぶ病の発病指数

0：発病なし，1：側根に単独のこぶ，2：側根に連続したこぶ，3：主根にこぶ（矢印はこぶを示す）

## 特集「DNAマーカー選抜による効率的育種」2 ハクサイ根こぶ病高度抵抗性系統の効率的選抜技術の開発

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
野菜茶業研究所 松元 哲

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

## 特 集「DNAマーカー選抜による効率的育種」

- |   |  |    |
|---|--|----|
| 1 | DNAマーカー選抜による高度病害虫抵抗性ダイズの育成 .....       | 1  |
|   | 石本 政男 ((独)農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター) |    |
| 2 | ハクサイ根こぶ病高度抵抗性系統の効率的選抜技術の開発 .....       | 7  |
|   | 松元 哲 ((独)農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所)      |    |
| 3 | おいしく、食べやすく、病気に強い果樹の品種開発の効率化 .....      | 12 |
|   | 山本 俊哉 ((独)農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所)       |    |

## 国内情報

- |  |   |    |
|--|---|----|
|  | イネキチンエリシター受容体の発見と同定 .....                                       | 18 |
|  | 賀来 華江・渋谷 直人 (明治大学 農学部生命科学科)                                     |    |
|  | 植物の新規ペプチドホルモンの発見とその利用の可能性 .....                                 | 23 |
|  | 福田 裕穂 (東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻)                                   |    |
|  | スズメバチの繭から創る新シルク素材の開発 — ホーネットシルク研究の最前線 — .....                   | 28 |
|  | 亀田 恒徳・玉田 靖 ((独)農業生物資源研究所)                                       |    |
|  | いも類の収穫前茎葉処理機の開発 .....   | 33 |
|  | 貝沼 秀夫・青木 循・久保田 興太郎・安食 恵治 ((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

- |  |                                  |    |
|--|----------------------------------|----|
|  | 静電気を利用して農薬の付着性向上に役立つ散布機を開発 ..... | 38 |
|  | 山根 俊 (静岡県農業試験場 園芸部)              |    |

## 文献情報

- |  |   |    |
|--|---|----|
|  | ブタ卵子からのデモコルシン処理を併用したハンドメイド除核 .....  | 43 |
|  | J. Li et al. ( <i>Cloning And Stem Cells</i> , 8, 241-250, 2006) 抄訳: 下司 雅也  |    |
|  | 葉緑体は一酸化窒素の給源 .....  | 44 |
|  | S. Jasid et al. ( <i>Plant Physiology</i> , 142: 1246-1255, 2006) 抄訳: 岩井 純夫 |    |
|  | 老化研究モデルとしての長寿命酵母 .....  | 45 |
|  | P. W. Piper ( <i>Yeast</i> , 23, 215-226, 2006) 抄訳: 家藤 治幸                   |    |
|  | 飼料中の脂質量及び共役リノール酸がアトランティックサーモンでの脂質代謝酵素活性及び<br>遺伝子発現に及ぼす影響 .....              | 46 |
|  | S. R. Kennedy et al. ( <i>Lipids</i> , 41 423-436, 2006) 抄訳: 竹村 秀平          |    |

- |  |   |    |
|--|---|----|
|  | 生研センターからのご案内 (平成19年度民間実用化研究促進事業のお知らせ) ..... | 47 |
|--|---|----|

## 表紙の説明

根こぶ病はアブラナ科野菜にとって難防除病害の一つである。根こぶ病に対して高度な抵抗性を有する品種の育成を図るため、筆者らは、DNAマーカーと根こぶ病抵抗性の情報によりQTL解析を行い、2つの抵抗性遺伝子座に連鎖するDNAマーカーを見出した。さらに、これらのマーカーを用いて、宿主範囲の広い菌株に抵抗性を付与できる選抜方法を開発した。この選抜法の採用により、抵抗性検定や汚染圃場での検定の大幅な省略化と育種規模の拡大が期待される。詳細については、7頁をご覧ください。

◀特集▶ 「DNAマーカー選抜による効率的育種」 1

## DNAマーカー選抜による 高度病害虫抵抗性ダイズの育成

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
北海道農業研究センター  
石 本 政 男

ゲノム上の塩基配列は品種や系統によって固有なものであり、そのような塩基配列の違いをDNA多型という。DNA多型は品種の識別に利用可能であるとともに、目印（マーカー）として遺伝分析に利用できる。重要な形質と連鎖したDNAマーカーは、表現型によらない選抜マーカーとして育種の効率化や高精度化に利用できるため、様々な作物で開発が進められている。ダイズにおいては、収量の安定性向上を目指して、病害虫抵抗性遺伝子の選抜用DNAマーカーが開発され、品種育成への利用が始まっている。

### 1. はじめに

日本から朝鮮半島、中国にかけての東アジアに起源するダイズは、油脂・タンパク質源として世界的に重要性が高まっている。全世界でのダイズ生産量は米国やブラジルなどの主産地を中心に約2.2億トン（2005年）に達し、主要穀類の中でトウモロコシ、コムギ、イネに次いで第4位である。ここ10年間で生産量は約1.6倍に増加し、他の穀類と比較して著しく高い伸びを示している。一方で、かつて輸出国であった中国が輸入国に転じ、バイオディーゼルのような代替燃料生産との競合も生じていることから、世界的に需給が逼迫し、国際価格が高騰している。ダイズの世界平均単収は、1996年から除草剤耐性ダイズの商業栽培が開始されたこともあり、この20年間で1.4倍に増え、2.4トン/haに達している。一方、日本の平均単収は1.7トン/ha（2006年）であり、冷害や風水害などの自然災害による減収を差し引いても、この20年間ほとんど向上していない。このため、日本での自給率（2005年）は約5%、食用に限っても21%であり、国産ダイズの安定生産を可能にする品種の開発が強く求められている。

減収の要因の一つとして病虫害がある。ダイ  
ISHIMOTO Masao

〒062-8555 札幌市豊平区羊ヶ丘1

ズはその生育中に地域や栽培法によって様々な病害虫の攻撃にさらされる。主要な病害虫であるダイズシストセンチュウ、ハスモンヨトウ、ジャガイモヒゲナガアブラムシやダイズモザイクウイルスの発生面積は延べ約34,000ha（平成15年度）に達し、ほとんどの在来品種はこれらに対して抵抗性が不十分なため、収量や品質の著しい低下を蒙（こうむ）ってきた。しかし、長年にわたる広範な探索の結果、抵抗性を示すダイズ品種や系統（遺伝資源）が見つげ出され、実用品種への利用が進められている。ところが、このような遺伝資源は現代の栽培品種と比較して栽培特性や品質などの農業上重要な形質が不良であることが多く、抵抗性の導入に付随して持ち込まれるこれらの不良形質の除去に多大な労力が必要となる。さらに、病害虫の発生が天候等により不安定なため、抵抗性の評価に長い年数がかかることもある。そこで、「有用遺伝子活用のための植物（イネ）・動物ゲノム研究—DNAマーカーによる効率的な新品種育成システムの開発」プロジェクトのダイズチームでは、北海道農業研究センター、九州沖縄農業研究センター、東北農業研究センターなどの農業・食品産業技術総合研究機構の研究チームに加えて、北海道立中央農業試験場や北海道立十勝農業試験場、千葉大学などのダイズ研究者も加わって、抵抗性を遺伝形質として解析し、抵

抗性遺伝子に近接する特定の遺伝子配列を判別し、それを目印（DNAマーカー）として、耐病・耐虫性をもったダイズを選抜する育種システム（DNAマーカー選抜育種）の開発を進めた（<http://nics.naro.affrc.go.jp/press/press-21.html>）。

## 2. ダイズにおけるDNAマーカー情報

ダイズはそのゲノムサイズが比較的大きく（約1,120Mb）、4倍体に由来すると推定されるゲノムの重複領域が散在し、ゲノム構造が複雑である<sup>1)</sup>。当初、ゲノムDNAやcDNAクローンをプローブとして多型を検出するRFLP（restriction fragment length polymorphism）マーカーによって分子連鎖地図が作製されてきた。しかし、検出が煩雑である上に、単一のクローンが複数の遺伝子座に対応することがある。そのため、ゲノム上の特定の領域に由来するATやATTなどの単純繰り返し配列であるSSR（simple sequence repeat）を利用したマーカーが開発され、連鎖地図の作製が急速に進展した。最近、米国農務省の研究者らは5つの連鎖地図を統合し、総計1,849のDNAマーカーからなる、ダイズの染色体数20と一致する分子連鎖地図を報告した<sup>2), 3)</sup>。連鎖地図の総延長は2,523.6cM、SSRマーカーの平均間隔は2.5cMである。また、日本では、千葉大を中心に独自のDNAマーカーが開発され、日本品種を用いて分子連鎖地図が作製された<sup>4)</sup>。ダイズチームではこれら日米で開発されたDNAマーカーを用いて、病害虫抵抗性遺伝子との関連を解析した（図1）。

## 3. ヒメシラズに由来するハスモンヨトウ抵抗性

九州などの西南暖地でのダイズ栽培では、ハスモンヨトウの幼虫による被害が大きな問題となる。九州沖縄農業研究センターでは、遺伝資源に抵抗性の探索を進め、「ヒメシラズ」に幼

虫の成長量を低下させる抗生性を見いだした。しかし、評価が難しいうえに、その程度は交配後代で連続的に分離し、抵抗性遺伝資源の農業形質が劣悪であることから、抵抗性品種の育成はなかなか進まなかった。そこで、抗生性の評価法の開発に取り組んだ<sup>5)</sup>。脱皮直後の6令幼虫に評価する個体の葉を蛹化するまで毎日与え、蛹化迄期間と蛹重を測定した。さらに、幼虫の雌雄の差を補正するために抗生性指数（蛹重/蛹化迄期間）を考案し、評価に用いた。感受性品種である「フクユタカ」×「ヒメシラズ」に由来する分離世代のF<sub>2</sub> 143個体を用いて、抗生性指数を指標として、QTL（quantitative trait locus）解析を行ったところ、連鎖群Mに2つのQTL（*qCCW-1*と*qCCW-2*）が見いだされた<sup>6)</sup>。DNAマーカーを用いて優良品種「フクユタカ」を遺伝背景として抵抗性遺伝子のうち前者あるいは両者を有するNIL（準同質遺伝子系統）を開発した。これらのNILでは戻し交配親である「フクユタカ」と比較してハスモンヨトウの摂食量が明らかに減少しており、被害の軽減が期待できる（図2）。現在、これら抵抗性系統の品種化を目指して、各種農業関連形質の調査が進められている。

## 4. ダイズシストセンチュウ抵抗性に関する4つの遺伝子座

ダイズシストセンチュウは東アジアはじめ北米や南米に広く分布し、北米だけで年間10億ドルに達する被害が出ていると推定されている。国内外において、ダイズシストセンチュウに対する抵抗性遺伝資源の探索が行われ、「Peking」や「下田不知（げでんしらず）」等の抵抗性品種が見出されている。「Peking」が示す高度抵抗性は、独立した3つの劣性遺伝子（*rhg1*, *rhg2*, *rhg3*）と優性遺伝子（*Rhg4*）の関与が報告されている。高度抵抗性には4つの遺伝子が必要であることから、以前からDNAマーカーによる選抜が検討されてきた。このうち効果が大きく、主要な抵抗性遺伝子と考えられる

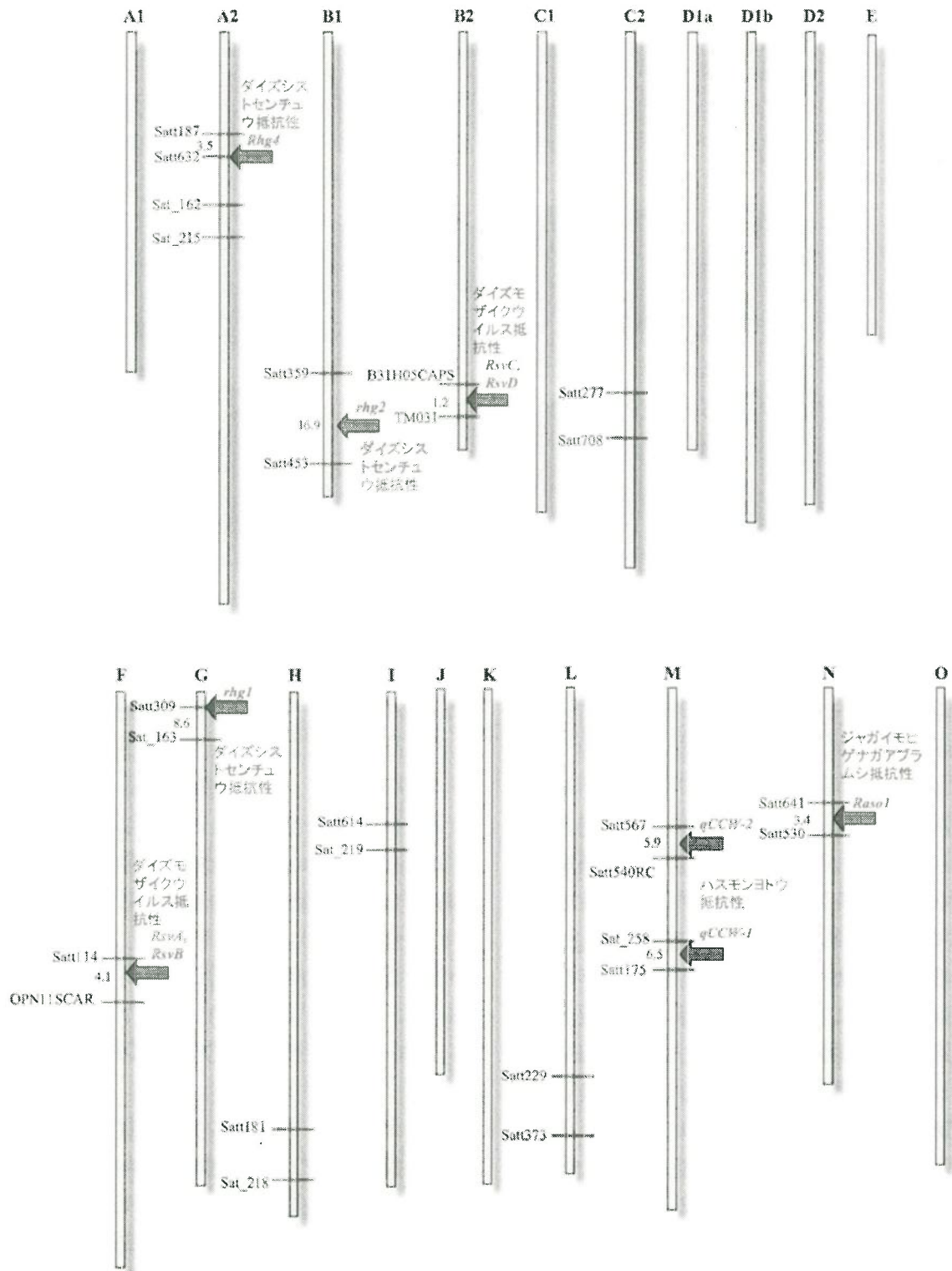
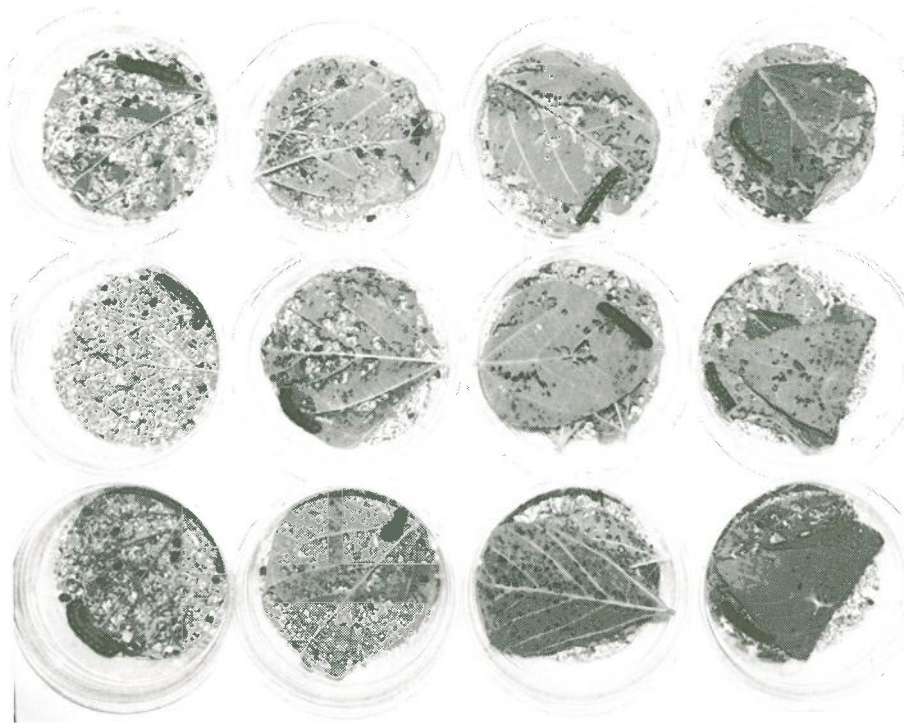


図1 ダイズ連鎖群上の病害抵抗性遺伝子座と近接したDNAマーカー  
各連鎖群の上にあるアルファベット (A1からO) は連鎖群名を示す。Satt187などは  
DNAマーカーの名称、遺伝子記号の頭文字qは量的遺伝子座を示す。



フクユタカ NIL-1 (九系 356) NIL-2 (九系 357) ヒメシラズ

図2 ハスモンヨトウによる被食程度の比較

抗生性の検定開始後3日目、葉を与えてから20時間後の状況。2系統の準同質遺伝子系統(NIL)では摂食量が明らかに減少している。(原図：小松)

*rhg1*と*Rhg4*はそれぞれ連鎖群GとA2に座乗している(図1)。<sup>7)</sup>北海道立十勝農業試験場では、「Peking」系の抵抗性を持つ「PI84751」を用いて残りの2つの抵抗性遺伝子*rhg2*と*rhg3*の解析を進め、*rhg2*が連鎖群B1に座乗することを明らかにした。一方、「下田不知」の抵抗性は3つの劣性遺伝子(*rhg1*, *rhg2*, *rhg3*)によって支配されていることを確認した。「PI84751」がダイズシストセンチュウのレース1とレース3に対して抵抗性を示すのに対し、「下田不知」はレース3にのみ抵抗性を示す。それぞれに由来する抵抗性遺伝子をもった系統の交配後代の解析から、*rhg2*と*rhg3*の効果が共通であるのに対し、*rhg1*の効果はレース特異的であり、「下田不知」の*rhg1*は「PI84751」の*Rhg4*と組み合わせてもレース1に対して抵抗性を示さないことが明らかになった。そこで、レース3抵抗性品種である「ユキ

ホマレ」を戻し交配親として、DNAマーカーによる選抜を行い、レース1にも抵抗性を示す系統の育成が進められている。すでに、農業形質の優れた系統に地方番号を付し、品種化に向けた調査が行われている。

## 5. ダイズモザイクウイルス抵抗性

ダイズモザイクウイルス(SMV)によるモザイク病は、ダイズの主要な病害の一つである。罹病した場合は、収量が低下するばかりでなく、種皮に褐斑を生じ、子実品質を著しく損なう。国内のSMVはAからEの5つの病原型に分類され、北海道を除く全国でAおよびB系統が発生し、東北南部や関東地方ではCおよびD系統も発生することから、これらの地域では4系統に対して抵抗性を有する品種の栽培が不可欠である。東北農業研究センターでは、「ネマシラズ」

に由来するAおよびB系統に対する抵抗性と「Harosoy」に由来するCおよびD系統に対する抵抗性の遺伝解析を行った。SMVはアブラムシによって媒介されるため、自然発生による検定では効率が悪い。そのため、各病原系統に罹病した葉片を接種源とした人工接種技術を開発するとともに、病徴の観察やELISA法あるいはDIBA (Dot immuno-binding assay) 法により抵抗性の判定を高精度に行った。その結果、AおよびB系統に対する抵抗性遺伝子 (*RsvA*, *RsvB*) は連鎖群Fに、CおよびD系統に対する抵抗性遺伝子 (*RsvC*, *RsvD*) は連鎖群B2に座乗することが明らかにされた (図1)。2つの病原系統に対する抵抗性遺伝子がそれぞれ同じ場所に位置づけられたことから、1つの遺伝子あるいは密接に連鎖した複数の遺伝子がこれらの抵抗性に関与しているものと考えられる。米国と日本では病原型の分類が異なるため、直接比較できないが、米国で研究されているSMVに対する抵抗性遺伝子である *Rsv1* が *RsvA*, *RsvB* と同じ位置に<sup>8)</sup>, *Rsv3* が *RsvC*, *RsvD* と同じ位置に座乗することから<sup>9)</sup>, 同一の遺伝子である可能性が高い。これらの抵抗性遺伝子を挟み込むDNAマーカーを開発できたことにより、年2回の戻し交配が可能になり、抵抗性を集積した系統の育成が進められている。

## 6. ダイズわい化病ウイルスを媒介するジャガイモヒゲナガアブラムシに対する抵抗性

ダイズわい化病は、ジャガイモヒゲナガアブラムシが媒介するウイルス病であり、北海道から東北北部のダイズ生産における重大な病害である。北海道立中央農業試験場では、1996年からダイズわい化病が激発する現地選抜圃において抵抗性遺伝資源の探索を行った。その結果、これまでに調査した約3,100品種・系統から、「Adams」や「黄宝珠」などの圃場抵抗性を有する品種・系統が見いだされた。このうち「Adams」の抵抗性を仔細に解析したところ、

生育初期の植物体上でアブラムシの生育が阻害され、発病率の低下をもたらすことが明らかになった。このアブラムシに対する抵抗性は1つの優性遺伝子に制御されており、この遺伝子は *Raso1* と名付けられた。*Raso1* は連鎖群Nに座乗しており、この遺伝子座を挟み込むDNAマーカーが開発され、DNAマーカー選抜育種に利用されている (図1)。さらに、最近、病原ウイルスに抵抗性を示す遺伝資源が見つかり、遺伝解析が進められている。将来は病原ウイルスとその媒介者に対する両抵抗性遺伝子を組み合わせることにより、高度に安定した抵抗性をもつ品種が育成されるものと期待される。

## 7. 今後の展望

今回紹介した病害虫抵抗性の成果は、抵抗性の評価手法の開発から遺伝資源の探索、そして、遺伝資源を利用した品種育成に至る膨大な研究蓄積に、DNAマーカーを用いた解析手法を取り入れることにより花開いたものである。形質の評価法の確立や遺伝資源の探索は地道な研究であるが、このような研究蓄積がない限り、育種的な対応は不可能である。耐湿性や機械化適性などの重要形質についても、検定法を開発し、遺伝資源の探索を進めていく必要がある。

一方で、現在、選抜に使用しているDNAマーカーでは目的遺伝子との間が離れており、不良形質が紛れ込んでしまうことが懸念される。DNAマーカーを量的にも質的にも充実させるとともに、イネで進められているように目的遺伝子を単離し、目的遺伝子そのものをDNAマーカーとして利用することができれば選抜の精度も高まる。日本でも2007年度からダイズゲノム研究が開始される。重要形質の単離も視野に入れて、研究基盤を整備していく必要がある。

## 謝 辞

この研究は、農林水産省の委託プロジェクト「DNAマーカー」において、東北農業研究セン

ター主任研究員 高田吉丈，九州沖縄農業研究  
センター研究員 小松邦彦，北海道立中央農業  
試験場 畑作科長 田中義則，北海道立十勝農  
業試験場 研究員 鈴木千賀らによって行われ  
ました。

## 文 献

- 1) Harada, K. and Xia, Z. (2004) Breeding Science 54 : 215-224
- 2) Cregan, P.B. et al. (1999) Crop Science 39 : 1464-1490
- 3) Song, Q.J. et al. (2004) Theor. Appl. Genet. 109 : 122-128
- 4) Yamanaka, N. et al. (2001) DNA Research 8 : 61-72
- 5) Komatsu, K. et al. (2004) Breeding Science 54 : 27-32
- 6) Komatsu, K. et al. (2005) Crop Science 45 : 2044-2048
- 7) Meksem, K et al. (2001) Theor. Appl. Genet. 103 : 710-717
- 8) Yu, et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 93 : 11751-11756.
- 9) Jeong, et al. (2002) Crop Science 42 : 265-270



◀特集▶ 「DNAマーカー選抜による効率的育種」 2

## ハクサイ根こぶ病高度抵抗性系統の 効率的選抜技術の開発

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
野菜茶業研究所 野菜ゲノム研究チーム  
松 元 哲

根こぶ病はアブラナ科野菜にとって難防除病害の一つである。この防除には抵抗性品種の導入が効果的であるが、レース分化により既存の抵抗性品種の罹病化が問題となっている。そこで2つの抵抗性遺伝子座に連鎖するDNAマーカーを用いることによって、宿主範囲の広い菌株に抵抗性を付与できる選抜方法を開発した。この選抜法は、抵抗性検定や汚染圃場での検定が大幅に省略できるとともに、幼苗検定により望むマーカー遺伝子型のみを有する個体を形質評価の対象にすることで、育種規模を拡大できると期待されている。

### 1. はじめに

アブラナ科野菜の根こぶ病は土壤細菌 *Plasmodiophora brassica* によって引き起こされる土壤伝染性の難防除病害である。発病株は根部がこぶ状に肥大するため養水分の吸収に支障をきたし、生育の著しい遅延や場合によっては枯死にいたる（図1）。特にハクサイ、カブ、ツケナ類での被害が顕著である。本病は、一旦発生すると休眠胞子が土壤中に長期間にわたり存在するため連作圃場では年々菌密度が高まり、耕種的防除が困難になる点が特徴である。根こぶ病の抵抗性遺伝子は、「Siloga」「Millan white」「Gelria」などのヨーロッパ飼料用カブ品種に見つかり、その抵抗性は1つの主働遺伝子と複数の微動遺伝子で制御された優性形質であるとされてきた。ハクサイではこれらの遺伝資源を用いて抵抗性遺伝子が導入されたCR (Club root Resistant) 品種が育成され、一定の成果を挙げてきた。しかし、近年、レース分化により根こぶ病菌の宿主範囲が変化し、これまで加害されなかったCR品種の被害が報告されるようになった。CR品種の抵抗性の崩壊に伴い、ハクサイ産地では汚染されていない圃場での栽培や薬剤散布による被害軽減がなされているが、高度な抵抗性を有する品種の育成が望

MATSUMOTO Satoru

〒514-2392 三重県津市安濃町草生360

まれている。宿主範囲を変えた根こぶ病菌に抵抗性を付与する品種の育成は容易ではなく、効率的な選抜技術の開発が必要である。そこで本欄ではハクサイ根こぶ病抵抗性遺伝子座を2個見出し、それぞれに連鎖するDNAマーカーでの選抜効果について述べる。

### 2. 抵抗性遺伝子に連鎖するDNAマーカーの開発

根こぶ病抵抗性の解析にはハクサイ罹病性系統A9709（中間母本農7号）と抵抗性系統G004を用いた。どちらも小孢子培養を経て作出された純系であり、G004は「Siloga」より根こぶ病の抵抗性遺伝子を受け継いだ系統である（図2）。まず両親間で多型のあるDNA（RAPD, RFLP, SSR）マーカーを開発し、F<sub>2</sub>集団のマーカーの分離により連鎖地図を構築した<sup>1)</sup>。つぎに2つの根こぶ病菌株「Ano-01」と「Wakayama-01」による抵抗性検定を行った。2つの菌株はそれぞれ宿主範囲が異なり、Ano-01菌は少数の品種のみを加害するのに対して、Wakayama-01菌は広い宿主範囲をもち、CR品種として販売されている21品種を用いた試験ではわずか1品種しかこの菌株に対して抵抗性をもたない、いわゆる「多犯性の菌」である<sup>2)</sup>。抵抗性検定は土壤1gに対して根こぶ病菌の休眠胞子を5×10<sup>6</sup>個混ぜた土にF<sub>3</sub>世代の



図1 根こぶ病に罹病したハクサイ

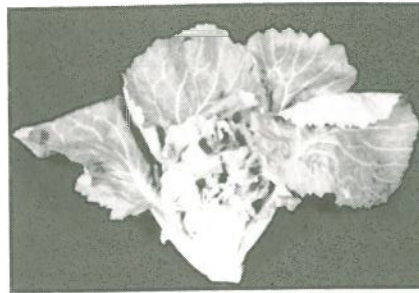


図2 抵抗性系統G004 (上)と  
マーカー選抜により、2  
個の抵抗性遺伝子を導入  
したハクサイ (右)

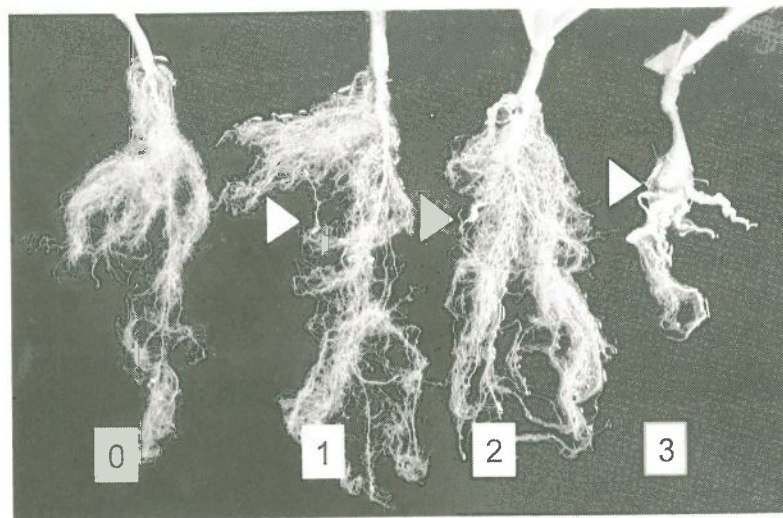
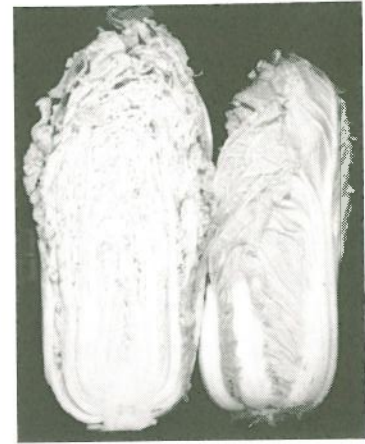


図3 根こぶ病の発病指数

0：発病なし， 1：側根に単独のこぶ， 2：側根に連続したこぶ，  
3：主根にこぶ（矢印はこぶを示す）

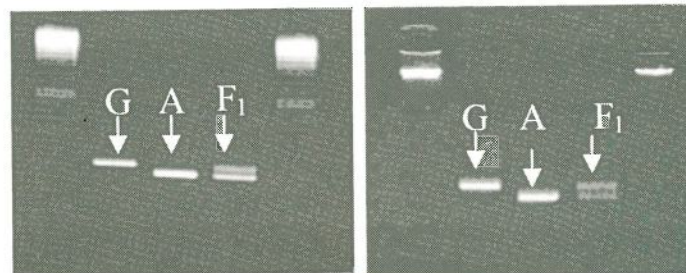


図4 根こぶ病抵抗性遺伝子に連鎖するマーカーの  
PCR増幅断片長多型

左：BRMS-173， 右：BRMS-096

抵抗性親 (G) と罹病性親 (A) および両者のF<sub>1</sub>で検出さ  
れるDNAマーカーの電気泳動パターン

種子10粒を播種し、6週間人工気象室の中で育苗後、根に発生したこぶのつき方と大きさを観察する病土挿入法により行った。F<sub>3</sub>各系統の平均の発病指数をF<sub>2</sub>の数値に換算した。発生したこぶの状態に従って、0から3までの4段階の発病指数を設定した(図3)。それぞれの実験で2反復の実験区を設けるとともに同じ検定を2回以上繰り返し、データの安定性を確保した。DNAマーカーと根こぶ病抵抗性の情報により、QTL解析を行った。

見出されたQTL中で主要な2個を詳細に検討した結果、それぞれを根こぶ抵抗性遺伝子座*Crr1*と*Crr2*と命名した<sup>1)</sup>。*Crr1*に連鎖するDNAマーカーとしてBRMS-173、*Crr2*にはBRMS-096が見出され、これらのマーカーは両親間でPCRによる増幅断片長差が大きく、アガロースゲルでも容易に検出が可能であった(図4)。F<sub>2</sub>におけるそれぞれのマーカー遺伝子型と根こぶ病菌株に対する抵抗性の結果を表1、2に示した。供試した94系統におけるBRMS-173のマーカー遺伝子型は罹病性親A9709型(AA)、ヘテロ型(AG)、抵抗性親G004型(GG)がそれぞれ36:50:8に分離した。マーカー遺伝子型による2つの根こぶ病菌の抵抗性

をみると、Ano-01菌に対しては、抵抗性親型の8個体の発病指数の平均は0.7、ヘテロ型では1.8、罹病性親型では3.0であったが、Wakayama-01菌に対する発病指数は、それぞれ2.3、2.6、3.0であった。このことは宿主範囲の狭いAno-01菌に対する抵抗性を獲得するには、*Crr1*だけの効果で十分であるが、多犯性のWakayama-01菌に対しては*Crr1*だけでは不十分であることを示している。Wakayama-01菌に対しては、*Crr1*と*Crr2*に連鎖するマーカー遺伝子型がともに抵抗性親型の場合にのみその発病指数が0.6にまで下がり、抵抗性を獲得できることが明らかになった(表2)。

### 3. 根こぶ病抵抗性遺伝子座*Crr1*, *Crr2*

根こぶ病抵抗性はこれまで優性形質とされてきたが、抵抗性系統G004が有する*Crr1*と*Crr2*の遺伝子は、Ano-01とWakayama-01に対してはいずれも不完全な優性形質であった。そのため宿主範囲の広い菌株に対して抵抗性を付与するには抵抗性の遺伝子を少なくともこの2個を抵抗性ホモ型として導入する必要がある。BRMS-173とBRMS-096はいずれもSSR

表1 F<sub>2</sub>集団におけるBRMS-173のマーカー遺伝子型と根こぶ病菌株の発病指数との関係

DNAマーカー 遺伝子型	個体数	発病指数	
		Ano-01	Wakayama-01
AA	36	3.0	3.0
AG	50	1.8	2.6
GG	8	0.7	2.3
合計, 平均	94	2.2	2.7

Aは罹病性親、Gは抵抗性親のDNAマーカー遺伝子型。ハクサイは2倍体なので、それぞれマーカーを純系で有する個体はAAあるいはGG、雑種の個体はAGとなる。発病程度は、3に近づくほど罹病性、逆に0に近づくほど抵抗性を示す。

表2 検定したハクサイ個体の有するDNAマーカー(BRMS-173, BRMS-096)遺伝子型と多犯性の根こぶ病菌株Wakayama-01に対する発病程度との関係

DNAマーカー遺伝		個体数	発病指数
BRMS-173	BRMS-096		
AA	AA	4	3.0
	AG	19	3.0
	GG	13	3.0
AG	AA	11	3.0
	AG	29	2.7
	GG	25	2.0
GG	AA	4	2.9
	AG	3	2.2
	GG	6	0.6
合計, 平均		114	2.6

(Simple Sequence Repeat) を標的に増幅し、両親由来のいずれの断片も検出する共優性型のDNAマーカーである。RAPDなどの優性型のマーカーでは、一般にヘテロ型を識別することはできない。選抜の対象となる形質が両親の表現型の間中型を示すと、マーカー遺伝子型でヘテロ型の識別の可否は、選抜上極めて大きな意味をもつ。つまり優性マーカーを用いて抵抗性親型を選ぶと次代で形質が分離する個体が必ず出現してしまうため、選抜の精度が落ちる。一方で共優性型では、マーカー遺伝子型の周辺は分離しないため、次代でも安定して抵抗性が発揮される個体が得られる。

#### 4. 抵抗性系統の効率的選抜技術の開発

我々の研究目標を、多犯性のWakayama-01菌株に対して強い抵抗性を付与でき、かつ効率的な選抜技術を開発することに置いた。最初にA9709とG004間の交雑F<sub>2</sub>個体の中から*Crr1*と*Crr2*の連鎖マーカー型が抵抗性ホモ型でWakayama-01菌に対して抵抗性を有する個体を選んだ。この個体にハクサイの形状をもつA9709を戻し交雑を行い、各世代でDNAマーカーにより選抜することを3回繰り返し、最後に抵抗性遺伝子をホモに集積するために自殖した。つまり*Crr1*と*Crr2*のゲノム領域だけを抵抗性親G004側に、他のゲノム全体はハクサイA9709型にすることによって、形状はハクサイで高度抵抗性を有するハクサイをマーカー選抜のみで育成することを試みた。

最初の戻し交雑で得られた個体は*Crr1*と*Crr2*のマーカー遺伝子型はいずれもヘテロとなるため、選抜の必要はなく、2回目から連鎖マーカーにより2つの座がともにヘテロ型の個体の選抜を行った。2回目、3回目ともにほぼ予想どおりの4分の1でヘテロ個体を得られた。これらの世代で抵抗性検定を行うとAno-01菌に抵抗性をもつ個体は見出されるが、Wakayama-01菌ではほぼすべての個体で罹病性となる。戻し交雑3代目で2座のマーカー遺

伝子型がヘテロの個体を選んで自殖すると16分の1の割合で2座ともに抵抗性のホモ型個体を得られ、これらはWakayama-01菌に対して抵抗性を示した。これらの個体をさらに自殖し、固定を進め、圃場での形質評価を行った。育成された系統はいずれもWakayama-01菌に対して、発病指数で1未満の強い抵抗性をもつとともに、形質ももとのA9709とほぼ同等であった(図2右)。

マーカー選抜を行うことなく従来の検定による選抜だけで、2つの抵抗性遺伝子をホモに、しかもF<sub>1</sub>品種の両親系統に導入することはそう簡単なことではない。既存の品種に抵抗性を付与するのであれば、示したようなスケジュールに沿って抵抗性親に戻し交雑とマーカー選抜を繰り返すことにより、高度な抵抗性の個体を得られる。この間、抵抗性の検定が不要であるばかりでなく、年間2世代以上の促進が可能となる。また今回抵抗性遺伝子のソースにはG004を用いたが、この系統の形状はハクサイとはほど遠いため、最初の交雑から数えるとハクサイであるA9709を4回交雑し、形質をハクサイに戻している。したがって今回得られたハクサイに戻した系統を供試することにより、比較的少ない回数で目的とする親形質に戻る可能性もある。

最終的には形質の評価が必要となるが、2つの抵抗性遺伝子をホモ化した個体は16分の1の確率で得られる。マーカー選抜では播種後の幼苗時にDNAマーカーでスクリーニングを行い、抵抗性ホモのマーカー遺伝子型を有する個体だけを本圃に定植すればよく、その中で形質の良し悪しを選抜することができる。そのため育種の規模を極めて大きくすることができる。本実験においても100個体のホモ化個体の獲得を目指して約1600個から選抜を行い、率は若干低下したが、約80の個体だけを定植して形質の評価を行った。このようにたった2つの遺伝子を導入するだけでもマーカー選抜の効果は極めて高いと言える。

## 5. おわりに

今回得られた系統は、既存の根こぶ病抵抗性の中間母本に比較して、安定した抵抗性やハクサイとしての形状の良さをもつと考えられている。今後、本系統を新たな中間母本にするための特性検定試験の実施を予定している。マーカー情報と素材をセットで公開することにより、より使いやすい選抜技術になると期待している。

根こぶ病抵抗性遺伝子には *Crr1*, *Crr2* 以外にも複数の座が報告されている<sup>3), 4)</sup>。*Crr1* と *Crr2* だけの導入により、根こぶ病対策が万全ではないことは言うまでもない。今後、さらなる遺伝子の集積を進めて、飼料用カブ並みの強さを有するスーパーCR系統を選抜できるシステムの構築が必要となるであろう。さらに、根こぶ病の被害にあっているのは、ハクサイだけでなく、カブ、ツケナ、ナバナなども含まれる。これらの植物は同じ *B. rapa* であるので交雑不親和性はなく、交雑による遺伝子の導入が可能である。したがって、この方法を駆使すれば、複数のアブラナ科植物の根こぶ病抵抗性品種を育成することができる。難防除病害に対して抵

抗性品種を効率的に育成する技術の開発は、野菜の安定生産、減農薬の点から欠かせない技術である。根こぶ病抵抗性以外のマーカー情報が蓄積されることにより、野菜育種の進化が期待されている。

## 謝 辞

本研究成果は農林水産省委託プロジェクト研究「有用遺伝子活用のための植物（イネ）・動物ゲノム研究—DNAマーカーによる効率的な新品種育成システムの開発」で得られたものであり、関係各位に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Suwabe, K. et al. (2003), *Theor Appl Genet*, (107) 997-1002
- 2) Hatakeyama, K. et al. (2004), *Breeding Science*, (54) 197-201
- 3) Hirai, M. et al. (2004), *Theor Appl Genet*, (108) 639-643
- 4) Piao, Z.Y. et al. (2004), *Theor Appl Genet*, (108) 1458-146

◀特集▶ 「DNAマーカー選抜による効率的育種」 3

## おいしく、食べやすく、病気に強い 果樹の品種開発の効率化

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
果樹研究所 果樹ゲノム研究チーム  
山 本 俊 哉

果樹では、大果で食味に優れたおいしい品種、種なしで食べやすい品種、病気に強く栽培しやすい品種など消費者と生産者の双方にメリットのある品種が求められているが、新品種の育成には長年月と広大な栽培面積を必要とする。果樹研究所では、ナシの黒星病抵抗性及び黒斑病抵抗性、カンキツの種なし性及びカンキツトリステザウイルス抵抗性、カキの甘ガキ性についてDNAマーカーを開発し、果樹の新品種育成を大幅に効率的に進めることを可能にした。

### 1. はじめに

果樹類は、永年性、木本性、ヘテロ性などの特徴を持つ。世代のサイクルが長く、また樹体が大きいため、新品種の育成には「長い育種期間」と「広い圃場面積」が必要である。世代のサイクルが比較的短いモモやクリでも、実生から開花・結実まで約3年かかり、果実の形質が安定するのにさらに3～5年を要する。カンキツやカキでは、さらに世代のサイクルが長く、実生から開花・結実まで7～10年（高接ぎする方法を用いれば4～6年）を要する。日本で最も大規模に育種を行っている果樹研究所の育種用実生数は、ナシで約2,500個体、カンキツで約2,500個体、カキで約3,500個体と、一年生や草本性の作物と比較して、1/10～1/100の個体数しか評価できない。これまでの交雑育種では、果実が結実してから優良個体を選抜する必要があること、さらに結実開始から数年経って初めて果実の形質が安定すること、その間も多数の不要な個体を数年栽培する面積が必要であることなどのデメリットがあった。重要形質に関連するDNAマーカー\*による選抜が可能になれば、果実がなる前に実生の段階で選抜が可能と

なり、予め優良個体を選抜（あるいは不良個体を淘汰）することで多数の実生個体の評価が可能となる。さらに限られた圃場面積を有効に活用することで実質的な育種規模を大幅に拡大することができるため、その効果は非常に大きい。

果樹研究所では、ナシの黒星病抵抗性と黒斑病抵抗性、カンキツの種なし性（無核性）とカンキツトリステザウイルス抵抗性、カキの甘ガキ性を識別するDNAマーカーを開発し、果樹の新品種育成を大幅に効率的に進める技術を開発した。その概要について、紹介する。

\*DNAマーカー：DNAの塩基配列は品種間で部分的な違いがあり、品種に特徴的な違いを識別することで、ゲノム上の標識（目印）としたもの。染色体上の遺伝子内あるいはその近傍の塩基配列に違いがあり、その違いを識別できれば、DNAマーカーとして利用することができる。DNAマーカーによって、特定の遺伝子を含む染色体のある領域が親から子へ受け継がれたかどうか検定できる。

### 2. ナシの病害抵抗性

ニホンナシの栽培では、ニホンナシ黒星病（病原菌 *Venturia nashicola*）と黒斑病（病原菌

YAMAMOTO Toshiya

〒305-8605 茨城県つくば市藤本2-1

*Alternaria kikuchiana*あるいは*Alternaria alternata*) が最も重要な病害である。特に黒星病に抵抗性を持つ栽培品種はなく、すべての経済栽培品種が罹病性である。在来ニホンナシ品種「巾着」, 「ラ・フランス」や「バートレット」など多くのセイヨウナシ品種, 一部のチュウゴクナシ品種が抵抗性を示す。しかしながら, これら抵抗性品種の抵抗性が同じ遺伝子(座)に支配されているかどうかや遺伝子地図上の位置情報等は未だ断片的であった。そこで, ニホンナシ品種「巾着」の黒星病抵抗性(Vnk)の遺伝解析を行い, 抵抗性座を連鎖地図上にマッピングして存在位置を明らかにするとともに, 抵抗性に連鎖するDNAマーカーの取得を試みた。

「秋麗」×314-32(「巾着」×「豊水」) 集団112個体に加え, 「豊水」×30-38(「筑水」×「巾着」) 集団160個体(茨城県農業総合センター育成)の遺伝解析とマッピングを行い, 黒星病抵抗性と強く連鎖する8種類のDNAマーカーを取得した。内訳は, 4種類のRAPDマーカーをSTS化したマーカー(STS-OPW2, STS-OPAW13, STS-OPO9, STS-OPAQ11), および取得した3種類のAFLPマーカーのうちの1種類をSTS化したマーカー(STS-CT/CTA)と, 1種類のSSRマーカー(Hi02c07)である<sup>1)</sup>(図1, 図2)。連鎖地図上の位置情報<sup>2)</sup>から, 「巾着」の黒星病抵抗性は第1連鎖群中央部に位置していること, 「巾着」の黒星病抵抗性(Vnk)は, リンゴ黒星病抵抗性遺伝子Vf(図2中のCH-Vf2)と同じ連鎖群に存在するが, 位置が異なっていることが明らかとなった<sup>1)</sup>。また, 「新星」×282-12(「豊水」×「ラ・フランス」)の集団を用いた遺伝解析から, 「ラ・フランス」の黒星病抵抗性は, 2因子以上の遺伝子に支配され, 第2, 14連鎖群に位置することが明らかとなり, 関連DNAマーカーも取得することができた。開発したDNAマーカーにより黒星病抵抗性の早期選抜が可能となり, 黒星病抵抗性を有するニホンナシ品種の育成が期待される。

黒斑病では, 「二十世紀」や「南水」など主要品種が罹病性である。なお, 抵抗性の栽培品種は, 「豊水」, 「幸水」などである。黒斑病菌の生産する毒素AKトキシンの受容体を持つものが罹病性で優性, 受容体を持たないものが抵抗性で劣性である。「二十世紀」, 「南水」の黒斑病罹病性遺伝子座を第11連鎖群上部に同定することができ, 連鎖マーカーを取得することができた。

本研究により取得できたDNAマーカーにより, 複合病害抵抗性(黒斑病抵抗性+起源の異なる黒星病抵抗性)の選抜が可能であり, 品種の育成と評価の効率を大きく改善できると考えられる。両方の病気(黒斑病, 黒星病)に弱い品種では年間約20回の農薬散布を必要とし, 一つの病害抵抗性品種では約5回の農薬散布を削減できる。両方の抵抗性を持つことで農薬散布を半数に削減することが可能である(図3)。

### 3. カンキツの種なし性及びカンキツトリステザウイルス抵抗性

カンキツでは, 種なし化による食べやすさと病気に強く栽培しやすい特性を持つ品種が求められている。在来のカンキツ品種「無核紀州」は, 受精しても接合体が発育せず, 受粉の有無に関わらず種なしの果実を生産できる, 完全無核性を有している。この無核性は単一の優性遺伝子に支配されていると考えられ, 交配するとその子供の約半数が種なしになることから, 育種上非常に有用な形質として無核性カンキツの交配親として利用されている。「無核紀州」を交配親とする無核性の分離集団から, 「無核紀州」型の無核性と連鎖するRAPDマーカーを見出し, さらにこれをクローニングして塩基配列を決定することでSTSマーカーを開発した。果樹研究所と静岡大学との共同研究により, カンキツの遺伝子地図を作成して「無核紀州」が持つ無核性を第9連鎖群に同定した。「かんきつ中間母本農5号」, 「かんきつ中間母本農6号」, 「サザンイエロー」など「無核紀州」から育成



図1 親およびF1集団個体でのSTS-OPW2マーカーの分離  
STS-OPW2マーカーを矢印で示す。P1, P2, P3, P4はそれぞれ巾着，筑水，30-38，豊水を，黒星病抵抗性と罹病性をR, Sで示す。

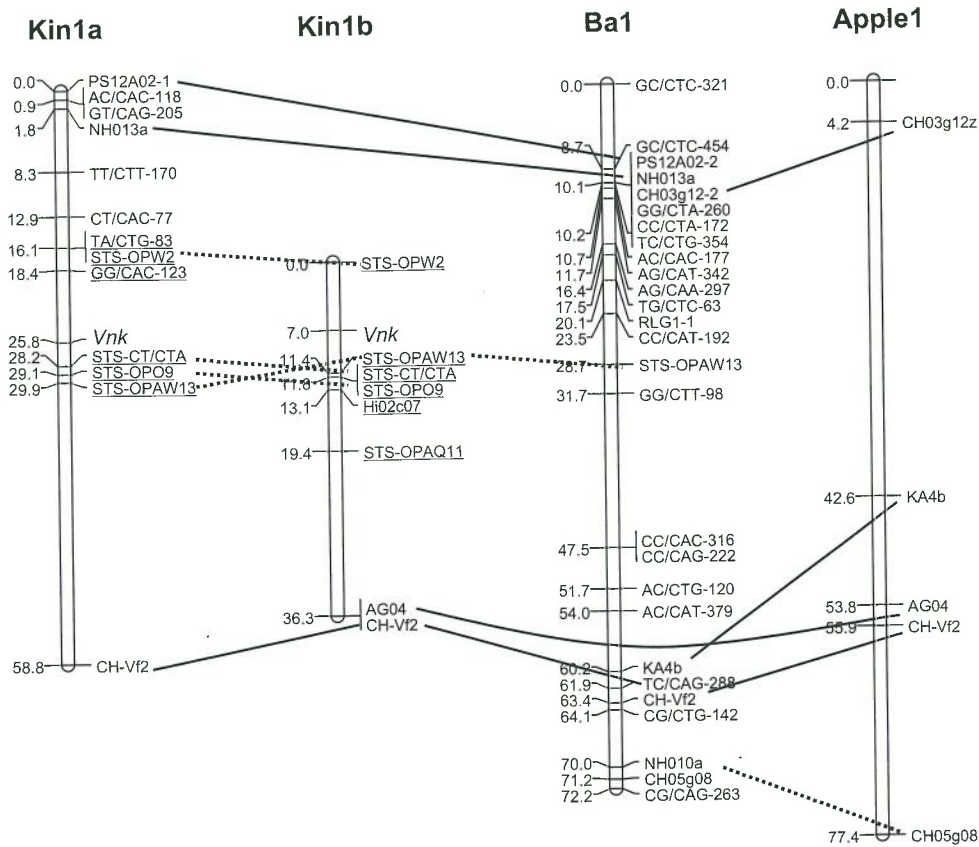


図2 巾着，バートレット，リンゴの第1連鎖群の連鎖地図  
Kin1a, Kin1b, Ba1, Apple1は，それぞれ秋麗×314-32（巾着×豊水）で作成した巾着の第1連鎖群の連鎖地図，豊水×30-38（筑水×巾着）で作成した巾着の地図，バートレットの地図，リンゴ品種 Discoveryの地図を示す。巾着由来の黒星病抵抗性座をVnkで，取得した連鎖DNAマーカーを下線で示す。



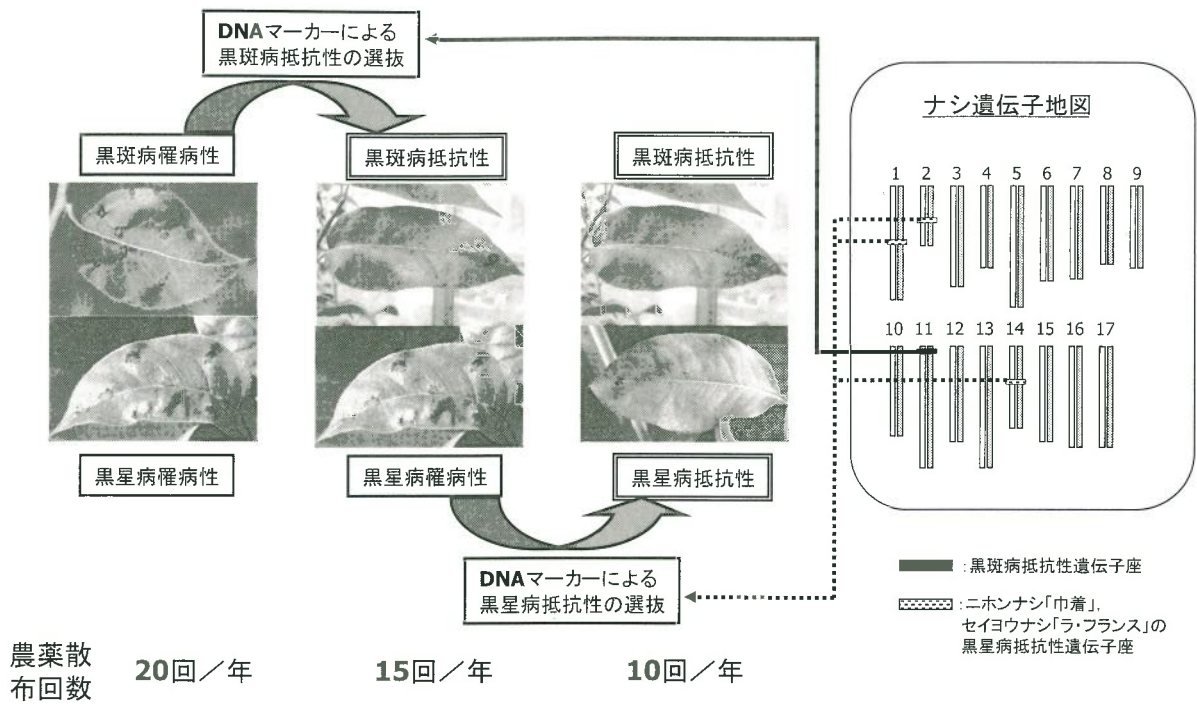


図3 病害抵抗性のニホンナシ育成と減農薬の効果

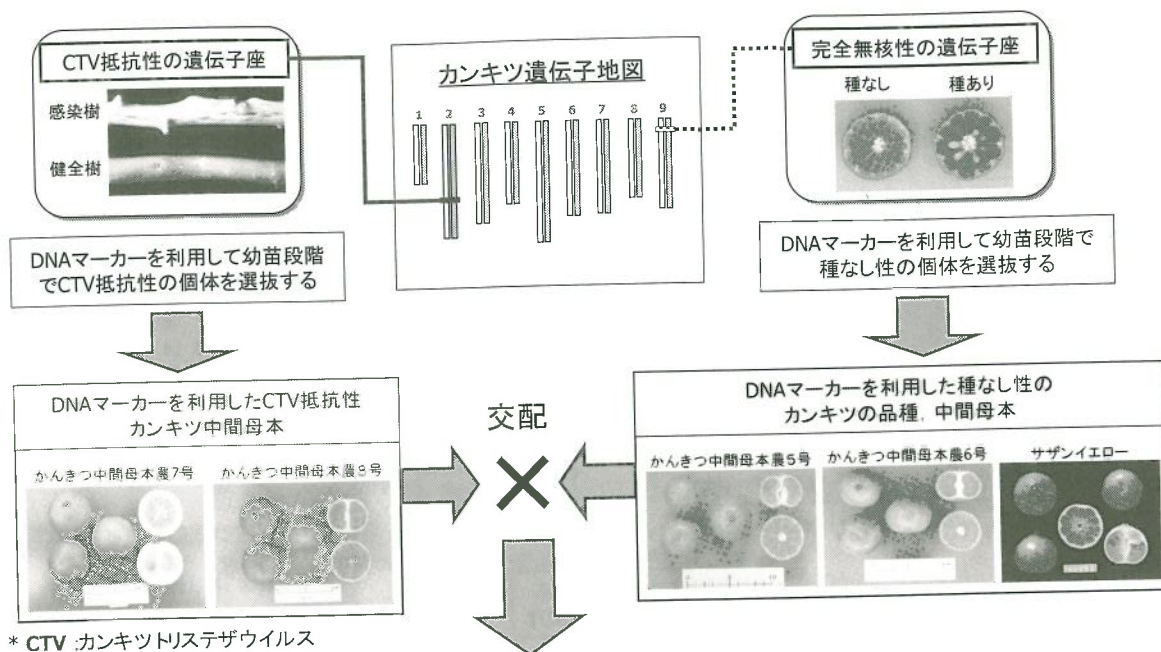
された無核性カンキツも，このSTSマーカーを有しており，これらを母本とする実生集団でのDNAマーカー選抜に利用することが可能である(図4)。

カンキツトリステザウイルス (CTV) は世界的に深刻な被害をもたらしているカンキツの重要なウイルス病害である。カンキツおよびその近縁種のうち，カラタチの抵抗性は，CTVウイルスを接種しても樹体内でのウイルス増殖が認められない特性を有している。従来，CTV抵抗性の評価は，接種検定やELISA法等により行っていたが，多くの労力と長い期間を要する。CTV抵抗性遺伝子の地図上の位置を第2連鎖群に同定するとともに，0 cMで連鎖する3種類のDNAマーカー (CTg12A, CTg17A, CTg06B) を開発した。このDNAマーカーを持つ「かんきつ中間母本農7号」, 「かんきつ中間母本農8号」と組み合わせてCTV抵抗性個体を選抜可能である。今後，種なし性の特性を持つ育種素材とCTV抵抗性を持つ親を交配して得られた種子から幼苗段階に両方の

特性を検出できるDNAマーカーによる複合選抜を行うことにより，両方の形質を兼ね備えた新品種の効率的育成を進めている(図4)。

#### 4. カキの甘ガキ性

カキには甘ガキと渋ガキがあり，甘ガキは果実に渋みが無い種類である。甘渋性によるカキの分類は複雑で，完全甘ガキ(種子の有無に関係なく自然脱渋して，常に甘ガキになる品種，「富有」, 「次郎」など)，不完全甘ガキ(種子から渋を抜く物質が発生し，多量の褐斑(かっぱん)を生じて甘ガキとなる品種，「西村早生」など)，不完全渋ガキ(種子から渋を抜く物質が発生するが，その量が少ないあるいは種子が多くできない性質のため，甘ガキとにならない品種，「平核無」など)，完全渋ガキ(種子の有無に関係なく，常に渋ガキの品種，「西条」など)の4タイプに分類される。1,000を越える日本のカキ品種の中で，安定して甘ガキになるもの=完全甘ガキは，ごく少数しかない。完全甘



複数の育種素材とDNAマーカーを組み合わせる複合選抜により、種なしでCTV抵抗性の個体を短期間で選抜することが可能になり、育種効率が飛躍的に向上する。

図4 DNAマーカーを利用した種なし，CTV抵抗性のカンキツの開発

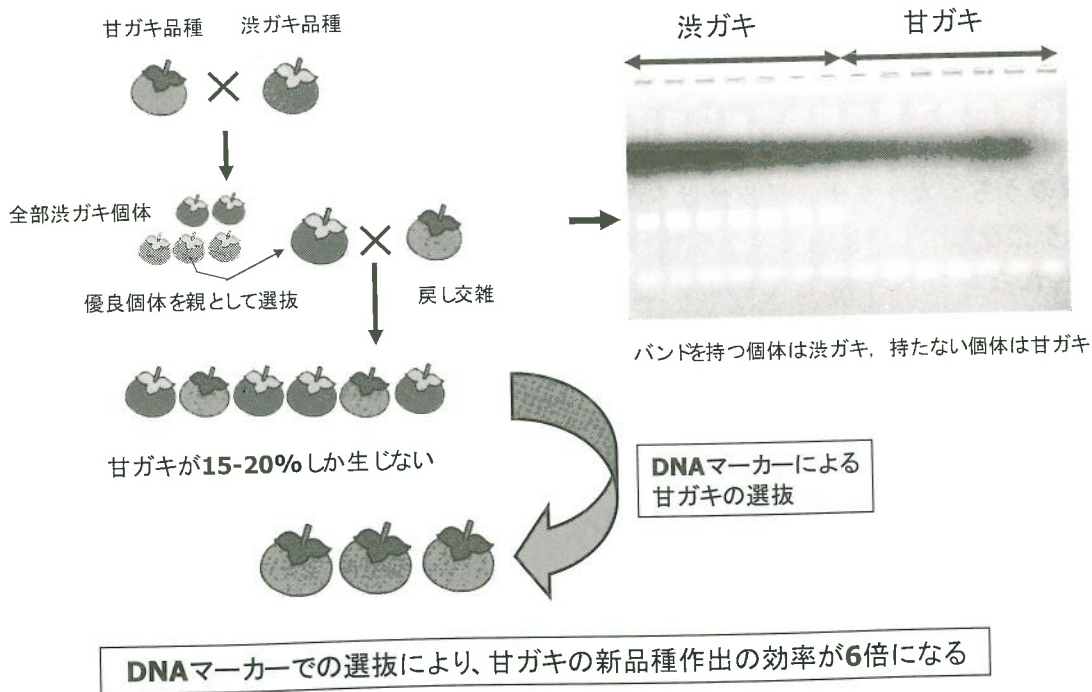


図5 DNAマーカーによる甘ガキ品種の育成

ガキ性は遺伝的に劣性であるため、甘ガキ品種と渋ガキ品種を交配した世代では、甘ガキの子供は生まれず、子供に繰り返して甘ガキ品種を交配すると、その次の世代では15~20%程度が甘ガキになる。果樹研究所と京都大学との共同研究により、甘ガキ性に関連するAFLPマーカーやゲノムライブラリーを利用して、甘ガキ性を識別するDNAマーカーを開発することに成功した。種子から発芽した若い葉のDNAを調べることによって、甘ガキと判定された個体だけを育てることにより大幅な品種改良の効率化が可能で、現在、交配で作出した約3,000個体について、DNAマーカーによる甘ガキの選抜を進めている。(図5)。

## 謝 辞

なお本研究成果は、農林水産省委託プロジェ

クト研究「有用遺伝子活用のための植物（イネ）・動物ゲノム研究—DNAマーカーによる効率的な新品種育成システムの開発」で得られたものである。本研究は、果樹研究所果樹ゲノム研究チーム・清水徳朗上席研究員、果樹研究所ブドウ・カキ研究チーム・山田昌彦上席研究員、京都大学農学研究科農学専攻園芸科学講座・米森敬三教授、静岡大学農学部共生バイオサイエンス学科・大村三男教授を始めとする研究者の成果をまとめたものである。

## 文 献

- 1) Terakami, S. et al. (2006) *Theor Appl Genet* 113: 743-752.
- 2) Yamamoto, T. et al. (2004) *Acta Hort* 663: 51-56.

## ◀国内情報▶

## イネキチンエリシター受容体の発見と同定

明治大学 農学部生命科学科

賀来華江・渋谷直人

エリシターは植物の生体防御系を活性化する物質の総称である。筆者らはこれまで特定サイズのカチンオリゴ糖断片がエリシターとしてイネ細胞において様々な生体防御応答を誘導することを明らかにしてきた。このカチンエリシターの受容とシグナル伝達の初期応答に関わるKeyタンパク質であるカチンエリシター結合タンパク質(CEBiP: Chitin Elicitor Binding Protein)をイネ培養細胞の原形質膜から単離・精製、さらにその遺伝子の同定に成功した。

## 1. はじめに

私たちを含む動物は夏の暑さ、冬の寒さ、風や雨などの環境ストレスから逃れるために、その場から移動し、より安全でより安心な場所に身を置くことができる。だが植物は一度大地に根を固定すると、どんな環境ストレスからも逃れることができない。一方、8千種類を超える植物病原菌が存在するにもかかわらず、ある特殊な環境条件を除いて、私たちの周りの植物は、そう簡単には病気にはならない。また病気に罹ったとしても、イネにおいて深刻な病害を引き起こす植物病原菌は実に数えるほどしかない。これらのことは植物がほとんどの植物病原菌に対して、植物体内に侵入させない「仕組み」をもっていることを示している。植物では「この仕組み」を基礎的抵抗性、あるいは非宿主抵抗性と呼んでいる。動物のような防御に特殊化した細胞や抗体などの免疫系をもっていない。植物はどのようなメカニズムで外来の敵を認識し、それを排除しようとしているのだろう。この植物のもつ独自の防御機構を解明することができれば、病気に強い植物を作り出すことや環境にやさしい病害駆除剤を開発するための基礎的情報を得ることができると考えられる。

## 2. キチンオリゴ糖エリシター受容体の同定

キチンはN-アセチルグルコサミンが $\beta$ 1,4結合した重合体であり、糸状菌の細胞壁の主要な構成多糖の一つである。これまでに私たちはイネ培養細胞を用いた研究から、キチンオリゴ糖がエリシターとして、活性酸素の産生、キチナーゼ、 $\beta$ -グルカナーゼ及びフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)等の生体防御関連遺伝子の発現や抗菌性物質であるフィトアレキシンの誘導などのさまざまな生体防御応答を引き起こすことを明らかにしてきた<sup>1)</sup>。一方、同じ重合度をもちキチンと類似する構造をもつキトサン( $\beta$ 1,4結合したグルコサミンからなる多糖)のオリゴ糖あるいは重合度の低いキチンオリゴ糖では、これらの生体防御応答反応が誘導されない(図1)。これらの結果は植物にはこのエリシターの糖鎖構造と鎖長(長さ)を厳密に識別し、シグナルを伝達する物質、すなわち受容体が存在することを示唆した。

我々は、放射性標識したキチンオクタマー( $\beta$ 1,4結合したN-アセチルグルコサミンの8量体, GlcNAc<sub>8</sub>)の誘導体を用いて、イネ培養細胞から単離した膜画分との結合実験から、キチンエリシター結合タンパク質(Chitin Elicitor Binding Protein, CEBiP)が原形質膜上に存在することを確認した<sup>2)</sup>。また放射性標識した

KAKU Hanae, SHIBUYA Naoto

〒215-0001 川崎市多摩区東三田1-1-1

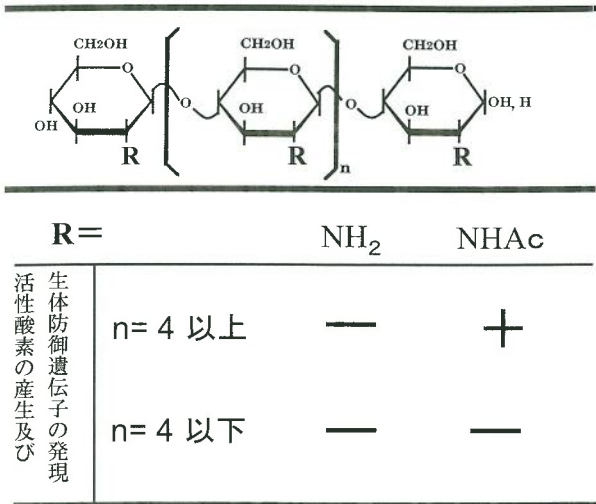


図1 糖鎖構造の異なるキチン系オリゴ糖によるイネ細胞の生体防御応答系の誘導

GlcNAc<sub>8</sub>を用いた光親和性標識及び親和性架橋実験から、キチンエリシターに高親和性を示す単一なタンパク質バンドを検出し、このバンドが非標識エリシター糖の処理をすることにより特異的に消失することを確認した(図2 B-a)<sup>3)</sup>。これらの結果はこのタンパク質が受容体の候補分子である可能性を示唆するものであった。興味あることに、親和性架橋及び活性酸素応答等の実験結果からCEBiPはイネの培養細胞のみでなく、イネの葉や根などの植物体、また大麦、ニンジン、大豆などの単子葉植物や双子葉植物においても存在し<sup>4)</sup>、CEBiPがある特殊な植物体のみ存在するのでなく、広く植物界に分布していることが示唆された。

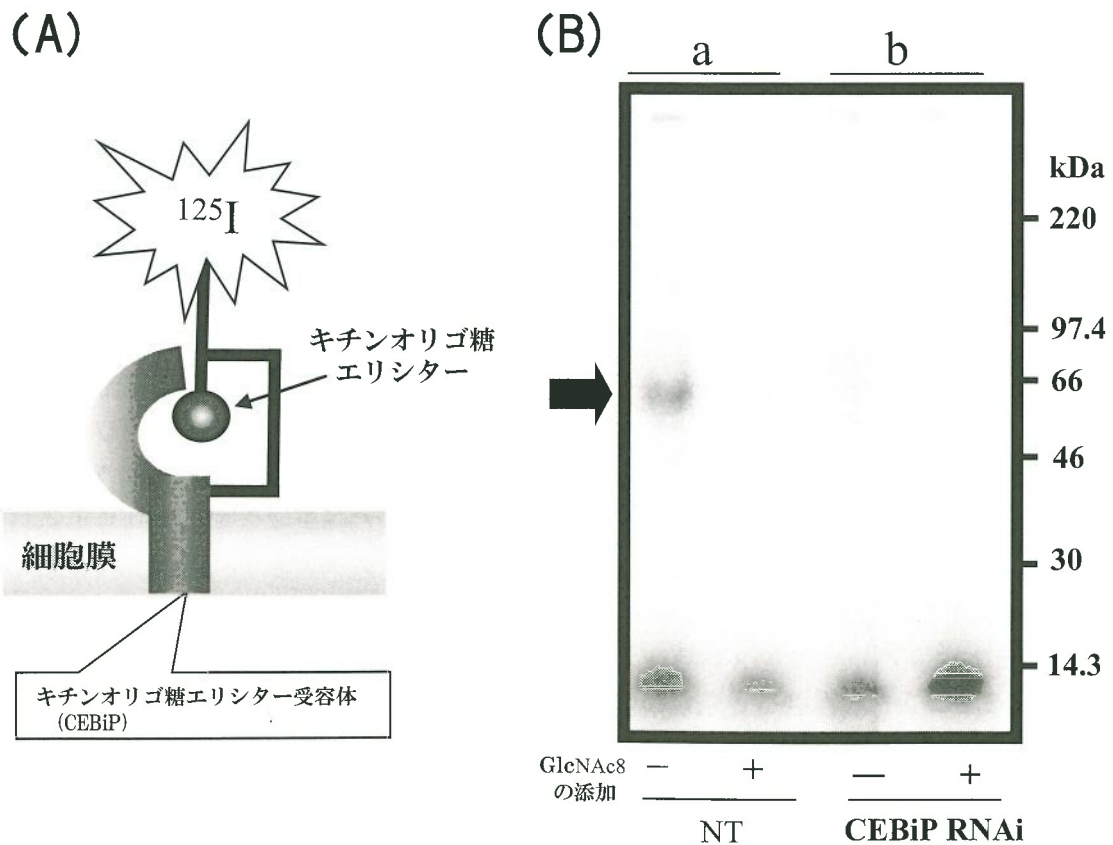


図2 親和性架橋によるキチンエリシター結合タンパク質の検出

(A) 親和性架橋の模式図, (B) 非標識エリシター糖 (GlcNAc<sub>8</sub>) 処理/非処理したイネ細胞の原形質膜試料と放射性標識エリシター糖を化学的架橋・SDS電気泳動後、放射性標識した複合体物質を検出した。

a : 非形質転換イネ細胞 (NT)

b : CEBiPの発現を抑制したイネ細胞 (CEBiP-RNAi)

(Kakuら, PNAS2006から引用・改変) 矢印: キチンオリゴ糖エリシター受容体 (CEBiP) と放射性標識エリシター糖の複合体

### 3. キチンオリゴ糖エリシター受容体の単離とその遺伝子解析

我々は、このCEBiPの実体を明らかにするために、界面活性剤Triton X-100を用いて効率的にイネ原形質膜を可溶化し、CEBiPをキチンエリシターを親和性担体としたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。この精製タンパク質から32残基のN末端ペプチド配列を決定し、この情報に基づいてイネ培養細胞cDNAライブラリーからCEBiP遺伝子の単離に成功した<sup>5)</sup>。CEBiPは、1436bpのヌクレオチドでコードされ、28残基のシグナルペプチド及びC末端側には膜貫通部位を含む356アミノ酸残基から成る翻訳領域を持ち、システイン残基、セリン残基、スレオニン残基に富んでいた。ゲノム上では4つのエクソンと3つのイントロンから構成され、イネの第3染色体に座乗していた(図3)。また、化学的に糖鎖を除去したもの及び

非処理のCEBiPタンパク質の挙動や遺伝子の翻訳領域から求められる分子量等から、CEBiPは糖鎖が付加した糖タンパク質であることを確認した。

CEBiPの構造的特徴は、2つのLysMドメインを有していることである。LysMドメインはN-アセチルグルコサミンとN-アセチルムラミン酸が $\beta$ -1,4結合した基本構造をもつペプチドグリカンの認識に関与することが報告され、細菌のペプチドグリカン分解酵素の基質認識に寄与するドメインである。また最近、分子遺伝学的な研究からミヤコグサ (*Lotus japonicus*)、タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) などのマメ科植物と根粒菌との窒素固定共生を開始する際に、根粒菌の生産するアシル化キチンオリゴ糖 (Nodファクター) を認識する植物側の受容体が明らかになったが、この分子もLysMドメインを保持し、Nodファクター中のキチンオリゴ糖構造の認識に関与していることが示唆

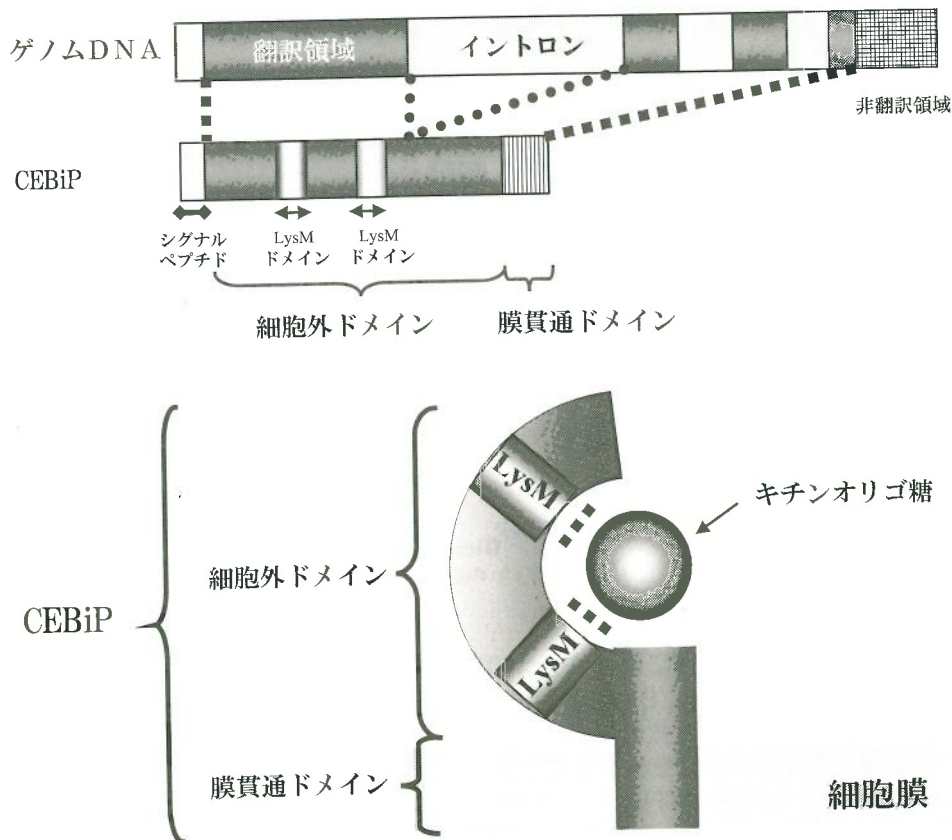


図3 CEBiPの一次構造とCEBiP遺伝子を含むゲノム領域の概略図

された。現段階では、まだ直接的な証拠を得ていないが、おそらくCEBiPにおいてもLysMドメインがキチンエリシターの結合に重要な役割を持つと予想される。しかしLysMドメインを含む受容体がどのように植物の共生と防御の相反するシグナルの認識・伝達に関わっているのかまだ不明である。だがこの双方向の研究が進展することにより、植物と微生物の共生及び植物の微生物に対する生体防御に関わるシグナルの認識とその伝達のメカニズムの相違が明らかにされることはそう遠くないと考えられる。

#### 4. CEBiPが受容体として機能

このように単離してきたCEBiPが、本当にイネの細胞において受容体としてキチンエリシターを認識し、シグナルを伝達する役目を担っているかどうかの確認をすることは重要なことである。そこでこれを実証するためにRNAi法によりCEBiP遺伝子の発現を抑制したイネカルス(CEBiP-RNAi)を作製した。複数のCEBiP-RNAi細胞ラインにおいて、CEBiPタンパク質の発現は検出されず、また定量的PCRの測定結果から、最も抑制されたイネカルスラインでは約97%のCEBiP遺伝子の発現が抑制されていることが明らかになった。さらにこれらのCEBiP-RNAi細胞は、非CEBiP発現抑制細胞に比べ、キチンエリシターによる活性酸素の応答が約86%抑制されている一方、他のPAMPsであるリポ多糖(LPS)による活性酸素応答には影響を受けなかった(図4)。これに加え、放射性標識エリシターと原形質膜画分との親和性標識の実験から、非形質転換体で見られた標識タンパク質バンドは、CEBiP-RNAi細胞においてほとんど消失していた(図2 B-b)。これらの結果はCEBiPが特異的にキチンエリシターを

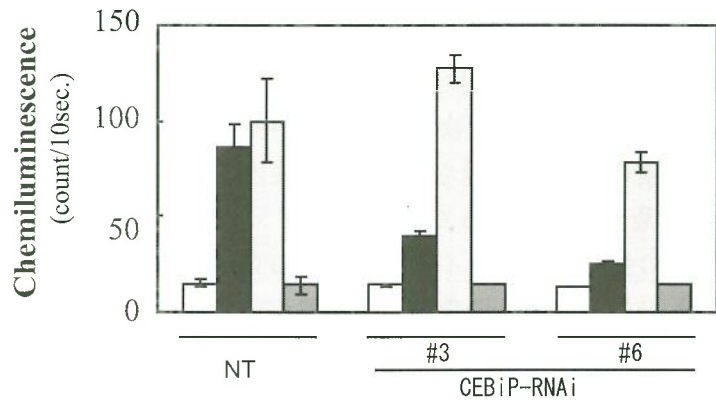


図4 種々のエリシター処理による非形質転換 (NT) 及び CEBiP発現抑制した (CEBiP-RNAi) イネ細胞の活性酸素応答  
 □: 水処理      ■: キチンオリゴ糖 (GlcNAc)<sub>n</sub>  
 □: リポ多糖      ■: キトサンオリゴ糖 ((GlcNH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>)  
 (Kakuら, PNAS2006から引用・改変)

認識し、生体防御のシグナル伝達の開始に重要な分子であることを示している。また市販の22kイネオリゴマイクロアレイを用いたCEBiP-RNAi細胞の解析において、キチンエリシターで2時間処理した非形質転換細胞で誘導される遺伝子の約7割が抑制される結果を得た<sup>5)</sup>。この結果からもCEBiPが主要なキチンエリシターシグナル伝達を受容体であることを再確認した。

一方、データベースを用いた構造予測ではCEBiPには細胞内ドメインが存在しない。そのため、CEBiPのみではキチンエリシターを受容し、そのシグナルを細胞内に伝達することができないと考えられる(図3)。CEBiPには何らかの協力分子が必須であることを示唆した。現在私たちはCEBiPと相互作用し、受容体複合体形成に関わる分子を様々な手法を用いて模索を行っているところである。

#### 5. おわりに

キチンは、非特異的エリシターの一つである。近年、これらの非特異的エリシターが、キチン、β-グルカン、リポ多糖(LPS)、細菌鞭毛タン

パク質であるフラジェリン等の病原菌を含む微生物の細胞表層にある共通した分子パターン (PAMPs/MAMPs) に起因することが明らかになってきた。また植物のみならず、動物の先天性免疫の誘導に共通なPAMPsも報告されている。最近、PAMPsであるフラジェリンやEF-Tuの受容体がシロイヌナズナから見出された。しかしこのように受容体の実態が明らかになったのはまだわずかである。CEBiPも含め植物の基礎的抵抗性に関わるこれらの受容体は多くの植物種を越えて共通に存在している。このため、この受容体研究が、広範囲の植物種の持つ基礎的な生体防御機構の解明のための糸口となることは間違いと考えられる。さらにこれらの知見は、植物自身が本来保有している「防御システム」を強化させ、化学物質である農薬に変わる「環境に優しい」「地球に優しい」新たな病害防除技術として農業に大きく貢献することが期待される。

なお、本研究は、(独) 農業生物資源研究

所・西澤洋子博士、南(石井)尚子博士、秋本千春博士、南栄一博士および理化学研究所・瀧尾擴士博士、堂前直博士の共同研究によって行ったものである。また、本研究は生物系特定産業技術研究支援センターの助成によって実施された。ここに深く感謝します。

## 文 献

- 1) Shibuya, N. and Minami, E. (2001) *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 59, 223-233
- 2) Shibuya, N. et al. (1996) *Plant Cell Physiol.*, 37, 894-898
- 3) Ito, Y. et al. (1997) *Plant J* 12, 347-356
- 4) Okada, M. et al. (2002) *Plant Cell Physiol* 43, 505-512
- 5) Kaku, H. et al. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103, 11086-11091
- 6) Desaki, Y. et al. (2006) *Plant Cell Physiol.*, 47, 1530-1540



## ◀国内情報▶

## 植物の新規ペプチドホルモンの発見とその利用の可能性

東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻  
福田 裕 穂

植物にはCLEと総称される分子量1万強のタンパク質をコードする遺伝子群がある。シロイヌナズナには31のCLE遺伝子があり、イネにも同程度のCLE遺伝子が存在する。最近の研究から、CLE遺伝子は、植物の茎・葉・花・根の成長や根粒の形成に重要な働きをすることが明らかになってきている。昨年、このCLE遺伝子産物の機能実体が私たちの研究により解かれ、水酸化されたプロリンを含む12個のアミノ酸からなるペプチドであることが明らかとなった。ここではCLEペプチドの働きとその利用の可能性について紹介する。

## 1. はじめに

シロイヌナズナやイネのゲノム配列の決定の結果、植物には非常にたくさんの細胞膜受容体が存在すると予想されるようになった。植物に特徴的なロイシンリッチリピート受容体キナーゼ (LRR-RK) と呼ばれる受容体は、シロイヌナズナやイネには200種以上あり、動物に比べて圧倒的に多い。このことは、植物の細胞が細胞同士で多様な情報をやりとりしていることを示している。しかしながら、この受容体に結合し、情報を伝えるリガンドはほとんどわかっていない。このタイプの受容体のリガンドとしては、ブラシノステロイド、ファイトスルフォカイン、システミンなど数種が知られているのみである。このうち、松林・坂神により発見されたファイトスルフォカイン<sup>1)</sup>は2つのチロシンが硫酸化された5アミノ酸からなるペプチドであるし、ライアンらにより発見されたシステミンも10数個のアミノ酸からなるペプチドである<sup>2)</sup>。このように、このタイプに結合する分子としては、ペプチドやブラシノステロイドのようなあまり大きくない分子が予想されている。また、このタイプの受容体においては、その機能欠失が起こると、植物の生育に重大な影響が起こることがわかり、その受容体が関与するシ

FUKUDA Hiroo

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

グナル経路が植物の生育に必要であることが理解されつつある。

ヒトの病気の薬としてしばしば、細胞間シグナル伝達系をターゲットにした物質が用いられるように、また、植物ホルモンシグナル系をターゲットとした植物調整剤が利用されてきたように、新規の植物細胞間シグナル経路の発見とその詳細な解析が植物の生育の人為的な調整に役に立つことも多い。

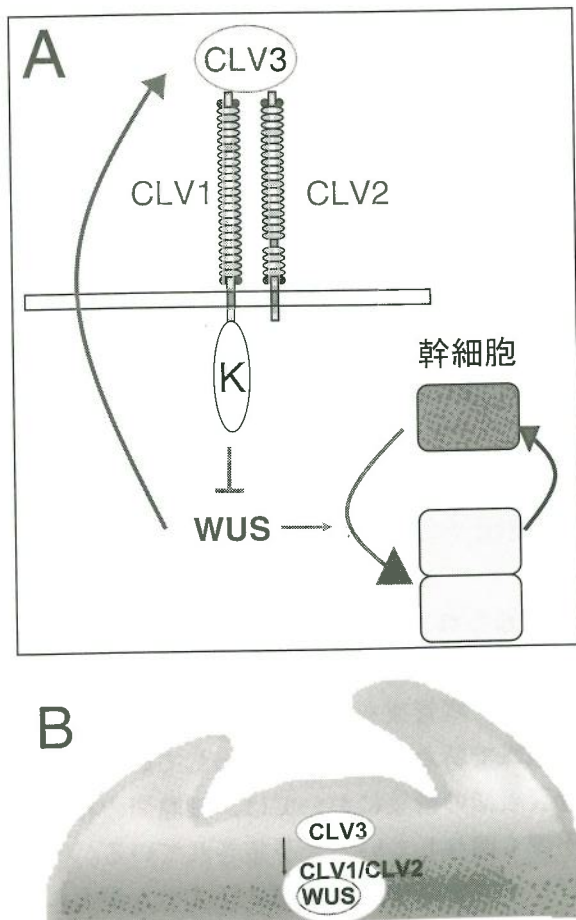
本レポートでは、私たちが最近発見した、12個のアミノ酸からなる2つのペプチドTDIF (Tracheary element Differentiation Inhibitory Factor)<sup>3)</sup>とCLV3 (CLAVATA 3)<sup>4)</sup>、およびこれらが含まれるCLEペプチド類が担うシグナル伝達機能について報告するとともに、その農業への利用の可能性について述べたい。

## 2. 茎頂メリステムにおけるCLAVATA遺伝子の働き

よく知られているように、発芽後の植物は、茎・葉を作る茎頂メリステム、根を作る根端メリステム、維管束を作る前形成層という3つの分裂組織で新たな組織を作り出していく。これら分裂組織の構築においては、細胞間の相互作用が深く関与していると予想されている。

シロイヌナズナには茎頂メリステムが大きくなり、その結果として、雄しべや花弁などの花

器官の数が増える *clavata* (*clv*) 変異体が知られている。*clv*には3つの遺伝子座が知られており、CLV1はLRR-RKの一種、CLV2はLRRをもつキナーゼドメインを欠く膜タンパク質、CLV3は1万数千の分子量の小タンパク質をコードしていることが明らかになっている(図1)。そして、細胞外リガンドであるCLV3が細胞間を移動し、CLV1発現部位においてCLV1とCLV2ヘテロダイマーに受容され、細胞内にタンパク質のリン酸化を解したシグナルが送られると考えられた。細胞内でのCLVシグナルのターゲットは、*Wuschel* (*WUS*)と名付けられた、幹細胞の増殖に働く遺伝子で、CLVシグナルはこの遺伝子を負に制御していると考えられている(図1)<sup>5)</sup>。したがって、*CLV*の機能欠損型の変異体では*WUS*が過剰に発現され、その結果として、茎頂の幹細胞が過剰に作られ、茎頂領域が拡大することになる。



しかし、この仮説を実証する上で最大の問題点は、CLV3が真にリガンドとして機能しうかどうかという点であった。このCLV3の機能実体が、思わぬ方向から解かれることになる。

### 3. 単細胞培養系を用いた分化抑制ペプチドTDIFの発見

ヒヤクニチソウの葉から光合成細胞を単細胞として単離し、植物ホルモンであるオーキシンとサイトカイニン存在下で培養すると、道管細胞に分化させることができる<sup>6)</sup>。私たちは、この実験系を用いて、道管細胞への分化を阻害する細胞外因子を探索し、TDIFと名付けた分化阻害因子を発見した<sup>3)</sup>。TDIFは2つの水酸化されたプロリンを持つ12個のアミノ酸からなるペプチド(HEVHypSGHypNPISN)であった。面白いことに、TDIFは道管形成を阻害する作用を持つ一方で、細胞分裂を促進しており、単に分化の阻害因子というよりは、幹細胞の分化と維持のスイッチングに関与している因子である可能性が示された。TDIFをコードする遺伝子を単離したところ、132のアミノ酸をコードしている遺伝子であり、TDIFはアミノ末端の119個のアミノ酸とカルボキシ末端の1つのアルギニンが除去され、12個のアミノ酸からなるペプチドとして切り出されることがわかった。そこで、TDIFおよび様々な改変TDIFペプチドを化学合成してその活性を調査した。その結果、TDIFは30pMというごく低濃度で分化を

図1 CLAVATAシグナル経路

A. *WUS*は幹細胞の細胞増殖を促進する転写制御因子であるが、同時に、*CLV3*遺伝子の発現を促進する。*CLV3*はリガンドとしてCLV1とCLV2のヘテロダイマー(?)に受容され、ホメオボックス遺伝子*WUS*の発現を抑制する。このフィードバック機構により、茎頂の幹細胞の領域サイズが一定に保たれる。  
B. *CLV3*は表層近くで作られ、内部に移動する、そこでCLV1・CLV2に受容されて、*WUS*遺伝子の発現を抑制する。

阻害することが明らかになった。

データベースでゲノム検索をしたところ、TDIFはシロイヌナズナのCLE41, CLE44のC末端のアミノ酸配列と一致した。また、CLE42は1アミノ酸のみ異なるC末の12アミノ酸をもっていた。したがって、TDIFは植物に共通して存在することになる。CLEは、C末側の14アミノ酸が似ているタンパク質ホモログに付けられた名称で、CLAVATA3/ESR-relatedに由来する。シロイヌナズナでは31種存在し、その中に、CLV3が含まれている。

#### 4. CLV3ペプチドの同定

それでは、CLV3の機能実体も同様の構造をもつのだろうか。そこで、2個のヒドロキシプロリンをもつ様々な長さのCLV3ペプチドを化学合成し、茎頂の形成抑制を指標に活性を検討した。その結果、TDIFと同じ領域の12アミノ酸からなるペプチドがCLV3活性のために必要かつ十分であることがわかった<sup>4)</sup>。一方で、近藤・坂神らはCLV3を過剰発現させたカルスを直接TOF-MSにかけ、コントロールと比較して特異的なシグナルを得るという方法でCLV3の産物を探索した<sup>4)</sup>。その結果、やはり2カ所のプロリンが水酸化された12アミノ酸からなるペプチドが同定された。これにより、CLV3も保存された2個のプロリンが水酸化された12個のアミノ酸からなる小ペプチドとして切り出されて、機能することが明らかとなった。以上の結果から、これまで不明であったCLV3を含むCLEタンパク質の機能単位が、C末に存在する12アミノ酸からなるペプチドであり、しかも水酸化を受けた分子であることが示された。

#### 5. CLEペプチドの多様な機能とその利用の可能性

##### (1) シロイヌナズナにおける26種のCLEペプチドの働き

それでは、TDIF, CLV3以外のCLEペプチ

ドは何をしているのだろうか。シロイヌナズナ31種のCLE遺伝子をもとに機能ペプチドを調査したところ、26種類のペプチドが予測された。そこで、この26種のペプチドを、2個のヒドロキシプロリンを入れて化学合成し、その活性を、道管形成の阻害（形成層幹細胞からの分化の抑制）、茎頂の縮小（茎頂幹細胞維持の抑制）、根の成長阻害（根の幹細胞維持の抑制）について調べた（図2）<sup>3)</sup>。すると、CLE41/44, CLE42は道管形成を特異的に抑制し、根の成長や茎頂の形成には効果がなかった。しかし、他のCLEペプチドは道管形成には全く影響しなかった。一方で、CLV3他いくつかのCLEペプチドは、茎頂の抑制と根の成長抑制にともに効果を持ち、CLE17などのペプチドは根の成長のみを阻害した。また、CLE1-CLE7はいずれに対しても活性は持たなかったため、未知の機能があると考えられた。このように、CLEペプチドは一部で機能の重複をもちながら、植物の多様な器官で幹細胞の維持と分化の切り替えに働いていると考えられる。同時に、この結果は、外から与えたペプチドが植物の成長を制御できることを示した。

##### (2) CLEシグナル伝達系による葉・花・根の形成制御

CLV3遺伝子のホモログを様々な生物ゲノム上で探してみると、イネには40を越えるCLE遺伝子があり、また、マメ科ミヤコグサにも多数のCLEが、そして下等陸上植物のヒメツリガネゴケにもCLEが少なくとも1種類存在する。したがって、CLEペプチドは広く陸上植物に分布し、多様な役割を果たしていることが予想される。

CLEシグナル機能の多様性と共通性の一端が遺伝学的な解析からわかりつつある。イネにおいて花器官が増える*fon1*, *fon2*突然変異体が単離されていたが、最近これらの原因遺伝子がクローニングされ、それぞれ、シロイヌナズナのCLV1, CLV3のオルソログであることが証明された<sup>7), 8)</sup>。このように、単子葉植物と双子葉

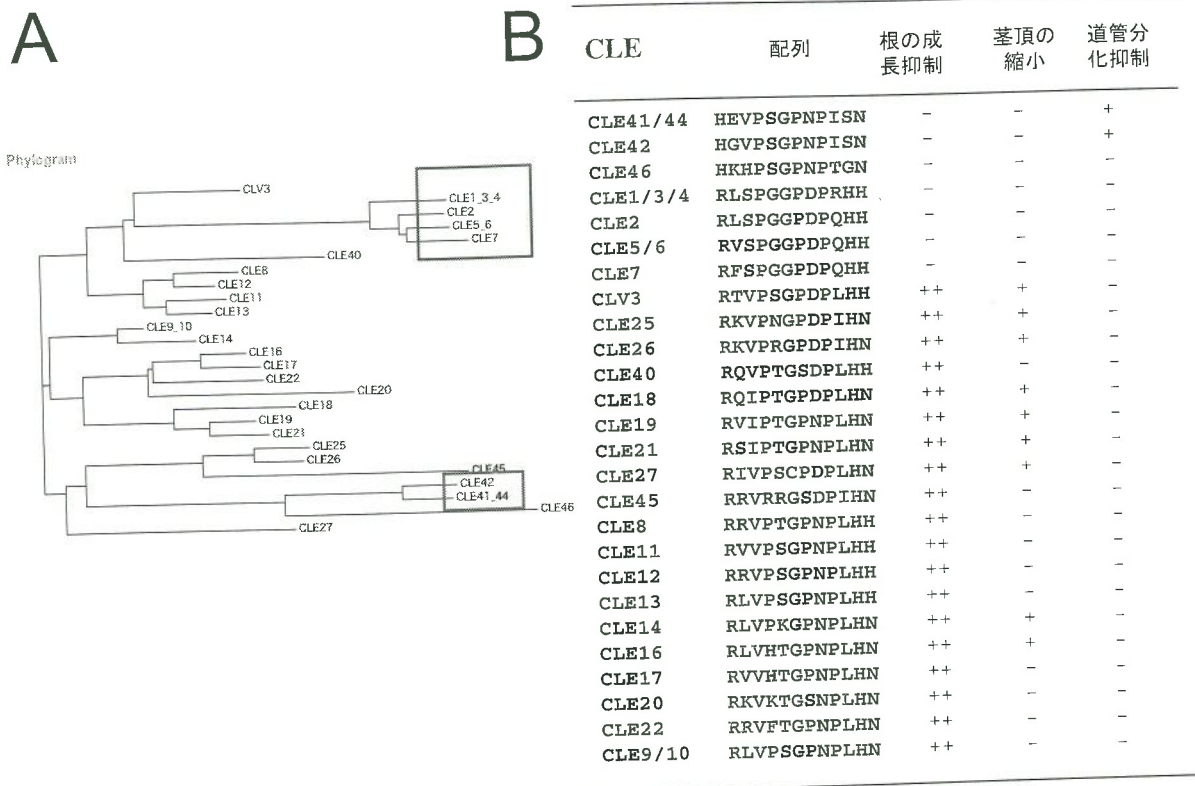


図2 シロイヌナズナの全CLEペプチドの構造と働き

A. シロイヌナズナCLEペプチドの系統樹。

B. CLEペプチドの機能。4番目と7番目のプロリンを水酸化したCLEペプチドを合成し、根の成長抑制、茎頂の縮小、道管細胞分化阻害、の各活性を調べた。++は強い活性があったもの、+は活性があったもの、-は活性のなかったものを示す。

植物で共通のCLVシグナルシステムによる花形成の制御がなされていることがわかる。しかし、違う点もあって、シロイヌナズナではCLVシグナルシステムは葉を作るときでも花を作るときでも働いているのに対して、イネでは花を作るときのみ働いているようである。また、シロイヌナズナの26種のCLEペプチドを用いてイネの根の成長阻害をみると、全体としてシロイヌナズナ根の阻害とよく似ているのだが、よく阻害するCLEグループに違いのあることが分かる(木下, 未発表)。この結果は、特定のCLEペプチドによる種特異的な根の成長阻害が可能であることを示している。

(3) CLEシグナル伝達系による根粒・シストの形成制御

最近、川口らによりミヤコグサ根粒形成の長

距離シグナルに関わる遺伝子HARIが単離された<sup>9)</sup>。このHARIはミヤコグサの根粒の過剰形成を抑制するシグナル機構の1員として地上部で働いていると予想された。驚いたことに、このHARI遺伝子はCLV1およびFON1ともっとも相同性が高かった。しかし、このHARIは茎頂の形成そのものには関与していないと考えられた。このようにマメ科植物にとって重要な根粒形成制御においてもこのCLEシグナル伝達系が重要な役割を果たしていることがわかる。また、この結果は、同じ双子葉植物でも、CLEシグナル系は種特異的に分化し、種に特徴的な器官形成の重要なパートを担っていることを示している。このシロイヌナズナにおけるCLV1とミヤコグサにおけるHARIの違いがなぜ生まれるのかは、今後の研究を待たなくてはならない。しかし、12アミノ酸からなるCLV3ペプチドが

CLV1のリガンドであることが示されていることから、ミヤコグサにおいてもHAR1のリガンドが同定され、根粒抑制の長距離シグナル伝達のしくみがわかる日が遠くないと考える。

また、驚くべきことに、植物に感染しシストを形成するシストセンチュウにもCLE遺伝子 (*HgCLE*) が存在する。*HgCLE*は線虫が植物の根に感染して、植物の細胞を改変してシストを作るときに関与すると考えられている<sup>10)</sup>。今後、シスト形成におけるCLEシグナル伝達経路がわかってくると、それを利用した感染抑制の方法にも道が拓けるものと期待される。

ここ数年でCLEシグナルの研究は飛躍的に発展した。今回私たちの研究によりこのシグナル伝達を担うリガンドの構造とその修飾の一端が明らかになった(図3)。リガンドの構造がわかったことで、今後、CLEシグナル経路の多様な機能の分子実態が明らかになるであろう。一方で、CLEシグナル系が関与する植物器官形成が多様でかつ種特異的であることから、分子機構の解明と共に、CLEシグナル経路の改変による植物成長制御方法の開発競争が、今後世界中で始まる可能性も高い。

文 献

1) Matsubayashi Y. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 7623-7627.  
 2) Pearce G. et al. (1991) Science 253, 895-898.  
 3) Ito Y. et al. (2006) Science 313, 842-845.  
 4) Kondo T. et al. (2006) Science 313, 845-

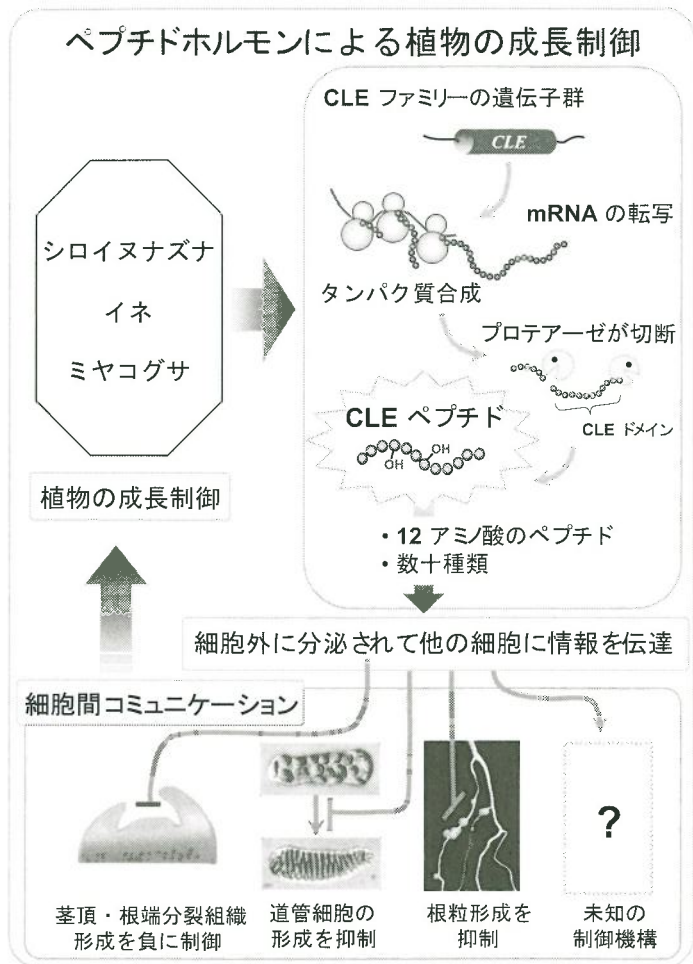


図3 CLEペプチドの修飾と働き (原図作製：吉田彩子)

848.  
 5) Dievart A. et al. (2004) Development 131, 251-261.  
 6) Fukuda H. (2004) Nature Rev. Mol. Cell Biol. 5, 379-391.  
 7) Suzaki T. et al. (2004) Development 131, 5649-5657  
 8) Suzaki T. et al. (2006) Plant Cell Physiol. 47, 1591-1602.  
 9) Nishimura R. et al. (2002) Nature 420, 426-429.  
 10) Davis EL. et al. (2005) Plant Physiol. 137, 1182-1188.

## ◀国内情報▶

スズメバチの繭から創る新シルク素材の開発  
—ホーネットシルク研究の最前線—独立行政法人 農業生物資源研究所  
亀田恒徳・玉田靖

スズメバチ類の幼虫は、蛹になる前にホーネットシルクというタンパク質から成る糸を吐いて繭を作るが、このホーネットシルクを天然素材として利用しようとする取り組みは、これまでなかった。我々は、スズメバチの巣からホーネットシルクを抽出・精製し、素材として使える形に加工する方法を見出した。さらに、ホーネットシルクの構造、機能および物性を解明して、ホーネットシルクが従来のシルクにない特性を有していることも明らかにした。

## 1. ホーネットシルクとは

近年、昆虫は21世紀最大の未利用資源として、その産業利用が期待されている。昆虫の産業利用法の一つに、昆虫が生産する物質（産生物）の利用があり、化学合成物にはない安全性や生分解性などの特性を活用した素材開発が期待できる分野として注目されている<sup>1)</sup>。昆虫産生物として、これまでに人類が利用してきたものは、世界的に見て、カイコがつくる繭とミツバチが生産するハチミツである。最近では、約100万種という多種、多様な昆虫から未利用の産生物を探索、利用しようとする試みが国内で活発になっている<sup>2)</sup>。

スズメバチは昆虫界最強の害虫として、我が国では毎年30人以上の死者をもたらす、恐れられているが、アジア諸国では古くから食材として利用され、国内でも家庭料理などで善用されている地域がある<sup>3)</sup>。また、害虫を大量に捕食する益虫として、生物農薬として活用している農家もある<sup>4)</sup>。さらに、スズメバチの幼虫の口腔分泌液の主要アミノ酸成分（V.A.A.M）に脂肪の消費を高める効果があることが分かり<sup>5)</sup>、V.A.A.M合成物を添加した飲料がスポーツドリンク等の機能性食品として商品化されている。

一方、スズメバチの幼虫は、上記のような  
KAMEDA Tsunenori, TAMADA Yasushi  
〒305-8634 つくば市大わし1-2

泌物の他に、タンパク質から成る糸（ホーネットシルク）を吐いて繭を作る。この繭は、育房と呼ばれる六角形の穴の中で成長したスズメバチの幼虫が蛹になる前に入口を塞ぐためのものである（図1B）。キイロスズメバチの場合、1つの巣に存在する総育房数は平均で5千、多い巣では1万を越える<sup>6)</sup>。これだけの数の育房で繭が作られている（図1A）。生物学的な観点から、スズメバチの繭の機能や構造を調べる研究はイスラエルのグループを中心に既に行われているが<sup>7)</sup>、繭を天然素材として利用しようとする取り組みは、これまでなされてこなかった。

我々は、現在、カイコ、クモなどの昆虫をはじめとした節足動物が作るシルクの用途開発研究を進め、その一環として、ホーネットシルクの新素材としての可能性を探っている<sup>8)~10)</sup>。本稿では、著者らがこれまで行ってきた研究結果を中心に、ホーネットシルクの構造や特性、および抽出・精製法、成形法および成形物の構造と機能、素材としての優位性、および今後の展望等について概説する。

## 2. ホーネットシルクの分子構造

繭は穴の入口をキャップ状に覆っているだけでなく、育房の壁面に沿っても薄い繭が張られている（図2A）。キャップ部と壁面部の繭を、

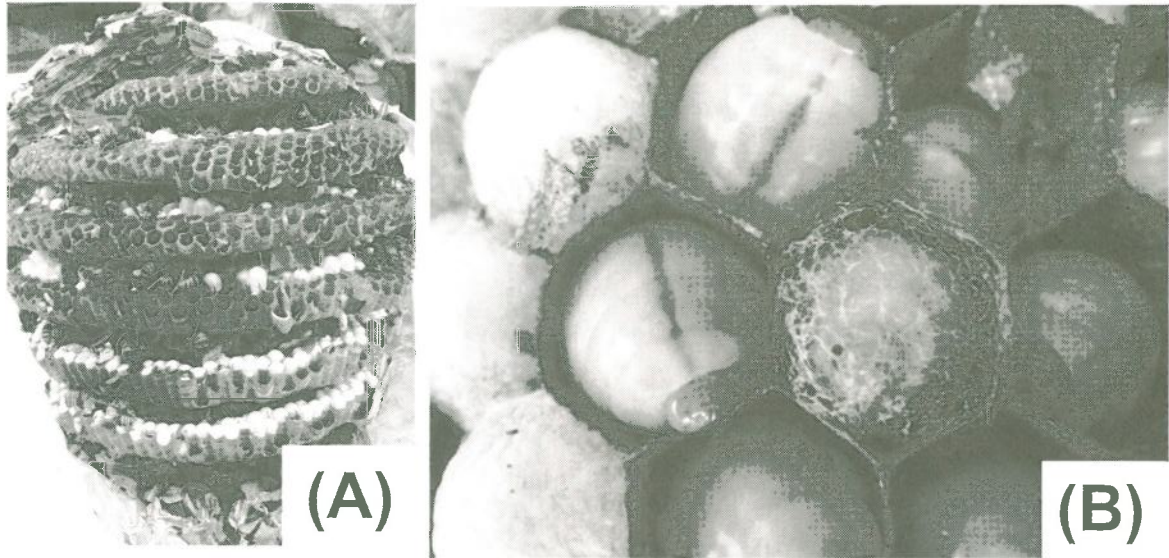


図1 キイロスズメバチの巣の内部 (A) と育房 (B) の写真  
育房の入口を塞いでいる白いキャップがホーネットシルクで作られた繭。図 (B) 中央は、ホーネットシルクを吐糸している幼虫。

$^{13}\text{C}$ 固体核磁気共鳴 (NMR) 法でそれぞれ測定した結果を図2BおよびCに示す。両方のスペクトルとも、共通して、ほとんどがタンパク質に由来するピークであり、繭中のタンパク質の純度が非常に高いことを示唆している。その他の成分として、ワックス成分に由来するシャープなピークが観測されている。このワックス成分は、NMRピークの位置から、斜方晶型結晶で構成された結晶化度85%以上の高結晶性ワックスであることが分かった。さらにGC-MS測定の結果から、このワックスは、ほぼ炭化水素だけで構成されており、エステル等を多く含むミツバチの分泌ワックス (ミツロウ) とは成分や結晶構造が異なっていることが分かった<sup>11)12)</sup>。

スズメバチの繭の固体NMRスペクトル (図2) には、AlaとSerのピークが相対的に強く現れている。アミノ酸分析の結果も、AlaとSerの合計がホーネットシルク全体の過半数を占めることを示唆した。一方、Glyは、カイコやクモのシルクには多く含まれているが、ホーネットシルクでは5%程度の含有量であった。また、芳香族アミノ酸に関するアミノ酸分析の結果は、Tyr, Phe, HisおよびTrpの全てが検出限界以下程度の含有量であることを示唆して

いた<sup>8)</sup>。しかし、酸でタンパク質を加水分解してアミノ酸量を定量する通常の方法では、Trpの存在量を正確に検出することができない。そこで、紫外共鳴ラマン法によって、繭の*in-situ*測定を試みた。その結果、ホーネットシルク中には比較的多くのTrpが存在していることが分かった<sup>13)</sup>。

ホーネットシルクのSDS-PAGE電気泳動分析を行うと、30-60kDaの範囲に4本のバンドが濃く現れる<sup>8)</sup>。そこで、我々は、これらのバンドに相当する4種類のタンパク質がホーネットシルクを構成する主成分 (分子量の低い方から *Vespa simillima silk* (Vssilk) 1, 2, 3および4と命名) と考え、各々のタンパク質をコードする塩基配列、およびアミノ酸配列を決定した<sup>14)</sup>。その結果、Vssilk 1-4は、いずれも、分子鎖内部がAlaリッチ領域、分子末端付近はSerリッチ領域になっていることが分かった。また、多くの繊維状タンパク質に共通して見られるアミノ酸の規則的な繰返し配列は、Vssilk 1-4にはほとんど存在しないことが分かった。これと同様の傾向は、最近になってアミノ酸配列が決定された、ミツバチの幼虫が作る繭の構成タンパク質 *AmelFibroin1-4*においても報告されてい

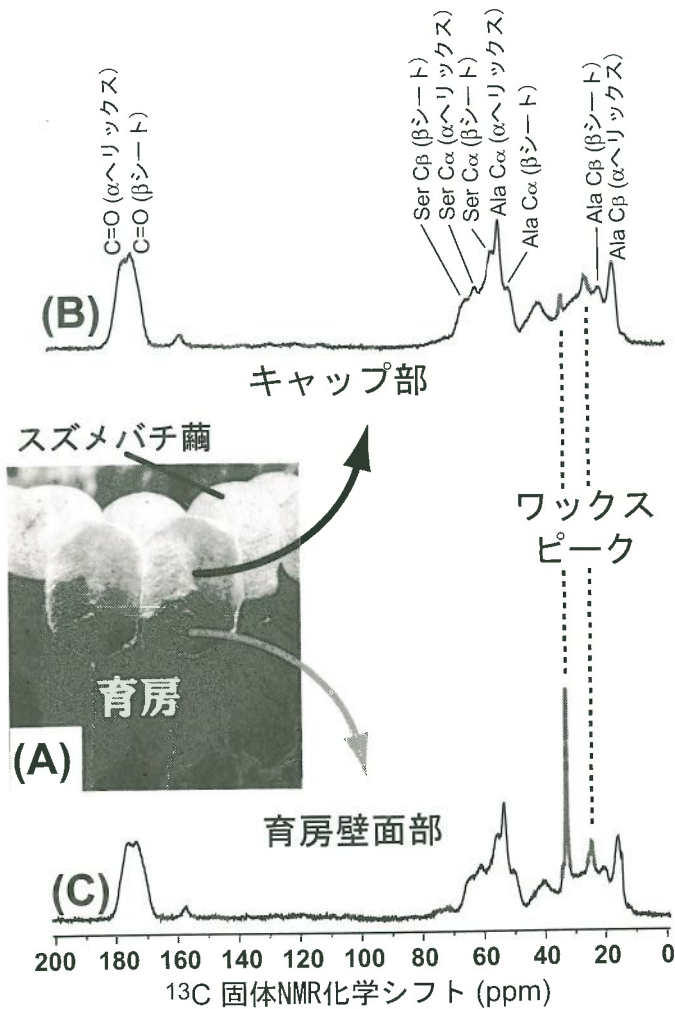


図2 繭がかぶった育房の断面 (A)  
 繭は育房の入口を塞ぐキャップ部と育房の壁面部に存在し、  
 それぞれの固体NMRスペクトルを (B) と (C) に示した。

る<sup>15)</sup>。VssilkとAmelFibroinの間のアミノ酸配列の相同性は非常に低い<sup>14)</sup>。

カイコやクモが吐糸した糸の高次構造は、 $\beta$ シートが支配的であることが知られている。ところが、ホーネットシルクの高次構造は、 $\beta$ シートも存在するものの、 $\alpha$ ヘリックスが支配的であることが固体NMR解析 (図2) から明らかとなった<sup>8)</sup>。糸の強度としては $\beta$ シート構造が有利であるが、成虫に守られて育つスズメバチの幼虫や蛹には強固な繭は不用であり、むしろ成虫が羽化する時に出やすいように、繭の強度はほどほどである方が都合が良いのだろう<sup>14)</sup>。

### 3. ホーネットシルクの抽出と成形加工法

繭にはワックス成分や巣盤の木くずの付着物といった不純物が含まれている。こうした不純物は、ホーネットシルクのみが臭化リチウム (LiBr) 水溶液に溶けるという性質を利用することで、ホーネットシルクを高収率で抽出し、精製粉末を得ることができる<sup>8-10)</sup>。なお、上記の条件で溶解した場合には、シルクタンパク質の分解は起こっていないことはSDS-PAGEによって確認された。

ホーネットシルクが溶解しているLiBr水溶液を透析してLiBrを除去すると、精製ホーネットシルクのゲルが得られた。ゲルの凍結乾燥により粉末に、また $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結した後の融解によりスポンジ状の多孔質にそれぞれ成形することができた。また、ホーネットシルクはヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) に分解することなく溶解することを見出した。この溶液を細いノズルからアルコール中に射出して巻取ること

で繊維状、平板に注いで乾燥 (キャスト) することで透明なフィルムに成形することができた。キャストで得たフィルムは、高い透明性と十数ミクロンの薄膜が得られることが特徴である。フィルム中に多少のHFIPが残存するが、水洗いで除去できる。しかし、有害なHFIPを製造過程で使用することの問題や、吸水すると極度に脆弱になり、フィルムの摘み上げ、切断、貼り付けなどの取扱いが困難になる等の欠点がある。こうした欠点を補うフィルム化方法として、ゲルフィルム化法を開発した (図3, 特許出願中)。これは、LiBrを透析で除去する過程で得られるホーネットシルクのゲルを、平板状に圧縮乾燥してフィルム化する方法である。こ



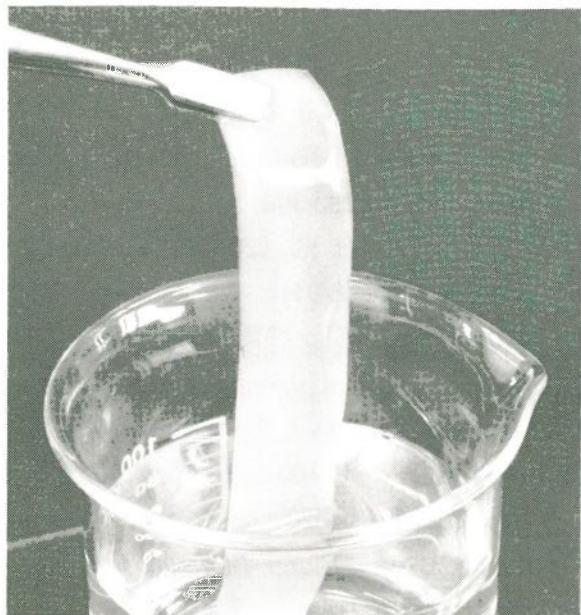


図3 ゲルフィルム化法で作製した  
ホーネットシルクフィルム

の方法であれば、有害な有機溶媒を全く使わないでフィルムを得ることができる。

#### 4. ホーネットシルクの機能と利用法

ホーネットシルクを成形することができても、他の素材にはない有用機能がなければ、素材としての利用はひらけない。そこで、ホーネットシルクの特長、機能について調べた。ゲルフィルム化法で得られたフィルムは、生体に対する安全性が高く、吸水状態で優れた力学的強度と柔軟性を有する。また、120℃のオートクレーブ中で20分間滅菌処理を行っても、処理の前後における電気泳動パターンにほとんど変化が観測されず、分子の分解は極めて少ないことが分かった。さらに、細胞との親和性において、ホーネットシルクには従来のシルクにない細胞非接着活性という特性があることが分かった(特許申請中)。すなわち、繊維芽細胞のシルクに対する接着性を血清が共存する場合としない場合で比較したところ、絹フィブロインでは血清が共存することによって細胞の接着数が増加するのに対して、ホーネットシルクの場合には、

血清が共存すると、繊維芽細胞がほとんど接着しなくなるという、絹フィブロインとは対照的な結果が得られた。このような細胞非接着活性という特性は、創傷保護材、癒着防止膜、人工血管として有利であり、ホーネットシルクの医療用素材としての可能性を示唆している。精製したホーネットシルクの細胞に対する毒性が低いことや、重金属の含有量が蛍光X線の検出限界以下であることを既に確認しているが、今後、動物実験によってホーネットシルクの医療用素材としての安全性を調べていく予定である。

#### 5. 実用化における課題

ホーネットシルクの実用素材としての可能性を探るためには、まず、構造、機能、物性について、様々な角度から実験を行うのに十分な量の原料繭を確保する必要がある。スズメバチの駆除依頼件数は、ここ十数年の間に、特に都市近郊において大きく増加している<sup>4)</sup>。全国で駆除される巣の総数は定かではないが、名古屋市だけで年間に2,000個近くの巣が駆除されている<sup>16)</sup>。巣が大きくなる秋季では、キイロスズメバチの巣1個から20~30グラムの繭が採取できる。駆除された巣のほとんどが廃棄されている現状を考えると、こうした巣を利用することで、ホーネットシルクの素材としての機能を検証するには十分な量の繭が集められる。

しかし、ホーネットシルクの実用化を考えるならば、さらに大量の繭が必要になり、駆除される巣だけでは供給が間に合わない。そこで我々は、ホーネットシルクをコードする遺伝子を単離し、それをカイコに導入し、ホーネットシルクの特長を付与した新しい絹フィブロインとして、カイコから得ることを当面の目標とする。上述のように、ホーネットシルクの遺伝子情報は既に明らかになったので、遺伝子組換えカイコでホーネットシルクの性質を付与した絹を生産する準備は整いつつあると言える。

ホーネットシルクの素材化研究は始まったばかりである。未知の可能性を秘めたホーネット

シルクは、今後、様々な視点からの研究アプローチにより、新シルク素材としての重要な地位を築くと期待している。

## 6. 謝 辞

本研究の固体NMR測定は、(独)森林総合研究所との共同研究によって、当研究所所有のChemagnetics Infinity 300を用いて行いました。これらの成果の一部は、文部科学省科学研究補助金(若手研究(B) No. 18780041)の研究費を得て遂行しております。

## 文 献

- 1) 竹田敏 (2004), バイオサイエンスとインダストリー, 62, 825-828
- 2) 亀田恒徳 (2006), 繊維学会誌, 62, 72-75
- 3) 松浦誠 (2002), スズメバチを食べる(北海道大学図書刊行会)
- 4) 小野正人 (2003), ミツバチ科学, 24, 21-26
- 5) 阿部岳 (2006), 昆虫と自然, 41, 15-18
- 6) 松浦誠 (2004), ミツバチ科学, 25, 63-73
- 7) Joseph, Z. and Ishay, J. S. (2004), *J. Elect. Microscop.*, 53, 293-304
- 8) Kameda, T. et al. (2005), *Z. Naturforschung*, 60c, 906-914
- 9) 亀田恒徳 (2006), 特開2006-45076
- 10) Kameda, T. *Anal. Bioanal. Chem.*, in press
- 11) Kameda, T. (2004), *J. Ins. Sci.*, 4, 1-5
- 12) Kameda, T. (2005), *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 38, 4313-4320
- 13) Kameda, et al. *Biosci. Biotech. Biochem.*, in press
- 14) Sezutsu, H. et al. to be submitted
- 15) Sutherland, T.D. et al. (2007), *Genome Res.*, 29, 1414-1421
- 16) 山内博美 (2005), スズメバチ駆除対策実施結果2005-1983年~2005年, 23年間の調査結果から, 名古屋市生活衛生センター

## ◀国内情報▶

## いも類の収穫前茎葉処理機の開発

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  
 貝沼 秀夫・青木 循・久保田 興太郎・安食 恵治

バレイショ等いも類の収穫前茎葉処理は、いもの品質維持、皮剥け防止等の観点から重要な作業である。今回、開発した茎葉処理機は、従来機とは異なる新しい方式のもので、茎葉を引き抜いて処理することができる。自走式とトラクター装着式のタイプがあり、実験結果では処理率97~99%程度の高い作業精度を得ることができた。茎葉を引き抜いて処理する方法は、いもの表皮硬化が促進され皮剥けし難くなるなど多くの利用メリットがある。

## 1. はじめに

バレイショの収穫前茎葉処理は、収穫の作業性を向上、いもの品質維持、皮剥け防止等の観点から重要な作業である。

消費者ニーズに合致した農産物を供給するため、効率の良い茎葉処理機の開発は不可欠となっている。

このような状況を踏まえて、生研センターでは次世代農業機械等緊急開発事業の中で平成15年度より「いも類の収穫前茎葉処理機」の開発に取り組んできた。そして、バレイショを対象とした茎葉処理機を共同研究実施会社とともに開発した。本稿では、その構造・特徴、作業性能、利用のメリットについて述べる。

## 2. 開発の背景とねらい

我が国で栽培されているバレイショは20品種以上あり、作付け面積は平成16年度統計で87,200ha<sup>1)</sup>であり、そのうち北海道での作付けが55,400ha<sup>1)</sup>と6割程度を占めている。

北海道でのバレイショを用途別にみると、生食用15%、加工用21%、種子用6%、澱粉用

KAINUMA Hideo, AOKI Jyun,  
 KUBOTA Koutarou, AJIKI Keiji  
 〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

50%、その他8%となっている<sup>2)</sup>。収穫前の茎葉処理作業は、生食用や加工用においては①収穫作業性の向上、②いもの形状・品質の向上、③収穫時の皮剥け防止が主な目的であり、種子用においては①ウイルス汚染防止、②いもの粒揃いの向上が主な目的である。

バレイショの茎葉処理は一部の産地でチョッパー等を利用した機械処理が行われているものの、薬剤を用いる方法が一般的である。消費者や市場流通からは、薬剤に頼らない効率的な茎葉処理機の開発・実用化が求められている。

## 3. 従来技術の課題

現在、バレイショの茎葉を機械的に処理する方法としては、主にチョッパータイプの機械が利用されている。

チョッパータイプは、トラクター装着式のものと同走式のものがあり、いずれも地上の茎葉を細断して処理する機械である。地下の根部までは処理できないため、作物の生育停止が緩やかで、いもの形状に影響が出る場合がある。

この点を改善するため、地下の根部ごと茎葉を引き抜くように処理を行えば作物の生育を速やかに停止させることができ、表皮硬化が促進され皮剥けし難くなるなど品質面で有利な茎葉処理が行えると言われている。

#### 4. 開発機の構造・特徴

従来の茎葉処理機の問題点を改善するため、新たに開発する茎葉処理機は以下のような基本方針に基づくこととし、現場での様々なニーズに対応するため、自走式とトラクター装着式のタイプを開発した(図1)。

- (1) 茎葉処理機構は、品質上有利と言われている引き抜き方式とする。
- (2) 収穫時の妨げとならないように引き抜いた茎葉を細断する機構を備えている。
- (3) 2畝処理できる構造とする。

##### 1) 自走式

茎葉の引き起し部、引き抜き部、細断部から構成される茎葉処理機構を装備し、走行部は履帯式とした。操縦席は、作業の状況が確認し易いように機体左側の中央付近に配置した。

ディバイダーと爪付きチェーンで構成された引き起し部で茎葉を引き起し、そり状の畝押え部品で畝を押えながら、引き抜き部であるベルト部品で茎葉を挟持して引き抜く。

そり状の畝押え部品で畝を押えながら茎葉を引き抜くことで、いもの露出を抑制できる。また、畝押え部品のそり裏面は土壌の付着を防止するため樹脂板で構成している。マルチ栽培の場合でもマルチフィルムを破らずに畝押えができるため、マルチ栽培されたバレイショの茎葉

処理にも利用できる。

細断部は、ディスクカッターと水平に回転する切断刃で構成し、引き抜いた茎葉を細断するとともに、拡散させながらほ場へ放出することができる。

##### 2) トラクター装着式

茎葉の細断部、引き起し部、引き抜き部から構成される茎葉処理機構を装備したトラクター装着式の茎葉処理機である。作業時の平均所要動力は14kW程度であるが、質量が680kgであるため、50kW(70PS)クラス以上のトラクターでの使用を推奨している。

畝の上面と側面をそれぞれ専用のフレールモアで構成された細断部で茎葉を細断することができる。細断後の株元を爪付きベルトで引き起し、ボール状の部品から構成した引き抜き部で茎葉を挟持して引き抜くことができる。

引き抜き部の後方に配置した車輪状の畝押え部品で、茎葉の引き抜きとともにまき上げて落下した土壌を鎮圧し、いもの露出を抑制することができる。

#### 5. 開発機の作業性能

開発した茎葉処理機の性能を確認するため、作業精度確認実験と作業能率確認実験を実施した。



図1 いも類の収穫前茎葉処理機(左:自走式,右:トラクター装着式)

1) 作業精度

生食用の主力品種である「男爵薯」と「メイクイン」を供試して、茎葉の処理率といもの露出率を調査した。実験は、生食用のバレイショとしては一般的な処理時期である茎葉が黄変し始める時期に実施した。また、参考として茎葉の性状が「男爵薯」や「メイクイン」と異なる加工用の品種である「ホッカイコガネ」についても同様の実験を行った。実験場所は、道立十勝農試内のほ場と実際の生産ほ場において実施した(表1)。

バレイショは品種によって茎葉の性状に特徴がある。「男爵薯」は早生の品種で、茎長は40~60cm程度、黄変初め時期であれば比較的茎葉の倒伏も少ない品種である。「メイクイン」は中生の品種で、茎長は60~80cm程度、比較的茎葉が倒伏し易い品種である。「ホッカイコガネ」は晩生の品種で、茎長は80~100cm程度と長いものの、茎径が株元で10mm以上と他品種と比較して太いため、倒伏し難い品種である。

「男爵薯」を供試した実験では、自走式、トラクター装着式とも99%程度の高い処理率であり、いもの露出も1%以内と少なかった。

「メイクイン」を供試した実験では、茎葉が倒伏した条件であったが、引き起し部が有効に作用し97~99%の処理率を得ることができた。いもの露出も1%以内と少なかった。また、自走式はマルチ栽培への対応を確認する実験も行

った。その結果、マルチフィルムを破ることなく円滑に作業が行え、無マルチ栽培のほ場と同程度の処理率、露出率であった。このため自走式については、マルチ栽培でも十分利用できることを確認した。

「ホッカイコガネ」を供試した実験では、自走式、トラクター装着式とも99%程度の高い処理率であり、いもの露出も1%以内と少なかった。

産地では通常、茎葉処理後2週間経過した時期より収穫作業を行うが、その時点でのほ場調査では、ほとんど全ての茎葉が枯凋しており、引き抜かれた茎葉も細断されることによって乾燥が促進され収穫作業への妨げは無かった。

2) 作業能率

条間72cm、畝長さ250mの北海道では一般的なバレイショほ場において作業能率を確認した。自走式、トラクター装着式とも作業速度1.1m/s程度で円滑に作業を行うことができ、有効作業効率90%程度で50a/h程度の作業能率であった。

また、自走式のガソリン燃料消費量は0.8L/10a程度で、トラクター装着式の作業時平均所要動力は14kW程度であった。

6. 開発機のメリット

茎葉を引き抜く方式の茎葉処理機は、地下の

表1 主要品種での作業精度

供試品種	作物条件								自走式			トラクター装着式		
	条間 (cm)	茎長 <sup>1)</sup> (cm)	茎数 (本/株)	倒伏率 <sup>2)</sup> (%)	茎葉重 (g/株)	いも重 (g/株)	いも数 (個/株)	塊茎深 <sup>3)</sup> (mm)	作業速度 (m/s)	処理率 <sup>4)</sup> (%)	いもの露出率 <sup>5)</sup> (%)	作業速度 (m/s)	処理率 <sup>4)</sup> (%)	いもの露出率 <sup>5)</sup> (%)
男爵薯 (H18京極町)	72	54	8.5	18	400	1000	8.8	52	0.8	99.2	1.0	1.2	99.4	0.9
メイクイン (H17十勝農試)	75	82	5.8	93	230	575	9.8	80	1.0	97.1	0.9	1.2	99.0	0.5
ホッカイコガネ (H16十勝農試)	75	85	4.8	50	573	1018	11.4	67	0.5	99.5	0.5	0.6	98.9	0.2

1) 茎長: 株元から成長点までの茎長さ。

2) 倒伏率: (調査区内において株元で90°に倒伏している茎数) ÷ (調査区内の全茎数) × 100

3) 塊茎深: 畝天面位置及び左右畝肩位置でのいもの深さの平均。

4) 処理率: (試験区内の全茎数 - 未処理茎数) ÷ (試験区内の全茎数) × 100

5) いもの露出率: (露出していたいも数) ÷ (作物条件から試算した試験区内の全いも数) × 100

根部まで処理でき作物の生育を速やかに停止させることができる。表皮硬化が促進され皮剥けし難くなり品質面で有利な処理方法であると言われている。また、茎葉や地下の根部が処理されることにより収穫能率の向上に寄与するなど多くの利用メリットがあると考えられた。そのような利用メリットを、以下のような実験を行い確認した。

### 1) 収穫時の皮剥け抑制効果

茎葉処理方法の違いが収穫時の皮剥け程度に及ぼす影響を検討するため、引き抜き又はチョッパー処理して、10日後に収穫したいもを1個ずつ容器（縦10×横12×高さ5cm）に入れて一定の振動（振幅25mm, 180Hz, 1分間）を与え、容器壁面に当たった衝撃で発生する皮剥け程度を5段階の指数で評価した。

その結果、引き抜き処理した区のいもでは、指数0（無傷）と指数1（1cm<sup>2</sup>以内の皮剥けが1ないし2カ所）の合計が95%程度と、チョッパー処理した区と比較して、皮剥けする程度は少なく、いもの表皮硬化が促進されていることが確認された。

また、実際の産地では、収穫されたバレイショは、収穫後出荷施設で大きさや形状選別を行うための選別ラインに流され、最終的に市場出荷される。そうした選別・出荷の工程でも皮剥

け等の損傷が発生すると言われている。特に早生品種を栽培し、早期出荷を行っている産地では、そうした状況が顕著に出るとのことであった。そのような産地の一つである檜山南部地域で、開発機を使用してもらったところ、引き抜き処理したほ場の出荷可能割合は、チョッパー処理した場合と比較して良く、引き抜き処理によって皮剥けし難いバレイショになっているとの評価を得た<sup>3)</sup>。

### 2) 収穫能率向上への寄与

主に生食用バレイショで利用されているダイガーとピッカーを組み合わせた収穫体系では、地下の根部が未処理のまま利用するとピッカーでの選別作業が大変であり改善が求められている。このため、実際の生産ほ場において、開発機による引き抜き処理とチョッパーによる細断処理という茎葉処理方法の違いが収穫作業に及ぼす影響を調査した。

開発機を利用した場合、地下の根部ごと引き抜いて茎葉処理を行うのに対して、チョッパーを利用した場合は、地上部のみを細断する作業であり、平均10.6cmの茎が刈り残されている状態であった。ダイガー作業は、茎葉処理方法の違いによらず17.8a/h程度の作業能率であった。その後、いもをピッカーで拾い上げる収穫においては、チョッパー処理した区の場合、い



図2 茎葉処理方法の違いによる選別作業状況の違い  
 (左：引き抜き区、右：チョッパー区)  
 ～引き抜き区では、根部等の夾雑物が無く作業が容易～

もと根部を拾い上げるため、選別作業に時間を要し、6.2a/h程度の収穫能率にとどまった。これに対して、開発機を利用した区では、根部等の夾雑物が少ないため、選別コンベア上での作業も容易で8.7a/h程度の作業能率を得ることができた(図2)。

開発機を利用して茎葉処理を行った場合、ピッカー作業が1時間当たり2a以上も高能率に行えることが確認された。また、ハーベスターを利用した収穫体系においても、茎葉や根部の処理が不十分であった場合、ハーベスターの茎葉等を除去する部品に作物が絡まることなど円滑な作業に支障を来す場合がある。さらに、その絡まりを作業者が除去しようとして回転部に挟まれるなどの作業安全上問題となる場合があるとのことであった。そのため、開発機のように茎葉を根部から引き抜き細断する茎葉処理方法は、ハーベスターを利用した収穫体系でもメリットがあるとの評価を得た<sup>4)</sup>。

## 7. おわりに

バレイショの品種は多く、茎葉の性状やいもの着生状況は多様である。また、生食用、加工用、種子用など用途毎に茎葉処理の目的も異なっており、それらの状況を正しく理解して開発を進めるとともに、開発した茎葉処理機が迅速に現場に導入されるためには、栽培技術を含め茎葉処理機の利用技術を検討しておくことも重

要であると考えた。そこで、開発とあわせて、品種、用途毎の処理適期の検討、開発機を円滑に利用するための栽培技術の検討などを行うため、北海道、農業改良普及センター、農業試験場、ホクレン農業協同組合連合会、関係農業協同組合連合会、関係農業協同組合、生産者、緊プロ参画企業、種苗管理センター、北海道農業研究センターなどとともに茎葉処理に関する研究会を設け意見交換を行ってきた。研究会の実施により、開発の方向性の確認、効果的な実験方法の検討、性能の評価を行うことができた。本機は、生産現場と共同で作り上げた茎葉処理機であると考えている。関係諸氏の多大なご協力に対して感謝の意を表す。

## 文献

- 1) 農林水産省(2005), 平成16年産「野菜生産出荷統計」, 47
- 2) 日本いも類研究会(2007), ジャがいもの用途別需要量の推移(都道府県報告による農水省特産振興課調べ) <http://www.jrt.gr.jp/>
- 3) 檜山南部地区農業改良普及センター(2003), 平成15年度試験展示ほ成績書, 29-40
- 4) 生研センター(2005), 第3回茎葉処理研究会資料

## ◀地域の先端研究▶

## 静電気を利用して農薬の付着性 向上に役立つ散布機を開発

静岡県農業試験場 園芸部  
山 根 俊

現在の農薬散布は薬剤の付着効率が低く、農薬投下量の無駄や周辺環境への飛散が指摘されている。静岡県農業試験場では付着効率を高める技術として静電散布装置を開発した。装置の特徴は、市販の動力噴霧機用ノズルを利用した簡易な構造と、パルス電流を用いた安価な帯電用電源装置である。従来付着させにくかった部位に対して静電気の力で薬剤を付着させることができる。今後フィールドでの試験を重ねて実用化を目指す。

### 1. はじめに

国内農業における病害虫の防除作業は、大正時代から動力噴霧機（以下、動噴と略す。）を用いた農薬の液剤散布が広く行われてきた。動噴は機構が単純で安価であり、取り扱いが容易なために、現在も薬剤散布作業の主流となっている。

動噴は便利な散布方式であるが、問題点も指摘されている。それは薬剤の付着効率が低いことである。噴霧した薬剤の大部分は飛散するか土壌へ滴下しており、ひどい場合は実際に付着する農薬量が噴霧量の10%程度にすぎないケースがある。農薬経費は高額であるため、無駄な農薬の投下を極力抑制することが求められている。さらに圃場外に飛散する農薬（ドリフト）が近接圃場の作物に付着した場合、食品衛生法（残留農薬のポジティブリスト制度）に抵触する可能性も懸念される。

また近年では多数の噴霧ノズルを装備した、散布作業幅が非常に広い大形自走防除機（ブームプレーヤ等）が普及している。しかし大型自走防除機は大抵の場合ノズルが固定されていて、手散布のようにノズルを動かしながら、茂った作物体の内部や葉裏に薬剤を付着させるこ

とは難しい。

以上の背景を考慮し、静岡県農業試験場では、作物体へ効率よく農薬を付着させる技術のひとつとして静電散布の研究を行っている。その概要を紹介する。

### 2. 静電散布の歴史と国内での普及経過

液体や粉体に静電気を帯電させて散布し、対象物へ強制的に付着させるという技術は、古くから工業分野で静電塗装技術として広く普及している。これを農薬散布へ応用し、作物体へ効率良く薬剤を付着させる試みが、1960年代頃から欧米で多数行われた。日本でも70～80年代にかけて盛んに研究開発がなされ、静電散布装置の設計理論や、様々な特性と利点が明らかとなった<sup>1)～3)</sup>。

静電散布（誘導帯電）の原理を図1に示す。作物の葉の裏側（下側）など、通常では薬剤を付着させにくい部分にも、電荷の力（クーロン力）によって付着させることができる。

静電散布した液滴の運動を図2に示す。対象物の裏側（下面）に対して噴霧が回り込み、重力に逆らって吸着する様子がわかる。

静電散布は欧米では実用的な技術として、果樹園用噴霧機や航空散布にも応用されている。しかし残念ながら国内において普及に至った例

YAMANE Suguru

〒438-0803 静岡県磐田市富丘678-1



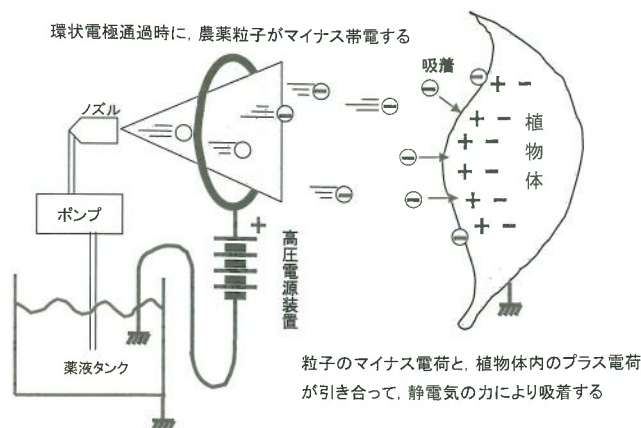


図1 静電散布の原理  
(誘導帯電induction charging)

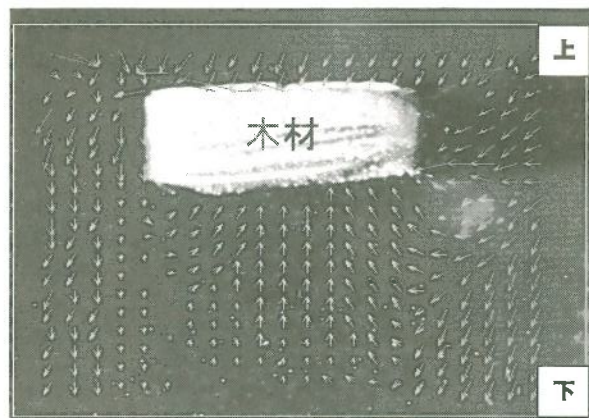


図2 静電散布した粒子が木材に付着する様子  
矢印の長さは速度，方向は運動の向きを表す。  
Particle Image Velocimetryにより作成。  
(協力：生研センター，(株)共立)  
ノズル噴霧粒径…80 $\mu$ m (VMD)

は施設栽培用を除いてほとんど無い。この理由は下記の二点と考えられる。

(1) 噴霧装置が複雑化し、コストが高い

静電散布では粒子が小さくなるほど、静電気の力(クーロン力)が粒子の運動を支配する。このため、薬液を数10 $\mu$ m以下できわめて均一に微粒化する二流体ノズル (air-atomizing nozzle) や遠心微粒化装置 (rotary atomizer) を使用する場合が多い。しかし構造が複雑で付帯装置も多く、高価である。また静電気を帯電させるためには数kV以上を発生できる高電圧直流電源が必要であり、コストが高い。

(2) 農薬登録の問題

前述の微粒子散布装置は一般的に散布量が少ないため、単位時間あたりの散布面積が抑制される。これを解決するには、農薬の倍率を高くして少量散布する作業方法(濃厚少量散布)が有効である。しかし我が国の農薬登録は低倍率希釈散布が基本であり、濃厚倍率で散布するには薬剤の登録をやり直す必要がある。

3. 静岡県農業試験場で開発した静電散布装置の特徴

これまでの静電散布の問題を解決するため、開発した装置は下記の特徴を持つ。

(1) 動噴用ノズルに帯電用電極を組み合わせた簡易な構造(図3)

市販の動噴用ノズルをそのまま利用した。噴霧に静電気を帯電させるための金属製環状電極を、絶縁材料(Poly-acetal)を用いてノズル噴口近傍に支持している。帯電方式は環状電極・誘導帯電(induction charging)である。各部の寸法は実験によって決定した。

ノズルの噴霧粒径はドリフトとの関係が深い。直径100 $\mu$ m以下の散布粒子は軽いので長時間空中を漂流し、遠距離のドリフトが発生する<sup>4)</sup>。一方、直径270 $\mu$ m以上では質量が大きく、帯電させても静電気の影響は小さい<sup>2)</sup>。そこで、ドリフト抑制と静電気の効果を両立させるため、平均粒径100~200 $\mu$ m前後のノズルを採用している。

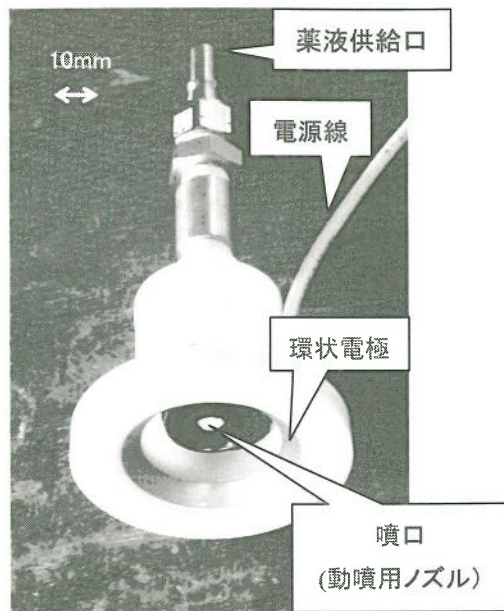


図3 開発中の環状電極・誘導帯電型ノズル

## (2) 低コストで簡易な帯電用電源装置 (図4)

静電散布装置には直流高電圧電源装置が必須であるが、非常に高価である。また電源とノズル電極の間を接続する高圧電線のコストが高く、耐久性も問題がある。

そこで単純な低圧パルス発生回路 (200Hz, 30Vpeak) と昇圧コイル (1 : 150) による低コストな帯電用電源を開発した。昇圧コイルは電極近傍に設置し、電源からコイルまでの配線は一般的な低圧ビニル電線で済むため安価・簡易である。電極部位に対して約4.5kV (peak) のパルス状電流を発生する設計とした。

## (3) 慣行の動噴散布と同じ散布倍率

動噴散布と同じ散布倍率で作業を行うので、農薬登録を新たにする必要がない。既存の大形防除機等に改造装着して使用することも容易である。

## 4. 開発した静電散布装置の性能

大形防除機の散布作業状態を室内実験で再現するため、ノズルを等速で水平移動させながら

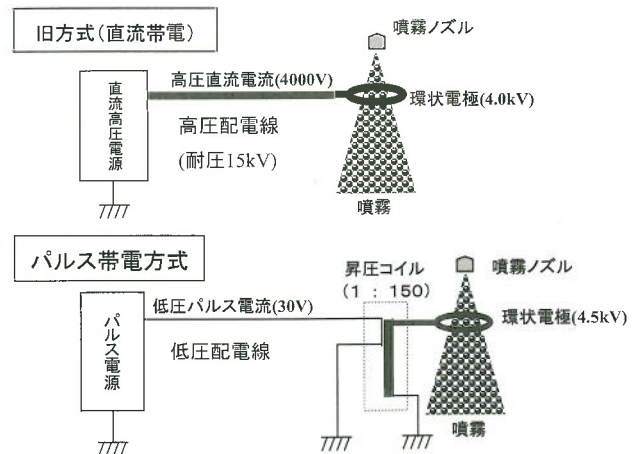


図4 パルス電源による静電散布装置の概念図 (太線部分が高圧部分)

下向きに散布する試験装置を製作した。噴霧対象物はキャベツの模擬作物体である。付着性能の測定は感水紙 (水が付着した部位が青く変色する) を利用し、変色部面積を被覆面積率として評価している。

## (1) 電極に付与する電圧が付着性能に及ぼす影響 (表1)

本実験では設定散布圧力が低い (0.8MPa) ため、やや極端な結果になっているが、無帯電で散布した場合、キャベツ模擬作物体の外葉裏面や最下葉裏面での付着が良くない。これらの部位は液滴が飛翔してくる方向に対し裏側になるためである。

一方、静電散布では結球側面と外葉裏面における大幅な付着の改善が見られ、特に電極印加電圧2.5kVおよび5kVで顕著である。本来、静電散布は静電微粒化が起きない範囲 (Rayleigh限界) ならば、電極電圧を上げるほど噴霧の電荷が増加し、付着性能は向上する。しかし本結果では、10kVまで電圧を上げると、逆に性能低下が見られた。10kVでは漏電か逆コロナ放電 (reverse corona, 後述) など、静電氣の帯

表1 電極付与電圧が静電散布の付着性能に与える影響

荷電の有無	付与電圧 (kV)	被覆面積率(%)		
		結球側面	外葉裏面	最下葉裏面
無荷電	-	51.8 a	5.0 a	1.1
	1.0	73.7 b	16.5 ab	1.4
	2.5	93.4 c	36.4 c	1.1
	5.0	99.8 c	28.1 bc	1.3
	10	87.9 bc	9.0 a	1.4

注) 被覆面積率 (%) …付着液滴が対象物表面を被覆した面積の割合  
a, b, c : 同列異符号間に有意差有り,  $p < 0.01$ , Tukey's method  
測定条件: ノズルCV1080 (VMD90  $\mu\text{m}$ ),  
散布量200L/10a相当, 散布圧0.8MPa  
噴霧対象: キャベツ模擬作物体

表2 ノズルの噴霧パターンと静電散布の付着性能

噴霧パターン	付与電圧 (kV)	被覆面積率(%)		
		結球側面	外葉裏面	最下葉裏面
扇形	4.0	77.5	30.4	20.0
中空円錐		92.1 *	68.3 *	11.6

注) 被覆面積率 (%) …付着液滴が対象物表面を被覆した面積の割合  
\* : 有意差有り  $p < 0.01$ , T-test  
使用ノズル: 扇形CV2180 (VMD141.84  $\mu\text{m}$ ),  
中空円錐TXVK12 (VMD147.44  $\mu\text{m}$ )  
測定条件: 散布量200L/10a相当, 散布圧1.5MPa  
噴霧対象: キャベツ模擬作物体

電効率を低下させる何らかの現象が発生していると思われる。

## (2) ノズル噴霧パターンと静電散布の性能 (表2)

市販されている動噴用ノズルの噴霧パターンは様々であるが、代表的な扇形噴霧 (Flat fan) と中空円錐噴霧 (Hollow cone) パターンの二種類について、静電散布装置と組み合わせで性能試験した。ここでは粒子径は150  $\mu\text{m}$ 程度と、従来使われてきた殺虫剤用動噴ノズルに対して二倍程度、直径の大きい物を選択した。

その結果、中空円錐噴霧は、最下葉裏面を除いて高い被覆面積率が得られた。環状電極の誘導帯電では、噴霧粒子が電極の極力近い位置を通過すると帯電効率が良いので<sup>2)</sup>、中空円錐噴霧はスプレーパターンがこの帯電方式に良く適

合していると考えられる。最下葉の裏面はどのような対策を行っても付着させることが困難であるが、この部分は出荷しないので、実害はほとんど無い。

## (3) パルス電源による静電散布の付着性能

開発したパルス電源装置は、3.9kV (Peak) のパルス電流を電極に発生でき、直流電源4.0kVで帯電させた場合と比較すると、ほとんど同様の付着性能が得られた。

## 5. 今後の課題

### (1) 装置に関する開発課題

開発している静電散布ノズルでは、環状電極近辺にも液滴が付着してしまう。電極に付着し

た水滴からは逆コロナ放電 (reverse corona) や漏電が生じる恐れがある。逆コロナ放電は逆極性のイオンが発生させ、噴霧の帯電を打ち消してしまう恐れがある<sup>5), 6)</sup>。本開発装置でも逆コロナが観察されるが、電極電圧 5 kV 程度以下では、支障になる程の帯電性能の低下は無いようである。漏電は、電極支持体の寸法や形状、材質が影響していると考えられ、最適化への技術開発が必要である。

農薬の性状 (乳剤, 水和剤, 懸濁剤など) の違いにより、静電散布が何らかの影響を受ける可能性もあり、調査しなければならない。

## (2) 性能評価に関する課題

付着性能は感水紙を利用し、水の付着面積で評価しているが、実際の農薬付着量に対する静電散布の影響についてはデータが少ない。また、フィールドにおける試験は端緒についたばかりである。静電散布を圃場レベルで、防除効果を含めて性能評価した事例は、国内では施設栽培を除けばきわめて少なく、早急なデータの蓄積が求められている。農薬散布量削減の可能性などを含め、具体的な評価を進めていきたい。

## 6. おわりに

最近になって、国内でも手持ち散布型の低コ

ストな静電散布装置の製品化が始まっている。当試験場としては、静電散布をブームスプレーヤや防除ロボットに組み合わせることで、病害虫防除効果だけでなく作業効率の良い散布作業体系を実現したいと考えている。将来、静電散布が減農薬および環境負荷低減技術の一助となれば幸いである。

## 文 献

- 1) 津賀幸之介 (1998), 新版静電気ハンドブック (静電気学会編), 第1版, 農薬散布, 753-756, オーム社出版局, 東京
- 2) 松尾昌樹 (1984), 精密防除その理論と実際 (講演要旨), 静電散布について, 農業機械学会, 17-27
- 3) G. N. Laryea, et al. (2004), 微粒化, 13 (41), 33-53
- 4) (社) 日本植物防疫協会編 (2006), 平成17年度農薬飛散対策に関する研究報告書, 日本植物防疫協会, 7-10
- 5) S. Edward Law (1978), Tr. of the ASAE, 21 (6), 1096-1104
- 6) 東山禎夫ら (1996), 静電気学会誌, 20 (3), 163-170

## ◀文献情報▶

ブタ卵子からのデモコルシン処理  
を併用したハンドメイド除核Chemically Assisted Handmade Enucleation of  
Porcine Oocytes.J. LI<sup>1,3</sup>, Y. DU<sup>1,3</sup>, Y.H. ZHANG<sup>1</sup>, P.M. KRAGH<sup>1,3</sup>,  
S. PURUP<sup>2</sup>, L. BOLUND<sup>3,4</sup>, H. YANG<sup>4</sup>, Q.Z.  
XUE<sup>5</sup>, and G. VAJTA<sup>1</sup><sup>1</sup> Department of Genetics and Biotechnology,  
and<sup>2</sup> Department of Animal Health, Welfare and  
Nutrition, Danish Institute of Agricultural  
Sciences, Research Center Foulum, Tjele,  
Denmark.<sup>3</sup> Institute of Human Genetics, Aarhus  
University, Aarhus, Denmark.<sup>4</sup> Beijing Genetics Institutes, Chinese  
Academy of Sciences, Beijing, China.<sup>5</sup> James D. Watson Institute of Genome  
Sciences, Zhejiang University, Hangzhou,  
China.*Cloning And Stem Cells*, 8, 241-250 (2006)

体細胞核移植においては、卵子から染色体に起因する遺伝情報をすべて除去することが重要である。特にブタ卵子は脂肪含有量が高く、明視野顕微鏡で染色体を確認することは困難であることから、一般的にはマイクロマニピュレーターを用いて細胞質の吸引等によって染色体を取り除いている。一方、マイクロマニピュレーターを用いないで核移植操作を行うハンドメイドクローニング法においては、卵子をランダムに半分に切断することから細胞質のロスが大きく、また、除核の確認のために行うヘキストによる染色とUV照射によって細胞質へダメージを与える可能性がある。これまで、化学物質による除核の試みも行われているが、核移植全体の効率からするとまだまだ問題が多い。そこで、完全ではない化学物質による除核操作と極体の位置を基準にして行う不正確な除核操作の折衷案として、減数分裂の第2分裂中期の卵子にデモコルシン等の薬物を作用させることにより卵

子表面に核クロマチンを含んだ隆起を作らせ、この部分をマイクロマニピュレーターを用いて除去することにより除核率を高めるといふ、化学物質の併用による除核操作が開発されてきた。化学物質を併用した除核操作は、ブタ卵子からの除核効率が高いと考えられることから、化学物質を併用した除核操作を取り入れたハンドメイドクローニング法が検討された。すなわち、成熟培養41～42時間後のブタ卵子を0.4 μg/mlのデモコルシンで45分間処理し、その後卵丘細胞の除去、プロナーゼによる透明帯の部分的消化を行い、細胞質の突起部分あるいは極体を目標にマイクロブレードを用いて卵子を切断して染色体を除去し、細胞質のみの部分にブタ胎子線維芽細胞をドナー細胞として用いた核移植を行った。デモコルシンを用いることにより、除核率が81%から90%へと高まった。また、デモコルシンを用いた除核によるハンドメイドクローニング法における融合率、卵割率、胚盤胞期への発生率は87%、97%、28%であり、デモコルシンを用いない従来のハンドメイドクローニング法と同等かそれ以上の成績であった。一方、マイクロマニピュレーターを用いた従来法においては、融合率や胚盤胞期への発生率には差はみられないものの、卵割率は69%と低かった。

体細胞クローン動物も数多く作出されてきているものの、核移植操作には高価な実験器具が必要という問題があった。デモコルシンを併用した除核によるハンドメイドクローニング法は、マイクロマニピュレーター等の高価な機器を必要としないことから、ブタにおける簡便で効率の高い体細胞核移植技術として多くの研究室で利用可能と考えられる。ただ、本方法の普及のためには、移植試験による産子への発育能等を十分に検討しておく必要がある。

(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▶

## 葉緑体は一酸化窒素の給源

Chloroplasts as a Nitric Oxide Cellular Source.

Effect of Reactive Nitrogen Species on Chloroplastic Lipids and Proteins

Sebastián Jasid, Marcela Simontacchi, Carlos G. Bartoli, and Susana Puntarulo

*Plant Physiology* (2006) 142: 1246-1255

一酸化窒素 (NO) は、動物と同様植物においても重要な役割を果たしているにもかかわらず、植物でのNO発生機構については未だ論争が続いている。基質はアルギニンか、亜硝酸か、一酸化窒素合成酵素 (NOS) か、硝酸還元酵素か、亜硝酸還元酵素か、それとも非酵素的なものなのか。それとは、別にNOの細胞内の発生場所もまた様々である。ミトコンドリア (Xuら 2003), パーオキシゾーム (Corpasら 2004), 細胞質・ミクロゾーム (Quら 2006)。葉緑体も名乗りを上げた。NO発色剤で細胞を染めると葉緑体が染まっていることは多くの論文でみてとれるが、確証がなかった。今回はそれが証明された。

ダイズ無傷葉緑体には、NADPH依存性で、NOS阻害剤であるアルギニン構造類似体で (L-NAME) で抑制されるNO発生系が存在する。この反応は煮沸葉緑体では起こらないことから、非酵素的反応ではなく酵素的反応であると考えている。ただ、この反応は、動物NOSで必須なCaとカルモジュリンを必要とはせず、動物NOSとは異なる酵素であると思われる。また、葉緑体は亜硝酸からもNOを発生する。葉緑体中もストロマではなく光化学系の存在するチラコイドで、この反応は起こり、光化学系Ⅱの阻害剤であるDCMUで阻害されるので、光化学系とカップルして起こる反応であることが類推される。この反応は硝酸を基質とせず硝酸還元酵素ではない、他の発生機構によるものと考えている。

では、NOは葉緑体でどのような生理作用を果たしているのか。まず、Hill反応による葉緑

体の酸素発生能を阻害する。言い換えれば光化学的リン酸化を阻害する。しかし、光化学系Ⅱの光量子収率は下げない。また、NOは光合成で発生する活性酸素の消去剤としての役割も果たしている。活性酸素による葉緑体膜脂質の過酸化とタンパク質のカルボニル化を抑制している。先に光化学系Ⅱの酸素発生抑制といい、NOは葉緑体の防御物質として働いているかのようなところがある。ところが、NOの活性酸素と反応してパーオキシナイトライドを生成するのだが、この物質は活性酸素よりも強力な酸化剤であり、脂質もタンパク質も過酸化してしまう。NOが活性酸素からの防御作用を持つということは、この物質の生成量は比較的少ないということなのか、今ひとつ気がかりである。

これら一連の報告をみると、様々な場所で、様々な機構でNOは発生している。刺激に応じてあるいは細胞組織に応じて発生機構は変化しており、一つの機構で説明しようとする考えが誤っているのかもしれない。

(抄訳：岩井純夫, IWAI Sumio, 鹿児島大学農学部)

## ◀文献情報▶

## 老化研究モデルとしての長寿命酵母

Long-lived yeast as a model for ageing research

Peter W. Piper

Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, Firth Court, Western Bank, Sheffield S10 2TN, UK

Yeast 23, 215-226 (2006)

酵母は分子生物レベルの研究が容易であることより、真核生物細胞機能を研究する上で欠かせないものとなっているが、老化研究のモデルとしても現在注目されている。

酵母では、12番染色体上にあるrDNA座に、9 kb単位のrDNAが100~200ヶコピー直列にならんでいる。この繰り返しは遺伝子的には不安定な箇所でもある。Sinclairらは、酵母の老化に染色体外に出現する染色体外環状rDNAが関係するとの、酵母の老化モデルを提案している。染色体外環状rDNAはDNA複製起点を持つが、娘細胞に効率よく分配されるための機能は持たない。その結果、一度生じた環状rDNAの数は、細胞分裂の度に母細胞の核の中で増えてくる。そして15~30回分裂後には環状rDNAは染色体DNA以上の量となり、おそらくそのことが必須の転写や複製に必要な因子の欠乏を起こすことにより死を招くことになるのであろう。

ショウジョウバエなどの研究で、ストレス耐性と寿命の間には相関があることが明らかにされている。そこで、酵母の寿命を長くする酵母遺伝子の取得法として、Kennedyたちは飢餓耐性変異に焦点をあてたスクリーニングを行い、4つの長寿命株を取得した。そのうちのひとつsir4-42は、テロメアやmating type遺伝子座のサイレンシングに関与するSir2/3/4p複合体の一つのタンパクであるSir4pにおける変異であった。sir4-42は、Sir4pの変異によりSir2/3/4p複合体が核に移行し、そのことでrDNAのサイレンシングを増強する。この変異

株では、酵母の寿命が45%も長くなる。これは、rDNAのサイレンシングが酵母寿命を長くすることができることの基本的発見でもあった。

その後の研究で、rDNAにおけるサイレンシングにはSir2pが関係し、その過剰発現で酵母の寿命(replicative lifespan)が長くなり、逆にSir2pの欠失で寿命が短くなることが示された。この酵母Sir2pの活性はrDNAのサイレンシングに限定され、そしてそれにより酵母の寿命を延ばすことに寄与すると考えられる。また寿命は、cdc6-1温度感受性変異(⇒複製起点開始の欠損)における染色体外環状rDNAの複製阻害によっても延ばすことができ、このことによっても酵母においては、rDNAのサイレンシングが寿命の引き伸ばしに大きく寄与することが示された。

さて、全ての器官、生物において、老化はミトコンドリアの機能障害と関連している。これは、外来的ROS(活性酸素種)生成の増加と、それによる蛋白質、脂質、DNAの酸化的損傷に起因する。長寿命のは乳類種の細胞は、短寿命のものより、よりストレス耐性がある。そして、ショウジョウバエやほ乳類における研究で、酸化ストレスへの抵抗性を強めることにより老化プロセスを遅くすることができる、との研究がなされている。酸化ストレスは、定常期酵母の寿命を決定する主要なファクターである。酵母においても、酸化ストレス耐性と寿命にはある程度の相関が見られる。飢餓耐性は、(その性質を利用し最初に長寿命uth1-4変異株がとられた)、酸化ストレスへの耐性が高められる状態である。その一つuth1変異株では、酸化ストレスにより誘導されるタンパク質(その消失はミトコンドリアのオートファジーによる分解を生じさせる)の欠損が見られる。

以上、酵母を使用した老化に関する様々な研究の成果が得られつつある。今後とも他の生物を使った研究とお互いに相補しながら、細胞の老化研究が進展していくことが期待される。(抄訳：家藤治幸, IEFUJI Haruyuki, 独立行政法人 酒類総合研究所)

## ◀文献情報▶

## 飼料中の脂質量及び共役リノール酸がアトランティックサーモンでの脂質代謝酵素活性及び遺伝子発現に及ぼす影響

Influence of Dietary Oil Content and Conjugated Linoleic Acid (CLA) on Lipid Metabolism Enzyme Activities and Gene Expression in Tissues of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.)

Sean R. Kennedy<sup>1</sup>, Michael J. Leaver<sup>1</sup>, Patrick J. Campbell<sup>2</sup>, Xiaozhong Zheng<sup>1</sup>, James R. Dick<sup>1</sup>, and Douglas R. Tocher<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling FK9 4LA, Scotland, United Kingdom

<sup>2</sup>BioMar Ltd., Grangemouth Docks, Grangemouth FK3 8UL, Scotland, United Kingdom  
*Lipids*, 41 423-436 (2006)

試験の目的は、アトランティックサーモンに共役リノール酸 (CLA) を投与することで脂質と脂肪酸代謝に影響を与え、有益な効果が得られるのではないかという仮説を検証することである。本研究では特に、脂肪酸酸化や高度不飽和脂肪酸 (HUFA) 合成などの脂肪酸代謝の主経路への効果を評価することが狙いである。

添加魚油の含量 (低脂肪~17%, 高脂肪~34%) 及びCLA (*cis*-9, *trans*-11 : *trans*-10, *cis*-12 = 1 : 10) 含量 (0, 1, 2%) の異なる飼料を3ヶ月間スマルトに給餌した。CLAのHUFA合成及び $\beta$ -酸化に対する影響を評価し、脂肪酸酸化及びHUFA合成経路の鍵となる遺伝子とペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) の発現量を血合筋, 白色筋, 肝臓で測定した。

肝臓では, CLAの投与によってHUFA合成と不飽和化酵素遺伝子発現量が増加したが, 高脂肪飼料では低下した。白色筋ではカルニチン・パルミトイルトランスフェラーゼ1 (CPT-1) 活性及び遺伝子発現量がCLAの投与

によって増加したが, 飼料中の脂肪含量では影響を受けなかった。CPT-1活性及び遺伝子発現量は $\beta$ -酸化と関係していなかった。肝臓ではPPAR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ の, 筋肉ではPPAR  $\alpha$ ,  $\beta$ の遺伝子発現量がCLAの投与によって増加する傾向にあった。すなわち, 脂肪酸代謝系の遺伝子発現量及び活性は飼料中のCLAや脂肪含量によって変動し, また, PPAR遺伝子発現量も制御されることが示唆された。肝臓でのHUFA合成及び不飽和化酵素遺伝子の発現量とPPAR  $\alpha$ 発現量の関係, 筋肉でのCPT-1発現量・活性とPPAR  $\alpha$ 発現量のCLAとの関係が確認された。

本研究によって, CLAをアトランティックサーモンに投与すると脂肪酸代謝とPPARが影響を受けることが示された。しかし, 魚類での飼料へのCLAの添加効果とPPARの機能を解明するためには, 更なる研究が必要である。

(抄訳: 竹村秀平, TAKEMURA Shuhei, 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19年度民間実用化研究促進事業のお知らせ

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では、平成18年度より、農林水産研究基本計画に即して農林水産業、食品産業、醸造業等の向上に資する画期的な生物系特定産業技術の開発を促進することを目的として、民間における実用化段階の研究開発に資金を提供する事業を開始しており、平成19年度においても、引き続き本事業を実施することとしています。この事業は、提案公募による委託方式（日本版パイ・ドール条項を適用した委託方式）で行うもので概要は以下のとおりです。

- 対象研究分野：農林水産業、飲食料品産業、醸造業等の向上に資する画期的な生物系特定産業技術の開発を目指した、生産現場、食品製造等現場への移行が可能な実用化段階の研究であって、製品化に向けた明確な計画（当該製品の実用化にあたり必要となる特許権等を既に有している等）が明らかなもの
- 研究期間：原則として3年間。
- 研究費の規模：1課題あたり1億円程度／年が上限
- 提案資格：生物系特定産業技術の実用化段階の研究開発を行っている民間の登記法人
- 募集期間：平成19年4月19日（木）～5月30日（水）
- 公募説明会日時及び場所：平成19年4月6日（金）午後2時～4時 生研センター東京事務所 2F 大会議室にて開催

募集要領等の詳細につきましては、下記のホームページをご覧ください。

<http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/marumin/kouboannnai/annnai.htm>

<お問い合わせ先>

新技術開発部 民間研究促進第1課

電話：03（3459）6565 FAX：03（3459）6566

E-mail：minkanken07@ml.affrc.go.jp URL：http://brain.naro.affrc.go.jp/



### ブレイン テクノニュース

バックナンバーのご案内  
第119号  
2007年1月15日発行

#### 総説

発熱植物ザゼンソウに見出された非線形体温制御システム  
……………伊藤 孝徳・伊藤 菊一

#### 総説関連情報

極小サイズ時系列のアンサンブル再構成による生態ダイナミクス推定法—農学における決定論的非線形予測とカオス制御の可能性—  
……………酒井 憲司

#### 国内情報

コムギの低温適応においてRNAの働きを助けるタンパク質  
……………中南 健太郎・Dale Karlson・今井 亮三  
黄色フラボノイド, オーロンによる黄色花の分子育種  
……………小埜 栄一郎・中山 亨

自然免疫における病原体認識蛋白質の多機能性

……………倉田 祥一郎  
昆虫のステロイドホルモン合成を抑制する神経支配の発見  
……………田中 良明・山中 直岐・片岡 宏誌

#### 地域の先端研究

細胞剥離法を用いたウシ性判別産子の生産に成功  
……………尾形 康弘・日高 健雅・松重 忠美

#### 文献情報

細胞質内精子注入時に原形質膜と先体を同時除去した精子を用いることにより, 卵子の活性化率と胚発生率が向上する  
……………(抄訳: 下司 雅也)  
一酸化窒素合成酵素はまた振り出しに……(抄訳: 岩井 純夫)  
回腸部に病変が認められるクローン病患者においてパネート細胞の産生する $\alpha$ デフェンシンは減少している  
……………(抄訳: 芦田 延久)  
レスベラトロールは, 高カロリー餌摂取マウスの健康および寿命を改善する……………(抄訳: 秦 淳一郎)

#### 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118号  
2006年11月15日発行

#### 総説

麹菌ゲノム解析の完了と今後の展望……………町田 雅之

#### 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  
……………北本 勝ひこ  
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……………岩下 和裕

#### 国内情報

イネケイ素吸収遺伝子の同定……………馬 建鋒  
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  
……………高林 純示・塩尻 かおり・小澤 理香

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—……………近藤 宣昭

ICSI-mediated gene transfer法によるトランスジェニックブタの作出……………長嶋 比呂志・池田 有希・齊藤 仁・松成 ひとみ・黒目 麻由子  
作業ナビゲータ……………濱田 安之

#### 地域の先端研究

名古屋コーチンのDNA識別法を開発  
……………中村 明弘・木野 勝敏・峰澤 満・野田 賢治・高橋 秀彰

#### 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……………(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……………(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……………(抄訳: 山口 秀明)

## 編集後記

120号をお届けします。本号では「DNAマーカー選抜による効率的育種」を特集に取り上げ、石本政男氏（北海道農業研究センター）にダイズについて、松元哲氏（野菜茶業研究所）にハクサイ等アブラナ科野菜について、山本俊哉氏（果樹研究所）に果樹類について、それぞれDNAマーカーを用いた育種効率化の実例をご紹介します。

その他の研究情報としては、賀来華江氏（明治大学）らにイネキチンエリシター受容体の発見、福田裕穂氏（東京大学）に植物の新規ペプチドホルモンの発見、亀田恒徳氏（(独)農業生物資源研究所）らにスズメバチの繭から創る新シルク素材の開発、貝沼秀夫氏（生研センター）らにいも類の収穫前茎葉処理機の開発、山根俊氏（静岡県農業試験場）に静電気を利用した農薬の付着性向上に役立つ散布機の開発についてご執筆戴きました。

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）、家藤治幸氏（(独)酒類総合研究所）、竹村秀平氏（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120号

平成19年3月15日発行

発行人 朝比奈 清

編集人 加藤 俊典

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