

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成19年5月15日発行（隔月1回15日発行）

ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.121

15 MAY, 2007

ブレインテクノニュース



抵抗性遺伝子による過敏感反応の誘導の例
(タバコ)



わが国に広く分布する野生のアカネズミ

植物の全身獲得抵抗性

独立行政法人
農業生物資源研究所
瀬尾茂美 ほか

アカネズミが有するタンニン 無害化メカニズムを解明

独立行政法人
森林総合研究所
島田卓哉 ほか

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

- 植物の誘導抵抗性—広範な病原体に有効な植物独自の自己防御システム— …… 1
高橋 英樹 (東北大学 大学院農学研究科)

総説関連情報

- 植物の全身獲得抵抗性 …… 5
瀬尾 茂美・光原 一朗 ((独)農業生物資源研究所)
- 植物の誘導全身抵抗性 …… 10
有江 力 (東京農工大学 大学院共生科学技術研究院)
- ジーンサイレンシングによる植物のウイルス抵抗性 …… 14
増田 税 (北海道大学 大学院農学研究科)

国内情報

- アカネズミが有するタンニン無害化メカニズムを解明 …… 18
島田 卓哉¹・齊藤 隆²・大澤 朗³ (¹(独)森林総合研究所 東北支所, ²北海道大学
北方生物圏フィールド科学センター, ³神戸大学 大学院自然科学研究科)
- ブタにおいて椎骨数を増大させ体を長くした遺伝子の解明 …… 23
美川 智 ((独)農業生物資源研究所 動物科学研究領域)
- 繋ぎ飼い飼養における新酪農システム実証試験 …… 28
道宗 直昭・志藤 博克・高橋 仁康・平田 晃・後藤 裕・川出 哲生・原田 泰弘・
皆川 啓子・山名 伸樹 ((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

- LAMP法と黄化葉巻病常発地域を活用した抵抗性トマトの選抜技術の確立 …… 32
福田 至朗・加藤 政司・穴井 尚子・矢部 和則 (愛知県農業総合試験場)

文献情報

- 体細胞核移植後のトリコスタチンA処置によるクローズドコロニーマウスのクローン作出 … 37
S. Kishigami et al. (*J. of Reproduction and Development*, 53, 165-170, 2007)
抄訳: 下司 雅也
- Gタンパク質連結型ABA受容体の発見 …… 38
X. Liu et al. (*Science*, Vol.315, Issue 5819, 1712-6, 23 March, 2007) 抄訳: 久保山 勉
- 乳酸菌のS-layerタンパクを被覆したリポソームの特徴づけ …… 39
Hollmann A. et al. (*Biochim. Biophys. Acta.*, 1768(3): 393-400, Mar. 2007)
抄訳: 芦田 延久
- シロアリに共生している原生生物は、やはりセルラーゼ産生に関与している …… 40
H. Watanabe et al. (*Eukaryotic Cell*, 5(9): 1571-1576, 2006) 抄訳: 鈴木 賢一

表紙の説明

(左写真) TMV抵抗性遺伝子Nを有するタバコ品種(右)と有さない品種(左)の葉にそれぞれTMVを接種した。右の品種では感染細胞が過敏反応を起こし、結果、壊死斑が出現している。左の品種では一見健全に見えるが、過敏反応が起きないためTMVは葉全体に蔓延している。

(右写真) アカネズミは、哺乳動物にとって有害なタンニンが多く含まれるミズナラやコナラなどの堅果(ドングリ)を大量に摂取、利用している。筆者らは、アカネズミが有するタンニン無害化メカニズムを初めて明らかにした。

詳細については、それぞれ5頁、18頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

植物の誘導抵抗性 —広範な病原体に有効な植物独自の自己防御システム—

東北大学 大学院農学研究科
高 橋 英 樹

誘導抵抗性は、植物が病原体の局部感染を受けたり、根圏生息菌などの非病原性微生物と相互作用することにより、広範な病原体に対して抵抗性を発揮するようになる自己防御システムのひとつである。抵抗性を誘導する微生物由来のエリシター分子や誘導抵抗性に関わる多様なシグナル伝達系の解析が進みつつある。誘導抵抗性の具体的な分子機構の理解は、誘導抵抗性を活性化するplant activatorの開発の点からも注目されている。

1. はじめに

病原微生物の局部感染を受けた植物では、幅広い病原体に対する抵抗性が植物体全身に誘導される現象が知られている。類似した現象は、病原体の細胞壁抽出物や土壌中に生息する非病原性根圏微生物などを施用した植物においても確認されている。おそらく自然界において、植物は、やがて遭遇するかもしれない病原体の感染から自らを守るため、病原体の局部感染や環境中の微生物との接触に应答し、あらかじめ防御应答機構を活性化させたり、迅速に防御应答機構を発動できるように準備を整えているのかもしれない。その抵抗性誘導現象は一口に「誘導抵抗性」と呼ばれているが、抵抗性が誘導されるタイミングやその制御に関わるシグナル伝達系は同一ではなく、また誘導抵抗性が認められる病原体と宿主の組合せや、抵抗性を誘導する非病原性微生物の性状なども多様である。したがって、「誘導抵抗性」とは、種々の要因により植物が広範な病原体に対する抵抗性を誘導する現象の総称であり、実際には様々なタイプの誘導抵抗性が存在するものと考えられる¹⁾。しかし、その具体的な分子メカニズムの解明が進みつつあるものは、一部の誘導抵抗性現象にとどまっている。本特集では、これまでに見出

TAKAHASHI Hideki

〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1

されている誘導抵抗性について概説するとともに、誘導抵抗性の分子機構の解明が進んでいる全身獲得抵抗性 (systemic acquired resistance: SAR) と誘導全身抵抗性 (induced systemic resistance: ISR)、さらにウイルス感染において同種ウイルスの2次感染を抑制する干渉現象とRNAサイレンシングについて最新の研究成果を紹介し、植物独特の自己防御システムである誘導抵抗性についての研究動向をまとめる。

2. 植物における誘導抵抗性現象

誘導抵抗性についての初期の報告としてしばしば紹介されるのは、Rossが行なったN遺伝子タバコとTMVを用いた実験である²⁾。Nをもつタバコ品種では、TMVに対して、ウイルス感染部位における急激な細胞死を伴う過敏感反応抵抗性を示す。その結果、ウイルスは局部壊死病斑部位に局在化し、それ以外の植物体組織にウイルスが移行・増殖することはない。ウイルス感染を免れた組織に再びTMVや他のウイルスを接種すると抵抗性を示す。同様の抵抗性誘導現象は、病原糸状菌間や病原細菌間あるいは異種病原体間でも多数報告され、全身獲得抵抗性 (systemic acquired resistance: SAR) と呼ばれてきた (本特集「植物の全身獲得抵抗性」を参照)。SARでは、サリチル酸シグナル伝達

系などの活性化に伴う一連の防御関連遺伝子の発現を伴うことが知られている。一方、植物生育促進作用をもつRhizobacteriaなどのPGPRや土壤中などに生息する非病原性微生物が植物根圏に定着した植物では、病原体に対する抵抗性が増強する現象も報告されている³⁾。それらの微生物の中には、生物防除資材として農業場面で用いられているものも存在する。また、*Pseudomonas fluorescens* WCS417を根部に施用したシロイヌナズナでは、施用により際立った遺伝子発現の変動は認められず、病原体感染後に防御関連遺伝子の発現が迅速かつ高レベルに誘導される現象（プライミング現象）が確認されることから、SARと区別して誘導全身抵抗性（induced systemic resistance: ISR）と呼ばれている（本特集「植物の全身誘導抵抗性」

を参照）。

3. 抵抗性を誘導する微生物とエリシター物質

糸状菌や細菌による誘導抵抗性においては、病原体の細胞壁成分や病原体に由来する多糖類、不飽和脂肪酸などの分子種が、誘導抵抗性を活性化するエリシターとして同定されている（表1）。それらの多くは病原微生物に共通に認められる構成分子や生産物であり、植物はそれらを病原体関連分子パターン（pathogen-associated molecular patterns: PAMPs）として認識し、一連の防御システムを始動させるものと考えられている。非病原性根圏微生物により誘導される抵抗性の中にも、植物が同様の分子パ

表1 病原体に対する誘導抵抗性が報告されているエリシター・微生物の例

エリシター・微生物タイプ	植 物	病原体
キチン・キトサン Chitin (All fungi)	Groundnut	<i>Phaeoisariopsis personata</i>
	Carrot	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
	Cucumber	<i>Botrytis cinerea</i>
	Potato	<i>Erwinia carotovora</i>
	Potato	<i>Rhizoctonia solani</i>
	Tomato	<i>Fusarium oxysporum</i>
	Wheat	<i>F. graminearum</i>
β -グルカン Liner oligo- β -glucoside (<i>Phytophthora</i> spp.)	Tobaccoなど	<i>Erwinia carotovora</i> など
Sulfated fucans Fucan oligosaccharide (brown algae)	Tobacco	<i>Tobacco mosaic virus</i>
菌体由来タンパク質・糖タンパク質 Pen (<i>Penicillium simplicissium</i>)	Arabidopsis	<i>Hyaloperonospora parasitica</i> など
EC3.2.1.4 (<i>Trichoderma longibrachiatum</i>)	Melon	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>
Sm1 (<i>Trichoderma virens</i>)	Cotton	<i>Colletotrichum</i> sp.
Cryptogein (<i>Phytophthora cryptogea</i>)	Tobacco	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>armoraciae</i> など
CWP (<i>Pythium oligandrum</i>)	Tomatoなど	<i>Ralstonia solanacearum</i> など
<i>Penicillium chrysogenum</i> extract	Cotton	<i>Verticillium dahliae</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> extract	Barley	<i>Blumeria graminis</i>
<i>S. cerevisiae</i> extract	Lettuce	<i>B. cinerea</i> and <i>R. solani</i>
脂質 Cerebroside B (<i>Fusarium oxysporum</i>)	Lettuceなど	<i>F. oxysporum</i> など
Lipopolysaccharide (Xanthomonads and Pseudomonads)	Pepperなど	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> など

病原体に対する誘導抵抗性が報告されている例を示した。これら以外に、ファイトアレキシン合成、防御関連タンパク質遺伝子の発現、oxidative burst、過敏細胞死などを指標として誘導抵抗性を評価した報告は多数ある。

ターン (microbe-associated molecular patterns: MAMPs) を認識するものがあると推察されている。また、そのエリシターと同様に抵抗性誘導活性を有する化合物も見出されている (表2)。それらの化合物の多くは、誘導抵抗性に関わるシグナル伝達分子やその類似物質であることが明らかになっており、植物に作用して病害抵抗性を発揮させる plant activator として、農業場面で実用化されているものも存在する⁴⁾。抵抗性を誘導する病原体由来エリシターや化合物の中には、誘導抵抗性におけるトランスクリプトームやプロテオーム解析がなされているものがある⁵⁾。誘導抵抗性において発現が変動する遺伝子やタンパク質のゲノムレベルでの解析が進み、さらにシロイヌナズナ変異体などを用いたシグナル伝達系の解析がなされることによって、多様な誘導抵抗性の分子機構が明らかになりつつある¹⁾。

4. 非病原性根圏生息菌による誘導抵抗性の例

土壌生息菌である *Pythium oligandrum* (PO菌) は、植物に病気を引き起こすことなく根圏

に定着する⁶⁾。PO菌は、*Rhizoctonia solani*によるジャガイモ黒あざ病、*Ralstonia solanacearum*によるトマト青枯病、*Pythium ultimum*によるてんさいの苗立枯れ病などを抑制することが明らかになっているが、その原因のひとつがPO菌の細胞壁に含まれるエリシチン様の糖タンパク質 (CWP) による誘導抵抗性であると考えられている⁷⁾。CWPを処理したトマト根でのcDNAアレイを用いた遺伝子発現変動の網羅的解析の結果は、サリチル酸を介したシグナル伝達系ではなくジャスモン酸とエチレンを介したシグナル伝達系が活性化されていることを示していた^{8, 9)}。さらに、ジャスモン酸シグナル伝達系に異常をきたした *jail-1* 変異体では、CWPによる病害抵抗性誘導が抑制されることから、ジャスモン酸およびエチレンを介したシグナル伝達系が、CWPによる誘導抵抗性を制御しているものと考えられた。また、CWP処理トマト根では、塩基性キチナーゼなどの感染特異的タンパク質 (PRタンパク質) やファイトアレキシン生合成系の酵素をコードする遺伝子など防御応答にかかわると考えられる遺伝子群の発現が上昇していた。それら発現が上昇する遺伝子の中には、シロイヌナズ

表2 病原体に対する誘導抵抗性が報告されている化合物・シグナル物質の例

化合物・シグナル物質	植 物	病原体
Reactive oxygen species		
Oxycom TM	Tobacco	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>
Signal and structurally related compounds		
Jasmonate	Potatoなど	<i>Phytophthora infestans</i> など
Salicylic acid	Tomatoなど	<i>Alternaria solani</i> など
BTH	Wheatなど	<i>Puccinia recondita</i> など
NCI	Riceなど	<i>Magnaporthe grisea</i> など
PBZ	Riceなど	<i>Magnaporthe grisea</i> など
Amino acid derivarate		
AABA	Tobacco	<i>Tobacco mosaic virus</i>
BABA	Arabidopsisなど	<i>Botrytis cinerea</i> など
Minerals and ions		
Phosphate	Barley	<i>Blumeria graminis</i>
Sugars		
Trehalose	Wheat	<i>B. graminis</i>

BTH: Benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester, NCI: N-cyanomethyl-2-chloroisonicotinamide, PBZ: probenazole, AABA: DL-2-aminobutyric acid, BABA: β -aminobutyric acid

ナにおいてエリシター誘導性のユビキチンリガーゼE3をコードする遺伝子として報告されているATL6のオーソログ (*LeATL6*) も含まれていた。この*LeATL6*のトマト細胞における一過的過剰発現実験から、*LeATL6*は、ジャスモン酸シグナル伝達系の活性化とジャスモン酸・エチレンシグナル伝達系の協調的なクロストークに関与していることを示すデータ得られている¹⁰⁾。非病原性根圏生息菌による誘導抵抗性の分子機構に、ユビキチン/プロテアソーム系が関与することを具体的に示した事例である。

5. ウイルスにおける誘導抵抗性と干渉作用

先に述べたTMV感染N遺伝子タバコにおける過敏反応において、糸状菌や細菌の2次接種に対する誘導抵抗性は、サリチル酸シグナル伝達系を介したSARとみなされている一方、弱病原性ウイルスの感染により同種のウイルスの2次接種に対して誘導される抵抗性現象は、干渉作用と呼ばれてきた。この干渉作用もウイルス感染における誘導抵抗性のひとつとみなすことができるが、現在ではRNAサイレンシングにより誘導される植物の防御応答と考えられている。ウイルス感染におけるRNAサイレンシングについては、本特集「ジーンサイレンシングによる植物のウイルス抵抗性」に詳しく述べられている。

6. おわりに

誘導抵抗性は、様々な種類の病原体に有効な抵抗性であることから、農業現場における病害防除の場面で実用化の可能性を秘めている。実際に、plant activatorとして実用化されている化合物は、誘導抵抗性を活性化することによっ

て効果を発揮するものと推察されている。誘導抵抗性を活用することにより、環境負荷の少ない病害防除システムの実現に期待したい。

文 献

- 1) Hammond-Kosack, K.E. and Parker, J.E. (2003), *Curr. Opin. Biotech.*, 14, 177-193
- 2) Ross, A.F. (1961), *Virology*, 14, 329-358
- 3) 久保田真弓 (2007) 生物農薬の新戦略とバイオコントロール研究の最前線 (百町満朗・対馬誠也 編集), 植物生育促進菌類利用の最前線, 64-72, 日本植物病理学会バイオコントロール研究会, 東京
- 4) 有江 力 (2006), 拮抗微生物による作物病害の生物防除 (百町満朗 監修), 生物防除資材の定着性解析と作用機構解析の行方, 238-245, クミアイ化学工業株式会社, 東京
- 5) Kazan, K. and Schenk, P.M. (2007), *Genomics in induced resistance : Induced Resistance for Plant Defence*, (Walters, D. et al. Eds), 31-64, Blackwell, Oxford, UK
- 6) 竹中重仁 (2007), 生物農薬の新戦略とバイオコントロール研究の最前線 (百町満朗・対馬誠也 編集), 生物防除微生物*Pythium oligandrum*利用の最前線, 101-112, 日本植物病理学会バイオコントロール研究会, 東京
- 7) Takenaka, S. et al. (2006), *Mol. Plant Pathol.*, 7, 325-339
- 8) Hase, S. et al. (2006), *Plant Pathol.*, 55, 537-543
- 9) Takahashi, H. et al. (2006), *Phytopathology*, 96, 908-916
- 10) Hondo, D. et al. (2007), *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 20, 72-81

◀総説関連情報▶

植物の全身獲得抵抗性

独立行政法人 農業生物資源研究所
瀬尾茂美・光原一郎

病原体に感染した植物細胞が病原体を封じ込めるために起こす過敏反応とそれに引き続いて誘導される全身獲得抵抗性は、植物の典型的な病害抵抗性反応である。なかでも植物版免疫とも言える全身獲得抵抗性は、シグナル伝達研究の格好のモデル系として注目を集めている。全身獲得抵抗性には植物ホルモン類が重要な役割を演じており、最近の研究からそれらの生合成系やシグナル伝達系を制御する因子の実体が明らかにされつつある。

1. はじめに

人間が病気に罹ると同様、植物も病気に罹る。病気とは、植物の一部や植物全体が萎れたり、腐敗したり、あるいはわい化したりするような健全ではない状態のことを指す。病気の原因となるものを病原体と言い、その原因の多くはウイルスや糸状菌、細菌などの微生物による感染である。自然界には多くの病原体が存在するが、植物に感染して発病させる種類は非常に少なく、植物は大方の病原体の感染から病気を免れている。病気を免れるこのような性質を抵抗性という。言ってみれば、植物は病原体に対する抵抗性を本来備えているのである。病害抵抗性には、植物がもともと有する細胞壁の硬さや抗菌性物質などにより発揮される静的な抵抗性から、感染後に新たに誘導される動的な抵抗性など、さまざまな形態が知られている。これらのうち、全身獲得抵抗性は、植物における獲得免疫ともいえる感染防御システムであり、自ら移動することができない植物の感染に対する適応戦略のひとつと考えられる。全身獲得抵抗性はまた、病原体の感染部位から感染シグナルを全身的に発信し、未感染組織に防御応答を誘導させる全身応答であることから、植物のシグナル伝達に関する研究のモデル系として注目さ

SEO Shigemi, MITSUHARA Ichiro

〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2

れている。そこで本稿では、全身獲得抵抗性の分子機構に関して、筆者らの研究も紹介しながら解説したい。

2. 過敏反応と全身獲得抵抗性

病原体が感染できる植物を宿主植物という。病原体の感染に感受性の宿主植物中では、病原体が容易に増殖・蔓延してしまう。一方、ある特定の病原体に抵抗性を示す植物のなかには病原体に感染した細胞が自殺することで病原体の全身への蔓延を食い止めようとするものがある。感染細胞が起こすこのような反応を過敏反応といい、主に病原体に対する宿主側の抵抗性遺伝子の応答が引き金となるものと考えられている。過敏細胞死は個体を生かすための積極的な自滅死であり、感受性植物の感染細胞で見られるような病原体の出す毒素による細胞死とは全く異なった意義を持つ。過敏反応を起こす病原体—植物の例としては、タバコモザイクウイルス (TMV) と TMV 抵抗性遺伝子 *N* を有するタバコ品種 (*NN*タバコ) の組合せが古くから知られており、過敏反応研究のモデル系として現在も広く使われている (図1)。なお、細胞死を伴わずに病原体の増殖を阻止する反応を起こす病原体—植物の組合せも知られており、必ずしも過敏反応 = 過敏細胞死ではない。

感染細胞で過敏反応がひとたび起きると、その細胞の周辺部ではリグニン化やスベリン化などが促進され、細胞壁が強化されるとともに、抗菌性物質や蛋白質が生産される。このような物理的・化学的防御手段によって感染細胞からの病原体の拡がりやさらに阻止される。その一方で、未感染の遠隔組織では、一連の防御反応が新たに誘導される。この過敏反応に伴い植物体全体で発揮される抵抗性を全身獲得抵抗性 (systemic acquired resistance: SAR) という (図2)。SARが成立すると、植物は同じ病原体の再感染に対して強い抵抗性を示すのみならず、他種病原体に対しても抵抗性を発揮するようになる。このように、SARは植物の免疫とも呼べる防御応答であるが、動物の獲得免疫とは大きく異なる点がある。それは、動物の場合、病原体の攻撃に対してリンパ球が迎え撃つが、植物の場合、そのような迎撃専門の細胞はなく、基本的に個々の細胞が防御にあたる点である。

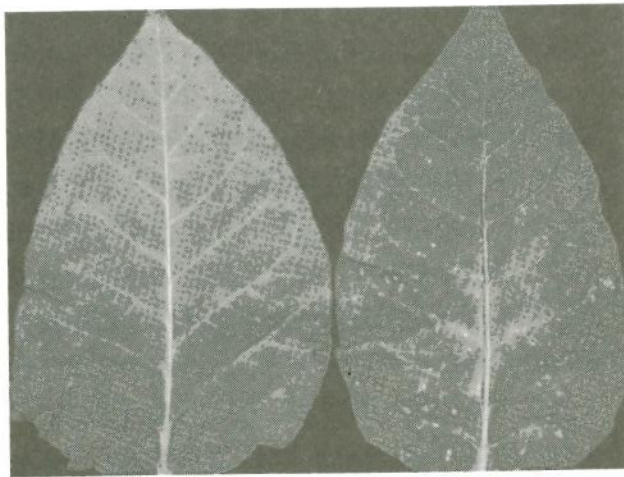


図1 抵抗性遺伝子による過敏反応の誘導の例
TMV抵抗性遺伝子Nを有するタバコ品種 (*Nicotiana tabacum* Samsun NN; 右) と有さない品種 (*N. tabacum* Samsun S; 左) の葉にそれぞれTMVを接種した。N遺伝子を持つタバコ品種では感染細胞が過敏反応を起こし、結果、壊死斑が出現している。N遺伝子を持たない品種の接種葉は一見健全に見えるが、過敏反応が起きないためTMVは葉全体に蔓延している。

3. 過敏反応の分子機構

SARの分子機構の解明のためには、その引き金となる過敏反応のことを理解する必要がある。過敏反応は、前述したように、病原体が非病原性遺伝子を持ち、宿主植物がそれに対応する抵抗性遺伝子を持つときに起こる。一般には、抵抗性遺伝子産物が非病原性遺伝子産物を直接的あるいは間接的に認識することにより過敏反応の引き金が引かれると考えられている。抵抗性遺伝子産物による病原体の認識は極めて特異性の高い反応であり、特定の病原体と宿主の間でしか起こらない。それに対して、病原体認識後の過敏反応やその後に誘導されるSARは、植物種や病原体の種類に関係なく観察される。つまり、病原体の認識は極めて多様な反応である一方、それらは少数の反応パターンに収束するのである。このことは、病原体認識から過敏反応その後のSARに至るまでの間には、植物共通の反応経路が存在していることを示唆している。そのような共通の反応経路

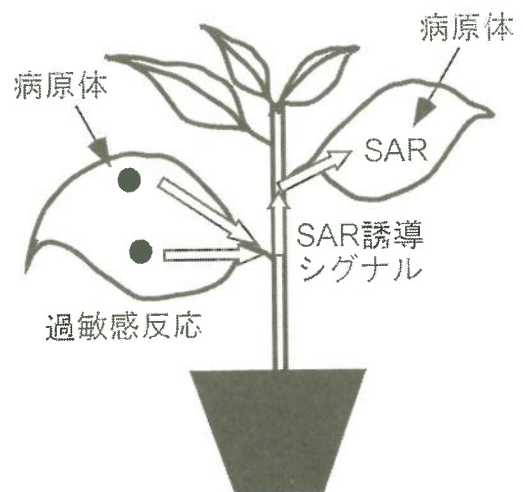


図2 過敏反応とSARの関係を示す模式図
病原体感染部位では過敏反応が起こるとともに、全身に向けてSARを誘導するためのシグナルが発信される。そのシグナルは未感染遠隔部位でSARを誘導する。

で機能する因子としてRAR1やSGT1, HSP90などがシロイヌナズナやイネ、タバコなど複数の植物種において同定されている¹⁾。これらは複合体を形成し、抵抗性遺伝子産物の機能発現や安定性に関与していると考えられている。さらにこれらの因子の下流では、WIPKとSIPKを主要な構成因子とするMAPキナーゼカスケードが機能することが最近の研究から示された²⁾。

MAPキナーゼは真核生物に普遍的に存在するセリン/スレオニンタンパク質リン酸化酵素で、細胞のシグナル伝達で重要な役割を演じる。植物のMAPキナーゼはその一次構造に基づき幾つかのサブグループに分けることができる。MAPキナーゼはその上流キナーゼであるMAPキナーゼキナーゼによってリン酸化され、これはさらに上流のMAPKキナーゼキナーゼによってリン酸化される。リン酸化されたMAPキナーゼはその主要な機能発現の場である核に移行し転写因子等をリン酸化することで遺伝子の発現制御に関わると考えられている。病原体の感染に応じて活性化されたWIPKとSIPKはWRKY（植物特有の転写因子の一種）を含むストレス応答性転写因子をリン酸化し活性化することで一連の防御遺伝子の発現を誘導する。このような遺伝子発現の誘導に加えて、これら両MAPキナーゼはシグナル物質であるジャスモン酸の生産を正に、サリチル酸の生産を負にそれぞれ制御することが示されている³⁾。また、別のシグナル物質であるエチレンの生産はSIPKによって正に制御される⁴⁾。

蓄積したジャスモン酸やエチレン、サリチル酸はPR (pathogenesis-related) タンパク質と呼ばれる一群の防御タンパク質発現を誘導する。PRタンパク質は、その一次構造や特性に基づき10以上に分類されており、その中には抵抗性反応に重要な役割を果たすと考えられている抗菌性タンパク質や二次細胞壁の主要構成成分であるリグニンの合成に関わる酵素なども含まれている。

このように、感染細胞では、抵抗性遺伝子産

物による病原体の認識後、RAR1やHSP90を経て活性化されたMAPキナーゼが転写因子群をリン酸化し活性化するとともに植物ホルモン類の生産を正または負に制御し、最終的にPR遺伝子を含む防御遺伝子群の発現が誘導される。感染細胞ではこれら一連の防御応答が起こるとともに、病原体を封じ込めるための細胞死も引き起こされる。過敏感細胞死の誘導にはHSP90, WIPKやSIPKなどのMAPキナーゼが必要であることが遺伝学的・生化学的解析から明らかにされている。したがって、少なくともMAPキナーゼまでのシグナル伝達経路は防御応答と細胞死の両方に必要であることを示唆する。さらに、細胞死の実行や促進には葉緑体や液胞に局在するプロテアーゼやミトコンドリアの崩壊が関与することが示されている⁵⁻⁷⁾。このようなオルガネラの崩壊・機能不全がどのようにして引き起こされるのかは十分には理解されておらず、その機構の解明は今後の課題である。

4. SARの分子機構

ひとたび過敏感反応が起こると、未感染遠隔組織ではサリチル酸の蓄積やサリチル酸応答性PR遺伝子群の発現が誘導される。蓄積したサリチル酸や誘導されたPRタンパク質遺伝子群は広範囲な病原体に対する抵抗性に関わると考えられている。サリチル酸からPRタンパク質遺伝子の発現に至るまでの反応経路では、NPR1と呼ばれる因子が重要な役割を果たしている。NPR1は通常は細胞質にオリゴマーとして存在しているが、サリチル酸による酸化還元電位の変化によってモノマーになる。活性型のモノマーNPR1は核に移行し、TGAファミリーなどの特定の転写因子と結合することでPRタンパク質遺伝子の発現を誘導すると考えられている⁸⁾。

サリチル酸に加えて、ジャスモン酸もまたSARで重要な役割を果たしていることが最近報告された。非病原性遺伝子RPM1を持つ*Pseudomonas syringae*とシロイヌナズナの系

を用いた解析から、感染葉の師部滲出液および未感染上位葉においてジャスモン酸の蓄積が起こること、未感染上位葉ではジャスモン酸合成・応答性遺伝子の発現誘導が起こることが示された⁹⁾。未感染上位葉におけるジャスモン酸蓄積はサリチル酸蓄積に先行して起こることがわかった。これらの結果から、ジャスモン酸はSARの誘導に関わるシグナルとして機能することが示唆された。サリチル酸はSARの確立には必要であるが、誘導のためのシグナルではないと考えられている。このように、SARにおけるジャスモン酸とサリチル酸の役割は異なっているらしい。

NPR1はサリチル酸のシグナルをサリチル酸応答性PR遺伝子へ伝達する因子としてSARで重要な役割を演じている。NPR1以外にも、SARに関わる因子が幾つか見つかっている。MPK4はWIPKやSIPKとは異なるサブグループに属するMAPキナーゼであるが、WIPKやSIPK同様、ストレスに反応して活性化される。シロイヌナズナの*mpk4*変異体ではSA含量の増大、SA応答性PR遺伝子の構成的発現、親和性の病原体に対する抵抗性の増強など恒常的にSARが起きていることから、MPK4はSARを負に制御する因子であることが示された¹⁰⁾。また、本変異体ではジャスモン酸応答性遺伝子の発現が抑制されていたことから、MPK4はジャスモン酸の下流で機能することが示唆された。シロイヌナズナの*dir1-1*は、病原体感染によって誘導されるはずのSARが起きない変異体である。この原因遺伝子は細胞外分泌タンパク質の一種であるlipid transfer protein (LTP) をコードしている¹¹⁾。興味深いことに、タバコのLTPはジャスモン酸と結合すること、このLTP-ジャスモン酸結合体は*Phytophthora parasitica*に対する抵抗性に寄与することが示されている。これらの知見を考え合わせると、DIR1がジャスモン酸と結合することでSARに貢献している可能性が示唆される。

SARにはサリチル酸やジャスモンがその誘導や確立のためのシグナル物質として機能して

いることを先に述べた。これらの物質以外にもSARに関わる内生あるいは外生の化学物質が同定されている。植物ホルモンであるブラシノステロイドはTMVを含む複数の病原体に対する抵抗性に関わることが示されている。ブラシノステロイド処理してもサリチル酸応答性PR遺伝子の発現は誘導されないことから、ブラシノステロイドによる抵抗性はサリチル酸非依存的経路で発揮されると考えられている¹²⁾。また、BTH (benzothiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester), INA (2,6-dichloroisonicotinic acid), プロベナゾール (3-allyloxy-1,2-benzisothiazole-1,1-dioxide), NCI (N-cyanomethyl-2-chloroisonicotinamide) などは外生のSAR誘導物質として知られている。これらの外生物質によるSARの誘導効果は病原体に対する殺菌作用によるものではなく、植物の抵抗性反応を誘発することで発揮された抵抗性によるものである。このような植物が本来有する抵抗性を高めることで病害抵抗性を付与する物質は、環境に与える影響も少ないと考えられることから、環境低負荷型農薬に利用できるものとして期待されている。

5. おわりに

以上、SARについて解説してきたが、その分子機構については不明な点が多く残されている。例えば、感染細胞から未感染遠隔組織へと伝達されるSAR誘導シグナルの実体はまだまだ明らかにされていない。本文中で述べたように、感染葉の師部滲出液に高含量のジャスモン酸が検出されることから本物質がそのような全身シグナルの可能性も示唆されているが、実験的には証明されていない。また、SARに関わるタンパク質や化学物質が多数見出されているが、これらの相互関係は十分には理解されていない。今後、これらの課題が解明されることを期待する。

文 献

- 1) Shirasu, K. and Schulze-Lefert, P. (2003), *Trends Plant Sci.*, 8, 252-258
- 2) Takabatake, R. et al. (2007), *Plant Cell Physiol.*, 48, 498-510
- 3) Seo, S. et al. (2007), *Plant J.*, 49, 899-909
- 4) Liu, Y. and Zhang, S. (2004), *Plant Cell*, 16, 3386-3399
- 5) Seo, S. et al. (2000), *Plant Cell*, 12, 917-932
- 6) Hatsugai, N. et al. (2004), *Science*, 305, 855-858
- 7) Mitsuhashi, I. et al. (1999), *Curr. Biol.*, 15, 775-778
- 8) Mou, Z. et al. (2003), *Cell*, 113, 935-944
- 9) Truman, W. et al. (2007), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 1075-1080
- 10) Petersen, M. et al. (2000), *Cell*, 103, 1111-1120
- 11) Maldonado, A.M. et al. (2002), *Nature*, 419, 399-403
- 12) Nakashita, H. et al. (2003), *Plant J.*, 33, 887-898

◀総説関連情報▶

植物の誘導全身抵抗性

東京農工大学 大学院共生科学技術研究院

有 江 力

植物は根圏微生物を認識すると、SARとは異なる、誘導全身抵抗性 (ISR) という抵抗性を全身で発動する場合がある。ISRは、サリチル酸に依存せず、ジャスモン酸およびエチレンに依存するシグナル伝達経路を介する。近年、根圏微生物の生物農薬としての実用化に向けて、ISRのメカニズム解析が進められている。

1. はじめに

植物は、外的な物理的、化学的、生物的障害から自らを守る機構を保持している。ワックスやクチクラ、カテコールやサポニン、植物が当初から保持している、それぞれ物理的、化学的な障壁であり、これらをまとめて静的抵抗性と呼ぶ。一方、植物が外的要因を認識して初めて立ち上がる抵抗性を動的抵抗性、あるいは誘導抵抗性と総称する。

植物の動的抵抗性は、動物の免疫システムほどシステマティックではないものの、さまざまなシグナル伝達経路を活性化することによって、病原や害虫などの様々な外的因子の攻撃から自らを防御しているとされる。病原の攻撃に対して機能する動的抵抗性には複数のシグナル伝達経路が関与することが報告されている。その中でもっとも解析が進んでいるのが全身獲得抵抗性 (systemic acquired resistance, SAR) であり、この経路についてはすでに詳しく紹介された (「植物の全身獲得抵抗性」参照)。SARがどちらかというとな植物の地上部において殺生的な病原に対する抵抗性を司るのに対して、主に腐生的な病原に対する抵抗性に関与する機構として誘導全身抵抗性 (induced systemic resistance, ISR) が知られている。本章では、ISRの発見の経緯、効果の範囲、関与す

ARIE Tsutomu

〒183-8509 東京都府中市幸町3-5-8

るシグナル伝達経路、最近の研究動向について概説する。なお、ISRについての総説は複数存在するので¹⁻⁵⁾など、詳しくはそちらをご参照いただきたい。

2. 誘導全身抵抗性 (induced systemic resistance, ISR)

根圏土壌中には数多くの微生物が存在する。根圏微生物の一部は、植物の生育促進などに関与することが知られており (plant growth promoting rhizobacteria, PGPRまたは、plant growth promoting fungi, PGPF)、すでに生物農薬 (植物成長調節剤) として利用されているものも存在する。さらに、根圏微生物の中には、土壌病害に対する発病抑制効果を示すものもある。その代表格が蛍光性*Pseudomonas*属細菌で、このような根圏微生物も、土壌病害に対する微生物殺菌剤として利用されつつある。過去の数多くの研究の結果、根圏微生物による土壌病害の防除のメカニズムは、抗菌性物質による抗菌、細胞壁分解酵素等による溶菌、シデロフォア産生等による養分の競合などによって説明されてきた。しかし、*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (FOD) によって引き起こされるカーネーション萎凋病に生物防除活性を有する*P. fluorescence* WCS417は、それまで知られていたものとは異なる新たなメカニズムで発病抑制をしていることが明らかにされた。すな

わち、カーネーションの根部を2つに分けて片方にWCS417を、もう一方に1週間遅れてFODを接種すると発病が低減したこと、さらには、WCS417の死菌体処理によっても同様な効果が見られたことから、この防除効果には植物の因子が関与していることが示唆されたのである。同様なことは、カブを用いた試験でも確認され、これらを総合して、この根圏細菌が、植物に抵抗性を誘導することで病気の発生を低減していること、その誘導抵抗性を、誘導全身抵抗性 (ISR) と呼ぶことが提案された^{6, 7)}。

3. ISRの普遍性

SARは、非常に多くの植物種において機能していることが確認されている。ISRも多くの植物種で機能すると考えられているが、未だ単子葉植物で機能している旨の報告はないようである^{1, 5)}。

ISRは当初、土壌病害に対する抵抗性として見出されてきたが、その後、茎葉部病害である灰色かび病や炭疽病、あるいはウイルス病にまで効果があることが判明してきた²⁾。従って、

ISRは、植物が根圏で収集した情報に基づいて発動する、とても普遍的な全身抵抗性誘導機構であると理解することができる。

4. ISRのメカニズム

前述したWCS417を用いた実験例で、WCS417を直接処理した部位以外でも抵抗性が誘導されていること⁶⁾、*P. aeruginosa* 7NSK2を根部に処理したインゲンマメで、7NSK2が全く分離されない茎葉部でも灰色かび病の発病が抑制されること⁸⁾などから、ISRは全身的 (systemic) な抵抗性の誘導を伴うことが確認されている。すなわち、植物が根部で根圏微生物の存在を認識したことが、シグナルとして地上部を含む全身へと伝達されていることになる。

SARの場合、植物が病原などを認識した結果立ち上がる局所的な反応は、サリチル酸関連物質あるいはその他の物質を介するシグナル伝達経路を通じて全身に伝えられ、全身において抵抗性が誘導される (図1)。ISRでも、根部で受容した信号を全身に伝え、抵抗性を誘導す

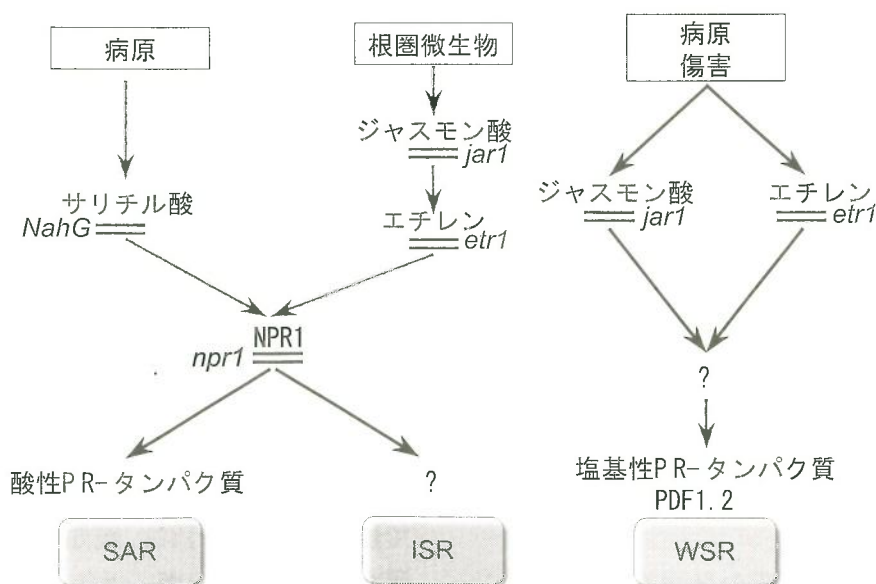


図1 誘導全身抵抗性 (ISR), 全身獲得抵抗性 (SAR), 傷害誘導全身抵抗性 (WSR) に関わると想定されているシグナル伝達経路

NahG, *jar1*, *etr1*, *npr1*は、それぞれ、サリチル酸非蓄積、ジャスモン酸非感受性、エチレン非感受性、転写制御因子NPR1欠損変異植物を示し、これらの変異植物では、それぞれのシグナルがそれより下流に伝わらない。

るに至る過程で、シグナル伝達経路が関与する。ISRにおけるシグナル伝達に関する研究は盛んに行われているものの、未だSARほど明確にされてはいない。これまでに明らかになっているISRシグナル伝達経路の特徴を纏めると、

- (1) サリチル酸に依存しない：*P. putida*由来のサリチル酸ヒドロキシラーゼ遺伝子を発現させ、サリチル酸を蓄積できなくなった*NahG*植物（シロイヌナズナ、トマトなどで利用可能）でも根圏微生物による抵抗性誘導は起こる。これは、ISRがサリチル酸に依存しないシグナル伝達経路を介していること、その経路がSARとは異なることを示している（図1）。また、これは、ISRが誘導されている場合に、SARのマーカであるサリチル酸の蓄積、酸性PR-タンパク質遺伝子の発現を伴わないことによっても支持される。
- (2) ジャスモン酸・エチレンに依存する：ジャスモン酸非感受性 (*jar1*) およびエチレン非感受性 (*etr1*) 変異植物（シロイヌナズナ、トマトなどで利用可能）に、根圏微生物を処理した場合に、病害抵抗性が認められなくなる。これは、ISRがジャスモン酸・エチレンに依存するシグナル伝達経路を介していることを示している（図1）。
- (3) 転写制御因子NPR1を介している：NPR1は、SARにおいて転写制御因子として機能している。*npr1*変異植物（シロイヌナズナなどで利用可能）に根圏微生物を処理した場合、*jar1*や*etr1*と同様に、病害抵抗性が認められなくなる。これは、ISRでもNPR1が転写制御因子として機能していること、ISRとSARがNPR1を介してクロストークしている可能性を示唆している（図1）。
- (4) 既知PR-タンパク質の発現を伴わない：SARでは関連因子として、複数の酸性PR-タンパク質がNPR1の制御下で発現し、そのうち幾つかは直接的に病原の制御に機能していることが知られている。また、傷害

などで誘導される別の抵抗性において、複数の塩基性PR-タンパク質が発現することが知られている。ISRにおいては、これら既知のPR-タンパク質の発現は認められないのが特徴である¹⁰⁾（図1）。

5. 最近の研究動向

近年、ISRの実際場面での利用が始まろうとしている。それに伴って、ISRのメカニズム研究も盛んに行われるようになってきた。例えば、*P. fluorescence*を有効成分とした生物農薬「セル苗元気」は、抵抗性誘導によってトマト青枯病や根腐萎凋病等を防除するとされているが、そのメカニズムはISRであると推測されている¹¹⁾。また、*Pythium origandrum*は、トマト根圏に処理すると根腐萎凋病を防除するが¹²⁾、この防除効果が、*P. origandrum*の細胞壁タンパク質エリシターを認識したトマトがジャスモン酸依存経路を介したISRを発動した結果であるとされている¹³⁾。一方、茎葉散布型土壌病害用プラントアクチベーターとしての利用が検討されているバリダマイシンA¹³⁾も、トマトにISRを誘導していることが推測されている¹⁴⁾。エチレン依存の抵抗性は強光下では発動せず、弱光～暗黒化で発現するとの報告もある^{15, 14)}ため、光などの環境条件とISR誘導の関係の解析にも興味を持たれる。SARとISRはどちらも転写制御因子であるNPR1を要求する（前出）が、その定常的発現があれば十分であり、特にNPR1の高発現を要求するわけではない。また、SARとISRは拮抗的ではなく、独立して誘導がかかる。従って、抵抗性誘導による病害防除効果の向上には、SARとISRを同時に誘導することが有効であることが示唆されている¹⁶⁾。ISRでは、前述のように、既知PR-タンパク質の発現が誘導されないが、近年、シロイヌナズナやトマトのcDNAアレイ等を用いた網羅的解析によって、ISRの誘導に付随して発現する遺伝子が探索されつつある^{17, 18)}。中でも、シアン代謝に関与するβ-シアノアラニンシンターゼ遺伝

子は、トマトにおけるISRのマーカー遺伝子とされ注目されており¹⁸⁾、今後ISRに関わるシグナル伝達経路の全貌が解明されるのに寄与することが期待されている。

文 献

- 1) Van Loon, L. C. et al. (1998), *Ann. Rev. Phytopathol.* 36, 458-483
- 2) 長谷 修 (2001), 植物感染生理談話会論文集 37, 15-24
- 3) Hammerschmidt, R. (1999), *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 77-84
- 4) Vallad, G. E. & Goodman, R. M. (2004), *Crop Sci.* 44, 1920-1934
- 5) 染谷信孝 (2005), バイオコントロール研究会レポート 9, 66-78
- 6) Van Peer, R. et al. (1991), *Phytopathology* 81, 728-734
- 7) Van Peer, R. & Schippers, B. (1992), *J. Plant Pathol.* 98, 129-139
- 8) De Meyer, G. & Hofte, M. (1997), *Phytopathology* 87, 588-593
- 9) Verhagen, B. W. M. et al. (2004), *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 895-908
- 10) Van Wees, S. C. M. et al. (1999), *Plant Mol. Biol.* 41, 537-549
- 11) 有江 力 (2006), 今月の農業50 (11), 20-24
- 12) Benhamou, N. et al. (1997), *Phytopathology* 87, 108-122
- 13) Takenaka, S. et al. (2006), *Jpn. J. Phytopathol.* 72, 267
- 14) 濱川 陽 (2007), 平成19年度日本植物病理学会大会プログラム・講演要旨予稿集, 137
- 15) Zeier, J. et al. (2004), *Planta* 219, 673-683
- 16) Van Wees, S. C. M. et al. (2000), *PNAS* 97, 8711-8716
- 17) Verhagen, B. W. M. et al. (2004), *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17: 895-908
- 18) Takahashi, H. et al. (2006), *Phytopathology* 96, 908-916

◀総説関連情報▶

ジーンサイレンシングによる植物のウイルス抵抗性

北海道大学 大学院農学研究院
増 田 税

植物は、抵抗性遺伝子による防御機構の他に、ウイルスを認識し、配列特異的に抑制するシステムを備えている。これはRNAサイレンシング (Post-transcriptional gene silencing, PTGSと呼ばれることもある) と呼ばれている。これに対してウイルスはサブプレッサータンパク質を出し、カウンター攻撃でこのサイレンシングを抑制しようとする。植物とウイルスの攻防をサイレンシングという現象に焦点をあてて紹介する。

1. はじめに

RNAサイレンシングは10年ほど前に発見され、研究対象の生物によってRNAi (線虫, ショウジョウバエ), Quelling (アカパンカビ) そしてPTGS (植物) などと呼ばれている。ファイアーとメローが線虫のRNAiの研究によって2006年にノーベル賞を受賞したことは記憶に新しいところであるが、初期のRNAサイレンシングの研究はむしろ植物学者によって推進されたと言っても過言ではない。例えば、1995年にダガティーはウイルスに感染した植物で病徴が消失する現象を見出し、「リカバリー」として報告しているが、その論文には既に今日のRNAサイレンシングの概念が示されている。ファイアーらの発見の前のことである。その後、多くの植物ウイルスの研究者がRNAサイレンシングの研究に参入し、siRNAの発見やサイレンシングサプレッサーの解析などに多大な功績を上げている。これには理由がある。前述の「リカバリー」から想像できるように、植物のRNAサイレンシングは、ウイルスに対する防御機構として機能していると考えられたからである。今日では、植物ウイルスに限らず、動物ウイルスにおいてもRNAサイレンシングは重要な役割を果たしていると認識されている。

MASUTA Chikara

〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

2. RNAサイレンシングとウイルス抵抗性

植物は、RNAサイレンシングと抵抗性遺伝子の2つのメカニズムを使用してウイルスに対抗している¹⁾。それぞれ独立していると考えられるが、両者にまたがって機能する因子も見出されており、クロストークによるより高度な防御ネットワークの存在も想定される。しかし、ウイルスは、RNAサイレンシングによる植物の抵抗性に対してすら、カウンター攻撃を準備しており、サイレンシングサプレッサーを装備している。このタンパク質は既に多くのウイルスで同定されており、構造タンパク質、複製酵素など様々である。

RNAサイレンシング経路を図1に示す。ウイルスRNAは細胞質で起きるサイレンシングによって宿主からの攻撃を受ける。まず、細胞が2本鎖RNA (dsRNA) を認識し、これをDicerという酵素でsmall interfering RNA (siRNA) と呼ばれる21-24ヌクレオチド (nt) のdsRNAに切断する。ウイルスRNAは自身のコードする複製酵素によってdsRNAである複製中間体を形成するため、このdsRNAがDicerによって認識され、siRNAが生成される。また、別の経路では、RDR6と呼ばれる宿主のRNA依存型RNA複製酵素によってウイルスRNAを鋳型にdsRNAが形成され、Dicerによる切断で

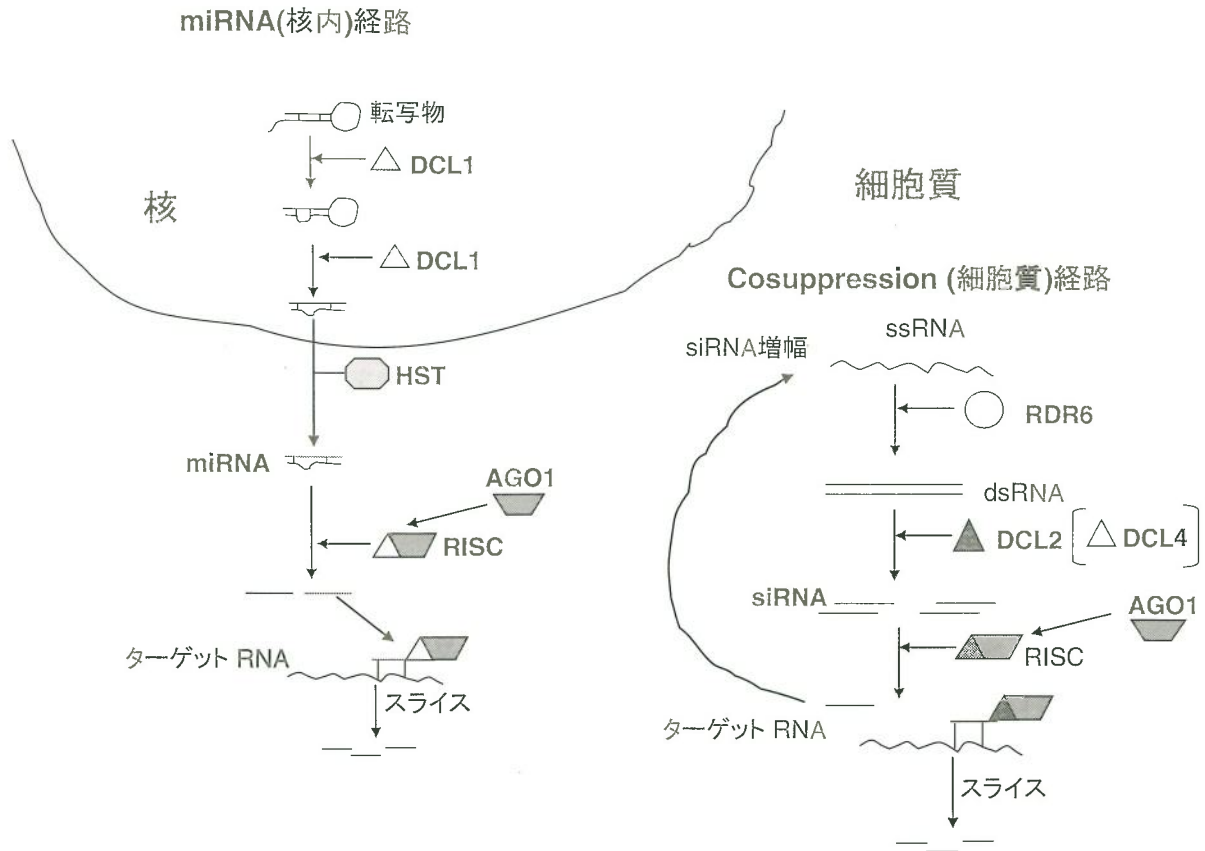


図1 RNAサイレンシング経路の模式図

ssRNA, 1本鎖RNA; RDR, RNA依存型RNA複製酵素; dsRNA, 2本鎖RNA; DCL, ダイサー様dsRNA分解酵素; AGO, アルゴノート; RISC, RNA誘導サイレンシング複合体; HST, miRNA輸送タンパク質

siRNAが生成される場合もある。宿主のRDRは植物の他には、線虫で見つかったが、ショウジョウバエやほ乳類の細胞では報告されていないため、後者のメカニズムは植物に特異的な現象かも知れない。このようにして生成したsiRNAはRNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体に取り込まれ、標的ウイルスRNAはRISCに載っているsiRNAの相補的な配列によって認識され、RISCの成分であるスライサー (AGO) によって切断される。切断されたRNAやsiRNAはRDR6によって再利用され、ウイルスRNAの配列を持つsiRNA生成が増幅される。

3. 病徴とサイレンシングサプレッサー

植物がウイルス対策として備えているこのサ

イレンシングも結局植物がウイルスに感染してしまうことから、たいして役立っていないように思われる。しかし、RNAサイレンシング経路の因子を欠失したシロイヌナズナの変異体は、ウイルスに感染しやすくなることからサイレンシングが自然界で機能しているのはまちがいない。また、ほとんどのウイルスがサイレンシングサプレッサーと呼ばれるサイレンシングを阻害するタンパク質を持っていることから、サイレンシング自体が十分働いていないのである。前述したようにリカバリーはサイレンシングによってウイルスの病徴が軽減される現象である。ウイルス由来の遺伝子を植物に組み込んだ形質転換植物が、ウイルス抵抗性になることが報告され、実用化を目指して世界中で多くの形質転換植物が作られた。現在では、この抵抗性は、植物が導入された遺伝子に反応してサイ

レンシングを発動したからだと考えられている。

さて、ウイルスの誘導する病徴についてもRNAサイレンシングによって説明できる。例えば、葉のモザイク症状は植物細胞とウイルスの闘いの跡であり、緑の部分は細胞のサイレンシングが勝った組織であり、黄色になった部分がウイルスのサプレッサーが勝った組織である。ウイルス感染で生じる奇形についても説明できる。実は、植物はサイレンシングをウイルス対策のためにだけ利用しているのではなく、自己の器官分化を制御するために使用している(図1のmiRNA経路)。しかもサイレンシング自体がフィードバック制御を受けることも知られており、植物は複雑なバランスの上にサイレンシングを利用しているようである。器官分化に活躍するsmall RNAはmiRNAと呼ばれ、転写因子のmRNAなどをターゲットとしている¹⁾。ウイルスが感染した場合、サイレンシングサプレッサーが生産され、miRNA経路も同時

に阻害を受けるため、植物は十分に分化できなくなり、奇形になると考えられている。

4. 植物ウイルスのサプレッサー

最近になって、大半の植物ウイルスサプレッサーの阻害機作がsiRNAへの直接結合であると報告がいくつか出された²⁾。表1に代表的なサプレッサーを作用点に応じて、まとめてあるので参照されたい。例えば、*Tombusvirus*のP19については、1つのsiRNA分子にP19のダイマーが結合することが判明している。しかし、*Potyvirus*のP1/HC-Proについては、Dicer阻害やAGO阻害など諸説があり、判然としなかった。最近siRNAやmiRNAに直接に結合する能力があることが報告されたことから、複数の作用点を持っているのかも知れない。同様に、*Cucumovirus*の2bタンパク質も早くからサプレッサーと同定されていたが、どのようにサイレンシングを抑制しているのか長い間不明であ

表1 代表的な植物ウイルスのサイレンシングサプレッサーの作用点

作用点	サプレッサー	ウイルス (グループ)	文献
dsRNA結合(21-nt)／長いdsRNA結合	P19	<i>Tomato busy stunt virus</i> (<i>Tombusvirus</i>)	Li and Ding (2006) ²⁾
	CP	<i>Turnip crinkle virus</i> (<i>Carmovirus</i>)	Li and Ding (2006)
	P21	<i>Beet yellows virus</i> (<i>Closterovirus</i>)	Li and Ding (2006)
dsRNA結合／Dicer阻害?	P1/HC-Pro	<i>Tobacco ethe virus</i> (<i>Potyvirus</i>)	Li and Ding (2006)
dsRNA結合／AGO1結合	2b	<i>Cucumber mosaic virus</i> (<i>Cucumovirus</i>)	Zhang et al. (2006) ³⁾
AGO1分解促進	P0	<i>Beet western yellows virus</i> (<i>Pterovirus</i>)	Li and Ding (2006)
DCL1阻害	P27+P88+ウイルスRNA	<i>Red clover necrotic mosaic virus</i> (<i>Dianthovirus</i>)	Takeda et al. (2005) ⁴⁾

った。最近になって、2bはAGO1 (図1参照)に直接結合³⁾することによってmiRNA経路を阻害すると報告されたが、我々の研究室では、*in vitro*で翻訳した2bが直接にsiRNAに結合することを見出しており、2bもまた複数の作用点を有しているのであろう。また他のウイルスでは、AGOの分解促進 (*Pterovirus*) やDicerの横取り (*Dianthovirus*)⁴⁾などが報告されており、siRNA結合以外のメカニズムも存在する。

5. サイレンシングサプレッサーと抵抗性遺伝子

植物は、抵抗性遺伝子とサイレンシングという独立した2大防衛戦略を持っている。サプレッサータンパク質の中に、抵抗性遺伝子による抵抗反応に介入するものがある。例えば、キュウリモザイクウイルス (CMV) のサプレッサー2bタンパク質はサリチル酸経路の抵抗反応を阻害する。そしてこれとは対照的に、2b遺伝子をタバコに過剰発現させると過敏感反応 (HR) を引き起こして局部病斑が生じる。すなわち宿主がサプレッサーを認識してHRを誘導する一方、サプレッサーはHR後のサリチル酸を介した抵抗反応を阻害していると考えられ、

ウイルスと宿主の熾烈な分子の闘いを見せつけられているようである。

6. おわりに

本稿では、植物のウイルス防御機構としてRNAサイレンシングに焦点を当てて説明したが、抵抗性遺伝子による誘導抵抗性との間に密接なつながりがあることを示唆するデータも蓄積してきている。今後、この2大抵抗性機構間のクロストークが分子レベルで詳細に解明され、新たな植物ウイルス防除戦略につながることを期待している。

文 献

- 1) 竹田篤ら (2006), 蛋白質核酸酵素, 51 (16), 2463-2470
- 2) Li, F. & Ding, S. (2006), *Annu. Rev. Microbiol.*, 60, 503-531
- 3) Zhang, Z. et al. (2006), *Gene Dev.*, 20, 3255-3268
- 4) Takeda, A. et al. (2005), *EMBO J.*, 24, 3147-3157

◀国内情報▶

アカネズミが有するタンニン無害化メカニズムを解明

¹独立行政法人 森林総合研究所 東北支所 生物多様性研究グループ，

²北海道大学 北方生物圏フィールド科学センター，

³神戸大学 大学院自然科学研究科

島田卓哉¹・齊藤 隆²・大澤 朗³

ミズナラやコナラなどの堅果は森林に生息する動物の重要な資源であるが、被食防御物質であるタンニンを高い含有率で含み、摂食した動物に消化管の損傷や臓器不全、消化阻害といった有害な効果を及ぼすことが知られている。私たちの研究グループでは、我が国に広く分布するアカネズミが、唾液中に分泌するタンニン結合性タンパク質とタンナーゼ産生腸内細菌の働きによってタンニンを無害化して堅果を利用していることを初めて解明した。

1. はじめに

コナラやミズナラ、クヌギなどのコナラ属樹木は、温帯域森林生態系の主要な構成樹種である。その種子である堅果（ドングリ）は腐りにくく長期保存が可能な大型の種子であり、さらに豊作年には莫大な量の堅果が生産されるために、森林に生息する動物にとって秋から冬にかけての貴重な餌資源となっている。実際、堅果の豊凶が野生動物の個体数変動に大きな影響を持つことが報告されている。野生動物の中でもアカネズミ（図1）などの森林性齧歯類は、落果時期に堅果を集中的に摂食し、さらに大量の堅果を運搬・貯蔵し、越冬期の餌として利用する。そのため、堅果は野ネズミにとって利用しやすい「良い餌」であると信じられてきた¹⁾。ところが、ミズナラなどの一部の堅果には被食防御物質であるタンニンが多量に含まれており、堅果の摂食はアカネズミに著しい負の効果（体重減少、タンパク質消化率の低下など）をもたらすことが実験条件下で明らかにされた²⁾。一方、アカネズミが秋から冬の資源として堅果に強く依存することは上述の通りである。これ

SHIMADA Takuya¹, SAITOH Takashi²,

OSAWA Ro³

¹〒020-0123 盛岡市下厨川字鍋屋敷92-25,

²〒060-0811 札幌市北11条西10丁目,

³〒657-8501 神戸市灘区六甲台1-1

らの一見矛盾する事実は、アカネズミが自然条件下ではタンニンを何らかの方法で無害化して堅果を利用していることを示唆していた。

近頃私たちは、アカネズミが有するタンニン無害化メカニズムを微生物学及び生理学的知見に基づいて解明することに成功した。本稿では、始めに哺乳動物に対するタンニンの作用機構の解説を行い、明らかになったタンニン無害化メカニズムの詳細を紹介する。



図1 アカネズミ

全国の亜高山帯から平地にまで広く分布する森林性野ネズミ。種子や昆虫類を主な餌とする。頭胴長10cm、体重30-50g程度の大きさ。

2. 被食防御物質タンニンの作用機構

タンニンは、植物によって生産される、タンパク質と高い親和性を有する分子量500以上の水溶性フェノールの総称であり、抗酸化作用、抗菌作用、そして植食者に対する被食防御作用を持つことが知られている³⁾。化学構造の面から、タンニンは加水分解性タンニンと縮合タンニンとに大別される。従来は、タンニンの被食防御作用は、タンニンが食物中のタンパク質や消化酵素と結合し消化阻害を引き起こすことによって生じると考えられていた。そのため、タンニンは穏やかに働く消化阻害物質であると見なされてきたが、近年の研究の進展により、タンニンは以下のように消化管の損傷や臓器不全といった急性毒性を持つ物質であると認識されるようになった(図2a)⁴⁾。

摂取されたタンニンは、消化管内で消化酵素よりもむしろ消化管上皮細胞や粘膜と結合し、消化管に潰瘍などの損傷を引き起こす。この際に生じたタンニンとタンパク質の複合体は消化管内でも安定であり、後述するようなタンナーゼ産生細菌などの働きがなければ、そのまま排泄され生体内の窒素バランスを悪化させる。また、摂取された加水分解性タンニンの一部は、胃液などの作用によって消化管内で低分子のフェノールに加水分解される。これらのフェノールは消化管から吸収され、肝不全、腎不全といった毒性を示す⁴⁾。

このような作用を持つタンニンを、ある種の堅果は高濃度で含むことが報告されている⁵⁾。表1は、日本産の堅果2種について含有成分をまとめたものである。中でも、ミズナラは約10%と非常に高いタンニン含有率を示してい

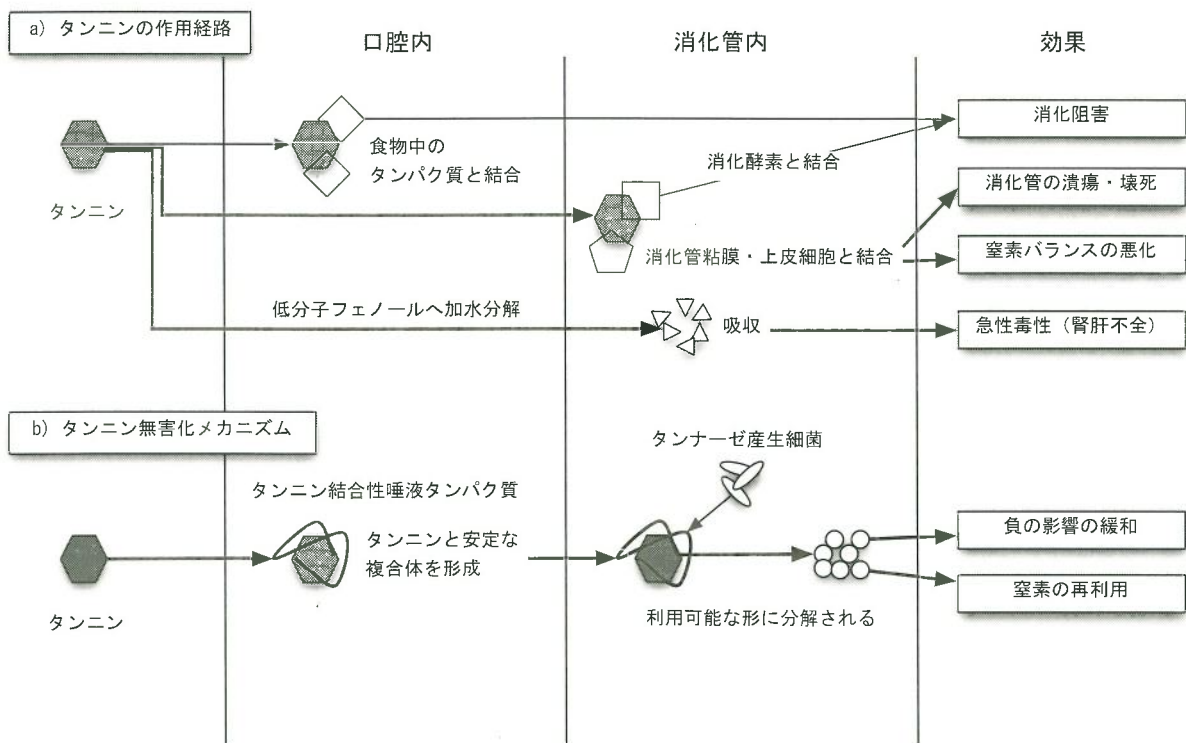


図2 タンニンの潜在的な作用経路とアカネズミにおけるタンニン無害化メカニズム模式図
 a) 摂取されたタンニンは口腔内及び消化管内で生体内のタンパク質と結びつき負の効果をもたらす。また、一部の加水分解性タンニンは分解されて低分子のフェノールとなり、急性毒性を示す。なお、重要であると考えられている経路を太線で示した。
 b) 摂取されたタンニンは口腔内で紐状のタンニン結合性唾液タンパク質分子と結合し作用を阻害されるために、負の効果が緩和される。さらに、タンナーゼ産生細菌の働きによって、タンニン-タンパク質複合体が利用可能な形に分解され、窒素が再利用されると考えられている。

表1 日本産堅果に含まれる栄養成分

種名	コナラ	ミズナラ
粗タンパク質 %	4.5	4.4
粗脂肪 %	2.5	1.7
粗灰分 %	1.9	2.1
粗繊維 %	2.8	1.5
可溶性無窒素物 %	88.3	90.3
タンニン % TAE	2.7	8.6

(注) 乾重に対する重量百分率。タンニンはRadial diffusion法で測定した、タンニン活性(タンニン酸当量, TAE: tannic acid equivalent) で示している。

る。なお、堅果に含まれるタンニンは、主に加水分解性タンニンであることが報告されている⁶⁾。

3. アカネズミはどうやってタンニンを無害化しているのか

野外で捕獲後、タンニンを含まない人工飼料で一定期間飼育したアカネズミにミズナラ堅果のみを供餌したところ、著しく体重が減少し(5日間で平均17.5%減)、14頭中8頭が10日以内に死亡した。一方、捕獲後、少量のミズナラ堅果を与え続けたアカネズミに同様にミズナラ堅果のみを供餌したところ、このような効果はほとんど認められなかった(体重減少、平均2.5%;死亡率、12頭中1頭)⁷⁾。この結果は、アカネズミは漸増的にタンニンを摂取することによってタンニンに対する生理的な馴化を獲得し、タンニンによるダメージを緩和することが出来ることを示唆している。

では、アカネズミが有するタンニンに対する馴化は、どのようなメカニズムによってもたらされているのだろうか。これにはタンニン結合性唾液タンパク質とタンナーゼ産生腸内細菌という二つの相補的なメカニズムが関わっていることが明らかになった。

タンニン結合性唾液タンパク質は、一部の哺乳類の唾液中に分泌される、アミノ酸の一種プロリンに富んだタンパク質である。タンニンと高い結合能力を持ち、その結合能力は標準タンパク質として用いられることの多いウシ血清アルブミン(BSA)の5倍ないし80倍、リゾチームの1,000倍以上と報告されている。このような高い結合能力のために、タンニン結合性タンパク質はタンニンに対する防御物質であると考えられている。すなわち、口腔内で食物中のタンニンと速やかに結合し安定な複合体を作ることによって、タンニンの生体内での作用を阻害する

機能を持つのである⁸⁾。

タンニン結合性タンパク質は全ての哺乳類が分泌するわけではなく、葉食者や種実食者などタンニンを摂取する機会の多い種(シカ、齧歯類、ヒトなど)において発見されている一方、草食性であってもウシやヒツジなどのようにタンニンを含まない草本を主たる餌とする種はこのタンパク質を分泌しないことが知られている⁸⁾。この事実は、タンニン結合性唾液タンパク質がタンニンに対する防御物質として進化してきたことを示唆するものである。タンニン結合性唾液タンパク質の存在は、野生動物においては十分に検討されてこなかった。アカネズミの唾液を採取して分析したところ、アカネズミは高いレベルでタンニン結合性タンパク質を分泌し、しかもタンニンの摂取によってその分泌量が増加することが明らかになった⁷⁾。

一方、タンナーゼ産生腸内細菌は、加水分解性タンニンの分解酵素であるタンナーゼを産生する能力を持った、タンニンを特異的に分解する腸内細菌群である。コアラやリングテイルポッサムなどの後腸発酵動物の盲腸に存在することが報告されており、タンニンとタンパク質の複合体に作用し、再利用可能な形に分解する機能を持つと考えられている。コアラは、これらの腸内細菌の働きによって、タンニンに富むユ

一カ리의葉を消化し、利用していることが明らかにされている⁹⁾。私たちは、アカネズミの糞便から2タイプのタンナーゼ産生細菌を分離した。一つは、グラム陽性の連鎖球菌であり *Streptococcus gallolyticus* と同定された。もう一方は、グラム陽性桿菌であり、新記載の乳酸菌の一種であることが判明した（後に、アカネズミの属名 *Apodemus* に因んで、*Lactobacillus apodemi* として記載された¹⁰⁾）。

この二つの防御メカニズムの効果を検証するために、アカネズミにミズナラ堅果のみを供餌し、各個体の体重変化および消化機能とタンニン結合性唾液タンパク質およびタンナーゼ産生細菌との関連をパス解析によって解析した。パス解析は、変数間の相関関係から因果関係を推定する多変量解析手法である。その結果、タンニン結合性唾液タンパク質を多く分泌し、乳酸菌タイプのタンナーゼ産生細菌を多く保有する個体ほど、体重減少が少なく、消化率や摂食量といった消化機能も高い状態であることが明らかになった。一方、連鎖球菌タイプのタンナーゼ産生細菌に関しては、タンニンによる負の効果を軽減させる効果は認められなかった⁷⁾。

以上の知見から、私たちは、アカネズミの有するタンニン無害化メカニズムは以下のような二つのステージをもつものであると考えている（図2b）。

第一に、摂取された食物中のタンニンは、タンニン摂取によって産生が誘導されたタンニン結合性唾液タンパク質とアカネズミの口腔内で結合し、安定な複合体を形成する。その結果、タンニンは機能を失い、アカネズミは消化管損傷や臓器不全といったダメージを被らなくなる。ところが、タンニンとの複合体がそのまま排泄されてしまうと、タンニン結合性タンパク質自体がタンパク質であるため、生体内の窒素バランスの悪化という負の効果は解消されず残存する。そこで、第二段階として、タンナーゼ産生腸内細菌がタンニン-タンパク質複合体を生体が利用可能な形に分解し、窒素バランスの悪化を緩和しているのではないかと考え

ている。窒素が再利用されるメカニズムは未だ解明されていないが、複合体由来のタンパク質を糞食によって回収している可能性があり、今後の検討課題だと考えている。

このように、タンニン結合性唾液タンパク質とタンナーゼ産生腸内細菌の2つをセットで保有することにより、アカネズミは堅果中のタンニンを無害化し、効率よく堅果を利用できるのだと考えられる。

4. おわりに

コナラ属樹木の更新には、アカネズミなどの森林性齧歯類の活動がプラス・マイナス両面で深く関わっている。彼らは大量に堅果を消費する一方で、堅果を持ち運び、土の中に貯蔵することで樹木の更新に寄与している。そのため、両者の関係は「堅果=良い餌」という常識に基づいた相利共生的な枠組みで捉えられてきた。しかしながら、本研究で得られた知見は、「動物は、潜在的に有害な堅果を工夫して利用している」という新しい枠組みに基づいて、その相互作用を捉える必要性を示している。

アカネズミは今まで紹介してきたようなタンニンに対する無害化メカニズムを獲得することによって、堅果の主要な捕食者となり、同時に重要な散布者ともなっているのだと考えられる。しかし、このような「タンニンに対する耐性」は、動物種間で同等ではないだろう。例えば、従来堅果の主要な散布者と考えられてきたニホンリスは実際は堅果を余り利用しないことが最近明らかにされた¹¹⁾。ヨーロッパに生息する近縁種アカリスでは、タンニンに富む堅果を効果的に利用できないことが知られているため¹²⁾、ニホンリスのタンニン耐性もアカネズミに比べて低いレベルにあると予測される。タンニン耐性の違いは森林性齧歯類の採餌行動や種子散布行動、そしてそれを通じて樹木の更新過程にも影響を及ぼすと予測されるが、タンニン耐性を定量的に評価し、比較を行うという試みは未だなされていないのが現状である。私たち

は今後、アカネズミをモデルケースとしてこの課題に取り組んで行きたいと考えている。その成果は、広葉樹林の保全および管理のための資料となることが期待される。

文 献

- 1) McShea, W.J. and Healey, W.M. (2002), Oak forest ecosystems, The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- 2) Shimada, T. et al. (2003), *Popul. Ecol.*, 45, 7-17
- 3) Waterman, P.G. and Mole, S. (1994) Analysis of phenolic plant metabolites, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 4) Bernays, E. A. et al. (1989), *Adv. Ecol. Res.*, 19, 263-302
- 5) Shimada, T. et al. (2006), *Popul. Ecol.*, 48, 341-352
- 6) Chung-MacCoubrey, A. L. et al. (1997), *Physiol. Zool.*, 70, 270-277
- 7) Shimada, T. et al. (2006), *J. Chem. Ecol.*, 32, 1165-1180
- 8) Shimada, T. (2006), *J. Chem. Ecol.*, 32, 1149-1163
- 9) Osawa, R. et al. (1993), *Biodegradation*, 4, 91-99
- 10) Sasaki, E. et al. (2005), *Syst. Appl. Microbiol.*, 28, 358-365
- 11) Tamura, N. et al. (2005) in Seed fate (Forget, P.-M., Lambert, J. E., Hulme, P. E. and Vander Wall, S. B., Eds), 241-252, CABI Publishing, Wallingford

◀国内情報▶

ブタにおいて椎骨数を増大させ
体を長くした遺伝子の解明独立行政法人 農業生物資源研究所
動物科学研究領域 家畜ゲノム研究ユニット

美 川 智

ブタはイノシシより家畜化され、さらに18世紀以降においては産肉性、繁殖性の向上のため体が大きくなるように選抜育種されてきた。それによりイノシシでは19個であった椎骨数が、今日の大型肉用品種では21個から23個と増大している。私たちはこの椎骨数の増大に関与する遺伝子の1つが核内受容体の一種であるNR6A1であることを発見した。本稿ではこの遺伝子の特定に至るまでの研究について紹介したい。

1. はじめに

哺乳類において頸椎が7個に固定されていることはよく知られているが、それに続く胸椎と腰椎もその和が19個である傾向がある (Narita & Kuratani 2004)。カンガルーなどの有袋類を含む多くの哺乳類においてその和は19個であり祖先型であると考えられている。イヌなどの食肉目では20個に増大し、類人猿では17個に減少している。またウマでは24個にまで増大している。しかしながらこれらの変移は系統的なもので、種内での変動は非常に小さい。イノシシの椎骨数は19個であり他の偶蹄目と同じであるが、種として同一である家畜ブタにおいては椎骨数に多様性がある。今日の豚肉生産に用いられている西洋品種は体が大きく、椎骨の数が23個にまで増大したものが存在する。同一種内においてこれほどまで大きな変動が存在していることは家畜育種学的だけでなく、発生学的にも非常に興味深い。

2. 椎骨数に関与する遺伝領域の単離

我々はブタの経済形質に関与する量的形質遺伝子座 (QTL; quantitative trait loci) の単離を目的に研究を続けてきた。そのために各道県

Mikawa Satoshi
〒305-8602 茨城県つくば市池の台2

と共同で東洋品種、西洋品種、およびミニブタを用いて複数のF2家系を造成し、その形質の測定とマイクロサテライト (MS) マーカーを用いた連鎖解析を行っている。それらの解析により様々なQTLが検出されているが、椎骨数に関しては2つのQTLが単離された。1つはブタ第1染色体 (*Sus scrofa* chromosome 1; SSC1) の末端領域のMSマーカーSW705の近傍にあり、西洋品種由来の対立遺伝子に椎骨数増大効果が認められた。その効果は対立遺伝子あたり約0.5個であり、2つそろふことで椎骨数は平均で約1個増大した。

他方はSSC7の中央部のMSマーカーSW252の近傍にあり、西洋品種由来の対立遺伝子の一部に椎骨数増大効果が認められた。その効果はSSC1のQTLと非常によく似ており、対立遺伝子あたり約0.5個であった。こちらも2つそろふことで椎骨数は平均で約1個増大した。これら2つのQTLは独立に働いており、2つのQTLの4つの対立遺伝子により約2個の椎骨数の増大がF2家系においては認められた。

3. 椎骨数QTLの各種形質への影響

実験家系において実際にこれら2つのQTLを選抜し、様々な形質に対するその効果を検証した。実験に用いた家系は金華豚とデュロック種によるF2家系であり、金華豚はSSC1, SSC7

の両方の椎骨数QTLが野生型 (q/q) であり、またデュロック種はともに増大型 (Q/Q) である。F2集団においては増大型のホモ型 (Q/Q)、野生型のホモ型 (q/q)、そしてヘテロ型 (Q/q) が存在するが、マーカーアシスト選抜によりF3を生産した。マーカーアシスト選抜とはQTL近傍のMSマーカーを解析することによって目的のQTLの対立遺伝子を選抜することを意味する。つまりF2個体でデュロック由来のMSマーカーを持つ個体と金華由来のMSマーカーを持つ個体をそれぞれ選択し、デュロックタイプつまりQ/Q型の雄と雌の交配、または金華豚タイプつまりq/q型の雄と雌の交配を行うのである。今回は2つのQTLがともにQ/Q型 (デュロック型)、またはq/q型 (金華型) になるように交配を行い、F3個体の形質を測定した。

結果は表1に示したが、2つのグループ間に椎骨数は予想通り約2個の差が生じた。乳頭数においても左右合わせると約2個の差があった。同じ体重 (75kg) において出荷した際に

は、体長に差が生じ、特に胸椎と腰椎部分に相当する背腰長IIでは3.5cmの差があった。各部分の肉量ではロース・バラ重量が約850g増大し、特にバラ重量が顕著に (約500g) 増大した。これは椎骨数が約2個増大したうち、胸椎部分が約1.5個を占めていることによるものと考えられる。上腕部やモモの重量に関しては有意な変動は認められていない。また肉色、pH、肉のやわらかさ (シェアバリュー) など肉質にも差はなかった。

4. 椎骨数QTL (SSC1) の責任遺伝子の単離

4-1. 椎骨数QTLのSSC1における遺伝解析

我々はこれまで、これら2つの椎骨数QTLの責任遺伝子の単離に向けて研究を進めてきた。その内SSC1のQTLについては最近ファインマッピングに成功し、その責任遺伝子を単離することに成功した。QTLの検出は、まずF2家系において連鎖解析を行うのであるが、家畜の

表1 椎骨数QTLのマーカーアシスト選抜 (F3個体)

	デュロック型, 62頭		金華型, 92頭		
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	
椎骨数	21.65	0.67	19.72	0.73	**
胸椎数	15.77	0.49	14.25	0.62	**
腰椎数	5.87	0.37	5.47	0.50	**
乳頭数 (合計)	15.34	1.10	13.39	1.14	**
生時体重 (kg)	1.11	0.26	1.11	0.25	
背腰長II ¹ (cm)	61.29	2.62	57.81	2.46	**
カタ重量 (kg)	8.10	4.37	7.48	0.77	
ロース・バラ重量 (kg)	11.00	1.60	10.14	1.19	**
ロース重量 (kg)	6.17	1.09	5.84	0.91	*
バラ重量 (kg)	4.82	0.82	4.33	0.49	**
ハム重量 (kg)	6.49	0.60	6.58	0.54	
pH	5.62	0.21	5.58	0.18	
肉色, PCS ²	3.24	0.61	3.38	0.67	
シェアバリュー (kgw/cm ²)	2.97	0.82	2.85	0.87	

¹ 第1胸椎から最終腰椎,

² PCS ; pork color standard (淡1 ~ 濃6),

** ; P<0.01, * ; P<0.05

量的形質においては、そのQTLが95%の信頼性で位置する区域を約10cM（1cMは組み換えが1/100で起こる遺伝的距離で、ゲノム全体を平均すると約1Mbに相当する。）程度にまで領域を絞り込むことが限界である。我々は連鎖解析により約4cMにまで絞り込むことができたのであるが、その原因としては椎骨数が環境要因に左右されにくい形質であること以外に、F2個体の数がそれぞれ528頭および360頭という2つの極めて大きなF2家系を用いることができたということがある。

さらにこの約4cMの領域内に組み換えが起きている個体を検索し、幸運にもこの領域のほぼ中央に組み換えがある雌個体を見つけることができた。その産子の椎骨数データよりこの雌のQTLがヘテロ型であると判断され、QTLは染色体がヘテロな領域に位置することとなった。これによりQTLが位置するのはさらに半分の約2cMの領域にまで絞り込まれた。

4-2. ヒトとブタとの比較遺伝子地図の作製

この約2cMの領域にどのような遺伝子があるかについて次に解析した。家畜においてはゲノムが解読されたヒトの情報を最大限利用して解析を進めている。ヒトとブタの染色体はその構成が異なっているが、小さな領域で見ると遺伝子の並びは保存されている。つまり共通の遺伝子群を持つブロックが互いにモザイク状に組み合わせられてそれぞれの染色体ができている。ブタにおいては約3,000個の遺伝子について染色体上の位置を決定することにより、先に述べたブロックの構成が解析され、ヒトとの比較遺伝子地図が作製されている（http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/draw_rh2human）。これまでにヒトとブタにおいては小さなものまで含めると200弱のブロックが検出されており、このような情報をもとにブタの特定の領域にどのような遺伝子が位置するかを予想することができる。対象となっている約2cMの領域について解析した結果、ブタ、ヒトともに17個の遺伝子が等しく存在していた。

4-3. 高密度マイクロサテライトマーカーの開発

対象となるゲノム領域の部分配列が判明すれば、その配列をもとにその近傍のBAC（バクテリア人工染色体）クローンが単離できる。これはゲノム全体を約150kbにランダムに切断したものをクローニングしたものであり、約10万クローンからなるライブラリーとして整理されている。またスクリーニングシステムにより約10万クローンから数段階のPCRによって単一クローンに達することができる。先の17個の遺伝子配列より設計したPCRプライマーを用いてBACクローンを単離し、さらに部分的にゲノムウォーキングを行うことによって約2cMのQTL候補領域を完全にカバーすることができた。単離された個々のBACクローンからは新規のMSマーカーを開発し、以降の解析に用いた。

4-4. QTL領域の遺伝的多様性の解析

次に行った解析は椎骨数が増大しているブタに特徴的なゲノム領域の探索である。我々の仮説は、「選抜育種においては特定の対立遺伝子が選抜されてきたため、QTLの近傍はそれ以外の領域に比較して遺伝的多様性に乏しい」というものであった。そのために椎骨数が増大している西洋系の複数品種由来の194頭のサンプルを収集し、新規に開発したMSマーカーについて解析を行った。その結果、多様性が認められないMSマーカーが連続して6つ存在した。その領域を含む約600kbについてはすべて塩基配列を解読し、すべての多型を有するMSマーカーを用いて再度解析した。その結果、約300kbの範囲の10個のMSマーカーに多様性が認められなかった（図1，表2）。一方、日本イノシシや選抜が行われていないアジア在来の梅山豚、金華豚などではこれらのMSマーカーの多様性は維持されていた。このようにMSマーカーを用いて、椎骨数増大に関連して連鎖不平衡が存在する領域を特定することができた。

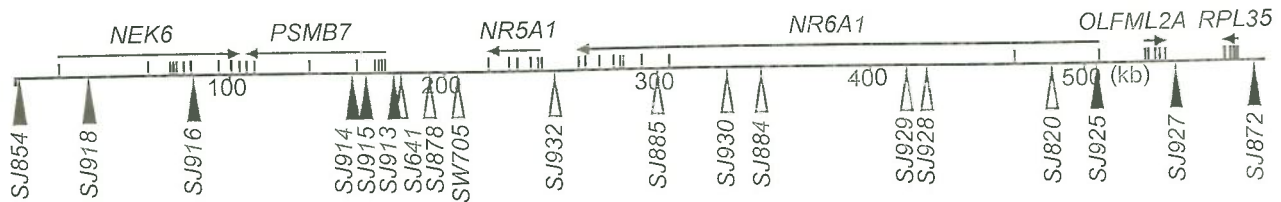


図1 QTL領域の遺伝子とマイクロサテライトマーカーの遺伝的多様性
塩基配列を決定した600kbの領域に位置する遺伝子のエクソンを示している。矢印は転写の方向である。下段は解析に用いたマイクロサテライトマーカーの位置で、白色が椎骨数の増大したブタにおいて遺伝的多様性が認められなかったものを示す。

表2 QTL領域のマイクロサテライトマーカーの遺伝的多様性

マーカー	西洋品種 (n=194)					アジア系品種 (n=40)				
	アリル数	上位4アリルの割合				アリル数	上位4アリルの割合			
<i>SJ854</i>	5	0.55	0.32	0.08	0.04	5	0.47	0.21	0.12	0.10
<i>SJ918</i>	5	0.54	0.36	0.09	<0.01	7	0.42	0.16	0.14	0.12
<i>SJ916</i>	4	0.95	0.02	0.02	0.01	8	0.42	0.15	0.13	0.08
<i>SJ914</i>	1	1.00	—	—	—	2	0.93	0.07	—	—
<i>SJ915</i>	3	0.60	0.34	0.06	—	6	0.24	0.20	0.18	0.16
<i>SJ913</i>	6	0.86	0.06	0.03	0.02	3	0.62	0.20	0.18	—
<i>SJ641</i>	2	0.99	0.01	—	—	5	0.50	0.16	0.16	0.13
<i>SJ878</i>	1	1.00	—	—	—	4	0.40	0.28	0.16	0.16
<i>SW705</i>	4	0.93	0.05	0.01	0.01	9	0.25	0.20	0.15	0.13
<i>SJ932</i>	1	1.00	—	—	—	6	0.33	0.19	0.19	0.13
<i>SJ885</i>	1	1.00	—	—	—	2	0.70	0.30	—	—
<i>SJ930</i>	1	1.00	—	—	—	3	0.65	0.33	0.02	—
<i>SJ884</i>	2	1.00	<0.01	—	—	5	0.47	0.22	0.18	0.07
<i>SJ929</i>	1	1.00	—	—	—	2	0.93	0.07	—	—
<i>SJ928</i>	1	1.00	—	—	—	7	0.30	0.27	0.18	0.13
<i>SJ820</i>	3	0.99	<0.01	<0.01	—	3	0.41	0.39	0.20	—
<i>SJ925</i>	2	0.78	0.22	—	—	8	0.57	0.13	0.12	0.05
<i>SJ927</i>	2	0.65	0.35	—	—	2	0.67	0.33	—	—
<i>SJ872</i>	2	0.55	0.45	—	—	2	0.90	0.10	—	—

4-5. QTL領域に位置する遺伝子

この約300kbの範囲には2つの遺伝子が位置していた(図1)。ともに核内受容体をコードしており、NR5A1 (nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1) とNR6A1 (nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1) である。NR5A1については研究が進んでおり、性分化や性腺の発達、またステロイド合成系の誘導に関わっている。またブタNR5A1遺伝子の多型検索においてはQTLと一致するアミノ酸置換は見いだせていない。NR6A1について

はその機能に不明な部分が多く、成体の精巢、卵巣、および初期胚において発現が認められる。ノックアウトマウスは胚性致死なのであるが、その際には通常25である体節が13しかできていない。これはNR6A1が欠失しているため体節形成が不全であるのか、他の原因で死に至ったことによって体節が途中までしか形成されなかったのかは不明であるが、非常に興味深い結果である。このNR6A1にはQTLと一致するアミノ酸置換があり、マウス、ヒト、野生型のブタではプロリンに保存されており、椎骨数増大型

のブタにおいてのみロイシンに置換していた。またこのアミノ酸置換はNR6A1と相互作用する因子との結合領域に位置したが、このアミノ酸置換によってその結合能に変化が生じた。またマウス胚を用いた発現解析ではNR6A1タンパク質が体節の内部に検出された。これらのことからNR6A1がこのQTLの責任遺伝子であると、確信するに至った (Mikawaら2007)。

5. 終わりに

以上のように、SSC1のブタの椎骨数QTLの解明について紹介したが、これらの情報は今後どのように活用されるであろうか。もちろんブタの育種においては、アミノ酸置換の原因となるSNPが利用されるであろう。それ以外に期待されることは、NR6A1が如何に椎骨数の変動を引き起こしたかを解明することによって、体節形成や四肢の形成の研究が進むことである。今のところNR6A1のこれらに対する機能は全くわかっていない。さらに今回発見したNR6A1のアミノ酸置換は、他の因子との結合能に変化を及ぼすが、それがどのような生理的意味を持っているのかもわかっていない。しかしながら椎骨数が変化することから、胚において、i) 体節の数が増えて長くなっている、ii) 単位長さ当たりの体節数が増えている、もしくは

はiii) ホメオジーンが発現部位がシフトしている、といったことが可能性として考えられる。今後は体節形成やそれを制御している分節時計に関わるNOTCH系列の遺伝子発現に対するNR6A1の関与、またはホメオジーンが発現に対するNR6A1の関与について研究する必要がある。今回は紹介していないが、SSC7に検出されたもう1つの椎骨数QTLについてもその責任遺伝子の単離を進めており、できるだけ早く紹介できるようにしたい。

謝 辞

本研究は農林水産省委託プロジェクト、およびJRA研究助成事業により行われました。また今回紹介した内容は農業生物資源研究所、STAFF研究所また多くの道県の協力によるものであり深く感謝します。またマーカーアシスト選抜については神奈川県畜産研究所の成果を紹介させていただきました。

文 献

- 1) Narita, Y. & Kuratani, S. (2005) *J. Exp. Zool.* 304: 91-106.
- 2) Mikawa, S et al. (2007) *Genome Research* (in press)

◀国内情報▶

繋ぎ飼い飼養における新酪農システム実証試験

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 畜産工学研究部

道宗 直昭・志藤 博克・高橋 仁康・平田 晃・後藤 裕・
川出 哲生・原田 泰弘・皆川 啓子・山名 伸樹（現：鳥取大学）

細断型ロールベアラなどの緊プロ開発機を実証試験協力牧場に導入し、飼料生産、搾乳、ふん尿処理・利用までを含めた一連のシステムとして、その効果を実証する試験を行った。各作業において大幅な軽労化、省力化が図られ、畜産環境を改善することができる新酪農システムを構築することができた。本システムでは、良質で長期保存に優れたコーンサイレージを生産して搾乳牛に安定給与し、搾乳ユニット自動搬送装置で安定的な搾乳を行い、ふん尿を堆肥化、液肥化し全量をトウモロコシ飼料畑に利用することが可能な循環型の畜産経営を行うことができる。

1. はじめに

生研センターでは、作業の軽労化、省力化、生産性の向上、環境改善をねらいとして、細断型ロールベアラ、搾乳ユニット自動搬送装置、高精度固液分離装置などの機械を農業機械等緊急開発事業（緊プロ事業）で開発した。これらの開発機は農家にそれぞれ単独で導入され高い評価を受けている。さらに、これらの開発機種がシステムとして農家に導入されることにより、土―草―牛の資源循環に基づくゆとり溢れる経営形態が生まれるものと期待される。

そこで、繋ぎ飼い牧場を対象に実証試験協力牧場を選定し（栃木県下T牧場、群馬県下S牧場）、それぞれの牧場の経営形態にあった形で、細断型ロールベアラ、搾乳ユニット自動搬送装置や高精度固液分離装置などの緊プロ開発機を導入し、飼料生産、搾乳、ふん尿処理・利用までを含めた一連の酪農システムとしての効果を実証する試験を行った。

2. 牧場の概要と導入したシステム

T牧場は、夫婦2名と娘1名で営む酪農＋水稲の複合経営である。飼料畑は約6haで、デントコーン、牧草の他、飼料イネの収穫調製・利用も行い、積極的に自給飼料生産に取り組んでいる。牛舎新築時に搾乳ユニット自動搬送装置、高精度固液分離装置、堆肥化制御システム及び細断型ロールベアラ、ベールラップ等を導入した。ふん尿処理・利用方式は、ふん尿を高精度固液分離装置で固液分離し、固形分をハウス乾燥装置で乾燥後、育成牛舎の敷料として利用し、使用後には堆肥化制御システムを組み込んだ通気型堆肥舎で堆肥化して飼料畑に堆肥として利用している。液分は貯留槽に溜め、飼料作物の栽培状況を勘案しながら、適宜、飼料畑に散布している。

S牧場は、夫婦2名（経営主63歳）で営む酪農専業経営で、経産牛頭数は31頭で、飼料畑は約5ha、デントコーン、牧草の他、飼料イネ収穫調製・利用も行い、積極的に自給飼料生産に取り組んでいる。細断型ロールベアラ、ベールラップ、搾乳ユニット自動搬送装置を導入し、ふん尿処理は、バークリーナーで分離した固形分をハウス乾燥・発酵装置で堆肥化している。尿汚水はほ場散布方式であったが散布時の臭気発生が課題となっていたため、曝気装置を

DOSHU Naoaki, SHITOU Hirokatsu,
TAKAHASHI Hitoyasu, HIRATA Akira,
GOTO Hiroshi, KAWAIDE Tetsuo,
HARADA Yasuhiro, MINAGAWA Keiko,
YAMANA Nobuki
〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

設置して臭気軽減策を施した。

3. 実証試験の概要

1) 細断型ロールベアラ体系による実証試験

T牧場の細断型ロールベアラによる開発機体系は、作業体制として3戸共同(4名)による「定置作業」体系で、使用機械はハーベスタ、細断型ロールベアラ、ベールラップ、ホイールローダを使用、ロール運搬用として軽トラック、2tダンプ、ベールグラブを使用した。また、トウモロコシ以外に飼料作物として、イタリアンライグラスをはじめとする牧草や飼料イネについても、ピックアップユニットを装着したハーベスタを細断型ロールベアラと組み合わせることにより細断ロールサイレージとしている。

S牧場の細断型ロールベアラによる開発機体系は、作業体制として家族労働+ヘルパー(2.5名)による「定置作業」体系で、使用機械はハーベスタ、細断型ロールベアラ、ベールラップを使用、ロール運搬用として軽トラック、2tダンプ、4tダンプ、ベールグラブを使用している。

実証試験において、延べ労働時間の比較では、開発機体系におけるロールベアラのは場からの運搬作業も含めると両牧場とも慣行体系とは大きく変わらないが、それでも慣行体系で40~50%を占めた人力作業が開発機体系ではなくなり(図1)、給飼までを含めると大幅な軽労化

と省力化が図られた。また、サイレージの品質は既設のサイロに比べ優位性が確認され、ロスも少なかった。

2) 搾乳ユニット自動搬送装置による実証試験

搾乳ユニット自動搬送装置は、2つの搾乳ユニット(自動離脱装置付き)を牛のところへ自動搬送し、ミルクタップと接続して2頭同時に搾乳ができる。さらに、ユニット離脱信号を検出してミルクタップから切り離し、次の牛へと移動する半自動搾乳システムである。

T牧場は、新築の繋ぎ飼い牛舎(対尻式52床)に本装置4台・8ユニットを導入した。能率は導入後半年以降、概ね安定した。搾乳頭数は、導入前27頭から導入後1年半で39頭に増え、作業時間は導入前の朝夕合計170分から148分へと22分短縮した。導入後の作業能率で見れば、労力的には45頭まで搾乳牛を増頭可能と推定された。

S牧場は、既存の繋ぎ飼い牛舎(対尻式40床)に本装置4台・8ユニットを導入した。搾乳頭数は、導入前31頭から導入後35頭に増えたが、作業時間は朝夕合計121分から92分へと約30分短縮し、作業動線の合理化により歩行距離が減少した。導入後の作業能率で見れば、労力的には40頭フルに搾乳可能と推定された。

搾乳ユニット自動搬送装置の導入前後の搾乳作業能率の比較を表1に示した。両牧場とも搾乳ユニットの自動搬送・2頭同時搾乳によって

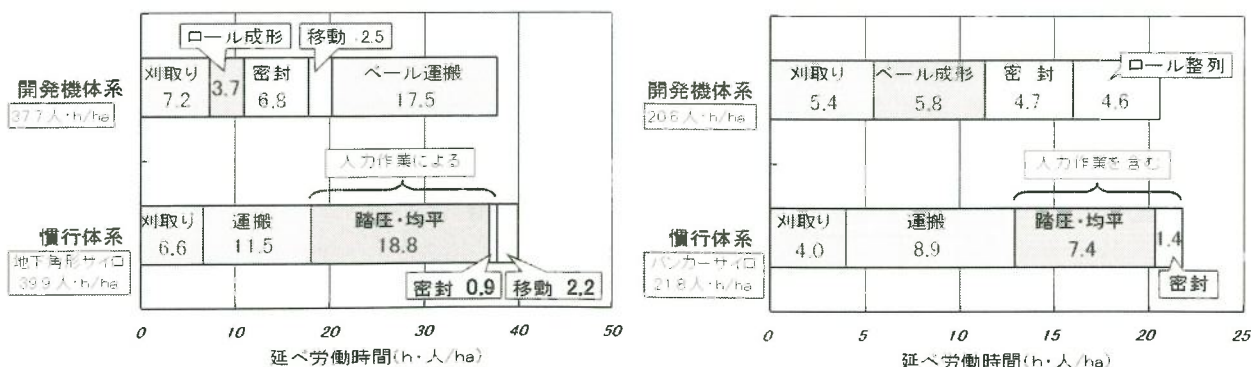


図1 延べ労働時間の比較(左:S牧場, 右:T牧場)

表1 搾乳ユニット自動搬送装置導入前後の搾乳作業能率の比較

	S 牧場		T 牧場	
	導入前	導入後 ¹⁾	導入前	導入後 ²⁾
搾乳ユニット数	6 ³⁾	8	4 ⁴⁾	8
作業人数	2	2	2	2
調査時搾乳頭数(頭)	31	35	27 ⁵⁾	39 ⁶⁾
搾乳作業時間(分) ⁶⁾	60.5	46	85	74
搾乳作業能率(頭/時間) ⁶⁾	30.8	45.7	19.3	32.1
1頭あたりの歩行距離(m) ⁷⁾	28.3	15.3	22.9	20.3

注 1)導入2年5ヶ月後調査 2)導入1年半後調査 3)懸架式ミルカ(手押し搬送、自動離脱装置付き)
4)ユニットを担いで搬送 5)3頭は別牛舎でバケットミルカ搾乳 6)調査時平均 7)作業者の平均

搾乳作業能率(頭/時)が約50%改善し、S牧場では搾乳牛を4頭、T牧場では12頭増頭し、導入後の作業能率と導入前の作業時間からさらに増頭余力があると推定された。また、搾乳作業の大幅な軽労化が図られ、酪農家から、身体への負担が軽減され、1人作業も楽になったとの評価を得ている。

3) ふん尿処理・利用機械による環境改善

T牧場では、高精度固液分離装置によりふん尿を固液分離して固形物の含水率を70~78%まで低減できた。固形分は、ハウス乾燥施設で乾燥した後育成牛舎等の敷料として利用され、使用後の敷料は新たに副資材を追加することなく堆肥化できた。堆肥化制御システムは、通気の制御によって堆肥原料の温度60℃以上を達成

し、初回の切返しまでの短期間に16~28%程度の有機物を分解できた(図2)。分離液分のは場散布ではふん臭と分る程度の弱い臭いが残るが、散布翌日には検知管では検出されず、臭いは2日目を過ぎるとかなり弱くなった。

S牧場では、既存の尿汚水貯留槽(3槽)のうち、2槽を曝気槽として曝気処理する方法とし、有効貯留量5.8m³の曝気槽2槽に対し、30分間欠で200L/min(推定)の条件で曝気処理する方法に改良した結果、散布当日の夕方には臭気がほとんどなくなり、「臭わなくなった」との評価を得た。

両牧場とも堆肥化、液肥化したふん尿は、トウモロコシ栽培を中心とした自家飼料畑で全量有効利用することができた。

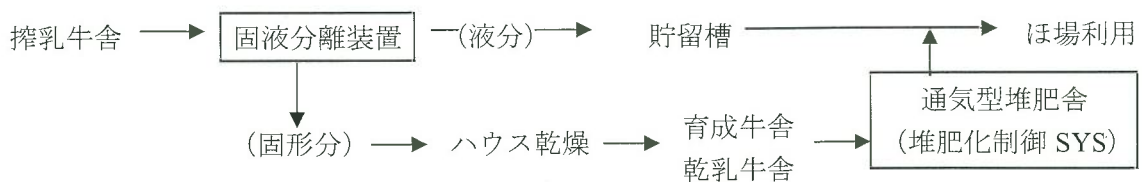


図2 T牧場の装置導入後の処理方法

4. 新酪農システムの効果

①両牧場とも細断型ロールベアラの導入によって、良質サイレージが不足しがちな夏季においても安定的に良質サイレージを搾乳牛に給与できるようになった。また、慣行作業で40～50%を占めたサイロ詰めなどの人手による作業がなくなり作業が省力化され、収穫時期における家族労働の担い手の一人である奥さんの労働負荷も大幅に減少する効果が確認された。搾乳ユニット自動搬送装置の導入では、搾乳作業能率(頭/時)が約50%改善し、大きな省力化が図られ、安定的に搾乳できるようになった。細断型ロールベアラサイレージによる良質のサイレージの安定給与と搾乳ユニット自動搬送装置による安定した搾乳作業で乳質、乳量の改善効果にも大きな期待が寄せられている。また、これまで繁忙を極めた収穫時期でも、必要に応じて夫婦で圃場作業と搾乳作業を分業化することによって作業ピークをしのぐことが可能となり、ゆとりも持つことができるようになった。さらにロールベアラサイレージを自動給飼装置へ直接投入することにより、従来のバンカーサイロ取り出し給与方式より大幅な省力化となっている(T牧場)。

②畜産経営で重要な問題であるふん尿の処理、利用は、トウモロコシ畑では牧草畑に比べ2倍程度の堆肥、液肥を肥料分として利用できるようになり、適正なトウモロコシ作付面積(T牧場では40頭飼養で約6haの飼料畑)を確保できれば、ふん尿を経営内ですべて処理・利用でき、臭気の発生が抑制され環境問題も大幅に改善することができるようになった。また、固液分離装置等の導入により堆肥化時の副資材と、窒素、カリの化成肥料が不要となった。

③これら機械・装置の導入によって、資源循環に基づいた技術体系が実際の経営において定着しうることが確認された。

④導入した農家の声として、飼料作に精神的なゆとりが生まれた、年間を通して品質の安定したサイレージが給与でき乳質・乳量が向上した、酪農を続ける期間が5年は延びる、等々があった。

5. おわりに

本実証試験では、緊プロ開発機を実証試験協力牧場に導入し、飼料生産、搾乳、ふん尿処理・利用までを含めた一連のシステムとしてその効果を実証する試験を行い、各作業において大幅な軽労化、省力化が図られ、畜産環境を改善することができる新酪農システムを構築することができた。また、本システムを構成する3機種が全て同時に導入される必要はなく、経営形態や事情に合わせて、段階的あるいはいずれかの機械・装置を必要に応じて導入することも可能であることも特徴の1つであり、今後の普及が期待される。輸入飼料の高騰が危惧される今日、本システムがわが国の畜産に大きく貢献することを期待している。

文 献

- 1) 志藤博克ら (2004), 平成15年度生研センター研究報告会資料, P35-44
- 2) 平田晃ら (2004), 平成15年度生研センター研究報告会資料, P45-54
- 3) 道宗直昭ら (2007), 平成18年度生研センター研究報告会資料, P51-62

◀地域の先端研究▶

LAMP法と黄化葉巻病常発地域を活用した
抵抗性トマトの選抜技術の確立

愛知県農業総合試験場

福田 至朗・加藤 政司・穴井 尚子・矢部 和則

黄化葉巻病抵抗性トマトを効率的に選抜する技術を確立した。即ち、シルバーリーフコナジラミを黄化葉巻病罹病トマトと共にケージ内に7日間おいて保毒させた後に、選抜したいトマト苗を入れ、さらに1週間栽培することにより均一に罹病させることができた。その後、リアルタイムLAMP反応によって個体ごとのウイルス濃度を測定し、濃度の低い個体を選抜した。この方法で選抜されたトマト系統を現地圃場で栽培したところ、高い抵抗性を有していることが明らかとなった。

1. トマト黄化葉巻病とは

トマト黄化葉巻病はベゴモウイルスに属すトマト黄化葉巻ウイルス (*tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) によって引き起こされる。黄化葉巻病に罹病したトマトは、新葉の黄化や奇形、萎縮などの症状を呈し、収量も著しく減少する。本病は1960年代にイスラエルで最初に報告され、その後世界のトマト産地に広がった。現在では、南ヨーロッパ・アジア・中南米などの主要なトマト生産地で大きな問題となっている。わが国では1990年代の半ばに東海地方と九州において最初に発生が報告されている¹⁾。黄化葉巻ウイルスを媒介するシルバーリーフコナジラミ (タバココナジラミBタイプ) が、その頃すでに国内に広がっていたこともあり、黄化葉巻病は西南暖地を中心にその被害を拡大した。愛知県は最初に本病が発見された地域の1つでもあり、現在でもその被害は深刻である。県内のトマト生産現場では、無病苗の利用や徹底したコナジラミ防除対策などを中心に綿密な病害防除対策を採っているが、黄化葉巻病の発生を抑制することができていないのが現状であ

FUKUTA Shiro, KATOU Masashi,

ANAI Naoko, YABE Kazunori

〒480-1193 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字
三ヶ峯1-1

る。

2. 研究のヒントは現場にあった

黄化葉巻病を抑えきれない最も大きな要因は、日本の生食用トマトに抵抗性品種が無かったことにある。同じベゴモウイルスに属す日本在来のタバコ葉巻ウイルスがこれまでトマト栽培で大きな問題とならなかったこともあり、これらのベゴモウイルスに対する抵抗性品種が全くなかった。その一方、本病によって大きな被害を受けていた海外では、黄化葉巻病抵抗性トマトの育種にいち早く着手し、様々な抵抗性品種が育成されていた。これらの品種はTYLCVには感染するが、罹病性品種に比べ症状が軽く、収量や品質も大きく低減しない特徴を持っている。

愛知県の西部で先進的なトマト生産を行っている鍋田トマト組合では、これらの抵抗性品種を産地に導入し、毎年のように病気が発生する圃場 (黄化葉巻病常発圃場) の一画で栽培するという取り組みを行っていた。これによって、それぞれの品種の抵抗性の強さやトマトの品質を確認していたのである。愛知県農業総合試験場では、このような農家の取り組みをヒントに、黄化葉巻病抵抗性育種の方法を作り出すことができないかと考え、研究を開始した。

3. 先端技術との組み合わせ

黄化葉巻病の常発圃場でトマトの育成系統を栽培することによって、効率的に抵抗性トマトを選抜することができる。しかし、農家の圃場で多数の育種素材を栽培する訳にはいかないの
で、現地選伐するための有望系統を予め絞り込む必要がある。一般に罹病性品種に比べ、抵抗性品種は感染後のウイルス濃度が低いことが報告されている²⁾。従って、育成したトマト系統にTYLCVを均一に感染させた後、個体ごとにウイルス濃度を測ることができれば、抵抗性の強い系統を選抜できるのではないかと考えた。

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法はNotomiらによって開発された新しいDNAの増幅法である³⁾。従来のPCR法に比べ、LAMP法は精確である上に、簡易に短時間でDNAを増幅することができる。愛知農総試ではいち早くLAMP技術を取り入れ、黄化葉巻病を始めとした植物病害の診断に利用してきた⁴⁾。このLAMP反応を活用することによって、植物内のウイルス濃度を測定することができれば、簡易な抵抗性の一次選抜が可能であ

ると考えた。

4. 開発した技術

本研究で目指す選抜法を図1に示した。交配後分離した世代についてTYLCVを接種する。接種後、病徴を観察すると共に、それぞれの個体のウイルス濃度を調査することによって、強い抵抗性を持った系統を選抜する。これらの中から果実品質などその他の形質を加味して抵抗性の候補系統を選び出す。最後に、選抜系統を現地の常発圃場で栽培することによって、実際の現場で耐えうるものかを確認するという流れである。このような選抜技術を確立するためには、

- ①トマトの実生苗に黄化葉巻病を確実に感染させるための接種法。
 - ②トマト内のウイルス濃度の測定法。
- を開発することが必要となる。以下にその技術の詳細を示した。

1) 幼苗接種法

TYLCVはシルバーリーフコナジラミを媒介

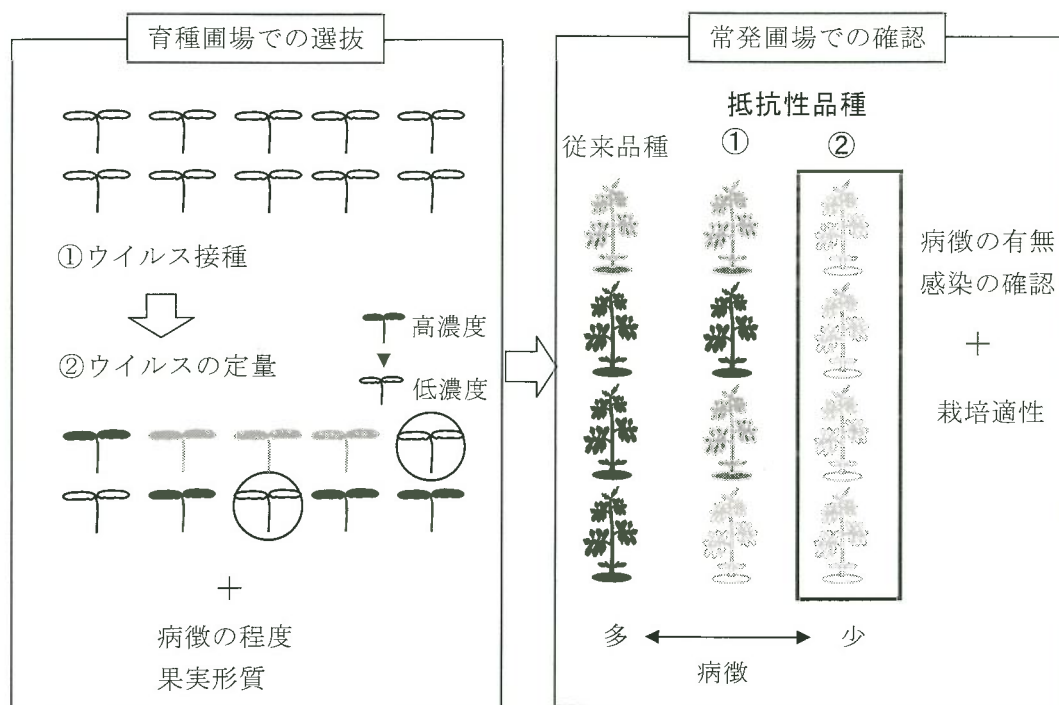


図1 抵抗性トマト選抜技術の開発の流れ

しなければトマトに接種することができない。従って、コナジラミを使って、簡易で均一なウイルス接種法を確立する必要がある。

接種法の前に、先ず大量にシルバーリーフコナジラミを飼育する方法を開発した。コナジラミの増殖率や植物のもちなどを基準に様々な植物を調べた結果、キャベツが最も優れていることが明らかとなった。キャベツを使うことにより、約1ヶ月で500頭のコナジラミを得ることができた。

トマトに対し個体別に黄化葉巻病を接種する場合は、シルバーリーフコナジラミを罹病トマトで保毒させ、接種したいトマト1個体につき10頭程度になるように保毒コナジラミを付けることによって行っていた。しかし、このような個体別の接種法では、多くの系統を短期間に選抜することはできない。従って、セルトレイで栽培した多数のトマトに対し黄化葉巻病をまとめて接種する「集団接種法」を開発した。

本研究で開発した集団接種法を図2に示した。キャベツ上で増殖したコナジラミと感染源となる黄化葉巻病に罹病したトマトを同一ケージ内に7日間おいて保毒させた後に、実生のセルトレイ育苗トマト（本葉1葉期）を入れて、7日間25℃下において感染させるというものである。本法を用いることにより、簡易にしかも均一に大量のトマト苗にウイルスを接種することが可能となった⁵⁾。

2) ウイルスの定量的検出

PCR法に比べLAMP法が特に優れているのは、①阻害物質による影響を受けにくい、②反応時間が短い（1時間程度）、③DNA増幅の判定が容易、という点である。これは多くの個体を扱わなければならない育種過程の選抜には極めて有効である。通常LAMP反応

では、DNAが増幅されたか否かは、DNA合成の際に生成する不溶性のピロリン酸マグネシウムによる白濁によって判定する。しかし、反応中の濁度を経時的に読み取るリアルタイム濁度測定装置を用いた「リアルタイムLAMP」では、DNA増幅の有無だけではなく、反応開始から何分後に濁度が上昇したかを知ることができる。この濁度上昇開始時間と鋳型に含まれる目的配列のコピー数の間に高い相関があることがわかった（図3）。

リアルタイムLAMPによって、トマト内のウイルス濃度を測定した結果を図4に示した。抵抗性品種である‘Athyla’や‘ToviKing’は、罹病性品種である‘ハウス桃太郎’に比べ、

- ① 1ヶ月間シルバーリーフコナジラミを飼育したキャベツ2株と TYLCV 感染トマト1株を、同一ケージ内に入れる。
コナジラミの保毒化 7日間
- ② ケージ内に、本葉1葉期の被験トマト（128穴セルトレイ半数程度）を入れる。
接種 7日間
- ③ コナジラミの回収及び殺虫後、育苗する。

図2 黄化葉巻病の集団接種法

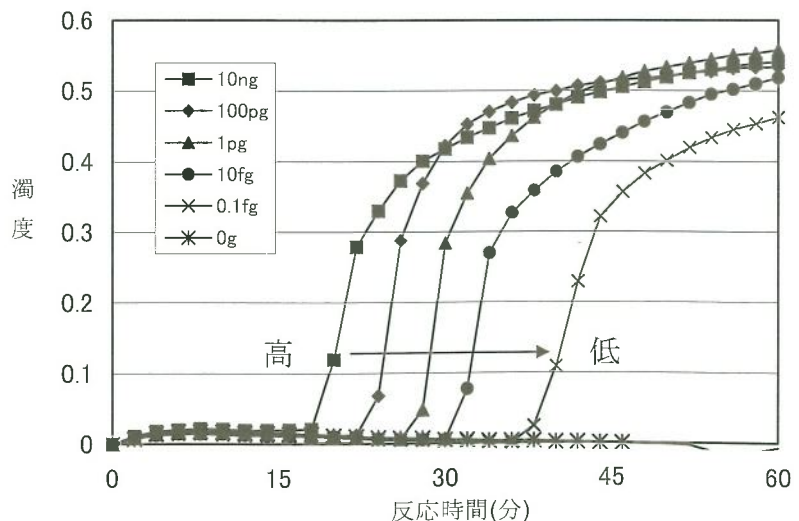


図3 段階希釈をしたプラスミドを鋳型に用いたリアルタイムLAMPの結果
鋳型濃度と濁度上昇開始時間との間に相関が認められる。

ウイルス濃度が低いことが分かった。

5. 抵抗性トマトの育種

これらの技術を組み合わせて作り出された抵抗性トマト選抜法を利用して、実際のトマトの育種を行った。抵抗性品種としては海外で育成された‘Athyla’を用いた。‘Athyla’と‘ハウス桃太郎’を交配した後代について、幼苗接種法によってウイルスを接種し、個体ごとにリアルタイムLAMP法を行った。その結果、対照となる‘ハウス桃太郎’に比べ、濁度上昇開始時間が長く、ウイルス濃度が低いと推定される系統が認められた(表1)。これら6系統のうち、A・E・F系統については、ウイルス濃度がやや低く、B・C・D系統については、さらに低いものと考えられた。選抜した系統の次世代を常発圃場で栽培し、発病株率を調べた結果を図5に示した。リアルタイムLAMPの結果、ウイルス濃度

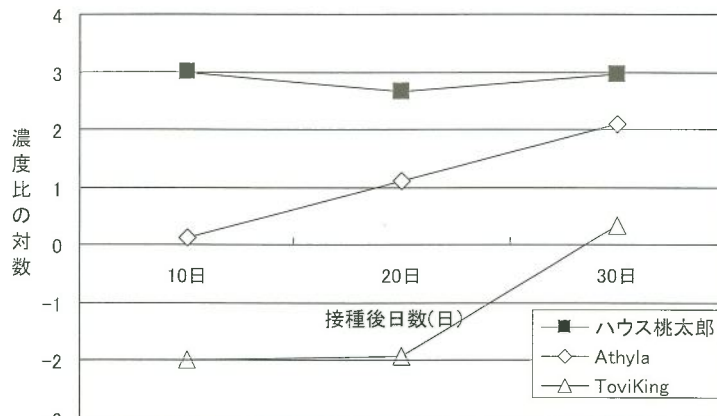
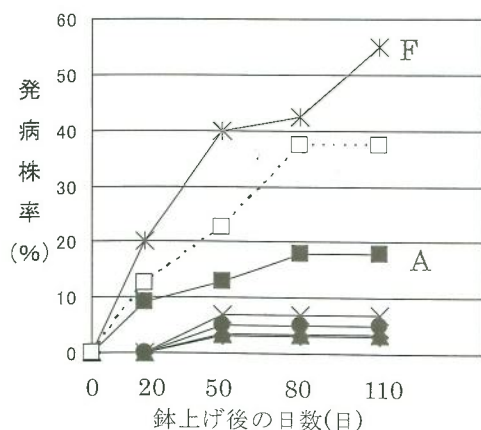


図4 Real time LAMP法によるウイルス濃度の測定

表1 各系統のリアルタイムLAMPによる濁度上昇時間と病徴

系統名	LAMPの濁度上昇開始時間	病徴の有無
A	22分42秒	—
B	27分23秒	—
C	41分47秒	—
D	24分37秒	—
E	22分48秒	—
F	22分23秒	—
ハウス桃太郎	20分55秒	+

圃場-1



圃場-2

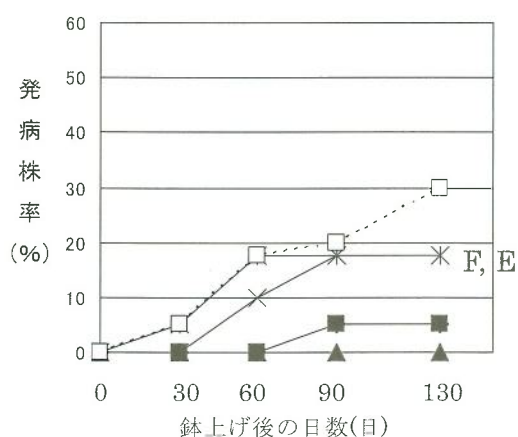


図5 各系統の常発圃場での発病率
 ■：A系統，◆：B系統，▲：C系統，●：D系統，
 ×：E系統，*：F系統，□：ハウス桃太郎。

がやや低いと推定されたA・E・F系統については、'ハウス桃太郎'と同程度であったり、圃場によるばらつきがあったりした。しかし、極めて低いと推定されたB・C・D系統については、現地圃場での発病株率も安定して低く抑えられており、既存の抵抗性品種と同程度であるとの結果を得ることができた。以上のことから、今回確立した幼苗接種法とリアルタイムLAMPによるウイルス濃度測定による選抜システムが実用的であることが明らかとなった。

6. 終わりに

今回の研究では、先進的な現場の取り組みに、研究部門が入ることによって、誰もが利用できる普遍的な抵抗性トマト選抜技術を作り上げることができた。現場の経験に研究者の科学的な技術を組み合わせることにより、それぞれが独自に行うよりも、効率的で実用的な成果を得る

ことができる良い例ではないかと思われる。今後は、抵抗性トマトの育成を進め、現場の農家の方々に利用していただけるような品種を作り出していきたい。

尚、本研究は平成15年度に採択された「先端技術を活用した農林水産高度化事業」の研究資金で行ったものである。

文 献

- 1) 加藤公彦ら (1998), 日植病報 64, 552-559
- 2) Ladipot, M. et al. (1997), Plant Dis. 81, 1425-1428.
- 3) Notomi, T. et al. (2000), Nucl. Acids Res. 28, e63.
- 4) Fukuta, S. et al. (2003), J. Virol. Methods 112, 35-40
- 5) 穴井尚子ら (2005), 関東東海北陸農業・病虫害 成果情報



ブレインテクノニュース
バックナンバーのご案内
第120号
2007年3月15日発行

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
.....石本 政男
- 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
.....松元 哲
- 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
.....山本 俊哉

国内情報

イネキチンエリシター受容体の発見と同定
.....賀来 華江・渋谷 直人
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

.....福田 裕穂
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.....亀田 恒徳・玉田 靖
いも類の収穫前茎葉処理機の開発
.....貝沼 秀夫・青木 循・久保田 興太郎・安食 恵治
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
.....山根 俊

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
.....(抄訳：下司 雅也)
葉緑体は一酸化窒素の給源.....(抄訳：岩井 純夫)
老化研究モデルとしての長寿命酵母.....(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遺伝子発現に及ぼす影響
.....(抄訳：竹村 秀平)

生研センターからのご案内

◀文献情報▶

体細胞核移植後のトリコスタチンA処置によるクローズドコロニーマウスのクローン作出

Successful Mouse Cloning of an Outbred Strain by Trichostatin A Treatment after Somatic Nuclear Transfer.

S. KISHIGAMI¹⁾, H-T. BUI¹⁾, S. WAKAYAMA¹⁾, K. TOKUNAGA²⁾, N. Van THUAN¹⁾, T. HIKICHI¹⁾, E. MIZUTANI¹⁾, H. OHTA¹⁾, R. SUETSUGU¹⁾, T. SATA²⁾ and T. WAKAYAMA¹⁾.

¹⁾ Center for Developmental Biology, RIKEN Kobe,

²⁾ Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases.

Journal of Reproduction and Development, 53, 165-170 (2007)

遺伝資源の保存、増殖、ES細胞を用いた細胞治療等への体細胞クローン技術の応用が期待されている。しかしながら、体細胞核移植におけるクローンマウスの作出率は2%以下であり、非常に効率が悪い。また、クローンマウスの作出率は、系統により大きく異なり、現時点でクローンマウスの作出が可能な系統は、B6D2F1やB6C3F1等の一部の交雑種F1系統に限定されている。一方、クローズドコロニーで維持されるICRマウスは、実験用のマウスとして広く用いられているものの、胎仔線維芽細胞等の核移植において3%以下の作出率が得られるということがわずかに報告されているのみであった。最近、トリコスタチンAを用いることによって、B6D2F1マウスの卵丘細胞を用いたクローンマウスの作出率を2~5倍に高める新しい効率的なクローンマウス作出技術が報告された。そこで、このトリコスタチンAを用いたクローンマウス作出技術の有効性を調べるために、これまでクローンマウスを得ることができなかったクローズドコロニーで維持されるICRマウス成獣の細胞を用いたクローンマウスの作

出が試みられた。その結果、トリコスタチンAを用いたときにのみ、4~5%の作出率でICRマウス成獣の卵丘細胞あるいは線維芽細胞から雌及び雄のクローンマウスを得ることに成功した。同じ処置方法により、B6D2F1マウスにおいては、5~7%の作出率が得られた。すなわち、体細胞核移植胚へのトリコスタチンA処理は、クローズドコロニーで維持されるマウスのクローン作出を可能とする最初のクローンマウス作出技術であり、トリコスタチンAを用いた本技術は、交雑種のクローンマウス作出率を高めるだけではなく、これまでクローンが作出できなかった系統のクローンマウスの作出を可能とする技術であることが明らかとなった。

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチンAは、体細胞核移植後のDNAの脱メチル化を促進することが知られている。また、トリコスタチンA処理による影響は、核の由来により大きく異なり、普通の受精卵や精子の細胞質内顕微注入胚においては発育に悪影響を及ぼすが、円形精子細胞の注入胚や単為発生胚においては悪影響は及ぼさないことが知られている。今回、マウスの体細胞核移植においてクローンマウス作出効率の向上が認められたが、体細胞核移植技術の生産効率を高めるためにも、他の動物種においても同様な効果が認められるのかどうかを検討していく必要がある。

(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▶

Gタンパク質連結型ABA受容体の発見

A G Protein-Coupled Receptor Is a Plasma Membrane Receptor for the Plant Hormone Abscisic Acid.

Xigang Liu, Yanling Yue, Bin Li, Yanli Nie, Wei Li, Wei-Hua Wu, Ligeng Ma.

Science, Vol. 315, Issue 5819, 1712-6, 23 March 2007

アブシジン酸 (ABA) は植物の発生や成長の様々な場面で働く植物ホルモンである。また、ABAは乾燥や傷害など環境との応答反応で特に重要な働きを担っている。これまで、ABAのシグナル伝達の経路に関する研究が進められており、2006年にはABA受容体に関する2つの報告があった。ABA受容体の1つは、核に局在し、花成を制御するRNA結合タンパク質FCA、もう一つは、葉緑体に存在し、マグネシウムをキレートするタンパク質複合体のサブユニットであった。しかし、これまで、存在が予想されたにもかかわらず細胞膜におけるABAの受容体については報告されていなかった。今回紹介する論文は、細胞外のABAに対する受容体を初めて発見したことを報告している。

この論文を書いたMaのグループはもともと、Gタンパク質を介した細胞情報伝達の植物における働きを調べていた。このシグナル伝達の仕組みは真核生物で広く保存されており、動物では、視覚、味覚、嗅覚などで重要な働きをしている。しかし、植物では、この機構がどんな働きを担っているのかは明らかでなかった。シロイヌナズナのゲノム配列情報からGタンパク質連結型受容体と思われる遺伝子GCR2を見つけ、調査したところ、遺伝子産物は細胞膜に局在し、ヘテロ3量体Gタンパク質の α サブユニットGPA1と結合した。GCR2の突然変異体では種子の休眠性を消失していたため、GCR2はABAのシグナル伝達に関わっていると考えら

れた。GCR2は受容体であるため、ABAがリガンドとしてGCR2に結合することが期待された。ABAとGCR2の親和性を調査したところ、GCR2は予想通り、ABAと特異的に結合した。また、GCR2の突然変異体はABAに関わるすべての現象に異常を示すため、GCR2はABAの主要な受容体であると考えられた。通常Gタンパク質連結型受容体にリガンドが結合すると受容体とGタンパク質の複合体が解離し、3量体Gタンパク質が α と $\beta\gamma$ の2つに分かれて下流へのシグナル伝達が起きる。ABAがGCR2に結合した場合にも、GCR2とGPA1を解離させた。これらの実験結果から以下のようなモデルが提示された。(1) 通常ABA受容体GCR2はGPA1を含む3量体のGタンパク質と複合体を形成している。(2) リガンドのABAが結合すると複合体が解離し、受容体GCR2からGタンパク質が離れる。(3) 解離したGタンパク質が下流へシグナルを伝達する。

著者らは、この論文で、ABAの受容体の発見だけでなく、ABAのシグナル伝達には、植物ではあまり役割が知られていなかったGタンパク質を介したシグナル伝達経路が存在することも示したことになる。

(抄訳：久保山勉, KUBOYAMA Tsutomu, 茨城大学農学部)

◀文献情報▶

乳酸菌のS-layerタンパクを被覆したリポソームの特徴づけ

Characterization of liposomes coated with S-layer proteins from lactobacilli.

Hollmann A, Delfederico L, Glikmann G, De Antoni G, Semorile L, Disalvo EA.

Laboratorio de Microbiologia Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnologia, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina.

Biochim. Biophys. Acta. 2007 Mar; 1768 (3): 393-400.

結晶性S-layerは1953年に*Spirillum*属菌で発見され、それ以降多くの細菌類で細胞外被の最外層構造に規則的に配列したタンパク質または糖タンパクの層があることが報告されている。乳酸菌においても、数種の*Lactobacillus*において細胞の最外層構造に規則的配列が報告されている。このようなタンパク質性サブユニットの二次元的結晶配列はsurface layer (S-layer) と呼ばれている。現在まで、S-layerの役割は明らかにされていないが、防御機構・栄養や代謝の伝達の調節・細胞接触と表面認識・細胞形と外被硬直の維持などの役割が考えられている。

リポソームはリン脂質2重層構造を持ち、細胞膜と融合することで、細胞内に物質を導入出来る。融合以外に吸着、エンドサイトーシス、脂質変化などにより標的細胞との相互作用時に内包物質を細胞内に放出する。また、遺伝子やタンパク質などの高分子を細胞内に導入することも可能である。現在、リポソームは生体内の疾病の部位に治療薬を送達するデリバリーシステム媒体として開発が進められている。

デリバリーシステムに使用するリポソームは、pH変化、胆汁酸・膵臓抽出物耐性、浸透圧、熱ショックなどのストレスに対して脆弱である問題が示唆されており、著者らはこれらのストレス因子への抵抗性を付与する目的で、*L.brevis*ならびに*L.kefir*のS-layerタンパクをリ

ポソームに被覆し、その安定性を評価した。

*L.brevis*と*L.kefir*から各々S-layerを単離し(それぞれの分子量は49.5, 69kDa), それぞれ大豆レシチンおよびジパルミトイルホスファチジルコリンとで作成した陽性に荷電したリポソームに被覆することにした。ゼータ電位の変化によって調べた結果、各々の乳酸菌のS-layerタンパクはリポソームの表面に付着することが明らかとなった。

リポソームはcalseinやCarboxyfluorescein (CF) を内部に保持する能力があり、胆汁酸・膵臓抽出物耐性、熱ショック、pH勾配に対する安定化を調べるための指標として利用しうる。各々の乳酸菌のS-layerタンパクを被覆したリポソームは胆汁酸・膵臓抽出物耐性、熱ショックなどのストレスに対して安定化効果をもたらすことが明らかとなった。またS-layerタンパクを被覆したリポソームをグルタルアルデヒド処理すると、pH勾配に対する安定性の付与に貢献することが明らかになった。グルタルアルデヒド処理を施さない場合において、pH7での安定性では、*L.brevis*のS-layerタンパクの方が*L.kefir*のそれに比べて効果が高いことも明らかにされた。

以上の結果より、*L.brevis*および*L.kefir*のS-layerタンパクを被覆したリポソームにはストレス因子に対する安定性の付与が確認され、ワクチンキャリアとしての応用性が見出された。今後、S-layerに関する知見がさらに集積され、これらの知見はリポソームを媒体とするワクチン開発研究に貢献するものと思われる。

(抄訳：芦田延久, ASHIDA Nobuhisa, カルピス株式会社 健康・機能性食品開発研究所)

◀文献情報▶

シロアリに共生している原生生物は、やはりセルラーゼ産生に関与している

Symbiotic "Archaezoa" of the Primitive Termite *Mastotermes darwiniensis* Still Play a Role in Cellulase Production

Hirofumi Watanabe¹, Aya Takase^{1,2}, Gaku Tokuda³, Akinori Yamada^{2,3}, and Nathan Lo⁴

¹National Institute of Agrobiological Science, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japan;

²Graduate School of Engineering and Science, University of Ryukyus, Nishihara-cho, Okinawa, Japan;

³Center of Molecular Biosciences, University of the Ryukyus, Nishihara-cho, Okinawa, Japan;

⁴School of Biological Sciences, The University of Sydney, Australia

Eukaryotic Cell 2006 5 (9): 1571-1576

1924年に報告されたシロアリの共生原生動物の駆除実験以降、シロアリのセルロース分解性原生動物依存説は、長く受け入れられてきた。しかしながら、渡辺らによってシロアリ自身が産生するセルラーゼの存在が明らかにされ (Nature 1998), 『シロアリのセルロース分解=共生微生物の働き』という、考えに風穴が開けられた。しかしながら、シロアリ自身がセルラーゼを産生することは証明されたが、シロアリのセルロース分解における共生者の役割に関しては、未だに議論が続いている。

ムカシシロアリ *Mastotermes darwiniensis* は世界で最も強い破壊性をもつシロアリである。このシロアリは、系統的に基底的な全てのシロアリ (下等シロアリ) と同様に、後腸に原生生物を有し、それらが木質の分解を助けると信じられている。Liらは、近年ムカシシロアリに共生する原生生物からセルラーゼ遺伝子をクローニングした (Eukaryotic Cell 2003)。しか

しながら、彼らはこの遺伝子に由来するタンパク質を確認することができず、この遺伝子は基本的には不活性で、セルロースの消化には大きく貢献せず、宿主シロアリが唾液腺で産生しているセルラーゼこそが、後腸で生活している原生生物にも重要なものであると主張した。

筆者らは、この主張を確認するために、Liらとは異なる方法で後腸のセルラーゼを分離した。それによると、後腸では3つの主要なセルラーゼが確認されたが、それらはいずれも宿主シロアリが唾液腺で産生するセルラーゼよりも大きな分子量を有していた。さらに、その後腸で得られたセルラーゼのうちの一つのN末端アミノ酸配列は、Liらが確認したmRNAから演繹されるアミノ酸配列と一致していた。そして、後腸のセルラーゼ活性の全量は、唾液腺、前腸、中腸で検出される、宿主シロアリが産生するセルラーゼ活性の全量とほぼ同じであった。これらの結果から筆者らは、ムカシシロアリ後腸の原生生物は宿主シロアリのセルロース分解に重要な役割を果たすセルラーゼを産生すると結論している。

セルロース分解性原生動物依存説は、シロアリのみならず多くの草食動物でも信じられてきた。筆者らが以前に、宿主シロアリが産生するセルラーゼを発見して以来、セルロース分解を共生生物に依存していると思われてきた種で、宿主自身が産生するセルラーゼが発見され始めている。その様な種でも、今後、宿主-共生者間の食物消化の役割が明確にされることが期待される。

(抄訳：鈴木賢一, SUZUKI Ken-ichi, 日本水産株式会社 中央研究所)

編集後記

121号をお届けします。本号の総説では、高橋英樹氏（東北大学）に植物の自己防御システムである誘導抵抗性について概説して戴くとともに、総説関連では、近年分子メカニズムの解明が進んでいる分野として、瀬尾茂美氏（(独)農業生物資源研究所）らに全身獲得抵抗性、有江力氏（東京農工大学）に誘導全身抵抗性、さらに、増田税氏（北海道大学）にジーンサイレンシングについてそれぞれご紹介戴きました。

その他の研究情報としては、島田卓哉氏（(独)森林総合研究所）らにアカネズミが有するタンニン無害化メカニズムの解明、美川智氏（(独)農業生物資源研究所）に椎骨数を増大させ体を長くしたブタ遺伝子の解明、道宗直昭氏（生研センター）らに繋ぎ飼い飼養における新酪農システム、福田至朗氏（愛知県農業総合試験場）らにLAMP法と黄化葉巻病常発地域を活用した抵抗性トマトの選抜技術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）、久保山勉氏（茨城大学）、芦田延久氏（カルピス(株)）、鈴木賢一氏（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121号

平成19年5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