

# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成20年3月15日（隔月1回15日発行）

ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.126

15 MARCH, 2008

ブレインテクノニュース

A



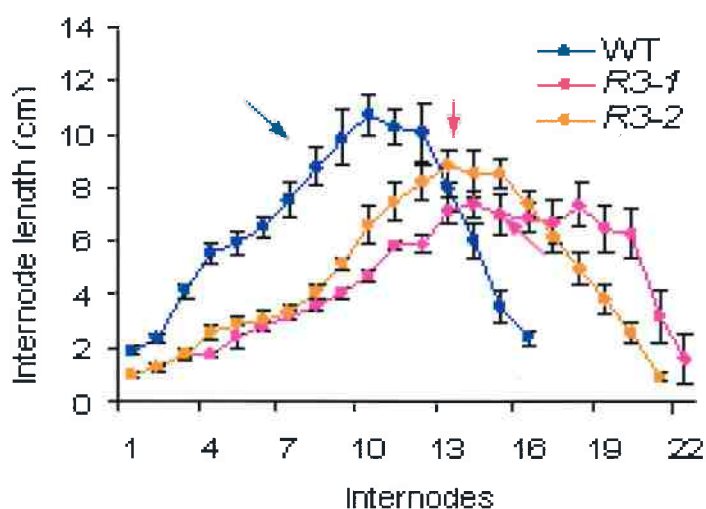
WT

R3-1

R3-2

アラスカエンドウの野生種，変異株R3-1及びR3-2の生育状況

B



活性酸素耐性変異株の選抜と太陽光利用  
効率の向上した高収量変異個体の作出

横浜市立大学 木原生物学研究所 国際総合科学研究科  
蓮沼 仰嗣・吉田 雄介・Md. E. ハーク・深松 陽介

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

- 卵子ゲノムの父性化への変換と産仔作成技術の開発 ..... 1  
河野 友宏 (東京農業大学 応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

## 国内情報

- 植物プロバイオティクスの開発研究 - 植物共生細菌の環境調和型イネ栽培技術への応用 - ... 6  
仲下 英雄<sup>1</sup>・安田 美智子<sup>1</sup>・伊沢 剛<sup>2</sup>・粟崎 弘利<sup>3</sup>・篠崎 聡<sup>2</sup> (<sup>1</sup>(独)理化学研究所 中央研究所, <sup>2</sup>(株)前川製作所, <sup>3</sup>美唄市農業協同組合)
- ウイルスRNAの複製を直接阻害する植物ウイルス抵抗性遺伝子 ..... 10  
石橋 和夫<sup>1,2</sup>・石川 雅之<sup>1</sup> (<sup>1</sup>(独)農業生物資源研究所 植物・微生物間相互作用研究ユニット, <sup>2</sup>北海道大学 大学院農学研究科 応用分子生物学分野)
- 活性酸素耐性変異株の選抜と太陽光利用効率の向上した高収量変異個体の作出 ..... 14  
蓮沼 仰嗣・吉田 雄介・Md. E. ハーク・深松 陽介 (横浜市立大学 木原生物学研究所 国際総合科学研究科)
- 植物のアンモニア態窒素吸収機構の機能分担を解明 ..... 20  
小島 創一<sup>1,2</sup>・高橋 秀樹<sup>2</sup> (<sup>1</sup>東北大学 大学院農学研究科 植物細胞生化学分野, <sup>2</sup>(独)理化学研究所 植物科学研究センター 基礎代謝研究チーム)
- 除菌効果の高い「乳頭清拭装置」の開発 ..... 25  
平田 晃・後藤 裕・川出 哲生・阿部 洋平 ((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

- 化学発光能測定技術を用いたフィールドでの乳房炎早期診断法 ..... 30  
稲田 司 (熊本県農業研究センター 畜産研究所 大家畜研究室)

## 文献情報

- 初期G1期あるいはG0期ドナー細胞を用いたウシ核移植胚の子宮内における初期発生 ..... 34  
A. Ideta et al. (*Cloning and Stem Cells*, 9(4), 571-580, 2007) 抄訳: 下司 雅也
- 植物のドブジャンスキー=マラー型雑種生育不全には自己免疫反応によって引き起こされるものがある ..... 35  
K. Bombliet et al. (*PLoS Biology* Vol. 5, Issue 9, 1962-1972, September, 2007)  
抄訳: 久保山 勉
- 蛋白工学によりNADH選択性へ改変した*Pichia stipitis*キシロース還元酵素を導入した*Saccharomyces cerevisiae*によるキシロースからのエタノール生産 ..... 36  
S. Watanabe et al. (*Microbiol.*, 153, 3044-3054, 2007) 抄訳: 家藤 治幸
- 促進型大容量トレハロース輸送体, トレハロース・トランスポーター1 (TRET1) は外部から細胞内へのトレハロースの取り込みを可能にする ..... 38  
T. Kikawada et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.104, No.28, 11585-11590, July 10, 2007)  
抄訳: 橋本 朋子

- 生研センターからのご案内 (2008年度 新規研究課題公募のお知らせ) ..... 39

## 表紙の説明

コムギ, アラスカエンドウ等を, パラコート存在下で太陽光のもとに発芽させた。大部分は死滅するが, 生き残った植物の中で活性酸素耐性を示し, 飛躍的に生産力の向上する株が見出された。アラスカエンドウの活性酸素耐性株を野生株と比較すると, 耐性株では分枝が多くなり, きぬさやエンドウとしてのサヤの数が約2倍の高収量になった。また野生株に比べ3~4週間ほど遅咲きとなり, 花芽の付く節も約13節(野生株では約8節)となるとともに, 節間も短く背丈も低くなる事が確認された。

詳細については, 14頁をご覧下さい。

## ◀ 総 説 ▶

## 卵子ゲノムの父性化への変換と産仔作成技術の開発

東京農業大学 応用生物科学部 バイオサイエンス学科

河 野 友 宏

哺乳類においては、卵子ゲノムと精子ゲノムの働きが決定的に異なるため、個体発生には父母ゲノムの協調的な貢献が不可欠である。卵子ゲノムの機能の特徴付けているDNAメチル化インプリントに人為的操作を加え、母性ゲノムを父性ゲノム化させる卵再構築システムを確立し、母性ゲノムのみから確実に高率に個体発生させることが可能となった。したがって、生殖系列で獲得されるメチル化インプリントが、次世代の誕生に父母ゲノムを不可欠としている分子基盤であることが実証された。

## 1. 全能性をもつ卵母細胞の再構築システム

我々は、生殖細胞ゲノムに刷り込まれた情報の実態に迫りたいと考え、特に生殖細胞形成過程におけるメチル化インプリントに焦点を当て、卵母細胞ゲノムにおけるインプリント遺伝子発現パターンを父性（精子ゲノム）パターンへ改変するシステムを開発した。以下にその概要を述べるが、詳細なプロトコルは既報<sup>1)</sup>を参照したい。

このシステムは、二重遺伝子欠損マウス新生仔の卵母細胞を用いた連続核移植法からなる。具体的な卵子構築方法を図1に示した。二重遺伝子欠損マウス新生仔は、*H19-DMR* (10kb) 欠損マウスと *Dlk1-Dio3* intergenic germline-derived (IG) -DMR (13kb) 欠損マウスを交配して作成し、実験に供試した。このマウスは、染色体7番および12番遠位部に存在する父性メチル化インプリント領域を欠損している。両メチル化インプリント領域により発現調節を受けるインプリント遺伝子群は、いずれも父性発現パターンに改変される。

非成長期卵母細胞ng (non-growing) 卵子 ( $\phi$  約15  $\mu$ m) は二重遺伝子欠損マウス新生仔

KONO Tomohiro

〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

から、またGV期卵 ( $\phi$  約75  $\mu$ m) は性腺刺激ホルモン投与42~46時間後に成熟雌マウスから、それぞれ回収した。GV期卵は透明帯の切断および除核を行い、レシピエント卵とする。次いで、レシピエント卵の囲卵腔内にng卵子をセンダイウイルス (HVJ) とともに注入し融合させ、14時間の体外成熟培養を行った。この間に、操作卵のng卵子由来核では、核膜の崩壊、分裂装置の形成、減数分裂そして第一極体の放出と、GV期卵を成熟培養した場合とほぼ同じスケジュールで第二減数分裂中期 (MII期) へと移行する変化が再現される。翌日、構築卵子に形成された分裂装置 (MII期染色体) を正常な排卵卵子に核移植した。ついで活性化処理 (10mM SrCl<sub>2</sub>を含むM2培地で2~4時間培養) 後、2つの第二極体および2つの雌性前核が形成され、ng卵子とfg卵子に由来する半数体ゲノムをそれぞれ持つ二母性胚 (ng/fg 胚) が完成する。単為発生との混同を避けるために、2セットの半数体雌ゲノム (卵子ゲノム) を持つことから、二母性胚/マウス (bi-maternal embryos/mice) と呼ぶことを昨年提案し、世界的に受け入れられている。

## 2. 二母性胚の発生能力

これまでインプリント遺伝子の発現を改変

## Igf2-H19 および Dlk1-Gtl2 2 領域の父性型発現を示す二母性胚の作出

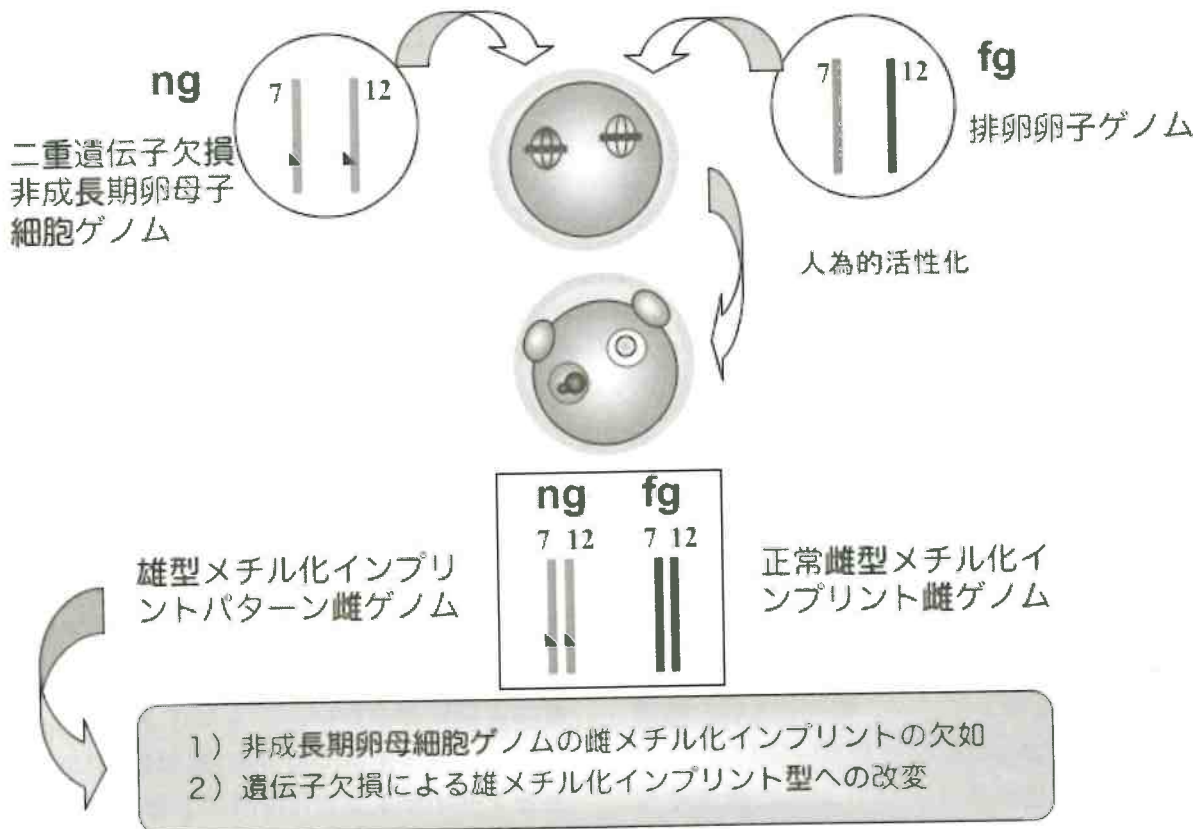


図1 二母性マウスの作出方法

した6遺伝子型の二母性胚を構築している。ここでは、それらのうち4遺伝子型の二母性胚の発生能を比較し、インプリント遺伝子の作用について考察してみたい(図2)。二母性胚の原型は、新生仔由来の非成長期卵母細胞 (ng) の核と完全に成長した卵子 (fg) の核が組み合わされて構築されており、胎齢13.5日まで発生延長を示す<sup>2)</sup>。単為発生胚は妊娠10日目までに必ず致死となることから3.5日の発生延長である。この発生延長の間に、マウスでは著しい胎仔成長と器官形成が行われる。何故に母性胚はこの発生延長ができたのであろうか?それは次のように理解することができる。母性メチル化インプリントを欠如したngゲノムからは、本来発現が抑制されていた父性発現インプリント遺伝子が多数発現し、同時に本来発現すべき多数の母性発現インプリント遺伝子の発現抑制が

生じて、精子ゲノムに類似した遺伝子発現パターンを示した。その結果、二母性胚は胎齢13.5日にまで発生延長した。しかしながら、精子形成過程で確立する父性メチル化インプリントを模倣しておらず、完全な父性ゲノムとしての機能を再現するには至っていないため、それ以降のステージへの発生は全く認められない。

そこで、さらに二母性胚の発生を延長させるため、父性メチル化インプリントの調節を試みた。父母アレル間で異なるメチル化状態を示すメチル化発現調節領域 (differentially methylated region, DMR) は、インプリント遺伝子の発現を制御している。我々は7番染色体にある *Igf2-H19* 領域と、12番染色体上にある *Dlk1-Gtl2* 領域の2つの領域に注目した。はじめに、*Igf2-H19* 領域の遺伝子発現を雄性化 (paternalization) することに着手した。*Igf2-H19* 遺伝子

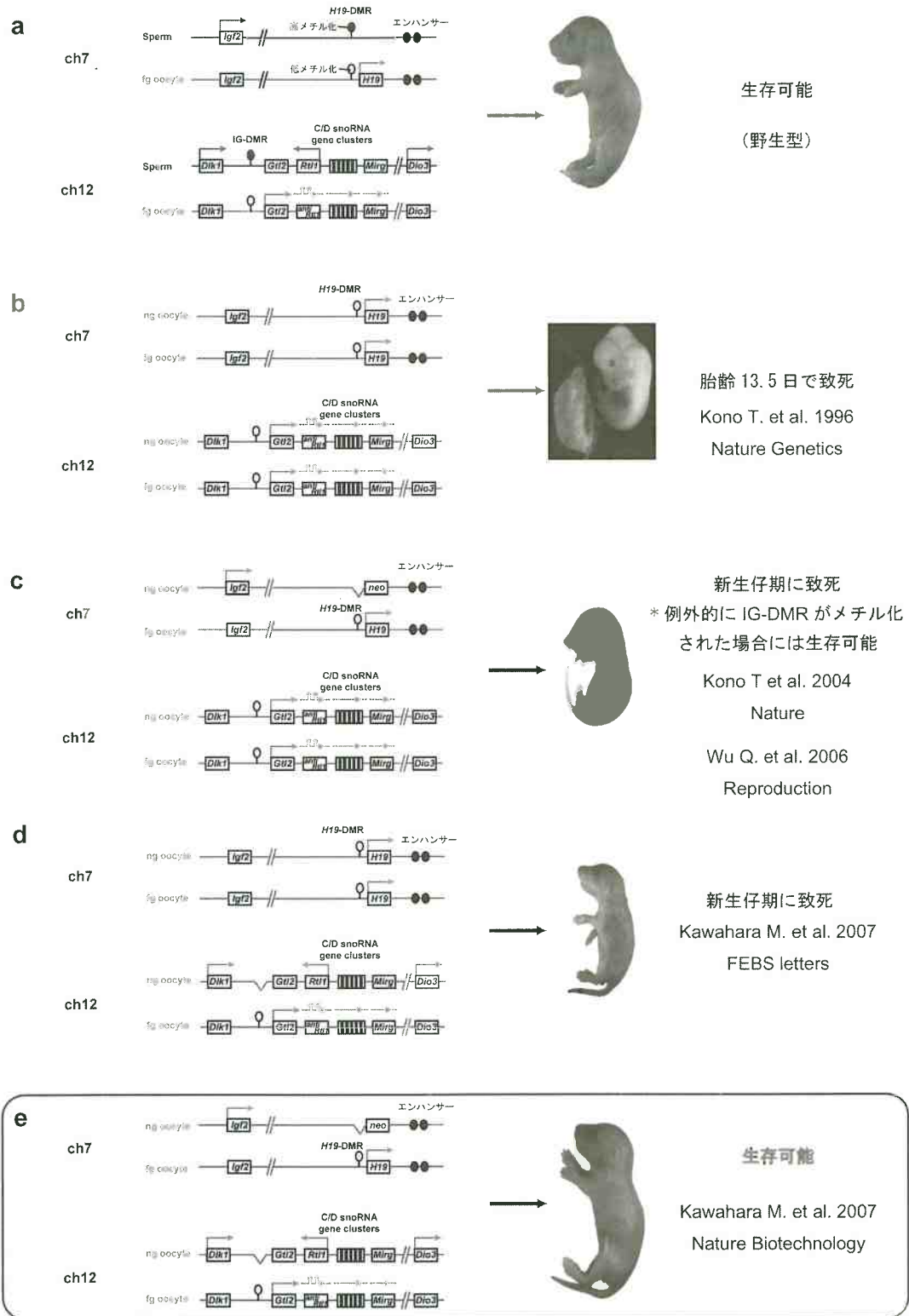


図2 二母性胚由来胎仔の遺伝子型，7および12番染色体上の父性メチル化インプリント遺伝子発現パターンならびにその発生限界

a: 野生型新生仔。b: ng/fg二母性胚由来胎齢13.5日胎仔；使用されたng卵子は野生型新生仔に由来する。c: ng<sup>Dch7</sup>/fg二母性胚由来胎齢19.5日胎仔；ng<sup>Dch7</sup>卵子ゲノムは7番染色体上のH19遺伝子の転写領域と転写調節領域を欠損している。d: ng<sup>Dch12</sup>/fg二母性胚由来胎齢19.5日胎仔；ng<sup>Dch12</sup>卵子ゲノムは12番染色体上のIntergenic Germline-Derived DMRを欠損している。e: ng<sup>Double</sup>/fg二母性胚由来新生仔；ng<sup>Double</sup>卵子ゲノムはDch7およびDch12の双方の欠損を併せ持つ。

は、図2aに示すように、*H19*遺伝子上流にあるDMRのメチル化によって発現が制御されている。そこで、*H19*遺伝子の転写領域と転写調節領域を欠損したKOマウス（*Dch7*マウス）新生仔のng卵子（ng<sup>*Dch7*</sup>）と成熟野生型マウスのfg卵子からなるng<sup>*Dch7*</sup>/fg二母性胚を構築し、その発生能を検討した。その結果、驚くべきことに移植胚中2匹が明らかに正常な産仔の形態で誕生し、自発性呼吸を開始した<sup>2)</sup>。このうちの1匹は“KAGUYA”と名づけられ、正常に発育して成熟個体に成長した。

しかしながら、出生以後の生存確率が極端に低く、雌ゲノムの雄ゲノムへの変換は不十分であることが示された。その後の解析から、“KAGUYA”では12番染色体上にある*Dlk1-Gtl2*領域のインプリント遺伝子発現を調節するIntergenic Germline-Derived DMR (IG-DMR)が高メチル化状態であることが判明した<sup>3)</sup>。そこで12番染色体上の遺伝子群を父性パターンで発現させるために、7番染色体のときと同様にIG-DMRを欠損させたKOマウス（*Dch12*）を導入した。*Dch12*-KOマウスと前述の*Dch7*-KOマウスを交配させることによって、7番および

12番染色体上のDMRを共に欠いたDouble-KO（二重遺伝子欠損）マウス（Double）を作製した。それらの新生仔から採取したng卵子（ng<sup>Double</sup>）を用いて、再びng<sup>Double</sup>/fg二母性胚を作製し個体までの発生率を調べた。結果は、期待通り移植胚のうち約40%が妊娠満期にまで発生し、そのうち約80%が正常な成熟雌マウスにまで発育した（図3）<sup>4)</sup>。誕生した二母性マウスの正常性を確認するため、新生仔および胎盤重量、繁殖試験、病理組織解析、血液成分解析などの表現型を詳細に解析したところ、二母性マウスは極めて正常な個体であることが明らかとなった。一方、*Dch12*-KOマウス由来のng卵子を用いて再構築した二母性胚においても、妊娠満期への発生が確認されたが、著しい発育不全が認められ、誕生直後に致死となった<sup>5)</sup>。

### 3. 家畜への応用

ウシやブタなどで、実際に二母性胚を作出することは、現状では困難である。その主な理由は、家畜卵母細胞の体外成長培養や成熟培養は、マウス卵母細胞に比べ限定されることによ

## 二母性マウス Bi-maternal mice

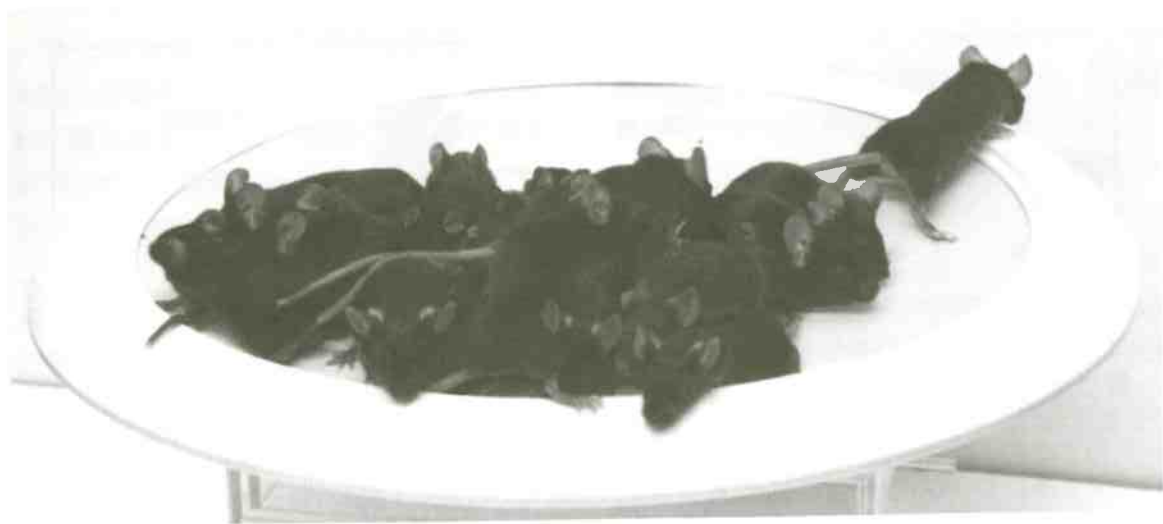


図3 誕生した二母性胚マウス集団

る<sup>6)</sup>。しかしながら、体外成熟能を獲得する前の小型の卵母細胞の核を用いて、上述の連続核移植法により半数体ゲノムを持つ成熟卵子を再構築することは可能である。実際にウシでは、直径70~110  $\mu\text{m}$ の小型卵母細胞ゲノムを持つ成熟卵子を体外受精に供試して、産仔の生産に成功している<sup>7)</sup>。また、ブタにおいても成熟卵子の構築に、低率ではあるが成功している（未発表）。今後、さらに周辺技術の整備と、それぞれの動物種に適した手法の開発により、これまで不可能と考えられていた小型卵母細胞の活用に道が開かれるものと期待される。

#### 4. おわりに

個体発生という複雑かつ神秘的な生命現象において、あたかも父母ゲノムはそれぞれの意志を持ち、自らの遺伝情報をいかに効率的に次世代へ伝達するかを競っているかのようにも見える。雌雄生殖細胞で行われるゲノムの修飾が、厳格な選択性をもって正確に実行されている。我々は、その精密な機構の一端を解明したが、まだまだ明らかにしなければならない謎は山積している。今後の研究の進展が期待される。

#### 文 献

- 1) Kawahara M, Obata Y, Sotomaru Y, Shimozawa N, Bao S, Tsukadaira T, Fukuda A, Kono T. Protocol for the production of viable bi-maternal mouse embryos. *Nature Protocol* 2008 ; 3 : 197-209.
- 2) Kono T, Obata Y, Yoshimizu T, Nakahara T, Carroll J. Epigenetic modifications during oocyte growth correlates with extended parthenogenetic development in the mouse. *Nature Genet.* 1996 ; 13 : 91-94.
- 3) Wu Q, Kumagai T, Kawahara M, Ogawa H, Hiura H, Obata Y, Takano R, Kono T. Regulated expression of two sets of paternally imprinted genes is necessary for mouse parthenogenetic development to term. *Reproduction* 2006 ; 131 : 481-488.
- 4) Kawahara M, Wu Q, Takahashi N, Morita S, Yamada K, Ito M, Ferguson-Smith A C, Kono T. High-frequency generation of viable mice from engineered bi-maternal embryos. *Nat. Biotechnol.* 2007 ; 25 : 1045-1050.
- 5) Kawahara M, Wu Q, Ferguson-Smith A C, Kono T. Appropriate expression of imprinted genes on mouse chromosome 12 extends development of bi-maternal embryos to term. *FEBS Lett.* 2007 ; 581 : 5178-5184.
- 6) Obata Y, Maeda Y, Hatada I, Kono T. Long-term effects of in vitro growth of mouse oocytes on their maturation and development. *J. Reprod. Dev.* 2007 ; 53 : 1183-1190.
- 7) Bao S, Ushijima H, Hirose A, Aono F, Ono Y, Kono T. Development of bovine oocytes reconstructed with a nucleus from growing stage oocytes after fertilization in vitro. *Theriogenology* 2003 ; 59 : 1231-1239.

## ◀国内情報▶

植物プロバイオティクスの開発研究  
—植物共生細菌の環境調和型イネ栽培技術への応用—<sup>1</sup>独立行政法人 理化学研究所 中央研究所 植物獲得免疫研究ユニット,<sup>2</sup>株式会社 前川製作所, <sup>3</sup>美唄市農業協同組合仲下 英雄<sup>1</sup>・安田 美智子<sup>1</sup>・伊沢 剛<sup>2</sup>・栗崎 弘利<sup>3</sup>・篠崎 聰<sup>2</sup>

食の安全、環境保全を実現する農業システム構築のための技術開発が望まれており、化学農薬や化学肥料に代わる農業資材の開発が進められている。その一つとして、自然界に存在する植物共生細菌のうちで植物に生長促進や病虫害耐性といった有用形質を付与するものを選抜し、これを植物の生命力や免疫力を活性する植物プロバイオティクスとして利用する生物資材の開発が進められている。

## 1. はじめに

戦後の農地拡大や品種改良・化学農薬・化学肥料・機械化を取り入れた農業近代化によって多くの作物の安定供給が可能になり、さらなる品種改良や栽培技術の進歩によって人々の多様な生活様式に合わせた作物供給が行われる状況に至っているが、その一方で、消費者側からは、農薬の過剰使用への懸念等、食の安全が注目されてきている。また、化学農薬・化学肥料がもたらした生態系破壊を教訓として環境保全も叫ばれるようになって久しい。国内で使用される化学農薬は非常に安全性の高いものへと世代交代しているが、2006年には有機農業推進法が議員立法として制定・施行されるなど、食の安全・環境保全に対する危機感は依然として高い。このような消費者の要望を満たす有機農業を広く実践するためには、自然環境における植物自身の能力を最大限に発揮させて利用することが効果的であり、その一つの方法として、植

NAKASHITA Hideo<sup>1</sup>, YASUDA Michiko<sup>1</sup>,  
ISAWA Tsuyoshi<sup>2</sup>, AWASAKI Hirotohi<sup>3</sup>,  
SHINOZAKI Satoshi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1<sup>2</sup>〒135-8482 東京都江東区牡丹2-13-1<sup>3</sup>〒072-0001 北海道美唄市大通り東1条北1  
丁目2-1

物の内部に生息している細菌を利用する方法が現実化してきており、その科学的裏付けも明らかになりつつある。

## 2. 植物共生細菌が植物に付与する有用形質

植物は、動物と同様に、自然界の様々な生物と相互に作用しながら生育している。その代表的なものが、病気を引き起こす病原微生物（糸状菌や細菌、ウイルス等）や植物を食餌とする害虫で、葉や根など様々な場所に攻撃してくる。また、マメ科植物で窒素固定に働く根粒菌や多くの植物の根に侵入して土壤中の栄養分の吸収を助ける菌根菌のような共生菌も重要である。これらの他にも、植物の葉の表面や組織の内部には様々な微生物が生息していることが明らかとなってきており、その意義についての研究も進み始めているところである。植物の内部に共生する微生物（エンドファイト）の1つに植物共生細菌（細菌エンドファイト）があるが、イネの茎葉部に生息していた共生細菌を分離して調査した結果、数種の細菌にイネに有用な形質を付与する能力があることがわかった。

実験室レベルの研究では、このような植物共生細菌 *Azospirillum* sp. や *Herbaspirillum* sp. を培養して、イネ幼苗の根に処理してイネ植物体



に感染・定着させたところ、このイネはイネいもち病（稲熱病）の感染に対して抵抗性を持つようになった（図1）。また、イネの生育促進効果があることも確認された。感染させた共生細菌は、細胞と細胞の間の空間（細胞間隙）に生息していることも確認されているが<sup>1)</sup>、共生細菌自身は抗菌物質や毒素を生産せず、イネの細胞と共生細菌の間に何らかの相互作用が起こってイネの誘導抵抗性や生育促進に働くシグナルが活性化されると考えられている（図2）<sup>2)</sup>。これらの共生細菌は、モデル実験植物であるシロイヌナズナにも感染・定着し、病原性細菌の感染に対して抵抗性を持つようになることが確認されている。

### 3. 植物プロバイオティクス

動物の腸には様々な種類の腸内細菌が生息していて、その構成・集団（腸内フローラ）が腸の健康状態だけではなく、宿主の健康にも影響を及ぼすことが分かってきているが、この腸内

フローラを良い状態にして消化吸收を促進したり免疫力を強化する働きを持つ微生物をプロバイオティクスと呼んでいる（図3）<sup>3)</sup>。プロバイオティクスは、プロバイオシス（共生）とアンチバイオティクス（抗菌物質）を組み合わせた造語であるが、予防医学の観点から注目を浴びており、これを含むヨーグルトをはじめとする健康食品も開発されている。

植物共生細菌が生息する細胞間隙は気孔を通して外界とつながる構造で、動物の消化器官と似た状況にあり、ここに生息して植物細胞と相互作用関係にある様々な共生細菌群は、植物の健康状態とも密接に関わっていることが推察される（図3）。動物の場合と同様に、病原菌も悪玉菌として存在し、ここで紹介している共生細菌のような善玉菌もある。したがって、イネに有用な形質を付与する *Azospirillum sp.* のような共生細菌は植物におけるプロバイオティクスとして働いて、植物体内の細菌フローラを改善して、生育促進や免疫力向上をもたらすものと考えられる。

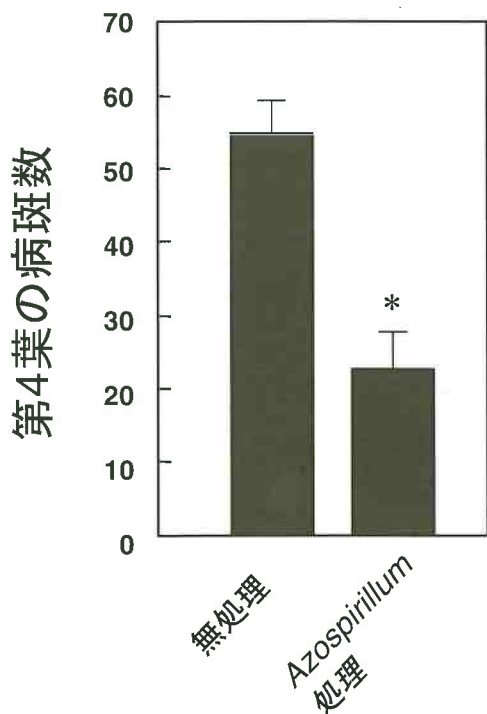


図1 植物共生細菌のイネいもち病抵抗性誘導効果

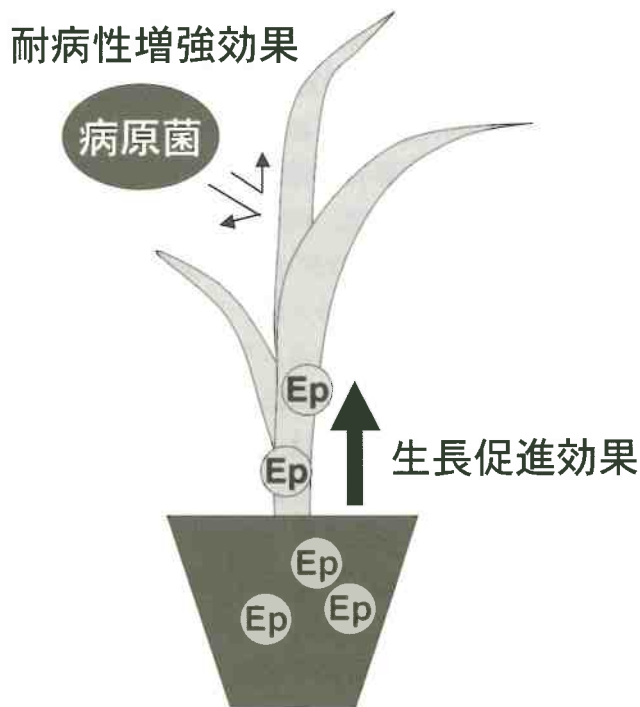


図2 植物共生細菌がイネに付与する有用形質

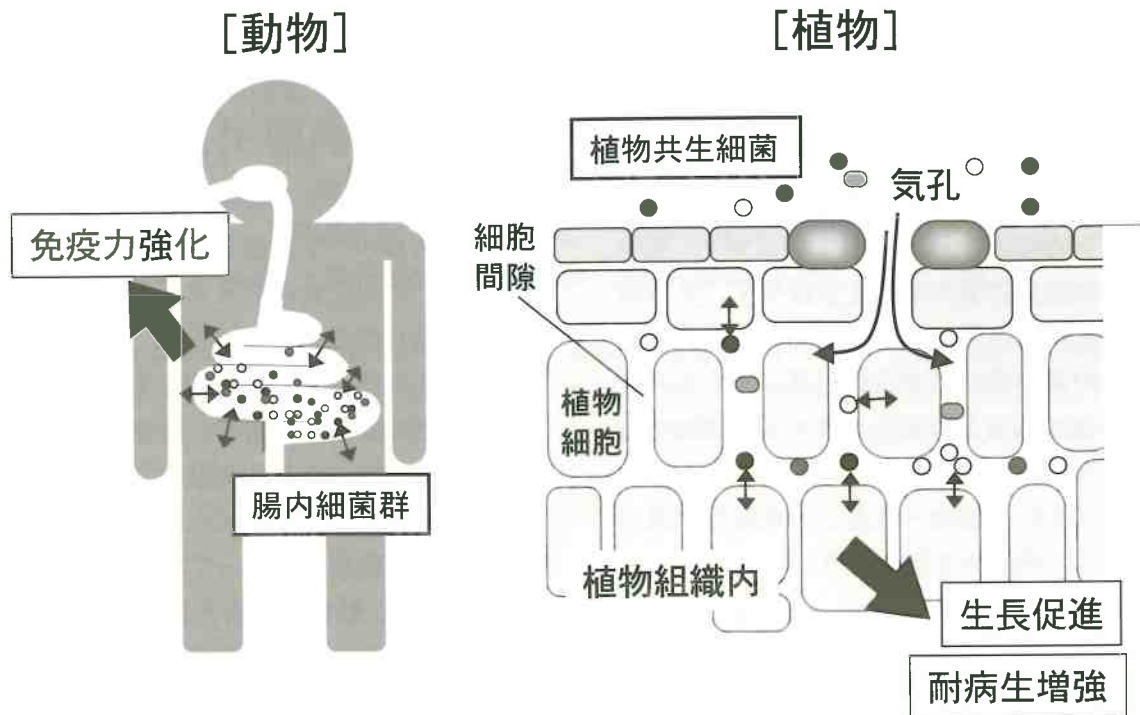


図3 動物と植物の共生菌とプロバイオティクス効果の概念図

#### 4. 植物の誘導抵抗性のメカニズム

植物は様々な病原菌から身を守るために複雑な自己防御系を備えている。大きく分けて、特定の病原菌を認識して防御する強い抵抗性、様々な刺激によって全身に誘導されて多様な病原菌に対して効果を発揮する誘導抵抗性がある。前者は特定の遺伝子（抵抗性遺伝子）に依存しており、従来から育種分野で利用されているが、後者の抵抗性には、病原菌感染や傷害によって誘導される数種のタイプが知られており、サリチル酸、ジャスモン酸、エチレン、ブラシノステロイド等の植物ホルモンがシグナルとして機能している<sup>4)</sup>。誘導抵抗性の1つである全身獲得抵抗性については、これを活性化する化学物質（殺菌剤として登録されている）を利用した防除方法が既に実用化され広く利用されている。植物共生細菌が誘導する病害抵抗性についてイネ、シロイヌナズナで解析した結果は、これまでに知られていないタイプの誘導抵抗性メカニズムが活性化されていることが示され、現在、詳細な解析が進められている。

#### 5. 実用化へ向けた圃場試験

これらの植物共生細菌の有効性については、すでに圃場での試験も行ってきており、その有効性が確認されている。北海道美唄市で数年にわたって行われたイネの有機または低農薬栽培圃場での試験では、共生細菌を処理した植物では、処理していない植物に比較して、単位面積あたりの穂数増加や米の収量増加などの生育促進効果が認められた（表1）。また、北日本で葉を食害する重要害虫であるドロオイムシについても食害を軽減する効果が認められている。

表1 ななつぼしにおける収量調査

処理区	穂数 (本/m <sup>2</sup> )	精玄米重 (kg/10a)
<i>Azospirillum</i>	649 (112)	699 (108)
Endophyte A	625 (108)	658 (102)
Endophyte B	638 (110)	684 (106)
無接種	578 (100)	645 (100)

(図4, 表2)。平成20年度からは, 試験販売的に圃場試験面積を拡大して行い, 今後の実用化に向けた実証データを集積する予定である。



図4 ドロオイムシおよびその食害の様子

表2 ななつぼしにおけるドロオイムシ食害葉数調査

処理区	ドロオイムシ食害葉数 (枚/株)
<i>Azospirillum</i>	4.2 (64)
Endophyte A	6.2 (94)
Endophyte B	5.6 (85)
無接種	6.6 (100)

## 6. おわりに

ここで紹介した植物共生細菌はイネから分離された天然のもので, これを植物プロバイオティクスとして与えてイネが遅く育つ環境を整えることは, 食の安全や環境への脅威とはならない。今後は, 実用化研究とともに, 圃場試験で得られている有用な効果を参考にしながら実験室レベルでの研究を遂行して, 植物共生細菌と植物細胞との間の相互作用を遺伝子レベルで解明し, 植物プロバイオティクスのより効果的な利用方法の開発や他の作物へ展開するための技術基盤の構築を進めていく必要がある。このような植物共生細菌を用いた植物プロバイオティクスは, これまで見逃されがちであった自然環境と近代農業の調和を可能にし, 将来への持続型農業システムの構築に大きく貢献することが期待される。

## 文献

- 1) Elbeltagy, A. (2001), *Appli. Environ. Microbiol.*, 67, 5285~5293
- 2) 有江力, 仲下英雄 (2007), 植物防疫, 61 (10),
- 3) 上野川修一 (2003), 免疫と腸内細菌, 平凡社, 東京
- 4) 仲下英雄 (2006), 植物ホルモンの分子生物学 (小柴共一, 神谷勇治, 勝見允行編), 講談社サイエンティフィック, 東京

## ◀国内情報▶

## ウイルスRNAの複製を直接阻害する 植物ウイルス抵抗性遺伝子

<sup>1</sup>独立行政法人 農業生物資源研究所 植物・微生物間相互作用研究ユニット,

<sup>2</sup>北海道大学 大学院農学研究科 応用分子生物学分野 分子生物学研究室

石橋 和大<sup>1,2</sup>・石川 雅之<sup>1</sup>

トマトの *Tm-1* 遺伝子は、トマトモザイクウイルス (ToMV) に対する抵抗性遺伝子として古くから知られ、多くのトマト品種に導入されてきた。筆者らは、*Tm-1* トマトの細胞抽出液に、試験管内 ToMV RNA 複製反応を阻害する活性を見出し、これを精製することによって *Tm-1* 遺伝子産物を同定した。さらに、これまでに知られているウイルス抵抗性遺伝子産物とは異なり、*Tm-1* は ToMV の複製タンパク質に結合してその働きを阻害することを明らかにした。

### 1. はじめに

ウイルス病は農作物に多大な被害を与えるため、その防除は農業における重要な課題である。現在ウイルス病に対しては、抵抗性遺伝子の導入が最も有効な対策のひとつとなっている。植物のウイルス抵抗性遺伝子には優性に遺伝するものと劣性に遺伝するものがあり、それぞれ異なる機構でウイルス抵抗性を与えていると考えられている。多くの優性抵抗性遺伝子の産物は、共通のモチーフ (ヌクレオチド結合部位-ロイシンリッチ反復配列) をもち、抵抗性の発揮に際してしばしば過敏感細胞死を伴うことが知られている。これらのモチーフは、植物がもつ細菌やカビに対する抵抗性遺伝子の産物にも共通してみられ、またそのうちのいくつかは、哺乳動物や昆虫の自然免疫システムにおいて重要な役割を果たす Toll 様受容体と類似している。これらのタンパク質の機能については未解明な点が多いが、特定のウイルスの感染 (非病原性因子の発現) を感知して自己防御応答を活性化する働きを担っていると考えられている<sup>1)</sup>。一方、これまでに同定された劣性抵抗性遺伝子

ISHIBASHI Kazuhiro<sup>1,2</sup>, ISHIKAWA Masayuki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2

<sup>2</sup>〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

は翻訳開始因子などをコードしている。その多くは、ウイルスの増殖のために必須な宿主因子遺伝子の対立遺伝子で、何らかの原因でウイルスの増殖をサポートする能力を喪失したものであると考えられている<sup>2)</sup>。

トマト (*Solanum lycopersicum*) の *Tm-1* は、トマトモザイクウイルス (ToMV) に対する半優性の抵抗性遺伝子で、プロトプラストにおける ToMV の増殖を抑制する。*Tm-1* は、1940年代にトマトの近縁野生種 *S. habrochaites* から育種的に導入され、多くのトマト品種にとり入れられてきたが、染色体上の組み換え頻度の低い領域に座乗し、ポジショナルクローニングが成功していない。*Tm-1* 感受性である ToMV 野生株 (WT ToMV) と *Tm-1* 抵抗性打破 ToMV 変異株 LT1 を *Tm-1* トマトプロトプラストに同時に感染させると、LT1 株のみが増殖し、WT ToMV の増殖は抑制されることから、*Tm-1* による抵抗性は過敏感反応 (病原体を特異的に認識することによって起こる非特異的な防御反応) を介さないユニークなものと考えられた<sup>3)</sup>。さらに、LT1 株がゲノム RNA の複製に関与するタンパク質にアミノ酸置換をもつことから、*Tm-1* は ToMV 複製タンパク質の発現あるいは機能を阻害すると予想された<sup>4)</sup>。

## 2. *Tm-1*の同定

ToMVのゲノムRNAが宿主細胞に感染すると、宿主の翻訳装置によって翻訳され、複製タンパク質が合成される。複製タンパク質は宿主の因子と協働して、自身のゲノムRNAを特異的に複製する。筆者らは、ToMVの効率のよい増殖を許容するタバコBY-2細胞から調製した脱液胞化プロトプラスト（液胞は、RNA分解酵素やタンパク質分解酵素に富む）を破碎することによって、高い試験管内翻訳活性をもつ抽出液（BYL）を得た<sup>5)</sup>。BYLを用いてToMVのゲノムRNAを翻訳すると複製タンパク質が合成され、さらにRNA合成基質を加えるとゲノムRNAが複製された<sup>5)</sup>。*Tm-1*がToMV複製タンパク質の発現あるいは機能を阻害するとすれば、この系を利用して、*Tm-1*によるToMV RNAの複製阻害活性を試験管内で検出できる可能性がある。そこで、*Tm-1*遺伝子をもつトマトから培養細胞ラインを樹立し、この培養細胞から脱液胞化プロトプラスト抽出液を調製した。BYLを用いた試験管内ToMV RNA翻訳-複製系に*Tm-1*トマト細胞の脱液胞化プロトプラスト抽出液を加え、WT ToMVあるいはLT1のRNAをそれぞれ試験管内翻訳-複製させたところ、LT1株と比較してWT ToMVのRNA複製がより強く抑制された。*Tm-1*をもたないトマトの抽出液にはこのような活性は検出されなかったことから、この抑制活性は*Tm-1*遺伝子産物に由来すると考えられた。

ToMV RNA複製抑制因子を同定するため、

各種クロマトグラフィー等を用いた6段階からなる分画操作により活性を精製し、活性画分に含まれるタンパク質（p80）をLC-MS/MS法により同定した。*Tm-1*をもつトマト由来のp80（p80<sup>GCR237</sup>）cDNAの塩基配列は、*Tm-1*をもたないトマト由来のp80（p80<sup>GCR26</sup>）の配列とは異なり、*Tm-1*遺伝子が由来したとされる野生種トマト*S. habrochaites*のものと同一であった。試験管内翻訳により合成したp80<sup>GCR237</sup>は、試験管内ToMV RNA複製抑制活性を有していたが、p80<sup>GCR26</sup>は活性を示さなかった（図1）。p80と類似のアミノ酸配列をもつタンパク質は、植物界のみならずカビや細菌にも見出されたが、それらはいずれも機能が知られていないものであった。

次に、p80のToMV増殖における機能を生体内で調べた。Virus-induced gene silencing法により*Tm-1*トマトにおいてp80<sup>GCR237</sup>の発現を抑制したところ、ToMV抵抗性が打破された。また、p80<sup>GCR237</sup>を恒常的に発現する形質転換トマトは、WT ToMVに抵抗性を示し、LT1株の増殖を許容した。さらに、*Tm-1*トマトと*Tm-1*をもたないトマトの交配に由来するF2世代において、WT ToMVに対する抵抗性とp80<sup>GCR237</sup>が共分離することもわかった。これらの結果から、p80<sup>GCR237</sup>が*Tm-1*遺伝子産物であることが強く示唆された<sup>6)</sup>。また、*Tm-1*は、元来ToMVの増殖に必須であった因子の変異型をコードしており、ドミナントネガティブ効果によって抵抗性を与えている可能性が提唱されていたが、p80<sup>GCR237</sup>の発現抑制によってWT ToMVが増殖

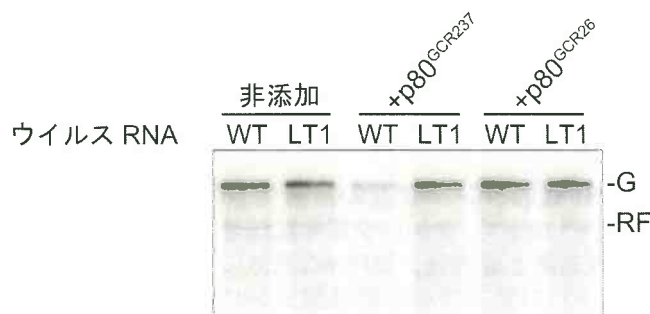


図1 p80の添加による試験管内ToMV RNA複製の阻害

試験管内翻訳によって合成したp80<sup>GCR237</sup>あるいはp80<sup>GCR26</sup>タンパク質をBYLに添加して、野生型（WT）ToMVあるいはLT1 RNAの試験管内複製反応を行い、<sup>32</sup>P標識されたRNA複製産物を検出した。

G：ゲノムRNA；RF：複製型RNA。

可能になったことから、この可能性は考えにくいものとなった。

### 3. Tm-1はToMV複製タンパク質に結合してその働きを阻害する

従来、ウイルス抵抗性に関する研究は生細胞にウイルスを感染させる実験系を用いて行われてきた。しかし、*Tm-1*トマト細胞にToMV RNAを感染させてもウイルス由来のRNAおよびタンパク質の蓄積は全く検出されないため<sup>7)</sup>、*Tm-1*がToMV増殖のどの段階を阻害しているのかは不明であった。一方、試験管内ToMV RNA複製系においては、*Tm-1*によりRNA複製が抑制されたときも、WT ToMVの複製タンパク質は正常に蓄積した<sup>6)</sup>。このことから、*Tm-1*は複製タンパク質の合成あるいは安定性には影響を与えずに、その機能を阻害することが示唆された。*Tm-1*抵抗性打破変異株が複製タンパク質内のアミノ酸残基に置換をもつことから、*Tm-1*は何らかの形で複製タンパク質を認識することにより抵抗性を与えていると考えられる。そこで、*Tm-1*と複製タンパク質との相互作用の検出を試みた。試験管内翻訳系を利用してFLAGタグ融合p80タンパク質およびToMV複製タンパク質を合成し、混合後免疫沈降解析を行ったところ、p80<sup>GCR237</sup> (*Tm-1*)

とWT ToMV複製タンパク質が共精製された(図2)。しかし、LT1株の複製タンパク質との相互作用は検出されなかった。p80<sup>GCR26</sup>と、WT ToMVあるいはLT1複製タンパク質の相互作用は、いずれも検出されなかった。これらの結果より*Tm-1*はWT ToMVの複製タンパク質と結合することによってその機能を阻害すること、LT1株は*Tm-1*との結合から逃れることによって抵抗性打破能を獲得したことが示唆された<sup>6)</sup>。

### 4. おわりに

*Tm-1*は、その存在が古くから知られ、広く栽培トマト品種に導入されてきた。また、抵抗性が過敏反応を介さないことなどから、ユニークなウイルス抵抗性遺伝子として研究対象となってきた。しかし、染色体上の組み換え頻度の著しく低い領域に座乗しているためにポジショナルクローニングによる同定が成功していなかった。本研究では、*Tm-1*トマトの細胞抽出液中に試験管内ToMV RNA複製阻害活性を見出し、これを分画・精製することによって*Tm-1*遺伝子産物を同定した。

これまでに同定された植物の優性ウイルス抵抗性遺伝子のほとんどは、ウイルス感染を感知して過敏反応を引き起こすタイプであった。

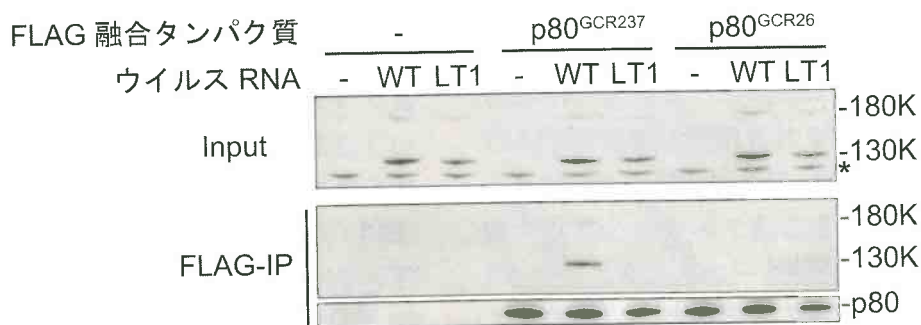


図2 p80<sup>GCR237</sup> (*Tm-1*) とToMV複製タンパク質の結合

FLAGタグを融合したp80<sup>GCR237</sup> (*Tm-1*) あるいはp80<sup>GCR26</sup> (*tm-1*) タンパク質を試験管内翻訳によって合成し、WT ToMVあるいはLT1 RNAを試験管内翻訳した反応液と混合後、抗FLAG抗体による免疫沈降を行った。免疫沈降前 (Input) および免疫沈降後 (FLAG-IP) のサンプルを抗複製タンパク質抗体 (130K, 180K) あるいは抗FLAG抗体を用いてウェスタンブロットティングにより解析した。

これに対し、Tm-1はToMVの複製タンパク質と結合することによってウイルスRNAの複製を直接阻害した。過敏反応を誘起しない優性抵抗性遺伝子もこれまでに数例知られてはいたが<sup>8-10)</sup>、抵抗性遺伝子の実体とその機能が結び付けられた例はこれまでなかった。

ウイルスは多くの宿主因子を利用して増殖する。一方、ウイルスは宿主から受ける様々な阻害から逃れなければ増殖することができない。ウイルス-宿主間相互作用の研究は専らウイルスが増殖可能な宿主生物種を用いて行われてきたが、このような宿主では、ToMVが複製タンパク質とTm-1の相互作用を弱める変異を獲得してLT1株を生じたように、阻害から逃れるようにウイルスが適応していると考えられる。したがってこれまでの研究では、ウイルス-宿主因子間の阻害的相互作用は注目されてこなかった。最近いくつかのウイルスについて、ウイルス由来分子と相互作用する宿主因子が、本来増殖を許容する宿主から同定された。そして、これらの宿主因子を過剰発現することによって、自然宿主内においてもウイルス増殖が抑制されることが報告された<sup>11-13)</sup>。これは、自然宿主においてもウイルス-宿主間の阻害的相互作用が広く存在する可能性を示唆する。ウイルスの宿主範囲や増殖効率の決定にどの程度阻害的相互作用が貢献しているかについては今後の研究が待たれるが、ウイルス抵抗性遺伝資源として非宿主生物種にも目を向けることによって、これまでに有効な抵抗性遺伝子が見つかっていなかったウイルス病の防除に向けた新たな手掛かり

が得られるかもしれない。

## 文 献

- 1) Jones, J.G.D. and Dangl, J.L. (2006), *Nature*, 444, 323-329
- 2) 石橋和夫ら (2007), 蛋白質核酸酵素, 52, 686-691
- 3) Yamafuji, R. et al. (1991), *Virology*, 183, 99-105
- 4) Meshi, T. et al. (1988), *EMBO J.*, 7, 1575-1581
- 5) Komoda, K. et al. (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 1863-1867
- 6) Ishibashi, K. et al. (2007), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 13833-13838
- 7) Watanabe, Y. et al. (1987), *Virology*, 161, 527-532
- 8) Chisholm, S.T. et al. (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 489-494
- 9) Whitham, S.A. et al. (2000), *Plant Cell*, 12, 569-582
- 10) Ponz, F. et al. (1988), *Mol. Plant Microbe Interact.*, 1, 25-31
- 11) Zheng, Y. et al. (2005), *Virology*, 342, 150-158
- 12) Honda, A. et al. (2007), *Genes Cells*, 12, 133-142
- 13) Zhu, J. et al. (2007), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 3129-3134

## ◀国内情報▶

活性酸素耐性変異株の選抜と太陽光利用  
効率の向上した高収量変異個体の作出横浜市立大学 木原生物学研究所 国際総合科学研究科  
蓮沼 仰嗣・吉田 雄介・Md. E. ハーク・深松 陽介

コムギ、オオムギ、イネ、サトウキビ、サツマイモ、アラスカエンドウ等を用いて、パラコート存在下、光照射（太陽光）下に種子または苗を発芽、生育させた。パラコート濃度を变化させた処理により、細胞内の活性酸素の濃度を高める。大部分の植物は死滅するが、生き残る植物も存在する。生き残った作物の中に、ある頻度で飛躍的に生産力の上があった作物が生ずる。その変異誘導の機構及び変異株が示す特異的な形質が部分的に解明されはじめた。

## 1. はじめに

植物は強い太陽光のもとで光合成を行い、炭酸ガスを炭水化物に還元している。太陽の光量は昼間に植物が光合成に利用できる光量（100～150  $\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$ ）の10倍以上（1,700～1,900  $\mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$ ）となる。その過剰エネルギーの一部は光合成で発生した酸素ガス（3重項酸素（ $^3\text{O}_2$ ）；基底状態）に吸収され、1重項酸素（ $^1\text{O}_2$ ）を生ずる（図1）。1重項酸素（ $^1\text{O}_2$ ）はそのエネルギーレベルが高く、反応性が高く、周辺の膜脂質を過酸化脂質とする。過酸化脂質は膜構造にイオンのもれ易い構造を与える。膜脂質が葉緑体のチラコイド膜であるときは、光合成でチラコイド膜内にためられた $\text{H}^+$ がもれ出すことになり、光合成の能率は極端に低下する。強光阻害として知られるこの現象は、晴天の日は午前10時頃に光合成速度の極大を与え、その後午後4時頃にまた極大を示し、昼間は低下するパターンを与える。その光合成速度に大きくマイナスに作用する1重項酸素（ $^1\text{O}_2$ ）はあまりの反応性の高さに、その解析が難しく、今までどのような経路で消去、無害化されるかは不明のまま残されてきた。本稿では最近私どもの解析により、1重項酸素（ $^1\text{O}_2$ ）

HASUNUMA Kohji, YOSHIDA Yusuke, HAQUE Mohammed Emdadul, FUKAMATSU Yosuke  
〒244-0813 横浜市戸塚区舞岡町641-12

の消去過程がアカパンカビを用いて解明されはじめたことを報告する。植物でも同様の1重項酸素（ $^1\text{O}_2$ ）の消去系の存在が示唆された<sup>1)</sup>。その消去過程を増強する変異を誘起することにより、光合成の速度を上昇させ、高収量となったと考えられる変異株が得られはじめた<sup>2)</sup>。

2. アカパンカビでの光受容後の1重項酸素（ $^1\text{O}_2$ ）の消去過程

アカパンカビの菌糸の粗抽出液を用いて、光照射によりリン酸化が上昇する15kDaタンパク質が見出された。そのタンパク質はクローニング等によりヌクレオシド2リン酸キナーゼ（NDK）であることが判明し、NDK-1と命名された。一方NDK-1のリン酸化が全く起らない変異株が得られ、72番目のProがHisに変換した変異株 *ndk-1<sup>P72H</sup>* であることが判明した。*ndk-1<sup>P72H</sup>* 変異株はパラコート、更に過酸化水素（ $\text{H}_2\text{O}_2$ ）に感受性となることが判明した<sup>3)</sup>。パラコートはスーパーオキシド（ $\text{O}_2^{\cdot-}$ ）の発生剤である。図2に示すように活性酸素分子種（ROS；Reactive oxygen species）、 $^1\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ のなかで $^1\text{O}_2$ の消去過程は不明であった。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ はスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）で過酸化水素（ $\text{H}_2\text{O}_2$ ）に変換される。過酸化水素（ $\text{H}_2\text{O}_2$ ）はカタラーゼ（CAT）で酸素ガスと水に分解される。アカパンカビには4種類



## 過剰太陽光エネルギーによる1重項酸素の発生

晴天: 1825  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$   
 雨天: 24  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$   
 光合成: 100~150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$

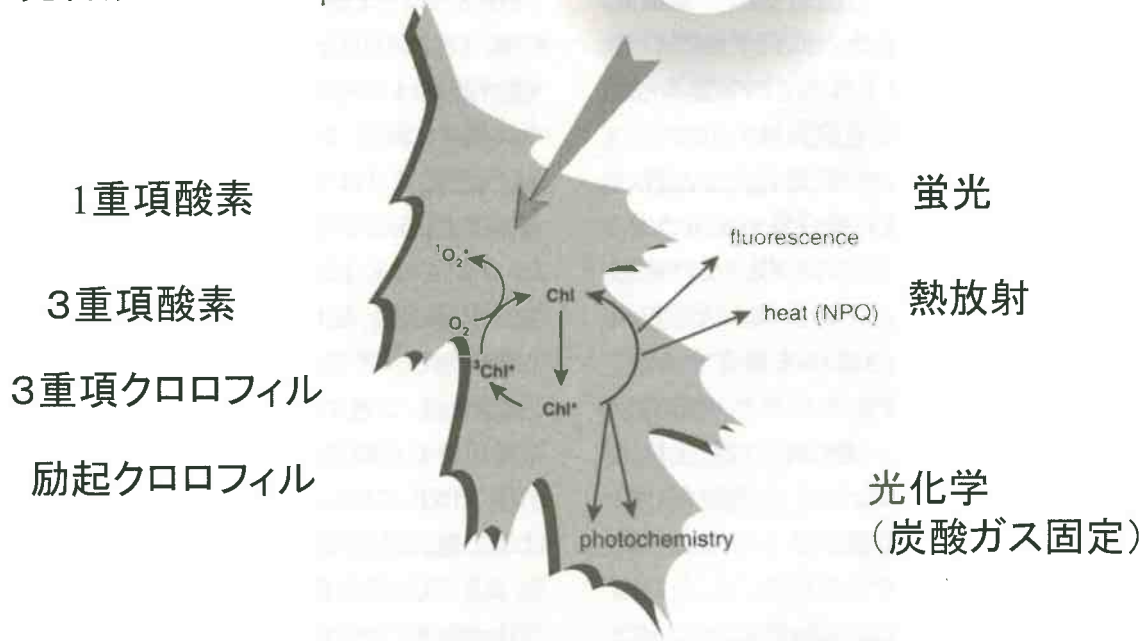


図1 太陽光の過剰エネルギーによる1重項酸素の発生

図に示されているようにクロロフィルの場をかりて過剰太陽光エネルギーの一部は1重項酸素の発生に至る。その1重項酸素はどのように無害化されるかは分かっていない。(本図は米国スタンフォード大学カーネギー研究所の年報(1995~1996)に掲載された図を改変した。)

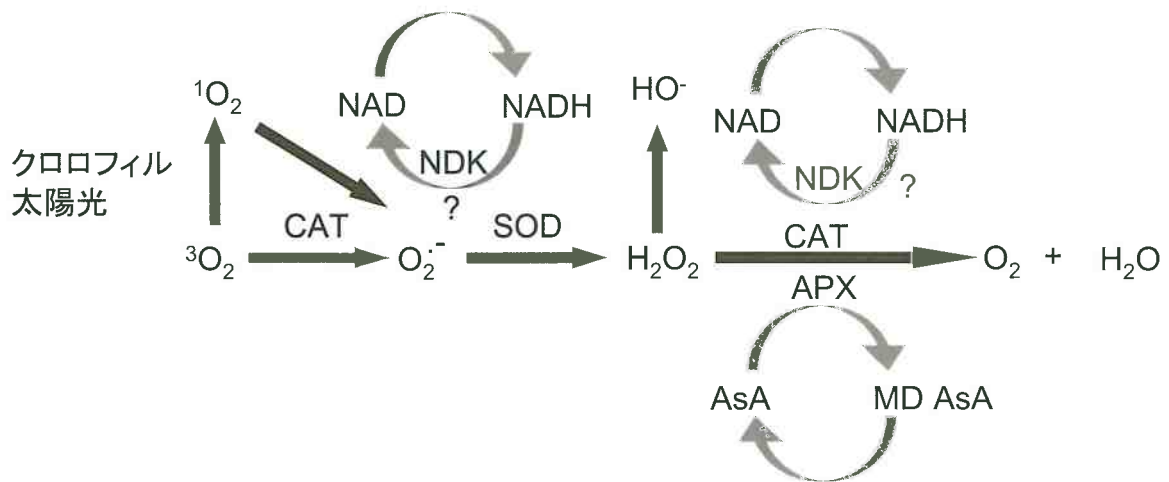


図2 活性酸素分子種 (ROS;  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) の無害化過程

図に記載されていないが、変異原活性の高い活性酸素、パーオキシナイトライト ( $\text{ONOO}^-$ ) はスーパーオキシドとNOより生じ、ヒドロキシルラジカル ( $\text{OH}^\cdot$ ) は過酸化水素から生ずる。

のカタラーゼが存在し、CAT-1, 2, 3, 4と命名されている。*ndk-1<sup>P72H</sup>*変異株の $O_2^{\cdot-}$ 感受性はCu, Znスーパーオキシドジスムターゼ (Cu, ZnSOD) の変異株, *sod-1*とほとんど同程度であった<sup>3)</sup>。また培地にリボフラビンを入れ、強光 ( $100 \mu\text{mole}/\text{m}^2/\text{sec}$ ) で照射し、1重項酸素 ( $^1O_2$ ) を発生させた。その寒天培地での野生株, CAT-1ノックアウト株*cat-1<sup>RIP</sup>*<sup>4)</sup>, *ndk-1<sup>P72H</sup>*変異株及びそれらの2重変異株の分生子の生残曲線を取ると, *ndk-1<sup>P72H</sup>*変異の入った株のみ1重項酸素 ( $^1O_2$ ) に強い感受性を示した<sup>5)</sup>。*cat-1<sup>RIP</sup>*は分生子の光照射下での生残, また暗黒下での生残に強く影響し, その生残を低下させた<sup>4, 5)</sup>。またCAT-1, 2, 3は $^1O_2$ を結合するが, CAT-1は $^1O_2$ を結合すると, 未変成ゲル電気泳動で, 泳動度が早くなる。光照射下の野生株菌糸より粗抽出液を調製すると,  $^1O_2$ を結合していないCAT-1a (還元型) 及び2分子結合したCAT-1c (酸化型) が多く見られる。しかし変異株*ndk-1<sup>P72H</sup>*ではCAT-1aの量はきわめて少なく,  $^1O_2$ の解離速度が遅いと考えられる<sup>3)</sup>。このように, NDK-1は $^1O_2$ の解離を促進できるが, NDK-1<sup>P72H</sup>はその速度が遅いことが考えられた<sup>3, 5)</sup>。NDK-1はCAT-1と相互作用することがTwo-hybrid法で, NDK-1とCAT-3の相互作用は免疫沈降で示された<sup>3)</sup>。前者は光受容過程に,

後者は低温, 高温耐性及び酸化ストレスに関与することが示されている<sup>3)</sup>。シロイヌナズナでも同様に, AtNDK-1はAtCAT-1, 2, 3と複合体を形成し, 活性酸素の消去過程に関与することが示されている<sup>1)</sup>。

NDK-1はATP, ADPを結合できる。従ってNDK-1はNADHを結合し, NDK-1<sup>P72H</sup>はNADHを結合しない可能性があり, それがテストされた。図3に示すようにプルダウンアッセイでヒスタグNDK-1は( $^{32}\text{P}$ ) NADHを結合するが, ヒスタグNDK-1<sup>P72H</sup>は結合しないことが示された<sup>5)</sup>。このようにNDK-1はNADHを結合し, 活性酸素分子種 (ROS;  $^1O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ) に電子を供与し, そのエネルギーを電子に小分けにして熱として逃す過程に重要な働きをしていることが強く示唆された。図2に示す活性酸素分子種 (ROS;  $^1O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ) の無害化過程は全て還元過程で, 電子の供与が必須であるが, SOD及びCATの測定標準反応液にも電子供与体が含まれていない。このように活性酸素分子種の無害化過程は従来十分に理解されていたわけではない。活性酸素分子種 (ROS;  $^1O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ), 特にそのなかで1重項酸素の無害化過程は本研究により少しずつ解明されはじめた。

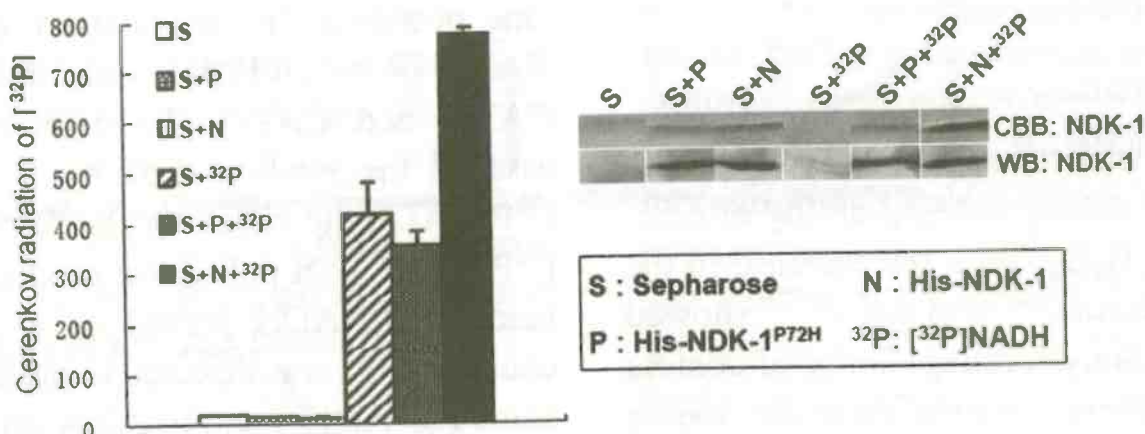


図3 プルダウンアッセイによるヒスタグNDK-1への( $^{32}\text{P}$ ) NADHの結合とヒスタグNDK-1<sup>P72H</sup>への( $^{32}\text{P}$ ) NADHの非結合  
CMBB; クマジーブリリアントブルー染色, WB; NDK-1抗体によるウエスタンブロット。

### 3. 作物植物に於ける活性酸素耐性株としての高収量変異株の選抜

コムギ、アラスカエンドウ等の種子を次亜塩素酸で常法に従い無菌化し、4℃暗黒下に無菌水で1晩置いた。液体MS培地にパラコート(Methyl viologen; Mv)を0, 4, 8, 40, 80 μMになるようにペトリ皿に入れ、浸潤種子を加えた。8℃, 8h光照射(100~160 μmole/m<sup>2</sup>/sec)/7℃, 16h暗黒、に設定した人工気象器に入れ、1週間生育させた。この過程を温室で、10~23℃で行なっても良い。またアラスカエンドウの場合は無菌のステンレスバットを用い、通気性に気をつけた。コムギの場合各Mv濃度に4つのペトリ皿を用い、各々50粒の種子、計1,000粒の種子を用いた。1週間後、コムギの場合は50粒を1プランタに、アラスカエンドウは10粒をプランタに植え、露地に置いた。40, 80 μM以上では植物はほとんど死滅するが、4, 8 μMではかなり生残する植物が存在する。コムギではその生残した幼植物を圃場に移植する。1回の実験で高収量の形質を示す変異株は10株程度単離されるが、そのうち1~2株は分げつ数が増加し、野生株の3倍前後の

高収量を示す遺伝的特性を示す。

発芽種子はその成長点(外衣, 内体)に10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup>の胚性幹細胞に相当する細胞を有する。その細胞の1つが変異原活性の高い活性酸素, パーオキシナイトライト(ONOO<sup>-</sup>), ヒドロキシラジカル(OH<sup>·</sup>)により, 変異を起こし, 活性酸素耐性となった細胞を中心に新しい植物体が形成されると考えられる。従って変異はキメラになっている可能性が高い。そのため, 成績の良い自殖による穂から種子を得て, それを更に自殖させ, 収穫性の高い個体をうる。そのようにしてホモ個体と考えられる個体を確立する必要がある。

図4に示すように, アラスカエンドウでは突然変異誘起から, 3代目, 及び4代目の解析がなされ, 現在5代目が生育している。そのうちの2株, R3-1, R3-2はパラコートでみた活性酸素耐性を示し, 分枝が増加し, きぬさやエンドウとしてのサヤの数については約2倍の高収量になる遺伝的特性が確認された<sup>2)</sup>。また野生株(元の株)に比べ, 花の咲く時期がおおよそ3~4週間遅くなり, 花芽の付く節も, 野生株の場合約8節となるのが, 変異株の場合約13節となり, 遅咲きであることが確認された。また変異

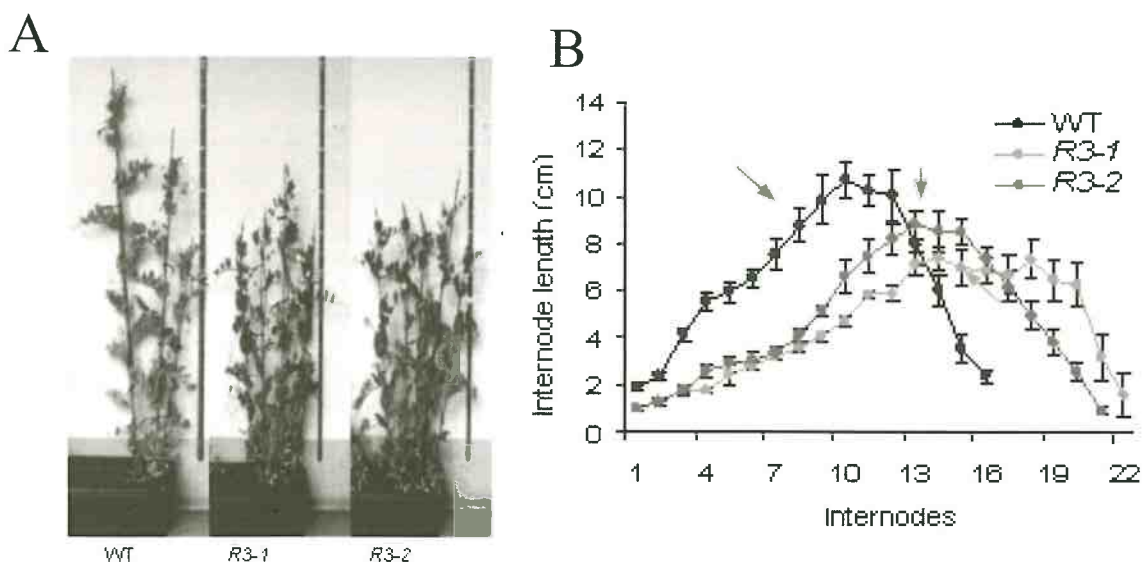


図4 アラスカエンドウの野生株, 変異株R3-1及びR3-2の生育状況

A 生育の比較, B 各節間の長さとお花芽の付く節(矢印で示す)。野生株は8節目, 変異株は13節目に初めての花芽が付く。

株は節間が短くなり、草丈も低くなる<sup>2)</sup>。活性酸素が生物リズムに大きな影響を与え、生物リズムの構成員であることは、アカパンカビでも確認されている<sup>6)</sup>。

#### 4. 活性酸素耐性株が選抜される原理と活性酸素代謝系酵素のレベルの調査

光化学系 I で打ち上げられた電子は電子伝達系を移動し、フェレドキシンを還元する。その還元型フェレドキシンはモノデヒドロアスコルビン酸 (MDAsA) をアスコルビン酸 (AsA; ビタミンC) に還元する。アスコルビン酸はアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) と共役して、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を酸素ガスと水にする。電子伝達系からもれたエネルギーの高い電子は3重項酸素に補足され、スーパーオキシド ( $O_2^{\cdot-}$ ) を生ずる。それはSODにより過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) となる。その過酸化水素がAPXにより、酸素ガスと水となり無害化され

る。しかしパラコート (Mv) はフェレドキシンの代わりに入り、還元型フェレドキシンを生ずる代わりに、還元型パラコートを生ずる。それは酸素に電子を渡し、スーパーオキシドを生ずる。SODにより過酸化水素にされるが、モノデヒドロアスコルビン酸 (MDAsA) は再活性化されなくなるので、APXは活性を持ち得ず、過酸化水素は集積する。この過酸化水素を無害化出来ない植物は枯死する。しかし、CATまたはNDKが活性化する突然変異を起こした細胞は、活性酸素耐性となり、植物体を形成したと考えられる。特にNDKのNADH運搬能が活性化した突然変異を起こした植物変異株は、活性酸素分子種 (ROS;  $^1O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ) 全てを迅速に無害化することが可能となるために、高収量となることが十分に考えられる。生体内で $^1O_2$ の消去能が高い株は、そのCATから効率よく $^1O_2$ が除去されるので、その未変成ゲル電気泳動で、CATの泳動速度が落ちる。図5に示すようにアラスカエンドウの葉の粗抽出

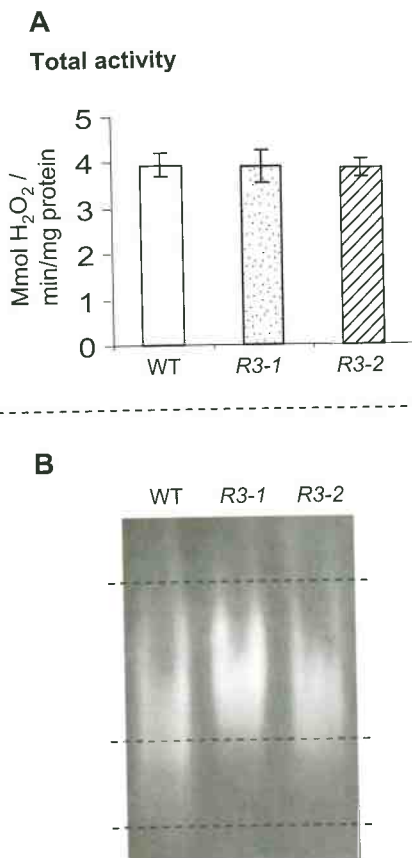


図5 葉の粗抽出液のカタラーゼ活性

A 反応液にNADHを加えず測定したカタラーゼ活性、野生株 (WT) と変異株、R3-1、R3-2ではそのNADH非存在下での活性に差がない。

B 未変成ゲルによる電気泳動と活性染色による移動度の比較。野生株 (WT) は移動度が高いが、変異株、R3-1、R3-2では移動度が低い。

液の未変成ゲル電気泳動でR3-1, R3-2株ともにCATのNADHを加えない状態での活性は野生株と変異株では変化がなかった。しかしCATの電気泳動速度は野生株に比べて遅い。NDKのNADH運搬能が活性化した突然変異である可能性が十分にある。またSOD活性も20%上昇している。他の関連する酵素の活性に明確な変化は見られなかった<sup>2)</sup>。

## 5. 終わりに

活性酸素の消去過程は電子を供与して還元する過程である。その過程にNDKがNADH運搬体として稼働する姿が見えてきた。本論説では分かり易くするために仮説レベルの事柄を記述している場合が多い。これからの証明を待っている事象が多いことを申し述べたい。活性酸素はエネルギー調節の重要な働きがある故に、その制御は複雑を極めることが予測される。

## 謝 辞

本研究は日産自動車（株）総合研究所と、一

部（独）農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センターとの共同研究であるとともに、農林水産省委託；地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発プロジェクト、横浜市立大学研究戦略プロジェクトより研究支援を受けた。

## 文 献

- 1) Fukamatsu, Y. et al. (2003) *Plant Cell Physiol.* 44, 982-989
- 2) Haque, Md E. et al. (2008) *Plant Biotechnology Reports*, in press.
- 3) Yoshida, Y. et al. (2006) *FEBS Letters*, 580, 3282-3286
- 4) Wang, N. et al. (2007) *Mol. Genet. Genomics*, 277, 13-22
- 5) Wang, N. et al. (2007) *Mol. Genet. Genomics*, 278, 235-242
- 6) Yoshida, Y. et al. (2008) *Mol. Genet. Genomics*, in press.

## ◀国内情報▶

## 植物のアンモニア態窒素吸収機構の機能分担を解明

<sup>1</sup>東北大学 大学院農学研究科 植物細胞生化学分野<sup>2</sup>理化学研究所 植物科学研究センター 基礎代謝研究チーム小島 創一<sup>1, 2</sup>・高橋 秀樹<sup>2</sup>

植物は生産者として、光エネルギーを利用して、空気中の二酸化炭素を固定し、土壌中の無機栄養を有機物へ変換する。窒素は植物の育成にとって必須な多量元素であり、その利用効率は直接的に植物の生産性を左右する。本稿では、窒素栄養の中でも、アンモニア態窒素について、環境から植物個体への吸収機構に特に焦点をあてて、近年の研究成果について報告する。

## 1. はじめに

窒素は植物の育成にとって必須な多量元素である。環境から効率的に窒素栄養を獲得し植物体内で利用することは、自然界に生息する植物、農耕地で栽培される植物、いずれの場合でも植物個体の生長と生産性に直結する重要な問題である。大気中には窒素ガスが約八割含まれるが、高等植物は窒素ガスを直接的に栄養とすることはできない。植物が利用できる窒素の主要な分子形態は硝酸あるいはアンモニウムといったイオンであり、自然界の土壌ではごく低濃度存在する。近代では、ハーバー・ボッシュ法などにより、工業的に窒素ガスをアンモニアに効率よく変換できるようになり、農耕地で化学肥料として用いられるようになった。全世界の農耕地では、高収量かつ高品質な農作物の獲得を目指して、毎年約9千万トンもの窒素肥料が消費されている。窒素肥料は主に尿素や硝酸アンモニウムとして施肥される。土壌中で尿素はアンモニウムに分解され、最終的には微生物によって硝化されて硝酸を生じる。ところが、硝酸は土壌中に安定にとどまることができない。過剰な窒素肥料の施肥は、経済的に無駄であるばかりか、植物に利用されなかった余剰分が環境へ流

KOJIMA Soichi<sup>1, 2</sup>, TAKAHASHI Hideki<sup>2</sup><sup>1</sup>〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1<sup>2</sup>〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22

出する。環境へ流出した窒素は、地下水や河川を富栄養化し、環境汚染を引き起こす因子となる。農作物は農耕地に施肥された窒素の約六割を吸収することができるが、最終的に種子に到達する窒素は施肥量の三割に過ぎないともいわれる。世界の食糧事情を解決し、なおかつ環境負荷が小さい農業生産を行っていくためには、農耕地へ適正量の窒素肥料の施肥を行うことに加えて、植物が環境から窒素を吸収かつ利用する機構の詳細を理解し、植物の窒素利用効率を改善することがきわめて重要である。本稿では、土壌中の窒素形態の中でも特にアンモニウムに焦点をあてて、モデル植物であるシロイヌナズナのアンモニウムトランスポーター (AMT) について、欠損変異体を用いた分子生理学的な解析で明らかにされたアンモニウム吸収機構について紹介する。

## 2. 植物の根におけるアンモニウムの輸送

植物は土壌中の硝酸やアンモニウムといった無機イオン態の窒素を根より吸収する。どちらのイオン形態を優先的に吸収して育成することができるかは植物種によって異なり、窒素獲得戦略はその植物が好んで育成する環境に適応している。ある種の植物は硝酸が十分量存在しても優先的にアンモニウムを吸収する。例えば、

還元土壌で成育するイネや茶はアンモニウムをより好んで吸収する傾向がある。植物の根におけるアンモニウムの吸収は、二つの基質親和性が異なる輸送機構から成り立っていることが放射性同位体 ( $^{13}\text{N}$ ) または安定同位体 ( $^{15}\text{N}$ ) で標識されたアンモニウムの吸収実験から生理学的に明らかにされてきた。それらはすなわち、アンモニウムに対して高い基質親和性を持ち低濃度のアンモニウムを効率よく輸送するが輸送量に限界がある高親和型輸送系 (high-affinity transport system; HATS) と、アンモニウムに対して低い親和性を持ち高濃度のアンモニウムのみを輸送することができアンモニウムの輸送量に限界を持たない低親和型輸送系 (low-affinity transport system; LATS) である。HATSからLATSへ移行するアンモニウムの濃度はおよそ200から500  $\mu\text{M}$ 程度であるといわれる。自然界の土壌のアンモニウム濃度は数十  $\mu\text{M}$ であり、施肥された水田のアンモニウム濃度は1 mM程度である。従って、この二つの基質親和性が異なるアンモニウム輸送機構をよく理解することが、植物の窒素肥料利用効率の向上を考える上で重要である。

### 3. 高親和型アンモニウムトランスポーターの発見

高親和型のアンモニウムトランスポーターは、アンモニウムの毒性アナログであるメチルアンモニウムに耐性を示す酵母変異株を用いて単離された。酵母のメチルアンモニウム耐性変異株 (*mep*) は、メチルアンモニウムに対して耐性を持ち、アンモニウムを単一の窒素源とする培地では成育することができない。*mep*変異株に遺伝子ライブラリーを形質転換し、アンモニウム培地で選抜して、変異形質を相補する酵母遺伝子を単離したところ、11個の膜貫通領域を持つ膜タンパク質が見出された<sup>1, 2)</sup>。この膜タンパク質は、MEP (methyl ammonium permease) と名付けられた。MEPはメチルアンモニウムのみならず、アンモニウムも輸送した。

*mep*変異株の相補試験を通じて、双子葉植物の代表的なモデル植物であるシロイヌナズナからAMTが単離された<sup>3)</sup>。その後シロイヌナズナの全ゲノム配列が明らかにされたことで、シロイヌナズナはAMTを6分子種もつことが明らかにされた。これらのAMTについてアミノ酸配列の相同性をもとに分類したところ、植物に独自の1型AMT (AMT1;1, AMT1;2, AMT1;3, AMT1;4, AMT1;5) を5種類、原核生物や酵母のMEPタンパク質と近縁な2型AMT (AMT2;1) を1種類有していることも明らかにされた。シロイヌナズナのAMT1;1, AMT1;2, AMT1;3, AMT2;1をそれぞれ形質転換した酵母*mep*変異株を用い、同位体標識した基質を与えてアンモニウム輸送活性の動力学を解析した結果、すべてのAMTが、基質に対する親和性が高く最大吸収速度が飽和するHATSであることが明らかとなった<sup>4, 5)</sup>。また、植物根より調製された細胞膜画分のウェスタンブロット解析や、AMT-緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein; GFP) 融合タンパク質を発現する形質転換植物の解析から、AMTタンパク質が細胞膜に局在することも明らかにされた<sup>6, 7)</sup>。

### 4. アンモニウムトランスポーターのシロイヌナズナ植物体における発現

細胞膜に局在し、アンモニウムに対する親和性が高いといった類似した性質をもつAMT遺伝子族であっても、植物個体内における局在場所は各AMT分子種で異なる。例えば、AMT2;1は根でも発現するが主に葉で発現する<sup>5)</sup>。一方、AMT1;1, AMT1;2, AMT1;3, AMT1;5は葉でも発現するが主に根で発現する<sup>4, 6, 7)</sup>。葉で発現するAMTは、光呼吸や異化代謝の過程で生成するアンモニウムが細胞間隙に放出された場合に、そのアンモニウムを細胞内に運び戻す役割があると推定される。根で発現するAMTは、植物が窒素不足の状態におかれたときに発現が誘導される。根の先端から

基部側に少し上った部分に根毛帯と呼ばれる領域があり、植物はその領域で土壤中の栄養を盛んに吸収し同化する。AMT1;1とAMT1;3は、窒素の欠乏に应答して、根毛帯の根の表層細胞群と根毛で発現する（図1）。それに対して、AMT1;2は窒素の欠乏に対する应答は弱く、AMT1;1やAMT1;3よりは根の内部の細胞層（内皮、皮層の一部）で主に発現がみられた（図1）。AMT1;4は根でほとんど発現しない。すなわち、シロイヌナズナの根のアンモニウム吸収機構は、細胞局在や窒素の欠乏に対する应答性が異なるAMT分子種により構成されており、それぞれが機能を分担している可能性が示唆された。これらの機能分担の生理的意義をさらに明確にするために、逆遺伝学的なアプローチが必要になった<sup>7)</sup>。

## 5. アンモニウムトランスポーター欠損変異植物の解析

一般に、注目する遺伝子の機能を明らかにするために、その遺伝子の機能が破壊された変異体を選抜して、その変異体の機能を野生型と比較することで、野生型における遺伝子の機能を理解する方法を逆遺伝学的な解析という。シロイヌナズナの場合、T-DNA挿入による破壊株がよく用いられる。土壤病原微生物であるアグロバクテリウムは、傷害を受けた植物に感染し、アグロバクテリウムのプラスミドDNA中のT-DNAをランダムに植物の染色体DNAに組み込む性質がある。近年、このアグロバクテリウムを用いた形質転換を繰り返すことで、シロイヌナズナの遺伝子がランダムに破壊されたT-

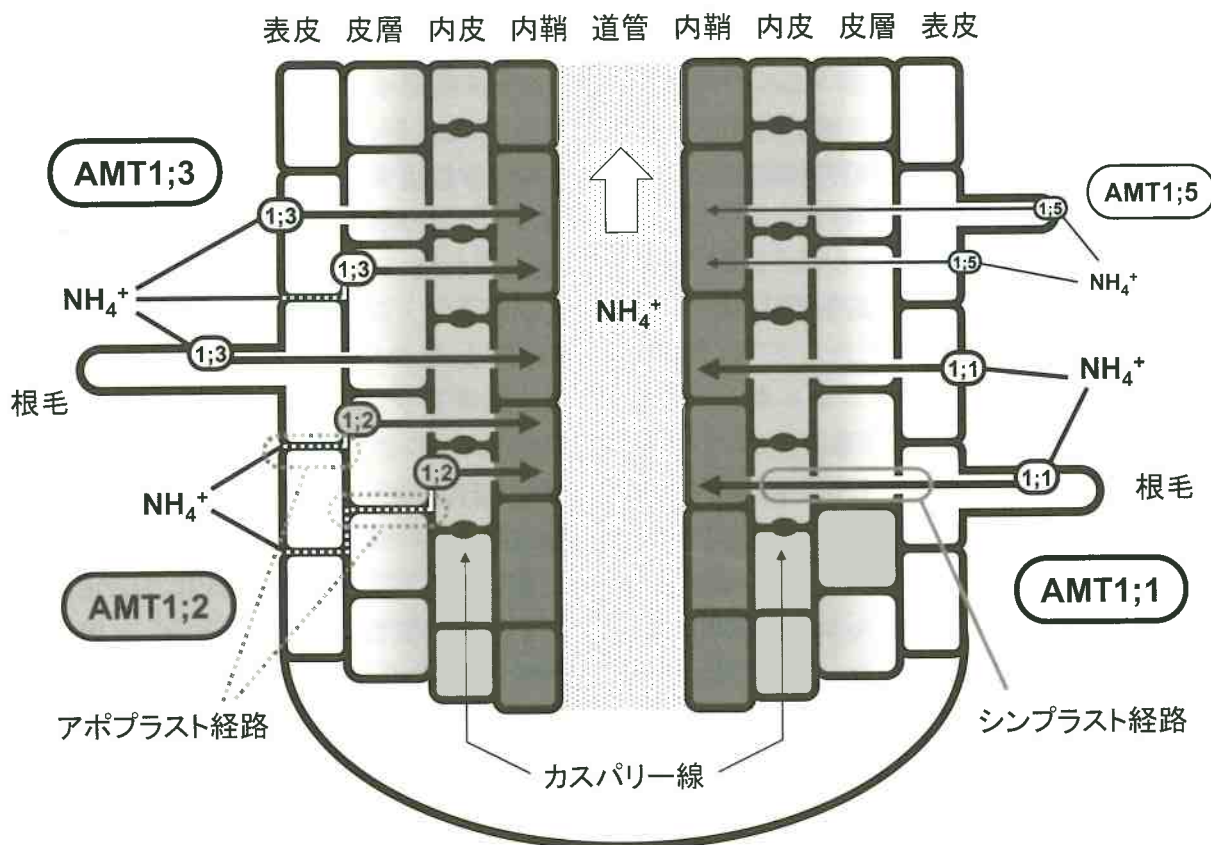


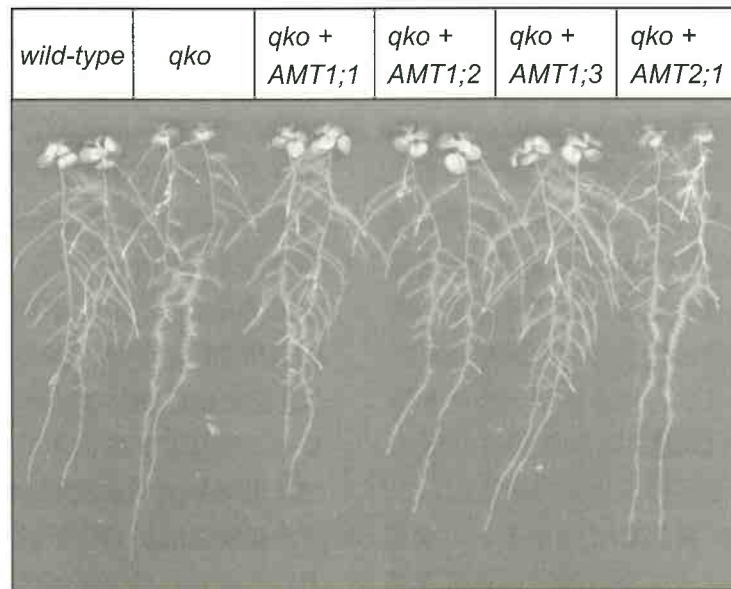
図1 アンモニウムトランスポーターの役割分担（シロイヌナズナの根の断面図）

AMT1;1とAMT1;3が根の表層細胞群（表皮、皮層）と根毛で吸収したアンモニウムイオンは、シンプラスト経路を通じて維管束組織（地上部へ養分を運ぶ道管が存在する）へ到達する。一方、AMT1;2は内皮と皮層でアポプラスト経路からアンモニウムイオンを吸収する。内皮細胞のカスパー線は、皮層と維管束組織の間でアポプラスト経路の水分や養分の維管束組織への移動を制限する。



DNA挿入変異株が多数整備され、植物の逆遺伝学的な解析が飛躍的に進むようになった。AMT分子種間の機能分担の解明にもこの手法が用いられ、それぞれのAMTを欠損する変異植物や<sup>6)</sup>、そのAMT欠損変異体同士を掛け合わせることで、AMTの多重変異体 (AMT1;1, AMT1;2, AMT1;3, AMT2;1) を欠損する quadruple knockout ; *qko* が単離された<sup>6, 7)</sup>。AMT四重変異体株 (*qko*) では、野生型と比較して、高親和型アンモニウム輸送活性の約90%が消失していた (図2)<sup>7)</sup>。その結果、

*qko*はアンモニウムを主要な窒素源として与えられたときに、野生型と比較して半分程度のバイオマスを獲得するにとどまった。これらの結果は、根における高親和型のアンモニウム輸送機構が、植物の生長に直接的に重要であることを示している。さらに、*qko*の根で発現するAMT分子種を詳細に解析したところ、AMT1;5のみが発現していることが明らかとなった。AMT1;5は、アンモニウムの最大吸収速度は低いが、アンモニウムに対して他のAMT分子種よりも一段と高い基質親和性を有するこ



*qko*: アンモニウム輸送体AMT1;1/1;2/1;3/2;1を欠損する四重変異体

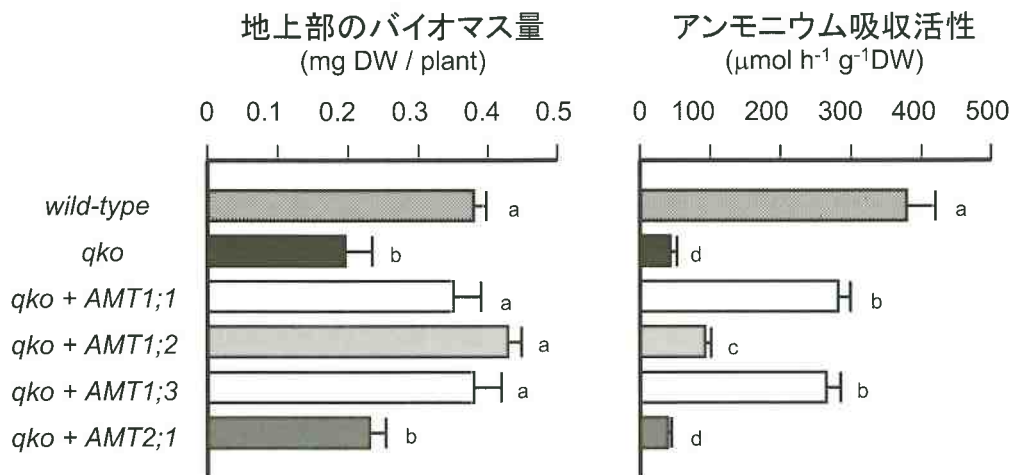


図2 AMT1;1, AMT1;2, AMT1;3はアンモニア態窒素の吸収に必須なアンモニウムトランスポーターである

とも明らかとなった<sup>7)</sup>。さらに、*qko*に野生型を戻し交配して得られた三重変異体のアンモニウム吸収速度を*qko*と比較することで、AMT1;1, AMT1;2, AMT1;3, AMT2;1の根におけるアンモニウム輸送に対する貢献度合いを正確に評価し、それぞれのAMTの根における発現部位と合わせて考察できるようになった(図1, 2)。例えば、AMT2;1は根でのアンモニウム吸収に変化を与えない。AMT1;1, AMT1;3は窒素の欠乏に強く応答し、根の表層細胞群で発現するので、植物根全体のアンモニウム吸収に対する貢献が非常に大きい。これに対して、AMT1;2は、窒素の欠乏に弱く応答し、根の表層ではなく内皮細胞や皮層の一部で発現するので、根でのアンモニウム吸収に与える影響はAMT1;1やAMT1;3より小さい。今回の我々の研究で、シロイヌナズナがタイプの異なるAMT分子種を時と場合によって使い分けながら、土壤環境中の限られたアンモニウムを効率的に吸収する機構を備えていることが明らかとなった<sup>7)</sup>。

## 6. 今後の展望・課題

AMTの細胞質側に露出しているタンパク質のC末端領域は、アンモニウム輸送活性に重要であるが<sup>9, 10)</sup>、この領域はリン酸化を受けることが報告されている<sup>11)</sup>。AMTの転写段階あるいは組織局在の制御機構に加えて、AMTのリ

ン酸化を介した活性制御機構を合わせて総合的に理解することで、環境中の窒素栄養を効率よく吸収できる植物体を作成することを目的とした研究が前進することが今後期待される。

## 文 献

- 1) Marini, A. M. et al. (1994), *EMBO J*, 13(15), 3456-3463
- 2) Marini, A. M. et al. (1997), *Mol Cell Biol*, 17(8), 4282-4293
- 3) Ninnemann, O. et al. (1994), *EMBO J*, 13(15), 3464-3471
- 4) Gazzarrini, S. et al. (1999), *Plant Cell*, 11(5), 937-948
- 5) Sohlenkamp, C. et al. (2002), *Plant Physiol*, 130(4), 1788-1796
- 6) Loque, D. et al. (2006), *Plant J*, 48(4), 522-534
- 7) Yuan, L. et al. (2007), *Plant Cell*, 19(8), 2636-2652
- 8) Kaiser, B. et al. (2002), *Plant Physiol*, 130(3), 1263-1275
- 9) Marini, A. M. et al. (2000), *Mol Microbiol*, 35(2), 378-385
- 10) Loque, D. et al. (2007), *Nature*, 446(7132), 195-198
- 11) Hem, S. et al. (2007), *Biochem Biophys Res Commun*, 363(2), 375-380

## ◀国内情報▶

## 除菌効果の高い「乳頭清拭装置」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  
平田 晃・後藤 裕・川出 哲生・阿部 洋平

乳頭清拭は、衛生的搾乳と環境性乳房炎の予防を目的に行われるが、作業の仕方により不十分な清拭となることがある。どんな乳頭にも適用でき、誰にでも高い清拭効果が得られる洗浄液と清拭ブラシを用いる乳頭清拭装置を開発した。搾乳牛を供試して清拭後の乳頭表面細菌数を調査した結果、乳頭を薬液浸漬して丹念に拭き取る変法ミネソタ法と同等以上の除菌効果があること、酪農現場でのモニター試験で実用性が高いこと等が分かった。

## 1. はじめに

乳頭清拭は、朝と夕方の搾乳作業において、ティートカップを装着して搾乳する前に、前搾りの後、清拭布を用いて乳頭の汚れを拭き取る作業である。その目的は、乳房炎予防と衛生的搾乳並びに適切な乳頭刺激を与えて射乳を促すことにある。牛の乳房炎は、原因菌が乳頭口から侵入し、乳腺に炎症を起こす病気であって、乳頭清拭は、搾乳後の乳頭消毒では対応できない搾乳中に乳頭表面から排出乳汁に溶け出す原因菌の侵入に起因する新規感染防止を主眼としている。乳頭口からの乳汁逆流は、正常な搾乳におけるカップ内の真空拍動に伴う真空度逆転によっても頻繁に発生し得る<sup>1) 2)</sup>ため、乳汁汚染の原因となる乳頭表面に付着した原因菌の徹底した除去と、乳房内部に損傷を与える過搾乳を回避することが重要となる。そのためには、清潔な資材を用いた丹念な清拭が不可欠であるが、乳頭表面の細菌数を十分に低下させれば環境性乳房炎の新規発症を抑制できることが、試験的に実証され<sup>3)</sup>、推奨清拭方法や作業手順が示されている。しかし、乳頭口を含む乳頭先端は、乳房内部に最も近く、原因菌も付着しやすく、また、短時間で清拭するのが難しい部位で

HIRATA Akira, GOTOH Hiroshi,

KAWAIDE Tetsuo, ABE Yohei

〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

ある。乳頭は4本有り、前搾りを含めティートカップ装着までの前処理時間は60秒ほどである。限られたタイミングで次々と搾乳する必要があるため、作業者の技量によっては清拭が不十分となりやすい。そこで、生研センターでは、「どんな乳頭にも適用でき、誰にでも高い清拭効果が安定して得られること」をねらいとして、次世代型農業機械等緊急開発事業の下、酪農機器メーカーであるオリオン機械㈱と共同し、北海道立根釧農業試験場への委託試験協力を得て、乳頭清拭装置を開発したので概要を報告する。

## 2. 従来の清拭法と汚れ除去メカニズム

温湯ですすぎ絞った布による乳頭清拭における汚れ除去のメカニズムを考察すると、汚れ(有機物や微生物)は、布の水分(洗剤など界面活性剤を含む)によって乳頭皮膚表面で膨軟化され、布との摩擦力によって布の繊維の間に絡め取られる。汚れの程度によって拭き取る回数は多少変化するが、推奨される1頭1布以上を基本としても、乳頭毎や側面と先端で布の清拭面が更新されなければ、付着した汚れにより再汚染が生じる。

プレディッピング法は、薬液に乳頭を浸漬し、30秒以上感作させてから薬液を拭き取るという方法で、殺菌作用が期待できる有機物付着の少

ない乳頭に適用が限られる。変法ミネソタ法は、汚れた乳頭にも適用できる方法で、薬液の界面活性剤としての効果を利用し、前搾りと乳頭マッサージをして薬液を馴染ませ、汚れを溶解させてペーパータオルや脱水タオルで拭き取る方法である。1頭1布以上を基本とするプレディッピング法や変法ミネソタ法であっても用いる資材や作業方法によって、清拭効果は異なり、清拭後の付着細菌数（対数値）の平均値で1～2桁の差が生じ得る。

### 3. 乳頭（洗浄）清拭装置に求める機能

乳頭の前搾り（10～15秒）をしてから、オキシトシンが分泌され乳房内圧が高まる60秒後をティートカップ装着のタイミングとすれば、正味清拭時間は30～40秒となる。従って、開発装置の目標性能は、「1頭当たり30秒程度の機械清拭で、1本ずつ乳頭先端まで丹念に清拭した場合の変法ミネソタ法と同等の清拭効果を得ること」とした。本装置の機能要件を以下に列挙する。

- 操作が簡単、誰でも使える
- どんな乳頭にも対応できる
- 適切に乳頭を刺激し、痛めない

- 根元から先端までティートカップとの接触範囲を清拭できる
- 30秒程度の作用で十分に清拭可能
- 再汚染、伝染の可能性が低い
- 乳頭の水切り（乾燥）ができる
- 保守管理（清掃、交換）が簡単

### 4. 開発装置の洗浄・清拭機構

開発装置の洗浄・清拭機構は、乳頭に洗浄液を噴射し、乳頭を大きさ形状に応じて変形・密着して包み込むことのできる清拭ブラシを、縦軸回りに正逆転させて、乳頭表面を擦りながら汚れや細菌を洗い流し、再汚染防止のために洗浄污水を排出する方式とした。本装置の構成と洗浄・清拭機構を以下に示す。

- (1) 開発装置は、清拭カップ、洗浄液供給部、污水回収ケース及び制御部で構成した（図1）。
- (2) 清拭カップは、円筒型の洗浄ケース外周に挿入口を境に上下2層に分かれた洗浄液噴射口を備え、洗浄ケース内のブラシホルダーに取り付けた清拭ブラシセットは、底部に設けた清拭ブラシ用モータにより縦中心軸回りに正逆転し、洗浄污水は吸引ファン

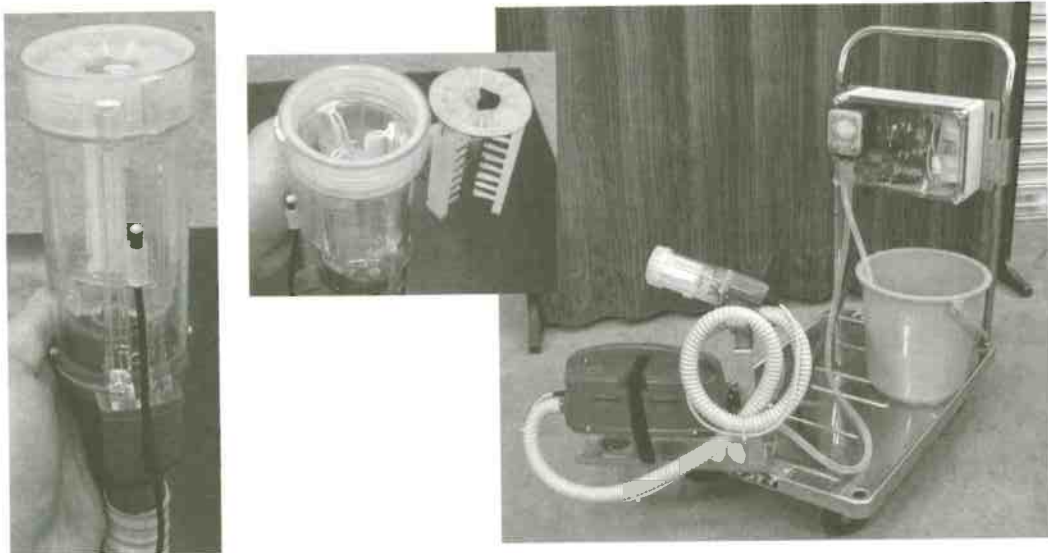


図1 開発した乳頭清拭装置の構成と清拭カップ

により洗浄ケース底部から汚水回収ケースに吸引排出される。

- (3) 清拭ブラシセットは、乳頭挿入口となる根元ブラシ、側面ブラシ及び先端ブラシによって構成される。根元ブラシは、3本の側面ブラシを保持しているリングに3点でピン固定され、根元・側面ブラシを構成している。先端ブラシは、乳頭と接する軟質シリコンブラシとその柔軟な変形を逃がすように支える外殻の2重構造となっており、様々な先端形状に適應できる深さと柔軟性を有している。また、下方のコイルバネに支持され、挿入口より深さ25~80mmまで乳頭長さに応じて上下スライドし、乳頭挿入時から抜き取る直前まで乳頭先端に40~140gfの押圧力で清拭作用を与えている。
- (4) 制御部は充電式でDC24V NiMHバッテリー(DC24V・1900mAh)を電源とし、乳頭清拭作用部の手元SW操作により清拭ブラシ用モータ7.5WDC24V、洗浄液供給ポンプ(1200mL/min)及び汚水吸引ファンモータ30W DC24Vの駆動インターバルを制御している。

## 5. 開発装置の洗浄・清拭作用と効果

乳頭を挿入し、手元スイッチを押し、挿入口

上面を乳房に押し当てると、正逆転する根元用ブラシのフィン12枚と、挿入口上面に噴射される洗浄液とによって根元接触部分の汚れが除去され、挿入口より引き込まれる空気流により乾燥される。同時に、根元以下から先端は、挿入口下層より噴射される洗浄液と正逆転する側面用ブラシ及び先端用ブラシにより清拭され、抜取時に挿入口のシリコン膜によるかき取り作用と汚水吸引空気流により水切り乾燥される。

乳牛を供試した清拭試験において、清拭ブラシ用モータの正逆転インターバル1回につき0.6秒回転-0.2秒停止とし、4乳頭に対し1巡目の予備洗浄で各2回作用させ、2巡目の本洗浄で各6回作用させた場合(約30秒/頭)、変法ミネソタ法(70~90秒/頭)の場合と同等以上の除菌効果があった。さらに薬液浸漬と乳頭マッサージの後に機械清拭を行うと除菌効果は一層改善された(表)。洗浄液は、40℃程度の温湯に乳頭洗浄剤(シユアコンフォート)0.2%添加した溶液を用いた。清拭後のブラシ各部へのゴミ等の付着は、ほとんど認められなかった。

## 6. 酪農現場での利用試験

実用上の問題点を調査するため実用化原型機を試作し、繋ぎ飼い農家と根釧農業試験場のミ

表 清拭後の乳頭表面付着菌数(表面1cm<sup>2</sup>当たりのコロニー個数の対数値)

部位	清拭方法	清拭時間/頭	清拭後の付着菌数のパーセンタイル値				
			10	25	50	75	90
乳頭先端	変法ミネソタ法	70~90s	1.00	1.81	2.81	3.59	4.12
	機械清拭	30s	1.30	1.30	2.45	3.28	3.88
乳頭側面	変法ミネソタ法	70~90s	1.00	1.30	1.91	2.61	3.39
	機械清拭	30s	1.30	1.30	1.30	2.15	2.89

注1) 変法ミネソタ法:薬液浸漬(有効ヨウ素0.1%)後、薬液を作用させる時間(30s)中に汚れの溶解を図るために前搾りと乳頭マッサージをし、脱水タオルで拭き取りを行った。延べ10頭。

2) 機械清拭:清拭ブラシ用モータの正逆転インターバル(0.6s回転-0.2s停止)を清拭1回とし、4分房各乳頭を1巡目に各2回、2巡目に各6回清拭した(洗浄液流量:1,200mL/min)。延べ40頭。

3) 清拭前菌数は、乳頭先端、側面とも4.25~6.50の範囲にあった。

ルキングパーラでモニター試験を開始した。モニター試験の目的は、本装置による清拭状態、乳頭損傷の有無、清拭ブラシの管理を含む取り扱い性、清拭ブラシと装置各部の耐久性等の把握と長期連用試験に向けた改良点の整理である。繋ぎ飼い農家での供試頭数は、1日約80頭で、ミルクパーラでは1日約50頭である。

モニター試験の様子を図2に示す。繋ぎ飼い農家では、搭載バッテリー2台の内1台で30頭をスムーズに清拭できた。酪農家からは、汚れ除去効果が高く手作業より楽である、乳頭刺激がタオル清拭より適切で搾乳がスムーズであるなど実用性が高いとの評価を得た他、乾いた汚れがスポット状に残ることがあるとの指摘もあった。なお、1ヶ月経過した時点で故障のため使用を中断している。根釧農試パーラでは3ヶ月以上を経過して継続中で、清拭状態は良いが各部耐久性に問題があることが判明した。詳細については継続して調査中であるが、概ね改良設計の見通しを得ている。

なお、いずれの場合も乳牛は初産牛を含めて本装置による乳頭清拭にすぐ馴れ、この間に乳頭損傷等は観察されず、衛生的乳質の低下も認められなかった。

## 7. おわりに

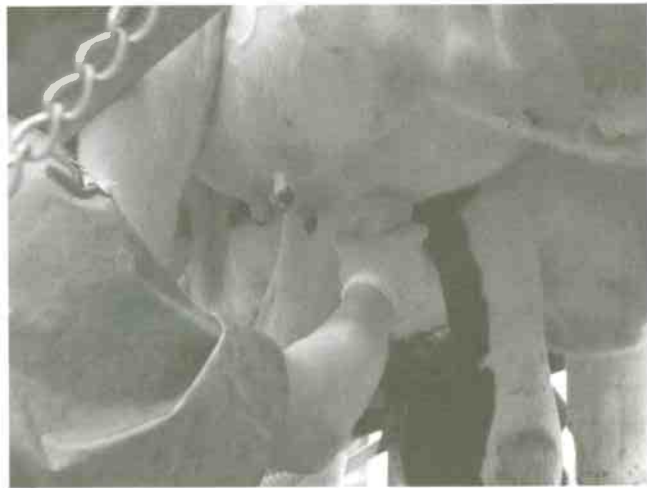
生研センターでは、平成10年度から乳頭清拭装置の開発に着手し、平成15年度からは次世代緊プロ事業において、実用化を目指してオリオン機械株式会社と共同研究を実施してきた。この間、根釧農業試験場の関係者には平成13年度からの委託研究を通して、多大な試験協力を戴いている。また、モニター試験にご協力いただいた酪農家の方々には、毎日の搾乳作業の中で本装置の取り扱い性や貴重な時間とご意見を戴き、改良に実用化の見通しを得た。記して謝意を表したい。今後は、改良機を増加試作し、飼養管理や衛生管理の異なる牧場において長期連用する過程で実用上の課題を解決し、市販化を図っていく予定である。

## 文 献

- 1) 本田善文他. 2004. ミルカのライナ内における乳汁の逆流防止に関する研究. 63回農機学会講要53-54.
- 2) 板垣昌志. 2006. 乳房炎における病原菌侵入のメカニズムと予防対策. 日本乳房炎研究会抄録集. 17.
- 3) 平井綱雄. 1999. 0.1%ヨウ素乳頭消毒剤



繋ぎ飼い農家 (左)



ミルクパーラ (右)

図2 開発装置によるモニター試験の様子

を用いたプレディッピングの牛乳房炎予防効果.平成10年度北海道農業試験会議資料. 1-7.

4) 平田 晃・後藤 裕・オリオン機械(株)・高橋雅信. 2006. 除菌効果の高い乳頭清拭装

置.平成18年度成果情報. 農研機構.

5) 平田 晃・後藤 裕. 2007. 汚れ除去効果の高い乳頭洗浄・清拭装置. 農機誌69 (4). 40-41.



ブレインテクノニュース  
バックナンバーのご案内  
第125号  
2008年1月15日発行

**総説**

誘導抵抗性に関わる転写因子WRKY45の発見とその利用  
.....高辻 博志

**国内情報**

ウイルスの増殖を防ぐ人工タンパク質を組み込んだ、ウイルス耐性植物の創出.....世良 貴史

microRNAによるタンパク質合成の制御機構  
.....脇山 素明・横山 茂之

シロアリの卵保護行動と卵認識フェロモン - 擬似卵運搬で効果的な駆除技術も.....松浦 健二

超低温保存の体外受精卵を借り腹の雌豚に移植し、子豚誕生に成功 .....菊地 和弘・Tamás Somfai・柏崎 直巳・永井 卓

海産魚のウイルス性疾病を予防するための組換え酵母を用いた経口ワクチンの開発

.....家戸 敬太郎・石丸 克也・田丸 浩・吉水 守・真鍋 貞夫・植田 充美・村田 修・熊井 英水

**地域の先端研究**

ブドウ接ぎ木苗の簡易生産技術の開発 - 活着率向上や植え傷みの防止にも有効.....山本 孝司・中尾 知樹

**文献情報**

体細胞核の初期化能力を持つウシ卵子には23kDaのPhosphorylated Transcriptionally Controlled Tumor Protein (リン酸化TCTP) が存在する ... (抄訳：下司 雅也)  
ブドウのゲノム塩基配列から見えてきた被子植物門で過去に生じた6倍体化.....(抄訳：久保山 勉)  
共生細菌はROS産生を介してcullin依存性のシグナル伝達を調節する.....(抄訳：安田 源太郎)  
スズメバチの作る絹糸タンパク質の特徴的な一次構造.....(抄訳：漆田 洋平)

**生研センターからのご案内**

## ◀ 地域の先端研究 ▶

## 化学発光能測定技術を用いた フィールドでの乳房炎早期診断法

熊本県農業研究センター  
畜産研究所 大家畜研究室  
稲田 司

乳房炎は乳用牛の死産原因の中で最も多い疾病のひとつで、その発生による酪農経営に与える影響は大きい。乳房炎防除のためにさまざまな乳房炎診断法が開発・利用されているが、必ずしも迅速で活用しやすい診断法には至っていない。そこで、フィールドにおいて迅速かつ客観的に判定できる乳房炎診断法の確立のために、生乳中化学発光能測定技術を応用した乳房炎診断法を開発した。

### 1. はじめに

乳房炎は乳用牛の死産原因の中で最も多い疾病のひとつであり、特に高温多湿の西南暖地においては分娩前後に感染・発症が多発し、酪農経営に与える損失は甚大である。乳房炎防除のため、フィールドにおける乳房炎診断法としてMCMT法（PLテスト薬と生乳を混合した後の凝集及び色の変化による診断法）やEC測定（分房間の生乳の電気伝導度の差による診断法）が普及している。これらの診断法は乳房炎乳の検出方法としては有効であるが、比較的体細胞数が少ない生乳中の体細胞数の変動等については把握することが困難である。初期の乳房炎診断法としては蛍光光学細胞測定機による生乳中体細胞数測定法が活用されているが、測定機器は非常に高額で大型機器であるため設置場所が限られ、特に遠隔地等ではサンプル輸送等に問題が残る。

乳房炎発症時に生乳中体細胞の大勢を占める好中球は血液と生乳に共通して存在している。好中球は自然免疫反応として細菌感染時の感染部位への遊走、貪食および殺菌という免疫反応が感染初期の段階でおこり、免疫系の中でもっとも初期反応が優れている。化学発光能測定法は、好中球の活性酸素の生成や消費の際に動員

INADA Tsukasa

〒861-1113 熊本県合志市栄3801

される電子をルミノール存在下で光子に変換して計数化する方法で、好中球の殺菌活性を高感度で評価できる指標<sup>1)</sup>であり、医学から畜産分野へと応用が進められている。乳房炎診断関係では、乳房炎評価に対する生乳中化学発光能の有効性について報告<sup>2)</sup>され、特に生乳中化学発光能と体細胞数およびPLテスト値間に高い相関関係がみられるため、乳房炎診断指標のひとつとして期待されているが、従来の測定手法では1検体あたりの測定時間に長時間を要するとともに評価が発光量であるため、フィールドにおける乳房炎診断法として迅速かつ活用しやすい診断法には至っていない。

そこで、生乳中化学発光能測定の迅速化および評価方法の開発を目的として、フィールドにおける生乳中化学発光能測定手法を検討するとともに、乳房炎評価法としての生乳中化学発光能による生乳中体細胞数の推定について併せて検討した。

### 2. 生乳中化学発光能と体細胞数の関係

図1に生乳中体細胞数と測定時間5分間の生乳中化学発光能（5 mins CL能）の関係を示した。生乳中体細胞数が10万/ml未満の階層では発生する化学発光は非常に微弱で、測定時間内の変動はほとんどみられない。一方、体細胞数の高い階層においては測定開始時点から高値を



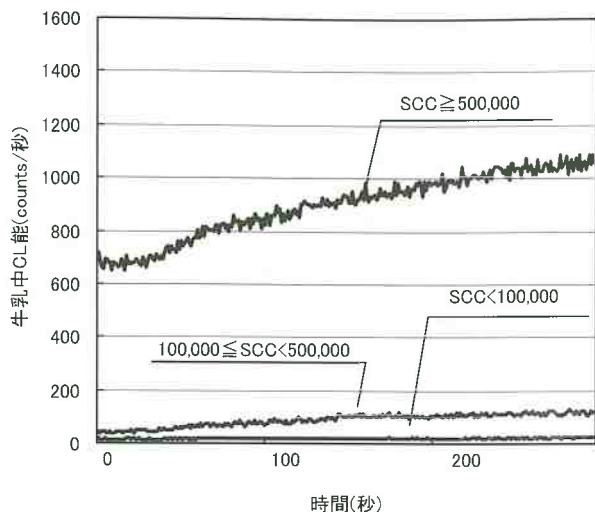


図1 生乳中の体細胞数と化学発光能の関係

示し、測定時間5分間においては経時的に増加し、その傾向は体細胞数の高い階層において顕著である。このように体細胞数の多い生乳については、化学発光能は急激な測定値の上昇がみられる<sup>3)</sup>。生乳中体細胞数と5 minsCL能には高い正の相関 ( $R=0.86$ ) がみられ、生乳中体細胞数の5 minsCL能に対する回帰は有意 ( $P<0.01$ ) で、 $y=13.6678+0.0022x$  ( $R^2=0.74$ ) の回帰直線が得られ、その標準誤差は61.699 ( $10^3/ml$ ) である。しかし、本測定法ではフィールドにおける乳房炎診断法としては1検体あたりの測定時間がかかりすぎるために活用が難しい (図1)。

### 3. 生乳中化学発光能測定法と体細胞数の推定

#### (1) 10secsCL能測定法

10secsCL能測定法は生乳中化学発光能の特性を応用して、フィールドにおける乳房炎診断の時間短縮を図るため、10秒間の化学発光能積算値により生乳中体細胞数を推定する乳房炎診断法である (以下「10secsCL能測定法」)。

測定方法は、恒温振とう器を用いて、生乳サンプル100  $\mu l$  にHEPES添加フェノールレッド不含ハックス緩衝液400  $\mu l$  を加え37°Cで5分間

インキュベーションし、その後ルミノール液を20  $\mu l$  加え37°C、5分間インキュベーションを行う。さらにオプソニン化ザイモザン20  $\mu l$  を添加し、4分50秒間のインキュベーションの後、生乳中化学発光能を10秒間測定する (図2)。

この10secsCL測定法による生乳中体細胞数の10secsCL能に対する回帰は有意 ( $P<0.01$ ) で、 $y=14.712+0.058x$  ( $R^2=0.75$ ) の回帰直線が得られ、その標準誤差は60.659 (千個/ml) である。この測定法では測定以外の前処理に14分50秒を要するが、測定時間は10秒間であるため、10秒間隔の流れ作業を行えば、10分間で60検体の測定が可能となる。10secsCL法により測定値と牛乳中体細胞数には高い相関がみられ、生乳中体細胞数 (SCC) は、 $SCC$  (千個/ml) =  $14.712+0.058 \times 10secsCL能$  ( $R^2=0.75$ ) と推定することができる。

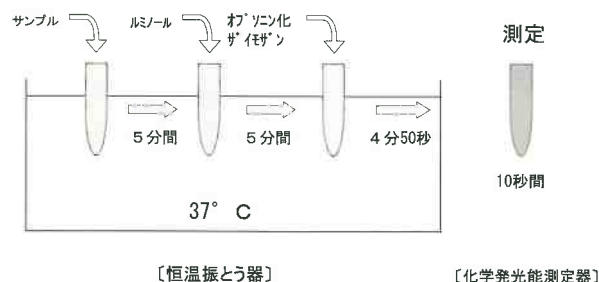


図2 10secsCL能測定法

#### (2) 10secsCL能変法

さらに、フィールドにおいて従来法 (10secsCL能測定法) より簡便で迅速かつ正確な乳房炎診断技術として化学発光能測定技術を活用するため、測定過程において細胞刺激剤として用いられるオプソニン化ザイモザン添加行程を削除した簡易化学発光能測定法 (以下「10secsCL能変法」) について検討した (図3)。

10secsCL能変法はオプソニン化ザイモザンの添加および添加後のインキュベーション時間を削除することで測定前処理時間が約5分間短縮され、オプソニン化ザイモザンの試薬作成作

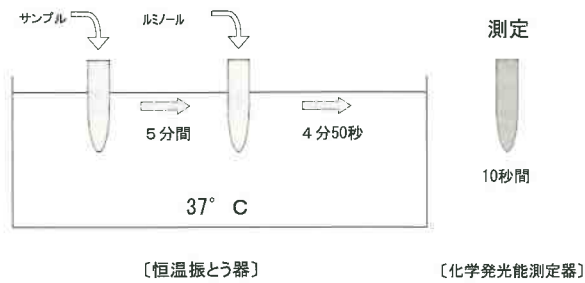


図3 10secsCL能変法

業の省略が図られる。10secsCL能変法測定値と生乳中体細胞数には10secsCL能測定法の場合と同様に高い相関関係にあり、生乳中体細胞数（SCC）は、 $SCC（千個/ml）= 31.183 + 0.085 \times 10secsCL能変法値（R^2=0.59）$ と推定することができるとともに、測定機器はサイズがコンパクトで、車への積み込みも容易であることから、フィールドにおける簡便で迅速な乳房炎診断が可能であると考えられる（図4，5）。

4. おわりに

飼養環境の改善や搾乳衛生の向上により以前に比べ衛生的生乳生産がなされるようになったが、高温多湿の西南暖地においては乳房炎対策という大きな課題を依然として抱えているのが現状である。通常、搾乳時の乳房の異常や固形物の排出等があれば、生乳を廃棄し検査・治療となるが、目視で判定できない場合は、定期的な既存の診断法による判定を行わなければ、体細胞数の多い生乳を排除することは困難である。今回紹介した診断法はフィールドにおいてリアルタイムに生乳中化学発光能測定値から体細胞数を推定する診断法であるため、生産者にとって利用しやすく、地域の指導機関等で当診断法による検査体制を整え、定期的な診断を実施することで高品質乳生産に向けた対応が急速に進むと考えられる。現在、本県においては関係機関と連携して県内にモデル地区を設定し、高品質な生乳生産に向けて本診断法を活用した検査体制の整備を進めているところである。



図4 フィールドでの測定風景

平成 * 年 * 月 * 日				
	牛NO	CL能	体細胞数ランク	予測体細胞数
1	112	4161	C	253,978
2	117	10652	E	627,224
3	119	986	A	71,409
4	121	4769	C	288,939
5	124	5663	D	340,346
6	126	4585	C	278,359
7	129	741	A	57,321
8	130	561	A	46,971
9	132	535	A	45,476
10	133	550	A	46,338
11	134	10763	E	633,606
12	135	674	A	53,469
13	137	676	A	53,584
14	139	889	A	65,832
15	141	834	A	62,669
16	142	1512	B	101,655
17	144	1150	A	80,840
18	146	790	A	60,139
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				

体細胞数ランク	CL能	体細胞数範囲(個/ml)
A	1400以下	100,000以下
B	1400~3400	100,000~200,000
C	3400~4900	200,000~300,000
D	4900~8400	300,000~500,000
E	8400以上	500,000以上

図5 乳房炎診断表

文 献

1) 村田英雄 (1995), 日本畜産学会報, 66 (11), 976-978  
 2) 農林水産省北海道農業試験場 (1997), 環

境ストレス低減化による高品質乳生産マニュアル, 33-42  
 3) 稲田 司ら (2001), 熊本県農業研究センター畜産研究所試験成績書 (平13), 11-12



ブレイン テクノニュース  
 バックナンバーのご案内  
 第124号  
 2007年11月15日発行

総 説

ミツバチゲノムの解読完了と今後の展望  
 .....門脇 辰彦・木村 澄

総説関連情報

ミツバチゲノム解析と養蜂への応用—抗菌ペプチドの  
 理解とその応用—.....芳山 三喜雄・木村 澄

国内情報

コールドチェーンフリー経口ワクチンとしてのワクチン発現  
 米の開発  
 .....幸 義和・野地 智法・高木 英典・高岩 文雄・  
 増村 威宏・田中 國介・清野 宏  
 植物バイオマスへの<sup>13</sup>C代謝・分解過程の追跡—高分解能マジ  
 ック角回転 (hr-MAS) 法によるアプローチ—

.....菊地 淳・森 哲哉・雪 真弘・西原 崇・  
 佐藤 一・甲野 裕之

超音波を利用した動物細胞への核酸導入技術の開発

.....根岸 洋一・遠藤 葉子・鈴木 亮・滝澤 知子  
 ・山本 松男・丸山 一雄・新根 幸彦

マルカメムシがダイズ上で繁殖できる能力を腸内共生細菌が規  
 定する.....深津 武馬・細川 貴弘

乗用型トラクタの安全キャブ・フレームの効果とシートベルト  
 の使用実態に関する農業者調査結果

.....富田 宗樹・水上 智道・高橋 正光・塚本 茂善

地域の先端研究

北海道産サケの品質等級判別システムの開発.....宮崎 俊之

文献情報

二母性胚由来マウスの高率生産.....(抄訳：下司 雅也)

受容体様キナーゼFERONIAは花粉管を胚珠が受け入れる際の  
 雌雄相互作用を取り持つ.....(抄訳：久保山 勉)

末端にシアル酸が付加された糖タンパク質を生産する酵母  
 .....(抄訳：平野 拓也)

ニジマスの視床下部、菱脳、ブロックマン体にはグルコセナー  
 ーが存在している.....(抄訳：川中子 誠)

## ◀文献情報▶

## 初期G1期あるいはG0期ドナー細胞を用いたウシ核移植胚の子宮内における初期発生

Early Development *In Utero* of Bovine Nuclear Transfer Embryos Using Early G1 and G0 Phase Cells.

ATSUSHI IDETA<sup>1</sup>, MANAMI URAKAWA<sup>1</sup>, YOSHITO AOYAGI<sup>1</sup>, and KAZUHIRO SAEKI<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Zen-noh Embryo Transfer Center, Kamishihoro, Hokkaido, Japan.

<sup>2</sup>Department of Genetic Engineering, Kinki University, Wakayama, Japan.

*Cloning and Stem Cells*, 9(4), 571-580, 2007

体細胞核移植により作出したウシ胚は、体外培養により高率に胚盤胞期へ発生するものの、移植後の流産・早産が多いこと、また、核移植胚の移植により産子が得られても、体外受精や人工授精による産子に比べて、出生体重が重く、出生後の生存率が低いことが問題となっている。また、ウシ核移植胚由来胎子においては、胎盤の形成異常も報告されており、人工授精ではみられないような水腫が認められることも多い。さらに、体外受精胚の移植や人工授精に比べて、子宮小丘数の減少が認められる。以上のような子宮内での発育異常により、体細胞核移植胚の移植においては流産が頻発すると考えられる。これまで、核移植胚由来産子の生産効率を高めるために、ドナー細胞として使用する細胞の種類、継代回数、細胞周期、卵子活性化のタイミングあるいは胚の培養方法等が検討されてきている。これらのうち、ドナー細胞の細胞周期は重要であり、一般的には血清飢餓培養などにより得られるG0期の細胞が用いられているが、近年、初期G1期細胞をドナー細胞として用いることにより、G0期細胞を用いるよりも産子の生産効率が高まることが報告された。ただし、その理由については明らかではなかった。そこで、この論文においては、G0期ある

いは初期G1期のドナー細胞を用いた核移植胚、体外受精胚、単為発生胚の移植あるいは人工授精時の胚の子宮内における初期発育について比較検討が行われた。初期G1期あるいはG0期のドナー細胞を用いて作出した核移植胚を未経産牛に移植し、妊娠14日目まで子宮内で発育させた。体外受精胚、単為発生胚あるいは人工授精による胚をコントロールとして用いた。胚盤の形成率は、回収された初期G1期核移植胚、体外受精胚、人工授精由来胚の間に差は認められなかったが、初期G1期核移植胚における胚盤の形成率は、G0期核移植胚に比べて有意に高かった。初期G1期核移植胚の胚の長さは、体外受精胚、単為発生胚あるいは人工授精由来胚と同等であったが、G0期核移植胚に比べると有意に短かった。以上の結果から、初期G1期核移植胚の14日令における発育は、人工授精由来胚と同等であるが、G0期核移植胚は形態的に大きく、人工授精由来胚や初期G1期核移植胚と異なることが明らかとなった。また、G0期核移植胚における高い流産率や胎盤形成の異常は、低い胚盤の形成率が影響している可能性があると考えられている。

これまでに、数多くのクローン動物が生産されているが、その生産効率の低さが問題となっている。今回、用いるドナー細胞の細胞周期により、14日令においてすでに子宮内での初期発生に差が現れることが明らかとなった。この時期であれば子宮灌流により胚が回収可能であり、出生まで長期間経過観察しなくても、胚の正常性・発生能を早期に確認することが可能となり、核移植胚の生産効率向上のための情報収集を短期間で効率的に行えることとなる。細胞周期と核の初期化や産子生産効率との関係に関する研究がより進展し、体細胞核移植胚による産子生産効率が向上することを期待したい。

(抄訳：下司雅也, GESHI Masaya, 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所)

◀文献情報▶

植物のドブジャンスキー＝マラー型  
雑種生育不全には自己免疫反応によ  
って引き起こされるものがある

Autoimmune Response as a Mechanism for a  
Dobzhansky-Muller-Type Incompatibility  
Syndrome in Plants

Kirsten Bomblies, Janne Lempe, Petra Epple,  
Norman Warthmann, Christa Lanz, Jeffery  
L. Dangl, Detlef Weigel

Max Planck Institute for Developmental  
Biology, Tübingen, Germany

*PLoS Biology* Vol.5, Issue 9, 1962-1972,  
September, 2007

正常な2つの系統を交雑したときに雑種が成育不全となる現象の原因遺伝子がどのように現れ、維持されているのかを説明する理論としてドブジャンスキー＝マラーモデルが知られている。ショウジョウバエの種間で見られる生殖隔離障壁遺伝子の研究から、ドブジャンスキー＝マラーモデルに適合する遺伝子は進化速度が速いことが明らかになっており、これらの遺伝子は適応進化の副産物として現れたのだと考えられている。しかし、同じ種の中で、比較的最近現れた生殖隔離障壁がどのような遺伝子によって成立しているのかは知られていない。そこで著者らは、シロイヌナズナ280系統の861組み合わせにおいて交配実験を行い、2%にあたる20組み合わせでネクロシスが現れ、これらが遺伝的に原因の異なる5グループに分類されることを明らかにした。そして、Uk-1系統とUk-3系統の組み合わせにおいて、雑種ネクロシス原因遺伝子の分子遺伝学的な解析を行った。

Uk-1系統とUk-3系統の雑種は16℃で栽培すると激しい雑種ネクロシスが生じるが、23℃で栽培するとネクロシスの症状が抑制されることを発見した。そして、23℃での栽培によって雑種から種子を取り、F<sub>2</sub>世代を得てネクロシスの程度を指標にしてQTL解析を行った。その結果、DM1とDM2が雑種において補足的に相互作用し、ネクロシスを起こしていることが明らかに

なった。ポジショナルクローニングの結果、DM2については染色体の組換えが抑制されており、148kbより絞り込むことが困難であったが、DM1はTollインターロイキン受容体タイプのNB-LRRタンパク質をコードする遺伝子に特定された。DM1候補遺伝子のゲノム断片をDM2を持つUk-1へ導入すると生育阻害が起こるが、DM2を持たない系統へ導入しても生育阻害が生じなかった。また、遺伝子の発現を抑制する人工microRNAを導入すると、DM1候補遺伝子の発現が抑制された雑種では正常な成長が見られた。これらのことから、候補遺伝子がDM1をコードしていることが確認された。DM1の分布を調査するため、世界中から集められたシロイヌナズナ46系統とDM2を持つUk-1を検定交雑すると、1つだけDM1を持つ系統が見つかった。さらに、Uk-3が採取された地域でDM1の存在を調べると、1系統のシロイヌナズナが見つかった。これらの結果から、DM1は実験室で生じた突然変異ではなく、採取前に既に自然界に存在した遺伝子であることが明らかになった。

雑種ネクロシスで起きる遺伝子発現の変化をマイクロアレイで網羅的に解析した結果、病原菌の感染に反応して発現する遺伝子が有意に増加していることが明らかとなった。この結果から過敏感細胞死のような現象が見られることが予想されたため、葉で死んだ細胞を検出したところ、両親系統よりも多くなっていた。また、雑種ネクロシスを起こした植物ではべと病菌に対する抵抗性が増加していることも確認された。さらに、雑種ネクロシスを生じるUk-1とUk-3以外の組み合わせについても同様の観察を行ったところ、Uk-1とUk-3の場合と似た遺伝子発現の変化や抵抗性の増加が認められた。以上のことから、シロイヌナズナ種内で見られる雑種ネクロシスの多くは、宿主と病原菌の反応と同様の現象によって生じており、植物における生殖隔離障壁の一部はこのような宿主と病原菌の反応メカニズムで生じているものと考えられた。(抄訳：久保山勉, KUBOYAMA Tsutomu, 茨城大学農学部)

## ◀文献情報▶

### 蛋白工学によりNADH選択性へ改変した*Pichia stipitis*キシロース還元酵素を導入した*Saccharomyces cerevisiae*によるキシロースからのエタノール生産

Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein-engineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*

Seiya Watanabe, Ahmed Abu Saleh, Seung Pil Park, Narayana Annaluru, Tsutomu Kodaki, and Keisuke Makino

Faculty of Engineering, Kyoto University, Kyotodaigaku-katsura, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501

*Microbiol.*, 153, 3044–3054 (2007)

バイオマスエタノールの生産について、食料と競合しない木質バイオマスからのエタノール生産技術の開発が注目を浴びている。木質バイオマスはセルロース、ヘミセルロース、リグニンを主成分とするが、容易にエタノール発酵に利用できるのは、グルコースを構成糖とするセルロース部分のみである。酵母*S. cerevisiae*はヘミセルロースの主成分であるキシロースなどのペントース（五単糖）をエタノール発酵に用いることができない。

一方、酵母の中には*Candida stipitis*や*Candida parapsilosis*など弱いながらもキシロースよりエタノールを生産できるものがわずかに存在する。*S. cerevisiae*はキシロースを発酵できないが、それをキシルロース（xylulose）まで変換すると発酵可能となる。そこで、*Candida stipitis*より、キシロースをキシルロースに変換するための酵素遺伝子を取り出し、*S. cerevisiae*に導入することで、キシロースをエタノール発酵する*S. cerevisiae*を育種する研究開発が古くより北歐のグループを中心になされてきた。

その際、キシロースをキシリトールに変換するキシロース還元酵素（リダクターゼ（XR））、さらにキシリトールをキシルロースに変換するキシリトール脱水素酵素（デヒドロゲナーゼ（XDH）

の2つの遺伝子を導入する必要がある。これらの遺伝子を導入することで*S. cerevisiae*はキシロースをエタノール発酵することが可能となる。しかし、キシリトールが多量に蓄積するなど、その変換効率はあまり満足のものではなかった。

XRはキシロースをキシリトールに変換する際、補酵素としてNADPHを利用しNADP<sup>+</sup>とする。一方、XDHはキシリトールをキシルロース変換する際、NAD<sup>+</sup>を利用しNADHとする。このXRとXDHの補酵素特異性が異なることが、酵母細胞内の酸化・還元バランスを乱し、キシロース→キシリトール→キシルロースへの変換がスムーズに行かない一つの原因ではないかと著者らは考えている。

そこで本報では、もしXRのNADPH依存（選択）性を、NADH依存（選択）性とすることができたなら、XR（NADH→NAD<sup>+</sup>）→XDH（NAD<sup>+</sup>→NADH）とNADHを循環利用させることが可能となり、エタノールへの変換効率が増加するのではないかと考え、XRの補酵素特異性を蛋白工学的に改変することを行った。

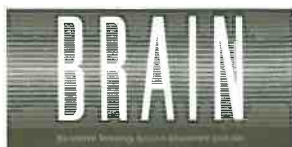
*Candida stipitis*のXRはNADPH選択的であるが、他種のXRにはNADH選択的なものもある。そこでそれらの補酵素結合領域のアミノ酸配列を比較し、それをもとに*Candida stipitis*のXRのいくつかのアミノ酸配列を置換した変位酵素を作成した。そして、270番目のリジンをヒスチジンに置換（R270H）したXRなどが目的どおりNADH選択的となったことより、それらを*S. cerevisiae*に導入し、その形質転換株によるキシロースの発酵試験を、キシロース15g/L+グルコース5g/Lを含む培養液にて行った。結果、野生型XRを導入した対照株（Y-WT）では2.15g/Lのエタノール生産、1.45g/Lのキシリトール排出であったのに対し、R270H型XR導入株（Y-R270H）では、2.30g/Lエタノール生産、0.97g/Lキシリトール排出、とエタノール生産性の向上かつキシリトール排出の低下が見られた。さらにY-R270H株にてバイオリアクターによる発酵を行ったところ、5.94g/Lのエタノールを生産した。これは0.43g/g消費糖にあたり、理論収率の84%に達することが

できた。

酵素の補酵素特異性に注目し、それを改変する本著者らのアプローチはたいへんユニークなものであり、木質バイオマスの効果的利用に役立つも

のと期待される。

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



ブレインテクノニュース

バックナンバーのご案内  
第123号

2007年9月15日発行

特集 最近のβ-クリプトキサンチン研究の動向

- 1 ウンシュウミカンで特異的にβ-クリプトキサンチンが多量に集積する生合成調節機構……………生駒 吉識
- 2 β-クリプトキサンチンの多様な生理機能—疫学研究から明らかになったこと……………杉浦 実

国内情報

イネの花成ホルモンHd3a ……………玉置 祥二郎・島本 功  
微生物の「休眠遺伝子」を活性化し抗生物質などを作り出す  
技術を開発……………越智 幸三  
鳥とヒトのインフルエンザワクチン株ライブラリー…喜田 宏  
カイコが黄色の繭を作るメカニズム—カロチノイドの選択的  
輸送機構の解明

……………土田 耕三・作道 隆・中島 健陽・藤本 浩文・  
高田 直子・片岡 宏誌・瀬筒 秀樹・田村 俊樹  
乗用型水田用除草機を利用した水田内複合除草技術の開発  
……………宮原 佳彦

地域の先端研究

デジタルビデオ録画像の利用により牛超音波肉質診断の脂肪  
交雑推定精度の向上を図る……………川田 智弘

文献情報

泌乳牛への脂肪酸給与が卵子の品質や胚発生に及ぼす影響  
……………(抄訳：下司 雅也)  
ブラシノステロイドのシグナル伝達で働くBAK1は、フラジェ  
リンによる誘導でFLS2と複合体を形成し、植物の防御反  
応を開始する……………(抄訳：久保山 勉)  
HIV-1抗ウイルス薬Cyanovirinを分泌する乳酸菌に  
ついて……………(抄訳：芦田 延久)  
イガイとヤモリにヒントを得た着脱可能な水中接着因子  
……………(抄訳：足立 亨介)

生研センターからのご案内

## ◀文献情報▶

### 促進型大容量トレハロース輸送体，トレハロース・トランスポーター1 (TRET1) は外部から細胞内へのトレハロースの取り込みを可能にする

Trehalose transporter 1, a facilitated and high-capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells

Takahiro Kikawada, Ayako Saito, Yasushi Kanamori, Yuichi Nakahara, Ken-ichi Iwata, Daisuke Tanaka, Masahiko Watanabe, and Takashi Okuda

National Institute of Agrobiological Science, Ohwashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.104, No.28, 11585-11590, July 10, 2007

トレハロースは、細胞やタンパク質・ヌクレオチドなどの生体分子に対する効果的な凍結・脱水保護剤としての可能性を秘めている。しかしながら、トレハロースがそのままでは細胞膜を通過できないという点が、その利用性を妨げている。一方、著者らはネムリユスリカ (*Polypedilum vanderplanki*) の幼虫が乾季の間完全な脱水状態となるが、その後改めて水を与えると吸水して活性を回復する現象 (クリプトビオシス) に着目し、研究を進めてきた。これまでに、ネムリユスリカ幼虫が乾燥や塩分ストレスに伴って多量のトレハロースを合成することが明らかとされている。この結果は、トレハロース・トランスポーター遺伝子がネムリユスリカ幼虫の脂肪体内で発現している可能性を強く示唆している。そこで著者らは、ネムリユスリカから促進型のトレハロース輸送体 (トレハロース・トランスポーター: TRET1) を単離し、その機能性を探った。Tret1の発現は、乾燥や塩分ストレスによって促進された。また、Tret1はトレハロースの蓄積と共に、主に脂肪体において発現したことから、脂肪体内で合成されたトレハロースの血リンパへの輸送に関与

していることが示された。更に、アフリカツメガエル卵母細胞にTret1を発現させて検討した結果、Tret1はトレハロースに対してのみ特異的に作用し、細胞外pHの変化 (4.0~9.0) や電気化学的な膜電位には依存しないことが明らかとなった。これらの結果から、Tret1はトレハロース特異性の促進型トランスポーターであり、濃度勾配に依存してトレハロースを細胞内外へ自由に出入りさせることが明らかとなった。トレハロースの細胞内への取り込み挙動から得られた $K_m$ および $V_{max}$ の驚くべき数値 ( $K_m=114\text{mM}$ ,  $V_{max}=523\text{pmol/min per oocyte}$ ) は、Tret1がトレハロースの大容量トランスポーターであることを示している。更に、Tret1を様々な哺乳動物の細胞へ導入してその機能性を検証した結果、Tret1はそれら細胞へのトレハロースの浸透能力を高めることが明らかとなった。

ここで示されたTret1の持つ様々な特性は、トレハロースと組み合わせることでTret1が基礎的、あるいは実用的に生体への高いアプリケーション能力を有していることを示している。(抄訳: 橋本朋子, HASHIMOTO Tomoko, 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

## 2008年度 新規研究課題公募のお知らせ

## — イノベーション創出基礎的研究推進事業 —

## 事業の趣旨

生物系特定産業技術研究支援センター(生研センター)では、農林水産業、飲食料品産業、醸造業等の生物系特定産業に関する研究開発における産学官の連携の要として、農林水産省が定める「農林水産研究基本計画」等に則しつつ、民間、大学、独立行政法人等の行う試験研究に対し、各般にわたる支援を実施しています。

2008年度から新たに実施する本事業では、基礎から応用まで一体的に推進することにより、革新的な技術の開発を促進し、生産性の飛躍的向上や農林水産物の高付加価値化等の生物系特定産業における諸課題の解決に必要な技術的障害の解決や革新的な技術の開発を促進するとともに、生物系特定産業の発展の可能性を広げる新たな分野を創出することを目的として、下記の研究分野及び研究タイプを設置し、提案課題を公募します。

## ■ 研究分野

- ① 農林水産業の競争力強化のための生物機能解明による生産力向上に関する研究分野
- ② 高品質・高機能な農林水産物・食品の開発やその安全性に関する研究分野
- ③ 生物の生産する有用物質、バイオマスからの新素材・用途、エネルギー活用に関する研究分野
- ④ 生物機能を活用した環境の改善に関する研究分野
- ⑤ 工学・環境学・情報学等異分野との融合による生物機能向上分野
- ⑥ その他基礎的・基盤的な研究分野

## ■ 研究枠・研究期間・研究費の規模

(研究費には間接経費を含みます)

## (1) 技術シーズ開発型研究

## ◇ 一般枠

研究者の独創的なアイデア、基礎科学や鉱工業、医療等他産業の研究分野における萌芽段階の研究を基に、生物系特定産業における技術的障害の解決や革新的な技術の開発につながる新たな技術シーズを開発するための基礎となる研究が対象です。一般枠においては、研究計画の中に国際活動を含めることが可能です。

- ・研究期間: 5年以内
- ・研究規模: 7千万円以内/年(国際活動を含む場合には、研究費の上限が8千万円となります。)

## ◇ 若手研究者育成枠

一般枠と同じ性格の研究を行う若手研究者(研究代表者を含む研究チームの構成員全ての年齢が、2008年4月1日において原則39歳以下)を支援するための資金です。この枠への応募課題に国際活動を含めることはできません。

- ・研究期間: 3年以内
- ・研究規模: 3千万円以内/年

## (2) 発展型研究

## ◇ 一般枠

「技術シーズ開発型研究」や他の研究制度等で開発された技術シーズを将来における新たな事業の創出につなげるための応用研究が対象です。

- ・研究期間: 3年以内
- ・研究規模: 6千万円以内/年

## ◇ ベンチャー育成枠

独創的な発想や既存の技術シーズを活かした応用段階の研究開発であって、その成果を用いて新たな事業を創出するために研究開発ベンチャー企業の設立を目指すものが対象です。ベンチャー育成枠は、企業設立に関するフィージビリティスタディを行うフェーズⅠと応用段階の研究開発を行うフェーズⅡから構成されます。

①フェーズⅠ: フェーズⅡにおいて実施する研究開発の成果を用いた研究開発ベンチャー企業設立の見通しを明らかにするため、研究開発終了後における製品化及びその実施許諾の見通しや採算可能性等を把握するための調査、ベンチャー設立に向けた具体的なビジネスプランの作成、補完的研究等を実施していただきます。また、その結果を踏まえ、予め提出していただく研究開発実施計画等のブラッシュアップを行っていただきます。

- ・研究期間: 1年以内
- ・研究規模: 5百万円以内

②フェーズⅡ: フェーズⅠの結果について高い評価を得た課題のみを対象とし、フェーズⅠの結果を踏まえて修正・改善された実施計画等に基づき研究開発を実施していただきます。

- ・研究期間: 2年以内
- ・研究規模: 3千万円以内/年

## 生研センターからのご案内

### ■ 応募資格

- ① 日本国内の基礎研究を実施する能力のある機関に所属する常勤の研究者であること。
  - ② 研究期間を通じて応募課題に関する研究に責務を負い、研究に力を注げること。
- ※その他の応募資格等については、公募要領でご確認ください。

#### 留意事項

生研センターで実施している提案公募事業(基礎研究推進事業及び異分野融合研究支援事業)で、2008年度に継続を予定している課題において、研究の実施に責任を持つ研究者は応募できません。また、同一の研究代表者/研究分担者が2008年度に本事業に応募いただけるのは、1研究課題に限ります。

### 応募方法

府省共通研究開発管理システム(e-Rad)を利用して、応募してください。その他の方法による書類の提出等は受け付けません。応募するためには、事前に研究者情報・所属機関情報を登録しておく必要がありますのでご注意ください。

### ■ 応募期間：2008年4月1日(火)～

2008年4月15日(火)締切(当日17時)

### ■ 研究課題の決定

学識経験者で構成する課題選考のための委員会が①書類審査、②面接審査により採択候補課題を選定。

生研センターはその結果を踏まえて採択課題を決定。

♪詳細は公募要領をご覧ください。

♪公募要領・様式は生研センターのホームページよりダウンロードできます。

### 【問合せ先】

#### <募集内容等について>

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3-18-19 虎ノ門マリビル10階

URL <http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/> (生研センターホームページ)

技術シーズ開発型研究に関すること

新技術開発部 基礎研究課

TEL: 03-3459-6569 FAX: 03-3459-6594

発展型研究に関すること

新技術開発部 技術開発課

TEL: 03-3459-6567 FAX: 03-3459-6577

#### <府省共通研究開発管理システムの利用について>

府省共通研究開発管理システム(e-Rad)ヘルプデスク

TEL: 0120-066-877

受付時間帯: 午前 9:30～午後 5:30 (土曜日、日曜日、祝日を除く)

URL <http://www.e-rad.go.jp/> (e-Rad ポータルサイト)

### 【ご注意】

府省共通研究開発管理システムを利用して応募する場合には、研究代表者及び研究分担者の研究者情報、並びに所属する研究機関の情報が応募時までに登録されている必要があります。研究機関の登録方法については、上記のポータルサイトを参照してください。

登録手続きに日数を要する場合がありますので、2週間以上の余裕を持って登録手続きをしてください。

## 編集後記

126号をお届けします。本号の総説では、河野友宏氏（東京農業大学）に卵子ゲノムの父性化変換と産仔作成技術の開発についてご執筆戴きました。この課題については、本誌第124号の文献情報（抄訳）においてその概要が掲載されたところですが、重要な技術情報でもあり今回、研究者ご本人に改めて研究の内容をご紹介戴きました。

その他の研究情報としては、仲下英雄氏（理化学研究所）らに植物共生細菌の環境調和型イネ栽培技術への応用、石川雅之氏（農業生物資源研究所）らにウイルスRNAの複製を直接阻害する植物ウイルス抵抗性遺伝子、蓮沼仰嗣氏（横浜市立大学）らに活性酸素耐性変異株の選抜と太陽光利用効率の向上した高収量変異個体の作出、高橋秀樹氏（理化学研究所）らに植物のアンモニア態窒素吸収機構の機能分担、平田晃氏（生研センター）らに除菌効果の高い「乳頭清拭装置」の開発、稲田司氏（熊本県農業研究センター）に化学発光能測定技術を用いたフィールドでの乳房炎早期診断法について、それぞれご紹介戴きました。

また、本号の文献情報は、下司雅也氏（畜産草地研究所）、久保山勉氏（茨城大学）、家藤治幸氏（酒類総合研究所）、橋本朋子氏（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。

## 生研センター 業務のご案内

～研究開発を強力に支援いたします～

### 提案公募型の委託研究制度

- 民間企業の実用化段階の研究支援なら 民間実用化研究促進事業
- 技術シーズ開発のための基礎研究や  
応用・発展研究及びベンチャー創業を目指すなら イノベーション創出基礎的研究推進事業

### その他の支援制度

- 「共同研究先のあっせん」、 「遺伝資源配布先のあっせん」 などもお気軽にご相談下さい。  
詳細は、生研センター企画部企画第1課までお問い合わせください。

## ブレインテクノニュース 第126号

平成20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