

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成20年5月15日（隔月1回15日発行）

ISSN 1345-5958

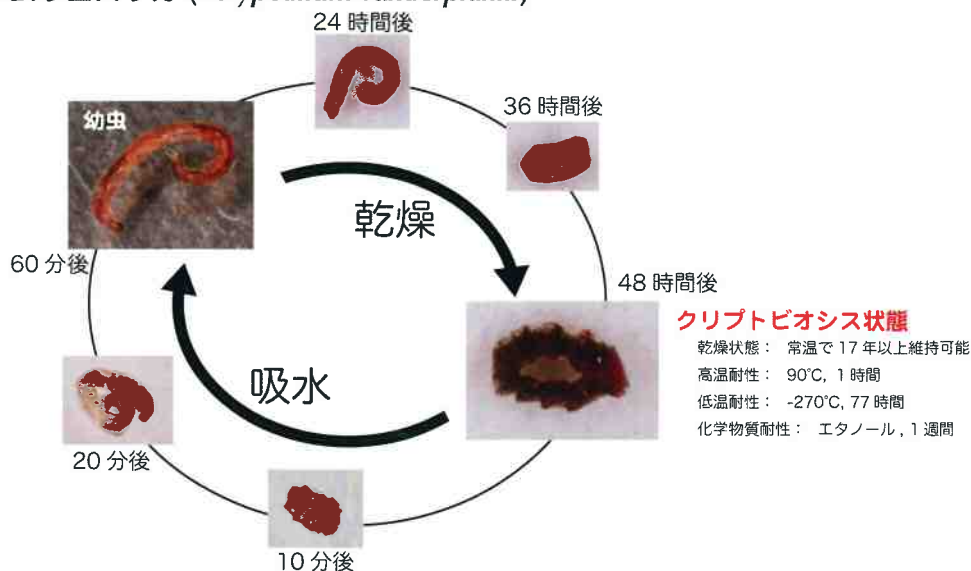
TECHNO NEWS

No.127

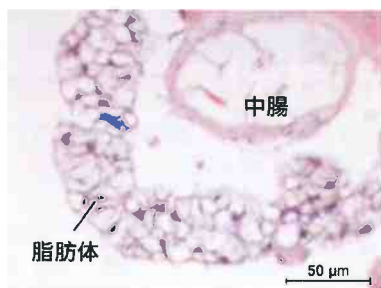
15 MAY, 2008

ブレインテクノニュース

ネムリユスリカ (*Polypedilum vanderplanki*)



A



B

乾燥処理時間

0 1 3 6 24 48

Tret1



C

乾燥処理時間

0 1 3 6 24 48

TRET1



トレハロースを細胞の内外に輸送する遺伝子 ートレハロース
トランスポーターの発見と応用の可能性についてー

独立行政法人 農業生物資源研究所 乾燥耐性研究ユニット
黄川田 隆洋

目 次

総 説

- トレハロースを細胞の内外に輸送する遺伝子 - トレハローストランスポーターの発見と応用の可能性について - 1
 黄川田 隆洋 ((独) 農業生物資源研究所 乾燥耐性研究ユニット)

国内情報

- 花粉制御への一歩 - 花粉成熟に必須なシロイヌナズナMS1転写因子の同定 7
 伊藤 卓也¹・篠崎 一雄² (¹(独) 理化学研究所 基幹研究所 長田抗生物質研究室,
²(独) 理化学研究所 植物科学研究センター 機能開発研究チーム)
- 半乾燥地の不良土壌に多く見られるハウ酸過剰に耐性な植物の作出に成功 12
 三輪 京子¹・藤原 徹^{1,2} (¹東京大学生物生産工学研究センター, ²SORST, JST)
- 低濃度エタノール水溶液を用いた新しい土壌消毒法の開発 16
 小原 裕三 ((独) 農業環境技術研究所 有機化学物質研究領域)
- 通電処理による鶏胸肉の物性と食味性の向上技術 22
 坂田 亮一¹・押田 敏雄¹・辻 聡²・樋口 清志² (¹麻布大学 獣医学部, ²(株) 前川製作所)
- 果樹園用せん定枝粉碎搬出機の開発 27
 金光 幹雄・太田 智彦・山本 聡史 ((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

- カンキツグリーニング病の簡易診断法 (スクラッチ法) の開発 32
 澤岬 哲也 (沖縄県農業研究センター 病虫管理技術開発班)

文献情報

- 肉用未経産牛における妊娠3日目からのプロジェステロン濃度の上昇が胚の生存性及び胚発育に及ぼす影響 36
 F. Carter et al. (*Reproduction, Fertility and Development*, 20, 368-375, 2008) 抄訳: 下司 雅也
- シロイヌナズナで見いだされた減数分裂を伴わない配偶子形成変異体 37
 M. Ravi et al. (*Nature*, Vol. 451, Issue 7182, pp. 1121-1124, 28 February, 2008) 抄訳: 久保山 勉
- 細菌の大きさを制御するメタボリックセンサー 38
 R. B. Weart et al. (*Cell*, 130, 335-347, 2007) 抄訳: 安田 源太郎
- 苦味ペプチドに対するヒト苦味レセプターhTAS2Rsの応答 40
 K. Maehashi et al. (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 365(4), 851-855, 2008) 抄訳: 大嶺 啓介

表紙の説明

トレハロースは多様な生理活性を持つ糖として最近注目されてきている。長期間の乾燥に耐えるアフリカ原産のネムリユスリカから単離されたトレハローストランスポーター (TRET1) は、トレハロースを効率良く細胞の内外へ輸送する能力を持つ膜タンパク質である。TRET1を用いることで、乾燥耐性農産物の作出や細胞の常温乾燥保存法の開発といったトレハロースの応用が進むと期待される。(ネムリユスリカの写真はコルネット・リチャー博士提供)。

詳細については、1頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

トレハロースを細胞の内外に輸送する遺伝子 - トレハロース トランスポーターの発見と応用の可能性について -

独立行政法人 農業生物資源研究所 乾燥耐性研究ユニット

黄 川 田 隆 洋

トレハロースは2つのグルコース（ブドウ糖）が還元基同士で結合した二糖類の一種である。近年、トレハロースの持つ生理活性に注目が集まり、生体への利用が試みられてきたが一般化するには至っていない。応用の最大の障壁は、トレハロースが細胞膜を通過できない点にあった。我々はこの問題を解決すべく、トレハロースを爆発的に蓄積し体内の隅々に拡散させる昆虫であるネムリユスリカを用いて、トレハローストランスポーターを単離した。この遺伝子は、トレハロースの持つ可能性を具現化する最良のツールであることが分かった。

1. はじめに

トレハロースは、昆虫や植物、キノコ類、酵母、細菌などに存在する天然の非還元二糖で、他の糖類と同様に、これらの生物のエネルギー源として利用されている。さらに、最近では、エネルギー源としての利用の他に、細胞やタンパク質の乾燥保護¹⁾や植物の生長制御²⁾、哺乳類における骨粗鬆症の予防³⁾、ハンチントン病の症状軽減⁴⁾など多様な生理活性を持つ糖であることが明らかとなってきた。このようにトレハロースには多くの可能性が秘められているが、トレハロースは細胞膜を透過できないという大きな障壁が、トレハロースの生理活性を利用する上で問題となってきた。

これまでトレハロースを細胞へ導入する系として、トレハロース合成酵素を遺伝子導入する方法⁵⁾や、ヘモリシンのような細胞膜に非選択的に物質を通過させる穴（ポア）をあける抗菌ペプチドを用いて導入する方法⁶⁾が報告されている。両者ともトレハロースを細胞内に蓄積させるが、前者は細胞内のグリコーゲンや脂質を消費する上、構成発現プロモーターの支配下にあるためトレハロースが永続的に残存する欠点がある。また、後者の方法は、ポアに基質選択性

がないため、トレハロース以外の物質が容易に細胞内外に流入及び流出してしまう問題点がある。このため、これらの方法が、トレハロース導入系として一般に用いられることはない。

糖が細胞膜を透過する際には、トランスポーターと呼ばれる膜タンパク質が介在することが知られている。例えば、人間の血糖であるグルコース（ブドウ糖）は、グルコーストランスポーターが仲立ちをすることによって、血液から各組織の細胞の中へ移動することができる。これまでに、トレハロースを輸送するトランスポーターは、酵母や大腸菌などの単細胞生物では見つかった^{7, 8)}。しかし、これら単細胞生物のトランスポーターは、輸送にエネルギーを必要とするタイプのトランスポーターであり、その上、トレハロース以外のスクロース（ショ糖）やマルトース（麦芽糖）といった他の α -二糖類も輸送するため、トレハロース専用のトランスポーターではない。これらの性質から、トレハロースが持つ多様な生理活性を発揮するためにこれら単細胞生物のトランスポーターを利用した応用事例は、これまで報告されていない。

2. トレハローストランスポーター遺伝子 (*Tret1*) の単離

KIKAWADA Takahiro

〒305-8634 茨城県つくば市大わし1-2

我々の研究グループは、クリプトビオシス（復活可能な状態で完全乾燥に耐える現象）という非常に特殊な生理現象に興味を持ち、アフリカ半乾燥地帯原産のネムリユスリカを用いて、その分子メカニズムの解明を進めてきた。その研究の過程で、ネムリユスリカ幼虫が乾燥に伴って多量のトレハロースを合成・蓄積し、それが水の代わりに生体成分を保護していることが分かってきた⁹⁾。そこで、このネムリユスリカにはトレハロースを効率良く輸送するトランスポーターが細胞膜上に多く発現されていると予想し、その遺伝子の単離を試みた。ネムリユスリカのESTデータベースの検索を進めたところ、最終的に糖トランスポーターのモチーフを持つ1つの遺伝子を同定した。得られた遺伝子は、脂肪体（人間の肝臓に相当する昆虫の器官）に多く発現し（図1A）、幼虫が乾燥に曝されると発現量が増加していた（図1B及びC）¹⁰⁾。脂肪体はトレハロースの合成器官であり、乾燥に伴ってネムリユスリカのトレハロース合成量は増加することから、得られた遺伝子はトレハロースのトランスポーターである可能

性が高いと考えられた。そこで、この遺伝子をトレハローストランスポーター1 (*Tret1*) と命名した¹⁰⁾。

3. TRET1はトレハロースを輸送する

TRET1が本当にトレハロースを輸送するかどうか知る目的で、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を利用したアッセイを行った。手始めに、TRET1とGFP（蛍光タンパク質）の融合タンパク質をコードする cRNA を卵母細胞に注入してタンパク質を発現させると、細胞膜が強く蛍光を発した（図2A）。この融合タンパク質を発現した卵母細胞を、トレハロースを含む緩衝液に浸すと、細胞内のトレハロース濃度は上昇した（図2B）。当然、蛍光タンパク質を含まないTRET1単独を卵母細胞に発現させた場合も、同様にトレハロースの取り込みが認められた（図2C）。これらの結果から、TRET1は膜に局在するトレハロース輸送活性を持つタンパク質、すなわちトレハローストランスポーターであることが明らかとなった¹⁰⁾。

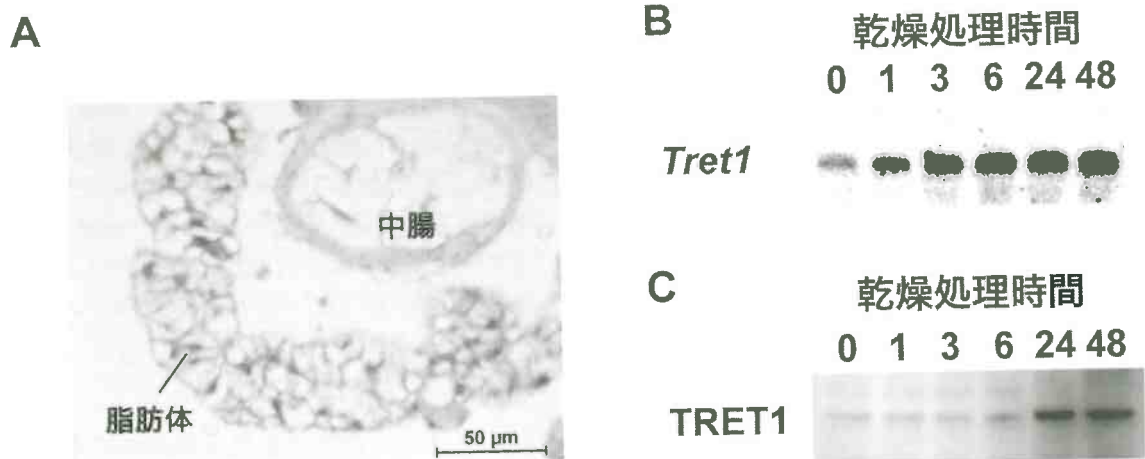


図1 *Tret1*遺伝子の発現分布と乾燥刺激に伴う発現変動 (Kikawada, et al. 2007)

- A. 乾燥24時間後のネムリユスリカの横断面を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション。 *Tret1* のアンチセンスリポプグループで処理した結果、脂肪体のみが強く染色されていた。
- B. *Tret1* 遺伝子発現変動のノーザンブロット。乾燥に伴って、 *Tret1* 遺伝子発現は上昇していた。
- C. TRET1タンパク質発現変動のイムノブロット。遺伝子の発現と同様にTRET1タンパク質は乾燥に伴って蓄積量が増加していた。

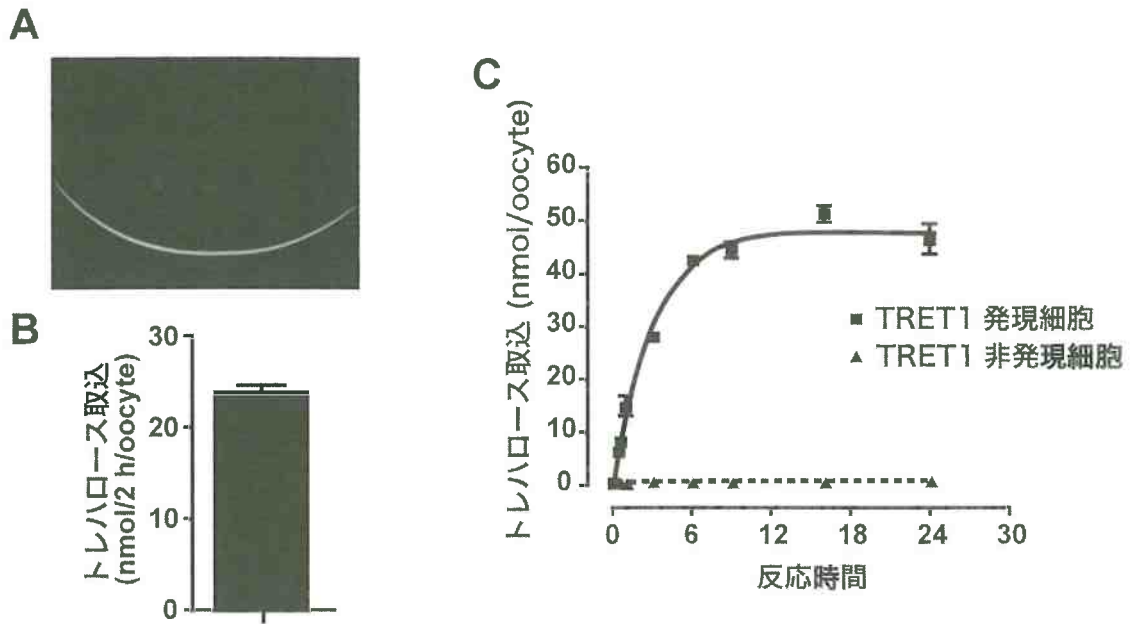


図2 TRET1はトレハローストランスポーターである (Kikawada, *et al.* 2007)

A. アフリカツメガエル卵母細胞にTRET1-GFP融合タンパク質を発現させると細胞膜に局在した。

B. TRET1-GFP融合タンパク質を発現させた卵母細胞はトレハロースを取り込んだ。

C. TRET1単独で発現させた卵母細胞はトレハロースを取り込んだが、発現していない細胞はトレハロースを取り込まなかった。

4. TRET1はトレハロースのみを輸送する

果たしてTRET1は、トレハロース以外の二糖類を輸送するのだろうか。前述の通り、酵母や細菌から見つかった α -グルコシドトランスポーター (AGT1, MalEFGK₂) は、トレハロース以外にマルトースやスクロースも輸送する。一方、TRET1は、トレハロース以外の天然二糖類 (マルトース、スクロース及びラクトース) を輸送しなかった (図3A)。その上、トレハロースの立体異性体であるネオトレハロース (α , β -トレハロース) やイソトレハロース (β , β -トレハロース) も輸送しなかった (図3B)。このことから、TRET1は、基質としてトレハロースの立体構造を厳密に認識して輸送していることが明らかとなった¹⁰⁾。

5. TRET1はトレハロースの輸送にエネルギーを必要としない

一般にトランスポーターは、ATPの加水分解や細胞膜内外の電位差といったエネルギーを利用して基質を輸送する“能動輸送型”と、これらのエネルギーを全く必要としない“促進拡散輸送型” (受動輸送型) の2つに分けられる。TRET1を発現させた卵母細胞を、能動輸送型トランスポーターの活性を阻害することが知られているATP合成阻害剤 (アンカプラー) や膜電位を消去する薬剤 (イオノフォア) を含む緩衝液に浸した後、トレハロースの輸送活性を調べてみた。すると、これらの薬剤処理をしたにもかかわらず、TRET1の輸送活性は無処理区と比べて何ら変化がなかった (図4)。このことから、TRET1はエネルギーに依存しないトランスポーター、すなわち促進拡散型のトランスポーターであることが明らかとなった¹⁰⁾。

6. TRET1は双方向に輸送可能である

トランスポーターは基質を決まった方向へ輸

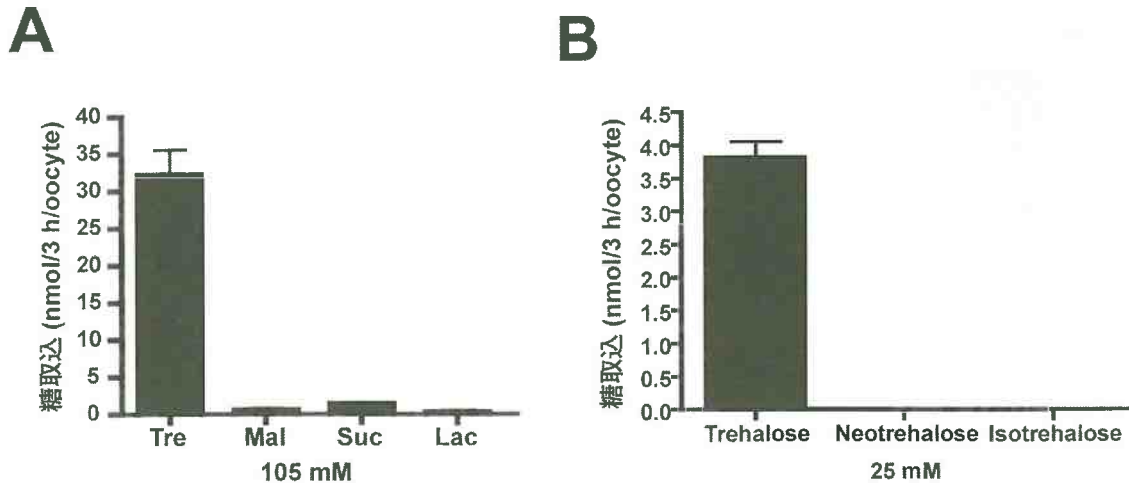


図3 TRET1はトレハロースに対して高い基質特異性を示す (Kikawada, *et al.* 2007)

A. TRET1発現卵母細胞はトレハロース (Tre) を取り込んだが、マルトース(Mal)やスクロース(Suc), ラクトース (Lac)を取り込まなかった。

B. TRET1発現卵母細胞はトレハロースの立体異性体を取り込まなかった。

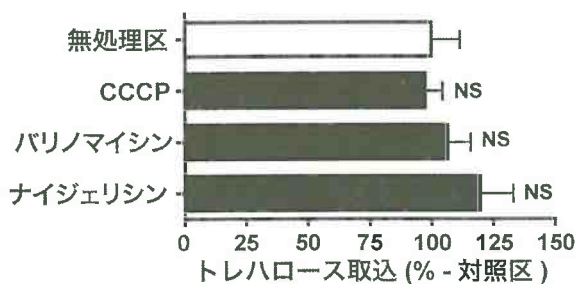


図4 TRET1は促進拡散型トランスポーターである (Kikawada, *et al.* 2007)

TRET1は、能動輸送トランスポーターの阻害剤 (CCCP: アンカプラー, バリノマイシンやナイジェリシン: イオノフォア) が存在しても、トレハロース輸送活性が低下しなかった。

送する。促進拡散型トランスポーターは、輸送する基質の膜内外の濃度差を駆動力として、基質の輸送を行う。平たく言えば、基質を濃度の濃い側から薄い側へ輸送するのである。従って、細胞外側の基質濃度が内側に比べて高い場合は、内向きの輸送をし、基質濃度の差が逆の場合は外向きの輸送をする。TRET1も同様か調べるために簡単な実験を行った。まず、TRET1を発現させた卵母細胞をトレハロース緩衝液に浸して細胞内のトレハロース濃度を上げておく。

その後、その卵母細胞をトレハロースの全く含まない緩衝液に移して、細胞膜の外側と内側のトレハロース濃度を逆転させた時の卵母細胞内のトレハロース濃度の変化を調べた。その結果、卵母細胞内のトレハロース濃度は時間と共に減少しており、トレハロースが細胞の中から外へ輸送されていた (図5)。このことから、TRET1は基質濃度の差に依存して輸送方向を変化させるトランスポーターであることが確認された¹⁰⁾。

7. TRET1は高濃度のトレハロースを輸送する

トランスポーターも酵素と同様に基質濃度が高くなると反応速度が飽和し、それ以上基質を速く輸送することができなくなる。この飽和最大速度を V_{max} と呼ぶ。 V_{max} が高いトランスポーターは、基質濃度が高くなっても輸送速度が落ちないため、結果として大量の基質を短時間で輸送することが可能となる。このような性質を持つものを高容量型トランスポーターと呼んでいる。基質輸送速度の動力学的な解析を行った結果、TRET1はトレハロースに対して V_{max}

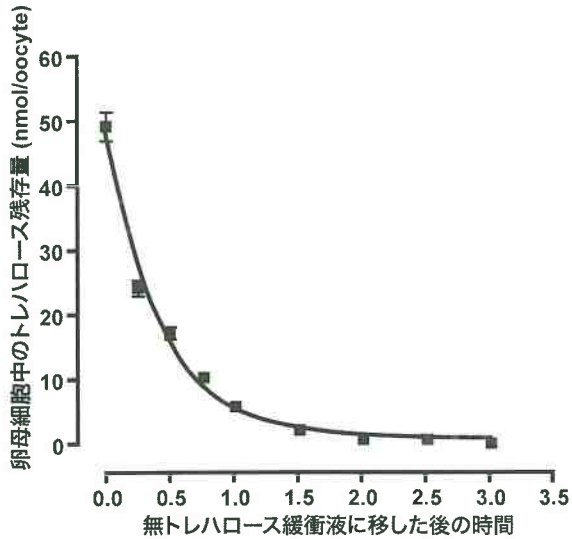


図5 TRET1は双方向にトレハロースを輸送する (Kikawada, *et al.* 2007)

105 mMトレハロース緩衝液に3時間放置した後、TRET1発現細胞を、トレハロースを全く含まない緩衝液へ移した。すると、細胞内のトレハロース濃度は経時的に減少していた。

が500 pmol/min/oocyteであり、既知の糖トランスポーターに比べて非常に大きい値を示した(図6)ことから、高容量型であることが明らかとなった¹⁰⁾。また、基質との親和性を示す K_m 値はトレハロースに対して約100 mMであった(図6)。既知のグルコーストランスポーターの K_m 値の約10~100倍の値であり、TRET1のトレハロースに対する基質親和性は低いことが分かった¹⁰⁾。一見このことは欠点のように見えるが、基質親和性が低いと言うことは基質(トレハロース)とトランスポーター(TRET1)の結合はゆっくりだが、解離は非常に速いことを示す。従って、TRET1の輸送速度は非常に速いことが想像される。

8. ネムリユスリカのクリプトビオシスにおけるTRET1の役割

これまで示してきたTRET1の生化学的な性質は、ネムリユスリカのクリプトビオシスにとって非常にメリットがある。前述の通り、ネム

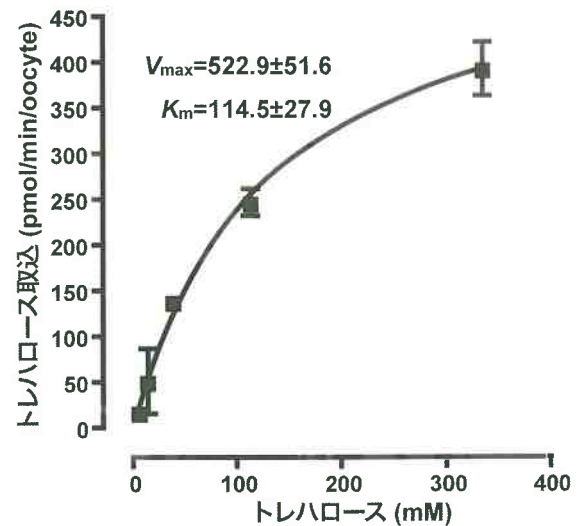
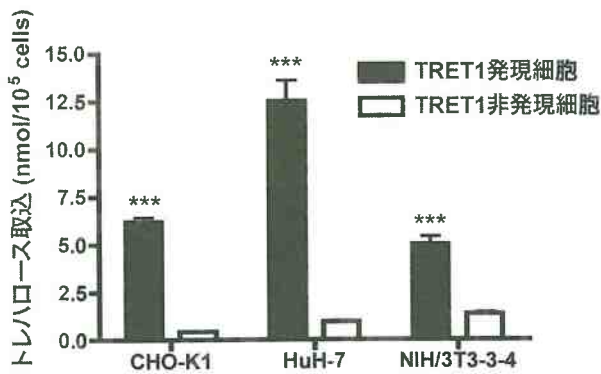


図6 TRET1のトレハロース輸送活性の動力学的解析 (Kikawada, *et al.* 2007)

TRET1のトレハロース輸送活性は、典型的なミカエリス-メンテン型の反応速度の変化を示した。

リユスリカは、乾燥に伴って乾重当たり約20%ものトレハロースを脂肪体で合成し、TRET1を通じて効率良く血リンパへ放出される。分光学的手法を用いた分析の結果、ネムリユスリカの体内にトレハロースが均一に分配されていることが確認され、最終的に全ての細胞がトレハロースのガラスに閉じこめられることでタンパク質や細胞膜などの生体成分が保護されることでクリプトビオシスに至ることが明らかになった¹¹⁾。このガラス化に至る過程で、溶媒である水分が同時に失われていることを合わせて考えると、ネムリユスリカ体内のトレハロース濃度は100 mM以上の高濃度になっていることが予想される。もしもTRET1が低容量なトランスポーターだったなら、トレハロース濃度が高くなると輸送速度が飽和して基質が細胞膜を通過する前に細胞が乾燥してしまい、トレハロースの分配は上手くいかなくなるであろう。TRET1は高容量型であるおかげで、効率良いトレハロースの分配が進んで、最終的に全ての細胞がガラス化してクリプトビオシスに至るのである。



9. TRET1の応用の可能性

TRET1は、昆虫由来のトランスポーターであるが、その他の生物でも機能する。実際、TRET1をマウスやヒトの細胞に発現させると、それらのトレハロース取込量は大きく高まる(図7)¹⁰⁾。また、TRET1は双方向の輸送を行うトランスポーターであるため、細胞外のトレハロース濃度を細胞内側よりも低くするだけで、一旦取り込ませたトレハロースを除去することも容易に可能である。このことは、TRET1を用いることで、細胞内に任意の濃度でトレハロースを導入することができることを意味する。TRET1は、トレハロースを選択的に認識して輸送するため、トレハロース以外の不要な分子の流入や細胞内に存在する生存に必須な分子の流出も起こらないであろう。このように、TRET1を用いることで既存のトレハロース導入系の欠点を全て解消できると考えられる。

トレハロースは多様な生理活性を持ち合わせている“奇跡の糖”と考えられている。Tret1遺伝子を様々な生物へ導入してTRET1タンパク質を発現させることにより、将来的には乾燥に強い作物作出等の農業分野の他、細胞や組織の常温乾燥保存法開発による医療等の産業分野の発展にも貢献出来るかもしれない。また、TRET1タンパク質の高い基質特異性を利用して、新規のトレハロース類似化合物のスクリーニングにも利用でき、トレハロースの基礎及び

図7 TRET1は哺乳動物細胞でも機能する (Kikawada, et al. 2007)

遺伝子導入によりCHO-K1 (ハムスター卵母細胞由来培養細胞)、HuH-7 (ヒト肝癌細胞由来培養細胞) 及びNIH/3T3-3-5 (マウス繊維芽細胞由来培養細胞) にTRET1を発現させた。Tret1遺伝子を導入した細胞は、導入していない細胞に比べてトレハロース取込量が約4~14倍に上昇した。

応用研究が加速的に進むことが考えられる。TRET1は、トレハロースの持つ大きな可能性を具現化する最良のツールとなると期待される。

文献

- 1) Crowe, J. H. et al. (2005) *Integr Comp Biol* 45, 810-820
- 2) Ramon, M. et al. (2007) *Plant Mol Biol* 63(2), 195-206
- 3) Nishizaki, Y. et al. (2000) *Nutrition Research* 20(5), 653
- 4) Tanaka, M. et al. (2004) *Nat Med* 10(2), 148-154
- 5) Guo, N. et al. (2000) *Nat Biotechnol* 18(2), 168-171
- 6) Eroglu, A. et al. (2000) *Nat Biotechnol* 18(2), 163-167
- 7) Stambuk, B. U. et al. (1996) *Eur J Biochem* 237(3), 876-881
- 8) Boos, W. et al. (1998) *Microbiol Mol Biol Rev* 62(1), 204-229
- 9) Watanabe, M. et al. (2002) *J Exp Biol* 205(Pt 18), 2799-2802
- 10) Kikawada, T. et al. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(28), 11585-11590
- 11) Sakurai, M. et al. (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(13), 5093-5098

◀国内情報▶

花粉制御への一步 - 花粉成熟に必須な
シロイヌナズナMS1転写因子の同定

¹独立行政法人 理化学研究所 基幹研究所 長田抗生物質研究室,
²独立行政法人 理化学研究所 植物科学研究センター 機能開発研究チーム
伊藤 卓也¹・篠崎 一雄²

植物において、花粉母細胞の減数分裂により生じた小胞子は、その後の成熟過程を経て受粉・発芽・受精に備えた体制を構築する。我々は花粉成熟機構を明らかにする目的でシロイヌナズナを用いて雄性不稔突然変異体のスクリーニングを行い、*male sterility1 (ms1)* 突然変異体を単離した¹⁾。原因となるMS1遺伝子は司令塔の役割を果たす転写活性化因子をコードし、花粉成熟に必要な下流遺伝子を制御していることが明らかとなった²⁾。MS1遺伝子を用いた花粉制御法についても言及する。

1. はじめに

花粉を作ることができない雄性不稔形質は、遺伝子組換え作物の花粉が環境中に拡散するのを防ぐ目的や、作物のハイブリッド種子を作製する目的など、様々な応用技術に利用されている重要な形質である。また、近年の花粉症被害の広がりから、花粉と健康との関連も注目されるようになった。このように雄性不稔は利用価値が高い重要な形質であり、花粉制御技術の開発が待たれている。そのための基礎研究として、我々はモデル植物のシロイヌナズナを実験材料として用い、花粉成熟の分子メカニズムの解明に取り組んでいる。

植物の花粉成熟過程では、雄しべの葯内にある花粉母細胞から減数分裂により生じた小胞子(将来の花粉)は、エキシンと呼ばれる特殊な構造をもつ花粉壁を構築する(図1)。エキシンは非酸化的分解に対して極めて耐性で、厳しい外界環境から花粉細胞を保護する役割を持つ。この過程で、タペート層が花粉成熟に必要な物質の供給を行う。タペート層とは葯室を取り囲む細胞層で、減数分裂から花粉成熟過程に

ITO Takuya¹, SHINOZAKI Kazuo²

¹〒351-0198 和光市広沢2-1

²〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22

において減数母細胞や小胞子に栄養や情報を供給する役目を果たしている。その後、タペート層はプログラム細胞死を引き起こし、タペート層内に蓄積された脂質を主成分とした物質がポレンコートとしてエキシン間隙に蓄積する。ほぼ同時期に、シロイヌナズナの場合は小胞子が

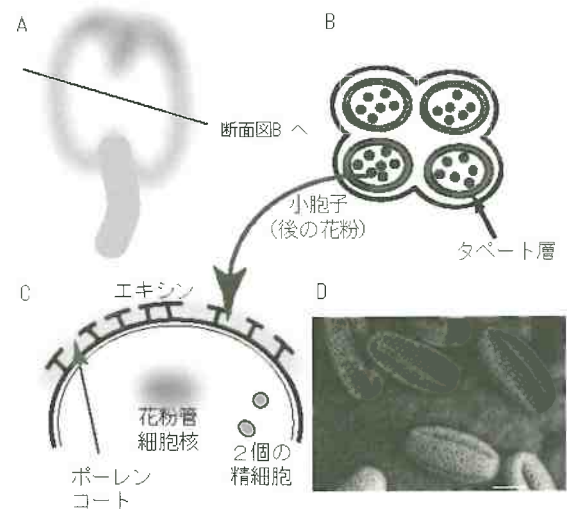


図1 シロイヌナズナの花粉成熟過程

(A) 雄しべの模式図。(B) Aの横断面の模式図。減数分裂により生じた小胞子をタペート層が取り囲む。(C) 成熟花粉断面の模式図。(D) 成熟花粉の走査電子顕微鏡写真。花粉表層に網目状のエキシン構造が観察される。

2回細胞分裂して、一つの花粉管細胞と二つの精細胞を持つ成熟花粉となる。

2. *ms1*突然変異体

我々は、雄性不稔形質を示す突然変異体のスクリーニングを行い*ms1*変異体を得た。*ms1*突然変異体の葯発達は、減数分裂後の四分子期、その後の小胞子が分離した時期までは、野生型との相違が認められなかった(図2)。しかし、その後のエキシン形成が阻害され、さらに小胞子・タペート層共に空胞化し、最終的には成熟花粉が全くできなかった。このように、*MSI*遺伝子はエキシン形成・小胞子サイトゾル発達・タペート細胞発達における多面的な役割を果たしている。

in situ mRNAハイブリダイゼーション法により*MSI*遺伝子発現パターンを調べたところ、この遺伝子はタペート層特異的、四分子期一過的という特徴的な発現パターンを示し他の組織では全く発現しなかった。このことは、*MSI*遺伝子が減数分裂後の花粉成熟特異的な機能をもつことを示唆している。

*MSI*遺伝子がコードするタンパク質は、N末

に核移行シグナルに特徴的な塩基性アミノ酸残基に富む領域をもち、中央には7アミノ酸残基ごとにロイシンが現れるロイシンジッパー様配列が認められる。さらに、C末にはC₄-H-C₃(Cはシステイン残基、Hはヒスチジン残基)の共通配列をもつPHDフィンガーモチーフ様配列が存在する。しかし、それ以外には特徴的な共通配列は認められない。N末領域は実際に核移行シグナルとして機能することがGFPとの融合タンパク質を用いた細胞内局在実験から明らかとなった。また他の2領域についても変異導入*MSI*遺伝子を形質転換した*ms1*雄性不稔形質の相補実験から、機能領域であることが明らかとなった。

PHDフィンガーモチーフ様配列をもつタンパク質は真核生物種に広く存在する。それらPHDタンパク質はヒストンメチル基転移酵素・アセチル基転移酵素複合体のサブユニット・DNA結合活性など様々な機能が報告されており、機能に関しての統一の見解はないが、クロマチンを介した転写調節機能というのがコンセンサスのようである³⁾。以上の知見を総合して、*MS1*は転写制御因子として花粉成熟に必要な遺伝子群を制御しているという作業仮説を立てた。

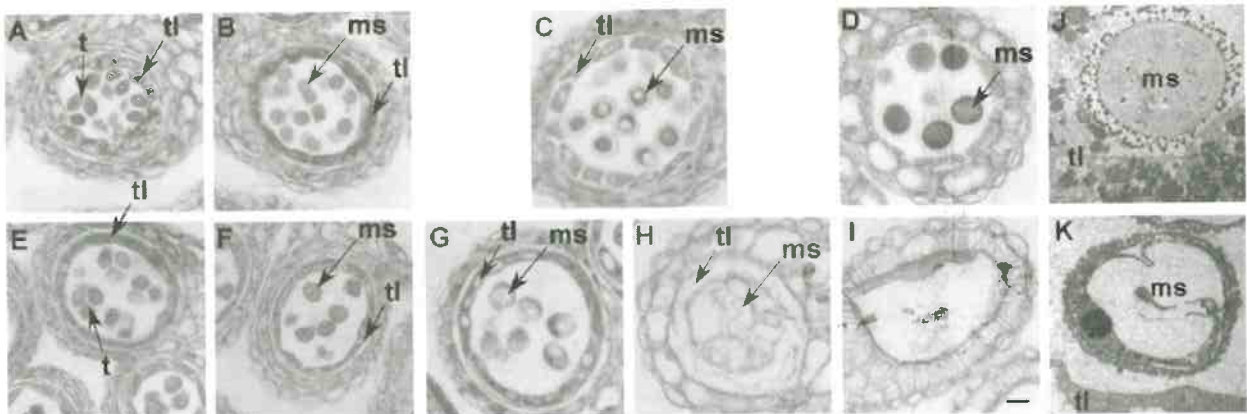


図2 *ms1*突然変異体の花粉成熟過程

(上段) 野生型。(下段) *ms1*変異体。

(A, E) 四分子期。(B, F) 小胞子が分離した時期。(C, G, J, K) エキシンが形成される時期。J, Kは透過電子顕微鏡写真。(D, H, I) その後*ms1*は小胞子、タペート層共に空胞化し、成熟花粉は全くできない。t:四分子, tl:タペート層, ms:小胞子・花粉。文献1)より転載、改変。

3. MS1は転写活性化因子である

MS1タンパク質が転写制御因子であることを示すため、転写活性化因子を強力な転写抑制因子に機能変換する遺伝子サイレンシング技術(CRES-T法)⁹⁾を利用した。この技術は植物特異的な転写抑制ペプチドを利用する。このペプチドは、エチレン応答性シスエレメント結合性転写抑制因子とTFIIIAタイプZnフィンガー転写抑制因子のC末端に共通して存在する配列として同定された。このペプチドを任意の転写活性化因子のC末につなげたキメラコンストラクトを野生型シロイヌナズナに導入すると、当該転写活性化因子遺伝子の機能欠損変異体と類似の表現型異常を示すことが報告されている⁹⁾。

もし、MS1タンパク質が転写活性化因子として機能するならば、MS1遺伝子と転写抑制ペプチドとの融合遺伝子を野生型シロイヌナズナに導入すると、*ms1*突然変異体と類似の表現型を示すことが予想される。実際に、形質転換シロイヌナズナは雄性不稔を示し(図3)、花粉壁の形成が阻害され小孢子とタペト細胞が空胞化するという形質を示したことから、MS1タンパク質は転写活性化因子として花粉成熟過程を制御していることが示された⁹⁾。しかし、MS1の転写活性化はDNA結合によるのか、あるいはクロマチンリモデリングによるのかといった分子機構は不明のままであり今後の課題として残っている。

4. MS1により制御される遺伝子群

転写制御因子は下流の遺伝子群の発現を制御するマスター因子である。したがって、*ms1*突然変異体の表現形質とMS1遺伝子支配下にある遺伝子群の一次構造との比較から、これら遺伝子群の機能を類推することができる。*ms1*突然変異体では、特徴的なエキシン構造が欠損していた。一方、MS1遺伝子により制御される

遺伝子群を、網羅的発現解析であるマイクロアレイ解析およびグルココルチコイド誘導システムを用いた解析から検索したところ、フェニルプロパノイドの一種であるリグニン単量体の生合成遺伝子群の類似遺伝子が4種類同定できた。*ms1*変異体の葯ではリグニン形成は正常なことから、これら遺伝子の分子系統樹解析ではリグニン生合成酵素遺伝子のクレードから外れていることから、これら遺伝子はリグニン単量体の生合成酵素遺伝子ではないことが示唆された。また、3種類の脂質合成・代謝系遺伝子も含まれていた。エキシンはスポロポレニンと呼ばれるポリマーを主成分としており、近年の生化学的解析からスポロポレニンは脂質とフェニルプロパノイドから成ることが判ってきた。しかし、スポロポレニンは難分解性のため、詳細な分子構造、生合成経路および、関与する酵素遺伝子

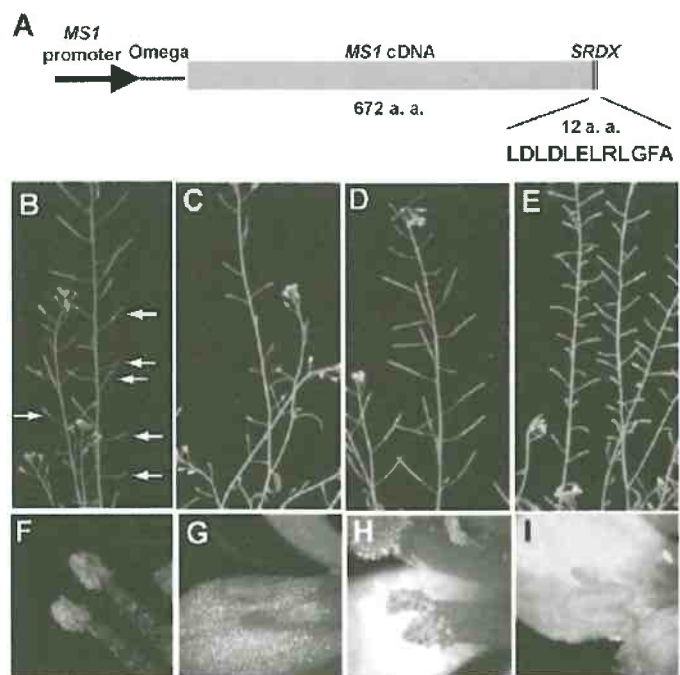


図3 MS1と転写抑制ペプチドとのキメラ遺伝子導入で野生型シロイヌナズナを雄性不稔に改変。

(A) 導入したキメラ遺伝子の模式図。SRDXは転写抑制ペプチド。(B, F) 半雄性不稔を示す形質転換体。結実しない短い鞘を矢印で示す。葯表面に少量の花粉が見られる。(C, G) 強い雄性不稔を示す形質転換体。全ての鞘は短く、葯表面には花粉が見られない。(D, H) 野生型。(E, I) *ms1*変異体。文献²⁾より転載。

は未だ明らかになっていない。今回同定されたMS1制御下の遺伝子群はスポロポレニン生合成に関与する遺伝子候補であると考えている²⁾。

これまでエキシン形成に関与する遺伝子は主として遺伝学的手法によって単離されてきた。例えば、エキシン形成異常形質を示すms2突然変異体からMS2遺伝子が単離され、コードするタンパク質の一次構造から脂肪酸還元酵素がエキシン形成に必須であることが示唆されている³⁾。今回の我々のアプローチは、エキシン形成異常形質を示す転写因子遺伝子の突然変異体をプローブとして用い、下流で制御される遺伝子群の中から候補遺伝子を検索するという方法である。今後はこれら遺伝子が本当にスポロポレニン生合成に関与するかどうか、分子生物学・遺伝学的解析、メタボローム解析等を通じて明らかにしていきたい。

5. おわりに

我々の研究グループでは、シロイヌナズナを用いて植物の生産性向上に関わる生理機能をもつ遺伝子探索を行っており、その一環として花粉成熟に注目してきた。シロイヌナズナはゲノムサイズが約130 Mb (130 x 10⁶塩基対)と極めて小さいこと、実験室内で生育可能で播種から次世代の種子収穫まで約2ヶ月と短いことなどからモデル植物として認知された結果、他の植物種と比べてゲノム研究基盤が圧倒的に整っている。したがって、シロイヌナズナを用いて花粉成熟の分子メカニズムを解明し、これを基盤として作物へと展開する戦略は有効であろうと考えている。例えば、減数分裂期あたりに相当するイネ穂ばらみ期の障害性冷害は、花粉形成過程が低温感受性であるために生じる雄性不稔である。今後、穂ばらみ期のイネ障害性冷害に関与する量的形質遺伝子座 (QTL) の原因遺伝子が単離されてくるであろうが、シロイヌナズナでの基礎研究はこれら遺伝子機能の理解に役立つであろう。

花粉をつくることのできない雄性不稔形質は

農業上重要な形質である。また、1992年の雄性不稔スギ発見⁴⁾を契機に各地で無花粉スギが見つかり、雄性不稔スギへの置換は花粉症の有効な対策として期待されている。したがって、遺伝子導入により雄性不稔作物を作出する花粉制御技術の開発が待ち望まれている。平成20年1月31日現在、花粉制御技術であるSeedLink™テクノロジーを用いた遺伝子組換え作物は国内で承認された事例があり⁵⁾、開発ははるかに進んでいる。SeedLink™では、タペート層特異的発現を示すプロモーターにRNA分解酵素遺伝子 (Barnase) をつないだコンストラクトを作物に導入し、花粉形成に必須なタペート層を除去することにより不稔形質を付与している。また、果菜・穀物類のハイブリッド種子作製では、花粉親として稔性回復系統を用いる必要があるが、RNA分解酵素インヒビター遺伝子 (Barstar) を用いることでこの問題を解決している⁶⁾。SeedLink™は優れた技術であるがこれに対抗し得る技術開発が望まれており、CRES-T法はその候補である。本研究により、MS1と転写抑制ドメインとの融合コンストラクトが野生型シロイヌナズナへの雄性不稔形質導入に有効であることが示された。一方で、シロイヌナズナのMS1遺伝子コンストラクトを導入した形質転換ペチュニアでは、形質転換シロイヌナズナで見られた様な強い花粉形成抑制は認められなかった²⁾。このことは、各植物種に合わせた導入遺伝子の改良が必要なことを示唆している。

6. 謝辞

花粉の透過電子顕微鏡写真を貸与して頂いた日本女子大学・永田典子博士に感謝致します。

文 献

- 1) Ito, T. and Shinozaki, K. (2002) Plant Cell Physiol. 43, 1285-1292
- 2) Ito, T. et al. (2007) Plant Cell 19, 3549-3562
- 3) Bienz, M. (2006) Trends Biochem. Sci. 31, 35-40

- 4) Hiratsu, K. et al. (2003) *Plant J.* 34, 733-739
- 5) Aarts, M. et al. (1997) *Plant J.* 12, 615-623
- 6) 富山県農林水産総合技術センター・森林研究所・無花粉スギ「はるよこい」
<http://www.fes.pref.toyama.jp/index.html>
- 7) 農林水産省・農林水産技術会議・カルタヘナ法に基づく第一種使用規定が承認された遺伝子組換え農作物一覧
<http://www.maff.go.jp/carta/list/01a.pdf>
- 8) Mariani, C. et al. (1992) *Nature* 357, 384-387

◀国内情報▶

半乾燥地の不良土壌に多く見られる ホウ酸過剰に耐性な植物の作出に成功

¹東京大学 生物生産工学研究センター, ²SORST, JST
三輪 京子¹・藤原 徹^{1, 2}

ホウ素 (B) は生物にとって生育に必須である一方で、高濃度のホウ素は生物に毒性を示す。高濃度のホウ酸を含む土壌は半乾燥地を中心に世界に分布しており、それに起因する農業生産の低下が報告されている。コムギやオムギでホウ酸過剰耐性品種の作出が試みられてきたが、植物でホウ酸過剰耐性に関与する遺伝子は同定されておらず、育種の決定的な方法は確立されていなかった。私たちは排出型ホウ酸トランスポーターを過剰発現することにより、世界で初めて過剰なホウ酸に耐性を示す植物の作出に成功した。

1. 不良土壌環境での生産性向上を目指して

植物は土壌から無機元素を吸収し、それらを利用して炭酸同化することで生存している。同化産物は食料、衣類、建材や燃料等として私たちの生存を支えている。植物は進化の過程で、土壌中の必須元素の選択的な取り込みや生育を阻害する重金属など有害元素からの防御など、不良な環境に適応する機構を発達させてきたと考えられる。

現在、世界的な人口増加に対応する食糧生産の増加とともに、バイオエネルギー原料としての作物生産の増産が叫ばれている。歴史的に人間は、耕地面積の拡大や化学肥料など外部エネルギーの投入による単位面積当たりの収量 (収率) の上昇によって生産を増加させてきた。しかし、世界的には利用可能な優良な農地は減少しており、増産の達成のためには特に、肥沃度の低い土壌や有害物質の存在する不良な土壌環境での収率の増加が必須である。そのためには不良な土壌環境でも高い収量を持つ不良環境耐性作物の開発が有効である。私たちはこれまで植物の無機栄養輸送のしくみの解明を通じて、不良栄養土壌での植物の生育改善方法の開発を試みてきた。本研究は、モデル植物であるシロ

Miwa Kyoko, Fujiwara Toru

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

イヌナズナを用いてホウ素輸送のしくみの解明を通じて、農業生産を低下させる一つの要因である過剰ホウ酸への耐性を植物に付与する遺伝子を初めて同定し、ホウ酸過剰耐性植物の作出への新たな道を開いたものである。

2. ホウ酸過剰土壌での農業生産被害

ホウ素は植物にとって必須元素の一つであるが、高濃度に存在すると毒性を示す。ホウ素過剰障害は根の伸長抑制、葉縁部の枯死、稔実性の低下となって現れる。

世界にはホウ素 (ホウ酸) を高濃度に含む土壌が存在しており、それらの地域ではホウ酸過剰による農業生産の低下が報告されている¹⁾。半乾燥地を中心にオーストラリア (南・西オーストラリア)、西アジア (トルコ)、北米 (アメリカ・カリフォルニア)、南米 (チリ) などでその存在が報告されている。土壌へのホウ酸の集積は自然の土壌生成環境による要因と灌漑や工業活動での排出などの人為的な要因の双方で起こると考えられている。

例えば南オーストラリアでは、植物の生育を阻害する 15mgkg^{-1} 以上のホウ素を含む土壌が500万ha存在しており、南オーストラリア南部地域の30%を占めると報告されている。1984年の報告ではこれらの地域の高濃度のホウ酸を含む土壌では、含まない土壌と比較して17%まで

のオオムギの収量の減少が予想されている³⁾。

ホウ酸過剰土壌においては土壌からのホウ酸の選択的な除去が困難であることから、耐性作物品種の開発が農業生産向上の最も有効な手段と考えられ、オーストラリアやトルコではコムギやオオムギを対象とした品種改良が取り組まれてきた。様々な品種間のホウ酸過剰に対する感受性の違いが記述され、品種の選抜が行われていたものの、ホウ酸過剰耐性品種作出の決定的な手法は確立されていなかった。

3. 生物に対するホウ素の必須性と毒性

植物に対するホウ素の必須性は80年以上前に報告されており、細胞壁ペクチン質多糖の架橋をして構造維持や細胞接着に働いている。近年では微生物や動物に対する必須性も認められつつあり、細胞増殖や分化への関与が指摘されている。高濃度のホウ酸は生物一般に毒性を示し、私たちの生活の中でも抗真菌剤やゴキブリ駆除用のホウ酸ダンゴとして使用されている。ホウ素のオキソ酸であるホウ酸 $B(OH)_3$ は解離定数9.24の弱酸であり、シスジオール基とエステル結合しやすい性質を持つ。ホウ酸による生物毒性の分子機構は明らかにされていないが、生体内に存在するATPやRNAなどシスジオール基を持つ化合物との結合とそれによる機能の阻害が毒性の一因と考えられている。

4. ホウ酸トランスポーターBOR1の同定

ホウ素の必須性と毒性を考えると、植物は土壌中からのホウ素の取り込みや細胞内のホウ素濃度を適切な範囲に調節する必要があると考えられる。しかし、これまで生物におけるホウ素輸送の分子機構はほとんど未解明だった。

私たちの研究グループは高ホウ素要求性シロイヌナズナ変異株*bor1-1*より、生物界で初めてのホウ酸トランスポーター（輸送体）を2002年に同定した³⁾。BOR1は細胞膜に局在する排出型のホウ酸トランスポーターであり、環境中のホ

ウ酸が低濃度のときに生育に必要なホウ素を効率的に導管へ積み込むための分子であった。

BOR1を発現させた酵母は、細胞内ホウ素濃度が低下しており、ホウ酸過剰に耐性を示した。当初、植物でも同様の効果を期待し、BOR1を過剰発現する形質転換シロイヌナズナを作出したが、期待に反してホウ酸過剰に耐性は示さなかった。実は、BOR1はホウ酸濃度に依存した転写後制御を受けており、環境中のホウ酸濃度が高い条件におくと、細胞膜に局在したタンパクがエンドサイトーシス経路によって液胞に運ばれ分解を受けていた⁴⁾。この制御は、毒性を持つ高濃度のホウ酸を地上部へ送りすぎないようにするための防御機構と考えられる。

BOR1の過剰発現体は、地上部への効率的なホウ素輸送というBOR1本来の機能が強化され、低ホウ素栄養耐性が付与されていた⁵⁾。同時に、高濃度のホウ酸環境下ではBOR1が分解を受けるため、ホウ酸過剰に弱くなるなど悪影響なく、低ホウ素栄養耐性が付与できることも示された。

5. ホウ素過剰耐性植物の作出に成功

オーストラリアのReidらは、オオムギのホウ酸過剰耐性品種と感受性品種の生理学的な解析から、根でのホウ酸排出による根や地上部のホウ素濃度の低減がホウ酸過剰耐性の一つの機構であることを示していた⁶⁾。しかし、実際にホウ酸排出を担う分子実体は同定されていなかった。

BOR1は上記のように環境中のホウ酸が高濃度の際にはタンパクが分解を受けて蓄積せず、ホウ酸過剰耐性には機能しない。そこで、私たちは高濃度ホウ酸環境下でも分解されない排出型トランスポーターの同定を目指し、シロイヌナズナに存在するBOR1相同タンパクに注目した。シロイヌナズナにはBOR1と相同性を示すタンパクが6つ（BOR2-BOR7）存在している。このうち、BOR4を過剰発現させる形質転換シロイヌナズナを作出したところ、環境中のホウ

酸濃度に関わらずタンパクが高蓄積していた⁷⁾。これはBOR4が、BOR1が受けるホウ酸濃度に依存した転写後制御の対象ではないことを示している。BOR4過剰発現シロイヌナズナを高濃度のホウ酸を含む培地で生育させたところ、野生型株と比較して大幅な生育改善が見られた⁷⁾ (図1)。野生型株では根の伸長抑制と地上部生育量の減少、クロロフィル含量の低下が見られたのに対し、BOR4過剰発現体では根と地上部ともにホウ素濃度の減少と生育改善が観察され、ホウ酸過剰耐性が付与されたことが分かった。BOR4は植物にホウ酸過剰耐性を付与する初めて同定された遺伝子であり、ホウ酸過剰耐性植物の作出に世界で初めて成功した。

さらに、面白いことにBOR4遺伝子自身のプ

ロモーターでBOR4のGFP融合タンパクを発現する形質転換体を作成したところ、GFP蛍光が根の表皮細胞の遠心側（土壌側）に偏って観察され、BOR4タンパクが極性を持つことが示された⁷⁾ (図2)。BOR4の遠心側への極性は方向性を持った輸送に寄与し、毒性を示す高濃度のホウ酸を効率的に体外へ排出するために貢献しているものと考えられる。

また、同時期にオーストラリアの二つの研究グループより、オオムギとコムギのBOR相同遺伝子がクローニングされ、そのmRNA発現量とホウ酸過剰耐性に品種間で正の相関が見られることが報告された^{8,9)}。これは、BOR相同遺伝子が作物においてもホウ酸過剰耐性に機能していることを強く示唆している。

野生型株 BOR4過剰発現体 (L12)

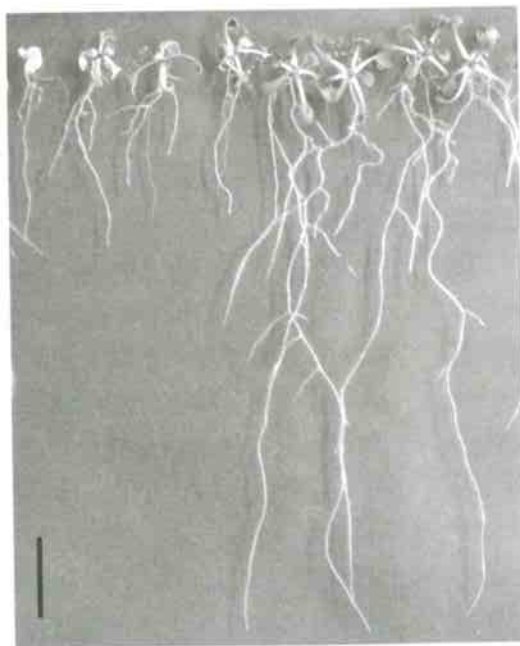


図1 BOR4過剰発現によるホウ酸過剰耐性付与

野生型シロイヌナズナ(左4株)とカリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター制御下でBOR4を過剰発現する形質転換体(ライン12, 右4株)。4mMのホウ酸を含む固形培地で12日間生育させた。BOR4過剰発現体では野生型株と比較して大幅な生育改善が観察された。スケールバー10mm。



図2 BOR4の遠心側細胞膜への極性

BOR4プロモーターでBOR4-GFP融合タンパクを発現させた形質転換シロイヌナズナを観察した。GFP蛍光は根の表皮細胞の遠心側（土壌側）細胞膜に強く観察された。スケールバー50 μm 。

6. 今後の展望

BOR相同遺伝子は植物一般に広く存在しており、低ホウ酸環境で必要なホウ酸を運ぶBOR1タイプとホウ酸過剰環境で毒性を示すホウ酸を体外へ排出するBOR4タイプとに機能分化していると考えられる。BOR4タイプの遺伝子の過剰発現方法の作物への応用や、分子育種のマーカーとしての利用による効率的な品種選抜を通じて、ホウ酸過剰土壌での生産性向上への貢献が期待できる。

輸送タンパク質は物質を運ぶ機能を持ち、植物体への物質の取り込みや排出、細胞内局在を制御する分子である。今後、植物の輸送タンパク質の基質特異性や親和性、発現の改変を通じて、不良環境耐性作物の分子育種の発展がさらに期待される。

文献

- 1) Nable, R.O. et al. (1997), *Plant Soil*, 193, 181-198
- 2) Cartwright, B. et al. (1984), *Aust J Soil Res*, 22, 261-272
- 3) Takano, J. et al. (2002), *Nature*, 420, 337-340
- 4) Takano, J. et al. (2005), *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 12276-12281
- 5) Miwa, K. et al. (2006), *Plant J*, 46, 1084-1091
- 6) Hayes, J.E. et al. (2004), *Plant Physiol.*, 136, 3376-3382
- 7) Miwa, K. et al. (2007), *Science*, 318, 1417
- 8) Sutton, T. et al. (2007), *Science*, 318, 1446-1449
- 9) Reid, R. (2007), *Plant Cell Physiol.* 48, 1673-1678

◀国内情報▶

低濃度エタノール水溶液を用いた 新しい土壤消毒法の開発

独立行政法人 農業環境技術研究所
有機化学物質研究領域
小原 裕三

連作に伴って発生する土壤病害虫を防除するため、化学的、物理的、生物的、耕種的な手段による種々の防除方法が、鋭意検討され、実践されてきたが、効果や安全性の面でさらに改善が求められていた。我々は、新たな土壤消毒技術として、エタノールを水で2%程度かそれ以下の濃度に薄めて、畑土壤が湛水状態になるまで処理した後、農業用ポリエチレンフィルムで土壤表面を1週間以上覆うという低コストで簡便な技術を開発した。これは新たな土壤消毒技術として実用化が期待できる。

1. はじめに

わが国では、農耕地における連作に伴って発生する土壤病害虫を防除するため、臭化メチルによる土壤くん蒸消毒が広く行われてきた。特に、ピーマン、トマト、メロン等に代表される我が国の園芸農業は、臭化メチルを用いることで連作障害を回避し、集約的生産体系を今日まで維持してきたと言える。しかし、臭化メチルはオゾン層破壊物質であり、モンリオール議定書締約国会議において、日本を含む先進国では、代替不可能な一部の用途（不可欠用途）を除いて2005年に使用が禁止された。UNEP（United Nations Environment Programme：国連環境計画）の下部機関であるTEAP（Technology & Economic Assessment Panel：技術・経済評価委員会）・MBTOC（Methyl Bromide Technical Options Committee：臭化メチル技術選択肢委員会）は、不可欠用途においても2013年で完全に撤廃すべきであるとの削減案を提示した¹⁾。現在認められている日本における不可欠用途は、ショウガ根茎腐敗病、メロンのえそ斑点病とモザイク病、キュウリとスイカの緑斑モザイク病、トウガラシ類のモザイク病等、臭化メチルの規制以前の適用作物と適用病害虫に比較してごく限られた用途である。代替技術があるとされている

KOBARA Yuso

〒305-8604 茨城県つくば市観音台3-1-3

適用においても、必ずしも経済的な実行可能性と臭化メチルに比較して十分な消毒効果が得られているとは限らない。このような状況下、臭化メチルに替わり得る新たな土壤消毒技術が求められている。

代替技術として、代替薬剤の適用（化学的防除）、太陽熱や熱水、蒸気消毒（物理的防除）、生物農薬や拮抗微生物の探索・導入（生物的防除）、病害抵抗性品種および抵抗性台木の導入、アブラナ科植物の鋤込み、完熟堆肥の施用、菌根菌の接種や輪作（耕種的防除）の単用あるいは組み合わせなど、開発と普及が鋭意進められている。しかし、これらの代替技術によっても、防除効果と効果の安定性、環境への影響、また経済性等の観点から、現状において完全に代替することは困難な状況にある。

我々が開発を行ってきた低濃度エタノール水溶液を用いた土壤消毒技術は、海外から輸入される粗留の原料アルコール（エタノール）の蒸留精製時に生じる副生アルコール、もしくは原料アルコールを水で2v/v%（体積濃度）程度もしくはそれ以下に薄めて、灌水装置により畑土壤が湛水状態になるまで処理した後、農業用ポリエチレンフィルム（農ポリ）で土壤表面を1週間以上被覆するという簡便かつ低コストの技術であり²⁾、臭化メチルの代替となる土壤消毒技術の選択肢の一つとして実用化が期待される。

本成果は、(独)農業環境技術研究所、千葉県農業総合研究センター、日本アルコール産業株式会社と研究契約を結んで、取り組んだ成果である。

2. 低濃度エタノール水溶液を用いた土壤消毒法の概要

農業従事者の高齢化が進むなか、優れた土壤消毒効果があったとしても、これまで以上の労力や経済的負担を強いるような技術は、容易には受け入れられず普及しない。また、土壤消毒に関して欧米諸国と最も異なる点は、欧米諸国では土壤消毒を生業とする専門業者が大型のくん蒸機械を用いて土壤消毒処理を行なうのに対して、日本では栽培農家自身が土壤消毒処理を行なっている点である。そのため、栽培農家にも容易に導入が行えるよう、初期投資が不要で低コストの土壤消毒技術が必要である。

新規土壤消毒資材として多くの物質のスクリーニングを行った中で、エタノールは生物活性が小さく、土壤中での拡散性も小さいため、必ずしも有望な資材ではなかった。これは、一般的な消毒用エタノール(別名：消毒用アルコール)が、15℃でエタノールを76.9~81.4v/v%含有していることから明らかである。最も殺菌効果があるとされている濃度は、79v/v%付近

であることから容易に理解できる。無水エタノール(99.5v/v%以上)を直接畑土壤中に注入した場合には、種々の植物の種子の発芽抑制効果を指標とした試験で、他の土壤消毒剤と比較しても10倍量以上必要であり、実用的なものではなかった。しかし、ヒト等への毒性に関する情報の豊富さ(低い毒性)や、環境中で容易に分解され消失する(環境残留性が小さい)こと等、エタノールは多くの利点を有しているため、処理方法の改良によって土壤消毒効果の改善が可能か検討を行った。処理方法の検討を種々行った結果、エタノールを水で2v/v%程度、もしくはそれ以下の濃度に希釈して、灌水装置等により消毒を目的とする深さまで土壤を湿潤状態にした後(図1A)、農ポリで土壤表面を1週間以上覆う(図1B)という簡便な技術で十分に効果が得られることが分かった。また、エタノールは容易に水中で均一化し、プラスチック資材を劣化させる等の影響もないため、予め散水チューブを土壤表面に設置して、農ポリで土壤表面を被覆した後、液肥混入器等を用いて低濃度アルコールを処理する等、手順の変更は容易である。農ポリで被覆する目的は、空気(酸素)を遮断するためと、エタノールと水の蒸発を防ぐためである。また、土壤を十分に低濃度エタノール水溶液で湿潤状態にするための処理量は、畑条件によっても異なるので、



A エタノール水溶液を湛水状態になるまで灌水処理



B 土壤表面を農業用ポリエチレンフィルム等で被覆する

図1 低濃度アルコールを用いた土壤消毒の手順

防除方法	毒劇物の分類	ウイルス	細菌	糸状菌	線虫	土壌害虫	雑草	資材費用/10a
太陽熱消毒		×	○	○	○	○	△	-
熱水・蒸気消毒		△～×	○	○	○	○	○～△	80,000円(灯油)
抵抗性品種(台木)*1		○	○	○	○	×	×	-
対抗植物		×	×	×	△	×	×	-
ダゾメット剤	劇物	×	○	○	○	○	○	30,000円
カーバムNa剤	普通物	×	○	○	○	○	○	21,000～31,500円
D-D剤	普通物	×	×	×	○	○	×	10,000円
クロルピクリン剤	劇物	×	○	○	○	○	△	30,000円
臭化メチル	劇物	○	○	○	○	○	○	65,000円
低濃度エタノール	普通物	-	○	○	○	○	○	60,000円*2

○:効果がある, △:やや効果がある, ×:効果なし

*1一部作物(品種)に限られる。また、全てに有効でない。

*2原料アルコールの輸入価格(平成18年通関統計実績)、副生アルコールの利用によって資材費用の削減が可能

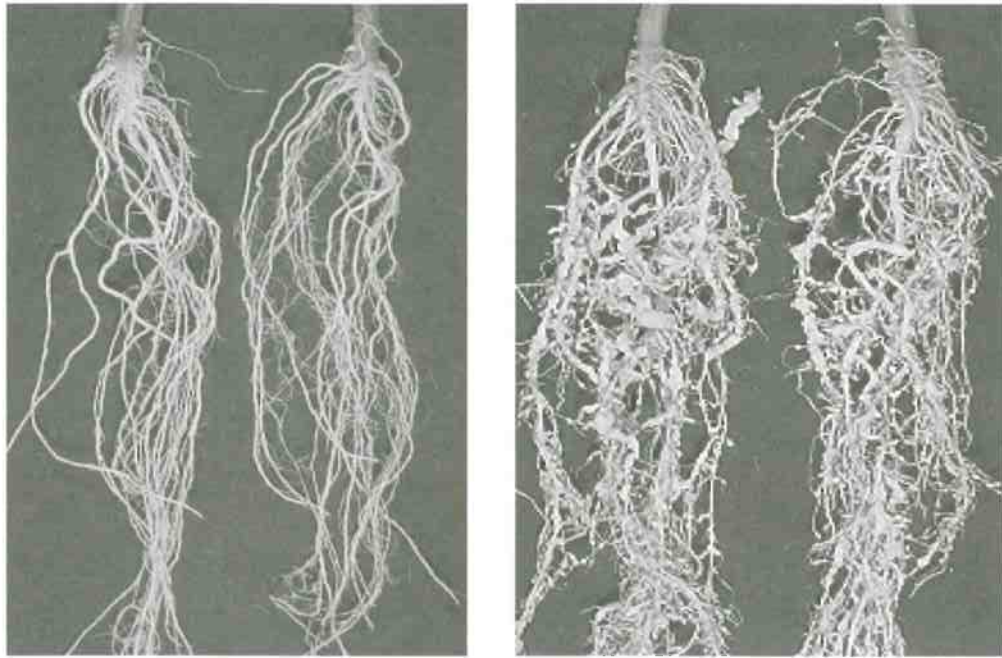
条件に合った処理量を把握する必要がある。また、低濃度エタノールを処理する場合に、灌水処理時に湛水状態とすることで、土壌消毒を意図する深さまで低濃度エタノール水溶液を十分に行き渡らせることが可能であった。

3. 土壌消毒効果の範囲と作用特性

本土壌消毒方法で用いる数%程度の低濃度エタノール水溶液では、エタノールによる殺菌・殺虫効果等の直接的な防除効果は期待できない。これは、キュウリつる割病菌、トマト青枯病菌等を用いた室内実験の結果からも明らかであり、この程度のエタノール濃度であれば短時間で死滅させることは難しく、静菌作用程度の効果しか得られていない。臭化メチルやクロルピクリン、1,3-ジクロロプロペン、メチルイソチオシアネート等が持つ広範囲な適用について、まだ評価ができていないわけではないが、実際に低濃度エタノール水溶液を畑土壌に処理した場合、代表的な作物種と対象病害虫に対し、細菌、糸状菌、線虫、土壌害虫、雑草に至る広い範囲の土壌病害虫に、十分な防除効果が得られている(表1)³⁾。キュウリネコブセンチュウに対しては、1v/v%の低い濃度でも効果が十分得られていること(図2)、また、雑草抑制効果については、0.25v/v%の非常に希薄な濃度でも効果が得られていることが分かる(図3)。

本技術が、土壌病害虫等の防除に有効な理由について、今後、詳細な解析が必要であるが、本技術を適用することで、土壌中の環境が酸化(好氣的)状態から還元(嫌氣的)状態に変化すること(図4)、有機酸濃度が増加することなどが要因として考えられる⁴⁾。これは、土壌の部分殺菌により、土壌微生物全体の内、エタノールに感受性の高い微生物が処理後に死滅し、その死菌体、それから発生した有機物質やエタノールを基質として他の土壌微生物が増殖する際に、土壌中の酸素を消費し、土壌が湛水状態もしくは湿潤状態であることや、かつ土壌表面を農ポリで被覆することで酸素の流入を制限しているため、酸素濃度が下がり、還元状態が発達する。1週間程度で、エタノールに感受性でない土壌生物の内、酸素を必要とするものも死滅させることが可能で、広範な土壌伝染性の病害虫や雑草抑制に効果が得られるものと考えている。また、処理後に酢酸等有機酸の生成を確認しており、この有機酸による副次的な消毒効果も考えられる。

低濃度エタノールを土壌処理した場合に、この濃度領域で常在の土壌微生物のフザリウム菌(*Fusarium solani sens lato*)やトリコデルマ菌(*Trichoderma sp.*)等が特異的に増殖していることを観察した。ここで、増殖した菌類は、植物に対する影響は小さいようである。種々の植物の種子を埋設して雑草抑制効果を評価した結

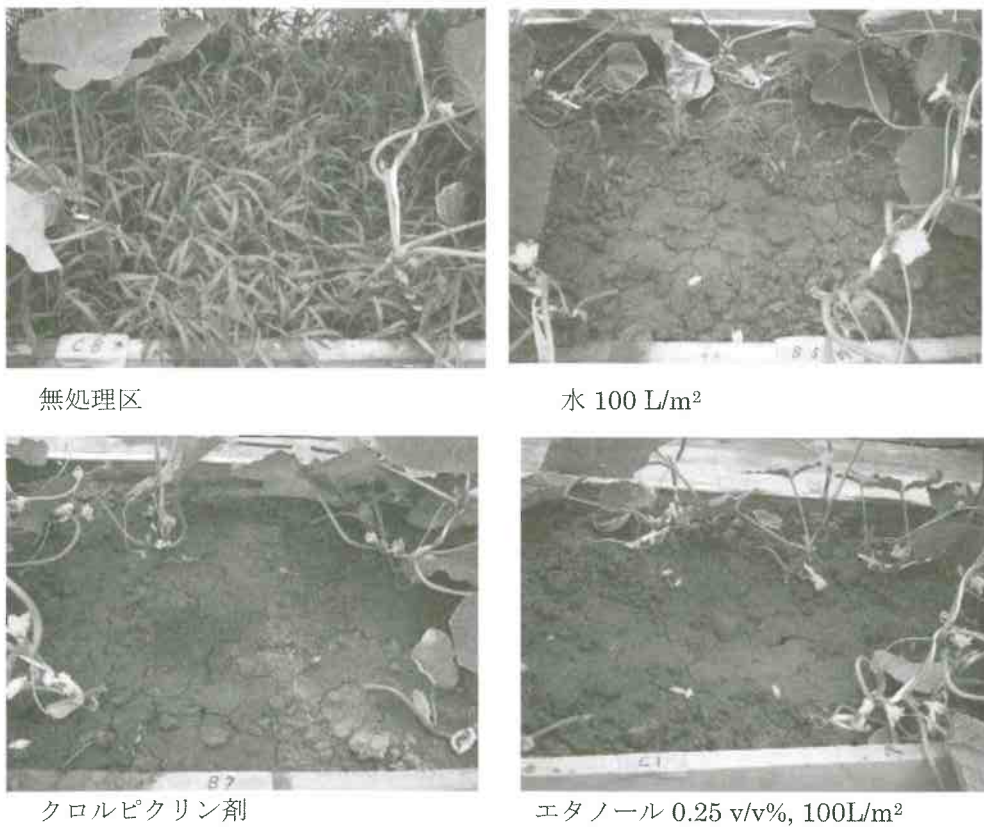


A 処理区 (エタノール1%溶液)

B 無処理区

図2 効果の一例：キュウリ根のネコブセンチュウへの防除効果

エタノール1%溶液で処理した畑で栽培したキュウリ根には、ネコブセンチュウの被害が全く見られない。



無処理区

水 100 L/m²

クロルピクリン剤

エタノール 0.25 v/v%, 100L/m²

図3 雑草の抑制効果の比較

キュウリ定植1ヶ月後

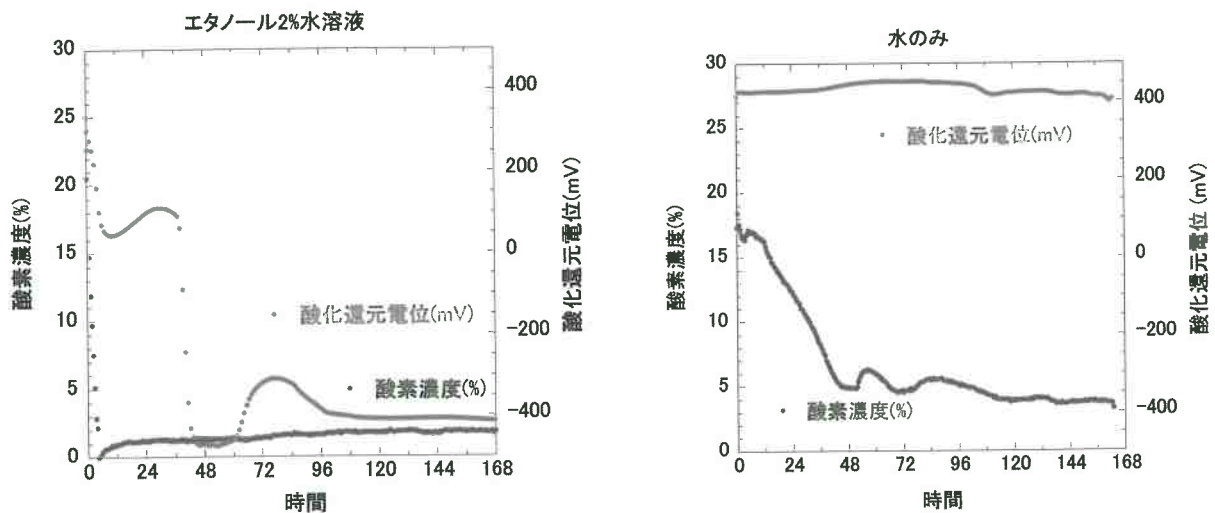


図4 エタノール2%水溶液（左）および水のみ（右）で処理した場合の土壌中酸素濃度と酸化還元電位の推移（農業環境技術研究所内，黒ボク土）

果，これら菌類による雑草抑制効果への寄与もあるようである。いずれにせよ，今後，本土壌消毒技術の詳細な作用機構の解明が必要であり，得られる科学的知見に基づいた土壌消毒法の確立が必要である。

4. 土壌消毒にかかる経費について

原料アルコール（約95v/v%）は，米国，ブラジル，タイ，インドネシア，中国等から，年間約36万kLが輸入され，価格は50～60円/Lである。この原料アルコールを使用した場合に，1v/v%エタノールを100L/m²の処理量で処理すると仮定した場合に，エタノール資材の費用は，60,000円/10aである（表1）。ここでの計算は，エタノールの処理量を過剰に見積もっているが，エタノール濃度を半減することができれば30,000円/10aとなり，また，処理量を減らすことが可能であればさらに経費の削減は可能である。また，原料アルコールの蒸留精製過程で，高濃度エタノールを含有した副生アルコール（約89v/v%）が1%程度生じている。この副産物を有効に利用することができれば，さらに経費の削減は可能であり，他の土壌消毒技術と比較しても，経費面で十分に利点がある。

5. おわりに

エタノールは，土壌中では数日で分解消失し，環境への負荷が小さく，また，ヒトに対する毒性データも十分に得られており，安全性の高い技術である。フスマや糖蜜を用いた土壌還元消毒法が鋭意実施されているが，至適温度条件，臭気等の問題点があり，適用が制約されることがあった。本土壌消毒技術では，これらの問題点が改善される可能性がある。しかし，本土壌消毒技術には，まだまだ検討しなければならないことが多く残されており，例えば，処理するエタノール濃度や処理量の至適化等，処理方法の検討，防除・作用機構の解明，適用を目的とする作物・病害虫への効果の確認と実証，土壌消毒から収穫まで，さらに次作への効果の持続性の評価，薬害の確認等，実用化までに多くの課題が残されている。

文献

- 1) Methyl bromide Technical Options Committee (MBTOC) Reports
<http://ozone.unep.org/teap/Reports/MBTOC/index.shtml>
- 2) 小原裕三ら (2007) PCT/JP2007/000472 「土

壤還元消毒方法，土壤還元消毒剤，土壤湿潤化消毒方法，土壤湿潤化消毒剤および土壤消毒剤灌注システム」平成19年4月27日

- 3) Uematsu, S. *et al.* (2007) Proceeding of 2007 Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions: 75.1-75.2.
- 4) Kobara, Y. *et al.* (2007) Proceeding of 2007 Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions: 74.1-74.2.

◀国内情報▶

通電処理による鶏胸肉の 物性と食味性の向上技術

¹麻布大学 獣医学部, ²株式会社 前川製作所
坂田 亮一¹・押田 敏雄¹・辻 聡²・樋口 清志²

「当日と鳥の当日出荷」の正肉流通を生かし、本来鶏の胸肉が持っている「保水性」「旨み」を十分に保持させ、かつ「軟らかさ」が安定した品質になるように通電処理を行い、肉質に影響を与える死後硬直を早く通過させ、より良い肉質の状態を除骨することにより解決しようとした。軟らかさ、加熱保水性、核酸関連物質等の評価および官能評価を行ったところ、通常胸肉に比べ硬さおよび保水性で良好な結果が得られ、官能評価においても「軟らかく」「ジューシー」な結果となり、肉質改善効果が明確となった。この技術は、鶏肉のみならず他の畜肉に適用する可能性が示唆される。

1. はじめに

近年、と体のまま熟成させた鶏肉製品が市場に出回るようになったが、未だ市場に定着するには至っていない。鶏肉の熟成に関わる物性や微生物学的評価についての報告もあまり見られない。また、わが国では他国と比べ鶏の腿肉の消費割合が多いが、それは腿肉がもつジューシーさが消費者に好まれるからである。一方で、鶏の胸肉はバサバサ感があり、日本では安価で取引されているが、本来胸肉が持っている「旨み」を十分に保持させ、かつ「軟らかさ」が安定した品質になるような生産技術の確立が重要

である。

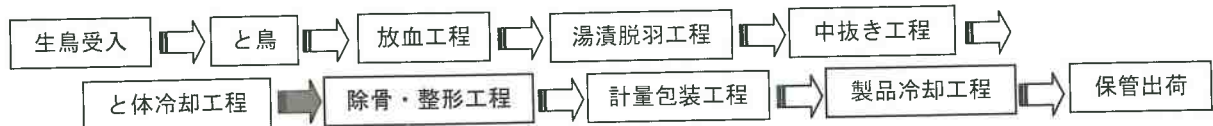
これまで、通電処理を行うことで、硬さやと体表面菌数にどのような変化が生じるかを検証し、物性の変化について報告した¹⁾が、生産管理、作業環境の安全、イニシャルコストの増大など問題も上げられた。

本試験ではこれらの問題点を解決するために、通電処理方法を導入した試験装置をあらたに開発し、電気による鶏胸肉の熟成促進効果について、さらに官能評価、クッキングロス、物性などを調べ、美味しさの向上に関する検討を行った。

2. 試験方法

(1) 試験処理区

対照区：と体冷却後、すみやかに除骨処理した胸肉。



SAKATA Ryoichi¹, OSHIDA Toshio¹, TSUJI Satoshi², HIGUCHI Kiyoshi²

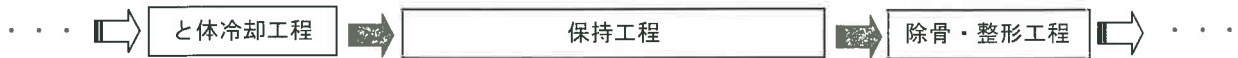
¹〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71

²〒135-8482 東京都江東区牡丹2-13-1

通電処理区：と体冷却後，3 分間通電処理を行い冷蔵庫にて 2 時間保持した後除骨した胸肉。



低温熟成区：と体冷却後，冷蔵庫にて 18 時間保持の後，除骨した胸肉。



(2) 通電処理装置

図 1，2 の試験装置を用いて，鶏胸肉の通電処理を実施し，従来法との比較検討を行った。装置の機能は投入部～排出部まで4つのセクションに分かれている。まず冷却後の中抜きと体を装置に懸けると，足首および肩口に針が刺さり，低電圧で3分間通電が行われる。その後，と体より針が抜け装置より排出される仕組みとなっており，中抜きと体を装置に懸ける他はすべて自動的に処理できる装置である。また，通電処理の方法については筋肉生理学に基づいて試験を重ね，導き出した条件を採用した。電圧については，以前はと体表面に通電させ筋肉を動かしていたことから，死後硬直促進を行うのに100V必要であったが，針を刺すことで20Vに減少でき，低電圧条件下で同等の効果が確認できた。

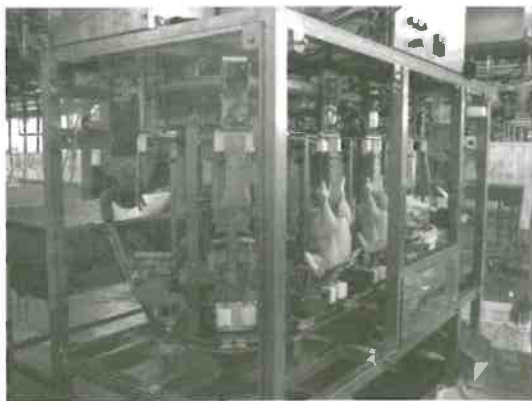


図 1 通電処理装置の外観

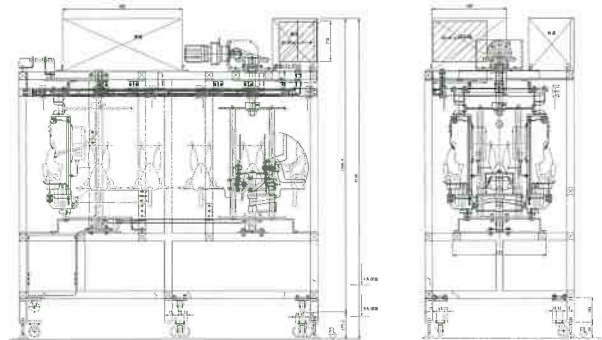


図 2 通電処理装置の概要図

(3) 評価方法

肉質の評価は，と鳥当日，および製品にして 0～2℃で3日間保持後に行った。

①肉の硬さ（剪断力）

鶏胸肉を加熱処理した後，20mm(W)×20mm(L)×10mm(H)に整形したものを試料とした。測定装置はテンシプレッサー My Boy System（タケトモ電機）を使用した（図3）。

②加熱保水性（クッキングロス）

予め重量測定した鶏胸肉を脱気包装し加熱した後，肉の表面の水分をキッチンペーパーで拭き取って再び重量測定し，保水量を算出した（図4）。

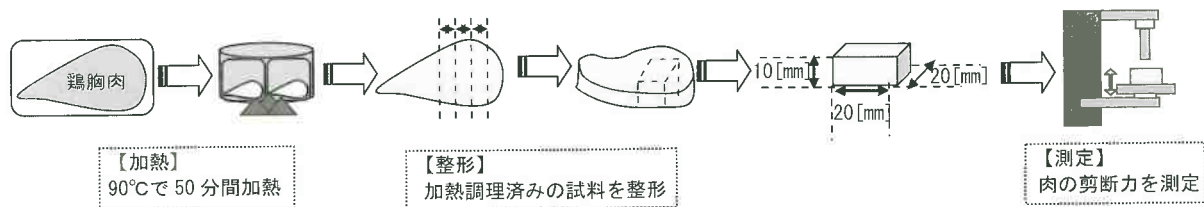


図3 肉の硬さ測定フロー図

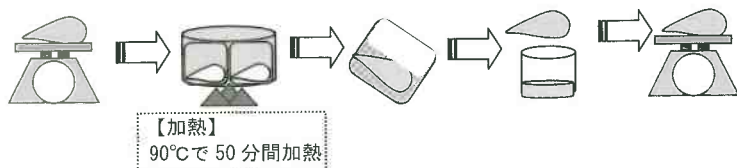


図4 肉の加熱保水性測定フロー図

③組織観察

生鶏胸肉をメスで切り出し、脱水処理後、樹脂包埋法にて組織を固定化したものを切片としてHE染色をした後、光学顕微鏡にて観察した²⁾。

④食味官能試験

生鶏肉の最大消費期限であると鳥後3日目における胸肉を90℃で10分間加熱したものを試料として、「軟らかさ」「ジューシー感」および「総合評価」の項目でパネラーは40名、7段階評点尺度法を用いて官能試験を実施した。

なくなり、3日後も対照区および低温熟成区と比較して、通電処理区はクッキングロスが少なく(図6)、すなわちジューシーであった。

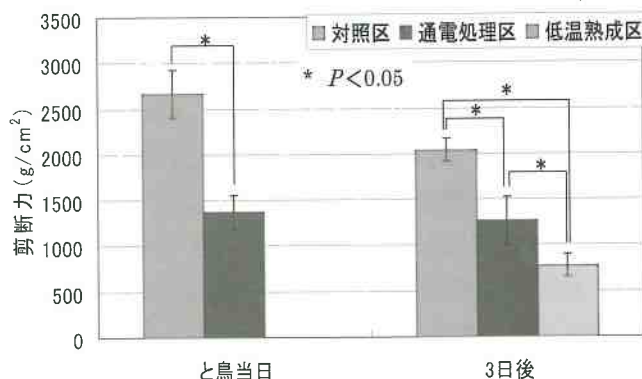


図5 各処理区における鶏胸肉の剪断力の比較

3. 試験結果

①肉の硬さ (剪断力)

通電処理区の水の硬さは、通常の処理(対照区)と低温熟成区との中間の値を示した(図5)。その理由として、通電処理で強制的に筋肉を収縮させることにより、ATPが減少し、死後硬直期までの時間を短縮しているためと考えられる。

②加熱保水性 (クッキングロス)

通電処理肉は、通常の処理(対照区)に比べて鳥当日はクッキングロスが少

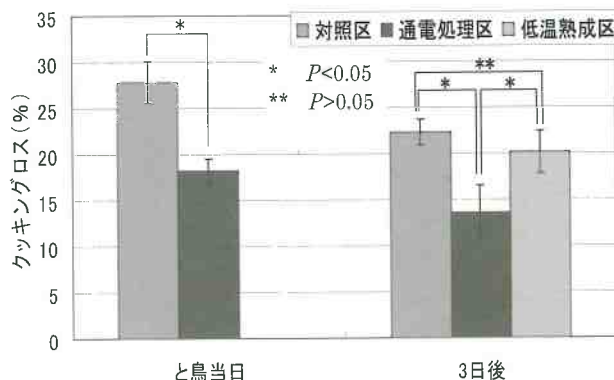


図6 各処理区における鶏胸肉のクッキングロスの比較

③組織観察

光学顕微鏡にて各処理区の組織を観察した結果（図7），日数が経過するごとに筋線維間の細胞間隙が明確となることが認められた。

④官能試験

官能試験の結果（図8）から，対照区と通電処理区で明確な違いがみられ，通電処理の有効性が明らかとなった。このことから，物性試験

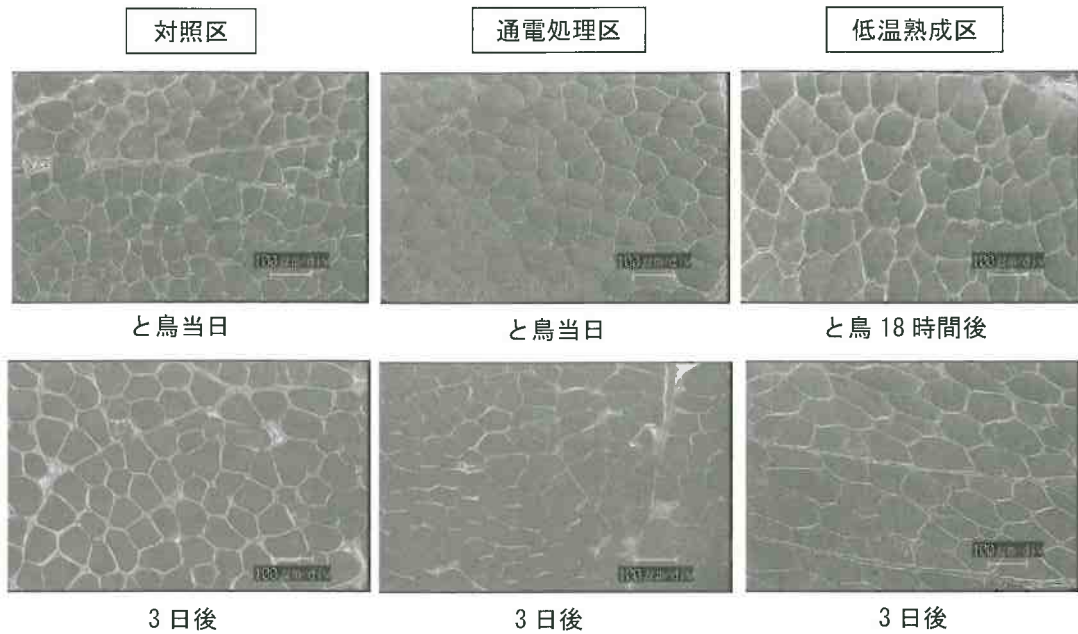
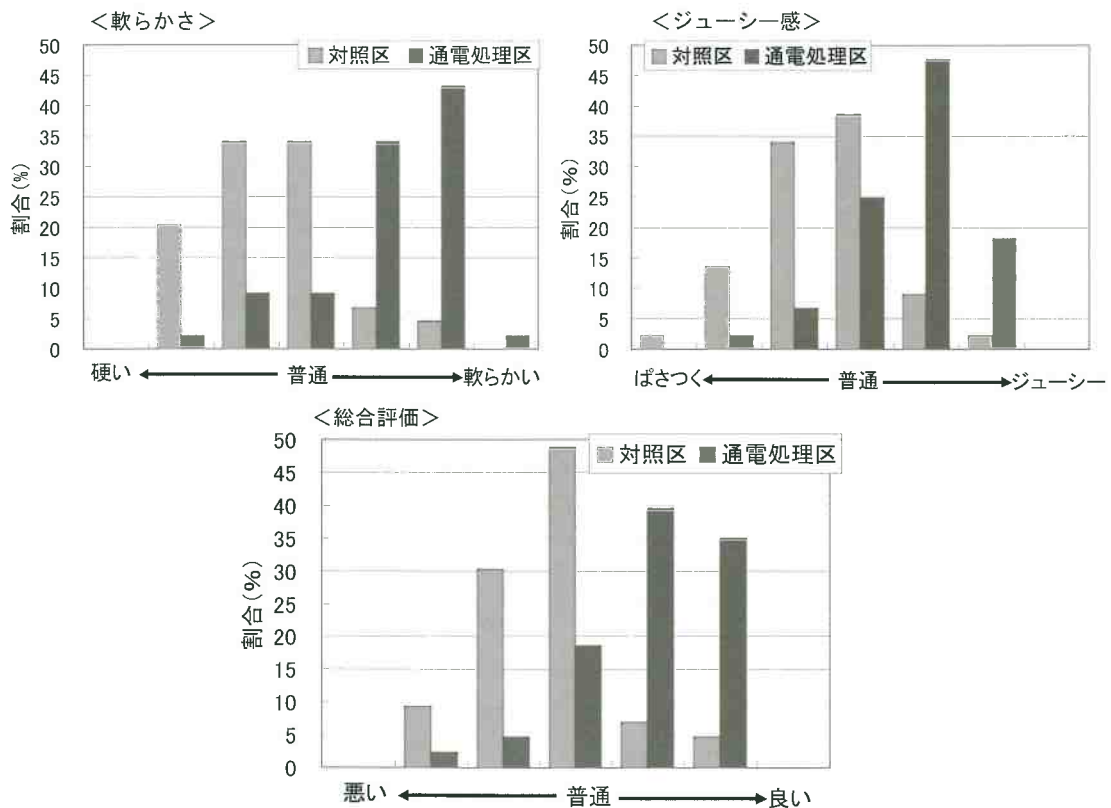


図7 各処理区における鶏胸肉の筋繊維の顕微鏡写真



※「軟らかさ」「ジューシー感」「総合評価」ともに $P < 0.05$ で有意差あり

図8 各処理区における鶏胸肉の官能試験結果

での剪断力およびクッキングロス等可食状態での評価と実際の官能試験の結果がほぼ一致しており、通電処理の有効性が示唆された。

4. おわりに

本試験でブロイラーの中抜きと体を通電処理し、一定時間保持した後、肉質評価を行った結果、「軟らかさ」および「保水性」で肉質改善効果が認められた。このことにより、「軟らかく」かつ鶏胸肉本来の旨み成分であるイノシン酸をより多く含み、かつ「ジューシー」な鶏胸

肉が得られるシステムの構築が可能となる。さらに、このシステムの導入により「当日と鳥当日出荷」が可能となることで、鶏肉の品質と生産性が確保でき、新しい味覚の創出につながり、また国産胸肉の消費拡大が期待される。

文 献

- 1) Sakata R. et al., (2006), *Fleischwirtschaft-International*, 3/2006, 51-52.
- 2) 鈴木 惇(1999), *食品・調理・加工の組織学*. 田村咲江監修, 学窓社, 東京, 99-108.

◀国内情報▶

果樹園用せん定枝粉碎搬出機の開発

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
 生物系特定産業技術研究支援センター 園芸工学研究部
 金光 幹雄・太田 智彦・山本 聡史

リンゴやナシのせん定枝を効率的に拾い上げて粉碎する拾上げ式と、従来機に比べ低騒音で粉碎できる投入式の2方式のせん定枝粉碎搬出機を開発した。拾上げ式は、園内に幅1m程度に置いたせん定枝を機体中央方向に掻き寄せ、拾い上げて、粉碎し、網袋へ収容する歩行型作業機で、作業能率は2~3h/10aである。投入式は、園内で作業者がせん定枝を集めてホッパに投入すると、2軸カッタで粉碎し、スクリュコンベヤで搬送し、収容する。作業員2名での作業能率は3h/10a程度であり、作業員耳元騒音レベルは86dB程度と小さい。

1. はじめに

リンゴ園やナシ園で発生するせん定枝を効率的にチップ化する「せん定枝粉碎搬出機」を開発した。せん定枝は、園内に放置すると草刈り作業の邪魔となり、また、白紋羽病などの発生要因となるため、ほ場から除去する必要があるが、その収集・運搬には多大な労力を要しているのが現状である。また、混住化等に伴う野焼きの抑制への対応やバイオマスの有効利用の観点から、除去したせん定枝は、チップ化して堆肥等として再利用・再資源化することが望まれている。このため、次世代農業機械等緊急開発事業のもとで、(株) I H I シバウラ、(株) 氏家製作所、文明農機(株)と共同で開発した。

2. 開発の背景とねらい

リンゴ園やナシ園では、樹種、樹齢、品種、仕立て方、せん定の方法等によってせん定枝の発生量は異なるが、年間約200~800kg/10aのせん定枝が発生する。リンゴやナシのせん定枝を、園内に放置したり土中に埋め込むと白紋羽病の原因となると考えられており、予防のため焼却処分が推奨されてきた。せん定枝の園外への搬

KANAMITSU Mikio, OOTA Tomohiko, YAMAMOTO Satoshi

〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

出作業では、長く曲がった枝や分かれた枝を一定の長さに切り結束して搬出され、20h・人/10a程度と多くの労力を要している。

平成13年4月には産業廃棄物処理法が改定され、野焼きが禁止された。果樹のせん定枝の焼却処分については、農業者が営農上やむを得ず焼却することは例外規定として認められている。しかし、近年、焼却処分が困難な情勢にあり、特に都市近郊においては、条例により焼却処分が禁止されている地域もある。ここでは、せん定枝を細かく粉碎するチップの利用が見られる。果樹のせん定枝用に利用されるチップは粉碎部が3,000rpm程度で高速回転する機種が多く、それらは作業時の耳元騒音が110dB程度と大きく、作業員の大きなストレス要因となるとともに、付近の住民への影響も危惧されている。また、作業員がせん定枝を供給する時に、供給ローラの間隙から粉碎された枝の破片が飛び出して危険な場合があり、改善が要望されている。

一方、産業廃棄物処理場や木材ペレット製造プラント、せん定枝堆肥化センター等では大型定置式電動2軸カッタ等が利用されている。また、街路樹や公園の管理業者等を対象に、ゴミ収集車(パッカー車)に似た外観で、トラックに2軸カッタ、収容装置を搭載したせん定枝粉碎処理車が市販されている。しかし、果樹園内作業に使える仕様のもものは市販されていない。

そこで、果樹のせん定枝を拾い上げて、粉碎し、収容及び搬出ができるせん定枝粉碎搬出機の開発を目標とし、わい化リンゴ園と棚栽培ナシ園を主な対象として、効率的に拾い上げて粉碎する拾上げ式と、高能率で従来機に比べ低騒音で粉碎できる投入式の2方式を開発した。

3. 拾上げ式せん定枝粉碎搬出機の開発

せん定作業時に園内の樹列間に幅1m程度の列状に置いたせん定枝を、拾い上げ、粉碎し、網袋に収容する拾上げ式せん定枝粉碎搬出機を開発した。

1) 構造と作用

拾上げ式の構造を図1に示す。拾上げ式は、搔寄せ部、拾上げ部、搬送部、粉碎部、収容部等からなる。本機はまず、事前に作業者が園内の樹列間に幅1m程度の列状に置いたせん定枝をスクリュ式搔寄せ装置で機体中央方向に集め、2軸水平円盤式拾上げ装置で拾上げる。その後、搬送ローラで搬送し、作用幅255mmのシリンダカッタで粉碎してスローワで排出し、粉碎したチップを容量約60Lの網袋に収容して搬出する。なお、機体前部で拾い残したせん定枝

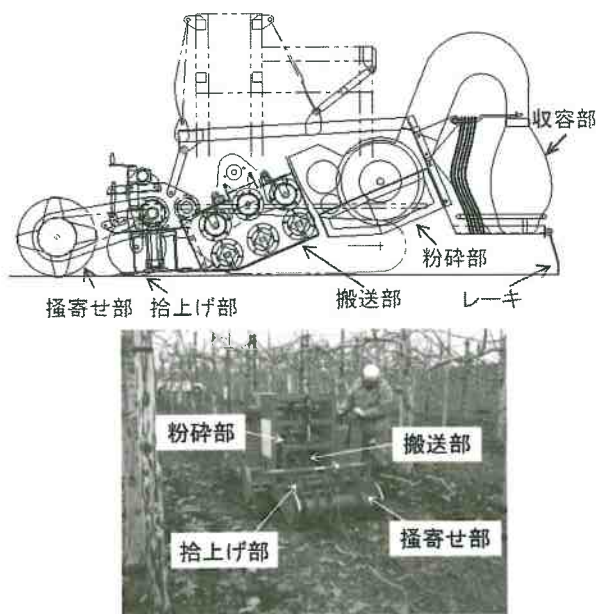


図1 拾上げ式の構造

は、機体後部に備えたレーキでは場端まで掻き集める。レーキでは場端に掻き集めたせん定枝は再度拾上げチップ化して袋に収容する作業を行う。走行速度はHSTにより無段階で調節できる。搔寄せ部、拾上げ部、搬送部は油圧モータで駆動しており、過負荷時には自動停止し、レバー操作で容易に正逆転できる。

2) 作業性能

ナシ園での作業能率はせん定枝量454kg/10aの条件で2.2h/10aであった(図2)。

リンゴ園で、園内で集めて樹列間に列状に192~619kg/10aのせん定枝量の条件で、作業速度0.03~0.07m/sで作業した結果、拾上げ率は60~83%であった。また、全せん定枝量に対する網袋収容チップとレーキでは場端まで掻き集めたせん定枝の合計質量割合(収集率)は91~98%であった。なお、掻込み速度の影響は明らかでなかった。

リンゴ園での作業能率は、せん定枝量214~767kg/10aの条件で、1.1~2.9h/10aであった(図2)。チップの形状は幅19mm、長さ15mmで容積重420kg/m³程度であった。

4. 投入式せん定枝粉碎搬出機の開発

園内で間欠的に移動しながら、作業者が周りのせん定枝を収集してホッパに供給すると、せん定枝は供給部で前処理し、粉碎部でチップ化して、排出部で搬送し、収容部で網袋に収容し

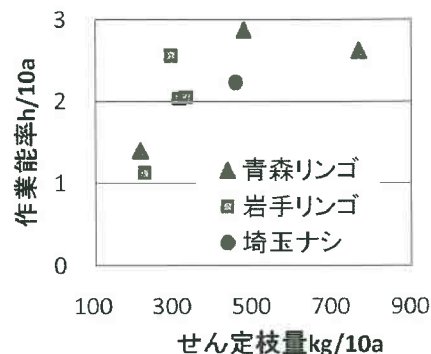


図2 拾上げ式の作業能率

て搬出する投入式せん定枝粉碎搬出機を開発した。

1) 2軸カッタの形状・寸法の検討

2軸カッタは、互いに内向きに回転する2軸に取り付けた回転刃の爪刃によりせん定枝を内部に引き込み、回転する刃の外周エッジ間に連続的に作用するせん断力及び爪刃の先端と軸の間に断続的に作用する圧縮力により切断し、2軸間に断続的に作用する圧縮力によって押し潰す作用がある。2軸カッタ形状についてせん定枝の引き込み具合や粉碎所要動力、せん定枝チップの粉碎具合等が異なることから、外径158mmで爪刃のすくい角及び背面角が異なる3タイプの形状のカッタを試作し、ウメのせん定枝(含水率15~21%)を供試して粉碎時の瞬間所要動力を測定した。すくい角30°背面角30°では、爪刃が鋭角すぎ、引き込み作用が不足した。直径2.5cm以上の枝では、切断抵抗が大きく、過負荷状態となり粉碎できなかった。すくい角45°背面角45°及びすくい角30°背面角60°では、引き込みは良好で、2軸間の圧縮力によるせん定枝チップの組織破碎が観察され、直径2.5cm以上の枝もほとんど粉碎できた。太さ30mm×24mmの角材(スギ)を2本ずつ用いて、粉碎所要動力を比較した結果、すくい角30°背面角60°では4.4kW、すくい角45°背面角45°では、6.0kWであった。更に動力の軽減を図るには2軸間でせん定枝が圧縮される作用を弱めることが有効と考えられ、2軸カッタの刃幅を20mmから40mm、刃数を16枚から12枚、刃の枚数を4枚/軸から2枚/軸、刃高を9mmから15mmに改造した。なお、刃の外径158mm、開口幅160mmは同じである。改良前後の2軸せん断刃について、1本のリング枝を粉碎する時の瞬間最大動力をみると、改良により粉碎時の瞬間最大動力は、例えば枝径40mmでは、11kWから7kWへと35%程度減少した。枝径40mm程度までは円滑に粉碎され、枝径が太くなるに従い所要動力が増加した。なお、枝径60mm以上の太い枝はせん断刃を正・逆転させる操作が必

要であった。

2) 供給部の検討

2軸カッタはせん定枝の枝径が50mm以上の太い枝は爪刃の引き込み作用不足で滑って処理できないことが観察された。そこで2軸カッタ入り口部に供給部を設けた。供給部は2軸ローラ式で、供給上ローラと供給下ローラで構成され、供給上ローラの外周には割裂き刃と搔込み歯を備えており、割裂き刃は太いせん定枝を縦方向に割る作用があり、搔込み歯はせん定枝を機内に引き込む作用がある。この前処理により、太い枝や枝分かれした枝の2軸カッタへの噛み込みが円滑に行われる。

3) 搬送・収容部の検討

2軸カッタで粉碎したチップを自然落下させ、コンテナに収容すると、コンテナ容量が小さく頻繁に交換が必要であり、ホッパ投入口位置が高くせん定枝投入が難しかった。そこで、チップをスクリュオーガで横搬送し、スローワで放出し、断面形状が4角形のシュータを經由して、容量180L(60kg)程度の網袋へ収容する構成とした。ホッパ投入口を真上に配置したため、ナシ園では長いせん定枝をホッパに投入する時に、せん定枝が柵に当たることがあった。そこで、2軸カッタを斜めに配置し、スクリュオーガとスローワで排出する構成とした。スローワについては、スローワから放出されたチップが、袋へ収容する前で、管の湾曲した部分の壁面に当たり、その衝撃音が大きいことと、せん定枝を多量に処理した時にスローワ部分へチップが詰まるがあった。そこで2軸カッタ下部にスクリュオーガ式排出装置を設けることにより、円滑な搬送が可能となった。なお、180Lの網袋は2人でも運ぶのが難しく、容量60L(20kg)程度のコンバイン粉袋に変更し、拾上げ式と同様に交換用網袋の収納部を設けた。

4) トラクタ装着投入式の概要

(1) 構成と作業方法

トラクタ装着投入式は、作業者が供給したせん定枝を一時的に貯留するホッパ、ホッパ内のせん定枝を一定量掻込みながら搬送すると同時に、30mm以上の太い枝や枝分かれした枝を割る作用を備えた2軸供給ローラからなる供給部、せん定枝を粉碎する2軸カタからなる粉碎部、粉碎されたせん定枝チップを網袋口まで搬送するスクリュオーガ式搬送装置からなる排出部、せん定枝チップを収容する袋（コンバイン用粉袋）を装着する収容部、これらを駆動する油圧装置等で構成されている（図3）。

せん定枝の粉碎作業は、園内をトラクタが間欠移動しながら行う。せん定後に園内に散らばっているせん定枝を、作業者が拾い集め、せん定枝粉碎搬出機の供給ホッパへ投入すると、粉碎処理し、袋に収容する。

（2）駆動方式

実際のせん定枝粉碎作業場面では、多量に処理する枝の中に、対象とする50mmより太い枝が混入することは避けられない。そのような場合は作用部に太い枝が詰まり機械が停止してしまうこととなるが、その時でも機械が破損することなく、しかも、作用部を逆回転させて容易に詰まった枝を排出できるよう、油圧式とした。油圧ポンプは、可変容量式アキシャルピストンポンプ（最大圧力32.2MPa）としトラクタPTO軸からVプーリ、Vベルトを經由して駆動した。油圧モータはラジアルピストンモータ（出力トルク17.4N・m）とし2軸式カタを駆動した。

（3）作用性能

作業者2名で園内を移動しながらの作業能率は、ナシ園でせん定枝量1185kg/10aの時、3.3h/10aであり、リンゴ園では239～822kg/10aのせん定枝量の条件で1.5～2.8h/10aであった（図4）。トラクタ装着投入式について、せん定枝を集めて、ホッパに投入する作業人数を1～

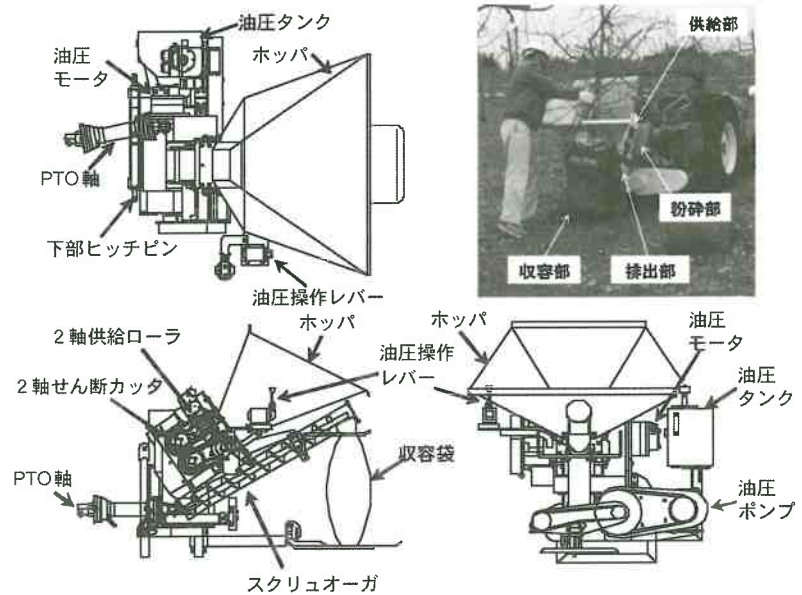


図3 トラクタ装着投入式の構造

4人とした場合の作業能率では、作業人数が4人の場合、せん定枝をホッパに投入する際の待ち時間が多くなり、2～3名の組作業が能率的と考えられる。

予め収集した枝の定置作業での処理能力は、ナシ園で最大640kg/h、リンゴ園で最大440kg/h程度であった。チップの形状は幅21mm、長さ32mmで容積重が340 kg/m³程度であった。また、24kWトラクタに装着し、エンジン回転2000rpmで作業時の作業員耳元騒音レベルは86dB程度であり、従来機と比較して小さい値であった。

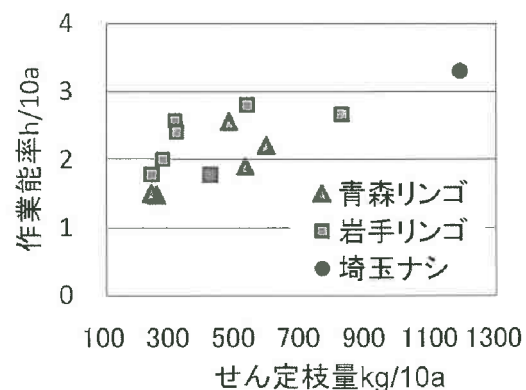


図4 トラクタ装着投入式の作業能率

5) 自走投入式の概要

粉碎したチップの運搬を容易にすることをねらいとして、リフトダンプ式バケツトへチップを収容する自走投入式を試作した。エンジンは18kW (24.5 PS)、全高1.3m、全幅1.5m、全長3.2mとし、バケツト収容量は270L (90kg) で、リフト高さ1.4m、荷下し高さを地上高1.2mとし、棚栽培ナシ園内で動力運搬車の荷台に荷下しができた (図5)。

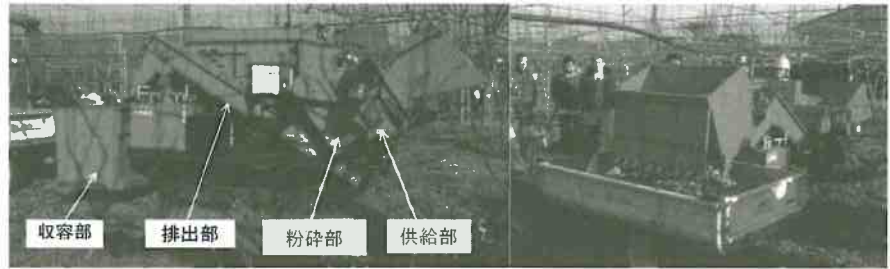


図5 自走投入式の外観及び荷下しの様子

5. せん定枝チップの利用について

シリンダカッタ (拾上げ式) によるリングせん定枝チップは幅19mm、長さ15mm、容積重420kg/m³程度である。一方、2軸カッタ (投入式) によるチップの形状は幅21mm、長さ32mm、容積重が340kg/m³程度でチップは圧縮され割られた状態である。

チップの利用については堆肥化・炭化して園地に還元、マルチ資材としての利用等が考えられる。炭化の例では、容量150Lの金網製容器に乾燥したナシのせん定枝チップを30kg入れ4h燃焼させ、消火16h後に8.3kgの炭ができた。

チップのマルチ利用については、青森県りんご試験場、岩手県農業研究センターでの試験結果によると、リングせん定枝チップをリングの樹冠下に5cmの厚さにマルチすると、生長や果実品質への影響は明らかでなかったものの、抑草効果、水分保持効果が認められた。また、山形県農業生産技術試験場ではリングせん定枝チップをリング樹冠下 (フジ/M9 10年生) に6年間、マルチ的に連年施用しており、紋羽病による被害は見られていないことが報告されている。

6. おわりに

せん定した枝を短く切り揃えて束ね、運び出す慣行作業は、多くの労力を要しているが、開発した拾上げ式及び投入式せん定枝粉碎搬出機を利用することにより、大幅な軽労化、省力化を図ることができる。拾上げ式せん定枝粉碎搬出機を使う際には、せん定作業時に処理できない直径3cm以上の太い枝は主幹周り等に落とすなどして除外し、処理する枝を樹列間の通路に置いておくと、改めて腰を曲げて拾い集める作業が不要となり効率的である。一方、投入式は、直径5cm程度まで、正逆転操作をすれば7cm程度までの枝を処理でき、せん定枝以外のものとして、直径7cm程度までの竹が長いままでも処理可能である。2軸カッタを採用している投入式は低騒音であるため、住宅地に隣接した園地の他、街路樹や庭木のせん定枝処理にも利用できる。

今後は、更に、現地での利用試験を行い、各タイプのコストパフォーマンスを比較・検討した上で、農機メーカーより実用化の予定である。

文 献

- 1) 特開2007-98359 剪定枝破碎作業機
- 2) 特開2007-301527 剪定枝破碎機

◀地域の先端研究▶

カンキツグリーニング病の簡易診断法（スクラッチ法）の開発

沖縄県農業研究センター 病虫管理技術開発班
澤 岬 哲 也

カンキツグリーニング病の感染葉では柵状組織内に多量のデンプン粒が異常蓄積する。その性質に着目し、サンドペーパーとヨウ素デンプン反応を利用した簡易診断法（スクラッチ法）を考案した。スクラッチ法とPCRによるHLB罹病判定結果は、樹および葉あたりともに90%以上の高い一致率を示した。また要素欠乏症状の葉や他病害（CTLV, HSVd）の感染葉では、スクラッチ法による陽性反応は認められなかった。本法の普及により、簡単に圃場での一次診断が可能となり、迅速な伐採防除が実施できる。

1. はじめに

カンキツグリーニング病（Huanglongbing:以下HLB）は、現在、沖縄県および鹿児島県の一部地域で発生が確認されている。HLBの病原菌（‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’）は、師部局在の難培養性細菌であり、ミカンキジラミ（*Diaphorina citri* Kuwayama）によって媒介される。発病樹は葉が黄化し、樹勢衰弱して収量低下および果実の品質低下をもたらすことから、日本本土へと発生域の拡大が進むと、わが国のカンキツ産地に多大な被害を及ぼすことが懸念される（図1）。そのため、HLBは植物防疫法により、特定重要病害虫に指定されており、感染かんきつ類（果実、種子を除く）とミカンキジラミの未発生地への移動が規制されている。本病の防除は、有効な防除薬剤がないため、罹病樹の伐採除去と媒介虫の防除が重要な手段となっている。沖縄県では1997年から特定重要病害虫特別対策事業によりHLB発生状況の全島一斉調査並びに伐採防除指導、啓発普及などの総合的な防除対策を行っている。HLB感染葉の病徴は要素欠乏症や生理障害と類似し、肉眼による識別が困難であるため、発生調査では主に特異的プライマーを用いたPCRによる検定が行われている。PCRは高精度の検定法であるが、核

TAKUSHI Tetsuya

〒901-0336 沖縄県糸満市字真壁820



図1 シークワーシャー罹病葉の症状

酸抽出や機器等の能力により1日の検定数が制限され、県全域より持ち込まれる大量のサンプルを短期間で処理することが困難となる。また、設備や試薬コストが高く、技術者の熟練が要求されるため、限られた研究機関でしか診断できないという欠点がある。そのため、迅速な診断結果が得られず、伐採防除までに時間を要するために罹病樹を長期間放置してしまう状況が生じている。こうした背景から、迅速、簡易に診断できる検定技術の開発が強く求められていた。本稿ではHLB感染葉内に多量のデンプンが異常蓄積する性質に着目し、感染葉と健全葉における詳細なデンプンの定量比較およびサンドペーパーを利用した簡易診断法（スクラッチ法）²⁾の開発と有用性について検討したので紹介したい。

2. HLB感染葉と健全葉における葉内デンプン含量の比較

あらかじめPCR検定によってHLB感染の有無を判定したシークワーシャー (*Citrus depressa*), オートー (*C. oto*), ポンカン (*C. reliculata*) の3種において、ヨウ素比色法³⁾による葉内デンプン含量の比較を行った。その結果、3種の平均は健全葉で85.6 mg/kgであったのに対し、感染葉では514.2 mg/kgと約6倍濃度のデンプンが異常蓄積することが明らかとなった(図2)。またHLB感染葉では、無症状と比較して退緑、まだら退緑および脈間黄化の症状を示した葉でデンプン量の増加が認められた。一方、健全葉における無症状並びに要素欠乏症を示した葉ではデンプンの多量蓄積は認められなかった(データ省略)。このことから、デンプンの異常蓄積はHLBの感染によって起こる現象であることが確認された。また症状の明瞭な葉でデンプン蓄積量も高まることから、症状の進行に伴いデンプン蓄積量も増加していくことが推察された。

3. スクラッチ法

葉内に蓄積したデンプンを簡単に抽出するために、サンドペーパーを用いた。1cm×2cm四方に切り取った耐水性サンドペーパー(＃120)を用いて、葉を破らない程度の強さで採取した葉の表側を削るように20～30回擦った。そのサンドペーパーをビニールパックに入れ、1 mlの水道を添加した。サンドペーパーに付着した表皮組織を水に懸濁するように軽く揉んだ後、0.05Mヨウ素溶液を約25 μ l添加し、水溶液の染色の有無でHLB感染を判定した。判定は水溶液の着色に基づいて行い、HLB陽性は黒色、陰性は黄色およびオレンジ色を示す(図3)。

4. スクラッチ法とPCRにおけるHLB罹病判定の比較

沖縄県うるま市の園地から採取したタンカン葉におけるPCRとスクラッチ法とのHLB罹病判定比較では、調査した24樹78試料のうち、75試料で両検定による判定が一致し、樹あたりおよび葉あたり的一致率はそれぞれ91.7%, 96.2%と高い値を示した。また両検定法ともに退緑、脈間黄化、黄化の症状葉で陽性が検出された。また石垣島中心地に位置する石垣市の園地より

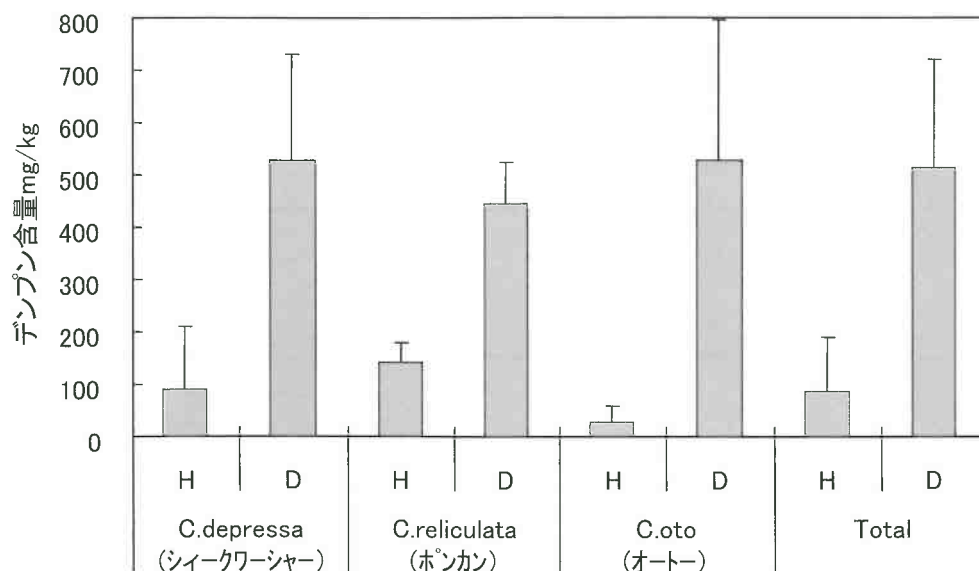


図2 カンキツ葉におけるデンプン含量の比較

H：健全葉，D：HLB罹病葉

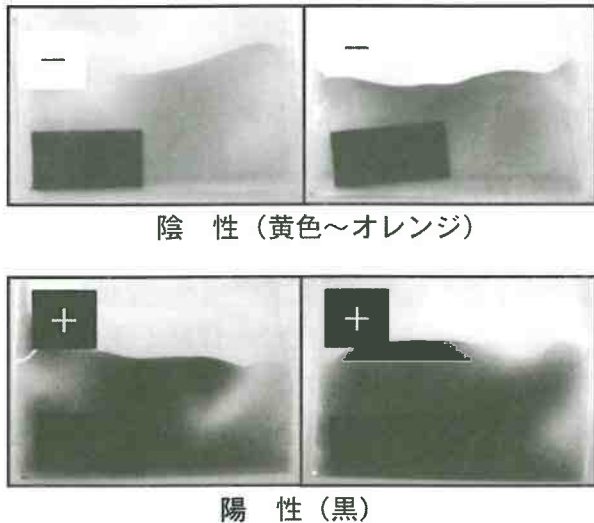


図3 スクラッチ法による判定

採取したタンカン葉における罹病判定比較の結果，調査した7樹20試料のうち18試料で両検定法による判定が一致し，樹あたりおよび葉あたりの一致率はそれぞれ100%，90%と高い値であった。また症状別では退緑，まだら退緑でのみ両検定法による陽性反応が認められた（表1）。CTLV（カンキツタターリーフウイルス）およびHSVd（ホップわい化ウイロイド）感染葉における判定比較では，ボンカンおよび天草のいずれの品種においても，スクラッチ法

による陽性反応は認められず，全ての試料において両検定法による判定が一致した（表2）。

5. おわりに

スクラッチ法は葉の柵状組織内に蓄積したデンプンをサンドペーパーで効率よく抽出して，ヨウ素デンプン反応の原理を利用する点が大きな特徴となっている。粉碎や煮沸がいらないため，1葉を約2分間程度で誰でも簡単に診断することができる。また特別な器具も必要としないため，現在，診断キットを作製して現場への普及を図っている（図4）。本県の特定重要病害虫特別対策事業では，平成18年度から肉眼診断法⁹⁾とともにHLBの圃場簡易診断法として現場機関への導入を開始し，PCRとの併用で効率的な伐採防除に大きく貢献している。HLB感染葉におけるデンプン蓄積のメカニズムについては未だ明らかではないが，師部組織の壊死，収縮が起因となって柔細胞並びに葉緑体内にデンプンが蓄積すると推察されている⁹⁾。これはHLBの病徴発現機構と深く関与していると考えられるため，今後，植物生理分野からの研究アプローチも望まれる。

表1 現地タンカン園におけるスクラッチ法とPCR法によるHLB罹病診断比較

	調査樹数	症状	調査葉数	陽性(+)		陰性(-)		擬陽性(±)		PCRとの一致率(%)	
				PCR	スクラッチ	PCR	スクラッチ	PCR	スクラッチ	樹あたり	葉あたり
うるま市	24	なし	23	0	0	23	23	0	0	91.7	96.2
		退緑	25	1	2	24	23	0	0		
		脈間黄化	23	1	1	22	22	0	0		
		黄化	7	2	2	5	4	0	1		
石垣市	7	なし	5	0	0	5	5	0	0	100.0	90.0
		退緑	8	1	1	7	6	0	1		
		まだら退緑	3	3	3	0	0	0	0		
		脈間黄化	2	0	0	2	2	0	0		
		黄化	2	0	0	2	2	0	0		

表2 HSVdおよびCTLV感染葉におけるスクラッチ法とPCR法によるHLB罹病診断比較

	品種	症状	調査葉数	陽性(+)		陰性(-)		擬陽性(±)	
				PCR	スクラッチ	PCR	スクラッチ	PCR	スクラッチ
HSVd	天草	なし	5	0	0	5	5	0	0
		退緑	10	0	0	10	10	0	0
		黄化	5	0	0	5	5	0	0
CTLV	ボンカン	退緑	10	0	0	10	10	0	0



図4 診断キット

文 献

- 1) Schneider, H. (1968), *Phytopathology* 58, 1155-1160
- 2) 澤岬哲也ら (2007), *日本植物病理学会* 73(1), 3-8
- 3) 杉山泰之・大城 晃 (2001), *日本土壤肥料学雑誌* 72(1), 81-84
- 4) 那須奏美ら (2003), *Proceeding of the 22nd Plant Bacterial Disease Workshop*: 11-19
- 5) 田中彰一・土居養二 (1974), *玉川大農学部研究報告* 14, 64-70

◀文献情報▶

肉用未経産牛における妊娠3日目からのプロゲステロン濃度の上昇が胚の生存性及び胚発育に及ぼす影響

Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers.

F. Carter, N. Forde, P. Duffy, M. Wade, T. Fair, M. A. Crowe, A. C. O. Evans, D. A. Kenny, J. F. Roche and P. Lonergan.

School of Agriculture, Food Science and Veterinary Medicine, College of Life Sciences, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland.

Reproduction, Fertility and Development, 20, 368-375, 2008

人工授精や自然交配における未経産牛の受精率は90～95%であるが、受精から分娩までの間にかなりの割合で胚死滅や胎子死が起こるため、受精1回あたりの分娩率は55%程度にとどまる。胚死滅の多くは妊娠16日までに起こるが、これは、妊娠が成立・維持するために黄体退行機構を無効にするインターフェロントウが作用する重要な時期である。受精直後の循環血中プロゲステロン濃度の上昇が胚の発生率（大きさ）、インターフェロントウ産生量あるいは妊娠率を高めることがこれまでも報告されている。また、動物本来の内因性プロゲステロンに、内因性以外のプロゲステロン（プロゲステロンの連日注射、持続性プロゲステロン放出腔内挿入剤（PRIDやCIDR）の挿入あるいは副黄体の形成）分を加えて、循環血中プロゲステロン濃度を高めることにより、妊娠率を高める試みがこれまでも行われ、妊娠率を高める効果があることが報告されているものの、人工授精後の最適な処置時期等はいまだ明らかではない。高濃度のプロゲステロンによる胚発生の変化は、プロゲステロンによる子宮組織の遺伝子発現の変化によりもたらされると考えられているものの、プロゲステロン濃度が

胚の初期発生に影響を及ぼす時期については明らかではない。そこで、本論文では、妊娠3日目からのプロゲステロン濃度の上昇が、胚の生存性や胚発生に及ぼす影響が検討された。発情同期化した210頭の交雑種肉用未経産牛のうち、約2/3に人工授精を実施した。半数の牛にDay3からとさつまでPRIDを挿入し、1) 高レベルプロゲステロンの妊娠牛、2) 通常レベルプロゲステロンの妊娠牛、3) 高レベルプロゲステロンの非妊娠牛、4) 通常レベルプロゲステロンの非妊娠牛の4群とした。Day3でのPRID挿入により、Day3.5以降、非挿入区に比べてプロゲステロン濃度の有意な上昇が認められた。Day5あるいはDay7においては処理区間の胚の発育ステージに差は認められなかった。有意差はないものの回収された生存胚の割合は、Day13（58対43%）あるいはDay16（90%対50%）において、高レベルプロゲステロン区が高かった。Day13（2.24mm対1.15mm）あるいはDay16（14.06mm対5.97mm）において、高プロゲステロンレベル区の胚の長さが長かった。以上の結果から、Day3でのPRIDの挿入は、血清中プロゲステロン濃度を急速に高め、Day5あるいはDay7における発生には影響しないものの、Day13あるいはDay16における胚の大きさが増加することが明らかとなった。

近年、人工授精における受胎率の低下が問題となっているが、排卵後早期にプロゲステロン濃度を高めることにより、胚発生を促進して受胎率を向上させる可能性が示された。今後、どのような牛群に対して、どの時期にどのような処置を行うことにより、受胎率向上に有効である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▶

シロイヌナズナで見いだされた
減数分裂を伴わない配偶子形成
変異体Gamete formation without meiosis in
*Arabidopsis*Maruthachalam Ravi, Mohan P. A. Marimuthu
& Imran SiddiqiCentre for Cellular and Molecular Biology,
Uppal Road, Hyderabad 500007, India*Nature* Vol. 451, Issue 7182, pp. 1121-1124,
28 February, 2008

植物におけるアポミクシスは受精によらず種子を形成するため、アポミクシスによってできた植物は母本と遺伝的に同一のクローンとなる。そのため、もし、アポミクシスを作物に利用できれば雑種のヘテロ接合性を世代を越えて維持すること可能となり、雑種強勢を育種に利用する上で大きな技術的進展をもたらすと考えられている。アポミクシスでは母本の遺伝子型をそのまま持つ非還元雌性配偶子形成（アポマイオシス, apomeiosis）に続き、卵細胞が単為発生して胚になり胚乳も形成される。しかし、アポミクシスの基盤となる分子メカニズムについてはまだ解明されていない。

著者らはシロイヌナズナの減数分裂における染色体編成の調節遺伝子 *DYAD / SWITCH1* (*SWI1*) における突然変異がアポマイオシスを引き起こすことをこの論文で示した。*SWI1* は減数分裂において娘染色体の接着と動原体の編成に必要な遺伝子である。この *SWI1* の突然変異によって正常な減数分裂の代わりに1回の均等分裂が起こり、その結果、半数性の大孢子が4つできる代わりに2倍性の細胞が2つ作られ、雌性配偶子の形成が異常となる。*SWI1* に突然変異を持つ対立遺伝子 *dyad* は花粉形成には影響を与えず雌性配偶子形成特異的に不稔となる。*dyad* 変異体は不稔ではあるが、1つの植物あたり1~10個ほどの種子をつける。これらの種子を播種し、育てたところ、花のサイズが大きいなど倍数体植物の性質が見られた。そこで、こ

れらの植物の倍数性を調査すると、多くの植物が3倍体であることが判明した。そこで、この3倍体が雌性配偶子によって生じたものか雄性配偶子が複数受精して生じたものかを調査した。種子の大きさが小さい場合は雌性配偶子が2倍性となっていることが原因で3倍体が生じていると考えられ、種子が大きい場合はその逆だと考えられる。調査の結果、雌性配偶子が2倍性であるために3倍体が生じていることが明らかになった。これは、花粉親に抗生物質をマーカーを持つ植物を用いた調査によっても確認された。次に、この2倍性の雌性配偶子がアポミクシスで生じるアポマイオシスのように母本のヘテロ接合性を保持しているかどうかをマイクロサテライトマーカーを用いて調査した。その結果、262個体のうち52個体でヘテロ接合性が失われている個体が存在したが、それらは3倍性ではなく半数性雌性配偶子に由来する2倍性の植物であった。3倍性の植物で、ヘテロ接合性が失われた植物が見つからなかったことにより、2倍性の雌性配偶子では染色体の乗換えが生じないことが示された。この結果は、減数分裂後に染色体が倍加したり雄性配偶子が複数受精して3倍性となったのではなく、アポマイオシスによって形成された雌性配偶子が受精して3倍性植物が生じたことを明確に示すものであった。*dyad* 変異体では、複相胞子 (diplospory) 形成をするアポミクシス植物と同様に大孢子母細胞が均等分裂してできた2つの細胞のうち下側の細胞が雌性配偶子の性質を持つようになる。自然界に存在するアポミクシス植物でも *SWI1* 相同遺伝子の突然変異が関与しているかもしれない。この研究によって、著者らは *SWI1* 遺伝子に生じた突然変異が、アポミクシスの主要な構成要素であるアポマイオシスを引き起こすことを示した。この発見は、通常性のによって生殖を行う植物種の遺伝子进行操作してアポミクシスを起こす上で重要なステップを提示したという意義を持つものである。

(抄訳：久保山勉, KUBOYAMA Tsutomu, 茨城大学農学部)

◀文献情報▶

バクテリアの大きさを制御する
メタボリックセンサーA Metabolic Sensor Governing Cell Size in
BacteriaRichard B. Weart, Amy H. Lee, An-Chun
Chien, Daniel P. Haeusser, Norbert S. Hill,
Petra Anne LevinDepartment of Biology, Washington
University, St. Louis, MO 63130, USA
Cell, 130, 335-347 (2007)

細胞の大きさは生育環境や分化のステージで異なる。細胞周期が厳密に制御されている真核生物ではWee1やCdc25といったタンパク質が細胞の大きさに大きく関与することが明らかとなっているが、DNAの合成・分配と細胞分裂がオーバーラップして起こる原核生物ではどのような因子によって細胞の大きさが制御されているのか明らかになっていなかった。一方、枯草菌や大腸菌、サルモネラは十分な栄養状態で生育している時に比べ、栄養欠乏状態において細胞が小さくなること、枯草菌の大きさは細胞のDNA含量に比例することが知られていた。筆者らはこれまでに、栄養状態の違いによるバクテリアの大きさの違いは、FtsZタンパク質の集合とFtsZリングの形成が関係していること、FtsZリングあたりの細胞の長さは栄養状態に関わらず一定であることを明らかにしてきた。正常な細胞では核様体が分裂した後に細胞中央の分裂部位にチューブリン様GTPaseであるFtsZタンパク質がリングを形成することで正常な細胞分裂が開始される。なぜ、細胞の大きさがFtsZタンパク質の集合とリング形成によって制御され、さらにそれが栄養状態により変化するのだろうか。

筆者らは様々な挿入変異株を作製し、FtsZタンパク質の局在はそのままに、細胞の大きさに影響を与える因子をスクリーニングした。その結果、PgcAタンパク質の欠損により細胞は小さくなり、野生型では一定であったFtsZリングあたりの細胞の長さが栄養状態により変化する

ことを見出した。PgcAタンパク質はグルコースからグルコリピッドを合成する経路においてGlc6-pからGlc1-pへの転換反応を触媒する。このPgcAタンパク質の欠損はFtsZタンパク質の量的変化に無関係であったこと、FtsZタンパク質の集合を阻害するMinCDタンパク質の過剰発現により生じる細胞の生存率低下はPgcAタンパク質の欠損により抑制されたことから、PgcAタンパク質はFtsZタンパク質の集合を阻害することが示唆された。また、pgcA欠損変異株のFtsZタンパク質は核様体が完全に分離していないにもかかわらず分裂部位でリングを形成した。これらのことから、変異体細胞は正常な細胞分裂が誘導されないため、野生型に比べて細胞の大きさが小さくなると考えられた。

次に、FtsZタンパク質の集合阻害にPgcAタンパク質が直接関与しているのか、それともグルコリピッド生合成経路自体が関係しているのかを確かめるために、グルコリピッド生合成経路に関係する他のタンパク質の欠損変異株を作製し、MinCDタンパク質の過剰発現における生存率の低下抑制について検討した。その結果、グルコリピッド生合成経路においてUDP-Glcからテイコ酸を合成する3経路のうち、リポテイコ酸をグルコリピッドに係留する経路に関与しているUgtPタンパク質の欠損変異株のみがMinCDタンパク質の過剰発現における生存率の低下を抑制した。さらに、*in vitro*において組換えUgtPタンパク質はFtsZタンパク質の集合を直接的に阻害した。さらに、UgtPタンパク質は富栄養状態において細胞の分裂部位に局在するが、栄養欠乏状態になると発現量が減少し、分裂部位への局在が見られなくなることが分かった。

これらのことから、富栄養状態ではUgtPタンパク質が細胞の分裂部位に局在することでFtsZタンパク質の集合を阻害し、正しくDNAが娘細胞へと分配されるが、栄養欠乏状態ではUgtPタンパク質の発現量が減少し、その局在も変化するところから、完全にDNAが分配される前にFtsZタンパク質が分裂部位でリングを形成する

ため、細胞が小さくなると考えられる。

細胞の「形」を決める因子は真核生物で多く報告されているが、より形態に多様性のある原核生物での報告は少ない。原核生物はその細胞自身が1つの生命体として様々な機能を発揮し

ているため、この報告以外にも機能と形態との相関性やその制御に関わる因子がまだ存在していると考えられる。今後の進展に期待したい。

(抄訳：安田源太郎, YASUDA Gentaro, カルピス株式会社 健康・機能性食品開発研究所)



第 126 号
2008 年 3 月 15 日発行

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

河野 友宏

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 -

仲下 英雄・安田 美智子・伊沢 剛・栗崎 弘利・篠崎 聡
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

石橋 和太・石川 雅之

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

蓮沼 仰嗣・吉田 雄介・Md. E. ハーク・深松 陽介

植物のアンモニア態窒素吸収機構の機能分担を解明

小島 創一・高橋 秀樹
除菌効果の高い「乳頭清拭装置」の開発

平田 晃・後藤 裕・川出 哲生・阿部 洋平

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

稲田 司

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

(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

(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

(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

(抄訳：橋本 朋子)

生研センターからのご案内

◀文献情報▶

苦味ペプチドに対するヒト苦味
レセプターhTAS2Rsの応答

Bitter peptides activate hTAS2Rs, the human bitter receptors

Kenji Maehashi¹, Mami Matano¹, Hong Wang², Lynn A. Vo², Yasushi Yamamoto¹ and Liquan Huang²

¹Department of Fermentation Science, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan

²Monell Chemical Senses Center, 3500 Market Street, Philadelphia, PA 19104-3308, USA

Biochem. Biophys. Res. Commun. 365(4), 851-855 (2008)

苦味は多くの毒物・腐敗物が有する味であり、生物にとって有害物質摂取に対する防御シグナルとして重要な役割を持つ。しかしヒトにとって苦味はその強さの程度によっては美味しさの中心的要素となり、ビールやコーヒーなどでは好ましい味として感じられる。そのため、苦味のコントロールは食品にとって重要な課題である。チーズや醤油、味噌など発酵食品にはペプチドが多く含まれ、原料タンパク質が熟成中に酵素分解され生成することが知られている。これらペプチドの中には苦味を有しているものがあり、研究が幅広く行われている。苦味物質の多くは味蕾の味細胞膜上に特異的に発現するGタンパク質共役型受容体である苦味受容体TAS2Rによって受容される。ヒトでは25種類以上の受容体が存在しており、各TAS2Rはそれぞれ異なるリガンド特異性を持っていることが知られている。しかし多くの苦味受容体はそのリガンドが不明のままであり、数多く存在する苦味物質がどの受容体でどのように認識されているのか詳細は明らかにされていない。また、食品に多く含まれる苦味ペプチドを用いた受容体の研究は行われておらず、未だその受容機構も明らかになっていない。そこで、著者らは苦

味ペプチドに対するヒト苦味受容体hTAS2Rsの応答を異種発現系によって解析した。

まず、ヒト苦味受容体安定発現細胞の取得を試みた。ヒト胎児腎由来HEK293細胞にhuman *Gα15*を形質導入し、Gタンパク質安定発現細胞を取得した後、それをベースにヒト苦味受容体を形質導入し、苦味受容体安定発現細胞を作成した。作成した受容体は4種類で、そのうちhTAS2R4、hTAS2R14及びhTAS2R16の3種類は苦味物質のDenatoniumやPicrotoxin, Salicinに特異的に応答する受容体として知られている。これらの受容体を用いて、苦味ペプチドの混合物であるカゼイントリプシン分解物に対する応答をカルシウムイメージングによって解析した。その結果、4つの受容体全てに応答を示し、特にhTAS2R1には強い応答を示した。このことから、これら4つの受容体は全て苦味ペプチドに応答するが、構造認識における特異性は異なる可能性が考えられた。また、hTAS2R1の苦味物質応答は新知見であり、更に詳細な検討を行った。

筆者らは苦味ペプチドに対するhTAS2Rsの応答を詳細に検討するため、合成ジペプチドを用いて解析評価した。その結果、苦味を有するGly-Leu及びGly-Pheに対してhTAS2R1は強く応答したが、その他hTAS2R4、hTAS2R14及びhTAS2R16はほとんど応答を示さなかった。一方で無味のGly-Glyに対しては、いずれの受容体も応答しなかった。更に、苦味ジペプチドに対して強い応答を示したhTAS2R1は、苦味物質Denatonium, Picrotoxin, Salicin及びCaffeineに対して非常に弱い応答しか示さず、苦味ペプチドに特異的に応答する受容体である可能性が示唆された。

以上の研究結果により、苦味ペプチドが他の多くの苦味物質と同様にhTAS2Rsを活性化すること、また、ヒトがペプチドの構造や苦味を認識、感知する際にhTAS2Rsを利用していることが始めて明らかとなった。

(抄訳：大嶺啓介, OMINE Keisuke, 日本水産株式会社 中央研究所)

編集後記

127号をお届けします。本号の総説では、黄川田隆洋氏（農業生物資源研究所）にトレハロースを細胞の内外に輸送する遺伝子 - トレハローストランスポーターについてご執筆戴きました。本号においても、図らずも前号と同様、本誌の文献情報（抄訳）で以前に（126号で）取り上げられた課題について、改めて研究者ご本人に総説としてご紹介戴くことになりました。これらの課題がそれだけ注目度の高い研究成果であることの証左とご理解を賜れば幸いです。

その他の研究情報としては、伊藤卓也氏（理化学研究所）らに花粉成熟に必須なシロイヌナズナMS1転写因子、三輪京子氏（東京大学）らにホウ酸過剰に耐性な植物の作出、小原裕三氏（農業環境技術研究所）に低濃度エタノール水溶液を用いた新しい土壤消毒法、坂田亮一氏（麻布大学）らに通電処理による鶏胸肉の物性と食味性の向上技術、金光幹雄氏（生研センター）らに果樹園用せん定枝粉砕搬出機、澤岬哲也氏（沖縄県農業研究センター）にカンキツグリーニング病の簡易診断法について、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）、安田源太郎氏（カルピス（株））、大嶺啓介氏（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促進事業

その他の支援制度

- 「共同研究先のあっせん」、「遺伝子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下さい。

ブレインテクノニュース 第127号

平成20年5月15日発行

発行人 行本 修

編集人 浅野 将人

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/>