

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成20年9月15日（隔月1回15日発行）

ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.129

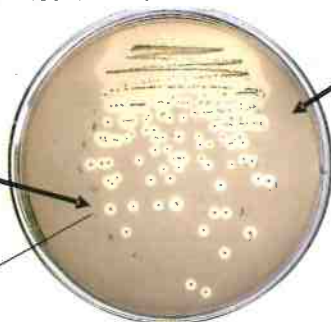
15 SEPTEMBER, 2008

ブレインテクノニュース

自然環境



乳化した生プラを
分解する菌を分離する



乳化した生プラの
分解速度を調べる



固形状の生プラの分解速度を調べる



生分解性プラスチック分解菌の選抜方法

生分解性プラスチック分解微生物はどこにいるか？

独立行政法人 農業環境技術研究所 生物生態機能研究領域

北 本 宏 子

目 次

総 説

- 生分解性プラスチック分解微生物はどこにいるか? 1
北本 宏子 ((独)農業環境技術研究所 生物生態機能研究領域)

国内情報

- DNA マーキングによる栄養繁殖作物の品種・産地判別 7
松山 知樹 ((独)理化学研究所 基幹研究所 松山植物細胞育種研究ユニット)
- 質量分析情報を総合的に活用した代謝物アノテーション法の開発 12
青木 考・飯島 陽子・柴田 大輔 ((財)かずさディー・エヌ・エー研究所 産業基盤
開発研究部)
- 遺伝子組換えカイコによる組換えタンパク質の大量生産 - ヒト型ゼラチンの生産例を
中心に - 16
富田 正浩 ((株)ネオシルク)
- 養豚で発生する污水からリンを除去回収し、リン酸肥料として再利用する技術を開発 22
鈴木 一好¹・脇屋 裕一郎²・古田 祥知子³・川村 英輔⁴・竹本 稔⁵・安里 直和⁶・
眞境名 元次⁷ (¹(独)農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所, ²佐賀県畜産
試験場, ³佐賀県農業技術センター, ⁴神奈川県畜産技術センター, ⁵神奈川県農業技術
センター, ⁶沖縄県畜産研究センター, ⁷沖縄県農業研究センター)
- 天然油脂由来非イオン系界面活性剤を用いたスギ花粉飛散抑制技術の開発 27
小塩 海平¹・山仲 藍子²・嶋田 昌彦²・椎野 太二郎²・鶴岡 邦昭²・柴山 俊朗³
(¹東京農業大学 国際農業開発学科, ²日油(株) 油化事業部 油化学研究所, ³日油(株)
油化事業部)
- 精度の高い施肥作業を支援する「可変施肥装置」の開発 31
西村 洋・林 和信・堀尾 光広・紺屋 秀之 松尾 陽介 濱田 安之 ((独)農業・
食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター)

文献情報

- マウス胚の着床前の初期発生にはオートファジーが不可欠である 36
S. Tsukamoto et al. (*Science*, 321, 117-120, 2008) 抄訳: 下司 雅也
- イネ栽培化過程において穀粒幅を決める遺伝子の欠失が収量の増加をもたらした 37
A. Shomura et al. (*Nature Genetics*, 40, 1023-1028, 2008) 抄訳: 高田 美信
- シロアリ後腸生物叢のメタゲノム解析 38
Warnecke F. et al. (*Nature*, 450, 560-565, 2007) 抄訳: 安田 源太郎
- イカのくちばしに見るミスマッチな組織のつなぎ方 39
A. Miserez et al. (*Science*, 319, 1816-1819, 2008) 抄訳: 足立 亨介

表紙の説明

プラスチックごみの処理が大きな環境問題となっており、その解決に資するため生分解性プラスチック(生プラ)の導入が進められている。しかし、生プラの分解制御は未だ難しく、強力な分解能力を有する微生物の探索とそれらを利用した分解促進技術の開発が期待されている。筆者らは、自然環境の中でも、一般的に探索される土壌中からではなく、植物(イネ)の葉の表面に常在する微生物に着目し、その中から乳化した生プラを迅速に分解する酵母菌を発見した。発見された菌は、固形状の生プラも分解する上、常温では生分解が難しいとされる植物由来のプラスチックであるポリ乳酸の膜も常温で分解することがわかった。

詳細については、1頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

生分解性プラスチック分解微生物はどこにいるか？

独立行政法人 農業環境技術研究所 生物生態機能研究領域

北 本 宏 子

プラスチックゴミの処理が問題となっている。農業分野でも多量のプラスチックが使われ、速やかに廃棄される。プラスチック廃棄物を回収する労力と処理量を削減するために、生分解性プラスチックの普及が勧められている。しかし、従来のプラスチック製品に比べて価格が高いうえ、分解制御はまだ難しい。石油価格の高騰により、生分解性プラスチックと従来のプラスチックの価格差が縮まってきた。分解微生物による分解制御の研究がどこまで進んできたか紹介する。

1. はじめに

プラスチックは便利な素材だが、自然界で分解を受けにくく、かさばるため、使用後に廃棄物処理が問題になる。プラスチックの国内利用量は増加しており、年間約1千万tが廃棄されている（環境省H16¹⁾）。このうち26%が埋立処理、14%が単純焼却処理されていると推測される。農林業用使用済みプラスチックは年間18万t程度廃出され、全体の半量が再生処理されている（農林水産省 H17²⁾）。しかし、原油価格の高騰により、適切な回収・処理が難しい状況になっている。廃棄物削減と地球温暖化防止のために最近5年程度で生分解性プラスチック（生プラ）の導入が図られている。生プラの分解性を生かした具体的な用途としては、コンポスト化によって分解されることから、資源循環に資する用途（ゴミ袋、ワンウェイ食器、食品包装材料など）、農林水産、土木資材など自然環境下で使い切り、省力化に資する用途（マルチフィルム、育苗ポット、杭、シート、紐、土嚢、袋、テープなど）などがある³⁾。さらに、サイレージ梱包用ラップ、漁網、オムツや生理用品用シート（水に流せるものを含む）、文具などの用途でも特性が活かされる可能性がある。生プラ普及促進のためには、生プラの構造改変だ

KITAMOTO Hiroko

〒305-8604 茨城県つくば市観音台3-1-3

けでなく、簡便かつ効率的な分解技術が必要である。生プラ製品には、使用中は分解しない強度を保ち、使用後には速やかに分解することが求められるが、その制御が生プラ普及上の問題である。分解が容易な農業用生プラマルチフィルムでも、栽培過程で必要な強度を保つように製造すると、春の作付け時に残存している場合があり、まだ分解制御が困難な場合がある。

また、現場でプラスチック製品を用いる時に注意すべきことがある。日本バイオプラスチック協会（JBPA）では、自然界の微生物によって分解される生分解性プラスチック（グリーンプラ）と、生物資源（バイオマス）を原料に生産されたプラスチック（バイオマスプラ）を環境配慮型プラスチックと位置づけ、「バイオプラスチック」と呼ぶことにしている³⁾。しかし、グリーンプラとバイオマスプラは使用目的が異なる。グリーンプラは生分解性が特徴であるが、バイオマスプラは植物等の再生可能な資源から作られたプラスチックで、分解しないプラスチックの作出を目指している。バイオマスプラの代表といえるポリ乳酸は、常温では分解しない。ポリ乳酸は、コンポスト中などで高温高湿度に曝されると、非酵素的に結晶状態が崩れ低分子化され、生分解されるようになる⁴⁾。そこで常温では従来のプラスチック製品と同じように使い、使用後は燃焼するかコンポスト内で分解させ、処理をする。しかし、グリーンプラとして

作られている素材に比べるとポリ乳酸はコンポスト内でも分解に時間がかかる（2の項に比較結果を掲載）。また、ポリ乳酸の用途を広げるために、最近では高温でも結晶構造が崩壊しにくい（さらに分解しにくい）ポリ乳酸が作られている。一方、生分解性プラスチックは石油由来の製品が多かったが、原油の高騰と発酵技術改変の結果、生物資源由来の生プラを合成する技術が実用化レベルに達しており、近々市場に投入されるといわれている〔三菱化学と味の素の提携により、PBS（ポリブチレンサクシネート）の原料の1つであるコハク酸を微生物による発酵法で製造する技術〕。こういった様々な性質を持つ製品の中から、消費者は使用目的にあったものを選択する必要がある。

農業・食糧現場での用途が多い生プラに着目し、本文では生プラ分解を促進させるような微生物の発見と分解酵素の特性について研究の現状を紹介する。

2. 生プラ分解活性を測定する技術

冒頭で紹介したように、私たちが生分解性を持ったプラスチック製品を選択する時には、分解しやすさを示す指標が必要である。生分解性材料は、使用后どこにでも捨ててよい材料ではなく、全く新たな廃棄処理システムとともに利用するものである。生分解性の評価とバイオプラスチックを普及し国際的に流通させるために、

各種の処理条件において相互に比較可能な国際標準規格（ISO: International Standard）が開発されている（表1）。現在最新の方法（ISO14855-2）は、完熟コンポスト中で測定試料（10g）を分解させた際に放出される二酸化炭素の重量を定量する方法である⁵⁾。コンポスト中で試料を58度に暴露するために、難分解性のポリ乳酸の分解も評価できること、サンプル量が少なくても精度が高いデータを得ることができるといった特徴がある。例えば、ISO14855-2法でPCL（ポリカプロラクトン）とポリ乳酸の分解を比較した結果、80%程度分解させるのに、PCLでは10日、ポリ乳酸では50日程度を要する⁶⁾、といった比較ができる。

一方、研究現場では、各種の生プラ分解微生物やその分解酵素の能力を簡便に評価する必要がある。通常は、緩衝液中や培地中で、乳化した生プラや、膜や粒など固体の生プラ素材に対する分解活性を調べることが多い（図1）。分解量の定量は、乳化した生プラの濁度減少量や、残存しているプラスチックの重量を測定する方法⁷⁾、液体中に遊離してきた低分子のプラスチックを全有機体炭素計等で定量する方法が報告されている⁸⁾。

また、実用化条件下では、土壌埋設試験が使われている。この方法は、限られた地域の気象条件や、土壌環境下での分解活性を評価する方法に向いている。

表1 国際合意された標準生分解性試験法

試験方法	ISO 14851 / ISO14852	ISO14855-2
概要	好気的水系での生分解	好気的コンポスト過程での生分解
微生物源	非順化活性汚泥・コンポスト懸濁液等	安定熟成コンポスト
試験材料	粉体。フィルム、破片、成型品等	フィルム、粉体等10g
試験期間	最大6ヶ月	最大6ヶ月
試験温度	20-25度±1度	58度±2度
分解度評価	ISO 14851 酸素消費量 ISO14852 二酸化炭素発生量	二酸化炭素発生量（重量）

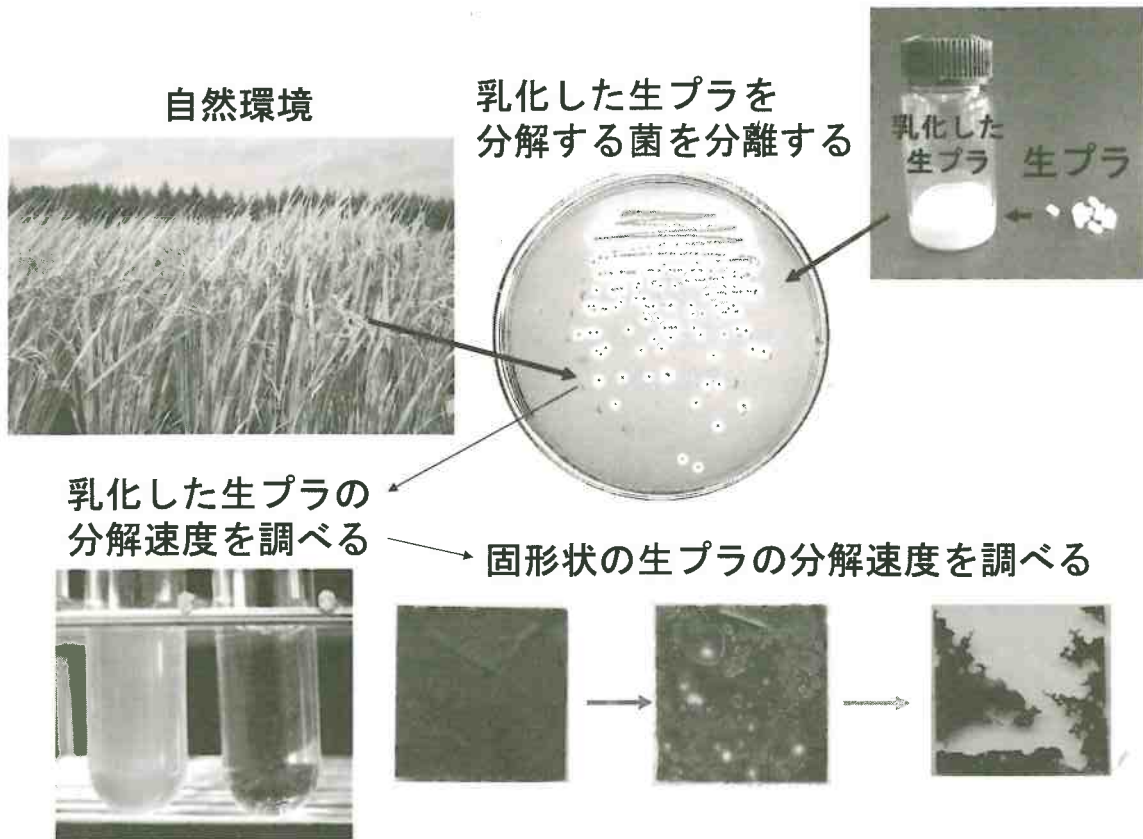


図1 生分解性プラスチック分解菌の選抜方法

3. 使用目的に合った生プラ分解菌の分離と活用

3-1. プラスチック原料のリサイクル技術

プラスチック廃棄物を再資源化するには、分別してモノマーに分解し、再合成する方法が考えられる。しかし、混合したプラスチックを素材毎に分別するのは困難である。筑波大の中島らは、酵素によるプラスチックのバイオケミカルリサイクルを提案している⁹⁾。化学的な分解ではなく酵素を用いるメリットは、反応が常温常圧で行われ、有機溶媒等も使用しないことだけでなく、酵素が持つ基質特異性を利用することにある。プラスチックを分別せずに、基質特異性が高い酵素を投入した反応槽に投入すると、モノマーに分解されるものは可溶化する。不溶性の残さを、別の基質特異性を持つ酵素を投入した反応槽に投入する、といったことを順次くりかえすことで、可溶化した高純度なモノマーを各反応槽から回収することができる。分

解しきれなかった残さは、最後に埋立て・焼却・再融解等で処理することで、廃棄物量を削減しつつ、モノマーリサイクルをする、という発想である。中島らは、構成的に分解酵素を生産し、固形のポリブチレンサクシネートアジペート (PBSA) を効率良く分解する細菌 *Acidovorax delafieldii* BS-3株¹⁰⁾ を分離し、分解遺伝子を同定している。培養液に含まれる他の栄養源が分解酵素の生産に影響を与えないので、菌自体を各種の環境下で用いることもできる。

一方、東北大の五味らは、麹菌からPBSAフィルムを分解する生プラ分解酵素を得ている¹¹⁾。麹菌は清酒や味噌の醸造に使われるように、著量の分解酵素を生産する有用微生物である。漫画「もやしもん」に登場する「もやしや」は麹屋のことで、日本は麹菌培養技術の長い歴史と経験がある。麹菌は安全に酵素を大量生産することができるため、遺伝子組み換え技術を用いたタンパク質の大量生産技術が実用化されている。五味らは麹菌を用いた、醤油製造工場のよ

うなプラスチックモノマー化工場を提案している¹²⁾。麴を用いた醸造技術を応用して、固相培養で酵素を生産し、これを醪（もろみ）に移して高密度酵素分解させる「プラスチック醪」で、生プラをモノマーまで分解して回収するシステムである。麴の生プラ分解酵素の活性はあまり高くないが、分解を促進させる物質も培養液中から見つけている。麴菌はゲノム解析が終了していることから、生プラ分解過程に分解酵素とともに発現が高くなる遺伝子を調べた。その結果、疎水性が高いPBSA表面と分解酵素の間を介在するRolAというヒドロホーピン（低分子の界面活性を示す蛋白質）¹³⁾や、疎水面に結合する蛋白質であるHsbAを見つけた¹⁴⁾。PBSAマイクロ粒子に対する麴菌分解酵素の活性は、これらの物質共存下で上昇することを報告している¹⁰⁾。さらに、ゲノム解析から見出されたクチナーゼホモログ2種について、PBSA分解様式をはじめとする酵素学的諸性質を明らかにしている。麴菌のPBSA分解活性はそれほど高くないが、介在する物質や複数の酵素による複合的作用などで活性向上が期待される。

3-2. 基質特異性が広い分解菌の発見

独立行政法人 酒類総合研究所の家藤らは、廃水処理を目的に生デンプンを分解する活性が高い*Cryptococcus* sp. S-2株を分離した。この酵母は、デンプンを分解する α アミラーゼだけでなく、キシラナーゼや耐熱性セルラーゼ、リパーゼといった酵素を著量生産した。このうち、油脂のエステル結合を分解する活性からリパーゼと同定された酵素は、脂肪酸鎖長が長い油脂に対しても高いエステル分解活性を示した¹⁵⁾。脂肪酸系の生プラの構造は、ジオール、ジカルボン酸系の重縮合によって得られ、ブタンジオールやコハク酸からなるPBS、さらにアジピン酸も重合させたPBSAなどの脂肪酸エステル重合物である。そこで*Cryptococcus* sp. S-2株のリパーゼ（CSリパーゼ）が生プラのエステル結合を分解するか調べたところ、乳化したものだけでなく固体のPBSA、PBSおよびPCLを強力に

分解した¹⁶⁾。常温でポリ乳酸を分解する酵素はProteinase Kが知られている。CSリパーゼのポリ乳酸分解活性を調べたところ、CSリパーゼは500倍濃度のProteinase Kよりも早くポリ乳酸を分解し、バイオプラスチックに対して広い分解活性を示した。家藤らは、*Pichia pastoris*や*A. oryzae*を宿主とした本酵素の大量生産にも成功しており、実用化が期待される。

3-3. 真核微生物の生プラ分解酵素 — クチナーゼ

五味らが麴菌から分離した生プラ分解酵素の配列は、既知タンパク質の中でクチナーゼと相同性が最も高かった。クチナーゼは植物の葉などの表層にあるクチンを分解する酵素で、植物病原性の多様な糸状菌から分離されている。麴菌の生プラ分解酵素にクチン分解活性は調べられていないが、植物病原糸状菌*Fusarium solani*のクチナーゼが乳化PCLを分解したという報告がある¹⁷⁾。クチンは常温で固体の長鎖脂肪酸のポリエステルであり、脂肪族ポリエステルであるPBSAに対して作用することは考えられる。

一方、*Cryptococcus* sp. S-2株のCSリパーゼのアミノ酸配列はユニークで、20%以上の相同性を示す配列はデータベースに登録されていなかった。部分配列を解析すると、リパーゼよりもクチナーゼに高い相同性を示す配列を見出した¹⁸⁾。リパーゼとクチナーゼの基質と活性部位の結合には違いがある。リパーゼは、不溶性基質と水が界面を形成する場で活性部位を覆うリッドと呼ばれる構造が変化し、活性部位が露出して基質に結合できるようになるのに対し、クチナーゼはリッドに相当する領域を持たず、活性部位は常に露出している。また、CSリパーゼのX線結晶構造解析の結果から、基質結合部位と思われる領域に大きな溝があり、周囲が疎水的になるため、直鎖状の疎水性高分子基質を挟み込めるかもしれない、と推測される¹⁹⁾。

このように、糸状菌や酵母等の生プラ分解能力は、クチナーゼが担っている可能性がある。

3-4. 生プラ分解菌は自然界のどこに棲息しているか？

生プラを使用している現場で分解を制御するためには、高い分解能力を示す微生物とその分解酵素が必要である。筆者は、分解性が高い微生物を自然界から効率良く分離する方法を検討した。一般に生プラ分解菌は土壌から分離を試みられる。土壌中から生プラ分解菌の分離を試みると、乳化した生プラを分解する菌は容易に分離できるが、固形状の生プラを分解できるものはこのうち1-2%程度である。麹菌や *Cryptococcus* S-2株のクチナーゼ様酵素が生プ

ラを分解したことから、筆者らは、植物を分離源に用いて分解菌の分離を試みた。身近にあった2株のイネの葉から、各々乳化PBSA分解性の酵母を容易に分離することができた²⁰⁾。これらの分解菌は、両株とも固形のPBSA膜やPBS膜を分解した(図2)。全国のイネから採集した籾からも容易に乳化PBSA分解性の酵母が得られ、そのほとんどが固形のPBSA膜やPBS膜を分解した。分離された分解酵母やその分解酵素の生プラ分解基質特異性を調べると、PCLやポリ乳酸膜も分解した。分解酵素のタンパク質アミノ酸配列と既知タンパク質の類似性を比較し

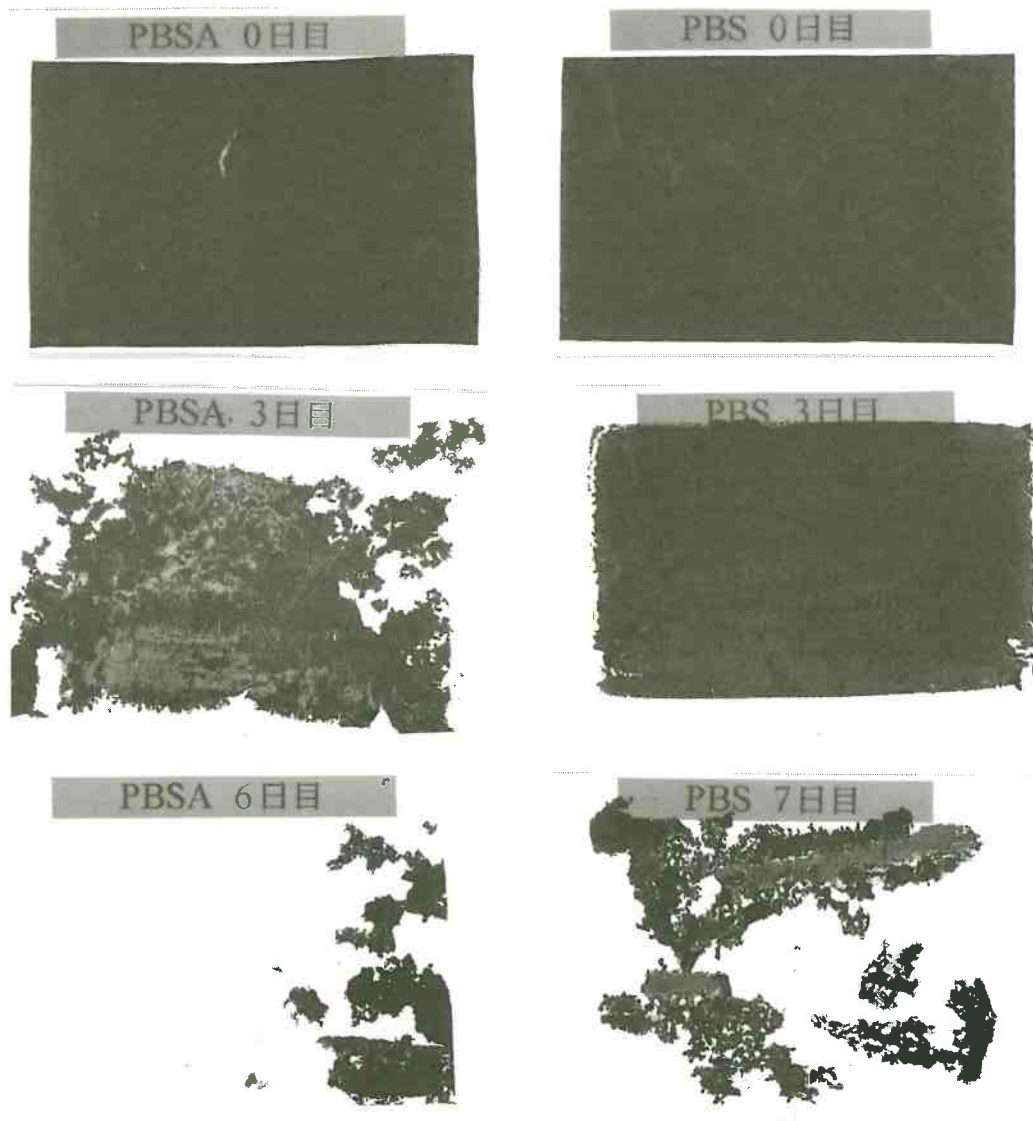


図2 葉面棲息酵母によって分解された生分解性プラスチック製マルチフィルム PBS または PBSA のみで製造したフィルム (昭和高分子株式会社見本) を用いた。

た結果、*Cryptococcus* S-2株のリパーゼに最も近かった。*Cryptococcus*属酵母もしばしば葉面から分離される。このように葉面常在酵母が高い生プラ分解活性を持つことが明らかになった。

3-5. 自然界で生プラを分解できるか？

基質特異性が広い生プラ分解菌や分解酵素は、自然環境下で生プラを分解させるのに適している。中島らは、他の栄養源存在下でもPBSA、ポリエチレンサクシネート (PES) やPCL製の膜を強力に分解する *Leptothrix* sp. TB-71株を分離している⁹⁾。*Leptothrix* sp. TB-71株から単離した分解酵素は、固体状の生プラも効率よく分解し、ディスク状の固形PBSAを48時間以内に分解する強力な分解活性を持っていた。こういった特定の分解菌が土壤中での生プラ分解に寄与しているのだろうか。中島らは、固形生プラが分解される土壤中から、残存している生プラを取り出して、付着している細菌の微生物叢をDNAレベル、培養レベルで調べた。生プラに付着している菌をDNAレベルで解析すると、同じ環境から培養法で分離した分解菌とは異なる菌が菌叢の主体を占め、分離し分解菌は生プラ表面にほとんどいないという結果を得た²¹⁾。土壤中からは、固体の生プラ分解菌の分離頻度が低いことから、自然環境中では、我々が分離・培養できない菌が生プラ分解に大きく寄与している可能性がある。

文 献

- 1) 環境省 (2005) 平成16年環境白書, 東京
- 2) 農林水産省統計 (2005)
- 3) 神波節夫 (2008) *JETI* 56 (5) 111-113.
- 4) 生分解性プラスチック研究会 (2004), トコトンやさしい生分解性プラスチックの本 日刊工業新聞社, 東京
- 5) Funabashi M. *et al.* (2007) *Journal of Polymer and Environment* 15, 245-250.
- 6) 国岡正雄 (2008), バイオプラスチックの高機能化・再資源化技術, 6-3 p334-354, エヌ・ティー・エス, 東京
- 7) Uchida H. *et al.* (2000) *FEMS Microbiology Letters* 189: 25-29.
- 8) Akutsu-Shigeno Y. *et al.* (2003). *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2498-2504.
- 9) 中島敏明 (2006), *プラスチック*, 57(2) 52-55.
- 10) Uchida H. *et al.* (2003), *J. Bioscience Bioeng.* 93, 245-247
- 11) Maeda H. *et al.* (2005), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 778-788.
- 12) 前田浩ら (2005) バイオサイエンスとインダストリー, 63, 241-245.
- 13) Takahashi T. *et al.* (2005), *Molecular Microbiol.*, 57 1780-1796.
- 14) Ohtaki S *et al.*, (2006) *Appl. Environ. Microbiol.* 72. 2407-2413.
- 15) Kamini NR. *et al.* (2000) *Process Biochem.* 36: 317-324.
- 16) Masaki K. *et al.* (2005) *Appl. Environ. Microbiol* 71: 7548-7550.
- 17) Murphy CA. *et al.* (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 456-460
- 18) 正木和夫, 家藤治幸 (2007) バイオベースマテリアルの新展開, シーエムシー出版, p.174-184, 東京
- 19) 正木和夫, 家藤治幸 (2006) バイオサイエンスとインダストリー, 64, 24-25.
- 20) 北本宏子 (2008) 平成19年度農業環境技術研究所成果情報 http://www.niaes.affrc.go.jp/sinfo/result/result24/result24_12.html
- 21) 中島敏明 (2004) *化学工業* 55, 679-682

◀国内情報▶

DNAマーキングによる栄養繁殖作物の品種・産地判別

独立行政法人 理化学研究所 基幹研究所

松山植物細胞育種研究ユニット

松山 知樹

栄養繁殖作物ではクローン増殖が容易であるため、枝変わり等の小さい変異で優良形質を得ることができる反面、権利保護のためには新しい品種・産地判別技術の開発が必要である。ここではイオンビーム誘発の輪ギク品種「新神」と元品種「神馬」におけるDNA鑑定例を示し、物理的変異原処理後、形態・形質に変異のなかった個体を選抜し、ゲノムDNA中の反復配列から変異領域を見出すことで「DNAマーク」を作出する研究スキームを紹介する。

1. はじめに

農林水産物の信頼確保に向けた品種・産地判別については、安定した検出能を有するDNAマーカーによる取組が多く、多くの作物でなされている。しかし、花きや果樹のような栄養繁殖作物は、枝変わりや芽条変異など小さな変異により有用形質を付与されるものがあり、これらの識別マーカー作出は困難を極めている。一方で、日本産の優良栄養繁殖作物品種では、挿し木、接ぎ木等によるクローン増殖が容易であるため、不法流出による海賊版生産物の流通、国外からの安価な形での流入による国内生産者への圧迫、あるいは市場での不適切な評価等の問題が生じており、DNAレベルでの新しいトレーサビリティの体系化が必要となっている。

そのような海外への種苗の不法流出が危惧される作物の一例として鹿児島県の秋輪ギク「新神」が挙げられる。これは全国で栽培されている主要品種「神馬」にイオンビーム照射（日本原子力研究機構・高崎）し、年内の作型において側枝の発生が少なくなる形質を付与した品種である（図1・A）^{1) 2)}。この新形質により栽培過程における側枝を摘むための屈む作業が大幅に少なくなり、摘花作業の労力や負担が著しく軽減されたが、市場に出回り商品となった際

MATSUYAMA Tomoki

〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1

には、側枝の有無は関係なく、両品種の外見による判別は困難である。この場合、DNA鑑定が有効な手段となるが、「新神」は突然変異誘発によって育成した品種であるため元品種とほぼ同じ遺伝質であり、従来法での識別は難しい。ここでは、このキクにおいて品種特異的DNAマーカー（ここでは「DNAマーク」）の作出例を示し、上述の問題解決に資する研究スキームについて紹介する。

2. 変異検出のためのゲノムスキャンニング

キクに対して、筆者がこれまでゲノムワイド変異検出に利用してきたRLGS（Restriction Landmark Genomic Scanning）法を行ったところ³⁾、DNAメチル化感受性制限酵素を用いた際の検出スポット数が著しく少なく、CGやCNG配列の高度なメチル化が示唆された。また、6倍体でゲノムサイズが大きいことから、AFLP（Amplified Fragment Length Polymorphism）法などの制限酵素を利用する方法やarray、サブトラクションといった多型検出法は不適と考え、RAPD（Random Amplified Polymorphic DNA）法などのPCR増幅産物によるlength mutationを検出する方法に絞って多型検出を進めることとした。イオンビーム照射では、塩基置換の他に挿入や転座、数bpから数十kb程度の欠失を誘発

している例が報告されており^{4) 5) 6)}、これらはある程度の効率で検出できれば有効な方法となる。「新神」と同様に「神馬」へのイオンビーム照射により作出された「今神」では約2%のゲノムDNA量減少があり⁷⁾、市販のプライマーセット (Operon Biotechnologies Inc.) を用いたRAPD法による多型検出が報告されている⁸⁾。しかし、「新神」においては同様の方法では多型検出に至らなかった。

種々の反復配列はその構造上の特徴から高多型性を示し、個人識別、親子鑑定などのDNA鑑定に供されてきた。このうち、局在型の縦列型反復配列であるリボゾームRNA遺伝子クラスターではコーディング領域は進化を通して高く保存されているのに対し、スペーサー領域では高可変領域の存在が知られている。また、多コピー重複しているため、この領域に入った変異も保存され易いことが期待できる。そこでコーディング領域から隣接するユニットに向けてスペーサーを増幅するプライマーをデザインし増幅を行ったが、45S、5Sクラスターそれぞれについて、ラダー状のバンドパターンの中に多型は検出できなかった。染色体端部のテロメア特異的配列など他の縦列型反復配列でも同様の結果であった。これらの結果を受け、本研究では、散在型の特定領域、特にレトロトランスポゾンとその近傍領域にターゲットを絞った変異検出を試みることにした。この手法には以下の特徴がある。

- 1) 数kb程度の長さを単位として、ゲノム上に散在している。
 - 2) レトロウイルスから高等生物に至るまで構造上保存された領域がある。
 - 3) 植物種の区別なく、進化を通して保存されているタイプがある。
- これにより、以下の利点が生じることになる。
- I) 一つの情報でゲノム上の複数の領域を一度に調べることができる。
 - II) ゲノム解析の進んだ生物種の塩基配列情報を利用できる。
 - III) 多種類のレトロトランスポゾン塩基配列

情報を利用できる。

この結果、ゲノム解析が全く進んでおらず、塩基配列情報がほとんどないキクのような園芸作物をサンプルとした場合でも開発研究を進めることが可能となる。

3. 「DNAマーク」による品種内識別

本研究では、レトロトランスポゾンとして構造がコンパクトにまとまっているトウモロコシTRIM⁹⁾、キクの情報を含む*pol*領域のRT遺伝子 (Reverse Transcriptase) 領域の情報が豊富なgypsyタイプの塩基配列情報を利用した¹⁰⁾。これらの中で構造上保存されているLTR (Long Terminal Repeat) や*gag*・*pol*領域、PBS (Primer Binding Sequence)、ppt (polypurine tract) に注目し、プライマーデザインを行った。

まず、上述のプライマーによりレトロトランスポゾン内の増幅を試みた。55℃および37℃のアニール温度でのPCR解析を行ったが多型の検出はなかった。さらに、それらの組み合わせでPCR増幅を進めたところ、トウモロコシのTRIMのpptとキクRT geneの一部でデザインしたプライマーセットで「新神」において再現性高く、薄くなるバンドが見つかった (図1・B)。「神馬」において相当するバンドをクローニングし、塩基配列を決定したところレトロトランスポゾンの特徴づける領域は認められなかったが、「神馬」と「新神」に対し、この配列内のPCR増幅を行ったところ、明瞭に両品種を識別することができた。さらに、想定される実用場面・現場でのハンドリング・安定性を考慮し、500bp前後のPCR産物で明瞭に「神馬」2本、「新神」のみ1本となるバンドパターンを作出した¹¹⁾。図1・Cに示されるように、この変異は育成の過程で「新神」のゲノムに固定されており、保存株、農家等に供給する生産株双方において安定して検出できること、および、どの「神馬」系品種でも2本出現し、「新神」のみ1本となるパターンであることも確認した。以上の結果は、全国の「神馬」系品種の中で鹿児島県育成の

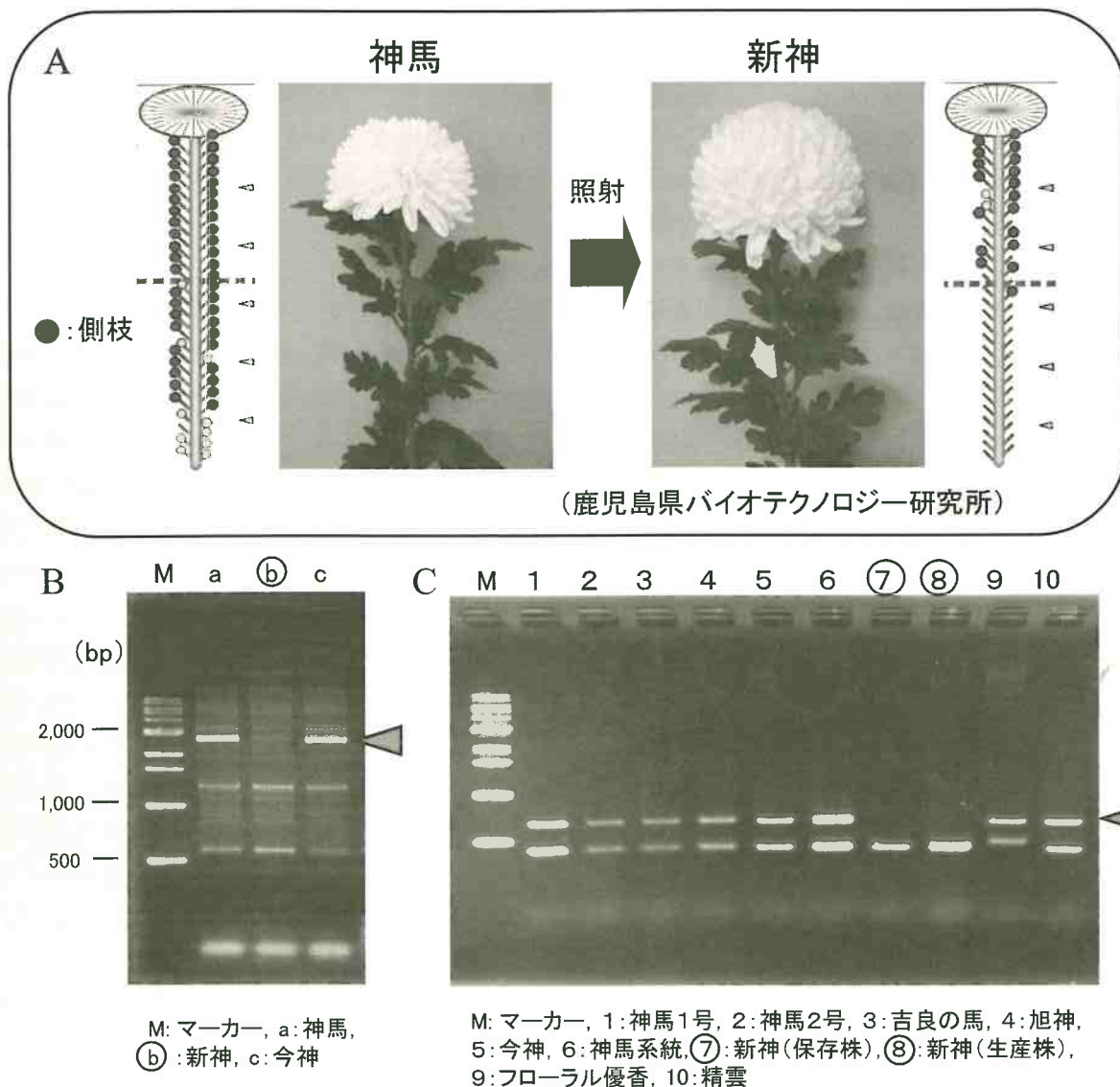


図1 秋輪ギク「神馬」と「新神」のDNA鑑定

A: 「神馬」へのイオンビーム照射により育成した「新神」での側枝着生
B: レトロトランスポゾン配列を利用したゲノムスキャニング(矢印は多型バンド)
C: 「新神」DNAマーク(矢印は「新神」のみ検出されない多型バンド)

「新神」を明瞭に特徴づけるものであり、これを品種内識別に資する「DNAマーク」とした。

4. 「DNAマーキング」という考え方

単純反復配列SSR (Simple Sequence Repeat) や一塩基置換SNP (Simple Nucleotide Polymorphism) を利用した解析による品種識別・同定は多方面のプロジェクトにより進んで

おり、成果を上げている。これらにおいては同一品種内、系統内は同じパターンになることが前提となっている。栄養繁殖性作物の花きや果樹では、前述のように枝変わりや芽条変異によって育成し品種登録されるものがあり、これらは従来法的前提となるところの同一遺伝質であり、識別は難しい。今回、「新神」について元品種「神馬」とのDNA鑑定による識別が実現したことはこの点での問題解決の糸口を示すもの

であり、これを受けて、筆者らは「DNAマーキング」と称した研究スキームを考えた(図2)。

従来の突然変異育種の選抜においてイオンビーム照射後、変異形質のあった個体を除き、これまでは捨てていたプールを保存し(図2-1)、その中から、「新神」DNAマークと同様に遺伝子をコードしておらず、変異が起きても表現型に出ない、ないしは出にくい反復配列をターゲットとしてゲノムスキャンニングし、変異を検出する(図2-2)。検出された個体をクローン増殖することで特有の「DNAマーク」を有した系統の作出を行う(図2-3)。これを複数用意できれば、同一品種内での識別ができ、かつ、産地ごとあるいは業者ごとに最初から配布することで産地判別や生産から流通に至る過程でのトレーサビリティが可能となる。

本手法はごく近い品種ないしは同じ品種内でDNAに「マーク」を付すことを特徴とする。この場合、第一にDNA組換えによる手法がイメージされるが、現時点では全てのマーケットのコンセンサスは得られておらず、また、全植物種・品種で形質転換が容易に行えるわけではないため、「食の安全確保」や「育成者権の保

護」といった今現在の問題への迅速な対応として現実的ではない。本手法は、物理的変異原による照射後、商品価値への影響がないという点での選抜を受けていれば、どのような作物あるいはどのような生物種でも基本的には適用可能であり、多方面での利用が期待できる。

5. おわりに

平成19年度より、イオンビーム照射済みのキク、ラン、ナシ優良品種を供試して「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」の中で「DNAマーキングによる栄養繁殖作物の品種・産地判別技術の開発」とする課題研究を開始した。進行中のプロジェクトの中でキクについて「新神」の他に2品種・系統、ランについても同様の手法によりいくつかの特定品種内DNAマークやDNA多型領域が見出されている(未発表)。これらは育成者権保護のための不法流出抑止や水際措置において有効なツールとなることが期待される。一方、DNAマーク作出の過程において、シロイヌナズナやイネなどのモデル植物と比べて、DNA抽出や反復配列の

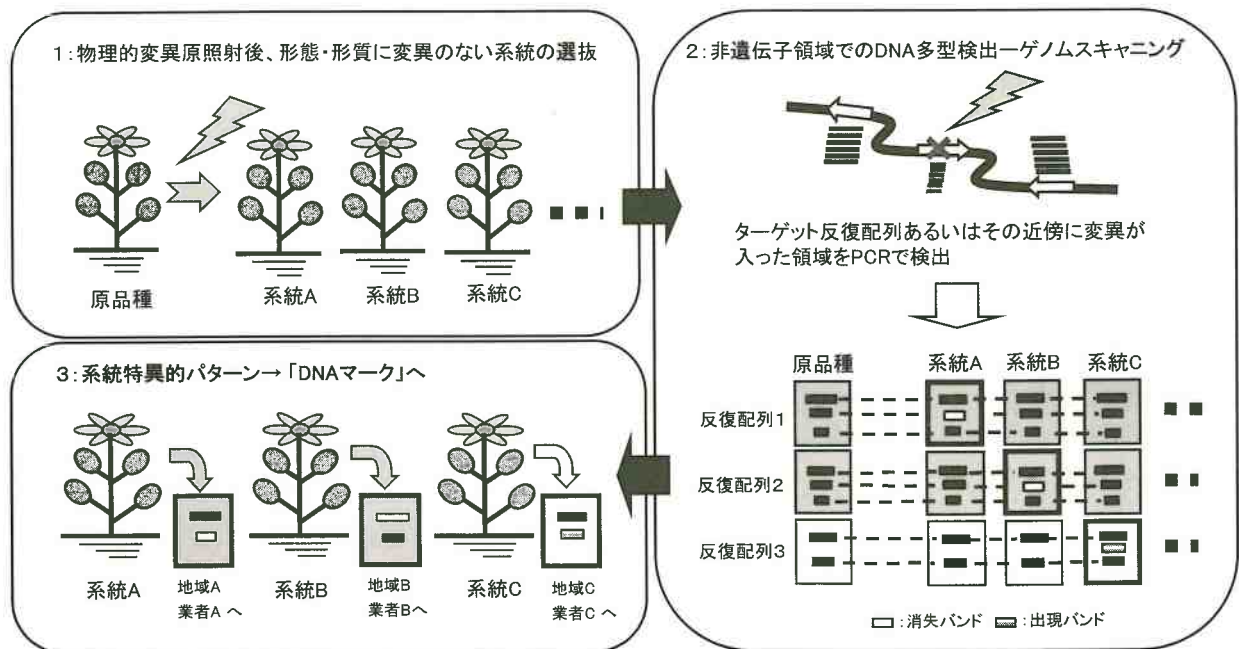


図2 栄養繁殖作物における品種識別のための研究スキーム (DNAマーキング)

PCR増幅等において安定性に難がある園芸作物特有の技術的な難しさを経験した。今後、さらに多くの実例を示すと同時に、これらの問題点を整理し、本研究スキームを実用性・汎用性の高い技術開発に繋げていきたい。

文 献

- 1) 今給黎征郎ら (2006), 鹿児島県農業試験場研究報告, 34, 15-19
- 2) Ueno, K. et al. (2003), *JAERI-Review*, 2003-033, 52-54
- 3) Matsuyama, T. (2008), *FEBS Journal*, 275, 1607
- 4) Shikazono, N. et al. (2005), *J. Exp. Bot.* 56, 587-696
- 5) Kazama, Y. et al. (2007), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2864-2869
- 6) Ichida, H. et al. (2008), *Mutation Research*, 639, 101-107
- 7) Ueno, K. et al. (2004), *JAERI-Review*, 2004-025, 53-55
- 8) 白尾 吏ら (2008), DNA多型, 16, 108-110
- 9) Witte, C.-P. et al. (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13778-13783
- 10) Ohtsubo, H. et al. (1999), *Genes Gent. Syst.*, 74, 83-91
- 11) 特開2007-244334 キク品種識別方法

◀国内情報▶

質量分析情報を総合的に活用した 代謝物アノテーション法の開発

財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所 産業基盤開発研究部
青木 考・飯島 陽子・柴田 大輔

質量分析装置による分析データをもとに代謝物の構造・機能推定を行うことは代謝研究の大きな課題である。我々は超高分解能質量分析装置（LC-FTICR-MS）による分析データに基づき全代謝物に一挙にアノテーションを与える手法を確立した。これをトマト果実に応用し869代謝物を検出し、500あまりの代謝物は新規であることが明らかになった。この手法は有用成分を高蓄積する植物の育種・開発への応用が期待される。

1. はじめに

植物・微生物に由来する天然の化合物は、現在でも薬品の開発にとって重要であり、また食品の機能性を高めていく上でも大きな注目が集められている。近年の質量分析装置の技術的発展により、1回の生体試料分析から数千～数万にも及ぶ天然代謝物のシグナルを検出することが可能になってきた。この数千～数万のシグナルの中から個別の代謝物を同定することは代謝物研究における大きな課題である。代謝物を同定する、とは測定データを既知化合物のデータと照合し同一性を示すことである。しかしながら、これを20万種程度あると言われている植物代謝物全てに対して実行することは困難である¹⁾。

この状況を打開するために「代謝物アノテーション」というアイデアが提案された²⁾。これは、実測された代謝物シグナルに対して、代謝物の構造を反映する様々な質量分析情報や、代謝物の出現した生物学的状況を反映する実験条件やサンプル情報といった「注釈（アノテーション）」を付加することである。これらのアノテーションにより代謝物の構造や反応関係の推定が、ひいては代謝物の生物学的役割や蓄積

に關与する遺伝子の推定が可能になると期待される。

本稿では高分解能質量分析装置により取得したデータに基づいた代謝物アノテーション法の開発と、そのトマト果実全代謝物への応用を報告する³⁾。

2. 代謝物アノテーションの手順

液体クロマトグラフィー質量分析装置（LC-MS）による測定では、代謝物自体のシグナルに加えて多くのノイズシグナルや派生物シグナルが検出される。そこで我々はノイズ・派生物シグナルを代謝物シグナルから識別し、代謝物シグナルに対してアノテーションを付加する方針をとることにした。

では「代謝物」をどのように識別したらよいのだろうか？我々は2つの基準をもうけた。第一に、代謝物由来のシグナルはある範囲のリテンションタイム幅にわたって現れるはずである。この基準により、突発的に現れるノイズや溶出時間の大半にわたって現れる背景ノイズを区別する。第二に代謝物シグナルには、同位体シグナルが付随するはずである。天然状態で多くの元素には、質量の異なる同位体が存在する。例えば天然に存在する炭素は質量数12のものが約99%を占めるが、約1%の割合で質量数13

AOKI Koh, IJIMA Yoko, SHIBATA Daisuke

〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7

の同位体が存在する。ほとんどの代謝物は炭素を含むので、親となる代謝物シグナルよりも1,003Da大きな炭素13を含む同位体シグナルが炭素原子数に比例した相対強度で付随するはずである。

次に、代謝物から区別しなければならない派生物シグナルとしてどのようなものがあるだろうか？第一にナトリウム・カリウム・ギ酸等の付加体イオン，第二にプロトンが複数付加した多価イオン，第三にイオン化の段階で不可避免的に生じる代謝物の断片化イオンである。これらの派生物イオンは、いずれもイオン化の際に生成されるため、派生物イオンの理論的質量は親となる代謝物イオンと同じリテンションタイムの範囲に出現するはずである。

このような基準に基づき、代謝物アノテーションの一連の手順を確立した（図1）。この手順は8つの連続的なステップから構成される。

- (1) 生データのテキストファイルとしての取り出し。
- (2) 全マスシグナルのm/z値補正。

代謝物推定の精度を上げるために、我々は液体クロマトグラフィーと連結したフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析装置（LC-FTICR-MS）による測定データを利用した。質量電荷比（m/z値）の測定精度を上げるために既知のm/z値をもつ内部標準物質のm/z値に基づいて補正を行なう方法が報告されている⁴⁾。我々はLCから溶出後の試料にオンラインで内部標準物質を導入する方式を採用し全マスシグナルを補正し、これにより質量測定精度は0.5ppm～1ppmが達成された。

- (3) 補正m/z値とMS/MSデータの対応付け
- (4) 同位体イオンの検出

補正m/z値に基づき、炭素13・イオウ34・窒素15などの同位体を含むシグナルを検出する。

- (5) ノイズ除去

同じm/z値が3スキャンポイント未満にしか現れないもの、同じm/z値が全スキャンポイント数の30%以上にわたって現れているもの、をノイズとみなして除去する。

- (6) ピークグループの形成

同じm/z値が連続して現れている場合、これらのマスシグナルをピークグループとしてまとめる。シグナル強度閾値をもとに選ばれたマスシグナルの平均をとることで、ピークグループのm/z値・同位体イオン強度比を算出する³⁾。同じリテンションタイム範囲で派生物シグナルに相当するm/z値をもったピークグループを、派生物シグナルとして区別する。



LC-FTICR-MS
による測定

テキスト形式で生データ取り出し

全マスシグナルのm/z値補正

補正m/z値とMS/MSデータの対応付け

同位体イオンの検出

ノイズの除去

ピークグループの形成

ピークグループの精密m/z値算出
ピークグループの炭素13同位体イオン強度比の計算
派生物シグナルの区別

組成式の推定

データベース検索

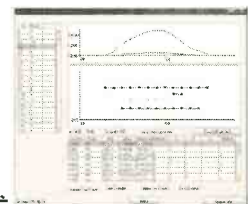


図1 代謝物アノテーションの手順

(7) 組成式の推定

ピークグループの補正 m/z 値および同位体イオン強度比に基づいて組成式の推定を行なう。

(8) データベース検索

ピークグループの補正 m/z 値および同位体イオン強度比に基づいて、公開されている代謝物データベース KNApSAcK (<http://kanaya.naist.jp/KNApSAcK>), KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>), PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) を検索する。

この一連の手順は派生物シグナルの区別のステップを除き全て自動化され、1回の分析データに対する解析が非常に短時間（～数時間）で行うことができる。

3. トマト全代謝物のアノテーション

我々はこの代謝物アノテーション法を、トマト果実代謝物分析データの解析に応用した。トマトは、ゲノム解読が進行中の新たなモデル植物であり、他のモデル植物には見られない代謝物の多様性をもっている。分析には矮性トマト品種マイクロトムの、異なる登熟段階4段階についてそれぞれ果皮と果肉を採取し、70%メタノール抽出物をLC-FTICR-MSを用いてESIイオン化によりポジティブ・ネガティブ両イオンモードで分析を行なった。累計50万マシグナルの中から、試料間での重複を省いて代謝物を代表しているピークグループ869個が抽出された。既存の化合物データベースとの照合から、869個のうち494個はデータベースに登録されていない未知化合物であることが明らかになった。これら869個の代謝物に対して、リテンションタイム・ m/z 値・吸収スペクトル・MS/MSデータ・推定組成式・推定構造・データベースヒット・文献情報をアノテーションとして付加して、アノテーション情報を代謝物データベースKOMICS (<http://web2.kazusa.or.jp/komics>) に収録し一般公開した (図2)。

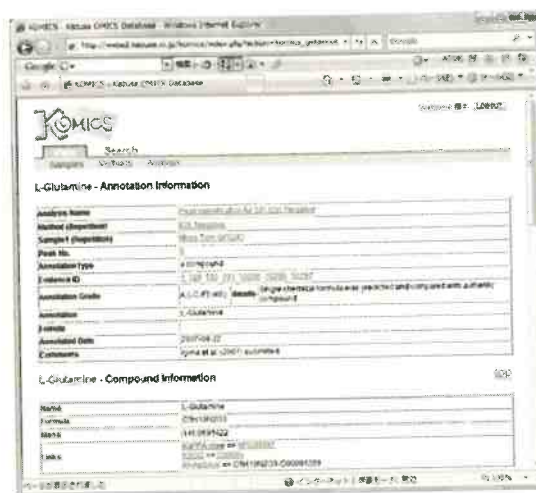


図2 代謝物アノテーションデータベースKOMICS (<http://web2.kazusa.or.jp/komics/>)

4. 代謝物アノテーションに基づいた代謝経路および代謝反応の解析

全代謝物のアノテーションから、様々な代謝に関する情報が得られる。その第一として、未知な代謝経路の推定が可能になることが挙げられる。一例として、トマト果実のグリコアルカロイド生合成経路を示す (図3)。登熟過程の進行に伴いグリコアルカロイドの主成分がトマチンからエスクレオシドAへと変化する⁵⁾。我々はMS/MS情報を活用してトマチンからエスクレオシドAが生合成される際の間体を検出することができた³⁾。同様な結果は他のトマト品種からも報告されている⁶⁾。さらに、登熟が抑制される変異体果実の解析を通じて、エスクレオシドA生合成が登熟ホルモン・エチレンに依存的であることを示唆した。

第二に、より包括的に代謝物アノテーション情報を活用し、ある組織内の代謝物間に頻繁に見られる修飾や付加反応を特定することも可能であった³⁾。このような頻繁に見られる修飾・付加反応が、登熟に伴うトマト果実代謝物多様化に寄与していると考えられる。

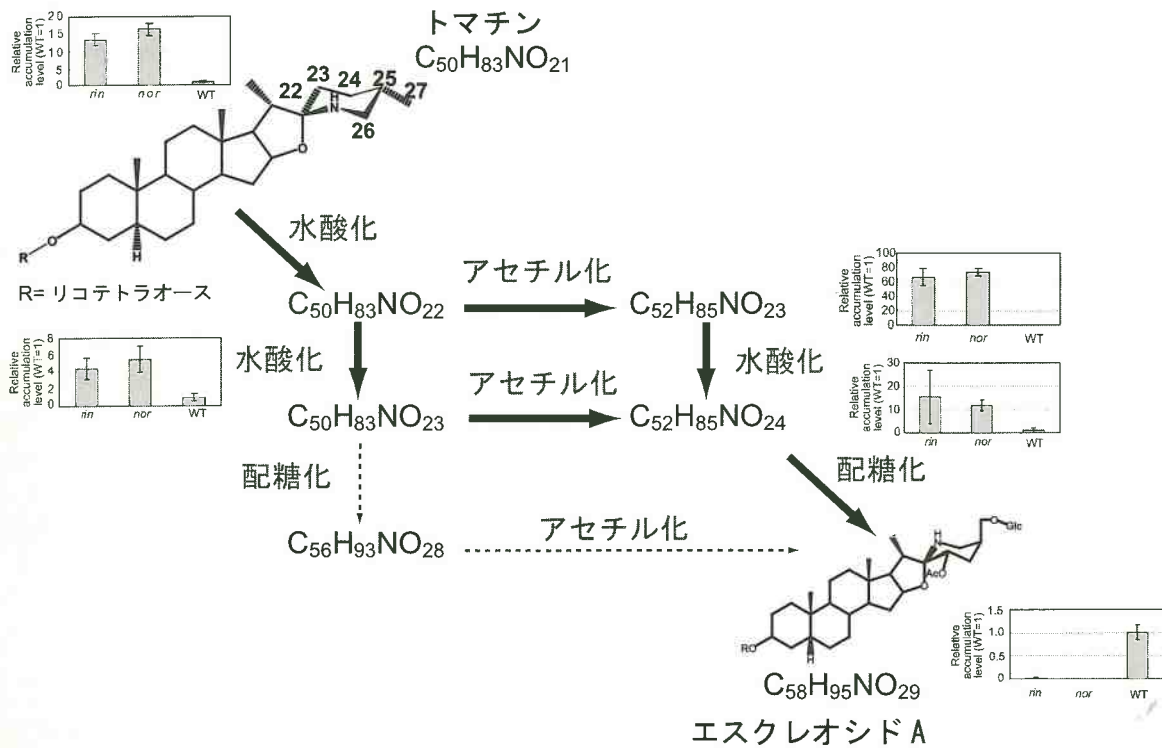


図3 トマチンからエスクレオシドAへの代謝経路

太い矢印が主たる経路を示している。挿入図は、各代謝物の登熟変異体における野生株を1とした相対蓄積レベルを示す。バーは左から、*rin*変異体、*nor*変異体、野生株。

5. 今後の展望

代謝物間の構造の関係性を知るために、MS/MSによる部分構造情報は大きな助けになる。より多くの未知代謝物を既知代謝物と関連付けるためにもMS/MSデータを活用する方法の開発が望まれる。

今回の研究で開発された手法は、あらゆる生体試料での成分分析に応用可能である。我々は様々な野菜の成分分析を進めており、大規模な代謝物データベースの構築を開始している。この情報は、有用成分を高含有する野菜の育種や、食品・薬品の開発への応用の基盤として利用されることが期待される。

文献

- 1) Dixon, R. A. et al. (2003), *Phytochemistry*, 62, 815-816
- 2) Fiehn, O. et al. (2005), *Data Integration in Life Sciences*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg
- 3) Iijima, Y. et al. (2008) *Plant J.*, 54, 949-962
- 4) Oikawa, A. et al. (2006) *Plant Physiol.*, 142, 398-413
- 5) Nohara, T. et al. (2007) *J. Nat. Med.*, 61, 1-13
- 6) Mintz-Oron, S. et al. (2008) *Plant Physiol.*, 147, 823-851

◀国内情報▶

遺伝子組換えカイコによる組換えタンパク質の大量生産 — ヒト型ゼラチンの生産例を中心に —

株式会社 ネオシルク

富田 正浩

遺伝子組換えカイコを用いて、繭から可溶性の組換えタンパク質を多量に回収することができるタンパク質生産系を開発した。この生産系を用いて、抗体、ヒト型ゼラチン、アルブミン、各種サイトカイン・成長因子類の生産に成功した。ヒト型ゼラチンについては、既に生産系の構築が完了しており事業化レベルにある。カイコで生産したゼラチンは、安全で高品質であるため、特に再生医療の領域で有用である。この他、組換えカイコの生産系は、抗体医薬などの生産にも活用できると考えられ、日本独自のバイオテクノロジーとして発展させることが可能である。

1. はじめに

1980年代の始めに、大腸菌による組換えヒトインシュリンや成長ホルモンの生産が実現して以来、大腸菌だけでなく、酵母や動物細胞などを宿主として用いた組換えタンパク質生産系が次々と開発され、様々な有用物質が遺伝子組換え技術を用いて生産されるようになった。特に、医薬品分野では、病原体の感染源となるヒト血液や動物組織を医薬品タンパク質の供給源とすることを止め、より安全性の高い組換え技術による生産が選択された。近年では、少量の投与で絶大な効果を発揮するホルモン剤やサイトカイン剤に加えて、大量に投与しなければ効果が得られない血清アルブミンなどの血液タンパク質や、治療用モノクローナル抗体（抗体医薬）なども組換えタンパク質として生産されている。多くの医薬品タンパク質は、ハムスター卵巣由来のCHO細胞を宿主として用い、巨大な培養タンクにて細胞を培養することにより生産されている。この生産系では、莫大な設備投資が必要であり、また高価な培養液を用いるため低コスト化には限界がある。このような背

TOMITA Masahiro

〒739-0046 広島県東広島市鏡山3-13-26

景から、生産性の高い新しい組換えタンパク質生産系が望まれるようになり、遺伝子組換え動物や植物など、生物個体を利用した生産系の開発が進められている。

カイコは、数千年の長い養蚕の歴史の中で、繭を大きくする方向で人為選択が繰り返されてきた生き物である。その結果、カイコには、一頭あたり0.3～0.5gの絹タンパク質の塊を短時間で生産する能力が付与された。カイコのもつ、この優れた絹タンパク質合成能力を利用して、有用タンパク質を繭の中に分泌させれば、低コストで大量のタンパク質を生産することが可能である。カイコの繭は、フィブロインやセリシンなどのごく限られた種類のタンパク質により構成されている。そのため、繭からの組換えタンパク質の精製が容易である。さらに、生産したタンパク質に、ヒトに感染性のある病原体や動物由来のタンパク質等が混入する危険性が低いこと、ライフサイクルが短く、小規模な飼育設備で多くの個体を飼育できるため、短期間にスケールアップができること、カイコは成虫になっても飛ぶことができないため組換え生物の管理が容易であること、など様々な利点を有している。カイコへの遺伝子導入については、*piggyBac*と呼ばれているDNA型トランスポゾ

ンをベクターとして用いる方法が確立されており¹⁾、絹タンパク質を合成する組織である絹糸腺で組換えタンパク質を発現させることにより、繭の中へ組換えタンパク質を分泌させることが可能となっている²⁾。

2. 遺伝子組換えカイコによる組換えタンパク質発現系

絹タンパク質は、約75%がフィブロイン、残りの約25%がセリシンと呼ばれるタンパク質により構成されている。これらの絹タンパク質を合成する絹糸腺は後部絹糸腺、中部絹糸腺および前部絹糸腺より構成されるが、フィブロインは後部絹糸腺で、セリシンは中部絹糸腺で、それぞれ特異的に合成・分泌される(図1A)。後部絹糸腺から分泌されたフィブロインは、徐々に中部絹糸腺へと送られ、そこで分泌されたセリシンによって周りが被覆され、さらに前部絹糸腺へと送られ絹糸として吐糸される。従って、吐糸された絹糸において、フィブロインは糸の中心に、セリシンは、フィブロインの周

りを取り巻くように存在する(図1B)。フィブロインは、難溶性の繊維構造を形成するのに対し、セリシンは親水性の糊状構造を形成する。

遺伝子組換えカイコにおいて、組換えタンパク質の発現組織をコントロールすることにより、発現したタンパク質を絹糸中心のフィブロイン繊維内、または外側のセリシン層に局在させることが可能である。すなわち、フィブロインなどのプロモーターを用いて後部絹糸腺で発現させることにより、組換えタンパク質をフィブロイン繊維へ、セリシンなどのプロモーターを用いて中部絹糸腺で発現させることにより、セリシン層へ局在させることができる。フィブロインに局在させた組換えタンパク質は、フィブロインの結晶構造中に安定に保持される。従って、後部絹糸腺での発現は、絹糸から組換えタンパク質を単離する目的には向かないが、絹繊維の物理的性質などの改変や、フィブロインから新しいバイオマテリアルを作り出す目的には有用である³⁾。一方、中部絹糸腺でタンパク質を発現させた場合、親水性のセリシン層に局在した組換えタンパク質を容易に抽出すること

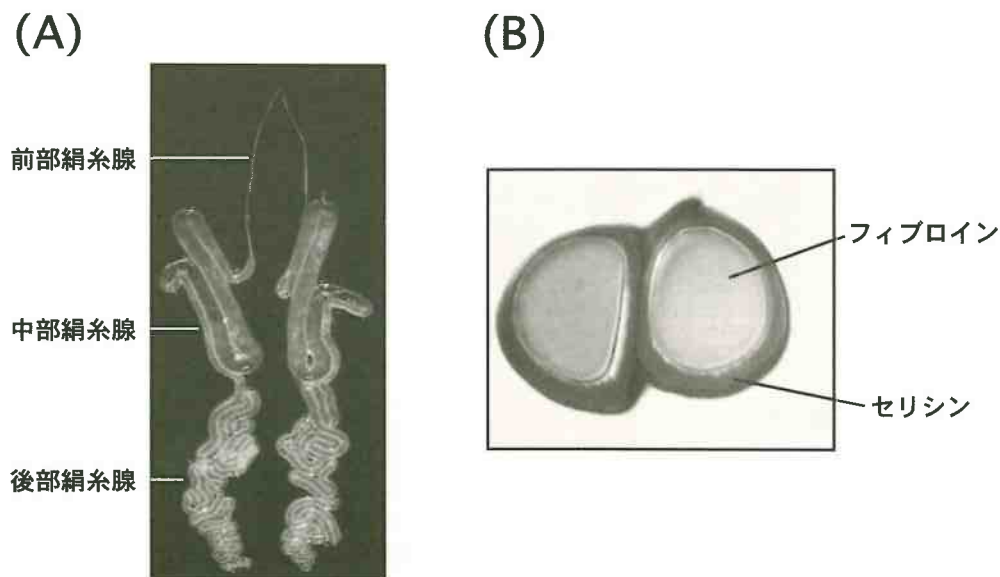


図1 絹糸腺と絹糸の構造

(A) 絹糸腺の構造。

(B) 絹糸の構造。絹糸の横断切片を Azure-B で染色した。

ができるため、タンパク質の回収という面では都合が良い。抽出に中性緩衝液などを用いると、緩衝液中にセリシン自体が溶け出さないため、組換えタンパク質を優先的に抽出することができ、その後の精製を極めて容易に行うことができる。従って、医薬品などの有用タンパク質等を生産する場合は、中部絹糸腺で発現させセリシン層に局在させるタンパク質生産系が有効である。我々は、セリシンプロモーターに、プロモーター活性を増強するエンハンサーや転写調節因子の遺伝子を組み合わせることにより、多量の組換えタンパク質をセリシン層に分泌させる技術を開発した⁴⁾。この生産系を用いて、抗体 (IgG)、ゼラチン、アルブミン⁵⁾、各種サイトカインや成長因子類など、様々な組換えタンパク質の生産に成功している。

例として、マウスIgGを生産した場合の結果を以下に記す。マウスIgGのL鎖およびH鎖を、それぞれ単独に発現する遺伝子組換えカイコを作製した。次に、これらを交配することにより、

中部絹糸腺でL鎖およびH鎖の両方を合成するカイコを得て繭を作らせた。繭のタンパク質を解析した結果 (図2A)、IgGのL鎖およびH鎖の両方を、絹糸のセリシン層から検出することができた。中性緩衝液または低濃度の尿素溶液にてタンパク質を抽出し、非還元条件で電気泳動を行ったところ、L鎖2分子とH鎖2分子からなる四量体を形成したIgG分子が認められた。驚いたことに、抽出液中には、L鎖単量体、またはH鎖の単量体や二量体などの不完全な分子は含まれず、ほとんどが完全な四量体として存在していた。繭から抽出したIgGの抗原結合性を調べたところ、組換えIgGは、天然型と同一の抗原結合活性を有しており、また抗原特異性も一致していることが確認された (図2B)。発現量は、一繭あたり1~2mgであり、低コストでの大量生産が可能であることが推察された。このように、中部絹糸腺で組換えタンパク質を発現する生産系を用いると、IgGのような複雑な立体構造を持ったタンパク質でも大量生産が

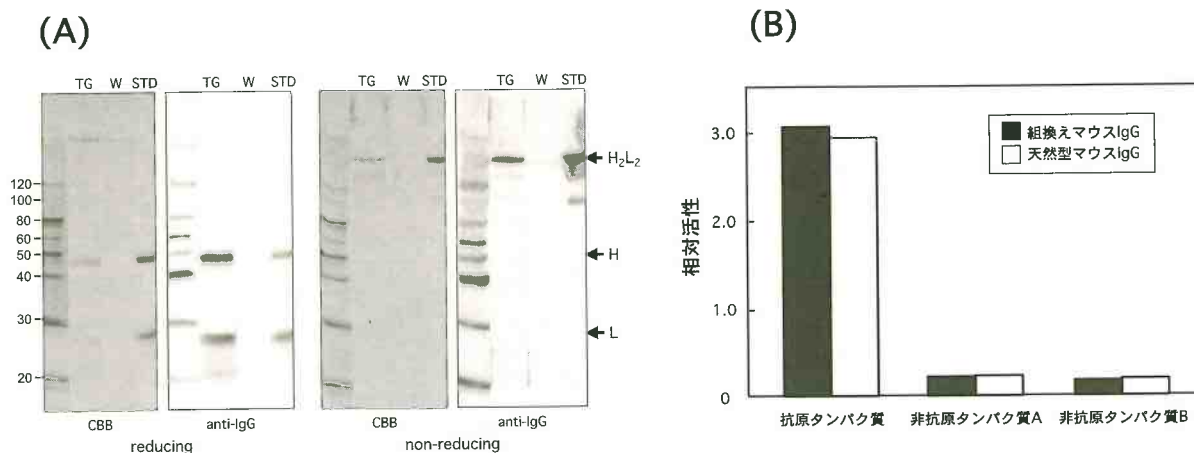


図2 マウスIgGの発現

- (A) 繭抽出液の電気泳動解析。組換えカイコ (TG) および野生型カイコ (W) の繭タンパク質を中性緩衝液にて抽出し、還元 (reducing) および非還元条件 (non-reducing) で電気泳動を行った。CBB染色により抽出された全タンパク質を染色するとともに (CBB)、ウエスタンブロットによりマウスIgGを染色した (anti-IgG)。還元条件ではIgGのH鎖およびL鎖が、非還元条件ではH₂L₂が検出された。STD: マウスIgGスタンダード。
- (B) マウスIgGの活性。ELISA法により組換えマウスIgGの抗原結合性を調べた。抗原結合活性および抗原特異性は、天然型マウスIgGと同等であった。

可能であることが判った。今後の開発により、抗体医薬などのタンパク質医薬品を、安価に生産できる生産系の構築が可能であると考えている。

3. ヒト型ゼラチンの生産

ヒト型ゼラチンの生産については、1ロットで10gオーダーを生産できる生産系の構築が完了しており、既に事業化レベルにある。ゼラチンとは、本来、ウシやブタの骨に含まれるコラーゲンを、アルカリや酸で処理することにより抽出されるコラーゲンの変性産物を指す。生体内に存在するコラーゲンは、分子量100kDaの α 鎖が三本会合した三重らせん構造を形成している。一方、ゼラチンは、このコラーゲンをアルカリや酸で処理して得られたものであるため、三重らせん構造を持たず、加水分解により低分子化している。加水分解の程度は、処理方法により変化するため一定で無く、処理方法やロット間で品質に差が生じる。

カイコにヒトI型コラーゲンの $\alpha 1(I)$ 鎖の遺伝子を組み込み、コラーゲン α 鎖を中部絹糸腺で合成し繭に分泌する遺伝子組換えカイコを作製した。 α 鎖が会合して三重らせん構造を形成するためには、 α 鎖内のプロリン残基が水酸化される必要があるが、カイコの絹糸腺には、この反応に必要な酵素がほとんど存在しない⁶⁾。そのため、プロリン残基の水酸化は起こらず、細胞内で合成された α 鎖は変性状態のまま繭に分泌された。繭に分泌した変性コラーゲン(ゼラチン)は、絹糸のセリシン層に存在するため、アルカリや酸を用いなくとも簡単

に抽出することができた(図3A)。そのため、分子量の低下を引き起こすこと無く、100kDaの全長のまま回収でき、ロット間での品質のばらつきも無かった(図3B)。このように、遺伝子組換えカイコにより生産されたヒト型ゼラチンは、ウシやブタの骨から抽出される従来のゼラチンに比べ、高品質なゼラチンであることが判った。

カイコで生産したヒト型ゼラチンの性質を詳細に調べ、その活用方法について検討を進めている。円二色性分散計を用いて、ヒト型ゼラチンの二次構造を調べた。既に述べたように、ヒト型ゼラチンには水酸化プロリンが含まれないため、予想通り、コラーゲン特有の三重らせん構造は全く検出されず、二次構造的にはゼラチンに類似していることが確認できた。ゲル化能を調べた実験からも、物性的にはゼラチンに近いことが確かめられた。ヒト型ゼラチンは、一般的なゼラチンの性質として知られている性

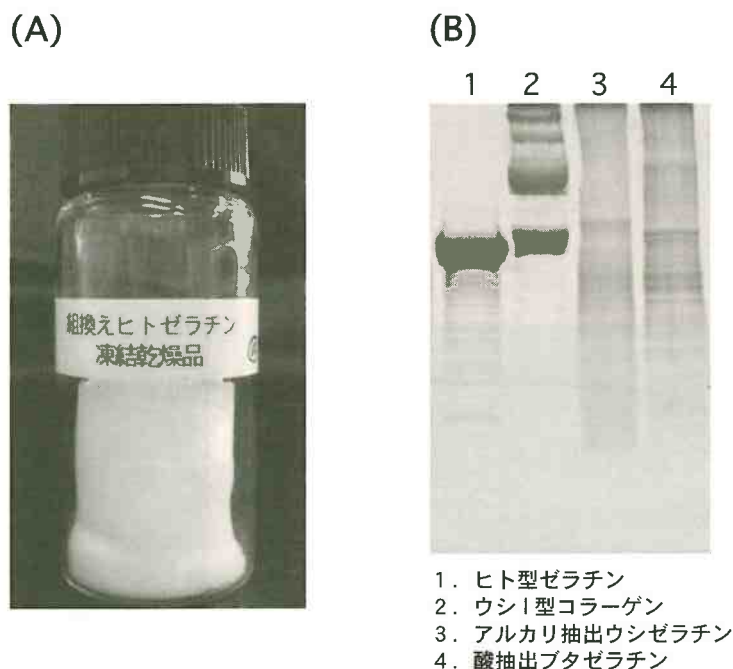


図3 組換えカイコで生産したヒト型ゼラチン

- (A) ヒト型ゼラチン凍結乾燥品。
 (B) ヒト型ゼラチンの電気泳動解析。ヒト型ゼラチンは、分子量100kDaの単一分子から成る。

質、つまり低温下でゲル化する性質を有していた。一方、コラーゲンとは異なり、37℃に加熱してもゲル化しなかった。低温でゲル化したヒト型ゼラチンを、グルタルアルデヒドで処理することにより架橋を形成させれば、体温でも溶けないハイドロゲルを調製することが可能であった。ゼラチンハイドロゲルは、ドラッグデリバリーの担体として有用であることが知られており、カイコで生産したヒト型ゼラチンも、この分野で活用できる可能性がある。

ヒト型ゼラチンは、ヒトタンパク質である上に、動物由来の病原体などの混入の危険が無いため、高い安全性が求められる再生医療の領域においても有用であると考えられる。そこで、ヒト型ゼラチンを組織培養用のディッシュにコーティングし、その上に細胞を播種して、細胞培養用基材としての有効性を調べた。ヒト型ゼラチン上で、ヒト線維芽細胞を培養したところ、動物組織由来のゼラチンやコラーゲンをを用いた場合と、ほぼ同様な接着・伸展性が認められた。カニクイザルES細胞を培養したところ、さらに興味深い結果が得られた。ヒト型ゼラチンをコートしたディッシュ上にマウス胎仔線維芽細胞

をフィーダーとして播種した後、カニクイザルES細胞を播種した。その結果、ES細胞は形態的に良好なコロニーを形成し（図4A）、30継代後もOCT4、SOX2、NANOGなどの未分化マーカーの発現が確認された。さらに、このES細胞を免疫不全マウスの皮下および腎皮膜下に移植したところ、外胚葉、中胚葉、および内胚葉のいずれの組織にも分化可能であることが判り、多分化能が保持されていることも確認できた（図4B）。これらの結果は、ヒト型ゼラチンが、ヒトES細胞やiPS細胞の培養にも適していることを示唆しており、再生医療の実現化に大きく貢献する可能性が高いと考えられた。

4. おわりに

養蚕業は、国内全域で危機的な状況に陥っている。遺伝子組換えカイコを用いた有用タンパク質生産が実現すれば、新しい産業としての養蚕業が復活する可能性がある。古典的な養蚕業のノウハウを生かしつつ、遺伝子組換えという新しいテクノロジーを組み入れ、新産業を創出することを目指す。そのためには、遺伝子組換

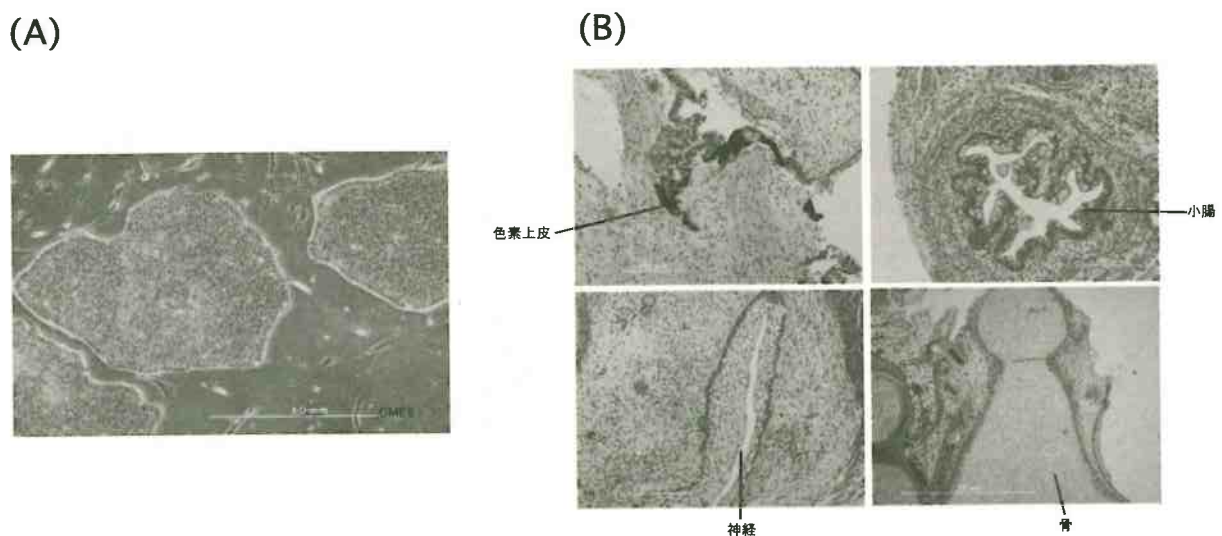


図4 ヒト型ゼラチンを用いたカニクイザルES細胞の培養

(A) ヒト型ゼラチン上で培養したカニクイザルES細胞。

(B) 免疫不全マウスへの移植結果。

えカイコで生産したタンパク質の最初の実用化成功例として、ヒト型ゼラチンの製品化に注力したい。まずは、研究用試薬として製品化し、次いで再生医療用の細胞培養用基材としての利用を検討する。さらに、遺伝子組換えカイコを用いて、抗体医薬を含めた医薬品の生産を実現し、この技術を、国際競争力のある日本独自のテクノロジーとして開発していきたい。

謝 辞

遺伝子組換えカイコを用いた組換えタンパク質生産の基本技術は、(独)農業生物資源研究所および広島県産業科学技術研究所等との共同研究により開発されました。

ヒト線維芽細胞を用いたヒト型ゼラチンの評価は、広島大学大学院理学研究科の小原政信准教授に、ES細胞を用いた評価は、国立成育医

療センターの阿久津英憲室長に実施していただきました。両先生に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Tamura, T. et al. (2000), *Nat. Biotechnol.*, 18, 81-84
- 2) Tomita, M. et al. (2003), *Nat. Biotechnol.*, 21, 52-56
- 3) Hino, R. et al. (2006), *Biomaterials*, 27, 5715-5724
- 4) Tomita, M. et al. (2007), *Transgenic Res.*, 16, 449-465
- 5) Ogawa, S. et al. (2007), *J. Biotechnol.*, 20, 531-544
- 6) Adachi, T. et al. (2006), *J. Biotechnol.*, 20, 205-219

◀国内情報▶

養豚で発生する汚水からリンを除去回収し、 リン酸肥料として再利用する技術を開発

1 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，
2 佐賀県畜産試験場，3 佐賀県窯業技術センター，4 神奈川県畜産技術センター，
5 神奈川県農業技術センター，6 沖縄県畜産研究センター，7 沖縄県農業研究センター
鈴木 一好¹・
脇屋 裕一郎²・古田 祥知子³・川村 英輔⁴・竹本 稔⁵・安里 直和⁶・眞境名 元次⁷

豚舎汚水中のリンを簡便な装置で結晶にして除去回収し、排水の水質を改善する技術を開発した。この技術は、リンを結晶化するMAP（リン酸マグネシウムアンモニウム）反応を利用したもので、汚水中にMAPの結晶が付着する網を入れて通気することで、水質汚濁物質であるリンを効率的に除去・回収できるようにした。また、回収したMAPは肥料や陶磁器原料として利用できることも明らかにされつつあり、価格が高騰しているリンを再利用する技術としても注目される。本技術は、汚水中の水質汚濁物質の濃度低減と有限資源の回収が同時に実施できる養豚農家で実施可能な技術であり、実用化に向けた今後の取り組みが期待されている。

1. はじめに

養豚業で発生する汚水（豚舎汚水）の中にはリンが高濃度で含まれており、豚舎におけるふんの尿汚水への混入率を一律30%と仮定した場合、国内で年間豚舎汚水中に排出される総リン量は約1万トンと推定される。このように養豚では大量のリンが豚舎汚水中へ排出されるが、リンは環境負荷物質であるため、豚舎汚水を放流する場合には水質汚濁防止法及び各都道府県の条例等により規制値以下にまで低減化させることが義務付けられている¹⁾。

一方、リンは石油などと同様、枯渇が懸念される有限資源である。わが国には採掘可能なリン資源は存在せず必要とするリン鉱石のほぼ全量を輸入に依存している。また近年、わが国へのリン鉱石の最大の輸出国で1990年代前半ではわが国の輸入量の半分近くを占めていた米国

SUSUKI Kazuyoshi¹, WAKIYA Yuichiro², FURUTA Sachiko³, KAWAMURA Eisuke⁴, TAKEMOTO Minoru⁵, ASATO Naokazu⁶, MAJIKINA Motoji⁷

¹〒305-0901 茨城県つくば市池ノ台2

が1995年に自国のリン鉱石の輸出を禁止したことに加え、米国に替わる形でわが国への輸出量が増大していた中国も最近リン鉱石の輸出規制を始めた。さらに最近、急速な経済発展を遂げる中国やインドなどの新興国におけるリン消費量の増大に伴いリン鉱石の国際価格が高騰しつつある。これらのことから、リン資源確保のため汚水や廃棄物からのリン再資源化の必要性が急速に高まっている¹⁾。

このような情勢の中、豚舎汚水中リンの除去・回収技術を構築することで、養豚現場からの水質汚濁物質であるリンの排出量削減を達成すると同時に枯渇有限資源でもあるリンの供給が求められている。豚舎汚水にはリン酸イオン、マグネシウムイオン、アンモニウムイオンなどが、リン酸を結晶化するMAP（リン酸マグネシウムアンモニウム）反応（図1）にちょうど適した濃度で含まれている。そのため、何らかの方法で豚舎汚水のpHを8～8.5の結晶化に適した値にまで上昇させれば、リン酸の結晶化反応が進行する¹⁾。苛性ソーダなどのアルカリ剤を加えれば確実にpHを上昇させることができ

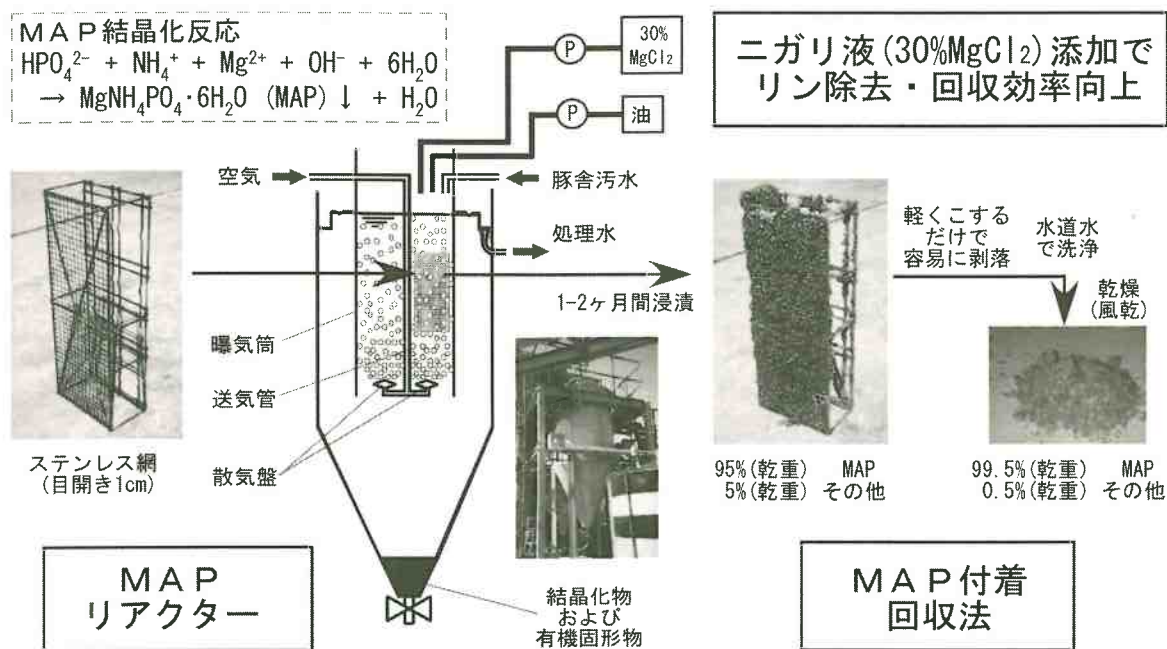


図1 結晶化法による豚舎污水中リンの除去回収技術の概要図

るが、劇物であるため養豚農家が用いるのには適さない。そこで簡便で安全な手段として、曝気により污水中に溶存していた炭酸ガスを追い出しpHを上昇させる方法^{2~4)}を採用してリンを結晶化させ、さらにはこれを回収することができる装置を開発するとともに、回収したリンの再利用の可能性についても検討した。

2. リン除去・回収技術

豚舎污水を曝気することで污水のpHを上昇させMAP反応を誘導する装置として、污水中に空気を送る「曝気部」と、污水中の固形分を沈殿分離する「沈殿部」を併せて有するMAPリアクター（図1）を考案した^{4, 5)}。これは、污水处理施設のうち污水原水が流入する部分に設置し、稼働させることを想定している⁶⁾。曝気することで污水のpHを上昇させることができ、污水のpHが上昇すると結晶化反応であるMAP反応が進行する。生成したMAPや污水中の浮遊物質をMAPリアクターの沈殿分離機能により污水から取り除くことで、污水中の全リ

ン濃度や浮遊物質濃度が低減化できる。3年間にわたる実証運転の結果、曝気により曝気筒内の豚舎污水のpHを8~8.5まで上昇させることができるのと同時に、処理水中の全リン濃度及び浮遊物質濃度を実証運転期間を通じ1/4~1/5に低減化できることが示され、良好な処理性能を確認することができた（図2）⁷⁾。

曝気している槽に金網などの回収用部材を沈めると、その表面にMAPが付着・成長する。付着・成長したMAPは回収用部材を引き上げた後に容易に剥落させることができる⁸⁾。（MAP付着回収法）（特許第4129953号：畜舎污水からのリン回収装置）（図1, 図3）。生成されるMAPのほぼ5割をMAP付着回収法にて回収でき、1m³の豚舎污水から最大で約170gのMAPを回収できた⁷⁾。肥育豚1,000頭規模の一貫経営の養豚場を想定すると、最大で1日におよそ1.7kgのMAPが回収できることになる。但し、回収できるMAP量は豚舎污水の性質（リン酸イオン濃度など）により異なるので注意が必要である。

MAPリアクターの設置コストを抑制する手

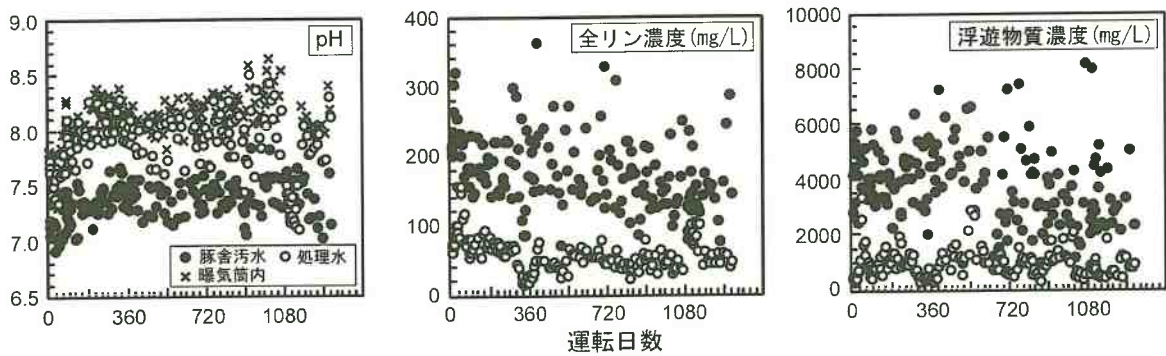


図2 3年間にわたるMAPリアクターの実証試験における運転性能
 (畜産草地研究所にて実施した実証試験)

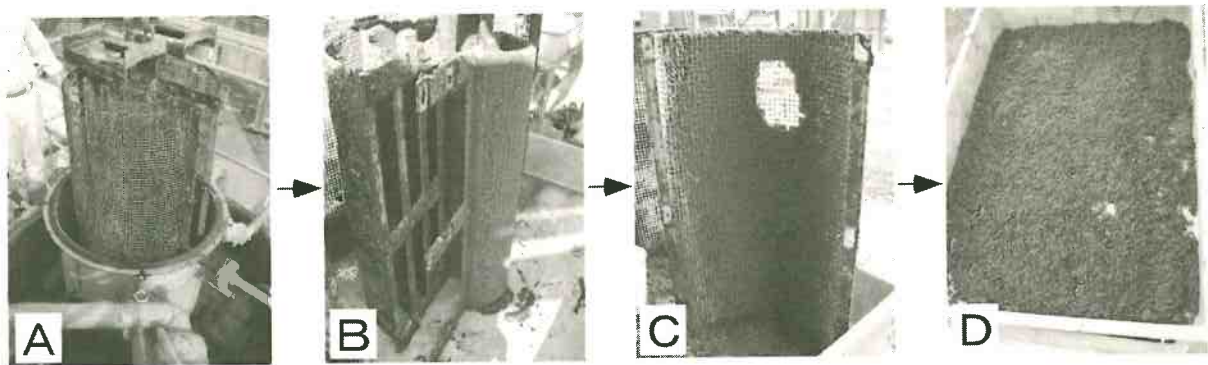


図3 MAP附着回収法の実証試験の様子 (畜産草地研究所にて実施)

A: MAPリアクター曝気部へ浸漬する直前のMAP附着回収用部材, B: 曝気部中へ1週間浸漬後に引上げ解体中の回収用部材, C: 回収用部材へのMAPの附着状況, D: 附着したMAPを剥落し乾燥中のもの

段として、既設の最初沈殿槽や流量調整槽の一部を区切り曝気用の設備を付設し簡易MAPリアクターを構築して対応する方法もあり、この方法でもMAPリアクターとほぼ同等の機能を発揮できることが明らかになった(図4)。なお、簡易MAPリアクターを用いた実証試験を国内の3軒の養豚農家において実施中で、それぞれ良好な結果が得られつつある。

除去回収効率を向上させたい場合は、曝気を実施している槽へのニガリ液(塩化マグネシウム液)などのマグネシウム液の添加が有効であ

る(図1)⁷⁾。入手が容易な場合は海水(約0.12%のマグネシウムイオンを含有)を利用することで、低コスト化をはかることも可能である⁹⁾。また、曝気部での発泡が激しい場合は、消泡用油の添加が有効である⁸⁾。

3. 回収したMAPの利用

回収したMAPは、天日乾燥後、肥料会社等における加工を経ることなく、直ちにリン酸肥料等として利用できることが明らかにされつつ

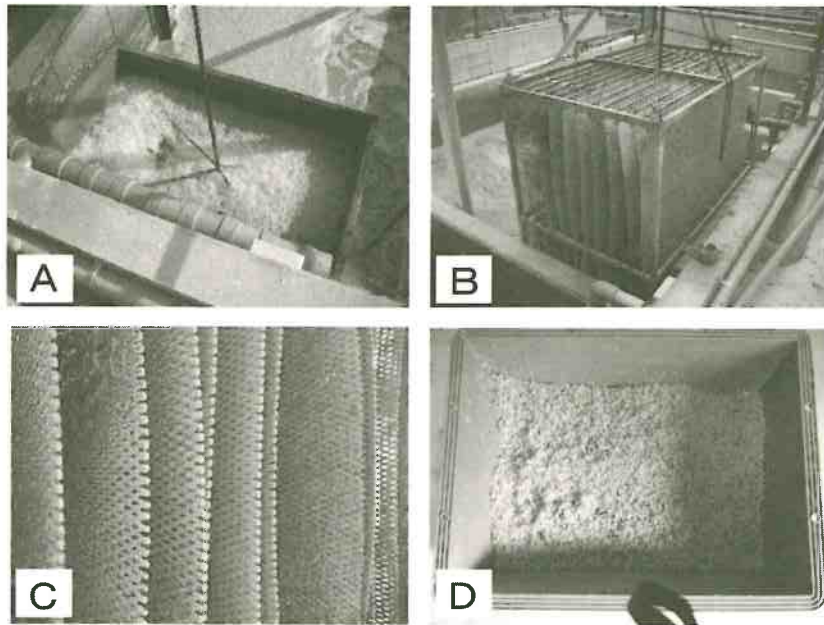


図4 国内の養豚農家（肥育豚2,400頭規模一貫経営）における
 簡易MAPリアクターを用いた実証試験の一例

A：既設の流量調整槽の一部を区切り曝気設備を付設して構築した簡易MAPリアクター，
 B：簡易MAPリアクターの曝気部に浸漬させたMAP附着回収用部材(金網)，
 C：回収用部材表面に附着したMAPの拡大図，D：附着したMAPを剥落し乾燥中のもの

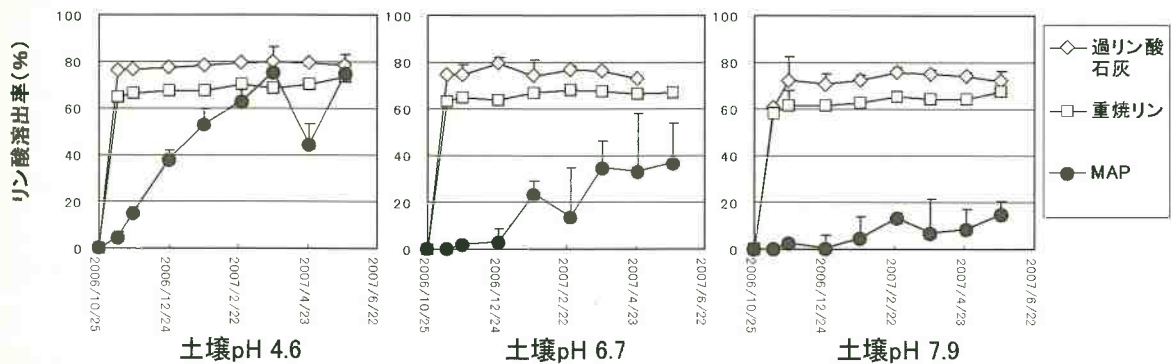


図5 pHの異なる土壌におけるMAP中リン酸の溶出特性

溶出特性は、回収されたMAPをガラス繊維ろ紙に封入後、国頭マージ (pH4.6)、島尻マージ (pH6.7)、ジャーガル (pH7.9) の3種土壌に埋設し、一定期間に溶出したリン酸量により評価した。

ある。市販のリン酸肥料（過リン酸石灰や重焼リン）よりもゆっくりと溶出すること、土壌のpHによりMAP中リン酸の溶出のパターンが異なること（図5）^{10, 11)}、市販のリン酸肥料に比べてタマネギ栽培にMAPが優れており、それ以

外の作物（ニンジン、スイートコーン、キャベツ）でもMAPは市販のリン酸肥料と遜色ない肥効を示すこと（表1）、などが明らかとなった。釉薬などの陶磁器原料としての利用も検討している。

表1 回収されたMAPの施用が各種作物の収量に及ぼす影響

作目 部位	タマネギ		ニンジン		スイートコーン		キャベツ	
	結球重	葉重	根部重	葉重	雌穂重	茎葉重	結球重	外葉重
MAP区	4838 ^a	556 ^a	4294 ^a	1162 ^a	1796 ^a	2513 ^a	3927 ^a	3377 ^a
重焼リン区	4148 ^b	418 ^b	4061 ^a	1226 ^a	1771 ^a	2512 ^a	4175 ^a	3382 ^a
過リン酸石灰区	3420 ^c	335 ^c	4201 ^a	1147 ^a	xxx	xxx	xxx	xxx
無リン酸区	xxx	xxx	xxx	xxx	1623 ^b	2416 ^a	4088 ^a	3338 ^a

(g/m²)

* 腐植質黒ボク土壌(pH6.0~6.5)における栽培試験の結果

* Tukey多重比較検定法で異符号間に危険率5%で有意差有り

* 2圃場でそれぞれ、タマネギ→ニンジン、スイートコーン→キャベツの順で栽培を行った。

4. おわりに

わが国は必要とするリンを全て輸入に頼っていることに加え、近年の穀物増産等に連動してリン価格が急騰していることから、今後リンの回収再利用の動きはますます強くなるものと思われる。そのような情勢の中、本技術は簡便な手段にて豚舎汚水中リンを除去できると同時に回収もできることから、養豚農家でも実施可能な水質汚濁物質濃度低減化と有限枯渇資源回収を同時に実施できる技術として、今後の普及が期待される。

なお、本研究は農林水産省の委託プロジェクト研究「農林水産バイオリサイクル研究」(平成14~17年度)により構築された技術を基本とし、農林水産省の競争的研究資金である「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業(現:新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業)」(平成18~20年度)により当該技術の簡易化・低コスト化や回収物の利用試験を実施しているものである¹²⁾。

文 献

- 1) Suzuki, K. et al. (2006), JARQ, 40(4), p341-349.
- 2) 脇信利ら (1987), 用水と廃水, 29, p636-640.
- 3) Battistoni, P. et al. (1997), Water Res, 31(11), p2925-2929.
- 4) Suzuki, K. et al. (2002), Water Res, 36(12), p2991-2998.
- 5) 鈴木一好 (2005), 畜産の研究, 59(1), p98-104.
- 6) 鈴木一好 (2006), 農業技術, 61(1), p33-38.
- 7) Suzuki, K. et al. (2007), Bioresource Technol, 98(8), p1573-1578.
- 8) Suzuki, K. et al. (2005), Bioresource Technol, 96(14), p1544-1550.
- 9) 鈴木直人ら (2008), 日本畜産学会第109回大会講演要旨, p149.
- 10) 上山紀代美ら (2007), 日本土壤肥料学会講演要旨集第53集, p148.
- 11) 眞境名元次ら (2007), 日本土壤肥料学会講演要旨集第53集, p149.
- 12) 鈴木一好 (2007), 畜産の研究, 61(2), p275-280.

◀国内情報▶

天然油脂由来非イオン系界面活性剤を用いた スギ花粉飛散抑制技術の開発

¹東京農業大学 国際農業開発学科, ²日油株式会社 油化事業部 油化学研究所,
³日油株式会社 油化事業部

小塩 海平¹・山仲 藍子²・嶋田 昌彦²・椎野 太二郎²・鶴岡 邦昭²・柴山 俊朗³

天然油脂由来の界面活性剤をスギに散布処理し、雄花に対する選択的褐変効果のスクリーニングを行った。非イオン系界面活性剤のうち、種々のオレイン酸化合物でスギ雄花に対する褐変効果が認められた。これらの天然油脂由来の非イオン系界面活性剤は、安全性の高さから食品添加物として利用されているものもあり、近い将来、環境にやさしいスギ花粉飛散防止技術として開発が期待される。

1. はじめに

現在、日本におけるスギ花粉症患者は国民の約20%にも上るといわれており¹⁾、年間の経済的損失はおよそ2,860億円にも達すると概算されている²⁾。さらに花粉症予備軍は、若年層を中心に国民の50~60%に及ぶとみなされており³⁾、将来にわたって大きな社会問題となっている。

花粉症の治療法や花粉の飛散予報などの技術の進展は目覚ましいものがあるが⁴⁾、根本的な対応策としては、スギ花粉そのものの飛散を抑制するのがもっとも望ましいことはいままでのない。著者らは、当初、“鳥もち作戦”と称し、松脂やアルギン酸、ゴム樹脂や植物油など、粘性の高い天然物を処理して花粉をからめとり、飛散を抑制する技術を開発することをもくろんでいたのだが、偶然にも、植物油脂を処理すると、スギの雄花が選択的に褐変・枯死すること

KOSHIO Kaihei¹, YAMANAKA Aiko², SHIMADA Masahiko², SHIINO Daijiro², TSURUOKA Kuniaki², SHIBAYAMA Toshiro³

¹〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

²〒660-0095 兵庫県尼崎市大浜町1-56

³〒150-6019 東京都渋谷区恵比寿4-20-3

恵比寿ガーデンプレイスタワー

を見出した。その後、主として食品あるいは食品添加物である天然油脂およびその誘導体である界面活性剤をスギに散布処理し、雄花に対する選択的褐変効果のスクリーニングを行ってきた。今回はこれまでの研究概要について、紹介してみたい。

2. 一石二鳥の効果を有するスギ雄花褐変技術

スギ花粉は直径30-40 μ mの突起を持った独特の形をしており(図1)、米粒大の雄花の中に約30-40万粒が形成されることが知られている(図2)。著者の一人は、サラダ油の5%溶液をヘリコプターで散布することによってスギ雄花を効率的に褐変・枯死させることに成功したが(図3)⁵⁾、その効果は、雄花の着生が観察され始めた8月から9月が高く、それ以降急激に減少することを見出した⁶⁾。花粉壁は難分解性のスポロポレニン主成分とするエキシンで構成されているため⁷⁾、いったん花粉が形成されてしまうと花粉自体を殺したり、飛散を抑制したりするのは難しいが、イネの障害型冷害の例にも見られるように、花粉形成に付随してタバート細胞のプログラム細胞死などが起こる減数分裂期は、外部環境の変化に対して非常に敏



図1 スギ花粉の顕微鏡写真
直径は約30－40 μmでユニークな突起がある。

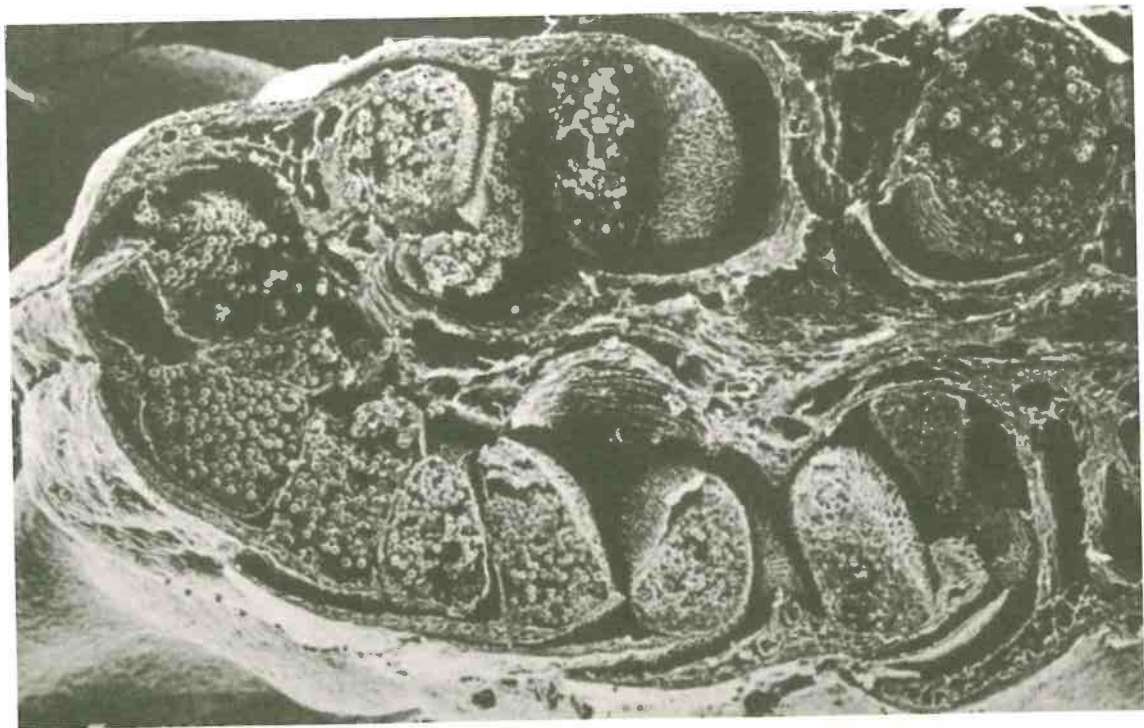


図2 スギ雄花縦断面のSEM写真
米粒大の雄花に約30－40万粒の花粉が詰まっている。



対照区

サラダ油5%乳化液散布区

図3 サラダ油処理によりスギ雄花は褐変・枯死し、脱落する

感な時期である。幸い、スギは裸子植物であり、雄花が枝の先端にまとまって着生する性質を持っているため、雄花が肉眼で観察できるようになった時点で適当な薬剤を散布処理し花粉の形成を阻止すれば、スギ花粉の飛散防止の根本的な解決策となりうる可能性がある。また花粉形成を阻害することによって雄花を褐変・枯死させることが可能となれば、本来花粉形成に用いるべき大量のエネルギーをスギの木材形成にまわすことができ、木材としてのスギの付加価値を高めることにもなり、まさに一石二鳥の技術となる。現在、育種によって“爽春”などの無花粉スギが育成され⁸⁾、既存林の伐採と新たな植栽が行われつつある地域もあるが、労力と時間を要する上に、木材としてのスギの価値が軽視され、しかもスギ林の持つ二酸化炭素吸収能や洪水緩衝機能など、何世代にもわたる先人の努力の賜物が失われようとしていることは無念極まりないことである。著者らが開発しつつある天然物由来の界面活性剤を用いた花粉形成阻止技術では、スギの雄花だけを選択的に褐変・枯死させることにより木材としてのスギの価値を維持することが可能であり、スギ林の所有者と行政、さらには花粉症被害者との間の合意形成も比較的容易に行われるものと考えられる。

3. オレイン酸誘導体非イオン系界面活性剤の効果

著者らは“鳥もち作戦”後、植物油脂の構成成分であるオレイン酸の効果に着目してきたのだが、ジグリセロールトリオレート、グリセロールジオレート、グリセロールモノオレート、ペンタエリスリトールジオレート、ソルビタン植物系脂肪酸（16, 18, 18:1）トリエステル、ソルビタントリオレートなどの主としてオレイン酸誘導体である非イオン系界面活性剤の方が、雄花に対する選択的褐変効果に優れ、処理時期も長く確保できることが明らかになった（図4）。これらの界面活性剤を5%の乳化液に調整して50ml/m²程度葉面散布すると、約1ヵ月後には、雄花のみが褐変・枯死し、やがて脱落する。これらの界面活性剤がどのような作用メカニズムで雄花のみを選択的に褐変・枯死させるのについては、現在まだ検討中であるが、これまでの実験結果から、雄花と針葉への浸透性の違いよりは、界面活性剤に対する雄花と針葉における感受性の違いが大きく寄与しているように思われる。



図4 オレイン酸およびオレイン酸誘導体非イオン系界面活性剤がスギ雄花および針葉の褐変に及ぼす影響

左から、対照区（水）、ジグリセロールトリオレート5%、グリセロールジオレート5%、グリセロールモノオレート5%、ペンタエリスリトールジオレート5%、ソルビタン植物系脂肪酸（16, 18, 18:1）トリエステル5%、オレイン酸5%、ソルビタントリオレート（ノニオンOP85R）5%処理区。散布処理は2006年9月20日に行った。雄花のみを選択的に褐変させる効果が観察された。

4. おわりに：スギとの共生を目指して

日本書紀にはスサノオがスギの植林を命じる件があり、また万葉集を繙けば、柿本人麻呂が「いにしへの人の植ゑけむスギが枝に霞みたなびく春は来ぬらし」と詠い、先祖代々、営々と行われてきたスギの植林事業を頌栄している。遠山富太郎が名著「杉の来た道」⁹⁾の冒頭で述べているように、まさに「スギは日本の杉である。そして、日本はスギの日本であった」といえよう。昨今、スギの存在自体が嫌悪されるような時代になりつつあるが、従来、日本人はスギと共生してきたはずである。著者らの開発しつつある天然油脂由来非イオン系界面活性剤を用いたスギ花粉飛散抑制技術が、スギとの共存の道を切り開くものとなることを願ってやまない。

文 献

- 1) 北村嘉章ら（2002），なぜアレルギー性鼻炎は増加しているのか？ 四国医誌 58:267-271
- 2) 中村昭彦ら（2002），全国耳鼻咽喉科学会会報 10:5215-224
- 3) 高岩文雄ら（2006），化学と生物 44:282-284
- 4) 今井透ら（2002），花粉症治療の最前線（ここまで進んだ花粉症治療法。佐橋紀男+NPO花粉情報協会，岩波アクティブ新書） 57-114
- 5) Koshio Kaihei et al. (2000), J. For. Res. 5:77-80
- 6) Koshio Kaihei et al. (1995), Plant and Cell Physiology 36:1511-1517
- 7) 伊藤卓也ら（2008），ブレインテクノニュース 127, 7-11
- 8) Saito Maki et al. (1998), J. For. Res. 3:173
- 9) 遠山富太郎（1976），杉の来た道 中公新書

◀国内情報▶

精度の高い施肥作業を支援する「可変施肥装置」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

西村 洋・林 和信・堀尾 光広・紺屋 秀之・松尾 陽介・濱田 安之

肥料の物性（かさ密度）、施肥量（10a/kg）をボタン操作で入力し、作業速度に応じて肥料の繰出量を制御する機能を持つ可変施肥装置を、田植機の側条施肥機や乗用管理機搭載式の散粒機などに搭載した可変施肥機を開発し、計画的な施肥を高い精度で行えることが実証された。また、GPSを搭載した作業ナビゲータと連動させることにより、あらかじめ作成した施肥マップに応じた可変施肥作業を実現できた。

1. はじめに

水稻を中心とする我が国の農業では、高い品質を求める実需や消費者側のニーズ、石油の高騰による肥料価格の上昇などを背景として、精度の高い施肥に対する要望が強まっている。例えば、受託作業を多くこなす大規模経営においては、ほ場の特性に応じた施肥量の調整が必要であり、一筆毎に施肥量の設定を変更することがある。また、依頼主の要望に応じて肥料そのものをほ場毎に変える必要性も出てくる。現行の施肥機ではこのような場合、施肥機に貼り付けられた、肥料の種類、施肥量から繰出装置の設定を指示する早見表を見て調整するが、大まかな調整はできても十分な精度を得るためには試し繰り出しを行って確認する必要がある。また、作業速度に応じて繰出量を制御することも精度の高い施肥を行うために必要な技術であるが、田植機の側条施肥機以外には標準でこのような機能を利用することができない。そのため現行の施肥用機械では、要望される精度を十分に満たすことが困難である。そこで、生研センターでは「肥料の種類の変化、施肥量の変化に柔軟に対応して簡単に機械設定ができ、速度連

NISHIMURA Yoh, HAYASHI Kazunobu, HORIO Mitsuhiro, KONYA Hideyuki, MATSUO Yosuke, HAMADA Yasuyuki
〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

動及び可変施肥を可能とする」可変施肥装置を、次世代型農業機械等緊急開発事業において、井関農機(株)、初田工業(株)、(有)東製作所、ヤンマー農機(株)と共同して開発したので概要を報告する。

2. 可変施肥装置に求める機能

対象作物が水稻であることから、基肥用と追肥用に対応した施肥機を開発ターゲットとした。基肥用は田植機の側条施肥機、追肥用は、水田用栽培管理ビークルまたは乗用管理機に搭載して利用する粒状物散布機（散粒機）である。開発する可変施肥装置は、これらの施肥機に搭載することで以下のような機能を果たす。

- ① 肥料のかさ密度と設定施肥量から繰出ロールの回転数を制御する方式とし、施肥量（kg/10a）と肥料のかさ密度を数値入力するだけで設定に対して±5%以内の精度が得られる
- ② 運転席に座った状態で作業中に施肥量の変更操作が可能である
- ③ 作業ナビゲータに接続して通信を行い、作業ナビゲータからの指示によって自動的に施肥量を変更できる

なお、作業ナビゲータとは、生研センターが開発したGPSを利用したコンピュータシステム、農業用のカーナビである。可変施肥装置は、

この作業ナビゲータに接続することによって、GPSから得られる位置情報とあらかじめ準備した「施肥マップ」に基づき、ほ場内作業中にも施肥量の変更を完全に自動で行うことが可能となる。

3. 簡便で精度の高い施肥量設定機能

国内で使用されている施肥機の繰出部には様々な方式があるが、精度の高い施肥機が採用している方式は、溝ロール式や回転目皿式に代表される容量式と呼ばれるものが多い。容量式では、原理的に繰出量は回転数に比例して変化する。しかし肥料のかさ密度が変われば、同じ一回転で繰り出される肥料の容積（かさ）は同じでも、質量が異なってくる。

開発した技術は、あらかじめ肥料のかさ密度を測定して、その数値をもとに繰出部の回転数制御を行うものである。この技術は、生研センターにおける第1期の農業機械等緊急開発事業で、初田工業(株)と共同で開発したもので、これからの施肥機の基本技術となるものと期待している。現在では組込型のマイコンが市販農業機

械の中で利用されることが多くなったため、より安価にシステムを組み上げることが可能になった。

図1は、専用開発されたコントローラを用いたシステム例である。この例に示す田植機側条施肥機の場合は、車速に連動した駆動軸と繰出ロールの間にある変速機構を利用して繰出ロールの回転数を制御する機械駆動式を採用している。開発の中では構造の異なる2機種を対象に新しい施肥機構を試作したが、ここに示した機械では、市販機がもつリンク式変速機構にDCモータを装着し、モータによってリンク比を変更することにより減速比を制御している。減速比の変更は電気的に行われるが、実際の駆動は全て機械的に行われるため、車速の変化や停止・発進に対する追従性や応答性が高い特徴を持つ。また、繰出ロール駆動軸に回転数検出センサが取り付けられており、実際の繰出ロールの回転数を検出、積算することにより、肥料の積算使用量を算出する機能を備えている。

一方、散粒機の繰出部は、田植機側条施肥機の機械駆動方式とは異なり、減速機付きDCモータによって直接駆動され、モータの回転数を

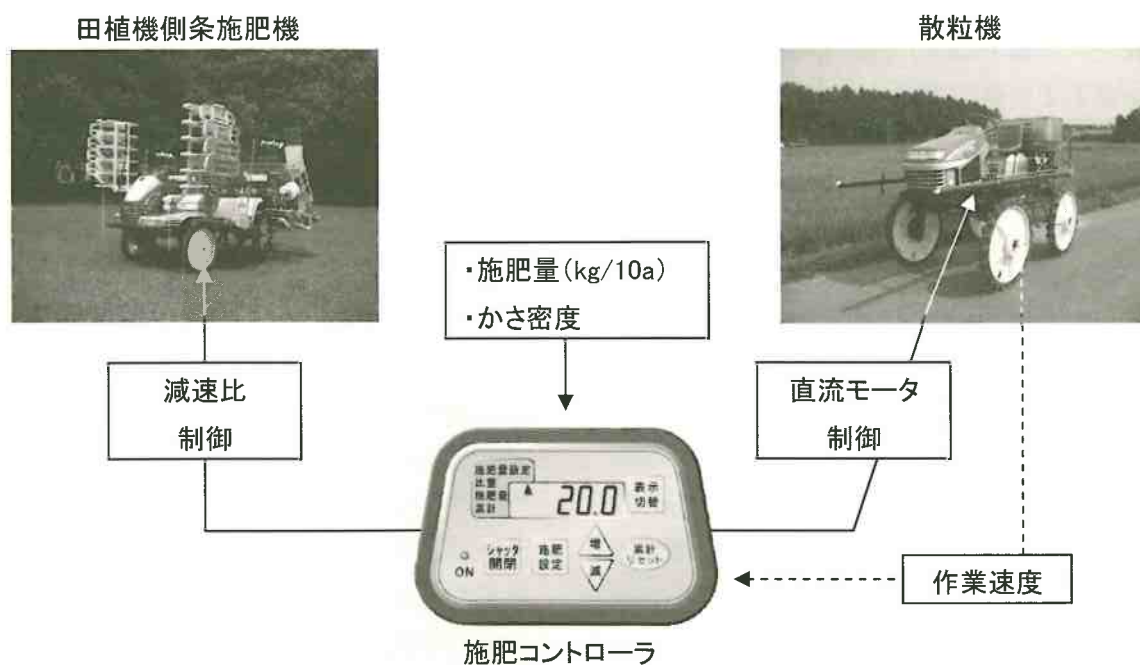


図1 施肥コントローラを利用した構成例

表1 可変施肥装置の主な仕様

	基肥用		追肥用	
	I機	Y機	粒状物散布機	散粒機
作業幅	2.4m(8条)		7.5m	10m、15m(延長時)
作業幅変更単位	0.3m(1条毎)		1.25m	5m、7.5m(延長時)
散布量設定範囲	10～80kg/10a		1～80kg/10a	1～150kg/10a
散布可能資材	粒状化成肥料		粒状化成肥料 粒剤	粒状肥料(有機肥料含) 粒剤
繰出方式	溝ロール	回転目皿	ゴムロール	
繰出部個数	8	8	6	2
コントローラ 入力項目	かさ密度、設定施肥量(kg10a)			

変更することにより施肥量を調整する方式となっている。施肥コントローラを利用し、DCモータの回転数及び回転方向を、走行本機から得られる車速信号と設定施肥量から算出される値によって制御することにより施肥量の調整を行う方式を採用している。

可変施肥装置を搭載した施肥機の主な仕様を、表1に示す。

4. 施肥量を作業中に変更する機能

かさ密度、施肥量及び作業速度によって繰出部の回転数制御が可能になれば、作業中に施肥量を変更することは容易に可能となる。

1) 手動可変施肥モード

コントローラの増減ボタンで、施肥量を1kg/10a単位で増減できるようにしたもので、作業中のボタン操作で自由に施肥量を変更することができる。この機能は、ほ場内の地力むらを長年の経験から知っていたり、生育むらを達観で把握することのできる経験豊かなプロの農業者用であり、これまでは機械を止めて設定し直す必要があったが、この機能を利用すれば作業中に、高い施肥精度を維持したまま簡単に施肥量を変更できる。

2) 自動可変施肥モード

作業ナビゲータと連動させることによって、あらかじめ用意した施肥マップに応じて、ほ場内の場所毎に適正な施肥を自動的に行う機能である。作業ナビゲータと可変施肥機はRS-232Cで接続され、作業ナビゲータ側ではGPSで得られた位置情報と施肥マップを照合して施肥量データを可変施肥機側に送る。施肥量データを受け取った可変施肥機側は、データ通りに設定を変更する。この機能を利用すれば、事前に検討して施肥マップを作成すれば、オペレータは施肥量を意識することなく作業を行うことができる。

5. 実証試験における可変施肥機の利用とその効果

可変施肥機については3カ年の開発を経た後に、実証試験を4カ年にわたって行い、生育情報、収穫情報などに基づいた施肥設計と可変施肥機を組み合わせた日本型水稻精密農業システムを、二つのモデルで効果検証した。

1) 広域管理における利用と効果

広域管理では、我が国の水田が30a程度の比較的小規模な区画で分割されている特性を活かして、ほ場一筆単位で情報を収集し管理する精

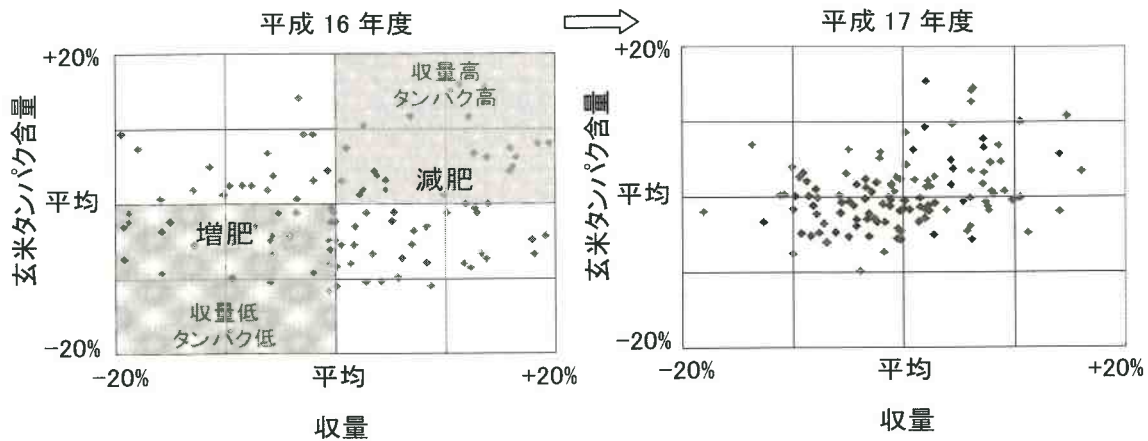


図2 広域管理による可変施肥機の利用事例

密農業をモデルとした。実際には、宮城県大崎市の大規模個人農家の45ha、約170ほ場全てを対象として、ほ場毎の収量－タンパク含量情報から基肥の施肥設計を行い、基肥用可変施肥機で施肥作業を行うという試験を3カ年にわたって実施した。このモデルで利用された可変施肥機能は、ほ場毎に異なる施肥量を、簡単に設定して作業を行う部分で、当初の目標通りの性能を発揮して、高い精度を維持して効率よく施肥作業を行うことができた。

図2の左側は精密農業を導入する以前のグラフで、横軸が収量、縦軸がタンパク含量を示している。この結果を受けて、収量が高くタンパク含量も高いほ場については肥料を減らし、収量もタンパク含量も低いほ場は肥料を増やすという、品質揃いの向上に目標を置いた基本的なルールに基づいて施肥設計を大幅に変更した結果、図2右側のように、タンパク含量のほ場間のむらが2～3割小さくなった。

2) 局所精密管理における利用と効果

局所精密管理は、地力むらの大きいほ場をメッシュに分割して、情報取得とそれに基づく管理を行う、いわば最も原作に近い精密農業のモデルである。実際には秋田県秋田市の基盤整備後2

年目の水田3筆を対象とし、基肥・穂肥を均一施肥する対照区に対して、土壌調査結果及び慣行生育情報に基づいて基肥・穂肥をメッシュ毎に変える可変Ⅰ区、メッシュ毎の収量－タンパク含量及び携帯式生育情報測定装置データに基づいて基肥・穂肥をメッシュ毎に変える可変Ⅱ区を設定して管理した。このモデルで利用された可変施肥機能は、GPSを搭載した作業ナビゲータと可変施肥機（基肥用、追肥用）を連動させた自動可変施肥モードである。メッシュ毎の地力、生育、収量、品質などの情報から施肥マップを作成して作業ナビゲータに読み込ませ、GPS位置情報と施肥マップを照合して可変施肥

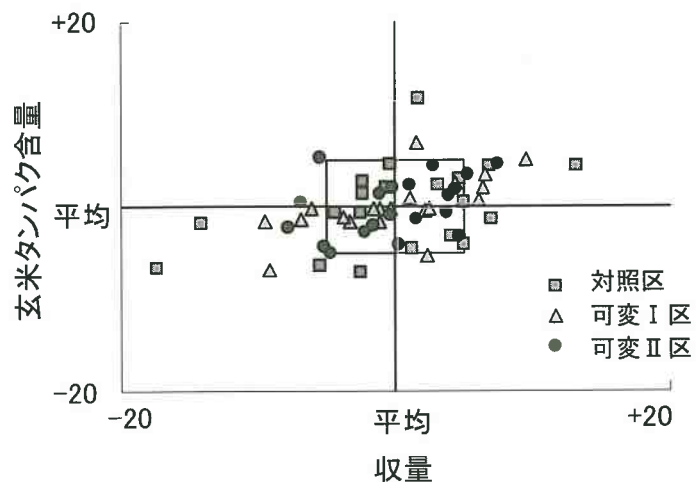


図3 局所精密管理による可変施肥機の利用事例
(中心部の野線は±5%)

機を制御するという高度なシステムも順調に稼働し、精度の高い局所精密管理を行うことができた。その結果は広域管理と同様で、図3のようにメッシュ情報に基づく施肥マップの作成と精密可変施肥によって、玄米タンパク含量のメッシュ間のむらが大きく減少した。

6. おわりに

実証試験は、精密農業の効果を検証するために高度な仕組みを中心として実施してきたが、簡単な操作で1kg/10a単位の施肥量を設定でき、また実際に高い精度で施肥できるのも可変施肥装置付の施肥機である。品質重視の肥培管理と

いう視点も重要だが、高騰する資材費をいかに有効に利用するかという視点も重要になっている昨今の農業情勢を考えると、可変施肥装置を利用するメリットはさらに幅広く想定できそうである。ここで紹介した機械はまもなく市場に投入される予定である。

文 献

- 1) 西村 洋 他 (2006), 平成18年度成果情報, 農研機構
- 2) 生研センター平成18年度研究報告会資料 (2006)

お詫び (本誌第128号の文献情報)

本誌第128号(2008年(平成20年)7月15日発行)から文献情報(植物関係)の執筆担当者が交代されましたが、その際編集部の手違いにより、新任者が抄訳に選定された外国文献(第128号)が、前任者の文献(第127号)と同じものとなってしまいました。深くお詫び申し上げます。(編集部)

◀文献情報▶

マウス胚の着床前の初期発生にはオートファジーが不可欠である

Autophagy Is Essential for Preimplantation Development of Mouse Embryos.

S. Tsukamoto^{1*}, A. Kuma^{1,2†}, M. Murakami¹, C. Kishi¹, A. Yamamoto³ and N. Mizushima^{1,2}¹Department of Physiology and Cell Biology, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo.²SORST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi.³Department of Bio-Science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, Nagahama.

*Present address: Laboratory Animal Sciences Section, National Institute of Radiological Sciences, Chiba.

†Present address: Genome Research Institute, University of Cincinnati, Cincinnati, OH 45237, USA.

Science, 321, 117-120, 2008

受精直後、卵母細胞の母性タンパク質は急速に分解され、受精卵のゲノムにコードされる新しいタンパク質の合成が開始される。リソソームを細胞質成分の分解の場とするオートファジーは、受精直後に活性化され、受精直後の胚発生に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。Atg5はオートファゴソームの形成に不可欠な因子である。Atg5ホモ欠損マウスどうしの交配においては、産子は生まれるものの、娩出1日以内に死亡する。一方、Atg5ヘテロ個体どうしの交配においては、Atg5ホモ欠損マウスを作出することが可能である。Atg5ヘテロ個体どうしの交配によるAtg5欠損2細胞期胚におけるオートファジーのレベルは、正常個体と同レベルであったことから、Atg5ヘテロ由来卵子細胞質に存在する母性由来Atg5タンパク質が、胚形成初期において、表現型としてオートファジーに欠陥のある個体においても、胚

形成を手助けする可能性が示された。そこで、卵子中にAtg5遺伝子およびAtg5タンパク質を持たない、Atg5を卵子特異的に欠損したマウスを作製し、胚形成初期におけるオートファジーの機能が調べられた。その結果、オートファジーは、卵子形成や受精には必要ではないことが明らかとなった。また、Atg5欠損マウス由来の卵母細胞を、Atg5欠損雄精液を用いて受精させた場合には、4~8細胞期を越えての発生は認められないが、Atg5を持つ雄精液を用いて受精させた場合には、発生可能であった。タンパク質合成率は、オートファジー関連遺伝子を欠損した胚では減少していた。すなわち、オートファジーは、受精直後に活性化され、母性タンパク質の分解により必要なアミノ酸を確保し、着床前の発生、特に受精直後の初期発生には不可欠な因子である可能性が示された。ただし、オートファジーは発生の後半には必要ないかもしれない。鳥類、魚類、両生類と対比して、ほ乳類の着床前の発生は、細胞外の栄養分の蓄積がなく、非常にゆっくりと進行する。受精後のオートファジーがほ乳類において特異的であるかどうかは不明であるが、オートファジーは、ほ乳類の発生を助ける特異的な機構の可能性も考えられる。

胚発生には、まだまだ不明なことが多い。本論文より、Atg5により制御されるオートファジーによって、胚自体のタンパク質が分解され、初期発生に不可欠なアミノ酸を供給するというメカニズムが存在することが明らかにされた。ゲノム情報等の利用により、これまでブラックボックスであった胚発生のメカニズムが、今後さらに解明され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▶

イネ栽培化過程において穀粒幅を決める遺伝子の欠失が収量の増加をもたらした

Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication.

A. Shomura¹, T. Izawa², K. Ebana³, T. Ebitani⁴, H. Kanegae³, S. Konishi² and M. Yano³

¹STAFF, Japan. ²Plant Genome Research Unit, NIAR, Japan. ³QTL Genomics Research Center, NIAR, Japan. ⁴Toyama Agricultural Research Center, Japan.

Nature Genetics, 40, 1023-1028 (2008)

栽培化された作物とその祖先、近縁種との比較を行うことは、進化学上重要な意味を持つだけでなく、栽培化においてどのような選抜がかかったのかと言うことを明らかにし、今後の育種に応用することも可能となる。

本論文ではジャポニカイネの栽培化の過程で穀粒収量の増加に寄与してきた遺伝子を単離する目的で、ジャポニカイネ・日本晴とインディカイネ・カサラスとの間でQTL解析を行い、穀粒の幅を狭くする遺伝子 $qSW5$ を単離した。 $qSW5$ 領域には、日本晴において約1.2kbの欠失が存在しており、この1.2kbを含むカサラスのゲノム断片を日本晴に導入することにより、形質転換体の粒の幅が狭くなり、インディカイネ型となった。さらにカサラスにおいてこの領域に推定された3つの遺伝子(ORF1,2,3)のうち、ORF1をRNAi法によりノックダウンしたところ、多くの形質転換体カサラスの一粒重が重くなったことから、ORF1が $qSW5$ であろうと結論づけている。このORF1は、既知のタンパク質との相同性が見られない機能未知なタンパク質であったが、形質転換体の表現型からイネの外穎の細胞数を低下する機能を持つと考えられた。この研究から、著者らはインディカイネに対して $qSW5$ の機能欠失型対立遺伝子を用いた育種を行うことによって、新たなインディカ品種の育成が可能であろうと示唆している。次に、

様々な地域からとられた100以上のイネにおいて $qSW5$ 領域の塩基配列とその穀粒幅を調査したところ、 $qSW5$ の欠失が栽培化過程でのジャポニカイネの収量増加に大きく寄与したと考えられた。

さらに140以上イネ品種において、 $qSW5$ 以外の既知栽培化関連遺伝子である Wx (デンプン合成に関連し、食味の向上に寄与)遺伝子配列と、 $qSH1$ (脱粒性に関与)のプロモーター領域の塩基多型をそれぞれ調査した結果、インディカイネには、 $qSW5$ 、 $qSH1$ 、 Wx に多型がほとんどないのに対して、ジャポニカイネでは、様々な多型が存在していたことから、インディカイネとジャポニカイネは、栽培化が独立して起こったことが示された。この結果と、各品種における170からなるRFLPマーカーを用いたゲノムワイドな多型調査の結果を組み合わせることにより、ジャポニカイネの栽培化過程に関する考察を行った。3つの栽培化関連遺伝子がいずれも野生型であるイネはほとんど東南アジアの熱帯ジャポニカ品種であることから、ジャポニカイネの起源は東南アジアの熱帯ジャポニカイネであり、その後、栽培化の過程で起源地周辺において、 $qSW5$ 、 Wx への独立な変異が起こった。 $qSH1$ 変異は、 $qSW5$ 変異を持った植物に対して、起こった変異と考えられた。さらに $qSW5$ 、 Wx の変異品種が栽培域を広げ、主に中国周辺でそれらが独立に何度か互いに交雑があったことが、ジャポニカイネの栽培化に重要な役割を果たしていたと考えられた。

(抄訳：高田美信, TAKADA Yoshinobu, 東北大学 大学院生命科学研究所)

◀文献情報▶

シロアリ後腸生物叢のメタゲノム解析

Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite.

Warnecke F, Luginbühl P, Leadbetter JR. et al.

DOE Joint Genome Institute, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, California 94598, USA.

Nature, 450, 560-565 (2007)

シロアリといえば木造家屋を食い尽くす害虫としてよく知られている。しかし一方では、森林の倒木を分解することにより環境中の炭素代謝回転を促進するという重要な役割を担っている。木材は主にセルロースやキシランから成り、これらを栄養源として利用するためにはその分解酵素が不可欠である。しかしながらシロアリ自身は分解酵素を持っていないため、どのように木材を資化しているのか明らかになっていなかった。近年、セルロースおよびキシランの分解にシロアリ腸内の共生細菌が直接的に関与していることが報告された。さらに、シロアリの腸内共生細菌のメタゲノム解析結果をアメリカのグループが報告し、シロアリの腸内に生息し、セルロースを分解する原生生物の共生細菌RS-D17の全ゲノム配列の解析結果を日本のグループが報告した。今回は主にアメリカのグループの結果を中心に紹介する。

シロアリ腸内におけるセルロースおよびキシランの分解は、腸内の共生細菌に依存する場合と腸内に生息している原生生物に依存する場合の2通りが知られている。筆者らはコスタリカにおいて木材の分解を腸内の共生細菌に依存する樹上性シロアリ *Nasutitermes corniger* と *Nasutitermes epharatae* を採取し、後腸の腸内細菌叢について調査した。まず、16SリボソームRNA 遺伝子配列からその菌種を同定したところ、*Treponama* 属およびセルロース分解細菌として知られている *Fibrobacter* 門に属するバクテリアが多く発見された。続いてセルロースとキシレンの加水分解に関係するタンパク質の同定をメタゲノム解析により試みた。その結果、シロアリ腸内からグリコシド加水分解酵素

の活性部位と相同性を有する遺伝子が700以上見出された。これらの中には、セルロース分解系に関与するセルラーゼやセロビオースなどの遺伝子が100以上、キシラン分解系に関与するヘミセルラーゼやエンドキシラネースが約100含まれていた。これら遺伝子について解析を進めたところ、多くの遺伝子にシグナルペプチドが付与されていることが明らかとなった。さらに、これらタンパク質の存在が後腸で確認されたことから、共生細菌から分泌された加水分解酵素がシロアリ腸内の木材分解に寄与していると考えられた。この他にもセルロースとキシレンの分解に関与すると思われる遺伝子が数多く見出されており、さらに詳細な解析が待たれる。また、今回のメタゲノム解析からは炭素代謝に伴い発生した水素や二酸化炭素を利用する水素代謝および二酸化炭素還元の酢酸生成に関係する遺伝子群も発見されている。一方、木材には窒素源が少なく、シロアリ自体もアミノ酸やビタミン類を合成することができないため、窒素固定に共生細菌が関与していることが示唆されていた。今回のメタゲノム解析では窒素をアンモニアに変換する反応を触媒するニトロゲナーゼがシロアリ共生細菌から数多く発見された。さらにRS-D17の全ゲノム配列からはアミノ酸やビタミン類などの窒素化合物を合成する遺伝子群が見出された。これらことから、シロアリの食べた木材は共生細菌により加水分解されることでシロアリが炭素源として利用できるようになり、その結果生じた水素と二酸化炭素から共生細菌が酢酸を生成し、それをシロアリが利用するという炭素源を介した共生関係。さらに空気中の窒素をアンモニアに変換し、そこからアミノ酸やビタミン類を合成するという窒素源を介した共生関係が成立することによりシロアリが生育できることが明らかとなった。これらの知見を利用することにより、シロアリの共生細菌が木材からバイオ燃料を生産する過程で利用できる可能性があり興味深い。(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)

◀文献情報▶

イカのくちばしに見るミスマッチな組織のつなぎ方

The transition from Stiff to Compliant and Compliant Materials in Squid Beaks

Ali Miserez,^{1,2,3} Todd Schneberk,^{2,3} Chengjun Sun,^{2,3} Frank W. Zok,^{1*} J. Herbert Waite^{2,3*}¹ Materials Department, University of California, Santa Barbara, CA 93106, USA.² Department of Molecular, Cellular, and Developmental Biology, University of California, Santa Barbara, CA 93106, USA.³ Marine Science Institute, University of California, Santa Barbara, CA 93106, USA.*Science*, 319, 1816-1819 (2008)

生物は異なる組織が相互に連結しあった集合体である。軟骨と骨、貝殻と閉殻筋、爪と皮膚などは物理的に全く異なる組織が結合している例である。しかしながらこれらの異なる組織をつなぎとめるということによって接着面にストレスが生じたり、接触によるダメージを招くことは容易に想像できる。それにも関わらず強固な結合が維持されるのは、生物が力学的特性を示す“勾配”を持っているからだと考えられはじめている。歯の象牙質とエナメル質の結合、節足動物の外骨格、多毛類の顎、およびムール貝の足糸には全てこの勾配が報告されている。しかしどのように生体高分子が接着面近辺で振舞っているのかについてはこれまで、ほとんど知見がなかった。

カリフォルニア州立大学のWaite教授らのグループはアメリカオオカイカのくちばし (beak) を題材にこの事例を化学的、および力学的な手法で検証した。イカのくちばしの先端は全ての有機物の中で最も硬いと考えられているが、基部では柔軟な組織とつながっている。これをイカから外して観察してみると、先端部は黒くウイングと呼ばれる末端部に近づくに従い、色が半透明になる。

彼らはこれを先端部より末端部にかけて五つの部位に分割し、その化学組成の解析を行った。結果、先端部ではタンパク質・黒い色素が高濃度で含まれるがこれらは末端部に近づくに従い濃度が

低くなり、キチン質・水分はこれらとは逆の勾配様式をとることが明らかになった。色素成分に関しては質量分析を用いた解析から、His-3,4-dihydroxyphenyl-alanine (DOPA) 多量体であることが示された。このHis-DOPAはタンパク質のクロスリンクに関わることが想定されるが、詳細は明らかにされていない。

物質の変形しにくさを示すヤング係数はくちばしの先端部 (5GPa) と末端部 (0.05GPa) ではおよそ100倍異なる。この数値は色素量と相関する。しかしながら過酸化処理 (組織中のキチン以外的高分子は全て除去される) することによって、この数字は部位によらず0.03GPa程度にまで下がる。このことからキチン含量自体は強度にほとんど影響していないことが分かる。凍結乾燥した状態でのヤング率の値は部位によらず5-10GPaと高い値を示す。Nativeな状態では勾配を持つヤング係数が、脱水状態ではほぼ一定になってしまうという結果は水分含量がくちばしの強度の鍵を握る一つのファクターであることを示している。

次に上記五つの部位を用いてnative、凍結乾燥、および再水和、という三種の状態でのヤング係数を測定した。得られた係数を縦軸に、キチン含量を横軸にプロットしてみると、ヤング係数はキチン含量に逆相関することが分かった。キチン繊維は非常に硬質な繊維であることが知られているので、これは意外な結果である。同様にキチン+タンパク質 (全量から両者を除けばほぼ水分量になる) を横軸にプロットした結果から、キチンと水分量の比率がヤング係数に大いに影響していることが示された。

以上の結果から、イカのくちばしにおいてはタンパク質、色素、水分、およびキチンの濃度勾配が構造的に異なる組織をつなぎとめるのに大きな役割を果たすことが示された。タンパク質と色素中ではHis-DOPAを持つ未同定な分子の重要性が示された。また水分とキチンの比率や、くちばし中の水分量とその物性の鍵を握ることが明らかになった。

(抄訳：足立亨介, ADACHI Kohsuke, 日本水産株式会社 中央研究所)



バックナンバーのご案内
第 128 号
2008 年 7 月 15 日発行

特集「イネをめぐる先端研究」

- 1 ジーンターゲットングによるイネの分子育種
..... 土岐 精一・清水 力・遠藤 真咲・
..... 雑賀 啓明・阿部 清美・刑部 敬史
- 2 RNA サイレンシングの経路を介したイネの茎頂分裂組織
構築機構 佐藤 豊・野坂 実鈴・伊藤 純一
- 3 開花せずに受粉するイネとそのしくみ
..... 吉田 均・長戸 康郎

国内情報

クモが出す糸の成分を蚕に組み入れ、強度や伸縮性に優れた
「スパイダーシルク」を開発 中垣 雅雄
簡便で高感度なフタトゲチマダニの小型ピロプラズマ原虫
保有率検査法
..... 寺田 裕・金平 克史・大田 方人・神尾 次彦

魚や肉の鮮度を簡便・迅速に測定する「鮮度チェッカー」
..... 佐藤 実

野菜接ぎ木装置用自動給苗ユニットの開発
..... 小林 研・石綿 陽子・重松 健太・大越 崇博

地域の先端研究

農作物を病害から護る「乳酸菌農薬」の開発
..... 津田 和久・小坂 能尚・梅村 賢司・
..... 三富 正明・辻 元人・久保 康之

文献情報

新鮮な卵丘細胞の核と体内成熟卵あるいは体外成熟卵の細胞
質を用いたウシの核移植 (抄訳: 下司 雅也)
シロイヌナズナでの減数分裂を伴わない配偶子形成
..... (抄訳: 高田 美信)
麹菌の非相同組み換え修復に関与する *ligD* 遺伝子の欠損は
遺伝子ターゲットング効率を著しく上昇させる
..... (抄訳: 水谷 治)
キンギョでのニワトリ生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン II
による摂食への抑制効果 (抄訳: 奥野 敦朗)



バックナンバーのご案内
第 127 号
2008 年 5 月 15 日発行

総説

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
..... 黄川田 隆洋

国内情報

花粉制御への一歩 ー 花粉成熟に必須なシロイヌナズナ MSI
転写因子の同定 伊藤 卓也・篠崎 一雄
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 三輪 京子・藤原 徹
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
..... 小原 裕三
通電処理による鶏胸肉の物性と食味性の向上技術
..... 坂田 亮一・押田 敏雄・辻 聡・樋口 清志

果樹園用せん定枝粉碎搬出機の開発
..... 金光 幹雄・太田 智彦・山本 聡史

地域の先端研究

カンキツグリーンング病の簡易診断法 (スクラッチ法) の開
発 澤岨 哲也

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
..... (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 (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
..... (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
..... (抄訳: 大嶺 啓介)

編集後記

129号をお届けします。本号の総説では北本宏子氏（農業環境技術研究所）に生分解性プラスチック分解微生物による分解制御に関する研究の現状について、ご自身による新たな分解微生物の発見を含めてご紹介戴きました。プラスチックごみの処理が大きな環境問題となっている中、微生物による生プラの分解制御に関する研究の今後の展開が期待されます。

その他の研究情報としては、松山知樹氏（理化学研究所）にDNAマーキングによる栄養繁殖作物の品種・産地判別、青木考氏（かずさDNA研究所）らに質量分析情報を活用した代謝物アノテーション法、富田正浩氏（(株)ネオシルク）に遺伝子組換えカイコによる組換えタンパク質の大量生産、鈴木一好氏（畜産草地研究所）らに養豚で発生する汚水からのリンの除去回収とリン酸肥料としての再利用、小塩海平氏（東京農業大学）らに天然油脂由来非イオン系界面活性剤を用いたスギ花粉飛散抑制技術、西村洋氏（生研センター）らに精度の高い施肥作業を支援する「可変施肥装置」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）、高田美信氏（東北大学）、安田源太郎氏（カルピス（株））、足立亨介氏（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

～研究開発を強かに支援いたします～

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129号

平成20年9月15日発行

発行人 曾根 則人

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/>