

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

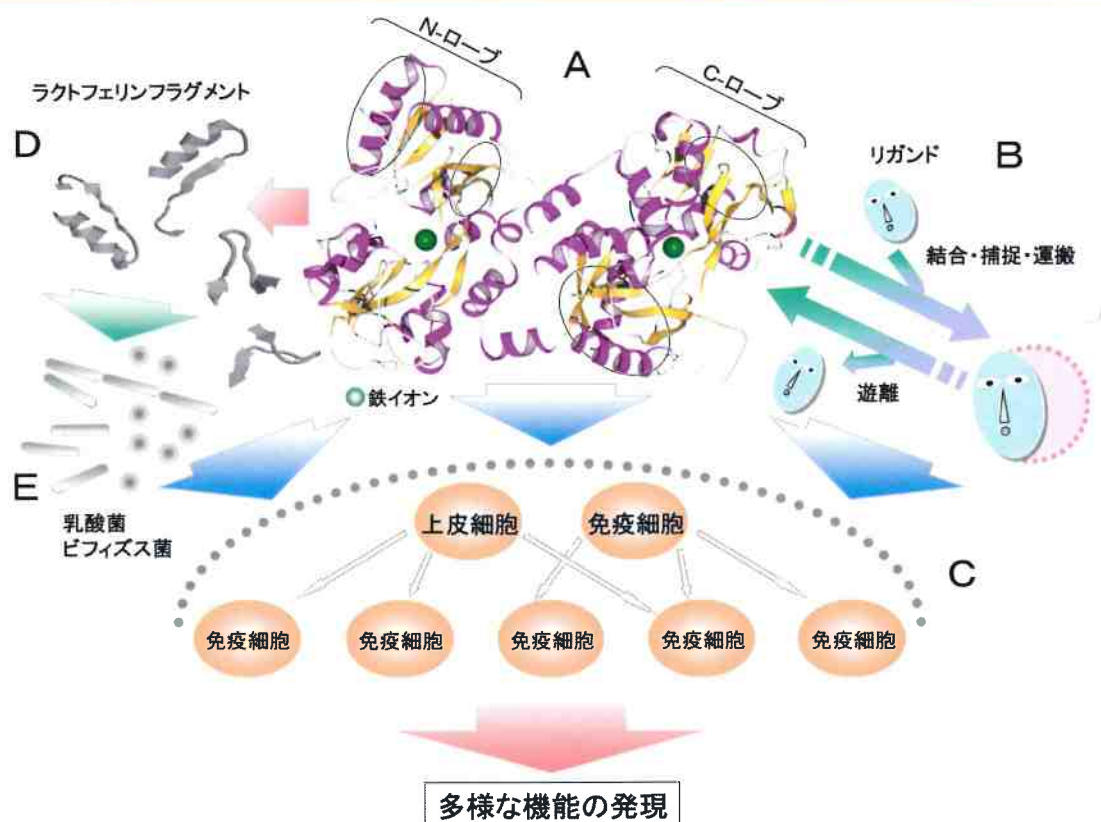
平成20年11月15日（隔月1回15日発行）
ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.130

15 NOVEMBER, 2008

ブレインテクノニュース



ラクトフェリンの多機能性発現のモデル

ラクトフェリンの構造,機能とその応用

北海道大学 大学院農学研究院

島崎 敬一

目次

総説

- ラクトフェリンの構造、機能とその応用 1
 島崎 敬一 (北海道大学 大学院農学研究院)

総説関連情報

- ウシラクトフェリンと骨芽細胞による骨様組織の形成 6
 高山 喜晴 ((独)農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所)

国内情報

- イネの粒幅を決める遺伝子の単離とジャポニカイネの栽培化過程の推測 10
 小西 左江子¹・正村 純彦²・江花 薫子³・矢野 昌裕³・井澤 毅¹ (¹(独)農業生物資源研究所 植物ゲノム研究ユニット, ²(社)農林水産先端技術産業振興センター 農林水産先端技術研究所, ³(独)農業生物資源研究所 QTLゲノム育種研究センター)
- 米粉パンに適した鍵因子を探る - 米粉用イネの画期的な品種開発を目指して 17
 川越 靖 ((独)農業生物資源研究所 植物科学研究領域)
- 遺伝子組換え樹木の野外試験 - キシログルカナーゼの過剰発現による高セルロース含量ポプラ - 22
 谷口 亨¹・林 隆久² (¹(独)森林総合研究所 森林バイオ研究センター, ²京都大学)
- 自脱型コンバインの事故事例と安全装備の実態に関する農業者調査結果 27
 富田 宗樹・川瀬 芳順・水上 智道・高橋 正光・塚本 茂善 ((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

- 業務用軟弱野菜の刈り取り再生栽培法 31
 岩崎 泰史 (埼玉県農林総合研究センター 園芸研究所 露地野菜担当)

文献情報

- 妊娠初期のヒッジの子宮以外の組織における Interferon (IFN)-Stimulated Genes の発現は、子宮静脈からの IFN- τ の内分泌的な移行により引き起こされる 35
 J. F. Oliveira et al. (*Endocrinology*, 149, 1252-1259, 2008) 抄訳: 下司 雅也
- テルペノイド系の新規植物ホルモンは枝分かれを抑制する 36
 M. Umehara et al. (*Nature*, 455, 195-200, 2008) 抄訳: 高田 美信
- Histoplasma capsulatum* α -(1,3)-glucan は β -glucan レセプターによる自然免疫認識を妨げる 37
 C. A. Rappleye et al. (*PNAS*, vol. 104, no. 4, 1366-1370, 2007) 抄訳: 水谷 治
- 皮下脂肪移植による代謝改善作用 38
 T. T. Tran et al. (*Cell Metab.*, 7, 410-420, 2008) 抄訳: 竹内 壱明

表紙の説明

図は、ラクトフェリンの有する様々な機能性を説明するモデルである。Aはラクトフェリンの特定部位(楕円で囲った部分など)が、抗菌性やレセプターとの結合に関与することを表す「十徳ナイフモデル」。Bはリガンドを結合・捕捉して複合体を形成し、ターゲットとなる組織に運搬して協同的あるいは拮抗的に機能する「キャリアモデル」。Cはラクトフェリンあるいはそのフラグメントが免疫細胞系に作用して、サイトカインなどによる細胞制御を誘導する「玉突きモデル」。その他にラクトフェリンとそのフラグメント(D)が腸内の乳酸菌やビフィズス菌の生育を促進し、これらの菌が免疫系に働きかける間接的な効果(E)も示した。

詳細については、1頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

ラクトフェリンの構造、機能とその応用

北海道大学 大学院農学研究院

島 崎 敬 一

ラクトフェリンが初めて報告されてほぼ70年となる。直接的な抗菌、抗ウイルス作用の他に、免疫系の賦活など生体調節機能も示す「多機能性タンパク質」である。近年は経口摂取によるラクトフェリンの有効性が認められ、医学および歯学分野での応用が進んでいる。本稿では主にラクトフェリンフォーラムでの諸発表に基づいて、その多機能性を紹介する。これら多機能性を説明するモデルも提示した。

1. はじめに

ラクトフェリンは1939年に Sørensen & Sørensen によって「赤色タンパク質」として報告され、ラクトトランスフェリンとも呼ばれていた¹⁾。感染防御作用の他にも生体調節の機能を示す『多機能性タンパク質』であるため、2年毎に開催される「ラクトフェリン国際会議」²⁻⁸⁾に多くの分野の研究者が集い、また国内では2004年から「ラクトフェリンフォーラム」が開催され^{9, 10)}、2008年11月の開催で3回目となる。ラクトフェリンについて数多くの解説があるが、これら国内外の2つの研究集会でラクトフェリン研究のほぼ全てを把握できる。本稿においてはラクトフェリンのタンパク質分子としての概略を述べ、機能についてはごく最近の成果の多くが網羅されている第2回ラクトフェリンフォーラム¹⁰⁾に基づいて記述した。

2. ラクトフェリンの分布と分離

ミルクとその他の分泌液、血液に含まれているが、種によってミルク中での含量には差があり、ウサギ、ラット、イヌのミルクにはほとんど無く、ヒトで最も多く含まれている。初乳での含量はかなり高く、実験室でラクトフェリンを分離する材料として適している。工業的には

SHIMAZAKI Kei-ichi

〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

脱脂乳やチーズホエイが原料となり、陽イオン交換樹脂に吸着させて分離する。カゼイン画分にも含まれるためカゼインをpH 4で懸濁し、遊離させてラクトフェリンを得る方法もある。さらにイオン交換膜やイオン性界面活性剤を用いた分離法も開発されている。図1にラクトフェリンを製造・販売している企業を示した。また、ヒトラクトフェリンについては、組換え体を微生物によって発現させ、臨床応用を目指している。ヒトラクトフェリンを分泌するトランスジェニックウシも作成され、また米やイチゴに発現させた例もある。

3. 分子構造

トランスフェリンファミリーに属し、トランスフェリンのアミノ酸配列と約60%のホモロジーを示す。NローブとCローブから構成され、各々に鉄イオン結合部位がある。また、アポ型に鉄が結合することによって、鉄結合ドメインのコンフォメーションが変化し、分子の安定性が増加する。糖含量は7~12%で、アスパラギン結合型糖鎖である。ウシラクトフェリンでは糖鎖結合部位が5ヶ所あるが、糖鎖は4本である。ラクトフェリン糖鎖の役割として、構造の安定性の保持、プロテアーゼ抵抗性などの他に、単球やマクロファージとの相互作用なども報告されている。電気泳動やクロマトグラフィーのパターンから不均一性が観察されることもある

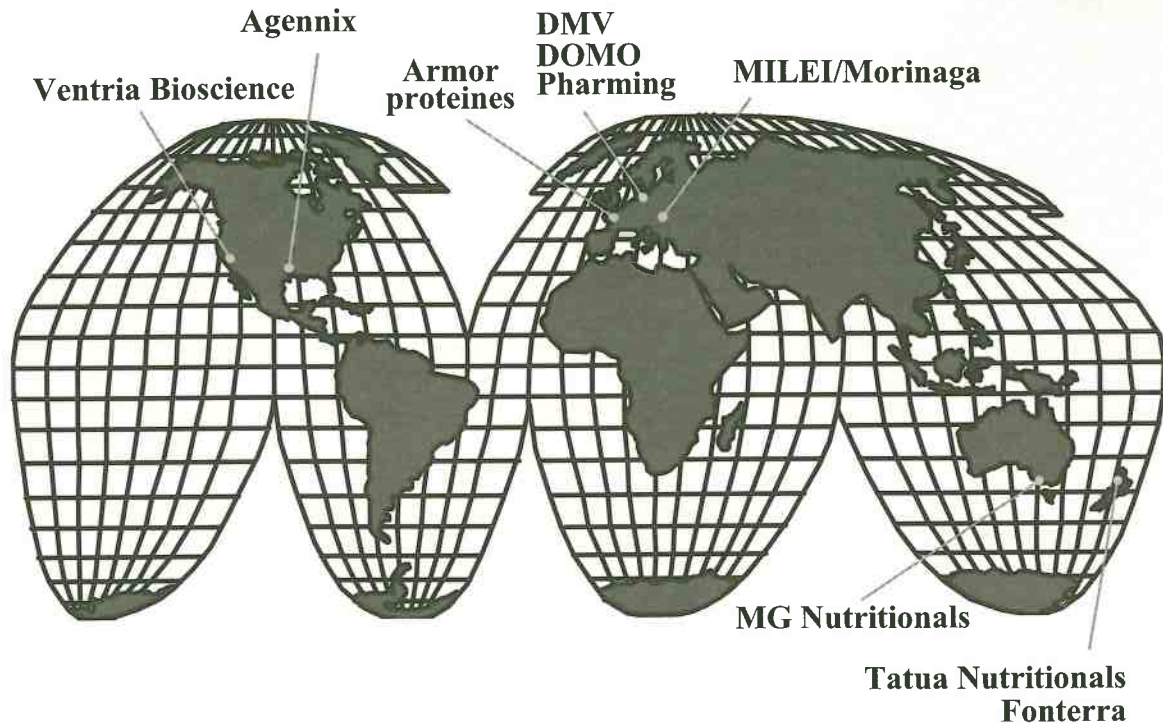


図1 ラクトフェリンを製造・販売している企業

Agennix, Ventria Bioscienceは組換えヒトラクトフェリンを製造。Pharmingはヒトラクトフェリン遺伝子を有するトランスジェニックウシを作成。その他はウシラクトフェリンを主にホエイから分離。

が、糖鎖構造の違い，自己分解産物，他の分子との結合などによる。

4. 他物質との結合・相互作用

ラクトフェリンには鉄，銅，亜鉛，アルミニウム，コバルト，その他の金属イオンが可逆的に結合し，キレート剤あるいはpHが2以下で解離する。ヒトやウシのミルクから分離したラクトフェリンの鉄飽和度は10～30%であるが，ウマではほとんどが飽和している。ラクトフェリンの2カ所の金属イオンとの配位結合では， HCO_3^- も関与しており，また鉄結合力はトランスフェリンよりも強い。その他にもさまざまな低分子物質から寒天，ヘパリン，リポ多糖などの多糖類，リポドA，各種のタンパク質やDNAなどの高分子物質とも結合する。ラクトフェリンにはこれらとの結合・補足・運搬に加えて，複合体として協同的な働きがあると考えられる(図2)。

5. 多機能性とメカニズム

1) 感染防御因子としての働き

ラクトフェリンの鉄イオンに対するキレート作用で菌の増殖を抑えるのが静菌作用である。キレート物質(シデロフォア)を分泌せず，ラクトフェリンレセプターを有する細菌もあり，鉄取込みに利用していると考えられている。ビフィズス菌にはラクトフェリンにより生育が促進されるものがあり，ラクトフェリン結合タンパク質も検出されているが，まだレセプターであると証明はされていない。また，ラクトフェリンが直接にダメージを与え殺菌する作用もある。ペプシン分解によって得られるペプチドに，強い殺菌効果のあるラクトフェリシンが見出され，その後もラクトフェランピンやカリオシン-1も報告されている。ラクトフェリシンはグラム陰性菌の外膜に結合してリポ多糖を遊離させ，さらに細胞膜にまで達して菌体を崩壊させると考えられている。また，細胞性免疫に関係して

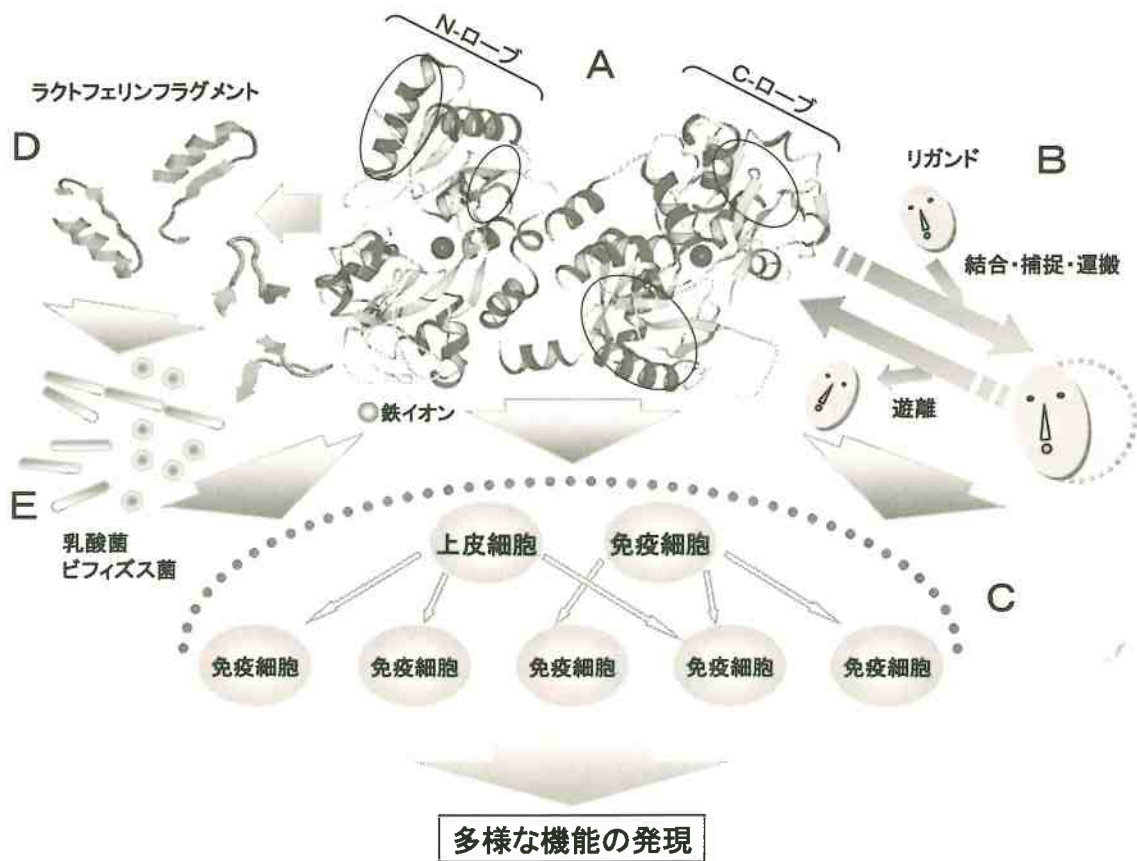


図2 ラクトフェリンの多機能性発現のモデル

Aはラクトフェリンの特定部位（精円で囲った部分など）が，抗菌性やレセプターとの結合に関与することを表す「十徳ナイフモデル」。Bはリガンドを結合・捕捉して複合体を形成し，ターゲットとなる組織に運搬して協同的あるいは拮抗的に機能する「キャリアモデル」。Cはラクトフェリンあるいはそのフラグメントが免疫細胞系に作用して，サイトカインなどによる細胞制御を誘導する「玉突きモデル」。その他にラクトフェリンとそのフラグメント（D）が腸内の乳酸菌やビフィズス菌の生育を促進し，これらの菌が免疫系に働きかける間接的な効果（E）も示した。

いるマクロファージや単球などがラクトフェリンによって活性化されることによる感染防御作用，他の抗感染因子との協同的・相乗的な作用もある。

2) 実験動物での経口投与の効果

ラクトフェリン投与によりマウス小腸上皮のIL-18の増加が報告されているが，小腸免疫関連遺伝子発現の調節も観察され，その結果からラクトフェリンの初期ターゲットがマクロファージや樹状細胞であると推定された。消化管内

に投与されたラクトフェリンがリンパ系を介して体内に移行し，その一部は脳にまで達して神経細胞と相互作用するとの報告もある。動物実験での抗不安，抗ストレス，鎮痛効果は，ニューロンへの作用で説明できる可能性が大きい。リウマチ性関節炎，脂質代謝，血圧低下に対する効果も観察されている。また，ラクトフェリンのNO合成酵素活性化によるNO産生促進が，抗不安，鎮痛，血管拡張作用に関係しているとも推察されている。さらに，マウスへの放射線照射実験で生存率向上に寄与したとの報告や，

Wilson病動物モデルに対するラクトフェリンの経口投与が累積生存率を上昇させ、酸化ストレスによる劇症肝炎様肝不全の改善効果が認められている。さらに腫瘍治療のための化学療法剤投与の副作用軽減モデルとして、金魚による実験での効果や、ニトロサミンで誘発したマウス肺腫瘍に対する投与効果がみられたとの報告もある。

3) 経口摂取により臨床的に期待される効果 (図3)

300人弱の乳幼児によるロタウイルス下痢症効果試験から、感染予防効果は無かったが、軽症化効果があることが報告されている。また、女性22名による試験で、月経痛に対する鎮痛剤服用の頻度がラクトフェリン摂取で減少したことから、緩和効果があるといえる。さらに、C型肝炎患者に対する経口投与の効果も認められつつあり、インターフェロンおよびリバビリンと併用することの有用性が検討されている。一方で効果に有意の差が出ないとの報告もあるが、ラクトフェリンフリーの肝炎患者の確保に困難があるためとの理由は無視できない。また、足白癬(水虫)やドライアイに対する効果、大腸ポリープの抑制効果も報告されている。その他に、1分子当たり200個の鉄イオンを結合させたラクトフェリンの経口摂取で、貧血の軽減効果が認められている。

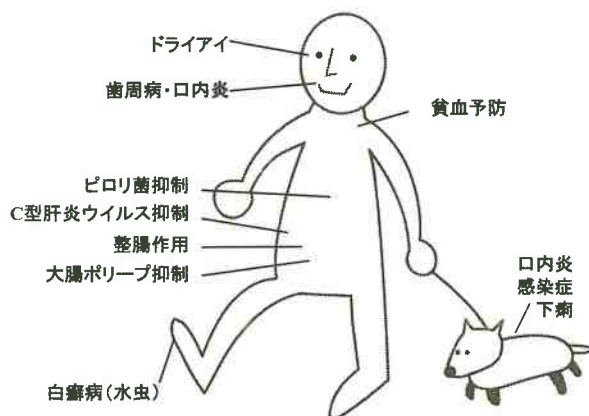


図3 ラクトフェリンの健康への寄与

が認められている。

4) 健康維持・疾患予防の効果

ラクトフェリンの骨吸収抑制あるいは骨密度改善効果が、培養細胞系を用いた実験によって認められ、カテプシン阻害効果さらにコラーゲン分解抑制および骨組織再生との関連で説明されている。また、組換えヒトラクトフェリンをウサギに臍内局所投与した実験であるが、子宮頸管熟化抑制作用を認め、早産予防薬となる可能性が報告されている。さらに、ラクトフェリンとビフィズス菌は異なるメカニズムで免疫調節機能を示すため、併用によってTh1/Th2バランスの効果的な制御が期待されるとの考えもある。その他、慢性腎不全患者の腹膜透析での細菌性腹膜炎診断マーカーとして、ラクトフェリン濃度測定を併用することの有用性が報告されている。

5) 口腔衛生関連の効果

ラクトフェリンを歯周病患者に投与したところ、歯肉炎の症状の軽減が認められている。歯周病菌はリポ多糖を産生して歯肉組織でのコラーゲン合成を抑制するが、ラクトフェリンの結合によって不活性化されると考えられる。口内炎など口腔粘膜疾患の場合も、ラクトフェリン投与あるいは塗布によって消炎、鎮痛、創傷治療促進の効果が認められている。さらに、口臭抑制効果が硫化水素濃度測定や舌苔異常の改善などから確認されている。

6) 動物医薬・治療への応用

養殖魚の白点虫感染予防と治療に効果が認められ、さらにストレス症状の緩和にも有効とされている。これら魚への投与では、免疫関連細胞の増加、貪食能の上昇、あるいは体表粘液分泌量の増加などが観察されている。小動物についてはFIV(猫エイズ)感染による症状の緩和、犬での好中球機能低下による感染症に対する投与効果が報告されている。大動物では象や馬の皮膚病の治療に効果が認められ、新生仔馬への

ラクトフェリンの経口投与が、貧血防止に有効であり、ウイルス性の下痢の重症化を抑える効果も認められている。また、乳牛の乳房炎治療にも試用され、その有効性が認められつつある。動物用医薬品として認可されることが期待される。

6. 安全性について

ラクトフェリンは本来、乳児の消化管経路で機能しているタンパク質のため、経口摂取による副作用は年齢に関係なくほとんど無いと期待される。ウシラクトフェリンについては、ラットによる急性、亜急性の毒性試験で異常は認められず、またAmes試験においても変異原性は認められていない。わが国では既存添加物リストに記載されており、米国ではGRASとして認められている。

7. ラクトフェリン錠剤について

現在、10社近くからラクトフェリン錠剤が市販されているが、大きな2つの流れがある。乳業系ではラクトフェリンそのままの錠剤、ビフィズス菌やオリゴ糖を加えた錠剤、あるいは鉄含量を高めたラクトフェリン素材の提供などが主体である。それに対して製薬系では胃内での耐酸性、ペプシン耐性を高めるコーティング剤を用いた腸溶性ラクトフェリン錠剤や顆粒を製品化している。その他に血中安定性を目的としたポリエチレングリコール (PEG) 修飾ラクトフェリンや、リポソーム化ラクトフェリンも試作されている。

8. おわりに

以上に述べた他にも、ラクトフェリン遺伝子の発現調節と免疫系との関連について、またラクトフェリンが細胞周期の制御に関与していることなども明らかになりつつある。ラクトフェリン単独ではなく、他の様々な物質と協同的に体内で作用していることが、その機能解明を遅らせている要因の一つであるが、近年は応用面での進展が急であり、それに伴ったメカニズムの解明が期待される。

文 献

- 1) 島崎 (2007) 化学と生物, 45(8) 519.
- 2) Hutchens, T.W. et al. (eds) (1994) Lactoferrin: Structure and Function, Plenum Publishing Co., New York. (Adv. Exp. Med. Biol. Ser. No.357)
- 3) Hutchens, T.W. and Lonnerdal, B. (eds) (1997) Lactoferrin: Interactions and Biological Functions, Humana Press, Totowa.
- 4) Spik, G. et al (eds) (1998) Advances in Lactoferrin Research. Plenum Publishing Co., New York. (Adv. Exp. Med. Biol. Ser. No.443)
- 5) Shimazaki, K. et al. (eds) (2000) Lactoferrin: Structure, Function and Applications. Elsevier, Amsterdam. (Exc. Med. Int. Congr. Ser. No.1195)
- 6) Schryvers, A.B. et al. (2002) *Biochem. Cell Biol.*, 80 (1), 1-168.
- 7) Antonini, G et al. (2004) *BioMetals*, 17(3), 189-356.
- 8) Lönnerdal, B. and Schryvers, A.B. (2006) *Biochem. Cell Biol.*, 84(3) 263-403.
- 9) 島崎ら (2004) ミルクサイエンス, 53(4), 219-376
- 10) 津田ら (2007) ラクトフェリン2007, 日本医学館

◀総説関連情報▶

ウシラクトフェリンと骨芽細胞による骨様組織の形成

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 畜産物機能研究チーム

高山 喜晴

ラクトフェリンは主に乳中に含まれる鉄結合蛋白質で、抗菌活性や免疫賦活作用により、生体防御に重要な役割を果たしている。一方、筆者はウシラクトフェリンがヒト骨芽細胞によるコラーゲンの産生と石灰化を促進し、骨様組織を形成させる新たな機能を持つことを明らかにしてきた。これにより、骨形成を促進するサイトカインとして、ラクトフェリンの再生医療への利用が期待される。

1. はじめに

ラクトフェリンは鉄結合性の糖蛋白質である。1939年に牛乳中に含まれる「赤色蛋白質 (Red Protein)」として発見され、その後ヒト・ウシの乳より精製されると共にその構造が決定された。(ラクトフェリンが赤色を帯びているのは、結合している鉄イオンのためである。) 乳中のラクトフェリンは乳腺上皮細胞で作られる。その量は泌乳期により大きく変動し、特に出産後数日の間は分泌される量が多い。また、ラクトフェリンは乳以外にも涙・唾液などの外分泌液に含まれており、抗菌活性・抗カビ活性・抗ウイルス活性を持つことから、免疫系が未熟な新生児において、自然免疫による生体防御に寄与していると考えられてきた。一方、ラクトフェリンは白血球の一種である好中球から放出され、ナチュラルキラー細胞やマクロファージを活性化させる^{1, 2)}。このようなサイトカインに類似したラクトフェリンの機能として、B細胞・T細胞に対する増殖促進³⁾、線維芽細胞によるコラーゲンゲル収縮の促進⁴⁾、骨芽細胞の増殖促進⁵⁾などがある。筆者はこのようなラクトフェリンのサイトカインとしての機能が骨組織の再生医療に利用可能と考え、研究を進めている。

2. 骨芽細胞による骨組織の形成

骨組織は繊維状の構造を持つI型コラーゲンの周囲にリン酸カルシウム(ハイドロキシアパタイト)が沈着し、結晶化することで形成される(この過程を石灰化と呼ぶ)。骨組織は一度形成されると、そのままの状態では維持されることが考えられがちであるが、実際には一生を通じて合成と分解を受けている。例えば、成長期のヒトの大腿骨は2年以内に全てが更新される。成人の場合でも全骨格の3~5%は常に置き代わっているとされている。この骨組織の代謝回転(リモデリング)は、組織を定期的に更新しその機能を維持するのに役立つのみならず、生体内のカルシウム恒常性の維持にも寄与している。

骨組織に含まれる主な細胞として、骨芽細胞・骨細胞・破骨細胞がある。骨芽細胞はI型コラーゲンを産生すると共に、アルカリフォスファターゼを細胞外に分泌することで、コラーゲンにカルシウムを沈着させ、骨を形成する細胞である。I型コラーゲンは骨基質蛋白質の90%以上を占め、骨芽細胞の代謝に重要な役割を果たす。骨芽細胞が成熟し、自分の作った骨基質に包囲されると骨細胞となる。破骨細胞は、マクロファージから分化する多核の巨大細胞で、古くなった骨組織を破壊する。破骨細胞が骨基質を溶解した後の空間に骨芽細胞が進入し、骨基質を合成することによって、骨組織の代謝回

TAKAYAMA Yoshiharu

〒305-0901 茨城県つくば市池の台2

転が行われる。

3. 骨芽細胞に対するウシラクトフェリンの活性

牛乳は良質のカルシウム源、栄養源として知られているが、乳清に含まれる塩基性蛋白質 (Milk Basic Protein : MBP) に骨形成を促進し、骨吸収を抑制する作用があることは以前から報告されていた⁶⁾。2004年にGreyらは、ウシラクトフェリンがヒト初代培養骨芽細胞、ヒト・ラット由来の株化骨芽細胞の増殖を促進すること、ラクトフェリンに血清飢餓によって引き起こされるラット初代培養骨芽細胞のアポトーシス (細胞死) を抑制する機能があることを報告した⁵⁾。筆者はウシラクトフェリンが骨芽細胞による骨様組織の形成を促進する機能を持つのではないかと考え、MG63細胞をモデルにして研究を進めてきた。MG63細胞はヒト骨肉腫から樹立された細胞株で、骨芽細胞の前駆細胞 (前骨芽細胞) の性質を持っている。

MG63細胞をI型コラーゲン上で単層培養し、コンフルエントの状態にして細胞増殖を完全に停止させた。その後、培養液のカルシウム濃度を8mMに上げ、デキサメサゾンを経最終濃度10nMで培養液に添加すると骨芽細胞分化が誘導される。分化誘導開始後1週間後に、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性が上昇すると共に、I型コラーゲンの産生が開始される。分化誘導開始後2-3週間後にはオステオカルシンなどの骨基質蛋白質が生産されると共に、I型コラーゲンにカルシウムが沈着し、コラーゲン薄膜上に骨様組織が形成される⁷⁾。分化誘導開始と同時に、培養液に最終濃度1 μ Mでウシラクトフェリンを添加すると、コントロールではALP活性の上昇は一時的であったのに対し、ラクトフェリン添加区ではALP活性の上昇が、分化誘導後3週間後まで継続的に観察された (図1A)。また、コラーゲンの産生もラクトフェリン添加区の方が活発に行われていた (図1B)。ラクトフェリン添加区では、分化誘導開始

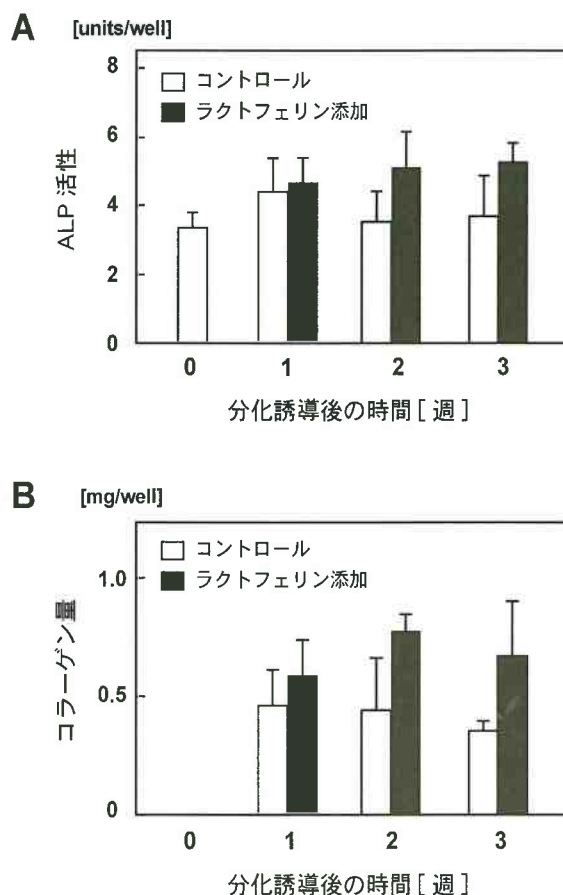


図1 MG63細胞の骨芽細胞分化の過程において、アルカリフォスファターゼ活性 (A) 及びコラーゲン産生 (B) に与えるウシラクトフェリンの効果 (参考文献8より改変して引用)

後3週間後の時点で、カルシウムの沈着量とオステオカルシンの産生量がコントロールと比較し上昇していた (図2A, B)。この時点で、結晶化カルシウムを可視化するために、アリザリンレッド染色を行うと、ラクトフェリン添加区ではコントロールと比較してより強い染色パターンが認められ、ウシラクトフェリン添加により骨芽細胞の石灰化が促進されたことが明らかとなった (図3)。一方、MG63細胞の数はコントロールとラクトフェリン添加区で有意な差は認められなかった。これらの結果から、ウシラクトフェリンは骨芽細胞の分化を促進することで、カルシウムの沈着を促進し、骨様組織の形成を促進する機能を持つことが明らかとなった⁸⁾。

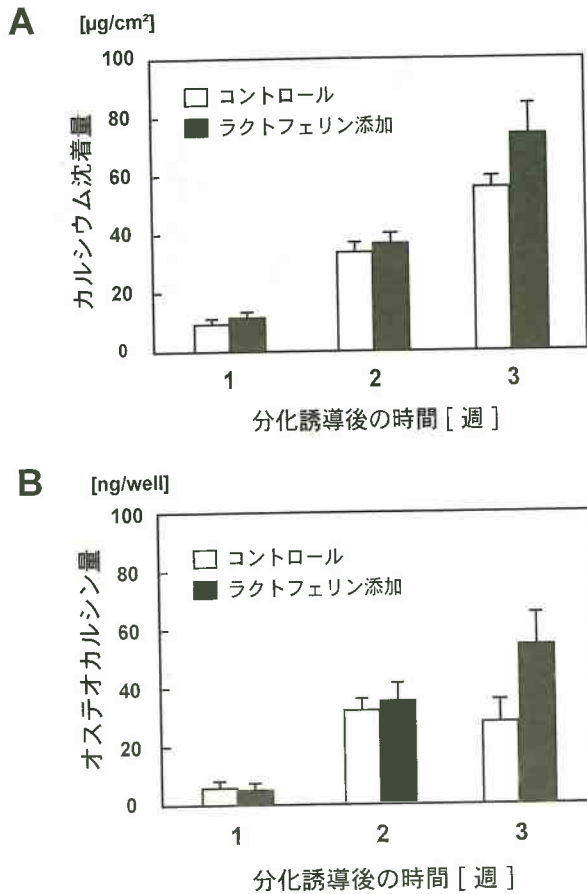


図2 MG63細胞の骨芽細胞分化の過程において、カルシウムの沈着(A)及びオステオカルシン産生(B)に与えるウシラクトフェリンの効果(参考文献8より改変して引用)

また、ウシラクトフェリンには破骨細胞の骨吸収活性を抑制する機能が報告されており、骨吸収の抑制による骨代謝の改善機能として注目される^{5, 9)}。

4. 骨組織の再生

病気やけがで大規模に損傷した骨組織を修復する方法の一つに骨移植がある。これには、自分自身から採取した骨を移植に用いる場合(自家骨移植)と他人から採取した骨を移植に用いる場合(他家骨移植)があるが、自家骨移植の場合、供給できる移植片の量に限度がある。また他家骨移植の場合、感染症や移植片への免疫拒絶反応の問題がある。そこで、現在では主に人工骨が移植に用いられている。

現在、ハイドロキシアパタイトを主成分とする人工骨が医療機器メーカー数社から販売されている。しかし、いずれの製品も強度が十分でない上に、患部に埋入した後の新生骨形成が表層部に限定されることから、傷病の治療の期間が長くなるという欠点がある。そのため患者の肉体的・精神的及び経済的な負担が大きい。

これらの問題を解決する方法として、再生医療の技術を用いて培養骨を形成する方法が開発されつつある。再生医療とは、幹細胞などを用いて患者の体外において人工的に構築した組織



図3 ウシラクトフェリンによる骨芽細胞の石灰化の促進(アリザリン染色)

を患者に移植することで、失われた人体の機能を回復させる医療である。人工的に組織の再生や再構築を行うためには、培養細胞に、細胞の足場 (scaffold) となる物質とサイトカインを供給する必要がある。骨組織は再生医療が成功している組織の一つであり、未分化の細胞 (間葉系幹細胞) を、骨基質蛋白質の主成分である I 型コラーゲン上に播種した上で、骨形成を誘導するサイトカインを加えて分化誘導し、カルシウムを沈着させることにより培養骨を形成させる方法が広く用いられている。

強い骨形成誘導活性を持つサイトカインとして Bone Morphogenetic Protein (BMP) が最もよく用いられている。現時点ではヒトにおいて骨を増加させるためには多量の BMP が必要であり、経済的な負担が大きい。そこで、骨芽細胞分化を促進するサイトカインとしてウシラクトフェリンが利用可能と考えられる。ラクトフェリンは骨分化を誘導する活性以外にも、抗炎症活性や抗菌活性を併せ持つ。これは、無菌的な条件で培養骨を形成し、かつ移植された培養骨が生体内で定着するために有用な性質である。

5. おわりに

骨形成サイトカインを再生医療に応用するためには、サイトカインを直接患部に投与するか、患部においてサイトカインの産生を誘導する必要がある。局所的に骨形成を誘導するためには、有効濃度のサイトカインを持続的に骨芽細胞に供給する技術が必要になる。BMP の場合、BMP を含んだハイドロキシアパタイトや I 型コラーゲンが開発され、骨再生や骨折の治療に用いられている。

ウシラクトフェリンを骨再生サイトカインとして骨組織の再生に利用する場合にも、ラクトフェリンを持続的に標的部位に供給する技術が

必要であり、今後の技術開発が期待される。

ラクトフェリンは乳・乳製品に含まれており、ヒトには長い食経験がある。最近ではラクトフェリンを含んだ栄養補助食品が市販されている。また、ラットを用いた動物実験やヒト臨床試験でもウシラクトフェリンの経口投与による異常は報告されていない。ウシラクトフェリンの抗菌活性を利用して、米国食品安全局 (FDA) は、枝肉の表面で微生物の繁殖を抑制する「抗菌スプレー」としてウシラクトフェリンを認可している。これら点からウシラクトフェリンを骨形成促進サイトカインとして臨床に応用した場合の、安全面での問題は少なく、骨形成を促進するサイトカインとしてラクトフェリンは有用と考えられる。

文 献

- 1) Nishiya, K. et al. (1982), *J. Immunol.*, 129, 2519-2523
- 2) Lima, M.F. et al. (1985), *J. Immunol.*, 134, 4176-4183
- 3) Hashizume, S. et al. (1983), *Biochim. Biophys. Acta.*, 763, 377-382
- 4) Takayama, Y. et al. (2001), *FEBS lett.*, 508, 111-116
- 5) Grey, A. et al. (2004), *Mol. Endocrinol.*, 18, 2268-2278
- 6) Toba, Y. et al. (2000), *Bone*, 27, 403-408
- 7) Takagishi, Y. et al. (2006), *Tissue Eng.*, 12, 927-937
- 8) Takayama, Y. et al. (2008), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 226-230
- 9) Lorget, F. et al. (2002), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296, 261-266

◀国内情報▶

イネの粒幅を決める遺伝子の単離と
ジャポニカイネの栽培化過程の推測

¹独立行政法人 農業生物資源研究所 植物ゲノム研究ユニット，
²社団法人 農林水産先端技術産業振興センター 農林水産先端技術研究所，
³独立行政法人 農業生物資源研究所 QTLゲノム育種研究センター
 小西 左江子¹・正村 純彦²・江花 薫子³・矢野 昌裕³・井澤 毅¹

イネは約1万年前に自生していた野生イネが古代人によって選抜され、作物として改良された植物である。この過程を栽培化と呼んでいる。栽培化の過程で生じた形質の変化としては、脱粒性の喪失や収量に関わる穂や粒の巨大化などがあげられる。ここでは、イネの粒の巨大化に關与する粒幅を制御する遺伝子の単離ならびに、5つの栽培化に關わったと考えられる遺伝子の塩基配列の変化から推定されるイネの栽培化過程について紹介する。

1. はじめに

イネ、コムギ、トウモロコシといった主要作物の栽培化は、考古学的な知見や分子進化系統学的な研究などから、数千年前から約1万年前に起こったと考えられている。アジアで栽培されているイネは、分類学上、インディカイネとジャポニカイネに大別される。これまでイネの栽培化については、主に遺跡から出土した炭化米等の解析などの考古学的な観点から推定されており、ジャポニカイネの起源地は中国の長江付近との説が有力である¹⁾。

近年、国際イネコンソーシアムにより、ジャポニカイネ「日本晴」の全ゲノム塩基配列解読によって、ゲノム塩基配列の変化から、イネの分類が進んでいる。例えば、ゲノム上の特定のレトロトランスポゾンの挿入の有無を指標に用いたゲノムワイドな解析から、インディカイネとジャポニカイネは、20-40万年前にはすでに
 KONISHI Saeko¹, SHOMURA Ayahiko², EBANA Kaworu³, YANO Masahiro³, IZAWA Takeshi¹

¹〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2

²〒305-0854 茨城県つくば市上横場字一杯塚446-1

³〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2

分岐していたと推定されている²⁾。このことは、栽培化よりかなり以前に、インディカイネとジャポニカイネが亜種として分化していたことを示唆している。言い換えると、インディカイネとジャポニカイネは別々の栽培化過程を経てきたと考えられる。

最近では、品種間に見いだされる形質の違いを決定している遺伝子の単離がすすみ、単離された遺伝子の中には、栽培化に關わったと考えられる脱粒性や粒形に關与する遺伝子が含まれている。現在の栽培イネは、強い自殖性をもつので、DNAの変異が固定されやすく、その栽培化過程も塩基配列の変化の蓄積として順序立てて追いかけることができるかもしれないと考えられ、そういった解析も報告され始めている。

本稿では、イネ栽培化関連遺伝子の1つである粒幅に關与する遺伝子*qSW5*の単離を紹介する。さらには、アジアの様々な地域から由来する多様なジャポニカイネについて、ゲノム全体から推定される品種分類と*qSW5*を含む5つの栽培化関連遺伝子の機能に關わる塩基置換 (Functional Nucleotide Polymorphism) の変化との関係から推定する、ジャポニカイネの栽培化過程について考察する。

2. イネの粒幅を決める *qSW5* 遺伝子の単離

インディカイネのカサラスは、穀粒の幅が狭い。一方、ジャポニカイネの日本晴は、穀粒の幅が広い（図1）。イネの穀粒の幅に関する遺伝子の染色体上での位置を決定するために、まず、日本晴とカサラスのF2集団を用いた量的形質遺伝子座（QTL）解析を行った。その結果、最も大きな効果をもつQTLが第5染色体短腕に見いだされた。このQTLを *qSW5* (*QTL for seed width on chromosome 5*) と名付けて解析を進めた。*qSW5* の遺伝子作用の違いを調べるために、*qSW5* が座している第5染色体のみをカサラス型に、それ以外の染色体を日本晴型に固定した置換系統SL (*qSW5*) を作成し、日本晴との形態比較を行った（表1）。その結果、日本晴はSL (*qSW5*) と比較して明らかに粒幅が増加し、その主な原因は、外穎の幅の増加であることが明らかとなった。次に細胞の大きさを比較したところ、細胞の大きさは変わらなかった。また、日本晴の外穎が、SL (*qSW5*) と比較して細胞数が増加していることが分かった（表2）。このことから、*qSW5* は主に外穎の細胞数を制御する遺伝子であることが示唆された。

次に、この粒幅に関する *qSW5* 遺伝子を単離するために、*qSW5* のゲノム上での位置を詳細に解析し、*qSW5* 遺伝子の候補領域を2263bpに絞り込んだ。その後、候補領域の日本晴とカサラスの塩基配列を比較したところ、日本晴に1212bpの欠失と数個のSNPが見つかった。そこで、日本晴の1212bpの欠失がFNPとして有力であると考え、次に、この欠失領

域を含むカサラス断片を日本晴に導入し、相補性試験を行った。その結果、日本晴の1212bpの欠失領域を含んだ11.2kbのカサラス断片を導入した植物体で粒幅が相補された。そこで、この相補した11.2kbの断片内で遺伝子予測を行い、機能未知の3つの予測ORFを同定した。リアルタイムRT-PCRを用いた発現解析により、3つのORFから *qSW5* のORFを推定し、さらに、このORFの配列を含むRNAiコンストラクトをカサラスに導入したところ、導入した植物体の多くで、粒幅が広くなった種子を得た。これらの結果から、特定したORFが *qSW5* 遺伝子産物であることが明らかとなった。また *qSW5* 遺伝子は機能すると粒幅が減少し、機能しなくなった場

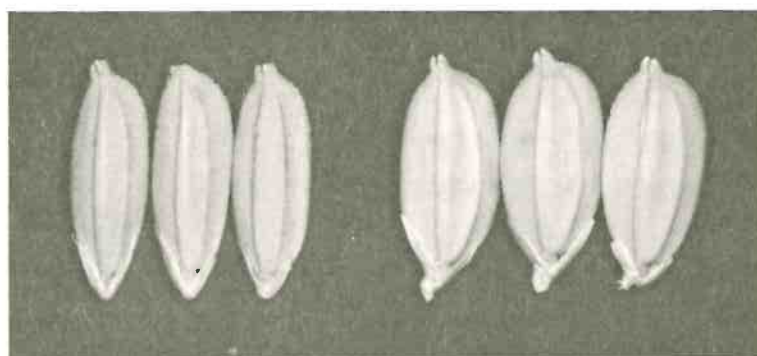


図1 *qSW5* 遺伝子の単離に用いた親品種のコメの粒幅の比較
左はインディカイネのカサラス、右はジャポニカイネの日本晴を示す。

表1 日本晴とSL (*qSW5*) との表現型の比較-1

形質	日本晴 (mm (%))	SL (<i>qSW5</i>) (mm (%))
粒の幅	3.3±0.1 (100)	2.8±0.2 (85)
粒の長さ	7.2±0.2 (100)	7.6±0.2 (95)
外周(外穎)	5.7±0.2 (100)	4.9±0.1 (86)
外周(内穎)	2.6±0.2 (100)	2.5±0.1 (96)

表2 日本晴とSL (*qSW5*) との表現型の比較-2

	日本晴 (個(%))	SL (<i>qSW5</i>) (個(%))
外穎の細胞数 (上部)	106.0±3.6 (100)	79.3±0.9 (75)
外穎の細胞数 (下部)	157.7±5.6 (100)	126.0±2.4 (80)
内穎の細胞数 (上部)	44.0±3.3 (100)	42.7±3.1 (97)
内穎の細胞数 (下部)	72.3±2.6 (100)	61.3±2.6 (85)

合に粒幅が増加することが明らかとなった。またその原因が*qSW5*上に生じた1212bpの欠失であることも明らかとなった。

一方、*qSW5*近辺のゲノム領域だけがカサラス由来で、その他の領域は、日本晴由来の準同質置換系統NIL(*qSW5*)を作成し、圃場で収量性試験を行った結果、NIL(*qSW5*)では、日本晴よりも10%以上収量が減ることが明らかとなった。つまり、この遺伝子は籾のサイズを決めることで、その収量を変えることができる遺伝子あるといえる。見方を変えると、多くのインディカイネは機能する*qSW5*をもっていることから、その機能を無くす操作によって、インディカイネの収量の向上も期待できる。

3. 解析に用いた栽培化遺伝子とイネ品種について

栽培化においては、収量の増加は重要な変化であることから、単離できた粒幅を決める遺伝子*qSW5*上の変化(1212bpの欠失)が、ジャポニカイネの栽培化過程に関わった可能性は高い。そこで、その可能性を検証するために、100系統以上のジャポニカおよびインディカイネにおいて粒幅と*qSW5*の1212bpの欠失の有無との関連を調べたところ、1212bpの欠失を持つほとんどの系統で粒幅が広がっていることが判明した⁴⁾。このことは、*qSW5*遺伝子が栽培化で選抜を受けた遺伝子であることを示唆しているものの、この結果だけで、*qSW5*遺伝子の変化が栽培化に関与したことの証明にはならない。そこで、さらなる証拠を集めるための実験を行った。これまでに複数の栽培化関連遺伝子が単離され、それぞれについてFNPが同定されている。これらのFNP

を多様な品種群について調査した(図2)。まず、今回単離した粒幅に関与する遺伝子*qSW5*は、1212bpの欠失をもつ日本晴型のアリルで粒幅が広がる⁴⁾(図2)。*Wx*(*Waxy*)遺伝子は、顆粒結合性のでんぷん合成酵素をコードする遺伝子で、炊飯したときのコメの粘り具合(もち性)を決定する。*Wx*遺伝子は複数のアリルが同定されているが、ここでは、第1イントロンの5'スプライシング部位のDNA変異により機能が低下し、もち性が高くなるFNP^{5), 6)}を調べており、機能型の*Wx^a*を*Wx*、機能欠損型の*Wx^b*を*wx*と表記した(図2)。脱粒性(種子成熟時に、野生イネは種子の拡散を効率的に進めるた

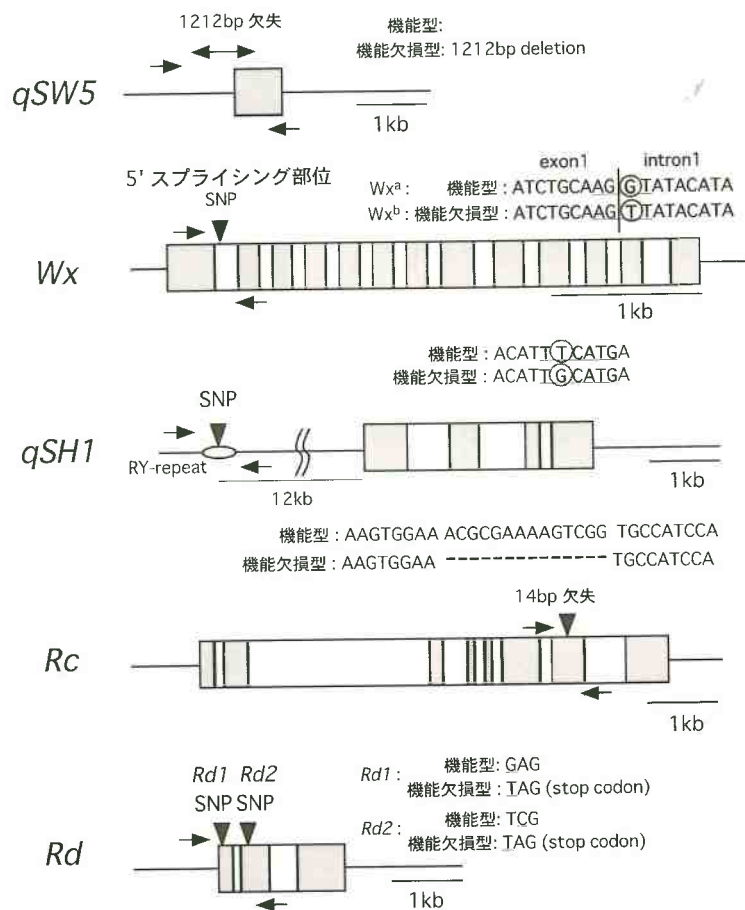


図2 解析に用いた5つの栽培化遺伝子の6つのFNPについて

エキソンはグレーの四角で、イントロンは白の四角で示した。矢頭は、FNP部位を示す。対の矢印は、解析に用いたプライマー部位を示す。

め、脱粒という性質を持つ。)に關与し、離層(脱粒時に積極的に崩壊する糊の基部にできる特殊な細胞層)形成に必須である*qSH1* 遺伝子に関しては、FNPはコード領域から12kb離れたプロモーター領域のRYリピート内に生じた変異で、離層特異的に発現を調節し、FNP変異を持つと離層が形成されず、登熟しても種子落下しないため収穫量のロスが少なくなることが明らかとなっている³⁾(図2)。また、最近単離された栽培化遺伝子として、種皮の色を決める遺伝子の*Rc*および*Rd*遺伝子がある。これらの遺伝子が壊れると、コメが白米化することが古くから遺伝学的に明らかになってきたが、*Rc*遺伝子は、色素合成に必要な酵素遺伝子の転写制御因子であり、第7エキソンの14bpの欠失により、フレームシフトが生じ、15bp下流でストップコドンが生じることにより機能欠損していることが明らかとなった(図2)。*Rd*遺伝子は、その酵素の内の一つの遺伝子で、第1エキソンの3番目のアミノ酸の変異によりストップコドンが生じる変異(*Rd1*とする)と、第2エキソンの55番目のアミノ酸の変異によりストップコドンが生じる変異(*Rd2*とする)が自然変異中のFNPとして同定されている^{7), 8), 9)}(図2)。*Rc*変異は*Rd*変異に対して優性に働き、*Rc*変異を持つと*Rd*が機能型でも種皮の色は白くなる(図2)。

これらの塩基配列の変化を調べる品種系統には、ゲノムワイドな179個のRFLPマーカーと呼ばれる進化的に中立であると考えられるDNAマーカーを用いて、ゲノムの類似性からの分類が済んでいたジャポニカイネ91品種の分類結果を用いた。これらのイネ品種のゲノムは、原産地(育成起源地)ごとに類似性が強く、ゲノムの多様性が品種形成の状態を反映していることが示唆されていた。また、イネは、前述の通り、形態的および生化学的な特徴から、インディカイネとジャポニカイネに大別されるが、RFLPマーカーを用いたゲノムの多様性情報からもこれらの違いは明確であり、さらに内部で再分化できることが分かってきた¹⁰⁾。しかしながら、RFLPマーカー自身に、強い選抜がかか

ったとは考えられず、それによる分類のみでは、イネの栽培化過程の詳細、特に、選抜の有無や順番までは、はっきりとは分からなかった。

作物の栽培化に関して、以前は、ある日突然、古代人が栽培を始めたといったイメージでの理解が多かったが、近年のゲノム解析や広範な表現型の変化を調べた研究成果から、多くの場合、栽培化とは、数年での急激な変化ではなく、その過程は、数百年から数千年のオーダーで比較的長くゆっくりしたものであったとの考え方が支持され始めている。すなわち、栽培化はイベントではなく何段階にもわたる選抜プロセスと考えることができる¹¹⁾。また、古くても約1万年前に起こったというイネの栽培化に関する事実から、上記の栽培化遺伝子のFNPは、過去に1回だけ選ばれた変異で、それをもつ個体が徐々に栽培域を広げたと考えることができる。そこで、FNPの有無を91系統の情報に照らし合わせることで、イネの栽培化過程の順序や起源を推定できるのではないかと考えた。

つまり、ジャポニカイネ91品種を、179個のRFLPマーカーのタイプによって分類し、それぞれ類縁関係が近い品種群の中で、上記の5つの栽培化遺伝子の6つのFNPがどのようになっているのかを調べた¹²⁾。

4. 栽培化遺伝子を用いたジャポニカイネの栽培化過程の推測

今回の解析では、6つのFNPの有無の組み合わせを見ているが、*Rd*遺伝子のFNPである*Rd1*と*Rd2*は同じ遺伝子内のFNPで、距離は150bpのため、その間での遺伝子相同組換えは現実的には考えられないので、理論上は最高で48通りの組み合わせが考えられる($2^6 \times 3/4 = 48$)。しかし、実際には、17通りの組み合わせしか存在しなかった(表3)。このことから、可能な組み合わせの大部分は存在せず、栽培化の過程でかなり偏りが生じた、つまり逆に見れば、このことは栽培化の過程を遡って推測することが可能であることを示唆していると考えられる。

表3 解析に用いた91品種の5つの栽培化遺伝子の6つのFNPの組み合わせ

変異の数	<i>qSW5</i>	<i>Rc</i>	<i>Wx</i>	<i>Rd1</i>	<i>Rd2</i>	<i>aSH1</i>	品種数	原産地
0	○	○	○	○	○	○	4	インドネシア, フィリピン, ベトナム ブータン
1	○	×	○	○	○	○	4	インドネシア(2), マレーシア(2)
1	×	○	○	○	○	○	3	インドネシア, フィリピン, 中国
2	○	×	×	○	○	○	1	ブータン
2	×	○	○	○	○	×	2	中国(2)
2	×	×	○	○	○	○	9	フィリピン(2), スリランカ, ミャンマ (2), バングラディシュ(3), 中国
3	○	×	×	○	×	○	5	ベトナム, 中国(3), 日本(陸稲)
3	×	×	○	○	×	○	2	インド, ブータン
3	×	×	○	○	○	×	1	中国
3	×	×	○	×	○	○	3	フィリピン, 日本(陸稲)(2) ベトナム(4), ラオス(5), タイ, 中国 (4), 日本
3	×	×	×	○	○	○	15	
4	×	×	○	○	×	×	4	中国(4) フィリピン(2), ラオス(2), タイ, 中国 (2), 日本(3)
4	×	×	×	○	×	○	10	
4	×	×	×	○	○	×	1	日本
4	×	×	×	×	○	○	7	フィリピン, 日本(6)
5	×	×	×	○	×	×	12	日本(12)
5	×	×	×	×	○	×	8	日本(8)

○印は機能型のアレルを、×印は機能欠損型のアレルを示す。

まず、5つの栽培化遺伝子の6つのFNPがすべて機能型の組み合わせをもつ品種を調べてみると、インドネシア、フィリピン、ベトナムそしてブータン原産の品種であった(表3)。RFLPマーカーを用いたゲノムの類似性のパターンから、インドネシア、フィリピン、ベトナム原産の品種は、ゲノムの類似性が高かった。ただし、ブータン原産の品種は、ゲノムの類似性が低く、最近になっての遠縁交配の可能性が示唆された¹²⁾。このことは、古代人による選抜をあまり受けていない系統が、いまでも存在し、東南アジアで栽培されていることを示しており、ジャポニカイネの起源を示唆する重要な知見である。

次に、古代人による選抜をあまり受けていない系統に、最初に生じたDNA変異を調べるために、1つのFNPだけ変異型である組み合わせを調べてみると、1つのFNPだけ変異型である遺伝子は、*Rc*と*qSW5*遺伝子の2つだけであった(表3)。このことから、これらの2つの遺伝子が解析した5つの栽培化遺伝子の中で、古くに変異し、古代人により選抜を受けたと考えられる。また、この段階では、ジャポニカイネは少なくとも独立に2回選抜されていることが示唆された。*Rc*遺伝子のみ欠損型である品種は4

品種あり、原産地はインドネシアとマレーシアであった(表3)。また、*qSW5*遺伝子のみ欠損型である品種は3品種あり、原産地はインドネシアとフィリピンと中国であった(表3)。

次に、2つのFNPが変異型である組み合わせを見てみると、3つ組み合わせがあった(表3)。その中で、*qSW5*および*Rc*の変異をもつ組み合わせの品種は、最も多く、ゲノム構造も似ていた¹²⁾。原産地は、フィリピン、スリランカ、ミャンマー、バングラディシュ、中国であった。このことから、*qSW5*および*Rc*の変異をもつ組み合わせは、単独の変異が入った場所近辺で自然交配によって2つの変異が合わさって生じたと考えられる。

次に、3つのFNP変異をもつ組み合わせを見てみると、5つ組み合わせがあった(表3)。その中で、*qSW5*と*Rc*の変異を持つ組み合わせは、5組み合わせ中4組み合わせ存在した(表3)。このことから*qSW5*と*Rc*の変異が生じた後に3番目の変異が生じたと考えられる。また、その中で、品種数が最も多い組み合わせが、*qSW5*、*Rc*および*Wx*の3つの変異を持つ組み合わせであった(表3)。この組み合わせをもつ品種のゲノム構造も類似性が非常に高いことが確認でき

た¹²⁾。

以上のことから、*qSW5*と*Rc*の変異を持つ系統に3番目の変異として*Wx*変異が入ったと推測できた。

最後に日本の品種について見てみると、日本の品種のほとんど(34品種中31品種)が、*qSW5*、*Rc*および*Wx*の3つの変異を持っていた(表3)。ジャポニカイネは、栽培特性、ゲノム構造などから、さらに、熱帯ジャポニカと温帯ジャポニカに再分化される。*Rd1*および*Rd2*変異は東南アジアで、そして温帯ジャポニカの脱粒性の喪失に大きな貢献をしたと考えられる*qSH1*の変異は中国で入ったと推測される。*Rd*遺伝子は、*Rc*遺伝子存在下で、種皮の色素合成に必須な遺伝子^{7), 8), 9)}であるが、日本のイネのほとんどは、

*Rc*遺伝子がすでにつぶれている。*Rd1*、*Rd2*といった独立な*Rd*変異をもつ系統が日本の温帯ジャポニカの主流(31品種中29品種(表3))になっていることから、色素合成以外の機能、例えば、耐病性関連の遺伝子であるファイトアレキシンの合成に効いていた可能性が示唆される。*Rd*遺伝子への選抜は、白米化の程度に対する選抜の可能性も存在し、本当の選抜対象形質に関しては、今後の解析を待つ必要がある。

5. おわりに

今回、ゲノムワイドなマーカーを用いてゲノムの類似性をモニターしながら、栽培化遺伝子に塩基配列の変化が生じた順序をたどった結果、

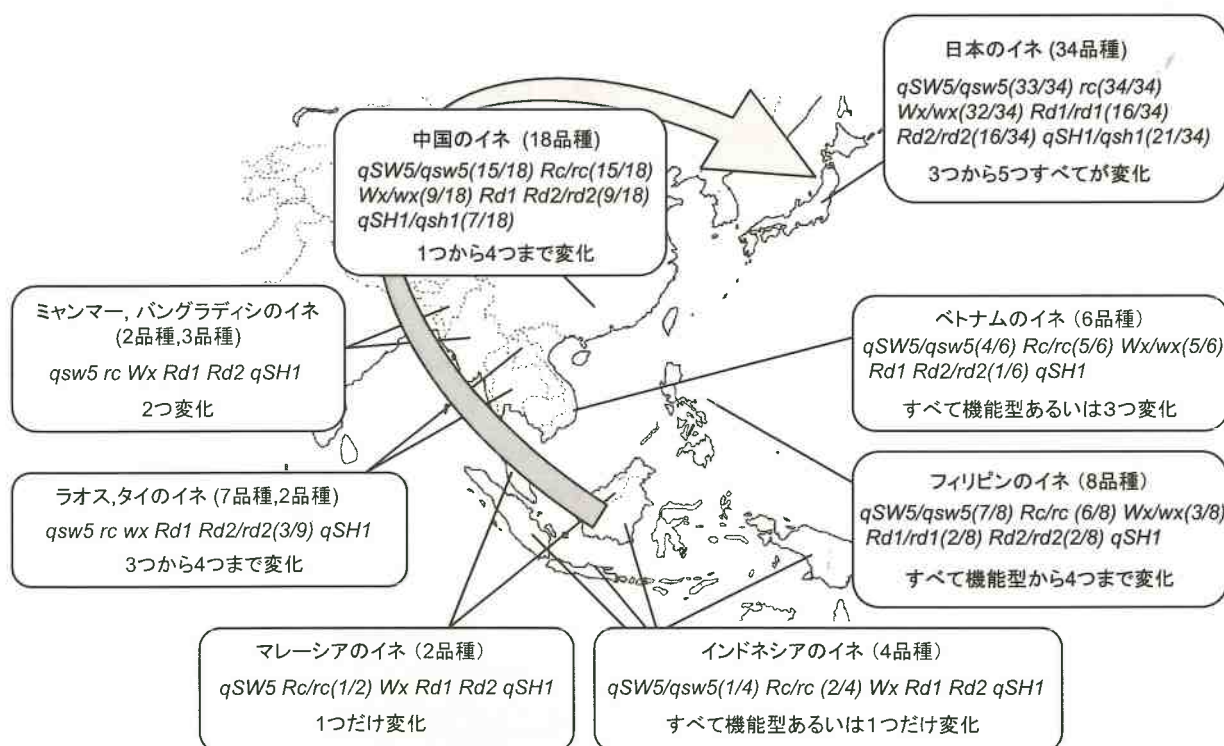


図3 栽培化遺伝子の変化からみたイネの栽培化

5つの栽培化遺伝子(の6つのFNP)が、コメの粒幅(*qSW5*)、玄米の色(*Rc*、*Rd1*、*Rd2*)、もち性(*Wx*)、脱粒性(*qSH1*)を決定している。ここでは、これらのFNPで判断した遺伝子型を示しており、大文字表記は機能型を、小文字表記は、その遺伝子の機能が栽培化過程で変化し、選抜されたことを示す。また、*Wx*については、*Wx^a*を*Wx*、*Wx^b*を*wx*と表記した。()内の数字は、FNPが、各国、地域の品種の中で変化した割合を示す。大きな矢印は、5つの栽培化遺伝子の変化から推定されるイネの栽培化の流れを示す。

qSW5, *Rc* および *Wx* 遺伝子の変異の蓄積過程として、ジャポニカイネの栽培化を推測することができた。また、これら遺伝子のDNAの変異が徐々に蓄積していくにつれて、その変異をもった品種が、インドネシアからインドシナ半島、そして、中国や日本にその栽培域を広げていく流れをたどることができた(図3)。これらの結果は、ジャポニカの原因が東南アジアであることを強く示唆している。一方、これまでの考古学からの知見では、ジャポニカの起源は中国の長江付近との説が有力である。この両推定における矛盾については、現時点では説明はできていない。今後、新たな考古学的な知見やさらに多くの品種・系統のゲノム塩基配列解析による知見が組み合わさることによって、実際に生じた栽培化のプロセスが浮かび上がってくることを期待している。

文 献

- 1) 佐藤洋一郎 (2007), 科学, 77, 618-620.
- 2) Cheng, C. et al. (2003) Mol.Biol.Evol., 20, 67-75.
- 3) Konishi, S. et al. (2006) Science 312:1392-1396.
- 4) Shomura, A. et al. (2008) Nature Genetics, 40:1023-1028.
- 5) Hirano, H.Y. et al. (1998) Mol. Biol. Evol. 15:978-987.
- 6) Isshiki, M. et al. (1998) Plant J. 15:133-138.
- 7) Sweeney, M.T. et al. (2006) Plant Cell 18:283-294.
- 8) Sweeney, M.T. et al. (2007) PLoS Genet. 3:1418-1424.
- 9) Furukawa, T. et al. (2007) Plant J. 49:91-102.
- 10) Kojima, Y. et al. (2005) Breeding Science 55:431-440.
- 11) Tanno & Willcox (2006) Science, 311, 1886.
- 12) Konishi, S. et al. (2008) Plant Cell & Physiology 49(9):1283-1293.

◀国内情報▶

米粉パンに適した鍵因子を探る — 米粉用 イネの画期的な品種開発を目指して

独立行政法人 農業生物資源研究所 植物科学研究領域

川 越 靖

米粉利用の促進は日本の食料自給率の向上につながる事が期待され、各地で米粉用イネの品種選定が進められている。本稿は米粉と小麦粉の特性の違いについて概説し、製パンにおける米粉の欠点を緩和するために、突然変異体の利用が有効である事例について解説する。イネの充実した保存系統や突然変異体のリソースを有効に活用することで、米粉用の画期的な新品種の開発が期待される。

1. 脚光を浴びる米粉

オーストラリアでの2年連続の記録的な干ばつや穀物のバイオエタノールの原料としての利用等で、世界的に穀類価格は上昇傾向にある。一方国内では米粉の製粉技術が改良され、米粉が小麦粉の代替原材料として脚光を浴びている。これらの国内外の情勢と連動して、大手のコンビニや食品会社などでは米粉パンや米粉麺などの商品開発が活発になっている。米粉の利用促進は日本の農業や食品産業に大きな変革をもたらす可能性があり、長期的には食料自給率の向上に大きく貢献すると期待される。しかしながら、米粉用イネの新品種開発はこれまで体系的に進められていないため、米粉パンに適した鍵因子が何であるか十分な検証実験がなされていない。本稿では米粉と小麦粉の特性の違いについて概説し、突然変異体の利用や米粉用品種の開発における今後の課題を議論する。

2. 米粉と小麦粉の違い

小麦粉が米粉を含めた他の粉と異なる最も大きな点は、小麦粉からはグルテンが形成されることである。グルテンとは、小麦粉に水を加え

KAWAGOE Yasushi

〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2

て捏ねる過程で形成されるタンパク質複合体で、生地に特有の粘弾性を与える。この粘弾性によって発酵パンは大きく膨らむことができる。言い換えれば、通常の製パン法では、本来グルテンを形成しない米粉だけを材料にして、小麦強力粉ほど大きく膨らむ発酵パンをつくることは理論的に不可能であり、事実、そのような成功例は報告されていない。グルテン特有の粘弾性が生じる理由は、コムギの種子貯蔵タンパク質に含まれるシステイン残基が生地を捏ねる過程でジスルフィド結合を形成して、複雑に絡み合ったネットワークを形成するためである。グルテンに粘弾性が生じる二つ目の理由は、ネットワークを構成するタンパク質の特性にある。コムギの種子貯蔵タンパク質の高分子量グルテニン(HMW glutenin)はx-typeとy-typeに大別され、グルタミン、プロリン、グリシンを含む配列が数十回反復した配列を持ち、例えば1Dx2の場合には、PGQGQQ又は類似の配列が72回反復した配列がある。これらの反復配列の立体構造がグルテン特有の粘弾性を作り出すと推察される¹⁾。高分子量グルテニン遺伝子を導入した組換えコムギを材料にした製パン試験では、導入した遺伝子によって生地特性に違いが現れた²⁾。グルテンに粘弾性が生じる3つ目の理由として、コムギは6倍体であるため、種子に含まれる種子貯蔵タンパク質が、2倍体の穀類の

種子タンパク質に比べると組成がはるかに複雑なことが挙げられる。構造や化学的性質が多少でも異なるタンパク質が、生地を捏ねる過程で膨大な数の組み合わせで複雑な網目構造を形成して、グルテン特有の粘弾性を作り出すと推察される。

精米（胚乳）を構成するデンプン貯蔵細胞のそれぞれは、数十のアミロプラストを含み、各アミロプラストは数個から数十個のデンプン粒（デンプン粒1個の大きさの平均は6～8ミクロン）を合成する。イネは1つのアミロプラストの中に多数のデンプン粒を合成する複粒型であるのに対し、コムギは1つのアミロプラストの中に1個のデンプン粒を合成する単粒型である。コムギのデンプン粒は大きさが10ミクロン以上のAタイプと10ミクロン以下のBタイプに分類され、AタイプとBタイプの比率は生地の物性に大きく影響する。米の複粒型デンプンは単粒型に比べて体積あたりの表面積が大きいいため、糊化が進みやすく炊飯に適している。一方、粉食利用においては、デンプン粒は発酵過程で炭素源として利用されるが、加熱するまでは生地の中で粒として存在する。米粉のデンプン粒は小さいためデンプン粒の総表面積が大きくなり、結果として、パン生地を作るために加える水の量は多くなる。加水する量の多少は生地やパンに多面的な影響を及ぼす。影響の一つは、米粉パンは小麦パンよりもしっとり感があり、水を飲まなくても食べやすいという利点がある。二つ目は、水分が多いためパンが重くなり膨らみ難くなること、また膨らんだパンが自らの重みで凹みやすいという点である。また、米粉パンは水分含量が高いため、雑菌の繁殖を含め日持ちの問題も小麦パンとは異なることが推察される。イネの複粒型デンプンが形成される分子機構は全く不明である。また、単粒型デンプンを形成するイネの突然変異体はこれまでのところ報告されていない。複粒形成の分子機構は、アミロプラストの分裂・発達、及びデンプン生合成の分子機構と関連していると推察され、この研究分野の進展が期待される。また、

米粉のデンプンは小麦粉のデンプンと比べて糊化及び老化特性が大きく異なり、発酵パンの物性、食感に大きな違いが生じる³⁾。

小麦の品種開発では製粉性は最も重要な形質の一つである。種子の粉碎に必要なエネルギーの多少によって、小麦は硬質小麦と軟質小麦に分類される。種子の硬さを決める主要因は、細胞間の接着性と細胞内のデンプン粒とその周辺のタンパク質との結合状態の違いによる。軟質小麦は種子貯蔵タンパク質の2Sアルブミンに属するピュロインドリンA (*PINA*)、ピュロインドリンB (*PINB*) の両方又は片方を含み、硬質小麦やイネには*PINA* 及び *PINB* に相当する遺伝子は存在しない⁴⁾。これらの遺伝子がコードするタンパク質はトリプトファン残基を多く含む配列を含み、この疎水的な領域が脂質やデンプン粒に結合し、細胞間及び細胞内のデンプン粒とタンパク質間での接着性が変化して、種子の粉碎時に必要なエネルギーが少なく済むと推察されている。形質転換イネを用いた実験では、*PINA* 及び *PINB* 遺伝子を導入したイネの種子は粉碎が容易になる⁵⁾。粒食用の米は硬質小麦以上に硬いため、米粉を小麦粉なみに細かくすることは技術的に困難であり、コスト高となる。そのため、粉食用イネの品種開発では製粉性は最も重要な形質の一つである。

3. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) と *esp2* 変異体

イネの主要な種子貯蔵タンパク質はグルテリンとプロラミンで、粗面小胞体上で翻訳された新生ポリペプチドは、翻訳と同時に小胞体膜を通過して小胞体内腔に産生する。グルテリン前駆体の新生ポリペプチドは分子内ジスルフィド結合を形成して、ゴルジ体経由でタンパク質貯蔵液胞に輸送され、タンパク質顆粒 (PB-II) を形成する。グルテリン前駆体は、この液胞内でアミノ酸配列特異的なプロテアーゼによって切断され、多量体を形成して蓄積する。一方、システイン残基を含んだプロラミンは分子内及び分

子間ジスルフィド結合によって多量体を形成し、小胞体内腔に留まりタンパク質顆粒 (PB-I) を形成する。ジスルフィド結合は2つのシステイン残基の-SH基が-S-S-の共有結合で繋がった結合で、新生ポリペプチドの酸化的フォールディングにおいて、多くの場合必須の翻訳後修飾である。この酸化的フォールディングでのジスルフィド結合形成はタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) によって触媒される。イネのPDIは19個の遺伝子からなる*PDI-like*(*PDIL*) 遺伝子ファミリーを形成する⁶⁾。イネの胚乳は貯蔵タンパク質を大量に合成・蓄積するため、植物体の中で最もタンパク質合成の活発な組織である。その胚乳細胞で発現量が最も高いPDI遺伝子は*PDIL1-1*で、その翻訳産物は*abb'a'*の構造を有した典型的なPDI酵素である。*PDIL1-1*のノックアウト型の突然変異体*esp2*では、グルテリン前駆体のPB-IIへの輸送が阻害され、グルテリン前駆体の多くが小胞体内腔に蓄積する⁷⁾。本来プロラミンが集積するPB-Iにグルテリン前駆体が混入するため、小胞体のタンパク質顆粒の形状が野生型PB-Iとは著しく異なっている。これらの表現型は、大量に合成されるグルテリン前駆体の酸化的フォールディングに*PDIL1-1*が必須であること、また、胚乳で発現する他の*PDIL*酵素は、*PDIL1-1*の機能を完全に補完できないことを示唆している。*esp2*変異体で多量に蓄積するグルテリン前駆体の抽出にはタンパク質抽出溶液に還元剤 (DTT) の添加が必要である (図1)。農業生物資源研究所の在来種コアコレクション50系統の種子を用いてグルテリン前駆体の抽出条件を調べたところ、どの系統もグルテリン前駆体の抽出に還元剤の添加は必要なかった。これらの結果から、*esp2*のグルテリン前駆体は分子間ジスルフィ

ド結合によって、小胞体内腔でプロラミンも含んだ巨大なタンパク質複合体を形成すると推察される。加えて、*esp2*の精製デンプン粒を走査型電子顕微鏡で観察したところ、8ミクロン以下の通常の大きさのデンプン粒に加えて、10ミクロン以上のデンプン粒が観察された (図2)。この結果はPDI酵素がデンプン粒の発達に間接的に関与することを示唆しているが、その分子機構の詳細は不明である。

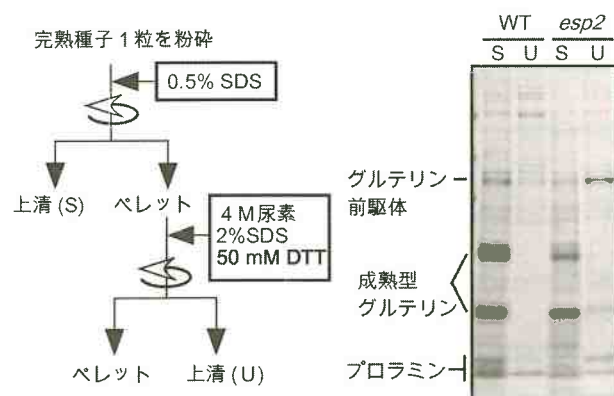


図1 *esp2*のグルテリン前駆体は分子間ジスルフィド結合で複合体を形成して蓄積する。*esp2*のグルテリン前駆体の抽出には還元剤 (DTT) の添加が必要のため、*esp2*のグルテリン前駆体はUの分画に抽出される。

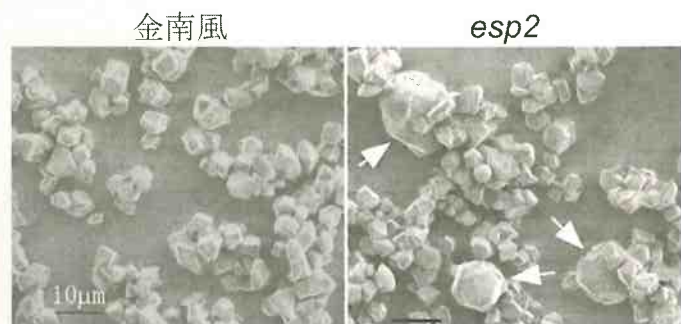


図2 野生型 (金南風) と *esp2*の胚乳のデンプン粒の比較。*esp2*は普通の大きさ (3~8ミクロン) のデンプン粒に加えて10~18ミクロンの大きさのデンプン粒 (矢印) を合成する。

4. *esp2*米粉の製パン性

*esp2*の種子貯蔵タンパク質の多くは細胞内で既に複合体を形成しているため、*esp2*米粉を材料にして製パン用の生地を作製すれば、野生型の米粉生地とは異なるタンパク質ネットワークを形成するのではないかと予測した。そこで、*esp2*の製パン適性を評価するために、野生型の金南風と*esp2*（品種は金南風）の米粉に小麦グルテンを2割加えて製パン性の比較を行った。まず、生地を比較したところ、最適な加水量が*esp2*の米粉は野生型に比べて少ないことが明らかになった。また、*esp2*米粉の生地はまとまりやすく、指や器具に付着する性質が野生型に比較して弱いことが顕著であった。パン酵母による発酵では、ホイロ及びオーブンでの生地の膨らみは野生型に比較して*esp2*は若干良いことが認められたが、両者の大きな違いは、焼成後に室温に冷やす過程で現れた。野生型金南風の丸パンは膨らんだ形を維持できず、気泡が潰れ、丸パンの表面には深いシワが現れた（図3）。これに対し、*esp2*の丸パンでは深いシワは現れなかった。この結果は、*esp2*の生地は可塑性が大きいことを示唆している。*esp2*米粉生地の可塑性が増す理由として、胚乳細胞内で既に、変性タンパク質が分子間ジスルフィド結合で複合体を形成しているため、その米粉とコムギグルテンを混合した生地では、新たなグルテン様のタンパク質ネットワークが形成されて可塑性が増すと考えられる。

5. 課題と展望

*esp2*は種子貯蔵タンパク質の蓄積変異体として20年以上も前に単離された。この変異体に当初想像できなかった加工適性を見出すことができた。現在、*esp2*を母本にして、各地の多収品種との交配育種が進められている。国内外のイネの系統や突然変異体のリソースは米粉用の品種開発においてきわめて有用な遺伝資源になると期待される。従来粒食用イネの育種では食味が良食味米に劣るために普及していない系統や突然変異体は数多くあるので、粉食用の新品種開発では粒食用品種の開発とは異なる視点から、製パン適性の評価を体系的に進める必要がある。例えば、製粉性、収量、デンプン特性、タンパク質の蓄積量などが製パン性に及ぼす影響を体系的に検証する必要がある。米粉パンに適した鍵因子を探り、幾つかの鍵因子を組み合わせた画期的な新品种が今後次々に開発されることを期待する。

6. 謝辞

本研究の実施にあたっては、*esp2*変異体の製粉は九州大学大学院農学研究院の熊丸敏博准教授、製パン試験は（株）波里の多大なるご協力を賜った。改めて感謝の意を表す。本研究は、新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業の平成17年度採択課題「イネ胚乳細胞のオルガネラ工学の開発と利用」によって行われている。



図3 野生型の金南風は、焼成後、丸パンの表面に深いシワが現れた。これに対し、*esp2*は膨らんだ丸パンの形が維持され、可塑性の増大が顕著である。

文 献

- 1) Halford, N.G. et al. (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 75, 117-126.
- 2) Shewry, P.R. & Jones, H.D. (2005), *Ann. Appl. Biol.*, 147, 1-14.
- 3) Kadan, R.S. et al. (2001), *J. Food Sci.*, 66, 940-944.
- 4) Bhave, M. & Morris, C.F. (2008), *Plant Mol. Biol.*, 66, 221-231.
- 5) Krishnamurthy, K. & Giroux, M.J. (2001), *Nature Biotechnology*, 19, 162-166.
- 6) Houston, N.L. et al. (2005), *Plant Physiol.*, 137, 762-778.
- 7) Takemoto, Y. et al. (2002), *Plant Physiol.*, 128, 1212-1222.

◀国内情報▶

遺伝子組換え樹木の野外試験 — キシログルカナーゼ の過剰発現による高セルロース含量ポプラ —

¹独立行政法人 森林総合研究所 森林バイオ研究センター,

²京都大学 生存圏研究所

谷口 亨¹・林 隆久²

植物細胞多糖であるキシログルカンは細胞壁中でセルロースマイクロフィブリルを架橋していると考えられる。この架橋を構成的に分解するキシログルカナーゼ過剰発現ポプラは、室内実験においてセルロース含量が10%、比重が16%増加していた。このポプラを隔離ほ場で栽培する野外試験を2007年3月から開始した。海外では200件以上の組換え樹木の野外試験の実施例があるが、国内では3例と少ない。本稿においては高セルロース含量ポプラの野外試験までの経緯とその途中経過について記す。

1. はじめに

樹木は光合成により二酸化炭素を吸収し、木部に炭素を固定する、再生可能で持続的な利用ができる生物資源である。人類は太古より、この樹木を燃料や木材として利用してきた。一方、産業革命以来の化石燃料の大量使用や森林の無秩序な伐採により、大気中の二酸化炭素が増大し、地球温暖化とうい深刻な問題が生じている。この問題の解決のために森林が寄与することができることは国際的にも広く認知されている。具体的には、森林の面積を増やすこと、樹木の成長量を高めて蓄積量を増やすこと、化石燃料代替として森林資源を使用すること、などが挙げられる。

このような状況において、成長が早く、高度な木材利用を可能とする樹木を創出し、持続的に利用することは地球温暖化対策に貢献できる。しかし、開花までの期間や成長期間が長く、さらに樹木が大きい樹木の品種改良には長い時間と多大な労力を要する。遺伝子組換え技術は樹木の品種改良を加速するための有力な手法であ

TANIGUCHI Toru¹, HAYASHI Takahisa²

¹〒319-1301 茨城県日立市十王町伊師3809-1

²〒611-0011 京都府宇治市五カ庄

る。ポプラは、他の樹木に比較して遺伝子組換えが容易であり、またゲノムサイズが小さく、ゲノム情報の蓄積が進んでいる。また、北半球の温帯を中心に分布し、成長が早く、短伐期での利用が可能なバイオマスに適した樹木である。このようなことより、ポプラは産業利用に適した特性を備えたバイオテクノロジー研究のモデル樹木となっている。そこで、我々は地球温暖化対策に資する樹木の開発を最終目的とし、遺伝子組換えポプラの隔離ほ場での野外栽培試験を2007年3月に開始した。今回の試験に用いている組換えポプラでは、キシログルカナーゼというタンパク質を過剰発現させたところセルロース含量が高くなったことが室内実験で明らかになっている。

なお、国内における組換え樹木の野外試験は今回の高セルロース含量ポプラを含めて3例しかない。他の二例は2005年10月と2008年3月から筑波大学で実施されている、塩類の集積した土壌でも成育できることを目指した耐塩性ユーカリの隔離ほ場試験である¹⁾ (http://www.bch.biodic.go.jp/bch_3_11.html)。これに対し、海外では1988年にベルギーで除草剤耐性ポプラの野外試験が行われて以来、アメリカを中心に200件以上の野外栽培試験が報告されている²⁾。

これらのうちの半数以上はポプラの組換え体であり、リグニン生合成経路の改変、害虫の食害に対する抵抗性付与や不稔化を目的としている。樹体が大きく、成育期間の長い樹木の場合、根の伸長が制限される温室でのポット植栽ではなく、野外に定植して屋外環境で栽培を行うことは、形質の正しい評価のために非常に重要である。

2. キシログルカンについて

キシログルカンは、伸長・肥大している植物細胞の壁に普遍的に存在する糖鎖で、植物細胞多糖ヘミセルロースを構成する成分の一つである。キシログルカンの化学構造は1,4-β-グルカン主鎖のグルコース残基にキシロースがα(1→6)結合したものである。細胞壁中ではキシログルカンとセルロースのネットワークが形成されている(図1)。すなわち、セルロース分子鎖の束であるセルロースマイクロフィブリルが

キシログルカンにより架橋されることにより、マイクロフィブリルが拘束された状態となっていて、細胞が伸長する際には、キシログルカン架橋を分解し、マイクロフィブリルの拘束を弱めることが必要と考えられている。キシログルカンを分解するキシログルカナナーゼ活性は植物細胞壁に存在するが、広く菌類・微生物界にも存在する。

3. 遺伝子組換えポプラの作成とその特徴

ポプラの一種であるギンドロ (*Populus alba* L.) の無菌植物体の葉にアグロバクテリウム法によりコウジカビ由来のキシログルカナナーゼ遺伝子 *AaXEG2* を導入し、選抜用抗生物質であるカナマイシン含有の茎頂誘導培地で培養して組換えポプラを作出した³⁾。キシログルカナナーゼ遺伝子にはカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターとエンハンサーが結合され、キシログルカナナーゼは植物体全体で過剰発現する。またポプラのセルラーゼ遺伝子由来のシグナルペプチドを付け、キシログルカナナーゼを細胞質から細胞膜を通過して外側の細胞壁に輸送させ、細胞壁中で効率よくキシログルカンが分解されるようにしている。作出した組換えポプラのうち、細胞壁結合画分のキシログルカナナーゼ活性が高い2系統を *trg300-1* と *trg300-2* とした。これら組換えポプラでは、キシログルカナナーゼが高発現しているため、細胞壁中のキシログルカンの90%以上が分解されていた。

実験室内で育成した組換えポプラの木部の比重は非組換えポプラに比較して約16%

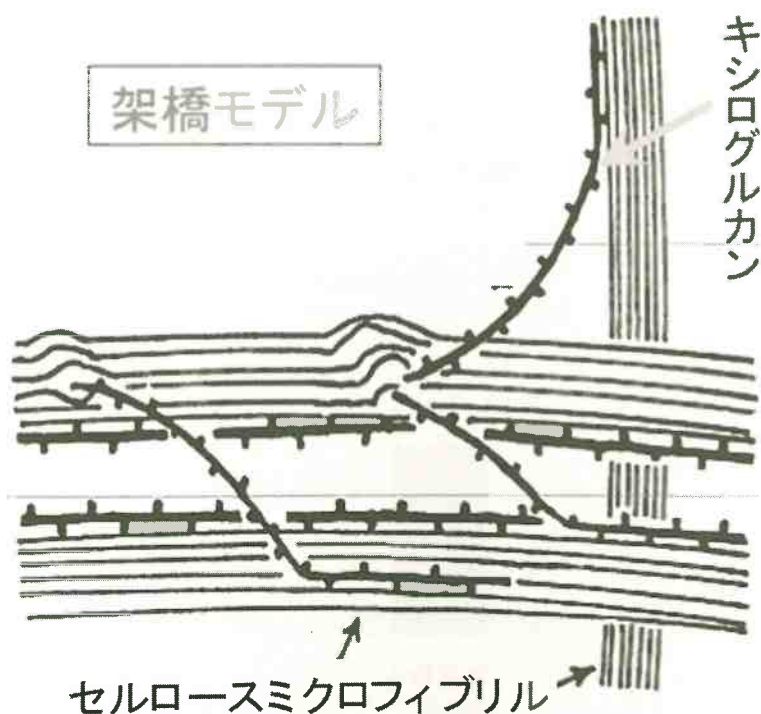


図1 キシログルカンとセルロースマイクロフィブリルのネットワークの模式図

増加し、木部乾燥重量当たりのセルロース含量も約10%増加した(図2)。セルロースマイクロフィブリルを架橋するキシログルカンが構成的に分解されることにより、セルロース合成酵素は架橋による抑制・束縛を受けなくなり、セルロース生合成が活性化され、セルロース含量が増加するとともに比重も増加したと考えられる。

ポット栽培における苗高成長量は、当初1ヶ月間は約1.4倍であったが、特定網室という組換え植物栽培用の温室におけるその後の成長量には顕著な差は見られなくなった⁴⁾。培養室内でさし木苗を傾斜させて育てたところ、傾斜させた部分が上方に立ち上がる能力が弱く、姿勢制御が阻害されていることが示唆された。葉は日差しの強い場所で形成される陽葉の形態に類似した厚く、濃い緑色を呈し、大きさは非組換えポプラに比較して小さかった。

4. 野外試験までの経緯

キシログルカナナーゼを過剰発現させた組換えポプラは、比重とセルロース含量が高いために、通常の樹木よりもパルプ生産に適した生物資源となる可能性を持つ。そこで、野外で栽培した場合の組換えポプラの性質を調査するために隔

離ほ場における野外栽培試験を開始した。隔離ほ場とは、組換え植物が意図せずに出されること等を防止するためのフェンス等の設備を設けた一定の区画された、一般環境を模した、遺伝子組換え植物を栽培するためのほ場である。野外試験の期間は、2007年3月より2011年12月までである。今回、組換えポプラを栽培する隔離ほ場は、生枝がほ場の外に出るのを防ぐためにフェンスの高さを8mと高くしている(図3)。また、根がほ場外まで伸びて出ないように、深さ1mのコンクリート壁で囲まれている。

遺伝子組換えは、優れた植物を創り出すことのできる技術であることは広く知られていると同時に、組換え植物が周辺環境へ影響を及ぼさないように栽培には十分な配慮がなされなければならない。そこで、カルタヘナ法により、組換え植物を野外で栽培する場合には周辺の生態系への影響(法的には生物多様性影響と言う)をあらかじめ評価しなければならないことが規定されている(http://www.bch.biodic.go.jp/bch_2.html)。我々は、室内で栽培した組換えポプラ(室内栽培は第二種使用と定義され、実験室や特定網室など決められた拡散防止措置をとった施設で栽培する。これに対し、隔離ほ場など野外で栽培することは第一種使用と定義される。)の情報などより環境への影響評価を実施した。⁴⁾

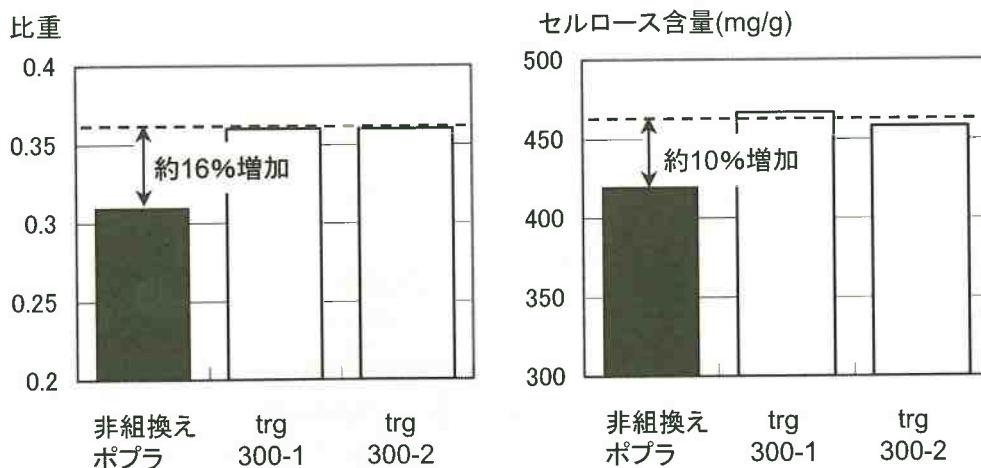


図2 組換えポプラ (trg300-1, trg300-2) と非組換えポプラの比重(左)とセルロース含量(右)の比較



図3 野外栽培を実施している隔離ほ場は、高さ8mのフェンスと深さ1mのコンクリート壁で囲まれている

その結果、高セルロース含量ポプラの栽培実験を隔離ほ場で約5年間実施しても周辺環境には影響を及ぼす恐れはないと判断した。カルタヘナ法に従い、組換えポプラの隔離ほ場栽培を行うために、生物多様性影響評価書を添付して第一種使用規程承認申請を農林水産大臣と環境大臣に行った (http://www.bch.biodic.go.jp/bch_3_1_4.html)。第一種使用規程に従って栽培すれば生態系への影響が生じる恐れはないという学識経験者の判断を経て大臣より栽培の承認を受けた。生態系への影響評価の要点は以下の通りである。キシログルカナーゼは食品添加物の生産に用いられているコウジカビに由来する遺伝子の産物であり有害物質ではなく、また、高セルロース含量ポプラは他の生物の成育に支障を及ぼすような有害物質を作ることはないこと。雌株とされる個体から作出しているので花粉は作らない、また、ポプラの開花までには通常は10～15年の期間が必要だが試験期間が5年と短いので花は咲かず、種子による組換え体の拡散や交雑による導入遺伝子の近縁の樹木への拡散はないことである。なお、仮に花芽が形成された場合には、切除するなどして交雑を防止することが義務づけられている。

また、遺伝子組換え植物の野外での栽培については、環境への影響評価の他にその情報を十

分に公開することが重要である。そこで、野外試験実施前に、ほ場周辺の自治体や関連団体に十分な説明を行うとともに、近隣の方々へも説明会を開くなどして情報の公開に努めた。

5. 野外試験の途中経過

高セルロース含量ポプラ2系統 (trg300-1とtrg300-2) と比較用の非組換えポプラ1系統を各々50本ずつ、2007年3月に植栽した。同一系統25本を2m間隔で植栽した区画を各系統2区画設け、植栽総数は150本とした。植栽したポプラは、さし木により増殖させ、特定網室で成育させた1年生苗で、平均苗高は約1mであった。現在は、二成長期間を終えようとしている(図4)。

伐採して利用するまでの期間が長い樹木において、導入した遺伝子が安定的に発現することが重要である。隔離ほ場での栽培1年目の組換えポプラよりRNAを抽出して導入遺伝子である*AaXEG2*の発現をRT-PCRにより調査した結果、*AaXEG2*は発現していることが確認された。また、葉の色は非組換えポプラに比較して緑色が濃く、特定網室での葉の色の相違と同じ傾向を示した。これらのことより、野外においても*AaXEG2*は組換えポプラで安定して発現していることが示唆された。

隔離ほ場1年目の樹高成長量は組換えポプラで約20cm、非組換えポプラで約30cmであった。これに対し、隔離ほ場に植栽する前の特定網室では組換えポプラと非組換えポプラの成長量の間には明瞭な差は認められなかった。成長量は今後も野外栽培期間中に継続調査を行う。組換えポプラで向上していることが期待されているセルロース含量と比重については、栽培期間中と栽培終了後に幹をサンプリングして調査する。また、組換えポプラと非組換えポプラの根元より別々に採取した土壌を用いて微生物相の調査や指標植物であるレタスの根の伸長量の調査を行って、微生物や他の植物の成育に及ぼす影響を調べている。



図4 隔離ほ場で育成二年目の組換えポプラ（左）と非組換えポプラ（右）

6. おわりに

組換え樹木の野外栽培は緒に就いた段階であり、今後期待される高度な樹木の開発には望まれる形質を付与できる遺伝子の更なる探索やその発現のコントロールに関する研究が必要である。今回用いている高セルロース含量ポプラではキシログルカナナーゼを植物体全身で高発現するようにしているが、発現部位を木材として利用する木部に限定することが今後の課題である。

今回の野外試験は高いフェンスと地下のコンクリート壁を設けた隔離ほ場という限定された場所で、四成長期と限られた期間での栽培である。このために組換え遺伝子の拡散など、周辺生態系への影響はないと判断し、また、組換え遺伝子の拡散がないことをモニタリングしながら試験を進めている。これに対し、組換え樹木を産業利用するために長期間の栽培を通常の野外で行う場合には交雑による導入遺伝子の生態

系への拡散が懸念される。これを防ぐためには種子や花粉の形成を阻害する不稔化の技術が必要になると考える。アメリカでは不稔化遺伝子を導入した組換えポプラの野外試験が進められている。国内ではスギの雄性不稔化のために雄花で特異的に発現する遺伝子やその発現調節領域の単離が行われている。また、樹種によるが、ポプラなどでは根から発生する根萌芽とよばれる方法での無性繁殖により増殖することが知られている。無性繁殖による組換え樹木の意図しない拡散を防ぐためには根の生育のコントロールも必要と考える。

謝 辞

本試験の一部は、文部科学省科学研究費補助金による「産業利用を目的とした遺伝子組換えポプラの野外試験」により行っている。組換えポプラの作出については、生研機構基礎研究委託費により実施された。

文 献

- 1) 菊池彰ら (2006), 育種学研究, 8: 17-26
- 2) Valenzuela S et al. (2006), Electronic J. Biotechnol., 9: 335-339
- 3) Park YW et al. (2004) FEBS Lett., 564: 183-187
- 4) Taniguchi et al. (2008) J. Wood Sci., 54 (in press)

◀国内情報▶

自脱型コンバインの事故事例と 安全装備の実態に関する農業者調査結果

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

富田 宗樹・川瀬 芳順・水上 智道・高橋 正光・塚本 茂善

生研センターでは、農業機械事故の減少を目的として、型式検査・安全鑑定を通じた、各種の安全装備の装着を推進してきたが、さらなる農業機械事故の減少を図るためには、事故の現状を踏まえた、安全鑑定基準の見直しや安全装備の改善、追加等の検討が必要である。そこで、事故実態とこれらに対する安全装備の効果を定量的に把握、分析し、これにより安全鑑定の農業機械事故軽減における効果を明らかにし、有効性の検証と基準の改善を図る研究を行った。その一環として、自脱型コンバインにおける事故事例と安全装備の効果に関し、農業者調査を実施したのでその結果を報告する。

1. はじめに

現在、農林水産省の調査によると、我が国の農作業死亡事故は、年間およそ400件発生している¹⁾。そのうち、農業機械によるものは約280件で、全事故の約70%を占めている¹⁾。近年、その事故件数はほぼ横ばいであり、その減少が求められている。

自脱型コンバイン（以下、コンバイン）による事故は農業機械による死亡事故の約4%を占め、第4位となっている。一方、コンバインにおける問題点として、負傷事故、中でも通院や入院を要する比較的重度の事故が多いことが挙げられる。生研センターが過去に実施した調査においても、コンバインを使用する農業者の27%に負傷事故の経験があり、この割合は乗用型トラクタの2倍以上であった²⁾。しかし、コンバインにおける死亡・負傷事故の詳細な実態や機械の安全装備との関係は、現状では十分把握されていない。

TOMITA Muneki, KAWASE Yoshiyuki, MINAKAMI Tomomichi, TAKAHASHI Masamitsu, TSUKAMOTO Shigeyoshi

〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

一方、コンバインの負傷事故については、手こぎ時のフィードチェーンへの巻き込まれ及びカッタでの切られによる重傷事故が発生していることが、以前から報告されていた³⁾。これを踏まえ、生研センターでは、安全鑑定を通じ、防護カバーの改善、手こぎ部の緊急停止ボタン（図1）及びカッタの動力遮断装置の装着義務付け等の対策を行ってきた⁴⁾。しかし、これらの農業者における普及及び使用状況や事故に対する効果は現在十分検討されているとはいえない。



図1 手こぎ部緊急停止ボタンの1例

そこで、コンバインに関して、農業者における事故事例と安全装備の実態を把握することを目的として、農業者調査を行った。本稿では、その概要について、脱穀部における事故と転落・転倒事故を中心に述べる。

2. 調査方法

本調査は平成18年9月から平成19年1月にかけて、アンケート形式で実施した。調査表の配布は、コンバインまたは同時に調査した農業用運搬車両を日常的に使用している農業者（全国23道府県・2300戸）に対して行い、コンバインについては902戸から回答を得た。回答方法は、回答者自身が調査票に記入する方式とした。

調査内容は、所有または使用するコンバインの仕様及び事故事例とした。事故事例調査では、過去の調査結果を参考に、事故を発生部位により刈取・搬送部、脱穀部、排わら処理部、転落・転倒事故及びその他に分類し、有無を調査した。さらに、その他を除き、事故形態、受傷程度及び関連する安全装備の状況を調査した。

関連する安全装備としては、刈取・搬送部に関して可動部カバー、脱穀部に関して緊急停止ボタン及び排わら処理部に関して動力遮断装置を設定し、事故における使用状況及び作動状況を調査した。

3. 調査結果

1) 回答者の概要

性別は、男性が95%であった。年齢は平均53.4歳であり、50歳代が35%で最も多く、60歳以上は30%、70歳以上は8%であった。専業/兼業の別では、専業が64%であった。

2) 回答者の所有するコンバインの概要

回答者の所有するコンバインの延べ台数は1013台であった。刈取条数は、2条刈、3条刈、4条刈及び5・6条刈がそれぞれ22~28%で、ほぼ同程度であった。使用年数は、平均6.7年であり、10年以下が78%を占めた。これは、乗用型トラクタ及び歩行型トラクタ⁵⁾に比較すると大幅に短かった。

また、手こぎ部の緊急停止ボタンは、有無が判明したものの47%に装備されていた。

3) コンバインにおける事故の概況

153名の回答者から、延べ257件の事故事例が報告された。事故の発生部位は、転落・転倒が最も多く29%を占めた。次いで、刈取・搬送部27%、脱穀部21%、排わら処理部17%であり、主要4部位で全事故の94%を占めた（図2）。

さらに、受傷程度は、全事故257件中217件で回答があった。その結果は、無傷が最も多く32%を占め、死亡事故は2件（1%）であった。こ

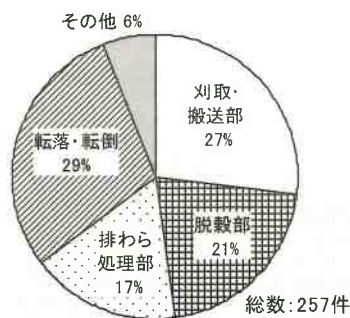


図2 コンバイン事故の発生部位

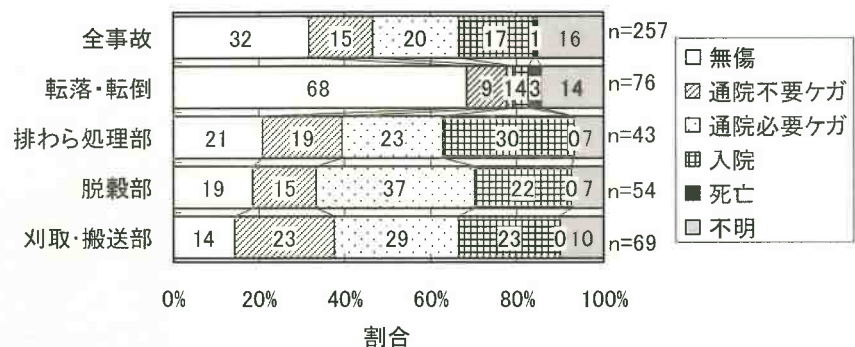


図3 各発生部位における受傷程度

れより、コンバイン事故全体では、死亡事故は少ないものの、無傷も少なく、負傷事故が過半数を占めて多いこと傾向があることが明らかになった。

一方、事故発生部位によって、受傷程度には差異があった(図3)。作用部では、死亡事故が発生していないものの負傷事故の割合が高く、これに対して、転落・転倒事故では無傷の割合が高いものの死亡事故が発生していた。

なお、本調査の結果においては、年齢階層による事故件数及び受傷程度の差異は明確には認められなかった。

4) 脱穀部における事故

図3に示したとおり、脱穀部における事故では、通院または入院を要する負傷事故が59%に達し、著しい重傷傾向があった。

事故の形態は、54件中45件で判明した。内訳は、「手こぎ作業時にチェーンに巻き込まれ(以下、手こぎ作業時事故という)」が最も多く、有効回答の69%を占めた。また、これらでは、通院または入院を要する負傷事故が68%に及んだ。

次に、緊急停止ボタンの有無と脱穀部事故との関係のみた。脱穀部事故54件のうち35件で、緊急停止ボタンの有無が判明し、緊急停止ボタン装備機(以下、「装備機」という)は13台、緊急停止ボタン非装備機(以下、「非装備機」という)は22台であった。さらに、緊急停止ボタンの有無により脱穀部の事故における受傷程度を比較した。その結果、非装備機では、半数が通院必要ケガであり、入院も18%あった。これに対し、装備機では、無傷が54%と過半数であり、重傷事故が少ない傾向があった(図4)。

さらに、緊急停止ボタンが事故軽減に繋がる理由を検討するため、事故発生時におけるエンジン停止の可否及び受傷程度との関係を調査した。その結果、まず、緊急停止ボタンの有無に係らず、エンジンが停止できなかった場合は、通院必要ケガ以上の割合が67%と高かった。さらに、装備機では、69%が「エンジンを停止できた」と回答していたのに対し、非装備機では、73%

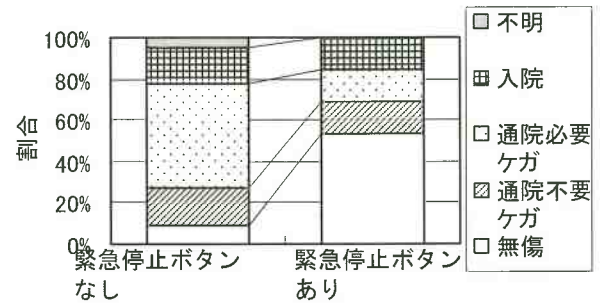


図4 緊急停止ボタンの有無による受傷程度の差異

が「エンジンを停止できなかった」と回答していた。一方、エンジンを停止した方法を調査したところ、緊急停止ボタン装備機では、47%が緊急停止ボタンにより停止していた。

以上の結果より、脱穀部の事故においては、エンジン停止の可否が受傷程度に影響することが示された。また、緊急停止ボタンが、エンジン停止の可能性を増加させ、結果としてケガの防止及び軽減に寄与していることが示唆された。しかし、明確な結論に至るには、事例数が不足しており、今後の調査・研究をさらに行っていく必要性を認めた。

5) 転落・転倒事故

転落・転倒事故においては、無傷が69%であったが、本調査における死亡事故の全て(2件)が発生していた。うち1件は、アユミ板からの転落・転倒により下敷きになった事例であり、もう1件は、傾斜地の道路を後退登坂中に横滑りして転倒、下敷きになった事例であった。

事故の形態は、68件で判明した。内訳は、「アユミ板で転落・転倒」及び「トレーラから転落」が最も多く、それぞれ17%を占めた(図5)。

さらに、転落・転倒事故を、トラック、トレーラ等での輸送に係るもの(以下、「輸送事故」という。)、自走での道路移動に係るもの及び出入りを含むほ場作業に係るものの3つに大別すると、輸送事故が34%を占め、予想以上に多いことが明らかになった。

このように、本調査においては、輸送事故が

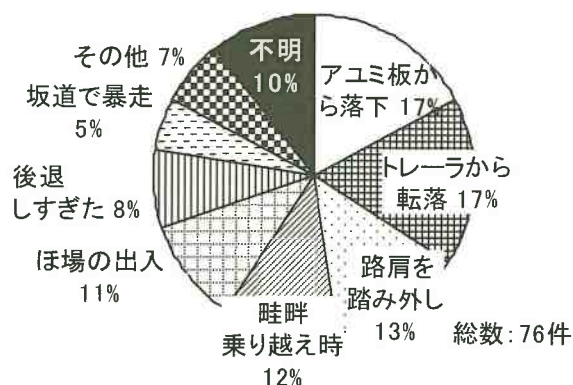


図5 転落・転倒事故の事故形態

多く報告された。このうち、アユミ板を用いたトラックへの積み降ろしについては、取扱説明書等でも注意が喚起されていたが、その危険性が改めて示された。一方、トレーラによる輸送については、トレーラの実態（仕様、作業性及び安全性等）及び作業者の実態（必要な免許の取得状況等）が現時点では十分把握されていない。

転落・転倒事故については、事故形態が多様であるため、各形態の事故事例数が少なく、さらに実態調査を進める必要がある。その際には、特に、輸送時の事故、作業環境及び作業者の実態について今まで以上に注意するべきである。

4. おわりに

以上の結果より、コンバインの事故の実態と安全装備の効果に関する有用な資料を得ることができた。これより、コンバインにおいては、緊急停止装置等の作用部に対する安全装備には

一定の効果が認められたが、作用部での重傷事故の防止と、転落・転倒事故での死亡事故防止が重要な課題であることが示された。これには、手こぎ作業等の可動部に接近した作業やトラックまたはトレーラによる輸送が広範に行われるというコンバイン作業の特性が影響しているともいえる。今後もこの特性を大きく変えることは困難と予想されるため、コンバインの安全性向上には、危険な作業を安全に行うための高度な技術が必要といえ、今後のさらなる調査、研究及び技術開発が求められる。

なお、今回の調査にあたっては、ご協力いただいた全国の農業者の皆様をはじめとして、社団法人日本農業機械化協会、全国農業機械士協議会並びに各道府県の農業機械士協議会の各位に多大なご指導、ご協力を賜った。この紙面を借りて深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 農林水産省（2007）：農作業事故調査結果、平成17年度
- 2) 生物系特定産業技術研究推進機構（2005）農業機械の安全装備と使用実態調査結果概要
- 3) 農林省農蚕園芸局（1977）：昭和51年度農作業事故調査 農作業事故事例集、57-64
- 4) 生物系特定産業技術研究支援センター（2008）：平成20年度 安全装備の確認項目と安全鑑定基準及び解説
- 5) 生物系特定産業技術研究支援センター（2006）：農業機械の事故実態に関する農業者調査結果（第1報）

◀地域の先端研究▶

業務用軟弱野菜の刈り取り再生栽培法

埼玉県農林総合研究センター 園芸研究所 露地野菜担当

岩崎 泰史

業務用に利用されるハウレンソウ、コマツナは、草丈35～40cm以上に生育したものを地上5cm程度の高さで刈り取ることで収穫が行われている。品種や播種時期を選ぶことで、刈り取り収穫後、ほ場に残された切り株から新たに株を再生させて複数回収穫することが可能で、ハウレンソウは8月下旬～10月上旬播種で計2回、コマツナでは2月下旬～4月上旬、8月下旬～9月上旬播種で計3～4回の刈り取り収穫が可能である。

1. はじめに

近年、外食・中食等の業務用野菜の需要が増加し、外食・食品業界では低価格な外国産への依存が拡大している。その一方、消費者は業務用野菜に対して「安全・安心」な国産品を求めるニーズが強く、学校給食でも地元産の野菜を周年利用するなど国産野菜の需要が高まっている。

業務用に利用されているハウレンソウ等の軟弱野菜は青果用とは異なり、根元の部分は土や異物等の混入の問題から必要とされず、収穫は地上数センチの位置で刈り取って行われている。刈り取り後はほ場を耕耘し、新たに作付けをするのが一般的であるが、ほ場に残された株から再び収穫することができれば、種子代や作業時間等が削減でき、コスト低減を実現できる。

そこで、業務用軟弱野菜の代表的な品目であるハウレンソウ、コマツナについて、これまで以上に低コストで生産できる可能性を秘めた新しい栽培技術である「刈り取り再生栽培法」について検討した結果、いくつかの知見が得られたので報告したい。

2. 刈り取り再生栽培の検討

平成18～19年にハウレンソウおよびコマツ
IWASAKI Yasushi
〒350-2214 埼玉県鶴ヶ島市太田ヶ谷25

ナを周年で露地栽培して刈り取り再生栽培を行い、収量、品質、栽培適期等を検討した。品種は各作期とも5～10品種を供試した。栽培は幅80cmのベッドに4条まきとし、条間15cm、株間5cmとした。草丈35cm程度を目安に、地上5cmの位置で刈り取りをして収穫を行った。追肥は刈り取り収穫直後、条間に化成肥料を三要素等量で10aあたり成分量10kg程度施用することで行った。

3. 刈り取り再生栽培の適品種および播種適期

1) ハウレンソウの刈り取り再生栽培

ハウレンソウは、8月下旬～10月上旬播種で再生により計2～3回の刈り取り収穫が可能で、品種は‘パレード’、‘パンドラ’などが再生能力が高く適していた。第2回刈り取り収量は、8月下旬～9月下旬播種では第1回収穫と同等またはそれ以上であったが、10月上旬播種では第1回収穫の6割程度と少なかった。第3回刈り取り収穫は8月下旬～9月下旬播種で可能ではあったが、抽だい株の発生により収穫が不安定と考えられた。一方、10月下旬および2月中旬播種栽培では、刈り取り後再生株が抽だいして品質が低下しやすく、品種によっては抽だい程度が比較的lowく第2回収穫も可能ではあったが、その年の気象条件等により収量が大幅に変動することも考えられ、この時期の刈り

取り再生栽培は不安定と判断された。4月上旬～6月中旬播種栽培では、刈り取り株が腐敗するなど再生株の生育が安定しなかった（図1、表1）。

8月下旬～9月上旬播種で計3～4回の刈り取り収穫が可能であった。再生株の収量は概ね第1回収穫の8～9割程度であった。しかし、刈り取り収穫が高温期となる5月～6月播種では軟腐病の発生により株が腐敗し再生栽培は困難であった。また、9月下旬～10月上旬播種では刈り取り後、一部に腐敗株の発生がみられたも

2) コマツナの刈り取り再生栽培

コマツナは、2月下旬～4月上旬播種および

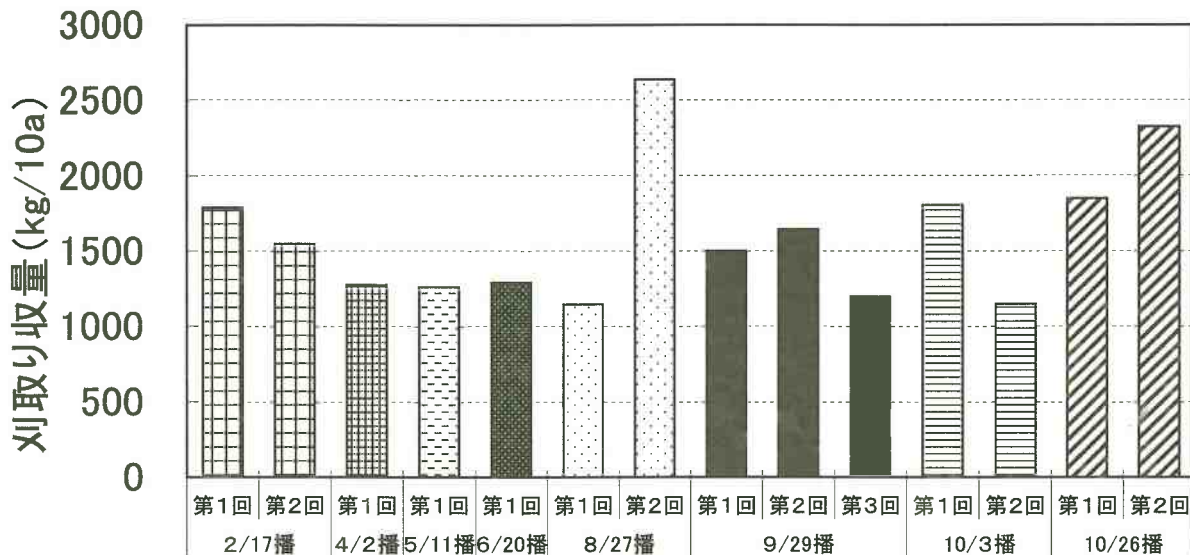
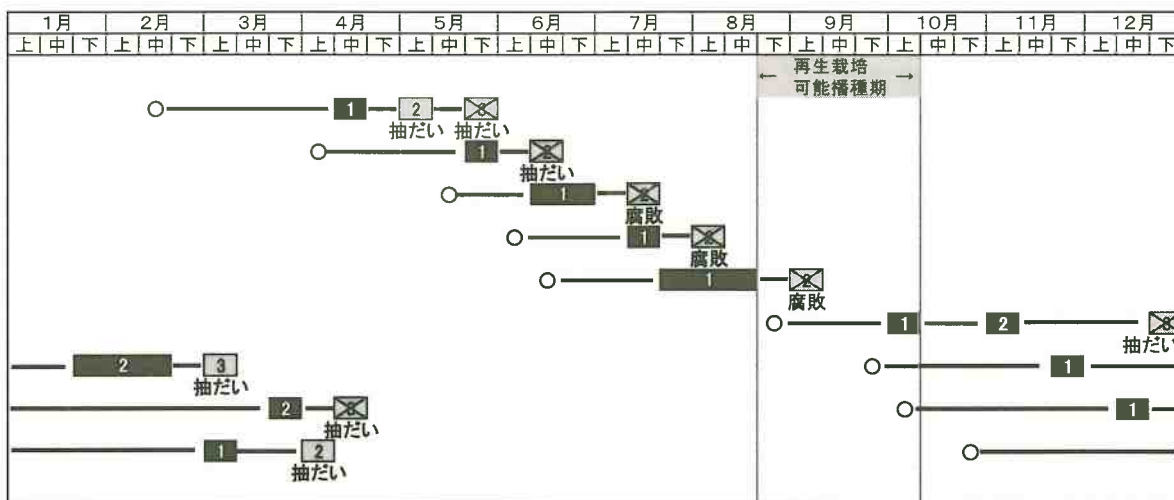


図1 ホウレンソウの播種時期と刈り取り回数別収量

表1 ホウレンソウ刈り取り再生栽培の播種適期



の2回刈り取り収穫までは可能であった。10月下旬播種では再生株が抽だいするため再生栽培は不可能であった(図2, 表2, 図3)。刈り取り再生栽培には、春まき, 秋まきともに, 再生能力が高く収量の多い‘浜美2号’, ‘美味菜’, 収量は前記2種より若干少ないが葉色の濃い‘みなみ’等が適品種として選定できた。

4. 刈り取り再生栽培の適性

今回の試験から, ホウレンソウは8月下旬~10月上旬播種により刈り取り再生栽培が可能であったが, 再生回数が多くなると抽だいしやすく, 実用的な収量が得られるのは2回の刈り取り収穫までであった。一方, コマツナは2月

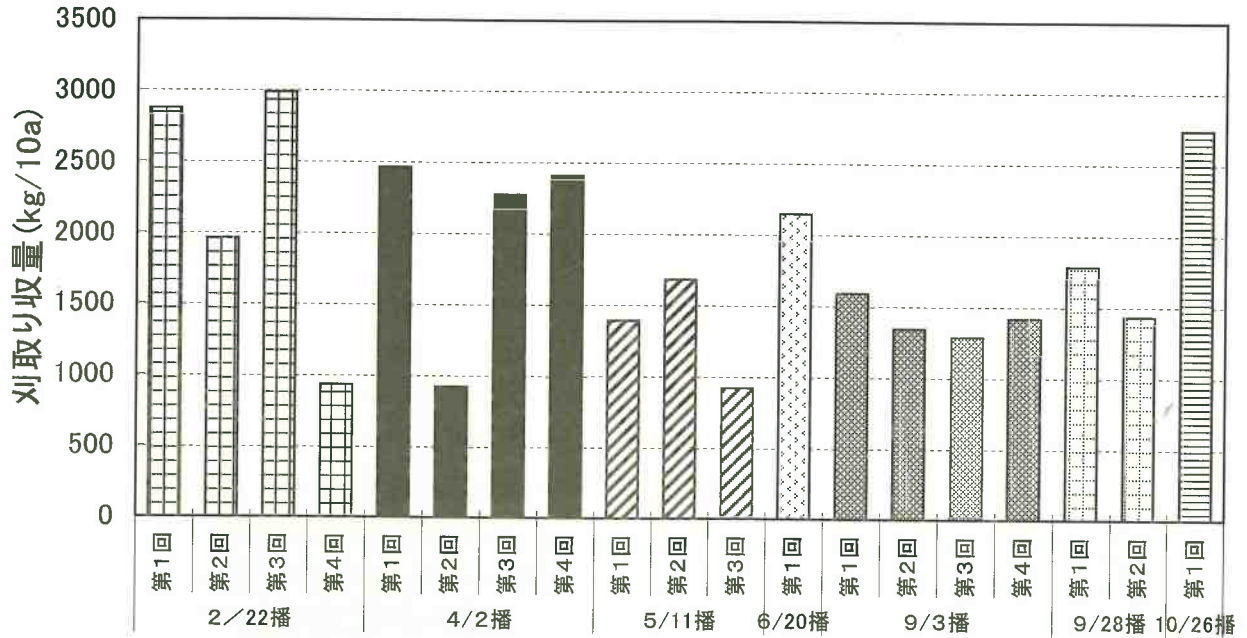
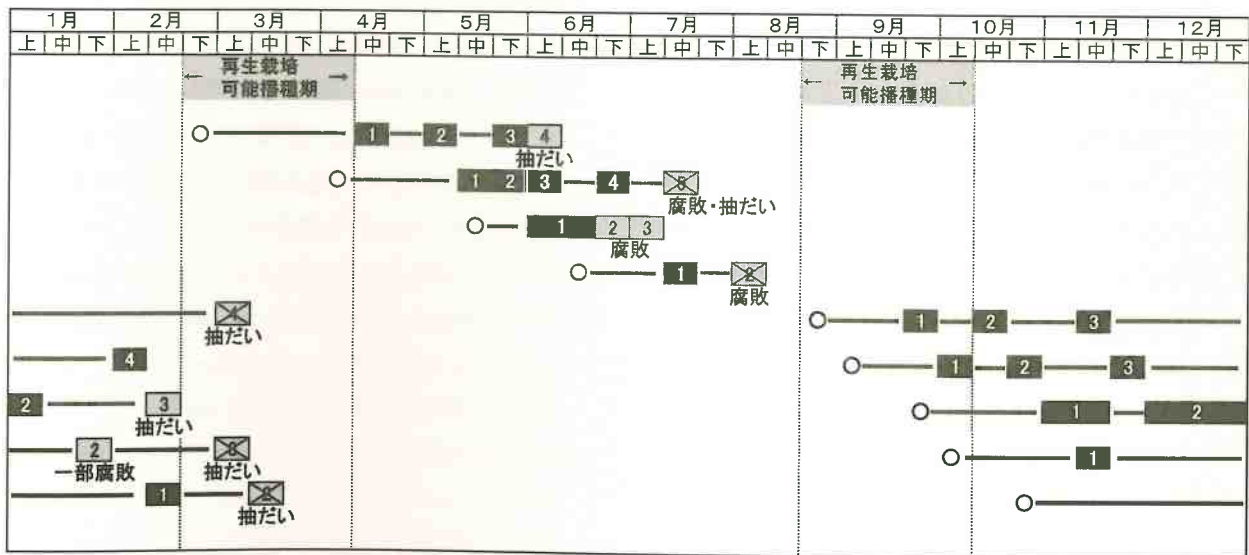


図2 コマツナの播種時期と刈り取り回数別収量

表2 コマツナ刈り取り再生栽培の播種適期



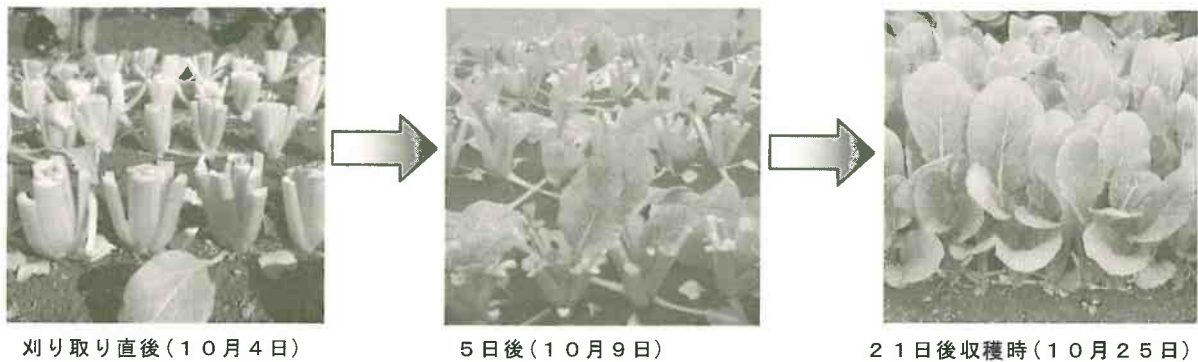


図3 再生の様子（コマツナ，9月3日播種栽培）

下旬～4月上旬，8月下旬～9月上旬播種により計3～4回の刈り取り収穫が可能であり，再生株の収量が8～9割と安定し，播種栽培と比べて収穫までの期間を半分程度に短縮できるなど，播種時期に注意すれば再生栽培の適性が高いと判断された。

ホウレンソウは日長や温度条件等によらず，播種後15～30日程度で花芽分化することが知られており^{1), 2)}，これが刈り取り回数が2～3回までになってしまう要因と考えられた。一方，コマツナは低温によって花芽分化が誘起されるため³⁾，植物体が低温の影響を受けにくい時期に播種することで，計4回の収穫が可能であるものと考えられた。

5. 今後の展望・課題

刈り取り再生栽培は，生産コストや労力を低減でき，収穫までの期間も種子からの栽培に比べて半分程度に短縮できるなど，ほ場を効率的に利用できることから，業務用軟弱野菜をより

低コストに生産できると考えられる。現在，業務用コマツナ，ホウレンソウの収穫は手作業で行われている地域が多いが，今後機械化による生産規模拡大や再生栽培法の導入により，低コスト生産が期待される。

再生栽培法は栽培期間が長く，作型によっては病虫害防除が複数回必要となる場合があるため，農業散布は登録された使用回数に気をつける必要がある。また，再生栽培を行う場合は播種適期を遵守することも大切である。

文 献

- 1) 香川 彰 (1997)，高品質ホウレンソウの栽培生理，第1版，40-53，いしずえ，東京
- 2) 香川 彰 (1974)，農業技術体系野菜編7，第1版，449-458，農山漁村文化協会，東京
- 3) 青葉 高 (1974)，農業技術体系野菜編7，第1版，617-621，農山漁村文化協会，東京

◀文献情報▶

妊娠初期のヒツジの子宮以外の組織における Interferon (IFN)-Stimulated Genes の発現は、子宮静脈からの IFN- τ の内分泌的な移行により引き起こされる

Expression of Interferon (IFN)-Stimulated Genes in Extruterine Tissues during Early Pregnancy in Sheep Is the Consequence of Endocrine IFN- τ Release from the Uterine Vein.

Joaõ F. Oliveira^{1,2}, Luiz E. Henkes¹, Ryan L. Ashley¹, Scott H. Purcell¹, Natalia P. Smirnova¹, D. N. Rao Veeramachaneni¹, Russell V. Anthony¹, and Thomas R. Hansen¹.

¹Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Department of Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Colorado State University, Fort Collins, Colorado 80523. ²BioRep, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

Endocrinology, 149, 1252-1259, 2008

反芻家畜の拡張胚盤胞は、母体の妊娠認識のためにパラクリンシグナルとして子宮内で局所的に作用するインターフェロン τ を分泌する。インターフェロン τ は、子宮内のレセプターに作用し、オキシトシンレセプターの発現を抑制することによりプロスタグランジンF2 α の分泌を抑え、黄体退行を抑制する。また、近年、インターフェロン τ は、黄体退行抑制効果だけでなく、ubiquitin-like IFN-stimulated gene 15-kDa protein (ISG15), signal transducer and activator of transcription (Stat)-1, Stat2, major histocompatibility complex class I, 2-microglobulin, IFN regulatory factor (IRF)-1, IRF-9, myxovirus resistance 2や2,5-oligoadenylate synthetase (OAS-1)のようなInterferon-Stimulated Genes (ISG)の子宮における発現を調節していることが明らかとなってきた。そこで、この論文では、ISG15やOAS-1のようなISGが、雌羊の子宮にお

ける循環血球で特異的に発現されているかどうか、また、黄体のような繁殖に関係する子宮以外の組織がこのようなISGを発現するかどうか、そして、妊娠初期において、子宮動脈に比べて子宮静脈において抗ウイルス活性が高いかどうかについて、検討が行われた。その結果、子宮内膜及び頸静脈におけるISGのmRNA発現量は、非妊娠の雌羊に比べて妊娠15日の雌羊において有意に(P<0.0001)高かった。また、ISG15及びOAS-1のmRNA量は、非妊娠の雌羊に比べて妊娠15日の雌羊の黄体で有意に(P<0.05)高かった。免疫組織化学的には、妊娠15日の大型黄体細胞において、ISG15の強い陽性反応が認められた。妊娠15日における子宮動脈及び静脈から得た血球は、ほぼ等しいISG15及びOAS-1のmRNA量を持っていたことから、これらの細胞は、子宮内でインターフェロン τ に感作されたものではないことが示唆された。抗ウイルス活性の検査から、妊娠15日において、子宮静脈中のインターフェロン τ の生理活性は、子宮動脈に比べて500~1000倍の高レベルな活性を持っていた。以上の結果から、インターフェロン τ は、子宮内から血液中に移行し、母体の妊娠認識期間において黄体のような子宮外組織においてもISGを誘導することが明らかとなった。

反芻家畜の妊娠認識物質であるインターフェロン τ は、これまで子宮内という限られた場所で作用し、子宮内膜のオキシトシンレセプターの発現抑制により、プロスタグランジンF2 α の産生を押さえて黄体退行を抑制しており、血液循環にはのらないと考えられてきた。本論文において、子宮静脈および子宮動脈中の抗ウイルス活性が認められることが明らかとなり、インターフェロン τ が血液循環にのる可能性が示された。今回の報告は、インターフェロン τ タンパクを検出したものではないので、本当に抗ウイルス活性を示した物質がインターフェロン τ であるかを確認する必要があるが、血液中にインターフェロン τ が移行するのであれば、新たな反芻家畜の超早期妊娠診断法の確立が可能となるかもしれない。

(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▶

テルペノイド系の新規植物ホルモンは枝分かれを抑制する

Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones

M. Umehara¹, A. Hanada¹, S. Yoshida¹, K. Akiyama², T. Arite³, N. Takeda-Kamiya¹, H. Magome¹, Y. Kamiya¹, K. Shirasu¹, K. Yoneyama⁴, J. Kyoizuka³ and S. Yamaguchi¹.¹RIKEN Plant Science Center, Japan. ²Osaka Prefecture University, Japan. ³The University of Tokyo, Japan. ⁴Utsunomiya University, Japan.*Nature*, 455, 195-200 (2008).

植物の枝分かれは植物の形態を決定する要因の一つであり、農業上においても収量に直接関わってくることから重要な形質といえる。この枝分かれに関してはこれまでオーキシシンとサイトカイニンという二つの植物ホルモンが関係していることが分かっていた。これとは別に、過剰な枝分かれを作る突然変異体を用いた接ぎ木実験、多重変異体の解析から第三の未知の植物ホルモンが関与していることが明らかとなっていた。これら先行研究の成果はさらに、新規植物ホルモンは、カロテノイド由来であり、根で合成され、シュートに移動し枝分かれを抑制する働きを持つことを示唆していた。

本論文では、この第三の植物ホルモンの正体がテルペノイド系化合物のストリゴラクトン類であることを明らかにしている。このストリゴラクトンは多くの植物種の根浸出液中に存在するカロテノイド系化合物であり、その機能としては土中の寄生植物雑草の種子発芽を促す物質として知られていた。さらに、菌根菌の共生誘導物質としても報告されている物質であった。著者らはまず、イネの過剰分蘖変異体である *d* (*dwarf*) 突然変異体を用いて、根浸出液中の内生ストリゴラクトンの量を測定したところ、*d17*、*d10*では、野生型に比べてストリゴラクトンが減少していた。また、寄生植物の種子発芽誘導を指標にした根浸出液中のストリゴラクトン濃度測定法を用いて、*d17*、*d10* 突然変異体の根浸出液を調べたところ、やはり野

生型に比べ減少していた。*d17*、*d10*はそれぞれ、カロテノイド酸化開裂酵素 (CCD7, CCD8) をコードしており、ストリゴラクトン生合成突然変異体であると考えられている。さらに、*d17*、*d10* 突然変異体に対してストリゴラクトンを処理したところ、その過剰枝分かれ突然変異が解消し、野生型に対して高濃度で処理した際には、枝分かれの数が抑制された。また、ストリゴラクトンのシグナル伝達系に関わると考えられる突然変異体 *d3* では、上記したような野生型に比べてストリゴラクトン減少、処理による表現型の回復も見られなかった。

次に、シロイヌナズナの過剰枝分かれ変異体である CCD7, CCD8 突然変異体に対して、イネと同様にストリゴラクトン処理を行ったところ、過剰な枝分かれが抑制された。以上のことから、ストリゴラクトンあるいはその誘導体が根において他生物との相互作用に関わるだけでなく、茎頂において枝分かれを抑制する植物ホルモンであると結論づけた。また、土壌中の無機リンの欠乏によって、内生ストリゴラクトンの増加が見られることなどから、植物は貧しい栄養条件下では枝分かれの数を減らし、菌根共生を促進することで栄養素の取り込みを上昇させ生存を有利にしてきたものと考えられた。逆に寄生植物はこのシグナルを利用して、自らの種子発芽を促すことにより寄生効率を高めているといえる。

本研究により、枝分かれを制御することによる収量の増加や、新たな植物形態の育成に関して重要な知見が得られたものと考えられる。さらに、根寄生雑草ストライガ等は、農業上でも重大な被害をもたらす要因の一つであるが、今回の発見によりストリゴラクトン類の制御による、寄生雑草の種子発芽を誘引しないような育種への可能性が示された。

また、本論文と同時に Gomez-Roldan らはエンドウを用いて同様の研究を行い、ストリゴラクトンが茎頂の枝分かれを抑制する機能を持つことを報告している。(Gomez-Roldan et al. 2008, *Nature*, 455, 189-194)

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

◀文献情報▶

Histoplasma capsulatum α -(1,3)-glucanは β -glucan レセプターによる自然免疫認識を妨げる

Histoplasma capsulatum α -(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the β -glucan receptor

Chad A. Rappleye, Linda Groppe Eissenberg, and William E. Goldman

Department of Molecular Microbiology, Washington University, St. Louis, MO 63110

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., January 23, 2007, vol. 104, no. 4, 1366-1370

哺乳類の自然免疫システムは、病原体の分子パターン (pathogen-associated microbial patterns : PAMPs) を、レセプターを介して認識することにより進入した病原体を検出し、この情報を基に適切な免疫応答を行う。真菌細胞壁多糖は、主要な PAMPs の一つであり、近年、真菌細胞壁 β -1,3-glucan を認識するレセプターとして dectin1 が発見されている。dectin1 は β -1,3-glucan を認識するとサイトカインの一種である TNF α を誘導する。

H. capsulatum は、ヒストプラズマ症を引き起こす病原性二形性酵母である。菌糸が産生する分生子が肺の中に入り、酵母形態として出芽する。この酵母形態への転換は病原性に必須なことから毒性に重要な因子を含んでいると示唆されている。酵母形態時特有の構成要素の一つとして α -1,3-グリコシド結合を主とするグルコースのポリマーである α -1,3-glucan がある。筆者らの以前の研究において、細胞壁 α -1,3-glucan が減少した株では病原毒性が減少することを報告している。しかしながら、その詳しい機構については解明されていない。そこで本研究では、細胞壁 α -1,3-glucan が病原性にどのように関与しているのかを明らかにすることを目的としている。

H. capsulatum は、37°C で酵母形態、30°C で菌糸形態をとる。まず筆者らは、分生子から酵母形態への変化時に、酵母体のみ α -1,3-glucan が

生産されることを α -1,3-glucan 抗体を用いた抗体染色法から明らかにした。この発見から、 α -1,3-glucan の迅速な合成が肺への感染時や酵母形態での生き残りに必要であることが示唆された。さらに筆者らは、 α -1,3-glucan の詳細な局在を α -1,3-glucan 及び β -1,3-glucan 抗体を用いた抗体染色や免疫電子顕微鏡法により観察した。その結果、 α -1,3-glucan は酵母細胞壁の最外層を構成することが明らかになった。この観察から α -1,3-glucan 層が β -1,3-glucan を宿主による検出から隠蔽しているのではないかと筆者らは考え、*H. capsulatum* 酵母と宿主細胞との結合実験を行った。ここで、*H. capsulatum* 酵母では細胞壁 α -1,3-glucan 合成酵素 Ags1p を破壊した株 *ags1* Δ とその親株 (野生株) を、宿主細胞では、 β -1,3-glucan のレセプターである dectin1 を発現するコンストラクトを組み込んだものとそのコントロールを用意し、それぞれの結合試験を行った。その結果、dectin1 を発現しない細胞では野生株、*ags1* Δ 株共に結合せず、dectin1 を発現する細胞では、*ags1* Δ 株のみ高い結合能を示した。さらに α -1,3-glucan が食細胞によるサイトカイン TNF α の生産を防ぐかどうかを調べたところ、*ags1* Δ 株の方が野生株よりも5倍以上の TNF α を生産した。また、dectin1 の発現を RNAi 干渉で減少させた食細胞を用いた場合では、野生株、*ags1* Δ 株、どちらを感染させた場合においても TNF α 量の生産が抑制されていた。これらの結果から dectin1 は、 α -1,3-glucan が存在しない時にのみ *H. capsulatum* を認識し、TNF α 生産を仲介する主要なレセプターであることが示された。

以上から、筆者らは *H. capsulatum* の細胞壁 α -1,3-glucan が細胞壁 β -1,3-glucan をマスクすることで宿主免疫システムから身を隠し、病原性を促進させることを提案している。またこの現象は、 α -1,3-glucan を持つ病原性真菌グループ間で保存された機構ではないかと予想しており、今後これら真菌の高い病原性を説明する手助けになると思われる。

(抄訳：水谷 治, MIZUTANI Osamu, 独立行政法人 酒類総合研究所)

◀文献情報▶

皮下脂肪移植による代謝改善作用

Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism

Thien T. Tran, Yuji Yamamoto, Stephane Gesta & Ronald Kahn

Joslin Diabetes Center and Harvard Medical School, Boston, MA, USA

Cell Metab., 7, 410-420 (2008)

体脂肪は皮下脂肪と内蔵脂肪に大きく分けることができるが、メタボリックシンドロームで厄介者とされているのは内蔵脂肪である。内蔵脂肪の蓄積による中心性肥満では皮下脂肪の蓄積による末梢性肥満と比較してインスリン抵抗性、II型糖尿病、血中脂質の異常、アテローム性動脈硬化のリスクが高まる。また、外科的な脂肪除去により内蔵脂肪を取り除くと血中のインスリンやグルコースのレベルが下がるのに対して、皮下脂肪の除去はメタボリックシンドロームの改善には効果がない。

同様の現象はマウスやラットでも見られ、異なった部位の脂肪組織が異なった代謝作用を有することは徐々に明らかになりつつあった。内蔵脂肪から分泌される遊離脂肪酸やその他の代謝物が肝臓や他の組織の代謝に悪影響を及ぼすという考え方は一見分かりやすいが、様々な代謝改善作用が実は皮下脂肪の増加と相関しているという例も多く報告されており、皮下脂肪自身の代謝改善作用についても近年注目が集まっていた。このような内蔵脂肪と皮下脂肪の代謝作用の違いは脂肪組織の体内での位置に由来するのか、脂肪組織を構成する細胞自身の性質の違いによるものなのかという疑問に答えることが、この報文のメインテーマである。マウスを使って内蔵脂肪、皮下脂肪をそれぞれ内蔵と皮下の部位に移植し、代謝の変化を測定した結果、もっと大きな代謝改善作用が見られたのは皮下脂肪を内蔵脂肪部位に移植したマウスであった。すなわち、皮下脂肪を構成する細胞が内在的に代謝改善作用を有することが示された。

皮下脂肪を内蔵脂肪部位に移植すると、体重、体脂肪総量、血中グルコース、インスリンレベルが減少した。また、このマウスはインスリンによる全身のグルコース取り込み、内因性脂肪組織におけるグルコース取り込み、肝臓でのグルコース合成抑制が改善されており、インスリン感受性が充進していることがわかった。皮下脂肪がシステミックな代謝に影響を与えていることが示唆されるが、移植された皮下脂肪ではレプチンやアディポネクチンのmRNAレベルは低く、血中のこれらの因子の濃度も低いため、これらのアディポカインレベルの変化では代謝改善作用を説明できない。また、炎症系マーカーの濃度も変化しておらず、炎症の軽減による代謝改善という説も成り立たない。ところが、インスリン抵抗性と相関するレジスチンや*Rbp4*のレベルは移植された皮下脂肪で低下しており、これらの因子はインスリン感受性の充進に寄与している可能性がある。

皮下脂肪を皮下に移植した場合よりも内蔵脂肪部位に移植した場合のほうが代謝改善作用が顕著であったことから、皮下脂肪から分泌される物質あるいは皮下脂肪によって制御される他の因子は内蔵脂肪や肝臓の近くで作用することが代謝改善作用に重要であると考えられる。このような皮下脂肪によってもたらされる代謝改善因子を解明することによって、肥満に伴うインスリン抵抗性やメタボリックシンドローム、心血管疾患、糖尿病などの予防、治療の新たな標的が見いだされるかもしれない。

(抄訳：竹内壱明, TAKEUCHI Kazuharu, 日本水産株式会社 中央研究所)

編集後記

130号をお届けします。本号の総説では島崎敬一氏（北海道大学）にミルクなどに含まれる多機能性成分ーラクトフェリンに関する研究の最近の動向についてご紹介戴きました。また、総説に関連して、高山喜晴氏（畜産草地研究所）にウシラクトフェリンと骨芽細胞による骨様組織の形成についてご執筆戴きました。

その他の研究情報としては、小西左江子氏（農業生物資源研究所）らにイネの粒幅を決める遺伝子の単離とジャポニカイネの栽培化過程の推測、川越靖氏（農業生物資源研究所）に米粉用イネの画期的な品種開発を目指した研究、谷口亨氏（森林総合研究所）らに遺伝子組換えによりキシログルカナーゼを過剰発現させた高セルロース含量ポプラの野外試験、富田宗樹氏（生研センター）らに自脱型コンバインの事故事例と安全装備の実態に関する農業者調査結果、岩崎泰史氏（埼玉県農林総合研究センター）に業務用軟弱野菜の刈り取り再生栽培法について、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）、高田美信氏（東北大学）、水谷治氏（酒類総合研究所）、竹内壺明氏（日本水産（株））にご執筆戴きました。

ご多忙な中玉稿をお寄せ戴きました執筆者各位に深甚の謝意を申し上げます。（渡辺記）

本誌著作物の複写利用等について

本誌掲載の論文・記事の複写・転載等を希望される方は、執筆者ならびに生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）の許諾を得て行って下さい。

生研センター 業務のご案内

～研究開発を強力に支援いたします～

提案公募型の委託研究制度

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

その他の支援制度

- 「共同研究先のあっせん」、「遺伝資源配布先のあっせん」などもお気軽にご相談下さい。

詳細は、生研センター企画部企画第1課までお問い合わせください。

ブレインテクノニュース 第130号

平成20年11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/>