

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成21年5月15日（隔月1回15日発行）

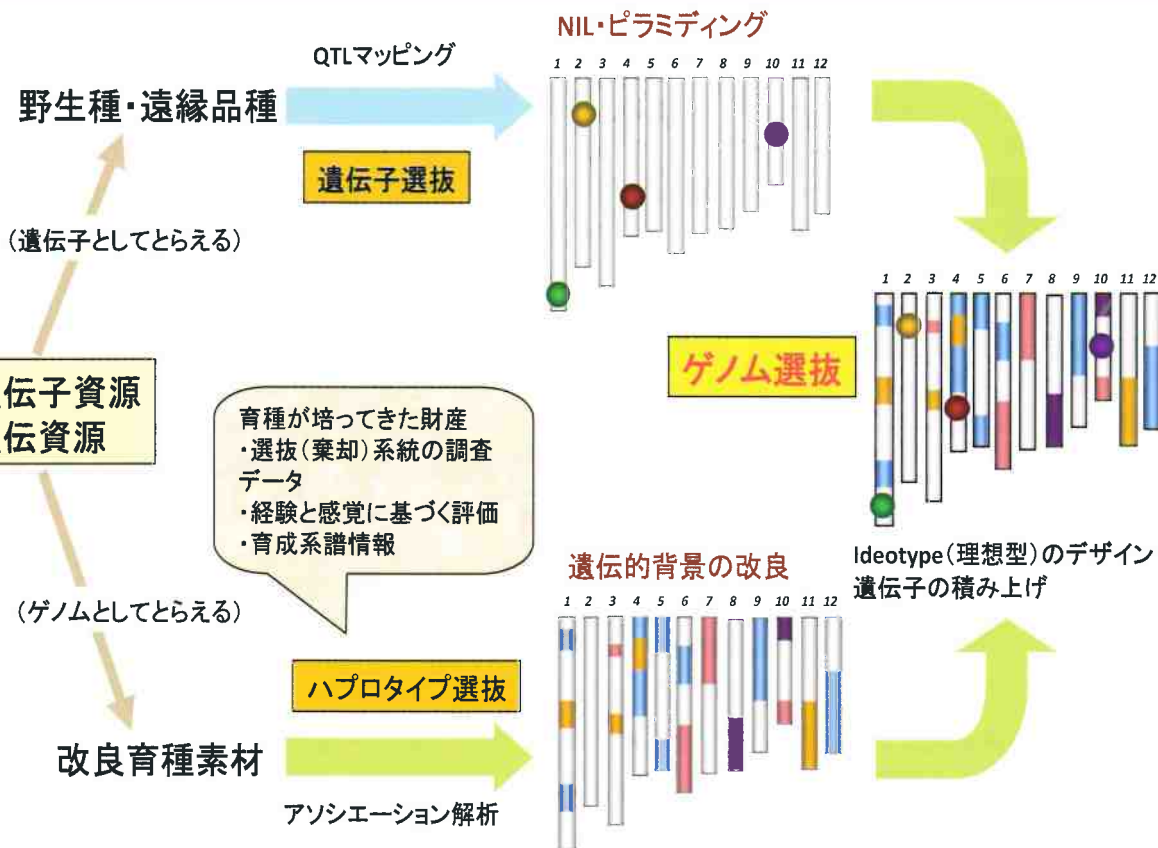
ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.133

15 MAY, 2009

ブレインテクノニュース



ハプロタイプ選抜を組み合わせたこれからのゲノム育種

ゲノミクスを背景とした新たな作物育種

(独)農業生物資源研究所 QTLゲノム育種研究センター
矢野昌裕・福岡修一・江花薫子・山本敏央

目 次

総 説

- ゲノミクスを背景とした新たな作物育種…………… 1
 矢野昌裕・福岡修一・江花薫子・山本敏央 ((独)農業生物資源研究所 QTLゲノム育種研究センター)

国内情報

- 根粒菌および菌根菌との細胞内共生に共通して必要な遺伝子の機能同定…………… 8
 矢野幸司・林 誠 ((独)農業生物資源研究所 植物科学研究領域)
- 植物の耐乾燥性を向上させる方法 - 生理活性脂質の代謝調節を利用した植物の気孔開閉の制御 - ……………12
 今井博之 (甲南大学 理工学部 生物学科)
- 遺伝子組換えイネによるサイトカインの生産……………17
 藤原義博 ((株)プリベンテック)
- マナマコの放卵・受精行動を誘起する神経ペプチド (クビフリン) の解明……………21
 吉国通庸¹・大野薫²・山野恵祐³ (¹九州大学 農学研究院, ²大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 基礎生物学研究所, ³(独)水産総合研究センター 養殖研究所)
- キュウリホモプシス根腐病の発病機構の解明とそれに基づく防除対策……………26
 永坂厚・堀越紀夫・太田弘志・岩館康哉・山口貴之・山田修・古屋廣光・藤晋一・松崎辰夫・門田育生 ((独)農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター他)
- ディスク式中耕培土機の開発……………31
 手島司・後藤隆志・藤井幸人・長澤教夫・大西正洋 ((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

- 13年間冷凍されていた精巣組織から体細胞クローンウシ作製に成功……………36
 星野洋一郎 (岐阜県畜産研究所 飛騨牛研究部)

文献情報

- プロゲステロン感作下での高用量エストラジオールベンゾエート投与は、リピートブリーダー牛の子宮内膜EGF濃度の周期的な変化を正常化するとともに、受胎性を回復させる……………40
 S. Katagiri et al. (*Journal of Reproduction and Development*, 54(6), 473-479, 2008)
 抄訳：下司雅也
- 助細胞から分泌されるディフェンシン様タンパク質「ルアー」が花粉管を誘引する……………41
 S. Okuda et al. (*Nature*, 458, 357-362, 2009) 抄訳：高田美信
- 細菌の宿主域を変化させるには単一の調節遺伝子で十分である……………43
 M.J.Mandel et al. (*Nature*, 458, 215-218, 2009) 抄訳：若井丈人
- アニサキス接触性皮膚炎におけるIL-4およびIL-13の機能的役割……………44
 N. Nieuwenhuizen et al. (*Allergy*, Epub ahead of print, 2009) 抄訳：平山健史
- 生研センターからのご案内 (平成20年度研究成果発表会の開催について (予告))……………45

表紙の説明

多様な作物種においてゲノム塩基配列が解読される今日、一塩基多型 (SNP) アレイを活用することより、これまでのゲノムのある特定の部分 (遺伝子) だけに注目して操作するマーカー選抜育種に加えて、ゲノム全体あるいは複数の染色体の領域に注目して選抜操作を行う新たな選抜指標も利用可能となった。この新たな選抜指標は、イネに限定されることなく、多くの作物種において適用できると考えられる。

詳細については1頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

ゲノミクスを背景とした新たな作物育種

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
矢野昌裕・福岡修一・江花薫子・山本敏央

ゲノム塩基配列解読によりイネの量的形質に関する遺伝子の単離やその機能解析はこの10年で著しく進展した。一方、遺伝子情報を活用した新たな品種改良も試みられている。本稿では、品種間変異の原因となる量的形質遺伝子の解析の現状をまとめるとともに、その成果がいかにイネの品種改良に波及しているのかあるいは今後解決すべき問題にどんなことがあるのかについて概説する。また、近年の急速なゲノミクスにおける解析手法の進展がもたらす育種選抜における新たな選抜指標について紹介する。

1. はじめに

イネのゲノム塩基配列解読から早くも5年が経過しようとしている¹⁾。塩基配列情報は、イネ遺伝子の単離・同定や機能解析、あるいは比較ゲノム解析など、様々な研究分野（ゲノミクス）で活用されている。そのなかでも、突然変異と比較して解析が困難であった自然変異（品種間変異）の原因遺伝子の解析は、従来に比較して飛躍的に進展した研究分野である。一般に、栽培品種や野生種などに見られる形質変異には複数の遺伝子（量的形質遺伝子：QTL）が関与し、ゲノム塩基配列解読以前には、その効率的な遺伝学的解析は困難であった。塩基配列解読がその分子遺伝学的解析を加速化し、基礎研究としての遺伝子機能解析のみならず、その応用場面としてイネの品種改良への活用も始まっている。著者らのグループは、これまでイネゲノム研究によって蓄積された情報やツールを駆使して、多様な遺伝資源を活用した遺伝子機能解析やそれらの情報の育種的選抜への活用に取り組んできた。本稿では、この10年におけるQTL遺伝子の機能解明の現状とともに、品種育成におけるゲノム情報の活用に焦点をあて、その実

YANO Masahiro, HUKUOKA Shuichi,
EBANA Kaoru, YAMAMOTO Toshio
〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2

例や問題点をまとめてみたい。また近年、急速にその利用が進んだ次世代シーケンサーがもたらす、品種改良における新たな選抜指標についても言及したい。

2. 有用形質に関するQTL検出と遺伝子機能解析

著者らのグループはQTL解析手法を利用して、イネの育種上重要な形質、例えば、出穂期、いもち病圃場抵抗性、根組織形態、穂発芽耐性、収量性、食味および高温登熟耐性などの遺伝子マッピングに取り組んできた。出穂期については、アジア栽培種の出穂期を決定している8種類のQTLを同定し、それらの遺伝子の組み合わせによって、200日程度の大きな出穂期の変異が作り出されていることを明らかにした²⁾。いもち病圃場抵抗性については、作用の大きな遺伝子*pi21*の単離・同定に成功し、さらには複数の圃場抵抗性遺伝子について候補ゲノム領域の絞り込みや遺伝子同定を進めている。イネ穂発芽耐性関連QTLについても作用力の大きな遺伝子*Sdr4*の単離同定に成功するとともに、複数の交雑組み合わせを用いて、新たな耐性関連QTLを検出している。根の形態変異については、木部導管中心柱の大きさ、深根性などの根系形態の遺伝解析に取り組み、陸稲品種の特徴である深

根性に関与する作用の大きなQTLを見いだすことに成功している。収量性に関しては、着粒数に影響する穂型（シンクサイズ）と光合成能力（ソース能）に注目し、多収性品種をもとにした実験系統群の作出も含めた解析を開始したところである。

一方、これまで分子マーカーの多型が得にくいことから解析が進んでいなかった日本型品種の組み合わせにおいても、SSRやSNPマーカーの充実にもなって遺伝解析が可能になった。これまでに、コシヒカリと日本晴の雑種後代を用いて、稈長、出穂期、穂発芽耐性などに関与する新規なQTLを見いだすことに成功し、遺伝子単離にむけた解析が進行中である³⁾。また、コメの価値を決定する重要な指標であり、官能試験によって評価される食味に関しても、最近、QTL解析の手法がいくつかのグループによって適用され、コシヒカリの食味の良さに大きく貢献しているQTLをマッピングすることに成功している⁴⁾。

QTLのゲノムへのマッピングは、ゲノム塩基配列解読が引き金となり、内外の研究グループによって取り組まれ、この10年間に様々な形質の品種間変異に関与するQTLの解明は著しく進展した⁵⁾。しかしながらその一方で、QTLをゲノム上におおまかに位置づける作業にとどまり、得られた情報が、必ずしも効果的に育種選抜に活用されていない例も見受けられる。育種選抜においては、今後は、これらの膨大な研究成果をいかに活かすかが大きな焦点となる。

3. QTL遺伝子の単離・同定

1980年代後半に、DNAマーカーによるQTL解析手法が提唱・実践されて以来、遺伝子単離に向けた取り組みが10年以上にわたって精力的に進められてきた。2000年にトマトでその成功事例が報告されるとほぼ時を同じくしてイネにおいて出穂期に関与するQTLのポジショナルクローニングが成功して以来、様々なグループによってQTL遺伝子の単離とそれらの機能解明が

進められた。表1には、論文として発表されたイネのQTL遺伝子を列挙した⁵⁾。これらの成功例は、概して対立遺伝子の作用（表現型の違い）は比較的大きく、信頼性の高い連鎖解析が可能だったことにより達成されたと考えられる。また遺伝子同定においては、いずれのケースにおいても、連鎖解析において大規模な分離集団を利用することで、目的のQTLの候補ゲノム領域をできるだけ小さく限定する方法が用いられている。その中でも、出穂期に関しては5種類のQTLが単離されており、それらの遺伝子の転写ネットワークも明らかになりつつある。シンクサイズ（種子の大きさや粒数）に関与するQTLの遺伝子単離も大きく進展し、粒幅や粒長に関わる複数の遺伝子が単離されている（表1）。同定されたタンパク質の機能については、生化学的な機能が明らかになっているものは少なく、QTLの単離が対象形質の遺伝的調節機構解明の端緒になるケースがしばしば見受けられる。

最近では、QTLの単離・同定において、その遺伝子機能の変化の原因となる塩基配列変異が明らかとなり、その機能変異が栽培品種の成り立ちの中で時系列的にどのように生じてきたかが証明されている。したがって、QTLの単離そのものが、イネの栽培化がどのようにして起こったのかを解明する絶好の機会をも提供している⁶⁾。また、品種間変異として選抜されてきた遺伝子のなかには、転写調節やタンパクの機能のわずかな違いにかかわるものも多く、単に遺伝子が働かなくなる変化のみならず、人為突然変異では得にくい微妙な機能の変化が、品種改良において選抜されてきたことも明らかとなっている。

一方、形態的な形質とは異なり、生理的な形質、たとえば乾燥ストレス耐性や耐冷性に関するQTLについては、QTLの遺伝学的な同定までは多くの報告があるものの⁵⁾、その遺伝子の構造と機能解明はまだ報告例が少ない。この主な原因は、形質の違いを精度高くとらえることの困難性によるものと考えられる。作物にとっては、環境ストレス耐性（乾燥、高温、低温など）は、直接、乾物生産に影響する形質であり、

表1 単離された量的形質遺伝子

形質	QTL名	染色体	タンパク構造および機能	文献
出穂期	<i>Hd1</i>	6	Znフィンガードメインおよび CCTモチーフ	16
出穂期	<i>Hd3a</i>	6	シロイヌナズナFT様タンパク (フロリゲン)	17
出穂期	<i>Hd6</i>	3	カゼインカイネースIIアルファ	18
出穂期	<i>Ehd1</i>	10	B-型レスポンスレギュレータ	19
出穂期	<i>Ghd7</i>	7	CCTモチーフ	20
浸水抵抗性	<i>SubA1</i>	9	エチレン反応ファクター	21
一穂粒数	<i>Gn1a</i>	1	サイトカイニン酸化酵素	22
紫外線抵抗性	<i>qUVR10</i>	10	CPD 光修復酵素	23
耐塩性	<i>SKC1</i>	1	HKT-型トランスポーター	24
脱粒性	<i>qSH1</i>	1	BEL-型ホメオドメインタンパク	25
脱粒性	<i>Sh4</i>	4	Myb3 DNA結合ドメインおよび核移行シグナル	26
草姿 (株開張性)	<i>PGOG1</i>	7	Znフィンガードメイン	27,28
粒長	<i>GS3</i>	3	BEBP様ドメイン TNFR/NGFR システインリッチドメイン YWFC モジュール	29
粒幅	<i>GW2</i>	7	RING-タイプ」タンパク (E3 ユビキチンライゲース活性)	30
粒幅	<i>qSW5</i>	5	新奇	31
低温発芽性	<i>qLTG3-1</i>	3	RP および LTP ドメイン	32
再分化能力	<i>PSR1</i>	1	フェレドキシン硝酸還元酵素	33

今後はこのようなより複雑な生理形質に関与するQTLの単離・同定が期待される。

4. QTL解析のための基盤整備

表現形質の違いは様々な環境に適応している在来系統や育成品種に見いだすことができるが、数万を超える多様な遺伝資源を有効に活用するためには、より効率的に有用な変異を見いだすことがQTLの検出と単離を進める上で重要である。その最も重要な作業は、遺伝子バンクに保存されている数万点の遺伝資源から、研究者が研究に用いることができる限定された系統群を選ぶことである。このような背景から農業生物資源研究所ではイネコアコレクションの整備を進めてきた^{7,8)}。コアコレクションは、比較的少数のアクセッションから構成されており、興味のある形質変異を調べるための対象として、イネの品種・系統に関する知識が少ない研究者に

も広く利用されている。このことが、これまでに見いだされなかった形質変異の発掘にもつながっている。

一方、有用な遺伝資源を探し出したとしても、その系統を観察しているだけでは、遺伝子の解析は進まない。有用形質をもつ品種・系統を利用して、遺伝解析のための実験系統群を作出することも、遺伝子機能解析にとっては不可欠な作業である。著者らのグループは、この10年間、より詳細な遺伝解析のための実験系統群の作出にも精力的に取り組んできた。種子で増殖が可能で、恒久的に利用できる実験系統群として、組換え自殖固定系統群や染色体断片置換系統群 (CSSLs) を作出し、QTLマッピングや遺伝子単離に利用している⁹⁾。CSSLは特定の品種・系統の遺伝的背景に供与親となる品種・系統の一方所あるいは数カ所の染色体断片を置換させた系統群である。遺伝的背景が均一であることから、効果の小さなQTLの検出に適している材料

であることや、特定の染色体断片にQTLを検出した場合、他のQTLの影響に悩まされることなく、精度の高いマッピングや遺伝子単離にも活用できる材料である。CSSLは比較的少数の系統群から構成されていることから、形質評価に要する労力や手間が軽減できることから、今後の有用農業形質の解析に大きく貢献すると期待される。

作出した系統群はイネゲノムリソースセンター (<http://www.rgrc.dna.affrc.go.jp/jp/>) を通じて、公開分譲を行っており、内外の研究者に広く利用されている。現在、これらの実験系統群の利用範囲をより拡大するために、日本の優良基幹品種であるコシヒカリを遺伝的背景とし、多数のアジア栽培種を供与親にしたCSSLsの作出に取り組んでいる⁵⁾。これらの系統はコシヒカリを背景としていることから、遺伝子機能解析のみならず、コシヒカリへ新たな有用形質の導入する品種改良にも利用できる材料となっている。

5. DNAマーカーによる遺伝子選抜(MAS)

単離あるいは正確なゲノム上の位置が明らかとなった遺伝子については、マーカー選抜法による品種改良の効率化が期待できる⁹⁾。マーカー選抜の詳細については、ここでその説明を省略するが、マーカー選抜によって、近縁野生種や遠縁品種に存在する有用遺伝子を、望ましくない性質を取り込むことなく、極めて短期間に優良品種に導入することを可能にする手法である。その一例として、いもち病の圃場抵抗性の改良が挙げられる。

優良な水稻品種の特性を維持しながら、陸稲のもついもち病圃場抵抗性を導入する育種は、従来から行なわれてきたが、陸稲品種由来の抵抗性と水稻の玄米品質や収量を両立させることが困難であった。著者らのグループでは、陸稲品種がもついもち病圃場抵抗性遺伝子の正確な遺伝子位置情報を利用して、抵抗性遺伝子の近傍に存在する不良形質に関わる遺伝子の連鎖

(連鎖のひきずり) をマーカー支援により解消することに成功している。この選抜においては、多数の個体のDNAマーカー解析によって抵抗性遺伝子近傍に組み換えが生じた個体を見出しており、表現型では有望個体の選抜は不可能であったと考えられる。

DNAマーカーを用いて遺伝子を導入することの利点は、ひとつの遺伝子の導入にとどまることなく、交配による遺伝子集積(ピラミディング)が可能となることである⁵⁾。従来の技術でも集積は可能であるが、連鎖により望ましくない遺伝子を伴うリスクが遺伝子をひとつ増やす毎に増加するため、品種として満足できる系統を作出できる確率はMASと比較して格段に劣る。著者らのグループは、いもち病圃場抵抗性に関与する複数のQTLを検出するとともに各抵抗性遺伝子の準同質遺伝子系統(NIL)を作出することで、遺伝子作用を確認するとともに複数の抵抗性遺伝子を集積することによって、供与親系統のもつ高度いもち病抵抗性を異なる遺伝的背景において再構築できることを実証している¹⁰⁾。

いもち病抵抗性以外にも、遺伝子の解析が進んだ出穂期やトビロウカ抵抗性については、遺伝子位置情報を利用した品種が育成されている^{11, 12)}。また、海外では冠水に対する抵抗性を付与した品種がDNAマーカー選抜育種により作出されている¹³⁾。農業上有用な遺伝子の位置情報は、近年急速に明らかとなってきていることから、DNAマーカーによる選抜育種は、いまや通常の選抜法になっていると言っても過言ではない。

6. SNPタイピングアレイの開発

全ゲノム配列が解読されて、イネの遺伝子マッピングやマーカー選抜育種は、あらたなフェーズへと展開している。これまでのDNAマーカータイピングは、効率化されたとはいえかなりの労力を必要とするものである。近年、ゲノム塩基配列情報を活用して、一塩基多型(SNP)の

大規模検出が可能になってきたことで、選抜マーカーとしてのSNPの活用が現実的なものになっている。国際イネ研究所 (IRRI) では多様な品種20種類について、配列解析をゲノムワイドに行い、20万以上のSNP候補を見いだしている。著者らも、アジア栽培種のコアコレクションを整備し、それらのアクセッション間に見いだされるSNPのデータベース化を試みている。一方、日本型品種間で見いだされる多型頻度の低さは、これまで日本型品種を用いた遺伝解析の推進を妨げていたが、著者らのグループでは、次世代シーケンサーを利用して、コシヒカリのゲノム塩基配列の解読を行い、その配列情報を利用したゲノムワイドSNPの検出を進めてきた。その結果、遺伝的に近縁な日本晴とコシヒカリの間においても、数万種類のSNPを検出することができている¹⁴⁾。さらに、コアコレクションや日本型品種間で見いだされるSNPはタイピングアレイとしてデザインし、ゲノムワイドなSNPタイピングの効率化を図っている。これらの基盤

整備は、今後、これまでのマーカー (遺伝子) 単位の解析から、ゲノムワイドな一斉解析を可能にし、ひいては後述の新たな選抜指標の活用にもつながる大きな成果である。

7. 遺伝子選抜からゲノム選抜へ

著者らは、開発したSNPアレイを利用して、日本の在来および近代育成品種 (94種) について、ゲノムワイドなSNPタイピング (ゲノムタイピング) を行った。解析結果を育成系譜と照らし合わせることによって、近代育成品種のゲノム構成の可視化が可能となった¹⁵⁾。例えば、近年のコシヒカリ型良食味品種はゲノムの70%以上がコシヒカリと共通のハプロタイプを示す可能性や、育成組み合わせによっては両親のゲノムの半分以上がもともと共通であった可能性など、さらには遺伝子の交換をとまなう有効な組換え数は組み合わせ毎や染色体毎に偏りがあることなどが明らかとなった。これらの知見は

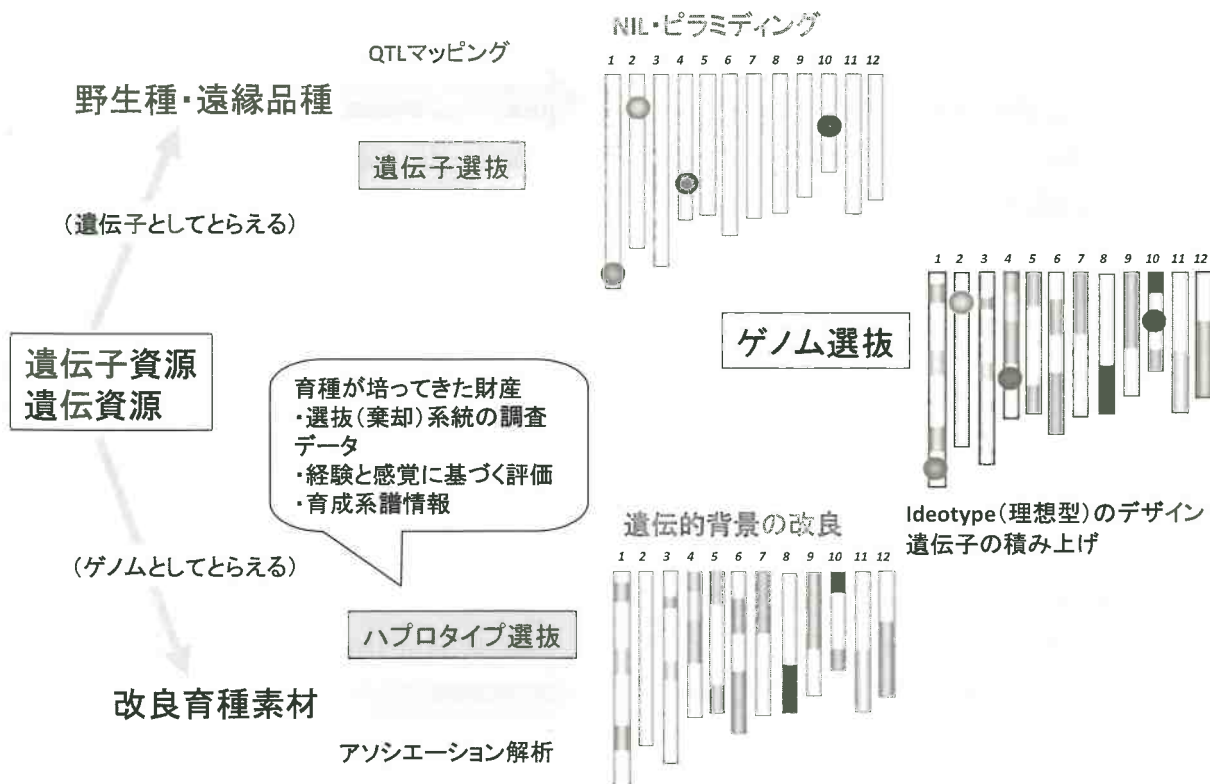


図 1 ハプロタイプ選抜を組み合わせたこれからのゲノム育種

過去100年のイネ育種の変遷を明らかにするのみならず、これからの品種改良のデザインにとっても有用な指標になる。言い換えれば、SNPアレイを活用することによって育種選抜の効果をゲノム構成の変化で確認することが可能になったことになる。このようなゲノム全体のイメージ化ができると、これまでゲノムのある特定の部分（遺伝子）だけに注目して操作するMASのみならず、ゲノム全体あるいは複数の染色体の領域に注目して、選抜操作を行うことが可能になる（図1）。トウモロコシ、ソルガム、ダイズなど多様な作物種において続々とゲノム塩基配列が解読される今日、育種選抜における新たな選抜指標は、イネに限定されることなく、多くの作物種において適用できると考えられる。

8. 今後の課題

20年前は、机上の空論としてみられたMASが、ゲノム研究の進展に伴って現実のものになりつつある。その一方、研究が進んでMASの限界も見えてきた。その限界は、マーカーに代表されるゲノムツールの問題と言うよりはむしろ、いかにして望ましい遺伝子を見いだすか、育種形質に関していかに信頼性の高い評価手法を作り出すか、あるいは精度の高い遺伝解析を可能にする実験材料の準備など、遺伝育種に関わる研究者の工夫の問題になってきた。育種選抜の対象となる多くの形質は環境条件の影響を受けやすく、評価の信頼性は必ずしも高くない。イネを例に考えると、収量性、乾燥ストレス耐性、異常高温によるコメ品質劣化、低温出芽性や初期生育などの直播適性等については、そもそも形質にどのような物差しを当てればよいのか試行錯誤している状況である。ゲノム育種をより広範に適用するためには、決して新しいことではないが、ゲノミクスを念頭においた新しい評価法の模索や、広範な遺伝資源の利活用が重要であると考えられる。SNPマーカー検出の効率化によって、育種におけるマーカーの利用は新たな場面へ展開しようとしている。これからは、

一見、遠回りにみえても、現場にある解決すべき問題（形質）に向き合い、形質の理解を深める基礎的な研究（生理学）から目をそらさずに、さらには育種が培ってきた経験や知識とゲノミクスにおける新しいツールや方法との融合を積極的に図ることが、新たな作物育種を実現する近道ではなかろうか。

文 献

- 1) International Rice Genome Sequencing Project. (2005) *Nature*, 436, 793–800.
- 2) 矢野昌裕 (2004) 農林水産研究ジャーナル, 27(7), 27-32
- 3) Matsubara, K. et al. (2008) *Theor. Appl. Genet.*, 117, 935-945
- 4) Takeuchi, Y. (2008) *Breed. Sci.* 58, 437–445
- 5) Yamamoto, T. (2009) *DNA Res.*, (印刷中)
- 6) 小西左江子ら (2007) 農業および園芸, 82, 445-456
- 7) Kojima, Y. et al. (2005) *Breed. Sci.*, 55, 431–440
- 8) Ebana, et al. (2008) *Breed. Sci.*, 58, 281–291
- 9) 山本敏央・矢野昌裕 (2007) 科学, 77, 607-613
- 10) 福岡修一ら (2007) 育種学研究 8 (別2) :191
- 11) 竹内善信・矢野昌裕 (2006) 農業及び園芸, 81,110-113
- 12) 平林秀介ら (2008) 育種学研究, 10 (別2), 169
- 13) Neeraja, C.N. et al. (2007) *Theor. Appl. Genet.*, 115, 767–776
- 14) 長崎英樹ら (2008) 育種学研究, 10 (別2), 67
- 15) 山本敏央ら (2008) 育種学研究, 10 (別21), 68
- 16) Yano, M. et al. (2000) *Plant Cell*, 12, 2473–2483
- 17) Kojima, S. et al. (2002) *Plant Cell Physiol.*, 43, 1096–1105
- 18) Takahashi, Y. et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 7922–7927

- 19) Doi, K. et al. (2004) *Genes Dev.*, 18, 926–936
20) Xue, W. et al. (2008), *Nat. Genet.*, 40, 761–767
21) Xu, K. et al. (2006) *Nature*, 442, 705–708
22) Ashikari, M. et al. (2005) *Science*, 309, 741–745
23) Ueda, T. et al. (2005) *Genetics*, 171, 1941–1950
24) Ren, Z. H. et al. (2005) *Nat. Genet.*, 37, 1141–1146
25) Konishi, S. et al. (2006), *Science*, 312, 1392–1396
26) Li, C. et al. (2006) *Science*, 311, 1936–1939
27) Tan, L. et al. (2008) *Nat. Genet.*, 40, 1360–1364
28) Jin, J. et al. (2008), *Nat. Genet.*, 40, 1365–1369
29) Fan, C. et al. (2006) *Theor. Appl. Genet.*, 112, 1164–1171
30) Song, X. J. et al. (2007) *Nat. Genet.*, 39, 623–630
31) Shomura, A. et al. (2008), *Nat. Genet.*, 40, 1023–1028
32) Fujino, K. et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 12623–12628
33) Nishimura, A. et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 11940–11944

◀国内情報▶

根粒菌および菌根菌との細胞内共生に 共通して必要な遺伝子の機能同定

独立行政法人 農業生物資源研究所 植物科学研究領域
矢野幸司・林 誠

根粒菌および菌根菌の細胞内共生の分子メカニズムを明らかにするために、マメ科モデル植物ミヤコグサから Cyclops を単離同定した。Cyclops は核タンパクであり、CCaMK と相互作用した。CCaMK はそのアミノ酸配列からセカンドメッセンジャーであるカルシウムスパイクをリン酸化シグナルに変換するとされており、Cyclops は CCaMK によりリン酸化されることで共生シグナル伝達に寄与していると予想された。

1. はじめに

土壌微生物（バクテリア）である根粒菌は、マメ科植物の根に感染し、根粒と呼ばれるコブ状構造の中で細胞内共生する。共生状態の根粒菌は大気窒素を還元し、植物が利用できるアンモニアに変換する。この見返りとしてマメ科植物は根粒菌の生育に必要な炭素源を根粒菌に供給することで、マメ科植物-根粒菌の相利共生が成り立っている。マメ科植物と根粒菌との共生は100年以上前から知られていた。1980年代に根粒菌の遺伝学が盛んになり、共生に必要な遺伝子が次々と同定された結果、1990年には共生の最初期における相互認識のためのシグナル交換に必要な分子、Nod ファクターの構造が明らかとなった。根粒菌は宿主となるマメ科植物に特異的な構造の Nod ファクターを合成・分泌することで宿主特異性を生み出している。このように、共生における根粒菌の作用機構は明らかとなってきたが、植物側における分子メカニズムはほとんど不明のままだった。

ところが1990年の初めごろ、マメ科植物の中でも比較的ゲノムサイズが小さい種をモデル植物として利用する動きが現れ、ミヤコグサとタ

YANO Koji, HAYASHI Makoto

〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2

ルウマゴヤシが実験材料として集中して使われるようになってきた。2008年には日本のかずさDNA研究所がミヤコグサのゲノム解読を終了し¹⁾、アメリカとヨーロッパの共同によるタルウマゴヤシのゲノム解読も追隨している状況である。これと並行して、ミヤコグサとタルウマゴヤシを使って、共生に必要な植物遺伝子の同定が2002年以降相次ぎ、現時点では感染初期に必要なとされる特異的遺伝子の多くが明らかとなっている。

2. 根粒菌との共生に必要な植物遺伝子のサブセットは菌根菌との共生にも必要だった

メンデル遺伝で有名なエンドウを使った共生変異体の選抜はマメ科のモデル植物における共生変異体の選抜に先行しており、多くのアレルが蓄積していた。1989年には、その中でも根粒菌の感染初期に異状を呈している変異体群のうち、菌根菌との共生についても破綻している変異体が複数選抜された。これはすなわち、根粒菌（バクテリア）と菌根菌（カビ）という、全く分類の異なる土壌微生物との共生において、共通して機能する共生遺伝子が存在することを意味する。

現時点で、これら共通共生遺伝子は7種存在すると考えられている²⁾ (表 1)。マメ科植物と根粒菌との共生は比較的最近成立したと考えられており、マメ科植物として分岐したおよそ6500 万年前に遡ると言われている。これに対し、菌根菌は陸上植物の8割以上と共生し、その起

源は植物が陸上に現れた4億年以上前だと予測されている。つまり、マメ科植物は根粒菌との共生を成立させる際に、菌根菌との共生に必要な遺伝子群の一部を流用したのではないかと推測されている。

表 1 ミヤコグサにおける共通共生遺伝子

遺伝子名	予測機能	局在	スパイクキング ¹⁾	論文発表
<i>SymRK</i>	受容体キナーゼ	細胞膜?	-	2002
<i>Castor</i>	イオンチャネル	プラスチド?	-	2005
<i>Pollux</i>	イオンチャネル	プラスチド?	-	2005
<i>Nup85</i>	ヌクレオポリン	核膜	-	2007
<i>Nup133</i>	ヌクレオポリン	核膜	-	2006
<i>CCaMK</i>	キナーゼ	核	+	2006
<i>Cyclops</i>	?	核	+	2008

1) それぞれの遺伝子の機能喪失型変異により、Nod ファクターによって引き起こされるカルシウムスパイクキングが見られなくなるものを「-」見られるものを「+」とした。

3. セカンドメッセンジャーとしてのカルシウムスパイクキング

根粒菌に由来する Nod ファクターを植物が受容したのち、植物細胞では共生に必要な遺伝子の発現誘導に至る一連のシグナル伝達が引き起こされると考えられる。根粒菌との共生に特徴的なシグナル伝達として、核周辺でのカルシウムイオン濃度の周期的な変動であるカルシウムスパイクキングが挙げられる³⁾。根粒菌接種あるいは Nod ファクター処理によって、およそ 10 分後から 1, 2 分間隔でカルシウムイオン濃度の一過的上昇が観察される。

共通共生遺伝子変異体の中には、このカルシウムスパイクキングが起こるものとそうでないものがあることが明らかとなっている (表 1)。すなわち、*SymRK*, *Castor*, *Pollux*, *Nup85*, *Nup133* はカルシウムスパイクキングの起動に必要であり (つまり上流), *CCaMK* および *Cyclops* は必要ない (下流あるいは別経路), ということになる。このように、カルシウムスパイクキングに対する

必要性において、共通共生遺伝子間で違いがある、ということは、菌根菌接種によっても同様のカルシウムシグネチャが誘導されると考えられる。実際、根粒菌ほど周期的でないにせよ、一過的なカルシウム濃度の上昇は観察されることが最近報告されている⁴⁾。

4. 共通共生遺伝子の働きと *Cyclops* の役割

それでは、それぞれの共通共生遺伝子産物の共生における役割はどのようになっているのであろうか。*SymRK* は受容体キナーゼであるが、そのリガンドは同定されておらず、Nod ファクター受容体キナーゼ *Nfr1/Nfr5* の下流で機能するであろう、という推測しかされていない。*Castor/Pollux* はそのアミノ酸一次配列からイオンチャネルであると予測され、カリウムチャネルだと考えられている。*Nup85/Nup133* はその局在パターンからも核膜孔を構成しているヌクレオポリンであることは明らかであるが、核膜孔

が共生にどのように関わるかについては全く不明である。したがって現時点では、Nod ファクター受容からセカンドメッセンジャーであるカルシウムスパイクの起動に至るまでの、シグナル伝達経路の実体はほとんど明らかになっていないと言える。

これはカルシウムスパイクの下流でも同様であった。CCaMK はカルシウムと結合する EF ハンドとカルモジュリンと結合する CaM 結合ドメイン、そしてキナーゼドメインから構成されている。この一次構造から、CCaMK はカルシウムスパイクの受容体だと考えられる。実際、*in vitro* の系で CCaMK はカルシウムとカルモジュリン依存的に自己リン酸化および基質タンパク質をリン酸化する。さらには自己リン酸化部位の変異により、根粒菌の感染がなくとも根粒を形成することが明らかとなっている⁵⁾。ところが、CCaMK の下流で遺伝子発現調節に至る経路（あるいは転写因子につながる経路）は全く知られていなかった。

我々は共通共生遺伝子で唯一その塩基配列が同定されていなかった *Cyclops* に着目した⁶⁾。*cyclops* 変異体はその他の共通共生遺伝子変異体と異なり、根粒菌の感染が途中まで進行する(図1)。根粒菌は根毛が屈曲した構造に包み込まれた後、根毛に形成される感染系を通して根の内部に進入する。*cyclops* 変異体では根毛は屈曲して根粒菌を包み込むが、感染系の形成が不全である。また同時に根粒原基が誘導される。その他の共通共生遺伝子変異体では根毛の屈曲も見られず根粒原基も形成されない。したがって、*Cyclops* は共通共生遺伝子の中でも最も下流に位置するものと考えられた。

Cyclops の推定アミノ酸配列には核局在シグナルが認められたので、蛍光タンパク質との融合タンパク質で細胞内局在を検証したところ、予想通り核に蛍光が観察された。また、変異体においてカルシウムスパイクも観察されたことから、核に局在するもう1つの共通共生遺伝子産物 CCaMK となんらかの関係があるのではないかと想像した。酵母でそれぞれのタン

パク質を発現させたところ、相互作用が確認できた。また、上述した *in vitro* の系で *Cyclops* を基質とした場合、カルシウムおよびカルモジュ

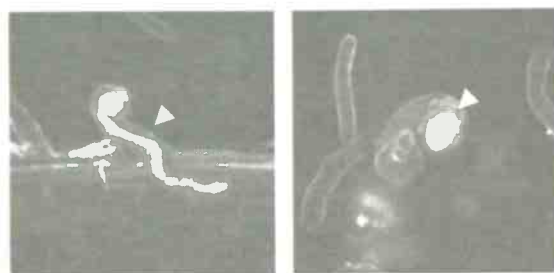


図1 ミヤコグサ *cyclops* 変異体の根粒菌感染表現型

野生型(左写真)では根粒菌(矢尻)が感染系を経由して植物細胞(根毛)内に進入するが、変異体(右写真)では根粒菌は根毛に包まれて増殖するものの、感染系が形成されないために細胞内に進入できない。

リン依存的に CCaMK は *Cyclops* をリン酸化した。*Cyclops* には DNA 結合配列は認められないが、おそらく転写因子と相互作用していると考えている。さらに、自己リン酸化変異により機能獲得型になった CCaMK を *cyclops* 変異体で発現させたところ、根粒菌感染に依存しない根粒形成が認められ、それは野生型と同等の発達を示した。つまり、機能獲得型 CCaMK により *Cyclops* の変異表現型が抑圧されたことになる。したがって、*Cyclops* は CCaMK と相互作用することにより、感染依存的な CCaMK の自己リン酸化を維持すると考えられた(図2)。

5. おわりに

Cyclops の機能同定により、共通共生遺伝子が働く共生シグナル伝達経路の一端が明らかになった。ミヤコグサ・タルウマゴヤシとも共生変異体は飽和しておらず、今後さらに共通共生遺伝子が同定される可能性も高い。またこれまでの共生変異体は、共生のみに変異表現型が現れるものを主体的に選抜してきたので、共生に必

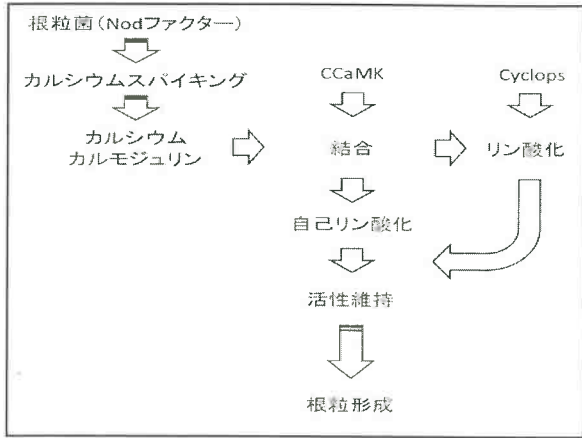


図2 CyclopsのCCaMKに果たす役割

CCaMKはカルシウムおよびカルモジュリンと結合することでCyclopsをリン酸化し、かつ自己リン酸化する。Cyclopsは自己リン酸化したCCaMKを安定化することで、CCaMKの活性維持に貢献すると考えられる。活性化したCCaMKは根粒形成を誘導する。

要な遺伝子でもその変異によって多面表現型を示すものは手つかずのままである。機能喪失型変異による遺伝的解析のみではなく、抑圧変異体の選抜やタンパク質相互作用を指標にした解析などから、新たな局面が見えてくると考えている。

マメ科植物は根粒菌との共生によって大気窒素を利用でき、窒素肥料に対する要求が低減する。また、菌根菌は土壤中に菌糸を張り巡らせ

ることで、植物の根が及ぶ範囲外からリンなどのミネラルや水を獲得して植物に供給する。将来的には根粒菌・菌根菌との共生メカニズムを上手に利用することで、持続的農業生産につながると期待される。

謝辞

本研究の大部分は科学技術振興機構 CREST「共生ネットワークの分子基盤」により実施された。また、多くの共同研究者の貢献によって成り立っている。ここに感謝の意を表す。

文献

- 1) Sato, S. et al. (2008), *DNA Res.* 15, 227-239
- 2) Kistner, C. et al. (2005), *Plant Cell* 17, 2217-2229
- 3) Erhardt, D. W. et al. (1996), *Cell* 85, 673-681
- 4) Kosuta, S. et al. (2008), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 9823-9828
- 5) Tirichine, L. et al. (2006), *Nature* 441, 1153-1156
- 6) Yano, K. et al. (2008), *Proc. Natl. Acad. Sci.*

◀国内情報▶

植物の耐乾燥性を向上させる方法

—生理活性脂質の代謝調節を利用した 植物の気孔開閉の制御—

甲南大学 理工学部 生物学科
 今井 博之

水不足の状態に陥った植物では、気孔を閉じて蒸散が起らないようにしているが、これにはアブシジン酸情報伝達系が関与している。我々は、この情報伝達系に関与する生理活性脂質の一つスフィンゴシン 1-リン酸 (SIP) に注目し、SIP を分解する酵素 SIP リアーゼについて調べ、その遺伝子破壊株が「乾燥しにくい」ことを見つけた。SIP の代謝調節に基づく気孔開閉の制御という本手法は、野菜や花卉の日持ち向上の技術として適用可能であり、様々な方面での利用が期待される。

1. はじめに

スフィンゴシン 1-リン酸 (SIP) は、細胞内だけでなく、細胞間セカンドメッセンジャーとしても機能する生理活性脂質として注目を集めている。近年、SIP は植物ホルモンの一種アブシジン酸(ABA)による気孔孔辺細胞の膨圧調節に関与するシグナル伝達物質としての機能を持つことが明らかになった¹⁾。さらに、シロイヌナズナにおけるこの反応は、SIP の合成酵素スフィンゴシンキナーゼが ABA によって活性化されることで SIP を生産し、その結果、気孔開口抑制および気孔閉鎖促進の両方に関与していることが明らかになった²⁾ (図 1)。しかし、ABA による気孔開閉の情報伝達が、SIP の合成と分解に関与する代謝系によってどのように調節されているのかについてはあまりわかっていない。

SIP の生理機能は、動物細胞や酵母で詳細に研究されている。近年、SIP はカルシウム動員、ホスホリパーゼ D の活性化、細胞増殖の促進、アポトーシスの抑制を行う細胞内シグナル伝達物質であることが報告されている。一方、SIP

は細胞間シグナル伝達物質として細胞増殖、細胞運動制御、分化など様々な細胞応答を引き起こすこと、この反応は 7 回膜貫通領域を持つ G-タンパク質結合型 Edg ファミリー受容体を介して行われていることが報告されている。このように多くの重要な細胞レベルのイベントでシグナル伝達物質として機能する SIP は、その合成および分解に関わる酵素によって細胞内レベルが厳密に制御されている。本稿では、植物における SIP 代謝系を人為的に操作することで気孔の開閉をコントロールする技術の可能性を議論し、乾燥に強い植物の作出につながる今後の研究について考察する。

2. 気孔の開閉とスフィンゴシン 1-リン酸

植物は、二酸化炭素の同化、呼吸、蒸散などのガス代謝にあたって空気や水蒸気の通路として気孔を備えている。気孔は孔辺細胞と呼ばれる 1 対の細胞の間にレンズ状の隙間として、主に葉の裏側に存在している。ガスの通過量は気孔の開閉作用によって調節されている。水不足

IMAI Hiroyuki

〒658-8501 神戸市東灘区岡本 8-9-1

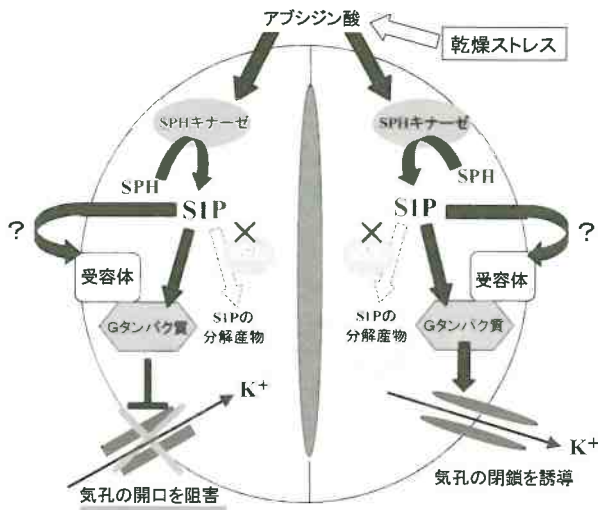


図1 気孔孔辺細胞のアブシジン酸 (ABA) 情報伝達経路におけるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) の役割を示す模式図

S1P は気孔閉鎖の誘導と気孔開口の阻害の両方に関与する。Coursoi ら (*Nature* 423: 651-654, 2003) より改変。

の状態に陥った植物では、気孔を閉じて蒸散が起こらないようにしているが、気孔孔辺細胞に ABA を与えると、細胞膜 Ca^{2+} -チャネルの活性化により細胞外から Ca^{2+} が流入し、細胞内の S 型陰イオンチャンネルと K^{+} out チャンネルが活性化されるとともに K^{+} in チャンネルが不活性化され、 K^{+} 、 Cl^{-} などのイオンが細胞外に大量に排出される結果、気孔が閉鎖する。2001 年、この気孔孔辺細胞の閉鎖時に観察される ABA による Ca^{2+} 動員の調節に、S1P がシグナル分子として機能することがはじめて報告された¹⁾。その2年後に、S1P の合成を触媒する酵素スフィンゴシンキナーゼがシロイヌナズナにおいて ABA により活性化すること、および S1P 情報伝達系の下流に位置し、S1P レセプターと予想される G-タンパク質 (GPA1) が、ABA による気孔閉鎖の情報伝達に関与することが報告された²⁾ (図 1)。このような基礎研究の結果をもとに、我々は、乾燥耐性植物の作出につながる鍵となる仕組みの一つが、「S1P の細胞内レベルをコントロールすること」であると考えた。我々の研究グループは、図 2 に示すように、シロイヌナ

ズナの S1P 合成酵素 (スフィンゴシンキナーゼ) 遺伝子 AtLCBK1 を単離し、この遺伝子発現が乾燥ストレスに応答すること³⁾や、S1P の分解を触媒する酵素 S1P リアーゼの遺伝子をシロイヌナズナより単離し⁴⁾、この遺伝子 (AtSPL1) の発現が乾燥ストレスで抑制されることを明らかにした (「葉の水分蒸散を調節させる方法、及び植物の耐乾燥性を向上させる方法」特願 2005-234607)。さらに、S1P の脱リン酸化を触媒する酵素 S1P ホスファターゼをシロイヌナズナより単離し、この遺伝子 (AtSPP1) の発現が乾燥ストレスで抑制されることを見出している。

シロイヌナズナの S1P リアーゼ遺伝子 (AtSPL1) に関する GUS を用いたプロモーターアッセイの結果から、AtSPL1 遺伝子の cis 配列は転写開始点の上流 14 bp の位置に存在する TCTAT AT という配列であることが確認できた。さらに AtSPL1 はその程度に差はあるものの幼体から成熟体まで全てのステージのロゼット葉で発現していることが確認された。特に成熟体においてはトライコームの基部および気孔での発現が確認できた。気孔においては、その本体で発現しているというよりは真下の細胞で発現しているように観察できた。これらのことから AtSPL1 はトライコームや気孔を支えている部分で強く発現している可能性が示唆できる。つまり植物体の水分調節に関与する細胞の周辺で発現していると考えられる。さらに気孔の真下の細胞で発現しているように観察できたことから、気孔孔辺細胞外で生成された S1P がレセプターを介してシグナル伝達を行う可能性が示唆された。

3. スフィンゴイシン-1-リン酸リアーゼ (SPL) 遺伝子破壊株は乾燥しにくい

我々は、AtSPL1 遺伝子が破壊された変異株を用いて乾燥ストレス応答を解析した。野生株とこの変異株について、生長の程度や各器官の形態、葉や花芽の数、発芽率等を比較したが、現在のところ、有意な差を示すデータを得ていない。しかし、シロイヌナズナの地上部を電子天

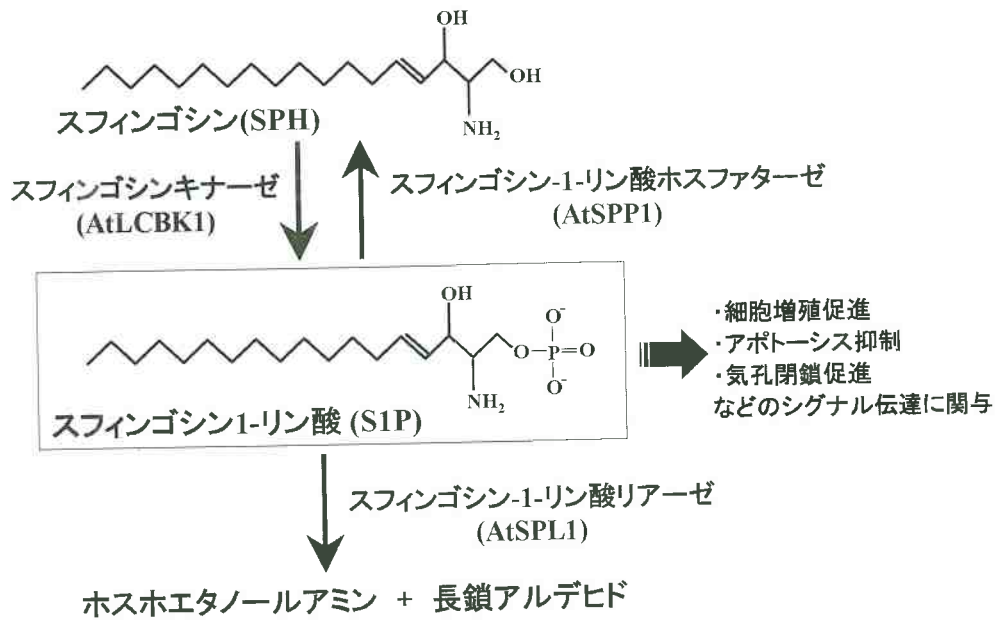


図2 スフィンゴシン1-リン酸の合成と分解

秤に置いて、照明下で経時的に新鮮重量の変化を測定したところ、野生株よりも変異株1, 2のほうが有意に減少しないことがわかった(図3A)。すなわち、AtSPL1の変異株は野生株よりも「乾燥しにくい」ということが明らかになった。この結果は、AtSPL1変異株の方が野生株よりも気孔が閉じる方向に作用し、蒸散の速度が低下するということを強く示唆するものである。この「蒸散の速度が低下する」という可能性を支持するデータとして、サーモカメラによる葉の表面温度を測定したところ、AtSPL1変異株の方が野生株よりも高いという結果を得ている⁴⁾。

上述のAtSPL1変異株における現象と、ABA応答の関連を調べるために、シロナズナの葉の表皮切片をABAで処理したときの気孔の開度を測定した(図3B)。その結果、野生株よりも変異株1, 2のほうが閉じやすい傾向にあるものの、統計的に有意な差ではなかった。この結果は、AtSPL1の欠損によるSIPの細胞内レベル変動が気孔閉鎖の誘導にほとんど寄与していないが、気孔の開口を抑制することに影響しているのではないかと考えている。また、ABAで処理したときの発芽率や根の伸長は野生株と変異株の間でほとんど差がなかった。

これまでのABAによる耐性遺伝子群の制御の研究において、ABAに感受性を示す変異体の中には、「気孔が閉じやすい」という乾燥ストレス耐性にとっては良い形質を示す反面、二酸化炭素の同化を制限するために、栄養生長あるいは生殖生長の良くない形質を示すものがある。当然、このような植物体を用いた実用化研究には様々な困難が伴う。このような背景を念頭に置き、ABAによる気孔孔辺細胞の膨圧調節に関与するシグナル伝達の観点から、耐乾燥性を向上させることを目的とする実用化植物の創出を考えたときに、はたしてSIP代謝系の操作は有効であろうか？ 表皮切片のABA処理実験(図3B)の結果から、本手法は、砂漠のような過酷な乾燥ストレス環境で実用化される緑化技術としては非力かもしれない。その一方で、今回の我々の研究により、SIPリアーゼがない形質転換植物は、普通の植物体として生長し、開花結実する反面、乾燥ストレス条件下では(気孔が閉じやすいために)乾燥しづらい。従って、本手法は、野菜や切り花などを日持ちさせる技術としては適用可能であり、このような方面での利用が期待される。

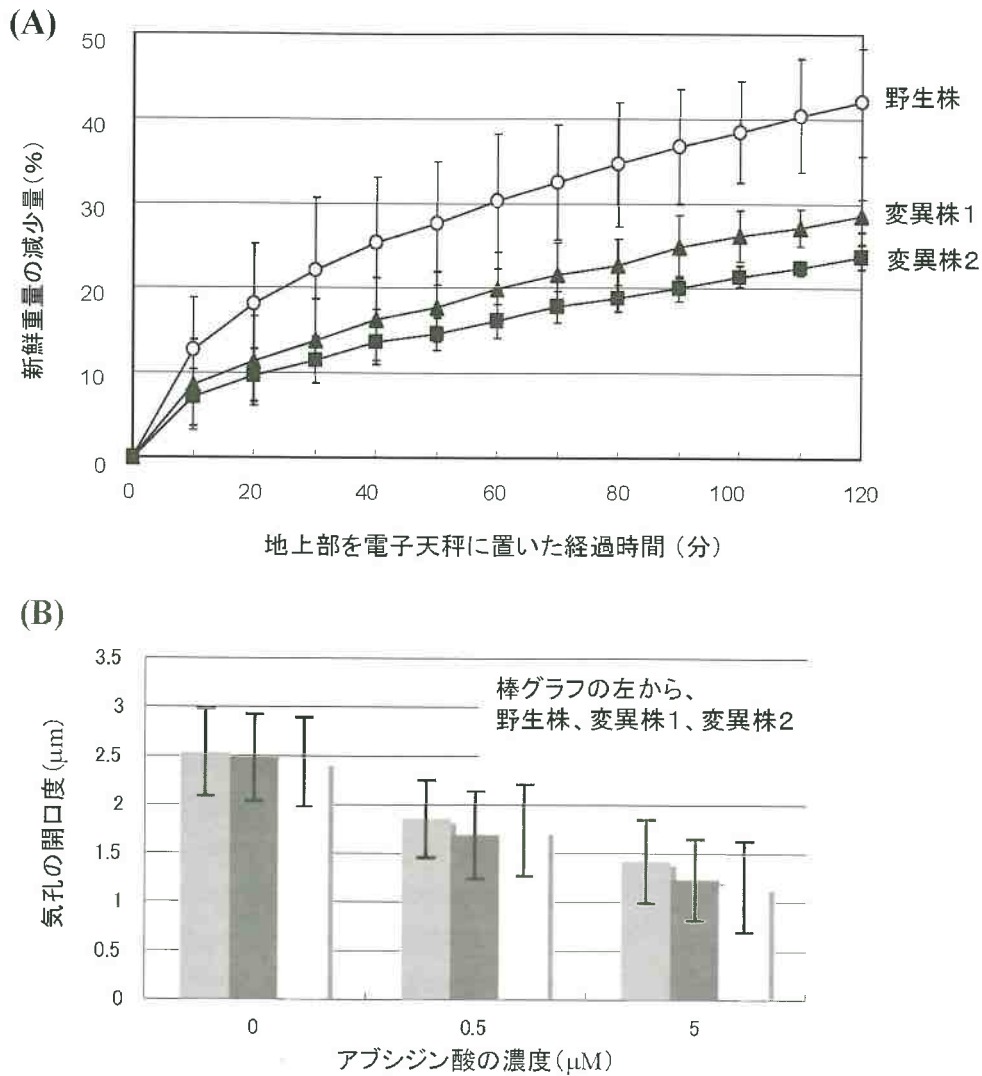


図3 スフィンゴシン-1-リン酸リアーゼ (SPL) の
 ナズナ変異株における乾燥耐性

- (A) ナズナ地上部の新鮮重量の経時変化
- (B) ナズナの表皮切片を ABA で処理したときの気孔の開度

4. 今後の展望

孔辺細胞の膨圧調節に基づく気孔開閉のコントロールによって、植物の耐乾燥性を向上させる技術では、栄養生長あるいは生殖生長には影響を与えず、乾燥ストレス条件の時だけに機能を発揮することができる形質転換植物の創出が必要である。最近、我々は S1P の脱リン酸化を触媒する酵素 S1P ホスファターゼをシロイヌナズナより単離し、この遺伝子 (AtSPP1) が破壊

された変異株を用いて乾燥ストレス応答を解析した結果、AtSPL1 変異株を用いた実験と同様のデータを求めることができた。これは、「葉の水分蒸散を調節する方法、及び植物の耐乾燥性を向上させる方法」(特願 2006-248762) として公開中である。今後、S1P リアーゼや S1P ホスファターゼの遺伝発現を操作した形質転換植物をシロイヌナズナ以外の植物種で作製し、本研究の実用性・汎用性を試験していきたい。

謝 辞

ABA 処理による気孔の開度の測定、およびサーモカメラによる葉の表面温度の測定は、九州大学の島崎研一郎教授、高橋洋平氏との共同研究により実施された。

文 献

- 1) Ng, C. K. et al. (2001), *Nature*, 410, 596-599.
- 2) Coursol, S. et al. (2003), *Nature*, 423, 651-654.
- 3) Imai, H. and Nishiura, H (2005), *Plant Cell Physiol.*, 46, 375-380.
- 4) Nishikawa, M. et. al. (2008), *Plant Cell Physiol.*, 49, 1758-1763.

◀国内情報▶

遺伝子組換えイネによるサイトカインの生産

株式会社プリベンテック
藤原義博

遺伝子組換え植物によるタンパク質生産系は、安価に大量生産ができること、動物由来の病原体や微生物由来の毒素を含まず安全であることなどの利点から注目を集めており、海外では既にいくつかの製品が販売されている。本稿では遺伝子組換え植物によるタンパク質生産について概説し、我々が開発中の遺伝子組換えイネによるサイトカインの生産に関する最近の成果について報告する。

1. 植物によるタンパク質生産

組換え生物によるタンパク質生産は、遺伝子組み換え技術の発明により 1980 年にヒトインシュリンが大腸菌で生産されることにより始まって以来、今では微生物や動物細胞を用いて多くの組換えタンパク質が医薬品等として生産されている。世界の医薬品市場は約 50 兆円、日本は 13% で 6.7 兆円である。今後世界では 30% の 15 兆円、日本では 2 兆円がタンパク質医薬市場に成長すると言われ、ますます重要度を増している⁽¹⁾。ところが、微生物によるタンパク質生産システムはエンドトキシンの混入リスクがあること、また動物細胞によるシステムでは培養に莫大なコストがかかるという問題があり、さらなる発展のためにはこれらに代わるシステムが期待されていた。

近年、これらの問題を解決する新しいタンパク質生産系として、植物における遺伝子組換え技術の発展とともに、組換え植物によるタンパク質生産系が注目を集めてきている⁽²⁾。太古の昔より植物が薬として利用されてきたことを考えれば、組換え植物で作られたタンパク質を薬として利用することは驚くに当たらない。世界ではすでに多くの組換え植物で作られたタンパク質が医薬品として開発中である^(2,3)。

FUJIWARA Yoshihiro

〒305-0035 茨城県つくば市大わし 1-2

2. イネ種子によるタンパク質生産系

まだ実際の産業化例はないが、日本でも組換え植物によるタンパク質生産に関していくつかの試みがなされている。その中でイネ種子胚乳にタンパク質を蓄積し利用する我々のグループの最近の成果を紹介する。イネ種子胚乳にタンパク質を蓄積するベクターの開発は独立行政法人農業生物資源研究所の高岩氏のグループによって開発されてきた^(4,5)。この技術はイネ種子の貯蔵タンパク質であるグルテリンのプロモーターとターミネーターを用い、目的タンパク質を種子胚乳中に蓄積するものである。タンパク質の C 末端には小胞体係留シグナル (KDEL) を付加することで、タンパク質の発現量と安定性を増加させ、糖鎖付加を防ぐこともできる。このベクターをアグロバクテリウム法を用いてイネに感染させ組換え植物体を得ることで組換えイネ種子に一粒当たり 50 μg のタンパク質を蓄積することが可能になった。この技術を利用してタンパク質生産の開発を行うために株式会社プリベンテックが 2006 年に設立された。

表 1 に組換え植物によるタンパク質生産系の代表として遺伝子組換えイネによるタンパク質生産系とその他のタンパク質生産システムの比較を示した。利点としては以下のことが挙げられる。遺伝子組換えイネの作出方法は確立されており、特別な技術や細胞の培養装置を必要としないこと。一度遺伝子組換えイネができると栽培するだけで生産ができるので、大量生産に

表1 タンパク質発現系の比較

特徴 \ 発現系	Tgイネ	大腸菌	動物細胞	Tg動物
発現量	+++	+++	+	+++
コスト	+++	++	+	++
翻訳後修飾	+	+	+++	++
生産維持・保存	種子で保存 随時生産可	液体窒素	液体窒素	飼育
生産納期	+	++	++	+
安全性リスク他	可食部に発現 栽培規制	LPS混入	動物由来成分 の混入	動物由来成分 の混入

適しており、野外栽培が可能なら栽培は極めて小さい費用で済むこと。種子の状態で保存ができるので、適宜抽出精製を行うことができるため、そのつど培養する必要がなく在庫の管理が容易であること。動物細胞ではウイルス、プリオンなどの病原体や動物由来成分の混入、微生物ではエンドトキシンの混入のリスクが常にあるが、お米は毎日我々が食べているものでもあり安全性のリスクは小さいと考えられること、などである。

逆にデメリットとしては、技術的な面では、組換え体を得るのに比較的時間がかかること、ヒトと異なる翻訳後修飾が起きる可能性があることが挙げられる。また、現実的な問題としては、現時点では消費者の組換え植物に対する感情が良くないことから、組換え植物の野外での栽培が難しいことと、食品や食品加工への使用が難しいことがある。日本では組換え植物の野外での栽培はまだ例がなく、当面は費用はかかるが室内の閉鎖系で栽培を行うしかないと考えられる。

特に組換え植物の系に向いていると考えられるのは、安全であることが求められるもの、食品あるいは食品加工に使うもの、大量に使うため安価であることが求められるもの、などである。いままで高価であった組み換えタンパク質を贅沢に使うことも可能になるであろう。このカテゴリーは今まで存在しなかったものであり、全く新規なタンパク質の使用法が可能になる。逆に種子の保存性が良いことを利用して試薬のように少量で頻りに抽出精製する必要があ

るものにも向いている。

3. サイトカイン生産

サイトカインとは細胞から分泌されるタンパク質で、特定の細胞に作用し細胞の増殖、分化に働く。多くの種類があるが免疫、炎症に関係したものが多く、医薬品として使われているものも多く、研究試薬としてもよく使われている。我々はイネ発現系を用いた最初の製品としてサイトカイン IL-10 の試薬としての生産を計画した。IL-10 はサイトカインの一種で、ヘルパーT細胞等から分泌される。IL-10 の作用は抗炎症など抑制活性が中心であり、経口投与、鼻粘膜投与などの新しい投与方法による自己免疫疾患、アレルギーの治療薬としても期待されている。これらの投与方法では、高い安全性が要求されることに付け加えて、安価に多量の精製 IL-10 を用意する必要があるために遺伝子組換えイネによる生産系が適していると考えられた。また試薬としての生産では種子の保存性の良さや適宜抽出精製ができるという在庫管理上のメリットも生かすことができる。これらの理由から医薬品としての開発を念頭に置きつつまずは試薬としての販売を目指すことにした。

4. IL-10 の生産

コドンを最適化したヒト IL-10 遺伝子はグル

テリンプロモーターによる発現ベクター^(4,5)に連結され、アグロバクテリウム法によりイネ(キタアケ系統)に導入された。導入遺伝子をホモに持つ高発現の系統を選抜・栽培し IL-10 が蓄積した米を得た。この IL-10 米から IL-10 を抽出・精製するわけである。組み換えイネからのタンパク質抽出の知識経験の蓄積はなく、一から試行錯誤しながらの開発となった。

IL-10 は単量体が 18.5kDa で単量体内に 2 対のジスルフィド結合を持っており、単量体が 2 つ非共有結合で二量体を形成した形で初めて活性を持つ⁽⁶⁾。単量体では存在できず、不可逆的に失活してしまう。またジスルフィド結合が構造の維持に必須であり、還元されると失活する、という抽出精製にはやや難しい条件を持っている。また、精製の過程では活性を測定する必要があるが、従来の培養細胞を用いた生物活性測定法では時間と手間がかかるため、開発の効率を上げるため生物活性法に代わる方法が必要とされていた。

IL-10 米を粉碎し抽出を試みたが、穏やかな条件(例えば 50mM Tris pH7.5, 0.1M NaCl, 1% Triton X-100)では全く IL-10 が抽出されて来なかった。抽出バッファーを検討した結果、還元剤が必須であること、両イオン性あるいはイオン性の界面活性剤が必要であることがわかった。

これはネイティブ構造のままでは抽出できず、抽出後リフォルディング(巻き戻し)が必要であることを意味した。

抽出物を His タグを用いて Ni アフィニティークラムで精製し、アセトンで沈殿、グアニジン液で可溶化し、リフォルディングを行った。リフォルディングの条件検討には生物活性測定の代わりに、前述の IL-10 の構造を利用した化学的に架橋して非共有結合の二量体を検出する方法を用いた。架橋剤には BS3 (Bis (Sulfosuccinimidyl) suberate) という試薬を用いた。リフォルディングした IL-10 は透析後、酸で変性してから、あるいはそのままクロスリンクし、SDS-PAGE とウエスタンブロットティングにより分析した。二量体はクロスリンクで二量体の 40kDa 付近にバンドが見られるが、非共有結合の二量体は酸で変性した実験区では単量体になることで共有結合の二量体と区別できる。数日かかる培養細胞による生物活性の測定に対してクロスリンク法は一日で結果が判明した。この方法を利用することにより従来法よりも効率的なリフォルディング条件を得ることに成功した。

リフォルディングした IL-10 はイオン交換とゲル濾過クロマトグラフィにより精製することができた(図 1)。最終的には 40g の米粉末から

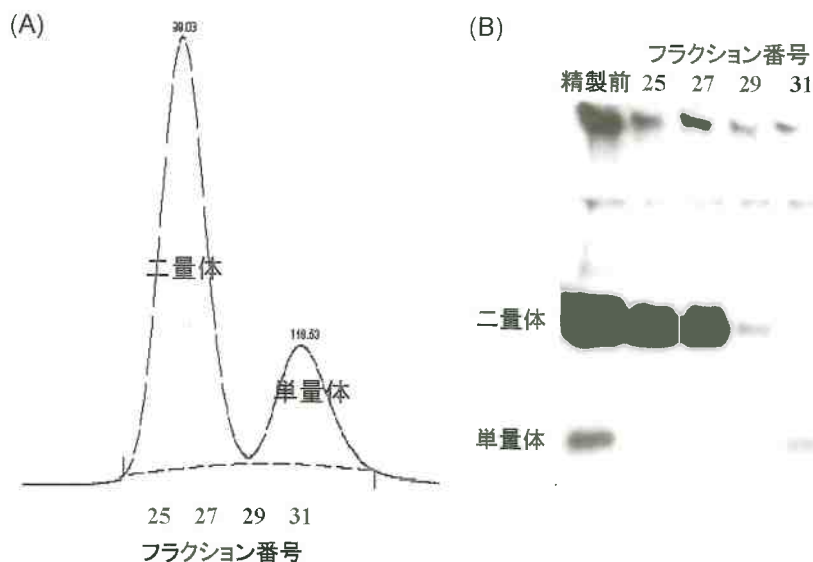


図 1 IL-10 のゲルろ過カラムによる精製

IL-10 はリフォルディング後イオン交換カラムで精製後、ゲルろ過カラム(HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR)で精製した。バッファーは 50mM Sodium phosphate pH7.4, 150mM NaCl, 流速 0.5 ml/min の条件で精製を行った。(A) ゲル濾過カラムにより IL-10 の二量体と単量体を分離した。(B) 各フラクションは BS3 で架橋しウエスタンブロットティングで IL-10 を検出した。

表2 開発中(予定)のサイトカイン

サイトカイン	機能	研究試薬以外の用途
IL-10	炎症の抑制	自己免疫・アレルギー疾患治療薬
IL-4	B細胞の増殖・分化	モノクローナル抗体製造
IFN- γ	マクロファージの活性化	
IL-6	抗体産生	癌免疫治療
IL-2	T細胞の増殖	
bFGF	繊維芽細胞増殖	再生医療
EGF	細胞増殖	化粧品

他、TGF- β 、IGF-1、sRANKL等

2mg の精製 IL-10 を得ることに成功した。精製した IL-10 は培養細胞における生物活性評価法においても高い活性を持っており、糖鎖修飾を受けていないことが明らかになった。また精製した IL-10 のエンドトキシン量は 0.00003EU/ μ g という極めて低いレベルであり、組換えイネによって作るタンパク質の安全性を確認することができた。

5. 課題と展望

我々は組換えイネ種子から高品質の IL-10 を精製することに成功し、現在、試薬として商業栽培と精製品の販売の準備を進めているところである。組換え植物によるサイトカインの商業生産は世界で初めてになる。将来は GMP 対応の施設で精製することで医薬品としての生産も可能であると考えている。

組換えイネタンパク質生産システムの費用面での利点を生かすためにはさらなる改良が必要と考えられる。技術的な課題としては、抽出コストの削減が挙げられる。抽出段階、あるいはカラムクロマトグラフィ前の段階での精製手法を開発することで改良が可能と考えられる。また、ベクターを改良して発現量自体を増やすことは抽出・精製のコスト削減に大きく貢献す

ると思われる。IL-10 は IL-10 同士あるいは他のタンパクとジスルフィド結合で会合していると思われるため、ネイティブフォームで抽出精製しやすい形で発現させる技術の開発も重要な課題である。現在、IL-4、6 など他のサイトカインなども開発中であり、他のタンパク質へ適用可能な抽出精製法の開発が必要である(表2)。

野外での栽培ができるようになれば圧倒的に安いコストで組換えタンパク質を生産することができるようになる。そうすれば医薬、試薬のみならず食品加工、工業用途など幅広い用途へ拡大していくことができると思われる。

文献

- 1) 日経 BP 社バイオセンター.(2006), 日経バイオ年鑑〈2007〉研究開発と市場・産業動向. 日経 BP 社, 東京.
- 2) Lienard, D. et al.(2007), *Biotechnol Annu Rev*, 13, 115-47.
- 3) Ma, J.K. et al.(2005), *EMBO Rep*, 6, 593-9.
- 4) Goto, F. et al.(1999), *Nat Biotechnol*, 17, 282-6.
- 5) Yang, L. et al.(2007), *Plant Biotechnol J*, 5, 815-26.
- 6) Syto, R. et al.(1998), *Biochemistry*, 37, 16943-51.

◀国内情報▶

マナマコの放卵・放精行動を誘起する 神経ペプチド（クビフリン）の解明

¹ 国立大学法人 九州大学 農学研究院,

² 大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 基礎生物学研究所,

³ 独立行政法人 水産総合研究センター 養殖研究所

吉国 通庸¹・大野 薫²・山野 恵祐³

マナマコの神経組織から、親マナマコの放卵・放精行動を誘発する神経ペプチド、クビフリン（Cubifrin）、を発見した。成熟した親個体に、体内最終濃度が 10nM となるようにクビフリンを注射することで、放卵・放精行動を誘発することができる。また、研究の過程で成熟親個体の選別法も開発した。産卵誘発効果が不安定であった従来の昇温法に代わる新しい採卵技術として、既に種苗生産現場での技術導入が始まっている。

1. はじめに

平成 19 年度の日本から海外への水産物輸出額の第 1 位は真珠である。では、第 2 位をご存じだろうか？なんと干しナマコである。その輸出額は年間 160 億円（平成 19 年度）を超え、殆どが中国へ輸出されている。干しナマコは、中国では海中珍寶の一つ“海参（海の高麗人参）”と呼ばれる人気のある高級食材で、日本では江戸時代から俵物三品の一つに数えられる重要な輸出品であった。近年の中国の経済成長に伴い、昔からブランドとなっていた日本産の高級干しナマコの価格が急騰していると言われる。昨今では、マナマコは海の黒ダイヤとも呼ばれて密漁報道も良く見かけるようになっている。年間の漁獲量は 1 万トンを超えており、比較的大型の個体を 1 匹 500 グラムとすれば、年間 2000 万匹のマナマコが漁獲されていることになるが、一方で、全国の総放流種苗数は 300 万匹に達せず、繁殖効率がそれほど高いとは思えないマナマコの資源量の枯渇を危惧する声も聞かれる。さらに、大皿料理で賞味する北京など中国北部

での消費に加え、最近では、小皿料理を好む中国南部での需要に応じて小型個体の消費が増加しているとも言われ、従来は捕獲しなかった小型のマナマコの漁獲が増えている可能性も懸念されている。

マナマコの資源管理は、国内では漁期の設定と稚マナマコの放流事業の 2 本立てで行われている。マナマコの放流用種苗の生産は、主に地方自治体の水産試験場や栽培漁業公社で実施されているが、実際に種苗放流を行う漁業協同組合からの希望量をとうていまかなえていない状況である。採卵・授精から、幼生の飼育、稚マナマコの育成までの各過程で幾つもの問題点があり、思うように種苗生産が進まないのである。

我々は基礎研究推進事業の支援を受けて、水産無脊椎動物の生殖のホルモン制御の仕組みの解明に取り組んでいるが（平成 18 年度採択課題）、本稿では、その成果の一つであるマナマコの放卵・放精誘起活性を持つ神経ホルモンの解明とその応用について紹介する。

2. 無脊椎動物のホルモンによる卵成熟の制御

一般に、動物の卵は十分に発達した卵であっても、卵巣から取り出して試験管内（in vitro）で受精させることは出来ない。その時点での卵

YOSHIKUNI Michiyasu¹, OHNO Kaoru²,

YAMANO Keisuke³

¹〒811-3304 福津市津屋崎 4 丁目 46 番 24 号

²〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38

³〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1

（正確には卵母細胞）は減数分裂の過程を途中で休止した状態にあり、精子を正しく受け入れることが出来ない。自然界では、産卵直前の雌の卵巣内で、ホルモンの働きにより卵の減数分裂の再開の引き金がかかれた後に、卵巣内から排卵され、最終的に放卵・受精に至る。卵母細胞の減数分裂が再開し、受精可能な卵細胞になる過程を卵成熟と呼ぶ。ホルモンによる卵成熟の開始機構は、サケ科アマゴと棘皮動物イトマキヒトデを主なモデル動物として生物学的な研究が進められて来た。卵成熟に関わるホルモンと、その作用部位との関わりを図1に示した。脊椎動物（図1右側）では、脳下垂体から”生殖腺刺激ホルモン（ゴナドトロピン）”が分泌され血流を介して卵巣内に至り、卵を個別に包む濾

胞細胞層に働く。刺激された濾胞細胞からは、”卵成熟誘起ホルモン（脊椎動物ではステロイドホルモンの一つ）”が分泌され、これが卵に直接作用して卵成熟の引き金を引く^{1),2)}。一方、イトマキヒトデ（図1左側）は脳を持たず、放射神経組織からインスリン様の生殖腺刺激ホルモン（INSL-GSS）を分泌し濾胞細胞を刺激する³⁾。濾胞細胞は卵成熟誘起ホルモンである1-メチルアデニンを分泌し卵成熟が開始する。このように動物毎に物質は異なるが、ホルモン刺激の流れそのものは類似していることがわかる。我々は、ヒトデのモデルを参考にして、同じ棘皮動物であるマナマコの神経組織から、卵成熟に関わる生理活性物質の単離・同定が可能であると考えた。

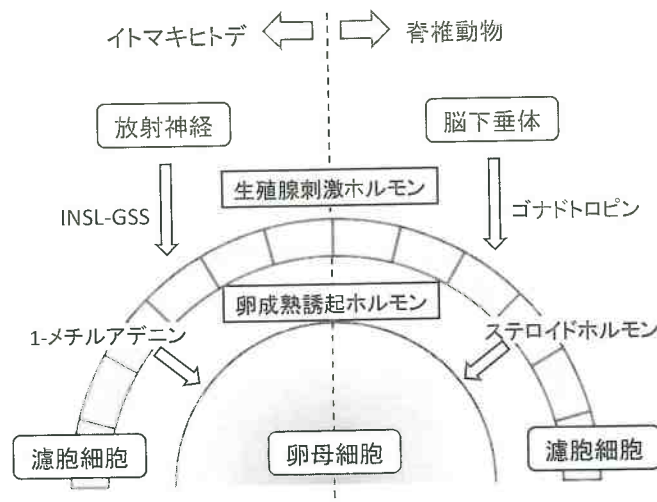


図1 ホルモンによる卵成熟の制御機構

3. マナマコ卵成熟・排卵誘起活性成分の精製と構造決定

マナマコ (*Apostichopus japonicus*) の主な神経組織は、口の周囲に位置する一つの周口神経環と、そこから発し体軸方向に伸びる5本の放射神経からなる。これらの神経組織から調製した抽出液中に極めて強力な卵成熟誘起活性が検出された。活性検定には、卵巣内の卵の成熟の進行とそれに続く排卵（成熟した卵細胞が卵巣から放出される）現象を指標とした生物検定法（排卵アッセイ法）を用いた。産卵期のマナマ

コから十分に発達した卵巣（柳の枝状に分枝している）を取り出し、長さ3mm程度の卵巣片を調製し用意した抽出液中で培養すると、室温で1時間から1時間30分程度で排卵現象が完了する（図2：下図では、成熟した卵が排卵されている）。

卵成熟・排卵誘起活性成分の抽出材料には、組織摘出の容易さから周口神経を用いた。活性は神経抽出液の分子量10,000以下の画分に回収され、3段階の逆相クロマトグラフィーを経て2つの活性画分を得た。それぞれの画分のプロテインシーケンサーと液体クロマトグラフ質

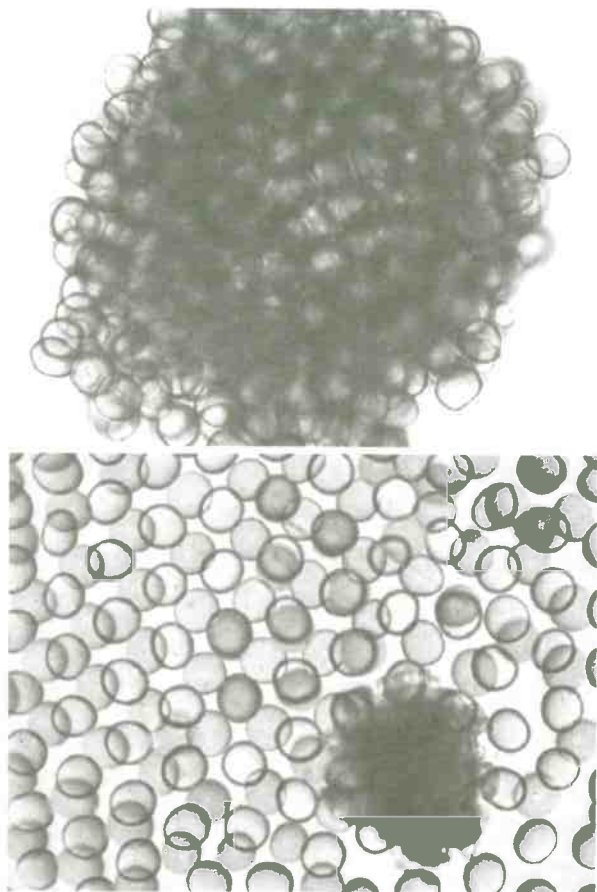


図2 排卵アッセイ法（上：培養開始前，下：培養終了時）

量分析計による構造解析から、NGIYWamideとQGLFSGVamideの2種類の低分子ペプチドの情報が得られた⁴⁾。いずれも上述した既知の卵成熟に関連する因子とは全く異なる物質だったことは予想外であった。合成ペプチドの活性検定を実施し、NGIYWamideとQGLFSGVamideはそれぞれ、 $ED_{50} < 1\text{pM}$ と $ED_{50} < 10\mu\text{M}$ の卵成熟・排卵誘起活性を持つことがわかった（図3）。活性の強さの差から、生体内では主にNGIYWamideが作用の主体となっていると考えている。イトマキヒトデの生殖腺刺激ホルモンは ED_{50} が数nM程度であるので、それよりも1000倍薄めても活性を示したのには驚いた。現在、NGIYWamideを中心に、作用部位の解析、構造の部分改変による活性の変化（構造活性相関）、産生時期・産生部位の解析などを進めている。卵巢から取り出した濾胞細胞に包まれた卵や、濾胞細胞を取り除いて裸にした卵にはNGIYWamideは作用しない。NGIYWamideの標的細胞は濾胞細胞ではなく卵巢内の未知の組織であると思われる。そこで更なる2次物質の産生を促しているらしい。NGIYWamideは生殖腺刺激ホルモン（狭義の意味では濾胞細胞に作用するものである）ではな

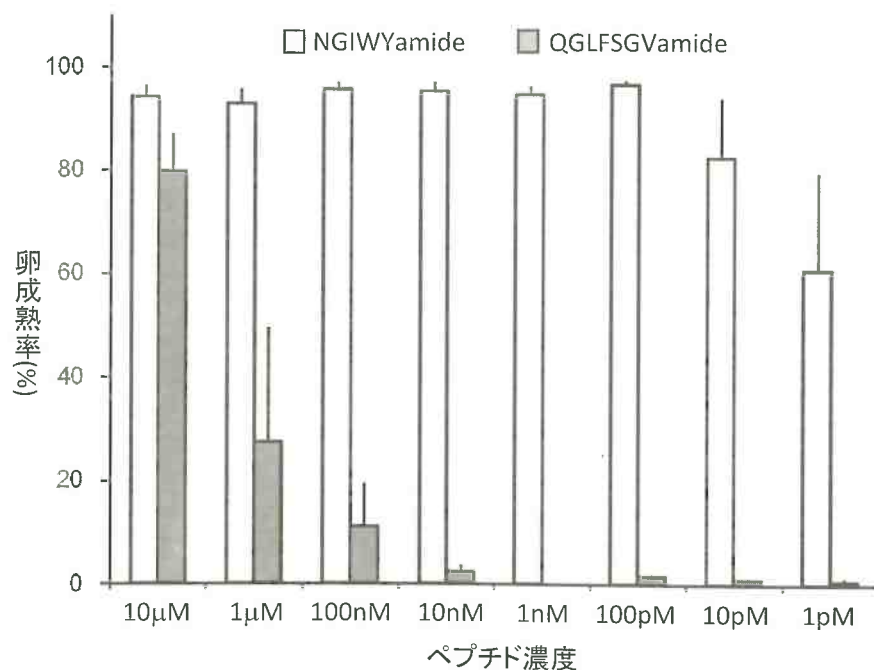


図3 合成ペプチドの卵成熟誘起活性の検定

く、さらに上位のホルモンである可能性があり、今後の解析で詳細を明らかに出来ることが楽しみである。

4. マナマコの放卵・放精行動の誘発

In vitro の卵成熟・排卵誘起活性検定で、NGIWyamide が極めて強い生物活性を持つことが明らかになった。そこで、産卵期の親個体に注射して産卵の誘発を試みた。マナマコの体重を体液の総重量と仮定して、最終濃度が 10nM となるようにクビフリンを体腔内へ注射すると、開始時間の個体差は大きいですが、平均すると雄では注射後 60 分、雌では 80 分で放精・放卵を始めることがわかった。注射後の行動を観察すると、注射後まもなく水槽内での匍匐を再開し、水槽の壁に触れると壁面を登り始め、水面に到達してそれ以上、上に登れないとなると頭を起こし、水の中から水面に接するように上体を反らして左右に振り始める。それに続いて放精・放卵が始まる。大水槽の底に石積みの小山を作り傍らに注射した個体を置くと、まもなく山を登り始め、頂上に達すると大きく頭を持ち上げて首を左右に振り放精・放卵を始める。奇妙なことにマナマコの生殖孔は頭頂背部にある。この首振り行動はナマコ類の典型的な産卵行動であり、卵・精子の海中への拡散に役立っているであろう（図 4）。マナマコの産卵行動にちなんで NGIWyamide にクビフリン（Cubifrin）という名前を付すことにした。

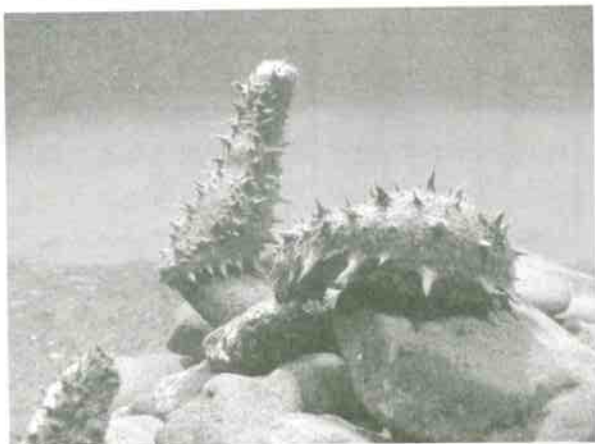


図 4 クビフリン注射により誘発された産卵行動

5. クビフリンを用いた新しい採卵技術

クビフリンの研究過程で新たに得られた知見の幾つかは、そのまま種苗生産現場での採卵作業に応用出来る。マナマコの部分切開法で生殖巣の一部を摘出することで、雌雄の判別が可能であるだけでなく、摘出卵巣の観察とクビフリン感受性を試験することで卵巣の成熟度を判定することが可能となった。切開創は 2~3 日で治癒するので、日を置いて同じ個体の成熟度を繰り返し検査することも可能である。卵巣内の卵が直径 150 ミクロン以上に育っていないと卵成熟が起こらないことは重要な知見である。十分に発達した卵巣では、卵径が 150 ミクロン以上に揃った卵がぎっしりと詰まっていて、数百グラムを越える成熟雌からは、数百万粒を越える卵が得られることがわかっている。未熟な卵巣では卵径が不揃いで、クビフリンで処理しても卵径が 150 ミクロンを越える卵が排卵されるのみである。

これまで種苗生産現場ではマナマコ種苗生産用の受精卵を得る為に、親個体を温めた海水中に保ち産卵を促す昇温海水処理法が用いられてきたが、その効果は低く不安定であり、効率的な採卵作業を計画することは不可能であった。雌雄の判別や生殖巣の発達度検査が行われていなかったことも効果を悪くする大きな要因となっていたと考えられる。上記の方法で雌個体の成熟度を判別し、良好な個体にクビフリンを注射することで、確実に採卵することが可能となった。

現時点で明らかに出来たクビフリンの作用は、産卵期に至り十分に発達した精巣・卵巣に作用して、精子・卵を最終的に成熟させ、その放出の為に放精・放卵行動を誘導するものであった。ホルモンによる生殖の制御においては、もう一つ解明すべき重要な作用がある。産卵期の前段階である卵黄形成期（生殖腺発達期）において卵巣や精巣の発達を促すホルモンは何かということである。果たして、クビフリンがその作用を持つかどうかは基礎研究として興味深

いと共に産業上では重要な問題であり、現在、鋭意、解析中である。

6. おわりに

マナマコ種苗生産に携わる全国の自治体関係機関（水産試験場や栽培漁業公社など）への採卵技術講習会を開始した。クビフリンの作用とマナマコの生殖生理の解説及び種々の技術の実技講習を内容としている。21年春の産卵期からあちこちの種苗生産現場でのクビフリンの試験運用が始まっている。今後、生産規模での運用に合わせた工夫・改良が必要であろうし、新

たな技術の開発も必要であろう。関係機関との連携を密にして研究を進める為に、ナマコメーリングリストの運用を開始している。

文 献

- 1) Nagahama Y. et al.(1995), *Curr. Top. Dev. Biol.*, 30, 103-145
- 2) Senthilkumaran B. et al. (2004), *Mol. Cell. Endocrinol.*, 15, 11-18
- 3) Mita M. et al. (in press), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- 4) Kato S. et al. (2009), *Dev. Biol.*, 326, 169-176

◀国内情報▶

キュウリホモプシス根腐病の発病 機構の解明とそれに基づく防除対策

¹独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター，
²福島県農業総合センター，³岩手県農業研究センター，⁴秋田県立大学，
⁵有限会社品川通信計装サービス

永坂厚¹・堀越紀夫²・太田弘志²・岩館康哉³・山口貴之³・
山田修³・古屋廣光⁴・藤晋一⁴・松崎辰夫⁵・門田育生¹

キュウリホモプシス根腐病を引き起こす病原菌は土壌伝染し、極めて低密度でも宿主の根に感染して病斑を形成する。本菌は茎葉部には感染しないと考えられるが、根部の病斑形成の進行に伴って地上部が萎凋するため、収量低下の大きな要因となる。その対策として土壌消毒により病原菌の感染を遅延させると、根部に病斑が形成された場合でも地上部の萎凋症状は顕著に抑制される。

1. 国内における発生経過と被害

キュウリに発生する主要な土壌病害としては、つる割病（病原菌：*Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*）や疫病（病原菌：*Phytophthora melonis*）などがあるが、これらに抵抗性を示す台木用カボチャに接ぎ木することにより極めて効果的に発病を回避してきており、生産地における連作を可能としてきた。ところが、1983年に埼玉県でこの台木用カボチャを侵すホモプシス根腐病（病原菌：*Phomopsis sclerotioides*）が発生¹⁾して以来、関東周辺や東北地域に本病が

NAGASAKA Atsushi¹, HORIKOSHI Norio², OHTA Hiroshi², IWADATE Yasuya³, YAMAGUCHI Takayuki³, YAMADA Osamu³, FURUYA Hiromitsu⁴, FUJI Shin'ichi⁴, MATSUZAKI Tatsuo⁵, KADOTA Ikuo¹

¹〒960-2156 福島県福島市荒井字原宿南 50

²〒963-0531 福島県郡山市日和田町高倉字下中道 116

³〒024-0003 岩手県北上市成田 20-1

⁴〒010-0195 秋田県秋田市下新城野字街道端西 241-438

⁵〒971-8124 福島県いわき市小名浜島字高田町 44 番地 7

発生するようになり、栽培上の大きな問題となっている。特に、東北地域では 1994 年に福島県の施設栽培で発生し、2001 年には露地栽培で発生するようになった²⁾。また、2002 年には岩手県でも露地栽培で発生が確認され、2003 年には福島県と岩手県で甚大な被害を引き起こした。その後、2005 年には宮城県、2006 年には山形県で本病の発生が確認されるなど、急速に被害地域が拡大している。なお、本病原菌はスイカ、メロン、カボチャなどのウリ科作物にも感染して根腐病を引き起こしており、2008 年には秋田県でメロンに発生した。

本病は病原菌が根に感染して根腐れを引き起こすが、茎葉や果実に直接病斑を形成することはない¹⁾。ところが、収穫初期から地上部が萎れるようになり、激しい場合は全身が枯死するため、本病の発生は収穫量に直接影響する。これらのことから、その防除対策の開発が行われてきたが、本病原菌は比較的熱に弱い特性から¹⁾、太陽熱を利用した土壌消毒により一定の防除効果が得られるようになった。しかし、東北地域では夏季に露地でキュウリ栽培を行うことが多いため、秋～春季に殺菌に十分な土壌温度を確

保することは困難である。また、抵抗性品種あるいは抵抗性台木の検索も行われているが、現時点では防除に有効な品種は開発されていない。したがって、これら以外の防除方法を緊急に開発する必要がある。

2. 病原菌の伝染環

病原菌に感染した被害植物の根の表面には病原菌の耐久器官と考えられる *Pseudostromata* (偽子座) や *Pseudomicrosclerotia* (疑似微小菌核) といった黒色の構造物が形成され、土壤中で生存していると推定される。これらが伝染源となり、宿主植物(ウリ類)が栽培されるとこれらの器官が発芽して根に侵入すると考えられる。感染した植物根ではやがて疑似微小菌核や偽子座が再び形成されるということを繰り返すため、ひとたび病原菌が畑に侵入すると、その根絶は極めて困難である。また、本病原菌は土壌の菌密度がかなり低くても根に感染する。人

為的に汚染した土壌(市販の育苗培土)で調べたところ、キュウリ自根では 1 CFU/g (1 g の土壌中に含まれる菌体断片数を表わす。菌体断片とは寒天平板培地上でコロニーを形成する能力を有するもので、形態や長さは問わないものとした) という極めて低密度の病原菌しかいない土壌でも地上部に萎凋症状が発生した。また、カボチャに接木栽培した場合には 100 CFU/g 以上で萎凋症状が発生する³⁾ことから、キュウリよりはカボチャの方が抵抗性が強いと考えられる。しかし、発生圃場のほとんどはカボチャ台木への接ぎ木を行っているので、現在使用されている台木の抵抗性は実用的なものではないと考えられる。

なお、本病原菌は分生子殻(柄子殻)を形成し、分生子(柄胞子)を生産するが、野外での形成が全く知られていないことから、伝染環や伝搬における役割や重要性については不明である。

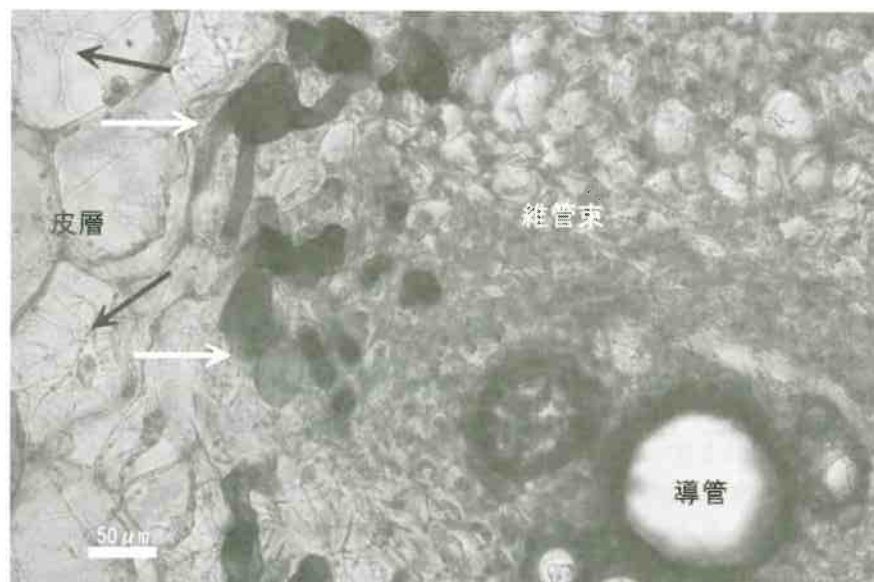


図1 キュウリ苗の根における菌糸の伸展状況

黒い矢印は皮層内の細い菌糸を、白い矢印は維管束周囲の太い菌糸を示す。菌糸はラクトフェノール・コットンブルーで染色した。

3. 病原菌の感染と発病

病原菌が根に感染すると、維管束に沿って伸長する太い菌糸と、皮層細胞に蔓延する細い菌糸が観察される(図1)。導管にも菌糸が観察される場合もあるが、それを完全に閉塞させるような伸展ではないことから、茎葉部に引き起こされる萎凋症状の発生原因については明らかにされていない。

そこで、まずキュウリ同士を接ぎ木して根部が2つある苗を作成し、その両方に病原菌を接種すると萎凋症状が発現した。一方、片方だけに接種した場合は萎凋しなかったことから、本病原菌は茎葉部への感染や萎凋を引き起こす物質の生産によって萎凋症状を引き起こしているのではないと考えられる。

つぎに、根部の発病程度と導管液量との関係を調査したところ、根部の病斑が進展したキュウリ個体(発病程度3)では導管液量が著しく減少するが、軽度(発病程度1)の場合は健全個体の導管液量と大きな違いはなかった(図2)。そこで、根部の病斑形成を土壌消毒で軽減させることを想定して、汚染土壌までの深さを段階的に変えた土壌カラムを作成し、そこにキュウリ苗を移植して栽培した。その結果、移植75日目では汚染部位までの深さが10cm以内の場合は萎凋症状が発現したが、15cm以上離れると根部の病斑形成が軽減され、萎凋症状は発現しなかった(図3)。したがって、このような防除対策を圃場で実施すれば、本病の被害を軽減できるのではないかと考えられた。

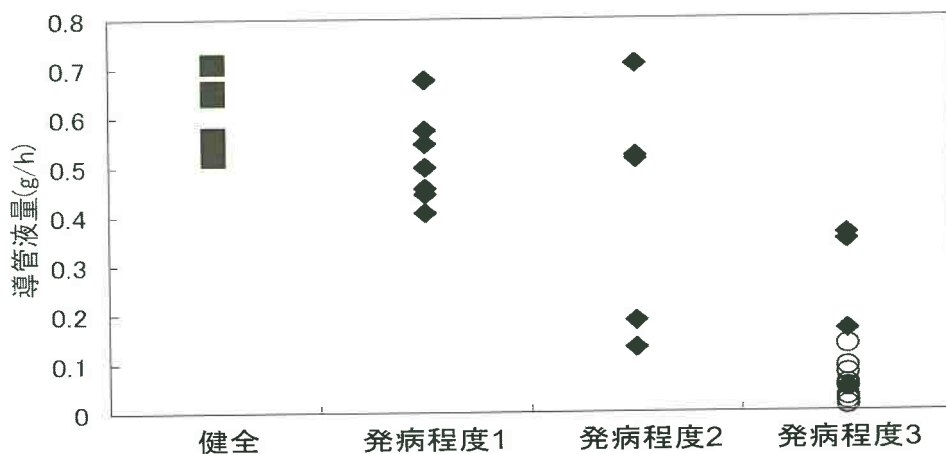


図2 根部の発病程度と導管液量との関係

接種24日後に、主茎を切断して溢出した量を導管液量とした。

■:無接種個体, ◆:接種個体(地上部未発症), ○:接種個体(萎凋)。

発病程度1=側根基部のみ褐変, 発病程度2=株元表面に僅かな褐変, 発病程度3=株元表面に広範囲の褐変。

4. 感染・発病機構に基づく防除対策

苗を移植する部位から一定の距離にある土壌の病原菌を殺菌するために、ここでは本病原菌に効果のある土壌くん蒸剤(クロルピクリン剤)を使用した。

まず、本剤の使用方法に従って土壌施用するが、消毒後にガス抜きや畦立てのための耕起を

行うと殺菌効果が低下する場合がある。これは殺菌効果が不十分である深部の土壌が耕起作業によって地表面近くに移動することによると考えられる。本病原菌の特性として、極めて低密度でも感染・発病することから、消毒後に土壌をかく乱しないような対応が必要である。具体的な方法としては、畦内だけを土壌消毒してすぐにマルチし、ガスが完全に抜けるまでの

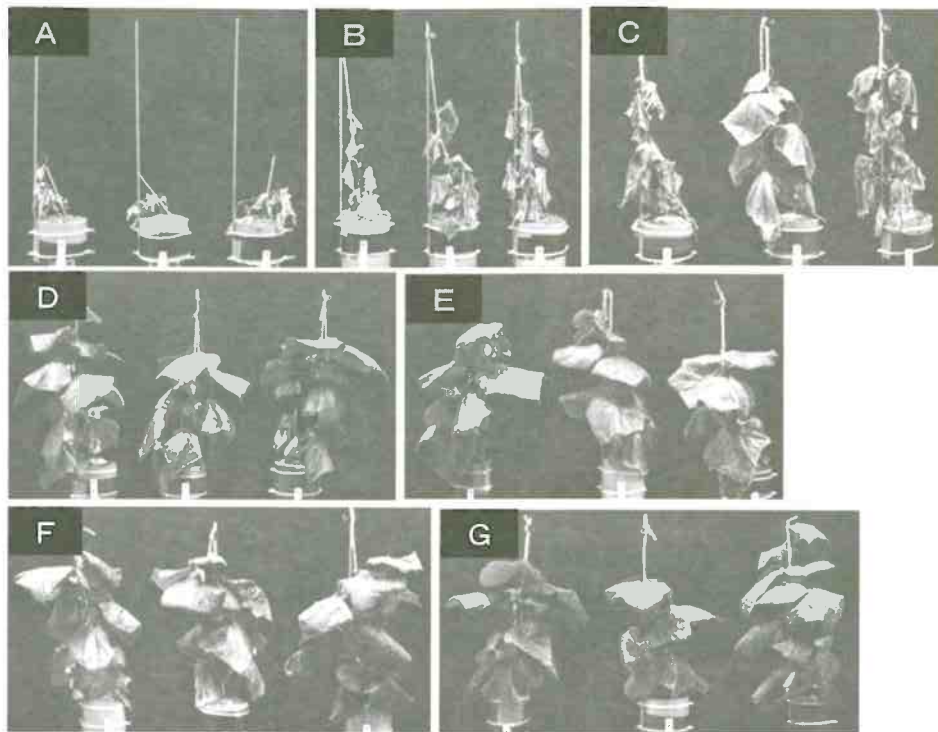


図3 汚染土壌までの距離が萎凋症状の発現に与える影響

地表面から汚染土壌までの距離は A:0cm, B:5cm, C:10cm, D:15cm, E:20cm, F:25cm, G:汚染土壌なしである。

キュウリ苗を移植して75日後に撮影した。

所定期間そのまま放置してキュウリ苗を植えると、安定した防除効果が得られる。また、畦幅を広くして苗をその中央に移植することや、畦を高くしてマルチの裾を深く埋め込み、消毒部分にできるだけ長期間根部を留めるようにすると防除効果が向上する^{4,5)}。

このような防除対策を導入した圃場では、地上部の萎凋症状が顕著に減少する(図4)。ただし、このように外観上健全に生育した場合でも、収穫後に根部を掘り上げて観察すると病斑が認められる場合が多い。根部が発病するのになぜ萎凋症状が発生しなくなるのか詳しい機構はわかっていないが、土壌消毒によって病原菌のいない部分で生育した根部には、病原菌が根の組織内を経由して到達するまでに細根を発達させることができるのではないかと推測している。

このように、本病に関しては根部の発病を完全に制御しなくても、株全体が萎凋・枯死することは回避できるようである。しかし、根部に病斑が形成されれば根の吸水機能や水分輸送

機能などには少なからず影響を与えていると考えられるので、根部病斑をさらに効果的に抑制する手法の開発は必要である。また、本防除対策では病原菌密度の減少は期待できない。したがって、外観上健全であっても、土壌には発病に十分な病原菌が生息しており、いつでも伝染源になることは留意する必要がある。

5. 課題と展望

本研究は、東北地域における本病の急激な発生とそれに対応する防除方法がないことから、とりあえずの防除対策を確立したものである。特に、これまで接ぎ木技術で土壌病害を克服してきたキュウリ栽培に土壌くん蒸剤を導入し、かつ毎年実施する必要がある状況は、栽培農家にとっては経済的負担が大きいものである。また、土壌生物相に与える影響も大きいと考えられ、生産環境に負荷のかからない新たな防除技術の開発は次の研究課題である。

最良の防除対策はこれまで行ってきた抵抗

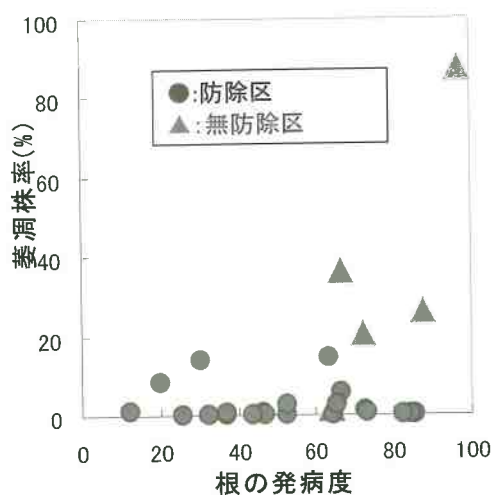


図4 現地圃場での防除効果

左：根部に発生した病斑の発病程度と茎葉部における萎凋症状の発生との関係

右：防除対策を導入した圃場の一例

性台木での回避技術の開発であることから、今後抵抗性台木を検索・選抜するとともに、完全な抵抗性を持たない場合でも栽培方法との組み合わせで実用化できる可能性もあると考えている。また、本病の感染・発病機構は十分に解明されておらず、特に気温や地温が発病に大きく影響するとする報告⁶⁾もあることから、栽培地域の気象条件に適合した栽培体系の開発も必要と考えられる。

本研究は農林水産省が実施した「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」を活用して、平成17年度から3年間行ったものである。

文献

- 1) 橋本光司・吉野正義(1985), 植物防疫, 39, 570-574
- 2) 堀越紀夫ら(2003), 北日本病害虫研究会報, 54, 67-69
- 3) 村上洋之ら(2008), 日本植物病理学会報, 74,50
- 4) 岩館康哉ら(2008), 日本植物病理学会報, 74,50
- 5) 山田修・岩館康哉(2006), 東北農業研究, 59,187-188
- 6) Ebben, M.H. and Last, F.T. (1973), *Ann. Appl. Biol.*, 73, 259-267

◀国内情報▶

ディスク式中耕培土機の開発

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
 生物系特定産業技術研究支援センター
 手島司・後藤隆志・藤井幸人・長澤教夫・大西正洋

今回開発したディスク式中耕培土機は、前後に設けた2対のディスクにより中耕培土作業を行う作業機である。試験結果では、高速化により従来機に比べ作業能率は1.5~2倍、収穫前の雑草量は半分程度であった。また湿潤な土壌条件でも土を練りにくく、大豆の増収が期待できる。

はじめに

大豆の中耕培土は、除草、土壌通気性の確保、倒伏防止等の目的で広く行われており¹⁾、つめを逆転させたロータリ式中耕除草機（以下「従来機」）により土を飛ばす方法や、つめを正転させた同機の後方に培土板を取り付けて土を作物側に寄せる方法が一般的である。梅雨期に中耕培土を行う地域も多いが、これらの方法により水分の高い土壌条件下で作業すると、ロータリづめで土を練り付け、土壌物理性を悪化させる。そのため、土壌水分の高い状態が長く続くとその間は作業できず²⁾、雑草が繁茂してしまうことがある。また、受託作業の増加等により高能率化の要望もあるが、従来機の作業速度は0.5~0.8m/s程度と遅い。

そこで、これらの問題の改善をねらい、前後に設けられた2対のディスクにより中耕除草や培土作業を行うことのできるディスク式中耕培土機（以下、「開発機」）の開発を、井関農機（株）、小橋工業（株）と共同で行った。

TESHIMA Tsukasa, GOTOH Takashi, FUJII Yukito,
 NAGASAWA Norio, OHNISHI Masahiro
 〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

1. 開発目標

以下を開発目標として設定した。

- ① 湿潤な土壌条件下でも土を練らず、株元まで精度良く培土できる機械とする。
- ② 従来機より高速作業が可能な機械とする。

2. 開発機の構造と作用

開発機の側面図を図1に、外観を図2に示す。開発機は、前後に設けられた2対のディスクが作物条間を通過する際に土壌反力により回転し、土を横に反転移動させることにより中耕除草や培土を行う。トラクタ用と乗用管理機用があり、外周に切欠きのないディスクを前列に、切欠き付きの花型ディスクを後列に取り付けている。条間や作業速度、または土壌条件に応じ、前・後列ディスクの角度や後列ディスクの横方向取り付け位置を変更でき、土が硬い時に作用させるチゼルを有している。

培土量の変更は、後列ディスクの角度や間隔の調整により行い、後列ディスクの取り付け角度の変更（図3）により、作物が小さい時でも作業できる³⁾。

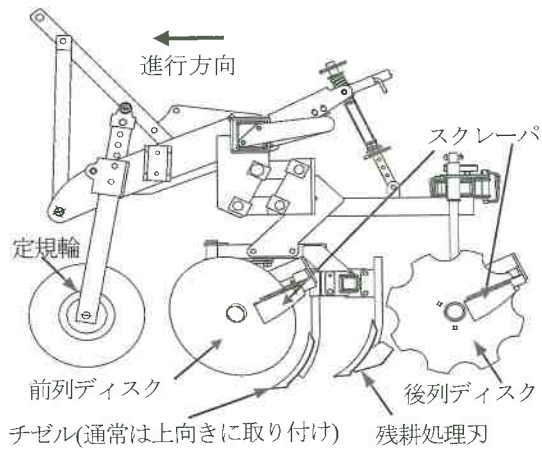


図1 開発機の側面図（トラクタ用）



図2 開発機の外観（乗用管理機用）

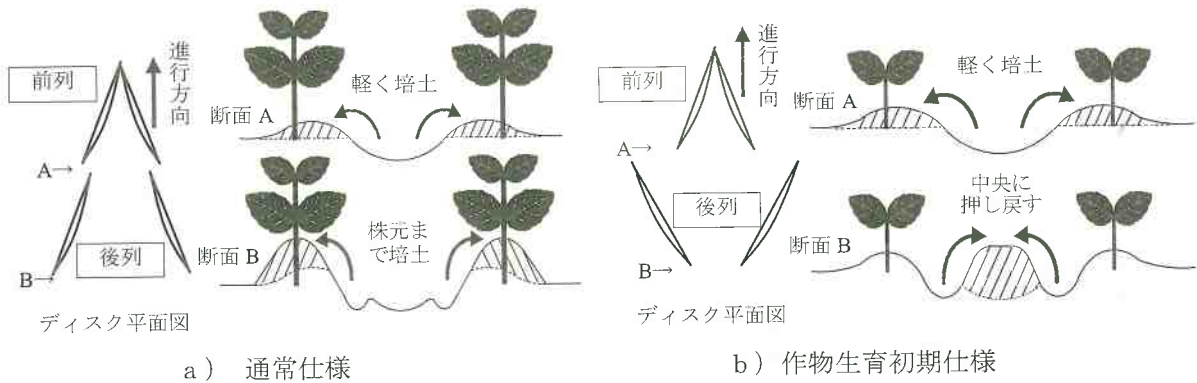


図3 後列ディスクの取り付け角度と作業状況

3. 開発機の性能

1) 作業能率試験

(1) 試験方法

長辺 72m の小麦跡 7 年目転換畑（土性 SiC）と長辺 198m の水稻跡初年目転換畑（土性 SL-CL）において、作業能率試験を行った。

(2) 試験結果

開発機は、1.0～1.4m/s 程度の高速作業が可能で、開発機のは場作業量は 72～95a/h であり、0.5～0.6m/s で作業した従来機の 1.7～1.9 倍であった。

2) 所要動力・燃料消費量試験

(1) 試験方法

ロータリ耕後の大豆跡 2 年目転換畑（土

性：L，作土の液性指数：0.58）において、トラクタの機関回転速度を 1,900rpm に合わせて作業速度を 3 段階に変え、従来機を対照機として所要動力と燃料消費量を測定した。所要動力はトラクタの機関回転速度と排出ガス温度から機関動力を推定する方法⁴⁾により、燃料消費量は容積式の流量センサにより測定した。

(2) 試験結果

開発機の中耕断面あたり所要動力は、作業速度が半分程度の従来機とほぼ同じであった。また、作業速度 1.1m/s 時の開発機の中耕体積あたり燃料消費量は、作業速度 0.5m/s 時で従来機の 43%、0.8m/s 時で従来機の 56%であった。

3) 作業精度・栽培試験

(1) 試験方法

通常仕様 (図 3a) の開発機と従来機を供試し、延べ 14 箇所の大豆 (条間 70~75cm) 栽培ほ場において各 2 回ずつ延べ 28 回試験し、作業精度、雑草量、土壌物理性、品質収量等を測定した。設定作業速度は、開発機が 1.2m/s、従来機が 0.65m/s とした。

(2) 試験結果

① 作業状況

開発機は、作業速度や土壌条件等に応じ、前・後列ディスクの角度や後列ディスクの横方向位置を適切に調節することにより、従来機と同様な畝断面形状の培土作業を円滑に行うことが可能であった。

湿潤な土壌条件においては、従来機ではロータリづめによる土の練り付けや培土器による土の圧縮が起こったが、開発機では土の練り付けが少なかった。また同条件下の中でも特に軟弱なほ場では、開発機、従来機ともに、トラクタや乗用管理機の進行低下率が 15~35%程度になることがあり、このような条件では、けん引抵抗の増大を防ぐため、耕深が深くなりすぎないように注意する必要があった。

② 砕土性能

湿潤土壌条件下でも開発機は土の練り付けや圧縮が少なく、同条件下での開発機の砕土性能は、従来機より良好であった。

③ 培土性能

開発機は湿潤土壌条件下でも土移動を円滑に行うことができ、開発機区の培土成功率 (株元まで培土されている進行方向の割合) は、従来機区に比べやや高い傾向があった。

④ 雑草防除性能 (図 4)

試験全体における開発機区の条間の雑草 (収穫前 2 カ月~1 週間に調査) は、従来機区に比べ乾物重で約 50%、本数で約 35%少なかった。条間の雑草は、湿潤土壌で作業した場合に、従来機区との差が大き

い傾向があった。試験全体における開発機区の株間の雑草は、従来機区に比べ乾物重で約 40%、本数で約 45%少なかった。

開発機の除草性能が高かったのは、従来機では雑草と土壌を混和するのに対し、開

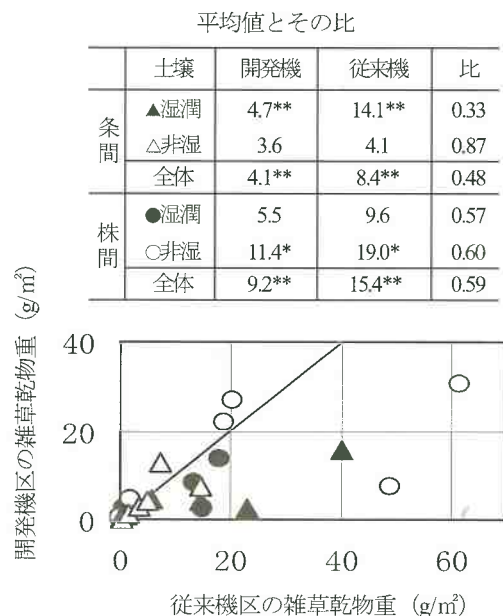


図 4 条間および株間の雑草乾物重

※1 従来機: 1 回目は逆転ロータリ式, 2 回目は培土板付き正転ロータリ式, ※2 試験は 2005~2008 年に秋田県 (グライ低地土転換畑: SL-CL), 新潟県 (グライ低地土転換畑: LiC, 黒ボク土普通畑: CL), 埼玉県 (低地水田土転換畑: SiC) で実施, ※3 「湿潤」は液性指数 0.35 以上の土壌で作業した延べ 6 ほ場, 「非湿」はそれ以外の延べ 7 ほ場での値, ※4 **危険率 1% で有意差あり, *同 5% で有意差あり

発機では土壌を反転して雑草を埋没させる作用が強いためではないかと考えられた。

⑤ 土壌物理性

湿潤土壌条件下で作業した場合、開発機区の収穫前約 2 カ月から収穫直前の土壌は、従来機区に比べ、比較的膨軟で過乾燥にならない状態 (従来機区より固相率が 5% 低く、矩形板沈下量が 35% 大きく、含水比が 10% 高い。) が保たれていた。

⑥ 大豆の品質

湿潤土壌条件下で作業した場合、開発機区の大豆は、従来機区に比べ被害粒数率が約 20% 低く、大粒重率が約 10% 高かった。

被害粒の中で多かったのは、しわ粒数率（従来機区全体で約8%）、未熟粒数率（同約5%）、虫害粒数率（同約5%）であった。湿潤土壌条件下で作業した場合、従来機区に比べ開発機区の未熟粒数率は約45%、虫害粒数率は約25%少なかったが、しわ粒数率は5%少ない程度で有意差はなかった。

⑦ 大豆の収量

湿潤土壌条件下で作業した場合、開発機区の大豆収量（子実重から被害粒重を引いた値）は、従来機区に比べ約15%多かった。これは、湿潤な土壌条件下で作業しても、開発機は土を練り付けたり圧縮したりすることが少なく、砕土も比較的良好であるため、前述したように、土壌が比較的膨軟で過乾燥になりにくい（毛管水の上昇が妨げられにくい）状態であったためと考えられた。なお、土壌が湿潤でない状態で作業した時の開発機区の大豆収量は、従来機区と同程度であった。

4) モニタ試験

(1) 試験方法

2007年および2008年の2年間、秋田県（潟上市、井川町）、岩手県（花巻市）、宮城県（大崎市）、新潟県（長岡市、新潟市、上越市）、埼玉県（熊谷市）、福岡県（中間市、岡垣町、遠賀町）の大豆生産組合、大規模農家等を対象にモニタ試験を行い、作業終了後に、所定の設問と自由回答欄を設けたアンケート調査を行った。

(2) 試験結果

① 設問に対する回答

開発機の性能評価に関する設問への回答結果において「十分満足」、「まあまあ満足」の割合は「作業能率」で92%、「培土精度」で88%、「土壌物理性悪化の低減」と「湿潤土壌への適応性」で81%、「除草効果」で67%であった。また「ディスクの調整」については、33%が「ややめんど

う」という回答であった。

② 自由回答での意見

自由回答欄では、「開発機は排水の悪いほ場に適した機械である」、「直進が難しい湿潤な土壌でも、従来機に比べ作物を傷めにくい」、「従来機では作業ができなかった、大きな石があるほ場でも作業可能」などの評価などとともに、「早く市販してほしい」という意見が複数寄せられた。一方で「ディスクへの土付着を減らしてほしい」という意見や、部品強度の問題や部品が外れる問題への意見があり、これらに対しては市販予定機で対応を行った。また「乾燥した硬い土壌では、ディスクの食い込みと砕土が悪い」、「水田地帯ではディスク式の機械を使うことが少ないので、利用マニュアルがほしい」という意見も出された。

4. 開発機の効果と利用上の留意点

1) 開発機の効果

- ① 増収効果：湿潤な土壌で作業した場合に、土壌物理性の悪化を軽減させること、雑草が少なくなることから大豆の増収が期待できる。
- ② 機械利用費の低減効果：機械の価格は従来機と同程度で、作業能率が向上し、燃料消費量が減少することから、面積あたりの機械利用費の低減が期待できる。また、受託作業を大規模に行っている生産組合などでは、機械台数の削減も期待できる。
- ③ 受託作業面積の拡大効果：作業能率が向上するため、受託作業を拡大する余地がある地域では、中耕培土作業の受託面積の拡大が期待できる。
- ④ 除草剤や手取りによる除草経費の低減効果：雑草防除効果が高いため、除草剤の散布回数や手取り除草時間の減少が期待できる。
- ⑤ 大豆の品質向上効果：作業能率と湿潤土壌適応性の向上により適期作業がしやす

くなること、雑草防除効果が高いことにより、雑草が繁茂してしまうケースが減り、コンバイン収穫時における大豆の汚粒の減少が期待される。

2) 開発機利用上の留意点

- ① 作物が埋没しない状態で株元まで培土できるよう、作物を挟んで対向する後列ディスクの間隔を調節する。また、作業速度や土壌条件に応じ、後列ディスクの角度を調節して適切な培土量が得られるようにする。
- ② 土が硬いために耕深が浅くなる時は、付属のチゼル（図 1）を下向きにして作用させる。
- ③ 条間を変える場合は、作物を挟んで対向する後列ディスクの間隔が変更前と同じになるように調節する。
- ④ 作物が小さく、培土すると埋没してしまう時は、後列ディスクの取り付け角度を通常仕様と逆にし、条間中央側に土を寄せる（図 3b）。

おわりに

以上のように、開発機の湿潤土壌条件下での作業性能、雑草防除効果や大豆の収量に及ぼす効果、高速作業性などが実証され、開発機は開発目標を達成したと判断された。これらの結果を受け、開発機は 2009 年度から市販化される予定である。

文献

- 1) 有原文二（1999），中耕・培土，大豆の機械化栽培とコンバイン収穫事例集，27-33，（財）日本豆類基金協会，東京
- 2) 倉田和彦ら（1985），農作業研究，53，転換畑大豆作における作業不可能日の推定法，日本農作業研究会，埼玉
- 3) 後藤隆志，手島司（2007），中耕除草機，特許第 4005512 号
- 4) 後藤隆志ら（2007），平成 18 年度生研センター研究報告会資料，トラクタ用省エネ運転指示装置の基礎的研究，埼玉

◀地域先端研究▶

13年間冷凍されていた精巣組織から 体細胞クローンウシ作製に成功

岐阜県畜産研究所 飛騨牛研究部
星野 洋一郎

和牛遺伝資源として重要な種雄牛「安福」号の体細胞クローンウシの作製に成功した。安福の死後、13年もの長期間にわたり精巣が冷凍保存されていたが、耐凍処理を一切行わなかったため細胞は死滅していると考えられていた。しかし、我々は安福の冷凍精巣の中に生きた細胞が残存していることを発見し、これらを培養して増殖させることに成功した。この細胞をもとに、4頭の体細胞クローンウシが誕生し、2頭が健康に生存している。

1. はじめに

体細胞クローン技術は、動物の体細胞の核に含まれる遺伝情報をもとに、全く同じ遺伝情報をもつ動物を作り出す技術である。1997年、イギリスの Wilmut らが、哺乳類において世界初の体細胞クローン動物である、ヒツジの「ドリー」の誕生を報告した¹⁾。1998年には若山らによって体細胞クローンマウスが報告され²⁾、さらに加藤らによって体細胞クローンウシが報告された³⁾。これらのことがブレイクスルーとなり、現在までに様々な動物種において体細胞クローン動物が生産されている。

通常の繁殖方法では、優れた遺伝的能力を持つ家畜を育種できても、全く同じ遺伝的能力を持つ家畜を再び生み出すことはほぼ不可能である。しかし、体細胞クローン技術を用いれば、優良家畜の体細胞をもとに、同じ遺伝的能力を持つ家畜を複製できる。また、体細胞は凍結保護剤を用いて生きたまま凍結保存することも容易であるため、現存する優良家畜の体細胞を凍結保存し、将来の育種に応用することも可能になる。一方、体細胞クローン技術には成功率の低さや、クローン個体が周産期や若齢期に死亡

するケースが多いことなどが指摘されている。

体細胞クローン家畜の食品としての安全性については、欧米に続き日本でも食品安全委員会において調査が行われ、科学的に安全であるという評価がなされた（平成21年3月12日）。しかし、体細胞クローン動物の周産期や若齢期に認められた異常は、エピジェネティックな変化が適正に行われず、体細胞クローン牛及び豚における発生と分化が適正に行われないことが主な原因ではないかとされており、体細胞クローン技術が新しい技術であることから、体細胞クローン牛及び豚に由来する食品の安全性に関する知見について、引き続き収集することが必要であるとされている。

生物遺伝資源保護の観点からは、体細胞クローン技術は動物の遺伝資源を完全な状態で保存し、生きた動物として再生できる画期的な技術である。実験動物、優良家畜、絶滅危惧種などの様々な動物において、遺伝資源の保存を目的とした体細胞の凍結保存が行われている。さらに、すでに絶滅して現存していない動物であっても、凍結保存されている生体試料があれば遺伝資源を再生できる可能性がある。しかし、生体試料が適切でない凍結環境で長期間保存されており、細胞の生存性が失われていた場合、体細胞クローン作製が可能かどうか疑問で

HOSHINO Yoichiro

〒506-0101 岐阜県高山市清見町牧ヶ洞 4393-1

あった。

我々は、長期間冷凍保存された生体試料から遺伝資源を再生する研究のモデルケースとして、16年前に死亡した黒毛和種の種雄牛「安福」号の体細胞クローン技術による復活に取り組んできた。このたび、冷凍保存されていた安福の精巣組織から、体細胞クローンウシを誕生させることに成功したので報告する⁴⁾。

2. 種雄牛「安福」号について

種雄牛「安福」号は昭和60年代に岐阜県で活躍した種雄牛である。安福の子牛は優れた霜降りの肉を生産し、飛騨牛ブランド確立の礎となった。安福の雌子牛は岐阜県内だけでなく県外にも購買され、各地で和牛の育種改良に貢献した。現在までに安福の血を引く種雄牛は全国で約150頭誕生しており、全国の黒毛和種の約30%が安福の子孫であると推定されている。まさに和牛全体の霜降り品質の向上に貢献した、貴重な遺伝資源であると言える。

安福は1993年9月28日に13歳で死亡した。病性鑑定の際に精巣が取り出され、アルミホイルに包まれた状態で -80°C の冷凍庫で冷凍保存された(図1)。当時は体細胞クローン技術が開発される前であったため、この精巣の保存はクローン再生を目的としたものではなく、 -80°C で10年間、その後液体窒素中で3年間もの長期間にわたり、凍結保護処理を施さない悪条件で保存されていた。このような組織の中の細胞は、



図1 冷凍保存されていた安福の精巣

ほとんどが凍結の過程で破壊され死滅してしまい、体細胞クローン作製に用いるために生きた培養細胞を取り出すことはほぼ不可能であると考えられていた。

しかし、近畿大学大学院生物理工学研究科と岐阜県畜産研究所の連携大学院による研究の過程で、凍結保護処理を行わずに冷凍された動物組織の中に、培養増殖できる生きた細胞が残っている可能性が見いだされた。もし、安福の冷凍された精巣から生きた細胞を培養することができれば、体細胞クローンウシを作製できる可能性が飛躍的に高まる。我々はまず、新鮮な精巣を冷凍して予備実験を行った。

3. 研究手法

観血去勢によって摘出された雄牛の精巣3頭分を、まるごと -80°C の冷凍庫に入れ、1ヶ月ほど冷凍保存した。精巣を冷凍状態のまま分割し、精巣本体、精巣上体頭部、精巣上体尾部、精索の部分に分け、 42°C の生理食塩水中に投入することによって解凍した。完全に解凍された組織片を生理食塩水中より取り出し、はさみで細切り、コラゲナーゼとディスパーゼを含む培地中に入れ、 39°C で振とう培養して細胞分散処理を行った。

その結果、精巣の特定の部分から生きた細胞を培養することに成功した。予備実験では、精巣上体頭部と、精索組織の部分から、増殖する生きた体細胞が得られた。細胞核内のDNAも断片化を起こしておらず、体細胞クローン作製のためのドナー細胞として用いることができると考えられた。実際にこれらの細胞を用いてクローン胚を作製し体外培養したところ、仮親に移植可能な胚盤胞期まで発生することが確認された。

予備実験において、冷凍精巣組織からクローン胚作製に利用できる生存細胞を採取できる可能性が示されたため、実際に安福の精巣を用いて実験を開始した。安福の冷凍精巣から、精巣上体頭部と精索の部分とを分離し、予備実験と同

じ手法で解凍して細胞培養を試みた。5日間の培養後、精巣組織を培養したものにおいて、ごく少数ながらプラスチックシャーレの底面に張り付いた細胞が発見された。このとき、初代培養増殖培地である MF-start (東洋紡) を用いることにより、これらのわずかな細胞を効率的に増殖させることができた。

安福の培養細胞は、繊維芽細胞様と上皮細胞様の二種類の形態の細胞が得られた。それぞれ一部の細胞を初代培養でクローン胚作製に用いた。また一部の細胞は、実験の再現性を確認する意味で、凍結保存して近畿大学に輸送し、融解後、継代培養して増殖させ、細胞の正常性の検査とクローン胚の作製が行われた。

表1に示すように、初代培養の場合、二形態の細胞はどちらもドナー細胞として用いることができ、核移植胚は胚盤胞期まで発生した。し

表1 冷凍ウシ精巣由来細胞をドナーとして用いたクローン胚の発生

細胞	使用 ^{*1}	細胞の形態 ^{*2}	細胞のDNA断片化率 ^{*3}	実験回数	クローン胚数	胚盤胞期胚までの発生数	移植胚数	受胎頭数	分娩頭数
A	初代	繊維芽	-	1	21	9	6	3	2
B	初代	上皮	-	1	21	7	4	0	-
C	凍結	繊維芽	71.4%~75.0%	-	-	-	-	-	-
D	凍結	上皮	1.3%~5.4%	6	162	27	6	2	2
合計					204	43	16	5	4

*1: 核移植に使用した時の細胞の状態。

初代培養: 継代培養せず初代培養で使用。凍結融解: 凍結保存、融解、継代培養して使用。

*2: 細胞の形態。繊維芽: 繊維芽細胞様細胞。上皮: 上皮細胞様細胞。

*3: 調査した細胞のうち、TUNEL法ポジティブだった細胞の割合。

4. 安福クローン「望安福」の誕生

2007年11月30日、安福の体細胞クローン第1号が誕生した。生時体重が18.5kgと小さい牛であったが、健康状況は良好であった。

2008年3月5日にクローン第2号が誕生した。この時は子牛が非常に大きいことが予想されたため、帝王切開により娩出させた。産まれた子牛の体重は47.5kgであった。このクローン第2号は生後2日で死亡した。

かし、凍結融解し継代培養すると、繊維芽細胞様の細胞は細胞が肥大化し、分裂能力の低下が見られた。TUNEL法によって細胞の核内のDNAがダメージを受けているかどうかを調べたところ、繊維芽細胞様細胞は71.4%~75%の細胞がDNA断片化を起こしていることが明らかになった。上皮細胞様の細胞は凍結融解後もDNA断片化がほとんど起こっておらず、核移植に用いることができ、クローン胚は胚盤胞期まで発生した。

合計16個のクローン胚が、仮親1頭につき1個ずつ移植された。その結果、5頭が受胎した。このうち1頭は妊娠約6ヶ月目で流産したが、残りの4頭は分娩に至った。初代培養の繊維芽細胞様細胞から2頭、凍結融解し継代培養した上皮細胞様細胞から2頭の体細胞クローンウシが誕生した。

第3号と第4号は、それぞれ2008年7月22日と31日に生まれた。生時体重はそれぞれ32kgと30kgであった。二頭とも正常に発育していたが、第3号は2009年1月7日、5ヶ月齢で感染症のため死亡した。

安福の体細胞クローン牛は、「望安福(のぞみやすふく)」と命名され、現在は第1号と第4号が健康に成長している(図2)。家畜改良事業団および岐阜県畜産研究所において、マイクロサテライト多型解析による親子判定を行った結果、流産した胎子と死亡した子牛を含むすべて

のクローンウシが安福と全く同じ遺伝情報を持っていることが証明された。

ウシの体細胞クローンは、流死産などの事故が多いと言われている。海外の過去の研究では、ウシの場合、胚移植した体細胞クローン胚のうち分娩に至る率は6.8%であると報告されていた⁵⁾、本研究では16頭の受胎雌のうち5頭が妊娠し、4頭(25%)が分娩に至り、誕生したクローンウシの2頭(12.5%)が正常に生存していることから、高い効率でクローン作製に成功したと言える。



図2 安福の体細胞クローンウシ「望安福」

左、望安福の1号(15ヶ月齢)

右、望安福の4号(7ヶ月齢)

5. おわりに

本研究の体細胞クローン技術そのものに新規な点はない。しかし、安福の生きた細胞を得られたからこそ、従来の方法を踏襲して体細胞クローン個体を誕生させることができたのである。安福の精巣は、なんら特別な凍結保護処理を施さず、死後13年間もの長期にわたって冷凍されていた。しかも最初の10年間は、-80度の冷凍庫の中という、冷凍条件としては不安定な環境下で冷凍されていた。このような精巣組織から生きた細胞を培養増殖できたことは、驚くべき結果である。

本研究では精巣組織を用いたが、他の部位の組織でも、冷凍後に生きた細胞が保存されている可能性はあると考えている。特に、脂肪組織は-80℃の冷凍庫でそのまま凍結しても、解凍後に非常に高い効率で生きた細胞を得られることを確認している。この事実を応用すれば、現在は動物の遺伝資源の保存法として、体細胞を培養してから凍結保存しているところを、脂肪組織を採取して何の処理もせずそのまま凍結保存するだけで、生きた体細胞を保存できることになる。この件については特許出願中である⁶⁾。

本研究で誕生した安福の体細胞クローン「望安福」については、種雄牛として後代を生産し市場に流通させる計画はない。しかし、和牛の育種改良に多大な貢献を果たした安福の遺伝資源が「生きた」状態に復活したことは大きな意義があると考えている。望安福を研究することにより、和牛の改良に活用できる有用遺伝子の解明に役立つことが期待される。

謝 辞

本研究は近畿大学大学院生物理工学研究科と岐阜県畜産研究所の連携大学院の取り組みの中で行われた。ご指導をいただいた近畿大学生物理工学部遺伝子工学科の佐伯和弘教授に深く感謝の意を表す。本研究の一部は、科学技術振興機構・和歌山県地域結集型共同研究事業によって行われた。

文 献

- 1) Wilmut I. et al. (1997) *Nature*. 385(6619):810-3
- 2) Wakayama T. et al. (1998) *Nature*. 394(6691): 369-74
- 3) Kato Y. et al. (1998) *Science*. 282(5396):1975-6
- 4) Hoshino Y. et al. (2009) *PLoS ONE*. 4(1):e4142
- 5) Heyman Y. et al. (2002) *Biol. Reprod.* 66:6-13
- 6) 佐伯ら(2008), 特願 2008-267648.

◀文献情報▶

プロゲステロン感作下での高用量エストラジオールベンゾエート投与は、リピートブリーダー牛の子宮内膜EGF濃度の周期的な変化を正常化するとともに、受胎性を回復させる

A Progesterin-Based Treatment with a High Dose of Estradiol Benzoate Normalizes Cyclic Changes in Endometrial EGF Concentrations and Restores Fertility in Repeat Breeder Cows

S.Katagiri and Y. Takahashi.

Laboratory of Theriogenology, Department of Veterinary Clinical Sciences, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan.

Journal of Reproduction and Development, 54 (6), 473-479 (2008)

正常な牛においては、発情周期の 2~4 日と 13~14 日の 2 回、子宮内膜において上皮細胞増殖因子 (EGF) 濃度のピークが認められるが、リピートブリーダー牛においてはこのような EGF 濃度の周期的な変化は認められないことが報告されている。牛において、EGF は子宮内膜のプロスタグランジン E2 産生を増加させて黄体機能を増強させていると考えられることから、このような EGF 濃度変化の異常がリピートブリーダー牛が受胎しない原因の一つとも考えられる。そこで、本論文においては、プロゲステロン感作下での高用量エストラジオールベンゾエート投与が、リピートブリーダー牛の子宮内膜上皮細胞の EGF 濃度の変化を正常化させ、受胎性を回復させるかどうかを検討された。発情周期の 3 日及び 14 日において、子宮内膜上皮細胞中の EGF 濃度がピークを示さないリピートブリーダー牛を試験牛として用いた。プロゲステロン感作下で 1 (標準量)、2.5 及び 5mg のエストラジオールベンゾエート投与 (EB1, EB2.5, EB5 処置区:各区 5 頭)が子宮内膜の EGF 濃度に及ぼす影響を最初に検討した。リピートブリーダー牛への EB1 及び EB2.5 処置区の子宮内膜中 EGF 濃度の変化は、正常牛への EB1 処置と比べて抑制されており、処置後の発情周期

における EGF 濃度は正常化しなかった。しかしながら、EB5 処置区においては、正常牛と同様な EGF 濃度の増加を示し、子宮内膜 EGF 濃度が正常化した。次にリピートブリーダー牛を用いて、EB1 処置及び EB5 処置を各 30 頭に対して実施し、子宮内膜中の EGF 濃度の変化と受胎性を検討した。EGF 濃度の変化が正常化した牛の割合は、EB5 処置区 (66.7%) が、EB1 処置区 (30.0%) 及び無処置の対照区 (13.3% : n=30) よりも有意に高かった ($P<0.01$)。EB1 処置区 (88.9%) 及び EB5 処置区 (85.0%) において、EGF 濃度の正常な変化を示した牛における受胎率には差は認められなかったが、EB1 処置区及び EB5 処置区において異常な EGF の濃度推移を示した牛における受胎率 (19.0% 及び 30.0%) よりも有意に高かった ($P<0.01$)。以上まとめると、リピートブリーダー牛においては、EGF 濃度に着目すると、エストラジオールベンゾエート投与に対する子宮内膜の反応性が低下していることが明らかとなった。また、発情周期の 3 日及び 14 日において子宮内膜中の EGF 濃度が低いリピートブリーダー牛においては、プロゲステロン感作下での高用量である 5mg エストラジオールベンゾエート投与は、EGF の濃度変化の正常化をもたらすとともに、受胎性の回復に効果があることが明らかとなった。

人工授精における牛の低受胎率は、生産性を低下させ農家の収益に直接影響する大きな問題となっている。また、発情周期が正常に営まれており、臨床検査において卵巣および副生殖器に異常が認められない雌に対して、3 回以上交配しても受胎しないリピートブリーダー牛の存在は、受胎率を低下させる要因ともなっている。リピートブリーダー牛の治療法はこれまで明らかではなく、今回の処置により受胎性が回復するのであれば、牛を無駄に飼養したり淘汰せずにすることから、農家にとっても大きなメリットとなる。今回の報告をベースに、リピートブリーダー牛に対する、より効果的な治療法が開発されることを期待したい。

(抄訳：下司雅也, GESHU 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▶

助細胞から分泌されるディフェンシン様タンパク質「ルアー」が花粉管を誘引する

Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells.

S. Okuda^{1*}, H. Tsutsui^{1*}, K. Shiina¹, S. Sprunck², H. Takeuchi¹, R. Yui¹, R. D. Kasahara¹, Y. Hamamura¹, A. Mizukami¹, D. Susaki¹, N. Kawano¹, T. Sakakibara¹, S. Namiki¹, K. Itoh³, K. Otsuka⁴, M. Matsuzaki⁴, H. Nozaki⁴, T. Kuroiwa⁵, A. Nakano^{4,6}, M. M. Kanaoka¹, T. Dresselhaus², N. Sasaki^{1*} & T. Higashiyama^{1*}

¹ Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, ² Cell Biology/Plant Physiology, University of Regensburg, ³ Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, ⁴ Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo, ⁵ Research Information Center of Extremophile, Graduate School of Science, Rikkyo (Saint Paul's) University, *These authors contributed equally to this work.

Nature, 458, 357-362 (2009).

植物の花粉管ガイダンス研究においては、140年以上にもわたって胚珠から放出される花粉管の化学誘因物質が存在すると考えられてきたものの、今日までその実態は明らかにされてはいなかった。これまでの先行研究によって、花粉管誘因物質は胚珠中の助細胞から分泌されており、この誘因物質には、種特異性が存在することが明らかになっていた。本論文では、トレニアという胚珠が一部子房から突き出ている植物を用いて、助細胞から分泌されるディフェンシン様タンパク質こそが花粉管誘因物質であることを見いだしている。

著者らはまず、助細胞のプロトプラスト 25 個からなる cDNA ライブラリーを作成し、発現

解析を行った。この結果、システインに富んだ分泌型の低分子タンパク質群(CRPs)が強く発現していることを見いだした。これら低分子タンパク質の多くは非常に進化速度が速いことが知られており、実際にトレニアで見つかったこれら遺伝子の同祖遺伝子を他の植物から見つけ出すことは困難であった。以上の点は、助細胞から分泌され、種特異性をもつという花粉管誘因物質の候補としての条件をすべて満たしていた。そこで、特に強く発現していた 3 つの遺伝子 (CRP1, 2, 3) について詳細な発現解析を行ったところ、2 つ (CRP1, 3) は、助細胞特異的に強く発現しており、タンパク質は助細胞の線状器官、珠孔付近で検出された。

次に、大腸菌で発現させたタンパク質を用いて花粉管の誘因活性を検証した。柱頭と花柱を通過させた後に花粉管伸長培地上におかれた花粉管は、インジェクションされた CRP1, CRP3 に向かって伸長方向を変えた。CRP1, 3 が持つ花粉管誘因活性は非常に強く、1000 分子ほどで花粉管の向きを変えることができた。また、トレニアから単離された CRP1, 3 は近縁種であるアゼトウガラシの花粉管を誘引することができず、種特異性も有していた。これらのことから、CRP1, 3 はそれぞれ花粉管誘因物質ルアー1, 2(LURE1, 2)とそれぞれ名付けられた。さらに、著者らが開発したレーザーマイクロインジェクターを用いて LURE1, 2 のモルフオリノアンチセンスオリゴマーを胚珠に導入したところ、対象区に対して優位に花粉管の誘因が減少していた。つまり、LURE1, 2 の発現抑制によって胚珠の花粉管誘因能が阻害されたことを示していた。

本論文において、花粉管ガイダンス物質が同定されたことにより、LURE を受容する花粉管側の受容体単離や、助細胞において見いだされた他の CRPs の解析など、同分野における多くの基礎研究が加速していくことが考えられる。また、受精制御に関係するこれら因子の研究は、不適切な花粉との受精の排除や、新たな組み合わせの交雑といった分野にも応用可能であると考えられる。

なお、本論文が掲載されたサイトでは射出された LURE に向かって伸長方向を変える花粉管の非常に綺麗な動画を見ることができる。

(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▶

細菌の宿主域を変化させるには
単一の調節遺伝子で十分である

A single regulatory gene is sufficient to alter bacterial host range

Mark J. Mandel¹, Michael S. Wollenberg¹, Eric V. Stabb², Karen L. Visick³ & Edward G. Ruby¹

¹Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Wisconsin School of Medicine and Public Health, 1550 Linden Drive, Madison, Wisconsin 53706, USA. ²Department of Microbiology, University of Georgia, 828 Biological Sciences, Athens, Georgia 30602, USA. ³Department of Microbiology and Immunology, Loyola University Chicago, Maywood, Illinois 60153, USA.

Nature, 458, 215-218 (2009)

微生物共生は、動物の正常な発達、成長にとって、必要不可欠である。それぞれの世代で、環境から共生生物を獲得しなければならない。相利共生のパートナーを無数の望まれない関係の中から識別することは、恐ろしいほど大変な仕事である。宿主特異性の具体例はよく報告されているが、その遺伝学的なメカニズムはほとんどわかっていない。

本論文では、海洋性発光細菌(*Vibrio fischeri*)のもつセンサーキナーゼ RscS が、北太平洋に生息するダンゴイカ(*Euprymna scolopes*)への定着に必要であり、かつ十分であることが示されている。これまでの研究により、イカに共生している *V. fischeri* 株では、感染初期に RscS タンパクが、Syp エクソポリサッカライドを誘導することによって、バイオフィームを形成し、イカの発光器官への定着を制御していることがわかっている。具体的には、筆者らは、イカへの定着能を有する *V. fischeri* 株と定着能をもたない株との遺伝子比較、形質転換等の手法により、細菌の宿主特異性について検討している。

マツカサウオから単離した *V. fischeri* MJ11 株は、イカには定着できない株である。イカに定

着能を有す *V. fischeri* ES114 株のゲノムと比較すると、Syp エクソポリサッカライド合成に関わる遺伝子群は両株間に大きな差はなかったが、*rscS* 遺伝子は *V. fischeri* ES114 株には存在し、*V. fischeri* MJ11 株には存在しないことが明らかとなった。そこで、*rscS* 遺伝子を *V. fischeri* MJ11 株に形質転換して発現させると、イカに定着する能力を獲得することがわかった。また、*rscS* 遺伝子を導入した *V. fischeri* MJ11 株はバイオフィームを形成することも判明した。さらに、自然界の *V. fischeri* の *rscS* 遺伝子の分布が、イカへの定着能と一致するかを確かめるために、イカとマツカサウオから単離した他の *V. fischeri* 株の *rscS* 遺伝子の有無を確かめた。調べた全ての株で、Syp エクソポリサッカライド合成に関わる遺伝子群の中の代表的な 3 つの遺伝子は存在していた。対照的に、*rscS* 遺伝子はイカから単離した 12 株すべてに存在していたが、マツカサウオから単離した株では、10 株中 5 株は配列をもち、4 株は相同性の低い配列をもち、1 株(MJ12 株)のみが相同性の高い *rscS* 遺伝子配列を有していることがわかった。また、マツカサウオから単離した *V. fischeri* 株 10 株中で *rscS* 遺伝子配列を有していた MJ12 株のみが、イカへの定着能を有していた。一方で、イカに定着する *V. fischeri* 株の *rscS* 遺伝子破壊株は、イカへの定着能を失った。これらのことから、これらの *V. fischeri* の集団の中では、*rscS* 遺伝子がイカへの定着に必要かつ十分であることが示された。また、ベイズ法による系統学的な解析によって、*rscS* 遺伝子が、イカとの共生という進化にとって重要な役割を担っていることが示された。

このように本論文は、1つの調節遺伝子が、共生細菌の宿主特異性を変化させうることを明らかにしている。宿主に直接作用するわけではない、たった1つの調節遺伝子が、動物組織と相互作用する既存の能力のスイッチをオンにすることによって、宿主特異性の進化に貢献していることを示した。

(抄訳：若井丈人，WAKAI Taketo，カルピス株式会社 健康・機能性食品開発研究所)

◀ 文献情報 ▶

アニサキス接触性皮膚炎における
IL-4 および IL-13 の機能的役割

Differential requirements for interleukin (IL)-4 and IL-13 in protein contact dermatitis induced by *Anisakis*

N. Nieuwenhuizen^{1,2*}, D. R. Herbert^{1,2,*†}, F. Brombacher^{1,2}, A. L. Lopata^{1‡}

¹ Division of Immunology, IIDMM, Faculty of Health Sciences, University of Cape Town, Cape Town

² International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) and Division of Immunology, IIDMM, Faculty of Health Sciences, University of Cape Town, Observatory 7925, South Africa

Present addresses: [†]Research Service, Cincinnati Veterans Administration Medical Center, Cincinnati, OH 45220 and Division of Immunology, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, OH 45267, USA.

[‡] College of Applied Sciences, Allergy Research Group, Royal Melbourne University of Technology, Bundoora West Campus, Melbourne, Australia.

Allergy, Epub ahead of print (2009)

魚類寄生虫として知られるアニサキスは、じんま疹、接触性皮膚炎、アトピーなどのアレルギー性皮膚疾患を引き起こし、魚類加工従事者の健康を脅かしている。アレルギー疾患には、CD4⁺ T細胞 (Th2 細胞) 型の免疫反応が重要であり、アレルゲンの経皮暴露によって Th2 細胞による IL-4, IL-13 の発現が上昇し、IgE の産生を介してアレルギー反応を誘導する。本研究では、アニサキスタンパク質との接触によって誘導される局所的皮膚炎およびアナフィラキシーショックにおける、IL-4 および IL-13 の機能的役割について検討した。

本研究では、IL-4, IL-13 および IL-4 + IL-13 遺伝子をそれぞれノックアウトした BALB/c マウスと野生型のマウスを用いて、以下のような試験を行った。感作抗原には、オキサワラの小

腸から分離した *Anisakis pegreffii* 幼生の抽出液を用いた。抗原感作は、マウス腹部表皮への経皮暴露 (3 週間隔, 2 回) によって行った。また、経皮暴露後のマウスにアニサキスタンパク質を静脈注射し、感作強度の臨床的評価を行った。感作後の野生型およびノックアウトマウスについて、炎症反応, Th2 細胞由来サイトカイン, IgE, IgG 抗体産生能, アナフィラキシーショック応答について検討した。

その結果、野生型マウスでは白血球, マスト細胞および T 細胞浸潤による局所的な炎症および表皮過形成が認められ, IL-4, IL-5, IL-10 および IL-13 などの Th2 細胞由来サイトカイン, アニサキス抗原特異的な IgE および IgG 抗体産生が上昇した。また, アニサキスタンパク質の静脈注射試験では, 感作直後の直腸温低下, マスト細胞プロテアーゼ 1 の発現上昇などアナフィラキシーショック様の反応が認められた。これに対し, IL-13 ノックアウトマウスでは局所的炎症および表皮過形成が, IL-4 および IL-4 + IL-13 ノックアウトマウスではアナフィラキシー反応の抑制がそれぞれ認められた。

IL-4 および IL-13 は構造, 機能ともに類似しており, 受容体サブユニットである IL-4R を共有することが知られている。炎症反応における IL-13 受容体について検討するため, IL-4R α , T 細胞特異的 IL-4R α およびマクロファージ/好中球特異的 IL-4R α 遺伝子をノックアウトしたマウスを用いて同様の実験を行った。その結果, 細胞非特異的 IL-4R α ノックアウトマウスのみ炎症反応の抑制が認められ, 炎症反応時の IL-13 シグナル経路には II 型 IL-4R α が関与していることが示唆された。

以上の結果より, アニサキスタンパク質によって誘導される皮膚炎には IL-13 が, アナフィラキシーショックには IL-4 が中心的な役割を担っているものと推察された。また, 炎症反応時の IL-13 シグナル経路において, II 型 IL-4R α の関与が示唆された。

(抄訳: 平山健史, HIRAYAMA Takeshi, 日本水産株式会社 中央研究所)

生研センターからのご案内

平成20年度 研究成果発表会の開催について（予告）

生物系特定産業技術研究支援センターでは、「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」及び「生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業」の終了課題の成果発表会を、これまで当該年度の3月上旬に開催しておりましたが、平成20年度の研究成果発表会については、本年の7月に開催することとなりました。

開催日：平成21年7月13日（月）～15（水）

場 所：東京国際フォーラム（ホールD7）

〔東京都千代田区丸の内3-5-1〕

入場無料

なお、プログラムや発表課題等の詳細については、平成21年6月中に生研センターのホームページに掲載するほか、パンフレットやポスターでご案内いたします。

入場無料で、どなたでもご参加いただけますので、多数の皆様のご来場をお待ちしております。

問合せ先：基礎研究課 E-mail kisoken@ml.affrc.go.jp
TEL:03-3459-6569 FAX:03-3459-6594

技術開発課 E-mail kaihatsu@ml.affrc.go.jp
TEL:03-3459-6567 FAX:03-3459-6577

URL <http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>



バックナンバーのご案内
第 132 号
2009 年 3 月 15 日発行

総 説

天敵昆虫サビマダラオオホソカタムシによるカミキリムシ被害対策手法の開発 浦野 忠久

国内情報

イネいもち病菌及びアルタナリア菌の生育を抑制するマイコウイルスを世界で初めて発見 森山 裕充・青木 菜々子・加藤 幸栄・鈴木 佑・浦山 俊一・浮池 孔 洗・児玉 基一朗・有江 力・寺岡 徹・福原 敏行
イネの穂ばらみ期耐冷性を強くする遺伝子の同定 斎藤 浩二・早野 由里子・黒木 慎・佐藤 裕
海水でも育つマングローブから耐塩性遺伝子を同定 多田 雄一
BSE 罹患牛における脳幹機能障害の特徴 新井 鐘蔵

汎用型飼料収穫機の開発 — 圃場を選ばず、一台三役の府県コントラクタ向け機械 志藤 博克・橘 保宏・川出 哲生

地域の先端研究

単為結果性とげなしナス「試交 05-3」の育成 穴井 尚子

文献情報

凍結保存・融解後に生存性の低いプタ精液において、精漿は凍結時の精子に障害を与えるが、融解時に精漿が存在することで、融解後の精子の品質と受精率が向上する (抄訳: 下司 雅也)
シロイヌナズナにおいて重複した遺伝子の多様な進化が遺伝的不適合を引き起こす (抄訳: 高田 美信)
ドコサヘキサエン酸は細胞表面のマイクロドメインのサイズと分布を変化させる (抄訳: 池本 英生)

生研センターからのご案内



バックナンバーのご案内
第 131 号
2009 年 1 月 15 日発行

総 説

幼若ホルモンネットワーク遺伝子の解明と制御 篠田 徹郎

国内情報

イネで低い温度でも発芽を向上させる遺伝子を発見 — 乾燥や塩害などのストレスでも同様の役割 藤野 賢治
米の古米臭の原因となる酵素の有無を判別する DNA マーカーの開発 鈴木 保宏
味覚センサーを用いた緑茶の滋味(味わい)の客観的評価技術 林 宣之
マダニの飢餓耐性機構に必要なオートファジー遺伝子の同定 藤崎 幸蔵・白藤(梅宮) 梨可

長年の研究が実る！ズワイガニの稚ガニ産産に一步前進 山本 岳男・藤本 宏・山田 達哉・高橋 庸一
加工食品中の「えび・かに」に由来するアレルギー原因物質の混入を短時間で検出する簡易キットの開発 田中 誠司

地域の先端研究

タバココナジラミバイオタイプ Q によるサヤインゲン白化葉の発生 上門 隆洋・大藪 正史

文献情報

Busulfan の徐放性エマルジョンによるレシピエント胚の不妊化処理により、キメラ生殖巣のドナー由来始原生殖細胞の割合が増加する (抄訳: 下司 雅也)
特定の転写因子の発現によりトマト果実の健康促進アントシアニン含量が増加する (抄訳: 高田 美信)
微生物の共生因子は腸の炎症性疾患を防止する (抄訳: 若井 丈人)
キチンはアレルギーに関連する先天性免疫細胞の組織集積を誘導する (抄訳: 飯島 学)

編集後記

133号をお届けします。本号の総説では矢野昌裕氏（農業生物資源研究所）らにゲノミクスを背景とした新たな作物育種についてご紹介戴きました。

その他の研究情報としては、矢野幸司氏（農業生物資源研究所）らに根粒菌および菌根菌との細胞内共生に共通して必要な遺伝子の機能同定、今井博之氏（甲南大学）に植物の耐乾燥性を向上させる方法、藤原義博氏（株式会社プリベンテック）に遺伝子組換えイネによるサイトカインの生産、吉国通庸氏（九州大学）らにマナマコの放卵・放精行動を誘起する神経ペプチド（クビフリン）の解明、永坂厚氏（東北農業研究センター）らにキュウリホモプシス根腐病の発病機構の解明とそれに基づく防除対策、手島司氏（生研センター）らにディスク式中耕培土機の開発、星野洋一郎氏（岐阜県畜産研究所）に13年間冷凍されていた精巣組織からの体細胞クローンウシの作製について、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）、若井丈人氏（カルピス(株)）、平山健史（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。

なお、本誌の編集業務は133号から佐々木が担当することになりました。皆様のご支援、ご協力をよろしくお願いいたします。
(佐々木記)

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133号

平成21年5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 brainkil@ml.affrc.go.jp URL <http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>