

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成21年7月15日（隔月1回15日発行）

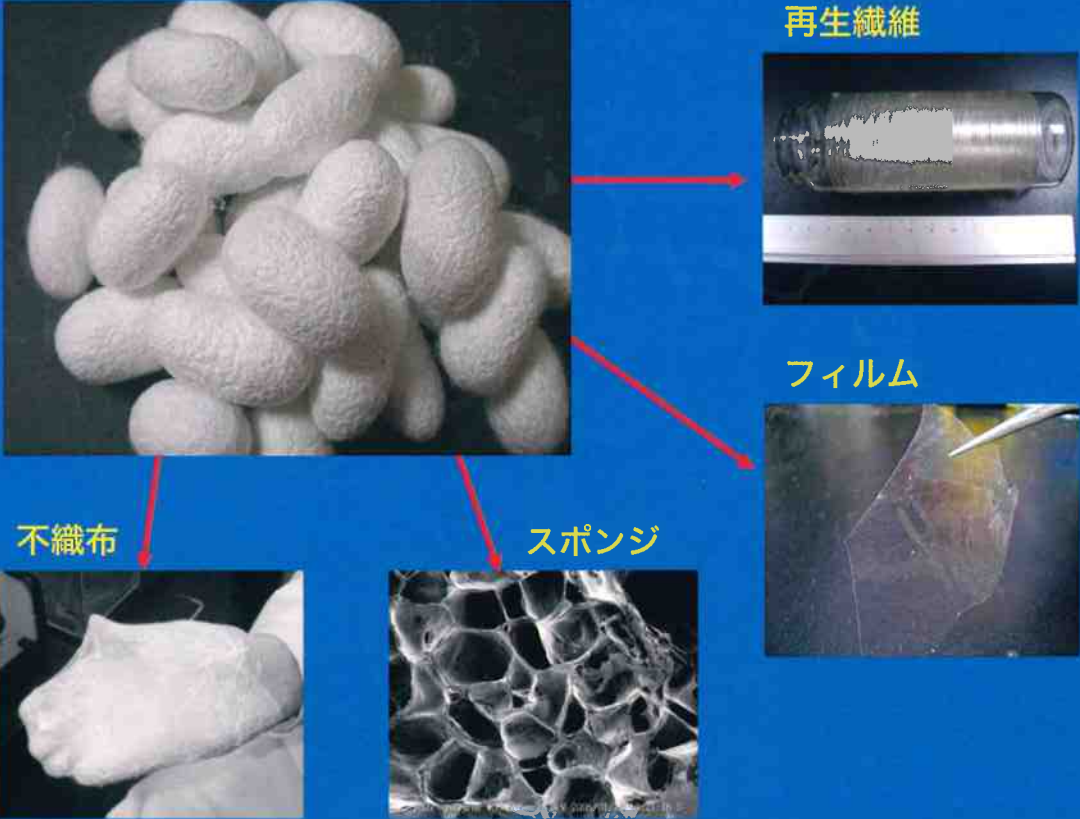
ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.134

15 JULY, 2009

ブレインテクノニュース



再生繊維

フィルム

不織布

スポンジ

繭から再生医療用に作成された各種絹材料

生体との適合性を高めた絹糸の作製と 再生医療分野への応用

東京農工大学大学院 共生科学技術研究院

朝倉 哲郎

目 次

総 説

- 生体との適合性を高めた絹糸の作製と再生医療分野への応用 1
朝倉哲郎 (東京農工大学大学院 共生科学技術研究院)

国内情報

- カイコを用い、インフルエンザウイルス吸着剤の合成に必要な酵素を生産することに成功 7
朴 龍洙 (静岡大学 創造科学技術大学院 統合バイオサイエンス部門)
- CRES-T法を利用した新形質花きの開発 11
四方雅仁¹・鳴海貴子²・佐々木克友¹・山口博康¹・間竜太郎¹・大坪憲弘¹
(¹(独)農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所, ²香川大学 農学部)
- 緑色光で植物の病害抵抗性を引き出す 16
石田 豊・工藤りか・山本敬司・末包亜矢子・小松精二 ((株)四国総合研究所
バイオ研究部)
- イチゴの植物工場的な生産を可能とする移動栽培装置 21
林 茂彦・齋藤貞文・山本聡史 ((独)農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定
産業技術研究支援センター 園芸工学研究部)

地域の先端研究

- ナガイモにインフルエンザウイルスの感染抑制作用タンパク質成分 (デオスコリンA) が
あることを発見 26
三上稔之¹・畑山一郎¹・加藤陽治²・伊藤聖子²・工藤重光³・市田淳治⁴・奈良岡馨⁴・
柴田浩夫⁵・小田桐弓芽⁵ (¹青森県環境保健センター, ²弘前大学教育学部,
³弘前大学地域共同研究センター, ⁴青森県工業総合研究センター弘前地域技術研究所,
⁵(株)ミリオン)

文献情報

- 未経産牛由来卵子へのコルセミド処理は、核移植胚の発生率、受胎率及び分娩率を向上
させる 31
G. Li et al. (*Molecular Reproduction and Development*, 76, 620-628, 2009) 抄訳: 下司雅也
- ヒナゲシからの花粉側自家不和合性決定因子の単離 32
M.J.Wheeler et al. (*Nature*, 459, 992-995, 2009) 抄訳: 高田美信
- 出芽酵母において、Pho91はリン酸・ポリリン酸代謝を制御する液胞リン酸トランスポー
ターである 34
H.C. Hurlimann et al. (*Molecular Biology of the Cell*, 18, 4438-4445, 2007) 抄訳: 金井宗良
- DHA複合リポソームによるヒト腫瘍細胞のアポトーシス誘導 35
K. Goto et al. (*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, 1880-1883, 2008)
抄訳: 山崎圭樹

- 生研センターからのご案内 (アグリビジネス創出フェア開催のお知らせ) 36

表紙の説明

筆者らは、再生医療用に一次構造を改変した新しい絹を設計・生産し、再生医療—血管、骨・歯、角膜、皮膚—への応用研究を推進している。図は、プロセッシング技術によって、再生医療の目的に合わせて、再生繊維、フィルム、スポンジ、不織布等、形状を大きく変えた絹材料をまとめた。

詳細については1頁をご覧ください。

◀ 総 説 ▶

生体との適合性を高めた絹糸の作製と
再生医療分野への応用

東京農工大学大学院 共生科学技術研究院

朝 倉 哲 郎

高齢化社会に向けて急務な、再生医療を担う優れた材料の開発研究は極めて活発である。絹は再生医療材料に必要な高い強度とタフネスを有するとともに、長年にわたり縫合糸として体内に埋め込まれて使用されてきた実績がある。そこで、さらに生体との適合性を高め、再生医療用にその一次構造（アミノ酸の並び方）を改変した新しい絹を設計、トランスジェニック蚕を用いて生産した。新しい絹の再生医療—血管、骨・歯、角膜、皮膚—への応用について紹介する。

1. はじめに

絹は繊維の女王として有名な優れた衣料材料である。一方、格段に高い強度とタフネスならびに優れた操作性を有することから、長年にわたって縫合糸として体内に埋め込まれて使用されてきた経緯がある。したがって、再生医療用材料の有力な候補である。我々は、各種絹の詳細な構造を核磁気共鳴 NMR の手法を駆使して徹底的に解明し、その構造解析データを 28 年の長きにわたって蓄積してきた¹⁾。絹は繭として蚕にとって最適なように設計されており、再生医療材料用にそれを使用しようとする、その一次構造から変えることも必要となる。そこで、絹の構造と物性・機能に関するデータの蓄積を背景として、再生医療材料に適した一次構造からなる、新しい絹（以下、従来の絹とは異なるので絹様タンパク質と書く）を設計、遺伝子組み換え法を用いて大腸菌やトランスジェニック蚕で生産してきた。さらに、再生繊維、フィルム、スポンジ、不織布等、再生医療の目的に適した形状に成形するためのプロセッシング技術の開発を行った。そして、細胞培養ならびに動物へ

の移植実験による評価を経て、人工血管や角膜、骨ならびに歯の足場材料を開発してきた²⁾。

2. 家蚕絹(絹フィブロイン)の構造

まず、絹の構造の概略について述べる。通常、養蚕農家で飼育される蚕は家蚕である。我々は、その繭を絹として利用するが、絹は本体が絹フィブロインというタンパク質であり、その周囲をもう一種類のタンパク質である絹セリシンで囲まれている。通常、絹セリシンを精練と言う操作を経て取り除き、本体の絹フィブロインを再生医療用材料として用いる。さらに、絹フィブロインは H 鎖と L 鎖からなるが、H 鎖の分子量が圧倒的に大きいので、H 鎖が主に物性や機能を左右する。その一次構造は、2000 年、Zhou らによって決定された³⁾。家蚕絹フィブロイン（以下、単に絹と略する）は、アラニン (Ala) とグリシン (Gly) が交互に繰り返された部分が大半を占める。さらに、絹を領域に分けてみると、セリン (Ser) 残基が加わった Ala-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly の繰り返しからなる部分が「結晶領域」、Ser 残基が、チロシン (Tyr) やバリン (Val) 残基に置き換わった「準結晶領域」、さらに、荷電性アミノ酸残基を多く含む「非晶領域」や「N-端や

ASAKURA Tetsuo

〒184-8588 東京都小金井市中町2-24-16

C-端の領域」に分類される。絹は蚕体内で水溶液の状態から外力を受け、繊維化前後に劇的な構造変化を遂げることによって、高い強度とタフネスを有する繊維となる。蚕体内の絹を取り出し穏やかな状態で乾燥させた繊維化前の絹の固体構造を「Silk I」と言い、繭となった繊維化後の絹の構造は「Silk II」と呼ばれて区別される。Silk I型の結晶部分の構造は、図1に示す“タイプII型の繰り返すβターン構造”をとることが、我々の研究から明らかとなった⁴⁾。一方、繊維化後の構造であるSilk II型構造に関しては、1955年に Marsh, Corey, Pauling らが絹繊維のX線構造解析結果に基づいて提案した逆平行βシート構造がよく知られており、長年にわたって教科

書にも引用されてきた。しかしながら、この構造モデルは約半世紀前のモデルであり、近年の高度な解析技術によって改良すべき段階にあった。我々はSilk I型構造の決定に威力を発揮した新しい固体NMRの方法を駆使して、Silk II型構造を解明することが出来た⁵⁾。Silk I型と異なり、逆平行βシート構造を中心とする不均一な構造であった。これによって、家蚕が水溶液から鋼鉄線に匹敵する、あるいは、それを超える強くてタフな絹繊維を瞬時に作成する機構が明らかになった。同様に、他の蚕やクモの生産する様々な絹について、その構造の解明を進め、その成果の蓄積が新しい絹の創生とそれをを用いた再生医療材料開発の基盤となった。

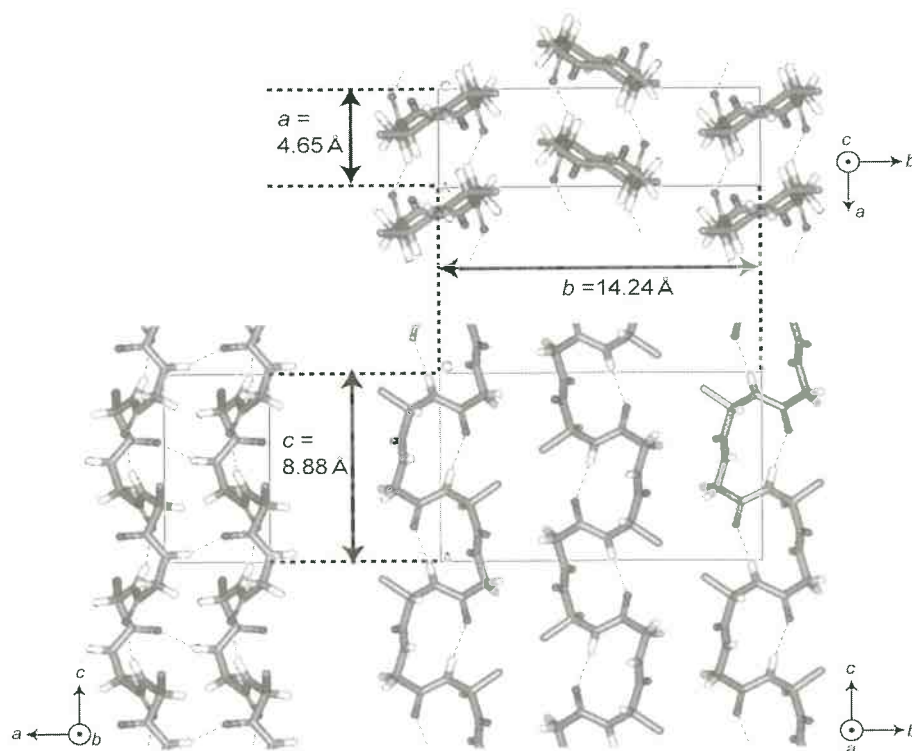


図1 主に固体NMR法を用いて決定された家蚕絹フィブロインの繊維化前(Silk I型)の構造

分子内と分子間の水素結合(破線)が、分子鎖に沿って交互に形成されている。

3. 再生医療を目的とした絹様タンパク質の設計と生産

我々は、引き続き、遺伝子組み換え法によつ

て、絹の一次構造中に細胞接着性配列を導入させて生体との適合性を高めた絹様タンパク質を大腸菌やトランスジェニック蚕(TG蚕)を用いて作製した。特に、大腸菌による生産と比較

して、TG 蚕を用いると大量かつ安価に繭として生産することができるという利点を持つ。また、蚕（家蚕）は飛ぶことができないので飼育の際に隔離する必要がない。図2は、フィブロネクチン中で細胞接着活性を有するアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) を含む繰り返し配列 (TSRGDSPAS) を絹の一次構造中に導入し、TG 蚕を用いて生産した絹様タンパク質の細胞接着活性をまとめた⁶⁾。細胞接着部位を

含まない場合や天然の絹と比較して高い細胞接着活性を示すことがわかった(図2)。特に、セリシン蚕 (Nd-s^D) を用いて、絹中の細胞接着部分の割合を高めた場合、一段と高い活性値を示した。また、骨・歯の足場材料として用いる際に重要な石灰化を促進させることを考え、ポリグルタミン酸やアスパラギン酸を絹の一次構造中に導入することによって、高いカルシウム結合能を付与した絹様タンパク質をTG 蚕で生産した。

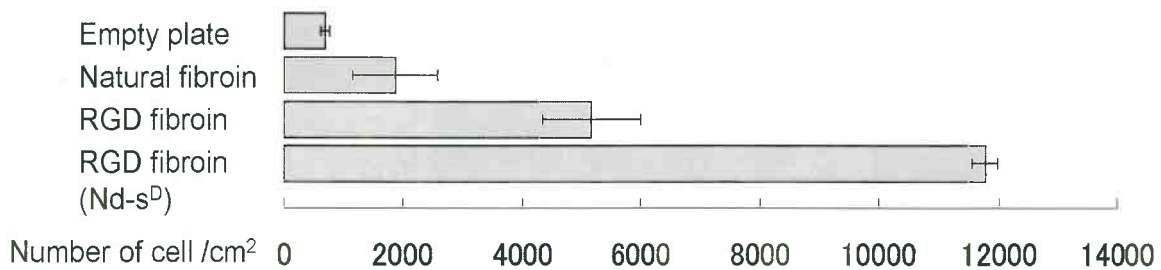


図2 フィブロネクチン中の細胞接着部位 (RGD) を導入した絹様タンパク質の細胞接着活性評価

棒が長い方が細胞接着数が多い、すなわち、細胞接着活性が高いことを意味する。プレートのまま、ならびに絹フィブロインでコーティングした場合を比較用に示した。Nd-s^Dは、セリシン蚕という特殊な蚕で絹セリシンのみを選択的に生産する蚕。

4. 絹を各再生医療材料に合わせて成形するプロセッシング技術の開発

絹を濃厚な臭化リチウムや塩化カルシウム等の中性塩に溶解後、蒸留水に対して透析することによって水溶液を得ることができる。図3に、再生医療の目的に合わせたプロセッシング技術によって形状を大きく変えた絹をまとめた。水溶液の作製が出発点となる。絹フィルムは、絹水溶液をシャーレ上に展開し、温和な状態で乾燥させることによって得られる。一旦、絹の水溶液を凍結乾燥によってスポンジ状とし、再度、ヘキサフロイソプロパノール(HFIP)等のフッ素系溶媒に溶解、凝固浴にメタノールを用いる溶液紡糸によって、天然絹繊維に匹敵する十分な強度を有する再生絹糸を作成することができ

る。また、絹の HFIP 溶液を原料とし、エレクトロスピニングの手法を用いて、表面積の大きな極細（繊維径がサブマイクロメートル以下）の絹不織布を作製することもできる。一方、物性の全く異なる絹スポンジを作製することができる。一つは絹の HFIP 溶液とショ糖を孔源とした系、もう一つは絹水溶液と NaCl を孔源とした系である。二つの系の大きな違いは、絹の不溶化方法である。前者はメタノールを用いて絹の不溶化を促進させるが、後者は、絹水溶液が NaCl の作用により凝固する性質を利用する。このようなメカニズムの違いにより、HFIP 系では高い弾力性を有するスポンジが、水系では高い強度を有するが生分解性が高いスポンジが得られる。

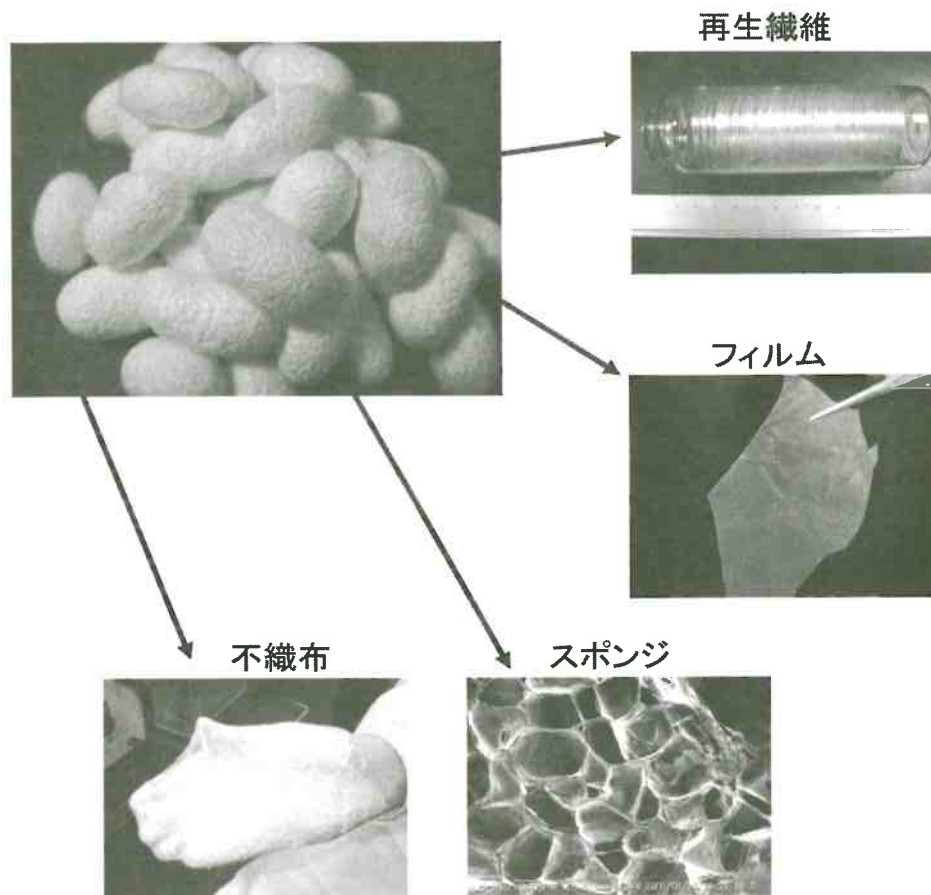


図3 繭から再生医療用に作成された各種絹材料
再生医療の目的に合わせて適した形状のものを作成する。

5. 絹を用いた小口径人工血管の開発

人工血管は、通常、ポリエステル繊維やポリフッ化エチレン (PTFE) などの素材で作られており、主に内径が 10mm 以上の大きな血管用の場合、人に移植後も異物反応等は少なく広く用いられている。しかしながら、内径が数 mm 以下の場合、血栓が短時間で生じやすいという問題があった。また、ポリグリコール酸やポリ乳酸等の生体吸収性高分子を用いて人工血管を作製する試みがあるが、耐圧性に問題があり、動脈系に用いた場合は動脈瘤形成や破裂の危険性があるため肺動脈や静脈などの低圧系にしか使用できなかった。そこで高強度を有する絹縫

合糸を用いて、径 1.5mm の動脈用小口径人工血管を作製、ラット腹部大動脈に移植した。PTFE 製の人工血管についても同様の実験を行い比較した所、絹の場合の方が格段に閉塞しにくく、高性能であることがわかった。例えば、移植後、24 週を経過した絹の人工血管の断層像 (図 4) では、絹繊維中に細胞が遊走し、密な血管構造を構成していた。内腔側内皮細胞や、その周辺の平滑筋細胞も整然と配列されており、外膜の栄養血管も形成され、本来の血管に近い構造となっていた⁷⁾。現在、小口径絹人工血管をブタに移植し臨床医の先生方と一緒に評価実験を行っている。

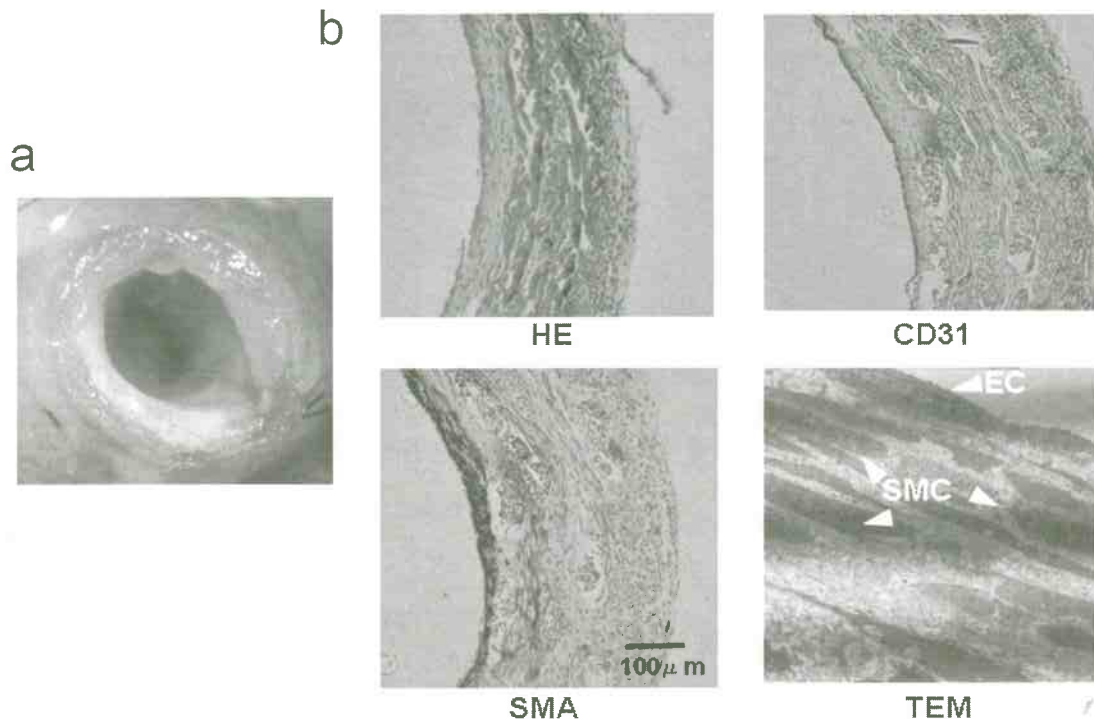


図4 a. ラット腹部大動脈に移植後、24週を経過した後に摘出した小口径絹フィブロイン人工血管の断面図
 b. 各種の免疫染色後の断層像
 自己の細胞により内皮や中膜が形成されていることがわかる。

6. 絹を用いた角膜上皮ならびに骨・歯足場材の開発

日本は、角膜疾患の治療の際に必要な角膜提供予定者の数が圧倒的に不足しており、再生医療による代替技術の開発が求められている。角膜は、主に三つの層、すなわち上皮細胞層、角膜実質、内皮細胞層からなるが、十分な強度と高い透明性ならびに酸素透過性を有する絹フィルムの特長を生かして、我々は上皮シート移植材料の開発を行っている。透過性をあげるためにフィルムの多孔質化を行っており、生体外で、角膜上皮の再生を確認している。

また、絹スポンジは骨や歯の足場材料として開発研究が進んでいる。足場材料による骨形成の誘導を評価するため、絹でコーティングした基材上で培養した骨芽細胞について石灰化を観測した

(図5)。まず細胞の石灰化をアリザリン染色法により判定し、次に沈着したカルシウム量を定量した。絹でコートされたディッシュ上で培養した骨芽細胞は、比較対象としたブタI型コラーゲンやウシ血清アルブミン (BSA) でコートしたディッシュ上で培養した場合に比べて、アリザリンレッド染色に陽性な細胞がかなり早期に出現、絹は石灰化を強力に促進することが明らかになった。カルシウムの定量においても同様の結果が得られ、絹は骨や歯の足場材料として極めて有力であることが明らかとなった。現在、遺伝子レベルでその原因を検討中である。現在、ポリグルタミン酸やアスパラギン酸を絹の一次構造中に導入、高いカルシウム結合能を付与した絹様タンパク質がTG蚕で生産されているので、それを用いることによって一層の石灰化の促進が期待される。

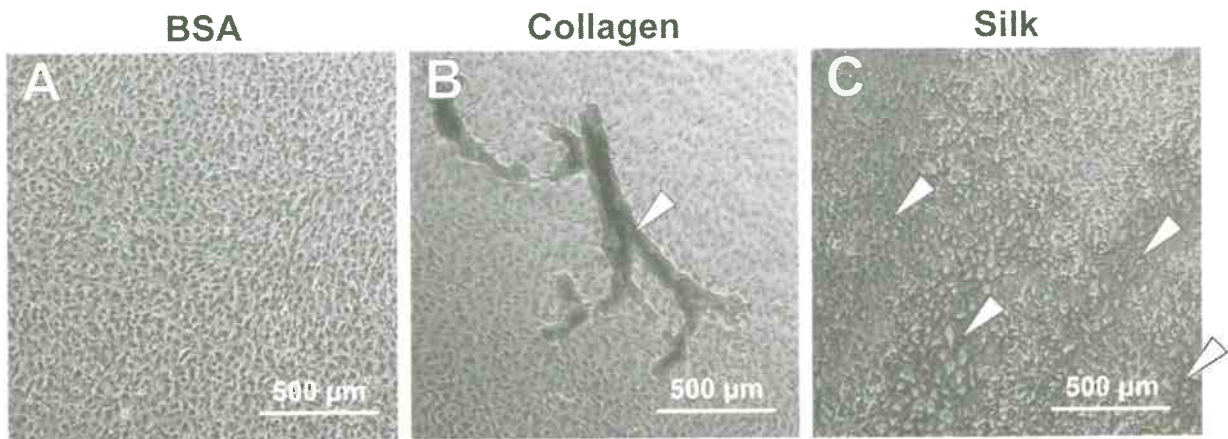


図5 A: ウシ血清アルブミン上で培養した骨芽細胞; B: ブタI型コラーゲン上で培養した骨芽細胞; C: 家蚕絹フィブロイン上で培養した骨芽細胞の2週間培養後のアリザリンレッド染色法による石灰化評価
矢じりで示す濃灰色の部分にカルシウムの沈着が見られる。

7. 展 望

本研究は、絹ならびに新たに設計・生産した絹様タンパク質を用いて、人工血管や角膜、骨、歯等の足場材料を開発することを目的とし、それによって、再生医療材料の開発・生産に関する産業分野を、絹を基幹産業として創生することを目指している。世界の絹研究の動向を眺めてみると、絹の再生医療材料への応用研究は益々盛んである。日本は絹に関する多くの研究成果の蓄積があり、その強みを生かして、是非、日本発の絹再生医療材料の製品化を行ないたいと考えている。

謝 辞

これらの研究成果は、多くの研究者との共同研究によるが、各々、血管再生（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス部 佐田教授，順天堂大学循環器内科 代田教授・宮内准教授・梶本講師），骨・歯再生（日本大学松戸歯学部 西山教授・久保山准教授 東京農工大学工学部 宮浦教授・稲田准教授），角膜再生（慶應義塾

大学医学部眼科教室 坪田教授・榛村講師・比嘉講師），トランスジェニック蚕（農業生物資源研究所 田村博士）に関して、特にお世話になった。お礼申し上げます。また、これらの研究は、生物系特定産業技術研究支援センターならびに科学研究費（基盤研究 S :18105007）の援助の下で行われている。感謝申し上げます。

文 献

- 1) 朝倉哲郎(2007), 蚕糸・昆虫バイオテック, 76, 9-14.
- 2) 中澤靖元, 朝倉哲郎 (2009), 繊維学会誌, 65, 11-13.
- 3) Zhou, C. et al.(2000), *Nucleic. Acids. Res.*, 28, 2413-2419.
- 4) Asakura, T. et al.(2001), *J. Mol. Biol.*, 306, 291-305.
- 5) Asakura, T. et al.(2002), *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 8794-8795.
- 6) Yanagisawa, S. et al.(2007), *Biomacromolecules*, 8, 3487-3492.
- 7) 朝倉哲郎(2007), 未来材料, 7, 38-44.

◀国内情報▶

カイコを用い、インフルエンザウイルス吸着剤の合成に必要な酵素を生産することに成功

静岡大学 創造科学技術大学院 統合バイオサイエンス部門

朴 龍洙

インフルエンザウイルス感染初期においてウイルスと相互作用する受容体認識は、糖鎖結合様式に深く関わっている。本研究では、糖鎖結合様式に欠かせられない $\alpha 2,6$ シアリルトランスフェラーゼ ($\alpha 2,6\text{SiaT}$) をカイコで発現し、精製を行い、インフルエンザウイルス感染阻害剤の合成に用いた。マウスを用いた *in vivo* 感染試験において致死的なインフルエンザウイルス感染からの防御増強効果を確認した。

1. はじめに

豚インフルエンザの脅威が徐々に収束に向かっている。いきなり現れ、またいつの間にか消えていく不思議な病原体と言えよ。しかし、インフルエンザウイルスに関する研究が進み、ヒトや動物への感染メカニズムが明らかになりつつある。特に、インフルエンザウイルスは、糖鎖を特異的に認識すると言われるが、このような特異性は、ウイルス DNA の変異によってトリ型、ヒト型、豚型などと変わっていく^{1, 2)}。受容体糖鎖認識特異性が、シアル酸結合様式が $\alpha 2-3$ の場合はトリ型、 $\alpha 2-6$ の場合はヒト型として厳格に区別されている。そこで、尾形ら³⁾ は γ ポリグルタミン酸を骨格にし、人工糖鎖ポリマーを合成し、糖鎖の先端のシアル酸の結合様式を $\alpha 2-3$ 、或いは $\alpha 2-6$ にすることによって、トリ型やヒト型ウイルスの特異的な吸着を確認した。そこで、シアル酸を正確な位置に転移するための酵素の開発が望まれ、カイコを用いることによって、非常に効率よくシアル酸を $\alpha 2-6$ に転移させることができた。本報では、シアル酸 $\alpha 2-6$ 糖転移酵素の開発についてまとめ、紹介する。

2. カイコを用いた $\alpha 2,6$ シアリルトランスフェラーゼ ($\alpha 2,6\text{SiaT}$) の発現

ラット由来 $\alpha 2,6\text{SiaT}$ 遺伝子を FLAG タグに融合した形で、TOPO クローニング、Gateway technology および Bac-to-Bac システムによって組換えバクミド(著者が開発した独自のベクター^{4, 5)}、大腸菌とカイコで DNA が複製できるシャトルベクター) bacmid/bx-FLAG-tagged $\alpha 2,6\text{SiaT}$ を作製した。得られたバクミド 100 ng/ μl を 5 齢カイコ (*Bombyx mori*, フヨウツクバネ) に、1 頭あたり 40 μl を注射した。注射後、24 時間毎に体液を摂取した。その結果、カイコ幼虫体液中に感染後 4.5 日目から 6.5 日目にかけて $\alpha 2,6\text{SiaT}$ 活性の発現を確認した。酵素活性は感染後 6.5 日目で最大に達し、その酵素活性は 1958 mU/ml に達した(図 1)。コントロール(バクミドを注射していないカイコ)において、体液および脂肪体からの本酵素活性は確認されなかった。

3. カイコ幼虫の体液から $\alpha 2,6\text{SiaT}$ の精製

カイコ幼虫の体液に分泌した FLAG-tagged $\alpha 2,6\text{SiaT}$ (4.5 ml, 9.0 U) を 25-70% の範囲で硫酸処理し、続いて 4°C, 8000 rpm で遠心分離し

PARK Enoch Yongsu

〒422-8529 静岡市駿河区大谷836

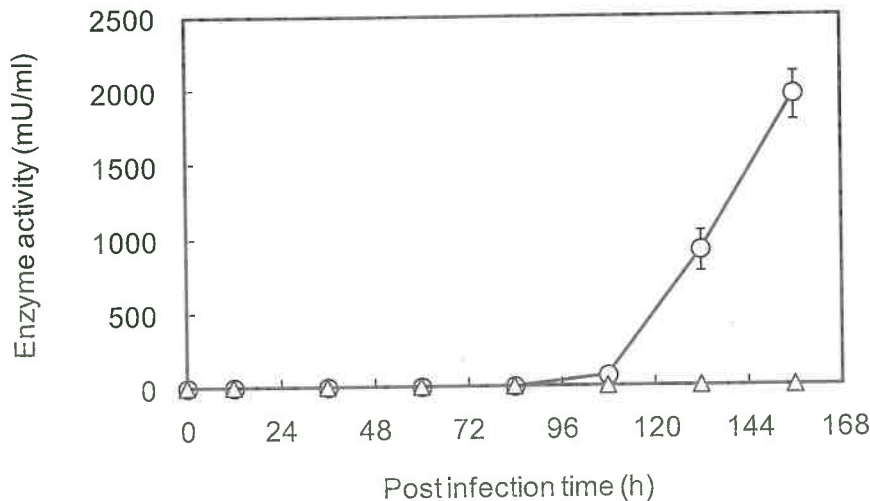


図1 カイコの体液に分泌した $\alpha 2, 6\text{SiaT}$ の活性

沈殿部を回収した。次に、生じた沈殿を 6.9 ml の 0.02% Tritin X-100, 150 mM NaCl を含む 20 mM MOPS buffer (pH7.5) に溶解した。これを PD-10 (1.7 × 5.0 cm, Sephadex G-25) カラムを用いて脱塩した (タンパク量: 105 mg, 酵素活性: 7.2 U) 後, 予め 0.02% Tritin X-100, 150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH8.0) で平衡化した Anti-FLAG M2 アフィニティーカラムクロマトグラフィー (7 ml) に供した。カラムを 70

ml の同緩衝液で洗浄後, 70 ml の 100 $\mu\text{g/ml}$ FLAG peptide を含む同緩衝液でステップワイズ溶出を行なった。カラム吸着部を遠心フィルター (NWCO: 10,000, Amicon) で脱塩, 濃縮後, 活性測定およびタンパク定量を行なった。その結果, タンパク量 2.2 mg, 活性回収率 64% でカイコ幼虫体液から 159 倍の精製が可能であった。

精製 $\alpha 2, 6\text{SiaT}$ の MALDI-TOF-MS の結果, m/z 45172.045 に分子イオンピークが観察された (図 2)。この値は, $\alpha 2, 6\text{SiaT}$ の推定アミノ酸一次配列から算出される分子量 40798.76, SDS-PAGE の 40 kDa 付近のシングルバンド, 以前に報告された, ST6GalI の分子量とほぼ一致した。また, MALDI-TOF-MS の結果と推定アミノ酸一次配列から算出される分子量との誤差 (4373.285) は *N* 型糖鎖修飾によるものであると考察した。カイコ幼虫発現精製 $\alpha 2, 6\text{SiaT}$ には, *N* 型糖鎖付加領域 (NXS および NXT) が 2 個存在することより, それぞれの Asn に対し *N* 型糖鎖修飾が施されているのではないかと考えている。

この結果は, カイコ一頭あたり 200 μg 程度の組換えタンパク質発現が可能であるということを示している。カイコ幼虫

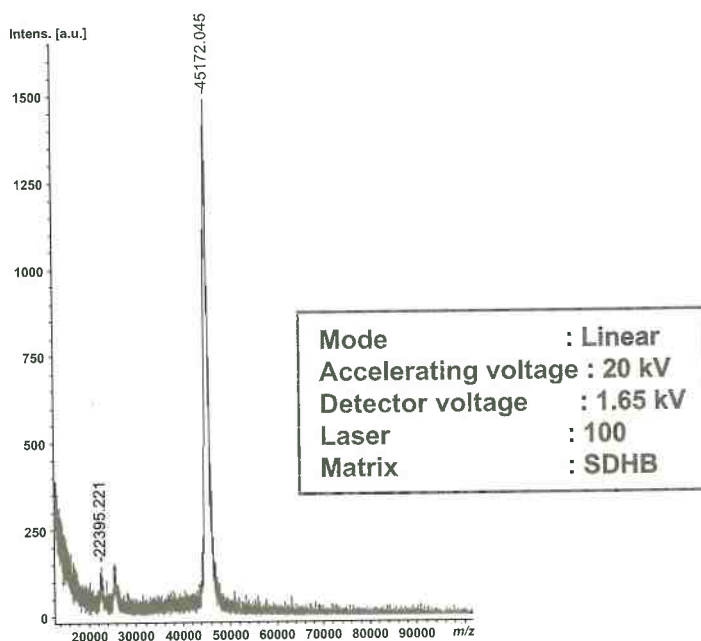


図2 精製 $\alpha 2, 6\text{SiaT}$ のMALDI-TOF MSの結果

を用いた本バクミドシステムによって、酵素活性を有した状態での組換えタンパク質の大量発現が可能であった。

4. シアロ糖鎖ポリペプチドの設計及び合成

本インフルエンザウイルス阻害剤をグリコン部・アグリコン部（スペーサー）・骨格となるペプチド部に3分割し、機能設計を行った。まず、

糖鎖やアグリコン部の構造が異なる種々の *O*-及び *N*-結合型アミノアルキル配糖体を合成し、これら配糖体のアグリコン部アミノ基を納豆菌由来 γ -PGA（ γ -ポリグルタミン酸）カルボキシル基と縮合することで各種アシアロ型糖鎖ポリペプチドを合成した。アシアロ型糖鎖ポリペプチドに糖転移酵素（ $\alpha 2,3/6$ SiaT）を用いて位置選択的にシアリル基を導入し、一連のシアロ糖鎖ポリペプチドの実践的合成法を確立した(図3)⁶⁾。

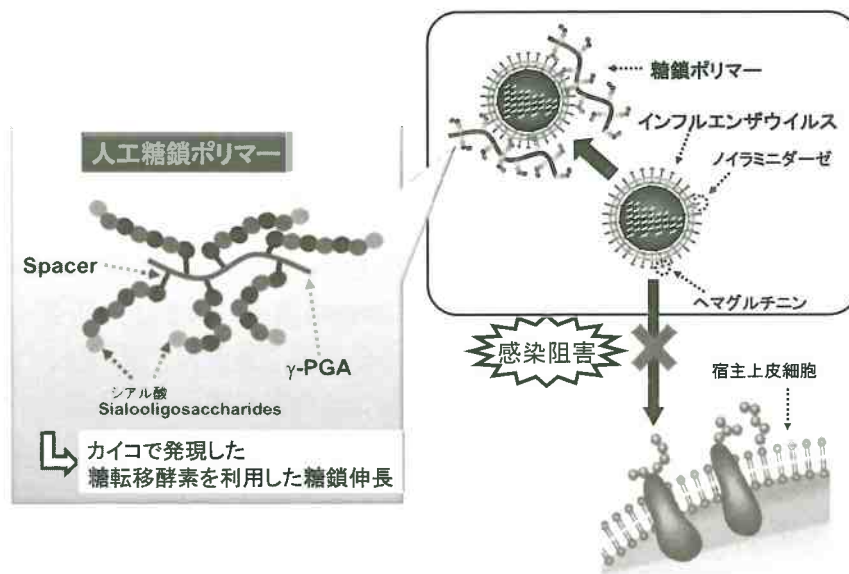


図3 カイコで発現した $\alpha 2, 6$ SiaTを用いて糖鎖伸長を行って合成した人工糖鎖ポリマー及び感染阻害剤としての模式図

人工糖鎖ポリペプチドを用いたトリおよびヒト型インフルエンザウイルスに対する赤血球凝集阻害試験・感染阻害試験の結果から、両インフルエンザウイルスの受容体認識特異性は末端シアリル基の結合様式において異なるだけではなく、そのコアとなる内部糖鎖構造も活性に大きく関与していることを示した。この内部糖鎖構造に対する活性の違いはトリとヒトで大きく異なっており、特にヒト型インフルエンザウイルス[A/Aichi/2/68 (H3N2), A/WSN/33 (H1N1)]においては $\text{Neu5Ac} \cdot 2,3/6(\text{LacNAc})_3$ の7糖構造を含有する糖鎖ポリペプチドに強力な感染阻止活性を観察した⁷⁾。また、本糖鎖ポリペプチドを

用いることにより、マウスを用いた *in vivo* 感染試験においても致死的なインフルエンザウイルス感染からの防御増強効果を確認した。さらに、このヒト型インフルエンザウイルス感染阻止活性の飛躍的な増加に關与するシアロ糖鎖の内部糖鎖構造を直鎖状のアルキル鎖でミミックしたスペーサー延長型 SialylLacNAc 含有糖鎖ポリペプチドが、長鎖内部糖鎖構造内の LacNAc 繰り返し構造に対応し強力な阻害活性を発現し、糖鎖をアルキルスペーサーで代用できることを明らかにした。

5. 今後の研究の展開

カイコ 14 頭から $\alpha 2,6\text{SiaT}$ 2.2 mg を精製できた。この酵素を用いて、シアル酸をほぼ 100% の確率で転移することに成功した。この $\alpha 2,6\text{SiaT}$ の利用によってシアル酸付きの糖鎖を持つ化合物は非常に効率よく合成できる道が開かれた。今後、シアル酸の結合様式を厳密に制御した化合物を認識デバイスとしてナノ検出システム化し、これによって変化しやすいインフルエンザウイルスの判別が一層簡単にできると予想している。更に、安価で製造できれば、感染阻害剤としての応用が十分見込まれる。

謝 辞

本研究は、(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の「新技術・新分野創出の基礎研究推進事業」“高

次タンパク質の大量発現用バクミドの開発及び応用”により実施した。糖鎖の合成について、静岡大学農学部碓氷泰市教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Kobasa, D. et al. (2004), *Nature*, 431, 703-707
- 2) Yamada, S. et al. (2006), *Nature*, 444, 378-382
- 3) Ogata, M. et al. (2009), *Bioconjugate Chem.*, 20, 538-549
- 4) Motohashi, T. et al. (2005), *Biochem. and Biophys. Res. Com.*, 326, 564-569
- 5) 朴ら (2009), 特許 4288389
- 6) 尾形ら (2008), 第 28 回日本糖質学会年会講演要旨 39 頁
- 7) Ogata, M. et al. (2009), *Biomacromolecule*, in press

◀国内情報▶

CRES-T法を利用した新形質花きの開発

¹独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所

²香川大学 農学部

四方 雅仁¹ ・ 鳴海 貴子² ・ 佐々木 克友¹ ・
山口 博康¹ ・ 間 竜太郎¹ ・ 大坪 憲弘¹

CRES-T法は、シロイヌナズナの転写因子に転写抑制ドメインを付加したキメラリプレッサーを用いることで、その標的遺伝子の機能を抑制する技法である。この手法をトレニアなどの花き園芸植物に適用することで、新規の花色や花形を持つ花きを作出できることが示された。さらに効率的に有用形質を得るため、バルク感染によるスクリーニングを行った。期待通り花で効率よく色や形の変化が表れ、CRES-T法による花きの形質改変の有効性が示された。

1. はじめに

花は生活に潤いを与えるという目的のため、人々の好みに応じた色、形、大きさ、香りなどの要望に応えるべく数多くの品種が作られている。新しい品種を生み出すため、従来は交配による育種が行われてきた。また、ガンマ線や重イオンビームのような放射線照射、EMSのような化学薬品処理による突然変異誘発育種も一般に行われている。しかしながら、このような従来育種はどの遺伝子に変異がおこるかわからない上、有用形質のスクリーニングに多大な時間と労力が必要である。一方、遺伝子を導入する組換え育種は、目的に応じた遺伝子を用いるため、従来育種では獲得することのできない新規の花の形質を付与することができる。例えばサントリーが開発した青いバラは、本来は青い色素を作ることができないバラに、他の植物から青い色素を作る遺伝子を導入することにより作出された¹⁾。また、組換え育種では特定の形質に対象を絞って改変することができるため、新

形質獲得までの期間が短くてすむことも利点の一つである。

組換え育種でよく行われるのはアンチセンスやRNAi法による内在遺伝子の発現を抑制する手法である。これにより例えば色素生合成遺伝子の発現を抑制し、花色が変化した花が作られている。しかしながらこのような手法は導入する遺伝子の配列情報が必要となり、ゲノム情報やEST情報の乏しい園芸植物では遺伝子の単離から行わなければならない、やはり時間と労力を要する。本稿で紹介するCRES-T (chimeric repressor gene-silencing technology) 法では、そのような遺伝子情報を必要とせず、遺伝子情報が整備されているシロイヌナズナ等モデル植物の転写因子を用いることで、他の植物種の形質を改変することができる手法である。ここでは、CRES-T法を用いた新形質花きの開発と最近の研究成果について報告する。

2. CRES-T法の概略

CRES-T法は、シロイヌナズナの転写因子の機能解析から開発された手法である。転写因子はモジュール構造をとっており、DNAに結合する領域、他のタンパク質と結合する領域、転写活性化に働く領域などがある。それぞれの領域

SHIKATA Masahito¹, NARUMI Takako², SASAKI Katsutomo¹, YAMAGUCHI Hiroyasu¹, AIDA Ryutarō¹, OHTSUBO Norihiro¹

¹〒305-8519 茨城県つくば市藤本2-1

²〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸2393

は独立して機能することができ、例えば DNA 結合領域や転写活性化領域を切り離して他のタンパク質に結合してもこれらの領域は機能する。タンパク質間相互作用の解析に使われる酵母ツーハイブリッド法はこの性質を利用した技法の代表例である。CRES-T 法は、12 アミノ酸からなる転写抑制領域 (SRDX) を転写因子の C 末端側に付加した場合に、本来の転写因子が転写活性化の機能を持っていても転写抑制因子に変換されるという性質を利用している。このキメラリプレッサーを植物体に導入すると、内在の転写因子にも優先して標的遺伝子の発現を抑制するので (図 1)、結果としてその転写因子の機能欠失型の表現型を誘導することができる²⁾。例えば、シロイヌナズナの花器官形成に働く *AGAMOUS* (*AG*) 遺伝子の変異体は八重咲きになるが、この形質は野生型のシロイヌナズナに *AG-SRDX* を導入することで再現できる。これは、内在の *AG* があるにもかかわらず、導入された *AG-SRDX* が優先的に働いて標的遺伝子の発現を抑制しているためと考えられる³⁾。

植物の遺伝子解析を行うにあたり、しばしば悩まされるのが機能重複遺伝子の存在である。CRES-T 法の優れたもうひとつの点は、内在の単一の転写因子だけでなく、これら機能重複因子にも優先して働く点である (図 1)。機能重複遺伝子が存在する場合、一つの遺伝子の機能欠失変異体の表現型は野生型と全く差がなく、機能重複遺伝子との多重変異体となって初めて表現型が表れる。生育に重要な遺伝子はバックアップが用意されているわけである。例えばシロイヌナズナにおいて、茎頂分裂組織形成に働く *CUP-SHAPED COTYLEDON1* (*CUC1*) と *CUC2* は NAC ファミリーの転写因子をコードし、*cuc1 cuc2* 二重変異体はカップ状の子葉を形成する⁴⁾。それぞれ単独の変異体ではそのような表現型を示さないが、CRES-T 法を使用した場合、つまり、野生型に *CUC1-SRDX* を導入すると、内在の *CUC1* や機能重複因子の *CUC2* があるにもかかわらず、カップ状の子葉が形成された³⁾。

このように CRES-T 法では内在因子や機能重

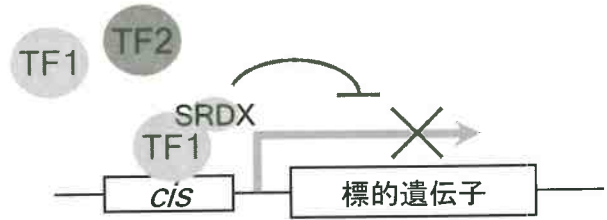


図1 CRES-T法の概略図

TF1; 内在転写因子, TF2; 機能重複転写因子

複因子に関係なくキメラリプレッサーが機能することが利点のひとつである。従来育種で得られるもののうち、劣性変異の場合はホモにならないと機能は欠失しない上、機能重複遺伝子があると交配で多重変異体を作成しなければならず、時間と労力がかかる。一方で CRES-T 法は、シロイヌナズナのように採種する場合は T1 世代、タバコのようにカルスから再分化させる場合は T0 世代での評価が可能であり、大幅な時間の短縮ができる。また、CRES-T 法はシロイヌナズナだけでなくイネなど他の植物でも機能することに加え、シロイヌナズナの転写因子を他の植物にそのまま用いた場合も形質改変に作用することが明らかになっている^{3), 5)}。これらは、園芸植物のようなゲノム情報が乏しい植物においても効率的な機能改変を可能にするという有用な技術である。

3. モデル園芸植物として期待されるトレニア

実際に園芸植物に CRES-T 法を適用した結果の前に、我々が用いているトレニア (*Torenia fournieri*) について紹介する。トレニアはキンギョソウと同じゴマノハグサ科に分類されていたが、近年の DNA 解析ではトレニアはアゼナ科に、キンギョソウはオオバコ科に分類される。東南アジア原産のトレニアは耐暑性が強い一年草である。日本名はナツスミレ、またはハナウリグサと呼ばれる。トレニアはゲノムサイズが小さい (171 Mbp, シロイヌナズナと同程度)、背丈が 20~30cm で小さい、カルス化や再分化

が容易である、形質転換系が確立されているなどの理由で、園芸分野における分子生物学や生理学のモデル植物としての利用が期待される。

4. CRES-T法の園芸植物への適用

花き園芸植物における有用形質は主に花色と花形であることから、花で働く転写因子を利用してCRES-T法の適用を行った。シロイヌナズナの約2000個の転写因子のうち、花器官形成に働く転写因子を選抜し、これらのキメラリプレッサーをトレニアに導入した。このとき用いたプロモーターやターミネーターなどベクターの基本骨格はシロイヌナズナで用いているものをそのまま用いることができるため、プラスミド構築の手間も省略できる。このようにして得られた形質転換トレニアの2つの例を紹介する。まずひとつは、花器官形成に働くSEPALLATA3 (SEP3)のキメラリプレッサーを導入した35S:SEP3-SRDXトレニアは、花卉の縁片が鋸歯化するという表現型を示した⁵⁾(図2B, C)。このような表現型は従来育種では得られなかった新規のものである。なぜ鋸歯化するのかという点は現在解析中であるが、園芸的に有用な形

質であると期待される。また、花卉の鋸歯化はシロイヌナズナの変異体やシロイヌナズナに35S:SEP3-SRDXを導入した場合には見られなかった表現型であり、導入遺伝子が本来と異なる標的遺伝子に作用している可能性が考えられるが、あるいはこれも本来のSEP3の機能であり、シロイヌナズナの研究だけでは明らかにすることができない機能の手がかりを示しているのかもしれない。このように応用だけではなく基礎研究としてもトレニアを用いた研究は有効である。

遺伝子組換え植物を作出した場合、導入遺伝子の発現量の違いなどにより系統ごとで表現型に強弱が表れ、遺伝子の機能解析には複数ラインを調べる必要があるという点が厄介である。しかしながら、園芸植物の形質改変には、この表現型のばらつきは有利に働くことがある。35S:SEP3-SRDXトレニアでは、鋸歯化の程度や花卉の着色部分が系統によって様々に現れ、ひとつのコンストラクトの導入で様々な形質の花を得ることができた⁵⁾(図2B, C)。トレニアの場合は挿し芽で増やすことができるため、安定した形質であれば有用形質がひとつでも現れればそれを増殖、維持することができる。

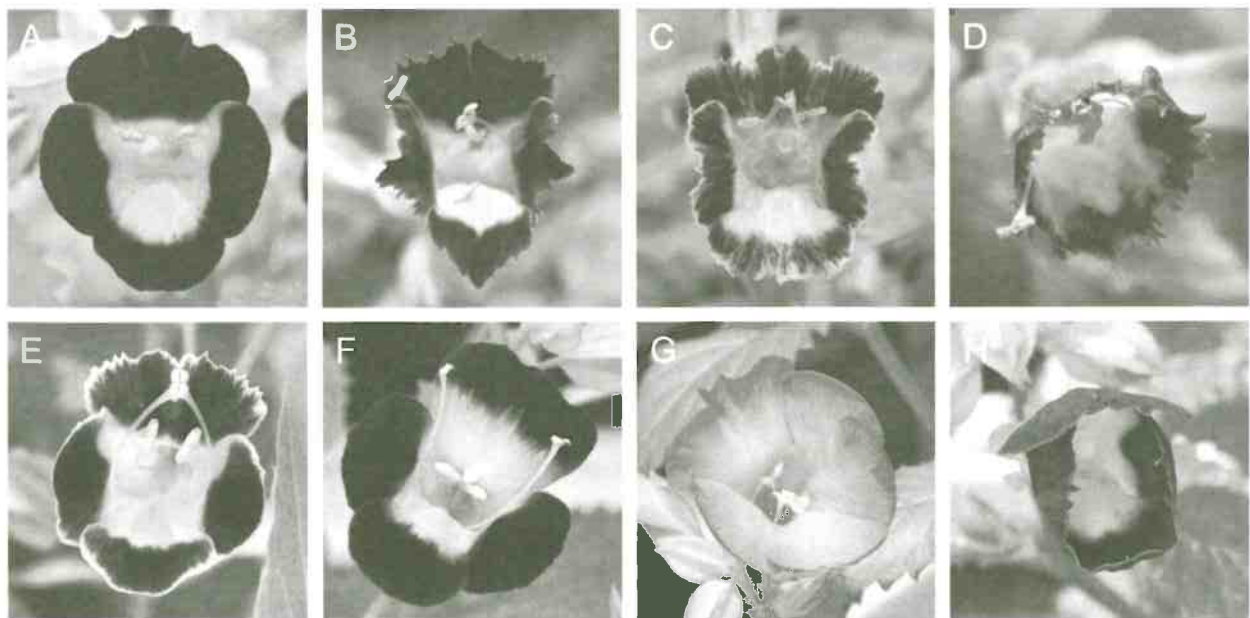


図2 CRES-T法によって得られた新規形質を持つトレニア
 (A)野生型, (B,C)35S:SEP3-SRDX, (D)35S:AG-SRDX, (E-H)バルク感染で得られたもの

CRES-T法を用いた形質転換のもうひとつの例は、AGである。前述したようにシロイヌナズナのag変異体およびAG-SRDX導入シロイヌナズナは八重咲きとなる。八重咲きの花きは商品価値が高いと期待されることから、AG-SRDXを園芸植物へ導入することで、八重咲き花きの作出を試みた。しかしながら、35S:AG-SRDXトレニアは八重咲きになることはなかった⁶⁾。35S:AG-SRDXに関しては、キク、アサガオ、シクラメン、リンドウ、トルコギキョウにも導入しているが、いずれも花は野生型と差がないか、花形が変化するものの八重咲きになることはなかった。異常な形質として、トレニアでは花弁の縁片が鋸歯化するという表現型を示した(図2D)。35S:AG-SRDXの花弁では、維管束のパターンが野生型と異なっていた。期待された八重咲きにはならず、本来のAGの機能がトレニアでは働かないことが考えられたが、AGのトレニアの相同遺伝子であるTfPLE1やTfFARをキメラリプレッサーにしてトレニアに導入した場合もAG-SRDXと同様の表現型を示した。このことから、タンパク質の機能としては同じであっても種によって生物学的な機能は異なることが示唆された。これは進化的な観点からも非常に興味深い。

5. 新形質花き作出の効率化

以上のように、シロイヌナズナの遺伝子を用いることで他の植物の形質改変が可能である一方、期待する表現型が得られないこともあることが明らかになってきた。つまり、どの遺伝子が有用形質を付与するかは、導入してみないと判断できない。そこで、より効率よく新規有用形質を得るための手法として、多数のコンストラクトを同時に導入し、有用なものをスクリーニングするという手法を開発した。シロイヌナズナの花で高度に発現する転写因子42遺伝子を、公開されているマイクロアレイデータから選抜し、キメラリプレッサーを作成した。42のプラスミドをミックスしてアグロバクテリウムに導

入し、これを用いてバルク感染することでトレニアの形質転換を行った。348ラインの形質転換体を得られ、うち193ラインについて導入遺伝子を同定した。多数のコンストラクトを同時に導入しているため、複数のコンストラクトが形質転換される可能性があるが、82.4%は1つのコンストラクトのみ導入されていた。表現型は花の色や形に関するものが82%であり、期待通り効率よく花の形質改変を行うことができた。得られた形質は、花弁の縁が白いもの、上弁の形態および配色パターンが異なるもの、単色のもの、花が完全に開花しないものなどがあつた(図2E-H)。導入した遺伝子の多くは機能未知のものであり、バルク感染によるスクリーニングが機能未知の遺伝子でも積極的に扱えること、シロイヌナズナでは明らかにできなかった機能が明らかになるかもしれないことが期待される。

6. 今後の展望

これまで得られた形質転換トレニアには、花弁の配色パターンが変化したものがいくつかある(図2)。

これは、細胞の分化や発生に関与する転写因子を用いることで、花弁の配色パターンを制御できることを示唆している。花色を変える従来の手法は、色素の生合成酵素遺伝子や生合成を制御する転写因子を改変するのが一般的である。色素合成に直接関与しない、発生や分化に関わる転写因子による配色パターンの改変が可能になれば、模様も自由にコントロールできるようになるかもしれない。さらに、現在は35Sのような構成的なプロモーターを用いているが、組織特異的なプロモーターを用いることで花弁だけでキメラリプレッサーを働かせるようなことを行えば、より精密な形質改変を行うことができるようになるであろう。

CRES-T法の優れた点として、キメラリプレッサーが機能重複した転写因子にも優先して働くことがあげられる。これは、4倍体などの染色体の倍数性が高いものにもあてはまる。例えば

6倍体のキクでも CRES-T 法が働くことが明らかになっている。野生のバラは2倍体であるが、栽培品種は4倍体というように、園芸植物あるいはコムギやバナナのような作物にも倍数性の高いものがある。このような品種においては従来の RNAi 法のような手法では困難な形質改変も、CRES-T 法で有用形質を得ることができるかもしれない。

謝 辞

この研究は、農林水産省の「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」（平成 17～19 年度）および生研センターの「イノベーション創出基礎的研究推進事業」（平成 20 年度～）によるものである。また、本研究は、(独)産業技術総合研究所、筑波大学、(財)岩手生物工学研究

センター、北興化学工業(株)、山形県農業総合研究センター、サントリーホールディングス(株)との共同研究である。

文 献

- 1) Katsumoto, Y. et al. (2007), *Plant Cell Physiol.*, 48, 1589-1600
- 2) Hiratsu, K. et al. (2003), *Plant J.*, 34, 733-739
- 3) Mitsuda, N. et al. (2006), *Plant Biotechnol. J.*, 4, 325-332
- 4) Aida, M. et al. (1997), *Plant Cell*, 9, 841-857
- 5) Shikata, M. et al. (2008), *Plant Biotechnol.*, 25, 31-36
- 6) Narumi, T. et al. (2008), *Plant Biotechnol.*, 25, 45-53

◀国内情報▶

緑色光で植物の病害抵抗性を引き出す

株式会社四国総合研究所 バイオ研究部
石田 豊・工藤りか・山本敬司・末包亜矢子・小松精二

特定波長の光を用いて植物の病害を防ぐ『光防除』を目指し、緑色光照射による病害防除技術を開発した。緑色光の照射は、植物に対して一種のストレス刺激となり、病害抵抗性の誘導を引き起こすと考えられ、イチゴ炭そ病をはじめとする各種果菜類や花卉類の炭そ病や灰色かび病に防除効果を示すことが確認できた。現在イチゴ育苗向けの病害防除システムとして商品化を進めており、今後は様々な農作物への適用が期待される。

1. はじめに

農業分野での光利用については、従来からキクやイチゴへの電照が広く普及している。さらに日射量の少ない時期における補光も太陽光併用型植物工場などで使われている。一方、食の安全・安心が求められる中で、無農薬・減農薬栽培のニーズはますます高まってきている。このため最近では、農薬散布を抑えながら、耕種的、生物的、物理的防除を取り入れることで環境への負荷を軽減した IPM (Integrated Pest Management: 総合的病害虫管理) 防除の普及が進んでいる¹⁾。IPM 防除における光利用技術としては、黄色光や緑色光で夜蛾類の夜間の活動を低下させる防蛾灯が積極的に取り入れられるようになった。さらには、特定波長の光を用いて植物の病害を防ぐ、いわゆる『光防除』についても、紫外線蛍光ランプや青色発光ダイオード(LED)を利用した病害防除などいくつかの取り組みが行われている²⁾。我々は、緑色光を植物に照射することにより病害を防除できることを見出し、イチゴ炭そ病をはじめとする各種植物病害に対して防除効果があることを明らかにしたので、ここに紹介したい。

2. 緑色光照射による病害防除の仕組み

植物へ単色光を照射した場合の反応については、これまで非常に多くの研究がなされている。植物はクロロフィルなどの集光色素のほかに、光センサーとしてクリプトクロムやフォトトロピンなど青色受容体とフィトクロムなど赤色受容体を持ち、これらは葉緑体光定位運動、気孔開口、光周性花成誘導など各種光反応のセンサーとして機能していることが明らかになっている³⁾。一方、植物は、病害、虫害、温度、水分など様々なストレスを受けると、自ら各種の生体防御反応を起こすことが知られている。植物に病害抵抗反応を誘導する活性をもつ物質は総称してエリシター (Elicitor) と呼ばれ、植物病原菌の細胞壁の分解物などの生物学的エリシターと重金属や界面活性剤などの非生物学的エリシターとに分類され、紫外線もエリシターの活性を持つことが知られている⁴⁾。我々は非生物学的エリシターとして光にターゲットを絞り、安全性や農業資材などへの影響を考慮して、可視光の利用可能性を検討した。

我々は、まず LED から発する各種波長の光をトマトの幼苗に照射し、病害抵抗性に関わる各種遺伝子の発現を調べた。その結果、病害抵抗性にも関与すると言われている植物ホルモンの一種であるジャスモン酸の生合成に必要なアレノキシドシンターゼ (AOS) 遺伝子が、緑色

ISHIDA Yutaka, KUDO Rika, YAMAMOTO Keiji,
SUEKANE Ayako, KOMATSU Seiji
〒761-0192 香川県高松市屋島西町2109-8

光を照射した際にのみ特異的に発現することを見出した (図 1)。また、キチナーゼなど各種 PR タンパク質の遺伝子発現も誘導されることを確認した。さらに、イネを対象に DNA マイクロアレイを用いて緑色光照射により発現量が増大する遺伝子を調べた。その結果、UV-B、熱、浸透圧、水分などに対する各種ストレス関連遺伝子、Zn finger 蛋白質、WRKY6⁴⁾、DRE 結合蛋白質⁵⁾、CIGR1⁶⁾などの各種転写因子、MAPKKK などのプロテインキナーゼ類、RPR-1⁷⁾、 β -1,3-グルコナーゼ、パーオキシダーゼ、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL)、リポキシゲナーゼ (LOX) など各種病害抵抗性に関わる遺伝子の発現量が緑色光照射により増えることが確認された。このことから、これまで植物の光合成にはあまり寄与しないということで注目されていなかった緑色光の照射が、植物に対して一種の適度なストレス刺激となり、病害抵抗性の誘導を引き起こすのではないかと推察される。

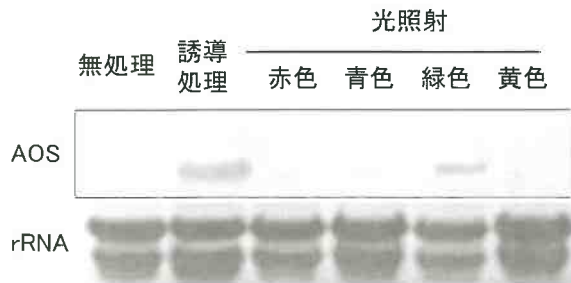


図 1 光照射によるトマトAOS遺伝子の発現誘導
 無処理：暗所放置，誘導処理：傷処理，
 光照射：LEDによる照射

3. 緑色光照射による防除効果

緑色光照射により病害抵抗性に関与する遺伝子の発現が誘導されることが明らかになったため、実際の植物病害に対してどの程度の抑制効果があるかをキュウリ炭そ病発生系により調べた。キュウリの幼苗に LED を用いて青色光、緑色光および赤色光をそれぞれ単独で照射した後、キュウリ炭そ病菌 (*Colletotrichum orbiculare* NBRC33130) の分生子懸濁液を葉面接種し、一

定条件に設定したグロースチャンバー内で栽培した。2 週間後、キュウリの子葉における病斑の発生状況を観察した。その結果、青色光および赤色光を照射しても病斑の発生は抑制されず、緑色光照射のみによって有意に病斑の発生が抑制されることが明らかになった (図 2)。

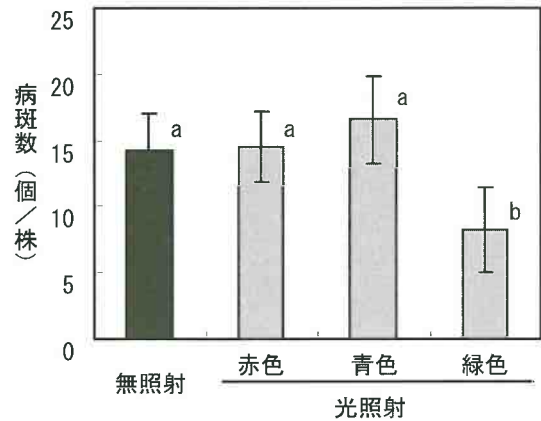


図 2 キュウリ炭そ病に及ぼす光照射の影響
 異なる英文字の間にはTukeyの多重比較法により
 5%水準で有意差があることを示す。(n=9)

次に、栽培現場での防除ニーズが大きいイチゴ炭そ病への効果について検討した。イチゴは収益性の高い農作物の一つとして全国的に栽培が盛んであるが、昨今重大な問題となっているのが、イチゴ炭そ病である。これはイチゴの育苗時から本圃において、特に高温多湿時期に多発して株を枯死させる病害である。感染力が強く病状の進行も早いうえ、農薬耐性の炭そ病菌も出現しており、イチゴ栽培における最重要病害 (Key Pest) と言われている。そこで、イチゴ炭そ病に対する緑色光照射の効果を調べた。キュウリ炭そ病の防除試験の場合と同様、イチゴの組織培養苗に LED を用いて光照射した後、イチゴ炭そ病菌 (*Glomerella cingulata* NBRC6425) の分生子懸濁液を葉面接種し、一定条件下のグロースチャンバー内で栽培した。2 週間後、葉面におけるイチゴ炭そ病の病斑を観察した。その結果、無照射区ではイチゴ炭そ病の発生が著しく、2 週間後には株はすべて枯死した。これに対して、緑色光照射区のイチゴは炭そ病の病

斑の発生が著しく抑制される傾向が認められ、株はすべて生存していた (図3)。さらにイチゴ葉面に形成された病斑数を計測した結果、緑色光照射のみによって有意に病斑の発生が抑制されることがわかった。病害防除効果の高い最適

な緑色光照射条件を検討した結果、これまでのところ、光量子量: $80\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 照射時間: 夜間2時間, 照射間隔: 3日に1回であることが明らかになっている。

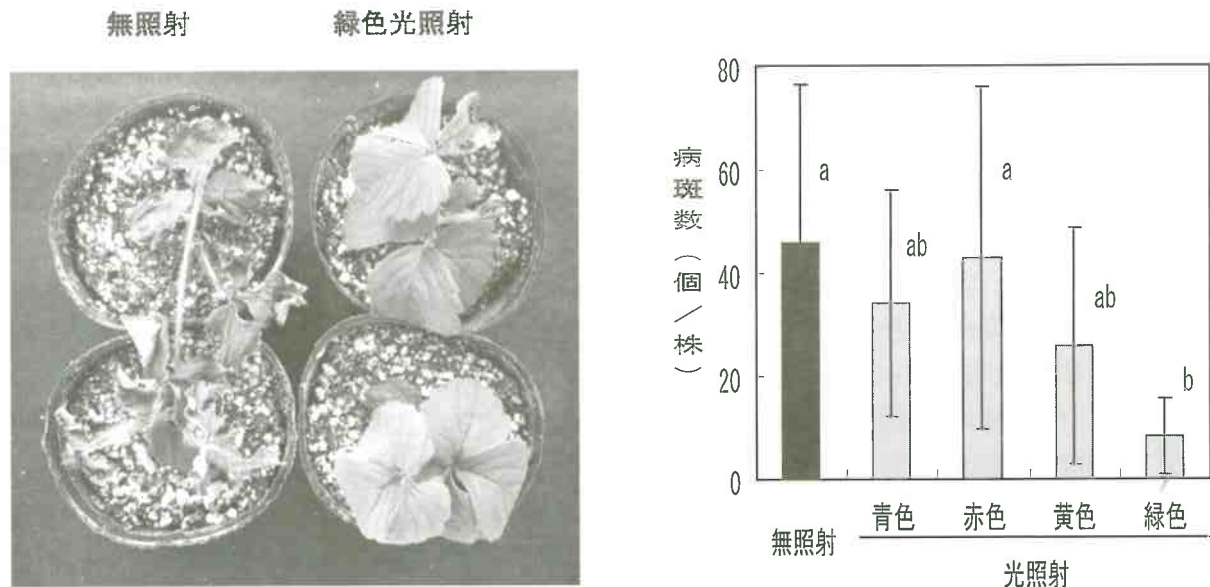


図3 イチゴ炭そ病に及ぼす光照射の効果

異なる英文字の間にはTukeyの多重比較法により5%水準で有意差があることを示す。(n=5)

次のステップとして、本技術の実用性を見極めるために、実際のイチゴ栽培現場において緑色光照射の効果を調べた。イチゴの育苗時および本圃栽培時に、緑色LEDや緑色蛍光灯、緑色メタルハイドランプを用いて、上記照射条件にて緑色光を照射しながら栽培し、イチゴ炭そ病の発生率を無照射区と比較した (図4)。四国内の数カ所で試験を行った結果、いずれの試験地でもイチゴ炭そ病の発生率が1/3から2/3に低減できることが確認できた。また、イチゴ炭そ病の保菌状況調査に用いられるエタノール浸漬簡易診断法⁸⁾により炭そ病保菌率の推移を調べた結果、緑色光照射により保菌率が抑制される傾向が認められ、発病リスクが低減できることが明らかになった。このことから、親株の管理・育成段階や育苗段階で緑色光照射を行うことにより、その後の病害発生を低減できる可能性が示唆された。

4. 果菜類及び花卉類への適用拡大

果菜類全般に対して被害を及ぼす重要病害として灰色かび病を対象とした。灰色かび病の原因となる灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) は寄生範囲が広く、ほとんど全ての植物に感染する。薬剤耐性を示す灰色かび病菌も出現しており、耐性菌に有効な薬剤が登録されても数年でその薬剤に耐性菌が出現することもあり、現場での防除が困難な病害となっている。

そこで、果菜類の灰色かび病に及ぼす緑色光照射の効果を明らかにするために、ピーマン、トマト、ナスの幼苗を対象に、灰色かび病に対する防除効果を調べた。すなわち、各種果菜類の幼苗にLEDを用いて各種照射条件で緑色光を照射後、灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea* NBRC9760) を感染させ、イチゴ炭そ病などと同様に病害の

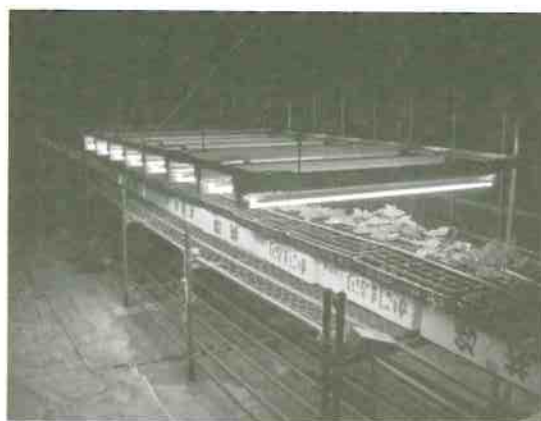


図4 イチゴ育苗ハウスでの緑色光照射状況

発生状況を調査した。その結果、いずれの果菜類においても緑色光照射により灰色かび病の発生が約半分に抑制された。また、最適な光照射条件は、イチゴ炭そ病への最適照射条件とほぼ同じであった。以上の結果から、果菜類全般に対して被害を及ぼす重要病害である灰色かび病の発生が、緑色光照射により抑制できることが明らかになった。

あわせて、花卉類の炭そ病に及ぼす緑色光照射の効果を調べた。花卉類は出荷時の形態により切花と鉢花に大別される。このうち鉢花は観賞用として根強い需要があるが、種子をはじめとする多くの栽培資材が海外から輸入されていることなどから病害の防除が十分でないケースが見られる。特に新規に海外から導入された品目では登録農薬がないため有効な防除手段がないことも多い。そこで、従来から安定した需要があるシクラメンと国内で新規に栽培が始まっているチェッカーベリーを対象に緑色光照射の効果を調べた。すなわち、発病の状況から炭そ病を保菌していると考えられる苗を用い、イチゴ炭そ病と同様の照射条件で緑色光を照射しながら、育苗用のパイプハウス内において栽培を行い、発病を経時的に観察した。その結果、シクラメンとチェッカーベリーのいずれにおいても炭そ病と考えられる発病が約半分に低減した。また、イチゴと同様にエタノール浸漬簡易診断法⁸⁾により炭そ病保菌率の推移を調べた結果、

緑色光照射により保菌率が抑制され、発病リスクが低減できることが明らかになった。

5. おわりに

以上のように、緑色光照射による植物病害防除技術は、農作物に緑色光を照射するだけで病害発生を低減できる画期的な方法と言える。農薬のように登録の必要や安全性の問題もないため、農薬登録のない新規作物や農薬の使用が制限される植物工場への利用も可能であり、幅広い農作物を対象とした早期実用化が期待できる。当研究所で開発した緑色光照射を利用した病害防除システムは『みどりきくぞう』と命名し、まずイチゴ育苗向けの病害防除システムとして商品化を進めている。今後はさらに、イチゴ栽培圃場向けやイチゴ以外の農作物についても実証試験等を進め、広く普及を図っていきたいと考えている。また、これを契機として、農業分野での光利用が一層進展することを期待したい。

謝 辞

本研究は、四国電力(株)からの委託を受けて実施した。研究の実施に際して様々なご協力をいただいた関係者の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) 梅川學ら (2005), IPM マニュアル, 養賢堂, 東京
- 2) 現代農業編集部 (2009), 現代農業, 88 (6), 168-171.
- 3) 松岡大介ら (2006), 生物物理, 46(6), 324-329.
- 4) Robatzek, S. et al. (2001), *The Plant J.*, 28(2), 123-133.
- 5) Dubouzet, J.G. (2003), *The Plant J.*, 33(4), 751-763.
- 6) Day, R.B. (2003), *Biochim. Biophys. Acta*, 1625(3), 261-268.
- 7) Sakamoto, K. (1999), *Plant Mol. Biol.*, 40(5), 847-855.
- 8) 石川成寿 (2005), 栃木県農業試験場研究報告, 第 54 号, 1-187

◀国内情報▶

イチゴの植物工場的な生産を可能とする移動栽培装置

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

林 茂彦・齋藤貞文・山本聡史

イチゴの栽培ベッドを通路がない状態で並べ、縦横の2方向に循環移動させる移動栽培装置を開発した。慣行の高設栽培では栽培ベッドの間に幅90cm程度の通路が必要だが、この装置では作業者は一定の場所で定植や収穫ができる。栽植密度は15,300株/10aで慣行のおよそ2倍程度であった。促成栽培に加え、冷蔵苗や四季成り品種を組み合わせることで、イチゴの植物工場的な周年生産が期待される。

1. はじめに

平成19年におけるイチゴの栽培面積は6,580ha、出荷量は173,000t、卸売価額は1,657億円であり、野菜の中でも主要な作目の一つである。しかし、栽培農家の栽培面積は一戸あたり30a弱で、10aあたり2,000時間近くの労働時間を費やしているにもかかわらず、収量は3~5t/10a程度に留まっているのが現状である。また、イチゴの作型は、促成栽培、半促成栽培、露地栽培、抑制栽培に大別されるが、その生産のほとんどは、一季成り性品種の苗を9月に定植し12月から翌年5月頃まで収穫を続ける促成栽培であり、この促成栽培では、気温、日射量の低下する時期に着果負担が増し、さらに休眠の誘導が重なって草勢管理が難しく、環境制御や肥培管理などの高度な栽培技術を要する。イチゴは周年的な需要があるにもかかわらず、この作型では夏秋期の生産は不可能であるため、短日処理技術の開発や四季成り性品種の導入が模索されているが、品質や収量の点に課題が残されており、夏秋期の需要を満たすまでには至っていない。

そこで、長期株冷蔵苗の短期植え替えによる
HAYASHI Shigehiko, SAITO Sadafumi,
YAMAMOTO Satoshi
〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

夏秋どり技術と、それに適した高密植移動栽培技術を組み合わせた栽培システムを開発することにより、イチゴの植物工場的な生産、つまり栽培の周年化と収量の向上に取り組んできた。ここでは、栽培システムの概要、およびハードウェアの中心となる高密植移動栽培装置について紹介する。

2. 周年生産システムの開発構想

周年生産システムの開発構想を図1に示す。開発要素は、①高密植移動栽培装置、②冷蔵苗の養成技術、③移動栽培に適した養液栽培技術の3つに大きく分けられる¹⁾。

高収量を実現するための最も直接的なアプローチは単位面積あたりの栽植本数を増加させることである。本システムでは、栽培ベッドを縦方向と横方向に循環移動させる装置を開発することにより、栽培ベッド間の通路をなくし栽植本数の増大を実現する。さらに、促成栽培に加え、短期間で植え替えて夏秋期にも収穫可能な冷蔵苗を組み込むため、一季成り性品種における冷蔵特性を解明する。また、移動栽培装置では点滴チューブ等が使えないことから、底面給水を中心とした養液栽培管理技術を開発する。

3. 移動栽培技術

栽培ベッドの移動方法としては、栽培ベッドを立体的に配置し上下移動させる方法と、栽培ベッドを平面的に循環移動させる方法がある²⁾。前者の方法では栽植本数の飛躍的向上が期待できるものの、受光量が不均一になりイチゴの場合株あたりの収量を維持することが難しいこと

から、後者の方法を採用した。栽培ベッドを循環移動させることで、栽培スペースと作業スペースを分離でき、作業スペースに日除けや冷暖房を備えることで作業環境の改善が容易である。また、作業者が一定の場所で定植や収穫作業を行えることから、作物や資材の運搬および作業者の移動時間短縮などの作業性の向上や軽労化も期待できる。

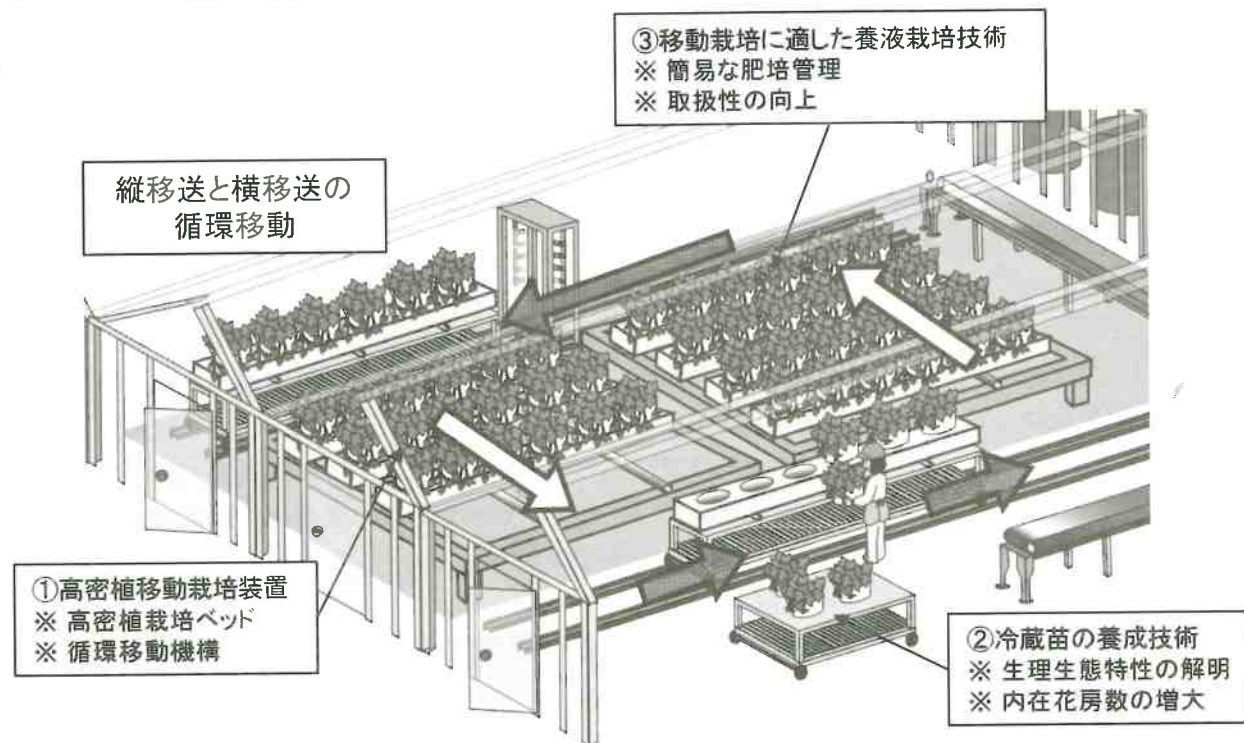


図1 イチゴ周年栽培システムの開発構想

4. 基本モデル

イチゴの平面的な移動栽培の可能性と技術課題を把握するため、高密度植移動栽培装置の基本モデルを試作した³⁾。基本モデルは、主に栽培ベッドを縦方向に移動する縦移送ユニット2台、縦移送ユニットから押し出された栽培ベッドを隣の縦移送ユニットまで運ぶ横移送ユニット2台、頭上かん水ユニット、底面給水ユニット、ゲート型の防除ユニットおよび制御ユニットから構成される(図2, 図3)。また、イチゴを養液栽培するための栽培ベッドが、各縦移送ユニットに8台(計16台)、横移送ユニットに1台、合わせて17台積載できる。この栽培ベッドは底

面給水用栽培槽の塩ビ被膜C型鋼(長さ2.2m)に底面給水ポット13個を配置した構造で、ベッド下部の車輪によって縦移送ユニット上を移動する。

栽培ベッドの移動方法は、横移送ユニットが停止している状態(初期状態)で作業者が操作ボタンを押すと、栽培ベッドを載せた横移送ユニットAと何も載せていない横移送ユニットBが同時に右端まで移動する。移動後、横移送ユニットA上の栽培ベッドは、縦移送ユニットBの引き込み部によって、縦移送ユニットBに乗り移る。この時、縦移送ユニットBにある8台の栽培ベッドは、乗り移った栽培ベッドによって順次押し込まれ、反対側にある横移送ユニッ

トBに最も近い栽培ベッドが横移送ユニットBに乗り移る。横移送ユニットBは栽培ベッドを積載後、横移送ユニットAと共にユニットの左端まで移動する。縦移送ユニットAも縦移送ユニットBと同様の引き込み部を有し、横移送ユニットBにある栽培ベッドを縦移送ユニットAに引き込むことにより、横移送ユニット側の栽培ベッド1台が横移送ユニットAに乗り移り初期状態に戻る。これら一連の動作を1サイクルとし、サイクル動作を繰り返すことにより栽培ベッドは循環移動する。

装置の動作試験および栽培試験を行い、制御プログラムによる頭上かん水や底面給水の自動化と防除ユニットによる散布性能等の基本性能を把握した。しかし、1サイクルに約72秒の時間を要し、作業を行う際には待機時間の占める割合が多いことから、移送時間の短縮が課題として残った。また、栽培時の栽植密度については12,500株/10a程度で、慣行高設栽培の7,000~8,000株/10aと比較して、1.5倍程度の密植栽培が可能であった。

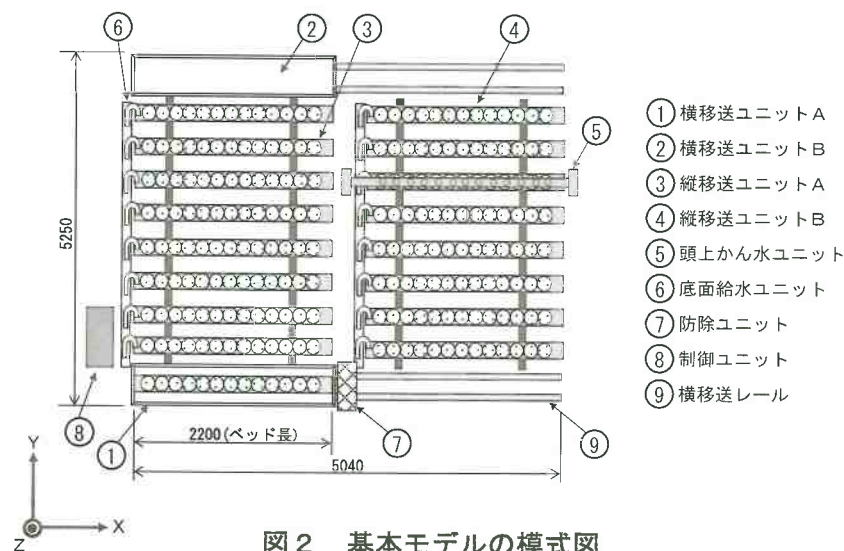


図2 基本モデルの模式図



図3 基本モデルの全体図

5. 低コストモデル

1) 装置の改良

低コストモデルは、基本モデルから得た技術

知見を生かしたうえで、実用化および大規模化を考慮して、主に①使用資材、②移送方法、③養液供給の3点について改良を行った⁴⁾。

①について、構造部材として使用していたアルミ構造材(45×45mm)を農芸用鋼管(φ31.8mm)に変更することにより低コスト化を図った。縦移送ユニットは、引き込み用スライドモータ、回転モータ2基、引き込み棒2本で構成され、引き込み棒には500mm間隔で引き込み用フックを取り付けた(図4)。また、栽培ベッドの改良も行い、農芸用鋼管のフレームに塩ビ被膜C型鋼(長さ4.2m)を固定し、その上にイチゴ用プランタを4個載せる構造とし、フレーム下部に車輪を固定した。

②については、横移送ユニットが往復動作し栽培ベッドを搬送する方法から、平ベルトコン

ベアによる一方向搬送に改良した。平ベルトコンベアはベルト幅 0.3m, 長さ 9m, 搬送速度は 2.5~10.5m/min であり, コンベアの終端にはリミットスイッチが取り付けられており, 栽培ベッドがこれに接触することでコンベアは停止する。また, 縦移送方法に関して, 左右の縦移送ユニットが交互に栽培ベッドを移送する方法から, 左右同期して移送する方法に変更した。縦移送ユニットでは, 栽培ベッドの移動および横移送ユニットからの引き込みを上述の引き込み棒で行う(図4)。引き込み棒は回転モータにより 90° 回転してフックの起立と倒伏を行うとともに, 引き込み用モータにより前後にスライドする。

③については, 地上部給液の方法を変更した。栽培ベッドは循環移動する中で必ず定点を通過することから, 横移送ユニットの中央にシャワーノズルを設置し, 栽培ベッドの移送中に給液する方法を採用した。基本的には, 底面給液と地上部給液を併用し, 余剰液を再利用する循環方式である。

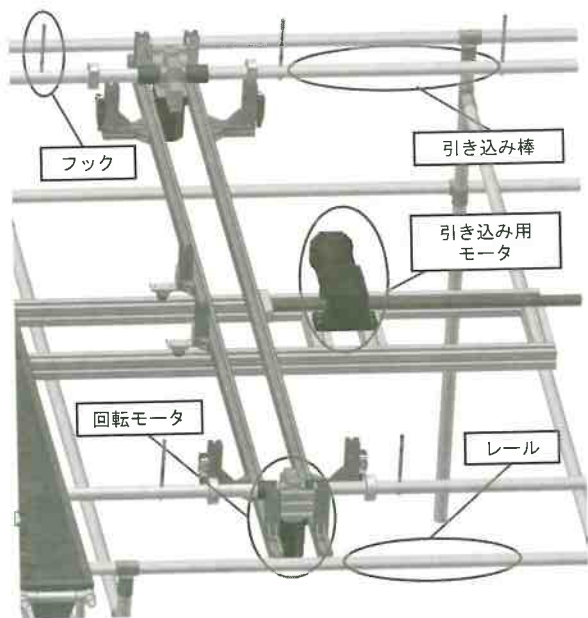


図4 低コストモデルの縦移送機構

2) 循環移動動作

低コストモデルの基本動作は以下の通りである。栽培ベッドが横移送ユニット上の初期位置からスタートとする。左右の縦移送が開始し,

横移送ユニット上の栽培ベッドは縦移送ユニットに引き込まれる。この時, 縦移送ユニット上の栽培ベッドは, 乗り移った栽培ベッドと共に 1 台分ずつ押し込まれ, 反対側にある横移送ユニットに最も近い栽培ベッド 1 台が, 横移送ユニットに乗り移る。横移送ユニットは, この栽培ベッドを反対側の端まで移動させる。これにより装置は, 栽培ベッドが 1 台分ずつ動いた最初の状態に戻る。このサイクル動作を繰り返すことにより栽培ベッドは循環移動する。

3) 装置性能

試作した低コストモデルの大きさは縦 10.8m×横 9.6m (約 1.0a 規模) で, 宮城県農業・園芸総合研究所に設置した。栽培ベッド (長さ 4.2m) を各縦移送ユニット上に 20 台 (計 40 台), 横移送ユニットに 2 台, 合わせて 42 台積載できる (図5)。移送方法の変更により 1 サイクルに要する時間は約 58 秒に短縮され, 作業中の待機時間の割合も減少した。

1 台の栽培ベッドには株間 12cm で 32 株のイチゴが定植でき, 栽培ベッド間隔は 50cm であることから, 栽植密度は 15,300 株/10a 程度と慣行の高設栽培の約 2 倍の高密植栽培が可能であった。定植, 下葉取り, 収穫などの作業を, 横移送ユニット上の定位置で行えることを確認した。なお, 定植作業の作業能率はおよそ 200 株/h・人で, 慣行高設栽培と同程度であった。



図5 低コストモデルによるイチゴの栽培

6. おわりに

イチゴの栽培ベッドが循環移動することで高密度な栽培が可能となるイチゴ移動栽培装置を開発した。促成栽培作型で1月末までの収量は株あたり80g程度(章姫)であり、現在栽培試験を継続中である。促成栽培に加え冷蔵苗や四季成り品種を組み込むことにより、植物工場的な周年生産技術の確立に寄与することを期待したい。

謝 辞

本研究は、農林水産省の「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」のもと、東北

農業研究センター、宮城県農業・園芸総合研究所、大阪府立大学、(株)誠和と共同で実施した。

参考文献

- 1) 林茂彦ら(2008), 日本生物環境工学会講演要旨, pp.310-311
- 2) 中村謙治(2003), 施設園芸ハンドブック, 五訂版, 植物工場の実例, 289-295, 日本施設園芸協会, 東京
- 3) 吉田啓孝ら(2008), 農業機械学会誌, 70(4), 98-106
- 4) 齋藤貞文ら(2008), 日本生物環境工学会講演要旨, pp.312-313

◀地域先端研究▶

ナガイモにインフルエンザウイルスの感染抑制作用 タンパク質成分（デオスコリンA）があることを発見

¹青森県環境保健センター，²弘前大学教育学部，³弘前大学地域共同研究センター，
⁴青森県工業総合研究センター弘前地域技術研究所，⁵（株）ミリオン

三上稔之¹・畑山一郎¹・加藤陽治²・伊藤聖子²・工藤重光³・
市田淳治⁴・奈良岡馨⁴・柴田浩夫⁵・小田桐弓芽乃⁵

ナガイモ (*Dioscorea batatas*) 抽出液には、試験管内試験においてインフルエンザウイルスの感染を抑制することが確認され、その成分は、60℃1時間では機能を保持し、極端な酸性 (pH4.0) やアルカリ性 (pH9.5) では失活する。成分の特定では、精製物のアミノ酸配列から抗ウイルス活性の本体は、ナガイモのデオスコリンA 様貯蔵蛋白質と称すべき物質である事が明らかになった。ナガイモの抗ウイルス活性機能を維持した加工食品を開発した。今後、作用機序等の研究により広範な利用が期待できる。

1. はじめに

ナガイモは、ヤマノイモ科ヤマノイモ属に属するヤマイモの一種¹⁾であり、各種の消化酵素を含むことから生食できる唯一のイモとして、古くから消化促進、滋養強壮に良い食べ物として食されてきた。また、漢方でも「山薬」として強精・糖尿病・心臓病等に効果があるとして利用されている。国内における生産量は青森県が最も多く、平成19年度は62,800tで全国生産量の4割を占めている。青森県では、平成14年度から16年度までの3年間にわたって、「知」の結集プロジェクト研究推進事業を実施したが、この事業のひとつである「県産農水産物を活用

MIKAMI Toshiyuki¹, HATAYAMA Ichiro¹, KATO Yoji², ITO Seiko², KUDO Shigemitsu³, ICHITA Junji⁴, NARAOKA Kaoru⁴, SHIBATA Hiroo⁵, ODAGIRI Yumeno⁵

¹〒030-8566 青森市東造道一丁目1番1号

²〒036-8560 弘前市文京町1番地

³〒036-8561 弘前市文京町3番地

⁴〒036-8363 弘前市袋町80

⁵〒030-0962 青森市佃1丁目6-14

した産業振興モデル」の研究において、青森県環境保健センターと弘前大学地域共同研究センターは、試験管内試験においてナガイモ抽出液にインフルエンザウイルスの感染を抑制することを見出したが、成分の特定に至らなかった²⁾。平成18～19年度に産学官連携共同研究開発重点化事業が再開され、ナガイモのインフルエンザ感染抑制機能成分の特定と加工食品化に関する研究が行われた。

2. インフルエンザウイルスの感染抑制

図1のように、ナガイモ抽出液はAソ連型インフルエンザウイルスであるA/Yamagata/120/86 (H1N1)に加え、A香港 (H3N2) 型やB型ウイルスによる細胞変性効果 (CPE) を抑制した。また、最近、流行したAソ連型ウイルスである分離株 A/Aomori/13/05 (H1N1) についても CPE の抑制が認められた。しかし、ムンプスウイルス、エンテロウイルス (エコー9型)、単純ヘルペスウイルス1型、アデノウイルス6型などインフルエンザウイルス以外の感染増殖には影響しなかった。このことは、ナガイモ抽出液はイ

ンフルエンザウイルスに特異的な感染・増殖抑制物質を含んでいることが示唆された。

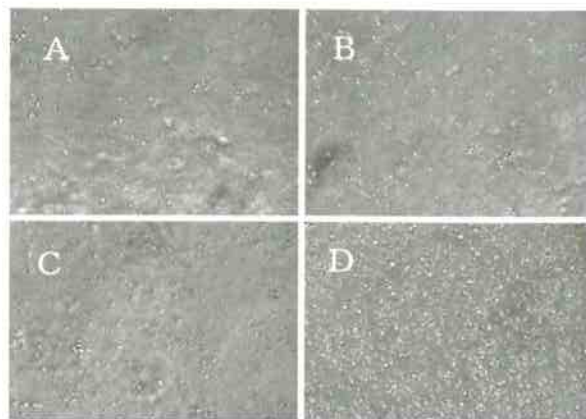


図1 ナガイモ成分によるウイルス感染・増殖抑制

ナガイモ抽出液によるAソ連(H1N1)型インフルエンザウイルス感染による細胞変性の抑制

A：ウイルス未感染細胞 B：ナガイモ抽出液
 C：抽出液とウイルスの混合液 D：ウイルス液

3. ナガイモ成分の機能安定性

ナガイモ抽出液の抗インフルエンザウイルス

活性の熱安定性については、図2のように、60℃、1時間では若干の白濁が認められたものの、抗ウイルス活性は充分に残っていた。しかし、70℃、1時間や5分間の煮沸のような高温処理では強い白濁と共に、完全な失活が確認された。また、25℃での保存では少なくとも6ヶ月間、機能は安定であった。次にpH安定性については、少なくともpH 5.8 - 7.6の間では長期間安定であったが、極端な酸性(pH 4.0)やアルカリ性(pH 9.5)にすると失活した。なお、ナガイモの粗抽出液はpH 5.8であった。

実験には、抽出液とウイルス液を混和し、十分な接触時間(60分)を置いた後に使用していたが、抗ウイルス活性の有効接触時間について調べた結果、実験操作において最も短い時間である接触1分間で、接触60分と同等の抗ウイルス活性が認められ、ナガイモ抽出液の抗ウイルス活性は即効性であることが判明した。次に、抽出液の凍結乾燥品を蒸留水に溶解した後、ウイルス感染抑制実験に使用したところ、凍結乾燥前と同様の抗ウイルス活性が認められた。これは、当該機能成分は乾燥に強いことを示す。また、超音波処理により、粘性を取り除いても機能は維持されていた。

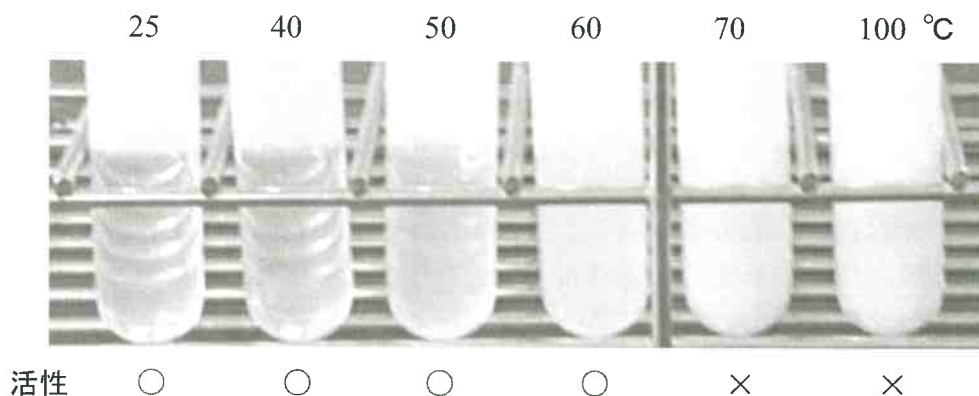


図2 ナガイモ抽出液の抗インフルエンザウイルス活性の熱安定性
 処理時間は、70℃までは1時間、100℃では5分間

4. ウイルスへの作用成分濃度

定量的にウイルスをプラーク形成法により、

ナガイモ抽出液の抗ウイルス活性を測定した。結果は、抽出液蛋白 0.03 mg は 20 個のインフルエンザウイルスの感染を阻害することを示した。

ヒトの1回のくしゃみ・咳で約1,000,000個のウイルスが飛散し、近傍のヒトにその1%である10,000個が吸入されるとすると、感染を抑えるには計算上15mgの蛋白質を必要とする。ナガイモ抽出液の蛋白濃度は約20mg/mlである事から、1ml（凍結乾燥物では、さらに少量にできる）で感染抑制が期待される。

ナガイモ抽出液の抗ウイルス活性の分子機構については、現在のところ明らかではない。し

かし、電子顕微鏡では、図3に示すように、抽出液との接触によりインフルエンザウイルスの外殻が不鮮明になり、スパイク構造の損壊を示唆する像が観察された。このようなウイルス形態の変化が感染抑制と関連しているものと思われる。また、抽出液による培養細胞（MDCK細胞）処理・洗浄後のウイルス感染操作ではCPEが認められるため、ナガイモ抽出液はウイルスに直接作用している事がわかる。

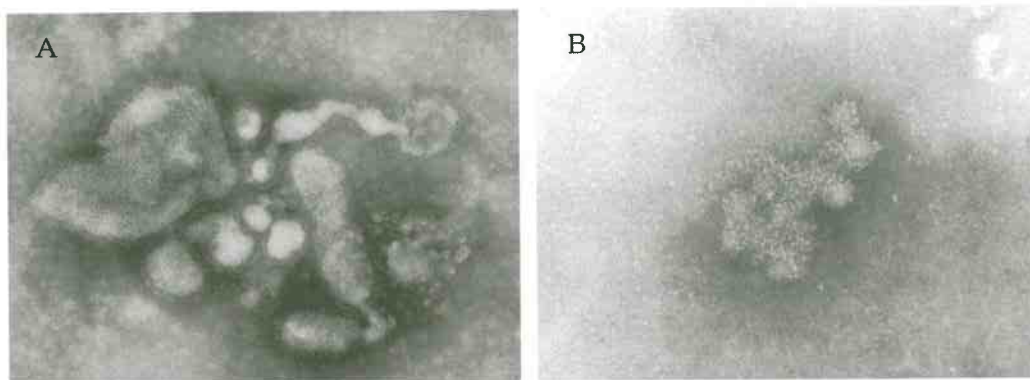


図3 ナガイモ抽出液によるインフルエンザウイルスのスパイクの消失

- A. 抽出液と接触前；ウイルス不定形の楕円で、外殻にスパイクをもつ
B. 抽出液と接触；スパイクが消失

5. 機能性成分の特定

機能成分特定に関して異なる精製法で取り組んだ。NaClの段階溶出と濃度勾配溶出を用いたDEAE cellulose column chromatographyである。はじめに、50mM, 100mM, 1M NaClの段階溶出では、図4のように、4つの画分が得られたが、F1とF4の最大吸収は265nm付近にあった。抗ウイルス活性は50mM NaCl溶出画分（F2）にのみ検出された。

各画分の蛋白質20 μ gは、SDS電気泳動パターンにより、F2とF3に分子量33,000のバンドが認められた。しかし、詳細にみると、活性のないF3には、33,000と32,500の2つのバンドが存在していた。

さらに、同カラムでF2のNaCl濃度勾配によ

る溶出を試み、抗ウイルス活性は40 mM NaClで溶出されるF2-1に確認された（図5）。

活性画分F2-1のMALDI/TOF-MSによる解析の結果、蛋白質の分子量は、27,590と算定された。また、回収率から、F2-1は少なくとも粗抽出液総蛋白の約20%を占め、当該物質はナガイモに大量に含まれていることを示す。F2-1のEdman分解によるアミノ末端の配列は、既報³⁾のナガイモ貯蔵蛋白質DB2（DB3Sとは、アミノ末端の配列が同じだが、chromatographyにおける挙動が異なる）と同一である事を示した。また、*Dioscorea alata*の貯蔵蛋白質Dioscorin Aと高い相同性をもつ事から、抗インフルエンザウイルス活性の本体は、ナガイモ（*Dioscorea batatas*）のDioscorin A様貯蔵蛋白質と称すべき物質である事がわかった。

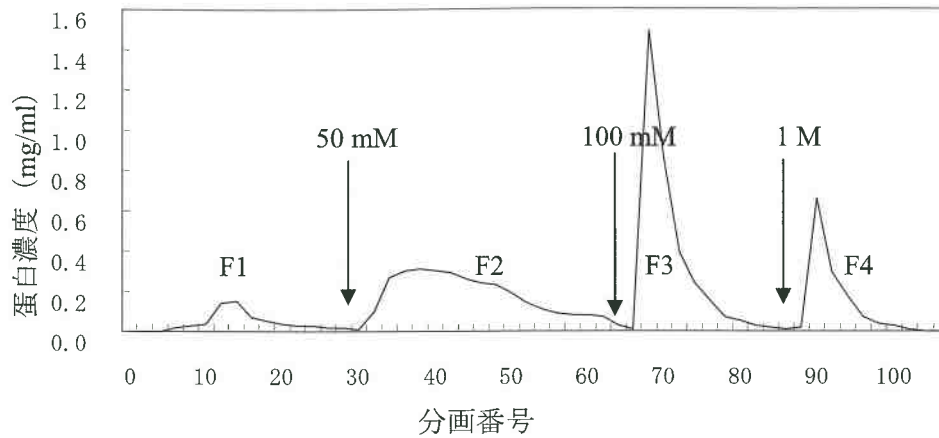


図4 ナガイモ抽出液のDEAE cellulose column chromatography (NaCl段階溶出)

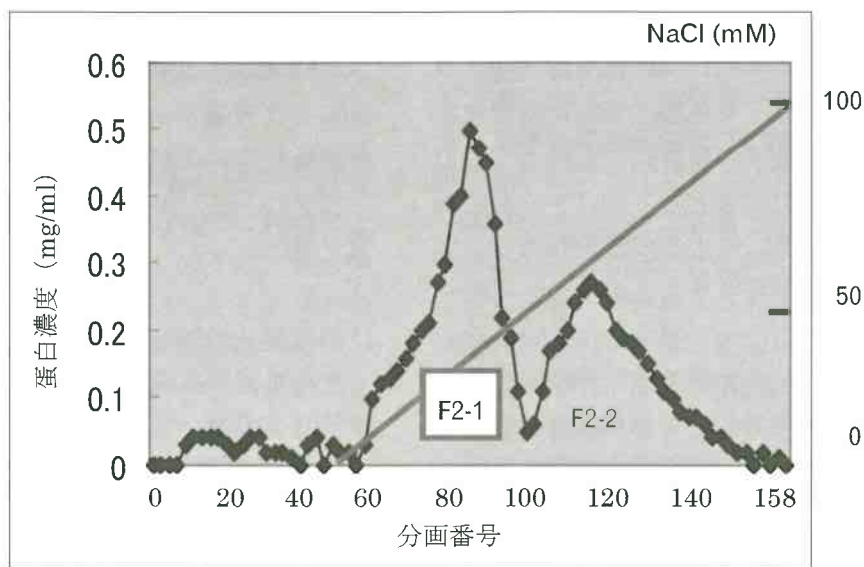


図5 ナガイモ抽出液のDEAE cellulose column chromatography (NaCl濃度勾配溶出)

6. 加工食品の試作

ナガイモが有する抗インフルエンザウイルス活性を保持した食品開発を目的に、試作実験を行った。抗インフルエンザウイルス活性発現は、ナガイモ活性成分がインフルエンザウイルスに直接作用し、細胞を包み込むようにする²⁾ことで感染を抑制していることが明らかになっている。したがって、開発食品としては、口からのインフルエンザウイルスの感染を予防する食品であり、そのためには直ぐに飲み込むような食品ではなく、口中に長く留まることで効果を発揮させるような食品が適当と考え、グミやキャ

ンデー、トローチ、錠剤（タブレット）などを開発候補食品とした。しかし、活性成分がタンパク質であることから、加熱処理や極端な pH 変化を伴う製造方法には注意が必要である。以下に、錠剤、ラムネ菓子（錠菓）、キャラメルゼリーの試作品を開発した（図6）。試作品については、複数の添加物（ペクチン分解物製剤、ニンニク抽出物、ビタミンC等）を含むことから、添加物等が品質に与える影響について、1ヶ月間20℃と36℃の温度条件下で、経時的に調べ、製造直後の品質と代わりがないことと、抗ウイルス活性機能も保持され、安定した品質の試作加工食品であることを確認した。



錠剤

ラムネ菓子

キャラメルゼリー

図6 ナガイモの試作品

7. おわりに

本研究は、ナガイモに付加価値を付けてナガイモや規格外品ナガイモを加工食品に利用することにより、ナガイモの消費拡大を図ることを目的とした。研究の成果としてナガイモを使用したインフルエンザに対する作用を利用したナガイモ加工食品を開発することができ、その一部については、商品として発売されている。

今後、抗インフルエンザ効果の作用機序について、さらなる研究が必要であり、その研究成果によっては、新たな応用範囲の拡大が期待できる。

謝辞

本研究の推進にあたり多大なご尽力をいただきました青森県商工労働部 新産業創造課の関係職員各位に深謝いたします。

文献

- 1) 西村繁夫(1993),新版食品工業総合事典,日本食品工業学会編,.1276
- 2)「知」の結集プロジェクト研究推進事業「青森県産農水産物を活用した産業振興モデル」(2005), 成果報告書
- 3) Gaidamashvili,M.et al.(2004).*J.Biol.Chem.*, 279, 26028-26035

◀文献情報▶

未経産牛由来卵子へのコルセミド処理は、核移植胚の発生率、受胎率及び分娩率を向上させる

Colcemid-Treatment of Heifer Oocytes Enhances Nuclear Transfer Embryonic Development, Establishment of Pregnancy and Development to Term.

G. Li¹, K.L. White^{1,2}, K.I. Aston^{1,2}, T.D. Bunch¹, B. Hicks³, Y. Liu¹ and B.R. Sessions^{1,2}

¹Department of Animal, Dairy and Veterinary Sciences, Utah State University, Logan, Utah.

²Center for Integrated BioSystems, Utah State University, Logan, Utah. ³J.R. Simplot Company Cattle Reproduction Facility, Boise, Idaho.

Molecular Reproduction and Development, 76, 620–628 (2009)

核移植に用いるレシピエント細胞質としては、減数分裂第2分裂中期(M-2)のもの利用がよいと考えられている。M-2期の卵子は、ドナー細胞のリプログラミングに重要な働きを示すと考えられる卵成熟促進因子(MPF)活性が高い。MPF活性は、M-1期の卵子においても高いことが知られており、また、微小管の重合阻害剤であるコルセミド処理により、卵子のMPF活性が高まることも報告されている。そこで、本論文においては、1)コルセミド処理による卵子からの除核率の向上、2)核移植のレシピエント細胞質として、第1極体を持たない卵子利用の可能性、3)コルセミドの濃度と処理時間が核移植胚の発生率に及ぼす影響、4)コルセミド処理卵子の半限定培地による胚発生率向上の有無、5)胚移植後の核移植胚の生体内での発生能等を明らかにするために実験が実施された。まず、レシピエント卵子の成熟時間を変えてコルセミド感作を行うことにより、第1極体の有無にかかわらず、コルセミド感作卵子の約80–93%において、明らかな細胞膜の突出が観察されることが明らかとなった。また、14–15時間あるいは16–17時間成熟培養後にコルセミド処理を実施した卵子を核移植のレシピエント細胞質として使用することにより、40%をこえる胚盤胞期への発生率が得られることが明らかとなった。さらに、16–17時間成熟培養を実施した卵子に対し

て、0.2あるいは0.4 μ g/mlのコルセミド濃度で2–3あるいは5–6時間処理した場合、コルセミド処理区間には胚盤胞期への発生率(39–42%)に統計的な有意差は認められなかったが、対照区(30%)よりも有意に高まる($p < 0.05$)ことが明らかとなった。しかしながら、コルセミド濃度や処理時間による核移植胚の胚盤胞期や脱出胚盤胞期への発生率の向上効果には差は認められなかった。また、5%CO₂ in airの培養環境下において、コルセミド処理後に核移植した胚の桑実胚期や胚盤胞期への発生率は、半限定培地において高まること、さらに、コルセミド処理区の胚盤胞の細胞数は、対照区よりも多くなることが明らかとなった。コルセミド処理区の胚移植後の受胎率は無処理区よりも有意に高く($p < 0.05$)、コルセミド処理胚を移植した40頭中5頭(12.5%)が健康な子牛を出産し、コルセミド無処理胚移植群(3.3%)よりも有意に高い分娩率を示した。

体細胞核移植による産子が得られて以来、生産性の向上を目指した種々の取り組みが行われてきている。レシピエント卵子の品質、ドナー細胞の生理的・遺伝的状态、レシピエント卵子とドナー細胞の相互作用、核移植方法、培養条件、胎盤形成異常、移植核の不十分なプログラミング等が影響していると考えられ、種々の検討が行われているが、早期胚死滅や流産の発生率はいまだに高い。理論的には、プログラミングが完全な胚のみが満期まで発生する能力を持つはずであるが、現在の技術では、完全にプログラミングされた核を持つ胚を生産するレシピエント卵子やドナー細胞を選別することはできない。今回、レシピエント卵子をコルセミド処理することにより、第1極体の有無にかかわらず卵子をレシピエント細胞質として用いることができること、さらには、高い除核率、胚盤胞期への発生率、受胎率及び分娩率が得られることが明らかとなった。今回示されたコルセミド処理は、核移植胚・産子の効率的作出のための有効な手段となる可能性がある。今後、さらなる技術改良により核移植胚由来産子の生産効率の向上が望まれる。

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

◀ 文献情報 ▶

ヒナゲシからの花粉側自家不和合性
決定因子の単離

Identification of the pollen self-incompatibility determinant in *Papaver rhoeas*.

M.J. Wheeler*, B.H.J. de Graaf*, N. Hadjiosif*, R. M. Perry, N. S. Poulter, K. Osman, S. Vatovec, A. Harper, F.C. Franklin & V.E. Franklin-Tong
School of Biosciences, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham, UK.

*These authors contributed equally to this work.

Nature, 459, 992-995 (2009)

高等植物では、花粉とめしべの間で行われる様々な情報交換、伝達の結果として種が生産される。その中でも自家不和合性は近親交配を避けるための重要な機構として多くの植物種で見られる。自家不和合性は、*S* 遺伝子座と呼ばれる複対立遺伝子系によって制御されており、柱頭上で自家花粉は柱頭と花粉の *S* 遺伝子座産物同士が結合することによって自己と認識され、拒絶される。本論文において材料となったヒナゲシもまた自家不和合性を有しており、柱頭側の自家不和合性決定因子として PrsS (*Papaver rhoeas* stigma *S* determinant) と呼ばれるタンパク質が同定されていた。花粉発芽伸長培地上において、この PrsS タンパク質を花粉に与えることにより、*S* 遺伝子型特異的にカルシウム依存型情報伝達系を誘導し、花粉の拒絶が起こることが知られている。しかし、花粉側因子に関しては、これまで単離同定されてはいなかった。本論文において執筆者らは、ヒナゲシの自家不和合性の自他認識を司る花粉側因子 PrpS (*Papaver rhoeas* pollen *S* determinant) を同定した。

まず、*S*₁ 型 *S* 遺伝子座の塩基配列解析を行ったところ、柱頭側自家不和合性決定因子 PrsS₁ 遺伝子の下流わずか 457bp 離れた位置に新規の ORF を見いだした。この ORF の発現解析を行ったところ、花粉で特異的に発現しており、時間的発現パターンも PrsS と類似していたことから、この ORF が花粉側因子の候補であると考え、

PrpS と名付けた。次に *S*₁ 型以外の *S* 遺伝子型について、*S*₃ 型、*S*₈ 型からこの PrpS 遺伝子の単離を行い、それぞれ PrpS₁, PrpS₃, PrpS₈ と名付けた。3 つの PrpS のアミノ酸多型は 40% から 50% ほどであった。これは、すでに単離されていた PrsS に見られる *S* 遺伝子型多型とほぼ一致する値である。そして、PrpS と PrsS の同義置換数に対する非同義置換の割合には優位な差が見られないことから、二つの遺伝子は共進化してきたと考えられた。

PrpP はデータベース上に相同な遺伝子を見つけることのできない新規な遺伝子であったが、3-5 つの膜貫通ヘリックスを持つことが予測された。さらにウエスタンブロット解析の結果から、PrpS タンパク質は花粉管の細胞膜に存在することを明らかにした。また、いくつかの構造予測ソフトの結果を総合すると、PrpS タンパク質の 63~97 アミノ酸残基の領域が細胞外領域にあたる考えられた。これらの結果から、執筆者らは PrpS が花粉管細胞膜上で PrsS と結合する自家不和合性の受容体として機能すると示唆した。

次に、PrpS タンパク質が、柱頭側因子である PrsS と結合し、花粉の不和合性反応を誘導することを明らかにするために、*in vitro* での生物検定並びに、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた解析を行った。自家不和合性反応を誘起する花粉管発芽伸長培地条件においた花粉管に対して、PrpS の推定細胞外領域を元に作成したペプチドを加えたところ、不和合反応が打破され花粉管の伸長が見られた。つまり、花粉管中の PrpS と培地中の PrsS との結合に対して、外的に与えた PrpS 由来ペプチドが競合し、PrsS と結合していた。また、PrpS 遺伝子配列由来のホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを用いて培地上の花粉管の PrpS 発現を減少させることによって不和合性反応が打破されること、さらには、PrpS₁, PrpS₈ の発現をそれぞれの *S* 遺伝子型特異的に抑えることにより、PrpS が *S* 遺伝子型特異的に機能することを証明し、PrpS がヒナゲシの自家不和合性花粉側決定因子であるこ

とを明らかにした。

本論文により、自家不和合性の自他認識機構として PrsS-PrpS の S 遺伝子型特異的結合とそれによる情報伝達機構の存在が示唆された訳だが、PrsS, PrpS いずれも相同遺伝子に関する解析例は現在までになされていないことから、新

規な細胞間の認識機構といえる。本論文による成果は自家不和合性の反応機構の研究のみならず、自他認識機構の進化に関する研究分野においても、大きく貢献することだろう。

(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 ▶

出芽酵母において、Pho91はリン酸・ポリリン酸代謝を制御する液胞リン酸トランスポーターである

Pho91 Is a Vacuolar Phosphate Transporter That Regulates Phosphate and Polyphosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.

Hans Caspar Hurlimann, Martha Stadler-Waibel, Thomas P. Werner, and Florian M. Freimoser

Institute of Plant Sciences, Eidgenossische Technische Hochschule Zurich, 8092 Zurich, Switzerland

Molecular Biology of the Cell, 18, 4438-4445 (2007)

無機ポリリン酸 (poly P) は、全ての生命体・細胞で機能するバイオポリマー (生物高分子) であるため、細胞組織の生物学的現象・機能に深く関与している。しかしその重要性にも関わらず、ポリリン酸代謝機構において不明な点が多い。酵母においてポリリン酸の大部分は、細胞増殖期に液胞内に蓄積することが知られているが、このポリリン酸が生体内でどのように合成され液胞に輸送されているのか、また細胞質内リン酸濃度を充足させるために、液胞内ポリリン酸が液胞からどのように細胞質へ輸送されるのか全く分かっていない。本論文で著者は、特にリン酸・ポリリン酸代謝に係わる出芽酵母リン酸トランスポーター (Pho84, 87, 89, 90, 91) に注目し、これらの新規機能について報告している。

まず、通常のポリリン酸代謝における、出芽酵母リン酸トランスポーターの機能を調べた結果、Pho84 が通常のポリリン酸代謝において最も重要なリン酸トランスポーターであることが分かった。また、PHO85 (Cyclin-dependent kinase) の不活性化 (PHO経路が恒常的に活性化) によって引き起こされるポリリン酸の高蓄積にも、PHO84 の活性化が重要であることが分かった。しかし、 $\Delta pho85$ と比較して、 $\Delta pho85\Delta pho87$ 、 $\Delta pho85\Delta pho90$ 、 $\Delta pho85\Delta pho91$ においてはポリリン酸レベルが顕著に増加したことから、低親

和性リン酸トランスポーターである Pho87, 90, 91 は、 $\Delta pho85$ によって引き起こされるポリリン酸の高蓄積を負に制御していることが示唆された。

次に、 $\Delta pho85$ のポリリン酸高蓄積に対する Pho87, 90, 91 の抑制効果が、PHO経路や Pho84 の転写活性に依存した効果かどうか検討するため、単独または二重破壊株における rAPase 活性 (酸性ホスファターゼ活性) 測定、LacZ レポーターアッセイ (PHO84) を行った。結果、 $\Delta pho85$ と比較して、 $\Delta pho85\Delta pho87$ 、 $\Delta pho85\Delta pho90$ 、 $\Delta pho85\Delta pho91$ ではほとんど変化がなかった。また、Pho84 の局在に、Pho87, 90, 91 は依存していなかった。以上より、低親和性リン酸トランスポーターである Pho87, 90, 91 は、PHO経路、Pho84 の活性・局在 (機能) に若干の影響があるようではあるが、特に $\Delta pho85\Delta pho90$ 、 $\Delta pho85\Delta pho91$ において観察された顕著なポリリン酸の増加は PHO経路に依存した現象ではないことが示唆された。さらに、Pho87, 90 は細胞膜に局在していたが、Pho91 は液胞膜に局在しており、その Pho91 の液胞への局在は、Pho85, 86, 87, 90 に依存していなかった。また、GFP-Pho91 を過剰発現させた株においては、野生株と比べ、ポリリン酸量が減少していた。以上より、Pho91 は液胞リン酸トランスポーターであり、その局在性についても PHO経路に依存しないということが示唆された。

仮説として、Pho91 は、液胞内から細胞質へリン酸を輸送する液胞リン酸トランスポーターとして機能し、 $\Delta pho85$ と比べ、 $\Delta pho85\Delta pho91$ では、液胞内でのポリリン酸分解と、液胞から細胞質へのリン酸輸送が減少しているために、より多くのリン酸がポリリン酸の形で液胞にトラップされ、結果、ポリリン酸が高蓄積しているのではないだろうか。

(抄訳：金井宗良, KANAI Muneyoshi, 独立行政法人 酒類総合研究所)

◀ 文献情報 ▶

DHA複合リポソームによるヒト腫瘍細胞のアポトーシス誘導

Induction of apoptosis of human tumor cells by hybrid liposomes including docosahexaenoic acid
Koichi Goto, Yoshihiro Tanaka, Yoko Matsumoto and Ryuichi Ueoka

Division of Applied Life Science, Graduate School of Engineering, Sojo University, 4-22-1 Ikeda, Kumamoto 860-0082, Japan

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 18, 1880-1883 (2008)

多価不飽和脂肪酸 (PUFA: PolyUnsaturated Fatty Acids) は長い炭化水素鎖で構成され、その中に二重結合部位を多数有しており、健康に良いとされている脂肪酸である。また、これらは細胞内の生理活性物質の一つであるプロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサンの様なエイコサノイド類の前駆体でもある。このPUFAの機能性研究の一つとして、腫瘍の形成とPUFAには密接な関係があることが、食品や医学の分野において多く報告されている。

著者らの既往の研究において、ジミリスチルフォスファチジルコリン (DMPC) やポリオキシエチレンアルキルエーテル (Tween 20) からなる複合リポソーム (HL: Hybrid Liposomes) には、腫瘍細胞の成長抑制機能があることを報告した。また、HLによる腫瘍細胞のアポトーシス誘導に関するメカニズムについても明らかにしてきた。

本研究では、DMPCとTween80, PUFAからなるHL-PUFA (粒子径<210nm) による腫瘍細胞の成長阻害作用とそのメカニズムについて検討を行った。対象とした腫瘍は、胃腫瘍細胞、肺腫瘍細胞、結腸腫瘍細胞である。

まず、HLと複合させる脂肪酸の種類について、オレイン酸 (OA), リノール酸 (LA), α -リノレン酸 (ALA), エイコサペンタエン酸 (EPA), ドコサヘキサエン酸 (DHA) について検討した。全ての脂肪酸種において腫瘍成長抑制活性が認められ、DHAに関しては特に強い活性が認められた。その濃度としては、代表的には、他の脂肪酸と比較して1/5程度のDHA濃度 (55 μ M-30 μ M)

において、同等の活性を示した。なお、この結果はin vitroの結果ではあるが、著者らの既往の研究では、HLは正常細胞と腫瘍細胞の選択性を有していることが明らかになっており、in vivoにおいても選択的な腫瘍成長抑制活性の発現が期待できる。

一般的に知られている脂肪酸による抗腫瘍活性の作用機序は、脂肪酸の酸化によるラジカルやアルデヒド生成によるものと言われている。そこで、HL-LAまたはHL-DHAとビタミンE (抗酸化剤) を共存させ、LAとDHAの酸化を抑制した条件下におけるHL-PUFAによる腫瘍細胞の成長抑制活性について検討した。なお、ビタミンEには腫瘍成長抑制活性は無い。

HL-LAとビタミンEを共存させた条件における抗腫瘍性に関しては、その腫瘍成長抑制活性は大きく減衰した。一方で、HL-DHAの腫瘍成長抑制活性は、ほぼ維持された。このことより、DHAの腫瘍成長抑制活性は、一般的に知られている脂質酸化による作用だけではないことが明らかになった。

そこで、HL-LAとHL-DHAの作用機序について詳細な検討を行った。HL-LAの作用機序に関しては、腫瘍細胞の壊死によって腫瘍成長抑制活性が現われることが明らかになった。これは、脂肪酸が酸化されることによって発生した過酸化化物により誘導されたものである。一方で、HL-DHAに関しては、細胞の壊死ではなく細胞のアポトーシスを誘導することで、腫瘍成長抑制活性が現われていることが明らかになった。

以上の結果より、HL-DHAは、腫瘍細胞に対して強い成長抑制活性を有し、それは正常細胞に影響を及ぼさない。また、その作用機序として、細胞のアポトーシスを誘導し、腫瘍細胞の成長を抑制していることが明らかになった。これより、HL-DHA (HL-PUFA) は、腫瘍細胞と正常細胞を区別することができるドラッグデリバリーシステムの一つとして、臨床的な研究の展開が期待できる。

(抄訳：山崎圭樹, YAMAZAKI Keiju, 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

アグリビジネス創出フェア開催のお知らせ

アグリビジネス創出フェアは、農林水産省主催による技術交流展示会です。

平成21年度においては、11月25日（水）から27日（金）までの3日間、幕張メッセにおいて、盛大に開催されることとなっており、生産者、産業界、研究者、行政部局等の関係者が一堂に会する機会は、技術シーズとニーズに関わる幅広い人・情報の交流を通じて、食と農林水産の未来を拓く新たな連携の芽が育つこととなるでしょう。

また、6月下旬から、出展者を募集中です。是非、この機会に産学官連携による交流の輪を広げてみてはいかがでしょうか。

○ 会 期 2009年11月25日（水）～27日（木） 9：30～16：30

○ 会 場 幕張メッセ

○ 主 催 農林水産省

○ 展示予定規模 250団体

○ 予定来場者数 約40,000人

○ 出展対象者

都道府県、大学、独立行政法人等の研究機関、大学発ベンチャー、各種協議会・研究会等の非営利団体等

○ 出展料 無料

詳細につきましては、下記のホームページをご覧ください。

<http://agribiz-fair.jp/>

＜お問い合わせ先＞

アグリビジネス創出フェア2009事務局（株式会社フジヤ）

電話：03（5560）7731 FAX：03（5548）2838

E-mail：agribiz-ex@fujiya-net.co.jp

編集後記

134号をお届けします。本号の総説では朝倉哲郎氏（東京農工大学）に生体との適合性を高めた絹糸の作製と再生医療分野への応用についてご紹介戴きました。

その他の研究情報としては、朴龍洙氏（静岡大学）にカイコを用いてのインフルエンザウイルス吸着剤の合成に必要な酵素の生産、四方雅仁氏（花き研究所）らにCRES-T法を利用した新形質花きの開発、石田豊氏（(株)四国総合研究所）らに緑色光照射による植物病害防除技術の開発、林茂彦氏（生研センター）らにイチゴの植物工場的な生産を可能とする移動栽培装置の開発、三上稔之氏（青森県環境保健センター）らにナガイモのインフルエンザウイルス感染抑制作用について、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）、金井宗良氏（酒類総合研究所）、山崎圭樹氏（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。 （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134号

平成21年7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/>