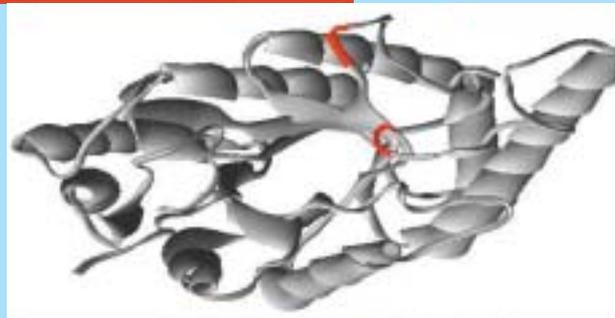


新事業創出研究開発事業
(2004年度終了課題)

研究成果



表紙の説明

上 段：乾燥耐性を獲得したペチュニア

シロイヌナズナのプロリン合成酵素遺伝子をペチュニアに導入し、乾燥耐性を示す組換えペチュニアを作出した。左側ポットはその組換え幼植物体で、14日間無灌水状態に置いて、再灌水によって回復した（再灌水開始後12日目の状態）。右側は非組換えペチュニアで同様処理によってすべて枯死した。

〔研究課題名：環境ストレス耐性植物の開発〕

（技術コーディネーター：篠崎 和子）

中 段：改変酵素キシラーゼの立体構造

高温で安定的に作用するキシラーゼの2箇所（赤色部分）を換えることによって、改変キシラーゼを作出した。この酵素は高温で安定しているのに加えてアルカリ側で作用する特性を有することから、クラフトパルプの漂白などに利用可能である。

〔研究課題名：食品の機能を高めるための新機能酵素の開発〕

（技術コーディネーター：林 清・北岡 本光）

下 段：ダイオキシン類汚染モニタリング用ペチュニア

マウスのダイオキシン受容体に由来する遺伝子と花色の合成を抑制する遺伝子とを導入した組換えペチュニアを作出した。このペチュニアをダイオキシン汚染土壌で栽培すると、花色の合成が抑制されるため、非組換えペチュニアの花色が赤色（右側）であるのに対して、部分的に白色を混在した花色となる。

〔研究課題名：環境浄化・モニタリング植物の開発〕

（技術コーディネーター：大川 秀郎）

はじめに

政府のミレニアム・プロジェクトの一環として、生物系特定産業技術研究推進機構（現 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター）では、平成 12 年度から平成 16 年度の 5 年間、豊かで健康な食生活と安心して暮らせる生活環境の実現を基本テーマに、新事業創出研究開発事業を実施しました。

本事業では、健康機能性作物、環境ストレス耐性植物の開発、環境浄化・モニタリング植物の開発、新しい生物農薬の開発、食品の機能を高めるための新機能酵素の開発、遺伝子の分子レベル操作技術の開発のテーマを設け、産学官が連携して研究を実施しました。

ここに、5 年間の研究成果の概要を取りまとめました。

平成 17 年 3 月

研 究 成 果

目 次

■健康機能性作物	1
高岩 文雄、城森 孝仁、今村 順、河野 淳子、金田 武夫、 羽生 友治、安西 弘行、海老沼 宏安	
■環境ストレス耐性植物の開発	5
篠崎 和子、吉羽 洋周、日尾野 隆、常森 謙紀	
■環境浄化・モニタリング植物の開発	9
大川 秀郎、大川 安信、小沢 憲二郎、川東 広幸、山田 幸生、 田中 良和	
■新しい生物農薬の開発	13
国見 裕久、榎井 昭夫、志田 篤彦、土井 清二、伊豆 進	
■食品の機能を高めるための新機能酵素の開発	17
林 清、北岡 本光、福田 恵温、山本 幹男、小川 浩一、 三吉 新介、富田 哲司、窪田 英俊	
■遺伝子の分子レベル操作技術の開発	21
鷺津 正夫、大塚 喜弘、堀尾 浩司、中西 博昭、平松 光夫	

■研究課題名

健康機能性作物

■研究項目と担当機関（研究代表者、◎は技術コーディネーター）

- ①健康機能性作物の開発
独立行政法人農業生物資源研究所（◎高岩 文雄）
- ②生活習慣病予防作物の開発：血糖コントロール作用を持つペプチド含有米の開発
㈱三和化学研究所（城森 孝仁）
- ③機能性共役脂肪酸を産生、蓄積するイネ、ナタネ及び野菜の開発
㈱植物工学研究所（今村 順 [H12-15]、河野 淳子 [H16]）
- ④感染症予防効果を有するラクトフェリン米の開発
全国農業協同組合連合会（金田 武夫 [H12-15]、羽生 友治 [H16]）
国立大学法人茨城大学遺伝子実験施設（安西 弘行）
- ⑤ MAT ベクターによるマーカーフリー健康機能性作物の作出
日本製紙㈱（海老沼 宏安）

■研究の目的

糖尿病、肥満等の生活習慣病や感染症、さらには主要なアレルギー疾患であるスギ花粉症に対して予防・改善効果のある機能性のペプチド・タンパク質・脂肪酸を、作物の可食部である種子中に特異的かつ高度に蓄積した健康機能性作物（主としてイネ）を開発する。なお、関連する遺伝子の導入にあたっては、選抜マーカーである抗生物質耐性遺伝子などが脱離し、目的とする遺伝子だけが植物細胞内に導入・保持されるマーカーフリーシステムを活用して、それぞれの健康機能性作物を開発する（図1）。

■主要な成果

- ①スギ花粉アレルギーの原因となっているアレルゲンのヒトT細胞抗原決定基（エピトープ）を7個連結した人工ペプチド（7Cp）の発現遺伝子をイネに導入し、種子胚乳中に特異的に、目的ペプチドが高度蓄積された組換えイネを開発した（図2）。この米をマウスに摂食させたところ、スギ花粉アレルゲン特異的なT細胞の反応が非形質転換米を摂食させた場合に比較して50%程度減少した。さらに、アレルギー発症に強く関与する免疫グロブリンE（IgE）の産生量も30%に抑えられた（図3）。すなわち、開発した7Cp蓄積米を経口投与したマウスに、免疫寛容が誘導されることが明確となった。
- ②血糖値に依存してインスリンの分泌を促進するヒト由来のペプチドホルモン、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）を、種子貯蔵タンパク質中に挿入して発現させる手法と、直接発現させる手法で、イネ種子胚乳中に高度蓄積させた組換えイネを開発した。このGLP-1発現米（品種：キタアケ）を加熱処理してマウスに摂食させた結果、血糖値の低下効果が確認された（図4）。
- ③従来のマーカーフリー MAT ベクターシステムをハイグロマイシン（Hm）- MAT ベクターシステムに改良し（図5）、このシステムを用いて、7Cp、GLP-1、ラクトフェリン、共役脂肪酸の合成遺伝子を効率的に導入したマーカーフリー組換えイネ（品種：日本晴）を開発した。
- ④ザクロやキカラスウリから単離した共役脂肪酸の一種、プニカ酸の合成酵素遺伝子をナタネおよびイネに導入し、それらの種子にプニカ酸が特異的に蓄積する組換え体を作出した。全脂肪酸のうちを占めるプニカ酸の蓄積割合はナタネで3.8%、イネで5%であった（図6）。さらに、これらの種子より搾油したプニカ酸含有油の効果を動物摂餌実験で調べたところ、内臓脂肪蓄積抑制作用が認められた（図7）。

■公表した主な特許と論文

- ①特開2004-321079：アレルゲン特異的 T 細胞抗原決定基を植物に集積させる方法、および該抗原決定基を集積させた植物：独立行政法人農業生物資源研究所
- ②特願2003-92827：組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官の生産方法及び新規組換えタンパク質：独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構・日本製紙株式会社・株式会社三和化学研究所
- ③特願2004-023841：脂肪蓄積抑制剤：株式会社植物工学研究所
- ④ Iwabuchi, M., *et al.* δ 12-oleate desaturase-related enzymes associated with formation of conjugated *trans*- δ 11, *cis*- δ 13-double bonds. *J. Biol. Chem.* 278:4603 - 4610(2003)
- ⑤ Qu, L.Q. and Takaiwa, F. Evaluation of tissue specificity and expression strength of rice seed component gene promoters in transgenic rice. *Plant Biotech. J.* 2: 113-125 (2004)

■事業化の見通し

- ①スギ花粉症に対して緩和効果がある 7Cp ペプチドを含む遺伝子組換えイネ、および糖尿病に対して予防・改善効果がある GLP-1 を含む遺伝子組換えイネについては、農林水産省・環境省に対して、「遺伝子組換え生物等の利用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(カルタヘナ法) の第 1 種使用規程に基づく栽培実験計画の承認を申請する予定である。
- ②スギ花粉症用の 7Cp ペプチド含有米や糖尿病用の GLP-1 含有米については、医薬品並の安全性試験を実施するとともに、医学分野の専門家と共同して臨床試験を実施し、それぞれの有効性を評価する。
- ③ブニカ酸を含有する遺伝子組換えナタネ・イネについては、農林水産省・環境省に対して、「遺伝子組換え生物等の利用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(カルタヘナ法) の第 1 種使用規程に基づく栽培実験計画の承認を申請する予定である。
- ④内蔵脂肪減少効果を示した共役脂肪酸を含有するナタネ油やコメ油は、マヨネーズ、マーガリン、ドレッシング等、機能性食品としての製品開発を検討する。

■問い合わせ先

- ①スギ花粉症緩和米：独立行政法人農業生物資源研究所 新生物資源創出研究グループ
遺伝子操作研究チーム (029-838-8373)
- ②糖尿病予防米：株式会社三和化学研究所 三重研究パーク (0594-72-6221)
- ③肥満予防油：株式会社植物工学研究所 (045-963-3520)
- ④マーカフリー組換え機能性イネの作出法：日本製紙株式会社 研究開発本部
森林科学研究所 (03-3911-5106)

■研究成果の具体的図表

健康機能性作物



図1. マーカーフリーシステムを用いた機能性成分蓄積米の開発

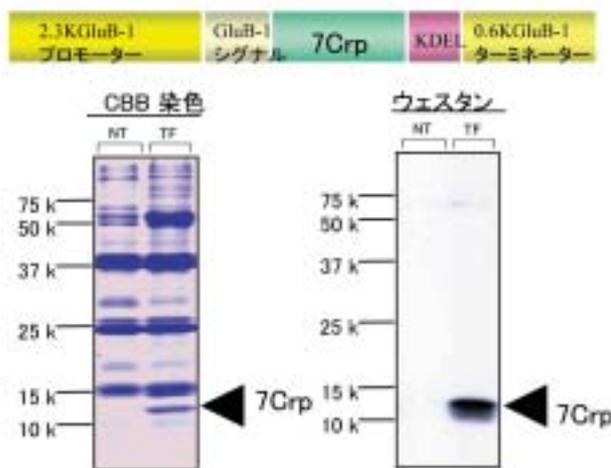


図2. ヒトT細胞エピトープペプチド(7Crp)のイネ種子胚乳中での高度発現
NT:非組換え米
TF:組換え米

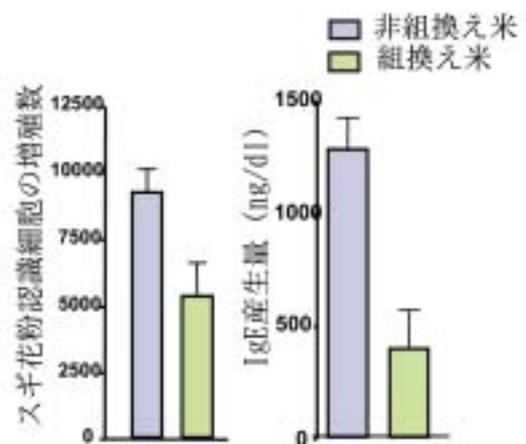


図3. 7Crp米のマウスへの経口投与による免疫寛容の誘導

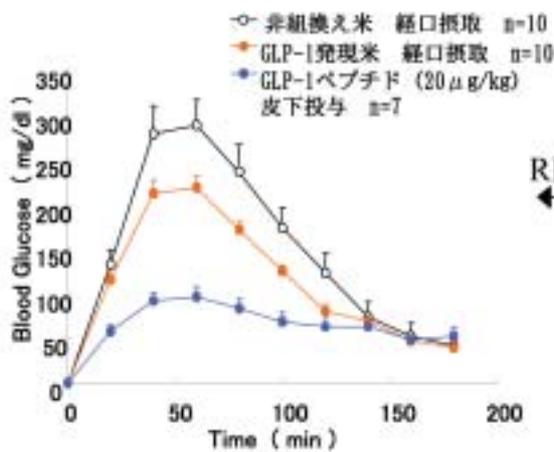


図4. GLP-1発現米のマウスへの経口投与による血糖値低下効果

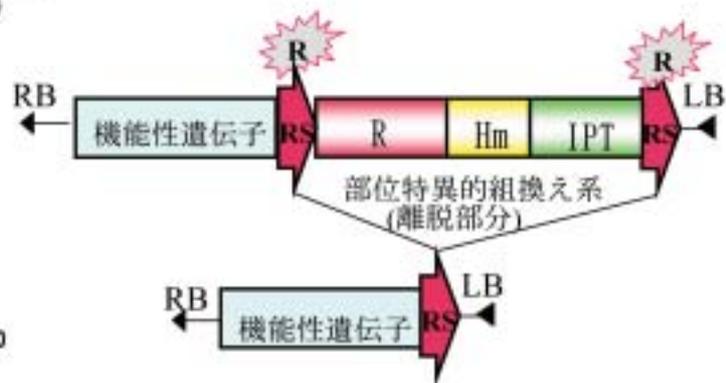


図5. イネ形質転換用に改良されたマーカーフリーHm-MATシステム

機能性共役脂肪酸蓄積作物の開発

ブニカ酸合成酵素遺伝子



ナタネ

マウス試験で有効性確認

分析

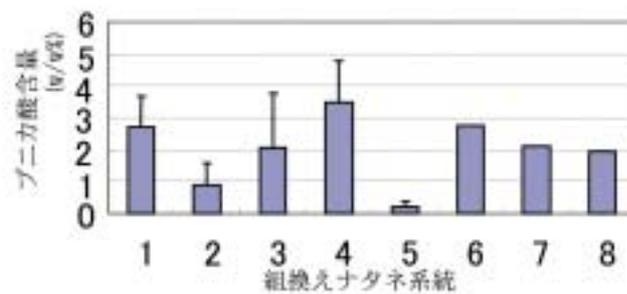


図6. 組換えナタネの共役脂肪酸(ブニカ酸)含量

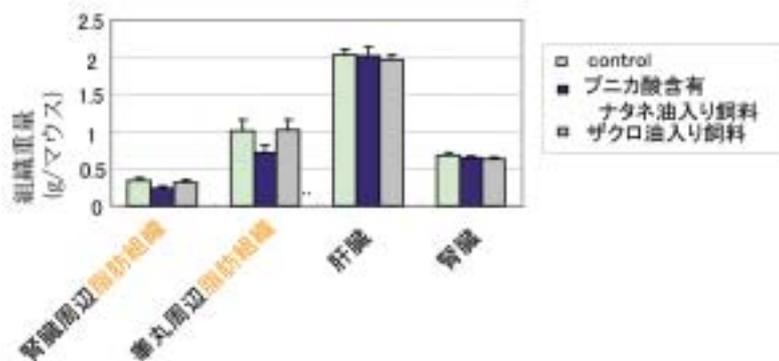


図7. ブニカ酸経口摂取マウスの各種組織重量比較

■研究課題名

環境ストレス耐性植物の開発

■研究項目と担当機関（研究代表者、◎は技術コーディネーター）

- ①環境ストレス耐性遺伝子組換え作物の開発
独立行政法人国際農林水産業研究センター（◎篠崎 和子）
- ②環境ストレス耐性遺伝子組換え作物の開発
㈱日立製作所（吉羽 洋周）
- ③ストレス耐性遺伝子組換え樹木の開発
王子製紙㈱（日尾野 隆）
- ④環境マルチストレス耐性遺伝子組換え芝の開発
海水化学工業㈱（常森 隆紀）

■研究の目的

近年、地球規模で緑地の砂漠化等の環境劣化や異常気象による農業被害が報告されている。これに対応して、遺伝子組換え技術を活用した環境ストレス耐性植物を開発する。シロイヌナズナ等から単離した環境ストレス耐性遺伝子やストレス応答を制御する転写因子遺伝子等を用いて、環境ストレス耐性イネや花卉（ペチュニア）、芝や樹木（ユーカリ）を開発し、新たな産業の創出、農業生産の安定化、環境保全、都市の美化などに貢献する。

■主要な成果

- ①調節遺伝子を利用した環境ストレス耐性イネの開発
 - (1) 乾燥・塩・低温等の環境ストレスに対する耐性獲得のために働くシロイヌナズナの転写因子の遺伝子 *DREB* の相同性遺伝子をイネから単離して、*OsDREB* と名付け、ストレス応答や耐性獲得における機能を明らかにした。
 - (2) イネ由来の乾燥・塩・低温ストレス誘導性プロモーター (*LIP9* や *OsNAC6* プロモーター等) を多数単離して、ストレスによる誘導性や組織特異性等の性質を明らかにした (図 1)。また、単離したストレス誘導性の *LIP9* プロモーターを利用して、*DREB* 遺伝子等の有用遺伝子を植物中でストレス時に特異的に発現させるベクター系 (*LIP9*: *DREB1A*) を構築した。
 - (3) シロイヌナズナの環境ストレス耐性の獲得において機能する転写因子をコードする *DREB* 遺伝子またはイネの *OsDREB* 遺伝子とイネのストレス誘導性プロモーター (*LIP9*) を用いて、乾燥・塩・低温ストレスに対して耐性を示す遺伝子組換えイネ (品種: 日本晴、コシヒカリ) を開発した (図 2、3)。また、*DREB* 遺伝子を導入することにより、イネ中で多くのストレス耐性遺伝子群が誘導されていることをマイクロアレイ解析により明らかにした (図 4)。
 - (4) シロイヌナズナから単離した植物ホルモンアブシジン酸 (ABA) の合成酵素をコードする遺伝子 *NCED3* 遺伝子を用いて、乾燥に対し耐性を示すイネ (日本晴) を開発した。
- ②機能遺伝子を利用した環境ストレス耐性イネの開発
 - (1) イネまたはシロイヌナズナのプロリン合成系遺伝子 *OsP5CS*、またはシロイヌナズナのオリゴ糖合成酵素遺伝子 *AtGolS* を用いて、塩ストレスに対して耐性を示す遺伝子組換えイネを開発した (図 5)。これらの塩ストレス耐性イネではオリゴ糖やプロリンを多量に蓄積していることを明らかにした。
 - (2) イネの塩ストレス誘導性を示すアルデヒド脱水素酵素遺伝子 *OsALDH* を単離して、機能を解析し、その

遺伝子をイネに過剰発現させることにより、塩ストレス耐性を示す組換えイネを開発した。

③環境ストレス耐性ペチュニアの開発

- (1) シロイヌナズナの転写因子遺伝子 *DREB1A*、プロリン合成酵素遺伝子 *AtP5CS*、またはオリゴ糖合成酵素遺伝子 *AtGolS2* を導入した、乾燥ストレスに対して耐性を示す遺伝子組換えペチュニア（品種：ミッチェル、サフィニア）を開発した（図 6）。乾燥耐性ペチュニアは、鉢植えや公園等に利用することにより、都市生活の美化に役立つと思われる。

④環境ストレス耐性ユーカリの開発

- (1) シロイヌナズナの転写因子をコードする *DREB1A* 遺伝子を導入して、乾燥ストレスに対して耐性を示す遺伝子組換えユーカリを開発した（図 7）。乾燥耐性ユーカリは、特に海外において、緑地帯の回復や表土流出の防止等の地球環境保全に役立つと思われる。
- (2) ユーカリ由来のストレス応答性遺伝子を単離して、そのプロモーターを同定した。このプロモーターを用いることにより、ユーカリにおいてストレス耐性付与遺伝子を効率的に発現制御する系を確立した。

■公表した主な特許と論文

- ①特願2003-067049：イネ由来のストレス誘導性プロモーター：独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構・独立行政法人国際農林水産業研究センター（米国、カナダ、韓国、中国にも出願）
- ②特願2001-174553、英国 GB2376236、韓国 10 - 2001 - 85746：プロリン蓄積能力の高いイネ科植物とその製造方法：独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構・株式会社日立製作所・独立行政法人国際農林水産業研究センター
- ③ Rabbani, M. A., *et al.* Monitoring expression profiles of rice (*Oryza sativa* L.) genes under cold, drought and high-salinity stresses, and ABA application using both cDNA microarray and RNA gel blot analyses. *Plant Physiol.* 133:1755-1767(2003).
- ④ Dubouzet, J. G., *et al.* OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L, encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J.* 33:751-763(2003).

■事業化の見通し

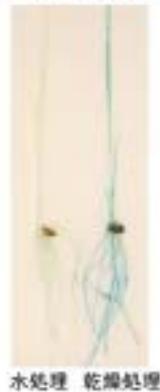
- ① *DREB* 遺伝子組換えイネでは乾燥や塩や低温等のストレスに対して高い耐性が付与されていることが明らかにされたので、今後安全性評価や実用上の形質評価を継続して行う。さらに、農林水産省・環境省に対し「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(カルタヘナ法)の第1種使用規程に基づく栽培実験の承認を申請する。
- ② ストレス耐性に関与する機能遺伝子 (*OsP5CS* や *AtGolS2*) を導入した組換えイネでも高い耐塩性を付与することができたので、今後は実際の塩害環境に近い条件での耐性レベル評価と形質調査を行うと共に *DREB* 組換えイネと同様に安全性評価を実施する。
- ③ 遺伝子組換えペチュニアでは商品性の高い品種に耐乾燥性効果の高い遺伝子を導入しその効果を検証することができたので、今後安全性評価を含め詳細な形質調査を実施し、2～3年後を目処に商品化を目指す。

■問い合わせ先

- ①調節遺伝子を用いた環境ストレス耐性イネの開発：独立行政法人国際農林水産業研究センター 生物資源部 (029-838-6641)
- ②機能遺伝子を用いた環境ストレス耐性イネの開発：株式会社日立製作所 中央研究所 ライフサイエンス研究センター (049-296-6111)
- ③環境ストレス耐性ペチュニアの開発：株式会社日立製作所 中央研究所 ライフサイエンス研究センター (049-296-6111)

■研究成果の具体的図表

① 調節遺伝子を利用した環境ストレス耐性イネの開発



LIP9プロモーターとGUS遺伝子を結合したコンストラクト (LIP9:GUS)を導入したイネは、乾燥条件下で強いGUS活性を示した

他にもOsNAC6プロモーター等、多くのストレス誘導性プロモーターを単離し、特許申請中

図1 ストレス誘導性の強いLIP9プロモーターの単離



図3 LIP9:DREB1遺伝子組換えイネ 乾燥耐性を示し、生育も良かった



図2 マルチストレス耐性を示したDREB1過剰発現イネ

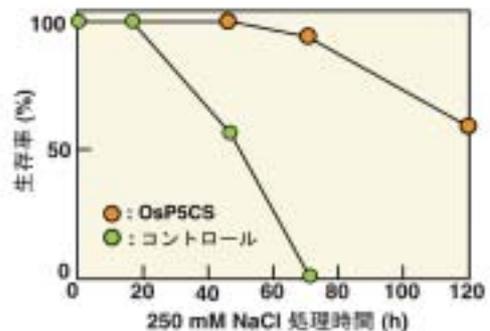
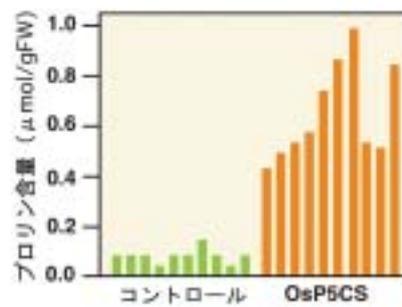


図4 DREB1によるストレス耐性獲得機構

② 機能遺伝子を利用した環境ストレス耐性イネの開発



図5 塩耐性試験 (250 mM NaCl 3日処理後31日栽培)



糖の合成に関わるガラクトキノール合成酵素 (AtGalS) や塩誘導性のアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) をコードする遺伝子を過剰発現したイネも、塩耐性を示した

図5 プロリン合成酵素 (P5CS) 遺伝子組換えイネ プロリンを蓄積し高い塩耐性を示した

③ 環境ストレス耐性ペチュニアの開発



(A) *DREB1A*遺伝子組換えペチュニアが示した乾燥耐性 (B) プロリン合成酵素(*AtP5CS*)遺伝子組換えペチュニアが示した乾燥耐性



(C) 糖の合成酵素(*AtGolS2*)の遺伝子導入ペチュニアが示した乾燥耐性
*AtGolS2*遺伝子組換えペチュニアでは、糖(ガラクトキノール)の蓄積も確認された

図6 乾燥ストレスに対し耐性を示すペチュニア

④ 環境ストレス耐性ユーカリの開発



図7
乾燥耐性を示した
*DREB1A*遺伝子組換えユーカリ

■研究課題名

環境浄化・モニタリング植物の開発

■研究項目と担当機関（研究代表者、◎は技術コーディネーター）

- ①環境負荷化学物質のモニタリング用植物及び負荷軽減型作物の実用化研究
福山大学 生命工学部（◎大川 秀郎 [H12-15: 神戸大学]）
- ②環境負荷化学物質のモニタリング用植物及び負荷軽減型作物の実用化研究
独立行政法人農業生物資源研究所（大川 安信 [H12-13]、小沢憲二郎 [H13-14]、川東 広幸 [H14-16]）
- ③環境浄化作物の開発
㈱豊田中央研究所（山田 幸生）
- ④環境モニタリング園芸植物の分子育種
サントリー㈱（田中 良和）

■研究の目的

ダイオキシン類、環境ホルモン類、残留農薬などによる環境および農水畜産物の汚染ならびにそれらの生態系や人の健康への影響が心配されている。動物にはダイオキシンや環境ホルモンをおのおの特異的に認識する受容体が存在し、また、これらの外来異物を代謝・解毒する酵素系が発達している。そこで、動物の受容体や異物代謝に係わる遺伝子を遺伝子組換え技術によって植物に付与・発現させて、これら環境負荷化学物質の汚染現場に適用できるモニタリング用植物及び負荷軽減用作物を開発する。

■主要な成果

- ①モニタリング用植物：動物のダイオキシン受容体（AhR）または女性ホルモンの作用するエストロジェン受容体（ER）とレポーター（導入した遺伝子の発現を定性的・定量的に検出する）を組合せた遺伝子系を植物に付与・発現させ、レポーターの機能に基づいてダイオキシン類または女性ホルモン様化学物質をモニタリングする植物を開発した。
 - (1) マウスの AhR に由来する組換え AhR（LexA / AhR / VP16）はバクテリアの DNA 結合因子、ダイオキシン受容体およびウイルスの転写活性化因子から構成され、これとレポーターとしての β -グルクロニダーゼ（GUS）を組合せた遺伝子系を導入した遺伝子組換えタバコを作出した。本組換えタバコをダイオキシン類汚染土壌（360pg-TEQ / g 土壌）〔環境基準値は 1,000pg-TEQ/g 土壌で、TEQ は 2, 3, 7, 8-四塩化ダイオキシンに換算した毒性等量〕で栽培すると、GUS 活性が誘導され、それを測定することによりダイオキシン類の汚染を検出することができた（図 1）。
 - (2) 組換え AhR と花の色素の合成を抑制する花色抑制遺伝子（RNAi）とを導入した遺伝子組換えペチュニアとトレニアを作出した。これらのペチュニアとトレニアをダイオキシン類汚染土壌（360pg-TEQ / g 土壌）で栽培すると、花弁の色素合成が抑制され、花色が赤から白へ、また、青から白へと変化した（図 2）。これらの植物を栽培することにより、ダイオキシン類の汚染を花色の変化で検定することができる。
 - (3) ヒトの ER に由来する組換え hER（LexA / hER / VP16）またはメダカの ER に由来する mER（LexA / mER / VP16）とレポーターとしてのクラゲ緑色蛍光タンパク質（GFP）を組合せた遺伝子系を導入したシロイヌナズナを作出した。これらの遺伝子組換えシロイヌナズナを女性ホルモン・17 β -エストラジオールを含む土壌で栽培するか、環境ホルモン・4- t-オクチルフェノールを含む培地で培養すると、RT-PCR 分析で顕著な GFP 遺伝子の転写の増加が認められた（図 3）。とりわけ、4- t-オクチルフェノールでは組

換え hER に比べて組換え mER を用いることにより約 10,000 倍の感度上昇を達成できた。

②負荷軽減用作物：動物の異物代謝酵素（CYP）遺伝子をイネとサツマイモに導入することによって、水田と畑の残留農薬を代謝・分解して軽減する作物を作出した。

(1) 異物代謝酵素である CYP2B6 の遺伝子を導入した遺伝子組換えイネ（日本晴）を特定網室における水田条件下で栽培し、除草剤メトラクロールを水面に散布したところ、3 ヶ月後に土壌での残留量が、非組換えイネでは 14% に減少したのに対して、組換えイネでは 6% まで減少した。すなわち、本組換えイネは除草剤メトラクロールを水田から吸収・代謝して、 $13.5\text{mg}/\text{m}^2/3$ ヶ月の残留低減性能を示した（図 4 - A）。なお、本組換えイネは閉鎖系温室および特定網室における環境安全性評価試験を終了している。

(2) 異物代謝酵素である CYP1A1、CYP2B6 および CYP2C19 の 3 遺伝子を同時に導入した遺伝子組換えサツマイモを作出した。本遺伝子組換えサツマイモは除草剤アトラジン吸収・代謝して、その植物体での残留量が 0.5ppm（非組換え体では 2ppm）であった（図 4 - B）。すなわち、本組換えサツマイモは顕著な作物残留の低減性能を示し、また、土壌残留についても減少が認められた。

■公表した主な特許と論文

- ①特開2004-08906、米国出願 U2002P121US：Ah 受容体リガンド特異的な遺伝子発現誘導因子及びその機能に基づく異種遺伝子誘導発現系の利用技術：神戸大学長
- ②特願 PCT - JP03 - 10500：新規糖転移酵素遺伝子：サントリー株式会社
- ③特願2004-319828：内分泌攪乱化学物質モニタリング植物、その生産に使用する DNA、発現ベクター、同植物の生産方法、および、同植物を用いたモニタリング方法：国立大学法人神戸大学長

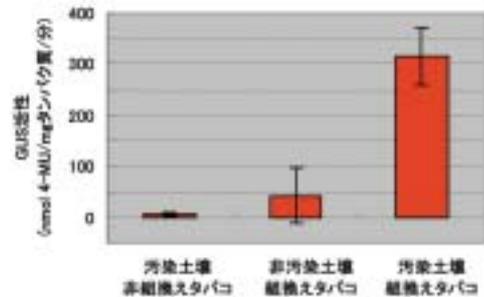
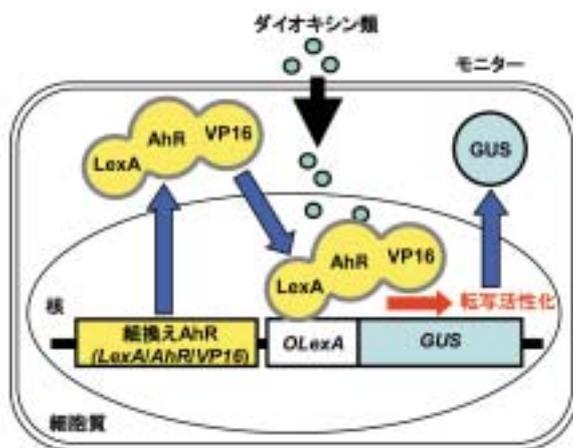
■事業化の見通し

ダイオキシン類汚染土壌モニタリング用植物として作出・選抜した遺伝子組換えタバコ及び遺伝子組換えペチュニアとトレニアについては、農林水産省・環境省に対し「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（カルタヘナ法）の第 1 種使用規程に基づく栽培実験計画の承認を申請する予定である。

■問い合わせ先

- ①ダイオキシン類汚染土壌モニタリング用遺伝子組換えタバコ：福山大学 生命工学部（084-936-2112 内線4053）
- ②ダイオキシン類汚染土壌モニタリング用遺伝子組換えペチュニアとトレニア：サントリー株式会社 先進技術応用研究所（075-962-8807）
- ③女性ホルモン様化学物質モニタリング用遺伝子組換えシロイヌナズナ：神戸大学 遺伝子実験センター（078-803-5863）

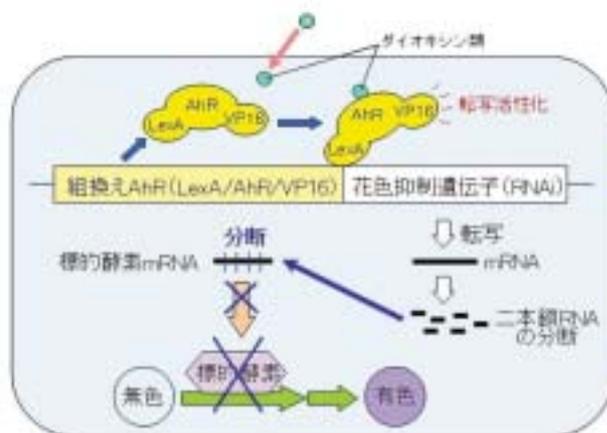
■研究成果の具体的図表



遺伝子組換えタバコはダイオキシン類を吸収し、それが組換え AhR (LexA/AhR/VP16) に結合すると、*OLexA* に作用して *GUS* 遺伝子の発現を誘導する。その結果、GUS 活性が増加する。

遺伝子組換えタバコはダイオキシン類汚染土壌 (360pg-TEQ/g) に栽培すると、顕著な GUS 活性の増加が認められた。

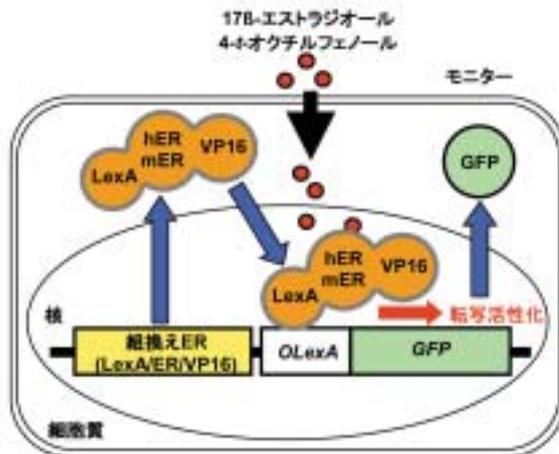
図 1：組換え AhR とレポーター *GUS* を組合わせた遺伝子系を導入した遺伝子組換えタバコによるダイオキシン類のモニタリング



ダイオキシン類が組換え AhR (LexA/AhR/VP16) に結合すると、花色抑制遺伝子が働き、花の色素の合成に必要な標的酵素ができなくなり、花の色素が合成されなくなる。その結果、花色が白に変化する。

ダイオキシン類汚染土壌 (360pg-TEQ/g) で栽培すると、おのおの赤から白及び青から白への花色の変化が認められた。

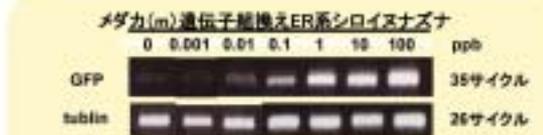
図 2：遺伝子組換えペチュニアとトレニアの花色の变化によるダイオキシン類のモニタリング



遺伝子組換えシロイヌナズナは 17β-エストラジオールや 4-*n*-オクチルフェノールを吸収し、それらがおのおの組換えヒト (h) ER とメダカ (m) ER に結合すると、*O*LexA に作用して *GFP* 遺伝子の発現を誘導する。その結果、生成した *GFP* が蛍光を発する。

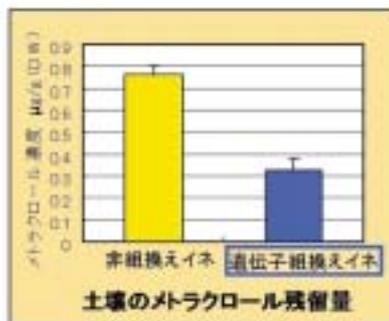
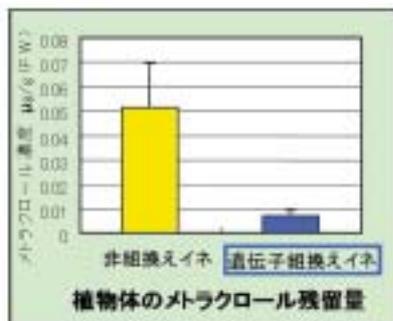


hER系遺伝子組換えシロイヌナズナを 1ppt (0.001ppb) の 17β-エストラジオールを含む土壌で栽培すると、RT-PCR 分析で顕著な *GFP* 遺伝子の転写の増加が認められた。

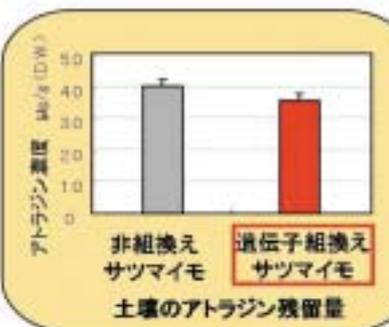
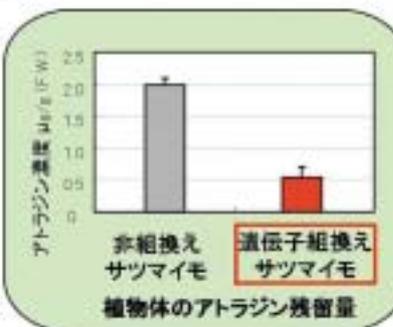


mER系遺伝子組換えシロイヌナズナを 10ppt (0.01ppb) の 4-*n*-オクチルフェノールを含む培地で培養すると、RT-PCR 分析で顕著な *GFP* 遺伝子の転写の増加が認められた。

図 3：組換え hER または mER とレポーター *GFP* を組み合わせた遺伝子系を導入した遺伝子組換えシロイヌナズナによる女性ホルモン様化学物質のモニタリング



4-A
遺伝子組換えイネは異物代謝酵素 CYP2B6 を生成して、それが水田から吸収した除草剤メトラクロールを代謝・分解して、植物体及び土壌における残留量を顕著に低減した。



4-B
遺伝子組換えサツマイモは異物代謝酵素 CYP1A1 と CYP2B6 を生成して、それらは土壌などから吸収した除草剤アトラジン代謝・分解して、植物体における残留量を顕著に低減し、また、土壌の残留量が減少した。

図 4 (A と B)：異物代謝酵素 (*CYP*) 遺伝子を導入した遺伝子組換えイネとサツマイモによる除草剤残留の低減

■研究課題名

新しい生物農薬の開発

■研究項目と担当機関（研究代表者、◎は技術コーディネーター）

- ①ウイルス農薬の効果の強化及び安定性に関する基盤的技術の開発
国立大学法人東京農工大学大学院共生科学技術研究部（◎国見 裕久）
- ②害虫防除用ウイルス農薬の開発
日本化薬㈱（榎井 昭夫 [H12-15]、志田 篤彦 [H16]）
- ③ *Gliocladium* 菌を用いた新規土壌病害防除剤の開発
出光興産㈱（土井 清二 [H12-13]、伊豆 進 [H14-16]）

■研究の目的

化学合成農薬の使用を低減させるために、人畜に安全性が高く、環境に優しい新しい生物農薬を開発する。具体的には、①ウイルス農薬の効果の強化・安定性に関する基盤技術の開発、②害虫防除用ウイルス農薬の開発、③ *Gliocladium* 菌を用いた新規土壌病害防除剤の開発を、3 研究機関の有機的な連携によって実施し、害虫防除用ウイルス農薬 1 剤及び微生物土壌病害防除剤 1 剤を農薬登録する。

■主要な成果

- ①ウイルス農薬の効果の強化・安定性に関する基盤技術の開発
 - (1) わが国で分離されたハスモンヨトウ核多角体病ウイルス (SpitNPV) には、遺伝的特性が異なる二つのタイプがあり、ハスモン型、リトラリス型と命名した。わが国のハスモンヨトウ自然個体群ではリトラリス型が優占していた。
 - (2) リトラリス型のウイルスについて、殺虫活性が強く、ハスモンヨトウの致死までに要する時間が短いウイルスクローン（福山クローン No. 1）を選抜し、資材候補ウイルスとした。
 - (3) ウイルス感染を増進させる物質として知られている「ティノポール」のジエチルアミノ基を他の置換基に変換した化合物を作出したところ、高い感染増進作用を有していた。
 - (4) 圃場で SpitNPV を散布すると、SpitNPV は天敵の働きを損なうことがなく、両者は相加的に働き、ハスモンヨトウ個体群密度を抑制した。
- ②害虫防除用ウイルス農薬の開発
 - (1) ハスモンヨトウ幼虫を用いた SpitNPV の大量増殖技術（増殖技術マニュアルを作成）を確立し、安定した生産体制を樹立した。
 - (2) 公的試験機関の協力を得て SpitNPV の防除効果を調査した。ラジコンヘリや動力噴霧機で散布したところ、イチゴ、ダイズ、レタス、キャベツで発生するハスモンヨトウ幼虫に対して、高い防除効果があった。
 - (3) SpitNPV の水和剤タイプの製剤は、冷蔵保存で約 1 年半感染性を維持していた。製剤製造技術マニュアルを作成した。
- ③ *Gliocladium* 菌を用いた新規土壌病害防除剤の開発
 - (1) 収集・保有している *Gliocladium* 菌の中から新規土壌病害防除剤の資材候補としてグリオクラディウム・ビレンス Gv0928 株（グリオ菌）を選抜した。
 - (2) グリオ菌をフスマで培養し、実用的な製剤としてグリオ菌フスマ製剤 (IK-1140) を開発した。
 - (3) 公的試験機関の協力を得て、IK-1140 のネギ白絹病防除効果を調査した。IK-1140 を 100L / 10a または 200L / 10a、定植前土壌混和处理で、防除効果が高かった。

- (4) グリオ菌の安全性について、マウスへの単回経口投与試験を行ったところ、毒性、感染性及び病原性は認められなかった。

■公表した主な特許と論文

- ① 土壤病害防除剤および土壤病害防除法：特開2004-131422：独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構・出光興産株式会社
- ② 土壤病害防除剤および土壤病害防除法：特開2004-137239：独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構・出光興産株式会社
- ③ Takatsuka, J., *et al.* Genetic and biological comparisons of ten geographic isolates of a nucleopolyhedrovirus that infects *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control* 26: 32-39(2003)
- ④ Okuno, S. *et al.* Viral-enhancing activity of various stilbene-derived brighteners for a *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. *Biological Control* 26: 146-152, 2003.

■事業化の見通し

- ① ハスモンヨトウ核多角体病ウイルスを主成分とするウイルス農薬の開発
適用作物および害虫

適用作物	適用害虫	希釈倍数	使用時期	使用方法
イチゴ、レタス、ダイズ、キャベツ	ハスモンヨトウ	1,000倍	幼虫発生初期	散布

※平成17年10月に農薬登録を行う予定であり、販売予定は18年2月の見込み。

- ② *Gliocladium* 菌を用いた新規土壤病害防除剤の開発
ネギ白絹病防除を対象として平成17年度下期に農薬登録を行う予定である。

■問い合わせ先

- ① ハスモンヨトウ核多角体病ウイルスを主成分とするウイルス農薬の開発
日本化薬株式会社 化学品事業本部 アグロ事業部 (03-3237-5223)
- ② *Gliocladium* 菌を用いた新規土壤病害防除剤の開発
出光興産株式会社 新規事業推進室 アグリバイオ技術グループ (0438-75-7020)

■研究成果の具体的図表

ハスモンヨトウ防除用ウイルス農薬の開発

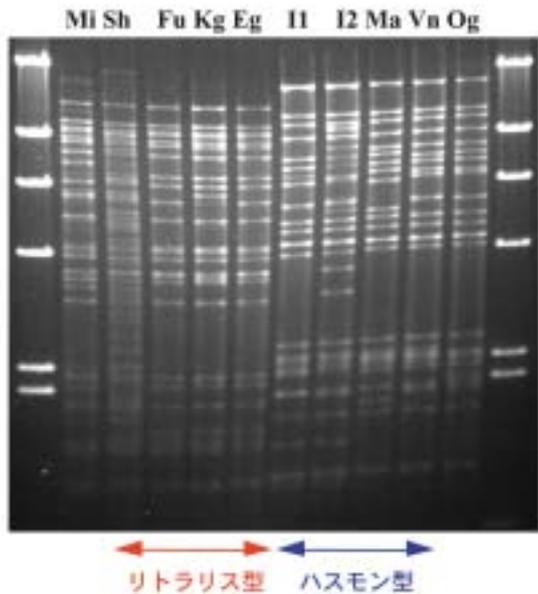


図1 各地で採集された Sp11NPV の制限酵素断片パターン
 Mi:三島, Sh:静岡, Fu:福山, Kg:鹿児島, Eg:エジプト,
 I1, I2:インド, Ma:マレーシア, Vn:ベトナム, Og:小笠原

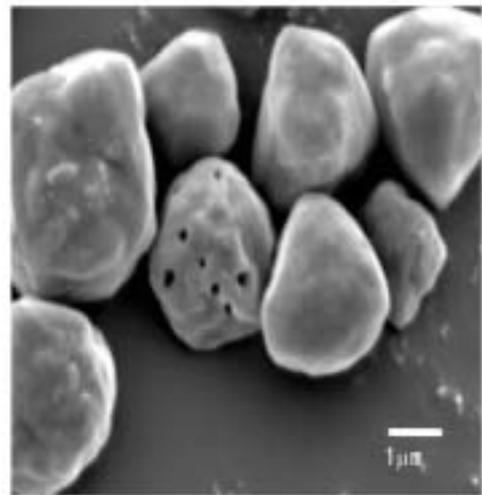


図2 Sp11NPV の包埋体(ウイルス粒子がタンパク質に包埋されている) 走査電子顕微鏡写真

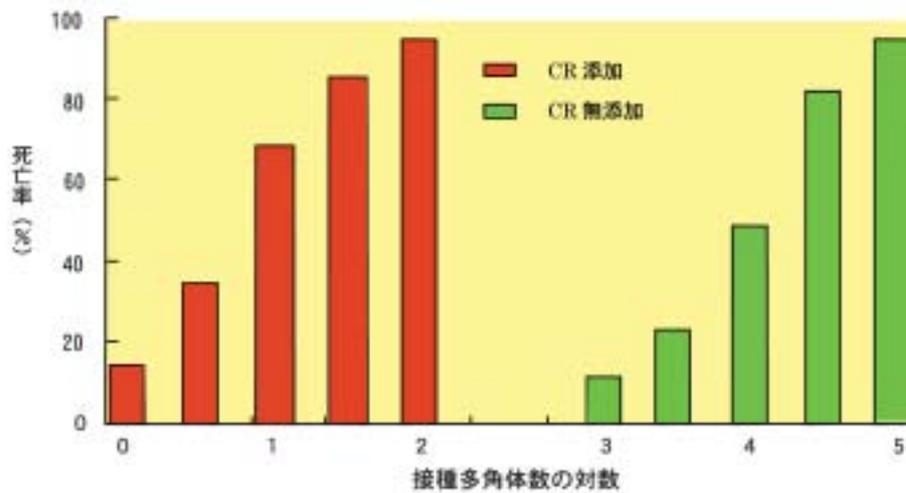


図3 ハスモンヨトウ4齢幼虫におけるウイルス感染増進物質 CR の Sp11NPV に対する感染増進効果

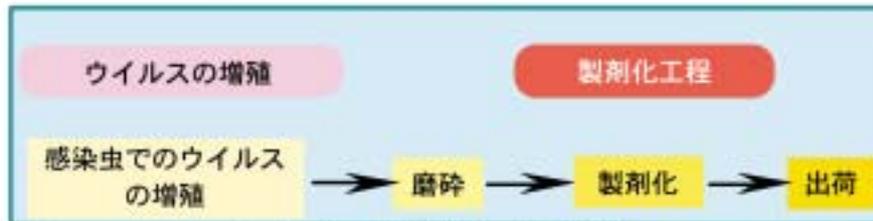


図4 ハスモンヨトウで SplitNPV を使った大量増殖システム
(週当たり 25,000 頭の感染虫を使用)



図5 SplitNPV の大量増殖風景

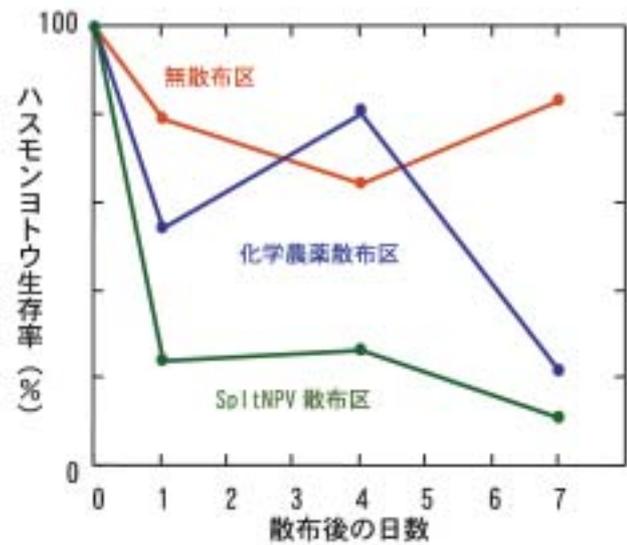


図6 SplitNPV によるハスモンヨトウの防除試験結果 (ダイズ畑)

Gliocladium 菌を用いた新規土壌病害防除剤



図7 グリオ菌処理によるネギ白絹病の防除効果

■研究課題名

食品の機能を高めるための新機能酵素の開発

■研究項目と担当機関（研究代表者、◎は技術コーディネーター）

- ①分子デザインに基づく新機能酵素の開発技術に関する研究
独立行政法人食品総合研究所（◎林 清 [H12-15]、◎北岡 本光 [H16]）
- ②コージビオースホスホリラーゼによる新規機能性オリゴ糖の創出
㈱林原生物化学研究所（福田 恵温）
- ③ α -glucosidase を利用した機能性オリゴ糖の開発
日本食品化工㈱（山本 幹男 [H12-14]、小川 浩一 [H14-16]）
- ④マンノースからマンノオリゴ糖を効率的に生産する酵素の開発
昭和産業㈱（三吉 新介 [H12-13]、富田 哲司 [H13-16]）
- ⑤バイオテクノロジー活用による機能性オリゴ糖製造のための新機能酵素の開発
明治製菓㈱（窪田 英俊）

■研究の目的

近年、我が国では生理機能をもつ様々なオリゴ糖が開発されている。これらのオリゴ糖は厚生労働省の特定保健用食品として認定されるなど、その生産・利用は世界でも最先端に位置している。オリゴ糖は酵素を用いて生産されているが、目的とするオリゴ糖以外の副産物が生成されること、また免疫強化等の有用な生理機能が期待されても大量製造に利用できる酵素が見出されていないことなど解決すべき問題が残されていた。そこで本研究では、バイオテクノロジーを活用して、オリゴ糖生産酵素の特性の改良技術、新世代の生理機能性オリゴ糖を生産する技術を開発する。

■主要な成果

- ①酵素の改変手法の開発
 - (1) 基盤技術となる酵素の改変方法として、プラスミドなどの環状 DNA に簡便にランダム変異を導入する新技術を開発した。すなわち、環状 DNA をランダム変異を含む直鎖状 DNA に増幅した後、増幅産物をそのまま大腸菌に導入すると、菌体内で環状 DNA に自動的に再生され、変異酵素ライブラリーが構築される。この方法は従来のエラープライム PCR 法と比較して、時間が半減し、特殊な機器（サーマルサイクラー）も不要である（図 1）。
 - (2) 高温で安定なキシラナーゼがアルカリ性の pH でも作用できるように改変することを試みた。高温で安定な酵素がアルカリ性でも働くことができれば洗剤に添加することが可能になる。アルカリ性で働くキシラナーゼの特定な二つの部位を高温で安定なキシラナーゼに導入したところ、高温で安定かつアルカリ性で働くキシラナーゼに改変できた（図 2）。
- ②フラクトオリゴ糖

フラクトオリゴ糖は酵素である β フラクトフラノシダーゼを砂糖に作用させて製造されているが、この時、種々のフラクトオリゴ糖の混合物になる。この酵素を改良し、特定のフラクトオリゴ糖を選択的に作るようにして、結晶フラクトオリゴ糖を製造することに成功した。

 - (1) 1-ケストースを唯一の炭素源とする培地上で変異酵素を生産する酵母を培養・選択した。小さなコロニーを形成する酵母から 1-ケストースを製造するのに適した変異酵素を、また大きなコロニーからニストースを製造するのに適する変異酵素を各々得た。このようにしてコロニーの大きさを指標として特定の

フラクトオリゴ糖の製造に適する酵素を簡便に取得する方法の開発に成功した（図 3）。

- (2) 重合度 3 のフラクトオリゴ糖である 1- ケストースを選択的に作る酵素（改変酵素）を利用して結晶 1- ケストースの製造に成功した（図 4）。結晶オリゴ糖は錠剤・チョコレートなどに添加することが可能であり、オリゴ糖の用途が広がった（図 5）。

③ コーシオリゴ糖

ブドウ糖が α 1, 2 結合した構造のコーシオリゴ糖は古くから麴に含まれていることが知られており、種々の生理活性が期待されている。しかしコーシオリゴ糖の有効な製造方法がなかった。そこで新規に見いだした酵素であるコーシビオースホスホリラーゼを用いたコーシオリゴ糖の製造法およびその生理活性について検討を行い、バイオリクターによる新規な製造法を開発するとともに新たな生理機能を発見した。

- (1) 酵素を工業的に用いるためには酵素の安定性が高いことが重要である。そこで、遺伝子工学的手法によりコーシビオースホスホリラーゼの耐熱性向上を試み、75℃ での安定性を飛躍的に高めることに成功した（図 6）。
- (2) 固定化酵素を用いたバイオリクターシステムを活用して、トレハロースを原料としてセラギノースを主成分とするコーシオリゴを製造することに成功した。バイオリクターは 100 日以上連続運転が可能であり工業的に使用できることを実証した（図 7）。
- (3) セラギノースを主成分とするコーシオリゴ糖の生理機能を種々検討した結果、新たに脂肪低減作用を見出した。この生理機能は肥満・成人病予防食品への応用可能性を示している（図 8）。

■ 発表した主な特許と論文

- ① 特開 2004-154014：耐熱性コーシビオースホスホリラーゼ：独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構・株式会社林原生物化学研究所
- ② 特開 2004-242528：結晶 1- ケストース製造に用いる β -フルクトフラノシダーゼの選抜法：独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構・明治製菓株式会社
- ③ Fujii, R., et al. One-step random mutagenesis by error-prone rolling circle amplification. *Nucleic Acids Res.*, 32 (19), e145/1-5 (2004)

■ 事業化の見通し

- ① 結晶化高純度フラクトオリゴ糖（1- ケストース）に関しては、工業規模での製造試験を実施している。目標原価達成の後、本格事業化する予定である。
- ② 新たな酵素が発見され製造可能となったコーシオリゴ糖に関しては、脂肪の沈着を抑制するという、従来のオリゴ糖にない新しい生理機能が見出され、有望視されている。現在、kg オーダーのコーシオリゴ糖の製造に成功している段階であり、今後、製品の市場規模等を調査しながら開発研究を継続する。

■ 問い合わせ先

- ① 結晶フラクトオリゴ糖（メイオリゴ CR）：明治フードマテリア株式会社
新素材事業部（03-3273-3521）
- ② コーシオリゴ糖：林原生物化学研究所 天瀬研究所（086-231-6731）

研究成果の具体的図表

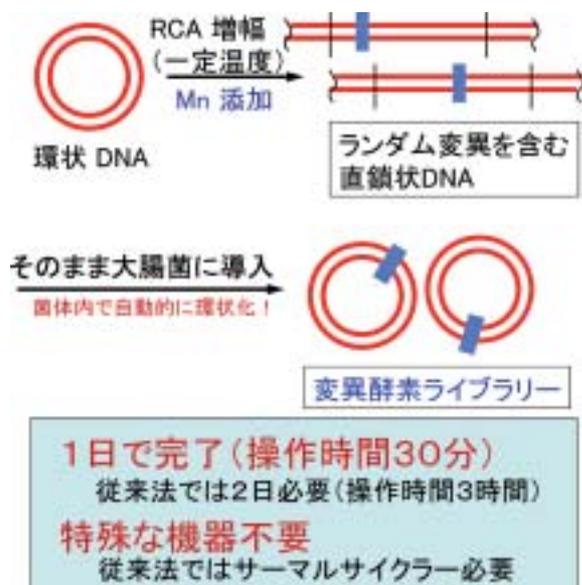


図1. 簡便な変異酵素ライブラリー作成技術の開発に成功

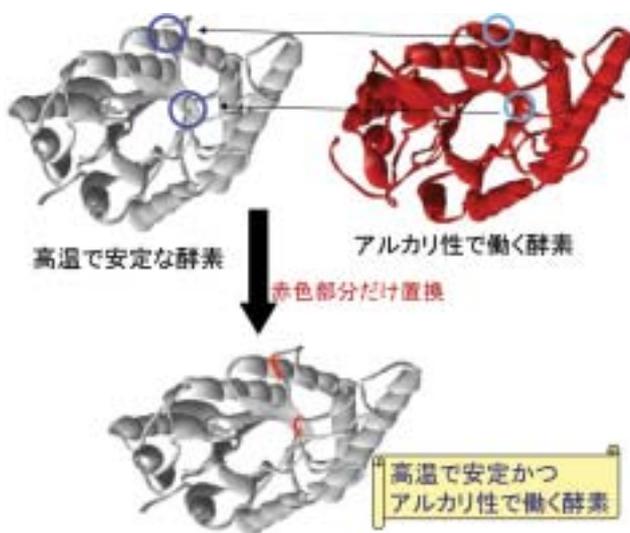
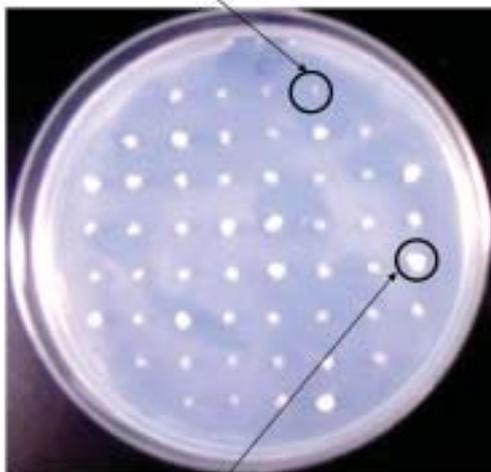


図2. 高温で安定な酵素がアルカリ性でも働くように改変

小さいコロニー
1-ケストース製造に適した酵素



大きいコロニー
ニストース製造に適した酵素

図3. 1-ケストース生産に適した酵素を含む酵母を簡便に見つけだす方法を開発

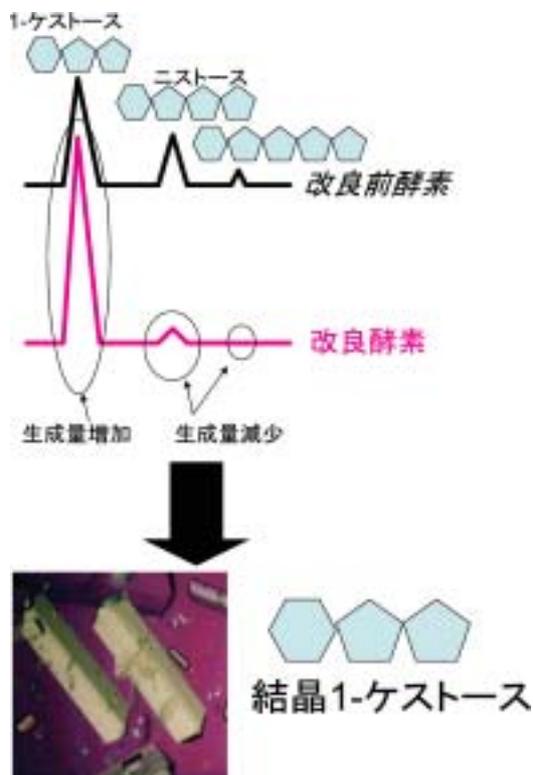


図4. 結晶1-ケストースの製造に成功



図5. オリゴ糖の結晶化による用途拡大

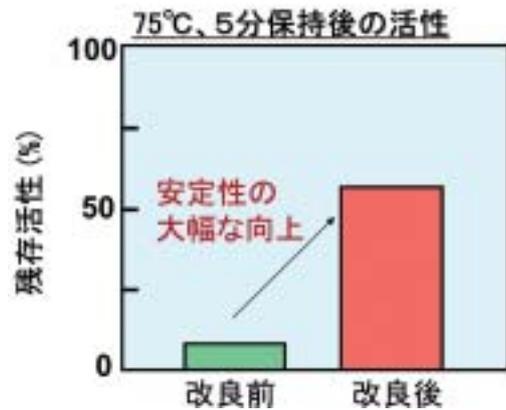
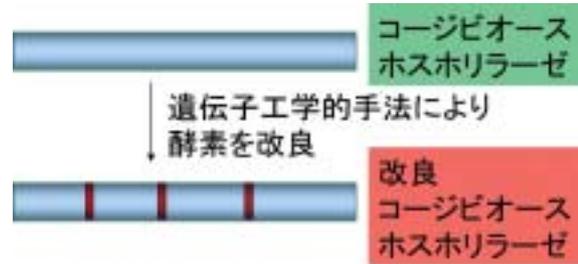


図6. コージビオースホスホリラーゼの耐熱性向上に成功

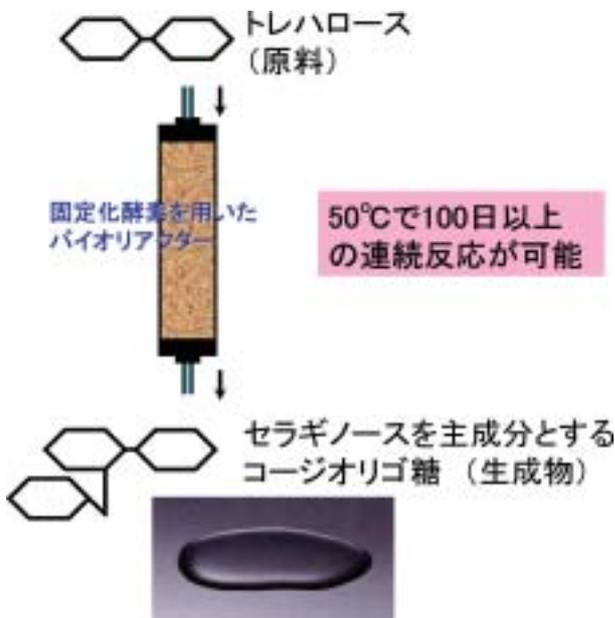
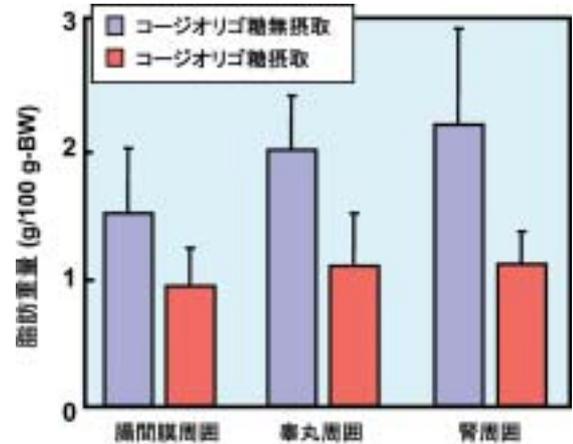


図7. バイオリアクターによるセラギノースを主成分とするコージオリゴ糖の連続生産に成功



ラットでの動物実験の結果
脂肪低減作用を発見

オリゴ糖の新規な生理機能

図8. セラギノースを主成分とするコージオリゴ糖の脂肪低減作用を発見

■研究課題名

遺伝子の分子レベル操作技術の開発

■研究項目と担当機関（研究代表者、◎は技術コーディネーター）

- ①遺伝子工学における分子操作
国立大学法人東京大学大学院工学系研究科（◎鷲津 正夫 [H12-13: 京都大学]）
- ②遺伝子工学に関するレーザーマニピュレーション装置の開発
㈱モリテックス（大塚 喜弘 [H12]、堀尾 浩司 [H13-16]）
- ③細胞操作機能を集積したチップを用いたフロー系で細胞機能を経時的に解析する技術の研究開発
㈱島津製作所（中西 博昭）
- ④新作物作出を促進する光による機能性成分の微量分析システムの開発
浜松ホトニクス㈱（平松 光夫）

■研究の目的

本コンソーシアムでは、マイクロ・ナノテクノロジーを用い、1分子操作によるDNAの解析技術と、それを実現するための細胞1個レベルでのハンドリング技術および超高感度の分析システムを開発する。

具体的には、①DNA-タンパク相互作用解析のための分子操作技術の開発、②小型軽量で操作性に優れ、既存の顕微鏡に取り付け可能なアドオン型レーザーマニピュレータの開発、③様々な波長領域に対応する近接場観察用・分子加工用の近接場光ファイバプローブの開発、④細胞が発現する物質をリアルタイムで高感度検出できる細胞機能解析チップの開発、⑤マイクロチップキャピラリーを用いた走査型蛍光等電点電気泳動による導入遺伝子産物測定装置の開発、および、⑥化学発光と蛍光の同時測定による免疫機構解析装置のプロトタイプ構築を行う。

■主要な成果

- ①DNA-タンパク相互作用解析のための分子操作方法および装置の開発を行い、RNAポリメラーゼがRNAを合成する時にDNA上を移動していく様子の1分子観察に成功した（図1）。
- ②集光されたレーザーの焦点に微小な物体が捕捉される現象を利用して顕微鏡下で細胞や分子などの対象を捕捉し、レーザー焦点を移動させることにより対象の移動を行う装置「アドオン型レーザーマニピュレータ」（図2）を開発、製品化した。本装置は、小型軽量、光ファイバー接続により既存の顕微鏡に直装、コンピュータから簡単に操作できる（図3）、などの特長を有する。
- ③単一細胞・単一分子を観察したり加工したりするための微小領域光照射プローブとして、3種類の波長領域（紫外・可視・赤外）の近接場用光ファイバプローブを開発した。可視光近接場光学顕微鏡用光ファイバプローブ（図4）は、従来比20倍の光透過率を持ち、高感度高分解能蛍光観察ができる。また、紫外線用のファイバプローブでは、開口部からの紫外線照射によるDNA切断などができる。
- ④限られた個数の貴重な細胞試料の産生する物質を計測するため、微細加工技術を用いて作製された微小細胞培養室で少数（数十個～百個）の細胞を培養し、マイクロバルブにより刺激物質を定量添加した時の応答を経時的に計測する、細胞機能解析チップ（図5）を開発した。平成17年秋に「細胞培養チップ実験キット」として発売予定。
- ⑤機能性ペプチド等を等電点電気泳動を用いて高感度で分析するため、等電点を均一化した蛍光標識抗体の作製法を開発するとともに、マイクロチップキャピラリーを用いた自動化走査型等電点電気泳動装置（図6）を開発した。

⑥細胞内カルシウムイオン Ca^{2+} とスーパーオキシドイオン O_2^- の経時的な濃度変化を4つの試料に対し同時並列測定可能な、蛍光/化学発光同時測定装置(図7)を開発した。食品の免疫賦活能の評価や医薬品の免疫関連機能の研究開発に適用できる。好中球のトリペプチド(f-MLP)刺激による応答を測定したところ、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に続く O_2^- の産生が測定された(図8)。

■発表した主な特許と論文

- ①特開2003-255256：光スキャンニング装置：独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構・株式会社モリテックス先端技術研究所
- ②特開2004-279143：時間分解偏光解消法による分析法および装置：独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構・(株)島津製作所
- ③特開2004-61438：化学発光および蛍光の経時変化測定装置および方法：浜松ホトニクス株式会社
- ④黒沢修ら マイクロシステムを用いた DNA の特定部位の取得 電気学会センサ・マイクロマシン準部門誌 *IEEJ Trans. FM*, 123(4), 112-117(2003)

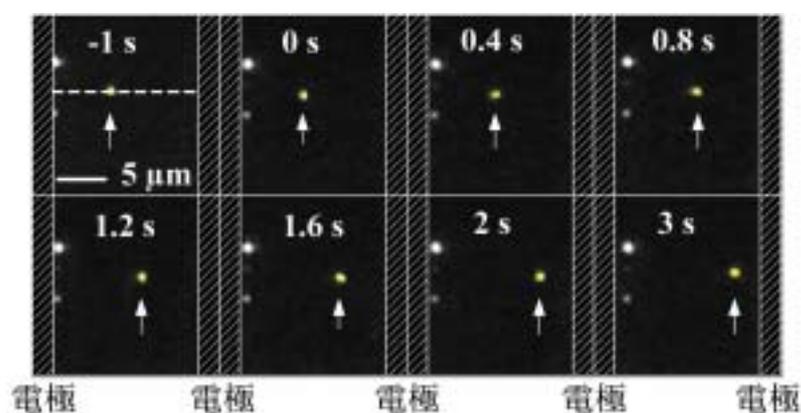
■事業化の見通し

- ①アドオン型レーザーマニピュレータを平成16年4月より3台試作販売。可視光近接場光学顕微鏡用光ファイバプローブを平成16年4月より78本試作販売。
- ②平成17年秋に「細胞培養チップ実験キット」を発売予定。
- ③蛍光/化学発光同時測定装置は、事業化を検討中。

■問い合わせ先

- ①アドオン型レーザーマニピュレータおよび近接場用光ファイバプローブ：株式会社モリテックス ナノ・バイオサイエンス研究所 (045-913-5808)
- ②細胞培養チップ実験キット：株式会社島津製作所 基盤技術研究所 (0774-95-1650)
- ③自動化走査型等電点電気泳動装置および蛍光/化学発光同時測定装置：浜松ホトニクス株式会社 中央研究所 (053-584-0250)

■研究成果の具体的図表



電極間に伸長固定されたDNA（破線の位置、写真には写っていない）上を、蛍光標識されたRNAポリメラーゼ（黄色）が、RNAの合成が進行するにつれ移動していく。

図1 転写にともなうRNAポリメラーゼ1分子運動の実時間観察



図2 アドオン型レーザーマニピュレータ（顕微鏡に取り付けたところ）

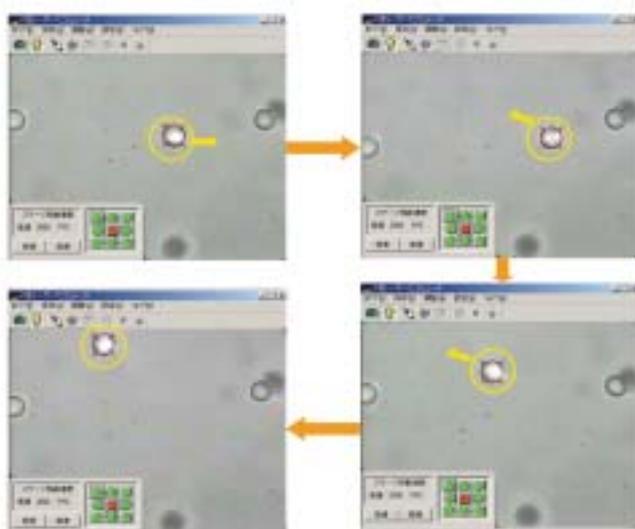


図3 アドオン型レーザーマニピュレータによる操作
捕捉した微粒子を任意の位置に移動可能

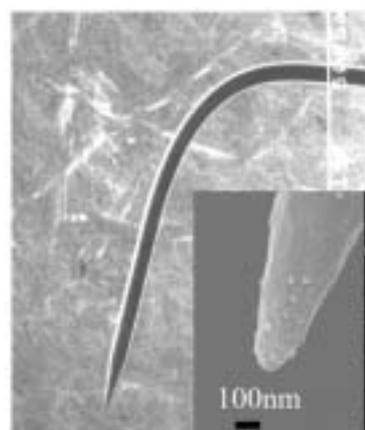
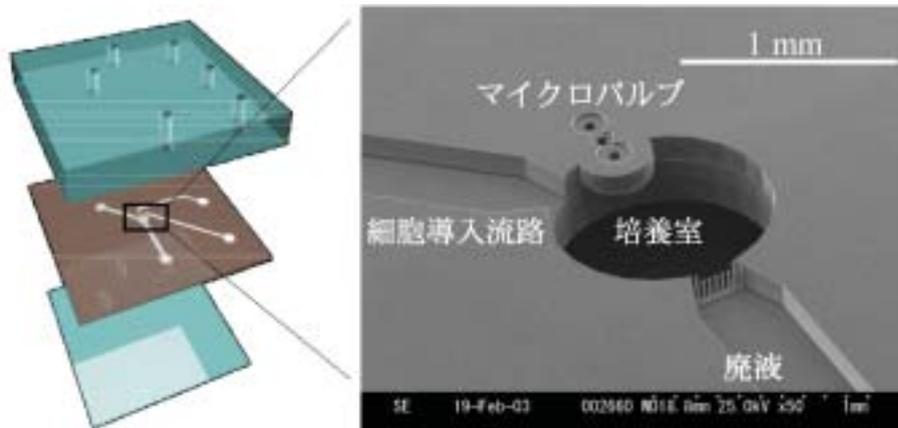


図4 可視光近接場光学顕微鏡用
光ファイバプローブ
右下：数十nmの開口部を有する先端部（電子顕微鏡写真）



240nL-細胞培養室SEM写真

図5 細胞機能解析チップ

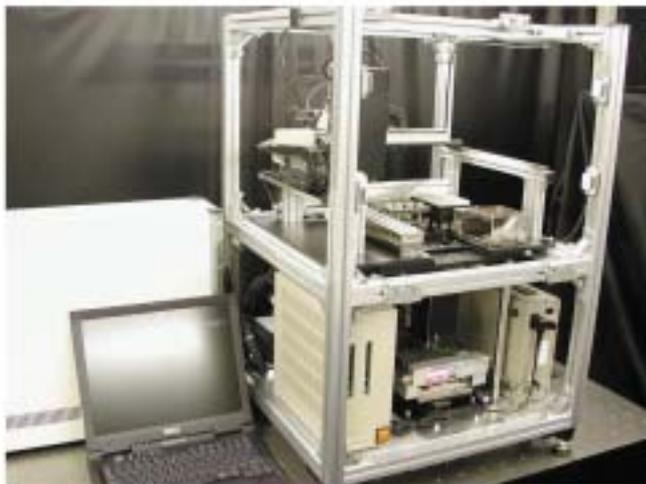


図6 マイクロチップキャピラリーを用いた自動化走査型等電点電気泳動装置



図7 蛍光/化学発光同時測定装置

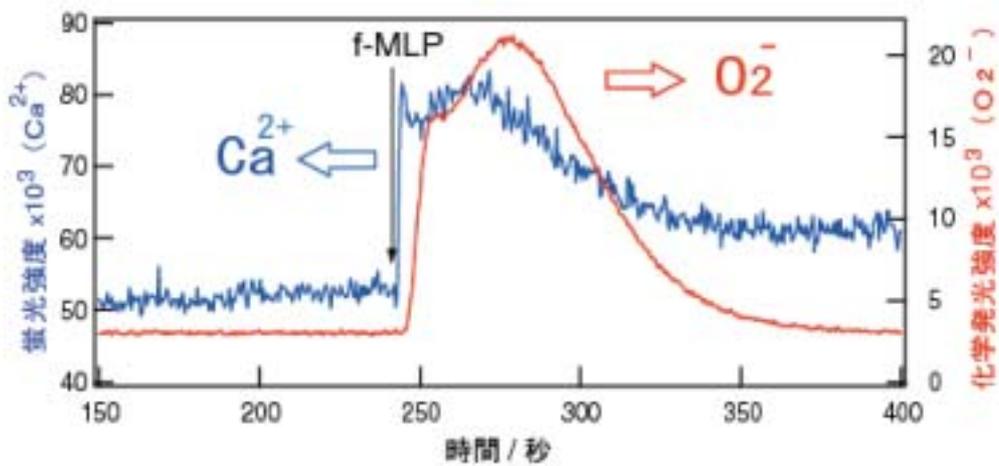


図8 好中球のトリペプチド (f-MLP) 刺激による応答

生物系特定産業技術研究支援センター 東京事務所



お問い合わせ先

新技術開発部 技術開発課

住 所 〒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

電 話 03-3459-6567

FAX 03-3459-6577

生研センターホームページ・アドレス

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

営団地下鉄日比谷線 神谷町 徒歩2分

神谷町駅 霞ヶ関寄り出口3番を出て、左へ10m

左折後50m右手。虎ノ門マリビル10階