

生物系産業創出のための 異分野融合研究支援事業

(2008年度終了課題)

研究成果



表紙の説明

上：酵素合成アミロース（平均分子量 2.2 万）含有食品（タブレット、飲料）。本アミロースは、高結晶性で α -アミラーゼ強抵抗性を示し、消化され難く食物繊維機能が期待される。

[研究課題名：砂糖及びセルロースを原料とする酵素合成アミロースの製造と利用]

（異分野融合型 技術コーディネーター：鷹羽武史）

左下：トマト根の表面に定着した生物防除微生物（根圏土壌生息菌）*Pythium oligandrum* (PO) の緑色蛍光抗体染色像、左隅は製剤として使用する PO の卵胞子

[研究課題名：環境保全型病害防除技術の核となる広スペクトル微生物農薬の開発]

（異分野融合型 技術コーディネーター：竹中重仁）

右下：淡水、閉鎖環境で養殖した出荷サイズ（16g）のバナメイエビ

[研究課題名：安全な国産エビ（バナメイ）生産技術のシステム化]

（異分野融合型 技術コーディネーター：マーシー・ニコル・ワイルダー）

生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業 (2008年度終了課題)

研究 成 果

目 次

異分野融合研究開発型 (研究期間：2004～2008年度)

安全な国産エビ(バナメイ)生産技術のシステム化 マーシー ニコル ワイルダー・野原 節雄・奥村 卓二・福崎 竜生……………	1
環境保全型病害防除技術の核となる広スペクトル微生物農薬の開発 竹中 重仁・高橋 英樹・加来 久敏・半澤 卓・山中 聡・清水 基滋……………	5
植物由来のディフェンシン蛋白質を利用した新規抗菌剤の開発 川田 元滋・大島 正弘・提箸 祥幸・高久 洋暁・清水 力 加藤 秀樹・堀内 達也……………	10
セルロース系バイオマスの複合的変換技術の開発 天野 良彦・木下 晋・藤堂 洋子・柏木 豊・進士 和典・鈴木 雅之……………	13
伝統的醗酵産業を再生する革新的で安全なバイオプロセスの開発 近藤 昭彦・秦 洋二・植田 充美・野田 秀夫・田中 久志……………	17
リン資源の再利用技術とリサイクルシステムの開発 大竹 久夫・佐藤 恵一・長谷川 進・美濃和 信孝・古畑 哲 阿江 教治・佐藤 英俊・黒田 章夫……………	21

異分野融合研究開発型 (研究期間：2005～2008年度)

砂糖及びセルロースを原料とする酵素合成アミロースの製造と利用 鷹羽 武史・和田 守・北村 進……………	25
--	----

起業化促進型 (研究期間：2007～2008年度)

低アレルギー大豆加工食品の開発と製造・流通システムの構築 小川 正・森山 達哉・高橋 浩司・河智 義弘・土肥 貞夫 村田 陽子・折笠 廣司……………	29
電気化学計測技術を用いた受精卵品質評価システムの開発と実用化 阿部 宏之……………	31
天敵誘引剤・活性化剤を用いた害虫管理 高林 純示・松原 弘行……………	33

■ 研究課題名

安全な国産エビ(バナメイ)生産技術のシステム化

■ 研究項目と実施体制 (◎は技術コーディネーター)

- ①生理学的研究によるバナメイ淡水化養殖技術の確立
(◎マーシー ニコル ワイルダー／(独)国際農林水産業研究センター)
- ②高密度循環式エビ生産プラントの開発
(野原 節雄／株式会社アイ・エム・ティー)
- ③エビ(バナメイ)のストレス評価・低減技術の開発
(奥村 卓二／(独)水産総合研究センター 養殖研究所)
- ④バナメイ用配合飼料の開発
(福岡 竜生／株式会社ヒガシマル)

■ 研究の目的

日本では大量に消費しているながら自給率が10%程度しかないエビ類の国産化技術を開発し、安全な食料自給の実現に貢献することを目的とする。高密度循環式バナメイエビ生産システムを構築し、マニュアルに基づく飼育方法・ストレス低減方策、さらに高密度養殖に適した植物性タンパク質を利用した低環境負荷の専用飼料も提供する。バナメイエビ養殖では世界最高水準の高密度(10kg/m³)を通年で実現し、安定的な事業推進が図れるようにする。

■ 主要な成果

- ①バナメイエビの浸透圧調節機構を調べ、稚エビの最適な低塩分飼育水(塩分濃度5ppt、硬度1400ppm)のほか、低塩分水への最適馴致期間(5pptの場合、1日以上が必要)(図1)を見出した。
- ②バナメイエビの生殖機構解明の一環として、眼柄由来のペプチドを詳細に解析した結果、7種の卵黄形成抑制活性を保持するペプチドを明らかにした(図2)。この結果に基づき、卵黄形成抑制ホルモン(vitellogenesis-inhibiting hormone: VIH)の同定に成功し、ホルモン投与等による親エビの人為催熟技術の開発に取り組んだ。また、国内でのエビ類生産の安定化を図るため、種苗生産技術のシーズ開発を試みて、親エビの成熟誘導に成功した(図3)。
- ③高密度循環式エビ生産プラントを開発するに当たり、バナメイエビの各成長段階における最適な水温、酸素消費量(図4:クルマエビの3倍)、流速、水質を解明し、エビ生産システム(図5)を設計し特許を取得した。
- ④プラント機器(造波ゲート、マイクロスクリーン、沈殿物排除装置、酸素混合器、人工海草、低揚程大流量循環ポンプ、収穫用四手網など)(図6)を独自に開発製作し、これらを利用した事業規模での実証プラント(図7)を建設した。実証プラントでは、最終生存率58.9%、密度9.43kg/m³を実現している。また、プラント運転は素人でも可能な様に、各種運用マニュアル類の整備を行い、現地での教育に利用している。
- ⑤バナメイエビのストレスを、病気への抵抗力を中心に評価した。バナメイエビに溶存酸素低下、アンモニア濃度増加、絶食、ハンドリング等のストレスを与えると、生体防御関連遺伝子の発現量が増減することから、遺伝子発現量によってストレスを評価できる。その結果をもとに、実証プラントでの育成試験について飼育密度とストレス指標の関係を調べたところ、目標とする高密度水準(1000尾/トン)で育成しても、水質管理が適切に行われていればストレスは適正範囲に保つことができる(図8)。

- ⑥バナメイエビの基礎的栄養要求量を解明し、低塩分育成水での育成環境を勘案して、バナメイエビ育成用の基本飼料組成を決定した。またこの基本飼料のタンパク質の組み合わせ検討や、植物性タンパク量を増やすなどの工夫により、飼料の低価格化を実現するとともに、増肉効果の高い経済的飼料組成を確立した（図9）。粘結剤を検討することにより、餌の水中保形性が向上し、飼育水の水質安定、劣化防止に貢献した。
- ⑦以上コンソーシアム各機関の知見を全て統合し、商業レベルのエビ育成マニュアルを作成、それに基づいて実証プラントにおいて育成実験を行った上で、平成19年9月より、商業運転も開始、平成19年12月より「妙高ゆきエビ®」として地元を中心に販売を開始した。

■ 公表した主な特許と論文

- ①特許第4242875：水槽内の沈殿物排除装置及びこれらを用いた水産養殖装置：(株)アイ・エム・ティー
- ②特開2008-043252：室内型エビ生産に用いるエビ育成・健康管理システム：(独)国際農林水産業研究センター、(株)アイ・エム・ティー
- ③Tsutsui, N., *et al.* Purification of sinus gland peptides having vitellogenesis-inhibiting activity from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Marine Biotechnology* 9: 360-369 (2007)
- ④Okumura, T. Effects of lipopolysaccharide on gene expression of antimicrobial peptides (penaeidins and crustin), serine proteinase and prophenoloxidase in haemocytes of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* 22: 68-76 (2007)

■ 今後の展開方向

- ①安定的な国内種苗生産：エビ類全般における親エビの人為催熟技術の開発、成熟機構の解明を行い、安定的な国内種苗生産を行う。
- ②水産物の自給率向上に繋がる本システムは、実証プラントによる商業生産を開始したが、安定的な生産を持続するための更なる改良が必要となっている。特に、本委託研究で達成した高密度育成下での水質安定手法や、エビのサイズ別収穫方法などが課題となっている。
- ③上記課題を解決しつつ、今後、安心安全な国産エビ生産工場を全国に建設することにより、安全な食料自給の実現に貢献する。また遊休耕作地の利用や雇用確保、特産物による観光振興などの波及効果につなげる。
- ④エビプラントにおいてストレス評価、低減技術が有効に働くことが明らかになった。本技術を他の陸上養殖魚種に展開することで、日本で低調な陸上養殖技術開発を促進する一助となりうる。

■ 問い合わせ先

- ①生理学的研究によるバナメイ淡水化養殖技術の確立：(独)国際農林水産業研究センター (029-838-6370) (<http://jircas.affrc.go.jp>)
- ②高密度循環式エビ生産プラントの開発：株式会社アイ・エム・ティー (03-5363-6942) (<http://www.imt-japan.co.jp>)
- ③エビ（バナメイ）のストレス評価・低減技術の開発：(独)水産総合研究センター 養殖研究所、(0599-66-1830) (<http://nria.fra.affrc.go.jp>)
- ④バナメイ用配合飼料の開発：株式会社ヒガシマル (0996-33-5412) (<http://www.k-higashimaru.co.jp>)

■ 研究成果の具体的図表

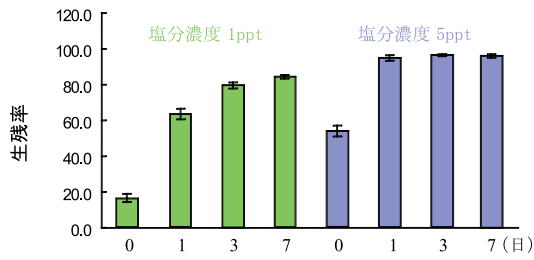


図1. 各低塩分水への馴致期間と稚エビ生残率の関係

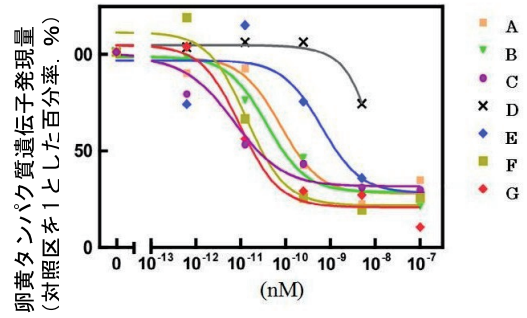


図2. バナメイ眼柄由来の7種(A~G)ペプチドの卵黄形成抑制活性

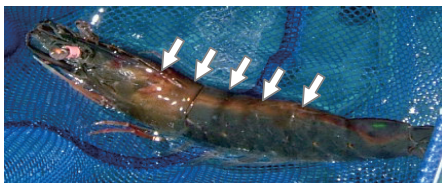


図3. 人工授精に使用した親エビ (矢印は成熟した卵巢を示す)

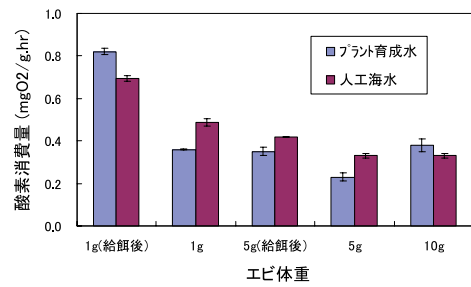


図4. バナメイの酸素消費量 (0.4~0.5mg/g·h)

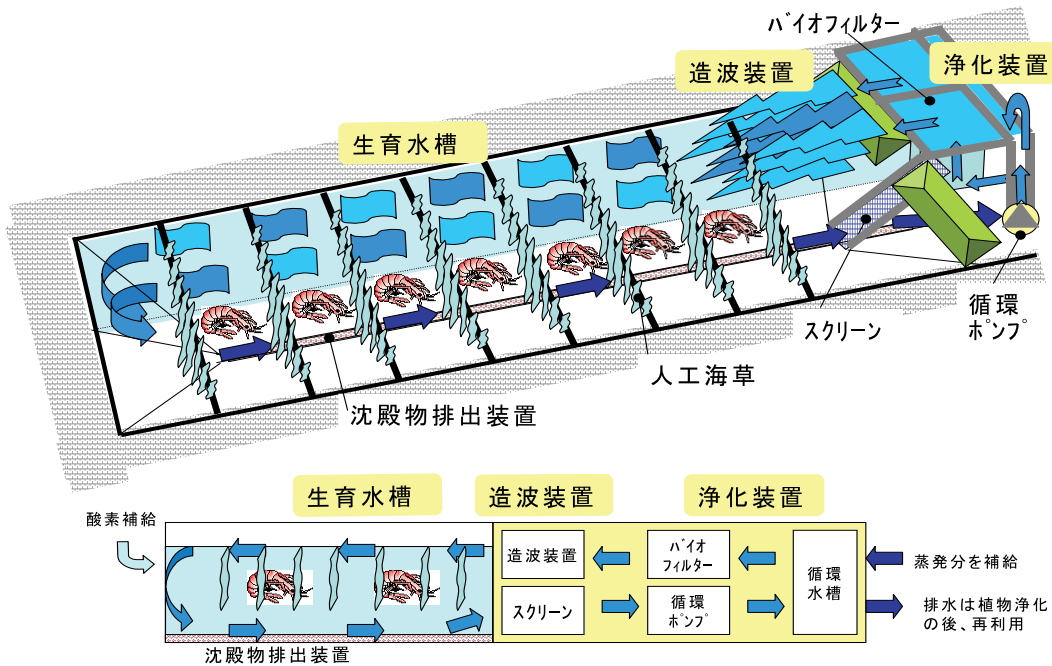


図5. 高密度循環式エビ生産システム



図6. 開発した機器（1 酸素供給器、2 マイクロスクリーン、3 循環ポンプ、4 沈殿物排除装置、5 造波ゲート）

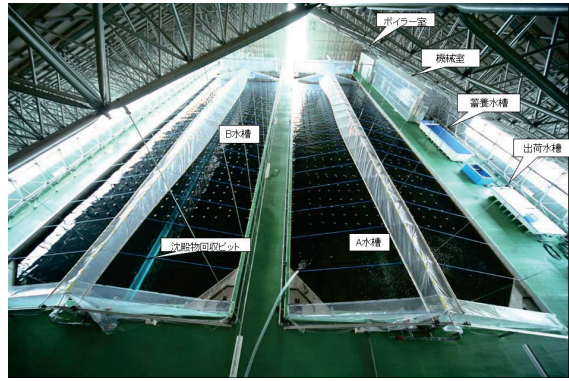


図7. 実証プラント（600トン2基）

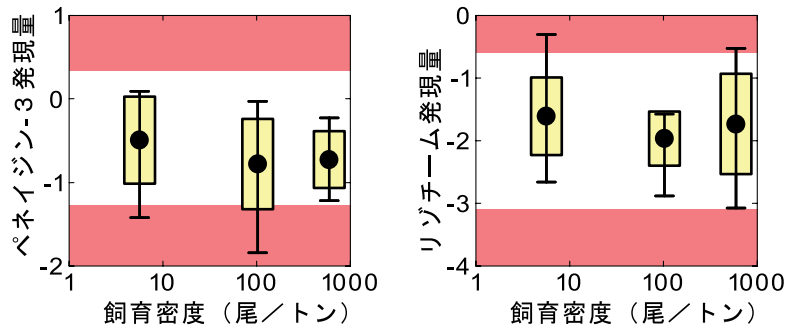


図8. 実証プラントで育成したエビの飼育密度とストレス指標
（黒丸は平均値、黄色四角は標準偏差、棒は範囲。飼育実験で求めたストレス指標の適正範囲外を図中に赤色で表示。発現量をβ-アクチン発現量との相対値にして対数表示。）

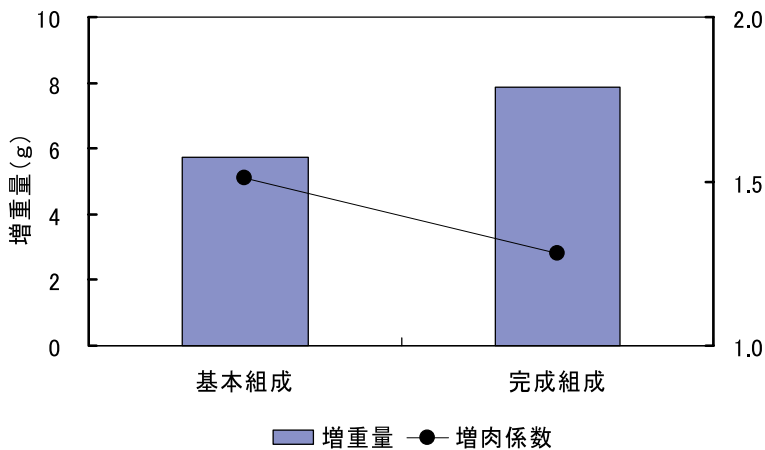


図9. 餌の組成改良によるエビの成長への貢献
（増重量は8週間の育成期間でのエビ1尾当たりの体重の増加を表す。
※増肉係数とは：エビを1g成長させるのに必要な餌のg数の比率で、この数値が低いほど飼料効果が優れる。）

■ 研究課題名

環境保全型病害防除技術の核となる広スペクトル微生物農薬の開発

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ① *Pythium oligandrum* (P0) の作物根圏への定着性および病害抑制機能の解明
（◎竹中 重仁／（独）農研機構 北海道農業研究センター）
- ② P0 施用作物における分子応答機構の解明
（高橋 英樹／国立大学法人東北大学）
- ③ バイオセンサーを用いた P0 適応土壌の解明
（加来 久敏／株式会社サカタのタネ）
- ④ P0 の大量培養法、製剤化および保存性の検討
（半澤 卓／北海三共株式会社）
- ⑤ 園芸作物、イネ病害防除技術開発のための P0 の性能最適化
（山中 聡／アリスライフサイエンス株式会社）
- ⑥ 畑作物病害防除技術開発のための P0 の性能最適化
（清水 基滋／北海道立十勝農業試験場）

■ 研究の目的

土壌生息菌 *Pythium oligandrum* (P0) は、①多くの病原菌に寄生する能力、②植物根から供給される栄養や生息域を勝ち取る競争能力、③植物に病害抵抗性を誘導する能力など、微生物農薬として極めて優れた特性を有する。そこで、この P0 の機能を徹底的に究明するとともに、P0 の製剤化を検討し、トマト青枯病を始めとした重要病害に対する P0 の性能最適化を図ることにより、広範囲な作物病害に効果のある「広スペクトル微生物農薬」を開発する。

■ 主要な成果

- ① 根圏での P0 の定着性を解明するため、土壌からの P0 の特異的検出定量法と特異的染色法を開発した。これにより、P0 は土壌の殺菌の有無にかかわらず卵胞子の施用量が増加するとトマトの根圏での定着量が増加すること、P0 はトマトの根部の表皮細胞および根毛に定着し（図 1）、一部は表皮細胞内に侵入する。
- ② P0 はトマト根圏での定着量が少なくてもトマト青枯病に抑制効果を示し（図 2）、P0 が主根の基部等に定着することにより抵抗性が誘導され（図 3）、側根等の傷口から侵入した青枯病の上部への増殖を抑制する（図 4）。
- ③ P0 の抵抗性誘導物質として、POD-1 と POD-2 という 2 種類のタンパク質からなる P0 の細胞壁タンパク質画分（CWP）（図 5）が関与している。P0 の CWP をトマトの根に処理すると、表 1 に示すように、植物ホルモンであるジャスモン酸 (JA) やエチレン (ET) を介したシグナル伝達系に関与する遺伝子、糖代謝やアミノ酸代謝に関わる遺伝子、ファイトアレキシン合成などの 2 次代謝系に関わる遺伝子の発現が強く誘導される。また、P0 の卵胞子を施用しても CWP 処理と共通した遺伝子の発現が確認され、P0 の卵胞子と CWP 処理で、共通したシグナル伝達系が活性化される。
- ④ P0 によるトマト青枯病の抑制機構は抵抗性誘導が主因で、その分子機構を一部仮説も含めて図 6 にまとめた。すなわち、P0 がトマト根部に近づくと、P0 の菌体細胞壁に存在する POD-1 と POD-2 が有するセルロース結合能力によりトマトの細胞壁に付着する。トマトは POD-1 と POD-2 の形成する複合体のある構造部分を認識して、SGT1 や RAR1 タンパク質を介して JA と ET のシグナル伝達系を活性化させる。その際、ユビキチンリガーゼ *LeATL6*

は、標的タンパク質 SAMDC にユビキチンを付加させプロテアソームで分解させることにより ET 合成を亢進するとともに、JA シグナル伝達系を介して下流にある防御関連遺伝子 *PR-6* の発現を制御する。また、ET 合成の過程で発生するシアンの解毒のため、CAS 遺伝子が一過的に発現上昇して無毒のシアノアラニンを生成し、これが JA シグナル伝達系を活性化させ *PR-6* の発現を誘導する。このように P0 により亢進される JA と ET のシグナル伝達系はネットワークを形成し、相互に協調的に防御関連遺伝子群の発現を誘導する。

- ⑤ P0 製剤の主成分として卵胞子を選定し、市販の「人参濃縮ジュース」3%の液体培地で静置あるいは通気攪拌培養することにより、大量の卵胞子が低コストで得られる。次に、P0 製剤として水和剤と顆粒水和剤の処方を検討し、水中での分散が良好な顆粒水和剤（卵胞子濃度 10^6 個/g）の製造に成功した（図7）。また、本製剤は脱酸素剤を入れた場合は室温で6ヶ月間以上の保存が可能であった。
- ⑥ 有効な登録農薬がないトマト青枯病に対して、本 P0 製剤は (a) 鉢上げ時1回処理と (b) 鉢上げ+定植1週間前の2回処理では防除価が低いが、(c) 鉢上げ+定植1週間前+定植2週間後の3回処理することにより、有意に発病を抑制する（図8）。
- ⑦ 本 P0 製剤は、種いもを P0 卵胞子濃度で 1×10^4 個/ml に瞬間浸漬して風乾する処理法で、種いも伝染するジャガイモ黒あざ病に対して有効である（図9）。また、本処理により土壌伝染するジャガイモ黒あざ病に対しても効果が認められ、その防除効果は化学農薬より高い。
- ⑧ 本 P0 製剤はイネばか苗病、イネ苗立枯細菌病、イネもみ枯細菌病、イネごま葉枯病、イネ褐条病に対して、現在、上市されている化学農薬並みあるいはそれらより優れた防除効果を示した。

■ 公表した主な特許と論文

- ① Takenaka, S., *et al.*. Colonization of *Pythium oligandrum* in the tomato rhizosphere for biocontrol of bacterial wilt disease analyzed by real-time PCR and confocal laser scanning microscopy. *Phytopathology* 98:187-195 (2008).
- ② Takenaka, S., *et al.*. Novel elicitin-like proteins isolated from the cell wall of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induce defence-related genes in sugar beet. *Molecular Plant Pathology* 7: 325-339 (2006).
- ③ Hase, S., *et al.* Jasmonic acid signaling is required for bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant Pathology* 57:870-876 (2008).
- ④ Hondo, D., *et al.* Up-regulation of *LeATL6* that encodes a fungal elicitor-responsive ubiquitin ligase induces jasmonic acid-dependent *proteinase inhibitor* gene expression in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 72-81 (2007)

■ 今後の展開方向

- ① 卓効を示す化学合成農薬のないトマト青枯病に対する微生物農薬として、農薬登録に向けた準備を進める。
- ② P0 の CWP による抵抗性誘導機構解明を継続し、将来的なプラントアクティベーター開発のための基盤情報を得る。

■ 問い合わせ先

- ① 北海三共株式会社・農業科学研究所 (011-370-2103)
- ② 北海道農業研究センター (011-857-9260、seika-narch@naro.affrc.go.jp)

■ 研究成果の具体的図表

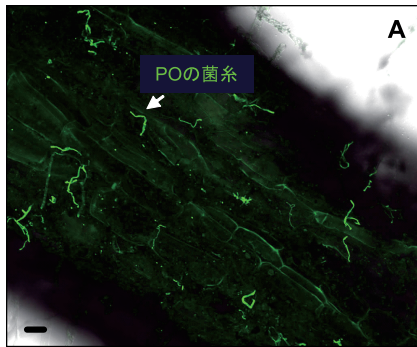


図1 トマト根部表面上に定着しているPOの菌糸
スケールバーは50 μmを示す。

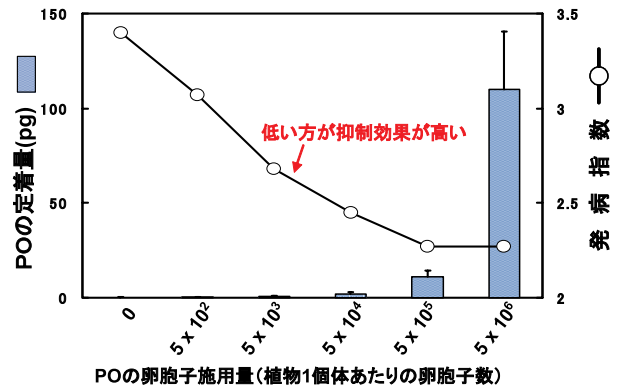


図2 POのトマト根圏での定着量とトマト青枯病抑制効果

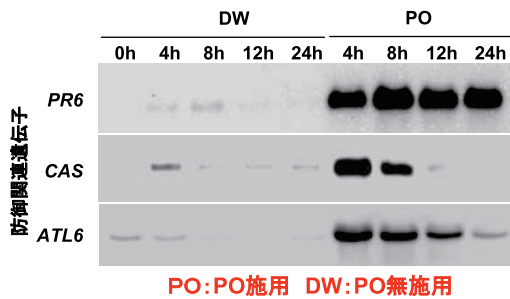


図3 PO定着によりトマトで誘導される
防御関連遺伝子

青枯病菌接種14日後

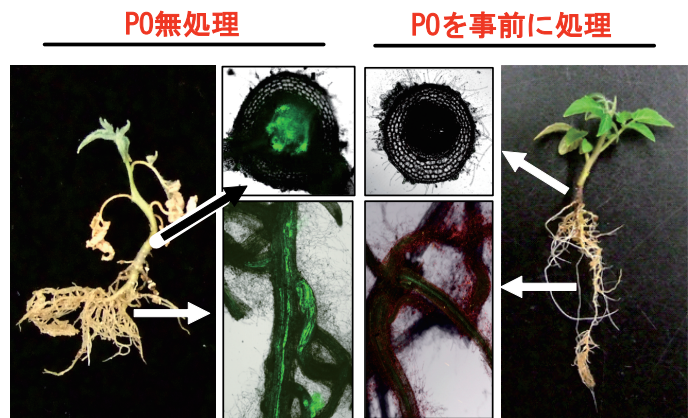


図4 PO処理および無処理トマトの茎部と根部における青枯病菌の動態観察
POは赤色蛍光に、青枯病菌は緑色蛍光に染色されている。

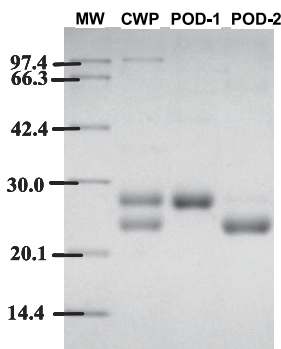


図5 POD-1とPOD-2からなる
POの細胞壁タンパク質
(CWP)

表1 PO菌およびPOのCWPを処理したトマトの根部で発現が亢進された遺伝子

遺伝子の特性	BLASTNとBLASTXによる推定遺伝子	PO菌による発現強度 ^a	CWPによる発現強度 ^a
二次代謝関連	chorismate synthase 1	6.26	6.25
"	3-dehydroquinate dehydratase (EC 4.2.1.10)	4.81	8.10
"	farnesyl pyrophosphate synthase	10.60	9.74
"	L-asparaginase	3.06	5.29
一次代謝関連	transaldolase	4.20	5.07
"	ATP:citrate lyase	9.29	5.03
ETシグナル関連	ethylene receptor homolog	4.16	9.08
"	beta-cyanoalanine synthase (CAS)	7.40	13.50
JAシグナル関連	lipoxygenase (LOX)	4.46	5.27
転写因子	bZip DNA-binding protein	13.20	13.80
ユビキチンプロテアソーム関	RING-H2 zinc finger protein ATL6 (LeATL6)	5.41	13.93
糖代謝	sucrose synthase	5.32	5.74

^b DW処理区と比較した際の発現強度の倍数

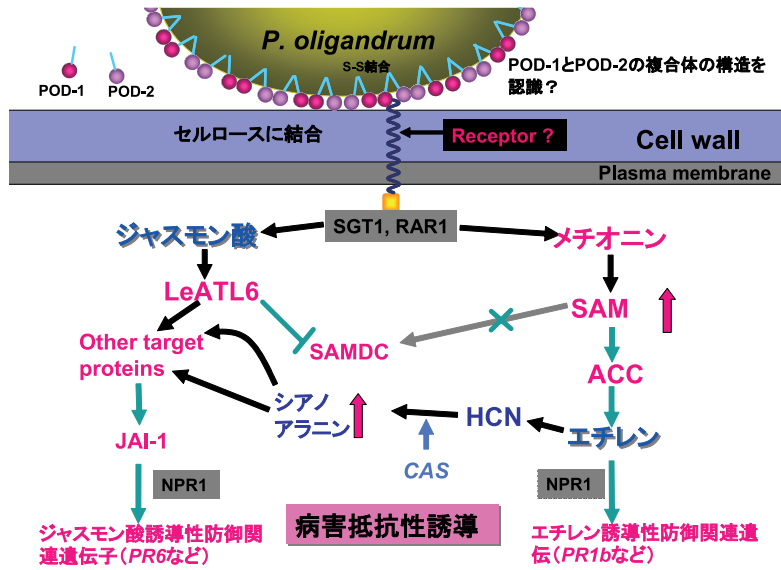


図6 POによるトマトでの誘導抵抗性の分子機構

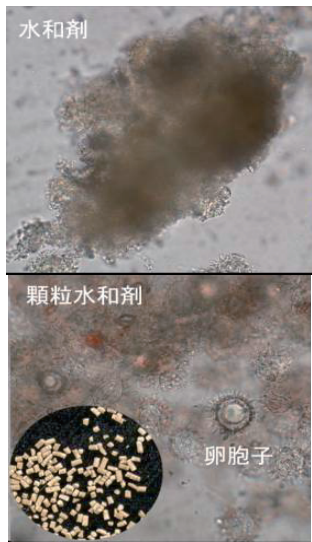


図7 水和剤と顆粒水和剤を水に溶解した時の卵胞子分散の様子

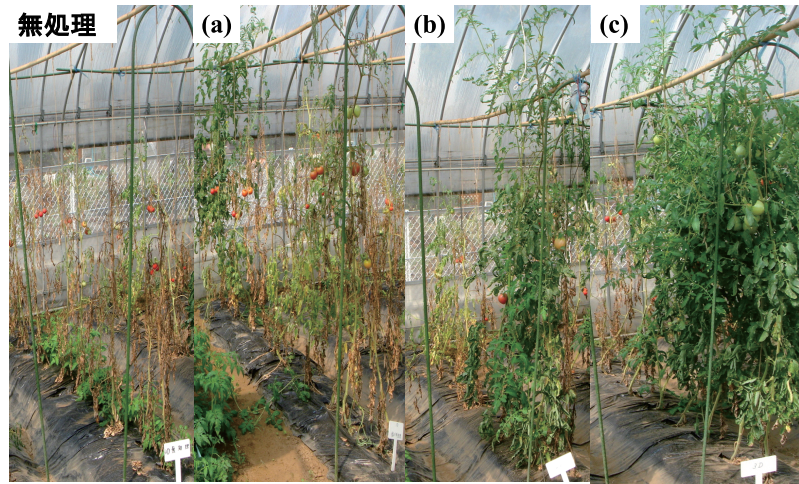


図8 トマト青枯病に対するPOの防除効果 (鉢上げ後91日、定植後65日)

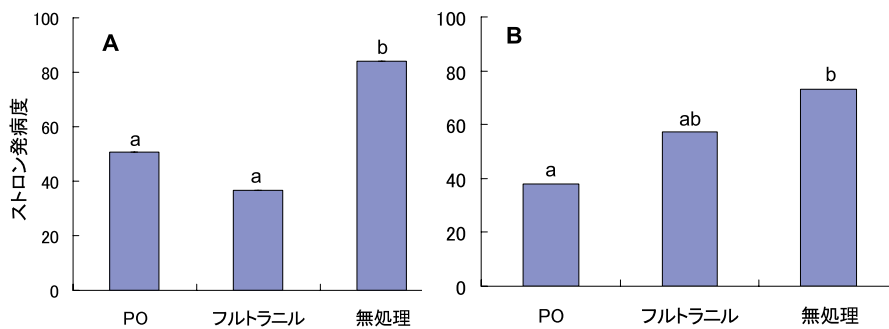


図9 種いも伝染(A)および土壌伝染(B)のジャガイモ黒あざ病に対するPOの防除効果

注: Tukey法により、同一アルファベットは有意差がないことを示す。

■ 研究課題名

植物由来のディフェンシン蛋白質を利用した新規抗菌剤の開発

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ①ディフェンシン遺伝子を導入した高発現微生物系統の開発
（大島 正弘、◎川田 元滋／(独)農研機構 作物研究所）
- ②抗菌活性に関わる構造解析と機能増強型ディフェンシン蛋白質の開発
（◎川田 元滋、提箸 祥幸／(独)農研機構 中央農業総合研究センター）
- ③ディフェンシン蛋白質の分子生化学的特性と作用機作の解明
（高久 洋暁／新潟薬科大学）
- ④ディフェンシン蛋白質の活性スペクトラム解析と製剤化のための技術開発
（清水 カノクミアイ化学工業株式会社）
- ⑤ディフェンシン蛋白質の大量培養による生産・精製の確立
（加藤 秀樹、堀内 達也／ケイ・アイ化成株式会社）

■ 研究の目的

昨今、農作物生産場面での農薬使用には環境負荷低減が求められており、また消費者の購買マインドへの対応の面からも、従来の化学製剤に替わる天然物由来の製剤に対する需要が高まっている。本研究では、植物の持つ抗菌蛋白質(BJ-AFP1)を安く大量に増産し、従来の化学製剤に替わり、安心できる農薬成分として利用する研究を行う。

BJ-AFP1を生産する本研究ではBJ-AFP1を①安く大量に作る②なぜ効くのか、その仕組みを調べる③安全性を確認する④適する用途を見極める、ことを目指し、農業・産業・家庭における農薬や抗菌剤としての用途で実用可能性を見出すことを目指す。

■ 主要な成果

- ①カラシナが持っている抗菌蛋白質(BJ-AFP1)は、糸状菌（カビの仲間）や菌類（バクテリアの仲間）に広く効果があることが判明した（図1）。
- ②メタノールで増殖するピキア酵母にBJ-AFP1遺伝子を導入することで、より高いレベルの発現が期待でき、BJ-AFP1蛋白質を1.2g/L以上生産可能となった（図2、3）。これは研究当初と比較すると約12,000倍にあたる。現在の生産スケールは90L培養槽（有効液量45L）で、1回あたり54g以上のBJ-AFP1が生産可能である。製剤化に向けたBJ-AFP1の特性として高い熱安定性・PH変化に対する安定性・高い常温保存性等の利点を確認した。また実用場面で想定される展着剤との混用条件下で活性が維持されることを確認した。
- ③BJ-AFP1が効果を示す過程の第一段階である、病原菌への着地点（細胞膜上の標的分子）は、類似の既知蛋白質と同じグルコシドセラミドであると判明した。BJ-AFP1存在下で病原菌の細胞膜では、能動輸送に関わる膜電位のバランスが崩れること（脱分極化）、および、細胞の機能低下につながる活性酸素濃度が上昇することを見出した（図4）。BJ-AFP1は、二形成酵母において酵母型から菌糸型への形態変化を誘導することを見出した。この形態変化誘導に関する新知見を糸口に、BJ-AFP1の作用の第2段階である、病原菌における細胞内情報伝達経路の解析が進んだ。
- ④ピキア酵母で生産された高純度BJ-AFP1について、急性毒性、皮膚刺激性、眼刺激性をはじめとする農薬用途向け安全性評価試験に着手し、現時点で実用化には問題無しと判定できる（表1）。
- ⑤農薬としての利用：BJ-AFP1は稲いもち病に加え、キュウリベト病やコムギうどんこ病にも一定の防除効果を示すが、他用途と比較してもっとも低コストが求められる農薬用途

(図5)では、BJ-AFP1 単独施用に限定すると効果・生産効率の両面でなお改善を図る必要がある。しかし稲作体系の変化にともない「高価でも従来の農薬にかわるもの」をもとめる新需要は拡大しており、BJ-AFP1 と微生物農薬との混用で実用化を見通すことができる(表2)。

- ⑥農薬以外の利用として、産業(製紙工程等で問題となる藻類)・家庭(水垢の原因となる藻類)に対する有効性を *in vitro* 実験で確認した。また薬剤用途として、副作用のない新薬が待望されているヒト日和見感染菌 *C. albicans* や、水虫の原因菌である白癬菌 *T. rubrum* に対する有効性を *in vitro* 実験で確認した。

■ 公表した主な特許と論文

- ①特願 2006-318851：藻類防除剤及び藻類防除方法：クミアイ化学工業(株)、(独)農業・食品産業技術総合研究機構、ケイ・アイ化成(株)

■ 今後の展開方向

- ①農薬用途：稲作体系の変化にともなう新需要にマッチした BJ-AFP1
ポジティブリスト制度の施行や減農薬栽培の普及により、大規模な共同防除や液剤散布が制約される現状において、これまでの主力化学製剤にかわる新規防除剤を求める新需要に、BJ-AFP1 の特性はマッチしており、商業的設備投資が実現すれば、従来の化学製剤に対する優位性をもって、適剤不在の市場へ商品投入が可能と考える。
- ②農薬用途：成果をもとにさらなる低コスト生産の余地とアイデア
BJ-AFP1 が 1000ppm 含まれる安定的な大量培養システムが確立できており、BJ-AFP1 の培養液を直接利用できれば精製にかかる工程およびコストを省いた生産が可能となる。成分カウントゼロの天然物と認可されるかどうかポイントになる。
- ③薬剤用途：カンジダ症や水虫の新薬候補
副作用のない新薬が待望されているヒト日和見感染菌 *C. albicans* が BJ-AFP1 高感受性であることを見出した。また、白癬菌 *T. rubrum* に対する効果を検討したところ感受性を示し、BJ-AFP1 の薬剤としての利用に期待が寄せられる。

■ 問い合わせ先

- ①稲作体系の変化にともなう新需要にマッチした BJ-AFP1：クミアイ化学工業株式会社
(0537-23-6721)
- ②成果をもとにさらなる低コスト生産の余地とアイデア：ケイ・アイ化成株式会社
(0538-58-1000)
- ③カンジダ症や水虫の新薬候補：新潟薬科大学 (0250-25-5119)

■ 研究成果の具体的図表

用途	対象病害	効果	用途	対象病害	効果
農業	稲いもち病	◎	産業・家庭	緑藻	○
	稲紋枯れ病	○		藍藻	○
	稲ごま葉枯れ病	○		珪藻	○
	キュウリ苗立枯れ病	○	医薬	カンジダ症原因菌	◎
	トマト葉かび病	◎		水虫の主要原因菌	◎
	キュウリ灰色かび病	◎			
	リンゴ斑点落葉病	◎			

供試したBJ-AFP1は研究段階の試料を使用した

図1 BJ-AFP1の各種病害に対する効果

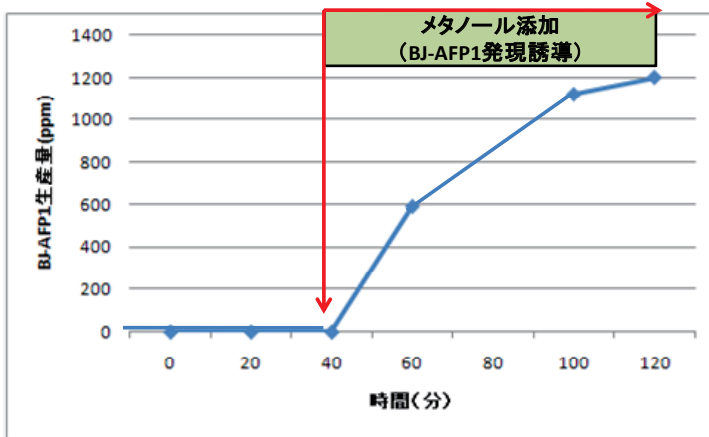


図2 10L容ジャーファーマーターによるBJ-AFP1生産の経時的増加



図3 BJ-AFP1生産のための培養装置: ジャーファーマーター(写真は90L容)

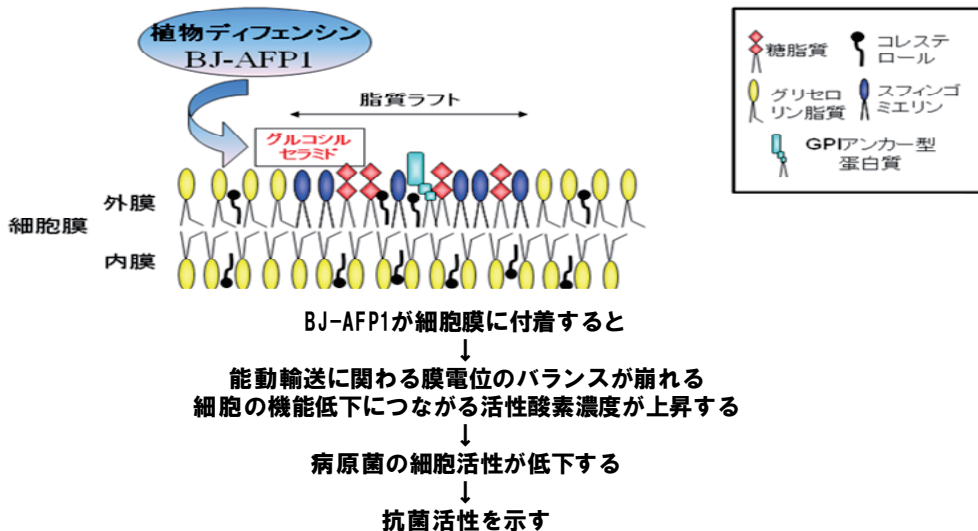


図4 BJ-AFP1の作用機構

表1 *Pichia* BJ-AFP1 (SA-1) の安全性評価試験結果

試験項目	供試生物	試験結果
急性経口毒性	マウス (Slc:ddY)	LD ₅₀ : 300mg/kg以上 (雄雌とも) 300mg/kg : 死亡, 中毒症状なし
眼刺激性	ウサギ (日本白色種)	中等度
皮膚刺激性	ウサギ (日本白色種)	なし
復帰突然変異	Bacteria (TA100, TA98株)	陽性 (S9±とも) ただし、SA-1中のヒスチジンによるコロニー数の増加と考えられるので、実際は陰性だと考えられる
コイ急性毒性	コイ (<i>Cyprinus carpio</i>)	LC ₅₀ (96時間) : 10.0mg/L以上



図5 BJ-AFP1の防除効果
上:キュウリべと病菌防除効果(ポット試験)
下:コムギうどんこ病防除効果(ポット試験)
供試したBJ-AFP1は研究段階の試料を使用した

表2 農薬有効成分の比較

	化学製剤	新規天然型蛋白質	生物由来成分混合剤
	現在の主力剤	BJ-AFP1	BJ-AFP1+微生物農薬
生産コスト	◎	×→△	○△
効果	○	△	△→○
安全性	○	○	○
施用マインド	○△	◎	◎

■ 研究課題名

セルロース系バイオマスの複合的変換技術の開発

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ①セルロース系バイオマス変換システムの設計と酵素処理技術の開発
（◎天野 良彦／国立大学法人信州大学）
- ②高圧水熱反応プロセス制御とリグノセルロース分離技術の開発
（木下 晋、藤堂 洋子／株式会社東芝）
- ③β-オリゴ糖生産のための酵素変換技術の開発
（柏木 豊／（独）農研機構 食品総合研究所）
- ④セルロース系バイオマス資源より得られるβ-オリゴ糖類の開発
（進士 和典、鈴木 雅之／物産フードサイエンス株式会社）

■ 研究の目的

これまで利用されなかったキノコ栽培後の使用済み培地などの地域セルロース系バイオマスを、産業素材として利用するため、高効率で可溶化する要素技術を開発しシステム化するとともに、変換素材を電機産業用絶縁構造材料および機能性の食品素材として利用するための応用技術を開発する。最終的には地域バイオマス資源を有効利用することにより、わが国の環境保全と資源開発問題の解決等に寄与し、新規事業の創出に資する。

■ 主要な成果

- ①バイオマス変換システムの要素技術として、セミパイロットスケールの連続式高圧水熱反応装置（リアクター：図1）を開発し、安定的な連続運転技術を確立した。長野県で豊富に存在する地域バイオマス資源であるキノコ栽培の使用済み培地の処理では、190℃、10分間の処理において、糖質の回収率が最大となることを明らかにした。また、その際のバイオマス（コーンコブ）の細胞壁成分の可溶化（構造変化電顕観察：図2）の反応速度論的な考察と、エネルギーおよび物質収支におけるデータを蓄積した。
- ②水熱反応により得られる残渣成分の電気機器分野でのプラスチック材料としての適用技術を開発した。電気機器のプラスチック材料は、家電やPC用筐体から数万ボルトクラスの発電所で用いられる構造材料などまで多岐にわたる。本研究では、過酷な条件で用いられる高電圧機器の絶縁部材である真空遮断器の絶縁部材（図3）とポリマー碍子（図4）の作製に成功した。石油由来材料を削減した環境調和型材料を採用した製品の開発実績は、この分野にとどまらず民生用電気機器への応用も期待できる。
- ③上記の可溶化反応から、特徴的な重合度分布を持つキシロオリゴ糖（図5）の製造・精製技術を確立し、食品グレードのキシロ糖の製造に成功した。また、種々の重合度のキシロオリゴ糖の調製が可能となり、これら糖質の安全性と腸内環境を整える整腸作用効果を確認した。さらに、上記の糖質の糖アルコール化の技術を確立し、重合度の大きな糖質の可溶化率を向上させることができた。
- ④水熱反応で得られた可溶化糖質を酵素変換するための酵素（セロビオースホスホリラーゼ）を、遺伝子組換え技術により大量に生産し、それを固定化する技術を確立した（図7）。また、水熱反応と酵素反応から得られるセロビオースとキシロースから、グリコシルキシロース（GX）（図6）を大量に合成する手法を確立した。
- ⑤最終的に、上記のような地域のバイオマス資源を活用し、バイオマス成分をカスケード的に利用する新たな複合変換システムを構築することができた。

■ 公表した主な特許と論文

- ①特願 2007-095544 : バイオマス処理用連続式高圧水熱反応装置 : 物産フードサイエンス株式会社および国立大学法人信州大学
- ②特願 2008-218349 : 絶縁構造材料およびその製造方法 : 株式会社東芝
- ③Y. Kashiwagi, *et al.* : High-throughput genotyping of filamentous fungus *Aspergillus oryzae* based on colony directed polymerase chain reaction, *J. Biosci. Bioeng.*, 102, 572-574 (2006).
- ④Y. Amano, *et al.* : Recovery of soluble sugars from waste medium for Enokitake (*Flammulina velutipes*) mushroom cultivation with hydrothermal reaction and enzyme digestion, *J. Appl. Glycosci.*, 53, 261-266 (2006).

■ 今後の展開方向

① バイオマス変換システム

開発した変換システムは、キノコ栽培使用済み培地以外にも適応が可能であり、化石資源に依存してきた材料開発に貢献し、環境問題の解決に資するものと考えられる。連続式の水熱反応機は、パイロットプラントの100倍程度の処理能力を持つ実用機を設計中であり、将来のプラント化を模索している。

② 絶縁構造材料への利用

今回対象としたエポキシや不飽和ポリエステル絶縁材料以外のプラスチックへ適用することにより、本分野における環境負荷の低減に貢献できる。今後、事業化に向けて導入する絶縁構造材料分野を検討する予定である。

③ 機能性糖質分野での応用

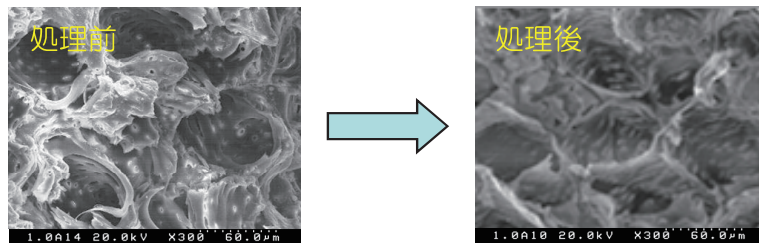
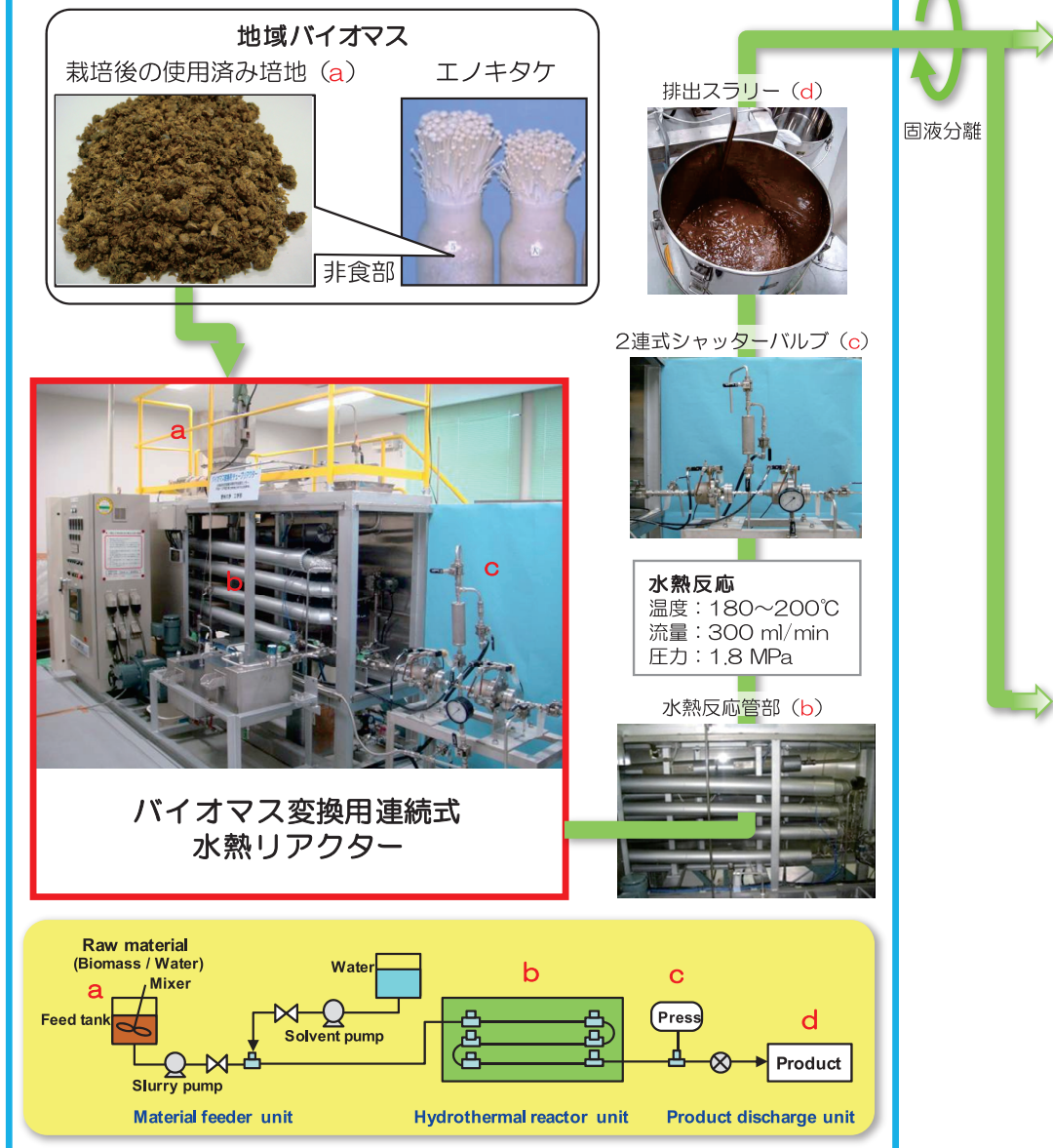
水熱反応により製造されたキシロオリゴ糖やバイオリアクターにより製造されたグルコシルキシロースの安全性が証明されたことにより、新しい機能性糖質のマーケットを開拓し、産業化を図る。

■ 問い合わせ先

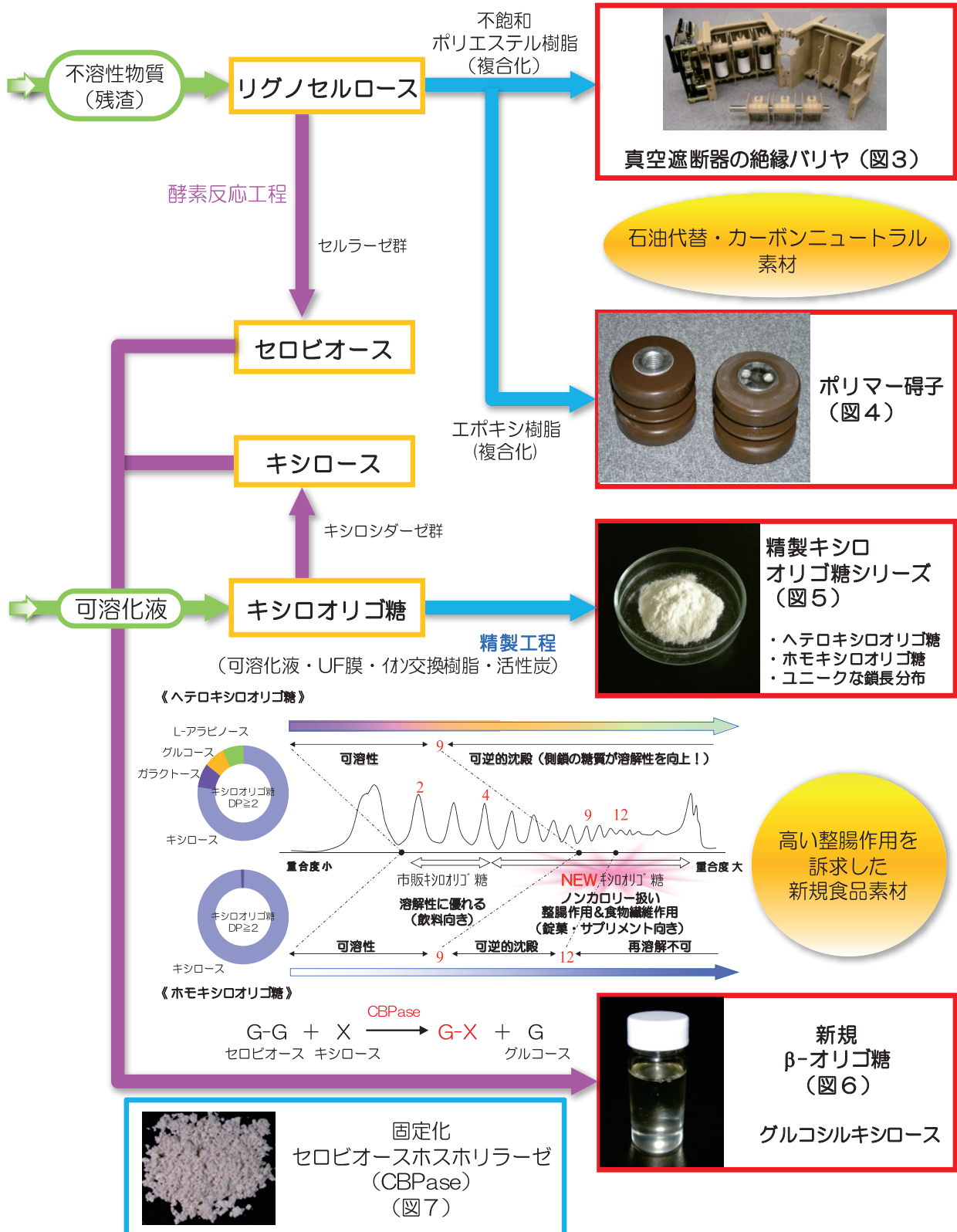
- ① バイオマス変換システム : 国立大学法人信州大学
(026-269-5394、yoamano@shinshu-u.ac.jp)
- ② 絶縁構造材料への利用 : 株式会社東芝
(042-333-2548、yoko.todo@toshiba.co.jp)
- ③ 機能性糖質分野での応用 : 物産フードサイエンス株式会社
(0562-55-1629、m-suzuki@bfsci.co.jp)

■ 研究成果の具体的図表

バイオマス変換用連続式水熱リアクターによる可溶化 (図1)



コーンコブ細胞壁の構造変化 (図2)



■ 研究課題名

伝統的醗酵産業を再生する革新的で安全なバイオプロセスの開発

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ① 醗酵微生物を用いた表層提示バイオプロセスの構築
（◎近藤 昭彦／国立大学法人神戸大学）
- ② 醗酵微生物からの新規機能性遺伝子の単離と機能解析
（秦 洋二／月桂冠株式会社）
- ③ ハイスループット技術を利用した醗酵微生物機能の向上
（植田 充美／国立大学法人京都大学）
- ④ バイオプロセスのプラント設計とプロセスの最適化
（野田 秀夫／関西化学機械製作株式会社）
- ⑤ プロダクト評価と市場ニーズ調査
（田中 久志／三栄源エフ・エフ・アイ株式会社）

■ 研究の目的

醗酵微生物である麹菌や酵母のゲノム情報を用い有用な酵素群を単離するとともに、麹菌や酵母の細胞表層提示システムの基盤を完成させ、機能性食品素材を自由に製造できるバイオコンバージョンシステムを構築し、様々な機能性食品素材を市場に提供する。本プロセスの目的は、①既存の機能性素材をより安価に製造し、広く市場を拡大する、②既存の方法では生産できない機能性物質をバイオコンバージョンによって製造し、市場を創出する、である。そして、目標機能性食品素材として、市場性などの観点から6品目（機能性糖質2品目、機能性ペプチド3品目、機能性脂質1品目）を選定し、そのうち少なくとも3品目に関してはプロセス構築の基盤を完成させることを目指す。

■ 主要な成果

- ① 麹菌がもつ有用タンパク質（β-グルコシダーゼ、リパーゼ、ペプチダーゼ、ペプチドリガーゼ、ペプチドシンセターゼ等）遺伝子を短期間にクローニングするため、独自の麹菌ゲノム配列データベースを構築し、ORF構造がはっきりとした遺伝子を優先度の高いものから順に、イントロンを除いてクローニングして配列確認を行なう効率良い手法を構築した（図1）。この手法により、全部で45個の遺伝子（新規遺伝子34個、既知遺伝子11個）をクローニングし、それらの細胞表層提示や菌体内発現に成功した。
- ② 実用酵母細胞表層提示基盤技術として、目的遺伝子をホモ型で酵母ゲノムに導入する、あるいは欠損させる技術として「High-Efficiency Loss of Heterozygosity (HELOH)法」を開発する（図2）とともに、酵母の主要な液胞プロテアーゼであるプロテイナーゼA (PrA) 活性がほぼゼロの「プロテアーゼレス株」の作製に成功した。
- ③ 酵母における細胞表層提示技術のプロセス化を目指し、醗酵微生物の機能探索・機能向上の強力な支援技術として、2次元マイクロキャピラリーカラムナノHPLCと質量分析の共役システム、細胞表層提示酵母マイクロチップシステム（図3）、という二つの「ハイスループットスクリーニング (HTS) システム」を開発した。また、これらのHTSシステムを用いて、酵素の高機能化を行うことに成功した。
- ④ 清酒酵母において効率よく目的酵素を細胞表層提示できるシステムの開発に成功した。提示用のアンカーとしては、α-アグルチニンおよびFlo1蛋白質を用いた系を開発した（図4）。
- ⑤ 麹菌において効率よく目的酵素を細胞表層提示できるシステムの開発に成功した。提示用のアンカーとしては、麹菌由来のGPIアンカー型の蛋白質 (MP1) および酵母のキチン結

合蛋白質（CBM）を用いたシステムを開発した（図5）。

- ⑥β-グルコシダーゼ表層提示酵母による大豆イソフラボンアグリコン生産プロセス、クチナーゼ表層提示酵母による乳製品系フレーバー生産プロセス、CGTase 表層提示酵母を用いたγ-シクロデキストリン生産プロセスについては、反応特性や生産プロセスに関する基盤データの取得に成功した。すなわち、当初目指した3品目についてのプロセス構築の基盤を完成させることに成功したといえる。特にイソフラボンアグリコン生産プロセスについては、生産のためのプロセスフローを確立した（図6）。
- ⑦細胞表層提示酵母による生産プロセスに加えて、β-グルコシダーゼ、クチナーゼについては、麹菌における大量分泌生産系を確立した。分泌酵素による機能性食品素材製造を検討し、これらの麹菌由来酵素が市販酵素より高い生産性を示すことを明らかにした。
- ⑧イソフラボンアグリコンおよび酵素フレーバーに関しては、バイオプロセスで得られた食品素材の特性評価および最終食品の検討を行った。また、大豆イソフラボンアグリコンについては、食品安全委員会の安全性評価基準を参考にして、必要と考えられる試験を実施し、安全性を確認した。

■ 公表した主な特許と論文

- ①特願 2005-212327： 新規β-グルコシダーゼ、及びその利用： 月桂冠株式会社
- ②特願 2008-165781： 微生物の表層に親和性を持つキチン結合ドメインを用いた表層提示技術： 国立大学法人神戸大学、関西化学機械製作株式会社
- ③Kaya, M., *et al.* Aglycones production from isoflavone conjugates by display of β-glucosidase from *Aspergillus oryzae* on yeast cell surface, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 79, 51-60 (2008).
- ④Adachi, T., *et al.* Construction of an *Aspergillus oryzae* cell-surface display system using the putative GPI-anchored protein, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81, 711-719 (2008).

■ 今後の展開方向

- ①開発した機能性食品製造プロセスの事業化に向けた検討を行う。
- ②開発した清酒酵母細胞表層提示システムや麹菌細胞表層提示システムは、幅広い領域のバイオコンバージョンに適用可能なスーパー微生物を創出するコア技術となり、幅広く利用できるものと期待される。近年、バイオリファイナリー（バイオプロセスによる燃料や化学品生産）が強く求められているが、こうした領域でも広範囲な展開を目指す。
- ③整備した麹菌の有用酵素遺伝子のライブラリーについて、安心・安全な組換え微生物構築のための遺伝子資源（リソース）として幅広い利用を目指す。
- ④表層提示技術を駆使し、目的とする形質を高速にスクリーニングするHTSシステムを開発したが、各種有用酵素の機能改変・向上や新機能創出への広範囲な展開を目指す。
- ⑤安全な発酵醸造微生物の遺伝子組換え技術を用いることにより、反応効率の向上、コスト低減、開発期間の短縮などが期待される。実用化を進めるためにも、遺伝子組換えに対する正しいリスク評価の確立を目指す。

■ 問い合わせ先

- ①清酒酵母および麹菌細胞表層提示システム：国立大学法人神戸大学（078-803-6196）
- ②麹菌の有用酵素遺伝子ライブラリーおよび清酒酵母・麹菌宿主ベクターシステム：月桂冠株式会社（075-623-2130）
- ③HTSシステム：国立大学法人京都大学（075-753-6110）
- ④機能性食品素材製造プロセス：関西化学機械製作株式会社（06-6419-7121）

■ 研究成果の具体的図表

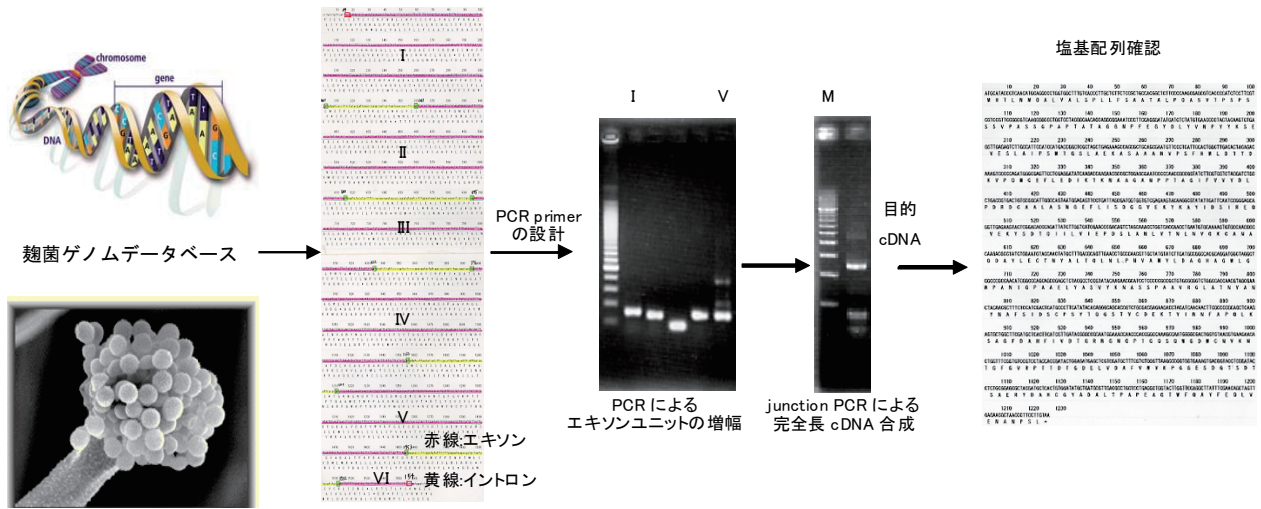


図 1 麹菌ゲノムからの目的酵素遺伝子 (cDNA) 取得方法

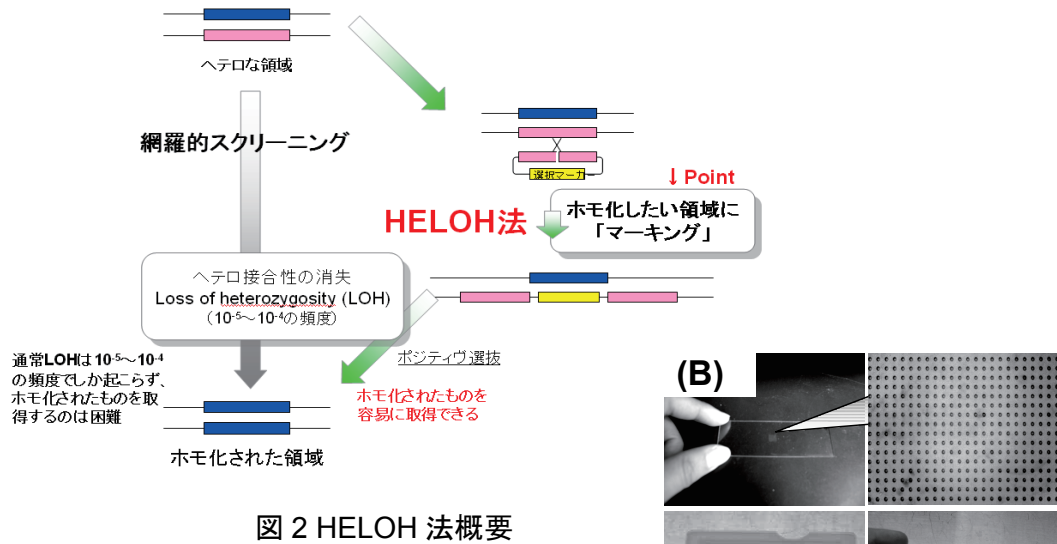


図 2 HELOH 法概要



図 3 2次元マイクロキャピラリーカラムナノ HPLC と質量分析計の共役システム (A)、および細胞表面提示酵母マイクロチップシステム(B)

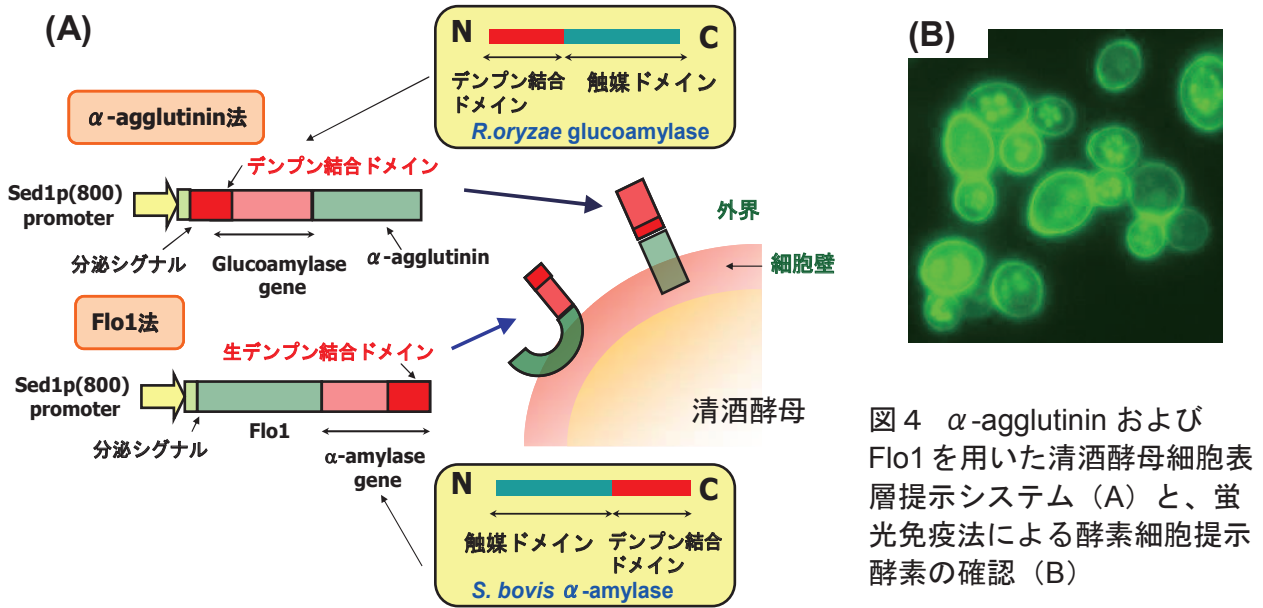


図4 α-agglutinin および Flo1を用いた清酒酵母細胞表面提示システム (A) と、蛍光免疫法による酵素細胞提示酵素の確認 (B)

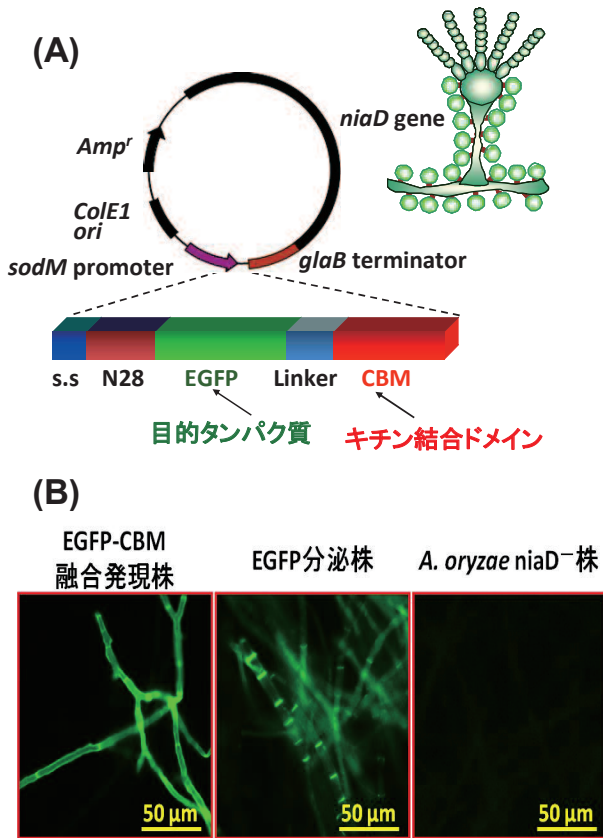


図5 CMB をアンカーに用いた麹菌細胞表面提示システム (A)、および麹菌細胞表面への目的蛋白質 (GFP) の提示確認 (B)

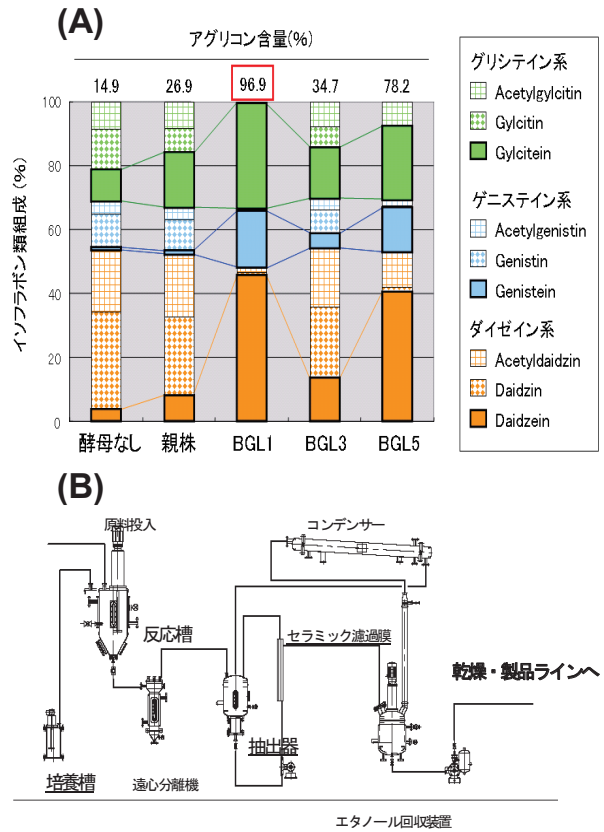


図6 麹菌 β-グルコシダーゼ (BGL1, BGL3, BGL5) 細胞表面提示酵母によるイソフラボンアグリコン生産結果 (A)、および生産プロセスフロー (B)

■ 研究課題名

リン資源の再利用技術とリサイクルシステムの開発

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ①人工リン鉱石からの有機物及び窒素除去技術の開発
（◎大竹 久夫／国立大学法人大阪大学）
- ②リン資源のライフサイクルアセスメント
（佐藤 恵一／東和環境科学株式会社）
- ③人工リン鉱石製造及び改質技術の開発
（長谷川 進／株式会社神鋼環境ソリューション）
- ④人工リン鉱石からのリン酸質肥料の製造技術の開発
（美濃和 信孝／小野田化学工業株式会社）
- ⑤人工リン鉱石及び人工リン鉱石由来のリン酸質肥料を用いた植栽試験
（古畑 哲／財団法人日本土壌協会）
- ⑥人工リン鉱石及び人工リン鉱石由来のリン酸質肥料の有効性及びその機構解明
（阿江 教治／国立大学法人神戸大学）
- ⑦人工リン鉱石からの工業用リン酸製造技術の開発
（佐藤 英俊／下関三井化学株式会社）
- ⑧ポリリン酸を活用するバイオ技術の開発
（黒田 章夫／国立大学法人広島大学）

■ 研究の目的

都市下水処理場で発生する余剰汚泥を約 70℃で 1 時間加熱する方法（HeatPhos 法）で溶出させたリンを、カルシウム添加により凝集沈殿させて、天然リン鉱石の代替物となりうる人工リン鉱石を製造する（図 1 及び 2）。焼成等により改質した人工リン鉱石を原料に用いて、リン酸質肥料や工業用リン酸及び各種リン化合物を生産する技術の開発を行う。これらの技術開発の成果を基に、人工リン鉱石の生産からリン製品の製造と販売に至るリン資源のリサイクル事業を創出する。

■ 主要な成果

- ①人工リン鉱石の製造と改質技術
HeatPhos 法は、嫌気好気生物脱リン法を採用している処理場の余剰汚泥に有効であった。また、改質前人工リン鉱石に含まれる有機物（強熱減量）は、焼成により除去することができた（表 1）。
- ②人工リン鉱石製造コスト
人工リン鉱石 1kg 当たりの建設費用も含めた製造コスト及び償却費を含まないランニングコストは、それぞれ 605 円及び 185 円、汚泥加熱等に下水処理場の消化ガス等の余熱を利用し、消化汚泥脱離液からも合わせてリン回収を行う場合には、それぞれ 151 円及び 95 円と見積もられた。
- ③リン酸質肥料の製造技術の開発
焼成改質人工リン鉱石を一部天然リン鉱石の代替原料に用い、保証成分と造粒性を満足する加工リン酸肥料を製造できた（表 2 及び図 3）。147 円/kg の改質前人工リン鉱石を原料に用いた場合、加工リン酸肥料 kg 当たりのコスト上昇は約 20-60 円程度であった。
- ④非晶質ケイ酸カルシウムによるリン回収と副産リン酸肥料製造技術の開発
非晶質ケイ酸カルシウムを用いて製造したリン吸着材は高いリン回収性能を持ち、リン回

収品はカルシウム凝集沈殿で多く混入する有機物や窒素成分を含まないので、そのまま副産リン酸肥料として用いることが可能であった(図4及び5)。

⑤リン酸質肥料の有効性と肥効の解明

改質前人工リン鉱石は酸性土壌で溶解し易く、含まれる有機物が分解することにより生成する有機酸がリンの可溶化を促進し、作物収量の増加に有利に働いた。焼成改質人工リン鉱石を用いて製造した加工リン酸肥料は、キャベツやハクサイなど養分吸収期間が長くて生育後半にもリンの吸収を必要とする作物により適していた(表3、図6及び7)。

⑥工業用リン酸とポリリン酸の製造

現在稼働中の工業用リン酸製造プロセスの原料として用いるためには、人工リン鉱石中のMgやAlなどの金属成分の総含有率を約2%以下にまで抑える必要がある。焼成改質人工リン鉱石を20%ブレンドした原料を用いた場合、リンの抽出率は天然リン鉱石のみ(天然鉱)を使用した場合に比べて約15%低かったが、製品の品質はほぼ同等であった(表4)。また、ポリリン酸ナトリウムも重合度65を越えて製造できた(図8)。

⑦好熱菌から取得した耐熱性のホスホフルクトキナーゼ遺伝子(PFK)とポリリン酸合成酵素遺伝子(PPK)を発現させ(図9)、70°Cで10分間加熱処理した組換え大腸菌は、75°Cの温度でフルクトース1,6ニリン酸を合成できた。また、耐熱性ポリリン酸グルコキナーゼ遺伝子(GK)とホスホグルコムターゼ遺伝子(PGM)を発現させた後に熱処理した大腸菌も、グルコースとポリリン酸からグルコース-6-リン酸を合成できた(図10)。

■ 公表した主な特許と論文

- ①特願 2008-143895：リン回収資材およびリン回収方法：小野田化学工業株式会社
- ②特願 2008-143896：リン回収資材とその製造方法およびリン回収方法：小野田化学工業株式会社
- ③Ohtake, H., *et al.* Effect of mineral elements on phosphorus release from heated sewage sludge, *Biores. Technol.*, 98: 2533-2537 (2007).
- ④Kuroda, A., *et al.* Use of an *Escherichia coli* recombinant expressing thermostable polyphosphate kinase as an ATP regenerator to produce fructose 1, 6-diphosphate, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 5676-5678 (2007).

■ 今後の展開方向

- ①本プロジェクトで開発した人工リン鉱石の製造・改質技術、工業用リン酸とリン酸質肥料の製造技術や植栽試験で得られた肥効や農作物への影響に関する知見を基に、人工リン鉱石製造コストのさらなる削減に取り組み、リン資源リサイクル事業化の実現を目指す。
- ②新事業の創出に向け残された課題については、平成20年度に設立されたリン資源リサイクル推進協議会を通して、行政の縦割りや民間企業間の壁を乗り越え総合的かつ戦略的に取り組む予定である。

■ 問い合わせ先

- ①非晶質ケイ酸カルシウムを用いたリン回収法：小野田化学工業株式会社
(093-383-1620) (<http://www.onoda-kagaku.co.jp/>)
- ②大腸菌を用いた各種リン酸化合物の製造方法：国立大学法人広島大学
(082-424-7758) (<http://home.hiroshima-u.ac.jp/~mbiotech/kuroda/>)
- ③リン資源リサイクル技術：国立大学法人大阪大学
(06-6879-7435) (<http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/be/>)

■ 研究成果の具体的図表



図1 試験材料に用いた人工リン鉱石

表1 人工リン鉱石と改質人工リン鉱石の品質

	人工リン鉱石	改質人工リン鉱石				天然リン鉱石
		遠心分離 8,000G	UF膜 50,000分画	晶析	焼成 800°C, 5h	
有機物(強熱減量)	% 30.34	29.62	11.15	15.03	0.20	0.50
T-P	% 10.10	11.20	12.65	11.52	11.50	17.03
T-N	% 1.08	1.82	0.16	8.38	0.18	—
Ca	% 25.40	25.60	31.35	16.23	36.61	38.64
Fe	% 0.43	1.55	0.02	0.84	0.70	0.39
Mg	% 2.74	1.33	1.73	2.54	2.92	0.54
Al	% 0.12	0.23	0.01	0.23	0.25	0.07



図3 人工リン鉱石を原料に用いた加工リン酸肥料の製造の様子

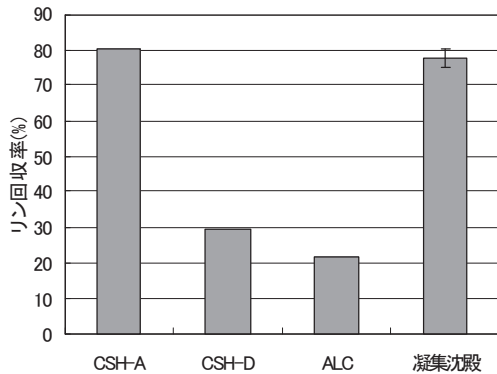


図4 非晶質ケイ酸カルシウムを用いて製造したリン吸着剤による下水余剰汚泥の加熱脱離液からのリン回収結果
 CSH-A及びCSH-D：非晶質ケイ酸カルシウム
 ALC：軽量気泡コンクリート粉末
 凝集沈殿：消石灰添加凝集沈殿による回収

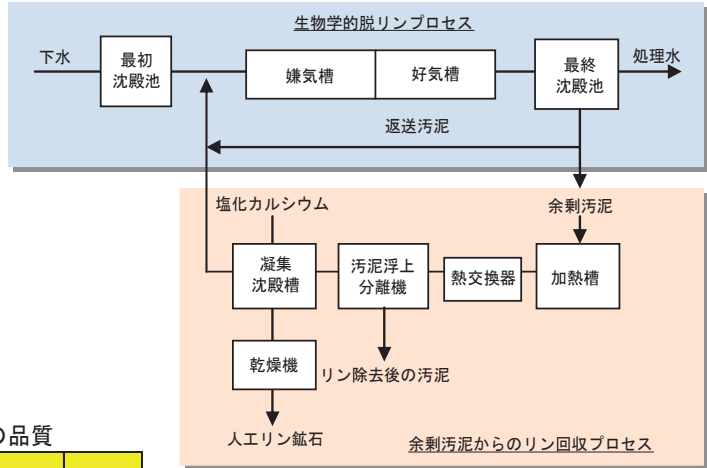


図2 HeatPhosプロセスの概略図

表2 一部を人工リン鉱石で代替した原料より合成した加工リン酸肥料の品質 (重量%)

No.	人工リン鉱石比率 (%)	T-P ₂ O ₅	C-P ₂ O ₅	W-P ₂ O ₅	T-MgO	C-MgO	硬度 kgf
保証値		—	≥35	≥16	—	≥4.5	—
1	15	38.00	37.40	22.68	8.01	5.83	
2	44	37.22	36.52	19.75	8.15	6.35	2.4
3	49	39.67	36.68	23.85	7.21	5.12	5.8

T-P₂O₅、T-MgO：全含有量
 W-P₂O₅：水溶性の含有量
 C-P₂O₅、C-MgO：2%クエン酸に可溶する含有量
 硬度：木屋式硬度計による測定値

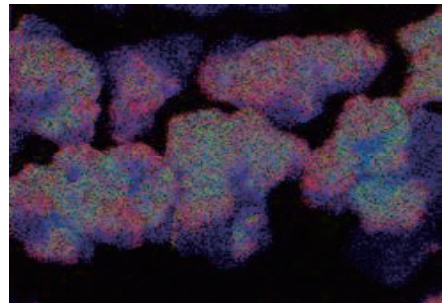
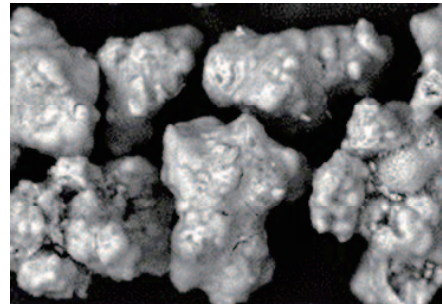


図5 非晶質ケイ酸カルシウムによるリン吸着後のEDX分析結果
 赤点：リン 黄点：ケイ素 青点：カルシウム

表3 加工リン酸肥料と過リン酸石灰の施用による収量結果

時期	作物		加工A		加工B		過石	
			収量	指数	収量	指数	収量	指数
17年 春	菜豆	kg/10a	103	79	112	86	130	100
	コマツナ	g/株	200	82	204	84	241	100
17年 秋	シュンギク	g/株	42	80	48	91	53	100
	キャベツ	g/株	1102	114	1243	124	1004	100
18年 春	レタス	g/株	498	84	491	83	590	100
18年 秋	ブロッコリー	g/株	589	100	614	104	589	100

加工A：焼成改質人工リン鉱石を天然リン鉱石の代替原料に用い製造した加工リン酸肥料
 加工B：市販の加工リン酸肥料
 過石：市販の過リン酸石灰



図6 人工リン鉱石より製造したリン酸肥料を用いた菜豆の栽培

表4 天然リン鉱石と人工リン鉱石の混合原料から製造したリン酸液の品質

		天然鉱石 100%	5% ブレンド	10% ブレンド	20% ブレンド
P ₂ O ₅	%	40.4	39.7	39.5	39.4
抽出率	%	75.0	70.1	69.3	59.4
Fe	ppm	21.7	25.2	19.6	32.2
Mg	ppm	12.1	12.1	9.6	10.3
Al	ppm	5.3	4.8	5.0	5.8
K	ppm	0.8	0.8	0.8	0.7
Na	%	1.0	0.8	0.7	0.8



図7 人工リン鉱石より製造したリン酸肥料を用いたキャベツの栽培

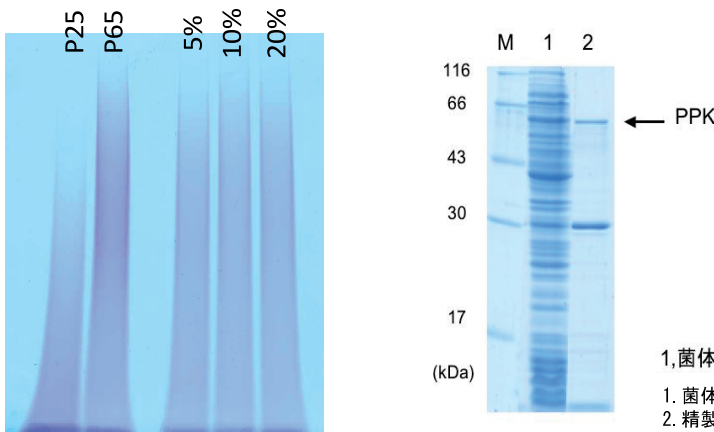


図8 天然リン鉱石と人工リン鉱石の混合原料から合成したポリリン酸の鎖長
 P25及びP65：市販の鎖長25及び65のポリリン酸
 %は原料に含まれる人工リン鉱石の割合。

図9 SDS-PAGEによるPPK精製の確認
 M：分子量マーカー
 PPK：ポリリン酸合成酵素

1. 菌体破砕液
 1. 菌体破砕液
 2. 精製酵素

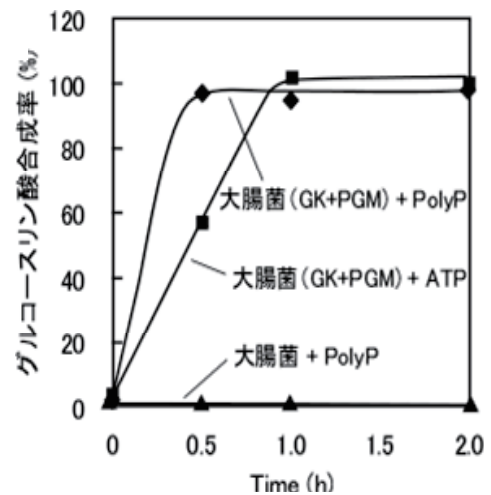


図10 耐熱性ポリリン酸グルコキナーゼによるグルコースとポリリン酸からのグルコース-6-リン酸の合成
 GK：耐熱性ポリリン酸グルコキナーゼ
 PGM：耐熱性ホスホグルコムターゼ
 PolyP：ポリリン酸
 ATP：アデノシン三リン酸

■ 研究課題名

砂糖及びセルロースを原料とする酵素合成アミロースの製造と利用

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ①セルロースを原料とした酵素合成アミロースの生産技術開発及び酵素合成アミロースの安全性検証
（◎鷹羽 武史／江崎グリコ株式会社）
- ②食品用酵素合成アミロースの量産化技術の開発
（和田 守／三和澱粉工業株式会社）
- ③酵素合成アミロースの基礎物性と機能性の解明
（北村 進一／公立大学法人大阪府立大学）

■ 研究の目的

酵素的に合成したアミロースの特長を活かした食品開発を行う。そのために、酵素合成アミロースの産業利用スケールでの製造方法を確立し、その安全性を検証する。さらに酵素合成アミロースの食品素材としての基礎物性を調べ、機能性を立証し、機能性食品素材としての事業化への道を開く。また、セルロース系バイオマスを原料としたアミロース製造のための技術的課題を解決する。

■ 主要な成果

- ①食品用酵素合成アミロースの量産化技術の開発
砂糖にスクロースホスホリラーゼとグルカンホスホリラーゼを作用させる方法では、酵素反応組成や反応条件の制御により、重合度数十から数千までの、様々な重合度の酵素合成アミロースが製造可能である（図 1）。これら各種重合度の酵素合成アミロースの工業的製造方法を確立した。
- ②酵素合成アミロースの安全性評価
酵素合成アミロースを 13 週間ラットに反復投与したが、被験物質投与に起因した異常は認められなかった。微生物を用いた復帰突然変異試験、チャイニーズ・ハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用いた染色体異常試験において、酵素合成アミロースは陰性と判定された。
- ③酵素合成アミロースの基礎物性
各種重合度の酵素合成アミロースの、水への溶解性、ゲル化能、ゲルの粘弾特性、フィルム形成能、粒子形成能などの基礎物性を調べた（図 2）。さらにこれらアミロースの特徴を利用し、強い抗菌性を示すアミロースとキトサンとの混合ハイブリッドフィルム（図 3）、水溶液中で安定なナノサイズゲル、粒子径のそろったアミロース粒子（図 4）など、酵素合成アミロースの食品分野での利用につながる重要な技術シーズを開発した。
- ④酵素合成アミロースの生理機能
高い結晶性を示す平均分子量 2.2 万の酵素合成アミロースに強い α アミラーゼ抵抗性を見出した。すなわち、当該アミロースをラットに単回経口投与したところ、食後の血糖値上昇がほとんど確認できず（図 5）、盲腸でのプロピオン酸量は有意に増加し、結晶性酵素合成アミロースが食物繊維様機能を有することを確認した。結晶性酵素合成アミロース含有飼料を用いて長期飼育（8 週間）したラットは、血漿中性脂肪値に有意な改善が見られた（図 6）。
- ⑤酵素合成アミロースを利用した食品開発

酵素合成アミロースの物理化学的特長を生かした加工食品を各種検討した。酵素合成アミロースの生理機能を訴求しうる食品として、アミロースタブレットおよび微結晶アミロース含有飲料を試作した（図7）。

⑥セルロースを原料とした酵素合成アミロースの生産技術開発

セロビオース（セルロースの酵素分解により調製される主要成分）とポリリン酸の混合液を出発原料に、セロビオースホスホリラーゼ、ポリリン酸グルコキナーゼ、ホスホグルコムターゼ、グルカンホスホリラーゼの4種類の酵素を作用させることで、対原料収率63%でアミロースを合成する方法を確立した（図8）。

■ 公表した主な特許と論文

- ①特開 2008-280466：非消化性アミロース粒子、その製造方法、ならびにそれらを含む食品、医薬品および医薬部外品：公立大学法人大阪府立大学、江崎グリコ株式会社、三和澱粉工業株式会社
- ②Suzuki, S., *et al.* Surface structure of chitosan and hybrid chitosan-amylose films – Restoration of the antibacterial properties of chitosan in the amylose film –. *Carbohydr. Res.* 342, 2490–2493 (2007)
- ③Ohdan, K., *et al.* Phosphorylase coupling as a tool to convert cellobiose into amylose. *J. Biotechnol.*, 127, 496–502 (2007)
- ④Suzuki, S., *et al.* Unfrozen water in amylosic molecules are dependent on their molecular structures – A differential scanning calorimetric study. *Food Hydrocolloids* 22, 862–867 (2008)

■ 今後の展開方向

- ①酵素合成アミロースの生理機能をヒト試験で検証する。
- ②酵素合成アミロース食品素材事業、及び酵素合成アミロース含有加工食品事業開始への取り組みを継続。

■ 問い合わせ先

- ①酵素合成アミロース全般・セルロース利用：江崎グリコ株式会社(06-6477-8425)
- ②酵素合成アミロースの製造：三和澱粉工業株式会社(0744-23-7480)
- ③酵素合成アミロースの物性と機能：公立大学法人大阪府立大学(072-254-9457)

■ 研究成果の具体的図表

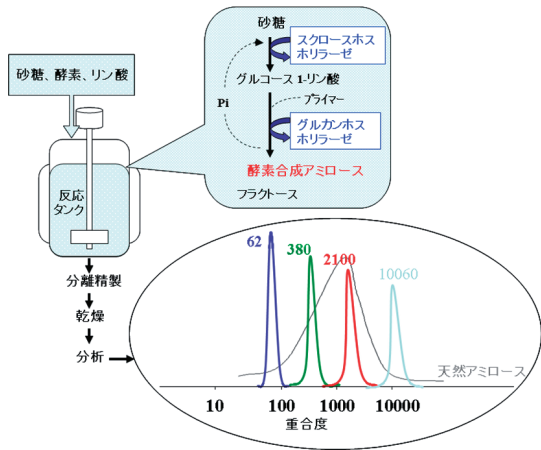


図1 酵素合成アミロースの製造方法

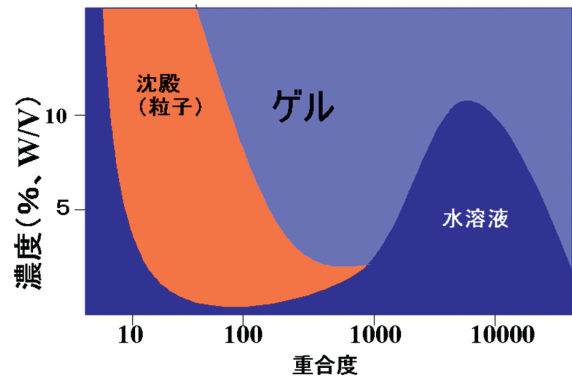


図2 酵素合成アミロースの重合度と性質



平均分子量100万の
アミロースフィルム

少量(2.5-10%)の
キトサンを添加

抗菌性の付与

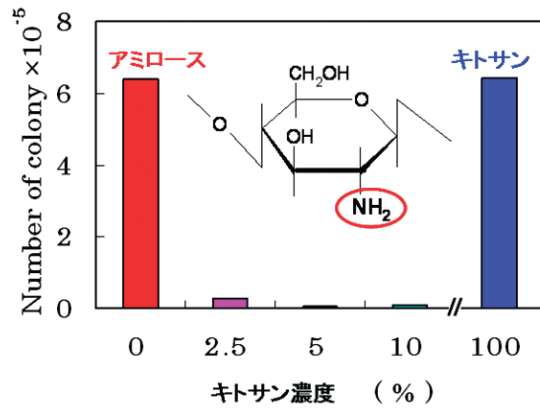


図3 キトサン混合アミロースフィルムの抗菌性
(*Escherichia coli* IF0 3972)

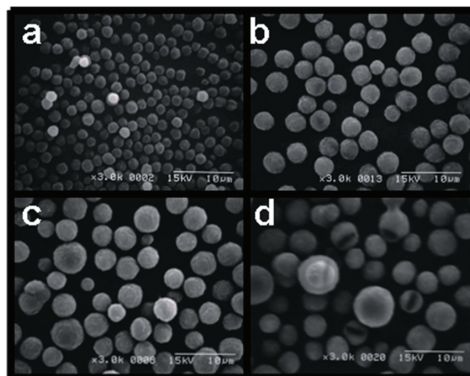


図4 粒子径のそろったアミロース粒子
MW2.2万、Bar=10 μ m

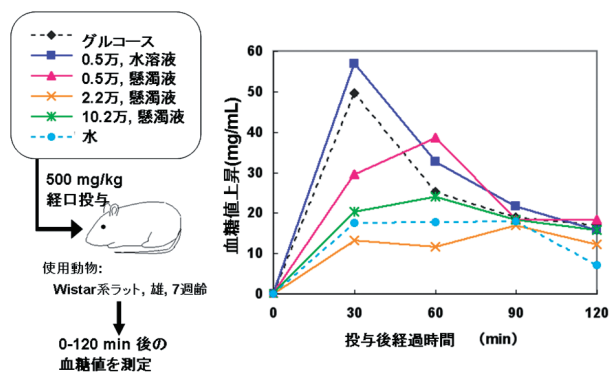


図5 *In vivo* における酵素合成アミロースの消化性
アミロース : MW:0.5、2.2、10.2 万

- ・使用動物: Sprague-Dawley ラット, 雄, 3週齢
- ・高脂肪食組成: ラード 19%, コーン油 1%
- ・アミロース入り高脂肪食組成:
高脂肪食中セルロース 5% → アミロース 5%

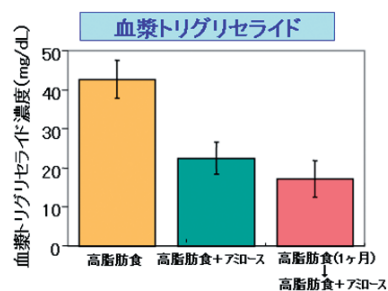
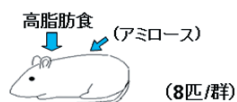


図6 酵素合成アミロース長期摂取試験
アミロース : MW:2.2 万



図7 酵素合成アミロース含有食品 (タブレットと飲料)
アミロース : MW:2.2 万

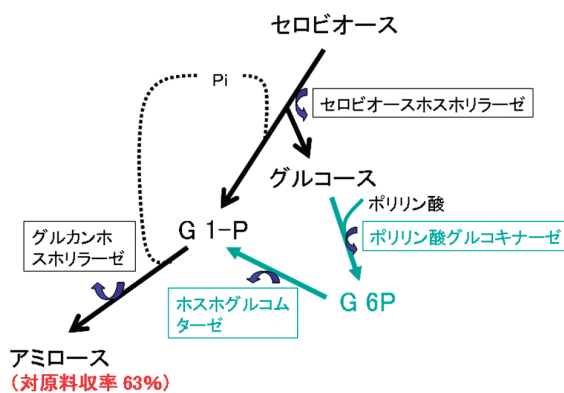


図8 セロビオースを原料とした酵素合成アミロースの新規合成方法

■ 研究課題名

低アレルゲン大豆加工食品の開発と製造・流通システムの構築

■ 研究実施体制（◎は総括責任者）

- ◎小川 正／関西福祉科学大学
- 森山 達哉／学校法人近畿大学
- 高橋 浩司／（独）農研機構 作物研究所
- 河智 義弘／株式会社タスク
- 土肥 貞夫／天野実業株式会社
- 村田 陽子／株式会社椿き家
- 折笠 廣司／株式会社まぎーずはーと

■ 研究の目的

品種登録済みで実用栽培が可能な低アレルゲン食品加工用大豆を原料にし、食品加工的アプローチにより実質的にアレルゲン性フリーの低アレルゲン大豆加工食品群を開発するため、正確なアレルゲン性低減化評価法を確立し、アレルゲン性低減化度合いを間接的に評価できるようにする。同時に患者によるチャレンジテストを医師の監視下で行って有効性を確認し、試作された低減化食品を効率的に患者へ供給しうる製造・販売・流通システムの基盤を構築し、大豆アレルギー患者に貢献できるベンチャー企業の設立に資する。

■ 主要な成果

- ①糖鎖マスク法の有効性の立証に成功した。この方法によって、より正確なアレルギー診断に役立つことが期待でき、より安全なチャレンジテストの実施に貢献できる。
- ②花粉症に関連する大豆クラス2アレルギーの原因アレルゲンとして最も重要な抗原である Glym4 について、そのクローニングと抗体作製に成功し、血清を用いることなく大豆加工食品のクラス2アレルゲン性を評価する方法が構築できた。これらの試料・手法は大豆アレルギー研究分野や大豆の安全性評価の分野において、貴重な研究ツールとなる。
- ③各種低アレルゲン大豆加工食品の試作に成功した。すなわち、味噌、フリーズドライ味噌汁、豆乳のほかにも煮豆や納豆、さらに小麦アレルギー患者用の大豆クッキーなどに関しても試作できた。
- ④低アレルゲン化加工食品の評価に協力頂く医師団が組織化された。
- ⑤本システムの中心的な役割を果たすホームページ案の構築ができ、ベンチャー企業運営のシミュレーションの準備が完了した。

■ 設立が見込まれるベンチャー企業の概要

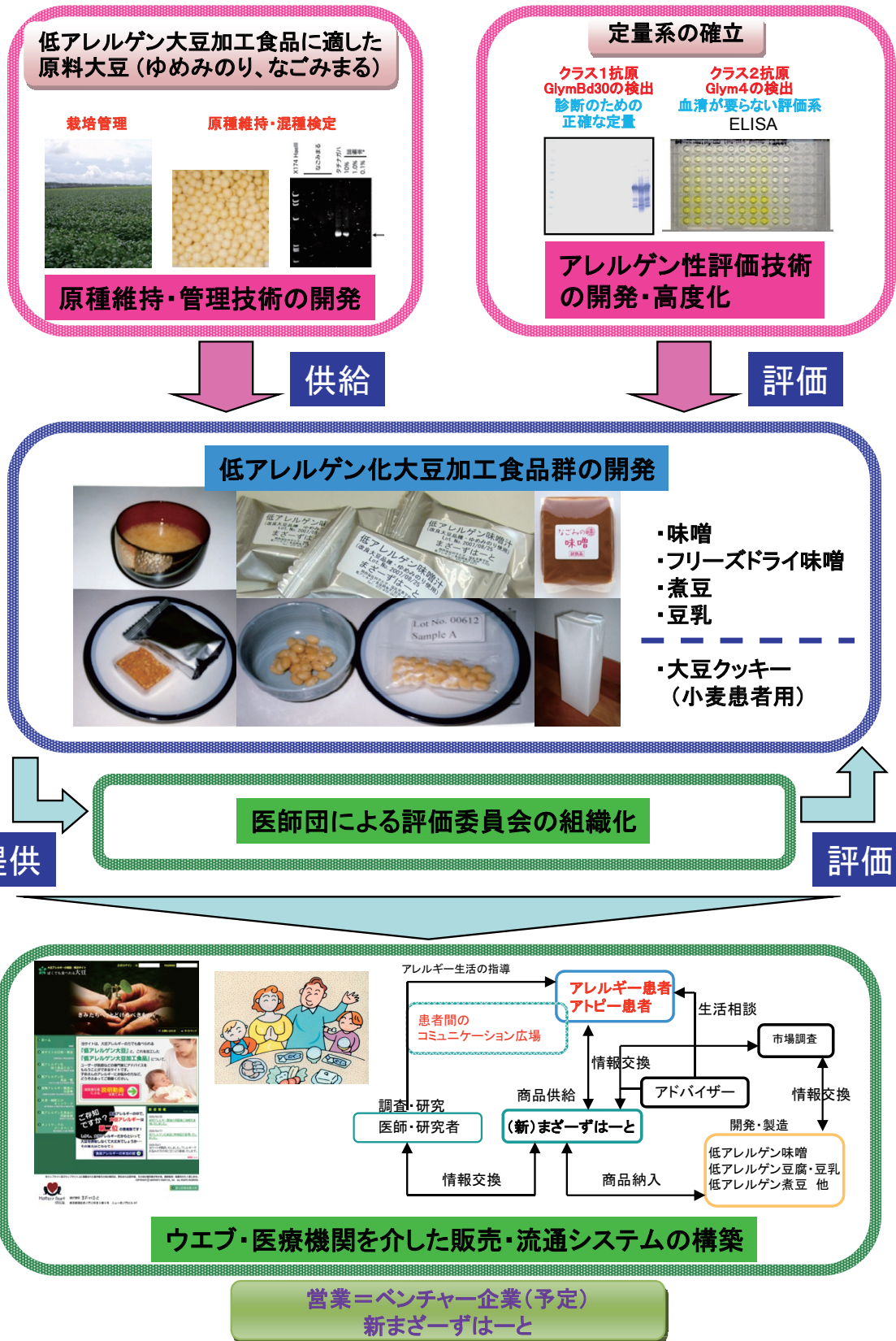
ウェブを通じて、患者、医療機関、低アレルゲン化食品開発会社、研究者等のネットワークを構築運営し、新しい形のテラーメイド食品の販売流通企業として営業を行う。また、食物アレルギーに関する情報提供及び食物アレルゲンの検知・定性定量委託分析及び関連分野のコンサルタント業務等も同時に行う。

設立時期は、平成21年度内の予定で、経営責任者；折笠廣司、総括責任者；河智義弘、技術顧問；小川 正の予定。仮称：新まぎーずはーと

■ 問い合わせ先

小川 正 関西福祉科学大学(072-978-0612)

■ 研究成果及び企業の概要の具体的図表



■ 研究課題名

電気化学計測技術を用いた受精卵品質評価システムの開発と実用化

■ 研究実施体制（◎は総括責任者）

◎阿部 宏之／国立大学法人山形大学

■ 研究の目的

受精卵移植による受胎率の向上には、受精卵の正確な品質評価が不可欠である。受精卵の品質は形態観察により評価されているが、より精度の高い品質評価法の開発が要望されている。本研究では、電気化学計測技術を応用した「受精卵呼吸測定装置」を開発し、呼吸活性値という客観的数値で正確に受精卵の品質を評価できる新しい受精卵品質評価システムの開発と実用化を目的とする。

■ 主要な成果

- ①高感度マイクロ電極の開発：精度の高い白金電極エッチング技術を確立することができた。高精度で受精卵の呼吸を計測することができるディスク型マイクロ電極の開発に成功した。
- ②多検体測定プレート・測定液の開発：受精卵の呼吸量を連続して計測できる専用の多検体測定プレートを考案した。受精卵培養液をベースに計測感度や呼吸活性に影響しない専用の測定液を開発した。
- ③多機能呼吸解析ソフトの開発：球面拡散理論に基づいた呼吸解析ソフトを開発した。コンピューター制御によりマイクロ電極を1ミクロン単位で移動できる半自動計測機能と、計測データの精度を向上させるバックグラウンド補正機能を開発した。これにより、呼吸測定操作の簡素化が可能となり、計測データの信頼性も大幅に向上した。
- ④「受精卵呼吸測定装置」の開発：走査型電気化学顕微鏡をベースに、各要素技術をシステム化し受精卵の呼吸計測に特化した「受精卵呼吸測定装置」を製作した。この装置は、ウシ受精卵の呼吸量を短時間（1分以内）で測定することができる。受精卵の培養試験や生物学的解析により装置の有効性を検証した結果、単一の受精卵においてミトコンドリア呼吸を非侵襲的に測定できることが示された。
- ⑤受精卵品質評価法の確立と実証：ウシ受精卵の移植試験を行い、胚の呼吸活性と妊娠率の関係を調べた。その結果、呼吸活性の高い受精卵は妊娠する確率の高い品質良好胚であることが示された。呼吸活性値を基準に受精卵の品質を客観的に評価できる方法を確立することができた。

■ 設立が見込まれるベンチャー企業の概要

研究成果活用を目的としたベンチャー企業（クリノ株）を2007年11月1日に設立した。このベンチャー企業では、本研究で開発した「受精卵品質評価システム」の販売と、これに関連する消耗品及び電気化学計測に関する技術開発・指導、受託試験を行う。業務の対象として国内の受精卵移植施設・大学等研究機関を想定している。

■ 問い合わせ先

阿部 宏之 国立大学法人山形大学（0238-26-3361）

クリノ株式会社（022-352-8195、<http://www.clino.org/index.html>）

■ 研究成果及び企業の概要の具体的図表

【電気化学計測技術】

マイクロ電極 走査 マイクロ電極

還元電流

O_2 H_2O

(低い) 酸素濃度

無侵襲・高感度計測

【呼吸計測要素技術開発】

- (1) 受精卵呼吸測定システムの開発
- (2) 高感度マイクロ電極の開発
- (3) 多検体測定プレート・測定液の開発
- (4) 多機能呼吸解析ソフトの開発

【受精卵呼吸測定装置の性能評価】

呼吸量 ($\times 10^{14} / \text{mol s}^{-1}$)

呼吸測定装置は受精卵のミトコンドリア呼吸を検出できる

要素技術のシステム化

【受精卵呼吸測定装置】

【受精卵品質評価システムの開発と有効性の検証】

(ウシ胚の呼吸量と妊娠率の関係)

移植時の発生ステージ	酸素消費量 ($F \times 10^{14} / \text{mol s}^{-1}$)	受胎胚数/移植胚数 (妊娠率%)
胚盤胞	$F \geq 1.0$	21/36 (58.3)
	$F < 1.0$	0/ 6 (0)
初期胚盤胞	$F \geq 0.8$	16/25 (64.0)
	$F < 0.8$	0/ 6 (0)
桑実胚	$F \geq 0.5$	17/28 (60.7)
	$F < 0.5$	1/12 (8.3)

高品質胚の効率的選択

【ベンチャー企業: クリノ株式会社】

- ・「受精卵呼吸測定装置」の販売
- ・呼吸測定関連消耗品(マイクロ電極、測定プレート等)の販売
- ・受精卵品質評価に関する技術指導
- ・医療向け呼吸測定装置の市場調査と技術開発

■ 研究課題名

天敵誘引剤・活性化剤を用いた害虫管理

■ 研究実施体制（◎は総括責任者）

◎高林 純示／国立大学法人京都大学
松原 弘行／丸紅株式会社

■ 研究の目的

天敵誘引剤（ハチクール）・天敵活性化剤（ハチゲンキ）は、有機農業に用いることのできる世界的にも新しい概念の農薬であり、害虫防除技術の新機軸を開拓するものである。これまで、コナガの天敵であるコナガサムライコマユバチの誘引剤、活性化剤を開発し、それらがコナガの防除に対して有効であることを確認した。本研究では、企業化、農薬登録に向けてその効果について実証試験を重ねるとともに、さらに多様な地域でのニーズの掘り起こしと普及法の検討を行う。

■ 主要な成果

- ①農家、関係当局（農林水産省農産安全管理課農薬対策室、日本植物防疫協会、農薬検査所等）ならびに天敵農薬の専門家からの意見聴取を行い、天敵利用技術を実用化するための体制を構築した（図1）。
- ②現地実証試験 異なる地域、作型におけるアブラナ科作物の雨よけハウス栽培体系に本技術を活用するため、実証試験を熊本県と京都府で行なった。京都府美山町では、ハチクールおよびハチゲンキを設置することで、コナガの発生率と発生量を抑制した（図2）。また、コナガの発生が認められない場合でも両剤を設置することで、より多くのコナガサムライコマユバチが発生した（図3）。熊本県大津町の試験ではハチクール・ハチゲンキ設置区ではコナガ数を100株あたり10頭以下に抑えた。一方、未設置区でのコナガ数はそれぞれ100株あたり43、15頭と高かった（図4）。
- ③農薬登録に向けた試験を実施した。日本植物防疫協会を通じて、日本植物防疫協会研究所（茨城県牛久市）、東京都農林総合研究センター（東京都立川市）、野菜茶業研究所（三重県津市）、徳島県立農林水産総合技術支援センター（徳島県吉野川市）の4箇所に試験を委託した。新しい概念の剤であり、試験設計について模索しながら実施した。ハチクール及びハチゲンキの有効性を示す試験結果を得た（表1）。

■ 設立が見込まれるベンチャー企業の概要

名称：(株)ハチクール（仮称）

事業内容：ハチクール、ハチゲンキの製造、普及、販売活動。他の害虫への適応拡大のための試験研究開発ならびに同様のメカニズムを有する新規薬剤の開発（図1）。

設立時期：平成24年度内を予定

■ 問い合わせ先

高林 純示 国立大学法人京都大学（077-549-8235）

松原 弘行 丸紅株式会社（03-3282-2859）

■ 研究成果及び企業の概要の具体的図表

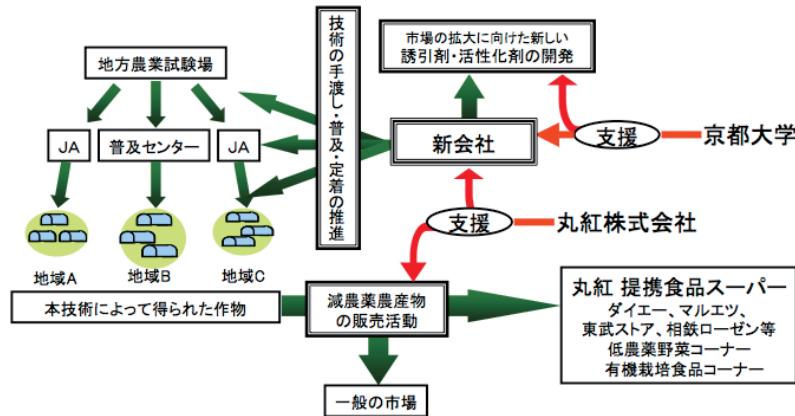


図1 天敵利用技術を実用化するための体制の構想 天敵利用技術はきめ細かい指導が必要なので、市場を睨んだ普及販売体制を作る。普及販売体制の核として、ベンチャー企業を設立し、経験のある丸紅が運営支援(経営ノウハウ、人材、資金の提供)をする。京大は継続的に技術シーズを提供する。

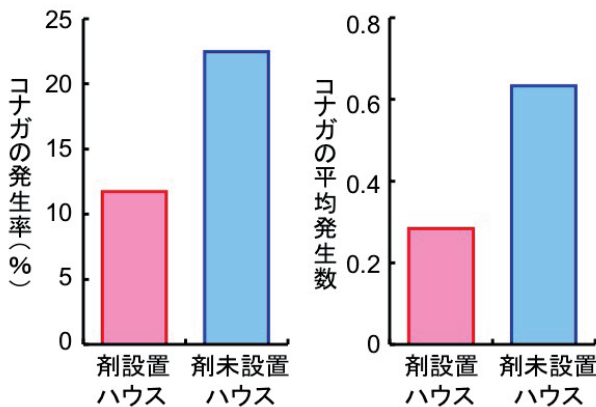


図2 京都府の雨よけハウス栽培におけるコナガの発生率(A)と発生数(B) 剤設置によってコナガの発生率、発生数とも減少。

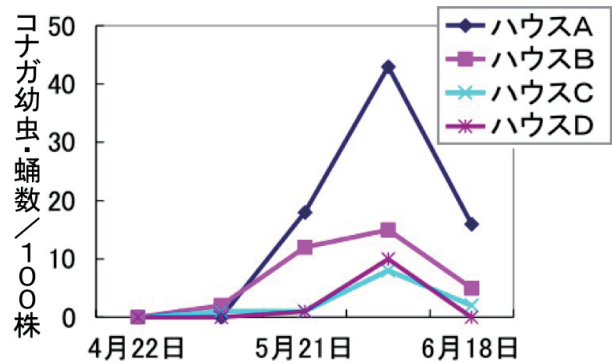


図4 熊本県の雨よけハウス栽培におけるコナガの発生数の推移 ハウスA,B: 未設置ハウス ハウス C,D:ハチクール・ハチゲンキ設置ハウス

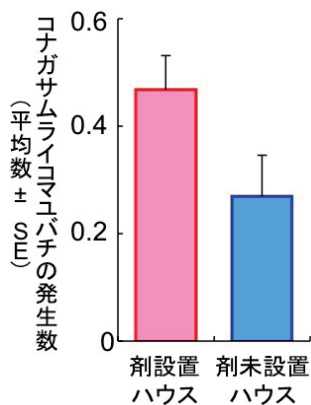
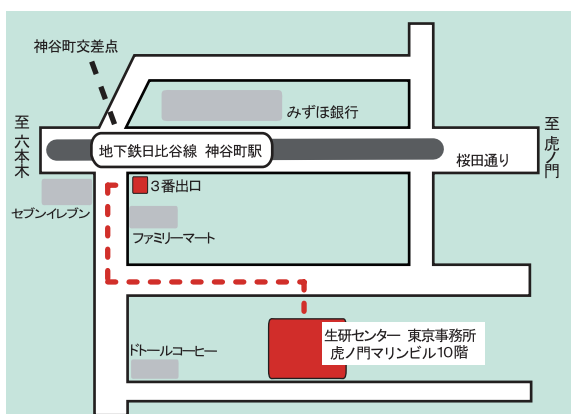


図3 コナガの発生が認められないハウスでのコナガサムライコマユバチの発生数 剤設置によってコナガサムライコマユバチの発生数が増加。

表1 農薬登録に向けた試験におけるハチクールとハチゲンキの効果

試験地	確認できた効果
日本植物防疫協会研究所 (茨城県牛久市)	コナガサムライコマユバチの寄生率の向上
東京都農林総合研究センター (東京都立川市)	コナガ発生数の減少とコナガサムライコマユバチの発生数の増加
野菜茶業研究所 (三重県津市)	コナガ数の減少
徳島県立農林水産総合技術支援センター (徳島県吉野川市)	コナガサムライコマユバチの寄生率の向上

生物系特定産業技術研究支援センター 東京事務所



東京メトロ日比谷線 神谷町駅 徒歩2分
神谷町駅 震ヶ関寄り3番出口を出て、左へ10m
左折後50m右手。虎ノ門マリビル10階

●お問い合わせ先

技術開発課

〒105-0001

東京都港区虎ノ門3-18-19

虎ノ門マリビル10階

03-3459-6567

●生研センターホームページ

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