

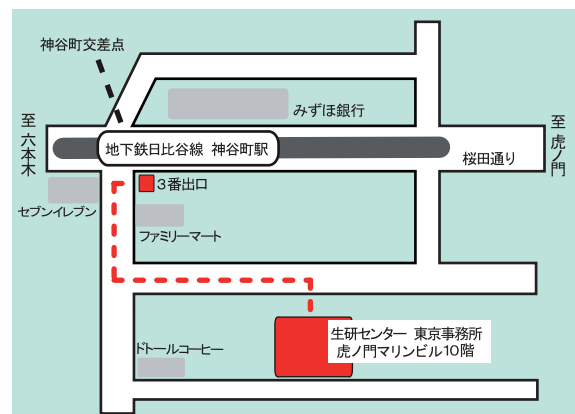
生物系産業創出のための 異分野融合研究支援事業

研究成果

(2009年度終了課題)



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 霞ヶ関寄り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/>

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

表紙の説明

花粉症や生活習慣病に予防効果のあるナリングニンカルコン（NGC）、 γ -アミノ酪酸（GABA）および新規機能成分を高生産するトマト品種・系統を作出し、それらを利用した飲食品や苗の実用化を図る。

[研究課題名：トマト機能性成分を活用した花粉症・生活習慣病対策食品の開発]
(異分野融合型 技術コーディネーター：河田 照雄)

生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業

(2009 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：2005～2009 年度)

温室ガス抑止のための窒素バイオマス再生・浄化システムの構築

祥雲 弘文・若木 高善・上田 祐一・渡辺 昭・遠藤 銀朗 …………… 1

こめトコトリエノールを活かす食品開発とこめアグリビジネスの展開

宮澤 陽夫・及川 眞一・村田 和優・木村 俊之・増田 隆之
天野 義一 …………… 5

糸状菌比較ゲノム情報に基づく新規抗菌剤の開発

阿部 敬悦・西村 麻里江・永山 孝三・坂内 誠 …………… 9

免疫基礎研究に基づく食物アレルギー対策食品の画期的創成

近藤 直実・金子 英雄・中埜 拓・嶋崎 康高 …………… 13

初乳成分の高度利用技術の開発

浦島 匡・橋本 修一・岡本 明治・五十嵐 慎・川本 恵子
磯部 尚・寺林 隆志・森田 稔 …………… 17

トマト機能性成分を活用した花粉症・生活習慣病対策食品の開発

河田 照雄・江面 浩・柴田 大輔・津金 胤昭・稲井 秀二
小幡 明雄 …………… 21

マイクロロボティクスを適用した胚操作の自動化

新井 健生・谷川 民生・新井 史人・佐藤 理・麻生 博
赤木 悟史 …………… 25

■ 研究課題名

温室効果ガス抑止のための窒素バイオマス再生・浄化システムの構築

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ① N₂O 抑止型廃水脱窒素システムの開発と超好熱発酵における微生物の役割の解明
（◎祥雲 弘文 (H17-20)、若木 高善 (H21) / 国立大学法人東京大学）
- ② 家畜糞尿等窒素バイオマスの超好熱即成コンポスト生産技術の開発
（上田 裕一 / 有限会社日本ライフセンター）
- ③ 廃水脱窒素システム / 家畜糞尿処理システムの設計、実証プラントの設計・管理
（渡辺 昭 / 荏原エンジニアリングサービス株式会社）
- ④ 好気脱窒素システムおよび超好熱発酵における微生物群集の動態解析
（遠藤 銀朗 / 学校法人東北学院東北学院大学）

■ 研究の目的

廃水処理や堆肥造りからは強力な温室ガスである N₂O が発生し、地球温暖化に一役買っている。とくに窒素含量の多い家畜排泄物処理では大量の N₂O 発生が予想される。本プロジェクト研究では、養豚場の排泄物および廃水の処理をモデルとして、廃水処理および堆肥化からの N₂O 発生を抑止し、地球温暖化防止に貢献する技術開発を目的とした。そのために廃水処理では N₂O 発生が少ない好気性脱窒菌（バイオオーグメンテーション）、豚糞堆肥化では急速昇温が可能な攪拌式発酵機（りぼん）の機能をそれぞれ最大限に利用するための研究を行った。

■ 主要な成果

- ① **好気脱窒細菌 *Pseudomonas stutzeri* TR2 株の脱窒特性の解明**：廃水処理槽に純粋培養した高性能脱窒細菌（TR2 株）を添加し、活性汚泥の脱窒素能力（N₂O を発生しない）を向上させる試み（バイオオーグメンテーション）を行なった。そのためにまず、TR2 株の脱窒特性の解明を行った。多くの脱窒細菌が亜硝酸を脱窒基質とした脱窒が苦手であるのに対し、TR2 株は脱窒活性が高く、誘導期間も短く、また亜硝酸の脱窒も硝酸と同程度の活性を示した。N₂O 発生抑止の鍵酵素は N₂O 還元酵素であるが、TR2 株の酵素は酸素耐性で、またその遺伝子（*nosZ*）は好気条件でも構成的に発現していた。これらの結果から TR2 株は、N₂O を発生しない高活性の脱窒菌であり、予想通りオーグメンテーションに使用可能であると判定された。
- ② **脱窒細菌 *Ralstonia pickkettii* K50 株のアレロパシー（他感作用）現象の解明**：K50 株と放線菌 *Streptomyces griceus* の共培養により、K50 株の脱窒活性が約 100 倍上昇する他感作用を見出し、そのシグナル伝達がアミノ酸のヒスチジンにより介在されることを明らかにした。脱窒活性が脱窒基質（硝酸、亜硝酸など）以外の物質で促進される現象は初めての発見で、この成果は Biosci. Biotechnol. Biochem. 誌に掲載され、本誌の 2008 年度論文賞に選ばれた。
- ③ **TR2 株のオーグメンテーション達成のための条件検討とその実際**：上記目的を達成するために豚糞尿由来の廃水処理液で馴養した活性汚泥と TR2 株を共存させ、TR2 株の生残条件や脱窒に与える影響を、試験管・フラスコレベルからベンチスケール（膜分離リアクター；MBR；30 L/50 L）、実証試験レベル（5 m³）まで調べた。その結果、実証試験装置は硝化と脱窒処理を分離する二槽式の亜硝酸型脱窒システムが最適との結論を得た。微生物群集解析の結果から、添加する TR2 株は原生生物の補食により消滅することが示唆された。亜硝酸型脱窒を実現するための熱処理（40-42℃）は原生生物の活動を抑えるた

めに有効と考えられた。これら結果に基づき実証試験運転を行ない、TR2 株の生残性を向上させることに成功した。

- ④ 廃水処理の好気・硝化工程で N_2O の発生することは古くから知られていたが、その機構は長年の間不明であった。この N_2O 発生が硝化過程の前半を担うアンモニア酸化細菌の脱窒によるものであることを、世界で初めて証明した。また簡単な N_2O 発生防止策を示した。この発見は今後の廃水処理の新技術開発に大きな影響を与える成果である。
- ⑤ りぼん型発酵機による家畜糞尿の超高温（90–100°C）一次処理は公衆衛生学的安全性に優れ、なおかつ好熱菌や好気性細菌、真菌（カビ）などの微生物の活動を活発化させることなどにより堆肥化二次発酵の速度を上昇させる効果のあることが示された。すなわち堆肥化開始の際のりぼん処理は、家畜糞尿の堆肥化前処理としてきわめて優れた方法であることが示された。
- ⑥ 養豚場では搾汁により豚糞尿は残渣と搾汁液に分離され、別々に処分されるが、その処分は大きな負担となっている。搾汁液はメタン発酵ののち廃水処理を受け外部に放流される。ここで生じる汚泥と搾汁残渣を混合し、りぼん前処理を施したのち堆肥化を行なう新たなシステムを構築した。堆肥化過程では N_2O が発生するが、汚泥との混合により N_2O 発生は大きく軽減された。さらに生ゴミを混ぜることにより N_2O 発生はほとんど抑えられた。これにより本プロジェクト研究の二大柱である廃水処理と堆肥造りが養豚場に連携する、窒素バイオマスリサイクル・浄化システムの完成を見た。

■ 公表した主な特許と論文

- ① 公開番号 2009-234855：有機廃棄物の堆肥化方法：有限会社 日本ライフセンター
- ② Kim, S., *et al.*, Nitrous oxide emission from nitrifying activated sludge dependent on denitrification by ammonia-oxidizing bacteria. *Biores. Technol.* (in press)
- ③ Yamada, T., *et al.*, Successions of bacterial community in composting cow dung wastes with or without hyperthermophilic pre-treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81, 771–781 (2008)
- ④ Takaki, K., *et al.*, *Streptomyces griseus* enhances denitrification by *Ralstonia pickettii* K50, which is possibly mediated by histidine produced during co-culture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 163–170 (2008)

■ 今後の展開方向

- ① 亜硝酸型脱窒素法は汚泥減容、炭素源節約などの効果により炭酸ガス放出削減に貢献できるが、さらにその欠点である N_2O 発生を抑止技術開発により、全温室ガス抑止型廃水処理システム構築のための一つの有力な技術になり得る。
- ② 硝化工程における N_2O 発生機構のさらなる解明によりその抑止技術を開発し、硝化・脱窒両工程から温室ガスを放出しない完全な水処理技術を完成させる。
- ③ りぼん型発酵機の前処理による、 N_2O 抑止型家畜糞尿即成堆肥化技術を完成させる。

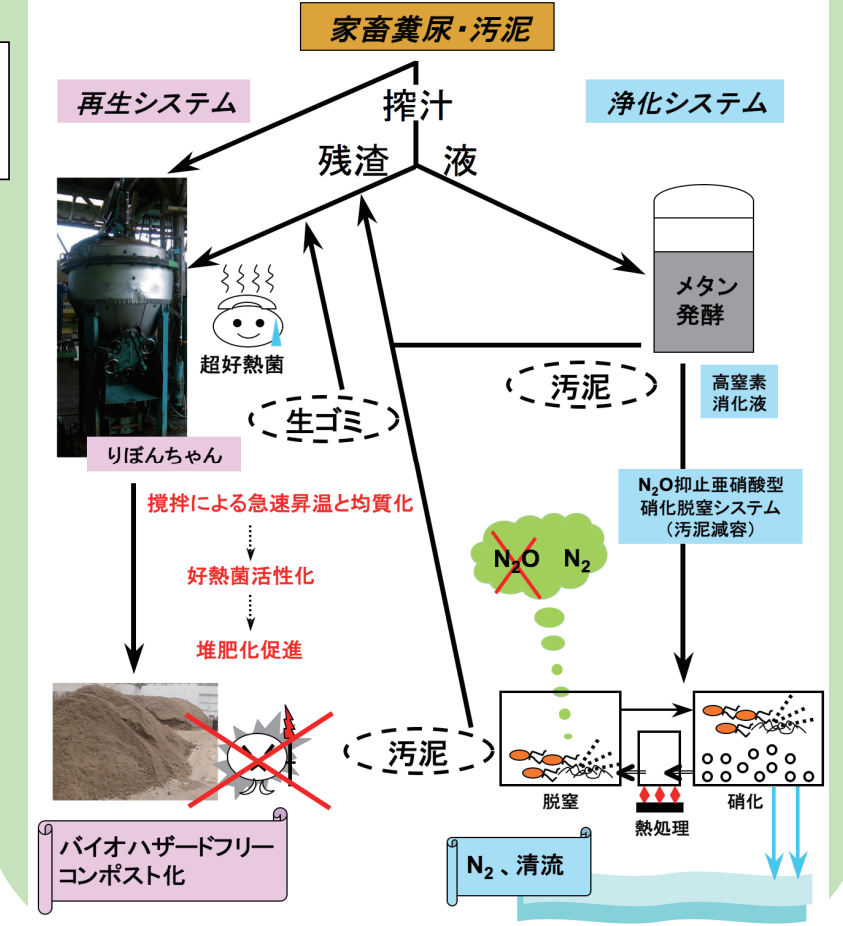
■ 問い合わせ先

- ① 亜硝酸型脱窒による N_2O 抑止型廃水処理システムの構築：荏原エンジニアリングサービス株式会社・経営企画（03-6275-8227）
- ② 硝化工程における N_2O 抑止技術の開発：東京大学農学生命科学研究科酵素学研究室（03-5841-5148）
- ③ 家畜糞尿即成堆肥化技術：日本ライフセンター（03-5428-0767）

■ 研究成果の具体的図表

窒素バイオマスリサイクルシステム

図1 窒素バイオマスリサイクルシステムの二大柱、再生システム・浄化システム



硝化工程における N_2O 発生は硝化菌（アンモニア酸化細菌；AOB）が担っていた!!!
 緑のベルトは、AOB によるアンモニアから N_2O までの道筋

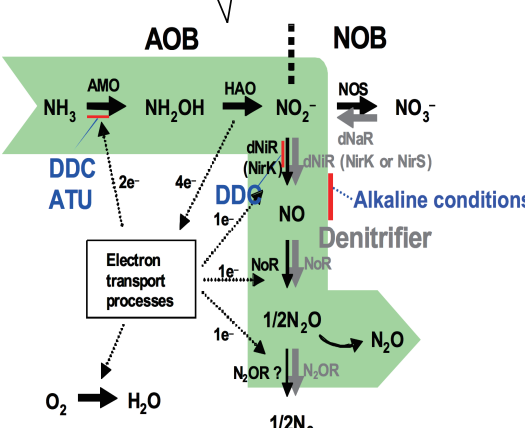


図2 アンモニア酸化細菌による硝化・脱窒経路

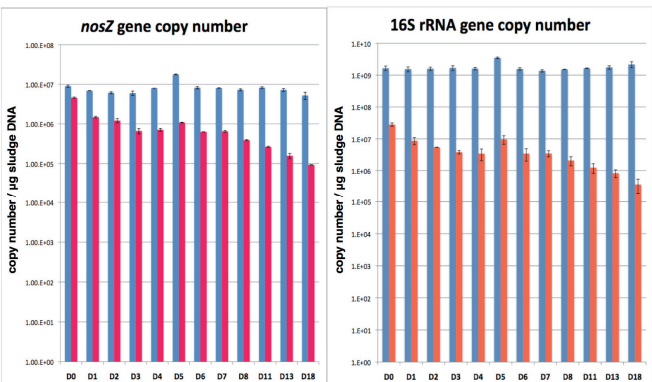


図3 実証試験におけるTR2株生残性
 全バクテリア：青色、TR2株：左図：赤色・右図：オレンジ色
 添加後18日目まで生存していることが *nosZ* 遺伝子（左）、*16SrRNA* 遺伝子（右）により示された。

廃水脱窒素(活性汚泥)・家畜糞尿(搾汁残渣)処理工程

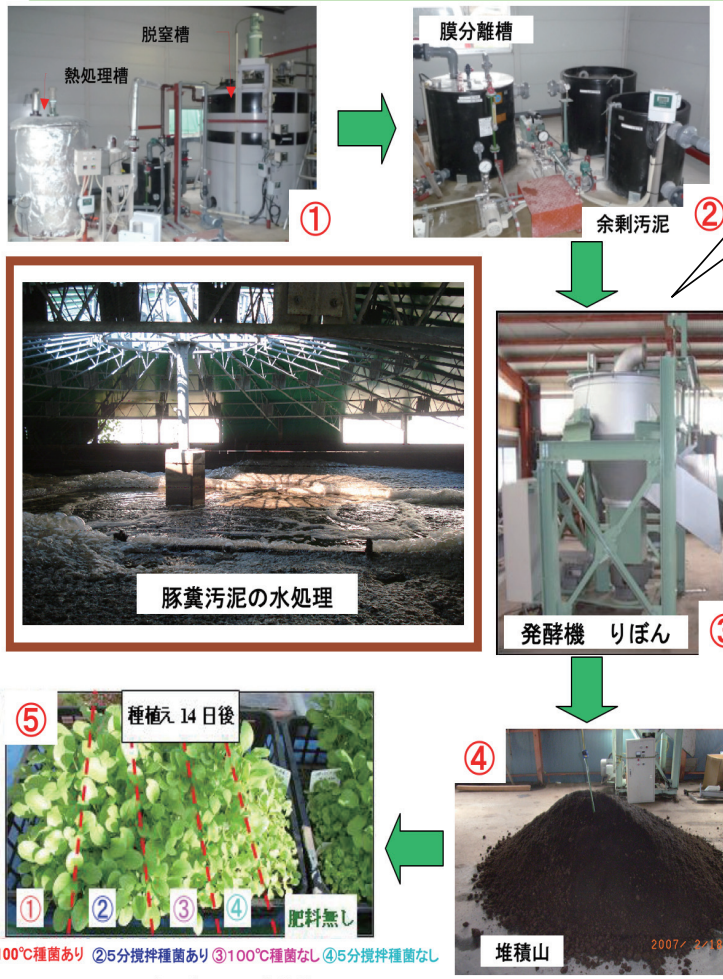


図4 ①②③④⑤構築した実験プラント
搾汁残渣と廃水処理汚泥の混合は、 N_2O 発生を防ぎ、堆肥化期間を2週間という短さに短縮した。

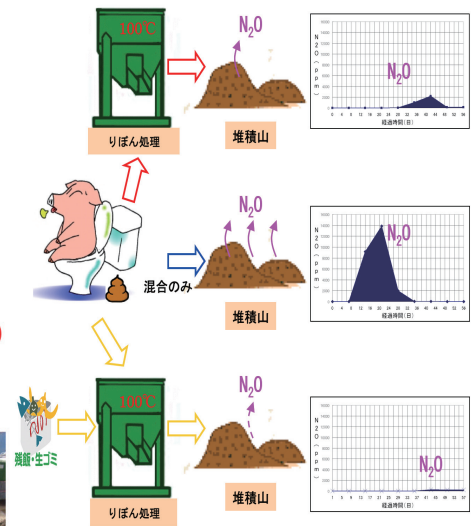


図5 豚糞堆肥化で発生する N_2O
水処理実験プラントより出る豚糞搾汁残渣・活性汚泥の堆肥化で発生する N_2O の量は、通常の堆肥化(中段)が多くりぼん処理すると1/7となる(上段)。調理ゴミ・食品残渣を加えると発生はさらに減弱する(下段)。

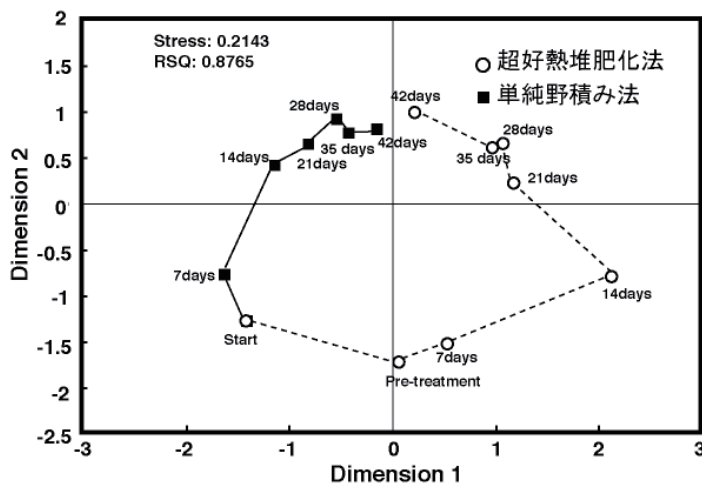


図6 多次元尺度法によるりぼん処理(白)、非処理(黒)間の真正細菌群集構造の遷移の評価
りぼん処理と非処理で途中経過が大きく異なる。りぼん処理の方が好気性細菌が多い。

■ 研究課題名

こめトコリエノールを活かす食品開発とこめアグリビジネスの展開

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ①血管新生阻害など米糠トコリエノールの健康機能解析と食品への応用
（◎宮澤 陽夫／国立大学法人東北大学）
- ②米糠トコリエノールによる血管新生病予防に関するヒト臨床試験
（及川 眞一／日本医科大学）
- ③トコリエノール高生産イネの探索と育成
（村田 和優／富山県農林水産総合技術センター）
- ④トコリエノール分離技術の開発及びトコリエノール高生産イネの栽培・調製技術の確立
（木村 俊之／（独）農研機構東北農業研究センター）
- ⑤工業化に向けた高純度米糠トコリエノールの製造システム開発
（増田 隆之／オルガノ株式会社）
- ⑥米糠トコリエノール食品の製造と事業展開
（天野 義一／三和油脂株式会社）

■ 研究の目的

社会の高齢化で血管新生病が激増し対策が急務である。イネ（米）は我が国の基幹作物であり、我々は米の糠部に含まれる不飽和ビタミン E “トコリエノール（T3）” に強い血管新生阻害作用を発見した。本事業では、T3 の血管新生阻害作用をはじめとする健康機能・安全性の評価、T3 高生産イネの育成、米糠 T3 製造技術の開発を行う。米糠 T3 を特徴とする食品を開発する。これにより新しい“米”アグリビジネスを展開する。

■ 主要な成果

- ①細胞実験により、血管新生促進因子や腫瘍細胞の培養上清によって惹起される血管内皮細胞（HUVEC）の増殖、遊走、管腔形成が、T3 によって抑制されることを確認し（図1）、その抗血管新生メカニズムを解明した。
- ②ヌードマウスを用いた動物実験において、本研究で製造した高純度米糠T3の経口摂取により腫瘍の成長が抑制され（図2）、この作用は血管新生抑制とともに癌細胞の細胞周期停止やアポトーシス惹起を機序とすることを示した。
- ③臨床試験によって高純度米糠T3の安全性を確認し、動脈硬化性疾患リスクの高い境界域者において高純度米糠T3の血清脂質改善作用を検討した（図3）。
- ④動脈硬化症発症メカニズムの培養細胞での解析モデルを開発し、T3 が単球の接着性を抑制し、抗動脈硬化的に作用することを認めた。さらに、動脈硬化モデルマウスへの高純度米糠 T3 の投与によって動脈硬化巣の形成が抑制される傾向を認めた（図4）。
- ⑤米糠の T3 含量に品種間での大きな差異を認め、「Milyang23」を遺伝的に安定した T3 高含量品種として確定した。「Milyang23」と多収性育種資源「ハバタキ」の交配に基づき、現行の水稻栽培体系に適した「T3 高含量かつ多収」の中間母本系統を育成した（図5）。
- ⑥米糠 T3 含量は栽培条件に影響されないことを明らかとした。収穫後の玄米の貯蔵により、米の T3 含量が減少する問題が見いだされたが、籾保存もしくは玄米保存であっても低温下（10℃以下）で貯蔵することにより、T3 減少が抑制できる技術開発に成功した。

- ⑦脱臭スカム油を直接（前処理無し）分子蒸留する新たな方法を開発し、T3 を 20%含む米糠 T3 原料の調製と安定供給を可能とした。
- ⑧小型 T3 製造試作機の運転条件検討により、大型 T3 製造試作機を設計・作製し、米糠 T3 原料（20%）からの高純度米糠 T3（>95%）の連続製造を実現した（図6）。これにより、高純度米糠 T3 の大量製造が可能となり、他機関の「臨床試験」や「効能評価試験」の実施が可能となった。
- ⑨米糠T3原料（20%）や高純度米糠T3（>95%）を使用した、「米糠T3添加油脂（T3強化こめ油）」や「T3ソフトカプセル（栄養補助剤）」をはじめとする米糠T3食品を企画・試作した（図7）。また、健康食品・医薬市場に導入した場合の市場性を評価、想定される市販価格、製造量などを検討し、米糠T3ビジネスを展開するための戦略的事業プランを立案している。

■ 公表した主な特許と論文

- ①Nakagawa, K., *et al.*, In vivo angiogenesis is suppressed by unsaturated vitamin E, tocotrienol. *J. Nutri.*, 137, 1938-1943 (2007)
- ②Miyazawa, T., *et al.*, Antiangiogenic and anticancer potential of unsaturated vitamin E (tocotrienol): a review. *J. Nutri. Biochem.*, 20, 79-86 (2009)
- ③Asai, A., *et al.*, Phosphatidylcholine hydroperoxide-induced THP-1 cell adhesion to intracellular adhesion molecule-1. *J. Lipid Res.*, 50, 957-965 (2009)
- ④Sookwong, P., *et al.*, Cross-fertilization for enhancing tocotrienol biosynthesis in rice plants and QTL analysis of their F₂ progenies. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 4620-4625 (2009)

■ 今後の展開方向

- ①T3 の健康機能（とくに血管新生阻害作用とそのメカニズム）が明確となり、その安全性も担保され、さらには高純度米糠 T3 の抗動脈硬化性作用を示す知見が得られている。今後、さらにヒトでの有効性等についての検討を進めるとともに、米アグリビジネスを成立させるべく事業戦略の構築を進める。
- ②本事業の成果を受けて、今後、需要増が見込まれる高純度米糠 T3 の生産・供給に対応するために、T3 高生産イネの品種登録および普及体制を整える。
- ③今後、米糠 T3 食品や、高純度米糠 T3 の試薬・医薬原体の大きな需要増が見込まれるため、本事業で明らかとなった効果・効用を十分にアピールし、他の機能性食品との差別化を図った商品開発を進める。

■ 問い合わせ先

- ①米糠 T3 健康機能解析および米アグリビジネス事業戦略：国立大学法人東北大学（022-717-8906）（<http://agri.tohoku.ac.jp/kinoubunshi/index-j.html>）
- ②T3 高生産イネの開発：富山県農林水産総合技術センター（076-429-2111）（<http://www.pref.toyama.jp/branches/1661/>）、東北農業研究センター（024-593-6178）（<http://www.tnaes.affrc.go.jp/>）
- ③米糠 T3 製造技術および新規米糠食品の開発：オルガノ株式会社（03-5635-5200）（<http://www.organo.co.jp/technology/hisepa/index.htm>）、三和油脂株式会社（023-653-3021）（<http://www.sanwa-yushi.co.jp>）

■ 研究成果の具体的図表

米ぬかT3機能性解析

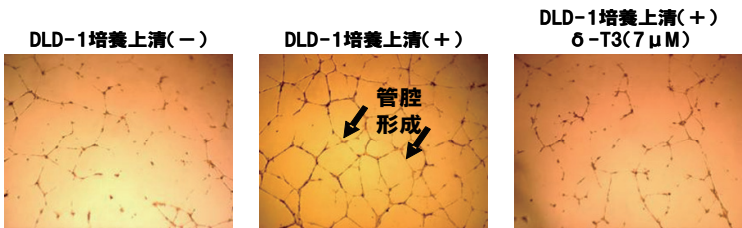


図1 T3による血管内皮細胞の管腔形成抑制

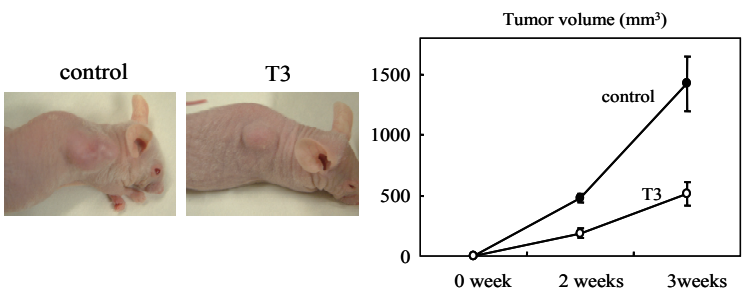


図2 癌細胞を移植したヌードマウスにおける腫瘍形成の高純度米糠T3投与による抑制

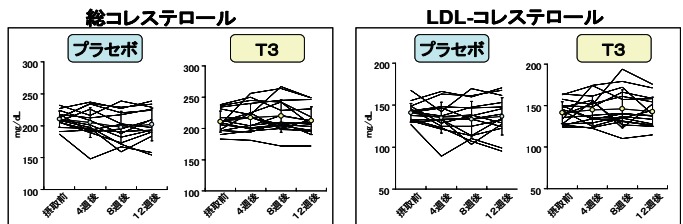


図3 ヒト臨床試験による高純度米糠T3の効能評価(血清脂質改善作用の検討)

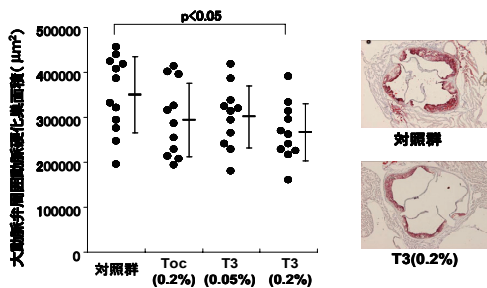


図4 米糠T3の新規機能性の探索(ApoE-KOマウスにおける動脈硬化形成の高純度米糠T3投与による抑制)



T3試験試料



機能性のエビデンス

T3高生産イネ開発

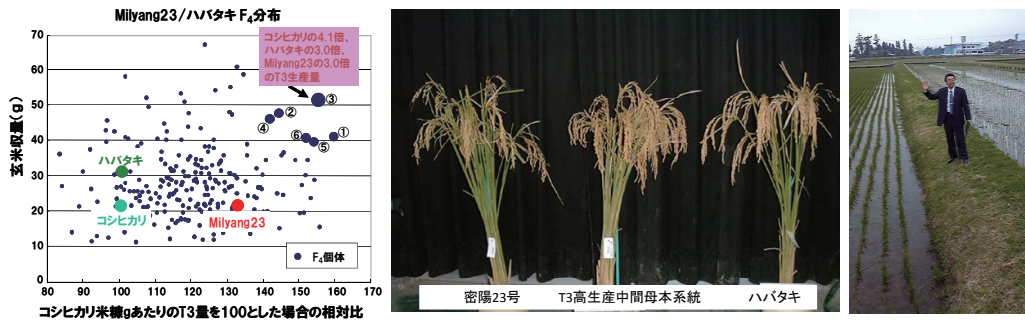


図5 現行の水稲栽培体系に適した「T3高含量かつ多収」中間母本系統の育成



T3製造原料(米ぬか)

米ぬかT3製造技術

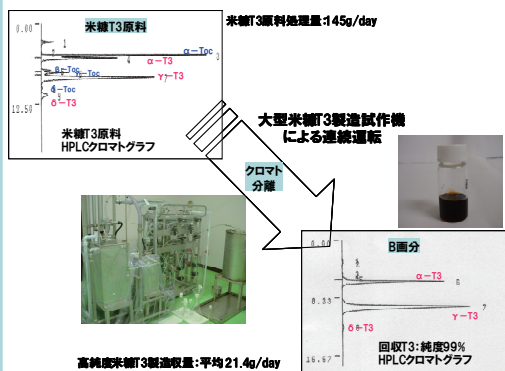


図6 大型T3製造試作機による高純度米糠T3の連続精製



図7 米糠T3食品の企画・試作

米ぬかT3製品開発

T3の機能性を特徴とする新たな
”米ぬかT3”アグリビジネスの展開へ

■ 研究課題名

糸状菌比較ゲノム情報に基づく新規抗菌剤の開発

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ① *Aspergillus* 属菌のゲノム情報に基づく薬剤標的の特定
（◎阿部 敬悦／国立大学法人東北大学）
- ② モデル糸状菌情報を活用した抗いもち病菌剤探索システムの構築
（西村 麻里江／（独）農業生物資源研究所）
- ③ 化合物ライブラリーの供給および抗菌剤の最適化と実用化
（永山 孝三／クミアイ化学工業株式会社）
- ④ 標的の特定および薬剤-標的相互作用解析システムの構築とキット化
（牧野 徹 (H17-18)／株式会社ノバスジーン；
中村 誠 (H19)、坂内 誠 (H20-21)／オリンパス株式会社）

■ 研究の目的

農業用殺菌剤の国際市場では新剤の継続的創出が望まれている。そこで、異分野技術（糸状菌ゲノム科学、情報科学、合成化学、農薬科学、工学）を結集して、糸状菌類の特定標的に作用する新剤の高速探索システムを構築し、本システムを用いて見出した新規作用性を有する農業用殺菌剤のリード化合物を最適化して、新規抗菌剤の創出・実用化を目指す。本研究を通じて、連続的に新剤の創出が可能なゲノム創農薬パイプラインを確立する（図 1）。

■ 主要な成果

- ① 高速スクリーニング (HTS) に対応可能な化合物ライブラリーの構築：HTS に対応可能な目的指向型化合物ライブラリー（4 万化合物）を構築した。
- ② イネいもち病菌マイクロアレイの開発：ブロード研究所の予測遺伝子情報および既存の市販アレイの搭載遺伝子に比べて農業生物資源研 EST 配列へのヒット率が高く、実験結果も既存アレイに比べ定量 PCR との対応が良い世界最高水準のマイクロアレイを独自開発した（図 2）。
- ③ レポーターアッセイ系の構築：シグナル伝達作動薬探索用レポーターアッセイ系を構築し、大量スクリーニングを行って、高浸透圧応答 (HOG) 経路に働く薬剤候補を得た（図 3-5）。
- ④ 分子間相互作用解析技術の構築：1 分子蛍光分析装置を用いて HOG 経路に作用する薬剤の迅速スクリーニング法を確立した。また、シグナル伝達系を対象に蛍光標識 ATP を用いることにより、タンパク質の ATP 結合性評価を可能にし、創薬標的としての ATP 結合阻害剤評価系を構築した。
- ⑤ 化合物応答データベースの構築：遺伝子発現情報と表現型情報を格納し、相互検索とローカルマシンで高度な統計解析を行うためのインターフェース群も整備された、世界でも類のない革新的な化合物応答データベース「IDEA」を構築した（図 6-10）。
- ⑥ 新規作用性化合物の発見：構築した HTS 系を活用してカルボン酸系抗菌化合物を発見し、それがシグナル伝達系 HOG 経路のこれ迄にない阻害剤であることを明らかにした。本周辺化合物は、真菌類のシグナル伝達研究における有用なプローブとして活用できる。
- ⑦ 細胞壁構築経路 (CWI 経路) の標的の特定：糸状菌の CWI 経路が α -1, 3-グルカン (AG) 合成酵素遺伝子の転写制御に特化されていることを明らかにし、イネいもち病菌のステルス因子としての AG の発見に繋がった。本成果は「2009 年農林水産研究成果 10 大トピックス」に選ばれた (<http://www.s.affrc.go.jp/docs/10topics.htm>)（図 11）。
- ⑧ レポーター株によるシグナル伝達作動薬の HTS 探索と「IDEA」への統計照合を併用した、

継続性・拡張性のある新規創農薬パイプラインを開発実用化した(図 12)。

■ 公表した主な特許と論文

- ① 特願 2009-074728 : 新規レポーター遺伝子を用いたスクリーニング方法 : 東北大学、農業生物資源研究所、クミアイ化学工業(株)
- ② 特願 2009-079050 : 検索装置および検索プログラム : 東北大学、農業生物資源研究所、クミアイ化学工業(株)、オリンパス(株)
- ③ Fujioka, T., *et al.*, MpkA-Dependent and -Independent Cell Wall Integrity Signaling in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 6, 1497-1510 (2007)
- ④ Fujikawa, T., *et al.*, Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development. *Molecular Microbiology*, 73, 553-570 (2009)

■ 今後の展開方向

- ① ゲノム創農薬パイプラインの活用 : マイクロアレイと化合物応答データベース「IDEA」を活用した作用点推定および標的探索機能並びにレポーターアッセイ系を用いた薬剤探索システムとを併用することで、これまでにないゲノム創農薬パイプラインを構築した。本研究成果は医農薬創製における有用なツールとして、抗菌剤3.3兆円市場へ向けた新薬開発に活用されるものと期待でき、商業的利用の準備段階に入っている。
- ② イネいもち病菌マイクロアレイの活用 : 本事業において独自に開発したイネいもち病菌マイクロアレイは、既存製品と比べ高精度かつ高性能でいまだに世界最高水準のアレイであり、抗菌剤開発、薬剤耐性獲得のメカニズムの解明等、産業面・学術面からも今後の活用が期待される。
- ③ α -1, 3-グルカン (AG) の活用 : *Aspergillus*属糸状菌のCWI研究、いもち病菌の細胞壁研究から、AGが動植物で糸状菌感染時の免疫攻撃を回避するステルス因子として機能することを明らかにした。本成果を活用してAGを標的とした医農薬の開発や病害抵抗性作物の育種などが考えられる。一方、麴菌からAGを大量生産する技術(100gAG生産/100kg麴)を確立し、AG及びAGを除去した β -1, 3-グルカン(BG)などの素材の工業的利用開発にも着手しており、素材分野として新領域の開拓も期待される。
- ④ 分子間相互作用解析技術の活用 : 1分子蛍光分析装置を用いて、HOG経路のタンパク質間相互作用に作用する薬剤の迅速スクリーニング系を構築した。本方法を応用することで、他のタンパク質間相互作用評価も可能であり、蛍光標識ATPを用いたATP結合性タンパク質の評価やプロテインキナーゼC(PKC)の活性評価にも活用できる。
- ⑤ 抗菌化合物の開発 : カルボン酸系抗菌化合物は構造改変を行ない、実用化を目指す。

■ 問い合わせ先

- ① ゲノム創農薬パイプライン、 α -1, 3-グルカン : 東北大学未来科学技術共同研究センター (022-795-3205 ; kabe@niche.tohoku.ac.jp)
- ② イネいもち病菌マイクロアレイ、抗菌化合物 : クミアイ化学工業株式会社・(株)ケイ・アイ研究所 (0538-58-0141 ; yoshimura@ki-chem.co.jp)
- ③ イネいもち病菌、ステルス因子 : 農業生物資源研究所植物・微生物間相互作用研究ユニット (029-838-8461 ; marie@affrc.go.jp)
- ④ 「IDEA」、分子間相互作用解析技術 : オリンパス株式会社医療技術開発本部 (0426-91-7429 ; m_bannai@ot.olympus.co.jp)

■ 研究成果の具体的図表

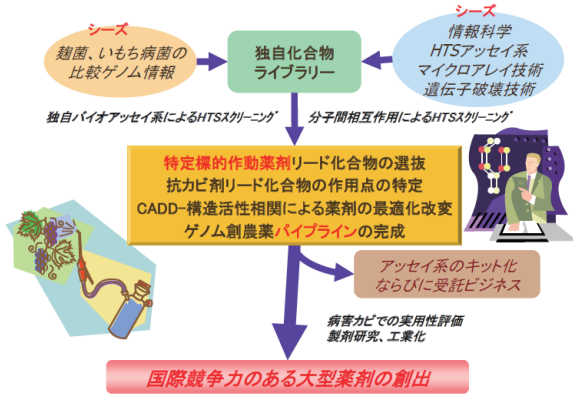


図 1. 研究の目的

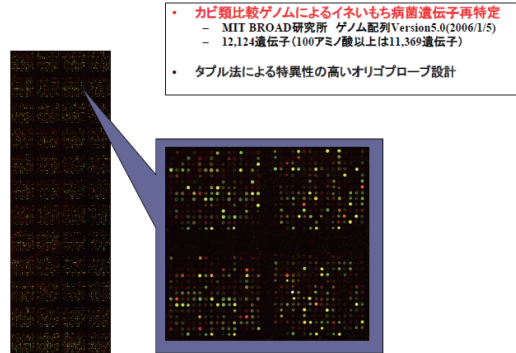


図 2. イネいもち病菌マイクロアレイの作製

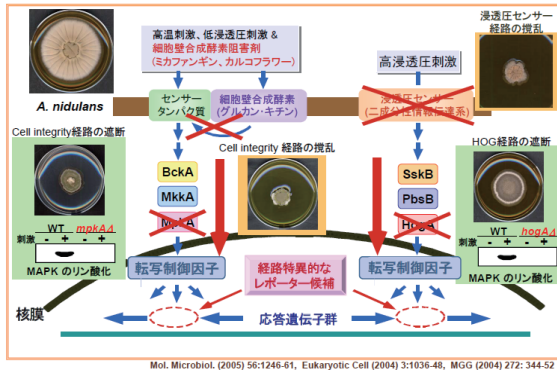


図 3. シグナル伝達系とレポーター

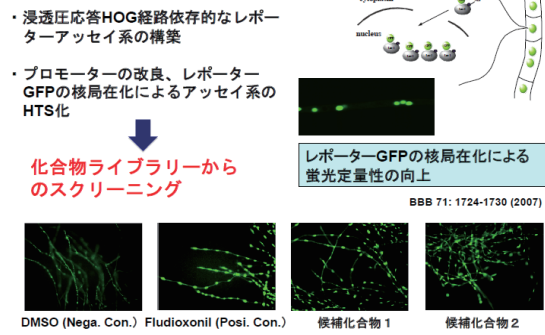


図 4. レポーターアッセイ系を用いた薬剤スクリーニング

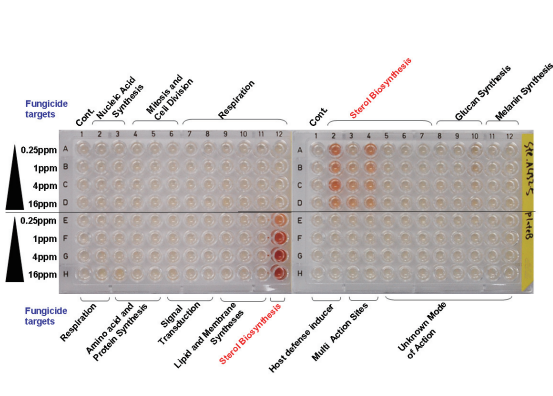


図 5. レポーターアッセイ系の実例

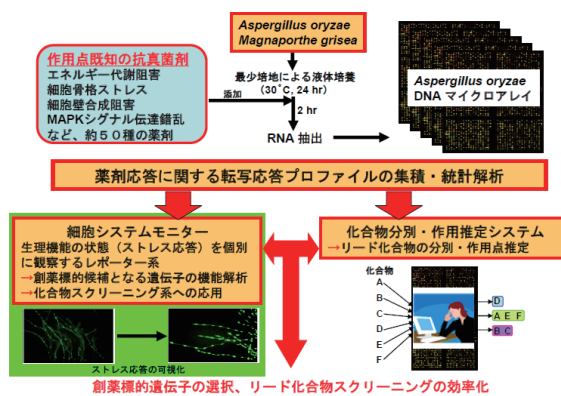


図 6. 糸状菌マイクロアレイを活用した創薬支援システムの構築

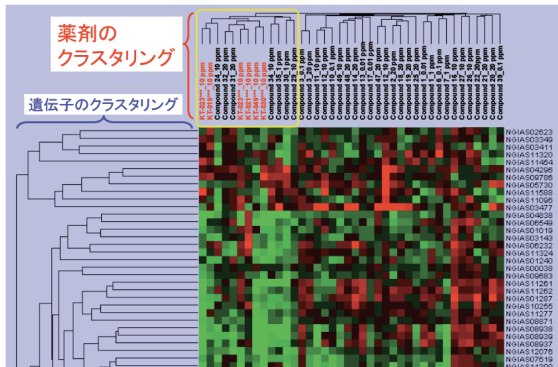


図7. 薬剤のクラスタリングの例

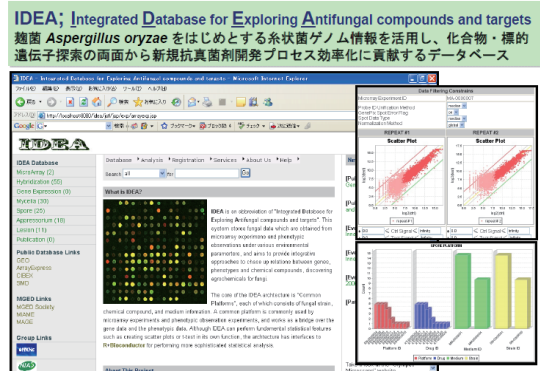
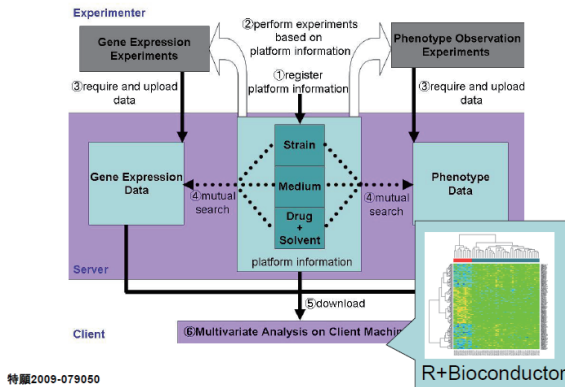


図8. 化合物応答データベース (IDEA) の構築



特願2009-079050

図9. IDEA システムの概要

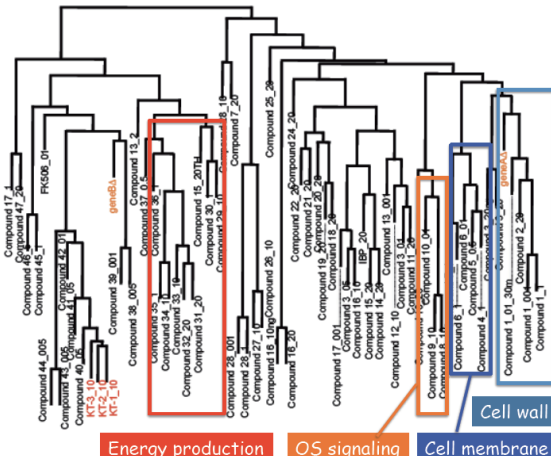


図10. IDEA を用いた薬剤プロファイリングからのリード化合物探索

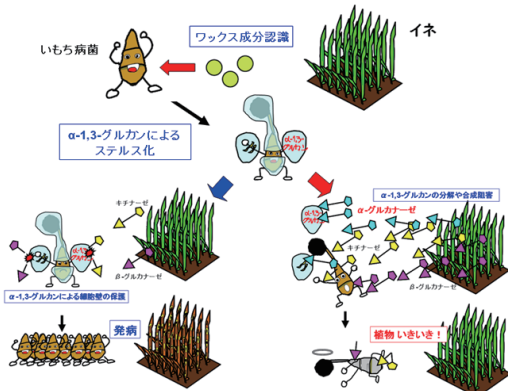


図11. カビの「ステルス作戦」

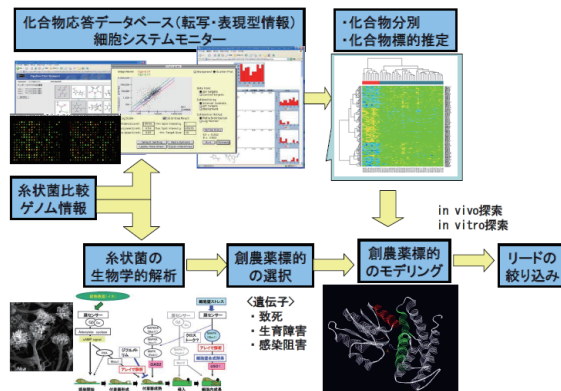


図12. 抗真菌剤ゲノム創薬パイプラインのフロー

■ 研究課題名

免疫基礎研究に基づく食物アレルギー対策食品の画期的創成

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ①食物アレルギー病因病態の遺伝子学的およびタンパク質構造学的解明
免疫寛容を誘導する大豆タンパク質分解物の分析とその臨床応用（H20-21）
（◎近藤 直実／国立大学法人岐阜大学大学院医学系研究科）
- ②食物アレルギー患者の臨床像の解明および新規治療法の実践
（金子 英雄／国立大学法人岐阜大学医学部附属病院）
- ③免疫寛容を誘導する牛乳タンパク質分解物の開発および製品化
（中埜 拓／ビーンスターク・スノー株式会社）
- ④免疫寛容を誘導する大豆タンパク質分解物の開発および製品化（H17-19）
（嶋崎 康高／百福インターナショナル株式会社）

■ 研究の目的

食物アレルギーの治療法は極めて立ち後れており、原因食品を明らかにし、その食品を除去するという除去食療法しかない。本研究では、積極的に免疫寛容を誘導させ“食べて治す”画期的アレルギー対策食品の開発をめざす（図1）。牛乳または大豆アレルギー患者の臨床像、病態を明らかにし、さらにヒト白血球型抗原（HLA）—抗原ペプチド—T細胞受容体（TCR）との結合様式、T・B細胞エピトープを明らかにして、どのようなペプチド配列の組合せが食物アレルギー発症に関わるかを解明する。この知見をもとにして酵素分解によりB細胞エピトープ等を消失させ“食べて治す”（免疫寛容誘導）画期的アレルギー対策牛乳、大豆食品を創出する技術の開発に取り組み、これらの食品を応用した多種の事業の展開へつなげる。

■ 主要な成果

① 免疫寛容を誘導する牛乳タンパク質分解物の開発

牛乳アレルギー疾患でアレルゲン性が高いとされる牛乳タンパク質のβ-ラクトグロブリン（BLG）について、BLGのT細胞エピトープを明らかにするため、牛乳アレルギー患者からBLGに対するT細胞クローンを樹立し、HLA—ペプチド—T細胞受容体の結合様式を明らかにした（図2）。以上の結果をもとに、重篤な症状を生じるB細胞反応性の減弱ならびに免疫寛容を誘導するT細胞反応性の保持を指標として、酵素分解によるペプチド調製方法を検討した（図3）。その結果、BLGでは2種類の分解物を選択し、とくに#47分解物は、T細胞反応性を有するアミノ酸配列（コア配列、図3の枠内）の保持が確認された。これらの有望酵素分解物の分離・精製調製条件を確立し（図4）、大量調製および安全性確認を経て、臨床評価用サンプル（抗原修飾BLGペプチドパウダー）を調製した（図5,6）（図10参照）。もう一つの主要な牛乳アレルゲンであるカゼインについても、B細胞反応性の減弱、ならびに免疫寛容を誘導するT細胞反応性の保持を指標として分解物の調製条件を検討し、3種類の分解物を選択し評価を進めている（図7）。このなかで、T細胞反応性は保たれておりB細胞反応性が減弱しているカゼイン分解物を見出し、この分解物が免疫寛容を誘導する可能性が示された。

② 抗原修飾BLGの臨床試験

#47分解物は、経口摂取による臨床評価にて牛乳アレルギー疾患の寛解例が認められた。#47分解物の投与に先立ち、投与に関するプロトコルを作製した（図8）。#47分解物投与の投与前後にintact BLGの負荷を行い、BLGに対する摂取閾値の変化を検討したところ、8例中7例で閾値が上昇しており、免疫寛容が誘導されたと考えられた。#47分解物の摂取により牛乳を飲めなかった患者さんの中で、牛乳100ml以上摂取できるようになった患者さんもあり、有用

性が確認できた。その例を図 9 に示す。

- ③ 抗原修飾 BLG の製品開発
#47 分解物の大量調製法を確立し、ラムネ菓子やタブレットのような形状の製品（試作品）を開発した（図 10）。
- ④ 大豆主要アレルゲン P34 の大腸菌利用による作製と解析
リンパ球幼若化反応および IgE 反応で大豆アレルギーの診断に利用可能な高純度精製のリコンビナント P34 (rP34) を作製した（図 11）。酵素分解した rP34 分解物は B 細胞反応性が減弱していた。また rP34 はエンドトキシンと結合する性質が認められエンドトキシン除去が必要である（図 12）。
- ⑤ 免疫寛容を誘導する大豆タンパク質分解物の開発
大豆のある分解物に P34 の消失を確認した。大豆アレルギー患者のうち、この大豆分解物によりリンパ球幼若化反応が誘導される者がみられたことから、この分解物が免疫寛容を誘導する可能性が示された。

■ 公表した主な特許と論文

- ① 経口免疫寛容を誘導するペプチド組成物及びその製造方法
（特開：2008-195618、出願人：ビーンスターク・スノー（株）、国立大学法人岐阜大学）
- ② Kaneko, H., *et al.*, The response of bovine beta-lactoglobulin-specific T-cell clones to single amino acid substitutions of T-cell core epitope. *Pediatric Allergy and Immunology*, 19, 592-598 (2008)
- ③ Ohnishi, H., *et al.*, Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106, 10260-10265 (2009)

■ 今後の展開方向

- ① BLG 以外の牛乳の主要なアレルゲンであるカゼインについても、同様な方法で免疫寛容を誘導するカゼイン分解物の作製を進め、BLG 分解物とカゼイン分解物を混合して摂取することで、牛乳アレルギーをより寛解に誘導することが可能な素材・製品作りを進め、さらなる特許出願を目指す。#47 分解物に関しては大量生産の方法が確立していることから、臨床応用が可能であり、業界での多種の製品化を検討する。
- ② 大豆分解物を用いての臨床応用を行うと同時に、大豆分解物を用いた食材の開発と商品化を多種の業界と提携しすすめていく。

■ 問い合わせ先

- ① 本研究全般、高純度精製リコンビナント P34 開発、大豆分解物食材開発 … 岐阜大学大学院医学研究科小児病態学（058-230-6000）
- ② 酵素分解 BLG 臨床治験 … 岐阜大学医学部附属病院小児科（058-230-6000）
- ③ 酵素分解 BLG、カゼイン製品開発 … ビーンスターク・スノー株式会社（049-242-8138）

■ 研究成果の具体的図表

“食べて治す”という新しい独創的発想

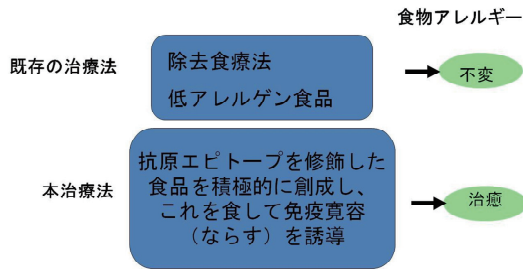


図1 本治療法と既存の治療法の相違



図3 #47酵素によるBLGの分解

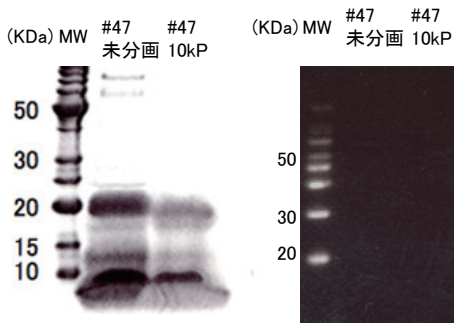


図5 #47分解物の患者血清IgE Westernblot

左: #47分解物のSDS/PAGE (CBB染色)
 右: 牛乳アレルギー患者(RAST score 6)の血清IgEを使用したWesternblot
 CBBでは#47分解物のペプチドの存在が確認できるが、IgE Westernblotでは検出できない。

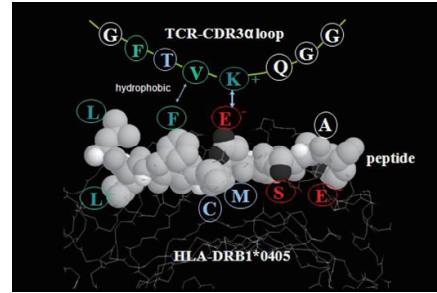


図2 HLA-BLG peptide-T細胞受容体との結合様式

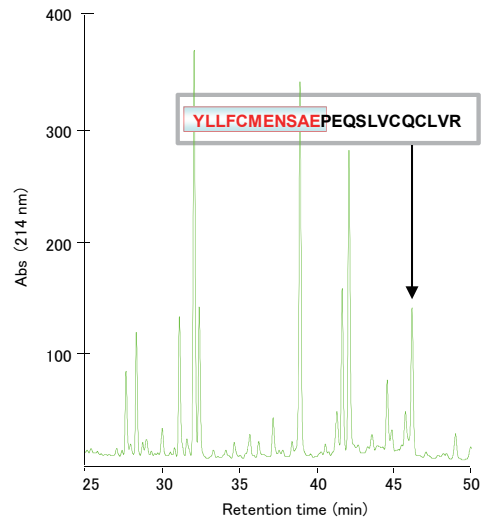


図4 #47分解物の逆相HPLCクロマトグラム

RT46min付近のピークにコア配列を含むペプチドが同定された

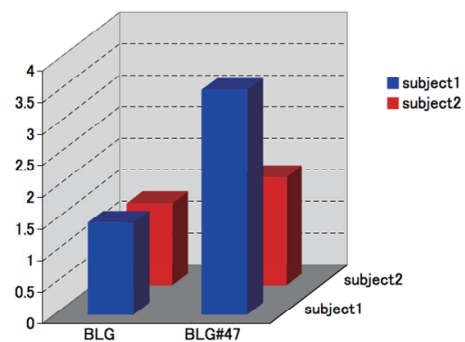


図6 #47分解物を使用したリンパ球幼若化反応 (LST)

Intact BLGとBLG分解ペプチド(#47分解物)に対して、LSTで陽性反応を示す牛乳アレルギー患者が存在する。

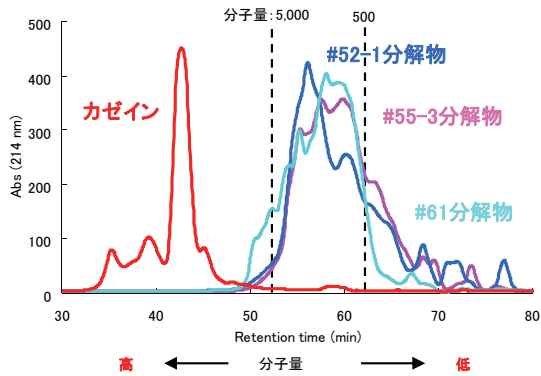


図7 各カゼイン分解物の分子量分布

BLG#47分解物経口免疫寛容誘導プロトコル



- 対象は牛乳に即時型のアレルギー反応の既往を有し、寛解していない症例とする。
- 投与前に書面にてインフォームドコンセントを得る。
- * BLG 負荷試験を行なう。牛乳40ml相当のBLGパウダーを20mlの水に溶解し、15分おきに1ml→2ml→4ml→8ml→(5ml)の順に増量し、total 40mlのBLG負荷を行なう。(0) (15分) (30分) (45分) (60分) 最終投与後1時間観察。
- 2回(3回)の採血を行なう(矢印)。
- 末梢血一般、血液像、IgE、RAST (牛乳、 α -ラクトグロブリン、BLG、カゼイン、卵白)
- Th1/Th2、CD4/CD25の測定
- BLG#47分解物を水20ml(外来では注射用蒸留水)で希釈したもの1mlの摂取(牛乳0.25ml相当BLG)から開始する。
- 毎日、規定量を午前中にのんでいただく。
- 1週間毎に負荷する量を増量する。
- 最終的に牛乳40mlに相当するBLG#47分解物を摂取していただく。
- プロトコル終了後、再度BLG負荷試験を行う。
- BLGが摂取できた場合は牛乳の負荷試験を行う。

図8 #47分解物の投与プロトコル

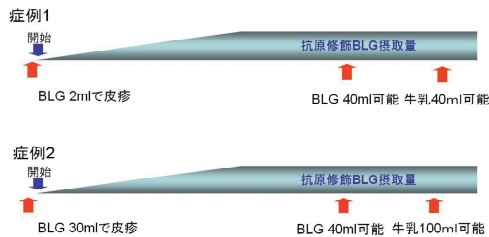


図9 #47分解物の摂取による牛乳アレルギー寛解症例



図10 #47分解物の製品化(試作品)

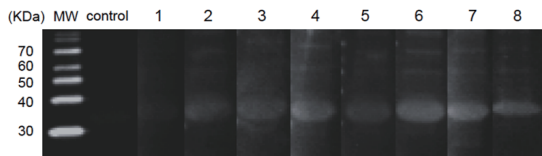
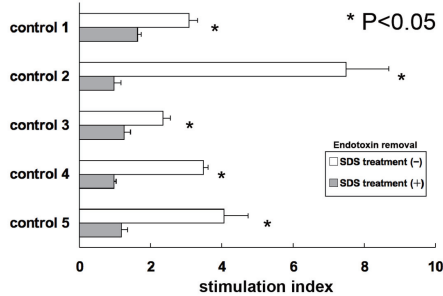
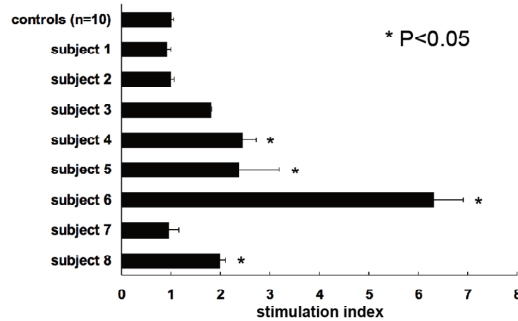


図11 rP34を使用した大豆アレルギー患者血清IgE Westernblot

rP34を使用したヒト血清IgE Westernblot例
8名の大豆アレルギー患者の血清IgEは、精製したrP34と反応を示した。



【エンドキシン除去・非除去の影響】



【エンドキシン除去rP34を使用した大豆アレルギー患者リンパ球幼若化反応】

図12 rP34を使用したリンパ球幼若化反応 (LST)

■ 研究課題名

初乳成分の高度利用技術の開発

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ① プロテオミクス手法による初乳からの生理活性蛋白質・ペプチドの探索
（◎浦島 匡／国立大学法人帯広畜産大学畜産学研究科）
- ② 初乳の分画と成分中の抗微生物、免疫調整物質探索技術の開発
（橋本 修一（H17-19）、岡本 明治（H20-21）／ニュテックス株式会社）
- ③ 免疫調整物質の探索
（五十嵐 慎（H17-19）、川本 恵子（H20-21）／国立大学法人帯広畜産大学原虫病研究センター）
- ④ 初乳由来の抗微生物、免疫活性物質による疾病制御技術の開発
（磯部 尚／（独）農研機構動物衛生研究所）
- ⑤ 化学修飾シアル酸含有オリゴ糖の抗ウイルス作用の解析
（寺林 隆志／学校法人北里研究所北里大学理学部）
- ⑥ ミルクオリゴ糖による抗インフルエンザウイルス剤の開発
（森田 稔／東光薬品工業株式会社東京研究所）

■ 研究の目的

未利用資源である初乳より機能性の期待されるミルクオリゴ糖を産業的なレベルで分画する技術を確立するとともに、ミルクオリゴ糖やその化学的誘導体による各種の病原性細菌、ウイルス、原虫に対する抗感染作用や免疫細胞に対する調整作用をアッセイすることで、同画分の実際への利用を検討する。一方、初乳より新たな機能性成分を探索し、構造解析ならびにその分離技術の開発を行ってその利用を図る。

■ 主要な成果

- ① 初乳からの効率的なシアル酸含有オリゴ糖調製技術の開発
初乳からクロロホルム/メタノール抽出、2回のゲル濾過ならびに順相クロマトグラフィーの組み合わせで4種類のシアル酸含有オリゴ糖（3'-SL、6'-SL、6'-SLN、DSL）を効率的に調製する方法を開発した（図1）。
- ② シアル酸含有オリゴ糖からのシアログリコサイドの効率的調製技術の開発
シアル酸含有オリゴ糖を原料とし、炭酸水素アンモニウムおよびC12~C18脂肪酸の縮合反応を行い、効率的にシアログリコサイドを調製する方法を開発した（図2）。
- ③ シアログリコサイドによる抗ヒトインフルエンザウイルス活性の発見
MDCK細胞に対するヒトインフルエンザウイルス感染後の増殖阻害実験で、シアログリコサイドにアマンタジンと同程度の強さの抗ウイルス活性を発見した（表1）。ヒトインフルエンザウイルスを感作したマウスへの経口投与実験で、シアログリコシドはタミフル投与と同様に100%の生存率を示した（図3）。
- ④ シアログリコサイドを不織布に固定化した抗インフルエンザウイルスマスクの開発
シアログリコサイドを含潤した各不織布に、抗ヒトインフルエンザウイルス活性の維持を確認した（表2）。また、シアログリコサイドを含有した抗ウイルススプレー製剤をマスクに噴霧しても抗ウイルス効果が維持されることを確認した。
- ⑤ 初乳からの新規抗インフルエンザタンパク質の発見
初乳から分画した画分に、MDCK細胞を使用した抗ヒトインフルエンザウイルス増殖阻害実験で、タミフルと同程度の強さの抗インフルエンザウイルス活性を発見した（表3）。

抗インフルエンザ活性を有するタンパク質は、トリプシンインヒビターであることが発見された（図4）。

⑥ 初乳からの新規免疫調整ペプチドの発見

初乳より分画した成分にマスト細胞脱顆粒化抑制作用（図5）、リンパ球増殖促進作用を発見した。それらの活性を有するペプチド成分は構造決定され、マスト細胞脱顆粒化抑制作用を有するのは $\alpha s1$ -カゼイン N 末端由来の3～8アミノ酸残基を有するペプチドであることが発見された。

⑦ 初乳から血圧降下が期待される作用や卵包顆粒細胞抗アポトーシス作用を有するペプチドの発見

上のマスト細胞脱顆粒化抑制作用を有する8アミノ酸残基を有するペプチド成分に、アンジオテンシンI変換酵素阻害作用（図6）と卵包顆粒細胞抗アポトーシス作用を発見した（図7）。

⑧ 初乳を利用した家畜飼料調製技術の開発

初乳から分画したタンパク質画分をブロメライン（タンパク質分解酵素）処理し、それを添加した飼料を用いてマウス生育試験を行なって、1日あたりのマウスの食餌量変化ならびに飼料投与によるマウスの体重変化を調査した。処理飼料を添加したマウスの体重増加の方が大きい傾向を認めた（図8）。酵素処理をすることで、生体に有益なペプチドを添加する付加価値が示唆された。

■ 公表した主な特許と論文

- ① 特開 2007-308444：シアル酸含有糖鎖複合体及びその製造包、並びに、該シアル酸含有糖鎖複合体を含有する抗インフルエンザウィルス剤：学校法人北里学園、東光薬品工業株式会社
- ② 特願 2009-186487：新規ペプチド、トリプシン阻害剤、抗インフルエンザウィルス剤、及び抗体：学校法人北里学園、東光薬品工業株式会社
- ③ Terabayashi, T., *et al.* Inhibition of influenza-virus-induced cytopathy by sialylglycoconjugates. *Carbohydr. Res.*, 341: 2246-2253 (2006).
- ④ Fukuda, K., *et al.* Evidence for the presence of a putative odrant-binding protein in bovine colostrum. *J. Dairy Sci.*, 92: 4992-4996 (2009).

■ 今後の展開方向

- ① 本プロジェクトで発見したシアログリコサイドやトリプシンインヒビターによる抗インフルエンザウィルス活性を基に、それらの抗インフルエンザウィルス剤としての実用化を目指す。
- ② 本プロジェクトで発見した $\alpha s1$ カゼイン由来のペプチド成分による免疫調整作用や血圧降下が期待される作用を基に、常乳を原料として同ペプチドを効率的に調製する方法の開発を行い、機能性食品素材や家畜飼料添加素材としての実用化を目指す。

■ 問い合わせ先

- ① 抗インフルエンザウィルス剤の開発：学校法人北里研究所北里大学理学部
(042-778-8655) (terabaya@sci.kitasato-u.ac.jp)
- ② 免疫調整また血圧降下素材の開発：国立大学法人帯広畜産大学
(0155-49-5566) (urashima@obihiro.ac.jp)

■ 研究成果の具体的図表

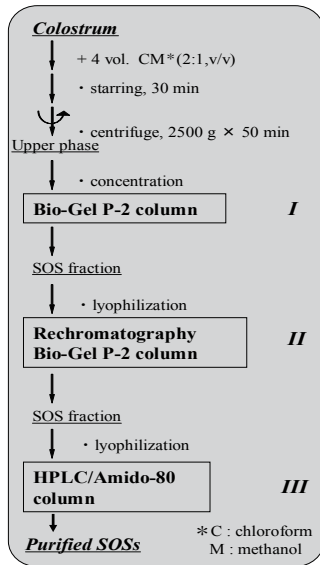


図1. シアル酸含有オリゴ糖の調製

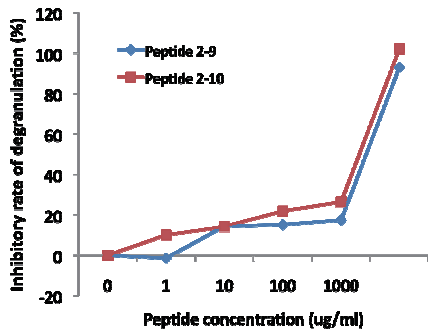


図5. 初乳ペプチドによる抗アレルギー活性

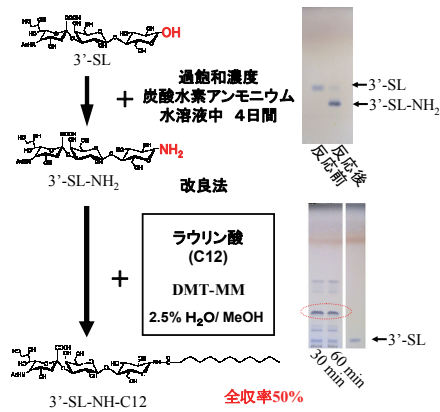


図2. シアログリコサイド合成の改良法

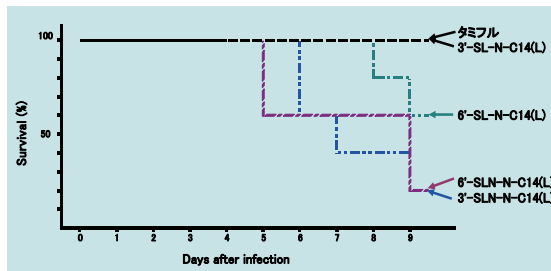


図3. マウスでのシアログリコサイドの抗インフルエンザウイルス効果

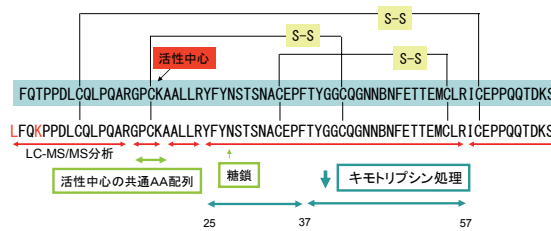


図4. ウシ初乳由来トリプシンインヒビター

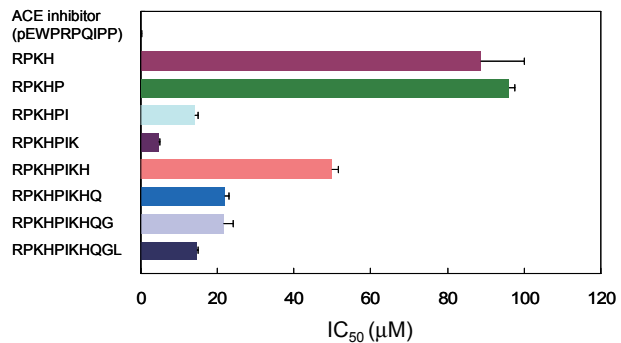


図6. ACE 阻害活性

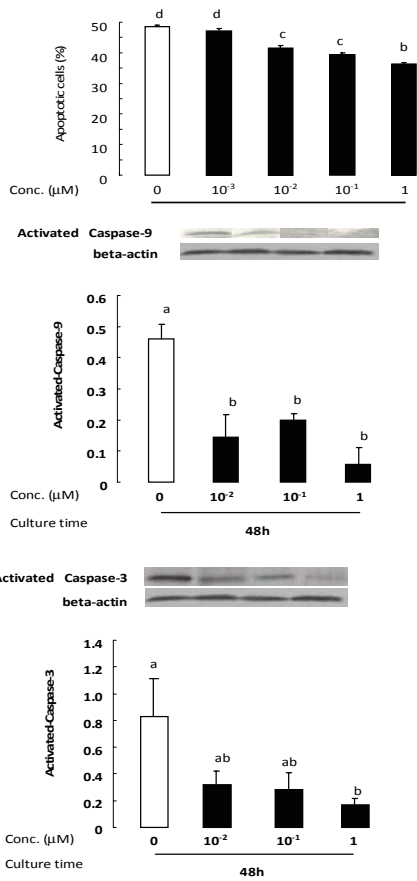


図7. ペプチドの卵胞細胞抗アポトーシス作用

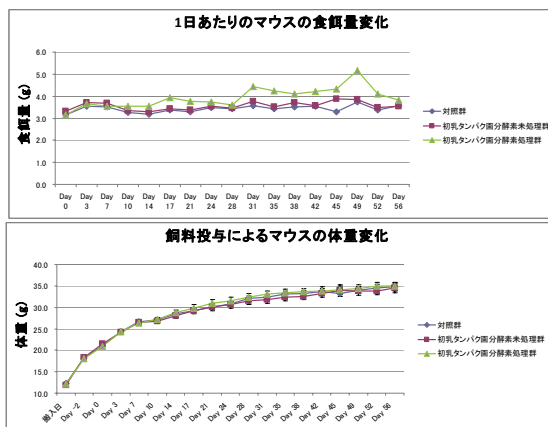


図8. ウン初乳タンパク質画分給餌がマウスの体重に与える影響

(A/PR/8/34)

薬材	IC50 (μg/ml)
3'-SL -N-C12	286.5
3'-SL -N-C14	58.5±21.9
3'-SL -N-C16	22.5± 4.7
3'-SL -N-C18	4.0
3'-SLN-N-C14	114.0
6'-SL -N-C14	99.4±51.6
6'-SLN-N-C14	85.3±11.1
薬剤	IC50 (μg/ml)
オセルタミビル(タミフル)	0.9±0.13
ザナミビル(リレンザ)	0.5
アマンタジン塩酸塩	30.9

素材添加条件: 感染時(-)・感染後(+)
IC50: 対照群の50%まで阻害する濃度 (μg/ml)

表1. シアログリコサイド素材のインフルエンザウイルス阻害作用

不織布	シアログリコサイド	
	6'-SLN-N-C14 (U)	6'-SLN-N-C18 (L)
LPO 252D PPスパンボンド 25g/m ²	45.0	89.0
3201A スパンボンド PPT100% 20g/m ²	81.0	96.0
3301A スパンボンド PPT100% 30g/m ²	95.3	95.8
GC-25 サーマルボンド PP/PE 25g/m ²	78.0	95.4
GC-30 サーマルボンド PP/PE 30g/m ²	83.0	97.3
BT-0605W 30g/m ²	81.0	96.2

* 50 μg/cm²を不織布に含浸
* 1X10⁶PFU/mlウイルス (A/PR/8/34) を作用
表2. シアログリコサイド含浸不織布の抗ウイルス効果

(A/PR/8/34)

薬材	IC50 (μg/ml)
高分子1	0.3±0.03
高分子2	1.3±0.40
低分子1	0.6±0.28
低分子2	1.5±0.86
薬剤	IC50 (μg/ml)
オセルタミビル(タミフル)	0.9±0.13
リレンザ(ザナミビル)	0.5
アマンタジン	30.9

素材添加条件: 感染時(-)・感染後(+)
IC50: 対照群の50%まで阻害する濃度 (μg/ml)

表3. トリプシンインヒビターのインフルエンザウイルス増殖阻害活性

■ 研究課題名

トマト機能性成分を活用した花粉症・生活習慣病対策食品の開発

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ① トマト由来抗肥満・抗生活習慣病成分の解析と応用基盤研究
（◎河田 照雄／国立大学法人京都大学）
- ② -アミノ酪酸生合成制御遺伝子解析と高含有トマト栽培技術開発
（江面 浩／国立大学法人筑波大学）
- ③ 成分分析による既存および作出トマト系統の評価
（柴田 大輔／財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所）
- ④ 機能性成分高含有トマト育成のための DNA マーカーの開発
（津金 胤昭／千葉県農林総合研究センター）
- ⑤ 花粉症・生活習慣病改善効果を有する高機能性トマト品種の開発
（稲井 秀二／日本デルモンテ株式会社）
- ⑥ トマト成分の抗アレルギー・抗高血圧機能評価と製品開発
（小幡 明雄／キッコーマン株式会社）

■ 研究の目的

本研究は、遺伝子組換え法によらず、既存系統や遺伝子解析技術、高分解能質量分析装置を用いた成分分析等を駆使した先端的分子育種法により、花粉症や抗高血圧、抗肥満などの生活習慣病に予防効果のあるナリンゲニンカルコン(NGC)、-アミノ酪酸(GABA)および新規機能性成分を高生産するトマト品種・系統を効率的に作出することを目的とする。さらに、それらを利用した飲食品や苗の実用化技術を完成させることにある。

■ 主要な成果

- ① NGC 高含有トマト：通常より5～10倍NGC含量が高く、かつ加工用トマト品種であるDR5600を選抜し品種登録を行うとともに、DR5600の抗アレルギー作用を確認した（図2、4）。本品を有効に活用できる食品を創生するための加工技術の開発も進めることが出来た。さらに苗販売も可能な品種へも戻し交配を進め、品種開発の可能性を見出した。
- ② GABA 高含有トマト：通常より2倍以上GABA含量が高い品種として、DG03-9を選抜した。高いGABA含量を維持するための栽培条件、トマト収穫後の処理方法についての知見を得ることが出来た（図3）。DG03-9の血圧降下作用について動物実験で有効性を確認するとともに、抗ストレス作用を有することも明らかにした（図5）。
- ③ GABA 高含有トマト苗：GABAの生合成と分解系に関する植物生化学的研究成果の裏付けを元にGABA含量と栽培性にすぐれたDG07-1を育成し品種登録（図2）を行うとともに、家庭菜園用苗として、2010年春に販売する計画を進めている（図7）。
- ④ トマト由来脂肪燃焼促進成分：肝臓での脂肪酸酸化系遺伝子発現の増強や脂肪蓄積減少、酸素消費量の増大（脂肪燃焼）をもたらすトマト新規機能性成分(RF57)を発見した（図1、6）。本成分は、今後肥満やメタボ対策に有効な食品機能性成分になりうる可能性がある。
- ⑤ 分子育種学的解析：機能性成分高含有品種の育成に役立つDNAマーカーを複数個開発し、2種類（アントシアニンとリコペン蓄積形質）について特許出願を行った（図3）。また、TILLING法によりGABA分解に関わる酵素の変異体を単離し、実際に果実GABA含量が増加していることを確認した（図3）。
- ⑥ 高分解能質量分析装置を用いたトマト成分分析：GABA・NGC高含有系統の選抜、トマト全代謝物の解析、選抜したGABA・NGC高含有系統の安全性評価、機能性成分の血中への取り

込みの実証、さらには新規機能性物質の詳細分析による同定など、精密質量分析のこれまでにない有用な利用法を確立した（図1）。

■ 公表した主な特許と論文

- ①特開 2009-027987： γ -アミノ酪酸を高濃度に含有するトマト果実を含む組成物およびその製造方法：キッコーマン(株)、日本デルモンテ(株)、国立大学法人筑波大学
- ②特開 2009-055855：トマト果実におけるアントシアニン蓄積の形質を判別するためのDNA マーカー：千葉県、日本デルモンテ(株)
- ③トマト新品種登録（2品種）：DR5600（NGC 含量の高い品種）（出願番号第 24354 号）：日本デルモンテ(株)、DG07-1（GABA 含量の高い品種）（出願番号第 24479 号）：日本デルモンテ(株)、国立大学法人筑波大学
- ④Iijima, Y., *et al.*, Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information. *Plant J.*, 54, 946-962 (2008)
- ⑤Yoshimura, M., *et al.*, Antihypertensive effect of a gamma-aminobutyric acid-rich tomato cultivar 'DG03-9' in spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 615-619 (2010)

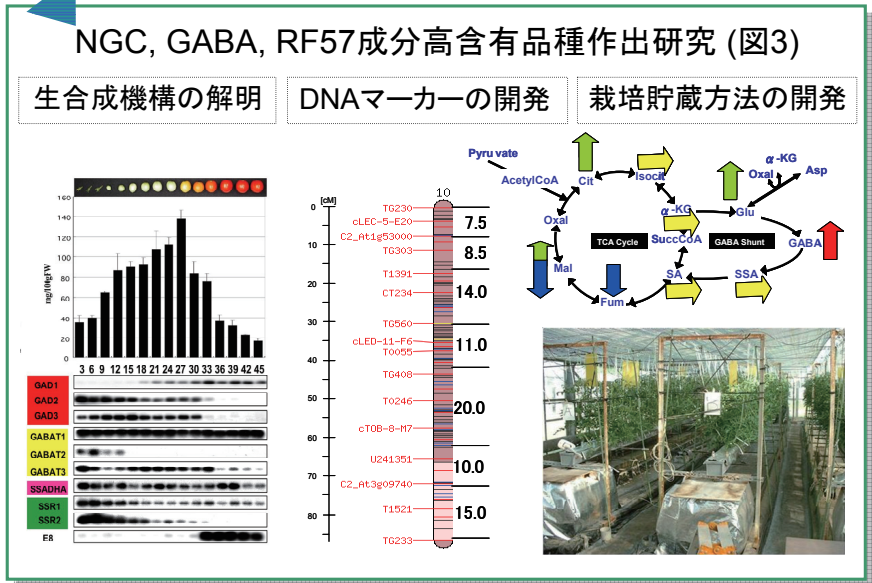
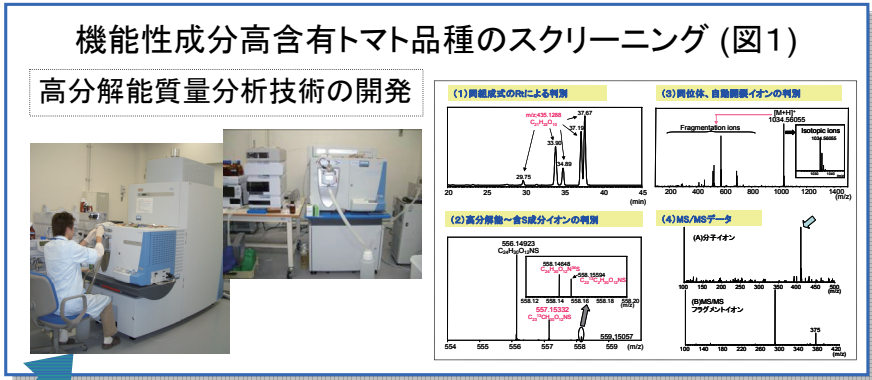
■ 今後の展開方向

- ①NGC 高含有トマト：NGC 含量の高いトマト品種 (DR5600) や加工技術を活用して、新タイプの抗花粉症および抗アレルギー対策食品の事業化に関する検討を継続する。
- ②GABA 高含有トマト：GABA 含量の高いトマト品種 (DG07-1、DG03-9) およびその栽培技術を活用して、家庭菜園用苗の販売（商品名：フルーツゴールドギャバリッチ、2010 年春販売予定）を行う。抗高血圧・リラックス効果食品の製品化・事業化を検討する。
- ③トマト新規機能性成分：脂肪燃焼効果を有するトマト新規機能性成分 (RF57、特許申請準備中) を活用した食品の製品化に関する基礎的検討を行う。
- ④作物 DNA マーカーの開発：機能性成分高含有品種の育成に役立つ DNA マーカーを開発した実績を活かして、農作物の育種に有用な DNA マーカーの開発技術が提供できる。
- ⑤植物代謝変異選抜技術の開発：EMS 誘発系統と TILLING 法を組み合わせた植物代謝酵素変異選抜技術を開発した。これらリソースと技術を組み合わせることにより、視覚的には選抜できない代謝変異体を逆遺伝学的に選抜する実験システムを提供できる。
- ⑥高精度成分受託分析・解析：本研究課題の実施による経験に基づいて、かずさ DNA 研究所では成分分析と解析コンサルティングを含む受託分析サービスを行うバイオ産業技術支援センター（生体物質解析センター部門）の事業化へ展開する。

■ 問い合わせ先

- ① NGC 高含有トマト：キッコーマン(株) (04-7123-5548)
- ② GABA 高含有トマト：
苗（日本デルモンテ(株)、03-5510-3563）http://www.delmonte.co.jp/garden/grow/v_product/
食品（キッコーマン(株)、04-7123-5548）、栽培技術（国立大学法人筑波大学、029-853-7263）
- ③ トマト機能性成分 RF57：国立大学法人京都大学（0774-38-3751）
- ④ 作物 DNA マーカーの開発：千葉県農林総合研究センター（043-291-9996）
- ⑤ 植物代謝変異選抜技術の開発：国立大学法人筑波大学遺伝子実験センター（029-853-7263）
- ⑥ 高精度成分分析・解析受託：財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所
バイオ産業技術支援センター（0438-52-3900）<http://www.biosupport.kazusa.or.jp/>

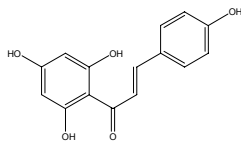
■ 研究成果の具体的図表



機能性成分

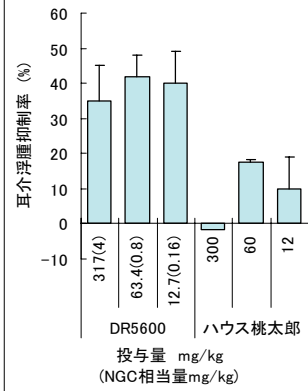
ナリンゲニンカルコン

NGC



機能性評価

抗アレルギー作用 (図4)



製品化イメージ

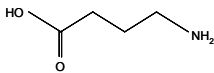
(図7)



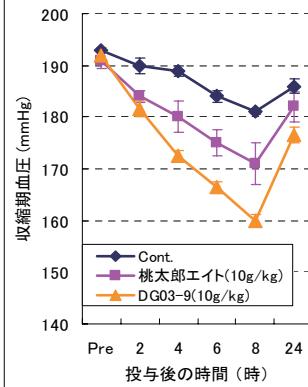
- ・育種
- ・加工技術

γ-アミノ酪酸

GABA



血圧降下作用 (図5)



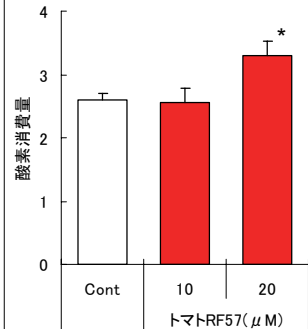
- ・育種
- ・加工技術



RF57

特許出願
準備中

脂肪燃焼作用 (図6)



「トマトRF57」が肝細胞酸素消費 (脂肪燃焼) に与える作用



- ・育種
- ・加工技術



■ 研究課題名

マイクロロボティクスを適用した胚操作の自動化

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ① センシング技術と統合システム化技術の開発
（◎新井 健生／国立大学法人大阪大学）
- ② 切断識別モジュールの開発
（谷川 民生／（独）産業技術総合研究所）
- ③ 搬送流路系と分離モジュールの開発
（新井 史人／国立大学法人東北大学）
- ④ カップリング・注入モジュールの開発
（佐藤 理／川崎重工業株式会社）
- ⑤ 融合モジュールの開発
（麻生 博／富士平工業株式会社）
- ⑥ 胚操作技術の簡易化と発生能評価
（赤木 悟史／（独）農研機構畜産草地研究所）

■ 研究の目的

現在、手作業で行われている複雑かつ困難を伴う種々の細胞・卵子を対象とした顕微操作（胚操作）に対して、マイクロロボティクスとマイクロフルイディクスを適用して自動化を図り、ドナー細胞移植、性判別、顕微注入など各種作業の効率化、高品質化、大量生産化を目指し、畜産および生物学分野の新たな産業を創出することを目的とする。

■ 主要な成果

- ① マイクロロボティクスを適用した胚操作の自動化のため、マイクロ流体チップを用いた新たな胚操作手法を考案した（図 1）。
- ② マイクロ流体チップ内の微小流路を移動する細胞や卵子を検出するとともに細胞の位置姿勢が計測可能なセンシング技術として、チップに搭載可能な光遮断型細胞検出センサとマイクロ撮像センサシステム（図 2）を開発した。
- ③ 容器に漂う個々の細胞を自動で検出してマイクロ流体チップに投入する自動細胞供給モジュールを開発した（図 3）。
- ④ 高精度・高応答性のシリンジポンプを作製し、マイクロ流体チップとポンプコネクション方法の見直しにより高応答性のマイクロ流路内部流体の制御に成功した。
- ⑤ 流体と微小流路によって卵子の切断を行う手法を開発し、プログラムによる自動操作で平均 45 秒での切断を実現する自動卵子切断システムを開発した（図 4）。
- ⑥ フォトリソグラフィ技術を用いて、安価で大量生産性の良い磁気駆動マイクロツール（MMT）を開発した。これを微小流路内に組み込んで攪拌、バルブなどの多機能を世界で初めて達成した。また MMT を着磁処理し、磁場集中の工夫により 180 [Hz] での高速駆動に成功し、上流部に画像センサをつけ、粒子のソーティングを自動化した（図 5）。
- ⑦ 細胞位置検出用撮像センサ、高応答性シリンジポンプ、RF 電源、微小流路を有する PDMS チップで構成されるカップリングモジュールを実現し、誘電泳動と流体制御を併用した高度な細胞ハンドリング技術を開発した。これらを構成する機器群を統合制御する自動化プログラムの開発により、カップリング操作の自動化を実現した（図 6）。
- ⑧ 低コストでの製造が可能なニッケル電極埋め込み型チップを開発した。メッキ電極型チップとニッケル電極埋め込み型チップを用いて、微小流路中に電極を配した PDMS チップ

における整列操作及び融合操作が十分に可能であることを示した。

- ⑨ 投入、切断、分離、溶液置換、カップリング、そして融合といった一連の胚操作プロセスを自動化するワンチップクロニング流路を世界で初めて開発し(図 7、8)、この統合ワンチップを用いたデスクトップバイオプラントシステムを構築した(図 9)。
- ⑩ 機械加工により同一規格で小穴培養プレートを製作した。このプレートで培養した透明帯除去ウシ胚は、透明帯を除去していない対照胚と同等の胚盤胞発生率を示した。

■ 公表した主な特許と論文

- ① 特願 2007-326073 : マイクロチップの微小流路を流過する細胞の切断装置、マイクロ流体チップおよび細胞の切断方法 : 谷川民生、市川明彦、大場光太郎、高橋清也
- ② 特願 2008-309806 : 細胞カップリングモジュール、細胞カップリング装置および細胞カップリング方法 : 中山章弘、佐藤理、新井史人、山西陽子、佐久間臣耶
- ③ 特願 2009-037189 : 粒子検出センサ : 新井健生、奥田一郎、田窪朋仁
- ④ Yamanishi, Y., *et al.*, Biocompatible Polymeric Magnetically Driven Microtool for Particle Sorting. *J. Micro and Nano Mechatronics*, 4(1), 49-57 (2008)
- ⑤ Uvet, H., *et al.*, Miniaturized Vision System for Microfluidic Devices. *Advanced Robotics*, 22(11), 1207-1222 (2008)

■ 今後の展開方向

- ① コンパクトビジョンシステムと細胞供給システムの活用: コンパクトビジョンシステムは狭いスペースに複数のセンサを同時に設置することができるため、リアルタイム観測しながらの数種類の連続した細胞操作をマイクロ流体チップ内で行うことが可能となる。また細胞供給システムは、発生・細胞分化時の特異的な細胞の原因物質を探ることや単細胞の遺伝子発現プロファイリングなどに適用できると考えられる。
- ② 細胞切断技術の活用及び流体制御技術の活用: 細胞切断の技術は、ウシ卵細胞の部分切除によるオスメス判別や、細胞を吸引する際の変形度合いの違いによる細胞や細胞膜固さ計測へ応用できる。高精度流体制御と当研究機関が有するマイクロハンド技術とを合わせ、細胞の姿勢制御や局所固さ計測へ応用できる。
- ③ 磁気駆動マイクロツールの活用: 磁気駆動マイクロツール(MMT)は柔軟性を有し、mN オーダーの駆動力を持つことからオンチップロボットとして細胞操作を行う上で大変効果的なツールであり、幅広い応用が可能である。最近この MMT のハイブリット化が進み、剛性や磁気特性を自在に設計することが可能となり、より複雑な細胞操作が可能になった。幅広いオンチップ細胞操作の事業創出に大きく貢献できる技術である。

■ 問い合わせ先

- ① センシング技術と統合システム化技術の開発 : 国立大学法人大阪大学
(06-6850-6367) (arai@sys.es.osaka-u.ac.jp)
- ② 細胞切断技術の活用及び流体制御技術の活用 : 独立行政法人産業技術総合研究所
(029-861-5952) (tamio.tanikawa@aist.go.jp)
- ③ 磁気駆動マイクロツールの活用 : 国立大学法人東北大学 (TEL:022-795-6966、
FAX:022-795-6967) (arai@imech.mech.tohoku.ac.jp)

■ 研究成果の具体的図表

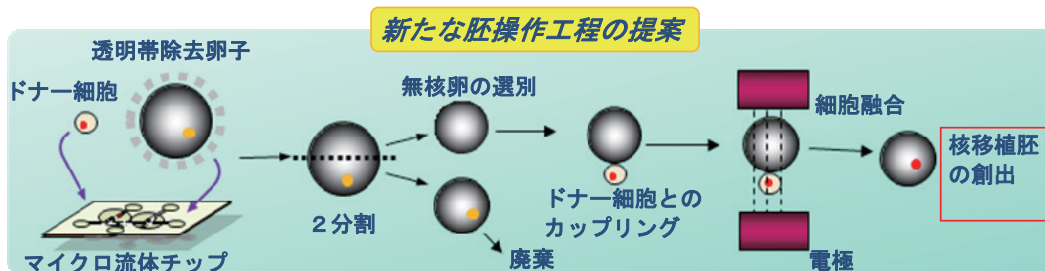


図1 マイクロロボティクスを適用した新たな胚操作手法

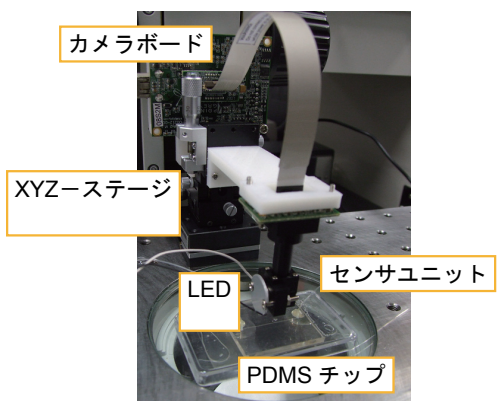


図2 マイクロ撮像センサ

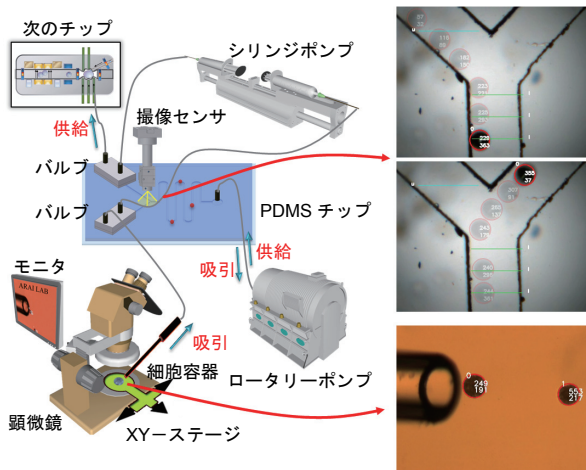


図3 自動細胞供給モジュール

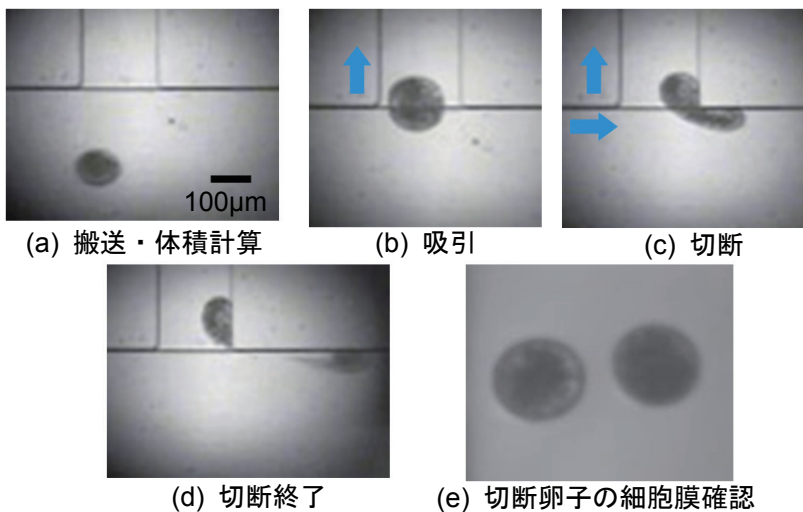


図4 卵子自動切断

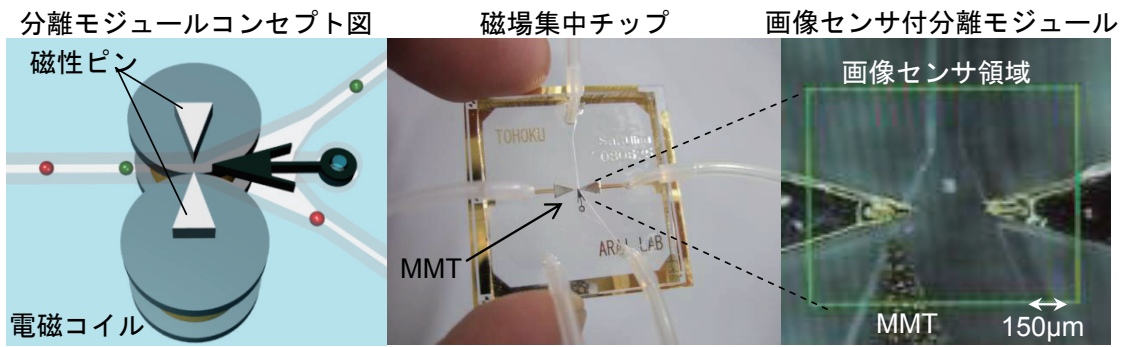


図5 分離モジュール用ソーティングシステム

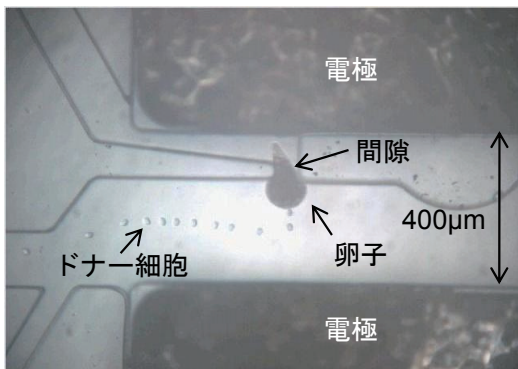


図6 モジュール内での自動カップリング

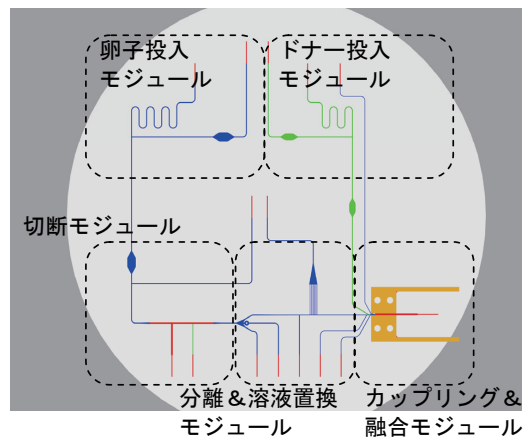


図7 クローニング用流路設計図

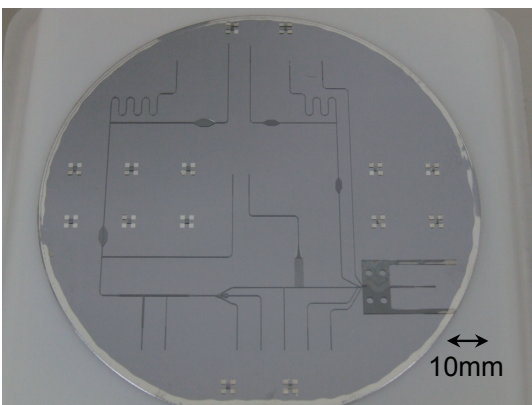


図8 ワンチップ用シリコンモールド

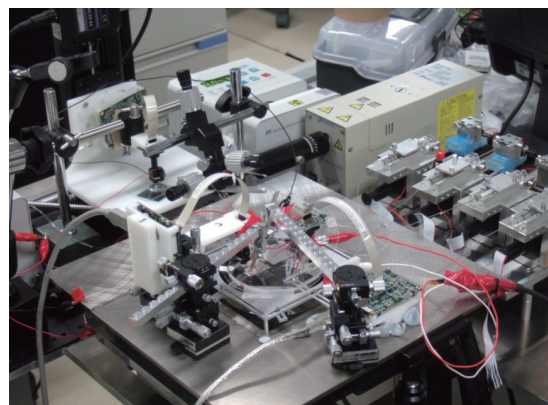


図9 デスクトップバイオプラントシステム