

基礎的研究業務 研究成果集

(2010年度終了課題)



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

表紙写真説明

上 マナマコ神経組織から発見された神経ペプチド「クビフリン[®]」の投与により産卵行動を開始した雌のマナマコ

（新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業（一般型）
課題名：水産無脊椎動物の生殖腺刺激ホルモンの解明と応用
研究代表者（所属機関）：吉国 通庸（九州大学大学院農学研究院）

下 八重咲き形質の付与と不稔化を同時に実現する遺伝子組換え技術により作出された商品性の高い多弁咲きシクラメン

（イノベーション創出基礎的研究推進事業 発展型研究（一般枠）
課題名：CRES-T法を基盤とした花きの高度形質制御技術の実用化
研究代表者（所属機関）：大坪憲弘（(独) 農研機構 花き研究所）

基礎的研究業務研究成果集

(2010年度終了課題)

目 次

新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業【一般型】

(2006年度～2010年度)

オオムギ重要形質に関する遺伝子の同定と育種への応用 (岡山大学資源植物科学研究所／佐藤 和広)	1
家畜原虫病に対するTh1免疫誘導型糖鎖被覆リボソームワクチンの開発研究 (帯広畜産大学原虫病研究センター／横山 直明)	3
希少糖生理活性の作用機構と生物生産場面での利用 (香川大学農学部・希少糖生産センター／秋光 和也)	5
クロマチン構造と細胞周期制御による高等植物の高効率・高精度遺伝子操作技術の開発 (独) 農業生物資源研究所／土岐 精一)	7
ゲノム情報に基づく麹菌全プロテアーゼの機能解析 (東京農工大学大学院農学研究院／竹内 道雄)	9
高効率物質生産系宿主としてのカイコのポストゲノム育種 (九州大学大学院農学研究院／日下部 宜宏)	11
「植物の「みずみずしさ」の分子機構解明とその応用のための基盤研究」 (岡山大学資源植物科学研究所／且原 真木)	13
水産無脊椎動物の生殖腺刺激ホルモンの解明と応用 (九州大学大学院農学研究院／吉国 通庸)	15
耐熱性発酵微生物の「耐熱性」分子機構の解明と発酵産業への利用 (山口大学農学部／松下 一信)	17
トランスジェニックニワトリ作製のための生殖工学的基礎研究 (名古屋大学大学院工学研究科／飯島 信司)	19
標的特定のLINEを利用した新規トランスジェニックツールの開発 (東京大学大学院新領域創成科学研究科／藤原 晴彦)	21

生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業【異分野融合研究開発型】

(2006年度～2010年度)

- 新しい遺伝子サイレンシング法を用いたスーパーグラスの開発
(独) 農研機構 畜産草地研究所/高溝 正) 23
- 花芽形成促進物質KODAによる果樹の花芽着生制御技術の開発
(独) 理化学研究所/吉田 茂男) 25
- 環境調和を考慮した細菌情報伝達阻害型薬剤の開発
(近畿大学農学部/内海 龍太郎) 27
- 昆布フコキサンチンを利用した食べ易い微粉末食品の開発
(神戸大学大学院農学研究科/金沢 和樹) 29
- 最先端クルマエビ養殖技術の構築—安全・安心・健康なエビを作る
(宮崎大学農学部/酒井 正博) 31
- バキュロウイルスの特性を利用した家畜用ワクチンの開発
(BachTech株式会社/矢野 良治) 33

イノベーション創出基礎的研究推進事業 技術シーズ開発型【若手研究者育成枠】

(2008年度～2010年度)

- イネいもち病菌の非病原性遺伝子産物の機能と分子構造の解明
(北海道大学大学院農学研究院/曾根 輝雄) 35
- 温帯果樹の休眠制御機構の分子基盤解明
(京都大学農学研究科/山根 久代) 37
- 高機能食品成分としてのスフィンゴ脂質に関する基盤構築
(京都大学大学院農学研究科/菅原 達也) 39
- 全アミノ酸同時計測用バイオチップの開発
(広島市立大学社会連携センター/釘宮 章光) 41
- ヘアリーベッチ導入大豆栽培の多収機構解明と栽培技術の確立
(秋田県立大学生物資源科学部/佐藤 孝) 43
- 葉緑体工学を用いた自己糖化型エネルギー作物の開発
(京都府立大学大学院生命環境科学研究科/中平 洋一) 45

イノベーション創出基礎的研究推進事業 発展型研究【一般枠】

(2008年度～2010年度)

- ウシ用胎盤剥離誘導製剤の開発と繁殖機能への影響の解明
(独) 農研機構 畜産草地研究所／鎌田 八郎) 47
- 海性バイオマス(アルギン酸)からのエタノール生産基盤
(京都大学農学研究科／村田 幸作) 49
- 環境負荷低減技術によるキチン系バイオマス資源の高度利用
(独) 国立高等専門学校機構 一関工業高等専門学校／戸谷 一英) 51
- 絹の高機能化による再生医療材料創製システムの構築
(東京農工大学大学院工学研究院／朝倉 哲郎) 53
- CRES-T法を基盤とした花きの高度形質制御技術の実用化
(独) 農研機構 花き研究所／大坪 憲弘) 55
- 抗疲労作用のある新規高アントシアニン茶品種育成と利用食品開発
(独) 農研機構 野菜茶業研究所／山本 万里) 57
- 草原短角牛の造成と産肉機構ならびに肉質特性の解明
(東北大学大学院農学研究科／山口 高弘) 59

イノベーション創出基礎的研究推進事業 発展型研究【ベンチャー育成枠】

(2008年度～2010年度)

- 水産有用甲殻類の難飼育性種苗生産技術の開発
(東京海洋大学／田中 祐志) 61
- 味覚受容体をターゲットとした調味ペプチド評価システムの開発とその商品化
(東北大学大学院農学研究科／駒井 三千夫) 63
- ブタ大腸菌性下痢症予防食べるワクチンの開発研究
(東京大学医科学研究所／幸 義和) 65

■研究課題名

オオムギ重要形質に関与する遺伝子の同定と育種への応用

■研究の目的

オオムギ遺伝子の高速マップベース単離法を開発し、ストレス耐性および醸造上の重要遺伝子の配列を解析するとともに、遺伝子配列の多型を用いて、オオムギの遺伝資源に存在する重要形質の変異を高効率に選抜し、さらに、醸造工程でオオムギのタンパク質を制御することによって、高品質の醸造製品の生産技術を開発する。また、イネとオオムギの相同性の高い領域を解析し、イネゲノム情報を最大限に活用した、オオムギのゲノム育種技術を開発する。

■研究項目・実施体制（◎は研究を総括する者（研究代表者））

- ①大量マップベース単離システムと育種システムの開発
（◎佐藤和広／岡山大学資源植物科学研究所）
- ②ストレス耐性遺伝子の単離と解析
（馬 建鋒／岡山大学資源植物科学研究所）
- ③醸造品質関連遺伝子の単離と解析
（木原 誠／サッポロビール株式会社バイオ研究開発部）



佐藤和広



木原 誠



馬 建鋒

■研究の内容・主要な成果

- ①オオムギの染色体3Hおよび5Hに座乗する600個のBACおよび5倍量の全ゲノムを配列解析するとともに、オオムギ完全長、イネゲノム等を活用したデータベースを作成し公開した。また、オオムギ育種に利用可能なSNPマーカーを大量に開発した。さらに、形質転換技術、組換え置換システムなど育種の基礎技術を開発した。
- ②オオムギのミネラル耐性遺伝子のうちアルミニウム耐性遺伝子を単離し、機能を解明するとともに、遺伝子の発現制御機構を明らかにした。また、アルミニウム耐性の中間母本を開発した。さらに、植物による土壌からの鉄の獲得および植物体内の輸送に関与する3つの遺伝子を単離するとともに機能を解析した。また、ケイ素の吸収と分配に関わる3つの遺伝子を同定し、オオムギにおけるケイ酸の吸収・集積機構を解明した。
- ③ビール醸造品質に関するオオムギのQTLを多数同定し、EST-SNPによる5H染色体の醸造遺伝子集積領域の高密度地図を作成した。また、醸造関連遺伝子を同定し、この遺伝子と強く連鎖する遺伝子マーカーを開発した。麦芽およびビールのTOF/MSを用いた発現解析によって、醸造に関わるオオムギの遺伝子を同定した。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①ゲノムに関するデータベースの公開、また、ゲノムを網羅するDNAマーカー、中間母本、形質転換技術は、今後のオオムギのゲノム育種の実現に貢献する。
- ②酸性、鉄欠乏土壌に適応する品種開発が進展し、ケイ酸吸収能力を強化した品種の作出に寄与する。
- ③醸造品質選抜用DNAマーカーと醸造関連タンパクは、オオムギ育種および醸造工程での品質管理に寄与する。

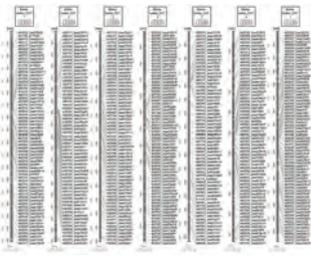
■公表した主な特許・論文

- Sato, K. *et al.*, A high density transcript linkage map of barley derived from a single population. *Heredity* 103: 110-117 (2009)
- Mitani, N., Ma, J. F., *et al.* Identification and characterization of maize and barley Lsi-2-like silicon efflux transporters reveals a distinct silicon uptake system from that in rice. *Plant Cell* 21: 2133-2142 (2009)
- Chiba, Y., Ma, J. F., *et al.* HvLsi1 is a silicon influx transporter in barley. *Plant J.* 57: 810-818 (2009)
- Iimure, T., Kihara, M., Sato, K., *et al.* Construction of a novel beer proteome map and its use in beer quality control. *Food Chemistry* 118: 566-574 (2009)
- 特許番号4555970 アルミニウム耐性に関与する遺伝子、およびその利用. 国立大学法人岡山大学（馬・佐藤）

■研究成果の具体的図表

オオムギ重要形質に関する遺伝子の同定と育種への応用

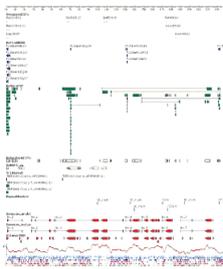
大量マップベース単離システム



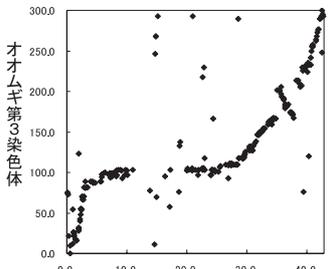
http://map.lab.nig.ac.jp:8085/cmmap/
遺伝地図(3千遺伝子)



http://150.46.168.145/gbrowse_v2/
ゲノム配列の公開

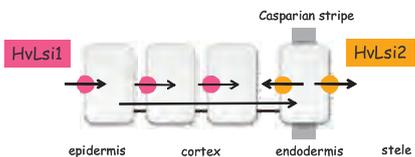


ゲノム配列の遺伝子予測



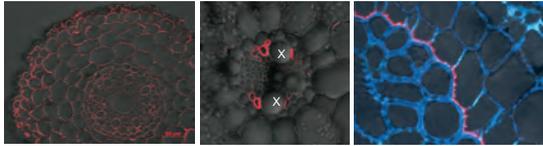
オオムギ第3染色体
イネ第1染色体
オオムギとイネのゲノム配列比較

ストレス耐性遺伝子の単離

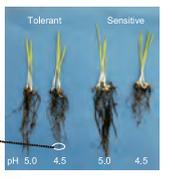


epidermis cortex endodermis stele

オオムギ根のケイ酸輸送体遺伝子HvLsi1とHvLsi2

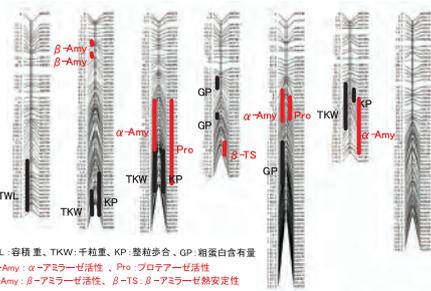


オオムギケイ酸輸送体遺伝子HvLsi6の根(左)、
葉身(中)および節(右)における細胞局在性



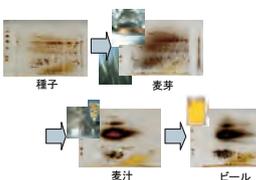
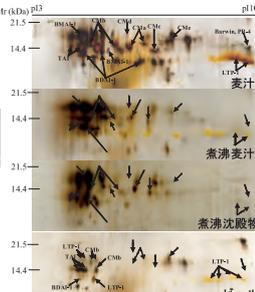

オオムギ根の伸長を害するアルミニウムを無毒化するクエン酸の輸送体遺伝子

醸造品質遺伝子の解析



TWL: 容積重、TKW: 千粒重、KP: 整粒歩合、GP: 糊蛋白含有量
 α -Amy: α -アミラーゼ活性、Pro: プロテアーゼ活性
 β -Amy: β -アミラーゼ活性、 β -TS: β -アミラーゼ熱安定性

醸造関連遺伝子の同定とDNAマーカー開発

醸造に伴うオオムギ種子の全タンパク質の変遷の
解明とその制御による育種、醸造工程管理

育種システムの開発



→単離Al耐性遺伝子



置換系統 置換親 耐性導入親



耐性遺伝子の形質転換



優良醸造品質母本の種苗登録

単離遺伝子を戻し交雑で置換した系統

新しいオオムギ育種技術の導入

■研究課題名

家畜原虫病に対するTh1免疫誘導型糖鎖被覆リポソームワクチンの開発研究

■研究の目的

オリゴマンノース糖鎖被覆リポソーム (OML) にワクチン抗原を封入して動物に接種すると、封入抗原特異的なTh1免疫を誘導できる。そこで、OMLの実用的作製プロトコール及びウシのTh1免疫応答の評価系を確立し、かつ標的動物であるウシを用いた動物試験を実施することで、予防法がないウシの原虫感染症である小型ピロプラズマ症 (タイレリア症) に対する新規ワクチンの開発に挑む。

■研究項目・実施体制 (◎は研究を総括する者 (研究代表者))

- ①家畜原虫病に対する糖鎖被覆リポソームワクチンの構築とその総合評価
(◎横山直明/帯広畜産大学原虫病研究センター)
- ②抗原提示細胞へ効率よく標的抗原を送達できる糖鎖被覆リポソームの構築とTh1免疫応答へ導く分子メカニズムの解明
(小島直也/東海大学・糖鎖科学研究所)
- ③病原性原虫によるTh1免疫回避機構の解明と糖鎖被覆リポソームワクチン評価技術の確立
(池原 譲/ (独) 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター)



横山直明

■研究の内容・主要な成果

- ①小型ピロプラズマワクチンとネオスポーラワクチンの開発に成功した。
- ②実用化に向けたOMLワクチンの大量作製技術と凍結乾燥剤による再水和技術の確立に成功した。
- ③小型ピロプラズマ抗原に対するウシのTh1免疫応答を実測できるELISpot法の確立に成功した。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

本生研プロジェクトの成果により、小型ピロプラズマ症に対する新規のOMLワクチンの開発に世界に先駆けて成功した。我々が積み上げてきた一連の技術は、清浄が困難で被害の大きい原虫病のワクチンの開発のみに留まらず、1) あらゆる家畜感染症に対応できる多価ワクチンの開発展開、2) 現行生ワクチンに変わる安全で安定なワクチンの迅速な提供、及び3) Th1免疫応答の実測による現実的な診断監視体制の構築への展望が可能となり、安全な動物資源の安定供給を確保する迅速な予防戦略の構築が可能となった。

■公表した主な特許・論文

- ①特願2008-237719: ネオスポラ原虫感染症に対するワクチン製剤: 西川義文、横山直明、小島直也
- ②特願2008-249221: ウシタイレリア症の病態評価を可能とする方法: 池原譲、山口高志、山中将敬
- ③特願2010-227268: 免疫原性を有するペプチド: 池原譲、山口高志、山中将敬
- ④特願2010-268957: 免疫原性を有するペプチド: 池原譲、山口高志、山中将敬
- ⑤Nishikawa *et al.*, Immunization of oligomannose-coated liposome-entrapped NcGRA7 protects dams and offspring from *Neospora caninum* infection in mice. *Clin. Vaccine Immunol.*, 16: 792-797, 2009.
- ⑥Yamaguchi *et al.*, Generation of IFN- γ -producing cells 1 that recognize the major piroplasm surface protein in *Theileria orientalis*-infected bovines. *Vet. Parasitol.*, 171: 207-215, 2010.
- ⑦Ishii *et al.*, Targeting with oligomannose-coated liposomes promotes maturation and splenic trafficking of dendritic cells in the peritoneal cavity. *Int Immunopharm.*

■研究成果の具体的な図表

背景: 深刻化するダニ媒介性の小型ピロプラズマ病



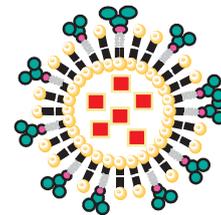
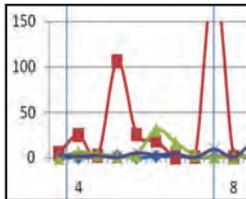
“肥育率の低下による経済被害”

研究目的: オリゴマンノース糖鎖被覆リポソーム媒体を用いた小型ピロプラズマワクチンの開発

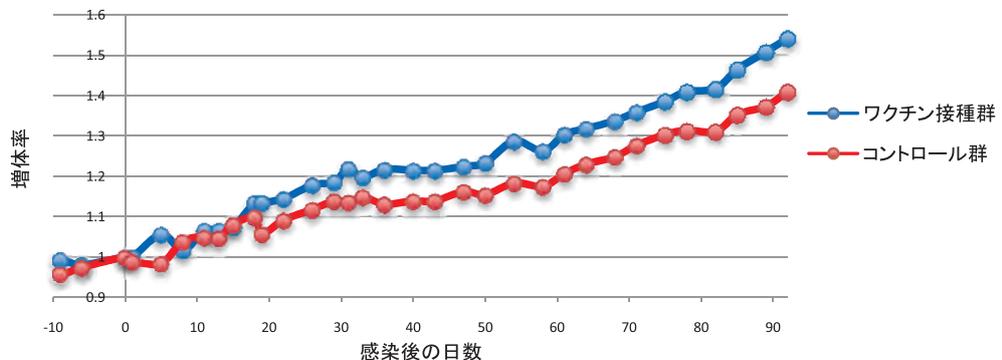
池原班: 免疫解析

横山班: ウシ接種試験

小島班: ワクチン作製



感染後の体重増体率の推移



研究成果: 小型ピロプラズマ症に対する新規ワクチンの開発に成功!



“安全な動物資源の安定供給を確保する新たな予防戦略の構築へ”

- あらゆる家畜感染症に対応できる多価ワクチンの開発展開が加速!
- 現行生ワクチンに変わる安全で安定なワクチンの迅速な提供!
- Th1免疫応答の実測による現実的な診断監視体制が構築!

■研究課題名

希少糖生理活性の作用機構と生物生産場面での利用

■研究の目的

希少糖とは「自然界に微量にしか存在しない単糖とその誘導体」と定義される。香川大学を中心に大量生産に成功した幾つかの希少糖が、イネ等に対して植物防御関連遺伝子の発現を誘導し、また顕著な植物生育調節活性を持つことが明らかになった。本研究は希少糖の生理活性作用のメカニズムを解明し、農業場面における利用の可能性を探ることを目指した。

■研究項目・実施体制

(◎は研究を総括する者(研究代表者))

- ①希少糖のシグナル活性に関する研究
(◎秋光和也、何森 健、田島茂行
／香川大学農学部・希少糖生産センター)
- ②希少糖作用の農業への用途開発を目指した試験研究
(田中啓司／三井化学アグロ株式会社)
- ③希少糖の肥料養液素材としての実用化を目指した試験研究
(石田 豊／株式会社四国総合研究所)



秋光和也



何森 健



田島茂行



田中啓司



石田 豊

■研究の内容・主要な成果

- ①Izumoringの希少糖の総てをPR遺伝子発現誘導活性と生長制御活性でスクリーニングし、さらに植物病害虫に対する生理活性作用のスクリーニングにより、農業場面で利用が期待できる希少糖の選抜ができた。
- ②D-アロースとD-プシコース由来の植物耐病性誘導機構についての詳細解析が進展した。
- ③D-アロースの植物生長制御機構についての詳細解析が進展した。
- ④D-タガトースの植物病害防除場面での希少糖の利用の可能性が提案できた。
- ⑤レタスに対する希少糖の生育促進・品質向上効果、トマトに対する水分ストレス調節作用、イチゴに対する花芽分化促進作用を提案することができた。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

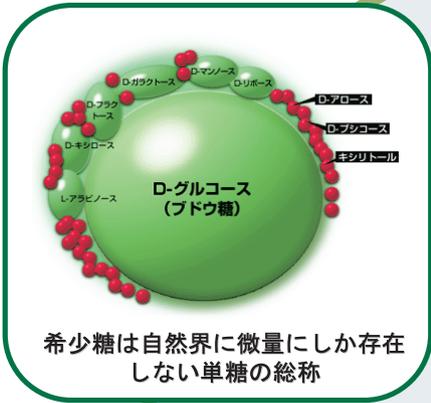
自然界に大量に存在する単糖である「天然型単糖」に対して、微量にしか存在しない単糖を「希少糖」と定義付けている。これら希少糖はバルク生産方法がなかったため、高価であるか、試薬として販売さえされていないものが多く、世界的に見ても、希少糖に関する研究はほとんどなかった。香川大学を中心として組織された研究グループはこの希少糖の生産システムを確立し、生物系特定産業、特に農業場面での応用の可能性を模索した結果、植物病害防除場面への応用が期待できるD-タガトースを選抜できた。また、希少糖の施設栽培・植物工場での利用法を提案できた。天然物由来である希少糖の農業場面での実用化により、希少糖利用産業の創生を促進できる可能性が見出せたとともに、農産物・農作物生産技術のブランド化による地域の活性化等数値化できない部分での貢献も期待でき、希少糖の応用が生物系特定産業技術にもたらす貢献度は極めて高いと考える。

■公表した主な特許・論文

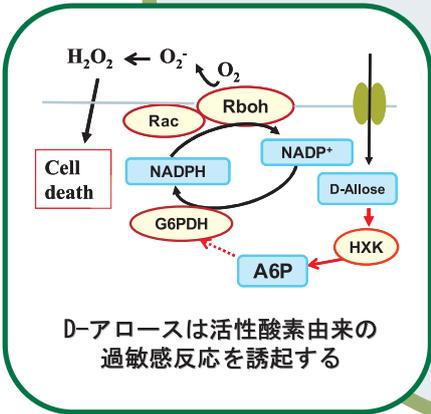
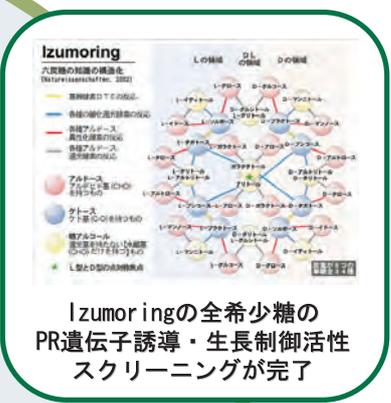
- ①Izumori, K. Izumoring: A strategy for bioproduction of all hexoses. *Journal of Biotechnology* 124: 717-722 (2006)
- ②Gullapalli, P., *et al.* Bioproduction of a novel sugar 1-deoxy-L-fructose by *Enterobacter aerogenes* IK7; isomerization of a 6-deoxyhexose to a 1-deoxyhexose. *Tetrahedron: Asymmetry* 18: 1995-2000 (2007)
- ③Yoshihara, A., *et al.* Isomerization of deoxyhexoses: green bioproduction of 1-deoxy-D-tagatose from L-fucose and of 6-deoxy-D-tagatose from D-fucose using *Enterobacter agglomerans* strain 221e. *Tetrahedron: Asymmetry* 19: 739-745 (2008)
- ④Gullapalli, P., *et al.* Conversion of L-rhamnose into ten of the sixteen 1- and 6-deoxyketoheptoses in water with three reagents: D-tagatose-3-epimerase equilibrates C3 epimers of deoxyketoses. *Tetrahedron Letters* 51: 895-898 (2010)
- ⑤Kano, A., *et al.* A rare sugar, D-allose, confers resistance to rice bacterial blight with upregulation of defense-related genes in *Oryza sativa*. *Phytopathology* 100: 85-90 (2010)
- ⑥(WO/2010/021121) Plant disease Control Agent Comprising D-Tagatose as Active Ingredient, and Plant Disease Control Method; Applicants: Mitsui Chemicals Agro, Inc., Shikoku Research Institute Inc., and National University Corporation Kagawa university (優先権主張 2008-209921 (18.08.2008,JP), Title: D-タガトースを有効成分として含有する植物病害の防除剤および防除方法)

希少糖生理活性の作用機構と生物生産場面での利用

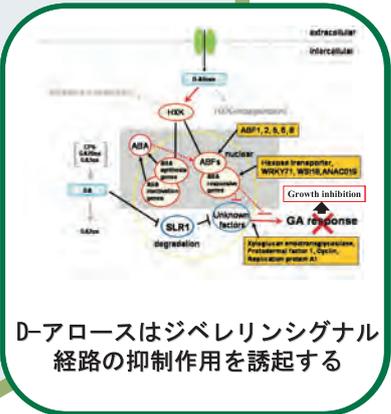
Izumoring による全希少糖の生産供給は世界で香川大学のみが可能な Only One 技術



希少糖の安定供給
↓
Izumoring 希少糖の各種スクリーニングによる生理活性の提示
↓
ターゲット希少糖の作用機構研究と農作物生産場面での利用の可能性



- ・D-アロースとD-プシコースは活性酸素生産を介した過敏反応によりイネ白葉枯病耐性を付与
- ・D-アロースはHXK依存型経路でGAシグナル伝達経路をSLR1の下流で抑制し生長阻害を誘起
- ・D-タガトースの植物病害防除活性の発見と実用化の可能性
- ・レタス、トマト、イチゴ等に対する希少糖の作用は営農的利点を示す



今後の展開波及効果が 見込まれる成果

高い植物病害防除効果を有するD-タガトースの発見

キュウリ・べと病菌接種 無処理



キュウリ・べと病菌接種 D-タガトース処理

実用化の可能性は各種圃場試験で確認
作用機構研究により新規作用性と推定
天然物由来で食品中にも存在: 高い安全性

D-アロース・D-プシコースの施設栽培・植物工場での利用



レタスに対する生育促進・品質向上効果
トマトに対する水分ストレス調節作用
イチゴに対する花芽分化促進作用

■研究課題名

クロマチン構造と細胞周期制御による高等植物の高効率・高精度遺伝子操作技術の開発

■研究の目的

クロマチン構造と細胞周期の制御、人工制限酵素を含めたDNA切断酵素の利用を組み合わせることにより、高等植物の、高効率・高精度の遺伝子ターゲティング（GT）系を構築する。

■研究項目・実施体制（◎は研究を総括する者（研究代表者））

- ①クロマチン構造制御による高等植物の高効率・高精度遺伝子操作技術の開発
（◎土岐精一、刑部敬史、阿部清美、遠藤真咲、雑賀啓明／（独）農業生物資源研究所）
- ②細胞周期制御による相同組換えの効率化
（梅田正明、奥島葉子、原 千景／奈良先端科学技術大学院大学）
- ③ニワトリDT40細胞を利用した標的組換えを上昇させる方法のスクリーニングとその知見の植物での研究へのフィードバック
（武田俊一／京都大学）



土岐精一

■研究の内容・主要な成果

- ①シロイヌナズナとイネの細胞でzinc finger nucleases（ZFNs）を発現させ、ゲノム上の標的遺伝子を特異的に切断することに成功した。またZFNsを誘導的に発現させることで、標的遺伝子特異的に突然変異が導入されたシロイヌナズナを作出することに成功した。
- ②ニワトリDT40細胞を用いたモデル実験系において、メガヌクレアーゼによる標的遺伝子切断とExo1による削り込み処理が、GT効率を飛躍的に上昇させることを発見した。また、イネのモデルGT系においてこの効果を確認し、さらにZFNsとExo1を利用したイネ内在性遺伝子のGTにおいて、この系の汎用性を示した。
- ③相同組換え（HR）タンパク質の活性化と転写促進に関わる細胞周期制御因子の利用により、HRの効率を向上できることを見出した。

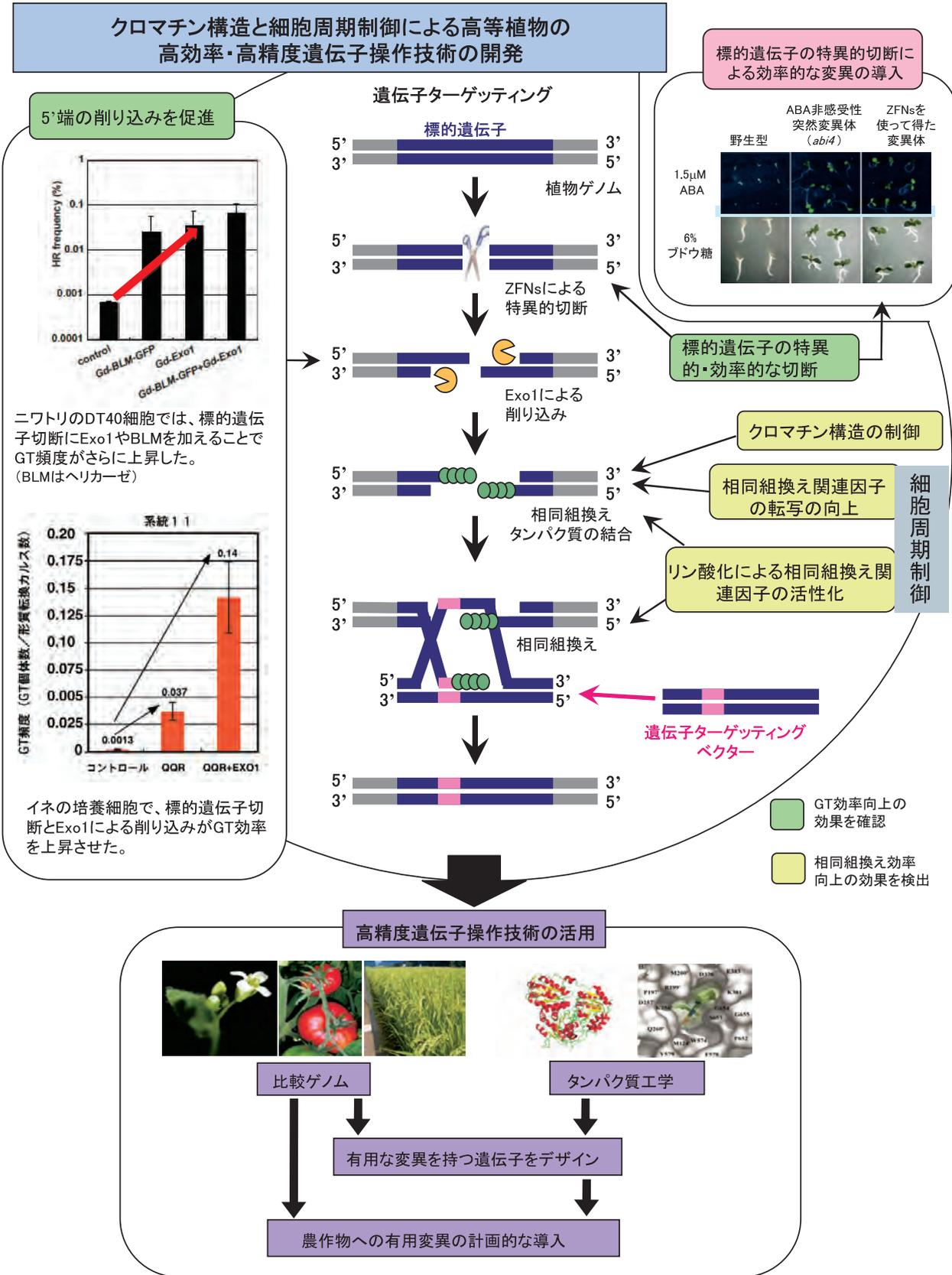
■今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①本研究で開発された標的遺伝子改変技術を活用すれば、今後農作物に有用な変異を計画的かつ効率的に導入することが可能になると考えられる。
- ②今後細胞周期制御の知見を導入することにより、GTの効率をさらに向上できると考えられる。
- ③本研究で開発された技術は、将来的には家畜のGTやヒトの遺伝子治療にも適用できる可能性がある。

■公表した主な特許・論文

- ①Osakabe K. *et al.* Site-directed mutagenesis in Arabidopsis using custom-designed zinc finger nucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 12034-12039 (2010)
- ②Kikuchi K *et al.* Bloom DNA helicase facilitates homologous recombination between diverged homologous sequences. *J. Biol. Chem.* 284: 26360-26367 (2009).
- ③Takatsuka, H. *et al.* The Arabidopsis cyclin-dependent kinase-activating kinase CDKF1 is a major regulator of cell proliferation and cell expansion but is dispensable for CDKA activation. *Plant J.* 59: 475-487 (2009)
- ④Endo M, *et al.* Molecular breeding of a novel herbicide-tolerant rice by gene targeting. *Plant J.* 52: 157-166 (2007).
- ⑤Kono, A. *et al.* The Arabidopsis D-type cyclin CYCD4 controls cell division in the stomatal lineage of the hypocotyl epidermis. *Plant Cell* 19: 1265-1277 (2007)

■研究成果の具体的図表



■研究課題名

ゲノム情報に基づく麹菌全プロテアーゼの機能解析

■研究の目的

麹菌ゲノム解析が2005年に終了し、麹菌のゲノム中には、134種のプロテアーゼをコードすると推定される遺伝子が存在していた。本研究は、蛋白性食品から機能性ペプチドを効率よく生産するために、麹菌のゲノムにコードされる全てのプロテアーゼの性質を明らかにし、麹菌全プロテアーゼ一式の作用特性、基質特異性を明らかにしプロテアーゼカタログを作成し、選択したプロテアーゼを用いて機能性ペプチド製造試験を行うことを目的とした。

■研究項目・実施体制（◎は研究を総括する者（研究代表者））

- ① 麹菌酸性プロテアーゼ等の解析
（◎竹内道雄／東京農工大学大学院農学研究院）
- ② 麹菌金属プロテアーゼ等の解析
（山形洋平／東京農工大学大学院農学研究院）
- ③ 麹菌アミノペプチダーゼ等の解析
（楠本憲一／（独）農研機構 食品総合研究所）
- ④ 麹菌セリンプロテアーゼ等の解析と新規プロテアーゼ剤の作製試験
（天野 仁／天野エンザイム株式会社マーケティング本部）
- ⑤ プロテアーゼ高発現に関する研究及び有用ペプチド製造試験
（石田博樹／月桂冠株式会社）



竹内道雄

■研究の内容・主要な成果

- ① 麹菌のゲノム中のプロテアーゼをコードすると推定された遺伝子134種について解析し、プロテアーゼ遺伝子ではないと判断された遺伝子を除いた123種について *A. oryzae*、*A. nidulans*、*Pichia pastoris*、または *Escherichia coli* を宿主として発現し、102個遺伝子産物を取得し、プロテアーゼ活性を示した遺伝子産物75種について、基質特異性、酵素化学的性質を明らかにした。これらの結果をまとめてデータベースを構築した。
- ② 基質特異性の明らかとなったプロテアーゼを、セルフクロニングの系で発現し、食品タンパク質に作用させ血圧降下活性等生理活性を有する有用ペプチドを複数得た。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

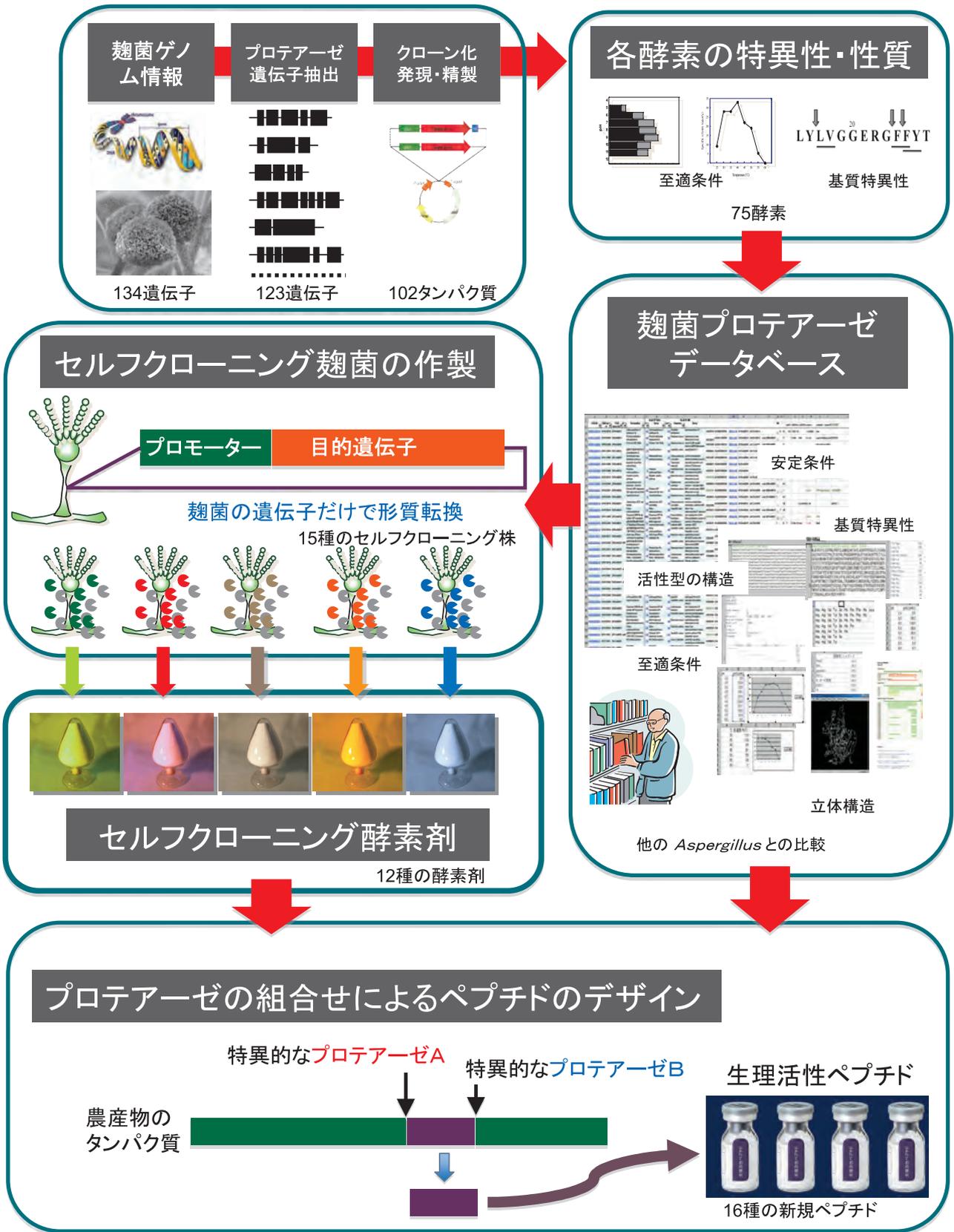
- ① 麹菌のゲノムにコードされるプロテアーゼの性質を網羅的に明らかにし、データベースを構築した。基質特異性が明確となった麹菌プロテアーゼを用いることにより科学的知見に裏付けられた蛋白性食品の製造が可能になった。
- ② 特異性の高い麹菌プロテアーゼを用いて、機能性ペプチドを効率良く生産することが可能になった。

■公表した主な特許・論文

- ① K.-I. Kusumoto, *et al.*: Efficient production and partial characterization of aspartyl aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Applied Microbiology* 105: 1711-1719 (2008)
- ② H. Morita, *et al.*: Heterologous expression and characterization of CpI, OcpA, and novel serine-type carboxypeptidase OcpB from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 335-346 (2009)
- ③ M. Matsushita-Morita, *et al.*: Characterization of recombinant prolyl aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Applied Microbiology* 109: 156-165 (2010)

■研究成果の具体的図表

ゲノム情報に基づく麹菌全プロテアーゼの機能解析



■研究課題名

高効率物質生産系宿主としてのカイコのポストゲノム育種

■研究の目的

組換えバキュロウイルスを利用した高効率組換えタンパク質生産系宿主として有用なカイコ系統をスクリーニングにより選抜する。このカイコ系統を基本シーズに、高生産に寄与する遺伝子の同定とその利用及び、カイコ系統の分子育種を行い、確立した発現系を用いて、これまで発現が困難であったタンパク質の大量生産技術を確立することを目的とする。

■研究項目・実施体制（◎は研究を総括する者（研究代表者））

- ①更なるカイコ系統のスクリーニング
（◎日下部宜宏、伴野 豊／九州大学大学院農学研究院）
- ②高タンパク質生産能の遺伝様式の解析と当該遺伝子の同定
（◎日下部宜宏、門 宏明／九州大学大学院農学研究院）
- ③選抜した系統を基にした更なる系統の改良
（◎日下部宜宏、李 在萬、河口 豊、洪 善美／九州大学大学院農学研究院）
- ④組換えタンパク質の網羅的発現
（◎日下部宜宏、飯山和弘／九州大学大学院農学研究院）



日下部宜宏

■研究の内容・主要な成果

- ①九州大学カイコ遺伝資源のスクリーニングにより、高効率組換えタンパク質生産系宿主として有用なカイコ系統を見出し、これらの系統を基にタンパク質大量生産に好適な品種を育成した。
- ②組換えタンパク質の高発現は、幅広い細胞内の代謝制御によって支持されていることが示された。その中でも、難分泌性タンパク質については、小胞体に侵入直後に高次構造の異常として感知されていることを明らかにした。また、タンパク質の分泌促進には小胞体シャペロンの1つであるBiPの抑制が有効であることを明らかにした。
- ③複数のシャペロン遺伝子を導入した遺伝子組換えカイコ系統を作製し、組換えタンパク質の可溶化発現に有効であることを明らかにした。
- ④上記の項目で確立した発現系を用いて、これまで発現が困難であったタンパク質を高生産できることを示した。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

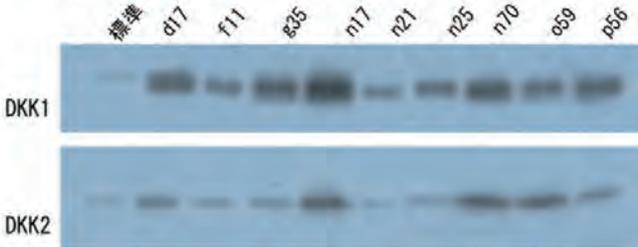
多様な産業分野からの組換えタンパク質の需要は多く、家畜や魚貝類の成育制御剤、病虫害の防除剤、ワクチンや新規薬剤の開発ツールとしての利用が期待される。また、これまで組換えタンパク質が得られなかったために進展しなかった基礎研究、例えば、タンパク質チップによる食品の安全性、新規機能評価法の確立などが推進できる。

■公表した主な特許・論文

- ①Hong SM. *et al.*: Efficient Soluble Protein Production on Transgenic Silkworms Expressing Cytoplasmic Chaperones using Baculovirus Expression System. *Appl. Microbiol. Biotech.* 87:2147-2156 (2010)
- ②Kawakami N. *et al.*: Efficient Protein Expression in Bombyx mori Larvae of the Strain d17 Highly Sensitive to B. mori Nucleopolyhedrovirus. *Mol. Biotechnol.* 40:180-185 (2008)
- ③Lee JM. *et al.*: Screening of high-permissive silkworm strains for efficient recombinant protein production in Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV). *J. Insect Biotech. Seric.* 76:101-106 (2007)

高効率物質生産系宿主としてのカイコのポストゲノム育種

組換えタンパク質高生産システムのスクリーニング



二次元電気泳動解析

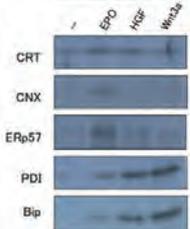


マイクロアレイ解析

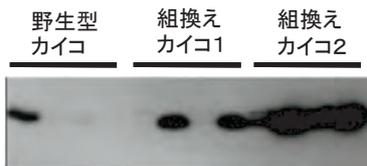


高タンパク質生産を支持する分子機構の解析
高生産の阻害要因の解析

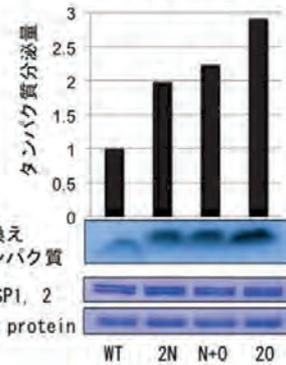
免疫共沈降



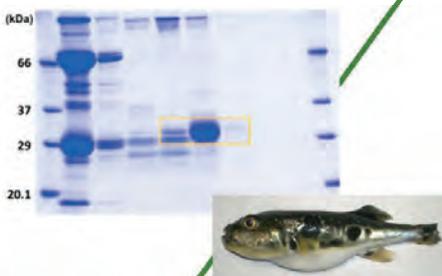
遺伝子組換えカイコによる組換えタンパク質生産の質的量的改良



ベクターシステムの改良



高効率な組換えタンパク質大量生産系の確立



魚の生殖腺刺激ホルモン
(完全養殖)



農薬の標的タンパク質
(新規農薬開発ツール)

タンパク質チップ
(次世代生体分子機能解析)



成長因子、サイトカイン
(動物治療薬・再生医療)

■研究課題名

「植物の「みずみずしさ」の分子機構解明とその応用のための基盤研究」

■研究の目的

植物の水吸収と含水量調節の基盤分子となっている水チャネル・アクアポリンの分子特性、活性と発現の制御機構、新機能を明らかにする。その上でこれら研究成果を植物のストレス適応性の強化、花きや果実の品質向上と鮮度保持向上につなげることを目的とする。

■研究項目・実施体制 (◎は研究を総括する者(研究代表者))

- ① イネ科植物のアクアポリンの多彩な役割と制御機構の解明およびその応用
(◎且原真木、柴坂三根夫、森 泉/岡山大学資源植物科学研究所)
- ② アクアポリン分子種の分子機能解明と園芸作物への応用展開
(前島正義、白武勝裕/名古屋大学大学院生命農学研究科)
- ③ 植物および微生物アクアポリンのゲーティング機構の解明
(北川良親、岩崎郁子/秋田県立大学大学院生物資源科学研究科)
- ④ 植物の吸水と保水の分子メカニズム
(村井麻理、櫻井淳子/(独)農研機構 東北農業研究センター)



且原真木



前島正義



北川良親



村井麻理

■研究の内容・主要な成果

- ① イネ科作物、花き類、トマトなどから新規アクアポリン遺伝子を同定して、その発現と機能のプロファイリングを行うことを通じて「みずみずしさ」の実現のために重要な役割をもつアクアポリン分子種を選抜した。
- ② 水ストレス環境に適応性が高いイネを育成するために、土壤水分が潤沢にある条件では地上部の蒸散要求に応じて根の水透過性を高め、不足した条件では抑制する能力の高い形質が重要であることを明らかにした。
- ③ イネで吸水阻害がおこる低温ストレスにおいて、耐冷性強化のためのターゲットとなるアクアポリン遺伝子OsPIP1;3を同定して、その過剰発現体イネを作成し、耐冷性を向上させることができた。
- ④ アサガオの開花とトマト果実成熟に関与する、水輸送活性の高いPIP2型アクアポリン分子種を決定した。花持ち性および糖度の向上を目指して、これらのアクアポリン発現を抑制する形質転換体を作成した。
- ⑤ アクアポリン新機能の解明を進めて、二酸化炭素透過性をもつアクアポリン、高温に対して発現応答するアクアポリンなどを見つけた。またアクアポリン分子間相互作用による活性化の分子機構を解明した。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

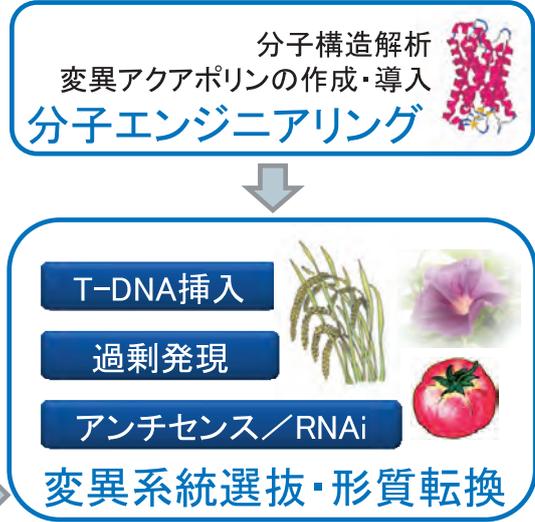
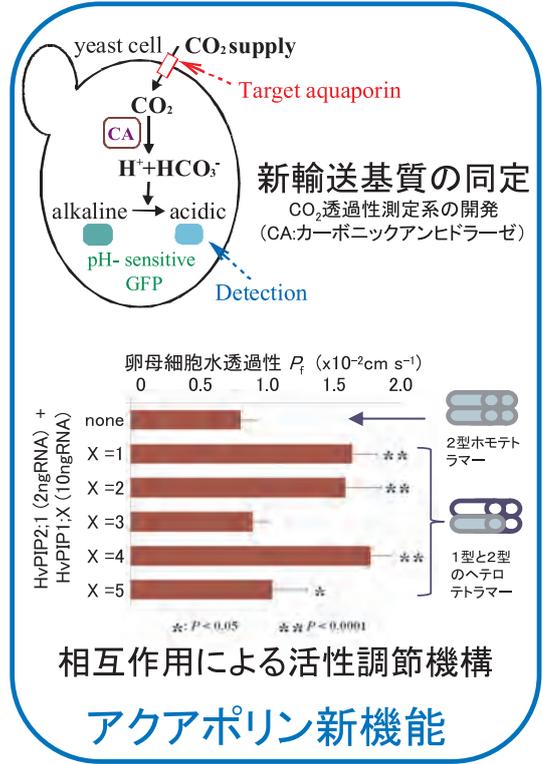
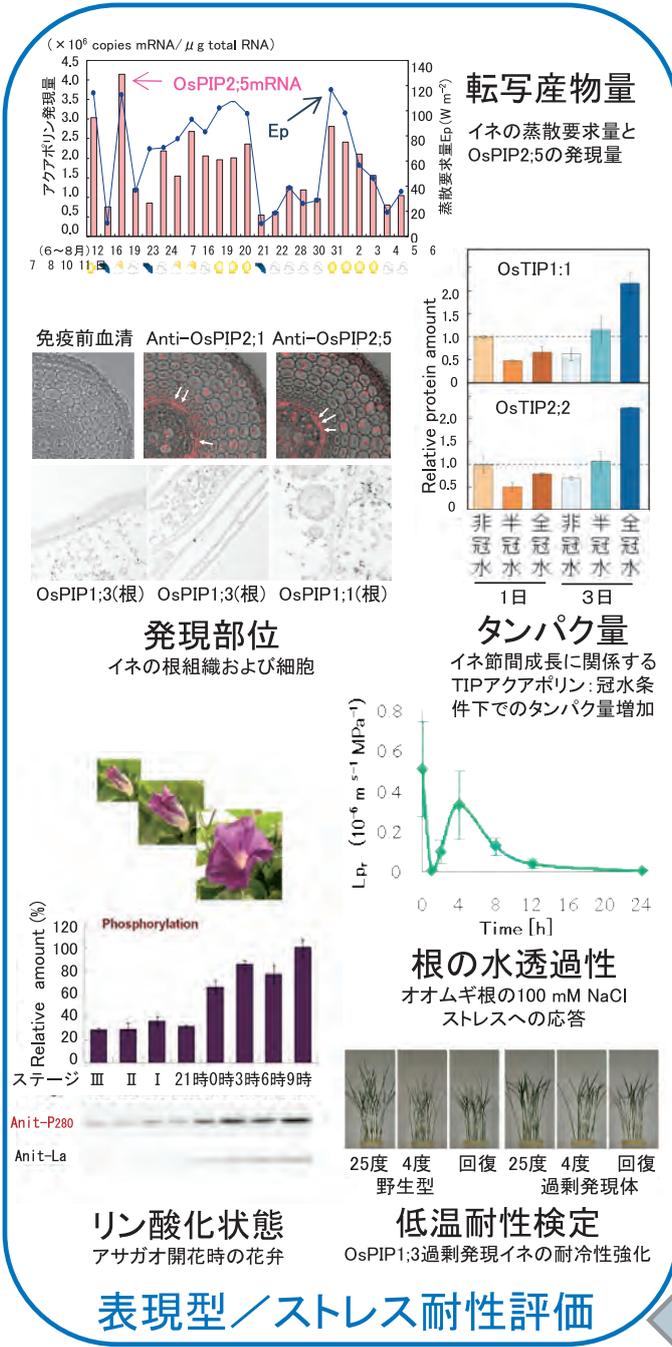
選抜されたアクアポリン遺伝子の発現を適切に制御することで、イネの水ストレス環境適応性を高めることができると期待される。これは栽培技術と生産性の改善に貢献する。また花き類、果実のアクアポリンを抑制的に制御することは開花時間の制御技術や高糖度果実作成技術の開発につながると期待される。

■公表した主な特許・論文

- ① Katsuhara, M., *et al.*: Expanding roles of plant aquaporins in plasma membranes and cell organelles. *Functional Plant Biology* 35: 1-14 (2008)
- ② Sakurai, J., *et al.*: Tissue- and cell-specific localization of rice aquaporins and their water transport activities. *Plant Cell Physiology* 49: 30-39 (2008)
- ③ Matsumoto, T., *et al.*: Role of the aquaporin PIP1 subfamily in the chilling tolerance of rice. *Plant Cell Physiology* 50: 216-229 (2009)
- ④ Kamiya, T., *et al.*: NIP1; 1, an aquaporin homolog, determines the arsenite sensitivity of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 284: 2114-2120 (2009)

■研究成果の具体的図表

アクアポリン機能の解析と利用



- 水ストレス環境耐性強化植物(イネ)
- 花き類、果実の品質向上
- アクアポリン新機能の利用

■研究課題名

水産無脊椎動物の生殖腺刺激ホルモンの解明と応用

■研究の目的

多くの水棲無脊椎動物では内分泌器官の発達は見られず、その制御は神経組織からの神経分泌因子（神経ホルモン）により行われている。水産重要種において、生殖現象に関与するホルモン成分の解明例は極めて少ない。本研究では、マナマコ・アカウニ・マガキ等の水産重要種の神経組織より、配偶子成熟や産卵行動を誘発する生殖関連因子の探索・解明とその応用技術を確認し、さらに、最新手法を用いて未知の神経分泌性ペプチドを短期間に網羅的に解明することを目的とする。

■研究項目・実施体制（◎は研究を総括する者（研究代表者））

- ①無脊椎動物放射神経のEST解析と生殖腺刺激ホルモン遺伝子のクローニング
（大野 薫／自然科学研究機構基礎生物学研究所）
- ②無脊椎動物生殖腺刺激ホルモンのペプチドーム解析と人工ホルモンの合成
（◎吉国通庸／九州大学大学院農学研究院）
- ③水産無脊椎動物の生殖腺刺激ホルモンの生理作用解析
（山野恵祐／（独）水産総合研究センター養殖研究所）



吉国通庸



山野恵祐

■研究の内容・主要成果

- ①マナマコ・アカウニ・マガキの神経組織中に、配偶子成熟や産卵行動を誘発するペプチド性・蛋白質性成分が含まれることを発見した。このうち、マナマコ神経中の「クビフリン」は極めて強い配偶子成熟誘起活性を持ち、放卵・放精行動を誘発する。さらに、アカウニのGnRH様ペプチドは放卵・放精を、マガキの産卵ホルモンは放卵を誘発することなどを見いだした。
- ②マガキ・アカウニ神経に発現するペプチドの網羅的解析により、多くの未知の神経ペプチドが発現していることを見いだした。マガキで、それらから合成した幾つかの神経ペプチドに産卵誘発活性を確認した。
- ③マナマコ「クビフリン」を用いた、親個体の性成熟度の判定法及び放卵・放精の誘発技術を確認し、試験薬としてのクビフリンの頒布を開始した。さらなる種苗生産効率向上を目指して、全国の主要公的試験研究施設・栽培公社等で簡易に活用可能な、*in vitro*での採卵・授精技術を開発した。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

現在、北海道から九州までの18ヶ所の公的・民間種苗生産施設で「クビフリン」が利用され、採卵の確実性と作業量の軽減化に多大な効果が得られている。採卵作業のさらなる効率化を可能とする生体外卵成熟誘起による採卵手法も開発を進めており、種苗生産現場でのより一層の「クビフリン」の利用が進む。

マガキ産卵誘発ペプチドの作用は研究段階であるが、今後、有用な産卵誘発技術に繋がると期待される。このペプチドは二枚貝類で新規に発見されたホルモンで、ホタテ・アサリ等の多くの水産重要二枚貝類における研究を進めて行く上で科学的なインパクトは極めて大きい。

■公表した主な特許・論文

- ①出願特許：マナマコの放卵・放精誘起剤、およびそれを用いたマナマコの生産方法（特開2010-53041：平成22年3月11日）
- ②Kato S., *et al.*: Neuronal peptides induce oocyte maturation and gamete spawning of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Dev. Biol.* 326: 169-176 (2009).
- ③Mita M., *et al.*: A relaxin-like peptide purified from radial nerves induces oocyte maturation and ovulation in the starfish, *Asterina pectinifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 9507-9512 (2009)
- ④Fujiwara A., *et al.*: Molecular characterization of the major yolk protein of the Japanese common sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) and its expression profile during ovarian development. *Comp. Biochem. Physiol. A* 155: 34-40 (2010)
- ⑤Fujiwara A., *et al.*: Spawning induced by cubifrin in the Japanese common sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Fish. Sci.* 76: 795-801 (2010)

水産無脊椎動物の生殖関連因子の解明と応用技術の開発

研究目的

無脊椎動物の神経組織から生殖関連因子を発見する

卵成熟・排卵を指標とした生物検定
マイクロアレイ解析

トランスクリプトーム解析・ペプチドーム解析

マナマコ クビフリンの解明・応用技術の開発
マガキ 産卵誘発ペプチドの発見、GnRH様ペプチドの発見
アカウニ 産卵誘発活性を持つGnRH様ペプチドの発見

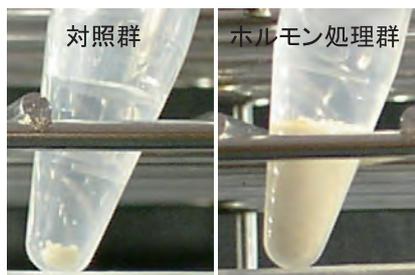
クビフリンを用いたマナマコ産卵誘発技術の確立
種苗生産施設への技術移転開始・特許出願

研究成果

クビフリンにより誘発されたマナマコの生殖行動



種苗生産施設でのクビフリンの運用



マガキ産卵誘発ペプチドによる産卵の誘発

クビフリンを用いた生体外卵成熟誘起法



クビフリン投与前 クビフリン投与後



アカウニGnRH様ペプチドによる排卵・排精の誘発

- ◎クビフリンを用いた産卵誘発技術を確立し、全国の種苗生産施設への技術講習会を実施し、技術の普及を開始した。
- ◎マガキ・アカウニの産卵誘発ペプチドを発見し産卵技術開発への道を拓いた。
- ◎マガキ・アカウニ神経組織の未知の分泌性ペプチド候補を多数発見し、生理学的研究の分子情報基盤の整備を開始した。

■研究課題名

耐熱性発酵微生物の「耐熱性」分子機構の解明と発酵産業への利用

■研究の目的

酵母や酢酸菌などの有用発酵微生物は一般に低温（15-25℃）を好むことから、発酵生産においては厳密な温度制御が求められる。好熱性ではなく、より高温（+10-20℃を想定）に適応した耐熱性菌の分離もしくは適応的変異育種がこの問題を解決できる。本研究では、常温性ならびに耐熱性を有する酵母、酢酸菌、大腸菌のゲノムワイドな解析を通じて、「耐熱性」の分子機構を解明し、その成果を利用した高温発酵系の開発に取り組む。

■研究項目・実施体制（◎は研究代表者）

- ①酵母の耐熱性機構の解析と高温アルコール発酵酵母の育種
（星田尚司／山口大学工学部）
- ②大腸菌の熱ショック応答及び耐熱性機構の解析
（山田 守、高坂智之／山口大学農学部）
- ③耐熱性酢酸菌の耐熱性機構の解明と高温酸化発酵系の開発
（◎松下一信、薬師寿治、足立収生／山口大学農学部、東 慶直／近畿大学、外山博英／琉球大学）
- ④耐熱性酵母及び酢酸菌の常温菌との比較ゲノム解析
（東 慶直／近畿大学、◎松下一信／山口大学農学部）
- ⑤耐熱性酵母の耐熱性機構の解析と高温エタノール発酵系の開発
（山田 守／山口大学農学部、星田尚司／山口大学工学部）



松下一信

■研究の内容・主要な成果

- ①遺伝子破壊株セットを用いたゲノムワイド解析と高温感受性株の取得解析から、大腸菌、酵母*S. cerevisiae*、耐熱性酢酸菌、耐熱性*Zymomonas*菌、耐熱性酵母*K. marxianus*の耐熱性遺伝子群を明らかにした。
- ②高温下で酸化ストレスが増加するが、耐熱性分離株や高温適応変異株ではそれが低下していること、また高温感受性変異株の多くが酸化ストレス感受性を示すことを明らかにした。
- ③酢酸菌の易変異性を利用した*Acetobacter*ならびに*Gluconobacter*の高温適応変異株を作出した。
- ④エタノール生産性の耐熱性*Zymomonas*菌を育種し、高速高温エタノール発酵のための基礎を構築した。
- ⑤耐熱性酵母*K. marxianus* DMKU3-1042株が実用的な高温エタノール発酵に最適な株であることを明らかにし、さらにこの株の種々の遺伝子操作系を開発した。
- ⑥高温適応変異株を用いた高温および非温度制御酸化発酵システムを開発した。グルコースから酢酸への高温・並行複発酵に成功した。

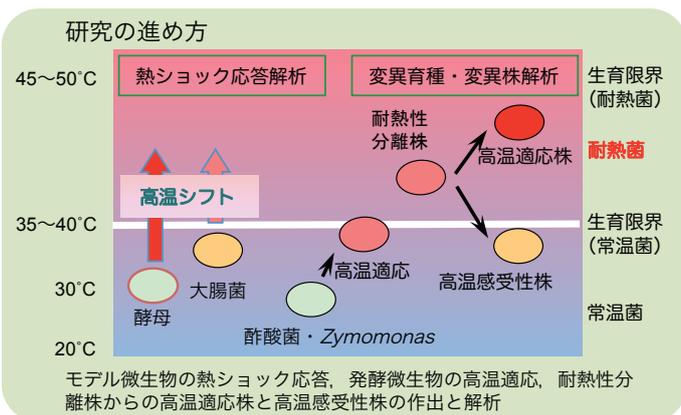
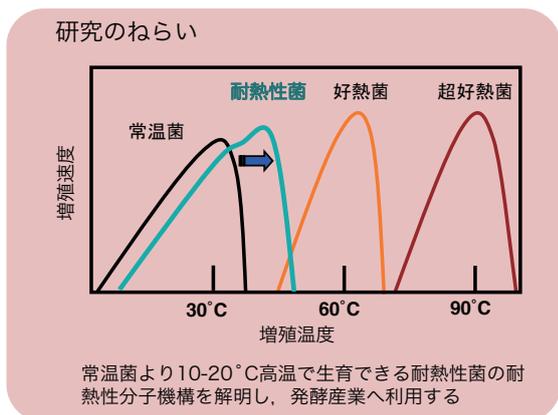
■今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①解析した5種類の微生物に共通して、高温増殖に重要な耐熱性遺伝子の機能が見えてきた。これらの機能を強化することで産業微生物の耐熱化が可能になると予測され、冷却コスト等を削減できる環境にやさしい高温発酵の実現を期待できる。
- ②耐熱性酵母*K. marxianus*は多様な糖質資化性も持っており、農産廃棄物等を原料としたエタノール発酵、特に高温発酵の特性を生かした効率的プロセスの構築が期待できる。
- ③ストレス緩和剤や細胞表層安定化剤等の添加が高温発酵を支えることが期待され、耐熱性遺伝子群の機能からも、他の有効な添加剤が推測できる。
- ④適応的変異育種技術をもとに実用的な高温酢酸発酵システムの開発が可能となり、今後、品質的に良好な菌株の育種による実用化が期待できる。
- ⑤地球温暖化による種の絶滅を抑制する「耐熱化」遺伝子・ゲノム情報を提供できる。

■公表した主な特許・論文

- ①特願2006-313162（外国出願PCT/JP2007/001270）：耐熱性エタノール生産酵母及びこれを用いたエタノール生産方法：国立大学法人山口大学
- ②特願2008-187206（外国出願PCT/JP2009/001214）：酵母の形質転換法：国立大学法人山口大学
- ③K. Sootsuwan, M. Yamada et al. Thermotolerant *Zymomonas mobilis*: Comparison of ethanol fermentation capability with an efficient type strain. *Open Biotech. J.*, 1: 59-65 (2007)
- ④S. Nonklang, H. Hoshida et al. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 7514-7521 (2008)
- ⑤Y. Azuma, K. Matsushita et al. Whole-genome analyses reveal genetic instability of *Acetobacter pasteurianus*. *Nucleic Acids Res.* 37: 5768-5783 (2009)
- ⑥I. Saichana, H. Toyama et al. Screening of thermotolerant *Gluconobacter* strains for production of 5-keto D-gluconic acid and disruption of flavin adenine dinucleotide-containing D-gluconate dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 4240-4247 (2009)

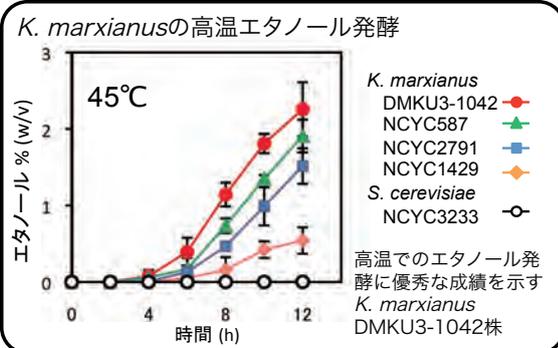
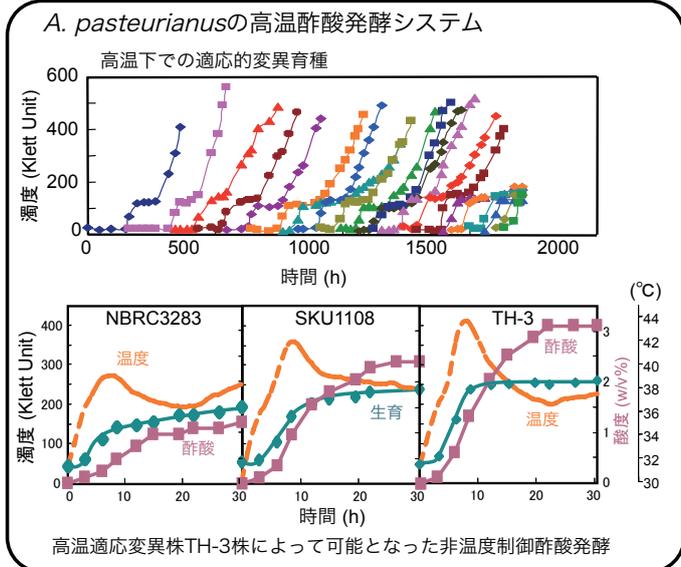
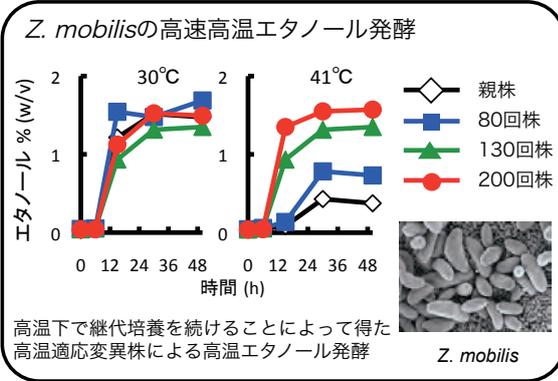
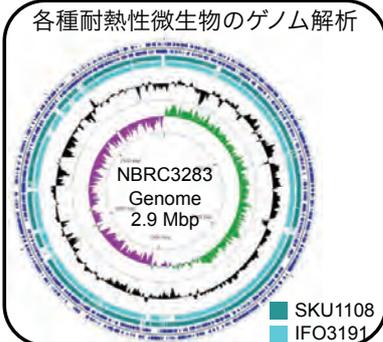
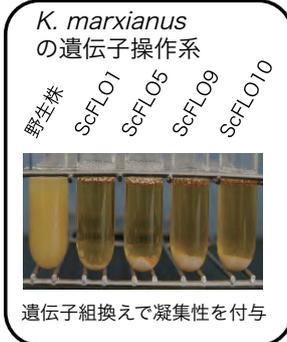
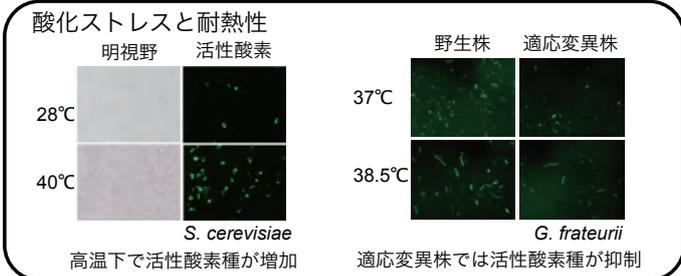
■研究成果の具体的図表



高温感受性株の破壊遺伝子の分類

機能 (同定遺伝子数)	Sc (125)	Km (22)	At (24)	Zm (19)	Ec (51)
変性タンパク質処理等 ストレス応答因子	8	1	8	4	4
染色体構造・DNA修復	11	2	1	4	5
細胞周期・細胞分裂	21	1	2	1	3
RNA	18	1	0	1	8
ATP生成・グルコース代謝	1	1	0	0	8
翻訳	1	0	0	0	4
膜構造	0	0	3	3	16
分泌経路・膜輸送系	27	3	2	1	2
ミトコンドリア	6	1	-	-	-
その他	27	3	3	2	0
機能未知	5	9	5	3	1

Sc, *S. cerevisiae*; Km, *K. marxianus*; At, *A. tropicalis*; Zm, *Z. mobilis*; Ec, *E. coli*



波及効果と展開

- 耐熱性微生物の利用**
 - 高温発酵システムによる冷却コストの削減
 - 遺伝子操作による有用菌株の育種
- 耐熱性遺伝子の利用**
 - 機能強化による高度耐熱性菌株の創成
 - 高温発酵を支える添加剤の推測
 - 地球温暖化による種の絶滅を抑制する遺伝子情報
- 適応的変異育種技術の利用**
 - ニーズに応じた変異育種を適応的に実施

■研究課題名

トランスジェニックニワトリ作製のための生殖工学的基礎研究

■研究の目的

本研究では、安全だが染色体への組込み効率の悪い化学的遺伝子導入法に、レトロウイルスの持つインテグレーション（宿主染色体への遺伝子挿入）機能を付与し、両者の長所を生かしたハイブリッドである「擬似ウイルス」を作製する。さらにこれを用いてトランスジェニックニワトリ作製にまつわる種々の問題を克服し、抗体など複数の遺伝子によりコードされる有用タンパク質を卵白へ生産させる新たな方法の実用化をはかることを最終目標とする。

■研究項目・実施体制（◎は研究を総括する者（研究代表者））

- ①レトロウイルスのDNAインテグレーションメカニズムに関する研究
（◎飯島信司／名古屋大学大学院工学研究科）
- ②レトロウイルスサイレンシングメカニズムの解明
（◎飯島信司／名古屋大学大学院工学研究科）
- ③擬似ウイルスの作製
（三宅克英／名古屋大学大学院工学研究科）
- ④始原生殖細胞や受精卵の試験管内培養とトランスジェニックニワトリの作製
（西島謙一／名古屋大学大学院工学研究科）



飯島信司

■研究の内容・主要な成果

- ①レトロウイルスインテグラーゼを用いて作製した擬似ウイルスは遺伝子導入された培養細胞の20-50%に遺伝子を挿入できた。
- ②レンチウイルスベクターを用いたトランスジェニックニワトリ作製法の基盤を確立した。
- ③擬似ウイルスをニワトリ始原生殖細胞に導入し、実用頻度でトランスジェニック後代を得られる可能性が高まった。
- ④ガラクトース転移酵素導入ニワトリにより目的タンパク質の活性発現に重要な糖鎖構造を改善した。

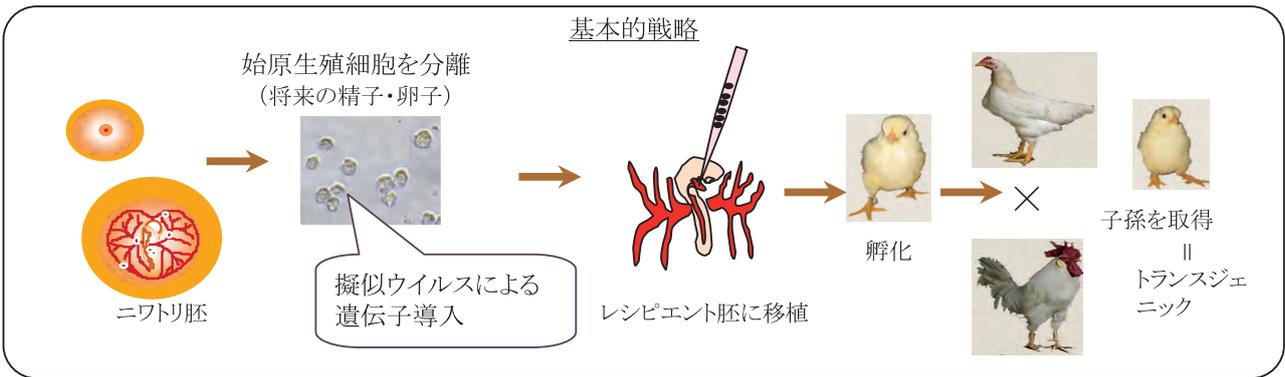
■今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①トランスジェニックニワトリによる医薬品生産技術の革新
- ②インフルエンザ耐性ニワトリの作製及び他の家畜の効率的育種
- ③病態モデル動物として有望なトランスジェニックマウス・ラット作製効率の飛躍的向上

■公表した主な特許・論文

- ①K Miyake, S Iijima *et al.* "Transcription factor YY1 interacts with retroviral integrases and facilitates integration of Moloney murine leukemia virus cDNA into the host chromosomes." *Journal of Virology*, 84, 8250-8261 (2010).
- ②K Miyake, S Iijima *et al.* "Differentiation-specific expression of chromatin remodeling factor BRM." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366, 827-839 (2008).
- ③K Nishijima, S Iijima *et al.* "Production of recombinant tumor necrosis factor receptor /Fc fusion protein by genetically manipulated chickens." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105, 454-459 (2008).
- ④K Nishijima, S Iijima *et al.* "Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109, 315-321 (2010).
- ⑤2008-223490. "トランスジェニック鳥類及びその作製法、並びにタンパク質の生産法." 出願人：国立大学法人名古屋大学

トランスジェニックニワトリ作製のための生殖工学的基礎研究



①擬似ウイルス法の開発

背景: 従来型遺伝子導入法の限界
非生物法: 染色体組込効率が低い
ウイルス法: 潜在的危険性

○ インテグラーゼ + LTR
:レトロウイルスの最小構成要素?

インテグラーゼ
レトロウイルスに特有な
染色体への組込酵素

ΔLTR
レトロウイルスゲノム末端の
インテグラーゼ認識配列

活性化タンパク質

メリット: 組込効率, 安全性, 導入遺伝子の自由度 (長い遺伝子、複数の転写ユニット)

Method	LTR Status	BS resistant cells (%)
-	LTRなし	~5
インテグラーゼ	LTRあり	~25
GST	LTRなし	~5

→ 遺伝子導入された細胞の 20-50%にインテグレーション

②トランスジェニック技術の開発

○ 始原生殖細胞の利用
モデル系
:ウイルスベクターによるGFP発現ニワトリ

擬似ウイルス導入ニワトリ
:導入効率の大幅上昇(期待頻度1.5%)

○ 糖鎖制御技術 = 生産した医薬品の品質向上
卵白タンパク質の弱点克服
糖鎖末端のガラクトース/シアル酸の欠損

ガラクトース転移酵素導入ニワトリによる改善

導入遺伝子発現 (輸卵管)

卵白中の組換え一本鎖抗体/Fc
タンパク質のガラクトース附加に成功

GalT		scFvFc alone		Galactosidase
#A	#B	-	+	
-	+	-	+	Galactosidase

→ 生産医薬品の半減期延長・活性改善に期待

①安全・自在にトランスジェニックニワトリを作成するための基盤技術

- ニワトリ卵への医薬品タンパク質の生産
- インフルエンザ耐性ニワトリなど

②他の家畜やモデル生物への応用

トランスジェニックマウス・ラット作製の効率化

■研究課題名

標的的特異的LINEを利用した新規トランスジェニックツールの開発

■研究の目的

トランスジェネシスは遺伝子の機能を調べるだけではなく、遺伝子改変や遺伝子治療のベースとなる生物科学の最も基本的な技術だが、一部のモデル生物以外では効率的な方法がない。研究代表者は、テロメアに転移するレトロトランスポゾン（LINE）をウイルスに組換えて、細胞の特定の染色体位置に導入する全く新規のトランスジェネシス法を考案した。本研究は、昆虫で見つかった様々な配列特異性を持つLINEを、適切なウィルスベクターに組み換えることにより、昆虫から脊椎動物にいたる広範な動物で、簡便に遺伝子導入する技術の開発を目指す。

■研究項目・実施体制（◎は研究代表者）

- ①広範な昆虫における標的的特異的LINEによるトランスジェネシス法の確立
（◎藤原晴彦／東京大学大学院新領域創成科学研究科）
- ②魚類における標的的特異的LINEによるトランスジェネシス法の確立
（◎藤原晴彦／東京大学大学院新領域創成科学研究科）
- ③ヒト細胞における標的的特異的LINEによるトランスジェネシス法の確立
（◎藤原晴彦／東京大学大学院新領域創成科学研究科）



藤原晴彦

■研究の内容・主要な成果

- ①各種生物から合計9種類の標的的特異的LINEを同定・単離し、8種類のLINEについてSf9細胞（昆虫の培養細胞）などで特定の配列部位に標的的特異的に転移させるシステムを完成させた。
- ②高感度緑色蛍光タンパク質（EGFP）を組み込んだR2Bm（カイコのレトロトランスポゾン的一种）のメッセンジャーRNA（mRNA）をカイコ胚に注入し、28SリボソームDNA（rDNA）の特定配列に特異的に転移させた。
- ③R2OI（メダカのリトロトランスポゾン的一种）がゼブラフィッシュの28S rDNAの特定配列へ特異的に転移したことを検出し、魚類で初めて標的的特異的に遺伝子を導入するシステムができた。
- ④EGFPを組み込んだR2OIを作成してゼブラフィッシュで転移実験を行い、EGFP全長が28S rDNAの特定配列部位に特異的に導入されたのを確認するとともに、導入した世代の稚魚でEGFPを発現する個体を複数得た。
- ⑤ウイルスに組み換えたR2OIを構築し、ヒト細胞の28S rDNAへ標的的特異的に転移させる技術を確立した。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①昆虫を使った新たな有用物質の産生システムとしてその応用が期待できる。
- ②養殖や家畜の品種改良において、安定した発現が期待できる遺伝子導入系として応用できる。
- ③医薬研究のためのトランスジェニックマウスの作成などに応用できる。

■公表した主な特許・論文

- ①Kawashima, T., *et al.*: A novel target-specific gene delivery system combining baculovirus and sequence-specific long interspersed nuclear elements. *Virus Res.* 127: 49-60 (2007).
- ②Richards, S., *et al.*: The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 452: 949-955 (2008).
- ③Futahashi, R. & Fujiwara, H.: Juvenile hormone regulates butterfly larval pattern switches. *Science* 319: 1061 (2008)
- ④Yoshitake, K., *et al.*: Creation of a novel telomere-cutting endonuclease based on the EN domain of telomere-specific non-long terminal repeat retrotransposon, TRAS1. *Mobile DNA* 1: 13 (2010)
- ⑤Mitchell, M., *et al.*: Structural basis for telomerase catalytic subunit TERT binding to RNA template and telomeric DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17: 513-518 (2010)

■研究成果の具体的図表

標的特異的LINEを利用した新規トランスジェニックツールの開発

ランダムな挿入
(DNA型トランスポゾン等)

網羅的な遺伝子破壊株の構築に適する。

標的特異的な挿入

安全で安定した遺伝子導入に適する。

SART, TRAS

R2, R1, R7, R8 Kibi

テロメア リソソームDNA (rDNA) マイクロサテライト テロメア

レトロトランスポゾン的一种(LINE)には標的特異的に転移するものがある。

LINE	生物種	標的
SART1	カイコ	テロメア
TRAS1	カイコ	テロメア
SARTTc1	トリボリウム	テロメア
R1Bm	カイコ	28S rDNA
R2Bm	カイコ	28S rDNA
R2OI	メダカ	28S rDNA
R7	ハマダラカ	18S rDNA
R8	ヒドラ	18S rDNA

■ 本プロジェクトで新たに転移システムを構築したLINE

標的特異的LINEを利用すれば、外来遺伝子を標的特異的に挿入できる
①昆虫、②魚類、③ヒト細胞についてトランスジェニックツールを開発する

昆虫

昆虫細胞における複数の標的特異的LINE転移システムの構築

AcNPV genome

SART1, TRAS1, R1Bm, SARTTc1, R7, R2OI, R2Bm, R8

ORF1, ORF2, 3'UTR

感染

コトウガ細胞、カイコ細胞

バキュロウイルス(AcNPV)に組換えられた複数の標的特異的LINE(R1Bm, R2Bm, R2OI, R7, R8)が、昆虫細胞の標的配列に転移する系を構築した。

R2Bmによるカイコ個体への標的特異的外来遺伝子導入

R2Bm (カイコのLINE) 内部に外来遺伝子としてEGFPカセットを導入し、カイコの28S リソソームDNA (rDNA) に標的特異的に転移させた。

EGFPを保持する次世代カイコを得た。トランスジェニック効率は既存の方法(piggyBac: DNA型トランスポゾン)と比べて高かった。

合成したmRNAを注入

約20%の個体が次世代へEGFPを引き継ぐ

次世代の約10%がEGFPを保持

カイコを使った有用物質産生システムへの応用が期待される

魚類

ゼブラフィッシュ個体における標的特異的LINE転移システムの構築

R2OI

EGFPカセット

28S

5' UTR 3' UTR

mRNAを人工的に合成 mRNAの注入 PCRで転移検出

1個体ずつゲノム抽出

人工的に合成したmRNAをゼブラフィッシュ胚に注入して、R2OI(メダカのLINE)を転移させるシステムを構築した。

R2OIによるゼブラフィッシュ個体への標的特異的外来遺伝子導入

R2OIの内部にEGFPカセットを挿入してゼブラフィッシュ胚で転移させた。一部の個体でEGFPの発現が見られた。

魚類への標的特異的遺伝子導入技術など、養殖分野での応用が期待される

ヒト

ヒト細胞における標的特異的LINE転移システムの構築

バキュロウイルス (VSVG-AcNPV)

感染

293細胞

PCRによる転移検出

(day) 1 2 3 4

細胞毒性が低い
転移検出が早い

アデノウイルス

感染

293細胞

PCRによる転移検出

(day) M 1 2

感染効率が良く
転移効率が良い

プラスミドトランスフェクション

プロモーター

R2OI

トランスフェクション

293細胞

(day) 1 2 3 4 21

プラスミドの構築が容易
薬剤による選択が可能

R2OI(メダカのLINE)の標的特異的転移システムを複数の手法で構築した。ウイルス介在法は転移効率がよく、遺伝子治療などに向いている。

遺伝子治療やiPS細胞構築などの技術への応用が期待される

標的特異的な遺伝子導入技術は、農業・医薬・遺伝子治療・品種改良などの分野で大きなインパクトを与える

■研究課題名

新しい遺伝子サイレンシング法を用いたスーパーグラスの開発

■研究の目的

新しい遺伝子サイレンシング法であるCRES-T法を駆使して植物体中のリグニン含量を低下させた高消化性の牧草ならびに塩類耐性や高温耐性を付与した芝草を開発する。また、CRES-T法によって、不稔性を付与する技術及び植物由来選抜マーカーを開発する。

■研究項目・実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ①新規遺伝子サイレンシング法による高機能性トールフェスクの開発
（◎高溝 正／（独）農研機構 畜産草地研究所）
- ②低リグニン含量及び環境ストレス耐性を付与した日本シバの開発
（趙 徹／株式会社ジェイター）
- ③リグニン合成および環境ストレス耐性を制御する転写因子の検索
（高木 優／（独）産業技術総合研究所）
- ④セルフクローニング法に必要な植物由来の選抜マーカー等の開発
（松井恭子／株式会社グリーンソニア）



高溝 正

■研究の内容・主要な成果

- ①二次細胞壁合成関連遺伝子の働きを抑制するキメラリプレッサー（*OsNST1SRDX*）を導入することにより、リグニンやセルロース等の繊維成分の減少に伴い、消化性が向上したトールフェスクと日本シバの組換え体を作成した（図1）。
- ②花器官形成関連遺伝子の働きを抑制するキメラリプレッサー（*OsAGSRDX*）を導入することにより、トールフェスクと日本シバの不稔個体を作成した（図2）。
- ③シロイヌナズナから単離した高温耐性を付与するキメラリプレッサー（*HR1717SRDX*）を導入することにより、クレーピングベントグラスの高温耐性個体を作成した（図3）。
- ④シロイヌナズナに塩・浸透圧耐性を付与するキメラリプレッサーを単離した（図4）。また、除草剤耐性を付与するキメラリプレッサー（*OsCRI1SRDX*）は、シロイヌナズナ並びにイネ形質転換カルスにおいて植物由来の選抜マーカーとして利用できる可能性が示唆された（図5）。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①高消化性や高温耐性を付与した組換え体と雄性不稔化技術を組み合わせることにより、花粉による遺伝子拡散リスクのない高機能性牧草・芝草の作出が可能になる。
- ②完全不稔日本シバをベースに、組換え体の機能性評価や商品化を受託する新たなフィードビジネスを立ち上げられる。
- ③塩耐性並びに浸透圧耐性キメラリプレッサーは、組換え体の選抜マーカーとしてだけでなく、世界的に増加傾向にある塩害地域での農作物の生産性向上へ寄与できる。
- ④除草剤耐性キメラリプレッサーを導入した日本オリジナルの遺伝子組換え作物の開発が期待される。

■公表した主な特許・論文

- ①特願2008-251043 PCT/JP2009/065385：ストレス耐性が付与された植物体の生産方法およびその利用：産業技術総合研究所、株式会社グリーンソニア
- ②Tomomi Mito. *et al.* Generation of chimeric repressors that confer salt tolerance in Arabidopsis and rice. *Plant Biotechnology Journal* (2011)

■研究成果の具体的図表

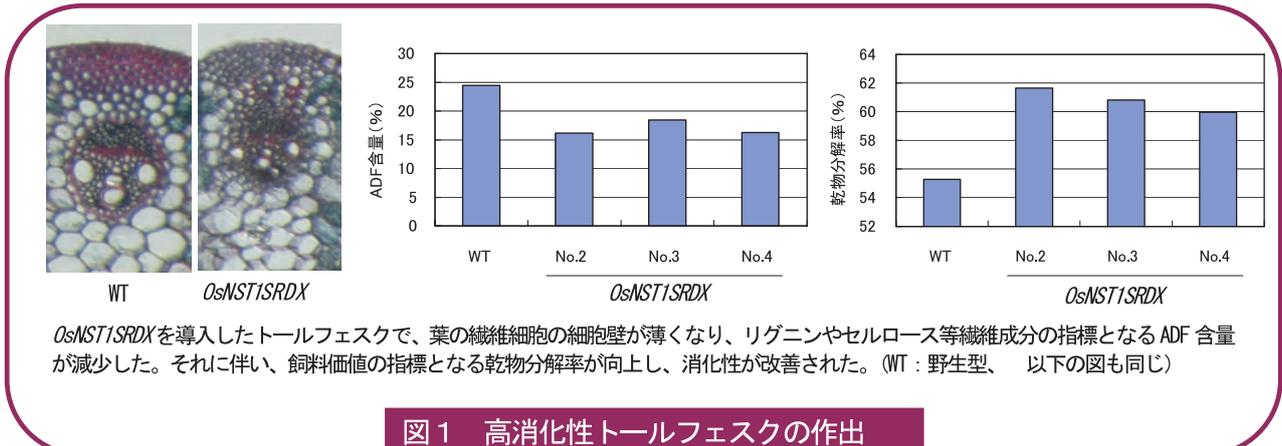


図1 高消化性トルフェスクの作出



図2 完全不稔日本シバの作出



図3 高温耐性クリーピングベントグラスの作出

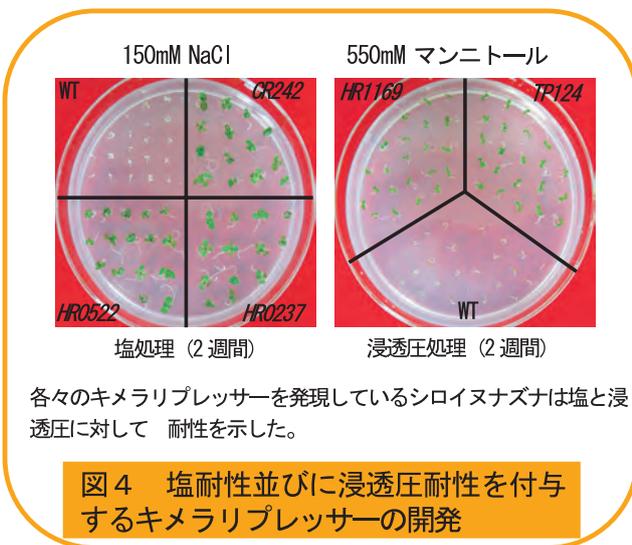


図4 塩耐性並びに浸透圧耐性を付与するキメラリプレッサーの開発



図5 新規選抜マーカーの開発

■研究課題名

花芽形成促進物質KODAによる果樹の花芽着生制御技術の開発

■研究の目的

本研究は、わが国で発見された新規な天然生理活性物質であるKODAを知的財産資源として活用し、果樹園芸領域における国際的な競争力を有する生物系産業基盤の確立を目指す。KODAは、ジャスモン酸 (JA) と同じオキシリピンに属する化合物であるが、KODAの遺伝子発現様式や作用様式はJAと大きく異なっている。そこで本研究ではニホンナシ、ウンシュウミカン、リンゴ栽培におけるKODA効果を詳しく検討する一方、モデル植物を利用してKODAの作用機構を遺伝子・分子レベルで解明する。さらには、安価に大量のKODAを供給するために、酵素法による実用的製造法を開発する。それらの検討に基づきKODAを果樹用植物成長調節剤として確立することを目的とする。

■研究項目・実施体制 (◎は技術コーディネーター)

- ①ウンシュウミカン、ニホンナシにおけるKODA利用技術の開発
(中村ゆり / (独) 農研機構 果樹研究所)
- ②リンゴにおけるKODA利用技術の開発
(近藤 悟 / 千葉大学)
- ③カンキツ類生体内動態に基づくKODA作用機構の解明
(渡辺修治 / 静岡大学)
- ④分子生物学的手法を用いたKODA作用機構の解明
(◎吉田茂男 / (独) 理化学研究所)
- ⑤遺伝子改変によるKODA製造用酵素の創出
(田端和文 / 株式会社ネオ・モルガン研究所、H18-H20)
- ⑥KODA製造用酵素のスクリーニング、及びKODAの実用的製造法の確立
(伊福欧二 / 株式会社資生堂)



吉田茂男

■研究の内容・主要な成果

- ①ウンシュウミカン、ニホンナシ、リンゴでKODAによる花芽着生促進条件を見出した。リンゴでは、KODAは幼若性遺伝子 (TFL) の発現を抑制することにより、結果的に花芽形成を促進することがわかった。
- ②花芽形成以外では、ウンシュウミカンの隔年結果性改善につながる新梢数の増加効果、また、リンゴ果実の硬度維持やニホンナシ休眠芽覚醒にも関与することが判明した。
- ③高活性な、また、安定型のKODA類縁体を見出した。
- ④GC-MS及びLC-MS/MSを用いた内生KODA定量系を確立した。
- ⑤KODAの安定で高効率な生産システムを構築した。

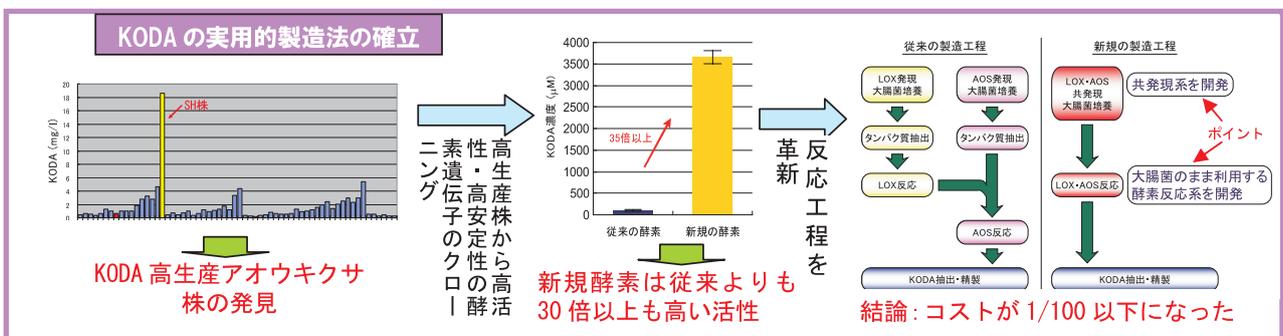
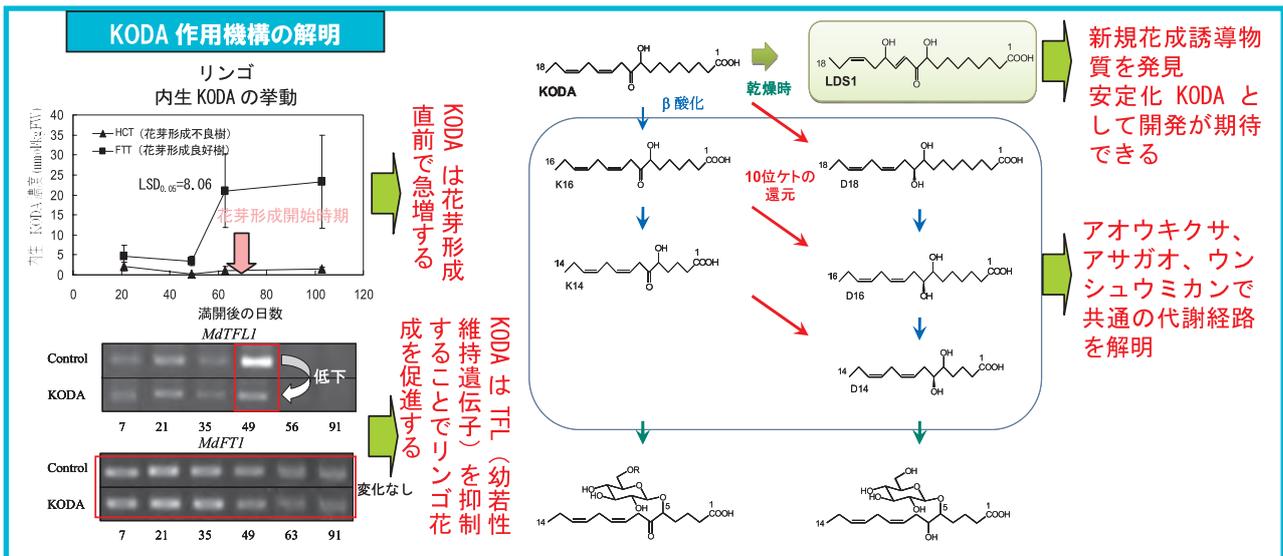
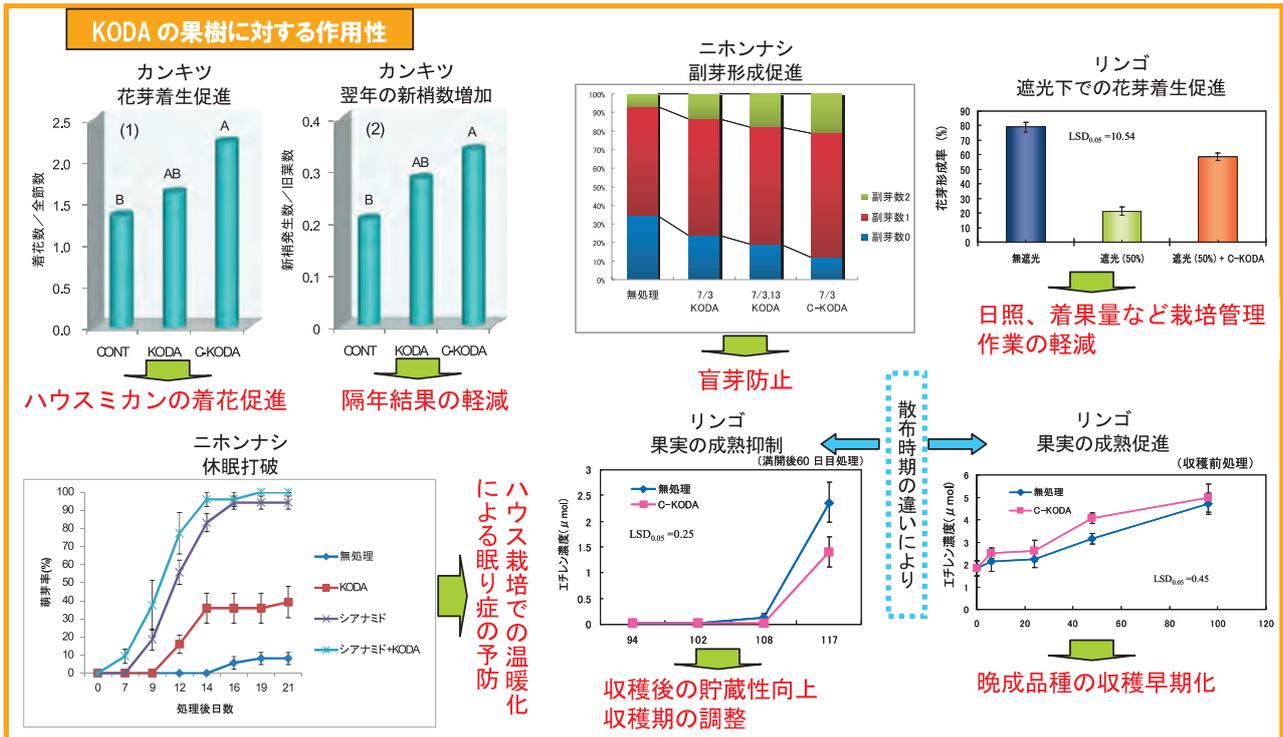
■今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①温暖化により着花確保がより難しくなると危惧されるハウスミカン栽培の着花促進剤として利用可能である。
- ②カンキツ栽培の最大の課題である隔年結果の軽減対策としての利用が期待される。
- ③ニホンナシの盲芽防止剤として利用が可能である。
- ④自発休眠打破剤として、シアナミド剤での萌芽効果が不十分な場合の補完剤としての利用が期待される。
- ⑤リンゴ栽培で剪定および着果数を制限する管理作業を軽減することが期待される。
- ⑥リンゴ成熟を制御することにより、貯蔵性改善、収穫時期の調整が可能になる。

■公表した主な特許・論文

- ①特願2008-213092：落葉果樹の自発休眠覚醒剤及び自発休眠覚醒方法：果樹研究所、(株)資生堂
- ②特願2010-55099：アオウキクサ由来の新規リポキシゲナーゼ：(株)資生堂
- ③特願2010-082354：アオウキクサアレンオキシドシンターゼ遺伝子：(株)資生堂
- ④特願1008WT005：新規オキシリピン化合物及び花芽形成誘導剤：静岡大学
- ⑤Kai, K., *et al.* Metabolism of α -ketol derivative of linolenic acid (KODA), a flowering-related compound, in *Pharbitis nil*. *Tetrahedron* 63, 10630-10636 (2007)
- ⑥Kittikorn, M. *et al.* Effect of fruit load on 9, 10-ketol-octadecadienoic acid (KODA), GA and jasmonic acid concentrations in apple buds. *Scientia Horticulturae* 124: 225-230 (2010)
- ⑦Sakamoto, D., Nakamura, Y., *et al.* Effect of 9-Hydroxy-10-Oxo-12 (Z), 15 (Z)-Octadecadienoic Acid (KODA) on Endodormancy Breaking in Flower Buds of Japanese Pear. *Hortscience* 45: 1470-1474 (2010)

■研究成果の具体的図表



■研究課題名

環境調和を考慮した細菌情報伝達阻害型薬剤の開発

■研究目的

細菌の情報伝達（TCS：two-component system）はセンサーキナーゼ（HK：histidine kinase）とレスポンスレギュレーター（RR：response regulator）によって、構成されている。種々の病原菌の病原性や増殖はHK-RR間のリン酸化やリン酸基転移反応によって、制御されている。本研究の目的は、病原性や増殖を制御するHK、RR阻害剤のリード化合物を探索し、各種病原菌の病原性抑制剤や新規抗生物質を開発することである。

■研究項目 実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ① 選択的情報伝達阻害剤開発法を用いた環境調和型薬剤の開発
（◎内海龍太郎／近畿大学農学部）
- ② 土壌微生物の生産する細菌情報伝達阻害剤の評価と開発
（五十嵐雅之／微生物化学研究会微生物化学研究センター）
- ③ 情報伝達阻害剤の作用機構解析と細菌情報ネットワークの立体構造解析
（岡島俊英／大阪大学産業科学研究所）
- ④ セルコンピケム技術による細菌情報伝達阻害剤の開発
（三沢典彦／石川県立大学生物資源工学研究所）
- ⑤ ショウガ由来細菌情報伝達阻害剤の生産と機能性材料への応用
（田中康雄／大洋香料株式会社）



内海龍太郎

■研究内容・主要な成果

- ① 白菜軟腐病菌（*Erwinia carotovora*）の病原性を制御するPehS（HK）阻害剤（signermycin B）はその病原性因子であるペクチナーゼの生産を抑制して、その病害防除効果を示した。Signermycin Bは白菜軟腐病菌の増殖を阻害しないで、病原性のみを抑制する環境調和型の細菌情報伝達阻害型薬剤である。
- ② イネ苗立枯細菌病菌（*Burkholderia plantarii*）の病原毒素、トロポロン生産抑制剤として、MM326-95F4（特許出願予定）が*B. plantarii*の増殖を阻害しないで、トロポロン生産を抑制し、その病徴抑制効果を示した。
- ③ signermycin B、walkmycin C、MK844-mF10は増殖必須なHK（WalK）阻害剤として、walrycin BはRR（WalR）阻害剤として、MRSA等の多剤耐性菌にも有効な新規抗生物質のリード化合物として開発された。
- ④ う蝕菌（*Streptococcus mutans*）のバイオフィルム阻害剤として、alloaromadendrene（セスキテルペン）が見出された。

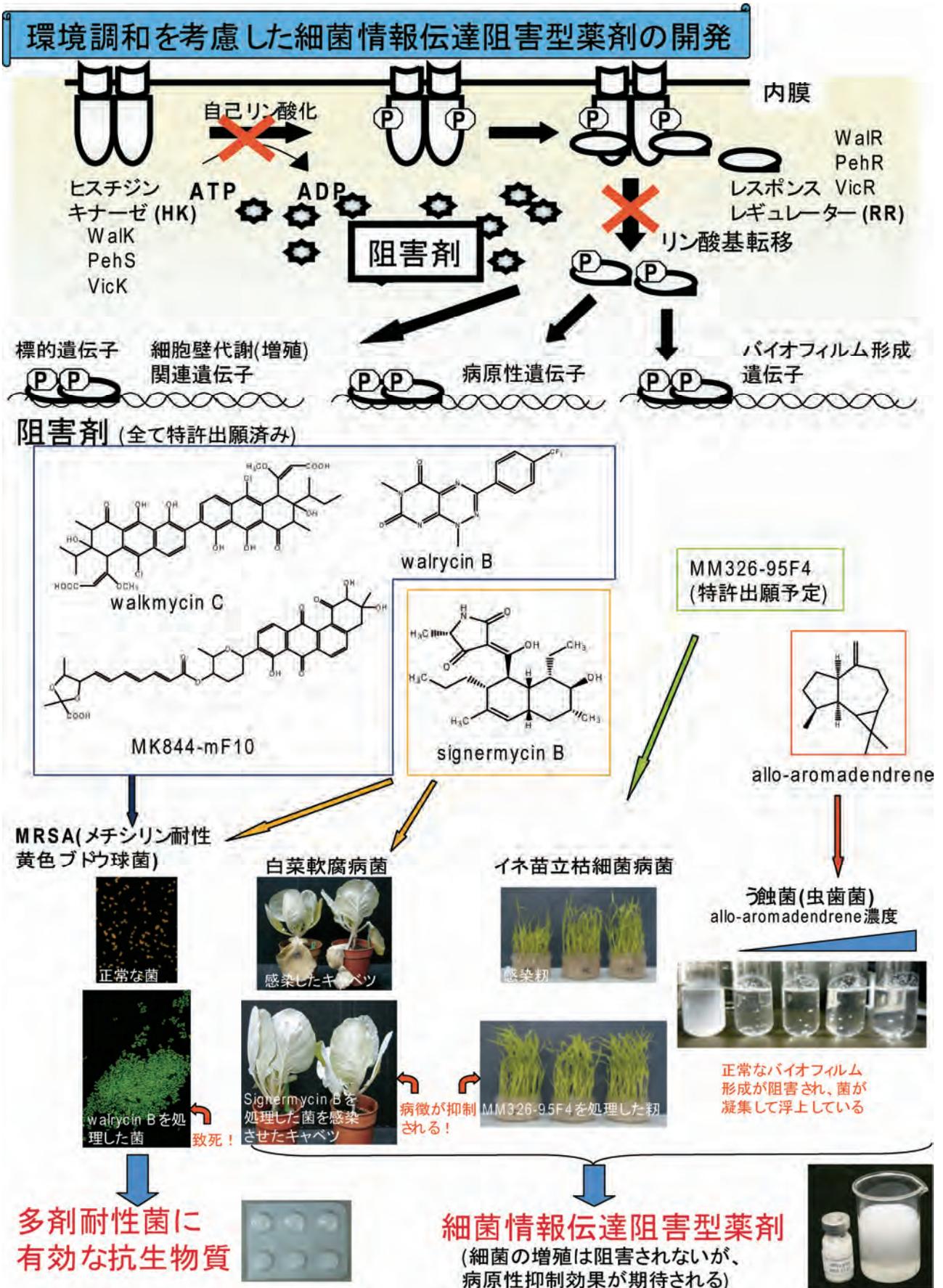
■今後の展開・見込まれる波及効果

Signermycin Bは、HKを有する細菌に対して、様々な効果を及ぼす多機能な抗生物質として活用される。主として、白菜軟腐病の病害防除剤として、優れた防除効果が期待される。一方MRSA等の多剤耐性細菌には、その細胞分裂に必要な働きをするHK（WalK）を阻害し、その増殖を止める新規抗生物質として活用される。すでに、本剤は特許出願（国内外）済みで、本薬剤をリードにして、より有効な医薬・農薬品の開発が可能である。signermycin Bと同様のコンセプトで、開発されたイネ苗立枯細菌病菌の毒素生産抑制剤MM326-95F4は、きわめて効果的に、その病原性のみを抑制することが可能である。また、alloaromadendreneの*S. mutans*に対するスクロース依存性のバイオフィルム形成抑制効果の応用開発も期待される。これらの成果によって、細菌情報伝達機構を標的にした分子標的剤の開発は、従来とは異なる革新的なコンセプトに基づいた抗生物質開発が可能であることを示した。

■公表した主な特許・論文

- ① PCT/JP2008/065196：新規化合物シグナマイシン、その製造方法、及びその用途：（財）微生物化学研究会、近畿大学
- ② 特願2009-230384：レスポンスレギュレーターWalRを標的とする新規抗菌剤：近畿大学
- ③ 特願2010-12418：バイオフィルム形成阻害剤：大洋香料（株）、近畿大学
- ④ T. Okajima, A. Doi, R. Utsumi *et al.*: Response regulator YycF essential for bacterial growth: X-ray crystal structure of the DNA binding domain and its PhoB-like DNA recognition motif. *FEBS Lett.* 582: 3434-3438 (2008)
- ⑤ F. Yu, S. Okamoto, N. Misawa, R. Utsumi *et al.*: Molecular cloning and functional characterization of α -humulene synthase, a possible key enzyme of zerumbone biosynthesis in shampoo ginger. *Planta* 227: 1291-1299 (2008)
- ⑥ Y. Gotoh, Y. Eguchi, R. Utsumi *et al.*: Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 63: 127-134 (2010)

研究成果の具体的図表



■研究課題名

昆布フコキサンチンを利用した食べ易い微粉末食品の開発

■研究の目的

伝統食品として親しまれてきた昆布は生活習慣病予防活性を有するフコキサンチンやフコイタンを含む。ところが、色が暗い、好ましくない成分が多い、調理法に限られるなどの点で消費が敬遠されている。そこで、昆布からフコキサンチンとフコイタンを抽出し、好ましくない成分を除去し、不安定なフコキサンチンをフコイタンで包接して安定な微粉末に再構築する。そして、市場調査で探った食べ易い好まれる新食品に商品化する。

■研究項目・実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ①フコキサンチンとフコイタンの機能性の解明
（◎金沢和樹／神戸大学大学院農学研究科）
- ②有用成分抽出と不要成分除去法の確立及びスーパー昆布微粉末の創出
（岡田忠司／オリザ油化株式会社）
- ③生昆布処理法の確立とスーパー昆布を用いた食べ易い食品の開発
（森 伸樹／株式会社小倉屋山本）
- ④消費者ニーズのマーケット調査と昆布の好まれる食品形態の開発
（中塚正博／株式会社日本食品開発研究所）



金沢和樹

■研究の内容・主要な成果

- ①フコキサンチンの大腸がん予防、腫瘍細胞増殖抑制、美白効果、骨粗鬆症予防、糖尿病性腎症予防、脂質代謝調節作用と、フコイタンの血栓症予防、炎症性腸炎予防効果を明らかにし、人での適正摂取量を策定した。
- ②昆布からフコキサンチンを高効率で抽出し、塩分や砒素を除き、安定性が高い微粉末のスーパー昆布を低コストで開発した。
- ③原料生昆布の安定供給ルートを確認し、スーパー昆布を素材として消費者が好む形態の新食品を開発した。
- ④市場調査で消費者が好む昆布食品の形態を探り、好まれる形態の新食品を提示した。

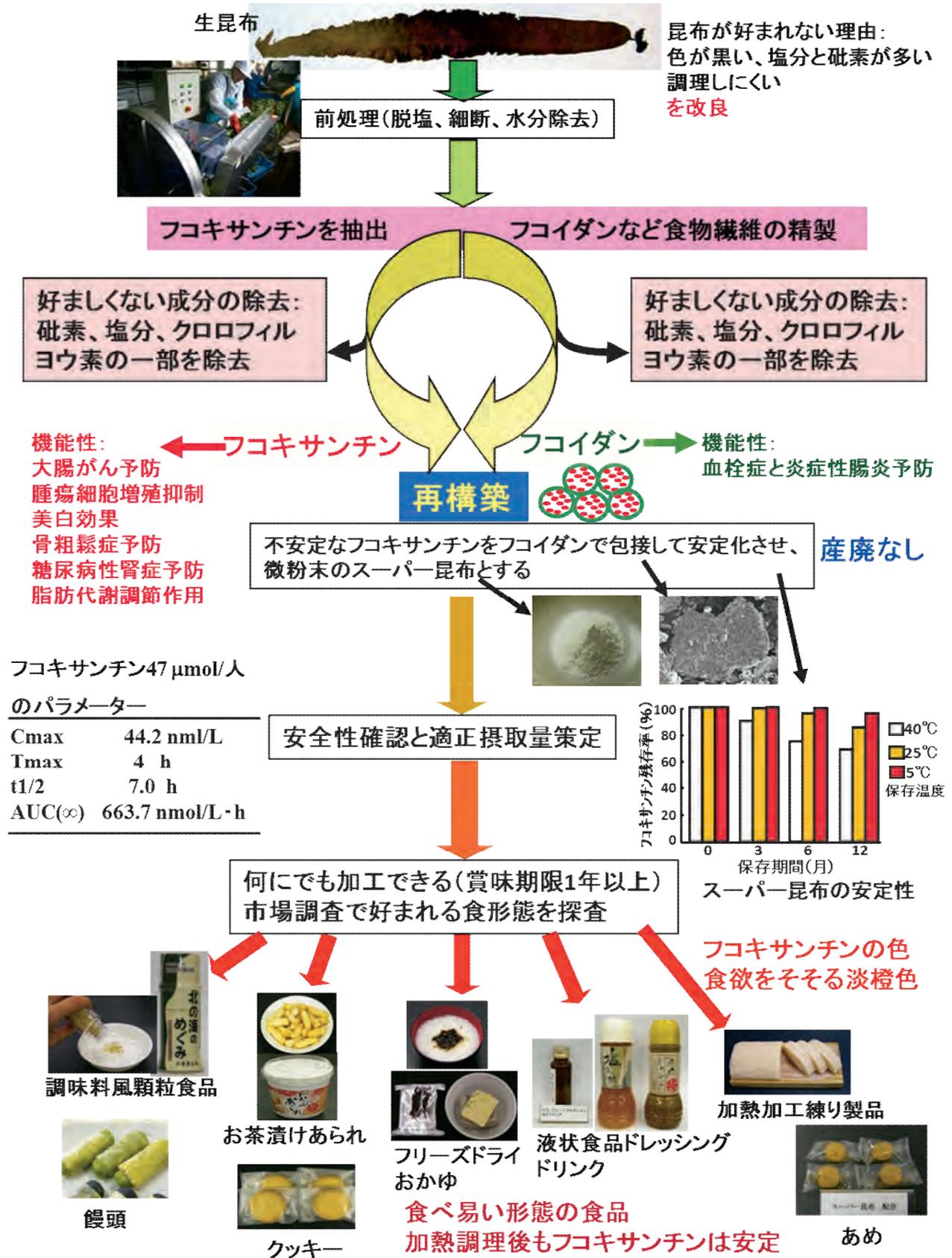
■今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①昆布のフコキサンチンとフコイタンが副作用なく生活習慣病を予防できるという情報は、社会の健康増進に貢献でき、昆布の消費を上げることができる。
- ②市場要求性が高いフコキサンチンを安定なスーパー昆布として提供する技術を確認したので、その市場が広がるとともに、この技術を他の多くの分野に応用できる。
- ③海藻の加工技術を広く活用できるので、低迷していた海藻栽培漁業に新しい需要を提供して活性化させる。
- ④新形態の食品を開発したので、これが新しい市場を生むとともに、主食の米の消費も上がると思える。

■公表した主な特許・論文

- ①特願2008-215838：フコイタン特異抗体及びそれを用いたフコイタンの免疫学的定量法：神戸大学、オリザ油化株式会社、株式会社小倉屋山本、株式会社日本食品開発研究所
- ②Das, S. K. et al., Growth inhibition of human hepatic carcinoma HepG2 cells by fucoxanthin is associated with down-regulation of cyclin D. *Biochimica Biophysica Acta*, 1780, 743-749 (2008).
- ③Tanoue, T. et al., Fucoidan inhibits IL-8 mRNA expression in Caco-2 cells co-cultured with RAW264.7 cells. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 374, 565-569 (2008).
- ④Hashimoto, T. et al., Distribution and accumulation of fucoxanthin and its metabolites after oral-administration of fucoxanthin in rats. *British Journal of Nutrition*, 102, 242-248 (2009).
- ⑤Das, S. K. et al., Fucoxanthin induces apoptosis in osteoclast-like cells differentiated from RAW264.7 cells. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58: 6090-6095 (2010).

研究成果の具体的図表



■研究課題名

最先端クルマエビ養殖技術の構築—安全・安心・健康なエビを作る

■研究の目的

日本のクルマエビ養殖はホワイトスポット病原因ウイルス（WSDV）の感染によって被害を受けており、特に、採卵用親エビとして天然から採捕したクルマエビがWSDVに感染していた場合、卵や稚エビへの垂直感染が確認されている。このため、病原ウイルスを持たない（ウイルスフリー）親エビの供給が、安全・安心・健康なクルマエビ生産に必要とされている。そこで、本課題では、飼育システム・飼料・診断法・ワクチンなどを開発し、これらの成果を結集することで、ウイルスフリー親エビの生産手法の確立を目的とする。

■研究項目・実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ①病原ウイルスフリー親エビの生産手法の確立
（◎酒井正博／宮崎大学農学部）
- ②ウイルスフリークルマエビの生産を目的とした完全閉鎖循環式飼育システムの構築
（鈴木祥広／宮崎大学工学部）
- ③親エビ育成飼料および性成熟促進飼料の開発とその評価
（越塩俊介／鹿児島大学）
- ④エビ由来のプロバイオティクスを用いた新規バイオ飼料の開発
（前田 稔／株式会社九州メディカル）



酒井正博

■研究の内容・主要な成果

- ①WSDVワクチンと迅速定量診断法の開発…WSDVに対するDNAワクチン、サブユニットワクチン（無細胞発現系利用）を開発し、WSDVの感染に対し極めて高い防御能をクルマエビに付与することに成功した。また、等温核酸増幅法を用いて、WSDV、イエローヘッド病ウイルス（YHV）、タウラ症候群ウイルス（TSV）および伝染性皮下造血管壊死症ウイルス（IHHNV）の迅速・高感度定量検出法の開発に成功した。
- ②完全閉鎖循環式飼育システムの構築…設置条件に適用させて、任意の規模のシステムを設計・構築し、クルマエビの長期間の連続飼育を実施できる技術を完成させた。
- ③育成・催熟用飼料の開発…ムラサキイガイ、フコイダン、ビタミン類等の成長促進物質を添加した高品位育成飼料とゴカイ中性脂質、高度不飽和脂肪酸、ビタミン類を含有する催熟用配合飼料を開発した。
- ④新規バイオ飼料の開発…クルマエビから2,990株の消化管内細菌コレクションを構築した。この中から抗菌作用や免疫賦活作用などを有する菌株を選抜し、新規プロバイオティクスを開発した。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①WSDVワクチンならびに高感度定量検出法によって、クルマエビ養殖の最大の疾病問題であったWSDVによる被害は低減され、安定的生産・生産量の増加が見込まれる。
- ②エビ養殖産業における親エビ・種苗流通ルートの整備に加えて、実用化システムの構築および継続的に運転・維持管理できる技術力を備えた民間企業あるいは公的機関（部門）を創出することが予想される。
- ③開発した育成・催熟飼料は他のエビ類にも転用可能であり、アジアでの展開も考慮して低コスト化を図る。
- ④抗菌作用や免疫賦活作用などを有する微生物混合飼料を使用することで、親エビを含む養殖クルマエビの健全な生育に貢献できる。

■公表した主な特許・論文

- ①特願 PCT/JP2010/060503：甲殻類急性ウイルス血症に対するワクチン：宮崎大学
- ②Mekata, T., Kono, T. *et al.* Identification of cDNA encoding Toll receptor, MjToll gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 24, 122-133, 2008.
- ③Jean, F., Chakraborty, G. *et al.* Rapid detection of vibriosis in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* by loop-mediated isothermal amplification. *FEMS Microbiology Letter*, 288, 171-177, 2008.
- ④Mekata, T., Sudhakaran, R. *et al.* A novel gene of tumor necrosis factor ligand superfamily from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 28, 571-578, 2010.
- ⑤Inada, M., Mekata, T. *et al.* Molecular cloning and characterization of the nitric oxide synthase gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 28, 701-711, 2010.

研究成果の具体的図表

ワクチンの開発 (宮崎大農)

① DNAワクチン (プラスミドDNA)

② サブユニットワクチン (組換えタンパク質)

抗原を発現するプラスミドDNA → 組換えタンパク質 → ワクチン

開発したワクチン(DNA,サブユニット)は、ウイルス感染時の生残率を対照区と比べ、50%以上高めた(左グラフ)。さらに、ワクチンの接種によって、抗菌ペプチドなどの免疫関連遺伝子の発現が増強された。また、サブユニットワクチンは、注射法での投与に加え、飼料に混合する形で終口投与しても、その効果が発揮されることを確認した。

迅速診断法の確立 (宮崎大農)

	本研究におけるLAMP法	従来のPCR法
検出時間	20分~1時間	約3時間
検出感度	従来のPCR法の10~100倍	-
反応温度	等温(60-65℃)	95℃→93℃→72℃
特異性	非常に高い	高い

検出までの時間 約20~60分

従来のPCR法は、検出までに約3時間を要していたが、本研究では、60分以内の検出を可能にした。また、高い特異性と10²の微量な核酸を検出する高い感度を有しており、クルマエビの重要な病原性ウイルス4種類に対する、より迅速な高感度定量診断法を確立した。

ウイルス検査

ワクチン接種

ウイルス人為感染試験によるワクチン効果の判定

生残率(%)

ウイルス感染後日数(日)

泡沫分離プロセスを利用した完全閉鎖循環式飼育システム (宮崎大工)

育成

育成

プロバイオティクスの開発 ((株)九州メディカル)

抗菌活性
Bacillus amyloliquefaciens D1768株

免疫賦活活性、成長促進
Lactococcus lactis D1813株

クルマエビ消化管内細菌から、抗菌作用や免疫賦活作用などを有する菌株を選抜し、新規プロバイオティクスを開発した。

育成飼料および性成熟促進用飼料の開発 (鹿児島大水産)

ふ化率とふ化幼生数に及ぼすゴカイ抽出成分(中性脂質+トリクロ酢酸可溶成分)の効果

ゴカイ中性脂質成分の添加により成熟に要する日数が減少

ビタミンとの添加によりふ化幼生の生残率が向上

ウイルスフリー親エビからウイルスフリー卵を獲得

ムラサキイガイ、フコイダン、ビタミン類等の成長促進物質や機能性成分を添加した高品位育成飼料は、成長が速いだけでなく免疫応答も向上させることが確認された。

また、ゴカイ中性脂質、高度不飽和脂肪酸、ビタミン類等を配合することで、卵巣成熟を促進し、健康な幼生を作出可能な催熟用飼料を開発した。

■研究課題名

バキュロウイルスの特性を利用した家畜用ワクチンの開発

■研究の目的

畜産業における感染症予防という課題に対して、異分野である分子ウイルス学の技術を用いて、より安価で効果的なワクチンを開発し、より安全な家畜の飼育環境を提供することを目指す。本コンソーシアムは以下の2つの基盤技術、(1) バキュロウイルス (AcMNPV) を用いて作製したウイルス様粒子による経口・粘膜ワクチンの製造開発、(2) バキュロウイルスが持つ免疫賦活のメカニズムを利用した感染予防薬の開発をもとに、家畜用ワクチンの開発を行う。

■研究項目・実施体制 (◎は技術コーディネーター)

- ① ワクチンの製品化を目指した生産システムの開発
(◎矢野良治/BachTech株式会社)
- ② E型肝炎ウイルス様粒子を用いた粘膜ワクチンの開発
(松浦善治/大阪大学微生物病研究所)
- ③ バキュロウイルスの免疫賦活作用を応用したワクチンの開発
(高久 洋/千葉工業大学)
- ④ 鳥インフルエンザに対する有効性評価
(喜田 宏/北海道大学)
- ⑤ 家畜を用いた粘膜ワクチンおよび飼料添加剤としての有効性評価
(林 洋一/全農飼料畜産中央研究所)



矢野良治

■研究の内容・主要な成果

- ① E型肝炎ウイルス様粒子の結晶構造を決定し、外来エピトープ（抗原決定基）の挿入に成功
- ② 鳥インフルエンザ様粒子を開発し、高病原性鳥インフルエンザウイルスに対し高い感染防御能を確認
- ③ バキュロウイルスの自然免疫活性能を利用した感染予防薬のプロトタイプを開発

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

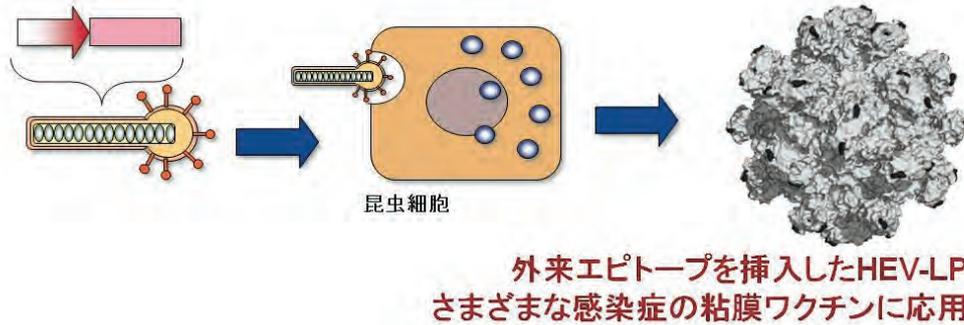
- ① さまざまな感染症に対する動物用ワクチンの開発の基盤となる。
- ② 粘膜ワクチンとして経口投与・経鼻投与が可能となる。

■公表した主な特許・論文

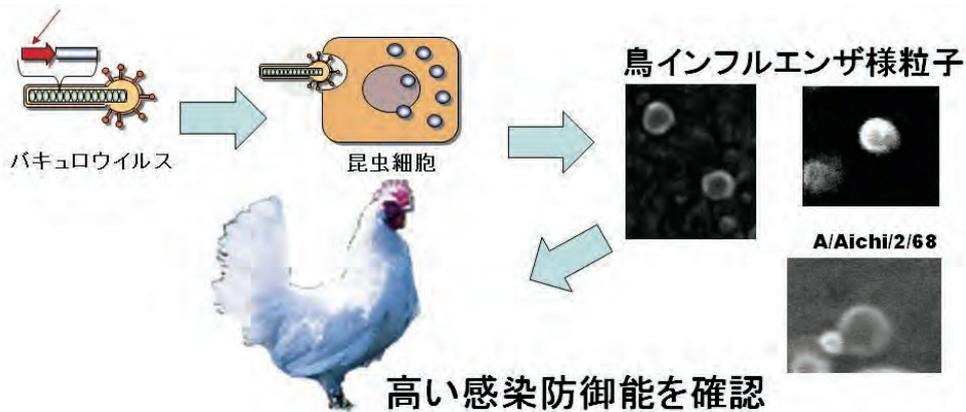
- ① 特願2011-000285：融合タンパク質：国立大学法人大阪大学、全国農業協同組合連合会、BachTech株式会社
- ② Yamashita T. *et al.*: Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 12986-12991 (2009).
- ③ Abe T. & Matsuura Y.: Host innate immune responses induced by baculovirus in mammals. : *Curr. Gene Ther.*, 10: 226-231 (2010).
- ④ Kitajima M. *et al.*: Induction of NK cell-dependent antitumor immunity by the *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. : *Molecular Ther* 16: 261-268 (2008).
- ⑤ Nishibe Y. *et al.*: Baculovirus-mediated interferon alleviates dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis symptoms in a murine model. : *Gene Ther* 15: 990-997 (2008).

■研究成果の具体的図表

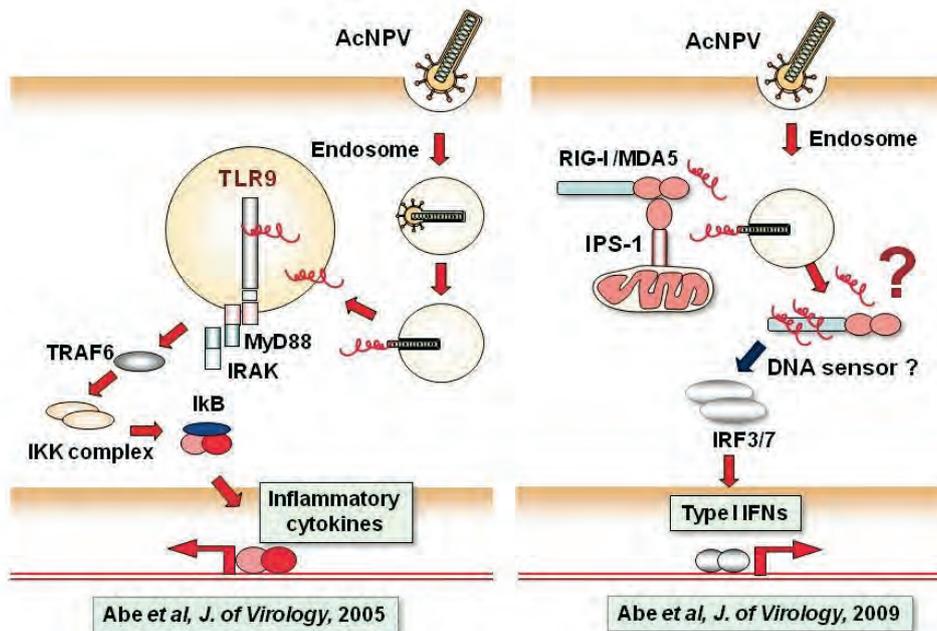
1. E型肝炎ウイルス様粒子の結晶構造を決定し、外来エピトープの挿入に成功



2. 鳥インフルエンザ様粒子を開発し、高病原性鳥インフルエンザウイルスに対し高い感染防御能を確認



3. バキュロウイルスの自然免疫活性能利用した感染予防薬のプロトタイプを開発



■研究課題名

イネいもち病菌の非病原性遺伝子産物の機能と分子構造の解明

■研究の目的

いもち病はイネの最重要病害である。イネのいもち病抵抗性遺伝子の持続的利用のために、新たな病害防除法の確立が求められている。本研究では、イネの抵抗性遺伝子（R 遺伝子）といもち病菌の非病原性遺伝子（AVR 遺伝子）の相互作用による抵抗性に注目し、イネいもち病菌のAVR 遺伝子産物の機能とその分子構造を明らかにすることで、AVR/Rタンパク質相互作用を分子レベルで明らかにし、新たな防除法の確立につなげることを目的とする。

■研究項目・実施体制（◎は研究を総括する者（研究代表者））

- ①AVR-Pia及びPiaの遺伝生化学的解析
（◎曾根輝雄／北海道大学大学院農学研究院）
- ②AVR及びRタンパク質の構造生化学的解析
（尾瀬農之／北海道大学大学院薬学研究院）



曾根輝雄

■研究の内容・主要な成果

- ①イネいもち病菌のAVR遺伝子AVR-Piaは、イネ感染時にのみ発現し、感染後付着器形成時から侵入菌糸形成時に発現し、抵抗性を誘導すること、また、抵抗性遺伝子を持たない親和性イネ上では、発現が継続し、AVR-Piaタンパク質が侵入菌糸からイネ細胞に分泌されることを明らかにした。
- ②イネPia遺伝子が、SASRGA4とSASRGA5の2つの遺伝子からなることを明らかにした。
- ③AVR-Piaタンパク質はSASRGA4、SASRGA5タンパク質と直接相互作用しないが、AVR-Piaタンパク質同士で相互作用し、それがAVRタンパク質としての機能に必要なことを明らかにした。
- ④AVR-Piaタンパク質を大腸菌で発現させ、精製することに成功した。イネいもち病菌由来のAVRタンパク質として初めて結晶化することに成功した。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

AVR-Piaタンパク質の発現時期、機構、局在が明らかになった事で、今後AVRタンパク質を応用した防除薬剤の開発のための重要な情報を得ることが出来た。イネPia遺伝子の単離により、今後分子的なイネ育種への応用が期待できる。いもち病菌AVRタンパク質の異種発現、精製方法について豊富な情報が得られたことにより、別なAVRタンパク質の解析への応用が期待できる。

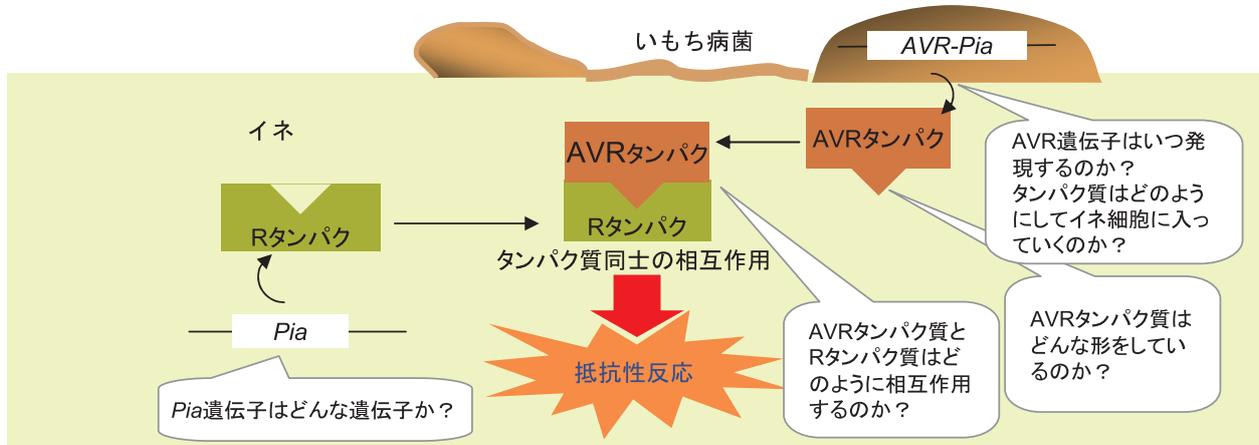
■公表した主な特許・論文

Okuyama, Y. *et al.*: A multi-faceted genomics approach allows the isolation of rice *Pia*-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. *The Plant Journal*.

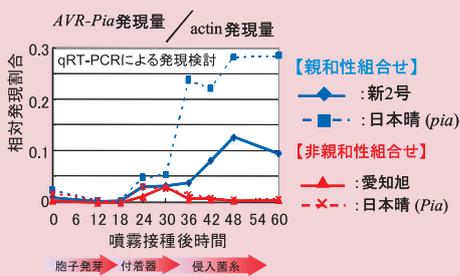
■研究成果の具体的図表

イネいもち病菌の非病原性遺伝子産物の機能と分子構造の解明

イネのR(抵抗性)タンパクといもち病菌のAVR(非病原性)タンパクが相互作用すると病気にならない!



AVR遺伝子はいつ発現するのか?



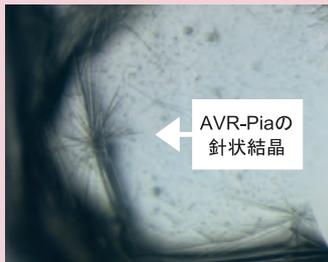
AVR-Piaは胞子発芽後、付着器形成～侵入時に発現し、抵抗性を誘導する。抵抗性遺伝子の無いイネでは、継続的に発現する。

AVRタンパク質はどのようにしてイネ細胞に入っていくのか?



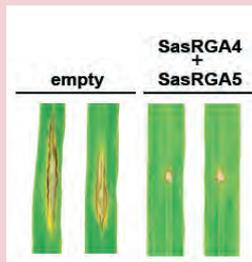
AVR-Piaは親和性イネに侵入後、侵入菌糸の先端に局在する。局在部はそのままの位置にとどまり、BICとなる。ここからイネ細胞に分泌されていく。

AVRタンパク質はどんな形?



AVR-Piaタンパク質を、いもち病菌由来AVRタンパク質としては初めて結晶化に成功した。構造解析が進行中。

Piaはどんな遺伝子?



ササニシキのRGA4とRGA5という2つの遺伝子がPiaとしての機能に必要な事がわかった。

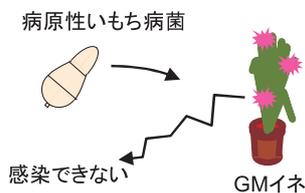
AVRタンパク質とRタンパク質の相互作用は?



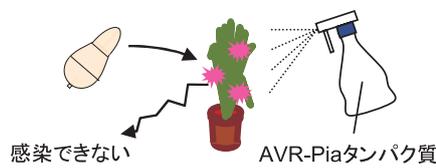
AVR-PiaとRGA4とRGA5は直接相互作用しないが、AVR-Pia同士で相互作用する事がわかった。

イネがいもち病抵抗性を発揮する仕組みを分子レベルで解明

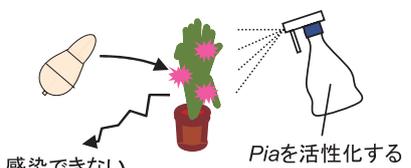
◆ AVR-Pia, Pia保有GMイネ作出



◆ AVR-Piaタンパク質農薬



◆ AVR-Piaに類似した働きをもつ農薬



■研究課題名

温帯果樹の休眠制御機構の分子基盤解明

■研究の目的

永年性作物のライフサイクルを制御する重要な生理現象のひとつに休眠があげられる。休眠芽は一定期間の低温に遭遇してはじめて生長を再開するが、近年の地球温暖化によって低温遭遇期間が短縮してきており、それに伴い温帯果樹の開花時期の変動や不揃いが問題視されている。本研究では、温帯果樹の自発休眠の制御機構を解明し、休眠の人為的制御あるいは地球温暖化に適応した温帯果樹育種の迅速化のための技術シーズの開発へ貢献することを目的としている。

■研究項目・実施体制

- ①休眠制御遺伝子の探索と機能解析
(◎山根久代／京都大学農学研究科)
- ②休眠性改変個体の解析と休眠関連分子マーカーの開発
(◎山根久代／京都大学農学研究科)



山根久代

■研究の内容・主要な成果

- ①次世代シーケンサーを利用したEST解析およびマイクロアレイ解析により、温帯果樹の休眠芽で高発現する6つのDAM遺伝子群（SVP/AGL24タイプのMADS-box遺伝子、DORMANCY-ASSOCIATED MADS-box (DAMI-6) 遺伝子）を単離した。
- ②モデル樹木のポプラにDAM6遺伝子を導入すると、休眠が促進されることを明らかにした。
- ③DAM遺伝子群の発現をRNAi法で抑制したウメは腋芽の休眠が抑制される傾向にあることを明らかにした。
- ④DAM6遺伝子は休眠レベルを評価可能な発現マーカーとして利用可能であることを示した。
- ⑤DAM遺伝子の発現を誘導する経路やDAM遺伝子の標的遺伝子を探索することで、休眠関与候補遺伝子としてDREB, FT, SOC1-like MADS-box遺伝子を単離した。
- ⑥温帯果樹の花成から開花にいたる生理現象を調査し、開花の人為的制御にむけた理論基盤を構築した。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①DAM遺伝子を改変することで、芽の休眠を人為的に操作できる可能性が示された。今後、芽の休眠を短縮させることができれば、冬の気温が上昇しても休眠覚醒に異常をきたさない果樹品種を作出できると考えられる。
- ②DAM6遺伝子は、芽の休眠深度を推定する指標として利用できる。温帯果樹の促成栽培時の加温開始時期を適切に判断するための指標としてDAM6遺伝子を利用できれば、促成栽培の普及に寄与できると考えられる。
- ③本研究によって、栄養生長の起点となる「葉芽」と果実を着ける「花芽」の休眠は別々に制御されていることが示唆された。このことは、翌年度の栄養生長に異常をきたすことなく開花のみを人為的に操作できる可能性を示唆しており、温帯果樹の二期作や周年栽培が理論的に可能であることを裏付けている。

■公表した主な特許・論文

- ①Yamane H., *et al.*: Suppression subtractive hybridization and differential screening reveals endodormancy-associated expression of an SVP/AGL24-type MADS-box gene in lateral vegetative buds of Japanese apricot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133: 708-716 (2008)
- ②Esumi T., *et al.*: Identification of an FT ortholog in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. Et Zucc.). *J. Hort. Sci. Biotech.* 84: 149-154 (2009)
- ③Esumi T., *et al.*: Identification of a TFL1 ortholog in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. Et Zucc.). *Sci. Hort.* 125: 608-616 (2010)
- ④Yamane H., *et al.*: Comparative analyses of dormancy-associated MADS-box genes, PpDAM5 and PpDAM6, in low- and high-chill peaches (*Prunus persica*). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*
- ⑤Yamane H., *et al.*: Expressional regulation of PpDAM5 and PpDAM6, peach (*Prunus persica*) dormancy-associated MADS-box genes, by low temperature and dormancy-breaking reagent treatment. *J. Exp. Bot.*

■研究成果の具体的図表

温帯果樹の1年のライフサイクルと休眠



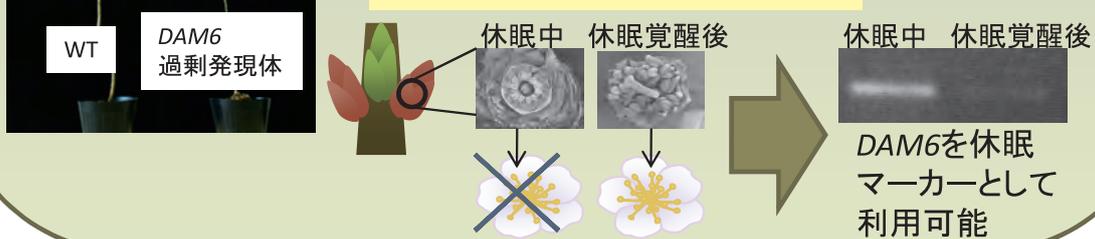
休眠制御経路を解明



DAM遺伝子改変個体の解析



休眠関連マーカーの開発



開花の人為的制御技術・
温暖化適応型品種の
開発へ

■研究課題名

高機能食品成分としてのスフィンゴ脂質に関する基盤構築

■研究の目的

機能性食品素材としてのスフィンゴ脂質に着目して、機器分析を用いたスフィンゴ脂質解析法を確立し、有望なスフィンゴ脂質素材の探索を行う。さらに、スフィンゴ脂質の体内動態と機能性について評価することで、機能性と安全性が明らかな高機能食品の開発のための科学的な基盤を構築することを目的とする。

■研究項目・実施体制（◎は研究を総括する者（研究代表者））

- ①スフィンゴ脂質素材の探索と食品機能性の評価
（◎菅原達也／京都大学大学院農学研究科）
- ②スフィンゴ脂質の消化管吸収と体内動態の解明
（都築 毅／東北大学大学院農学研究科）



菅原達也

■研究の内容・主要な成果

- ①スフィンゴ脂質の簡易定量法を確立し、水産未利用資源から魚の脳やナマコの内臓などのスフィンゴ脂質が高含有の素材を見出した。また、高等植物由来スフィンゴ脂質にこれまでに報告されていないトリエン型スフィンゴイド塩基が含まれることを見出した。
- ②スフィンゴ脂質の摂取により、皮膚バリア機能が改善することを確認し、その作用機序として表皮スフィンゴ脂質代謝関連酵素の発現変動を引き起こすことを見出した。さらにスフィンゴ脂質の新しい機能性として、抗炎症作用や光老化抑制作用を確認した。
- ③植物由来スフィンゴイド塩基は、吸収率は極めて低いものの、リンパを介して吸収されることを初めて証明した。さらにスフィンゴシンが結合するタンパク質が関与する新しい選択的消化管吸収機構を提示した。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

美肌機能を有する食品機能成分として注目されているスフィンゴ脂質について、消化管吸収機構と機能性に関する科学的基盤となる成果が得られた。本研究成果は、QOLの向上を目指した機能性食品素材としてのスフィンゴ脂質のさらなる有効利用に貢献しうるものであり、原料供給源としての農林水産業および素材加工と最終製品の生産・販売としての飲食料産品の振興に与える多様な波及効果が見込まれる。

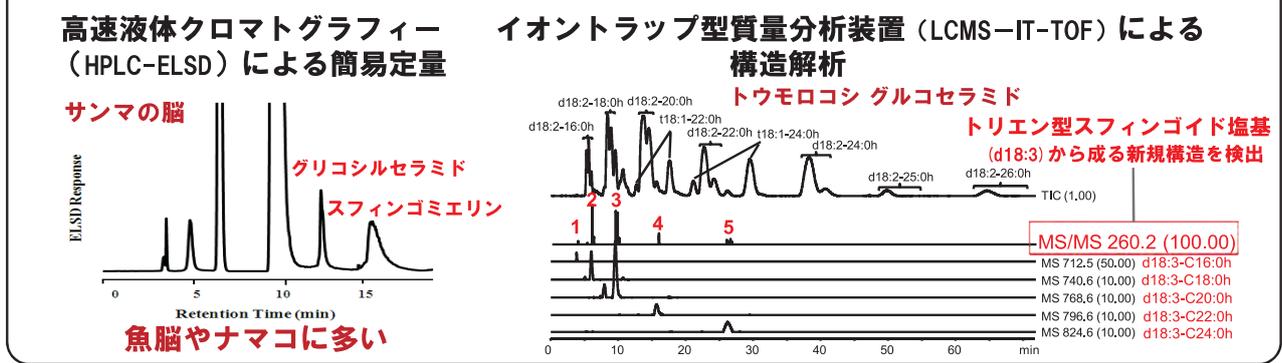
■公表した主な特許・論文

- ①Duan, J. et al.: Rapid quantitative analysis of sphingolipids in seafood using HPLC with evaporative light-scattering detection: its application in tissue distribution of sphingolipids in fish. *J. Oleo Sci.* 59: 509-513 (2010)
- ②Sugawara, T. et al: Analysis of glucosylceramides from various sources by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *J. Oleo Sci.* 59: 387-394, (2010)
- ③Sugawara, T. et al: Identification of glucosylceramides containing sphingatrienine in maize and rice using ion trap mass spectrometry. *Lipids* 45: 451-455 (2010)
- ④Sugawara, T. et al: Intestinal absorption of dietary maize glucosylceramide in lymphatic duct cannulated rats. *J. Lipid Res.* 51: 1761-1769 (2010)
- ⑤Duan, J., et al.: Oral glucosylceramide reduces 2,4-dinitrofluorobenzene induced inflammatory response in mice by reducing TNFalpha levels and leukocyte infiltration. *Lipids*
- ⑥Shimada, E. et al.: Inhibitory effect of topical glucosylceramide on skin photoaging in UVA-irradiated hairless mice. *J. Oleo Sci.*

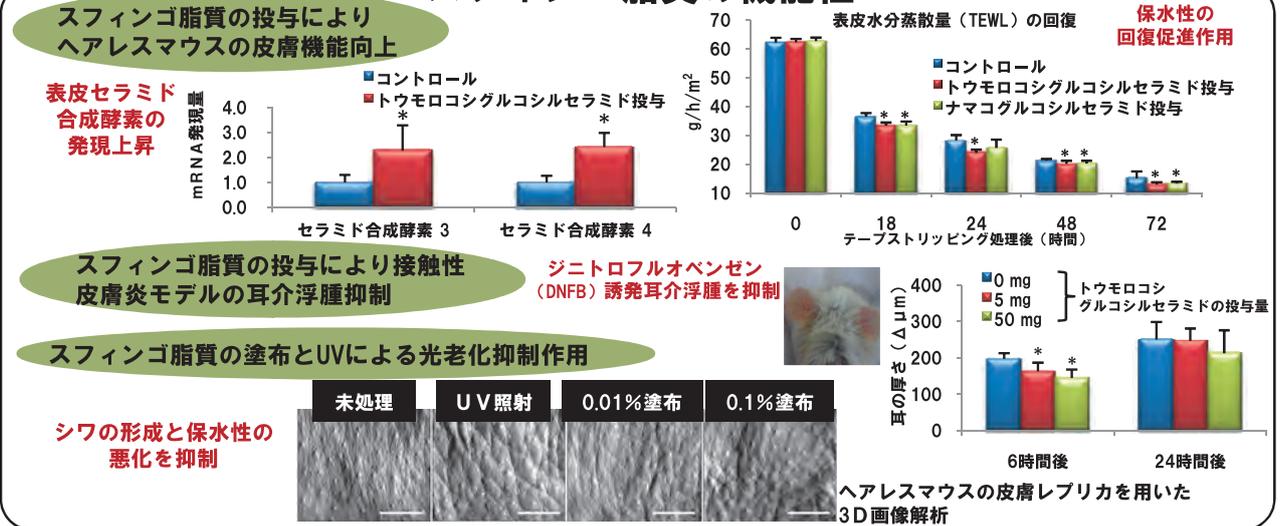
■研究成果の具体的図表

高機能食品成分としてのスフィンゴ脂質に関する基盤構築

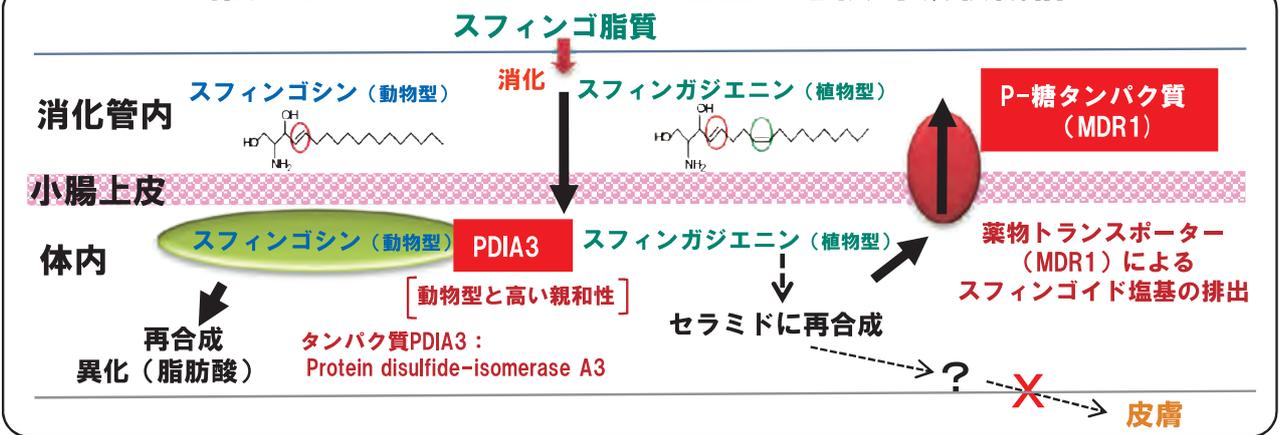
スフィンゴ脂質分析と素材の探索



スフィンゴ脂質の機能性



推定されるスフィンゴイド塩基の選択的吸収機構



スフィンゴ脂質食品開発の基盤

■研究課題名

全アミノ酸同時計測用バイオチップの開発

■研究の目的

食品分野においてアミノ酸の分析値が食品の味や鮮度、加熱後の香り、摂取後の生体調節機能などその品質の指標になるということが明らかになっている。また臨床医療の分野においても血液中あるいは尿中の遊離アミノ酸濃度を計測することは疾患の診断や病態の解析に有効な方法である。本研究は食品や医療分野において「その場」において特殊な技術を必要とせず、20種類のアミノ酸濃度を網羅的に迅速かつ簡便、安価に計測することができる装置および方法を開発することを目的としている。

■研究項目・実施体制（◎は研究を総括する者（研究代表者））

- ①電極装着型マイクロチップの開発
（◎釘宮章光／広島市立大学社会連携センター）
- ②フォトセンサーの開発
（◎釘宮章光／広島市立大学社会連携センター）



釘宮章光

■研究の内容・主要な成果

- ①アミノアシルtRNA合成酵素を各アミノ酸を識別するための分子認識材料として用いるアミノ酸センシング法、アミノ酸センサーについて検討し、本酵素を用いることで目的のアミノ酸の定量に有用であることを明らかにした。
- ②電気化学的計測法、ルミノール化学発光法、吸光法などによるアミノ酸検出方法について検討し、12種類のアミノ酸について2.5 μ M～15 μ M、あるいは2.5 μ M～100 μ Mの濃度で選択的に定量可能であることを示した。この定量可能な範囲は食品分析や臨床分析を行う上で必要な濃度範囲を満たしている。
- ③1本の主流路にサンプルのアミノ酸インジェクト流路、発色試薬インジェクト流路を有するマイクロチップを用い、フローインジェクションによりアミノ酸濃度を計測できるシステムを構築して、迅速・簡便にアミノ酸の濃度が計測可能であることを示した。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①今後の展開としては、複数のアミノ酸が同時計測可能なマイクロチップの開発を目指し、各アミノ酸の濃度分布（アミノグラム）から食品の味や鮮度、栄養の計測、また病態の診断が可能な装置の開発を目指す。
- ②波及効果としては、本研究が完成して検出のステップ、検出時間、コストが大幅に短縮すると、食品産業や臨床医療、個別化健康管理において簡便に利用可能なアミノ酸センシング装置になりうると考えられる。市場としては食品工場や医療機関、家庭などで、現在これら分野において外部に委託して行われているアミノ酸の計測を、「その場」において容易にかつ安価に行うことができるようになると考えられる。また環境負荷も小さくなるというメリットもある。

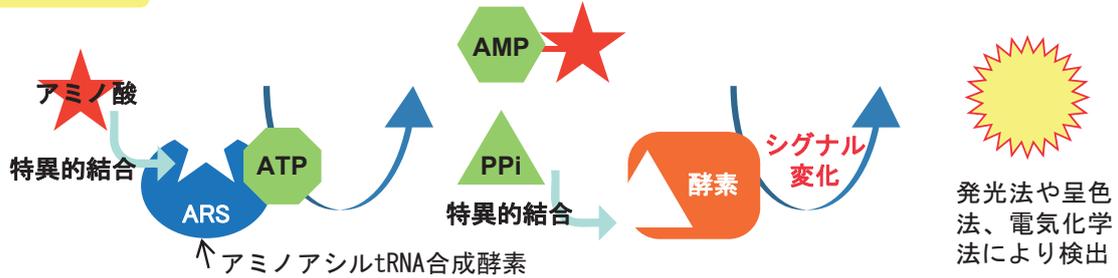
■公表した主な特許・論文

- ①特願2009-204896：アミノ酸の分析方法およびバイオセンサー：釘宮章光

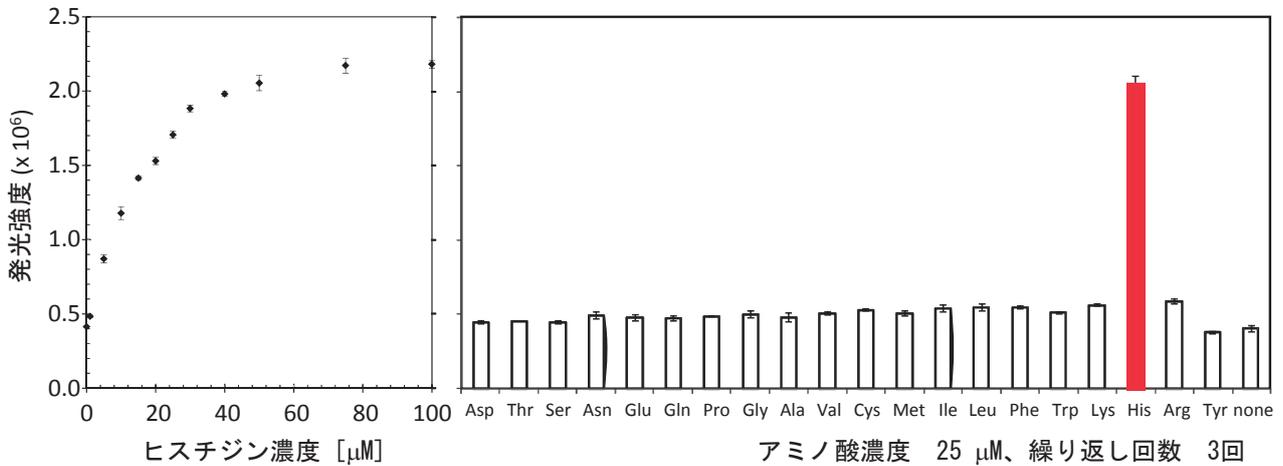
■研究成果の具体的な図表

研究内容と得られた成果

測定原理



ルミノール化学発光法による検出

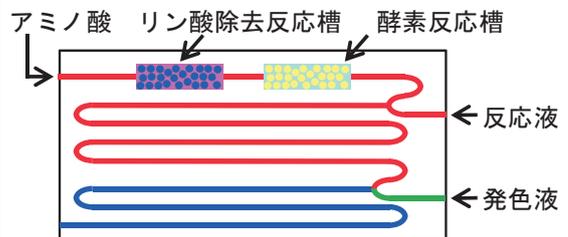


ルミノール化学発光法によりヒスチジルtRNA合成酵素（ヒスチジン結合性酵素）を用いてヒスチジンの定量性（左）と選択性（右）の評価を行った。2.5 μM～25 μMのヒスチジンが選択的に定量可能であることが示された。本法では、他8種類のアミノ酸についてもそれぞれ数μM～100 μMの濃度域で選択的に定量可能であることを示した。

可能にした各アミノ酸の定量範囲

アミノ酸	トリンダー試薬	発光法	NADH計測	
Lys	リジン	5 - 100	2.5 - 75	15 - 90
Arg	アルギニン			
His	ヒスチジン	2.5 - 100	1.0 - 25	10 - 100
Asp	アスパラギン酸	2.5 - 100		
Glu	グルタミン酸			
Asn	アスパラギン		2.5 - 50	
Gln	グルタミン			
Ser	セリン		2.5 - 20	5 - 80
Thr	スレオニン			
Tyr	チロシン			
Gly	グリシン	2.5 - 100	2.5 - 20	
Ala	アラニン		15 - 100	
Val	バリン		10 - 100	
Leu	ロイシン		2.5 - 20	
Ile	イソロイシン			
Pro	プロリン		2.5 - 15	5 - 20
Phe	フェニルアラニン			
Met	メチオニン	5 - 50		
Trp	トリプトファン			
Cys	システイン	5 - 100		10 - 75

作製した前処理反応槽付マイクロチップの模式図



アミノ酸サンプル溶液中から「リン酸除去反応槽」で反応妨害物質のリン酸イオンを除去し、「酵素反応槽」で酵素反応させた後、発色液のトリンダー試薬を加えて呈色反応により、アミノ酸濃度を検出するフローシステム。

■研究課題名

ヘアリーベッチ導入大豆栽培の多収機構解明と栽培技術の確立

■研究の目的

国内ダイズ生産では、圃場排水不良による低収量や田畑輪換の継続に伴う地力の低下が問題となっている。これまでの研究でマメ科のヘアリーベッチを優良根粒菌（Y629株）と共に導入すると、ダイズを増収できることを明らかにしてきた。本研究では優良根粒菌Y629株の生理的・遺伝的特徴を解明するとともに、ヘアリーベッチ植栽による土壌環境変化に対するダイズの生理的応答を明らかにし、地力維持型ダイズ増収技術を構築することを目的とする。

■研究項目・実施体制

- ①ヘアリーベッチ優良根粒菌Y629株の生理的特徴と遺伝的特徴の解明
(◎佐藤 孝／秋田県立大学生物資源科学部)
- ②ヘアリーベッチ植栽による土壌環境変化とダイズの生理的応答の解明
(◎佐藤 孝／秋田県立大学生物資源科学部)



佐藤 孝

■研究の内容・主要な成果

- ①秋田県内圃場の土壌中におけるヘアリーベッチ根粒菌の遺伝的多様性は、土壌型が同じでも圃場により大きく異なり、窒素固定活性が低い根粒菌も多数存在することが明らかとなった。
- ②Y629株は、土壌が湛水条件（還元条件）でも増殖できる能力を有していることが明らかとなった。
- ③田畑輪換体系における新たな根粒菌接種技術（水田流し込み接種法）およびヘアリーベッチ種子への根粒菌付着密度を高める接種資材を開発し、この技術は特許出願した後に商品化した。
- ④ヘアリーベッチ植栽は、ダイズ黒根腐病菌やダイズ茎疫病菌の増殖に大きく影響しないことが明らかになった（ダイズ黒根腐病菌検出方法は特許出願中）。
- ⑤ヘアリーベッチ植栽によりダイズの生育が促進される理由として、グライ低地土ではダイズ根粒の活性が高まることが主要因であるのに対し、黒ボク土と砂壤土では根の窒素吸収量が多くなることが主要因であった。また、グライ低地土におけるヘアリーベッチ植栽によるダイズ増収は、下層土が改良されてダイズの根域が広がると同時に、根圏活性が高まることが主要因であることが明らかとなった。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

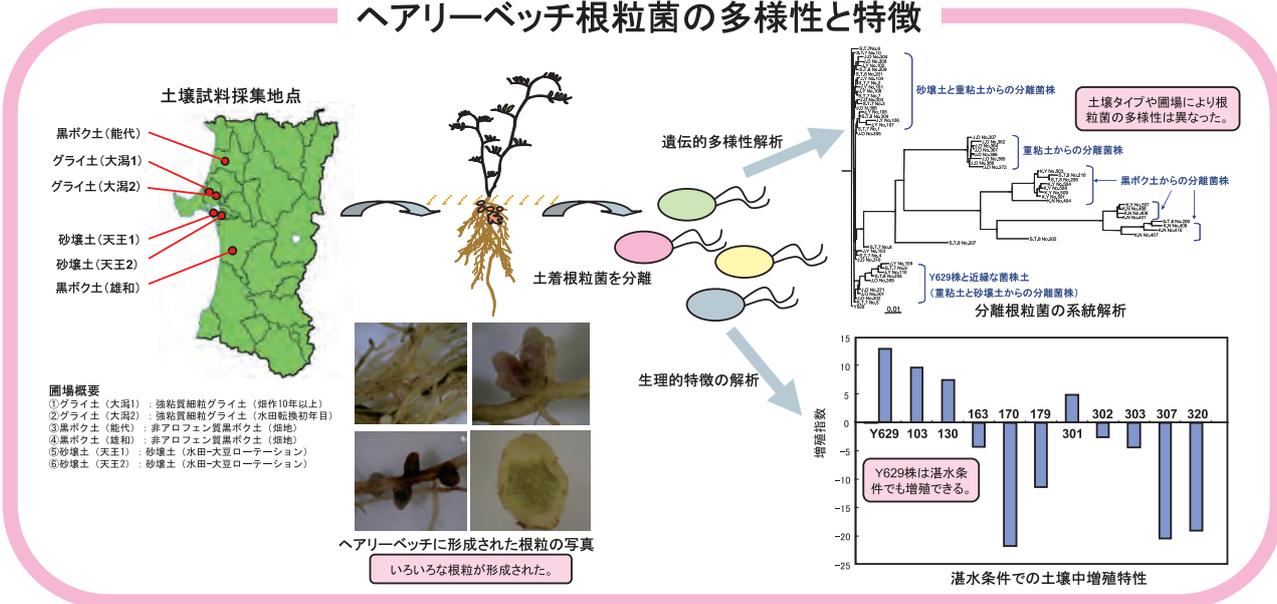
ヘアリーベッチ根粒菌の多様性は高く、窒素固定活性が低い根粒菌も多数存在することを明らかにするとともに、Y629株が高い窒素固定活性を持つこと、さらに還元条件下でも増殖できることを明らかにした。これらのことから、Y629の接種はヘアリーベッチ安定植栽のために重要であることが示された。Y629株の特性を生かした水田流し込み接種法は、田畑輪換体系において非常に有効な接種技術であり、ヘアリーベッチ安定植栽に大きく貢献すると考えられる。なお、本研究で開発した根粒菌接種資材は農家からの要望が高く、商品化されてすでに全国各地で利用されている。また、ヘアリーベッチの植栽・鋤き込みがダイズの生育に及ぼす影響を土壌型別に明確にしたことは、ヘアリーベッチを利用したダイズ増収技術普及のための重要な知見となる。

■公表した主な特許・論文

- ①佐藤孝 他：重粘土水田転換畑におけるマメ科緑肥植物ヘアリーベッチ植栽が後作ダイズの生育・収量に及ぼす影響」、日本土壤肥科学雑誌、82、(印刷中) (2011)
- ②特願2010-188681：根粒菌接種資材、根粒菌接種資材の接種方法、及び栽培方法：佐藤孝
- ③特願2011-007527：土壌DNA抽出-PCR法による土壌中ダイズ黒根腐病菌の迅速検出法：佐藤孝、他

■研究成果の具体的図表

ヘアリーベッチ根粒菌の多様性と特徴

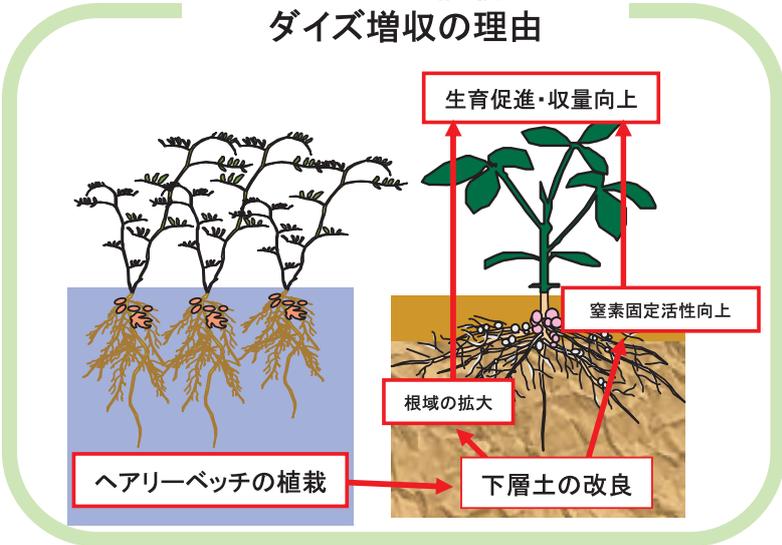


土壌中には多様な根粒菌が存在しており、Y629株は湛水条件でも増殖可能

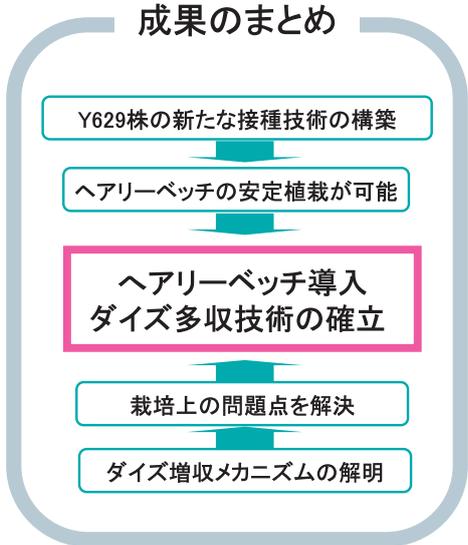
Y629株の特徴を生かした接種技術を開発



ヘアリーベッチ植栽による
ダイズ増収の理由



成果のまとめ



■研究課題名

葉緑体工学を用いた自己糖化型エネルギー作物の開発

■研究の目的

非食用植物の細胞壁成分（セルロース系バイオマス）を糖化して活用することは、持続可能な循環型社会の形成において重要な役割を担うことが期待されている。本研究では、耐熱性（高温で働く）糖化酵素群を大量発現する葉緑体形質転換タバコを作出し、これを粉砕・加熱処理することによって、植物自身が生産した酵素を利用して自己の細胞壁成分を糖化する「自己糖化型エネルギー作物」を開発する。

■研究項目・実施体制（◎は研究を総括する者（研究代表者））

- ①耐熱性糖化酵素群を用いたバイオマス糖化法の検討
（鹿島康浩／株式会社耐熱性酵素研究所）
- ②耐熱性糖化酵素群を大量発現する葉緑体形質転換タバコの作出
（◎中平洋一／京都府立大学大学院生命環境科学研究科）



中平洋一

■研究の内容・主要な成果

- ①前処理（アルカリ処理）を施したタバコの葉に対して、大腸菌から調製した6種類の耐熱性糖化酵素（エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ-I, -II（CBHI, CBHII）、β-グルコシダーゼ、キシラナーゼ、キシロシダーゼ）を作用させることで、糸状菌由来の市販酵素製剤を用いた場合の70%以上に達する糖化反応系を構築した。
- ②上記6種の耐熱性糖化酵素を、細胞内の全可溶性タンパク質の10%以上のレベルで（個別に）大量発現する葉緑体形質転換タバコの作出に成功した。
- ③6種の形質転換タバコの葉から耐熱性糖化酵素を粗抽出し、酵素回収後の（細胞壁成分を含む）植物残渣に対してアルカリ処理を施した後、両者を再混合して糖化反応を行うことで、自己の細胞壁成分の50%以上を糖質（グルコースやキシロース等）として回収可能なシステムを開発した。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

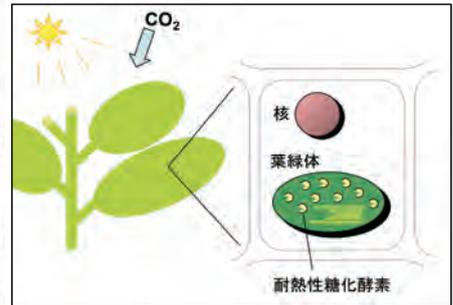
セルロース系バイオマスを糖化する方法として、様々な技術が検討されているが、本研究で実証された「自己糖化型エネルギー作物」は、植物が光合成によって生長するに伴い、糖化酵素が生産されるため、糖化処理に係るコスト並びに二酸化炭素排出量の大幅削減が見込まれる。今後、本研究で得られた基盤技術を実用植物（バイオマス生産量の高いイネ科植物等）に適用することで、バイオ燃料や有用化学製品の原料としての糖質を安価かつ効率的に生産する“バイオリファイナリー”の実現が期待される。

■公表した主な特許・論文

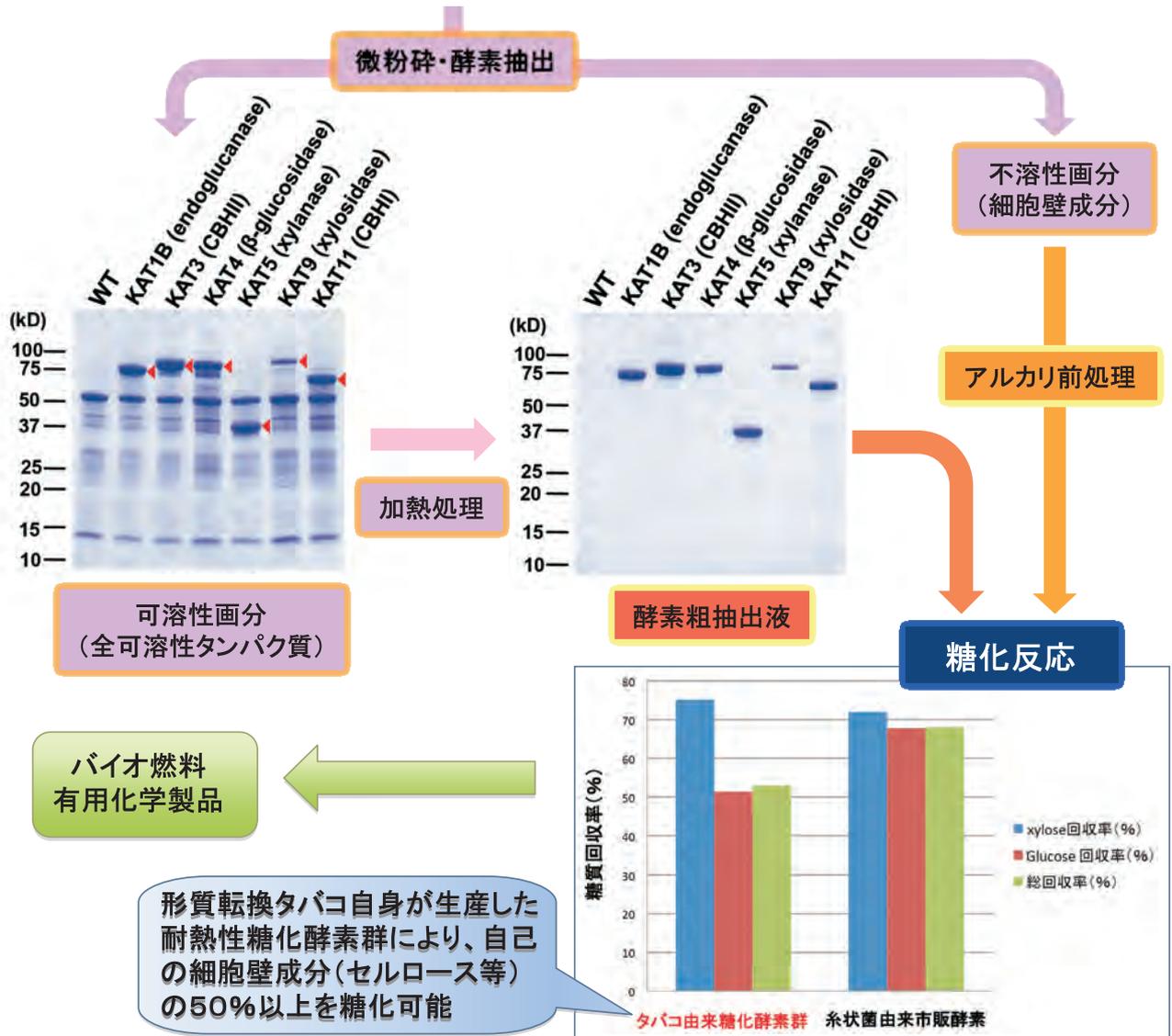
- ①特願2011-8045：糖化酵素を大量発現する植物及びそれを用いたバイオマス糖化法：京都府立大学法人、株式会社耐熱性酵素研究所
- ②鹿島 康浩、四方 孔：高温下で機能する酵素：化学工学 73:320-323 (2009)
- ③Shiina Y *et al.*: Function and evolution of plastid sigma factors: Plant Biotechnology 26: 57-66 (2009)

■研究成果の具体的図表

葉緑体工学を用いた自己糖化型エネルギー作物の開発



耐熱性糖化酵素を発現する葉緑体形質転換タバコ



■研究課題名

ウシ用胎盤剥離誘導製剤の開発と繁殖機能への影響の解明

■研究の目的

深夜の分娩介護による労働負担の軽減化や分娩介護の適正化による子牛損耗率の低減のために、生産現場では胎盤停滞を伴わない分娩誘導技術が求められている。本課題では、胎盤剥離誘導物質として新規に発見した物質（KETE）を安価に大量合成して製剤化する技術を開発し、それを用いて農家の希望する日の昼に胎盤停滞を伴わずに分娩誘導する技術を開発する。さらに使用後の生産物及び繁殖機能への影響も明らかにする。

■研究項目・実施体制（◎は研究代表者）

- ①ウシ用胎盤剥離誘導製剤の実用技術の開発
（◎鎌田八郎／（独）農研機構 畜産草地研究所）
- ②ウシ用胎盤剥離誘導物質の大量製造技術の構築
（高橋克成／共立製薬株式会社（旧川崎製薬株式会社））
- ③ウシ用胎盤剥離誘導製剤の開発
（貝 健三／共立製薬株式会社）
- ④ウシ用胎盤剥離誘導製剤の繁殖機能への影響の解明
（松井義貴／北海道立総合研究機構 根釧農業試験場）
- ⑤ウシ用胎盤剥離誘導製剤を用いた昼分娩誘導技術の開発
（桜井由絵／北海道立総合研究機構 畜産試験場）



鎌田八郎

■研究の内容・主要な成果

- ①胎盤剥離誘導物質の高純度大量合成を有機合成法及び酵素合成法で達成した。
- ②胎盤剥離誘導物質を製剤化することにより長期の安定性を実現した。
- ③自然分娩時母ウシ血中に胎盤剥離誘導物質を生体内シグナルとして見いだした。
- ④乳用牛および肉用牛において原薬及び製剤の胎盤剥離誘導活性を確認した。
- ⑤胎盤剥離誘導物質の使用が分娩後の繁殖機能、生理機能に影響がないことを確認した。
- ⑥ホルモン（プロスタグランジン（PG）、デキサメタゾン（Dex）など）による分娩誘起と夜間給餌の組み合わせにより、希望する日の通常労働時間内分娩を80%の確率で達成した。
- ⑦胎盤剥離誘導物質の代謝はきわめて早く、生産物への移行もないことを確認した。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

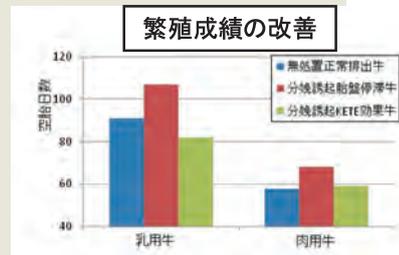
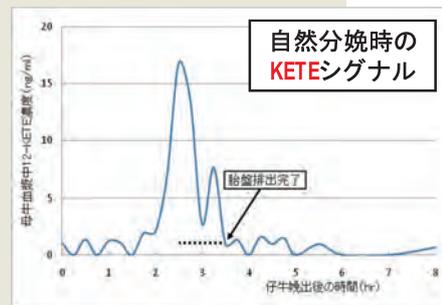
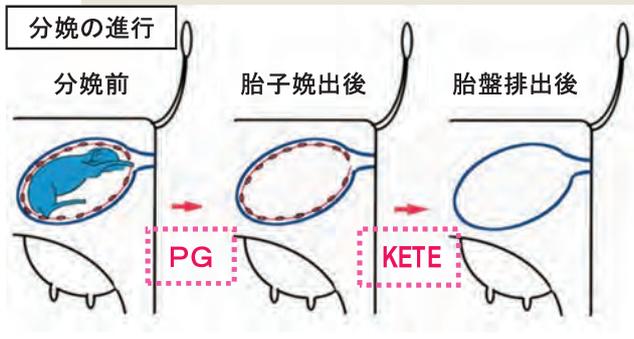
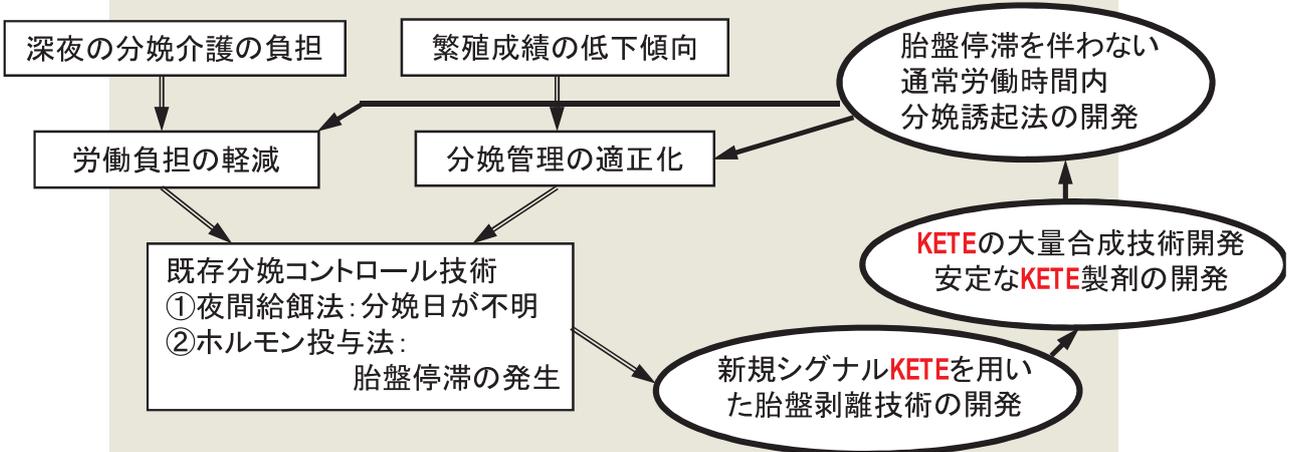
- ①動物用医薬品としての製品開発が見込まれる。
- ②通常労働時間内の分娩介護が可能となり農家の労働負担が軽減する。
- ③分娩介護が容易になり、適切な介護により子牛の損耗率が減少する（1%の改善で10億円以上の経済効果）。

■公表した主な特許・論文

- ①特願2010-192723：胎盤停滞の発生子測法：（独）農業・食品産業技術総合研究機構、北海道立総合研究機構
- ②特願2010-208325：アラキドン酸の臍帯注入による胎盤排出方法：（独）農業・食品産業技術総合研究機構、北海道立総合研究機構

■研究成果の具体的図表

ウシ用胎盤剥離誘導剤の開発と繁殖機能への影響の解明



高純度KETEの大量合成技術の確立



健全な産後の回復



KETEにより剥離排出された胎盤



KETE製剤化による長期の安定性確立



健全な子牛の誕生



労働負担の軽減と繁殖成績の向上が望める。

■研究課題名

海性バイオマス（アルギン酸）からのエタノール生産基盤

■研究の目的

体腔形成細菌 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株におけるアルギン酸代謝系の解析、エタノール耐性機構の解析、アルギン酸からのエタノール合成系の代謝工学的解析、並びに育種菌株の培養工学的解析により、海性バイオマス（褐藻アルギン酸）からのエタノール生産基盤を構築する。また、窒素固定細菌による大気窒素と廃グリセロールからのアルギン酸生産系を確立し、低環境負荷型エタノール生産系の実現を目指す。これにより、アルギン酸からのエタノール生産法を確立し、その実際の応用への道筋を明確にする。

■研究項目・実施体制（◎は研究代表者）

- ①体腔形成細菌によるアルギン酸からのエタノール生産基盤
（◎村田幸作／京都大学農学研究科）
- ②褐藻アルギン酸の分離・調製
（佐藤信行／株式会社マルハニチロホールディングス 中央研究所）



村田幸作

■研究の内容・主要な成果

- ①海性バイオマス利活用に関する国内外の動向を調査し、A1株を用いたアルギン酸からのエタノール生産法が有望であることを明確にした。また、コンブとアカモクがアルギン酸供給源となり得ることを明らかにした。
- ②分子育種したA1株を用いてアルギン酸からのエタノール生産（生産性：13g/ℓ）基盤を確立した。
- ③窒素固定細菌によるアルギン酸生産法及びアルギン酸以外の褐藻含有多糖のエタノールへの転換法を確立した。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

食資源と競合しない海性バイオマスのエタノールへの転換により、地球温暖化問題と化石エネルギー代替問題など地球レベルの問題解決への寄与、並びに海洋利用と海洋産業の拡大とそれによる雇用の創出などが期待される。アルギン酸代謝系における酸化・還元系の解析とエタノール耐性の更なる強化により、エタノール生産性の大幅な増大が期待される。

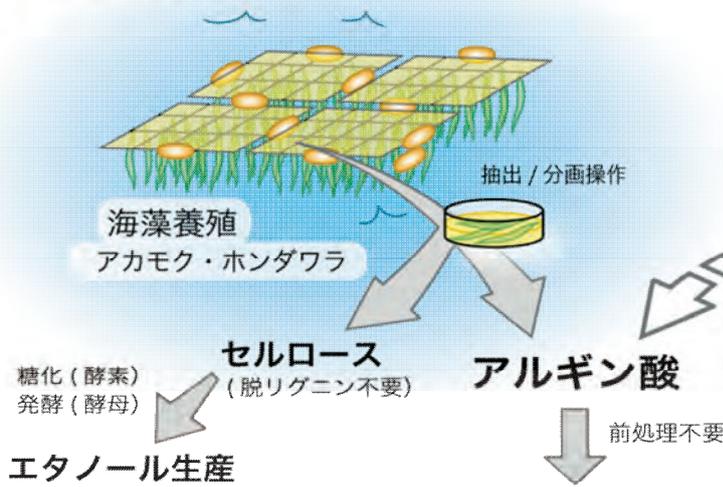
■公表した主な特許・論文

- ①特願2009-198972 PCT/JP2010/064383：海洋バイオマスからのエタノール生産：国立大学法人京都大学・株式会社マルハニチロホールディングス
- ②W. Hashimoto *et al.*: Substrate recognition by family 7 alginate lyase from *Sphingomonas* sp. A1. *J. Mol. Biol.*, 380 (2), 373-385 (2008).
- ③A. Ochiai *et al.*: Structural determinants responsible for substrate recognition and mode of action in family 11 polysaccharide lyases. *J. Biol. Chem.*, 284 (15), 10181-10189 (2009).
- ④K. Ogura *et al.*: Crystal structure of family 14 polysaccharide lyase with pH-dependent modes of action. *J. Biol. Chem.*, 284 (51), 35572-35579 (2009).
- ⑤A. Ochiai *et al.*., Kousaku Murata: Crystal structure of exotype alginate lyase Atu3025 from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Biol. Chem.*, 285 (32), 24519-24528 (2010).

■研究成果の具体的図表

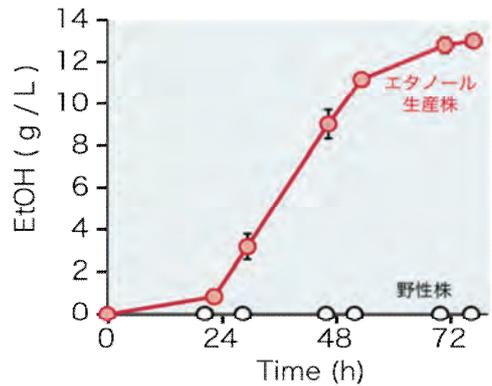
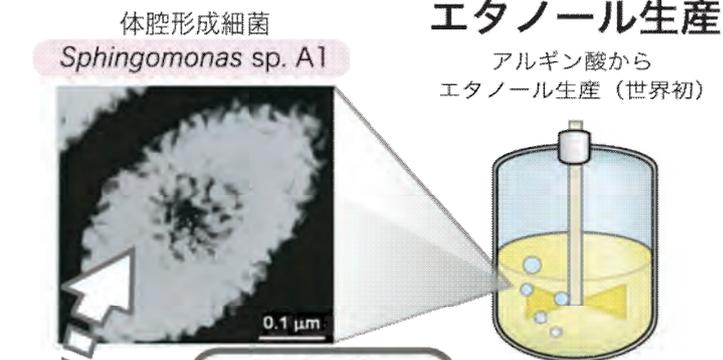
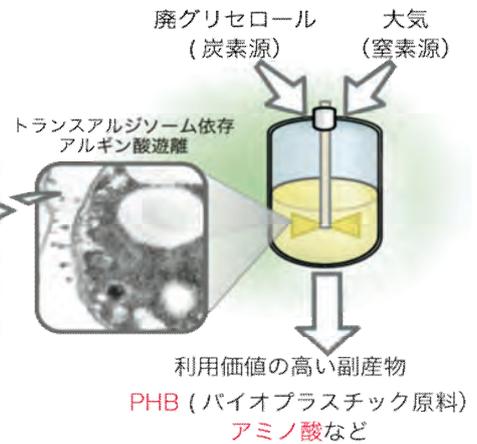
海性バイオマス（アルギン酸）からのエタノール生産基盤

～陸から海へ～



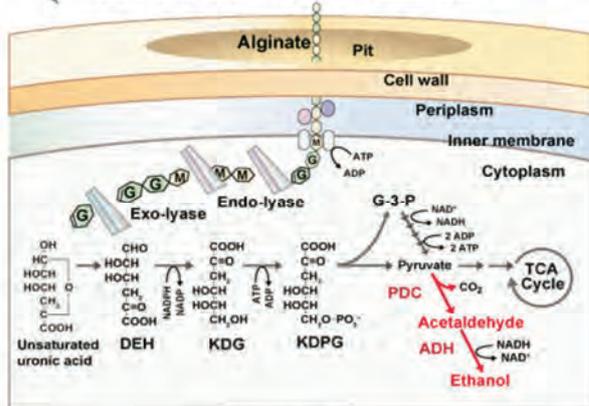
窒素固定細菌（アルギン酸生産菌）

Azotobacter vinelandii



細胞改造

代謝経路改変→エタノール生産可能に

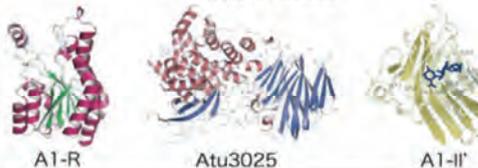


培養3日間で 13g/L エタノールを生産



培養液のガスクロマトグラム

代謝経路解明

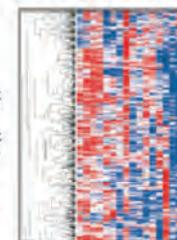


代謝産物網羅的解析

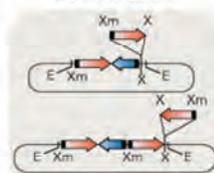
副産物合成経路遮断



高発現プロモーター探索



マルチコピー遺伝子挿入



■研究課題名

環境負荷低減技術によるキチン系バイオマス資源の高度利用

■研究の目的

メカノケミカル粉碎処理と酵素糖化法の組み合わせによりキチンの糖化率は著しく向上する。本研究では、キチン質から直接N-アセチルグルコサミン（単糖）やキチン二糖を製造するバイオプロセスを構築する。キチン二糖を出発原料にして高級キチンオリゴ糖類の量産技術を開発する。単糖、二糖・オリゴ糖類の新たな生理活性とその発現機構を解明する。

■研究項目・実施体制（◎は研究代表者）

- ①メカノケミカル粉碎および酵素糖化に関する基盤技術の確立
（◎戸谷一英／（独）国立高等専門学校機構 一関工業高等専門学校）
- ②メカノケミカル連続粉碎システムの開発
（猪股尚治／株式会社アーステクニカ）
- ③酵素糖化法による製造技術の開発
（又平芳春／焼津水産化学工業株式会社）
- ④キチンオリゴ糖および短鎖キチンの量産技術の開発
（碓氷泰市／静岡大学）
- ⑤アミノ糖の新機能 — オートファジー誘導能の評価と機構解明
（芦田 久／京都大学）
- ⑥N-アセチルグルコサミンの生理活性発現機構の解明と臨床評価
（和田政裕／城西大学）



戸谷一英

■研究の内容・主要な成果

- ①メカノケミカル粉碎と酵素糖化の最適化。水熱処理+粉碎により酵素糖化率90%を実現。酵素糖化機構の推定。
- ②100Lコンバージミル連続粉碎システム（処理量10kg/day、糖化率60%以上、非晶質化モニター入）を完成。
- ③食用キチン分解酵素を試作評価。単糖、二糖を原料10kgより生産試験し生産コストと安全性を評価した。
- ④オリゴ糖の重合度別分析・量産技術を確立。細胞障害性免疫担当細胞の活性化を確認。単糖の誘導体化確立。
- ⑤グルコサミン塩酸塩やキトサンオリゴ糖にmTOR非依存性のオートファジー誘導活性を見出した。
- ⑥DNAマイクロアレイでGlcNAcとGlcNの生理作用が異なり、GlcNAcは骨密度増加および皮膚水分量増加作用があることを明らかに。ヒト臨床試験においてGlcNAcの肌水分量増加作用を確認できた。

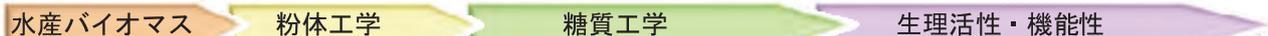
■今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①地球環境に優しく国民生活の質（QOL）向上に資する高付加価値アミノ糖の汎用性に富む製造技術を開発する。
- ②N-アセチルグルコサミンの大幅なコストダウンと機能性拡大を実現し、製品競争力を強化する。
- ③単糖、キチン二糖、オリゴ糖類は新機能を見だし新たな産業分野を創出する。

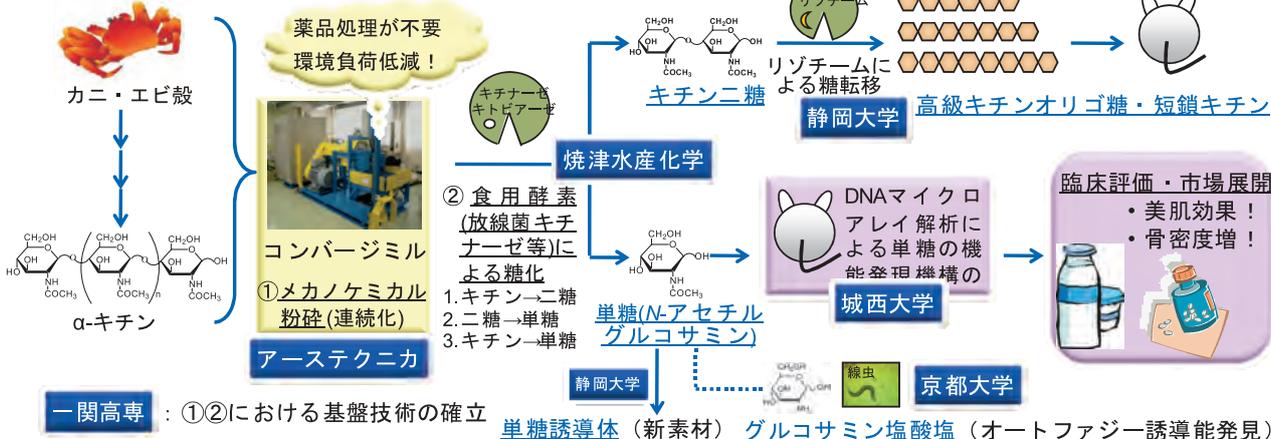
■公表した主な特許・論文

- ①Shintani T., *et al.*: Glucosamine induces autophagy via an mTOR-independent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 391: 1775-1779 (2010).
- ②Ogata M., *et al.*: Novel and facile synthesis of furanodictines A and B based on transformation of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose into 3,6-anhydrohexofuranoses. *Carbohydr. Res.*, 345: 230-234 (2010)
- ③Nakagawa Y. S., *et al.*: Development of innovative technologies to decrease the environmental burdens associated with using chitin as a biomass resource: mechanochemical grinding and enzymatic degradation. *Carbohydr. Polym.*, 83: 1843-1849 (2011)
- ④特許公開2010-178642：高級N-アセチルキトオリゴ糖の製造方法：焼津水産化学工業、静岡大学
- ⑤特許公開2010-190746：キチン結晶化度測定装置：アーステクニカ、国立高等専門学校機構
- ⑥特許出願2010-144174：キチン分解物の生成方法：国立高等専門学校機構

■研究成果の具体的図表



異分野融合型・農工連携技術



1. メカノケミカル連続粉砕自動化システム

原料キチン → ① → ② → ③ → ④ → ⑤ でメカノケミカル連続粉砕 (粉末収量95%、処理量10kg/day、糖化率60%以上)

① ブランジメ部
② 研磨木屑ドラム (100L)
③ 吸引回収
④ 非晶質判定
⑤ ミスト噴霧冷却

メカノケミカル連続粉砕システム

2. α-キチンの前処理と物性変化

前処理方法	粒子径 [μm]	結晶化度 [%]	糖化率 [%]
未粉砕	244	91	10
メカノケミカル粉砕 (30 min)	22	42	60
超臨界水処理 (400°C, 1 min)	3,000	89	37
超臨界水処理 (400°C, 1 min) + メカノケミカル粉砕 (10 min)	18	26	93
濃塩酸処理 (コロイダルキチン)	1	82	100
ナノファイバーキチン	N.D.	85	34

◆ 超臨界水処理 + 粉砕で糖化率90%以上へ!
◆ プロテアーゼにも糖化促進効果あり!

3. 単糖・二糖の製造と安全性試験

腸管吸収試験

キトビアーゼ
キチナーゼ (Streptomyces griseus)

単糖 (GlcNAc) 二糖 (GlcNAc₂)

単糖・二糖の安全性

- ① 復帰突然変異試験陰性
- ② LD₅₀値 2,000mg/kg以上

4. キチンオリゴ糖・新素材の創成

二糖の高重合度キチンオリゴ糖への酵素変換

単糖の化学変換

卵白リゾチーム + ワンボット合成

自己組織化

抗酸化活性

生理活性物質の骨格構造

甘味料

『動物・植物免疫賦活作用』

5. グルコサミンの新たな生理機能の発見

～オートファジー誘導活性～

オートファジー (自食作用)

LC3-II, LC3-I, Actin

COS7細胞

線虫 C. elegans

1: None, 2: GlcN, 3: GlcNAc, 4: Trehalose

飢餓時応答 感染防御 抗原提示 神経変性疾患予防 老化抑制

6. N-アセチルグルコサミンの機能発現と臨床評価

安全性確認

解糖系 / 糖新生

骨密度増加作用

Cont. GlcNAc GlcN·HCl

皮膚の水分量増加作用

角層水分量

ブラセボ GlcNAc GlcN·HCl

GlcNAc:

- ◆ II型糖尿病化リスク低い
- ◆ マウス大腿骨密度増加!
- ◆ 健常者臨床試験
- 頬の角層水分量増加!!

■研究課題名

絹の高機能化による再生医療材料創製システムの構築

■研究の目的

高齢化社会に向け急務な再生医療材料、特に小口径人工血管を、絹をベースに開発する。そのため、絹の一次構造改変技術、最適化のためのプロセッシング技術、構造・物性評価のための高度解析技術、再生医療材料評価技術、を基盤とした再生医療材料創製システムを構築、それを活用して小口径絹人工血管の作製と動物への移植による評価を繰り返すことによって、ヒトへの移植可能な小口径絹人工血管の実用化を目指す。さらに、本システムを活用して創傷被覆用絹フィルムの開発を行う。

■研究項目・実施体制（◎は研究代表者）

- ①再生医療材料開発のための絹基盤技術のシステム化とヒト用絹人工血管の開発
（◎朝倉哲郎／東京農工大学大学院工学研究院）
- ②ヒト用絹人工血管の動物実験による評価
（佐田政隆／徳島大学）



朝倉哲郎

■研究の内容・主要な成果

- ①絹糸の管状編みとコーティング処理を組み合わせ、物性ならびに動物の移植成績の優れた小口径絹人工血管（3-4mm径）を開発した。
- ②エレクトロスピンニング法によって、より小口径（1.5mm径）で、より血管に近い物性を有する絹人工血管を作製、ラットでの移植評価実験によって良好な成績を得ることができた。
- ③細胞接着配列を導入した高機能化絹フィルムを作製、優れた創傷被覆フィルムであることを、ラットでの移植実験によって実証した。
- ④高機能化絹を生産するトランスジェニック（TG）カイコの系統保存を行った。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

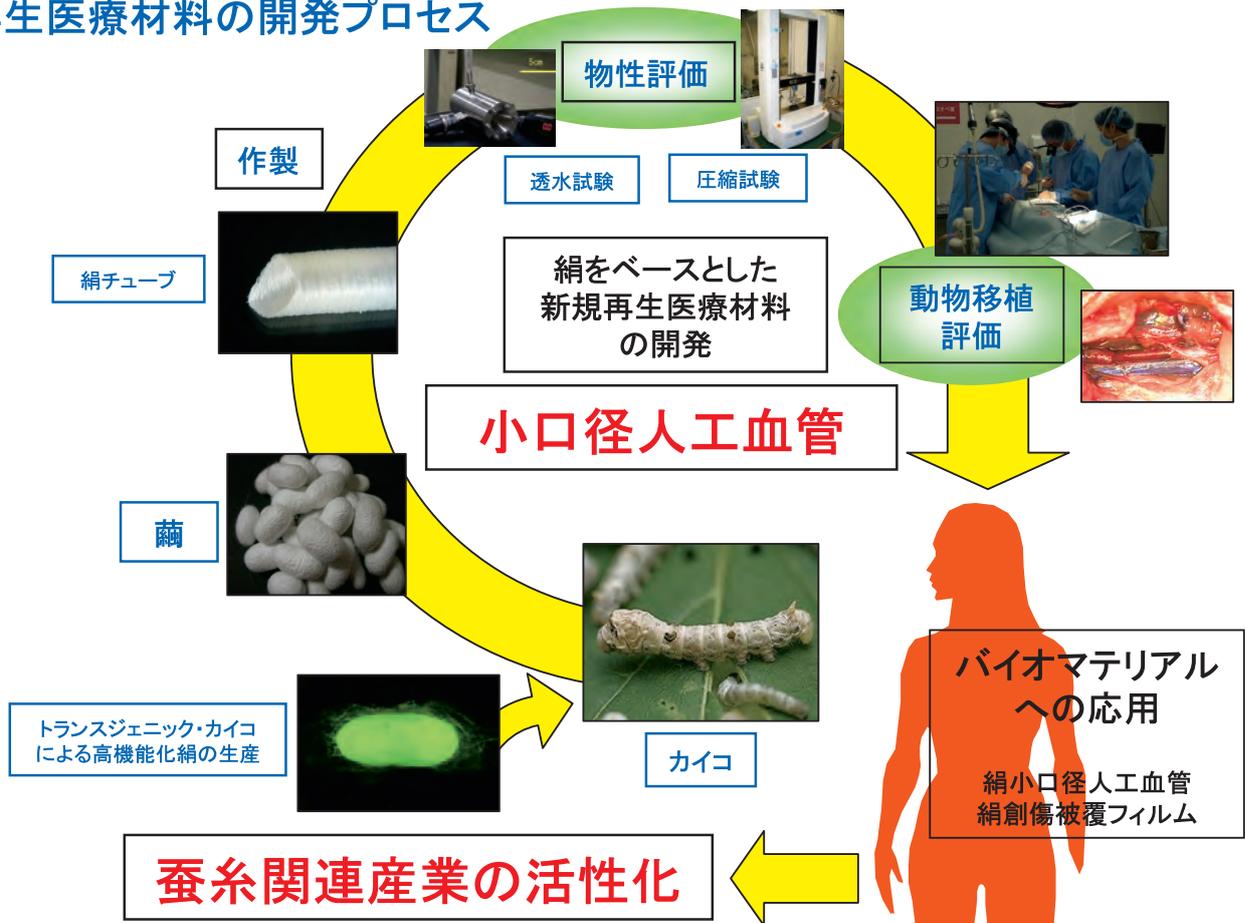
本研究で開発してきた小口径人工血管の作製と評価技術によって、これまで高い需要があるにもかかわらず、実質的に開発がなされていない小口径人工血管について、絹をベースとして開発・市販できる可能性が大きい。さらに、TGカイコでの高機能化絹の生産によって、高機能化絹をベースとした優れた再生医療材料が開発され、養蚕業や関連産業の活性化にも大きく貢献すると期待される。

■公表した主な特許・論文

- ①特願2010-291983：人工血管の製造方法：国立大学法人東京農工大学
- ②Sata M. et al, Periadventitial adipose tissue plays a critical role in vascular remodeling. *Circ. Res.* 105, 906-911 (2009).
- ③Enomoto S, Sata M. et al., Long-term Patency of Small-diameter Vascular Graft Made from Fibroin, a Silk-based Biodegradable Material. *J. Vasc. Surg.*, 51, 155-164 (2010).
- ④Asakura T. et al., Mechanical Properties of Regenerated *Bombyx mori* Silk Fibers and Recombinant Silk Fibers produced by Transgenic Silkworms. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 21, 395-411 (2010).
- ⑤Asakura T. et al., Small-diameter vascular grafts of *Bombyx mori* silk fibroin prepared by a combination of electrospinning and sponge coating. *Mater. Lett.*, 64, 1786-1788 (2010).
- ⑥Nakazawa Y, Asakura T. et al., Development of Small-Diameter Vascular Grafts based on Silk Fibroin Fibers from *Bombyx mori* for Vascular Regeneration. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 22, 195-206 (2011).

絹の高機能化による再生医療材料創製システムの構築

再生医療材料の開発プロセス



主な成果

①管状編みとコーティング処理による小口径絹人工血管(3-4mm径)の開発

②エレクトロスピニング(ES)法による、小口径(1.5mm径)絹人工血管の開発 (より実際の血管に近い物性)

③創傷被覆用高機能化絹フィルムの開発

■研究課題名

CRES-T法を基盤とした花きの高度形質制御技術の実用化

■研究の目的

植物独自の転写因子機能抑制技法であるCRES-T法（Chimeric REpressor gene-Silencing Technology）を基盤に、花色と花形に特化した形質改変技術および新規で優位性の高い不稔化技術の開発と実用化を進めることで、花粉の形成を最小限に抑えた全く新しい形質を持つ商品性の高い花きを作成する。組換え花きの実用化を進める一方、情報を様々な形で発信・提供し、組換え作物研究の技術的な底上げと国民理解の促進をはかる。

■研究項目・実施体制（◎は研究代表者）

- ①花卉配色パターン制御技術の実用化と汎用不稔化ベクターの開発
（◎大坪憲弘／（独）農研機構 花き研究所）
- ②花きの形質改変に特化した転写因子制御技術の開発とデータベースシステムの構築
（光田展隆／（独）産業技術総合研究所生物プロセス研究部門）
- ③変化朝顔の再現を通じた遺伝子組換え技術の教育的・文化的理解の促進
（小野道之／筑波大学）
- ④リンドウを用いた在来種花き組換え体の実用化技術の開発
（西原昌宏／（財）岩手生物工学研究センター）
- ⑤花器官形成遺伝子の局所的制御による多弁化・不稔化同時制御技術の実用化
（寺川輝彦／北興化学工業株式会社）
- ⑥CRES-T法のリソースを活用したバラ、カーネーションの新品種開発
（田中良和／サントリーホールディングス株式会社）



大坪憲弘

■研究の内容・主要な成果

- ①CRES-T法がキク、バラ等高次倍数体を含む各種花き園芸植物の花形等改変に利用できることを証明した。
- ②50種類の転写因子の有用性を一度に確認できるコレクティブ・トランスフォーメーション（CT）法を確立した。
- ③八重咲き形質の付与と不稔化を同時に実現する技術を確認し、商品性の高い多弁咲きシクラメンを作成した。
- ④遺伝子組換えでは形質改変の難しかったリンドウで新規花色の付与やバイカラー化に成功した。
- ⑤CRES-T法を用いて「失われた変化朝顔」数種の再現に成功し、教育的な情報発信のツールを提供した。
- ⑥データを共有や遺伝子解析、情報収集を目的としたデータベースシステム「FioreDB」を公開した。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①「多弁咲きシクラメン」を世界初の組換え鉢花として実用化する。これにより大きな経済効果が期待される。
- ②CT法は形質付与とバラエティ化を効率化し、様々な花き園芸品種での組換え体作出と実用化を促す。
- ③データベース（FioreDB）は関連研究者間での情報交換とリソース共有を促進し、科学技術の発展に貢献する。
- ④CRES-T法があらゆる作物の形質改良に利用され、実用性の高い新規作物が多数開発される。

■公表した主な特許・論文

- ①特願2009-286703：多弁咲きシクラメンの生産方法：北興化学工業（株）、（独）産業技術総合研究所
- ②Shikata, M., *et al.* Efficient production of novel floral traits in torenia by collective transformation with chimeric repressors of *Arabidopsis* transcription factors. *Plant Biotechnol.* 28: (2011)
- ③Mitsuda, N., *et al.* The new FioreDB database provides comprehensive information on plant transcription factors and phenotypes induced by CRES-T in ornamental and model plants. *Plant Biotechnol.* 28: (2011)
- ④Nakatsuka, T., *et al.* (2011) Production of picotee-type flowers in Japanese gentian by CRES-T. *Plant Biotechnol.* 28: (2011)
- ⑤Sage-Ono, K., *et al.* Induction of double flowers in *Pharbitis nil* using a class-C MADS-box transcription factor with Chimeric REpressor gene-Silencing Technology. *Plant Biotechnol.* 28: (2011)

■研究成果の具体的図表



CRES-T法の各種花きでの利用技術の開発

教育的・文化的発信

実用化

基礎研究への還元

国民理解の促進

商品性の高い花きの作出

学術情報の集積と提供(FioreDB)



■研究課題名

抗疲労作用のある新規高アントシアニン茶品種育成と利用食品開発

■研究の目的

高齢化が進む中、健全な食生活による健康寿命の延伸や生活習慣病リスクの高い人を対象とした高機能性食品に対する国民の期待が高まっている。そこで、本研究では、安全で科学的根拠の明らかな新規抗疲労・ストレス高アントシアニン茶品種の育成、それをを用いた飲食品素材の開発・提供を行い、疲労・ストレス症状の軽減、疲労・ストレスから起こる生活習慣病の予防、茶産地の活性化・新興化、新食品産業の振興化をはかることを目的とする。

■研究項目・実施体制 (◎は研究代表者)

- ①抗疲労・ストレス効果をもつ茶品種育成と有効成分利用技術の開発
(◎山本(前田)万里 / (独)農研機構 野菜茶葉研究所)
- ②抗疲労・ストレス茶品種の短期大量生産技術の開発
(村上 章 / 株式会社日本製紙グループ本社)
- ③抗疲労・ストレス茶成分の作用機構の解明とその分子的基盤の確立
(立花宏文 / 九州大学)
- ④抗疲労・ストレス成分の代謝吸収の解析と安全性の評価
(村上 明 / 京都大学)
- ⑤抗疲労・ストレス成分高含有茶品種を活用した新食品素材の開発
(佐見 学 / アサヒビール株式会社)



山本(前田)万里

■研究の内容・主要な成果

- ①高アントシアニン茶品種「サンルージュ」を品種登録申請し(写真1)、茶期別、熟度別、製造法別アントシアニン含有率変動を明らかにし、徳之島での栽培試験を開始した。
- ②発根培養時に小型のセルトレーを用いることで、現有の培養室において年間11万本の発根培養を行う方法を確立するとともに独自設計のセルトレーを考案、製作し、育苗が良好であることを確認した(写真2)。
- ③「サンルージュ」に血管弛緩作用を見出すとともに、その作用機序を明らかにした(図1)。
- ④マウス大腸炎惹起モデルで起こる肝臓障害によりアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)値が上昇する。「やぶきた」抽出液は無効であるが、「サンルージュ」抽出液はその上昇を有意に抑制した(図2)。
- ⑤「サンルージュ」に含有されるアントシアニン類を10種単離・精製・同定した。
- ⑥ヒト介入試験(RCT)にて「サンルージュ」の眼精疲労に対する有効性を検証した(図3)。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①「サンルージュ」茶葉を利用した様々な食品への応用と産地拡大・活性化、低カフェイン「サンルージュ」茶葉の生産、栽培・加工マニュアル作製、赤い緑茶(リーフ)として海外への輸出
- ②多品種の茶成分を対象としたメタボリック・プロファイリングの分析結果は、茶成分の質量データベースとして茶の機能性成分の同定への応用

■公表した主な特許・論文

- ①茶品種「サンルージュ」：第23800号：(独)農研機構、日本製紙
- ②育苗容器：特願2009-254634：日本製紙
- ③筋萎縮阻害剤：特願2010-044113：国立大学法人九州大学
- ④Kurihara, K. et al.: Inhibitory Effect on Thrombin-induced Myosin Light Chain Phosphorylation by An extract of new green tea cultivar in A7r5 rat aortic smooth muscle cells: *Food Sci. Tech. Res.*, 16 (3): 263-266 (2010)

■研究成果の具体的図表



写真1 「サンルージュ」の三番茶新芽
茎にもアントシアニンが多く利用可能



写真2 セル成型苗
旺盛に発根している

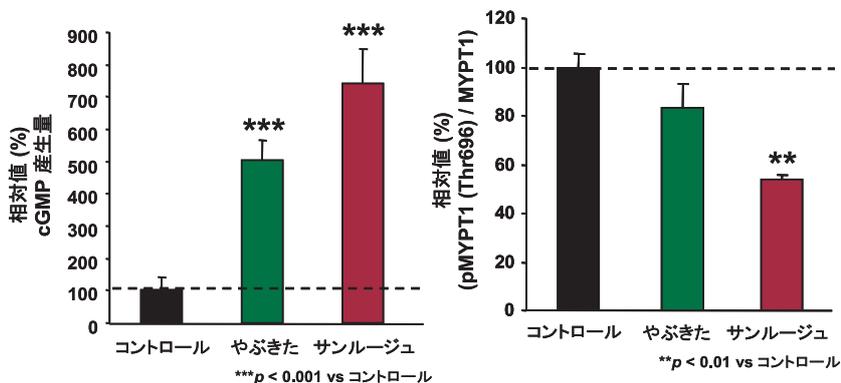


図1 「やぶきた」および「サンルージュ」の各抽出物のヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)における強力なサイクリックグアノシンリン酸(cGMP)産生誘導能ならびにミオシン軽鎖(MRLC)脱リン酸化酵素活性化(MYPT1脱リン酸化)作用

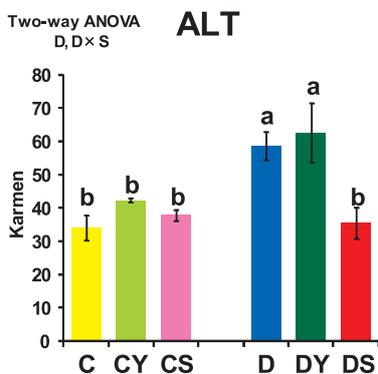


図2 マウス肝機能マーカーへの「やぶきた」と「サンルージュ」の対照的な作用性

デキストラン硫酸塩(DSS)投与によって肝臓障害が起こり、ALT値が上昇する(青バー)。やぶきた(緑バー)は無効であるが、サンルージュ(赤バー)はこれを抑制する。

C:無処理、 CY:やぶきた CS:サンルージュ
D:3%DSS、 DY:3%DSS+やぶきた、 DS:3%DSS+サンルージュ

Bars not sharing letter differ, p < 0.05

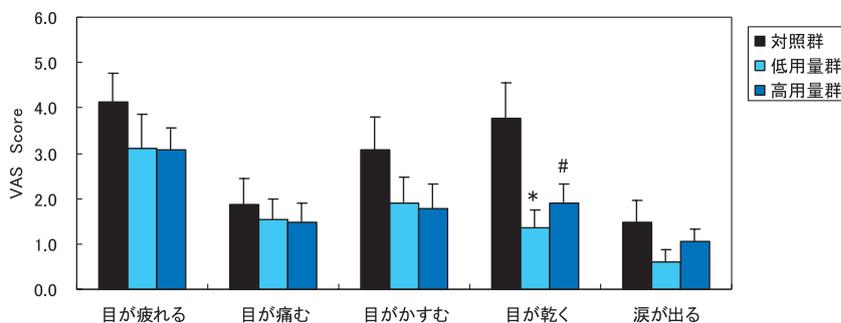


図3 「サンルージュ」摂取28日目のVDT(画像表示端末)作業負荷後におけるVAS(視覚的アナログスケール)のスコア

対照群:「やぶきた」緑茶 2g/日、低用量群:「サンルージュ」緑茶 2g/日、高用量群:「サンルージュ」緑茶 4g/日

■研究課題名

草原短角牛の造成と産肉機構ならびに肉質特性の解明

■研究の目的

優れた産肉性を有する日本短角種DM形質牛（草原短角牛、登録商標：No. 5270386）を「健康ビーフ」資源として位置付け、赤肉増産の新規な生産システムの開発に先鞭を付けるものである。本研究では、実用化に向けた草原短角牛の造成法の確立と草原短角牛での粗飼料多給を主体とする短期肥育法の開発、省エネルギー産肉性の生体機構の解明、「低脂肪で柔らかい肉質」の特徴と健康性、消費者のニーズと実用化に向けた消費者の動向を解明する。

■研究項目・実施体制（◎は研究代表者）

- ①草原短角牛の造成と産肉機構の解明
（◎山口高弘／東北大学大学院農学研究科）
- ②草原短角牛の赤肉質の特徴と健康性の解明
（滝川幸人／全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所）



山口高弘

■研究の内容・主要な成果

- ①草原短角牛の造成と産肉機構の解明
 - A：草原短角牛の造成法の確立と肥育特性の解明
草原短角牛基礎牛群を実用規模牛群に拡大造成することに成功した。
粗飼料多給型短期肥育技術によって草原短角牛が生産可能であることを実証した。
 - B：草原短角牛の省エネルギー産肉特性の機構解明
産肉能力を調節するミオスタチンの筋細胞内シグナル伝達調節機構を解明した。
草原短角牛の筋細胞は糖代謝能とタンパク質蓄積能に優れていることを明らかにした。
- ②草原短角牛の赤肉質の特徴と健康性の解明
粗飼料多給型短期肥育技術によって生産された草原短角牛肉が通常肥育の牛肉と大差ない肉質を有することを明らかにした。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①草原短角牛の造成と産肉機構の解明
粗飼料多給型短期肥育技術の環境負荷軽減効果を明確にし、その技術のマニュアル化を構築することで、国内粗飼料資源を活用した環境にやさしい低コスト赤身牛肉生産が可能となる。
- ②草原短角牛の赤肉質の特徴と健康性の解明
赤身牛肉の特徴的な肉質とその健康性を牛肉の新たな価値観として提示し、国内における健康的な赤身牛肉志向の消費者層をターゲットとして訴求力を持たせる。

■公表した主な特許・論文

- ①草原短角牛の造成と産肉機構の解明
 1. Miyake M., *et al.*, Possible role of TIEG1 as a feedback regulator of myostatin and TGF- β in myoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393: 762-766. (2010)
 2. Miyake M., *et al.*, Myostatin down-regulates the IGF-2 expression via ALK-Smad signaling during myogenesis in cattle. *Animal Science Journal* 81: 223-229. (2010)
 3. Miyake M., *et al.*, TIEG1 negatively controls the myoblast pool indispensable for fusion during myogenic differentiation of C2C12 cells. *Journal of Cellular Physiology*, (2011)
- ②草原短角牛の赤肉質の特徴と健康性の解明
 1. 滝川幸人, *et al.*, 粗飼料多給短期肥育による日本短角種の肉質特性、肉用牛研究会報、(2011).

研究成果の具体的図表

草原短角牛の牛群造成

基礎牛群 16頭
種雄牛2頭 繁殖雌牛14頭

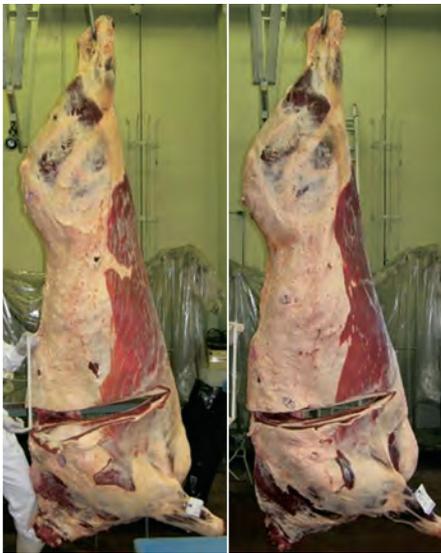


造成牛群 73頭
種雄牛3頭 繁殖雌牛20頭
ET産子30頭 自然交配産子20頭



- ◎草原短角牛と日本短角種牛のET生産
 - ・黒毛和種牛と同等の成績でET生産が可能。
 - ・1頭につき1回5頭の妊娠牛
 - ・分娩率72%
- ◎分娩管理のポイント
 - ・F1初妊牛(ホルスタイン×黒毛)は生時体重40kgまでは自然分娩可能。
 - ・予定日より1週間後まで分娩猶予期間を置く。

粗飼料多給型短期肥育技術



日本短角種牛
粗飼料多給区
20ヶ月齢

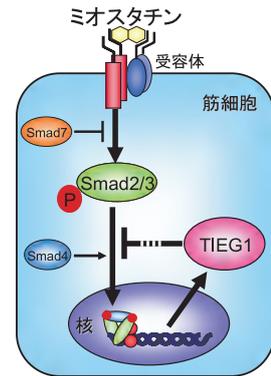
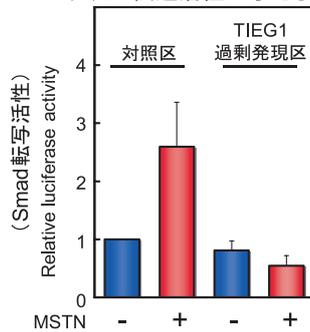
日本短角種牛
通常肥育区
20ヶ月齢



- ・粗飼料多給型短期肥育(濃厚飼料は体重の0.5%)は通常肥育(濃厚飼料は体重の1.5%)に比べて、濃厚飼料使用量が少なく、飼養期間も短いので低コストの牛肉生産ができる。
- ・枝肉重量と格付成績には差はなく、良質の赤身牛肉の生産が可能である。

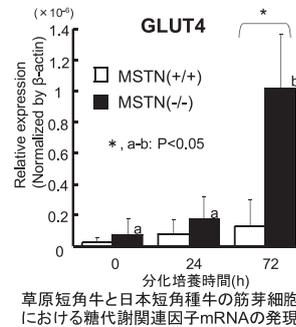
ミオスタチンのシグナル伝達調節機構

TIEG1過剰発現がミオスタチンシグナル伝達活性に与える影響

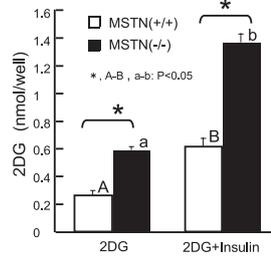


ミオスタチンの細胞内シグナル伝達は、ミオスタチンで誘導されるTIEG1によってネガティブフィードバックを受ける。(TIEG1: TGF-β Inducible Early Gene 1)

草原短角牛のエネルギー代謝特性



草原短角牛と日本短角種牛の筋芽細胞における糖代謝関連因子mRNAの発現



草原短角牛と日本短角種牛由来筋芽細胞における糖の取り込み能

草原短角牛の筋細胞はグルコース輸送担体 (GLUT4) の発現が高く、糖の取り込みが活発である。また、筋タンパク質分解産物の3-メチルヒスチジン量の放出量が低い。このことから、草原短角牛は産肉能力の高い、赤身肉生産に最適の肉用牛である。

粗飼料多給型短期肥育牛肉の肉質

- 粗飼料多給型短期肥育の日本短角種牛は、低脂肪(脂肪7%)で高タンパク質(粗蛋白質21%)の牛肉を生産する。
- ・通常肥育の牛肉と色、堅さ、栄養成分が同等である。
- ・黒毛和種牛肉に比べて、脂肪は5~7分の1、タンパク質は1.5倍、遊離アミノ酸は2倍で、タンパク質に優れた健康的な牛肉である。

■研究課題名

水産有用甲殻類の難飼育性種苗生産技術の開発

■研究の目的

本研究は、我が国の沿岸漁業資源として重要なイセエビやウチワエビなど難飼育性甲殻類に関する種苗大量生産技術の開発を主目的とする。さらにこの技術に基づいて、イセエビ・ウチワエビ類の種苗生産を新たな産業として創生させ、この生産に関連する餌料生産、流通、加工、販売等の関連産業の活性化実現を目指す。

■研究項目・実施体制（◎は研究代表者）

水産有用甲殻類の難飼育性種苗生産技術の開発
（◎田中祐志／東京海洋大学）



田中祐志

■研究の内容・主要な成果

①難飼育性甲殻類種苗生産技術開発

- ・オオバウチワエビの幼生を、陸上閉鎖循環装置を用い、薬浴に依存せず、粗放的に大量飼育する技術を確立した。これにより、種苗（稚エビ）の安定生産に見通しをつけた。
- ・孵化直後から浮遊幼生期を経て着底までの餌料はクラゲだけで十分と分かり、クラゲの生産および蓄養方法も確立した。
- ・稚エビから成体への育成も可能にした。
- ・イセエビ幼生については、繊細脆弱であり、オオバウチワエビよりも数倍長い浮遊期間を有することから、粗放的大量飼育技術の確立は容易ではなく、種苗安定生産の実現にはなお解決すべき問題を残した。

②難飼育性水産有用甲殻類の種苗生産に関連したビジネスモデルの検討

- ・市場調査の結果、ウチワエビ類は現在限られた地域だけで流通しているが、安定供給が可能となればビジネスの対象として将来有望な種であることを確かめた。
- ・ビジネスモデルとして、(1) エビ養殖に実績を持つ業者への稚エビ出荷、および (2) 稚エビ生産業者ならびに出荷サイズまでの養成業者への知財提供を想定した。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

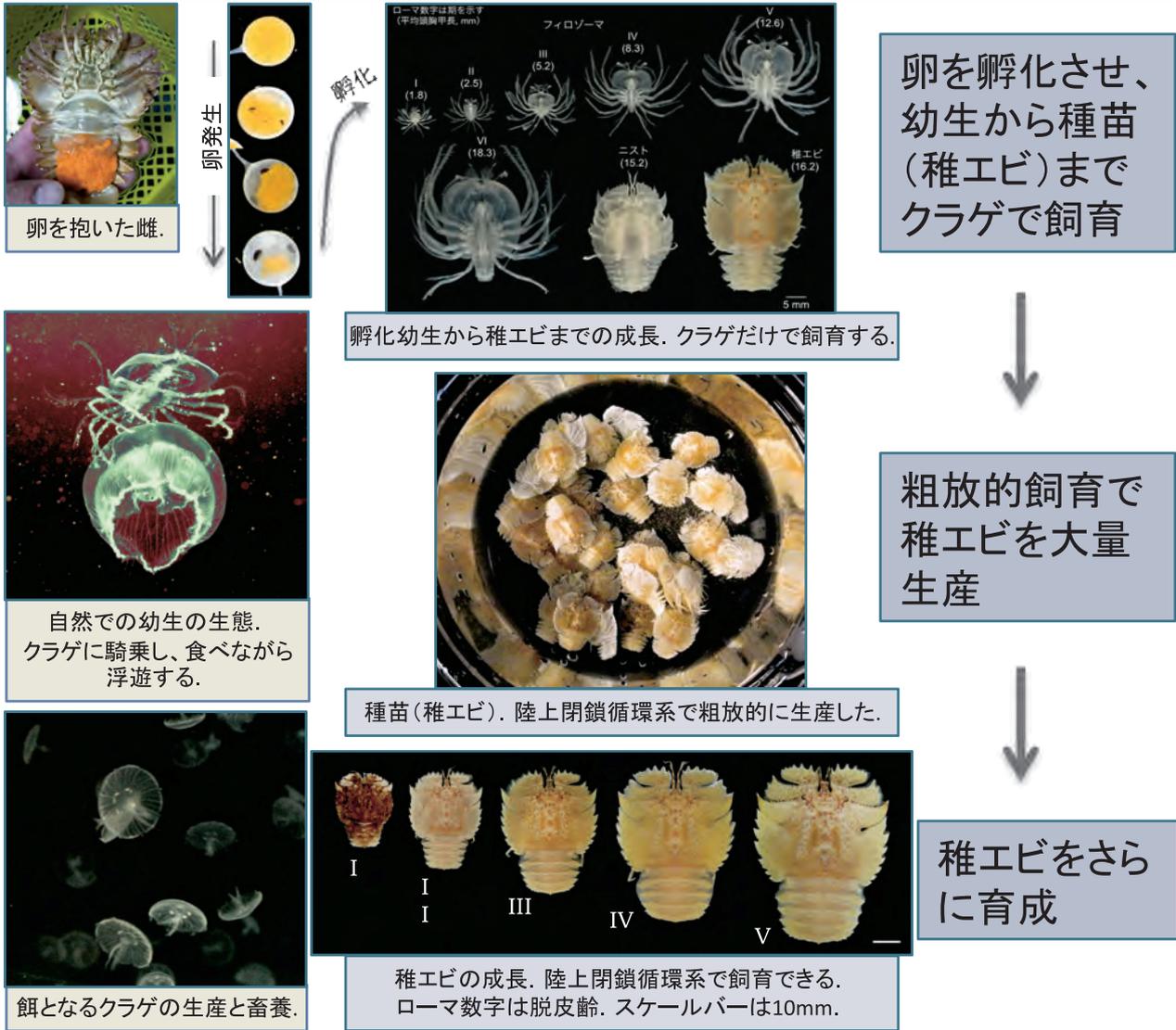
- ①オオバウチワエビに関して、自然の生態を模倣した粗放的大量飼育による種苗生産を産業として実用化する。これにより、地域水産業の活性化と雇用の創出が期待され、種苗生産から派生する餌料生産、流通、加工、販売等の関連産業の活性化も見込まれる。また、各地の遊休設備の再活用を促す可能性もある。さらに、人工（あるいは加工）餌料の開発が進展すれば、発電所取水口で集積され産業廃棄物となるミズクラゲや大量発生して漁網被害等の元凶となる大型クラゲを資源として活用でき、クラゲ類の漁獲と加工が新たな産業になり得ると期待される。
- ②本技術を用いて低コストで安全に生産されるオオバウチワエビについては、食料として良質で商品価値も高いので、種苗生産の請負や、種苗から出荷サイズの成体エビまでの育成請負等の起業を目指す。近縁種で産業的価値の高いセミエビ類やイセエビ類についても類似の技術による種苗大量生産手法の開発が進めることによって、食の持続的供給と地域経済の活性化にさらに貢献できると期待される。

■公表した主な特許・論文

- ①公開番号PCT/JP2008/68954・WO2009/057472：エビ類幼生の人工飼育方法及び飼育装置：国立大学法人東京海洋大学

■研究成果の具体的図表

1. オオバウチワエビ種苗の粗放的生産技術の開発



2. 種苗生産に関連したビジネスモデルの検討

- ① 種苗の出荷・販売(他のエビ養殖に実績を持つ業者向け)
- ② 知財提供(種苗生産業者、出荷サイズまでの養成業者向け)

3. 今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ウチワエビ・セミエビ類の種苗生産の産業化
- ① 地域水産業の活性化、雇用創出
 - ② 関連産業(餌料生産, 流通, 加工, 販売等)の活性化
 - ③ 産業廃棄物となるクラゲを資源として活用→新産業創出
- 経済の活性化と食料の持続的供給に貢献

■研究課題名

味覚受容体をターゲットとした調味ペプチド評価システムの開発とその商品化

■研究の目的

呈味性の評価は被験者による官能検査が主体であり、ヒトの味覚特性に基づく科学的な測定法の開発が望まれている。ここ10年間で味覚分子機構の研究が哺乳動物や昆虫で進展し、ヒト基本味の受容タンパク質とその遺伝子が次々と発見された。そこで本研究課題では高度な遺伝子操作技術を利用できるショウジョウバエを利用して様々なヒト味覚受容体を昆虫に機能的に発現させてその受容体特性を解析することにより、食品の呈味成分をバイオアッセイ法により分析的、客観的に評価する新しいシステムを開発する。

■研究項目・実施体制（◎は研究代表者）

- ①ヒト味覚受容体のショウジョウバエ組換え体の作成と調味ペプチドの検索と評価による調味ペプチド評価システムの開発とその商品化
（◎H20-21：磯野邦夫、H22：駒井三千夫／東北大学大学院農学研究科）
- ②ペプチドライブラリーからの探索と調味ペプチドの分子特性の解析
（鈴木政嗣／株式会社ペプタイトドア）



駒井三千夫

■研究の内容・主要な成果

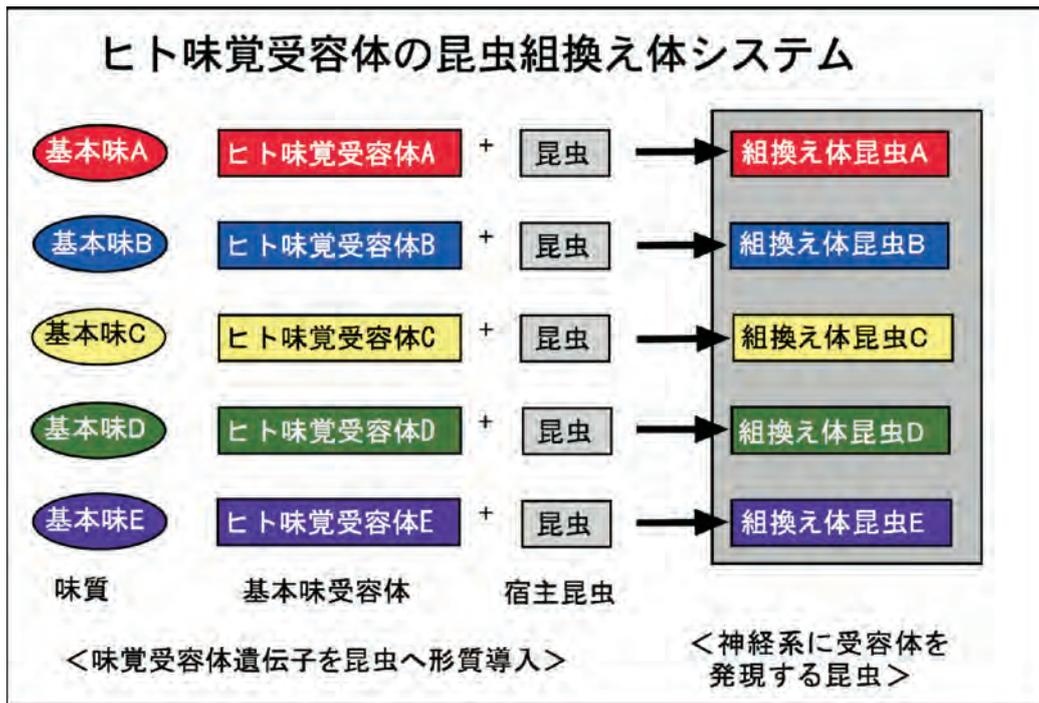
リガンド特性が解明されている苦味受容体遺伝子をショウジョウバエに組み込み、それらを神経系に機能的に発現させた組換え体を作成した。組換え体ショウジョウバエで導入した受容体の苦味リガンド刺激を行い以下のような成果をあげた。

- ①4種のヒト苦味受容体の他、ヒトの甘味、うま味受容体を昆虫の感覚細胞に発現させる組換え体を作成することができた。
- ②組換え体におけるヒト味覚受容体を定量的RT-PCR法と、受容体タンパク質の免疫組織化学的方法により確認した。
- ③味覚神経系に発現特性をもつ組換え体を利用してヒト苦味応答が機能的に再現できることを証明した。
- ④ジペプチドリガンドに対する応答性を解析し、官能検査で得たジペプチドの苦味強度と比較解析を行った。この組換え体システムが、未知のリガンド探索にも利用できることが示された。

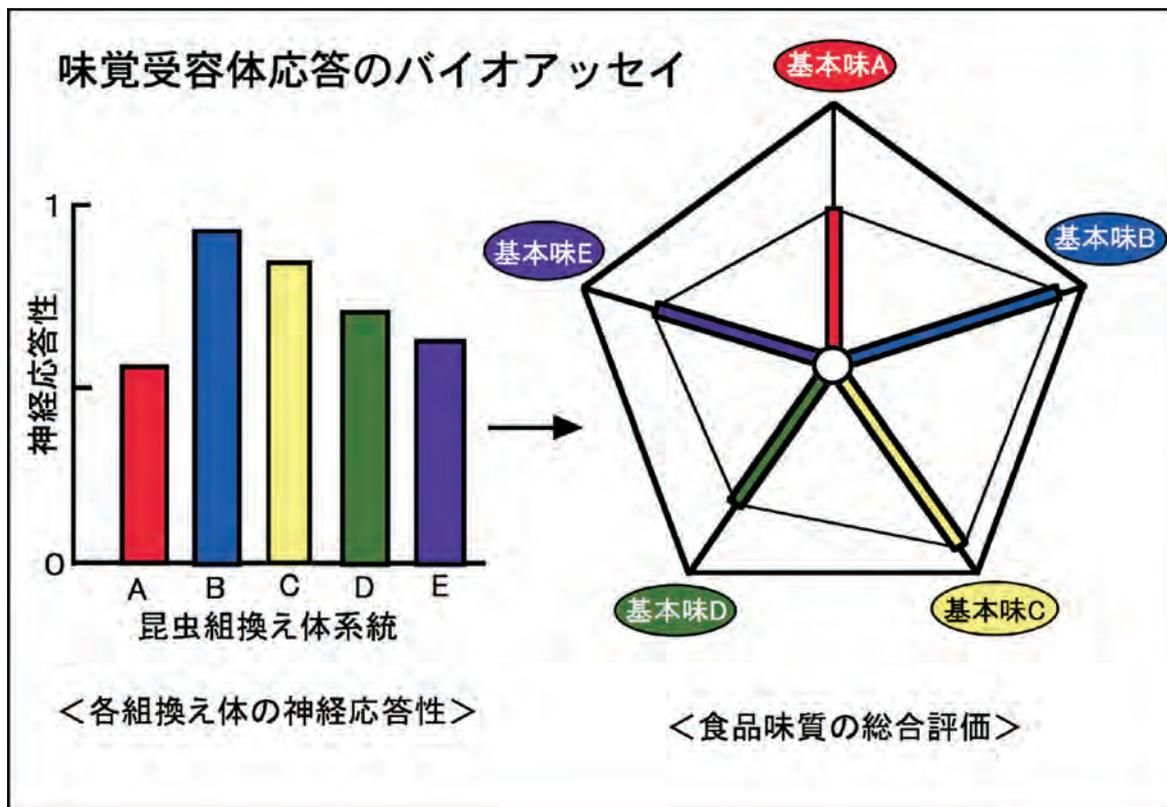
■今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①ヒトの味覚受容体のすべてをショウジョウバエに組み込んだシステムを作成し、食品成分に含まれる全ての呈味成分を評価できる総合的なシステムとして完成させ、これらのシステムを特許登録する。
- ②新味覚評価システムを活用して食品評価と新食品の開発のための共同研究を開始する。
- ③味覚受容体だけでなく、神経伝達物質とホルモン受容体を昆虫組換え体として機能発現させ、医薬品の開発研究に応用する。

■研究成果の具体的図表



↓ 食品分析



↓ 起業化

新しい食品評価と食品開発のための基盤技術の提供

■研究課題名

ブタ大腸菌性下痢症予防食べるワクチンの開発研究

■研究の目的

本課題はワクチン発現米を用いたブタ下痢症予防ワクチンを開発し、その技術を用いてバイオベンチャーの創出基盤を確立する。そのために、(1) 原薬に必要な品質をもつマーカーフリーワクチン米（均一高発現ワクチン米とその遺伝子を用いたマーカーフリー米）の開発と製剤化 (2) ワクチン米を用いた母ブタ及び子ブタでの防御免疫の誘導を実証する。

■研究項目・実施体制（◎は研究代表者）

- ① ワクチン米の物性、規格、安定性試験等の検討
（◎幸 義和／東京大学医科学研究所）
- ② ワクチン米の下痢抑制効果、投与量等の条件設定
（長井伸也／日生研株式会社）



幸 義和

■研究の内容・主要な成果

- ① ワクチン米を均一かつ高発現でき原薬に必要な品質をもつマーカーフリー米を開発することに成功し、発現されたワクチンの構造を決定した。
- ② このワクチン米をマウスに経口免疫することで、細菌性腸管下痢に対する防御免疫が誘導できることも証明した。
- ③ 20日齢、2か月齢ブタにワクチン米を胃内強制経口投与または混餌投与により、抗原特異的全身系IgG抗体及び筋肉注射免疫では誘導できない腸管粘膜IgA抗体が誘導でき、毒素病原性大腸菌の腸管ループチャレンジ試験で有意に下痢予防が達成されることを証明した。
- ④ 妊娠母ブタへの混餌投与で、抗原特異的血清IgG及びIgAのほか、分娩後でのミルクに抗原特異的IgAが誘導できることも証明できた。
- ⑤ マーカーフリーワクチン米を完全閉鎖系で栽培する試験施設が完成し、承認申請に向けた製剤、規格、安定性試験、安全性試験等を実施することとしている。

■今後の展開方向・見込まれる波及効果

細菌性ブタ腸管下痢症のワクチン米の前臨床試験、野外試験を実施し、製造販売承認が得られれば、日本だけで対象は母ブタとその子ブタ（離乳直後から2ヶ月まで）約300万頭が対象となる。従来は母ブタへの注射ワクチンは5ドーズで1300-4200円であり、現行では3億円程度の市場であるが、母ブタと子ブタの離乳後の下痢対策用となるので、市場的には7.5億円程度の市場でとなる。米国は日本の6.5倍、中国は35倍の市場がある。

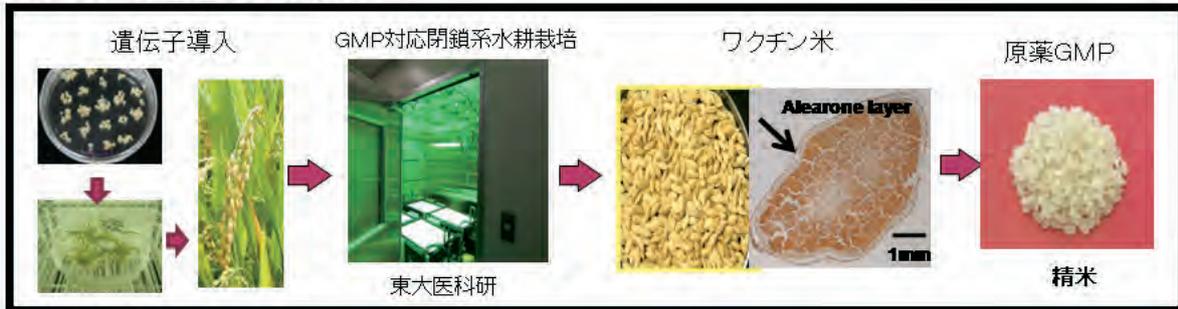
■公表した主な特許・論文

- ① Yuki Y. *et al.* Oral MucoRice expressing double-mutant cholera toxin A and B subunits induces toxin-specific neutralising immunity. *Vaccine*. 27: 5982-5988 (2009).
- ② Nochi T. *et al.* A rice-based oral cholera vaccine induces macaque-specific systemic neutralizing antibodies but does not influence pre-existing intestinal immunity. *J. Immunol.* 183: 6538-6544 (2009).
- ③ Tokuhara D. *et al.* Secretory IgA-mediated protection against *V. cholerae* and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by rice-based vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 8794-8799 (2010).

■研究成果の具体的図表

ブタ大腸菌性下痢症予防食べるワクチンの開発研究

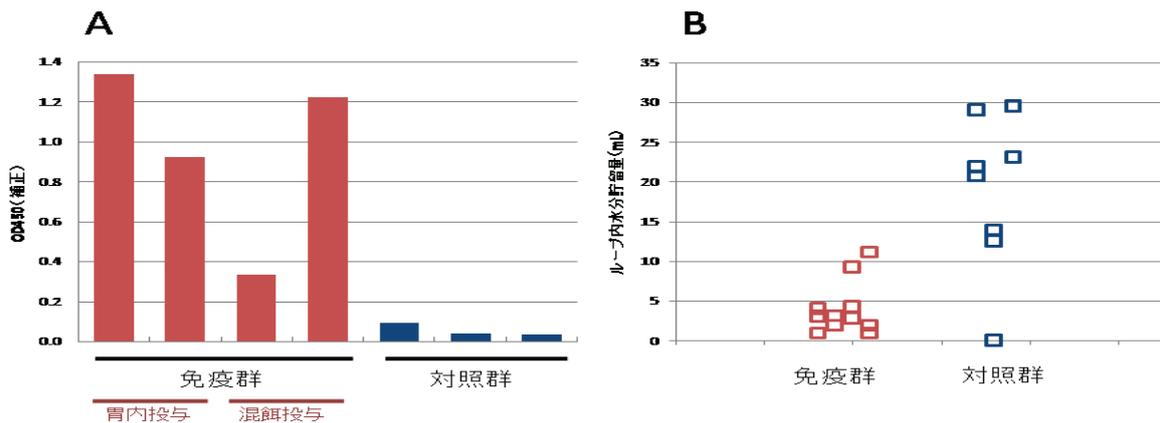
ワクチン米の作出と原薬製造



野外試験と上市



ワクチン米を経口投与されたブタの粘膜免疫応答(A)と大腸菌下痢抑制効果(B)



ワクチン米を胃内または混餌投与されたブタは腸管にワクチン特異的粘膜IgAを分泌し(A)、毒素原性大腸菌下痢症を抑制する(B)。

基礎的研究業務研究成果集（2010年度終了課題）

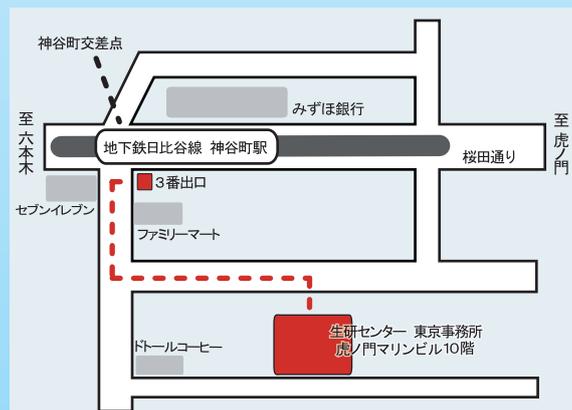
2011年3月15日発行

発行者 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
印刷者 新高速印刷株式会社



生物系特定産業技術研究支援センター 東京事務所
<http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3-18-19 虎ノ門マリビル10階
基礎研究課：03-3459-6569 技術開発課：03-3459-6567



東京メトロ日比谷線 神谷町駅 3番出口徒歩2分