

平成20年度の 主要な研究成果

平成20年度の 主要な研究成果

農業生物資源研究所では主要な研究成果を次の4つに分類しています。

- (1) **知的貢献：**
新しい法則・原理の発見、独創的な理論の構築、未知の現象の予測・発見など、論文発表による知の創造への貢献
- (2) **技術開発：**
生産性の向上及び消費ニーズに対応した品質の向上を図る上でキーとなる革新的な技術開発研究への貢献
- (3) **農業生産：**
農林水産業における生産活動を通じた社会への貢献
- (4) **生物産業：**
成果の活用により社会に直接の利便をもたらすことができる産業技術開発への貢献

目次

植物（微生物を含む）生命科学研究

コメの粒幅を大きくしたDNA変異の同定とイネ栽培化における役割の解明·····	4
イネいもち病菌EST配列を用いた高精度遺伝子同定とデータベース構築·····	6
根粒菌・菌根菌共通共生遺伝子 <i>Cyclops</i> の同定と機能解析·····	8
DNAメチル化により遺伝子発現が活性化される新たな分子機構の発見·····	10
種子貯蔵タンパク質蓄積変異体 <i>esp2</i> 米粉の優れた製パン適性·····	12

昆虫・動物生命科学研究

カイコ・エンハンサートラップ系統の開発とデータベースの構築	14
日中ゲノムデータ統合による高精度カイコゲノム塩基配列の決定	16
<i>Krüppel homolog 1 (Kr-h1)</i> 遺伝子を介した幼若ホルモンの変態抑制機構	18
遺伝子組換えカイコを用いた蛍光色を持つ高機能絹糸の開発とその利用	20
組織再生に有用なコラーゲンビトリゲルの開発	22
ガラス化冷却・超低温保存したブタ体外成熟・受精卵からの産仔作出	24

[主要研究成果名] コメの粒幅を大きくしたDNA変異の同定とイネ栽培化における役割の解明

[要 約] イネの粒幅を決める遺伝子のひとつ*qSW5*を単離し、日本晴が*qSW5*の欠失変異により、収量性が増加することを明らかにした。また、その欠失の有無を各種イネ在来品種で調べ、他の栽培化関連変異の分布と比較することでこの変異の栽培化における貢献を明らかにした。5個の栽培化関連遺伝子に関して、古代人による選抜をうけた遺伝変異の在来品種の分布から、ジャポニカイネの起源・形成過程に関して、新しい説を提唱した。

[キ ー ワ ー ド] コメ、粒幅、栽培化、収量性、ジャポニカ品種

[担 当] 農業生物資源研究所・基盤研究領域・植物ゲノム研究ユニット

[連 絡 先] 029-838-7446 [分 類] 知的貢献、農業生産

[背景・ねらい]

イネ品種間差のひとつ、コメの大きさ（シンクサイズ）に影響を与える粒幅のQTL解析をすることで、イネの重要な農業形質に関する遺伝子を単離し、今後の新しいマーカー育種に応用する。また、シンクサイズの決定分子機構を明らかにし、将来の応用研究につなげる。

[成果の内容・特徴]

1. ジャポニカ品種日本晴とインディカ品種カサラスのイネ品種間QTL解析を行い、粒幅に影響のある遺伝子座を同定し、そのうちのひとつである*qSW5*遺伝子をファインマッピングにより同定し、配列比較により、機能欠損を起こす欠失変異を発見した（図1）。
2. 相補実験により、この欠失を含む断片が遺伝子として機能し、粒幅を小さくすることを明らかにした。また、RT-PCRにより、欠失部分に転写される領域があることを示し、予測ORFを推定したが、生化学的な機能は不明である。
3. 欠失の有無を各種イネ在来品種で調べ、ゲノムの類似性とこれまでに報告のある栽培化関連変異との分布を調べ、ジャポニカ品種に関して、その栽培化過程を推定し、従来の学説とは異なり、ジャポニカイネの起源は東南アジアで、そこから中国に伝わり、そして、温帯ジャポニカが生まれたことを示す新しいモデルを提案した（図2）。
4. 考古学的知見との相違に関する考察を行い、中国長江付近で選抜が進んだ脱粒性喪失形質は、以前我々が報告した*qSHI*変異である可能性が高く、考古学的な遺跡が存在しない時代に、既にゲノム上では、栽培化が進んでいた痕跡を論理的に示すことができた。また、*qSW5*は*qSHI*より古い変異で、イネの栽培化の初期に選抜を受けた遺伝子である可能性が高いことも明らかになった。

[成果の活用上の留意点、波及効果、今後の展望等]

1. *qSW5*は、今回同定した欠失変異が基本的になく、インディカ品種では機能アレルが多いと推定されるので、インディカ品種由来の飼料イネ等のシンクサイズ向上を狙った品種改良が可能になる。
2. イネの栽培化の過程をDNA変化から推定することで、主だった形質は遺伝子の機能欠損を人間が利用したことが明らかとなった。突然変異育種の再評価につながる。
3. インディカイネとジャポニカイネで、ほぼ独立に栽培化が進み、選抜をうけたDNA変異も異なることが明らかになってきたので、栽培化関連変異の再利用育種が具体化する。
4. ジャポニカイネの起源に関して、東南アジア原産の在来種が古いタイプの遺伝子を多くもつことを明らかにし、その形成過程に関して新しい説を提唱することで、イネの栽培化に関する文化人類学的研究に貢献する。

[具体的データ]

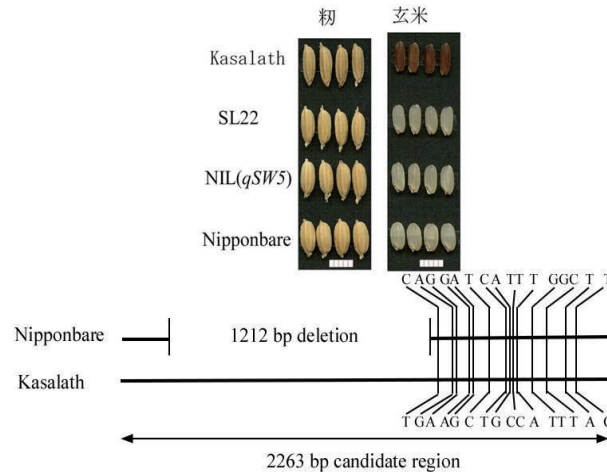


図1 系統間の粒幅の違いと *qSW5* 遺伝子領域の変異
Kasalath (インディカイネ) と日本晴 (ジャポニカイネ) は親品種。SL22は機能型 *qSW5* を持つ染色体置換系統、NIL (*qSW5*) は機能型 *qSW5* を持つ準同質置換系統



図2 ジャポニカイネの栽培化過程
4つの栽培化遺伝子 (*Rc*, *qSW5*, *qSH1*, *Wx*) がコメの色、幅、穂からのこぼれ易さ、コメのモチモチ感を決定している。在来品種における栽培化遺伝子の変異 (小文字) の分布を示す。緑の矢印は、4つの栽培化遺伝子の変化から推定されるイネの栽培化の過程を示す。

[その他]

研究課題名：イネ栽培化関連遺伝子の機能解析と応用研究

予算区分：農水受託 アグリゲノム「多様性ゲノム」新農業展開ゲノム「QTL」

中期計画課題コード：A02、研究期間：2007～2009 年度

研究担当者：井澤 毅、正村純彦、小西左江子、江花薫子、矢野昌裕

原著論文等：

- 1) Shomura A, Izawa T (co-first), Ebana K, Ebitani T, Kanegae H, Konishi S, Yano M (2008) Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. *Nature Genetics* 40(8):1023-1028.
- 2) Konishi S, Ebana K, Izawa T (2008) Influence of the *japonica* rice domestication process from the distribution of six functional nucleotide polymorphisms of domestication-related genes in various landraces and modern cultivars. *Plant and Cell Physiology* 49(9):1283-1293.
- 3) Izawa T, Shomura A, Konishi S, Ebana K, Yano M (2008) Reply to “Japonica rice carried to, not from, Southeast Asia”. *Nature Genetics* 40(11):1264-1266.

[主要研究成果名] イネいもち病菌EST配列を用いた高精度遺伝子同定とデータベース構築
[要 約] イネいもち病菌のESTを35,189配列解読し、その配列を用いて4,155の遺伝子情報を詳細に決定した。解読したEST配列、決定した遺伝子座及び関連解析の結果はデータベースに格納し、ウェブサイトを通して公開している。
[キ ー ワ ー ド] イネいもち病菌、EST、データベース、遺伝子予測、アセンブル
[担 当] 農業生物資源研究所・基盤研究領域・ゲノム情報研究ユニット
[連 絡 先] 029-838-7065 [分 類] 知的貢献、技術開発

[背景・ねらい]

いもち病は深刻な被害をもたらすイネの病害であり、その原因であるイネいもち病菌は世界的に重要な病原菌として知られている。2005年にイネいもち病菌の全ゲノム配列が解読され、ゲノムレベルで大規模に遺伝子研究を行うことが可能になってきたが、遺伝子機能解析を行うためにはゲノム配列上での遺伝子の詳細な位置、構造や機能の正確な情報が必要である。これは、cDNA及びそこから読み取られたESTの配列を用いることによって初めて可能となる。そのため、ESTのような転写産物データを大量に利用し、遺伝子領域を厳密に確定できることが重要である。そこで本研究では、イネいもち病菌のESTを大量解読し、それを用いて正確な遺伝子構造の構築をゲノム配列上で網羅的に行うとともに、この情報をイネいもち病菌の研究者が簡便に利用できるデータベースを開発、公開した。

[成果の内容・特徴]

1. イネいもち病菌cDNAクローンを作成し（計18,821クローン）、5'および3'両端ESTの塩基配列決定を行った。解読したEST配列（計35,189配列）はDDBJを通じて国際DNAデータバンクに登録した。これにより、国際DNAデータバンクのイネいもち病菌ESTが一気に約66%も増加したことになる。特に、今回登録したESTのうち実に49.4%はデータバンク中の既存のESTに全くヒットせず、完全に新規の配列を極めて多く含むことがわかった。
2. 解読したESTをゲノム配列と遺伝子予測プログラムを利用して再構成し、最終的に4,155遺伝子座を決定した。この遺伝子座に含まれるタンパク質コード領域3,891（表1）の全長性を、既知のタンパク質と比較することによって検証し、少なくとも約87%は完全長のタンパク質である（断片ではない）ことが示唆された。
3. コンピューターによる遺伝子予測は誤りを多く含む。そこで、ゲノム配列を公開しているBroad Instituteの遺伝子予測と比較したところ、我々が今回同定した17,639のスプライス部位のうち4,882（27.7%）は全く新規であることが明らかになった。我々のEST解析によってゲノム上の遺伝子構造が飛躍的に正確になった。
4. EST配列、構築した遺伝子座及び関連する解析結果をデータベースに格納し、ウェブサイト上（<http://mg.dna.affrc.go.jp/>）で公開した（図1）。すべてのデータはゲノムブラウザに統合されているため、簡単な操作で情報を検索し、遺伝子構造や機能情報を閲覧することが可能である。

[成果の活用上の留意点、波及効果、今後の展望等]

1. 本研究のEST配列データを、すでに公開されているゲノムデータと比較することによって、正確に大量の遺伝子構造を決定することができた。
2. 今回新たに解読したEST配列及び公開したデータベースは、イネいもち病菌の遺伝子の機能解明に利用されたり、あるいは他の菌類との比較ゲノム解析に利用できる。
3. 今回作成したcDNAクローンは大部分がタンパク質全長を含むことから、今後の遺伝子機能解明に直接的に役立つ研究材料として活用されるものと期待される。

[具体的データ]

表1 タンパク質コード領域の統計情報

平均長 (bp)	2, 116
平均エクソン数	2. 9
平均エクソン長 (bp)	651
平均イントロン長 (bp)	111
GC含量 (%)	
エクソン	54. 0
イントロン	47. 2
既知のタンパク質に相同性を示す数	3, 432
機能ドメインを持つ数	2, 827

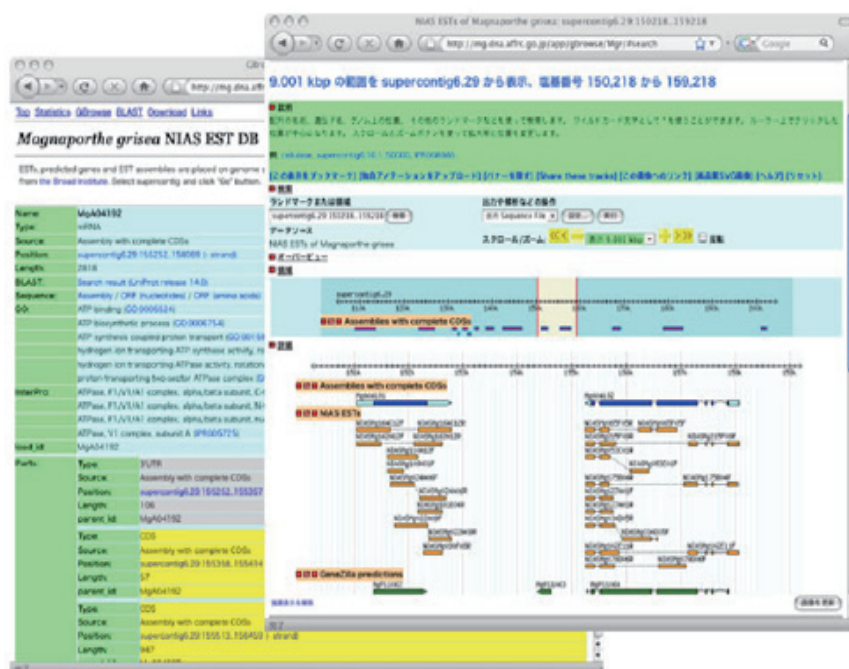


図1 遺伝子情報を効率よく取得できるイネいもち病菌ESTデータベース

[その他]

研究課題名：超高速配列決定時代に対応した情報リソース開発

予算区分：解析ツール、中期計画課題コード：A06、研究期間：2008～2012年度

研究担当者：沼寿 隆、西村麻里江、田中 剛、松本 隆、長村吉晃、伊藤 剛

発表論文等：

Numa H, Nishimura M, Tanaka T, Kanamori H, Yang C, Matsumoto T, Nagamura Y, Itoh T (2009) Genome-wide validation of *Magnaporthe grisea* gene structures based on transcription evidence. ***FEBS Letters*** 583(4):797-800.

[主要研究成果名] 根粒菌・菌根菌共通共生遺伝子 *Cyclops* の同定と機能解析

[要 約] 根粒菌・菌根菌の共生に関与する分子メカニズムを明らかにするために、ミヤコグサの共通共生遺伝子である *Cyclops* を同定した。CYCLOPSはカルシウムスパイクの受容に関わる CCaMK と相互作用することで機能すると考えられた。

[キ ー ワ ー ド] 根粒菌、菌根菌、共生、ミヤコグサ、マメ科、共通共生遺伝子

[担 当] 農業生物資源研究所・植物科学研究領域・耐環境ストレス研究ユニット、植物・微生物間相互作用研究ユニット

[連 絡 先] 029-838-8376 [分 類] 知的貢献

[背景・ねらい]

土壌微生物と植物との共生は植物の栄養吸収に多大な貢献をすることから、農業上の有効利用が想定される。根粒菌はマメ科植物と共生し、根粒中で大気中窒素を固定して植物に供給することで、土壌中の窒素に依存しない植物の生育が可能である。菌根菌は陸上植物の大半と共生し、リンや水などを植物に供給する。これらの共生を支配する植物側の遺伝子を明らかにすることで、共生の分子メカニズムを解明できる。特に、根粒菌・菌根菌双方との共生に必要な共通共生遺伝子の同定と機能解析は多くの知見をもたらすが、その全貌は明らかでなかった。さらに、共生遺伝子産物間の相互作用については全く知見がなく、共生遺伝子がどのように協調的に機能するかについては不明であったことから、これらを解明することを目的とした。

[成果の内容・特徴]

1. マメ科植物の根粒菌共生変異体の解析から、これまで7つの遺伝子が、根粒菌と菌根菌の双方との共生に必要であると考えられてきた。我々の研究成果を含め、ミヤコグサからは既に *SymRK*、*Castor*、*Pollux*、*Nup85*、*Nup133*、*CCaMK* という6つの共通共生遺伝子が同定され、機能解析が進められてきた。今回、残る1つの遺伝子 *Cyclops* について、遺伝子の同定と機能解析を行った。
2. ミヤコグサ *cyclops* 変異体では、根粒菌の感染が根毛への進入以前で停止しており（図1）、菌根菌においては付着器の異常による内生菌糸の発達不全が見られた。
3. *Cyclops* 遺伝子を同定した結果、その遺伝子産物は核タンパクであった。
4. 酵母を用いた2ハイブリッド法により、カルシウムスパイクの受容体と考えられる、根粒菌・菌根菌の感染を支配するカルシウム・カルモジュリン依存型キナーゼ CCaMK はキナーゼ活性依存的に CYCLOPS と相互作用したため、CCaMK と CYCLOPS は協調的に機能すると考えられた。これは、共生遺伝子産物間の協調的機能を明らかにした世界で最初の例となった。
5. 精製したタンパクを用いた実験において、CCaMK はカルシウムおよびカルモジュリン依存的に CYCLOPS をリン酸化し（図2）、共生シグナル伝達における分子メカニズムの一端が明らかとなった。
6. 自己リン酸化アミノ酸 T265 の点変異を導入した機能獲得型変異 CCaMK^{T265D} による自発根粒形成は CYCLOPS 非依存的であったため（図3）、CYCLOPS は CCaMK の活性（自己リン酸化）維持に関与していると考えられた。

[成果の活用上の留意点、波及効果、今後の展望等]

1. ミヤコグサで同定された菌根菌共生遺伝子のホモログを非マメ科植物で解析することで、菌根菌共生における植物に共通した分子メカニズムを知ることができる。
2. 根粒菌・菌根菌の感染を人為的にコントロールするための基盤を整備するために、今回同定された共通共生遺伝子のみならず、共生に関与する遺伝子の全貌を明らかにする必要がある。

[具体的データ]

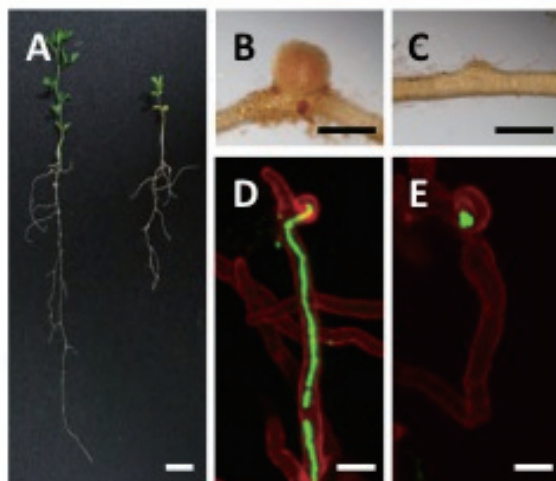


図1 *cyclops* 変異表現型
cyclops 変異体 (右) は野生型 (左) に比べ窒素制限下での生育が悪く (A)、根粒が発達せず (B、C)、根毛内に感染糸が伸長しなかった (D、E)。

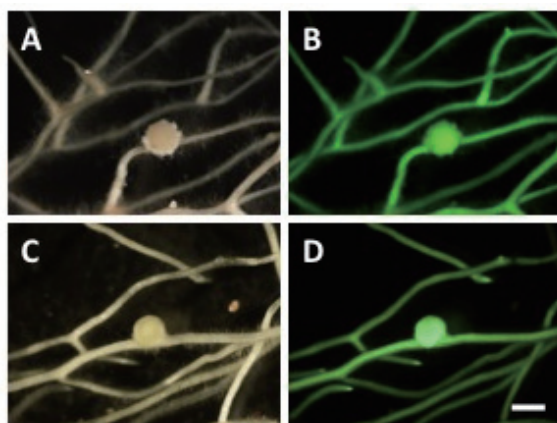


図3 CCaMK^{T265D} による自発根粒形成
cyclops 変異体に形成される自発根粒 (A) は野生型に形成される自発根粒 (C) とその発達サイズにおいて有意な差が見られなかった。BおよびDの蛍光は形質転換根を示す。

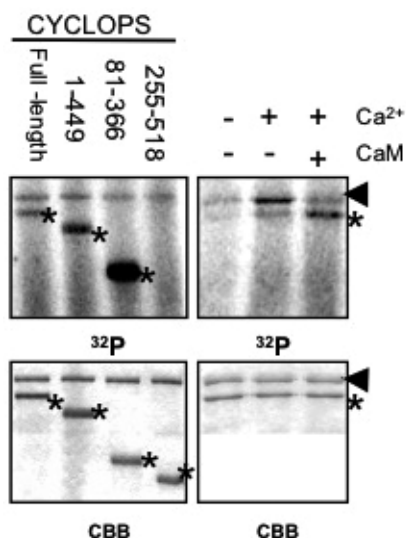


図2 精製 CCaMK および CYCLOPS を用いた、CCaMK による CYCLOPS のリン酸化
全長 CYCLOPS (右図星印) はカルシウム (Ca²⁺) およびカルモジュリン (CaM) 依存的に CCaMK (矢頭) によりリン酸化される。CCaMK と相互作用しない CYCLOPS²⁵⁵⁻⁵¹⁸ は CCaMK によるリン酸化を受けない (左図星印)。

[その他]

研究課題名：共生ネットワークの分子基盤、 予算区分：科技構CREST

研究課題名：マメ科植物の共生微生物受容システムと感染・根粒形成を支える遺伝子ネットワークの解析、 予算区分：生研機構若手

中期計画課題コード：B41、 研究期間：2002～2008年度

研究担当者：矢野幸司、馬場真里、今泉(安楽)温子、林 誠

発表論文等：

Yano K, Yoshida S, Müller J, Singh S, Banba M, Vickers K, Markmann K, White C, Schuller B, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Murooka Y, Perry J, Wang T L, Kawaguchi M, Imaizumi-Anraku H, Hayashi M, Parniske M (2008) CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(51):20540-20545.

[主要研究成果名] DNAメチル化により遺伝子発現が活性化される新たな分子機構の発見

[要 約] DNAメチル化は遺伝子サイレンシング誘導に重要な役割を果たす。本研究では、DNAメチル化が遺伝子サイレンシングとは逆に遺伝子発現の活性化にも関わっていることをはじめて示した。遺伝子制御技術への応用や生物の進化への寄与が考えられる。

[キ ー ワ ー ド] DNAメチル化、転写活性化、エピジェネティック、ペチュニア

[担 当] 農業生物資源研究所・植物科学研究領域・耐病性研究ユニット

[連 絡 先] 029-838-8383

[分 類] 知的貢献

[背景・ねらい]

遺伝子サイレンシングの誘導などに、RNAが引き金となるDNAメチル化（RNA指令性DNAメチル化）が関与していることが明らかにされ、その分子機構の概要が近年解明された。このような制御は、様々な生命現象の制御や生物の進化に関わっていると同時に、新たな遺伝子操作技術につながる可能性もあることから、重要な研究分野として発展しつつある。本研究では、形質転換ペチュニアに表れた花器官の異常が、これまでに報告された分子メカニズムでは説明できないことに着目し、遺伝子組換え技術にも応用できる新たなエピジェネティック遺伝子制御様式を解明することを目的に詳細な解析を行った。

[成果の内容・特徴]

1. ペチュニアの*pMADS3*は、花の雄しべおよび雌しべに特異的に発現し、花器官の形成を規定する遺伝子である。以前我々は、形質転換ペチュニアにおいて、内在性*pMADS3*が花卉で異所的に発現する結果、花卉が雄しべ化する現象を見出していた。その分子機構解明のため、*pMADS3*の発現特異性を規定する第2イントロン配列の逆反復RNAをペチュニア全体で発現させたところ（図1）、*pMADS3*の異所的発現／花卉の雄しべ化が誘導された（図2）。このことから上記現象にはRNAをシグナルとするエピジェネティック制御が関わっていることが示唆された。
2. 発現させる逆反復RNAの配列をしばらく込んだ結果（図1）、第2イントロンの1701-1800領域のみで強い*pMADS3*異所的発現／花卉の雄しべ化が誘導された。また、DNAメチル化パターンを調べた結果、2ヶ所のシトシンのメチル化が原因であることがわかった（図1）。
3. メチル化シトシン周辺のDNA配列は、植物種間で高度に保存されていたことから、*pMADS3*の発現を抑制する配列（負のシス・エレメント）と推定された（図2）。花卉では通常、このシス・エレメントに転写抑制因子が結合して*pMADS3*の発現が抑制されており（図3左）、一方、このシス・エレメントがDNAメチル化されると転写抑制因子の結合が阻害され、発現抑制が解除されて異所的発現に至ると考えられる（図3右）。
4. 導入されたDNAメチル化は、交配によって導入遺伝子を除いた後もゲノム*pMADS3*に保持され、それにとまって花卉が雄しべ化する形質も後代に遺伝した。このことは、逆反復配列を発現させてDNAメチル化を誘導する手法により導入遺伝子を残さずに内在性遺伝子の発現を制御できることを示している。また、RNAが引き金となるDNAメチル化は自然界でも起こり得るので、環境適応などの結果導入されたDNAメチル化により、後天的に獲得した遺伝形質が固定され、生物の進化に寄与した可能性が示唆される。

[成果の活用上の留意点、波及効果、今後の展望等]

逆反復RNAの発現により転写のシス・エレメントをDNAメチル化する方法は、新たな遺伝子発現制御法として応用できる。本法により、転写の抑制（遺伝子サイレンシング）および転写の活性化の両方が可能である。ポスト・ゲノム研究により多くの遺伝子の転写制御配列に関する情報が蓄積すれば、応用範囲が広がると期待される。植物の転写制御の基本的な分子機構によるのでおそらく植物種に関わらず応用できる。

[具体的データ]

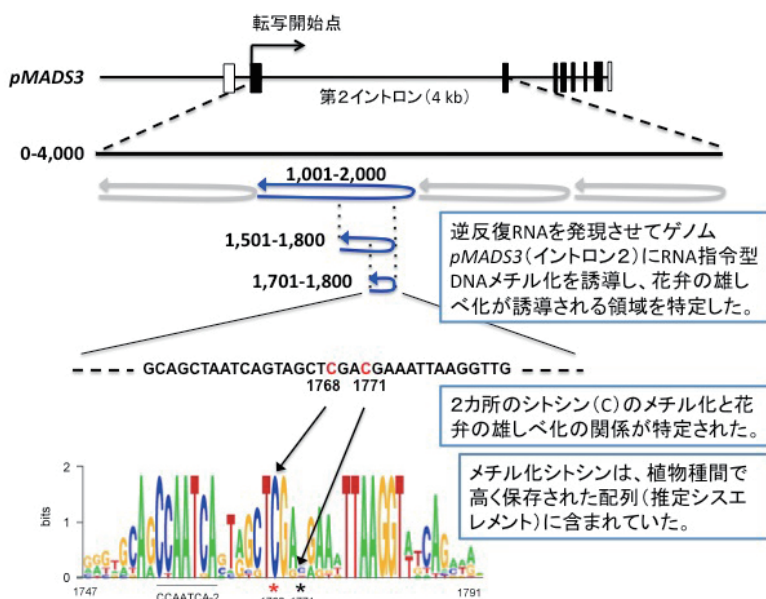


図1. 逆反復RNA発現によるpMADS3異所的発現の誘導

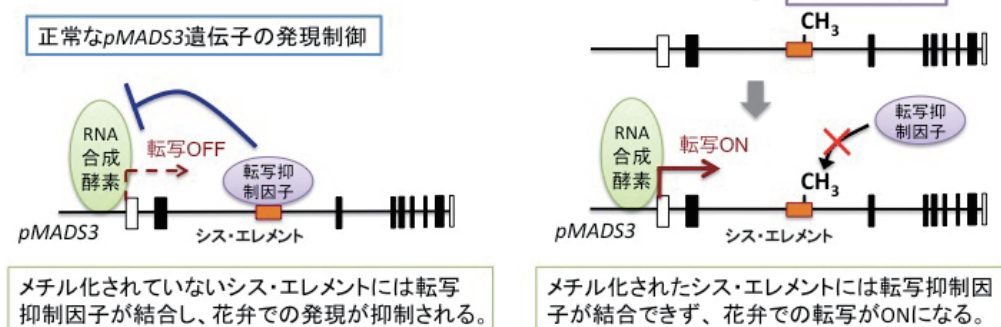


図3. RNA指令型DNAメチル化によるpMADS3遺伝子異所的発現誘導のメカニズム



図2. pMADS3遺伝子の発現異常による花卉の雄しべ化
a. 正常なペチュニアの花。
b. pMADS3イントロン2(1701-1800)の逆反復RNAを発現させると、内在性pMADS3遺伝子が花卉に異所的発現し、花卉がほぼ完全に雄しべ化した(白矢印)。赤矢印は本来の雄しべ。

[その他]

研究課題名：相同性遺伝子導入による内在性遺伝子の異所的転写活性化の分子機構解明

予算区分：科研費、 中期計画課題コード：B13、 研究期間：2004～2008年度

研究担当者：高辻博志、渋谷健市、Meenu Kapoor、福島説子、馬場晶子、久保健一

発表論文等：

- 1) Shibuya K, Fukushima S, Takatsuji H (2009) RNA-directed DNA methylation induces transcriptional activation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(5):1660-1665.
- 2) Kapoor M, Baba A, Kubo K, Shibuya K, Matsui K, Tanaka Y, Takatsuji H (2005) Transgene-triggered, epigenetically regulated ectopic expression of a flower homeotic gene pMADS3 in *Petunia*. *The Plant Journal* 43(5):649-661.
- 3) 国内特許申請「遺伝子導入によって内在性遺伝子を活性化する方法」高辻博志、渋谷健市 (特開2008-92947)

〔主要研究成果名〕 種子貯蔵タンパク質蓄積変異体 *esp2* 米粉の優れた製パン適性

〔要 約〕 タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ欠損変異体 *esp2* から作製した米粉は伸展性と可塑性に優れ、米粉パンの材料として作業性がよく生地特性にも優れる。

〔キ ー ワ ー ド〕 米粉パン、貯蔵タンパク質蓄積変異体、米粉加工特性、*esp2*

〔担 当〕 農業生物資源研究所・植物科学研究領域・遺伝子組換え技術研究ユニット

〔連 絡 先〕 029-838-8391

〔分 類〕 生物産業

〔背景・ねらい〕

米の消費量は年々低下しているため、米粉利用の促進が行政主導で進められている。近年の製粉技術の改良によって米粉の利用が容易になり、パンや麺類の原料の一部として米粉が利用されている。しかしながら、現在使用されている米粉は従来の粒食用の品種や飼料米を粉食用に用いたもので、米粉パン用に開発された品種は存在しない。米粉は小麦粉と比べると、生地の粘弾性、伸展性、可塑性などが劣るため、製パンの材料として用いるときには工夫が必要である。また、付着性が大きいため作業性が悪い。本研究は種子貯蔵タンパク質の組成及び胚乳細胞内の蓄積部位が異なる *esp2* 変異体の米粉の加工特性を調査し、粉食用の画期的な新品種を開発することを目的とした。

〔成果の内容・特徴〕

1. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)は、小胞体内腔でタンパク質のジスルフィド結合形成やつなぎ換えを触媒する酵素である。この酵素遺伝子の欠損変異体 *esp2* の種子では、グルテリン前駆体がプロラミンと複合体を形成して小胞体内腔に蓄積し、貯蔵タンパク質の組成と細胞内分布が野生型（品種は金南風）と異なっている（図1）。
2. *esp2* の米粉とコムギ粉を混合して生地を作製すると、コムギ由来のタンパク質に加えて、イネのグルテリン前駆体がグルテンに取り込まれることを明らかにした（図2）。
3. 米粉からデンプン粒を精製して走査型電子顕微鏡を用いて観察したところ、*esp2* 変異体のデンプン粒は野生型のデンプン粒に加えて、20ミクロン近くの大きさのデンプン粒を含むことを明らかにした（図3）。*esp2* 米粉の大きなデンプン粒は生地の加工特性を改善する一つの要因と推察される。
4. 野生型と *esp2* の米粉にコムギグルテンを2割加え、製パン試験を食パン及び丸パンで比較した。その結果、野生型の米粉パンは膨らんだ生地が焼成後、室温に冷える間に大きく凹むのに対し、*esp2* 米粉の場合は、その凹みが小さかった（図4）。この結果から、*esp2* 米粉の生地は野生型の米粉に比べて可塑性が大きいことが明らかになった。

〔成果の活用上の留意点、波及効果、今後の展望等〕

1. 米粉の加工特性はデンプン特性の影響が大きいと従来考えられていたが、種子タンパク質の違いが加工特性に大きく影響することを明らかにした。*esp2* 遺伝子は、米粉パン用のイネ品種の開発において、鍵因子の一つとして利用されることが期待される。
2. 製粉性に適した超多収品種と *esp2* との交配によって、製粉性に優れ、さらに生地の加工特性にも優れた米粉用の超多収新品種を開発することにより、コスト低減が期待できる。

[具体的データ]

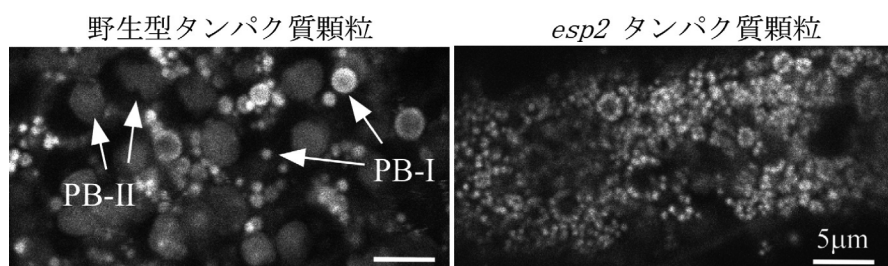


図1 野生型と *esp2* 変異体のタンパク質顆粒の比較
(左) 野生型ではPB-I (プロラミン) とPB-II (グルテリン) の2種類のタンパク質顆粒が合成される。(右) *esp2*変異体では小胞体に小さな顆粒が数多くできる。

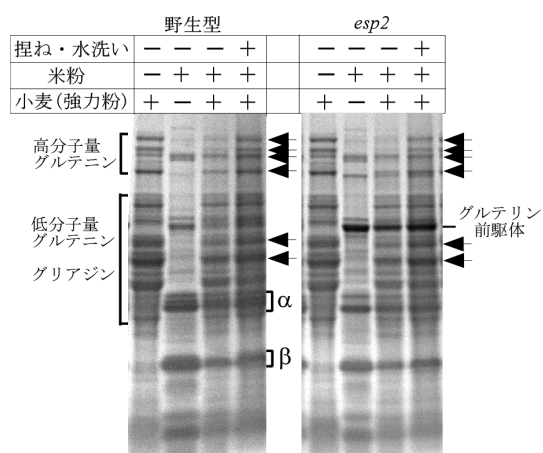


図2 米粉と小麦強力粉を7:3で混ぜ、グルテン形成の前後で全タンパク質を抽出しSDS-PAGE解析
*esp2*のグルテリン前駆体はグルテンに取り込まれる。
矢印: グルテンに取り込まれ濃縮された小麦タンパク質。
αとβ: 成熟型グルテリン。

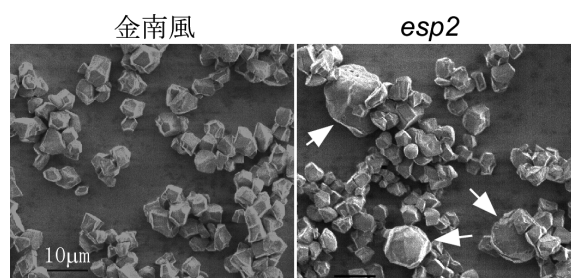


図3 野生型と *esp2*のデンプン粒の比較
*esp2*は普通の大きさ (3~8ミクロン) のデンプン粒に加えて10~18ミクロンの大きさのデンプン粒 (矢印) を合成する。

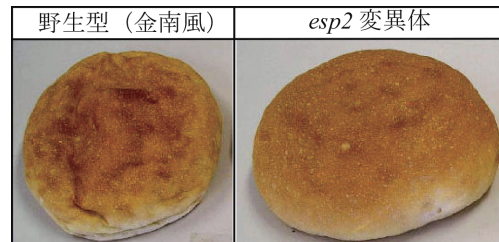


図4 野生型と *esp2*米粉の製パン試験
(左) 膨らんだ丸パンの表面に深いシワができる。(右) *eps2*の丸パンは膨らんだ形が保たれる。

[その他]

研究課題名: イネ胚乳細胞のオルガネラ工学の開発と利用

予算区分: 生研基礎、中期計画課題コード: C11、研究期間: 2005~2008年度

研究担当者: 恩田弥生、川越 靖

発表論文等:

- 1) 国内特許出願「パン類の製造に適した米粉組成物およびその利用」川越 靖、恩田弥生、高星 千恵美、佐藤 光、熊丸敏博 (特願 2008-058057)
- 2) 国内特許出願「加工特性に優れた米粉の判別法」川越 靖 (特願 2008-058106)
- 3) 川越 靖 (2008) 米粉パンに適した鍵因子を探るー米粉用イネの画期的な品種開発を目指して。ブレインテクノニュース (130):17-21.

[主要研究成果名] カイコ・エンハンサートラップ系統の開発とデータベースの構築

[要 覧] カイコのポストゲノム研究におけるリソースの開発と利用のために、トランスポゾンを用いたエンハンサートラップ法を開発し、新規突然変異系統を多数作出した。また、エンハンサートラップ系統情報のデータベースを作成し、ゲノムデータベースと統合して公開した。

[キーワード] 遺伝子組換えカイコ、新規突然変異、エンハンサートラップ、データベース

[担 当] 農業生物資源研究所・遺伝子組換えカイコ研究センター、昆虫科学研究領域・昆虫ゲノム研究・情報解析ユニット

[連絡先] 029-838-6091

[分類] 知的貢献、技術開発

[背景・ねらい]

カイコでは、ゲノムがほぼ完全に解読され、ポストゲノム研究における遺伝子機能解析が重要な研究課題となりつつある。体系的なリソース開発と遺伝子機能解析のためには、トランスポゾンをゲノムの様々な位置に挿入させて新規の突然変異系統を作出する方法が有効で、これにより新規遺伝子の網羅的な探索と導入遺伝子の人為的な発現制御が可能となる。本研究では、(1)カイコのエンハンサートラップ法を開発することによって多数の新規突然変異系統を作出すること、(2)これらの系統における GFP レポーター発現部位とゲノム挿入位置を解析することによって、新規突然変異系統データベースの構築、ゲノムデータベースとの統合を進め、公開・情報発信を行うことを目標とする。

[成果の内容・特徴]

1. トランスポゾンをゲノム中へランダムに転移挿入させる方法と、導入遺伝子の発現調節に有用なGAL4/UAS系と組み合わせたエンハンサートラップ系を開発し、多数の新規突然変異系統を作出した。具体的には、酵母の転写因子GAL4を持つトランスポゾンベクターを転移させて、遺伝子発現を活性化するエンハンサーにより、組織・時期特異的にGAL4を発現するエンハンサートラップ系統を数百作出した。
2. GAL4によって活性化されるUASの下流にGFPをつないだUAS-GFPをレポーターとして発現部位を観察したところ、GFPが様々な発現している系統が得られた(図1)。また、GFPのかわりに任意の遺伝子を強制発現させたり、誘導型RNAiを起こさせることが可能となった。
3. トランスポゾンベクターの挿入位置の近傍配列を決定し、ゲノムデータベースと照合することによってゲノム挿入位置を同定した。トランスポゾンベクターは、ゲノム中にはほぼランダムに挿入されていることが示唆され、いくつかの系統において発現様式と近傍遺伝子を対応づけることができた。
4. GFPレポーター発現部位情報および画像と、ゲノム挿入位置情報などをまとめた新規突然変異体データベース (Bombyx Trap DataBase) を構築し、公開した。さらに、このデータベースとゲノムデータベースの統合が進められ (KAIKObase)、トランスポゾンベクターの挿入位置が染色体地図にマップされるようになった。

[成果の活用上の留意点、波及効果、今後の展望等]

1. エンハンサートラップ系統は挿入近傍遺伝子の発現様式を模倣すると考えられるためゲノム情報の活用により新規遺伝子探索と発現解析が可能となる。遺伝子内にトランスポゾンが挿入すれば、遺伝子機能が破壊された新しい表現型変異体が見られることが期待される。
2. 中腸でGAL4を強く発現する系統が、従来の突然変異体における原因遺伝子の機能証明に用いられて*PNAS*誌で発表される等、エンハンサートラップ系統の実用性が示された。
3. 今後は、多数の新しい系統の作出を行って、データベースを拡充して公開し、系統を配布可能にする予定である。

[具体的データ]

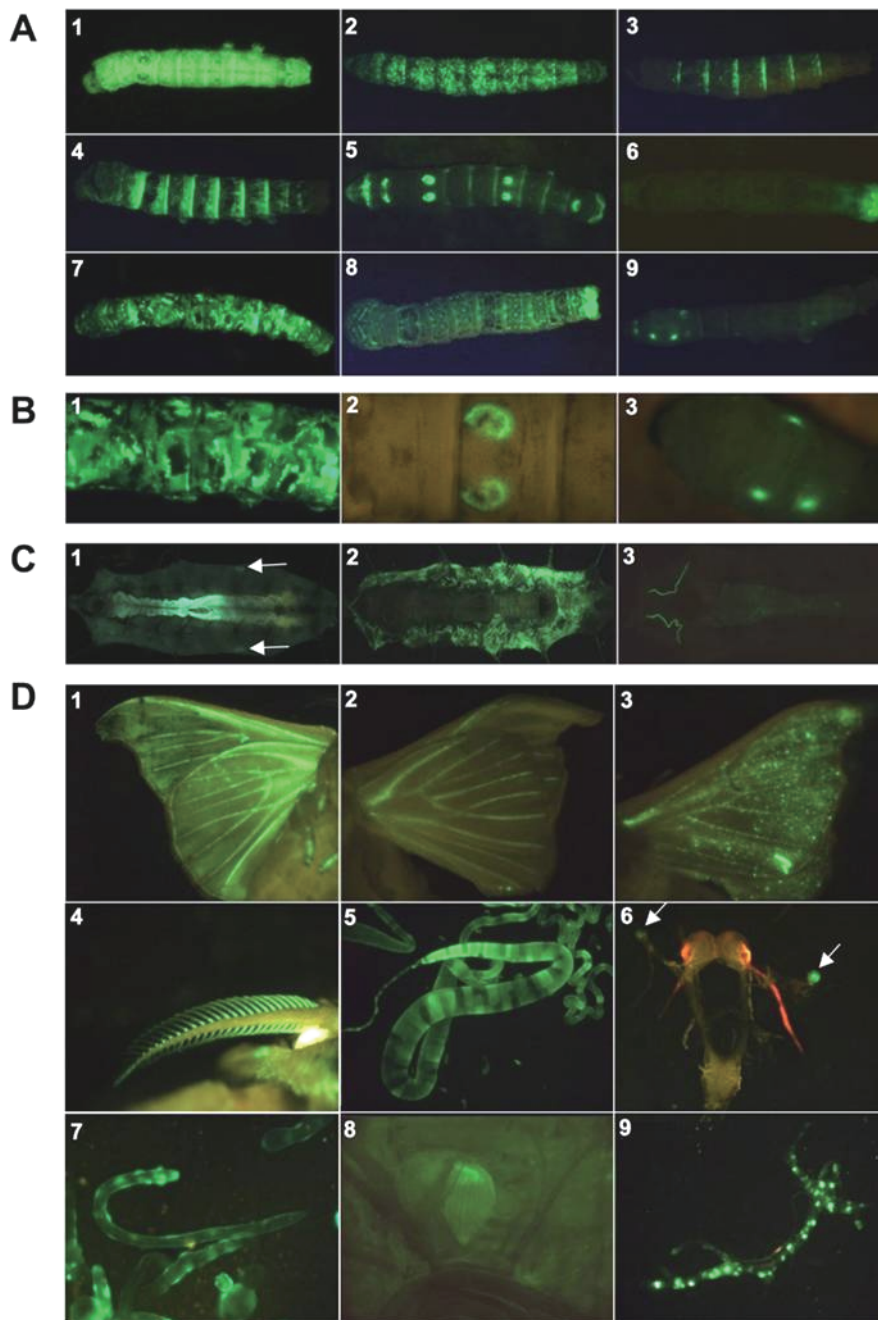


図1 様々にGFPが発現しているエンハンサートラップ系統 (Uchino *et al.* 2008)

[その他]

研究課題名：トランスポゾンを利用による新規突然変異系統の作出

予算区分：アグリゲノム(昆虫ゲノム)、中期計画課題コード：A03、研究期間：2007～2011 年度

研究担当者：内野恵郎、瀬筒秀樹、小林 功、立松謙一郎、飯塚哲也、米村真之、三田和英、田村俊樹

発表論文等：

- 1) Uchino K, Sezutsu H, Imamura M, Kobayashi I, Tatematsu K, Iizuka T, Yonemura N, Mita K, Tamura T (2008) Construction of a piggyBac-based enhancer trap system for the analysis of gene function in silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38: 1165-1173.
- 2) Bombyx Trap DataBase: <http://sgp.dna.affrc.go.jp/ETDB/>
- 3) KAIKObase: <http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>

[主要研究成果名] 日中ゲノムデータ統合による高精度カイコゲノム塩基配列の決定

[要 約] 日中のホールゲノムショットガンデータを統合することによって得られたカイコゲノムの8.5倍量の塩基配列断片をアセンブルすることで平均長が3.7Mbのスキヤホルドが得られた。このスキヤホルドを分子マーカを利用して染色体にマップし、染色体の87%を塩基配列情報でカバーすることができた。

[キ ー ワ ー ド] カイコ、ホールゲノムショットガン、ゲノム構造、ゲノム塩基配列

[担 当] 農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・昆虫ゲノム研究、情報解析ユニット

[連 絡 先] 029-838-6120

[分 類] 知的貢献

[背景・ねらい]

農業生物資源研究所では、これまで全ゲノムショットガン(WGS)方式でカイコゲノムの80%を解読してきた。一方、中国西南大学においても北京ゲノム研究所と共同でカイコゲノムの解読を行っていた。このように日中両国で独自にカイコゲノム解読を行ってきたが、それぞれ単独では実用的に利用するには不十分な情報であり、両者の情報を統合して完全なカイコゲノム情報を得ることが切望されていた。このため、日中の両研究機関は、2006年3月24日にカイコゲノム情報統合の合意をし、共同研究として高精度カイコゲノムの解読を進めてきた。

[成果の内容・特徴]

1. 日中のWGSデータを統合することで得られたカイコゲノムの8.5倍量の塩基配列断片情報800万リードと新たに得られたより長い断片(BAC/fosmidクローン)の両端塩基配列情報40万リードを合わせ、東京大学大学院新領域創成科学研究科が開発したプログラム(RAMENアセンブラー)を用いてつなぎあわせた(図1)。アセンブルした結果、計8万9千個のシーケンスコンティグと4万4千個のスキヤホルドが得られ、これらの合計は432 Mbとなり、カイコゲノムの91%に相当した。シーケンスコンティグの平均長は15,500 bpで、スキヤホルドの平均長は3.7 Mbとなり、高品質のアセンブル結果が得られた(表1)。
2. これらのスキヤホルドについて分子マーカーを用いて染色体に貼付けたところ、192個のスキヤホルドがマップされ、その総長は418Mbとなり、全染色体の87%を塩基配列情報でカバーすることができた。
3. これらのゲノム塩基配列情報から、主にトランスポゾン由来の繰り返し配列がゲノムの43.6%を占め、染色体上にほぼ均一に分布しているという特徴的ゲノム構造が明らかになった。また、カイコゲノム情報から、桑に含まれるアルカロイド系の糖代謝阻害物質を回避するメカニズムや絹糸タンパク質の大量合成を可能にする巧妙な仕組み等、カイコの特徴的生命現象を生み出すシステムが明らかになった。
4. 得られた高精度のカイコゲノム情報を地図情報と統合し、生物研のHPでKAIKObase (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>)として公開し、国内外の全ての研究者が利用できる体制を整備した。

[成果の活用上の留意点、波及効果、今後の展望等]

1. 日中共同研究で得られた成果は、カイコゲノム情報のデータベース KAIKObase (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>)として公開し、全世界の研究者が利用できる体制を整えた。今後、完全長 cDNA 情報やタンパク質情報も統合し、より高度なゲノムデータベースへと拡充する。これにより、遺伝子機能解析研究や安全な農薬の開発など産業利用に大きく貢献する。
2. 日中両国は、今後国際コンソーシアムを組織し、世界の関連する研究者の協力の下にカイコゲノム情報からの遺伝子の推定作業を行う予定である。

[具体的データ]

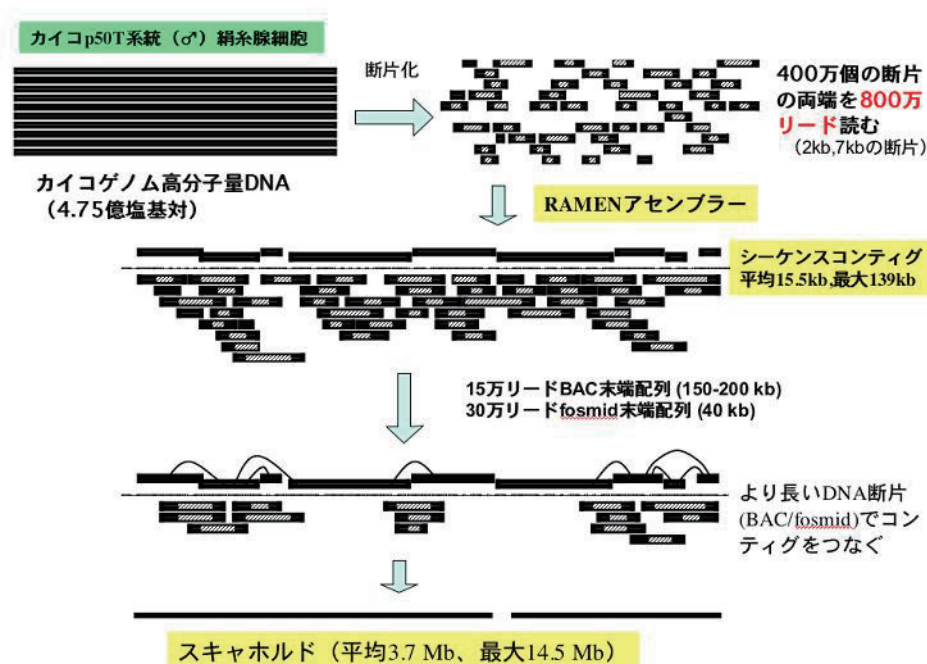


図1 ホールゲノムショットガン(WGS)法の手順

表1 カイコゲノムアセンブル結果

Scaffold statistics (wo/g)			Contig statistics		
	size	#scaffolds		size	#contigs
Max scaffold	14,496,184	1	Max contig	139,031	1
N10 scaffold	7,612,736	5	N10 contig	41,915	785
N20 scaffold	6,299,201	11	N20 contig	30,773	2,006
N30 scaffold	5,377,136	18	N30 contig	24,330	3,590
N40 scaffold	4,475,702	27	N40 contig	19,439	5,588
N50 scaffold	3,716,872	37	N50 contig	15,506	8,077
N60 scaffold	2,574,369	51	N60 contig	11,989	11,248
N70 scaffold	1,776,626	72	N70 contig	8,792	15,441
N80 scaffold	1,110,220	103	N80 contig	5,605	21,521
N90 scaffold	43,109	282	N90 contig	1,934	33,670
Total	431,756,343	43,622	Total	431,756,343	88,842

[その他]

研究課題名：カイコ等昆虫のゲノムリソースの開発と利用

予算区分：昆虫テクノ、中期計画課題コード：A3、研究期間：2006～2009年度

研究担当者：山本公子、門野敬子、末次克行、三田和英

発表論文等：

The International Silkworm Genome Consortium (2008) The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38(12):1036-1045. (カイコゲノム特集号 巻頭論文)

[主要研究成果名] *Krüppel homolog 1(Kr-h1)* 遺伝子を介した幼若ホルモンの変態抑制機構

[要 約] コクヌストモドキの *Krüppel homolog 1(Kr-h1)* 遺伝子が、幼虫形質を維持するために必須の因子の一つであることを見出し、幼若ホルモン(JH)は、JH 受容体候補遺伝子 *Methoprene tolerant (Met)* を介して *Kr-h1* 遺伝子の発現を誘導することで幼虫から蛹への変態を抑制するという、新しい JH の分子作用機構モデルを提唱した。

[キ ー ワ ー ド] 幼若ホルモン、*Krüppel homolog 1*、コクヌストモドキ、RNAi、変態

[担 当] 農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・制御剤標的遺伝子研究ユニット

[連 絡 先] 029-838-6075 [分 類] 知的貢献

[背景・ねらい]

幼若ホルモン(JH)は昆虫の変態を抑制するが、その分子機構は未だに不明である。最近、ショウジョウバエで、蛹化時の人為的な合成 JH の投与によって起こる成虫腹部の発達阻害に、転写因子の一つである *Krüppel homolog 1 (Kr-h1)* が関わっていることが報告された。しかしながら、*Kr-h1* が幼虫期において内在性 JH の変態抑制作用に関与するかどうかは明らかでない。そこで本研究では、RNAi による遺伝子機能解析が容易なコクヌストモドキ *Tribolium castaneum* から *Kr-h1* 遺伝子をクローニングしてその機能を解析し、幼虫期における JH シグナルの基本的伝達経路を明らかにしようとする。

[成果の内容・特徴]

1. コクヌストモドキ *Kr-h1* 遺伝子の発現パターンは、JH 合成の律速酵素である *JHAMT* 遺伝子の発現パターンと似ており、体内 JH 濃度が高いと考えられる幼虫期に高く、JH 濃度が低いと考えられる蛹期には発現が認められない。このことから、*Kr-h1* 遺伝子の発現は、主に JH によって制御されていると予想された。
2. 若齢幼虫で RNAi によって *JHAMT* 遺伝子をノックダウンし、JH 合成を抑制すると *Kr-h1* 遺伝子の発現が低下し、これに JH アナログ (JHA) 処理を行うと発現が再誘導された。このことから、幼虫期の *Kr-h1* の発現が JH によって維持されていることが明らかになった。
3. 若齢幼虫において RNAi によって *Kr-h1* 遺伝子を抑制すると、早熟変態が誘導される (図 1 A, B)。この時、一部の個体は小型の蛹になるが、大部分の個体は蛹化の途中で发育停止し、最終的に全て死亡する。RNAi を施した個体に、JHA 処理を行っても早熟変態は妨げられないことから (図 1 A)、*Kr-h1* は JH 合成ではなく、JH シグナル伝達に関わることがわかる。
4. 4 齢幼虫において、RNAi によって JH 受容体候補遺伝子 *Met* の発現を抑制すると、*Met* とともに、*Kr-h1* 遺伝子の発現も抑制される。一方、*Kr-h1* の RNAi によって、*Met* の発現は抑制されない。したがって、JH シグナル伝達経路において、*Met* は *Kr-h1* 遺伝子の上流に位置する。
5. 上記の結果に基づき、幼虫期における変態抑制に関わる JH シグナリング経路を提唱した (図 2)。すなわち、幼虫期においては高濃度の JH が、JH 受容体 *Met* を介して幼虫決定因子の一つである *Kr-h1* の発現を誘導するために、幼虫-蛹変態を抑制し、終齢になり JH 濃度が低下すると、*Kr-h1* の発現が停止してその変態抑制作用が解除されるために蛹化が起こる。

[成果の活用上の留意点、波及効果、今後の展望等]

1. *Kr-h1* の発現量を指標にした JH アゴニスト、アンタゴニストのスクリーニング法開発への応用が期待される。
2. 今後は、カイコなど他の昆虫種においても上記の JH 分子作用機構モデルが当てはまるかどうかを検証する。

「具体的データ」

(A)

dsRNA (4齢)	JHA	N	蛹化した齢 (蛹化中に発育停止を含む)					その他
			4齢	5齢	6齢	7齢	8齢	
<i>EGFP</i>	—	59	—	—	—	44	15	—
<i>Kr-h1</i>	—	68	2	47	9	5	1	6、7 齢で発育停止: 4
	アセトン	22	3	16	2	1	—	—
	JHA*	20	3	12	1	1	1	JHA処理直後に死亡: 2 4、5 齢で発育停止: 2

*25 ngメソプレン

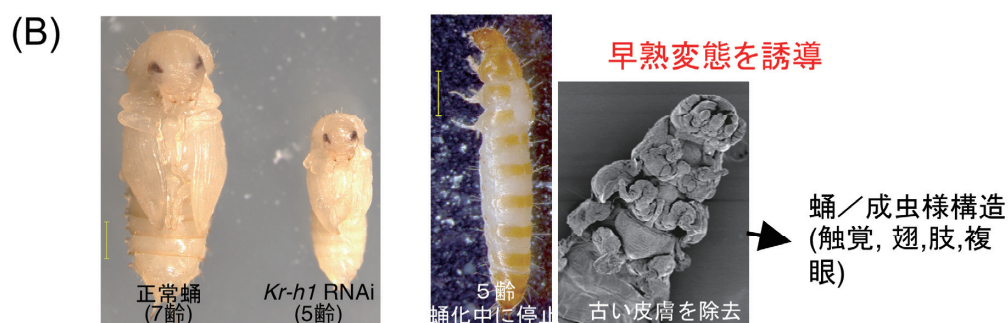


図1 若齢幼虫における *Kr-h1* RNAi の変態に及ぼす影響
 (A) *Kr-h1* RNAi によって誘導された早熟変態の出現数 (ピンク).
 (B) 代表的な表現形. 大部分の個体は蛹化中に発育停止し、最終的に死亡する.

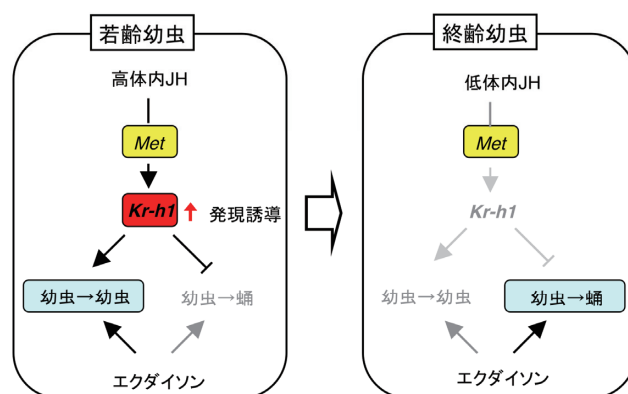


図2 幼虫期の変態抑制に関する JH シグナリング経路

[その他]

研究課題名: カイコゲノム情報に基づく幼若ホルモンネットワーク遺伝子の解明
 研究区分: (生研プロ、JSPS)、 中期計画課題コード: B21、 研究期間: 2005～2008 年度
 研究担当者: 水口智江可、並木俊樹、芳山三千代、篠田徹郎
 発表論文等:

- 1) Minakuchi C, Namiki T, Shinoda T (2009) *Krüppel homolog 1*, an early juvenile hormone-response gene downstream of *Methoprene-tolerant* mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Developmental Biology* 325(2):341-350.
- 2) Minakuchi C, Yoshiyama M, Shinoda T (2008) RNAi-mediated knockdown of *juvenile hormone acid O-methyltransferase* causes precocious metamorphosis in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *FEBS Journal* 275(11):2919-2931.

[主要研究成果名] 遺伝子組換えカイコを用いた蛍光色を持つ高機能絹糸の開発とその利用

[要 約] 遺伝子組換えカイコの作出技術を利用して、緑、赤、オレンジ色等の蛍光を持つ絹糸を始めとして、極細の繭糸、細胞接着性を高めた絹糸を作る実用系統を育成した。次いで、導入した遺伝子産物の性質を残したまま繭から生糸を繰糸する方法を開発し、ワンピース、ジャケット等の織物やインテリア用品の試作に成功した。

[キ ー ワ ー ド] 遺伝子組換えカイコ、蛍光タンパク質、高機能絹糸

[担 当] 農業生物資源研究所・遺伝子組換えカイコ研究センター、昆虫科学研究領域・生活資材開発ユニット、東レ、群馬県蚕糸技術センター、群馬県繊維工業試験場、理研、Amalgaam社

[連 絡 先] 029-838-6091

[分 類] 生物産業

[背景・ねらい]

我が国の養蚕業を復興し、カイコを用いた新産業の創出を図るには、中国、ブラジル、インド、タイ、などで生産される低価格の絹糸と差別化し、海外では真似のできない高価格の糸を作る技術の開発が重要である。

近年、農業生物資源研究所が中心となって遺伝子組換えカイコを作る技術が確立され、カイコの遺伝子を改変することができるようになった。本研究ではこの技術を用いて組換え絹糸の作出法を確立し、繭から糸にして織物に製品化するまでの全工程の開発を試みた。

[成果の内容・特徴]

1. 高機能絹糸を生産する遺伝子組換えカイコの作成

遺伝子組換えカイコを作る技術を利用して、蛍光タンパク質の遺伝子や酸性アミノ酸を多く含む特殊なペプチドの配列をコードする遺伝子を導入した系統を作出した。これらの系統の絹糸を解析した結果、前者では緑や赤、オレンジ色等の蛍光を持つ絹糸が作られることが分かった。また、後者では細繊維度の絹糸を作ることが分かった。

2. 蛍光を持つ絹糸を作る系統については実験系統に改変遺伝子を導入後、品種改良を行い、F1にした場合に実用品種に近い計量形質と質を持つ日本種と中国種を育成した。また、酸性アミノ酸の多いペプチドの遺伝子については細繊維度品種「はくぎん」の親系統に導入した。

3. 緑色、赤色及びオレンジ色の蛍光タンパク質の遺伝子を導入したものと酸性アミノ酸の多いペプチド遺伝子を導入した細繊維度品種について、それぞれ2万頭レベルでの大量飼育を行った。その結果、作成された組換えカイコ幼虫の性質は通常の実用品種とほとんど変わらず、大量の繭が生産された。

4. 遺伝子組換えカイコの繭からの繰糸法の開発

組換えカイコの繭から通常の方法で繰糸すると生糸の蛍光色が失われるため、蛍光色を残したまま、乾燥・繰糸する方法について検討した。その結果、低温で乾燥し、真空とアルカリ浸透液を用いた繭の浸漬処理、低温での繰糸、低温での酵素精練により、蛍光色を保つ絹糸が作成できた（図1）。

5. 試作品の作成

得られた絹糸を用いてスーツ、ドレスなどの婦人用衣服、タピストリーなどの織物、ランプシェードなどのインテリア製品の試作が行われ、従来にない製品ができることが明らかにされた（図2）。

[成果の活用上の留意点、波及効果、今後の展望等]

特許の許諾や組換えカイコの農家等での大量飼育法を確立することにより、実用化技術として有望である。

〔具体的データ〕

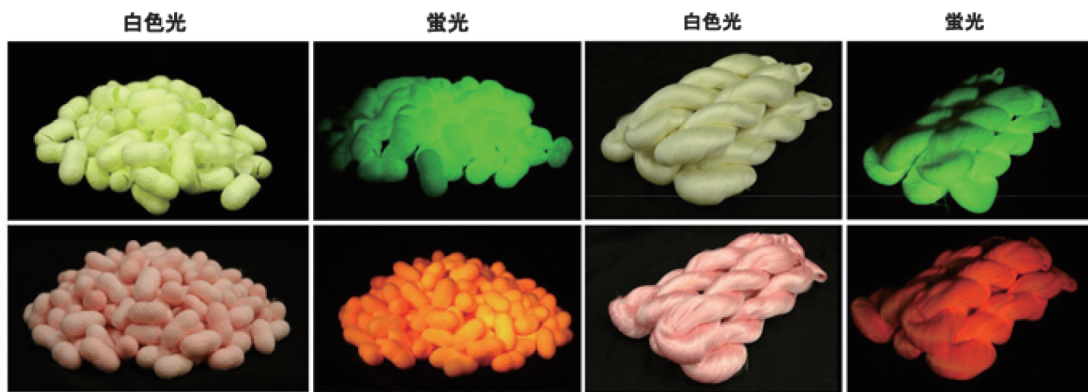


図1 緑（上）及び赤色（下）に光る遺伝子を挿入した組換えカイコの繭と生糸



図2 蛍光を持つ絹糸を用いて作られた婦人用の衣服

〔その他〕

研究課題名：遺伝子組換え昆虫を利用した有用物質生産技術の開発

予算区分：交付金、 中期計画課題コード：C13、 研究期間：2007～2008 年度

研究担当者：田村俊樹、米村真之、飯塚哲也、立松謙一郎、瀬筒秀樹、小林 功 他

発表論文等：

- 1) 瀬筒秀樹、小林さや香、飯塚哲也、立松謙一郎、内野恵郎、小林 功、米村真之、小島 桂、高林千幸、唐沢智司、水野秀昭、宮脇敦史、田村俊樹（2008）オレンジ蛍光タンパク質を絹糸に発現する遺伝子組換えカイコの作出。第78回日本蚕糸学会講演要旨：67.
- 2) 国内特許出願「外来遺伝子発現カイコ繭の製糸方法及びそれによる製品」高林千幸、宮崎栄子、木下晴夫、田村俊樹、飯塚哲也、瀬筒秀樹、立松謙一郎、町井博明 他（特願2008-269855）

〔主要研究成果名〕 組織再生に有用なコラーゲンビトリゲルの開発

〔要 約〕 熱変性タンパク質のガラス化技術を応用することで、生体内の結合組織に匹敵する高密度のコラーゲン線維で形成されるゲル（コラーゲンビトリゲルと命名）を世界に先駆けて作製した。コラーゲンビトリゲルは、上皮間充織や癌血管などの三次元培養モデルを容易に作製するための培養担体として有用であるのみならず、薬物送達システムとしても活用できることから、再生医療や創薬の研究発展に寄与する。

〔キーワード〕 コラーゲン、培養担体、培養モデル、再生医療、創薬、動物実験代替法

〔担 当〕 農業生物資源研究所・遺伝子組換え家畜研究センター、旭テクノグラス(株)

〔連絡先〕 029-838-8689

〔分類〕 生物産業

〔背景・ねらい〕

コラーゲンゾルに生理的な塩濃度、水素イオン濃度および温度を付与してゲル化を誘導する従来のコラーゲングル作製技術では、低密度のコラーゲン線維で形成されるゲルしか作製できない。この低密度のコラーゲン線維のゲルは柔らかく不透明であるため、組織を再生する培養担体としては取り扱いが困難である。そこで本研究では、熱変性タンパク質のガラス化技術を従来のコラーゲングルに応用することで、高密度のコラーゲン線維で形成されるゲルを作製して、動物細胞の培養担体に応用することを目指す。

〔成果の内容・特徴〕

1. 熱変性タンパク質のガラス化（vitification）技術を従来のコラーゲングルに応用した後、さらに再水和して得られるゲルでは、ガラス化の期間を長くすると体積が100分の1程度までに減少して、コラーゲン線維密度が100倍程度までに高くなる。その結果、強度、透明性およびタンパク質透過性に優れた新しい物性状態のゲルが得られる（図1）。この様なガラス化工程を経て作製できる新しい安定状態のゲルをビトリゲル（vitrigel）と命名した。
2. 環状ナイロン膜の支持体付きコラーゲンビトリゲル薄膜から成る培養担体上に細胞を二次元培養した後に、ピンセットで担体を裏返して異種細胞を二次元培養することで、上皮間充織や癌血管などの三次元培養モデルを容易に作製できる（図2）。
3. 神経成長因子（NGF）を産生するマウス線維芽細胞株（L929細胞）は、コラーゲンビトリゲル薄膜を介してパラクライン作用することで、NGFに応答して神経様突起を伸長するラット副腎髄質褐色細胞株（PC12細胞）の分化を誘導する（図3）。つまり、コラーゲンビトリゲル薄膜を介して、異種細胞間のパラクライン作用により標的細胞の分化を誘導する培養モデルが構築できる。
4. 血管内皮増殖因子（VEGF）を含有させたコラーゲンビトリゲル薄膜は、VEGFを継続的に徐放する。また、ラット皮下へ移植したVEGF含有コラーゲンビトリゲル薄膜は、血管新生を誘導する（図4）。

〔成果の活用上の留意点、波及効果、今後の展望等〕

1. コラーゲンビトリゲルは、構成成分や形状（薄膜、管および糸など）を改変したり、他の機能性材料とハイブリッド化することで、新しい機能を伴ったバイオマテリアルに変換することができる。その結果、細胞を伴わないバイオマテリアルとして活用する応用研究と細胞培養担体として利用した培養モデルを活用する応用研究が可能となる。
2. 再生医療の分野では、病変部の被覆あるいは結紮に有用であるのみならず、薬物送達システム（DDS）機能も兼ね備えたバイオマテリアルとしての応用、あるいは欠損した組織を再生させる細胞を移植するための培養担体としての応用が期待される。
3. 創薬研究の分野では、低分子のみならず高分子の生理活性物質も透過・徐放できるので、薬効および毒性の評価、そのメカニズム解析、あるいはDDSなどへの応用が期待される。

[具体的データ]

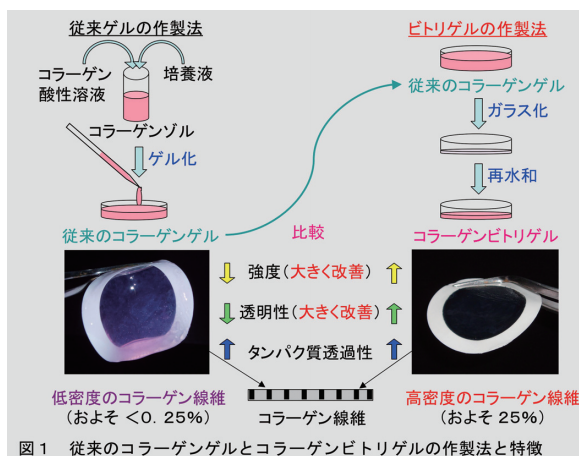


図1 従来のコラーゲンゲルとコラーゲンビトリゲルの作製法と特徴

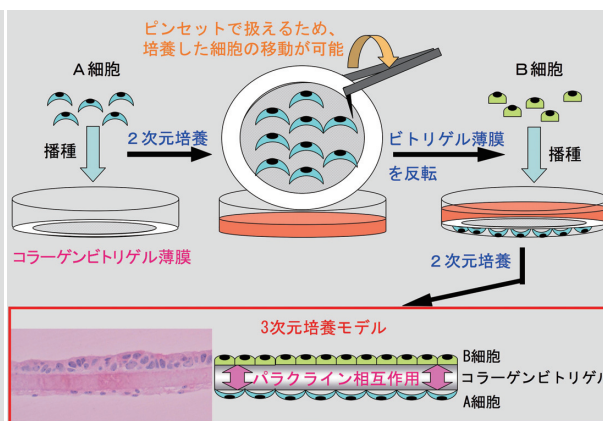


図2 支持体付きコラーゲンビトリゲル薄膜を利用した培養技術の特徴

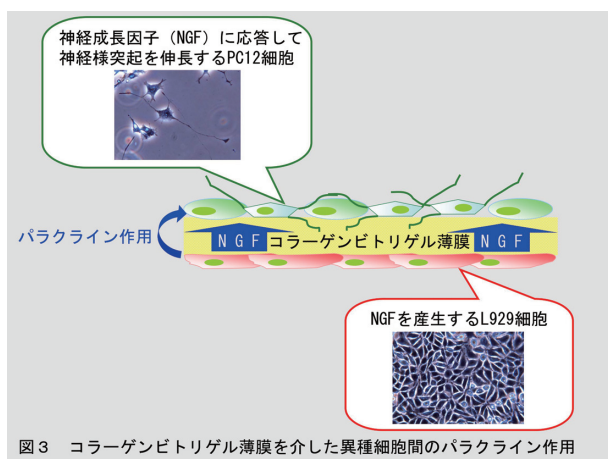


図3 コラーゲンビトリゲル薄膜を介した異種細胞間のパラクライン作用

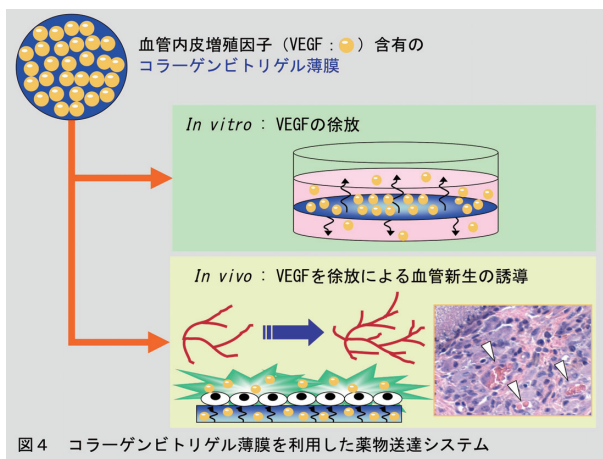


図4 コラーゲンビトリゲル薄膜を利用した薬物送達システム

[その他]

研究課題名：機能性培養担体による細胞挙動の制御と三次元組織の再生

予算区分：交付金、 中期計画課題コード：A5217、 研究期間：2004～2005年度

研究課題名：ゲル薄膜培養担体を活用した培養モデルの構築とその有用性の検証

予算区分：増殖分化、 中期計画課題コード：C14、 研究期間：2005～2008年度

研究担当者：竹澤俊明、二谷 綾（旭テクノグラス）

発表論文等：

- 1) Takezawa T, Ozaki K, Nitani A, Takabayashi C, Shimo-Oka T (2004) Collagen vitrigel: A novel scaffold that can facilitate a three-dimensional culture for reconstructing organoids. *Cell Transplantation* 13(4):463-473.
- 2) 国内特許出願「磁気付与型ハイドロゲル薄膜」竹澤俊明（特願2006-003468）
- 3) Takezawa T, Takeuchi T, Nitani A, Takayama Y, Kino-oka M, Taya M, Enosawa S (2007) Collagen vitrigel membrane useful for paracrine assays *in vitro* and drug delivery systems *in vivo*. *Journal of Biotechnology* 131(1):76-83.
- 4) 竹澤俊明 (2008) 生体内環境を反映した細胞培養担体の開発とその再生医療あるいは創薬研究への応用構想. *バイオインダストリー* 25(1):8-16.

[主要研究成果名] ガラス化冷却・超低温保存したブタ体外成熟・受精卵からの産仔作出
[要 約] ブタ卵胞卵を体外成熟・受精後に、超遠心により脂肪滴を偏在化させ、可視化した前核が2、3個の胚発生率の高い卵を選抜し、ガラス化冷却し液体窒素中に超低温保存後に、加温（融解）して、発情を同期化した他の雌豚に移植することにより正常な産仔を得た。
[キ ー ワ ー ド] ブタ、体外成熟、体外受精、受精卵、ガラス化冷却、超低温保存、胚移植
[担 当] 農業生物資源研究所・動物科学研究領域・生殖機構研究ユニット
[連 絡 先] 029-838-7447 [分 類] 技術開発

[背景・ねらい]

家畜では精子の超低温保存は比較的容易であるが、卵や初期胚の保存は難しい。ブタでは、発生が進んだ胚盤胞期胚の超低温保存は可能で、2～4細胞期の胚については細胞質内の脂肪滴を顕微操作により除去することで可能となる。しかし未受精卵や受精卵（1細胞期）での報告はない。一方、遺伝・育種資源の保存を促進するためには、顕微操作等の複雑な過程を経ず、卵に損傷を与えない簡便な手法の開発が望まれる。そこで、本研究では、体外成熟・受精卵の脂肪滴を超遠心により偏在化し、ガラス化冷却・超低温保存し、加温後の体外ならびに体内での発生能を確認し、産仔を産出する。

[成果の内容・特徴]

1. 性成熟に達していない雌豚より卵胞卵を回収し体外成熟を行い、成熟した卵を選別し体外受精を行う。受精を開始してから後10時間で、卵を20分間37℃、10,000×g で遠心処理をして脂肪滴を偏在化させ、前核を可視化する。ブタ体外受精では多精子受精が多く、その発生率が低いため、実体顕微鏡下で2ないし3個の前核を有する卵（それぞれ、単精子受精卵ならび軽度の多精子受精卵）を選抜（以下、体外成熟・受精卵と言う）し、以後の実験に使用する（図1）。
2. 対照区（耐凍剤で処理せず既報通りに体外胚培養）と耐凍剤対照区（耐凍剤で処理後に対照区と同様に体外胚培養）を比較したところ、培養2日目の卵割率、6日目の胚盤胞率およびその平均細胞数に差はない（表1）。体外成熟・受精卵に対して耐凍剤処理の影響がないことから、以後の実験では耐凍剤処理を行う。
3. 従来の鉄と比べ熱伝導度の高いアルミホイルを利用した改良solid surface vitrification (SSV) により体外成熟・受精卵のガラス化冷却を行い、液体窒素中に超低温保存し、加温（37℃、2分）後に体外培養し、胚の発生能を調べた。冷却・超低温保存を行わない体外成熟・受精卵（対照区）と、冷却・超低温保存し加温した体外成熟・受精卵（実験区）の生存率に差はない。一方、卵割率および胚盤胞率は対照区に比べて実験区で有意に減少する。しかし、胚盤胞の平均細胞数には両区で差がない。これらの結果より、体外成熟・受精卵をガラス化冷却・超低温保存し加温すると、その発生能は低下するが、ひとたび発生すれば胚の品質は影響されることが分かる（表2）。
4. ガラス化冷却・超低温保存し加温した体外成熟・受精卵を他の雌豚5頭に1頭あたり150個移植したところ、3頭から計16頭の生存仔豚（それぞれ、5、2ならびに9頭）が得られた（図2）。仔豚は順調に発育し、繁殖に供することができた。

[成果の活用上の留意点、波及効果、今後の展望等]

1. ブタ体外成熟・受精卵をガラス化冷却・超低温保存し産仔作出が可能であることを世界で初めて示した。遺伝・育種資源の保全に有用であり、今後、技術の安定化が必要である。
2. 更にブタ未受精卵（未成熟卵ならびに成熟卵）の超低温保存法の開発に着手する。未受精卵と精子を別個に超低温保存し、必要時に体外受精・移植を行えるようになれば、遺伝・育種資源の保存・利用という観点から意義深い。
3. 未利用資源として卵巣に数多く潜在する原始卵胞（卵）の超低温保存を行う。超低温保存後の卵巣組織片を免疫不全マウスに移植し体内発育させ、発育した卵胞より卵を回収して受精卵や初期胚の作出を目指す。

[具体的データ]

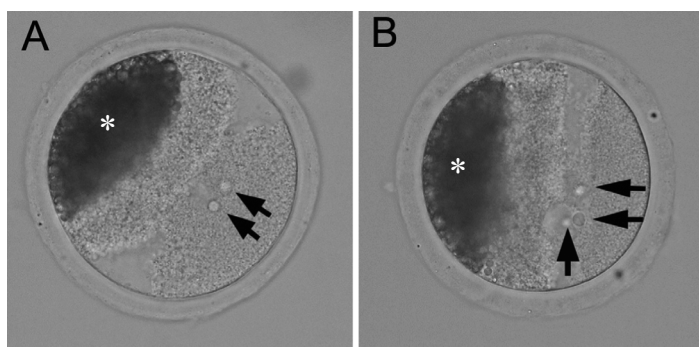


図1 遠心処理後の受精卵
前核(矢印)はAでは2つ(雌雄両前核からなる単精子受精卵)、Bでは3つ(多精子受精卵)が確認される。
*:偏在化された脂肪滴。



図2 ガラス化冷却・加温後の体外成熟・受精卵を移植して生産された仔豚(14日齢)

表1 耐凍剤処理のブタ体外成熟・受精卵の体外胚発生におよぼす影響

耐凍剤	供試受精卵数	培養2日目	培養6日目	
		卵割した胚(%)	胚盤胞(%)	細胞数
— (対照区)	265	235 (88.1 ± 1.4)	65 (23.2 ± 1.4)	38.0 ± 2.0
+	281	243 (86.1 ± 2.4)	58 (20.8 ± 1.4)	41.2 ± 1.7
(耐凍剤対照区)				

表2 ガラス化冷却処理のブタ体外成熟・受精卵の体外胚発生におよぼす影響

ガラス化 冷却	供試受精卵数	処理後の生存卵 (%)	培養2日目	培養6日目	
			卵割した胚(%)	胚盤胞(%)	細胞数
— (対照区)	153	153 (100)	132 (86.3 ± 1.5) ^a	37 (24.2 ± 2.0) ^a	41.6 ± 3.3
+	184	172 (93.4 ± 3.5)	131 (71.6 ± 7.5) ^b	28 (15.2 ± 2.1) ^b	41.2 ± 3.4
(実験区)					

^{a, b} 異符号間で有意差有り (P<0.05)。

[その他]

研究課題名：発生分化に関する因子と機構の解明

予算区分：(交付金)、中期計画課題コード：B-3)-(1)、研究期間：2006～2010年度

研究担当者：菊地 和弘、ソムファイ タマス、中井 美智子、柏崎 直巳(麻布大)、永井 卓(畜草研)

発表論文等：

- 1) Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Nakai M, Maedomari N, Ito J, Kashiwazaki N, Nagai T, Kikuchi K (2009) Live piglets derived from in vitro-produced zygotes vitrified at the pronuclear stage. *Biology of Reproduction* 80(1):42-49.
- 2) 菊地 和弘, Somfai T, 中井 美智子, 柏崎 直巳, 永井 卓 (2009) ブタ体外成熟・受精卵の超低温保存と発生能. 日本胚移植学会雑誌 [印刷中].

平成20年度の主要な研究成果

発 行 平成21年4月
発行者 独立行政法人 農業生物資源研究所
〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2
TEL 029-838-8469 (広報室)
URL <http://www.nias.go.jp>
印 刷 朝日印刷株式会社 つくば支社
〒305-0046 茨城県つくば市東2-11-15
TEL 029-851-1188 FAX 029-856-5009

本書から転載・複製する場合は当所の許可を得て下さい。