

農業生物資源研究所 ニュース No.6

CONTENTS

研究トピックス

顕微授精により子豚が誕生!!
 - 体外成熟卵子での世界初の成功例 -
 エンバク由来の抗菌性タンパク質遺伝子導入による
 細菌病抵抗性イネの開発

イネゲノム研究の展開

イネゲノム塩基配列解析データの一元化とその意義

受賞・表彰

2002年度日本畜産学会賞受賞
 平成14年度文部科学大臣表彰(研究功績者表彰)受賞

国際シンポジウム報告

第4回昆虫分子生物学国際シンポジウムに参加して

武部農林水産大臣、農業生物資源研究所を
 ご視察

| 非組換えイネ | 組換えイネ | | |
|--------|----------|----|-------|
| 健全 | 2 | 77 | 91 系統 |
| | もみ枯細菌病接種 | | |



エンバク由来の抗菌性タンパク質を、遺伝子組換えにより高発現させたもみ枯細菌病抵抗性イネ(右3系統)



農業生物資源研究所に来所され、イネゲノム研究について説明を受けられる武部農林水産大臣(手前中央)

研究 TOPICS

顕微授精により子豚が誕生!!

- 体外成熟卵子での世界初の成功例 -

農業生物資源研究所のジーンバンク事業では、動物遺伝資源の保存の一環として精子を凍結保存しています。一般に、凍結・融解した精子の受精能には個体差があって、中には運動性を全く示さず人工授精や体外受精を行っても受精・受胎しないものが存在し、遺伝資源の保存・利用の面で問題となっ

ています。この傾向はブタでは特に顕著です。運動性を失った精子を用いて家畜の妊娠・出産を可能とする技術は、希少動物や品種すなわち遺伝資源の保存・利用に必要不可欠なものです。精子を直接卵子に注入し受精卵を人為的に作出する「顕微授精」はそれを可能にする方法です。体外成熟卵子を用いた顕微授精は、すでに一部の家畜やヒトで妊娠・出産の成功例が報告されていますが、豚での成功例は、安定した受精・受胎の結果が得られる体内成熟卵子を用いた場合に限られていました。私たちは、労力・コスト面で有利な体外成熟卵子を用いた顕微授精による豚の妊娠・出産を可能とする技術の開発に取り組み、世界で初めて豚の妊娠・出産に成功しました。

まず、屠場（とじょう）から入手した卵巣から未成熟卵子を採取

し、あらかじめ体外培養することによって成熟させておいた体外成熟卵子の細胞質内に、凍結保存・融解後に尾部を切断・除去した精子の頭部だけを注入しました。レシピエント雌豚7頭を対象に、電気刺激によって活性化した受精卵子を1頭あたり55～150個移植しました（図1）。

2～3か月後に2頭の妊娠が確認され、このうちの1頭（100個移植の個体）が出産予定日に達しました。出産の兆候がなかったことから帝王切

開を行ったところ、元気な3頭の子豚（オス1頭、メス2頭）が誕生しました（図2）。

この技術は、運動性が悪く受精能力の劣る精子と、屠畜（とちく）材料からも省力・低コストで容易に得られる体外成熟卵子の組み合わせによって、繁殖を可能とするもので、次のような応用が期待されます。1）凍結保存精子のほか、受精能力の劣る希少動物・希少品種の精子の利用が可能となります。2）複雑な操作を必要としない簡便な精子の保存法や凍結乾燥法など新たな精子の保存法が期待できます。3）精子を介した形質転換動物の効率的な作製が可能となります。

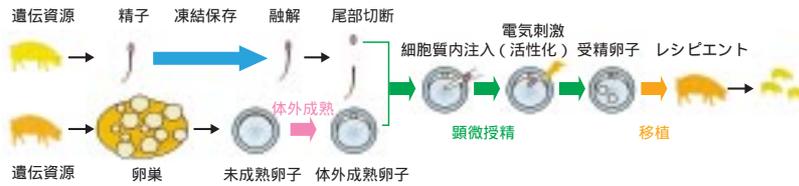


図1 顕微授精（細胞質内精子注入）による豚の作出法



図2 顕微授精により誕生した子豚

ことばの解説

顕微授精：顕微鏡下でマイクロマニピュレータを用い、精子を直接卵子の細胞質に注入し、人為的に受精させる手法。

体外成熟卵子：屠畜や斃死（へいし）した雌の卵巣から未成熟卵子を取り出し、体外で培養すると受精・発生能をもつ成熟卵子が得られる。体内成熟卵子にくらべて労力やコストの面で優れるが、受精・発生能が低いとされている。

レシピエント雌豚：体外操作卵子や胚を移植される雌豚。ホルモン製剤の投与により性周期を受精卵の発生ステージに同期化させて移植を行う。

形質転換動物：外来遺伝子を導入することにより、遺伝的に改変された動物。DNA懸濁液中に精子をさらしたり、あるいは精巣内にDNAを注入し、DNAを精子にまわりつかせた状態で、体外受精あるいは顕微授精して形質転換動物を作出する方法が考案され、効率がよいと報告されている。

ひとこと

顕微授精は受精技術の向上にとどまらず、生命の始まりである受精現象を研究するためのよい手法となります。



（遺伝資源研究グループ生殖質保全研究チーム主任研究官 菊地和弘）

研究 **T**
トピックス
TOPICS

エンバク由来の抗菌性タンパク質遺伝子
導入による細菌病抵抗性イネの開発

エンバク（カラスムギ）から単離した抗菌性タンパク質遺伝子をイネに導入し多量に発現させることによって、複数の重要細菌病害（イネ立枯細菌病およびもみ枯細菌病）に抵抗性を示すイネが作出されました。

育苗期に苗立枯細菌やもみ枯細菌に感染すると、緑色のイネ苗が褐色になって腐り、移植に使えなくなります。また、もしこれらの病気に感染した苗が水田に移植され、発病すると、不稔（ふねん）もみ、障害もみを発生させるとともに、種子に細菌が残ることにより種もみの汚染も引き起こします。近年、これらの細菌は難防除性の細菌病を引き起こすものとして、恐れられるようになってきました。これは機械植えに適したイネ苗を迅速に作るために、もともと水中での生育に適したイネを陸上の好氣的条件で、しかも高温・多湿下で育てることによって軟弱になったためではないか、といわれています。

これらの細菌病を防除するために化学農薬（抗生物質）が使われてきましたが、環境への影響や耐性菌の誘導の恐れが指摘されています。

遺伝子組換え技術により、実用イネ品種にこれらの細菌病に対する抵抗性を付加することができれば、従来の防除技術の弱点を克服し、手間がかからず、環境にもやさしい農業が行えるものとその開発が待たれていました。

ここで開発された組換えイネは、発芽の段階からエンバク由来のチオニンを多量に合成しているので、たとえこれら種子伝染性の病原細菌に接触しても、これらの細菌が感染する器官である鞘葉（しょうよう）における増殖を抑えることができました。この組換えイネは、ふつうの条件ではこれらの細菌に強い抵抗性を示すことから、省農薬・省労力栽培が期待されます。

今回、作成した組換え体の中ではエンバクチオニンを全身で作らせています。しかし、これらの細菌病耐性を目的にする場合、全身でなく鞘葉（および根）中心に発現させることで十分な防除効果が上げられるものと思われます。今後、導入遺伝子をもその目的に合うように改良すれば、「原品種の特性をそのまま保持した耐病性組換えイネ」という、理想に近い組換え体が作れるものと考えられます。

（この研究は、分子遺伝研究グループ、遺伝資源研究グループ、宮城県農業・園芸総合研究所との共同研究によって行われました。）

| 組換えイネ | 非組換えイネ |
|---------|--------|
| 立枯細菌病接種 | 健全 |



右の2つは、イネ原品種（チヨホナミ）。一番左は、エンバクチオニン遺伝子を導入したチヨホナミ。一番右は、健全イネ。左の2つはイネ立枯細菌病を接種して10日後のイネ。非組換え体（中央）は、病原細菌によって枯れてしまっているが、組み換え体（左）はほぼ正常に育っている。

ことばの解説

チオニン：複数のシスチン結合を含む小さなタンパク質で、細菌の細胞膜の透過性を変化させることにより抗菌性を示すと考えられています。

鞘葉：イネの鞘葉は子葉に相当するものといわれ、水中で発芽するとまず、1～2cm 鞘葉が伸びます。そのころまでに中で伸びてきた第一本葉がその先端に達すると、鞘葉の腹面が縦に裂けて本葉が外に出てきます。

ひとこと

消費者にも生産者にも喜ばれる有用組換え植物を作るためには、関連基礎研究を進めることが重要です。



（分子遺伝研究グループ特待研究員 大橋祐子）

イネゲノム研究の展開

イネゲノム塩基配列解析データの一元化とその意義

イネは主要食料生産植物として、またイネ科穀類ゲノム研究の基準植物として、このうえなく重要な植物です。ここ10年間の急速な分子レベルでのイネ遺伝解析の進展と、遺伝暗号の基盤である塩基配列解析技術の進歩により、約4億塩基対という“巨大”なイネゲノム中のA、G、C、Tの並び方すべてを読み取る計画が現実のものとなりました。この配列の中にイネの草丈、花の咲く時期、コメの味など、あらゆる遺伝する性質が暗号として書き込まれています。もちろんこれまでに解き明かされた暗号はごく一部で、今後いろんな方法でイネの重要な性質にかかわっている暗号の意味を明らかにしなくてはなりません。この重要な暗号情報源である塩基配列の読み取りは、4年

れます。一方、この重要な暗号情報の先取をめざして、民間企業が独自に取り組んだのも当然といえます。かれらは暗号の正確な存在場所や配列読み取りの精度は二の次にして、配列の概要をイネゲノム全体にわたり、早く、おおざっぱに捉える方法を用いています。しかし、この方法で得た情報ではイネの遺伝現象、例えばいつ花が咲き、なにがコメの味を決めているかなどの原因となる暗号を正しく突き止め、それがもつ意味をきちんと理解することはできません。イネがその長い分化と進化の過程で獲得したこのような性質を決めている遺伝暗号を解き明かすには、正しく解読された塩基配列が欠かせないのです。

民間企業も国際コンソーシアムと同様に、イネ品種「日本晴」DNAを材料に配列読み取りを行っていました。これは偶然ではなく、「日本晴」でなくてはならなかったのです。なぜなら国際コンソーシアムの配列解読の精度ははるかによく、解読結果を公開していきますからそれを取り入れてデータを改善すればいいのです。しかし、イネのように人類全体にとって大切な生物の遺伝暗号配列の読み取りは民間企業と公的機関が互いに協力して配列公開を前提に、迅速に行うことが望



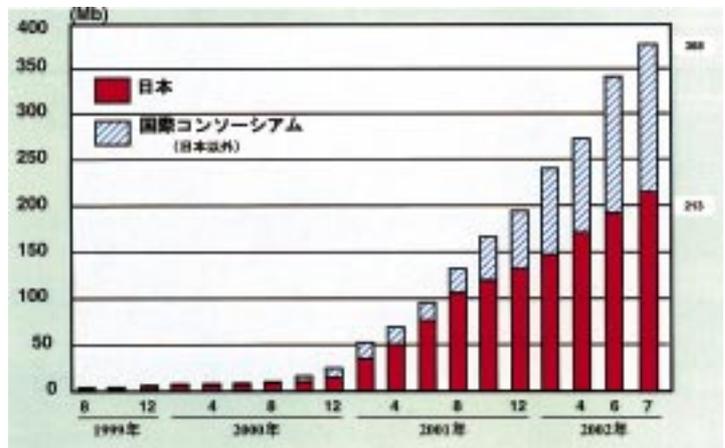
前からわが国を中心として結成した国際コンソーシアムにおいて、暗号の存在場所をまず正確に突き止めた後で、情報を詳細に取り出す方法を採用して協力して行ってきました。読み取られた配列は直ちに公開され、世界中の研究者に利用さ

左上は今回の会議の会場となったGenoscope研究所。右下は会議参加メンバーをGenoscope研究所屋上にて撮影。日本から4人の参加者（ゲノム研究グループ佐々木グループ長および松本チーム長、STAFF研究所主任研究員、技術会議事務局杉本調査官）の顔も見える。

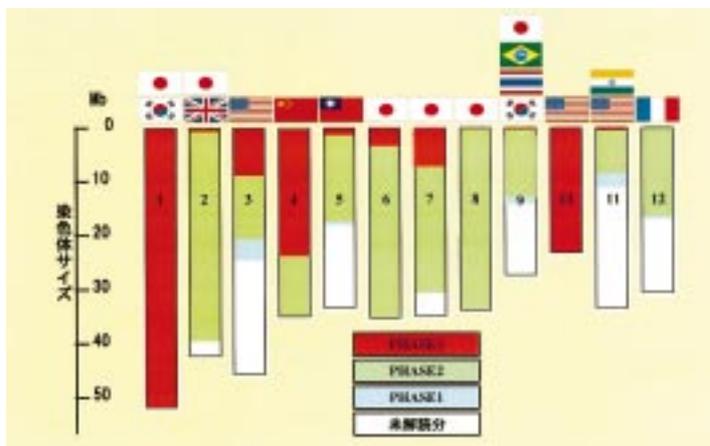
まれていました。どんな団体であれ、配列情報を独占することは社会的に許されないことなのです。2年前にはモンサント社が、不完全な形ではあるものの、暗号が解読されたDNA断片を並べた地図をこれらの断片とともに国際コンソーシアムに無償で提供しました。これらは国際コンソーシアムによる暗号の読み取りとそれらの公開速度を速めるのに大変役立ちました。特にわが国のように国際コンソーシアムにおいて、イネゲノムのほぼ半分の読み取りを担当している国にとっては望ましいものでした。今年4月にはシンジェンタ社が、ゲノム全体にわたる暗号解読情報を国際コンソーシアムに無償で提供しました。この情報は解読の下敷きとなる地図を作らずに配列を読み取り、読み取った後でコンピューターソフトを頼りに同一の配列を探し、重ね合わせてつないで得たものです。ですから多数の隙間がありますが、一方、国際コンソーシアムの用いている方法では隙間になっているところを偶然埋めている可能性もあります。今後の利用を通してその価値が評価されるでしょう。

と、民間企業からのデータの提供をうけながら2002年12月1日に完成に限りなく近い形で提供することを約束しています。この約束を守るために国際コンソーシアム参加各国メンバーは日夜たいへんな努力を傾けています。5月にはメンバーの一つであるフランス・Genoscope研究所に集まって、今年2月以降の読み取り成績と年末までの見通しをお互いに報告しました。その結果、現在の分担枠をそのまま継続して行うことで、約束が守れることを確認しました。また、今後更に完全

イネゲノム塩基配列解析累積 (1Mb = 百万塩基対)



国際コンソーシアムにおける染色体分担と解読状況 (2002.7)



にイネゲノムのすべての部分の暗号を読み取る努力を継続することも申し合わせました。

こうしてイネ品種「日本晴」の解読配列は国際コンソーシアムと民間企業がそれぞれ読み取ったものを統一し、公開できることになりました。この配列情報は今後「基準配列」として広く利用され、イネの重要な性質に関わっている遺伝暗号の解読や、イネ品種間の遺伝暗号の違いがこれらの性質にどんな違いをもたらすのかを解き明かすのに役だったり、イネ以外の穀類、たとえばトウモロコシやムギのゲノム研究の推進に役立つことは間違いありません。

国際コンソーシアムは、高い信頼度と正確さで読み取られたイネ遺伝暗号の全配列を、世界中のだれでもが早い時期に自由に利用できるように

間違いありません。これからの新たな研究の展開が楽しみです。

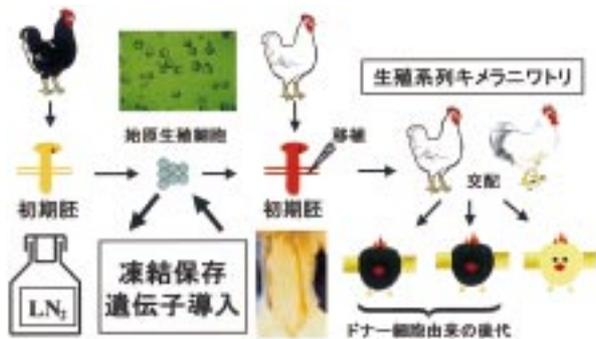
(ゲノム研究グループ長 佐々木卓治)

受賞・表彰

2002年度日本畜産学会賞受賞

- 家禽における胚操作技術の開発と生殖細胞操作への応用に関する研究 -

ニワトリ胚は古くから発生学の材料として多用されてきましたが、操作胚を孵化（ふか）させ個体レベルで解析することに関しては、その発生学上の特性から困難とされてきました。それは初期発生が母鶏の体内で卵形成の過程と並行して行われ、放卵後は卵殻内での体外発生となるためです。ニワトリの卵管から取り出した未分割の受精卵を体外で培養し孵化させる技術が1988年に開発され、鳥類胚操作研究が新たな展開を迎えることになりました。今回の一連の研究では、この体外培養法の開発を受けて孵化率を改良することから始め、改良された体外培養法を用いて、鳥類キメラの作出や遺伝子導入、さらには鳥類における遺伝資源保存法の開発を試みました。



始原生殖細胞の移植による生殖系キメラニワトリの作出

鳥類キメラの作出に関しては、発生に伴い卵子や精子に分化する細胞である始原生殖細胞に着目し、ニワトリ初期胚から採取した始原生殖細胞を別種のニワトリ初期胚に移植することにより、生殖系細胞がキメラになった個体を効率的に作出するシステムを開発しました。そして、初期胚から採取した始原生殖細胞への外来遺伝子の導入を試みた結果、移植されたレシピエント胚の生殖巣において効率的に外来遺伝子の導入と発現が観察されました。しかし、これらの外来遺伝子はほとんどが染色体外に存在するため、胚の発生や個体の成長の過程で消失してしまいました。今後、遺伝子導入効率や染色体への外来遺伝子の組み込み効率の高い方法を用いることにより、形質転換ニワトリを作出できると期待されます。さらに、体

外に取り出した始原生殖細胞を液体窒素中で凍結保存し、融解後レシピエント胚へ移植することにより、凍結保存した始原生殖細胞由来の後代を作出することに成功しました。このことは、鳥類の遺伝資源を細胞レベルで保存することを可能にしたものです。この他、未分割の受精卵への外来遺伝子の直接注入により、孵化した個体の体細胞や生殖細胞への外来遺伝子の導入にも成功しています。形質転換ニワトリの作出は広範な応用が期待されるため、ニワトリ個体への効率的な遺伝子導入法の開発に向け、現在も研究を続けています。

最後になりましたが、今回の受賞対象となった研究は多くの方々との共同研究で進めてきたものであり共同研究者の方々に感謝するとともに、受賞に際しお世話になった関係者の皆様には厚くお礼を申し上げます。



賞状授与（上）と記念講演（下）

（発生分化研究グループ発生制御研究チーム長
内藤 充）

受賞・表彰

平成14年度文部科学大臣表彰（研究功績者表彰）受賞

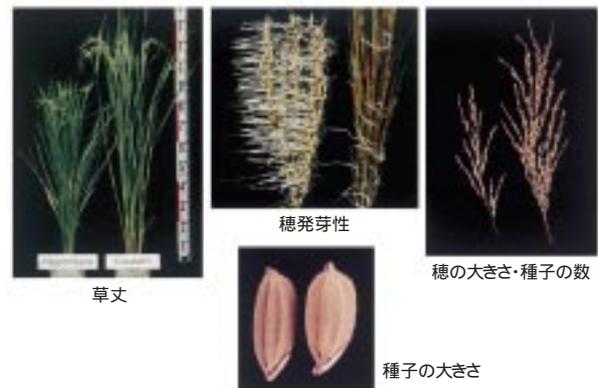
- 植物の量的形質に関する遺伝的制御機構解析手法の研究 -

植物の背丈や花が咲く時期のような性質（形質）は、複数の遺伝子の働きと温度や日長のような環境条件によって決定されるために、遺伝の仕組みが複雑です。このような形質は、品種をかけ合わせた雑種の子孫で連続的な違いを生じるために、量的形質とも呼ばれます。従来の遺伝学では量的形質の詳しい解析は不可能でした。イネのみならず多くの作物では、多収性や良食味などの品種改良のうえで重要な形質の多くがこの量的形質に含まれます。品種改良を効率化するためには、量的形質にどのような遺伝子が関わり、どのような仕組みで形質が決まるのかを明らかにすることが課題でした。

ミレニアムプロジェクトの一環として進められているイネゲノム研究の進展は、このような形質に関与する遺伝子（量的形質遺伝子座：QTL）を詳しく調べるための有効な道具と情報を提供してくれました。私たちはイネの量的形質の一つである出穂（しゅっすい）期（開花時期）に関わる遺伝子の解析に取り組みました。詳細な遺伝解析に不可欠なイネの実験材料の作出とともにイネゲノム研究によって作成された遺伝的標識（マーカー）による解析によって、イネのゲノム中に存在する15種類の出穂期関連遺伝子を明らかにしました。そのうち3種類の遺伝子については、ゲノム上の遺伝子の位置を精密に決定する手法（マップベースクロニング法）によって遺伝子の塩基配列を単離・同定し、出穂期を決定している仕組みの一部を明らかにしました。この研究によ



見出したQTLを利用した水稻品種「日本晴」の出穂期の改変



イネの量的形質の例

て、イネ（短日で開花が促進される）の出穂期関連遺伝子は、シロイヌナズナ（長日で開花が促進される）と呼ばれるモデル植物の開花関連遺伝子とよく似た塩基配列をもっていることがわかりました。また日長に対する異なる開花習性がどのような仕組みで決められているのかが新たな興味となりました。また育種への応用として、見出したQTLを利用した出穂期の改変も進めています。

この出穂期をモデルとした一連の研究によって、ゲノム研究の成果とユニークな実験材料を組み合わせた解析手法が、従来では困難であった複雑な量的形質に関わる遺伝子の分子レベルでの実体を明らかにするうえで有効であることが証明されました。この解析手法は、出穂期だけでなくイネの草丈、一つの穂につく種子の数、種子の大きさや寒さに対する強さなど、品種改良において重要な形質の遺伝解析や遺伝子単離に応用されています。受賞対象となった研究は、北陸農業試験場（現農業技術研究機構・中央農業総合研究センター・北陸研究センター）、農業生物資源研究所ならびにSTAFF（農林水産先端技術研究所）の多くの方々の協力のもとに進められたものです。共同研究者の皆様および貴重な助言や励ましをいただいた多くの皆様に感謝いたします。



（分子遺伝研究グループ応用遺伝研究チーム長 矢野昌裕）

国際シンポジウム報告

第4回昆虫分子生物学国際シンポジウムに参加して

平成14年5月28日から6月2日にかけて、アメリカ合衆国コロラド州ツースンのマリオットホテルにて第4回昆虫分子生物学国際シンポジウムが開催されました。この国際シンポジウムは4年に一度、アリゾナ州近辺で開催されるもので、今回はアリゾナ大学のすぐ近くにあるこのホテルで行われました。アメリカを中心に200名以上の昆虫の分子生物学に携わる研究者が集まり、午前中にワークショップ、午後から招待講演、さらに夜にはポスターセッションと充実したプログラムの中、盛んに議論や情報交換が行われました。招待講演では東大の嶋田透博士が行ったカイコゲノム研究や、カリフォルニア大学のWalter Leal博士（元蚕糸・昆虫農



業技術研究所)が行ったフェロモン受容体の発表など、鱗翅目(りんしもく)昆虫の研究も数多くありましたが、マラリア蚊の研究の進展に目を引くものがあり、中でも昆虫分子生物学の第一人者である Fotis Kafatos 博士の推進するゲノム解析をはじめ、その成果を活用した蚊とマラリアの相互作用の研究など、昆虫の中ではショウジョウバエに次ぐ勢いを感じました。会議場は寒いくらいに冷房が効いていましたが、6月初旬ですでに37度もある外気温と同様、熱気に包まれたシンポジウムでした。

(昆虫生産工学研究グループ 新蚕糸技術研究チーム
主任研究官 間瀬啓介)

武部農林水産大臣、農業生物資源研究所をご視察

武部勤農林水産大臣が平成14年6月24日(月) 筑波農林研究団地の試験研究機関を視察されました。農業生物資源研究所には14時5分から15時25分の間、途中の農林水産先端技術産業振興センター農林水産先端技術研究所を含め、本部地区及び大わし地区を訪問されました。



組換えイネについて桂理事長(手前左)より説明を受けられる武部農林水産大臣(手前中央)

本部地区の植物ゲノム解析センターでは、イネゲノム研究等の進捗状況や研究成果について桂理事長の説明を受けられました。途中、研究室を見

たいと希望され、若手研究者にいろいろ質問されるハプニングもありましたが、大臣は、イネゲノムの研究成果をもとに育成される新品種が、世界の食糧確保に貢献できることを期待されていました。

大わし地区の展示室では、昆虫・テクノロジーについて井上理事の説明を受けられました。新素材として期待されているセリシンを多く含む繭の利用や、医薬品などの有用物質を大量に生産するために開発された光るカイコ等に興味を示されていました。



カイコのホルモン制御について井上理事(手前右)より説明を受けられる武部農林水産大臣(手前中央)

(企画調整部広報普及課)

農業生物資源研究所ニュース No.6

平成14年8月1日



National Institute of Agrobiological Sciences

編集・発行 独立行政法人農業生物資源研究所
National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS)
事務局 企画調整部広報普及課 TEL0298-38-7004
〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2
<http://www.nias.affrc.go.jp/>