

# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

## TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

### ブレインテクノニュース

# 第 17 号

JANUARY 15, 1990



人工飼料を食べるタサールサン5令幼虫

(本文 25 ページ)

### 本号の紙面

国内情報	1
ダイズグリシニン遺伝子の異種植物への導入, 新アミノ酸配列分析法, ウイルスの浮遊培養法, コメの形状と銘柄判別	
文献情報	16
形質転換タバコ後代における転移因子Acの切出し, 膜電位依存性アニオンチャンネル, ゲノムプログラム	
海外便り	20
アメリカにおける植物バイテク研究	
国際学会レポート	23
チョウザメ国際シンポジウム	
特別情報	25
インド柞酸の人工飼料育	

## 口 絵

### 国内情報

門馬孝之

ダイズ グリシニン遺伝子の異種植物への導入と発現…………… 1

平野 久

新しいアミノ酸配列分析法, ダンシルアミノ-PITC法の開発…………… 6

難波功一

浮遊培養法によるウイルスの効率的増殖…………… 10

松永隆司

コメの輪郭形状と銘柄判別…………… 13

### 文献情報

形質転換タバコの後代におけるトウモロコシの転移因子Acの切り出し…………… 16

孔辺細胞の原形質膜にある膜電位依存性アニオンチャンネル…………… 17

ゲノムプログラムを熟望する植物学者…………… 18

### 海外便り

伊澤敏彦・吉田岳志

アメリカにおける植物バイオテクノロジーの研究開発動向調査…………… 20

### 国際学会レポート

藤井一則

第1回チョウザメに関する国際シンポジウムに参加して…………… 23

### 特別情報

赤井 弘

インド柞蚕の人工飼料育…………… 25

インド柞蚕の人工飼料育 (本文 25 ページ)



A : タサルサンの成虫(蛾)  
 B : 人工飼料で飼育したタサルサンの幼虫をクヌギの生枝につけて作らせた繭  
 C : タサルサンが産下した卵  
 D : タサルサンおよびカイコの蛹  
 左 : タサルサンの雌蛹  
 中 : タサルサンの雄蛹  
 右 : カイコの雌蛹

ダイズ グリシニン遺伝子の異種植物への導入と発現 (本文 1 ページ)



形質転換体ジャガイモの作出過程

A : 選択培地上に置床された *Agrobacterium* 感染 4 週間後のチューバーディスク  
 B : A においてディスクから切取ったシュートを選択培地上で発根させたもの  
 C : 馴化して人工気象室で育成中の形質転換体(左)と非形質転換体(右)

## ダイズグリシニン遺伝子の異種植物への導入と発現

キリンビール株式会社 植物開発研究所 細胞育種担当

門馬 孝之

### はじめに

ダイズ種子に含まれるタンパク質は含硫アミノ酸量が少ないのが欠点とされているが、比較的アミノ酸バランスのよいタンパク質であることが知られており、これらのタンパク質のプロティンスコアは高く、「畑の牛肉」と呼ばれているほどである。さらに、人類が摂取しているタンパク質の供給源には動物性と植物性のものがあり、近年、前者の摂取量の増加にともなう脂肪の取り過ぎが心臓血管病の誘引の一つになることが指摘されはじめから、ダイズタンパク質が良質な食品素材として注目されるようになった。これほどに良質なタンパク質を使わずにはおいてはならない。しかし、ダイズ種子タンパク質中にもいろいろなタンパク質のあることが知られているが、これらのタンパク質の全てが果して人類にとって良質なタンパク質となり得るのだろうか。これらのタンパク質が良質であることがわかったときどのように使えばよいのか。どのタンパク質をどんな形にして、どんな作物で、いつの時期に、どの程度、どこで働かせて、それを何に使っていくのか。これらの質問に答えるために、農林水産省・食総研において、深澤親房博士の指導のもとに、ダイズ種子貯蔵タンパク質の一つであるグリシニンに注目して、グリシニンを構成する主要なサブユニット前駆体の完全一次構造を決定し、これらの解析からグリシニンの構造的特徴について明らかにし、さらには発現制御関係を知るためにグリシニン構成サブユニットのうち発現量の多いA<sub>2</sub>B<sub>1a</sub>核遺伝子の完全一次構造を明らかにした<sup>1-6)</sup>。筆者らは、これらを出発

材料として形質転換系の確立、遺伝子発現調節技術の確立に関する研究をおこなっている。

### 1. グリシニンタンパク質研究の現状

このタンパク質の大半は、塩可溶性のグロブリンで、完熟種子タンパク質の約70~80%を占めており、いわゆる貯蔵タンパクとして子葉細胞内のプロテインボディ (protein bodies) に蓄えられている。その他に、ダイズ種子に含まれるグロブリン以外のタンパク質には、全タンパクの約5%を占めるレクチンをはじめとして、トリプシンインヒビター、ウレアーゼ、リポキシゲナーゼ、プロテナーゼ・インヒビター、およびβ-アミラーゼなどが知られている。このグロブリンは超遠心分離法で7S成分と11S成分に大きく分けられている。ダイズの場合、前者を特にコングリシニン (conglycinin)、後者をグリシニン (glycinin) と呼んでいる。筆者らは、この中でも比較的含硫アミノ酸も含みかつ、蓄積量も多いグリシニンに重点をおいてこのタンパク質の一次構造を遺伝子工学的手法を用いて決定することを試みた。その結果、世界に先駆けてグリシニンを構成する主要な5種類のサブユニット前駆体の全ての完全一次構造を決定し、これらの構造的特徴を明らかにすることができた<sup>1-5)</sup>。さらに発現量の多いグリシニンサブユニットA<sub>2</sub>B<sub>1a</sub>の核遺伝子の完全構造を決定した<sup>6)</sup>。ダイズの主要貯蔵タンパク質であるグリシニンは、沈降係数 (S<sub>20,w</sub>) は、~12、分子量約360,000で6量体を形成している。すなわち、酸性サブユニット成分 (Mr=35,000) と塩基性サブユニット成分 (22,000) がS-S結合した六つのサブユニッ

ト対からなっている。いくつかの酸性・塩基性サブユニット対があり、6種類の異なる酸性成分と5種類の異なる塩基性成分が、それらのN末端領域の部分的なアミノ酸配列の違いに基づいて同定されている。グリニン分子のこれらのサブユニット対合は、ランダムでなく、しかし多様性があり、全てのサブユニットは、 $A_4$ をのぞいて共有結合した酸性・塩基性サブユニット対からなることがわかっている<sup>7)</sup>。筆者らは、グリニン酸性・塩基性サブユニットは[A-B]サブユニット中間体をコードする1本のmRNAから合成され翻訳後の切断過程でAとBサブユニットに分断されることをグリニン中間サブユニット $A_3B_4$ において世界で初めて実証した<sup>1)</sup>。各サブユニットは、ポリソーム上でシグナルペプチドに始まり、A成分、B成分と続く1本の前駆体ポリペプチドとして合成される。シグナルペプチドが翻訳に伴って切断され(ステップ1)、このグリニン前駆体はAサブユニットとBサブユニットの間でジスルフィド結合を形成し(ステップ2)、粗面小胞

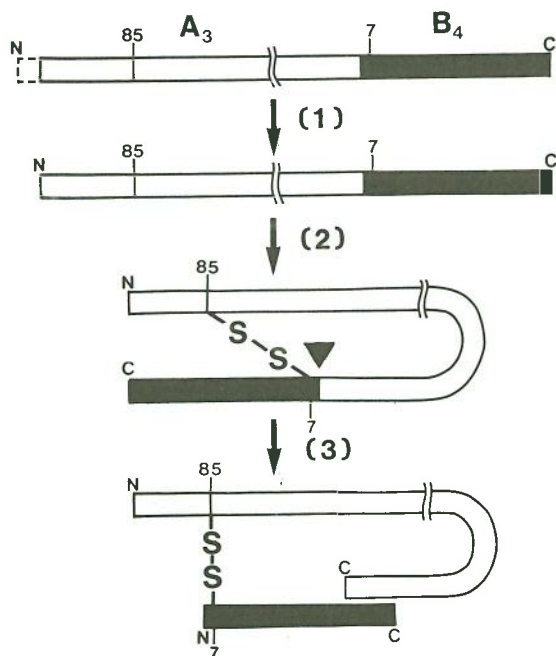


図1 グリニン $A_3B_4$ サブユニット前駆体におけるタンパク質分解酵素によるプロセッシング過程の模式図

[ ]はシグナルペプチド領域、□は $A_3$ サブユニット領域、■は $B_4$ サブユニット領域、N、Cはそれぞれのタンパク質のN末端とC末端、すじは $A_3$ と $B_4$ サブユニットの間にジスルフィド結合を形成するシステイン残基の位置、(▼)はタンパク質分解酵素によるプロセッシングのときの切断部位を示す。

体(ER)に移行し3量体を形成する。ERからプロテインボディへ移行する際に、A成分とB成分の間が切断され成熟型になる(ステップ3)。その後、6量体としてプロテインボディ中に蓄積する<sup>8~10)</sup>。図1にこれらの過程を模式的に示す。

## 2. グリニン中間サブユニット $A_2B_{1a}$ cDNAのタバコ植物への導入と発現<sup>11~14)</sup>

遺伝子の性質を知るためには、最終的にはもとの植物に戻すことが必要と考えるが、育種的な立場に立つと、有用遺伝子を有用作物に導入し、この有用物質を実用レベルで発現させることが重要である。はじめに、筆者らは、モデル系として、一般に使用されているタバコの系で有用遺伝子であるダイズ貯蔵タンパク質の一つグリニンタンパク質を発現させることに成功した。グリニン中間サブユニット $A_2B_{1a}$  cDNA、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターおよびノパリン合成酵素ターミネーターを組み合わせたキメラ遺伝子を構築し、中間ベクターpLGVneo1103に組み込み、アグロバクテリアを介して、タバコ細胞に導入した。すなわち、タバコ・リーフディスクにアグロバクテリアを感染させ、そのリーフディスクをカナマイシンを含む選択培地に置床したところ、3~4週間目に多数のシュートを得ることができた。さらに、これらを育成し、花を咲かせ種子を得ることができた。形質転換タバコ葉からDNAを抽出し、サザンブロット解析を行ったところ、数コピー~10数コピーのグリニン遺伝子が導入されているのを確認した。タンパク質の検出をするためにウエスタンブロット解析を試み、葉及び種子でグリニン $A_2B_{1a}$ と推定されるタンパク質を確認した(図2-A, B)。一方、岡田ら(1988)<sup>12, 13)</sup>は、エレクトロポレーション法によってグリニン $A_2B_{1a}$  cDNAを導入した形質転換タバコの解析からも同様の結果を得ている。グリニンサブユニットは、種子中ではAとBに切断されてプロテインボディ中に局在するが、人為的に本

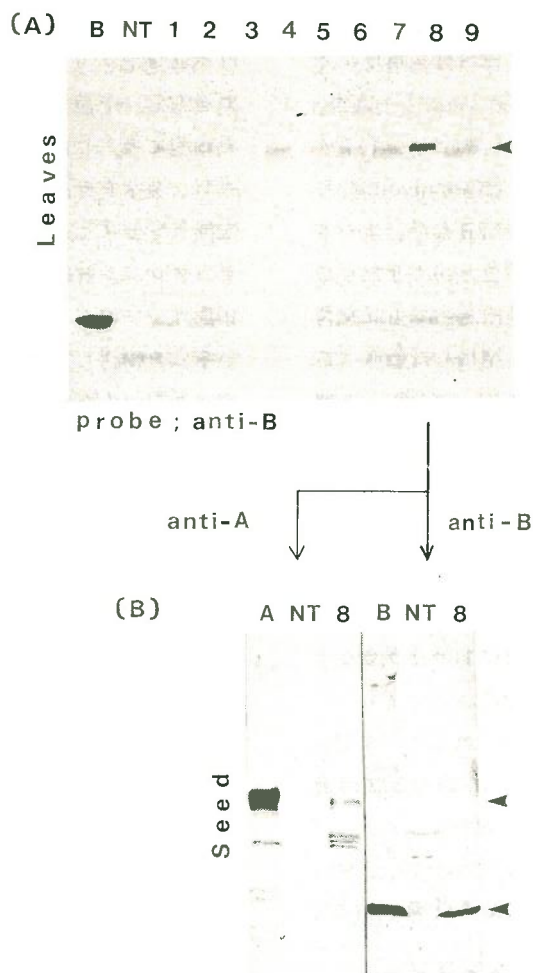


図2 形質転換タバコ葉 (A) と種子 (B) に於けるウエスタンブロット解析

AはグリシニンAサブユニット (50ng), BはグリシニンBサブユニット (50ng) を示す。(A)においてNTは非形質転換体, 1-9は形質転換体を示す。(B)においてNTは非形質転換体 (10 $\mu$ g 全タンパク質), 8は(A)に於ける形質転換体8と同じもの (10 $\mu$ g 全タンパク質) を示している。また, グリシニンAサブユニット, Bサブユニットに対してそれぞれ抗グリシニンA, あるいはB抗体を用いて反応を行なった。(◀)はグリシニンポリペプチドを示す。

来のプロモーターとは違ったものを使ったために, 葉においても発現してしまい, しかも葉で発現しているグリシニンタンパク質は, 成熟できずに前駆体の状態で存在していた (図2-A)<sup>14)</sup>。このことは, 種子中には, グリシニン前駆体が成熟するのに必要な成熟化酵素が局在していると推定される。この酵素の候補としては, 西村ら (1987)<sup>15)</sup> によって, カボチャの11Sグロブリンの成熟化酵素として報告されたチオール系のプロテアーゼ (プログロブリンプロセッシング酵素) が考えられる。

### 3. ジャガイモ栽培品種への外来遺伝子導入系の確立<sup>16)</sup>

筆者らは, すでにネオマイシン・フォスフォトランスフェラーゼII (NPT II) 遺伝子を用いて日本におけるジャガイモ主要品種 (農林1号, メイクイーン, 男爵, デジマ, 紅丸等) とキリンビール育成系統において, 外来遺伝子を導入する方法を確立した。すなわち, チューバーあるいはマイクロチューバーから直径約1cm, 厚さ約2~3mmのチューバーディスクを作り, NPT II 遺伝子の組み込まれた中間ベクターあるいはバイナリーベクター

を持つアグロバクテリアをチューバーディスクに感染させた。その後、MS修正培地に4時間置床し、再分化培地(0.1mg/l IAA, 1mg/l Zeatine, 0.5g/l Claforan [Hoechst Co., Ltd/], 100mg/l Kanamycine)に移し、25°C, 16時間照明で培養した。1~3か月後に、シュートを得ることができた(口絵-A)。その後、100mg/l Kanamycineを含むMSフリー培地に移し、発根した個体(口絵-B)について馴化を行い人工気象室に移した(口絵-C)。草丈約30cmに生育したジャガイモ植物体から上位葉を採取し、NPT II検定を行ったところ、NPT II活性の発現を確認できた。

4. 形質転換ジャガイモにおけるグリニン遺伝子の発現<sup>17,18)</sup>

前述したタバコへの導入に用いた有用遺

伝子のグリニン中間サブユニットA<sub>2</sub>B<sub>1a</sub>cDNAを含むキメラ遺伝子をアグロバクテリアを介し、上記3の方法によって、ジャガイモ細胞に導入した。形質転換ジャガイモを育成し、塊茎を形成させることもできた。形質転換ジャガイモの葉からDNAを抽出し、サザンブロット解析を行ったところ、数コピー~10数コピーのグリニン遺伝子が導入されているのを確認した(図3-A)。グリニシタンパク質の検出をするためにウエスタンブロット解析を試み、葉、塊茎でグリニン中間サブユニットA<sub>2</sub>B<sub>1a</sub>と推定されるタンパク質を確認した(図3-B-L, T)。驚くべきことに、ジャガイモの塊茎で検出されたグリニンと考えられるタンパク質はタバコの葉で見られるのと同様に切断されない形で存在していた。また、形質転換個体間で、明らかに発現量に差が認められ、解析した数十個体の内、多いものでは全タンパク質の約0.5%の発現

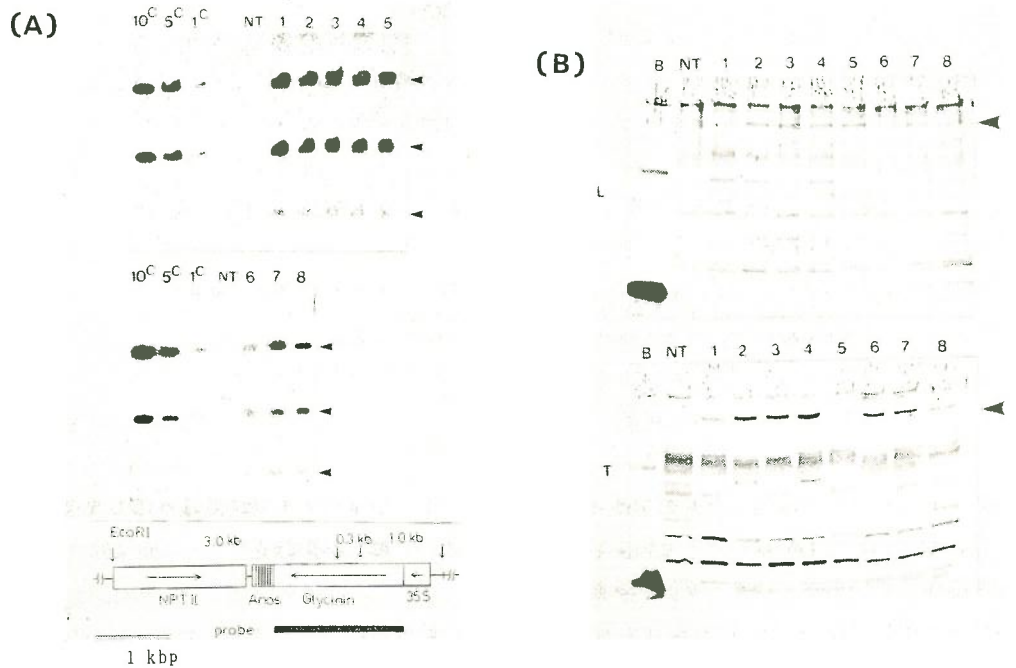


図3 (A) 形質転換ジャガイモのサザンブロット解析

10C, 5C, 1Cはそれぞれグリニン遺伝子のコピー数を示す。NTは非形質転換体、1-8は形質転換体を示す。ジャガイモ葉から抽出したDNA(10µg)を制限酵素EcoRIで切断し、電気泳動後、ゼータ・プローブにブロットした後、<sup>32</sup>P-標識したグリニンA<sub>2</sub>B<sub>1a</sub>cDNAをプローブとして反応を行なった。(◀)はグリニン遺伝子断片を示す。

(B) 形質転換ジャガイモ葉(L)と塊茎(T)のウエスタンブロット解析

BはグリニンBサブユニット(50ng)を示す。NTは非形質転換体(10µg全タンパク質)、1-8は形質転換体(10µg全タンパク質)を示す。プローブとして抗グリニンB抗体を使い、二次抗体にアルカリフォスファターゼを使い発色させた。(◀)はグリニンペプチドを示す。

を示すものもあった。前者の理解としては、タバコの葉と同様にジャガイモの葉と塊茎にも成熟化酵素がないと考えられる。おそらく、種子での貯蔵形態と塊茎での貯蔵形態ではかなり貯蔵様式が違っていると考えられる。このことは、この分野の研究者にとって非常に興味のあるところではないかと考える。後者については、位置効果（ポジション・エフェクト）の影響が考えられる。

### おわりに

アグロバクテリアを用いた系で有用遺伝子を有用作物に導入する系ができたわけであるが、果してこの発現レベルでタンパク質の改良につながっているかどうかは、甚だ疑問に思われる。ただし、この遺伝子の発現の影響で他の成分が変化するというような副産物がないともいえない。今後、さらにこの研究を進展させるためには、組織あるいは器官特異的発現、例えば、塊茎でのみ遺伝子を働かせる技術を開発しなければならないし、あるいは、大量発現、例えば、タンパク質レベルで0.5%の発現量だと環境要因によって変化するレベルなのでそれを超えるレベルにまで高める技術を開発することが必要になる。また、位置効果によって発現の仕方が変わってくるのでそれをどう使って行くかもポイントになるだろう。

最近、アメリカにおいて遺伝子工学を利用して作り出した植物体の野外放出試験が、数多く実施されており、一説によると早くも1993年にはモンサント社からラウンドアップ耐性ダイズが商品として出てこようとしている。日本においては、やっと農林水産省の生物資源研のグループが科技庁の許可を得て非閉鎖系の実験を開始したところである。この間アメリカに遅れること約5年である。遺伝子工学的手法を使って有用遺伝子を有用作物に入れることが可能となったいま、われわれは本当の意味での産・官・学が一致協力した研究体制で研究を進めて行くべきだと考える。なお、この研究を進めるに当たり、形質転換実験については高橋久恵さんに、ウエスタン

ブロットなどの解析については白石朋子さんに優秀なアシスタントを努めていただいた。さらに、植物開発研究所の皆様には日頃からこの研究に対して貴重なアドバイスをいただいている。また、このような研究の紹介をする機会を与えてくださった生研機構・企画部の作間宏彦氏に感謝の意を表したい。

### 文 献

- 1) Fukazawa, C., T. Momma, H. Hirano, K. Harada, and K. Udaka (1985) *J. Biol. Chem.* 260 : 6234-6239
- 2) Momma, T., T. Negoro, H. Hirano, A. Matsumoto, K. Udaka and C. Fukazawa (1985) *Eur. J. Biochem.* 149 : 491-496
- 3) Momma, T., T. Negoro, K. Udaka and C. Fukazawa (1985) *FEBS Lett.* 188 : 117-122
- 4) Negoro, T., T. Momma and C. Fukazawa (1985) *Nucleic Acids Res.* 13 : 6719-6731
- 5) Fukazawa, C. et al. submitted.
- 6) Fukazawa, C., T. Momma, W. Higuchi and K. Udaka (1987) *Nucleic Acids Res.* 15 : 8117
- 7) Staswick, P. E., M. A. Hermodson and N. C. Nielsen (1981) *J. Biol. Chem.* 256 : 8752-8755
- 8) Tumer, N. E., J. D. Richter and N. C. Nielsen (1982) *J. Biol. Chem.* 257 : 4016-4018
- 9) Chrispeels, M. J., T. J. Higgins and D. Spencer (1982) *J. Cell Biol.* 93 : 306-313
- 10) Barton, K. A., J. F. Thompson, J. T. Madison, R. Rosenthal, N. P. Jarvis and R. N. Beachy (1982) *J. Biol. Chem.* 257 : 6089-6095
- 11) 門馬孝之・深澤親房・加藤 忠(1988) 第11回日本分子生物学会年会要旨, p.167, 3D-28
- 12) 岡田和也・深澤親房・加藤 忠(1988) 第11回日本分子生物学会年会要旨, p.168, 3D-29
- 13) Okada, K., T. Ohtani, T. Momma, C. Fukazawa and T. Kato (1989) *UCLA Symposia on Molecular & Cellular Biology 18th Annual Meetings*, p.309, M341
- 14) Momma, T., K. Okada, T. Toguri, C. Fukazawa and T. Ohtani. submitted
- 15) 西村いくこ(1987) 植物の細胞生物学的研究法, 赤沢・杉浦・西村編, p.408-419, 共立出版
- 16) 門馬孝之・深澤親房(1989) 育種学雑誌 38巻別冊 2, p.120-121
- 17) Ohtani, T., T. Momma, K. Okada, C. Fukazawa and T. Kato (1989) *UCLA Symposia on Molecular & Cellular Biology 18th Annual Meetings*, p.309, M340
- 18) 門馬孝之・深澤親房・加藤 忠(1989) 育種学雑誌39巻 別冊 1, p.284-285



## 国内情報

## 新しいアミノ酸配列分析法, ダンシルアミノ-PITC法の開発

農林水産省 農業生物資源研究所 生育遺伝子研究室

平野 久

タンパク質のアミノ酸配列分析は、そのタンパク質の構造や機能を解明するうえできわめて重要であるばかりでなく、そのタンパク質をコードする遺伝子のクローニングや構造解析を行うため、あるいは翻訳中および翻訳後のタンパク質の修飾について解析を行う上で欠くことができない。

現在、ほとんどの場合、アミノ酸配列分析には、エドマン分解<sup>1)</sup>と呼ばれる方法が用いられている。図1に示してあるように、エドマン分解は、3段階の反応、すなわち、

- ① カップリング反応：タンパク質のN末端アミノ基にカップリング試薬であるフ

ェニルイソチオシアネート (PITC) を結合させる反応

- ② 切断反応：強酸を作用させてN末端ペプチド結合を切断する反応

- ③ 転換反応：遊離されたN末端アミノ酸を安定なフェニルチオヒダントイン (PTH) アミノ酸誘導体に変換する反応

とからなっている。

これらの反応を繰り返して行い、タンパク質のN末端から順次得られるPTHアミノ酸誘導体を次々同定していけば、アミノ酸配列を決定することができる。

エドマン分解において、PITCはきわめて重要な役割を担っている。この試薬は、カップリング後、N末端アミノ酸をフェニルチオカルバミル化し、強酸によるN末端ペプチド結合の特異的切断を可能にする。この機能がなくては、タンパク質を逐次分解していくことはできない。また、PITCを用いることにより、タンパク質から遊離されたアミノ酸をPTHアミノ酸誘導体として紫外部で容易に検出することができる。

PITCがタンパク質のアミノ酸配列分析に応用されて以来、多くの研究者がPITCと類似した機能を持つ試薬、それも、PITCより高感度で簡便なアミノ酸配列分析が行える試薬の開発を試みた。しかし、開発された試薬の多くは、合成や精製が難しかったり、分子骨格が大きく、カップリング反応の際、立体障害が生じる、あるいは副反応が起こり、反応副産物が多いなど種々の問題点をもち、広く利用されるには至らなかった。

私たちの研究グループもカップリング試薬の開発に力を注いできた。そして、ごく最近、高感度試薬、4-[[5-(ジメチルアミノ)-1-ナフ

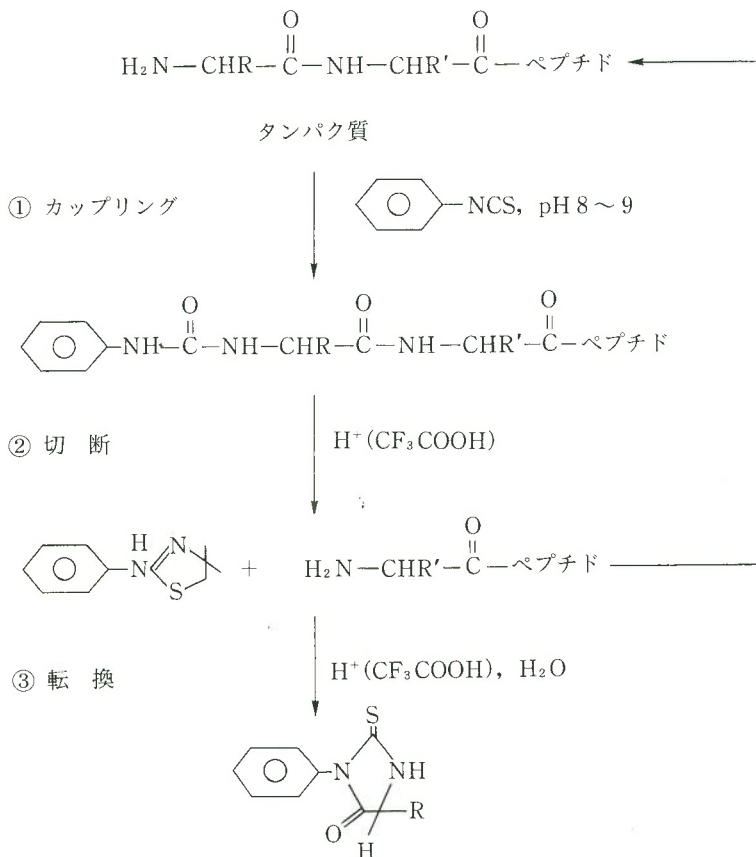


図1 エドマン分解

チルサルホニル] アミノフェニルイソチオシアネート (以下ダンシルアミノ-PITC と呼ぶ) を合成し<sup>2)</sup>、これを用いたアミノ酸配列分析法を確立することができた<sup>3,4)</sup>。

### 1. ダンシルアミノ-PITCの特徴

ダンシルアミノ-PITC は、PITC と蛍光試薬であるダンシルクロリドをスルホニルアミノ基をスペーサーとして結合させたものである (図2)。したがって、ダンシルアミノ-PITC を用いれば、導入された PITC の特性を活かしてタンパク質を N 末端から逐次分解し、アミノ酸配列を分析することができる。

図2に示してあるように、ダンシルアミノ-PITC は、大きなナフチル環を有する。一般にカップリング試薬は、分子骨格が大きくなればなるほど、カップリング効率が悪くなる。ダンシルアミノ-PITC のカップリング効率は、これまで開発された PITC 類似試薬の中では比較的高いものの、100%ではない。そのため、カップリング反応後、一部の N 末端

基が未反応のまま残ってしまう。しかし、この欠点は、ダンシルアミノ-PITC をカップリングさせた後、PITC をダブルカップリングさせるという手法により補うことができた。

また、分子骨格が大きいカップリング試薬は、カップリング溶媒への溶解度が低く、しばしば問題となる。しかし、ダンシルアミノ-PITC のカップリング溶媒への溶解度はきわめて高い。スペーサーとして用いたスルホニルアミノ基をメチレン基などと置換すると溶解度が著しく低下するので、スルホニルアミノ基が溶解度の向上に大きく寄与しているものと考えられる。

ダンシルアミノ-PITC は、ダンシルクロリド由来のジメチルアミノナフチル基を有するので紫外線光を照射すると強い蛍光を発する。したがって、エドマン分解を行って得られる PTH アミノ酸誘導体を、ポリアミドシートを用いた二次元の薄層クロマトグラフィー (TLC) で蛍光のスポットとして 1~5 pmol のレベルで感度よく同定することができる。また、逆相カラム HPLC と蛍光検出器を用いて同定することもできる。この方法による検出感度はきわめて高く、200fmol のアミノ酸誘導体でも検出が可能であった<sup>5)</sup>。

### 2. ダンシルアミノ-PITCを用いたアミノ酸配列分析

ダンシルアミノ-PITC をカップリング試薬として用い手動でタンパク質のアミノ酸配列を次のように分析することができる<sup>3~6)</sup>。まず小試験管 (長さ 2.7cm, 内径 4mm) にタンパク質を入れ、ピリジン水溶液中でダンシルアミノ-PITC を N 末端アミノ基にカップリングさせる。未反応の N 末端基を PITC でブロックした後、試料をベンゼン/酢酸エチル (1:1) で洗浄し、過剰のダンシルアミノ-PITC および反応副産物を除去する。試料を乾燥させた後、トリフルオロ酢酸 (TFA) を加えて N 末端ペプチド結合を切断する。そして、ベンゼン/酢酸エチル (1:1) でチアゾリジン誘導体を抽出する。これを乾燥させた後、50% TFA を加え、アミノ酸誘導体を TLC ま

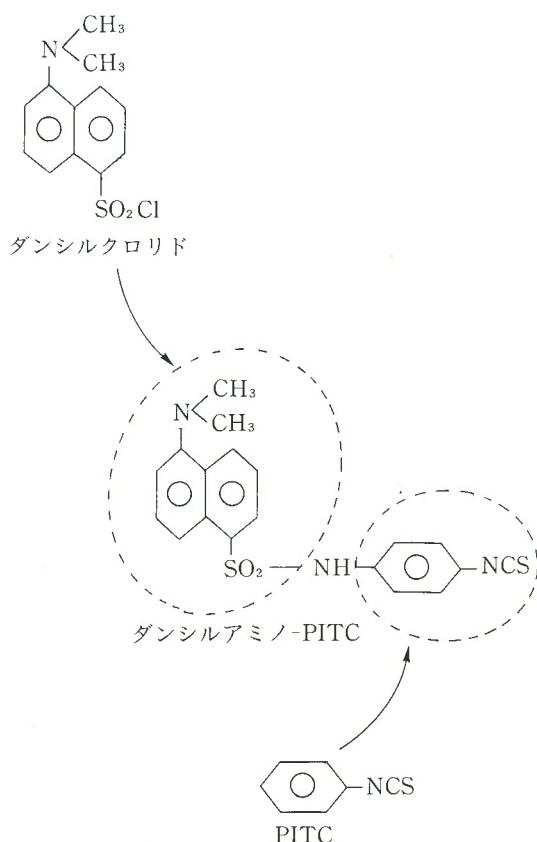


図2 ダンシルアミノ-PITC

たは HPLC で同定する。

二次元 TLC では、各アミノ酸誘導体を、2 種類の反応副産物 (図 3 の  $b_1$  および  $b_2$ ; チオ尿素の誘導体) と蛍光のダンシルアミノ-PTH-ジメチルアミンマーカを基準にして同定することができる (図 3)。

ダンシルアミノ-PITC を用いてエドマン分解を行い、得られた PTH アミノ酸誘導体を二次元 TLC で分別同定したところ、酸化型インシュリン B 鎖では、100pmol で 9 残基のアミノ酸配列を決定することができた。

図 4 は、トウモロコシホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのトリプシンペプチドをエドマン分解し、得られた PTH アミノ酸誘導体を TLC で同定した例を示したものである<sup>7)</sup>。

一方、HPLC を用いれば、ダンシルアミノ-PTH アミノ酸を TLC より感度よく同

定することができる。図 5 に、ダンシルアミノ-PITC を用いて、1 nmol の酸化型インシュリン B 鎖のエドマン分解を行い、得られた PTH アミノ酸の一部 (1/50~1/100) を HPLC によって同定した結果を示してある<sup>8)</sup>。ベースラインはきわめて安定しているので、さらに高感度で検出できる可能性がある。

### 3. ダンシルアミノ-PITC の シークエンサーへの応用<sup>9)</sup>

最近、気相シークエンサーが急速に発展し、ごく微量のタンパク質のアミノ酸配列分析が可能となった。気相シークエンサーでは、PITC がカップリング試薬として用いられているが、これをダンシルアミノ-PITC に置き換えれば、さらに感度よく分析できると考えられる。

ダンシルアミノ-PITC は、PITC とは異なり、揮発性ではないため、カップリング反応後、過剰のカップリング試薬や反応副産物を除去する目的で、比較的多量の有機溶媒を用いて試料を洗浄しなくてはならない。気相シークエンサーでは、ガラス繊維ろ紙にポリブレンを介してタンパク質を静電的に、あるいはポリビニルピロリドン (PVDF) 膜に疎水性相互作用によって非共有結合させてエドマン分解を行うので、多量の有機溶媒で洗浄すると試料が有機溶媒と共に流亡してしまう。その結果、PTH アミノ酸の収率は極端に悪くなる。そのため、これまで、ダンシルアミノ-PITC は専ら固相シークエンサーで利用されてきた<sup>8)</sup>。固相シークエンサーでは、タンパク質やペプチドを共有結合によって固相に固定してエドマン分解を行うの

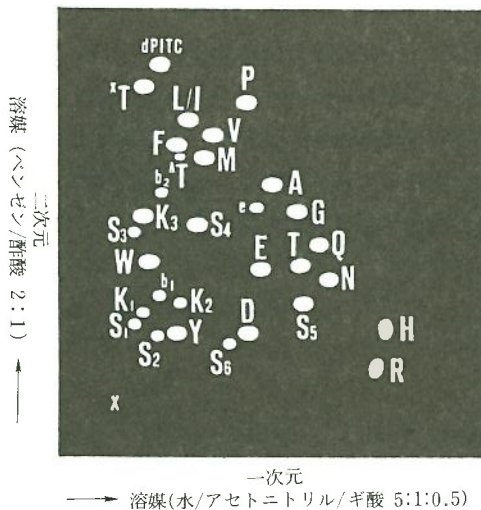


図 3 ダンシルアミノ-PTH アミノ酸誘導体の二次元 TLC<sup>2)</sup>

長波長紫外光下で蛍光のスポットとして検出される。dPITC: ダンシルアミノ-PITC, e: ダンシルアミノ-PTH-ジメチルアミン (マーカー, ポリアミドシートの裏面),  $b_1$  および  $b_2$ : 反応副産物 (チオ尿素), x: 原点



図 4 トウモロコシホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼトリプシンペプチド (YYIEFWK) のエドマン分解により得られたダンシルアミノ-PTH アミノ酸誘導体の TLC<sup>7)</sup>

で、試料が流亡してしまうことはない。しかし、タンパク質やペプチドを固相シーケンサーの固相に固定する効率は必ずしも高くないため、微量タンパク質やペプチドを分析することはむずかしかった。

最近、注目すべき技術が発達してきた。これは、気相シーケンサーで用いるガラス繊維ろ紙あるいはPVDF膜にタンパク質やペプチドを共有結合させて、アミノ酸配列を分析するというものである。Aebersoldら<sup>9)</sup>や Coullら<sup>10)</sup>は、ガラス繊維ろ紙やPVDF膜にP-フェニレンジイソチオシアネート(DITC)を結合させた後、これにタンパク質やペプチドのリシンのε-アミノ基を共有結合させ、アミノ酸配列分析を試みている。この場合、タンパク質やペプチドをDITCに結合させる効率は70~80%以下とみられ、あまり高くないが、一度共有結合した試料は、エドマン分解中に流亡することはほとんどない。したがって、ダンシルアミノ-PITCをカップリングさせた後、試料を完全に洗浄することができるようになる。そのため、過剰の試薬や反応副産物に影響されることなく、効率的にアミノ酸配列を分析できると考えられる。

私たちは、ダンシルアミノ-PITCを気相シーケンサーに応用すれば、固相シーケンサーの場合より、100~1,000倍感度を高めることができると推定している。

また最近、レーザー光によってHPLCで分別した蛍光誘導体を感度よく検出する方法が開発されつつあるが、ダンシルアミノ-PTHアミノ酸誘導体もレーザー光によって検出できれば、さらに感度よくアミノ酸配列を分析できるようになるかも知れない。

この2~3年の間に、電気泳動によって分離した微量タンパク質をガラス繊維ろ紙やPVDF膜に電気泳動的にブロットングし、ブロットングされたタンパク質をそのまま気相シーケンサーに挿入してアミノ酸配列を分析する技術が発達してきた<sup>11)</sup>。この方法では、クマシーブルーで染色できる程度(50~100pmol)のタンパク質が存在すれば、きわめて簡単にN末端配列を決定することがで

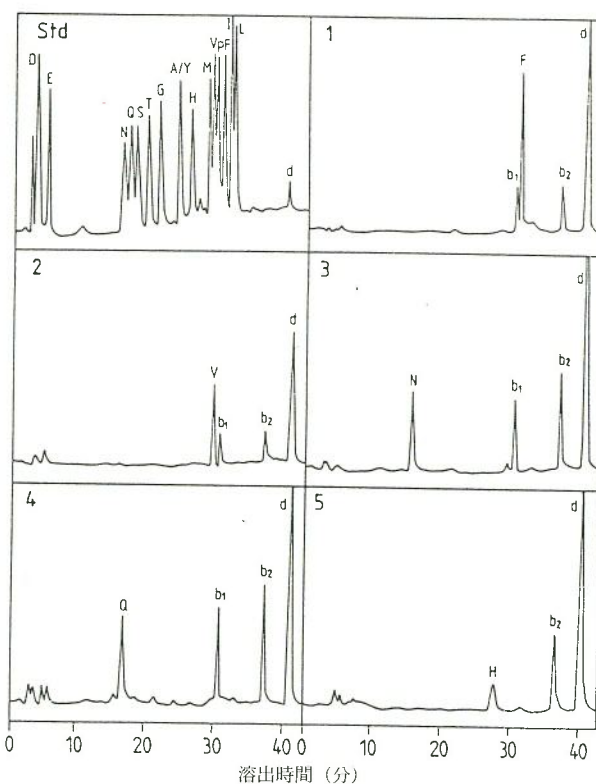


図5 酸化型インシュリンB鎖(1 nmol)のエドマン分解により得られたダンシルアミノ-PTHアミノ酸誘導体のHPLC<sup>9)</sup>

カラム: Spherisorb C<sub>8</sub>, 溶媒A: 8mM酢酸緩衝液pH4.5, B: 90%アセトニトリル, 濃度勾配: 45-70%B 20分, 流速: 0.5ml/分, カラム温度: 47°C, 検出器: 島津蛍光検出器RF-530, 励起波長: 340nm, 蛍光波長: 540nm, Std: 標準ダンシルアミノ-PTHアミノ酸誘導体, b<sub>1</sub>およびb<sub>2</sub>: 反応副産物

きる。しかし、現在の技術ではそれより微量のタンパク質を分析することはなかなかむずかしい。今後、ダンシルアミノ-PITCの応用により、気相シーケンサーの感度が高められれば、ブロットングされたごく微量(fmolレベル)のタンパク質のアミノ酸配列が分析できるようになると期待される。

## 文 献

- 1) Edman, P. (1949) *Arch. Biochem.* 22: 475-476
- 2) Jin, S.-W., G.-X. Chen, Z. Palacz and B. Wittmann-Liebold (1986) *FEBS Lett.* 198: 150-154
- 3) Hirano, H. and B. Wittmann-Liebold (1986) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 367: 1259-1265
- 4) Hirano, H. and B. Wittmann-Liebold (1989) *in Methods in Protein Sequence Analysis* (B. Wittmann-Liebold ed.) Springer, Berlin, 42-51
- 5) Salnikow, J., Z. Palacz and B. Wittmann-Liebold (1987) *in Methods in Protein Sequence Analysis* (K.A. Walsh ed.) Humana Press, Cri-

- fton, NJ, 247-260
- 6) 平野 久(1989) 蛋白質 核酸 酵素34:876-881
- 7) 平野 久・村田孝雄・香川裕之(1989) 光合成で機能する酵素・蛋白質と遺伝子の解析, 農林水産技術会議事務局 37-61
- 8) Salnikow, J., A. Lehmann and B. Wittmann-Liebold(1982) *in* Methods in Protein Sequence Analysis (M. Elzinga ed.) Humana Press, Critton, NJ, 181-188
- 9) Aebersold, R. H., G. D. Pipes, H. Nika, L. E. Hood and B. H. Kent (1988) *Biochemistry* 27: 6860-6867
- 10) Coull, J. M., D. J. Pappin, J. B. Dixon, R. A. Laursen and H. Koester (1989) *in* Methods in Protein Sequence Analysis (B. Wittmann-Liebold ed.) Springer, Berlin, 69-78
- 11) 平野 久(1988) 蛋白質 核酸 酵素 33: 2388-2396

## 国内情報

## 浮遊培養法によるウイルスの効率的増殖

農林水産省 家畜衛生試験場 製剤工学研究室

難波 功一

## はじめに

単層培養法に比べ、省力化が容易な浮遊培養法によるウイルスの培養は、口蹄疫ウイルス、狂犬病ウイルス等の不活化ワクチンの量産のために実用化されている<sup>1,2)</sup>。特に口蹄疫ウイルスの不活化ワクチン製造では、3,000 lを超える大型培養槽がヨーロッパ諸国で用いられている。しかし、浮遊培養が可能な細胞は一般にウイルスの感受性が低く、ウイルスによつては免疫性が低下することが報告されている<sup>3,4)</sup>。また、これまでに樹立されている細胞株で増殖するウイルスは少なく、本法のウイルス量産への普及は限られている。

幸い我が国ではワクチン製造に大量の不活化ウイルス液を必要とする上記のような疾病の発生を見ないが、近年、多発傾向が見られる豚オーエスキー病や牛の流死産の原因となるアルボウイルス感染の予防では安全性の面から不活化ウイルスあるいはサブユニットワクチンの開発が試みられている。家畜衛生試験場製剤工学研究室では、各種の浮遊細胞の樹立を試みているが、American Type Culture Collection (ATCC)より購入したBHK-21(C-13)細胞からオーエスキー病ウイルス、アルボウイルスの増殖に優れた浮遊培養細胞

株をクローニングによって得たので、その概要について述べることにする。

## 1. 浮遊培養細胞株の樹立過程

原株は静置培養法のEagle's MEMを用いて静置培養で継代されていたATCC由来のCCL-10株で、アミノ酸、ビタミン類、グルコースを2~4倍強化した浮遊培養用Eagle's MEMで5代継代し同培養液に順化させた後、浮遊培養法で20代継代した。ついで細胞を30~50個/mlに浮遊させ96穴のポリスチレン製マイクロプレートに0.1ml/穴ずつ接種し、静置培養を行い単一細胞から増殖した細胞株を選抜した。浮遊培養で5代継代した後、増殖性の優れた細胞株について再度マイクロプレートを用いてクローニングを行った。さらに浮遊培養法で10代継代し、比重が大きく、浮遊培養で安定した増殖を示すとともに、これらのウイルスの増殖性に優れた1株を選びBHK-21/C13 NIAHとした。同株は直径が10~20ミクロン、細胞表面に長さ0.1~0.2ミクロンの細い突起物を多数持っている。

## 2. BHK-21/C13NIAH株の増殖

浮遊培養では細胞を攪拌装置が発生する剪

断力から保護するため、血清を5～10%添加した培養液が用いられている。しかし、血清によっては細胞増殖を阻害する要因やウイルス増殖を抑制する抗体を保有することがしばしばある。さらに、量産したウイルス液に血清タンパクが混在するとウイルスの精製過程において複雑な操作が必要となる。このような障害を除くため、無血清培地の検討がなされているが口蹄疫ウイルスワクチンの製造ではポリエチレングリコールによって血清グロブリンを除去した血清（PEG処理血清）を用いることが多い。そのため、今回樹立したBHK-21/C13 NIAH株の細胞増殖試験ではPEG処理血清を用いた場合についても検討を行った。

BHK-21/C13 NIAH株に限らず浮遊培養が可能な動物細胞の増殖は培養規模を数千リットルに拡大した場合、500～1,000 mlの実験装置で得られる成績を一般に上回る。種々の要因が考えられるが、SUS 304あるいはSUS 316Lで作られている培養槽からの金属イオンの影響が培養規模の拡大とともに少なくなること、また金属タンクを用いる場合には内圧を高くすることができるため、pH、溶存酸素等の制御が容易になることが関係しているものと思われる。今回の成績は2～3 lのガラス製の三角フラスコにテフロンコーティングした長さ8 cm攪拌子を入れ回転数を75rpm、培養容量を400 mlにして浮遊培養を行ったときのものであるが、大型培養槽を用いて培養した場合にもほぼ同様の成績が得られるものと思われる。図-1はBHK-21/C13 NIAH株の増殖に新鮮血清とPEG処理血清とでどのような違いが生ずるか調べたものである。培養開始時の細胞数は $2.5 \times 10^5$ 個/ml、添加血清量は0.2～5.0%にした。添加量が5%の場合にはPEG処理血清添加の方が細胞増殖が優っていたが添加量が1%以下では新鮮血清の方が優っていた。しかし、図では示さないがPEG処理血清を添加して培養をした場合には細胞が小型化する傾向が見られた。いずれの血清添加でも培養3日後の細胞数は $5 \times 10^6$ /ml前後に達し、静置培養に比べ効率のよい細胞増殖の成績が得られた。

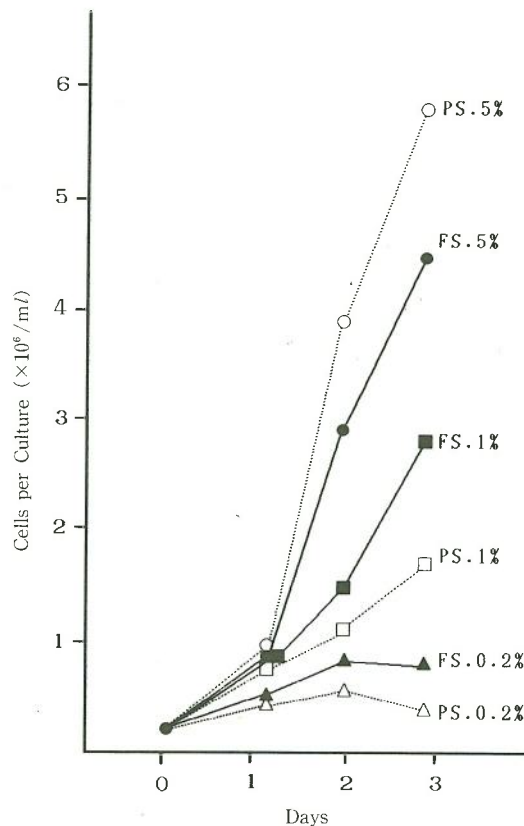


図1 BHK-21/C13NIAH株の増殖

FS; 新鮮牛血清添加培養液

PS; PEG処理牛血清添加培養液

### 3. BHK-21/C13NIAH株の保存性

浮遊培養法は大量培養を前提としているため培養槽をはじめ全ての関連機器が大型化し、その保守点検には細胞およびウイルスの培養を数週間停止させることがしばしばある。そのため、浮遊培養に用いる細胞株は増殖性やウイルスに対する感受性のみならず保存性にも優れることが要求されている。BHK-21/C13 NIAH株は、4℃、浮遊状態で保存した場合、30日後においてもよく増殖するために細胞の維持管理が容易である。しかし、4℃、静置状態で保存した場合には2週間後には死細胞の割合が増加し増殖性が低下する。4℃で保存した細胞は一般に培養開始1日目の細胞増殖が低下する。BHK-21/C13 NIAH株の場合にも同様の傾向が見られるが、培養3日後の細胞数は継代を繰り返している場合と大差がない。BHK-21/C13 NIAH株は遠心力に対しても強く、4℃、500×gでは60分の

遠心にも影響を受けない。

#### 4. BHK-21/C13NIAH株での ウイルス増殖

浮遊培養法では、ウイルス培養中にウイルスに感染していない細胞が増殖するために培養液の劣化が著しい。ウイルス価の高いウイルス液を得るためには、接種ウイルスを多くして、一段増殖でウイルス培養を行うことが

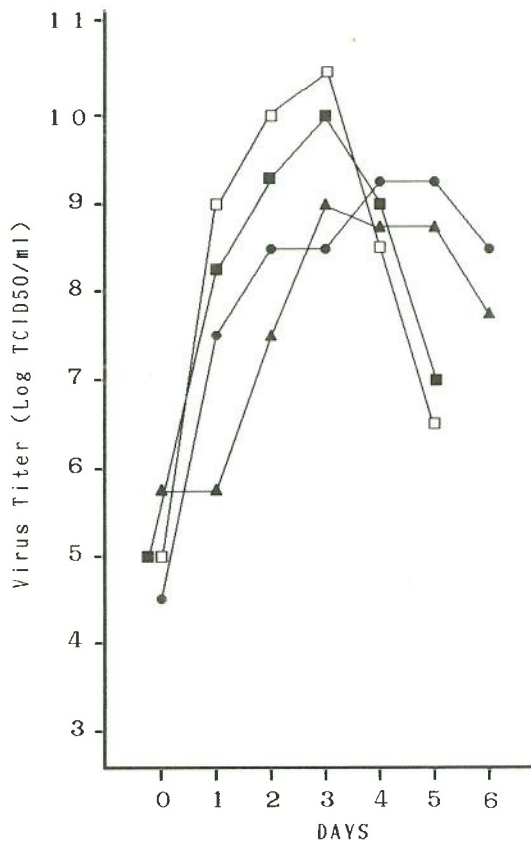


図2 BHK-21/C13NIAH株でのウイルス増殖

- : オージェスキー病ウイルス  
(1%牛血清加培養液)
- : オージェスキー病ウイルス  
(5%牛血清加培養液)
- : チュウザンウイルス  
(0.1%牛血清アルブミン加培養液)
- ▲: イバラキウイルス  
(0.1%牛血清アルブミン加培養液)

望ましいが、大量のウイルスを接種することは培養液の質を低下させるばかりでなく、培養規模が拡大した場合には技術的にも困難が生じてくる。一般には培養液を新鮮なものと交換し、細胞数を $3\sim 5\times 10^6/ml$ に調製した後、molを0.1~1にし、二ないし三段増殖でウイルス培養を行う方法がとられている。今回の試験成績もこの条件の範囲内で行った(図2)。オーエスキー病ウイルスの場合には1~5%牛血清加培養液を、チュウザンウイルスとイバラキウイルスでは0.1%牛血清アルブミン加培養液を用いている。いずれのウイルスも培養後3~4日目にウイルス価が最も高くなりオーエスキー病ウイルスは $10^{10}/ml$ 、チュウザンおよびイバラキウイルスは $10^9/ml$ に達した。オーエスキー病ウイルスのウイルス価は静置培養法で培養した豚腎由来株化細胞で得られるウイルス価とほぼ同程度であったが、チュウザンおよびイバラキウイルスのウイルス価はこれまで用いたハムスター由来肺、腎株化細胞よりほぼ10倍高い。これら以外のウイルスの増殖については行っていないが、原株のBHK-21/C13細胞は口蹄疫ウイルス、狂犬病ウイルス等の増殖も優れており、BHK-21/C13 NIAH株も応用しうるものと思われる。

#### 文 献

- 1) Capstick, P.B., R.C. Telling, W.G. Chapman and D.L. Stewart (1962). *Nature* 195: 1163-1166
- 2) Ozawa, Y. (1979) *Practical Tissue Culture Application*, pp.67-75. Academic Press, New York
- 3) Cowan, K.M., N. Erol and A.P. Whiteland (1974) *Bull. Off. int. Epizoot.* 81: 1271-1298
- 4) Nardelli, L. (1975) Report Meeting FAO, Brescia, Italy p.113-120

## 国内情報

## コメの輪郭形状と銘柄判別

農林水産省 食品総合研究所 食品流通研究室

松永 隆司

## はじめに

生物はもちろん、およそ全てのモノの形は、それが由来した過程、それが持つ機能と密接な関係がある。

食べ物は、有害でない限りおいしさが選択の第一基準であるから、同じ食品でもおいしそうに見えるもの、新鮮そうに見えるものが購入されることになる。そして、それは形や色で判断されることが多いので、食品の形は、われわれの食生活で重要な意義を持っていることになる。

残念ながら、食品の形についての実証科学的な研究はほとんどなされていない。形の測定の煩わしさと、測定技術の未発達のため、なかなか研究の対象とならなかったのである。しかし、最近のエレクトロニクスの発展で環境は大幅に改善されてきた。これから述べるコメ粒の輪郭の測定も、画像処理装置の導入で省力化できるようになり、統計的データ処理に耐えるような、量と質の測定ができるようになった。

一方、米の銘柄は、消費者の良食味嗜好の高まりから、商品特性として益々重みを増している。玄米については、農産物検査官により鑑定され、封印されるので、自由米以外はその銘柄は保証されている。しかしながら、精米については確とした銘柄判別技術がない。また、流通過程での低価格米による水増しの噂もあり、消費者の不信を招く結果ともなっている。

ここでは、モノの輪郭形状を数量化する方法、画像解析装置による輪郭測定法、およびこれらを精米の銘柄判別に応用した結果について簡単に報告させてもらう。

## 1. 輪郭形状の数量化

われわれの視覚による判断は強力であるが、個々の主観に頼っているため、結果に食い違いを生じることがある。

形の違いから、誰もが納得する結論を導き出すためには、その形の違いを客観的に表現する方法が必要である。客観的に表現するもっとも良い方法は、形の違いを数字の違いとして表すことである。つまり、形を数字で表す方法、形の数量化法があればよい。

さて、簡単な平面図形、たとえば、円では「半径の長さ」というただ一個の数値ですべての形を表すことができるし、三角形では「三辺の長さ」という三個の数字が形のすべてを決めてしまう。しかし、実在するモノの形は、幾何学的な形とちがってなかなか複雑で、一筋縄ではゆかない。そのため、どんな形にでも適用できる普遍的な数量化法は未だ見つかっていないようだ。

そこでわれわれは、普遍的とはいえないが、ある条件を満たせば、実際の食品にも適用できるような形の数量化法を開発し、「二次元輪郭図形の回転不変な数量化法」と名づけた。この方法は、二次元平面の輪郭の形を点列とみなし、その形の重心を原点とする極座標でその位置を表す。原点を中心として時計回りに一周するときの回転角度を横軸に、その角度に対応する動径(原点からその点迄の距離)を縦軸にとって、グラフで表す(図-1、図-2)。そして、このグラフに示される動径の変動を下式のようになし、 $A_0 \sim A_{20}$ 、 $\omega_1 \sim \omega_{20}$ という41個の数字(パラメータ)をもつサイン級数式で表すものである。



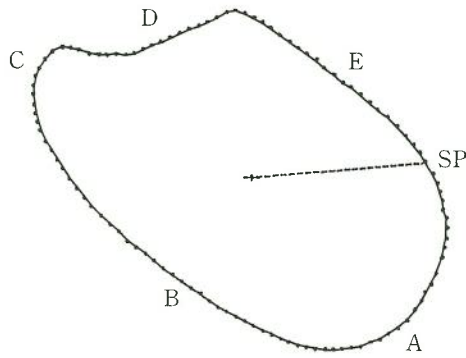


図1 精米(昭和62年産, 秋田キヨニシキ)の輪郭  
輪郭上の点が測定点であり, +は輪郭の重心, SPは  
第1番測定点を意味している。

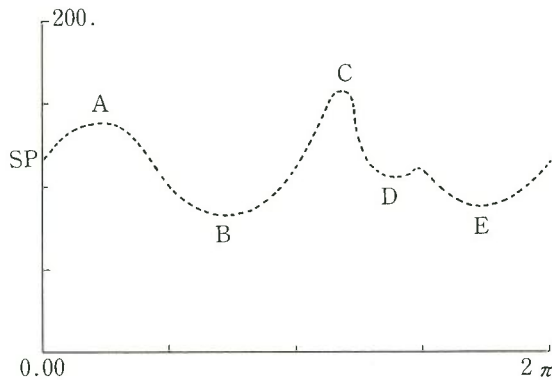


図2 輪郭測定点の極座標の展開図

図1のSPからはじまって, 時計まわりに移動したときの  
回転角を横軸, 重心からの距離を縦軸(数値には物理  
的意味はない)にとってある。A, B, C, D, Eは図1の  
同文字の部位に対応する。

$$r(\theta) = A_0 + \sum_{k=1}^{20} A_k \sin(k\theta + \omega_k),$$

$$0 \leq \theta < 2\pi,$$

$r(\theta)$ : 形の重心から, 回転角度が $\theta$ である輪  
郭上の点までの長さ

この式のパラメータの値は通常のフーリエ  
解析によって求めることができる。つまり,  
対象物の輪郭の形状が41個のパラメータの値  
を決定し, またパラメータの値が決まれば,  
回転角度 $\theta$ に対応した重心からの距離がた  
だ一つ定まるので, 輪郭の形状が決まること  
になる。

ところで, サイン波の振幅を表すパラメ  
ータ $A_k$ は元の輪郭形状の回転に対して不変で  
あるが, 位相を表すパラメータ $\omega_k$ は変化す  
る。しかし, コメ粒のような細長いモノの場  
合は $\sin 2\theta$ の位相を基準として, 他のサイ

ン関数の位相を表現し直すと回転不変な $\omega_k$   
を得ることができることがわかった。これで,  
対象となる輪郭の位置, 方向, 向きの変動に  
関係なく, 形が同じならば, 同じ値の数字を  
対応させることができる。さらに, この方法  
によれば, パラメータの値をもとに元の形を  
復元できるので, 数値の違いが, 実際の形の  
どこの違いとして現れるのかを, 視覚的に検  
証することもできる。また, 同じ種類に属す  
るモノの形をいくつか処理することにより,  
その種の平均的輪郭とか, 輪郭形状の変動の  
様子を再現し, 視覚的に表現することもでき  
る。

## 2. 輪郭形状の測定

平面上に物体を置き, その平面に垂直な  
平行光線を面に当てることによって, その平  
面にできる物体の影と, 影でない部分との境  
界線がつくる平面上の形を輪郭とする。また,  
この平面に, 互いに直交するX, Y軸を置き,  
輪郭上にあるいくつかの点の, X軸, Y軸の  
値, すなわち, その点の(x, y)座標を決  
めること, または, これと同等な処理を輪郭  
形状の測定ということにする。

さて, 画像解析装置によるコメ粒の輪郭形  
状の測定について説明する(図-3)。光源  
などに工夫をして, 明るさにムラがないよう  
に調整した水平な載物台を用意し, コントラ  
ストを強調するため黒色のビニールシートな  
どを敷く。コメの裏, 表による輪郭形状の変  
動を避けるため, コメ粒を上から見たとき,  
胚芽部分が左下になるような位置関係を保つ  
粒面を上にして, コメ粒をシート上に置く。  
これを一粒ずつTVカメラで撮像し, 映像を  
明るさに対応した0から255の数値に変換し  
て画像メモリーに送る。コンピュータ内で映  
像を二値化した後, 輪郭上の点に対応する,  
暗から明, 明から暗に変わる部分のメモリー  
アドレスから(x, y)座標値を逆算して求  
める。

用いたTVカメラは, ccdカメラで, 画素  
数は512X512である。コメ粒がモニタ装置の  
ほぼ全面を占める程度に拡大して撮像したの

で、座標値の有効数字は約3桁程度とおもわれる。測定点数は、粒の大きさによって多少異なるが、輪郭上の、ほぼ等間隔な110点である。

### 3. 米の銘柄とコメ粒の形

さて、米の銘柄ごとに、そのコメ粒の輪郭形状に差があれば、この数量化法によって得られる数字にも差が生じる。したがって、この数字の違いを統計学的に処理することによって、逆に銘柄を判定できないものだろうかと考えた。

昭和58年産から昭和62年産までの5年間にわたって、同一の5県から、各県ごとに2銘柄を選定し、各銘柄ごとに100から300粒の玄米整粒を測定試料とした。先の装置で一粒ずつ輪郭を測定し、輪郭の(x, y)値から「回転不変な数量化法」によりパラメータの値を求めた。また、粒形の大小は考えずに、形の違いのみに着目するため、復原図の大きさが一定になるようにパラメータを修正した。それぞれのパラメータについて、銘柄内で、平均値、分散などの統計量を計算した。銘柄間では、振幅を表す20個のパラメータ( $A_k$ ,  $k=1\sim 20$ )をもちいて、判別関数分析を中心に多変量統計解析法を適用した。

また、精米についても、玄米と同じ5県2銘柄について、昭和62年産米を対象として、通常の流通精米程度の搗精(歩留り, 89~91%)をした後、玄米と同じ方法で輪郭を測定し、データ処理をおこなった。

その結果、

- ① 同じ銘柄内でも一粒一粒の形は異なっている、
  - ② しかし、集団としての各銘柄の統計的性質(分布の位置と広がり)は銘柄間に差がある、
  - ③ 精米の銘柄による形の違いは、玄米についての形の違いとよく一致していて、精米でも銘柄判別ができる、
- ことがわかった。

また市場で販売されている精米について、

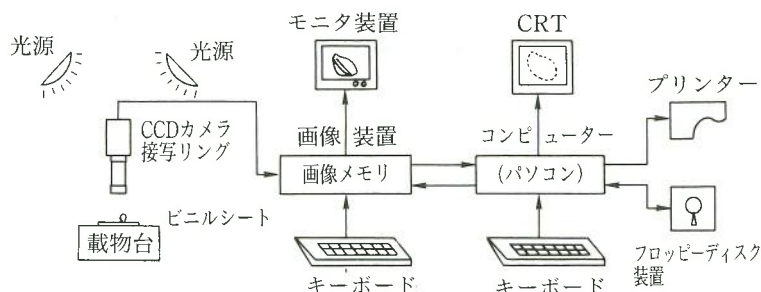


図3 コメの輪郭測定装置の概略

表示と中身との真偽を確かめる鑑定技術としての可能性を検討した。その結果、銘柄の確定している標準試料を広範囲に集め、それぞれ100粒程度の基準標本データを用意すれば、市販品の粒形の平均値や、粒形の分散を基準のそれと比較することによって、真偽の判定が可能であることがわかってきた。

### おわりに

近年、コメの品種改良の進展はめざましい。また「あきたこまち」の流通市場における成功が刺激となって、次々に新銘柄が登場してきた。そのため、産地で銘柄鑑定にあたっては農産物検査官の負担が増大し、きびしい状況にあるといえる。

このような中で、われわれが開発した「二次元輪郭図形の回転不変な数量化法」を米粒の輪郭に適用し、得られた数値群を統計処理することによって、銘柄を判別する試みについて説明させてもらった。形の数量化の研究は米の銘柄判定を目的として始めたわけではないが、客観的な銘柄判別技術開発の一ステップとなれば幸いである。

### 文 献

- 1) 松永隆司(1986) 第5回電子計算機利用研究発表会要旨集, 78-91, 92-110 農林水産研究計算センター
- 2) 松永隆司(1988) 食糧—その科学と技術, 27: 1-24 食品総合研究所
- 3) 松永隆司・田村真八郎(1989) 食の科学 131: 60-71

## 文献情報

形質転換タバコの後代に  
おけるトウモロコシの転  
移因子 Ac の切り出し

転移因子（トランスポゾン）の挿入によって突然変異を生じた遺伝子は、トランスポゾンを手がかりにして単離することができる。この遺伝子の単離方法は、一般にトランスポゾンタッキングと呼ばれ、RNAやタンパクがわからない遺伝子をクローニングするときには有効である。トウモロコシやキンギョソウなど内生のトランスポゾンを持つ植物では、この方法により多くの遺伝子がクローニングされている。しかし、多くの植物では、内生のトランスポゾンが見つかっていないか、あるいは見つかったとしても解析されていない。そのため、内生のトランスポゾンを持たない植物へのこの方法の利用はこれまで制限されていた。しかし、ベーカーら(1986)は、トウモロコシのトランスポゾン Ac がタバコの培養細胞で転移することを示し、続いて彼らは、トマト、ニンジン、シロイヌナズナ、ジャガイモで Ac が転移することを示した。この発見は、Ac が広範囲の植物の遺伝子タッキングに利用できる可能性を示した。

トランスポゾンが目的の遺伝子に挿入された突然変異体を得るためには、トランスポゾンが転移した多数の植物をスクリーニングしなければならない（例えばトウモロコシで  $10^5 \sim 10^6$  個体）。そこで、形質転換個体よりその後代の方が個体数を多く扱えるので、将来的には後代を用いてスクリーニングが行えるようになると思われる。実際にベーカーら(1988)は、Ac が次代でもトランスポゼース活性を持つことを示している。

この研究は、トウモロコシのトランスポゾン Ac を用いて、異種起源植物の遺伝子のタッキングへの利用の可能性を調べるために、形質転換タバコとその自殖後代における Ac の転写、切り出し、転移を調査した。

タバコの形質転換は、*Agrobacterium tu-*

*meffaciens* の Ti プラスミドを葉片に感染させて行い、選抜マーカーとして、カナマイシン耐性遺伝子を用いた。カナマイシン耐性を示した形質転換植物から RNA と DNA が抽出され、同時に温室で育成し、自殖させた。形質転換体及び自殖後代の RNA と DNA はそれぞれサザンハイブリダイゼーションと  $S_1$  マッピング法により分析した。その結果、形質転換した再分化個体では調査したほとんどの個体 (20/23=87%) で、Ac の切り出しがみられた。そして、Ac の切り出しがみられたほとんどの個体で Ac の転写が検出できた。また、Ac の切り出しはみられないが転写はされているものが 3 個体あった。Ac の切り出しが再分化個体でみられた個体のうち 3 個体では自殖後代でも、Ac の切り出しがそれぞれ 20%、30%、50% の個体でみられた。一方、再分化個体で Ac の切り出しがみられなかった個体のうち 1 個体の自殖後代で高頻度 (78%) で Ac の切り出しがみられた。このことから、再分化個体における Ac の切り出しは、その後代での Ac の活性の指標にならないことが示唆される。また、自殖後代で Ac の切り出しがみられたが、これは Ac の切り出しが減数分裂の時期あるいは発育過程の初期に起こったことを示唆する。

Ac が新たな位置に転移したと思われる例がたった 2 例だけ見つかった。一つは形質転換され Ac の切り出しが見られた再分化個体の培養細胞から再分化した個体のシュートの分析結果から見つかった。もう一つは、形質転換体では Ac の切り出しがみられなかったが、その後代において高頻度で Ac が切り出された個体の自殖個体で見つかった。Ac の転移がどのステージで起こったかは不明であるが、前者は、シュートの再分化あるいはシュートの発育過程において、後者は、胚発育の初期あるいは配偶形成の過程で転移したものと考えられた。この 2 例以外に Ac の転移を見つけれなかった理由として、Ac は切り出されても挿入しにくい、あるいは転移していても転移の生じた細胞の割合が小さすぎて検出できないなど考えられた。したがって Ac を利用した遺伝子のタッキングの効率の

向上のためには、転移した Ac が大きいセクターをしめる時期、すなわち胚発育の初期や減数分裂の時期に転移する系の利用が望ましく、ジャームラインなどの利用が有効となるであろう。

いずれにしても、Ac が形質転換植物の次代においても切り出され、転移するというこの事実は、トウモロコシのトランスポゾン Ac は、タバコや他の双子葉植物の遺伝子タギングに利用できる可能性を示唆する。

(抄訳 福地 淳・廣近洋彦——生物研)

### The maize transposable element Ac excises in progeny of transformed tobacco

Brian H. Taylor, E. Jean Finnegan, Elizabeth S. Dennis and W. James Peacock

*Plant Molecular Biology* 13:109-118 (1989)

#### 文献情報

### 孔辺細胞の原形質膜にある膜電位依存性アニオンチャンネル

近年、 $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$ 等、生体にとって重要なイオンの膜輸送の分子機構及びその調節機構として、生体膜中の特定の通路（イオンチャンネル）と、その開閉の制御が重要であることが明らかにされてきた。パッチクランプ(patch clamp)法は、その解明に大きな役割を果たした。今や、この方法により、一つのチャンネルを通る一個のイオンをも検出することができる。この方法の概略は、ピペットと呼ばれるガラス毛细管の先端（直径1ミクロン内外）に細胞（プロトプラスト）全体あるいは原形質膜や液胞膜の小片（パッチ）を張り付け、ピペット内外の電極から適当な電圧を加え（固定電圧法）、張り付けた膜パッチ（プロトプラストの場合には原形質膜全体）を通過するイオン電流を測定するというものである。この方法はイオンチャンネルが1～数個しかないような微小な膜片でイオン輸送現象を測定できること以外に、ピペ

ット内外の液組成を自由に定めることができるというメリットがある。

ここで紹介する論文は、ソラマメの葉の気孔開閉にともなう孔辺細胞原形質膜での $Cl^-$ 及びリンゴ酸アニオンの輸送が、膜電位で開閉が調節されるアニオンチャンネルを通して起きることをパッチクランプを用いて証明したのである。

植物は大気中の炭酸ガスを気孔から取り入れて同化し、酸素を放出する。また気孔からは水蒸気が失われる。植物はこのガス交換を葉の孔辺細胞の体積を変化させることによって調節する。すなわち、表皮の気孔を取り囲む一対の孔辺細胞の各々は、膨圧によって調節されるバルブとして働く。光が弱くなったり、水ストレスが始まると孔辺細胞は萎凋し、気孔は閉じる。この過程で孔辺細胞から塩が放出される。カチオンについては原形質膜中において $K^+$ の膜透過を担い、その開閉が膜電位に依存するカリウムチャンネルがその通路となることが明らかにされている(ProNAS, USA 84: 4108-4112, 1987)。しかし、アニオン、特に $Cl^-$ とリンゴ酸イオンの分子レベルでの膜透過機構については解っていない。そこで、本研究ではパッチクランプ法を *Vicia faba* (ソラマメ) の孔辺細胞プロトプラスト及びその原形質膜パッチに適用し、膜電位依存のアニオンチャンネルが原形質膜に存在するか検討した。

まず、プロトプラスト全体をピペットの先端に張り付け、外側を基準(=0 mV)にして-150 mV から+80 mV の範囲で電圧を固定し、原形質膜全体を通るイオン電流を測定した。プロトプラスト内外の KCl をそれぞれ 150, 30 mM としたとき得られる I-V 曲線は N 字型となり、-100 mV 以下では $K^+$ の細胞内への流入による内向き電流が、-20 mV 以上では $K^+$ の細胞外への流出による外向き電流が見られる。(これは細胞内外の $K^+$ をカリウムチャンネルを通過できない $Cs^+$ や N-methylglucamine (NMG) で置き換えたときには観察できないことから証明される。) -100 から -20 mV の間では -40 mV にピーク (25 pA) をもつ内向き電流がみられる。 $K^+$ を $Cs^+$

やNMGで置き換えてもみられるので、カチオンによるものではない。この電流は+39mVでゼロとなり、細胞内外のCl<sup>-</sup>濃度勾配から計算されるNernst電位+40mVと見合うことから、アニオン(Cl<sup>-</sup>)の流出によるものと結論された。孔辺細胞の主要なアニオンであるリンゴ酸イオンでも同様の内向き電流(最大-41mV, 10pA)が見られた。細胞質側のCa<sup>2+</sup>を>5μMとするとこの電流は増大するが>2mMにしても30pAを超えることはない。

原形質膜パッチ(outside-out)による解析では、単一のイオンチャンネルを通る個々のイオンが検出された。>+40mVではカリウムチャンネルの頻繁な開孔がみられるのに対して、<-40mVではアニオンチャンネルの開孔がみられた。膜電位を-90から+1mVの範囲で固定し膜の内外のKCl濃度をそれぞれ100, 10mMとしたときの単一アニオンチャンネルのI-V曲線の勾配から、チャンネル1個あたりの電気伝導度は39pSであることがわかった。このアニオンチャンネルのイオン選択性はNO<sub>3</sub><sup>-</sup>>Cl<sup>-</sup>>malate<sup>2-</sup>の順であり、アニオンブロッカーであるZn<sup>2+</sup>(10μM)でCl<sup>-</sup>の輸送は完全に抑えられる。ピペット内部(原形質側)のCa<sup>2+</sup>濃度が3~5μMのときもとても活性が高く、0.2~0.9秒の静止期のあと一斉に活性化する。

本研究で同定されたアニオンチャンネルは*Asclepias tuberosum*の培養細胞で報告されているものとは性質をかなり異にする。この場合、アニオンチャンネルは脱分極ではなく過分極で活性化し、チャンネル1個あたりの伝導度は100pSと高い。

ここで明らかにされたアニオンチャンネルを通るCl<sup>-</sup>による内向き電流は、孔辺細胞1個あたり少なくとも25pAと見積もられ、気孔が閉じるとき孔辺細胞から放出されるアニオンによる内向き電流値(細胞あたり30~40pA)とほぼ合う。細胞内Ca<sup>2+</sup>(一般に原形質膜が脱分極すると増加する)がこれを促進するかどうかはさらに研究を要する。

従来孔辺細胞からの塩の流出は原形質のイオン透過性によって一義的にきまり、気孔の

閉孔開始のためには単にこの透過性の増加で十分であるとされている。本研究の結論が示すところによれば、気孔の閉孔に際して原形質膜の脱分極があれば、Cl<sup>-</sup>やリンゴ酸アニオン、K<sup>+</sup>等のカチオンは孔辺細胞から放出されることになる。著者はさらに、このような種類の膜電位依存性アニオンチャンネルが他の種類の植物細胞にも存在して、たとえば浸透圧調節、膨圧調節、体積調節に際して塩放出に関与している可能性を指摘している。

(抄訳 坂野勝啓——生物研)

### Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells

Bernhard U. Keller, Rainer Hedrich and Klaus Raschke

*Nature* 341: 450-453 (1989)

#### 文献情報

#### ゲノムプログラムを熱望する植物学者

- アメリカの提起する5億ドルプロジェクト
- 農業上の競合が今後の争点

いま、アメリカでは、ヒトゲノムの遺伝子地図作成と塩基配列決定とを調整させるプログラムが計画され、動きは始めているので、植物学者達は、彼ら自身のプログラムをすすめる勢いをつけは始めている。今月末に、アメリカ農務省(USDA)は、新設の植物ゲノム局によって示された植物ゲノム研究への5億ドルプロジェクトの概要を決める会議を開くことになっている。このような多額の出費は、アメリカ経済の競合を激化させるので、論争を呼ぶことになるであろう。しかし、植物ゲノムの国際的な努力はまだ断片的であり、アメリカがどこまで競合するかは、はっきりしていない。USDAの植物ゲノムプログラムの構想は、最近、USDAの研究部長を引退したD. Bentlyによって擁護された。Bentlyの後継者としてカリフォルニア大学から着任した植物生理学者のC. Hessは植物研究に対する貧弱な財源を増額しようとしている。こ

のプログラムは、競合している研究助成金を10倍以上——あるいは、年間約5億ドルを計上するようUSDAへ要求するのに役立つであろう。

USDAの植物ゲノム局長のJ. Mikscheは、年間5,000万ドルを10年間受け取れるよう希望している。これは、過去10年間に毎年当局から研究方面に支出されてきた額にほぼ相当する。詳しい議事日程は、月末の委員会で提起されるであろう。しかし、Mikscheは、さまざまな植物を研究している研究者間の競合を避けたいと述べている。USDAは、ある一つの植物研究にその資金を全部投入するよりも、乾燥や病害に抵抗性のある農業上重要な数種の植物の遺伝子地図作成に資金を集中すると思われる。Mikscheの推測によれば、最初の20%の金額は、ヒトゲノムのデータベースに関連しようとしまいと、遺伝情報のデータベース開発に投入されることである。

比較的小さいプロジェクトのもとで、アメリカ国立科学基金(NSF)は、すでに雑草(*Arabidopsis*)の遺伝子地図作成と塩基配列決定のための共同研究への資金援助を考えはじめている。当局は、平均的なヒト染色体より少し小さいゲノムを有する雑草の遺伝子地図作成に対して、3,500万ドルを支出するかも知れない。*Arabidopsis*は、他の多くの植物よりも少ない反復DNAを持っており、遺伝子的な操作が容易である。

“競合”の問題は、USDA植物ゲノムプログラム設立の必要性を述べた昨年末の当局の報告で強調されている。その指摘によると、日本はイネの遺伝学と分子生物学に2億ドル

を支出し、イギリスは、種子会社協会を通じてコムギゲノムの遺伝子地図作成をすすめている。

日本は、農林水産省から7,000万円(50万ドル)の資金で、筑波学園都市におけるイネゲノムの配列決定の小プロジェクトをつくっている。このプロジェクトは大きく宣伝され、研究の主導性を発揮するとの期待が寄せられている。しかし、このプロジェクトの研究者達は、技術的な問題の解決に十分な金額でないと訴えている。それよりもっと有望な例は、三菱化成と三菱商事との民間合同ベンチャーである植物工学研究所で、そこでは、年間4億円(300万ドル)の経費の多くがイネの遺伝学に支出されている。

ケンブリッジのAgricultural Genetics社を中心に5社で組織されているイギリスの協会は、コムギとオオムギのゲノム遺伝子地図作成に対して約150万ポンドを支出するとされている。イギリスの農業食糧研究会議(AFRIC)は、植物分子生物学に3か年で1,400万ポンドを準備しており、その一部は、遺伝子地図作成と塩基配列決定に使われるであろう。AFRICのJohn Innes研究所は、*Arabidopsis*の遺伝子地図作成にとりかかっている。しかし、イギリスあるいはヨーロッパ諸国では未だ大きな成果はみられていない。

(抄訳 山本友英—南九州大)

#### Plant researchers eager for genome programme

Carol Ezzell and David Swinbanks

*Nature* 340: 491 (1989)



## 海外便り

アメリカにおける植物バイオテクノロジーの  
研究開発動向調査

生研機構

伊澤敏彦・吉田岳志

生研機構では、バイオテクノロジー等先端技術の開発動向を明らかにするため、年2回海外への派遣調査を行っている。これまでの成果は本誌の2, 6, 11, 15号に報告されている。従来の調査にあたっては、広く情報を収集する点に主眼をおき、アメリカからヨーロッパまでと調査地域を広くしたり、あるいは調査対象に植物も畜産も入れるなどして、調査者にはかなりの強行軍であった。今回は5回目、「アメリカ」、「植物」と絞り込んだ調査を企画した。訪問先は大学4か所、企業4か所で次のようである。

## 訪問先一覧

1. Department of Botany & Plant Science, University of California, Riverside
2. Mycogen Corporation
3. Department of Biology, Washington University
4. Monsanto Agricultural Company
5. Laboratory of Plant Molecular Biology, The Rockefeller University
6. Department of Cellular and Developmental Biology, Harvard University
7. Plant Cell Research Institute, Inc.
8. Genentech Inc.

海外の調査報告を書こうとして、ハタととまどうのは、わが国の現状との比較の視点を持たなければならないのに、それに対する理解がわれながら不足していることに気がついたからである。今回は個々の研究の紹介は抜きにして、訪問先で受けたいくつかのショックを記して、読者にアメリカの雰囲気をお伝えすることとしたい。

## 「日本は5年は遅れていますね」

遺伝子発現制御を中心とした研究内容の説明を受けたあと、私達が「日本のこの分野の進歩をどう見てられますか」と質問したのに対し、ロックフェラー大学のChur教授の答えがこれであった。同教授はPlant Physiology 1987に高等植物の遺伝子発現調節のレビューを書くなど世界を広く見ており、また、同大学には多数の日本の研究者が留学していること、氏の来日の機会もあることなどを考えあわせると、この認識は決して大きく間違っていないのであろう。ただ、同教授は「研究支援機器の充実も目覚ましいから、今後数年で追いつく可能性はありますよ」とつけ加えた。この後半の部分がお世辞に終わってしまうか、正しい予測であったと言えるようになるか、まさしく日本の研究者、研究体制のこれからの課題であろう。私としては後者となることを信じたい。

## 「Gene Discovery」

バイオテクノロジーを用いた企業活動戦略の説明図のフローの最初に書かれていたのが、この文字であった。モンサント社では、良く知られているように、遺伝子組換えによる植物を商品化すべく既に野外試験を重ねており、近い将来市場に具体的成果を送り出すと予想されている。遺伝子組換えの技術を生かし、有用な形質を組込んだ植物を作出するには、当然のことながら「何を」組込むかがその第一歩になる。本誌を発行するには読者にとって有用な情報を見出すことがまず大切なのと



屋上にガラス室を配したモンサント社の研究棟

同様、役に立つ gene を見出さなければ、その後へと続かない。一枚の説明図の一つの欄にさりげなく書かれたこの語であるが、実際には数多くの研究蓄積の裏付けがあってこそ、自信満々にこのような説明ができるのであろう。広々とした緑豊かなセントルイス郊外の同社の研究所には、屋上にガラス室を配した研究棟がゆったりと並び、必要ならばいつでも期待される gene を提供できると語っているようであった。

「ここでは実験材料として欲しい植物の仕様を指定すると、自分で準備しなくても整えてもらえるのですよ」

セントルイスにあるワシントン大学の Beachy 教授は、1988年の国際フォーラムに講演をお願いした方で日本にもおなじみである。同教授のもとに留学中の藤原徹氏（東大農化院）が、眼を輝かせて研究支援体制の充実ぶりを語ったのが最初のセリフである。日本では、研究者自らが実験素材の調製から分析機器の操作まで行い、そのゴールとして論文にまとめるという例の方が一般的である。この日本式研究体制には、一貫して物を考えながら研究を進められる利点がある反面、どうしても研究の速度に限界が出てしまう側面もある。研究支援者の正当な評価、その育成、グループ研究体制への理解（裏を返せばリーダーとなり得る研究者の存否）などの研究環境の違いとでも言うべきものがあるのであろう。どちらが良い、とは軽々しく言えるもの

ではないが、研究の進歩の速い分野であるだけに、わが国でも遅れをとることのないような体制づくりが必要とされよう。

このことを帰国後海外事情に明るい方に話したところ、「それだけに、優秀なテクニシャンの奪い合い、引き抜きが激しいのですよ。」と裏話を聞かされた。たしかに物事には、常に長短の両面があるとも思い知らされた。

「日本のバイオテクノロジー研究も国際協力の視点を持ってはどうでしょうか」

同じくワシントン大学で、キャッサバにウイルス抵抗性を与える研究を中心になって進めている Faquet 教授のセリフである。発展途上国の重要な食糧資源であるキャッサバにウイルス抵抗性を付与できれば、収量の飛躍的増大が期待でき、飢餓を救うことができる。この目標に向かい、Beachy 教授の説明によれば、同大学の研究勢力の40%程度をこの方面に注いでいる。わが国の技術協力の詳細は知らないが、Faquet 教授の指摘は新鮮に聞こえるものであった。



コートプロテイン遺伝子導入によるウイルス抵抗性の付与（ワシントン大学で）

左：処理区、右：対照区

「生物農薬の方が従来の化学農薬より短期間で製品開発できる利点があります」

会社設立6年を経過し、最初の生物農薬 M-one 発売後1年、その販売も軌道にのり、次の商品 Cell Cap M-one の市販をまぢかに控え、自信に満ちた口調で会社の基本戦略を話すのはマイコジェン社の Kim 副社長であっ



た。案内された実験室には数多くの昆虫が飼われており、ここで昆虫の餌の調製・管理について語る Hichle 分析化学・昆虫学担当部長の昆虫に対する愛情といたわりの表情が印象的であった。設立後の多くの困難を克服し、次への発展に向かう若いバイオテクノロジー企業の活力が感じられた。

「研究者には、常にできるだけ自由な発想を持ってもらえるような雰囲気作りを心掛けています。研究の成果は Nature, Science 等に積極的に投稿するよう勧めています」

今回の調査対象の「植物バイオテクノロジー」には入らないジェネンテック社を調査先に取上げたのは、同社のバイオテクノロジーの産業化の成功例からは学ぶべきものが多いに違いないと考えられたからである。したがって、バイオテクノロジーを生かした企業運営、研究管理、研究者の手綱捌きなどに話題が向かい、同社の McCracken 共同研究/共同開発推進部長がその中で研究開発成功の背景を説明したのが、初めのセリフである。他の機関との共同研究を行ったり、成果の公表を進めることは、企業の立場からは多少欠点が出ることもあるが、研究者の創造性・やる気を維持するには必要なことであり、総合的に見ればプラスと考えるとのことである。研究の中から製品化に結びつく成果が生まれると、迅速な商品化を図るためのプロジェクトが組まれる。プロジェクトのメンバーは、基礎研究から営業まで各分野から選ばれ、そのリーダーは進捗状況に応じて、順次交代してつとめる。周辺の土地を購入し更に発展しようとする同社の研究室には、研究者の将来への夢としてヨットハーバーが描かれた構内スケッチが貼られて、遊び心を持ちながら研究を進めているゆとりがうかがわれた。

「バイオテクノロジーそのものの研究とともに、多くの操作、処理などを正確に行えるようにロボット工学の研究も重視し、研究の二本柱としている」

同じくジェネンテック社で、製造プラントのファーマンター、精製用機器の見学のあと基礎研究室を通りながらの説明であった。バイオテクノロジーの産業化成功の背景には、そこで必要とされる諸機械施設の開発も必要とされる。他の訪問先でも研究支援機器の重要性は説明を受けたが、産業化となれば一層、正確に、安定して、大量に扱えるかどうかにか成否がかかっているのである。わが国でも、両分野の適正な交流が研究にとっても産業化にとっても必要とされよう。

「これは説明者のセリフでは表現できないこと。説明者にかかわることです」

最初の訪問先カリフォルニア大学リバーサイド校で、Leonard 教授の概要説明のあと、詳しい研究内容の解説は別室でと導かれた部屋でスライド映写の準備をしていた二人のご婦人を、てっきり講座の雑用諸事をとりしきるアルバイトの方であろうと簡単に挨拶をかわしたのであった。ところが、お一人はアブジン酸による遺伝子発現の制御の研究を説明された Bray 助教授、もうお一人は除草剤抵抗性の開発を紹介された Holt 助教授で、油の乗り切った研究者であり教育者として私達に語ってくれたのであった。まだまだわが国では研究者は男性との先入感が強く、女性の活躍はありながらも、それらは例外的なものとする考えが支配的である。若い学問分野であるバイオテクノロジー関連からこそ、こういった保守的な発想を打破しなければならぬし、その可能性を求めて行かなければ発展は望めないであろう。

以上調査報告は付録的な部分の記録で、本報告は近日中に生研報告No.12にまとめる予定であるので、関心をお持ちの読者は生研機構企画部あて請求の連絡をお願いする。

## 国際学会レポート

第1回チョウザメに関する国際シンポジウム  
に参加して

農林水産省 水産庁養殖研究所 技術第一研究室

藤井 一則

## ボルドーへの不安と期待

1989年10月3～6日の4日間、フランスのボルドーで「第1回チョウザメに関する国際シンポジウム」が開催された。10月1日12時発モスクワ経由パリ行きの日航空441便は、出発直前になって機に異常箇所（着陸に困難を生じる恐れがあるという）が見つかり、約2時間遅れて成田を後にした。見送りに伊勢から同行した私の家族は、同じく12時発のニューヨークあるいはシカゴ行きの日航空に向かって手を振っていたに違いない。乗客の不安を乗せた同機は、無事経由地モスクワ着。ここの免税店でも、キャビアは高く28gで2,000円を超える値札が着いていた。モスクワパーリ間の機内サービスでそのキャビアが出てきたが、養殖研で自分で作った試作品の方がうまいと感じた。予定通り約2時間遅れてドゴール空港着。日本から来た田舎者（フランス語を話せない人の総称）が、英語も日本語も話せないタクシー運転手に連れられ、市内のホテルに着いた時には22時を過ぎていた。初めてのフランス、話せる言葉は「ボンジュール」と「メルシー」のみ、一人旅、初めての国際学会等々不安と期待が交錯して、その夜はほとんど眠れなかった。翌日ボルドー入りし、すぐさまシンポジウム会場に向い受付を済ませる。そこでようやく手にしたプログラムに目を通す。何しろ、自分がいつ発表するのか、持ち時間は何分かさえ知らされていなかったもので、明日（初日）の午後の部の5番目に名前を見つけた時にはホッとため息が漏れた。しかし、細かいタイムスケジュールは書かれていない。

チョウザメの成熟度判定と人為催熟への  
関心

13か国から68の研究発表、18か国から138名の参加者が集まった本シンポジウムは、「ヨーロッパ水産増養殖学会」のサテライトシンポジウムである。発表当日（初日）、会場には本学会の参加者も混じり約200人程の聴衆が集まった。わが国ではキャビアは有名であっても、親のチョウザメはまだまだ馴染みが薄い。しかし欧米では興味を持つ国、興味を持つ人がいかに多いかを改めて知らされた。ちなみに日本からの参加は私一人だけ。本学会の方にも海洋科学技術センターの豊田氏がポスターセッションに、K商事のブースに佐倉氏がおられただけで日本人参加者は合計3名だけであった。水産国日本としてはいささか寂しい気がした。

シンポジウムは、チョウザメの生物学、増養殖学、資源学、経済学の四つのテーマに分かれていたが会場は一つなので全ての発表を聞くことができる。会場入口で英語、フランス語、ロシア語の同時通訳が聞ける小型ラジオを渡された。耳慣らしのために、関係機関のお偉方の挨拶をも一生懸命に聞き入る。昼食休憩が終了する15分前に、午後の部の打ち合せがあり、チョウザメ研究では最も高名なカリフォルニア大学のドロシヨフ博士からようやく発表開始時間と持ち時間を知らされた。本番まで1時間20分。時間がきて「チョウザメの卵黄タンパク前駆物質の定量による成熟度判定及びLH-RHを用いた人為催熟」という題で発表した。その内容は、チョウザメの再生産（子作り）過程で得られた知見、す

なわち卵巣卵の成熟過程における卵黄タンパク前駆物質（卵黄の材料となるタンパク質）の血中濃度の変化と、それを成熟の指標としてLH-RH（成熟を促進させるホルモンの一種）を用いた人為催熟法についてである。発表そのものは我ながら悪いではなかったと思う。しかし、肝心の自分に出された質問の意味がよく理解できない。少なからずあせってしまい、聞き直しを2回ほどして、答を返したら通じたようであった。ぎくしゃくと三つ目の質問に答えたところで持ち時間が終了した。語学能力の低さが最大の原因ではあるが、ひどい時差ぼけに加え、上がってはいないつもりでも脳ミソは沸点に近づいていたのであろう。後から考えるとこう答えればよかったとの反省が残り、質問した人をつかまえて答の補足を押し売りした。ともあれ大きな肩の荷を降ろし、会場の外でコーヒーをすすっていると、質問を投げかけて来る人が次から次に現れた。その内の1人、ベルギーの某教授など話しているうちに半強制的に本学会にある自分のポスターの所に私を連れて行き、説明を始め出した。魚種は違うが人為催熟に関することであり、興味があったので話し込んでしまった。おかげでプログラムに赤丸を書き込んであった発表をいくつか聞き損なう羽目にあう。残念とも思ったが、いずれでき上がる論文集を読めばよく、人とのつながりを作る方が重要であると自分に言い聞かせた。このような欧米人の積極性は見習うべきであらう。

チョウザメの卵黄タンパク前駆物質に関してはアメリカ、フランスからもセレンウムと

の結合能、高感度定量法についての発表があり、興味を引いた。また、人為催熟に関する報告も数多くなされた。使用するホルモンの主流はこれまでの脳下垂体からLH-RHに移り、LH-RH単独あるいは他のホルモンとの併用例がソ連、西ドイツ、アメリカからも報告された。

#### 各国のチョウザメ資源増養殖事業への 取組み

シンポジウム全体を要約すると、チョウザメ資源に関しては各国ともにその減少を憂慮し、早期対応の必要性を訴えていた。それに伴い、研究の主流が資源から増養殖へと推移しつつある傾向が感じ取れた。世界のチョウザメ漁獲量及びキャビア生産量の9割以上を占め、チョウザメ専門の研究所を持つソ連においては、資源の維持、増加に向けた増殖事業、産業ベースに乗った養殖事業（食肉用）の更なる増産を目指し、その研究に力を入れている様子がかげがえた。研究面での先進国アメリカ、フランスの他、イタリア、ハンガリー、ルーマニアからも、飼育下での成長、成熟、人為催熟等の増養殖の基礎となる研究が目玉を引いた。お隣の中国は、自然水系での資源特に親魚資源に関する研究発表と共に、捕獲したチョウザメを使って人工授精により種苗を生産し放流するまでの過程を映画にしたものが興味深かった。個人的な話の中でも、カナダ、イラン、西ドイツ、デンマーク等今回参加した多くの国（人）がチョウザメの増養殖に大きな関心を持っていることをひしひ



シンポジウム主催機関CEMAGREF(フランス農水林業機械化試験センター)のブース



会場入口に設置されたチョウザメの展示水槽

しと感じた。

今後チョウザメは養殖魚としても発展すると思われる。当面は食肉用として生産量が増加するであろう。実際ソ連、アメリカ、イタリア等ではチョウザメ養殖が事業として成り立っており、魚肉としての生産量は年々増加している。ソ連では年間2,000t、アメリカでは500tという生産目標が今後2～3年の内に達成されるという。イタリアの生産量は聞き損ねたが、現在世界全体のチョウザメ漁獲量が約25,000tであるから、これらの数字が決して小さいものでないことが理解していただけたと思う。また、主催国のフランスでは、産業ベースにはまだ乗りきれないが、研究面ではかなりの熱の入れようと実績を示し、近い将来頭角を現わすことが十分予想できる。いずれの国もキャビア生産は一つの大きな目標であると思われるが、成熟までの期間が長すぎるためそこまではなかなか達していない。ちなみに天然魚の場合、一般的に雌の成熟までに10年、種類、環境によってはそれ以上かかるといわれている。しかし給餌養殖の場合、

その年数は短縮できるであろうから、将来養殖チョウザメのキャビアが出回る可能性は大いにある。

わが国でのチョウザメ養殖の可能性を考えた場合、養殖技術、施設等は現有するもので十分応用できるので、種苗さえ確保できればすぐにでも始められる素地はある。後はキャビア生産が可能となるまで（雌が成熟するまで）の期間をつなぐため、食肉としての需要を喚起できるか否かがカギになると思われる。また、養殖の効率を高めるため、①より早く成長させるための最適飼育条件（環境、栄養等）の解明、②雄は食肉用、雌はキャビア用に振り分けるための早期雌雄判別法の開発、③雌性発生等の全雌生産技術の開発、等に関する知見の蓄積が望まれる。

シンポジウムの最後に事務局より、研究者の横のつながりを保つためチョウザメ研究の国際組織を作ろうとの提案がなされ、私も参加する意志を表明した。この組織は、遅れつつも注目を集め始めたチョウザメ研究の今後の発展を促すであろう。

## 特別情報

# インド柞蚕の人工飼料育

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所 神経生理研究室

赤井 弘

## はじめに

カイコがクワの葉を食べて繭を作り、この繭から生糸や絹織物ができることは一般によく知られていることであるが、カイコ以外の野生の絹糸昆虫類、すなわち野蚕が作る繭からも種々の絹織物が生産されていることについては殆ど知られていない。中国においては、カイコとは分類学上の科の異なるヤママユガ科の1種である中国柞蚕 (*Antheraea pernyi*) が、中国東北地方を中心に、その他の地方に

おいても広く野外で飼育され、中国にとって重要な産業となりつつある。中国柞蚕の繭の生産高は年によって異なるがこれまでに最高で8万トン以上も生産し、この量は現在の日本の家蚕繭の生産額の3倍にも達している。この繭から生糸を繰糸し、スーツやドレスなどのアウターウェアから下着などの各種インナーウェアまで多様な柞蚕絹織物を生産し、主として欧米に輸出している。

一方、インドにおいては中国柞蚕と同じ科に属するヤママユガ科のインド柞蚕（またはタサルサン、*Antheraea mylitta*）、ムガサ

ン (*Antheraea assama*), エリサン (*Philosamia cynthia ricini*) などが野外で飼育され, その繭糸から絹織物が作られ, サリーなどの民族衣装に重宝されている。また, アフリカでは全く別の科に属するギョウレツケムシ (*Anaphe*) の作る巨大な繭から糸をとり, ガウンなどの絹織物が生産されている。

わが国では, 長野県の有明地方で古くから前述と同じヤママユガ科の天蚕 (*Antheraea yamamai*) が野外で飼育され, その繭から繰糸された優美な薄緑色の生糸はその稀少価値と合わせて珍重され, ネクタイ, 打敷, 家紋, その他小物などに家蚕糸と混織され超高級絹織物として同好者に愛用されている。

以上に述べた何種類かの野蚕糸は, カイコの繭糸に比較して糸の性質が大きく異なっている。1例としてカイコと天蚕を比較すると, カイコの繭糸は太さが平均でほぼ3デニール, 外形は三角形を呈し, 内部は緻密で微細構造は見られない。これに対して天蚕の繭糸は太さが5~7デニールで外形は楕円形を呈し, 内部に多数の孔管が見られ, カイコの繭糸とは構造的にも異なっている。繭糸素材の物性は絹織物に対してもっとも影響の大きい要因であり, 野蚕のような性質の異なる多くの天然絹素材がハイブリット素材として利用できれば新しいタイプの多様な絹製品の生産が期待できる。衣料の評価は, 従来の耐久性から快適性へと移り, そのためには物性の異なる天然繊維素材の組合せによる多様化が一段と重視されてくるものと考えられる。

われわれの研究室では, インド産のタサールサンの卵を輸入し, この虫に適した人工飼料を新たに開発し, 一世代を飼育し, 繭と次代を得ることに成功した。このことは, 今後わが国における野蚕糸の生産と利活用に大きく影響を与えるものと考え, 本誌で紹介させて頂くことにした(表紙参照)。

### 1. インドにおけるタサールサンの飼育

タサールサンは, ベンガル湾に面したインド大陸の東部から南部にかけて, すなわち, Bihar, Orissa, Andhra Pradesh, Madhya

Pradesh, ならび Maharashtra などの各州で飼育されている。このタサールサンは広食性の昆虫でその飼料植物は広範囲にわたるといわれ, インドに自生するコバテイシ, サラソウジュ, カシワ, コナラなど多種にわたる樹種の葉を食する。その中でコバテイシが最も秀れた飼料作物であると従来からいわれてきたが, 終令期をサラソウジュで飼育すると繭重や繭層重がより重くなることが明らかにされ, 幼虫期の1~4令はコバテイシで飼育し, 5令になるとサラソウジュに移すことが有利な飼育法と考え始められている。

タサールサン幼虫はカイコに較べると体軀も著しく大きく, 体重比でみるとカイコの数倍から10倍近くにまで成長する。卵から孵化したときの体長は約7mm, 体重は約8mgであるが, 5令の盛蚕時では体長が13cm以上になり, 体重は70g以上に達し, その成長率は孵化時の6,000倍以上になるという。

繭の重さについて見ると, インド国内の地域と飼料樹種によって繭重には相当の開きが見られ, 平均繭重は7gから16gの変異幅が見られる。繭層歩合もまた変異幅が大きく, 10から23%と開き, コバテイシで飼育した場合の10~18%に対して, サラソウジュでは20~23%と明らかに後者が高い繭層歩合を示している。繭糸長, すなわち1粒の繭から採れる糸の長さについても同様の傾向がみられ, 地域と飼料樹種によって520mから1,400mと大きく開き, コバテイシによる飼育の場合は520~900m, これに対しサラソウジュでは1,200~1,400mとなっている(口絵参照)。

繭糸織度, すなわち繭糸の太さは絹糸昆虫の中で最も太く, 8~13デニールが普通であるが15デニール以上の例も多く記載されている。

タサールサンの飼育時期はインドでは3期に分かれ, 第1期は7月~8月, 第2期は9月から10月, 第3期は11月から1月である。幼虫期間は飼育時期によって大きく異なり, 第1期は30~35日, 第2期は40~45日, 第3期では60~70日であり, 温度により大きく左右されている。すなわち, 飼育時期の温度は, 第1期が24~34°C, 第2期が20~30°C, 第3

期は18~26℃である。

2. タサルサンの人工飼料育

わが国では、絹糸昆虫の中で家蚕及び中国柞蚕を除くすべての絹糸虫は植物防疫法によって輸入禁止品目となっている。タサルサンと同類の中国柞蚕は産業的にみて有用であるという理由で除外されている。今後、わが国においてもタサルサンの研究と利用が進み、有用性が認められれば輸入禁品目からの除外も可能であろう。

今回の研究では、インドのオリサ州の蚕業研究所から送付されたタサルサンの卵を25℃のインキュベーターで催青し、孵化した幼虫を人工飼料で飼育した。

カイコ、天蚕及び中国柞蚕の人工飼料はすでに開発されているが、インド柞蚕についてはこれまでに例を見ない。今回は、これまでに報告されている天蚕及び中国柞蚕の人工飼料を参考にしながら、タサルサン用人工飼料を独自に開発した(表紙参照)。

飼料組成を表1に示したが、カイコの人工飼料のように飼料を蒸すことはせず、植物葉乾燥粉末はインドから輸入したコバテイシの新葉の乾燥粉末を混入した。まず、表1に示す3種の人工飼料を試作し、先行飼育試験を行なったところ、1~2令期は各飼料区に比し大差は見られなかったが令が進むに従ってB及びC飼料の成長がA飼料に比し鈍化してきたので、飼育試験は表2に示す3区、すなわち、(A)全令A飼料、(B)1~3令B飼料、4~5令A飼料、(C)1~3令C飼料、4~5令A飼料とした。

飼料の調製に当っては、A飼料では表1中の(a)と(b)の混合割合を1:1とし、この(a)+(b)混合粉末に対して15%の割合で寒天(c)を混合した。なお、水の量(d)は稚蚕期(1~3令)では混合飼料[(a)+(b)+(c)]100gに対して400ml、壮蚕期(4~5令)は350mlとした。微量添加物として、ビタミン、無機質、防腐剤を加えた。B及びC飼料については表1に示す割合で混合した。

上記3種の人工飼料は、孵化直後の幼虫に

表1 人工飼料の組成

組 成 分		A 飼 料	B飼料	C飼料
植物葉乾燥粉末	1 (g)	5.00 (a)	5.0	6.0
キ ナ コ	(g)			1.0
庶 糖	(g)			1.0
寒 天		15% (c)	1.0	1.0
生大豆粉末	(g)		1.0	
ブドウ糖	(g)		1.0	
ビタミンC	(g)	0.3	0.2	
ろ紙粉末	(g)	1.0	1.72	
ソルビン酸	(mg)		30.0	
クロレラ粉末	(g)	3.0		
脱脂大豆粉末	(g)	1.0		
微量添加物	(g)	0.9		
ビタミン混合III	(mg)		50.0	50.0
防腐剤				若干
水	(ml)	混合飼料 [(a)+(b)+(c)] に対し て400~350ml	27.0	27.0

給与すると、全く忌避性を示すことなくよく食下した。

飼育はインキュベーター内で稚蚕期はプラスチック容器内に人工飼料と水を入れ、約28℃で飼育した。4令期以降はアイスクリームカップに1匹ずつ入れ、5令期はさらに大形のプラスチックカップまたは弁当箱に入れて飼育した。

発育経過は表2に示すように飼料によって相当の差が生じた。すなわち、A飼料区では幼虫期が28~38日であったが、B及びC飼料区では40~50日を要した。平均体重は表2に示すようにA飼料区が31gで、それに対してB及びC飼料区は共に約26gであり、A区は食餌日数が短いにも拘らずその体重は重く、A飼料がタサルサンの飼料として適している

表2 人工飼料育におけるタサルサンの発育経過と平均体重

試 験 区	全令経過日数 (♀♂混合) 平均体重	
	(日)	(g)
A飼料区 (全令A飼料育)	28~38	31
B " 1-3令 B飼料 4-5令 A飼料	40~50	26
C " 1-3令 C飼料 4-5令 A飼料	40~50	26

ることを示している。

上蔭には二つの方法を試みた。その一つは縦、横各40cm、高さ70cmの網箱にクヌギの枝を入れ、その中に熟蚕を入れると、熟蚕は枝に登り枝葉間の各所で営繭した。次の方法は、恒温飼育装置内でカイコの場合と同様にプラスチック製の山形蔭に熟蚕を入れ営繭させた。両区とも熟蚕は殆どすべて営繭し、両区の間になんらの差も見られなかった。

営繭後、繭を切開し中の蛹を取り出し、健蛹歩合を調査したところ、病蚕は殆どなく健蛹歩合は極めて良好であった。この蛹を縦、横、高さ各30cmの、内部にカンレイシャを貼り付けた箱に移し、羽化及び交尾を行なわせた。化蛹後10数日で化蛾し、交尾後産卵し、産卵数は1蛾当り160~220粒であった。タサールサンの場合は、天蚕のような交尾の難しさは無く、比較的容易に交尾、産卵ができた。

### 3. タサールサン利用の今後

インドではタサールサンは産繭量で約5,000トン、生糸量で約450トンの生産がなされている。この数値はインドのカイコの生産量に較べると少量であり、またインドで野蚕糸を主体にした新しい絹製品を開発するにはインドの生産体系と技術面から難しさがあり、わ

が国の協力と野蚕糸の安定供給が必要となる。

今回、私達は人工飼料でタサールサンを飼育することに成功し、質的にもインドで現在飼育されているタサールサン繭に較べて見劣りしない繭が得られた。今後この飼育法を多少改善していけば、わが国においてもタサールサンを大量に飼育し野蚕糸の安定供給も可能となろう。

前述のように、タサールサンの繭糸はその太さでカイコの数倍の達し、この繭糸の太さを生かせばこれまでにないユニークな絹製品を作り出すことは容易であろう。さらに、家蚕糸と野蚕糸とのハイブリッドによる多様な新しい絹製品を産出することも可能である。現在の豊かな時代に、人々は衣料の多様化と快適性を要求し、そのためには幅の広い繊維素材が不可欠であり、新素材としての野蚕糸の登場は間近に迫った問題と思われる。

一方、タサールサンの幼虫はその終令期においては体重が50~80gにも達する超大型昆虫である。最近バイオテクノロジーによりカイコにインシュリンを作らせるとか、それに類する昆虫機能の利用が開発されつつある。タサールサンはその巨大性を活かして今後のバイオテクノロジーの有力な受け皿として活躍できる可能性を十分に秘めた昆虫といえよう。

#### 編集後記

明けましておめでとうございます。BRAINテクノニュースも創刊以来4年を迎え、購読会員数も着実に伸びています。これも、ひとえに皆様の温かい御理解と御協力によるものと感謝しています。バイテク研究もそろそろ成

果を問われる時期になってきましたが、これからはよりよい情報をより早くお届けしたいと念願しています。本年もどうぞ宜しくお願いいたします。

(大畑記)

ブレイン テクノニュース (第17号)

---

平成2年1月15日発行

発行者 渡邊 五郎

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

〒160 東京都新宿区新宿6丁目24-16 日本生命新宿6丁目ビル3F  
TEL. 03-205-6565 FAX. 03-205-6566

編集 (社)農林水産技術情報協会

〒103 東京都中央区日本橋兜町15-6 製粉会館6F  
TEL. 03-667-8931 FAX. 03-667-8933

© Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 1990