

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

CODEN : BTEEEC

TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 53 号

JANUARY 15, 1996



フラボノイド系色素生合成阻害剤によるチューリップの淡色化

左 (赤色の花) : 無処理, 右 (桃色の花) : 処理

品種は Preludium, 植付け後 1 週間目に水耕液加用処理 (1ppm)

(本文25ページ参照)

発行 = 生物系特定産業技術研究推進機構

総 説

山口勲夫・瀬古秀文

小麦育種の現状と展望…………… 1

国内情報

福井希一

レーザー光による染色体・細胞操作…………… 5

細山 浩・小幡明雄・小川 正

大豆主要アレルゲンとそのエピトープ解析…………… 9

増田 税・田中英夫

S-アデノシルホモシステインヒドロレーズ (SAHH) 遺伝子をアンチセンスで発現させた
形質転換タバコのウイルス抵抗性と形質変化……………13

亀山賢次

豚胚の凍結保存技術……………17

黒川忠英・田中秀樹

ウナギ孵化仔魚の消化器官の発達と摂餌……………21

地域の先端研究

今井 徹

チューリップの花色調節法の開発……………25

文献情報

遺伝的にマーキングした *Lactococcus lactis* のヒト消化管での生残性……………28

正体不明のタンパク “ β -trace” はプロスタグランジンD合成酵素だった……………29

培養胚の発生速度の違いでその後の胚の発生能力を予測する……………30

小麦育種の現状と展望

農林水産省 農業研究センター・*農業生物資源研究所

山口 勲夫・*瀬古 秀文

わが国の小麦はそのほとんどがめん用として消費されるが、輸入小麦に比べて製粉性、めんの色、食感などが及ばないため、これらの改良に重点をおいて育種が進められている。ここでは、わが国における小麦生産の現状、育種組織と最近育成された品種、さらに、小麦では知られていなかったモチ性小麦について、育成のきっかけとなった研究とモチ性小麦の特徴及び今後の対応、などについて概略を紹介する。

1. はじめに

わが国の小麦は、北海道の一部の春播小麦が製パン用であることを除き、ほとんどが製めん用として消費される。

わが国の小麦作付面積は、戦後の増産計画で昭和30年代には70万 ha まで増加したが、昭和40年代に入ってから激減し、一時は10万 ha を割って、そのまま安楽死するかとささやかれたこともあった。その後、小麦は水田転換作物に指定され、麦作振興施策によって作付面積は増加に転じ、昭和63年には28万 ha にまで回復した。しかし、平成元年以降は再び減少する傾向にある。

この間、国産小麦が再び増加し始めた頃から、国産小麦は ASW（オーストラリン・スタンダード・ホワイト）をはじめとする輸入小麦に比較して品質が及ばないことが実需者から指摘されるようになり、品質が優れた品種の育成が望まれてきた。

そのため、現在の小麦育種は品質改善に重点をおいて進められている。以下、わが国における小麦育種の現状と今後の方向について述べる。

2. 小麦育種の現状

わが国の小麦育種は、北海道、東北、中国、九州の各農業試験場（以下、農試と略）及び農業研究センター（以下農研センターと略）の国立場所と、国が委託して行う指定試験地として北海道立北見農業試験場及び長野県農事試験場の計7か所で主に行われ、それぞれの地域に適応した生態型の品種育成を行っている（表1）。

わが国最大の小麦産地である北海道では、多収でめんの色味が優れるチホクコムギが大部分で、わが国の作付面積の50%近くを占めている。しかし、チホクコムギは赤かび病などの耐病性及び耐穂発芽性が必ずしも充分で

表1 小麦育成場所と育種対象地域及び育種目標

試験研究機関	育種対象地域及び育種目標
北海道農業試験場	寒地向け低アミロ耐性、高品質パン用の耐雪性秋播品種の育成
北海道立北見農業試験場（指）	寒地向け秋播、高品質めん用安定多収品種及び春播、高品質パン用安定多収品種の育成
東北農業試験場	寒冷地向け硬質～準硬質、高製粉性品種の育成
長野県農事試験場（指）	寒冷地南部及び温暖地北部向け早生、耐寒性、高品質めん用品種の育成
農業研究センター	温暖地向け製めん性、特に食感の優れた凍霜害抵抗性品種の育成
中国農業試験場	温暖地向け軟質、高製粉性、耐湿性品種の育成
九州農業試験場	温暖地向け低アミロ耐性、赤かび病抵抗性、高温登熟性、高品質品種の育成

表2 最近の主な育成品種と主要特性

品種名	育成場所	育成年	主 要 特 性
コユキコムギ	東北農試	昭 63.11	多収, 製粉歩留高い, 赤かび病強
ダイチノミノリ	九州農試	平 元.11	早生, 多収, 製めん性やや良い
バンドウワセ	農研センター	平 2.11	早生, 製粉性良, めんの色相良
タイセツコムギ	北見農試	平 2.11	製粉性良, めんの色相良, 耐雪性強
あきたっこ	東北農試	平 4.12	製粉歩留高い, 耐雪性優れる
アブクマワセ	九州農試	平 4.12	極早生, 製めん性やや良い
春のあけぼの	北見農試	平 6.11	耐穂発芽性優れる, 製パン適性優れる
きぬいろは	九州農試	平 6.11	極早生, めんの食感良, 穂発芽極難
チクゴイズミ	九州農試	平 6.11	めんの食感良 (低アミロース), 製粉性良
ホクシン	北見農試	平 7. 2	耐雪性優れる, めんの色相良
しゅんよう	長野農試	平 7. 2	めんの色相良 (黄色み), 多収, 穂発芽難

はない。最近育成されたホクシンは製めん性が優れ、耐雪性、赤かび病抵抗性及び耐穂発芽性も優れるため、チホクコムギに替わって普及するものと期待されている。春播小麦では最近パン適性が高い春のあけぼのが育成された。

北海道に次ぐ小麦産地である関東及び関東以西では、農林61号が主力品種であり、作付面積はチホクコムギに次いで25%を占めている。田植機の普及により水稻の移植期が早まるにつれ、農林61号の収穫が水稻の移植と競合するため、農林61号より早生の品種が必要となり、アサカゼコムギ、フクホコムギなどの早生・多収の品種が育成されて、一時的に農林61号の作付けは減少した。しかし、これらの品種は輸入小麦に比べ品質が劣ることが指摘され、再び農林61号の作付面積が増加した。

最近になって、バンドウワセ、ダイチノミノリ、チクゴイズミなどの早生で高品質の品種が育成され、農林61号の一部に替わって普及しつつある(表2)。

東北や東山などでは、適応する生態型がそれぞれ異なるため、異なる品種が栽培されている。東北ではナンブコムギ、キタカミコムギとともに、最近育成されたコユキコムギ、あきたっこが作付けされている。東山地方では、作付けはシラネコムギがほとんどであるが、最近育成されたしゅんようがシラネコムギの一部に替わって作付けされる予定である。

3. 小麦の加工適性と育種

小麦における品質には、一次加工適性と二次加工適性とがある。一次加工適性は製粉性であり、国産小麦は輸入小麦に及ばなかった。しかし、最近の品種では製粉性はかなり改良が進み、中にはASWなみの製粉性を有するものもある。

二次加工適性は、製パン適性や製めん適性であり、国産小麦は主にめん用として使用されることから、製めん性が重要視される。製めん性に関連する要因の中でも、色と粘弾性が重要であり、ASWはめんの色ではクリーミーホワイトと呼ばれる黄色みを帯びたさえた明るい色となめらかでモチモチした食感をもっている。全国の育種機関ではASWに及ばないめんの色と食感の改良に重点をおいて育種を進めている。チホクコムギは国産小麦では粘弾性がよい品種の代表である。

めんの食感の中ではとくに粘弾性(モチモチした感じ)が注目される。一般に、澱粉のアミロース含量が少ないと粘弾性が優れる。農研センターで育成した関東107号は農林61号よりアミロース含量が低く、食感はASWとやや異なるものの粘弾性が優れることから、食感改良の母材として多く用いられ、九州農試では粘弾性の優れたチクゴイズミを育成した。

しかし、関東107号やチクゴイズミの食感はASWなどとはやや異なり、食感はアミロース含量以外の要因も関与していることが示

唆される。現在、食感との関連でアミロペクチンの構造解析などの研究が行われている。

また、農研センターでは、アミロース含量の変異を拡大する目的で関東 107 号に突然変異処理を行い、関東 107 号より 2 割程度アミロース含量が低い突然変異系統、谷系 A 6099 を得た³⁾。この系統は、めん試験のときのゆで時間が関東 107 号より短く、粘弾性も優れていた。しかし、この系統は粒が小さくめんの色が劣っていることから、粘弾性を改良するための中間母本として登録された。

めんの食感は、関東 107 号のもつ低アミロース含量を利用した改良が進んでいるのに対して、めんの色の改良は優れた母材がなく、食感の改良に比べて遅れている。ASW はいくつかの品種をブレンドした銘柄であり、ASW の構成品種には粉の色が優れた品種も多いが、これらの品種は成熟期が遅く、赤かび病に弱い上に耐穂発芽性が弱く、これらの品種を交配した育種は困難を極めている。しかし、バンドウワセのめんの色は明るく農林 61 号より優れ、また、北海道のタイセツコムギはチホクコムギに比べめんの色が改良されており、最近長野農事試で育成されたしゅんようはめんが黄色みを帯びた明るい色を有するなど、めん色も着実に改良が進んでいるといえよう。

4. モチ性小麦の育成

イネやトウモロコシなどの作物では、古くからモチ性（アミロースをほとんど含まない）の品種はあったが、小麦ではモチ性の存在は知られていなかった。これは、小麦が異質 6 倍体であるため、三つのゲノムのすべてのモチ性遺伝子がそろわないとモチにならないからと考えられていた⁴⁾。

中村ら²⁾ はアミロースを合成する酵素である Wx タンパクについて、各ゲノムからのタンパク（Wx-A, Wx-B, Wx-D）を識別する方法を開発し（図 1）、関東 107 号は Wx-A 及び Wx-B を欠き、そのためにアミロース含量が低いことを示した。山守ら⁵⁾ は農業生物資源研究所の農林水産ジーンバンクに保存中の世界中から収集した小麦遺伝資源のうち、2,000 近い品種・系統を分析し、中国品種の中に Wx-タンパクを欠く白火（Baiho）という品種を見だし、これを関東 107 号と交配することによりモチ性個体が得られることを示した。このことは、遺伝資源の重要性を如実に示したものと見える。

東北農試では、この組合せの F₁ にトウモロコシ花粉を交配する半数体育種法を適用して遺伝的固定化を図り、2 系統のモチ性系統

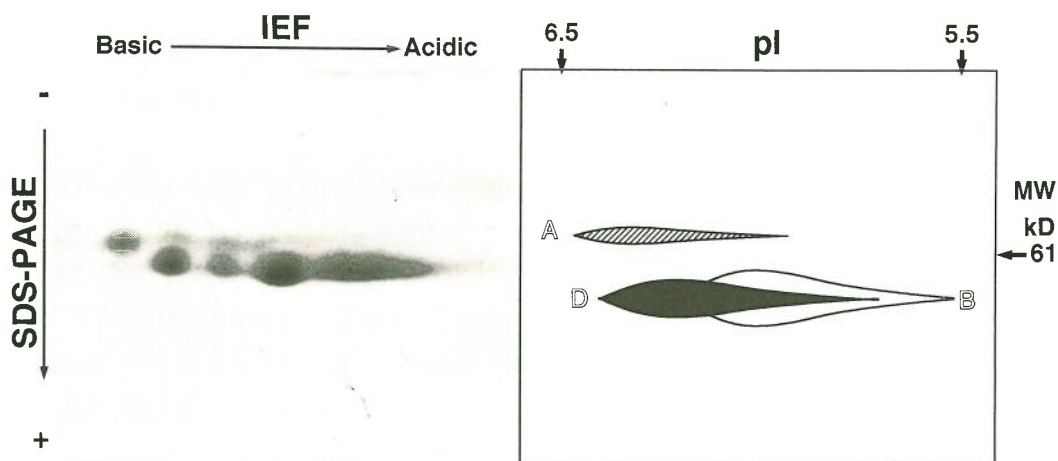


図 1 小麦タンパク質の 2 次電気泳動とダイアグラム（中村原図）

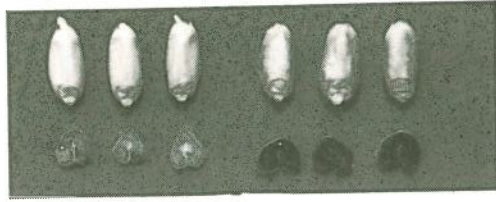


図2 モチ性小麦のヨウ素ヨウ化カリウム反応 (吉川原図)
左: 3粒モチ小麦, 右3粒普通小麦

を得ている (図2)。

一方、農研センターでは、関東107号よりアミロース含量が低い谷系A6099を食感が優れる西海168号 (後のきぬいろは) と交配し、これに半数体育種法を適用して得た半数体倍加系統の中からモチ性の5系統を見いだした。

農林61号などの小麦にモチ性小麦を少量ブレンドするだけで関東107号並のアミロース含量となり、食感が優れるめんが得られることとなる。そのため、モチ性小麦はまずブレンド用品種としての用途が考えられる。

また、小麦には、水を加えてこねると粘りを増すグルテンが形成されるため、モチ性小麦はイネやトウモロコシのモチとは異なり、グルテンとモチ性の両方の特性を合わせ持ち、新たな用途に利用できる可能性を有している。

農産園芸局農産課では平成8年度からの予算で「モチ性小麦の生産・利用技術実用化実証事業」を計画しており、研究、行政が一体となって、モチ性小麦を国産小麦振興の起爆剤にしようとしている。

5. おわりに

国産小麦は輸入小麦に対して加工適性が及ばないため、品質の改良をめざす必要があることは今後も変わらない。これまで、それぞれの品質特性に焦点を絞って改良が進められてきた。その結果、製粉性やめん粘弾性ではそれなりの改良は進んでいると言えよう。しかし、これらの特性に比べめん色の改良はこれから期待されるところが大きい。また、改良されたこれらの品質特性を集積して、ASWに優る品質を持つ品種育成が今後の課題である。

一方、UR新合意によって小麦も今後はさらに厳しい状況になることが予想されるため、生産の低コスト化を図る必要があり、品質の一層の改良とともに安定した二毛作のための早生化や、多収化、耐病性なども重要となってくる。多収化についてはハイブリッド小麦の本格的な研究が開始されている。

文 献

- 1) Kihara, H. (1979) *Seiken Jiho*, 27-28: 45-47
- 2) Nakamura, T. *et. al.* (1993) *Biochem. Genet.* 31: 75-86
- 3) Oda, S. *et. al.* (1992) *Jpn. J. Breed.* 42: 151-154
- 4) 山守誠ら (1994) 育種, 44 (別2): 242

レーザー光による染色体・細胞操作

農林水産省 北陸農業試験場
福井 希一

レーザー光を用いて植物の細胞器官や細胞自体を操作する3種類の方法について述べる。

第1番目の方法はレーザー切断法であり、この方法の開発により植物染色体の自由な微細加工が可能となった。第2番目のものは光穿孔法であり、従来の電気穿孔法に比べ長時間の開口が可能である。最後のものは光ピンセット法であり、対象とする細胞や核のひとつ一つを自由に操作することができる。

このような光を用いた操作法の開発により従来は不可能であったより高度な染色体・細胞操作への道が開かれたのである。

1. はじめに

光、特に波長の揃ったレーザー光を生物学の分野で用いることが最近急速に発展してきた。例えば既に手術にも多く用いられているレーザー光をメスとして用いる光切断法がある。その他に最近ではレーザー光を用いて植物の細胞、特に細胞壁を取り除いたプロトプラストに穴をあける光穿孔法、さらにはレーザー光をピンセットがわりに用いるものをつかむ光ピンセット法などが開発されつつある¹⁾。ここではこれらレーザー光を顕微鏡下の染色体や細胞の操作に用いることについていくつか具体例をあげて紹介する。

2. 光切断法

レーザー光を用いて対象物を焼き切ることは現在既に広く行われており、他の方法では困難な微細で精緻な加工が可能になっている。この方法は外科手術等にも多用され、出血等が比較的少なくすむことから、その利用は急速に広がりつつある。

こうしたレーザー光を顕微鏡レベルでの加工に用いることも以前から試みられており、

Monajembashiら(1986)はレーザー光を用いて人の染色体の切断に成功している²⁾。しかしながら顕微鏡下での染色体の加工が実際の研究に用いられるようになるのは、染色体の特定の位置に正確にレーザー光を照射するため対物レンズ中を通るレーザー光路の開発、レーザー光の微少な出力調整法、さらにはこれら全てを自由にコントロールする方法等の開発が必要であった。これらの条件を満足した最初のシステムは米国ミシガン大学によって開発され、Anchored Cell Analyzing System(付着細胞分取解析装置, 1982)と名づけられた。

このシステムは元来動物細胞の選抜に用いるために開発されたもので、染色体の加工を目的としたものではなかった。しかしながらその基本性能は染色体の加工にも適用可能であると考えられたので、植物における染色体の微細加工について長く検討してきていた私達は、本装置の市販型であるACAS 470を1987年に導入し、顕微鏡下での染色体のレーザー加工法について検討を始めた³⁾。その結果、レーザー光の出力調整を最適化することおよび染色体の標本作製法に手を加えることにより、染色体のレーザー加工についてはほぼ問題なく達成することができた。

図1にレーザー光を用いたオオムギ染色体の加工のプロセスを示す⁴⁾。酵素解離/空気

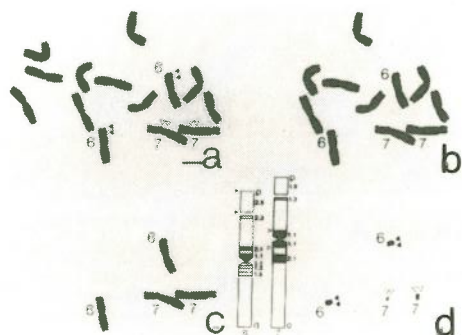


図1 レーザー光を用いたオオムギ染色体の加工プロセス

乾燥法でまずオオムギ染色体標本を作製する。ここでは▲と△で印をつけたオオムギ第6染色体のサテライト領域およびオオムギ第7染色体の動原体領域を切り出すことを目的とした(図1 a)。まず染色体周辺部の不要な染色体をレーザーで加工して除き(図1 b)、2本のオオムギ第6染色体と第7染色体4本のみを残して他の全ての染色体を焼き切る(図1 c)。その上でレーザー光の出力を幅 $0.5\mu\text{m}$ の染色体領域を切る程度にまで弱め、それぞれの染色体の目的とする領域を切り出すことに成功した(図1 d)。

顕微鏡下で切り出された染色体の断片をいかに回収するかという問題は、染色体標本を通常のスライドガラス上で作製するのではなく薄い光吸収性のポリエステル膜上に作製し、染色体の切断加工が終了した段階で、染色体断片が乗っている薄膜自体を切り取るという方法により解決した。現在は回収した薄膜のディスクそのものをPCR法における鋳型として用いることにより、染色体の特定領域におけるDNAの増幅、さらには回収も行えるようになった。また増幅されたDNA断片を

蛍光標識することにより、蛍光 *in situ* ハイブリッド法を行い、増幅された断片の染色体上の位置を再確認することもできる⁵⁾。

既に開発されている染色体の画像解析法⁶⁾とこれらの技術を組み合わせることにより、画像法による染色体の検出および染色体の特定領域の同定、レーザー光による切り出しおよび断片の回収、PCR法による特定領域のDNAの増幅、さらにはFISH法によるその位置の再確認という一連の流れが完成された訳である。この方法により生物の種によらずゲノム解析を完全に自動化して行うシステムの構築が夢ではなくなった。

3. 光穿孔法

光穿孔法はレーザー光を用いて細胞膜をとり除いたプロトプラストと呼ばれる裸の細胞の表面に小さな穴をあける方法である。プロトプラストに穴をあけることは、細胞中に外来の遺伝子を導入する方法のひとつであり、従来は電気的なショックをプロトプラストに与えてその表面に瞬間的に小さな穴をあける、エレクトロポレーション(電気穿孔法)が多く用いられてきた。しかしながら電気光穿孔法には穴があいている時間が短いということと、穴のサイズが小さいという欠点があり、大きなDNA分子をとり込むことには不都合があった。そこでレーザー光による光穿孔法をプロトプラストを用いて行い、これらの欠点の克服を試みた。

図2はレーザー光を処理したタバコプロトプラストの経時的な染料のとり込みである。まず単離したタバコのプロトプラス

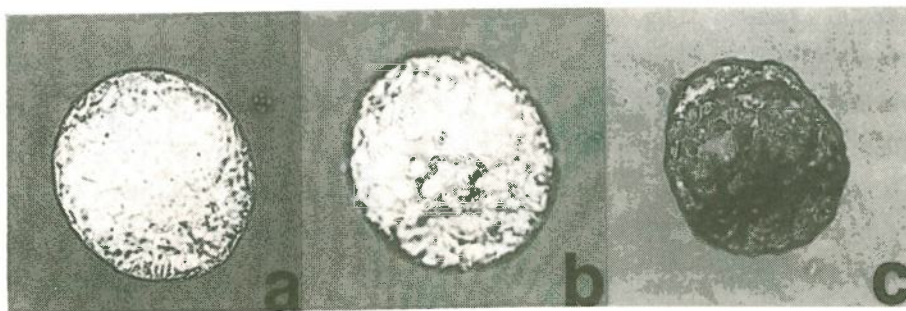


図2 レーザー光を処理したタバコプロトプラストの経時的な染料のとり込み

トをエバンスブルーを加えた培地中に懸濁培養し、タバコプロトプラストの中心部にパルスレーザー処理を行う (図2 a)。数分後にレーザー光を照射した中心部にエバンスブルーの浸透が認められ始める (図2 b)。エバンスブルーは生きてプロトプラストにはとり込まれないという性質を有しており、この色素の浸透はプロトプラスト表面に穴があいたことを示している。時間が経つにつれてエバンスブルーの浸透は多くなり、1時間後にはプロトプラストの内部は全てエバンスブルーによって占められる (図2 c)。レーザー光処理とプロトプラストの生存率についての検討は今後必要となるものの、このことはレーザー光によってあけられた穴が瞬間的なものではないことを明らかに示している。したがって今後はレーザー光の処理強度と穴のサイズ、あいている時間等について更に検討し、レーザー光処理の最適化を図っていく必要がある。

4. 光ピンセット法

光ピンセット法はレーザー光束を顕微鏡下の物体に照射した際にその物体がレーザー光束の中に捕らえられる現象をいう。この現象の理論的な裏付けは光の屈折によって生じる力、光子の散乱力等が物理的に考えられているが証明されたものはない。いずれにせよレーザー光のような波長の揃った光を溶液中で対象物に照射すると花粉、酵母、細胞核などが光束の中に捕らえられ、自由に動かすことができる。

図3にアルゴンイオンレーザー ($\nu=488$ nm) を用いて単離した核を光ピンセットで捕え、目的とするプロトプラストを選び、プロトプラストと核との融合を図るところを示す。図3 aはタバコのカルス細胞に由来する単離プロトプラストである。このプロトプラスト中には左下に核があることがわかる。次に同じ培養液中に懸濁したタバコの単離核をレーザー光束の中に捕え、ステージを移動させることにより、プロトプラストに接着させる (図3 b)。もし核を複数個接着させる必要があれば、周辺の遊離核を同様にレーザー光束の中に捕え、同じ操作を反復することにより、必要な個数の核をプロトプラストに接着させることができる (図3 c)。

光ピンセット法の最大の特長は、これ以外の種々の細胞融合法、核/細胞融合法と異なり、対象とする核や細胞を特定して接着させることができる点にある。したがってより対象を限定した細胞操作が可能となり、より特異的な現象の解明に有効と考えられる。

以上述べてきたように従来の光を用いての観察のみならず、光を用いて生物的な対象物を実際に操作していくことが可能になってきた。バイオテクノロジーと光工学という全く異質の分野の融合によって生まれたこれらの新しい技術は、今後ますます発展していくものと期待される。

文 献

- 1) Fukui, K., A. Nomiya, M. Nishiguchi and M. Fujishita (1995) *Zool. Stud.*, 34: 35-37

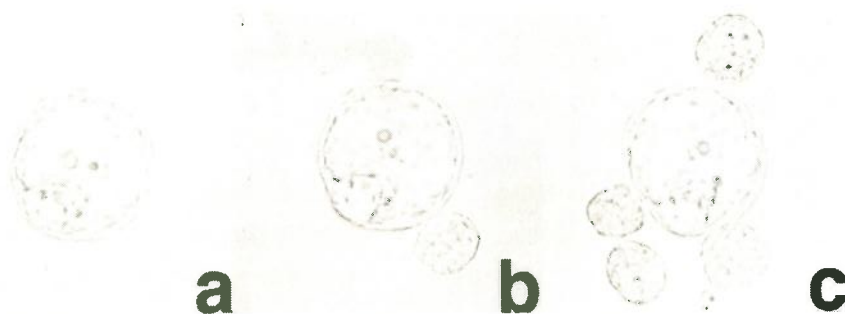


図3 アルゴンイオンレーザーを用いて単離した核を光ピンセットで捕え、目的とするプロトプラストを選び、プロトプラストと核の融合をはかる

8 国内情報

- 2) Monajembashi, S., C. Cremer, T. Cremer, J. Wolfrum and K. O. Greulich, (1986) *Exp. Cell Res.*, 167 : 262-265
- 3) 酒井富久美・福井希一 (1988) 第6回染色体検査学会抄録集, 1
- 4) Fukui, K., M. Minezawa, Y. Kamisugi, N. Ohmido, M. Ishikawa, T. Yanagisawa, M. Fujishita and F. Sakai (1992) *Theor. Appl. Genet.*, 84 : 787-798
- 5) Kamisugi, Y. and K. Fukui (1994) *Plant Chromosome Research* 1992, 103-109
- 6) Fukui, K. (1986) *Theor. Appl. Genet.*, 72 : 70-75



大豆主要アレルゲンとそのエピトープ解析

(株)アレルゲンフリー・テクノロジー研究所, *徳島大・医

細山 浩・小幡 明雄・*小川 正

わが国において、大豆は3大アレルゲンの一つとされているが、我々は大豆アレルギー患者血清 IgE と最も反応性の高い大豆アレルゲンタンパク質を単離精製し *Gly m Bd 30K* と命名した。そして、2種のマウスモノクローナル抗体、F5 (IgG 抗体) と H6 (IgM 抗体) を作製し、アレルゲン低減化の指標とするため、sandwich ELISA 法による食品中の *Gly m Bd 30K* の定量法を確立した。そして、*Gly m Bd 30K* 上のこれらモノクローナル抗体に対するエピトープをマルチ・ピンペプチド法を用いて決定した。さらに、この手法を用い患者血清 IgE に対するエピトープの検索を行っている。

1. はじめに

近年、様々なアレルギーに悩む人が増加しており、特に乳幼児を中心とするアトピー性皮膚炎患者において食品成分に起因する食物アレルギーが一種の社会問題ともなっている。わが国において、大豆は牛乳、卵に次ぐ3大アレルギー食品の一つとされている。大豆は近年、分離大豆タンパク質として、その栄養性、加工特性を生かして多くの加工食品にタンパク質素材として利用されており、大豆アレルギー患者にとって、大豆タンパク質を全く含まない安全な加工食品を選択することは非常に困難になりつつある。しかしながら、大豆アレルギー及びアレルゲン成分についてはわが国における独自の研究の立ち遅れや、大豆をあまり食べない欧米において大豆アレルギーがさほど問題にならず、逆に1900年当初から牛乳アレルギー患者の代替乳として豆乳が利用されていたこともあり大豆アレルゲンに関する情報はあまり多くなかった。我々は、小児病院の外来アレルギー患者でRASTによるスリーニングによって大豆陽性と判断された3か月から23才までの68人の患者血清を用いたイムノブロット法により詳細に IgE

抗体反応性タンパク質成分を検索した¹⁾。その結果を検出頻度に応じてまとめたのが表1である。また、最も検出頻度の高い分子量約30kDaのアレルゲンタンパク質(大豆アレルギー患者の約65%が認識するタンパク質)の単離同定を行い、これを *Gly m Bd 30K* と命名した(図1)。さらにタンパク質のN末端アミノ酸配列を解析した結果、アミノ酸配列の一致及び分子量、等電点等の類似性から soybean 34kDa oil-body-associated pro-

表1 アトピー性皮膚炎患者の保有する IgE 抗体と結合する大豆タンパク質成分

タンパク質成分 (質量 kDa)	帰属 (画分)	検出頻度* (%)
70-68	7S (α -サブユニット)	23.2
67-63	7S	18.8
55-52	7S	14.5
50-47	7S	13.0
45-43	7S (β -サブユニット)	10.1
41-40	7S	7.2
38-35	7S	7.2
35	11S (酸性サブユニット)	1.4
35-33	7S	15.9
31-29	ホエー	4.3
30	7S (<i>Gly m Bd 30K</i>)	65.2
28	7S (<i>Gly m Bd 28K</i>)	23.2
21-18	ホエー	7.2
20	2S (Kunitz 型トリプシン インヒビター)	2.9
17		1.4
15-14		2.9

* 大豆タンパク質陽性患者69人中の検出頻度

HOSOYAMA Hiroshi, OBATA Akio,
OGAWA Tadashi

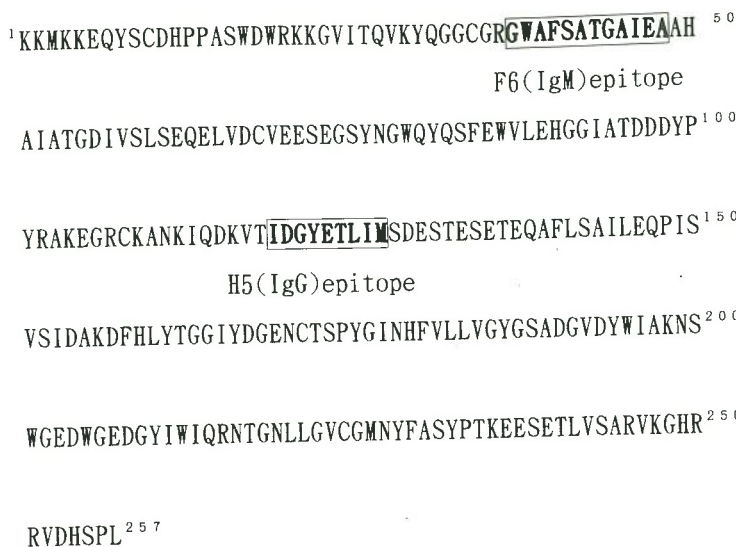


図1 Gly m Bd 30Kのアミノ酸列及びH5, F6に対するエピトープ

tein であることが解った²⁾。

2. モノクローナル抗体の作製

現在、食物アレルギー患者に対して有効な治療法がないため症状の緩和のための対症療法的な処置として、原因食品の除去食療法の指導が多く行われている。しかし、除去食品の多くは重要なタンパク質源であり、その実施には、栄養学上の問題点も多いのが現状である。そこで我々は、その問題の解決策の一つとして、その食品の摂取をやめるのではなく、アレルゲン成分のみを除去あるいは低減化した食品の開発を行っている。アレルゲン低減化に際しては、その過程で残存するアレルゲンの検出・定量法を確立することが必須の課題である。直接、人血清を用いてのアレルゲン検索は血清の確保や倫理上の問題もあり困難な面が多い。そこでアレルゲン物質を定量するため、我々は、マウスを用い2種の性質の異なるモノクローナル抗体、F5 (IgG抗体)とH6 (IgM抗体)を作製し、食品中の大豆アレルゲンの選択的かつ微量な定量法 (sandwich ELISA) を確立した³⁾。この方法を適用し、多くの大豆加工食品中に Gly m Bd 30Kが存在することが明らかとなった (表2)。

表2 大豆加工品中の Gly m Bd 30K 含有量

食品	含有量 (mg/g 新鮮重±SD)
(大豆加工食品)	
大豆種子	7.29±0.66
凍豆腐	5.54±0.69
豆乳	0.67±0.03
湯葉	4.68±0.54
納豆	n.d.*
味噌	0.17±0.10
豆腐 (絹ごし)	0.94±0.11
豆腐 (木綿)	0.82±0.06
きなこ	1.82±0.11
油揚げ	2.53±0.43
醤油	n.d.
(植物性タンパク質使用食品)	
ミートボール	0.30±0.11
フライドチキン	0.14±0.17
ビーフコロッケ	0.20±0.05
ハンバーガー	n.d.
フィッシュソーセージ	n.d.

(sandwich ELISA 法によって求めた値)

* n.d.: 検出せず

3. エピトープ解析

2種のモノクローナル抗体の Gly m Bd 30Kに対する結合部位 (エピトープ) が異なることで、sandwich ELISA 法において、この2種のモノクローナル抗体を有意に、高感度で用いることができる。そこで我々はいくつかの方法でそのエピトープの解析を行った。まず、シアン化プロマイド (BrCN) を用い

*Gly m Bd 30K*をペプチド断片化した。得られたペプチドの電気泳動を行い、モノクローナル抗体 F5, H6 をそれぞれ用いてイムノブロットを行った。その結果、両モノクローナル抗体とも Lys⁴から Met¹²⁷の間にエピトープが存在することが解った。リジルエンドペプチダーゼを用いて *Gly m Bd 30K*をペプチド断片化し、電気泳動を行った結果、27-, 22.5-, 17.5-, 14-及び13.5-kDaのペプチドが検出された。イムノブロットを行った結果、F5はすべてのペプチドと反応し、H6は27-kDaのペプチドとのみと反応することが解り、それぞれ反応部位が異なることが示唆された³⁾。さらに詳細にエピトープを解析するために、Geysenらが考案したマルチ・ピンペプチド合成法^{4,5)}を用いて解析を行った。この手法は96穴マイクロプレートに適合するようデザインしたポリエチレンのピン上にグラフト化したポリアクリル酸をベースに96穴マイクロプレート上でペプチド合成を行い、ピン先で合成されたペプチドを標準的なELISA法を用いて抗体との結合、相互作用を測定する方法である。具体的には *Gly m Bd 30K*の一次構造に基づいて3残基ずつ重複した12残基からなるオーバーラッピングペプチド83種をピン上に合成し(図2)、モノクローナル抗体 F5, H6 との反応性をELISAにより調べた。ELISAにおける2次抗体はパーオキシダーゼ標識した抗体を用いた。その結果、F5に関しては合成したペプチド Asp¹¹⁵-Ile¹²⁶, Thr¹¹⁸-Asp¹²⁹, Gly¹²¹-Thr¹³²と、H6に関しては合成したペプチド Gln³¹-Ala⁴², Cys³⁴-Ala⁴⁵, Gly³⁷-Ala⁴⁸と反応性が高いことが解った⁶⁾。F5に関しては山西らが *Gly m Bd 30K*のcDNAをクローニング後、5'末端から種々の長さを欠失した変異DNAを作製し大腸菌で発現させ、得られた *Gly m Bd 30K*のデリーションペプチドを用いたイムノブロットによりエピトープを Ile¹¹⁹-Met¹²⁷であると推定している⁷⁾。この部位は、今回得られたエピトープ部位とほぼ一致し、マルチ・ピンペプチド合成法がエピトープ決定に有効な手法であることが解った。

H6に関してはマルチ・ピンペプチド法の結果より Gly³⁷-Ala⁴⁸にエピトープが存在することが示唆された。ペプチド Gly³⁷-Ala⁴⁸を含む数種のペプチドを大量に合成し、さらに検討を行った。ペプチド及び *Gly m Bd 30K*をニトロセルロース膜にブロッティングし、H6を用いてイムノブロットを行ったところ、*Gly m Bd 30K*及びエピトープの候補となったペプチド Gly³⁷-Ala⁴⁸のみが反応し、他のペプチドは反応しなかった。また、各ペプチド及び *Gly m Bd 30K*をマイクロプレート上にコーティングし、ELISAによりH6との反応性を検討したところやはり *Gly m Bd 30K*及びペプチド Gly³⁷-Ala⁴⁸のみが反応した。以上のことから *Gly m Bd 30K*中のF5, H6に関するエピトープが明らかとなった(図1)。

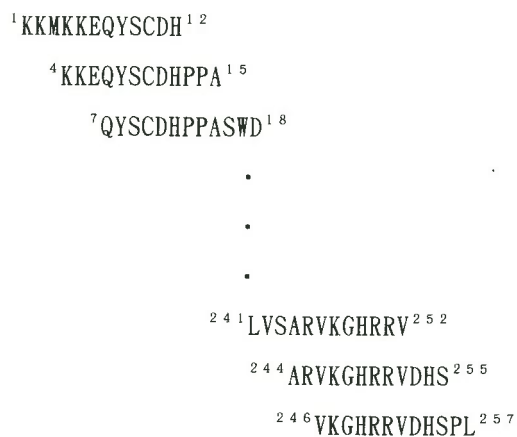


図2 マルチ・ピンペプチド法で合成したペプチド

4. 今後の課題

以上述べたようにマルチ・ピンペプチド法はエピトープ決定に有効かつ簡便な手法であることが明らかとなった。我々は現在進めている大豆アレルギー低減化に関する研究の成果として、醤油麴由来酵素を用いてアレルギーを分解することによって患者血清と全く反応を示さない豆乳の作製に成功している⁸⁾。しかしながら、酵素処理することで大豆タンパク質特有の加工特性が損なわれてしまうという欠点がある。患者血清中のIgEに対す

るエピトープのみ分解する酵素がスクリーニングできれば、その酵素でエピトープのみを分解することによって加工特性を保持しながら、アレルギー性のない大豆タンパク質が作製できるものと思われる。そこで、我々は現在、患者血清中のIgEに対するエピトープの検索を継続している。エピトープが明らかになれば、そのエピトープの配列からアレルギーになりやすいタンパク質のスクリーニングやそのペプチドを減感作療法に用いるなど、アレルギーの研究にとって新たな展開が期待されるものと思われる。

文 献

- 1) Ogawa, T., N. Bando, H. Tsuji, H. Okajima, K. Nishikawa and K. Sasaoka (1991) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 37:555-565
- 2) Ogawa, T., H. Tsuji, N. Bando, K. Kitamura, Y-L. Zhu and K. Nishikawa (1993) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57:1030-1033
- 3) Tsuji, H., N. Bando, M. Kimoto, N. Okada and T. Ogawa (1993) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 39:389-397
- 4) Geysen, H. M., H. M. Meloen and S. J. Barteling (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3998-4002
- 5) Geysen, H. M., S. J. Rodda, T. J. Mason, G. Tribbick and P. G. Schoofs (1987) *J. Immunol. Methods*, 102:259-274
- 6) 細山 浩・小幡明雄・坂東紀子・辻 英明・小川 正 (1995) 日本農芸化学会誌 (日本農芸化学会大会要旨), 69:345
- 7) 山西倫太郎・辻 英明・高野哲夫・坂東紀子・木本真順美・小川 正 (1994) 日本農芸化学会誌 (日本農芸化学会大会要旨), 68:342
- 8) 細山 浩・小幡明雄・辻 英明・小川正 (1994) 日本農芸化学会誌 (日本農芸化学会大会要旨), 68:343



国内情報

S-アデノシルホモシステインヒドロレース (SAHH) 遺伝子をアンチセンスで発現させた形質転換タバコのウイルス抵抗性と形質変化

日本たばこ産業株式会社 生命科学研究所

増田 税・田中英夫

植物ウイルス抵抗性の付与を目的にタバコの SAHH 遺伝子をアンチセンス方向で発現する形質転換タバコを作出した。得られた形質転換体は、複数のウイルスに対して予想どおり抵抗性となったが、その他にも様々な形質変化を示した。例えば、わい化する傾向や頂芽優勢の消失や老化の遅延などが観察された。花数が多くなり、雄しべが短縮したものや花びらに変化して八重咲きになるものなどが出現した。これらの特徴は、後代に引き継がれた。この技術は、他の植物にも応用可能と考えられるので、ウイルス抵抗性の付与はもちろん、花の改良などにも利用可能と期待される。

1. はじめに

S-アデノシルホモシステインヒドロレース (SAHH) は、S-アデノシルホモシステイン (SAH)/S-アデノシルメチオニン (SAM) 比を制御することによって生体内メチル基転移反応を律速する酵素である。生体内では、メチル基が SAM から供給されるときに SAH が生成する。SAH の蓄積は、メチル基転移反応をフィードバック阻害する。これを分解するのが SAHH である。生体内メチル基転移反応は、遺伝子の発現や酵素の活性の制御に重要である。例えば、動物細胞と動物ウイルスの研究では、mRNA の 5' 末端のキャップ構造のメチル化が SAH/SAM 比によって影響されるので、ウイルス感染細胞に SAHH 阻害剤を投与するとウイルスの増殖を阻害できることが多くのウイルスで報告されている¹⁾。

私たちは、SAHH 阻害剤の投与が植物ウイルスにも効果があるのではないかと考え、ウイルスに感染したタバコのリーフディスクを SAHH 阻害剤で処理して、ウイルス増殖を観察した。その結果、SAHH 阻害剤が植物ウイルスにも効果的であることがわかっ

たので、ウイルス抵抗性を付与すべく、SAHH 遺伝子の発現をアンチセンス RNA で抑制した形質転換タバコを作出する試みを行った。得られた形質転換体はウイルス抵抗性となったほか、様々な形質変化を示した。

2. TobSAHH アンチセンス発現タバコの作出

私たちは、タバコ SAHH 遺伝子 (Tob-SAHH) の cDNA クローンを花芽形成時に特異的に発現する遺伝子の一つとして単離した²⁾。この遺伝子の発現は、植物ホルモン (特にサイトカイニン) によって誘導されることが判明した。得られた cDNA クローンからのタンパク産物に SAHH 酵素活性があることを大腸菌で発現させたタンパクを用いて確認している³⁾。この cDNA クローンをアンチセンス方向で発現するように市販の植物発現ベクター pBI 121 の 35S プロモーターの下流に挿入した (図 1)。SAHH が生体内メチル基転移を支配することから、アンチセンス RNA による発現阻害が、細胞の致死につながることを心配したが、アンチセンス RNA の発現量に応じて様々な形質転換タバコが得られた。

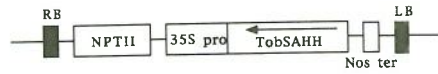


図1 タバコ形質転換ベクターの構造
 35S pro: カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター、TobSAHH: タバコ由来SAHH遺伝子、Nos ter: ノバリン合成酵素のターミネーター、NPTII: ネオマイシンホスフォトランスフェラーゼ遺伝子、LB: Tiプラスミドの左境界領域、RB: Tiプラスミドの右境界領域、矢印は発現方向

3. 形質転換タバコの形質変化

形質転換タバコの典型的な表現型を表1に示す。200個体以上の形質転換体を解析した結果、半分以上の個体がわい化する傾向を示した。顕著な例を図2の左図に示す。わい化の程度は、様々であった。また、多くの個体で側芽が出やすくなり(図2の右図)、葉の緑が濃いまま老化が遅延した。さらに、花に変化が現れた個体も見受けられた。特に、雄しべが短縮するものが多く、花の数が増加した。中には、雄しべが花びらに変化し、八重

表1 形質転換タバコの典型的な表現型

表現型の変化	特徴
外観	わい化、ロゼット状、頂芽優勢消失、わき芽多、節間短縮、老化遅延
花	おしべ短縮(めしべ突出)、雄性不稔、花粉稔性弱、花数増、八重咲き出現
根	茎からの発根



図2 形質転換タバコの形態変化(例)
 左図: 緑の濃い葉とわい化(右)、右図: わき芽の伸長

咲きとなるものも観察された(図3の下図)。ところで、得られた形質転換体は、表1の特徴をすべて示すわけではなく、ほとんど非形質転換体と変わらないものから、わい化や側芽出現が顕著でロゼット状になるものまで様々であった。形質転換体で観察された形質変化の特徴は、サイトカイニンの生理作用の結果として観察されるものに類似していたため、植物体の内在性サイトカイニン量を解析した。その結果、形質転換体では、サイトカイニンの量が約3倍に増加していた³⁾。三井らは⁴⁾、最近、タバコから分離したSAHHをサイトカイニン結合タンパクとして報告している。このことから私たちの観察したサイトカイニン量の変化について考察することができる。すなわち、私たちの作出した形質転換体ではSAHHの量が減少していたため、SAHHと結合しているサイトカイニン分子も少なく、相対的にサイトカイニン活性が増加したのではないかという仮説である。ただし、前述したようにSAHH遺伝子の発現自体がサイトカイニンによって誘導されることや、SAHHがメチル化のシグナル伝達を支

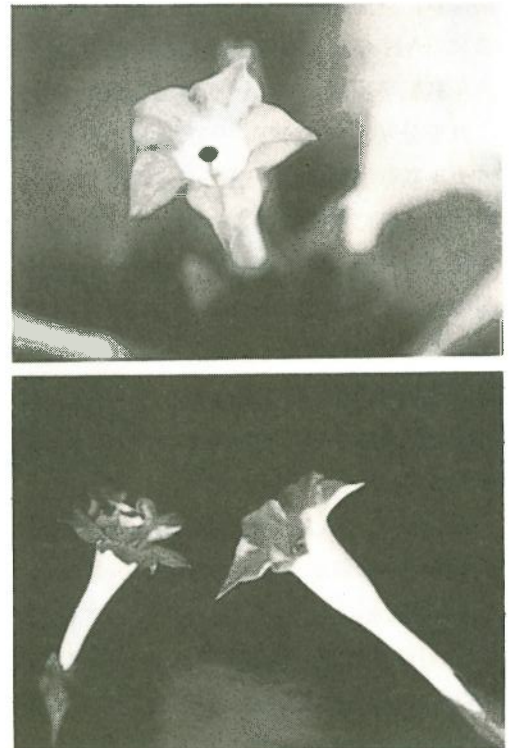


図3 形質転換タバコの花の変化(例)
 上図: 雄しべが短縮、雌しべが突出、
 下図: 八重咲きと対照の花

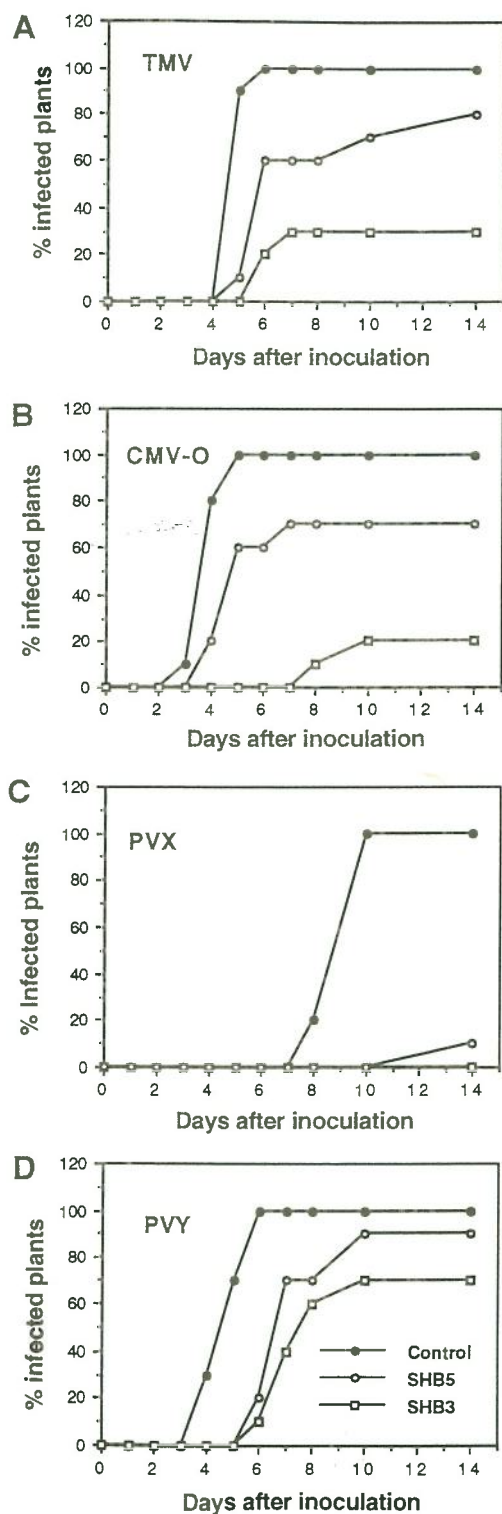


図4 植物ウイルスを接種したときの対照タバコと形質転換タバコの病徴発現

TMV: タバコモザイクウイルス, CMV-O: キュウリモザイクウイルス, PVX: ジャガイモウイルスX, PVY: ジャガイモウイルスY, SHB3及びSHB5: 形質転換タバコ, Control: 対照タバコ, 縦軸: 感染植物の割合(%), 横軸: 接種後経過日数

配していることなどを考えるとサイトカイニンの増加は、もっと複雑な制御機構によるのかもしれない。

4. 植物ウイルス抵抗性

得られた形質転換体の中で、わい化などの形態変化がそれほど顕著でないものをいくつか選抜し、後代を作出して植物ウイルスに対する抵抗性について検定した。図4に示すように、4種類のウイルスを使用して接種試験を行ったところ、形質転換体は(SHB5及びSHB3)、PVY接種の場合を除いて、明らかなウイルス抵抗性を示した。抵抗性の程度は、形質転換体によって決まるようである。PVY以外のウイルスは、いずれもRNAの5'末端にキャップ構造を必要とするウイルスであるため、動物ウイルスの場合と同様、SAHH阻害がキャップ構造のメチル化阻害につながったためと予想される。一方、PVYにおいてもウイルス抵抗性が全く観察されなかったわけではないので、別のメカニズムが存在する可能性もある。ところで、形質転換体では、サイトカイニン量が増加していたことを前述したが、サイトカイニンの増加がウイルスに対する獲得抵抗性という現象を誘導することが古くから知られている⁵⁾。私たちの形質転換体においてもこの獲得抵抗性が働いている可能性が十分考えられる。

5. おわりに

ある一つのウイルスをターゲットにする場合には、そのウイルスのコートタンパク遺伝子を植物に導入することが一般的に実行されている。最近、いくつかの研究で複数のウイルスに対する抵抗性を付与する試みがなされてきた⁶⁾。私たちの形質転換植物は、複数のウイルスに対して抵抗性となったが、同時に、当初、予想もしなかったサイトカイニンによると考えられる形質変化を示した。SAHHのアンチセンスRNAによる阻害は、他の植物にも応用可能と考えられるので、今後、単

にウイルス抵抗性植物を作出することを目的とするだけではなく、わい化や花数増加を目指して、花植物を遺伝子組み換えで改良することなどにも利用できるものと期待している。

文 献

- 1) Wolf, M. S. and R. T. Borchardt (1991) *J. Med. Chem.* 34 : 1521-1530
- 2) Tanaka, H. *et al.* (1995) *Plant Sci.* 印刷中
- 3) Masuta, C. *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 : 6117-6121
- 4) Mitsui, S. *et al.* (1993) *Plant Cell Physiol.* 34 : 1089-1096
- 5) Whenham, R. J. (1989) *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35 : 85-95
- 6) 小川俊也 (1994) ウイルス 44 : 69-76



豚胚の凍結保存技術

J A 全農 飼料畜産中央研究所 豚繁殖育種研究室

亀山 賢次

今まで、豚凍結保存胚の移植による分娩確認は世界で5例（うちJA全農が2例）しかなく、基本凍結法としてはすべてステップワイズ法であった。今回ダイレクト法による移植試験を2頭試み、2頭とも受胎した。ダイレクト法ではステップワイズ法に比べ融解後の操作が簡単だけでなく、1頭は良好な産子生産率を示しことから、実用化の期待が大きく膨らんだ。

本研究は農水省の家畜受精卵移植技術研究組合の課題として取り組んでいる。

1. はじめに

豚の胚移植は改良増殖率の向上ならびに清浄豚の作出等新しい生産技術として注目されているが、ほとんど利用されていない。豚胚移植の実用化を妨げている大きな技術的理由は、生殖器構造が複雑なため非手術的な採卵・移植が非常に困難であることと受精卵が低温感作に弱く保存ができないことなどである。

牛胚では半永久的保存法である凍結保存技術がすでに確立されており、受精卵移植の実用化と普及に大きく貢献している。しかし、豚胚は低温に弱く15°C以下で生存不可能と言われていた。その原因についても大型の脂肪滴を多量に含むためとされいながら詳細な検討はなされていない。1988年に長島らが11°Cに冷却した胚を移植して生存胎児を確認すると、1989年、林らは-35°Cに冷却した胚から産子を得た。同年、小栗らは凍結保存後、新鮮胚との混合移植（妊娠を成立させるために新鮮胚を同時に移植）により凍結胚由来の産子1頭を得た。そして1990年、全農は凍結保存胚を37個融解、そのうち生存胚20個を移植し産子（3頭、うち死産1、他にミイラ1）を得た。次いで、柏崎らも凍結保存胚82個融解、32個移植し4頭産子を得た。その後

は全農で1例産子が得られたのみでしばらく産子生産例の報告がなかった。県畜試等でも試みられたが受胎例は得られなかった。1995年、長島らは脂肪を遠心で偏らせてからマイクロマニピュレーションでその脂肪を抜き取り凍結保存した胚を39個移植し3頭の産子を得ている。豚凍結保存胚の移植による産子の報告は以上のものしかなく、受胎豚の妊娠率、移植胚当たりの生産率も非常に低い。

2. 凍結融解後の培養試験成績

当所では1990年に移植試験で産子が得られたものの、その生産率は低く実用化は無理であった。豚胚の凍結保存の試み自体がまだ少なく凍結保護物質の種類、濃度、凍結曲線等の基本的手法についても十分検討されていないため、牛胚等の凍結保存に用いられているいくつかの方法を基にして種々の凍結法を比較検討しながらより良い条件を検索してきた。以下にそのいくつかの検討項目を示す。

(1) ステップワイズ法

牛で一般的な融解時にシュクロースを加えてグリセロールを3段階で除去する方法よりも、その後さらにシュクロースを2段階で希釈すると生存率が向上する（表1）。浸透圧の変化はなるべく緩やかにする必要があると考えられる。良好なものは融解後2時間の培養でほぼ修復し、元の形態に近くなる（図1）。

表1 融解法 (ステップワイズ法)

融解法*	胚数	融解後2h		融解後48h	
		生存胚	移植可能胚	生存胚	脱殻胚
3段階	7	6(85.7%)	0	3(42.8%)	0
5段階	8	8(100%)	2(25.0%)	7(87.5%)	6(75.0%)

凍結溶液: 1.5M グリセロール+20% FCS in PBS
 * 3段階: 1, 0.5, 0M グリセロール+20% FCS in PBS +0.2M シュクロース
 5段階: 3段階→0.13, 0.06M シュクロース+20% FCS in PBS

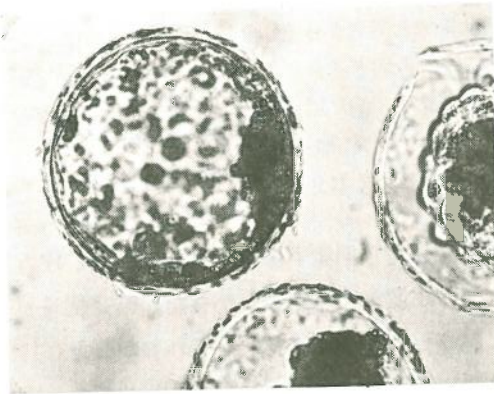


図1 凍結融解後の拡張胚盤胞
 ステップワイズ法で融解後2時間経過している。良好なものはきれいに修復している(中央)。写真がきれてしまっているが、修復途上(右)や退行(下)もみられる。

レシチンは生体膜の主要成分であり、膜の安定化を期待した。トコフェロールは脂質の安定化、コレステロールは脂質の柔軟性調節の効果を期待して添加してみた(表2)。融解後に良質(移植可能)と判定した胚の率および48時間培養後の脱殻(孵化, hatching)

表2 添加物 (ステップワイズ法)

添加物	胚数	融解後2h		融解後48h	
		生存胚	移植可能胚	生存胚	脱殻胚
—	13	9(66.7%)	2(15.4)	10(76.9%)	3(23.1%)
レシチン	8	7(87.5%)	0	7(87.5%)	2(25.0%)
トコフェロール	15	14(93.3%)	3(20.0)	14(93.3%)	6(40.0%)
コレステロール	8	6(75.0%)	0	6(75.0%)	1(12.5%)

凍結溶液: 1.5M グリセロール+20% FCS±0.05% (w/v) 各添加物 in PBS

表3 デキストラン添加 (ステップワイズ法, ダイレクト法)

添加物	デキストラン	胚数	融解後2h		融解後48h	
			生存胚	移植可能胚	生存胚	脱殻胚
SW	—	34	25(73.5%)	2(5.9%)	24(70.6%)	7(20.6%)
	+	25	21(84.0%)	6(24.0%)	19(76.0%)	9(36.0%)
Direct	—	16	4(25.0%)	0	4(25.0%)	1(6.3%)
	+	16	7(43.8%)	0	6(37.5%)	0

凍結溶液
 SW(ステップワイズ法): 1.5M グリセロール+20%調整血清±1%デキストラン in M199
 Direct (ダイレクト法): 4%エチレングリコール+4%プロピレングリコール+20%調整血清±1%デキストラン in M199

率ともにトコフェロール添加区が比較的良好な傾向を示した。ただし、この試験では基礎培地に PBS を用いており、比較試験後に基礎培地として 199 を用いるようになってからはトコフェロールがすでに入っているため添加していない。その他、シュクロースやトレハロースなども加えてみたが、特に効果はみられなかった。デキストランの添加は多少良い傾向がみられた(表3)。

血清は FCS よりも各種成長因子や微量元素を添加した調整血清に切り替えてからのほうが成績が良くなっている。試験に用いている調整血清は GIBCO の Calf Supreme™ serum だが、製造中止になっている。現在、類似の調整血清としては SIGMA の SERUM-MAX™ などがでており、同様の効果が培養試験で確認済みである。199 と調整血清を用いたのではどの成分・因子が有効であるのかという面では非常に難しくなってしまうが、現状の技術レベルではより安定的に産子を得るために少しでも良い手法を選択するしかない。なお、調整血清は安く、ロット間の差がほとんどないため安定的に使える。

また、胚の発育段階については、他種でもその凍結保存の可否に影響するが、今まで試した手法では胚盤胞以前の豚胚はほとんど生存できない。このため当所では拡張胚盤胞を中心に試験を実施しており、移植試験では防疫の問題もあるため透明帯に傷のない拡張胚盤胞のみを用いている。なお、今回示した培養成績はすべて拡張胚盤胞である。

豚胚の耐凍性は品種差よりも同一種内での個体差が非常に大きい。典型的な 2 頭の例を表4に示したが、融解後 2 時間の生存胚数、移植可能胚数、融解後 48 時間の生存胚数、脱殻胚数いずれも差がみられた。豚は精液の凍結保存でも個体差が大きいことが知られ、その原因解明と打開策が今後の大きな課題となる。胚の場合、脂肪の量的な差があるのか、質的なものであるのか調べる必要性を感じている。飽和脂肪酸の比率や細胞膜成分も牛とは当然違うであろう。電子顕微鏡による観察では脂肪滴の近辺に亀裂様の構造物がみられ、

脂質の漏出が疑われる。また、細胞膜の崩壊も随所でみられ、豚胚の耐凍性の低さを再認識した。拡張胚盤胞でも量的には少なくなつて来ているとはいえ、まだまだ大型の脂肪滴が散在している (図2)。

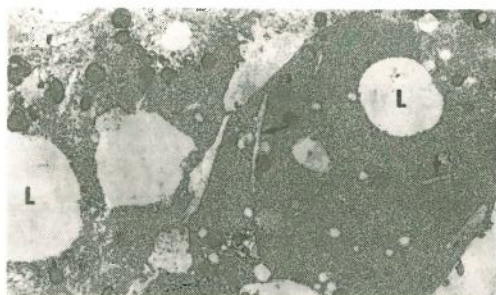


図2 凍結融解後の拡張胚盤胞
ステップワイズ法で融解後2時間経過している。内細胞塊の細胞。亀裂様構造物(矢印)が散見される。まだまだ大型の脂肪滴(L)がみられる。

(2) ガラス化凍結法

Veldez らがマウス胚で用いた方法ならびに浜野らが牛卵胞卵で用いた方法をもとに試行してみたが、豚胚では融解後の生存胚は得られなかった。ガラス化溶液は耐凍剤の濃度が高く毒性も高いと思われ、ガラス化溶液に豚胚を入れただけで死滅したという報告もあるため、溶液そのものやその添加法、除去法についても検討が必要であろう。最近、培養試験では非常に良い成績を出しているところもあるが、まだ移植による産子は得られていない。

(3) ダイレクト法

グリセロールを用いたステップワイズ法と

表4 個体差 (ステップワイズ法)

個体No.	胚数	融解後 2h		融解後48h	
		生存胚	移植可能胚	生存胚	脱殻胚
7	11	10(90.9%)	5(45.5%)	10(90.9%)	5(45.5%)
89	16	2(12.5%)	0	2(12.5%)	0

凍結溶液：1.5M グリセロール+20%調整血清+1%デキストラン inM199

それぞれ単独でのダイレクト法との比較の培養試験ではグリセロールが最も良かった。その後、当所の牛胚の凍結試験からプロピレングリコールとエチレングリコールの混合溶液を試したが、培養成績ではやはりステップワイズ法より良くない (表3)。ただし、ダイレクト法の培養成績での評価はステップワイズ法よりも悪くなってしまうことがあり、必ずしも移植成績と一致しないことがある。ステップワイズ法の場合でも融解後の耐凍剤希釈から培養開始の段階でかなりダメージを受けている様子がうかがわれているため (3段階よりも5段階が良かったこともあり)、また豚ではダイレクト法での移植試験がどこでも実施されていないため試行してみた。

3. 移植試験

多胎動物であるため、受胚豚の妊娠率とともに産子率 (産子数/移植胚数) も重要になってくる。当所では表5に示した例数しか移植試験を実施していなが、他所に比べ異常に妊娠率が高い。その理由については不明であるが、基本的な胚の取扱や手術の方式などに

表5 豚凍結保存胚の移植成績

No	凍結法	胚品種	融解胚数	移植胚数 (融解胚%)	産子数<移植胚%> (融解胚%)	分娩月日/備考
1	SW-1	LWH	37	20(54%)	3頭<15%>(8%)	90年4月17日/うち死産1+ミイラ1
2	SW-2	LWHD, WLD	50	20(38%)	5頭<25%>(5%)	91年9月24日
3	Direct	D	20	20(100%)	10頭<50%>(50%)	95年6月12日/うち死産2
4	SW-3	D	35	20(57%)	不受胎	
5	SW-3	D	49	20(41%)	2頭<10%>(4%)	95年6月21日
6	Direct	D	20	20(100%)	1頭<5%>(5%)	95年6月25日

注) 凍結法 SW:ステップワイズ法
SW-1:1.5M グリセロール+20% FCS+0.05%レシチン inPBS
SW-2:1.5M グリセロール+20% FCS+0.05%トコフェロール inPBS
SW-3:1.5M グリセロール+20%調整血清+1%デキストラン inM199
Direct:ダイレクト法 (ただし、移植法は外科的。胚は融解後に溶液はそのまま移植用カテーテルに移しかえる。)
胚品種, D:デュロック, W:大ヨーク, L:ランドレース, H:ハンブシャー

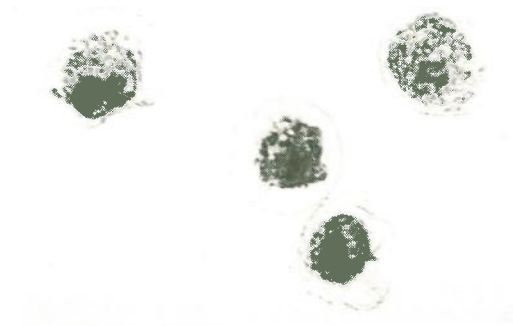


図3 凍結融解後の拡張胚盤胞

ダイレクト法の融解直後。凍結溶液中に浮遊しているため、正常な形態にみえないが、この後、直ちに移植用カテーテルに移し換えて移植し、受胎した。



図4 凍結保存胚の移植による産子
(ダイレクト法、平成7年6月12日分娩)

法でも4頭中3頭が妊娠しているが、融解胚数からみると生産率は非常に低い。ダイレクト法では2頭とも受胎した。また、生産率も良好な成績のものもあったため、実用化の期待が大きく膨らんだとはいえる。ただし、いづれにしてもまだまだ例数が少な過ぎるため、今後の試験でさらに膨らませたいと考える(図3, 4)。

4. おわりに

全農には豚の系統造成部門と2つの原種豚場があるため、豚胚の凍結保存が可能になれば系統豚の維持や種豚場間の豚の輸送に胚移植が即応用できる。1~2頭の供胚豚から受胚豚1頭分の凍結胚を確保し、8頭生産できれば事業へ移行できるという具体的数値目標を掲げて取り組んでいる(供胚豚2頭からの場合、品種を変えて産子の血統を明らかにする)。この場合、系統豚の維持等に豚を飼い

続けるよりもコストが低減できるうえにジーンバンクや豚の輸送手段として利用できる。今後も家畜受精卵移植技術研究組合や豚新技術開発研究会の協力を仰ぎながら実用化へ向けて試験を進めていく予定である。

文 献

- 1) 第3回豚新技術開発研究会資料；平成7年2月16, 17日, 農林水産省家畜改良センター
- 2) Wilmut, I (1972) *J. Reprod Fert.*, 31: 513-514
- 3) Nagashima, H., Y. Kato, H. Yamakawa and S. Ogawa (1988) *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 34: 123-131
- 4) 林 哲・小林一彦・水野仁二・斉藤邦男・平野 進(1989) *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 35: 135-139
- 5) 小栗紀彦(1989) 第53回日本養豚学会講演要旨 p.48-54
- 6) 亀山賢次・武富敏郎・板倉はつえ・鬼原辰夫(1990) 第78回家畜繁殖学会講演要旨, I-54
- 7) 柏崎直巳・大谷 悟・宮本勝巳・棚井幸雄・添田益夫・杉本輝夫・武田光彦・八下田幸男(1990) 第78回家畜繁殖学会講演要旨, I-57
- 8) Nagashima, H., N. Kashiwazaki, R. J. Ashman, C. Grupen, R. F. Seamark and M. Nottle (1994) *Theriogenology*, 41: 113-118
- 9) Nagashima, H., N. Kashiwazaki, R. J. Ashman, C. G. Grupen, and M. B. Nottle (1994) *Nature*, 374: 416
- 10) 亀山賢次・高坂哲也・武富敏郎・鬼原辰夫(1991) 第80回家畜繁殖学会講演要旨, I-55
- 11) Veldez, C. A., O. AbasMazni, Y. Takahashi, M. Hishinuma and H. Kanagawa (1990) *Theriogenology*, 33: 627-636
- 12) 浜野晴三・桑山正成・小池田明子(1991) 第80回家畜繁殖学会講演要旨, I-44
- 13) 小栗紀彦(1989) 動物遺伝資源の長期保存法に関する研究(農林水産技術会議事務局), p.63-68

ウナギ孵化仔魚の消化器官の発達と摂餌

水産庁 養殖研究所

黒川 忠英・田中 秀樹

人為的にウナギを成熟させ、孵化仔魚を得ることに成功しているが、仔魚を育てることは、未だ成功していない。人為的に得られたウナギ仔魚の消化器官の発達過程などから、摂餌開始時期は孵化後7日目頃と推定された。孵化後9日目以降の仔魚では、ワムシを摂餌する個体も確認されたが、生存期間の延長は認められておらず、ウナギ仔魚の飼育技術開発のためには、摂餌開始直後の仔魚に最適な餌料の探索が重要と考えられる。

1. はじめに

ウナギ養殖のための種苗であるシラスウナギ(図1)は、現在100%天然資源に依存しているが、天然種苗の捕獲量は豊凶の差が激しいうえ、長期的には減少傾向にある。そのため、最近の価格はキロ当たり約60万円と1990年頃に比べて約3倍に高騰し、養鰻経営にとって安定的な種苗の確保が急務となっている。そのような社会的背景から、人為的にウナギを成熟させ種苗を得るための研究の必要性が一層高まっている。しかし、北海道大

学の研究グループが孵化仔魚を得ることに初めて成功してから20年以上も経過しているが、未だにシラスウナギにまで育てることは成功していない。この第一の原因には、親ウナギを成熟させ安定的に卵を得る技術が確立されていなかったため、仔魚を飼育するための実験を十分行うことができなかったことがあげられる。

最近、筆者らの研究グループは、養殖ウナギを親魚に用い、雌の卵巣から卵の一部をバイオプシーにより取り出し、その成熟状態をモニターしつつ適切なホルモン投与を行うことにより、人為的に成熟させ、人工受精によ

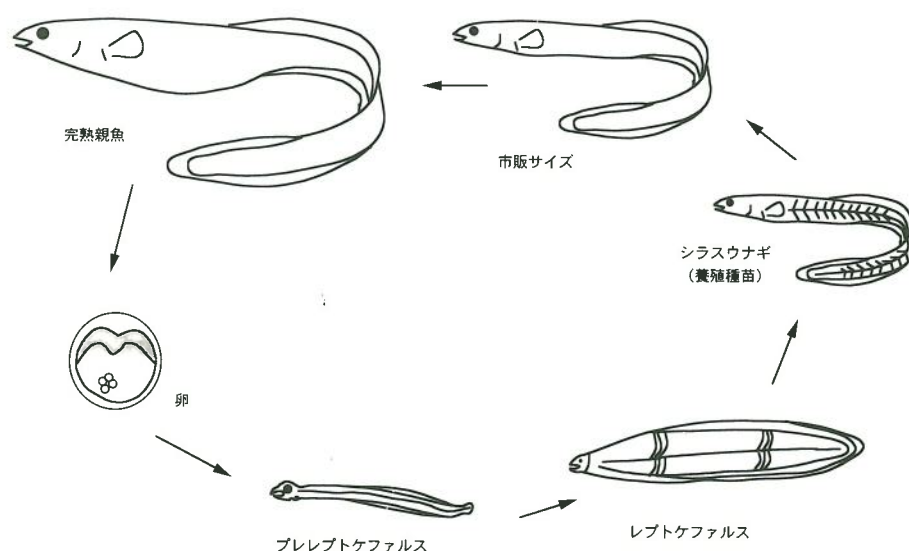


図1 ウナギの生活史

り受精卵を得る技術を開発した²⁾。この技術開発によって、孵化仔魚をある程度安定的に得ることが可能となった。ここでは、ウナギ仔魚育成技術開発のための基礎的知見として、人為的に得られた仔魚の消化器官の発達と摂餌について概説する。

2. ウナギの生活史

ニホンウナギの生活史は完全には解明されていないが、その概要を図1に示した。ニホンウナギの産卵場は、1991年に東京大学海洋

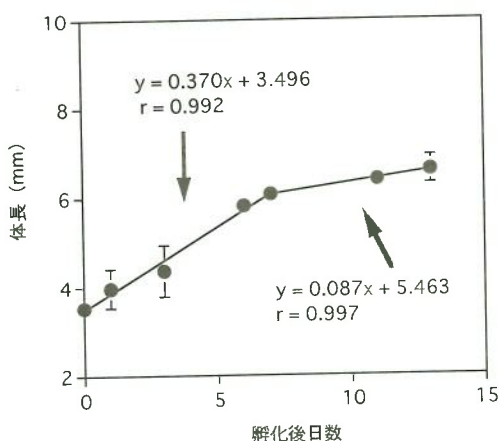


図2 ウナギ人工孵化仔魚の成長

研究所の研究グループによりフィリピン東方海域であることが明らかにされた³⁾。孵化直後の仔魚は、細長い形態（プレレプトケファルス）で、短期間のうちに木の葉状の形態をしたレプトケファルスに変態すると考えられている。レプトケファルスは、その後約半年間かけて日本沿岸に来遊し、河口域でシラスウナギに変態した後、河川に遡上して成長する。

これまでに、天然海域で採集された最小のニホンウナギは全長7.7mmのレプトケファルスで、プレレプトケファルスは採集されていない。このレプトケファルスは、耳石の日周輪（一日に一本のリングが形成される）から孵化後10日間ほど経過していると判定されたことから、天然魚では、プレレプトケファルスからレプトケファルスへの変態は、孵化から10日間のうちにおこるものと推定されている。

一方、人為的に得られた仔魚（プレレプトケファルス）は、最長で孵化から18日間（水温23°C）生存している。しかし、10日間以上経過してもレプトケファルスへの変態は一例

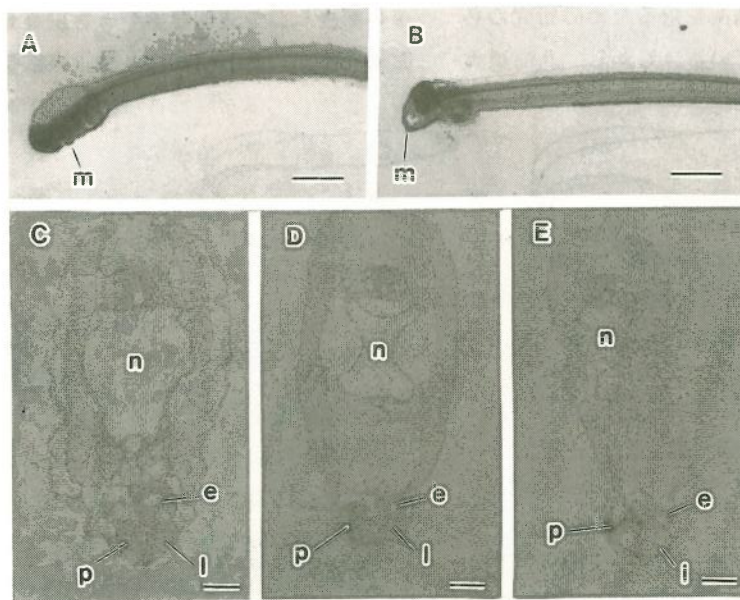


図3 ウナギ仔魚の頭部形態と臓器の発達

A, C: 孵化後3日目, B, E: 孵化後7日目, D: 孵化後6日目。
 C~E: 抗-ウナギトリプシノーゲン抗体を用いた免疫染色（孵化後6日目以降の膵臓の黒変部にトリプシノーゲンが含まれている）
 e: 食道, l: 肝臓, m: 口, n: 脊索, p: 膵臓
 スケールバーは, A, Bでは0.5mm, C~Eでは30μm

も確認されていない。人工孵化仔魚が10日以上経過しても変態しない理由としては、仔魚にとって適切な餌を与えられていないために、孵化後1週間目以降ほとんど成長が停止してしまっていることが考えられる(図2)。したがって、ウナギ仔魚を育成するためには、摂餌開始時期を解明し、適切な餌料を探索することが必要である。

3. ウナギ仔魚消化器官の発達

孵化時点におけるウナギ仔魚の消化管は非常に未熟で、咽頭部付近に管構造が形成されているにすぎない。水温22~23°Cで飼育した場合、消化管が肛門まで伸長するのは、孵化後1日目である。口が開くのは孵化後3日目だが、この時点では口は腹側に向けて開いており(図3A)、摂餌はまだできないと考えられる。この頃、消化管の中央部付近から肝臓や膵臓が分化する(図3C)。

一般的に魚類では、仔魚期には胃がまだ形成されていないので、膵臓が消化過程で中心的な役割を果たしており、膵臓が消化酵素を合成分泌し始めてから仔魚は摂餌を開始するものと考えられる。そこで、膵臓のタンパク質分解酵素の前駆体の一つであるトリプシノーゲンに対する抗体を用いた免疫組織化学的解析手法により、膵臓での消化酵素合成開始時期を調べた⁴⁾。その結果、膵臓でのトリプシノーゲン合成は、孵化から6日目になってようやく始まり(図3D)、翌7日目には多くのトリプシノーゲンが膵細胞に蓄積されることが分かった(図3E)。このことは、膵臓における消化酵素の合成は孵化後6日目始まり、餌の消化が可能になるのは少なくともこの時期以降であることを示している。

一方、組織学的知見から、仔魚の眼が見えるようになるのは、孵化後6日から7日目で、卵黄が消費し尽くされるのもこの頃であることが分かった。さらに、この時期に、腹側に向けて開いていた口が前向きに移動し、餌を食べるのに実用的な形態に変化した(図3B)。これらのことから、ウナギ仔魚の摂餌

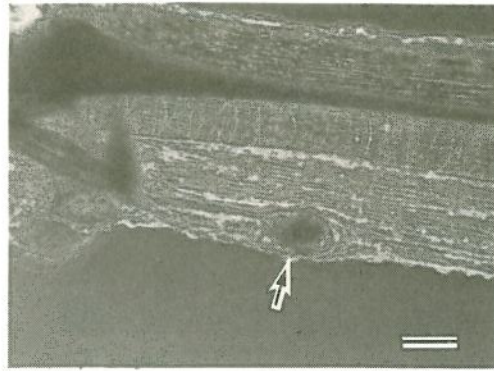


図4 孵化後13日目のウナギ仔魚によるワムシの摂餌
矢印は消化管中のワムシを示す。スケールバーは0.1mm

開始時期は孵化後7日目であるものと結論された。

4. ウナギ仔魚の摂餌

最近まで、天然のウナギ仔魚がどのようなものを餌としているかは明らかではなかった。今年になって、東京大学海洋研究所の研究グループによって、フィリピン東方沖で採取したレプトケファルスの消化管内容物に、動物プランクトンの糞や尾虫類のハウス(尾虫類の体を覆っているゼラチン状の殻)が含まれていたことが報告され、レプトケファルスはデトリタス(生物の死骸や排泄物が微生物によって分解される過程で生じる微細な浮遊物)食性である可能性を示唆している。

一方、これまで人工孵化仔魚の摂餌はほとんど確認されていなかったが、1993年に筆者らの研究グループは、孵化後13日目の仔魚が、餌として与えたワムシを摂餌するのを初めて確認した(図4)⁵⁾。摂餌の際、仔魚は体をS字状に曲げて構え餌に飛びつくという、摂餌行動も観察された。その後の実験で、孵化後9日目の仔魚においても、ワムシを摂餌するのが確認された。

魚類の仔魚期には、胃が未分化であるのを補う機能として、直腸上皮細胞においてタンパク質を高分子状態のまま取り込み、細胞内消化する機構がある^{6,7)}。ワムシを摂餌したウナギ仔魚においても、ワムシ由来のタンパク質が直腸の上皮細胞に取り込まれており、直腸でワムシのタンパク質が消化されている

ことが確認された。しかし残念ながら、ワムシを消化していたにもかかわらず、いまのところ無給餌に比べ生存期間の延長は認められていない。

5. おわりに

天然のウナギレプトケファルスの餌は、デトリタスである可能性が示唆されていることから、プレレプトケファルス期の本来の餌も動物プランクトンではなくデトリタスである可能性が高い。したがって、ウナギ孵化仔魚の飼育技術開発のためには、摂餌開始直後の孵化後7日目頃の仔魚に適切な餌料の探索と、飼育環境の検討などが重要と考えられる。一方、孵化後9日目以降の人工孵化仔魚において、摂餌されたワムシが仔魚の消化管内で消化されていたことから、ある程度成長すればワムシも餌として利用されるものと考えられる。ワムシは海産魚の仔魚を飼育するための最も一般的な餌であることから、ウナギの種苗生産技術の開発を考えるうえでその意義は非常に大きく、筆者らは今後もワムシを餌料として利用するための研究を行う必要があると考えている。

本研究は、農林水産省の大型別枠研究「生

物情報の解明と制御による新農林水産技術の開発に関する総合研究」(通称：バイオメディア計画)によって行われたものである。また、本研究は水産庁の「ウナギ人工種苗生産技術開発調査委託事業」の成果等も踏まえて行っているものであり、本事業の委託先である愛知県水産試験場から提供されたウナギを実験用親魚として用いている。

文 献

- 1) Yamamoto, K. and K. Yamauchi (1974) *Nature*, 251 : 220-222
- 2) Ohta, H., H. Kagawa, H. Tanaka, K. Okuzawa and K. Hirose (1995) *Aquaculture*, 投稿中
- 3) Tsukamoto, K. (1992) *Nature*, 356 : 789-791
- 4) Kurokawa, T., H. Kagawa, H. Ohta, H. Tanaka, K. Okuzawa and K. Hirose (1995) *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52 : 1030-1036
- 5) Tanaka, H., H. Kagawa, H. Ohta, K. Okuzawa and K. Hirose (1995) *Fisheries Sci.*, 61 : 171-172
- 6) Watanabe, Y. (1981) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 47 : 1299-1307
- 7) Watanabe, Y. (1982) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 48 : 37-42

チューリップの花色調節法の開発

富山県農業技術センター 野菜花き試験場

今井 徹*

チューリップにフラボノイド系色素の生合成阻害剤を水耕液加用処理, または切り花吸水処理することで花色を淡色化させる技術を開発した。本処理剤は処理時期・濃度によって淡色化の程度が異なり, かつ脂溶性色素(カロチノイド等)には影響しないことから, 品種や処理方法を選択することでカラーバリエーションを増加させることが可能となり, 多様化する消費者ニーズの対応策として貢献できるものと考えられる。なお, 本技術は住友化学工業株式会社との共同研究で開発された。

1. はじめに

近年, 多くの花きで原色よりも淡いパステルカラーが好まれる傾向がみられている。チューリップ切り花においても同様に Angeli-que や Pink Diamond 等の淡いピンク系品種に人気が集まる傾向がみられているが, これらの品種の中には促成栽培が不可能であったり, 球根生産性が低いために球根の供給量が不足する等, 需要に応じきれない場面もみられている。

一方, 花壇等では花色の組合せが重要なポイントであり, 開花期や草姿(花型及び草丈等)が同じで, 花色のみが異なるものを用いることによって, 今まで以上に多彩な演出が可能となる。

これらの問題点や要望を踏まえて新品種が開発がなされているが, チューリップは育種や増殖に長い年月を要する作物であり, 多様化する消費者ニーズに俊敏に対応するのは不可能である。

そこで, (株)住友化学工業と共同でフラボノイド系色素の生合成阻害剤を用いたチューリップの花色調節(淡色化)法を開発した。

2. 試験研究の概要

フラボノイド系色素の生合成阻害剤としては(株)住友化学工業農業研究所**で基礎スクリーニングを経た S-84702 を用いた。

処理方法は a) 茎葉散布, b) 球根浸漬, c) 水耕液加用及び d) 切り花吸水処理の4 処理を検討した。

a), b) の処理方法では淡色化の効果が不安定であったり, スポット状に花卉が色抜けしたりするため, 花色調節技術として確立するのは困難であると考えられた。

c), d) の処理方法は淡色化の効果が比較的安定しており, 処理も簡便なことから, 処理法としては実用的であると考えられた。

以下, c), d) の処理方法について述べる。

(1) 水耕液加用処理による花色調節

水耕液加用処理とは水耕栽培チューリップの培養液(主に0.05%硝酸カルシウム溶液)に処理剤を所定の濃度となるよう添加する処理法であり, 処理濃度と同様に処理開始時期の早晚が効果に大きく影響する。

S-84702 の同処理では処理時期が早くなるにつれて淡色化効果は高くなるが, 併せて茎長も低くなる傾向がみられた(図1)。このため, 草丈等のボリュームを低下させずに淡色化させるためには植付け後3週目(開花3

IMAI Tōru

*: 現 富山県高岡農業改良普及センター

** : 現 農業化学品研究所

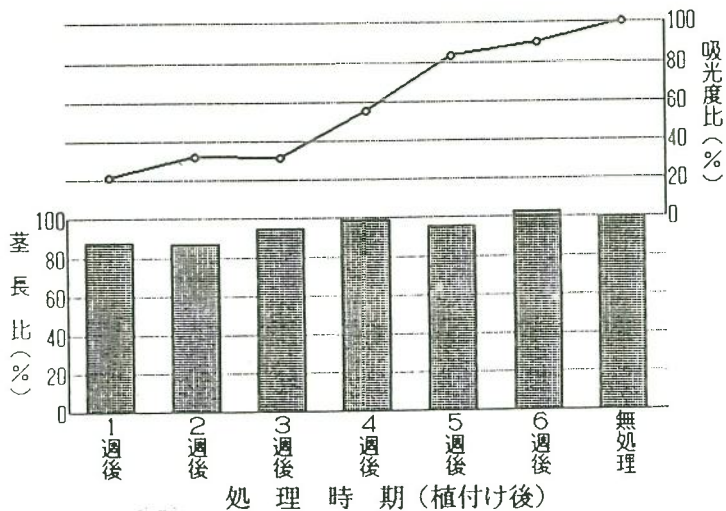


図1 S-84702処理時期が花色に与える影響
 注) 1 ppm水耕液加用処理, 品種: Preludium
 吸光度比はOD530nmで測定した

週前) 前後に処理するのが適当と思われた。

淡色化した花卉の色素をメタノール(1%塩酸含)抽出し, 吸収スペクトルの変化をみると370nm(白色)及び530nm(赤色)のピークを中心に吸光度が低下することがわかった(図2)。また, 花卉の表皮細胞を顕鏡すると液胞内の水溶性色素(フラボノイド等)の濃度が低下しており, 脂溶性色素(カロチノイド等)についてはほとんど影響がみられ

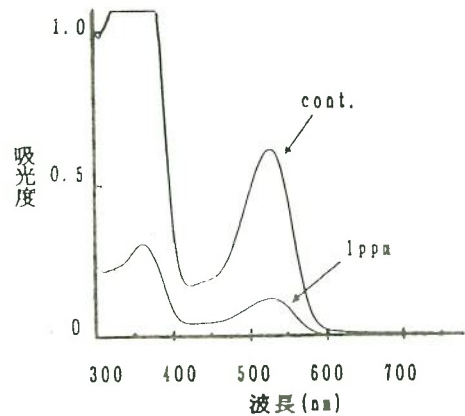


図2 処理による吸収スペクトルの変化
 注) 1 ppm水耕液加用処理, 品種: Preludium

なかった(図3)。このようにS-84702は水溶性色素の発現のみを抑えるため, 同じ赤色系品種であっても脂溶性色素との色合いによって花色の変化が異なることとなる(表1)。

表1 S-84702処理による花色の変化

品 種 名	花色の変化	
	処理前	処理後
Preludium	濃い桃色	淡ピンク
Ile de France	深紅色	洋紅色
Ben van Zanten	赤色	オレンジ
Queen of Night	濃黒紫色	藤色

注) 植付け時に水耕液加用処理(1ppm)

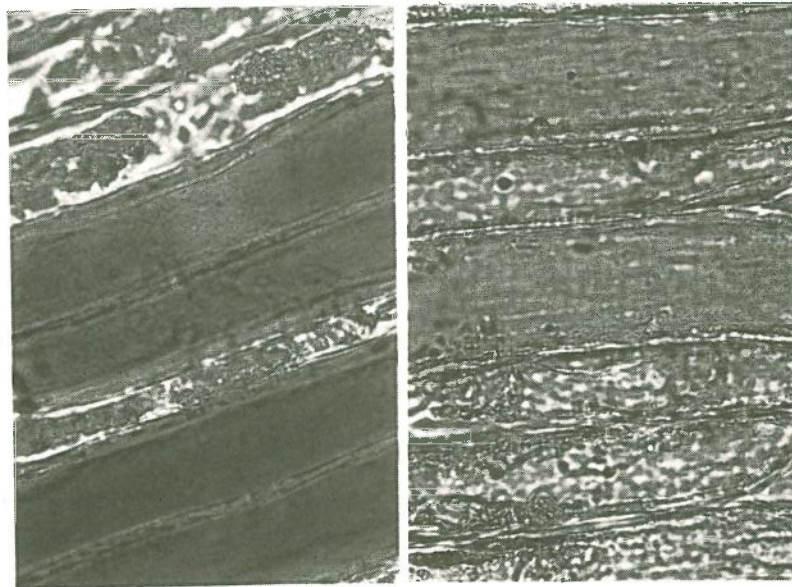


図3 S-84702処理による細胞内色素の濃度変化
 処理: 左から無処理, S-84702処理(1 ppm水耕液加用)
 品種: Ben van Zanten

表2 処理濃度・時間が花色に与える影響

処理濃度	処理時間	吸光度比
ppm	1 hr	59.5%
10	6	75.2
	24	47.1
	1	39.9
100	6	37.7
	24	33.1
	無処理	-

¹⁾ 切り花吸水処理 (室温5℃), 品種: Preludium

(2) 切り花吸水処理による花色調節

切り花吸水処理とは切り花を処理液に挿して放置するもので、一定時間だけ吸水処理する前処理と連続して処理する後処理がある。いずれの処理方法も簡便であるが、前処理が可能であれば、切り花の付加価値を高めることが可能となる。

前処理では処理濃度の他に処理時間が重要なポイントとなるが、扱い易さを考慮すれば、処理時間に対しては鈍感な方が望ましい。

チューリップは非常に水揚りの良い花であり、S-84702処理のよる淡色化の効果は処理時間が1時間以上であれば、ほぼ同様な効果が得られている (表2)。

一方、S-84702は発現後の色素には作用しないため、花卉全体を淡色化させるためには蕾の着色以前に採花・処理する必要がある。しかしながら、着色前の採花ともなると切り花のボリュームや花持ち性が低下することが懸念される。このため、チューリップ切り花の場合は Shiun や Gander's Rhapsody 等のように開花後に花色が徐々に濃くなる品種に処理し、濃色化を抑制するのが実用的と考えられた。

3. おわりに

一般に花色を変える方法としては切り花用染色剤を用いた着色法が簡便である。これは青やピンク等の染色剤を水揚げ、あるいは塗布することで着色する方法であり、主に白色のカーネーションやカスミ草等で行われている。

本技術は着色による花色調節ではなく、色素濃度を低下させることによって淡色化させる方法であるため、上記処理のように同一品種を複数のカラーバリエーションとすることは困難であるが、本処理によって淡色化した花色はむしろ自然色に近い色彩となる。

花色は花にとって生命線とも言える要素であり、消費者ニーズの影響を顕著に受ける要素でもある。花色調節技術は前述のような育種年月と消費者ニーズのギャップをある程度埋める方法であり、今後ますます重要視される技術になるものと思われる。

なお、S-84702はチューリップ以外の花きにおいても淡色化効果が確認されており、今後、多くの花き類で付加価値を高める技術として確立することが期待される。

文 献

- 1) 今井 徹・泉 和夫 (1994) 北陸農業研究成果情報, 10:160-161
- 2) 林 孝三 (1980) 植物色素, p.76-79
- 3) 斎藤規夫 (1989) バイオホルティ, 1:49-57
- 4) 斎藤規夫 (1990) バイオホルティ, 4:49-55
- 5) 斎藤規夫・御巫由紀 (1990) バイオホルティ, 6:49-55

文献情報

遺伝的にマーキングした
Lactococcus lactis の
ヒト消化管での生残性

乳酸菌は発酵乳製造において重要であるばかりでなく、プロバイオティクスやワクチンとしての利用が検討されている。乳酸球菌は主にチーズの製造に利用されており、その遺伝子レベルの解析もすすんでいる。プロバイオティクスなどを目的に乳酸球菌を遺伝的に改変する際には、それらの菌株が摂食後腸管内で生存し得るかを知ることが重要な情報となり得る。乳酸球菌の腸内における存在はすでに報告されているが、*Enterococcus* 属との区別は古典的な分類法では困難である。そこで筆者らは、遺伝的にマーキングした *Lactococcus lactis* 株を用いてヒトでの摂食試験を行い、糞便内の同菌株を分離株特異的遺伝子を PCR 法で増幅しハイブリダイゼーション法で検出し、選択培地を用いた生残数との比較を行った。

まず、リファンピンおよびアンピシリン耐性化した *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1613 株にスクロース-ナイシン遺伝子を接合伝達性トランスポゾンにより導入し、遺伝的にマーキングした *L. lactis* subsp. *cremoris* TC165.5 を分離した。この分離株はナイシンの構造遺伝子 (*nisA*) を含むため他の菌株との区別が可能である。つまり、*nisA* 遺伝子の上流、下流に相同なプライマー (各 P_{nis1}, P_{nis2}) を利用してナイシン遺伝子を PCR 法で増幅し、ナイシン遺伝子をプローブにドットハイブリダイゼーションすることで他の *L. lactis* subsp. *cremoris* との区別が容易に行える。また、コントロールとして *L. lactis* subsp. *cremoris* 間に保存性が高く共通に存在する配列、16S rRNA 遺伝子、に相同なプライマーを上流、下流セットで用意し同遺伝子を PCR 法で同様に増幅させ反応性を比較した。糞便に *L. lactis* TC165.5 株を各種濃度で添加し、検出限界濃度を調べ

たところ、 10^3 個/g まで測定可能であることが明らかとなった。

次に、6人のボランティアを3人ずつ2群に分けてのクロスオーバーでの飲用試験を行った。その結果、分離株を用いた飲用期間中はすべての飲用者で分離株が検出されたのに対し、分離株を除いたサンプルを飲用した場合、いずれも *nisA* に反応するものは検出されなかった。さらに、*L. lactis* TC165.5 株の腸管内の生残性を定量化する目的で新たな飲用試験を行った。すなわち、 10^9 個の *L. lactis* TC165.5 株を含む 100ml の発酵乳を4日間飲用し、飲用最終日から9日間にわたり糞便内の生残数及び PCR 法による増幅 DNA の検出を試みた。また、飲用サンプルに腸管通過用マーカーとして *Bacillus stearothermophilus* の胞子を 10^5 個混合しその生残性を比較した。この胞子は 37°C での増殖性はなく体内で増殖せず、 65°C で培養することでその生残数が測定できる。その結果、*L. lactis* TC165.5 株の糞便からの回収は確認されたものの、試験終了2日目ですでにその生菌数は激減し、3日目では生菌数は検出できなかった。一方、DNA を PCR 法により増幅し検出した場合、3日目でも陽性反応が確認されその検出感度が高いことが示唆された。このことから、死菌体や DNA 分子がある程度糞便内に安定に存在し、PCR 法による増幅法ではその存在が検出されるものと考えられた。一方、*B. stearothermophilus* の胞子は試験終了4日目までその回収率は変化せず、以後徐々に減少し、8日目に検出限界以下になった。今回の実験を通して *L. lactis* の胆汁耐性が高いことが改めて確認されたと同時に、これらの検出方法は感度が高いばかりでなく、菌株に対する特異性が高いことが示された。したがって今後遺伝的に修飾された変異体を経口的に摂取した場合、菌体の生体における選択的検出が可能であり、生体への作用を検討する上で重要な分析手段となり得るだろう。

(抄訳 山本直之)

—カルピス研究開発センター—

YAMAMOTO Naoyuki

Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the gastrointestinal tract

Klijn, N., A. H. Weerkamp, and W. M. de Vos
Appl. Environ. Microbiol., 61: 2771-2774 (1995)

文献情報

正体不明のタンパク“ β -trace”はプロスタグランジンD合成酵素だった

従来、プロスタグランジンD₂(PGD₂)は、他のプロスタグランジン(PG)に共通した性質である平滑筋に対する作用が弱いため、生理活性の乏しいPGとみなされていた。また他のPGが多量に含まれている一般の臓器には比較的微量しか存在しないことから、あまり研究の対象にならなかったPGである。1970年代になってPGD₂が脳の主要なPGの一つである事実が報告され (Abdel-Halim, M. S. *et al.*, *Prostaglandins*, 14: 633-643, 1977, Naruyama, S. *et al.*, *Life Sci.*, 31: 2093-2103, 1982), その後PGD₂周辺の生化学的研究が飛躍的に進展した。ラットを用いた実験により、各種PGの共通前駆体であるPGH₂からPGD₂への異性化を触媒するPGD合成酵素には脾臓型と脳型の2種類が存在することが明らかにされ (Urade, Y. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 262: 3820-3825, 1987), 前者は脾臓, 胸腺, 骨髄, 消化器, 皮膚等全身に幅広く分布しているのに対し, 後者は脳, 副腎丸, 脊髄, 網膜, 内耳といった主として中枢神経系を中心に局在していることが報告された (Ujihara, M. *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 260: 521-531, 1988)。同じくラットを用いて, PGD₂の生理作用の一つとして睡眠誘発作用を含む中枢活動のニューロモジュレーターとして機能していることが示され, 脳型PGD合成酵素は睡眠と覚醒の鍵を握る酵素であると考えられるに至った (Hayaishi,

O., *FASEB J.*, 5: 2575-2581, 1991)。

一方, ヒト脳脊髄液(CSF)中に β -traceと呼ばれる機能不明のタンパク質が特異的に存在することが1960年代に報告された (Clausen, J., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 107: 170-172, 1961)。その後 β -traceは, 血清, 尿, 腹水等にも存在することが明らかにされたが (Olsson, J. *et al.*, *J. Neurochem.*, 20: 837-846, 1973), その機能については不明のままであった。

本報文中で筆者らは, 従来膜結合型酵素であると考えられてきた脳型PGD合成酵素(以後単にPGD合成酵素とする)がヒトCSF及び尿中に存在することを見だし, 本酵素と β -traceが同一のタンパクであることを報告している。

はじめに¹⁴C-PGH₂を基質としてヒトCSF中のPGD合成酵素活性を測定したところ, 20-130 nmol/min/mg proteinの比活性が確認された。これは, ラットの脳, 脊髄, 内耳等のホモジネート中で確認された比活性 (2-15 nmol/min/mg protein, Ujihara, M. *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 260: 521-531, 1988) よりかなり高いものであった。そこでヒトCSFより, 硫酸分画, フェニルセファロースカラムクロマトグラフィー, DE52イオン交換クロマトグラフィーによってPGD合成酵素をSDS-PAGE的に均一になるまで精製した。得られた精製酵素の分子量は27,000であり, ラットPGD合成酵素の分子量と一致した。またKm値, 至適pH, Vmax値, SH剤要求性などの酵素学的性質に関してもラットPGD合成酵素と非常に類似していた。抗-ラットPGD合成酵素抗体を用いたイムノブロットティングの結果, 特有のブロードなバンド(糖鎖の多様性に基づくものと考えらる)が検出され, 本酵素が抗-ラットPGD合成酵素抗体に交叉反応を示すことが判明した。以上のことより, 本酵素はラットPGD合成酵素と酵素学的にも免疫学的にも非常に類似したものであることが示された。

次に抗-ラットPGD合成酵素抗体を用い

て、PGD 合成酵素、ヒト CSF より精製した β -trace、腎不全を併発した骨髄腫患者の尿中より精製した分子量 27,000 のタンパク (Murphy, C., unpublished results) のイムノブロットングを行った。その結果、全ての試料において交叉反応が観察された。タンパク濃度を 0-150ng に変化させてイムノブロット像の濃淡をデンストメーターで測定したところ、PGD 合成酵素及び β -trace では同様の交叉反応性が見られ、腎不全を併発した骨髄腫患者の尿中より精製した分子量 27,000 のタンパクの交叉反応性は若干劣っていることが判明した。また、抗- β -trace 抗体を用いたイムノブロットングを行ったところ、全ての試料において同様の交叉反応が認められた。

さらにプロテインシーケンサーを用いて、これらのタンパクの N-末端配列分析を行った。その結果、今回ヒト CSF より精製した PGD 合成酵素の N-末端配列は、以前報告されていた PGD 合成酵素遺伝子のヌクレオチド配列より推定したアミノ酸配列 (Nagata, A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:4020-4024, 1991) のシグナルペプチド領域を除いたものと完全に一致した。さらに、 β -trace、腎不全を併発した骨髄腫患者の尿中より精製した分子量 27,000 のタンパクの N-末端配列もこれと完全に一致した。

以上の結果より、従来その機能が不明であるとされてきた β -trace と PGD 合成酵素、腎不全を併発した骨髄腫患者の尿中より精製した分子量 27,000 のタンパクは全く、あるいは殆ど同一の物質であることが示唆された。尿中より精製した分子量 27,000 のタンパクでは若干の交叉反応性の違いが見られたが、糖鎖結合様式の違いやタンパクのマイナーな修飾が原因であると考えられた。

CSF より精製した β -trace と PGD 合成酵素がシグナル配列を欠損していることから、PGD 合成酵素は中枢神経系の脳軟膜、脈絡叢、オリゴデンドログリア細胞で合成された後 (Urade, Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:9070-9074, 1993)、活性型の β -

trace として CSF 中に分泌されるものと思われる。尿中より精製した分子量 27,000 のタンパクも同様に中枢神経系で合成された後尿中に分泌されるのかも知れないが、副睾丸、腎臓上皮細胞といった他の部位で合成されている可能性もあり、今後の研究が必要である。

1970年代に β -trace は、多発性硬化症 (Olsson, J. *et al.*, *J. Neurol. Sci.*, 27:233-245, 1976), Paraprotein 血症 (Whitshed, H. *et al.*, *Clin. Chim. Acta.*, 50:111-118, 1974), Meckel-syndrome (Chemke, J., *Clin. Genet.*, 11:285-289, 1977) 等との関連性が指摘されていた。しかしその生理機能が不明であることから、これら疾患との関連性を決定するまでには至らなかった。今回、その本体が明らかにされたことにより、今後の研究の進展が期待される。

(抄訳 織田浩司—マルハ株式会社中央研究所)

(ODA Hiroshi)

Identification of β -trace as prostaglandin D synthase

Watanabe, K. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203:1110-1116 (1994)

文献情報

培養胚の発生速度の違いで その後の胚の発生能力を予測する

牛の胚移植において、実際にどの胚を選んで移植するかは現在光学顕微鏡下での形態的な観察で行われているが、形態的評価が移植後の発生のための高い能力を有する胚を正確に選択しているとは必ずしも言い切れない。すなわち、形態的に正常な胚であっても顕微鏡下でみることのできない潜在的な異常 (既に報告されているような倍数体、ミトコンドリアの損傷などの他に未知の要因による異常) を含んでいる可能性が示唆される。このことは、胚移植後の受胎率は1980年代までに改善されてきたけれども、商業ベースでの過

去10～15年間の受胎率（50～70%）がほとんどよくなっていないことの一因かもしれない。

着床前期の胚の「質」を評価する方法として、形態的評価以外に、構成細胞数、二重蛍光染色による内部細胞塊と栄養外胚葉の比率、生化学的測定（例えば、ピルビン酸やグルコースの取り込み）、FDA による生体染色などがあげられるが、これらは胚を破壊したりするので、その後の発生は当然期待できない。

本研究では、培養ハムスター胚の初期卵割に要する時間を正確に測定し、これらの時間が胚の発生能力を予測できる非侵襲的（noninvasive）な指標として用いることができるかを検討している。本研究で発生能力の指標として卵割のタイミングを用いた論理的根拠として、著者らも述べているように、牛の体外受精胚の培養期間中に早く発生する胚は遅く発生する胚よりも桑実胚や胚盤胞へ発生する能力が高いことや、day 6～8 に胚盤胞に発生した胚は day 9 に発生した胚よりも移植後の着床率が高いという最近の報告に基づいている。ここで問題となるのが、胚の発生のタイミングの観察方法である。従来の報告にみられるように12時間あるいは24時間間隔での不連続な観察では胚の卵割と観察時間が一致していないので、結果として得られた卵割時期の時間の幅が広がってしまう。この問題を避けるには観察の頻度を増やすことであるが、胚の繰り返しの観察は胚の発生を損ねてしまう。そこで、本研究では倒立顕微鏡に装着した培養チャンバー内で雌ハムスターから回収した1-細胞期胚を培養し、倒立顕微鏡に取り付けたカメラとタイムラプスビデオレコーダーを用いて連続して撮影し、記録した。初期卵割のパラメーターとして、前核の融合から第1卵割の終了（Dt₂）、第1卵割の終了から第2卵割の終了（Dt₄；2から4細胞への時間間隔）および第2卵割の終了から第3卵割の終了（Dt₈；4から8細胞へ

の時間間隔）をそれぞれの胚について個別に計測し、胚盤胞への発生および透明帯からの脱出との関係について解析した。その結果、Dt₂とDt₄は胚盤胞形成および透明帯脱出を予測するための指標とならなかったが（Dt₂+Dt₄も同様）、Dt₈は胚盤胞形成や透明帯脱出の確率を予測するためのよい指標となることがわかった（P=0.015と0.041）。Dt₈が750分以内に終了する胚では92%が胚盤胞を形成し、69%が透明帯から脱出した。Dt₈を900分まで上げるとこれらの割合は75%および49%へと減少した。

このように、早く卵割する胚が遅く卵割する胚よりも高率に胚盤胞あるいは脱出胚盤胞に発生すること、特にハムスター胚では第2卵割から第3卵割までの時間（Dt₈）でその後の発生能力を予測できることが本研究で示された。しかしながら、なぜ、第3卵割の時間がその後の発生のために重要であり、発生能力の予測のために使えるのかという記述はまったくなく、この細胞周期中に何が起きているのか明らかにされていない。今後の生化学的あるいは分子生物学的な究明が待たれるが、いずれにしても、他の動物種においても同様に発生速度の違いにより有能な胚を非侵襲的に選抜できれば、家畜生産にも生かされるであろうし、最初の数回の卵割の後移植されるヒトの体外受精プログラムなど臨床的にも応用できると思われる。

（抄訳 板垣佳明—伊藤ハム・中研）

（ITAGAKI Yoshiaki）

Prediction of the developmental potential of hamster embryos *in vitro* by precise timing of the third cell cycle

Gonzales, D. S., J. C. Pinheiro and B. D. Bavister

Journal of Reproduction and Fertility, 105 : 1-8 (1995)



Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

BRAINテクノフォーラム

鳥とのより良い共生のために

-鳥害をめぐる研究の現状と展望-

主催：生研機構（BRAIN） 後援：農林水産省

総合司会 農林水産省 農業研究センター 病害虫防除部長 **中村 和雄**

演題及び講師

1. 視覚による鳥の認知とその応用

慶應義塾大学 文学部人間関係学科 教授 **渡辺 茂**

2. 鳥類の聴覚と発声 -鳴き声の解析とその応用-

千葉大学 文学部行動科学科 助教授 **岡ノ谷一夫**

3. 鳥による被害の現状と対策 -電力関係を中心にして-

大淀化工株式会社 特需部 総合技術研究室長 **福居 信幸**

4. 鳥害研究の最前線

農林水産省 農業研究センター 鳥害研究室長 **藤岡 正博**

日 時 平成8年2月13日（火） 13:00~17:00

場 所 全社協・灘尾ホール
東京都千代田区霞が関3-2-2 新霞ヶ関ビル TEL:03-3580-0988

参 加 費 10,000円（生研機構への出資者及びBRAINテクノニュース購読者：7,000円）
参加券と一緒に請求書を送付させていただきますので、請求書記載の口座への振り込み、または、当日会場受付にてお支払い下さい。

お申し込み方法 ファックス又は電話にてお名前、勤務先、所属、住所、お電話番号をお知らせ下さい。お申し込み、キャンセルは、2月5日（月）までをお願いします。

お申し込み先 〒105 東京都港区虎ノ門3-18-19 虎ノ門マリンビル10F
生研機構（生物系特定産業技術研究推進機構）
企画部 企画第1課 TEL:03-3459-6565 FAX:03-3459-6566

編集後記

明けましておめでとうございます。

本誌は今年で9歳を迎えました。これはひとえに購読会員、執筆者ならびに関係の皆様のご理解とご協力によるものと心からお礼申しあげます。

一昨年は兵庫県中央農業技術センター、広島県立農業技術センター、南西海区水産研究所を訪ね、研究成果の一部を本誌に執筆していただきました。昨秋は青森県グリーンバイオセンター、岩手県生物工学研究所、富山県農業技術センター、同野菜花き試験場、富山県水産試験場を訪ね、バイテク研究の現状を

取材しました。本号では富山県の野菜花き試験場のチューリップの花色の制御法を紹介しましたが、次号では青森県のニンニクについての成果を予定しています。今年もできるだけ現場を訪ねて、ホットな情報を集め、紹介したいと考えています。

「総説」、「国内情報」等の充実はもとより、「地域の先端研究」についても、一層の充実を図りたいと考えています。

本年もどうぞよろしく願います。

(大畑記)

ブレインテクノニュース (第53号)

平成8年1月15日発行

発行者 浜口 義 曠

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

〒105 東京都港区虎ノ門3丁目18番19号 虎ノ門マリビル10F
TEL. 03-3459-6565 FAX. 03-3459-6566

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. 03-3667-8931 FAX. 03-3667-8933