

CODEN : BTEEEC

TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 55 号

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

MAY 15, 1996

生研機構発足10周年記念



アカサング

奄美大島沖の230mから潜水艇によって採集し、深層水で1年間飼育したもの。

ポリープが群体となり、アカサングを形成している。

(本文22ページ参照)

発行=生物系特定産業技術研究推進機構

## 総 説

熊谷勝男・菅原俊二・力石秀実

多動物T細胞を活性化する微生物タンパク質“スーパー抗原”……………1

## 国内情報

佐藤 威・三代浩二

共生微生物の伝搬を遮断することによる害虫の新防除法……………5

木原 稔・坂田 隆

魚類の消化管内発酵とその生理作用……………8

磯野康幸・中嶋光敏

酵素反応と生成物の分離精製を同時に行うための荷電膜を用いた  
新規パーストラクションシステム……………12

伊藤隆司

牛サイトカイン遺伝子プロファイルテストの開発……………15

## 地域の先端研究

細川敬三

ヒアシンス花被外植片から再分化した花の特性

—香氣成分とアントシアニン成分を指標として—……………19

山口光明

深層水の冷熱利用による魚類飼育試験について……………22

## 文献情報

ラクトフェリン：分子構造と生物学的機能……………25

生理的な条件とは何か——ラットにおけるグルコース吸収に対する

手術と麻酔の影響——……………25

サケは川の匂いを記憶するか？……………26

## 海外便り

倉田のり

アメリカにおけるトウモロコシゲノムおよび関連分野の研究状況……………28

林 建樹

アメリカにおける果樹のゲノムおよびバイオテク研究の現状……………30

## 多動物T細胞を活性化する 微生物タンパク “スーパー抗原”

東北大学名誉教授, \*東北大学歯学部  
熊谷勝男・菅原俊二\*・力石秀実\*

近年、細菌外毒素として知られていた黄色ブドウ球菌の腸管毒や溶レン菌の発赤毒の毒性は、実は、これらのタンパクが抗原提示細胞上の MHC クラス II 分子と T 細胞上の T 細胞レセプター  $V\beta$  鎖とに架橋を形成して、免疫系を急激に活性化する “スーパー抗原活性” の結果として発現されることが明らかとなった。以来、スーパー抗原に関する研究は、その構造解析から認識機構、疾患との関連から、さらに微生物感染に対する防御作用まで幅広い分野で行われている。その結果、このスーパー抗原は、大変多様性に富む微生物タンパクであり、毒性はほとんど示さないが、強いアジュバント活性を有する分子も相次いで見出されている。そして、これらのスーパー抗原は、広範な微生物感染症を防御する有用な免疫薬理活性物質である可能性が生れてきた。

### はじめに

1970年代から、A群溶血性レンサ球菌や黄色ブドウ球菌の産生するある種の毒素にヒトやマウスのリンパ球を刺激して、その分裂、増殖を誘導する作用のあることに気付かれていた。1980年代の後半に入って、これらの反応は、毒素タンパクが、マクロファージ上に発現している主要組織適合抗原 (MHC) のクラス II 分子に結合し、他方で、Tリンパ球上の抗原レセプター (TCR) に結合して起こす T 細胞反応であることがわかった。これは、あたかも、特異免疫抗原がクローン T 細胞に起こす反応に酷似するが、その作用は、後記するように、特異抗原とは異なった型の結合によるものであり、作用は極めて多数の T 細胞に及ぶことが明らかになり、Kappler や Marrack<sup>1)</sup> は、このような微生物タンパクに “スーパー抗原” という新しい概念を提唱した。これと前後して、同系統のマウス間に見出される一種のマウスの組織適合抗原と考えられていた Mls 抗原も、実は、これらのマウスの遺伝子に組込まれたマウス乳癌ウイルス (MMTV) に由来するタンパクで、これも細菌性スーパー抗原に類する作用をもった微生物タンパクであることが明らかにされた

のである<sup>2)</sup>。

これらの発見は、生物学上、極めて意外性に富む驚くべき発見であり、微生物と脊椎動物との関わり合いに新しい機構の存在を明らかにするとともに、これらのスーパー抗原タンパクに関して、その構造解析、T細胞活性化機構、微生物感染における免疫学的意義や病原的役割にわたる広範な分野の研究が展開されるようになった。以下、スーパー抗原について、その微生物感染における生物学的役割について述べるとともに、この微生物タンパクの免疫活性化剤としての利用の可能性についても言及したい。

### 1. スーパー抗原の免疫学的特性

一般の外来抗原は、マクロファージなどの抗原提示細胞 (APC) 内で抗原ペプチドまで分解され、APC の MHC クラス II 抗原の抗原反応溝に結合し MHC クラス II 抗原とともに T 細胞に提示される。この MHC/抗原ペプチドを T 細胞上のレセプターが認識して抗原特異的免疫反応が始動する。1つの特異抗原を認識して活性化する T 細胞は全 T 細胞数の  $10^{-4} \sim 10^{-6}$  であると言われている<sup>3)</sup>。

一方、スーパー抗原は、APC に取り込まれることなくそのまま直接 APC 上の MHC クラス II 分子と結合し、一方で T 細胞レセプター  $\beta$  鎖の変領域 ( $V\beta$ ) と結合し三分子複

KUMAGAI Katsuo, SUGAWARA Shunji,  
RIKIISHI Hidemi



合体を形成する (図1)。スーパー抗原はこの複合体形成によりT細胞に刺激を加えてその分裂増殖を誘導する。Vβ鎖にはそのアミノ酸配列で約20種類の異なったタイプが存在するが、スーパー抗原は、その1つあるいは複数のVβに結合する。したがって、スーパー抗原によって活性化されるT細胞は少なくとも全細胞数の1/20にも及ぶ計算になる。これが複数のVβを認識するスーパー抗原では

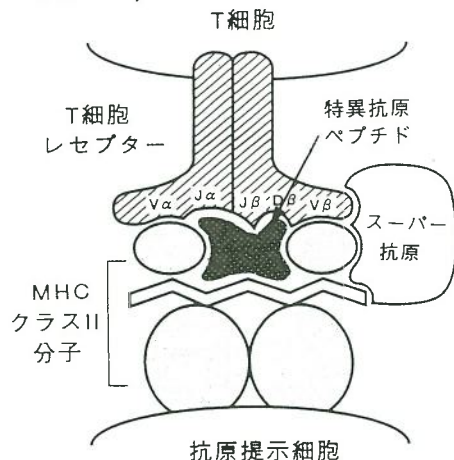


図1 特異抗原とスーパー抗原のT細胞レセプターへの結合様式

それ以上の高頻度 (1/3~1/4) でT細胞の活性化が誘導されることになる<sup>1)</sup>。こういった理由がスーパー抗原といわれる所以である。

2. スーパー抗原を産生する微生物

表1 代表的スーパー抗原

産生微生物	名称 (略称)
黄色ブドウ球菌	エンテロトキシン A (SEA)
	B (SEB)
	C1 (SEC1)
	C2 (SEC2)
	C3 (SEC3)
	D (SED)
A群溶血性レンサ球菌	E (SEE)
	毒素性ショック症候群毒素-1 (TSST-1)
	発赤性毒素 A (SPEA)
	C (SPEC)
	CAP
クロストリジウム・パーフリンジェンス	溶レン菌マイトジェン (SPM)
	SSA
	マイトジェン因子 (MF)
	CPET
	エルシニア由来マイトジェン (YPM)
	エルシニア
	Vβ5 活性因子
	トキソプラズマ・ゴンディ
	MAM
	マイコプラズマ・アルステリイディス
レトロウイルス	
マウス乳癌ウイルス (MMTV)*	LTR 中の ORF
ヒト免疫不全ウイルス (HIV)	
狂犬病ウイルス	ヌクレオカプシド (NC)

\* MMTV スーパー抗原はその遺伝子配列の違いから、現在まで 50 種類以上同定されている。

現在までにスーパー抗原活性が報告されている細菌性タンパクは、そのサブクラスも含めると約20種類にものぼり、その遺伝子が分離されている。代表的なものに、黄色ブドウ球菌では、毒素型食中毒の原因毒素である腸管毒や毒素性ショック症候群を惹起するTSST-1、溶レン菌では、猩紅熱患者に発赤を発生させる発赤毒 (SPE) などがある (表1)。また、溶レン菌では、我々が分離したCAP (cytoplasmic membrane-associated protein) やSPM (*Streptococcus pyogenes* mitogen) があり<sup>3,4)</sup>、また、SSA, MFなどの新しいスーパー抗原も報告されている<sup>5,6)</sup>。さらに、エルシニア菌、マイコプラズマ、原虫 (トキソプラズマ) にもスーパー抗原の存在が報告されている<sup>7,8,9)</sup>。

ウイルス性スーパー抗原としては、前記のマウス乳癌ウイルス (MMTV) スーパー抗原の他に、狂犬病ウイルスのヌクレオカプシドやエイズ病原ウイルス (HIV) にもスーパー抗原の存在が示唆されている<sup>10,11)</sup> (表1)。

3. スーパー抗原の構造とリンパ球による認識

黄色ブドウ球菌スーパー抗原 (SE) は230~240個のアミノ酸からなる分子量27-30kDaのタンパクで、5個のαヘリックス、12か所のβシートと1つのS-S結合をもち、2つの腎型のドメイン構造からなっている。TSST-1では、4個のαヘリックス、13か所のβシートからなり、立体構造はSEとよく似た構造をしている。溶レン菌スーパー抗原 (SPE) も、SEとはある程度のアミノ酸配列の相同性をもつことから相互の類似構造が推定されている。

MMTVウイルス性スーパー抗原は、45kDaのII型の膜結合型糖タンパクである。MMTVはこれまで50種以上の種類が分離されており、互いに90%以上の相同性をもつがC末端部分に多様性を示す部分があり、この部位で同じく多様性を示すVβと結合するものと考えられている。

4. スーパー抗原の生体内での役割

スーパー抗原を認識し得る動物種は、ヒト

の他、ウシ、ヤギ、ブタ、イヌ、ラット、マウスなどの哺乳類であり、そのリンパ球である。1~10ng/mlのスーパー抗原はウシやヒトのリンパ球を刺激して活性化するが、魚類や両生類のリンパ球はまったく反応しない。鳥類のリンパ球は限られたスーパー抗原(SEAなど)にのみ反応性を有する。スーパー抗原の結合標的であるT細胞レセプター(Vβ)の発達に依存しているものと思われる。いずれにしても、高度に進化した動物である哺乳類のリンパ球が、原始生物に近い細菌細胞の産生タンパクと反応するということになる。これらのリンパ球の反応が、その免疫系にどのような作用を及ぼしているかを表2に示した。

(1) 感染防御

スーパー抗原の免疫系に及ぼす最も重要な作用は、MHCクラスII抗原とTCRとが会合することにより、Vβ特異的にT細胞を活性化するとともに、マクロファージも活性化し、これらの細胞から多種類のしかも多量のサイトカインの産生を誘導することである。T細胞サイトカイン(IFNγ,IL-2,IL-12)の産生はT細胞やNK細胞の分化、増殖を促し、IFNγの産生を促進する。また、低濃度のスーパー抗原はT細胞依存性にB細胞の増殖、分化を促進する。さらに、スーパー抗原

表2 スーパー抗原の免疫系に及ぼす作用

Vβ特異的T細胞の活性化
MHCクラスII陽性細胞の活性化
サイトカインの産生誘導
NK細胞の活性化
B細胞の増殖、分化の誘導
好中球、肥満細胞の活性化
アナジーの誘導

は、好中球や肥満細胞にも作用する<sup>12)</sup>。

黄色ブドウ球菌スーパー抗原で腸炎誘起毒活性の強いSEAやSEBを極く微量、あらかじめマウスに投与すると、ウイルス(ヘルペス)や多くの細菌(肺炎桿菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌、サルモネラ菌など)の感染からマウスを防御する<sup>13)</sup>。つまり、細菌感染過程、特に、その早期過程では生体免疫系はスーパー抗原を認識し、その結果、効果的なサイトカインの産生にもとづいて免疫系細胞が

活性化し、感染防御免疫の成立を促す。つまり、本来スーパー抗原反応は微生物感染に対して自然免疫を増強し、特異免疫に促進的に働く免疫アジュバント的反応ではないかと考えられるのである。

(2) 急性毒性、ショック、発熱

黄色ブドウ球菌の産生するSEは、嘔吐、下痢を主徴とする毒素型食中毒を、TSST-1は高熱、発疹を伴う急性の毒素性ショック症候群を誘起する外毒素として知られている。また、溶レン菌の産生するSPEも、溶レン菌感染にもとづく咽頭炎、膿痂疹、丹毒や猩紅熱の発症に伴う、発熱、ショック、多臓器不全などの激しい炎症症状を誘発する外毒素として知られている。

これらの急性症状は、感染細菌から持続的に放出された多量のスーパー抗原が、マクロファージやT細胞の過剰反応を誘導し、大量の炎症性サイトカインの産生にもとづいて引き起こされる反応と理解される。産生サイトカインの中で、ウイルスに最も関与しているサイトカインはTNFであることは、抗TNF抗体の利用などで実験的に証明されている<sup>14)</sup>。また、グラム陰性菌の内毒素(LPS)はスーパー抗原の毒性に相乗的に働くことが知られているが<sup>15)</sup>、LPSの他にも、主病原菌を含む、種々の混在菌の産生する毒素性タンパク、酵素、代謝産物などの多くのビルレンス因子が、スーパー抗原の毒性発現に関与しているものと思われる。いずれにしても、スーパー抗原の中には、大量の炎症性サイトカイン(TNFなどの)を誘導する催炎性の強い分子種があるが、ウイルス性スーパー抗原にはそのような催炎性はない。また、細菌性スーパー抗原にも、実際には、以下に示すような幅広い多様性がある。

5. 低毒性で免疫増強(アジュバント)

活性をもつスーパー抗原

これまで、黄色ブドウ球菌や溶レン菌から分離されているスーパー抗原は、いわば、発赤毒やショック誘導活性を指標に分離された毒素性スーパー抗原であるが、近年は、黄色ブドウ球菌にも、溶レン菌にもそのような毒

性が極めて低いか、検出されないスーパー抗原が分離されている。MFがそうであり、また、我々の分離した溶レン菌スーパー抗原CAPもSPMもマウスへ直接投与しても、肝機能阻害剤であるD-ガラクトサミンとの併用でも、マウスに何らの発赤もショック症状も示さない低毒性のスーパー抗原である。このSPMをマウスにあらかじめ投与しておく、毒素性スーパー抗原SEAやSEBで認められたような細菌感染の防御作用が見出される。あるいは、CAPの10ng/mlをヒトや乳牛の末梢血リンパ球に添加して培養すると、T細胞の活性化を介して、B細胞を刺激して抗体産生能を高める。いずれも、低毒性であるが、アジュバント活性を保持しているスーパー抗原である。また、いずれも、リンパ球に作用してIL-4などのサイトカインの産生を促進するが、TNFの産生は極めて弱いが、その低毒性と関連づけられる。

また、MMTVに見出される多種類のスーパー抗原には、マウスに何ら目立った炎症反応を誘導していない。これに反して、B細胞の活性化を介して抗体産生機能の増強活性が認められている。我々は、また、多数分離されている既知のスーパー抗原遺伝子の変異株に、このような毒素作用が極めて低く、強い免疫アジュバント活性を有するスーパー抗原タンパクのスクリーニングを始めている。

#### 6. スーパー抗原の応用

今日の微生物感染症で、ヒトと家畜に共通の問題の1つは、多剤耐性菌の出現に伴う難治性の感染症の増加である。例えば、家畜感染症では、多種類の起炎菌によって誘起する乳牛の乳房炎などがその1つで、対策が大きな問題となっている。多種類の病原菌の故に、個々の原因菌に対するワクチンによる予防は困難であり、その対策に苦慮しているのが現状である。このような感染症には、化学療法剤以外には免疫強化剤（レバミゾールなど）による予防や治療が試みられているが、より強力な予防剤や治療剤の開発が待たれている。これまでにそのような目的で験されているのは、やはり、免疫アジュバント活性をもつ大

腸菌の細胞壁成分（リポドA）やグラム陽性球菌製剤やその細胞壁成分（ペプチドグリカン）などである。これらの粗製剤も免疫アジュバント剤としてそれぞれに実験的に乳房炎の抑制効果が示されている。ここに示した乳牛を含む多くの哺乳類のT細胞を刺激して低毒性で免疫アジュバント活性を示すスーパー抗原分子も新しい乳房炎予防剤あるいは治療剤としての開発が考慮されるべき対象物質と思われる。その他、トキソプラズマの感染において、産生されるスーパー抗原はトキソプラズマ発症に対する抵抗性因子として知られている。したがって、乳牛のピロプラズマ症なども、今後、予防薬あるいは治療薬としてのスーパー抗原の効果を験すべき家畜病の1つである。

#### 文 献

- 1) Marrack, P. and J. Kappler (1990) *Science*, 248: 705-711
- 2) MacDonald, H. R. *et al.* (1988) *Nature*, 332: 40-45
- 3) Itoh, T. *et al.* (1992) *Infect. Immun.*, 60: 3128-3135
- 4) Sato, H. (1994) *Microbiol. Immunol.*, 38: 139-147
- 5) Mollick, J. A. *et al.* (1993) *J. Clin. Invest.*, 92: 710-719
- 6) Norrby-Teglund, A. *et al.* (1994) *Infect. Immun.*, 62: 5227-5233
- 7) Miyoshi-Akiyama, T. *et al.* (1995) *J. Immunol.*, 154: 5228-5234
- 8) Mehindate, K. *et al.* (1994) *Infect. Immun.*, 62: 4716-4721
- 9) Denkers, E. Y. *et al.* (1994) *J. Exp. Med.*, 180: 985-994
- 10) Lafon, M. *et al.* (1992) *Nature*, 358: 507-510
- 11) Laurence, J. *et al.* (1992) *Nature*, 358: 255-259
- 12) Hensler, T. *et al.* (1993) *Infect. Immun.*, 61: 1055-1061
- 13) Otani, T. *et al.* (1985) *Infect. Immun.* 47: 767-773
- 14) Miethke, T. *et al.* (1992) *J. Exp. Med.*, 175: 91-98
- 15) Leonard, B. A. B. and P. M. Schlievert (1992) *Infection. Immun.*, 60: 3747-3755



# 共生微生物の伝搬を遮断することによる害虫の新防除法

農林水産省 果樹試験場

佐藤 威・三代浩二

半翅目昆虫であるカメムシ類は、一般に体内に共生微生物を有し、その存在が宿主の発育に深く関わっている。果樹の難防除害虫、チャバネアオカメムシの場合も、盲嚢部と呼ばれる特殊な器官に細菌が棲息する。この共生細菌は母から子へ、経卵的に受け継がれてきたもので、この伝搬を阻止すると幼虫は発育不良となる。そこで、こうした共生細菌の伝搬を遮断することで害虫発生を抑えるという新しい発想の防除技術の開発が期待される。

## 1. はじめに

近年、地球規模で環境保全の重要性が唱えられ、我が国の農業分野においても環境保全型、ないしは環境調和型農業生態系の再構築に対する認識が高まってきている。病害虫防除の場面でも、環境調和型への技術革新が強く求められてきており、化学農薬の開発にあたっては、より安全性・より選択性・より易分解性を旨とした研究への移行がなされつつあるが、生物学的特性に基づいた防除技術の開発に対する要望も一段と強まってきている。

果樹の主要害虫であるカメムシ類の場合、発生源は果樹園外の針葉樹である。園地周辺部のスギ、ヒノキ、サワラなどの実（球果）を吸汁して育った成虫が果樹園に飛来し、果実を吸汁し加害する。こうした二重生活をすする害虫であるため、防除はきわめて厄介である。幼虫期の棲息場所である森や林に化学殺虫剤を散布するという事は、生態系の破壊につながる。したがって、現在のところ被害を防止するには、果樹に定期的に化学殺虫剤を散布し、果実を保護するという方法が一般的に用いられている。効果の安定性と防除作業の軽減化からみれば、残効性の長い化学殺

虫剤が望ましいが、これは近年の開発方向に逆行する考えであり、新たな防除法の開発が強く求められている。

カメムシ類に関する研究が進むにつれて、その生態や弱点などが徐々に解明されてきた。こうした研究成果の一環として、カメムシ類の体内には共生微生物が棲息し、それがカメムシの幼虫期の発育に大きく関わっているという事実が明らかにされた。そして、こうした微生物の伝搬を遮断すれば、カメムシは発育不良となり、密度が抑制されることから、新しい防除法開発の糸口が得られた。

## 2. 果樹カメムシの生活史

標識したカメムシ成虫を放飼し、これを再捕獲するという手法や、各種植物における時期別加害調査などから、先述のように、カメムシ幼虫は果樹園周辺部の針葉樹の球果を吸汁して発育することが明らかにされた。こうした高脂質の球果を餌として利用するには、それを吸収できる特殊な機構もしくは機能を持つはずである。カメムシは腸管の一部が盲嚢部という特殊な器官として発達し、この中には微生物が棲息する。カメムシ幼虫はどうやらこれら微生物から、栄養的なサポートを受けているらしい。現在、この微生物は細菌の1種として捉えられている。

### 3. 共生細菌とその役目

チャバネアオカメムシの盲嚢部内(図1)に生息する細菌は、大きさが $0.3\sim 0.6\mu\text{m}\times 2\sim 6\mu\text{m}$ の桿菌(図2)である<sup>1)</sup>。しかし、今もって種の同定はなされていない。この細菌は経卵的に代々母から子に伝わってきたものである。チャバネアオカメムシを実験室内で、乾燥したダイズとラッカセイ種子とを餌に、水の補給を続けながら100世代以上も累代飼育を重ねても、盲嚢部には先の桿菌が多数棲息しているのが見られる。しかしながら、この細菌を色々な方法で除去することを試みると、幼虫の発育は著しく阻害され、成虫になる割合も極端に低下する。また、たとえ成虫になっても虚弱で、交尾や産卵といった種保存の行為はまったくなされない。

共生細菌は母成虫が産卵後、出される排泄物を卵の表面になすりつけることで次世代に伝達される。排泄物には盲嚢部のマイセトームから脱落した共生細菌が多数含まれる。卵から孵化した幼虫は、まずこの排泄物を舐め(図3)、それによって体内に共生細菌を取り込む。この細菌は盲嚢部に定着するが、盲嚢部自体も幼虫の発育に伴って発達する。盲嚢部中で増殖した共生細菌は、盲嚢部マイセトームの開口部から直腸に排出され、他の排泄物と一緒に総排泄口から排泄され、その一部は産下卵表面になすり付けられる<sup>1)</sup>。

こうした産下卵の表面をホルマリンなどで

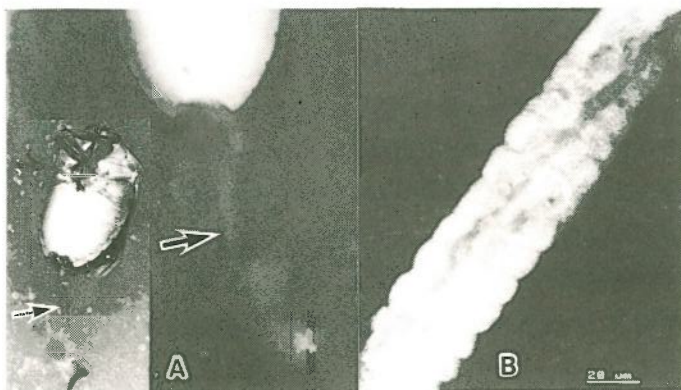


図1 チャバネアオカメムシ盲嚢部  
A: 雄成虫腹部末端より引出した状態→: 盲嚢部  
B: 幼虫の盲嚢部(レーザー共焦点顕微鏡像)

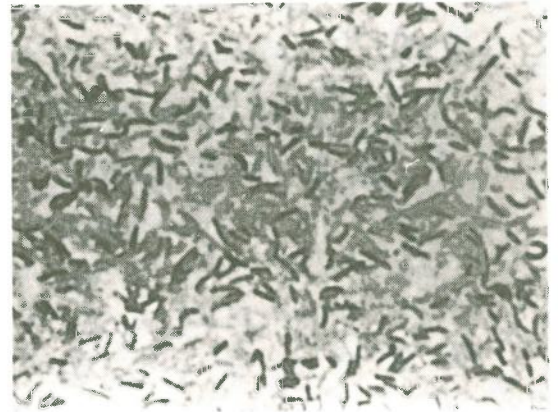


図2 チャバネアオカメムシ盲嚢部マイセトーム中の共生細菌

滅菌すると共生細菌は死滅し、これから孵化した幼虫の発育は極めて不良になる(図4)。

### 4. 共生細菌の伝搬遮断法

共生細菌の伝搬を遮断する方法としては、まだ実験室内の段階ではあるが、ホルマリン(3%)や塩化ベンザルコニウム(逆性石鹼:0.5%)を用いた卵の表面殺菌の他に、ペニシリンやストレプトマイシンなどの抗生物質を用いた卵表面処理によっても、同様の効果が得られている<sup>1)</sup>。ただ後者の場合、一部が体内に吸収されて共生細菌の増殖を制しているとも考えられる。いずれにせよ、こうした殺菌剤や抗生物質を野外でそのまま散布することはできない。今後、環境への影響を十分に配慮した、有効な薬剤等のスクリーニングが必要である。

### 5. おわりに

チャバネアオカメムシの共生細菌については、残念ながら未だに分離培養に成功していない。そのため、種の同定もできない状況にある。カメムシ類の共生細菌としては、これまでにオオホシカメムシ科のフタモンホシカメムシの一種 *Pyrrhocoris apterus* から新属新種の嫌気性細菌 *Coriobacterium glomerans* が知られている<sup>2)</sup>。しかしながら、チャバネアオカメムシの盲嚢部周辺には気管が縦





図3 チャバネアオカメムシの卵と孵化幼虫  
孵化幼虫が卵表面を舐める

走しており、嫌気的環境にあるとは考えにくい。ただ、細菌の一種であることから、有効な殺菌剤や抗生物質など化学薬剤を用いて共生細菌の伝搬を遮断し、カメムシの発生を抑制するといった害虫新防除法の開発とともに、バクテリオファージなど細菌に対し有効な天敵微生物を探索し、それを利用してカメムシ

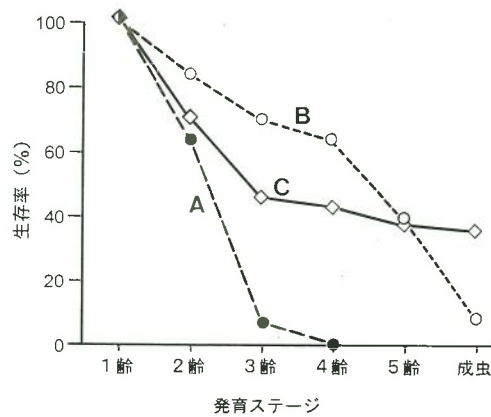


図4 チャバネアオカメムシの卵の表面を殺菌剤や抗生物質で殺菌処理し、共生細菌の伝搬を遮断した場合の幼虫の発育状況・生存率

- A: ホルマリン (3%) 処理
- B: ペニシリン (500単位/ml) + ストレプトマイシン (500mcg/ml) 混液処理
- C: 対照 (無処理)

共生細菌の増殖を制御し、カメムシの発生を抑制するという、まったく新しい概念の生物学的防除法の開発の可能性も秘められており、今後の進展が大いに期待される。

#### 文 献

- 1) 阿部芳彦・三代浩二・高梨祐明 (1995) 日本応用動物昆虫学会誌 39: 109-115
- 2) Haas, F. and H. König (1988) *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38: 382-384

## 魚類の消化管内発酵とその生理作用

マルハ株式会社 中央研究所・\*石巻専修大学 理工学部

木原 稔・坂田 隆\*

魚類の消化管内からも消化管内発酵の主産物である短鎖脂肪酸（酢酸，プロピオン酸，酪酸）が検出されることから，魚類にも消化管内発酵が存在することを確認した。魚類の消化管内短鎖脂肪酸濃度は，ほ乳動物の場合と大差なく，魚類でも消化管内発酵産物が，宿主になんらかの生理作用を与えていると考えられた。ここでは，魚類の消化管内発酵とその生理作用，特に消化管の形態に対する作用について紹介する。

### 1. はじめに

食品成分の中には，上部消化管での宿主動物自身の消化酵素による消化をまぬがれ，大腸など下部消化管に流れ込んで，そこにすんでいる微生物の消化を受けるものがある。たとえば，水溶性の食物繊維やオリゴ糖，レジスタントスターチなどの難消化性糖類である。

難消化性糖類の生理作用としては，血漿コレステロールの低下<sup>1)</sup>，消化管形態の変化<sup>2)</sup>，整腸作用<sup>3)</sup>，Ca, Mgの吸収促進作用<sup>4)</sup>などが確認されている。これら難消化性糖類は大腸内微生物によって酢酸やプロピオン酸，酪酸のような短鎖脂肪酸に変換される<sup>5,6)</sup>。したがって，難消化性糖類の生理作用のかなりの部分は，消化管内微生物が難消化性糖類からつくる短鎖脂肪酸の作用と考えられている。実際に短鎖脂肪酸の一つであるプロピオン酸を投与すると，難消化性糖類を投与した場合と同様に血漿コレステロールが低下する<sup>7,8)</sup>。

多様な食性を示す魚類の消化管内にも細菌がいて，微生物消化をしている。そして，草食魚でも肉食性の養殖魚でも，消化管内に短鎖脂肪酸が存在する<sup>9-12)</sup>。魚類の消化管内短鎖脂肪酸濃度の範囲は，ほ乳動物の場合と大差はなく<sup>13)</sup>，栄養・生理作用を示す濃度範囲にあると考えられる。そこで筆者らは，短鎖

脂肪酸の生産に代表されるような魚類消化管内発酵の生理作用と，消化管内発酵の制御について研究を進めている。

### 2. 魚類消化管内発酵の確認

魚類の消化管内の短鎖脂肪酸濃度は，魚種や消化管の部位，摂取した難消化性糖類の種類や量によって変化する。我々の実験では，マダイにオリゴ糖ラクトシュークローズを給与すると消化管内容物の短鎖脂肪酸濃度が増加して，100mmol/kg 内容物水分をこえる場合もあった（図1）。この結果から，マダイでも消化管内に微生物がすんでいて，これらの微生物は給与したオリゴ糖を資化することが可能なことがわかった。

またティラピアに各種糖質を給与した試験では，消化管内容物の短鎖脂肪酸濃度が対照区である糖質無給与区よりも $\alpha$ -デンプン給与区で高く，海藻に多く含まれる多糖類のアルギン酸を給与した区では対照区よりも低かった。すなわち植物食性のティラピアの消化管内微生物にとってもアルギン酸は資化しにくいらしい。ブタ盲腸由来の細菌を用いた培養実験でもアルギン酸の発酵性の低さが報告されているので<sup>14)</sup>，アルギン酸の血圧低下作用などは腸内発酵を介さない作用と考えられる。

消化管内での短鎖脂肪酸吸収はすみやかで，ほ乳動物では大腸内で作られた量の95%以

上が吸収される<sup>15,23</sup>)。したがって、消化管内容物中の短鎖脂肪酸濃度は実際の生成量を反映しない。このような場合には、短鎖脂肪酸の生成量を推定するために、消化管からの吸収や流出の影響がないバッチ培養法が用いられる<sup>16</sup>)。我々は消化管内容物が微量である魚類にも応用可能なマイクロスケールのバッチ培養法を開発した<sup>17</sup>)。現在では、消化管内容物の量が数十マイクロリットル程度しかなくても培養が可能となり<sup>18</sup>)、この方法を使って消化管内発酵の有無を確認したり、発酵基質の利用性の違いについて検討したりしている。このような方法で魚類の消化管内微生物による資化性を確認した発酵基質を実際に魚に給与した実験の結果について次にのべる。

### 3. 消化管形態の変化

植物食性のティラピアに、消化管内発酵を受けにくいアルギン酸と、発酵を受けやすい $\alpha$ -デンプンを給与した実験では、消化管の形態に影響がみとめられた。 $\alpha$ -デンプンを給与した魚の消化管筋肉層(縦走筋+輪走筋)がアルギン酸を給与した魚の筋肉層よりも厚くなっていたのである(図2)。同様な変化が海産性肉食魚であるマダイでも観察されている。消化管内で発酵を受けるようなオリゴ糖を養殖マダイに給与すると消化管の筋肉層が厚くなったのである<sup>17</sup>)。また、オリゴ糖を給与すると胃の乾燥重量も増加した(図3)。養殖マダイの消化管は脆弱で、タコ糸で軽くしばただけで腸管が切れたり、ピンセットでつまんだだけで胃が破れてしまうことがある。養殖クロダイでも消化管は脆弱であり、天然魚の消化管とは異なるといわれる<sup>19</sup>)。しかし、発酵基質であるオリゴ糖を給与した養殖マダイの胃はピンセットで引っ張っても破れることはなく、腸管も簡単に切れることはない。このように、下部消化管での発酵の影響は発酵部位だけではなく、胃のような上部消化管にもあらわれるようである。ほ乳動物でも大腸内に投与した短鎖脂肪酸が小腸やすい臓のような遠隔臓器にも影響をあ

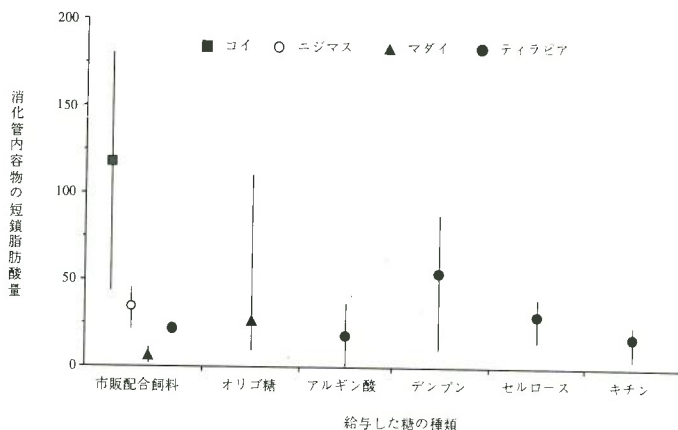


図1 市販配合飼料あるいは各種糖質を含有する実験飼料を給与した場合の消化管内容物の短鎖脂肪酸量 (mmoles/kg 内容物中の水分) (棒線はレンジ)  
オリゴ糖: ラクトシュークロース (0.25 g/100 g 飼料); アルギン酸: アルギン酸ナトリウム, デンプン:  $\alpha$ -デンプン, セルロース, キチン (いずれも 15 g/100 g 飼料)

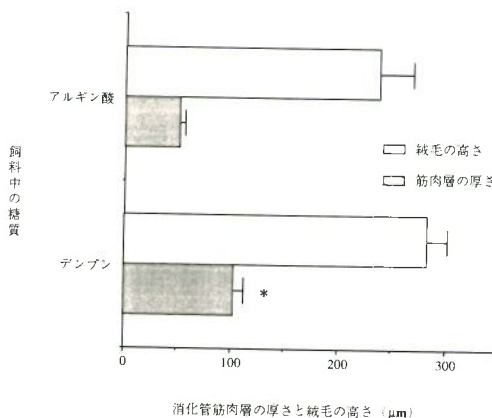


図2 発酵基質給与によるティラピア消化管形態の変化

\* :  $p < 0.05$

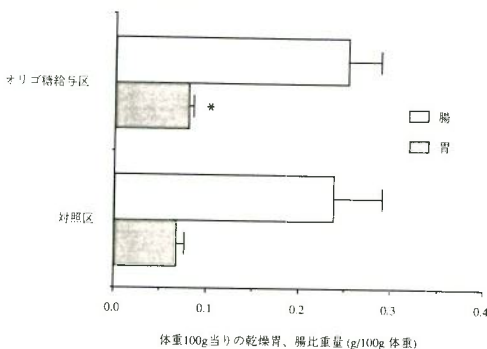


図3 オリゴ糖給与によるマダイの胃、腸乾燥比重量変化

\* :  $p < 0.05$

オリゴ糖: ラクトシュークロース

たえるので<sup>20</sup>)、魚類でも同様の情報伝達機構があるのかもしれない。

消化管内発酵の影響は細胞レベルでもあらわれる。ハマチにオリゴ糖を給与した試験では、腸後部絨毛中の粘液産生細胞数がめだっ



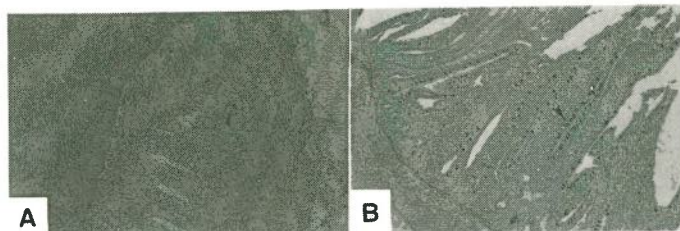


図4 ハマチ腸後部粘液産生細胞  
A: オリゴ糖無給与, B: オリゴ糖給与  
矢印: 粘液産生細胞

表1 オリゴ糖<sup>2</sup>給与ハマチの消化管組織変化

	対照区 (オリゴ糖無給与区)	実験区 (オリゴ糖給与区)
	平均値±標準偏差	平均値±標準偏差
粘液産生細胞数 <sup>1</sup> (個/1.2mm <sup>2</sup> )	210.3±112.1	892.3±350.2*

\*:  $p < 0.05$  (対照区と比較)

1: 0.15mm<sup>2</sup>当たりの細胞数×8か所の観察

2: オリゴ糖=ラクトシュークロース

て増加していた (図4, 表1)。消化管内の粘液は、外敵に対する生体防御の役割を果たしているという考えもあるが、その働きは実はよくわかっていない<sup>21)</sup>。発酵基質を給与した魚の糞が泥状にならずに粒状に固化することがあるのも、糞塊のまわりに粘液がコーティングされるためではないかと推測できる。糞塊が固化すれば、養殖場のイケスの中で魚が糞をしても簡単には糞塊がくずれないので養殖魚の周囲の環境はあまり悪化しないことになる<sup>22)</sup>。この意味でも、消化管の粘液の機能や粘液分泌の制御機構、糞塊の形成機構などの研究が進むことを期待したい。

#### 4. 肉食性魚類の栄養源としてのデンプンや難消化性糖

肉食性魚類の糖質利用能は低いと言われていた。中でも、マダイやマス類、ウナギなどは本来糖尿病性で耐糖能が低く、その原因のひとつはインシュリンの分泌不足にあると考えられている<sup>23)</sup>。このような耐糖能の低い魚類の糖質栄養源としては難消化性の糖類が有効なかもしれない。糖尿病患者のエネルギー源としては、血糖値を上げない糖質、つまり糖そのものとしては吸収されずに発酵部位で短鎖脂肪酸に変換される難消化性糖類が有効だという考えがあるからである<sup>24)</sup>。

マダイやハマチで飼養試験をすると、 $\alpha$ -デンプンの方がグルコースよりも高い栄養価を示す<sup>25)</sup>。また我々は、マダイ腸内微生物に対する発酵基質としての $\alpha$ -デンプン利用性は、オリゴ糖以上に高いという結果も得ている。これらの原因については色々な考え方があるだろうが、魚類ではデンプンを分解するアミラーゼの活性が低いので、デンプンは上部消化管であまり消化・吸収されずに発酵部位へ到達し、そこにすんでいる微生物によって吸収しやすい短鎖脂肪酸に変換され、エネルギー源として生体に利用されるためであるとも考えられる。短鎖脂肪酸の吸収には受動拡散と担体輸送の双方の機構があることや、体内に入った短鎖脂肪酸は脳の神経細胞を含むたいの細胞に取り込まれてエネルギー源として利用されることを考えると、魚類にとっては、微生物がつくる短鎖脂肪酸は無視できないエネルギー源かもしれない。

#### 5. おわりに

以上のことから、腸内共生生物を含めた魚類栄養学を、もう一度見直す必要があるのではないかと考えている。筆者らが調べた消化管内発酵の生理作用は生体にあらわれる変化のほんの一部を確認したものであって、短

鎖脂肪酸を主体とする消化管内発酵がどのように生体に作用しているのかはまだわかっていない。いずれにしても魚類消化管内発酵の解明は養殖産業にとって重要な領域であると筆者らは考えている。

#### 文 献

- 1) Marlett, J. A., *et al.* (1994) *Hepatology*, 20 : 1450-1457
- 2) Peter W. S. Chiou *et al.* (1994) *Comp. Biochem. Physiol.*, 108A : 629-638
- 3) 大西克成・木内武美 (1995) *New Food Industry*, 37 : 10-17
- 4) 太田篤胤 (1995) 静岡県立大学学長特別研究「食生活と長寿健康」: シンポジウム「消化管機能と健康」要旨集
- 5) Cummings, J. H. (1991) Report of the tenth ROSS CONFERENCE on medical research, 11-17
- 6) 星 清子 (1995) 食品工業, 38 : 57-66
- 7) Kishimoto, Y., *et al.* (1995) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 41 : 73-81
- 8) 竹久文之 (1992) 日本栄養・食糧学会誌, 45 : 325-331
- 9) 木原 稔 (1995) Hindgut club シンポジウム「消化管運動と消化管通過時間」要旨, 「サカナもおならをするのだろうか」
- 10) Rimmer, D. W. and W. J. Wiebe (1987) *J. Fish Biol.*, 31 : 229-236
- 11) Kandel, J. S., *et al.* (1994) *J. Fish Biol.*, 45 : 527-529
- 12) Clements, K. D. and J. H. Choat (1995) *Physiological Zoology*, 68 : 355-378
- 13) Breves, G. and K. Stuck (1995) In "Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids" 73-85 [Cummings, J. H., *et al.* Ed.]. Cambridge: Cambridge University Press
- 14) Togari, N., *et al.* (1995) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 41 : 179-185
- 15) 細谷憲政・奥 恒行: 厚生科学費研究「新開発健康影響評価研究」—「新開発食品素材の健康に果たす役割に関する研究」班, 平成4年度研究報告書: 110-119
- 16) Kikuchi, H. and T. Sakata (1992) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 38 : 287-296
- 17) Kihara, M., *et al.* (1995) *Comp. Biochem. Physiol.*, 112A : 629-634
- 18) Kihara, M. and T. Sakata (1993) Falk Symposium No. 73 "Short Chain Fatty Acids" Strasbourg (France), Abstracts: A10
- 19) 山下浩史ら (1996) *Nippon Suisan Gakkaishi*, 62 : 89-93
- 20) 坂田 隆 (1995) 「大腸内細菌がつくる短鎖脂肪酸の役割」日本臨床栄養学会雑誌, 17 : 3-10
- 21) 坂田 隆 (1982) 栄養生理研究会報, 26 : 37-48
- 22) 吉田陽一 (1979) 水産学シリーズ30「水域の自浄作用と浄化」: 22-35
- 23) 池田静徳 (1979) 蛋白質 核酸 酵素, 24 : 292-300
- 24) 坂田 隆 (1993) 「乳果オリゴ糖に関するシンポジウム」講演要旨
- 25) 米 康夫 (1984) 文部省科学研究費補助金研究成果報告書「魚類の糖代謝の特性に関する研究」—「海産魚の糖利用能と炭水化物の種類による栄養価の相違」: 78-96

国内情報

## 酵素反応と生成物の分離精製を同時に行うための荷電膜を用いた新規パーストラクションシステム

大日精化工業株式会社 中央研究所, \*農林水産省 食品総合研究所  
磯野康幸・中嶋光敏\*

膜を用いた液液抽出（パーストラクション）に荷電膜を組み込むことで、二相分配による分離効果および荷電膜と溶質との静電的反発による分離効果との相乗効果により、目的物質だけを選択的に抽出することが可能なハイブリッド分離システムを考案した。本研究ではアスパルテーム前駆体合成反応系を対象とし、システムの有用性を検証した。また、膜構造が分離性能に及ぼす影響についても考察した。

### 1. はじめに

バイオリクター研究の進展とともに、その下流プロセスである生産物の分離精製工程の重要性も高まっており、各单位分離操作については多くの報告がなされている<sup>1)</sup>。一方、近年では単位分離操作の多段化、複合化によるハイブリッド分離プロセスに関する研究例も増加してきた。ハイブリッド分離プロセスは従来の単一単位操作では分離性能のあるいは経済的に十分な効果が得られない場合の解決手段として期待される<sup>2)</sup>。一方、膜型バイオリクターは反応分離同時操作が可能なシステムとして知られている。膜は一般に生体触媒の保持を目的とすることが多いが、以下に示すようなハイブリッド分離システムを組み込んだ膜型リアクターの研究も注目されている。

### 2. パーストラクション

パーストラクション（Perstraction）はパーミエーション（Permeation）とエクストラクション（Extraction）との合成語であり、膜を通しての溶媒抽出操作を意味する。基本的には液液抽出であるが、利点として、①膜で二相が区切られているため、二相の混合操作、抽出後の相分離操作を必要としない、②密度の近い溶媒同士での操作も可能、③生体触媒が水相に存在する場合、有機溶媒との接触による失活を防ぐことができる、④膜の

分離効果との相乗効果が期待できる。欠点として、①膜による物質移動抵抗により、従来の抽出操作に比べ抽出速度が低下する、②有機溶媒耐性が要求される、③疎水性膜では有機溶媒の、親水性膜では水溶液の移流を防ぐために膜の両側での微妙な圧調整が必要となる、といった特徴がある<sup>3)</sup>。パーストラクションシステムがバイオリクターに応用された場合、反応一生産物分離の同時操作が可能となる<sup>4~6)</sup>。

筆者らは人工甘味料アスパルテームの前駆体合成用パーストラクションシステムについて検討している<sup>7)</sup>。酵素合成法ではN-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸（ZA）およびL-フェニルアラニンメチルエステル（PM）を基質とし、酵素（サーモライシン）を用いてアスパルテーム前駆体のジペプチド（ZAPM）を合成し（図1）、次に保護基をはずすという方法が一般的である。パーストラクションシステムは水相で酵素反応を行うと同時に有機相に生産物を連続的に抽出することができるため、水相中の生産物は低濃度に維持され、ZAPM 酵素合成のような低い合成反応平衡を持つプロセスにおいても高い生産性を得ることが期待できる。有機相に tert-アミルアルコール、水相に0.05 M リン酸緩衝液を用いた二相系 ZAPM 合成では、酵素反応を行う pH 6 近傍において ZA のほとんどが水相に、ZAPM の 9 割が有機相に分配されることがわかった。したが

ISONO Yasuyuki, NAKAJIMA Mitsutoshi



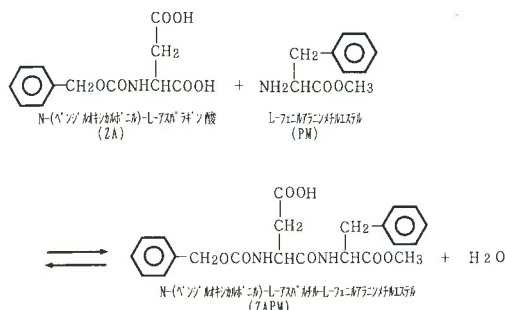


図1 アスパルテーム前駆体の合成

って、パーストラクションリアクターでは水相で合成された ZAPM は逐次有機相に抽出され、高い転換率を得ることができた。しかし PM の一部も有機相に抽出されるため有機相での ZAPM 純度は十分とはいえなかった。

### 3. パーストラクションシステムへの荷電膜の導入

荷電膜は一般にイオン交換、荷電分子や菌体等の選択的濾過分離に利用されており<sup>8)</sup>、アミノ酸、ペプチドの選択的濾過分離に関しては中島ら<sup>9)</sup>、Masawaki ら<sup>10)</sup>の報告がある。ZAPM 合成系において、酵素反応を行う pH 6 近傍では ZA が  $ZA^{2-}$ 、PM が  $PM^{+}$ 、ZAPM が  $ZAPM^{-}$  の状態となっているため、正荷電膜を用いた拡散透析による分離では、負荷電を持つ ZA、ZAPM は膜を透過することができるが正荷電を持つ PM は膜との静電的反発により膜を透過することができず原液側に保持される。その結果、正荷電膜を用いた拡散透析法では PM を原液側に保持することはできるが、ZA は ZAPM とともに抽出液側に移動してしまうため、抽出液側での ZAPM の純度は低いままである。

パーストラクションでは ZA が原液側に保持され、正荷電膜を用いた拡散透析では PM が原液側に保持されることから、著者らはパーストラクションに用いる膜に正荷電を持たせることにより、パーストラクションによる分離効果と荷電による静電的反発効果を同時に利用できないかと考えた (図 2)。すなわち液液抽出の効果により ZA を、荷電膜の効果により PM を水相に保持できれば、目的物質 ZAPM だけを選択的に有機相に抽出することが可能となる。これまでのパーストラ

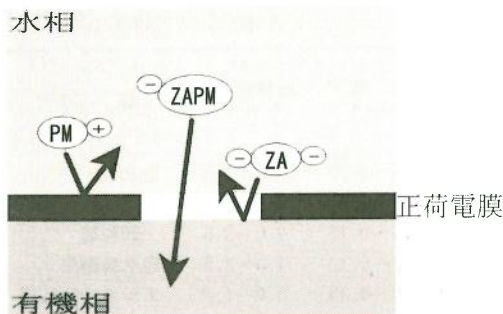


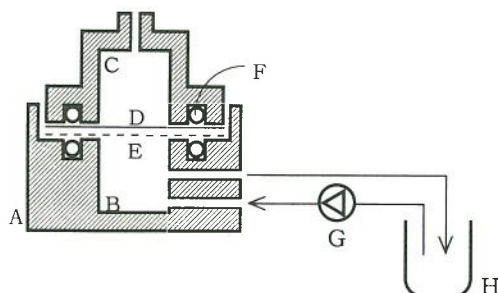
図2 本システムの分離メカニズム

クションに関する報告では膜は二相の隔壁または生体触媒の保持の役割を持っているが、膜の溶質に対する分離機能を積極的に用いた例はみられなかった。本システムは膜と溶質との電気的特性による分離をパーストラクションに組み込んだハイブリッド分離プロセスといえる。

### 4. 実験結果<sup>11)</sup>

実験には図 3 に示した装置を用いた。ステンレス製セルに荷電膜をはさみ、有機相 (tert-アミルアルコール) と水相 (McIlvaine 緩衝液) を接触させ、抽出を行った。水相は ZA、PM、ZAPM を溶解した後 pH 6 に調整し、チューブポンプにより循環させた。両相の物質濃度は HPLC により分析した。膜は旭硝子社製強塩基性陰イオン交換膜セレミオン 7 種を用いた (表 1<sup>12)</sup>)。

図 4 a, b はそれぞれ ASV, DSV を用いた場合の有機相濃度変化を示した。ASV を用いた場合は ZA、PM の有機相への抽出はみられず、ZAPM のみが有機相に抽出されており、本システムによる ZAPM の単独抽出が確認された。DSV を用いた場合では、ZAPM だけではなく PM の抽出がみられた。



A: ステンレス製セル, B: 下室 (水相), C: 上室 (有機相), D: 正荷電膜, E: ステンレスメッシュ, F: Oリング, G: ポンプ, H: 水相タンク

図3 実験装置

表1 供試膜および測定結果

膜名	膜厚 <sup>12)</sup> (mm)	面積抵抗 <sup>12)</sup> ( $\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ )	用途 <sup>12)</sup>	孔径 (nm)	透過速度 ( $10^{-9}$ m/s)		選択率 (-)	イオン交換容量 (mEq/g 乾燥膜)
					ZAPM	PM		
AMT	0.25~0.27	3.5~5.5	造水用	0.82	0.00	0.00	-	1.80
ASV	0.11~0.15	3.0~4.5	1価イオン選択脱塩	1.20	4.47	0.00	>1,000	1.95
AMV	0.11~0.15	2.0~3.5	一般脱塩	1.28	4.87	0.00	>1,000	2.14
ASS	0.11~0.13	1.5~2.5	海水濃縮用	1.30	3.80	2.20	1.7	1.93
AMP	0.13~0.15	3.0~4.0	アルカリ回収用	1.48	7.23	1.06	6.8	1.86
AAV	0.11~0.14	3.0~4.0	酸濃縮回収	2.46	5.72	0.92	6.2	0.07
DSV	0.13~0.17		拡散透析	2.68	15.6	3.13	5.0	2.08

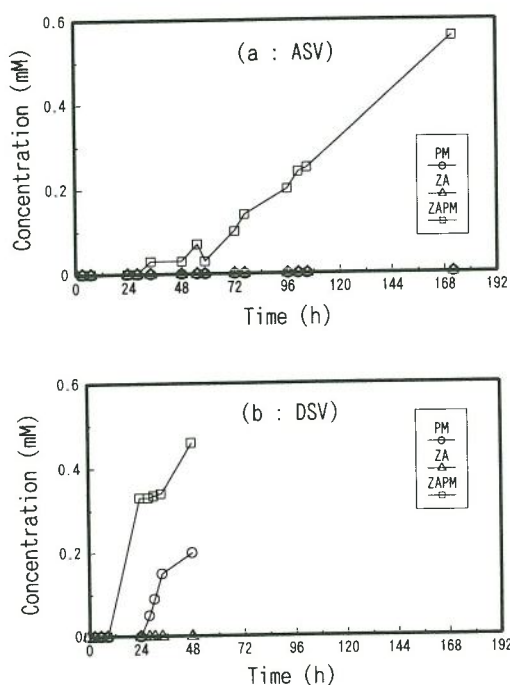


図4 有機相中の物質濃度変化

これは、DSVの荷電によるPM阻止効果がASVに比べ小さいことによると考えられた。一方、いずれの場合でもZAの抽出はみられず、液液抽出による分離効果は使用する膜に関係なく達成されているといえた。

各膜の孔径、物質透過速度、ZAPM選択率およびイオン交換容量の測定結果を表1にまとめた。最も孔径の小さいAMTではいずれの物質も透過しなかった。その他の膜では、イオン交換容量に大差はなかったが、孔径が小さいほど透過速度が小さく、選択率が高い傾向にあった。これは、膜構造が緻密であるほど物質が透過しにくい反面、荷電による阻止効果が大きいことを示している。膜孔径が大きくなるほど、孔内の荷電の及ばない領域が大きくなり、PMが反発を受けずに透

過してしまうため選択率が低下するものと思われる。一方、透過速度の低下は生産性の低下に直結するため、生産性と生産物純度とのバランスを考慮した膜の選択が必要となる。また、高い透過速度、選択率を両立させるためには膜厚が薄く荷電の強い膜が要求される。

## 5. おわりに

本システムでは液液抽出によりZAを、荷電膜の阻止効果によりPMを水相に保持し、目的物質ZAPMだけを選択的に有機相に抽出することが可能であった。こうしたハイブリッド分離システムでは複数の分離効果の組み合わせにより多成分混合系からの目的物質の選択抽出を実現できる。本システムは膜と溶媒の選択により、他の酵素反応系に対しても幅広い分離精製効果が期待され、応用の広い技術と考えられる。

## 文 献

- 1) 福井三郎 監修 (1988) バイオ生産物の分離精製, 講談社, p.1~12
- 2) 松本幹治 (1994) 食品膜技術懇談会第6回春季研究例会講演会講演要旨, 9-14
- 3) 松村正利 (1990) メンブレンリアクター 応用ハンドブック, サイエンスフォーラム, 257-262
- 4) Matsumura, M. and H. Markl (1984) *Biotechnol. Bioeng.*, 28 : 534-541
- 5) Hoq M. M., et al. (1985) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 62 : 1016-1021; (1985) *Agric. Biol. Chem.*, 49 : 335-342
- 6) McConville, F. X., et al. (1990) *Biocatalysis*, 167-178, Van Nostr and Reinhold, Australia
- 7) Isono Y., et al. (1995) *Process Biochem.*,

- 30:773-776
- 8) 永澤 満・滝澤 章 編 (1975) 水処理の高分子化学と技術(上)高分子膜, 地人書館, p.100~105
- 9) 中島忠夫ら (1992) 化学工学会 第57年会講演要旨集, 1:43; (1993) 化学工学会 第26回秋季大会講演要旨集, 3:72
- 10) Masawaki, T., *et al.* (1992) *J. Chem. Eng. Jpn.*, 25:708-715
- 11) Isono, Y., *et al.* (1995) *J. Membr. Sci.*, 105:293-297
- 12) 旭硝子(株), イオン交換膜「セレミオン」カタログ

## 国内情報

## 牛サイトカイン遺伝子プロファイルテストの開発

農林水産省 家畜衛生試験場北海道支場

伊藤隆司

RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 法により牛の各種免疫細胞における複数のサイトカイン (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ 及びGM-CSF) mRNAを検出する手法を確立した。このRT-PCR法によるサイトカイン遺伝子プロファイルテスト (Cytokine Profile Test: CPテスト) は細胞から分泌されたサイトカインを定量する技術よりも正確に免疫応答や病気の兆候をとらえられる可能性があり, 家畜の生体防御能の評価に極めて有効な技術となることが期待される。

## 1. はじめに

サイトカイン (cytokine) は各種細胞が産生する生体調節機構に関与する細胞間相互作用を担う分泌タンパクの総称である。サイトカインはホルモンや神経伝達物質とならんで情報伝達物質として重要であり, 特に免疫・炎症・造血系において重要な役割をはたす。サイトカインは複雑な免疫系をコントロールしており, 一つの病原体の侵入でも複数のサイトカインが放出され, また, 放出されるサイトカインにより病態がまったく異なってくる事実が明らかにされつつある。現在, 牛のサイトカインとしてはインターロイキン (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, インターフェロン (IFN)- $\gamma$ , 腫瘍壊死因子 (TNF $\alpha$ ), マクロファージ・顆粒球コロニー刺激因子 (GM-CSF), 顆粒球コロニー刺

激因子 (G-CSF) などをはじめとして数十種類のものが報告されている。ヒトあるいは実験動物であるマウスにおいては, サイトカインの検出法として生物活性測定のほか, 抗体を用いたELISAによる測定法が確立されている。また, 細胞・組織内でのmRNAの発現を検出する方法としてRT-PCR法が用いられており, RT-PCR法に必要な個々のサイトカイン特異的なプライマーセットも市販されている。1989年, Brennerらは, ヒトの複数のサイトカインmRNAの検出にRT-PCR法を応用し, その手法に対してcytokine MAPPING (message amplification phenotyping) という語を用いている<sup>1)</sup>。彼らはMAPPINGにより極めて少数の細胞あるいは組織から複数のサイトカインmRNAを検出しており, 応用面として健康組織あるいは病的組織におけるサイトカインmRNAの発現の特徴に基づき疾病の診断も可能であると言及している。一方, 牛のサイトカイン測定法は未だ十分確立されておらず, 研究開発途上にある。本稿では, RT-PCR法による牛

Ito Takashi



の複数のサイトカインmRNA検出法 (CPテスト) について紹介し, あわせてその応用面についてふれる。

2. RT-PCR法術式

RT-PCR法の術式を図1に示す。

1) 牛の各種免疫細胞 (末梢血単核球, 単球, リンパ球, 各組織マクロファージ, 乳汁

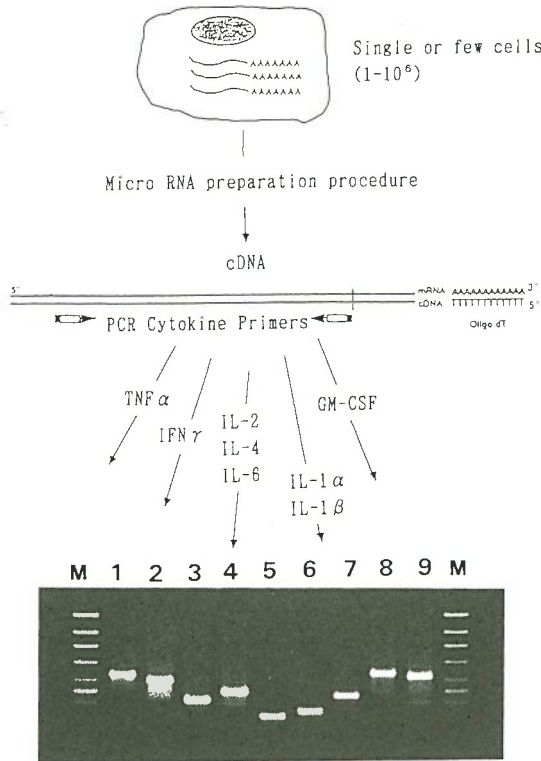


図1 RT-PCR法による牛サイトカインmRNAの検出  
 レーン1: IL-1α (424bp), 2: IL-1β (394bp),  
 3: IL-2 (307bp), 4: IL-4 (394bp), 5: IL-  
 6 (251bp), 6: IFNγ (270bp), 7: TNFα (325  
 bp), 8: GM-CSF (429bp), 9: β-actin (405  
 bp), M: φX174-Hinc II digest

中単核球など) あるいは組織片から poly (A)<sup>+</sup>RNA (または total RNA) を抽出した (単核球は一般に単球およびリンパ球の両者をいう)。

2) poly(A)<sup>+</sup>RNA (total RNA) をテンプレートとしてランダムプライマーと逆転写酵素によりcDNAを合成した。逆転写反応は 42°C, 15分で実施した。

3) 既に報告されている牛の各サイトカインcDNAの塩基配列をもとにプライマーを設計, 合成した。表1にプライマーの塩基配列

を示した。

4) 各サイトカイン特異的プライマーと TaqDNA合成酵素によりcDNAの一部を増幅した。PCR反応は熱変性95°C, 1分 (1回目は3分); アニーリング55°C (TNFαのみ60°C), 1分; 伸長反応72°C, 1分; サイクル数30-40で実施した。

5) PCR生成物は4%アガロースゲル電気泳動を行い, エチジウムプロマイド染色後, 写真撮影をした。

6) PCR生成物は制限酵素切断パターンあるいはシーケンス解析によりその特異性を確認した。必要に応じ, バイオイメージアナライザーにより半定量的解析を行った。

この条件により, まず, *in vitro*においてマイトジェン刺激時の牛末梢血単核球 (PBMCs) のCPテストを実施した。すなわち, 牛PBMCsを10μg/mlのリポポリサッカライド (LPS) あるいはコンカナバリンA (ConA) で4時間刺激した後, CPテストを実施した結果, LPS刺激した場合には, IL-1α, IL-1β, IL-6, TNFαおよびGM-CSF mRNAの有意な発現を認めた (図2)。また, ConA刺激した場合にはIL-2, IL-4, IFN-γ およびGM-CSF mRNAの発現を認めた。さらに, 牛肺胞マクロファージを同様に *in*

表1 プライマーの塩基配列

Gene	プライマー	PCR予想サイズ (bp)
IL-1α	sense 5'-CTCTCTCAATCAGAAGTCCCTTCTATG-3'	424
	antisense 5'-CATGTCAAATTTCACTGCCTCCTCC-3'	
IL-1β	sense 5'-AAACAGATGAAGAGCTGCATCCAA-3'	394
	antisense 5'-CAAAGCTCATGCAGAACCACCTT-3'	
IL-2	sense 5'-ACATTTGACTTTTACGGCCCAAG-3'	307
	antisense 5'-AATGAGAGCCACTTACTGATC-3'	
IL-4	sense 5'-CACAAGTGTGATATTACCTT-3'	339
	antisense 5'-GCTTCAACACTTGGAGTATT-3'	
IL-6	sense 5'-GACGGATGCTTCCAATCTG-3'	251
	antisense 5'-ACCCACTCGTTTGAAGACTGCATCTT-3'	
IFNγ	sense 5'-AATGCAAGTAGCCAGATG-3'	270
	antisense 5'-GATCTGCAGATCATCCACGG-3'	
TNFα	sense 5'-CAGAGGAAGAGTCCCAAGG-3'	325
	antisense 5'-CCTTGGTCTGGTAGGACT-3'	
GM-CSF	sense 5'-ATGTGGCTGCAGAACCCTGCTTCTCC-3'	429
	antisense 5'-CTTCTGGCTGGTCCAGCAGTCA-3'	
β-actin	sense 5'-ACGTGCGCTTGGACTTCGAGCAGG-3'	405
	antisense 5'-GCTGGAAGTGGCAGGAGGCCAGGA-3'	

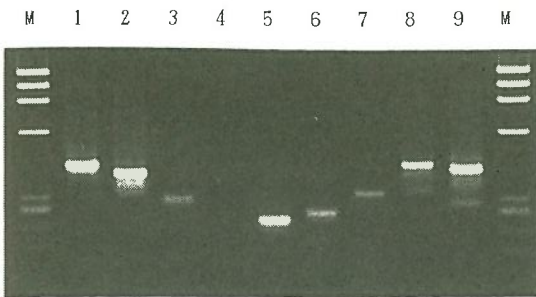


図2 LPS刺激した牛PBMCsにおけるサイトカイン mRNAの発現

レーン1: IL-1 $\alpha$ , 2: IL-1 $\beta$ , 3: IL-2, 4: IL-4,  
5: IL-6, 6: IFN $\gamma$ , 7: TNF $\alpha$ , 8: GM-CSF,  
9:  $\beta$ -actin, M:  $\phi$ X174-Hae III digest

*in vitro* において LPS 刺激した場合には IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  および GM-CSF mRNA の有意な発現を認めた。

### 3. サイトカイン遺伝子プロファイル テストの応用

RT-PCR法を用いた牛のサイトカイン mRNA 検出に関する報告は、これまで IL-2<sup>2)</sup>, IL-6<sup>3,4)</sup>, IL-1<sup>4,5)</sup>, TNF $\alpha$ <sup>6)</sup> に関するものなど数少ない。近年、我々<sup>7)</sup> および Covert ら<sup>8)</sup> によって複数のサイトカイン mRNA を同時に検出し、免疫応答をそれらの発現から解析する手法が報告されている。

これまで述べてきた、RT-PCR法によるサイトカイン mRNA 検出法 (CPテスト) の応用面としては次のものがあげられる。

① 生体防御能の評価法や健康状態検査法として利用できる。

例えば、ストレスをかけた牛がヘモフィルス肺炎に罹りやすくなる原因の一つは IL-2, IFN $\gamma$  産生能が低下するためであると言われている。また、ヨーネ病感染牛の血中白血球の IL-1 産生は病態悪化とともに亢進すると言われている。このように産生されるサイトカインの量、質の特徴は家畜の生体防御力や健康状態の指標となる。

② 新しいワクチンの設計や評価に応用できる。

例えば、有効なサルモネラワクチンは IFN $\gamma$  を誘発し、細胞性免疫を誘導しうが、無効なワクチンは IL-4 しか誘発しないと言われている。したがって、ワクチン接種にお

いて CP テストによりワクチンの効果判定ができる可能性がある。

③ サイトカインと病態の関係が明確になる。

様々な疾病において病態形成とサイトカインの関連を解析できる。その結果、例えば、炎症時における組織障害が過剰に産生されたサイトカインによるものであることが判明すれば、サイトカインの発現をコントロールすることによる治療法が考えられるであろう。

### 4. 乳房炎とサイトカイン: CP テスト

以下には、特にサイトカインと病態について、乳房炎を対象として解析した結果の一部を紹介する。すなわち、乳房炎の炎症とサイトカインの関係を CP テストにより解析した。炎症は異物、病原体などの排除や、損傷を受けた組織の修復を目的に起こる生体の防御反応のひとつである。サイトカインは炎症の各局面で重要な役割を果たしていると考えられており、いわゆる炎症性サイトカインとして IL-1, IL-6, IL-8 および TNF $\alpha$  などがあげられる。さらに、これらのサイトカインの産生を抑制するサイトカインとして IL-4, IL-10 および IL-13 などが知られている。

乳房炎罹患分房7例と健康分房10例から乳汁中単核球を分離し、IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  および IL-10 mRNA の発現について調べた。表2に示すように、IL-1 $\beta$  に関しては乳房炎分房の100% (7例中7例)、健康分房では20% (10例中2例) に発現が認められた。また、IL-6, TNF $\alpha$  についても乳房炎分房においては高率に発現を認めた。さらに、IL-10 については乳房炎分房で100%、健康分房においては70%であり、ともに高率に発現が認められた。以上のことから、乳房炎においては明らかにこれらサイトカインが炎症と深く関わっていることが示された。

これまでの解析により、乳房炎分房の乳汁中単核球における CP テストの結果は、一般的には図3に示すようなプロファイルである。すなわち、炎症性サイトカインである IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, および TNF $\alpha$  の発現を認め

表2 乳房炎罹患分房におけるサイトカイン mRNA 発現

サイトカイン		No.	++	+	-	陽性率
IL-1 $\beta$	Mastitis gland	7	7	0	0	100%
	Normal gland	10	0	2	8	20%
IL-6	Mastitis gland	7	4	2	1	86%
	Normal gland	10	0	1	9	10%
TNF $\alpha$	Mastitis gland	7	3	3	1	86%
	Normal gland	10	0	2	8	20%
IL-10	Mastitis gland	7	6	1	0	100%
	Normal gland	10	2	5	3	70%

(++) : 10,000vol.  $\leq$  (+) : 10,000vol.

(-) : Negative

イメージアナライザー (BIO-PROFIL : MS機器) OPTICAL DENSITY 解析による便宜上の単位 (vol.)

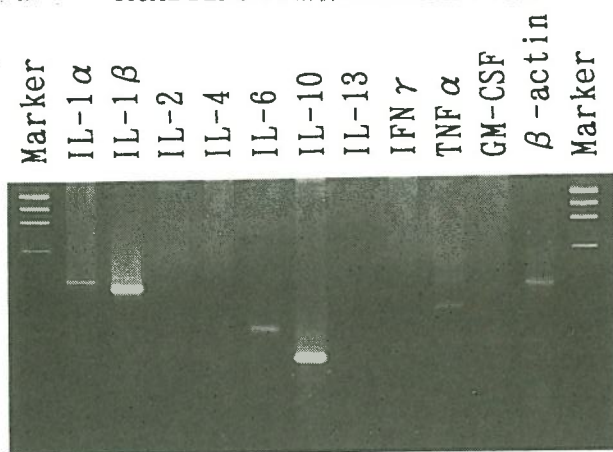


図3 乳房炎分房の乳汁中単核球におけるサイトカインmRNAプロファイル

さらに抑制性サイトカインのうち IL-10の発現を認める。

今後、解析例数を増やし、乳房炎の炎症のステージ (炎症の初期であるのか、あるいは慢性期にあるのか)、あるいは乳房炎起因菌別によるサイトカイン発現の特徴等を解析したいと考えている。

### 5. おわりに

近年、海外畜産先進国では組換え体サイトカインを感染症防除に応用する技術の開発研究が活発にすすめられている。種々の感染症に対してサイトカインを予防あるいは治療法として応用することが試みられている。予防にサイトカインを使う場合に重要なことはどのような場面で使用するかということである。

すなわち、生体防御能が未熟かあるいは低下している易感染期に使用することが望ましいと考えられる。下痢や肺炎の多発する哺育期、乳房炎の頻発する分娩前後、さらにストレスのかかる輸送時などが予防的投与の時期であろう。また、サイトカインの治療への応用についてはヒトの場合は既に数種のサイトカインが臨床応用されている。例えば、ウイルス性肝炎の治療に IFN、貧血の治療にエリスロポエチン (EPO)、好中球減少症の治療に G-CSFなどが使用されている。家畜においては有効なサイトカイン療法といわれるものはほとんどなく、これからの研究開発による。特に抗炎症作用についてのサイトカインの応用についていえば、炎症における組織障害を抑制性サイトカインの投与により軽減することが可能であろう。本稿で紹介したCPテストをこのようなサイトカインの予防あるいは治療的使用に際しての個体のサイトカイン発現状態チェック法として使用したいと考えている。

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」(バイオメディア計画)によって行われたものである。

### 文 献

- 1) Brenner, C. A. *et al.* (1989) *Biotechniques*, 7 : 1096-1103
- 2) Heussler, V. T. *et al.* (1992) *J. Immunol.*, 149 : 562-567
- 3) Mathialagan, N. *et al.* (1992) *Mol. Reprod. Dev.*, 32 : 324-330
- 4) Kato, N. and T. Ito (1995) *Res. Vet. Sci.*, 59 : 41-44
- 5) Ito, T. and M. Kodama (1994) *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 40 : 93-103
- 6) Bienhoff, S. E. and G. K. Allen (1995) *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 44 : 129-140
- 7) Ito, T. and M. Kodama (1996) *Res. Vet. Sci.*, 60 : 94-96
- 8) Covert, J. and G. Splitter (1995) *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 49 : 39-50



# ヒアシンス花被外植片から再分化した花の特性

— 香氣成分とアントシアニン成分を指標として —

(財)岩手生物工学研究センター

細川敬三

ヒアシンスの花被外植片から生殖器官である花を再分化させた。再分化した花（以後、再分化花と記す）の特性を知るために、まず、花で特異的に生成する二次代謝産物（香氣成分とアントシアニン成分）を指標として天然の花と比較を行なった。香氣成分はほぼ同じ成分が、アントシアニンでは全く同じ成分が生成していることから天然の花と同じ二次代謝系が働いていることが明らかとなった。次に、アントシアニンを生成する花被の細胞層について比較した結果、再分化花は天然の蕾の生育初期のステージに相当するものと推定することができた。また、花で特異的に生成する二次代謝産物を花器官培養により生産できることを示唆することができた。

## 1. はじめに

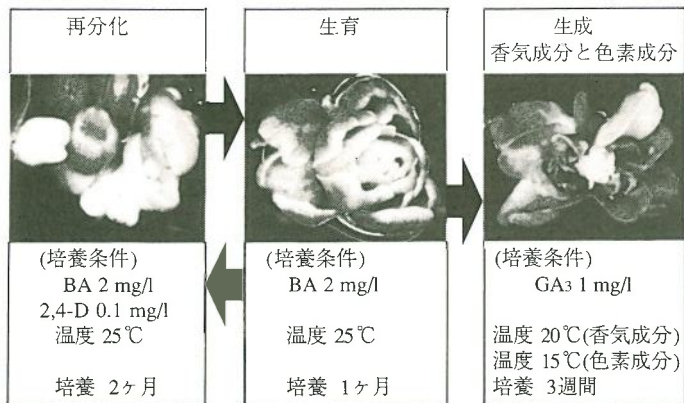
植物の組織培養による植物体の再分化は植物種により難易の差はあるものの多くの植物でコントロール可能になっている。また、生殖器官である花の *in vitro* での再分化はこれまで51属65種で報告されている<sup>1)</sup>。しかしながら多くの場合、細胞からの直接的な再分化ではなく、栄養生長している茎頂が生殖生長へ転換することにより *in vitro* で花序が形成されたものである。一方、直接的な花器官の再分化は tobacco<sup>2-7)</sup>, *Crocus*<sup>8-13)</sup>, *Hyacinthus*<sup>14,15)</sup> で報告があるだけである。*Crocus* においては物質生産の観点から再分化した雌蕊で生成する crosin, picrocrosin, safranal について母植物との比較が行なわれ、同じ成分が生成することが報告されている<sup>10,11)</sup>。

著者は、直接的に再分化した花が天然の花と同じ特性を維持しているならば、花で起こっている現象を解明するための培養系の一つになりうると考え、再分化花の特性を知るために高い再現性で直接的な花芽分化（無柄花形成）を行うことができる *Hyacinthus* の花器官の再分化系を用い、花で特異的に生成する香氣成分とアントシアニン成分を指標として天然の花と比較を行ない、その特性を明かに

した。

## 2. 香氣成分

ヒアシンス花被外植片から花を再分化し、その再分化花に香氣成分を生成させ（図 1）、天然の花の開花前期および後期の香氣成分と比較した<sup>16)</sup>（表 1）。再分化花で検出された成分は9成分であるのに対し、天然の花の開花前期で6成分、後期で10成分であった。これらの成分のうち4成分（1-hepten-3-ol, benzyl alcohol, phenethyl alcohol, cinnamyl alcohol）が3者で共通に検出された。再分化花の主成分は phenethyl alcohol であるのに対し、天然の花は phenethyl alcohol と cinnamyl alcohol であった。また、再分化花の主成分である phenethyl alcohol は3者でほぼ等量生成していた。一方、エステル類（いずれも酢酸エステルであった）は天然の花の前期で 7.2 μg/g fresh weight, 後期では 38.5 μg/g fresh weight に対し、再分化花では 11.6 μg/g fresh weight と開花前期の生成量に近かった。このように、香氣成分の生合成系は再分化花でも天然の花と同様に発現しているものと思われた。また、再分化花の香氣成分の含有量は開花後期の花の約65%とやや含有量は低いものの、組織培養による生産が難しい花の香氣成分の生産を花器官の再分化系を用いた培養により生産することがで



培地: MS 培地, 30 g/l ショ糖, 0.5 g/l カザミノ酸, 8 g/l 寒天, pH 5.7 - 5.8

図1 ヒアシンス花被外植片からの花の再分化と再分化花における香り成分とアントシアニン成分の生成のための培養条件

表1 ヒアシンスの再分化花と天然の花で検出された香り成分とその含有量

香り成分	含有量 [ $\mu\text{g/g}$ fresh weight (%)]		
	再分化花	天然の花	
		開花前期	開花後期
1. 1-Pentanol	1.3 (0.7)		
2. 4-Hexen-1-ol	1.1 (0.6)		
3. 1-Hepten-3-ol	3.1 (1.7)	26.8 (12.5)	6.0 (2.1)
4. Benzaldehyde			2.1 (0.7)
5. Phenylacetaldehyde		7.0 (3.3)	5.8 (2.0)
6. Benzyl acetate		7.2 (3.4)	6.6 (2.3)
7. Benzyl alcohol	9.0 (4.9)	5.7 (2.7)	4.5 (1.6)
8. Phenethyl alcohol	139.4 (75.4)	117.9 (55.3)	136.9 (48.1)
9. 3-Phenyl propanol			3.6 (1.3)
10. Unknown-1			4.7 (1.7)
11. Cinnamyl acetate	5.0 (2.7)		
12. Cinnamyl alcohol	1.1 (0.6)	48.7 (22.8)	82.5 (29.0)
13. Unknown-2	18.2 (9.8)		
14. Benzyl benzoate	6.6 (3.6)		31.9 (22.2)
含有量	184.8 (100)	213.3 (100)	284.6 (100)

きることを示すことができた。

### 3. アントシアニン成分

再分化花にアントシアニンを生成させ（最適温度条件が異なる点を除き、香り成分の場合と同じ条件であった、図1）、開花中の天然の花のアントシアニン成分と比較した<sup>17)</sup>。生成したアントシアニンは単離後、スペクトル解析（UV-Vis, FAB-MS, NMR）により構造決定した<sup>18)</sup>。両者で検出した成分は7成分（図2）で、その成分比もほぼ同じであることがわかった（表2）。したがって、再分化花では天然の花と同じアントシアニン生合成系が発現しているものと思われる。

### 4. アントシアニンを生成する細胞層

両者の花で同じようにアントシアニンが生成していることが明らかとなったので、花被のどの細胞層でアントシアニンが生成しているかについて調べた<sup>19)</sup>。圃場で開花した花の花被ではL2層の細胞で生成しているのに対し、再分化花の花被（以後、再分化花被と記す）では主にL1層の細胞で生成していた（図3）。では、再分化花被で天然の花被と同じようにL2層の細胞だけでアントシアニンを生成させることができるのだろうか。そこで、種々の培養条件（植物生長調節剤の種類と濃度、ショ糖濃度、温度条件等）について

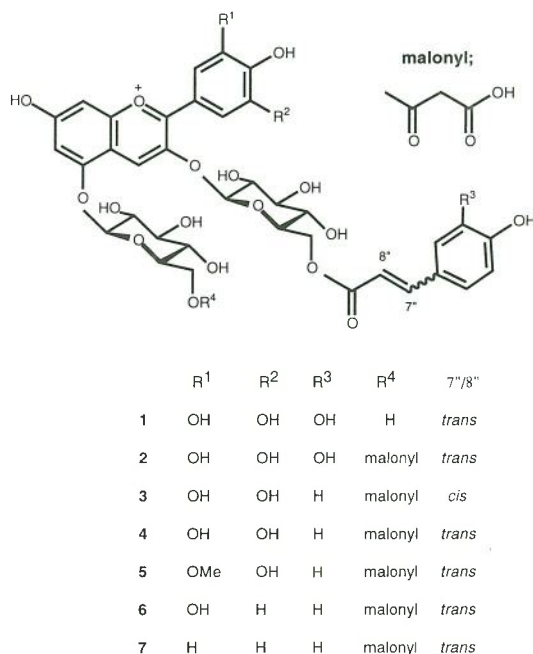


図2 ヒアシンスの再分化花および天然の花で検出されたアントシアニン成分の構造式

表2 天然の花および再分化花で検出されたアントシアニンの量

アントシアニン <sup>a</sup>	アントシアニン量 [ $\mu\text{g/g}$ fr. wt. flowers (%)]	
	再分化花	天然の花
1	14.5 (3.3)	18.4 (5.4)
2	0.9 (0.2)	0.7 (0.2)
3	15.8 (3.6)	7.1 (2.1)
4	347.2 (78.9)	281.9 (82.9)
5	19.8 (4.5)	19.0 (5.6)
6	36.1 (8.2)	8.8 (2.6)
7	5.7 (1.3)	4.1 (1.2)
含有量	410	340

<sup>a</sup> アントシアニンの番号は図2の番号に一致する

検討したが、いずれの条件においてもその生成は主にL1層の細胞であり、再分化花被でアントシアニンを生成する細胞層は天然の花被とは異なっていた。

では、天然の花被がL1層の細胞でアントシアニンを生成する能力を本来持っているのであろうか。そこで、生育ステージの異なる蕾（9月に購入した球根を10°Cで0~10週間処理し蕾を生育させた）を無菌的に調製しGA<sub>3</sub>有無の培地で培養したところ、生育初期の蕾だけがGA<sub>3</sub>の効果によりL1層の細胞でもアントシアニンを生成することが明らかとなった（表3）。このことから再分化花は天然の蕾の生育初期のものに相当すると考えられた。

5. おわりに

以上述べたように、ヒアシンスの再分化花は天然の花と同じ二次代謝系を発現していることを明かにすることができ、花で特異的に生成する二次代謝産物の花器官培養による生産の可能性を示すことができた。また、アントシアニンを生成する細胞層を比較することにより再分化花の特性を特徴づけることができた。このことから、ヒアシンスの再分化系は花器官で起こっている現象を解明するための培養系の一つとして用いることができるものと思われる。

文 献

1) Dickens, C. W. S. and J. van Staden (1988) *S. Afr. J. Bot.*, 54 : 325-344  
 2) Haccius, B. et al. (1974) *J. Exp. Bot.*, 25 : 695-704  
 3) Hicks, G. S. (1975) *Can. J. Bot.*, 53 : 77-81  
 4) Hicks, G. S. (1979) *Plant Sci. Lett.*, 17 : 81-89  
 5) Hicks, G.S. and A. McHughen (1974) *Planta*, 121 : 193-196  
 6) Katoh, N. and S. Iwai (1991) *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 26 : 7-10  
 7) Matsuzaki, T. et al. (1984) *Plant Cell Physiol.*, 25 : 197-203  
 8) Fakhrai, F. and P. K. Evans (1989) *J. Exp. Bot.*, 40 : 809-812

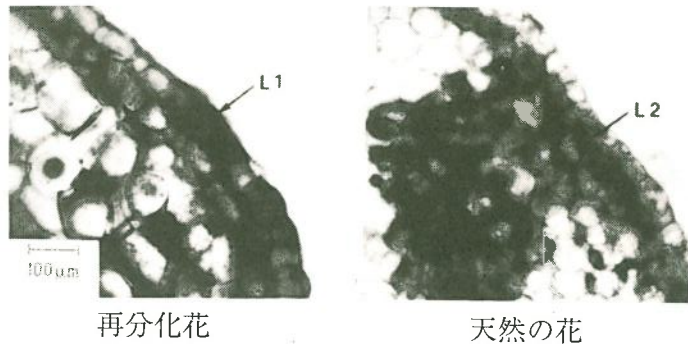


図3 再分化花と天然の花におけるアントシアニン生成細胞

表3 花芽形成後10°Cで0から10週間処理した球根から調製した蕾の花被におけるアントシアニン生成細胞

低温処理期間 (週)	アントシアニン生成細胞 <sup>a</sup>	
	+GA <sub>3</sub>	-GA <sub>3</sub>
0	nd <sup>b</sup>	nd
1	L1, L2	nd
2	L1, L2	nd
3	L1, L2	L2, (L1)
4	L2, (L1) <sup>c</sup>	L2
5	L2, (L1)	L2
6~10	L2	L2

<sup>a</sup> 調製した蕾をGA<sub>3</sub>(1mg/l)有無の培地で15°C, 3週間培養した  
<sup>b</sup> アントシアニンの生成が観察されなかった  
<sup>c</sup> 括弧はL1細胞の一部でアントシアニン生成が観察されたことを示す

9) Fakhrai, F. and P. K. Evans (1990) *J. Exp. Bot.*, 41 : 47-52  
 10) Himeno, H. and K. Sano (1987) *Agric. Biol. Chem.*, 51 : 2395-2400  
 11) Koyama, A. et al. (1987) *Shoyakugaku Zasshi*, 41 : 226-229  
 12) Namera, A. et al. (1987) *Shoyakugaku Zasshi*, 41 : 260-262  
 13) Sano, K. and H. Himeno (1987) *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 11 : 159-166  
 14) Lu, W. et al. (1988) *Planta*, 175 : 478-484  
 15) 福永行雄 (1991) 植物バイオテクノロジー-II: ヒアシンス花被外植片からの花芽分化誘導と花器官形成, pp. 29-38, 山田康之・岡田吉美 編, 東京化学同人  
 16) Hosokawa, K. and Y. Fukunaga (1995) *Plant Cell Reports*, 14 : 575-579  
 17) Hosokawa, K. et al. (1996) *Phytochemistry*, 41 : 1531-1533  
 18) Hosokawa, K. et al. (1985) *Phytochemistry*, 38 : 1293-1298  
 19) 細川敬三ら (1995) 日本農芸化学会誌, 69 (臨時増刊号), p.268



## 深層水の冷熱利用による魚類飼育試験について

高知県海洋深層水研究所

山口光明

深層水の冷熱を利用して深海性のメダイ、冷温性のホシガレイ、温水性のヒラメおよびトラフグ（夏期のみ深層水冷熱を利用）の飼育を行った。その結果、1年間の成長は他機関で行われた飼育の成長に比べて良好であった。特にヒラメについては、1年間で平均1kgに達した。また、各魚種ともに高い歩留まりを示した。この原因は深層水の特性によるものと考えられた。

### 1. はじめに

深層水の研究は、科学技術庁のアクアマリン計画の「海洋深層資源の有効利用に関する研究」に始まる。当計画において高知県が陸上型、富山県が海上型の深層水の研究海域として指定を受ける。深層水の研究は米国のハワイ島では大規模に行われているが、本邦において、深層水の陸上型の研究施設が設置されたのは高知県がはじめてである。2年間の海域調査後、平成1年に研究所が開設され、本格的な研究を開始した。研究は産・学・官体制で取り組んでおり、それぞれ深層水の要素技術の開発に当たっている。高知県としては深層水を利用した大型海藻のマコンブの培養や深海性のメダイの飼育の研究を当初の4年間実施した。その後、平成5年度からは深層水栽培漁業技術開発の中の親魚養成に取り組んでいる。目標としては、養成親魚からの健全な卵の採集技術開発である。ここでは、その途中経過として深層水の冷熱利用による魚類の成長について述べる。

### 2. 飼育魚の成長

各飼育魚の成長および飼育水温を図1～7に示した。

#### (1) メダイ

図1にメダイの各成長度を示した。

メダイの飼育水温は深層水によって13.4°C

に保った。

図1から、当才魚においては当飼育魚の成長が優れていることがわかるが、1.5年後にはその成長は鈍化した。その原因は飼育槽の狭隘によるものと思われた。

#### (2) ホシガレイ

図2に成長を、図3に飼育水温をそれぞれ示した。

飼育水温は適温といわれている18°Cをできるだけ維持するようにした。

成長に関する十分な資料を検索できなかったために1年後の体重のみで比較した。その結果、文献による魚体重は225gに対し、当飼育魚は337gで約100gほど成長がよかった。

なお、現在満2才魚になっているが、ホルモン処理によって少量の受精卵を得ている。

#### (3) ヒラメ

図4に成長を、図5に飼育水温を示した。

飼育水温は夏期の間20～24°Cに深層水によって維持した。

当飼育魚は文献によるヒラメの成長と比較すると格段に優れており、1年間に1kgに達した。また、現在満2才魚になっているが、それから、十分な受精卵を得ている。

#### (4) トラフグ

図6に成長を、図7に飼育水温を示した。

夏期の水温を深層水によって23°C以下に保った。成長は文献のそれよりもすぐれ、特に冬期における成長の停滞が見られなかった。

以上、メダイ、ホシガレイ、ヒラメ、トラフグについて、その成長を文献の成長と比較

YAMAGUCHI Mitsuaki

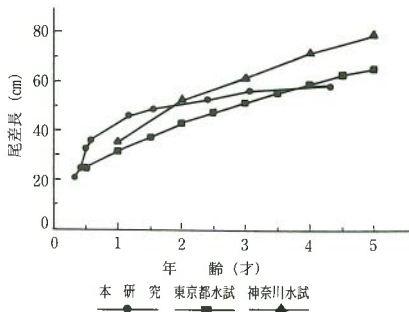


図1 飼育下及び天然におけるメダイの成長の比較

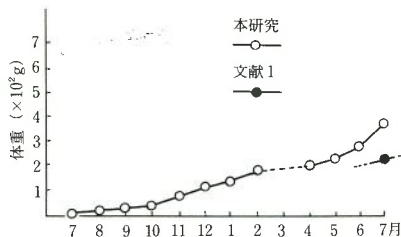


図2 ホシガレイの成長

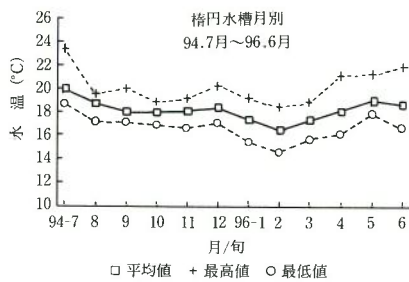


図3 ホシガレイ飼育水温

したが、いずれの魚種も優れていた。中でも、ヒラメとトラフグは成長度が大きい。その原因として、深層水による夏期の水温制御が挙げられる。この水温制御は深層水を冷熱として使用することにより簡単にできる。深層水利用の最大のメリットであったと思われる。

なお、成長度は対照区をおき、それとの比較が通例であるが、今回はやもえず、文献の成長度と比較した。また、成長度には給餌量や収容密度も相関するが、本研究では飽食量とし、水槽は0.5~3tを使用した。

### 3. 異体類の高生残率について

異体類であるヒラメ、ホシガレイの生残率が95~100%と非常に高い値であった。この

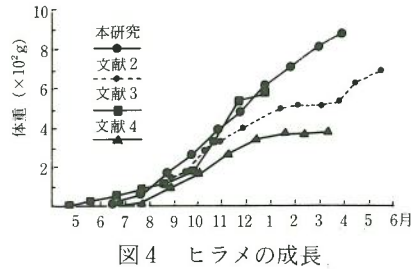


図4 ヒラメの成長

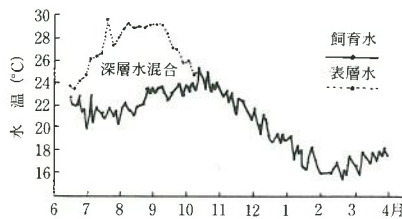


図5 ヒラメ飼育水温

要因として深層水の冷熱による水温制御が大きな貢献をしたと思われたが、その他にも深層水の特徴が関与したと考えられた。すなわち、深層水の持つ生物活性が関与したと考えられた。水の活性の指標として水のクラスターをNMR-0<sup>17</sup> (25°C) で測定し、そのクラスターの大小で比較されている。今回それによる測定の結果、表層水が半値64、深層水が半値70とクラスターの大きさでは表層水がむ

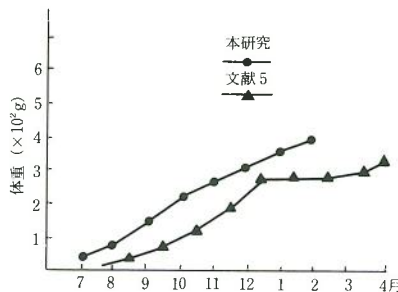


図6 トラフグの成長

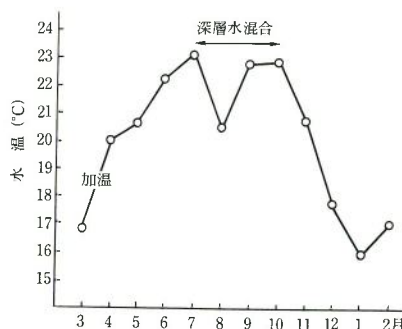


図7 トラフグ飼育水温 (平均)

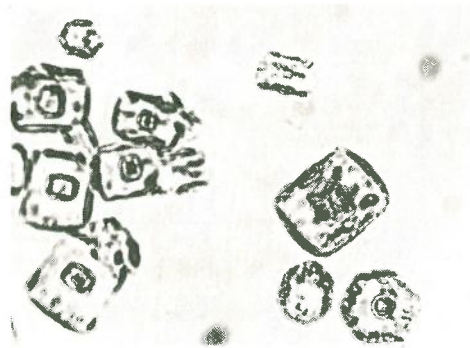


写真1 珪酸カルシウム (?) の樽状の結晶



写真2 カルシウム成分が離脱した珪酸の外殻

しろ小さい。しかし、熱膨脹率（海水 1 ml を 18cm のメスピペットに吸引後 92°C に加温）をみると表層水よりも、深層水の方が少し小さい。したがって、二つの測定結果から、クラスターでは世界の長寿村の半値 80 に近いことおよび生物活性水で観察される熱膨脹率の低さの二点から表層水より深層水の方が生物活性が優れていると推察される。このことが異体類のヒラメ、ホシガレイの高い生残率に寄与したものと推察された。

つぎに生物活性をもたらす溶存成分として陸上では珪素が注目されている。表層水と深層水の珪素の含有量を表 1 に示した。

この表 1 から珪素の季節変動はあるが、その含有量は深層水が表層水より 3~10 倍含ま

表1 表層水と深層水の珪素含有量の比較  
( $\mu\text{g} \cdot \text{at}/\text{l}$ )

調査月日	4/22	7/20	10/26	2/10	4/20
表層水	4.3	18.9	12.1	26.4	21.4
深層水	47.0	80.5	142.8	62.0	60.5

れている。珪素の海水中での化学形は、 $\text{Si}(\text{OH})_4$  であるが、濃縮していく過程で海水中の金属イオン特に Ca や Mg イオンと結合する。川田<sup>8)</sup> は岩石の分析からシリケート四面体は、あらゆる金属を纏っているという。その様子を深層水で観察した。それを写真 1, 2 に示した。すなわち、はじめは Ca 成分を纏った樽状の結晶であるが、それを溶かすと Ca 成分が離脱して珪酸体の骨格のみが残る。このことと前表の珪素が深層水中多く含まれるという二点を考えあわせると深層水中には、シリケート四面体に金属が配置したものが表層水より多く溶存していると考えられる。このシリケート四面体は単体の金属元素に比べると触媒能が  $10^4 \sim 10^5$  倍も高いということから、深層水は表層水より生物活性が高いと推察される。したがって、深層水の生物活性の高さがヒラメ、ホシガレイの高い生残率を誘因したものと思われた。

#### 文 献

- 1) 1 都 3 県水産試験場底魚資源調査グループ (1975) 水産研究叢書 Vol. 28, キダイとその他底魚類の資源生態, 日本水産資源保護協会
- 2) 東京都水試 (1972) 昭和 46 年度 底魚資源調査研究報告書
- 3) 津崎龍雄 (1995) 水産増殖, 42(2)
- 4) 二川正敏 (1984) 養殖, 21(7): 84-88
- 5) 鈴木吉典 (1992) 平成 2 年度静岡温水研業務報告, 73-77
- 6) 谷口朝宏 ら (1987) 鳥取栽試事報, 5: 31-41
- 7) 佐野隆三 (1986) 浅海養殖, 290~309
- 8) 網 和久 (1995) 工業材料, 43(12)
- 9) 綿抜邦彦・久保田昌治 (1994) 新しい水の科学と利用技術, p.168~175



## 文献情報

ラクトフェリン：  
分子構造と生物学的機能

ラクトフェリン (LF) は、哺乳動物の乳汁に存在する鉄結合性の糖タンパク質である。牛乳中の LF の含量は約 400mg/l と決して高くはないが、近年の乳業における分離精製技術の進歩により牛乳由来の LF が工業的に生産され、育児用ミルク、化粧品あるいは動物用食品などに使用されている。また、ヒトの LF がかび・酵母などの微生物あるいはトランスジェニックアニマルなどで既に生産されており、その医薬品等への応用が検討されている。本論文は LF について、発見の経緯、分布、分子化学的性質、生物学的機能に関する従来の知見を纏めたものである。

LF は、その名の示す通り、乳汁 (牛乳) 中に発見され、その後多くの哺乳動物の乳汁に存在すること、また、乳汁以外にも唾液、胆汁、涙液、涙液などの外分泌液、あるいは、好中球にも存在することが明らかにされている。その構造については、アミノ酸配列や糖鎖構造、立体構造が既に解明されている。一方、生物学的機能に関しては、腸管における鉄吸収調節作用、抗菌作用、免疫賦活作用、細胞増殖調節作用などが指摘されている。これらの作用については多くの *in vitro* の研究はあるが、*in vivo* で証明された例が少ない。

腸管における鉄吸収調節作用に関しては、母乳中の鉄含量が極めて低いにもかかわらず母乳栄養児は鉄欠乏をおこさないということから、LF が鉄吸収を促進するという考え方がなされてきた。しかし、LF を添加した育児用ミルクにおける鉄吸収試験では促進および阻害の両方の作用が報告されており、また、LF を除いた母乳からの鉄の吸収率と未処理の母乳からのそれを比較すると、4 か月齢以上の乳児では前者が高く、3 か月齢の乳児では後者が高いという試験結果も得られている。これらの矛盾した結果が出ている背景について、著者は鉄吸収試験の複雑さをあげ、LF の鉄吸収促進あるいは阻害作用に関しての結論を出すには、さらに信頼性のある試験を実施することが必要であると指摘している。

LF の抗菌作用としては、鉄結合能が関与する静菌作用と、直接、微生物を攻撃する殺

菌作用がある。後者についてはグラム陰性菌の細胞壁の LPS を放出する機構、大腸菌の porin に結合して膜透過性を変化させる機構、あるいは分子上の抗菌性ペプチド部位が直接微生物の細胞膜に結合して膜を破壊する機構などが報告されている。また LF は母乳栄養児におけるビフィズス菌優位の菌叢形成に寄与するが、これは LF だけではなく、分泌型 IgA, リゾチーム, クエン酸, 炭酸などの共同作用により発揮される作用である。

先天的あるいは後天的な LF 欠損症患者は感染症に繰り返し罹ることから、LF には免疫系を介した感染防御作用があると考えられる。動物では感染時に好中球からの LF の放出が有意に増加し、単球/マクロファージ系にリセプター様のメカニズムで結合し、これらの細胞を活性化することが示唆されている。例えばヒト単球の LF に対する親和性は非常に高く、結合定数は  $(4.5 \times 10^{-9} \text{M})$  である。

LF の細胞増殖作用は、種々の細胞で検討されているが細胞種によって様々な結果が報告されている。例えば、ラットの cript cell では、鉄結合の如何にかかわらずヒト LF に増殖作用が認められたが、BALB/c 3T3マウスの胚、ラット新生仔の肝細胞ではヒトおよびウシ LF の鉄飽和細胞のみが増殖作用を示した。また、MAC-T (ウシ乳腺上皮細胞) では LF は阻害作用を示しており、LF の作用の複雑さを示している。

以上のとおり、LF については多彩な機能が示唆されているが、その多くが最終的な結論を出すには至っていない。しかし、NIH が *in vivo* の研究を援助する動きなどもあり、今後の発展が期待される。

(抄訳 高瀬光徳—森永乳業栄養科研究)

(TAKASE Mitsunori)

## Lactoferrin: Molecular structure and biological function

Lonnerdal, B. and S. Iyer

*Annual Rev. Nutrition*, 15: 93-110 (1995)

## 文献情報

生理的な条件とは何か—  
ラットにおけるグルコース吸収  
に対する手術と麻酔の影響

栄養素などの吸収について研究するにあたって、より詳細な機構を解析するために培養

細胞や再構成膜小胞などを用いる実験系が用いられる。より生理的な状態を反映するためには実験動物を利用する系が用いられる。伝統的な動物の系としては、麻酔下のラットを開腹して小腸を露出させた状態にし、十二指腸からサンプルを投与して小腸の下部で回収する系（小腸をループ状にして灌流する、以下灌流ループ法）がある。場合によっては小腸の血液も灌流される。これは通常サンプルの投与量から回収量を引いた値を補正したものを管腔内からの消失すなわち吸収とみなして、その速度などから吸収機構を解明しようという実験系である。これを用いた研究によって、小腸でのグルコースの吸収は腸管内での濃度が非常に低いときでも輸送体を介する能動輸送よりも輸送体を介さない受動拡散が大きな割合を占めると発表されている。

これに対し、Uhing と Kimura は新しい実験動物の系を確立し、グルコースの吸収はやはり大部分能動輸送によるということを示す結果を発表した。この経緯は *Nature* (376: 117-118, 1995) にも紹介された。

この方法は、吸収されたグルコースが小腸吸収上皮細胞を通過して血管に入り、門脈から肝臓を経て大動脈に入る、という流れを利用している。つまり、この系は吸収された物質の血中濃度をもとに吸収率を割り出すのだが、この換算のために、dual-infusion method（二重投与法）を用いる。吸収率を求めたい物質を放射性同位体（例えば<sup>3</sup>H）で標識して小腸へ投与し、同時に異なる標識（例えば<sup>14</sup>C）をした同じ物質を門脈へ定常的に投与する。小腸へ投与された物質（<sup>3</sup>H）は門脈を過ぎると途中肝臓で貯蔵されるなど大動脈に達するまで門脈に投与されている物質（<sup>14</sup>C）と同じ経緯を経る。このため、2つの放射性同位体の大動脈中の濃度の増加の比率にあらかじめわかっている（<sup>14</sup>Cの）門脈への投与率をかけると、（<sup>3</sup>Hの）小腸での吸収率が求められる。

サンプル投与、採血用のチューブは、針を用いて血流などを阻害することなく門脈、大動脈、消化管に配置され、シアノアクリル接着剤を用いて永続的に固定してある。そのため実験に用いる時点ではラットは麻酔下ではなく過剰な拘束もされていない。手術自体による影響が抑えられるうえ、多数の一連の実験について同じ個体をコントロールとして再利用することが可能である。

この方法により著者らは、自然に存在するD-グルコースと、鏡像体で輸送体を介さずに吸収されるL-グルコース、輸送体を介して取り込まれるが代謝されない3-O-メチルグルコース（3-O-MG）を用いて以下のことを明らかにした。

第一に、麻酔と手術によってグルコースの吸収は抑制される。麻酔だけでも27%の抑制、さらに（灌流ループを調製するなど）小腸に手を加えると86%の抑制が起こった。また、手術4時間後でもまだ62%に抑制されたままで、翌日まで回復しなかった。小腸絨毛と管腔内液の境界である不攪拌層の抵抗を補正しても、手術後24時間以内では吸収は非常に低かった。

第二に、先に述べたようにD-グルコース吸収の大部分は能動輸送よりむしろ受動拡散による、という主張については、管腔内の濃度が非生理的に高い状態になっても、94%以上のD-グルコースの吸収は能動輸送によることがわかった。

つまり麻酔と手術は、受動拡散には影響することなく能動輸送を阻害し吸収を実際より非常に低くしていたことになる。著者らはグルコース以外の能動輸送される物質も同じような麻酔や手術の影響を受けているだろうと述べている。

（室田佳恵子・伏木 亨—京大農）

（MUROTA Kaeko, FUSHIKI Tohru）

#### The effect of surgical bowel manipulation and anesthesia on intestinal glucose absorption in rats

Michael R. Uhing and Robert E. Kimura  
*J. Clin. Invest.* 95: 2790-2798 (1995)

#### Active transport of 3-O-methyl-glucose by the small intestine in chronically catheterized rats

Michael R. Uhing and Robert E. Kimura  
*J. Clin. Invest.* 95: 2799-2805 (1995)

#### 文献情報

### サケは川の匂いを記憶するか？

日本のシロサケ漁獲量は、平成4年度より北洋での沖獲り全面禁止にもかかわらず、ここ数年、毎年増加し続けている。これは、国

の人工孵化放流事業によって、シロサケの母川回帰量が年々増加していることによるのであるが、サケがどのようなメカニズムで生まれた川の位置を正確に記憶し、降海回遊後、産卵のために故郷に戻ってくるのかは明らかになっていない。これまでの行動学的研究では、銀化変態 (parr-smolt transformation; 遡降河性のサケ科魚類では、降海回遊に先立ち、海水適応能力が発達するとともに、体側に黒斑のある“parr”状態から体表が銀色に変化した“smolt”状態になる一種の変態現象が起こる。)の時期に生まれた川を記憶すること、および母川回帰時には嗅覚が関与していることが明らかになっている (Hasler & Scholz; Olfactory Imprinting and Homing in Salmon. Berlin, Springer-Verlag 1983)。これらの研究から、現在では、母川回帰行動におけるサケ科魚類の記憶メカニズムは、生まれた川の匂いを記憶し、その匂いを頼りに母川回帰を行うという“嗅覚記憶説”が最も有力な仮説となっている。ここでは、銀化変態時期における嗅覚系の細胞質内在性タンパク質の経時的変化から生化学的に嗅覚記憶仮説を示唆する研究を紹介する。

北海道、積丹川より銀化変態時期 (11月～5月) にサクラマス稚魚を採取し、断頭後、氷冷下で嗅覚系組織 (嗅上皮、嗅神経、嗅球) および終脳を摘出した。各組織を Salmon Ringer 液でホモジナイズし、遠心分離 (10,000g×10min.) した上澄を、それぞれ 2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (2D-PAGE) に供した。

その結果、11月に採取した“parr”状態の稚魚では、嗅覚系組織および終脳のすべての抽出液で推定分子量27kDaのバンド (タンパク質) が認められた。このタンパク質のバンドは、稚魚が“smolt”状態 (5月) に変態するにしたがって消失した。また、嗅神経および嗅球組織抽出液の2D-PAGEでは、“parr”状態の稚魚で明瞭に認められた42kDa (pI 5.0) のバンドが、“pre-smolt”段階 (2月) から“smolt”状態の稚魚に変態す

るまでに徐々に消失した。さらに筆者らは、これらのバンド以外にも銀化変態に伴って出現または消失する数種類のバンドを確認するとともに、別報 (Zool. Sci., 10:287-294, 1993) で報告しているサケ科魚類嗅覚組織特異タンパク質 (24kDa) が、サクラマス稚魚の嗅神経組織にも存在することをこのタンパク質の特異抗体を用いた Western Blotting 法で確認した。

この結果から、筆者らは分子量27kDaと42kDa (pI 5.0) のタンパク質およびサケ科魚類嗅覚組織特異タンパク質 (24kDa) に注目し、これらのタンパク質が、サケ科魚類の嗅覚記憶に関与しているのではないかと推測している。本研究結果のみでは、これらタンパク質の変化と嗅覚記憶メカニズムとの関係は証明されないが、彼らは現在、これらのタンパク質をコードする遺伝子の解析を行っており、今後の研究の進展が望まれる。

冒頭で述べたように、今日の日本のサケ・マス漁業は、サケ科魚類の回帰行動特性をうまく利用した国の放流事業によって支えられている。一方、サケ・マス漁業と並んで我が国の重要な漁業の一つにカツオ・マグロ漁業が挙げられるが、これらの魚種もまた、サケ科魚類と同様な大型回遊を行う特性を持つ。カツオ・マグロ類の回遊行動については不明な点が多く、シロサケで成功したように稚魚放流による漁業資源の増大を望むのであれば、これら魚種の回遊現象について多方面から研究を進める必要がある。これからの日本の栽培漁業にとって、回遊魚類の記憶メカニズムの解明は極めて重要な研究課題である。

(抄訳 椎名 康彦—マルハ(株)中研)

(SHIINA Yasuhiko)

#### Electrophoretic changes in olfactory system proteins in masu salmon during parr-smolt transformation

Shimizu, M., H. Ueda, H. Kawamura, K. Shimazaki and K. Yamauchi  
*J. Fish Biol.*, 47:1044-1054 (1995)



海外便り

## アメリカにおけるトウモロコシ ゲノムおよび関連分野の研究状況

農林水産省 農業生物資源研究所  
倉田のり

USDA (アメリカ農務省) がトウモロコシをアメリカにおける植物ゲノム研究の柱にすえて、集中的な研究を開始する予定との情報を受けて、トウモロコシおよび穀類研究の主要研究室を中心に訪問し、研究の現状を視察した。以下主要訪問先における研究の現状を紹介したい。

### 1. パイオニア ハイブレッッド インター ナショナル (アイオワ州デモイン)

ここはアメリカでのトウモロコシ産業を担う最大手の民間企業であり、ここでの基礎研究の進展は、公立研究機関を凌駕するものがある。最近の技術やストラテジーの進歩を速やかに取り入れて、次の発展に結びつくような展開を図っている。パイオニアの研究部門は、他の実験圃場などもあわせると 347 人の研究員、450 人あまりのテクニシャンで構成され、さらに国内外の大学からの学生も受け入れ、活発な研究活動が展開されている。基礎研究に関する発表は自由性が保証されるが、研究部門内における研究レビューは厳しく行われる、という良好な研究環境が保たれているようである。

ここで特に目をひいたものは Dr. Bob Meeley の研究であった。Dr. Meeley は mu トランスポゾン数十コピーを導入したトウモロコシ約 40,000 個体を育成し、それらの DNA を用いて、トランスポゾン挿入形質転換体 DNA のパネル (ミュータントパネル) を作成している。このパネルはすでにジーンマシンという名称で他植物で試作され、強力な研究素材としてクローズアップされている。

これらのトランスポゾン挿入ミュータントパネルを用いると、機能未知の遺伝子に mu が挿入されたものを PCR で検索し、挿入変異体を選抜できる。それらの挿入変異体の形

質特性を解析することにより、用いた未知遺伝子の塩基配列とその遺伝子が破壊されることにより現れる形態や生理形質を、直接にしかも非常に効率的に関連づけることが可能となった。現在いくつかのモデル実験で好成績をおさめ、世界中の 70 ぐらいの研究グループと、個々の遺伝子や cDNA について共同研究がすすんでいる。

### 2. ミズーリ大学

ここでは農学部と生物学部の多くの研究者から、個々のトウモロコシ研究の進展状況を聞くことができ、それぞれ独自のすぐれた業績をあげていることが印象的であった。ここではその中の 2 つのトピックを紹介する。

(1) Dr. Mike McMullen のラボ (Prof. Ed Coe から引き継がれた) においては、これまでに連鎖地図上に位置づけられた 1,000 を超す形態形質マーカーのすべてを、DNA マーカーの連鎖地図の上にマップし、統合連鎖地図を作成すべく作業が進行中であった。このため、複数の形質マーカーシステムをプールで交配し、効率よく DNA マーカーとの統合をはかるストラテジーがとられており、すでに第 1 染色体については統合作業がほぼ完成していた。さらにこのラボと共同研究の形で Dr. Patrick Byrne は、トウモロコシ QTL 解析を用いてフラボノイド生合成系の十数のステップを司る遺伝子群の単離を目指して研究を進めており、Dr. Mary Polacco はトウモロコシのデータベース Maize DataBase

KURATA Nori

の構築をおこなっている。現時点でのトウモロコシ遺伝解析情報のほとんどが集められており、トウモロコシの研究者にとっては、不可欠の情報源となっている。

(2) Dr. Gurmukh Johal は、植物ではじめてトウモロコシの抵抗性遺伝子 *Hml* を単離した人である。その後トウモロコシで、病原菌に罹病しなくとも種々の病斑があらわれるミュータントを網羅して、実際の病害抵抗性反応を模倣できる系として利用している。この解析系を用いることにより、各々の抵抗性遺伝子が抵抗性反応のどのステップに関与する遺伝子であるのかを解明しようと試みている。すでにこれらのミュータントのうち3種については、トランスポゾンタギングによる遺伝子の単離が進行中であった。

### 3. テキサス A & M 大学

ここは、町全体がテキサス A & M 大学を中心に成り立っており、大学も農業生物関係の数多くの学部、学科があり、多くの研究者が集まって非常に活発な研究活動が展開されている。訪問したのは、「作物バイオテクノロジーセンター」であるが、このセンターは、生理学、作物学、土壌生物学、微生物学、遺伝学等の学部から最もアクティブなラボ7つを集めて構成されており、トマト抵抗性遺伝子、トマトの機械的収穫特性に関する形質遺伝子（ジョイントレス）等のポジショナルクローニング、窒素固定機構の解析、障害とストレス耐性に関する遺伝子の解析、さらには各種作物（トウモロコシ、ソルガム、イネ、トマト、ワタ、サトウキビ、アラビドプシス）を対象とした BAC ゲノムライブラリーの精力的な作成などが行われている。また、これら7つのラボの研究を支えるために、共通に利用できる DNA 解析ラボと組織培養ラボの2つが設置され、各々数名のスタッフにより DNA のオートマティックな処理や、BAC を用いた形質転換などの実験がすすめられている。このセンター自身で高精度コントロールの5つの大きな温室を持っており、研究環境としては最高の部類とおもわれる。

Dr. Rod Wing のラボで作成された上記の各種 BAC ライブラリーは、今年1月に発足した「作物 BAC 資源センター」に納められ、新たに配置された5名のスタッフにより高密度フィルターと菌体クローンの保存、増殖、配布業務およびスクリーニングにより集積されるデータのデータベース化、公開等をおこなう準備を整えているとのことであった。

### 4. 他の訪問先、対談者についての情報

(1) テキサス大学 Prof. Majorie Maguire は、トウモロコシの有名な遺伝学、細胞遺伝学者で多くの先導的な仕事を行っている。現在は、減数分裂期の染色体対合とキアズマの維持に関与している、染色体とコンプレックスを形成するタンパクの精製およびそのタンパク遺伝子の単離を目指している。生殖過程での遺伝子組換えの問題は、非常に普遍的な問題であり、これからの展開が期待される。

(2) ミネソタ大学の Prof. Ronald Phillip のラボでは、トウモロコシ染色体に関する興味深い実験系が進みつつある。オート麦にトウモロコシを交配した属間交雑後代で、トウモロコシ染色体が1~2本添加された植物体を得られた。安定に子孫に保持され、系統として確立したのは、今のところ染色体3と9の添加型のみであるが、これらを用いてトウモロコシの染色体特異的ゲノムライブラリーを作成し、好成績をおさめている。この試みは、単に染色体特異的ライブラリー作りだけではなく、植物のゲノム構成の可塑性の高さとその利用を示唆するもので、新たな植物の創造も可能になるかもしれない。

### 5. アメリカ視察を終えて

今回のアメリカにおけるトウモロコシおよび関連分野の研究状況視察では、多くの新たな展開と研究効率化のためのシステム作りが進んでいるのを目の当たりにした。アメリカにおけるトウモロコシ研究の裾野は幅広く、遺伝学の知見の蓄積もイネをはるかに超えるものがあり、個々の研究の質も高く、情報と材料の集積、利用システムの整備が進んでお

り、これらが有機的に結びついた活動が開始されれば、すぐに穀類研究をリードする地位に進出すると思われる。

さらにパイオニアに関しては、帰国直後にヒトゲノム科学財団 (HGS) に寄託して20万個の cDNA を3年の間にシーケンスするという取り決めが成立したとの報道があった。cDNA の塩基配列決定とミュータントパネルのシステムを両輪とすれば、トゥモロコシ

の遺伝子解析は、動植物を通じて最強の成果を生み出すことはまちがいない。さらにテキサス A & M 大学にみられるような、フレキシブルな研究室設営と、時宜に応じた研究および研究サポート組織の設計、広く材料や情報を提供する機関の運営などは、そこに集まる研究者のみならず、それらを取りまく環境そのものや世界規模での共同体を著しく活性化する効果があると考えられる。

#### 海外便り

## アメリカにおける果樹のゲノムおよびバイテク研究の現状

農林水産省 果樹試験場

林 建樹

### 1. はじめに

今年1月、果樹試験場興津支場の大村室長と2人で平成7年度科学技術振興調整費によってアメリカへ出張した。急速に進展しているこの分野の最新の情報を得るためである。

先ずカリフォルニア州サン・ジエゴのリゾートホテルで開催された「植物ゲノムⅣ—植物ゲノムの現状に関する国際会議」(1月14~18日)に出席した。これはアメリカ農務省主催で毎年開催されている会議である。広い一つの会場を使って技術、ゲノムと多様性、病害抵抗性、比較マッピング、ゲノムと染色体の5項目について、シンポジウム形式で進められていた。一般発表はポスターだけであった。また種々の課題についてワークショップも開かれていた。この会議全体の内容については、日本からはイネゲノム関係者をはじめ多数の参加者があり、別の機会に紹介されるものと期待してここでは割愛する。果樹の分野は、シンポジウムにはなかったが、「果樹ゲノム」のワークショップが今回初めて開催され、14課題のポスター発表があった。

HAYASHI Tateki

学会終了後、フロリダ州レイク・アルフレッドにあるフロリダ大学カンキツ研究教育センター、ゲインズビルの本校およびオーランドの農務省園芸研究所を訪問した。さらに温暖なフロリダから一気に厳冬のニューヨーク州北端近くのジェネバに移動して、コーネル大学を訪問した。

### 2. 植物ゲノム会議

果樹では、アボガドやジュンガン、ヘーゼルナッツのマイナー果樹の発表もあったが、以下主要果樹について紹介する。

モモではカリフォルニア大学デイビスの Prof. Bliss が中心となって、大きなグループを作っている。モモとアーモンドの交配雑種を材料として、モモ果肉の cDNA およびアーモンドのゲノム DNA、RAPD、アイソザイムを使い白肉・黄肉、モモ・ネクタリン、離核・粘核、台木品種における線虫抵抗性等の遺伝子に連鎖するマーカーの開発を行っていた。ノースカロライナ州立大学はかなり早い時期からモモのゲノム解析を独自に進めており、AFLP の連鎖地図が RAPD よりも非常に多くの情報が得られるとのことであった。フランス (INRA) からはモモの QTL 分析



で果実の毛と形やプラム台木品種の線虫抵抗性に連鎖するマーカーを発表していた。

リンゴでは、コーネル大学の Dr. Weeden らのグループとニュージーランド (Hort Research Center) が、黒星病抵抗性遺伝子 (Vf) に連鎖する RAPD マーカーを別々に発表していた。またコーネル大学では、黒星病抵抗性のロシア由来の実生との交配系統を使って、複数の病斑タイプ各々に連鎖するマーカーも見出していた。さらに黒星病抵抗性品種“リバテイ”の BAC ライブラリーを作成し、抵抗性遺伝子の単離を目指していた。

ブドウでもコーネル大学では、Dr. Reisch らがうどんこ病や灰色かび病抵抗性および花や果実の形に連鎖するマーカーの研究を進めていた。

キウイフルーツでは、ニュージーランド (Hortic. & Food Res. Inst.) から雌雄性に関連する遺伝マーカーについての発表があった。キウイフルーツの品種育成には幼木での雌雄判別が求められているが、今までは殆ど不可能であったためにこの成果は非常に興味を持たれた。

カンキツではカリフォルニア大学リバサイドの Dr. Roose やフロリダ大学の Dr. Gmitter らが中心となってグループ作りをしている。前者はカラタチとグレープフルーツおよびオレンジの雑種について、わい化、酸、CTV (カンキツトリステザウイルス) 抵抗性などに関与する遺伝子に近接のマーカーを発表していた。後者は BAC ライブラリーから CTV 抵抗性遺伝子の単離を行っていた。

### 3. フロリダ大学および農務省園芸研究所

フロリダ半島中心部のオーランド近くにあるフロリダ大学カンキツ研究教育センターは、約 150km 北のゲインズビル本校の食品・農業学部の一部である。同センターは、ポストハーベスト中心の州立農業試験場と同居している。今回世話になった Dr. Gmitter は、カンキツの育種担当であり、CTV と線虫抵抗性の分子地図作成を進めており、温室には多数の交雑実生を解析用に維持していた。オ

レンジとグレープフルーツの交雑育種も行ってた。細胞遺伝が担当の Prof. Grosser は、細胞融合による多数の種・属間雑種個体を維持していた。

ゲインズビルの園芸科学科の Prof. Moore は、カンキツの塩・寒耐性の QTL 遺伝子地図を作っており、耐寒性に関連の遺伝子の単離も行っていた。形質転換体の作出も進めており、果樹試験場の小林らのカラタチの茎を使う方法をカンキツの栽培品種に応用し、ウイルス外皮タンパク遺伝子や酸味や苦味に関係する遺伝子の導入実験を行っていた。

オーランド市内にある農務省園芸研究所では、病理学者の Dr. Garnsey の世話になったが、彼は自作の移動式閉鎖ガラス室 (トレーラーハウス) で、種々のカンキツの組換え体を育成していた。カンキツの育種担当の Dr. Bowman は、カラタチ (線虫抵抗性)



写真1 農務省オーランド園芸研究所  
移動式の閉鎖ガラス室内に多数の形質  
転換カンキツを育成していた

とレモン (耐塩性) の交雑による台木品種育成を進めていた。グレープフルーツとマンダリンの掛け合わせと照射による種無し早生品種の育成も行っていた。Dr. Kaplan は、線虫による根細胞の肥大に関係する遺伝子をトマトから単離していた。

オーランド周辺は、昔はカンキツ生産の中心地であったが、何回かの寒波によって壊滅的な打撃を受け、現在は南の方に移っており、関係研究機関だけが取り残された状態にある。ここはむしろデイズニーワールドなどの大リゾート地帯として発展しているようである。

#### 4. コーネル大学

ジェネバでは、園芸科学、虫害、病理、食品科学の学科で構成されており、州立農業試験場を兼ねている。本校のイサカは、車で約1時間の所にある。ここでは、果樹試験場から留学中の別所さんの世話になった。

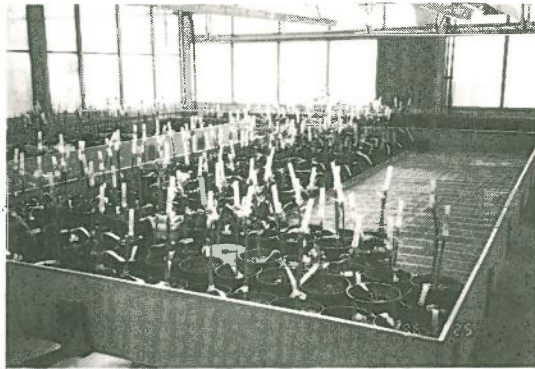


写真2 コーネル大学  
形質転換リンゴを接ぎ木し、穂木部分をプラスチック管で覆っていた

コーネル大学の育種グループは、リンゴの黒星病の抵抗性品種“リバティ”と“フリーダム”を既に作っている歴史的な背景のもとに、Drs. Weeden, Brownらが、黒星病抵抗性遺伝子 *Vf* の遺伝子地図を作成し、遺伝子の単離を進めていた。

Prof. Aldwinckle (病理) は、コーネル大学のブドウとリンゴの遺伝子組換えプロジェクトの中心的な存在であった。キチナーゼ遺伝子をはじめ病害抵抗性組換え体は既に5品種のリンゴで成功していた。キチナーゼはこの大学のDr. Harmanがトリコデルマ菌から単離しているものを使用していた。植物由来よりも活性が高いようである。黒星病感受性のガラにこの遺伝子を入れると、ゴールドデリシャスに近いレベルの抵抗性が見られたとのことで、うどんこ病や灰色かび病ばかりでなく、広範囲のかびによる病気に対しての抵抗性を示すことが期待される。Dr. Hrazudina (食品科学) はACC合成酵素遺伝子のセンスとアンチセンスをリンゴに導入していた。

ブドウの再分化系の開発は非常に難しいが、Dr. Reishのところでは、5種類の再分化可

能な系統（このうち3種類は未だ不完全と思われる）を持っていた。これらを使って、ウイルスや根頭がん種病抵抗性の形質転換体の作出を進めていた。上述のキチナーゼ遺伝子もブドウに導入していた。Dr. Gonsolvesは、こんな寒いところでパパイヤの遺伝子組換えを行っており、既に病害抵抗性遺伝子を導入した転換体を多数温室に維持していた。

コーネル大学のキャンパスには、農務省の遺伝資源部門もあり、リンゴとブドウを収集している。Dr. Forslineは、我が国の研究者が開発したリンゴ、ブドウの冬芽を液体窒素に保存する方法を既に事業として行っていた。パーテクルガン装置の開発者であるDr. Sanfordは、大学の近くでベンチャービジネスを兼業で始めており、野生型アグロを使った遺伝子組換え法でわい化句ゼラニュームを沢山作っており、日本の会社へも売り込みを考えているようであった。

ジェネバは湖に面した小さな大学町であり、周辺にはワイン用のブドウの畑が見られた。

夏は避暑地にもなるとのことである。

#### 5. ま と め

今回の国際学会はアメリカ農務省主催であるためか、ヨーロッパからの参加者が少なかったのが残念であった。リンゴのゲノム研究は、ヨーロッパの方が組織的に大がかりに進められているが、その情報は全くなかった。モモについてもヨーロッパでは米国と同程度に進められているが、一部フランスの発表だけであった。そのために、この学会では国際的なゲノム研究の全体の動向は必ずしも明かではないが、果樹のゲノム研究は、かなり進んでいることを現実的に知ることができ、我が国のこの分野の遅れに焦りを感じた。

果樹の形質転換体作出は、病害や流通関係の研究者が中心になってグループを作り、本格的に進めていたことに驚かされた。特に病害関係者の話は、最初から最後まで抵抗性遺伝子の単離と形質転換体の作出による抵抗性の付与であった。

### 編集後記

生研機構が設立されてから丸10年を迎えることになり、情報誌「BRAIN テクノニュース」も創刊10年を迎え、本号で55号を数えるに至った。

創刊当時、バイオテクノロジーへの夢は大きく広がっており、「日経バイオテク」をはじめ各種の関連情報誌が出されていて、これから創刊する情報誌の特徴を出すのに議論が沸いた。そこで創刊に先だち「創刊準備号」を作り、機構内はもとより、農林水産技術会議事務局や、筑波の2・3の研究機関、さらに企業の方々にも意見をうかがった。「創刊準備号とは何だね、ずい分丁寧な話だね」と言った話とともに貴重なアドバイスをいただき、今日の体裁の原形ができたように思う。

編集についても、プロに依頼するのではなく、

手作りにすることになり色々な案が出た。科学朝日の編集者の指導を受けたり、数次の読者会を催す中で、記事内容も順次充実していったと考えている。ニュースソースは国立研究機関、大学および企業の方々に依頼することが多く、週1回の筑波通いが続いたりした。

情報誌事業を独立採算で行うという課題は今日でも厳しい状況と思われる。バイオテクノロジーに対する見方も、夢から厳選して事業化して行く時代に入って来ている。それに連動して「BRAIN テクノニュース」の質も変化する必要があるだろう。読者のニーズに合致した編集方針をとり、さらなる発展を期待するのが創刊当時の担当者の真情である。

(松田俊夫記)

## ブレインテクノニュース (第55号)

平成8年5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