

CODEN: BTEEEC

TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

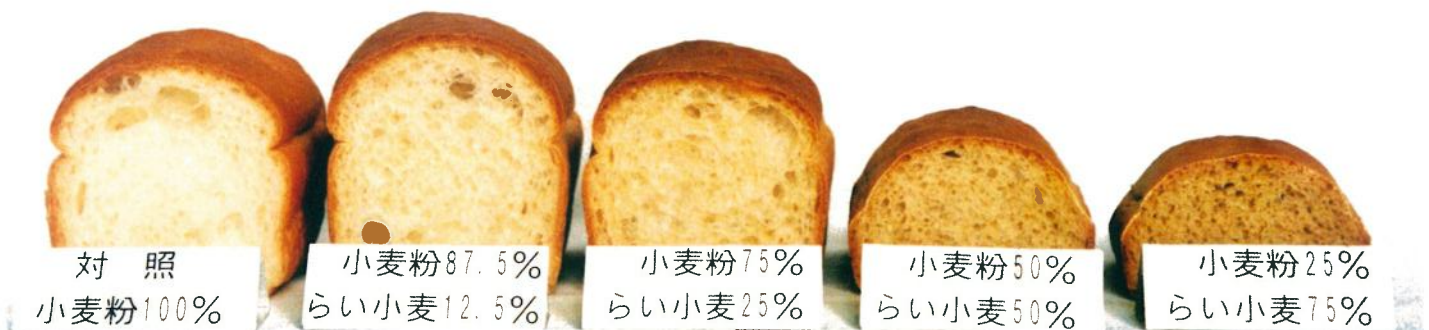
ブレインテクノニュース

第 65 号

JANUARY 15, 1998

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution



らい小麦粉混合とパンのボリュームの変化

(本文23ページ参照)

発行=生物系特定産業技術研究推進機構

総 説

井上 元

昆虫機能を利用した技術…………… 1

国内情報

藤井健司・瀬古沢照治・棟方 研

Kalman-Filter 理論に基づく強風時の水田水位推定モデル…………… 4

長谷川秀翁

玄米の殺菌と匂いセンシング技術…………… 7

西澤洋子・田部井豊・阿久津克己

遺伝子組換えによる灰色かび病抵抗性キュウリの作出……………10

大類幸夫

日本産主要有害線虫の簡易同定法……………14

地域の先端研究

石田基雄・中村総之・落合真哉

異質三倍体魚ニジイワの実用化……………18

中司啓二・山内宏昭・義平大樹・瀬口正晴

らい小麦の北海道への導入とその粉の利用性……………23

文献情報

サルの核移植……………26

糸状菌菌糸内の核の往来：*in vivo*での *A. nidulans* の核移動と位置決定について……………26

リボソームフレームシフトを利用したイースト ds RNA ウイルスの増殖抑制……………27

ヘネイコサペンタエン酸 (21:5 n-3)：脂質中への取り込みとアラキドン酸 (AA)

およびエイコサノイド合成に及ぼす影響……………28

海外便り

大倉哲也

味覚の細胞内情報伝達機構に関する研究

—フィラデルフィアでの2年間—……………30

昆虫機能を利用した技術

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所

井上 元

近年における遺伝子工学の進展と微量物質の分析技術の高度化等は、昆虫の機能を新資源として活用することを可能とした。さまざまな環境に適応してきた多様性ある昆虫と経済性昆虫として研究知見の豊富なカイコを対象として、昆虫の持つ特殊な機能の解明から、農業、工業、医薬等に役立つ新物質の探索と利用の研究や新材料の開発の研究が活発化している。

1. はじめに

地球上に100万種も生息している昆虫は、さまざまな環境に適合して多様な構造と機能を獲得し、脊椎動物にはみられない優れた機能を有している。その優れた機能を有用な生物資源とする視点から研究が進められている。昆虫機能を利用する視点は便宜的に3つに分けられる。すなわち、①有用物質の生産技術、②機能模倣技術、③新しい病虫害制御技術の開発である。幅広い昆虫機能利用研究のなかでも、本稿ではとくに有用物質の生産技術に焦点を当てて、新物質の探索と新材料の開発および大量生産技術開発の状況を紹介する。

2. 新物質の探索と利用研究の現状

コガネムシの一種ウスチャコガネの性フェロモンの単離解析から、アルカロイド化合物

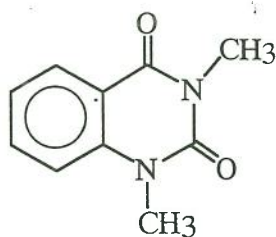


図1 ウスチャコガネの性フェロモンの化学構造式
雌成虫が放出し雄成虫を誘引する性フェロモンは、鎮痛剤や消炎剤として医薬で使われているアルカロイド化合物であった。

INOUE Hajime

を化学交信物質として利用していることが判明した。既に、この物質は人工的に合成され鎮痛剤や消炎剤として医薬に利用されているものであった¹⁾。このことは、昆虫の性フェロモン物質が新規なドラッグデザインを提供できることを示すものである。

昆虫は、抗体産生系による脊椎動物の生体防御機構とは異なる液性防御機構を有している。1970年代後半から研究が活発化し、チョウ、ハエ、カブトムシ、トンボ、カメムシなど多種類の昆虫で50種以上の抗菌性タンパク質が発見され、アミノ酸配列が解析されている。それらの特徴からセクロピン型、ディフェンシン型、アタシン型、高グリシン含有型、高プロリン含有型、その他の型に分類されている²⁾。医薬に利用するには更なる低分子化が必要であり、センチクバエのザーペシンBでは、小ペプチド化によって抗菌活性も増強している。また、カイコのモリシンなどにはMRSA（薬剤耐性黄色ブドウ球菌）を抑制する作用が見いだされている²⁾。一方、抗菌性タンパク質は細胞増殖促進などの別な機能を有することも明らかになった³⁾。抗菌タンパク質遺伝子を作物に導入する研究では、植物体内のタンパク質分解酵素による生産物の分解が速く、分解速度を上回る強力なプロモーターを用いてザルコトキシンIAの発現に成功している²⁾。

吸血昆虫の唾液腺にある抗血液凝固阻止物質の研究がここ数年進展している。サシガメ

から単離された抗血液凝固阻止物質のアミノ酸配列と内因系での阻害活性が解明され特許となっている(特表平8-507200)。オオサシガメからの抗血液凝固物質 Prolixin-S は分子量が2万のタンパク質であって、一酸化窒素(NO)を可逆的に結合し、平滑筋の弛緩作用を有することから、心筋梗塞の治療剤への応用が期待され特許出願されている(出願8-56920)。バキュロウイルス発現ベクターを用いて昆虫細胞で作られた Prolixin-S は、生体で作られるものと同じ作用を示す。また、蛭からの抗凝血剤ヒルジンは形質転換酵母で発現されている(特開平9-103295)。

3. 新材料の開発研究の現状

カイコやクモなど、昆虫類が分泌する繊維タンパク質は絹と呼称され、コラーゲン、キチン・キトサンと並ぶバイオマテリアルとして注目されている。中でもカイコの絹フィブロインタンパク質についての素材開発研究が進展している⁴⁾。カイコの絹糸をアルカリ液で処理したのち5 μ m程の粉末化とする技術が確立され(出願7-31417)、塗料と混ぜるコーティング素材の開発に成功し、ボールペンや電話、時計などの外装への応用が期待されている。また、アルコール処理で水不溶性化された絹フィブロインタンパク質の膜は、酸素の透過性に優れている特徴を生かしてコンタクトレンズ素材に応用する研究も進展し、フィブロインタンパク質の微粉末を数%程度 HEMA(ヒドロキシ2-エチルメタアクリレート)に混合する方法も開発されている(出願8-133733)。一方、絹フィブロインタ

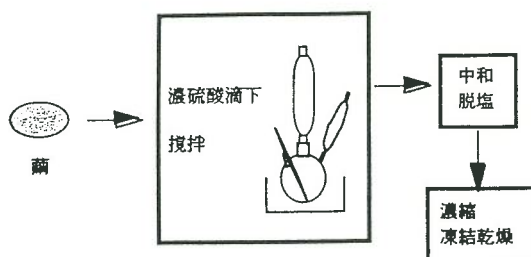


図2 絹糸を素材とする抗血液凝固物質の製造工程
絹フィブロインタンパク質に硫酸基を付加し血液凝固を阻害する機能をもたせる。

ンパク質分子のアルギニン残基に生化学的特性を有する物質を修飾し、細胞付着性の改変による細胞培養床への応用も試みられている

(特許1748463)。また、中性塩で溶解し脱塩後フィルム化した絹フィブロイン膜は、マウスでの創傷被覆効果が高く表皮細胞の再生が速いところから人工皮膚としての利用が期待できる(出願8-28559)。グリシン-アラニンの繰り返し配列が多いカイコ絹フィブロインタンパク質の、ヘパリン分子骨格との類似性に着目して、硫酸基の付加を試みた結果、その付加微粉末には血液凝固を阻止する顕著な効果が示されている(出願8-31858)。絹フィブロインタンパク質の力学的特性から人工腱材料への利用が考案され、リン酸側鎖をもつポリメタクリレートとのハイブリッド化素材へのカルシウム吸着量を向上する技術が確立した(出願8-293800)。絹フィブロインタンパク質でグルコースオキシダーゼを被覆するなど、バイオセンサー素材としての利用開発も進展している(特開平6-181763)。

クモの糸はグリシン、アラニン、プロリンが主要なタンパク質である。そのcDNAが大腸菌で発現されているが、将来的にはカイコ絹タンパク質とのハイブリッド化も夢ではない。

4. 有用物質の大量生産技術開発の現状

昆虫のパキュロウイルス発現ベクターは、その発現量が⁵⁾大腸菌などの系に比べて100倍と極めて高く糖鎖などが修飾されることから、広く利用されるようになった⁵⁾。AcNPVの系は昆虫培養細胞SF9株を用いるが、最近、物質生産に適する培養細胞High5株が開発され市販されている。一方、BmNPVの系はカイコを使用するのでさらに100倍ほど生産性が向上する。実用的な有用物質の生産技術の開発については、AcNPV系ではエイズウイルスのワクチンが生産され臨床試験が行われている。BmNPV系ではネコのインターフェロンが生産され、カリシウイルス感染症への治療剤として1993年から市販されて

いるが、1997年にはイヌへの適用拡大が認可されている。

BmNPV系でカイコを使って有用物質を生産することをバイオテク養蚕と称している。この技術開発の要点は、①ベクターの発現能力の強化、②大量のカイコへの効率的ベクター接種方法、③カイコの大量飼育装置の開発、④効率的な体液採取方法、⑤目的タンパク質の単離精製にある。ベクターの改変では、ウイルスからのシスティングプロテアーゼ遺伝子の除去、分泌シグナル遺伝子の導入などに進展がみられている。カイコへの接種は、ウイルスのポリヘドリン遺伝子のプロモーターを利用するベクターの場合は注射となるが、ペリスタリックポンプを用いる簡便な注射装置が開発されている(特開平9-51742)。また、経口接種のためにP10遺伝子のプロモーターを利用するベクターも開発されているが、前者の発現効率に比べると少し低い結果が得られている。カイコ2万頭を人工飼料で飼育するコンパクトな飼育装置が開発されていて(出願7-336822)、発育や行動のシミュレーションモデルの開発からシステムの全自動化が図られている。発現産物はカイコの体液中に分泌されるので、死後硬直を利用する体液採取方法が開発された(出願 9-522666)。

5. 今後の展開

新物質や新材料の医業への利用を考える場合、生体への適合性が重要な問題となる。医学関係の大学や民間企業との連携のもとに研

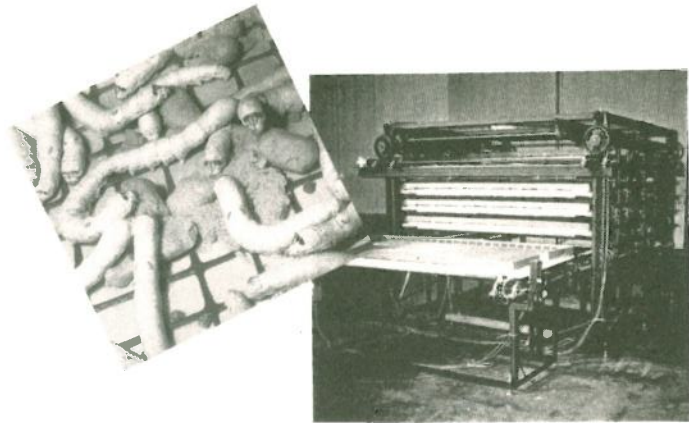


図3 人工飼料によるカイコの大量飼育装置
バキュロウイルス発現ベクターを接種したカイコ5齢幼虫2万頭を飼育できる。

究が進められることが肝要である。また、昆虫機能利用を促進するためには、カイコのゲノム研究やトランスジェニック昆虫の作出技術の確立など、関連する分野の研究進展が望まれる。

文 献

- 1) Leal, W.S. (1997) Medicinal alkaloid as a sex pheromone. *Nature*, 385: 213
- 2) 山川 稔 (1997) 昆虫抗菌性タンパク質の研究と利用, 昆虫産業(梅谷献二編) p.183-201, 農林水産技術情報協会
- 3) 名取俊二・本間光一 (1997) 昆虫の生体防御機構と創薬への応用, 化学と生物, 35: 484-490
- 4) 塚田益裕 (1997) 絹タンパク質の多面的利用, 昆虫産業(梅谷献二編) p.122-132, 農林水産技術情報協会
- 5) 前田 進 (1993) 昆虫ウイルスとバイオテクノロジー, pp. 162, サイエンスハウス

国内情報

Kalman-Filter 理論に基づく強風時の 水田水位推定モデル

(株)日立製作所 システム開発研究所, *生研機構

藤井健司・瀬古沢照治・*棟方 研

水田の区画整備・パイプライン敷設の進行に伴い、1 ha 規模の大区画水田群の水田管理を行うための水田水管理システムの開発が進んでいる。水管理システムは単に給排水作業を自動化するだけでなく、気象災害の回避、水資源の有効利用、環境負荷の軽減等の目的を達成するための機能も要求される。本稿では、水田の水使用量の低減を目的とした高精度な目標水位制御を実現するための、水田水位推定モデルについて述べる。

1. はじめに

水田の水管理作業時間は年間 76 時間/ha と全稲作労働時間の 20.2% を占め¹⁾、気象・土壌条件や稲の生育段階に応じて異なる判断を求められるため、農家にとって煩わしくかつ経験を要する作業となっている。一方で水田の区画整備・給排水パイプライン敷設が進行していることとあいまって、水田水管理の完全自動化を目指した水管理システムの開発が実用段階まで進んでいる²⁾。

水管理システムは単に水管理作業を自動化する機能だけでなく、安定した収量確保、及び水田の水使用量低減等の機能も要求される。安定した収量確保のためには冷害対策としての深水管理が有効であり、稲の生育に応じた水田の目標水位を適切に設定することで実現可能となる。水田の水使用量低減のためには水田の目標水位制御の精度を高め、必要以上の田水貯留を防止することにより地下浸透量を抑制することが有効であると考えられる。

水管理システムの目標水位制御では、目標水位の許容誤差内に水田水位が収まるよう給排水バルブ制御を行うのが普通である。仮に制御量として水田水位測定値をそのまま用いた場合、制御性能の向上には限界がある。許

容誤差を小さく設定するほど制御性能は向上するが、逆に風の吹き寄せ等によりハンチングが生じ無駄な給排水が増加しかねないためである。そこで水位測定値から風の影響を取り除いた真の水田水位を制御量とすることにより許容誤差を小さく設定し、制御性能の向上を図ろうとするのが本研究の目的である。

本稿では、測定水位に対して多大な影響を与える物理現象として風の吹き寄せ現象に着目し、風向・風速測定値及び 1 地点の水田水位測定値から真の水田水位（平均水位）の推定を行うモデルを構築し、平成 9 年の実験水田測定データを用いて検証を行った。

2. 水管理対象水田の環境

現在開発中の水管理システムは 1 ha 規模の大区画水田×30 枚程度を管理対象としており、稲の生育予測、目標水位決定、漏水検知等の機能実現のため、各区画水田における水位、給排水量、及び水田地域における気象値（雨量、風向・風速、気温、湿度等）をオンラインで測定する。上記測定データの中で水田水位に短期的に影響を及ぼす物理量は各水田の水位、給排水量、雨量、風向・風速であると考えられるため、本研究の水田水位推定モデルでは、上記物理量の測定データを利用可能とする。但し水位測定値は、水位計設置数・設置個所の制約から、水田端の 1 地

FUJII Kenjii, SEKOZAWA Teruji, MUNAKATA Ken

点における水位とする。

本研究のために手配した実験水田の規模と設備の配置を図1に示す。実験水田は茨城県南部に位置し、霞ヶ浦に面しているため、主に霞ヶ浦方向からの風が年中吹いている。ほぼ正方形の実験水田の対角線上に水位計1、水位計2を配置し、水田に隣接するポンプ機場に風向・風速、雨量等の気象値を測定する気象観測ロボットを設置した。平成9年5月21日から9月末までの期間において、15分ごとの平均値として上記水田水位、風向・風速、雨量データの測定を行った。平成9年は電磁流量計の設置が間に合わず、給排水量の測定はできなかった。

3. 強風時の水田水位特性

水田水位に対する風の影響は吹き寄せによる水位上昇及び風波による水位変動として現れる。したがって風の影響を考慮した水田水位推定モデルを考える際は、その両方を考慮したモデルとすべきである。しかしながら風波による水位変動はその周期が0.5秒程度と小さく、かつ水位計が15分間の平均値として水位を測定していることから十分無視できると考える。

風による吹き寄せ水位上昇は風速の2乗に比例し水田水位に反比例するとされる³⁾。更にオンシーズン中の水田での吹き寄せ水位上昇は稲の生育状態にも依存すると考えられるため、田植え後20日経過時点(5月21日)と出穂期時点(8月4日)における実験水田での吹き寄せ水位上昇と風速の調査を行った。但し風速が同じであっても風向が違えば吹き寄せ水位上昇量は違ってくるため、水位計設置方向(水位計2から水位計1に向かう方向を正)に対する風速成分である補正風速を用いて実験を行った。水位上昇量(水位1-水位2)と補正風速の符号を保存した2乗値との散布図を図2に示す。

水位上昇量 h_w 、補正風速の符号を保存した2乗値 v とすると、5月時点の散布図(a)から回帰式 $h_w = 0.30 \cdot v + 0.06$ を導出でき、

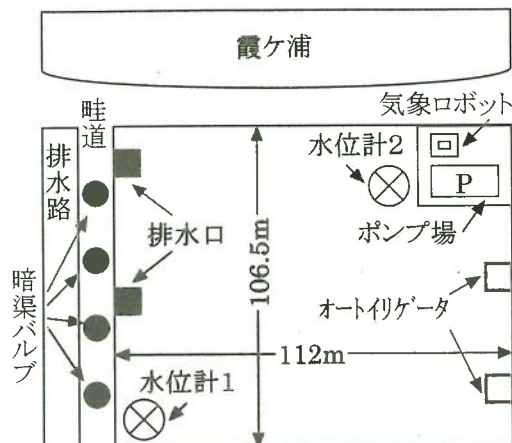
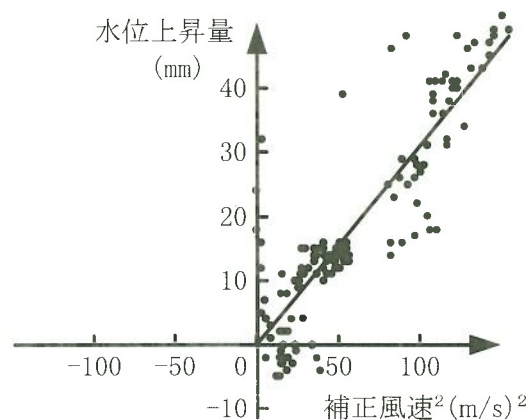
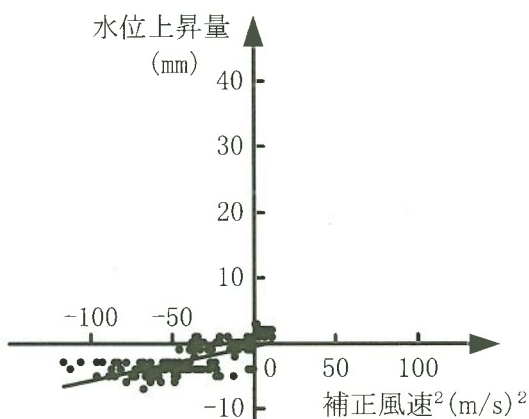


図1 実験水田設備概要

回帰係数に関して有意な関係が認められた。8月時点の散布図(b)からは回帰式 $h_w = 0.05 \cdot v + 0.55$ が導出できたものの、回帰係数、回帰定数ともに有意とは言えなかった。また今回の水田実験では、上述の「吹き寄せ水位上昇は水田水位に反比例する」という関係も特に確認できなかった。



(a) 5月21日～5月22日



(b) 8月4日～8月5日

図2 水位上昇量と補正風速との散布図

上記実験結果から、吹き寄せ水位上昇量は補正風速の2乗に比例するが、稲が十分生育してからはその比例関係は非常に小さくなることが判る。

4. 水田水位推定モデルの構築と検証

真の水田水位である水田平均水位を推定するには、吹き寄せ時の水面形状を把握しておく必要があるが、前記実験結果からは水田中央地点に関して対称な2地点の水位差と補正風速との関係が得られたに過ぎない。そこで本研究では、吹き寄せ時の水面は平面であると仮定して推定モデルの構築を行う。

上記仮定より水田平均水位は上記2地点の水位の平均値に一致するため、前節にて示した回帰式を用いれば、風向・風速及び1地点での水田水位から水田平均水位を推定することは可能となる。しかしながら上記回帰式は稲の生育に応じて回帰係数が変化し、また強風時の風速、測定水位の激しい変動を推定値に直接反映させることになるため好ましくない。そのためモデルパラメータのオンライン推定が可能で、モデルによる推定誤差分散を最小にできるKalman-Filter理論に基づくモデルの構築を行う。

水田平均水位及び比例パラメータを推定すべき状態変量とすれば、Kalman-Filter理論におけるシステム方程式、観測方程式は次のように導出できる。時点kにおける測定水位、平均水位、補正風速、比例パラメータをそれぞれ h_k 、 x_k 、 u_k 、 p_k とすれば、吹き寄せ水位と補正風速との関係より、

$$h_k - x_k = p_k \cdot v_k$$

但し、 $v_k = u_k^2 \cdot \text{sgn}(u_k)$ が成り立つ。非線型項 $p_k \cdot v_k$ を線形化して、観測方程式は、

$$h_k + p^* \cdot v^* - p^* \cdot v_k = [1 \ v^*] \begin{bmatrix} x_k \\ p_k \end{bmatrix} + e_k \dots (1)$$
 となる。ここに e_k は観測誤差であり、また p^* 、 v^* の値についてはk時点からみたときの既知値 p_{k-1} 、 v_{k-1} 、で代用して差し支えない。

また時刻k-1から時刻kまでの水田に対する雨量 r_{k-1} 、給排水量 q_{k-1} (水位換算) とすると、水収支関係より、

$$x_k = x_{k-1} + r_{k-1} + q_{k-1}$$

が成り立つ。ここで比例パラメータ p_k の短期的時間変動はないものとみなせば、システム方程式は、

$$\begin{bmatrix} x_k \\ p_k \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_{k-1} \\ p_{k-1} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} r_{k-1} + q_{k-1} \\ 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} w_{k-1} \\ w'_{k-1} \end{bmatrix} \dots (2)$$

となる。ここに、 w_k 、 w'_k はシステム誤差である。

上記モデル式(1)(2)に対してKalman-Filterアルゴリズムを適用し、平成9年の実験水田で測定された水位2、雨量、風向・風速データを用いて平均水位を推定した結果を図3に示す。但し給排水量データは未測定のため非給排水時のデータを用いた。5月時点での推定結果より、強風のため測定水位が変動した場合でも平均水位はほぼ一定値となり、よく推定できていることがわかる。一方8月になると、比例パラメータはほとんど0となり、稲の生長により水田水位が風の影響を受けなくなった現象を再現できている。真の水田水位が未知のため定量的評価はできないが、仮に水位1と水位2の平均値を真の水田水位とした場合、吹き寄せ水位上昇の比較的大きな期間(5月21日~5月末)におけるモデル推定値との誤差の標準偏差は2.00 mmとなった。

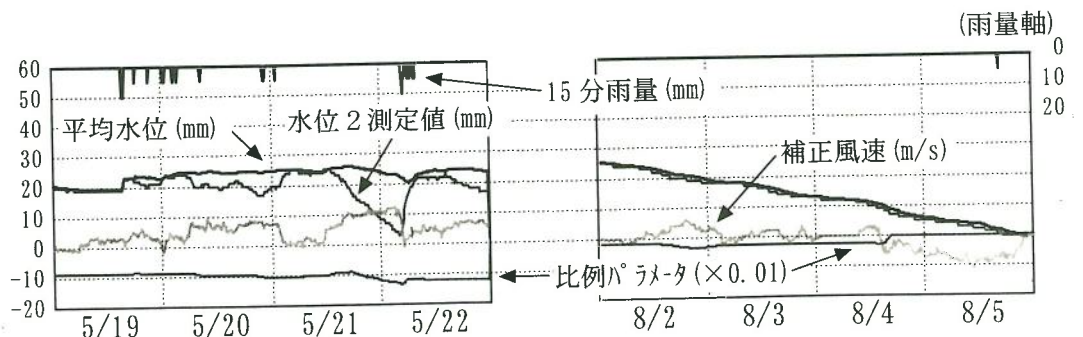


図3 推定モデルによる平均水位推定結果

5. おわりに

本稿では、水田測定水位に多大な影響を与える物理現象として風の吹き寄せに着目し、水田平均水位推定モデルの構築を行った。ある程度稲が生長すれば水田水位は風の影響を受けなくなるものの、幼穂時期における繊細な深水管理と水使用量低減のための最小水位管理との両立を図ることができ、また水管理システムに更なるハードウェアを追加する必要がないため、実用的な手法であると言える。水田では風向の上下ばかりでなく、灌水の上下によっても水面傾斜が発生するので、給排水時での平均水位推定については今後の

課題とする。

なお本テーマは、生研機構の「大区画水田における水管理の高度化に関する研究開発」委託研究事業に基づくものである。

文献

- 1) 農林水産省(1994)米生産費調査(榎日立製作所,生研機構委託研究事業,平成7年度成果報告書,p.9
- 2) 井上君夫(1994)診断型自動水管理装置の開発,農業気象,50(1):1-7
- 3) 山形県農林水産部農地計画課(1994)大区画ほ場整備モデル事業調査報告書,pp.34-37
- 4) 星清(1985)洪水予測システムの基礎的検討(2),土木試験所月報, No.386: pp.48-68

国内情報

玄米の殺菌と匂いセンシング技術

三洋電機株式会社 産機システム開発研究所
長谷川秀翁

高電圧を応用した殺菌技術により、玄米の表面に付着している細菌の99%以上を殺菌可能とした。これは、電圧は高いが電流は小さい経済的な方法である。従来、玄米は薬剤により処理されていた。すなわち、臭化メチルを使用していた。しかし、オゾン層保護の観点から、臭化メチルの使用は疑問視され、近い将来使用禁止となる。

一方、高電圧を応用したこの殺菌技術では、薬剤を使用せず、環境に優しく、加熱殺菌の適さない穀類の殺菌への利用が期待できる。

1. はじめに

食品加工をはじめ多くの分野において、効率的殺菌技術の開発が望まれている。食品の殺菌方法としては、加熱殺菌が最も一般的かつ確実な方法として広く用いられているが、熱による変質などが避けられない。そのため、最近では他の手段、例えば電磁波や電子線、放射線等の利用による非加熱殺菌方法が試みられている。これは、電気エネルギーを間接的に用いている例であるが、直接利用することも試みられている。

液体に電気エネルギーを直接的に利用した殺菌方式には、直流電圧、交流電圧、高電圧パルスなどがある。

(1) 直流・交流電圧の印加

食品のような導電率の大きな物質中で電圧を電極間に印加すると大電流が流れ、発生するジュール熱により短時間で加熱され殺菌される。また、直流高電圧を有効に利用するために、電気分解により発生する塩素化合物や過酸化物質などの電解生成物により電気化学的に殺菌するものがある。この方法は、殺菌後塩素やその他の化合物により品質が劣化するなどの問題点がある。

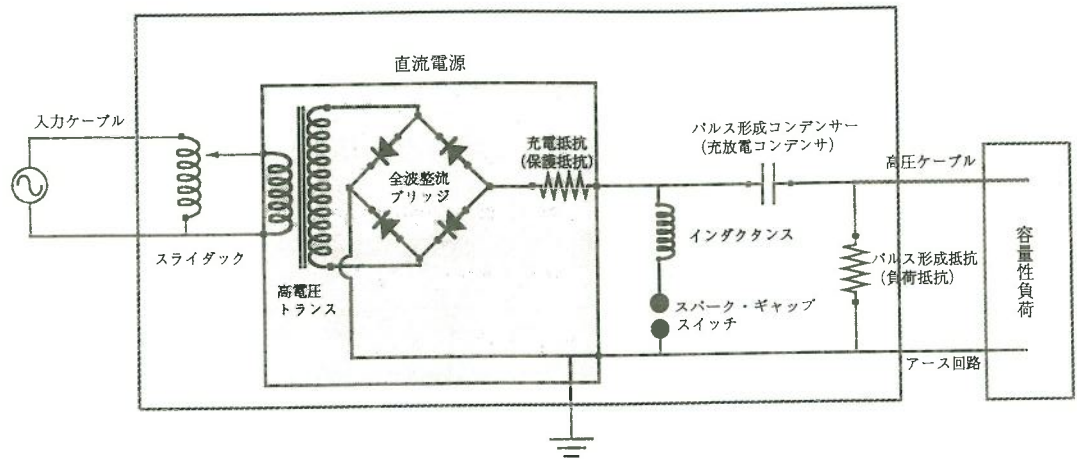


図1 高電圧パルス殺菌装置の概略

(2) 高電圧パルスの印加

高電圧パルスの印加は、コンデンサの充放電を利用する。すなわち、直流高電圧をコンデンサに貯えた後、スパーク・ギャップを通して一瞬に放電させることにより得られる。これにより、極めて短いパルス状電圧を印加することができ殺菌が可能となる。液体への高電圧パルス印加には、高電圧パルスのみを印加するパルス電界印加法と、スパーク放電により生じる衝撃波を利用するパルス放電衝撃波法の2つがある。

高電圧パルスの印加では、加熱殺菌に比べエネルギー効率がよく、他の電気による殺菌法と比較して対象物の変質が少なく、固体の殺菌へも応用が可能などの利点が挙げられる。

2. 高電圧パルス印加と殺菌

平行平板等の電極間に、立ち上がり時間数10ns、持続時間 $1\mu\text{s}$ 程度以下の高電圧パルスを印加すると、放電電極から線状に伸びるストリーマ放電が発生し、電極間の広い範囲がプラズマ化される。プラズマは、電子が高電界により加速され気体分子を電離することで生成される。また、電離にまでは至らないが、高いエネルギー状態に励起されたOHラジカルなどの活性種(ラジカル)もプラズマ中で多く生成される。この活性種が殺菌に関与していることが考えられるが、殺菌機構については解明されていない。高電圧パルス印加では温度上昇が起きにくいので、加熱殺菌の適さない玄米に代表される穀物の殺菌に

有用と考えられる。

3. 高電圧パルス殺菌装置の概要

高電圧パルスを効果的かつ安価に得る方法として、スパーク・ギャップを通したコンデンサの充放電によるものが有名である。図1に示したように、AC電源200V、50Hzをスライダック及び高電圧トランスにて電圧調節し、全波整流ブリッジで整流し、充電抵抗を通してパルス形成コンデンサを充電する。充電された電気エネルギーはスパーク・ギャップを通して瞬間的に放電され、パルス電圧となって処理槽に印加される。

4. 高電圧パルス印加による玄米の殺菌

(1) 処理槽及び玄米の処理量

処理槽部は、図2に示すように、アクリル製処理槽とステンレス製の平行平板電極及び放電中の短絡防止のため誘電体として用いる、厚さ1mmのセラミック板から構成される。処理槽へは15gから30gの玄米を投入し、高電圧パルスを印加して殺菌を行った。

(2) 高電圧パルス発生電源の概要

高電圧パルス発生電源は、パルスの発生方式にギャップ式を採用した電圧可変タイプのもを製作した。電源の仕様は、最大ピーク電圧50kV以上、周波数約100Hz、パルス極性は正極性、パルス幅約200ns、立ち上がり最短時間15nsである。

(3) 高電圧パルス印加条件

高電圧パルスの印加条件として、印加電圧は50kV、電界強度100kV/cm、パルス幅200

ns, 立ち上がり時間40ns, 印加時間15分で行った。

(4) 殺菌効果の指標

殺菌効果の指標として、玄米表面に付着している一般生菌及び真菌の殺菌率を測定した。一般生菌数の測定には標準寒天培地、真菌数の測定にはポテトデキストロース培地（クロラムフェニコール入り）を使用し、一般生菌は35°Cにて48時間、真菌は25°Cにて10～15日培養し、それぞれの菌数を測定した。

(5) 殺菌効果

高電圧パルス印加による殺菌では、電界強度が大きいほど殺菌率は上昇する傾向を示した。印加電圧50kV, 電界強度100kV/cmの印加条件では、一般生菌数及び真菌数とも99%以上の殺菌率が得られている。

5. 玄米の匂いのセンシング

(1) 必要性

従来から米に発生したカビの検出については、目視が中心であった。この方法では、作業による検出誤差やカビ発生初期において、発見が困難であるという問題点が挙げられる。そのため、作業者の主観や経験に頼らない客観的なセンシング技術が求められ、その可能性について検討した。

(2) カビ発生米の調製方法

新潟県魚沼産のコシヒカリ玄米（1996年度産）を加湿後、25°Cにて4週間貯蔵しカビを発生させたものを試料とした（写真1）。

(3) 分析方法

玄米の匂い（香気成分）の分析は、非常に希薄なためヘッドスペースガスをTENAX捕集器により香気成分を捕集し、Thermal

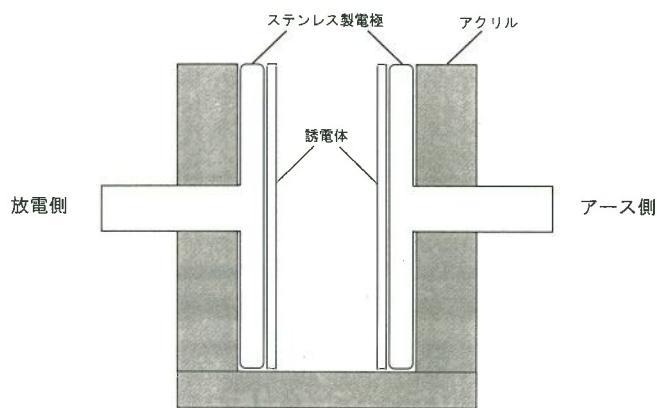


図2 処理槽部の概略

Desorption Cold Trap Injector (TCD) により濃縮後、Gas Chromatograph Mass Spectrometer (GC/MS) により分析を行った。

(4) 分析結果

通常の玄米とカビ発生後のGC/MSによる香気成分の分析結果を図3に示した。通常の玄米からは検出されず、カビ発生時だけに得られる香気成分（1-octen-3-ol, 3-hydroxy-2-butanone, 3-methyl-1-butanol）を検出することが出来た。この香気成分は、カビ発生時の指標臭になることが示唆された。

(5) 匂いセンサによるカビ発生米のセンシング

32個のセンサエレメントからなる導電性ポリマー型匂いセンサ（AromaScan製）により、玄米の香気成分を測定した。各センサの出力応答パターンから、カビ発生米を識別することが可能と考えられる。

6. おわりに

高電圧パルスを応用した殺菌技術は、現時点では研究段階であり、実用段階に至るまで



通常のみ

カビの生えた米

写真1 試料の玄米

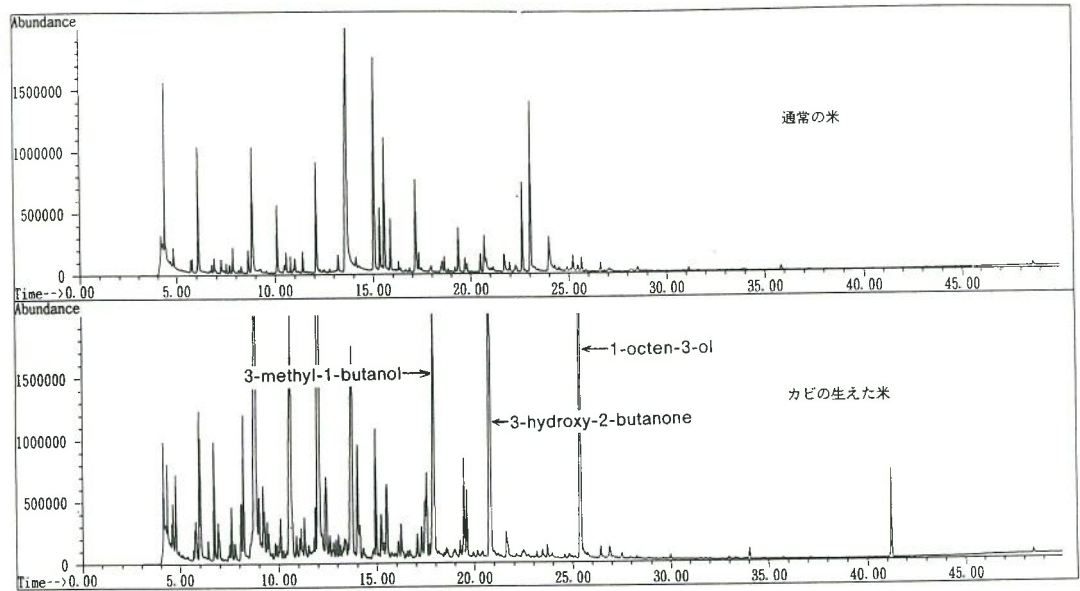


図3 香気成分の分析結果

には時間を要する。しかし、モデル的な実験ではあるが、99%以上の殺菌率を達成したことは実用化に向けて着実に前進していると言える。今後は、殺菌率を99.9%以上にするとともに処理能力を向上した実用機の技術開発を行っていききたい。また、カビの発生した玄米のセンシング技術を確立することにより、カビの発生初期の玄米を効率的に殺菌することが出来ると考える。

文 献

- 1) 佐藤正之 (1989) 化学工学, 53 (11) : 818-819
- 2) 佐藤正之ら (1989) 化学装置, 31 (1) : 129-132
- 3) 速水光浩ら (1989) 静電気学会誌, 13: (4), 322-331
- 4) 水野彰ら (1994) 粉体工学会, 29:86-90
- 5) 静電気学会編 (1986) 静電気ハンドブック, オーム社 p.220-229

国内情報

遺伝子組換えによる灰色かび病抵抗性キュウリの作出

農林水産省 農業生物資源研究所, **茨城大学農学部
西澤 洋子・*田部井 豊・**阿久津 克己

遺伝子組換え技術では、その遺伝資源を広く遠縁種、微生物さらに動物まで求めることができ、育種の可能性を広げることができる。キュウリの灰色かび病は、これまでキュウリにおいて抵抗性素材が見いだされていない、薬剤防除の困難な病気である。イネから単離したキチナーゼ遺伝子をキュウリに導入することにより、本菌類病に対する抵抗性が増加した組換えキュウリを作出することができ、育種素材としての利用が期待される。

1. はじめに

植物には脊椎動物で見られるような免疫システムによる生体防御機構はないが、それとは異なる機構で発現するいろいろな抵抗性を

持っている。例えば、主働抵抗性遺伝子（R 遺伝子）によって発現する真性抵抗性は、病原菌レースの非病原性遺伝子と R 遺伝子の相互反応によって特異的に決まる。近年、トランスポゾン・タギングや Map-based cloning の手法を用いて、R 遺伝子が次々と単離されている¹⁾。これまでの交配による抵抗性品種の育種は、この R 遺伝子の導入に長い年月が費やされてきたわけだが、今後は、単離された R 遺伝子を目的の品種に DNA 組換え技術を用いて導入することによって、短期間で抵抗性品種を作出することが可能になるであろう。しかしながら、単一もしくは少数の R 遺伝子が導入された抵抗性品種は、新たな病原性変異株の出現により短期間のうちに罹病化するという問題を残している。

一方、多種類の微働遺伝子によって発現する圃場抵抗性では、品種と病原菌の間に特別な遺伝子対遺伝子相互作用が存在せず、病原菌に対する反応の特異性が低い。この種の抵抗性は菌の増殖を完全に抑えることができない反面、効果を示す病原菌の範囲が広く、抵抗性も持続することが期待される。

病原菌の侵入に伴って植物が生産するキチナーゼや β -1, 3-グルカナーゼなどの溶菌酵素も圃場抵抗性の一因であろう。このような溶菌酵素の活性を人為的に高めることによって植物の菌類に対する抵抗性を増強させることができると考えられ、インゲンマメのキチナーゼ遺伝子を利用した腰折病抵抗性タバコが作出された²⁾。筆者らも、イネからキチナーゼ遺伝子を単離し、それを利用してうどんこ病抵抗性タバコを作出できることを示した³⁾。今後は、遺伝子組換えによる耐病性植物の作出を、重要作物の有用品種育成という実用化可能な技術にしていく必要がある。

その取り組みの一つとして、キュウリの耐病性育種母本の作出を行った⁴⁾。キュウリの品種育種において高度の耐病性を付与することは重要な育種目標である。特に灰色かび病は、これまでキュウリにおいて抵抗性素材が

見いだされてなく、かつ薬剤耐性菌が発生しやすい薬剤防除の困難な菌類病である。本菌の生育がキチナーゼによって阻害されることから⁵⁾、イネから単離したキチナーゼ遺伝子をキュウリに導入し、灰色かび病抵抗性を付与することを試みた。

2. キュウリの効率的な形質転換系の確立

キュウリでは、マーカー遺伝子の導入が報告されていたものの、安定した形質転換系が確立されているとは言い難かった。そこで、キュウリの効率的な形質転換系を確立することから研究を始めたが、ウリ科野菜へのアグロバクテリウム感染は比較的容易に起こるため、効率的な個体再分化系の確立が重要であると考えた。

まず、形質転換カルスから個体を再生させるために、オーキシシンとサイトカイニンの種々の濃度の組合せを検討したが、さらに効率を上げることは困難であったため、それ以外のホルモン（ABA）の効果を検討することにした。同時に、形質転換細胞と非形質転換細胞が混在するいわゆるキメラを回避する培養系が重要であると考え、カルスを経由しない外植片からの直接的な不定芽分化系による形質転換系を検討した。

その結果、不定芽分化培地（MS 培地 + BA 2 mg/l + ショ糖 30 g/l + ゲルライト 2.5 g/l）への ABA（0.5~1 mg/l）の添加により、不定芽分化率が向上し、多芽体形成が促進されることが明らかになった。しかも、この培養系では不定芽分化に関する品種間差異は解消され、供試した全ての品種で 80% 以上の不定芽分化率が得られた（表 1）。また、この培養系をアグロバクテリウムによる形質転換に用いたところ、分化した不定芽に占める形質転換組織の割合が著しく向上した（Tabei *et al.* 投稿準備中）。以上の結果から、ABA を用いた外植片からの直接的な不定芽分化系は、形質転換キュウリの作出に極めて有効であると判断された。

NISHIZAWA Yoko, Tabei Yutaka, AKUTSU Katsumi * : 現 農林水産技術会議事務局

表 1 キュウリのシュート形成における品種間差

品 種	不定芽分化率 (%)	
	+ABA	-ABA
四葉	83.5±12.8	50
青大	92.6±12.8	63
山東	80.3±7.0	33
埼玉落	87.1±3.3	38
ときわ	86.1±6.7	46
青長	86.4±9.7	8
相模半白	96.7±3.1	96
霜不知	82.8±5.5	51
新北星1号	90.3±6.1	42

3. キチナーゼ遺伝子導入形質転換キュウリの作出

キュウリにおいて高度な菌類病抵抗性の育種素材を作出するため、種々の病気に対して比較的強い抵抗性を有しているが、灰色かび病に弱い品種：霜不知を供試し、アグロバクテリウム LBA 4404 によってキチナーゼ遺伝子を CaMV 35 S プロモーターと共に導入した。形質転換用のバイナリーベクターは、以前、うどんこ病抵抗性組換えタバコの作出に用いたものと同じで、イネから単離したキチナーゼ遺伝子の翻訳領域を含む 1.1 kb の cDNA (RCC 2) を pBI 121 (Clontech, USA) の GUS 遺伝子と置き換えたもの (pBI 121-RCC 2) とした。

まず、アグロバクテリウム菌液に外植片を 5 分間浸漬した後、抗生物質を含まない再分化培地 (MS 培地+BA 2 mg/l+ABA 1 mg/l+シヨ糖 3%+ゲルライト 0.25%) に移して、25°C、暗黒条件下で 3 日間共存培養した。除菌後、不定芽を形成した外植片を MS 培地+シヨ糖 3%+ゲルライト 0.25%+クラフォラン 200 mg/l+カナマイシン 100 mg/l に移植し、不定芽の伸長を促すと同時に、カナマイシンによる形質転換体の選抜を行った。

莖葉の緑色を保ち順調に生育した再分化個体のうち、60 個体から DNA を抽出し、NPT-II 遺伝子の存在を PCR で確認したところ、全ての個体で特異的な PCR 産物が確

認された。次いで、イネ・キチナーゼ遺伝子 RCC 2 をプローブとした PCR-サザン分析を行い、RCC 2 遺伝子の導入が確認された個体を CR 系統とした。

これらの形質転換体を挿し芽によって増殖した後に隔離温室で順化し、順化個体数が確保できた 15 系統について、灰色かび病に対する抵抗性を検定した。1 回の抵抗性検定には各系統とも 4~6 個体を供試し、各個体から本葉 1 枚を採取して灰色かび病菌の人工接種を行った。灰色かび病菌の接種は、*Botrytis cinerea* A 340 株の分生孢子 (約 1×10^5 conidia/ml) を懸濁した径 3 mm の寒天片 (2.5% のグルコースおよび 1 mM のイノシンを含む) をキュウリの葉上に置床することによって行い、接種後 20°C の恒温器内で維持した。接種 4 日後まで経時的に病斑の直径を計測し、病斑の進展の程度から、非進展性病斑と進展性病斑とした。さらに、接種 4 日目の病斑の直径によって抵抗性の程度を評価した。対照区として用いたキュウリは、形質転換処理を行っていない霜不知と相模半白、あるいは pBI 121 を導入した霜不知とした。

抵抗性検定の結果、病斑型として非進展性病斑であり病斑径が 5 mm 以下の高度の抵抗性を示す 3 系統 (CR-29, 32, 33) が確認された (表 2)。特に CR-33 系統はほとんど病徴を示さなかった。その他、病斑の進展が遅く抵抗性を示した系統が 7 系統、コントロールと比べて抵抗性の増強が認められなかった 5 系統が観察された (表 2)。ELISA によるイネ・キチナーゼ遺伝子発現量や活性測定の結果から、強い抵抗性を示した系統ではキチナーゼの発現量が多いことが明らかにな

表 2 イネ・キチナーゼ遺伝子導入キュウリの灰色かび病抵抗性

病斑型	病斑直径 (mm)	キュウリ系統名
非進展性	<5	CR-29, 32, 33
弱進展性	5~10	CR-1, 3, 4, 6, 8, 31, 34
進展性	10<	CR-15, 18, 20, 37, 42, 霜不知, 相模半白

った。現在、エンハンサー領域を重複させた高発現用プロモーターを利用してキチナーゼ遺伝子を多量に発現させることにより、さらに高度な抵抗性キュウリを作出することを試みている。

4. 形質転換キュウリ後代における灰色かび病抵抗性の増強

灰色かび病に強い抵抗性を示した系統 CR-32 と CR-33 について自殖後代を得、それぞれ、約 180 株と約 60 株について、灰色かび病に対する抵抗性増強の有無を調べた結果、約 70% の株で抵抗性の増強が認められ、それらはイネ・キチナーゼ遺伝子を継代していることが PCR によって確認された⁶⁾。

CR-33 系統では灰色かび病菌の孢子発芽、付着器形成および侵入など、侵入以前の感染過程で顕著な阻害が観察された。一方、CR-32 系統では、侵入以前の感染過程で顕著な阻害は認められず、侵入後の菌糸伸長において顕著な阻害が観察された。また、これらの抵抗性増強株では非形質転換キュウリでは検出されなかった熱安定性の低分子物質による抗菌活性が認められた。このことは、恒常的に発現しているイネ・キチナーゼによる直接的な抗菌作用と、それに伴うキュウリ自身の抗菌性物質生産が誘導されているという可能性を示唆しており、今後、詳しく検証していく予定である。

5. おわりに

イネ・キチナーゼ遺伝子を導入したタバコやキュウリではうどんこ病や灰色かび病に対する抵抗性が増強されたが、菌の生育が全く抑えられるわけではない。細胞レベルで見

ると、キチナーゼの発現量や自己防御機構の活性は均一でなく、孢子の活性にも幅があるために感染が成立してしまうと推測される。しかし、形質転換タバコの葉上に形成されたうどんこ病菌のコロニーで生産される次世代の分生孢子は奇形が多く、それらを非形質転換タバコに接種しても、感染率は著しく低かった⁷⁾。この結果は、キチナーゼ遺伝子を利用した組換え作物において病徴が完全に抑えられなくとも、温室レベル、圃場レベルで抵抗性を評価した場合、十分に実用性の高い抵抗性を付与することができる可能性を示している。したがって、今回得られた灰色かび病抵抗性キュウリの中間母本としての価値を評価するために、その形質の安定性ととも圃場における抵抗性を評価することは非常に重要である。既に、これらのキュウリの閉鎖系温室における安全性評価実験は終了し、現在、非閉鎖系温室実験が進行中である。また、今回確立した効率のよい形質転換系を利用して、より実用的な品種にイネ由来のキチナーゼ遺伝子を導入し、灰色かび病抵抗性キュウリの実用化を推進していきたいと考えている。

文 献

- 1) Bent, A.F. (1996) *Plant Cell*, 8: 1757-1771
- 2) Broglie, K. *et al.* (1991) *Science*, 254: 1194-1197
- 3) 西澤洋子ら (1992) 植物防疫, 46: 500-506
- 4) Tabei, Y. *et al.*, *Plant Cell Reports*, (in press)
- 5) Hirayae, K. *et al.* (1996) *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 62: 30-36
- 6) 岸本久太郎ら (1997) 日植病報, 63: 232-233
- 7) 金子里子ら (1994) 日植病報, 60: 325

日本産主要有害線虫の簡易同定法

日本たばこ産業(株) 葉たばこ研究所

大類 幸夫

線虫防除技術には、土壤消毒以外に作付体系、抵抗性品種、対抗植物、*Pasteuria penetrans* などの天敵微生物の利用等がある。それらの防除効果は線虫の種によって異なるため、的確な防除手段の選択には、生息種の把握が重要である。そこで、ネコブセンチュウの種を簡易に識別する *P. penetrans* の寄主特異性を利用した方法を考案した。また、線虫の形態分類の知識がなくても迅速にネグサレセンチュウの種を同定できる PCR-RFLP 法による識別法を確立した。

1. はじめに

ネコブセンチュウ、ネグサレセンチュウ(図1)およびシストセンチュウは世界的に広く分布し、作物に与える被害が大きく、農業上重要な防除対象となっている。日本には、ネコブセンチュウ約10種、ネグサレセンチュウ約22種の生息が知られている。これらの線虫の問題は、線虫単独による被害だけではない。線虫と他の病原体が複合して植物に感染したとき、植物の被害は、それぞれが単独で起こすよりも相乗的に大きくなる場合が多い。また、土壤病害に対して抵抗性として育成された品種でも、線虫に感受性であれば病害抵抗性を失う。線虫防除では、殺線虫剤

によって経済的かつ効率的な安定した効果が得られてきた。しかし、土壤消毒剤は環境への悪影響が危惧されている。

作付体系、抵抗性品種の導入、マリーゴールドなどの対抗植物の利用、ネコブセンチュウに特異的に寄生する *P. penetrans* などの天敵微生物の利用を防除法に組み入れ、線虫密度を被害許容水準以下に維持する総合的線虫管理が目指されている。これらの防除法の効果は、線虫の種によって異なる。したがって、土壤中の線虫の種類や密度の正確な把握がより重要である。しかし、ネコブセンチュウおよびネグサレセンチュウでは、属までの識別は容易であるが、種までの同定は、形態的に酷似しているため難しい。総合的線虫管理を有効に導入するため、土壤からベルマン法(土壤から移動性のある線虫を簡便に分離する一般的な方法。図2参照)で分離されるネコブセンチュウ、ネグサレセンチュウの種を同定する簡便な方法を検討した。そして、アイソザイム解析によりネコブセンチュウの地理的分布を明らかにし、*P. penetrans* の寄主特異性を利用し、ネコブセンチュウの種を簡易に識別する方法を考案した。また、線虫の形態分類の知識がなくても迅速にネグサレセンチュウの種を同定できる PCR-RFLP 法による識別法を確立した。

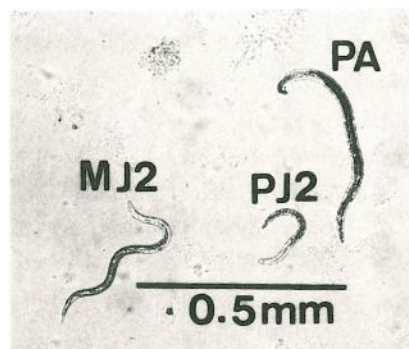


図1 MJ2:ネコブセンチュウの2期幼虫
PJ2:ネグサレセンチュウの2期幼虫
PA:ネグサレセンチュウの成虫

ORUI Yukio

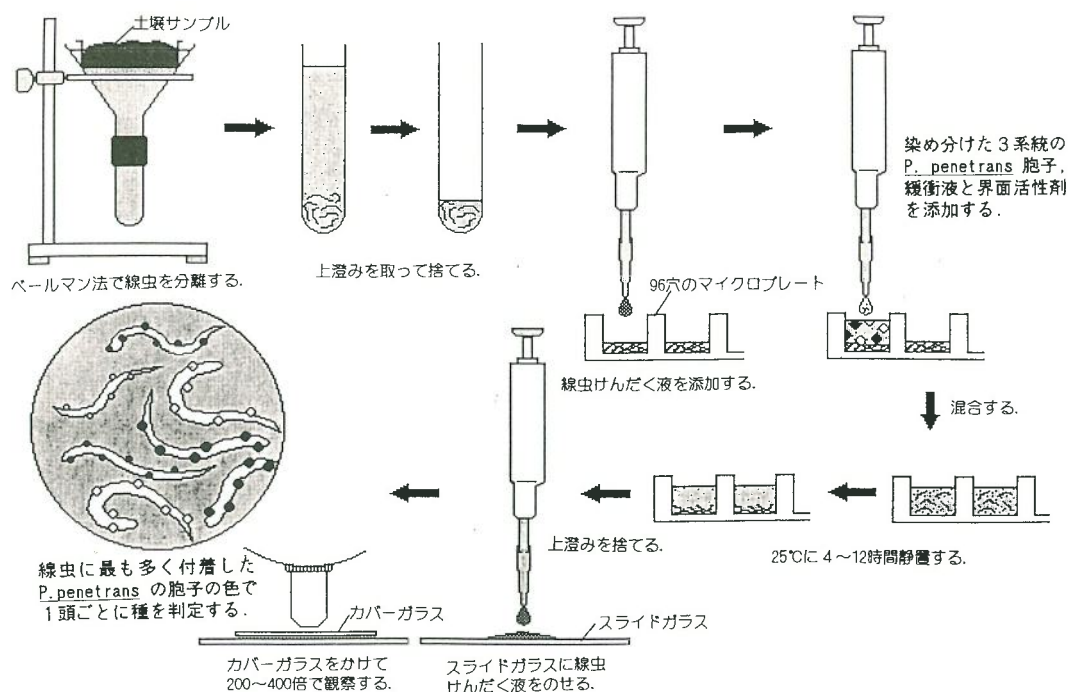


図2 染色した寄主特異性の高い *P. penetrans* の孢子による土壌サンプル中の主要な3種のネコブセンチュウの種判定プロセス

2. ネコブセンチュウおよびネグサレセンチュウの従来の同定法の問題点

ネコブセンチュウの同定は、雌成虫の会陰部周辺の紋様（ペリニアルパターン）の観察による方法が最も一般的である。この形態には、多くの種内変異があるので、正確な同定は難しい。また、判別寄主植物を利用し、ネコブセンチュウの増殖を確認して同定する方法がある。この方法は、これらの植物を準備・育成する管理場所と2か月以上の長期間を必要とする。アイソザイムを利用した同定は、正確で有効な方法として世界的に用いられている。

ネグサレセンチュウの同定には、作成した染色標本を高倍率の光学顕微鏡で観察し、分類に有効とされる形質の測定および形態観察が必要である。そして、これらのデータを総合的に勘案して種が判定される。しかし、形態による識別に有効な多くの形質には種内変異があり、種判定基準は種間でオーバーラップしている。また、ネグサレセンチュウでは雌成虫の形質にもっとも特徴があり、雄および幼虫では形質による同定はほとんどできない。

3. ネコブセンチュウの地理的分布

ネコブセンチュウの同定には、エステルゼとリンゴ酸脱水素酵素のアイソザイムが有効とされ世界的に用いられている。この2つのアイソザイムパターンによって日本の219か所のタバコ畑におけるネコブセンチュウを同定し、その分布を調査した²⁾。九州以北のタバコ畑には、サツマイモネコブセンチュウ、アレナリアネコブセンチュウ、およびキタネコブセンチュウの3種が検出された。ジャワネコブセンチュウは琉球諸島の一部でのみ確認された。各種の分布が重なり合う地域では同一の畑に2種以上が混棲していることが多かった。寄主範囲が広いこれらのネコブセンチュウは、野菜・作物畑でも同様な分布を示していると思われる。野菜・作物畑において、この3種を識別できることが重要である。

4. *Pasteuria penetrans* の寄主特異性を利用したネコブセンチュウの識別

サツマイモネコブセンチュウ、アレナリアネコブセンチュウおよびキタネコブセンチュウ

ウ由来の *P. penetrans* 3系統はそれぞれの起原種に付着特異性を示した。*P. penetrans* の胞子は、超音波処理により、2期幼虫に対する付着特異性を失わずに付着活性が高まることが明らかにされている³⁾。

寄主特異性の高い3系統の *P. penetrans* の胞子を超音波処理で付着活性を高め、その後 Brilliant Blue G (青色), Acridine Orange (橙色) および Methyl Violet (紫色) で染め分け、2期幼虫体表に接触させ、付着した胞子の色によってサツマイモネコブセンチュウ、アレナリアネコブセンチュウおよびキタネコブセンチュウの3種を1頭ごとに同定する方法を考案した(以下染色胞子法)。系統ごとにこの3色で染め分けた胞子の混合液と3種のネコブセンチュウの2期幼虫を混ぜ合わせたとき、最も多く付着した胞子の色によって、1頭ごとに種の判定が可能であった。図2に示したプロセスに従って、土壤試料からベルマン法で分離したネコブセンチュウ、自活性線虫およびネグサレセンチュウを含む線虫の懸濁液を供試した場合、染色胞子はネコブセンチュウの2期幼虫にのみ付着し、上述したように種を判定できた。本法はネコブセンチュウの2期幼虫を1個体ごとに識別し、試料中の2期幼虫の密度を同時に把握できる。さらに、他の方法では難しい種の混在

比の推定が可能なところに、この方法の特徴がある。

5. PCR法によるネグサレセンチュウ、ネコブセンチュウの種の識別

アイソザイム解析では微小なネコブセンチュウの2期幼虫およびネグサレセンチュウの種を識別するためには多数の線虫が必要となるが、PCR法を用いれば、1個体でも種の識別は可能である。

ネグサレセンチュウの rDNA の5.8Sを含む2つのITS領域をPCRで増幅し、個体ごとに種を識別するPCR-RFLP法を確立した⁴⁾。1頭の線虫を lysis buffer (10 mM Tris-HCl: pH8.0, 1 mM EDTA, 1% IGEPAL CA-630 (Sigma) and 100 μ g/ml proteinase K) 中で破碎し、proteinase K を失活するための熱処理後に遠心チューブのPCR反応液に直接加えた。この方法によって1頭の線虫から抽出したDNAがPCRで増幅され、これらの増幅産物を制限酵素 *AluI*, *HhaI*, *HinI* および *TaqI* で処理した断片パターンにより種を識別できた(図3)。この方法は、雌雄に関係なく卵から成虫までのすべての发育ステージに適用でき、形態による同定法の問題点を十分に解消している。

6. おわりに

線虫の形態分類の知識がなくても簡便かつ迅速な種までの識別が *P. penetrans* の染色胞子法およびPCR-RFLP法の利用により可能になった。形態による分類では、種判定基準の種間のオーバーラップや形態の変異が多いために識別が難しいことや顕微鏡観察に煩雑さがともない識別に熟練が必要であるなどの問題点をこれらの方法は十分に補ってくれる。農作物の植え付け前の土壌には、従来の技術では同定しにくいネコブセンチュウの2期幼虫、あるいは同定のために高倍率での形態観察が必要なネグサレセンチュウが生息している。しかし、ここで開発された同定法

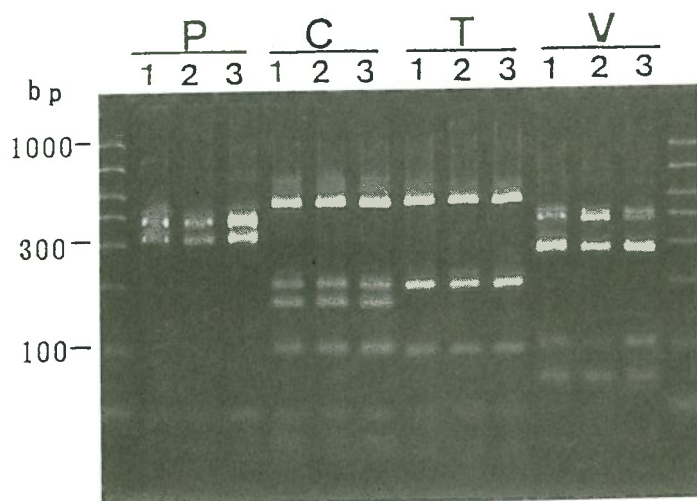
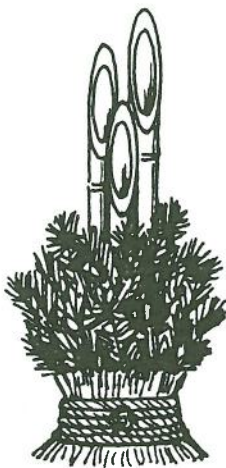


図3 PCR-RFLP法によるネグサレセンチュウの同定(リボゾームDNAのITS領域のPCR産物を *AluI* で処理したパターン)
P: キタネグサレセンチュウ, C: ミナミネグサレセンチュウ, T: ミナミネグサレセンチュウ近縁種, V: クルミネグサレセンチュウ, 番号: 個体群番号

は、これらの正確な種の判定を可能にした。これらの同定法は、線虫密度を被害許容水準以下に維持する環境への影響をも考慮した総合的線虫防除に役立つであろう。また、有害線虫の防除につながる今後の基礎的な研究にも貢献することが期待される。

文 献

- 1) Esbenshade, P. R. and A. C. Triantaphyllou (1990) *J. Nematol.*, 22 : 10-15
- 2) Orui, Y. T., Nishi and H. Matsuzawa (1996) *Appl. Entomol. Zool.*, 31 : 225-231
- 3) Orui, Y. (1997) *Appl. Entomol. Zool.*, 32 : 101-107
- 4) Orui, Y. (1996) *Appl. Entomol. Zool.*, 31 : 505-514



異質三倍体魚ニジイワの実用化

愛知県水産試験場 内水面漁業研究所 三河一宮指導所
石田基雄・中村総之・落合真哉

三河一宮指導所では、染色体操作による全雌異質三倍体魚ニジイワ（ニジマス♀とイワナ♂の交雑種）の作出技術を開発した。ニジイワは20~150gサイズで親魚であるニジマス、イワナより成長が早く、マス類養殖でもっとも被害の大きい病気IHNに抗病性を持つことが明らかになった。今後、付加価値の高い地域ブランド品として、県下の養殖普及を目指している。

1. はじめに

染色体操作による新たな養殖魚種の開発は、近年急速に技術開発が進み、1980年代には実用のレベルに達している。しかし、染色体操作による三倍体魚等の無秩序な利用は、自然生態系に悪影響を与えかねないことから、「三倍体魚等の水産生物の利用要領」（平成4年7月2日付け、水産庁長官）が制定され、秩序ある実用化が図られてきた。この要領は三倍体魚等の適切な利用のための基本的要件を示すとともに、事業者は利用しようとする三倍体魚等を利用上のメリット、自然生態系への影響等の観点から特性評価し、水産庁はその特性評価の要領への適合を確認することとしている。

三河一宮指導所では作出手法を開発したうえで、この要領に沿ってニジイワの特性評価を行い、水産庁へ確認申請を行った。そして、1997年7月には水産庁がその特性評価の要領への適合を確認し、ニジイワの種苗生産及び養殖が可能となった。ちなみに、1997年7月までに水産庁が利用要領への適合を確認し、種苗生産及び養殖が可能となっている新魚種は13種となっている。

魚類養殖では、大量の飼育動物をまとめて取り扱う必要があることから、物理的、化学

的刺激で可能な染色体操作は好都合な手法であり、染色体操作による新魚種の開発は今後さらに進んでいくと予想される。

2. ニジイワ作出に用いた親魚

ニジイワの雌親魚には、当所（平成6年、鳳来養魚場から移転）で継代保存しているニジマス（*Salmo mykiss*）、雄親魚には同様のイワナ（*Salvelinus pluvius*）を用いた。

当所継代保存のニジマスは1964年に滋賀県醒ヶ井の池田養鱒場から購入したものを起源として、以降1974年には岩手県内水面水産試験場からスチールヘッド（降海型のニジマス）を、1975年には長野県の民間養魚場から通常のニジマス、1977年には水産庁淡水区水産研究所日光支所からドナルドソン系ニジマスをそれぞれ導入しており、継代途上でこれらが交雑して現在に至っている。また、1965年にはパーマーク及び黒い斑点を持たないニジマス（ホウライマスと命名）を見つけ、純系化する試み等がなされてきた。その過程で、この無斑の形質はメンデル遺伝することが確認され、有斑の形質に対して優性であることも明らかになっている。¹⁾

当所では、飼育施設の制限から元々大集団での継代が不可能なうえ、ホウライマスを優先して交配を繰り返したことから、保存群は遺伝的にかなり偏りを生じていると推定している。

ISHIDA Motoh, NAKAMURA Fusayuki, OTSUI Masaya

一方、イワナは1975年に岐阜県水産試験場から導入したニッコウイワナが起源で、そのまま保存されてきた。ニジマス同様近親交配による遺伝的な偏りが進んでいると見られる。

イワナ類であるアメマス、ニッコウイワナ、ヤマトイワナ、ゴギの4種については、全部同一種とする説や、アメマスのみ別種とする説、それぞれが別種あるいは亜種とする説などがあり、分類は未だ確立されていない。その上、イワナ類は生息域によって生態、形態に変異が多いようなので、後に述べるニジイワの特性については、ニッコウイワナを親魚に用いたことを念頭に置いておく必要がある。

3. 異質三倍体化の手法

魚類における染色体の倍数化、別種の染色体の付加等の技術の基本は、1980年代にはすでに開発されていた。我々が担う役割は、基本的な技術を事業規模での実用化に結びつける橋渡しであり、養殖現場の実態を見据えたうえでの実現性、採算性を配慮した応用技術の開発といえる。そして、マス類における染色体操作技術の開発は養鱒技術協議会での頻繁な情報交換を介して進められた。以下に述べるニジイワ作出の技術は、同様の経過で開発されたことを付記しておく。

ニジイワは受精卵の第二極体放出を阻止して作出する。第二極体放出阻止は第二成熟分裂が休止した状態で生まれてくる魚類卵の性質を利用した方法で、受精後の一定時期に物理的あるいは化学的的刺激を与えて、再開された第二成熟分裂を不調に終わらせることで成立する。第二極体はもともと卵が作られるとき複製された染色体セットなので、これが残れば染色体セットが一組増えることになり、三倍体化が可能となる。但し、この方法は卵と精子が受精していることが前提となるので、三倍体化が可能な組合せは、かなり限定される。

第二極体放出阻止のための刺激としては温水、冷水、圧力などがあるが、ニジイワの作出では温水に浸漬する方法を用いる。具体的にはイワナの精子を媒精したニジマス受精卵

を吸水5分後（飼育水温10～12℃）から20℃の温水に5分間、その後26℃の温水に20分間浸漬してから元の飼育水に戻す。以後は通常のマス類卵と同様に管理する。ニジマスとイワナは致死性交雑種なので、この方法でふ化してくる稚魚のほぼ100%が三倍体魚ニジイワである。

4. 性の統御

三倍体魚については、雄は一部個体が成熟して精子を作るが、雌は成熟しないことがほぼ明らかになっている。万一養殖中の三倍体魚が事故等で自然界へ逃げ出した場合でも雌であれば自然界で子孫を残さないことから、三倍体魚については、総て雌であることが義務づけられている。

ニジイワを含め、これまで実用化されてきた三倍体魚の全雌生産には、雄親に遺伝的には雌で機能的には雄である性転換雄を使っている。マス類の性転換は、雌であることがあらかじめ明らかかな群（雌性発生群）の稚魚期に雄性ホルモン（メチルテストステロン）を一定量与えることで可能である。雌性発生はあらかじめ紫外線を照射して不活化した精子を受精させた卵の第二極体放出を阻止して行う。

この性転換雄の生産が三倍体魚作出のポイントの一つとなる。これまでニジマス、アマゴでは8割以上の高い性転換率が得られているが、イワナではふ化から餌付け期までの間の1日置き2時間の0.5μg/l 雄性ホルモン溶液への浸漬、及び60日間の0.5μg/kg 雄性ホルモン含有飼料の投与で1割程度の性転換率にとどまっている。

種苗生産では雄は少なくともよいことから、上記性転換率でも事業化は可能だが、雄親の飼育効率を考えればさらに高い性転換率が望まれる。

5. 作出されたニジイワの特性

三倍体魚に共通して言えることだが、受精卵の発眼率は正常魚より低い。これまでのニ

ジイワ生産例ではおよそ50%前後となっている。さらに、ふ化率もやや悪く、ふ化稚魚の初期死亡も多めである。

成長については30~150gサイズでの試験結果を表1、図1に示した。ニジイワはその親魚であるイワナ、ニジマス(ホウライマス)に比べて高い成長率を示した。飼料効率も109%でイワナ(94%)、ニジマス(90%)より高かった。服部ら²⁾はニジイワ、ニジアマ、

ニジマス(ホウライマス)の異なる水温条件下での成長を試験しており、11.3~19.7°Cで20gサイズのニジイワはニジマスより高い成長率を示したことを報告している。

ニジイワは飼育してみると、餌付け期から10gくらいまでは原因不明の死魚もあり、摂餌も特に良くはないが、以後は死魚も減ってニジマス並に活発な摂餌を示すようになる。水槽内での遊泳はニジマスよりゆったりして

表1 ニジイワ成長比較試験結果

項目	ニジイワ	イワナ	ホウライマス
開始尾数(尾)	60	60	60
開始平均体重(g)	31.2±2.8	27.0±2.8	31.3±2.9
開始時総重量(g)	1,873.9	1,617.1	1,880.2
終了時尾数(尾)	58	56	57
終了時平均体重(g)	194.5±24.3	134.6±27.6	153.0±22.1
終了時総重量(g)	11,280.3	7,536.4	8,721.0
へい死尾数(尾)	2	4	3
へい死重量(g)	109.7	435.5	442.0
給餌量(g)	8,770	6,765	8,080
増重量(g)	9,406.4	5,919.3	6,840.8
補正増重量(g)	9,516.1	6,354.8	7,282.8
飼料効率(%)	107.3	87.5	84.7
補正飼料効率(%)	108.5	93.9	90.1
飼育日数(日)	155	155	155

* (図1と同じ試験)

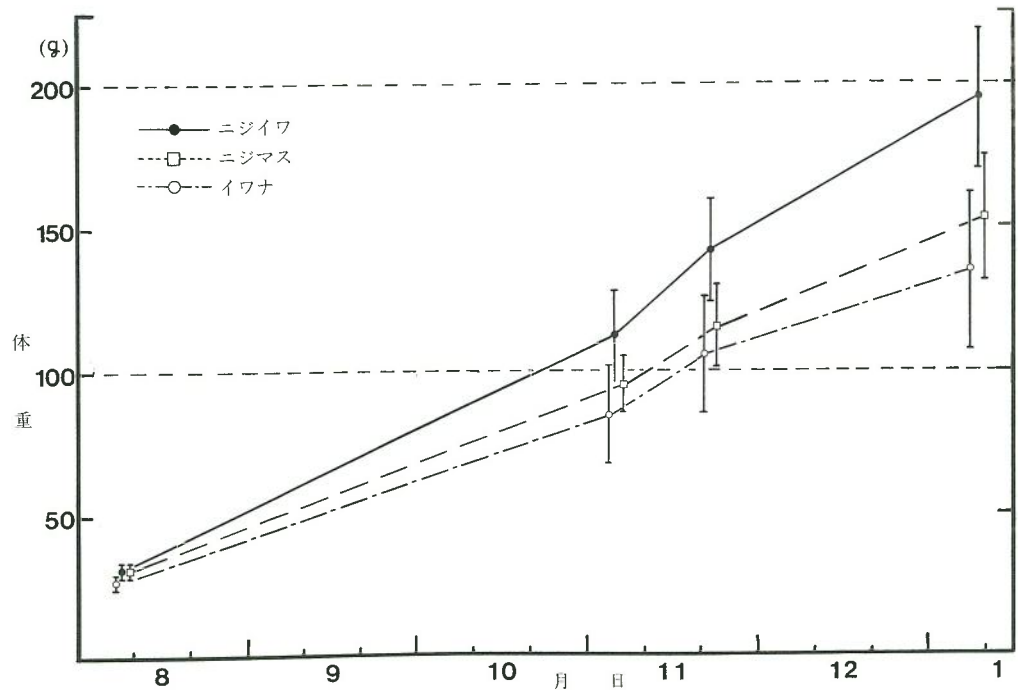


図1 ニジイワ成長比較試験結果

400 l FRP水槽使用, 毎分12 lの注水, 18°C前後で5か月間飼育, 市販ペレットを給餌, 給餌量はライトリッツの給餌率表を目安に期間中5回変更

おり、それが成長が早く、飼料効率が良い要因かも知れない。

また、ニジイワは近年マス類養殖でもっとも被害の大きいIHN（伝染性造血器壊死症；ウィルス病）に抗病性を持っている。表2にIHN感染試験の結果を示した。病原ウィルスを含む淡水に一定時間浸漬する方法、及び病原ウィルスを腹腔に直接注入する方法

とで感染させ、その後の死亡を調べた。その結果、ニジイワはイワナ同様IHNに対して強い抗病性を持っていることが明らかになった。マス類には多くの病気が知られており、ニジイワが総ての病気に強いことはあり得ないが、IHNに強いことは大きな特徴の一つといえる。

表2 ニジイワのIHN ウィルス感染試験結果

試験	方法	力価 試験 価 期 間	試 験 区	供試魚 サイズg	供 試 尾 数	へい死 尾 数	へい死 率%		
1	浸漬法	TCID ₅₀ = 10 ^{3.8} /m l 溶液に 1時間浸漬 21日間	ニジマス 感染区	2.6	35	23	65.7		
			ニジマス 対照区	2.6	35	0	0.0		
			ニジイワ 感染区	1.5	35	0	0.0		
			ニジイワ 対照区	1.5	35	0	0.0		
2	注 射 法	TCID ₅₀ = 10 ² MEM液を腹腔 に注射 21日間	ニジマス 感染区	7.9	30	24	80.0		
			ニジマス 対照区	7.9	30	1	0.3		
			ニジイワ 感染区	7.0	30	0	0.0		
			ニジイワ 対照区	7.0	30	0	0.0		
		同	21日間	ニジマス 感染区	7.9	30	29	96.7	
				ニジマス 対照区	7.9	30	1	0.3	
				ニジイワ 感染区	7.0	30	0	0.0	
				ニジイワ 対照区	7.0	30	0	0.0	
	同	14日間	ニジマス 感染区	7.9	9	8	88.9		
			ニジイワ 感染区	7.0	10	0	0.0		
			ニジマス 感染区	7.9	10	10	100.0		
			ニジイワ 感染区	7.0	10	0	0.0		
同	14日間	ニジマス 感染区	7.9	10	10	100.0			
		ニジイワ 感染区	7.0	9	0	0.0			
		ニジマス 感染区	13.7	30	27	90.0			
		ニジマス 1 対照区	13.7	30	0	0.0			
3	注 射 法	TCID ₅₀ = 10 ³ MEM液を腹腔 に注射 25日間	ニジマス 2 対照区	13.3	30	28	93.3		
			ニジイワ 感染区	12.5	30	1	3.3		
			ニジイワ 対照区	12.5	30	0	0.0		
			イワナ 感染区	9.1	30	0	0.0		
			イワナ 対照区	9.1	30	0	0.0		
			同	25日間	ニジマス 1 感染区	13.7	30	29	96.7
					ニジマス 2 感染区	13.3	30	30	100.0
					ニジイワ 感染区	12.5	30	2	6.7
イワナ 感染区	9.1	30			7	23.3			

* 注射法による力価は供試魚1尾あたりに与えたウィルス量を示した。対照区はウィルスを除いて、感染区と同じ取り扱いを行った。

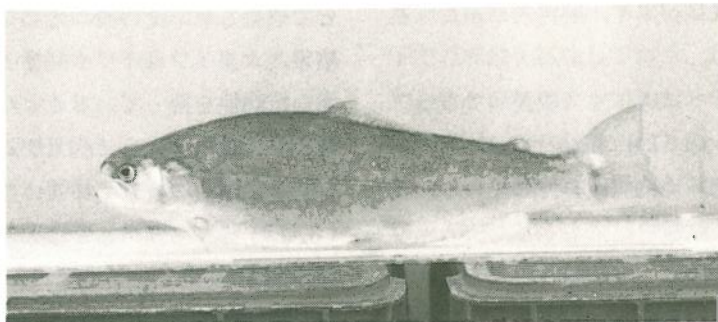


写真 ニジイワの1年8か月魚，体重約800g

6. 今後の方向

ニジイワは1997年7月から種苗生産及び養殖が可能となったが、これはニジイワ実用化の第一歩と言わざるを得ない。

ニジイワを事業規模で養殖した場合のメリット、デメリットは総てが明らかになっているわけではない。ニジイワは上記した特質の他、全雌三倍体なので成熟せず、秋冬季にはニジマスより良い肉質を保ち、この時期の成長の遅滞もない。これらがどの様にコストに反映されるのか、当面事業規模での養殖試験を行うことが前進の筋道である。

次に販売価格が問題となる。現在、サケ・マス類についてはノルウェー等から養殖アトランティックサーモンが大量かつ安価に輸入されている。ニジイワを一般消費向けに出荷しても、似たものが安価に販売されている以上、高価格は期待できない。ニジイワは付加価値が期待できる地域ブランド品としての出

荷を目指すべきであろう。愛知県下の山間地域には、温泉旅館等が点在しているので、これら旅館等の料理素材、特に刺身用素材として出荷できれば、地域ブランド品としての展望が開けてくる。もちろん、地域ブランド品として名を広めるためには安定供給が必須であり、需要に見合う供給体制の整備も重要な課題となろう。

ニジイワは雌親にホウライマスを使うことで、斑点の一切ない美しい魚体にすることも可能であり（絹姫サーモン；鈴木知事命名，愛知県淡水養殖漁業協同組合登録商標），ブランド品としてのイメージ創出は容易である。今後、山間地域の発展と合わせて、ニジイワの養殖が軌道に乗ることを期待したい。

文 献

- 1) 石井吉夫・小山瞬二・今泉克英（1980）水産増殖，28（3）：128-133
- 2) 服部克也・舞田正志（1996）愛知水試研究報告，第3号：43-48

らい小麦の北海道への導入とその粉の利用性

農林水産省北海道農業試験場, *酪農学園大学, **神戸女子大学
中司 啓二・山内 宏昭・*義平 大樹・**瀬口 正晴

北海道農業試験場では、円滑な畜産糞尿処理のために、らい小麦を導入することを検討してきた。その結果、小麦が栽培できない北海道東部地区でも、堆肥の原料となる敷料用や粗飼料用のわらがとれることが確認された。また、液状厩肥を肥料として用いると低コストで生産でき、糞尿の利用性が高まることが期待できた。一方、子実の用途では、パンをはじめ麺についても取り組み、らい小麦粉の特徴や性質が明らかになってきた。

1. らい小麦の紹介

らい小麦は日本での栽培面積が少なく、その存在はほとんど知られていない。北海道においては、昭和30年代までらい麦が栽培されていたため、両者が混同されることが多い。名前から想像されるように、らい小麦 (*X Triticosecale* Wittmack) は小麦 (*Triticum* spp.L.) とらい麦 (*Secale cereale* L.) の人工的な合成によってできた新しい麦で、First Man-Made Cereal (人類初の人工穀物) と呼ばれる。これは小麦とらい麦は自然状態で交配しないため、初期のバイオテクノロジーにより作りだされたためである。らい小麦の報告は古く、1875年スコットランドの A.S. Wilson が最初といわれている。全世界の栽培面積は1992年に約250万 ha であった。小麦には遠く及ばないが、86年が約110万 ha であったことを考えると、らい小麦の急速な普及と品種改良が理解される。最も栽培面積が大きいのはポーランド、続いてロシア、ドイツとなっている。最近では、オセアニア、アフリカ諸国、中南米でも栽培が始まっている。

らい小麦の特徴を一言で表現するなら、「小麦より高い乾物生産力(子実+わら)」となる。21世紀は飢餓の時代という警告があるなか、大変に魅力的な麦である。

2. 北海道への導入を考えた背景

北海道は国内最大の小麦生産量を誇るが、気候の関係で東部や北部の酪農地帯では小麦が栽培できない。このため、乳牛の敷料などに使うわらは、畑作地帯からの購入に頼っている。近年、酪農の規模拡大により、成牛を100頭以上飼養する経営も多く、わらの確保が困難になりつつある。これに伴い糞尿の量も多くなり、牧草地への施用だけでは処理できなくなり、河川・地下水の汚染は深刻化しつつある。これを解決する方法は、寒冷な気候でも栽培できる麦の導入である。すなわち、麦栽培のために施用する糞尿の量が牧草より2~3倍多いこと、牧草地への施用が表面散布なのに対し、麦では土壌と混和され流亡しにくいこと、わらが敷料や堆肥の原料となるためである。これに適した麦としてらい小麦を選んだ。

3. らい小麦の生産力と問題点

北海道用の品種がないため、ポーランドやカナダから種子を輸入し、栽培試験により使用する品種を PRESTO (ポーランド産、秋播) とした。PRESTO は小麦に比べ長稈穂重型で、叢生は匍匐型、茎は節間伸長期から直立して強靱という形質を持つ。千粒重は45g と重く、大粒な子実である。小麦、らい小

麦, らい麦の生育を比較すると, 出穂期は小麦に比べてらい麦が15日, らい小麦が6日早く, 開花期は総て同じで, 成熟期はらい麦が12日, らい小麦は6日遅い。生育は小麦とらい麦の中間となり¹⁾, らい小麦が両者から作られたことが表れている。試験は農家, 農協, 農業改良普及センターの協力により, 平成5年から道東を中心に行った。表は平成6年8月, 7年8月, 8年8月に収穫した PRESTO の収量調査結果である。このうち, 別海町と浜中町は小麦が栽培できない酪農専業地帯である。栽培は基本的に小麦と同じだが, 試験地が広範囲に分布して気候や栽培管理が異なるため, 栽培結果は大きく変動している。概括すると 1)全重は1000kg/10a 以上, 2)わらは700kg/10a 以上, 3)子実収量は畑作地帯で500kg/10a 以上, という結果となった²⁾。子実収量は小麦に比べ1~3割程度多く, わらは小麦の2倍以上となっている。その一方で, 平成8年の白滝村や別海町のように収穫できない例もあった。PRESTO は秋播のため, 9月中旬に播種して越冬, 翌年8月上旬に収穫している。PRESTO の越冬性は, 北海道の小麦に比べて劣り³⁾, 雪腐病により壊

滅的被害を受けることがある。この被害は積雪期間の長い地区で顕著であった。他の病害では眼紋病や株腐病には罹病せず, うどんこ病やさび病には強いが, 赤かび病は小麦並で罹りやすい。越冬性では小麦に劣るが, 夏の冷涼な気候には強く, 夏はほとんど霧に覆われる浜中町や別海町でも1000kg以上の全重が確保できた。酪農地帯にわらを供給する目的は十分に果たせると考えられる。ただし, 酪農地帯でわらを生産するためには, 播種や防除用の機械整備が必要である。なお, 春播品種も栽培したが, 子実収量が300kg/10a で, わらも500kg/10a 程度であった。

4. 子実や粉の利用

らい小麦は新しい麦であるため, 子実の利用に関する研究は進んでいない。欧州では, 家畜の飼料としてかなりの量が消費されているようであるが, 正確には把握できていない。らい小麦を利用した食品は, パンやクッキーが主であるが, ビールやウオッカなどもある。らい小麦粉50%以上のパンは表紙写真のように, ふくらみが弱くて酸味と苦みもあるため,

表1 らい小麦 PRESTO 栽培結果 (10a 当り)

地域	全重kg	わらkg	子実kg	穂数	穂長cm	稈長cm	千粒重g
音更町	2,399	1,628	891	770	9.0	118	34.4
音更町	1,555	1,083	545	531	8.1	119	31.5
8年 白滝村* ¹							
8年 別海町* ¹							
8年 浜中町	1,237	926	360	449	7.8	113	41.5
滝上町	991	609	441	281	9.0	99	33.3
端野町	1,408	1,039	427	459	8.9	111	28.7
紋別町	1,662	1,126	621	545	9.2	117	34.9
7年 音更町	1,495	834	764	396	9.0	112.0	42.0
7年 音更町* ²	1,052	673	438	370	8.8	113.7	35.5
8年 白滝村	1,866	1,240	723	498	10.0	121.5	44.7
8年 別海町	1,024	759	306	430	7.7	120.8	33.2
8年 浜中町	1,187	881	354	442	8.0	127.1	29.1
6年 音更町	1,021	589	502	307	9.6	108	36.6
6年 別海町	1,568	1,310	298	1,043	7.8	104	32.0
8年 端野町	1,315	784	614	456	8.3	107	42.7
8月 札幌市	1,871	1,139	846				42.3

*1: 廃耕, *2: 収穫放棄, 穂数は千本, 子実重は水分13.5%, 他は乾物

あまり好まれない。しかし、小麦粉にらい小麦を10%程度混ぜてパンを焼くと、小麦100%のものより2~3割ボリュームが増え⁴⁾(表紙参照)、なおかつ食味の評価が高い。ボリュームが増える原因は、らい小麦の酵素によることがほぼ確かめられ、同定に取り組んでいる。この酵素は水溶性でかなり安定で、天然の膨張剤としてパンでの利用が期待できる。混合割合を20%以上に増やすと、らい小麦の特徴が強くなるため、食味の評価は分かれるが、中年以上の男性の評価が高いというおもしろい結果が出ている。ただし、らい小麦粉を加えた生地は癖が強く、上手にパンを焼くのが難しいこと、らい小麦と異なり知名度がないため、パン屋での評判は良くなく、普及の大きな問題となっている。クッキーはパンとは異なり、らい小麦のものが小麦のものより高い評価が得られている。食味試験で、9割以上の人がサクサクとした食感と、独特の香ばしさがあると答えている。焼き菓子の原料としては、有望と思われる。ビールは大麦に比べエキス分が5%、澱粉糖化酵素力も1.5倍以上高いという特徴を持つが、大麦と異なり殻がないため、ろ過ができない、最終発酵度が6%低いという問題がある。地ビールとしてろ過しない状態で飲む場合はよいが、瓶や缶に詰めることは無理がある。

5. 麺—需要創出の試み

らい小麦の重要な育種目標の一つは、製パン特性を小麦並にすることで、基本的に麺用には適さない。しかし、日本人の麺好きを考えると、麺特性の把握が必要と考えて取り組んでいる。麺の太さ等の条件を一定にして、うどん(市販中力粉100%)、そば(そば粉80%+中力粉20%)、らい小麦(100%)の麺を打ち、破断力測定機でゆで上げ直後の物性を計測した。図1は麺をカッターで切断した時の力の値で、うどんの場合切断時の力は140g程度で、一気に切断される。さらに、切断までの変形量が7mmと多く、適度な硬さと腰が強いことを示している。そばは切断時の

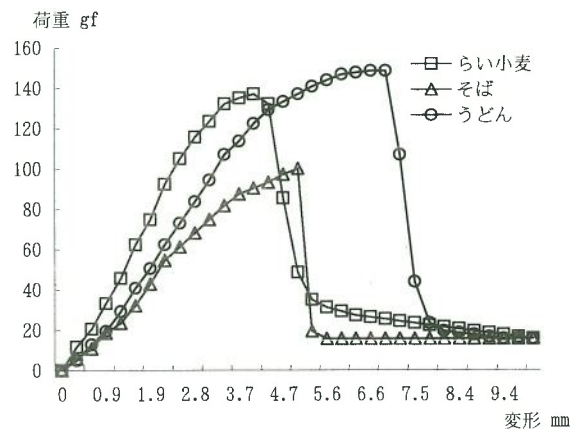


図1 各種麺の物性

力や変形も小さいが、切断時は一気に切れる。うどんより腰は弱い歯切れがよいことを示している。らい小麦麺は切断時の力はうどんと同様に高いが、変形量が4mmと最も少なく、さらに切断も緩やかに起こる。そのため、歯切れが悪く、硬いわりにうどんのような腰が感じられない。しかし、らい小麦麺はやや苦みを含む独特な風味を持つので、そばのように小麦粉を加えることで食感の改良が可能か、試験する予定である。

6. おわりに

新しい作物を研究する機会は極めて少なく、また、多くの方々の支援・協力を得られたことに、深謝している。しかし、新作物は知名度が低く需要が少ないため、多くの長所を持っていても、導入や普及は困難な場合が多い。北海道農業試験場でも、らい小麦の他にダツタンソバがその例である。今後は栽培だけでなく、食品加工などの研究を進め、実需者へのアピールが重要になってくる。

文献

- 1) 義平大樹ら(1997)酪農学園大学紀要, 21(2):193~200
- 2) 中司啓二ら(1996)日土肥学会講要, 42:215
- 3) 義平大樹ら(1996)酪農学園大学紀要, 21(1):101~107
- 4) Seguchi, M. et al(1997) 82nd AACC Annual Meeting, pp.357

文献情報

サルの核移植

核移植による再構築胚の研究は、成体ヒツジの乳腺細胞を核移植して産子を得た Campbell らの報告により、体細胞由来の新たなクローン動物の作出法として示された。霊長類におけるこの分野の研究は、発生生物学や医学面においてヒトのモデルとして注目されていたものの、卵子や胚を得ることでさえ難しかったが、最近のサルの研究成果を基に、サルの核移植による産子が得られ報告された。

サルはアカゲザルを用い、性腺刺激ホルモンを投与した雌から得た卵子を除核した。体外受精をした新鮮胚または凍結保存後融解した胚の割球をドナー核とし、これを除核した卵子の透明帯内に注入し、電気刺激で融合させた。166個の卵子を用い、除核したのは138個、融合したのは115個、分割したのは78個であった。得られた再構築胚は、培養後に胚移植するまで凍結保存し、性周期に合わせて9頭の雌のアカゲザルに29個の再構築胚を移植した。このうち3頭が妊娠し、2頭の産子が得られた。得られたのは雄と雌の1頭づつであった。

サルはヒトのモデルとしてその有用性は指摘されながら、他の種に比べ研究材料を得るうえで制限が多かった。今回の報告では、性腺刺激ホルモン処置や凍結保存することで受胎適期に移植するなど、他の動物種ではすでに基礎技術として利用されている種々の段階を経て、核移植による再構築胚を作成し、産子を得ている。こうした一連の改良によるこれまで困難とされてきた動物種での成功は、霊長類におけるこの分野の前進のみならず、これまで行なわれなかった動物種への応用を促すだろう。とくにこれまで材料の入手が困難であった種や絶滅危惧種への応用が可能になっていくかもしれない。

(抄訳 松本浩道—東北大農)

(MATSUMOTO Hiromichi)

Rhesus monkeys produced by nuclear transfer

Meng, L. *et. al.*

Biology of Reproduction, 57: 454-459, (1997)

文献情報

糸状菌菌糸内の核の往来：
*in vivo*での *A. nidulans* の
核移動と位置決定について

真核細胞において、核の移動とその位置決定は、細胞質分裂の位置の決定のために非常に重要な過程である。これに関する研究は、核の移動距離の長さから、主として担子菌や糸状菌において行われてきた。特に、分子面からの研究は、*Aspergillus nidulans* や *Neurospora crassa* を中心に展開されてきたが、細胞学的な研究、特に生きた菌糸での核の可視化が困難なことから、動的な研究はほとんど行われていないため、全体像の解明はなされていない。

ところで、ある種のクラゲの生産する green fluorescent protein (GFP) は、可視領域の波長の励起光照射によって、それ自身強い緑色の蛍光を発するタンパク質であり、発色に基質を必要としないことが特徴である。GFP は、特定の遺伝子やその一部と融合させるなどによって、特定遺伝子の発現場所の解明のためのタグや、オルガネラ特異的な蛍光プローブとして、ここ数年広く利用されるようになってきている。

今回 GFP をツールとして、生きた *A. nidulans* の菌糸における核移動の観察が行われた。Suelmann らは、植物での発現用に改良された GFP (sGFP) を、*A. nidulans* の transcriptional activator である StuA タンパク質の核局在ドメインとの融合タンパク質として発現させた。すなわち核特異的な蛍光プローブとして利用することで、菌糸伸長、核移動、隔壁形成、および分枝の様子を、連続的に撮影・解析した。これにより、以下のことが明らかになった。

菌糸は毎分0.1-1.2 μm の速さで伸び、核は同次元の速さで、菌糸先端または分枝点に向かって移動し、定位置に到達した。分枝点へ向けて菌糸内を逆行する核も認められた。分枝開始は近傍に核が存在するかしないかには関係がなかった。ただし、核の入り込んだ分枝菌糸は、ないもの比べて伸長が速かった。同一の菌糸コンパートメント内の核でも、移動速度や停止のタイミングが異なっていたことから、移動の調節は、それぞれの核に対して個別になされていることが示唆された。

さらに核の位置決定に関して、ApsAタンパク質 (ApsAp)の局在が検討された。ApsApは核の移動の調節に関係する。apsA変異体では、核は移動するが移動後の分布に異常が見られる。蛍光抗体法やGFP taggingによって、発芽中の菌糸の細胞膜や隔壁で局在することがわかった。

核の移動の観察とApsApの局在などから、糸状菌の核の移動、位置決定機構、及びApsApの役割に関するモデルが示された。しかしこのモデルでは、アウトラインが示されているにすぎず、位置決定のための情報の実体や所在などに関しては不十分である。既にPlamannらにより、異なった機構に基づくモデルも提出されており、これも踏まえたうえで今後の研究によるモデルの補完と、実際のメカニズムの解明が待たれる。

(抄訳 赤尾 健一醸造研究所)

(AKAO Takeshi)

Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*

Suelmann, R., et. al.

Molecular Microbiology, 25:757~769(1997)

文献情報

リボソームフレームシフトを利用したイースト dsRNA ウイルスの増殖抑制

RNAウイルスには、宿主細胞に感染後、ウイルス複製に必要なタンパク質の一部をリ

ボソームフレームシフトを利用して生成しているものがある。リボソームフレームシフトとはリボソームが mRNA 上の特定のシグナル配列に反応し、リーディングフレームがシフトする現象である。フレームシフトより下流では正常に翻訳された場合とは別のタンパク質が合成される。このシグナル配列は多くの場合7ヌクレオチド程度で、さらに数ヌクレオチド下流に pseudoknot などの高次構造が必要である。リボソームフレームシフトは動物、植物ウイルス、バクテリオファージなどの (+) 1 本鎖または 2 本鎖 RNA ウイルスで多数確認されているが、ウイルス以外では *E. coli* で知られるのみである。ウイルスゲノムでのリボソームフレームシフトは、そのほとんどがウイルスの複製酵素の生成に関与するものであるため、フレームシフトをコントロールすることでウイルス複製を阻害できると考えた。

イースト dsRNA ウイルス L-A は assembly (粒子形成) に関する研究と共に、ウイルス複製にリボソームフレームシフトを利用するウイルスとして多くの知見が得られている。L-A ウイルスは-1リボソームフレームシフト (5'方向へのシフト) を利用してウイルス複製に関与する約170 kDaのタンパク質 (Gag-Pol) を合成する。L-A ウイルスの assembly には Gag-Pol がイースト細胞内で一定の割合 (1.9%) で合成されることが必要である。さらに、Gag-Pol は L-A のサテライトウイルス M1 (イーストキラー毒素をコードする) の複製にも不可欠である。リボソームフレームシフトが1.9%より増加または減少すると L-A ウイルスの粒子形成は阻害され、イースト細胞のキラー毒素も減少することが認められている。

Dinman らはリボソームフレームシフトを起こした割合を測定するレポータープラスミドを導入したイースト細胞に anisomycin および sparsomycin (いずれもペプチジルトランスフェラーゼインヒビター) を処理した。その結果、-1リボソームシフトの割合がそれぞれ増加および減少していることが分か

った。両インヒビターを処理したイースト細胞ではL-A ウイルスゲノムRNA, およびL-AのサテライトウイルスM1 RNAが減少していた。このようなウイルス抑制効果はanisomycinでは $0.4\mu\text{M}$, sparsomycinは $0.3\mu\text{M}$ の濃度で認められ、イーストのキラー毒素は無処理細胞に比べ処理5日後には10%程度に低下した。両インヒビター処理によるウイルス抑制は、L-Aウイルスのリボソームフレームシフトの割合が変化した結果、ウイルスのassemblyが阻害されたためであると示唆された。さらに両インヒビターはイーストおよびウサギ *in vitro* translation system で使用してもリボソームフレームシフトをコントロールできることがわかった。

これらの結果はリボソームフレームシフトが多く的高等動物、植物を脅かすウイルスを抑制する機構として応用可能であることを示しており注目に値する。この研究が発展すると、ペプチジルトランスフェラーゼインヒビターを抗ウイルス剤として利用することも可能であるかもしれない。

(抄訳 大野 浩一東北大農)

(OHNO Hiroshi)

Peptidyl-transferase inhibitors have antiviral properties by altering programmed -1 ribosomal frameshifting efficiencies: Development of model systems

Dinman, J.D., *et. al.*

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 6606-6611 (1997)

文献情報

ヘネイコサペンタエン酸 (21:5n-3):
脂質中への取り込みとアラキドン酸(AA)
およびエイコサノイド合成に及ぼす影響

6,9,12,15,18-ヘネイコサペンタエン酸 (21:5; HPA) は、魚油の主成分であるエイコサペンタエン酸 (20:5; EPA), ドコサヘキサエン酸 (22:6; DHA), あるいはドコサペンタエン酸 (22:5; DPA) と同系列の n-3系長鎖高度不飽和脂肪酸 (PUFA)

の1種であり、その生合成経路はDPAが α 酸化および脱炭酸反応を受けることにより生成するものと推定されている。HPAはn-3系列ではあるが、カルボキシル基側の最初の二重結合が $\Delta 6$ 位で始まり、EPA ($\Delta 5$ 位), DHA ($\Delta 4$ 位) とは Δ 位が異なるため、n-3系列の中で Δ 位の違いによる生物学的な意義に興味を持たれていた。これまでHPAの生物学的役割はほとんど知られておらず、唯一、Jakschikらの研究で、HPAが5-リポキシゲナーゼの基質になりにくいことが確認されているに過ぎない。著者らは、EPA, DHAとともに魚油中に含まれるHPAの生物学的特性を検索するため、細胞中の各種酵素系に及ぼす影響について、EPA, DHAの作用と比較しながら検討した。まず、培養したラットヘパトサイトへの取り込み量を測定した結果、HPAはEPA, DHAとほぼ同程度ヘパトサイト脂質中に取り込まれた。取り込み量はリン脂質(PL)よりもトリグリセリド(TG)で多く、PL中ではPUFAの増加によりオレイン酸(OA)とリノール酸(LA)が減少したが、TG中ではOAのみが減少した。これまで魚油の摂取によってLAから $\Delta 6$ -デサチュレーションが抑制され、AAへの変換率が減少することが知られている。HPAの7800C₁モリス-ヘパトマ細胞中の $\Delta 5$ -および $\Delta 6$ -デサチュラーゼ(DS)活性に及ぼす影響を調べるため、1-¹⁴C-リノール酸(LA)および1-¹⁴C-ジホモ-ガンマ-リノレン酸(DGLA)を用いてAAへの変換率の測定を行った。その結果、HPAはEPA, DHAに比べ、LAおよびDGLAからAAへの変換を最もよく阻害することが確認された。同時に、LAからAAへの変換時の中間体であるDGLAが顕著に蓄積されていた。これは、HPAが $\Delta 5$ -DS活性を阻害することを明確に裏づけるものである。しかし、DGLAからAAへの変換よりもLAからAAへの変換をより強く阻害することは、ガンマ-リノレン酸(GLA)からDGLAへの変換に関与するエロンゲナーゼ活性の阻害作用を有する可能性も示唆される。プロスタグ

ランディン H(PGH)-シクターゼは、シクロオキシゲナーゼおよびヒドロペルオキシダーゼ活性を有する PG 合成酵素である。著者らは、羊精の由来のミクロソームを用いて HPA のシクロオキシゲナーゼ活性に及ぼす影響について、酸素消費量の測定により検討した。その結果、HPA は DHA と同様ほとんど酸素消費されず、シクロオキシゲナーゼが最も作用しにくいことが確認された。(PUFA に対する作用性は、AA ≫ EPA > DHA ≧ HPA の順であった)。また、PG 生成系の開始酵素である 5-リポキシゲナーゼに対する影響についても同様な検討を行ったところ、Jakschik らの報告と一致し、HPE が最も作用しにくいことを確認した。(PUFA に対する作用性は、AA ≧ EPA ≫ DHA ≧ HPA の順であった)。トロンボキサン(TX)-B₂は PGH₂から TX-A₂を経て生成されるが、ヒト血小板の AA 刺激により生成される

TX-B₂の HPA による産生抑制能について検討した。その結果 HPA は EPA, DHA と同程度の抑制効果を示した。その他、ヘパトーマ細胞でアシル-CoA オキシダーゼ活性の誘導能について検討した結果、DHA が最も高く、HPA, EPA の順であった。以上の結果を総括すると、HPA は LA から AA への変換に関わる Δ5-および Δ6-DS 活性を最も強力に阻害する以外は、各種酵素系に及ぼす影響は EPA, DHA と大差のないことが判明した。つまり、生体内酵素の Δ 位の識別はあまり厳密なものではないといえる。

(抄訳 丸山一輝—マルハ中研)

(MARUYAMA Kazuaki)

Heneicosapentaenoate (21 : 5n - 3) : Its incorporation into lipids and its effects on arachidonic acid and eicosanoid synthesis

Larsen L.N. *et al.*

Lipids, 32 : 707-714 (1997)

海外便り

味覚の細胞内情報伝達機構に関する研究 —フィラデルフィアでの2年間—

農林水産省 食品総合研究所

大倉 哲也

1. はじめに

1995年6月より2年間フィラデルフィアにあるモネル研究所 (Monell Chemical Sense Center) にオールギャランティ特別研究員として滞在する機会を得た。モネル研究所は1962年にペンシルヴァニア大学内に設立された非営利目的の研究所であり、味覚、嗅覚と化学感覚に特化して心理学、神経生理学、生化学的な見地から研究が行われている。副所長の生理学者 Joseph G. Brand 博士 (Joe) が率いる生理学、生物化学部門は、電気生理学が非常に充実し、ヒトやラットの嗅細胞の細胞培養系が確立されていたこともあり、productiveであった。一方、味覚については、少なくとも4種類の細胞からなる味細胞は個々の細胞の表面マーカーに関する研究も少なく、味細胞の progenitor cell は未同定であり、プライマリーカルチャーでも20日位からしか維持できない事情もあって、味覚に関する生化学と分子生物学は、立ち遅れた感が否めなかった。

2. ラットにおける苦味受容の機構について

苦味の受容については、NYUの Andrew Spielman 博士とサントリーの永井元氏らにより sucrose octacetate (ショ糖の全水酸基がアセチル化されると苦い) をラットの味細胞に加えると、三量体Gタンパク質の G_q もしくは G_i を介して phospholipase C が活性化されイノシトール三リン酸 (IP₃) の消

長が1秒以内に起こることが示されていた¹⁾。一方、Mount Sinaiの Robert Margolskee 博士らは味細胞と一部の神経細胞に特異的に発現しているGタンパク質の一種の gustducin を発見し、リガンドが結合してレセプターから離れた gustducin が phosphodiesterase を阻害することにより細胞内 cAMP レベルが維持され、その結果 PKA が活性化される系が、甘味苦味の情報を伝達するとしていた²⁾。筆者らは苦味の受容において IP₃ 生成系と PKA 系のどちらが dominant であるのかに興味をもち、1秒以内に IP₃ と cAMP の消長を捕えることを試みた。しかしながら、ATP が過剰に系に存在すること、cAMP と IP₃ とを抽出するのに至適な pH が異なること、IP₃ に対しては特異的な良い抗体がなく IP₃ 結合タンパク質を用いざるを得なかったことなどから、半年近く試行錯誤したものの筆者の腕では再現性のあるデータを取得することができず、断念。そして、生化学と分子生物学の手法を活かせるテーマに替えさせて貰うことにした。

3. 鯰におけるアミノ酸受容の機構について

ラットから突然鯰に話しが変わってしまうのであるが、catfish (鯰) は、腹の一部を除く全身の上皮に味細胞が存在していることから、swimming tongue (泳ぐ舌) と呼ばれており、味覚の分野では従来から研究用動物として用いられている。

Joe のラボには、鯰の味細胞に富む上皮の膜画分よりレクチンカラムで粗精製した SDS-PAGE 上で約80kDa に対する抗体があり、この抗体が鯰の味細胞を認識することが

OHKURA Tetsuya

免疫染色からわかっていた。John Teeter 博士らの作製した鯰の taste epithelium に富む cDNA library より、上記の抗体で抗体スクリーニングを試み、その結果 Ca 依存性システインプロテアーゼであるカルパインの全長 cDNA を魚類から初めてクローニングするのに成功した³⁾。タンパク質全体のホモロジーからは、図に示すようにどのタイプのカルパインからもほぼ均等に離れている。カルシウム結合部位だけのホモロジーからは、novel タイプのものに近いと予測された。現在、大腸菌で発現させたカルパインおよび鯰の味細胞に富む上皮からの粗精製画分におけるプロテアーゼ活性のカルシウム依存性を検討中である。

鯰の味細胞を塩基性アミノ酸の Arg で刺激すると、非選択性的カチオンチャンネルが開いて、Ca や Mg が流入することがわかっていた。一方動物細胞で、IP3受容体がカルパインにより限定分解されることがわかっていた。実際、鯰の味細胞に Arg を加えると、IP3受容体が分解されており、この限定分解は膜透過性のカルパインインヒビターにより有意に抑制されることがわかった³⁾。今後も、IP3受容体やその他の情報伝達系の分子がカルパインで分解されることが、味の情報伝達（特に Ca-wave や adaptation process）にどの様に寄与しているのかを解析していきたいと考えている。

4. その他雑感

味細胞が培養しにくいことは先程述べたが、味覚の研究における問題点は *in vitro* のアッセイ系の確立が困難なことである。たとえ、レセプターをクローニングしてカエルの卵や HEK293細胞に発現させても、なかなかうまく表面に呈示されなかったり、されても下流にシグナルが伝わらなかったりすることが学会等でよく聞かれた。味細胞の progenitor 細胞が同定され、分化誘導因子が発見されても安易な *in vitro* もしくは *in situ* での検定系が確立されなければ、Gene Targetting

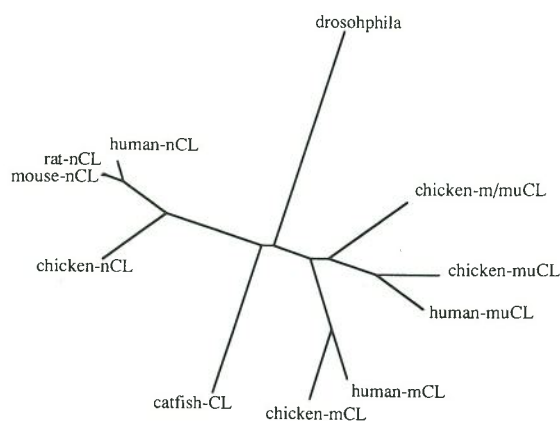


図 カルパインの系統樹

をしたマウスに頼らざるを得ず、研究の速やかな進展は望みにくい。この点をどうクリアーするのが大きな課題である。

留学していた時期は知人が東海岸に結構纏まって来ていたので、色々な大学や研究所の施設を見せて貰う機会に恵まれた。が、筑波の研究所よりも機器が揃っていると感じたのは、Howard Hughes とか Cancer Institute とかの限られたラボだけであった。機器は共有して、とにかく人（ポスドク、テクニシャン、ラボマネージャー）にお金をかけて、グラントやペーパーをさっさと書くという、システムの違いを痛感させられた。また、高校生や大学生をサマーキャンプのような型でテクニシャンとして早いうちから研究の現場に触れさせるプログラムは印象的だった。

多くの方々の協力で留学の機会を得、またフィラデルフィアでもたくさんの方々にお世話になりました。特に、ペンシルバニア大学歯学部的小山英樹博士、Mauriccio Pacificci 博士には、*in situ* hybridization と免疫染色を行ううえで非常にお世話になりました。また、単身での留学を可能にしてくれた家族（尚子と志織）とそれをサポートして下さった方々に、この場を借りて深謝いたします。

文 献

- 1) Spielman, A. I., *et al.*, (1996) *Am. J. Physiol.* 270:C 926-C 931
- 2) Won, G. T., *et al.* (1996). *Nature*, 381: 796-800
- 3) Ookura, T., *et al.* (1997) *ISOT XII and AChems XIX*, 119

「第6回国際イネゲノムフォーラム」のご案内

日 時：平成10年2月6日（金）10時～16時

会 場：科学技術庁研究交流センター（つくば市竹園）Tel：0298-51-1331

主 催：（社）農林水産先端技術産業振興センター（STAFF）
農林水産省農業生物資源研究所（NIAR）
生物系特定産業技術研究推進機構（BRAIN）

内 容：イネゲノムを中心に、世界的に注目されているゲノム解析研究の意義，戦略，進捗状況，将来方向等について非専門家にも分かりやすいように，それぞれの専門家が研究の最新成果を解説します。（同時通訳あり）

プログラム：

- 10:00 開会の辞：渡邊 格（STAFF 会長）
歓迎の辞：眞木秀郎（生研機構理事長）
座 長：柴田大輔（三井業際植物バイオ研究所）
菊池尚志（農業生物資源研究所）
- 10:15 フラベル，R.（英国ジョンイネスセンター）：
「植物生物学に貢献するゲノム研究」
- 11:00 ベネツェン，J.（米国パデュー大学）：
「イネ科植物のゲノム構造，機能及び進化の比較解析」
- 11:45 休 憩
- 13:00 メッシング，J.（米国ルツガー大学）：
「トウモロコシの 22-kDa アルファゼインクラスター領域とソルガム及び
イネでの相同領域の比較ゲノム解析」
- 13:45 廣近洋彦（農業生物資源研究所）：
「レトロトランスポゾンのストレスによる活性化とイネでの遺伝学的及び
逆遺伝学解析への利用」
- 14:30 休 憩
- 14:50 スレザク，T.R.（米国ヒトゲノムセンター，ロレンスリバモア国立研究
所）：
「10年を越えたヒトゲノム情報学：他のゲノム研究への影響と将来方向」
- 15:35 閉会の辞：中川原捷洋（農業生物資源研究所長）

参加方法：参加費は無料ですが，先着 150 名様までとさせていただきます。
平成10年1月27日（火）までに，FAX 又はE-mail で登録して下さい。
(FAX :0298-38-1780, E-mail : antonio @ staff. or. jp)

問い合わせ：内容の詳細及び申込みについての問合せは，STAFF 研究所
研究第1部長 長谷川 までお願いします。
(〒305-0854 茨城県つくば市上横場一杯塚446-1 STAFF 研究所，
TEL：0298-38-2113, FAX：0298-38-1780)

編集後記

明けましておめでとうございます。

本誌は11歳になりました。これはひとえに購読会員、執筆者ならびに関係の皆様の温いご理解とご支援によるものと、心からお礼申し上げますとともに、本年もよろしくお願いたします。

次号は、エルニーニョと農業生産、遺伝子組換えによる青色カーネーションの作出、精子を使わぬ卵子生殖、多孔質担体を用いた農用地の窒素対策、高色素系馬鈴薯新品種、ナシの新品種「おさゴールド」などの掲載を予定しています。ご期待下さい。（大畑記）

ブレインテクノニュース（第65号）

平成10年1月15日発行

発行者 眞木 秀郎

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

〒105-0001 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

〒103-0026 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

©Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 1998