

CODEN : BTEEEC

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

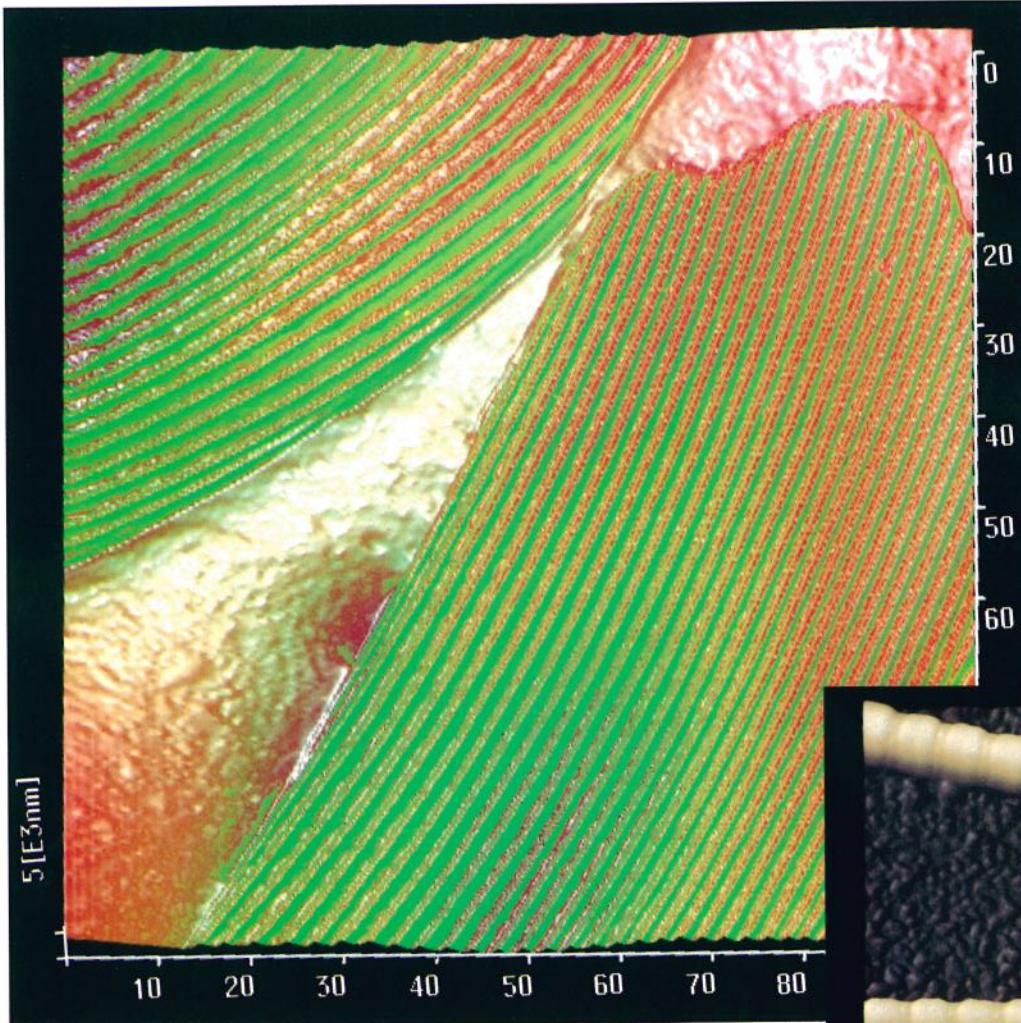
TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

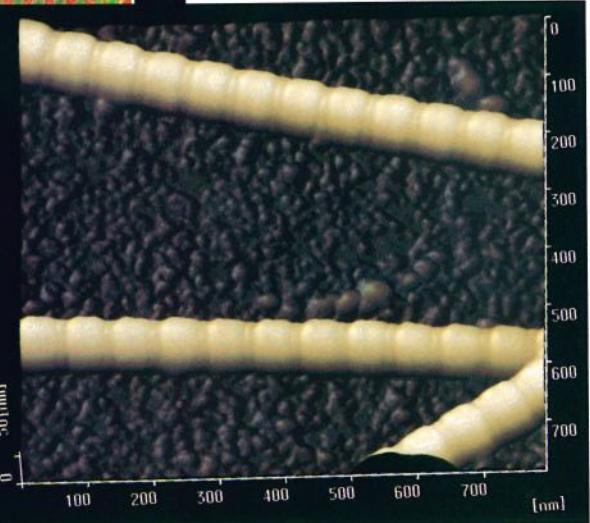
第 67 号

MAY 15, 1998



走査型プローブ顕微鏡で観察したアゲハチョウ
の羽（左上）およびマウス皮下組織のコラーゲン
細繊維（右下）

（本文 1 ページ参照）



発行=生物系特定産業技術研究推進機構

総 説

繁野雅次

走査型プローブ顕微鏡 1

国内情報

奥田 充・角田佳則・宮川久義

育苗期水稻に発生する細菌病を抑制する *Pseudomonas* 属細菌の発見 5

石本政男

遺伝子組換えによるアズキゾウムシ抵抗性アズキの作出 8

上田正次

乳汁中にヒト成長ホルモンを生産するトランスジェニックブタの作出 11

太田洋一

暗渠探査レーダーによる水田地下情報の非破壊検知 15

地域の先端研究

山川 理

サツマイモ研究の最前線 18

文献情報

受粉シグナルによって制御される 3 つの ACC 合成酵素遺伝子 21

性決定における *Dax1* 遺伝子の役割 22

ワインの色を抑える 23

新たに分離された魚類イリドウイルスの分子生物学的特性とその分類学的位置 24

海外便り

小松節子

タンパク質合成機構に関するリン酸化蛋白質の解析

—米国カリフォルニア大学デービス校での 6 カ月間— 25

特別情報

宮井俊一

生物の形態と生理機能はどこまで制御できるか

—農林水産省大型別枠研究「バイオデザイン計画」の紹介— 27

生研機構だより

UR 対策「研究開発事業」の進捗状況 30

総 説

走査型プローブ顕微鏡

セイコー電子工業(株) 科学機器事業部

繁野 雅次

1. はじめに

走査型プローブ顕微鏡 (Scanning Probe Microscope : SPM) は、1981年にIBM・Zurich研究所のG. Binnig, H. Rohrerにより研究・開発され、1986年のノーベル物理学賞授賞の対象となった走査型トンネル顕微鏡 (Scanning Tunneling Microscope : STM) が原型であり、その後試料探針間の様々な相互作用を用いたSPM (AFM, FFM, SMM, SNOAM, MFM, ...) が研究・開発されてきた。(表1)

表面の力の相互作用を利用したAFMは、最も普及しているSPMであり、AFMを基盤とした新しいタイプのSPMが数多く研究・開発され実用化してきている。AFMがここまで普及した理由は、SPMのキーパーツであるプローブが、マイクロマシンニングにより、安く、大量に、高品質のものが供給できるようになった技術革新と、大気中、溶液中、真空中等の様々な環境で、導電性・絶縁性を問わず試料形状を観察できる使い易さに

ある。さらに、試料探針間に働く力は、斥力・引力以外にも、磁界・電界・摩擦力などがあり、新しいタイプのSPMの基盤となっている。さらに観察するだけではなく、微細加工への応用も進んできており、今後が期待されている。

このようなSPMを生体分野へ応用する場合を前提として、AFMやAFMを基盤としたSPMの原理と観察例について概説する。

2. AFMの原理

AFM(図1)は、試料探針間に働く原子間力を検出し、一定になるように両者の距離を制御しながら試料表面を走査することにより、表面の三次元形状を測定する顕微鏡である。

原子間力の検出には、半導体のプロセスを利用したマイクロカンチレバー(シリコンまたは窒化シリコン製)の変位を光てこ方式により測定する方法が使用されている。探針先端を細くする技術は年とともに進み、当初(1991年)50nmであった先端半径は(1996

表1 代表的なSPMの種類と名称の一覧表

STM (Scanning Tunneling Microscope) : 走査型トンネル顕微鏡
AFM (Atomic Force Microscope) : 走査型原子間力顕微鏡
FFM (Friction Force Microscope) : 摩擦力顕微鏡
MFM (Magnetic Force Microscope) : 磁気力顕微鏡
SMM (Scanning Maxwell Stress Microscope) : マクスウェル応力顕微鏡
KFM (Kelvin Probe Force Microscope) : ケルビンプローブフォース顕微鏡
EC-STM (Electro-chemical STM) : 電気化学STM
EC-AFM (Electro-chemical AFM) : 電気化学AFM
LM-FFM (Lateral Modulation FFM) : 横振動FFM
VE-AFM (Visco-elasticity AFM) : マイクロ粘弾性AFM
DFM (Dynamic Force Mode) : ダイナミックフォースモード
SNOAM (Scanning Nearfield Optical Atomic Force Microscope) : 走査型近視野原子間力顕微鏡

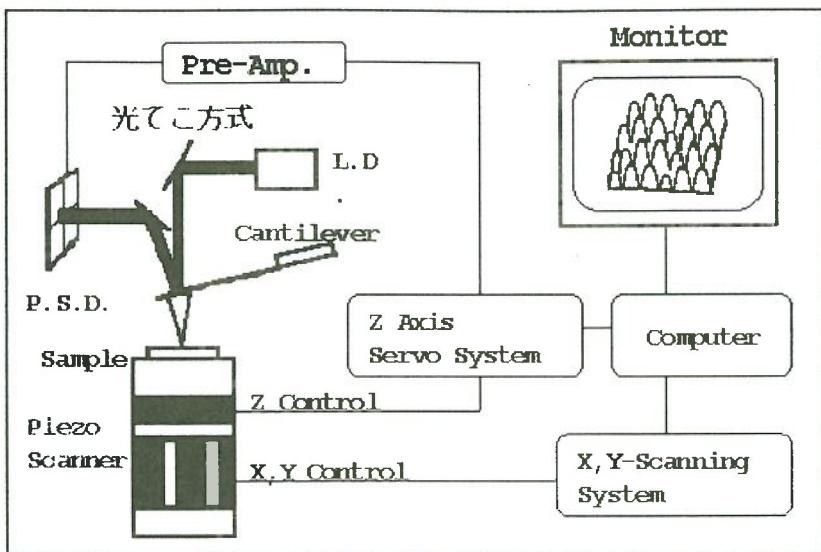


図1 AFMの構成図

年) 10nm, (1998年現在) 3 nm程度まで細くなってきており今後さらに細くなることが期待されるため、装置の分解能は年々向上していくと予想される。

3. AFMにおける力

最初に開発されたコンタクトモードのAFMは、探針試料間に働く吸着力の影響により、弱い力の設定には限度があり $10^{-8}N$ 程度の力で測定する場合が一般的である。軟らかな試料の高分解能観察では注意をする必要があるため、試料の変形を出来るだけ少なくす共振モード（ノンコンタクトモードや、サイクリックコンタクトモード）が実用化され、現在の測定の主流となっている（図2）。共振モード（DFM）は、試料に接しないノンコンタクトモードと、試料に接するサイクリックコンタクトモードに分かれるが、装置の構成は同じであり、測定時の振幅の設定だけで使い分けることができる。ノンコンタク

トモードは、試料に加わる力が小さく軟らかい試料に向いているが、応答速度が遅いため大きな凹凸観察に向きであり、サイクリックコンタクトは、大きな凹凸観察が可能であるが、試料に加わる力が大きくなってしまう特徴をもつ。最良の測定条件（高い分解能でできるだけ弱い力で観察する条件）は、試料からわずかに離れる振幅で測定することであり、ノンコンタクトとサイクリックコンタクトの狭間で測定することとなる。

4. 分解能

AFMは、原子オーダーの高分解能観察が可能な顕微鏡として知られているが、その性能を十分に発揮するためにはいくつかの条件が整う必要がある。その条件とは、

- 原子（分子）オーダーで平滑な試料。
- 測定環境中で試料が不活性である。

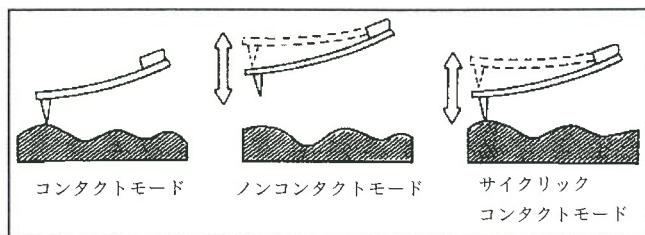


図2 原子間力顕微鏡の測定モード

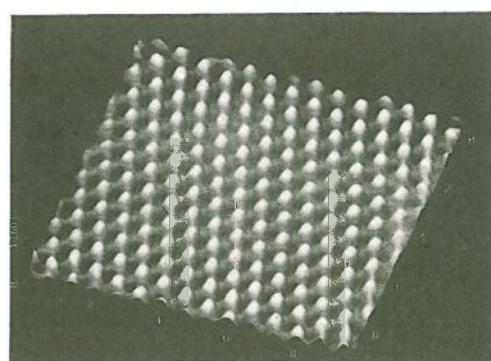


図3 マイカの原子像（走査エリア：9nm□）

○探針が原子オーダーで先鋭化している。等があげられる。有限の大きさを持った探針が試料表面をなぞることにより測定する SPM では、探針より狭い溝構造等は十分に観察できない場合がある。AFM により原子像が観察される代表的な試料は、層状化合物（マイカ、グラファイト、MoS₂……）や、KCl, CaF₂……等の単結晶の平滑な試料面である（図 3）。生体試料の場合は、膜蛋白等を平らな基板に固定した試料などに限られ、凹凸の激しい試料の分子オーダーの観察は難しい場合が多い。

5. 溶液中観察

光てこ方式の AFM は、検出に使用する光が透過する環境であれば動作するため、大気中・溶液中・ガス中・真空中などで試料を観察することが可能である。生体試料に対しては、「生の状態」、「生きた状態」を高倍率観察観察することができるわけであり、SPM の代表的な応用方法である。染色体及び培養細胞の測定例を以下に示す。

大気中で、自然乾燥させた染色体は、水の表面張力等により基板に強く引き付けられながら乾くため、凹凸が約1/10程度になってしまい AFM 観察の結果は、30nm 程度の高さしかない。

しかし、培養液中の「生の状態」で観察した染色体（図 4）は、300nm 程度の高さとなる。また試料表面はとてもやわらかく、大

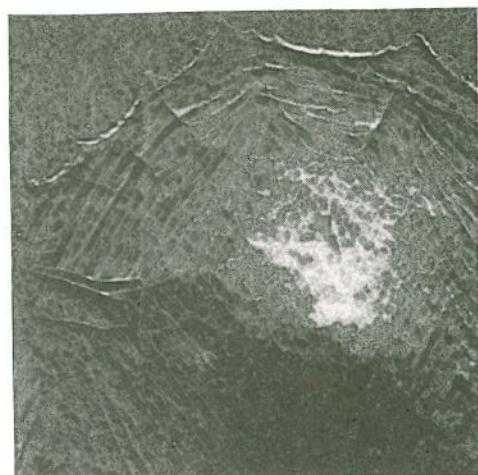


図 5 生きた状態のヒト肺癌培養細胞の培養液中 AFM 観察（走査エリア：100μm□）

気中の1/10以下の力で測定しないと、変形する場合がある。

電子顕微鏡で観察する場合と同じ方法で溶媒固定（酢酸メチルを使用）した試料の高さは約 400nm であり、生の状態と同じような高さで観察される。詳細に比較すると、染色体のねじれた構造がはっきり観察され、生の状態に比べ硬く巻きが強くなっているように観察される。

図 5 は生きた培養細胞（ヒト：肺癌）の培養液中 AFM 観察像である。細い線上見える部分は、アクチンファイバー等の細胞骨格と思われる。生きた状態での観察であるため、細胞が動いていく様子が観察できる。薬品を添加し細胞にどのような影響を与えるかを観察できる手法であり、薬などの効果を検証するなどの応用が考えられる。（試料処理と観察：スライドガラス上に培養した細胞を、培養液が満たされた倒立顕微鏡上のシャーレに移し、倒立顕微鏡に取り付けられた AFM で培養液中観察を行った。）

6. DFM による高分解能観察

図 6 はプラスミド DNA（2重らせん状態）の DFM（共振モード）像である。DNA は 2 nm 程度の直径であり、DFM 像からも基板に対して 1.7nm 程度の高さで観察されている。しかし、その幅は 10nm 程度であり実際の DNA の 5 倍程度の幅として観察されている。この原因是、探針の先端の太さであ

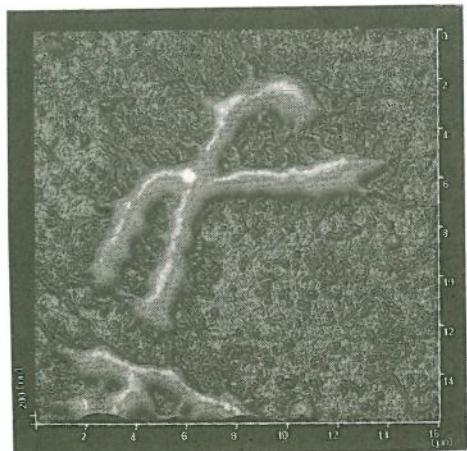


図 4 生の状態の染色体の培養液中観察（走査エリア：16μm□）

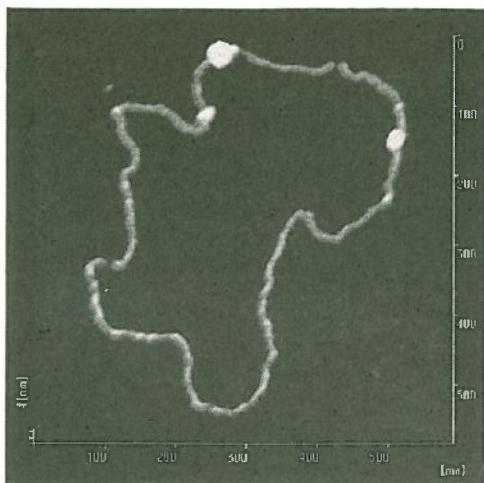


図6 プラスミドDNAのDFM像

り(先端半径:10nm程度),そのため2重らせんの細かなピッチも十分に観察できていない。しかし、探針の先鋭化技術の進歩により2重らせんが観察できると期待されている。

(試料処理:脱塩処理後のDNA水溶液, 0.005g/lを,マイカ基板上に10μl滴下し, 5~10分放置後,エアーブラシで,溶液を飛ばしDFM観察をおこなった。)

7. おわりに

今日,電子顕微鏡は様々な情報を我々に提供してくれる重要な顕微鏡として位置付けられているが,目的にあったプレパレーション・テクニックを確立する努力がそれを支えてきたことは,誰もが認める事実である。SPMにおいても今後の応用に向けた,「プレパレーション・テクニックの確立」を進めていかなければならない時期に来ている。

また,SPMは形状観察から物性測定,マイクロマニピュレーションへと発展してきており,応用分野は飛躍的な広がりを見せており。極所的粘弾性測定(VE-AFM),光の波長以下の分解能での極所分光測定(SNOAM),表面電位測定(SMM,KFM)などの新しい測定手法が,それぞれの分野で役立つためには,多くの研究者・開発者に使用されながら育って行かなければならぬ。AFMをはじめとするSPMは,まだ進歩の途上であり多くの課題を含んでいるが,多くの可能性を秘めた顕微鏡でもある。

国内情報

育苗期水稻に発生する細菌病を抑制する *Pseudomonas* 属細菌の発見

農林水産省 中国農業試験場, *山口県農業試験場

奥田 充・*角田 佳則・宮川 久義

中国農業試験場では環境調和型の作物生産技術の確立を研究目標とし、その中で拮抗微生物を利用した病害防除法について研究を行っている。イネから分離した約700菌株の細菌からイネもみ枯細菌病（苗腐敗症）の発病を抑制する菌株を探査した結果、非常に効果の高い*Pseudomonas* 属細菌 CAB-02を発見した。本菌はイネ苗立枯細菌病とイネばか苗病の発病も抑制した。現在、本細菌の製剤化にも着手し、実用化を目指して研究を進めている。

1. はじめに

稻は日本農業の主要作物であるが、経済と技術の発展に伴って稻作形態は変化してきた。特に田植え様式は苗代育苗・人力移植から箱育苗・機械移植へと変遷し、大幅な省力化を実現した。しかし育苗箱の高温多湿環境は病原菌繁殖の温床となりやすく、従来になかった病害の出現を引き起こしている。

1974年福島県で箱育苗の幼苗が腐敗を起こす原因不明の病気が全国で初めて確認された。本病はイネもみ枯細菌病菌 (*Pseudomonas glumae*) が原因であることが判明し、イネ苗腐敗症と命名された¹⁾が、被害は次第に広がり特に育苗期に加温を必要とする東北・北陸地方を中心に被害が発生した。さらに1982年には *P. glumae* による苗腐敗症と類似した苗立枯細菌病（病原菌：*Pseudomonas plantarri*）が千葉県で発生し、以後各地で散発的に発生している。両菌とも種子伝染するため、前年開花期に粒に感染した病原菌が翌年不十分な種子消毒と育苗箱中の好条件により繁殖し、発生にいたると考えられている²⁾。細菌性病害は突然的に発生するため、的確な発生予察は困難である。このため確実な防除には種子消毒が不可欠であるが、化学農薬の多用による耐性菌の出現や処理廃液の環境への影響が懸念される。また農薬に対する不安

感や高付加価値から無農薬栽培が各地で行われているが、種子消毒の未実施による病害の発生が危惧される。

このような現状に対処するため中国農業試験場では環境に調和した病害防除法の確立を研究目標とし、これらの病害を抑制する拮抗微生物（細菌）の探索を行ってきた。

2. 拮抗微生物の探索

微生物による発病抑制は大きく分けて病原菌に対する拮抗作用と植物の抵抗性を強化する作用が働いていると考えられている。拮抗作用には抗生（抗生物質を産生）、競合（生育場所、栄養等の取り合い）、寄生および補食があげられる。微生物を利用した病害防除を確立するには目的とする病害の発生（病原菌の増殖）を抑制する微生物を探索することが第一段階である。多くの場合、対峙培養法や阻止円形成法等を用いて培地上の拮抗作用を指標に選抜するが、この方法では植物の抵抗性を強化する作用を持つ微生物は選抜されない。また微生物間の相互作用は複雑であり、拮抗の強弱は環境により変化する。特に培地上で病原菌に拮抗作用を示す微生物が実際の発病抑制にはあまり効果がないことが多く、実用可能な拮抗微生物を探索することは極めて困難である。

育苗期に発生する細菌病を抑制する拮抗微生物を探索するにあたり、イネに定着している細菌から選抜を行った。自然感染粒は発病

OKUDA Mitsuru, SHUMIDA Masanori,
MIYAGAWA Hisayoshi

に十分な病原菌を保菌していても発病程度が低いことが時々観察されるが、この一因として糲に定着している細菌が病原菌の繁殖を抑制していると考えられているからである。また拮抗菌のスクリーニングは培地上の拮抗作用でなく、実際の発病抑制能を指標に用いた。すなわちイネから分離した細菌を培養し、健全な催芽種子を分離細菌 (10^8 cfu/ml) と病原細菌 (10^5 cfu/ml) の懸濁液に浸漬後、小形ポットに播種し、苗の発病程度を調査する方法で発病抑制能の高い菌株を選抜した。培地上の拮抗作用を指標にしたスクリーニングと異なり一度に多くの菌株を扱えないため、この作業はかなりの労力を必要とするが、確実に発病抑制能を有する菌株が得られる利点がある。1991

～1993年にかけて主に中国農業試験場内の圃場で栽培したイネの糲および葉鞘から分離した約700菌株の中から極めて強い発病抑制能を示す細菌が4菌株見つかり、これらをCAB-01～CAB-04と命名した。これらの細菌はイネ苗立枯細菌病に対しても安定した発病抑制能を示した（表1）。またCAB-02はイネばか苗病に対しても発病抑制を示した。

3. CAB 菌株の同定

CAB-01～CAB-04の形態を光学顕微鏡または電子顕微鏡で観察した結果、いずれも細胞の大きさは $1 \sim 4 \mu\text{m}$ の桿菌で、細胞の

表1-1 CAB菌株のイネもみ枯細菌病（苗腐敗症）に対する発病抑制効果

処理	発病苗率 (%)	発病度 ¹⁾	防除価 ²⁾
CAB-01	1.2	0.4	99.3
CAB-02	0.7	0.2	99.6
CAB-03	0.6	0.2	99.6
CAB-04	2.2	0.5	99.1
無処理	86.3	53.6	—

表1-2 CAB菌株のイネ苗立枯細菌病に対する発病抑制効果

処理	発病苗率 (%)	発病度	防除価
CAB-01	0.1	0.0	100.0
CAB-02	0.0	0.0	100.0
CAB-03	0.0	0.0	100.0
CAB-04	0.0	0.0	100.0
無処理	100.0	99.3	—

1) 病徵を5段階で評価 (0: 健全～4: 腐敗枯死)

発病度 = $(\sum_i X_i)/4n \times 100$ [i: 病徵, Xi: 病徵iの固体数, n: 総苗数]

2) 防除価 = $(a-b)/a \times 100$ [a: 無処理の発病度, b: 処理区の発病度]

多形性ではなく、鞭毛を有し運動性があった。また、いずれもグラム陰性で、内生胞子を形成しなかった。さらに種々の生理・生化学的反応および炭素源利用能の調査の結果、CAB-01, 03, 04 は *Pseudomonas gladioli* と同定された。CAB-02は1, 2の *Pseudomonas* 属細菌に近縁であるものの鞭毛の数、硝酸呼吸能、炭素源利用能が異なり、既知の分類基準では該当する種がなく新種の *Pseudomonas* 属細菌であると判断した³⁾。 *P. gladioli* はイネから普遍的に単離され、また菌株によって程度の差はあるがイネ苗腐敗症および苗立枯細菌病の発病を抑制する性質をもつことが報告されている。CAB菌株の発病抑制のメカニズムは現在解析中であるが、4菌株中3菌株が *P. gladioli* に分類されたことは興味深い結果であると思われる。今回発見された拮抗菌をモデルとして *P. gladioli* の箱育苗における挙動を解析することで、糲に自然に定着している拮抗菌を活用した病害抑制法への応用が期待できる。

4. 安全性の評価

CAB菌株はいずれも人工培地で容易に大量培養できる性質を持ち、培養細菌を催芽種子に処理することで育苗箱で発生する細菌性病害の防除剤となる（特開平9-124425、特開平9-124426）。これらは死滅すると発病抑制効果が消失するため生きた細菌を処理する必要があるが、人、家畜、他の作物等に対する影響が懸念される。CAB-01, 03, 04は *P. gladioli* と同定されたが、*P. gladioli* にはラン等に病原性を持つものがあるため、シンビジュームやスイセンの葉に接種したところ、葉に褐変腐敗が生じた。このままでは実用に適さないと判断し、人為的突然変異の誘発による非病原性株の作出を検討している。

CAB-02は新種であり、動物や植物に対する安全性は全く未知であったので詳細な調査を行った。イネの開花期に噴霧接種をしたところ、糲に全く褐変を起こさなかった。さらにコムギ、ダイズをはじめとする主要穀類、野菜、園芸作物等23品目について病原性の有

無を検定したが、少なくとも試験した作物には全く病原性を示していない。また、予備試験ではあるが動物への病原性も無いことが示されている。引き続き微生物農薬の安全性評価ガイドラインにそって調査する予定である。

5. 実用化に向けて

CAB-02 の安全性が十分に確認されれば、環境負荷の少ない病害防除法としての実用化が期待できる。しかし本菌は生きた状態で催芽種子に処理する必要があり、実際に農業現場で利用するためには簡便な処理法を開発しなければならない。現在、CAB-02の製剤化をセントラル硝子株式会社との共同研究によって進めている。まだ試作品の段階だが、本剤は無色・無臭の粉末で1gあたり約 10^{10} 個の生きたCAB-02を含んでいる。浸種時に本剤を水に溶かした液に粒を浸漬する、播種前に催芽粒に混合する、あるいは覆土に混合するといった処理法で非常に高く安定した発病抑制効果が確認されている。まだ、クリアしなければならない点は多いが、もし実用化されれば苗箱で発生する細菌病の防除剤としては微生物農薬の第一号となるだろう。

6. おわりに

微生物を用いた病害防除は環境に影響されやすく、実際の複雑な農業環境において常に安定した効果を維持することは困難である。しかし箱育苗では殺菌培土を用いるため微生物相が比較的単純であり、拮抗微生物活用による防除法が適用しやすいと考えている。

現在使用されている農薬は決して危険なもの

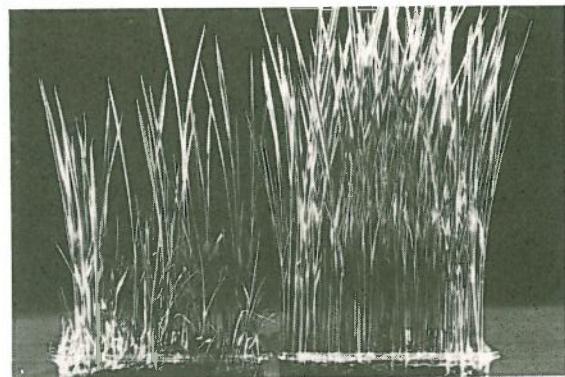


図1 イネもみ枯細菌病 (*Pseudomonas glumae*) の保菌種子を育苗用培土に播種し、人工気象器で一週間育苗した
CAB-02処理(右)：全て健全であり、発病苗は見られない
無処理(左)：生育不良、白化、腐敗枯死等の重度の苗腐敗症の病徵が見られる

のではなく、正しく使えば作物生産の安定と作業の省力化が期待できる。しかし化学農薬を過剰に使用することは環境に重大な影響を与えるだけでなく、薬剤耐性菌の出現を誘発し、病害の発生を助長する結果ともなりうる。農薬を使うから危険とか、無農薬だから安全というのでなく、それらの長所・短所を十分に理解した上で環境にできるだけ負荷の少ない病害防除法を提案することが必要であると考える。本研究の成果がその一端を担うものとなることを期待する。

文 献

- 1) 植松 勉ら (1976) 日植病報 42: 464-471
- 2) 遠藤 賴嗣 (1990) 「イネもみ枯細菌病—発生と防除対策—」加藤 肇編, 全国農村教育教会, p.82-83
- 3) 角田 佳則ら (1995) 日本植物病理学会報 第61巻 6号: 623 (講要)

国内情報

遺伝子組換えによるアズキゾウムシ抵抗性アズキの作出

農林水産省 農業研究センター

石本 政男

アズキゾウムシはアズキ貯蔵中の最大の害虫である。アズキゾウムシは色々な豆で育つことができるが、アズキに比較的近縁なインゲンマメでは育つことができない。そこで、インゲンマメにアズキゾウムシ生育阻害物質を求め、 α -アミーラーゼインヒビタタンパク質を見いだした。本タンパク質の遺伝子をアズキへ導入し、アズキゾウムシ抵抗性アズキの作出に成功した。

1. はじめに

昆虫類はその種類 180 万種以上、未知のものを加えると 1,000 万種を越えると予想される全動物で最も繁栄しているグループである。この多様性をもたらした原因の一つが植物との共進化であるといわれ、植物を食害する昆虫も多種多様である。昆虫による作物の食害や汚染を防除するために、近年、主として農薬が使用され、食糧生産に大きく貢献してきた。現在、世界中で年間約 9 兆円に及ぶ殺虫剤が消費されているが、なお農業生産のうち 13% が虫害により失われている¹⁾。一方で、農薬の継続的な使用は環境に多大な影響を及ぼし、生態系の破壊や薬剤耐性害虫の出現を招いてきた。そのため、各種害虫に対する総合的な防除体系 (IPM : integrated pest management) を確立し、環境負荷の小さい持続的農業を推進する必要がある。虫害抵抗性品種はその利用が安価で特別な知識を必要としないので農家への普及が容易であり、かつ安定した効果が期待できる、IPM の中核的な技術である。しかし、虫害抵抗性遺伝資源を得ることの困難性や育種年限の長期化等の問題により、主要な害虫に対してすら抵抗性品種の育成が困難な状況にある。

植物は昆虫の攻撃に対して決して無防備なわけではなく、種々の防御機構によって昆虫

の食害を回避しており、それらの機構を克服した昆虫だけがその植物を食害できる。そのため、植物が有するこのような化学的あるいは物理的な防御機構 (= 抵抗性) を解明し、その機構をもたない植物へ導入できれば、新たな虫害抵抗性作物を開発できるものと考えられる。この発想は近年の遺伝子組換え技術の進展により現実のものとなった。ここでは、著者らの研究の一端を紹介したい。

2. 豆類の貯蔵害虫

北海道を除く地域でアズキやササゲを栽培し、種子を収穫・保存していると小さな甲虫が出てくることがある。これはアズキゾウムシという貯蔵害虫である。アズキゾウムシを含むマメゾウムシ科の昆虫は世界に約 1,400 種が知られ、これら昆虫の幼虫はその多くがマメ科植物の種子を寄主としている²⁾。このうち、マメ科作物の種子を寄主とし、人間が種子を貯蔵する条件において繁殖可能な種が貯蔵害虫となったと考えられる。名前が似ているコクゾウムシ科の貯蔵害虫は幼虫とともに成虫も種子を食害するが、マメゾウムシ類害虫は幼虫のみが種子に被害を及ぼす。日本で普通に見られるアズキゾウムシは羽化後、餌をとることなく、交尾・産卵できるため、少數の昆虫が貯蔵施設へ侵入すると、多大な種子の損失・汚染につながる。

ISHIMOTO Masao

3. アズキゾウムシはなぜインゲンマメで育たないか？

アズキゾウムシとその近縁種でアジアからアフリカにかけて広く分布するヨツモンマメゾウムシはアズキ、ササゲ、リョクトウなどのササゲ属作物の重要な害虫であるが、実験的にはこれら以外にもダイズ、ソラマメ、エンドウマメなど色々なマメ科植物の種子で生育できる。ところが、アズキに比較的近縁なインゲンマメでは生育できない。雌成虫はインゲンマメの表面に卵を産みつけ、孵化した幼虫は種子を食べ始めるが、すぐに死んでしまう³⁾。インゲンマメはこれらの貯蔵害虫に対して抵抗性を有していると考えられる。インゲンマメとアズキでは交雑親和性がないため、交配によってこの抵抗性をアズキに導入することは不可能であるが、インゲンマメの示すこの生育阻害機構を解明し、その機構を遺伝子組換えによってアズキへ導入することができれば、アズキゾウムシ抵抗性のアズキを開発できるはずである。

今から50年以上前に日本の研究者によって、インゲンマメ種子中に水溶性の生育阻害物質の存在が示唆された。その後、サポニン、多糖、トリプシンインヒビター、レクチンなどがその候補として挙げられたが、どの物質も種子中の濃度では幼虫の生育を完全には阻害できなかった。そこで、著者らはインゲンマメ種子に含まれる生育阻害物質の精製を試みた。精製の各段階で各画分をアズキ種子粉に一定の割合で混入して、水を加え、豆のように丸めて乾燥した人工豆を作成した。この人工豆でアズキゾウムシを飼育し、生育阻害活性を調査し、精製を進めた。その結果、SDS-PAGE で約10kDa 付近の移動度に複数のポリペプチドバンドを与える糖タンパク質が強い生育阻害活性を示すことが分かった。インゲンマメの種子にはトリプシンインヒビターやレクチン等のタンパク質が存在し、アズキゾウムシ生育阻害活性との関連が示唆されていた。しかし、単離されたタンパク質はこれらの活性を示さず、アズキゾウムシ幼虫

や哺乳類の α -アミラーゼの活性を阻害する α -アミラーゼインヒビター (α AI) であることがわかった⁴⁾。哺乳類の α -アミラーゼ活性を阻害する物質がインゲンマメ種子中に存在することはすでに1945年に報告され、 α AI がインゲンマメの内生アミラーゼの活性を阻害しないことから、何らかの生体防御に関与するものと推測されていたが、昆虫に対する生育阻害作用の報告はこれまでなかった。 α AI はインゲンマメ種子に 0.4~1 % 含まれており、 α AI をその濃度で含む人工豆ではアズキゾウムシやヨツモンマメゾウムシが生育できないことから、 α AI はインゲンマメ種子中で貯蔵害虫に対する防御物質として機能していると考えられる。一方、アズキゾウムシに食害されるアズキ、ササゲなどの種子には α AI は含まれていなかった。なお、インゲンマメ以外にもコムギ、オオムギ、ソルガムなどのイネ科植物の種子にも α -アミラーゼインヒビタータンパク質が含まれているが、その構造はインゲンマメのものとは大きく異なる。

4. アズキゾウムシ抵抗性アズキの作出

α AI 遺伝子 (cDNA) は1982年にアメリカのグループによってすでにクローニングされていた。この遺伝子を種子で特異的に発現するレクチン (PHA-L) 遺伝子のプロモーターに接続し、アグロバクテリウム法によりアズキ栽培品種ベニダイナゴンへ導入した⁵⁾。 α AI は前駆体ポリペプチドとして合成された後、糖鎖の付加と内部切断を通じて、 α , β の 2 種のサブユニットが会合したヘテロ 4 量体として成熟する。得られた組換えアズキを解析したところ、成熟した α AI が種子中に蓄積し、インゲンマメと同程度の α -アミラーゼ阻害活性を示した。組換えアズキの種子はアズキゾウムシに対して完全な抵抗性を示し、幼虫は種子に食入直後に死亡した (図 1)。組換えアズキは正常に生長、稔実し、アズキゾウムシ抵抗性は後代へ安定して遺伝した。現在、このアズキゾウムシ抵抗性アズキの安全性評価実験を進めており、今年は模

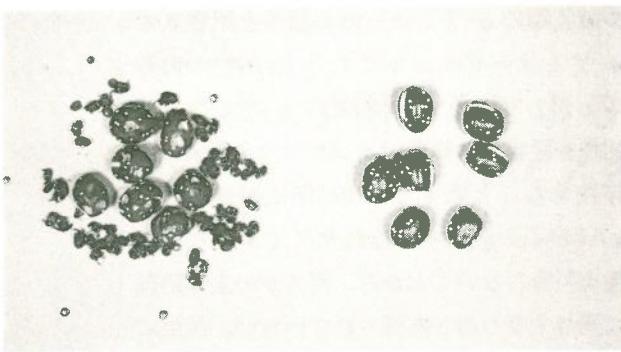


図1 インゲンマメ α -アミラーゼインヒビター遺伝子を導入した組換えアズキのアズキゾウムシ抵抗性の確認
非組換えアズキの種子（写真・左側）はアズキゾウムシに種子を食害されている。種子にあいた穴は成虫の脱出孔、種子の周囲はこれらの種子から出現した成虫である。
組換えアズキの種子（写真・右側）は、アズキゾウムシ幼虫が種子に食入直後に死亡したため、全く被害を受けていない。種子表面の小さな白い粒はアズキゾウムシの卵である。

擬的環境（隔離圃場）における実験を行う予定である。今後は、品種あるいは交配母本としての利用が期待される。

α AI を導入したアズキがアズキゾウムシ以外にもヨツモンマメゾウムシに抵抗性を示すことから、これらの虫害が深刻なアジア、アフリカ地域のリョクトウやササゲへの応用が可能である。 α AI は調理の際の加熱で失活するため、また、人類は α AI を含むインゲンマメを何千年も食用に供していることから、 α AI 遺伝子を導入した作物の食品としての安全性の問題はないと考えられる。

5. インゲンマメを食べるマメゾウムシ

中南米にはインゲンマメを食害するインゲンマメゾウムシやブラジルマメゾウムシが分布している。これら幼虫の消化管中の α -アミラーゼ活性は α AI によってほとんど阻害されなかった。特にブラジルマメゾウムシ幼虫は、 α AI の活性中心と推定されるアミノ酸の C 末端側を切断し、 α AI を不活性化していた。これらのマメゾウムシは α AI を高濃度（0.8%）に蓄積した組換えアズキにおいても正常に生育した。

α AI はマメ科植物のうちインゲンマメ属植物の一部に分布している。これら α AI の各種 α -アミラーゼに対する特異性を調べたところ、インゲンマメを寄主とするブラジルマメゾウムシ幼虫の α -アミラーゼを特異的に

に阻害する α AI 分子種を見いだした。現在、 α AI 分子種の構造と機能に関する研究を進めており、将来、標的となる昆虫の α -アミラーゼの構造に合わせて α AI を設計できるようになるものと期待される。

6. おわりに

殺虫剤は効果が顕著である一方、環境へ与える負荷が大きい。これに対して、植物の有する耐虫性物質は一部の毒物質を除き、その効果は穏やかであり、生育阻害を示すために比較的高濃度が必要であったり、効果を示す昆虫種が限定されることが多い。インゲンマメの α AI もコクゾウムシや消化管中の pH が高い鱗翅目害虫には効果が見いだせず、これまでのところマメゾウムシ類以外の昆虫に対する生育阻害活性は報告されていない。このように植物の有する耐虫性物質は特有の問題はあるものの、人間を含む地球生態系へ与える影響は小さく、遺伝子組換えによる耐虫性植物作出への利用価値は大きい。植物由来の“殺虫性”遺伝子として、これまでインゲンマメの α AI 以外にイネ科植物の α AI や各種タンパク質分解酵素のインヒビター、糖鎖結合タンパク質であるレクチンなどの遺伝子が同定され、利用が進んでいる。今後は低分子二次代謝産物の殺虫性物質の合成遺伝子が単離、利用されていくものと思われる。多種多様な昆虫を制御していくためには、多様な“殺虫性”遺伝子を用意し、対象となる昆虫に応じて栽培植物に導入していく必要がある。

文 献

- 1) Boulter, D. (1993) Phytochemistry, 34 : 1453-1466
- 2) 梅谷献二 (1987) 「マメゾウムシの生物学」, 築地書館
- 3) 石井象二郎 (1970) 「昆虫学への招待」, 岩波書店
- 4) 石本政男 (1994) 化学と生物, 32 : 169-173
- 5) Ishimoto, M. et al. (1996) Entomol. Exp. Appl. 79 : 309-315

国内情報

乳汁中にヒト成長ホルモンを生産する トランスジェニックブタの作出

株ワイエスニューテクノロジー研究所

上田 正次

哺乳動物の持つ優れた乳タンパク質合成能力を活用して家畜の乳汁中に医薬品等の有用物質を大量に生産する動物工場技術は実用の時代を迎え、バイオ医薬品の新しい安価な大量生産手段として注目されている。我々はブタの乳汁中に医薬品を効率的に生産する技術の構築を目指し、ウシ乳タンパク質プロモーターの支配下でヒト成長ホルモン遺伝子を発現するように設計した融合遺伝子をブタに導入して乳汁中にヒト成長ホルモンを生産するトランスジェニックブタの作出を試みた。本研究は平成4年3月に生研機構、(社)畜産技術協会、雪印乳業株式会社、三共株式会社で設立された株式会社ワイエスニューテクノロジー研究所で行われた成果である。

1. はじめに

組換えDNA技術を活用してヒトの生理活性物質等を微生物や培養動物細胞で大量生産して製造されるバイオ医薬品の優れた有効性が臨床の場で認識されている。しかし、バイオ医薬品は生産効率が低く、生産費が高額のために大量投与が必要な医薬品の開発には限界があった。そこで、哺乳動物の持つ優れた乳タンパク質合成能力を活用して家畜の乳汁中に医薬品を安価に大量生産する動物工場技術¹⁾が注目されている。本技術の活用により生産費を大幅に削減することができるため、臨床投与量が多いために医薬品として開発することが価格的に困難とされたバイオ医薬品の臨床応用への道が開かれた。我々は生理活性物質をブタの乳汁中に効率的に生産する技術構築を目指してヒト成長ホルモン遺伝子を乳腺で発現するブタの作出を行った。

2. 動物工場による有用物質生産技術構築への家畜ブタの利用

ブタは多産（平均産仔数：10頭）の周年繁殖性で、世代間隔も比較的短く（妊娠期間：約4カ月、性成熟期間：約6～7カ月）、平均分娩回数が年間約2回という高い生産性を

示す繁殖特性に加え、高い泌乳能力（5～8ℓ/日）を有している。また、SPFの繁殖技術も確立されている。ヒト型化インシュリンのようにブタを医薬品の生産材料として利用することには長い歴史があり、倫理的な面からも社会的な受け入れが比較的進んだ実用性の高い家畜である。従って、家畜へのトランスジェニック動物技術の応用に際して、ブタは非常に適した家畜と言える。

3. ヒト成長ホルモンを生産するブタの作出

そこでヒト成長ホルモン遺伝子を導入して乳汁中にヒト成長ホルモンを生産するブタの作出に取り組んだ。ブタへの遺伝子の導入方法は、現在のところ前核期受精卵の雄性前核へDNAを直接顕微注入する方法が最も確実で実用的な技術である。我々が行ったトランスジェニックブタの作出スケジュールの概要を図1に示した。安定した採卵成績を得るため、採卵に際しては大きなコロニーサイズで採卵適期まで飼育される食用のブタを使用した。6～7カ月齢の未成熟雌（体重100-110kg）に1,000～1,500単位のeCG（ウマ絨毛性性腺刺激ホルモン）を筋肉注射し、その72時間後に500単位のhCG（ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン）を投与して発情誘起処置を施した。供胚ブタにはhCG投与の32～34時間後

UEDA Masatsugu

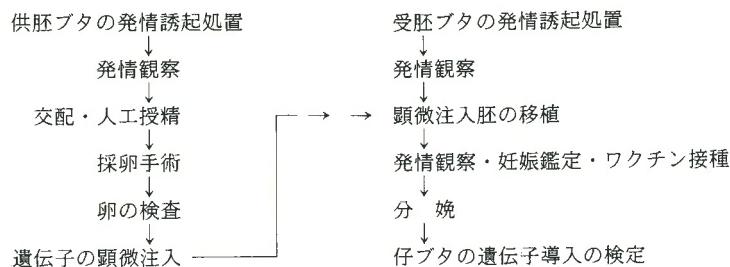


図1. トランスジェニックブタ作出プロセスの概要

に自然交配と人工授精を併用して確実な交配を行った。hCG 投与の50~56時間後に卵管を上向に灌流して卵子を外科的に採取した。採卵成績を表1に示した。1頭の供胚ブタで約16個の排卵を認め、約13個を採卵することができた。採取した卵子から1細胞期で透明体に精子の付着を認めたものを選別して遠心処理(13,000 g, 8-10分間)することにより卵子内の脂肪顆粒を偏在化させて前核を視覚化した。顕微注入に適した前核を認める前核期受精卵は約6個であった。この様にして得られた受精卵の雄性前核にDNAを顕微注入

した。注入には、乳汁中にヒト成長ホルモンが生産できるようにウシ・カゼイン遺伝子プロモーターの支配下でヒト成長ホルモン遺伝子が発現するよう設計した2種類の融合遺伝子($b\alpha S1CN/hGH$, $b\beta CN/hGH^2$)を使用した(図2)。1回の実験には5頭の供胚ブタと供胚ブタと同一方法で同一時期に発情を誘起した2頭の受胚ブタを用意し、顕微注入した約25~35個の胚を受胚ブタの片側卵管へ外科的に移植した。尚、移植する顕微注入した胚の数が不足する場合には2細胞胚や前核を視覚化できなかった受精卵を加え、移植す

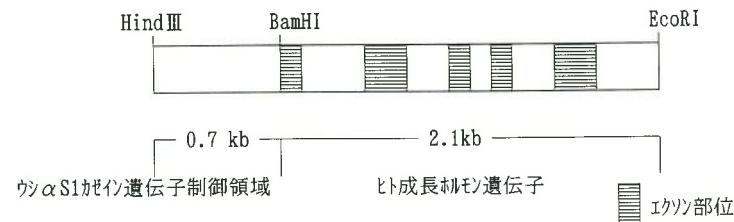
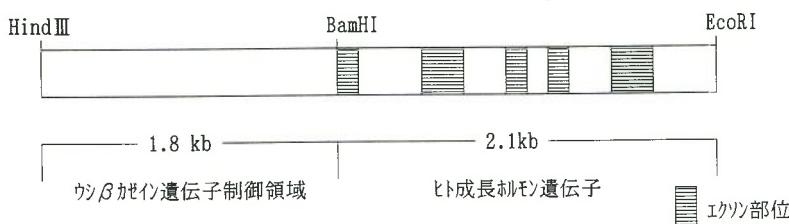
(A) $b\alpha S1CN/hGH$ (2.8kb)(B) $b\beta CN/hGH$ (3.9kb)

図2. 融合遺伝子の構造

表1 ブタ1細胞期胚の回収成績

	総 数	供試ブタ1頭当たり
供試ブタ頭数	90	
排卵数	1,394 (100%)	15.5
回収胚数	1,143 (82.0%)	12.7
1細胞期胚数	1,111 (79.7%)	12.3
DNA注入胚数	580 (41.6%)	6.4

る胚の数を整えて移植した。移植成績と得られたトランスジェニックブタの作出効率を表2に示した。 $b\alpha S1CN/hGH$ 融合遺伝子を注入した293個の胚を38個の非注入胚と共に12頭の受胚ブタに移植した。7頭が分娩して26頭の産仔と15頭の死産胎仔を得た。誕生した産仔から出生直後に断尾して、また、死産胎仔からは組織の一部を採取して全DNAを調製し、PCR法により融合遺伝子の導入を検定し、2頭に遺伝子の導入を認めた(1頭は死産胎仔)。一方、 $b\beta CN/hGH$ 融合遺伝子を注入した287個の胚を13個の非注入胚と共に11頭に移植した。5頭が分娩して15頭の産仔と15頭の死産胎仔を得、PCR検定により2頭に遺伝子の導入を認めた(1頭は死産胎仔)。いずれの融合遺伝子を注入した場合にもほぼ同じ結果が得られ、移植した胚の約11%が個体へ発生し、その約6%に遺伝子の導入を認め、トランスジェニックブタの作出効率は移植した顕微注入胚の約0.7%であった。次に、導入したヒト成長ホルモン遺伝子の乳腺における発現をWitch's milk法³⁾により新生児期に検定した。融合遺伝子が導入された出生直後の産仔(2種の融合遺伝子で各1頭づつのファウンダー)の乳腺組織を採取し、RT-PCR法によりヒト成長ホルモン遺伝子の発現を調べた。2頭のファウンダーのうち $\alpha S1CN/hGH$ 融合遺伝子を導入した個体においてヒト成長ホルモン遺伝子のmRNAを検出し、導入した遺伝子が乳腺において発現し、ヒト成長ホルモンを乳汁中に

生産するブタであることが示唆された。実際に搾乳して乳汁中のヒト成長ホルモンの生産量を確認するため、得られた2頭のファウンダーを交配して搾乳用のブタを準備している。また、2頭のファウンダーを飼育して得た次世代の産仔(G1)へのヒト成長ホルモン遺伝子の伝達をPCR法で検定した。いずれのラインにおいてもヒト成長ホルモン遺伝子を認め、次世代へ遺伝子が伝達されたことを確認した。尚、得られたトランスジェニックブタの保存は、射出精液を凍結保存希釈液で希釈して凍結すること⁴⁾で行った。

4. おわりに

われわれが実施したトランスジェニックブタの作出方法について述べた。本作出実験の実施過程で供胚ブタを採卵後に再び受胚ブタとして使用できることを経験した。また、他の研究グループからも供胚ブタと受胚ブタを共用できることが報告された⁵⁾。そこで発情誘起処置と交配条件の適正化に努めて顕微注入できる胚の採取率を改善し、供胚ブタと受胚ブタを共通にすることで1回の移植実験で使用できる卵子数の増大に努めている。現在の標準的な1回の移植実験において、7頭のブタを使用して60~100個の受精卵を採卵し、顕微注入した胚を1~3頭の採卵後のブタに移植することができるため、ラットと同じようにトランスジェニックブタの作出実験を行うことができる。

1頭に多数の胚を移植することができるブ

表2 DNA注入ブタ胚の移植成績

	注入融合遺伝子		合 計
	$\alpha S1CN/hGH$	$\beta CN/hGH$	
移植胚数	331	300	631
注入胚数	293	287	580
非注入胚数	38	13	51
受卵雌数	12	11	23
平均移植数(胚/頭)	2.8	2.7	2.7
妊娠雌数(妊娠率)	7(5.8%)	5(4.5%)	12(5.2%)
分娩雌数	7	5	12
個体発生率	12.4%	10.0%	11.3%
死産胎仔数	15	15	30
産仔数	26	15	41
生育産仔数	24	13	37
遺伝子導入個体数(率)	2(5%)	2(7%)	4(6%)
遺伝子導入個体作出効率	0.68%	0.70%	0.69%

タは、顕微注入した胚の移植に際して多数の受胚ブタを用意する必要がなく、更に、供胚ブタを採卵後に受胚ブタとして再び使用できることはトランスジェニック個体を作出する上で非常に有利である。また、ウシやヤギ等の搾乳動物の泌乳量程はないが、5～8 ℥/日の高泌乳能力を有し、省スペースでの繁殖ができるため、家畜ブタを微生物や動物細胞培養法に代わるバイオ医薬品の新しい製造法を担う動物工場に実用するこもできる。特に、トランスジェニック個体の作出効率を飛躍的に向上できる技術として注目される体細胞クローン技術^{6,7)}と組み合わせることで1回の移植実験でトランスジェニック個体を作出できることが期待できる。従って、作出期間が短縮され、作出費用も大幅に削減されることで実用価値が飛躍的に向上し、バイオ医薬品の信頼できる新しい安価な製造手段になることが期待できる。

動物工場技術を活用した医薬品を実際に製造するには医薬品製造基準に沿った実施方法を遵守しなければならない。世界的な競争の中で、本技術を活用して日本におけるバイオ医薬品の生産を行うには、トランスジェニック家畜に対する現在の厳しい組換えDNA指

針の緩和と医薬品製造のための基準の策定も大きな課題といえる。

哺乳動物の乳汁中に医薬品等の有用物質を生産する動物工場技術が実用される日も近いと考えられる。今後は、動物工場にとどまらず、医学、農学、環境科学等の様々な分野でのトランスジェニック動物技術の応用が考えられる。ブタの有する特性から今後の本技術応用に際し、ブタが広範に利用されることが期待できる。

文 献

- 1) Young M.W. et al. (1997) BioPharm 10(6) : 34-38.
- 2) Ninomiya T. et al. (1994) Mol. Reprod. Dev. 37 : 276-283.
- 3) Hirabayashi M. et al. (1996) Mol. Reprod. Dev. 43 : 145-149.
- 4) 柏崎直巳他 (1996) 第91回日本畜産学会講演要旨集 : 281.
- 5) Pursel V.G. and Wall R.J. (1996) Theriogenology 46 : 201-209.
- 6) Wilmut I. et al. (1997) Nature 385 : 810-813.
- 7) Schnieke A.E. et al. (1997) Science 277 : 2130-2133.

国内情報

暗渠探査レーダーによる水田地下情報の 非破壊検知

株式会社光電製作所

太田 洋一

埋設位置が不明となった水田用暗渠やモグラのトンネルを非破壊にて、それらの位置を検知する技術に物理探査法が考えられる。物理探査には各種の方法があるが、暗渠やモグラ穴の大きさは物理探査の検知ターゲットとして比較的小さく、またその地下深度が比較的浅い位置にあるため、地下レーダーを用いる電磁波探査が最適と考えられる。このターゲットに対する電磁波探査の問題点とその可能性を水田で検知実験を行い、追求した。

本件は生研機構の委託研究のなかで実施し、結果が判明したものである。

1. 地下レーダーの概要

地下レーダーには、パルス波方式と連続波方式がある。上記のターゲットに対して現状の技術レベルではパルス波方式が有利である。よって実験は全てパルス波の地下レーダーを用いた。地下レーダー（以下レーダーと称する）とは、パルス幅が数ナノセカント(ns)の広帯域の周波数成分を有するVHF帯の電磁波をアンテナから繰り返し放射し、エコーランダとして機能するものである。(1ns=10⁻⁹秒) レーダーは地中の様々な物標からの反射波を受信し、CRTにBスコープ画像として表示する。アンテナが暗渠及びモグラ穴を横断した場合のCRT画像は、疑似双曲線となる。(図1)

地下レーダーの受信信号画像は、地中情報を示すものである。

2. 農業現場における地下レーダ探査の困難性

地中の電波伝搬媒質となる土は固体・液体・気体の混合物である。しかも多数の元素が含まれ複雑な媒質となっている。よって地中の電波伝搬は一般の空中レーダーのような大気のみの電波伝搬とは異なり、複雑な伝搬となる。そのため一般に地下レーダーの解析は、

困難といわれる。一般的に伝搬減衰の最大の土質は粘土といわれている。水田の場合保水層として粘土が必ず存在するので、水田の暗渠や微少空洞の検知及びその識別は困難となる。更に農業現場での地下レーダー探査は、地表面の凹凸、植物の茎の存在と地表土の軟硬などによりアンテナの走行が困難となり、探査そのものが不可能になることもある。

3. 検知実験

地下レーダーの構成は、アンテナ部と制御指示部の2ユニットである。実験に用いた送信パルス幅 τ は1, 3, 6nsの3種である。実験はアンテナが暗渠を横断し、暗渠の反射波を受信させる。データの解析は、図1に示すようなCRT画像と受信波形を観測して行った。また受信信号とフィールドの物理的状態の関係を追求した。基礎実験は裸地状態の純土質のローム土、砂壤土、粘土の3種人工フィールドに各々埋設されたコルゲート暗渠の反射レベルの測定から始め、その反射特性及び地表面の走行特性を得た。応用実験は基礎実験データをベースにして、土質の異なる3ヶ所の水田において、暗渠及びモグラ穴の検知実験を実施した。また試掘によりそのデータの検証を行った。その結果、既存レーダーでの水田における暗渠及びモグラ穴の検知の可否について、土壤の電気的性質は言うまでもなく、アンテナの走行障害となる地表状態が大きく関

OHTA Youichi

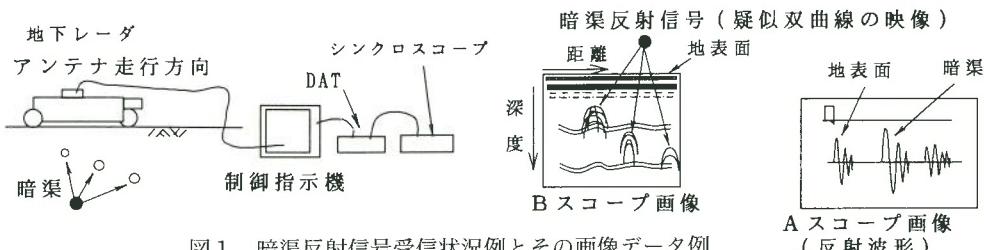


図1 暗渠反射信号受信状況例とその画像データ例

与する事が判明した。

4. 実験結果

1) 基礎実験：つくば市観音台 農業工学研究所内の実験フィールド

フィールドの状態は地表、地下ともに乾燥し、雑草が繁茂し、1つのフィールドに複数の暗渠が埋設され、その最大埋設深度は約1mであった。ローム土及び砂壤土に埋設された暗渠は全て検知できた。地中の電波伝搬の一般的減衰特性は、表1に示すように、粘土の電波伝搬減衰が大きく、当然の結果として粘土フィールドの暗渠検知は困難であった。また粘土フィールドは、地表面の凹凸が夏期の乾燥により硬くなり、そのためアンテナ走行に支障をきたし、結果として検知不能であった。

2) 応用実験

2-1) 埼玉県川越市南古谷 一般水田

フィールドは稲刈り後、田起し前の状態で地表は乾燥、地下は湿潤状態であった。土質は青灰色の重粘土である。1回目の実験は、前日までの雨のため、地下水位が地表から約50cmに存在し、その地下水の帶水層が厚く、暗渠検知は不能であった。2回目は地表面の乾燥を確認後実施し、暗渠単体の位置と深度を検知できた。また暗渠が交差している事までが判定できた。この検証として試掘を行い、暗渠の交差を確認した。

表1 150MHzにおける土の電気特性例

電気特性	比誘電率 ϵ	導電率 ρ (s/m)	1m往復の 減衰量 (dB/m)	1m往復の伝搬 時間 ns (10^{-9} 秒)
土質				
乾いた砂	5	9.63×10^{-4}	1.41	14.92
ローム	15	8.80×10^{-3}	7.43	22.85
湿った粘土	20	4.50×10^{-2}	32.82	29.91

但し、その暗渠の信号レベルは、微弱であり、対策としてアンテナと大地の結合損失の改良策を実施し、暗渠の受信電圧が180mVから処理後240mVになり、その効果を確認した。

2-2) 茨城県つくば市・市之台 一般水田
フィールドの状態は稲刈り後、田起し済みで、地表及び地下ともに湿潤状態であり、この水田土壌は、有機質に富む低位泥炭層で、耕盤は存在しないといわれた。この現場は川越現場と比較して、暗渠信号が格段に強く検知容易であった。この低位泥炭層は、ローム土と同様な伝搬減衰の少ないものであることが判った。また暗渠の上に存在している疎水材の反射も明確に受信できた。写真1の大きな2次曲線(2)は暗渠で、その上にある小さな2次曲線(1)が疎水材の反射を示している画像である。

写真2の曲線(3)はモグラ穴であり、(2)が暗渠、(1)は疎水材、(4)は暗渠を縦断した反射を示す画像である。

2-3) 秋田県大潟村・秋田県農業試験場の試験水田

フィールドは稲刈り後、田起し前で、地表及び地下も湿潤状態で、土質は低質重粘土であった。この水田はレーダ探査における最も困難な現場であり、従来検知不可能といわれていた。特殊ソリの採用で探査中のアンテナの動搖を防止する事ができ、埋設深度70cmのコルゲート暗渠が検知できた。

5. まとめ

5-1 問題点及びその対策

(1) 不要信号とアンテナ走行の問題

車輪付アンテナで走行困難となる現場では、

無理に走行するとアンテナの動搖が大きく受信信号が不規則となり、データの判別が困難となる。よってアンテナの動搖を押さえる必要がある。そのためアンテナを二重構造の特殊ソリに搭載し、アンテナ走行が安定した。川越や秋田の湿った重粘土でアンテナの動搖を押さえた事及びパルス繰り返し周期の高い機種の使用により、不要信号を減少させ微弱信号が受信できた。

(2) 微弱反射信号受信について大地とアンテナの整合問題

粘土質土壤で反射物がプラスチック材質の場合、その反射信号は微小で判定は難しい。そのため大地とアンテナの整合を高める処理を行い、受信電圧を約一割アップした。検知レベルが小さい場合、この処理法は有効と思われる。

(3) 地下水の存在について

地下水が存在すると、その下にある暗渠は極めて受信し難くなる。地下水の厚さが30cm以上の場合、受信は不可能であった。目下その対策はできていない。

5-2 実験により判明したこと

(1) 粘土質土壤の減衰問題

川越とつくばの暗渠の材質、埋設深度は同じであるが、泥炭層土壤が、重粘土質土壤に比較して暗渠の受信電圧が実数値で約3倍(10dB)も高い。また導電率は含水率に比例し、結果として減衰量にも比例するが、泥炭層土壤であれば、含水量に係わらず常時探査可能であるといえる。

(2) 暗渠縦断と横断の検知レベル問題

埋設管が金属の場合、電波の偏波面がその管に対して平行か直交かにより、反射レベルは変る。即ち鋼管を縦断した時の信号は、横断した時に比較して小さくなる。金属以外の材質では、その差は顕著に見られない。暗渠の場合、材質は非金属であるので、横断、縦断の両データが受信可能といえる。

(3) モグラ穴について

モグラ穴の検知については、当初その信号判断ができず、単なる小石のような物体と推定していたが、マルチウインドウ機能により、

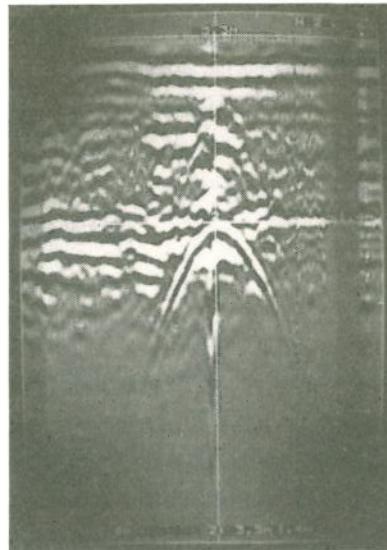


写真1 説明は本文参照

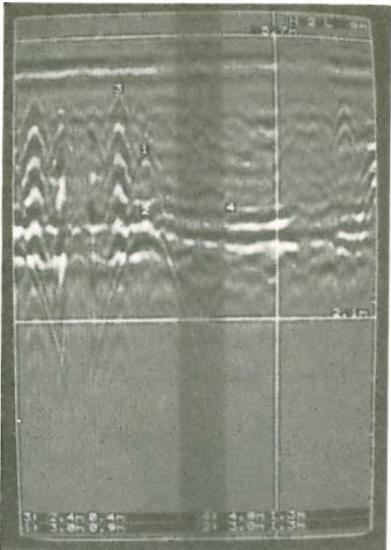


写真2 説明は本文参照

その連続性を推定し、1本の物標として判断できた。その後モグラ塚の存在している近傍では100%この空洞信号が表示され、モグラ穴の存在が判断可能となった。

結論

1. 地下レーダによる地下探査に関して、国内の農業現場で、最も困難とされている秋田県・大潟村の水田用コルゲート暗渠が特別仕様の地下レーダにより検知できた。このレーダにより、全国の水田で暗渠検知の可能性があるといえる。

2. 国内のモグラの穴は検知可能といえる。

文 献

- 1) 大友功一ほか (1988) 帯広大学研究報告書 I.15:301-312
- 2) 鈴木 努 (1981) 計測と制御 20-8:762-771
- 3) 今泉 吉典 (1956) 植物防疫叢書 4:73-91
- 4) 竹内 瞳夫 (1990) 農業土木学会誌 58-9:201-204
- 5) 太田 洋一ほか (1997) 農業土木学会講演要旨:670-671

謝辞：実験の実施にあたり、指導・協力を頂きました生研機構・棟方研リーダー・石野捷治リーダー、農業工学研究所・竹内瞳雄部長、秋田県農業試験場・太田健主任研究員及び筑波国際農業研修センター・天野洋司氏に、感謝申し上げます。

地域の先端研究

サツマイモ研究の最前線

農林水産省 九州農業試験場

山川 理

サツマイモは農薬や肥料の投入量の少ない環境に優しい作物であり、食物繊維や栄養素に富むなど安全性や栄養性、さらには健康機能増進効果をもつ未来型作物としての認識が高まりつつある。私の所属する九州農業試験場のサツマイモ研究グループは、まず幅広く集めたサツマイモ遺伝資源を調査し、私たちの食生活を豊かで健康的なものにするのに役立つ新しい特性を見つけ出した。そして選ばれた遺伝資源を素材として、アントシアニンやカロテンなどを多量に含む加工用新品種の開発や、品質を損ねない効率的な加工法を開発することにより、サツマイモを利用したパウダー、ジュース、ビール風飲料、ワイン風飲料など新加工食品の作出に貢献している。

はじめに

これまでの農業は生産性向上を重視する余り、農薬や肥料の過剰による環境保全や農産物の安全性などに問題を生じてきた。サツマイモはこれら化学物質の投入量の少ない作物であり、食物繊維や栄養素に富み、さらには健康機能増進効果をもつ未来型作物であるとの認識が高まっている。九州農業試験場サツマイモ研究グループは、食品素材として優れた特性をもつ新品種を作り、品質を損ねない効率的な加工法を開発することにより、サツマイモから新規食品を作ることに努力している。

1. サツマイモパウダーの開発

サツマイモを加工する場合、収穫時期との関係で工場の操業期間が限定される。そこで生サツマイモを乾燥し、パウダーの状態で年間を通して使うことが必要となる。私たちはパウダー用品種と乾燥法について研究した。品種としては紫色のアントシアニン系品種と橙色のカロテン系品種の開発を考えた。サツマイモの橙色素はベータ・カロテンであり、プロビタミンAとしての栄養性、また老化防止や発癌抑制などの機能性をもつことがわか

っている。紫色素については私たちの研究により抗酸化作用、変異原物質の無毒化、肝機能障害防止などの機能性が明らかになった。このことから高アントシアニン品種「アヤムラサキ」や高カロテン品種「九州114号」は消費者の健康志向にあう製品開発に役立つ原料になった。さらに色素を含まない品種の開発にあたっては、変色を起こさないためにポリフェノールオキシダーゼ活性が低く、かつポリフェノール類の含量が少ないと、麺のこしの強さや滑らかさなど製麺特性がユニークであることを考慮し、「ジョイホワイト」を選抜した(表1)。乾燥法については回転乾燥庫と降溫乾燥法を採用した。乾燥庫は回転することで試料をいつも攪拌し、乾燥を均一化する。同時に水分が減少するにつれて通風温度を下げ、品温の上昇を防ぐ。この方法で色素の分解を最小限に止めることができた。現在サツマイモパウダーには紫、橙、白色の3種類があり、パン、麺、菓子などに利用されている(図1)。その他に味噌、醤油、酢、焼酎などの発酵原料や冷凍食品素材としての利用が期待される。

2. サツマイモジュースの開発

サツマイモは栄養や機能性の面で穀物的特性と野菜的特性を共有する優れた食物であるが、その真価を發揮するには毎日食べること

YAMAKAWA Osamu

表1 サツマイモパウダー用に開発された品種の特性

特性	アヤムラサキ	九州114号	ジョイホワイト	ゴガネセンガン	ベニハヤト
いも収量(kg/10a)	175	183	173	230	141
切干歩合(%)	35.8	32.2	37.8	36.0	24.6
乾物重(kg/10a)	62	59	65	83	35
蒸しいもの割合(%)	3.5	3.8	2.0	4.8	3.3
アントシアニン 色価	7.2	—	—	—	—
Bカロテン含量(mg/100gDW)	—	39.3	—	—	49.1
貯蔵性	や易	や難	や易	や難	中

が必要であり、ジュース化はそのための筋道である。そこで、でん粉含量の低い品種を育成すること、そして製造工程ででん粉を糖化することを考えた。ジュース用の新品種として、低でん粉、高ベータ・カロテン、難変色性、高搾汁率などの特徴をもつ新品種「ジェイレッド」を開発した（表2）。この他にアントシアニンを含む紫色系やフラボノイドを含む黄色系が考えられ、それぞれの色を持つジュース用品種の開発が進められている。現在「アヤムラサキ」から紫色のジュースが製造されているが、色が濃すぎることや搾汁率が低いなどジュース用として利用するにはまだ問題が多い。

またジュースの製法については、当初生いもからそのまま搾汁する生ジュース加工を考えていたが、工場設備の都合で加熱調理後に搾汁する方法が採用された。この方法で製造されたジュースは生ジュースと比べ、変色は少ないが、粘性が高く、いも臭が強くなる。また搾汁滓は水分が多く、粘度が高いため再利用しにくいなどの問題もある。サツマイモの総合利用の観点からフレッシュスクイーザー(FS)法のような生ジュース製造ラインの建設が今後必要と思われる（図2）。

表2 サツマイモジュース用に開発された新品種「ジェイレッド」の特性

特性	ジェイレッド	ベニハヤト
いも収量(kg/10a)	297	171
切干歩合(%)	25.5	25.1
でん粉歩留(%)	15.0	13.1
蒸しいもの割合(%)	3.9	4.2
Bカロテン含量(mg/100gDW)	38.6	41.2
貯蔵性	良	中

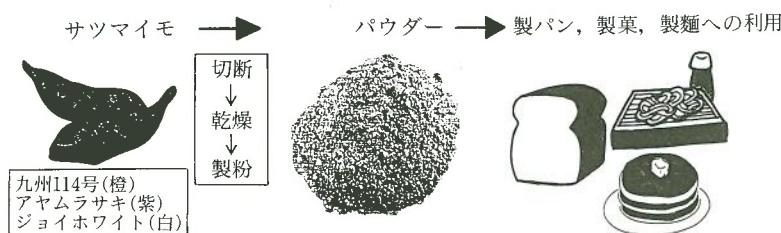


図1 サツマイモパウダーとその製品への利用

3. サツマイモビール・サツマイモワインの開発

サツマイモから作るアルコール飲料としてはいも焼酎がありにも有名であるが、焼酎は蒸留酒であるため、すべて透明となり、サツマイモ本来がもつ紫や黄色などの色合いが利用できない。また焼酎滓は醸造酒の搾り滓と比べ水分が多く、粘度も高いことから再利用や廃棄処理がしにくいなどのデメリットもある。そこで最近開発された高色素品種を用いてビール風飲料（発泡酒）やワイン風飲料（雑酒）などの醸造酒を作ることが研究された。南薩のビール工場でサツマイモビールの開発に成功した。紫色系のサツマイモから赤

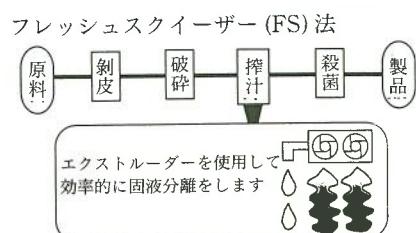
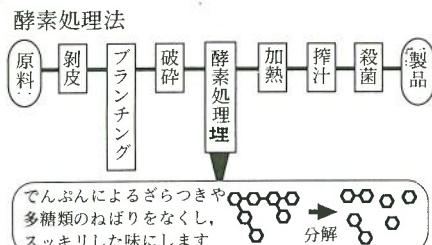


図2 工場レベルでのサツマイモジュースの製法

ビール、黄色系のサツマイモから黄ビール、焙煎サツマイモから黒ビールなどバラエティに富んでいる。ワイン、特に赤ワインはポリフェノール類を多く含むため、動脈硬化を防ぎ健康に良いということから最近消費が急速に伸びている。紫色系のサツマイモも同様な機能性が期待できるポリフェノール類を多量に含んでいることから消費者の嗜好に添う赤ワイン風雑酒を作ることができる。ただし、サツマイモの糖類の大部分はでん粉であるため、でん粉を糖化する酵素処理を行った後で発酵することが必要である。この手法はサツマイモジュースを作る時に用いられたものと同様である。あとはブドウ酒の場合と同じ工程でサツマイモワインを作ることができる。黄色系サツマイモを使えば白ワイン風雑酒を作ることができる。赤ワイン風雑酒は透明感のある、鮮やかな赤色を呈し、白ワイン風雑酒は通常のワインより琥珀色が濃い。味はイチゴや柑橘類で作ったワイン風雑酒に比べ、本物のワインに極めて近い。

4. 21世紀にむけてのサツマイモ研究 国際ワークショップ

人類の持続的発展に寄与しうるサツマイモ生産・利用システムの構築のための研究方向を最新の成果に基づいて議論し、国際共同研究等への方向性を打ち出すことを目的に「甘しょの20世紀型生産システムの技術開発戦略

に関する国際ワークショップ」が1997年12月9～10日に科学技術庁との共催で宮崎県都城市で開催された。民間企業や地元関係者も含め、9ヶ国、1国際研究機関から100名を越える人達が参加した。

各国とも従来比較的等閑視されていた利用関係の研究開発を強めていることや日本のサツマイモ研究への世界の期待は大きいものがあること、国別に見れば比較的マイナーなサツマイモ研究では他の作物以上に国際的協力を必要とすること等が明らかとなった。

本ワークショップとして、(1)サツマイモ研究開発に関する国際的情報交換の円滑化（インターネットの活用）、(2)国際共同研究に向けたポストハーベスト関連研究課題、(3)国際共同研究に向けた生産管理技術関連研究課題、(4)国際共同研究に向けた基盤的研究課題、からなる提言を取りまとめた。本ワークショップの概要は、"http://ss.mykz.affrc.go.jp/workshop/"にて公表している。

おわりに

この他、現在サツマイモは天然色素素材やペーストなどに加工され、アイスクリーム、菓子類などに用いられているが、今後はスープ、ピューレ、コロッケなど調理用の材料として食品全般に世界中で広く利用される可能性があり、この方面での研究の進展が期待される。

文献情報

受粉シグナルによって制御される3つのACC合成酵素遺伝子

カーネーション、ラン、ペチュニアをはじめとする多くの植物では、受粉によって花のエチレン生合成が誘導される。このエチレンは、花弁の老化、子房の発達といった花の受粉後の発達に関与している。受粉後の花の発達において、トリガーになるシグナルは花粉中にあるのではないかと考えられているが、その実態は明らかになっていない。ランでは柱頭に与えたオーキシンが、受粉させたときに見られる花のエチレン生成および老化現象と同じ効果を引き起こすことが知られている。受粉シグナルによって誘導されたエチレンは、花の各器官の受粉後の発育を調節するのに働いている。エチレン生合成系の-1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)合成酵素は数個の遺伝子からなる遺伝子ファミリーで、各ACC合成酵素遺伝子の発現は植物の成長および発育過程のなかで組織特異的に制御されている。ランの一種であるファレノプシス(*Phalaenopsis* sp. Hybrid (cv. Doritaenopsis))では、エチレンに反応して雌雄の群と唇弁で発現するACC合成酵素遺伝子Ds-ACS1が単離されている。しかし、この遺伝子は、受粉シグナルに直接反応して起こるエチレン生合成には関与せず、2次的な受粉シグナルを增幅して、末端の花器官へ伝達するエチレンの自己触媒的な生合成に関与していることが知られている。Bui and O'Neill (1998)は、*Phalaenopsis* sp.において、受粉シグナルに直接制御されているACC合成酵素遺伝子の単離を試みた。

受粉後の花の各器官におけるACC合成酵素活性の時間的な変化を調べたところ、柱頭、唇弁、子房では受粉後24時間後にピークが認められたことから、*de novo*でACCが合成されていることを確認した。花被では活性は極めて低く、柱頭では受粉後1.5時間以内に増加が見られた。受粉の代わりに、ナフタレン酢酸(NAA)を柱頭に処理(1μg)すると、急速なACC合成酵素活性が見られたことから、最初に受粉によって反応する器官は柱頭であり、その反応は花粉由来のオーキシンを介して起こることが示された。

受粉2時間後、または4時間後に、柱頭、子房の全RNAから、ACC合成酵素遺伝子のcDNA断片が1つずつ単離された(*Phal-ACS 2*と*Phal-ACS 3*)。2つのcDNA断片は異なるACC合成酵素遺伝子をコードしていた。これらのACC合成酵素遺伝子と、すでに単離され、エチレン反応型の*Ds-ACS 1*遺伝子と相同性の高い*Phal-ACS 1*を用いて、柱頭、子房における発現を解析した。

*Phal-ACS 2*に相当する転写物は受粉した花の柱頭で受粉2時間後から検出され、24時間後にピークに達したのに対し、*Phal-ACS 3*に相当する転写物は、受粉した花の子房で受粉6時間後から検出され、24時間後にピークに達した。すでに単離されている*Phal-ACS 1*は、受粉6時間以後の柱頭で検出されたが、子房では検出されなかった。受粉した花における*Phal-ACS 2*の柱頭での発現パターン、*Phal-ACS 3*の子房での発現パターンは、それぞれ、受粉後の柱頭、子房におけるACC合成酵素活性の増加パターンとよく対応していた。受粉花における*Phal-ACS 2*と*Phal-ACS 3*の発現は、柱頭へのNAA処理(1μg)によっても再現された。しかし、子房における*Phal-ACS 3*の発現は受粉による発現に比べて弱かった。これらの発現はエチレンの作用阻害剤によって影響を受けなかったことから、*Phal-ACS 2*と*Phal-ACS 3*の発現は、オーキシンあるいはその他の刺激によるもので、エチレンによるものではないことが示された。柱頭にNAA処理をした場合、*Phal-ACS 1*は柱頭で処理8時間後に検出され、*Phal-ACS 2*の発現より6時間遅れて検出されたが、子房では検出されなかった。NAA処理した柱頭における*Phal-ACS 1*の発現はエチレンの作用阻害剤を同時処理することにより阻害されたことから、*Phal-ACS 1*はエチレンによって誘導されることが確認された。

以上のことから、新たに単離された*Phal-ACS 2*と*Phal-ACS 3*は、オーキシン等花粉由来の受粉シグナルに反応して発現し、柱頭、子房でのACC合成酵素活性の増加を誘導するもので、エチレンに反応して発現する*Phal-ACS 1*とは異なった形で制御を受けていることが明らかになった。受粉したランの花における各器官間のエチレン生合成系遺伝

子の発現制御モデルは次のように考えられる。①オーキシン等の花粉由来のシグナルが、柱頭において *Phal-ACS 2* の発現を誘導して、ACC 合成酵素活性を誘導する。②柱頭において生成した ACC は、構成的な ACC 酸化酵素活性によってエチレンに酸化される。このエチレンは *Phal-ACS 1* とすでに単離されている ACC 酸化酵素遺伝子 *Phal-ACO 1* の発現を誘導し、自己触媒的なエチレンの合成を引き起こす。③増加した ACC あるいはエチレンは柱頭から唇弁と花被に移動する。④その結果、唇弁では、*Phal-ACS 1* と *Phal-ACO 1* 遺伝子の発現と、自己触媒的なエチレン合成がおこり、生成したエチレンは唇弁の下偏成長と老化を誘導する。⑤花被では、柱頭、子房、あるいは唇弁から輸送してきた ACC が ACC 酸化酵素活性によってエチレンに酸化される。エチレンは花被のしおれと老化を引き起こす。⑥子房では、花粉由来のオーキシンのほか、未知の受粉シグナルが *Phal-ACS 3* 遺伝子の発現を誘導し、ACC 合成酵素活性の増加、ACC の生成を引き起こす。子房では ACC 酸化酵素活性が低く、生成した ACC の一部は花被に輸送されている。

花の受粉後の反応には、おそらくエチレンの受容およびシグナルransductionも関与していると考えられ、これらも近い将来、エチレンを介した受粉シグナルの伝達モデルに組み込まれるものと思われる。

(抄訳 小杉祐介—東北大学大学院農学研究科)

(KOSUGI Yusuke)

Three 1- Aminocyclopropane -1- carboxylate synthase genes regulated by primary and secondary pollination signals in orchid flowers

Bui, A.Q. and O'Neill, S.D.

Plant Physiol., 116 : 419-428 (1998)

文献情報

性決定における *Dax 1* 遺伝子の役割

性の分化においては、*Sry* 遺伝子が重要な調整役であり、性腺に作用し精巣への発育を促すことが知られている。しかしながら、雌

雄への性分化の全体像についてはまだよく分かっていない。例えば、染色体が XY 型であるにもかかわらず雌性を示す例がヒトにおいて報告されている。ヒトでは、X 染色体短腕にある Xp 21 の 160-kb の部分が重複して、遺伝子量検出性転換を起こす。*DAX 1* は核のホルモンレセプタースーパーファミリーであり、初期の生殖隆起の発育に関わっている。XX 型と XY 型の両方で発現するが、その時期は *Sry* 遺伝子の発現時期と同時である。Swain らは、この性転換における *Dax 1* の関わりに着目し、トランスジェニックマウスを用いて解析を行なった。

Dax 1 と *Sry* 遺伝子は、妊娠 11.5 および 12.5 日齢のマウス胚の生殖隆起で共に発現しており、11.5 日齢の XY 型の生殖隆起における *Dax 1* と *Sry* の発現分布は似ていた。*Dax 1* をトランスジーンしたマウスでは、内因性の *Dax 1* よりトランスジーンした *Dax 1* の方が早く発現していた。この遺伝子が高レベルに発現したときには精巣の発育が遅れるものの、性転換は起こらなかった。*Dax 1* をトランスジーンした雄と雌を交配させてホモの雄を得たところ、精巣が野生型に比べて小さく、精子形成が阻害されていて不妊であった。*Dax 1* を高レベルに発現しているトランスジェニック雌と *Sry* 遺伝子の発現レベルが低い雄マウスを交配させることにより、胚の性転換が誘起できた。

以上の結果から、*Dax 1* の作用は単独で効果を発揮するものではないが、精巣形成に拮抗する遺伝子であること、またそれは、*Sry* 遺伝子の発現レベルに対して、*Dax 1* 遺伝子の発現レベルが著しく高いときに起きること、すなわち遺伝子量検出性転換に関与していることが明らかになった。この報告により、哺乳動物の性決定には、*Dax 1* と *Sry* 遺伝子の発現の関係のように、正確な量で正確な時期に遺伝子が発現することが重要であることが示された。

(抄訳 松本浩道—東北大農)
(MATSUMOTO Hiromichi)

***Dax 1* antagonizes *Sry* action in mammalian sex determination**

Swain, A., Narvaez, V., Burgoyne, P., Camerino, G., and R. Lovell-Badge
Nature, 391 : 761-767, 19 February, 1998

文献情報

ワインの色を抑える

近年のワインの流行において味や香りといった消費嗜好の拡大に加えて、カラフルなワインの色合いによるファッショニ性や、フレンチ・パラドックスに代表される健康感がワインの流行を少なからず後押ししているようだ。その二つの要因に深く関与していると考えられるワイン中の成分にアントシアニンがある。アントシアニンは2-フェニル-3,5,7-トリヒドロキシベンゾピリウム骨格をもつアントシアニジンの配糖体類の総称で、一般的にはポリフェノール類の一一種として知られている。ポリフェノール類は赤ワインの抗酸化物質の一つであり、数々の生理作用が示唆されている。前述のフレンチ・パラドックス、つまり乳脂肪消費量の多い西欧諸国の中でフランス人の心疾患死亡率が低いという統計結果も、ポリフェノールの抗酸化作用が血中の低密度リポタンパク質の酸化を抑え、心疾患の発生を抑制していると言われている。

また、アントシアニンは色素として赤ワインの色合いに深くかかわっているが、ワイン中の過剰なアントシアニンは濁(おり)と呼ばれる沈殿物を貯蔵熟成中に生成することが知られている。白ワイン製造ではアントシアニンは品質を左右する妨害物質ですらある。そのため通常の白ワイン製造では果皮の色の薄いブドウが用いられている。ロゼワインの場合、赤ワインと同じ原料ブドウを用いて短い発酵期間の後に果皮や種子を除いたり、赤用白用、両方の原料ブドウを混ぜることで微妙な色合いの調節を行っている。配糖体であるアントシアニンは β -グリコシド結合した糖を分解・除去するとアントシアニジンへ変わり、さらに自発的に色のない成分へ変化する。ワイン製造に用いられる酵母にはこの β -グリコシド結合を分解する活性、 β -グルコシダーゼ活性がほとんど無く、そうした性質を付加することで良質な白・ロゼワインの製造に有効であると考えられている。

本論文では、*Candida molischiana* の β -グルコシダーゼ遺伝子を用いたワイン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* T 73 株の形質転換例を示している。得られた形質転換体の β -

グルコシダーゼ活性は主に細胞壁画分に存在し、15%程度が培地に遊離していた。そして精製された酵素タンパク質は糖タンパク質であり、Endo-H 消化による糖鎖の除去を行うと、遺伝子配列から予想される約 94kDa の大きさを示した。酵素学的分析から本酵素はエタノールにより活性化され、亜硫酸イオンやフルクトースには影響を受けないが、グルコースによって阻害されることがわかった。グルコースはブドウ果実に多く含まれるため、発酵中は活性阻害を受けると考えられたが、実際の発酵過程では、基質としてグルコースが消費されるに従い、本酵素活性があらわれてくることも示された。その形質転換体は以下のワイン酵母とほぼ同じ発酵特性をもち、ロゼワイン醸造を行なうことを示されている。その過程でワインの色の濃さを約30%も減少させていることが示された。工業的な利用を考えた場合、原料を淡色系のブドウに限定しないでロゼワインを製造できるメリットは大きいと思われる。

しかし組換え体の食品への利用は、まだまだコンセンサスが得られているとはいえない状況であり、どれほどこの組換え体が利用できるか疑問も残る。筆者らは、この組換え体の作る酵素がワンステップで精製できることも報告している。このことは、この酵素を食品添加物として利用する可能性を暗に示唆しているのかもしれない。組換え体の安全性に関する評価は今なお継続して行わなければならぬ問題ではあるが、醸造に用いる酵母の組換え技術は手法として確立されたレベルにあるといえる。何の遺伝子を導入するとどのようなメリットが発生するかを熟考することが、その技術の工業利用に関して非常に大切であろう。組換え体酵母によって直接的、間接的に生み出された、薔薇色の微妙なロゼワインや黄金色の白ワインといった色鮮やかなワインが、レストランや家庭で一般的に飲まれるようになる日もそう遠くないかもしれない。

(抄訳 篠田 直一カルピス株式会社基盤技術研究所)

Heterologous Expression of a *Candida molischiana* Anthocyanin- β -glucosidase in a Wine Yeast Strain

Sánchez-Torres, P., L. González-Candelas and D. Ramón

J. Agric. Food Chem. 46: 354-360 (1998)

文献情報

新たに分離された魚類イリドウイルスの分子生物学的特性とその分類学的位置

1990年に四国のマダイ養殖漁場で発生した原因不明の大量斃死は水産庁養殖研究所の研究によりイリドウイルス科に属するウイルスによる感染症であることが判明したが(本誌第33号、第52号)、このウイルスによる感染被害はその後、シマアジ、ブリなどの他魚種にも広がり、現在でも毎年水産養殖業界を脅かす魚病となっている。一方、時を同じくしてヨーロッパの Sheatfish (ヨーロッパナマズ *Siluris glanis*) やオーストラリアの Red-fin perch (淡水スズキ *Perca fluviatilis*) でもイリドウイルス科に属する新たなウイルスによる甚大な被害が報告された。これらのイリドウイルスは、それまで比較的詳細に研究されていた魚類を宿主とするイリドウイルス科 Lymphocystivirus 属の Lymphocystis disease virus type 1 (LCDV-1) とは罹患魚の症状等の生物学的特性が異なることから、Iridovirus 属、Chloriridovirus 属、Ranavirus 属、Lymphocystivirus 属の4属に分類されているイリドウイルス科の再編成を含めその分類学的位置の再検討が望まれている。

本紹介論文の著者らは、ヨーロッパ、東南アジア、オーストラリアの魚類より新たに分離した6種類のイリドウイルスと北米の爬虫類および両生類から分離した3種類の分子生物学的特性を比較し新たな魚類イリドウイルスの分類を試みている。まず、各イリドウイルスのウイルス合成特異蛋白質を SDS-PAGE で解析したところ、それぞれの泳動パターンは微妙に異なるものの同一地域由来のウイルス間では類似していることが明らかとなった。また、ウイルスゲノム DNA の制限酵素切断パターンでも SDS-PAGE 解析と同様な結果が得られた。さらに、カエルを宿主とする Ranavirus 属の Frog virus 3 (FV3) で既に明らかにされているウイルス主外殻蛋白質 (MCP) の遺伝子配列より設計した数種類のプライマーを用いて PCR を行ったところ、6種類の魚類イリドウイルスからは約

13kb の全 MCP 遺伝子を、爬虫類および両生類分離株3種からは約 0.5kb の MCP 遺伝子断片を增幅することができた。次いでこれら PCR 増幅産物をクローニングし、決定された塩基配列をもとに翻訳アミノ酸配列のホモロジー解析を行った。その結果、新規魚類イリドウイルス 6 種および爬虫類イリドウイルス 1 種の MCP のアミノ酸配列は FV 3 のそれと 85% 以上の類似性を示した。また、残りの爬虫類および両生類由来のイリドウイルス 2 種は FV 3 と同一であることが判明した。一方、これまで詳細に研究されてきた魚類由来の LCDV-1 は FV 3 と 62% の類似性しか示さなかった。

また、これらアミノ酸配列データをもとにして LCDV-1 および既知の昆虫由来のイリドウイルスを含めた系統樹図を作成したところ、新たに分離した 6 種類の魚類イリドウイルスは FV 3 と同じ階層に位置していたのに対し、LCDV-1 と昆虫由来のイリドウイルスは FV 3 とはやや離れて位置していた。以上の結果から、著者らは新たに分離された魚類イリドウイルス 6 種は LCDV-1 が属する Lymphocystivirus 属ではなく、両生類を主な宿主とする Ranavirus 属のイリドウイルスとして分類すべきであると結論づけている。また、魚類イリドウイルス感染症において、原因ウイルスの宿主動物としては魚類だけでなく、爬虫類および両生類も含めて調査すべきであると指摘している。

冒頭で述べた日本で現在も猛威を振るっているイリドウイルス感染症の原因ウイルスについては、主にウイルス粒子の形態学的特徴からイリドウイルスとして分類されているが、ウイルス遺伝子の解析を含めた分子生物学的見地からの分類についてはほとんど検討されていない。マダイのみならず多くの海産魚を宿主とし、高い斃死率で養殖業に大きな打撃を与えるこのウイルスに関して、より詳細な研究が望まれる。

(抄訳 椎名康彦—マルハ中研)

(SHINA Yasuhiko)

Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses

Jinghe Mao, R.P. Hedrick, and V.G. Chinchar

Virology, 229: 212-220 (1997)

海外便り

タンパク質合成機構に関するリン酸化 タンパク質の解析

—米国カリフォルニア大学デービス校での6ヶ月間—

農林水産省 農業生物資源研究所

小松 節子

1. はじめに

平成8年3月より6ヶ月間、米国西海岸にあるカリフォルニア大学デービス校医学部に海外出張する機会を得た。デービスの町は、まさに学生の街で治安の良い一見日本のつくばを思い出させる町であった。気候は、私の滞在した6ヶ月間は夏であったが、湿度が低く過ごしやすい日々であった。

カリフォルニア大学デービス校医学部は、大学のキャンパスの中でもはづれに位置しており、落ち着いた環境で研究ができた。私の研究の場となった生化学教室はハーシー教授のもとポスドク・大学院生達が研究に励んでいた。ハーシー教授は、リン酸化を介するタンパク質合成機構の研究において世界的にも第一人者であり各国から研究者が集まっていた。

ここでは、今まで機能の解明されていなかった翻訳開始因子の一つである eIF1A (Eukaryotic Initiation Factor 1A) のリン酸化に関する研究成果を述べたい。

2. 翻訳開始機構とは

翻訳開始機構とは、リボゾームの上で遺伝暗号の鋳型である mRNA と、最初のアミノ酸を運ぶ開始メチオニル tRNA を結合させる反応である。真核生物の翻訳開始因子 (eIF) は、解離したリボゾームに結合して、大小サブユニットの再会合を妨げ、mRNA やメチオニル tRNA を40サブユニットに結合させ、mRNA の開始コドンと開始メチオニル tRNA のアンチコドンが塩基対合した

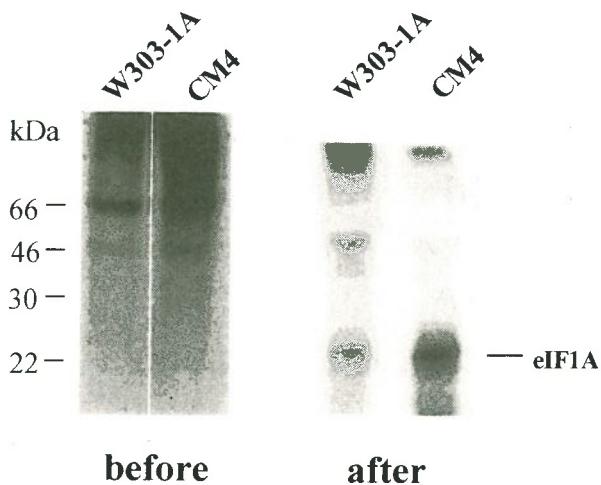
40S 開始複合体の形成を促進する役割をもっている。eIF は、1960年代、ウサギ網状赤血球抽出液のようなタンパク質合成が盛んな高等真核細胞をモデル系として、精製と再構築を通じた生化学的手法によって分離され、抗体または部分アミノ酸配列情報をもとにして単離された。一方、1980年代に入り、真核生物モデル系として、遺伝学的な解析の容易な出芽酵母が取り上げられるようになると、様々な翻訳制御に関わる遺伝子が eIF をコードすることが明らかにされた。酵母 eIF はほ乳類 eIF とよく対応し、機能的にも代替可能であることも明らかになっている。

3. 酵母における eIF1A のリン酸化能の役割

翻訳開始因子の1つである eIF1A は分子量16~17kDa・等電点4.7~4.9で極めて極性の強いタンパク質である（参考1,2）。eIF1A 以外の翻訳開始因子はリン酸化によりその活性さらには機能を調節されることが報告されているが、eIF1A についてはあまり明らかにされていない。本研究において、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の eIF1A がリン酸化により調節されていることを証明した。

酵母 eIF1A の一次構造から推定されるリン酸化部位はカルシウムリン脂質依存性プロテインキナーゼ (PKC) による部分が4種類、カゼインキナーゼ II (CK II) による部分が3種類、サイクリック AMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) による部分が1種類ある。まず、*in vivo* で [³²P] 無機リンを用いて CM 4 (eIF1A overexpressing strain) と W303-1A (wild type) を培養し抗 eIF1A 抗体を用いて免疫沈殿した結果、

KOMATSU Setsuko



Immunoprecipitation

図1 *in vivo*でリン酸化されたeIF1A

eIF1Aはリン酸化されることが確認された(図1)。

そこで、精製eIF1Aを*in vitro*で $\gamma^{32}\text{P}$ ATPと種々のプロテインキナーゼおよびその活性化剤を含む反応液中でインキュベートした。その結果、酵母eIF1AはCK IIとPKCによって顕著にリン酸化されたが、PKAによってはリン酸化されなかった(図

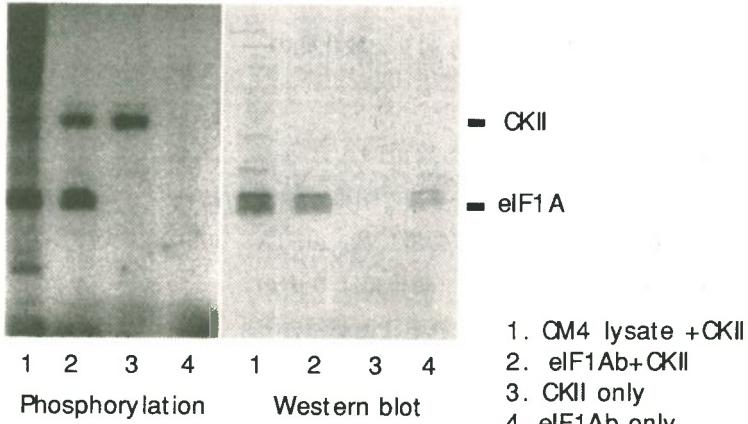


図2 *in vitro*でリン酸化されたeIF1A

2)。リン酸化アミノ酸解析の結果、CK IIによるリン酸化部位はセリンであった(参考3)。このようにeIF1Aも他の翻訳開始因子と同様リン酸化されていることが明らかになり、今後機能との関係において研究が進められる予定である。

4. その他雑感

本大学の機械整備をつくばの研究所と比較すると、機器に関してはあまり整っていないと言う感を受けたが、古い機械も良く管理されており有効に利用されていて、研究を行ってはなんら支障はなかった。グラントをたくさんとっており、もっぱら、人件費と消耗品(試薬等)に回していて、これには学ばれるものがあった。

海外出張なればにして、カリフォルニア大学デービス校病害抵抗性植物工学センター(CEPRAP)にてセミナーを行う機会を得た。ここは、大学と民間の共同出資による研究所で、設備の整った研究機関であった。ここでは、機能解明のために形質転換体作出技術の有用性と特許取得の重要性を学んだ。

末筆ながら、多くの方々のご協力で今回の6ヶ月におよぶ海外出張の機会を得ることができ感謝すると共に、特にこのチャンスをおつくりいただきました元国際農林水産業研究センターの貝沼圭二先生、さらにご招待いただきましたカリフォルニア大学デービス校のジョンハーシー教授にこの場を借りて深謝いたします。

5. 参考

- 1) M.Kainuma, S.Komatsu, JWB.Hershey (1997) A potential role for phosphorylation in the regulation of yeast of eIF1A. Gene Functions to Cell Differentiation, p. 55.
- 2) S.Komatsu, M.kainuma, JWB. Hershey (1996) Eukaryotic translation initiation factor 1A in *saccharomyces cerevisiae* is a phosphoprotein. Translational Control, p. 151.
- 3) 小松節子、貝沼真美、ハーシー・ジョン(1997) 酵母eIF1Aのリン酸化能の解析、生化学, 67, p.878.

特別情報

生物の形態と生理機能はどこまで制御できるか

—農林水産省大型別枠研究「バイオデザイン計画」の紹介—

農林水産省 農林水産技術会議事務局

研究開発官 宮井 俊一

農林水産省では平成10年度から10年計画で大型別枠研究「形態・生理機能の改変による新農林水産生物の創出に関する総合研究」(愛称「バイオデザイン計画」)を実施する。この総合研究では、分子生物学等の最新知見に基づいて、植物、家畜、魚類、昆虫、微生物等の形態や生理機能を画期的に改良するための基礎的研究と技術開発を行い、これまで不可能とされた優れた形態と生理機能を有する新農林水産生物の創出を目指す。

1. はじめに

世界の人口は、21世紀中頃には100億人に達すると予想されており、地球規模での食料やエネルギーの不足が深刻に懸念されている。農林水産生物は食糧の供給源であるとともに再生可能なエネルギー供給源でもあり、長期的視野に立ってその生産力を飛躍的に高めることが強く求められている。

このような背景のもとに、農林水産省では平成10年度から10年計画で大型別枠研究「形態・生理機能の改変による新農林水産生物の創出に関する総合研究」(愛称「バイオデザイン計画」)を実施する。これまでの研究蓄積と分子生物学の最新知見に基づいて、農林生物の形態や生理機能を遺伝子・分子レベルの操作等によって改変する基礎的研究を行い、その物質生産力を飛躍的に高める技術等の開発を目指す。

本稿では、この総合研究の内容と期待される成果について紹介する。

2. どのような研究を行うのか

(1) 研究体系

この総合研究は、図1の研究体系に示すように4つの系から構成されている。「生物形態の自律的形成機構の解明」の系では、形態

形成に関わる遺伝子の改変等により、体細胞の分化、組織・器官の形成、生殖細胞の分化、生殖器官の形成、細胞内組織の形成のメカニズムを解明する研究を行う。「形態・代謝応答による生物の環境適応機構の解明」の系では、光、温度、栄養条件等の外部環境への適応能力や生理代謝機能を、遺伝子導入等により改変して、生物の環境適応機構や物質生産機構を遺伝的・生理的に解明する研究を行う。これら2つの系の研究成果を受けて、「形態・生理機能の改変による生物生産技術の開発」の系では、遺伝子操作等を通じて従来の育種手法では改良が困難とされてきた生物の形態・生理機能に関する諸形質を改変し、生物生産を飛躍的に高める技術の開発を行う。さらに、「形態形成・代謝生理の高度計測技術の開発」の系は、形態形成過程や代謝生理過程を研究する上で必要な計測技術に関する系であり、個体、組織、細胞、細胞内組織、分子の各レベルでリアルタイムに計測する技術の開発研究を行い、他の3つの系に対して基盤的技術を提供する役割を担う。

(2) チーム、サブチームの編成と研究内容

上述した4つの系の研究を効率よく組織的に推進していくために、実際の研究課題はチームを編成して実施する。表1に示すように、研究課題数は全部で98(大学等への委託課題数は31)であるが、7つのチームがそれぞれ9~18課題を受け持つことになる。また、各

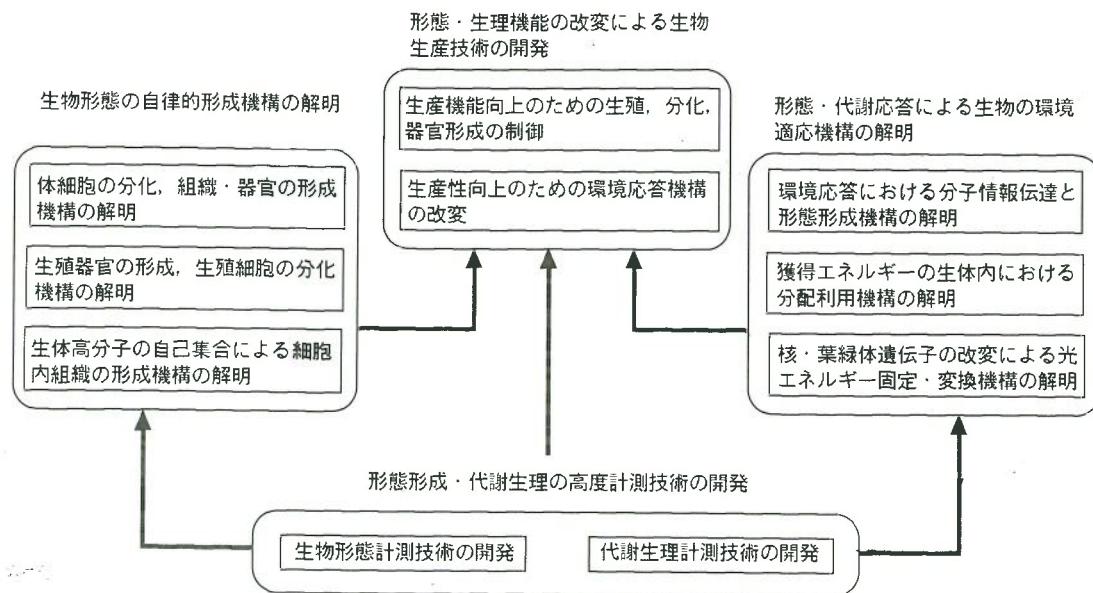


図1 「バイオデザイン計画」の研究体系

表1 「バイオデザイン計画」のチームおよびサブチームの編成

チーム名	サブチーム名	課題数
光合成・環境	光合成	10 (7)
	環境応答	7 (2)
植物形態	細胞・組織形成	3 (1)
	栄養器官形成	6 (3)
	生殖器官形成	6 (2)
畜産	発生分化	5 (1)
	乳肉生産制御	6 (1)
	環境制御	7 (0)
水産生物	発生	7 (2)
	生殖	6 (2)
昆虫	卵巣発育・卵形成	3 (0)
	発生・分化	4 (2)
	脱皮・変態・休眠	4 (1)
微生物	真核微生物	6 (1)
	放線菌	3 (1)
共通基盤	解析技術	5 (2)
	生体高分子	5 (1)
	代謝生理計測	5 (2)

* 括弧内の数字は大学等への委託課題数

チームは2つあるいは3つのサブチームから構成されている。ここでは、本総合研究の主要な研究内容をチームごとに簡単に紹介する。
 (光合成・環境チーム)：「光合成サブチーム」では、植物の光合成機構、光合成産物の転流・受容機構、登熟決定機構等を、また「環境応答サブチーム」では、植物の環境ストレスへの応答・耐性機構および共生成立機構の調節・制御システム等を、物質レベル、

分子レベル、個体レベルを組み合わせて総合的に解析する。

(植物形態チーム)：「細胞・組織形成サブチーム」は、植物の組織を形成する個々の細胞の形成段階において重要な一次壁構成成分の構造と機能を解明し、「栄養器官形成サブチーム」は、植物の特徴である葉・茎・根等の形成や成長に関わる制御機構を解明する。また、「生殖器官形成サブチーム」は、植物の生殖器官の形態形成と生殖機構に関わる花の形態形成、自家不和合性、アポミクシス、雌性不稔性等について分子生物学的なアプローチにより解析を行う。

(畜産チーム)：「発生分化サブチーム」では、個体に再生可能な培養細胞を作出するために、胚性幹細胞株(ES細胞)や胚性生殖細胞(EG細胞)を樹立する研究を行い、「乳肉生産制御サブチーム」では、耐暑性と繁殖周期の面から乳牛の生理機能を解明するとともに肉牛における筋細胞の分化と脂肪交雑機構等を明らかにする。また、「環境制御サブチーム」は、胚の発生分化、卵巣機能、乳腺分泌機能および牛肉生産に関連する生体内の諸機能を解明するとともにその発現を左右する内的および外的環境要因を明らかにする。

(水産生物チーム)：「発生サブチーム」では、遺伝子解析技術やトランスジェニック技術を用いて、魚類の発生・成長を制御してい

る分子機構を解明する。「生殖サブチーム」では、魚類の性決定、生殖腺の性分化、生殖細胞の増殖・分化機構と卵細胞の機能、性中枢の形成と機能発現機構を形態学的および分子生物学的手法を用いて解明する。

(昆虫チーム)：「卵巣発育・卵形成サブチーム」では、卵巣発育と卵形成に関わる機構を解明し、「発生・分化サブチーム」では、線虫 *Caenorhabditis elegans*, カイコ, ヤマトヒメミズ等の実験動物を活用して、発生・分化・再生による無脊椎動物の形態形成機構の解明を行う。また、「脱皮・変態・休眠サブチーム」では、昆虫の個体発生と生活史の大きな特徴である脱皮・変態・休眠の制御機構を解明する。

(微生物チーム)：「真核微生物サブチーム」では、キノコ・糸状菌の子実体形成、糸状菌の分化、酵母の二形性等に注目し、その形態変化に伴う微生物生理を分子レベル、遺伝子レベルで解明する。「放線菌サブチーム」では、二次代謝・形態変化の引き金となる代謝変動や環境要因の解明と、二次代謝・形態変化に関する遺伝子の発現に対する制御因子の役割を解明する。

(共通基盤チーム)：「解析技術サブチーム」では、植物組織や分子レベルにおける形態変化の動的分析を目指し、X線解析、多次元NMR解析、CCD画像解析等による計測技術の開発を進める。「生体高分子サブチーム」では、細胞膜組織および支持組織の構造と機能を解明するために、電子顕微鏡、X線解析、フローサイトメトリー等により構造生物学的な計測解析を行う。また、「代謝生理計測サブチーム」では、顕微磁気共鳴画像装置による植物組織の非破壊分析、ラマン分光分析装置を用いた光合成活性のマッピング、共焦点レーザー顕微鏡画像解析による細胞の生理活性の非破壊分析を行う。

3. どのような成果が期待されるのか

ここでは、この総合研究の終了時に各チームでどのような成果が期待されるのかを簡単に紹介する。

光合成・環境チームの研究では、光合成機能の向上と同化産物の収穫器官への効率的分配により作物の収量を飛躍的に高める技術が開発されるとともに、乾燥、低温、高温、高塩等の過酷な環境ストレスに耐え得る機構を人為的に賦与した農作物を作出する技術が開発される。植物形態チームの研究により、植物に特有の細胞・組織等の形態形成に関わる制御機構が分子レベルで解明され、形態形成を人為的に制御する技術を開発するための基礎的知見が得られる。

畜産チームの研究により、個体再生系を用いた遺伝子操作による効率的な優良家畜生産技術、卵巣機能等の制御による繁殖性の向上技術、外部環境要因に対応した泌乳牛の飼養管理技術、障害防除技術、脂肪細胞・筋肉細胞の増殖・分子に基づく高品質肉牛の早期選抜技術が開発される。水産生物チームの研究では、魚類の発生制御や生殖機構の解明により、魚肉を量的にも質的にも飛躍的に向上させる技術や健全で成長効率の良い種苗を安価に大量生産する技術が開発される。また、昆虫チームの研究では、昆虫と一部無脊椎動物に特徴的な形態形成や生理機構が分子生物学的に解明されることにより、斬新な害虫管理素材・手法が開発され、また発育・成長・繁殖の人為制御による害虫管理技術、有用昆虫の大量増殖技術、昆虫を用いた有用物質の効率的生産技術等が開発される。

微生物チームの研究では、微生物の形態変化に伴う代謝変動の機構が分子レベル、遺伝子レベルで解明されることにより、遺伝子操作等を活用した農林水産微生物の人為的制御技術が開発されるとともに微生物を用いた有用物質の生産技術が飛躍的に高められる。

共通基盤チームの研究により、植物組織の分子レベルでの形態変化の計測技術、機能タンパク質の構造・機能の解析技術、植物組織の生理活性の非破壊・連続測定技術等、食糧生産の効率向上に役立つ基盤的技術が開発される。

生研機構だより**UR 対策「研究開発事業」の進捗状況**

「研究開発事業」は、ガットUR農業合意関連対策として、農林水産大臣が定めた基本方針に即し、農業生産現場に直結した革新的技術を開発する事業です。研究開発は民間企業への委託により、国・都道府県農業研究機関の助言・指導を得て実施しており、事業期間は平成7年度から11年度の予定です。87研究テーマのうち15テーマは9年度で開発を終了しました。

1 これまでの成果

本研究開発も事業開始後4年目に入り、各研究テーマで試作品の作製・現地実証試験が本格化しているほか、一部の成果については、普及・販売が進みつつあります。

特許等については、4月10日現在で、農薬登録1件、特許出願53件などの成果をあげています。特許出願の内訳は、稻作分野27件、畜産分野12件、園芸分野7件、畑作分野7件などとなっています。

成果の導入事例

・小型高精度水位計

県農試に納入（新潟）

・パイプライン用定流量分水工

幹線用水路に導入（愛知）

- ・プラスチック畦畔ブロック
農家は場に試験導入（静岡）
- ・施設栽培総合管理システム
農業高校に納入（和歌山）
- ・生物農薬ククメリスカブリダニ
4月22日から販売開始

2 今後の進め方

研究開発の進捗状況・実用性の適切な評価に基づき、円滑な推進を図るため、学識経験者、農業団体関係者、農業研究機関研究者からなる研究開発推進委員会において毎年度評価、中間評価、事後評価を行うこととしました。

生産現場で求められている新技術成果の完成度を一層向上させるためには、①成果品の使い易さ、②製品価格の低減などについて、ユーザーである農業者、農業団体関係者、普及関係者の意見、同時にメーカーである企業の製品化に関する意見を最大限反映することが不可欠です。

このため、今年は、試作機、実証試験を眼の前にした現地検討会（表）の開催を強化します。また、生研機構ホームページ上の成果品情報の充実を図るなど少しでも多数の方に成果を目にしていただきたいと考えています。

【アドレス：<http://www.tokyo.brain.or.jp/maruken/index.html>】

表 平成10年度現地検討会等の開催計画

課題名	開催時期	開催地
1 大区画水田の自動水管理システム	6月下旬 7月下旬	現地見学会（茨城県） 現地検討会（宮城県）
2 水稲ロングマット育苗システム	10月	現地検討会（茨城県）
3 田畑輪換のための養水分調節技術	9月	現地検討会（富山県）
4 消費ニーズに対応した良食味米貯蔵技術	11月	技術交流検討会（東京）
5 牛の省力的安全放牧管理技術	9月	現地検討会（北海道）
6 肉用子牛等の低コスト・大量繁殖技術	8月11日～12日	現地検討会（徳島県）
7 低コスト・高品質・環境保全的畜産技術	11月	技術交流検討会（東京） 現地検討会（神奈川県）
8 施設栽培における低コスト化・高品質化	12月1日～2日	現地検討会（愛知県）
9 機能性素材等を利用した省力・高品質野菜生産技術	10月中旬	現地検討会（奈良県）
10 果樹栽培における低コスト化・省力化・高品質化技術	10月下旬	現地検討会（山梨県）
11 環境保全的な高付加価値畑作物栽培技術	10月	現地検討会（静岡県）
12 特定形質を有する畑作物の品種開発	11月	現地検討会（高知県）
13 新規地域特産作物等の大量増殖、農地斜面の整備等に関する技術		

編集後記

BRAIN テクノニュース67号をおとどけいたします。生物学の進歩は生体を観察する技術の進歩にともなってなされたと言っても過言ではありません。中でも顕微鏡の発達は、生物の微細構造をより詳細に、より鮮明に私たちの前に明らかにして来ました。本号では、さらに新しい特性をもった走査型プローブ顕微鏡についての総説を掲載いたしました。購読者の皆様の研究開発の参考にしていただけ

れば幸です。

本号から編集担当が変りました。創刊号から66号まで11年間にわたり担当した大畠さんの御尽力に感謝するとともに、BRAIN テクノニュースをより充実して行くために努力したいと考えております。購読者の皆様から多くの御意見や御注文をいただければ幸です。
(松田記)

ブレインテクノニュース（第67号）

平成10年5月15日発行

発行者 真木秀郎

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 虎ノ門マリンビル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