

# BRAIN

## TECHNO NEWS

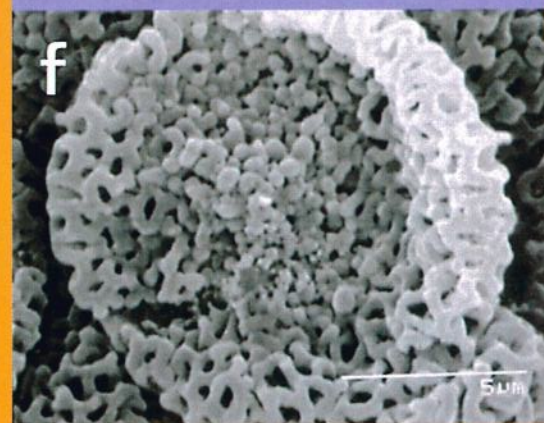
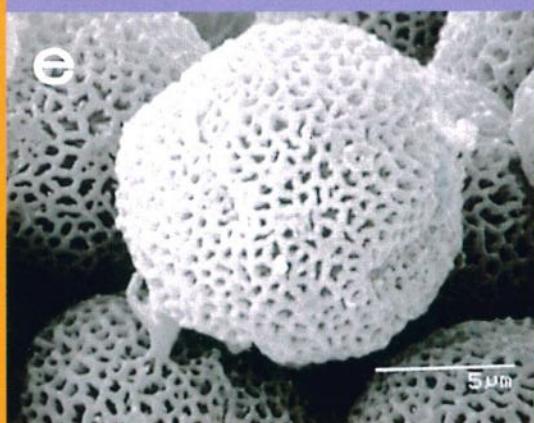
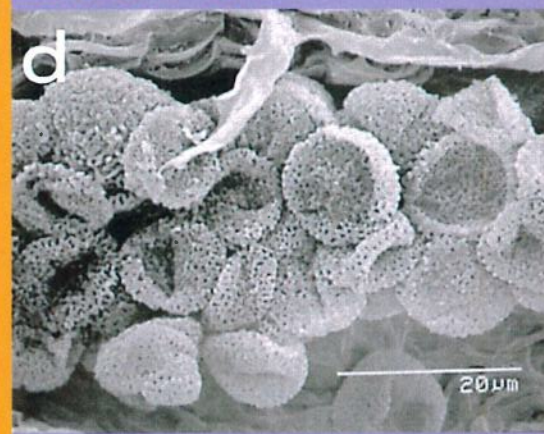
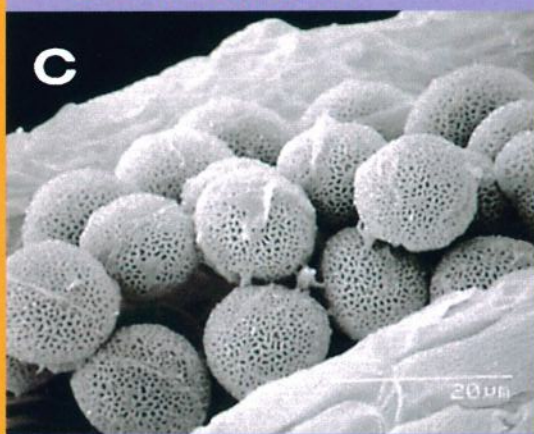
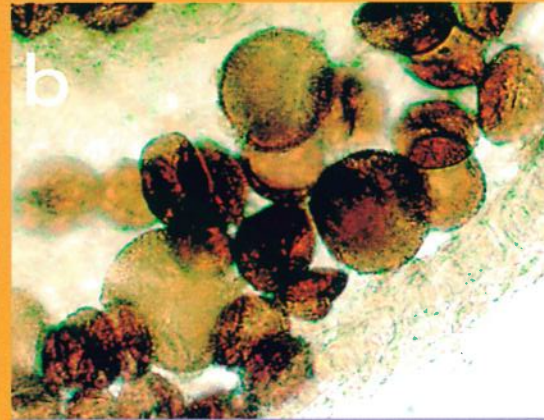
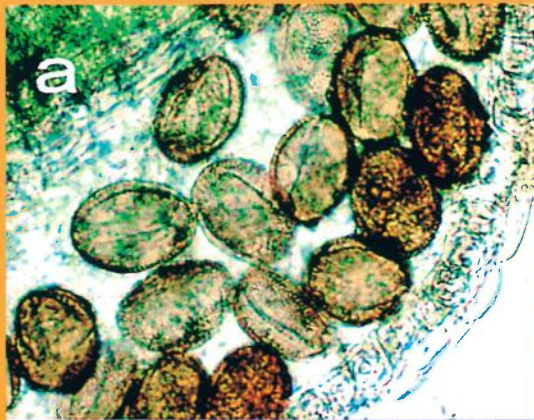
〈生研機構〉

### ブレインテクノニュース

# 第 82 号

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

NOVEMBER 15, 2000



シロイヌナズナの花粉の形態：左縦列は野生株，右縦列は人工的に作出した不稔株のもの（京都大学 光田展隆氏・佐藤雅彦氏原図）

## 目 次

### 総 説

- 花粉特異的プロモーターの単離とそれを利用した雄性不稔植物の開発 ..... 1  
 光田展隆・佐藤雅彦（京都大学 総合人間学部自然環境学科）

### 国内情報

- 高温高圧水処理による廃棄物の資源化技術 ..... 6  
 佐藤伸明・大門裕之・藤江幸一（豊橋技術科学大学 エコロジー工学系）
- アンチセンス遺伝子を用いた酒造用低グルテリンイネの育種 ..... 11  
 丸田嘉幸・井上 剛（株式会社 オリノバ）
- カイコの3眠化剤利用による、細くしなやかな絹の生産 ..... 15  
 木内 信（農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所）
- 緊プロ型ロックウール脱臭装置の開発と実用化 ..... 19  
 道宗直昭（生研機構 畜産工学研究部）

### 地域の先端研究

- イネ葉より分離した葉面菌によるイネいもち病の防除 ..... 24  
 河又 仁（茨城県 農業総合センター生物工業研究所）
- 天然由来の保存性向上物質によるカンキツ果実腐敗防止への新しい取り組み ..... 29  
 三好孝典（愛媛県立果樹試験場）

### 文献情報

- 成体体細胞の核移植により得られたクローンブタ ..... 32  
 I. A. Polejaeva et al (Nature, 407, 86-90, 2000)  
 抄訳：木村直子（東北大学大学院 農学研究科）
- 酵母の代謝工学 ..... 33  
 S. Ostergaard et al (Microbiol. Mol. Biol. Rev., 64, 34-50, 2000)  
 抄訳：家藤治幸（国税庁 醸造研究所）
- 摂食によって誘導される揮発性物質はリママメ葉の防御遺伝子を活性化する ..... 34  
 G. Arimura et al (Nature, 406, 512-515, 2000)  
 抄訳：鈴木章弘（鹿児島大学 理学部）
- 魚類養殖における給餌管理システムへの摂食音の利用 ..... 35  
 J. P. Lagardère et al (Aquaculture, 189, 251-258, 2000)  
 抄訳：椎名康彦（マルハ(株) 中央研究所）

### 海外便り

- ペプチドの二次構造構築と応用の試み  
 ーワシントン大学での1年半ー ..... 36  
 野方洋一（農林水産省 中国農業試験場）

### 表紙写真説明

シロイヌナズナの花粉の形態 (a, b 光学顕微鏡像, c~f 走査型電子顕微鏡像)：右縦列 (b, d, f) は、 $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) レポーター遺伝子を利用して、花粉の発達に関係する水素イオン輸送酵素 ( $H^+$ -PPase) の花粉特異的発現を人工的に抑制した不稔株の花粉で、左縦列 (a, c, e) の野生株のものに比べ大部分の花粉が潰れた異常な形状になっている。詳細については、総説 (1~5頁) をご覧下さい。

◀総説▶

## 花粉特異的プロモーターの単離と それを利用した雄性不稔植物の開発

京都大学 総合人間学部 自然環境学科  
光田 展隆 ・ 佐藤 雅彦

近年、欧米では遺伝子組換え作物が市場に出回り始めているが、日本では健康や生態系への悪影響を不安視する消費者が多いため、遺伝子組換え作物を利用した食品等の商品化は抑制傾向である。このような問題を解決するために、雄性不稔作出技術は重要な意味合いを持ってきている。今回、我々は新規に単離した花粉特異的プロモーターを用いて植物内在たんぱく質の発現を抑えることで、人工的に雄性不稔植物を作出することに成功した。ここでは、この技術の背景と成果について報告する。

### 1. はじめに

農学の分野において、雄性不稔形質は、人為的交配等を用いてハイブリッド植物を作る場合などにきわめて有用である。また近年では有用な遺伝子を組み込んだ遺伝子組み換え植物を一代限りで終了させるため、あるいは組み換え遺伝子の生態系への拡散を防ぐ上でも重要な技術になっている。遺伝子組み換え技術を利用した人工的雄性不稔植物の作出は、現在以下の方法が実用化されている。

この技術は、葯のタペート細胞特異的に土壌細菌 *Bacillus amyloliquefaciens* の barnase 遺伝子（一本鎖RNA特異的RNaseをコードする遺伝子で、このたんぱく質を発現した細胞は致死になる。）を発現させ、雄性不稔を引き起こすものである。しかしながら、花粉ないしタペート細胞特異的に細胞を致死にさせる遺伝子が発現させたつもりでも、少量は他の部位でも発現されてしまう危険性があり、食用作物の場合、不安を完全に払拭することはできないだろう。たとえ有害遺伝子ではないとしても、植物本来のタンパク質以外に他の生物の余分なタンパク質が追加されるわけで、近年の遺伝子組み換え植物に対する風当たりの強さを考慮するとあまり良い方法であるとは思えない<sup>1)</sup>。本研究は、筆者らが MITSUDA Nobutaka, SATO Masahiko 〒606-8501 京都市左京区吉田二本松町

独自に単離した花粉特異的プロモーター領域を用い、筆者らが以前から研究していた H<sup>+</sup>-PPase という植物の液胞膜に存在する酵素をターゲットとしてその発現を花粉特異的に抑え、人工的雄性不稔植物の作出を試みたものである。この方法は、外来の有害遺伝子を使わず雄性不稔形質を作り出すことができる点で従来法よりも優れていると考えられる。

### 2. 花粉特異的プロモーター領域の単離

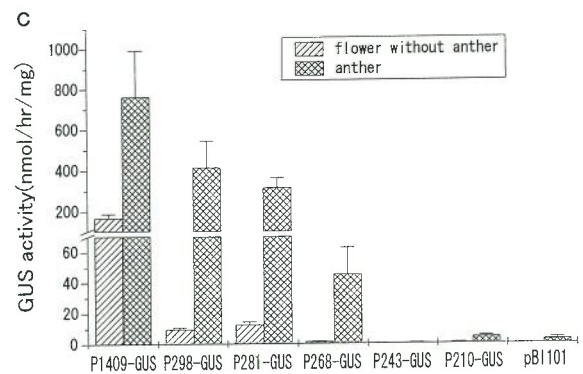
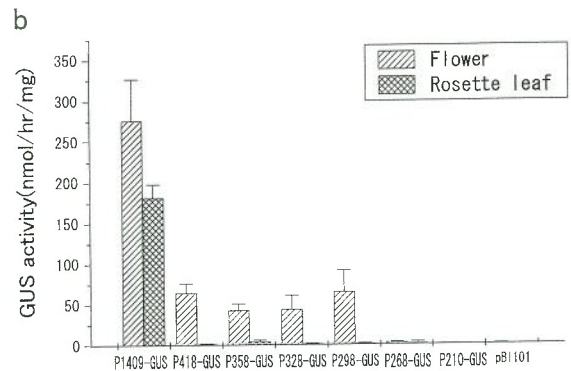
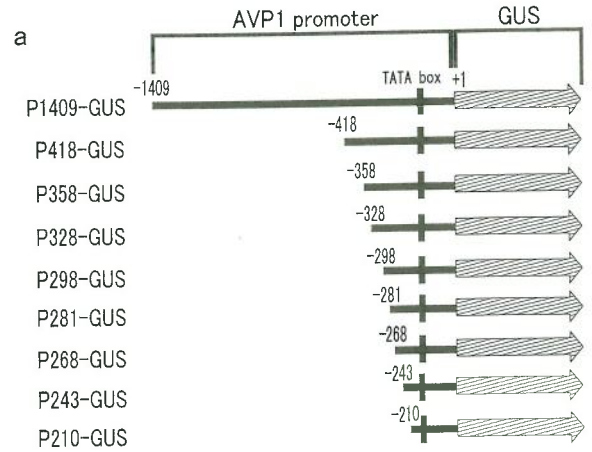
以前より筆者らは、液胞膜に存在し、ピロリン酸の加水分解によるエネルギーを利用して水素イオン (H<sup>+</sup>) を液胞内に輸送する酵素 H<sup>+</sup>-PPase に興味を持ち、その構造と機能、発現調節機構や細胞内輸送について研究してきた<sup>2,3)</sup>。そのなかで、GUS (β-グルクロニダーゼ) レポーター遺伝子を用いた GUS レポーター法を利用してシロイヌナズナ H<sup>+</sup>-PPase (AVP1) の発現機構を研究したところ興味深い結果を得た。GUS レポーター法とは植物に於いて遺伝子の発現部位を調べるのによく用いられる手法で、調べたい遺伝子の発現調節領域（上流領域、プロモーター領域）を GUS レポーター遺伝子の上流に接続し、それを導入した遺伝子組み換え植物で GUS レポーター遺伝子の活性を検出するのである。GUS レポーター遺伝子の活性は

2 総説



図1(上)：約1.4kb(左側(a, c, e))または0.4kb(右側(b, d, f))のプロモーター領域が下流遺伝子の発現を誘導する様子。0.4kbの場合花粉でのみ発現を誘導する。

図2(右)：様々な長さに短くしたプロモーター領域の発現誘導活性。(b)は花と葉に分けて大雑把な活性を測定したデータ。(c)は花を葯とそれ以外の部分に分けて活性を測定したデータ。これらの結果から-1409より-419の間、-281より-269の間、及び-268より-244の間の計3カ所に花粉特異的発現に重要な因子が存在すると推定される。



組織化学的に容易に観察できる。具体的には、特定の基質を反応液中に添加するとGUSレポーターがその基質を青色の色素に代謝する。つまり青く染色された部位で調べたい遺伝子のプロモーター領域が発現誘導活性を持つことがわかるわけである。また、GUSレポーターの活性は蛍光基質を用いて簡便に定量することもできる。筆者らはプロモーター領域の長さによってその活性または組織特異性等に差が見られることを期待して約1.4kbまたは0.4kbのプロモーター領域をGUSレポーター遺伝子に接続し、植物を形質転換して組み換え体を得た。その結果、図1に示す様

に、1.4kbのプロモーター領域はほぼ全組織で強力にレポーター遺伝子の発現を誘導したが、0.4kbに短くしたプロモーター領域は花粉でのみレポーター遺伝子の発現を誘導した。このことは削った約1.0kbのプロモーター領域中に花粉以外での発現を調節するエレメントが存在することを示唆する一方で、残った0.4kb中には花粉での発現をコントロールする重要な因子が存在すると考えられた。その後、筆者らはこの花粉特異的発現を担うDNAエレメントを同定するため、さらに短くしていった複数のレポーターコンストラクトを作成し、花粉でのレポーター活性を測定

した(図2)。その結果、 $H^+$ -PPaseの花粉特異的発現は少なくとも3段階以上に調節されていることがわかり、それを担う複数のDNAエレメントも15塩基以下のオーダーで絞り込むことに成功した。また、組換え植物体の花粉の半数しかGUSレポーター遺伝子が発現していないものがあることから、このプロモーターは花粉母細胞が減数分裂をして、半数体の花粉四分子になった後に、遺伝子の発現を誘導することが示唆された。このように花粉特異的に $H^+$ -PPaseの発現が調節されていることは、花粉の発達において $H^+$ -PPaseが重要な働きをしていることを示唆するものである。実際、花粉の発達段階では、葯のタペート細胞から養分を細胞膜を介して、能動的に花粉の細胞内に輸送するために細胞膜の $H^+$ -ATPaseが花粉特異的に発現す

ることが知られているが、 $H^+$ -PPaseはこの $H^+$ -ATPaseと共同して花粉細胞内に養分を輸送するのに働いているのかもしれない。

### 3. $H^+$ -PPaseの発現を花粉特異的に抑制する試み

以上のようにして発見された花粉特異的プロモーターは様々な利用法が考えられたが、花粉において複数のシスエレメントによって調節されている $H^+$ -PPaseの花粉発達段階における役割を明らかにすると同時に人工的雄性不稔植物の作出に挑戦すべく、このプロモーターを利用して $H^+$ -PPaseの発現を花粉特異的に抑制しようと試みた。具体的には0.4kbからなる花粉特異的プロモーター領域の下流に $H^+$ -PPase遺伝子の逆向き配列を接

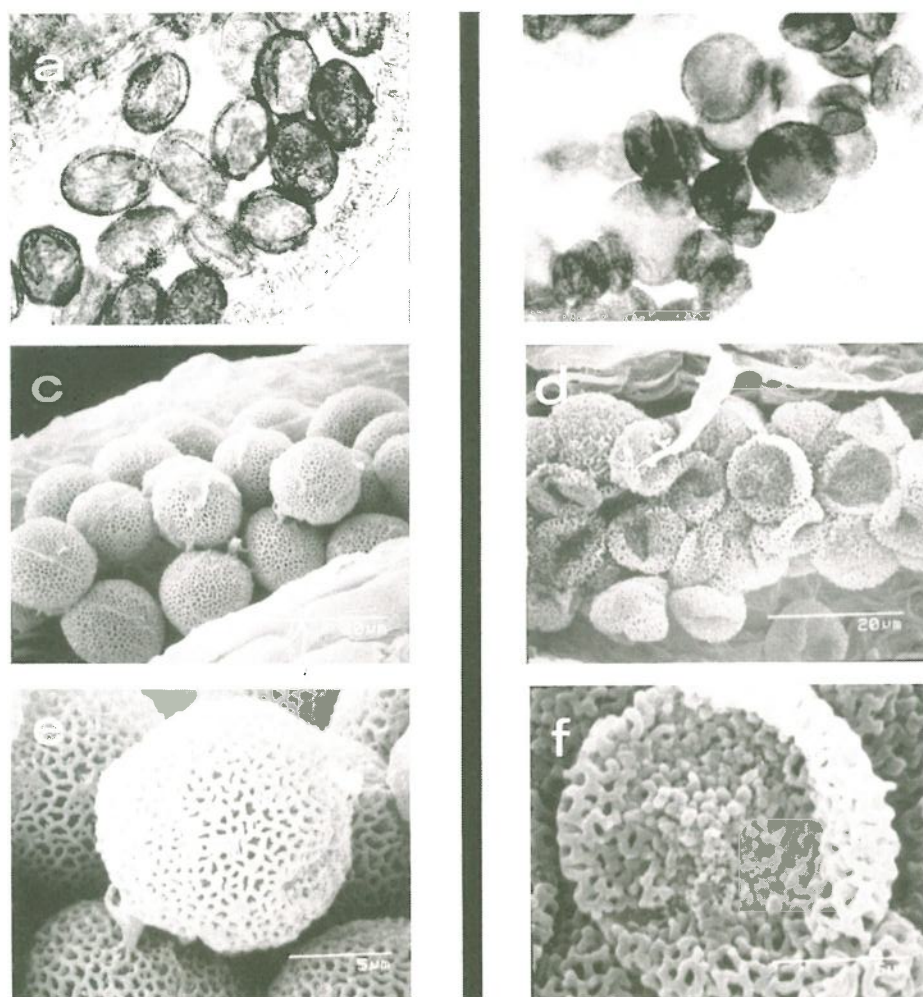


図3：花粉特異的に $H^+$ -PPaseの発現を抑制した花粉の形態。左側(a, c, e)は野生株の花粉、右側(b, d, f)は不稔株の花粉。大部分の花粉が潰れたような形状になっている。

続し（アンチセンス法）、シロイヌナズナに遺伝子導入した。その結果、次世代において約3～5%と低率ではあるが稔性が著しく低下し、ほとんど結実しない植物体を得られた。加えて結実するものの明らかに稔性が低下した植物体も10～20%程度見られた。稔性が著しく低下した植物体について実際にH<sup>+</sup>-PPaseの発現量を調べたところ、その全てにおいて発現量が通常より低下していた。また、これらの雌しべに野生株の花粉を人工的に受粉させると正常に結実した。さらに、稔性が低下した個体について花粉の形態を光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡で調べたところ、調べた全ての個体において大部分の花粉が図3に示すように潰れたような異常な形状になっていた。これらの事実により、以下のようなことが示された。①H<sup>+</sup>-PPaseは花粉の発達過程において重要な働きをしていて、その発現を抑制すると花粉の発達が阻害される。②シロイヌナズナにおいては本研究で単離した花粉特異的プロモーターでその発現を抑制可能である。③シロイヌナズナにおいてはH<sup>+</sup>-PPaseの発現を花粉特異的に抑制することで人工的に雄性不稔植物を作出できる。

#### 4. 問題点と今後の展望

本研究ではH<sup>+</sup>-PPaseの花粉における役割を探るという当初の目的を遂げるには、十分な成果を得たが、人工的雄性不稔植物の作出という点ではいくつかの問題点がある。第一に、まず不稔植物ができる割合の低さについてであるが、これはアンチセンス法を利用する上で常につきまとう技術的な問題で、その成功率は一般に3～15%にしか過ぎない。これはアンチセンスコンストラクトが植物のゲノム上のどこに挿入されるかでアンチセンス配列の発現量が変わるといふ、いわゆる「位置効果」によるところが大きい。

しかし、この問題は最近発見された現象に基づく新技術（RNAi）を用いれば解決可能だと筆者らは考えている。この技術を利用すれば遺伝子発現抑制の成功率は少なくとも

80%以上に高まることが予想される。筆者らも、現在この新技術を導入して雄性不稔植物の作出を行っている。第二の問題は、花粉は半数体なので、ゲノム上に組換えDNAが複数個挿入されなければ、不稔にはならないということである。第三の問題はシロイヌナズナで不稔植物できたからといって他の作物等でも同じことが起きるかどうかということである。プロモーター領域は種の壁を越えてある程度共通の仕組みがあると考えられているが、科まで違ってくると同じ様な効力を発揮するとは限らないかもしれずその都度調査が必要である。また、シロイヌナズナ以外の多くの植物はH<sup>+</sup>-PPase遺伝子を複数持っておりそのうち1つだけを抑制しても効果が現れるかどうか不明である。しかしながら、シロイヌナズナと近縁の有用植物なたねなどにおいては応用可能である可能性が高いと筆者らは考えている。

以上のようにいくつかの問題点があるものの本研究は、1つのモデルケースとして有意義な結果を得た。花粉特異的プロモーターは雄性不稔技術だけでなく、花粉アレルギーの抑制や遺伝子組み換え花粉の選別、自家不和合性の研究など幅広い用途が考えられる。今後は雄性不稔株作出の成功率を高めるよう努力するとともに、他の植物でも応用可能か調べるとともに花粉特異的発現を司る転写因子の単離に力を注ぎ、より優れた花粉特異的プロモーターの開発を狙っていく予定である。

#### 文 献

- 1) SCIAS 1997 Vol. 2 (4) 44-55 「組み換え植物の期待と不安」
- 2) Sato M.H. et al. "Purified Vacuolar Inorganic Pyrophosphatase Consisting of a 75-kDa Polypeptide Can Pump H<sup>+</sup> into Reconstituted Proteoliposome." *J. Biol. Chem.* 269, 6725-6728, (1994)
- 3) Maruyama C. et al. "Structural Studies of the Vacuolar H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase: Sequence Analysis and Identification of

the Residues Modified by Fluorescent  
Cyclohexylcarbodiimide and Maleimide.”  
*Plant Cell Physiol.* 39, 1045-1053, (1998)

4) Mitsuda N. et al. “Pollen-specific

Regulation of the Vacuolar H<sup>+</sup>-PPase  
gene by multiple cisacting elements.”  
*Plant Mol. Biol.* submitted

◀国内情報▶

## 高温高压水処理による廃棄物の資源化技術

豊橋技術科学大学 エコロジー工学系

佐藤 伸明・大門 裕之・藤江 幸一

近年注目されている高温高压水反応について、その特徴を簡単に解説するとともに、再資源化技術への適用例について述べた。再資源化を目的とした高温高压水による処理例として、プラスチック類や化学製品製造残渣などの人工起源の廃棄物に加えて、セルロース系やタンパク質系廃棄物など天然物由来の廃棄物への適用例を紹介した。水産加工廃棄物等の天然起源未利用物質に対する高温高压水を用いた再資源化技術に関する知見は未だ少ない。そこで、水産加工残渣を高温高压水処理することによって、温度、圧力などの反応条件を最適化すれば、有用物質であるアミノ酸やタウリン等を高い収率で生成・回収できる可能性があることを紹介した。

### 1. はじめに

循環型社会の構築を目指して、各種廃棄物を再資源化するための要素となる技術の開発が進められている。中でも「高温高压水」を用いて廃棄物や製造工程で排出される未利用残渣から有用物質へ転換・再資源化する技術の開発が注目されつつある。高温高压水とは超臨界や亜臨界の状態にある水を指しており、この高温高压水は、通常の水とは異なる特性をもつことから、これまでに無い反応場を提供できる溶媒としてその利用が期待されている。常温常圧での水の誘電率が約78であるのに対して超臨界状態では2~10程度まで大幅に低下するので、油など有機物の溶解も可能となる。超臨界水は酸素と任意の割合で混合できる特徴を持つため、有機物を効率的に酸化分解できる反応場も提供できる。加えて、温度と圧力の制御によりイオン積も変化できる。常温常圧下での水のイオン積は $1 \times 10^{-14}$  [mol/L]<sup>1)</sup>であるのに対し、飽和蒸気圧下では300℃付近で極大値をもち、このときのイオン積は $1 \times 10^{-11}$  [mol/L]<sup>1)</sup>程度を示す。水は温度、圧力を操作することによりイオン反応（加水分解反応）からラジカル反応（熱分

SATO Nobuaki, DAIMON Hiroyuki,

FUJIE Koichi

〒441-8580 豊橋市天伯町雲雀ヶ丘1-1

解反応)まで反応場を提供できる可能性も有している。このような水の溶媒特性を利用して、既に難分解性および有害な化学物質の分解・無害化の研究が報告されており、プラスチックをはじめ各種廃棄物の分解・再資源化などに適用できる可能性も有している。最近では高温高压水を反応場とする有機合成反応も試みられるようになった<sup>2)</sup>。

本稿では、まず高温高压水を用いた再資源化技術の研究開発状況を簡潔に総括するとともに、当研究室で実施している高温高压水反応を利用した水産加工廃棄物資源化技術の開発に関する研究を紹介させていただく。

### 2. 高温高压水における 化学物質の分解

高温高压水による化学物質の分解反応について、既往の研究情報をまとめて図1に示した。高温高压水中では、化学物質はさまざまな経路を経て低分子化される。含窒素化合物であるニトリル類からは加水分解によってアミドが生成し、さらにアンモニアとカルボン酸に変化する<sup>3)</sup>。300℃付近では、アミノ化合物からアミノ基の脱離が生じやすくなる。ただし、生成したアンモニアは500~600℃以下では分解は起こらない<sup>4)</sup>。酸素を含む化合物であるエステル類やエーテル類からはカル



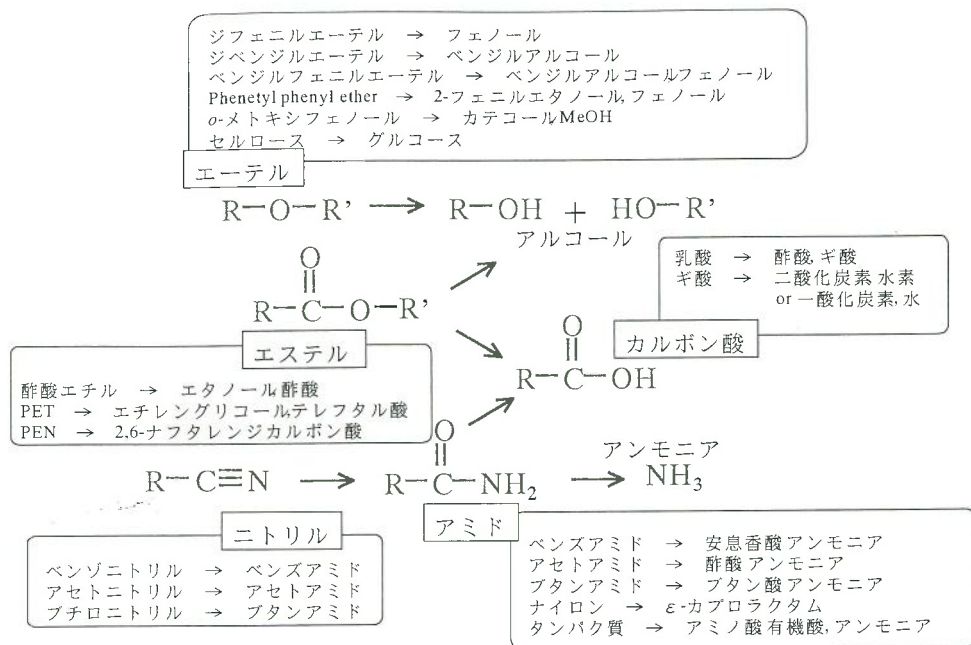


図1 高温高压水中での有機物質の反応経路例

ボン酸やアルコールが生成する<sup>5, 6)</sup>。さらにカルボン酸類は、二酸化炭素や一酸化炭素及び水素などになる<sup>7)</sup>。エーテル結合 (R-O-R')、エステル結合 (R-COO-R') や酸アミド結合 (R-NH-CO-R') を持つプラスチックやバイオマスについての分解実験の結果も報告されている<sup>8)</sup>。高温高压水を反応場として利用するためには、目的物質を生成する反応だけでなく、目的物質自身が分解する反応についての考慮も必要である。高温高压水中での反応に関する研究が進み、各種有機化合物周りの反応経路について明らかになりつつある。

### 3. プラスチック類の再資源化

高温高压水によるプラスチック分解に関する研究が行なわれるようになり、そこでの生成物質やその収率に関する情報が報告されるようになってきた。高温高压水中でのプラスチック分解の研究における反応条件と生成物をまとめて表1に示した。

汎用プラスチックの構造式は一般に  $\{-CH_2-CH(X)-\}_n$  で表され、Xは種類によってポリエチレン (X=H)、ポリプロピレン (X=CH<sub>3</sub>)、ポリスチレン (X=C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) 等となる。このような汎用プラスチックの再資源化

表1 プラスチック類の高温高压水中での反応条件と主な生成物

プラスチック	反応条件		主な生成物
	温度 [°C]	圧力 [MPa]	
ポリエチレン	400~550	25~35	n-パラフィン, オレフィン等
ポリプロピレン	—	—	n-パラフィン, オレフィン等
ポリスチレン	380~400	25~35	トルエン, キシレン, スチレン等
ポリ塩化ビニル	300~400	25~45	油分, HCl
ポリエチレンテレフタレート	300~400	10~40	テレフタル酸, エチレングリコール
ポリエチレンナフタレート	300~500	~70	2,6-ナフタレンジカルボン酸
ナイロン	380~400	25~35	ε-カプロラクタム
ポリウレタン	270~320	—	ジアミン, ポリオール
ポリカーボネート	300~500	~70	オリゴマー, フェノール等
フェノール樹脂*	430	22	フェノール類
エポキシ樹脂*			フェノール類等
繊維強化プラスチック**	330~380	13~22	油分, オリゴマー, ガラス繊維

\* 熱硬化性樹脂      \*\* 樹脂分は一般に熱硬化性樹脂

技術として、熱分解による油化の研究が行なわれている。しかし、熱分解法では処理時間が長い、副生するコークスの抑制や油分の軽質化のための触媒利用が不可欠であるなど課題が多い。一方、高温高压水中での付加重合系樹脂の反応については、主にC-C結合が切断されて油状物質を生成することが報告されている。ポリエチレンからパラフィン、オレフィン類に加えて、アルコール類の生成が確認されている<sup>9)</sup>。ポリ塩化ビニルの脱塩素化についての報告も見られる。ポリエチレンテレフタレート (PET) からテレフタル酸とエチレングリコールを生成するが、共存するテレフタル酸によりエチレングリコールの二次分解が促進されると考えられ、その収率が低下する<sup>10)</sup>。ナイロン、ポリウレタンの分解に関する報告も見受けられる<sup>11)</sup>。

熱硬化性樹脂は耐熱性、耐溶剤性に優れているものの、溶融が難しいため成型による再利用が困難であり、難燃性であることから焼却処理も難しい。代表的な熱硬化性樹脂であるフェノール樹脂のモデル物質として、そのプレポリマーについて超臨界水中での分解が報告されている<sup>12)</sup>。フェノール類の生成が報告されていることから、高温高压水中でメチ

レン結合の開裂が起きたと考えられる。Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>添加によるフェノール類の収率向上も報告されている。

#### 4. 木質系廃棄物の再資源化

農林水産物加工過程の残渣や廃棄物が大量に発生しており、一部は堆肥化・飼料化、燃料、再生紙の原料などとして活用されているが、用途開拓が不十分である。木質・セルロース系廃棄物の主成分は、セルロース、ヘミセルロースとリグニンである。リグニンはフェニルプロパンを基本骨格にもつ高分子物質であり、芳香族化合物の供給源としての役割を果たすものとして期待される。高温高压水中では、おもに加水分解反応と熱分解反応が起きると考えられ、セルロースの分解反応速度解析結果が報告されている<sup>13)</sup>。高温ほど加水分解反応が優先的に進み、単糖であるグルコースを生成する反応が支配的となる。ヘミセルロースやリグニンについては、構造が複雑なため反応経路や速度論的解析までには至っていない。

セルロース、ヘミセルロース、リグニンの高温高压水反応による挙動を迫田らが図に整

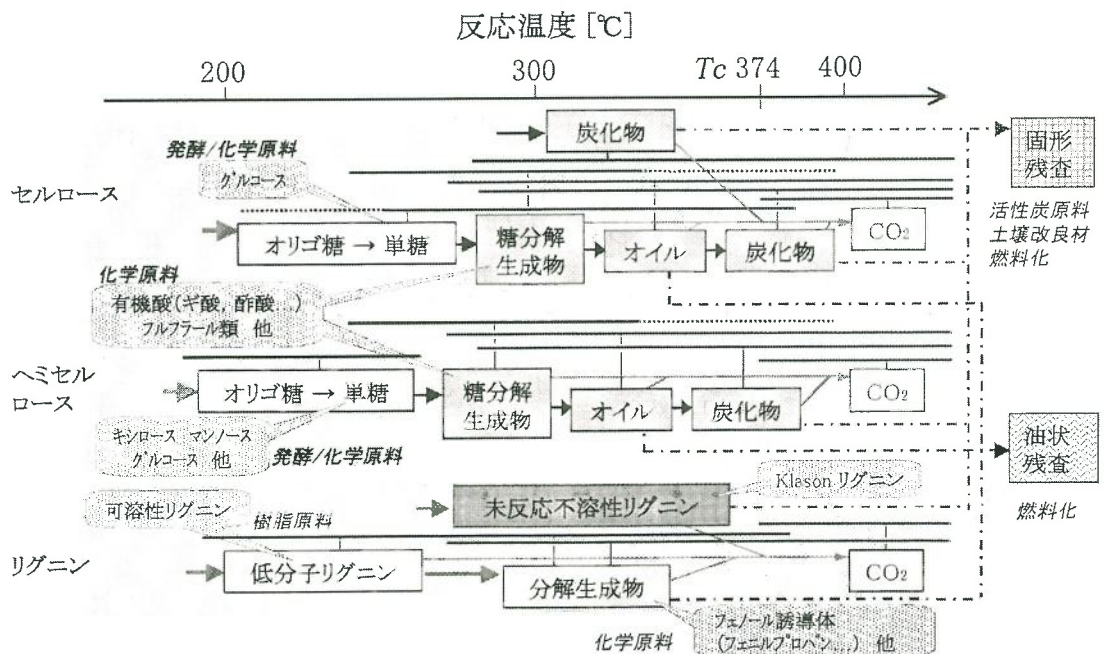


図2 高温高压水中におけるリグノセルロースの反応挙動

理した(図2参照)<sup>14)</sup>。横軸は反応温度を示し、セルロース、ヘミセルロース、リグニンから生成する物質とその温度範囲を表している。

## 5. 水産加工廃棄物の再資源化

(タンパク質を高い割合で含有する魚腸骨やホタテ貝のうろなどの水産加工廃棄物から、高温高压水反応によって、アミノ酸類を生成回収する手法について当研究室で実施している研究を紹介させていただく<sup>15)</sup>。)

**実験方法：**原料組成の均一化を目的に魚腸骨に代えてカツオ背肉(含水率76%)およびホタテ貝のうろ(含水率90%)を、それぞれミキサーで均一に破碎・攪拌して実験に供した。カツオ背肉の処理には容積が66mlの回分式反応容器を用いた。試料と水の比が1:50となるように反応容器に仕込み、所定温度に設定した熔融塩槽に浸漬して温度・圧力を急速に上昇させた。反応容器を熔融塩に浸漬した時を反応開始、容器を取り出して冷水で冷却をした時を反応終了とした。反応前後での試料中のアミノ酸と有機酸の分析を行った。

うろの高温高压水処理には、試料を充填した容器に高压水を連続的に供給しながら温度を上昇させる半回分式反応装置を用いた。排

出液を冷却後固液分離して水溶性成分中のタウリンをはじめとしたアミノ酸類とカドミウム等重金属を分析した。

**カツオからのアミノ酸生成と反応条件：**亜臨界領域(200~300℃)と超臨界領域(450℃)で生成したアミノ酸の組成と量の経時変化を図3に示した。ただし、設定温度・圧力に達するには反応容器を熔融塩に浸漬後約5分を要した。反応時間0分での値は、カツオ背肉が含有するアミノ酸量である。回分操作では250℃、60分でアミノ酸生成量は最大となった。200℃程度ではアミノ酸生成速度が遅く、一方、300℃以上では生成したアミノ酸が直ちに分解消失してしまう。高温高压水の飽和蒸気圧下でのイオン積は250~300℃で最大値を示す。タンパク質の加水分解によるアミノ酸の生成にはこの条件が適していると判断できる。

水と試料の混合比を一定のまま、容器内への充填量を変化させて圧力を4MPaから27.5MPaに上昇させて反応を行った。図4は生成アミノ酸組成に対する圧力の影響を示している。圧力の上昇はグリシンやアラニンを増大させており、温度・圧力など反応条件の制御により、目的とするアミノ酸の収率を選択的に向上できる可能性が示唆された。

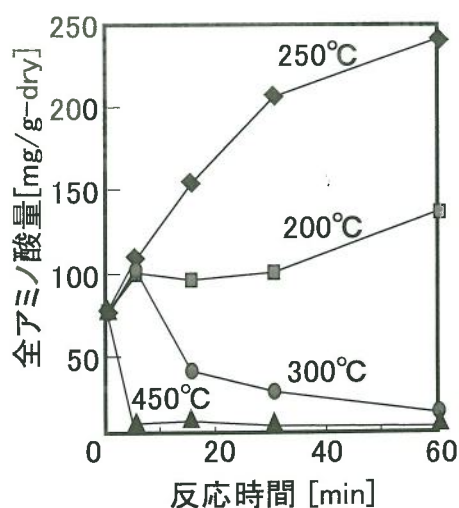


図3 カツオ背肉からのアミノ酸生成に対する温度の影響

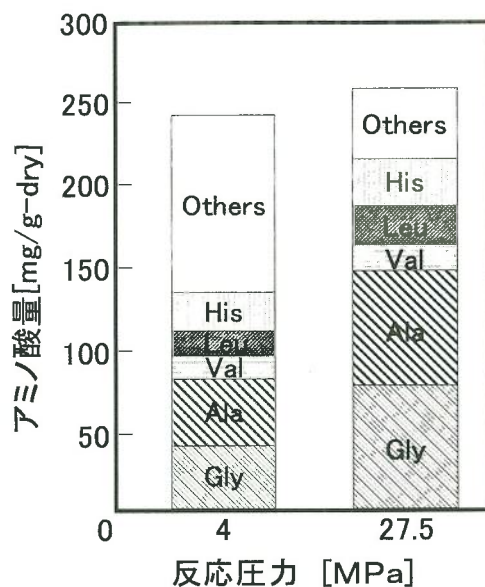


図4 カツオ背肉からのアミノ酸生成に対する圧力の影響

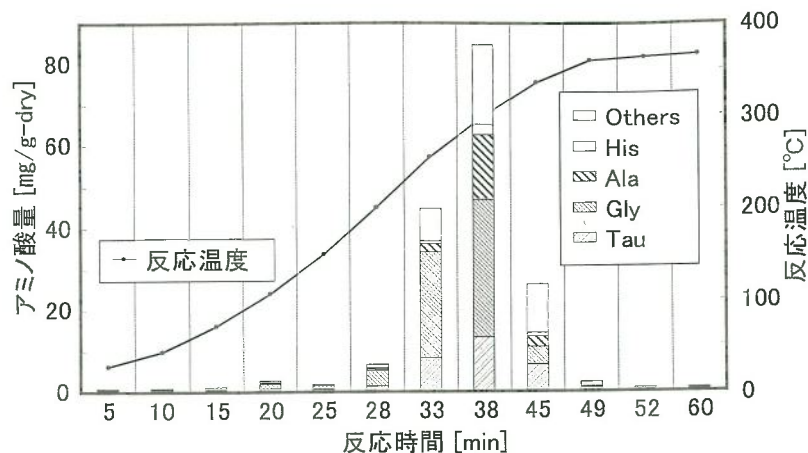


図5 ホタテうろからのアミノ酸生成 (半回分装置を用いた昇温条件で測定)

ホタテ貝うろからタウリン生成：半回分式反応装置を用いて昇温しながらホタテうろの処理を行った時のアミノ酸生成量を図5に示した。前記した回分操作による反応と同様に、イオン積が最も高くなる200~250°Cの範囲でタンパク質の加水分解反応が促進され、アミノ酸の生成量が増加した。この温度条件で、タウリンの生成量にも急激な増加が見とめられた。乾燥重量1gのうろにタンパク質は270mg含まれており、この実験ではその65%がアミノ酸として回収できた。タウリンについては、高温高压水反応によって、うろに元来含まれている量よりもはるかに多量を回収できた。高温高压水中では脱炭酸が起きやすいことから、システインなどのアミノ酸の脱炭酸反応によってタウリンが生成されたものと考えられる。

加えて、水溶性成分の分析からカドミウム、亜鉛、鉛が確認された。うろ中に含まれていたカドミウムなどの重金属が、高温高压水処理によって水中に溶出してきたと考えられる。

#### 参考文献

- 1) Shaw, R.W. et al. (1991), Chem. Eng. News, 69 (51), 26-39
- 2) 生島豊 (2000), 化学と工業, 53 (2), 696-699
- 3) Izzo, B. et al. (2000), AIChE Journal, 43 (8), 2048-2058
- 4) Paul, A.W. et al. (1991), Ind. Eng. Chem. Res., 30, 1745-1754
- 5) Petra, K. et al. (2000), J. Supercritical Fluids, 16, 189-206
- 6) Penninger, J. M. L. et al. (1999), J. Supercritical Fluids, 16, 119-132
- 7) Yu, J. et al. (1998), Ind. Eng. Chem. Res., 37, 2-10
- 8) 阿尻雅文 (1994), PPM, (11), 50-55
- 9) 大空弘幸ら (2000), 化学工学論文集, 26 (3), 381-386
- 10) 阿尻雅文ら (1997), 化学工学論文集, 23 (4), 505-511
- 11) 後藤元信 (1999), ケミカルエンジニアリング, 44 (9), 19-24
- 12) Tagaya, H. et al. (1999), ISFR '99 Proc. 1st Int'l Symp. Feedstock Recycling of Plastics, Sendai, Japan, pp. 83-86
- 13) Adschiri, T. et al. (1993), J. Chem. Eng. Japan, 26 (6), 676-680
- 14) 迫田章義ら (2000), 私信 (東京大学生産技術研究所)
- 15) 大門裕之ら (2000), ケミカルエンジニアリング, 45 (1), 14-19

◀国内情報▶

## アンチセンス遺伝子を用いた 酒造用低グルテリンイネの育種

株式会社オリノバ

丸 田 嘉 幸 ・ 井 上 剛

米のタンパク質は酒の品質に悪影響を及ぼすことから、酒造用には低タンパク質の米が求められている。当社では、アンチセンス遺伝子により米タンパク質の主要成分であるグルテリンを20～40%低減させた組換え体を作成することに成功し、醸造試験の結果、酒造原料用としての可能性が示された。また、これらについて、農林水産省の指針にしたがい、環境への影響を評価した結果、一般圃場栽培への移行が認められた。

### 1. はじめに

日本においては米の生産量の5～6%が日本酒醸造の原料として使用されている。米の胚乳には7～10%のタンパク質が含まれているが、これらは醸造過程において麹菌のはたらきで、ペプチド、アミノ酸に分解される。過剰のアミノ酸は酒の雑味、品質の劣化の原因となることから、酒米には低タンパク質という特性が望まれている<sup>1)</sup>。「山田錦」「五百万石」などの酒米は、このような特性をもつ品種である。また、胚乳中のタンパク質の分布は、胚乳の外周部に最も多く、中心部に向かうにしたがって減少する。したがって、一般の炊飯用の米の搗精歩合が90%程度であるのに対して、酒造原料用の米は搗精歩合70%程度、吟醸酒においてはさらに搗精を進めたものを原料として使用している。

米の貯蔵タンパク質（発芽時の窒素源として胚乳中に貯蔵されるタンパク質）としてはグルテリンとプロラミンが知られており、米の全タンパク質の約60%がグルテリンである。胚乳細胞内ではグルテリンはプロテインボディⅡに蓄積し、プロラミンはプロテインボディⅠに蓄積する<sup>2)</sup>。プロテインボディⅡは醸造過程で容易に破壊されてグルテリンが分解される。プロテインボディⅡの量と酒の品質には負の相関があることが知られている<sup>3)</sup>。

MARUTA Yoshiyuki, INOUE Tsuyoshi

〒438-0802 静岡県磐田郡豊田町東原700

そこで、グルテリンの含量を低減させた米ができれば、それを原料とした場合、同じ搗精精度であれば品質の向上が期待できる。あるいは低い搗精精度でも酒造に使用できる可能性があることから、原料米の節減に役立つものと考えられる。

近年、遺伝子組換え技術により、種々の遺伝子に対するアンチセンス遺伝子を導入し、内在の遺伝子の発現を抑制したとの報告例が多数あることから、当社においても有力な技術と考え、低グルテリンイネの開発にこの手法を利用した。なお、アンチセンス鎖とは、内在の遺伝子の2本鎖DNAのうちmRNAに転写されない鎖のことをいう。アンチセンス遺伝子はこのアンチセンス鎖が転写されるようにした遺伝子のことで、内在の遺伝子の転写領域の全部または一部を逆向きにして適当なプロモーターに連結することにより作製可能である。アンチセンス遺伝子が内在の遺伝子の発現を抑制するメカニズムについては、内在の遺伝子から転写されたセンスのmRNAとアンチセンス遺伝子から転写されたアンチセンスのRNAが2本鎖をつくりタンパク質への翻訳を妨げるためという説があるが、詳細は明らかでない。

ここでは、当社における遺伝子組換えによる酒造用低グルテリンイネのうち20～40%程度の低減がみられたH39-59およびH75-3の作出について紹介する。現在、さらにグルテリンを低減させた組換え体も得られているが、

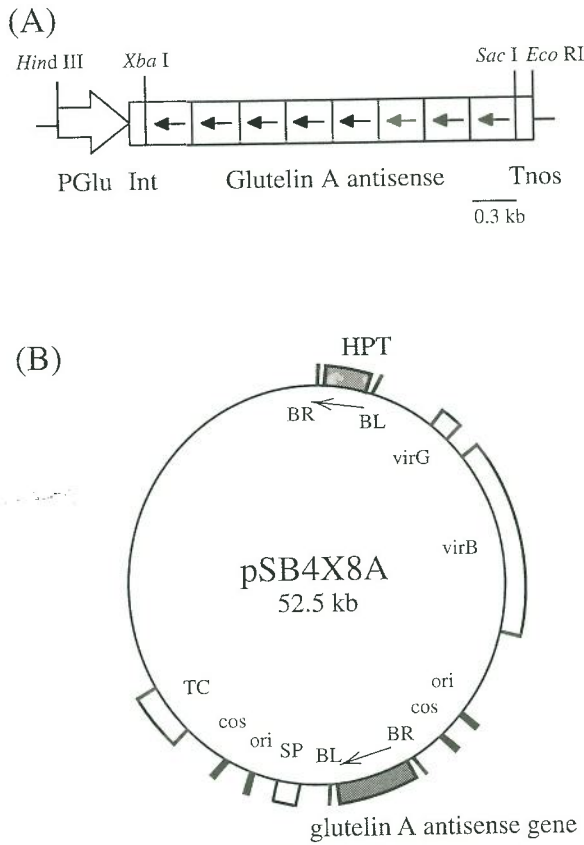


図1 A) グルテリンAのアンチセンス遺伝子の構造, B) スーパーバイナリーベクターの構造

PGlu: グルテリンプロモーター, Int: ヒマのカタラーゼ遺伝子第1イントロン, Tnos: ノパリン合成酵素遺伝子の3'ターミネーター, BR: 右ボーダー配列, BL: 左ボーダー配列, HPT: ハイグロマイシン耐性遺伝子

これについてはまだ分析中であり, 別の機会にゆずることとしたい。なお, 遺伝子組換え作物については, 一般の圃場での栽培に先立ち, 農林水産省の指針に基づいて環境への影響について評価する必要があることから, 低グルテリンイネの環境に対する安全性評価についても紹介する。

## 2. 低グルテリンイネの作出

イネのグルテリン遺伝子は, グルテリンAとグルテリンBのサブファミリーに分かれる<sup>4)</sup>。イネのグルテリンA遺伝子の完全長cDNAをクローニングし, その5'側0.3キロボースを8連結にし, ヒマのカタラーゼ遺伝子の第1イントロンを介して, グルテリン遺伝子のプロモーターに逆向きに連結することによりアンチセンス遺伝子を構築した(図1A)<sup>5)</sup>。なお, 8連結にした理由は, アンチセンスの効果を高めることを意図したからであり, イントロンを付加したのもアンチセンスRNAの発現を高める効果を期待したものである。

このアンチセンス遺伝子カセットをアグロバクテリウムの「スーパーバイナリーベクター

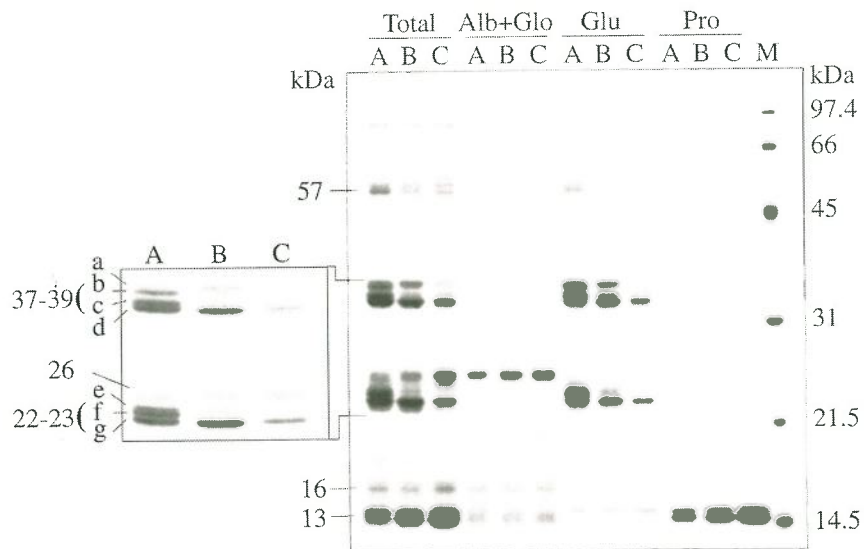


図2 月の光(A), アンチセンス遺伝子形質転換体H39-59(B), H75-3(C)の玄米タンパク質のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動による分析

Total: 総タンパク質, Alb+Glo: アルブミン/グロブリン画分, Glu: グルテリン画分, Pro: プロラミン画分

一」のT領域に組込んだ(図1B)。なお、このベクター上にはもう一つT領域が存在し、そこには選抜マーカーとして抗生物質であるハイグロマイシンに対する耐性遺伝子が組み込まれている<sup>6)</sup>。

このベクターをもつアグロバクテリウムをイネ品種「月の光」のカルスに感染させ、ハイグロマイシン耐性の形質転換細胞を得た<sup>7)</sup>。これらの形質転換細胞から再分化した植物から、導入されたアンチセンス遺伝子数が少なく、種子稔性があり、グルテリンが低減した形質転換体であるH39、およびH75が得られた。それぞれの自殖後代から2コピーのアンチセンス遺伝子をもつH39-59、4コピーのアンチセンス遺伝子をもつH75-3を選抜した。

H39-59とH75-3のT<sub>1</sub>世代について、1998年、当社敷地内の圃場に栽培し、収穫された玄米についてそのタンパク質含量を分析した。

図2は、玄米タンパク質の電気泳動の結果である。57kDaのバンドはグルテリンの前駆体であり、37~39kDaの酸性サブユニット、22~23kDaの塩基性サブユニットにプロセッシングされる。13kDa付近のバンドはプロラミンである。H39-59、H75-3では月の光と比較してグルテリンが減少し、その減少に応じてプロラミンが増加しているのが観察された。

表1は、各タンパク質画分を定量したものである。グルテリン含量については、対照の月の光と比較して、H39-59が約20%の低減、H75-3が約40%の低減を示した。一方、プロラミン含量については、H39-59が約50%の増加、H75-3にいたっては約90%の増加を示した。グルテリンの減少とプロラミンの増加

が相殺され、その結果、総タンパク質含量については、大きな変化はみられなかった。

このような現象は、突然変異により作出された低グルテリンイネでも観察されており<sup>8)</sup>、ホメオスタティスに関する機構がはたらいっている可能性がある。

次に、低グルテリン米の酒造適性を評価するため、小規模な醸造試験を行った。組換え体H39-59、H75-3、および対照の月の光について搗精歩合70%の精白を行い、それらを原料に醸造された日本酒について分析した。酒の雑味の原因となるアミノ酸の含量を測定したところ、原料米のグルテリンの低減に応じて醸造された酒に含まれるアミノ酸も低減していた。また、プロラミンは醸造過程で分解されにくいことが確認され、その増加は酒の品質に影響しないと考えられた。

最近、すっきりした辛口の日本酒が人気になっており、今回作出された低グルテリンイネについて酒造原料用としての可能性があることが示された。

### 3. 低グルテリンイネの環境への影響評価

日本では、遺伝子組換え作物を開放系(一般圃場)で栽培するためには、科学技術庁の「組換えDNA実験指針」にしたがって閉鎖系温室、非閉鎖系温室で栽培し、さらに農林水産省の「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」にしたがって模擬的環境(隔離圃場)で、環境に対する影響評価を行わなければならない。1997年の隔離圃場試験

表1 組換え体H39-59、H75-3玄米のタンパク質含量 (g/100g玄米)

	総タンパク質	タンパク質画分		
		アルブミン/ グロブリン	グルテリン	プロラミン
月の光	8.9 <sup>a,b</sup>	1.68 <sup>a</sup>	3.54 <sup>a</sup>	1.60 <sup>a</sup>
H39-59	8.5 <sup>a</sup>	1.69 <sup>a</sup>	2.78 <sup>b</sup>	2.36 <sup>b</sup>
H75-3	9.3 <sup>b</sup>	1.98 <sup>b</sup>	2.15 <sup>c</sup>	3.09 <sup>c</sup>

注1 総タンパク質はケルダール法により測定した。各画分のタンパク質はBCAタンパク質アッセイにより測定した。

注2 同一アルファベットで示した系統間には1%水準で有意差がないことを示す。

表2 成熟期におけるH39-59, H75-3の形態

		稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数
月の光		60.6	20.8	9.7
H39-59	line 1	59.6	20.7	12.5
	line 6	60.5	20.2	12.0
H75-3	bulk	59.5	19.9	10.9

注 系統間に、5%水準で有意差は検出されなかった。

では、T<sub>3</sub>世代のH39-59, およびH75-3を栽培し、生育特性、交雑率、雑草性、他生物への影響等を評価した。

生育特性については出穂期、稈長、穂長、穂数などを測定した結果(表2), H39-59, H75-3とも対照の月の光と実質的に同等であると判断された。

交雑率については、H39-59および対照の月の光を花粉源とし雄性不稔の月の光を受粉用イネとして用い、その稔実数から算出した。H39-59で2.1%, 月の光で1.7%であり有意差はみられなかった。

雑草性については、隔離圃場でひこばえの越冬性を達観で調査し、種子の休眠性および脱粒性、種子稔性を測定した。これらの形質について組換え体と対照で差はみられなかった。

他生物への影響については、隔離圃場への移植(田植え)前、および移植4, 8, 12週間後に、土壌中のバクテリア、菌類の密度を測定した。また、出穂期および成熟期に昆虫相を、出穂期に植物相を調査した。これらの結果、組換え体と対照で差はみられなかった。

以上のデータを農林水産省に提出した結果、環境への影響について、組換え体H39-59, H75-3と対照の月の光に差がないことが確認され、1998年開放系(一般圃場)栽培へ移行することが可能となった。

#### 4. おわりに

当社では、グルテリンA遺伝子に対するアンチセンス遺伝子をイネに導入することにより、グルテリンが約20%低減したH39-59, 約40%低減したH75-3を作成した。これらについて、酒造原料用としての可能性が示された。

そこで、グルテリンのより一層の低減により、さらに酒造原料用に適したイネを開発する目的で、1997年に品種「コシヒカリ」にグルテリンA遺伝子、グルテリンB遺伝子の両方に対するアンチセンス遺伝子を導入した組換えイネKA130を作成した。1999年の隔離圃場栽培での収穫物を用いてグルテリン含量を電気泳動により測定したところ約75%の低減がみられた。2000年4月に農林水産省から指針への適合が確認されたことから、開放系での栽培に移行した。今後、タンパク質含量、グルテリン画分等を測定するとともに、醸造適性を調査する予定である。

#### 文 献

- 1) Yoshizawa, K. et al (1985), in Rice: Chemistry and Technology (Juliano, BO, Ed), Rice in brewing, American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota, USA
- 2) Tanaka, K. et al (1980), *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1633-1639
- 3) Wakai, Y. (1993), in 17th seminar on sake-rice, 1-13, Sake-rice society, Tokyo, Japan
- 4) Takaiwa, F. et al (1991), *Jpn. J. Genet.*, 66, 161-171
- 5) Maruta, Y. et al. *Mol. Breed.*, in press
- 6) Komari, T. et al (1996), *Plant J.*, 10, 165-174
- 7) Hiei, Y. et al (1994), *Plant J.*, 6, 271-282
- 8) Iida, S. et al (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 87, 374-378



## ◀国内情報▶

## カイコの3眠化剤利用による、 細くしなやかな絹の生産

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所  
木 内 信

外国産の安価な繭に対抗するため、普通の繭にはない付加価値を持った繭糸の開発が進められている。その一つとして、カイコに生理活性物質を投与し、早熟変態を誘導して普通より早く繭を作らせることにより、通常の繭糸の3分の2程度の太さの繭糸を生産する技術が実用化されている。カイコの品種や生理活性物質の投与時期を変えることによりさらに細い繭糸を作ることも可能である。

### 1. はじめに

わが国の繭生産量は、養蚕従事者の高齢化や繭値の低迷により減少を続けている。このような状況を打開するため、低コスト・省力化技術の開発による養蚕経営の規模拡大や、絹の消費拡大を目指した開発研究が進められてきた。その一つとして絹素材の多様化と繭の高付加価値化を目指した繭糸織度の多様化があり、生理活性物質を投与して早熟3眠蚕を誘導し、細織度の繭糸を生産する技術が実用化されている。本稿では、この3眠蚕誘導剤の概略を紹介する。

### 2. 繭糸織度の多様化

一般に、糸の太さ（織度）はデニールという単位で表され、糸長450mで0.05gの重さがあるものを1デニールという。普通のカイコが作る繭糸の太さは3デニール前後で、織物を作るための絹糸はこの繭糸を何本かよりあわせて作る。絹糸の太さは同じでも元の繭糸の太さが違うと絹糸の性質も変わり、細い繭糸から作った絹糸は柔らかくしなやかなのに対し、太い繭糸から作った絹糸は硬くなる。このような絹素材の多様化は、絹の消費拡大や繭の高付加価値化につながる事が期待される。

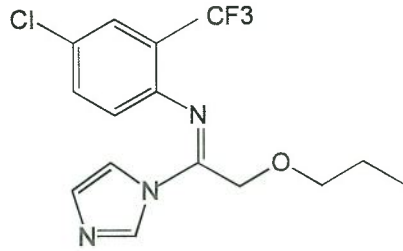
KIUCHI Makoto

〒305-8634 茨城県つくば市大わし1-2

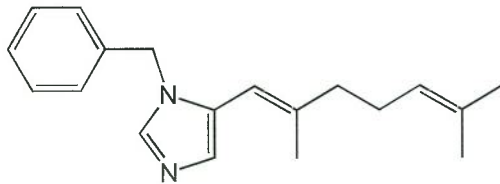
多様な繭糸織度の繭を作り出すため、これまでにカイコの品種改良とホルモン活性物質による発育制御という二つのアプローチが行われてきた。品種改良ではいくつかの細織度および太織度の品種が品種登録され、最近では普通の品種の半分程度の約1.6デニールという極細の繭糸を作る品種が育成されている。他方のホルモン活性物質による発育制御では、研究レベルでは1980年代の前半から早熟3眠蚕を誘導することにより細織度の繭を作ることが可能となっていたが、最近になって本稿で紹介する3眠化剤が養蚕用の動物薬として登録され、農家レベルの技術として実用化されるに至っている。

### 3. イミダゾール化合物による早熟3眠蚕の誘導

カイコは脱皮を繰り返して成長するが、脱皮の前1～1.5日の間は動かずにじっとしているのでこの時期を「眠（みん）」という。普通のカイコはふ化してから終齢の5齢になるまでに4回の「眠」を経過するので4眠蚕と呼ばれるが、飼育条件を変えたり、化学物質を投与することにより、普通より1齢早い4齢で繭を作る、いわゆる早熟3眠蚕が出現することが以前から知られていた。しかし、これらの方法による3眠蚕の出現は不安定で3眠化率もはあまり高くなく、実用的に使える方法ではなかった。ところが、1980年代の



トリフルミゾール



KK-42

図1 トリフルミゾールとKK-42の化学構造

前半に、ある種のイミダゾール化合物をカイコの体に塗布したり、クワの葉や人工飼料とともに食べさせるとほとんど100%に近い高率で早熟3眠蚕を誘導できることが見いだされた。図1に早熟変態誘導作用をもつ2種のイミダゾール化合物、KK-42とトリフルミゾールを示したが、前者は九州大学農学部で幼若ホルモンの阻害剤を目指して合成された化合物であり、後者は日本曹達(株)において

植物病原糸状菌の殺菌剤として開発されたものである。

これらのイミダゾール化合物をカイコに投与すると、1~4齢のどの齢期に処理しても早熟変態を誘導できる。おもしろいことに、投与する齢期によって繭を作り始めるまでの日数が違い、繭の大きさも違ってくる(図2, 木内ほか; 1985)。1齢に投与した場合には3眠蚕にはなるものの、繭を作り始めるまでの日数は無投与の場合とあまり変わらず、繭の大きさもほとんど変わらない。しかし、投与齢期が遅くなると繭を作り始めるまでの日数が短くなるとともに繭も小さくなり、3齢期への投与では普通の繭の3分の2程度、4齢期の投与では2分の1以下の大きさになる。そして、繭が小さくなるに従って繭糸の繊度も細くなり、3齢期への投与では約2デニール、4齢期への投与では約1デニールの繭糸ができる(図3)。

#### 4. 3眠化剤の実用化

このように、これらのイミダゾール化合物の投与により安定して早熟3眠蚕が誘導できることから、細繊度繭糸生産への利用を目指して、県の試験場レベルでの研究も精力的に行われた。しかし、当時は細繊度の繭糸を作る蚕品種の育成が進められており、品種によ

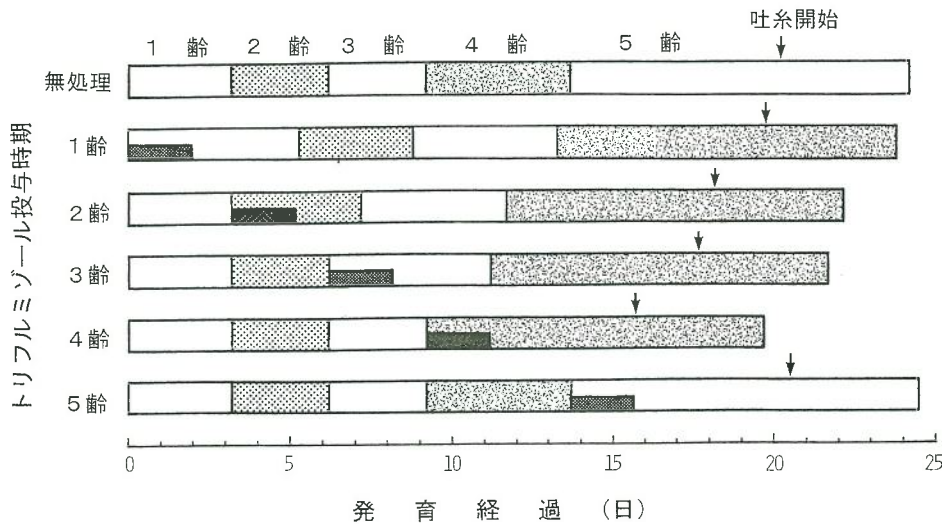
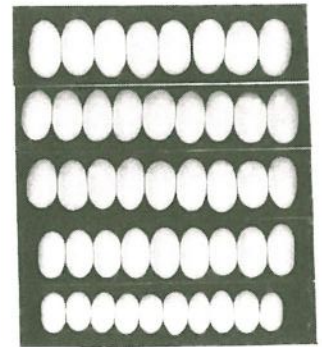


図2 トリフルミゾール投与蚕の発育経過と繭の大きさ



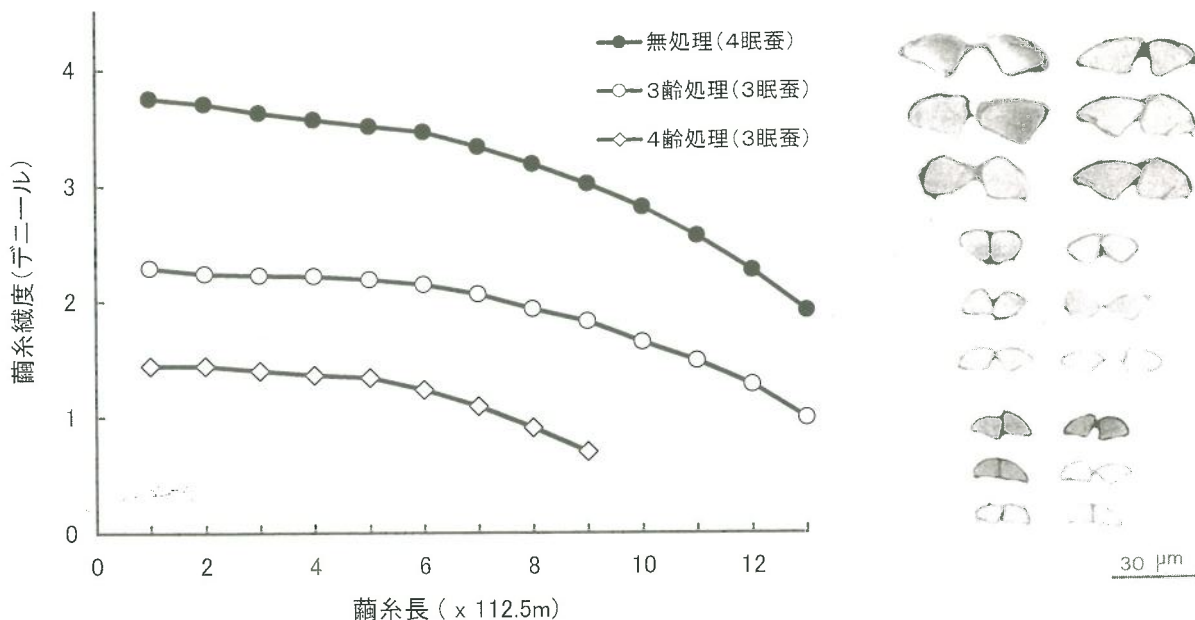


図3 3眠蚕の繭糸繊度(左)と繭糸断面(右)

繭糸断面は、上から無処理(4眠蚕)、3齢処理(3眠蚕)および4齢処理(3眠蚕)。

る細繊度繭糸の生産が優先されたことなどから実用化にはいたらなかった。近年になって多様な繭糸への要望がいつそう高まるとともに、普通の蚕品種から異なる繊度の繭糸を容易に作り出すことができる3眠化剤が再度注目され、千葉県などの働きかけにより日本農産工業(株)と日本曹達(株)が主体となり蚕糸・昆虫農業技術研究所が協力して、すでに殺菌剤として農薬登録されているトリフルミゾールを動物医薬品として登録申請し、1999年春に養蚕用三眠化剤「サンドリーム」として承認された。

サンドリームはカイコに食べさせることによって効果を現すが、水にはほとんど溶けず、水溶液として桑に散布して食下させることが困難なため、人工飼料に混入して使用する。少量のエタノールに溶かした本剤を飼料調製の熱湯に加え、良く攪拌して分散させてから湯練り人工飼料の粉体を加えて攪拌調製する。この飼料を3齢のはじめから48時間食べさせ、その後は桑葉を与えて飼育することにより、ほぼ100%近い高率で3眠蚕が誘導され、1.8デニール前後の細繊度の繭糸を作ることができる。サンドリーム入りの人工飼料を食べさせた後、続けて人工飼料で飼育する

ことも可能である。

### 5. 早熟3眠化の仕組み

ところで、これらのイミダゾール化合物はどのようにして早熟変態を誘導するのであろうか。KK-42やトリフルミゾールは当初、幼若ホルモンを阻害する「抗幼若ホルモン」と考えられていたが、その後、脱皮ホルモンの分泌器官である前胸腺に直接作用して脱皮ホルモンの分泌を阻害することが明らかになっており、早熟変態の誘導もこの作用で説明できる。くわしい説明は省くが、4齢期に投与した場合とそれ以前の齢期に投与した場合では早熟3眠蚕を誘導する仕組みが異なっていて、4齢期の場合には、脱皮ホルモン分泌の阻害により血液中のホルモンの状態が5齢と同じ状態になり、早熟変態が誘導される。一方、それより前の齢期に投与した場合は、脱皮ホルモンの分泌が一時的に低下することにより次の齢への脱皮が遅れ、その分次齢のカイコが大きくなって通常の1.5~2倍の体重になる。体が一定の大きさに達すると終齢と判断されるが、これらの化合物を投与したカイコは、4齢になった時点でこの大きさをこ

えるため終齢と判断して早熟変態を起こすと考えられる。

## 6. より細い繭糸を作る方法

現在のところ、3眠化剤は3齢期への投与による1.8デニール程度の繭糸生産だけに利用されている。4齢期に投与することにより1デニール以下の極細の繭糸を作り出すことができるが、繭の大きさ自体も2分の1以下になるため生産性が著しく低下してコスト高となるため織物用途への実用化は難しい。生産性を損なわずにより細繊維の繭糸を生産す

る方法として細繊維の繭糸を作るカイコの品種との組み合わせがある。最近育成された「はくぎん」という品種は1.6デニールという細繊維の繭糸を作るが、これに3眠化剤を投与して3眠蚕にすることにより、生産性を著しく損ねることなく1デニール以下の繭糸を作ることが可能となっている。技術的には、さらに超極細の繭糸を作り出すことも可能である。3齢のカイコにイミダゾール化合物を連続投与すると、ごく小さな繭を作る2眠蚕を誘導することができる。超極細の繭糸を必要とする特殊な用途があれば、現在の技術でも十分対応可能となっている。



## ブレイン テクノニュースの バックナンバーご案内 第 78 号

2000 (平成12) 年 3月15日発行

### 総 説

- DNAワクチンテクノロジーへの  
サイトカイン遺伝子の応用研究は  
21世紀の感染症克服に貢献できる ……横溝祐一
- 国内情報  
昆虫ウイルスを用いた  
家畜サイトカインの生産 ……犬丸茂樹  
サイトカインの動物臨床への応用  
……………板倉敦子・松田浩珍
- 抗アレルギー評価のための  
ヒト免疫担当細胞株の樹立 ……山本万里・川原浩治  
トランスポゾンによる植物遺伝子タギング法の確立  
……………町田千代子・田中博和・岩川秀和・町田泰則
- 地域の先端研究  
薬剤を必要としない新規選抜マーカー遺伝子の  
開発—チャにおける利用 ……丹羽康夫
- 文献情報  
卵細胞質内精子注入 (ICSI) 法による哺乳動物の  
遺伝子導入 ……(抄訳: 木村直子)

- ミトコンドリアDNAは酵母染色体の  
二重鎖の破損を修復する ……(抄訳: 家藤治幸)
- 根粒の発達をコントロールする  
植物のレギュレーター ……(抄訳: 内海俊樹)
- 重篤なインスリン低抗性、糖尿病  
および高血圧に關与するヒトPPAR $\gamma$ の  
遺伝子突然変異 ……(抄訳: 室田一貴)
- 海外便り  
カイコにおけるレトロウイルスベクターの利用  
—フランス分子細胞遺伝学センターでの1年間  
……………河本夏雄

### 特別情報

- BRAIN国際テクノフォーラム  
—トウモロコシ育種の最前線— ……(編集部)
- 生研機構からのご案内  
(1) 基礎的研究推進事業 (若手研究者支援型) 課題  
ならびに研究開発事業成果の紹介  
(2) 平成12年度募集について

## ◀国内情報▶

## 緊プロ型ロックウール脱臭装置の開発と実用化

生研機構 畜産工学研究部

道宗 直昭

親水性ロックウールに有機物等を混合し微生物活性を高めた通気性の優れた脱臭材料と寒冷地でも脱臭可能な生物脱臭法による脱臭装置を開発した。脱臭材料を2 m以上堆積した脱臭装置へ堆肥化装置から発生する平均200ppm以下のアンモニアガスを含む臭気を見掛け風速20mm/秒で通して良好に脱臭できる。散水は循環水方式を採用し、外部へ窒素を含む余剰水を出さない方式とした。現在、全国十数カ所で実用装置として稼働している。

## はじめに

畜産を取り巻く環境問題では、畜産経営に起因する苦情件数の最も多いのは悪臭関連であり次いで水質汚濁関連となっており、この2つの問題を解決することが急務な課題である。堆肥化施設などのふん尿処理施設から発生する臭気は、都市部だけでなく農村部でも適正な対応を行わないと経営そのものを営むことができなくなるほど深刻な状況にある。

筆者らは、農業機械等緊急開発事業（緊プロ事業）において、既に関発を行ってきたロックウール脱臭装置を基本に、寒冷地でも良好に稼働している堆肥化装置で発生する臭気を脱臭できる生物脱臭法による脱臭装置を開発した。

## 1. ロックウール脱臭法の原理

ロックウール（以下RW）脱臭法は、微生物活性を高め脱臭機能を発現させたRW脱臭材料に堆肥化装置などから発生するアンモニアを主体とする臭気ガスを通して脱臭する生物脱臭法である。その脱臭メカニズムは、土壤脱臭法と概ね同様で微生物の臭気物質の分解能力を利用した方法であり、脱臭能力と持続性も黒ボク土とほぼ同程度の能力がある。アンモニアはRW脱臭材料中の水に一旦吸着

DOSHU Naoaki

〒331-8537 大宮市日進町1-40-2

された後、脱臭材料中のアンモニア酸化細菌などによって硝化され、さらに脱窒されて無臭化し外気へ放出される。

## 2. RW脱臭材料

RW脱臭装置に用いられるRW脱臭材料は、生物脱臭法による脱臭材料として開発されたものであり（特許登録済み）、水耕栽培用培地として使われている親水性RWを主体として有機物など微生物源を添加・混合し、微生物活性を高めたものである。このRW脱臭材料は、高い脱臭能力を有し、通気性にすぐれ、通気抵抗は土壤の場合の1/3～1/5程度低く、土壤脱臭装置と比べ脱臭材料を3～5倍程度高く堆積することが可能であり、その結果として装置の設置面積は土壤脱臭装置より縮小することができる。ただしRW脱臭材料は通気性に優れているが保水性がやや劣り、乾くと保水しにくくなるため、脱臭槽上面から1日に5～25kg/m<sup>2</sup>・日の散水が必要である、そのため脱臭槽下部に溜まった排水を再循環している。さらに本開発研究において、従来のRW脱臭材料より通気抵抗の小さい脱臭材料（緊プロ型RW脱臭材）も開発することができた。

## 3. 脱臭装置開発のための基本的な考え方

RW脱臭装置は、生研機構と全農がメーカーとの協力を得て平成3年までに基礎試験を行い脱臭装置としての基本形を作ったが、生物脱臭法の弱点である寒冷地での適用、通気抵抗の改良、脱臭機能の持続性、低コスト化を念頭に置きながら平成5～9年まで農業機械等緊急開発事業の中で寒冷地型のRW脱臭装置を開発した。開発に当たっての基本的な考え方は、①寒冷地においても堆肥化装置から発生する臭気を脱臭できること、②脱臭材料および散水装置、排水装置が凍結しないこと、③通気抵抗の小さな脱臭材料を開発すること、④長期間(数年以上)使用しても材料の劣化やへたりによって圧密状態をつくらないようにすること、⑤散水量をできるだけ少なく

するような運転条件を確立する、などである。

#### 4. 臭気の捕集と換気方法

堆肥化施設等から発生する臭気を脱臭するには、まず発生した臭気を発生源から外部へ拡散させないようにすることが必要であり、そのためには臭気発生源を覆い密閉化を図り臭気を外へ逃がさないようにしなければならない。密閉化の方法は、発生源をシート等で覆って密閉化を図り、臭気を外部へ漏らさないようにするが、大型堆肥化施設のように臭気が充満する建屋の内容積がかなり大きな場合は、発生源を集中的に覆う目的で建屋内にさらに密閉化が可能な簡易ハウス(二重構造

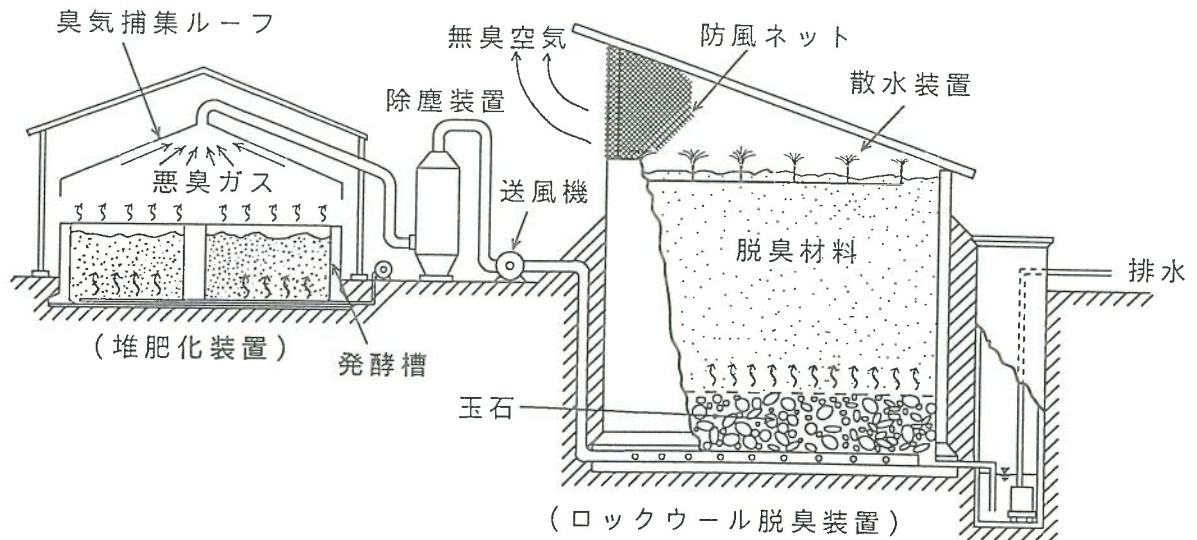


図1 緊プロ型ロックウール脱臭装置の概要

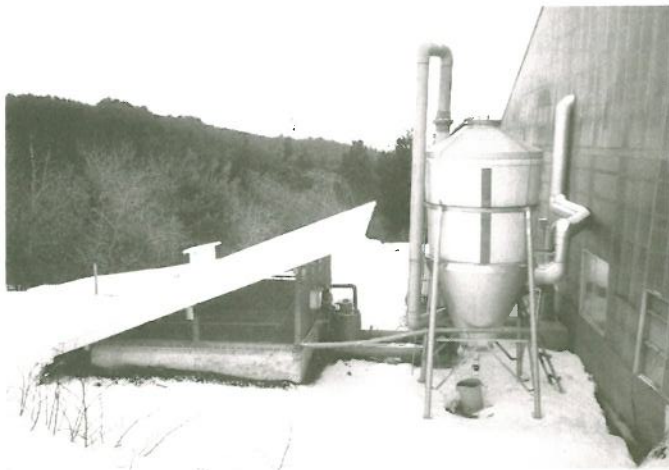


図2 緊プロ型RW脱臭試験装置(青森県階上町N養鶏場)

ハウス)を設けたり、カーテン等で仕切るなりしてその内容積を小さくする工夫が必要となる。臭気発生源の密閉化が図られると、密閉した室内に家畜ふん等の材料から発生した臭気と水蒸気が充満するために、これらの臭気と水蒸気の排気と新鮮空気の流入とによる室内空気の入替え、すなわち換気が必要になる。換気方法は、密閉化された室内で臭気のも最も発生しやすいところに換気口を設けて強制換気し、換気空気を脱臭装置へ送り脱臭する。換気口から離れた反対側に新鮮空気の流入口を設けて内部の換気を行う。換気量は、

発酵槽をビニールなどで覆った室内の空間部の容積の空気を毎時8～10回程度（臭気濃度が高い場合には12～15回／時）入替える量とし、発酵促進のために発酵槽下部から強制通気しているような例では、前述の換気量にさらに通気量を加えた量が必要な換気量となる。換気量は密閉化された内容積に比例するので、その内容積が大きくなればなるほど換気量も多くなり、かつ必要な脱臭装置規模も大きくなり運転コストがかさむことになるため、密閉化に当たっては、換気すべき室内の内容積を小さくするよう留意する。

## 5. 緊プロ型RW脱臭装置の概要

図1、2は寒冷地の堆肥化装置で発生する臭気を脱臭するために、青森県二戸郡階上町のN養鶏場に設置した試験用のRW脱臭装置である。山中にあるため冬期には日中でも氷点下8℃にもなるところである。

脱臭装置の構造は、脱臭槽本体、送風機と送風ダクト、散水装置、制御盤（配電盤を含む）、付帯装置などからなる。寒冷地用として、RW脱臭槽を半地下方式とし、外気の冷風が直接脱臭材料表面と接触しないよう防風ネットで囲われている。また、RW脱臭材料が乾燥しないよう脱臭槽表面に噴水型の散水

装置を設け、配管をRW脱臭材料に埋め込み凍結を防止した。脱臭槽にはRW脱臭材料を約2.5m堆積し（自然沈下2.2m程度となる）、下部から悪臭ガスを見掛け風速18～25mm／秒で通し脱臭する。槽下部の床面は排水が集水され脱臭槽外へ出すことができるよう水封付きの排水枡を設けている。送風機の軸動力は送風量と静圧の積に比例するので、できるだけ換気量を少なくし静圧の小さな脱臭材料を使うことが運転コストを少なくする方法であるが、新たに開発したRW脱臭材料は従来型の脱臭材料に比べ通気抵抗が半分程度であり、運転コストの低減も可能となった。現在まで約4年間経過しているがRW脱臭材料の劣化やへたりによる圧密状態は起きておらず、良好に維持されている。

## 6. 脱臭性能

脱臭性能は基本的には事業所の敷地境界線で悪臭防止法の規制基準以下であればよいが、できれば脱臭装置を通過したガスに臭気が無いことが理想である。図3は、N養鶏場に設置された堆肥化装置で発生した臭気をRW脱臭装置で脱臭する試験において、脱臭装置入口の換気空気のアモニアガス濃度の1日の変化を測定し、平均値を求めた結果で

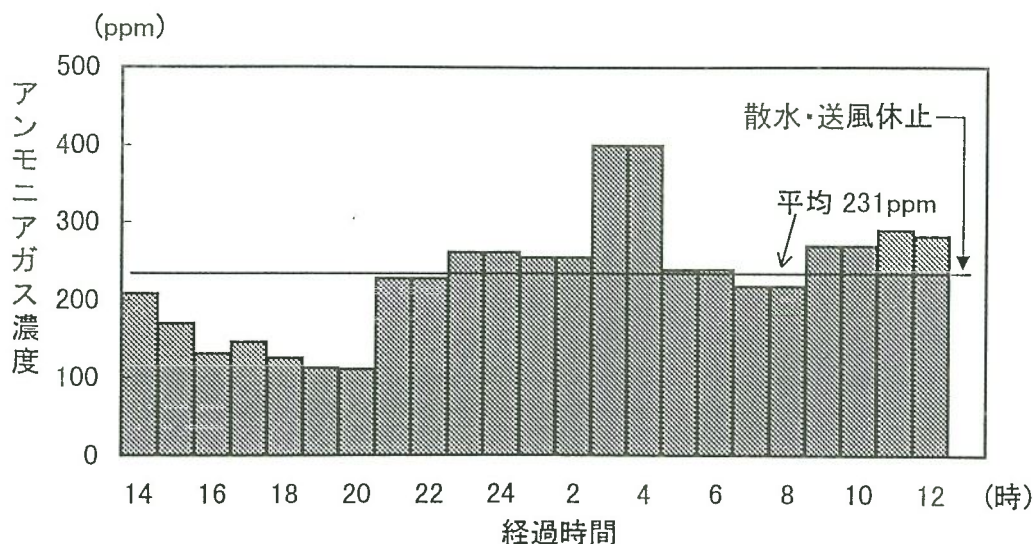


図3 緊プロ型RW脱臭装置に送られる換気空気のアモニアガス濃度の変化例  
(N養鶏場, 96年11月26日～11月27日測定)

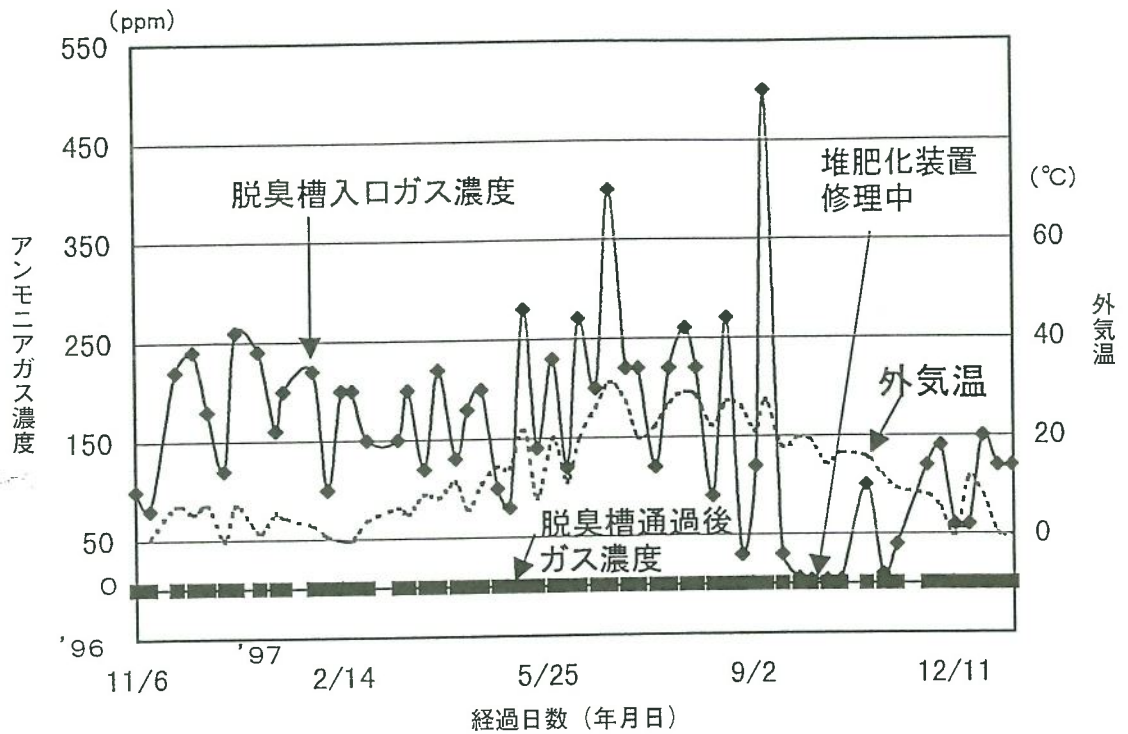
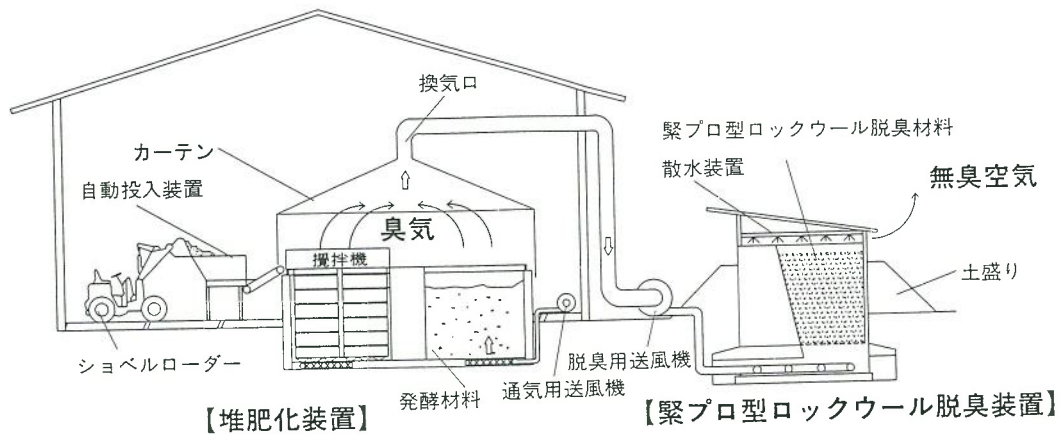


図4 脱臭試験結果（脱臭槽入口と脱臭後のNH<sub>3</sub>ガス濃度）



脱臭対象堆肥化装置の主要諸元

発 酵 槽	型 式	J R 120型円形発酵装置 ロータリーコンボ
	直 径	12m
	堆積高さ	2 m
	内 容 積	220 m <sup>3</sup>
	攪 拌 機	15.4kW
通 気 装 置	型 式	ターボファン×2台
	設定通気量	0.08m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> /分
	モーター出力	1.5kW×1台
		0.75kW×1台

緊プロ型ロックウール脱臭装置の主要諸元

脱 臭 槽	型 式	半地下式寒冷地型
	槽内寸法	5.8m × 13m
	堆積高さ	2.5m
	脱臭材料容積	189 m <sup>3</sup>
	脱臭材料	緊プロ型ロックウール脱臭材料
通 気 装 置	型 式	ターボファン
	設定通気量	110m <sup>3</sup> /分
	モーター出力	15kW
	送気配管	V P 350

図5 緊プロ型RW脱臭装置の実用例（岩手県畜産研究所）



ある。この例では、脱臭装置入口の換気空気のアンモニアガス濃度は夜中に高くなる傾向にあって1日の平均濃度は231ppmであった。また、脱臭槽通過後のガスにはアンモニアは検出されなかった。図4は、冬期を含む通年の脱臭槽入口と脱臭槽通過後のアンモニアガス濃度を調査した結果であり、RW脱臭装置で良好に脱臭された。図5は、岩手県畜産研究所に設置された実用装置の例である。

## おわりに

生物脱臭法は、吸着法や燃焼法、薬液処理法などに比べて設置面積はやや大きい、適正な管理のもとでは脱臭材料の交換がなく、

化石燃料も必要なく極めて低コストで安全な環境にやさしい脱臭方法である。本装置では、散水によって脱臭装置底部に排水が溜まるが、この排水を散水用に再循環し、外部へ排水をほとんど出ない構造に改良している。

開発した緊プロ型RW脱臭装置は、家畜ふん尿だけでなく野菜残さや生ゴミの堆肥化装置の脱臭装置として北海道から九州まで広く導入されている。

## 参考文献

- 1) 道宗直昭 他 (1999) 畜産の研究53 (1), 199-204, 養賢堂
- 2) 道宗直昭 他 (2000) 農機誌62 (3), 33-34



## ブレインテクノニュースの バックナンバーご案内 第79号

2000 (平成12) 年5月15日発行

### 総説

- 植物の形態を制御するジンクフィンガー転写因子 .....高辻博志
- 国内情報
- 遺伝子操作による葉・花形態の制御 .....塚谷裕一
- マダイイリドウイルス病ワクチンの開発.....中島員洋
- 氷核活性細菌による害虫防除—昆虫腸内定着細菌利用の一例として .....渡部賢司
- 分子擬態.....中村義一
- 色素体遺伝子の転写を支配する核ゲノム.....杉田 護
- 文献情報
- 受精とCD9との関わり.....(抄訳：横尾正樹)

- Lactococcus lactis*オリゴペプチド輸送システム結合蛋白質への変異導入と特異性の変化 .....(抄訳：上野敬太)
- 甦る植物—永遠の葉の秘密 .....(抄訳：岩井純夫)
- 切り刻んだグリコサミノグリカン、侮り難し?!
- 低分子量ヒアルロン酸が動脈硬化治療薬となる可能性がある— .....(抄訳：丸山一輝)
- 海外便り
- 食品の物性はヒトの咀嚼挙動に影響するか
- フランス国立食肉研究所に滞在した11ヶ月— .....神山かおる

◀地域の先端研究▶

## イネ葉より分離した 葉面菌によるイネいもち病の防除

茨城県 農業総合センター生物工学研究所  
河 又 仁

釣餌法と洗浄法を組みあわせてイネ葉より葉面菌を分離し、イネいもち病に対する発病抑制効果を評価した。沖縄県石垣島の水田、茨城県岩間町の水田およびポットで育成したイネより1,923菌株を分離した。これら菌株を供試して、いもち病の発病抑制を評価したところ、9菌株が発病指数20以下を示し、いもち病の発病をよく抑制した。これら9菌株のうち5菌株はいもち病菌分生子の発芽を0.7%以下に抑え、また、いもち病菌の菌糸生育を抑制した。

### 1. はじめに

イネいもち病は *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barrによって引き起こされる病気で、日本のみならず世界のイネ栽培地域における最重要病害のひとつである。この病気はイネ生育の全期間を通じて発生し、発病条件が整った場合の病気の拡散、進展は非常に早く、適切な防除が行われなかった場合には甚大な被害をもたらす。

現在、いもち病の防除は主として化学農薬の散布と抵抗性品種の利用に依存している。本病に対しては有効な薬剤が多数開発されているが、環境問題等の面から減農薬への社会的要請が年々、強まっている<sup>1)</sup>。また、コストや流通面から適切な薬剤が入手できない国、地域では十分な防除ができず、甚大な被害を被る。

一方、抵抗性品種の利用では抵抗性品種を侵す新レースが次々と登場し<sup>2,3)</sup>、抵抗性品種のみでの防除は難しい状況にある。また、日本においては、コシヒカリのように食味は良いが、いもち病に対する抵抗性をもたない品種の作付けが増加している。

以上のような状況から化学農薬や抵抗性品種に代わる、あるいは補完する防除法として生物防除法の開発が期待されている。

微生物を利用した生物防除を行う場合、利  
KAWAMATA Hitoshi  
〒319-0292 西茨城郡岩間町安居3165-1

用しようとする微生物が対象植物に定着性を有するという事は重要な要因である。なぜなら植物に定着することにより、感染から発病までの様々な段階に作用して病気を抑制することが期待され、拮抗性を発揮できる期間、場面が多くなるからである<sup>4)</sup>。特にいもち病のようにイネのほぼ全生育期間にわたって発生する病害の場合、このことはより重要な性質となってくる。実際、植物の葉面上には各種微生物が互いに強く影響し合いながら定着、生存している。そこで我々は、このイネ葉面に定着性を有する糸状菌をイネいもち病の生物防除に利用しようと考えた。さらに、なるべく多様な菌を分離することによって、今までに生物防除試験に供試されたことのない菌を得ようとした。そのために、生物防除資材を得るための分離法としては今までほとんど用いられたことのない、釣餌法と洗浄法を組み合わせて多様なイネの葉面菌を分離し、その中からいもち病防除に有用な菌を得ようとした。

### 2. 葉面菌の分離

#### 1) 釣餌法

植物の葉面上には様々な微生物が生育し、植物の生育環境などによってその微生物相は異なる。そこで、通常、水田には生息していてもイネに定着する能力は持っているような菌を得るために水田以外の環境でイネを

栽培し、そのイネから葉面菌を分離した。すなわちイネの葉を餌にしてそれに定着性のある菌をつり上げる釣餌法を用いた。具体的にはワグネルポットに植えたイネ苗を杉林（茨城県岩間町）の中やその周辺において2～3ヶ月間育成後、葉を採集し、分離に用いた。

また、生育ステージや栽培地域によっても微生物相は異なるため、釣餌法とは別に苗やひこばえを含めた様々な生育ステージのイネ葉を、茨城県岩間町と沖縄県石垣島という気候が異なる地域の水田から採集した。

## 2) 洗浄法

採集したイネ葉から菌を分離する方法として、徳増の洗浄法<sup>5)</sup>に若干の変更を加えて用いた。洗浄法は生態研究によく用いられている方法で、葉に生息する菌のかなり正確な情報が得られるとされている<sup>6)</sup>。したがって、今回の試験でもイネ葉に定着性を有する菌が分離できたものと考えられる。

今回行った洗浄法は以下の通りである。採集してきたイネの葉を約5mm角に切断し、0.005%のtween20溶液で1分間、激しく振とうする操作を溶液を換えながら計3回繰り返す。次に同様の操作を滅菌水を用いて同じく3回繰り返し、残存しているtween20を洗い流す。洗浄した葉片は細菌の生育を抑制するために滅菌ろ紙上で24時間風乾後、分離用培地(1/2 corn meal agar)に静置した。静置24時間後、葉片を裏返しにして新しい培地に静置した。葉片をおいた培地は室温、10℃、13℃の各温度で培養し、葉片から伸長してきた菌を分離した。

以上のような分離法によって1,923菌株の葉面菌を分離した。分離した菌のうち同定できた菌株は*Epicoccum*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Pestalotiopsis*などで、これらは高い頻度で分離された。

## 3. 葉面菌によるいもち病発病抑制

分離した葉面菌を用いていもち病に対する影響を生物検定によって評価した。検定法は以下のとおりである。まず、分離した葉面菌を9cmシャーレ(corn meal+malt extract+yeast extract:CMMY培地)上で2～4週間培養後、0.25%ゼラチン溶液を加えてスバチュラで菌体をかき取り、ガーゼを通して懸濁液を調製した。この懸濁液を4～5葉期のイネ(品種:コシヒカリ)に噴霧接種した。同時に $1 \times 10^5$ 個/mlに調整したいもち病菌(レース007)の分生子懸濁液を噴霧接種した。接種したイネは、暗黒下の温室条件下、25℃で16～20時間静置した後、23℃の陽光定温器で育成した。発病調査はいもち病菌接種10～14日後に行い、接種葉の病斑面積率を調査した。対照区の発病面積率を100としたときの葉面菌処理区の病斑面積率の比を発病指数とし、発病指数が20以下の場合、発病をよく抑えた菌株とした。この値は強度抵抗性品種が示す値にあたる<sup>7)</sup>。

生物検定の結果、9菌株がいもち病の発病をよく抑制し、最も発病を抑制したMKP33222菌株では全く病斑が認められなかった(表1, 図1)。発病指数が20以下を示した9

表1 葉面菌によるイネいもち病の発病抑制試験結果

菌株No.*	発病指数	いもち病菌分生子 発芽抑制率(%)	阻止帯形成	分離源
MKP33222	0	100	+	岩間(ポット)
MKP5111B	0.3	97.1	+	岩間(ポット)
MKP5112	5.1	96.7	+	岩間(ポット)
J2JMR3-2	8.6	8.1	-	石垣島
K2J131-2	9.2	8.5	-	石垣島
I5R3-1	11.6	7.8	-	石垣島
NOP5-4-1	12.1	97.1	+	岩間(ポット)
K1KM134-1	14.6	6.4	-	石垣島
NOP5112B	14.8	97.1	+	岩間(ポット)
CONTROL	100	0		

\* 発病指数20以下の菌株のみを記載した。



葉面菌接種区 対照区

図1 葉面菌によるいもち病の発病抑制

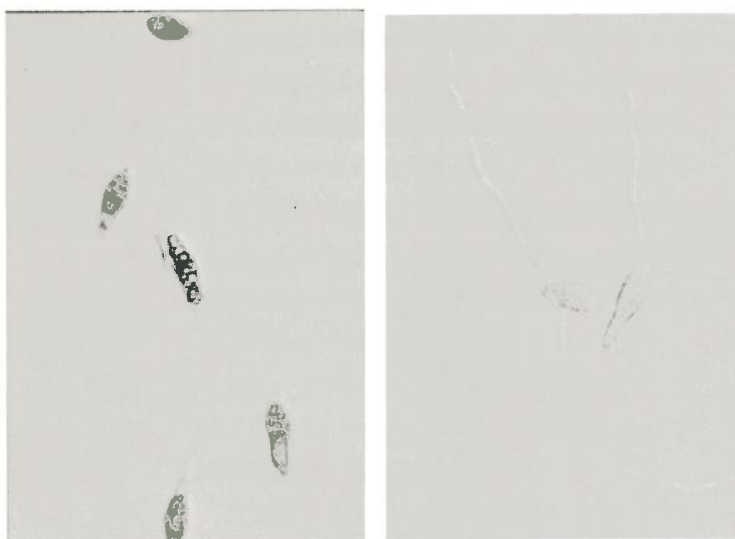
菌株中、5菌株はポット、すなわち釣餌法で得られた菌株であり、また、4菌株は石垣島の水田で採集したイネ葉から分離した菌株であった(表1)。このことは、釣餌法や、気候の異なる場所からサンプルを採集する方法が生物防除のための菌株を得るのにきわめて有効であることを示している。

#### 4. 作用機作

いもち病菌の発病を抑制した菌株の作用機作を検討するため、これら葉面菌のいもち病

菌分生子発芽ならびに菌糸生育に及ぼす影響を調査した。

分生子発芽に対する影響は、供試葉面菌の菌糸懸濁液をいもち病菌分生子と混合後、スライドグラス上の素寒天培地に適量滴下し、24時間後、いもち病菌の分生子発芽率を調査した。5菌株がいもち病菌の分生子発芽抑制率96.7~100%と、強い発芽抑制効果を示した(表1)。これら葉面菌処理区のいもち病菌分生子は対照区の分生子に比較して隔膜が消失し、内容物が顆粒状を呈していた(図2)。菌糸生育に及ぼす影響はCMMY培地上での



葉面菌処理区 対照区

図2 葉面菌によるいもち病菌分生子発芽抑制

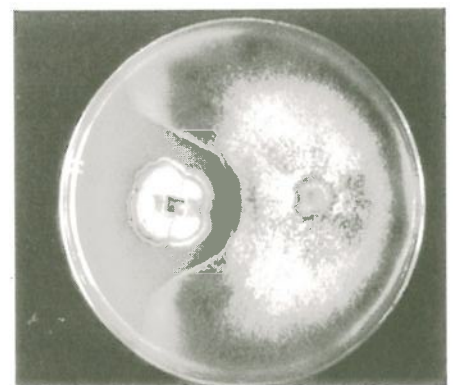


図3 葉面菌によるいもち病菌生育抑制  
左：葉面菌 右：いもち病菌

表2 ITSおよび5.8S rDNA領域の塩基配列の類似性

菌株No.	菌種*	配列の類似度 (%)
MKP33222	<i>Leptosphaeria microscopica</i>	84.8
MKP5111B	<i>Leptosphaeria microscopica</i>	84.4
MKP5112	<i>Stagonospora arenaria</i>	86.6
J2JMR3-2	<i>Fusarium flocciferum</i>	99.6
K2J131-2	<i>Leptosphaeria microscopica</i>	78.2
I5R3-1	<i>Penicillium soppii</i>	94.2
NOP5-4-1	<i>Cucurbitaria berberdis</i>	97.8
K1KM134-1	<i>Aporospora terricola</i>	83.7
NOP5112B	<i>Leptosphaeria microscopica</i>	85.3

\* 最も高いホモロジースコアを示した菌種

対峙培養によって調査した。5菌株ともいもち病菌との間に阻止帯が認められ、いもち病菌の菌糸生育抑制効果が認められた(表1, 図3)。

### 5. ITS領域の解析

以上のように、いもち病の発病抑制効果を示す葉面菌をイネから分離したが、これらの多くが胞子を形成せず、同定が困難であった。そこで、同定のための情報を得るため、葉面菌の5.8S rDNAを含むinternal transcribed spacer (ITS) 領域の塩基配列を決定し、その配列をもとにデータベースを検索して、材料とした葉面菌と関係の深い菌を見出そうとした。その結果、*Fusarium flocciferum*, *Cucurbitaria berberdis*, *Penicillium soppii*と90%以上の類似性を示し、これらの菌と供試葉面菌の類縁関係が示唆された(表2)。

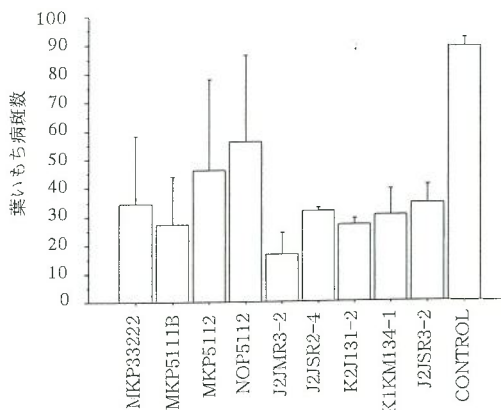


図4 葉面菌による葉いもち病防除圃場試験

### 6. 定着性

葉面菌接種後の定着性を検討するため、ITS領域の配列に基づき菌株特異的なプライマーを設計して、接種後の葉面菌の定着性を検討した。葉面菌を2葉期前後のイネ苗に噴霧接種後、人工気象器(23℃, 16時間照明)で育成し、1週間毎にイネを採集した。採集したイネを材料にDNAを調製し、これを鋳型として菌株特異的プライマーを用いたPCRを行った。その結果、4週間後でも目的とする大きさのDNAが増幅され、葉面菌の存在が示唆された。

### 7. 圃場試験

生物検定においてイネいもち病抑制効果を示した葉面菌9菌株を供試して、茨城県生物工学研究所内の水田におけるいもち病抑制効果を検討した。供試菌はPD培地で25℃, 2~4週間振とう培養後、ガーゼで回収し、ワーリングブレンダーで破碎した後、0.25%ゼラチン溶液に懸濁して接種液を調製した。調製した接種液を育苗中のイネ苗(品種:コシヒカリ)に噴霧接種し、本田に移植した。発病調査は葉いもちについては1区当たり18株の病斑数を調査した。また、穂いもちについては1区当たり20株のすべての穂について罹病程度を調査し、発病度を算出した。

その結果、葉いもち、穂いもちとも葉面菌処理区において対照区に比較してもいもち病の発病を軽減する傾向が認められ(図4), 圃場レベルでも葉面菌によるいもち病防除の有

効性が示された。しかし、試験年や圃場によってその効果の変動したため（データ省略）、実用化に向けては施用法等に関し、より一層の検討が必要である。

### 8. おわりに

釣餌法と洗浄法を組み合わせて分離することにより、いもち病の生物防除に有望な葉面菌を得ることができた。今後は、これら葉面菌の同定といもち病発病抑制機構、イネ体上での動態及びいもち病菌生育抑制物質を解明し、葉面菌による生物防除の実用化に向け、圃場において安定した効果を得るための条件を設定したいと考えている。

### 文 献

1) Froyd, J. D. et al (1994), in Rice Blast

Disease (Zeigler, R. S., Leong, S. A. and Teng, P. S. Eds), 501-520, CAB INTERNATIONAL, Wallingford

2) 浅賀宏一 (1987), 稲いもち病 (山中達・山口富夫編), 第2版, 216-249, 養賢堂, 東京

3) Lee, F. N. (1994), in Rice Blast Disease (Zeigler, R. S., Leong, S. A. and Teng, P. S. Eds), 489-500, CAB INTERNATIONAL, Wallingford

4) Andrews, J. H. (1992), Annu. Rev. Phytopathol., 30, 603-635

5) 徳増征二 (1978) 日菌報, 19, 383-390

6) 椿 啓介 (1990) 防菌防黴誌, 18, 235-241

7) 江塚昭典ら (1969) 中国農試報, E-4, 33-53



## ブレイン テクノニュースの バックナンバーご案内 第 80 号

2000 (平成12) 年 7 月 15 日 発行

### 総 説

味のメカニズム ..... 栗原堅三

### 国内情報

脳における味覚の認識 ..... 近藤高史・鳥居邦夫  
脂肪のおいしさ ..... 今泉正洋・伏木 亨  
アブラナ科自家不和合性に関する

雌ずい側・花粉側遺伝子の決定  
..... 畠山勝徳・高橋剛志・日向康吉

米品質測定評価装置の開発 ..... 杉山隆夫

### 地域の先端研究

ミカンの搾り粕を利用した

キトサンの発酵生産 ..... 宮岡俊輔

レーザー光による農産物生育情報の

非破壊モニタリング技術 ..... 斎藤保典

### 文献情報

Oct-3/4の発現量がES細胞の分化, 脱分化

あるいは自己再生を決定する ... (抄訳: 木村直子)

分裂酵母のヘキソース輸送体 ... (抄訳: 赤尾 健)

自家不和合性の花粉決定因子,

ついに発見さる ..... (抄訳: 岩井純夫)

SCARECROW機能の分子的解析によって

根とシュート共通のメカニズムを明らかにする

..... (抄訳: 木苗貴秀)

酵素を利用した魚油の香り成分の改良

..... (抄訳: 大栗智昭)

### 海外便り

土壌中におけるプレファレンシャルフローが

化学物質の溶脱に果たす役割

—スウェーデン農科大学における1年

..... 前田守弘

◀地域の先端研究▶

## 天然由来の保存性向上物質による カンキツ果実腐敗防止への新しい取り組み

愛媛県立果樹試験場  
三好 孝典

カンキツ果実腐敗は収穫前に薬剤を散布しても完全防除ができないため、天然由来の保存性向上物質（鮮度保持剤）を用いた果実腐敗防止を検討した。鮮度保持剤としてアリルイソチオシアネート（AIT）剤を用い、緑かび病菌および青かび病菌に対する抗菌活性を調査したところ、顕著な活性が認められた。次に、不知火 5 kg 当たり AIT 添着濃度 6,000 ppm の分包（RF）を 6 包施用して効果を検討したところ、顕著な効果が認められ、薬害も認められなかった。以上のことより、AIT を用いたカンキツ果実腐敗防止は可能であることが示唆された。

### はじめに

収穫後の果実腐敗対策は、主に収穫前に薬剤散布を行うことで対応している。しかし、現実には貯蔵中および出荷して消費者に届く間に多くの果実が腐敗し、収穫前の薬剤散布だけでは完全に防ぐことはなかなか難しい。腐敗が著しく発生すると減収につながるだけでなく、流通業者からのクレームも多くなり、産地のイメージダウンにつながる。そのため、より効果の高い腐敗防止技術の開発が強く要望されている。

近年、冷蔵庫内に安全性の高い天然由来の保存性向上物質を置くことによって、食品の日持ち性を向上させる技術が実用化されている。そこで、愛媛県立果樹試験場ではカンキツに対して安全性の高い天然由来の保存性向上物質を利用した防止技術の開発を平成 10 年から取り組んでいる。今回用いた天然由来の保存性向上物質は、日持ち性向上製剤（鮮度保持剤）として登録されているので、収穫後の果実に施用しても問題はない。天然由来の保存性向上物質はカラシから抽出したアリルイソチオシアネートやヒノキから抽出したヒノキチオール等数多くあるが、本稿では市場で腐敗しやすい不知火に対するアリルイソチオシアネートを用いた果実腐敗の防止効果を

MIYOSHI Takanori

〒791-0112 松山市下伊台町1618

中心で紹介する。なお、本研究の一部は既に発表している<sup>2)</sup>。

### アリルイソチオシアネートの 抗菌活性

アリルイソチオシアネート（以下AITと称する）は、黒カラシを原料とした製油物質であり、微生物の呼吸系を阻害し、カビやバクテリアに対して強い抗菌力を有している<sup>1)</sup>。

カンキツの主要貯蔵病害である青かび病菌および緑かび病菌について、AITの抗菌活性を培地上で比較したところ、青かび病菌および緑かび病菌を抑制することが明らかとなった（表1）。

### 不知火におけるアリルイソチオシアネートの市場病害に対する効果

AITは青かび病菌および緑かび病菌に対して顕著な抑制効果が認められたので、市場出荷を想定した不知火の腐敗防止試験を実施した。試験区は、虐待処理（コンクリート上を5 m 転がす）と虐待無処理を設け、RT 分包タイプ（AIT：20,000 ppm 添着）およびRJ 分包タイプ（AIT：10,000 ppm 添着）を1箱（5 kg）当たり6包施用し、室温（平均気温17℃）で1週間保存して腐敗状況および薬害を調査した。その結果、RTタイプおよびRJ

表1 緑かび病菌および青かび病菌に対するAITの抗菌活性

	緑かび病菌									
	培養日数									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AIT処理	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
無処理	-	+	+	+	+	+	++	++	++	++
	青かび病菌									
	培養日数									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AIT処理	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
無処理	-	+	+	+	+	+	++	++	++	++

- : 菌糸の発育認めず、+~++ : 菌糸の発育認め、程度を表す。

タイプの不知火に対する腐敗防止効果は顕著な効果が認められたが、こ斑症状の薬害が多数発生した(表2)。これはAIT添着濃度が高いため、薬害が発生したものと考えられる。

RJおよびRT分包タイプで薬害が発生したことから、AITの添着濃度の低いRF分包タイプ(AIT添着濃度6,000ppm)およびシートタイプ(AIT添着濃度10,000ppm)を用いて試験を行った。不知火(5kg)を1区当たり2箱用いて、1箱当たりRFおよびシートを2, 4および6枚入れ、室温(19~27℃)で保存し、2週間後に腐敗状況を調査した。なお、RF分包とシートタイプのAIT徐放濃度はほぼ同様である。その結果、RF分包タイプおよびシートタイプを用いた試験で最も効果の高かった処理区はRF6包区で全く腐敗が認められなかった。効果の認められた処理区はRF4包、シート2, 4および6枚施用区であり、薬害は認められなかった(図1)。

不知火に対するAITの施用効果が認められたので、流通経路にのせた場合の効果について検討を行った。施用したAITタイプはRF分包とNyゲルを用いた。RF分包の200ml容器内での放置残存濃度は約1週間であるのに

対し、Nyゲルは約3ヶ月である。平成11年3月6日に愛媛中央農協伊予基幹支所で、1区あたり不知火5ケースを虐待処理および虐待無処理を15ケース用いた。1ケース当たりRFを6包またはNyゲルを4包施用し、太田市場まで輸送して3月24日まで保管後、腐敗調査を行った。その結果、虐待無処理区では試験期間中の気温が低く、ほとんど腐敗しなかったため、施用効果を明らかにすることができなかった。しかし、虐待処理区では、NyゲルおよびRF分包処理で顕著な防止効果が認められたが、Nyゲルで薬害が発生した(図2)。この原因はNyゲルは低濃度で長期間成分が出続けるため薬害が起こるものと推察され、薬害は高濃度短期間で起こるだけでなく、低濃度長期間でも起こることが明らかになった。

ハウスミカンにおけるアリルイソチオシアネートの市場病害に対する効果

市販のハウスみかん(5kg)の4箱(虐待区:1箱, 虐待しない区:3箱)に、RJ分包をクッションの下に置いて直接果実に接

表2 不知火におけるAITの防止効果

虐待の有無	天然由来の抗菌物質	ケース当たり処理数	発病率(%)				合計	薬害
			緑かび病	青かび病	水腐症			
有	RJ分包	6	0	0	10.0	10.0	+	
有	RT分包	6	0	0	10.0	10.0	+	
有	無処理		35.0	5.0	35.0	75.0	+	
無	RT分包	6	5.0	0	0	5.0		
無	無処理		7.5	0	25.0	32.5		



触しないように1箱当たり6包施用し、室温(平均気温:28.0℃)で1週間後に腐敗状況および薬害を調査した。その結果、薬害は認められなかったが、腐敗状況は無処理と同様であり、防除効果は明らかにできなかった(表3)。同様の試験を数回行ったが、防除効果が認められる試験事例はなかった。この原因として、気温が高いのでAITの残効が短くなったためと考えられる。

不知火ではRJ分包で薬害が発生したが、温州みかんでは薬害が発生しなかった。このため、品種によりAITの薬害発生濃度が違うことが考えられた。

おわりに

今回の試験から、不知火においてはAITによる市場病害の防除は可能であることが明らかとなった。AITによる効果は抗菌活性によることが明らかとなったが、品種により薬害発生濃度が違うことより、AIT施用濃度は品種ごとの薬害発生濃度と抗菌活性濃度から決定する必要がある。

今後、ハウスミカンおよび極早生温州ミカンでの効果についても温度に左右されない製剤を改良して検討する予定である。

また、長期徐放型(ゲルタイプ)のAIT製剤が開発されたので、今後、貯蔵病害に対する効果についても検討する予定である。

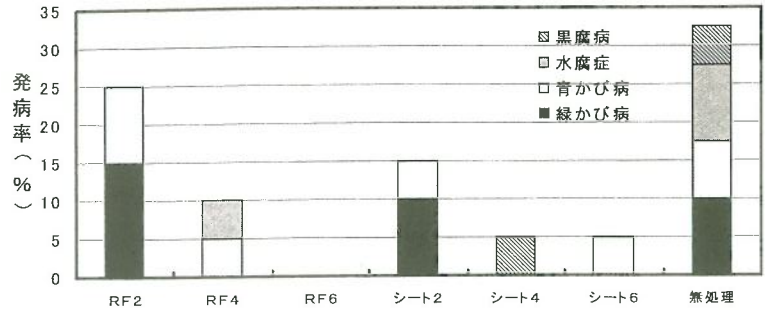


図1 AITの剤型および施用数と防止効果(不知火)

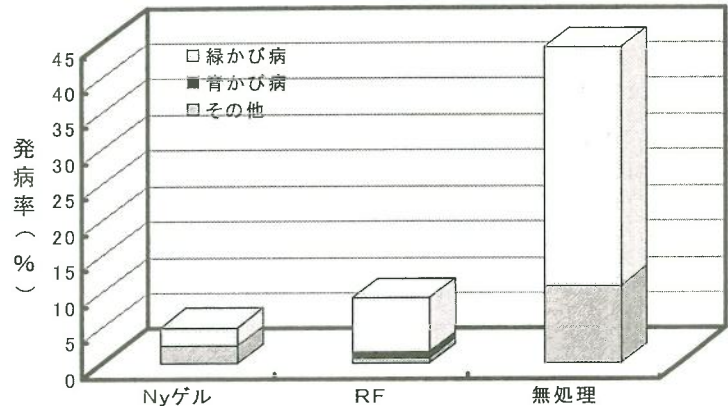


図2 AITの剤型と果実腐敗防止効果(不知火)

文 献

- 1) 一色賢司・徳岡敬子 (1993): 食品と微生物 10: 1~6.
- 2) 三好孝典 (2000): 植物防疫 54: 265~268.
- 3) 徳岡敬子・一色賢司 (1994): 日食工誌 41: 595~599.

表3 ハウスみかんにおけるAITの果実腐敗防止効果

虐待の有無	1箱当たりRF分包処理数	発 病 率 (%)				薬害
		緑かび病	青かび病	水腐症	その他	
無	1	2.2	0	0	0	-
無	2	1.5	0	0	0	-
無	3	0.8	0	0	0	-
無	4	2.9	0	0.5	0	-
無	無処理	1.3	0	0	0.5	-
有	1	5.4	0	0	0	-
有	2	6.0	0	0	0	-
有	3	3.6	0.5	0	0	-
有	4	2.5	0	0.5	0.5	-
有	無処理	2.4	0.5			-

## ◀文献情報▶

## 成体体細胞の核移植により得られたクローンブタ

Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells

Irina A. Polejaeva\*, Shu-Hung Chen\*, Todd D. Vaught\*, Raymond L. Page\*, June Mullins\*, Suyapa Ball\*, Yifan Dai, Jeremy Boone\*, Shawn Walker\*, David L. Ayares\*, Alan Colman\* and Keith H. S. Campbell\*

\*PPL Therapeutics Incorporated, 1700 Kraft Drive, Blacksburg, Virginia 24060, USA

\*PPL Therapeutics, Roslin, Midlothian EH25, 9PP, UK

*Nature*, 407: 86-90 (2000)

1996年英国のCampbellらによりヒツジ胚由来の継代細胞の核移植、翌年1997年には同グループのWilmutらによりヒツジ成体の乳腺細胞の核移植により産仔が得られた。これらの結果はいったん分化した細胞でも条件を整えることで全能性を持ちうることを意味し、従来の受精卵由来細胞の核移植によるクローン個体数の限界をはるかに越えたクローン個体の大量生産の可能性を示した。以来、他の家畜やマウスでも同様の試みがなされ体細胞由来の核移植によるクローン個体が得られている。ブタではこれまで4細胞期胚割球の核移植により産仔が得られた報告はあるものの、分化した細胞を核給与体としたクローン個体は未だ得られていなかった。今年になりOnishiらによりScience誌で、PolejaevaらによりNature誌で相次いで体細胞由来のクローンブタの作出に成功したことが報告された。特にPolejaevaらは除核したMⅡ期卵子にドナー核を移植する従来の方法に加えて核移植した卵の前核をさらに別の前核期受精卵の除核した卵に移植する（ダブル核移植）というものであり、ここに詳細を紹介したい。

ドナー核の細胞として過排卵処理を施したメスブタの卵胞から吸引採取した顆粒膜細胞を用いている。以前からの研究によりドナー

核の細胞周期はG<sub>0</sub>期が有効であると考えられ、このG<sub>0</sub>期を導くために血清飢餓培養が行われていた。しかしこれらの細胞中のDNA含量を検討した結果、2倍体に満たないDNA含量の細胞が含まれることが明らかになった。いくつかの検討からコンフルエントにした顆粒膜細胞を（血清飢餓培養を行わず）トリプシン処理後細胞接着しない状態で保持した場合、正常な2倍体のDNA含量を持ちかつ細胞周期がG<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>期またはG<sub>0</sub>期であることが明らかとなり、ドナー核細胞としてこれらの細胞と血清飢餓培養を行った細胞と両方で比較検討している。考察では核移植が成功するドナー核の細胞は正常な2倍体のDNA含量を持ち、細胞周期がG<sub>1</sub>期のものである可能性を述べていた。

401個のダブル核移植を行った胚を7匹のレシピエントメスブタに移植した結果、最終的に2匹で着床しそのうちの1匹から5匹のクローンブタが得られた。彼らが成功のために留意したポイントとして(1)ドナー核細胞、レシピエントに使用した卵子あるいは受精卵いずれも生体メスブタから採取したのものを用いたこと（*in vivo* 由来の材料）、(2)核移植後の卵子の活性化にMⅡ期卵子および前核期受精卵の細胞質をうまく利用したこと（ダブル核移植）、(3)体外培養時間を最小限に抑え、再構築胚は2時間内にレシピエントメスブタの卵管に戻したことを挙げている。加えてブタの妊娠維持には4匹以上の胎児が必要とされているが、今回彼らはレシピエントメスブタ1匹あたり平均約57個もの再構築胚を移植したことも成功のポイントと思われる。

クローンブタ作出の成功により従来の家畜としてのブタのみならず、異種臓器移植を主に医学分野へのブタの利用がこれまで以上に期待されている。今後は実用化を目指した核移植の効率化がポイントになると思われる。（抄訳：木村直子 東北大学大学院農学研究科）

## ◀文献情報▶

## 酵母の代謝工学

Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*

Simon Ostergaard, Lisbeth Olsson and Jens Nielsen, Department of Biotechnology, Technical University of Denmark  
*Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 34-50 (2000)

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は最も研究が進んでいる真核微生物であり、その研究は人間も含めた真核生物細胞の理解に役立っている。一方、酵母は酒類醸造、食品製造に古くからに使われてきたのみならず、今日医薬産業でのさまざまなプロセスで利用されており、産業上極めて重要なものである。

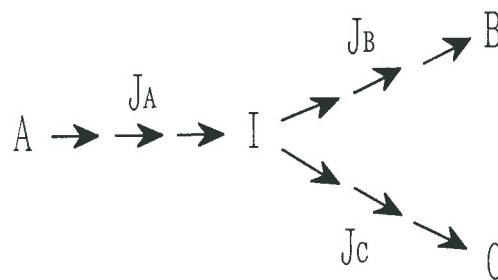
最近、生化学的情報や遺伝子工学を応用し、理論的解析を生かして細胞特性の改良を行うことを、代謝工学と呼ぶようになり、特に産業的利用の観点から酵母の代謝工学が盛んとなってきた。代謝工学のターゲットとしては、利用できる基質の範囲を広げること、生産性・収量を高めること、副生物を除くこと、プロセス機能を改良すること、細胞の特性を向上させること、及び異種蛋白の発現を含む生産物の範囲を拡大することなどである。

酵母を使った物質生産の開発改良に関して、まず簡単な例2点を紹介する。一つには、酵母により乳酸の生産を行なったもので、牛の筋肉の lactose dehydrogenase 遺伝子 (LDH-A) を *S. cerevisiae* で発現させることで、乳酸が 11g/liter/h の生産率で 20g/liter 生産された。酵母は酸耐性があることより、乳酸生産で細菌にかわるものとして使用できることが期待される。

次に、食品産業において魅力ある甘味料であるキシリトール生産について。この多量生産を目的に、*Pichia stipitis* の xylose reductase (XYL1) 遺伝子を *S. cerevisiae* で発現させることで95%の収量でキシロースからキシリトールを変換できるようになった。

以上は極めて単純な例であり、酵母の代謝経路を利用した物質の生産は、一般には一筋

縄では行かない場合がほとんどである。例えば、図のような単純な経路でBを多く生産することを考えよう。Bの収量は $J_B$ と $J_A$ のflux(流れ)比による。中間代謝物質Iが細胞内に蓄積しないとした場合、 $J_A = J_B + J_C$ であるから、 $J_C$ を減らすか削除することで $J_B$ の収量を増やすことができる。しかし、しばしばCの生成は細胞にとって重要な役割を持ち、ある特定の遺伝子破壊による $J_C$ の除去は細胞にとって致死か栄養要求性となることも多い。また場合によって、NAD(P)Hのような、他のいろいろな経路においても働いているコファクターによりfluxが決定されることがある。であるから、図のような単純な経路においても分岐ポイント周辺の完全な代謝ネットワークの解析が要求される。また一つの経路の流れを改良するためには、全く異なった経路を操作することで得られることもあり、細胞内すべての代謝ネットワークを把握し考慮



に入れることが重要である。

こうした細胞全体の代謝の流れを通して代謝の解析を行うことをPathway analysisまたはMetabolic flux analysis (MFA) と呼び、そうした解析を踏まえ、例えば酵母でのエタノール生産性の向上、またはキシロースを発酵する酵母の育種等が試みられており、今後の展開が期待される。

(抄訳：家藤治幸，国税庁醸造研究所)

## ◀文献情報▶

### 摂食によって誘導される 揮発性物質はリマメ葉の 防御遺伝子を活性化する

Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves

Gen-ichiro Arimura<sup>1,2</sup>, Rika Ozawa<sup>1,2</sup>, Takeshi Shimoda<sup>1,2</sup>, Takaaki Nishioka<sup>1</sup>, Wilhelm Boland<sup>3</sup> and Junji Takabayashi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Japan

<sup>2</sup>Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, Japan

<sup>3</sup>Max Planck Institute for Chemical Ecology, Germany

*Nature*, 406, 512-515 (2000)

植食者の加害ストレスにさらされた植物はさまざまな応答を示すが、その内いくつかの植物種ではハダニによって食害を受けると葉から揮発性物質が放出され、ハダニの天敵、捕食性ダニを誘引する。さらに食害を受けた葉だけでなく周辺の植物も影響を受け、捕食性ダニを誘引するようになることが知られている。本論文では、その揮発性物質が周辺の同種の植物の防御遺伝子を活性化し、その結果ハダニに対して抵抗性を示すようになることを明らかにした。

ハダニを接種したりマメ葉が入った容器と非接種葉が入った容器を、蓋付きのガラスコンテナに入れて保存した。ハダニを接種したりマメ葉（接種葉）からは揮発性物質が放出され、接種していないリマメ葉はそれを受容していると考えられる（受容葉）。そこで、それぞれの葉から全RNAを抽出して次の6種類の防御遺伝子、すなわち、塩基性タイプのPR-2, PR-3, 酸性タイプのPR-4, lipoxygenase (LOX), phenylalanine ammonia-lyase (PAL), farnesyl pyrophosphate synthetase (FPS) について、その発現パターンをRT-PCR法によって解析した。その結果、接種葉では6種類全ての遺伝子が発現し、受容葉でもPR-4を除いた5種類の

遺伝子が発現していた。この発現パターンはジャスモン酸による誘導パターンと同様であり、事実、ジャスモン酸生成の鍵酵素であるLOXの活性を測定したところ、接種葉だけでなく受容葉においても活性の上昇が確認された。さらに、この5種類の遺伝子の発現は、細胞内へのカルシウムイオンの流入とタンパク質のリン酸化/脱リン酸化が関わっていることも示されている。ハダニ接種の代わりに人為的に傷つけた葉を用いた対照区では、遺伝子の発現パターンは上記のものとは大きく異なっていた。

次に、接種葉から特異的に放出される揮発性物質についてGC-MSを用いて解析したところ、5種類の遺伝子の発現を誘導する物質として、(E)- $\beta$ -ocimene, (E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene (DMNT), (E,E)-4,8,12-trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraene (TMTT) の少なくとも3種類が同定された。しかしながら、人為的に傷つけた場合にはこれらの誘導は見られなかった。また、ある種の植物では、植物間のシグナル伝達をメチルジャスモン酸とメチルサリチル酸が担っているという報告があるが、本研究ではそのような結果は得られていない。

以上のことから、摂食されたりマメ葉では少なくとも3種類の特異的な揮発性物質が放出され、周囲のりマメ葉がそれを受け取って、5種類の特異的な防御遺伝子を発現するということが示されたが、本研究では実際にその葉が抵抗性を獲得しているか解析している。すなわち、接種葉からの揮発性物質と接種していない葉からのものでりマメ葉を処理し、その後のハダニに対する抵抗性を調べたところ、明らかに前者の方がハダニに対する抵抗性を獲得していた。

最後にこのような植物間のシグナル伝達のメカニズムが、植物を害虫から防御するための新たな方法につながる可能性を示唆しており、今後の展開が大変興味深い。

(抄訳：鈴木章弘，鹿児島大学理学部)

## ◀文献情報▶

魚類養殖における給餌管理  
システムへの摂食音の利用

Feeding sounds of turbot (*Scophthalmus maximus*) and their potential use in the control of food supply in aquaculture

J. P. Lagardère, and R. Mallekh

CNRS-IFREMER, CREMA L'Houmeau, France

*Aquaculture*, 189:251-258 (2000)

わが国の魚類養殖では、意外なことに給餌管理システムの省力化があまり進んでおらず、大規模養殖を営んでいる業者でも、自動給餌器すら使用せずにすべての給餌作業を人力で行っている場合がある。一方、欧米の大規模養殖では、給餌作業を含む養殖システム全体の集約化が進んでおり、僅か数人程度の人数で養殖場全体を管理していることも珍しくない。また、環境保護の観点から、養殖漁場の自家汚染（養殖魚の餌の食べ残しや排泄物による養殖環境の汚染）問題に対する意識も高く、養殖環境への負荷が少ない配合飼料の開発や、魚自身の自発的な摂餌リズムに合わせた効率的な給餌方法の研究などが盛んに行われている。

魚類は一連の摂餌行動（餌の捕食、吸入および咀嚼）において、口腔部を構成する内外骨格の摩擦や振動によって何らかの音を発している。今回紹介する論文の著者らは、turbot（欧州産の大型ヒラメの一種）が摂餌時に発する摂食音を音響物理学的に解析し、摂食音を摂餌活性の指標として給餌管理システムに応用できるかどうかを検討している。

陸上水槽（37m<sup>3</sup>）にて養殖している成長段階の異なる3群のturbot（平均魚体重：<300g, 500~800g, >1300g）を対象として、摂餌行動時に発生する摂食音（配合飼料を咀嚼する際に生じる鰓弓と鰓蓋の震動音）を録音し、録音データをフーリエ変換ソフトウェアを用いてデジタル化した。デジタル化された摂食音は、録音時間軸に沿って解析し、明らかに摂食音と判断される70サンプルについ

て周波数スペクトラム解析を行った。

その結果、turbotの摂食音は、周波数の異なる多くの純音から構成されており、その周波数域は0~10kHzと幅広いものであった。また、水中ポンプの音や配合飼料の散布音などのバックグラウンドノイズとは明らかに識別可能な音圧を有し、1/500~1/600秒未満の継続時間が短いパルス性の音であることも判明した。この摂食音の発生は、摂餌後1分以上に渡って断続的に確認された。さらに周波数スペクトラム解析結果からは、0~3kHzの周波数域では摂食音とバックグラウンドノイズを識別する事はできないが、5kHz以上、特に7~10kHzの周波数域では、摂食音とバックグラウンドノイズの音圧差が10~20dB程度あり、両者を明確に識別できることが明らかとなった。また、turbotの摂食音は摂餌活性の高い若年魚群（平均魚体重<300g）で大きく、成長段階が進むに伴って、5kHz以上の周波数域における音圧が下がる傾向が認められた。これらの結果から、著者らは、7~10kHzの水中音の音圧レベルを解析することによって、turbotの摂餌活性をモニタリングすることが可能になるのではないかと述べている。

turbotに限らず、養殖対象魚には肉食性魚類が多く、このような食性を有する魚類は一般的に幅広い周波数領域の摂食音を発するとされている。従って、他の養殖対象魚でも摂食音による摂餌活性モニタリングの可能性は十分考えられる。実用化に至るまではまだまだ多くの検討が必要であろうが、魚達が水中で一体どのような音をたてて食事しているのか一度は聴いてみたい気がする。

（抄訳：椎名康彦，マルハ株式会社中央研究所）

◀海外便り▶

## ペプチドの二次構造構築と応用の試み —ワシントン大学での1年半—

農林水産省 中国農業試験場  
野方 洋一

はじめに

1998年10月より1年半、科学技術庁長期在外研究員としてアメリカ合衆国シアトル市に在るワシントン大学の化学部にて研究する機会を得た。ワシントン大学は1861年に創立され、西海岸では最も古い公立大学の一つに数えられる。学生数はおよそ3万5千人で、医学系分野における学術的貢献が大きい。滞在中に所属したグループは、米国籍のSasaki教授と5人の大学院生、そして学部学生5人という構成であった。グループの柱とする研究は、生化学や生体材料工学分野で利用される機能分子を有機化学的手法で創製することであった。中でも、ポルフィリン分子の骨格を距離的に利用した素材の開発を得意とした。

今回の在外研究は、UWEB (University of Washington Engineered Biomaterial) というプロジェクトの中で行ったが、このことが大学の特徴的な一面を知る上で役に立った。

### 研究の概要

レセプターやリガンド、転写調節タンパク質他、多くのタンパク質が機能を発現する際には、それらの立体構造が重要な役割を果たしている。そこで、特定の二次構造を鋳型として作り、その一部にアミノ酸配列の可変部位を設ければ、タンパク質の低分子化が図られるとともに、二次構造の骨格を利用した機能性ペプチドの創製が可能になると考えられる。在外研究では、このようなアイデアに基づき、細胞膜の物性に関与するペプチドや抗

NOGATA Yoichi

〒721-8514 福山市西深津町6-12-1

菌性を有する膜ペプチドの創製を目標とした。対象とする二次構造には、比較的構造の単純な $\beta$ -ストランド-ループ- $\beta$ -ストランドを選んだ。N-末端及びC-末端側の $\beta$ 構造が14残基のアミノ酸、その間のループ構造が7残基程度のアミノ酸から成る一次構造とし、2本の $\beta$ 構造が疎水結合、静電結合、水素結合等で互いに補強し合うように設計した。また、アミノ酸の可変部位は片側5残基、計10残基とした。研究の手法としては、まず、可変部位をアラニンに固定し、固定部位を少しずつ変えたペプチドを作り、機器分析により立体構造と分子の会合状態を解析し、その結果に基づき、より強い構造になるよう固定部位を修正していった。その過程において、ランダム構造や $\beta$ 構造が得られることは予想していたが、 $\alpha$ -ヘリックスを形成するものが得られたことは意外であった。試しにその配列をホイール図にあてはめると、疎水結合と静電結合がうまく具合にかみ合った。また、ループ部分の配列変化で $\beta$ -構造が $\alpha$ -構造になり、その逆も起る結果には大いに興味を持たれた。

続いて安定性と流動性を併せ持つリン脂質二重層 (Supported Bilayer; SB) の構築に着手した。現在、産業的に最も利用されている脂質膜はSelf Assembled Monolayer (SAM) であり、生体材料の被覆剤やバイオセンサー、マイクロプリント技術に応用されている。しかし、単分子膜であるとともに流動性を持たないという欠点があり、より生体に近い特性を持つ脂質膜の開発が待たれている。SBの製作は、まず、ガラス板にコートした樹脂上にLangmuir-Blodgett (LB) 法でリン脂質単分子膜の下層を敷き、極性部位の一部を樹脂

とリンクさせることにより下層を安定化する。続いて、この上に同手法で上層を載せ、フリーの下層脂質と上層脂質の一部をクロスリンクさせて上層の安定化を図る。SB膜の安定性と流動性は、クロスリンクの程度を制御することにより調節される。下層の安定化はアミノ基を利用することですんなりと片がついたが、上下層の疎水末端部でクロスリンクするような脂質の製作には手間取った。用いるリン脂質は、上下層を重ねたときに自動的にクロスリンクしなければならない。加えて、修飾したリン脂質は水面上で単分子層を形成しなければならない。SN2反応、Micheal Addition, Diels Alder反応を試した結果、後二者が上記条件を満たすことを機器分析により確認した。ここまでで在外研究は終了し、論文を兼ねた報告書と発明の権利譲渡書を提出して帰国したが、SB膜の物性解析は生物材料工学部の共同研究者に託してあるので、その結果が待ち遠しい。今後は、Sasaki教授のアドバイスを仰ぎつつ、修得した技術を膜ペプチドの機能解析や機能性ペプチドの開発に活かしていきたい。

### プロジェクト研究を通して

ワシントン大学では、5年ほど前より

UWEBというプロジェクトを運営しており、理系の各学部と民間企業が連携してBiorecognitionやSurface Technologyに関する基礎から応用に至る研究・開発を統合的に推進している。当プロジェクトを担当することを聞いてはいたが、日本の職場と同じ様なものだろうと思い、別段構えることはなかった。しかし、大学の性格上、予期しないプログラムが盛り込まれており、場当たりに処理することも多かった。その一つであるが、研究を始めて間もなく一人の学部学生がやってきた。話を聞いてみると、UWEBが学部学生に奨学金を出しており、これを受けるものはプロジェクトに参加しなければならないとのことだった。驚いて事務局に問い合わせると、UWEBの主旨には人材の育成があり、参加者は実験技術を習得する機会を得るとともに、これを援助する義務もあるとの答えだった。以来半年、たどたどしい言葉で実験を指導することになった。同僚達から面白半分には冷やかされることも多かったが、実験しながらの会話に堅苦しさはなく、むしろ楽しい思い出になった。その他には、夏と冬の年2回、参加者が研究内容についてポスター発表する機会があった。これは学生にとっては単なる発表練習の機会であろうと勝手な想像をしていたが、実のところは就職活動の一大イ



写真 研究室のメンバーとバーベキューランチ。右後方の建物は、ビル・ゲイツ氏寄贈のメアリー・ゲイツホール。

ベントであった。会場にはプロジェクトに参加している民間企業に加えて、一般の企業からも大勢の来訪者があった。卒業の近い学生は、専用のボードに研究活動のレジメを張り付けたり、名刺を準備するものもいた。企業側からすれば、面接をするよりも学生の選抜は容易であろう。市内の一流ホテルを会場に選び、学長自らもスピーチするほどの熱の入れようであった。就職活動という緊張感がない私は、幾分物足りなさを感じたが、興奮した彼らの話に耳を傾けつつ豪華な料理を暫し堪能した。

### おわりに—シアトルでの生活

シアトルの気候は10月から5月の間、日が短いうえ、小雨の降る暗い日々である。降雪は滅多にないが、気温は1℃前後で動かない。この気候の入り口で赴任したので、これが半年以上も続くのかと気が重くなった反面、研究の進捗には役だったようだ。まれに太陽が顔を出すと、学生達は寒中にも拘わらずTシ

ャツになり、つかの間の日光を肌感じていた。6月に入り日が長くなると、突然雲が去り晴天の日々が変わる。この変化には気持ちが高揚し、室内にいることに欲求不満を感じた。7月から8月にかけての夏は、空気が透明で、緑がとても濃い。シアトルは周辺を寒帯雨林に囲まれ、リアス式の海岸線は穏やかなため、人々のアウトドア志向は半端ではない。学生達は浮かれてしまい、サマーオータも重なるであって、構内や大学の周りは閑散とした。私はこの時期から趣味の釣りを始め、2時間のドライブで行き着くスノホミッシュ川でのサケやマス釣りを楽しんだ。日本に戻り、灰色に護岸された川ばかりを見ると、あの川と魚達が懐かしく、また、愛おしくなる。自然と都会が調和したこの地で経験した事柄や共に過ごした仲間達の記憶は今でも鮮明であり、薄れることはないだろう。

最後に、在外研究の機会を与えて下さった科学技術庁、農林水産技術会議事務局ならびに中国農業試験場の方々にこの場をかりて深くお礼申し上げる。



ブレイン テクノニュースの  
バックナンバーご案内

## 第 81 号

2000 (平成12) 年 9 月15日発行

### 総 説

食用キノコが作る“体に良い”物質 ……河岸洋和  
国内情報

キノコの菌糸培養による有用物質の生産…堀内 勲  
ウイルスを利用した赤潮対策研究の現状と将来  
……………長崎慶三

飼料中アミノ酸組成の改善による

豚からの窒素排泄量低減技術 ……梶 雄次  
毛色関連遺伝子の多型を用いた

豚品種の推定 ……三橋忠由  
地域の先端研究

イチジクのフィック型品種に着生する

雄ずいを利用した交雑育種 ……野方 仁  
文献情報

胚発生における早期妊娠因子 …(抄訳：横尾正樹)

塩ストレス下での酵母遺伝子の発現

誘導DNAチップによる解析 ……(抄訳：楠田大輔)  
メチル化に影響を与えずにメチル化された  
遺伝子のサイレンシングを解除する

MOM遺伝子の突然変異 ……(抄訳：清水圭一)  
スフィンゴシン-1-リン酸受容体は脊椎動物の心臓の  
発生において細胞移動を制御する(抄訳：吉戒和剛)

海外便り

マツノサイセンチュウの故郷に

材線虫病微害化の手がかりを求めて

—ミズーリ大学における1年間 ……中村克典  
生研機構からのご案内；平成12年度「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」採択研究課題について。「新事業創出研究開発事業」課題採択について。平成12年度「新規融資課題募集」について。



#### 編集後記

- ◆ブレインテクノニュース第82号をお届けします。本号の表紙写真は、京都大学の光田展隆・佐藤雅彦両氏に提供していただいた「シロイヌナズナの花粉の形態」で、遺伝子操作により人工的に作出された雄性不稔株と遺伝子操作を加えていない野生株のものが示されてあります。両氏による雄性不稔株作出の研究は、花粉アレルゲンの抑制や遺伝子組換え花粉の選定、自家不和合性の研究の一つのモデルとして注目されており、両氏に総説の執筆をお願いしました。
- ◆国内情報では、高温高圧水処理による廃棄物の資源化技術について豊橋技術科学大学の佐藤伸明・大門裕之・藤江幸一各氏の共著で、アンチセンス遺伝子を用いた酒造用低グルテリンイネの育種について榎オリノバの丸田嘉幸・井上剛両氏共著により、またカイコの3眠化剤利用による細くしなやかな絹の生産について農水省蚕糸・昆虫農技研の木内信氏に、ロックウール脱臭装置の開発・実用化について生研機構の道宗直昭氏にそれぞれ紹介して戴きました。
- ◆地域の先端研究としては、イネ葉面菌によるイネいもち病の生物的防除研究を茨城県農総センター農業工学研の河又仁氏、及び天然の鮮度保持剤による柑橘果実腐敗防止研究を愛媛県果樹試の三好孝典氏に執筆していただきました。
- ◆文献情報は、畜産研究分野（木村直子氏）発酵研究分野（家藤治幸氏）、植物ゲノム研究分野（鈴木章弘氏）、水産研究分野（椎名康彦氏）について、海外便りは農水省中国農試の野方洋一氏にペプチド二次構造に関するワシントン大学での在外研究を紹介していただきました。（島山記）

#### 本誌著作物の複写利用等について

本誌掲載の論文・記事の複写・転載等を希望される方は、執筆者ならびに生物系特定産業技術研究推進機構（生研機構）の許諾を得て行って下さい。

ブレインテクノニュース（第82号）

平成12年11月15日発行

編集兼発行者 堤 英 隆

発 行 所 生物系特定産業技術研究推進機構（生研機構）

〒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

e-mail kikaku@tokyo.brain.go.jp

URL <http://www.tokyo.brain.go.jp/>

©Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 2000