

表紙説明

トビロウカの経卵伝搬性共生微生物
 ウンカ・ヨコバイ類には共生微生物が存在し、経卵
 伝染によって子虫に伝えられる。これらの微生物は
 卵ではシンビオントボールに存在する(左下、矢印)。
 イネの葉面微生物 *E. herbicola* を散布したイネ葉上
 で飼育したトビロウカの卵の切片を金コロイド
 抗体電顕法で観察したところ、卵の内部に抗体と反
 応する細菌が多数観察された(中央および右下)。こ
 のことから卵の中の共生微生物はイネの葉面微生物
 に由来することが明らかにされた。(補足、編集後記)

(写真提供 平八重一氏)

本号の紙面

国内情報	1
花卉特異的転写調節因子遺伝子、甘藷焼 耐の香、ウルトラマイクロ電極、バナザ ケ筋肉のプロテアーゼと軟化現象	
出資プロジェクト情報	12
ウシ人工卵管システム	
地域の先端研究	15
麦類雪腐病の血清学的診断技術	
文献情報	17
マメと根粒菌の関係、病原糸状菌抵抗性 トランスジェニック植物、トマトのエチ レン合成制御	
海外便り	20
マサチューセッツ工大留学後記	
国際学会レポート	22
国際木材およびパルピング化学シンポジ ウム	
特別情報	25
細胞育種技術の進捗状況 1991年度	

口 絵

国内情報

高辻博志

花卉特異的転写調節因子遺伝子の単離……………1

太田剛雄

甘藷焼酎の特徴香の生成機作……………4

末永智一

ウルトラマイクロ電極を用いた細胞内センシング……………6

山下倫明・小長谷史郎

ブナザケ筋肉のプロテアーゼと軟化現象……………8

出資プロジェクト情報

及川胤昭

ウシ人工卵管システム開発への試み……………12

地域の先端研究

竹中重仁

麦類雪腐病の血清学的診断技術の確立……………15

文献情報

マメと根粒菌の“密接な関係”の解明にむけて……………17

病原糸状菌 *Rhizoctonia solani* 抵抗性トランスジェニック植物の作出……………18

細菌由来の酵素遺伝子導入トマトにおけるエチレン合成制御……………19

海外便り

糸原重美

マサチューセッツ工科大学留学後記……………20

国際学会レポート

細谷修二

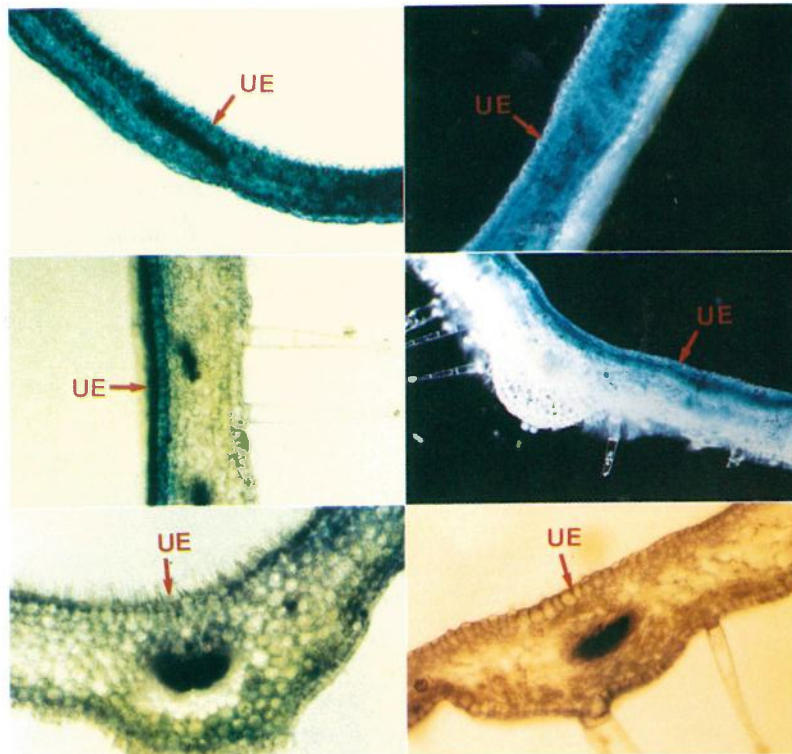
第6回国際木材およびパルピング化学シンポジウムに出席して……………22

特別情報

中島臯介

細胞育種技術の進捗状況 1991年度……………25

花卉特異的転写調節因子遺伝子の単離 (本文 1 ページ)



花卉切片のGUS遺伝子によるヒストケミカル染色

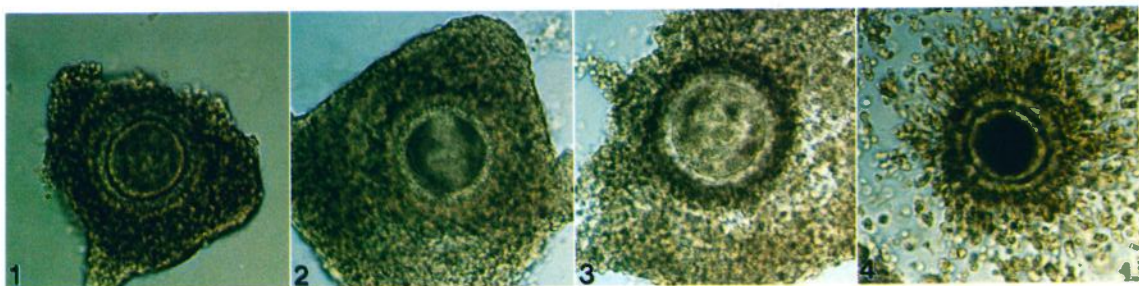
左側; *EPSPS* プロモーターによる発現, 右側; *EPF1* プロモーターによる発現。
上段; 花卉上部, 中段; 花卉中央部, 下段; 花卉下部, UE; 上側上皮細胞

ブナザケ筋肉のプロテアーゼと軟化現象 (本文 8 ページ)

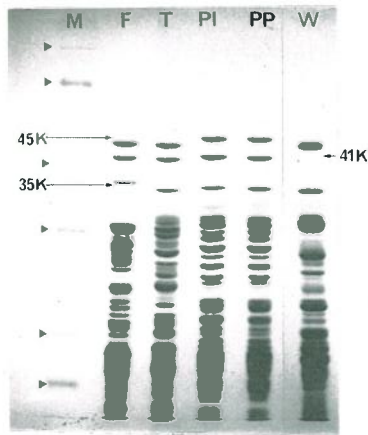


ブナザケの異常軟化肉 (指で軽く圧したところ)

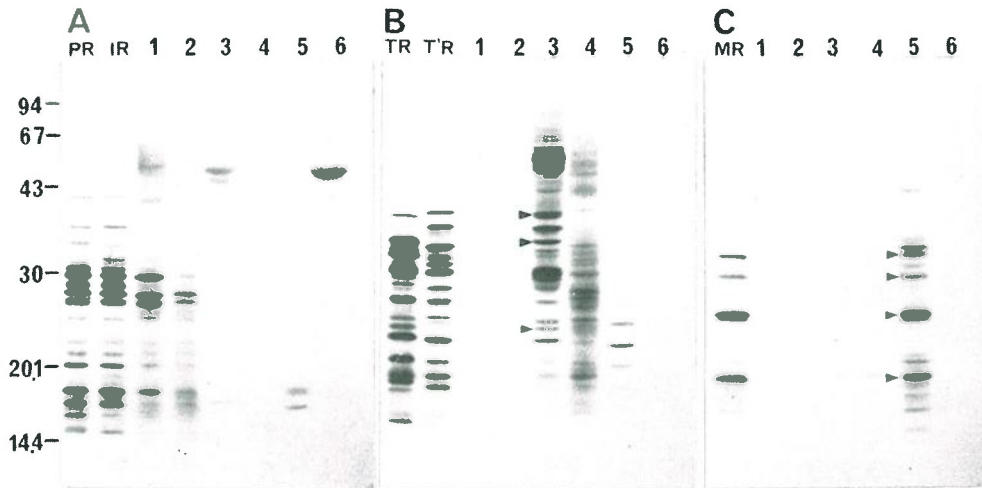
ウシ人工卵管システム開発への試み (本文 12 ページ)



タイプ分けされた4種の卵丘細胞——卵子複合体 (各写真の説明は本文を参照されたい)

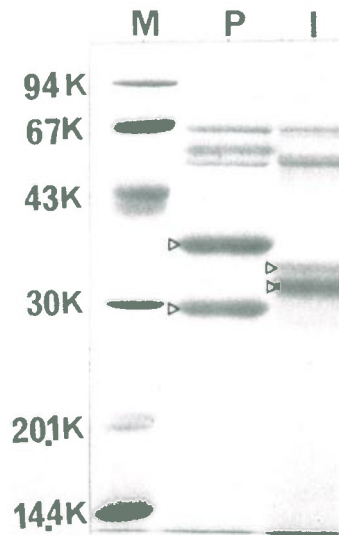


1. 各種雪腐病菌とコムギのリボソームタンパク質の電気泳動パターンの比較
 M: 分子量マーカー, F: *F. nivale*,
 T: *T. incarnata*, PI: *P. iwayamai*,
 PP: *P. paddicum*, W: コムギ



2. ウェスタンブロット法による感染コムギ葉粗汁液からの各菌の検出

A: *P. paddicum* の抗リボソーム血清
 B: *T. incarnata* の抗リボソーム血清
 C: *F. nivale* の抗リボソーム血清
 PR: *P. paddicum* のリボソーム
 IR: *P. iwayamai* のリボソーム
 TR: *T. incarnata* のリボソーム
 T'R: *T. ishikariensis* のリボソーム
 MR: *F. nivale* のリボソーム
 1: *P. paddicum* の感染コムギ葉
 2: *P. iwayamai* の感染コムギ葉
 3: *T. incarnata* 感染コムギ葉
 4: *T. ishikariensis* 感染コムギ葉
 5: *F. nivale* 感染コムギ葉
 6: 健全コムギ葉
 左の数字は分子量, 矢印は各菌のリボソームの特徴的なバンドを示す。



3. 各種褐色雪腐病菌の細胞壁タンパク質の泳動パターン
 M: 分子量マーカー, P: *P. paddicum*,
 I: *P. iwayamai*
 矢印はPとIの特徴的なバンドを示す。

国内情報

花卉特異的転写調節因子遺伝子の単離

農林水産省 農業生物資源研究所 遺伝子発現調節研究室

高辻 博志

1. はじめに

多細胞生物では、それぞれの細胞の中でどの遺伝子が発現するかが主にその細胞の性質を決定し、細胞タイプならびに組織による細胞の形態や機能の違いとなって現われる。このような遺伝子の発現は多くの場合、その遺伝子の mRNA への転写開始の段階で調節されている。一般的に遺伝子の開始領域（プロモーター）近傍には、TATAbox とそのさらに上流にシス領域と呼ばれる DNA 配列が存在する。このシス領域に、その DNA 配列を特異的に認識するトランス因子が結合する。そして結合したトランス因子が、TATAbox に結合した基本的な転写因子と RNA ポリメラーゼとの複合体と相互作用することによって、遺伝子の転写が活性化されたり抑制されたりする。このような転写調節の基本的な機構を解明することは、植物に遺伝子を導入して形質転換する際に、導入遺伝子を選択的、効率的に発現させる上でも重要と考えられる。

ここでは、ペチュニアの花に特異的に発現する遺伝子について、その発現を組織特異的、細胞タイプ特異的に制御していると考えられるシス領域とトランス因子の解析について紹介する。

2. ユニークな発現パターンを示す

EPSPS 遺伝子

5' エノールピリビン酸 3 リン酸合成酵素 (EPSPS) は芳香族アミノ酸やリグニン、アントシアニン、フラボノイド等の二次代謝産

物に至るシキミ酸経路の初期段階を触媒する重要な酵素であり、農薬グリフォセートの標的酵素としても知られている¹⁾。ペチュニアにおいてこの酵素をコードしている遺伝子 (EPSPS) は、生長した植物体では花卉において、芽ばえでは根、胚軸の生長点付近および毛じにおいて特異的に発現する。また花卉における発現量は開花にともなって急激に上昇する。つまり EPSPS の発現は組織特異的ならびに分化段階特異的に制御されている。このような EPSPS の特異的発現制御は、遺伝子の 5' 上流の DNA 配列（プロモーター領域）によって支配されている²⁾。

3. ペチュニア核抽出液中のトランス因子の検出

EPSPS プロモーターの色々な部分を欠失させた DNA 断片をレポーター遺伝子 (β -グルクロニダーゼ, GUS) に結合し、ペチュニアに形質転換する実験によって、プロモーター中 -823 から -1752bp の領域の中に特異的発現を支配する DNA 領域が存在することが示された^{2, 3)}。この領域に特異的に相互作用するトランス因子を検出するため、ペチュニア花卉の核抽出液を用いて *in vitro* フットプリント分析を行った結果、四つの強いタンパク質結合配列 (EP1~EP4) を見いだした (図 1)。このうち、EP2, EP3, および EP4 の三つは塩基配列に若干の相同性が見られるが (EP2rev: CAATTTACTGGGATAG, EP3: CCATTACTTTAATCCAAATCT, EP4rev: ATTATTACTATAATCG), EP1 配列 (TGATTTTGACAGTGTCACCTT) は他の三つとは全く異なる配列であった。このよう

に結合配列の相同性がこのように低いにもかかわらず、competition実験によると、一見四つの配列に同じトランス因子が結合するように見える。またEP1配列のうち2塩基を置換したEP1m配列(TGATTTTCAGAGTGTCACCTT)は結合活性を示さないことから、配列特異性の高い結合活性であることがわかった。

4. トランス因子遺伝子の単離と解析

これらのDNA配列に結合するトランスファクターをコードする遺伝子を単離するため、サウスウエスタン法によって、結合配列EP1に対するDNA結合活性を指標にして、ペチュニア花卉のcDNA発現ライブラリーをスクリーニングした。150万個のクローンをスクリーニングした結果、EP1配列に特異的に結合するDNA結合活性を示すクローンEPF1が得られた。DNA塩基配列を決定したところ、EPF1はCys₂/His₂タイプジンクフィンガーモチーフ(図1a, b)と呼ばれるDNA結合領域を二つ含むジンクフィンガープロテインであることがわかった。これまでに報告されているジンクフィンガープロテインには、ショウジョウバエの胚発生における

細胞分化の調節に関与するKrüppelや、ホルモン応答を媒介するグルココルチコイドリセプターなどの例のように、転写調節において重要な働きをすることが知られているトランス因子であるものが多く含まれる。最近、植物からもトランス因子の遺伝子の単離に関する報告が相次いでいるが、ジンクフィンガープロテイン遺伝子の単離はEPF1が初めてである。

EPF1遺伝子(EPE1)の遺伝子産物を解析するため、完全長のcDNAをバキュロウイルスの遺伝子発現系で発現させた。得られた遺伝子産物のDNA結合特異性を調べたところ、EPF1はEP1配列には結合するが、二塩基の変異をもつEP1m配列には弱い結合活性しか示さなかった。また、EP2及びEP3配列にも弱い結合活性しか示さなかった。EDTA,またはZn²⁺のキレーターである1,10-フェナントロリンによってEPF1を前処理すると、いずれの処理によってもDNA結合活性が失われた。このことは、ジンクフィンガーモチーフが実際にDNA結合領域として機能していることを示している。一方、ペチュニアの核抽出液で検出されたDNA結合活性はこれらの処理によって影響を受けなかった。従って、EPF1は核抽出液に検出されたDNA結合タンパクとは異なるものであると考える。しかしながら、このことはEPF1がartefactであることを意味するわけではない。なぜなら、一つの結合配列が複数のトランスファクターと相互作用し、核抽出液を用いた結合実験では検出されないトランスファクターも存在する例がいくつか知られているからである。

EPF1がEPSPSの発現を制御するトランスファクターであるためにはさらにいくつか条件が必要である。その中で、EPF1とEPSPSの発現パターンが空間的、時間的に一致しているということ、つまりEPF1タンパクが存在する時はいつもEPSPSが発現している事が証明されれば、EPF1がEPSPSを正に制御するトランスファクターであることの有力な証拠になる。そこで、生長後のペチュニアにおけるEPF1とEPSPSの発現パターン

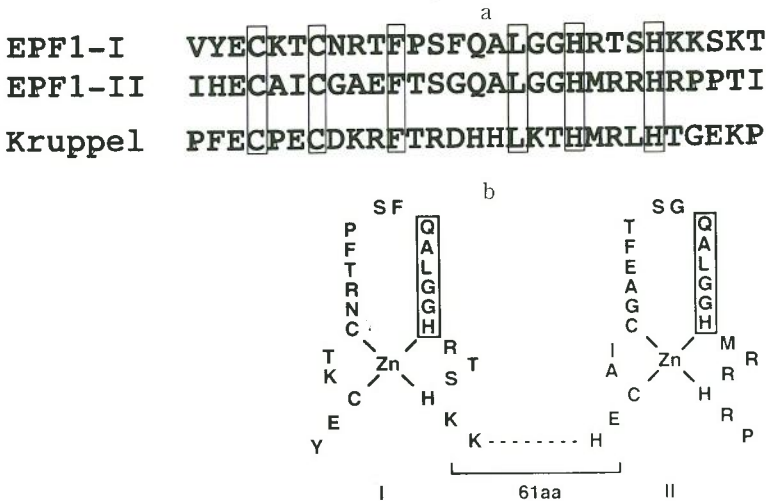


図1 EPF1アミノ酸配列中に見られるジンクフィンガーモチーフ
 a) EPF1に含まれる二つのジンクフィンガーモチーフ(EPF1-I, EPF1-II)とショウジョウバエのKrüppelのジンクフィンガーモチーフとの比較。Cys₂/His₂タイプのジンクフィンガーに特徴的な六つのアミノ酸が保存されている(ボックスで示した)。
 b) EPF1のジンクフィンガーの2次構造。Znイオンとの結合によってできた指のような構造に名前の由来がある。

ンをNorthern法によって比較した。すると図2に示すように、*EPF1*の発現は、*EPSPS*と同じく花弁特異的であり、花弁での発現は開花にともなって急激に上昇する、つまり*EPF1*と*EPSPS*の発現パターンは空間的、時間的に平行していることがわかった。

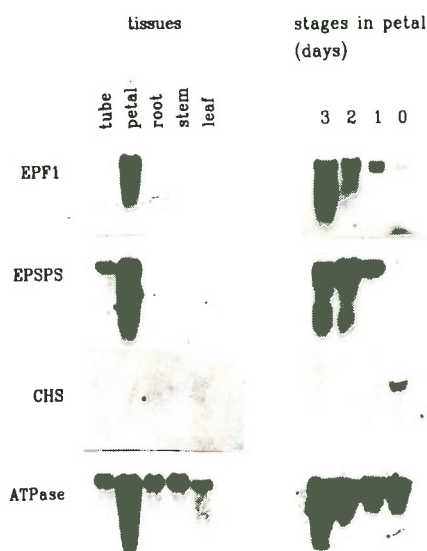


図2 Northern分析

*EPF1*遺伝子と*EPSPS*遺伝子は共に花弁(petal)特異的に発現し、花弁下部(tube)、茎(stem)、葉(leaf)、根(root)にはほとんど発現していない。また花弁における発現量は開花に伴って上昇する。*CHS*; chalcone synthase, *ATPase*; mitochondria *ATPase* β -subunit.

5. *EPF1*プロモーター活性の解析

*EPF1*と*EPSPS*の発現パターンをさらに微視的に細胞タイプレベルで比較するため、 β -グルクロニダーゼ(*GUS*)遺伝子をレポーター遺伝子として組織化学的染色によって両遺伝子のプロモーター活性を比較することにした。まず、ペチュニアのゲノミックDNAライブラリーをスクリーニングして*EPF1*を含むクローンを単離し、このうちプロモーター活性をもつと思われる遺伝子上流のDNA断片(約2 kb)を*GUS*遺伝子につなぎ、ペチュニアに導入した。生長後の形質転換植物について*GUS*活性の測定およびヒストケミカル染色を行なったところ、花弁に特異的に

活性が検出され、その活性は開花にともなって急激に上昇した。しかも、細胞タイプ別に見ると、花弁の上部ではすべての細胞タイプに活性が見られるが、中間部では上側の上皮細胞にのみ活性に限られ、下部では全く活性が見られなかった(口絵1)。これらの発現パターンは*EPSPS*プロモーターによるものと極めてよく似ていた。さらに、芽生え時期における活性を調べたところ、根、胚軸の生長点および毛じに発現が見られ、ここでも*EPSPS*プロモーターによるものと非常によく似ていた。このように両遺伝子の発現パターンが細胞タイプレベルで比較しても時間的、空間的に平行していることは*EPF1*が*EPSPS*の正の転写因子であることをさらに支持している。

6. *EPF1*による*EPSPS*プロモーターのトランスアクティベーション

最近になって、スイスの共同研究者 Gunther Neuhaus 博士から、マイクロインジェクションによって*EPF1*をコードするRNAをペチュニアの葉(本来*EPSPS*が発現していない組織)に導入すると、*EPSPS*プロモーターにつないだ*GUS*レポーター遺伝子が活性化された(トランスアクティベーション実験)という連絡があった。これは、*EPF1*が*EPSPS*を正に調節するトランス因子であることをさらに直接的に支持する結果である。

7. おわりに

以上の結果によって、*EPF1*が花弁特異的な遺伝子発現を制御するトランスファクターであることが示されたが、*EPSPS*も含めて花に特異的に発現する遺伝子の発現調節機構が完全に解明できたわけではない。恐らく、それぞれ異なった役割をもつ複数のトランスファクターによって複雑に調節されているであろう(筆者は現在第2のトランスファクターの候補であるDNA結合タンパクの遺伝子を単離し、解析を進めている)。さらにまたそれらのトランスファクター自身の発現も別

の上位にあるトランスファクターによって制御されているかもしれないし、トランスファクターとしての機能がリン酸化などのタンパクレベルでの修飾によって調節されている可能性もある。そして、植物ホルモン等がそれらの調節機構を始動させる引き金になっているのではないかと筆者は考える。今後さらに、このブラックボックスを少しずつ解き明かしていくと共に、得られた知見と材料を生かして、花きの形質転換等に 응용して行きたいと思う。なおこの研究の多くの部分は、筆者が米国 Rockefeller 大学 Nam-Hai Chua 教授の研究室において、現九州農試の森昌樹博士

の協力を得て行なったものである。この研究の詳細については原報⁴⁾を参照されたい。

文 献

- 1) Steinrucken, H.C. and N. Amerheim (1980) *Biochem. Biophys. Res. Communication*, 94 : 1207-1212
- 2) Benfey, P.N. and N.-H. Chua (1989) *Science*, 244 : 174-181
- 3) Benfey, P.H., H. Takatsuji, L. Ren, D.M. Shah, and N.-H. Chua, (1990) *Plant Cell*, 2 : 849-856
- 4) Takatsuji, H., M. Mori, P.N. Benfey, L. Ren and N.-H. Chua (1992) *EMBO J.* 11: 241-249

国内情報

甘藷焼酎の特徴香の生成機作

国税庁 醸造試験所

太田 剛雄

甘藷焼酎は特徴的な香りを持つが、これに注目し、まず、この香りに寄与する成分を明らかにし、さらにこの成分の甘藷焼酎製造工程における生成機作を明らかにすることにより、甘藷焼酎製品の多様化を図ることを試みた。

1. 甘藷焼酎の特徴香

まず、甘藷焼酎の原料甘藷に由来すると考えられる特徴的な香味に寄与する成分の分離・同定を試みた。常法分画の結果、中性区分に強い原料特性香が感じられ、さらにこれをシリカゲルカラム上で分画したところ、ヘキサノール酢エチ (9 : 1) で溶出される画分に強い原料特徴香があった。これを、GC および GC-MS により分離・同定したところ、この画分には量的には脂肪酸エチルエステル、数種のモノテルペンアルコール、酢酸フェニ

ルエチルが多く存在した。分離した各成分をにおいかぎ法により官能的に評価した結果、中性区分中のリナロール、シトロネロール、 α -テルピネオール、ネロール、ゲラニオール等のモノテルペンアルコールが甘藷焼酎の特徴香にとって、重要な寄与をしていることが明らかになった。これらのモノテルペンアルコールは他の麦焼酎、米焼酎からは検出されず甘藷焼酎に特有の成分であり、麦焼酎に添加することにより、甘藷焼酎様の香味を再現できた。

2. 甘藷中のテルペンアルコール配糖体

当初は甘藷焼酎のモノテルペンアルコールは原料甘藷からの持込みと考え、甘藷の水蒸気蒸留を行った。すりつぶした生甘藷の大蒸気蒸留物中にはゲラニオール、ネロール、p-menth-2-en-7-ol が多く含まれ、リナロール、 α -テルピネオールはきわめて少量しか含まれなかった。これに対し、形を崩さずに蒸し

OHYA Takeo

た甘藷の水蒸気蒸留物にはこれらのモノテルペンアルコールはいずれも痕跡量しか存在しなかった。このことは甘藷中にはテルペンアルコールは結合態で存在し、切断されたり、すりつぶされたりしたときに甘藷の内在酵素によってテルペンアルコールが遊離したものと推察された。

そこで、甘藷からグリコシドフラクションを調製し、TLCにより分画し、主要なモノサッカライドフラクションをGC-MS分析した。その結果、リナリル- β -グルコシド、 α -テルピニル- β -グルコシド、ネリル- β -グルコシド、ゲラニル- β -グルコシドをTMS誘導体として同定した。一方、甘藷焼酎蒸留廃液から同様の方法で調製したグリコシドフラクションには α -テルピニル- β -グルコシドのみが含まれた。

さらに、甘藷のグリコシドフラクションをアーモンドの β -グルコシダーゼであるエムルシンで分解すると、主に、ゲラニオールおよびネロールが遊離し、同様の結果が焼酎白麴の粗酵素液でも得られることから、焼酎白麴の β -グルコシダーゼの関与が推察された。

3. 焼酎白麴の β -グルコシダーゼ

焼酎白麴から分子量約11万の β -グルコシダーゼを精製し性質を調べた。最適pHは5.0で、pH2.3~9.0で安定であった。最適温度は60℃で、60℃以下で安定であった。エタノール濃度10%で活性の90%、20%で活性の70%を維持した。また、この酵素は広い範囲の β -グルコシドに活性があったが、セロビオースに対して強い活性があり、3級アルコールの β -グルコシド特に α -テルピニル- β -グルコシドに対しては活性が弱かった。甘藷中に存在するモノテルペンアルコール- β -グルコシド、酵素分解されて生じるアグリコン、蒸留廃液中に存在するモノテルペンアルコール- β -グルコシドを考え合わせると甘藷中の α -テルピニル- β -グルコシドは分解されずに蒸留廃液に移行し、他の β -グルコシドが分解されて生じたアグリコンは蒸留中に変換されて製品に移行するものと推察さ

れた。

4. 製造工程中のモノテルペンアルコールの変換

焼酎製造工程中のモノテルペンアルコールの変換についてモデル系で検討した。ゲラニオールは酸性高温下でリナロールに、ネロールはリナロール、 α -テルピネオールに変換された。一方これらの β -グルコシドは比較的安定であった。変換速度は、水素イオン濃度に比例し、温度に依存した。温度については、減圧蒸留を想定した、50℃、1hrの反応ではほとんど変換は起こらなかった。また、ゲラニオール、ネロールは焼酎酵母によって、シトロネロールに変換された。また、蒸留中にモノテルペンアルコールの変換と留出が並行して起こっていることが示唆された。

5. 仕込試験の結果

これまでに得られた結果をもとに、醪（もろみ）に持ち込む β -グルコシダーゼ活性を調整した仕込試験を行った。白麴の β -グルコシダーゼ活性は製麴工程の終盤にあらわれた。白麴仕込と β -グルコシダーゼ活性をほとんど含まない酵素剤仕込で製造した甘藷焼酎を2点嗜好法で官能検査した。すなわち、白麴仕込と酵素剤仕込の2者を提示し、どちらが甘藷焼酎の香味が強いかを判断させたところ、36名のパネラーのうち28名が白麴仕込の方が甘藷焼酎の香味が強いと答えた。これは5%の危険率で有意である。このことは、白麴中の β -グルコシダーゼ活性が酵素剤には含まれない、甘藷焼酎の特徴香に寄与する酵素活性であることを示唆しており、また、 β -グルコシダーゼ活性を調整することにより多様なタイプの甘藷焼酎の製造が可能であることを示している。

6. まとめ

以上の結果をまとめると、図1に示すような生成機作により、甘藷焼酎の特徴的な香味

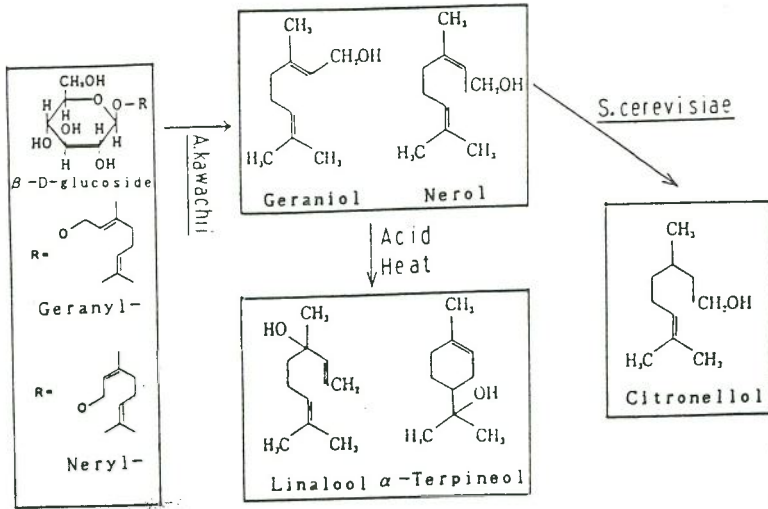


図1 甘藷焼酎特徴香の生成機作

が生成することが推察される。まず、原料蒸し甘藷中の含まれるモノテルペンアルコール- β -グルコシドのうち、ゲラニオールおよびネロールの β -グルコシドが焼酎醪中で焼酎麴の β -グルコシダーゼにより加水分解され、次に、遊離したゲラニオールおよびネロール

は焼酎酵母によりシトロネロールに、また、蒸留中に酸と熱によりリナロール、 α -テルピネオールに変換されて製品に移行し、甘藷焼酎の香味の発現に寄与する。

したがって、醪に持ち込む β -グルコシダーゼ活性を調整することにより、甘藷焼酎の品質の多様化が図れるものと期待される。このように、焼酎麴が液化・糖化酵素源としてだけでなく焼酎香味の発現に寄与していることは興味深いことと思われる。また、 β -グルコシダーゼ以外のエキソグリコシダーゼの寄与についても興味もたれる。

文 献

- 1) Ohta, T. et al. (1990) *Agric. Biol. Chem.* 54: 1353-1357
- 2) Ohta, T. et al. (1991) *Agric. Biol. Chem.* 55: 1181-1186
- 3) Ohta, T. et al. (1991) *J. Ferment. Bioeng.* 72: 347-351
- 4) 太田剛雄ら (1991) 醸協 86: 536-539

国内情報

ウルトラマイクロ電極を用いた細胞内センシング

東北大学 工学部
末永 智一

1. はじめに

pHメーター、酸素電極、バイオセンサーなど電気化学現象の計測に基礎を置く測定機器は、小型で操作が簡便しかも信頼性が高いことから、広い分野で化学分析に用いられている。これらの機器で使用されている電極のサイズはmm~cmのオーダーであるが、近年のマイクロテクノロジー、バイオテクノロジーの進展にともない、微小領域の計測に適用可能なマイクロ電極が開発されるようになった。これまで種々のタイプのマイクロ電極

が作成され、多岐にわたる計測に使用されている。本稿ではその中でも、先端径が1ミクロン程度のウルトラマイクロ電極を用いた細胞内センシングに関して、我々の研究を紹介したい。なお、本稿では金属などの導電体材質と、それを保持するためのガラスなど周辺部を含めて“電極”と呼ぶことにする。

2. マイクロ電極の特長

マイクロ電極を用いた電極反応に関しては、理論的側面も含め種々の検討がなされ多くの知見が得られている。その特徴を列記すると以下のようなになる¹⁾。

MATSUE Tomokazu

- 有機溶媒あるいは電解質濃度が極端に低い高抵抗溶媒中での計測が可能であり、短時間での過渡応答を追跡できる。
- 電極表面への物質供給が速やかに起こるため、高い電流密度で反応を行うことができる。
- 電極径が小さいため極微小領域での電気化学計測が可能である。

我々は、cの特徴、特に生体系への適用に重点を置きこれまで種々の検討を進めてきた。生きた単一細胞内での電気化学計測は、生命活動を維持するために生体内で効率よく、しかも整然と進行する各種化学反応を理解するうえで極めて重要である。これまで、電解液を充満したガラスキャピラリーを用いたポテンシオメトリックな計測（電位差計測）が行なわれ、細胞膜間のイオン移動、膜電位変化などの現象の解明に大きく貢献した。しかし、この計測法では得られる情報に限界があった。一方、マイクロ電極でアンペロメトリックな計測（酸化還元反応に起因する電流の測定）を行なうと、酸化還元種の濃度を評価でき、また単一細胞内での電子移動反応を直接計測できる。この手法は、ポテンシオメトリック計測とは別の観点で、生体機能の解明する際の有力な測定法となる。

3. ウルトラマイクロ電極の作製法

これまで作製されたマイクロ電極は、数ミクロンの導電性細線を適当なシール剤で被覆したものであり、電極先端径は数十ミクロンであった。細胞内での電気化学計測を可能とするには、導電性材料の極微細化だけでなく、絶縁部も含めた電極径を微小化する必要がある。我々は、ガラスキャピラリー内部に銀（無電解メッキ法）やカーボン（ブタンなどの熱分解）を析出させ、先端部を研磨することにより、ウルトラマイクロ電極を作製した。この電極は、先端径が1ミクロン程度で機械的強度があり、細胞内に挿入し得る²⁾。細胞内の酸素濃度のセンシングを行う際には、微量の白金を触媒として先端部に電極析出させた（図1）。

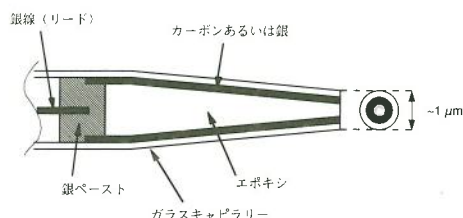


図1 ウルトラマイクロ電極の構造

4. 単一細胞内での酸素センシング

作製したウルトラマイクロ電極を用いると、アンペロメトリックに細胞内物質の定量を行なうことができる³⁾。まず、マイクロマニピュレーターにより電極を植物細胞であるハネモプロトプラストに挿入し、細胞内酸素濃度計測を行なった。さらに、光照射の影響を調べた。酸素は0Vvs銀/銀塩化銀電極(Ag/AgCl)より負の電位で還元される。そこで、酸素還元反応が速やかに起こる-0.55Vに電極電位を保ち、光照射した場合の細胞内酸素濃度変化を観測すると、図2に示すような結果が得られた。光合成は電子伝達を行う明反応と、炭酸ガス固定を行う暗反応から構成される。酸素発生速度は、この二つの過程の遅い反応に支配される。図2の結果は、光強度が大きい場合には、照射直後の酸素発生速度は明反応律速であるが、その後暗反応律速に転ずることを示している。一方、光強度が弱い場合には、全過程が明反応律速となっている。細胞内酸素濃度から直接酸素発生速度を決定することも可能である。例えば、直径80

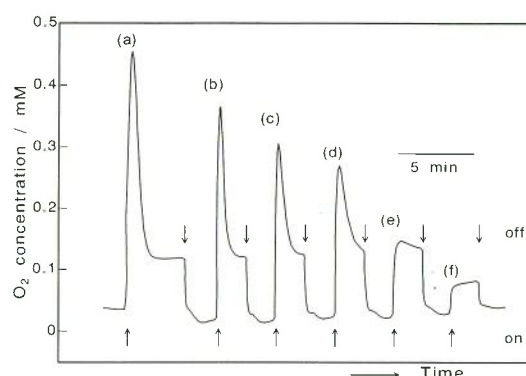


図2 光ON/OFFに対するプロトプラスト内酸素濃度の変化

光強度：a, 25klx; b, 18klx; c, 10klx; d, 7klx
e, 2.5klx; f, 0.7klx

μm の単一細胞に 25klx の光を照射した場合には、明反応速度は $5 \times 10^{-13} \text{ mol/s}$ 、暗反応速度は $1 \times 10^{-13} \text{ mol/s}$ の酸素発生速度に対応する。また、炭酸ガス濃度を増加させると、光照射にともなう酸素発生速度も大きくなった。この現象は炭酸ガス濃度の上昇により、光合成が促進されたことに起因している。ここで示したウルトラマイクロ電極を用いると、単一細胞レベルで光合成能を評価できる。また、応答が迅速であることから、細胞内の高速反応を追跡でき、細胞内反応の解析に使用できる。

5. 単一細胞膜の物質透過

細胞膜は高い物質透過選択性を示すことが知られている。そこで、ハネモプロトプラスト内に挿入したウルトラマイクロ電極上での酸化還元電流を計測することにより、いくつかの化学種の膜透過係数を決定した⁴⁾。その結果、酸素、1,3-ジクロロベンゾキノン、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ の膜透過係数は、それぞれ $>1.3 \times 10^{-4}$ 、 1.1×10^{-5} 、 $<2.5 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ となった。光合成阻害剤などの薬剤には酸化還元性

化合物が多いが、このような物質の膜透過現象を実細胞で定量的に評価できる。

6. おわりに

以上のように、ウルトラマイクロ電極を用いると、細胞内酸化還元種の定量など単一細胞レベルで電子移行反応を捉えることが可能である。この種の電極は新しいセンシング用ツールとして、細胞機能の解明のみならず極微小領域での反応解析に有力な情報を提供してくれるものと期待している。

文 献

- 1) Fleischmann, M., S. Pons, D.R. Rolison, D.P. Schmidt(1987) *Ultramicroelectrodes* Datatech Systems; Matsue, T., I. Uchida (1991) *Chemical Sensor Technology, Vol. 3* Kadansha: 263-279
- 2) Uchida, I., T. Abe, T. Itabashi and T. Matsue, (1990) *Chem. Lett.* 1227-1230
- 3) 末永智一・青木純・内田勇 (1991) *BME* 5: 15-22
- 4) 末永智一ら (1990) 第5回生体機能関連化学シンポジウム講演要旨集, p. 54

国内情報

ブナザケ筋肉のプロテアーゼと軟化現象

水産庁 中央水産研究所
山下倫明・小長谷史郎

はじめに

産卵期サケ、いわゆるブナザケには他の魚種には見られない著しい肉質軟化現象がしばしば認められる。人工採卵のために捕獲し、成熟を待つため蓄養したサケや、沿岸で定置網で漁獲したものを加工する際に、軟弱化した魚肉、ときにペースト状のものがある。こ

の現象には、筋肉の内在性プロテアーゼ(タンパク分解酵素)であるカテプシンLが関与することが明らかとなった。ブナザケにおけるカテプシンの諸性質と肉質軟化への関与について解説する。

1. ブナザケの肉質と筋肉軟化融解現象

北洋産サケ、あるいは春か夏にかけて日本近海で漁獲される「トキシラズ」などの索

YAMASHITA Michiaki and KONAGAYA Shiro

餌期のサケと比べて産卵期のサケは一般に品質が劣る。これは、産卵成熟期に入ったサケは飢餓状態にあり、体成分をエネルギー源や生殖腺の発達に利用するためと考えられている。事実、ブナザケの肉質劣化は成熟が進むにつれて著しい¹⁾。体表は黒色化し、橙赤色の婚姻色が発現する一方、サケ筋肉の特徴である橙色素（カロテノイド）含量が減少するため肉は白色化し、筋肉脂肪やタンパク質が消費されるため肉質は水っぽくなる。また、ブナ臭と呼ばれる生臭が生じる。このような成熟の進んだブナザケは主としてフィレールや塩蔵品に加工されるが、中には肉質がペースト状に異常軟化することがあって、やっかいな問題となる（口絵）。

筆者らはブナザケの異常軟化肉について、生化学的、原料学的視点から研究してきた。ブナザケ筋肉の軟化現象は、産卵期の生理的变化に伴う内在性プロテアーゼ活性の増大とそれによる筋肉タンパク質の分解によるものであることが明らかとなった²⁻⁴⁾。

ブナザケ筋肉のプロテアーゼ活性を調べた結果²⁾を図1に示す。この活性は酸性域で非常に強いことから、カテプシン群（細胞内酸性顆粒リゾチーム由来のプロテアーゼ群）によると考えられた²⁻⁴⁾。魚類筋肉におけるカテプシン活性は畜肉に比べると高いといわれるが、ブナザケの筋肉での活性は索餌期サケあるいは他魚種と比べ3倍から10倍程度高い。このプロテアーゼ活性は個体差がかなり大きく、異常軟化現象は同一漁獲物の中でもとくに高活性を示す魚体に見られ、魚の死後著しく進行することが観察された。とくに凍結・解凍したものでは軟化が顕著である。これは凍結保存時の組織破壊によって解凍後の軟化が促進されたためと考えられた。軟化に伴い筋形質、筋原繊維、結合組織における種々のタンパク質の分解・低分子化が認められた。筋肉の自己消化活性がシステインプロテアーゼ阻害剤によって完全に阻害されたこと、また軟化肉の筋原繊維タンパク質分解物のSDS-PAGEパターンがカテプシンLによる筋原繊維分解パターンに類似していたことなどから、カテプシンLが軟化の主要原因酵素であ

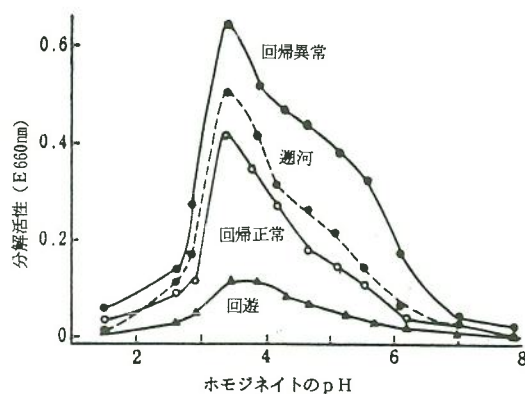


図1 サケ筋肉の自己タンパク分解活性

ると推定された。

2. ブナザケ筋肉におけるプロテアーゼ

従来の研究では酸性域でのタンパク分解活性はカテプシンDによるものと考えられてきたが、ブナザケ筋肉では酸性域（pH 3～4）での活性が約80%、魚肉の生理的 pH（pH 6～7）での活性のほとんどがカテプシンLの作用によるものであった^{2,4)}。一方、カテプシンLと酵素的性質が類似するシステインプロテアーゼとしてカテプシンBやHの存在も認められたが、これらはペプチダーゼとしての作用が強く、タンパク分解能は低かった⁴⁾。また、筋肉の自己消化への関与が推察されているカルパイン活性は、産卵期サケ筋肉でとくに高いということにはなかった^{3,5)}。産卵期に活性上昇を示すプロテアーゼとして高分子量アルカリ性プロテイナーゼが報告されているが³⁾、筋肉の自己消化や加工時におけるタンパク分解への関与はむしろ否定的である。

ブナザケ筋肉の異常軟化の主要原因酵素と考えられたカテプシンLを精製し、その酵素的性状を検討した^{6,7)}。単離されたカテプシンLは分子量30,000、タンパク分解の至適pHは5.6である。本酵素のN末端アミノ酸配列は図2に示すように、これまでに動物組織から単離されたカテプシンLのそれに極めて類似していた。また本酵素は筋肉構造タンパク質に高い基質特異性を示し、筋原繊維タンパク質であるミオシン、コネクチン、ネブ

	1	10	20
Salmon cathepsin L	Ala-Pro-Arg-xxx	Val-Asp-Trp-Arg-Glu-Lys-Gly-Tyr-Val-Thr-Pro-Val-Lys-Asn-Gln-Gly	
Rat cathepsin L	Leu-Pro-Lys-Thr	Val-Asp-Trp-Arg-Glu-Lys-Gly-Cys-Val-Thr-Pro-Val-Lys-Asn-Gln-Gly	
Mouse cathepsin L	Leu-Pro-Lys-Ser	Val-Asp-Trp-Arg-Glu-Lys-Gly-Cys-Val-Thr-Pro-Val-Lys-Asn-Gln-Gly	
Human cathepsin L	Ala-Pro-Arg-Ser	Val-Asp-Trp-Arg-Glu-Lys-Gly-Tyr-Val-Thr-Pro-Val-Lys-Asp-Gln-Gly	
Chicken cathepsin L	Ala-Pro-Arg-Ser	Val-Asp-Trp-Arg-Glu-Lys-Gly-Tyr-Val-Thr-Pro-Val-Lys-Asp-Gln-Gly	

図2 サケカテプシンLのN末端アミノ酸配列

リン、アクチニン、トロポニンを、また結合組織タンパク質であるコラーゲンの非ヘリックス部分を速やかに分解した。カテプシンLは、植物パハイヤ由来のパパインやジェリーミートの原因となる粘液胞子虫のプロテアーゼと同様、システインプロテアーゼに分類される酵素であり、放線菌由来のプロテアーゼインヒビターであるE-64、ロイペプチンあるいは卵白や血清中のタンパク性インヒビターであるシスタチンによって活性が強く阻害された^{4, 9)}。

3. システインプロテアーゼインヒビター

カテプシンLがブナザケ筋肉の軟化現象に最も強く関与していることはほぼ間違いないが、インヒビターの関与についても検討した。Barrettらはニワトリ卵白中のシステインプロテアーゼインヒビターを単離し、これをシスタチンと命名した⁹⁾。近年、動物組織中に類似インヒビターが次々と発見された。それ

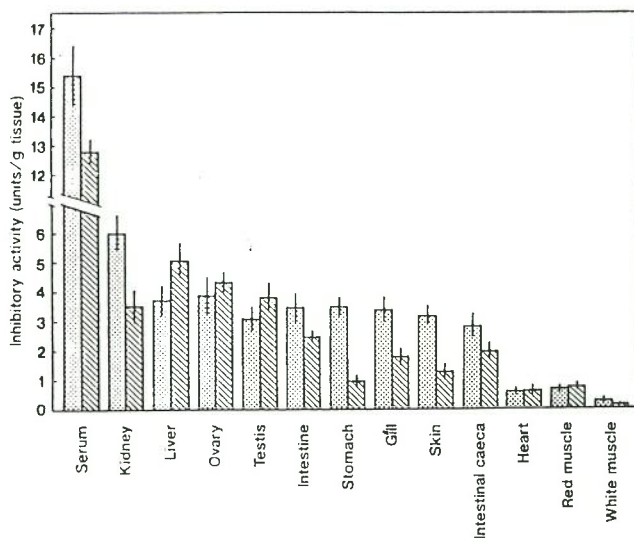


図3 索餌期および産卵期サケの各組織におけるシスタチン活性の比較

■: 索餌期サケ, ▨: 産卵期サケ

らのアミノ酸配列の類似性から、これらはシスタチンスーパーファミリーと呼ばれるようになった。筆者らはサケの組織からインヒビターを精製するとともに、cDNAをクローン化し、その構造と阻害機構、魚類細胞における発現制御に関する研究を現在進めている。サケ各組織のシスタチン活性を測定したところ、図3に示すように、血清、腎臓、肝臓や生殖巣には強い活性が認められたが、筋肉中には弱い活性しか認められなかった⁹⁾。また、筋肉では、産卵成熟に伴うカテプシンレベルの増大とともに、シスタチン活性が約40%低下するという興味深い結果が得られた⁹⁾。

4. ブナザケ筋肉の軟化機構

カテプシンLの筋肉組織における局在性を免疫組織化学的に調べた結果、本酵素は筋細胞間に分布するマクロファージ様食細胞に検出された(図4)¹⁰⁾。マクロファージは、生体内の異物を食作用によって除去する免疫系細胞で、高レベルのカテプシンをもつことが知られている。筋肉組織における食細胞の著増は、哺乳類の筋ジストロフィー症での筋細胞崩壊時やおたまじゃくしの変態に伴う尾筋の退縮期に報告されている。産卵回遊終期のブナザケでは、筋肉成分の極度の消耗と性成熟に伴う著しい生理的变化によって起きた障害筋細胞を除去・再生するために、これら食細胞が動員されたと考えられる。高カテプシン活性を示す個体では多くの食細胞が観察さ



図4 サケ筋肉におけるカテプシンLの分布

サケのカテプシンLに対する抗体を用いてブナザケの筋肉組織を染色した。筋細胞間に分布する食細胞にカテプシンLは局在していた。

れ、崩壊した筋細胞周辺にはとくに濃密に分布していた。ブナザケ筋肉におけるカテプシン活性の上昇はカテプシンレベルの高い食細胞が筋細胞間に誘導された結果であると考えられる。以上の結果から、ブナザケ筋肉の軟化現象は、高カテプシン活性をもつ魚体の漁獲後、死後の保蔵中に筋細胞周辺の食細胞から遊離したカテプシンLの作用によって筋肉構造タンパク質が分解された結果であると結論づけられた。とくに、魚体の凍結時の氷結晶生成によって筋細胞の構造が破壊され、食細胞も破壊され、それに局在するカテプシンが組織内に遊離した結果、解凍後の軟化が著しく促進されるものと考えられる^{7,10)}。

おわりに

近年の増殖技術の向上により、わが国沿岸では安定したサケの漁獲が得られており、各地方で秋サケを利用した新素材開発の努力が続けられている。しかしながら、沿岸域や河川に回帰したサケの多くはブナ化が進んでおり、産卵期の生理的变化に伴う肉質の劣化、とくに高活性のプロテアーゼの存在が加工上の難点となっている。低温では酵素作用が弱いいため異常軟化肉の出現頻度は比較的低いですが、室温付近20~40℃ではカテプシンLの作用は

強いので、異常軟化が顕在化し、薫製の製造過程では薫乾中に魚肉が融解することが多い。また、ねり製品とする場合には、プロテアーゼ作用のために良質なゲルが得られないといわれる。ブナザケの加工においてはプロテアーゼ活性をいかに抑制するかが、今後の一つの大きな課題である。

文 献

- 1) 安藤清一・波多野六男(1986) 化学と生物 24: 792-798
- 2) 小長谷史郎(1982) 日水誌 48: 1503
- 3) 小長谷史郎(1985) 東海水研報 116: 39-47
- 4) 山下倫明・小長谷史郎(1990) 日水誌 56: 1271-1277
- 5) 野俣 洋・豊原治彦・牧之段保夫・池田静徳(1985) 日水誌 51: 1799-1804
- 6) Yamashita, M. and S. Konagaya(1990) *Comp. Biochem. Physiol.*, 96B: 247-252
- 7) 山下倫明・小長谷史郎(1991) 日水誌 57: 1917-1922
- 8) Barrett, A.J., N.D. Rawlings, M.E. Davies, W. Macleidt, G. Salveser and V. Turk(1986) in "Proteinase inhibitors", (ed. by A.J. Barrett and G. Salvesen), Elsevier, Amsterdam, pp. 515-569
- 9) Yamashita, M. and S. Konagaya(1991) *Comp. Biochem. Physiol.*, 100A: 749-751
- 10) Yamashita, M. and S. Konagaya(1991) *J. Agric. Food Chem.* 39: 1402-1405

出資プロジェクト情報

ウシ人工卵管システム開発への試み

株式会社 機能性ペプチド研究所

及川 胤昭

1. はじめに

2年前に機能性ペプチド研究所がスタートした頃には、私自身一度もウシという実験材料を取り扱ったことがなく、学会などでその道の人々から得た情報、専門雑誌、そして、その他の情報などをもとにしてプロジェクトを推進するしかなかった。しかし、いざプロジェクトを動かしてみると、従来のデータは自分達の目的遂行にはほとんど役に立たないものであることが判明した。そしてそれは、新プロジェクトがスタートして約10カ月経過した頃であった。

そこで、順序は逆であるが、その原因分析をしてみると、従来の家畜繁殖分野における考え方と、我々が新しくスタートしたプロジェクトに対する考え方とは全く異なったものであることに気づいた；すなわち、従来の家畜繁殖分野の考え方は実学的物の考え方に焦点があり、我々の新プロジェクトは虚学的物の見方に焦点があるということである。それならば、その考え方の相違のギャップをどのようにすればなくすことができるかということになる。そこで、考えたのが従来虚学的発想のもとで、下等動物材料（マウス、ハムスターそしてラットなどを意味する）を用いて得られたデータを実学的発想のもとで、主として用いられてきた高等な動物材料（ウサギ、ヤギ、ブタ、ウシなどを意味する）に適応できるかどうかを検討することであった。

その後、気をとりなおして、以下に記すようなテーマを設定し、スタッフ全員にその考え方を周知させ本格的な新プロジェクトをス

タートさせたのは丁度1年程前のことである。以下にその設定テーマにもとづいて得られてきたデータの一部を記してみる。

2. 卵巣卵の成熟法と安定した受精方法の確立

屠場から得られた牛卵巣卵を体外培養系で効率よく成熟させ、受精を可能にするため培養用基礎培地に改良を加え、ホルモンや細胞成長因子などの既知生理活性物質を組み合わせ添加し、従来のものより生理学的に優れた人工培地を開発し、卵丘細胞または顆粒膜細胞から産出される卵子の成熟や体外受精を促進する物質を同定し、さらに、これらの物質を添加した卵子培養のための成分既知無血清培地を開発する。この目的のために行なわれた基礎実験からは次のような事実が判明している。1) 体外受精のために屠場卵巣より回収できる卵子は、外見的に大まかに四つのタイプに分類でき（口絵）、更にそれらの原形質膜に偏光性がある、またはなしで四つのタイプに分類でき〔すなわち、その膜に偏光性を有する群（タイプ1卵とタイプ4卵）とその膜に偏光性を有しない群（タイプ2卵とタイプ3卵）〕、そしてその上、偏光性を有しないタイプ2卵とタイプ3卵のみから高率に胚盤胞作出が可能であることが判明した。2) 卵丘細胞または顆粒膜細胞の無血清培養のための基本的な人工培地としてはTCM199+Aprotinin (500ng/ml)が適当であり（我々は、これをIFP100培地と命名）、このIFP100にインシュリンとその他の細胞成長因子を付加した人工培地を用いて、卵丘細胞または顆粒膜細胞を培養すると、それぞれの細胞の培養

OIKAWA Taneaki

上清 (Conditioned Medium) に液性の胚盤胞形成に関係する生理活性物質が少なくとも、二種類分必されていることが確認できた。我々は、これらの二種類の生理活性物質についてその生物・物理・化学的性質を明らかにしつつある。

3. 家畜卵管上皮細胞から分必される移植可能受精卵 (胚) への成熟に必須の生理活性物質の同定

卵管上皮細胞を成分既知無血清培地で大量培養し、この細胞が生産する胚発生に必須の生理活性物質を同定する。この目的のためには、まずはじめに、卵管上皮の分泌細胞に由来する分泌物を検出するためのプローブが必要になる。そこで、まずはじめに、取り組んだのが卵管上皮分泌細胞に特異的に交差反応するモノクローナル抗体産出ハイブリドーマ株を樹立することであった。はじめ、マウスのシステムを用いて、卵管抽出物に対するモノクローナル抗体を産出するハイブリドーマ株樹立を試みたが、何度くり返しても、卵管上皮分泌細胞と交差性を有するモノクローナル抗体産出ハイブリドーマ株を樹立することができなかった。そこで、その後、技術的問題は多少あるがラットのシステムを用いての卵管抽出物に対するハイブリドーマ株樹立を試みた。その結果、幸運にも首尾よく卵管上皮の分泌細胞と特異的交差性を有するハイブリドーマ株 4 株 (1 B12, 2 A 4, 2 C 5 と 1 H10) を樹立することができた。現在、かくして樹立されたハイブリドーマ株より得られるモノクローナル抗体を用いて、すでに、卵管分泌物の生物・物理・化学的解析がスタートしており、その分泌物の分子量、分布、そして生理学的役割が次第に明らかになりつつある。

4. 家畜卵管上皮細胞から分泌される生理活性物質の大量生産と移植可能受精卵 (胚) の成分既知無血清培地の開発

胚発生に関する生理活性物質を遺伝子クローニングと遺伝子組み換え法などの分子生物

的手法を用いての大量生産手法を確立し、さらに、この生理活性物質を添加した成分既知無血清培地を開発する。

この目的のためには、I および II のサブテーマの研究が進展することが絶対的に必要なことであるが、現在のところサブテーマ I で解析されつつある。生理活性物質二つのうち、一方についてその N 末 25 個のアミノ酸配列が決定し、その塩基配列が推定できている。したがって、次のステップとして、その物質について合成したプライマー DNA を用いて cDNA を PCR 法を利用して産出し、次のステップへ進むべく準備を行っているところである。

5. 成分既知無血清培地で生産された新鮮卵および凍結卵の移植

凍結保存ができ、融解後、胚の生存率が高い成分既知無血清培地の評価を行うと同時に成分既知無血清培地で得られた新鮮卵について移植受胎、そして正常出産の確認を行う。

この目的のためには、予備テスト段階として、前記したような独自の卵子判定法を用いて得られた卵子を利用し、I のサブテーマで産出できる卵丘または顆粒膜細胞の培養上清と II のサブテーマで産出できる卵管上皮細胞の培養上清を利用して胚盤胞を作出し、その凍結保存胚を小規模に移植テストしたところ、その結果は、本プロジェクト方式で作出できる胚盤胞が、たとえそのデータ例が少数であったとしても、経済効率範囲内で利用できる段階であることが判明している。

6. おわりに

以上、新プロジェクトの研究課題についての研究進捗状況を記したが、エピローグとして、今後どのようにプロジェクトを展開しようとしているのかを記してみたい。

図 1 は、一般的な哺乳類初期発生過程の模式図である。この図 1 から新プロジェクトに関するテーマは少なくとも、1) 卵巣内で起

る現象に関するもの、2) 卵管内で起る現象に関するもの、そして、3) 子宮内で起る現象に関するもの、などが設定されなければならないことがわかる。そして、特に注意しなければならないのは、その設定されたテーマは川の水が川上から川下に向かって流れると同様に、それぞれのテーマにかかわる現象が川上から川下へと連続した状態であって、決して3領域で起った現象がそれぞれのテーマ設定領域に特異的な現象でないというかわりあいの中で、動的に進行することをわすれてはならない。そのように考えると最終的に、この新プロジェクトの進行により、それぞれの現象にかかわる因子の遺伝子が明らかになるならば、哺乳類の胚発生はおそらく卵巢、

卵管、そして子宮という3領域において、時間を追って進行する遺伝子情報の発現と考えることができるようになるであろう。その時始めて、その新プロジェクトがより完全なかたちで完成していくことは、将来におけるトランスジェニックアニマル利用のためのベクターとしてのES細胞株の確立、そしてその応用への基盤技術が確立することを意味し、本プロジェクトが学術的にも、産業的にも意義あるものになるだろう。以上記したような考え方にもとづき、虚学と実学の橋渡しを行うことを目標に、未来におけるバラ色の展開を夢みながら、ウシ人工卵管システム開発への試みを進めて行きたいと考えている。

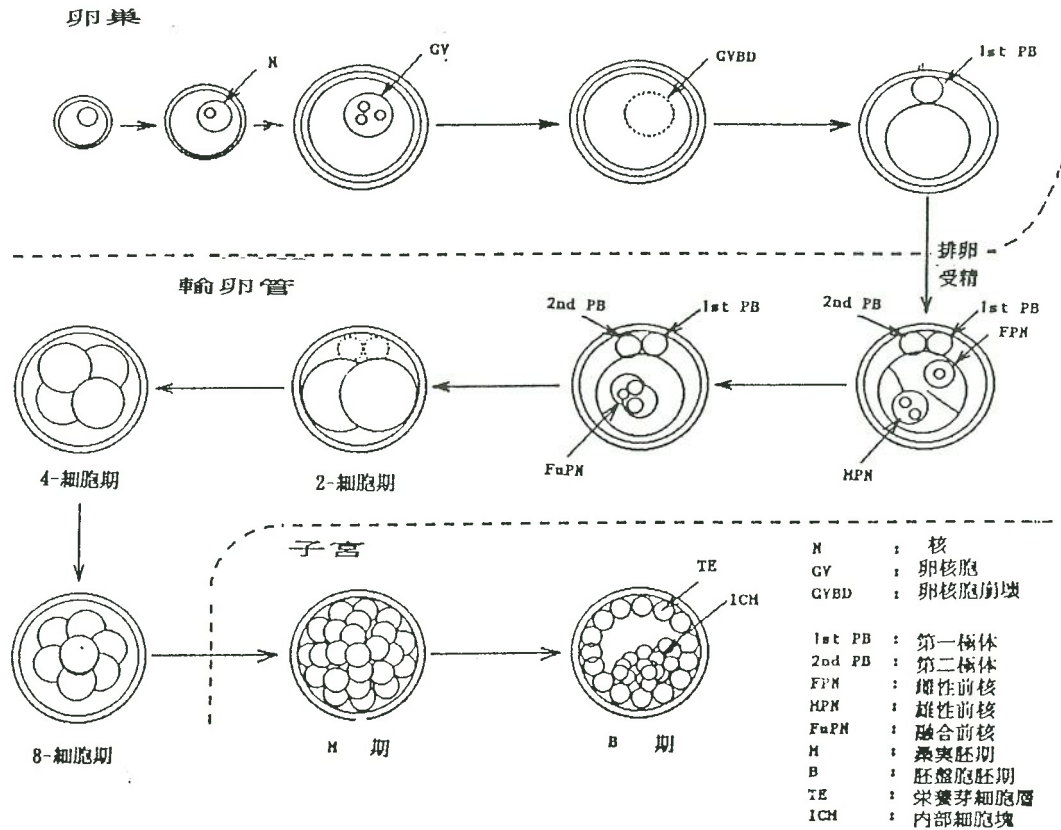


図1 哺乳類の初期発生過程模式図

麦類雪腐病の血清学的診断技術の確立

農林水産省 北陸農業試験場 病害研究室

竹中 重仁

1. はじめに

北陸地域をはじめとした積雪地帯での麦類栽培において、一番の問題は雪腐病による被害である。雪腐病とは、積雪下で活動できるという特殊な生態をもった数種の糸状菌によって引き起こされる病害の総称で、現在6種類の雪腐病が知られている。その内北陸地域で主に発生する雪腐病は、褐色雪腐病 (*Pythium paddicum*, *P. iwayamai*)、雪腐褐色小粒菌核病 (*Typhula incarnata*) および紅色雪腐病 (*Fusarium nivale*) の3種類である。これら病原菌は単独よりむしろ混合感染することが多く、有効薬剤も菌の種類によって異なるために、本病の防除が極めて困難な状況にある。したがって的確な防除法を確立するためには、植物体および土壤中における病原菌の種類と密度を正確かつ迅速に把握できる検出法を開発し、この手法を用いて各菌の植物体および土壤中での動態を解明することが極めて重要である。そこで、筆者は血清学的手法を用いて、各菌の検出・定量法の開発を試みた。

2. 各種雪腐病菌のリボソームに対する抗体を用いた雪腐病菌の検出^{1, 2)}

ウィルス病や細菌病では、病気の診断に血清学的手法が広く利用されているが、糸状菌病の診断には、まだあまり利用されていない。その理由は、糸状菌がウィルスや細菌を比べてサイズが大きく、またその構造が非常に複雑であるため、特異性の高い抗体を得るため

に、適切な抗原部位を選択しなければならないからである。そこで、本研究では各種雪腐病菌の抗原として、①すべての細胞に存在し、②種々のレベルの分類群に対応する多様性を示し、③生育条件や age による組成の変動がなく、④比較的抽出しやすいという利点を持っているリボソームに着目し、以下の手順で検出法を開発した。

初めに各菌およびコムギよりリボソームを抽出し、そのタンパク質組成に違いがあるか否か SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) により検討した。その結果、褐色雪腐病菌である *P. paddicum* と *P. iwayamai* の両菌間の泳動パターンには差異が認められなかったが、褐色雪腐病菌、*T. incarnata*、*F. nivale* および宿主であるコムギの間では明らかな泳動パターンの差異が認められた (口絵 1)。

次に *P. paddicum*、*P. iwayamai*、*T. incarnata* および *F. nivale* の4菌のリボソームをそれぞれウサギに免疫して、各菌の抗リボソーム血清を作製した。これら4種の抗血清の特異性を、宿主であるコムギのリボソームと東北・北海道地方に分布する雪腐黒色小粒菌核病菌 (*T. ishikariensis*) のリボソームも比較のため加え、ゲル内拡散法により比較した。その結果、*P. paddicum* と *P. iwayamai* のリボソームおよび *T. incarnata* と *T. ishikariensis* のリボソームは血清学的差異が認められなかったが、*Pythium* 菌、*Typhula* 菌、*F. nivale* 及びコムギのリボソーム間には血清学的差異のあることが明らかとなった。

そこで抗リボソーム血清を用いた間接 ELISA により、植物体から各菌の検出・定量が可能か否か検討した。上記5菌にそれぞれ感

染している植物体の粗汁液から各菌を特異的に検出できるか否か検討した結果、本法により各菌を属レベルで確実に検出できることが明らかとなった(図1)。次に上記抗リボソーム血清を用いたウェスタンブロット法により、間接ELISAで識別不可能であった上記 *Pythium* 菌と *Typhula* 菌のそれぞれ2菌の識別が可能か否か検討した結果、褐色雪腐病菌である2種の *Pythium* 菌を識別することは本法でも不可能であった。しかし、同じ *Typhula* 属の雪腐褐色小粒菌核病菌と雪腐黒色小粒菌核病菌は、各菌固有のバンドの有無により識別が可能であった(口絵2)。つまり本法で雪腐病を病気の種類別に診断することが可能である。

3. 各種褐色雪腐病菌を種レベルで識別しうる特異的タンパク質の検索³⁾

各菌の抗リボソーム血清を用いた検出法では、2種の褐色雪腐病菌 *P. paddicum* と *P. iwayamai* を識別することができない。そこで、2種の褐色雪腐病菌の特異的検出法を開発するため、各菌の特異的タンパク質の検索を行った。各菌体より細胞質の可溶性タンパク質と細胞壁タンパク質を抽出して、SDS-PAGEによりタンパク質組成を比較した。その結果、細胞質の可溶性タンパク質の泳動パターンには、両菌の間で明瞭な差異は認められなかったが、細胞壁から各菌固有のタンパク質が検出された(口絵3)。また、これらタンパク質はPAS染色に陽性であったことから、糖タンパク質であることが明らかとなった。以上のことから、これら細胞壁に存在する両菌固有の糖タンパク質に対する抗体を作製することにより、上記2種の *Pythium* 菌の識別も可能になるものと期待している。そこで現在これらの特異的糖タンパク質を純化し、抗体を作製中である。

- 1) Takenaka, S. and R. Yoshino (1987) *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 53: 591-597
- 2) Takenaka, S. (1992) *Phytopathology*(投稿中)
- 3) 竹中重仁・渡邊好昭(1990) *日植病報* 56: 376 (講要)

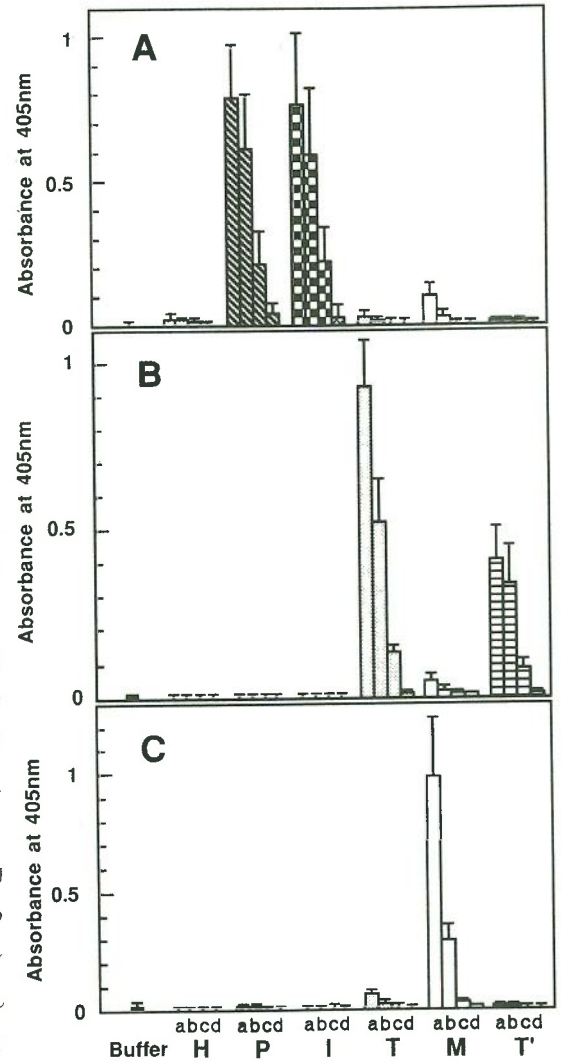


図1 間接ELISAによる抗リボソーム血清の各菌感染コムギ葉粗汁液との反応
 A: *P. paddicum* の抗リボソーム血清
 B: *T. incarnata* の抗リボソーム血清
 C: *F. nivale* の抗リボソーム血清
 H: 健全コムギ
 P: *P. paddicum* 感染コムギ
 I: *P. iwayamai* 感染コムギ
 T: *T. incarnata* 感染コムギ
 M: *F. nivale* 感染コムギ
 T': *T. ishikariensis* 感染コムギ
 上記コムギ粗汁液をコーティング液でa:1/100, b:1/1,000, c:1/10,000, d:1/100,000倍に希釈して用いた

文献情報

マメと根粒菌の“密接な関係”の解明にむけて

様々な生物種からなる生態系においては、異なる種類の生物個体が相互に密接な関係を保ちながら生活していく現象—共生—がしばしば見受けられる。中でも、マメ科植物と根粒菌との共生は両者にとって非常に効率のよいシステムである。植物は菌に生息の場を提供し、菌は植物に窒素を提供する。しかしこの関係は、特定のマメ科植物と根粒菌の間でのみ成立する。この高い宿主特異性は、そのメカニズムの解明という点からと、更には他の植物への有効利用という二つの見地から、古くより研究されてきている。近年、遺伝子レベルでの解析が進み、そのからくりが少しずつ判りかけてきている。

Rhizobium meliloti は、*Medicago*, *Melilotus*, *Trigonella* の三つの属だけに感染し、根粒を形成、窒素固定を行う菌である。この感染、根粒形成、宿主特異性の決定は、*nod* 遺伝子とよばれる一連の遺伝子により制御されている。これらは、その機能から更に以下の三つのグループに分類される。1) *nodABC* 遺伝子：すべての根粒菌に共通であり感染、根粒形成に必要な Nod factor を生産する。2) *nodD1*, *nodD2*, *nodD3* 遺伝子：植物からの phenolic compound の存在下で他の *nod* 遺伝子の転写を活性化させる DNA 結合タンパクをコードする。3) 宿主特異性を決定する *nod* 遺伝子。今回新たに 3) に属する *nodH*, *nodPQ* の機能が解析された。

実験は宿主として *Medicago* に属するアルファルファ、非宿主としてコモンベッチを用いて、*nod* 遺伝子産物を過剰生産する菌株の構築、3種の菌株 *nodH⁺*, *nodH⁻*, *nodQI⁻* によって生産された Nod factor の生化学的な比較、NodH タンパクの相同性の検索、精製した factor の生物検定、の順序で行われた。

まず、構築された *nodH⁺*, *nodH⁻*, *nod*

QI⁻ によって生産された Nod factor を逆相 HPLC にかけて。その結果、*nodH⁺* 株では根粒形成に先だっておこる根の形態変化をアルファルファに特異的にひきおこす factor に相当する fraction I が得られた。これに対し、*nodH⁻* 株では fraction I は存在せず新たに fraction II が、*nodQI⁻* 株では fraction I と II が得られた。これらをそれぞれ分析したところ、fraction I はアシル化、硫酸化した N-acetyl-D-glucosamine-oligosaccharides であり、II は、その硫酸基をもたない化合物であった。このことは、*nodH* 産物が sulfotransferase である可能性を示している。そこで *nodH* のコードする NodH タンパクを他の生物の sulfotransferase と比較したところ、生物種が離れているにもかかわらず、非常に相同性の高い部分が存在することが明らかとなった。

次に各 fraction と、宿主特異性との関連を調べた。活性は、根の形態変化の有無で調べた。fraction I を生産する *nodH⁺* の菌体および精製した fraction I は、本来の宿主であるアルファルファに活性を示し、非宿主であるコモンベッチには活性を示さなかった。これに対し fraction II を生産する *nodH⁻* の菌体および精製した fraction II ではアルファルファには活性がなく、コモンベッチに活性を示した。fraction I と fraction II を生産する *nodQI⁻* では、アルファルファ、コモンベッチの両者に対し活性を示した。これらの結果と、*nodABC* がすべての根粒菌に共通であり、Nod factor の生産に関与すること、宿主特異性を決定する遺伝子の一つである *nodPQ* 産物が ATP sulfurylase 活性をもち sulfate donor を生成しること、を考えあわせると、根粒菌とマメ科植物との宿主特異性の決定は、以下のようなスキームになっていることが推定された：*nodPQ* 産物である ATP sulfurylase により硫酸基と ATP から adenosine 5'-phosphosulfate (APS) が生成され、次にこれが APS-kinase によりリン酸化されて 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) が生成される。PAPS を硫酸基の供与体として、*nodABC* による Nod factor の前

駆体に *nodH* 産物である sulfotransferase により硫酸基が転移し、アルファルファに対する特異性を決定する。前駆体に付く官能基の多様性により host range の多様性を説明することができる。

今後、植物側の receptor も含めて研究が進められていけば、病原菌と植物との相互作用の解明や、植物の生産性の向上という方向にも大いに貢献していくことであろう。

(抄訳 小野明美——植工研)

Ono Akemi

Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipooligosaccharide signals

Roche, P., F. Debellé, F. Maillat, P. Lero-
uge, C. Faucher, G. Truchet, J. Dénarié,
and J.C. Promé
Cell 67: 1131-1143 (1991)

文献情報

病原糸状菌 *Rhizoctonia solani* 抵抗性トランスジェニック植物の作出

植物は病原菌の感染に対して、細胞壁の強化、ファイトアレキシン、プロテアーゼインヒビター、あるいは、溶菌酵素であるキチナーゼや β -1,3-グルカナーゼの産生など、一連の生体防御機構を発動する。キチナーゼは、多くの糸状菌の細胞壁主成分であるキチンを加水分解する酵素で、健全植物にも存在する。通常、植物におけるキチナーゼの活性は低いレベルにとどまっているが、病原菌の感染に伴って強い活性が誘導される。著者らは、キチナーゼ活性発現のタイミングを改変するため、構成的に発現するように組換えたインゲンマメのキチナーゼ遺伝子を、タバコおよびルタバガ(セイヨウアブラナ)に導入したところ、病原糸状菌 *Rhizoctonia solani* に対する抵抗性が増強され、生残能力の向上や病徴発現の遅延を示すトランスジェニック植物

を得ることができた。

すなわち、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモータにインゲンマメのエンドキチナーゼの構造遺伝子を連結して構築したキメラ遺伝子を、アグロバクテリウム菌を介してタバコに導入し、再分化させることによって、インゲンマメキチナーゼを発現した22株の形質転換株を得た。これらの株あるいはその自殖後代は、外観健全で、キチナーゼ活性が、野生株に比べ、根で2~4倍、葉で23~44倍高かった。タバコやアブラナの苗立枯病など、各種植物の土壌伝染病の重要な病原糸状菌のひとつ、*R. solani* に対する抵抗性を検定するため、これら形質転換タバコの播種後18日の幼苗を、*R. solani* (AG-4) を接種した汚染土壌に移植し、13~16日間生育させた。その結果、野生株では53%の苗が枯死したのに対して、形質転換株では枯死率が23~37%にとどまることが示された。また、播種後12日の幼苗を汚染土壌で11日間生育させた後、根の生重を測定したところ、野生株で46%の減少が認められるのに対して、形質転換株では5~15%の減少にすぎなかった。形質転換株が示したこのような抵抗性の増大は、キチナーゼ活性の高い株ほど抵抗性も強いこと、菌体細胞壁にキチンを欠く病原糸状菌 *Pythium aphanidermatum* の感染に対しては抵抗性が認められないこと、および、精製したインゲンマメキチナーゼが *in vitro* で *R. solani* の生育を阻害することなどから、主として、形質転換タバコ体内で多量に生産されたキチナーゼの溶菌作用に起因するものと推定される。なお、タバコと同様に、インゲンマメキチナーゼ遺伝子を導入した形質転換ルタバガでも、*R. solani* に対する抵抗性の増大が認められた。

(抄訳 日比忠明——生資研)

Hibi Tadaaki

Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*

Brogliè, K., I. Chet, M. Holliday, R. Cressman, P. Biddle, S. Knowlton, C.J. Mauvais, and R. Brogliè
Science 254: 1194-1197 (1991)

文献情報

細菌由来の酵素遺伝子導入
トマトにおけるエチレン合
成制御

エチレンは植物ホルモンの1種であり、植物体の老化、果実の成熟あるいは種々のストレスに対する反応などに様々な影響を与える。特に、果実の成熟に及ぼす影響は広く知られていて、エチレン合成阻害物質の施用により、果実の成熟や花卉の老化を遅らせたり、逆にエチレン処理によって未熟収穫物の成熟を促進させることができる。

エチレンは S-adenosylmethionine から中間前駆体、1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) を経て合成される。ACC 合成酵素や ACC 酸化酵素の遺伝子は既にクローニングされており、後者の遺伝子に対するアンチセンス RNA を発現する形質転換トマトでは果実の成熟が遅れたとする報告がある。今回はバクテリア由来の ACC 分解酵素 (ACC deaminase) をトマトで発現させ、ACC を分解することによってエチレン合成を抑制することに成功した研究を紹介する。

まず、ACC 分解酵素遺伝子を得るために、ACC のみを窒素源とする最少培地で生育可能なバクテリアのスクリーニングを行い、600 の菌株ストックから ACC を栄養源として旺盛に生育する 2 菌株を得た。これらは *Pseudomonas* に属する土壌細菌であった。本菌のゲノム DNA のコスミドライブラリーを導入した大腸菌を、同様な最少培地を用いてスクリーニングした結果、ACC 分解活性を示す分子量 36,800 のタンパク質の遺伝子をクローニングすることができた。大腸菌で発現させたこのタンパク質は、ACC を基質として等モルのアンモニアと α -ketobutyric acid を生産することから ACC deaminase と同定された。

本遺伝子をカリフラワーモザイクウイルスの 35 s プロモーターとともにアグロバクテリ

ウムを介してトマトに導入した。得られた形質転換トマトの多くは形態的に正常でありながら、多いものでは全タンパクの 0.5% に相当する ACC deaminase タンパクを発現し、葉や果実でのエチレン産生量は 90~97% も減少した。遺伝子の発現量とエチレン合成阻害の程度には相関関係が認められた。

ACC deaminase 高発現形質転換体から導入遺伝子をホモに持つ子孫を得、これを育てて導入遺伝子のトマト植物への影響を調べた。その結果、開花ならびに果実の成熟開始時期には対照植物と差が見られなかったが、その後の果実の着色ならびに軟化の程度には顕著な違いが認められた。また、着色開始期に収穫した形質転換トマト果実ではエチレン発生量が対照の約 10% で、完全着色までに 3 倍以上の日数を要した。さらに、これらの果実を室温条件のもとで実験台上に放置した場合、形質転換トマトは 5 カ月以上も硬さを失わず、一方、対照のトマトはほとんどしわしわに乾燥してしまった。ここで用いた手法は種々の植物に応用が可能で、エチレンの植物生理学的意義に関する研究に資するところが大きく、また、トマトのみならず種々の果実や野菜の保存期間を大幅に延ばすことが可能であると結論されている。

植物の形質を遺伝子工学的に制御する手段として、特定のメッセンジャー RNA に対するアンチセンス RNA 遺伝子を導入する方法で成功した例がこれまでにいくつも報告されている。ここに紹介した手法は、目的に合致する酵素遺伝子が必ずしも容易に得られるとは限らないという意味で、アンチセンス RNA を用いる方法よりも適用範囲が制限されるかもしれないが、植物遺伝子工学における注目すべき戦略の一つと考えられる。

(抄訳 高浪洋一——日本たばこ生命研)

TAKANAMI Yoichi

Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants

Klee, H.J. et al.

Plant Cell 3 : 1187 (1991)

海外便り

マサチューセッツ工科大学留学後記

農林水産省 家畜衛生試験場 生物物理研究室

糸原 重美

昭和63年4月から平成3年4月までの3年間マサチューセッツ工科大学利根川進研究室にポストドクトラルフェローとして留学する機会を得ました。きっかけは、友人を介して利根川先生が脳で遺伝子再配列を起こす遺伝子を探す人間を探しているとの情報を得たことでした。非常に興味をそそるテーマであり、さつそく応募の手紙を書いたのですが、まもなく利根川進先生のノーベル賞授賞が決まり、小生の採用の可否どころではなくなってしまった様子で、長い間連絡もとれない状態でした。幸い、数名の好意ある援助を受ける事ができ、半年以上たった翌年2月に採用の電話を頂くことができました。出発までの忙しかつたことを記憶しています。

ボストンに着いたのは4月下旬の夜。気候はさわやか、精神的に高揚していたこともあって、ホテルまでの道のりのチャールズリバー沿いの夜景がやけに美しく見えた事が昨日のように思い出されます。翌日、研究室を訪ね、利根川先生にお会いしたのですが、想像したとおりの人で、良い第一印象を持ちました。その印象は今でも変わりません。偉ぶる事なく科学に対して謙虚で、小事に拘らない人柄に魅力を感じました。帰国後読んだ立花隆・利根川進共著「精神と物質」(文芸春秋)にその人柄が良くでています。特に若い研究者あるいは研究者を目指す学生にとって勇気づけられるもので、一読して損はありません。マサチューセッツ工科大学はチャールズリバー沿いに細長く立地しており、春は桜並木、夏はヨットの三角帆、冬は全面凍てついた川面と変化に富んだ風景明媚な所です。利根川

研究室は、シャープ博士を所長として約10名の教授陣とそのメンバーから構成されている癌研究センター内にあります。道路1本隔てたすぐ側にはバルチモア博士(現ロックフェラー大学学長)を所長とし、十数名の教授陣とそのメンバーから構成されるホワイトヘッド研究所があります。いずれも近年の生物学研究をリードしてきた錚々たる存在であり、優れた研究者をすぐ側でかいま見ながら研究できることは大きな喜びでした。利根川研究室は、ポストドクター9人、大学院学生3人、テクニシャン5人、秘書1人の総勢約20人(現在は少し増えているらしい)です。メンバーはアジア人、ヨーロッパ人、アメリカ人と多様で、日本人も常時3~4名います。ポストドクターは医学、理学、薬学、獣医学等種々雑多なバックグラウンドを持ち、常に2~3年で入れ替わります。異なったバックグラウンドを持つ研究員が常に流動することがいかに研究の進展に有効であるかを実感してきました。

研究の事は後回しで、生活のスタートはアパート探しからですが、失敗の連続でした。ボストンはアメリカの大都市のご多分に漏れず、居住地域によって安全性が著しく異なります。特に私どものように学童期の子供を持っていると、学区が重要な要素になります。ボストン周辺には現在1万人を超す日本人が住んでいます。多くは、企業から派遣された学生であったり、研究員であるようです。多くの日本人は上述の理由から特定の地域に集中して居住する傾向が強く、日本人村と呼ばれるような所がなん箇所あります。そのあたりで手を打てば早い(家賃の高さを除いて)のですが、せっかく日本を離れたのだから、

ItoHARA Shigeyoshi

それら以外の所を探そうと思うと、地理は不案内であり、英語の不勉強が祟ってなかなか思うようには行きませんでした。連日子連れで歩き回り、夜は死んだように眠る繰り返しでした。総合的に善し悪しを判断する能力も貧弱で、一度は良いと思ってよくみると問題があったりで、最初の1カ月の間に3回もアパートを変わったという、多分例外的な記録を作ってしまった。そのうち一つは一晚も泊らないのに大枚1200ドルを取られてしまうなど惨憺たるものでした。しかしその甲斐あって、3年間家族共々大きな事故に遭遇せず、ボストンに良い思い出を持って帰国できたのは幸いでした。

どうにか生活できるようになって、さて研究ですが、利根川先生の希望は長年不首尾に終わっている $\gamma\delta$ T細胞レセプターに反応性の単クローン抗体を作りたいとの事でした。これでは話が違い、意にそまないとして数日結論を持ち越すことにしました。しかし、同僚達に彼らのプロジェクトを聞いてみると、ほとんど全てのプロジェクトがこの抗体に依存しており、緊急性が非常に高い事を知り、3カ月という期限付きで引き受ける事にしました。幸い、暑い夏の努力のかいあってか、この期限でいくつかの抗体を取る事に成功し、結局は3年間 $\gamma\delta$ T細胞の研究に打ち込む事になりました。 $\gamma\delta$ T細胞とは何かご存じない方もいらっしゃると思いますので、少し紹介します。脊椎動物の免疫反応の中で、リンパ球の抗原認識特異性は最も重要な意味を持ちます。この特異性はBリンパ球の場合は免疫グロブリンの、またT細胞の場合はT細胞レセプター(TCR)の構造によって規定されます。これらに共通する最大の特徴は、体細胞遺伝子の再配列によって構造の多様性(抗原特異性)を獲得する事です。この発見が利根川進先生のノーベル賞授賞理由である事にご存知のとおりです。TCR $\alpha\beta$ 鎖を細胞表面に持つ $\alpha\beta$ T細胞は胸腺及び末梢リンパ系組織の主構成細胞であり、免疫機構の中で重要な役割を果たすことは古くから知られています。一方、TCR $\alpha\beta$ 遺伝子を検索する程度でTCR γ 遺伝子が利根川研究室で偶然発見さ

れたことをきっかけとして、第二のT細胞($\gamma\delta$ T細胞)の存在が明らかになりました。TCR $\gamma\delta$ はTCR $\alpha\beta$ と遺伝子及びタンパク質レベルで非常に類似しているにもかかわらず、 $\gamma\delta$ T細胞は $\alpha\beta$ T細胞とは種々の点で異なる性格を持ちます。例えば、 $\gamma\delta$ T細胞はリンパ系組織では微小集団ですが、上皮組織内に選択的に分布します。TCR $\gamma\delta$ 鎖の認識する分子はTCR $\alpha\beta$ 鎖のそれと異なる事が示されてきています。 $\gamma\delta$ T細胞は $\alpha\beta$ T細胞では代償できない生物学的意義を持つのかも知れません。今後の研究の進展が楽しみな領域です。そもそもの動機であった脳の遺伝子再配列の問題は、現在論議的となっています。

この留学期間のなかで、東西冷戦の終結など世界情勢は大きく変化しました。そこまでは言いませんが、生物学の世界にも大きなうねりを感じます。マウス胚性幹細胞を用いたジーンターゲット法が登場し、この3年間の間に急速に普及しました。これはいままでも細菌、酵母、ショウジョウバエで可能であった特定遺伝子のみで随意的変異を導入する実験が、脊椎動物でも可能としたものです。神経系、免疫系あるいは個体発生等脊椎動物の高次機能において、ある遺伝子が動物個体の中で果たす真の機能を解析する手段を提供します。技術的にはほぼ確立され、遺伝子の塩基配列を決定する実験と同様、必要不可欠な一般的実験手法として、この3年間に急成長してきました。日本でも急速に普及しつつあるようです。ただし試験管がマウスになるわけで経費、労力と時間もかかります。研究費のバックアップが気にかかるところです。

この3年間雑事に煩わされる事無く研究に没頭する事ができ、それにもまして優れた、また魅力的な多くの研究者に接する事ができたことは、何物にも替え難い大きな財産となりました。終始啓蒙していただいた利根川先生、推薦して下さった先生方、理解と援助をいただいた家畜衛生試験場および農林水産省の皆様、この場を借りて心からお礼申し上げます。

国際学会レポート

第6回国際木材およびパルピング 化学シンポジウムに出席して

農林水産省 森林総合研究所 木材化学研究室

細谷 修二

1. はじめに

第6回 International Symposium on Wood and Pulp Chemistry (ISWPC) は昨年4月30日から5月3日までオーストラリアのメルボルンで開催された。このシンポジウムは2年に1度世界各地の持ち回りで開催されるもので、第1回は1981年にストックホルム（スウェーデン）で開催された。その後、筑波（日本）、バンクーバー（カナダ）、パリ（フランス）、ラーレー（アメリカ）と開催され、今回オーストラリアの順番になった。

今回は、参加者800名にのぼるジャンボなシンポジウムになった。資源問題や環境問題など種々の難問を抱える紙パルプ産業の研究開発に寄せる期待が大きいということであろうか。もっとも、今回のシンポジウムが、オーストラリア・ニュージーランドの紙パルプ技術協会の年次大会と同時開催であったことも、参加者が多かったことの原因のひとつではあると思うが。シンポジウムはメルボルンのダウンタウンから市電でも10分ほどのヤラ河畔の国際会議場 (World Congress Center) で行われた。ほとんどの読者にはなじみのないシンポジウムであると思うので、以下におおよそどのような研究発表が行われたか、概要をお知らせする。

2. 研究発表内容

ISWPCの研究発表は3会場で、10分科会に分れて行われ、口頭発表93件、ポスター発表93件、計186件の発表が3日半にわたって

行われた。3会場に分れての研究発表であり、全ての講演を聞くことは物理的に不可能であったが、それぞれ学会誌1報分に相当するほどのボリュームのプロシーディングがあるので、各分科会毎にいくつかの研究発表のタイトルを紹介し、シンポジウムの雰囲気をお伝えしたいと思う。なお、詳しい内容に興味のある方は筆者までご連絡下さい。

分科会1（木材化学、パルプ化および漂白の化学における新しい分析法）： ^{31}P NMR、二次元NMR等を用いたリグニンの構造解析、各種スペクトルの総合的評価によるパルプ品質の解析他。

分科会2（高収率パルプの化学）：パルプの物理的強度に及ぼすカルボキシル基の影響、パルプの過酸化水素漂白に及ぼす遷移金属イオンの役割他。

分科会3（木材および木材成分からの化学製品と副産物）：ペレット状培養系を用いたオルガノソルブリグニンの微生物変換、バイオマス資源の爆砕処理で得られる種々の高分子成分、リグノセルロースから調製したポリウレタンの熱的および機械的性質他。

分科会4（パルプ化および漂白の化学）：酸素および過酸化水素漂白過程における水酸ラジカルの役割、パルプ中の残渣リグニンのオゾンによる分解および漂白への適用、過酸化水素漂白のためのパルプ中の金属イオンのコントロール、リグニンモデル化合物からの塩素化ジベンゾフランおよびジベンゾダイオキシンの生成、蒸解過程で安定なりグニン構造の漂白過程での挙動他。

分科会5（木材および木材成分の生合成と化学構造）：被子植物カルス培養におけるシリングリグニン合成に関与するパーオキシダ

Hosoya Syuji

ーゼ、アスペン分化木部からクローニングしたりグニン特異性O-メチル基転移酵素の季節的発現、原生維管束植物のポリフェノールに関する ^{13}C -CP/MAS NMRによる研究、*Albizia falcata*材リグニン・糖結合体の構造分析、コムギ節間の生長におけるリグニンと多糖間のフェルラ酸架橋の役割、スプルーース繊維1次壁中の高反応性リグニンの構造、植物学的起源を異にするリグニンのFT-IRによる分類他。

分科会6(リグノセルロースの光化学):機械パルプに対する特定波長の光照射、酸素活性種による光黄色化とその抑制の可能性、光照射による紙中のリグニンの化学構造変化、スプルーース光分解リグニンのチオアシドリシスによる分解他。

分科会7(木材およびパルプの化学的性質):寸法安定化(アセチル化)木材の固体の化学、木材およびリグニンモデル化合物と無機試薬との反応のFTIRによる検討他。

分科会8(非木材繊維の化学および化学処理):非木材パルプ廃液の脱シリカ、麦わらのソーダ蒸解過程でのアルカリ消費特性、*Cajanus cajan*(キマメ)のソーダおよびソーダアントラキノン蒸解他。

分科会9(木材およびパルプの生物的処理):白色腐朽菌による木材成分の分解に関するリグニンペルオキシダーゼ系による蓚酸の新しい脱炭酸反応、カワラタケによるリグニンモデル化合物のキシロース配糖体への変換、高リグニン分解菌IZU-154株によるクラフトパルプの生物漂白、カワラタケによるパルプの生物漂白性の改善、耐熱性キシラナーゼを用いた非塩素漂白、クラフトパルプ酵素漂白に及ぼす再沈澱キシランの影響他。

分科会10(生物的および化学的排液処理):E₀-排液の限外濾過処理、凝集と微生物処理による排液処理、排水処理のモニターのための酸化還元電位の測定他。

以上、膨大な研究発表の中から、いくつかの発表を紹介したが、少なくともこのシンポジウムがどのようなシンポジウムであったかはお理解いただけたと思う。

世界のパルプ生産量は年間1億8千万トン

にも達している。しかもその大半を占めるクラフトパルプの製造には、苛性ソーダと硫化ソーダが使われており、漂白には塩素や二酸化塩素が使われている。森林の減少、炭酸ガス問題、ダイオキシン問題等の地球規模での環境問題がクローズアップされている現在、紙パルプ業界の省資源、省エネルギー、無公害の技術開発に期待するところは非常に大きい。

木材またはその化学成分に関する基礎的な研究発表もかなりあったが、これらもパルプ化技術の開発には欠かすことのできない重要な研究である。

技術開発関連の研究発表では、クラフトパルプの漂白をいかに少ない塩素量で達成するか、すなわち排液中の有機塩素化合物をいかに減らすかに関連した発表が目立った。パルプ中の残留リグニンの構造に関するもの、酸素、過酸化水素、オゾン等酸素系の漂白剤を用いた漂白法などが発表された。セルロースを損傷しないで、いかにしてリグニンを除去するかというところがポイントであり、まだまだ今後の研究に残されたものが多い。

微生物あるいは酵素を用いた漂白法もいくつか発表された。リグニン分解菌やリグニン分解酵素を用いたもの、あるいはヘミセルロース加水分解酵素を用いた漂白法が発表された。この分野では、実用的にはまだ十分な成果があがっているとは言い難いが、たいへん魅力的な方法であり、取り組んでいる研究者も多いので、今後の発展が楽しみである。

なお、この他に同時開催のオーストラリア・ニュージーランド紙パルプ技術協会の年次大会では77件の研究発表が2会場で行われた。

3. おわりに

筆者にとってはオーストラリアを訪れるのは初めてであった。メルボルンのダウンタウンは西欧風の建物の並ぶ美しい町であった。しかし、ダウンタウンはそれほど広くはなく、市電で20分ほど乗ると郊外に出た感じすらした。ダウンタウンには近代的な高層建築が並んでいたが、ひとたび郊外に出て、住宅地域

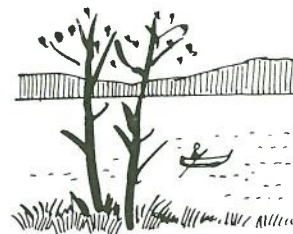
を見ると、ほとんど2階建ての家がなかった。土地が安いということなのだろうか。なんとなくゆったりした感じがした。

人々はとても friendly であった。筆者は磯釣りを道楽としているので、ファーストフード屋のおやじに釣りの話を聞くと、待っていたかのように、鉄砲玉のごとく話が飛び出してきた。この辺の人で釣りをやらない人はいないよという話であった。タクシーの運転手に黒鯛の話を知ると、60cm以上の日本ではお目にかかれないようなデッカイのが釣れるという話であった。実にうらやましい。しかし、日本でもそうであるが、黒鯛は場所によって釣れるシーズンが決まっているようで、釣り方もなかなか微妙なものがあるということだった。そうでなくては困る。

町からはゆったりとした感じを受けたが、経済はあまり順調ではなく、大きな建設会社等がいくつも倒産しているということだった。

町の人々に理由を聞くと、労組が強くて、労働時間が短くて給料を上げるからだと言っていた。友人のベトナム人に聞くと、公務員であるが週休2日は当たり前で、週休3日の週があるという。タクシーの運転手に、日本も週休2日になりつつあると言っていると、オーストラリアの経済も少しは好転するかなと言って喜んでいて。考えてみれば、何となくおおらかな話ではある。

初めてのオーストラリアであったので、もう少し他の都市も回って見たかったが、公務出張というなんとも不自由な身であったので、学会の直前に行って、直後に帰ってくるという忙しさで、今回は断念せざるを得なかった。ニュージーランドのポストシンポにも出られず、まっすぐ帰ってきたが、シンポジウムでは、久しぶりに世界中の友達と会い、十分な討論をし、十分に brush up されてきたので、有意義なゴールデンウィークであった。



細胞育種技術の進捗状況

1991年度

農林水産省 農業生物資源研究所 細胞育種部

中島 卓介

この資料は、1991年12月15日現在の細胞育種技術の進捗状況について、農業研究センター、農業生物資源研究所、野菜・茶業試験場、果樹試験場、草地試験場、蚕糸・昆虫農業技術研究所、及び森林総合研究所、北海道農業試験場、中国農業試験場、九州農業試験場、熊本県農業研究センター、大阪府立大学農学部との協力を得て取りまとめたものである。

1. 特記事項—本年度の特徴—

- 今回の調査から花きの種類を増した。そのため花きでは古い文献もあわせて取り上げた。昨年度の調査以来、2, 3の間違いが指摘されたため、今回訂正した。今後ともこうした指摘を期待する。
- プロトプラスト培養系、組換えDNA技術が着実に進展している。
- 培養系、技術の内容についての検討の要請も聞かれるようになった。今後の課題としたい。

<用語解説>

培養系

- 茎頂培養系……………茎頂を切り出して培養し、直接植物体を得る培養系
- 腋芽培養系……………腋芽を切り出して培養し、植物体を得る培養系
- 枝条(端)培養系……………枝の先端部分を切り出して培養し、植物体を得る培養系
- 胚培養系……………受精後の胚を取り出して植物を得る培養系
- 葯培養系……………葯を培養して花粉由来の半数体又は倍数体を得る培養系
カルス経由, 胚経由を含む
- 花粉培養系……………花粉を培養して花粉由来の半数体又は倍数体を得る培養系
カルス経由, 胚経由を含む
- 胚珠培養系……………胚珠を培養して植物体を再分化させる培養系
- 単細胞培養系……………Explant→カルス→振とう培養→プレーティング→カルス又は胚
→再分化植物を得る培養系
- 生殖細胞胚形成系……………葯培養・花粉培養・胚珠培養からの胚形成系
- 体細胞胚形成系……………体細胞を培養した胚形成系
- プロトプラスト培養系…プロトプラスト→カルス又は胚→再分化植物を得る培養系

技術

- 遺伝資源保存技術……………カルス, プロトプラスト, 茎頂培養由来の植物等を試験管内又は液体窒素中で保存し, 保存後再分化させる技術
- 大量増殖技術……………植物体を大量に増殖する技術, 培養系は何を用いてもよい
- ウィルスフリー化技術…ウィルスをフリー化する技術, 培養系は何を用いてもよい
- 人工種子形成技術……………主として体細胞胚形成系を用いて人工種子を作成する技術
- 試験管内受精技術……………試験管内で胚珠に花粉を受精させ雑種植物を得る技術
- 半数体育種技術……………葯(花粉), 胚珠培養, 種間交雑 (*H. bulbosum* 法等) によって半数体を作り, 育種年限を短縮する技術
- 細胞選抜技術……………培養細胞 (培養系は何を用いてもよい) によって変異の誘起, ストレスによる選抜を行い, 育種の効率化を図る技術
- 細胞融合技術……………細胞融合により体細胞雑種を作出する技術
- 組換えDNA技術……………特定の遺伝子, DNAをベクターの使用その他の方法で他の植物細胞に導入して, その形質を再分化植物で発現させる技術

2. 細胞育種技術の現状

作物群	分類 作物名	植物体再分化技術										細胞育種技術							備考： × 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術	
		培養系技術	茎頂培養系	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	胚珠培養系	単細胞培養系	生殖細胞胚形成系	体細胞胚形成系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術	半数体育種技術	細胞選抜技術		細胞融合技術
普通作物	イネ	○	◎	◎	○	×	○	○	○	◎	△	○	-	△	×	◎	○	○	◎	△ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術
	コムギ	○	◎	◎	○	△	△	△	○	○	-	-	-	×	×	◎	○	×	△ ¹⁾	
	オオムギ	○	◎	◎	○	△	△	△	○	◎ ²⁾	-	-	-	△ ³⁾	×	◎	△	×	×	
	ダイズ	◎	◎	△	×	○	△	×	◎	○ ⁴⁾	-	-	-	×	×	×	○	×	○ ⁵⁾	
	ササゲ	◎	△	△ ⁶⁾	×	○	×	×	△	△	-	-	-	×	×	×	×	×	△	
	アズキ	○	△	×	×	×	×	×	×	△ ^{7,8)}	-	-	-	×	×	×	△	×	△ ⁹⁾	
	バレイショ	◎	◎	○	○	○	◎	○	△	◎	◎	◎	◎	×	×	◎	○	◎	◎	
	カンショ	◎	○	△	×	○	○	△	○	◎ ¹⁰⁾	○	×	◎	×	×	×	×	△	×	
	トウモロコシ	○	◎	○	○	△	○	△	○	◎	△	△	×	×	○	○	○	×	○	
ソルガム	×	○	△ ¹¹⁾	×	×	×	×	○	△ ¹²⁾	×	×	×	×	×	×	○	×	×		
特用作物	テンサイ	○	△	△	×	○	○	×	△	△	○	○	-	×	×	△	△	×	×	
	サトウキビ	◎	○	△ ¹⁾	△ ²⁾	-	×	-	○	△ ³⁾	◎	◎	◎	-	-	-	◎	×	×	
	コンニャク	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	
	イグサ	◎	△	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ナタネ	◎	◎	◎	◎	○	◎	◎	○	◎	△	△	-	×	×	◎	○	○	○	
	ラッカセイ	○	◎ ^{4,6)}	△	×	△	×	△ ^{5,7)}	○ ^{6,7)}	×	△ ⁸⁾	○ ⁹⁻¹²⁾	-	×	×	×	×	×	×	
	クワ	◎	×	△	×	×	×	×	×	×	◎	◎	×	△	×	×	×	×	△	
	チャ(カメリア)	◎	◎	◎	×	○	×	×	○	×	△	○	×	×	×	×	△	×	×	
飼料作物	イタリアンライグラス	○	○	○	×	×	○	×	○	△	○	×	○	×	×	○	×	△ ¹⁾	×	
	オーチャードグラス	○	×	×	×	×	○	△	○	△	×	×	○	×	×	×	×	×	△	
	チモシー	△	×	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	トールフェスク	△	○	○	×	×	○	×	○	○	×	×	×	×	×	○	×	△ ²⁾	×	
	ベレニアルライグラス	△	○	○	×	×	△	×	○	○	×	×	×	×	×	○	×	×	×	
	メドウフェスク	△	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	スムーズブロムグラス	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ダリスグラス	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	バヒアグラス	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	パニカム	×	△	×	×	×	○	×	○	△	×	×	×	×	×	×	×	△	×	
	ローズグラス	×	×	×	×	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ネピアグラス	×	×	×	×	×	○	×	○	△	×	△	×	×	×	×	△	×	×	
パールミレット	×	×	×	△	×	○	×	○	△	×	△	×	×	×	×	△	×	×		
アカクローバ	○	○	×	×	×	○	×	○	○	△	×	○	×	×	×	△	△	×		
シロクローバ	○	○	×	×	○	×	○	○	○	△	×	○	×	×	×	×	×	△		

作物群	分類 作物名	植物体再分化技術										細胞育種技術							備考：× 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術	
		培養系系 技術	莖頂培養系	胚培養系	薬培養系	花粉培養系	胚珠培養系	単細胞培養系	生殖細胞胚形成系	体細胞胚形成系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術	半数体育種技術	細胞選抜技術		細胞融合技術
飼料作物	アルファルファ	○	○	○	×	×	○	×	○	○	△	○	○	○	×	×	○	△	○	報告あり
	バズフットトレフォイル	×	×	×	×	×	×	×	×	○	△	×	×	×	×	×	△	△	○	
	スタイロサントス	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
芝草類	ベントグラス	×	×	×	×	×	○	×	◎	○	×	△	×	×	×	×	△	×	×	可能
	レッドフェスク	△	○	×	×	×	△	×	△	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ノシバ	×	×	×	×	×	³⁾ △	×	△	⁴⁾ △	×	△	×	×	×	×	×	×	×	
	ケンタッキーブルーグラス	×	×	×	×	×	△	×	△	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
野菜	キュウリ	○	○	△	×	△	△	△	◎	◎	×	○	-	×	×	△	×	△	△	安定技術
	メロン	○	○	¹⁾ △	×	△	×	×	◎	◎	^{2,3)} △	○	-	×	△	△	×	△	⁴⁻⁶⁾ ○	
	スイカ	○	△	×	△	△	×	×	○	×	×	○	-	×	△	△	×	×	×	
	カボチャ	○	○	×	×	○	×	△	○	×	×	△	-	×	△	△	×	△	×	
	トマト	◎	◎	△	×	○	○	×	×	○	△	○	-	×	×	△	○	○	◎	
	ナス	◎	○	◎	△	×	○	◎	◎	◎	×	○	-	×	×	◎	×	○	○	
	ピーマン	◎	○	◎	×	△	△	◎	×	△	×	○	-	×	×	◎	×	×	×	
	ダイコン	◎	◎	△	△	△	×	△	×	△	×	×	-	×	×	×	×	△	×	
	キャベツ	◎	◎	○	○	○	×	◎	○	◎	×	○	-	△	△	○	△	◎	△	
	ハクサイ	◎	◎	◎	◎	○	×	◎	○	○	×	△	-	×	○	○	×	○	×	
	ブロッコリー	◎	◎	◎	◎	○	×	○	○	◎	×	○	-	×	△	○	×	○	△	
	イチゴ	◎	×	△	×	×	△	⁷⁾ △	○	△	○	◎	◎	×	×	△	△	×	△	
	タマネギ	◎	△	△	×	△	×	△	○	△	×	○	△	×	×	△	△	△	△	
	ネギ	○	△	×	×	×	△	×	△	×	×	○	○	×	×	×	△	×	×	
	ニンニク	◎	×	×	×	△	×	×	⁸⁾ △	×	○	○	◎	×	×	×	×	△	×	
	アスパラガス	◎	△	○	△	×	△	△	◎	○	△	◎	○	×	×	△	△	×	△	
	エンドウ	○	△	×	×	×	×	×	△	△	△	△	-	×	×	×	×	×	⁹⁻¹¹⁾ ○	
	インゲンマメ	◎	○	×	×	×	×	×	△	×	×	×	-	×	×	×	×	×	¹²⁾ △	
	ニンジン	○	×	△	×	×	◎	×	◎	◎	△	◎	-	○	×	×	○	◎	○	
	セロリー	○	×	×	×	×	◎	×	◎	◎	×	◎	-	○	×	×	○	○	○	
レタス	○	×	×	×	×	○	×	○	◎	×	◎	-	○	×	×	×	○	○		
ゴボウ	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	-	×	×	×	×	×	×		
サトイモ	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	○	◎	◎	×	×	×	×	×	×		
ヤマノイモ	○	×	×	×	×	△	×	△	×	△	△	○	×	×	×	×	×	×		
ホウレンソウ	○	×	×	×	×	×	×	△	×	×	¹³⁾ △	-	×	×	×	×	×	×		
フキ	○	×	×	×	×	×	×	×	○	×	○	○	×	×	×	×	×	×		
キク	◎	△	×	×	×	△	×	¹⁾ △	○	○	○	◎	×	×	×	×	×	²⁾ △		

作物群	分類 培養系技術 作物名	植物体再分化技術											細胞育種技術								備考：× 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術
		茎頂培養系	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	胚珠培養系	単細胞培養系	生殖細胞胚形成系	体細胞胚形成系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術	半数体育種技術	細胞選抜技術	細胞融合技術	組換えDNA技術		
花	ツツジ	◎	×	×	×	△	×	×	×	○	◎	◎	×	×	×	×	×	×	×		
	ユリ	◎	◎	×	×	△	×	×	×	³⁾ △	△	◎	◎	×	△	×	×	×	×		
	チューリップ	△	△	×	×	△	×	×	×	×	×	△	×	△	×	×	×	×	×		
	カーネーション	◎	△	×	×	△	△	×	×	△	○	○	◎	×	△	×	△	×	⁴⁾ △		
	ラン類	◎	◎	×	×	×	×	×	×	⁵⁾ △	×	◎	◎	×	×	×	×	△	×		
	ストック	×	×	×	×	×	×	×	×	×	⁶⁾ △	△	×	×	×	×	×	×	×		
	スターチス類	◎	×	×	×	×	×	×	×	⁷⁾ △	×	◎	×	×	×	×	×	×	×		
	トルコギキョウ	×	×	×	×	×	×	×	×	^{8,9)} △	×	^{10,11)} ◎	×	×	×	×	×	×	¹²⁾ ×		
	ペチュニア	◎	×	¹³⁾ △	×	¹⁴⁾ ○	×	×	×	◎	×	◎	○	×	△	△	×	◎	^{15,16)} ○		
	ヒマワリ	×	¹⁷⁾ ○	×	×	×	×	×	×	^{18,19)} △	×	×	×	×	×	×	×	×	²⁰⁾ △		
	リンドウ	²¹⁾ ○	×	²²⁾ △	²³⁾ △	×	×	×	²⁴⁾ △	×	×	^{21,25)} ○	×	×	×	×	×	×	×		
	ガーベラ	◎	×	×	×	²⁶⁾ △	×	×	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×		
	グラジオラス	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	◎	◎	×	×	×	×	×	×		
	フリージア	◎	×	×	×	×	×	×	²⁷⁾ △	×	×	○	◎	×	×	×	×	×	×		
	シクラメン	○	×	²⁸⁾ △	×	^{29,30)} ○	×	×	³¹⁾ △	³²⁾ △	×	○	×	×	×	×	×	×	×		
	ペゴニア類	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×		
	き	プリムラ類	³³⁾ ○	×	³⁴⁾ △	×	×	×	×	×	×	³⁴⁾ △	³³⁾ ○	×	×	×	×	×	×		
		ゼラニウム類	○	×	△	×	◎	○	×	×	^{35,36)} △	×	△	○	×	×	×	×	×		
バラ		³⁷⁾ ○	×	×	×	×	×	×	³⁸⁾ △	³⁹⁾ △	×	◎	⁴⁰⁾ ○	×	×	×	×	×			
ツバキ		⁴¹⁾ ○	^{42,43)} ○	×	×	×	×	⁴⁴⁾ △	×	×	×	^{41,44)} △	×	×	×	×	×	×			
果		ブドウ	◎	○	△	△	○	◎	^E ◎	^E ◎	^B △	◎	◎	×	×	△	×	×	○		
カキ	◎	○	×	×	×	×	×	△	^B △	¹⁾ △	×	◎	×	×	×	×	×	×			
クリ	○	×	×	×	×	×	△	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×			
ビワ	○	×	×	×	×	×	△	△	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×			
オウトウ	◎	○	×	×	×	×	×	^B △	^B ○	^B △	◎	○	×	×	×	×	△	×			
西洋ナシ	◎	×	×	×	△	×	△	^B △	^B ○	^B △	◎	○	×	×	×	×	△	×			
パイナップル	◎	×	—	×	×	×	×	◎	^B △	×	◎	×	×	×	×	×	×	×			
ブルーベリー	◎	△	×	×	×	×	×	◎	^B △	×	◎	×	×	×	×	×	×	×			
樹	キウイ	◎	△	×	×	×	○	^B ◎	^B ◎	^B ○	△	◎	×	×	×	×	×	◎			
	ザクロ	◎	×	×	×	×	○	^B ◎	^B ○	○	×	◎	×	×	×	×	×	×			
	カンキツ	◎	◎	^E ◎	○	^E ◎	^E ◎	^E ◎	^E ◎	^E ◎	△	◎	◎	×	×	○	○	◎			
	リンゴ	◎	○	^E △	△	^E △	×	○	^E ◎	^B ◎	^B ○	◎	◎	×	×	△	×	△			
日本ナシ	◎	×	×	×	×	×	△	^B △	×	○	◎	◎	×	×	×	×	×				

B : 単細胞または、体細胞組織からの不定芽誘導
E : " " " " 不定胚誘導

作物群	分類 作物名	植物体再分化技術										細胞育種技術							備考：前頁に同じ
		培養系 技術	茎頂培養系	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	胚珠培養系	単細胞培養系	生殖細胞胚形成系	体細胞胚形成系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術	半数体育種技術	細胞選抜技術	
果樹	モモ	◎	◎	×	×	×	×	×	○ ²⁾	×	△	◎	◎	×	×	×	○	×	×
	スモモ	◎	○	×	×	×	×	×	△	×	△	◎	◎	×	×	×	×	×	△ ³⁾
	アズ	△	○	×	×	×	×	×	△	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×
	ウメ	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

植物群	分類 植物名	植物体再分化技術										細胞育種技術							備考：× 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術			
		培養系 技術	茎頂培養系	腋芽培養系	枝条・端・培養系	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	胚珠培養系	単細胞培養系	生殖細胞胚形成系	体細胞胚形成系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術		半数体育種技術	細胞選抜技術	細胞融合技術
樹	スギ	○	×	○	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×
	ヒノキ	×	×	○	◎	×	×	×	×	×	×	△ ¹⁾	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×
	アカマツ	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	クロマツ	×	×	○	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ワカマツ	×	×	◎	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	カラマツ	×	×	○	◎	×	×	×	×	△ ²⁾	○ ³⁾	△ ³⁾	×	×	×	×	×	△ ²⁾	×	×	×	×
	グイマツ雑種	○	×	○	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ギンドロ	◎	×	◎	×	×	×	×	○ ^{B)}	×	×	◎	×	○	×	×	×	×	×	×	○	×
	ヤマナラシ	×	×	○	×	○	×	×	×	○ ^{B)}	×	◎	×	○	×	×	×	×	×	×	○	△ ⁴⁾
	ヒロハハコヤナギ	◎	×	◎	×	○	×	×	×	×	×	○	×	○	×	×	×	×	×	×	○	×
	ポプラ類	◎	×	◎	×	×	×	×	×	×	○	◎	×	○	×	×	×	×	×	×	○ ⁵⁾	○ ⁶⁾
	トチノキ	○	◎	×	×	×	×	×	○ ^{E)}	×	○ ^{F)}	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×
	シラカンバ	◎	○	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	◎	×	○	×	×	×	×	×	×
	クヌギ	×	◎	×	◎	×	×	×	○ ^{E)}	×	◎ ^{E)}	×	×	◎	×	○	×	×	×	×	×	×
	コナラ	×	○	×	◎	×	×	×	×	×	△ ⁷⁾	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×
	ミズキ	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	木	キハダ	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×
		ミツマタ	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
キリ		◎	×	×	×	×	×	×	×	×	△ ⁸⁾	×	◎	○	×	×	×	×	×	×	×	
ミズメ		○	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	クチナシ	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	

B：単細胞または、体細胞組織からの不定芽誘導
E： " " 不定胚誘導

植物群	分類 植物名	植物体再分化技術										細胞育種技術										備考： × 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術	
		培養系技術	茎頂培養系	腋芽培養系	枝条・端・培養系	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	胚珠培養系	単細胞培養系	生殖細胞胚形成系	体細胞胚形成系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術	半数体育種技術	細胞選抜技術	細胞融合技術		組換えDNA技術
樹	イヌマキ	×	×	△ ⁹⁾	△ ⁹⁾	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	シナノキ	×	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	サクラ	○	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ジンチョウゲ	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ヒムロ	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	フユボダイジュ	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ユーカリ	◎	○	○	×	×	×	×	×	×	×	◎	×	◎	×	×	×	×	×	○	×	△ ¹⁰⁾	△
	アキニレ	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	イヌエンジェ	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ケヤキ	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ハゼノキ	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ニセアカシア	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	木	ヤマモモ	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
カリビアマツ		×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	△ ¹¹⁾	×	×	×	×	×	×	×	×	×	△	△
ドイツトウヒ		×	×	○	○	×	×	×	×	○ ^{E B}	×	○ ^E	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×
ラジアータマツ		○	×	×	◎	×	×	×	×	×	○	×	○	◎	×	×	×	×	×	×	×	△	△
テーダマツ		×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	△	△
カジノキ		×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
コウゾ		×	○	◎	×	×	×	×	○ ^B	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	△	△
タバコ	◎	-	-	-	◎	◎	◎	◎	◎	○	◎	-	◎	-	-	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	

B : 単細胞または、体細胞組織からの不定芽誘導
 E : " " 不定胚誘導
 × 未開発 研究が行われていないか、または、実施されていても未だ成果が報告されていない。
 △ 報告あり 一報でもポジティブな報告がある。
 ○ 可能 複数の研究者から報告があり、再現性が確かめられている。
 ◎ 安定技術 該当培養系を用いた開発研究が行われている。

3. 細胞育種技術の進捗状況文献

(1991年調査で△または○になった文献を中心に記載)

普通作物

コムギ Volkenrode 38 : 305-309
 アズキ

- Vasil, I.R. and V. Vasil (1991) Abst. of 3rd Int. Congr. Pl. Mol. Biol. p. 67, Tucson, Arizona, USA
- Jahne, A. et al. (1991) *Plant Cell Rep.* 10 : 1-6
- Datta, S.K. and I. Potrykus (1989) *Theor. Appl. Genet* 77. 820-824
- Dhir, S.K. et al. (1991) *Plant Cell Rep.* 10 : 39-43
- Dhir, S.K. et al. (1991) *Plant Cell Rep.* 10 : 97-101
- Mix, G. and H.M. Wang (1988) *Landbauforschung*
- Ge, K. et al. (1989) *Plant Sci.* 63(2) : 209-216
- Huang, P.M. and K.L. Ge (1989) *Acta Agriculturae Shanghai* 5(1) : 31-36
- 佐藤 毅・松川 薫 (1990) 日本植物培養学会第2回植物組織培養コロキウム要旨集 p. 124-125
- 福岡寿夫 (1990) 九州東海大学農林水産業特別試験研究費補助金による研究報告書
- Kumaravadivel, N. et al. (1991) *Sorghum Newsletter* 32 : 15

- 12) Zhi-ming Wei et al. (1990) *Plant Cell Rep.* 9 : 51-53
 特用作物
 サトウキビ
- 1) Fitch, M.M. and P.H. Moore (1983) *Z. Pflanzenphysiol.* 197 : 206
 - 2) Hiuthee, M.A.W. and M.M. Fitch (1984) *Z. Pflanzenphysiol.* 113 : 305-314
 - 3) Srinivasan, C. and I.K.B. Vasil (1986) *J. Plant Physiol.* 126 : 41-48
 ラッカセイ
 - 4) Banerjee, S. et al. (1988) *Curr. Sci.* 57 : 252-255
 - 5) Ozias-Akins, P. (1989) *Plant Cell Rep.* 8 : 217-218
 - 6) Hazra, S. et al. (1989) *Bio/Technology* 7 : 949-951
 - 7) Sellars, R.M. et al. (1990) *Crop Sci.* 30 : 408-414
 - 8) Bajaj, Y.P.S. (1983) *Euphytica* 32 : 425-430
 - 9) Mhatre, M. et al. (1985) *Curr. Sci.* 54 : 1052-1056
 - 10) Jinduo, D. et al. (1989) *Genetic Manipulation in Plants* 5 : 69-74
 - 11) Mckently, A.H. et al. (1990) *Crop Sci.* 30 : 192-196
 - 12) Daimon, H. and M. Mii (1991) *Japan. J. Breed.* 41 : 461-466
- 飼料作物・芝草類
 イタリアンライグラス・トールフェスク
- 1, 2) Takamizo, T. et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 231 : 1-6
 ノシバ
 - 3, 4) 猪熊千恵ら (1991) 育種 41(別1) : 60-61
- 野菜
 メロン
- 1) 藤下典之・柴田哲生 (1991) 植物組織培養 8 : 98-104
 - 2) Shimonishi, K. et al. (1991) *Japan. J. Breed.* 41 : 347-351
 - 3) 鈴木誠一ら (1991) 植物組織培養 8 : 193-197
 - 4) Jin-Zhuo Dong et al. (1991) *Bio/Technology* 9 : 858-863
 - 5) 吉岡啓子ら (1991) 園芸雑 60(別2) : 206-207
 - 6) Toyoda, H. et al. (1991) *Plant Tissue Culture Letters* 8 : 21-27
 イチゴ
 - 7) Wang, D. et al. (1984) *Hortic. Sci.* 19 : 71-72
 ニンニク
 - 8) 薛 恵民ら (1991) 植物組織培養 8 : 166-170
 エンドウ
 - 9) Puonti-Kaerlas, J. et al. (1989) *Plant Cell Rep.* 8 : 321-324
 - 10) De Kathen, A and H.-J. Jacobsen (1990) *Plant Cell Rep.* 9 : 276-279
 - 11) Puonti-Kaerlas, J. et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 80 : 246-252
 インゲンマメ
 - 12) Mariotti, D. et al. (1989) *J. Genet. Breed.* 43 : 77-81
 ホウレンソウ
 - 13) Kondo, K. et al. (1991) *Plant Tissue Culture Letters* 8 : 1-4
- 花き
 キク
- 1) May, R.A. and R.N. Trigiano (1991) *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116 : 366-371
 - 2) Ledger, E.S. et al. (1991) *Plant Cell Rep.* 10 : 195-199
 - ユリ
 - 3) 三位正洋ら (1991) 育種 41(別1) : 56-57
 カーネーション
 - 4) Lu, C. et al. (1991) *Bio/Technology* 9 : 864-868
 ラン類
 - 5) Sajise, J.U. et al. (1990) Proceedings of NIOS '90. Nagoya, p.84-89
 ストック
 - 6) 福住久代 (1986) 昭和61年度園芸学秋季大会発表講演要旨 p.332-333
 スターチス類
 - 7) Kunitake, H. and M. Mii (1990) *Plant Sci.* 70 : 115-119
 トルコギキョウ
 - 8) 国武久登ら (1990) 育種 40(別1) : 216-217
 - 9) 村山秀樹ら (1990) 園芸雑 59(別) : 652-653
 - 10) 深井誠一ら (1987) 昭和62年度園芸学会秋季大会発表講演要旨 p.528-529
 - 11) 古川 一ら (1988) 育種 38(別2) : 172-173
 - 12) 半田 高 (1990) 園芸雑 59(別2) : 524-525
 ベチュニア
 - 13) Raquin, C. (1982) *Theor. Appl. Genet.* 63 : 151-154
 - 14) Raquin, C. (1985) *Z. Pflanzenzucht.* 94 : 166-169
 - 15) van der Krol, A.R. et al. (1988) *Nature* 333 : 866-869
 - 16) Meyer, P. et al. (1988) *Nature* 330 : 677-678
 ヒマワリ
 - 17) Chandler, J.M. and B.H. Beard (1983) *Crop Sci.* 23 : 1004-1007
 - 18) Burrus, M. et al. (1991) *Plant Cell Rep.* 10 : 161-166
 - 19) Chanabe, C. et al. (1991) *Plant Cell Rep.* 9 : 635-638
 - 20) Schrammeijer, B. et al. (1990) *Plant Cell Rep.* 9 : 55-60
 リンドウ
 - 21) 三宅正則ら (1986) 昭和61年度園芸学会春季大会発表講演要旨 p.404-405
 - 22) 松本悦夫ら (1986) 昭和61年度園芸学会春季大会発表講演要旨 p.392-393
 - 23) 小林光子・米内貞夫 (1991) 育種 41(別1) : 46-47
 - 24) 田平弘甚 (1991) 育種 41(別2) : 280-281
 - 25) 田平弘甚ら (1989) 園芸雑 58(別2) : 522-523
 ガーベラ
 - 26) Cappadocchia, et al. (1988) *Can. J. Bot.* 66 : 1107-1110
 フリージア
 - 27) Wang, L. et al. (1990) *Ann. Bot.* 65 : 271-276
 シクラメン
 - 28) 石坂 宏・植松盾次郎 (1989) 園芸雑 58(別1) : 432-433
 - 29) 石坂 宏・植松盾次郎 (1988) 昭和63年春季園学会発表講演要旨 p.392-393
 - 30) 石坂 宏・植松盾次郎 (1988) 昭和63年秋季園学会発表講演要旨 p.514-515
 - 31) 島田多喜子・大谷甚泰 (1989) 園芸雑 58(別1) : 574
 - 32) 大谷甚泰 (1989) 育種 39(別2) : 22-23
 プリムラ類
 - 33) 松本達夫ら (1986) 昭和61年春季園学会発表講演要旨 p.410-411
 - 34) Bajaj, Y.P.S. (1981) *Sci. Hortic.* 14 : 93-95
 ゼラニウム類

- 35) Dunbar, K.B. and C.T. Stephans (1991) *Plant Cell Rep.* 10 : 417-420
- 36) Yarrow, S.A. et al. (1987) *Plant Cell Rep.* 6 : 102-104
バラ類
- 37) Bressan, P.H. et al. (1982) *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 107 : 979-990
- 38) Wit, J.C. et al. (1991) *Plant Cell Rep.* 9 : 456-458
- 39) Matthews, D. et al. (1991) *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 24 : 173-180
- 40) Bjarnason, E.N. et al. (1985) *New Zealand J. Agric. Res.* 28 : 151-156
ツバキ類
- 41) Vietez, A.M. et al. (1989) *J. Hortic. Sci.* 64 : 177-182
- 42) Nadamitsu, S. et al. (1987) *Japan. J. Breed.* 36 : 309-313
- 43) Yamaguchi, S. et al. (1987) *Japan. J. Breed.* 37 : 203-206
- 44) Kato, M. (1986) *Japan. J. Breed.* 36 : 31-38
- 果 樹
- カキ
- 1) 田尾龍太郎ら (1991) 園学雑 60(別2) : 160-161
- モモ
- 2) Raj Bhansali, R. et al. (1990) *Plant Cell Rep.* 9 : 280-284
スモモ
- 3) Mante, S. et al. (1991) *Bio/Technology* 9 : 853-857
- 樹 木
- ヒノキ
- 1) 笹本浜子ら (1991) 第12回植物組織培養学会シンポジウム講演要旨 p. 73
- カラマツ
- 2) von Aderkas, P. et al. (1989) *Can. J. For. Res.* 20 : 9-14
- 3) Klimaszewska, K. (1989) *Plant Cell Rep.* 8 : 440-444
ヤマナラシ
- 4) 海老沼宏安ら (1991) 林木の育種 159 : 14-17
ボブラ類
- 5) Sasamoto, H. and Y. Hosoi (1990) Abst. VII th Int. Congr. Plant Tiss. and Cell. Cult. p. 36
- 6) McCrown, B.H. et al. (1991) *Plant Cell Rep.* 9 : 590-594
コナラ
- 7) Sasamoto, H. and Y. Hosoi (1989) *J. Jpn. For. Soc.* 71 : 20-22
キリ
- 8) 衛 志明ら (1989) 植物組織培養 8 : 110-113
イスマキ
- 9) 石井克明・近藤博夫 (1991) 第102回日本林学会大会論文集
ユーカリ
- 10) Kawazu, T. et al. (1990) Abst. VII th Int. Congr. Plant Tiss. Cell Cult. p. 64. A2-80
カリビアマツ
- 11) Laine, E. and A. David (1990) *Plant Sci.* 69 : 215-224



編集後記

本号の表紙写真は生資研の平八重さんの御好意によりました。ウンカ・ヨコバイ類は共生微生物を保存しており、これらは経卵伝搬によって次世代に移行することが知られています。ところが、この共生微生物の種類は、予想に反してその虫を採集した地域によって異なることが明らかにされました。そこで、なぜ地域によって共生微生物の種類が異なるかについて検討されました。すなわち、イネの葉面に常在する細菌の一種 *Erwinia herbicola* を分離・培養してイネに散布し、その上でトビイロウンカを飼育しました。一方、*E. herbicola* の抗血清を作製し、これに金コロイ

ドを結合させ、上記のトビイロウンカの卵の超薄切片に処理して電顕下で観察したところ、細菌と抗血清の反応により細菌の周囲に金コロイド粒子が付着しているのがみられました(右下写真の矢印の粒細な黒粒)。このことから、卵の中の共生微生物は葉面微生物に由来することが明らかにされました。

このことは昆虫と微生物の共進化を探るうえできわめて貴重な知見と思われます。また、共生微生物の動態や役割が解明されれば、その制御による害虫のバイオコントロール技術の開発という新しい分野の展開が期待されます。(大畑記)

ブレイン テクノニュース (第30号)

平成4年3月15日発行

発行者 佐野宏哉

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

〒160 東京都新宿区新宿6丁目24-16 日本生命新宿6丁目ビル3F
TEL. 03-3205-6565 FAX. 03-3205-6566

編集 (社)農林水産技術情報協会

〒103 東京都中央区日本橋兜町15-6 製粉会館6F
TEL. 03-3667-8931 FAX. 03-3667-8933