

CODEN : BTEEEC

TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 47 号

BRAIN
Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

JANUARY 15, 1995



胚珠培養により育成されたアルストロメリア
(本文21ページ参照)

発行=生物系特定産業技術研究推進機構

総 説

大坪研一

米の食味とその評価…………… 1

国内情報

野田健一・C. R. Martin

細胞の形により変わる花色…………… 6

前田昌調・上野欣也

バイオコントロールによる甲殻類（エビ，カニ）の大量生産……………10

奈良部 孝

天敵出芽細菌との親和性を利用したネコブセンチュウの同定法……………13

木内 信・霜田政美・木口憲爾

新実験用昆虫エビガラスズメの通年飼育体系……………17

地域の先端研究

石川貴之

胚珠培養による *Alstroemeria ligtu*-hybrids と

A. pelegrina var. *rosea* 間の種間雑種の育成……………21

文献情報

遺伝子導入による除草剤耐性植物の作出……………24

サーカディアンリズムで発現が調節されている遺伝子……………25

クローン化した TMV 抵抗性遺伝子 (N gene) の

産物は Toll あるいは Interleukin-1 receptor との類似性を示した……………26

巨大DNA分子を特異的に切断する方法……………27

国際学会レポート

吉田 薫

第8回国際植物組織培養会議に参加して……………29

米の食味とその評価

農林水産省 食品総合研究所 素材利用部
大坪研一

近年、良食味米の需要が増加し、米の食味に関する関心が高まっている。米の食味は品種、産地、気象条件、栽培方法、貯蔵、炊飯等の多くの要因の影響を受けることが知られており、同時に、米を構成する成分も澱粉、タンパク質、脂質を始め多様であることから、その食味の評価は重要であるとともに、大変難解な課題と言えよう。米の食味評価は、官能検査と理化学的測定とによって行われている。前者は、基準的方法であるが、試食者の嗜好や地域・時代等によって結果が異なることがあり、後者は、異なる地域や時代でも結果を比較できるが、測定精度において前者に及ばないという問題点があり、両者を組み合わせて評価することが必要である。ここでは、米の食味に関係する成分・特性に関して現在までの知見を解説するとともに、当研究室において最近研究を進めている新しい食味評価方法である、糊化特性の少量迅速試験法および米飯物性の新規測定方法について紹介する。

1. 米の品質・食味およびその変動要因

米の品質は、安全性、栄養性、嗜好性、経済性、機能性など、多くの観点から検討する必要がある。最近では消費者の良食味嗜好が強く、生産性に優れていると同時に、良質・良食味の米が求められている。

それでは良食味の米とはどのような米を指すのであろうか？

光沢のある、粒張りの良い飯粒がふっくらとしており（視覚）、強くはないがほのかな香りがあり（嗅覚）、噛みしめると僅かな甘味とうま味が感じられ（味覚）、口の中で舌と歯とに心地よい食感を感じさせる（触覚）米飯が良食味と言えるようである。

食糧研究所（現・食品総合研究所）等におけるこれまでの研究から、米の食味に影響する要因としては、品種、産地、気象条件、栽培法、収穫・乾燥調整法、貯蔵条件、精米加工、炊飯条件等が挙げられており、食味評価方法としても、食糧庁や日本穀物検定協会でも活用されている官能検査方法の開発や、米の

粘弾性、糊化特性等の6要素による食味の理化学的評価法に関する研究が行われてきたり。

2. 米の食味に関係する成分・特性

米の主成分は澱粉であり、 α -1,4結合による直鎖状のアミロースと、 α -1,6結合による分岐も有するアミロペクチンとから構成されている。澱粉のアミロースの割合が高い程、米飯が硬く、粘りが少なくなることが知られており、例えば、もち米はアミロース含量が0%、通常の国産米は15~22%程度であり、高アミロースのインド型米では30%を超えるものもある。

米のタンパク質も食味に関係する。東北農試の山下と藤本によると、同じ品種で比較した場合、精米タンパク含量が多い米ほど食味評価が低下する傾向が認められた。さらに、タンパク質総量ばかりでなく、タンパク質の組成も食味に関係するとの報告があり、新潟県食品研の江川や京都府立大の田中らによると、アルコール可溶性タンパク質（あるいはプロテインボディ I）の量の多い米は食味が低下するとのことである。

米の水分含量もまた、食味に関係する。食

総研の柳瀬と大坪によると、同じ米（茨城県産コシヒカリ）を試料とした場合でも、水分含量が10%~16%と異なっている場合には、炊飯後の米飯の水分含量、硬さ、付着性等に著しい相違が認められている。

米の脂質含量は、玄米では約3%、精米で約1.3%と少ないが、武田薬品工業の安松らによると、古米化の過程で脂質が分解されて生じる遊離脂肪酸は、澱粉と結合して糊化を抑制するとともに、酸化分解を経てヘキサナール等の古米臭の原因となると報告されている。また、名古屋大の玉置らによると、稲種子の登熟温度が高いほど、澱粉と結合した脂質の量が少なくなり、米飯物性も良好となることである。

これらの主要成分以外にも、新潟県食品研の斉藤や農水省生物研の渋谷らは、細胞壁を

構成する繊維成分を分解する酵素で処理すると米飯の物理性が変化することを報告しており、実践女子大の田島や農水省中国農試の堀野らは低分子糖や無機成分 (Mg/K) が食味に関係すると報告しており、東洋精米機の雑賀らは米飯粒外層の保水膜の多寡が食味に関係すると報告している。

このように、米は多種類の成分から構成されており、それぞれが多様な形で米飯食味に影響していると言えよう。

また、炊飯とは、米に適度の水と熱を加えることにより澱粉を糊化させて米飯とする工程であり、その意味からも、炊飯過程における米の吸水性、膨張性、糊化特性、あるいは米飯自体の硬さや粘りといった物理的特性が米の食味およびその評価にとってきわめて重要である。従来、わが国においては、炊飯時の加熱吸水率や膨張容積が小さく、糊化開始が早く、糊化時の粘度が高く、かつ、容易に澱粉粒が崩壊する、軟らかい糊の米の食味が好まれている。また、物理性の点では、軟らかく、粘りの強い米飯が好まれる傾向にある。

表1 日本穀物検定協会の食味試験方法

対象米 ¹⁾	各都道府県の主要品種について産地および品種を選定
基準米	滋賀県湖南産日本晴、品位は検査1等品
加水量	精米600gにつき水798g（精米重量の1.33倍）米の水分は13.0%を基準とし、水分0.1%につき1.2gを増減する。 米の質による補正は、硬質米はそのまま、超硬質米（四国、九州）と北海道産米は12g増（水分13%）、軟質米は12g減（水分13.0%）とする。
炊飯	電気釜を使用する。
評価項目	外観、香り、味、粘り、硬さ、総合評価の6項目 評価は基準米を0点とし基準米とわずかにちがう ±1 すこしちがう ±2 かなりちがう ±3
食味 ²⁾	特A 基準米よりも特に良好なもの A 基準米よりも良好なもの A' 基準米とおおむね同等のもの B 基準米よりもやや劣るもの B' 基準米よりも劣るもの

注1) 生産状況に応じて毎年、評価の対象を入れ替えており、61年産米の作付け面積が2千ヘクタール（1、2類は5百ヘクタール）未満の産地品種のものは原則として削除されている。
注2) 5ランクに分けて格付けし、前年までの結果と合わせて食味ランキングとして毎年発表。

3. 米の食味の評価方法

現在、よく用いられている米の食味評価方法は官能検査であり、電気釜等を用いて炊飯し、総合、味、外観、香り、粘り、硬さ等について16~24名のパネルで評価する。この方法は、人間が試食して食味を総合的に評価する最も基準的な方法であり、味、硬さ等の項目別に評価が得られるという利点もあるが、一方では、数百グラムというかなりの試料量と多くの試食試験者、試験時間を必要とする点や、検査結果が個人の嗜好性や地域・国・時代等によって相違するという問題点もある。

一方、米の成分や物理化学的特性から食味特性を客観的に評価する方法（理化学的評価）は、試料が少量で済み、個人差や地域差が少ないという特徴はあるものの、一種類の測定のみで官能検査レベルの食味評価を行うような精度は得られていないという問題点が

第 回 パネル氏名 平成

基準	不良			基準と同じ			良い			不良			基準と同じ			良い			評価尺度
	かなり	少し	わずか	わずか	少し	かなり	かなり	少し	わずか	わずか	少し	かなり	かなり	少し	わずか	わずか	少し	かなり	
総合																			総合
外観																			外観
香り																			香り
味																			味
粘り	弱い	かなり	わずか	基準と同じ	強い	かなり	わずか	基準と同じ	強い	かなり	わずか	基準と同じ	強い	かなり	わずか	基準と同じ	強い	かなり	粘り
	かなり	少し	わずか	基準と同じ	かなり	少し	わずか	基準と同じ	かなり	少し	わずか	基準と同じ	かなり	少し	わずか	基準と同じ	かなり	少し	
硬さ	軟かい	かなり	わずか	基準と同じ	硬い	かなり	わずか	基準と同じ	硬い	かなり	わずか	基準と同じ	硬い	かなり	わずか	基準と同じ	硬い	かなり	硬さ
	かなり	少し	わずか	基準と同じ	かなり	少し	わずか	基準と同じ	かなり	少し	わずか	基準と同じ	かなり	少し	わずか	基準と同じ	かなり	少し	

図1 官能検査用紙（日本穀物検定協会）

ある。こうした理由から、現在、米のおいしさの評価には官能検査と理化学的評価を組み合わせて行うことが必要とされている。

(1) 官能検査

官能検査で広く行われている方法及びその検査用紙を表1および図1に示す。昭和35年に食糧研究所でこの方法が確立され、日本穀物検定協会等においても、若干の改変を加えてこの方法に準拠して検査が行われている。

同協会では、毎年、各県・地域別に一定以上の作付け面積の米について官能検査を行い、滋賀県産日本晴を基準米とする相対評価によって5ランクに分類して発表している。

外観では、飯の艶、白さ、胚芽残存、煮崩れ、粒型の整否等を総合的に判断し、香りでは、米飯特有の新米の香りの状態や口から鼻に抜ける香りを捉えて評価を行い、味では、米飯のうま味、噛んでいるうちに感じる甘味、喉ごしの滑らかさ等に着眼し、粘りでは、米飯を噛んで離すときの歯や口腔の感覚によって基準米の粘りと比較して判断し、硬さでは、米飯を噛むときの歯ごたえを基準米の場合と比較して判断する。総合では、各項目の平均値ではなく、基準米と比べた供試米の食味を総合的に判断する。

また、最近では、主食以外の用途（他用途）に向けた新しい特性の米も育成されており、そうした米（例えば新形質米）の食味官能検査方法として、食総研の内藤らは、嗜好性尺度によらない、分析型尺度による官能検査方法を新たに提案している。

(2) 炊飯米の光沢検定²⁾

農事試験場の藤巻と榎淵が開発した育種用検定法であり、精米40mlに等容の水を加えて30分間吸水させた後、高圧滅菌器中で10分間加熱炊飯し、10分間蒸らした後、一定照光条件下で、肉眼により基準品（コシヒカリ6点、日本晴4点、トヨニシキ2点）と検定試料とを比較評価する方法である。判定に熟練を要する、光沢が中程度の試料の判定がやや不安定であるといった問題点も指摘されているが、手法として簡便であるうえに、一度に多数の標本処理が可能という特徴がある。

(3) 理化学的測定

1) アミロース含量

アミロース含量は、本来、米から希アルカリによって澱粉を精製し、ヨウ素電流滴定法等によって精密測定されてきたが、国際稲研究所のフリーアーノの開発した、精米粉末を試料とする簡易ヨウ素比色法³⁾、およびその原理に基づいて自動化したオートアナライザー法等により測定されることが多くなっている。

2) タンパク含量

米のタンパク質は、通常、ケルダール法によって測定される。すなわち、精米粉末試料を、触媒存在下で硫酸分解して生じるアンモニアを滴定することによって窒素量を求め、米の窒素-タンパク質換算係数(5.95)を掛けることによってタンパク質含量としている。

3) その他の成分

水分(105°C乾燥法)、脂質(エーテル抽出法、酸分解法)、マグネシウムやカリウム等のミネラル含量(原子吸光法)、少糖類(高速液体クロマトグラフで測定)等も食味と関係があるとして多くの測定報告がある。

4) 精米粉の糊化特性

精米粉の糊化特性(糊化開始温度、最高粘度、最低粘度等)をアミログラフやラピッド・ビスコ・アナライザー(RVA)等により測定する。わが国では最高粘度が高く、ブレークダウン(最高粘度と最低粘度の差)の大きい米の食味評価が高いが例外もある。

5) 炊飯特性試験

米国農務省で開発された方法を竹生らがわが国に導入した試験方法である。米粒が漏れないような20メッシュの金網かごに8~10gの精米を入れ、水(約160ml)を加えたトルビーカー中に吊してビーカーごと電気炊飯器中で加熱炊飯し、その際の米の膨脹容積、加熱吸水率や炊飯液中の固形物重量(溶出固形物)、炊飯液ヨード呈色度(溶出アミロース量)を測定する。ヨード呈色度はアミロース含量と相関が高いとされ、加熱吸水率等とともに食味と関係が深いとされている。

6) 米飯物性測定

各種の方法で炊飯した後、テクスチュロメ

ーター、テンシプレッサー、インストロン等の物性試験機を用いて、米飯の硬さ、粘り、バランス度（粘りと硬さの比）等を測定する。わが国では粘りが強く、バランス度の大きい米が好まれる傾向にある。粒間の変動があるので、1点につき5～10回ずつ測定する必要がある。

7) 近赤外分光分析

最近、800～2500nmの近赤外領域に存在するタンパク質や水、脂質等の特異的吸収を測定し、既知の方法による測定値との較正式を作成することによって、対象成分を非破壊的かつ簡易迅速に測定できる技術が進歩している。

8) その他

細胞壁や澱粉分解酵素活性の影響、収穫・乾燥・貯蔵の食味への影響や電子顕微鏡による米飯の細胞構造の観察等の研究報告がある。

4. 食味評価における新しい試み

1) 測定の簡易・迅速化

最近、近赤外分光法を用いて複数の成分や特性値を同時に測定し、官能検査結果に対する重回帰式を作成した、いわゆる「食味計」が登場し、使用例が増加している。

2) 食味評価の高精度化

東京農大の竹生らは、複数の理化学的測定値（精米タンパク、炊飯液ヨード呈色度、アミログラフ糊化特性値）の重回帰分析により、次年度の米試料においても官能検査との相関

係数が約0.84（説明変動率70%）という精度の高い食味判定式を作成した⁴⁾。

3) 北陸産米の食味評価のための理化学的測定とその解析

北陸地域は良食味米の主産地として知られている。高温登熟の良食味地域でさらに極良食味米を選抜するために、大坪らは理化学的測定値による食味推定式の作成を試みた。すなわち、平成3年産の北陸農試育成系統および比較品種、計40点を試料とし、稲育種研究室で実施された官能検査の総合評価値を目的変数として、成分分析、炊飯特性試験、糊化特性試験、米飯物性試験の4種類の測定によって得られる6測定値を説明変数とする食味推定式を作成し、その適用性を平成2年産米の未知試料により検定した結果、重相関係数0.79が得られた⁵⁾。

4) 糊化特性の少量迅速試験法

当研究室では、小麦試験用に開発されたラピッド・ビスコ・アナライザー（RVA）を米の糊化特性の基準的評価法として用いるための試験を全国の7機関と共同で実施中である。この方法によれば、試料量が3.5gと従来の十分の一以下で済み、測定時間も約19分に短縮され、多様な品種系統の米の糊化特性を明瞭に示すことが可能である（図2）。共同試験の結果、同一機種・同一条件で測定する場合には、異なる機関においても機差がきわめて小さいことが明らかになった⁶⁾。

5) 新しい米飯物性測定方法

当研究室では、改良型テンシプレッサーに

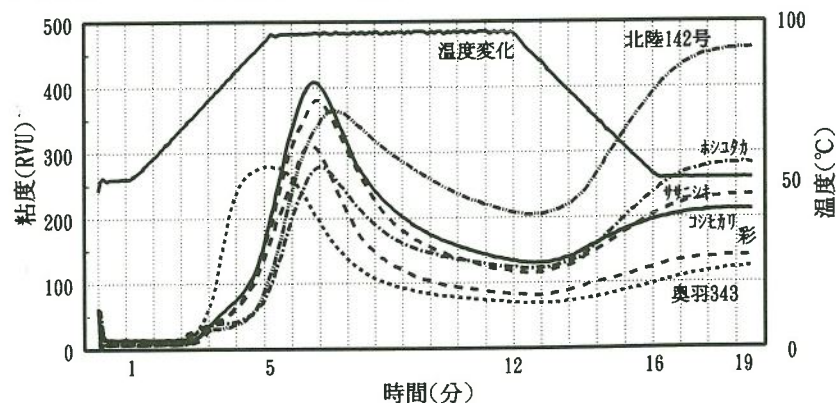


図2 RVAによる新形質米の糊化特性

※試料名（アミロース含量%）：北陸142号（31%）、ホシユタカ（27%）、ササニシキ（16%）、コシヒカリ（15%）、彩（10%）、奥羽343（8%）

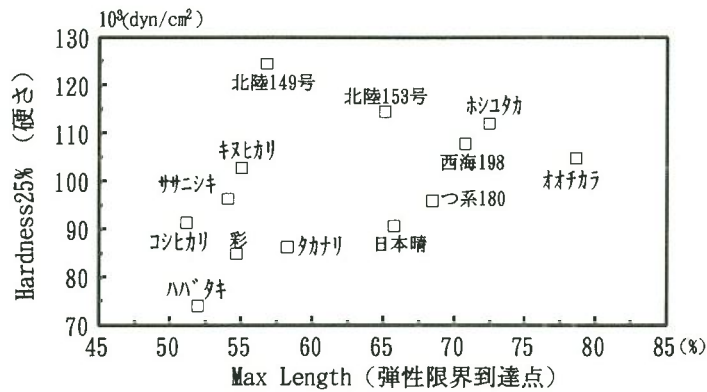


図3 積算加重及び低圧縮試験による新形質米の物性評価

よる米飯物性の新測定方法に関する研究を行っている。本装置の特徴の一つは、試料米飯粒の厚みを自動測定し、粒ごとに一定の圧縮率で測定を行うことができることである。例えば圧縮率90%の高圧縮率試験によって飯粒全体の硬さや粘りを測定し、同じく25%の低圧縮率試験で飯粒表面付近の物理性を測定し、両側測定結果を2次元表示することによって各種の米の特性を明らかにすることができる。1点の試料の測定が約30秒で済むため、10粒反復で約5分という迅速測定であり、積算加重方式（連続突き込み試験）による新しい測定方法の検討も行っている。各種の新形質米の物性測定に応用し、縦軸に低圧縮試験の硬さ、横軸に積算加重試験の弾性限界到達点（Max Length, ML）をプロットした結果を図3に示す。極良食味米（低圧縮の硬さが中程度でMLが小さいコシヒカリ等）、一般飯用米（低圧縮の硬さが中程度でMLがやや大きい日本晴等）、硬い米（MLが大きいホシユタカ等）、インド型低アミロース米（低圧縮の硬さが極小でMLが小さいハバタキ等）等の特徴を明らかにすることが可能である⁷⁾。

5. ま と め

米の食味は、物理性を中心に、味、香り、

外観等が複雑に絡み合って構成されており、個人によっても嗜好性が異なっている。米自身も澱粉、タンパク質、水分、脂質、繊維、無機成分等からなる多成分系であり、さらに組織構造や酵素分解等も関係してくる。生産・流通・利用の各段階の条件が食味に影響することも前述のとおりであり、そうした意味から米の食味の解明は重要であるとともにきわめて難解な課題と言えよう。科学技術の進歩とともに、新たな解明がなされており、今後生産・利用の各分野の方々と協力して研究を継続することが必要である。

文 献

- 1) 食糧研究所 (1969) 米の品質と貯蔵, 利用 p.29
- 2) 藤巻 宏・榎渕欽也 (1975) 農業及び園芸, 50 : 253
- 3) Juliano, B. O. (1971) *Cereal Science Today*, 16 : 334
- 4) 竹生新治郎ら (1985) 澱粉科学, 32 : 51
- 5) 大坪研一ら (1993) : 北陸農業の新技术, 6 : 199
- 6) 豊島英親ら (1994) 日本食品工業学会第41回大会講演要旨集, p.36
- 7) 岡留博司ら (1994) 日本食品工業学会第41回大会講演要旨集, p.35

国内情報

細胞の形により変わる花色

日本石油精製株式会社 下松製油所バイオ研究室

野田健一

英国 John Innes 研究所

Cathie R. Martin

花の色は通常、色素分子により決定される。しかし、実際には pH 等の細胞中の諸条件の違いによっても色は大きく変化する。我々は金魚草の花色素変異株より花色の変化に関与している遺伝子を単離し、解析を行った。解析の結果、この遺伝子は、細胞壁の形成に関与することで細胞の形を正常な円錐形にしていることが判明した。花びらの表皮細胞の形態によっても光の反射状態が変わるため、色が変わる。正常な光の反射には花びらの表皮細胞が円錐形をしていることが必要である。これは細胞が円錐形をしていると、平たい形よりも細胞内に入る光の割合が増加し、色素による光の吸収が増加して色が濃く見えるためである。

1. はじめに

1966年、ドイツにおいて一つの金魚草の花の突然変異株が発見された。本来、金魚草の花色は濃赤色であるのに対して、変異株では花色が淡く鈍い色調に変化していたり。この変異株は *mixta* 変異株と名付けられ、その後、英国の John Innes 研究所（以後 JII とする）で純粋系統として保存されてきた。

この *mixta* 変異株系統は自家交配して代を重ねるうちに、野生株と同じ色調の花をつけるものや、部分的に先祖帰りして変異株の淡い色と本来の濃赤色が混在する、まだら模様の斑点を持つ花をつけるもの（図1）が現れてきた。この現象は遺伝的に純粋にした系統であるにもかかわらず一定の頻度で常に発生することから、トランスポゾンの関与が推察された。

自家交配ならびに野生株との戻し交雑の結果、このトランスポゾンは、非自律性トランスポゾンであること、交配に伴うトランスポゾン転移が体細胞レベルでの転移より多いこと、ある特定の系統と交配すると体細胞レベルでの転移が急増すること等が判明した。これは JII の Coen 博士のグループによって単

NODA Kenichi, C. R. Martin

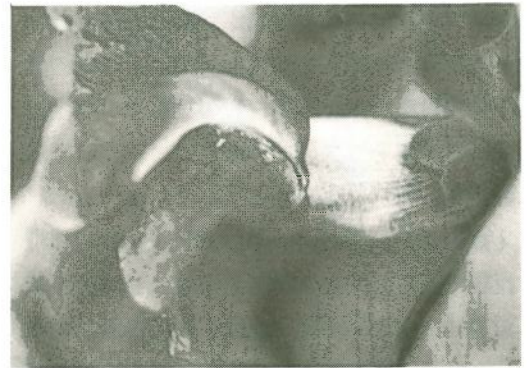


図1 *mixta*⁻変異株の花

下段は花弁の顕微鏡拡大写真

離同定された Tam 4 トランスポゾン²⁾ の性質に非常に類似していた。

2. トランスポゾンタギング

Tam 4 トランスポゾンを DNA プローブとして、*mixta* 変異株 (*mixta*⁻, 以下 *m*⁻) 及び先祖帰り株 (*Mixta*⁺, 以下 *M*⁺) のゲノム

DNA のサザンブロットを行った (図 2.A)。これにより, m^- に存在し, M^+ には存在しない DNA バンドが確認された。そこで, m^- に存在する DNA バンドよりライブラリーを作製し, Tam 4 DNA をプローブとしてスクリーニングを行った。得られたクローンの制限酵素地図を作製し, Tam 4 DNA が挿入されている位置を確認した。

この制限酵素地図より, Tam 4 を含まず, かつトランスポゾン挿入領域に近接した mixta 遺伝子領域を特定し, その DNA 領域をプローブとして m^- と M^+ のゲノム DNA のサザンブロットを行った (図 2.B)。 m^- では Tam 4 をプローブとしたときと同様に 12kb のバンドが現れた。これに対して M^+ では 12kb と 7.5kb の 2 か所, または 7.5kb の 1 か所のみにはバンドが現れた。Tam 4 の DNA サイズが約 4.5kb であることから, 12kb から Tam 4 の分だけ小さくなった 7.5kb の位置が本来の mixta 遺伝子のサイズであると考えられた。2 本バンドが現れた株は m^- と M^+ を両方持つヘテロ体であり, M^+ が正常に機能するため, もう一方の m^- の機能不全を補うことで野生株と同じ花を咲かせることができるものと推察された。

3. mixta cDNA の配列解析

次に, 野生株の花芽より cDNA ライブラリーを作製し, 前述のプローブを用いて mixta 遺伝子のスクリーニングを実施, 得られた mixta 遺伝子の cDNA の塩基配列を決定した。コードされているアミノ酸配列の相同性を検索した結果, mixta は myb 遺伝子の一種であることが判明した。翻訳産物である myb タンパク質は DNA に結合して RNA への転写を制御していると考えられている。mixta 遺伝子はヒトの c-myb 遺伝子とアミノ酸レベルで 42.7% の相同性を示した。最も相同性が高かったのはベチュニアから単離された mybPh 1 遺伝子³⁾ であり, C 末端側では 35.9% の相同性に過ぎないものの, 共通保存領域である N 末端側は 91.3% もの高い

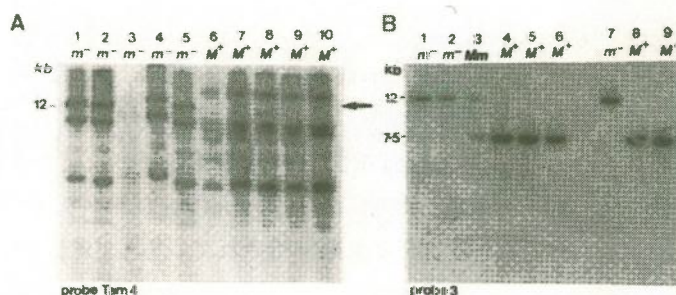


図 2 m^- 及び M^+ のゲノム DNA のサザンブロット

A; Tam4 プローブ
B; Mixta cDNA プローブ

相同性を示した。

4. mixta 遺伝子の発現

mixta の cDNA 断片を比較したところゲノム DNA 断片には 2 つのイントロンがあることが認められた。さらに, m^- では Tam 4 は 2 番目のイントロンに挿入していることが判明した。

cDNA の 5' 末端領域に相当する probe 1 を使用した場合, m^- では Tam 4 を含んだ状態で mixta 遺伝子が RNA に転写されていることが示され, M^+ のものよりも大きなサイズのバンドが認められた。これに対して probe 2 (cDNA の 3' 末端領域に相当) を使用した場合は, m^- では RNA バンドが検出されなかった。これは m^- では 3' 側までの転写が正常に行われていないためと推察される。

また, M^+ の花卉, 花筒, 葉, 種子鞘, がく等の各器官及び, 生育段階の異なる花芽から m^- -RNA を抽出し, mixta の cDNA をプローブとして器官特異的及び生育段階の違いによる mixta 遺伝子の発現について分析を行った。

その結果, 器官としては花卉部分でのみ発現が認められ, 花筒部分をはじめとして, その他の器官では発現が認められなかった。また生育段階については, カルコン合成酵素等アントシアニン合成系の遺伝子が, つぼみの大きさが 5mm 程度の初期の段階から発現するのに対して, mixta は 20-25mm と開花間

近にならないと発現しなかった。

5. *mixta* 遺伝子の機能解析

mixta 遺伝子が *myb* 遺伝子の一種であることが判明したため、*mixta* がトウモロコシ等で既に単離解析されている *c1* 遺伝子⁴⁻⁶⁾ のように、アントシアニン合成系全体を制御していることが期待された。ところが、 m^- と M^+ の花で、アントシアニン色素量に違いが認められず、また、ノーザンプロットの結果は主要なアントシアニン合成遺伝子の RNA レベルでの差異が認められないことを示していた。このことから、*mixta* の機能がトウ

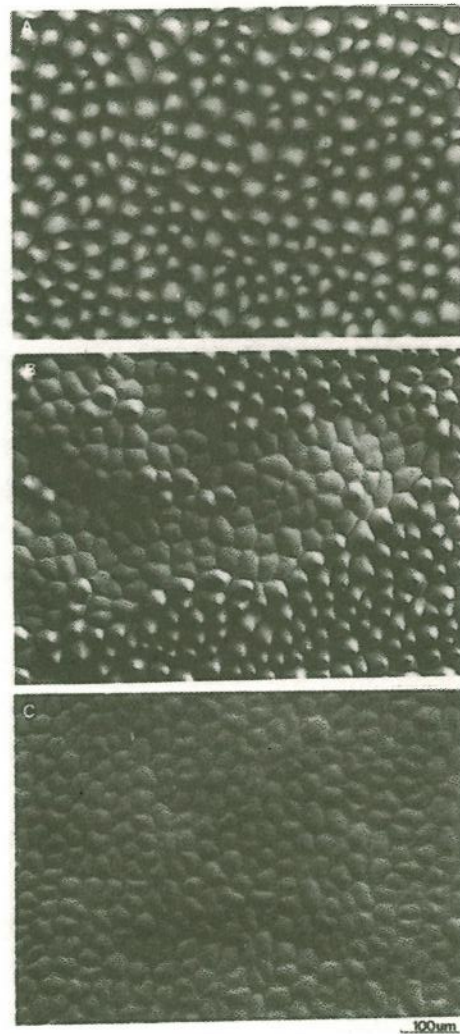


図3 花弁表皮細胞の電子顕微鏡写真

- A 野生株
- B 変異株 (High Spot type)
- C 変異株 (Low Spot type)

モロコシの *c1* 遺伝子に類似するとは考え難くなった。

m^- の花は M^+ に比べ、色調が鈍くなるという特徴があるが、 M^+ の花がベルベット様の光沢を持つのに対し、 m^- の花ではこれが消失していることが認められる。そこで、電子顕微鏡撮影により、 m^- と M^+ の花弁表皮の状態について観察を行った。その結果、 m^- と M^+ では細胞の形態に顕著な違いが認められた (図3)。 M^+ は円錐形の表皮細胞が隙間なく表面を覆っている (図3.A)。 m^- ではこれらの細胞が完全に平板になっていた (図3.C)。また、まだらの花の表面では、円錐形の細胞と平板な細胞が混在していることが認められた (図3.B)。これらのことから、*mixta* 遺伝子の役割は、色素の合成への関与というよりはむしろ、花弁の表皮細胞の形態を正常な円錐形に保つことにあると推察された。 m^- では、この花弁表面にある細胞が平板状になってしまい、光の入射及び反射状態が大幅に変化して、本来ならばシャンデリアのように光が反射するところが、ただのガラス板に光を当てたような状態となっていると考えられる (図4)。そこで、細胞の形態が花の色調にどのような影響を与えるか、 m^- 及び M^+ の花の表皮細胞よりプロトプラストを調製し、細胞壁を取り除いた状態の比較を行った。その結果、プロトプラスト化前の細胞形態が維持されている段階では m^- 、 M^+ の間に明瞭な違いが認められるが、細胞壁を取り除いたプロトプラストになると違いが全く認められなかった。

これらのことから、金魚草において、*mixta* は花弁表皮細胞の形態を円錐形にし、花がベルベット様の光沢を持つのに必要な因子であると判断される。しかし、表皮細胞の一般的な形態は、花弁の裏側や葉の表皮細胞にみられるように、アメーバ様の形態をしているが、 m^- の表皮細胞は平板ではあるがこのような形態は示していない。このことから *mixta* 遺伝子は、細胞の“変態”を制御しているのではなく、細胞が円錐形に成長するのに必要な経路を支配していると考えられた。

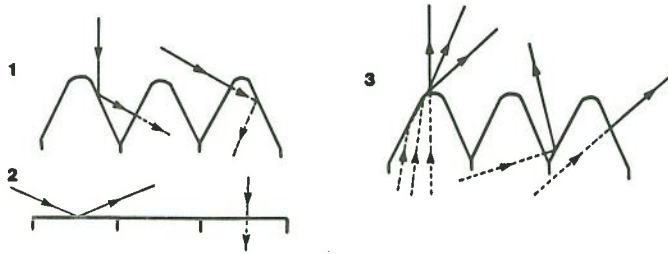


図4 花卉表皮細胞への光の入反射状態

- 1 野株細胞への光の入反射状態
- 2 変異株細胞への光の入反射状態
- 3 野生株細胞での光の散乱

その後の電子顕微鏡観察により、mixta 遺伝子は花卉表皮細胞の基部細胞壁の厚みに影響を与えていることが判明した。

先日博士より、mixta 遺伝子を他の植物に導入したところ細胞形態が変化したとの連絡をいただいた。今後の展開が楽しみである。

6. おわりに

mixta 遺伝子の不活性化によって、花の表皮の細胞形態が変化し、そのことによって花の色調も変化することが示された。野生株の花に見られるベルベット様の光沢は花卉の表皮細胞の突起構造に由来するものであり、突然変異株は平板な表皮細胞しか持たないため、色の冴えない花を咲かせることになる。mixta 遺伝子の機能は、極言すれば、花粉媒介者にとって魅力的な花を咲かせることであると言えるのかも知れない。

本研究は英国の JII の Cathie R. Martin 博士と共同で行われた。この場を借りて博士を始めとして関係者各位に感謝の意を表したい。

参考文献

- 1) Stubbe, H., Genetik und Zytologie von *Antirrhinum* L sect. *Antirrhinum* (VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1966)
- 2) Luo, D. et al. (1991) *Plant J.* 1: 59-69
- 3) Avila, J. et al. (1993) *Plant J.* 3: 553-562
- 4) Paz-Ares, J. et al. (1987) *EMBO J.* 6: 3553-3558
- 5) Cone, K. C. and B. Burr (1989) *The Genetics of Flavonoids* (eds. Styles, E. D., G. A. Gavazzi, and M. L. Racchi) 143-165 (Edizioni Unicopli, Milan)
- 6) Grotewold, E., P. Athma and T. Peterson (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 4587-4591

国内情報

バイオコントロールによる甲殻類(エビ, カニ)の大量生産

水産庁 養殖研究所 環境管理部

前田昌調

日本栽培漁業協会 小浜事業場

野上欣也

魚介類の成長を促進し、同時に病原菌の増殖を抑制する機能的微生物を甲殻類ガザミ幼稚仔(種苗)飼育環境水中に添加した。これまで、疾病および成長不良が主原因となり、ガザミの種苗生産は不調であったが、本方法の採用で生産量が飛躍的に増大した。現在、薬剤の使用量が多い養殖生産過程において、薬剤耐性菌の増加、また魚介類の薬剤汚染が心配されているが、この生物制御方法の使用により、いわゆる無農薬養殖魚生産の展望が開けた。また、この機能的微生物は、沿岸水や底土環境の改善・向上にも使用できると考えられる。

1. はじめに

海水を紫外線、オゾンあるいは次亜塩素酸ナトリウムで滅菌した後放置するか、または次亜塩素酸ナトリウムを中和すると、細菌は数10時間以内に元の数まで復帰する。抗生物質使用においても1~2日で同様に菌数は復元する。この復元過程において当然病原菌が増殖し優占することもありうる。このように海水の滅菌だけでは魚介類の飼育に適した環境が構築出来ない場合が多い。しかし、滅菌後の海水に有機物を添加した場合には、病原菌の増殖は抑制される事もある。この現象は、添加有機物により他の微生物が増加し、病原菌の増殖を抑制したことによるものと考えられる。自然界の微生物群集の分布は、種間の平衡関係の上に成り立っており、生産物生物から見れば、病害微生物と有益微生物とのバランス関係の過程において、生物の成長が行われているといえる。この平衡関係の内容は、拮抗(寄生、捕食、抗生作用、競争)、共生等であり、中でも拮抗作用を利用した病害防除が有効な方法として行なわれるようになった。これらの方法は生物防除(生物的防

除、生物学的防除, biological control, biocontrol)と呼ばれる。例えば、現在の植物生産の場における病虫害防除は、合成化学薬剤依存型であり、その使用量は膨大なものになっているが、その結果生態系のバランス崩壊、環境汚染、薬剤耐性のある害虫、病原菌の出現など大きな問題となっている。このような病害に対して薬剤を使用せず、自然のバランスを維持している微生物の機能を利用して生産物生物を保護する方法が開発された。

水圏における生物制御方法の実用化研究はいまだ少ないが、今後さらに進展するものと考えられる。ここでは特に水産増養殖における細菌相を制御したガザミ種苗生産について述べる。

2. 甲殻類の種苗生産

ガザミ, *Portunus trituberculatus* は、成長が速いため1年で漁業対象甲殻類となる。水産上の価値も高いことから、栽培漁業種として重要な位置にあり、年間約5,000万尾の放流用稚ガニが全国の種苗生産事業場において生産されている。ガザミの成長は、水温24℃以下の場合、ゾエアI, II, III, IV期およびメガロパ期の各成長段階において、通常それ

MAEDA Masachika, NOGAMI Kinya

ぞれ3, 2, 3, 4, 5日を要し, 稚ガニまでの育成日数は合計約17日である(図1)。種苗生産において, 減耗がみられる時期は, ゾエアIV期からメガロパ期に集中する傾向にある。その減耗の主原因がゾエアIII期までの育成過程に関係していることがわかった(前田, 1986)。

このガザミの種苗生産において, 「水づくり」過程は重要である。現状では, 有機物や植物プランクトンを飼育水に添加し, ガザミに適した細菌, 原生動物, 植物プランクトンの自然増殖を待つことによって, ガザミ幼生の好適な生育環境を作り出している。さらに水作りは, 有効な餌料微生物群集の形成をも意味している。しかし, 自然増殖という間接的な手法のため, 常にガザミに好適な微生物群集が作り出されるとは限らない(前田ら, 1991; Maeda *et al.* 1992)。そのため, 特定の微生物相を優占させる微生物管理方法の実用化が要請されるにいたった。

3. 機能性微生物の探索

微生物の拮抗作用により病原菌を防除するバイオコントロール法に用いる細菌を選抜するために, 飼育水や自然海水中より, 寒天平板培地を用いて多くの従属栄養細菌を分離した。これらの菌株を純粋株とした後, 液体培地で培養し, ガザミ幼生を飼育している水中に添加, 一定日数後, 幼生の生残率, 活力の度合いを数値化して, 添加細菌の有効性を判定した。この試験結果では, 多くの菌株が幼生に対して毒性を示したが, 生残および活性を促進する細菌も数株分離することが出来た(Maeda and Liao, 1992)。この細菌は餌料としてガザミ幼生に摂食されていることも確認されている(図2)。さらに, 分離菌株の病原細菌に対する拮抗作用の検定を, *Listonella* (*Vibrio*) *anguillarum* を試験株として行った。こうしてガザミ幼生の生残・成長を促進し, かつ抗病原菌作用のある菌株を選抜した(Nogami and Maeda, 1992)。

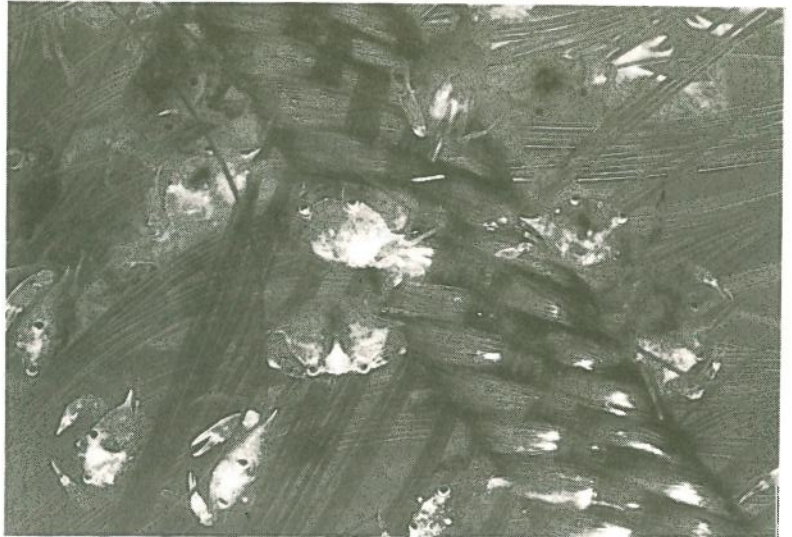


図1 ガザミ稚ガニ(甲長, 5~10mm)



図2 ガザミ幼生消化管内の細菌の塊

(細菌は蛍光色素で染色した。幼生が摂食すると, その蛍光を蛍光顕微鏡によって観察できる)



図3 有効細菌の添加

4. 機能性微生物を使用した養殖

この細菌の飼育水への添加量は、最終濃度 $10^5 \sim 10^6 \text{ cells/ml}$ である。いくつかの有機物濃度の異なる海域の細菌と原生動物（鞭毛虫と繊毛虫）の数を算出したところ、有機物濃度の低い太平洋の中心付近（溶存態炭素量約 0.7 mg-C/ml ）から、その濃度の高い東京湾の湾奥（約 1.3 mg-C/ml ）のような環境でも細菌の数は約 10^6 cells/ml 以下であった。しかし、原生動物、特に鞭毛虫の数は有機炭素濃度の増加に従って増している。すなわち、細菌は、ある数以上になると原生動物に摂食され、その数が制限される。同様に、種苗生産の飼育水においても、細菌数は 10^6 cells/ml のレベルにある。

ガザミ幼生飼育には、 200 m^3 のコンクリート製水槽を用いた。水槽には熱交換器、攪拌器、通気装置が設置されている。餌料系列としては、ワムシ、孵化直後のアルテミア、養成アルテミア、魚貝肉碎片を順次使用した。飼育水の微生物相を安定させるために、最初に海水を次亜塩素酸ナトリウムで滅菌し、幼生収容直前に中和して、前述の量の細菌を添加し、続いてケイ藻、孵化幼生とワムシを収

容した。細菌はゾエア I 期から III 期までの間、毎日添加した（図 3, Nogami and Maeda, 1992）。

この 200 m^3 水槽中の細菌、ケイ藻および鞭毛虫の変動過程において、実験開始時には上記滅菌処理により、細菌数は少なかったが、有効細菌株の添加により増加した。その後添加した有効細菌数は添加と同時に急激に減少する傾向を示した。この減少は、ガザミ I 期幼生が細菌を摂食したことによるものと考えられた（前田, 1986）。この期間の後、ガザミ幼生の成長に伴って、幼生は細菌を摂食しなくなるが、この時より飼育水中の細菌数が増加し、値は 10^7 cells/ml 以上に達した。この細菌の増加に対応して短時間内に原生動物鞭毛虫数が増加し、細菌数は再び 10^6 cells/ml のレベルに減少した。この細菌数の減少は、原生動物の摂食によるものと思われた（図 4）。

生産槽水中の添加細菌株の占有率は、株を毎日添加したために割合高い。添加株の占有率の低下時には、*Vibrio* 属細菌群が出現したが、占有率の上昇とともに *Vibrio* は減少、あるいは全く検出されなかった（Nogami and Maeda, 1992）。

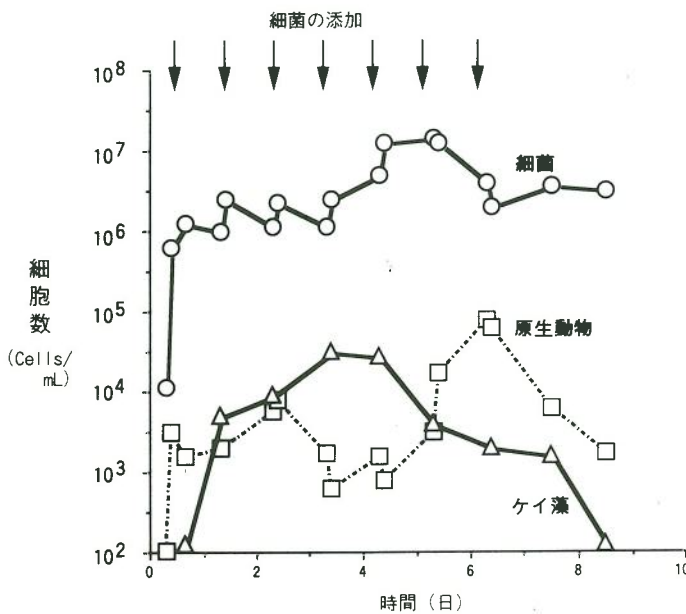


図 4 ガザミ幼生生産水中の細菌、原生動物とケイ藻数の変動

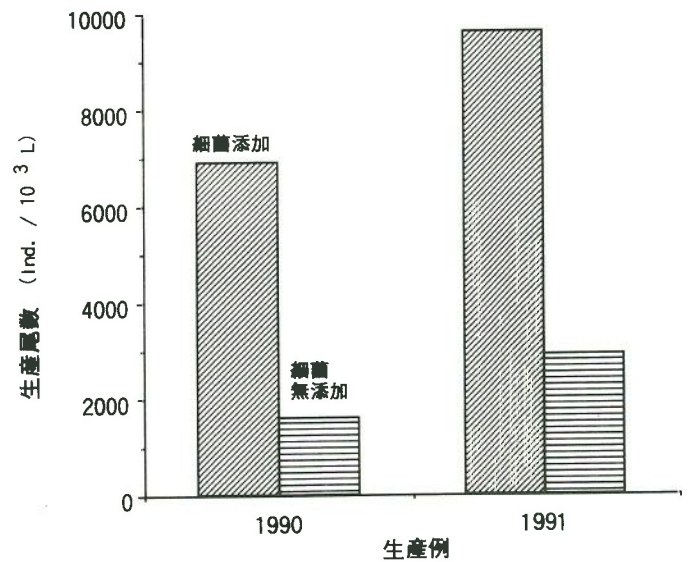


図 5 ガザミ稚ガニの生産結果

ものと考えられた（前田ら，1991）。

5. 生産結果

1990年のガザミ種苗生産結果では，本方法（バイオコントロール法）実施例7例中，生産尾数の変動はあるものの，全ての事例において稚ガニまでの生産に成功したが，通常法では9例中6例の生産事例で幼生は斃死した。総生産尾数は，前者では831万尾，通常法では292万尾であった。その後，1991，1992，1993年においても，バイオコントロール法は良好な生産結果を残した（図5）。この生産過程において，通常法では，疾病が現れなくても幼生は脱皮不全等の栄養不良と思われる症状で斃死した。しかし，本方法使用時における斃死は全く見られなかったことより，細菌の添加は栄養補強の効果もあらわしている

文 献

- 1) 前田昌調 (1986) 餌料微生物—細菌。河合章編，水産増養殖と微生物，恒星社厚生閣，p.101-114
- 2) Maeda, M. and I. C. Liao (1992) *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, 21 : 25-29
- 3) Maeda, M., K. Nogami and N. Ishibashi (1992) *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, 21 : 31-38
- 4) 前田昌調・野上欣也・廖一久 (1991) 江草周三・駒田 旦・岩花秀典 (編)，バイオ農薬・水産薬の開発と利用，シーエムシー出版，178-193
- 5) Nogami, K. and M. Maeda (1992) *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49 : 2373-2376

国内情報

天敵出芽細菌との親和性を利用した ネコブセンチュウの同定法

農林水産省 農業研究センター 線虫害研究室
奈良部 孝

線虫のように微小で，形態的特徴に乏しい動物の分類同定は一般的に難しく，習熟を要する。農作物に大きな被害を与えるネコブセンチュウは，防除を行ううえで，発生する種の同定を必要とする機会は多いが，種間で形態が類似するため，これまでは迅速な同定は困難であった。一方，ネコブセンチュウの天敵出芽細菌，パスツールシア・ペネトランスの性状解明により，それぞれの系統はネコブセンチュウの種を正確に認識し，特定の種にのみ付着寄生することがわかってきた。この，人間よりも正確な細菌の“目”を利用し，わが国に分布する主要なネコブセンチュウの種を，迅速かつ正確に同定する方法を開発した。

1. はじめに

ネコブセンチュウはふ化後，体長約0.4 mmほどの2期幼虫が土壤中を移動し，植物の根に侵入・定着し，体長約1 mmほどの洋ナシ形の雌成虫へと成長する。日本では

9種ほどが知られているが，このうち5種は，寄主植物がほぼ限定され，分布も局地的である。残り4種，サツマイモネコブセンチュウ，ジャワネコブセンチュウ，アレナリアネコブセンチュウ，キタネコブセンチュウは，通常は単為生殖で増殖し，寄主範囲が広く，多くの農作物に被害を与え，全世界に分布する難防除害虫として知られている。これら4種は形態的に非常に類似し，同定が難しい。しか

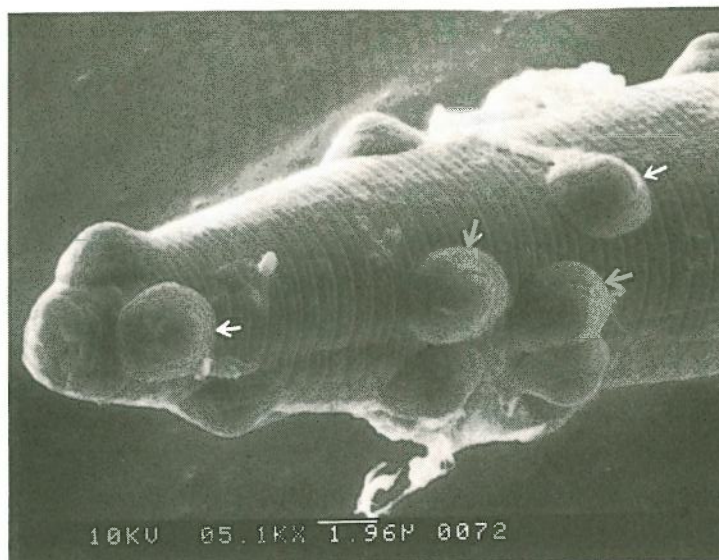


図1 ネコブセンチュウ2期幼虫に付着寄生した *P. penetrans* (矢印) の走査型電子顕微鏡写真

し、これらは種により寄主範囲や温度に対する感受性などが異なるため、輪作や耕種的防除を行ううえで、圃場に発生する種を正確に同定することが不可欠である。

一方、ネコブセンチュウにのみ寄生する出芽細菌 *Pasteuria penetrans* は、ネコブセンチュウの生物的防除に利用が期待されている天敵である。この出芽細菌の優良系統の探索の過程で、それぞれの系統は、特定のネコブセンチュウ1種（または2種）にのみ、付着寄生することがわかった。そこで、この宿主特異性を利用し、ネコブセンチュウの同定への応用を工夫し、一般に利用できる方法を考案した。以下にその過程と方法を述べる。

2. ネコブセンチュウの従来同定法と問題点

形態分類に最も良く用いられる形質は、雌成虫の会陰部周辺の紋様（会陰紋）である。また、2期幼虫および雄成虫の走査型電子顕微鏡による頭部正面像の形態が用いられることもある。これら形態観察に共通することは、種間の差異が明確でなく、種内変異が大きいため、多数の形質を比較し総合的に判断する必要があった。

判別寄主植物（6品種）を用いる方法もよく利用されるが、増殖の有無を確認するのに

約2か月を要するうえ、アレナリアネコブセンチュウの一部とジャワネコブセンチュウが同じ反応を示すため、この区別がつかなかった。

近年、ネコブセンチュウのエステラーゼアイソザイムは種により特異的で、種内変異もほとんど認められないことが判明し、これを比較することにより正確な同定が可能となった²⁾。日本国内に分布する主要ネコブセンチュウについてもこの方法を適用した結果、海外のネコブセンチュウ同様、種の区別が可能で、種内変異もほとんど認められなかった³⁾。さらに、アイソザイムを比較することにより、これまであいまいだった種の同定および分布が明確になった。すなわち、ジャワネコブセンチュウとアレナリアネコブセンチュウはよく混同されていたが、ジャワネコブセンチュウの分布はほぼ沖縄南部に限定され、日本全土に広く分布するのはサツマイモネコブセンチュウ、アレナリアネコブセンチュウ、キタネコブセンチュウの3種であることが判明した³⁾。

現時点では、アイソザイムを比較するのが、最も正確なネコブセンチュウの同定法と考えられるが、電気泳動装置およびいくつかの特別な試薬を必要とするため、現場や普及レベルでの実用化が難しいのが欠点である。

3. 天敵出芽細菌の特性

出芽細菌 *Pasteuria penetrans* は、直径約 $3.5\mu\text{m}$ の皿型の孢子のうに包まれた直径約 $1\mu\text{m}$ の球形の厚膜内生孢子をもつ。土壤中を移動するネコブセンチュウ 2 期幼虫に特異的に付着し (図 1), 線虫体内に侵入し, 線虫の成長に同調して増殖する。現在のところ人工培養は不可能である^{2,6)}。

出芽細菌はほぼ全国の圃場から検出されたが, それらは宿主特異性が認められ⁷⁾, 寄生性により, PPMI, PPMA, PPMH の 3 グループにわけられた。PPMI はサツマイモネコブセンチュウとジャワネコブセンチュウ, PPMA はアレナリアネコブセンチュウ, PPMH はキタネコブセンチュウの 2 期幼虫に特異的に付着寄生した。

しかし, 試験管内では, 線虫雌体内で成熟した出芽細菌孢子は, そのままでは孢子密度を高めても数個程度しか線虫に付着せず, 宿主特異性は明瞭には現れない。そこで, 様々な処理を試みた結果, 出芽細菌孢子をプロテイナーゼ K, キモトリプシン, アクチナーゼ等のタンパク質分解酵素で処理することにより, 2 期幼虫に対する付着数を高めることに成功した。酵素処理後は, 宿主-細菌系統の一致する組み合わせでは, すべての 2 期幼虫に数十から百個程度の付着が認められる一方, 異なる組み合わせでは, 20~50% の 2 期幼虫に 1~5 個の付着が認められる程度にすぎない。

酵素処理した出芽細菌が多数付着したネコブセンチュウ 2 期幼虫は, 容器内の水中を動き回る過程で互いに付着し合い, 集合塊を形成した。これは, 出芽細菌の腹側だけでなく, 背側にも弱い付着活性があるため, 出芽細菌が線虫どうしを接着させる役目を果たすものと考えられた。この集合塊は, 実体顕微鏡下で容易に観察された。

4. 同定の実際

2 期幼虫は線虫被害作物または土壤中から

多数分離できるので, 未同定のネコブセンチュウ 2 期幼虫を 3 系統出芽細菌に反応させ, どの出芽細菌に対し集合塊を形成するかにより, 種の同定が可能であると考えた。

実際には, 図 2 に示す, ネコブセンチュウ同定プレートを用意した⁴⁾。反応容器は, 96

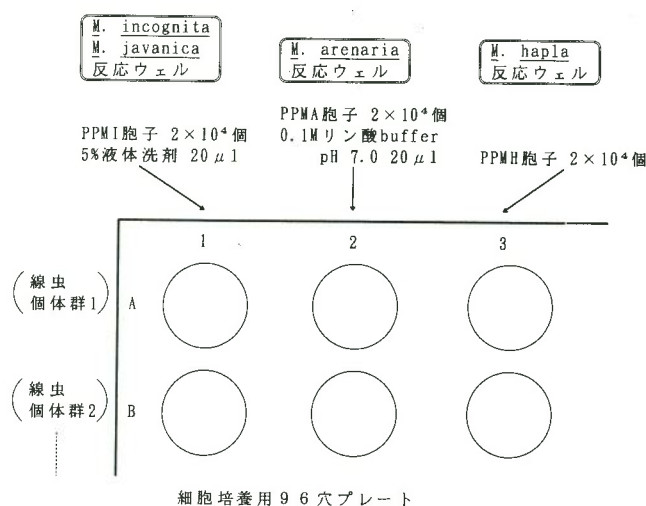


図 2 ネコブセンチュウ同定用プレートの作成法

穴細胞培養プレート (1 ウェル当たり容量約 0.35ml) を用いた。酵素処理した出芽細菌 3 系統 (PPMI, PPMA, PPMH) は, 1 ウェル当たり 2×10^4 個程度の孢子濃度が適量であった。付着活性には, 水素イオン濃度も関与しており, PPMA ではアルカリ側と蒸留水中では付着数が極端に低下したため, 0.1M リン酸緩衝液 pH 7.0 等を $20\mu\text{l}$ 程度加えた。また, サツマイモネコブセンチュウは, 容器の底に吸着されたり, 水面上に浮きやすい性質を持ち, 集合塊ができにくいため, 2% 程度の Triton X 等の界面活性剤, あるいは市販液体洗剤等を $20\mu\text{l}$ 程度加えた。出芽細菌は耐久性に優れ, プレートに入れた状態で, 冷蔵・冷凍あるいは乾燥させても, 1 年以上は孢子付着数の低下は認められなかった。

本邦産の既知種のネコブセンチュウ継代保存個体群 (北海道から沖縄まで) および海外の個体群 (インドネシア, タイ, スリランカ) について, 2 期幼虫を分離し, 上記同定用プレート 3 か所にそれぞれ注入した。その結果, ほぼ例外なく, 適合するいずれか一つの出芽細菌孢子のウェルで, 反応後約 30 分以



図3 ネコブセンチュウ2期幼虫と天敵出芽細菌の反応

左: ネコブセンチュウ種と出芽細菌系統の一致する組み合わせ
(サツマイモネコブセンチュウ-PPMI)

右: 異なる組み合わせ (サツマイモネコブセンチュウ-PPMA)

内に、大きな集合塊が形成された。適合しない出芽細菌孢子と2期幼虫の組み合わせでは、2期幼虫は通常の動きをし、変化はなかった(図3)。2期幼虫の状態により、集合塊が形成されない場合もあったが、この場合は、顕微鏡で拡大し、直接付着数を計数することにより、正確な同定ができた。2種が混合感染している場合でもその判別が可能であった。しかし、サツマイモネコブセンチュウとジャワネコブセンチュウの区別はできなかった。

5. おわりに

前述のネコブセンチュウ用同定プレートは一般に配布可能であり、試験研究機関や普及機関等で使用できるであろう。本同定法ではサツマイモネコブセンチュウとジャワネコブセンチュウの区別ができないのが最大の欠点であり、両者を別々に認識する出芽細菌系統の探索など改良すべき点も多い。しかし、ジャワネコブセンチュウは本州～九州にはほとんど分布していないので、現段階でも国内で

は十分実用可能である。

また、農業現場では、ネコブセンチュウとあわせ、ネグサレセンチュウおよびシストセンチュウを土壌中から簡便に検出する方法が求められている。これらに寄生する出芽細菌も報告されており、これらを用いて、土壌中から有害線虫が容易に判別できるような方法を開発することも今後の課題である。

文 献

- 1) Esbenshade, P. R. and A. C. Triantaphyllou (1985) *J. Nematol.* 17: 6~20
- 2) Mankau, R. (1975) *J. Invert. Pathol.* 26: 333~339
- 3) 奈良部 孝 (1994) 日線虫誌 24: 41
- 4) 奈良部 孝・安達 宏 (1992) 第36回応動昆講要, 227
- 5) 奈良部 孝ら (1989) 日線虫誌 19: 46~51
- 6) Sayre, R. M. (1980) *J. Nematol.* 12: 260~270
- 7) Stirling, G. R. (1985) *Nematologica* 31: 203~209

新実験用昆虫エビガラスズメの通年飼育体系

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所

木内 信・霜田政美・木口憲爾*

(現在：*信州大学繊維学部)

昆虫の生理・生化学的研究に欧米で広く使われているタバコスズメガに匹敵する新たな昆虫実験系を確立するため、これに近縁で日本にも広く分布するエビガラスズメの実験昆虫化を検討した。カイコの人工飼料組成を基礎とした人工飼料の開発と屋内採卵法の確立により、年間を通して安定した飼育が可能となった。飼育方法についても個別飼育および集団飼育のメニューをそろえ、使用目的に応じて選択することができ、実験昆虫としての基礎が確立した。

1. はじめに

昆虫の内分泌、神経生理等の研究材料として、近年、アメリカを中心にタバコスズメガという大型の蛾が使われ、多くの成果をあげている。日本では養蚕業の伝統を背景に、カイコが用いられ、優れた成果をあげているが、タバコスズメガはカイコにはない特徴を持ち、実験材料として優れている面もある。しかしながら、タバコスズメガはタバコ等の害虫で、日本国内への持ち込みが制限されていることから、これに近縁なエビガラスズメをタバコスズメガに代る新たな実験用昆虫として利用するため、通年飼育技術の開発を行った^{1,2)}。

2. エビガラスズメとは

エビガラスズメ (*Agrius convolvuli*) はスズメガ科に属する大型の蛾で、アジア、ヨーロッパ、アフリカの低～中緯度地帯に広く分布し、広域移動をするといわれている。幼虫は日本ではサツマイモ、ヒルガオ、アサガオ等のヒルガオ科の植物を食べる。ヨーロッパでは食餌植物の三色ヒルガオの属名 *Convolvulus* をとって *convolvulus hawk moth* とも呼ばれている。

本種の生態は未知の点が多いが、日本の暖地では成虫は年2回発生し、蛹で越冬する。成虫は夕刻に活発に活動することが知られており、卵はサツマイモ等の葉の裏に産みつけられる。幼虫は5齢を経過し、老熟幼虫は土中にもぐって蛹室を作り蛹化する。幼虫期の温度と日長により蛹休眠が誘導され、高温長日では非休眠蛹、低温短日では休眠蛹となる⁵⁾。

人工飼料育でのライフサイクル (飼育温度 27°C) は図1の通りである^{3,4)}。5齢幼虫の最大体重は10gを超え、蛹は約5gである。

3. エビガラスズメの人工飼料

エビガラスズメの通年飼育体系確立にあたっては解決すべき重要な問題が2つあった。その1つは生の食餌食物に依存しないで冬期間も飼育が可能な人工飼料の開発であったが、カイコの人工飼料を基礎としてサツマイモの葉の乾燥粉末を加えた飼料を調製し、生葉に匹敵する飼育成績が得られている^{2,3)}。

現在使用している人工飼料は、幼虫の発育時期によって3種類の異なった組成を使用している。1・2齢用はサツマイモ葉粉末を約17%、3・4齢用は約9%、5齢用は約5%含んでおり、餌の水分率は1～4齢期までは約78%、5齢期は約73%としている。

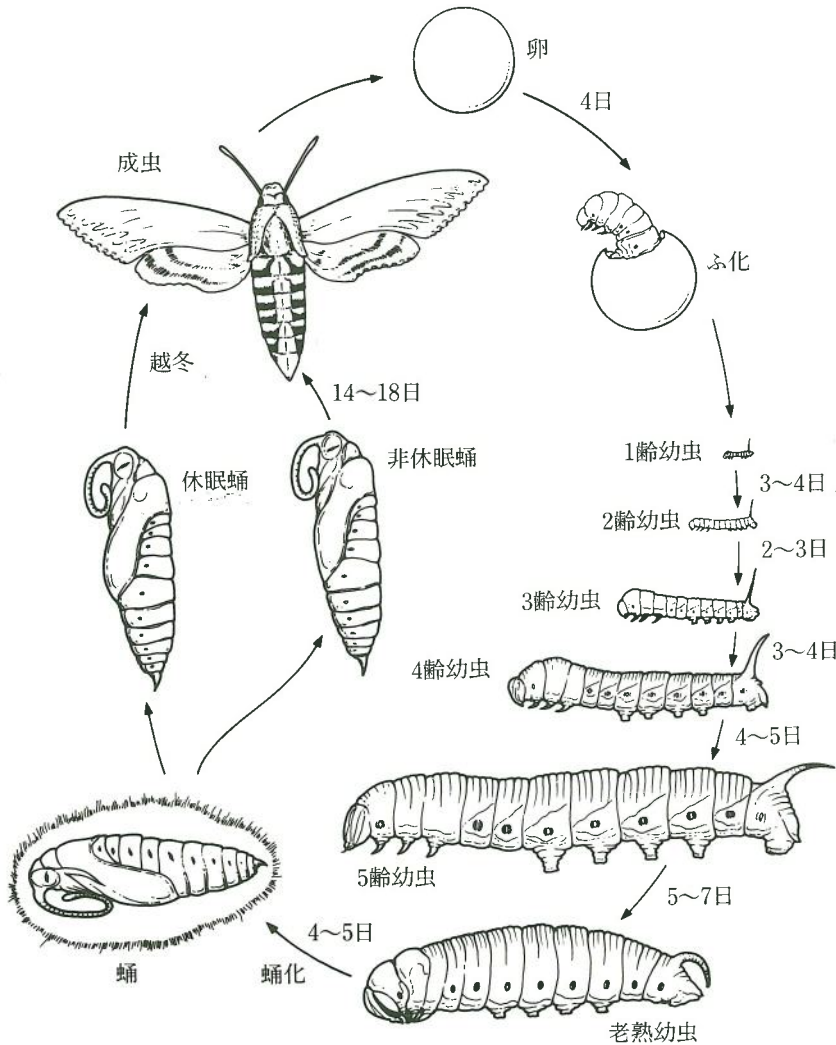


図1 エピガラスズメのライフサイクル

4. 採卵法

安定した採卵は人工飼料の開発とともに重要な課題であったが、現在は次のような方法で、1日1,000~3,000の卵を得ている。内部をつや消しの黒模造紙で覆った木製の箱(73×85×115cm)に、鉢植えまたは水差しのサツマイモと蜜源(20%しょ糖液)を置き、毎日羽化直前の蛹雄雌各7頭前後を入れる(図2)。箱内の温度は25~27°Cに設定し、箱の底には保湿のため、水を張ったバットを置いた。日長は16L 8Dとし、全暗では産卵しないので、顕微鏡用の照明装置で、蜜源付近に3~5 luxの照明を与えた。

5. 飼育方法と通年飼育体系

幼虫期の飼育は温度27°C、日長16L 8Dで行っており、継代及び小規模実験用の個体別飼育と、大量増殖用の集団飼育の2通りの方法を採用している。それぞれの飼育方法は表1に示す通りである。この条件では1世代に要する期間は約42日で、年間8世代の飼育が可能である(図3)。

現在の通年飼育体系は目的と規模によって4つの系列に分けられる(図4)。第1は採卵を目的とした継代用の系列で、毎日40頭を高温長日条件で個体飼育している。第2の系列は同じく継代用であるが、病気、事故等による系統の断絶に備えるとともに形質の維持を目的として、長期保存のための休眠蛹を生産している。飼育条件は低温(23°C)短日(12L12D)で、1か月に1回程度、100頭前後の蛹を生産している。第3は小規模実験用で、飼育条件は実験目的にあわせて任意である。第4は大規模実験用で、集団飼育により1日あたり数百頭、週数千頭規模の飼育を行うことができ、ホルモン等の微量成分抽出のための材料として使用できる。

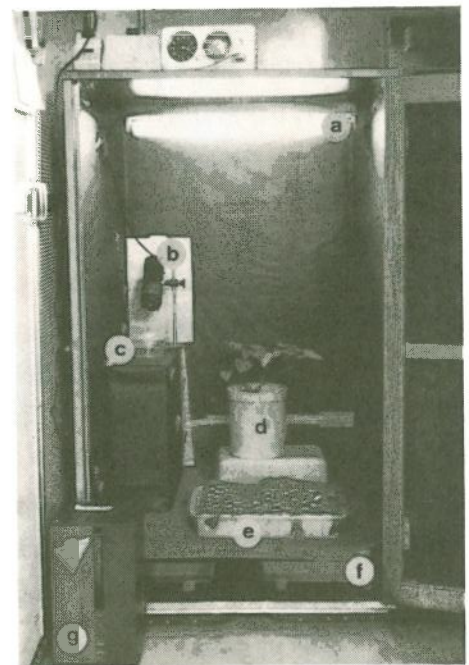


図2 採卵箱

表1 個別飼育と集団飼育の概要

個別飼育	集団飼育
<p>1～4 齢</p> <p>容積60mlのプラスチックカップに ふ化幼虫と約6gの人工飼料を入れ、 1週間後に餌を交換。その後は5 齢 脱皮まで放置。</p>	<p>ふ化後1週間は径14cm深さ2.5cmの プラスチックシャーレに30～50頭 の幼虫を収容。 1週間後から5 齢脱皮までは22×30×6 cmのプラスチック容器に網目1.3×1.3 cmのプラスチック網を敷き棒状に切っ た飼料を入れて飼育。</p>
<p>5 齢</p> <p>200ml容のプラスチックカップに約 30gの人工飼料を入れ、4日目以 降必要に応じて餌を追加。</p>	<p>38×57×13cmのプラスチックコンテ ナにカイコ上蒺用のポリエチレン製 まぶしを入れ、幼虫30～60頭を 収容。</p>
<p>老熟幼虫～蛹</p> <p>200ml容のプラスチックカップにティッ シュペーパーを1枚入れ、老熟幼虫 を収容。</p>	<p>12×40×5cmの杉材に直径3cm奥行き 10cmの穴を10個あけたものを用意し、 その中に老熟幼虫を収容し、木の板 でふたをする。</p>

6. 今後の課題

これまでにエビガラスズメの基本的な飼育体系を確立するとともに発育・休眠・行動などの基本的な特性の解明を進め、実験昆虫としての基礎はできたと考えられる。既にいくつかの大学で飼育されているが、より広く一般に利用されるためには解決すべき課題も残されている。

現在は幼虫の摂食性を良くし発育を斉一にするため、人工飼料にサツマイモの葉粉末を入れているが、これはどこでも簡単に入手できるわけではないので、市販の材料だけで調製できる、葉粉末を含まない飼料で飼育できることが望ましい。葉粉末を含まない飼料を食べて正常に発育する幼虫もいるので、栄養的には問題なく、摂食性の良い個体を選抜していけば葉粉末を含まない飼料でも飼育可能な系統の作出が可能と思われる。

もう1点は採卵法の問題で、現在、正常に採卵するためには、ある程度の広さの空間と

サツマイモの生葉を常時用意としている。生葉は交尾・産卵の刺激物質として重要と思われるが、冬期間の確保は困難が伴うので、葉の抽出物あるいは合成化合物での代用を検討している。

7. おわりに

現在、本種を材料として東京大学や筑波大学等と共同で、昆虫の発育制御に重要な役割を果たしているPTTH（前胸腺刺激ホルモン）をはじめとする神経分泌ホルモンの構造決定と遺伝子解析や飛翔行動の神経制御解析等いくつかの研究が進められ、成果が出はじめている。今後、本実験系を活用した研究ネットワークが一層広がることが期待される。

文 献

- 1) 木口憲爾 (1992) 蚕糸技術 144: 8-11
- 2) Kiguchi, K. and M. Shimoda (1994) *Zool. Sci.* 11: 143-147
- 3) 木口憲爾・霜田政美・田中良明・木内

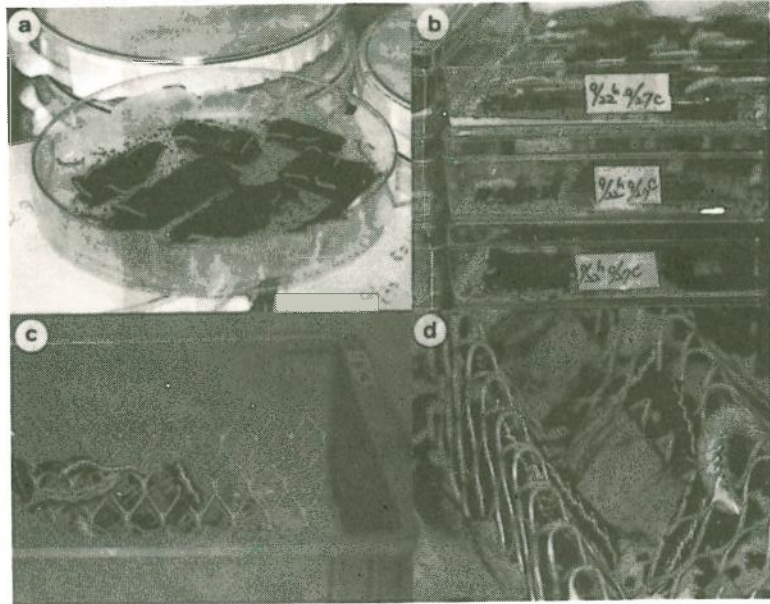


図3 幼虫の飼育状況

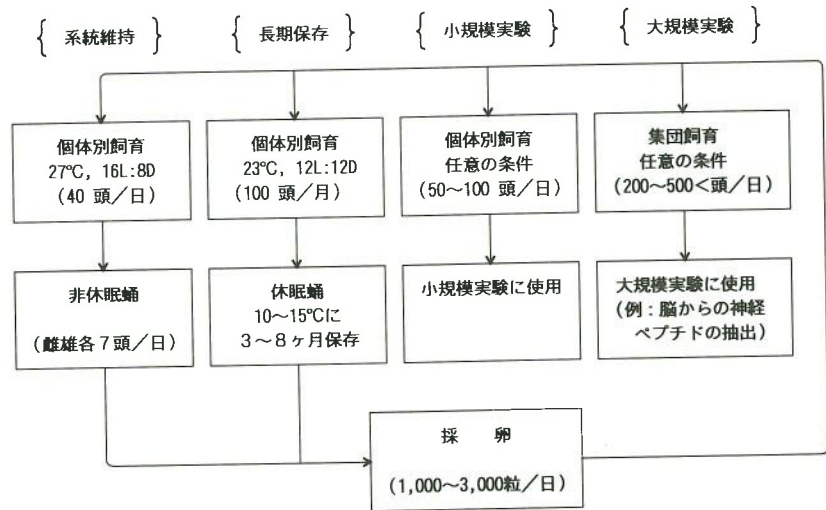


図4 エビガラスズメの飼育

- 信・竹田 敏 (1994) 蚕糸昆虫研報告 10: 37-52
- 5) 霜田政美・木内信・木口憲爾 (1995) 応動昆 39 (印刷中)
- 4) 霜田政美・上和田秀美・木口憲爾 (1994) 応動昆 38: 289-294

胚珠培養による *Alstroemeria ligtu* hybrids と *A. pelegrina* var. *rosea* 間の種間雑種の育成

埼玉県園芸試験場
石川貴之

アルストロメリア属には多数の原種が存在するが、その中で透明感のあるシンプルな花色が好まれて根強い人気を持つ *Alstroemeria ligtu* hybrids と早生性、大輪性の性質を持つ *A. pelegrina* var. *rosea* の種間雑種育成を目的に、胚珠培養の利用について検討した。その結果、*A. ligtu* hybrids を子房親とし、交配7日後及び14日後の胚珠を摘出して15°Cで培養したところ、幼植物体の形成率が高かった。胚珠培養からの成熟個体を形態的に観察したところ、両親種の形質が反映されており、雑種であることが確認された。

1. はじめに

アルストロメリアは近年の洋花嗜好に合致し、需要の伸びが著しい新しい切り花である。一般に、比較的低温を好み、問題となる病害虫が少なく生育も旺盛なことから、省エネルギー、省労力栽培が可能な作目として期待されている。

一方、オランダを中心として多数の営利品種が育成されているが、これらの導入に際しては、厳しい栽培契約のもとに高額なパテント料が課せられるため、生産者の経営を圧迫し、我が国の生産の伸びを停滞させている。また、オランダでは自国の風土にあった、冷涼な気候を好む原種を選んで、品種改良が進められてきたことが考えられ、我が国の夏期に高温な地帯では開花期間が短くなり、減収及び品質低下をまねくなど、栽培の問題点が指摘されている。さらに、花き全般における市場動向を精査すると、淡い色彩の切り花に対する需要が比較的多い傾向にある。これらの点を考慮し、我が国において栽培適性があり、日本人の嗜好にあった独自の品種を育成する必要性が認められた。

アルストロメリアはチリ、ブラジルなど南アメリカに広く自生し、100種以上の原種があるといわれている。開花期、草姿、花色、

花型などが実に多様で、育種による改良は無限の可能性を秘めている。*Alstroemeria ligtu* hybrids は *A. ligtu* と *A. haemantha* の自然交雑種と推定されているが、透明感のあるシンプルな花色が好まれて根強い人気を持ち、種苗費の負担が少ないため、現在切り花用として広く栽培されている。また、*A. pelegrina* var. *rosea* は原種の中で最も美しい花を有するもののひとつと評価され、大きな花径を持ち早生性の性質を示す。

一般的に、種間雑種個体の育成はいくつかの優良な形質を、栽培種に導入するのに有効な方法であるといわれる。しかし、遠縁な種間で交配を行うと、雑種胚は胚発達の早期に崩壊してしまうため、種子は得られないことが多い。いくつかの種間において、このような交配不親和性を打破し種間雑種個体を作成するために、胚珠培養は有効な手段となっている。ここでは、*A. ligtu* hybrids に *A. pelegrina* var. *rosea* の大輪性、早生性などの優良形質を導入する目的で、種間雑種を育成するため胚珠培養の利用について検討を行った。

2. 交配親和性

A. ligtu hybrids と *A. pelegrina* var. *rosea* 間の交配親和性を明らかにするために、開葯前に除雄を行い他の花粉が受粉しないように袋をかけ、柱頭が裂開した直後に正逆交配を行った。その結果ともに交配後子房の肥大は

認められるものの、成熟種子は得られなかった。

次に、*A. ligtu* hybrids と *A. pelegrina* var. *rosea* を正逆交配、または両親種を自家交配した場合における種子の発育経過を追跡するため、交配後1週間ごとに子房を採取し、FAA液で24時間固定した後に、各子房から胚珠を摘出して胚珠の肥大状況を、また、パラフィン切片を作製して胚の発達状況をそれぞれ観察した。

A. ligtu hybrids および *A. pelegrina* var. *rosea* を自家交配した場合には、ともに交配21日後まで胚珠の急激な肥大が認められたが、*A. pelegrina* var. *rosea* と比較して、*A. ligtu* hybrids は胚の発達が早く進行した。すなわち、パラフィン切片による観察によると、*A. ligtu* hybrids では交配7及び14日後に球状胚が、同21後以降に魚雷型胚が観察されたのに対し、*A. pelegrina* var. *rosea* では、交配7,14及び21日後に球状胚が、同28日後以降に魚雷型胚が認められた。

A. ligtu hybrids に *A. pelegrina* var. *rosea* を交配したところ、交配7日後までは胚珠の肥大が見られたが、同21日後には胚珠が褐変、萎縮していた。さらに、パラフィン切片による観察から、その後すべての胚が崩壊するのが認められた。

A. pelegrina var. *rosea* に *A. ligtu* hybrids を交配した場合には、交配21日後までは胚珠の肥大が認められたが、同28日後には胚珠が褐変、萎縮していた。また、パラフィン切片の観察により、その後同様にすべての胚が崩壊するのが認められた。

3. 胚珠培養

A. ligtu hybrids と *A. pelegrina* var. *rosea* 間の正逆交配後の胚を救済する目的で、交配後の経過日数が異なる胚珠を用い、70%エチルアルコールに1分間、2%次亜塩素酸ナトリウムに20分間浸漬後、子房壁を取り除いて胚珠に胎座をつけたままMS培地(しょ糖3%, ゲルライト0.2%, pH 5.7)に植え付け、20°C, 16時間照明下(3000 lux)で培養を行った。その結果、*A. ligtu* hybrids を子

房親とした交配7及び14日後の胚珠を、*A. pelegrina* var. *rosea* を子房親とした交配7, 14及び21日後の胚珠を用いた場合には、いずれも発芽、発根が認められ両組み合わせにおいて幼植物体が形成された(図1,2,3)。

培養の温度条件が胚珠の発育に及ぼす影響を明らかにするため、*A. ligtu* hybrids に *A. pelegrina* var. *rosea* を交配後、10日間を経過した子房から胚珠を取り出し、10,15,20及び25°Cの温度条件下で同様に培養したところ、幼植物体の形成には15°Cが最適であると考え



図1 胚珠からの発芽状況

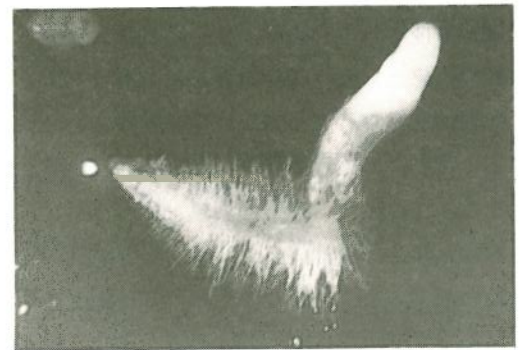


図2 胚珠からの発根状況



図3 胚珠培養により形成された幼植物体

られた。

4. 雑種検定

A. pelegrina var. *rosea* を子房親とした培養個体は全株が生育途中で枯死し、開花にいたらなかった。*A. ligtu* hybrids を子房親とした場合には成熟個体が得られたので、両親種と形態上の比較を行った。その結果、培養個体は *A. ligtu* hybrids と *A. pelegrina* var. *rosea* の中間的な大きさの花に、子房親固有の明るいピンクの地色と、花粉親の特徴であるブロッチを併せ持つ花色が確認された。また、培養個体は両親種の中間的な草丈を示し、*A. pelegrina* var. *rosea* の持つ葉が肉厚であり、根茎が土壌の浅層部で水平方向に伸張するなどの性質が導入されていた。

A. ligtu hybrids は明るく淡い色彩が日本人の好みに合い、切り花としての需要はあるが、葉が黄化し枯れ上がりやすい性質のため、外観が損なわれ、また、根茎が地中深く潜るため増殖管理に労力を要するなどの欠点がある。本技術により獲得された雑種個体は *A. ligtu* hybrids の花色を基盤として継承し、かつ収穫後も葉の黄化が少なく、さらに増殖管理が著しく容易となるなど、新しい切花素材としての利用価値は高いものと判断され、品種登録の出願を行ったところである。

また、得られた植物体の花粉を調べた結果、アセトカーミン染色率は2%に達せず、自家受粉及び両親種への戻し交雑により種子が獲得できなかった。今後、コルヒチン処理による稔性回復法を明らかにし、育種素材としての利用も併せて検討したい。

5. おわりに

これまで述べてきたように、*A. ligtu* hybrids と *A. pelegrina* var. *rosea* 間の雑種個体の育成を一応完成させたが、その組み合わせ以外にも、オランダなどで育成された営利品種の交配親になっていることが予想される *A. aurantiaca*, *A. pelegrina*, *A. pulchella*, *A. violacea* などの原種を用い、胚珠培養を試みている。本法による雑種個体の獲得率は、交配組み合わせにより差異が認められる

ものの、現在までに十数種の雑種個体が育成されており、広範なアルストロメリア属原種間の組み合わせに適用できるものと考えられた。

アルストロメリア栽培上の問題点については略記したが、現実にはオランダの営利品種が我が国においても栽培されているわけで、その技術確立を等閑視することはできない。一方、アルストロメリアは大変丈夫な植物で、一度植え付けると雑草のように増殖するため、営利品種の栽培に際しては細かい規定が設けられ、また、どのような原種を用いて育成されたかは高度の企業秘密となっている。こうした育種経過の非公開性が、育種の発展にどのような影響を及ぼすかという問題は置くとして、これら営利品種の生産力を最大限に発揮させるためには、育種素材として使用された原種を明らかにするとともに、その生理、生態的特徴を予め理解しておく必要があると思われる。近年、核型分析などの手法を用いて、営利品種の育成に関与した原種を解明する研究が進められており、漸次明らかにされていくだろう。

今後の育種目標についての定見は特にないが、アルストロメリアは湿地から砂漠地帯にかけて、日のあたらない熱帯雨林の低地からアンデス山脈の高地にいたるまで、幅広い環境条件下に100を超える原種が自生している。したがって、多様な原種の中から有望な形質を持つものを育種素材に選び、胚珠培養技術を適用することによって、現在の営利品種にはない優良形質を備えた品種が育成される可能性も十分に考えられる。

文 献

- 1) Aker, S. and W. Healy (1990) *Herbertia* 46(2) : 76-87
- 2) Hang, A. and T. Tsuchiya (1988) *Plant Breeding* 100 : 273-279
- 3) Tsuchiya, T. et al. (1987) *Bot. Gaz.* 148(3) : 519-524

文献情報

遺伝子導入による除草剤耐性植物の作出

形質転換植物を作出するために用いられる構造遺伝子は、種の起源を問わず利用できる。その中で、バクテリア由来の遺伝子は、選択マーカー、レポーター遺伝子、除草剤耐性遺伝子、耐虫性遺伝子等に広く利用されている。本論文では *Arthrobacter oxidans* P 52 由来の phenmedipham carbamate hydrolase (PMPH) 遺伝子を導入して、実用レベルの除草剤耐性タバコを作出した。除草剤耐性植物は今までに glufosinate, bromoxynil, 2, 4-D 耐性が作出されたが、新たに PMPH が加わり対象植物によって遺伝子の選択肢が広がった。

phenmedipham はカーバメイト化合物の一つで高等植物の光合成を阻害する。すでにこの化合物は photosystem II で機能する D1 polypeptide の QB 部位に結合する phenylurea と拮抗阻害を起こすことが知られている。また、ハウレンソウ、イチゴ、カモミール、テンサイ等これらの植物は phenmedipham に耐性があり、特にテンサイの除草剤として広く使われている。テンサイは phenmedipham を 2 段階反応で glucoside の形にして不活化する。しかし、一般的にバクテリアや哺乳動物では加水分解で不活化する。今回使用した遺伝子も *Arthrobacter oxidans* P 52 由来の加水分解酵素であり、基質特異性は割と狭く phenmedipham と desmedipham の 2 つに活性を示した。

タバコへの遺伝子の導入にはバイナリーベクター pBIN19 に、CaMV35S-PMPH-OCS 遺伝子を導入し、*A. tumefaciens* LBA4404 株を介したリーフディスク法を用いた。CaMV35S-PMPH-OCS の構築は大きく分けて、1) PMPH の 1st メチオニンコドン GTG を ATG に変えたコンストラクト、2) 転写開始点から 1st メチオニンコドンまで

の塩基配列を除いたシリーズ、3) タバコモザイクウイルスの 5'-非翻訳配列とプロテアーゼインヒビター II のリーダー配列をそれぞれ PMPH の 5' に付加したコンストラクトの 3 種類である。

それぞれの形質転換タバコの PMPH mRNA 転写量は 1) が最も低く、この発現量を 1 とした場合 2) は 2~3 倍、3) は 4 倍程見られた。

phenmedipham を用いたスプレー試験では、1kg/ha, 3kg/ha, 10kg/ha に相当する濃度で行い、光合成活性の変化を蛍光で測定した。通常のタバコは 1kg/ha の濃度で 8 時間後には、10% まで減少した。phenmedipham に対して抵抗性を示すテンサイは 30% 前後まで減少した。これに対して、プロテアーゼインヒビター II のリーダー配列を付加したコンストラクトでは 90% 以上を維持した。さらに、3kg/ha では 80% 前後、10kg/ha では 50% 前後を維持した。また、抵抗性のレベルは mRNA の転写量と一致していた。

phenmedipham, desmedipham, karbutilate に対する抵抗性を同様にスプレー試験した。通常のタバコは 1kg/ha の濃度で完全に萎れてしまう。これに対して 3) のグループの形質転換体は phenmedipham に対しては 3kg/ha まで全くダメージは見られず、10kg/ha でも 50% 前後のダメージしか受けなかった。desmedipham では、多少抵抗性が落ちたがそれでも 1kg/ha では全くダメージは見られず、3kg/ha でも 50% 前後のダメージであった。karbutilate は photosystem II の QB 部位で phenmedipham と同様の拮抗阻害を起こす除草剤であるが、これらの化合物には全く抵抗性を示さなかった。この事は、PMPH の基質特異性を反映したものである。以上の結果から、バクテリア由来の PMPH を導入して、phenmedipham 抵抗性タバコの作出に成功したといえる。

著者らは、プロテアーゼインヒビター II のリーダー配列を付加したコンストラクトを用いて高い除草剤抵抗性タバコを得たが、細胞外で PMPH 活性は検出できなかった。これ

は、実験手法の問題だとしているが、詳細な実験を行わなければならないであろう。しかし今回の実験では、タバコモザイクウイルスの5'-非翻訳配列を付加することで同等の mRNA の転写と抵抗性が得られているので、PMPH を細胞外に局在させる必要はなかったといえる。また今までにも指摘されているがバクテリアの遺伝子を効率よく利用するためには、十分な転写、翻訳が得られるよう、注意深くコンストラクトする重要性が示された。

PMPH の他の利用法としてはトマトやナタネ等の除草剤抵抗性植物の作出や形質転換の選択マーカーが考えられる。実際の農業利用では、ある種の雑草が phenmedipham 1kg/ha の濃度では十分なダメージを受けないので、抵抗性遺伝子の組み合わせで克服することになるであろう。

これまでに除草剤抵抗性植物は遺伝子導入によって数種類得られている。今後は、それぞれの除草剤抵抗性植物の野外試験と併せて、栽培地の植生や導入する植物の性質に合った、導入する抵抗性遺伝子や農薬の種類を組み合わせるきめ細かい育種が望まれる。

(抄訳 藤本英也—植工研)

(FUJIMOTO Hideya)

Expression of a bacterial gene in transgenic plants confers resistance to the herbicide phenmedipham

Streber, W. R., U. Kutschka, F. Thomas and H-D. Pohlenz

Plant Molecular Biology 25 : 977-987 (1994)

文献情報

サーカディアンリズムで発現が調節されている遺伝子

生物は、外界からの周期的な刺激を感知し、それに同調させて体内の生理、分化、行動を調節する機構を備えている。最もよく研究されている生物リズムにサーカディアンリズム

(概日性)がある。生物は、約24時間の明暗のサイクルにうまく適応している。例えば、昼行性、夜行性動物の存在はすぐ思いつく。植物では、砂漠に生える CAM 植物が昼間気孔を閉じ、夜間に開くリズムなどが環境に対するみごとな適応といえる。植物のサーカディアンリズムの研究成果は、キクの電照栽培やポインセチアの短日処理などをはじめ多くの園芸植物の栽培に活かされている。このように身近な存在のサーカディアンリズムも遺伝子レベル、分子レベルでの研究となると最近になってようやく報告例が増えてきた。しかし、生物時計の本体はいまだにブラックボックスのままである。

本論文の筆者らは、昼と夜に採取したカラシを材料にダイファレンシャルスクリーニングを行い、サーカディアンリズムによって発現がコントロールされる遺伝子 *Sagrp 1* と *Sagrp 2* をつりあげた。16015Da と 16360Da のタンパクをそれぞれコードしている。この2つの遺伝子発現は光あるいは温度の変動に同調して内在性の生物時計に制御されている。連続光照射下でも遺伝子発現の周期が保たれるのは興味深い。2つのタンパク (SaGRP) は94.4%の相同性があり、グリシン含量が39%を占める。ノーザン解析によって、この遺伝子の RNA レベルでの発現は、ツアイトゲーパー時間 (ZT) で 8 時間-12 時間で最大となり、ZT 20 時間で最小となることが判明した。抗体を作製してウエスタンブロット解析した結果、組織における SaGRP の変動は非常に小さいものであった。この観察結果からは、mRNA レベルとタンパクレベルが矛盾するように思われる。この論文の中で、特筆すべきは、インサイチュウハイブリダイゼーションによってこれらの遺伝子が生長点組織で主に発現していることを実証したことである。生長点組織は、最も外界からの刺激に敏感で、植物が即適応のための行動をおこす場所である。論議の中で筆者らは、SaGRP タンパクが RNA 結合タンパクと高いホモロジーがあることから、自らの RNA も含めて、サーカディアンリズムによって発現する種々

の遺伝子の発現を直接調節するのではないかと推測している。これまで報告された生物時計によって制御されている遺伝子のいくつかは、このような発現調節タンパクである。

植物は、光の刺激をまずファイトクロームと呼ばれる受容体で感知し、その情報を時計に送る。時計は、次に環境がどのように変化するかを予知して、種々の遺伝子の発現のタイミングと場所を指示し、精密にカップリングさせて、最終的なサーカディアンリズムを実現する。*Plant J.* 6: 457-470 (1994) では、アラビドプシスからとれた CAB2 プロモーターが、サーカディアンリズムによるこの遺伝子の発現に重要であることが報告された。今後植物のサーカディアンリズムと遺伝子発現、DNA の制御領域、DNA 結合タンパクそして RNA 結合タンパクなどの研究が進み、時計本体の解明まで到達できれば、農学面での新しい応用場所も開拓されることだろう。

蛇足だが、*Nature* 11月3日号に脳中に光を感知するタンパクが存在するという論文が掲載された。これらの知見が将来、例えば、時差ボケの防止に役立つようになるかもしれない。植物におけるサーカディアンリズムの研究もまた大なる可能性と夢を感じさせる分野である。

(抄訳 増田 税一JT 生命研)

(MASUTA Chikara)

A light- and temperature-entrained circadian clock controls expression of transcripts encoding nuclear proteins with homology to RNA-binding proteins in meristematic tissue

Heintzen, C., S. Melzer, R. Fischer, S. Kappeler, K. Apel and D. Staiger
The Plant J. 5: 799-813 (1994)

文献情報

クローン化した TMV 抵抗性遺伝子 (N gene) の産物は Toll あるいは Interleukin-1 receptor との類似性を示した

植物はウイルス、バクテリア、カビ、線虫などにより引き起こされる病害に対して、局所的な抵抗性反応でその病原体の増殖あるいは拡散を防いでいる。この積極的な抵抗性反応の一つに病原体が侵入した個所で壊死反応が起こる過敏反応 (HR: hypersensitive response) が知られている。

N gene は TMV に対する優性の抵抗性遺伝子で、この遺伝子を持ったタバコにタバコモザイクウイルス (TMV) を接種すると壊死反応により TMV を封じ込め、抵抗性を示す。今回この N gene がトランスポゾンタギングによって単離されたことが報告された。

このトランスポゾンタギングはトウモロコシ由来の *Activator* (*Ac*) が用いられた。また、本来抵抗性を示す遺伝子をトランスポソンの挿入により不活化するため、ネガティブな選抜となり、困難が予想されたが、著者らは N gene の働きが可逆的な高温感受性である点に着目し、N gene の機能が失われた物のみを得るポジティブな選抜手法を編み出した。*Ac* を持つ Sumsun NN と SR1 nn を交配した F₁ 64,000 に TMV を感染させた。これを 28°C で育成すると、N gene が不活化され、たとえ *Nn* の遺伝子型であってもシステミックな感染が起こった。その後育成温度を 21°C に下げることによって N gene の機能が回復し、全身で過敏反応が起こり *Nn* タイプのタバコは壊死した。この選抜の結果 36 の N gene 機能を失った (*nn* タイプの) 個体が得られた。ただし、コントロール実験でも類似した頻度で N gene の機能が失われたことから、全ての変異で *Ac* の挿入が起こったとは考えにくいものだった。

Ac を用いたタギングの利点の一つとして、*Ac* の離脱によりある程度の頻度で復帰変異が引き起こされる点があげられる。そのため、

(TMV^{R/S})を示す事が期待された。15系統を調べた結果1系統のみがこのような形質を示す後代を残し、Acの挿入によるN geneの不活化が引き起こされていることが示された。

Acが挿入された領域をクローン化し、アグロバクテリウムのT-DNA領域に挿入し、SR1 nnを形質転換したところ、TMVの感染に伴いHRが引き起こされた。この結果、まさにクローン化した断片がN geneであることが示された。

このN geneの産物はP loopと呼ばれるkinase, ATPaseそしてRasタンパク等に見られるATP/GTP結合部位、タンパク間の相互作用に関わっていると考えられているleucine rich repeat (LRR)を持っていた。そして、N geneの産物のN末端はショウジョウバエの発生分化に関わるTollやヒトのインターロイキン1レセプター(IL-1R)の細胞質ドメインと高い相同性を示した。相同性の見られた領域はTollやIL-1Rの関与するシグナル伝達に必須の部位である。特に、インターロイキン1レセプターは転写調節因子であるNF-kBを活性化することで様々な防御反応を引き起こす事が知られている。

N geneは植物の防御反応のシグナル伝達系でエリシターたるTMVの遺伝子産物に対応するレセプターである可能性が高い。驚くべき事に、シロイヌナズナからクローン化されたバクテリアに対する抵抗性遺伝子RPS2とも全域にわたって高い相同性を示した。異なる植物の、異なる病原体に対する抵抗性遺伝子間で相同性が高かったことから、今後、病原体を認識しHRを引き起こすタイプの防御機構に属する他のメンバーも構造的あるいは塩基配列の相同性から単離される事が期待される。著者らは病害抵抗性遺伝子が分離されることで、従来の育種ではなし得なかった、種の壁を乗り越えた抵抗性の導入が可能になることを望んでいると結んでいた。

(抄訳 杉本和彦—生物研)

(SUGIMOTO Kazuhiko)

The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N : similarity to Toll and

the Interleukin-1 receptor

Whitham, S., S. P. Dinesh-Kumar, D. Choi, R. Hehl, C. Corr, and B. Baker
Cell 78 : 1102-1115, (1994)

文献情報

巨大DNA分子を特異的に切断する方法

ヒトやイネの全ゲノムを解読しようとするプロジェクトが開始されて数年が経過しているが、その成功の重要な鍵を握るのが、いかにして効率よくゲノムライブラリーを構築し、全ゲノム中の遺伝子をカバーするかという点であることは異論のないところである。そのような目的で制限酵素で部分消化または完全消化したゲノムDNAをコスミドや酵母人工染色体(yeast artificial chromosome; YAC)に連結することが行われている。現在一般的に市販されている制限酵素は最大でも8塩基認識であり、その切断によって得られるDNAは平均 $4^8=66\text{kb}$ となる。よってゲノムDNAのようなメガベース単位の巨大なDNAを切断しそのライブラリーを作製するような目的ではいかに8塩基認識の酵素といえども不十分であり、さらに長い認識配列を持つ制限酵素もしくは同等の働きをする薬剤の開発が望まれている。

Pendergrastらは、新規の制限酵素様薬剤を開発するために、DNAに特異的に結合するタンパク質にDNAを切断する作用を持たせることを考案し、その目的に合致するDNA結合タンパク質として大腸菌のcatabolite activator protein (CAP)を選出した。CAPは2回回転対称の22塩基対のDNA(5'-AAATGTGATCT/AGATCACATTT-3')を認識して2量体の形で結合し、DNAを約90度の角度に折り曲げる。その結果、CAP2量体の側面に位置する24-26番目および89-91番目のアミノ酸がDNAに近接するようになる。CAPが非特異的に

DNA に結合する場合には、このような DNA の折り曲げは生じず、したがって側面のアミノ酸が DNA に近接することも無い。そこで彼らは既存の 178 番目の易反応性システイン (solvent-accessible cystein) をセリンに、また 26 番目のアミノ酸リジン (lysine) を易反応性システインに置換した後、その部分に DNA 切断作用のある copper : o-phenanthroline を導入して得られる CAP 誘導体 [(((copper : o-phenanthroline-5-yl) carbamoylmethyl) carbamoylmethyl) - Cys 26 ; Ser 178] CAP (以後 copper : OP²⁶CAP と略称) を作製した。実際に copper : OP²⁶CAP が DNA を特異的に認識し切断することができるかどうか、7.2kb または 48kb の DNA 中に 1 か所だけの認識部位を持つ DNA を鋳型として cAMP, 還元剤の存在下で 37°C, 6 時間インキュベートした後電気泳動した。その結果、反応は 90% 以上の効率で進行しており、目的の大きさの DNA 断片が生じていることが明らかとなった。またその反応は非常に特異的で、CAP 認識部位を持たない DNA に対しては働かないこと、反応には cAMP, 還元剤が必須であることが、コントロール実験から明らかになった。筆者らが最終的な目的としているメガベース単位の DNA に対しても切断が行われるかを調べるため、アガロース中に包埋した 4.7Mb の DNA を鋳型として *Not* I 単独切断および *Not* I と copper : OP²⁶CAP の二重切断を行い、CHEF 法を用いて電気泳動した後、サザンハイブリダイゼーションで切断断片を検出した。その結果、70% 以上の効率で同様にかつ特異的に反応が行われることが判明した。以上の結果から、筆者らは copper : OP²⁶CAP が染色体のマッピングやクローニングに有用であると結論づけている。

では、copper : OP²⁶CAP は DNA の認識

配列中のどこを切断しているのだろうか。彼らは、CAP 認識配列を持つ 40 塩基対の合成 DNA の一方の鎖のみを ³²P で標識した後、それを鋳型として反応を行い、その分解産物を変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動することで切断部位を検討した。その結果、DNA の切断は基本的には 22 塩基対の 2 回回転対称の 1 塩基目で生じ、鋳型 DNA は 21 塩基の 5' 突出末端を生じることが明らかとなった。一般に制限酵素で考えられているほどの厳密な切断部位の特異性ではないものの、このような突出末端を生じることが切断された DNA をクローニングする際に有効な特徴であると考えられる。

以上のように、Pendergrast らが考案した新規制限酵素様薬剤を開発する方法は、認識配列に特異的に結合して鋳型 DNA を折り曲げ、(ほぼ) 特定の部位で切断するという現在明らかになっている制限酵素の働きを模倣するものであることが明らかとなった。今回作出された copper : OP²⁶CAP は 22 塩基対の認識配列を持つため、平均して 4^{22} すなわち 1.76×10^4 Gb に 1 か所の認識部位を持つことになり、染色体 DNA を切断して直接クローニングしようとするには少々不向きであるかもしれない。しかしながら同様の手法が他の DNA 結合タンパク質に適用されれば、適度な大きさを持つ DNA の切断が可能となると考えられ、今後さらに多くのアプリケーションが行われることを期待したい。

(抄訳 柄澤 明—東北大)

(KARASAWA Akira)

High-specificity DNA cleavage agent : Design and application to kilobase and megabase DNA substrates

Pendergrast, P. S., Y. W. Ebright and R. H. Ebright

Science 265 : 959-962 (1994)

第8回国際植物組織培養会議に参加して

東京大学 農学部 育種学研究室
吉田 薫

1994年6月12日から17日まで、イタリアのフィレンツェで開かれた第8回国際植物組織培養会議(The VIIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture)に出席する機会を得た。この会議は植物の組織培養技術を用いた科学、バイオテクノロジーの研究者が一堂に会する国際会議で、4年に1回開かれる。今回の会議の参加者は約1300名、発表題数は約1000件であった。会議の開かれたフィレンツェは、イタリア中部に位置するトスカーナ州の州都であり、ルネッサンス文化の中心として有名な都市である。石畳の細い通りや調和のとれた建物など、ルネッサンス時代の古い町のたたずまいが損なわれることなく現存することには驚きを禁じ得ない。会議は市内にあるバツ要塞の中の会議場で開かれた(図1)。会議3日目の夜には14世紀に立てられたサンタ・クローチェ教会でオルガンコンサートが開かれたり、閉会式では伝

統芸能であるFlag-waving showを見せてくれたりと、会議以外にも楽しめるような工夫がなされていた。

今回の会議ではVasil, I. K., Salamini, F., Carpita, N. T., Hahn, M. G. および Sussex, Z. による特別講演が行われたほか、20のセッションに分かれてそのテーマごとにシンポジウムとポスター発表が行われた(表1)。また、それ以外に14題のワークショップが開かれた。20のセッションのうち発表件数が100を超えていたのは「再分化」、「繁殖」、「遺伝子導入」、および「不定胚発生」の4セッションであった(表1)。以下に、主な発表について記述する。

1. 再分化技術

不定芽または不定胚を経由する植物体再分化は、増殖のためばかりでなく、人工種子や遺伝子導入のための基礎的技術としてますます重要となってきた。そのため、再分化



図1 会場となったバツ要塞入口

表1 第8回国際植物組織培養会議の日程

	6月 12日	13日	14日	15日	16日	17日
9:00			シンポジウム 細胞融合 42 遺伝子導入128 細胞間輸送 9	シンポジウム オルガネラ 11 熱帯植物 35 不定胚発生118	シンポジウム 繁殖 105 分裂組織 16 二次代謝 78	シンポジウム 農業形質 14 シグナル伝達 8 大量繁殖 26
10:00	開会式					
12:00	昼食 特別講演		昼食 特別講演	昼食 特別講演	昼食 特別講演	昼食 特別講演
14:00	シンポジウム 再分化 189 一次代謝 25	ポスター	シンポジウム 半数体 61 遺伝変異 61 細胞表層 11	シンポジウム 繁殖 105 分裂組織 16 二次代謝 78	シンポジウム 生殖 10 ホルモン 36 ストレス 17	
16:30						
17:00	懇親会	ワークショップ 単子葉植物 マメ科植物 木本 人工種子 幼若化と成熟	ワークショップ 培養技術 分化マーカー 細胞分化 分裂サイクル 遺伝子導入技術	ワークショップ 形質転換 選抜 変異性と安定性 凍結保存		閉会式
19:00						

胚発生」の3セッションをあわせると発表件数は400題を超えたが、そのうちのほとんどは、効率のよい培養系の確立を目指したものであった。用いる材料や培地成分、培養条件等の検討が様々な植物種においてなされていた。組織培養技術が着実に進展していることがうかがわれた。

2. 遺伝子導入

4年前の前議会でも遺伝子導入に関する報告は多かったが、そのほとんどが導入細胞でのtransientな発現を確認したにすぎなかった。しかし、今回の会議では、様々な作物で形質転換体の作出の報告が相次いだ。100を超える発表例を見ると、遺伝子導入の方法は2つに絞られてきているのがわかった。双子葉植物ではアグロバクテリウム（主として *Agrobacterium tumefaciens*）によるものが圧倒的に多かった。一方、単子葉植物では、PEG法やエレクトロポレーション法に替わってパーティクルガン法が多くなってきていた。パーティクルガン法等でこれまで問題とされてきた不稔やアルビノ、低い形質転換効率については、材料に未熟胚、茎頂、未熟花序といった再分化能の高い組織を用いて短期間で形質転換体を再分化させることで克服できることが多くの報告例から示された。Lörz, H. はPEG法やエレクトロポレーション法のようにプロトプラストを経由するこ

とのないパーティクルガン法の方が、稔性を持った形質転換体を得やすいと報告した。実際、この方法では稔性のある形質転換体がコムギ、ライコムギ、ライ、オオムギ、イネ、トウモロコシ、およびソルガムで得られたことが複数の研究者の報告からわかった。

また、これとは別に、Hiei, Y. ら（日本たばこ株）は、アグロバクテリウムによる形質転換が困難とされてきた単子葉植物であるイネを *A. tumefaciens* により効率よく安定的に形質転換できる系を開発したと報告した。彼らは、増殖能および再分化能の高い胚盤カールスを材料とし、強病原性を有するスーパーバイナリーベクターを用いることで高頻度で形質転換が可能なること、導入遺伝子が安定的にゲノムに組み込まれることを示した。導入遺伝子に目を向けると、選抜マーカーとしてのカナマイシン耐性遺伝子やハイグロマイシン耐性遺伝子、そしてレポーター遺伝子としてのGUS遺伝子ばかりが目についた。これは、ほとんどの発表が形質転換系の確立に主眼を置いていたからである。有用形質の導入例は、耐病性や耐虫性を付与するための遺伝子（ウイルスのコートプロテインやサテライトRNA、エンドトキシン等）の導入に関する報告がわずかに見られただけであった。実用的農業形質を導入するための情報が圧倒的に少ない現状では致し方ないが、今後、形質

転換技術を利用してどんな作物をデザインしてゆかが問われることになる。

3. 試験管内受精

遺伝子導入以外のセッションで興味ある発表が見られたのは reproductive system のセッションであった。このセッションの発表数は10とわけて少なかったが、シンポジウムでの Kranz, E. と Holm, P. B. の発表は注目された。Kranz はトウモロコシの卵細胞と精細胞をマイクロマニピュレーターにより取り出し、それを電気的に融合させたあと、培養して稔性のある植物体にまで成長させた。これは、*in vitro* fertilization という新しい技術を確認したことを示している。Holm は、オオムギの受精直後の卵細胞をやはりマイクロマニピュレーターで取り出し、培養して稔性のある植物体を得たことを報告した。これらの結果は、植物においても卵細胞や精細胞を操作できる時代が到来したことを感じさせるものであった。

4. 不定胚形成のメカニズム

不定胚形成は種子中の接合胚とほぼ同じ経過をたどると考えられてきたが、Timmers, A. C. J. はこれに疑問を投げかけている。彼は、蛍光プローブを用いてカルシウムの分布や pH 勾配を、抗体を用いてカルモジュリンの分布を調べたところ、ニンジンで不定胚で見られるカルシウムやカルモジュリンの分布、pH 勾配のパターンは、同じ stage の接合胚とは違っていて、むしろ、発芽する時期の成熟胚のパターンによく似ていたと報告した。

ニンジンで以前から報告のあった不定胚誘導時に細胞外へ分泌されるタンパク質 (lipid transfer protein と endochitinase) に関しては、ニンジン以外にアルファルファやドイツトウヒでも相同なタンパク質が培養細胞から培地中に分泌されていることが報告された。

本会議の直後にオランダのアムステルダムで開催された第4回植物分子生物学会議の影響か、不定胚形成を分子生物学的に解析した例は少なかった。不定胚形成に関連した

cDNA 単離の報告はオオムギ (Mordhorst, A. P.) とイネ (Yoshida, K. T.) で見られただけであった。そんな中で、ワークショップ「細胞分化」で de Vries, S. が発表した differential display に関する報告は注目された。differential display 法は、RT-PCR 産物を比較して、例えば stage 特異的あるいは組織特異的な PCR バンドをクローニングする方法で、従来の differential screening に比べ、発現量の少ない遺伝子も容易にクローニングできる点が優れていると考えられる。de Vries は differential display 法でクローニングした遺伝子が、ニンジンの培養細胞のごく一部 (不定胚形成能を持つと考えられる) で発現していることを *in situ* hybridization で示し、不定胚形成の制御に関わる発現量の少ない遺伝子のクローニングの可能性を示唆した。differential display 法については、分子生物学会議でもいくつか報告があり、今後、遺伝子単離の有力な手段となることが予想された。

今回の会議は、4年前の第7回の会議に比較すると、発表数、参加者数とも半数近くに減少し、ポスター発表もエントリーはしたものの実際には欠席したものが20%近く見られた。発表内容もこれまでの研究成果を種々の植物に適用し発展させたものがほとんどであり、細胞の機能や形態形成のメカニズムを明らかにするための分子生物学的、分子遺伝学的、あるいは reverse genetics といったアプローチの研究成果はほとんど分子生物学会議で発表されていて、明らかに分子生物学会議の影響を受けてしまったものと思う。組織培養はこれまで、植物バイオテクノロジーの基礎として着実な歩みを続けてきた。培養会議も、理学、農学、薬学、そして工学の研究者の貴重な情報交換の場を提供してきた。しかしながら、分子生物学が隆盛になってきた今、組織培養と培養会議の転換期を迎えたことだけは確かなようである。

— 農文協ビデオ —

生研機構・バイオマニュアルシリーズ No.6

酵母のバイオテクノロジー

VHS 約30分 定価 30,000円(税込み)

◆作品のねらい◆

酵母は、醸造や発酵食品、パン製造に、微生物の中でもとりわけ人間の食生活になくてはならない存在です。

酵母に注目しているのは食品メーカーだけではありません。酵母は、病原性がない、保存しやすい、培養しやすいという特徴を備えています。そしてバクテリアと違い、核やミトコンドリアを持ち、ヒトにより近い真核生物です。この真核生物であることが、現代科学にとって酵母の真価なのです。生物学など基礎科学で、さらには医学の分野でも酵母の研究が盛んに行われています。

そこでバイオテクノロジーマニュアルシリーズの新作は、酵母を主人公に取り上げました。

酵母とは何か?から始まり、基礎研究の流れ紹介した後、バイオテクノロジー利用の方向、細胞融合や遺伝子組換え技術、バイオリクター利用など、食品分野での最先端技術のマニュアルを解説します。

◆ビデオの特徴◆

- 電子顕微鏡下の酵母の実像とコンピュータグラフィックスを組み合わせたダイナミックな映像と解説で、酵母の面白さと酵母の先端技術がわかります。
- 技術紹介が中心です。学生や研究者の卵が酵母に関する基礎的知識を身に付け、手技手法の獲得のための手助けとなる映像マニュアルです。

◆内容紹介◆

(内容は変更されることがありますのでご了解ください)

酵母とは／酵母の構造／酵母*Saccharomyces cerevisiae*のライフサイクル（ヘテロタリズム酵母とホモタリズム酵母）／人類と酵母のかかわり／酵母遺伝学の先駆者たち／解明された酵母の特徴／バイオテクノロジー利用の方向／細胞融合によるキラー酵母の育種（RNAプラスミド・細胞質遺伝・Zymolyase・核融合欠損変異株）／遺伝子組換えによる新酵母の作出（ H_2S 生成抑制遺伝子のクローニング・プラスミドの導入・発酵試験）／バイオリクター（連続発酵システム・固定化酵母）／スクリーニングの大切さ

(社)農山漁村文化協会 〒107東京都港区赤坂7-6-1 Tel 03-3585-1141 Fax 03-3589-1387

- | | | |
|--------------------|------------------------|-----------------------|
| ●東京支部 03-3585-1141 | ●北海道支所 011-271-1471 | ●東北支部 022-262-5804 |
| ●関東支部 0285-27-3047 | ●甲信越・北陸支部 0262-35-3427 | ●東海・近畿支部 052-571-3408 |
| ●大阪支所 06-962-0491 | ●中国・四国支部 086-231-2693 | ●九州支部 092-282-8550 |

編集後記

明けましておめでとうございます。

本誌は今年で8歳を迎えました。これはひとえに購読会員、執筆者ならびに関係の皆様
の温かいご支援とご協力によるものと心から
お礼申し上げます。

昨今バイオテク事情は、目を見はる研究の進歩の反面、企業では具体的成果・製品を求め

られています。このように厳しい情勢のもと
にあって、本誌が基礎研究と実用研究の間の
情報交換に、一層役立ちますよう、誌面の充
実を図りたいと考えています。

本年もこれまで同様ご指導、ご鞭撻いた
だきますよう、よろしくお願いいたします。

(大畑記)

ブレインテクノニュース (第47号)

平成7年1月15日発行

発行者 浜口義曠

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

〒105 東京都港区虎ノ門3丁目18番19号 虎ノ門マリビル10F
TEL. 03-3459-6565 FAX. 03-3459-6566

編集 (社)農林水産技術情報協会

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