

CODEN : BTEEEC

TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 62 号

JULY 15, 1997

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution



ダイズの根に寄生し肥大成長したダイズシストセンチュウの雌成虫

雌成虫は自らの体内を数百の卵で充満させたのち、体表がタンニン化してシストになる

(本文20ページ参照)

発行=生物系特定産業技術研究推進機構

総 説

岡田齊夫
生物農薬…………… 1

国内情報

岡田吉美
遺伝子組換えタバコを用いたB型肝炎診断用抗原の作出…………… 5

三上仁志
ブタの遺伝子マッピング…………… 8

土屋広司・山崎 文・宮島博文・本間孝宜・菅 博文
半導体レーザーの植物栽培への応用
—植物栽培用光半導体人工光源ユニットの研究開発—……………12

瀬井將公
全自動接木ロボットの開発……………16

地域の先端研究

串田篤彦
赤クローバの間作によるダイズシストセンチュウ防除……………20

文献情報

卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットにおける大豆タンパク摂取による骨量減少抑制効果……………23

コネキシン37遺伝子欠損による不妊……………23

カルコンシンセターゼ遺伝子導入ペチュニアにおける gene silencing 機構のモデル……………24

海外便り

佐藤 裕
タマネギの細胞質雄性不稔及び稔性回復遺伝子に関する研究
—ウィスコンシン大学での1年—……………26

特別情報

小川敏男
漬物の科学—浸透圧理論の応用—……………29

生 物 農 薬

生物系特定産業技術研究推進機構

岡田 齊夫

土、水、大気汚染など、地球規模の各種環境変化が深刻さを増しつつあり、この状態が続くと生物の生存さえも危うくしかねないと危惧されるようになってきている。“地球規模で考えて地域で実践する”の言葉がある。作物保護分野では、生態系に賦存する有害生物制御者の活用、生態系に調和する有害生物防除技術の開発、それらの有機的な統合による有害生物の総合管理技術の確立が大切である。

1. はじめに

病害虫、雑草などの有害生物の防除は、化学的防除、生物的防除、物理的防除および耕種的防除に大別される。近代の有害生物の防除は主に合成農薬によって行われ、これが食料生産の増大と安定に多大の効果をあげてきた。しかし、その不適切な使用によっては環境の汚染、天敵・拮抗生物などの減少、生物相の攪乱、誘導多発生（リサーチェンス）に加えて、有害生物の合成農薬に対する抵抗性の発達による農薬の効力低下などの事態も起こり、従来のように合成農薬に過度に依存した防除は国際的に再検討を求められている。今後の有害生物防除は、生態系に賦存する天敵・拮抗生物などを活用するとともに、生態系に調和した防除技術を開発して、各種資材との合理的な組合せによる総合管理技術の確立が重要である。生物農薬はそのための素材として重要な位置を占めるものである。

生物農薬は、この多くは自然界に普通に存在するもので、長所として、人畜や魚貝類に危害が少なく、植物に病気や薬害などの被害を起こさないことが経験的に知られている；また一般に作用範囲が限られるので、標的生物に選択的に利用できるから、生態系に攪乱

を起こす恐れは少ない；有害生物の生物農薬に対する抵抗性は発達し難い；などの特徴がある。しかし短所として、生物農薬は一般に効果が緩慢で、施用適期の幅が狭く、適期をはずして使用すると効果が現われ難い；施用・処理から効果が現われるまでに日数を要するものが多い；一部には製品の均一性、安定性の保持にも難点がある。

2. 害虫防除

1) 天敵昆虫の利用

天敵昆虫などの利用方法には、永続的効果を狙った放飼と操作による天敵昆虫などの増加に分けられる。後者はさらに接種的放飼、大量放飼および天敵の保護に分けられる。この天敵昆虫なども日本では、農薬取締法によって農薬として取り扱われているが、後者の前二者を生物農薬とみることが多い。諸外国では、天敵昆虫は農薬登録を必要としない国が多いので明らかではないが、西ヨーロッパでは30種以上が生産販売されている。

永続的利用：最初の激的な成功は1888～89年のカリフォルニアにおけるベタリアテントウの導入によるイセリヤカイガラムシの防除である。ベタリアテントウは1911年に日本に導入され、日本のイセリヤカイガラムシの防除に大成功を収めた。この成功例に刺激されて多数種の天敵昆虫が日本に導入され、果樹

害虫6種で成功した。

接種的放飼：害虫の発生初期は天敵がいないか、いても密度が極めて低いので、天敵昆虫などを接種的に放飼して被害を早く軽減させることを狙う。日本では1966年にチリカブリダニを導入したハダニ類防除の研究、1975年にオンシツツヤコバチを導入したオンシツコナジラミ防除の研究が多くの研究機関で行われてきた。その成果もあって、施設イチゴのハダニ類にチリカブリダニ、施設トマトのオンシツコナジラミとタバココナジラミにオンシツツヤコバチが農薬登録された(表1)。また登録申請中の天敵には、ミナミキイロアザミウマにククメリスカブリダニ、アブラムシ類にコレマンアブラバチおよびショクガタマバエならびにマメハモグリバエにハモグリコマユバチ+イサエヒメコバチがある。さらにアザミウマ類にナミヒメハナカメムシなど多数種の天敵昆虫利用の研究が行われていて、近い将来、多種類の天敵昆虫などが害虫防除に利用できるものと期待されている。

大量放飼：果樹のクワコナカイガラムシにクワコナカイガラヤドリバチが生物農薬とし

て開発され、1970年に登録された(表1)が、輸送の問題などから製造販売は1年で中止された。*Trichogramma* 属卵寄生蜂は飼育が比較的容易で、害虫防除に実用化されている国がある。日本でもコナガ、アワノメイガなどの防除を目指した研究が行われている。

2) 天敵微生物の利用

天敵微生物にはウイルス、細菌、糸状菌、線虫などがある。この害虫防除への利用は、農薬と同じように施用するものが多いが、少数回施用で持続的な効果が得られることがある。

ウイルス：利用されている主なウイルスは核多角体病ウイルス(NPV)、顆粒病ウイルス(GV)および細胞質多角体病ウイルス(CPV)である。諸外国ではGemstar LC(*Helicoverpa zea* NPV)、*Anticarsia gemmatalis* NPVなど20余種が農薬登録されているか、あるいは実用的に利用されている。日本ではマツカレハのCPVが登録された(表1)が、生産性、利用場面の制約などから生産販売は1年で中止された。続いてハスモンヨトウ、シロイチモジヨトウ、コカクモ

表1 日本で登録された生物農薬

8/IV, 1997

生物資材名	適用病虫害名	商品名	申請者	登録年
ウイルス				
マツカレハ細胞質多角体病ウイルス	マツカレハ	マツケミン	中外製薬	1974(失効)
細菌				
B T (結晶毒素)	鱗翅目害虫	トアローCT	東亜合成	1981
パチルス・チュリンジエンシス(細菌)	同上	バシレックス他*	塩野義製薬他	1982~1996
アグロバクテリウム・ラジオバクター ストレイン 84 (細菌)	バラ根頭がん腫病	バクテローズ	トモノアグリカ	1989, H 1.12. 1
糸状菌				
ポーベリア・ブロングニアルティ(糸状菌)	ゴマダラカミキリ, キボシカミキリ	バイオリサ・カミキリ	日東電工	1995, H 7.11.17
モナクロスポリウム・フィマトバガム (糸状菌)	サツマイモネコブセンチュウ	ネマヒトン	トモエ化学	1990, H 2. 7.24
トリコデルマ菌 (糸状菌)	タバコ白絹病, 腰折病	トリコデルマ生菌	山陽薬品	1962
線虫				
スタイナーネマ・カーポカプセ (線虫)	シバツトガ, スジキリヨトウ シバオサゾウムシ	バイオセーフ	エス・デイ・エス バイオテック	1993, H 5. 9. 8
ダニ				
チリカブリダニ (ダニ)	ハダニ類	スパイデックス	トーメン	1995, H 7. 3.10
チリカブリダニ (ダニ)	ハダニ類	トモノチリカブリダニパック	トモノアグリカ	1996, H 8. 5. 8
昆虫				
オンシツツヤコバチ (寄生蜂)	オンシツコナジラミおよび タバココナジラミ	エンストリップ	トーメン	1996, H 7. 3.10
ルビーアカヤドリコバチ (寄生蜂)	ルビーアカヤドリコバチ	ルビーロームシ	武田薬品	1951, 8.11(失効)
クワコナカイガラヤドリバチ (寄生蜂)	クワコナカイガラムシ	クワコナコバチ	武田薬品	1960, 3. 7(失効)

*: セレクトジン, ダイボール, チュリサイド, ガードジェット, ターフル, デルフィン, センターリ (平成9年3月現在)

ンハマキ類、チャハマキなど20余種の害虫にウイルス利用の研究が行われてきた。このうちハスモンヨトウなど4種は農林水産省の事業で、多数の県で現地適用試験が行われ、有効性が農家にも認められる成果が得られた。鹿児島県では茶樹のチャノコカクモンハマキGVとチャハマキGVの生産施設を農協に設置し、農家自身がウイルスを生産して、ハマキガ防除に利用している。またヨトウムシ類やコナガなどの防除にウイルスを実用化させようとする民間企業の動きがある。

細菌：生物農薬では世界で最も早く、1950年にアメリカで登録されたDoom/Milky spore (*Bacillus popilliae/lentimorbus*)は、マメコガネの防除に利用されている。天敵微生物の代名詞的存在である*B. thuringiensis* (BT)は、アメリカで1960年に登録されたのを初めとして、世界各国でコナガなどの防除に利用されている。BTは日本では、1981年から登録され、現在では20数種の害虫防除に利用されている。BTの病原性は菌株によって顕著な差異がある。多くは鱗翅目昆虫に病原性であるが、カやハエに病原性の菌株、ハムシに病原性の菌株などが知られていた。近年、コガネムシ類に病原性の菌株、*B. t. japonensis* st. Buibuiが日本で分離され、実用化に向けた研究が行われている。

糸状菌：諸外国ではBoverin (*Beauveria bassiana*)、Vertalec (*Verticillium lecanii*)など10余剤が農薬登録されている。日本ではタバコのサツマイモネコブセンチュウにネマヒトン (*Monacrosporium phymatophagum*)、桑のキボシカミキリと柑橘のゴマダラカミキリにバイオリサ・カミキリ (*Beauveria brongniartii*)が農薬登録されている(表1)。他にイネミズゾウムシ、ウンカ・ヨコバイ類、コナジラミ類、アザミウマ類、アブラムシ類、コナガ、モモシクイガ、コガネムシ類などの防除に糸状菌利用の研究が行われている。利用されている菌種は*Aschersonia aleyrodoidis*, *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Verticillium lecanii*などである。

線虫：天敵線虫は宿主探索能力があり、効果が比較的早く発現する。芝のシバツトガ、スジキリヨトウ、シバオサゾウムシにバイオセーフ (*Steinernema carpocapsae*)が農薬登録されている(表1)。日本の土壌から分離された*S. kushidai*は環境耐性が高く、コガネムシ類に病原性が極めて高い、登録申請中である。*S. glaseri*はある程度の深土まで分布するようで、甲虫目や鱗翅目昆虫に病原性が高く、実用化研究が続けられている。

3. 病害防除

1) 弱毒ウイルスの利用

植物のウイルス病には、植物体に弱毒ウイルスをあらかじめ接種して、強毒ウイルスの感染を防ぐという干渉作用を利用する方法がとられている。これまでにトマトのタバコモザイクウイルストマト系統にTMV-L₁₁A, TMV-L₁₁A237, ピーマンのタバコモザイクウイルストウガラシ系にPa18およびC-1421, ハッサクのカンキツトリステザウイルスでは母樹HM55に保毒された弱毒株など7種が実用化された。またダイズモザイクウイルスなど数種のウイルス病に弱毒株作出の研究が行われている他、単一の弱毒ウイルスでは防除できない作物には、複数種の弱毒ウイルス利用の研究が進められている。

2) 細菌の利用

バラの根頭がん腫病に*Agrobacterium radiobacter* strain K84がアメリカでGalltrolの商品名で、日本ではバクテロースの商品名で、オーストラリアでは別系統の菌株がNogallの商品名で登録されている他、2剤がアメリカで登録されている。日本で登録申請中のものには、ハクサイの軟腐病に*Erwinia cartobora*がある。研究中のものには、トマト青枯病に*Pseudomonas fluorescens*の2菌株を固定混合した育苗培養土、ダイコン苗立枯病やナス半身萎ちょう病に*P. cepacia* RB425, ユウガオのつる割病に*P. gladioli*の他、イネ苗腐敗症、イネ苗立枯細菌病、タバコ立枯病などの防除研究が行わ

れている。

葉面細菌の *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia ananas* などは、氷結の核になるタンパク質を生成して植物に凍霜害を発生させる。その（氷核活性 (INA)）細菌に対する生物的制御として、*E. herbicola* や INA 遺伝子を除去した *P. syringae* の利用の研究がアメリカで行われ、*P. syringae* は Frost-ban の製品名で農薬登録された。

3) 糸状菌の利用

諸外国では、BINAB T SEPPIC, F-Stop など 6 剤が農薬登録されている。日本では、タバコ白絹病にトリコデルマ生菌 (*Trichoderma lignorum*) が登録されている。日本で研究中のものには、サツマイモのつる割病に非病原性 *Fusarium oxysporum* が有効で、圃場で効果が実証された。非病原性 *F. oxysporum* による防除研究はイチゴ萎黄病、サラダナ根腐病、トマトやホウレンソウの萎ちょう病などでも行われている。また *Verticillium dahliae* によるエダマメ、ピーマンおよびナスの半身萎ちょう病の防除、コムギ葉から分離された糸状菌 kyu-W63 株によるコムギうどんこ病防除の研究の他、トマト半身萎ちょう病、キュウリフザリウム病、キュウリ炭そ病などに対する発病抑制の研究が行われている。

4. 雑草防除

柑橘圃場の *Morrenia odorata* に DeVine (*Phytophthora palmivora*), 水田雑草の *Aechynomene virginica* に Collego (*Colletotrichum gloeosporioides*) がアメリカで、*Malva pusilla* に BioMal (*Colletotrichum gloeosporioides*) がカナダで農薬登録されている。日本では、スズメノカタビラに *Xanthomonas campestris* が登録申請中である。日本で研究中のものには、水田のクログワイに

Epicoccosorus nematosporus, *Nimbya scirpicola* や *Dendryphiella* sp., ノビエに *Drechslera monoceras* がある。他に水田雑草防除にアイガモやカブトエビの利用、ミズカヤツリにイットガ、イヌビエやタイヌビエにホソメイガの利用による防除研究が行われている。

5. 総合管理に向けて、おわりにかえて

生態系に調和し、環境を保全する有害生物管理技術の開発を求められている。この素材として生物農薬は重要であるが、農薬登録されたものは現段階では少なく、また生物農薬は標的生物種が限られているので、作物ごとの総合的な管理技術を組むことは難しい。生物的防除の研究は、日本においても早くから多数の研究機関で行われてきたが、過去には産学官の連携が不十分であったこと、営業効率が低い生物農薬の開発に民間支援が不十分であったことなどから、民間の開発研究が遅れた。現在でも支援が十分とはいえないが、多数の生物農薬の開発研究が進んでいて、開発にのり出す企業も増加しつつある。近い将来、多数の生物農薬が有害生物の総合管理の素材として活躍することと期待したい。

文 献

- 1) 三橋 淳編 (1996) 第3回植物保護・環境シンポジウム 環境保全型農業における植物保護講演要旨集, 日本学術会議植物防疫研究連絡委員会, 東京, 59pp.
- 2) 根本 久 (1995) 天敵利用と害虫管理, 農文協, 東京, 181pp.
- 3) Nishi, Y. and T. Nonaka (1996) Biological Control of the Tea Tortrix—Using Granulosis Virus in the Tea Field—, *Agrochem. Jap.*, 69: 2-5
- 4) 農林水産技術会議事務局編 (1995) 農林水産研究文献解題 No.21環境保全型農業技術, 農林統計協会, 東京, 876pp.
- 5) Okada, M. (1996) Introduction of Biological Pesticide, *Agrochem. Jap.*, 69: 2-5

国内情報

遺伝子組換えタバコを用いたB型肝炎診断用抗原の作出

帝京大学工学部
岡田 吉美

遺伝子組換え植物を利用したDNA農業の次世代の夢は、植物をワクチンや検査薬などの医薬品を生産する工場として利用することである。すでにWHOはロタウイルスなどの「食べるワクチン」の開発を支援している。我々も最近B型肝炎ウイルスのC抗原をタバコで発現させることに成功した。この組換えタバコ1本で約50万人の供血血液の検査が可能であり、開発途上国のウイルス感染予防や疫学調査など、国際協力の分野での貢献が期待されている。

1. はじめに

除草剤に枯れないダイズやナタネ、害虫に食べられないジャガイモやトウモロコシなど、遺伝子組換え植物を利用した農業の成果が今、われわれの身近に登場しつつある。そして同時に、まったく新しい視点に立って組換え植物を利用する次世代の農業が生まれつつある。それは植物を食糧として考えるのではなく、ワクチンなどの医薬品や医療検査薬を生産するバイオリアクターとして利用しようという分子農業である。

植物で生産された抗体には「プラチボディー」というニックネームがつけられ、野菜や果物でワクチンをつくる研究は、WHOの支援を受けてロタウイルスや病原性大腸菌のエンテロトキシンなどに対する「食べるワクチン」の開発を目指している。最近われわれも、茨城県農業総合センター生物工学研究所の津田新哉、埼玉県赤十字血液センターの田中健志と共同で、B型肝炎ウイルス(HBV)のC抗原(HBc抗原)をタバコで安定して生産させることに成功した¹⁾。発現したHBc抗原は活性が高く、血液検査にすぐ利用することができ、組換え植物の新しい利用法として期待されている。さらにわれわれは

この成果を基盤として、HBVの「食べるワクチン」の開発を目指して現在組換えトマトと組換えジャガイモを作出中である。

2. B型肝炎と血液検査

HBVの感染者の中、外見的に症状を示さない持続感染者は世界で約3億人、日本では約100万人と推定されている。HBV持続感染者は自覚症状がないため、一般献血に協力する。その結果献血によるHBVの水平感染が生ずる。その危険性を回避するため、日本赤十字血液センターでは、1975年から供血血液のすべてに対する血液検査を開始した。

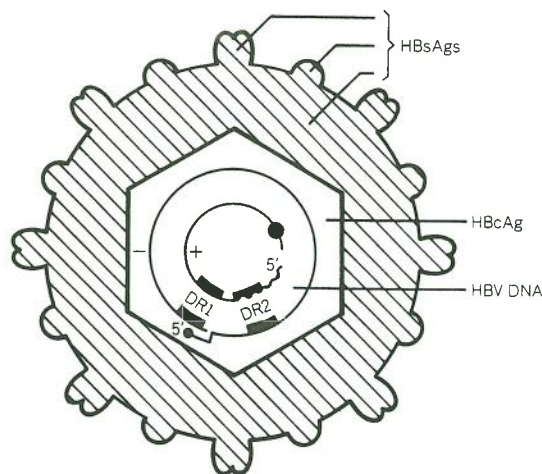


図1 B型肝炎ウイルスの構造

コア粒子の外側をエンベロープが包んでいる。ゲノムDNAはコア粒子のなかにある。エンベロープやコア粒子には、表面抗原としてそれぞれHBs抗原、HBc抗原が存在する。

HBVは図1に示したような直径42nmの球状粒子である。粒子は二重構造をとり、コア粒子とその外側のエンベロップからできている。エンベロップには表面抗原としてのHBs抗原が、コア粒子の表面にはHBc抗原が存在する²⁾。

持続感染患者の場合、HBs抗原がまず血中にあらわれる。したがって供血血液の検査はHBs抗原のスクリーニングによって行われる。しかしHBs抗原の検査だけでは輸血後B型肝炎の発症を完全に阻止できないことがわかった。それは感染後、HBs抗原量が検出不可能になる程減少する時期があるからである。そのため日本赤十字血液センターでは、HBs抗原の検査と同時にHBc抗体も定量的に検査することを1990年から世界に先駆けて開始した³⁾。その結果、日本における輸血後B型肝炎はほとんど皆無となった。現在わが国で利用されているHBc抗原は、大腸菌によって生産されたHBc抗原である⁴⁾。

3. HBc抗原を発現する組換えタバコの作出

われわれはHBc抗原をタバコで生産させる計画をたてた。発展途上国を含めた国際的な視野にたってHBV感染の予防を考えたとき、微生物を利用するよりもっと簡便で、安価にHBc抗原を生産できる系がほしいと考えたからである。

PCR法で分離したHBc抗原の遺伝子DNAに高発現35Sプロモーターをつなぎ、通常のアグロバクテリウムを利用する方法で組

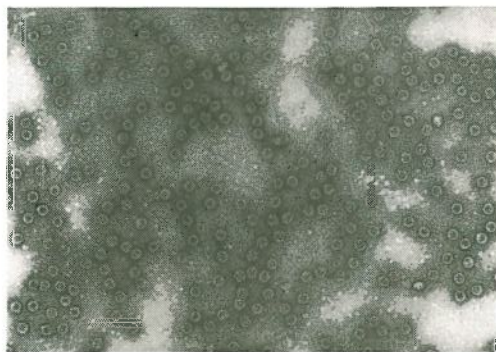


図2 組換えタバコから精製したHBc抗原粒子の電子顕微鏡写真
(埼玉県赤十字血液センター研究部 田中健志氏提供)

換えタバコを作出した。組換えタバコの成長は、親のタバコと変わりなかった。組換えタバコの葉の抽出液から植物細胞由来の夾雑物などを取り除き、蔗糖の密度勾配超遠心法によって精製すると、比較的簡単にHBc抗原活性の高い分画がえられた。その画分を電子顕微鏡で観察すると、図2に示したようにHBc抗原がきれいな会合体を形成しているのが観察された。この会合体は、本来HBVがヒトに感染したときに産生するHBV粒子内部のHBc抗原粒子と全く同じ形態であった。この結果はタバコという植物細胞で生産されたHBc抗原も、動物細胞で生産された場合と同じように、正常な抗原能を発揮するための会合体粒子を形成できることを示している。

4. タバコで生産されたHBc抗原の活性

現在、日本赤十字血液センターにおいて行われているHBc抗体の検査は、HI法と呼ばれる赤血球凝集反応を利用した方法である。タバコからえられたHBc抗原が期待通りHBc抗体と強く反応し、実際の検査に使えるかどうかを調べるため、われわれは埼玉県赤十字血液センターと共同で、日本の献血事業で使用されている検査方法により500人以上

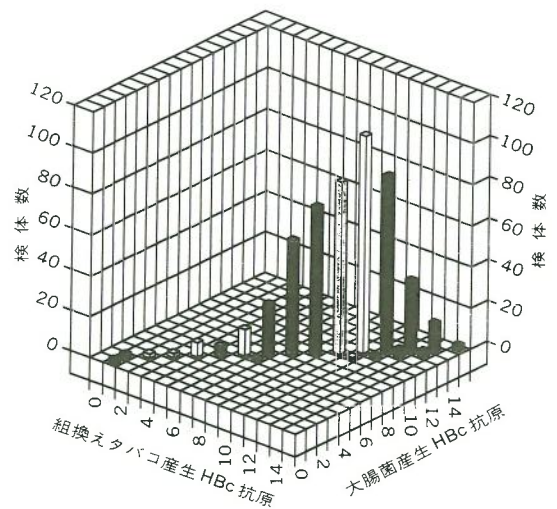


図3 組換えタバコ産生HBc抗原と大腸菌産生HBc抗原の活性の比較
大腸菌産生HBc抗原で2ⁿ倍の抗体価のある血液は、組換えタバコ産生HBc抗原を用いても2ⁿ倍の抗体価を示す。

のB型肝炎感染患者の血液について試験をおこなった。その結果、現在使用されている大腸菌で生産されたHBc抗原と全く同じ抗原活性を示すことが確かめられた(図3)。このことは組換えタバコが生産したHBc抗原が、現在使用されている標準抗原と同等であり、検査試薬としてすぐに役立つということを示している。

組換えタバコの抗原値は、自家受粉でえられたR1タバコでも安定して発現していた。その発現量は予想より高く、タバコの葉1gで約1280人の血液検査が可能であった。タバコの葉1枚が約50g、1本のタバコが8~10枚の葉をつけると仮定すると、この組換えタバコ1本で50万人以上の血液を検査することができる計算となる。

5. 将来への展望

わが国では輸血によるHBVの感染はほとんどなくなったが、発展途上国ではいまなお深刻な問題である。現在全世界の人口の5~6%(約3億人)がHBVのキャリアーといわれており、なかでも発展途上国でのキャリアー率は高い。さらに医療体制の十分に整っていないこれらの国々では、輸血による感染の拡大が今後も続くと考えられる。

しかし残念ながらこれらの国々では、高度な技術と資金を必要とする微生物での抗原生産工場を建設することは早急には望めない。

このような現状で、HBc抗原を生産する組換えタバコは重要な役割を果たすであろう。タバコの種子はどんな奥地にも送ることができるし、長期保存に特別な設備を必要としない。そして必要な時に必要な量を畑で栽培すればよいからである。

検査用抗原の必要性は、ここで述べたHBVだけではない。ヒトC型肝炎ウイルス、AIDSウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルスなどの血液を通して感染するウイルスの場合、その感染の検査にはHBc抗体検査の場合と同様、ウイルス抗原の確保が重要な問題となる。われわれがHBc抗原で成功したように、組換え植物を利用することができれば、世界のどこでも容易に検査体制を整えることができるだろう。そのためには、医学と農学にわたる多分野の研究者の協力と智慧が必要である。国際協力実現のためにも、そのような研究体制がわが国に早く生まれることを期待したい。そして植物で抗原を生産する研究が次に「食べるワクチン」へと発展することを期待したい。

文 献

- 1) Tsuda, S. *et al.*, *Vox Sang.*, in press.
- 2) Ganem, D. and H.E. Varmus (1987) *Ann. Rev. Biochem.*, 56: 651-693
- 3) Iizuka, H. *et al.* (1992) *Vox Sang.*, 63: 107-111
- 4) Wingfield, R.T. *et al.* (1995) *Biochemistry*, 34: 4919-4932

国内情報

ブタの遺伝子マッピング

農林水産省畜産試験場

三上 仁志

ブタのゲノム研究は急速に進展し、平均1.5センチモルガン間隔で全ゲノムをカバーするマーカーの連鎖地図が、国際協力により開発された。それに伴い、各国の研究者の興味は、マーカーと経済形質関連遺伝子との連鎖解析に向けられ、マーカーを利用した育種方法の開発と有用遺伝子の単離が現実的な目標として設定できるようになった。

1. はじめに

農林水産省畜産試験場、同家畜衛生試験場及び（社）農林水産先端技術産業振興センター農林水産先端技術研究所で組織した“家畜ゲノム研究プログラムチーム”では、研究の柱としてブタの遺伝子地図の作製を進めている。

ブタは家畜のなかでも、産子数が多い、世代交代が早い、染色体数が少ない等のゲノム解析に適した特徴を有している。そのため、そのゲノム研究は単に畜産の範囲だけでなくヒトを含めた生命科学の発展に貢献することが期待され、国際的に研究が進められている。すなわち、大規模な EC 共同プロジェクト（9カ国参加）と USDA のプロジェクトが1991年に開始され、DNA マーカーの連鎖地図の作製が精力的に進められ、現在までに未発表を含め合計2000個近いマーカーがマップされている¹⁻³⁾。この数は、平均1.5センチモルガン間隔でブタゲノムをカバーしており、経済形質関連遺伝子との連鎖解析に最低限必要なマーカーは確保されたと考えられている。それに伴い、研究の中心はマーカーの開発から、マーカーを利用した有用遺伝子のマッピングへと急速に移行しつつある^{4,5)}。

我々のグループにおいても、これら両グル

ープと密接に連絡を取りながら、有用遺伝子のマッピングと単離を目指して組織的に研究を進めている。本稿では、我々のグループでの最近の成果を中心に紹介する。

2. マッピングの方法

我々のグループで策定した有用遺伝子のマッピングの方法を図1に示した。マイクロサテライト配列等の多型性に富む反復配列マーカーを探し、これらマーカーの連鎖地図を

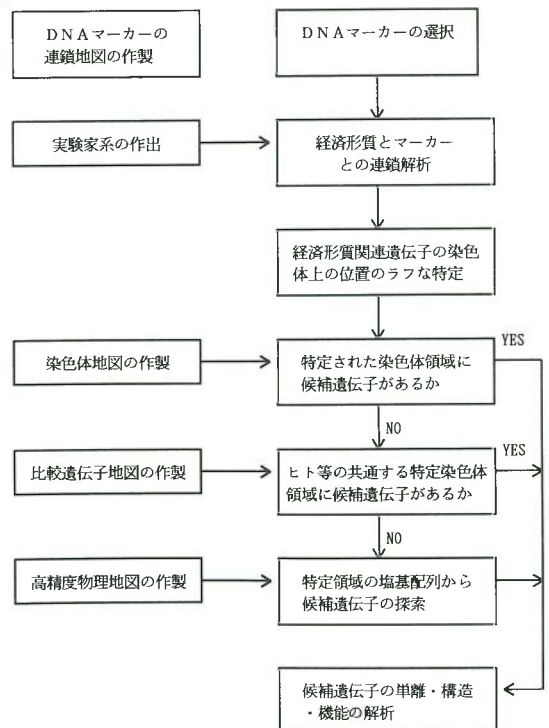


図1 ブタ有用遺伝子のマッピングの流れ

作製する。作製には、3世代からなる標準家系での連鎖解析を必要とする。作製されたラフな連鎖地図を基に、可能な限り等間隔で全ゲノムをカバーするマーカーを選択し、解析の対象とする形質が遺伝的に明確に異なる品種を交雑して得た交雑第2世代 (F_2) を用いてマーカーと生産形質との連鎖解析を行う。

この連鎖解析により、生産形質に関与する遺伝子が存在するおおよその染色体領域が特定できる。この領域から、候補遺伝子を限定し、単離するためには、以下の手順を踏む。

- 1) 特定された領域に、既に蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法等により染色体地図にマップされたブタの候補遺伝子があるか検索する。
- 2) 候補となるブタの遺伝子がなければ、ゲノム解析が先行しているヒトやマウスとブタとの比較遺伝子地図を参照して、候補となる遺伝子を特定する。
- 3) 1), 2) で候補となる遺伝子が特定できない場合、あるいは候補遺伝子が解析の結果原因遺伝子でなかった場合は、YAC (酵母人工染色体) や BAC (バクテリア人工染色体) ライブラリーを利用して、ポジショナルクローニングによる遺伝子の特定を行う。

このような基本的な流れとは別に、ヒトやマウスで目的とする遺伝子の構造が明らかにされている場合は、ヒトやマウスの遺伝子をプローブとして、直接豚の遺伝子を単離することが試みられている。これまで、ブタで利用できる遺伝子地図がなかったこともあり、ブタで単離された遺伝子の多くはこの方法によっている。しかし、この方法では、当然未知の遺伝子を取り出すことはできない。

3. 研究成果

1) マーカー連鎖地図の作製

これまでに、我々のグループでは散在性反復配列 (PRE-1配列)⁶⁾ やマイクロサテライト配列等のマーカーの開発を進め、93個について多型性を見いだしている。これらを順次、

連鎖地図へマップしているが、標準家系作出には最低でも3年を要するため、これまではECグループの標準家系を用いて作業を進め、28個をマップした。最近、畜産試験場において梅山豚とミニブタの組み合わせの標準家系を作出できたため、この家系を用いて独自の連鎖地図の作製を進めており、本年度中には先行グループの連鎖地図を補完する形で公表できる見通しとなっている。前述のように2000個近いマーカーが既にマップされており、マーカーの開発への研究者の興味は薄れてきているが、遺伝子の単離のためにはより多くのマーカーが必要であり、国際貢献の点からも研究の継続が必要である。

2) マーカーと経済形質との連鎖解析

我々のグループでは、独自の連鎖地図の作製を進める一方、USDA で作製された連鎖地図を基に、経済形質との連鎖解析用のマーカーを整備している。すなわち、全ゲノムにわたりにできるだけ等間隔に位置するマーカーを約200個選定し (図2)、PCR用のプライマーを合成した。

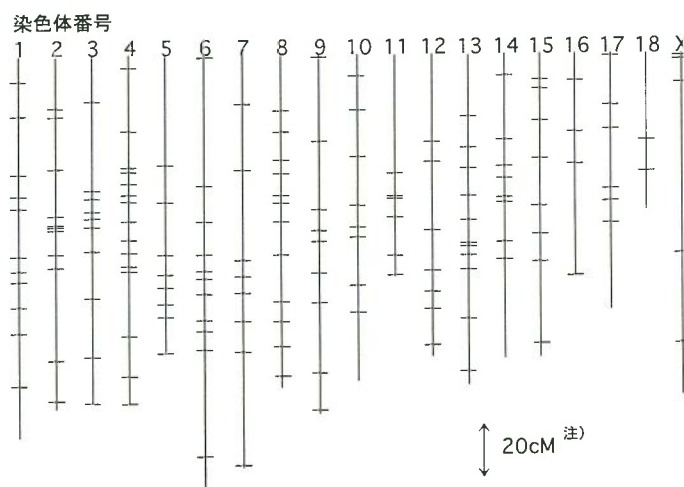


図2 本研究において用いるDNAマーカーの連鎖地図上の位置

このプライマーを用いて、畜産試験場の標準家系及び農林水産省が連鎖解析を委託している8公立試験研究機関の10実験家系で経済形質とマーカーとの連鎖解析が進められている。近交系の利用できないブタでは、解析に1家系当たり100頭以上の F_2 世代が必要となる。したがって、マーカーの判定を行うサンプル数は膨大な数となり、解析の自動化が研

究推進の鍵となる。

畜産試験場の家系を用いた予備解析の結果では、毛色、体重、椎骨数等と有意に連鎖するマーカーが見いだされており⁷⁾、公立試験研究機関での解析が進めば、多くの経済形質関連マーカーの特定が期待できる。その成果は、マーカー選抜育種や有用遺伝子の存在する染色体領域のラフな特定に利用できる。

3) 染色体地図の作製

試験開始以来、我々のグループではブタで既知の遺伝子 (cDNA) をできるだけ数多く集め、FISH 法により染色体上にマップして

きた。これまでにマップした遺伝子数は25で、これ以外に10のDNAマーカーもマップした (図3)⁸⁾。

現在は肉質や繁殖性に関連する脂質代謝関連遺伝子について、重点的に研究を進めている。すなわち、ヒトやマウスの塩基配列情報をもとに、ブタで単離されていない脂質関連遺伝子を RT-PCR 法により単離している。これまでに、20個の cDNA を単離・同定し、その中の6個の全塩基配列を決定した。これらについても、順次 FISH 法により染色体上の位置を決定する予定である。

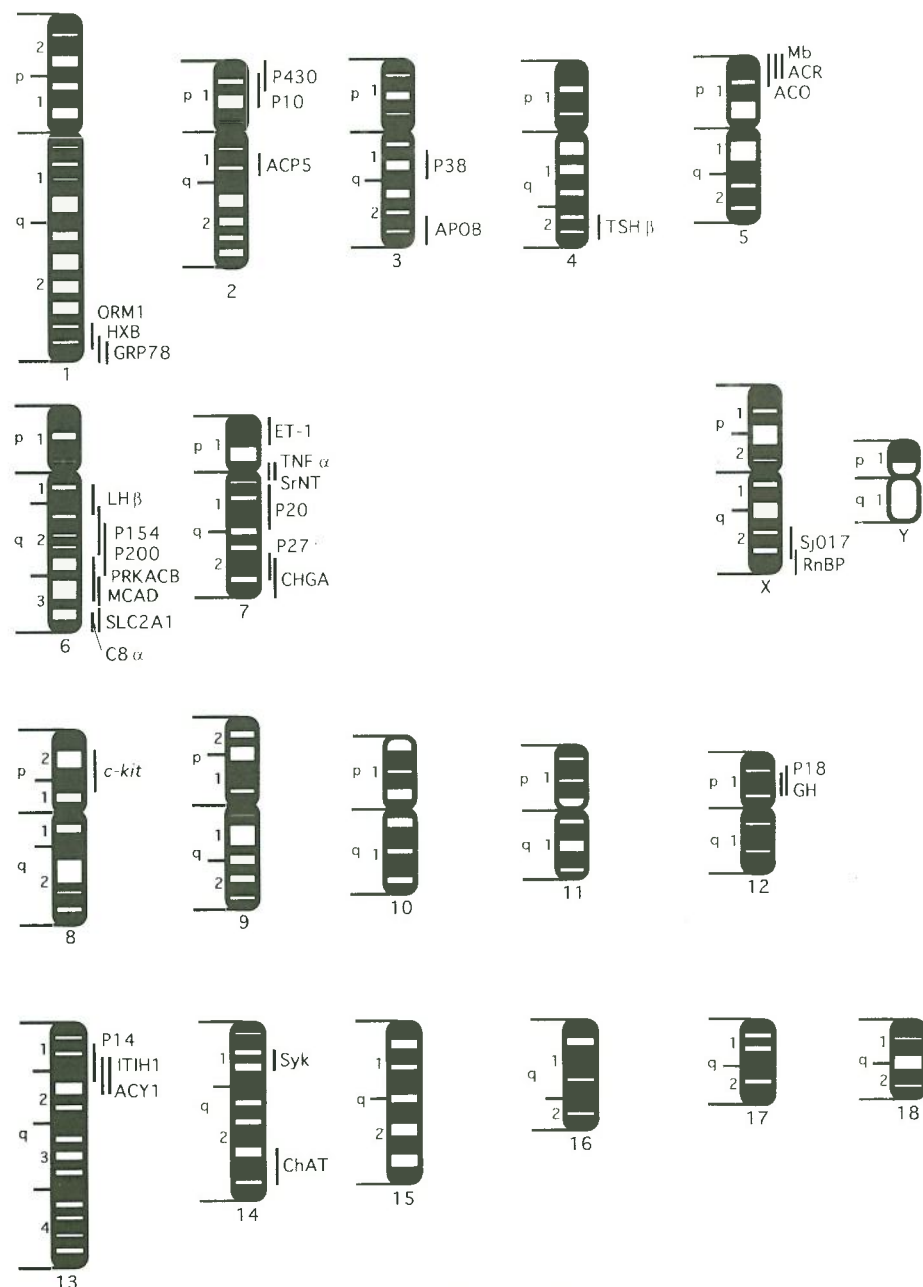


図3 染色体上の位置を決定した遺伝子 (ブタ染色体地図)

ブタ染色体地図に FISH 法でマップされている遺伝子数は、まだ約100にしか過ぎず、今後強化を必要とする分野である。特に、ゲノム解析で先行しているヒトやマウスの情報を有効に利用するには、これらの種間で共通した遺伝子のマッピングが不可欠である。染色体は種固有の形と数をとるが、進化の過程においてかなり大きな染色体領域（セグメント）を単位として再配列が生じており、種を越えて共通した遺伝子群（シンテニー）として標識できることが最近明らかになってきた。この染色体の相同性を利用して、おおまかに特定されたブタ染色体領域の経済形質に関連する候補遺伝子を、ヒトやマウスのゲノム情報から検索することができる。このような種間の染色体の相同性を明らかにした地図を比較遺伝子地図と呼ぶ。

4) BACライブラリーの作製

ポジショナルクローニングのために、我々のグループでは BAC クローニングの構築を進めている。BAC は YAC に比較してインサートサイズは小さいが、安定性が高く DNA の取扱いが容易であるという利点がある。また、ブタ YAC ライブラリーは、外国で既にいくつか作製されており、国際貢献という観点も含めて BAC を選択した。現在までに約25000クローンを作製した⁹⁾。平均インサートサイズは、130~140kbp であり、25000クローンでブタの1ゲノムに相当する。目標は10万クローンとし、特定の遺伝子を含む BAC クローンを短時間で取りだせるスクリーニング系を検討している。

4. おわりに

ブタのゲノム研究は、国際協力による遺伝子地図の作製というステージから、経済形質に関連したマーカーの探索という国、グループ間の競争へと移りつつある。既に、成長、

肉質、繁殖性等に関連したマーカーを見いだしたとする報告がいくつか出されており、関連遺伝子の単離へ向けて競争はより激化するものと思われる。数年遅れて開始した我々のグループにおいても、多くの関係者の援助によりマーカーと実験家系が整備され、欧米グループと競い合える状況に到達したと考えている。

家畜のゲノム研究は、申すまでもなく育種等への応用を絶えず念頭において進めるべきものであり、そのためには遺伝子の単離のための基礎的研究を加速するとともに、有用遺伝子の探索に民間ブリーダーの協力を求める必要がある。特に、家畜では未知遺伝子の単離に莫大な労力と経費を要するため、対象とする遺伝子の有用性については、現場での慎重な検討が必要となる。幸い、標準家系で開発されたマーカーの50%以上が、商業集団で利用可能であり、ブリーダーの関心も高い。

文 献

- 1) Rohrer, G.A. *et al.* (1994) *Genetics*, 136: 231-245
- 2) Archibald, A.L. *et al.* (1995) *Mamm. Genome*, 6: 157-175
- 3) Marklund, L. *et al.* (1996) *Anim. Genet.*, 27: 255-269
- 4) Andersson, L. *et al.* (1994) *Science*, 263: 1771-1774
- 5) Wilkie, P.J. *et al.* (1996) *Anim. Genet.*, (Suppl.2): 101
- 6) Harumi, T. *et al.* (1995) *Anim. Genet.*, 26: 403-406.
- 7) 三上仁志ら(1997) 第92回日本畜産学会講要: 225
- 8) Murakami, Y. *et al.* (1996) The 8th AAAP Animal Science Congress, Proceedings 2: 434-435
- 9) 鈴木恒平ら(1997) 第92回日本畜産学会講要: 218

国内情報

半導体レーザーの植物栽培への応用 —植物栽培用光半導体人工光源ユニットの研究開発—

浜松ホトニクス(株)中央研究所

土屋広司・山崎 文・宮島博文・本間孝宜・菅 博文

半導体レーザー開発技術の進展により、究極の人工光源である半導体レーザーが植物栽培用として応用できる可能性を持ち始めた。レーザー光はこれまで植物が経験したことのない純粋な光であり、自然光を含めた従来の人工光源とは光質が大きく異なっている。レーザー光を植物生産に適用するには、光と植物の基本関係に立ち戻り、その応用を見出す必要がある。本稿では高出力高効率半導体レーザーと、それをを用いた栽培実験について紹介する。

1. はじめに

レーザー光は自然界に存在しない光であり、植物がこれまでに経験したことのない光である。レーザーは1917年のEinsteinによる誘導放出の発見、1951年の理論的予言、1960年のルビーレーザーの世界で初めての発振成功以来、レーザー光の持つ時間的・空間的コヒーレンシー（単色性、指向性、干渉性、高輝度）を求めて様々な材料の分野でレーザー媒質が探索され、気体、固体を問わず多くの種類のレーザーが実現されてきた。

実用化されているレーザーには、エキシマレーザー、アルゴンイオンレーザー、色素レーザー、ヘリウムネオンレーザー、半導体レーザー、YAGレーザー、炭酸ガスレーザー等があり、これらはレーザー媒質に固有の発振波長を持つ紫外から赤外域までの代表的レーザーである。

レーザーの用途はこれまで、研究用、産業用、光通信やCD、レーザーディスク用が主であり、高価なレーザーを電球の代わりに用いて植物栽培を試みようとするのは非現実的なことと考えられていた。植物栽培において実用的な人工光源とは、植物栽培に適する

波長と光強度を持ち、効率が良く、長寿命で現実的な価格である必要がある。

近年、各種レーザーの中でも半導体レーザーに関する技術開発はめざましく進展し、半導体レーザーは既存の高圧ナトリウムランプや蛍光灯などと比べて、波長の純粋さや電気-光変換効率に優れる点以外にも植物栽培用として多くの可能性を持ち、近い将来、植物生産用として実用場面を担う新光源になると考えられるようになった。

2. 高出力高効率半導体レーザー

半導体レーザーが植物栽培の現場で役立つと考える根拠は、既存の人工光源のなかで理論的な電気-光変換効率が最も高いこと、結晶組成の選択により発振波長を設定できること、熱線など余分な光を出さないこと、光出力の制御性が良いことである。

現在の半導体レーザーは発明当初に比べ大幅な技術的進化を実現し、情報化社会の基幹となる光ファイバー通信の実用化や民生用機器のCDプレイヤーなどに組み込まれ、今や民生用、産業用を問わず光エレクトロニクス分野のキーデバイスとして確固たる地位を築いて我々の生活に深い関わりを持っている。半導体レーザー開発の歴史は古く、最初の発振はレーザーの黎明期まで遡ることができる。その当時、レーザー発振のために何万アンペ

TSUCHIYA Hiroshi, YMAZAKI Aya, MIYAJIMA Hirofumi, HONMA Takanori, KAN Hirofumi

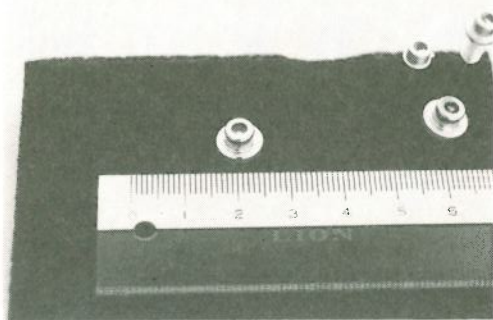
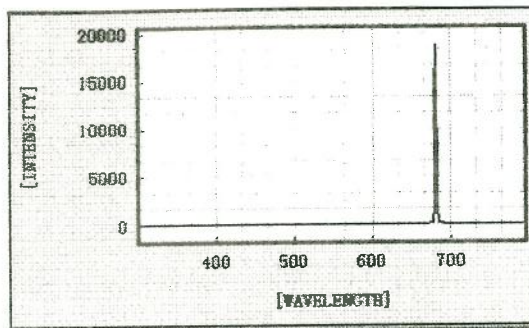


図1 半導体レーザー



半導体レーザー
発振波長：680nm

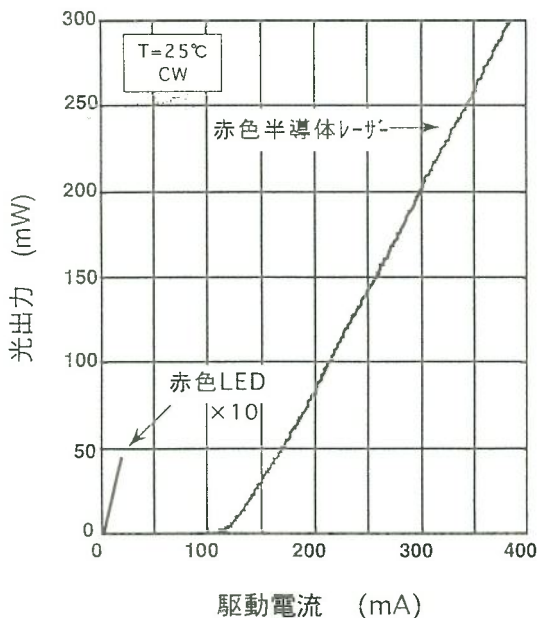
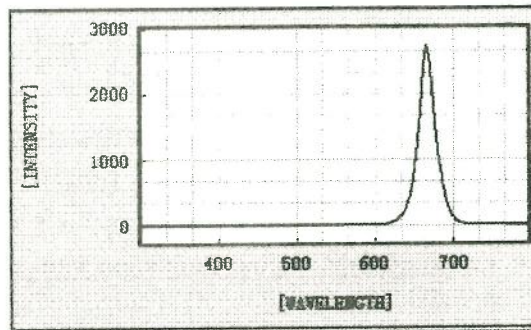


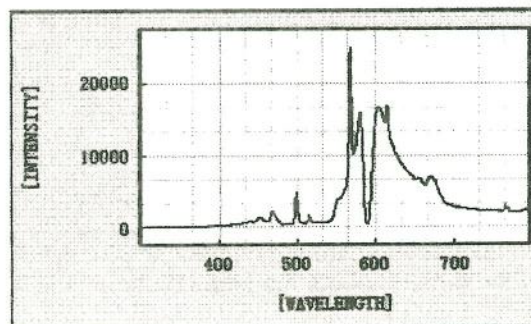
図2 680nm半導体レーザーの駆動電流対光出力特性比較データとしてLEDの出力特性を10倍拡大して記載

アも必要とした駆動電流が今では、乾電池1本で何本もの半導体レーザーが駆動できるまでに技術開発が進んできた。

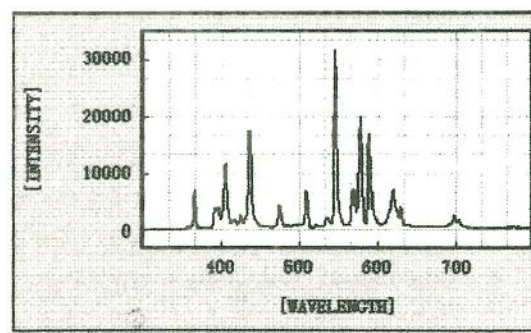
植物栽培には、光通信やCDプレイヤー用として開発されたレーザーをそのまま適用することはできない。これらのレーザーは植物の光合成に必要なといわれる790nmよ



LED 660nm



高圧ナトリウムランプ
高演色タイプ



メタルハライドランプ

図4 各種光源のスペクトル特性

り長い波長域で発振し、出力パワーも素子あたり数 mW と少ないからである。植物栽培に半導体レーザーを適用するには、700nm以下の光合成有効波長域で高出力化を達成する必要がある。

我々は半導体レーザー高出力化研究で開

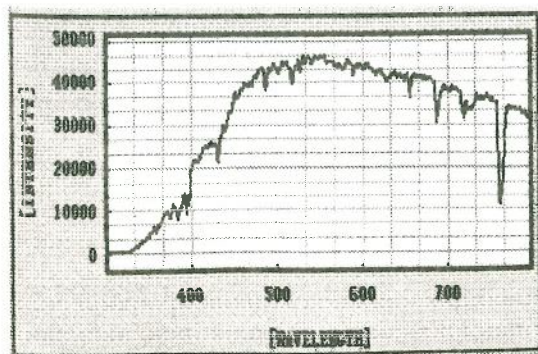


図3 太陽光のスペクトル例

発した技術を光合成に有効な 700 nm 以下の波長のレーザーに適用し、680 nm の波長で素子あたり 250 mW 以上の出力を持ち且つ電気-光変換効率が 40% と優れた高出力高効率半導体レーザーを開発した (図 1, 図 2)。この素子を複数用いることにより、最小の電力で真夏の太陽光直射の光強度も実現可能となる。

光強度以外にも、発光波長等の光質の違いは植物栽培における形態形成に関わる重要な要因といわれている。レーザー光源の特徴を理解する上で各種光源による放射スペクトルの違いを示す。図 3 に太陽光直達放射, 図 4 に半導体レーザーを含めた各種人工光源のスペクトル例を示す。各種光源に比べ、レーザー光源の単色性が際立っているのがわかる。

3. 半導体レーザーによる植物栽培

レーザー光の光質は既に述べたように植物にとって未知のものであり、植物栽培においてどのような生理的効果をもたらすのか今後の課題は大きい。レーザーの発振波長決定のよりどころとした光合成作用スペクトルのデータも、植物の生長を保証するデータではない。このため、680 nm の半導体レーザーの光だけで植物が育つのかどうか確認することから検討を始めた。

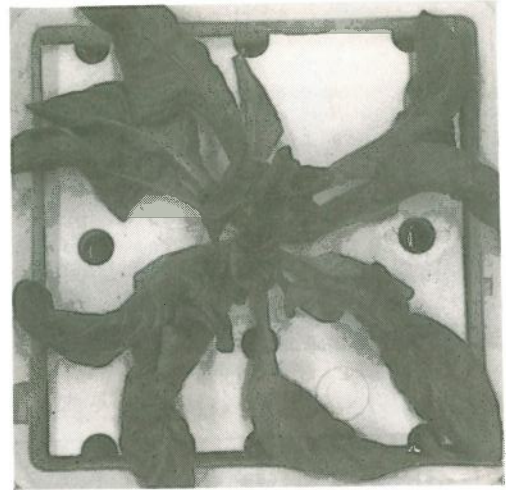
(1) 半導体レーザーパネル

試作した 680 nm の赤色半導体レーザー 19 個を用いて、光源パネルを作成した。植物体が出来るだけ均一な光を得られるようにレーザーのパネル上の配置を工夫し、このパネルと植物体との距離により光合成有効光量子束密度 (PPFD) を調節するようにした。半導体レーザーパネルの総駆動電力は 13W, 半導体レーザーは直流点灯である。

(2) 680 nm の単波長のみでのサラダナ栽培

半導体レーザーによる植物栽培の手始めとして、比較的少ない光量でも生育するといわれるサラダナ (岡山サラダナ) を供試材料とした。

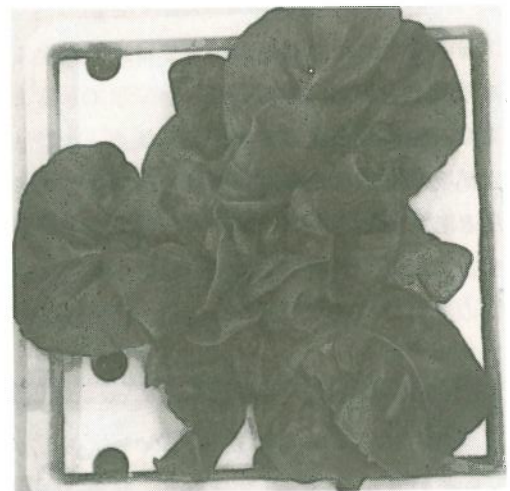
本葉が 4~5 枚程度展開した苗を養液栽培



半導体レーザー
(680nm単一波長)



メタルハライドランプ



高圧ナトリウムランプ

図5 栽培結果 (サラダナ)

装置に定植し、レーザーパネルを設置した人工気象箱内で栽培した。二つの対照区には、現在植物栽培用人工光源として市販されているメタルハライドランプと高圧ナトリウムラ

ンプを用い、各区のPPFD値は $200\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ となるように設定した。

図5に示す栽培実験の結果から、サラダナは 680nm の単波長でも生育することが証明された。しかし、 680nm のレーザー光のみで栽培すると葉が全体的に細長く、中心部で展開途中の葉が立ち上がり、色も薄くなる傾向が見られた。外観の形態は「丈夫な日陰植物」という感じてあった。また、対照区と比較して生長速度が遅く、地下部地上部共に重量も少なかった。

我々は、この形態異常の主な原因として、植物の形態形成に不可欠とされる $400\sim 500\text{nm}$ 付近の青色光が全く含まれていないためと考えた。

将来、青色光も半導体レーザー技術で実現することを考えると、青色光の適正な波長、強度について具体的な目標が必要となり、次の段階に進む前の予備実験として、栽培時における青色光の効果について簡単な実験を行った。その結果について次に紹介する。

4. 青色光の効果について

サラダナを含む多くの作物の生育に光強度と同様に光質が影響を与えることが報告されている。中でも青色光は植物の形態形成に重要であることが知られている。我々は、既に市販されている植物栽培用光源の中でも特に青色光の量が少ない高圧ナトリウムランプを用いて青色光の重要性を調査した。実験自体は簡単なもので、人工気象箱内に設置された高圧ナトリウムの青色光領域を大型のロングパスフィルターで除去し、 500nm 以下の割合を 1% 程度に押さえ、その下でサラダナを栽培した。

その結果、青色光を除去した状態で栽培した個体は、葉が細長く、色も薄くなり、半導体レーザーで栽培した個体によく似た形態となった。一方、フィルターを使用しなかった通常の高圧ナトリウムランプ下 (500nm 以下を 6.5% 含む) で栽培した個体は幅広の丸い葉となった。このことから、少量の青色光

でも有ると無いでは差が大きいことがわかった。また、PPFDを変えて栽培した結果、 $300\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 以上になると青色光が 1% と少なくとも葉の形態は通常の状態と栽培した個体に近い、幅広の葉となったことから、青色光の効果は光強度にも影響されることが再確認できた。

この結果はあくまでも、外観的な結果に過ぎず、成分や細胞レベルで青色光がどの様に作用しているかははっきりしない。

しかし、我々は、この結果から青色光は正常なサラダナ栽培には不可欠と単純に解釈し、現在、赤色半導体レーザーに青色光を付加した栽培実験を進めるに至っている。

その実験の様子の一例が図6である。内側



図6 青色光を付加した栽培実験の様子

に硫酸バリウムの拡散反射材を塗った調理用のサラダボール2個を合わせた積分球の中で、サラダナを定植し栽培している。側面部に6個の赤色半導体レーザー、上部に5個の青色LEDが取り付けられており、丸い白い壁を反射した光が効率良く、均等に植物を照らせるような構造になっている。この方法は、コンパクトで、実験場所を選ばないのが利点といえよう。といっても、実はこの実験は始まったばかりであり、最終的にどのような結果になるかはわからない。しかし、栽培開始10日目の順調な生育を見る限り、今まで以上のサラダナの生育が期待できるのではないかと日々楽しみに実験を続けている。

5. おわりに

植物栽培におけるレーザー光の利用は、今

回紹介した高出力半導体レーザーの開発によってようやく現実味を帯びてきたと言える。光源としての効率は既存光源中最高なものであり、寿命の点でも期待できる。また、コヒーレント光であるレーザー光に対する植物の反応には未知のものがあるが、レーザー光の高強度と単一波長性を利用した研究が植物の光に対する反応をさらに明確にしていくものと期待される。

栽培実験の過程で生長過程を微速度撮影した映像を見ると、680nmの光だけではどこに光源があるのか悩んでいるような動きがあり、斜めから照射しても葉がその方向に反応しない。このような植物の反応は、補光や苗貯蔵の場合にも役に立つと考えられる。レーザーの波長は680nmだけでなく、670nmや700nm以上の波長においても高出力な半導体レーザーが実現されており、波長の純粋性を生かした複数の波長の相乗効果、増進、抑制、パルス光の効果など、光と植物の基本部分から検

討すべき項目は多い。

今回紹介した半導体レーザーは植物栽培用として最も新しく、応用を含め特徴が多い将来性のある光源である。我々は半導体レーザーが光エレクトロニクスの分野だけでなく植物生産の分野でもキーデバイスになることを期待して、さらなる目標に向かって研究開発を続けている。

本報告は現在進行中の植物栽培用光半導体人工光源ユニットの研究開発/浜松ホトニクス株式会社・静岡製機株式会社の研究成果に基づいている。

文 献

- 1) 菅 博文・神崎武司・宮島博文・伊藤之弘・晝馬輝夫 (1996). レーザー研究, 24 (3): 334-342

国内情報

全自動接ぎ木ロボットの開発

(株)テクノ・グラフティング研究所

瀬井 将公

接ぎ木は、病気に強い品種の台木に、美味しい果実がなる品種の穂木を接いで、1本の植物として栽培し、商品価値のある美味しい果実を収穫する方法である。永年栽培のできる果樹は、世界中で接ぎ木栽培が行われているが、毎年接ぎ木を必要とする野菜の接ぎ木栽培は、日本において発達した技術である。ちなみに一般に販売されているトマト、ナス、キュウリ、スイカ、メロンのほとんどが、接ぎ木苗の栽培により収穫されている。従来は、農家の庭先で共同して、接ぎ木苗生産が行われていたが、農家の高齢化、後継者不足などから、農協、経済連の育苗センターや苗業者から購入する例が増え、接ぎ木苗の大量生産システムの開発の必要性が高まった。このような背景のもとに、平成2年3月に接ぎ木苗の大量生産システムの開発を目指し、(株)テクノ・グラフティング研究所(略称: TGR)が、生研機構と民間5社によって設立された。本稿では、TGRの研究開発の中で、全自動多連接ぎ木ロボットを中心としたシステムを紹介する。

1. 接ぎ木方法

人手による一般的な接ぎ木方法は、まず台

Sei Masahiro

木と穂木を播種・育苗し、適当な大きさになった台木苗の茎を鋭角に切り、円周の一部が切れているプラスチック製のチューブを切り口にかぶせる。同じく穂木苗の上部を切り取り、穂木と台木の鋭角に切られた茎の切断面

が癒合するように、チューブに挿し込む。接合された苗は、恒温高湿の環境で養生し癒合が進んだ後に自然環境に戻す。

穂木・台木の接合部の固定に、チューブの代わりに洗濯バサミを小型にした接ぎ木クリップを用いることもある。この場合は、穂木、台木の切断面を合わせた後、接合部を挟んで固定し養生する。

人が接げる大きさに育苗するには、ナス科の場合穂木が15～30日、台木が30～50日、ウリ科の場合は穂木、台木ともに5～15日が必要である。

2. 接ぎ木苗大量生産システムの開発

(1) 人手による接ぎ木苗の作り方

接ぎ木は、穂木と台木が活着するだけでなく、接合部で水分・養分の移動が円滑に行われ、十分に果実を実らせる植物体となって、成功といえる。活着率が高く良好な接ぎ木には、穂木・台木の苗が健やかに育っていることは必須であるが、組み合わせる穂木と台木の苗の高さ、茎の太さ、苗の日齢等が適切であること、接合部を適切な力で固定すること、接合後の適切な養生環境の維持等が必要になる。

人手による接ぎ木の場合、苗箱等で苗を育成し、目視により適切な苗を選んで接ぎ木を行い、発育不良の苗を自然に排除しているうえ、苗の大きさを確認しながら穂木と台木の組み合わせを決めていく。苗箱の中で発育の良くない苗は、接ぎ木せずに残しておき、さらに数日育苗してから接ぎ木することもできるし、切断面の形が不適切な場合や、接合部の固定がうまく行かなければ、穂木または台木を切り直して接合することもできる。人手による接ぎ木では、苗の状態に臨機応変に対応して活着の歩留まりを高めることができる。

しかし臨機応変に接ぎ木を行えるようになるには、長い経験による熟練が必要となる。一般に、接ぎ木はパート作業員によって行われ、平均で一日当たり1000本の接ぎ木を行うが、高度な熟練者は一日当たり1300本以上を

高い活着率で接ぎ木する。時間をかけて熟練者を育成しても、苗の需要は春から夏にかけてピークになり、秋には苗の需要が減少するので、接ぎ木作業がなくなる。すなわち翌春の接ぎ木時に、熟練者を確保しようとするれば、需要の少ない秋にも雇用を継続せねばならず、育苗センターにとって経済的に大きな負担となっている。

(2) 接ぎ木苗大量生産システムの開発

現在の電子化された機械化技術を用い、コストを考慮しなければ、人間の行うことはほとんどすべてがロボット化できると考えられる。しかし生産財として実用化することを考えれば、適正なコストで生産できるシステムを開発する必要がある。そこで人間とロボットの作業の得手不得手を考慮し、単に人手の接ぎ木作業をそのままロボット化するのではなく、ロボット化に適した接ぎ木苗の生産システムを構築することが必要になる。全自動ロボットによる接ぎ木苗大量生産システムの構築に当たって、研究開発した課題を以下にまとめた。なお、全自動接ぎ木ロボットの仕様値を表1に、機械の全体を写真1にトマトの接ぎ木を写真2に、キュウリの接ぎ木を写

表1 主仕様

名称	全自動多連接ぎ木ロボット (TGR方式)
構成	全自動多連接ぎ木ロボット及び予備切断機
外形寸法 (mm)	全自動多連接ぎ木ロボット: 2050×1875×1650 予備切断機: 2000×800×1000
電源	100V 13A (全自動多連接ぎ木ロボット) 6A (予備切断機)
圧空	7 kg/cm ² (コンプレッサー 1.5kW)
接ぎ木方式	台木トレイ上での平接ぎ接着剤固定
仕様トレイ	128セル (8セル×16列: 標準規格トレイ)
接ぎ木能力	ナス科: 1000本/h (機械速度) ウリ科: 800本/h (機械速度)
適用作物	ナス科, ウリ科
適用苗	子葉高さ: 20～40mm (穂木, 台木) 胚軸径: 1.2～2.0mm (穂木) 1.5～3.0mm (台木) 苗高さ: ~90mm (穂木) ~150mm (台木) 位置精度: 半径 6.5mm 以内 (穂木, 台木)

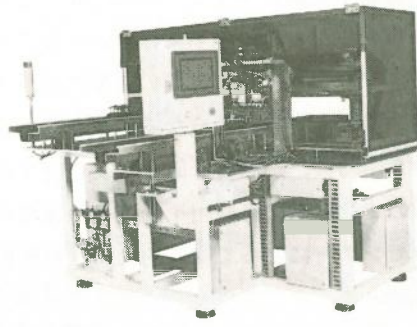


写真1 全自動接ぎ木ロボット

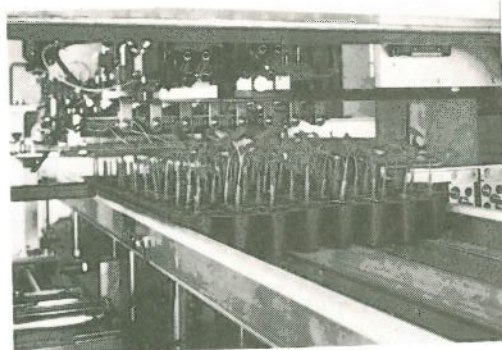


写真2 トマトの接ぎ木

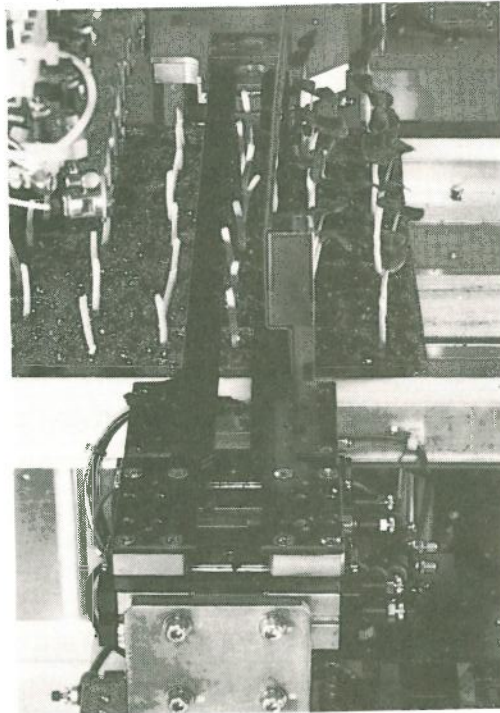


写真3 キュウリの接ぎ木

真3に示す。

① 全体構想

接ぎ木苗の流通形態は、鉢上げ苗、セル成形苗の2種類が考えられた。季節による需要変動の影響を少なくし、稼働率の向上を図るためには、広域供給が必要となる。鉢苗での輸送も考えられるが、より輸送性の高いセル

成形苗の生産を目標とした。また施設、設備当たりの生産量を増やすことが低コスト化につながるの、栽植密度の高い128セルの標準トレイを使用することにし、接ぎ木苗の出来上がり形状は、セル成形接ぎ木苗とした。またセル成形接ぎ木苗の生産システムを開発するにあたり、播種、発芽、育苗、接ぎ木、養生、順化、検査、出荷までのすべての作業をセルトレイ上で行うことを目指した。

② 育苗

CCDカメラとコンピュータを用い、苗の細かい形状の差異を認識し、接ぎ木前の苗の生育の良否を判断することは、コストがかかりすぎるので、苗を選別しなくてよいように、セルトレイ上で揃えて育苗できる方法を開発し、揃った健苗を接ぎ木ロボットで処理する方法とした。また機械による把持部分を確保するため、子葉の下の長さ(下胚軸長)を伸張する育苗方法も開発した。接ぎ木に適する期間が短いウリ科は、照明、温湿度等の環境を制御できる人工育苗室を用いた育苗方法を開発した。

③ 接ぎ木の接合方法

接ぎ木の効率を高めるために、台木トレイの1列8本を植えたままの状態上部を切断し、穂木トレイから同じく8本同時に切り取った穂木を、8本同時に接ぎ木する方法を開発した。低コスト化のために設備稼働率を上げるには、育苗時間の短いなるべく小さい苗を接ぐることが必要になる。しかし小さい苗は下胚軸長が短く、茎も細いため機械で把持することが難しい。また接ぎ木ロボット用の育苗では、精密播種器によって正確な位置に播種することが前提であるが、茎の位置がある範囲でばらつくことはやむを得ない。そこで下胚軸長が20mm以上、茎径が1.2mm以上の幼苗を対象にし、規定位置から6mm以内の誤差にある苗については、正確に把持し良好な接ぎ木ができるように、苗を把持するフィンガーの形状を研究した。

④ 接ぎ木の固定方法

揃った苗が供給されることを前提にした場合、ロボット化に適した接ぎ木方法として、

穂木、台木を水平に切断する平接ぎとし、接合部の固定方法は大阪府が研究した瞬間接着剤を用いることとした。接着剤による固定は、穂木と台木の接合部の茎の周囲を、接着剤でギブス状に固めて固定するのであるが、接着剤の固化時に接着剤が収縮するので、穂木と台木の圧着が良好に行われる。茎を鋭角に切って切断面を合わせて軸に直角に固定するチューブやクリップでは、細い茎ではクリップが締まらず固定が不確実になるが、軸方向に圧着できる接着剤は、細い茎も穂木と台木の径が多少異なっても、接ぎ木が可能である。また瞬間接着剤は、癒合後に接着剤が自然崩壊するので、チューブやクリップのように固定後に、取り外す手間がいらぬ。

⑤ 養生・順化等

幼苗の接ぎ木は、苗が成長した後は大苗の接ぎ木よりも癒合と一体化が進み良い接ぎ木苗になるが、小さい苗に生理的なストレスを与えるので、適正な環境で養生を進める必要がある。特に夏の高温は接ぎ木にとって負担となり養生設備が必要になるが、春などの気温の穏やかな時期は、低コスト化のために簡易養生の条件を解明した。養生後はハウス内で遮光し順化し出荷に備えることになる。

3. ま と め

TGRでは全自動接ぎ木ロボットを中心とする接ぎ木苗の大量生産システムの開発を行ったが、上記の多連接ぎ木方式以外に、列式の接ぎ木ロボットの開発、苗の検査装置の開発、使用培土の設定等の接ぎ木に係わる多くの研究開発を行った。TGRではこれらの研究成果を広く利用していただくために、成果の利用者の方から実施ロイヤリティをうけ、研究開発費の回収を行うことになった。幸い平成8年度には、徳島県、千葉県、高知県の接ぎ木苗生産者の方に、TGR方式の接ぎ木ロボットを導入していただき、実際の苗生産に貢献できるようになった。最後に研究開発に際してご指導いただいた方々と実際に研究を遂行したTGRの方々に謝意を表したい。

文 献

- 1) 森田 伸六 (1988) 果菜類の接着剤利用による新接ぎ木法, 農業及び園芸, 63巻
- 2) 小田 雅行 (1994) キュウリ接ぎ木苗生産の新技术, 施設と園芸, No. 85

地域の先端研究

赤クローバの間作によるダイズシストセンチュウ防除

農林水産省 北海道農業試験場
串田 篤彦

赤クローバにダイズシストセンチュウのふ化を促進する効果があることを利用した実用的防除技術として、春小麦への間作が利用できることを実証した。また、線虫密度低減効果は、間作当年よりも翌年により大きく表れることが明らかとなった。この栽培法では、主作物の小麦収量は、単作した場合と同程度得られ、後作した馬鈴薯収量は、大きく増加した。

1. はじめに

ダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines*) は、大豆や小豆などのマメ科作物の根に寄生、加害する農業上の重要線虫である。この線虫の卵は、シストという袋に包まれ、乾燥や低温などの環境ストレスに強く、土壤中に10年以上もの長期間、生残が可能である。シストには数百の卵が内蔵され、適度な温湿度条件下でふ化するが、寄主植物が栽培されていない場合は、ふ化率は低く、多くが卵のステージのまま生存し続ける (表紙参照)。ところが、そこへ寄主植物 (大豆や小豆) が栽培されると根から浸出する物質に刺激されて一斉にふ化が起こり、土壤中に出た幼虫が寄主根に侵入、寄生し、増殖する。このふ化を促進させる植物由来の物質を“ふ化促進物質”と呼んでおり、現在までにインゲンの根から3種類が単離、同定された¹⁾。その後、これを人工的に合成して線虫防除に利

用することが試みられたが、コスト的な面から実用化の目途は立っていない (写真1)。

一方、ダイズシストセンチュウのふ化を促進する効果は、寄主植物だけでなく、非寄主のマメ科植物にもあることがわかり、線虫防除への応用が期待された。つまり、線虫のふ化を促進する効果の高い非寄主植物を線虫汚染圃場で栽培すれば、線虫のふ化を誘引でき、ふ化した幼虫は土壤中または非寄主根内で生育できず、餓死するので、線虫密度を減らすことができると考えられているからである。近年、その効果の高い植物の1つとして赤クローバが見出された²⁾。しかしながら、赤クローバは収益作物ではないので、年1作しかできない北海道などでは特に、それを単一で栽培することは困難である。作付体系に有効に組み込むことができ、しかも線虫密度を効果的に減らせる栽培体系を確立することが重要であった。そこで、赤クローバの緑肥利用技術としてすでに栽培法が確立されている小麦への間作について、ダイズシストセンチュウ防除に応用するために密度低減効果を調査し、その有効性を検討した。

2. 赤クローバ間作によるダイズシストセンチュウ密度低減効果

ダイズシストセンチュウが高密度で生息するコンクリート枠圃場 (1.5×2m) に春小麦を単作した区 (品種「ハルユタカ」、畝幅30 cm 条播、播種量33g) 及び春小麦の畝間に赤クローバ (品種「サッポロ」、畝間条播、

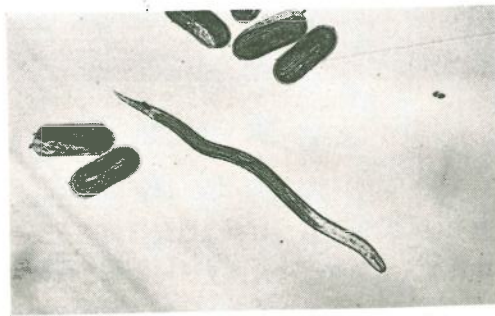


写真1 ダイズシストセンチュウの卵とふ化した2期幼虫

KUSHIDA Atsuhiko

播種量6g)を間作した区を3区ずつ設け、間作当年と翌年の土壤中のダイズシストセンチュウ卵の密度推移を調査した。間作翌年は、各区とも馬鈴薯(品種「トウヤ」,畝幅60cm,株間40cm)を栽培した。土壤中の卵密度は、風乾したサンプリング土壌100gからシストを分離し、その蔵卵数を計数して求めた。調査は各区3反復で行った。

その結果、赤クローバ間作区の卵密度の減少は、対照(小麦単作)区の減少程度よりも大きく表れた(図1)。間作した年は、対照区が秋までに初期密度の70%までの減少にとどまったのに対し、間作区の卵密度は40%まで減少した。この間の赤クローバの生育は、小麦生育期間中は貧弱であったが、小麦刈り取り後約1ヵ月(8月下旬以降)で旺盛となり、晩秋にかけて繁茂した。これに対してダイズシストセンチュウの卵密度は、8月30日調査時までには低下したが、赤クローバの生育が旺盛となったそれ以降は、ほとんど低下しなかった。これは、この時期から地温が下がってくるため、ふ化しにくくなったことや線虫が休眠状態に入ったことがその理由として考えられる。

3. 間作翌年に大きな効果

間作翌年のダイズシストセンチュウの卵密度は、5月1日の調査開始時から直線的に減少し、8月1日には試験開始時密度(前年4月21日)の10%未満となった(図1)。単年度別の減少割合は、間作した年よりも翌年の方が大きくなった。この理由として、1)赤クローバの生育が旺盛だった期間に多量に浸出したふ化促進物質が土壌中に蓄積し、地温上昇に伴ってその効果が発揮された、2)ふ化促進物質は、根内にも存在しているため、鋤込んだ赤クローバの根が分解する過程に浸出した物質が相加的に作用した、ことが考えられる。特に今回の試験では、赤クローバの鋤込みを春先(融雪直後)に行ったため、根内由来のふ化促進物質の効果がより大きく出た可能性があるが、冷涼地での秋季鋤込みでは、

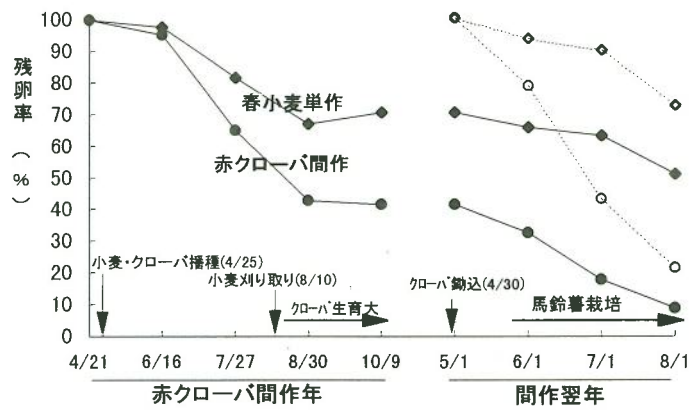


図1 赤クローバを間作したときのダイズシストセンチュウ卵密度変化
実線は、間作年の4月21日の卵密度を100としたときのその後の卵密度推移
点線は、翌年5月1日時点の卵密度を100としたときのその後の卵密度推移

冬期間の根の分解程度はそれほど大きくないと考えられるので、秋季鋤込みでも同様の結果が得られると推察される。

これらの結果より赤クローバの間作による線虫密度低減効果は、間作翌年により大きく表れることから、ダイズシストセンチュウの中、高密度圃場では、間作翌年も大豆や小豆等の寄主植物の栽培を避け、ふ化した幼虫を餓死させてしまうことが重要である。

4. 赤クローバの間作が春小麦収量に及ぼす影響

間作した赤クローバと小麦との間に養分や水分の競合が起こり、小麦収量が減少する可能性が考えられるため、赤クローバ間作と小麦単作との小麦収量を比較した。試験は、1995年と1996年の2回行った。

1995年の試験では、赤クローバを間作した区で収量が多く、1996年の試験では小麦単作区でやや良い傾向であった(表1)が、いずれも有意差はなく、赤クローバを間作しても小麦収量は単作した場合とほぼ同程度得られ

表1 単作及び赤クローバ間作時の春小麦収量

試験年	試験区の種類	収量*	千粒重*
		kg/10a	g
1995	春小麦単作	222	37.9
	赤クローバ間作	257	39.1
1996	春小麦単作	399	40.0
	赤クローバ間作	384	40.3

*: 3区平均

るものと考えられる (写真2)。

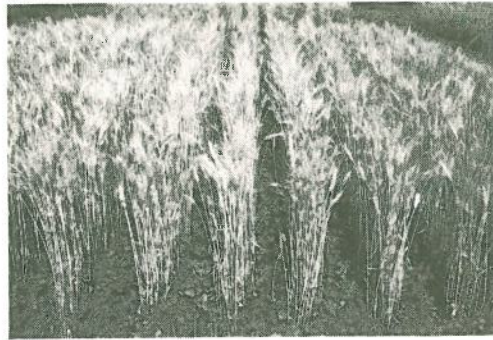


写真2 春小麦へのアカクロバの間作状況

5. 赤クローバ鋤込み後の後作馬鈴薯収量

赤クローバは、通常10~11月初旬に鋤込むが、後作によっては翌春鋤込みも可能である。今回の試験では、赤クローバの鋤込みを翌春の融雪直後に行い、この場合の肥効の有無を後作馬鈴薯の収量で比較、調査した。肥効程度の判断を容易にするために試験では馬鈴薯

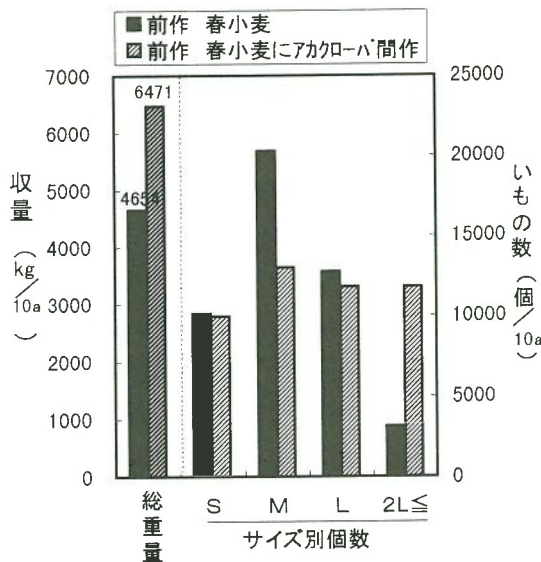


図2 後作物(馬鈴薯)の収量
 [馬鈴薯栽培条件]品種:トウヤ, 畝幅:60cm, 株間:40cm
 施肥:S053 40kg/10a (北海道施肥標準の半量)
 植付日:5月22日, 収穫:9月17日

の施肥量をいずれの区も標準施肥量の半量とした。馬鈴薯栽培条件は、間作試験の項に記載したとおりである。試験区より収穫した馬鈴薯をS(20~60g), M(60~120g), L(120~190g), 2L以上(190g~)の4段階に分け、重量及びいもの数を調査した。

試験の結果、鋤込んだ区の馬鈴薯収量は、鋤込んでいない区の収量より大きく増加した。(図2)

6. おわりに

今回の試験により、赤クローバの間作はダイズシストセンチュウ総合防除の1手法として利用できることが明らかとなった。このことにより、小麦栽培で農業収益を得ながら、また、緑肥栽培による肥料効果を得ながらダイズシストセンチュウの密度低減を図ることが出来る。

現在の小麦栽培は、収量増を図るために畝幅が狭くなってきており、赤クローバの間作には適さないと推察され、また、農業生産における省力化指向の中で労力を要する間作栽培は敬遠される傾向がある。今後、狭い畝幅での赤クローバの栽培技術や省力的間作技術の開発など、周辺技術の確立が重要である。農薬や化学肥料に依存した昨今の農業生産からの脱却が求められる中で、有機物の供給と線虫防除を同時に期待できる本技術は、環境に調和した農業の推進に大きく貢献できるものと考えられる。

文献

- 1) Fukuzawa, A. et al.(1985) *Tetrahedron Letters*, 26(45): 5539-5542
- 2) 相場 聡・三井 康(1995)北日本病虫研報, 46: 197-199

文献情報

卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットにおける大豆タンパク摂取による骨量減少抑制効果

骨粗鬆症は閉経後の女性ホルモン（エストロゲン）の欠乏により、骨吸収が促進されることにより引き起こされ、骨量は閉経後10年間のうちに急激に減少する。骨粗鬆症の治療においてエストロゲンをを用いるホルモン補充療法が最も効果的であるが、ホルモン補充療法にはいくつかのリスクファクターがあることから使用に制限がある。そこで、著者らは閉経後骨粗鬆症に対して骨量減少を最低限にとどめる天然物質の必要性があると考えた。

大豆タンパク中に優先的に存在するイソフラボンは薬理的、構造学的にも合成植物性エストロゲン（tamoxifen, ipriflavone）に類似しており、これらはすでに骨量減少抑制効果が報告されている。よって、本実験においてカゼインを大豆タンパクに置き換えることにより、大豆タンパク中のイソフラボンの閉経後骨粗鬆症モデルラットにおける骨量減少抑制効果を検討した。

実験動物はSD系3カ月齢雌ラット32匹を以下の4群に分けた。1) sham（偽手術群）、2) OVX（卵巣摘出群）、3) OVX+soybean（卵巣摘出、大豆タンパク投与群）、4) OVX+E₂（卵巣摘出、17β-エストラジオール：10μg/kg body weight/day）。0.4% Ca, 0.3% P, 22.7% protein（caseinあるいはsoybean protein）を含む飼料をpair-feedingし、30日間の投与後解剖し、右大腿骨および第4腰椎を摘出し骨密度測定、骨中Ca, P測定に用いた。

骨密度および骨中Ca, P含量の結果より、OVX+soybeanは卵巣摘出による骨量減少に対してOVX+E₂とほぼ同等の有意な抑制効果を示した。

血中パラメーターのうち卵巣摘出によって上昇する1,25(OH)₂D₃濃度において、OVX+soybean, OVX+E₂では上昇しな

った。卵巣摘出における1,25(OH)₂D₃の上昇はエストロゲン欠乏による血中Ca濃度の低下に対して腸管からのCa吸収を促進し、血中Caの濃度を一定に保つ働きであることから、何らかの作用によりOVX+soybeanにおいて血中Ca低下が抑制された可能性がある。

また、OVX+soybeanにおいて腹部脂肪量が他の3群に比して有意に低値を示したことは、大豆タンパクが脂肪組織を減少させ、骨量を増加させる成長ホルモンの合成を促進した可能性がある。子宮重量においてもOVX+E₂では子宮萎縮が見られなかったのに対しOVX+soybeanでは萎縮しており、大豆タンパク中のイソフラボンはエストロゲンの子宮栄養性活性とは異なる働きを持つものと考えられる。

以上の結果より大豆タンパクによる骨量減少抑制効果は確認されたが、今後その効果のメカニズムについてはカルシウムおよび骨代謝に対する詳細な検討が必要である。

（抄訳 久保田康子—マルハ中研）

Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis

Bahram H. Arjmandi *et al.*

Journal of Nutrition, 126: 161-167 (1996)

文献情報

コネキシン37遺伝子欠損による不妊

卵巣内の卵胞の発育を制御するシグナルとその伝達のメカニズムについてはよく分っていない。Simonらは、コネキシン37遺伝子欠損マウスでは成熟した卵胞を欠き、排卵できず、不妊になることを報告した。

新生仔の卵巣には、一層の顆粒膜細胞に囲まれ減数分裂を停止した卵母細胞からなる、原始卵胞が存在する。原始卵胞はサイズの拡大、顆粒膜細胞の増殖、液胞の形成といった発育をする。卵胞発育には、ギャップ結合チ

チャンネルを介した細胞間シグナルリングが影響していると言われている。ギャップ結合チャンネルは、コネキシンからなる細胞間チャンネルである。コネキシンは、少なくとも13あるファミリーであり、細胞膜に存在し、イオンや代謝物、その他のシグナル伝達分子を拡散移動させる。

正常マウスの腔形成前の卵胞内の卵母細胞および成熟したグラーフ卵胞では、卵母細胞と顆粒膜細胞の間のギャップ結合部分にコネキシン37が存在していた。一方、コネキシン37遺伝子欠損マウスでは、卵胞細胞と顆粒膜細胞の間のギャップ結合は見られず、物質の移動もできなくなっていた。

卵巣を解剖学的に観察すると、生後2週齢では両者に差は見られないが、5週齢の正常マウスでは、卵巣外観からも卵胞の発育が確認されるのに対し、遺伝子欠損マウスでは表面は滑らかなままであり、4カ月齢の卵巣でも卵胞発育は見られなかった。一方、卵管および子宮の外観では両者に差は見られなかった。組織学的に観察すると、5週齢の正常マウスでは良好に発育したグラーフ卵胞が見られたのに対し、遺伝子欠損マウスは腔を形成した卵胞が見られたものの、グラーフ卵胞は見られなかった。4カ月齢の正常マウスでは正常排卵を示すいくつかの大きな黄体が見られたが、遺伝子欠損マウスではグラーフ卵胞と排卵は見られず、多数の小さな黄体が存在していた。

コネキシン37遺伝子欠損マウスでは、卵母細胞の発育が減数分裂能を獲得する前に停止しており、成熟したグラーフ卵胞を欠き、排卵できず、多くの不適当な黄体を发育させていたことから、コネキシン37による細胞間チャンネルを介した細胞と細胞のシグナル伝達は、卵形成と排卵をさせるのに細胞の相互作用を制御しているといえる。

最近、ノックアウトマウスをもちいた遺伝子欠損個体の解析によって、生殖能や不妊に関する知見が多く得られてきている。これらの情報はヒトの初期卵胞発育における遺伝性不妊症等の解明に有用な情報となることが期

待されている。今後、生殖機能に関する遺伝子発現と作用因子の同定の研究はますます盛んになるだろう。

(抄訳 松本 浩道—東北大農)

(MATSUMOTO Hiromichi)

Female infertility in mice lacking connexin 37

Simon, A.M., D.A., Goodenough, E. Li and D.L. Paul

Nature, 385 : 525-529, 6 February, 1997

文献情報

カルコンシンセターゼ遺伝子導入ペチュニアにおける gene silencing 機構のモデル

植物の形質転換技術は基礎研究および応用面でめざましい貢献を遂げている。最近、導入した遺伝子とそれに相同な内在性の遺伝子の発現が共に抑制される負の現象、すなわち、gene-silencing に関する報告が増えている。gene-silencing は、導入遺伝子とそれに相同な内在性の遺伝子との間での DNA-DNA、DNA-RNA あるいは RNA-RNA の相互作用によって引き起こさせると考えられているが、不明な点が多い。

ペチュニア (*Petunia hybrida*) のカルコンシンセターゼ遺伝子 (*chsA*) は、花の色素の一つであるアントシアニンの生合成過程で、鍵となる酵素の遺伝子として知られている。*chsA* を導入した形質転換体からは、野生型の花の色は紫色であるのに対し、同じ表現型を示す形質転換体の他に、白と紫が混在した色模様を示す個体が複数見つかった。この白色部あるいは白色の花の花冠組織では *chsAmRNA* の発現が抑制されており、run-on transcription test により mRNA が転写後の過程で分解されることがわかってきた。

Metzlaff, *et al.* (1997) は、*chsA* 形質転換ペチュニアから、花の色がすべて白色、すべて紫色、ないし白色と紫の部分が混在する表現型に変化した形質転換個体、ならびに非

形質転換体であるが、光条件によって白色と紫の混在型の花に変化する品種を用いて、色別に花の各組織から Total RNA を抽出し、導入遺伝子と内在性遺伝子の mRNA について解析した。5'側に相同なプライマー、ならびに3'側に相補的なプライマーあるいはオリゴ d(T) プライマーを組み合わせて、RT-PCR 法により *chsA* RNA 由来の PCR 産物を検出し、*chsA* RNA の有無および量的差異を比較した。白色組織では正常な RNA に比べて3'末端側が欠損し、短くなった poly(A) を持つ RNA、ならびに poly(A) の欠損した RNA が存在すると推定された。予想される切断サイトは2カ所で、1つは終止コドン近傍の翻訳領域に位置しており、もう一つはそこから30塩基下流の3'側非翻訳領域に位置していた。各切断サイトは、すでに公表されている tobacco etch virus coat protein RNA ならびに human transferrin receptor mRNA における切断サイトの特徴と一致し、いずれも切断部位の5'側はグアニン残基であった。304塩基を含む近傍の2次構造を解析したところ、それぞれのサイトを含む一部の領域が互いに相補的な配列になって、二重鎖を形成している可能性が示唆された。そこで、RNA 転写ベクターを用いて相補的な配列を含む領域をそれぞれ合成し、アニーリング反応を行ったところ、複数のアニーリング産物が未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳導で検出された。さらに、この産物の中には、二重鎖 RNA を特異的に切断する RNase III 処理に対し分解を受けないバン

ドも存在した。このことから、相補的な配列部位での二重鎖の形成は、転写後の RNA 分解過程において、分解されるか、されないかの決定に関わる重要な働きを担っていると考えられた。

以上の結果をもとに、筆者等は *chsA* RNA の gene-silencing について RNA-RNA の二重鎖に基づいたモデルを提唱した。すなわち、Poly(A) の欠損した異常型の *chsA* 由来 RNA が gene-silencing の最初のインデューサーであると考え、正常な mRNA と異常型の RNA が相補的な領域で二重鎖を形成すると、切断サイトでヌクレアーゼによって切断を受け、さらにその分解 RNA も異常型 RNA となって次々に RNA の分解が引き起こされると考えた。

なぜ Poly(A) の欠損した RNA ができるのか、また RNase III のようなヌクレアーゼが *in vivo* で実際に働いているのかについては疑問が残されるが、RNA-RNA 相互作用による gene-silencing 機構のモデルは、ウイルス抵抗性形質転換植物や *Neurospora crassa* などを用いた他の系からも提出されており、今後それぞれのモデルに関する議論がなされるものと思われる。

(抄訳 長谷 修一東北大農)

(HASE Shyu)

RNA-Mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in petunia

Metzlaff, M., M. O'Dell, P. D. Cluster and R.B. Flavell

Cell, 88: 845-854 (1997)

海外便り

タマネギの細胞質雄性不稔及び稔性回復 遺伝子に関する研究

ウィスコンシン大学での1年

農林水産省 北海道農業試験場

佐藤 裕

1. はじめに

北海道のタマネギ産地は、昭和40～50年代にかけて乾腐病という土壌病害で大打撃を受け、壊滅状態となったことがある。それを救ったのが米国ウィスコンシン大学から導入した乾腐病抵抗性の細胞質雄性不稔系統「W202A」であった。この系統を種子親にして北海道農試が育成したF₁品種「フラヌイ」が北海道タマネギの救世主となったのである。

このように北海道農試とウィスコンシン大学とは深い関係にあったが、人的な交流はなかった。しかしながら、偶然にも双方で同じ研究テーマ「タマネギの細胞質雄性不稔の分子生物学的研究」が新たにスタートしており、1993年に双方の最初の成果が Theoretical and Applied Genetics 誌に相次いで掲載された。この時点で両者はいわば競争関係とな

ったわけであるが、私はこれを良い機会と捉え、ウィスコンシン大学にポスドクとして渡る手筈を整えた。同大学での滞在期間は1995年11月から1年間と短かったが、公私ともに得ることの多い1年となった。

2. タマネギの細胞質雄性不稔

タマネギの細胞質雄性不稔性は、細胞質型(N, S)と核内の稔性回復遺伝子型(*Ms*, *ms*)との組み合わせで決定される(図1)。雄性不稔は、S(*msms*)の場合のみ発現され、この遺伝子型を維持するためには、N(*msms*)の遺伝子型を持つ維持系統を花粉親にして交配する必要がある。タマネギでは、雄性不稔回復遺伝子 *Ms* が高頻度に存在するため、稔性回復遺伝子型が *msms* の個体を選抜することは容易ではない。また、在来品種の中にはS型細胞質を持つ個体を多く含むものがあり、この場合には維持系統の選抜がさらに困難となる。

以上のように、CMS系統を新たに作出する際には、細胞質型及び稔性回復遺伝子型を同定しなければならないが、タマネギは2年生であるため従来の交配による検定法では4～8年を要してしまう。そのため、より効率的な細胞質型及び稔性回復遺伝子型の同定法を確立することが望まれていた。

私は北海道農業試験場において、分子生物学的手法を利用した遺伝子マーカーの開発に取り組む、これまでに、タマネギの雄性不稔細胞質と正常細胞質との間で転写パターンが異なるミトコンドリア遺伝子を単離・クローニングし、細胞質型を特徴づける配列をもとにプライマーを合成してPCRにより細胞

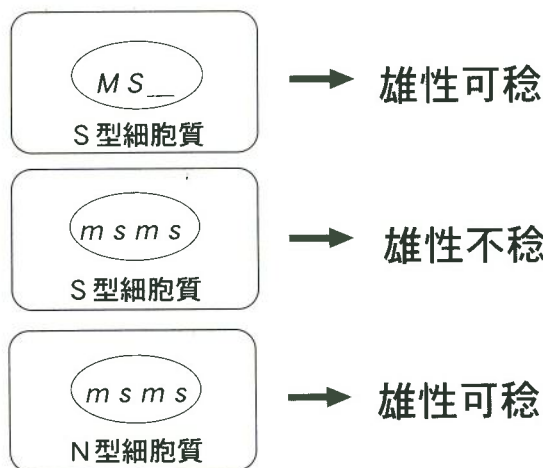


図1 タマネギの細胞質雄性不稔

SATO Yutaka

質型を同定する方法等を開発した。この方法により、迅速かつ正確に細胞質型を同定することが可能となったが、稔性回復遺伝子のマーカーの開発については今後の課題として残されていた。私がウィスコンシン大学に渡ったのは、このマーカーの開発が目的である。

3. 雄性不稔回復遺伝子の分子マーカー

ウィスコンシン大学では稔性回復遺伝子の分子マーカーの作出にむけて準備が着々と進んでいた。私のポストである Havey 教授が他のポストを指揮して RFLP 分析を担当し、私は一人で AFLP 分析を担当した。用いた材料は稔性回復遺伝子型が分離する F₃ 世代 58 個体であり、私の滞在中に全ての個体について稔性回復遺伝子型が後代検定により同定された。

AFLP 分析は近年開発された新手法で、制限酵素断片を選択的に PCR で増幅して多型を検出する (図2)。多型検出力は RFLP や RAPD の数十倍から数百倍と言われており、遺伝子地図の作成や遺伝子マーカーの作出に大きな効力を発揮するものとして期待されている。

6 年間 RFLP 分析を続けていた Havey 教授は、私が滞在中の 1996 年夏になって稔性回復遺伝子座が連鎖グループ B にあることをつきとめた。私もそれまでに AFLP プライマー 104 組合せから 3,500 種類の多型断片を検出しており、有望なマーカーの絞り込みに全力をあげていた。夏の終わりまでには、稔性回復遺伝子座から 6.7cM 及び 13cM の遺伝距離にある AFLP マーカーを見出すことに成功した (図3)。これらの AFLP は稔性回復遺伝子座を両側から挟み込むように位置しており、タマネギの稔性回復遺伝子の連鎖に関する報告がこれまで全くなかったことを考えれば、短期間に同遺伝子座にかなり接近できたとと言えるだろう。

Havey 教授はこれまでの実験結果をまとめて帰国までに論文を書き上げて提出するよう私に求めた。彼が英語のチェックをしてく

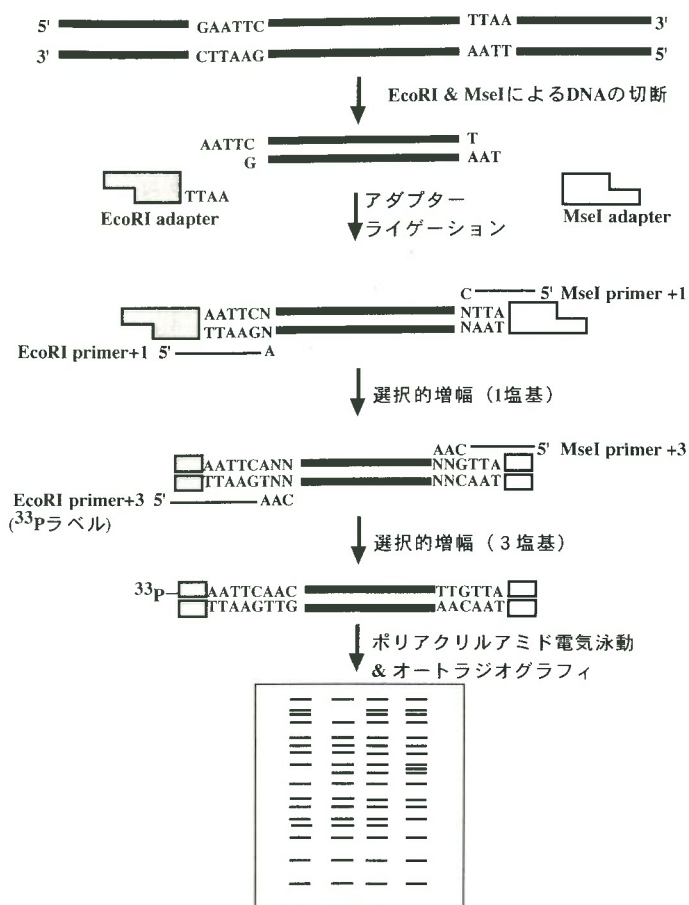


図2 3塩基選択プライマーを用いたAFLP分析

れるのだから、私は気が楽である。ケンタッキーで行われた学会での口頭発表を終えてから、私は論文作成に取りかかり、帰国の1週間前には無事提出することができた。現在 Havey 教授と私は共同して稔性回復遺伝子座とさらに密接に連鎖する AFLP マーカーの探索を続けるつもりでいる。

4. おわりに

ウィスコンシン大学の実験施設や機器類等が北海道農試と比べて特に優れているという印象はなかった。機器類は学部を超えて徹底して共用で使用されていたため、自分の順番を確保するのに苦労したり、順番を守らない人とトラブルを起こしそうになったりと色々大変な面が多かった。そういうハード面ではむしろ北農試の方が恵まれているように思う。しかし、Havey 研究室が遺伝子解析を行うために必要不可欠な実験材料を周到な計画の

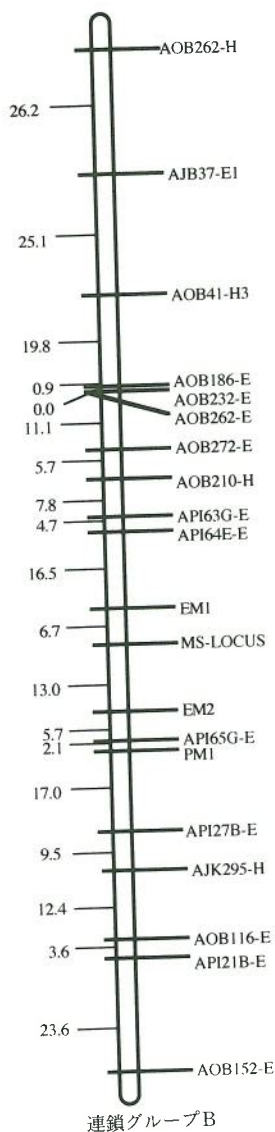


図3 稔性回復遺伝子座に連鎖する分子マーカー



Havey 教授を中心とする研究グループ (著者の送別会)

後列左から3番目がHavey 教授, 中央右に座っているのが著者

基に8年前から準備していたことや, 実験計画の立案や進捗状況のチェック時に徹底した議論を行って明確な判断を下すやり方は, 当研究の遂行におおいに役立った。1週間に1度決められた時間に担当教授に自分の研究の進捗状況を報告し, 必要があれば研究計画を見直すやり方は研究員にとって厳しい面もあったが, 実に効率的かつ客観的に自分の研究を評価する方法であると思う。

特別情報

漬物の科学—浸透圧理論の応用

漬物研究所

小川 敏男

1. 漬物と浸透圧

漬物は野菜を食塩で保存することから始められたといわれ、その研究にはまず第一に、漬物の基本である食塩が何故に利用されたかの原点から始めることになる。

食塩の保存性については、①塩素イオンの作用、②酸素の溶解性を減少させて好気性菌を阻止する、③細菌が炭酸ガスに対して鋭敏になる、④菌のタンパク分解酵素作用の阻害などがあげられている。

殺菌剤や防腐剤といわれるものは、0.1%以下の極めて薄い濃度でも効力を発揮するが、食塩の場合は1~2%では殆ど効果がなく、5~10%でも乳酸菌や酵母など容易に増殖するし、長期保存には15%もないと効果がない。

食塩の特性は、保存性を高め、塩味があって調味料になり、低分子でしかも電解質であるため、その溶液、つまり食塩水は極めて浸透圧が高いことである。食塩ほど容易に手に入り、毒性がなく、高浸透圧を呈するものは他にない。その高浸透圧性を利用して、野菜細胞の塩ごろしや、調味し、保存したりしたものが漬物である。漬物を始めとして、佃煮、塩辛、魚類の塩干物や味噌、醤油、ハムやベーコンなども食塩の浸透圧を利用した保存食品である。

近年、健康志向の中で食塩の摂取過剰が問題となり、これらの食品の低塩化が望まれるようになった。

このような観点から、浸透圧の面から漬物の低塩化の研究を進め、食塩の代替浸透圧物

質の利用などの低塩化技術を確立することができた。

2. 浸透圧算出式の設定

浸透圧に取り組むにはまず尺度になる浸透圧の算出式が必要である。浸透圧は気圧(atm)で表されるが、Vant-Hoffの公式 $P=N \cdot R \cdot T$ が用いられている。しかし、この式は希薄溶液に通用するもので、漬物などの塩分の高い食品には、誤差が大きくなり通用しない。

その後、Morse, Frazar らが25atm以上の高濃度のしょ糖液の浸透圧の測定に成功し、Vant-Hoffの式を改良をして次の式を提供した。

$$P_T = \frac{N \cdot R \cdot T}{V} \text{ (atm)} \dots\dots\dots A \text{ 式}$$

N=モル濃度, R=気体係数, T=絶対温度
V=溶媒の容積

A式を検討してみると、R(0.082)と、測定温度Tは定数であるから、浸透圧値は

表1 各種溶液の浸透圧計算式

- | | |
|-------------------|--|
| ① NaCl | $P_{30c} = \frac{(766 - 8.5C)C}{100 - 0.36C} \text{ 気圧}$
(KClはNaCl×0.78とする) |
| ② しょ糖, 麦芽糖 | $P_{30c} = \frac{72.6C}{100 - 0.36C} \text{ 気圧}$ |
| ③ ぶどう糖, ソルビット, 果糖 | $P_{30c} = \frac{138C}{100 - 0.36C} \text{ 気圧}$ |
| ④ アルコール | $P_{30c} = \frac{539C}{100 - C} \text{ 気圧}$ |

(注) 温度1度につき0.3%を加減する。
Cは濃度, アルコールV/V, 他はW/V%である。

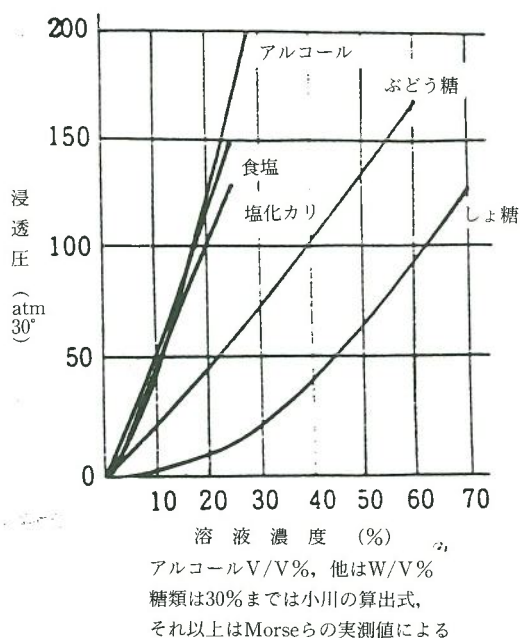


図1 調味料の濃度と浸透圧

モル濃度に比例し、また濃度が高くなるにつれ溶媒のVが減少するから、溶媒の量に反比例して高くなることである。

漬物の浸透圧値を検討するために、食塩、その他の調味料などの実用的な浸透圧算出式を提供した(表1)。

(1) 食塩の算出式

食塩のモル濃度を出すには電解質であるため、電離度を勘案しなければならない。希薄溶液では完全に電離するが、高濃度になるにつれ電離度が低くなるからである。濃度と電気伝導度から電離度を算出し、電離度を考慮して、A式を利用して食塩の算出式を提供した。

10%溶液で算出してみると、当算出式では128.5(atm)となり、Vant-Hoffの式で、完全に電離したものとして算出すると、170.4(atm)となる。それはVant-Hoffの式による方が当式よりも32.6%高い浸透圧値となる。食塩は電離度が低く飽和に近い25%で152atmである。塩化カリウムの浸透圧は分子量から、食塩の78%として算出することにした。

(2) 糖溶液の算出式

糖類は食塩のように電解質ではないので、A式で算出できる。ぶどう糖などの単糖類はしょ糖などの二糖類の1.9倍とみなして算

出することができる。しょ糖の50%の溶液では、53atmである。

(3) アルコール溶液の算出式

奈良漬などの粕漬には5~8%のアルコールが、福神漬にも、みりんなどを使うので、1~2%含んでいる。A式によりV/V%で算出したが、アルコール自体液体であるので、高濃度の溶液ができるので、500atm以上の極めて高い浸透圧を出すことができる。

アルコール液が殺菌や消毒に用いられるが、このような極めて高い浸透圧によるものであろう。

3. 浸透圧と微生物

微生物の増殖にはそれぞれに適した培地の浸透圧が考えられる。一般には真水よりも10atm以下の浸透圧溶液に適し、耐塩性(Halophilic)のものは、耐糖性のものが多く、耐浸透圧性(Osmophilic)のものである。

酵母は比較的浸透圧に強く、30atm以下の培地が適するが、100atm以上に耐えるものもある。それは微生物の細胞内の浸透圧と培地の浸透圧のバランスによるもので、細胞膜の組成や形状(小型で丸型が多い)も外圧に耐えるからであろう。

耐塩性と好塩性とは全く別の意味をもつものであって、後者は増殖に食塩を必要とする。あるいは食塩を含む培地を好み、海水などで増殖するものである。海水の発光菌では、食塩の代わりに、糖を添加して同じ浸透圧にしても食塩の代替にはならず、食塩のような電解質の存在を必要とされている。

筆者は漬物より分離した*Torulopsis*属酵母について、培地の浸透圧と増殖との関係をワールブルグ検圧計のガス発生量で比較測定したが、培地の食塩、糖などの溶質の濃度とCO₂ガスの発生量との関係はみられず、溶質の濃度ではなく、培地の浸透圧値に左右されることを知ることができた。つまり、食塩でもしょ糖でもぶどう糖でも同じ浸透圧の培地では、ほぼ同じガス発生量であった。醸造の

アルコール発酵をみると、澱粉などの高分子炭水化物が、微生物の酵素により加水分解して低分子となり、やがて極めて浸透圧の高いアルコールに至る。その酵母もやがて自ら生成したアルコールの100atm以上の高浸透圧によって終末をつげることになる。

4. 混合培地の相乗作用

奈良漬や福神漬などは、食塩、糖、アルコールなどの調味料の成分が混在する。混合溶液でも希薄な場合は、溶質それぞれの浸透圧の和がその溶液の浸透圧とされる。しかし、高濃度になると、相乗効果が期待できる。

前記のA式よりみると、異なった溶質をそれぞれa, b, cとすると、その和は次の式になる。

$$\frac{Na \cdot R \cdot T}{Va} + \frac{Nb \cdot R \cdot T}{Vb} + \frac{Nc \cdot R \cdot T}{Vc} \dots\dots B \text{ 式}$$

しかし、混合すると、合計された溶質の濃度が高くなるので、溶媒(V)の量が小さくなる。それぞれのVa, Vb, Vc > Vabc

したがって

$$B \text{ 式} < \frac{(Na+Nb+Nc) \cdot R \cdot T}{Vabc}$$

混合することによって、溶媒(水)の量を減少させるので、総合的な浸透圧値が高くなることである。

5. 浸透圧の利用 (低塩化技術)

一般の漬物の保存性は、食塩と酸(酢漬)に頼っている。福神漬や奈良漬は、食塩、糖、アルコールの三者の総合的な浸透圧により、粕漬では特にアルコールが大きな浸透圧の役割を果たしている。食品の保存に水分活性の見方もあるが、浸透圧とは基本的に異なっている。水分の多い食品には、成分から気圧(atm)で計算できるので、浸透圧の方がより合理的と考えられる。

近年、食塩つまりナトリウムの過剰摂取が健康上から問題になり、漬物の低塩化が重要課題となっている。

漬物の低塩化技術としては、食塩代替の浸透圧の利用、酸の利用(低塩増酸)、小袋などの加熱殺菌、低温の保存と流通などが進めている。食塩代替の浸透圧物質として、アルコールと塩化カリウムがある(表2)。

浸透圧値としては食塩1%に対し、アルコール1.1%、塩化カリウム1.3%をほぼ同じ浸透圧とみなし、また酸では0.14%が保存性が匹敵するものとして、減塩分を代替する方法を指導し効果をあげている。

有機酸は酸の種類により多少の差はあるが、「低塩増酸」の健康志向を受けて、減塩を酸で補っている。

表2によれば、Aの塩分10%、アルコー

表2 低塩化のために浸透圧と酸で代替する方式(例)
(A→Dに低塩化する簡略法である)

調味料 低塩化	NaCl 1%	≒	アルコール 1.1%	≒	KCl 1.3%	≒	酸 1.14%
A	10%		0.3%		—		0.6%
↓	(-3%)		(+1.1%)		(+1.3%)		(+0.14%)
B	↓ 7%		↓ 1.4%		↓ 1.3%		↓ 0.74%
↓	(-2%)		(+1.1%)		(+1.3%)		
C	↓ 5%		↓ 2.5%		↓ 2.6%		
↓	(-2%)		(+0.55%)		(+0.65%)		(+0.14%)
D	↓ 3%		↓ 3.05%		↓ 3.25%		↓ 0.88%

ル0.3%, 酸0.6%を含む漬物を, B~Dにと, つまり, 塩分10%から7, 5, 3%に漸次減塩するための浸透圧, 酸の両面からの代替法を示している。

6. おわりに

漬物に取り組んだことによって, その基本が食塩の浸透圧にあることから, 浸透圧がいかに多くの面にかかわっていることも知ることができた。

福神漬や奈良漬が食塩, アルコール, 糖などの総合的な浸透圧で保存されるように, 長く保存される味噌や醤油が16%の塩分を, 羊羹が糖分60%と2~3%食塩を, 清酒が約16%のアルコールを含んでいるが, これらはいずれも100~110atmの浸透圧によるもので

ある。

溶液のあるところ浸透圧ありではあるが, 浸透圧の理論が余り実際面に応用されていないように思う。

微生物に関連する培養, 発酵, 変敗防止, 殺菌消毒はもちろんのこと, 冷媒, 氷点降下剤, 色素や結晶の塩析, 透析処理, ゾル, ゲル化など広く, 各面に浸透圧理論の応用が期待されよう。

文 献

- 1) 小川敏男(1973)「漬物における浸透圧による変敗防止に関する研究」, 学位論文
- 2) 小川敏男(1988)「漬物製造学」, p.39~54
- 3) 小川敏男(1992)農業技術, 47(2):9
- 4) 小川敏男(1996)「漬物と日本人」(NHKブック), p.143~192

編集後記

最近“分子農業”とか“分子農場”という言葉に、ときどき出会うようになりました。詳しい定義は知りませんが、本号の岡田吉美先生の記事によると、植物を従来型農業が食料の生産手段とするのに対して、ワクチンなどの医薬品や医療検査薬等有用物質を生産するバイオリクターとして利用するものようでもあります。

本誌45号(1994)では、古澤巖先生にタバコによるヒトγ-インターフェロンの生産について紹介していただきました。本号では、

岡田先生にB型肝炎ウイルス抗原をタバコで生産することに成功した記事をいただきました。このように医薬や診断薬が植物で大量に低コストで生産されるようになれば、私達の健康はもちろん、開発途上国の人達にも大きく貢献することでしょう。今後は医薬だけでなく、さまざまな有用物質が分子農業で生産されることが期待されます。次はどんな物が作り出されるのでしょうか、楽しみです。

(大畑記)

ブレインテクノニュース (第62号)

平成9年7月15日発行

発行者 眞木 秀 郎

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

〒105 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