

CODEN: BTEEEC

TECHNO NEWS

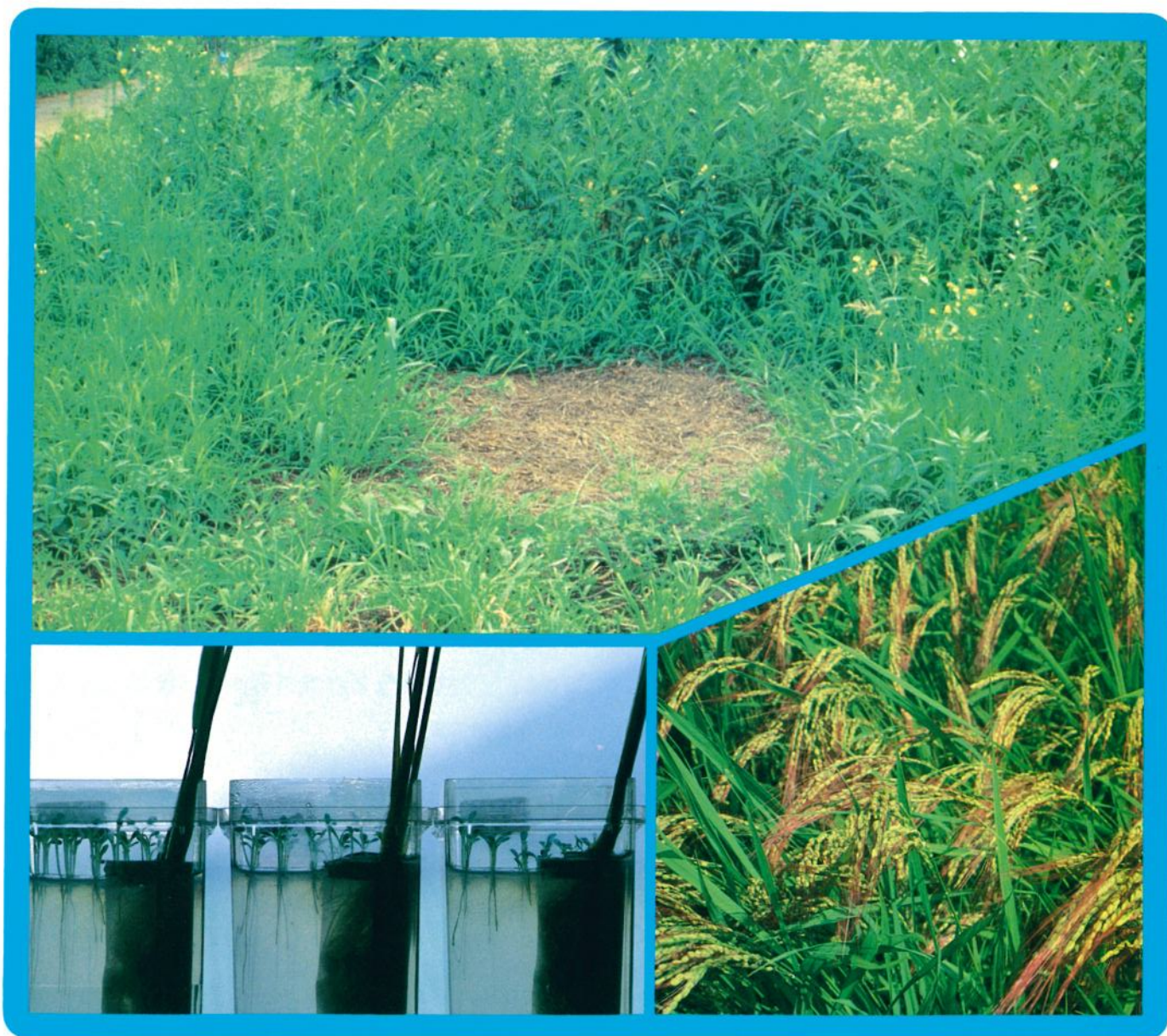
〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 74 号

BRAIN
Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

JULY 15, 1999



植物のアレロパシー現象（写真説明は、表紙裏の目次にあります。）

総 説

- 植物のアレロパシーとその利用…………… 1
藤井義晴（農林水産省農業環境技術研究所）

国内情報

- 群落を形成する熱帯の水田雑草ナガボノウルシの植物生長阻害物質…………… 6
平井伸博（京都大学大学院農学研究科応用生命科学）
トレハロース代謝系調節による冷凍耐性パン酵母の分子育種……………10
島 純（農林水産省食品総合研究所）・渡辺 肇（オリエンタル酵母㈱）
施肥自動化のための分光センサー開発……………14
棟方 研（生研機構）・石塚裕一（日本システム技術㈱）・
上野康男（国際技術開発㈱）
超臨界二酸化炭素を使用する液体食品の殺菌・酵素失活……………18
下田満哉（九州大学大学院生物資源環境科学研究科）

地域の先端研究

- サケ鼻軟骨に含まれるコンドロイチン硫酸とその利用……………22
錦織孝史（北海道立釧路水産試験場）

文献情報

- トウモロコシ栽培化の過程で何が起こったか……………25
R-L. Wang 他 (Nature, Vol. 398, 18 March, 1999)
マウス卵母細胞のクロマチン機構と遺伝子発現……………26
E. Christians 他 (Developmental Biology, 207 : 76-85, 1999)
タテジマフジツボの幼生どうしの情報交換……………26
K. Matsumura 他 (Proc. R. Soc. Lond., 256B : 1825-1830, 1998)

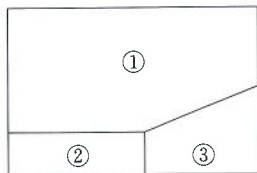
海外便り

- ミズーリ川のほとりにて：ロバーツ博士と研究と……………28
今川和彦（東京大学大学院農学生命科学研究科動物育種繁殖学研究室）

特別情報

- 遺伝子導入家畜の作製への展望—初期受精胚子の発生・分化と細胞間情報伝達……………31
平成11年3月23日開催ブレイン国際テクノフォーラム概要紹介

- 生研機構からのご案内……………30



写真説明 ①ヘアリーベッチ (*Vicia villosa*) のアレロパシー：中心部のヘアリーベッチの栽培跡地では、8月になっても雑草生育が完全に抑制されている。②イネのアレロパシー活性検定 (Plant Box 法)：3種のイネのうち、右端が最強の活性を示した阿波赤米で、雑草根伸長の顕著な抑制が見られる。③雑草抑制のアレロパシーが証明されたイネ科植物「阿波赤米」。

（植物のアレロパシーに関しては、本文総説1～5頁、国内情報6～9頁参照）

◀ 総説 ▶

植物のアレロパシーとその利用

農林水産省農業環境技術研究所

藤井義晴

アレロパシーは、植物が生産する生理活性のある化学物質による他の生物との相互作用であり、生物間相互作用において重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。本稿では、自然生態系や農業生態系の観察から得られたアレロパシーの実態に関する事例、作用する他感物質とその作用について紹介する。これらを農林水産業や関連産業に役立てる方法について解説する。

1. アレロパシーの意義と問題点

アレロパシーは他感作用と訳され¹⁾て、「植物が放出する化学物質が他の生物に阻害的あるいは促進的な何らかの作用を及ぼす現象」を意味し、作用物質を他感物質と呼ぶ。アレロパシーでは害作用が顕著に現れることが多いが、促進作用も含む概念である。最近の研究は、昆虫・微生物・動物に対する作用にも広がっており、化学物質による生物個体間の攻撃、防御、協同現象、その他情報伝達に関する相互作用を意味する²⁾。現象の報告は多いが特定の物質で現象を完全に説明した報告や作用機構に関する研究は少ない。

2. 二次代謝物質の意義はアレロパシー

特定の植物にのみ存在する二次代謝物質の存在意義は長く不明であり、老廃物であるとか、貯蔵物質であるとの説があった。近年、このような物質の意義は、動くことができない植物が身を守るために進化の途上で身につけた防御物質であるとする「アレロパシー仮説」が有力となっている。例えば、タバコのニコチン、デリスのロテノン、カラシのイソチオシアネート、キャッサバの青酸配糖体などがその事例と考えられている³⁾。

3. アレロパシーの実証法

農環研・他感物質研では、実際に根や葉から放出される物質が他の植物に影響を及ぼすことを証明する手法の確立を試み、置換栽培法、階段栽培法、無影日長栽培法などの識別手法を開発した⁴⁾。特に、根から出る物質を検定するプラントボックス法と、葉から出る物質を検定するサンドイッチ法を開発した。これらは寒天を用いて植物から放出される物質による作用を直接検定する方法である。

4. アレロパシーの強い植物の検索

これまでに作物・雑草・薬草・樹木など約500種、品種を含めると2000種類以上の植物から探索した。表1にプラントボックス法による根から出る物質による作用の強い植物を、表2にサンドイッチ法による葉から出る物質による作用の強い植物の例を示す。

5. 実用的なアレロパシーの探索例

作用が顕著で、物質が同定されており、実際の農業に役立ちそうな事例を紹介する。

1) マメ科植物に含まれる特殊なアミノ酸：

農環研の藤井らは、マメ科植物ムクナ (*Mucuna pruriens*)がブラジルの圃場で雑草の生育を抑制する現象を研究し、ムクナの植物

表1 Plant Box 法による根から出る物質によるアレロパシー活性の比較

学名 (英語名)	根伸長率[%]	反復試験数
— (Leguminosae) —		
<i>Mucuna pruriens</i> var. <i>utilis</i> (av. of 6 cv.)	13.4★★	22
<i>Vicia faba</i> (Broad Bean) (av. of 10 cv.)	19.4★	10
<i>Vicia villosa</i> (Hairy Vetch) (av. of 4 cv.)	20.3★	21
<i>Melilotus officinalis</i> (Yellow Sweet Clover)	23.4★	2
<i>Vicia sativa</i> (Common Vetch)	25.4★	5
<i>Ganavalia ensiformis</i> (Jack Bean)	28.1★	11
<i>Pueraria lobata</i> (Kudzu)	28.4★	4
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Tropical Kudzu)	28.5★	2
<i>Medicago sativa</i> (Alfalfa)	31.7☆	11
<i>Trifolium incarnatum</i> (Crimson Clover)	36.4☆	4
<i>Tephrosia candida</i> (White Tephrosia)	36.9☆	3
<i>Cajanus cajan</i> (Pigeon Pea)	39.7☆	10
<i>Lathyrus sativus</i> (Grass Pea)	40.8☆	7
<i>Cicer arietinum</i> (Chickpea)	43.9☆	6
<i>Vigna radiata</i> (Mung Bean)	47.1	6
<i>Trifolium pratense</i> (Red Clover)	52.7	6
<i>Crotalaria juncea</i> (Sunn Hemp)	56.9	4
<i>Astragalus sinicus</i> (Chinese Milk Vetch)	58.6	7
<i>Lupinus albus</i> (White Lupine) (av. of 5 cv.)	59.9	10
<i>Trifolium subterraneum</i> (Subterranean Clover)	70.4	6
<i>Trifolium repens</i> (White Clover)	71.7	5
<i>Glycine max</i> (Soybean) (av. of 2 cv.)	76.3	8
— (Gramineae) —		
<i>Avena sterilis</i> (Wild Oat)	12.0★★	5
<i>Triticum polonicum</i> (Polish Wheat)	13.3★★	3
<i>Panicum miliaceum</i> (Millet, Shikoku local cv.)	14.4★★	7
<i>Setaria italica</i> (Foxtail Millet)	18.0★	5
<i>Avena wiestii</i> (Wild Oat)	24.1★	2
<i>Triticum aestivum</i> (Mulch Wheat)	28.0★	2
<i>Anthoxanthum odoratum</i> (Sweet Vernalgrass)	28.8★	5
<i>Secale cereale</i> (Rye) (av. of 5 cv)	29.0★	12
<i>Avena sativa</i> (Oat) (av. of 12 cv)	29.5★	21
<i>Setaria italica</i> (Italian Millet)	30.2☆	2
<i>Festuca rubra</i> (Chewing Fescue)	30.3☆	3
<i>Avena fatua</i> (Karasumugi)	33.0☆	2
<i>Sorghum bicolor</i> (Sorghum)	35.5☆	9
<i>Hordeum vulgare</i> (Barley) (av. of 7 cv)	37.9☆	11
<i>Panicum maximum</i> (Guinea Grass)	39.7☆	4
<i>Triticum dicoccum</i> (Emmer Wheat)	40.5☆	3
<i>Panicum antidotale</i> (Blue Panicgrass)	43.5☆	3
<i>Festuca arundinacea</i> (Tall Fescue)	45.0☆	8
<i>Sorghum sudanense</i> (Sorghum sudanense)	45.2	6
<i>Echinochloa crus-galli</i> (Inubie)	48.0	3
<i>Digitaria sanguinalis</i> var. <i>ciliaris</i>	49.2	6
<i>Poa pratensis</i> (Kentucky Bluegrass)	59.5	12
<i>Zea mays</i> (Corn) (zv. of 3 cultivar)	60.0	7
<i>Dactylis glomerata</i> (Orchard Grass)	61.9	5
<i>Echinochloa utilis</i> (Hie) (av. of 3 cv)	62.3	10
<i>Lolium perenne</i> (Perennial Ryegrass)	63.6	7
<i>Paspalum dilatatum</i> (Dallis Grass)	72.4	5
<i>Lolium multiflorum</i> (Italian Ryegrass)	73.9	11
<i>Phalaris arundinacea</i> (Reed Canary grass)	76.3	4

注) 強さの目安 ☆30~45% (弱い阻害)
 ★15~30% (中程度の阻害)
 ★★0~15% (強い阻害)

体中に生体重の1%にも達する多量に含まれる特殊なアミノ酸L-DOPA(ドーパ, 図1)が作用物質の一つと報告した。ドーパは、キク

科やナデシコ科雑草の生育を阻害するが、イネ科植物は阻害しない。従ってムクナはトウモロコシやサトウキビ等のイネ科作物と混植

したとき、雑草は抑制するが、作物は阻害せずに収量を上げる共生関係にある。ドーパは雑草を枯らすほどの効果はなく、速やかに分解されて後作に阻害を残さない⁵⁾。

同様の異種アミノ酸として、オジギソウ、ギンネムからミモシンが、ナタマメからカナバニンが阻害物質として報告されている。ミモシンはドーパと構造が類似しており(図1)、同一の作用機構を持つ可能性がある。カナバニンはアルギニンの類縁体で、アミノ酸代謝を乱す可能性がある。しかし、これらの異種アミノ酸の作用機構は明らかではない。

2) イネのアレロパシー:

従来のイネ育種は、良食味、耐病性、高収量などを目的に行われ、耐雑草性を目的とした育種は皆無であった。近年、環境への影響と省力化の観点から、イネ自身の力で雑草を抑制する試みが開始されている。

日本では、農環研・四国農試・九州農試などにおいて、プラントボックス法によってイ

表3 Plant Box法によるイネのアレロパシー活性の比較

品種・系統名	根伸長率 (%)
阿波赤米	4
総社赤米	9
Deng Mack Tek	10
Dam Ngo	11
コウケツモチ	13
山坂	15
唐干	17
黄穀	18
北支16号	19
Daw Dam	20
宝満神社米	20
ネバリモチ	22
黒沢	34
紫黒米	38
Della	41
北京香稻	55
Sabarmati	55
南京11号	61
亀の尾	63
短銀坊主	65
Taducan	72
南京香稻	73
サリークイー	82
旭	90

注) %は対照区に対する伸長率を示し、値が小さいほど阻害が大きい(強さの目安は表1, 注参照)

表2 Sandwich法による葉から出る物質によるアレロパシー活性の比較

学名	和名	幼根
<i>Eucalyptus citriodora</i>	レモンユーカリ	0
<i>Nandina domestica</i>	ナンテン	4
<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	メタセコイア	10
<i>Delonix regia</i>	ホウオウボク	11
<i>Aleurites cordata</i>	アブラギリ	11
<i>Enkianthus perulatus</i>	ドウダンツツジ	12
<i>Duranta repens</i>	タイワンレンギョウ	12
<i>Bougainvillea spectabilis</i>	イカダカズラ	14
<i>Sequoia sempervirens</i>	セコイア	16
<i>Cedrus deodara</i>	ヒマラヤシーダ	16
<i>Leucaen leucocephala</i>	ギンゴウカン	16
<i>Erythria indica</i>	デイゴ	19
<i>Camellia japonica</i>	ツバキ	20
<i>Ginkgo biloba</i>	イチョウ	23
<i>Coffea arabica</i>	コーヒーノキ	24
<i>Cassia surattensis</i>	モクセンナ	31
<i>Picea jezoensis</i>	エゾマツ	34
<i>Sophora japonica</i>	エンジュ	34
<i>Castanea crenata</i>	クリ	44
<i>Populus nigra var. italica</i>	ポプラ	44
<i>Juniperus chinensis var. procumbens</i>	ハイビヤクシン	46
<i>Liquidambar formosana</i>	アメリカフウ	47
<i>Eugenia javanica</i>	オオフトモモ	49
<i>Cinnamomum camphora</i>	クスノキ	50
<i>Quercus serrata</i>	コナラ	50
<i>Acer palmatum</i>	イロハカエデ	54
<i>Pinus densiflora</i>	アカマツ	54
<i>Larix lepbolensis</i>	カラマツ	57
<i>Quercus dentata</i>	アカカシワ	60
<i>Quercus acutissima</i>	クヌギ	63
<i>Quercus phylllyraeoides</i>	ウバメガシ	68
<i>Quercus glauca</i>	アラカシ	72
<i>Fagus japonica</i>	イヌブナ	76
<i>Quercus acuta</i>	アカガシ	81
<i>Betula platyphylla var. japonica</i>	シラカバ	97
<i>Magnolia obovata</i>	ホオノキ	98
<i>Castanopsis cuspidata var. sieboldii</i>	スダジイ	104
<i>Fagus crenata</i>	ブナ	107

ネのアレロパシー活性が検索された。その結果、概して近代の栽培種の活性は低く、野生種、在来品種の中に、活性の強いものを検出した。特に赤稲系統の活性が強かった。アレロパシーの検定結果と圃場での効果は必ずしも一致しないが、阿波赤米、コウケツモチなどは圃場でも雑草抑制作用を示した(表3)。

アメリカ合衆国農務省の国立イネ遺伝資源研究所では、15000種のイネを圃場に植え、自然発生してくる雑草を抑制する活性を指標に

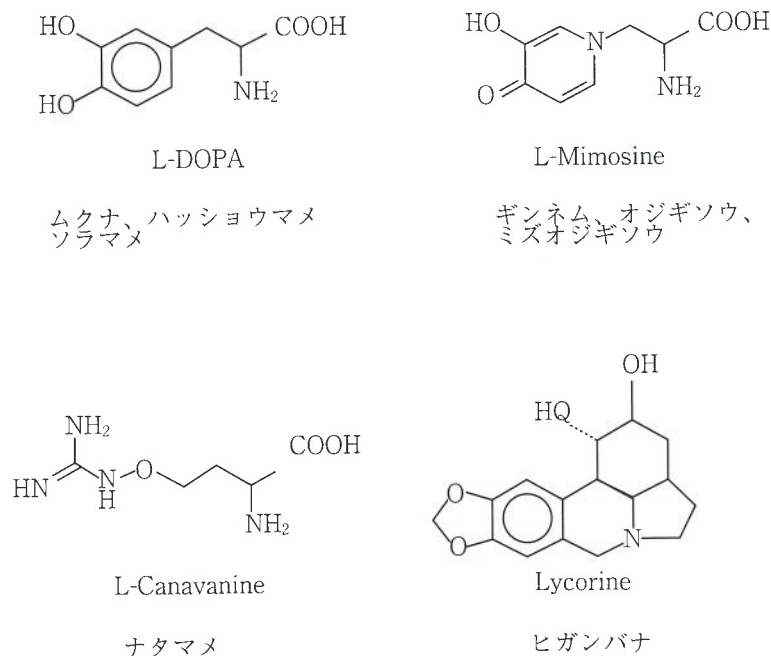


図1 生態秩序プロジェクトで固定したアレロパシー物質と含有植物

検索した結果、アレロパシーの強いイネ数種を見出した。これから増加すると見られる直播栽培では除草剤の使用が増加するとみられるので、イネのアレロパシーを利用した雑草抑制が期待される。このほかに、フィリピン国際イネ研究所 (IRRI)、韓国、台湾、エジプトなど世界15ヶ国でイネのアレロパシーに関する研究が開始されている。

6. アレロパシーの農林水産業への利用

アレロパシーの農業への利用としては、1) 作用のある植物を直接栽培したり、敷きわらマルチ、混植・輪作に利用する栽培的方法、2) 新たな生理活性物質を見出して利用する化学的方法、3) 関連遺伝子を組み込んだ雑草抵抗性作物や共栄作物の作成といった遺伝子工学的的方法が考えられる。

1) 栽培的方法:

①被覆植物による休耕地や果樹園の雑草管理

ヘアリーベッチ(*Vicia villosa*)は、ムクナの類縁植物で、農環研と四国農試において圃場

でのアレロパシーが実証された⁶⁾。

現在、全国で耕作放棄地や休耕地が増加し約5%に達しており、更に増加の傾向にある。そこでアレロパシーの強い植物を利用して、最少の労力で雑草制御を行い、随時耕地として復元できる技術を開発している。ヘアリーベッチは、根と葉から放出される物質によるアレロパシーがあり、圃場での雑草抑制が強い上、緑肥・土壌保全・牧草としての利用も可能であり、徐々に普及し始めている。

②敷き草マルチによる雑草制御

マルチによる雑草抑制の主因は光の遮蔽であるが、他感物質を含む植物を用いることで雑草抑制効果が確実になる。ヘアリーベッチは、層状のマットを作るので、スイカやメロンのマルチとしての利用が考えられる。

③輪作・作付け体系の中に組み込む

輪作は発生雑草を減少させる効果がある。アレロパシーの強い作物の導入で雑草抑制効果を高めることが考えられる。コムギ・ライムギは、ヒドロキサム酸などの強い他感物質を含むとの報告がある。ヘアリーベッチも輪作体系に加えることが可能である。

2) 化学的方法: 新たな生理活性物質の発見
アレロパシー植物の研究から、新たな生理

活性物質の発見が期待される。農環研では、京都大学と協力して、熱帯で強害雑草となっている水田雑草ナガボノウルシ(*Sphenoclea zeylanica*)から、植物成長阻害物質を単離した。こからはジチオラン構造を持つスルフィネートで、珍しい構造を持つ化合物である。また、クマツヅラ科の灌木タイワンレンギョウ(*Duranta repens*)から、トリテルペノイドサポニンを単離した。いずれも新規物質であったので、特許を取得している。

3) 遺伝子工学的な方法：

他感物質を作る遺伝子を明らかにし、これらを作物に組み込んで、雑草抑制能の高い作物を育種する。組換え作物の安全性が高ければ、もっとも簡便な雑草抑制技術になるものと期待される。

7. アレロパシー研究の展望

1) 在来農法や伝統農業に学ぶ：

農業に直接役立つ事例は、ムクナやナタマメによる雑草抑制、果樹園でのヘアリーベッチの利用、畦畔でのヒガンバナ栽培のように、農民が既に在来農法として行っていたものが多い。なお、他感物質研では、昨年、ヒガンバナの他感物質としてリコリンを同定した。

このような農業の本質は、被覆植物の利用にある。アレロパシーは、農薬や機械による雑草防除に比べて確実性に欠けるが、収量に被害が出ない程度に防除する粗放管理への転換を図った持続型農業に役立てて欲しい。

2) 生態系内での生物間相互作用の解明：

ブナやイヌブナ、ナラ、カシなど、ブナ科の樹木のアレロパシーは小さく、スギやヒノキ、マツなど針葉樹のアレロパシーは強い。ブナの森の下流域では魚が豊富であるが、スギや針葉樹の下流では少ないといわれる。保水力や他の因子も複雑に関与している可能性があるが、アレロパシーの関与が示唆される。

3) 未知のアレロパシー植物の探索：

中南米やアジア、アフリカの熱帯雨林などの未知の植物には未知の生理活性物質が存在すると推定される。アメリカ合衆国は農務省直轄研究所として1996年秋に天然物研究開発センターを設置し、系統的な天然生理活性物質の探索と開発を開始している。

アレロパシーは、未熟な分野であり、未知な現象も多い。しかし、このような生物間相互作用に関する研究が、持続的な食糧生産や、環境の維持に役に立ち、ヒトを含めた多様な生物の存続に役立つことを期待している。

引用・参考文献

- 1) 沼田 真(1977): 化学と生物 15, 412 ~ 418
- 2) 藤井義晴(1990): 化学と生物 28, 471 ~ 478
- 3) Harborne, J.B.(1990): Bioactive Compounds from Plants, Ciba Foundation Symposium 154, 126 ~ 139
- 4) 藤井義晴(1994)農業環境技術研究所報告 10, 115-218
- 5) 藤井義晴(1990)農業および園芸, 65, 835 ~ 840, 同, 945 ~ 948
- 6) 花野義雄ら(1998)四国農試報告, 62: 45 ~ 70

◀国内情報▶

群落を形成する熱帯の水田雑草ナガボノウルシの植物生長阻害物質

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

平井伸博

熱帯の水田雑草ナガボノウルシは純群落を形成することから、他感作用を有していることが指摘されている。我々はナガボノウルシから植物生長阻害物質として4種の新規環状チオールスルフィナート化合物と6種の既知セコイリド配糖体を単離同定し、これらが本雑草の他感物質として作用している可能性を示した。また、環状チオールスルフィナート化合物の合成にも成功し、これをリード化合物とする新しい植物生長阻害物質の開発に道を開いた。

1. 他感作用

他感作用とは、ある植物が放出する化学物質によって他の植物が何らかの影響を受ける現象であり、その化学物質を他感物質と呼んでいる¹⁾。他感作用は、光や栄養分の競合とは異なり、化学物質を通して他の植物が影響を受けることに特徴がある。有名な例として、クロゲルミが知られている。クロゲルミは、植物生長阻害作用をもつユグロンの前駆体を土壌に放出するため、その周辺では他の植物が生育しない。このような植物は生態系におけるアドバンテージをもっているため群落を形成することが多い。近年、他感作用は新たな生理活性物質の探索や、生態系調和型農業への利用面から再び注目されている。

ナガボノウルシ (*Sphenoclea zeylanica* Gaertn.) はかつてキキョウ科に分類されていたナガボノウルシ科の一年生草本である (写真)²⁾。熱帯アフリカ原産であるが、現在ではその分布は、世界中の熱帯と亜熱帯地域に広がっている。日本でも、1960年代から時おり熊本県内の水田で自生が確認されている。ナガボノウルシは自然環境では、定期的に干上がる水たまりや湿地に好んで生育する。したがって水田は絶好の生育場所になっている。ナガボノウルシの生活環を図1に示した。種子は土壌の灌漑や冠水によって発芽する。発芽には一定の水深を必要とする。この性質も

HIRAI Nobuhiro



写真 ナガボノウルシの生長個体。タイ国バンコク市北部の水田にて1996年5月撮影 (人物は著者所属研究室の大東肇教授)。

イネとよく似ている。発芽後、約45日で高さが約150 cmに達し、花が咲いて種子を形成しはじめる。種子は長さ約0.5 mmと小さく、一個体あたりの種子数は極めて多い。発芽してから約3カ月後、植物体は枯れて、次の灌漑・冠水まで種子が土壌中に残る。ナガボノウルシは除草剤の2,4-Dに対して耐性であるため、人手による除草が中心である。しかし、そ

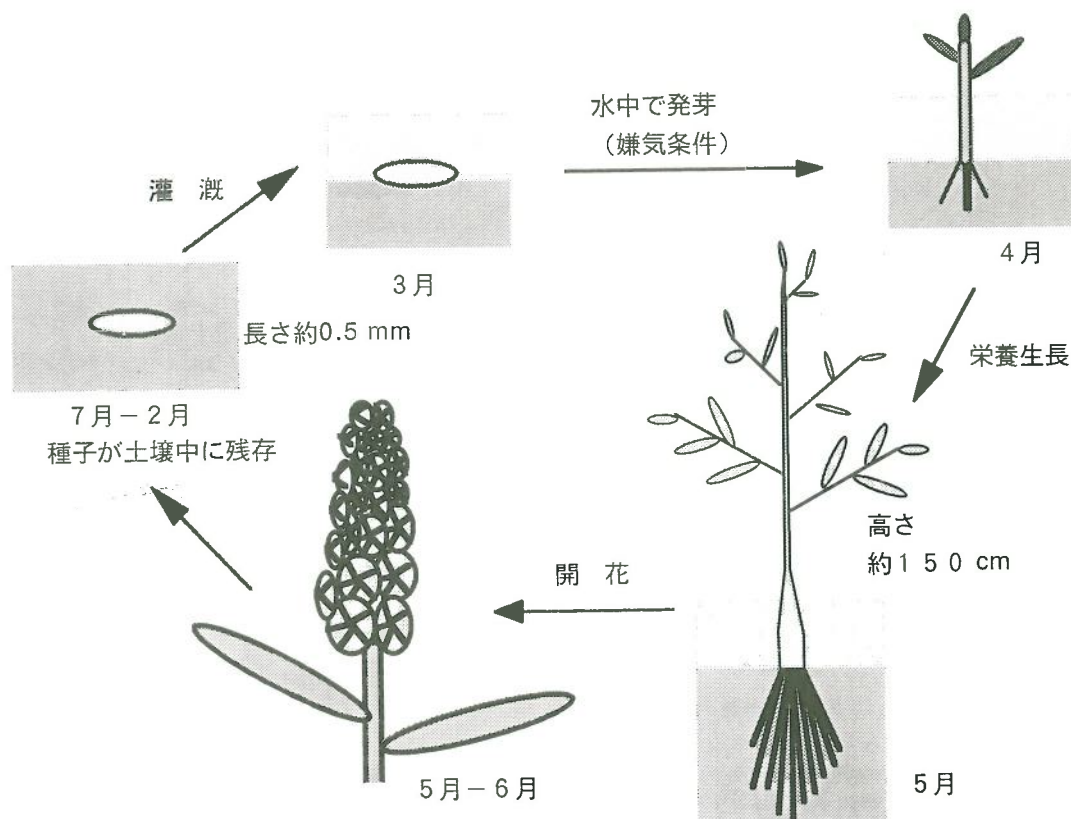


図1 タイ国の水田におけるナガボノウルシの生活環。タイ国では1年間に2-3回稲作を行うので、実際には一年間にこの生活環を2-3回くり返す。

れにも限界があるためしばしば放置されてしまい、数年後には水田中で大きな群落を形成する。実際に筆者もタイ南部で、面積の半分以上がナガボノウルシの群落によって占められた水田を見たことがある。このような性質のため、ナガボノウルシはイネの強害雑草に指定されている²⁾。ナガボノウルシの2,4-D耐性は、8-10葉期以降に発達するクチクラ層が2,4-Dを透過させにくくするためと考えられている³⁾。

ナガボノウルシの他感作用性に最初に注目したのは、タイ国立雑草科学研究所のC. Premasthira氏ならびに農業環境技術研究所の故浅川博士と原田博士である。彼らはナガボノウルシを水田にすきこむとイネの生育が悪くなること、乾燥した土にすきこんだ場合はあまり影響がないことを見出した。また、ナガボノウルシの抽出物がイネ芽生えの生育を阻害することも認めた。これらのことから、本雑草は、他感物質として作用するような特

徴的な植物生長阻害物質を含んでいると考えられた。そこで筆者らは農業環境技術研究所の藤井博士と協力して、その阻害物質を明らかにすることを試みた。

2. 植物生長阻害物質の化学構造

ナガボノウルシのメタノール抽出液より、イネ芽生え根の生長阻害活性を指標として、活性物質を合計10種類(SZ-1-10)単離した。これらがすべて水溶性物質であったことは、上述のナガボノウルシを水田にすきこむとイネの生育に影響するということと対応している。

スペクトル分析よりSZ-1-4は、いずれも新規環状チオールスルフィナートであり、SZ-1と-3が4-hydroxy-3-hydroxymethyl-1,2-dithiolane-1-oxideの1位エピマー、SZ-2と-4が4-hydroxy-3-hydroxymethyl-1,2-dithiolane-2-oxideの2位エピマーであることがわかつ

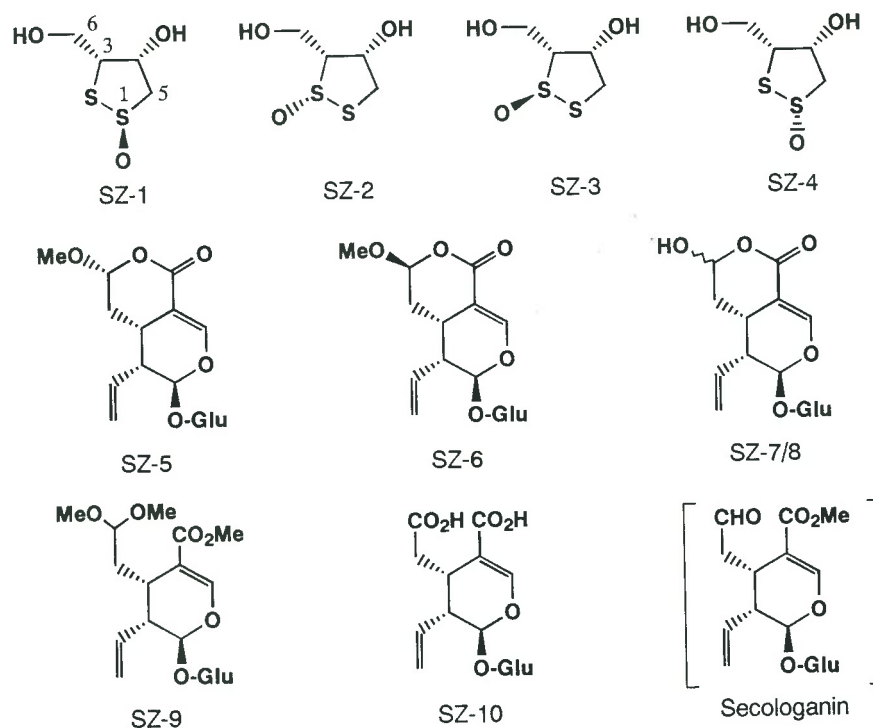


図2 ナガボノウルシに含まれる植物生長阻害物質。Secologaninの存在は推定。SZ-1, (1*S*,3*R*,4*R*)-(+)-4-hydroxy-3-hydroxymethyl-1,2-dithiolane-1-oxide; SZ-2, (2*S*,3*R*,4*R*)-(+)-4-hydroxy-3-hydroxymethyl-1,2-dithiolane-2-oxide; SZ-3, (2*R*,3*R*,4*R*)-(-)-4-hydroxy-3-hydroxymethyl-1,2-dithiolane-2-oxide; SZ-4, (1*R*,3*R*,4*R*)-(-)-4-hydroxy-3-hydroxymethyl-1,2-dithiolane-1-oxide; SZ-5, -6, -9は抽出溶媒のメタノールがSZ-7/8やsecologaninと反応して生じたものと推定される。Secologaninは検出できなかったが、SZ-9の存在はナガボノウルシにsecologaninが含まれていることを示唆している。

た。3,4位の絶対配置はL-グルコースを出発物質とする化学合成によって、S-oxideの絶対配置は¹HNMR分析によって決定した(図2)。D-グルコースからは非天然型のSZ-1-4を合成することができた。SZ-5-10は既知セコイリド配糖体であった(図2)。このうちSZ-5, -6, -9は抽出溶媒のメタノールがSZ-7/8やsecologaninと反応して生じたものと推定される。Secologaninは検出できなかったが、SZ-9の存在はナガボノウルシにsecologaninが含まれていることを示唆している。

環状チオールスルフィナートとして、黄化アスパラガスに含まれている植物生長阻害物質asparagusic acid-S-oxideが知られている⁴⁾。他にオヒルギから得られたbrugierolおよびisobrugierolが知られているが⁵⁾、これらの生物活性は明らかではない。Asparagusic acidでは、methacrylic acidがシステインと反応することによって生合成前駆体がつくられると推定されているので⁶⁾、SZ-1-4の硫黄原子もシステイン由来と推定される。

セコイリド配糖体はリンドウ科やモク

セイ科などの植物に含まれている⁷⁾。これらの植物は苦味生薬として健胃、解熱、解毒などに用いられてきたものが多く、セコイリド配糖体はその苦味本体とされている。中国ではナガボノウルシを木空菜という生薬として消炎、消腫に利用したり、新鮮植物体を潰して患部に塗布して用いたりしている⁸⁾。また、ジャワでは苦いにも関わらず、若苗や成長個体の上部をゆでて野菜として食べている²⁾。これらはナガボノウルシに含まれているセコイリド配糖体の薬理効果を利用していると思われる。イボタの葉では、イリド配糖体が昆虫に対する毒成分になっていることが知られているので⁹⁾、ナガボノウルシにおいてもセコイリド配糖体は他の植物の生長に影響するだけでなく、昆虫に対する防御物質となっている可能性もある。

3. 生理活性

SZ-1-4はイネ芽生えの根部の生長を0.5-1.2 mMの濃度で、SZ-5-8は0.1-0.3 mMの濃度で

50% 阻害し、根を病的に伸長させた。1 週間の観察では、SZ-1-8 のイネ芽生え地上部に対する生長阻害活性は弱かったが、根部の生長が阻害されることから、長期試験ではいずれ地上部も枯れると推定される。SZ-3 は 10 g/a で水田雑草のノビエの生育を 70% 阻害し、コナギに奇形を発生させた。非天然型の SZ-1-4 のイネ芽生えに対する阻害活性は天然型のものに近かった。S-oxide をもたない dithiolane 型では天然の SZ-1-4 と同じ 3, 4 位の絶対配置をもつものが SZ-1-4 と同等の活性を示したのに対して、その光学対象体にはほとんど活性がなかった。このことは SZ-1-4 では S-oxide が、dithiolane 型では 3, 4 位の絶対配置が重要であることを示唆している。

SZ-1-8 の阻害活性は決して強いものではないが、活性が低くてもその含量が高ければ他感物質として他の植物の生長を抑制する可能性がある。そこで、ナガボノウルシの新鮮植物体ならびに乾燥粉末中に含まれる SZ-1-8 を定量した。その結果、新鮮重で SZ-1-4 の合計含量が約 0.25 mg/g、SZ-5-8 の合計含量が約 4.5 mg/g であった。乾燥による分解は SZ-1-4 ではそれほど認められなかったが、SZ-5-8 では顕著であった。これは、乾燥中のオートリシスによって SZ-5-8 が β -グルコシダーゼによって加水分解され、生じたアグリコンが容易に分解するためと推定される。ただし、SZ-5-8 は分解後も SZ-1-4 よりも高い含量を示した。SZ-1-8 の合計含量は新鮮植物体では 0.5% 以上、乾燥粉末でも 0.1% 以上であった。した

がって、SZ-1-10 は活性はそれほど強くはないが、高含量で含まれているため、倒れたり枯れたりした植物体から大量の SZ-1-10 が水中や土壌中に移行し、これが他感作用の原因となってイネの生長を抑制している可能性が高い。

ナガボノウルシ自身の生長がなぜこれらの物質によって阻害されないのか、実際にこれらの物質がどの程度水田に残留しているのかなどは、今後明らかにすべき問題である。また、環状チオールスルフィナート化合物をリード化合物として、耕地生態系への影響の少ない新しい除草剤の開発も期待される。

文献

- 1) Rice E. L., 八巻敏夫ら訳 (1991) アレロパシー, 学会出版センター
- 2) Leroy G. H. et al. (1977) *The World's Worst Weeds*, The University Press of Hawaii, pp. 446-449
- 3) Mercado B. L. et al. (1990) *Weed Research* 30: 245-250
- 4) Yanagawa H. et al. (1973) *Tetrahedron Lett.* 1073-1075
- 5) Kato A. and Numata M. (1972) *Tetrahedron Lett.* 203-206
- 6) Parry R. J. et al. (1985) *J. Am. Chem. Soc.* 107: 2512-2521
- 7) 井上ら (1971) 薬学雑誌 91: 755 - 759
- 8) 中国本草図録編輯委員会 (1990) 中国本草図録 8, 商務印書館 (香港), p. 152
- 9) 今野ら (1999) 日本農芸化学会 1999 年度大会講演要旨集, p. 324

◀国内情報▶

トレハロース代謝系調節による 冷凍耐性パン酵母の分子育種

農林水産省食品総合研究所, *オリエンタル酵母(株)東京食品研究所
島 純, *渡辺 肇

冷凍生地製パン法で良質のパンを得るためには、冷凍生地中でも発酵力を失わない冷凍耐性パン酵母を用いる必要がある。二糖類であるトレハロースの細胞内含量はパン酵母の冷凍耐性の重要な決定因子であると考えられている。そこで、実用パン酵母のトレハロース分解酵素（トレハラーゼ）の遺伝子破壊を行ったところ、トレハラーゼ遺伝子破壊株は発酵過程において高い細胞内トレハロース含量を維持しており、冷凍生地中での冷凍耐性能も向上していた。

1. 冷凍生地製パン法

近年になり、パンは野菜・魚介類と同様に鮮度が重要視される傾向が強くなってきた。パンは、パン酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）を用いた発酵食品の一種である。パン生地の発酵時間は数時間と極めて短い、この間にパン特有の香りと柔らかな感触の内相が形成される。しかし、焼き上がり直後から、これらの香りやテクスチャーは急速に失われていく。こうしたことから、パンは生鮮食料品のひとつとさえ考えられるのである。

パンの製造は原料の混捏から始まり、焼成後の冷却まで4～7時間を要する。従来型の製パン法では、製パンの途中で作業を中断することができないため、焼き立てのパンを午前中に提供するには、深夜・早朝作業を余儀なくされた。また、消費者ニーズの多様化に伴い、数十種類にも及ぶ製品を多品種少量生産を行う必要があった。製パン作業を冷蔵、冷凍などにより適当な過程で中断できると好都合であるが、通常のパン酵母を用いると低温でも発酵が停止せず、また発酵後に冷凍すると解凍後にパンが膨らまなくなってしまう。これらの問題を解決する方法のひとつとして、冷凍耐性パン酵母を用いる「冷凍生地製パン法」が開発された（1, 2）。冷凍生地製パン法とは、図1に示したように原料の混捏・前発

酵を終えたパン生地を分割した後、 -20°C 以下の低温で冷凍し、貯蔵または流通させる方法である。この方法により、長時間の労働を中断することが可能になる。さらに、冷凍生地を輸送し、後半の行程をベークオフショップで行えば焼き立てパンが提供できることになる。

2. 冷凍耐性パン酵母

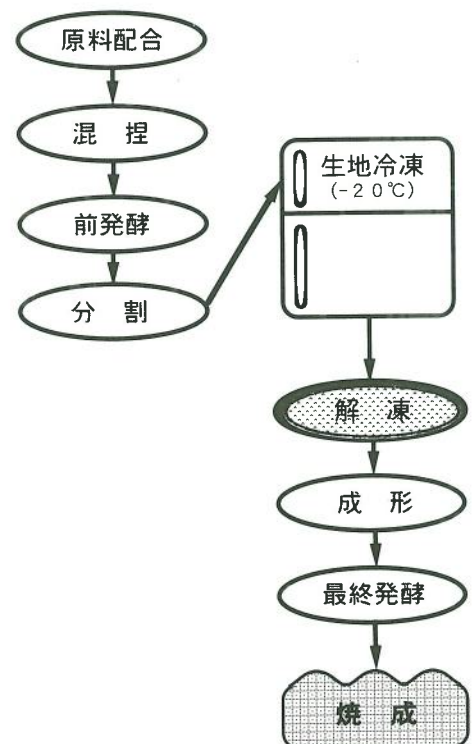


図1 冷凍生地製パン法によるパンの製造工程

SHIMA Jun, WATANABE Hajime

冷凍生地製パン法に通常のパン酵母を用いると、パン酵母は冷凍障害を受け、解凍後の発酵力が不足しパン製造が困難となる(3)。これに対して、前発酵時間の短縮、油脂や糖類といった冷凍保護物質となる副原料の添加、酵母の大量使用、などの方法で冷凍生地製パン法を可能にしようと試みられてきた。しかし、これらの方法では冷凍期間やパンの種類が限られ、製造されたパンも風味が劣るケースが多かった。こうした事情から、冷凍貯蔵中に冷凍障害を受けにくいパン酵母、すなわち「冷凍耐性パン酵母」の開発が強く求められた。現在まで、冷凍耐性パン酵母は自然界からのスクリーニングや突然変異といった手法により開発されてきており、特定のパン生地に使用可能な冷凍耐性パン酵母が得られてきている。

一方、パン生地の種類、すなわち含まれる糖類、脂質、食塩などの含量により、それに適するパン酵母株は異なる。今後、消費者ニーズの多様化に伴い、使用されるパン生地の種類はますます増加するものと予想される。各々のパン生地に使用可能な冷凍耐性酵母を従来型の育種技術により得ることは、膨大な労力を必要とする。また、全ての種類のパン生地に対応する冷凍耐性酵母を得るには限界があると予想される。そこで、我々は、実際

のパン製造に用いられるパン酵母に対して、遺伝子操作を行い冷凍耐性を付与する技術の開発を行った。

3. トレハロースと冷凍耐性

細胞内のトレハロース蓄積はパン酵母の冷凍耐性の決定因子のひとつとして考えられている。トレハロースはグルコース2分子が α -1,1結合した非還元性の二糖類であり、パン酵母の主要な貯蔵糖質である。トレハロースはきのこ類、海藻、大豆、など広く食品中に含まれ、近年になり種々の機能性・利用特性が明らかにされてきている(4)。また、乾燥、冷凍、高エタノールなどのストレス状態下で、トレハロースは細胞保護成分として機能していると考えられている。我々の以前の研究を含めて、冷凍耐性能の強いパン酵母は、冷凍耐性能の弱いパン酵母に比較して細胞内トレハロース含量が高いことが知られている(5)。特に冷凍耐性の弱いパン酵母では、パン生地の前発酵過程において著しくパン酵母細胞内のトレハロース量が減少し、このことが冷凍生地中の生存率及び発酵力の低下の主な原因のひとつとなっている。こうしたことから、パン酵母の冷凍耐性能の向上のためには、常に細胞内トレハロース量を高く維持させること

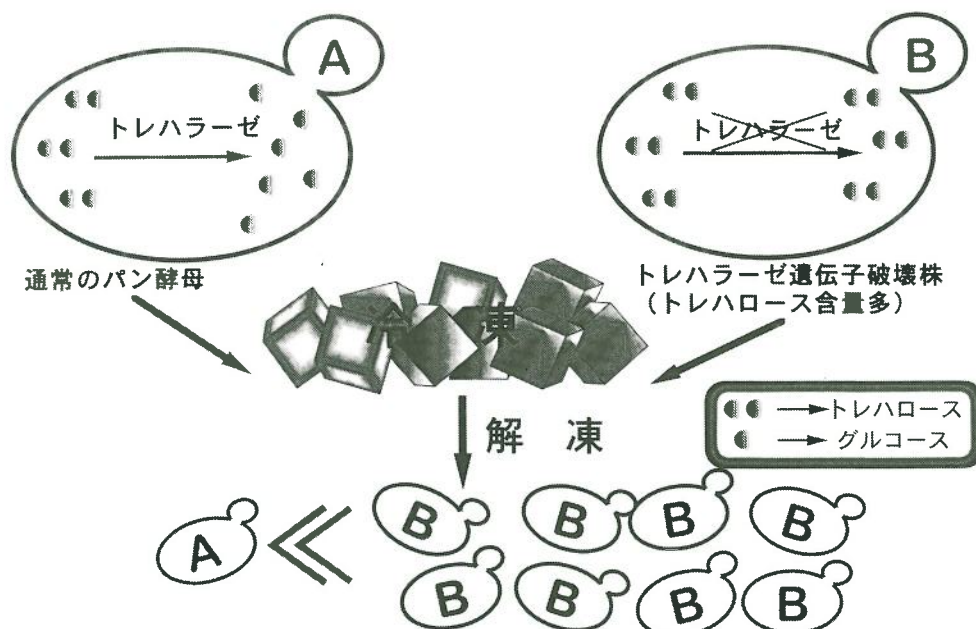


図2 トレハラーゼ遺伝子破壊による冷凍耐性の向上

が有効ではないかと考えた。そこで、我々はトレハロース代謝系のうち、特にトレハロース分解系に着目し、トレハロースの代謝調節を行った。パン酵母において、トレハロースの分解は主に2種のトレハロース分解酵素(トレハラーゼ)により行われていると考えられている(6)。トレハラーゼには至適pHが中性である中性トレハラーゼ(*NTHI* 遺伝子にコードされている)と至適pHが酸性域にある酸性トレハラーゼ(*ATHI* 遺伝子にコードされている)の存在が知られている。また、中性トレハラーゼは細胞質に、酸性トレハラーゼは液胞中に局在することが明らかにされている。これらのトレハラーゼ遺伝子を遺伝子破壊法により不活性化すれば、細胞内トレハロース蓄積量が増加し、冷凍耐性も向上するのではないかと考えた(7)。図2に作業仮説をモデル図として示した。

4. トレハラーゼ遺伝子破壊株の構築と冷凍耐性の向上

製パンを行うのに十分な発酵力を有する実用パン酵母株を親株として、トレハラーゼ遺伝子破壊を行った。遺伝子破壊はワンステップ破壊法を用いた。オープンリーディングフレームの両端を欠損した中性トレハラーゼ遺伝子または酸性トレハラーゼ遺伝子の内部に*URA3* 遺伝子(マーカー遺伝子)を挿入して遺伝子破壊用のDNA断片を構築した。実用パン酵母から誘導した一倍体株に*ura3* 変異を付与した後、各トレハラーゼ遺伝子破壊用のDNA断片を用いて形質転換を行った。形質転換株はウラシル非要求性株として取得した。サザン解析により、形質転換体では2回の相同組換えが生じており、トレハラーゼ遺伝子が破壊されていることを確認した。このようにして、中性トレハラーゼ遺伝子破壊株及び酸性トレハラーゼ遺伝子破壊株を得た。さらに、中性トレハラーゼ遺伝子破壊株に対して、酸性トレハラーゼ破壊用のDNA断片を用いて再形質転換を行い、中性トレハラーゼ・酸性トレハラーゼ二重遺伝子破壊株を得た。次に、日

本で用いられるパン酵母は通常二倍体であるので、得られた一倍体のトレハラーゼ遺伝子破壊株どうして性的接合を行い、二倍体のトレハラーゼ遺伝子破壊株を構築した。

こうして得られた二倍体のトレハラーゼ遺伝子破壊株を用いて、製パン過程における諸性質の評価を行った。まず、冷凍保存の前に行われる発酵(前発酵)における細胞内トレハロース量の消長を比較した。親株においては、前発酵開始後、著しいトレハロース量の減少が観察されたのに対して、全てのトレハラーゼ遺伝子破壊株ではトレハロース量の減少が妨げられていることが明らかになった。特に中性トレハラーゼ遺伝子破壊株では顕著にトレハロース量の減少が阻害されていた。このように、トレハラーゼ遺伝子破壊が細胞内トレハロース量の維持に有効であることが明らかになったことから、次にこれらの株の冷凍耐性を比較することとした。各株を用いてパン生地を調製し、前発酵を行ったのち冷凍保存を行い、その後の発酵力を炭酸ガス発生量として評価した。その結果、親株を用いた場合と比較して、各トレハラーゼ遺伝子破壊株を用いた場合では、冷凍後の発酵力が大きく増加していた。さらに、食パン生地を用いて、実際に製パンを行った結果を図3に示す。親株を用いた場合には、冷凍後の発酵力が不足しており、いわゆる「やせたパン」になっているのに対して、トレハラーゼ遺伝子破壊株を用いた場合には、十分なパン生地の膨張が見られた。トレハラーゼ遺伝子破壊株を用いて作られたパンは内相、外相の見かけ、柔らかさ、香りといった性質は良好であった。これらの結果から、トレハラーゼ遺伝子破壊はパン酵母の冷凍耐性を向上させるのに有効であると考えられた(7)。優れた性質を有するパン酵母に対して、トレハラーゼ遺伝子破壊を行えば、それらの有する優良形質に影響を与えずに冷凍耐性を向上させることが可能であると考えられる。

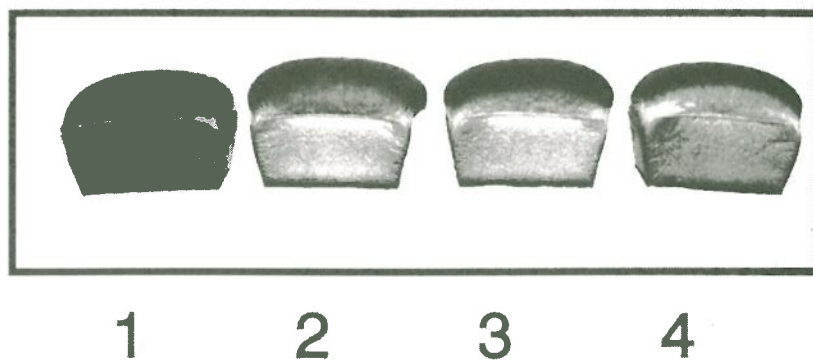


図3 冷凍生地製パン法により製造した食パンの比較
1. 親株 (T118), 2. 中性トレハラーゼ遺伝子破壊株 (T154) 3. 酸性トレハラーゼ遺伝子破壊株 (A318)
4. 中性トレハラーゼ・酸性トレハラーゼ二重遺伝子破壊株 (AT418)

5. おわりに

以上述べてきたように、トレハラーゼ遺伝子破壊がパン酵母の冷凍耐性向上に有効であることが明らかとなった。しかし、いくつかの遺伝的背景の異なるパン酵母において同様の実験を行ったところ、用いたパン酵母株によりトレハラーゼ遺伝子破壊の効果は異なっていた。おおまかに言って、もともとの冷凍耐性が弱い株に対しては効果が大きいものに対して、もともと強い冷凍耐性能を有する株においては、その効果は小さいようである。したがって、優良形質は有するが冷凍耐性の弱い株に対して適用するのが効果的な使い方であるように思われる。

また、トレハロースは細胞内において冷凍耐性以外のストレス耐性に関与している可能性が高いことが報告されている。我々の構築したトレハラーゼ遺伝子破壊株においても、乾燥耐性や高糖耐性が向上していることが観察された。これらについては、さらに詳細に検討していく必要があると考えている。

本稿では、トレハロース代謝系調節による冷凍耐性パン酵母の育種法を紹介した。細胞内トレハロース量の増加に伴い冷凍耐性も向上したことから、トレハロースが冷凍耐性に

重要な役割を担っていることは明らかであると思われる。さらにパン酵母の冷凍耐性における、トレハロースの作用メカニズムについて詳細に研究を行う必要がある。こうした研究を通して、より有効な冷凍耐性酵母の育種法を開発していきたいと考えている。

文献

- 1) 日野明寛: トレハロースと酵母のストレス耐性, 醸協 89, 100-105 (1994)
- 2) 大内弘造: 新しい製パン法を可能にした酵母 (田村他 編 酵母からのチャレンジ, 技報堂出版), 180-188 (1997)
- 3) 河合弘康: パン酵母の冷凍障害と冷凍耐性酵母, 化学と生物 31, 374-381 (1993)
- 4) 斉藤典行: トレハロースの特性とその利用, 本誌 70, 1-4 (1998)
- 5) A. Hino et al.: Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts, *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1386-1391 (1990)
- 6) S. Nwaka and H. Holzer: Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol.* 58, 197-237 (1998)
- 7) J. Shima et al.: Tolerance in doughs of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase mutants derived from commercial baker's yeast, *Appl. Environ. Microbiol.* (in press).

◀国内情報▶

施肥自動化のための分光センサー開発

生研機構, *日本システム(株), **国際技術開発(株)

棟方 研, *石塚 裕一, **上野 康男

走行中の作業機に搭載使用可能な作物生育診断用分光装置が開発された。本装置まづ、①作物体太陽反射光の可視～近赤外域にわたりスペクトルを計測する。②計測データは瞬時にマイコン演算処理され作物体の葉緑素含有量、繁茂量等に変換され、③これらの生育データをもとに最適施肥量を演算算出して施肥量調節を行おうとするものである。大区画時代における肥料散布作業の機械化、特に生育ムラの矯正機能のを問題とする Precision Farming の中核をなす技術開発として注目される（本研究開発は、生物系特定産業技術研究推進機構の UR 対策研究開発プロジェクトの一環として行われたものである）。

1. はじめに

肥振り（施肥）は農業技術の中でも極めて知的な作業である。葉色、繁りを肉眼で見ながら、過去の経験、田圃ごとの履歴、品種、気象条件などを考慮し、施肥のタイミング、施肥量を瞬時に判断・決定しなければならない。さらに肥振りには、「ムラ直し」という大事な役割がある。広い圃場のなかで生育の善し悪しが生じる。この生育ムラを部分的に施肥量を加減することによって矯正するという、高度にインテリジェントな操作を含んでいる。

近年、圃場区画が大きくなるとともに、これら人力による施肥が困難になりつつある。また世界的には地下水汚染をはじめとする環境保全が問題視され、いわゆる Precision Farming（精密圃場管理）が注目を集めている。これは別名「ばらつきの管理（Variable Management）」ともいわれ、作物生育量に応じた施肥量を散布することによって無駄を省き、圃場全体の施肥量を減少させることを狙いとしている。いずれにしても、施肥の機械化・自動化が求められているのである。

施肥の自動化には、人の眼の代わりにするセンサーの開発がポイントになる。施肥効率
MUNAKATA Ken, ISHIZUKA Yuichi, UENO Yasuo

を上げるためには、走行する車輛（施肥機）上から非破壊非接触で生育のセンシング出来ることが望ましい。この条件に合致するものが、光の利用である。

フィールド環境下で作物体は、太陽光を反射、吸収、透過するが、その様態（スペクトル）は作物の成分や生育状況によって変化することが知られている。この原理を応用して、まづ野外用の反射分光センサーが開発された。

2. 分光センサーの開発

分光は、文献などを参考に実験を重ねながら、最終的には可視から近赤外にわたる下記の6波長のバンドパスフィルターを選択使用した。

560,650,850,1280,1400,1650nm
(半値巾 15 ~ 16nm)

フィルターのバンド巾については複数のバンドフィルタを製作し、分光精度と出力の大きさの兼ね合いから最適値を選択した。

このフィルターは、多層膜コーティングフィルタを複数枚張り合わせた構造を持ったものである。

各波長を可能な限り同時に測定するために、受光素子の前に高速回転するロータを配置して、この円盤上にバンドパスフィルタを取り

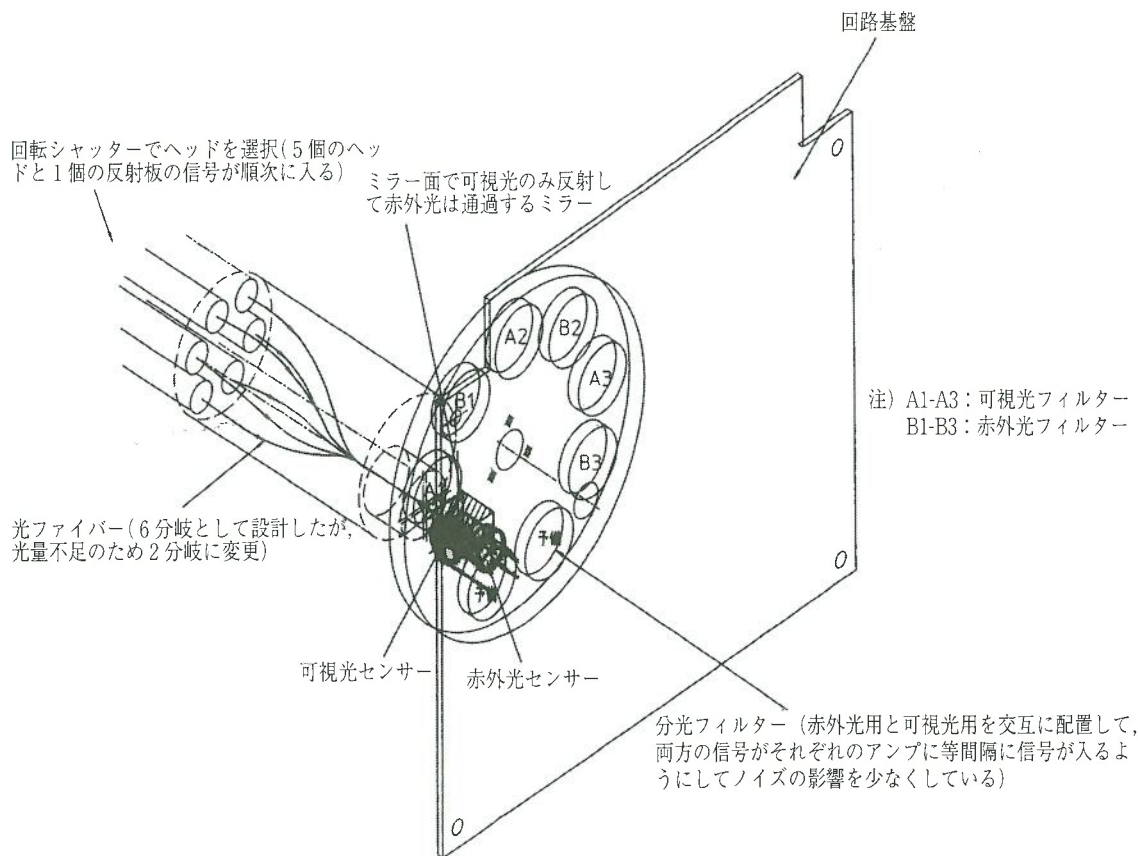


図1 分光センサー光信号受信部

左端のファイバーからの光を、円盤に配置された複数個のフィルターで分光し、円盤背後にある2種類の受光素子に伝えられる

付け、分岐ファイバの前で回転するシャッターと同期回転させる方式を採用した(図.1)。

フィルター透過光を測る受光素子は、可視光用(Siフォトダイオード)、近赤外用(PbS)の2種で構成される。

1台の分光センサーで圃場群落上の数カ所を同時に計測するための手段として、ファイバーを使用した(試作品では6本、図.2)。開発初期は石英ファイバを使用していたが、約1800nmまでの透過性能を持つコスト的に安価な複合ガラスファイバが市販されたため、これを評価した結果、十分な性能が得られている。このファイバーは、直径6mm、長さ2mのものである。なお、この受光ヘッドを地上約80cmに設置した場合、地表面にて0.5㎡の測定範囲となる。

また、太陽光のエネルギー強度分布を考慮して 近赤外センサー部には、温度補償回路、

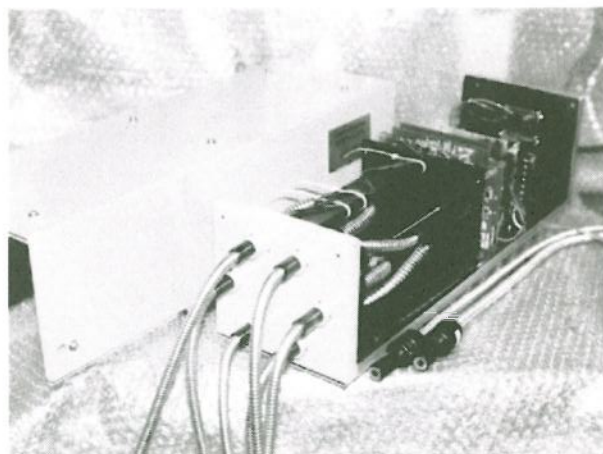


図2 分光センサー本体

全面に見える6本のファイバーから、群落表面の反射光が分光センサーに誘導される

ゲインコントロール機構を付加してダイナミックレンジ86dB(100~200000 Lx)とし、分岐ファイバ(複合ガラス繊維製、約5m)を通しも、野外の明るさが3000Lx(曇天)からの測定が可能となっている。

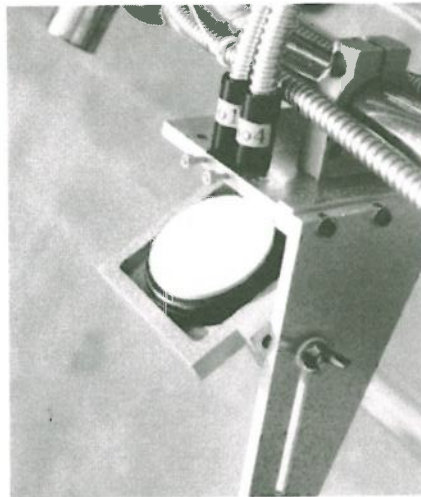
3. 比較用反射板の制作

光源である太陽光は、雲の動きなどによって変動する。それをキャンセルし正規化するため、全天光反射光と作物体反射光との比をとる必要がある。このため、labsphere社製による50%反射板を製作し(図3)、ファイバヘッド1チャンネルをこれに割り当てて同時計測することにした。

反射板の開発は、下記の事項に留意して行った。

- ・反射率が安定していること。
- ・400から2000nmの範囲で分光反射率が出来るだけ一定であること。
- ・入射光の方向による反射率の変化が極力少ないこと。
- ・雨に濡れても性能に支障のないこと。
- ・汚れの拭き取りが簡単なこと。
- ・安価なこと

以上の条件を満たすものとして下記のような反射板を選定し、極めて良好な結果を得ている(図3)。



メーカー	米国 labsphere 社
製品名	SRS-50-020
材質	軟質シリコン複合材
反射率	50%
測定範囲	400 ~ 2500nm
直径	20 mm

図3 比較用反射板

4. 分光センサーによる葉緑素量・繁茂量の推定

予備実験として生育環境を変えて作った稲のサンプルをポットの状態で模擬圃場に並べ、センサーを移動しながら出力の変化を詳細に観察した。

本田において4段階の窒素施肥で栽培された葉色の異なる稲株を使用し、株密度を変えた模擬群落を作成、それぞれの稲体の葉緑素、水分、グルコース成分の分析、群落上を移動するセンサーから、反射光分光データの計測収録を行った。

葉緑素分析には、ミノルタ製の透過光式葉緑素計 SPAD-502 を使用し、1株20点、16株の平均値をあてた。繁茂量(生体重)は、茎数×草丈×草丈をもって代替えた。

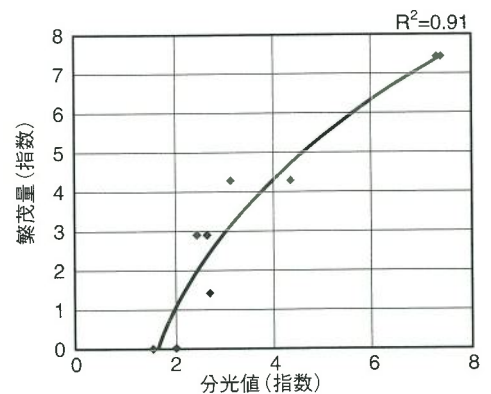


図4 分光指数と葉緑素量指数の相関図

注) 葉緑素数: ミノルタ製葉緑素計 SPAD-502 値

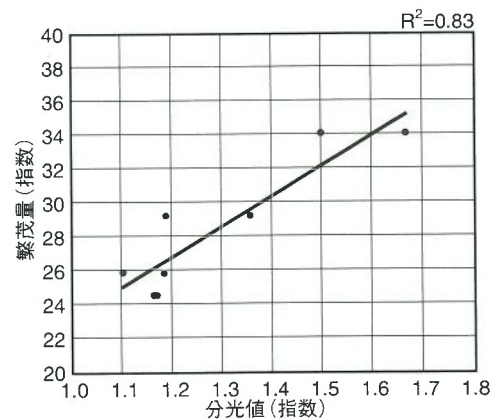


図5 分光データ(指数)と葉緑素量との相関図

注) 葉緑素量: 茎数×草丈²

これらのデータから葉緑素量、繁茂量を推定する重回帰式を作成した。式に使用した波長および重回帰式の詳細は割愛するが、葉緑素量推定では0.83、繁茂量推定には0.91の寄与率を得ている（図. 4, 図5）。

5. 施肥制御と位置検出

圃場からの反射分光情報を土面、水面、葉面などに識別を可能にするアルゴリズムと、4節に述べた重回帰式からの葉色等の推定値情報をもとに、施肥散布量を30%～150%まで自動制御することが出来るハードおよびソフトが開発された。制御のアルゴリズム概要は次のようである。

- ・分光センシング装置からの稲体および反射板の反射分光スペクトル情報を連続に入力する
- ・周囲温度をスペクトル情報と同期して入力する
- ・照度計からの照度をアナログ入力する
- ・入力された分光スペクトルを稲体・反射板・照度などで正規化し、回帰分析でもとめた回帰式を利用して施肥量を推論する
- ・推論した結果を施肥散布制御装置にデコードして散布量を出力する
- ・モニタに散布状況をグラフ出力する
- ・簡易的に試作した位置センサーからの回転パルスをエンコードし位置情報として格納する
- ・移動速度を算出して施肥タイミングを調整する
- ・環境情報（実験材料の草丈、SPAD値・天候等）をメモ機能でテキスト入力できる
- ・計測結果・施肥量の推移などをメモリ（ログデータ）として保存する

この部分はまだ試作段階なので、詳細は割愛する。平成11年度に本田での実証テストが数回予定されている。

生育ムラ情報や施肥実績情報の圃場マップ化とデータベース化は、今後の科学的圃場管理に役立つものと思われ、そのためには車



図6 分光装置搭載の自動施肥機圃場テスト風景

進行方向前方の横棒6カ所に反射光入光用ファイバーが下向きに設置されている。後方横棒には分光情報を受けて散布量を調節できる施肥装置が設置されている。

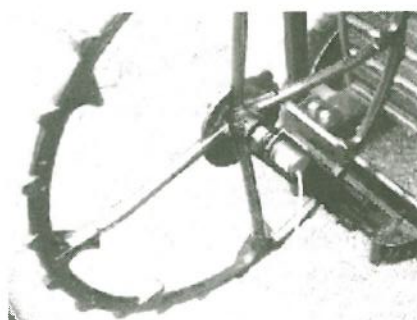


図7 位置検出のためのロータリーエンコーダ

車輪有効半径 580mm
エンコーダ分解能 500パルス/回転
距離分解能 3.64mm/パルス
距離誤差 37/30000 (平坦地平均)

輛走行軌跡の位置検出が必要になる。位置検出にはGPSなど高級かつ高価なものも考えられるが、ここでは極力安価なものを志向した。試作車輛の前部に取り付けた第5車輪にロータリーエンコーダを接続（図. 7）、回転パルスをカウントすることによって距離を算出する簡易機構を試作した。主として直線距離を計測する目的で設計し、転回時は車輪を上げ（手動）距離リセットをすることにより、累積誤差を最小限にするように制御ソフトウェアでの配慮を行った。

6. 終わりに

研究開発がスタートしてから4年たらずであり、実用化にはまだ多数回のテストと改良を重ねる必要があるが、作物生育量のセンシングに連動して自動的に施肥を行う装置が、世界に先駆けて開発された。本装置の中核部

（国内情報21頁へ続く）

◀国内情報▶

超臨界二酸化炭素を使用する液体食品の 殺菌・酵素失活

九州大学大学院生物資源環境科学研究科

下田 満哉

超臨界CO₂を微小気泡状にて液体試料へ供給することにより、CO₂の水系試料に対する溶解性を飛躍的に高めることができた。これによって水溶液中の微生物の殺菌、耐熱性孢子および酵素の失活化の効率を飛躍的に向上させることに成功した。処理温度以外で最も重要な因子は試料溶液中のCO₂濃度であった。本法は非加熱殺菌、酵素失活を可能とすることから、高品質食品の製造に寄与する新しい産業技術として期待される。

1. はじめに

超臨界 (SC) 流体は圧力、温度を制御することにより密度を任意に設定することができ、分子間相互作用力を目的に応じて変化させ得るという特徴を有する。なかでも、二酸化炭素は人体に対する毒性が無いばかりでなく、臨界点 (31.1°C, 7.2 MPa (1 MPa = 9.87 atm)) が比較的安く扱い易いことから、その利用に関する研究例は比較的豊富である。

分子間相互作用力を容易に制御し得るという特性を生かして、先ず抽出媒体としての研究が展開された。分別抽出並びに分別回収を実現する理想的媒質としての特性に注目したものである。次いで、食品、バイオテクノロジー分野を中心としてSC-CO₂の常温域での殺菌・酵素失活効果が注目されるようになった。これは抽出がSC-CO₂と被抽出成分との相互作用に基づくのに対して殺菌、酵素失活ではSC-CO₂と菌体あるいはタンパク質との相互作用を利用するものである。本法は熱エネルギーのみに依存しない、すなわち風味の劣化など品質の低下を引起こさない新たな殺菌・酵素失活技術を実現するものとして期待されている。

本稿では、SC-CO₂を用いた殺菌、酵素失活に関して著者らが開発したマイクロバブルSC-CO₂法を中心に述べる。

SHIMODA Mitsuya

2. SC-CO₂の水系への適用

従来、水系へのSC-CO₂の適用は困難と考えられてきた。これは水系試料へのSC-CO₂の溶解を積極的に促進させる試みがなかったことが主な原因と考えられる。我々はSC-CO₂の供給を微小孔径のフィルターを介して行うことによりCO₂の水系試料への溶解を顕著に促進させることに成功した¹⁾。すなわち、孔径2～440 μmのフィルターを用いてCO₂の溶解性に及ぼす効果を調べたところ、孔径10 μmのフィルターが最も効果的であり溶存CO₂濃度をフィルター未使用の場合の2倍以上にまで高めることができた。

3. 連続処理装置の開発

溶存CO₂濃度を高めることにより殺菌ならびに酵素失活効果が飛躍的に向上することが明らかとなったことから、連続処理装置を独自に試作、開発した。この装置はCO₂供給用と試料供給用の2機のポンプ、底部にSC-CO₂供給用マイクロフィルター (孔径: 10 μm) を装着した温度制御可能な処理槽 (容積5,800 ml)、並びに処理槽内の圧力および液面を一定に制御しつつSC-CO₂および試料を連続的に排出するための2つの圧力・流量調節バルブから成る。

詳細は文献²⁾を参照頂きたい。

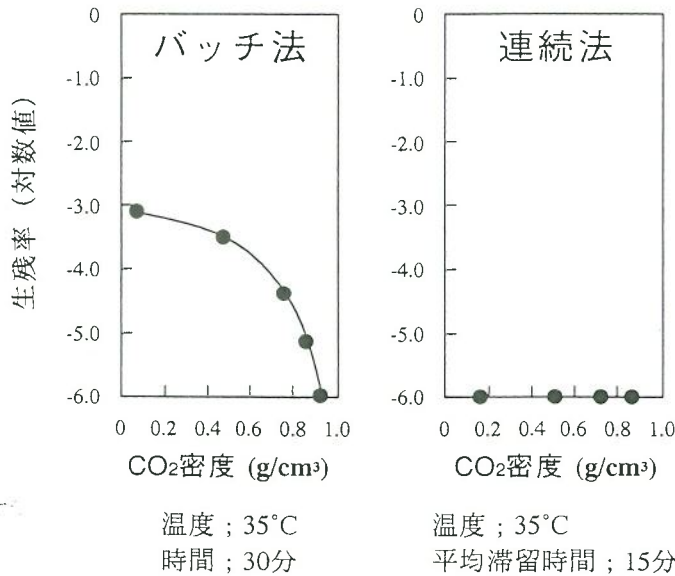


図1 酵母の殺菌におけるバッチ法と連続法の比較

4. 殺菌に影響を及ぼす因子

殺菌効率に及ぼす除圧速度の影響を明らかにするために、バッチ処理法と連続処理法による殺菌効果の比較を行なった。バッチ処理（処理槽容積：120ml）では所定の圧力で一定時間保持した後に、5 min 以上を要して徐々に大気圧まで減圧した。すなわち、緩慢除圧方式である。これに対して、連続法では試料を圧力・流量調節バブルIIから連続的に排出させることから、試料圧は急激に大気圧まで減圧される。このとき試料中のCO₂は瞬間的に膨張・気化する。これが瞬間除圧方式である。図1は酵母懸濁液を両方法で処理したときの結果である。バッチ法における殺菌効果のCO₂密度依存性は0.6 g/cm³以下では小さく、殺菌効果も低い。これに対して連続法では、6 MPa、滞留時間13minの処理で6桁以上の殺菌を達成することができた。このとき必要とされたCO₂量は、対試料比2.2%～4.4%であった。このように低い圧力と僅かなCO₂使用量によってもたらされる高い殺菌効率は、本法の新技术としての可能性を示すものである。

5. 酵素の失活に影響を及ぼす因子

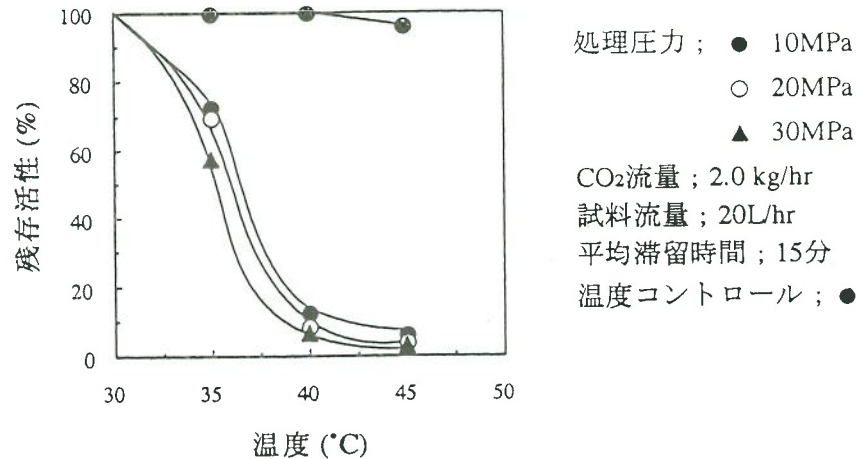
図2は処理圧をパラメータとして、 α -ア

ミラーゼの失活に及ぼす温度の影響をみたものである。45℃までの温度コントロールでは酵素活性はほとんど低下しなかったが、CO₂を供給することにより急激に失活化が進行した。図2から明らかなように、本法による酵素失活は圧力よりも温度に非常に敏感であった。さらに失活が不完全な35℃の処理条件を選んで酵素失活に及ぼす溶存CO₂濃度の影響を検討したところ、酵素の失活と溶液中のCO₂濃度の間に良好な直線関係が認められることが判明している。この結果から、酵素の失活化は処理圧力ではなく溶液中のCO₂濃度に依存すると考えられる。

以上、酵素の失活化に影響を及ぼす因子として処理温度、試料中のCO₂濃度（これは処理圧およびCO₂供給量によって決まる。CO₂の供給方法の最適化が最重要であり、マイクロバブル法はその一方策であると考えている。）を挙げることができる。

6. 酵素失活メカニズム

SC-CO₂処理により酵素の α -ヘリックス構造が容易に崩壊することを明らかにしている。このような α -ヘリックスの崩壊は熱処理によっては起らないことから、本法によるタンパク質の構造崩壊はSC-CO₂処理に特有のものとして注目される。これはタンパク質の疎

図2 連続法による α -アミラーゼの失活

水性領域へのCO₂分子の滲入によって起こされると我々は現在考えている。すなわち、CO₂によるタンパク質疎水性領域の局部的浸潤は、疎水性相互作用の消失を引起すと同時に、CO₂分子の可塑剤様の作用がタンパク質高分子の熱運動を大幅に促進させると推察している。当然ながら、本法によって処理された酵素の残存活性と酵素分子の α -ヘリックス残存率の間には良好な直線関係が存在する³⁾。

7. 耐熱性芽胞に対する効果

耐熱性芽胞の失活は、食品の加工・流通上特に注意が払われなければならない問題である。現状では、レトルト処理により胞子の失活が行われているが、120°C以上の高温下で長時間の処理を必要とすることから、品質の劣化が問題となる。本法（バッチ処理）がBacillus属の胞子の失活にも極めて効果的であることは既に報告している⁴⁾。すなわち、60°C、30～50minの処理で*polymyxa, cereus, subtilis*の胞子を6桁失活させ得ることが明らかとなっている。現在、連続法により詳細なデータを取得しているところである。

8. おわりに

本技術を産業技術として標準化していくためには、幾つかの問題を克服しなければなら

ない。なかでも殺菌技術としての標準化は最も重要と考えている。すなわち、殺菌理論はもとより殺菌に関する食品衛生法の記述は、熱処理法に基づいて処理条件を規定している。そこで、熱処理法に対して構築された殺菌理論を踏まえて、これに対応する新たな理論を構築する必要がある。最終的には、法令で定められている熱処理条件によって達成される殺菌レベルを本法が凌駕していることを個別に実証することが必要となる。これに対して、酵素失活技術としての標準化には別の考え方をもちて対処しなければならない。何故ならば、酵素失活に関しては法的規制がないことから、適用製品毎に品質劣化要因となる酵素の活性が流通上問題とならないレベルまで低減化するための処理条件が決定されればよい。

参考文献

- (1)下田満哉, 箆島豊: 非加熱殺菌・酵素失活技術の開発—連続マイクロバブル超臨界二酸化炭素法の特性と食品工業への展開—, 日本食品科学工学会誌, 45巻5号, 1998年, 334-339。
- (2)M. Shimoda, Y. Yamamoto, J. Cocunubó-Castellanos, H. Tonoike, T. Kawano, H. Ishikawa and Y. Osajima: Antimicrobial effects of pressurized carbon dioxide in a continuous flow system, J. Food Sci., Vol. 63(4), 1998, 709-712.
- (3)石川洋哉, 下田満哉, 米倉明善, 箆島豊: Inactivation of enzymes and decomposition of α -helix structure by supercritical carbon dioxide microbubble method, J. Agric. Food Chem., Vol. 44, 1996, 2646-2649.

(4)石川洋哉, 下田満哉, 玉屋圭, 米倉明善, 河野保, 箴島豊: Inactivation of Bacillus Spores by the supercritical carbon dioxide micro bubble-

method, Biosci. Biotech. Biochem., Vol. 61(6), 1997, 1022-1023.

(国内情報17頁よりの続き)
分については特許申請中である。

参考文献

- 1) 1979: 棟方 研, 芝山道郎: 圃場生体情報総合計測システムの開発: (第1報) 圃場作物用ダブルビーム分光測定装置の試作: 日作紀: 83-84:
- 2) 1980: 棟方 研, 芝山道郎: 圃場作物反射スペクトル解析装置の開発: (第2報) 近赤外光反射率による葉水分推定手法について: 日作紀: 133-134:)
- 3) 1982: 棟方 研, 芝山道郎: 圃場作物反射スペ-

クトル解析装置の開発: (第4報) 水稻群落における乾物重・葉緑素量・玄米収量の推定: 日作紀: 51-別1: 165-166:

- 4) 1983: 棟方 研: わが国のグリーンエネルギー計画[11]: 植物生体情報の計測手法の開発②: 農業および園芸: 58(8): 985-988:
- 5) 1984: 棟方 研: 農業フィールドにおけるセンシング技術: 高度リモートセンシング技術に関する調査研究報告書: 58技開: 102-119: 資源観測解析センター
- 6) 1998: 洪沢 栄: プレシジョンファーミング「圃場対話型の農法で環境保全と生産性向上」:(資料)

◀地域の先端研究▶

サケ鼻軟骨に含まれるコンドロイチン硫酸と その利用

北海道立釧路水産試験場

錦織 孝史

サケ (*Oncorhynchus keta*) 頭部の鼻軟骨からグリコサミノグリカンの一種であるコンドロイチン硫酸を分離精製した。コンドロイチン硫酸は生体内でプロテオグリカンとして細胞の機能・形態の維持などの重要な役割を担っており、医薬品や化粧品原料など広範囲に利用されている。今回、新たにコンドロイチン硫酸に肥満抑制効果があることが明らかとなり、今後、その機能性の利用が期待されている。

1. はじめに

北海道では孵化放流事業の成功からサケが毎年約16万トンと大量に漁獲されている。さらに、輸入されるサケ・マスなどを合計すると全国では年間約60万トンのサケ・マス類の供給があり、切り身やサケフレックなどの製品として食卓をにぎわしている。これらを製造する際、食用として利用される可食部以外の頭や内臓などは利用されずに廃棄され、そ

の量は頭部だけで年間約6万トンにも上っている。大規模にサケの加工生産を行う企業では、これらの処理に1トンあたり1万円程度の費用がかかるため、これによるサケ加工製品のコスト増加は企業経営を圧迫するとともに、資源の浪費、環境への負荷を与えるなど深刻な問題となっている。このため、サケの加工工程中に排出される水産廃棄物を有効な水産資源として利用するための研究は非常に重要な課題となっている。このような状況の中、我々は水産廃棄物の有効利用の取り組みの一つとして、サケの頭部(写真1)の鼻軟骨(写真2)から、糖質の一つであるコンドロイチン硫酸(写真3)という物質を分離回収し、その利用法の研究開発を行っているので紹介する。



写真1
サケ頭部

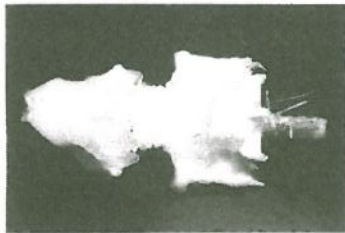


写真2
鼻軟骨

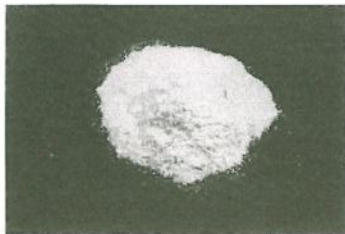


写真3
コンドロイチン硫酸粉末

2. コンドロイチン硫酸とは

コンドロイチン硫酸は、グリコサミノグリカンと総称される一群の生体高分子の一種で、グルクロン酸と硫酸基の結合したN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が β 1→3結合した二糖の繰り返し直鎖構造からなっている。分子量は数万から10数万程度で、GalNAcに結合する硫酸基の結合位置や数の違いからコンドロイチン-4-硫酸、コンドロイチン-6-硫酸などの種類がある。各種脊椎動物の軟骨、骨、腱などに広く分布し、生体内では通常コアタンパク質と呼ばれるタンパク質と共有結

NISHIKIORI Takafumi

合してプロテオグリカンと呼ばれる巨大分子として存在する。

生体内では、プロテオグリカンとして細胞接着、増殖、分化、細胞の機能・形態の維持など重要な機能を担っている。具体的には、その大きな水合力から細胞外液の容量調節や、アニオンとしての性質から Ca^{2+} , Na^{+} などのイオンを捕捉してこれらの移動を介して重要な生理作用を担い、さらに、骨の生成に際し $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$ の沈着に寄与し、化骨や石灰化に関与する。また、関節、靭帯、腱では、組織の弾性を維持するとともに関節では特にその円滑性に寄与している。

この様に、コンドロイチン硫酸はそれ単独、あるいはプロテオグリカンとして様々な生理作用を發揮しているが、現在はサメの軟骨や牛の軟骨から取り出されており、身近なところでは、これらの作用から、関節痛、神経痛、腰痛などの疼痛性疾患や疲労回復などに効果が期待される医薬品として、あるいは、眼の機能維持効果から眼薬の添加剤として、さらには、その高い保水性から化粧品原料として利用されている。

3. サメ鼻軟骨のコンドロイチン硫酸の調製

サメ頭部から鼻軟骨を取り出し、得られた鼻軟骨を 2 mm 程度の大きさに微粒化する。軟骨組織には、10%前後の脂質が含まれるため溶剤を添加混合し、脱脂を行う。この後、終濃度が 0.2M となるよう水酸化ナトリウムを添加し、37°C に温度を保持しながら 2 時間攪拌することで軟骨を可溶化するとともに、コンドロイチン硫酸とコアプロテインの結合を切断する。この状態ではコンドロイチン硫酸に結合していたコアプロテインなどのタンパク質が残存しているため、酢酸で中和した後、適当な緩衝液で pH を中性にし、プロナーゼなどのプロテアーゼを添加し、これらのタンパク質を完全に分解してしまう。この溶液に酢酸カルシウムを添加してコンドロイチン硫酸を

カルシウム塩とし、2 倍量のエチルアルコールを加えてコンドロイチン硫酸を沈殿させる。沈殿したコンドロイチン硫酸を水に溶解し、DOWEX50W × 2 などのイオン交換樹脂を通して、ペプチドなどの夾雑物を除去し、再びエチルアルコールを加えてコンドロイチン硫酸を沈殿させた後、乾燥することで、サメ鼻軟骨より約 3.0% のコンドロイチン硫酸の粉末が得られる。

得られたコンドロイチン硫酸の詳細分析¹⁾では、セルロースアセテート膜電気泳動により、単一スポットでコンドロイチン-4-硫酸と同一の移動度を示し、ゲル濾過法による測定の結果その平均分子量は約 17 万であった。また、コンドロイチン硫酸をコンドロイチナーゼ ABC により不飽和二糖とし、HPLC でその構成不飽和二糖を同定したところ非硫酸化 GalNAc, C 6 位一硫酸化 GalNAc, C 4 位一硫酸化 GalNAc, C 4, C 6 位二硫酸化 GalNAc の構成比はそれぞれ 11.0%, 52.8%, 28.4%, 7.8% で、これまで既知のものと比較してランダムな構造を有することが推測された。

4. コンドロイチン硫酸の新しい作用

このようにして得られたコンドロイチン硫酸の新しい作用を検討するために、愛媛大学医学部医化学第 2 教室の奥田拓道教授と共同で、その肥満予防効果について検討した。我々が日常摂取している食品に含まれるデンプンは、消化分解を受けてグルコースとなり、腸管から吸収される。しかし、一度にたくさんのグルコースが腸管から吸収されると、血液中の血糖値が急激に上昇し、この血糖値を下げるために、膵臓からインスリンが分泌され、グルコースは体の脂肪組織の細胞に取り込まれて、脂肪の合成と貯留に利用され、最終的に肥満の要因となることが知られている。グルコースを脂肪として蓄積させないためには、グルコースの腸管での吸収速度を遅らせて血糖値を急激に上げないことが重要になってく

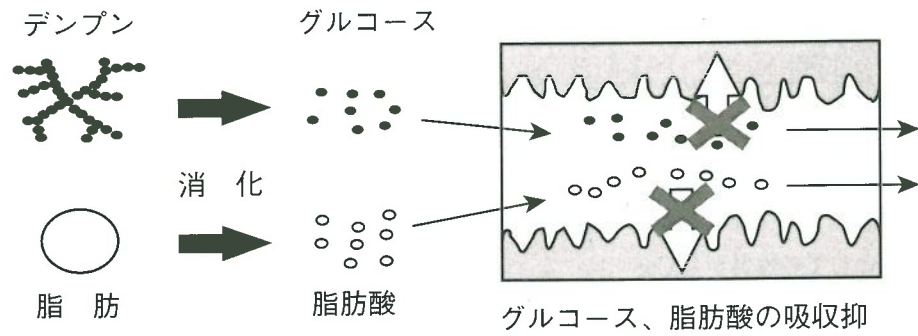


図1 コンドロイチン硫酸のグルコース及び脂肪酸の腸管吸収に及ぼす影響

る。そこで、グルコースの腸管吸収阻害作用について、試験管内の実験を行った。

ラットの小腸から吸収に関わる細胞を調製し、そこに標識を付けたグルコースを添加してグルコースの小腸への吸収を測定した。コンドロイチン硫酸を加えた場合グルコースの吸収にどの程度影響があるのかを検討したところ、コンドロイチン硫酸の添加濃度が1, 5及び10mg/mlにおいて、グルコース吸収の阻害率は、それぞれ22.1, 31.4, 46.3%とコンドロイチン硫酸の濃度に依存して増加することが分った。このようにサケ鼻軟骨由来のコンドロイチン硫酸は、グルコースの腸管吸収を抑制する働きを持った難消化性の高分子物質であることが明らかとなった。

肥満の要因としては、食事中に摂取する脂肪の吸収も大きな問題となる。そこで、グルコースと同様な試験管内実験を行った結果、コンドロイチン硫酸にはグルコースと同様に、脂肪の吸収を抑制する効果が認められた(図1)。さらに、マウスにコンドロイチン硫酸を添加した高脂肪食を与える動物試験においてもコンドロイチン硫酸を7%添加した場合、高脂肪食摂取により誘導される肥満の抑制効

果が確認された。

5. おわりに

現在、コンドロイチン硫酸はサメの軟骨や牛の軟骨から生産されているが、原料の安定供給と安全性の確保が生産サイドから求められている。また、コンドロイチン硫酸はその利用用途が広範囲で、今後その市場が拡大されることが予想されることから、安定供給が可能で安全性の高いサケの軟骨がコンドロイチン硫酸の原料として注目されている。さらに、今回明らかになったコンドロイチン硫酸の肥満予防効果は、過食による肥満を抑制し、肥満により誘導される現在大きな問題となっている糖尿病、高脂血症などの生活習慣病を予防する機能性食品への応用が今後期待される。

文献

- 1) 平成9年度異業種交流技術開発中央支援事業技術開発研究報告書 (1998)
- 2) 武田忠明他(1998)日本栄養・食糧学会誌 Vol.51 No.4 213-217

◀文献情報▶

トウモロコシ栽培化の過程
で何が起ったか

The limits of selection during maize domestication.

Rong-Lin Wang, Adrian Stec, Jody Hey,
Lewis Lukens and John Doebley
Nature, Vol.398, 18 March 1999

栽培植物の出現は人類史上における最も特筆すべき事件であったと言えよう。コムギはメソポタミア文明を、イネはインダス文明を産んだ。数多くの文明の礎となった栽培植物の起源の探索は、ド・キャンドル、バビロフに始まり、多くの研究者を惹きつけてきた。その結果、おおかたの栽培植物の祖先種と起源地は比定された。ところが、初期の農民の手によってなされた現代の遺伝子操作をも凌ぐ植物の改良、意識的あるいは無意識な選抜淘汰—栽培化とはいかなるものであったかは、十分解き明かされたとは言えない。

トウモロコシは7500年程前中米で栽培化され、その祖先種はテオシントとされているが、形態は大きく異なる。その違いの最たるものが腋芽の形態である。テオシントでは腋芽が多数伸長し、その先端には雄花を下位節に雌花をつける。トウモロコシでは、腋芽は少なく、また余り伸長しない。その先端に雄花はなく雌花のみをつけ、しかも、柱頭花柱に相当する多数の絹糸をつける。Doebley等は遺伝解析の結果、この違いは一つのQTLによることを明らかにし(1995)、更にこの遺伝子座に座乗する *teosinte branched1* (*tb1*) 遺伝子をトランスポゾン・タギングにより同定単離し、この遺伝子は腋芽成長抑制因子として働き、発現量がテオシントではトウモロコシの半分しかないこと、トウモロコシの *tb1* 変異体では頂芽優性が破れ腋芽の形態がテオシントに近づくことなどから、この遺伝子の発現調節が栽培化の進行に大きな役割を担ったという仮説を提唱した(1997)。

今回はこの仮説を補強すべく、様々な地域から収集したトウモロコシ13種、テオシント

18種の *tb1* 転写部位 (TU) 及びその上流1.1kb (UTR)の塩基配列を決定比較した。トウモロコシ内での塩基配列の多様性(違い)はTUでテオシントの37%であるが、UTRではわずかに3%に過ぎない(中立遺伝子 *Adh1* では71%)。栽培化の過程では、人間の利益に繋がる形質を支配する遺伝子は強く選択され他の遺伝子に比べ多様性が減少すると考えると、*tb1* のUTRは強く選抜を受け、TRは余り選抜を受けていないこととなる。即ち、高い発現量をもたらすプロモーター領域の変異体をまず選び取り、それを繰り返し選抜を重ねることにより集団内に固定し、原始トウモロコシが生じたと考えることができる。この時の選択係数を0.04-0.08とおき、固定に要した時間は315-1023年と計算している(この計算の妥当性については筆者に論評の資格はないが)。栽培化に要した時間はたかだか数百年であることになる。また、UTRの塩基配列から作成した系統樹に基づきメキシコ南西部のバラス川流域に自生するテオシントがその祖先種であり、栽培化はこの地域で始まったとしている。

壮大なストーリーであるが、幾つかの疑問は残る。まず、今回解析したテオシント2のUTR塩基配列はトウモロコシとわずか1塩基しか変わらないことである。この更に上流に違いがあるためではないかとしているが、そうであれば重要な発現調節部位はそこにあることになり、比較すべきはその部位ではないか。次は、これに関連することであるが、トウモロコシUTR活性はテオシントに比べ、本当に高いかということである。状況証拠からそうではあろうと予想されるが、押さえておくべきではないだろうか。

これらの欠点を含んではいても、本論文は古代の農民が莫大な遺伝子の海のなかから、極小さな遺伝子領域の変異を釣り上げ、固定していったことを明らかにした画期的な報告であり、高く評価されるべきものであろう。今後、同様なアプローチにより、多くの栽培植物、家畜で馴化について解き明かされるであろう。(抄訳 岩井純夫—鹿児島大農)

◀文献情報▶

マウス卵母細胞のクロマチン 機構と遺伝子発現

Gene expression and chromatin organization during mouse oocyte growth

Elisabeth Christians, Michele Boiani, Silvia Garagna, Cecile Dessy, Carlo Alberto Redi, Jean Paul Renard, Maurizio Zuccotti

Developmental Biology, 207: 76-85, 1999

減数分裂再開前のマウス卵母細胞をHoechst 33342で染色すると、核小体の周囲が染まる卵母細胞と染まらない卵母細胞がある。体外受精をすると、核小体の周囲が染まる卵母細胞(SN卵母細胞)は正常な胚発生をするが、核小体の周囲が染まらない卵母細胞(NSN卵母細胞)は2細胞期で発生を停止する。このことはクロマチン機構と雌側の生殖細胞である卵母細胞の発生の間には、遺伝子発現を介する何らかの因子が関与していることを示している。Christiansらはトランスジェニックマウスを用い、遺伝子の発現を指標としたクロマチン機構と卵子の発生について検討した。

彼らはHSP70.1とluciferaseをトランスジェンしたマウスを用い、遺伝子発現はluciferase

の酵素活性を指標とした。減数分裂再開前の卵核胞期では、SN卵母細胞でNSN卵母細胞より高い遺伝子発現をしていた。減数分裂を再開し、受精前のステージに発生した成熟卵母細胞の導入遺伝子発現量は、SN卵母細胞とNSN卵母細胞では同レベルであった。これらの結果からNSN卵母細胞では、減数分裂が再開して起きる最初のステージである卵核胞崩壊までに細胞質内での転写とタンパク質合成が制限されており、そのことが2細胞期を越えて胚発生をすることを出来なくしていることが考えられる。

マウス胚の2細胞期は、受精後に胚由来の多くの遺伝子発現の起きる時期であり、その後の胚発生に重要な時期であると考えられている。しかしながらこの研究では、受精後の胚発生が2細胞期よりずっと以前の減数分裂再開前の卵核胞期で卵母細胞の遺伝子発現量で影響を受けていること、さらに成熟卵母細胞になって発現量に差が無くても受精後の胚発生は既に決定されてしまっていることを示している。今後は、受精前後の卵子や胚の遺伝子の発現と初期胚発生の関与の重要性が明らかにされていくだろう。

(抄訳 松本浩道—東北大農)

◀文献情報▶

タテジマフジツボの幼生 どうしの情報交換

Immunological studies on the settlement-inducing protein complex (SIPC) of the barnacle *Balanus amphitrite* and its possible involvement in larva-larva interactions

Matsumura, K. et al.

Proc.R.Soc.Lond.265B: 1825-1830, 1998

フジツボに代表される付着生物は、海岸の岩や岸壁、船底や漁網などの表面に群居して付着することが知られている。この付着という現象のメカニズムは最近になってようやく少しずつわかってきたところである。ここで

まず、フジツボのライフサイクルを簡単に述べる。フジツボは一度付着して殻を石灰化すると一生同じ場所で過ごすことになる。したがって、付着場所の選択はフジツボにとってその後の生活を決定づける非常に重要な選択となる。生殖行動は、雌雄同体で交配器官の届く範囲の隣接した個体と交配をする。卵からはノウプリウス幼生が孵出、この幼生がやがてキプリス幼生に変態していく。キプリス幼生は付着に適した場所を選択してセメント物質で付着した後、幼体に変態、やがて幼体が成長すると殻が石灰化していく。このキプリス幼生がどのようなメカニズムで付着場所を選択するのかについてはこれまでも様々な説は存在したものの、決定的な研究報告はなかった。特に、どうやって群居するのかに

については、長い間漠然と親の近くに集まりやすいというレベルの報告しかなかった。著者は、タテジマフジツボ (*Balanus amphitrite*) の親 (成体) の抽出物を精製して得られる糖と蛋白質の複合体が子供 (幼生) を引き寄せる物質の本体であることを既に報告しており、これを SIPC (Settlement-Inducing Protein Complex) と名付けた。SIPC は分子量 20 万以上で、糖鎖構造を含む 76, 88, 及び 98kDa のサブユニットと糖鎖構造を有しない 32kDa のサブユニットから構成される。また、この糖鎖に関連した知見として SIPC のキプリス幼生に対する付着誘引効果がある種のレクチン (レンズ豆レクチン:LCA) を作用させることで阻害されること、さらには、フジツボやカメノテなどの蔓脚類に SIPC が広く存在していることも確認している。

本文献では、この SIPC という物質が実はフジツボの成体のみならずキプリス幼生にも存在していることを SIPC の抗体を用いて示し

た。キプリス幼生は付着場所を決定するまで基盤上を探索するが、その際に基盤上を触角で歩く様な仕草をする。この時、基盤上に残る痕跡はちょうど足跡の様なので footprints と呼ばれている。本研究ではこの基盤としてニトロセルロース膜を用いて膜上の痕跡から SIPC を抗体で検出し、さらにキプリス幼生の触角の先端部にある付着ディスクの抗体染色でも SIPC の存在を確認した。このようにフジツボの成体特有の物質であると考えられていた付着誘引物質の SIPC がキプリス幼生にも存在していることが明らかになった。以上の結果から、これまでフジツボの付着における群居性は成体から幼生への情報発信によるところが大きいと考えられていたが、幼生どうしにおいても SIPC を介した情報交換がされることで、種の存続に不可欠な群居性をより高めている可能性が示唆された。

(抄訳 山本 久-マルハ中研)

◀海外便り▶

ミズーリ川のほとりにて：ロバーツ博士と研究と 1986年2月から1989年5月まで

東京大学大学院・農学生命科学研究科・動物育種繁殖学研究室

今川 和彦

1. はじめに

1984年の秋、米国ネブラスカ州立大学で博士過程(Ph.D.)を終了したが、希望する大学には就職できず、半分失意のままプロクター・ギャンブル社の主任研究員として働くことになった。途中、大阪の日本支社に派遣され、2つの特許を取得するなどそこそこの研究に携わっていた。しかし、生物学とくに繁殖生物学研究への思いは断ちきることができず、1986年1月末日にプロクター・ギャンブル社を退社し、米国ミズーリ州立大学のR. M. Roberts博士の研究室のポストドクになった。Roberts博士は家畜動物(ウシ、ヒツジ、ブタなど)の繁殖、とくに初期胚の発生、母体の妊娠認識、胎盤機能などを生化学的手法で研究しており、分子生物学的手法を駆使できるポストドクを探していた。将来のあては何もなかったが、ただ自分の可能性を信じ、家族の支えとスーツケース2つだけを持って再渡米した。

2. 母体の妊娠認識

Roberts博士は1985年12月にフロリダ州立大学からミズーリ州立大学に転職したばかりで、研究室にはポストドク6人と大学院生が6人しかいなかった。しかし、研究室の立ち上げ期だったために、それぞれの領域で精力的に研究に取り組んでおり活気にあふれていた。私は以前より母体の妊娠認識、すなわち母子(子宮上皮と胚仔)間では着床以前に相

IMAOKAWA Kazuhiko

互のコミュニケーションを確立しなければ妊娠が成立しないという現象に興味を持っていた。反芻動物の妊娠の成立には胚仔がタンパク質様因子を分泌し、そのシグナル因子が子宮上皮に結合するために母体は妊娠を認識し黄体の機能が維持され、妊娠ホルモン・プロゲステロンが分泌されつづけると考えられていた。そのシグナル因子のアミノ酸配列とcDNAの同定が最初の研究テーマとなり、それぞれ水を得た魚のように研究に没頭する日々が続いた。

研究を始める前、実験手法・ステラテージ等をRoberts博士や実験室メンバーで連日連夜議論した。それは数々の選択肢のなかでシグナル因子をいち早く同定・解析するための研究方向を決めるものであった。胚が分泌するそのファクターはほぼ抽出・精製されていたが、その過程でこの因子やそのmRNAの半減期が意外に長いことが推察されていた。そこで妊娠14-15日目の胚から直接RNAを抽出するのではなく、in vitroで24時間培養した後RNAを抽出し、cDNAライブラリーを作製することにした。cDNAライブラリーの作製はロゲイン(養毛剤、日本名RIUP)を開発したUpjohn社のMarotti博士の技術援助で行われ、 λ gt11というexpression vectorに導入した。それと併行して、抽出・精製したタンパク質(群)をウサギに投与して抗体を作製し、その抗体を用いてスクリーニングを始めた。ポジティブなクローンを50ほど取り出した後、Upjohn社に移動し、定法通りpUC8にサブクローニングして、核酸配列の決定を行った。しかし、3'末端のpoly A tailから数えて400-500ベースほどしか読み取ることがで

きなかった。これをデータベースで解析するとインターフェロン (IFN), 特にIFN α やIFN ω と相同性が高いことがわかった。その時すぐ Roberts 博士に電話したところ、一言 "You made my day" と言い、お金はいくら使っても良いから、その cDNA の全長を取り出そうということになった。そこで、この IFN の 5' 末端をクローニングするために、3' 末端からデザインした oligonucleotide を用い、プライマー-extension法を用いて新しく cDNA ライブラリーを構築し、前述の抗体を用いてコロニーハイブリダイゼーション法によりスクリーニングを行った。ところが、いくらプラスミッドを回収し、制限酵素で切ってみても、やはり 500 ベースほどのフラグメントしか見出せなかった。「これはおかしい。絶対何かを見落としている。」2日ほど眠れない日々のあるところにある考えがひらめき、いても立ってもいられず午前2時ごろ実験室に向かった。クローニングとクローンの解析のために制限酵素 PstI を使用していた。「もしかするとこの IFN の cDNA 配列上に PstI サイトが存在するかもしれない」と考え、今までのプラスミッドをもう一度回収し、制限酵素で切断し、2.5% のアガロースゲル (小さな cDNA の断片を見つけることが出来る) で解析したところ、2あるいは3つのフラグメントが存在していた。

やはり PstI 切断部位は cDNA 上の 2 ヶ所に存在していた。ふと外を見やると空が白んでいたが、疲れは感じなかった。Roberts 博士はいつも朝7時ごろ実験室にやってくる。早速報告するとまた一言 "I knew you would figure it out". その日、それらのプラスミッドをシークエンスしたところ、ほぼ全長が得られた。しかし、プライマー-extension法を使用したため、一本の連続した cDNA ではなかった。そこで、今度は 5' 側の断片を ^{32}P で標識したものをプローブとして用い、再びスクリーニングを行い全長をもつ cDNA (1 kb) を取り出し、解析することができた。この間、アミノ酸配列の同定、ノーザンブロット法、in situ hybridization 法を駆使しつつ、その局在あるいは時期特異的な発現の解析も併行して行った。

これまでに子宮内で抗ウイルス活性が存在することはある程度分かっていたものの、胚自身が実際に IFN (後に IFN α と命名された) を分泌することは報告がなかったので、論文を作成し Nature に投稿した。ところが、その論文は Editor のところで Reject されてしまった (Nature や Science では 50-60% の投稿論文は Editor のところで Reject され、審査員には行かない方法をとっている)。しかし、Roberts 博士はめげなかった。彼はイギリスへ飛び直接 Editor と交渉し、とにかく審査員によ



Roberts 博士のご家族とともに (1986年)

る審査まではこぎつけた。Editorに反して審査員は価値があるものと認め、Natureに掲載されることになった。1987年11月のことであった。

3. あとがき

Roberts博士からは研究に対する実験の組み立て方から、実験の中止または続行の判断、論文の書き方、校正の仕方、自分の研究に対する直感・"instinct"を信じることなどいろいろなことを学んだ。そして何よりも、たとえ論文がrejectされても決して「めげない」ことを教えられた。また、家族同士の付き合いも忘れることが出来ない。1986年の秋に、私たちは車で片道2時間かかるセントルイス市の動物園で遊んだ。その時にRoberts博士が私の娘二人を交互に肩に乗せ、額に汗して歩く姿

は、つい先日のことのように思い出される。

3年半という短い期間ではあったが、論文にも恵まれた。Roberts博士にはいつまでも彼の研究室に残るよう望んでもらい、ポストドクからResearch Assistant Professorに格上げされた。ところが、1988年の秋から、いろいろな所に招待されるようになり、1989年6月からカンザス州立大学医学部・産婦人科にAssistant Professorとして赴任することになった。彼はそんな私の決断にはすぐには賛成してくれなかった。しかし、私は自分自身を試してみたかった。Roberts博士の加護のないところで、どれだけ自分がやれるかどうか見たかったのである。1995年に同大学の病理学科でAssociate Professorになり、米国で学者として何とか生きていける目処がついたところで、1997年4月1日からは東京大学にお世話になり現在に至っている。

生研機構からのご案内

生研機構では、ガット・ウルグアイラウンド農業合意関連対策として、農業生産現場に直結した新技術の開発を、平成7年度から11年度までの5カ年の予定で、民間企業への委託により進めております。

最終年度を迎え、既に完成した成果品を披露するとともに、改良途上の試作品について、生産者の方々、関係行政機関の方々からご意見をいただき実用性を高めるため、5月以降順次成果説明会をしております。これまで、開催した熊本、宮崎、高知、長岡での説明会には多数のご参加を頂きました。

9月以降の開催予定は次のとおりとなっております。詳しくは、当機構研究開発課までお問い合わせ下さい。

(Tel: 03-3459-6568/Fax: 03-3459-6577 電子メール: maruken@tokyo.brain.go.jp)

9月6日(月) 13:30~	北海道・札幌市 ホテル札幌ガーデンパレス	大区画水田の自動水管理
9月29日(水) 13:30~	岩手・盛岡市 エスポワールいわて	放牧管理と畜産環境対策技術
10月27日(水) 13:30~	千葉・千葉市 若潮会館	施設園芸・環境保全型栽培技術
11月10日(水) 15:00~	愛知・豊橋市 ホテル白豊	施設園芸・環境保全型栽培技術

◀特別情報▶

ブレイン国際テクノフォーラム
1999(平成11)年3月23日開催

遺伝子導入家畜の作製への展望 —初期受精胚子の発生・分化と細胞間情報伝達—

(概要紹介)

標記をテーマとした平成10年度ブレイン国際テクノフォーラムが、平成11年3月23日(火)に農林年金会館虎ノ門パストラル新館6階「橋の間」で開催された。このフォーラムは、日本中央競馬会の助成事業の一環として、社団法人・畜産技術協会の委託を受け、農林水産省畜産試験場の企画協力のもとで開催されたものである。生物系特定産業技術研究推進機構(生研機構)のブレイン国際テクノフォーラムは、1987(昭和62)年以来今日まで15回開催されているが、今回は標記のような幅広い内容であったため別掲のように午前・午後の開催となった。講演会場は定員80名のあまり大きくない会場であったため、補助椅子を準備しなければならないほど盛況であった。また、講演者9名のうち3名は外国人(中国, アメリカ, フランス)による英語講演であったため同時通訳を行った。当日の総合司会は、このフォーラムの企画に協力をいただいた農水省畜産試験場の假屋克由繁殖部長に担当していただいた。

フォーラムは、主催者を代表した眞木秀郎生研機構理事長の開会の挨拶に続いて、別掲次第の通り9演題により進められた。

最初の農水省畜産試験場の山口先生、細江先生によるクローンマウス研究の海外調査報告は、生研機構の依頼で実施された調査の一部である。英国の体細胞クローンヒツジ「ドリー」誕生が報告された翌年の1998年、「キムリナル」と名づけられたクローンマウス作出に成功したハワイ大学の柳町教授の研究室を訪問し、研究の経過・現状を調査したものである。マウス卵細胞への顕微受精技術の確立、凍結乾燥精子の作製、第二極体放出抑制

の為のサイトカラシンBの応用等、世界的に注目されている柳町教授研究室を中心とした核移植技術の最前線が紹介された。なお、この調査の詳細は、別途報告書として取りまとめられる予定である。

第2～9の演題は、フォーラムのサブテー

ブレイン国際テクノフォーラム

遺伝子導入家畜の作成への展望—初期受精胚子の発生・分化と細胞間情報伝達— 次 第

1. 期日：1999(平成11)年3月23日(火)10:00-17:15
2. 場所：農林年金会館虎ノ門パストラル6F「橋の間」(東京都港区虎ノ門)
3. 開会 (10:00)
4. 開会の挨拶：眞木秀郎 (生物系特定産業技術研究推進機構理事長)
5. 総合司会：假屋克由 (農林水産省畜産試験場繁殖部長)
6. 演題 (午前の部 10:10-12:00)
 - 1) クローンマウス研究の調査報告
山口 学 (農林水産省畜産試験場繁殖部生殖工学研究室)
細江実佐 (農林水産省畜産試験場繁殖部発生分化研究室)
 - 2) 次世代ジーンターゲット法による遺伝子機能解析
渡部 聡 (農林水産省畜産試験場繁殖部生殖工学研究室)
 - 3) 胎盤の幹細胞を制御する成長因子
田中 智 (東京大学・大学院農学生命科学科応用動物科学)
 - 4) ゲノムメチル化によるからだの設計図と胎盤形成
塩田邦郎 (東京大学・農学系大学院農学系研究科)
- (午後の部 13:00-17:00)
- 5) 乳腺におけるATP受容体を介した細胞間シグナリング
古家喜四夫 (京都工芸繊維大学応用生物化学科)
- 6) 胎盤のエストロゲン合成におけるレチノール酸の作用
Yun-Shang Piao (中国科学院動物学研究所繁殖生物学研究室)
- 7) ヒツジの胎盤性ラクトゲンの転写調節
Russell V Anthony (米国コロラド州立大学獣医学・医学生物科学部)
- 8) ウサギの始原生殖細胞の構造と特徴
Jacques Edmond Flechon (フランス国立細胞・分子生物学研究所)
- 9) 遺伝子変換マウスを用いた行動制御の分子メカニズム
八木 健 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所)
7. 開会の挨拶：六車 守 (生物系特定産業技術研究推進機構理事)
1. 閉会 (17:15)

マにもあるように「初期受精胚子の発生・分化と細胞間情報伝達」に関連したもので、司会の假屋部長がイントロダクションで指摘したごとく“遺伝子組換え家畜をつくるという大きな技術目標に対しては、それを取り巻く周辺技術の確立が不可欠である”という観点からの各研究者の貴重な報告である。

胚子形成前の雌、雄の始原生殖細胞段階について、フランスのJ.E. Flechon先生は、電子顕微鏡を用いた細胞生理学研究の立場から、ウサギの始原生殖細胞と受精後の胚盤胞細胞塊を対象にそれらの培養細胞も用い、その機能、構造に関する最近の成果を報告した。

胚盤胞から分化・成熟が進んで胎盤・胎子形成の段階では、4つの話題提供が行われた。東大の田中先生は、“胎盤とは何ぞや?”という視点で、幹細胞(ES細胞, TS細胞等)を中心に着床後の胚の動きと胎盤形成を支配する因子や、胎子死亡因子の分子機構を解明した結果を報告した。同じく東大の塩田先生は、胎子由来であり最初に分化する細胞である胎盤細胞について、遺伝子発現の制御を担っているゲノムのメチル化という組織特異的な分子修飾のメカニズムを紹介した。次いで、中国のY. Piao先生は、中国の人口問題との関連から取り組んでいる生殖腺の機能、受精、着床の研究の中から胎盤におけるエストロゲン産生のメカニズムとして、エストロゲンをエストラジオールに変える酵素17βヒドロキシステロイド・デヒドロゲナーゼの発現調節をしているレチノイン酸の作用メカニズムについて、遺伝子の転写等分子生物学的研究成果を報告した。更に、アメリカのR.V. Anthony先生は、ヒツジをモデルとして、妊娠中期以降の胎子の成長に関係するとみられて

いる胎盤性ラクトゲンについて、この物質は胎盤の胎子側細胞で産生され胎子では妊娠中期まで増加するが、母体の血中濃度は妊娠後期まで増加すること、またラクトゲン産生の組織特異性、種特異性については多面的な遺伝子解析を実施中であること等を報告した。

胎子出産後の授乳期段階では、京都工芸繊維大の古家先生が、乳腺の射乳現象についてATPリセプターの活性化によるCa⁺⁺ wave伝達における細胞内情報伝達の細胞生理学的メカニズムの解明結果を報告した。

産出動物の遺伝子解析に関しては、遺伝子から目的の遺伝情報を自由自在に変えることで遺伝子解析が可能となるマウスのES細胞を開発した岡崎国立共同研究機構生理学研究所の八木先生が、脳機能の形成・制御に必須であることが明らかにされているチロシンリン酸化酵素Fyn欠損マウスを作出し、その行動解析とともに遺伝子解析結果を紹介した。また、農水省畜産試験場の渡部先生は、将来の家畜の遺伝子解析を視野に入れたマウスレベルでのコンディショナルジーンターゲット法の開発を紹介した。これはキメラタイプとワイルドタイプを交配してF1を作出し、更に兄妹交配によりF2を作出して遺伝子解析を行うCre-loxPシステムで、家畜への応用が期待される。

以上、それぞれ高度に専門化した分野の第一線の研究者の報告であったが、熱心な質疑も行われた。フォーラムはほぼ予定どおり進行し、最後に六車守生物系特定産業技術研究推進機構理事の閉会挨拶で終了した。

なお、本フォーラムの詳細については当日の質疑応答も加えた報告書が作成される予定である。(編集部・畠山記)

編集後記

◇ブレイン・テクノニュース第74号をお届け致します。本号の総説に取り上げたテーマは、植物のアレロパシーです。農水省農業環境技術研の藤井先生に、植物アレロパシーに関する研究の現状と展望を総説して戴きました。関連した国内情報として、京大の平井先生には、熱帯・亜熱帯の水田雑草ナガボウルシの他感作用を紹介して戴きました。アレロパシー以外の国内情報として、農水省食品総研の島先生他による冷凍耐性パン酵母、棟方先生（生研機構）他の施肥自動化の分光センサー開発、九大の下田先生による液体食品殺菌・酵素失活、さらに地域先端研究情報として、釧路水研の錦織先生にサケのコンドロイチン硫酸の利用を、それぞれ執筆して戴きました。海外だよりは、東大の今川先生に、米国ミズーリ州立大学における家畜繁殖学研究参加の経験を綴って戴きました。また、海外文献紹介は、鹿児島大の岩井先生、東北大の松本先生、マルハ中研の山本先生にお願いしました。それぞれお忙しいなかを快く引き受けて戴き、編集部一同感謝致しております。

◇ブレイン・テクノニュースの編集・発行体制が変わりました。本誌は、1987年3月発

行の創刊準備号以来（社）農林水産技術情報協会が編集を担当して参りましたが、諸般の事情により前号第73号を引き継ぎ号として、編集・発行業務が全面的に生研機構に移行しました。12年間の永きにわたり、充実した誌面づくりに努力して下さいました（社）農林水産技術情報協会並びに編集実務を担当された各位の皆様へ深甚の謝意を表すると共に、今後とも従前同様ご指導ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます次第です。

◇19世紀後半の生物学分野では、「生命とは、タンパク質の存在形態である。」という現象論的認識に到達し、20世紀に移行したわけですが、まもなく21世紀に突入しようとしている現在、この命題は遺伝子レベルでの解明という実体論的認識の段階へと進んでいます。ブレイン・テクノニュースでは、こうした先端部分を視野にとらえながらも、その基盤になっている科学と産業の相互関係を踏まえ、独自の誌面構成、とくに新しい研究・技術情報、執筆者の開拓に努めたいと存じております。読者各位の忌憚のないご意見、ご要望をお寄せ下さるようお願い致します。

（畠山記）

ブレインテクノニュース（第74号）

平成11年7月15日発行

編集兼発行者 眞木秀郎

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

〒105-0001 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

©Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 1999