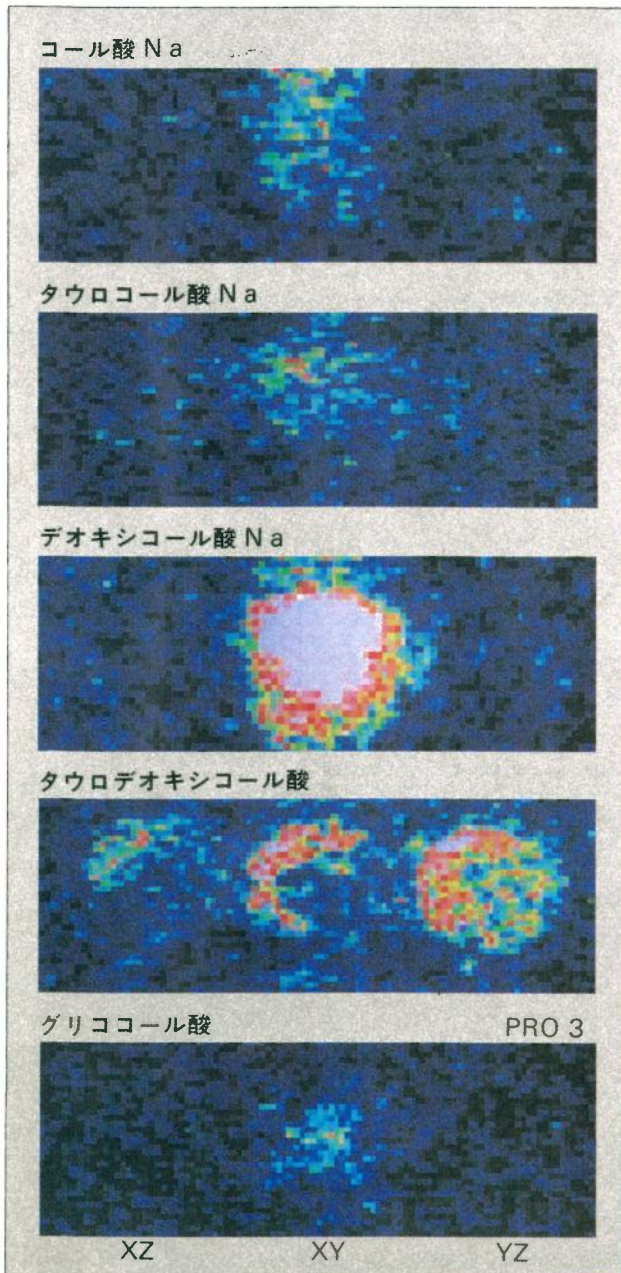


# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

②病原毒素液へのリーフディスク浸漬によるりんご斑点  
落葉病抵抗性個体の選抜状況 (目次・写真説明参照)



目 次

総 説	
大豆の健康機能.....	1
河村幸雄（農林水産省食品総合研究所）	
国内情報	
植物タンパク質由来ペプチドの生理作用.....	5
吉川正明（京都大学食糧科学研究所）	
新規微生物発光からみた大豆の活性酵素消去能とその応用.....	8
吉城由美子，大久保一良（東北大学大学院農学研究科）	
ウナギ・レプトケファルス幼生の人工生産.....	12
田中秀樹（水産庁養殖研究所）	
テンサイの雄性不稔性をひき起こすミトコンドリア遺伝子の発現機構.....	17
三上哲夫（北海道大学農学部）	
地域の先端研究	
りんごの培養シュートへの放射線照射による斑点落葉病抵抗性品種の選抜.....	21
斎藤 彰（青森県グリーンバイオセンター）	
梅優良系統の大量増殖.....	26
平田行正（JA 和歌山県農・植物バイオセンター）	
文献情報	
オス体細胞クローンマウスの作出.....	30
Wakayama, T. 他 (Nature genetics, 22:127-128, 1999)	
<i>Lactobacillus helveticus</i> ストレス誘導遺伝子の解析.....	30
Smeds, A. 他 (J. Bact., 180:6148-6153, 1998)	
形質転換植物による環境汚染物質の分解.....	31
French, C. E. 他 (Nature Biotechnology, 17:491-494, 1999)	
外生菌根形成に関与する菌側の遺伝子の単離.....	32
Kim, S. J. 他 (Gene, 222:203-212, 1998), (J. Bact., 181:1963-1967, 1999)	
植物の環境ストレス（塩分，干ばつ，寒さ，熱さ）耐性を高める遺伝子.....	33
Lee, J. H. 他 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:5873-5877, 1999)	
天高くサカナも肥える秋!? ヨーロッパスズキの自発摂餌活性の年内リズム.....	34
Sánchez-Vázquez, F. J. 他 (Chronobiology International, 15(6):607-622, 1998)	
海外便り	
スケトウダラ仔稚魚をとりまく食物網に関する研究.....	35
杉崎宏哉（水産庁東北区水産研究所）	
生研機構からのご案内 .....	20, 29, 38

表紙写真説明

① 食品や生体成分（胆汁酸等）における活性酸素消去物質の検出に応用されている X（活性酸素種） Y（水素供与体） Z（メディエーター）系微弱発光現象。詳細は国内情報 8 頁参照。② 培養シュートへ放射線照射後，生存した個体から育成した苗木の葉からリーフディスクを作成し，病原毒素液に 28℃ 2 日間暗黒下で浸漬静置後，褐変せず緑色を保持しているリーフディスクの個体を抵抗性変異体として 1 次選抜する。詳細は地域の先端研究 21 頁を参照。

◀ 総説 ▶

## 大豆の健康機能性

農林水産省食品総合研究所

河村 幸雄

近年、食品の生理機能の研究が進展している。日本を含めて世界の先進諸国の疾病構造が類似しており、罹病率の上位三者は、高血圧症、脳心臓機能異常、感染症である。また、先進諸国の死亡原因の上位は、悪性腫瘍、脳血管系障害、心臓疾患、である。これらは、いずれも現在、生活習慣病 (life-style related diseases) と言われる疾病であり、食習慣と運動 (エネルギー消費) に関係が深いことが判明している。本稿では、このような生活習慣病と大豆の健康機能はどのような関係があるのかについて述べる。

### はじめに

大豆が、古くから畑の肉と言われるほどタンパク質に富み栄養的に優れた食品であることは、科学的にも経験的にも良く知られている。これは大豆が、タンパク質含量が高い、アミノ酸バランスが優れている、高度不飽和脂肪酸が多い、食物繊維に富むと言った食品化学的・栄養学的に優れていることからくる評価であるが、現在注目されているのは、この様な点に加えてもっと特異的な特定の生体機能に対する大豆の効用である。すなわち、我々のいかなる生理機能に大豆のどのような成分が良い影響を及ぼしうるのかと云うことである。この様な観点から、大豆タンパク質や食物性脂質の古典栄養学的側面以外の機能、特に、大豆タンパク質の脂質代謝改善・ホルモン様作用、高血圧予防、及びフラボノイド化合物のガン抑制作用が注目される。

### I. 大豆タンパク質の脂質代謝改善作用

#### a) 大豆タンパク質の血漿コレステロール低下作用

食事タンパク質と血漿コレステロールレベ

KAWAMURA Yukio

〒 305-8642 つくば市観音台 2-1-2

ルとの間に密接な関係のあることは、1975年のCarroll & Hamilton<sup>1)</sup>のウサギでの研究報告以来注目され、疫学調査でヒトでも観察されている (表1)。

大豆タンパク質のタンパク質分解酵素非消化画分は、実験動物の糞便中へのコレステロールおよび胆汁酸の排泄を著しく増加させ、血漿コレステロール低下作用を発現した。この非消化画分を唯一のタンパク質源とし飼育した場合には、血漿コレステロール濃度の上昇のみならず肝臓へのコレステロール沈着も抑制される。このような効果はラット、マウスだけでなくハムスターでも認められた。

非消化画分はヒトでも有効であった。すなわち、軽度高コレステロール血症 (220mg/dl程度) の女子大生ボランティアに大豆タンパク質の非消化画分を14日間与えた場合、血漿LDL-コレステロールが低下し、HDL-コレステロールは上昇した。同時に糞便への胆汁酸排泄は有意に増加した。従って、非消化画分はヒトでも実験動物と同様な機構で血漿コレステロール低下作用を発現すると考えられる<sup>2)</sup>。

大豆タンパク質の脂質代謝に対するもう一つの重要な作用は、リノール酸のアラキドン酸への代謝、すなわちエイコサノイド産生に対する効果が動物性タンパク質と比較して、大きいことである。この作用が上述の非消化画分によって発揮されることから、やはり難消化性ペプチドの寄与が大きいと考えられる。

## 2 総説

表1 大豆を含む食事を摂取したヒトにおける血清脂質およびリポタンパク質の正味の変化：コントロール食との比較\*

	研究数	被験者数	変化 (mg/d)	95%信頼限界	パーセント変化
総コレステロール	38	730	-23.2	-32.9~-13.5	- 9.3
VDL-コレステロール	31	564	-21.7	-31.7~-11.2	-12.9
HDL-コレステロール	30	551	+ 1.2	- 3.1~+ 5.4	+ 2.4
VLDL-コレステロール	20	255	- 0.4	- 4.6~- 3.9	- 2.6
トリグリセリド	30	628	-13.3	-25.7~- 0.3	-10.5

\* J. W. Anderson ら (1995) による。

非消化画分がどのようなペプチドであるかについては、分子サイズとラットの血清コレステロール低下の解析から、分子量 5,000 ~ 10,000 程度の数種のペプチド混合物であることが示されている。調製方法が確立されているため実用への可能性は大きいと考えられる。

### b) 大豆グリシニンのホルモン増強作用

大豆タンパク質の摂取により脂質代謝関連ホルモンであるインスリンやグルカゴンの血漿中の濃度が変動する。この作用物質は分子量約 35kDa のタンパク質であり、その N-末端アミノ酸配列解析から、グリシニン酸性サブユニット A1a 並びに A2 であると推定された。

A1a サブユニットが胆汁酸と結合すると Try 残基の蛍光強度と波長シフトおよび 225nm 近傍の円二色性スペクトルが変化することから、その二次構造がヘリックス含量の多い構造体に移行し、タンパク質分子に協同的な構造変化が引き起こされるため、胆汁酸がタンパク質分子表面上の疎水性部位に結合すると推定されている<sup>3)</sup>。

ラット脂肪細胞におけるイソプロテレノール依存性脂肪分解のインスリンによる抑制に及ぼす大豆タンパク質の影響が検討された結果、インスリン作用を増強したのは、胆汁酸固定化カラムに吸着する大豆タンパク質成分、すなわちグリシニン酸性サブユニット A1a だけで、非吸着成分にはその活性は認められなかった。

A1a はイソプロテレノールに拮抗するインスリン依存性脂肪分解抑制を増強するばかりでなく、cAMP 活性化剤の存在下でインス

リン依存性の糖輸送や脂肪合成を顕著に増大した。A1a のトリプシン分解物とプロムシアン分解物はインスリン作用を増強したが、キモトリプシン分解物は効果を示さなかった。このことは特定のアミノ酸配列がインスリン作用促進効果に関与していることを示している。また、A1a は細胞に取り込まれて作用するのではなく、A1a のある特定のアミノ酸配列を持つ部位が細胞膜を安定化する結果としてホルモン作用の修飾効果をもたらされると考えられている。

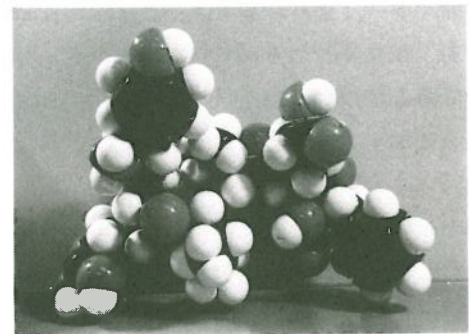


図1 ACE阻害ペプチドの分子模型

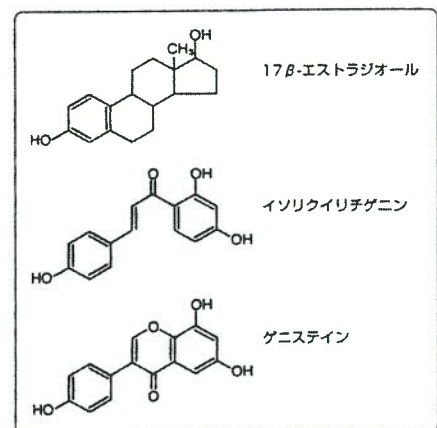


図2 女性ホルモンとフラボノイドの構成類似性

## II. 大豆タンパク質の 血圧低下作用と ACE 阻害ペプチド

生体内の血圧調節系の一つであるレニン・アンギオテンシン系，特に昇圧ペプチドホルモンの生成を直接触媒する酵素であるアンギオテンシン変換酵素 (ACE) が注目され，その *in vitro* での阻害活性を指標に種々の食品タンパク質から ACE 阻害ペプチドが単離されてきた。

### a) 大豆タンパク質由来のアンギオテンシン変換酵素阻害ペプチド

消化管での消化モデルとして胃のプロテアーゼで分離大豆タンパク質を分解し，分解程度と ACE の阻害程度を調べた結果，大豆タンパク質の分解が進行すると共に ACE 阻害活性が上昇した。このことは，タンパク質の分解に伴い ACE 阻害活性を有するペプチドが遊離してきたことを意味している。最も高い ACE 阻害活性の認められた分解物から，4 種の ACE 阻害ペプチドが分離され，その一次構造 (アミノ酸配列) が決定された。これらと同一のアミノ酸配列が大豆グリシニンとコングリシニンの一次構造中に存在することが明らかとなっている<sup>4)</sup>。その ACE 阻害ペプチドの分子模型を示した (図 2)。大豆の主要な貯蔵タンパク質であるグリシニンとコングリシニン中にこの様なペプチド配列が存在することは，大豆 (タンパク質) を食べた時に消化管内で量的に多くのペプチドが生成する可能性を示している。

### b) 経口投与大豆タンパク質による血圧低下と ACE 阻害ペプチド

定量的に経口投与した食品 (タンパク質) が高血圧ラット (SHR) の血圧に及ぼす影響が調べられた。試料は，味噌抽出物，大豆分離タンパク質，ミルクカゼイン，卵アルブミン，グルコース，グルコース+卵アルブミン，を用いた。その結果，味噌と分離大豆タンパク質投与区に於いて血圧低下が認められた。一方，カゼイン，卵アルブミン，および非タンパク質のグルコース投与区では若干の血圧低下が認められたが統計的に有意でなかった。従って，経口投与された大豆タンパク質そのものあるいは胃および腸管で消化酵素で分解された大豆タンパク質由来のペプチドやアミノ酸が血圧低下に関わっていると推定された<sup>5)</sup>。

この研究で用いられたカゼイン，卵アルブミン，大豆タンパク質にはいずれも，アミノ酸配列は異なっているがプロテアーゼ消化で遊離する ACE 阻害ペプチド配列の存在することが判明しているタンパク質である。このことを考え合わせると，ACE 阻害ペプチド配列を有するタンパク質，あるいは *in vitro* で ACE 阻害ペプチドを遊離することの示されたタンパク質であっても，必ずしも経口投与で (*in vivo*) 血圧降下をもたらすとはいえないことを示している。

## III. 大豆のガン予防成分

食習慣とガンの罹病率との関係を調べた疫学調査は，大豆製品の摂取と乳ガン，子宮ガ

表2 豆類の植物エストロゲン含量

マメ類ほか	ビオカニン A	ダイゼイン	ゲニステイン	SECO	MAT
ダイズ	15	56,000	84,000	222	nd
インゲン	3	28	158	56	nd
エンドウ	3	11	tr	9	nd
ソラマメ	tr	32	tr	26	tr
ヒヨコマメ	tr	10	19	12	tr
ピーナッツ	7	50	83	333	tr
クズ (根)	1,400	185,000	12,600	31	tr
エンジュ	830	319	265	1,590	4

μg/100g,

SECO: secoisolariciresinol, MAT: Matairesinol (W. M. Mazur et al. J. Nutr. Biochem. 1998 から)

## 4 総説

ン、前立腺ガンの発症の間に有意な関係のあることを示している。この結果は、大豆中のある種のイソフラボンの女性ホルモン様（フィトエストロジェン）作用によると推定され、大豆中のポリフェノール化合物の抗ガン作用やガン予防効果に興味を持たれている。

### a) マウス肝ガン

中性子線照射又はジエチルニトロソウレア 1 回投与による肝ガン誘発マウスに、10%味噌含有飼料を経口摂取させた。その結果、自然発生、中性子線照射によるいずれの肝腫瘍でも10%味噌投与区で発生率、平均腫瘍数とも減少した。この味噌の経口摂取による発ガン予防効果は、大豆のイソフラボン体の一種であるビオカニンAを10mg/kgあるいは50mg/kgの割合で混ぜた飼料を与えた場合にも認められた。又、ジエチルニトロソウレア誘発肝腫瘍においても、味噌および50mg/kgのビオカニンAの経口投与により有意に発生個数の抑制が認められた<sup>6)</sup>。

### b) ラット乳ガン

雌SDラットにモノニトロソウレアの静注による乳ガン発生系において、10%味噌、2%および10%の大豆粉末、50mg ビオカニンAを飼料に添加したときの乳癌発生に対する効果を検討した結果、ビオカニンA 50mg/kg、ビオカニンA 10mg/kg、10%大豆、10%味噌、2%大豆の順で対照群に比べ有意に腫瘍抑制効

果が示された。そこで、10%味噌の経口投与群とタモキシフェン（抗ガン剤）の2.5mg含有ペレット皮下投与群の二群を設定して乳癌の発症を検討した結果、10%味噌とタモキシフェンの単独投与は各々中等度の抑制効果を示したが、両者の併用は相乗効果を示して高度に乳癌の発生を抑制した。

以上の結果は、味噌には抗ガン作用を示す成分の存在すること、それが大豆由来のビオカニンAに代表されるようなイソフラボン化合物による可能性を強く示唆するものである。

女性ホルモンと大豆のイソフラボン化合物の構造（図2）と代表的な豆類のイソフラボノイドの含量（表2）を示した。イソフラボンがこの様な効果を発揮する機構として、一つには植物エストロジェンとしての作用、そして少なくともその一部は、活性酸素捕捉（消去）能によると考えられる。

## 参考文献

- 1) K.K.Carroll and R.M.G.Hamilton, J.Food Sci., 40, 18-23 (1975)
- 2) M.Sugano, J.Jpn.Soc.Nutr.Food Sci., 40, 93-102 (1987)
- 3) S.Makino et.al., Agric. Biol. Chem., 52, 803 (1988)
- 4) Y.Kawamura, Farming Japan, 31, 14-19, (1997)
- 5) 岩下敦子, 高橋祐司, 河村幸雄, 日本醸造協会誌, 89, 869-872 (1994)
- 6) A.Ito et al., Int. J. Oncology, 2, 773-776 (1993)

## ◀国内情報▶

## 植物タンパク質由来ペプチドの生理作用

京都大学食糧科学研究所

吉川 正明

動物に対して種々の生理活性を示すペプチドが植物タンパク質の酵素消化によって多数派生する。分子サイズが小さいことからこれらの中には経口投与でも有効なものがあり、学習促進作用や抗脱毛作用等のような意外な効果を示すものもある。これらを健康の増進や生活習慣病の予防に利用することが期待される。また、植物由来生理活性ペプチドのアミノ酸残基の一部を置換することによって生理活性が著しく増強される例や、動物性食品タンパク質から派生する有用ペプチドの類縁配列が植物タンパク中に存在する例を見出している。このことは植物タンパク質遺伝子の部位指定変異により生体調節機能を強化した作物を設計・生産し得ることを意味している。

## はじめに

従来は生理活性ペプチドの前駆体とは見なされていなかった乳タンパク質および血液タンパク質等の酵素消化によって多様な生理活性ペプチドが派生する例が多数見出されているが、さらに動物に対して生理作用を示すペプチドは植物タンパク質からも派生することがわかってきた<sup>1)</sup>。このような例としてはアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド、抗酸化ペプチドおよびインシュリン作用増強ペプチド等がある。以下では我々が植物タンパク質消化物から単離した生理活性ペプチドを紹介する。

## 1. 免疫賦活ペプチド soymetide

ヒト好中球による異物の貪食（ファゴサイトーシス）を促進する活性を指標にして大豆タンパク質のトリプシン消化物から13残基からなるペプチド Met-Ile-Thr-Leu-Ala-Ile-Pro-Val-Asn-Lys-Pro-Gly-Arg を単離し、soymetide と命名した。本ペプチドはβ-コングリシニンα'サブユニットに由来するが、N末端Met

YOSHIKAWA Masaaki

〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄

が活性発現に必須であり、α およびβサブユニットではMetが置換されているために相当部位から活性ペプチドは派生しない。また、本ペプチドの活性発現に最小限必要な構造はN末端4残基に相当するMet-Ile-Thr-Leuであった。soymetideの免疫促進作用がバクテリア由来の白血球走化性ペプチドであるformyl-Met-Leu-Phe (fMLP) のアンタゴニストであるBoc-MLPによってブロックされること、およびレセプターアッセイの結果から本ペプチドの作用はfMLPレセプターを介したものであることが明らかになった<sup>2)</sup>。これは食品タンパク質由来の最初のfMLPアゴニストであり、N末端がformyl化されていないにもかかわらずfMLPレセプターに結合し得ることは興味深い事実である。なお、fMLPは低濃度では走化性およびファゴサイトーシスの促進、高濃度では活性酸素の産生を促進し、炎症を誘発することが知られているが、soymetide類の比活性はfMLPの約数千分の1から数万分の1であることから大豆から派生したsoymetideが炎症等有害な作用を誘発することはあり得ない。また、Met-Ile-Thr-Leuの経口投与により抗ガン剤による脱毛を阻止できることを高畑（岡山大）との共同研究により見出している<sup>3)</sup>。なお本ペプチドの4残基目のThrを種々の疎水性アミノ酸残基と置換することによってその活性を数倍か

表1 植物タンパク質から派生する生理活性ペプチド

ペプチド	構造	前駆体タンパク	レセプター／標的酵素
ACE阻害ペプチド	多数	トウモロコシ, コメ, ダイズタンパク等	アンジオテンシン変換 酵素
soymetide	MITLAIPV NKPGR	$\beta$ コングリシニン	fMLPレセプター
gluten exorphin A	GYYP T	高分子グルテニン	$\delta$ オピオイドレセプター
gluten exorphin B	YGGWL	グルテン	$\delta$ オピオイドレセプター
gluten exorphin C	YPISL	グルテン	$\mu$ オピオイドレセプター
oryzatensin	GYPMYPLPR	コメアルブミン	C3aレセプター
コレステロール低下ペプチド	LPYPR	グリシニン	?

ら約百倍まで高め得ることも見出している。

## 2. グルテン由来オピオイドペプチド

グルテンの酵素消化物がオピオイド活性を示すことは古くから知られていたがその構造は永らく不明であった。我々は数年前グルテンの酵素消化物から5種類のオピオイドペプチド Gly-Tyr-Tyr-Pro-Thr, Gly-Tyr-Tyr-Pro, Tyr-Gly-Gly-Trp-Leu, Tyr-Gly-Gly-Trp および Tyr-Pro-Ile-Ser-Leu を単離し、それぞれ gluten exorphin A 5, A 4, B 5, B 4 および C と命名した<sup>4,5)</sup>。これらのうち gluten exorphin A5 および A4 は高分子グルテニンに由来し、 $\delta$ オピオイドレセプターに対して選択性を示すオピオイドペプチドである。gluten exorphin A 5 は鎮痛性は示さないが経口投与の際に学習促進作用およびインシュリン分泌促進作用を示すことを見出している<sup>6,7)</sup>。

## 3. C3a アゴニストペプチド oryzatensin

補体 C3a は補体系が活性化される際に生ずる 77 残基のペプチドであり、自然免疫に関与する重要な因子である。最近、我々は C3a が抗オピオイド作用や抗健忘作用などの神経作用を有することを新たに見出した。

コメタンパク質のトリプシン消化物からモルモット回腸収縮活性をもとにして単離した Gly-Tyr-Pro-Met-Tyr-Pro-Leu-Pro-Arg (oryzatensin) は C3a レセプターを介して作用することがわかった<sup>8)</sup>。その C 末端テトラペ

プチドに相当する Tyr-Pro-Leu-Pro-Arg の Tyr をさらに疎水性の高いアミノ酸残基に置換することによって C3a 活性は数倍上昇し、経口投与でも有効なペプチドが得られることを見出している。

## 4. コレステロール低下ペプチド

従来より食餌中の動物性タンパク質よりも植物タンパク質の方がコレステロール低下作用が大きいと報告されており、大豆タンパク質の場合には生じた難消化性の高分子ペプチドが胆汁酸の再吸収を阻害することによってコレステロール低下作用を示すと言われている。一方、低分子ペプチドの中にもコレステロール低下作用を示すものがあることがわかってきた。大豆グリシニンから派生する Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg がコレステロール低下作用を有することを最近見出した<sup>9)</sup>。また、前記 gluten exorphin A 5 および B 5 がコレステロール低下作用を有することも見出している。これらペプチドがダイズおよびコムギタンパクのコレステロール低下作用にどの程度寄与しているか今のところ不明であるが、それらの作用機構に興味を持たれる。

## おわりに

ところでこのように動物にとって望ましい作用を示すペプチドがなぜ植物タンパク質から派生し得るのであろうか。そもそも作物は栄養豊かで、かつ毒物を含まない有用な植物



を人類が選抜・育種したものである。しかし、それは有用ペプチド配列がなぜ作物タンパク質に含まれているかという理由の説明としては不十分である。植物が動物に対して利他的に物質を供給する例としては果実や蜜がある。これらの場合に植物は種子を遠くへ運んでもらうことや受粉を助けてもらうという利益を得ている。しかし次世代を生じるための種子が動物に対して利他的に作用する物質を含有しても植物にとっては何の利益もならない。生理活性は何らかの合目的性のもとに存在するというのが従来の一般的な考え方であった。しかし今日では化学合成やファージディスプレイによって得られたランダムペプチドライブラリーから生理活性ペプチドが多数得られていることがわかっている。このことは生理活性ペプチド配列はある確率で偶然存在し得ることを意味している。このように考えると植物タンパク質から派生する生理活性ペプチドも多くの場合いわば偶然存在すると考えるのが妥当であろう。その意味においてタンパク質の酵素消化物はペプチドのランダムライブラリーの一種と見なすことも可能である。そしてこのようにして得られたペプチドの活性は一般的にさほど大きくはないが、低分子で、且つペプチダーゼ抵抗性を示すために経口投与でも有効なものが存在し得るのである。

このことは動物体内に存在する内因性生理活性ペプチドは強力な比活性を有するにもかかわらず、経口投与では殆どすべて無効であることと著しい対照をなしている。

前述のように、我々はタンパク質から派生する生理活性ペプチドの少数のアミノ酸残基

を置換することによってそれらの活性が著しく上昇する例を見出している。また、動物由来の生理活性ペプチド、例えば卵白アルブミン由来の血圧降下ペプチド、およびその高機能化誘導体の類縁配列が植物、特に大豆タンパク質中に存在することも見出している。このように活性が増強された生理活性ペプチド配列や動物由来のペプチド配列を植物タンパク質遺伝子の部位指定変異によって導入することによって生体調節機能または生活習慣病予防機能を高めた作物を設計・生産することが可能である。このことは健康増進という目的性のもとに食品タンパク質を人為的に進化させることができるという意味において画期的である。なお、このような試みは生研機構による「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」の補助による「生理機能性タンパク質集積作物の開発と利用に関する総合的基盤研究」として現在進行中である。

#### 文献

- 1) 吉川正明(1997) 科学と工業 71, 310-316
- 2) 釣木隆弘他(1999) 日本農芸化学会講演要旨集, p.146
- 3) 高畑京也他(1999) 日本農芸化学会講演要旨集, p.151
- 4) S. Fukudome & M. Yoshikawa (1992) FEBS Lett. 296, 107-111
- 5) S. Fukudome & M. Yoshikawa (1993) FEBS Lett. 316, 17-19
- 6) S. Fukudome et al. (1995) Life Sci. 57, 729-734
- 7) M. Takahashi et al. Jap. J. Pharmacol., submitted
- 8) M. Takahashi et al. (1995) Peptides 17, 5-12
- 9) 山本大地他(1999) 日本農芸化学会講演要旨集, p.142

## ◀国内情報▶

## 新規微弱発光からみた大豆の活性酸素消去能とその応用

東北大学大学院農学研究科  
吉城 由美子, 大久保 一良

活性酸素, 化学発光, 生物発光はそれぞれ独自で国際学会が開催されるほど注目, 発展しつつある分野である。しかしながら, 生体に関与する発光反応が一重項酸素による根強い考えと, 発光試薬 (ルミノール, ルシゲニン) を用いた実験がその主流を占めている。その中において, 活性酸素消去と微弱発光とを直接結びつけたXYZ系微弱発光は全く独創性に富むものである。本報では大豆, 大豆食品を中心にXYZ系微弱発光を介した活性酸素消去能を中心に述べた。

## 1. はじめに

新規活性酸素消去反応の一つとして, 活性酸素種/水素供与体/メディエーター系における微弱発光 (XYZ系微弱発光) を最近明らかにした<sup>1,2)</sup>。この微弱発光は光エネルギー変換により活性酸素種 (X) を消去するために, 水素供与体 (Y) とメディエーター (Z) の組み合わせが重要であることを示している。このXYZ系で生じる微弱発光強度 (P) はX, Y, Z種それぞれに対し,  $[P] = k[X][Y][Z]$  に従う高い濃度依存性を示すことから<sup>3)</sup>, XYZ系微弱発光を用い, 食品や生体成分の活性酸素消去物質の検索法の検討を重ねてきた。現在まで, ウェル型ホール ( $\phi$  9 mm) にY, Z試薬 (X種の検索), X, Z試薬 (Y種の検索), X, Y試薬 (Z種の検索) をあらかじめ注入し, そこに試料を加え, 発生する微弱発光を二次元フォトン検出器 (CCDカメラ) により試料のX, Y, Z種の検索を行うスクリーニング法を開発した<sup>4)</sup>。この方法は活性酸素種として様々なヒドロペルオキシドを用いることができ, 活性酸素種における特異性も調べることができる。また従来の活性酸素種, 活性酸素消去物質の検索法と比較し短時間, 高感度, 試料調製の簡便性, 試料が少量ですむなどの特徴を有し, さらに固形試料にも適用できることから, 応

YOSHIKI Yumiko, OKUBO Kazuyoshi

〒981-0914 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1

用範囲の広い検索法である。

ここではこの微弱発光系を見出すに至る発端となった大豆DDMP (2, 3-dihydro-2, 5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one) サポニンの活性酸素消去作用と, 微弱発光による検索法を用いた大豆食品の活性酸素消去について紹介する。

## 2. DDMP サポニンの活性酸素消去能

最近その構造を明らかにしたDDMPサポニンのDDMP部位の反応性を調べるため分子軌道法でスピン密度を計算した<sup>5)</sup>。その結果, C-4位, ケトン基の酸素, C-6位に電子の局在性が見られ, 活性酸素との反応が期待された。亜硝酸法によるソヤサポニンBb (グループBサポニン) とソヤサポニン $\beta$ g (DDMPサポニン) のスーパーオキシド消去能の比較は, この結果を裏付けるものでありソヤサポニン $\beta$ gはマルトール (遊離DDMP部位) がスーパーオキシド消去能を発現する濃度からその消去能を示す。DDMPサポニンの反応特性は活性酸素消去能にあるが, なかでも特筆すべき作用はその協奏効果にある<sup>6)</sup>。DDMPサポニンは単独でもスーパーオキシド消去能を示すが, 没食子酸などの水素供与体の存在下で消去能を協奏的に増加させる作用がある。同様の協奏効果はDPPHラジカル消去能でも, またリノール酸自動酸化系でも見られる。DDMPサポニンは水素引き抜き作用を有するため, そ

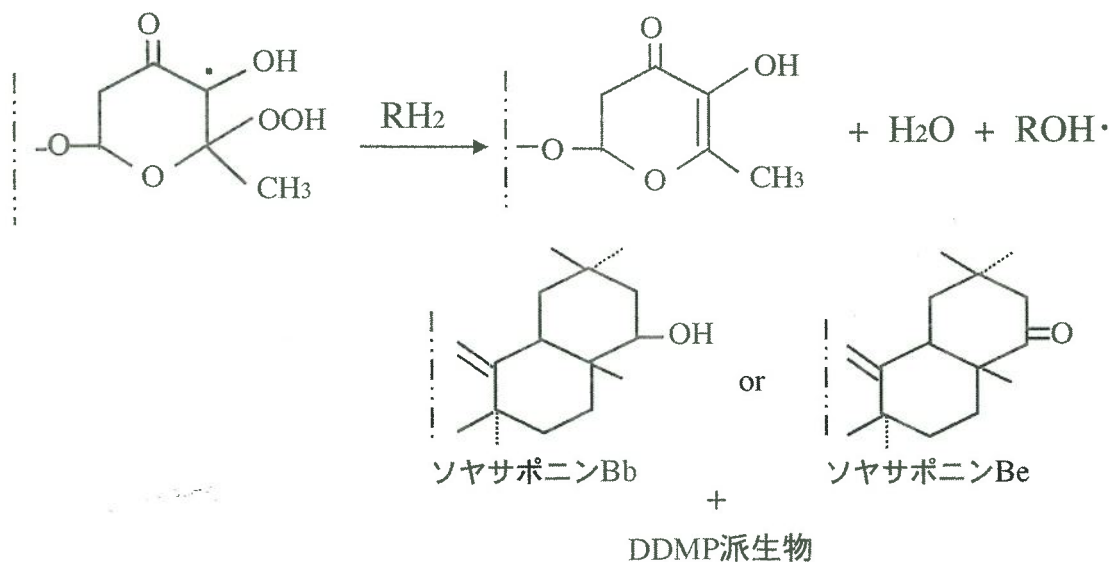


図1 DDMPサポニンの反応

れ自体はリノール酸の酸化を促進するが、水素供与体との共存により協奏的に抗酸化性を示す。このようなユニークな活性はDDMP部位の欠如したグループB,Eサポニンでは観察されず、DDMP部位に由来する特異的な反応である。

近年、活性酸素消去機構の一つとして明らかにしたXYZ系微弱発光で、DDMPサポニンの活性酸素消去機構における役割を検討した結果、DDMPサポニンはZ種として、すなわち活性酸素消去を促進するメディエーターとして作用する知見を得た。メディエーターはX種がY種を消去する際の環境的因子(潤滑剤)である。DDMPサポニンのメディエーターとしての役割はDDMP部位の不對電子に活性酸素が付加し、つづいて没食子酸などの水素供与体と反応し、水素供与体を酸化した後、さらに生成した酸化体との反応を経て、従来のグループB,Eサポニンが生成する過程で発現するものと考えられる(図1)。これら知見はDDMPサポニンが大豆活性酸素消去物質あるいは抗酸化物質(グループAサポニン、イソフラボン、ビタミンなど)と相互作用し活性酸素消去作用を増幅するというサポニンの新しい機能性を示すものである。

### 3. 大豆サポニンの微弱発光

大豆サポニンのアグリコンはメバロン酸を中間体とし、スクアレンを経て合成されるトリテルペノイドに属する脂環式多環化合物である。同様の経路を経て合成されるものにステロイドがある。アグリコンの構造類似体であるステロイドのXYZ系微弱発光特性を調べると、いずれもメディエーターとしての発光を観察することができる(図2)。その発光強度はステロイドの構造により明確な差を生じ、コール酸、タウロコール酸ともにデオキシ型で発光強度が高いことからC-7位の水素が、またリトコール酸では発光が観察されないことからC-12位の水酸基およびC-20位の置換基が重要である。大豆サポニンのアグリコンではC-7位に水素が結合しているが、C-12位は二重結合であり、アグリコン骨格によるメディエーターとしての役割への寄与は少ないと考えられる。ステロイドのC-20位は大豆サポニンアグリコンのC-22位に相当し、DDMP部位の結合位置と一致している。デオキシコール酸Naを用い微弱発光後の反応生成物をHPLCで分析すると、その9.3%(w/w)がデオキシコール酸に変化し90%以上がデオキシコール酸Naとして単離することができる<sup>7)</sup>。したがって、DDMPサポニンは活性酸素と反

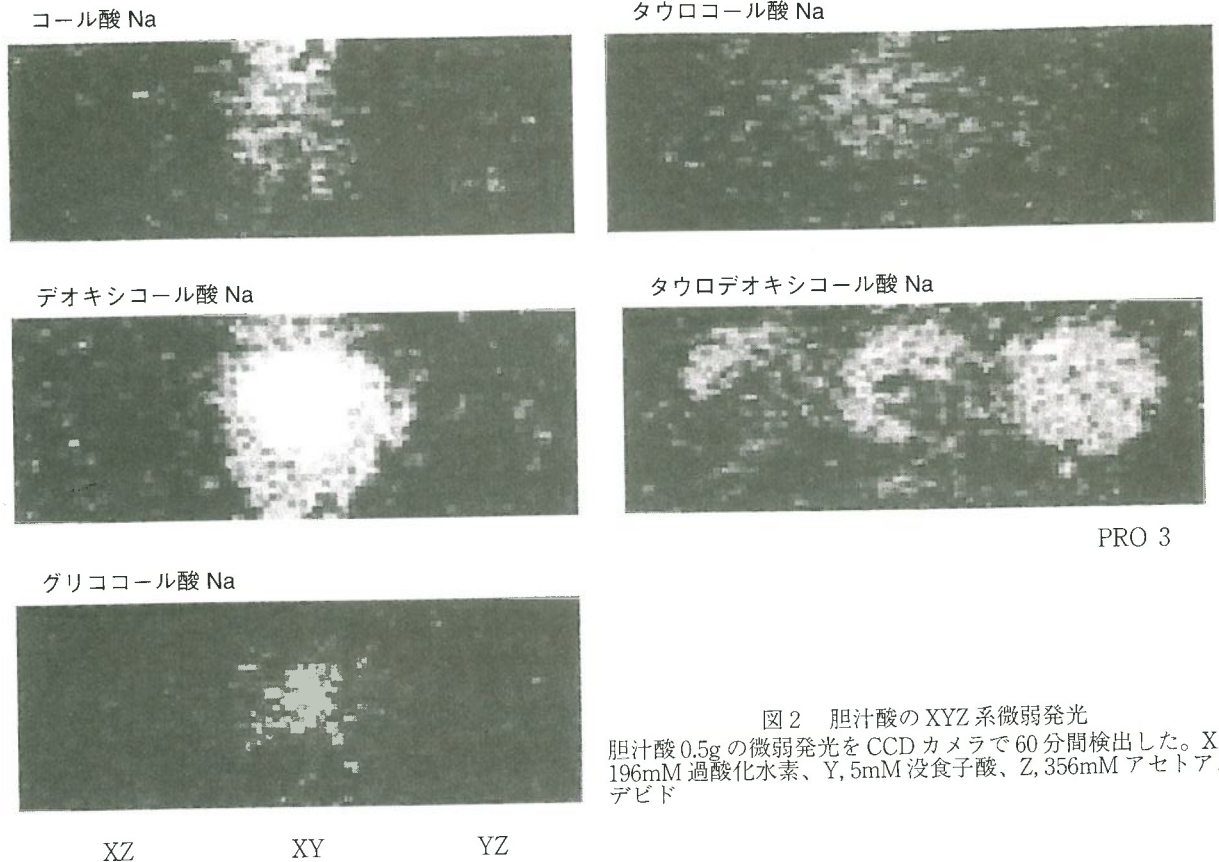


図2 胆汁酸のXYZ系微弱発光  
胆汁酸0.5gの微弱発光をCCDカメラで60分間検出した。X, 196mM 過酸化水素、Y, 5mM 没食子酸、Z, 356mM アセトアルデヒド

応してもほとんどアグリコン部分は構造変化せず、DDMP部位の脱離を伴い反応が進行すると考えられる。これらの結果はDDMPサポニンの活性酸素消去反応経路を裏付けるものである。

活性酸素は紫外線照射、排気ガスなどの外的因子、ミトコンドリアによる電子伝達系や酸化分解反応、白血球による食作用などの内的因子により容易に発生するものであり、癌、炎症、老化などに関与する酸化的細胞障害を引き起こす原因物質である。DDMPサポニンにはこれら活性酸素を消去する作用はもちろんのこと、他の活性酸素消去物質の活性酸素消去能を協奏的に増加させる内部環境因子(メディエーター)としての作用がある。

#### 4. 大豆食品の活性酸素消去能

XYZ系における微弱発光を用いた検索法を食品へ応用すると、食品をY食品、Z食品として範疇分けできる<sup>7)</sup>。主な大豆食品であるもやしは生の場合Z食品、加熱した場合Y食品

として、また醤油、みそはY食品としての微弱発光を示す。この検索法によると、魚肉、獣肉など動物性食品はZ食品となることから、動物性食品の調味料として醤油、みそが調味料として用いられることは調理中に発生する活性酸素(脂質過酸化物質など)を消去する点からも利にかなった方法である。

醤油は0.5 $\mu$ l当たり0.58 SOD U/mlのスーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)消去能を、また32%のヒドロキシルラジカル(HO $\cdot$ )消去能を示す、活性酸素消去食品である。醤油の微弱発光は500nm付近に極大発光波長を示し、醤油の醗酵期間に伴い微弱発光強度が増加する。そこで醤油醗酵過程で生成されるメイラード反応物質に着目し、その微弱発光と活性酸素消去能の比較を行った。メイラード反応物質はアミノ酸と糖の加熱反応生成物である。様々なアミノ酸と糖との組み合わせから生じるメイラード反応物質の微弱発光を調べた結果、アラビノース-フェニールアラニンから生成されるメイラード反応物質で強い発光強度を得ることができた。図3にはグルコース-フェ

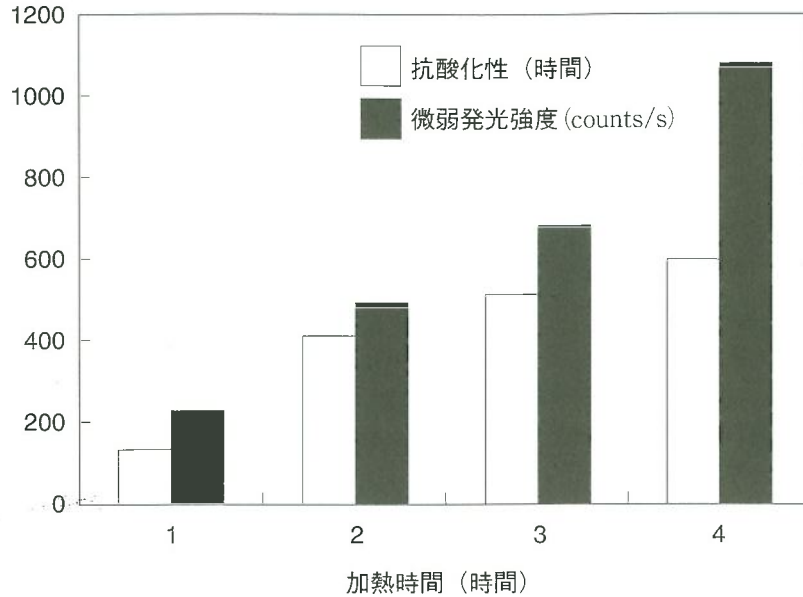


図3 グルコース-フェニルアラニン由来メイラード反応物質の抗酸化性と微弱発光強度

抗酸化性はリノール酸自動酸化系における影響をロダゲル法で測定し、吸光度が0.5に達する時間で表した。微弱発光強度は過酸化水素/アセトアルデヒド系で測定した。

ニールアラニンから生成されるメイラード反応物質の抗酸化性ならびに微弱発光強度を示した。この微弱発光は反応加熱時間に依存し増加する。また抗酸化作用の他、 $O_2^-$ 、 $HO^-$ 消去能も反応加熱時間に伴い増加することから、醤油の微弱発光物質（活性酸素消去物質）として、メイラード反応物質が関与していると考えられる。またメイラード反応物質は活性酸素種として過酸化水素だけでなく、*tert*-ブチルヒドロペルオキシドなど有機ヒドロペルオキシドでも微弱発光を示すことから、広範囲のヒドロペルオキシドを消去する物質として作用するものと期待される。

食品素材として広く用いられ、また多年にわたり摂取することのできる大豆の水素供与体あるいはメデイエーターとしての作用は、活性酸素と密接にかかわる癌、動脈硬化、糖尿病、腎疾患の予防に対し、即効性のある薬剤より、その貢献度ははるかに大きいと考えられる。

## 5. おわりに

動物とその進化、分化過程を異にする植物には、動物に存在しない様々な生理活性物質

が存在している。大豆は食糧資源として世界的に用いられており、摂取することにより健康を維持、増強する医食同源的な作用を有する代表的な食品素材である。大豆は人間の生体内では合成できないサポニン、イソフラボンなどの様々な低分子生理活性物質を有している。さらなる大豆の機能性、新しい大豆食の方向性に期待したい。

## 参考文献

- 1) Yoshiki Y. et al (1995) *Phytochemistry* 39: 225-229.
- 2) Yoshiki Y. et al (1998) *Photochem. Photobiol.* 68: 802-808.
- 3) Yoshiki Y. et al (1996) *J. Biolumin. Chemilumin.* 11: 131-136.
- 4) Yuan H. et al (1999) *Bioluminescence and Chemiluminescence*, eds Roda A. Pazzagli M. Kricka JL. Stanlety PE. John Wiley & Sons Ltd, pp.346-349.
- 5) Yoshiki Y. et al (1996) *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 405, eds. Waller RG. Yamasaki K. Pelenum press, New York, pp.231-239.
- 6) Yoshiki Y. et al (1998) *Biosci. Biotech. Biochem.* 62: 2291-2299.
- 7) 吉城由美子 他 (1999) *ジャパンフードサイエンス*, 日本食品出版, pp.50-54.

## ◀国内情報▶

## ウナギ・レプトケファルス幼生の人工生産

水産庁 養殖研究所

田中 秀樹

水産庁養殖研究所のウナギ研究グループは、ウナギの人工種苗生産技術開発を目指して雌雄親魚の成熟誘起および人工受精技術の開発を続け、ほぼ周年にわたって大量の孵化仔魚を得る技術を確立した。仔魚の飼育は、その適正餌料が全く分からなかったために困難を極めたが、昨年、サメ卵粉末を好んで食べることを明らかにし、本年5月にはついに養殖用種苗となるシラスウナギの一步前の段階であるレプトケファルス幼生まで成長させることに成功した。

## 1. はじめに

ウナギの腹を開いていくら注意深く観察しても、他の魚のように大きくなった卵巣や精巣を見つけることは出来ない。それは、ウナギが飼育下では決して自然に成熟することのない魚だからである。図1に示したように、日本、韓国、中国、台湾など東アジア諸国の河川や湖沼で育った天然のウナギは、成熟がわずかに始まるころに海に下り、太平洋を数千キロも南下しながら成熟し、マリアナ諸島の西の海域で産卵すると考えられている<sup>1)</sup>。しかし、黒潮より南側で親ウナギが捕えられた例はなく、受精卵や孵化したばかりのプレレプトケファルスと呼ばれる仔魚も見つかっていない。これまでに天然海域で採集されているのは孵化後約2週間以上と推定されている、全長1 cm 前後より大きい透明な柳の葉のような奇妙な形をしたレプトケファルスと呼ばれる仔魚で、レプトケファルスは黒潮に流されながら3~5か月かかって成長し、シラスウナギに変態して河口にやってくる。我々が食べている蒲焼きの99%を占める養殖ウナギは、全てこのような天然のシラスウナギを採捕して育てたものである。しかし、近年シラ

TANAKA Hideki

〒516-0193 三重県度会郡南勢町中津浜浦  
422-1

スウナギの極端な不漁が続き、価格の高騰とともに必要量の確保も困難となって養鰻経営を非常に圧迫し、ウナギ人工種苗生産に対する期待は益々高まっている。

## 2. 人為催熟、人工孵化および仔魚飼育研究の進歩

前述のようにウナギは長期間飼育していても自然に産卵することはないので、下りウナギや養殖ウナギにホルモンを注射して成熟を促し、人工受精により孵化仔魚を得る試みが、1960年代から行われてきた。そして、1973年に北海道大学で世界で初めて人工孵化に成功し、孵化後5日目までの発生が観察された<sup>2)</sup>。さらに、その後数年以内に、国内外の複数の研究機関で孵化後2週間、全長7 mm 程度のプレレプトケファルス段階までの飼育に成功したが、それ以来近年まで仔魚の飼育に関して大きな進歩はなかった。その原因としては、人工受精が可能になったとはいえその成功率は極めて低く、ごくまれにしか孵化仔魚が得られなかったことと、天然の生態が不明なために孵化仔魚の適正な餌が分からなかったことが挙げられる。

そこで我々はまず初めに孵化仔魚の安定的大量生産を目指して、様々な魚種で積み重ねられてきた基礎研究の成果を基に、ウナギの雌雄親魚の成熟誘起および人工受精技術を高

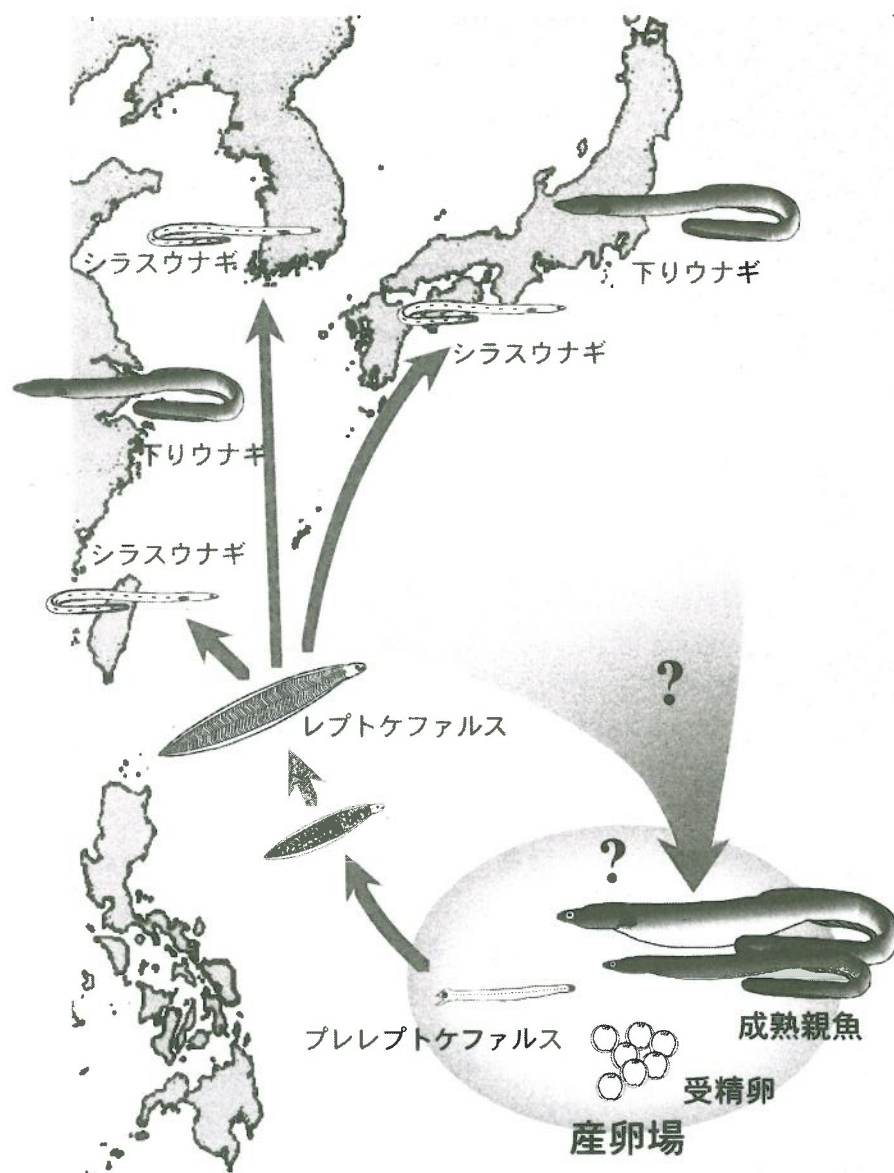


図1 ウナギの生活史

めることに取り組んだ。その結果、雌に関しては、サケ脳下垂体抽出液の反復投与に加えて、卵径が約  $850 \mu\text{m}$  に達した段階でサケ科魚類などで卵成熟誘起ホルモンと同定されている  $17,20 \beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (DHP) というステロイドを注射することによって確実に成熟・排卵を誘起できること、雄に関しては、ヒト胎盤性性腺刺激ホルモン (hCG) の反復投与によって精液の採取が可能となり、カリウムおよび重炭酸イオン濃度を調整した人工精漿で希釈して培養することによって、精子の活性を高めるとともに数

週間にわたって冷蔵保存が可能であることを明らかにした。さらに排卵後速やかに人工受精することが、高い受精率・孵化率を得るためには必須であることも示した (図2)<sup>3)</sup>。

このようにしてウナギ仔魚が安定して大量に得られるようになってから、我々は仔魚の給餌飼育研究を本格的に開始し、まず初めに海産魚の種苗生産には欠かすことの出来ない初期餌料であるワムシという動物プランクトンの給餌を試みた。数十例におよぶ給餌試験の結果、1994年、孵化後13日目の仔魚がワムシを食べているのをようやく発見した<sup>4)</sup>。そ

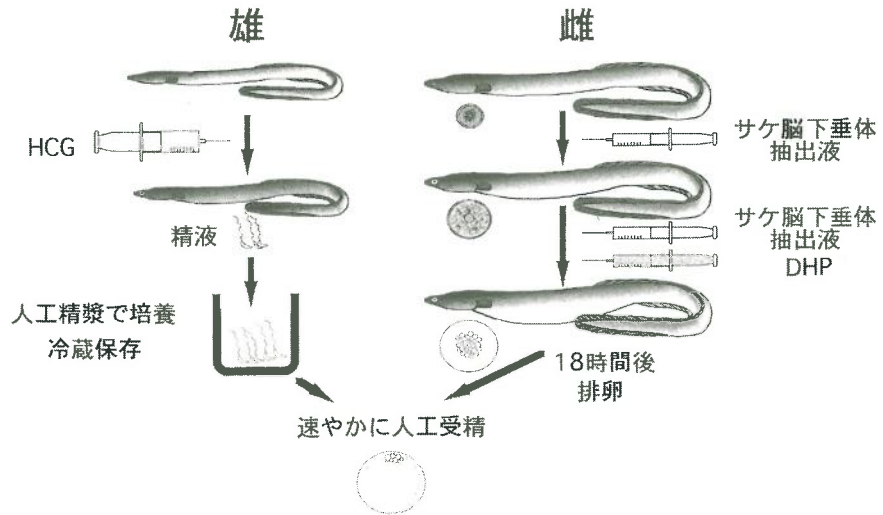


図2 ウナギの人為催熟および人工受精法

の後の研究で、ウナギ仔魚は孵化後7日目ごろに眼が機能的となり、最初腹側に開いていた口が前方を向き、膵臓が発達して消化酵素の分泌が活発となるなど、摂餌可能な発育段階に至り、餌を食べて消化吸収する能力を持つことが明らかになった。しかし、ワムシを餌とした飼育では、摂餌率、量ともに低く、卵黄吸収完了後の成長や生存期間の延長といった給餌の効果は現れなかったため、再び餌の探索をやり直さねばならなかった。

### 3. 有望な餌の発見と飼育法の開発

仔魚の餌に必要な条件としては、仔魚の口に入る大きさ、形であり、成長に必要な栄養素を含み、消化吸収され易く、仔魚が好んで食べる嗜好性を備えていること等が挙げられる。そこで、これらの条件をある程度満たし

そうな餌の候補として種々の生物餌料、仔稚魚用微粒子飼料、餌料生物用栄養強化飼料、その他の飼料素材等を選び、小さな容器の中で仔魚に与えて食べるかどうか試してみたところ、ワムシの栄養強化飼料として市販されているサメ卵粉末だけが際だって高い嗜好性を示した。このサメ卵粉末を海水と混ぜ合わせて濃厚な懸濁液とし、飼育容器の底に注入すると、仔魚は餌に頭を突っ込み短時間の内に消化管内に取り込んでいく様子が透明な体を通して観察された。この餌は栄養的には高タンパク・高脂肪で非常に有望であったが、残餌を放置すると水質の悪化を招くため、水質が悪化する前に、元気な仔魚を1尾ずつ傷つけないように細心の注意を払いながらスポイトで吸い取って新しく用意した清潔な容器に移し、また餌をやるという操作を繰り返してみた。その結果、孵化後25日目まで生存させ

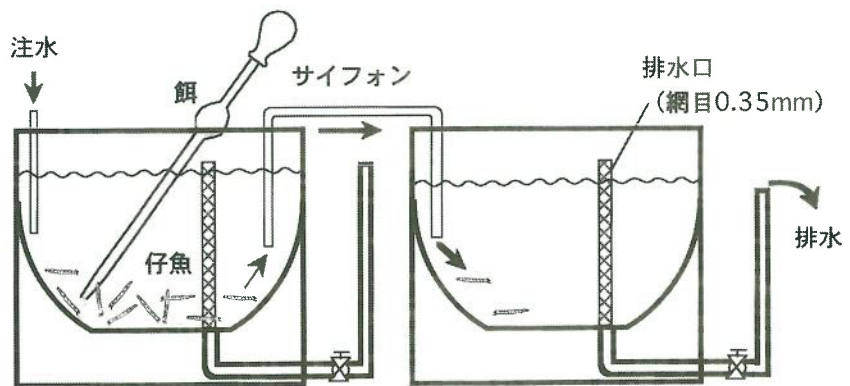


図3 ウナギ仔魚の飼育装置と飼育法



ることに成功、最大のもの全長8.3mmに達し、世界で初めて孵化仔魚の給餌による成長が確認された。

しかしこの方法では多数の仔魚を長期間飼育することは困難なので、次にこの餌を用いた効率的な飼育法を考案した(図3)。底を平らにした容量約5ℓの亚克力製の半球状水槽を用い、摂餌可能な発育段階に達した仔魚を500~1,000尾収容し、給餌前に注水を停止し飼育室を明るくすると仔魚は水槽の底に集まるので、そこに駒込ピペットを用いてサメ卵粉末の懸濁液を注入することにより効率的な給餌が可能となった。約2時間放置した後注水を再開し、底に沈殿している残餌を水流で洗い流し、約1時間注水を続けると白濁していた飼育水はほぼ澄んでくるので再び注水を止め給餌を行った。この様な操作を繰り返しても、次第に水槽の底や壁面が汚れてくるので、1日に4回給餌を行い、最後の洗い流しが終わった時点で、各飼育水槽の隣に新たに清潔な水槽を用意し、コの字型のパイプで両水槽を接続して、給餌を行っていた水槽の水位を少し高めると、残餌や糞、死骸は旧水槽に留まり、遊泳力のある元気な仔魚だけが

サイフォンを通して翌朝までに自動的に新しい水槽に移った。この操作によって、毎日、清潔な水槽で給餌飼育を継続することができた。

#### 4. レプトケファルス幼生までの飼育

上記の飼育法によりウナギ人工孵化仔魚は明らかに成長を示したが、孵化後20日目を過ぎた頃から餌は食べるものの成長が鈍り、生残率も急激に低下して、孵化後約1カ月、全長10mm程度までの飼育が限界であった。その原因として、サメ卵粉末のみでは栄養的に不十分であることが懸念されたので、餌の改良を中心に飼育技術の改善に取り組んだ。嗜好性の高いサメ卵粉末をベースとし、消化機能の十分発達していないプレレプトケファルスに効果的に栄養を吸収させるために、タンパク質を低分子にまで分解したオリゴペプチドを添加するとともにビタミン・ミネラルを強化し、これらの材料をオキアミ抽出液に懸濁させた。また、飼育水温をこれまでよりやや下げて21.5℃前後とし、4回だった給餌回数を5回とした。その結果、従来は成長が停滞した孵化後20日目以降も順調な成長が続

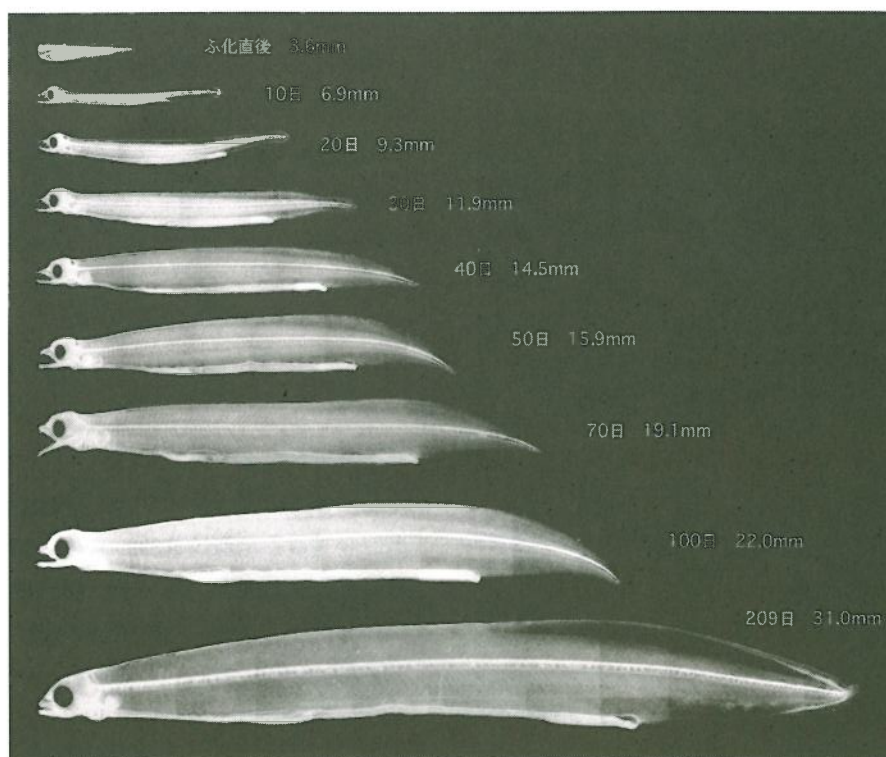


写真1 ウナギ人工孵化仔魚の給餌による成長

き、30日で平均全長は10mm、50日で15mmを越え、100日目には20mm以上となった。また、孵化後30日、全長10mmを越える頃から体が柳の葉のように平たくなり始め、最終的には天然海域から得られているような透明で神秘的なレプトケファルス幼生に成長し、大きいものは全長30mm以上に達した(写真1)。

## 5. おわりに

レプトケファルス幼生までの人工飼育に成功したことは、ウナギ人工種苗生産研究において画期的な成果であり、シラスウナギ以降の飼育技術は確立されているので、ウナギの完全養殖の実現までに残された課題はレプトケファルスをシラスに変態させることのみとなった。しかし、天然のレプトケファルスは孵化後3～5カ月で6cm前後まで育ち、その後2～3週間でシラスウナギに変態すると考

えられているので、今回人工的に得られたレプトケファルスは天然に比べて成長が遅く、まだまだシラスウナギへの道は険しい。

今年はずっとシラスウナギが豊漁で、養鰻業界は一息ついているところであろう。しかし、来年以降も豊漁が続くという保証はなく、将来も安心して蒲焼きを食べられるようにするためには、天然のシラスウナギ資源の保護に努めるとともに、レプトケファルスの飼育技術を一層高め、シラスウナギの人工生産を一日も早く実現することが必要である。

## 文献

- 1) Tsukamoto, K. (1992) Nature 356:789-791
- 2) Yamamoto, K. and Yamauchi, K. (1974) Nature 251:220-222
- 3) Ohta, H. et al. (1997) Fish Physiol. Biochem. 17: 163-169
- 4) Tanaka, H. et al. (1995) Fisheries Sci.61:171-172

## ◀国内情報▶

# テンサイの雄性不稔性をひき起こす ミトコンドリア遺伝子の発現機構

北海道大学農学部

三上 哲夫

作物のハイブリッド育種において利用価値の高い細胞質雄性不稔性はミトコンドリア突然変異に起因する。雄性不稔性の原因遺伝子の構造は、植物種間で、また同一種でも変異株によって異なっている。由来の違う2種のテンサイ細胞質雄性不稔株から、原因遺伝子と考えられるミトコンドリア遺伝子をそれぞれ単離し、構造と発現を調べた。

## 1. はじめに

花粉は種子植物の雄性配偶体である。花粉のできない変異を雄性不稔といい、細胞質遺伝を示すものを特に細胞質雄性不稔と呼ぶ。テンサイにおいては、葯の発育初期には細胞質雄性不稔株と正常株間で葯の内部形態に差異は認められない。ところが、減数分裂を経て第一花粉分裂が始まる頃に雄性不稔株の葯壁(タペート細胞)は形態異常を呈し(図1)、花粉退化がもたらされる。雄性不稔性はミトコンドリア遺伝子突然変異に起因するが、この変異が栄養器官や雌性器官の発育には何の影響も及ぼさず、葯組織の特定の細胞にのみ異常を引き起こすメカニズムは明らかでない。われわれはメカニズム解明の第一段階として、雄性不稔ミトコンドリア遺伝子の同定を試みた。

## 2. ミトコンドリアゲノム

トウモロコシやペチュニア等では雄性不稔関与の可能性の高いミトコンドリア遺伝子が単離されている<sup>1)</sup>。これらの遺伝子は互いに塩基配列が全く異なるので、相同性をもとに他の植物の雄性不稔遺伝子をクローン化するのには不可能である。しかし、雄性不稔遺伝子は、(1) ミトコンドリアゲノムの構造変異域に位

MIKAMI Tetsuo

〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

置し、(2) 雄性不稔株固有の転写産物を生ずることが知られており、また(3) しばしば正常株には存在しない読取り枠(ORF)として同定され、(4) 稔性回復に働く核遺伝子(*Rf*)によって転写や翻訳レベルでの発現が変化するという共通の特徴を示す<sup>2)</sup>。

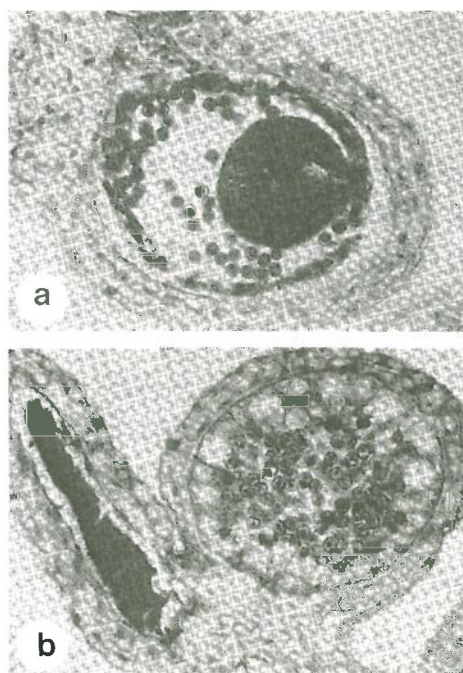


図1 テンサイ細胞質雄性不稔株にみられる花粉退化

1 細胞期花粉ができ上がった頃にタペート細胞の異常肥大(a)や高度の液胞化(b)が起こり、やがて花粉が退化する。

このような特徴を備えるテンサイ遺伝子をクローン化する目的で、先ず正常・雄性不稔両株のミトコンドリアゲノム物理地図を作り比較することにした。ラムダファージを用いて、テンサイミトコンドリアDNAのオーバー

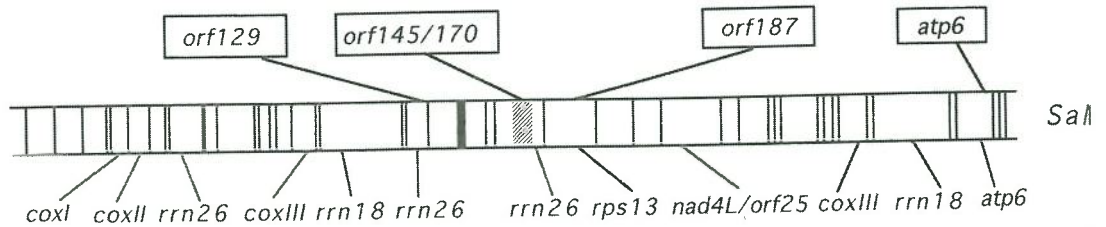


図2 テンサイ細胞質雄性不稔株 I-12CMS(3) のミトコンドリアゲノム構造変異域に見出された遺伝子 (枠で囲む) 縦線は Sal I サイトを、斜線は I-12CMS(2) ミトコンドリアゲノムで欠失している領域をそれぞれ示す。

ラッピングライブラリーを構築した上で、ゲノムウォーキングを進めた。その結果、正常株については369kbから成る環状マスター染色体地図ができ上がった<sup>2)</sup>。

### 3. 野生ビート由来の細胞質雄性不稔

テンサイは小型の両性花をつけるので、交配時に一々ピンセットを使って母株の雄しべを取り除くのは手間が掛かり現実的でない。そのため、現在世界的に普及しているテンサイのハイブリッド品種は、全て細胞質雄性不稔を利用して作られたものである。一口に細胞質雄性不稔といっても起源の異なる多様な不稔株が存在する<sup>3)</sup>。われわれはパキスタン原産の野生ビートに由来する細胞質雄性不稔株 [I-12CMS(3)] を使って、ゲノムウォーキング法によりミトコンドリアゲノム物理地図を作り、正常株の物理地図と比較した。その結果、I-12CMS(3) ゲノムにおける構造変異域が11箇所にはぼることが明らかとなった。

次にこれら変異域の塩基配列と発現を解析

し、I-12CMS(3) ゲノムに固有の転写パターンを示す5種の遺伝子 *orf129*, *orf145*, *orf170*, *orf187*, *atp6* を特定した (図2)。*orf145*, *orf170*, *orf187* の3遺伝子はミトコンドリア内でmRNAに転写されるものの、タンパク質には翻訳されていないようである。また正常株と I-12CMS(3) 株間にみられる *atp6* (ATP合成酵素サブユニット6) の転写パターンの差異は転写調節に関わる5'上流配列の相違に起因する。しかし、*atp6* の翻訳産物のサイズと蓄積量に関しては、正常株と I-12CMS(3) 株との間で違いが認められない<sup>4)</sup>。従って、以上の4遺伝子が I-12CMS(3) の不稔性に関与している可能性は極めて低い。

### 4. *orf129*

*orf129* は、*coxII* (シトクロム酸化酵素サブユニット2) 遺伝子の5'隣接域とそれに続くコード域5'端 (4 bp) ならびに由来不明の383bp配列が融合したキメラ遺伝子である (図3)。*orf129* はもとより、この由来不明の

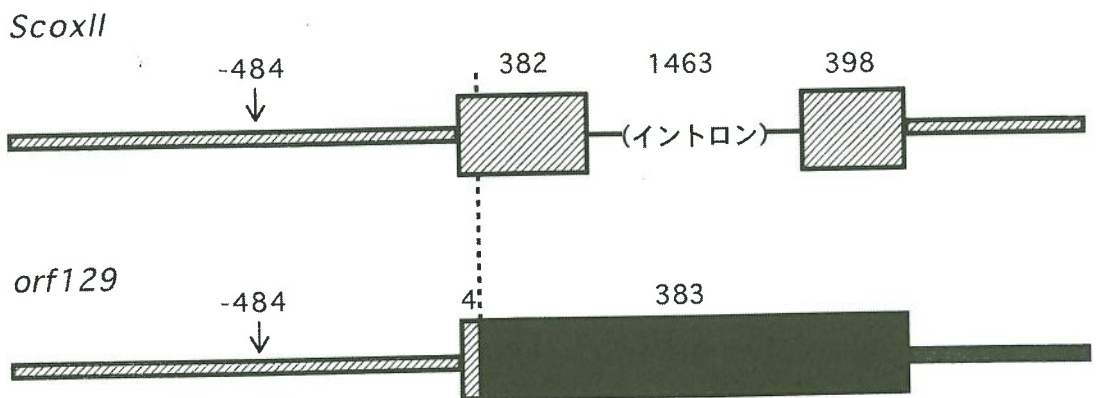


図3 *orf129* の構造 *orf129* と *coxII* の共有配列を斜線で示す。矢印は *orf129* および *coxII* 転写物の5'端。数字は塩基対を示す。

配列も正常株ミトコンドリアゲノムには見当たらない。抗 ORF129 抗体を用いたウエスタンブロット分析によれば, *orf129* は I -12CMS (3) 株の葯組織や葉, 肥大根で翻訳されている。

葉や肥大根より単離したミトコンドリアを用いて *in organello* 翻訳産物を得, SDS-PAGE で分画後オートラジオグラフィを行った。その結果, I -12CMS(3) 株を特徴づける唯一の翻訳産物として 10kDa タンパク質が検出された。抗 ORF129 抗体を使って, *in organello* 翻訳産物に対する免疫沈降を試みたところ, 予想通り 10kDa タンパク質は *orf129* の産物に間違いなく, *orf129* が I -12CMS(3) の不稔遺伝子である可能性が高まった。ただ, トウモロコシやペチュニアの雄性不稔ミトコンドリア遺伝子 (T-*urf13* や S-*pcf*) の場合とは異なり, *orf129* の転写や翻訳は *Rf* 遺伝子の制御を直接受けることはない。

この点で注目すべきデータがトルコ産野生ビートに由来する I -12CMS (2) 株の解析を通じて得られた。I -12CMS(2) 株のミトコンドリアゲノムの構造は I -12CMS (3) のゲノム構造と酷似する。両ゲノム間に生じた構造差は 1 箇所に限られ, I -12CMS(3) ゲノムに固有の *orf145/orf170* 連鎖域が I -12CMS (2) ゲノムから失われているに過ぎない (図 2)。*orf129* は I -12CMS(2) にも含まれている。しかも *orf129* の翻訳産物の蓄積量 (花蕾) は I -12CMS (2) の方が I -12CMS (3) よりも 5 倍程度多いことが判った。検定交配によれば, 興味深いことに I -12CMS (3) に作用して完全な稔性回復をもたらす *Rf* 遺伝子は I -12CMS (2) に対しても共通に働くものの, その稔性回復作用は不完全である。この稔性回復パターンの差は I -12CMS(2), I -12CMS(3) 両株に共通の雄性不稔ミトコンドリア遺伝子 *orf129* の発現量の差異に起因すると考えると矛盾なく説明できる。

## 5. Owen 細胞質雄性不稔

現在, テンサイ育種に使われている細胞質

雄性不稔は, いずれも米国の育種家 Owen が半世紀以前に品種 US 1 から発見した変異株 (Owen 株) に由来する。Owen 株には *orf129* 遺伝子が存在しないので, Owen 細胞質雄性不稔の発現メカニズムは I -12CMS (3) の場合とは異なるに違いない, われわれは最近, Owen 株のミトコンドリアゲノム物理地図を完成した<sup>5)</sup>。正常株のミトコンドリアゲノム物理地図との比較を通じて, 両ゲノム間では塩基置換は殆ど認められないが, 代わりに塩基配列の配置換え (再編成) がゲノム全域に亘って生じていることを見出した。

転写パターンに影響を及ぼしている再編成サイトを 5 箇所特定したが, その内 4 箇所より見出された 5 遺伝子 (*coxI*, *coxII*, *atpA*, *rps3*, *orf324*) については不稔性との関連はないようである。残り 1 箇所には *atp6* 遺伝子がコードされている。Owen 株の *atp6* は進化的保存性の高い, いわゆるコア配列とその上流の 387 コドン分のプレ配列が結合した, 650 コドンの ORF として同定された。このプレ配列は正常株の *atp6* 座やそれ以外の領域には見つからず, Owen 株固有の配列とみてよい<sup>4)</sup>。

ウエスタンブロット分析によれば, 先ずプレ配列を含む前駆体タンパク質が翻訳され, その後プロセシングを受けてコア配列にほぼ相当する ATP 6 タンパク質ができるようである。成熟 ATP 6 のサイズと蓄積量は正常株, Owen 細胞質雄性不稔株間で差異がない。一方不思議なことに, プレ配列の翻訳産物は分解されずにミトコンドリア中に蓄積しており, これと雄性不稔性との関連が注目される。

## 6. 細胞質雄性不稔性の機構

花粉母細胞の減数分裂が進行してゆく際に, 母細胞を取り囲むタペート細胞のミトコンドリアの分裂が急速に活発化する。花粉の発育はミトコンドリアの呼吸能に大きく依存しているに違いない。*orf129* や *atp6* プレ配列の産物の機能は明らかでないが, 呼吸能に高度に依存する花粉発育過程においてのみ, 産物の効果が表現型 (花粉不稔) として現れるとい

うのが真相なのかも知れない。

テンサイの正常株では、四分子期を経て一細胞期花粉ができ上がる頃に、タペート細胞が一斉に崩壊する。恐らく正確にプログラムされた細胞死が起こることによって、タペート細胞中に蓄えられていた物質が放出され、若い花粉の細胞壁の素材やエネルギー給源として使われるのであろう。これに対して、Owen細胞質雄性不稔株のタペート細胞においてはミトコンドリアが十分に発達せず、減数分裂終了後タペート組織の異常肥大が起こる(図1)。そのためタペート細胞の崩壊のタイミングが遅れて、花粉の発育も止まってしまう。ミトコンドリア遺伝子変異とタペート細胞異常との因果関係の解明が急務である。

一方、*Rf*遺伝子はどのような機構を介して稔性回復をもたらすのであろうか？*Rf*の分子的な特徴づけはトウモロコシのTexas型細胞質雄性不稔に働く*Rf2*を除いて行われていない<sup>1)</sup>。

テンサイのOwen細胞質雄性不稔においては花粉稔性の回復に2個の補足遺伝子が作用を現す。われわれは最近、AFLP解析を通じて補足遺伝子の一方と共分離する複数のマーカーを得た。テンサイBACライブラリーの構築にも着手しており、*Rf*遺伝子のポジショナルクローニングを目指している。

本研究の遂行に当たり、農林水産省バイオテクノロジー先端技術シーズ培養研究の助成を受けた。

#### 文献

- 1) 三上哲夫：雄性不稔，山田康之編 植物分子生物学 朝倉書店，135-144 (1997)
- 2) Kubo T. et al.: Curr. Genet 28: 235-241 (1995)
- 3) Mikami T. et al.: Theor. Appl. Genet. 71: 166-171 (1985)
- 4) Onodera Y. et al.: J. Plant Physiol. (in press)
- 5) Kubo T. et al.: Mol. Gen. Genet. (in press)

### 生研機構からのご案内

## UR 対策研究開発・成果発表会

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、札幌、長岡、高知、熊本、宮崎での説明会には多数のご参加を得ました。

これから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 :03-3459-6565/Fax :03-3459-6577,

電子メール : maruken@tokyo.brain.go.jp)

9月29日(水) 13:00~	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7日(木) 13:00~	岩手・盛岡市 サンセール盛岡	大区画水田の新技術
10月27日(水) 13:00~	千葉・千葉市 ヴェルシオーネ若潮	施設園芸・環境保全型栽培技術
11月10日(水) 13:00~	愛知・豊橋市 ホテル白豊	施設園芸・環境保全型栽培技術

◀地域の先端研究▶

## りんごの培養シュートへの放射線照射による 斑点落葉病抵抗性品種の選抜

青森県グリーンバイオセンター

齋藤 彰

りんご斑点落葉病はわが国のりんごの主要病害で、その防除には年間約10回もの殺菌剤が散布されている現状である。これらの散布回数低減によるりんご栽培の省力化を進めるためにも、抵抗性品種の早期育成が望まれている。そこで、本病にり病性の品種の培養シュートに放射線を照射し、突然変異を誘起して抵抗性の系統を選抜する事を試みた。その結果、本病の病原毒素ならびに病原菌接種による抵抗性検定で、非常に抵抗性に変異したと思われる系統が品種‘北斗’、‘ふじ’、‘王林’において選抜できた。これらの選抜系統は現在、いずれも葉の大きさや枝の節間がつまるなどの劣悪形質を伴う変異は認められていない。今後は、さらに特性調査を進め、その普及性が明らかになった時点で品種登録を進めていくこととしている。

### 1. はじめに

りんご斑点落葉病の病原菌は主に葉や果実に感染し、発病すると葉では褐色の円形病斑あるいは流れ型（不整形）病斑として現われ、多発すると落葉して収量低下につながる重要な病害である。その防除は薬剤散布によっており、多大な労力を要しているが、りんご主要栽培品種間には本病に対する抵抗性に品種間差が認められる。けれども、りんご品種のほとんどは高度に自家不和合性であるために圃場においては多数の品種が混植されており、防除をり病性の品種に適應するため防除回数が多くなっている現状である。

近年、果樹の育種において日本ナシ品種‘二十世紀’の黒斑病抵抗性新品種‘ゴールド二十世紀’にみられるような放射線照射による突然変異を利用した育種が注目を浴びてきている<sup>1)</sup>。この方法では従来の形質を変えることなく病害抵抗性や着色性などの特定形質を改良することができ、そのうえ、育種年月の短縮ができるなど利点が多い。りんごにおいても、品種‘印度’で斑点落葉病抵抗性変異体が得られており、この選抜系統は‘印度’原

SAITO Akira

〒030-0142 青森市大字野木宇山口221-10

系統に比較して10,000倍以上の抵抗性を示すことが報告されている<sup>2)</sup>。

また、‘ゴールド二十世紀’は黒斑病に対して中間的な抵抗性を示すが、その要因として‘ゴールド二十世紀’では生長円錐のL-2層が抵抗性に変異し、L-1層は原品種‘二十世紀’のり病性である周縁キメラであろうと考えられている。果樹では従来、これらのキメラを解消して変異体を遺伝的に安定させるのに切り戻しという技術が用いられているが、長い年月を要する。このキメラの解消を図るためと、より変異幅を拡大するために、組織培養と放射線照射を組み合わせた試みがなされている。

そこで、我々は斑点落葉病に対し、り病性の4品種‘北斗’、‘青り10号’、‘ふじ’、‘王林’の培養シュートにX線あるいはγ線などの放射線を照射して、従来の形質はそのまま抵抗性に変異した個体を作成するための基礎試験を行った。

### 2. 斑点落葉病抵抗性変異体の選抜

1) 放射線の照射線量ならびに線量率の違いが、照射後の培養シュートの生存率に及ぼす影響：

本研究を進める上で、抵抗性個体選抜に有

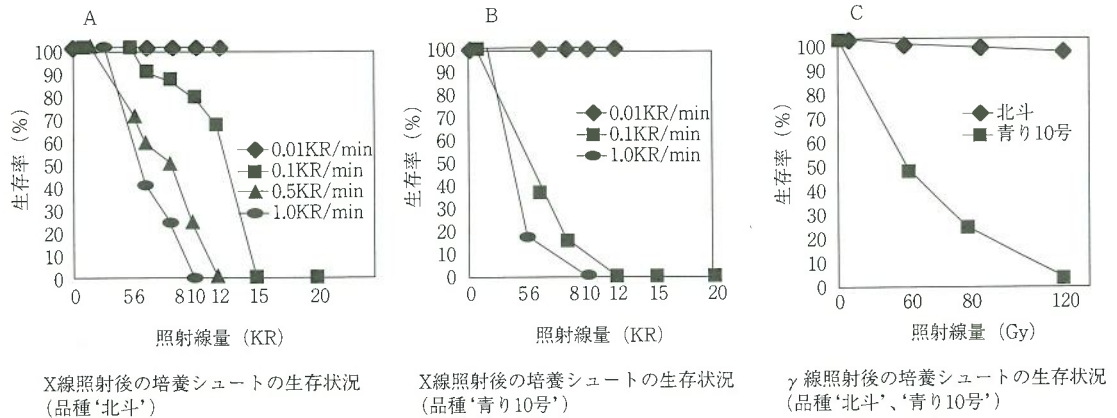


図1 A-C X線および $\gamma$ 線照射後の培養シュートの生存状況

効な放射線照射の線量率，線量ならびに照射後の材料の損傷程度を把握する必要がある。り病性品種‘北斗’，‘王林’，‘青り10号’，‘ふじ’の培養シュート（継代培養後30日）の頂芽を約5 mmの大きさに切り取り，9 cmシャーレに20mlずつ分注したシュート増殖用培地に1シャーレ10個体ずつ植え付け，1試験区10シャーレ供試した。これらのシャーレを軟X線照射装置にいて線量率，線量を変えてX線照射した。

$\gamma$ 線の照射は上記のシャーレを放射線育種場に送り，そのガンマルームで60，80，120Gyの線量（線量率5 Gy/h）で依頼照射した（1996年10月21日，1997年6月18日照射）。照射後，シャーレを25℃，16時間照明の培養室で培養し，30日後に，放射線照射による損傷程度を把握するためシュートの生存率ならびに形態変化の有無を調査した。

その結果，照射線量ならびに線量率により，生存個体数に差が認められ，どちらも高くなるにつれて生存率は低下し，生存個体のなかには異常形態を示すものも認められた。また，同じ線量でも品種間に生存率の差が認められ，放射線に対する感受性には品種間差があるものと思われた（図1参照）。

## 2) 放射線照射個体の病原毒素による1次，2次選抜：

放射線照射後に生存した個体は培養中にシャーレの中でシュートが伸長，増殖してくるが，これらのシュートを小さく切り分けて，200mlの培養フラスコに50mlずつ分注した

シュート増殖培地に1フラスコ当たり10個体ずつ移植して培養した。この，シュートを小さく切り分けて新しい培地に植え付ける（継代培養）の操作を3回繰り返す，個体の増殖およびキメラの解消を図った。つまり，培養瓶の中で切り戻しを繰り返して，変異組織あるいは細胞層を遺伝的に安定させるための操作を行ったことになる。

3回目の継代培養後に増殖したシュートのうち，約2 cmに伸長したシュートを切り取って発根培地に移植し，発根させた。これらの発根個体を，順化，鉢上げして養成した苗木（長さ，約15cm）を用い，本病の宿主特異的毒素AM-toxin Iによる抵抗性検定を行った。抵抗性検定はこれらの苗木の展開葉の上から第3葉目を採取し，直径8mmのコルクボーラーで打抜き，リーフディスクを1葉片調製した。それを毒素希釈液濃度10  $\mu$  Mに調製した液を分注したタイタープレートに浸せきし，28℃の暗黒条件下で2日静置し，葉片の褐変が認められず緑色を保っている個体を1次選抜した。

これらの病原毒素は葉肉細胞の原形質と葉緑体に障害を与えることが認められている。また，病原毒素AM-toxinを用いた判定法は接種時に接種源濃度の調整が容易で斉一にできることから，抵抗性個体の初期選抜の手法としてはかなり有効である（図2参照）。

次に，これらの抵抗性変異個体として1次選抜した個体を温室で更に育成して，伸長させた苗木（長さ約30cm）から第3葉目を採取し，



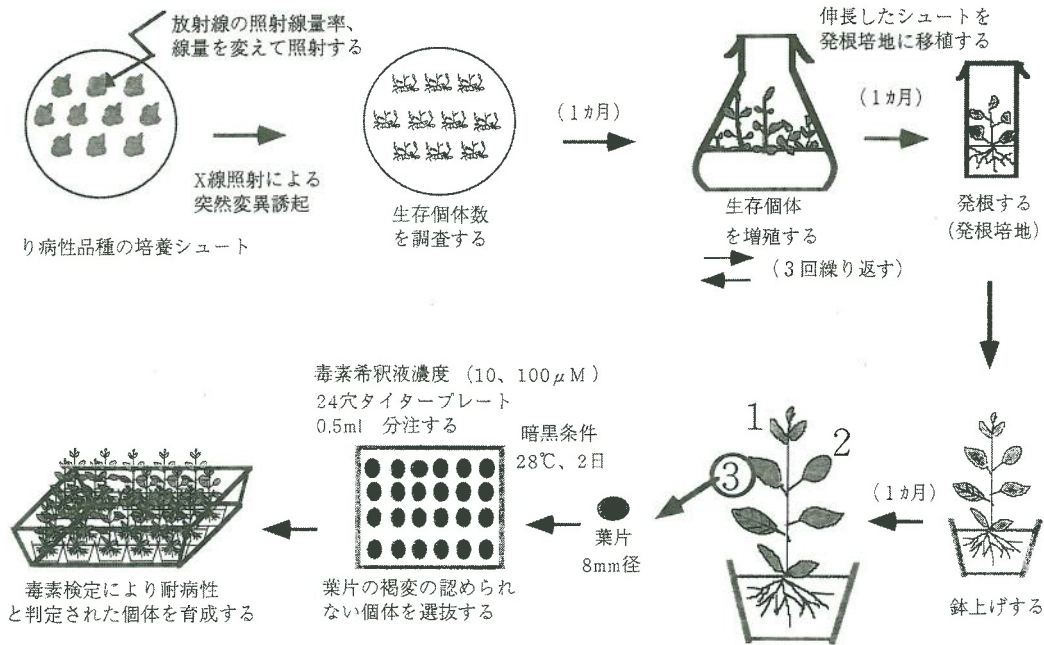


図2 放射線照射生存個体の病原毒素希釈液による抵抗性検定法模式図

表1 放射線照射条件と供試苗木の病原毒素による抵抗性個体選抜状況

供試品種	線源	線量率	線量	供試個体数	一次選抜* 個体数	二次選抜** 個体数
北斗	X線	0.01 KR/min	6	263	1	0
			8	223	3	0
			12K R	232	5	0
	γ線	0.1 KR/min	1, 2, 4	162	0	0
			6	276	4	0
			8	312	5	1
10K R	303	8	4			
ふじ	X線	0.01 KR/min	60	181	3	0
			80	168	5	0
			120Gy	203	4	0
王林	X線	0.1 KR/min	6	99	2	0
			8	111	1	0
			10K R	102	2	0
青り10号	X線	0.01 KR/min	6	280	22	6
			8	497	53	12
			10K R	529	44	19
青り10号	X線	0.1 KR/min	60	116	5	1
			80	352	28	12
			120Gy	441	39	20
青り10号	X線	0.01 KR/min	6	189	12	1
			8	185	24	18
			10K R	156	14	11
青り10号	X線	0.01 KR/min	6	123	0	0
			8	125	0	0
			10K R	98	0	0

\* 採集した葉から調整した葉片を毒素希釈液の濃度10 μ M液に浸せきして、葉片が褐変しないものを選抜した。

\*\* 一次選抜個体を温室で育成後、採取した葉から調整した葉片を毒素希釈液の濃度100 μ M液に浸せきして、葉片が褐変しない個体を選抜した。

それを1次選抜に用いた手法により、2次選抜を行った。なお、毒素希釈液の濃度は1次選抜の濃度より高濃度の100 μ Mで用いた。その結果、3品種‘ふじ’、‘北斗’、‘王林’では病原毒素による抵抗性判定で1次、2次選抜

個体が得られたが、‘青り10号’では選抜個体が全く得られなかった(表1参照)。

3) 2次選抜した個体の病原菌胞子懸濁液接種による耐病性判定:

本病原菌の胞子懸濁液(胞子濃度 $3.3 \times 10^4$ )

個/ml)を品種‘北斗’，‘ふじ’，‘王林’の二次選抜した個体および本病に対する抵抗性の異なる数品種の苗木(長さ40~50cm)の葉に噴霧接種し，温度25℃，湿度80%以上の接種箱で2日間保持した。その後，苗木は温室に移して生育させ，接種7日後に苗木の先端部から上位10葉について，発病の有無ならびに病斑数を一葉ごとに調査した。その結果，これら3品種の選抜個体の多くは病原菌接種による抵抗性判定で，原品種よりも明らかに抵抗性であった。なかには，強度に抵抗性に変異したと思われる個体も得られており，有望系統として選抜した(表2，図3写真:参照)。

### 3. 選抜系統の特徴とその選抜条件に関する考察

りんごではまだ，‘印度’以外の品種での抵

抗性個体選抜の報告例は認められていないが，本研究では供試した4品種‘北斗’，‘ふじ’，‘王林’，‘青り10号’のうち‘北斗’，‘ふじ’，‘王林’の3品種で抵抗性個体を選抜することができた。これらの選抜系統の抵抗性は高度抵抗性の品種‘紅玉’，‘ジョナゴールド’と同等かそれ以上で，なかには非常に高度な抵抗性をもつと考えられている‘さんさ’と同等と判定される系統も得られている<sup>3)</sup>。

また，リンゴや日本ナシの放射線照射による抵抗性育種における成功例の変異源としては従来，γ線を用いるものがほとんどであった。我々の実験ではX線およびγ線照射両試験区において抵抗性変異個体が得られていることから，突然変異の照射変異源として報告の多いγ線のほかに，X線も有効であること

表2 毒素選抜個体と抵抗性程度の異なる品種の病原菌接種による発病状況と抵抗性系統の選抜状況

品種および毒素選抜系統	斑点落葉病に対する感受性	毒素選抜個体数	供試個体数	発病葉率(%)*	発病度**	選抜系統数***
北斗(無照射)	高度感受性	—	5	90~100	38.9	—
北斗(選抜系統)	—	5	4	10~40	1.7~15	4
王林(無照射)	高度感受性	—	2	70~80	48.3~50.0	—
王林(選抜系統)	—	39	18	0~80	1.7~28.3	12
ふじ(無照射)	中度感受性	—	5	50~60	15.0~23.3	—
ふじ(選抜系統)	—	70	38	0~40	0.0~17.7	33
ジョナゴールド	—	—	4	0~30	0.0~6.0	—
紅玉	抵抗性	—	3	0~10	0.0~1.7	—
さんさ	—	—	3	0	0	—

\* 病原菌接種後の発病状況で供試個体間で認められた発病葉率の範囲。

\*\* 病原菌接種後の発病状況で供試個体間で認められた発病度の範囲，発病度は以下の算出式で求めた。

$$\text{発病度} = \frac{\sum(G \times n)}{N \times 6} \times 100$$

n: 指数(G)に該当する葉数  
N: 調査葉数

一葉当り病斑数	0	1~5	6~10	11~30	31~50	51以上	落葉
指数(G)	0	1	2	3	4	5	6

\*\* 北斗，王林については発病葉率40%以下，発病度15.0以下で選抜した。

ふじは発病葉率40%以下，発病度10.0以下で選抜した。



図3 病原菌胞子懸濁液接種後の発病状況(左:原品種‘ふじ’、右‘ふじ’の抵抗性変異系統)

が示唆された。

一般に、放射線の急照射による突然変異体の出現頻度は緩照射に比較して多くなり、その突然変異出現率は $10^{-3}$ ~ $10^{-4}$ のオーダーといわれているのに対して、今回の実験による変異体出現率ははるかに高い。この理由としては照射条件、線源、品種や材料の違いなど色々考えられるが、りんごは自然界においても枝変わりなどの突然変異が起こりやすいなど、内在性の変異源を有しているといわれている。

これらが、トランスポゾンによるものなのかどうかは定かでないが、今回の実験の様に培養中のシュートを用いて、これを小さく切り分けて放射線を照射する処理を加えることにより、トランスポゾンが動きやすくなり、変異体が多く得られたのではないかということも考えられる。

また、照射線量率については高線量率での処理は染色体異常の出現により、劣悪形質を伴うことが多いといわれている。我々の実験も高線量率での処理であるが、得られた選抜系統は現在、いずれも葉の大きさや枝の節間がつまるなどの劣悪形質を伴う変異は認められていない。同時に、我々の研究グループでは斑点落葉病のり病性に連鎖している DNA マーカーの設定に成功しているが、設定した

DNA マーカーは放射線照射する以前の原品種では認められたが、抵抗性変異系統ではいずれも欠失していた(データ省略)。

#### 4. おわりに

今後は、本研究で得られた抵抗性変異系統の特性調査を進めていき、品種としての有望性を明らかにしていく。さらに、これらの変異体を多く扱うことにより、抵抗性の組織化学的なメカニズムの解明や抵抗性の後代への遺伝的様式について検討していく予定である。

#### 謝辞

本研究を遂行するに当たり、病原毒素 AM-toxin I を提供いただいた弘前大学農学生命科学科の奥野智且教授、貴重な御助言をいただいた鳥取県園芸試験場の田平弘基氏、 $\gamma$ 線の照射にご協力いただいた農水省生物資源研究所、放射線育種場の方々に厚く感謝する。

#### 文献

- 1) Sanada, T., T. Nishida, and F. Ikeda. (1988) J. Japan. Soc. Hort. Sci. 57: 159-166.
- 2) 田平弘基ら (1997) 育種学雑誌, 47 (別2): 331
- 3) 斎藤彰ら, 投稿準備中

◀地域の先端研究▶

## 梅優良系統の大量増殖

JA 和歌山県農 植物バイオセンター

平田 行正

従来、ウメは実生、接ぎ木によって増殖されてきた。JA和歌山県農では、組織培養によるメリクロン苗生産に成功した。また、挿し木による増殖技術を確立し、この技術で作成した苗は旺盛な生育を示すことも確認した。数万本単位での大量増殖も可能であり、実用化が進んでいる。今後、産地に密着した優良台木系統の選抜・育種も併せて進めていく予定である。

### 1. はじめに

ウメは古くよりその花が愛でられ、果実は日本人固有の保存食品として親しまれてきた。近年の健康志向に伴い、消費の拡大している加工用果実である。しかし、その品種育成や栽培技術などの研究面ではまだまだ発展途上にある作物である。日本の各産地において選抜された優良な系統は、経験的に良く育つといわれる実生の台木に接ぎ木され、苗となる。植物の下半身である地下部の本格的な選抜は行われていない。また、接ぎ木を繰り返して維持されている優良系統、品種においてもウイルスなどの病気の検定などは行われていない。これは、優良なウメ台木の増殖技術やウイルスの検査技術、ウイルスを取り除くフリー化技術などが確立されていないことも一因である。日本一の生産量を誇る紀州・和歌山県においても、さまざまな問題を抱えている。台木に問題があるとされる低収量樹、ウイルスの複合感染といわれる茶ガス症、原因不明の衰弱症などである。これらの問題に取り組み・解決を図るための有効な道具として、優良系統の選抜、無病化を行うメリクロン技術、そして低コストの苗を生産するための挿し芽増殖技術の開発に取り組んできた経過を紹介する。

HIRATA Yukimasa

〒649-6112 和歌山県那賀郡桃山町調月396-1

### 2. ウメの組織培養

ウメの組織培養に関してはいくつかの報告があるが、成長点培養（メリクロン）については報告がない。材料として南高ウメの地元南部高校で選抜された優良系統“南高2号”を用い、実際に成長点培養を行ってみると、ウイルスなどを除去できるとされている直径0.3mmの大きさの成長点を植え付けた場合、その全てが褐変し枯死した。ウメの体内から出る褐変物質が原因と思われた。そこで、材料を若返らせること、褐変物質の影響から逃れることの2点に要点を絞り、再度、試験を行った。まず、長さ1cmの節部を殺菌して培地に植え付け、試験管苗を作成した。試験管苗は節から出てくる芽を切り分けて増殖を行いながら2週間おきに移植を行い、植物体の活性化および若返りを促した。成長の盛んな時期を見計らい、先端部の分裂組織（成長点）を直径0.3mmに切り取り、BA（ベンジルアミノ



図1 組織培養により増殖中のウメ‘南高’

プリン)を $3\mu\text{M}$ 含む修正MS培地に植え付けた。この成長点を1週間ごとに移植を繰り返した結果、2カ月後には、供試した50個体のうち3個体のみが苗条に成長した。これらは2週間おきに移植することによって容易に増殖をすることができるが、移植間隔が2週間以上に広がると急激に褐変し枯れてくるやっかいな面も持ち合わせている。

### 3. ウイルス検定

ウイルスフリー化処理を行ったものは検定を行う必要がある。ウメには「茶ガス症(ウメ葉縁えそ病)」と呼ばれる病気があり、接ぎ木で伝染することが確認されている。この病気はキュウリモザイクウイルスとプルヌスネクロテックリングスポットウイルスの複合感染であると報告されている。しかし、この病気が発症した場合でもウメの樹体内のウイルス濃度は低く、エライザ検定などの血清学的手法では難しい。私たちはキク類のウイロイド病の検定用に開発した遺伝子診断法(シーケンスキャプチャーRT-PCR法)をウイルスにも適用し、成功している。この手法では、植物体内にある阻害物質の影響を逃れて、なおかつ低濃度のウイルスも濃縮してからRT-PCR法を実施できるため検定感度が非常に高くなる。ウメへの応用を進めている段階である。

### 4. ウメの挿し木技術

ウメの場合は、メリクロンの他にも、挿し木増殖の際、発根が悪いという問題がある。そのため、ウメの栄養繁殖は実用化された例は見あたらないが、現場では耐病性や安定結果のため、均一な形質を持つ優良台木が求められている。現場では、取り木増殖による優良系統の増殖も実用化されているが、取り木増殖では大量に増殖することは無理がある。そこで、優良台木および優良系統の自根苗の低コスト・大量生産を目的として緑枝挿し法を検討した。材料として南高実生の選抜優良台

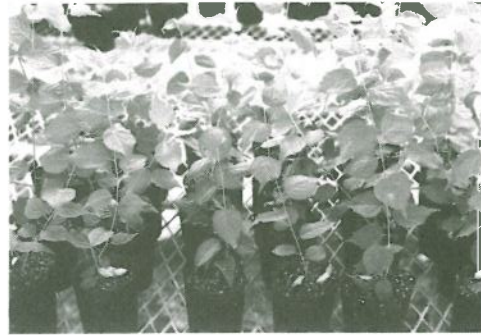


図2 挿し木により増殖した優良台木系統

木を用い、徒長枝を葉を3枚残してさし穂を調整した。さし穂の基部の切り方を変えて、水平切り、斜め切り、水平+削ぎ切りとし、発根促進剤をつけ、ハウスのミスト条件下で管理して30日後に調査した。結果は、水平+削ぎ切りが最も良く、81%が発根した。60日後には残りのさし穂も生き残ったものは全て発根した。なぜ、基部の皮を削ぐと発根が促進されるかは分かっていない。傷を付けたことによるエチレンの発生が関与しているとの説もあるが、単に傷を付けただけでは発根率が向上しないことから、単に発根する場を物理的に提供していると考えている。通常、落葉果樹の挿し木は葉が落ちたあとの休眠枝を用いて行うことが多い。そのためこれらのさし木苗は、しばしば地下に真直に伸びる直根が無く、ひげ根といわれる細い根が横に張り、浅根性になるといわれる。今回のように、葉を付けたままの若い枝を挿す緑枝挿しにより、育成した苗は多くの太い根を持ち、直根が無く側根ばかりと言うよりは、直根がいっぱい伸びているような苗になる。

### 5. 大量増殖

数百個体程度の試験結果と数万個体の生産技術では非常に大きなギャップがあることをしばしば私たちは経験する。これらの技術が実用可能かどうか、実際に、共同研究をおこなっている和歌山県の小坂調苗園において試験生産を行った。ハウスに直径 $5\mu\text{m}$ の水粒子を吹き出すというフォグ装置を設置し、ハウス内が湿度60%を下回った時点でフォグが

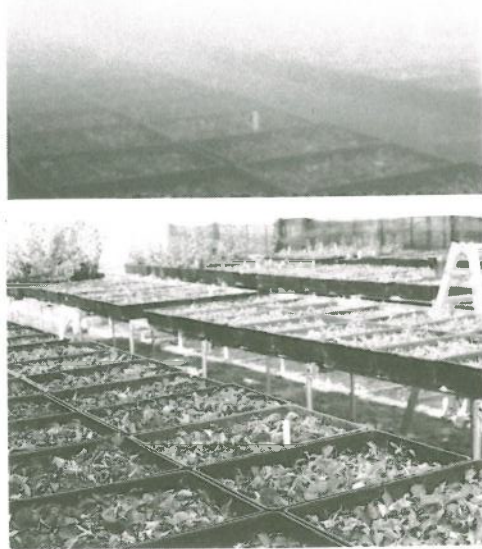


図3 ウメ優良系統の大量増殖  
上：フォグ噴霧中  
下：フォグ停止

吹き出す設定で自動運転を行った。さし穂は3節に調節し一番下の葉を取り、上記条件で挿し芽用土を入れたバットに約200本ずつ挿し芽を行い、合計3万本以上の挿し芽を行った。粒子が大きいミストに比べて、フォグは安定した環境ではミストを上回る生育促進効果が得られるが、あまりにも粒子が細かく軽いため、横からの風に流されて分布が不均一になる。フォグが当たらないところは枯れ、充分当たるところは腐りが発生し、病気になるなどの問題は生じた。初年度は最終的に40%程度の収率だった。2年目で50%、3年目の今年は5万本の挿し木を行い、収率は70%程度と見込まれている。この小坂調苗園では、年々大量増殖用に装置類や作業が改良され、ノウハウの蓄積やオリジナル技術の開発も順調に進んでいるため、来年以降も収率はさらに向上していくと考えている。

## 6. 挿し芽苗の生長

発根した苗をポットに移植すると、地上部は旺盛な生育を示した。さし穂の軸が7~8mm以上の太い軸を使った個体は芽が出にく

いようである。生育途中で肥料の欠乏した個体も、伸長を停止しその年、再萌芽はしなかった。生育に応じて移植を行いハウス内で育成することにより、7月に挿し芽した個体が11月末には地上部1m以上に生育した。この大きさは、台木であれば翌春に穂木を接ぎ木できる、穂木の自根苗であれば出荷できるサイズである。半年足らずで苗は育成可能ということになる。しかし、育成後、株を掘り上げてみたところ、3割程度の株に片側だけ根の張った株が見受けられた。これらの株は将来、台風や強風、干ばつなどの条件下で弱い可能性がある。挿し芽の際の未熟な操作によりこのような株が生じるものと思われる。

## 7. 優良台木の選抜

和歌山では一般的に南高の台木には南高の実生(南高の種をまいて育てたもの、共台)が用いられる。経験的に良いから行われているのであろうが、当然実生であるから、ばらつきが生じている。花粉親も様々であり、充実していない種子を台木用に用いた場合には低収量樹になるという説もある。増殖試験用に用いた優良台木系統も様々な形質のばらつきを生じている。

現在、地元産地のJAの指導員とともに優良な台木の選抜を進めている。特に、和歌山県の産地内では、ウメの木の樹勢が弱り、やがて枯れていく「ウメ衰弱症」と呼ばれている被害が大問題となっている。原因は特定できていないが試験場や大学関係者などがプロジェクトを組み解明に当たっている。

私たちJAとしては、解決策の1つとして優良台木の利用を考えており、衰弱症の激しい園地の中でも生き残っている株を選抜し、その株の台木部を増殖して、再び台木としての利用試験を行うこととしている。いくつか系統が選抜されているが、現在の私たちの方法では台木から吹いた芽、すなわち台芽が必要となる。台芽の出ない台木は増殖ができず、傷など入れるして気長に待つ状態である。植物ホルモン処理などは失敗しているが、こ

れから台芽を出させる技術も開発していく必要がある。

また、地球温暖化のあおりを 受けて、和歌山の冬も年々短くなり、夏は猛暑が続くようである。低温要求性が低く、高温耐性のあるウメの形質を紀州ウメあるいは台木に入れることも検討している。

### 8. おわりに

ウメはこれまでマイナーな果樹ということで置き去りにされてきた感があり、現場から吹き出してくるさまざまな問題に右往左往し

ているのが現状である。これまでの試行錯誤を述べさせていただいたが、未完成な形での報告をお許し願いたい。関係諸先生方のご指導を重ね重ねお願いする次第である。

#### 文献

- 1) 谷口充(1994) ウメの作業便利帳 農文協
- 2) 村井他(1996) 園学雑誌 第65巻第2号 P155-159
- 3) 村井他(1999) 園学雑誌 第68巻第3号 P648-654
- 4) 平田他(1997) 園学近畿支部要旨 P570
- 5) 堀内昭作他(1996) 日本の梅・世界の梅 養賢堂

## 生研機構からのご案内

### 「研究開発型企業特別融資制度」を創設

—生物系特定産業技術研究推進機構融資事業の拡充—

生研機構では、民間部門の生物系特定産業技術における研究開発と、その事業化を一層促進するため、資本金10億円未満の中堅・中小企業が行う事業化指向の研究課題について、従来のものより高いリスク負担機能を持つ標記の支援制度を創設しましたのでお知らせします。

#### 「研究開発型企業特別融資制度」の概要

貸付対象である試験研究の成功度に応じて貸付元本の減免を行う融資制度で、最大減免率は50%になります。

##### 1. 貸付対象

資本金10億円未満の研究開発型企業が、事業化を目指して行う生物系特定産業技術に関する試験研究。

##### 2. 貸付条件

償還元本の算出方法 (貸付元本の減免)	貸付額の50% + 貸付額の50% × 成功度 (1, 0.75, 0.5, 0.25, 0のいずれかの数値)
金 利	貸付時点の資金運用部貸付利率 (1999.7.16現在、2.00%/年)
償 還 期 間	試験研究終了後10年以内。原則として元金均等年2回分割償還
負 担 金	償還元本の試験研究期間中の利息相当額を「負担金」として試験研究終了後分割償還
担保・保証人	原則として必要

##### 3. 売上納付金

試験研究の成果を事業化した場合に、事業化後10年間、その売上高の一定割合(売上納付率を乗じて算出される額)を納付。

当該制度の詳細及び募集日程等につきましては、当機構融資課までご連絡下さい。  
(Tel : 03-3459-6565/Fax : 03-3459-6566, E-mail : yushi@tokyo.brain.go.jp)

## ◀文献情報▶

**オス体細胞クローンマウスの  
作出**

Cloning of male mice from adult tail-tip cells  
Teruhiko Wakayama and Ryuzo Yanagimachi  
Nature genetics, 22: 127-128 (1999)

ヒツジのドリーに始まった体細胞クローンの作出は、これまでにマウスやウシなどでも成功している。しかし、そのすべてがメスの体細胞をもとに作出されたものであり、しかも乳腺細胞や卵丘細胞など生殖に関連した細胞が用いられてきた。これらのことから、この方法でオスのクローンを作成することができるのであろうかという疑問さえもあった。筆者らは以前メスのクローンマウスの作出に成功したことでも知られるが、本論文ではオスの体細胞由来クローンマウスの作出例を報告している。

ドナーとなる体細胞にはオスマウス（アグーチ種）の尾部の先端から結合組織細胞である線維芽細胞を採取し使用した。これを10%血清添加培地で約1週間培養し、その後無血清培地に移し3～5日間培養した。このようにして初期化したドナー細胞から核を取り出し、あらかじめ除核しておいた未受精卵に注入して、その後その胚に活性化処理を施した。こうして得られた核移植胚（再構築胚）は桑実胚または胚盤胞にまで発生した時点で仮親の卵管もしくは子宮に移植された。

その結果、移植できるまでに発生した再構築胚は全体の50～58%で、移植された274個のうち3個が分娩まで至ることが出来た。うち2匹は呼吸不全のため摘出後1時間以内に死亡したが、残る1匹は繁殖力を持つまでに

成長し、ドナーと同じアグーチ種のオスであることが確認された。

また、今回の実験では胎盤重量が通常の妊娠マウスと比べ2倍以上も大きいことが確認された。これはメスのクローンマウスの研究でもみられた現象である。この原因についてはまだ明らかにはなっていないが、このような分娩前後で起こる問題やクローン動物作出における出生率の低さはマウスに限られたことではないことから、胎盤と胚もしくは胎児とのコミュニケーションの不完全さが原因でこれらの現象が引き起こされているのではないかと推察している。

今回の研究結果はオスの体細胞からでもクローン動物の作出が可能であることを示している。しかし、これは単にこれまでの体細胞クローン技術がメスの細胞や生殖系から採取した細胞に限られたものではないということを示すだけでなく、これまで専ら配偶体や胚の凍結保存という形で行われてきたゲノム情報の保存が、今後は成体の体細胞を凍結保存するという新しい手法でも可能であるということも示唆している。さらに非生殖系細胞によってクローン動物が作出されたことで、性の遺伝情報も卵子や精子に頼らず体細胞の形で保存できることも示されたと言える。近年、我が国の畜産界において高能力牛のクローン作出技術の開発は最も期待されているものの一つであり、最近では種雄牛の体細胞クローン作出の成功例もいくつかみられている。このような点からも今回の報告はたいへん意味のある内容であり、今後の研究の発展にも注目していきたい。

(抄訳 横尾正樹・東北大)

## ◀文献情報▶

***Lactobacillus helveticus*  
ストレス誘導遺伝子の解析**

Molecular Characterization of a Stress-Inducible Gene from *Lactobacillus helveticus*  
Andreas Smeds, Pekka Varmanen, and Airipalva

Journal of Bacteriology, 180:6148-6153 Dec. 1998

細菌は生存に影響を及ぼすストレス状況に直面した時、自ら守り生き抜いていくため、瞬時かつ一時的に特定の蛋白質を発現することが知られている。その様な蛋白質のなかでも、セリンプロティナーゼ機能を持つ *Escherichia coli* の HtrA 蛋白質が良く知られている。Lac-



tobacillus helveticus (以下 L.H.) はスイスタ  
イブのチーズや他の発酵食品のスターターと  
して工業的に使用されており、製造過程で熱や  
食塩などの様々なストレス状況下に置かれる。  
しかしながら、L.H. についてのストレス応答  
蛋白質については現在までのところ報告され  
ていない。そこで筆者らは L.H. の HtrA 様ス  
トレス誘導遺伝子について解析を行った。

L.H. CNRZ32 からストレス誘導性 HtrA 様  
蛋白質をコードしている遺伝子 (htrA) をク  
ローニングし、塩基配列を求めた。htrA 遺  
伝子は読み取り枠(ORF) が 1,239 bp であり、推  
定される蛋白質の分子量は 42.6 kDa であつた。  
そして、E.coli の HtrA 蛋白質と 29.3% の相  
同性を示し、その配列中に推定の活性サイト  
(His, Ser, Asp を含む特徴的な領域) や細菌のセ  
リンプロテイナーゼとして知られる HtrA  
ファミリーを特徴付ける PDZ ドメイン(基質結  
合領域として機能する) が認められた。

次に様々なストレス状況において L.H. htrA  
遺伝子の発現がノーザンブロッティングによ  
り転写レベルで調べられた。ストレス環境と  
して、37°C から 52°C への加熱、4% (wt/vol)  
NaCl 添加、5% (wt/vol) エタノール添加、  
抗生物質としてプロマイシン (100  $\mu$ g/ml) 添  
加、酸化ストレスが検討された。最も転写が  
誘導されたのは、NaCl ストレス下で通常の 8

倍以上にもなった。同じ様な発現増強が、プ  
ロマイシン、エタノール或いは熱に曝した時  
に認められたが、酸化ストレス下では発現に  
変化は見られなかった。

続いて、レポーター遺伝子 gusA を二重クロ  
スオーバー組換えにより L.H. 染色体上の htrA  
プロモーター遺伝子の下流に組み込んだ。ま  
た、それによって野生型の遺伝子を破壊する  
事もできた。種々のストレス状況下での gusA  
遺伝子の発現は htrA の発現と良く似た挙動を  
示した。この事からストレス下で応答を示し  
ていたのは、htrA 遺伝子そのものではなく、  
プロモーターであることが強く示唆された。  
さらに、生育速度の検討から htrA 遺伝子が破  
壊された株は全てのストレス下で生育速度の  
減少が見られるが、完全な htrA 遺伝子を持つ  
野生株は熱ストレス下において生育を促進さ  
せ、その他のストレス下においては前株と同  
様、生育速度が減少することが分つた。

以上の研究より HtrA 蛋白質は熱ストレス  
下において重要であることが示唆されている  
が、他のストレス下では別の働きをしている  
のか、或いは他の蛋白質が重要な働きをして  
いるのかは不明であり、今後の検討が待たれ  
る。

(抄訳 上野敬太・カルピス (株))

#### ◀文献情報▶

### 形質転換植物による環境汚染 物質の分解

Biodegradation of explosives by transgenic  
plants expressing pentaerythritol tetranitrate  
reductase

Christopher E. French, Susan J. Rosser, Gareth  
J. Davies, Stephen Nicklin, Neil C. Bruce  
Nature Biotechnology vol. 17 May 1999 491-  
494

爆薬工場や軍事演習などでは、四硝酸ペン  
タエリスリトール (PETN)、三硝酸グリセリン  
(GTN) および 2, 4, 6-トリニトロトル  
エン (TNT) などの毒性と爆発性を持った危  
険な窒素系化合物が発生し、しばしば土壤中

に残留し問題となっている。

本論文の著者らは、上記のような窒素系の  
爆薬を分解する土壌バクテリア *Enterobacter  
cloacae* PB 2 の研究を行ってきた。そしてこ  
の分解は PETN リダクターゼによって行われ  
ていることが明らかになっている。

ご存じのように、*E. cloacae* PB 2 のような  
有害物質分解能を持った微生物を使って、汚  
染された環境を浄化しようとするのをバイ  
オリメディエーションと言う。しかし、汚染  
された土壤に分解能力を持った微生物を導入  
しても、在来微生物と競合してしまい有用微  
生物のバイオマス量が低下するなどして、必  
ずしも浄化が成功するとは限らない。

これに対し、植物を利用した有害物質の除去をファイトリメディエーションと言い、微生物を利用した場合と比べて、容易にバイオマス量を維持できる利点がある。しかしながら、一般に植物による有害化学物質の分解能力は、微生物に比べて低いことが問題となっている。

そこで著者らは、微生物のPETNリダクターゼをタバコに遺伝子導入し、バイオリメディエーションとファイトリメディエーションの利点を組み合わせることを試みた。まず、アグロバクテリウム法により、22系統のPETN分解活性を持ったタバコが作出された。そして、その形質は後代に遺伝することが確認された。形質転換体の系統の中で、高いPETNリダクターゼ活性を持っており、導入された遺伝子をホモで持つと思われる1系統の自殖種子を、1 mM GTNを含む培地に無菌播種したところ、正常に発芽し生育した。こ

れに対し、対照区の野性型の種子は発芽と生育が抑制された。また、発芽した実生を1 mMのGTNを含む液体培地で生育させたところ、形質転換体の実生は野性型と比べて効率的に液体培地中のGTNを分解することが明らかとなった。なお、本実験でPETNよりGTNをより多く使用したのは、GTNは水溶性で実験に使いやすいからである。

以上の結果、本研究では効率的に窒素系爆薬を分解することの出来るタバコを作出することに成功した。しかしながら、本研究ではより深刻な環境汚染物質であるTNTについては、GTNほど効率的な分解能力を得るには至らなかった。今後は、PETNリダクターゼ遺伝子を改変するなどしてTNT分解能力を高めることが必要であろう。また、窒素系爆薬以外にも(例えばダイオキシンなどに)、このような研究が応用されることを期待したい。

(抄訳 清水圭一鹿児島大農)

#### ◀文献情報▶

### 外生菌根形成に関与する菌側の遺伝子の単離

Cloning and characterization of a symbiosis-related gene from an ectomycorrhizal fungus *Laccaria Bicolor*

S-J Kim, J Zheng, S.T. Hiremath and G.K. Podila

Gene 222, 203-212 (1998)

*LB-AUT7*, a novel symbiosis-regulated gene from an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria bicolor*, is functionally related to vesicular transport and autophagocytosis

S-J Kim, D. Bernreuther, M. Thumm and G.K. Podila

Journal of Bacteriology 181, 1963-1967 (1999)

外生菌根菌は、マツ・ブナ・カバノキ・ヤナギなどの科に、共生性の担子菌、子嚢菌類の一部が共生したものであり、根を覆う菌糸の鞘(マントル)を形成するのが特徴である。マントルの内部では、根の皮層細胞間に菌糸が入り込みハーティングネットと呼ばれる構

造を形成し、代謝物の交換が行われる。外生菌根菌の多くは人工培養が可能で、遺伝子導入も比較的容易である。

菌根菌に関しては、応用を目指し、共生機構の遺伝子レベルでの解明が現在進められている。しかし、植物側に比べ、菌側はほとんど進んでいない。そこで、今回は、外生菌根菌の共生初期に発現している遺伝子の単離を試みたKimらのグループの論文を紹介する。

実験は、アカマツ(*Pinus resinosa*)と担子菌*Laccaria bicolor*を用いて行われた。実験を行うに当たり、Kimらは、次のような実験系を作成した。まず、アカマツを無菌的に4-6週間育てた後、金網を支えとして培養ポットに入れ、根が浸る量の液体培地を加えた。24時間その状態で慣らした後、3週間程度培養した菌根菌を液体培地に加え、6時間後に根と菌根菌を別々にサンプリングした。次に、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いて、菌根菌で特異的に発現している遺伝子の単離を試みた。この方法によって、約30のバンドが単離された。得られたクローンについてノーザン解析を行い、PF6.2, PF6.3のクロー

ンについて、さらに解析を進めた。

クローン PF6.2 をゲノムライブラリーよりスクリーニングし、塩基配列を決定したところ、イントロン 6 個、エキソン 7 個の構造をもつ遺伝子であることが分かった。興味深いことに、エキソン 2~3, エキソン 4~6 内にそれぞれ非常にホモロジーの高い繰り返し配列が見つかった。データベースで検索を行ったところ、ホモロジーの高い既知の配列は見つからなかった。しかし、アミノ酸レベルでは、酵母の転写因子である GAL11 遺伝子の機能部位と弱いホモロジーを示した。さらに、PF6.2 遺伝子は、キナーゼによりリン酸化されうるモチーフを 8 箇所持っていた。よって、この遺伝子は転写の活性化に関わり、酵母の GAL11 遺伝子と同様に、リン酸化の状態によってその機能が制御されているのではないかと考えられた。

クローン PF6.3 の全塩基配列を決定しデータベースで検索したところ、酵母の AUT7 遺伝子と高いホモロジーを示した。AUT7 遺伝子は、細胞の自己消化作用に関係する遺伝子であり、自食胞を液胞へ輸送する働きがあ

ることが明らかになっている。そこで、菌根菌の PF6.3 遺伝子を、酵母の aut7 遺伝子欠損株に導入したところ、自食胞の液胞への輸送が回復した。このことから、PF6.3 遺伝子は、酵母の AUT7 遺伝子と同様に、自食胞の液胞への輸送に関与していると考えられた。共生時には、細胞の分化が進み、栄養状態も急激に変化するため、活発な自己消化により細胞の構成物をリサイクルし、新しい物質の合成に利用しているのかもしれないと筆者らは述べている。

菌根菌などの糸状菌の共生菌は、特に農業面で様々な応用が期待されている。しかし、共生が植物との相互作用の結果もたらされるものであるため実験系の構築が難しく、遺伝子レベルでの解析はほとんど進んでいない。そのなかで、今回は数少ない菌側からの遺伝子単離の報告であり、非常に興味深い。今後、形質転換体の作成やプロモーター領域の解析により、具体的に共生時にどのような働きをしているのか、明らかにする事が必要であろう。

(抄訳 大木健広・東北大)

#### ◀文献情報▶

### 植物の環境ストレス (塩分, 干ばつ, 寒さ, 熱さ) 耐性を高める遺伝子

A highly conserved kinase is an essential component for stress tolerance in yeast and plant cells

Lee J. H., Montagu M. V. and Verbruggen N. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 5873-5877, May 1999

世界の穀物生産における最も重大な制限要因は塩分と干ばつ (浸透圧ストレス) である。Lee らはシロイヌナズナにおいて浸透圧などのストレス耐性に重要な役割を果たしている遺伝子を発見した。

この研究の特徴は、植物の浸透圧耐性に関与する遺伝子の選抜を酵母を用いて行った点である。浸透圧ストレスに対する細胞の反応が真核生物で共通していること、また酵母は

植物よりも遺伝子研究に適していることがその理由である。シロイヌナズナの長角果由来の cDNA ライブラリーをプラスミドベクター上に構築し、酵母に導入した。形質転換酵母を段階的に濃度を高くした塩化リチウムを含む培地で培養し、最終的に 100mM の塩化リチウム存在下で生き残った酵母を選抜した。この高浸透圧耐性を示した酵母には、酵母の *DBF2* 遺伝子と高い相同性を示すシロイヌナズナの遺伝子 (*At-DBF2*) が導入されていた。酵母 *Dbf2* はリン酸化酵素で、転写性複合体の構成要素の一つある。*At-DBF2* を酵母の *dbf2* ミュータントに導入したところ、*dbf2* ミュータントは正常な形質に回復した。このことから、シロイヌナズナの *At-DBF2* は、酵母 *Dbf2* リン酸化酵素と機能的にホモログであるといえる。

*At-DBF2* を過剰に発現させた酵母は、ソルビトール (浸透圧ストレス)、塩化ナトリウム

(塩ストレス)を含む培地, および42°C (熱ストレス), 4°C (低温ストレス) 条件下で生育することができ, 野生種に比べ顕著な耐性を示した。

*At-DBF2*をセンスおよびアンチセンス方向でタバコ培養細胞に組み込み, それらを過剰に発現させた。センス *At-DBF2*過剰発現タバコ細胞は, 塩化ナトリウム (塩ストレス), ポリエチレングリコール (乾燥ストレス) を含む培地, および47°C (熱ストレス), 0°C で2日間処理 (低温ストレス) 条件下で, コント

ロール細胞に比べ明らかな耐性を示した。一方, アンチセンス法により内生タバコ *DBF2*の発現を抑えたタバコ細胞は, これらのストレスに対する感受性が高まった。

サザン解析により, *DBF2*のホモログがトマトなどの植物にも存在することが示唆され, 多くの植物が同等の遺伝子を持っていると推測された。

この遺伝子は, 過酷な環境下でも生育可能な作物の作出に道を開くと期待される。

(抄訳 渋谷健市・東北大)

#### ◀文献情報▶

### 天高くサカナも肥える秋?! ヨーロッパスズキの自発摂餌 活性の年内リズム

Annual rhythms of demand-feeding activity in sea bass : evidence of a seasonal phase inversion of the diel feeding pattern

F. J. Sánchez-Vázquez, M. Azzaydi, F. J. Martinez, S. Zamora, and J. A. Madrid

Chronobiology International, 15 (6), 607-622 (1998)

サカナにも学習能力がそなわっていることはよく知られている。自発摂餌とは, サカナが餌を欲しいときに欲しい量を自発的に摂餌することである。自発摂餌のための給餌装置は, サカナが水中のスイッチを口でひっぱったり, 口やからだの一部でおしたりすると, 水上の給餌器から餌が落下してくるしくみになっているもので, サカナがスイッチの意味を理解して記憶し, 自分でスイッチをいれて, 欲しいときに欲しい量の餌を食べることができるようになっている。現在日本では, すぐれた自発摂餌能力をしめすキンギョをはじめ, マダイ, ブリ, ニジマスなどの養殖対象魚種もつかって, 新しい養殖技術開発のための研究が行われている。自発摂餌装置をつかった最近の研究では, サカナがタンパク質や脂質, 糖質などの主栄養素を選択し, 必要なエネルギー量を調整して摂取できることもわかってきている。

紹介する文献は, ヨーロッパスズキの自発摂餌行動を1995年6月から1996年5月まで1年間調査したものである。1群15尾 (平均体重60g) からなる個体群10群を, 自然環境条件の屋外水槽で飼育した。試験中の水温は13.2°C (2月) ~ 27.4°C (8月), 日長は明時間=9.5h (11月) ~ 15h (6月) の変化をしめた。

月別の自発摂餌回数 (1日の摂餌回数の月間平均値) を比較すると, 最大日長期 (6月) あるいは最高水温期 (8月) とは一致しない秋季の10月~11月がもっとも摂餌回数が多かった。6月から9月にかけての摂餌はほとんど日中に集中し, 夜間での摂餌はあまり見かけられなかったが, 秋季にかけて徐々に深夜や未明にも摂餌がみとめられるようになり, 日中に認められていた最多摂餌時刻は, 10月から12月にかけて日没時の薄暮時間帯へ移っていった。そして, 冬場の1月から3月にかけては摂餌回数が減少し, 摂餌時刻は日没以降の暗時間帯へ移行していた。この夜型の摂餌リズムは, 春になるとふたたび昼型の摂餌リズムに回帰していた。このようにヨーロッパスズキは, 日長と水温が低下していく秋に徐々に夜行性 (夜間摂餌性) へと変化し, 逆に日長と水温が上昇する春に昼行性へと変わっていく年変化をしめしていた。ヨーロッパスズキの摂餌リズムの年変化は, 急激な環境変化というものが引き金になっているのではなく, 徐々に変わっていくような環境要因が引き金になっている可能性があると考えら

れた。

現行の魚類養殖における給餌時刻は日中に集中している。ヨーロッパスズキ以外の養殖魚種がどのような摂餌リズムの変化をしめすのかまだよくわかっていないが、かりに同じように摂餌リズムが変化するならば、秋から冬にかけての日中の給餌は、サカナにとっては過剰な給餌となり、成長や生産性の面から効率的ではないかもしれない。そして、摂餌

量以上の過剰な（ムダな）餌は漁場を汚染することにつながるかもしれない。効率的で環境にやさしい養殖漁業を実施するためにも、サカナの食要求に対応した“サカナ本位”の養殖システム開発がのぞまれる。

シーバス釣りが趣味の方々。冬場のつりは日没後が狙い目かもしれません！

（抄訳 木原稔・マルハ(株)中央研究所）

## 生研機構からのご案内

### BRAIN テクノフォーラム

#### 「質的形質に関するゲノム解析の最前線：イネ，ヒトから家畜まで」

#### 開催のお知らせ

主催：生物系特定産業技術研究推進機構，(社)畜産技術協会

後援：農林水産省

協賛：(社)農林水産技術産業振興センター (STAFF)

日時：平成11年10月5日（火）13：00～17：00

場所：東京国際フォーラム D-501会議室

東京都千代田区丸の内3-5-1 TEL：03-5221-9000

#### 講演内容および講師

- 1) ヒト疾患遺伝子の構造と機能：新たなゲノム医学の展開  
清水 信義（慶応義塾大学医学部 教授）
- 2) イネゲノム解析による有用遺伝子のポジショナルクローニング  
矢野 昌裕（農林水産省 農業生物資源研究所 室長）
- 3) 和牛遺伝性疾病のゲノム解析と遺伝子診断法の確立  
平野 貴（(社)畜産技術協会 附属動物遺伝研究所 研究員）
- 4) Mining the human genome for horns: Comparative fine mapping and sequence analysis of the Horn/Poll region (同時通訳付き)  
Dr. Scott K.Davis (テキサス A & M大学 准教授)  
総合司会者  
関川 賢二（農林水産省 家畜衛生試験場 生体防御研究部長）

参加費：無料

お申し込み方法：FAX, e-mailまたは郵送にてお名前，勤務先，所属，住所，お電話番号をお知らせください。準備の都合上，お申し込み・キャンセルは9月28日（火）までをお願いいたします。なお，お申し込みは定員になり次第締め切らせていただきますので，予めご了承ください。

お申し込み先：〒105-0001

東京都港区虎ノ門3-18-19 虎ノ門マリンビル10階

生研機構 企画部 企画第1課（塚本，勝呂）

TEL：03-3459-6565 FAX：03-3459-6566

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

◀海外便り▶

## スケトウダラ仔稚魚を取り巻く食物網に関する研究 …米国アラスカ水産研究センターでの1年…

水産庁 東北区水産研究所  
杉崎 宏哉

### はじめに

私は科学技術庁長期在外研究員制度を利用して、1997年1月より1年間アメリカ合衆国ワシントン州シアトル市のSand Pointというところにある、NOAA (National Oceanic and Atmosphere Administration) のアラスカ水産研究センター (Alaska Fisheries Science Center) に滞在し、スケトウダラ仔稚魚の生態に関する研究に携わった。

受け入れ研究先であるFOCI (Fisheries-Oceanography Coordinated Investigations) グループは、スケトウダラの資源量変動要因を生物海洋学的に解明することを目的に組織されたもので、資源学者のみならず海洋物理学者や生態学者など様々な分野の研究者で構成されている。スケトウダラの初期生活史における減耗に着目した生物海洋学研究で多大な成果を上げている。私の滞在は魚類の生活史初期の被食による減耗 (特に動物プランクトンによる被食) のメカニズムを研究することが目的であった。

実を言うと、研究所の施設やコンピュータなどは古く (サーバーがインターネットの急激な普及速度についてゆけずにしょっちゅうダウンしていた)、図書室の文献もさほど充実しているわけではなかった。この研究所から質の高い仕事がたくさん発表されているのが不思議なほどであった。しかし仕事をしてみて合理的な仕組みと仕事に対する考え方を知ることができた。特にはっきりしているのは

SUGISAKI Hiroya

〒985-0001 塩釜市新浜町3丁目27-5

専門家集団による分業が実によく行われていることである。FOCIグループの中だけでも、分類の専門家、統計の専門家、コンピュータの専門家、観測機器の専門家、データ整理の専門家などがある。管理職、事務職の人々も含め、どの分野が偉くてどの分野が偉くないと言った意識はなく、皆各自の分野に自信と責任を持って仕事をしていた。だから仕事のたらい回しや、“面倒な仕事は後回し”で無駄な時間が過ぎるようなことはなく、速やかに結果が出るのであると思う。他人の評価を待つのではなく自分の満足のいく仕事をし、優越感や劣等感に縛られないで常に自分にとって一流の仕事を目指す姿勢は見習うべきものがあると感じた。

### プランクトンによるスケトウダラ仔稚魚の捕食

肉食性の大型動物プランクトンは世界中の海洋に広く数多く分布していることが知られており、それらは小型動物プランクトンや仔魚を捕食していると考えられている。仔魚は成長して運動能力も高くなるにつれて捕食されにくくなると予想される。そこで、実験室内でスケトウダラ仔魚を発生直後から飼育し、動物プランクトンと遭遇したときの行動をビデオ装置を用いて観察して成長に伴う反応の変化を解析した。

Sand PointにあるNOAAの研究所は全面ガラス張りの巨大な未来建築のような建物 (写真1, 2) なのだが、実験棟は別棟で飛行機の格納庫であった巨大で殺風景で壊れかけた建造物であった (NOAAの施設は海軍が

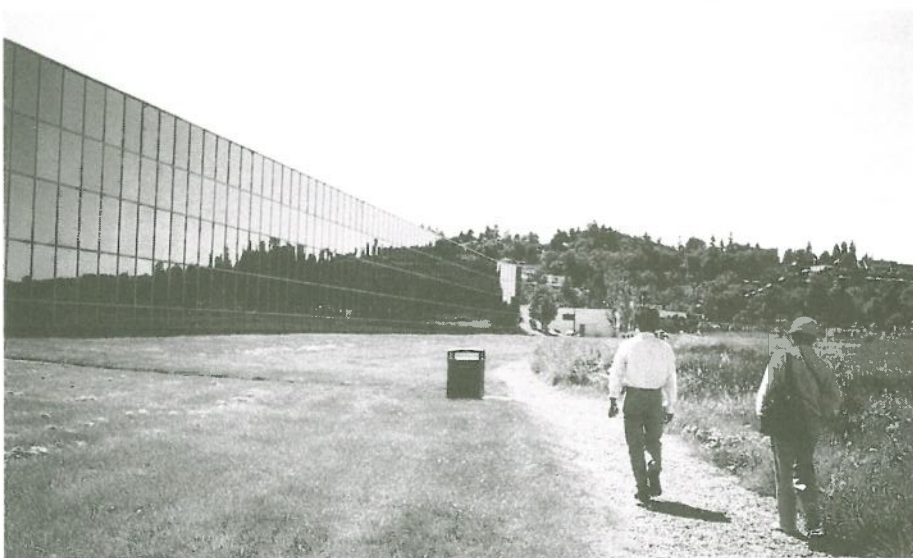
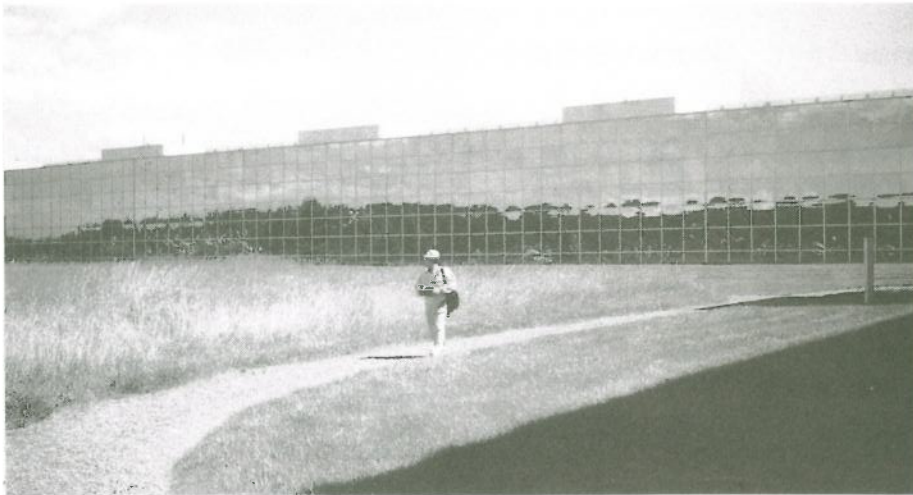


写真1, 2 Sand Pointの建物外観。巨大なガラス張り建物。

使っていた敷地を譲り受けたため古い建物をかなり再利用していた)。建物内をハトが飛び回っており、フクロウが巣を作っていたこともあるという。スケトウダラ仔魚の飼育器材も手作りで、恒温槽にはコココーラの自販機から取り外したという冷却器を使っていた。この研究所はワシントン湖という淡水湖のほとりにあり、海からは離れたところにある。そのため、実験用の海水を入手するには、自分たちでドラム缶のような容器をトラックに積み、車を飛ばして1時間ほど離れたところにある臨海実験所まで海水をもらいに行っていた。しかもその海水も Puget 湾という内湾のため塩分量が薄く、人工海水の素を加えて塩分量調整を行う必要があった。スケトウダラの仔魚の餌となる小さな動物プランクトンは毎週 Puget 湾内の島にある塩水の潟湖に出

かけて手漕ぎのゴムボートを浮かべて手引きネットで採集したものを用いていた。

このように手作りで準備した後、実験を開始した。3月にベーリング海のスケトウダラ産卵調査で得られた卵を船上で人工授精し、すぐにアラスカの港に寄港してシアトルまで空輸された受精卵を実験室で孵化させ育てたものを用いた。孵化した仔魚と天然で採集したクラゲやオキアミなどの肉食性大型動物プランクトンを同時に水槽に入れ、それらが近づいたときに仔魚がどのような行動をとるか、どの程度の早さで逃避するか、捕食されるかをビデオテープに録画して解析した。その結果、孵化後40日ほど経過した仔魚は遊泳力が高くオキアミなどの甲殻類プランクトンにはほとんど捕食されなくなることが観察された。

直径が50cm ほどもある *Chrysaora*

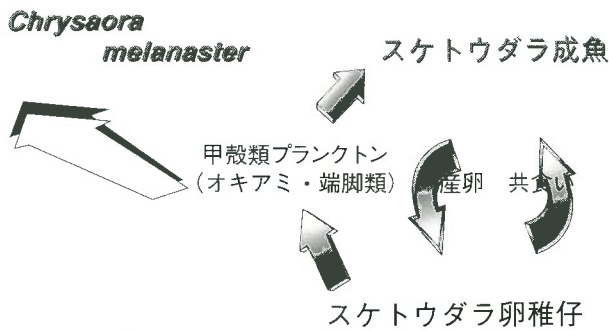


図1 ベーリング海のスケトウダラと大型クラゲ(*Chrysaora melanaster*)を取り巻く食物網を通じた有機物の流れ模式図

*melanaster*という大型のクラゲが近年ベーリング海に大発生している。私も滞在中にベーリング航海に参加する機会に恵まれたが、確かに広範囲にわたって多数、大きなクラゲが漂っているのが認められた。スケトウダラ仔稚魚を採集するためにトロールネット曳網を行うと仔稚魚に混ざってこのクラゲが多数採集されることから、仔稚魚とクラゲ海の中で高い確率で遭遇していると推察された。採集されたクラゲの消化管の中から半消化されたスケトウダラ稚魚がしばしば検出されることからこのクラゲは仔稚魚の捕食者となっていると考えられる。そこで窒素の同位体比が栄養段階の指標となり、炭素の同位体比が基礎生産者の種類や状態の指標となることを利用して、ベーリング海で採集されたスケトウダラ仔稚魚と動物プランクトンの窒素と炭素の安定同位体比を測定し、それぞれの種間の被食-捕食関係を表した。その結果、大型クラゲ*Chrysaora melanaster*はスケトウダラ仔稚魚の捕食者レベルの栄養段階にあることが確認された。スケトウダラ仔稚魚はスケトウダラ成魚の主要な餌料生物であることはかつてから知られていることから、*Chrysaora melanaster*の存在はスケトウダラにとって仔稚魚の捕食者であると同時に成魚の餌料の競合者となり得るため、これが大量発生することはスケトウダラの個体群維持に不利益になる可能性があることが示唆された(図1)。

終わりに—シアトルの街の印象—

シアトルという街は、アメリカ西海岸の北

のはずれにある。東海岸のニューヨークやワシントンのようにぎすぎすしていないし、南のロスアンゼルスのようにぎらぎらしていない穏やかな雰囲気が漂う街である。日本の東北地方のようにのんびりした住み心地のよい街であった。滞在中たまたまカリフォルニアやニューヨークに行くことがあり、シアトルに戻ってくると日本に帰ってきたようにほっとした。マイクロソフト社とボーイング社の本社がある巨大都市にも関わらず、アメリカの都市では珍しいほど安全な街として知られていて、日本でも不用心だといわれている私でさえも盗難に遭うこともなく無事に一年間過ごすことができた。研究所でも街でも人々は優しかった。言葉も社会のルールも不案内な分からず屋だった私が街でおろおろしていると通りがかりの人が気安く声をかけてくれた。街で買い物してもコンサートに行っても食事をしてもいつもにこにこで帰ってくることができた。この街の唯一の欠点は、一年の4分の3は雨季だといわれるほど雨が多いことである。冬から春にかけて毎日梅雨のような天気が続く。しかし、7月になると突然雲一つないさわやかな晴天が訪れ、それが数週間続くのである。この街の人たちはこの季節を楽しむために9ヶ月間どんよりした天気を我慢している。高緯度地域(北緯45°ぐらい)のため夏の日没は午後9時頃となり、仕事が終わってから釣りに行ったり泳ぎに行ったり陽気に過ごすのである。もし、この拙文を読んでもくださった方にシアトルに滞在する予定がある方がいれば、7・8月にいらっしゃることをおすすめする。ただしその季節のシアトル市民は浮かれきっているので仕事にはならないかもしれないが。

最後になりましたが、このようなすばらしい研究と留学の機会を与えてくださった水産庁、農林水産技術会議、科学技術庁の皆様、私の滞在を快く受け入れて惜しみないご協力をいただいたNOAAのアラスカ水産研究所職員と調査船乗組員の皆様に心より感謝申し上げます。



#### 編集後記

BRAIN テクノニュース75号をお届けいたします。

医食同源という言葉がありますが、健康ブームの中、「体によい食べ物」ということが様々に言われてきました。最近では、それに科学のメスが入り、食品素材様々な機能が判ってきました。

今回の総説は、日本人の食生活の中で極めて身近な素材である大豆に焦点を当てることといたしました。これに関連して2つの論文をお願いいたしました。味噌、しょう油、納豆、豆腐、煮豆、枝豆、大豆油と、私たちの周りにあふれる様々な大豆食品が、今まで

とひと味違ったものとなれば幸いです。

また、このほかには、それぞれ非常に困難であったウナギの完全人工養殖の大幅な前進、リンゴの耐病性育種、梅の優良系統の大量増殖等の研究を紹介していただきました。なお、海外便りは水産分野でアメリカにおけるスケトウダラ仔稚魚研究留学の経験を寄せていただきました。

限られた紙面ではありますが、本誌では農林水産並びに関連産業分野における先進的研究を逐次反映させていきたいと思っておりますので、各位のご協力をお願いいたします。

(編集部)

#### 本誌著作物の複写等について

本誌掲載の論文・記事の複写・転載を希望される方は、執筆者ならびに生研機構の許諾を得て行ってください。

ブレインテクノニュース (第75号)

平成11年9月15日発行

編集兼発行者 堤 英隆

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3丁目18番19号 虎ノ門マリンビル10F

TEL. 03-3459-6565 FAX. 03-3459-6566

©Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 1999