

# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

## TECHNO NEWS

〈生研機構〉

ブレインテクノニュース

# 第83号

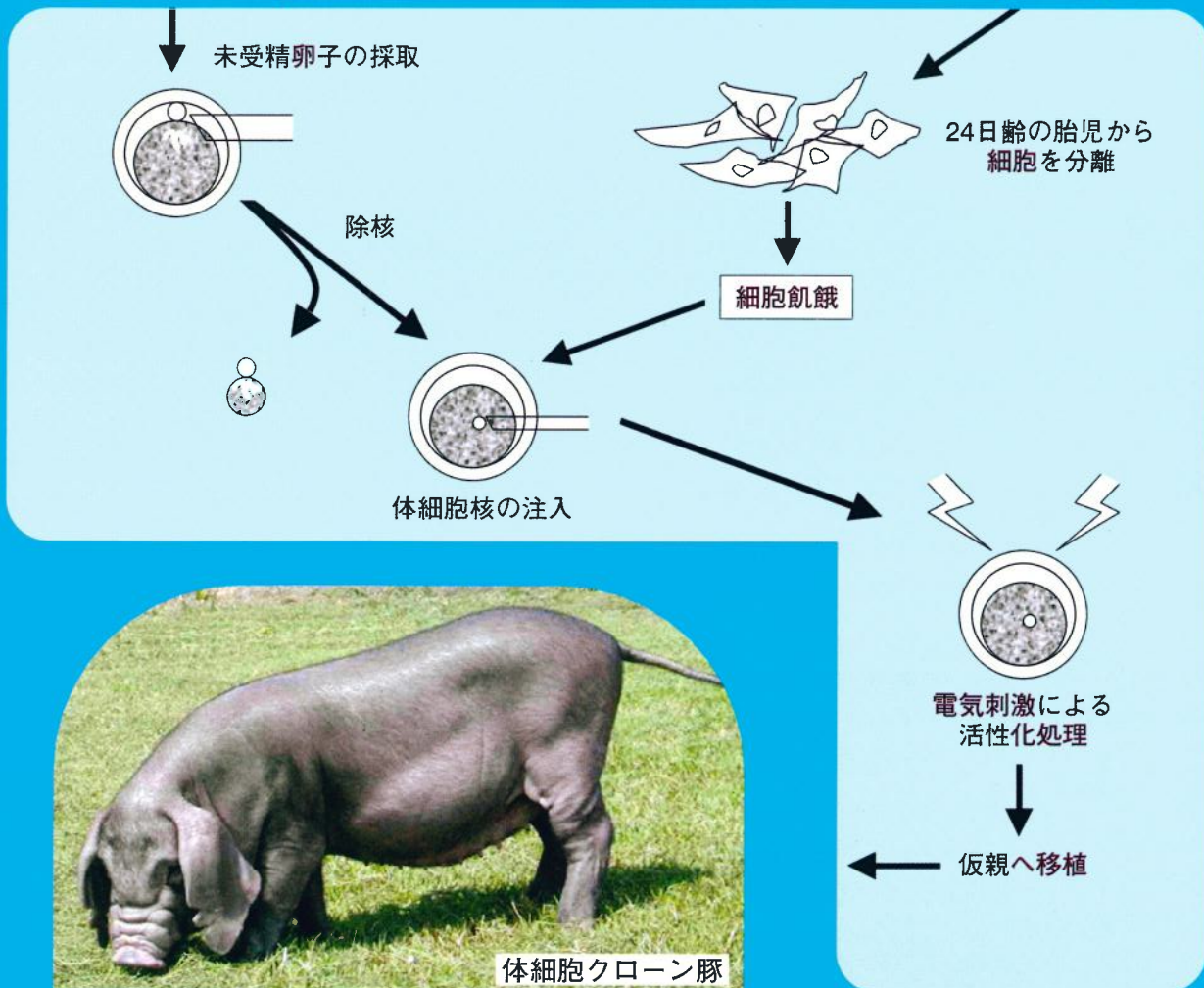
JANUARY 15, 2001



ランドレース



梅山豚



体細胞クローン豚の作出 (農林水産省畜産試験場 大西 彰氏原図)

## 目 次

<b>巻頭言</b>	
21世紀の門出 .....	1
堤 英隆 (生物系特定産業技術研究推進機構理事長)	
<b>総 説</b>	
生鮮野菜・果物の微生物学的安全性確保に関する最近の研究動向 .....	2
一色賢司 (農林水産省 食品総合研究所流通保全部)	
<b>国内情報</b>	
食品に応用できる可能性を持つ新規殺菌技術について .....	8
五十部誠一郎・植村邦彦 (農林水産省 食品総合研究所)	
絹の繊維化前の構造と巧みな繊維化のメカニズム .....	12
朝倉哲郎 (東京農工大学 工学部)	
体細胞クローン豚の作出 .....	15
大西 彰 (農林水産省 畜産試験場)	
分解菌集積木質炭化素材を用いた難分解性有機化合物のバイオレメディエーション .....	19
高木和広 (農林水産省 農業環境技術研究所)	
<b>地域の先端研究</b>	
ジャガイモほ場におけるウイルス病の簡易・迅速診断法の実用化 .....	25
三澤知央 (北海道 病害虫防除所)	
<b>文献情報</b>	
ヒアルロン酸のアポトーシス抑制効果 .....	30
T. Kaneko et al (Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 17, 162-167, 2000)	
抄訳: 横尾正樹 (東北大学大学院 農学研究科)	
菌体内にトレハロースを蓄積することで酵母はエンドサイトシスのエタノール耐性を獲得する .....	31
P. Lucero et al (Appl. Environ. Microbiol., 66, 4456-4461, 2000)	
抄訳: 楠田大輔 (カルピス株式会社 基盤技術研究所)	
高温ストレスで光化学系IIが損傷するメカニズムが明らかに .....	32
A. Rokka et al (Plant Physiology, 123, 1525-1535, 2000)	
抄訳: 岩井純夫 (鹿児島大学 農学部)	
エンドウマメの複葉の構造は、遺伝子群 <i>UNIFOLIATA</i> , <i>COCHLEATA</i> , <i>AFILA</i> , <i>TENDRIL-LESS</i> の相互関与によって制御される .....	33
C. W. Gourlay et al (The Plant Cell, 12, 1279-1294, 2000)	
抄訳: 木苗貴秀 (東京大学大学院 農学生命科学研究科)	
ニジマス鰓上皮細胞が産生する水酸化脂質による抗炎症作用 .....	34
J. W. Holland et al (Comparative Biochemistry and Physiology, 122, 297-306, 1999)	
抄訳: 玉井忠和 (マルハ株式会社 中央研究所)	
<b>海外便り</b>	
カスパーゼの調節を介した食品成分の新たな機能性	
—ハーバード大学医学部における1年半— .....	35
小堀真珠子 (農林水産省 食品総合研究所)	
<b>生研機構からのご案内</b>	
基礎研究推進事業 (平成8年度採択課題) 研究成果発表会のご案内 .....	裏表紙

### 表紙写真説明

顕微注入法による体細胞クローン豚の作出法の概略。詳細については、国内情報15頁の「体細胞クローン豚の作出」をご覧ください。



## 21世紀の門出

生物系特定産業技術研究推進機構  
理事長 堤 英 隆



新年あけましておめでとうございます。

いよいよ21世紀を迎えました。遠い将来と思っていたものが、除夜の鐘と共に訪れたことを感慨深く感じた方も多いと思います。

生研機構ではこれまで、出融資事業を通じた民間の研究開発の支援、UR対策関連の研究開発事業、さらに新技術・新分野の創出を目指した基礎研究を推進して参りました。これらの業務に加えて、今年度から、新たに、ミレニアムプロジェクトの一環として、民間企業等の研究シーズによる新事業創出の加速化を図るため、産学官の勢力を結集したコンソーシアムによる新事業創出研究開発事業を実施しております。

一方、農業機械化促進業務の中で、いわゆる「21緊プロ」として、機械化一貫作業体系の確立、環境負荷の軽減等に向けた革新的農業機械の開発に取り組んでいるほか、先進技術を駆使した次世代を担う機械・技術の開発に向け、異業種との連携や海外の研究機関との協力体制の強化など、様々な取り組みを進めております。

さて、自然科学を対象にした場合、19世紀は化学の世紀、20世紀は物理学の世紀、そして、21世紀は生命科学の世紀と言われていますが、バイオテクノロジーをはじめとする先端技術は、世界の食料・環境問題、人や動物の健康問題等の解決を図る上からも、大きな期待が寄せられています。

例えば、農林水産・食品の分野で、21世紀の技術として次のように様々な新しい技術の開発・実用化が期待されています。

- ・食料問題の解決に向け、低温、乾燥、塩害などストレスに強い作物の開発
- ・健康の維持・向上に向け、食品の機能性を開発するための新しい成分を含む作物及び

食べるワクチンなどの開発・実用化

- ・環境に優しい農業の実現に向けた、生物農薬等の開発、さらに、残留農薬の分解など環境修復を行う植物の実用化
- ・家畜では、体細胞クローン技術を応用した効率的な改良、医薬品などを乳汁中に分泌する動物工場、DNAワクチン、異種移植用としてヒトに拒絶反応を起こさない動物の開発
- ・生体親和性を持つ素材及び有用物質を生産する工場としての絹タンパク・カイコの利用などが見込まれます。

また、農業機械化分野では、

- ・多様な経営の実態・地域の実情を反映した機械化一貫体系の確立
- ・生産性の向上と環境に優しい農業の実現に向けたプレジジョンファーミングの確立
- ・搾乳作業及び遠隔地からの放牧管理のための情報通信技術の活用
- ・高齢者等の労働軽減を図るため、農作業の様々な分野におけるロボット化などが挙げられます。

このように先端技術の役割、可能性が広がるなか、本年1月6日の中央省庁の再編統合に続き、4月1日には国立試験研究機関の独立行政法人化が予定されており、国においては21世紀における研究の推進体制が整いつつあります。

21世紀の門出に当たり、生研機構と致しましても、豊かな社会、新産業の創出に向け、バイオテクノロジー等の先端技術の分野と農業機械の分野を車の両輪として研究開発を図り、関係者一丸となって努力していく所存でありますので、皆様のご支援、ご協力をよろしくお願い申し上げます。

TsUTSUMI Hidetaka

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3-18-19

◀総説▶

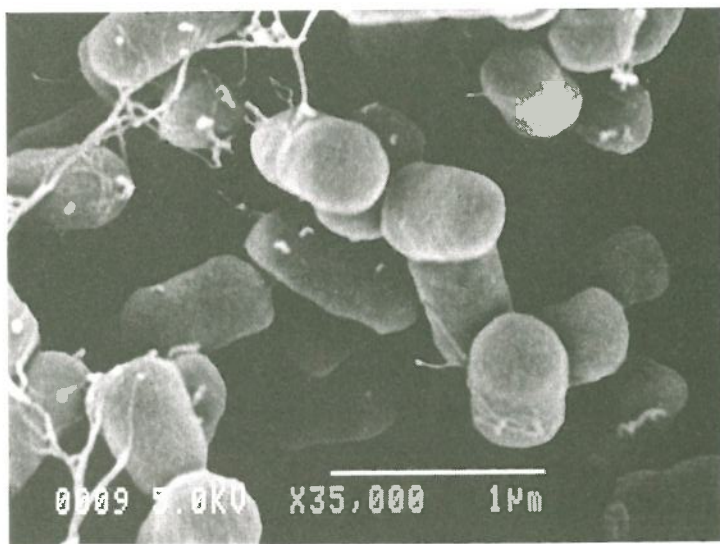
## 生鮮野菜・果物の微生物学的安全性確保 に関する最近の研究動向

農林水産省 食品総合研究所流通保全部  
一 色 賢 司

腸管出血性大腸菌O157:H7 (O157) 等の病原体を媒介する可能性は、生食される野菜・果物では加熱後摂取される食品よりも高くなる。先進国を中心に、英知を集め生食用野菜・果物の持つ潜在的なリスクを低減化するための研究開発が続けられている。O157対策に関する研究開発を中心に紹介する。

### 1. はじめに

食べる前から全ての人に100%安全であると保証ができる食品は存在せず、特に生食用



写真：腸管出血性大腸菌O157:H7

の野菜では加熱食品よりもリスク（起こるかも知れない不都合）を多く有している<sup>1,2)</sup>。安全だったと過去形で言えても、食べる前にはどのような食品も安全性が高いとしか言えない。我が国の低い食料自給率、そして独自の食文化を考え合わせると、生鮮野菜・果物を含む生食文化の安全性確保研究やその消費者（国民）教育が積極的に行われることが望まれる。米国では農業を重要視し、大統領主導で強力な食品の安全性向上キャンペーンがくり広げられている。ヨーロッパでは、伝

ISSHIKI Kenji  
〒305-8642 つくば市観音台2-1-2

統的に農業を大切に考え、それぞれの食文化へのこだわりを示し、さらに安全性確保へのこだわりを示している。

四季折々の変化を生かした多彩で美味しい日本の料理は消えてしまうのではないだろうか。前提条件を無視してHACCPにジャンプする前に、生産から消費までの食品衛生思想の普及を優先させるべきではないだろうか。米国の“Food Safety Initiative<sup>3)</sup>”や、ECの“White Paper on Food Safety<sup>4)</sup>”を食品の質だけの問題と解釈するのではなく、安全な食品の質と量の安定確保は農業を大事にするところから始まると解釈すべきではないだろうか。

### 2. 非加熱と加熱

食の分業化が進み、人間は生物を食べていることを理解できない人々が、増えている。現在、健康志向や味覚、清浄感が生鮮野菜・果物の消費増加の要因となっているが、腹が減ればどんな不潔な野菜や果物でも食べてしまい、立派な建前論やルールも無視されてしまう。野菜の安全性確保にも分別ある人間が必要である。その一方で、欧米生まれのHACCPおよびISO9000sなどの食品の衛生・品質管理に係わる国際的枠組みが強化され、内容よりも形式が先行しているようにも思われる<sup>5,6)</sup>。これらの手法の導入に当たっては、生物としての野菜・果物の本質を見失わず、形式にとらわれて内容を無視することがない

よう、特に環境の変化に対応できるよう工夫していただきたい。野菜生産・供給は動的な柔軟性に支えられており、気候風土を無視した硬直化した管理手法では変化に対応できない。

先進国を中心として病原体の特性の解明研究や、制御技術の開発研究が進められる中で、食中毒対策を超えて感染症対策が必要なことが判明した。特に、生食される農作物では、農業者にも生食食品を取り扱っているという自覚が求められるようになった<sup>11)</sup>。加熱(kill step)によりO157等の病原体のリスクを回避あるいは低下させることができるが、加熱せずに食されることがある農産物の衛生管理が問題となっている<sup>7-9)</sup>。kill stepがない生食野菜や果物は、加熱調理食品では消去されるO157等のリスクを持ち続けている。生産から最終消費に至るまで全員で気を配らなければ、そのリスクはさらに高くなることも明らかにされている。病原菌も一所懸命生きている<sup>10)</sup>。病原菌に生まれ変わったと仮定して、生き残り作戦(サバイバルゲーム)を展開することは、危害防止の予防の良い参考となる。

O157の耐熱・耐酸性の獲得に象徴されるように、微生物には環境への適応力や増殖力を有するものがある<sup>11-13)</sup>。人間は微生物のいない世界では暮らしていけない。肥沃な土壌や堆肥、あるいは発酵食品も微生物なしには作ることもできないが、病原菌は我々にとっては困った存在である。我々は被害を怖れて過去の経験を頼りに、殺したり、増殖を抑制したりして難を逃れている。現在、最も確実なO157対策は、加熱とその後の衛生管理である。非加熱の生食野菜は、O157の隠れ家になる場合もある。

### 3. 病原体と野菜

国境を越えて生鮮農産物が移動し消費される量も増え、国際的な安全性確保の再検討・再構築が必要となっている。加熱できない野菜の衛生管理技術の発展も切望されている<sup>14,15)</sup>。

食品や原材料の国際的な流通消費が増大し、食品の安全性確保について世界的に英知を集め基本的な合意を得ることが必要となった。国際食品規格委員会(FAO/WHO/CODEX)では、1997年に「食品衛生の一般原則」を採択し、一般原則を遵守することが食品の安全性ならびに有用性の確保には必要であることを合意した<sup>16)</sup>。さらに、この一般原則は、産物、工程等の個別の衛生規範ならびに付属文書「HACCPシステムおよび適応のためのガイドライン」と一緒に使用し、さらなる衛生管理に取り組むべきであることを合意した。我が国では、HACCPに目を奪われ、HACCPの前提条件である一般原則と個別の衛生規範が無視される傾向が見うけられる。一般原則

表1 野菜からの大腸菌の検出

年度	検体名	検体数	陽性(%)
10	ダイコン	202	8 (4.0)
	ニンジン	203	9 (4.4)
	キャベツ	90	11 (5.8)
	ネギ	226	14 (6.2)
	レタス	197	10 (5.1)
	キュウリ	198	13 (6.6)
	トマト	215	2 (0.9)
	タマネギ	182	1 (0.5)
	カイワレ大根	299	67 (22.4)
	アルファルファ	77	11 (14.3)
11	ハウレンソウ	182	20 (11.0)
	カイワレ大根	197	13 (6.6)
	アルファルファ	51	2 (3.9)
	モヤシ	225	67 (29.8)
	ミニトマト	179	5 (2.8)
	カット野菜	161	5 (3.1)
	その他	300	27 (9.0)

厚生省報告を抜粋。文献8)参照。

表2 腸管出血性大腸菌O157:H7の特徴

1. 発症菌量(10~100)が少ない。
2. 保菌動物は牛のみではない。
3. 原因食は、肉のみではない。
4. 有機肥料は要注意である。
5. 牛糞中では57日以上生きる。
6. 水泳も要注意である。
7. 水中では80日は生きる。VBNCで、さらに長く存在する。
8. 熱と酸に抵抗性を獲得する。
9. 人から人に感染する。
10. 世界的な問題である。

VBNC: 存在するが、培養によりコロニーとして確認できない状態。



表3 新鮮野菜・果物から検出された病原微生物の例

野菜・果物	病原微生物
アルファルファ	エロモナス、サルモネラ、腸管出血性大腸菌O157:H7
アーチチョーク	サルモネラ
アスパラガス	エロモナス
アイスベルグレタス	腸管出血性大腸菌O157:H7、赤痢菌
イチゴ	A型肝炎ウイルス、クリプトスポリディウム原虫
カリフラワー	エロモナス
キャベツ	リステリア、腸管出血性大腸菌O157:H7、コレラ菌、エルシニア
グリーンサラダ	サルモネラ、ポツリヌス菌
クレスモヤシ	サルモネラ、黄色ブドウ球菌
コリアンダー	セレウス菌
シラントロ	腸管出血性大腸菌O157:H7
スイカ	腸管出血性大腸菌O157:H7、サルモネラ
セロリ	黄色ブドウ球菌、リステリア、エルシニア、キャンピロバクター
大根	キャンピロバクター、サルモネラ、エロモナス
大豆モヤシ	黄色ブドウ球菌、セレウス菌
種モヤシ	サルモネラ
チリ	リステリア、サルモネラ
トマト	黄色ブドウ球菌、リステリア、エルシニア
ニンジン	エロモナス
ブロッコリ	リステリア
包装済みサラダ	リステリア、サルモネラ
豆モヤシ	サルモネラ
メロン	赤痢菌、エロモナス、リステリア、黄色ブドウ球菌、ポツリヌス菌、エルシニア
野菜サラダ	サイクロスポーラ原虫
ラズベリー	腸管出血性大腸菌O157:H7、赤痢菌、A型肝炎ウイルス
レタス	赤痢菌
若タマネギ	

この他に、加熱不足が指摘されているオレンジおよびリンゴジュース(腸管出血性大腸菌O157:H7)やオレンジジュース(サルモネラ)、疫学的に原因食品として厚生省が指摘したカイワレ大根(腸管出血性大腸菌O157:H7)がある<sup>34-36)</sup>。

は、HACCPを採用するか否かにかかわらず、生産から消費までの安全な食品を確保するための必要条件である。

フードチェーンと呼ばれるように、食品の生産は農業から始まる。農業者もこの一般原則を理解し、食品の安全性確保にさらなる貢献することが要請されている。特に、加熱せずに食される生鮮野菜・果実の衛生管理では、その種子の栽培現場から食品としての取扱が必要であることが明らかになり、生鮮野菜・果物に関する衛生規範作成の準備が進められている<sup>6)</sup>。流通者、加工者、消費者の責任分担もCODEX食品衛生の一般原則では明示している。

欧米先進国を中心に、野菜や果物が病原体を媒介したために発病したと考えられる事例が近年増加している。我が国では、生野菜・果物が原因となった食中毒事例は比較的少ないが、潜在的脅威となっている<sup>17)</sup>。特に、表

1のように大腸菌(大腸菌群の中の)が検出される野菜が多いと報告されたことが注目される<sup>8)</sup>。この現象をどのように解釈すべきか、英知を集め検討すべきである。大腸菌が検出されるということは、糞便由来の伝染病菌や寄生虫がいても不思議はないというのが、これまでの常識である。

さらに、実験的にレタス等にO157を付着させると、次亜塩素酸ナトリウム等の殺菌剤で処理しても生き残る菌が多く<sup>15)</sup>、リンゴにおいては過酢酸や過酸化水素を配合した殺菌洗浄剤を高濃度で使用しても生存が認められることが報告されている<sup>18,19)</sup>。アルファルファの種子に付着させたO157は、2%もの高濃度の次亜塩素酸カルシウムで10分間殺菌した場合にのみ、1/100万に菌数が減ることが報告されている<sup>20)</sup>。洗浄・殺菌処理により付着したO157の菌数は減少するが、O157は洗浄・殺菌に抵抗するバイオフィームを作るこ

とも知られており<sup>11)</sup> (表2), 大腸菌が検出される野菜・果物があること<sup>8)</sup>や, 洗浄・殺菌後もO157が生存する可能性があることが懸念される。

Beuchat教授(ジョージア大学)や米国疾病管理センター(CDC)のTauxe博士の疾病事例研究や著者がこれまでに得た情報を, 生鮮野菜・果物と病原体の組み合わせとして整理すると表3のようになる<sup>2,7)</sup>。加熱されずに摂食される野菜・果物は, 病原体の汚染を受け発病を媒介する可能性がある可能性を持つことは否定できない。非加熱殺菌技術<sup>18, 21-23)</sup>の開発が望まれる。その一方で, 消費者を含む全ての国民に生産あつての消費であることや, 生産や流通の実態を理解していただき, リスクを回避する努力を求めると考えられる。食生活に伴う微生物による健康被害をリスクとして科学的に捉え, 必要な対策を取るための研究が開始されている<sup>24)</sup>。定性のみならず定量的考察が必要とされ, 病原体の微生物としての基礎的なデータと疫学的事例研究が積み重ねられている。

誰が食べるかも十分に考慮されなければならない。同じ食品や同じ量の病原菌を摂食しても, 誰が食べるかによって, 無症状であったり, 発症したり最悪の場合は死を招く場合もある。その一方で, 免疫機能による抵抗力を獲得するためには, 病原体やワクチンで感染される必要があることも忘れてはならない。毒性が強く発症菌量の少ない病原体に対する免疫力の獲得法については, さらに基礎的な研究が必要である。O157等の感染はわずかな菌量でも成立し, 抵抗力の弱い年少者, 年長者, 免疫不全等の人あるいは体調の悪い人は, 健常な成人よりも注意が必要である<sup>11)</sup>。

米国政府は, 食中毒原因としてアルファルファやクローバーモヤシが疑われる事例が終息しないため, 芽物野菜生産者に種子や栽培水, 製品の検査を求め, 生産工程管理を厳しく指導<sup>25)</sup>するとともに, 安全性確保ができるまで生で食べないように勧告を行った<sup>26)</sup>。我が国では, 厚生省が1996年にO157感染症の原因食品としてカイワレ大根を否定できない

と判断したことを受けて農水省では, より安全性の高いカイワレ大根を栽培するための調査研究を行い, 「カイワレ大根生産衛生管理マニュアル」を1996年に取りまとめ, 1998年に改訂を行った<sup>26)</sup>。また, 1999年5月には「水耕栽培の衛生管理ガイドより安全な水耕葉菜類生産のために―」を取りまとめた<sup>27)</sup>。他の農産物の衛生管理の高度化にも貢献すべく検討を重ね調査研究を行っている。牧場や養鶏場等から始まる動物性食品の安全性確保努力も絶え間なく続けられている<sup>28)</sup>。

#### 4. GAP, GMP, そしてHACCP

食品の衛生管理におけるHACCPの導入の有効性は国際的に認められているが, HACCPプランの作成と実施には, 危害要因の解析やその克服法の評価等, 科学的実験結果が必要である。科学的事実の不足と状況変化の多様性, 特に未知の病原体やO157等の性質が解明されていない病原体の存在を考え併せると, リスクの低減化が目標と考えられる。特に, 野菜は, 天然自然の恩恵を受けながら, 言い換えれば自然の影響下で生産されるため, 不確定な要素が多くHACCPの導入以前の解決すべき課題が多い。

米国では, 各省庁が協力し, 各州政府, 大学等の協力も得ながら基礎研究を強化推進させるとともに, 適正農作業規範(GAP, Good Agricultural Practice)の確立・成文化を進めている。生鮮農産物をGAPにより適正に生産し, その後の食品としての加工を適正製造規範(GMP, Good Manufacturing Practice)で行うことを目指している。FDAは, 野菜や果物が媒介した食中毒の増加への対策として, 国民に注意を喚起するとともに, 「新鮮な果物及び野菜の微生物による食品の安全性における危害を低減化するためのガイド」<sup>30)</sup>を提示し, 有効活用を指導している。本ガイドの簡略版も, 最近作成され配布している<sup>31)</sup>。

米国農務省ベルツビル研究センター(BARS)のMillner部長は, 農業における有機肥料, 堆肥の役割の重要性を認識している

人は多いが、衛生的な堆肥の作り方や施肥の方法を理解し実践している人は少ないと語った。広大な土地を十分に有する米国と、国土が狭い我が国では、堆肥化方法や施肥方法も異なることを忘れずに米国の研究成果も活用すべきであろう<sup>32,33)</sup>。リスク低減化の努力は、生産から消費に関わる全ての人々に求められるべきである。ジョージア大学食品安全・品質向上センターのDoyle所長は、O157の性質には不明な点が多く、環境への適応性を誘導され、コイン上でも数日は生きており、水中ではVBNC（培養できないが、死んだ確証が得られない状態）なることを憂慮していた<sup>11)</sup>（表2）。

GAPも成文化されてから実施を考えるのではなく、汚水を使わないことや、野菜畑に動物を入れないこと、あるいは未熟な堆肥を施肥しないことなど、「止めた方がよいことを止めること」から始めるべきであろう。カリフォルニアのレタス畑では、農作業用のトラックにトイレと手洗いが準備されていた。国情や文化の違いもあり、我が国では我が国の農業に適したGAP、さらには各農家に適したGAPを気付いた箇所から実践していくことに大きな意義があると思われる<sup>30)</sup>。

## 5. おわりに

生鮮農産物の安全性確保には、動的で柔軟な対応が必要である。天候異変や経済状況の悪化による悪条件下での安全性確保も覚悟しておく必要があり、悪条件下での研究に力を注いでいただきたい。敵も分からず、誰を危害から守るかも分からずに、ただ闇雲に安全を農家等の生鮮農産物取り扱い関係者に要求しても混乱を招くだけである。また、技術に走り病原体はいないが、本来持っているべき栄養価値や機能性を失い、美味しくもない野菜や果物となつては、困ってしまう。もちろん、妥当な価格であって欲しいものである。

農場の立地条件や堆肥の作り方、灌漑用水や作物への与え方等々、食水系感染症防止の観点からは不明な点が多く、基礎研究なしに

は今後の展開が難しい。野菜・果物を含む食品の安全性確保について生産から消費までの全段階における衛生管理の徹底と、そのための基礎研究や技術開発が必要である。生産農場から食卓まで、生食食文化を維持発展させる努力が、その他の衛生問題の克服にも役に立つと期待される。生活者としての国民全員の衛生意識の向上が生鮮野菜・果物の安全な消費には必須事項であり、適切な対策が望まれる。

## 文 献

- 1) 一色賢司：日本食品微生物学会誌，17，31-35 (2000).
- 2) L.R. Beuchat: *J.Food Protect.*, 59, 204-216 (1996).
- 3) US. EPA, DHHS, USDA: Food Safety From Farm To Table, A Report to the President. (1997).
- 4) EC: White Paper on Food Safety, COM (1999) 719 (2000).
- 5) 豊福肇：食品衛生学雑誌，39, J-361-371 (1998).
- 6) 一色賢司：月刊HACCP，5 (6)，69-73 (1999).
- 7) R.Tauxe, et al.: *J.Food Protect.*, 60, 1400-1408 (1997).
- 8) 小沼博隆：日本食品微生物学会雑誌，17, 37-41 (2000).
- 9) 上田成子，桑原祥浩：日本防菌防黴学会誌，27, 369-376 (1999).
- 10) W.F. Fett: *J.Food Protect.*, 63, 625-632 (2000).
- 11) M.P.Doyle，一色賢司：月刊フードケミカル，15 (7)，2-5 (1999).
- 12) C.H. Liao, G.M. Sapers: *J.Food Protect.*, 63, 876-883 (2000).
- 13) Y.Hara-Kudo, et al.: *Appl. Environm. Microbiol.*, 66, 2866-2872 (2000).
- 14) J.P. Cherry: *Food Technol.*, 53 (11), 54-59 (1999).
- 15) K.Takeuchi, J.F. Frank: *J.Food Protect.*,



- 63, 434-440 (2000).
- 16) CODEX COMMITTEE ON FOOD HYGIENE: Recommended International Code of Practice General Principles of Food Hygiene: CAC/RCP 1-1969, Rev.3 (1997).
- 17) 金子賢一：食品衛生学雑誌，40, 417-425 (1999).
- 18) M.A. Wisniewsky, et al.: *J.Food Protect.*, 63, 703-708 (2000).
- 19) R.L. Buchanan, G.M. Sapers: *J.Food Protect.*, 62, 444-450 (1999).
- 20) P.J. Taormina, L.R. Beuchat: *J.Food Protect.*, 62, 318-324 (1999).
- 21) 松田敏生：食品衛生学雑誌，41, 163-170 (2000).
- 22) T.Ogawa, et al.: *J.Food Protect.*, 63, 884-888 (2000).
- 23) K.T. Rajkowski, D.W. Thayer: *J.Food Protect.*, 63, 871-875 (2000).
- 24) 藤川浩，小久保彌太郎：日本食品微生物学会誌，16, 87-98 (1999).
- 25) US. FDA: Guidance for Industry: Reducing microbial food safety hazards for sprouted seeds and guidance for industry: sampling and microbial testing of spent irrigation water during sprout production, Federal Register: October 27, 1999 (Vol.64, No.207).
- 26) P.Kurtzweil: *FDA Consumer* (USA), 33, Jan.-Feb., p.28-22 (1999).
- 27) 社団法人日本施設園芸協会：カイワレ大根生産衛生管理マニュアル策定委員会報告（改訂版），(1998).
- 28) 社団法人日本施設園芸協会：水耕栽培の衛生管理ガイドーより安全な水耕葉菜類生産のためにー，(1999).
- 29) 小久保彌太郎，茶園明：日本獣医学会誌，53, 1-9 (2000).
- 30) US. FDA: Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables (1998).
- 31) US. FDA: The Guide at a Glance. Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables In Brief (2000).
- 32) B.G. Harmon, et al.: *J.Food Protect.*, 62, 574-579 (1999).
- 33) J.V. Gagliardi, J.S. Karns: *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 877-883 (2000).
- 34) Y.Hara-Kudo, et al.: *J.Food Protect.*, 60, 1125-1127 (1997).
- 35) Y.Ito, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1532-1535 (1998).
- 36) M.L. Bari, et al.: *J.Food Protect.*, 62, 128-132 (1999).

◀国内情報▶

## 食品に応用できる可能性を持つ 新規殺菌技術について

農林水産省 食品総合研究所

五十部 誠一郎・植村 邦彦

食品の安全性確保のための微生物制御技術について当方で実施した「病原性大腸菌」プロジェクトでの液体通電殺菌技術の成果と関連した高電圧パルス処理及び非熱的な食品表面処理として注目されるソフトエレクトロン処理、電解酸性水処理について紹介する。通電殺菌処理では通電加熱による材料の温度上昇効果と電界印加による電気穿孔の効果を併用することで、短時間で効率的な殺菌を行うことが確認された。

### 1. はじめに

昨今の食品事故に見るように、食品産業における微生物制御の必要性は異物混入阻止と同様に非常に高まっている。特に消費者は食品の安全性を従来以上に要求しており、これらの要求を満たすためには食品製造における高度の製造管理技術の早急な構築が望まれる。研究開発分野においても、加熱殺菌の最適化や死滅予測、汚れの付着とその洗浄技術の検討、洗浄における除菌効果、さらに非熱的微生物制御についての検討が積極的に行われており、従来の加熱殺菌処理のみならず、汚れや微生物の洗浄・除菌、生の原料の微生物制御などが重要になっていることを示していると思われる。野菜や畜肉類、魚介類などは本来健康な組織内に病原菌等の存在は認められない。収穫から1次処理、貯蔵・流通において微生物の付着・繁殖による2次汚染が主であり、対策としては表面の微生物制御を如何に品質を損なわずに行うかが、これらを原料とした食品加工の微生物的安全性確保の大きな鍵となる。もう1つは果汁飲料や水などの液体の効果的な殺菌技術の開発である。ここでは、食品の安全性を高めるための微生物制御技術の検討について、当方で実施していた「病原性大腸菌」プロジェクトでの液体殺菌技術の開発成果と関連した高電圧パルス殺菌処

ISOBE Seiichiro, UEMURA Kunihiro

〒305-8642 つくば市観音台2-1-2

理の紹介といくつかの非熱的な食品表面の微生物制御処理について紹介する。紹介する電気処理等を用いた非熱処理は新しい微生物制御技術として期待されている。さらに省エネルギーや排熱・排ガスの低減による環境負荷低減の効果も併せて期待される。加熱処理ではほとんどの場合が間接加熱処理であり、食品への加熱の際の排熱などによる効率の低下と作業環境の劣化を引き起こす。そこで加熱処理でも、直接加熱処理である通電加熱などの効率的な処理もあまり食品の熱劣化を引き起こさない、かつ、熱効率のよい処理として注目されている。非熱処理はもちろん、これらの排熱によるエネルギーの損失は生じないし、処理自体の消費エネルギー量も小さいと言える。簡単に非熱処理の持つ特徴をまとめたものを表1に示す。さらに、表2に最近、筆者が注目している非熱処理と主な応用例についてまとめたものを示す。ここでは食品の安全性や環境負荷の観点から従来からの薬剤的な処理による微生物制御については触れていないが、これらの薬剤的処理においてもその効果を保持しつつも残存性の少ない、さらに品質劣化の少ない薬剤の使用や適正な使用方法の検討が不可欠であることは言うまでもない。

### 2. 病原性大腸菌プロジェクトでの成果

本研究では図1のような通電加熱と電界印加の二つの作用を同時に与えることで液状食

品の効率的な殺菌装置を開発した<sup>1)</sup>。

大腸菌、酵母、芽胞菌の殺菌について検討した結果、以下のことが判明した。連続交流電界を用いて液状食品中の大腸菌を連続的に処理できる殺菌装置を開発した。殺菌は通電加熱による材料の温度上昇効果と電界印加による電気穿孔の効果を併用することで、短時間で効率的な殺菌を行うことが確認された。低濃度の食塩水に大腸菌を添加した液状食品のモデル系に対して20kHz、10kV/cmの交流電界を印加した通電殺菌を行ったところ、通電加熱により70℃まで液温が上昇し、急冷したサンプル中の大腸菌数を10<sup>5</sup>オーダー低下させることができた。食塩水の濃度を変えた実験から、通電殺菌は処理温度が一定の場合には印加電界強度が高いほど殺菌効果が高いこと、また印加電界が同じ場合には処理温度の高いほうが殺菌効果が高いことから、両パラメータが基準値を超えた場合に最も効率的な殺菌が実現できることがわかった。またマイクロ波加熱の実験結果より、殺菌が加熱による温度の効果だけでないことがわかった。通電処理における電気化学的な副作用についてpH測定、スカベンジャーによるラジカルの消去実験を行ったところ、通電処理前後で、pHが変化せず、本殺菌が活性酸素によるものでないことがわかった。大気圧下における殺菌は十分に芽胞菌を殺菌することが困難であったため、加圧下で連続的に行える加圧殺菌装置を開発した<sup>2)</sup>。オレンジジュースに芽胞菌の胞子を添加し、加圧殺菌を行ったところ、加圧殺菌処理は、100℃ 5分間の煮沸加熱よりも殺菌効果が高く、初発菌数から10<sup>4</sup>オーダー以上低減させる殺菌能力を有することがわかった。一方、ビタミンCの残存量は加圧通電加熱、マイクロ波加熱、煮沸加熱の順で少なくなった。つまり、加圧通電殺菌は耐熱性の芽胞菌に対しても高い殺菌効果を持ちながら、熱に弱い有用成分（ビタミンC）や加熱臭の発生が抑えられる高品質な殺菌方法であることがわかった。

本装置は電極の構造上、扱える材料は液体に限られるが、このままでも本研究で扱った

表1 非熱殺菌処理の持つ特徴

利点	欠点（考慮すべき点）
<ul style="list-style-type: none"> <li>品質保持・劣化抑制（熱劣化等の変質防止）（色、香りの保持）</li> <li>生鮮物などの殺菌が可能</li> <li>処理時のエネルギー節減</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>熱変化による品質改善が期待できない</li> <li>殺菌の確実性</li> <li>装置コストや既存工程の改良の必要性</li> </ul>

表2 最近の関心を持たれている非熱殺菌処理

操作媒体	操作の方法	研究例、応用例
静水圧	高圧処理	殺菌、酵素失活、酵素反応の制御、蛋白・澱粉等の変性
電気	高電圧パルス処理（高周波）通電処理	電気穿孔による細胞破壊 液体試料での殺菌処理（ジュール熱及び電界効果の併用）
	電極接触処理	電子移動反応による細胞死滅、水の殺菌等で実用化
	高圧静電場処理 水の電解処理	鮮度保持 酸性水による殺菌、医療・食品工業・農業で利用
磁場	磁場処理	高磁場下での増殖抑制
電子線	ソフトエレクトロン処理	電子線強度を弱めた表面殺菌処理
光	高強度の光パルス処理	表面殺菌処理（紫外線+αの効果）
ガス	加圧操作によるガス溶解 除圧によるガス化	不活性ガスの溶解による鮮度保持、ガス溶解及び除圧処理による細胞破壊

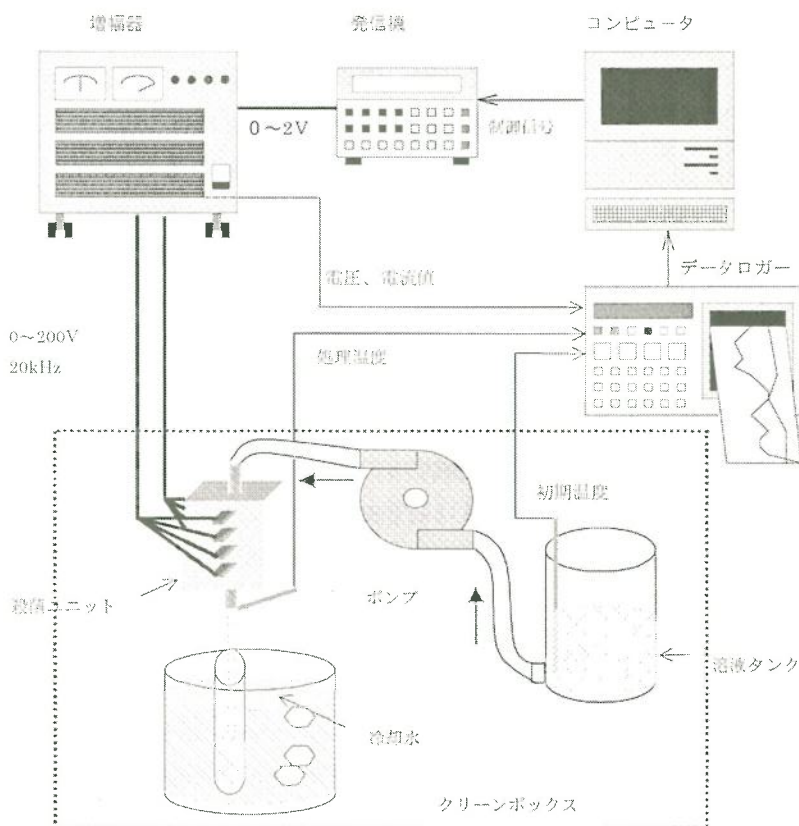


図1 通電殺菌装置



液状食品以外にも農業用水や工業用水などの殺菌処理にも適用可能である。また、電界の印加方法を工夫することで、液状材料に固形物が混入したような材料への応用展開が期待される場所である。さらに、通電加熱以外の物理的エネルギーを用いたものの併用により、食品材料または対象とする微生物の適用範囲を広げることが期待される。ただし、本研究では通電処理によって細胞膜が電気穿孔され、結果的に細菌が死に至ったことの実事確認が十分に行えたとはいえないと同時に、装置の簡便性・低コストの利点を保持したまま、処理量増加などの実用化のための改良についても検討しなければならない。

これらの成果は食総研・製造工学研・植村邦彦主任研究官が中心となって得られたものであり、詳しい成果については現在論文等を投稿中である。

### 3. 高電圧パルス殺菌処理

高圧パルス電界処理は、微生物への膜破壊を生じさせる臨界電圧以上の高圧を設定し、極短時間のパルス処理（1マイクロ秒弱）を行うことで、電界処理時の内部での電気変性や化学変化を防止して処理を行うものであり、日本では群馬大学の佐藤氏により精力的に研究がなされている。飲料への適用例として関連する特許<sup>31</sup>において触れている実施例を紹介すると、*Lactobacillus brevis*の菌体を懸濁したビール（生菌数 $1.9 \times 10^8$  cells/ml）で電界強度20kv/cm、滞留時間11分、印可パルス数5280（450/分）で印可した場合で、完全に死滅できたとしている。この場合、ビール品質は通常分析値及び試飲による比較テストでも処理前後で変化がなかったことを述べている。この高圧パルス処理は果汁飲料や酒類等に有効な制菌処理としている。Qinらの総説<sup>41</sup>はスキムミルクや液卵、豆のスープなどの検討例を示している。比較的高い殺菌効果を期待するには、ある程度の処理時間（パルス回数）が必要であり、大量処理等が求められる食品（飲料等の液状物）において

は電極の設計や臨界電圧を設定するための電極間距離と発生電源の仕様等クリアにする課題は多いが、最近の内外のレポート数からも最も注目されている非熱殺菌システムであろう。また最近では、気中雰囲気での高電圧パルス処理による殺菌処理機についても米の殺菌装置として報告されている<sup>32</sup>。高電圧状態でのパルス・ストリーマ放電を用いたこの方法は、対象となる最近の細胞膜の内外での電位差による破壊、機能障害を生じさせ、さらに放電により生じたヒドロキシラジカルやオゾン等の各種ラジカルに晒される影響を受けて効果的に殺菌されると説明している。このパルス殺菌も殺菌効果を確保するためには、印可時間の保持による機会増加が必要であり、その殺菌効率も90~99%以上としているが、100%の保証は困難である。しかし、穀類や香辛料の付着細菌を熱処理を経ないで一定細菌数以下に静菌が出来、そのコストも安価である（2円/kg玄米）ことから、このシステムは高品質穀類貯蔵システムとしては、十分に実用化の可能性はあると考える。

### 4. ソフトエレクトロン処理

従来の放射線処理とは異なり30万電子ボルト以下の低エネルギーの電子線（ソフトエレクトロンとよばれる）を用いた食品殺菌技術について検討されている<sup>61</sup>。加熱殺菌には適さない素材への放射線殺菌はいくつかの対象に絞って実施されているが、放射線照射によっても品質劣化が生じる場合があり、また遮蔽装置も必要となる。ソフトエレクトロンを用いることで、電子線の透過力を抑えて、表面近傍のみでの殺菌処理を行うことで、対象物の品質劣化を抑えている。またこの技術では電子線の透過力が弱いために遮蔽等についても電子顕微鏡レベルの遮蔽で十分であるなど、装置コスト面でも改善された。表面殺菌を確実にを行うためには対象物への全表面照射が不可欠となるため、試料への均一な照射のための振動装置も併せて試作している。既に米、小麦、香辛料、豆などの処理で殺菌効果

を認めると同時に、デンプン等の品質劣化が少ないことを確認している。殺菌効果が他の非熱処理に比べて大きいことや大量処理システムなどへのスケールアップが比較的容易と思われ、今後の実用化への検討が期待される。

## 5. 電気分解処理による酸性水

電気分解処理により生成される酸性水（強酸性水）の殺菌効果も電界処理を利用した非熱殺菌処理法ととらえることが出来る。多くの酸性水生成装置の場合、食塩等の添加により解離を促進して強酸性水を得ている。これらの水は酸性（pH 2～3）、さらには塩素、次亜塩素酸による制菌効果を持つ。食品工業への利用可能性として食品や加工器具類の殺菌効果についての検討結果が報告されている<sup>7)</sup>。大腸菌やサルモネラ菌、腸炎ビブリオ菌などの食中毒菌に対する効果も確認している。さらには実際の食品としてキャベツやカイワレ菜などの野菜やうどんや魚介類への殺菌効果を検討している。これらの結果は、次亜塩素酸による酸化作用による殺菌効果が培地条件や食品の表面性状に左右されてことを示している。残存性の少ない殺菌処理として酸性水が注目されているが、酸化作用が生じやすい条件では微生物死滅のための必要十分量を見極めることが重要である。食肉表面の洗浄・制菌効果についても大腸菌を用いて検討されているが、使用した鶏肉と牛バラ肉では処理後の生菌数による効果には大きな差があり、表面性状に殺菌効果が左右されているので、実際の利用にあたっては最適処理化が不可欠となる<sup>8)</sup>。米国では酸性液で食肉の表面処理等の検討がなされているが、その場合、変色や食味の変化も懸念されており、酸性水での同様の危惧はある。しかし、残存性の少ないこと、洗浄水システムの簡単な装置交換で制菌効果を向上させられることは、農産物や水畜産物等の1次処理としては魅力的であり、カット野菜への利用可能性についての報告もなされており<sup>9)</sup>、農林水産省等の試験研究機関でも基礎的なところからの効果確

認、さらには対象物に合わせた処理方法確立のための検討が進められている。酸性水の殺菌効果の主体を次亜塩素酸としてみた場合には、現在、食品添加物リストに含まれていないことで最終食品の処理には用いられないことになっているが、現在、装置メーカーの協議会が申請を行っている。

## 6. おわりに

今回紹介した非加熱殺菌処理法は、実用段階に至るには幾つかの課題をクリアにしなければならないものが大半である。しかし、今まで大半の殺菌技術が熱依存型であるのに対して、非加熱処理では、あまり食品の熱変化を伴わない処理であり、食品原料の1次処理として安全な原料を供給することが求められている現在、非常に興味ある処理法ではないであろうか？ 生鮮物での表面の微生物制御法としてはHACCPでの製造初期段階でのCCPの処理として有効となる可能性は高い。実用化に向けて、殺菌作用の解明、適正な利用条件の検索など予測手法の開発を含めた検討が望まれる。

## 文 献

- 1) 植村邦彦：「液体の連続殺菌装置及び液体の連続殺菌方法（大腸菌，酵母）」，平成10年特許登録，2848591
- 2) 植村邦彦：「液体の連続殺菌装置及び液体の連続殺菌方法（芽胞菌）」，平成11年特許登録，2964037号
- 3) 特許公報，特願昭62-252561。(1987)
- 4) Qin, B-L. et al, Food Technology, December 1995, 55-60 (1995)
- 5) 長谷川秀翁ら，静電気学会講演論文集 '98, 327 (1998)
- 6) 林徹，食品工業，1998-5.30, 30-36(1998)
- 7) 山中信介，食品加工技術，15, 2, 103-112 (1995)
- 8) 福田久代ら，北畜会報，37, 39-42 (1995)
- 9) 小関成樹ら，日本食品科学工学会誌，47, 9, 722-726 (2000)

## ◀国内情報▶

## 絹の繊維化前の構造と巧みな繊維化のメカニズム

東京農工大学 工学部

朝 倉 哲 郎

カイコは、水に溶けた状態の絹タンパク質から、延伸をかけるだけで、高強度の絹繊維を極めて巧みに、かつ、瞬時に作りだす。固体NMRによって解明された絹の繊維化前の構造を、“繰り返し $\beta$ ターン構造”と名付けたが、分子鎖に沿って、分子内水素結合と分子間水素結合が、交互に形成された、特異な構造であった。絹繊維の繊維化機構の解明は、各種の機能を有する絹様物質を地球にやさしい方法で製造するための技術的基礎となる。

## 1. はじめに

カイコは、水溶液から、室温で極めて短時間に強い絹糸を作成する。しかもその糸は、生分解性を有する。人類が、同程度の強度の繊維を作成しようとするれば、濃硫酸等の有害な有機溶媒を用い、極めて高温で紡糸しなくてはならない、しかも、合成繊維は釣り糸に用いれば、環境を破壊する。我々は、環境にやさしい繊維の開発にあたって、カイコによる巧みな絹の繊維化の機構を先ず、見習ったらどうであろうか。そのためには、先ず、絹の繊維化前の構造がどのようになっているかを知ることが必要である。これまで、絹の繊維化前の構造の研究は数多く行われてきたが、決定的な構造は得られてこなかった。我々は、最近、絹の繊維化前の構造の全容を、主に、固体NMRを駆使して解明することができた。解明のポイントは、配向しない糸でも、原子座標レベルでの精密な構造決定を行なうことのできる固体NMR解析手法の開であった。解明してみると、絹の繊維化の機構は極めて巧みであった。

## 2. 従来の研究

絹の繊維化前の構造はSilk I と呼ばれ、繊維化後の構造であるSilk II と区別される。絹、  
ASAKURA Tetsuo  
〒184-8588 小金井市中町2-24-16

正確には絹フィブロインのアミノ酸組成は、グリシンとアラニンが大部分であり、絹フィブロインは、グリシンとアラニンの交互共重合体と考えることが出来る<sup>1)</sup>。絹の繊維化前の構造解析が困難な理由は、精度の高い構造情報を得ようとして、配向を試みるとSilk I型構造は容易にSilk II型構造に変化してしまうことである。Silk Iのこれまでの構造モデルとして、Lotzら<sup>2)</sup>によるクランクシャフトモデルとFosseyら<sup>3)</sup>によるアウトオブレジスターモデルが知られている。いずれもペプチド基は全て分子間水素結合を形成するモデルであった。前者は、X線回折、電子線回折、コンフォメーションエネルギー計算の結果に基づき、後者は、詳細なコンフォメーションエネルギー計算の結果に基づいている。

## 3. Silk I 構造の解明

その解明に至った解析の流れについて述べることにする。グリシンとアラニンの交互共重合体とした場合、構造決定のためにはグリシンとアラニンの内部回転角を決定することが必要である。まず、Silk I構造の<sup>13</sup>C固体NMR化学シフト（ピーク位置）を定量的に構造解析に用いることを試みた。40個の構造既知のタンパク質について、既に帰属された<sup>13</sup>CNMR化学シフトと内部回転角の関係をアミノ酸残基毎に整理し、<sup>13</sup>CNMR化学シフトをラマチャンドランマップ上に等高線として



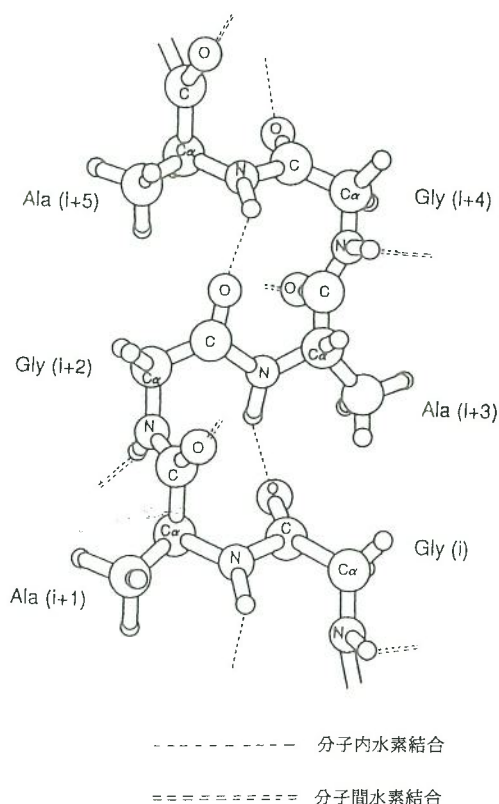


図1a 絹の繊維化前の構造 (Silk I 型の部分構造)

描いた化学シフトの等高線マップを作成した。これによって、Silk I 構造のアラニン残基について、そのとりうる内部回転角の範囲を  $\phi = -80^\circ \sim -20^\circ$ ,  $\psi = 90^\circ \sim 180^\circ$  と特定することができた<sup>4)</sup>。

続いて、2次元固体スピン-拡散<sup>13</sup>CNMRを用いて、アラニンとグリシンの内部回転角の決定を行った。この解析手法は、2ヶ所の<sup>13</sup>C核(数Å以内)を安定同位体ラベルし、その<sup>13</sup>C核間のなす角度を決定する手法である<sup>5)</sup>。すなわち、アラニンとグリシンの交互共重合体(30量体)からなるモデル化合物について、Silk I 構造をとることを確認した後、まず、アラニン残基の内部回転角を決定するための2次元固体スピン-拡散<sup>13</sup>CNMRの測定を行った。そのスペクトルのシミュレーションと上述の化学シフトの制限から、アラニン残基の内部回転角を  $\phi = -60^\circ \pm 5^\circ$ ,  $\psi = 130^\circ \pm 5^\circ$  と決定した。

次に、グリシンの内部回転角の決定を行った。ラベル部位を変えた、Silk I 構造をとるアラニンとグリシンの交互共重合体、30量体

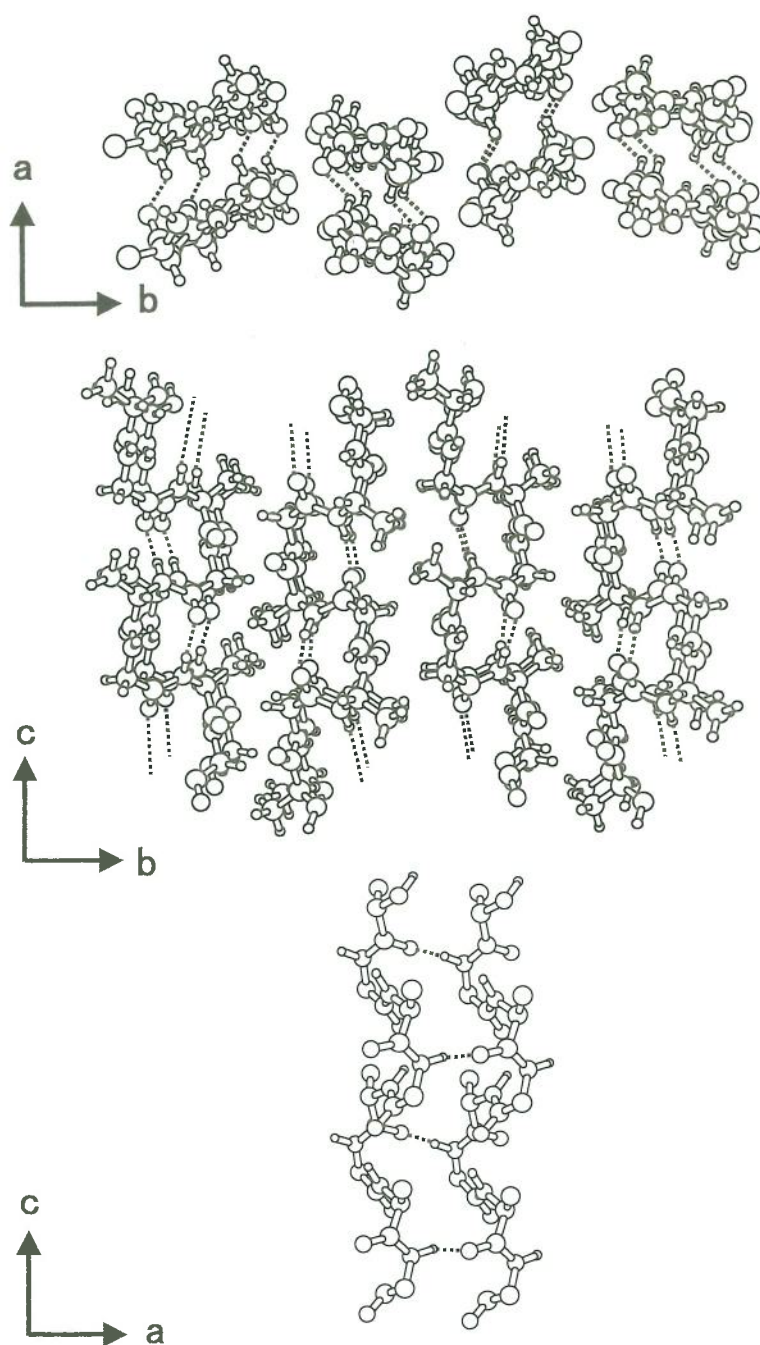


図1b Silk I 型の全体構造

について、2次元固体スピン-拡散<sup>13</sup>CNMRの測定を行った。その結果、ラマチャンドランマップ上で4ヶ所、解が得られた。さらに、X線および電子線解析に基づく、繊維軸方向の格子定数、 $c$ 、の報告値<sup>7)</sup>を参考にして、 $\phi = 70^\circ \pm 5^\circ$ ,  $\psi = 30^\circ \pm 5^\circ$  と決定した。決定されたアラニンとグリシン残基の内部回転角の値を用い、逆平行型のパッキングを考慮することによって、広角X線散乱、WAXSパターンを計算した。実測のパターンとの一致は、

驚く程良く、本モデルがSilk I型モデルであると結論することができた。我々が解明したこのSilk I構造を図1aに示した。全く新しい絹の繊維化前の構造であり、“繰り返しβターン構造”と名付けた。

図1bは、絹分子鎖の構造をab, bc, ca軸方向から、眺めた図である。破線は、水素結合を意味し、ab, ca軸方向から見た図では、分子間水素結合の対を、bc軸方向から見た図では、分子内水素結合の対のみを示している。分子鎖に沿って、分子内水素結合と分子間水素結合が、交互に形成された構造をとっていることがわかる(図1a)。そこで、最終的な確認をするために、安定同位体ラベル原子間の距離を厳密に決定できる固体NMRのREDOR法を用いて、分子内水素結合に関与する<sup>13</sup>C核と<sup>15</sup>N核の間の距離を決定した。結果は、 $4.0 \pm 0.1 \text{ \AA}$ と得られ、分子内水素結合が証明された。

#### 4. 繊維化機構の説明

このSilk I構造によって、絹の繊維化の機構が説明できる。すなわち、紡糸の際、糸の先端を固定した後のカイコの首振り運動によって、繊維軸方向への延伸がかかり、分子内水素結合が切れ、分子間水素結合に移行することによって、全ての水素結合は分子間水素結合に変わる。その際、その分子間水素結合の方向は、繊維軸に垂直であり、繊維軸に対する横方向からの力に抗する分子間水素結合のネットワークが、瞬時に作成される。すなわち、絹繊維は、切れにくくなる。特に興味深いのは、このβターン構造(図1a)は、3番目の残基(Gly(i+2))の位置に側鎖が有る場合、2番目の残基(Ala(i+1))のカルボニル酸素と立体障害を起こすので、3番目の残基は、選択的にグリシン残基でなくてはならない点である。すなわち、タイプII型のβターン構造が繰り返すためには、グリシンが分子鎖に沿って、一個おきに存在する必要がある、かくして家蚕絹の一次構造は、グリシンの交互共重合体となったわけである。

さらに明らかにしなくてはならないのは、Silk I構造は、水に溶けている点である。その役目を担っているのがチロシンである。アラニンとグリシンの交互共重合体は水に不溶であるが、その中に、チロシン残基が存在すると急激に可溶となる<sup>7)</sup>。家蚕絹の一次構造中には、かくして周期的にチロシン残基が存在する。以上のように、Silk I構造が解明されてくると絹様物質を作成するためには、その巧みな構造転移の機構を利用して、どのように分子を設計しなくてはならないかが、明らかとなった(詳細は、Journal of Molecular Biologyに印刷中である)。

以上の結果は、当研究室で過去20年にわたる成果である。特に、1997年から、開始された生研機構の基礎的研究事業のプロジェクト“絹タンパク質の構造-物性相関の徹底解明とバイオセンシングシステム等への応用”によって、研究が大いに進展し、本構造を決定するに至った。記して感謝いたします。

なお、本プロジェクト研究においては、これらの絹タンパク質の構造・物性等に関する新しい知見を生かして、優れた特性・機能を持った新規絹様物質等の開発を目指している。

#### 文 献

- 1) R. E. Marsh, R. B. Corey, L. Pauling, *Biochem. Biophys. Acta* 16, 1 (1955).
- 2) B. Lotz, F. C. Cesari, *Biochimie*, 61, 205 (1979).
- 3) S. A. Fossey, G. Nemethy, K. D. Gibson, H. A. Scheraga, *Biopolymers* 31 1529 (1991).
- 4) T. Asakura, M. Iwadate, M. Demura, M. P. Williamson, *Int. J. Biol. Macromolecules*, 24, 167 (1999).
- 5) J.D.van Beek, L.Beaulieu, H.Schafer, M.Demura, T.Asakura, B.H.Meier, *Nature* 405, 1077 (2000).
- 6) S. Ichimura, K. Okuyama, *Polymer Preprints Jpn*, 38, 2845 (1989).
- 7) H. Kato, T.Asakura et al., *Polymer Preprints Jpn*, 48, 5 (1999).

◀国内情報▶

## 体細胞クローン豚の作出

農林水産省 畜産試験場  
大 西 彰

体細胞クローン動物は、これまで、マウス、山羊、羊および牛で誕生している。豚に関しては、特に異種移植の分野からクローンの作出が期待されてきたが、成功例が極めて乏しい状況にあった。我々は、今回、除核した卵子内に体細胞核を直接注入することにより、クローン豚の作出に成功した。クローンの判定は、毛色、性およびマイクロサテライトDNAマーカーを用いた分析により行った。

### 1. はじめに

分化した体細胞からクローン個体を得ることは、不可能とされてきた。しかし、1997年に発表されたクローン羊の“ドリー”以来、体細胞クローン動物の誕生が相次ぎ、これまでにマウス、牛および山羊での成功例が報告されている。

体細胞クローンが誕生する前、核移植には、初期胚由来の未分化細胞（主に割球）が用いられてきた。上記の動物種においても、種々の発育ステージの初期胚を用いた受精卵クローンが得られている。しかし、豚の受精卵クローンの成功例は極めて乏しく、1989年に米国ミズーリー大学で報告された、4細胞期胚の割球を由来とする1頭の子豚の誕生があるのみであった。

豚は、食肉生産としてこれまで重要な役割を担ってきた。しかし、最近では、畜産以外の分野でも豚が注目されている。特に医学の分野では、慢性的に不足している人移植用臓器の代換えとして豚臓器の利用が研究されている。豚臓器を人に利用するには、遺伝子操作により拒絶反応を抑制した細胞の核を基にしたクローン豚を作出する必要がある。体細胞を核移植に用いる場合、初期胚の場合とは比べものにならない数の細胞を扱うことができ、核移植の材料に事欠かかないばかりか、

ONISHI Akira

〒305-0901 茨城県稲敷郡茎崎町池の台2

細胞を介した遺伝子組み換え等の操作が可能となる利点を持つ。そのため、体細胞クローン豚の作出に向けた研究が、世界各国で活発に行われるようになった。その結果、本年3月に英国PPL社が世界初の体細胞クローン豚の作出に成功し<sup>1)</sup>、次いで我々のグループ<sup>2)</sup>、そしてInfigen社<sup>3)</sup>の順に成功例が得られている。

これらの報告を検討すると、我々の場合、従来の電気融合法を核移植に用いた他のグループと異なり、体細胞核を除核した卵子の細胞質内に直接注入する方法を用いた点に特徴がある。

### 2. 顕微注入法による体細胞クローン豚の作出法

顕微注入法によるクローン豚作出の概略を示した(図1)。

核移植に用いる体細胞に関しては、胎児の細胞を用いたクローンの成功例が羊、牛および山羊であることから、胎児を選択した。さらに、外見からクローンであることが容易に判定できるよう、毛色が黒色である梅山豚を選んだ。24日齢の梅山豚の胎児を採取し、1頭毎に胎児を処理して培養線維芽細胞を得た。さらにDNA分析により性判別を行い、雌胎児由来の細胞を核移植に用いた。体細胞クローンを成功させる要因の一つに、細胞を血清飢餓状態とし、細胞周期をG0にするこ



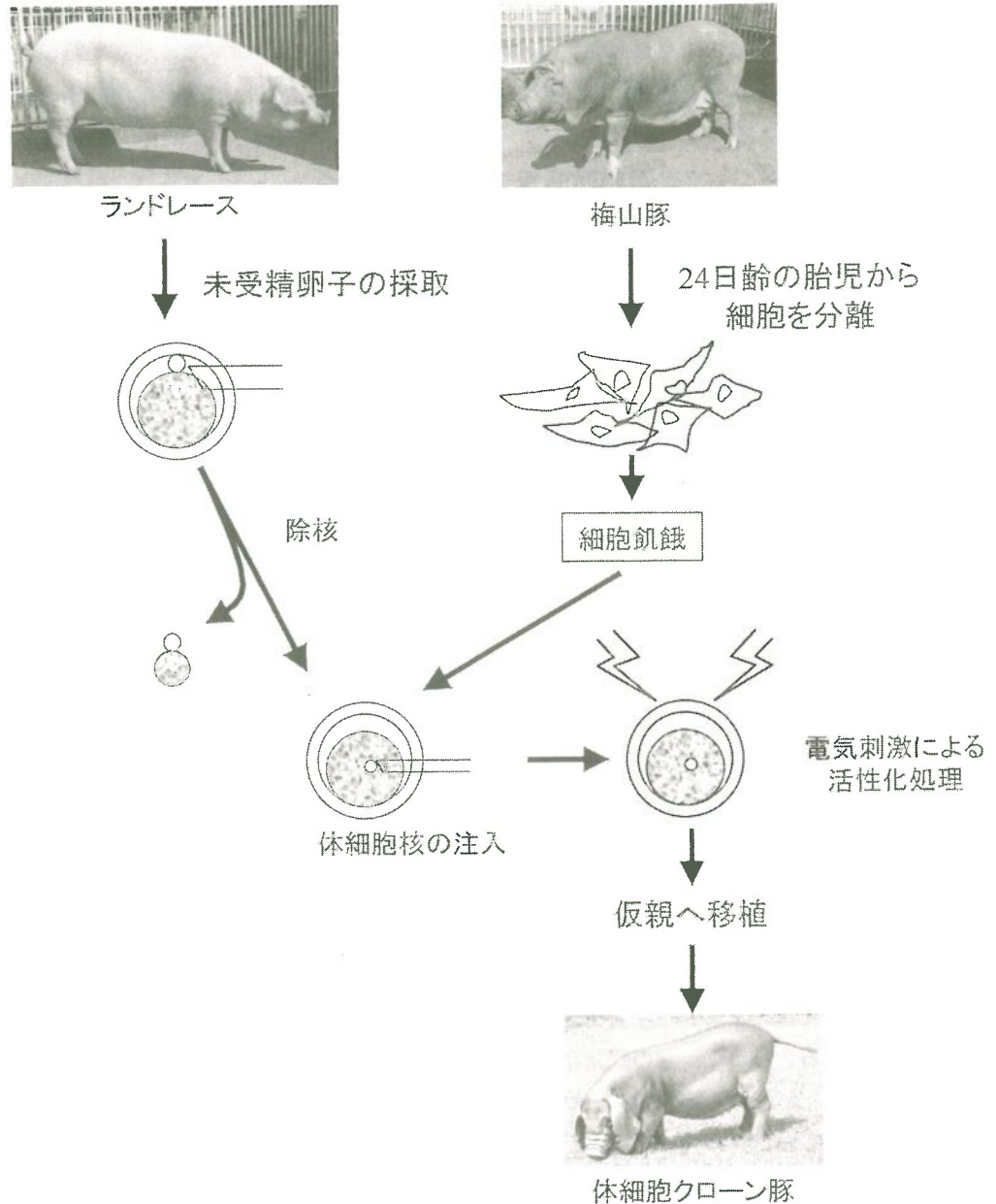


図1 体細胞クローン豚の作出

とが唱えられている。細胞周期をG0とすることが、体細胞クローンの作出に必須であるかどうかは、議論の分かれるところだが、我々は、コンフルエントとなった細胞を、培養液の交換をせずに約2週間放置した後、核移植に用いた。

除核用の未受精卵子は、PMSGおよびhCGのホルモン投与により発情誘起したランドレースまたはその雑種（白色あるいは、白色に黒色の斑点を持つ）より採取した。hCG投与45時間後に屠殺し、卵管環流により得た成熟卵子は、極体およびその周辺の細胞質をピエ

ゾ式マイクロマニピュレーターに装着したガラス管内に吸引することにより除核した。除核の際には、サイトカラシンBを含む培養液を用いた。

体細胞核の移植は、細胞の径よりやや小さいガラス管内に線維芽細胞を吸引し、細胞膜を破壊した後、細胞質を含む核を除核した卵子細胞質内に直接に注入することにより行った。除核および核の注入操作には、ピエゾ式マイクロマニピュレーターを用いたが、作業の効率と成功率が格段に高められた。

核を注入した卵子は、3～4時間培養した

後、電気刺激により活性化処理をした。電気刺激した卵子は、サイトカラシンBを含む培養液中で2時間培養し、第2極体の放出を抑制した後、通常の培養に切り替えた。

約40時間の培養後、発生した卵子を、発情を同期化した仮親の卵管に移植した。110個の卵子を4頭の仮親に移植した結果、その内の1頭が妊娠し、正常分娩により1頭の子豚が誕生した。子豚の生時体重および胎盤重量は、正常値であった。子豚の毛色は黒色で雌であった。さらに、マイクロサテライトDNAの分析の結果、用いた線維芽細胞と子豚の間では20種類のマーカーで一致がみられ、子豚と仮親の間での親子関係は全て否定された。これらの結果より、得られた子豚は、体細胞クローンであることが証明された。

### 3. 顕微注入法の特徴

クローン豚に関する他の2報においては、核移植に従来の電気融合法を用いている。PPL社は、除核した未受精卵子と体細胞を電気融合することにより1段階目の核移植を行い、次に、移植した核を取り出し、除核した受精卵子に再度核移植を行う2段階核移植を行っている。この手法は、大変に煩雑で、成功率も必ずしも高くはない。一方、Infigen社においては、体外成熟卵子を除核用卵子に用いている。体外成熟卵子は、屠場由来の卵巣より未成熟卵子を採取し、体外で成熟させることにより用意する。そのため、生体からの採取に比べて容易に多数の卵子が得られる利点を持つ。実際、牛の場合、卵子の体外成熟技術がほぼ確立しているため、クローン作出に広く利用されている。しかし、豚においては、体外成熟卵子の発生能が低い傾向にあり、クローンへの利用には問題が残る。Infigen社が、体外成熟卵子を用いたクローン豚の作出に成功したことは、この点で興味深い。

体細胞核がどのようにして初期化されるのか、全く明らかになっていない。しかし、体細胞核を、MPF (Maturation Promoting

Factor) 活性の高い卵細胞質中に直接に曝す必要があることは、ほぼ間違いない。顕微注入法の場合、核の細胞質への導入と卵子の活性化を分けて実施することができる。そのため、体細胞核を卵細胞質中に十分に曝すことが可能である。しかし、電気融合法の場合、排卵から一定時間を過ぎた卵子を用いると、細胞の融合と同時に卵子の活性化が生じてしまい、体細胞核が十分に卵細胞質中に曝されないまま、発生が開始する恐れがある。PPL社が2段階核移植で成功した理由も、核の初期化と発生の時間的なずれが、2回の核移植により調整されたためと考える。

顕微注入法は、マウスの場合、かなりの熟練を要することから敬遠されがちであるが、豚では意外なほど容易に行うことができる。マウスでは、ピペット内に水銀あるいはフロリナートを充填してピエゾ操作を確実にする必要はあるが、豚では、通常の先端を研いだピペットで、卵子の破壊もなく十分な注入操作を行うことができる。さらに、電気融合法に比べて作業時間も大幅に短縮できることから、今後の普及が期待される。

### 4. 今後の展望と課題

マウス、ヒツジおよびウシの体細胞クローンにおいては、流死産や形態形成異常が生じる割合が高く、誕生後の死亡率も高い。また、胎盤異常も多く見られている。しかし、体細胞クローン豚に関しては、今のところ異常例の報告はない。体細胞クローンの作出に伴う異常が、豚でも生じるのか否か、今後例数が増えることにより明らかになるであろう。

今回のクローン豚の技術は、優良種豚の増産を始めとする豚の育種改良技術や遺伝資源の保存技術へ応用できる。現在、最も注目を浴びている臓器移植への利用に関しては、豚が保持している内因性レトロウイルスの人への感染が危惧されている点は無視できない。人胚性幹細胞の利用など、再生医学の分野では様々な研究が進むであろうが、移植用の臓器が絶対的に不足している現状では、

豚を用いた異種移植の研究はさらに進展するものと思われる。しかし、これらの技術へ対応するためには、クローン豚の作出技術が安定したものとなる必要があり、技術の精密化と安定化が今後の課題である

### 5. おわりに

長年、豚卵子を取り扱っていると、豚卵子の操作技術が、マウスや牛に比べて大きく立ち後れていることを痛感する。例えば、卵子の体外培養や凍結技術が、マウスや牛では確立しているのに対し、豚では未だに発展途上の段階にある。体外受精の技術も同様である。この原因の1つには、多量の脂質を卵子細胞質内に含むなど、マウスや牛とは異なる豚特有の卵子の性質があげられる。2つ目には、豚においては体外受精や核移植の技術が従来の畜産の分野であまり重要とされてこなかったことから、研究そのものが立ち後れた点が

上げられる。マウスや牛での体細胞クローンの相次ぐ成功の背景には、基盤となる卵子の操作技術が確立していたことが大きく影響している。豚の利用が従来の畜産から他の分野へ拡大し、これまでにはない新たな技術へ対応するためには、豚卵子の基盤的な操作技術を再度検討し、確実なものにする必要がある。

今回の成果は、農林水産技術会議事務局大型別枠研究「形態生理」およびプライムテック株式会社との官民交流共同研究により得られた。

### 文 献

- 1) Polejaeva, I. A. et al. (2000), *Nature*, 407, 86-90
- 2) Onishi, A. et al. (2000), *Science*, 289, 1188-1190
- 3) Betthausen, J. et al. (2000), *Nature Biotech.*, 18, 1055-1059



## ブレイン テクノニュースの バックナンバーご案内 第 80 号

2000 (平成12) 年 7 月15日発行

#### 総 説

味のメカニズム ..... 栗原堅三

#### 国内情報

脳における味覚の認識 ..... 近藤高史・鳥居邦夫

脂肪のおいしさ ..... 今泉正洋・伏木 亨

アブラナ科自家不和合性に関する

雌ずい側・花粉側遺伝子の決定

..... 畠山勝徳・高橋剛志・日向康吉

米品質測定評価装置の開発 ..... 杉山隆夫

地域の先端研究

ミカンの搾り粕を利用した

キトサンの発酵生産 ..... 宮岡俊輔

レーザー光による農産物生育情報の

非破壊モニタリング技術 ..... 斎藤保典

#### 文献情報

Oct-3/4の発現量がES細胞の分化、脱分化

あるいは自己再生を決定する ... (抄訳: 木村直子)

分裂酵母のヘキソース輸送体 ... (抄訳: 赤尾 健)

自家不和合性の花粉決定因子、

ついに発見さる ..... (抄訳: 岩井純夫)

SCARECROW機能の分子的解析によって

根とシュート共通のメカニズムを明らかにする

..... (抄訳: 木苗貴秀)

酵素を利用した魚油の香り成分の改良

..... (抄訳: 大栗智昭)

#### 海外便り

土壌中におけるプレファレンシャルフローが

化学物質の溶脱に果たす役割

ースウェーデン農科大学における1年

..... 前田守弘



## ◀国内情報▶

## 分解菌集積木質炭化素材を用いた難分解性有機化合物のバイオレメディエーション

農林水産省 農業環境技術研究所 資材動態部 除草剤動態研究室  
高木 和 広

難分解性有機化合物（ダイオキシン類、農薬等）による環境汚染が問題になっており、微生物の分解機能を利用した汚染物質除去技術（バイオレメディエーション）に期待が寄せられている。本研究は、ある一定条件で炭化・加工した木炭（木質炭化素材）を用いて、土壌中の難分解性農薬分解細菌の集積・純化法を開発し、世界で初めて殺菌剤PCNBを好氣的に完全脱塩素分解する細菌を単離・同定した。また、単離した分解細菌を集積させた木質炭化素材で環境中の汚染物質を迅速に吸着・分解除去する技術を開発した。

### 1. はじめに

近年、有機塩素系農薬（DDT, BHC）やダイオキシン類などの化学物質が超微量（数十pptレベル）でも人間の性発達障害や行動及び生殖異常に関係することが検証され、社会問題化していることから、これらの環境リスク削減技術が求められている。化学物質の環境リスクは毒性と暴露量（環境中濃度）の両者から評価されるため、化学物質の毒性または暴露量を低下させれば、環境リスクは削減できる。暴露量の削減法としては汚染物質の除去が考えられるが、農薬等の合成有機化合物による環境汚染は低濃度で広範囲に広がっているため、従来の物理・化学的手法では汚染除去に多額の経費を必要とする。そこで、微生物の分解機能を利用した汚染物質除去技術（バイオレメディエーション）に期待が寄せられている。しかし、その素材である分解菌を環境中から迅速・簡便に集積・単離する手法や、分解菌の分解能を汚染環境中で安定的に発現させる接種法は開発されていない。そこで、今回は筆者らが開発した木質炭化素材（有機化合物（分解菌のえさ）の吸着能が高く、細菌の住みかに適した木炭）を用いた土壌中の農薬分解細菌の迅速集積・単離法を紹介し、さらに、汚染土壌を修復するための

TAKAGI Kazuhiro

〒305-8604 つくば市観音台3-1-1

木質炭化素材を利用した分解菌接種法についても紹介する。

### 2. 木質炭化素材とは(定義とその特性)

木質炭化素材は、木炭の一種である。市販の多くの木炭は伝統的な炭窯で燃料用に製造されており、炭化時間・温度は熟練者の経験によっているが、今回開発した木質炭化素材は、窒素置換した真空雰囲気炉を用い、一定の炭化時間・温度で工業的に製造・加工した木炭である。今回研究に使用した4種の木質炭化素材A, A-1, A-2, B(粒径: 5—10mm)と対照として用いた市販の粒状活性炭(和光特級, 粒径: 5 mm)の物性を表1に示す。

### 3. 対象農薬の選定と環境特性

今回、分解細菌を集積・単離するために選定した農薬はトリアジン系除草剤のシマジン(CAT)と有機塩素系殺菌剤キントゼン(PCNB)である。ともに土壌中での半減期が長い(シマジンは70~110日, PCNBは4~10ヶ月)難分解性農薬であり<sup>1)</sup>, 分子中に塩素, 窒素原子を含むのが特徴である。シマジンは, 土壌中半減期が長く土壌吸着係数が低い<sup>2)</sup>ためゴルフ場の排水や水道原水から最も多く検出された農薬の1つであり<sup>2)</sup>, 欧米では類縁化合物のアトラジンによる地下水汚染

表1 各種木質炭化素材及び粒状活性炭の物性 (高木, 1996)

木質炭化素材	pH (H <sub>2</sub> O)	BET一点法 比表面積 (m <sup>2</sup> /g)	細孔直径に対する累積細孔容積の占める割合(%)						
			細孔直径(μm)						
			200~100	100~50	50~20	20~10	10~5	5~1	1~0.003
A	7.8	99.9	3.0	6.5	9.8	6.4	5.8	16.5	52.3
A-1	5.5	72.1	5.4	4.3	9.0	6.6	5.4	9.3	60.1
A-2	10.4	208.6	0.2	2.3	15.8	15.0	1.0	12.9	52.6
B	8.1	555.7	0.0	2.5	20.0	25.4	7.5	22.5	22.1
粒状活性炭	9.6	1020.9	0.8	0.9	1.4	1.8	3.2	29.0	63.2

が環境問題となっているため、対象農薬として選んだ。PCNBは1978~92年まで土壤病害殺菌剤として大量(5000~6000t/年)に使用され<sup>3)</sup>、典型的な難分解性有機塩素系農薬であるため、使用地域周辺環境からPCNBとその代謝物が高頻度・高濃度で検出されている<sup>4)</sup>。しかも、PCNBを好氣的に完全脱塩素分解する細菌はこれまで単離されていないので、対象農薬として選んだ。

#### 4. 土壤中の農薬分解細菌の迅速集積・純化法の開発<sup>5, 8)</sup>

従来、土壤中から農薬等有機化合物を資化し、分解する細菌を集積・単離する方法として、土壤還流法(土壤に対象薬剤を溶かした無機塩溶液を循環させる)が用いられてきたが、この方法では分解菌を十分に集積出来な

いことが頻繁に起こった。そこで、筆者らはこの土壤還流法を改良し、還流実験を行った。つまり、対象農薬連用土壤に木質炭化素材AあるいはA-1を5%混和し、対象農薬を唯一の炭素・窒素源とする無機塩培地を還流したのである。その結果、還流2週後から還流液中のシマジン消失速度が増加し、それに伴い分解副産物であるCl<sup>-</sup>濃度の増加が認められた(図1)。PCNB還流試験でも同様な結果になった。つまり、2~3週間という短期間の還流で土壤系内にシマジンあるいはPCNB分解菌を集積させることができたのである。この様な短期間に難分解性農薬分解菌を集積できた要因は、分解菌の栄養源(C・N源)である農薬が高い吸着能を有する木質炭化素材に集まり、しかもそこが分解細菌にとって好適な住みかであったためだと考えられる。つまり、土壤中に低密度で生存していた分解

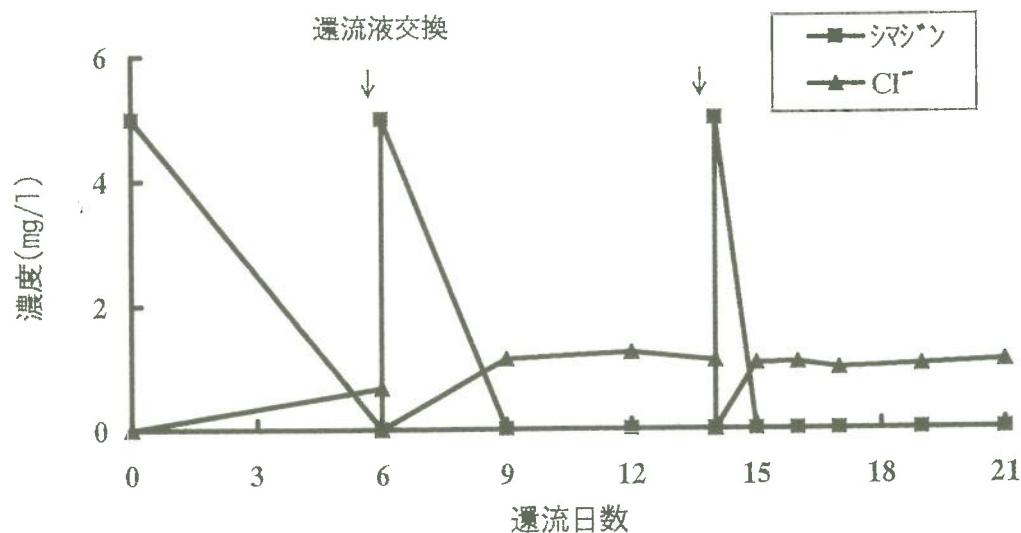


図1 木質炭化素材混入土壤還流法による還流液中のシマジン、Cl<sup>-</sup>濃度の変化 (高木, 1996を一部改変)

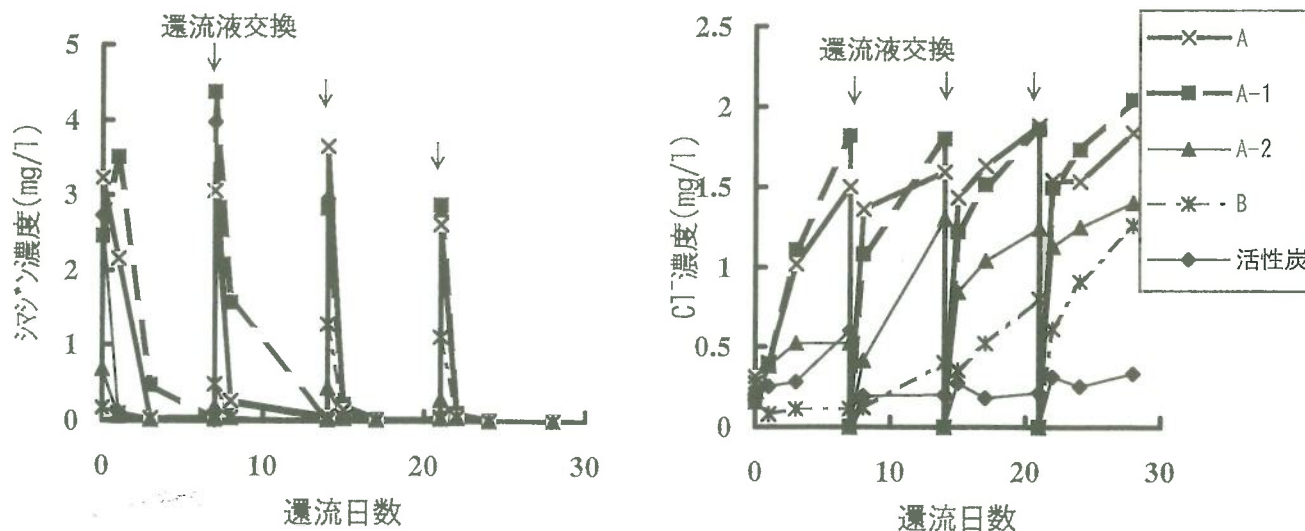


図2 各種木質炭化素材及び活性炭によるシマジン分解菌集積速度の違い (高木, 1996)

細菌は、土壌ではなく木質炭化素材細孔内で増殖・集積したと考えられた。そこで、土壌中から木質炭化素材だけを取り出し、物性の異なる5種(表1)の炭化素材に接種し、同様の還流試験を行った。その結果、シマジン還流試験では、4種の木質炭化素材の中でAとA-1が還流1週間後からシマジン消失速度が増加し、それに伴いCl<sup>-</sup>濃度の増加が認められた(図2)。一方、市販の粒状活性炭は還流4週目でもCl<sup>-</sup>濃度の増加は認められず、シマジン分解菌が集積しない炭化素材であることが明らかになった(図2)。PCNB還流試験では、5種の炭化素材の中でAのみ還流4週間後からCl<sup>-</sup>濃度の増加が認められた。これらの結果から素材AとA-1はシマジン分解菌を素材AはPCNB分解菌を迅速に集積させる素材であることが明らかになった。素材A及びA-1が分解菌集積素材として優れている要因として、1) pHが細菌の好む弱酸性～弱塩基性の領域にあること、2) 分解細菌の住みかとして適当な細孔分布(直径5～20 $\mu$ m程度の細孔が全細孔容積に対して10%以上)を有すること、3) 農薬のバイオアベイラビリティ(生物利用性)を損なわない適度な比表面積(土壌に比べ数十倍の農薬吸着能)を有すること等が考えられる。一方、粒状活性炭は、細孔が小さすぎるため(全細孔の90%以上が直径5 $\mu$ m以下の細孔(表1))分

解細菌が細孔内に定着・増殖できないと推察される。次にシマジン分解菌が集積した素材A、A-1をSEMで観察したところ、直径5～20 $\mu$ mの細孔内に細菌コロニーの存在が確認された(図3)。PCNB分解菌が集積した素材Aについても同様の大きさの細孔内に細菌コロニーの存在が確認された。

##### 5. 分解細菌集積木質炭化素材からの農薬分解細菌の単離

分解細菌が純化・集積された素材A1.0gを粉砕し、リン酸バッファーで適当に希釈したものをPCNBあるいはシマジンをC・N源とした無機塩寒天培地に接種し、25 $^{\circ}$ Cで3週間

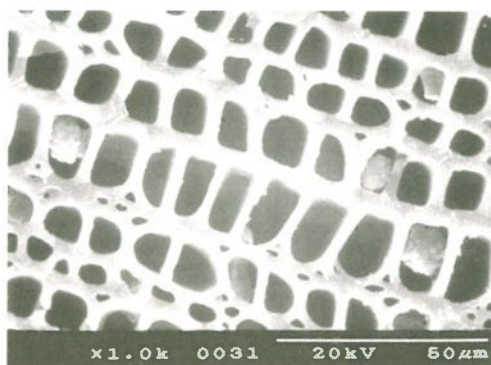


図3 木質炭化素材A-1の細孔内に集積したシマジン分解細菌(倍率:  $\times 1000$ ) (高木, 1996)



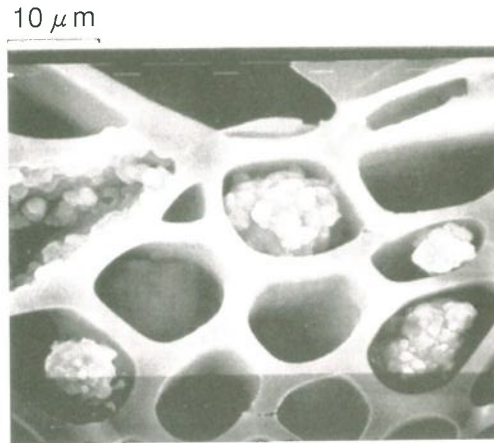


図4 木質炭化素材Aの細孔内に集積した接種PCNB分解菌  
(*Burkholderia cepacia* KTY97)  
(倍率: ×2000) (高木, 2000)

培養したところ培地上にクリアゾーンが形成された。クリアゾーンから分離される細菌は最初の段階で2種類程度と非常に純化されていた。後は定法に従ってシマジンあるいはPCNB分解菌を3週間程度で単離出来た。

### 6. 単離した分解細菌の特性

同定試験の結果、シマジン分解細菌は *Arthrobacter* sp., PCNB分解細菌は *Burk-*

*holderia cepacia*であることが判明した。シマジン分解細菌はシマジンをも唯一のC及びN源として資化し、5 mg/lのシマジンを培養5日間で検出限界(5 μg/l)以下まで好氣的に脱塩素分解した。PCNB分解細菌もPCNBを唯一のC及びN源として資化し、PCNB(3.7 mg/l)を5日間で好氣的に検出限界(0.1 μg/l)以下まで完全脱塩素分解した<sup>6)</sup>。PCNBを好氣的に完全脱塩素分解する細菌が土壤中から単離・同定されたのは、今回が世界初である。よって単離したPCNB分解菌は *Burkholderia cepacia* KTY97と命名し、特許登録済み<sup>9)</sup>である。

### 7. 分解細菌の汚染土壌への接種方法の開発<sup>10)</sup>

従来、分解菌を汚染土壌に接種する方法としては、液体培地で培養し、菌密度を10<sup>9</sup>個/ml程度にしてから、液体培地ごと接種する方法が一般的だった。しかし、この方法では、接種後、他の土着菌との競合や原生動物による捕食により、菌密度が急激に低下し、安定的に長期間分解活性を発現させることが困難である。また、接種細菌による地下水汚染も

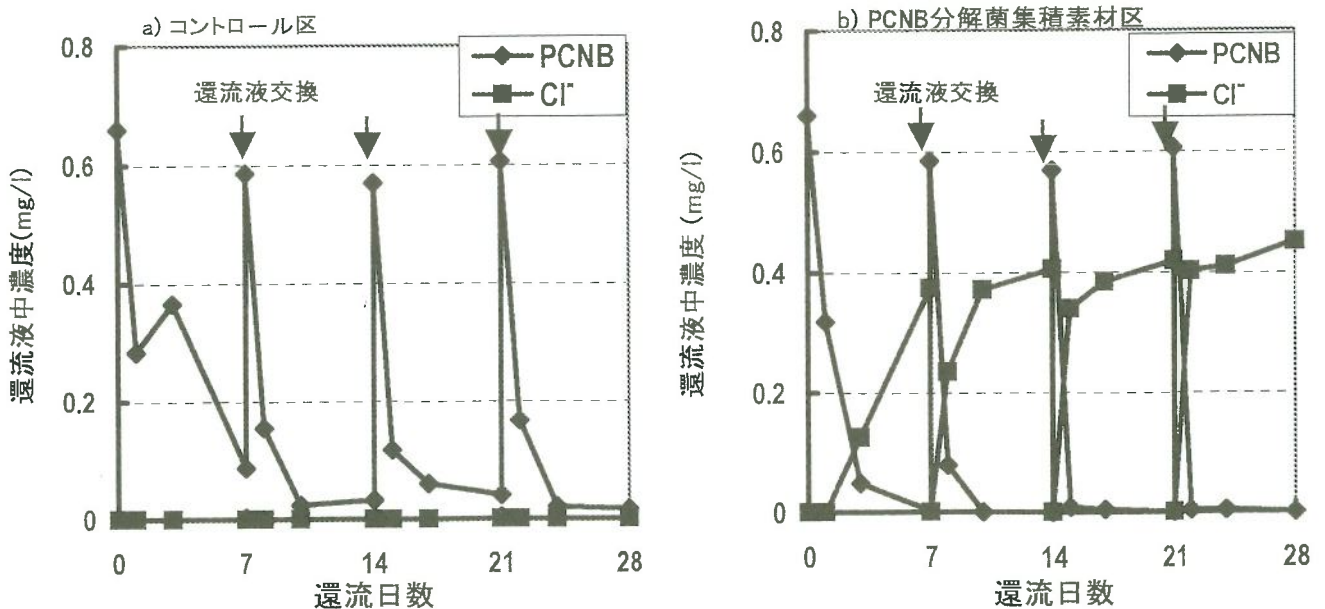


図5 PCNB分解菌集積素材Aを混和した土壌還流法によるPCNB分解除去試験 (高木, 2000)  
注) 土壌中のPCNB初期濃度: 10mg/kg d.s. (Cl換算で6.02mg/kg乾土)  
注) PCNB (0.6mg/l) が完全分解した時のCl<sup>-</sup>濃度: 0.36mg/l

表2 還流法によるPCNB分解除去試験終了（4週間）後の土壌、木質炭化素材A、還流液中へのPCNB残留量と分解除去率（高木，2000）

		未集積素材区 (コントロール)	PCNB分解菌 集積素材区
土壌	乾土20g中の量(mg)	0.435	0.0005
	土壌中濃度(mg/kg 乾土)	21.75	0.0231
木質炭化素材A	乾物0.25g中の量(mg)	0.050	0.0007
	素材A中濃度(mg/kg 乾物)	199.77	2.667
還流液	交換前の残留量の合計(mg)	0.068	0.002
	残留量合計 (mg)	<b>0.553</b>	<b>0.004</b>
分解率(%)		<b>0.8</b>	<b>99.4</b>

注) 還流試験系: 土壌 20g、木質炭化素材 0.25g、還流液 0.6ppmPCNB水溶液 150ml  
土壌へのPCNB総投入量: 0.557mg

懸念されている。そこで、新たな分解菌接種方法を開発した。つまり、単離した分解細菌を木質炭化素材Aに接種し、培養液（シマジンあるいはPCNBが唯一のC・N源）を2～3週間還流することにより、シマジンあるいはPCNB分解細菌を素材細孔内に集積させ、分解菌集積木質炭化素材を作成した（図4）。そして、砂質土壌（pH(H<sub>2</sub>O) 7.2, T-C 1.91%, T-N0.18%）にシマジンあるいはPCNBを添加して作成した汚染土壌に分解菌集積素材を1.25%混和し、シマジンあるいはPCNB水溶液を3～4週間還流した。その結果、PCNB分解試験では試験直後から、還流液中のPCNB濃度は急激に減少し、それに伴い分解副産物であるCl<sup>-</sup>濃度が増加した（図5b）。一方、素材Aのみを汚染土壌に1.25%混和した場合（コントロール）還流液中のPCNB濃度は急激に減少したが、PCNBの分解副産物であるCl<sup>-</sup>は検出されなかった（図5a）。よって、還流液中のPCNB濃度の急激な減少は、分解ではなく土壌及び素材Aへの吸着であると考えられた。また、還流試験終了後の土壌及び素材A中のPCNB残留量を測定し、PCNB分解除去率を計算したところ、コントロール区では、わずか0.8%であるのに対し、分解菌集積素材区では99.4%に達した（表2）<sup>7)</sup>。シマジン分解試験の場合でも同様の結果が得られた。これらの結果から、

土壌中あるいは還流液中の農薬は水の移動に伴って木質炭化素材に吸着され、そこに集積・生息している分解細菌により、短時間で脱塩素分解されたと考えられる。なお、接種した分解菌は試験期間中の還流液中及び試験終了後の土壌中から検出されず、試験終了後も木質炭化素材内に10<sup>8</sup>個/g乾物レベル生残していた。つまり、この接種方法を用いることで、土壌中の難分解性有機化合物を安定的に吸着・分解除去し、地下水及び表流水汚染の防止が可能である。また、接種細菌による地下水汚染の心配が殆どなく素材が自然素材であるため、環境にやさしい浄化・修復手法である。

## 8. 成果の活用場面と今後の研究課題

開発した分解菌集積素材を汚染環境（生活・農業排水路等や難分解性化合物で汚染された表層・下層土、ゴルフ場や産廃処理場の下層土等）に直接適用することで、汚染物質が吸着・分解され、汚染環境の修復が図れる可能性がある。ただし、これらの可能性を現実のものとするには、温度や水分条件等が変動する野外環境下での実証試験と知見の集積が不可欠である。この課題については、2000年10月から民間企業（東洋電化工業株）と共同でゴルフ場での野外実証試験を行い、知見

を集積している。また、単離したPCNB分解細菌は非常に高い脱塩素能を有しており、他の難分解性有機塩素化合物(ダイオキシン類, PCP, HCB等)への応用が期待されている。今後は対象化合物を広げるとともに、分解機構・経路の解析や分解遺伝子の探索・解析等の基礎研究にも取り組みたい。

文 献

1) 伏脇裕一ら (1990), 用水と廃水, 32 (12), 3-12  
 2) 丸論 (1998), 農薬環境科学研究, 第 6 号, 9-14  
 3) 西田誠 (1997), 農薬環境科学研究, 第 5

号, 6-15  
 4) C. Tomlin Edit. (1994), The Pesticide Manual (10th Edition). 1606 pp., Crop Protection Publication, UK.  
 5) 高木和広 (1996), 農業環境研究年報, 14, 72-75  
 6) 高木和広 (2000), 農業技術体系土肥編, 第 3 卷, 追録第11号, 49-55  
 7) 高木和広 (2000), 農林水産技術研究ジャーナル, 23 (3), 10-15  
 8) 高木和広ら (2000), 特許第3030370号  
 9) 高木和広ら (1999), 特許第2904432号  
 10) 高木和広ら (1999), 国際出願番号 PTC/JP99/03324



ブレイン テクノニュースの  
 バックナンバーご案内  
**第 81 号**

2000 (平成12) 年 9月15日発行

総 説

- 食用キノコが作る“体に良い”物質 ……河岸洋和  
 国内情報  
 キノコの菌糸培養による有用物質の生産…堀内 勲  
 ウイルスを利用した赤潮対策研究の現状と将来  
 ……………長崎慶三  
 飼料中アミノ酸組成の改善による  
 豚からの窒素排泄量低減技術 ……………梶 雄次  
 毛色関連遺伝子の多型を用いた  
 豚品種の推定 ……………三橋忠由  
 地域の先端研究  
 イチジクのフィッグ型品種に着生する  
 雄ずいを利用した交雑育種 ……………野方 仁  
 文献情報  
 胚発生における早期妊娠因子 …(抄訳: 横尾正樹)

- 塩ストレス下での酵母遺伝子の発現  
 誘導DNAチップによる解析 ……(抄訳: 楠田大輔)  
 メチル化に影響を与えずにメチル化された  
 遺伝子のサイレンシングを解除する  
 MOM遺伝子の突然変異 ……………(抄訳: 清水圭一)  
 スフィンゴシン-1-リン酸受容体は脊椎動物の心臓の  
 発生において細胞移動を制御する(抄訳: 吉戒和剛)  
 海外便り  
 マツノサイセンチュウの故郷に  
 材線虫病微害化の手がかりを求めて  
 ーミズーリ大学における 1年間 ……………中村克典  
 生研機構からのご案内; 平成12年度「新技術・新分  
 野創出のための基礎研究推進事業」採択研究課題に  
 ついて。「新事業創出研究開発事業」課題採択につ  
 いて。平成12年度「新規融資課題募集」について。



## ◀地域の先端研究▶

ジャガイモほ場におけるウイルス病の  
簡易・迅速診断法の実用化

北海道病害虫防除所

三 澤 知 央

迅速免疫ろ紙検定法（RIPA法）によりジャガイモYウイルスえそ系統（PVY-T）をジャガイモから実用的に検出する手法を検討した。その結果、中位葉の複葉内の先端の小葉の葉身基部を検定部位として用いることにより、着蕾5日後～開花2週間後までの約3週間ELISA法とほぼ同程度の高い検出率を得られることが判明した。本法は迅速にPVY-Tの診断が可能であるためジャガイモ採種ほ場における病株の抜き取り作業に利用できる。

1. ジャガイモのウイルス病と  
その診断法の現状

## (1) 農作物のウイルス病

農作物に病害を引き起こす主要な微生物としては、カビ（糸状菌）・バクテリア（細菌）・ウイルスが挙げられる。この三者で全病害の99%以上を占めているため、農作物の病害を抑えるということは、すなわちこの三者を抑えるということである。この数十年の間に数多くの殺菌剤が開発されてきたが、これらはいずれもカビ・バクテリアを対象としたものでウイルスには有効な防除薬剤がないのが現状である。そのためウイルス病の蔓延を防ぐためには発病株を速やかに除去すること、およびウイルスを媒介する生物（昆虫やカビなど）を防除し二次伝染を防ぐことが重要である。

## (2) ジャガイモの栽培

ジャガイモは栄養繁殖性の作物であるため、一度ウイルス病に感染すると後の世代にまで伝染することから大きな問題となる。そこでわが国では農林水産省の種苗管理センターを頂点とする種ジャガイモ採種体系が確立され、この採種体系内で栽培され、植物防疫所による検査に合格したもののみが種ジャガイモとして販売することができる。種ジャガイモ

MISAWA Tomoo

〒069-1395 北海道夕張郡長沼町東6北15

イモを生産する採種ほ場では発病株の抜き取りおよびジャガイモのウイルス病を媒介するアブラムシ類の防除（殺虫剤の散布）が頻繁に行われている。

## (3) PVY-T

ジャガイモの重要病害であるジャガイモYウイルスえそ系統（necrotic strain of Potato virus Y: PVY-T）によるモザイク病は、主要品種「男爵薯」等で病徴が不明瞭であることや、ジャガイモの生育環境によって病徴が異なることなどから健全株との見分けが非常に困難であり、発病株の抜き取りに苦慮している。また、PVY-Tはジャガイモに単独感染した場合の被害は軽微であるが、他ウイルスとの複合感染や他作物（タバコ・トマト）では大きな被害をもたらす。

## (4) ウイルス病診断の現状

現在、農作物のウイルス病の診断は酵素結合抗体法（ELISA法）が主流となっているが、ELISA法はある程度の実験器具が必要であることおよび結果の判定までに1～2日を要することから、迅速な診断を必要とする農業現場においては十分に対応しきれていない状況である。

## (5) RIPA法

RIPA法とは、抗体を感作させた白色ラテックス（白いる紙上では白いので見えない）

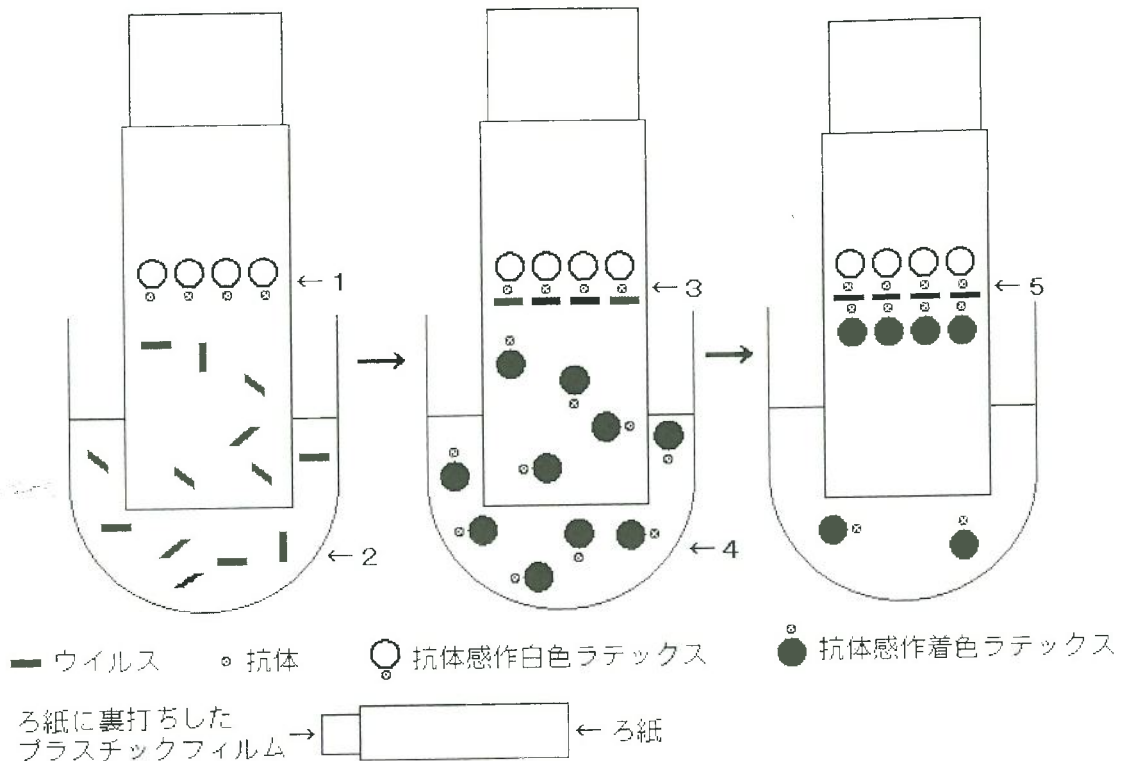


図1 RIPA法の原理

- 1: ろ紙に固定された抗体感作白色ラテックス
- 2: ウイルス液の展開
- 3: 抗体感作白色ラテックスにウイルスがトラップされる
- 4: 抗体感作着色ラテックスの展開
- 5: 抗体感作着色ラテックスがウイルス液を挟んで抗体感作白色ラテックスにトラップされる (バンドの出現)

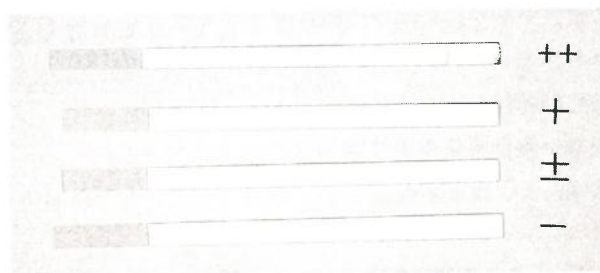


図2 検定後のろ紙に現れたバンド

をろ紙上に固定し、ろ紙の下端からウイルス液および抗体を感作させた着色ラテックス(白いろ紙上で見える)を展開させ、ろ紙上で抗原抗体反応を起こさせ、結果をバンドとして認識するものである(図1, 2)。本検定に使用する検定葉は、わずか5mm四方である。

本法は迅速かつ簡便な検出手法であるため農業現場での実用的な使用が期待されている。しかし、検出するウイルスや宿主植物の

種類によって、適正な検出条件が異なるため、ウイルス・宿主ごとに種々の条件を検討する必要がある。そのため、実際の農業現場での普及率はまだ低い。

そこで、RIPA法によりジャガイモからPVY-Tを実用的に検出できる諸条件を検討した。

## 2. PVY-T検出条件の検討

### (1) 適正な検定部位の検討

本法はジャガイモ1株の中の1茎の1葉のほんの一部分のみを検定することによって、その株全体のウイルス感染の有無を確認しなければならない。そのため、適正な検定部位について入念に検討する必要がある。そこでPVY-T感染ジャガイモ(品種「男爵薯」)の茎を定期的に採取し葉位別、複葉内小葉別、小葉内部位別にRIPA法で検定した。複葉内

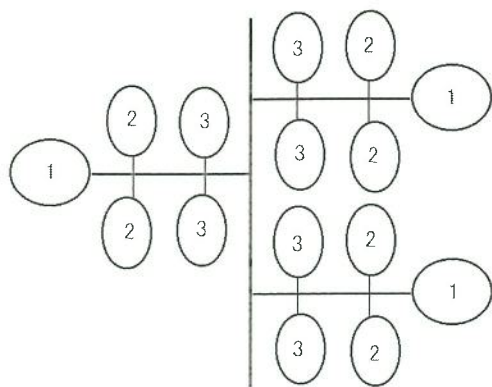


図3 複葉内小葉番号

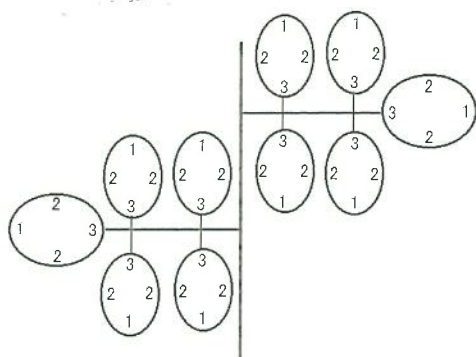


図4 小葉内部位番号

小葉および小葉内部位に図3および図4のように番号を付けた。

その結果、葉位別検定では下位3葉，上位2葉に比べ，中位葉で検出率が高かった（表1）。

複葉内では，先端の小葉で最も検出率が高かった（表2）。

小葉内部位では，葉身基部が最も検出率が高かった（表3）。

以上の結果より，本法の検定部位として中位葉の複葉内の先端の小葉の葉身基部が適することが判明した。

表1 PVY-T 葉位別検定

検定月日	検出率		
	下位3葉	中位葉	上位2葉
7/4	3/6	7/7	4/4
7/16	3/4	6/6	3/4
7/25	0/0	12/12	2/4
全期間合計	6/10	25/25	9/12

表2 PVY-T 複葉内小葉別検定

検定月日	検出率		
	複葉内小葉番号		
	1 (先端)	2 (2番目)	3 (3番目)
7/4	7/7	12/14	11/14
7/16	5/5	12/12	11/12
7/25	4/4	8/8	5/8
全期間合計	16/16	32/34	27/34

表3 PVY-T 小葉内部位別検定

検定月日	検出率		
	小葉内部位番号		
	1 (先端部)	2 (側部)	3 (基部)
7/4	2/2	4/4	2/2
7/16	10/10	16/20	10/10
7/25	5/10	9/20	8/10
全期間合計	17/22	29/44	20/22

(2) 有効検定期間の検討

RIPA法による検定が有効な期間を決定するために，試験年次，試験時期，供試品種が異なる表4に示した3種類の試験を行った。検定は同一の葉をRIPA法・ELISA法でそれぞれ検定し，ELISA法陽性検体のうちのRIPA法陽性検体の割合を検出率とした。

その結果を図5に示した。図5は生育期（開花期との日数差を+，-で表した）とRIPA法によるPVY-Tの検出率との関係を表したものである。

RIPA法によるPVY-Tの検出率は，萌芽直後は低く着蕾期頃に急激に高まり，開花期前後からその後2～3週間最も高い値を維持

表4 PVY-T 時期別検定

	試験Ⅰ	試験Ⅱ	試験Ⅲ
試験年次	1998年	1998年	1999年
供試品種	「男爵薯」	16品種・系統	「男爵薯」
試験開始	開花7日前	開花期	萌芽6日後
生育期			
試験月日	6/22～8/2	7/3～8/12	6/13～6/27
試験間隔	約10日間隔	約10日間隔	7日間隔
試験回数	5回	5回	3回
枯凋期	8/12	8/28	8/29



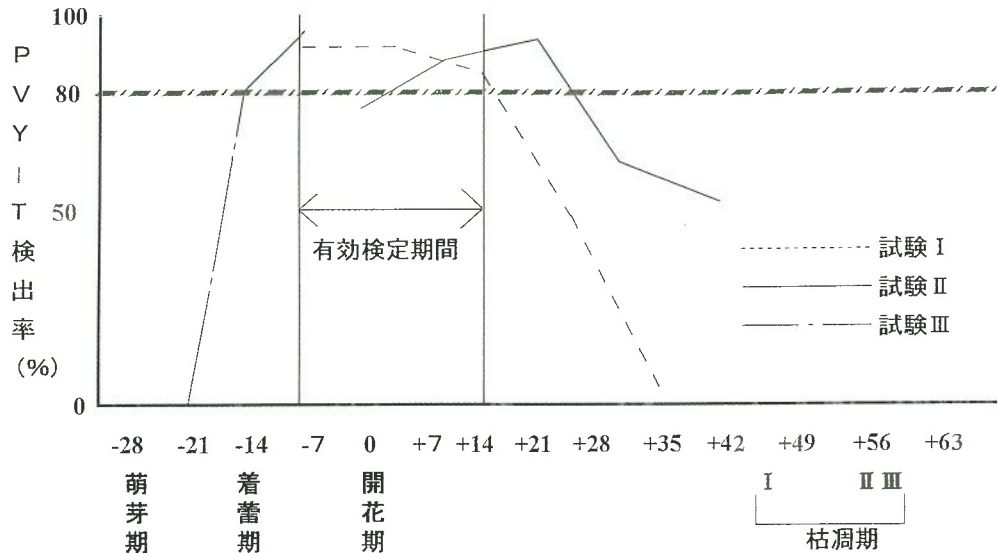


図5 生育期とPVY-T検出率との関係

し、その後再び低下する傾向が認められた。検出率の低下が始まる時期は、枯凋の早晩により前後する傾向が認められた。

本法の有効検定期間を決定するために、目標とする検出率を80%に設定した。

図5より試験Ⅲでは着蕾期にすでに検出率が80%に達していたが、この時期の試験例が1例しかないことおよび着蕾期以前の検出率が低いことを考慮して有効検定期間は着蕾5日後（開花約1週間前）とする。最終有効検定期間は枯凋の早晩によりかなりばらついたが、最も早期に枯凋した試験Ⅰの結果に従い開花2週間後とする。

### 3. 考察

#### (1) 検出率80%で十分か

PVY-T検出率が80%という水準はジャガイモ採種ほ場での病株の抜き取りにおいて求められる水準よりやや低いことから、1回目の検定で陰性となった株は別の葉を採取して2回目の検定に供試し信頼性を向上させることが望ましい。

#### (2) 検定対象

本法の検定対象は次代感染株（保毒イモから発病した株）のみに限られる。なぜなら、

当代感染株（当代にアブラムシがウイルスを媒介し感染した株）は一般に1株当たり1～2茎のみが感染するため、本法のように1茎の1葉の一部分のみを検定する方法では株全体の感染の有無を判定できないからである。

しかし、発病株の抜き取りの対象は次代感染株が主体であることおよび道央地域においては本検定の有効検定期間に当代感染は起こらないことから、本法の適用においてこのことは問題とはならない。

#### (3) 総合的な実用性の判定

本法の有効検定期間は着蕾5日後（開花約1週間前）～開花2週間後の約3週間であり、これは実際の発病株抜き取り作業や植物防疫官による検査あるいは地域独自の検査が行われる最も重要な時期である開花期前後を含んでいるため、本法はジャガイモ採種ほ場での病株抜き取り作業に利用できる。

また、本法の使用場面としては、ほ場から様々な症状のサンプルを採取し、本法によりウイルス感染の有無を確認し、感染株と判定されたものと同じ症状の株をほ場から抜き取るということが想定される。そのため、検定個体数は数株から十数株程度で十分である。これに要する時間は20分程度であり、農業上の実用性が十分にある。

文 献

- 1) 亀谷 満朗 (1993) 植物防疫 47: 189-192  
 2) 三澤 知央ら (2000) 北日本病害虫研報 51: 83-86  
 3) 夏井 勉ら (1988) 植防研報 24: 21-31  
 4) Tsuda, S. et al. (1992) Plant Dis. 76: 466-469  
 5) Tsuda, S. et al. (1993) Ann. Phytopath. Soc. Japan 59: 200-203



ブレイン テクノニュースの  
 バックナンバーご案内  
**第 82 号**

2000 (平成12) 年11月15日発行

総 説

花粉特異的プロモーターの単離とそれを利用した  
 雄性不稔植物の開発 ……………光田展隆・佐藤雅彦

国内情報

高温高圧水処理による廃棄物の資源化技術  
 ……………佐藤伸明・大門裕之・藤江幸一

アンチセンス遺伝子を用いた酒造用  
 低グルテンイネの育種 ……………丸田嘉幸・井上 剛

カイコの3眠化剤利用による  
 細くしなやかな絹の生産 ……………木内 信

緊プロ型ロックウール脱臭装置の  
 開発と実用化……………道宗直昭

地域の先端研究

イネ葉より分離した葉面菌による  
 イネいもち病の防除 ……………河又 仁

天然由来の保存性向上物質によるカンキツ果実  
 腐敗防止への新しい取り組み ……………三好孝典  
 文献情報

成体体細胞の核移植により得られた  
 クローンブタ ……………(抄訳：木村直子)

酵母の代謝工学 ……………(抄訳：家藤治幸)  
 摂食によって誘導される揮発性物質は

リマメ葉の防御遺伝子を活性化する  
 ……………(抄訳：鈴木章弘)

魚類養殖における給餌管理システムへの  
 摂食音の利用 ……………(抄訳：椎名康彦)

海外便り  
 ペプチドの二次構造構築と応用の試み

—ワシントン大学での一年半—  
 ……………野方洋一

## ◀文献情報▶

## ヒアルロン酸のアポトーシス抑制効果

Hyaluronic acid inhibits apoptosis in granulosa cells via CD44.

Tomoko Kaneko, Hidekazu Saito, Mayumi Toya, Takakazu Saito, Kenji Nakahara and Masahiko Hiroi.

Department of Obstetrics and Gynecology, Yamagata University School of Medicine.

*Journal of Assisted Reproduction and Genetics: 17: 162-167 (2000)*

ヒアルロン酸は哺乳動物のほとんどの細胞外マトリックスにおいて見られるグリコサミノグリカンであり、細胞の増殖や転移、接触に関与していることが報告されている。また、ヒアルロン酸は排卵期にある卵胞内にも存在していることが多くの研究によって明らかになっており、胞状卵胞ではLHによる排卵誘起後に卵丘細胞、顆粒膜細胞においてヒアルロン酸の合成・蓄積が観察される。一方、このように排卵まで至る卵胞は限られており、卵巣内のほとんどの卵胞は発育途中で退行することが知られている。この現象は卵胞閉鎖と呼ばれ、これまでの研究からこれがアポトーシスと関連があることが報告されている。著者らはヒアルロン酸に富む卵丘細胞においてアポトーシスの出現率が低いことに着目し、本論文では卵丘細胞や顆粒膜細胞でのアポトーシスに対するヒアルロン酸の効果について調査している。

実験に使用した卵丘細胞はヒト卵胞液中より採取した卵丘細胞-卵子複合体 (COC) からピペッティング操作により機械的に回収し、顆粒膜細胞はCOC採取後の卵胞液からパーコール法によって回収した。各細胞はHam's F-10を基礎培地として培養した。アポトーシス細胞ではクロマチンの凝縮及び核の断片化が起こることが明らかとなっているので、細胞をHoechst 33258で染色後、フローサイトメトリーを用いてアポトーシス細胞の判定を行った。その結果、培養時間に伴っ

てアポトーシス細胞が増加することが観察されたが、ヒアルロン酸を添加した培地で培養した場合には、卵丘細胞、顆粒膜細胞のいずれでもアポトーシス細胞の増加は有意に抑えられた。この抑制効果はヒアルロン酸の濃度に依存していた。また、ヒアルロン酸レセプターであるCD44に対するモノクローナル抗体をヒアルロン酸と同時に培地に添加した場合には、濃度依存的にヒアルロン酸の効果はブロックされ、250ng/ml添加時ではヒアルロン酸無添加と同様の結果となった。これらの結果により、ヒアルロン酸が卵丘細胞、顆粒膜細胞におけるアポトーシス抑制効果を有しており、その効果はヒアルロン酸レセプターであるCD44を介して行われていることが示唆された。

体内においてヒアルロン酸は普遍的な存在であり、その機能や役割についてこれまでに多くの研究がなされている。繁殖の分野においても例外ではなく、受精や発生におけるヒアルロン酸の重要性が注目されている。今回の報告でも、胞状卵胞内に存在するヒアルロン酸は卵母細胞をアポトーシスから保護していることが推察される。また、著者らは以前にも着床前胚を卵丘細胞と共培養した研究で、胚の質を維持したまま培養期間を延ばすことに成功したと報告している。これは、着床前の早期胚でもCD44が発現していること、卵丘細胞ではヒアルロン酸の合成・分泌が行われることを考えると、ヒアルロン酸がアポトーシスのような胚の質の維持に有害なものを抑えていたと推察できる。このようなヒアルロン酸によるアポトーシス抑制効果はヒアルロン酸の新しい機能と言え、今後の研究の伸展に注目したい。

(抄訳：横尾正樹, YOKOO Masaki, 東北大学大学院 農学研究科)



## ◀文献情報▶

### 菌体内にトレハロースを蓄積することで酵母はエンドサイトシスのエタノール耐性を獲得する

Internal Trehalose Protects Endocytosis from Inhibition by Ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*

P. Lucero, E. Peñalver, E. Moreno, and R. Lagnas

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols," CSIC, 28029-Madrid, Spain

*Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4456-4461 (2000)

酵母サッカロマイセス・セレビジエは一般にエタノール耐性で、8—12%のエタノール存在下でも増殖できるが、物質取込経路の一つ、エンドサイトシス（受容体を介さない取込）は2—6%のエタノールの存在下で強く阻害されることが報告されている。しかし、より高濃度のエタノールの存在下でも、増殖中の酵母菌体ではエンドサイトシスは起こっている。従って著者らは、酵母はそのエンドサイトシスがエタノールによる阻害に対して耐性を示すための何らかの手段を獲得していると考え、主要なストレスプロテクタとして知られるトレハロースに着目し、それらのエタノール耐性への寄与を検討した。著者らは、2種のストレス条件（①窒素源が枯渇した条件、②炭素源が糖以外（エタノール、グリセロール）である条件）下で増殖中の酵母菌体において、エンドサイトシスがエタノール阻害に対して耐性を獲得していることを確認した。またその検討の中で、エタノール耐性はトレハロースの菌体内蓄積に伴って現れること、及び高耐性を示す時は高濃度のトレハロースの蓄積を伴い、低耐性を示す時は低濃度の蓄積を伴うこと、を確認した。それらの結果はトレハロースが耐性機構に寄与していることを示唆しており、著者らは次の2点を示すことによりその仮説を証明した。(1) トレハロースを合成できない $tps1\Delta$ 変異株はエタ

ノール耐性を獲得できない。(2) トレハロース水解酵素を持たないために菌体内にトレハロースを過剰蓄積する $nth1\Delta$ 変異株は、炭素源が糖である条件（親株は耐性を獲得できない）下で増殖中のものもエタノール耐性を獲得する。以上より、トレハロースはエタノールからエンドサイトシスを保護する主要なファクタであると結論した。

トレハロースはその保水特性等から細胞保護機能が注目されており、酵母の生育ストレス（エタノール、浸透圧等）耐性への関与やその代謝機構に関しては広く研究されている。その中で本報告は、トレハロースの関与に関して、エンドサイトシスという菌体の一機能に落とし込んでそのエタノール耐性を議論した点で新規であり、興味深い（著者らは膜間輸送等を研究しているグループであり、トレハロースを中心に研究している訳では無いのだが）。しかし論文全体の流れは、現象論的な証明に終始しており、トレハロースがどのように関与することによって、エンドサイトシスのエタノール耐性獲得につながっているのかを示唆するデータや考察はまだ不足している。今後トレハロースが他の細胞機能に及ぼす効果が明らかにされ、ストレス耐性機構研究の扱いやすいモデルとしての酵母の理解が深められるために、この糖の菌体内での振舞いに関し知見が追加されればなお良いと考える。

（抄訳：楠田大輔，KUSUDA Daisuke，カルピス㈱ 基盤技術研究所）

## ◀文献情報▶

高温ストレスで光化学系Ⅱが  
損傷するメカニズムが明らかに

Dephosphorylation of photosystem II reaction center proteins in plant photosynthetic membranes as an intermediate response to abrupt elevation of temperature.

Anne Rokka, Eva-Mari Aro, Reinhold G. Herrmann, Bertil Anderson, and Alexander V. Vener

*Plant Physiology*, 123, 1525-1535 (2000)

筆者の学生時代、光合成の光化学系研究と言えばナノ秒、ピコ秒でおこる反応を追う生物物理的なアプローチの全盛時代で、生き物屋には一寸敬遠したい世界であった。ところが、光化学系、特に系Ⅱが乾燥、熱、UVなどの環境ストレスに鋭敏に反応する過程である事が知られるようになり、生き物屋が気楽に利用できる世界になってきた。

さて、光化学系Ⅱは、集光クロロフィルタンパク複合体 (LHCⅡ)、酸素発生複合体、反応中心の25以上のポリペプチドから構成される超分子複合体である。反応中心は更にD1、D2タンパク、アンテナクロロフィルタンパク (CP43, CP47)、チトクローム b559 などからなる。このうちのD1タンパクは、ストレスによって分解され、新たに合成されるということを常に繰り返している非常に代謝回転の早いタンパクであり、このタンパクが分解されることによって他のタンパクへの影響を波及させないと考えられている。

この分解は系Ⅱの発生する活性酸素によるとする説とプロテアーゼによるとする説があるが、現在のところ、後者が優勢である。その説によれば以下のストーリーとなる。葉緑体は吸収した光エネルギーによって引き起こされる酸化還元によって制御される特異なリン酸化反応があり、約20種のタンパクがリン酸化される。系ⅡではD1、D2タンパク、CP43、9kDタンパク、LHCⅡがリン酸化される。更に、これらタンパクは脱リン酸化された後に、プロテアーゼによって分解される。

ここで紹介する論文は、プロテアーゼ説に立ち、高温ストレスによる光化学活性低下の機構を説明しようとするものである。

高等植物の光化学系研究はハウレンソウと共にあったといってもよいが、この植物は耐暑性に乏しく(25℃以上の高温で生育遅延)高温ストレス研究のよきモデル植物でもある。ハウレンソウ葉およびチラコイド膜を高温(42℃)に曝すと、光化学系Ⅱの構成タンパクは脱リン酸化反応が進むが、その中でもD1、D2タンパク、CP43では常温(22℃)の10倍以上の速度なる。特に、D1タンパクはわずか2-3分で1/2のタンパクが脱リン酸化される。

分解の第一段階が高温によって促進される事が明らかになったが、その機構はどういうことか。この場合、一番に思いつくのは、脱リン酸化酵素(ホスファターゼ)の高温による活性上昇であるが、著者等も定法通り、精製酵素の活性の温度変化を測定する。ところが、案に相違して、42℃の活性は22℃での活性とほぼ同じである。普通はここで諦めるところだが、未精製の膜結合した状態で酵素活性の温度変化を測定すると、42℃では活性は22℃の約7倍に上昇した。また、peptidyl-prolyl cis-trans isomerase TLP40はチラコイド膜内にありホスファターゼと結合して活性を抑制することを、著者は既に明らかにしていたが、今回、このTLP40が高温により膜から遊離する結果を得、本酵素との結合がはずれることにより活性が上昇するのではないかと考えている。

脱リン酸化酵素の活性があがるとしても、D1タンパクは系Ⅱ複合体の奥深くに存在し、酵素が近づけないのではという反論が出てくる。そこで、もう一つの実験を行う。膜が幾重にも積み重なった部分(系Ⅱが存在)と積み重なるの少ない部分を分画し、高温によりD1タンパクが後者の画分に脱離することを明らかにした。ここに高温による脱リン酸化反応促進の機構はほぼ解き明かされたと言える。(抄訳: 岩井純夫, IWAI Sumio, 鹿児島大学 農学部)

## ◀文献情報▶

エンドウマメの複葉の構造は、遺伝子群 *UNIFOLIATA*, *COCHLEATA*, *AFILA*, *TENDRIL-LESS* の相互関与によって制御される

Pea Compound Leaf Architecture Is Regulated by Interactions among the Genes *UNIFOLIATA*, *COCHLEATA*, *AFILA*, and *TENDRIL-LESS*.

Campbell W. Gourlay, Julie M. I. Hofer, and T. H. Noel Ellis

Department of Applied Genetics, John Innes Centre, United Kingdom

*The Plant Cell*, 12, 1279-1294 (2000)

植物の葉には1枚の葉からなる単葉と葉が2つ以上に分かれている複葉が存在する。

エンドウの羽状複葉は、茎に近い近位から托葉、小葉、巻きひげの順に求頂的に形成されていく。エンドウの複葉の突然変異体は古くから見つけられており、複葉が単葉になる *unifoliata* (*uni*)、巻きひげが小葉に転換する *tendrill-less* (*tl*)、小葉が巻きひげに転換し分枝が1回増える *afila* (*af*)、托葉が複葉に転換する *cochleata* (*coch*) などがある。これらの二重突然変異体は解釈が難しいものもあり、例えば、*af tl* では *af* よりもさらに分枝が増え先端に小さな小葉が形成される。

最近、エンドウの複葉の研究に新しい風を吹き込んだのは、*UNI* がクローニングされたことである。*uni* は複葉原基から器官分化する領域 (*blastozone*) の維持に必要であるとされていたが、果たして、*in situ* hybridization により *blastozone* で器官分化直後まで発現していることが明らかになった。また、*af* や *af tl* においては *UNI* の発現が延長されており、やはり、分枝の増加と一致した。*coch* では、托葉での *UNI* の発現が抑制されていなかった。

したがって、*UNI* の発現は近位から順に *COCH*, *AF* によって抑制されているというモ

デルが提唱された。また、*af tl* では *af* よりも分枝が増えることから、*TL* も *UNI* に対して抑制的に働くと考えられる。しかし、*tl* は半優勢の突然変異体であることなどから未だ不明な点が多い。

また、*uni af tl* 三重変異体では複葉の復帰が見られることから、*UNI* にリダンダントな遺伝子の存在が示唆された。トマトの複葉では *KNOX* 遺伝子の発現が見られ、これが複葉形成に関与するとの説もある。そこで、エンドウの *KNOX* 遺伝子のホモログ、*PSKNI* の発現を解析した。その結果、野生型といずれの突然変異体においても、茎頂分裂組織での発現はみられたが、葉の原基での発現は見られなかった。したがって、今のところ *UNI* とリダンダントな遺伝子は見つかっていない。

今後、このモデルを中心にした、遺伝学的、分子生物学的解析によって、複葉形成においてより多くの知見が得られるであろう。

(抄訳：木苗貴秀, KINAE Takahide 東京大学農学生命科学科)



## ◀文献情報▶

ニジマス鰓上皮細胞が産生する  
水酸化脂質による抗炎症作用

The eicosanoid generating capacity of isolated cell population from the gills of the rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*.

Jason W. Holland, et al.

Univ. of Wales Swansea, UK

*Comparative Biochemistry and Physiology*: 122: 297-306 (1999)

ロイコトリエンやプロスタグランジンなどアラキドン酸の水酸化代謝物が好中球活性化、血小板凝集、血管収縮などを經由して疼痛、組織障害や発熱を引き起こす事が知られている。一方、魚油に豊富に含まれる高度不飽和脂肪酸（PUFA）であるドコサヘキサエン酸（22：6，DHA）やエイコサペンタエン酸（20：5，EPA）の水酸化がマダイやニジマスの表皮や鰓に存在する酵素、リポキシゲナーゼによって代謝されている事が報告されていたものの、リポキシゲナーゼ活性を持った細胞種の同定は行われていなかった。しかし、昨年、英国のAnderew F. Rowleyらの研究グループは、ニジマス鰓細胞をパーコルを用いた密度勾配によって分画し、得られた細胞集団の脂質水酸化活性を検討したところ、鰓の上皮細胞がリポキシゲナーゼ活性を示す事をつきとめた。

Rowleyらは、体重120—500gのニジマスの鰓をハンクス緩衝液中でミンスし、コラゲナーゼ消化で得られた細胞懸濁液をパーコルに重層、20,000×gにて15分間遠心分離して3層の細胞集団に分画した。H&E染色とPAS染色によって、3つの細胞集団が多形上皮細胞、ゴブレ上皮細胞と、それ以外の細胞である事を確認し、それぞれの細胞集団（1×10<sup>7</sup>個）をCa<sup>2+</sup>イオノフォアで刺激した後、C<sub>18</sub> ODSカラムを用いた逆相HPLCによって脂肪酸を分析した結果、上皮細胞集団がOH-DHAやOH-EPAを産生していた。つまり、以前より報告されていた魚鰓のリポキシゲナーゼ活性が上皮細胞に極在している可能性が

示唆された事になる。

さて、魚上皮細胞より見いだされた水酸化PUFAの生理作用に関し、血管平滑筋収縮に及ぼす作用を、Norman Salem Jrらが検討している。N. Salem Jrらは、C-11、C-14、C-17のモノOH-DHA、C-12のOH-EPAの4物質が、トロンボキサンA<sub>2</sub>（TX A<sub>2</sub>）類縁体U 46619（2.5 micro M）によるラット大動脈平滑筋収縮を抑制し、その作用強度は14 OH-DHA > 17 OH-DHA > 11 OH-DHA > 12 OH-EPAの順に強く、最も強い14 OH-DHAによる25%阻止点IC<sub>50</sub>値は1.07±0.34 micro Mである事を示した。つまり、魚鰓より見いだされた水酸化PUFAが、TX A<sub>2</sub>による血小板凝集や血管収縮を抑制し、抗炎症的に作用している可能性を示した事になる。

一方、哺乳動物でも、リポキシゲナーゼ活性が血小板や腸上皮細胞に報告されており、例えば、ヒト血小板中で、11 OH-DHA、14 OH-DHAが外因性DHAから代謝される事が示されている。また、魚油を摂食させたラット血小板をCa<sup>2+</sup>イオノフォアで刺激すると1.4 micro Mの14 OH-DHAが放出される事が確認されているが、先述の14 OH-DHAによる血管平滑筋収縮の阻止点IC<sub>50</sub>値と比較すると、両者はほぼ同等である事が解る。つまり、哺乳動物体内に於ける14 OH-DHA濃度は、抗炎症作用を発揮できる濃度域と一致する事になり、14 OH-DHAが、生理的条件下で、動物体内に於ける恒常性維持に積極的に関与している可能性が示唆されている。“魚から見つかった水酸化PUFAが、実は哺乳動物の重要な生理活性物質だった”という結論が得られる事になるのかもしれない…

（抄訳：玉井 忠和，TAMAI Tadakazu  
マルハ(株) 中央研究所）

## 参考資料

J. W. Karanian et al., *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (1994) 270, 1105-1109.

◀海外便り▶

## カスパーゼの調節を介した食品成分の新たな機能性

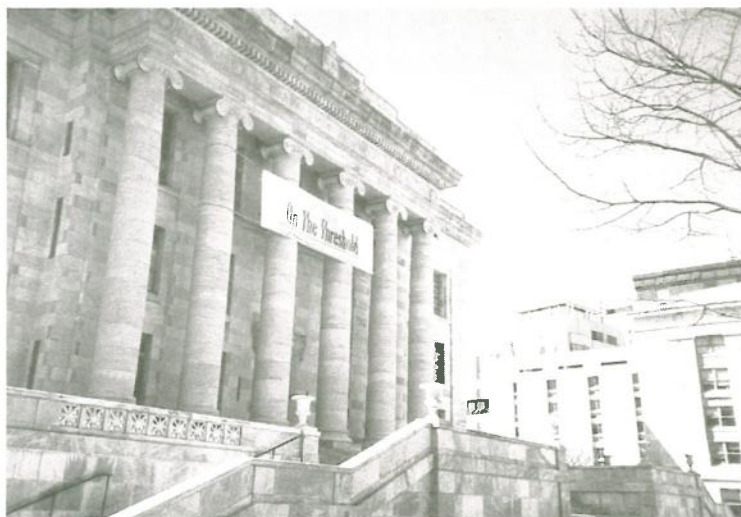
—ハーバード大学医学部における1年半—

農林水産省 食品総合研究所

小堀 真珠子

### 1. はじめに

1998年8月から1年半の間、科学技術庁長期在外研究員として米国マサチューセッツ州ボストンのハーバード大学医学部に滞在した。ハーバード大学医学部はボストン市内のメディカルエリアと呼ばれる地域にあり、子供病院 (Children's Hospital Boston)、女性病院 (Brigham & Women's Hospital)、がん研究所 (Dana Farber Cancer Institute) 等、医学分野において、米国内はもとより世界でも有数の施設に囲まれている。治安も良く、生活にも便利で研究には最適の環境であった。



写真：ハーバード大学医学部校舎

### 2. カスパーゼと疾病

滞在先は細胞生物学部、Associate ProfessorのDr. Junying Yuanの研究室であった。アポトーシスと呼ばれる細胞死が注目されて久しいが、これはアポトーシスが遺伝子によって制御された能動的な細胞死であり、「生体の発生と分化」から「疾病の発症と抑制」まで、様々な現象に関わっているためである。Yuan博士はICE (Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme, caspase 1) と呼ばれるシステインプロテアーゼがアポトーシスの誘導に関わることを明らかにした。その後、アポトーシスに関与するシステインプロテアーゼが次々に発見され、Yuanらはこれら一群のシステインプロテアーゼをカスパーゼ (caspase) と命名した。現在、1から14までのカスパーゼが見いだされている。カスパーゼにはアポ

KOBORI Masuko

〒305-8642 つくば市観音台2-1-2

トーシスの実行因子としてのカスパーゼ3とそのグループ、レセプターからの刺激で活性化される等細胞死の分子機構の上流で作用するカスパーゼ8とそのグループ、及びインターロイキン1 $\beta$ の産生等主に免疫系に働くカスパーゼ1のグループがあり、アポトーシスや免疫に極めて重要な役割を果たしている。Yuanの研究室では、最近では、カスパーゼ11が虚血症における細胞死の誘導に関わること、またハンテントン病における神経細胞死はカスパーゼ8の活性化を含むアポトーシス誘導経路を介していること等を明らかにしており、カスパーゼを介した様々な疾病のメカニズムの解明を行っている。

### 3. 食品機能とカスパーゼ

整腸作用、血圧制御作用及び免疫賦活作用等、食品は様々な生理的機能を示す。中でも、がんは常に死因において高い割合を占めていることから、食品の発がん抑制、がん予防は特に重要な機能の一つであるといえる。未分

化なまま異常に増殖し続ける白血病細胞にはその分化を誘導することによって、また、アポトーシスが抑制されて異常増殖するがん細胞（白血病細胞も含む）にはそのアポトーシスを誘導することによって、がん予防効果が期待できる。これまで私は食品のがん予防効果等の生理的機能を解明するため、食品成分が「白血病細胞分化誘導効果」や「がん細胞アポトーシス誘導効果」を示すこと等を明らかにしてきた。

そして、今回在外研究を行うにあたっては、未だ検討されていない新たな食品機能の研究を行いたいと思っていた。食品成分の生理的機能を明らかにするためには、病気や老化等の現象の分子機構に基づき、食品成分の効果を分子レベルで解明した後に、動物や、実際のヒトでの効果を確認してゆくことが重要である。カスパーゼはがん細胞のアポトーシス誘導等「疾病の抑制」に働くと共に、神経疾患におけるアポトーシス誘導等「疾病の発症」にも関わっている。また感染症等の免疫疾患においても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ことから、食品成分のカスパーゼ調節作用とその結果期待できる疾病予防効果の解明を在外研究の目的とした。

#### 4. カスパーゼ抑制効果を示すハーブ成分

Yuanらは、カスパーゼ11を発見し、そのノックアウトマウスを作成した。そしてその結果、カスパーゼ11ノックアウトマウスはほぼ正常に生育するが、感染症のショック症状には耐性であることが明らかになった。このことは、カスパーゼ11の発現抑制効果を示す成分が、老人や重篤な患者においては致命的となり得る感染症のショック症状に、効果を示す可能性を示すものである。今回の在外研究においては、まずカスパーゼ11発現抑制成分の培養細胞を用いた簡便な検索法を開発し、本法を用いてハーブ抽出物にカスパーゼ11抑制効果があることを明らかにした。更に、カスパーゼ11抑制効果を示すハーブ成分をほ

ぼ単離することができた。今回単離したハーブ成分は、カスパーゼ11発現抑制効果を示す食品成分として始めて見いだされたものである。カスパーゼ11発現抑制効果を示すハーブ成分が、実際に感染症のショック症状を抑制するかどうかは今後の課題として残されたが、新たな食品機能の可能性を示す興味深い結果を得ることができた。

#### 5. ボストンについて

ボストンは米国独立の舞台として知られており、市内にはボストン茶会事件の船の複製（博物館）や当時活躍した人々の銅像、また多数の歴史的建造物がある。街並みは落ち着いたヨーロッパ風の佇まいで、独特の雰囲気を持っている。ボストン美術館には浮世絵や仏像等の日本コレクションが充実しており、ボストンシンフォニーもまた有名である。滞在中、ジョン・F・ケネディJr.氏が飛行機事故で亡くなるという事件があったが、ボストンはジョン・F・ケネディの出身地でもあり、当時、テレビのニュースは何日もこの話題で持ちきりだった。

ボストン、特にメディカルエリア周辺は研究に適した良好な環境であったが、唯一の問題は住環境で、古い街であるためアパートも古く、需要の割に数も少なかった。更に、米国の好景気を反映して家賃が毎年かなり割合で値上がりしており、毎年来る学生やポスドクはアパート探しに苦労している。数部屋ある場合には、ルームメイトとして何人かでアパートの部屋を共用しているケースも見られた。幸い私は研究室の近くにルームメイトと共に住むことができ、またアパートの庭には、都会にも拘わらずリスや野ウサギが住み着いていて、ささやかな自然を楽しむこともできた。

今回の滞在中は、研究の進め方から研究室の運営まで、様々な面での知見を深めることができた。最後に、本長期在外研究の遂行に際してご尽力いただいた方々に謝意を表して、本文の終わりとしていたい。



#### 編集後記

◆時の流れは新世紀に入りましたが、その最初の発行になるブレインテクノニュース第83号をお届けします。本号の表紙写真は、昨年、農林水産省畜産試験場の大西 彰氏らによりその成功が発表された「体細胞クローン豚作出」の概略を、同氏のご好意により掲載させて頂きました。

◆本号では、総説として、生食野菜・果物の有害微生物汚染防止による安全性確保問題の研究状況(食品総合研究所 一色賢司氏)を取り上げ、関連してその新規殺菌技術(食品総合研究所 五十部誠一郎氏・植村邦彦氏)を、その他の研究情報として絹の繊維化メカニズム(農工大 朝倉哲郎氏)、体細胞クローン豚の作出(畜産試験場 大西 彰氏)、分解菌利用のバイオレメディエーション(農業環境技術研究所 高木和

広氏)、ジャガイモウイルス病の簡易・迅速診断法(北海道病害虫防除所 三澤知央氏)、さらに海外便りに、カスパーゼの調節による食品成分の新機能性(食品総合研究所 小堀真珠子氏)に執筆して戴きました。執筆研究者各位に、改めて御礼申し上げます。

◆また本号では、裏表紙に、生研機構の「基盤研究推進事業(平成8年採択課題)研究成果発表会」次第を掲載いたしました。発表会では、各担当研究者により多くの貴重な研究発表が行われますので、読者各位におかれましても是非ご参加下さいませようご案内申し上げます。

◆次号84号では、イネのマップベースクロニング(総説)他、各分野の先端的研究を取り上げる予定です。(島山記)

#### 本誌著作物の複写利用等について

本誌掲載の論文・記事の複写・転載等を希望される方は、執筆者ならびに生物系特定産業技術研究推進機構(生研機構)の許諾を得て行って下さい。

ブレインテクノニュース(第83号)

平成13年1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(生研機構)

〒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

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

URL <http://www.tokyo.brain.go.jp/>

©Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 2001



# 生研機構 基礎研究推進事業 成果発表会 (平成8年度採択課題)

開催日：2001年2月14日(水)、28日(水)、3月1日(木)、2日(金)

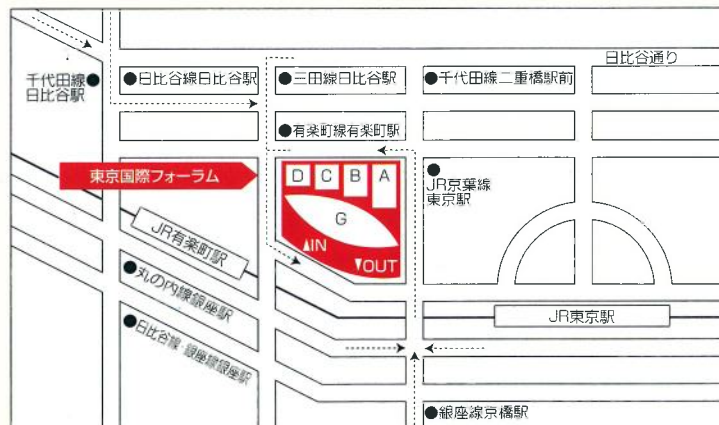
場 所：東京国際フォーラム (2月14日のみホールD、その他の日はD501)  
東京都千代田区丸の内3-5-1 (tel 03-5221-9000(代))

参加費：無料

## プログラム

2月14日(水)	2月28日(水)
9:40 開会挨拶	
10:00 昆虫・微生物寄生共生系の分子機構 (東京大学 石川 統)	10:00 乾燥・塩ストレス耐性の分子機構の解明と分子育種の応用 (国際農林水産業研究センター 篠崎和子)
11:00 昆虫の生体機能に基づくバイオマイクロマシン (東京大学 下山 勲)	11:00 植物の遺伝子発現の光スイッチング機構の解明 (日立製作所基礎研究所 古谷雅樹)
12:00 休憩	12:00 休憩
13:00 CO2固定細菌を利用した地球環境修復システム (大阪大学 森川正章)	13:00 光過剰による光合成抑制機構の解明と遺伝子導入による回避システムの開発 (農業生物資源研究所 徳富光恵)
14:00 宿主決定に関わる植物マイコプラズマの遺伝子発現・制御メカニズム (東京大学 難波成任)	14:00 ヘプチド性植物増殖因子に関する基礎的研究 (名古屋大学 坂神洋次)
15:00 休憩	15:00 休憩
15:15 植物病原菌類における多剤耐性の分子機構 (東京大学 日比忠明)	15:15 森林生態系における共生関係の解明と共生機能の高度利用のための基礎研究 (東京大学 鈴木和夫)
3月1日(木)	3月2日(金)
10:00 哺乳動物の高度に発達した薬物代謝機能を利用した環境負荷物質の代謝・分解技術の応用 (神戸大学 大川秀郎)	10:00 群管理システムを中心とした収穫・運搬機械システムの研究 (京都大学 梅田幹雄)
11:00 近赤外分光法による乳牛生体情報のオンラインモニタリング手法の開発 (畜産試験場 田辺 忍)	11:00 カンキツによるがん予防 (果樹試験場 矢野昌充)
12:00 休憩	12:00 休憩
13:00 臓器移植医療に応用するためのブタの品種改良・増産 (大阪大学 白倉良太)	13:00 味覚シグナリングの分子機構の解析と食品の品質設計基盤の展開 (東京大学 阿部啓子)
14:00 無脊椎動物を利用したヒト病態の解析と病態モデル動物 (東京大学 鈴木利治)	14:00 生理機能調節性タンパク質集積作物の開発 (京都大学 内海 成)
15:00 休憩	15:00 休憩
15:15 茶機能検定系と茶成分新機能 (野菜・茶業試験場 袴田勝弘)	15:15 ドメインシャッフリングによる高機能キメラ酵素の創出と植物における発現技術 (食品総合研究所 林 清)

## 案内図



問い合わせ・申し込み先 生研機構基礎研究課(担当 渡辺) e-mail: kwatanab@tokyo.brain.go.jp  
tel: 03-3459-6569 fax: 03-3459-6594