

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

目 次

課題番号			
2.0000970A 31015	結核菌の迅速薬剤感受性試験法の開発	山崎 利雄	1
971A 31028	バイオテクノロジーを用いた薬物代謝酵素の特性解析と医薬品の適正使用化に関する研究	頭金 正博	9
972A 31064	感染症予防効果のある糖鎖を付加した多機能食用難消化性多糖類の開発とその有効性及び安全性を評価する方法の開発	小西 良子	23
973A 31065	食中毒細菌の検出方法の開発と評価	山本 茂貴	29
974A 31093	リポソームを用いた遺伝子導入法の開発、その有効性、安全性に関する研究	北川 隆之	39
975A 31112	ラット初代培養肝細胞を用いる毒性評価系の確立	四宮 貴久	47
977A 31219	生殖細胞系列の完全連続培養系の開発	佐藤 英明	52
978A 31238	精巣細胞各種分化系列を標識する抗体の作成と精巣障害解析の技術基盤の整備	井上 達	55
979A 31239	加速試験で評価できない製剤機能の安定性評価に関する研究	吉岡 澄江	66
980A 31240	新開発食品の食品化学的特性の解析と評価に関する研究	豊田 正武	74
981A 31242	糖タンパク質及び糖鎖関連物質の糖鎖の機能及び構造解析と品質等評価技術の開発	早川 堯夫	83
982A 31244	食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性の評価・試験方法に関する研究	米谷 民雄	93
983A 31249	遺伝子改変テスターを用いる第二世代変異原性試験法の開発	能美 健彦	102
984A 31266	培養細胞を用いたインビトロ発熱性物質試験法の開発に関する研究	村井 敏美	108
985A 31267	薬物代謝活性の多型性とハイリスク患者における薬物評価に関する研究	大野 泰雄	116
2.0000976A 32146	トランスポーター遺伝子発現細胞を用いた薬物吸収・分布・排泄動態評価系の開発	辻 彰	126

食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性 の評価・試験方法に関する研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部
研究者 米谷 民雄

分担研究者

- (1) 筑波大学生物科学系 鎌田 博
- (2) 東京農工大学工学部 小関 良宏
- (3) 千葉大学園芸学部 石川 恵子
- (4) 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 米谷 民雄
- (5) 三栄源エフ・エフ・アイ(株)第三研究部 香田 隆俊

要旨

バイオテクノロジーを応用した天然食品添加物の生産に関して、(I) 遺伝子操作技術等を駆使して効率的に天然食品添加物を生産するための開発型研究と、(II) 生産された食品添加物の安全性と品質を評価・試験するための安全性評価研究の、両研究を実施した。

1. 研究目的

天然食品添加物の新しい生産手法として、遺伝子操作技術や組織培養法の応用が考えられている。一方で、これらバイオテクノロジーを用いて生産される食品添加物が、従来の方法で生産されたものと同様であるかは、その安全性及び品質の面から大変重要な問題である。そのため、これらバイオテクノロジーを応用して生産される食品添加物の安全性・品質の評価・試験方法は、科学技術の進歩とともに常に改良していく必要がある。本研究では、バイオテクノロジーの応用による天然食品添加物の生産に関して (I) 遺伝子操作技術等を駆使して効率的に天然食品添加物を生産するための開発型研究、及び (II) 生産された食品添加物の安全性と品質を化学的観点から試験・評価する安全性確保型研究の、両研究を実施することを目的とした。

平成12年度は、(I)の分野では、①辛味成分の供給源である西洋ワサビとカロテノイド色素の供給源であるニンジンを用い、西洋ワサビにおいては栄養繁殖を効率的に行うための不定芽形成機構を解明し、またニンジンにおいては種子乾燥耐性獲得機構を解明し、遺伝子組換えによる種苗増殖の効率化や乾燥耐性植物の育成を試み、そのような遺伝子組換え植物における食品添加物の含量を調査することとした。

また、②形質転換植物において、導入された遺伝子が期待どおりに発現しない、または個体ごとの発現にばらつきがあるという現象が数多く報告されているが、この問題の原因の一つとして、遺伝子を植物に導入する際にその遺伝子が核ゲノム中のどの領域に導入されるかが個体ごとに異なるために「位置効果(position effect)」の影響を強く受けるということがあげられる。前年度までに、ニンジン(*Daucus carota* cv Kurodagosun)核内の PAL (phenylalanine ammonia-lyase) 核遺伝子の一つ *gDcPAL3* 遺伝子のプロモーター領域を解析している過程で MITE 様の配列 IS1 と IS2 を見だし、これが *gDcPAL3* 遺伝子の発現に重要な役割を果たしていることを見だし、これら MITE を導入した植物の遺伝子導入ベクターを作成したところ、タバコおよびニンジン植物体という双子葉植物への遺伝子導入効率が高まることを見出した。そこで今年度は、単子葉植物においてもこれらが有効であることを明らかにするために、イネ培養細胞への遺伝子導入効率に対する効果を調べることを目的とした。

さらに、③昨年度 *Capsicum annuum* 品種ちぐさの4倍体を作成し、その花粉稔性を調べたところ、15°Cでの花粉発芽率が2倍体からの花粉と比較して有意に増加し、低温での稔性向上が示唆された。そこで、本年度は4倍体シトウの花粉稔性を調べ、倍数性による花粉稔性向上が一般的であるかを調べることにした。また、ちぐさ4倍体のコルヒチン処理当代を用いて、果実の形態と種子数を調査することにした。

一方 (II) の分野では、④カンゾウ抽出物にシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (CGTase) を作用させて製造される酵素処理カンゾウ (Enzymatically modified licorice extract, EMLE) は、カンゾウ抽出物よりも溶解性が高く、また味質も良いためわが国で広く用いられているが、その構成成分は十

分に明らかにされていない。そこで、化学的安全性評価を目的として、EMLE の主要な構成成分を単離して構造を明らかにし、また、単離した構成成分の味について検討することを目的とした。

また、⑤最近、中国で密蒙花 (*Buddleja officinalis* Maxim.) の花を原料とした黄色素が開発され、食品、医薬品、化粧品等に使用されるようになってきているが、現在、日本では密蒙花黄色素は既存添加物リストに掲載されておらず、食品添加物として許可されていない。密蒙花黄色素の色素成分であるクロセチン及びその配糖体は、クチナシ黄色素やサフラン黄色素にも含まれているため、主色素含量や他の指標成分により密蒙花黄色素をクチナシ黄色素やサフラン黄色素と判別する方法を確立することを目的とした。

2. 研究方法

①西洋ワサビは不定芽形成によって栄養繁殖しており、この繁殖形態が産業にも利用されている。西洋ワサビに見られるこの不定芽形成は光によって制御されていることから、光誘導不定芽形成と名付けられている。本研究では、この光誘導不定芽形成に関与する分子機構を解明することとした。昨年度までの研究により、本現象に関与する光受容体として西洋ワサビより7種類のフィトクロム遺伝子と5種類のクリプトクロム遺伝子を単離し、その構造解析と発現解析を行った。本年度は、光受容後の細胞内情報伝達を司る転写制御因子として、シロイヌナズナの *PIF3* 遺伝子および *PKS1* 遺伝子をプローブとして西洋ワサビホモログを単離し、その発現解析およびフィトクロム分子との結合の有無を、酵母の two-hybrid 法を用いて検討することとした。

一方、乾燥耐性植物を遺伝子組換え技術によって育成するために種子乾燥耐性機構が解析されているが、材料である胚の調製が困難であるため解析は遅れている。ニンジンでは、種子胚発生のモデル系である体細胞不定胚形成系が確立されており、それを利用することで、種子乾燥耐性の分子機構を明らかにできる。昨年度までの研究により、種子におけるアブシジン酸 (ABA) 誘導性乾燥耐性獲得に関与すると考えられている情報伝達因子のニンジンホモログである *C-ABI3* 遺伝子および *C-Lec1* 遺伝子を単離し、その発現解析や過剰発現形質転換体の乾燥耐性を検討した。本年度は、*C-ABI3* 因子を介して ABA 依存的に発現が誘導される *DcECP* 遺伝子群のプロモーター解析を行い、転写制御カスケードの一端を明らかにするとともに、*C-ABI3* 遺伝子を過剰発現させた形質転換ニンジン培養細胞におけるカロテン含量を、HPLC を用いて測定した。

②ニンジン培養細胞の核ゲノム DNA から得た新規 MITE、IS1 および IS2 を植物への遺伝子導入ベクターである pAB に挿入したコンストラクト、pIS135S/AB、pIS235S/AB および pIS1235S/AB については昨年度の研究報告書に記載したものをを用いた。またコントロールとしてはこれら因子を含まない pI35S/AB を用いた。これを *Agrobacterium tumefaciens* にエレクトロポレーション法によって導入し、これを用いてイネおよびタバコ培養細胞に感染させた。イネ培養細胞への形質転換についてはイネ (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare) 完熟種子より新鮮なカルスを誘導し、これに形質転換済みの *A. tumefaciens* を共存培養によって感染させて遺伝子導入を行い、除菌後 28 °C、暗黒下で培養した。3 ~ 4 週間後、多数のカルスからランダムに個体を選び出し、各カルスの一部をとって GUS 染色をおこない、形質転換効率を調べた。

タバコ培養細胞への形質転換については、タバコ培養細胞 BY-2 に形質転換済みの *A. tumefaciens* を共存培養によって感染させて遺伝子導入を行い、除菌後に細胞数を計測し、1 枚のプレート当たり、 4×10^5 、 6×10^5 、 8×10^5 、 10×10^5 、 15×10^5 となるように、100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ および 300 $\mu\text{g} / \text{ml}$ カナマイシンを含む固体選択培地に均一に広げて、暗黒下、28 °C で培養した。得られたタバコ・カルスからタンパク質を抽出し、GUS 活性を計測した。

③植物材料：*Capsicum annuum* シシトウ No.562、ちぐさ、カリフォルニアワンドー、Sweet Banana、シグナル、ラルクは日本園芸生産研究所より供試され、同研究所ハウスにて栽培された。

倍数体の作出：前年度の報告に従った。倍数性はフローサイトメトリーにて確認した。シシトウ 4 倍体から放任受粉により後代を得、通常の 2 倍体からの種子とともに、3 ~ 5 個体ハウスにて栽培し、花粉発芽試験に用いた。ちぐさ 4 倍体はコルヒチン処理当代 (2 個体) を用いた。

花粉稔性調査：花粉の稔性は、人工培地における花粉発芽率により求めた。ハウスで 4 ヶ月から 10 ヶ月栽培した植物体 (各 3 ~ 5 個体) から、開花前日の蕾を採取し、温室、25 °C にて 1 ~ 2 日静置した。開花後、花粉は 50 μl の液体人工培地 (Brewbaker and Kwack 1963) にて発芽させた。10, 15, 20, 25 及び 30 °C にて 5 時間静置した後、光学顕微鏡 (x100, Olympus IX70, Japan) で観察し、花粉管が花粉粒の直径以上伸長しているものを発芽した花粉とみなし、視野内の全花粉粒数あたりの発芽花粉粒数の百分率を発芽率とした。

果実の形態：ちぐさ2倍体（5個体）、4倍体（2個体）の開花前日の蕾各々15個、7個に札をつけ、それぞれ果実長、直径、果皮厚はノギスにて測定した。

果実の倍数性調査：ちぐさ2、4倍体の果実、葉（各3サンプル）を用いて、フローサイトメトリーにて核の倍数性を調査した。フローサイトメトリーは前年度の報告に従って行った。

④日本食品添加物協会を通じて入手した酵素処理カンゾウ1gをMeOH-H₂O（1：2）20mLに溶解させて分取HPLCカラムJ'sphere ODS-H80（20mm i.d. x 250mm, YMC）に載せ、MeOH-H₂O（3：2）を1mL/minで流して溶出させた。NMRスペクトルはAlpha 600（600MHz for ¹H, 150MHz for ¹³C, JEOL）を使用して測定した。Liquid Secondary-ion mass spectrometry（LSI-MS）はZAB-2SEを用いて測定した。官能試験は0.5%溶液を用い、4人で行った。対照としてaspartame、acesulfame-K、sucroseを用いた。

⑤試料：密蒙花乾燥原料は中国雲南、クチナシ乾燥果実は台湾、サフランはイランより入手した。また、密蒙花黄色素は昆明密蒙花科技有限责任公司製、クチナシ黄色素は三栄源エフ・エフ・アイ(株)製、サフラン黄色素は研究室にて原料より調製したものをを用いた。

抽出精製法：乾燥原料を乳鉢にて粉碎し、70% EtOHにて抽出後、濾過してHPLC分析試料とした。

密蒙花黄色素指標成分の同定：指標成分1、2をpH-zone-refining counter-current chromatography、ODS column chromatographyにて単離し、NMR、MS、IR分析を行った。

添加回収実験：モデル食品として密蒙花、クチナシ、サフラン黄色素にて着色した中華麺、クッキーを調製した。モデル食品は、50% MeOHにて抽出し、濾過後、C18カートリッジにて前処理を行ったものを、HPLCで分析し、色素と指標成分の添加回収率を算出した。

指標成分の定性方法：密蒙花、クチナシ、サフラン黄色素、モデル食品抽出液について、LC/MS分析を行った。

3. 研究成果

①光情報伝達においてフィトクロムタンパク質に結合することが知られているシロイヌナズナのPIF3因子やPKS1因子の対応遺伝子をプローブとして西洋ワサビの毛状根あるいは葉から調製したcDNAライブラリーをスクリーニングし、4種類の*ArPIF3*遺伝子および3種類の*ArPKS1*遺伝子が単離できた。その発現を調査したところ、毛状根の基部側で発現量が多く、また、毛状根の暗黒下での培養期間が長くなるにつれて発現量は増加した。この発現パターンは毛状根における光誘導不定芽形成頻度と正の相関を示しており、本因子が光誘導不定芽形成に関与していることが示唆された。そこで、酵母のtwo-hybrid法を用い、この*ArPIF3*タンパク質および*ArPKS1*タンパク質がフィトクロムタンパク質と相互作用するか否かについて検討した。その結果、両タンパク質ともにフィトクロムAおよびフィトクロムBタンパク質と結合することが確認された。

ニンジンにおいては、胚特異的な転写制御因子である*C-ABI3*因子を介してABA依存的に発現が誘導される*DcECP*遺伝子群のプロモーター解析を行った。特に、ABAによって発現が強く誘導される*DcECP31*遺伝子についてはそのプロモーターにABA応答性シス配列（ABRE）が3つタンデムに並んでおり、そのうちの任意の2つが実際のシス配列として機能することを明らかにした。さらに、このシス配列が胚を構成している細胞の核タンパク質と実際に結合することもゲルシフトアッセイによって明らかとなった。

一方、昨年度までの研究によって、*C-ABI3*遺伝子を過剰発現させたニンジン形質転換培養細胞は乾燥耐性が新たに付与されることを明らかにしていたが、本年度はこの形質転換培養細胞と非形質転換培養細胞のカロテン含量を高速液体クロマトグラフィーによって検討した。その結果、両細胞においてカロテンの質的・量的変化はないことが明らかとなった。

② pIS135S/AB、pIS235S/AB および pIS1235S/AB を導入したイネ・カルスを選抜培地に置き、28℃、暗黒下で培養してから3～4週間後に、GUS染色により青色を呈したカルス、すなわち遺伝子導入されたカルスの全体に占める割合はコントロールであるp35S/ABよりも約2倍に向上し、単子葉植物においてもIS1、IS2の導入により遺伝子導入効率が向上したことが示された。

またタバコ培養細胞にpIS135S/AB、pIS235S/AB、pIS1235S/AB および pIS35S/AB を導入した。これらのタバコ培養細胞をカナマイシン濃度が100、300 μg/mlの固体選択培地に、細胞数を5×10⁴、1×10⁵、2×10⁵、4×10⁵、6×10⁵、8×10⁵、1×10⁶、1.5×10⁶と変えて広げ、1ヵ月後、1mm以上に成長したカルス数を計測した。その結果、特にIS12と35Sのカルス数の差が大きく、約2.5倍以上もの再生率の向上がみられた。中でも細胞数が8×10⁵においては13倍もの形質転換効率の差がみられた。

これらのIS12を含む形質転換タバコ・カルスおよびコントロールとしてISを含まない形質転換タバ

コ・カルスから核 DNA を抽出してサザン・ハイブリダイゼーション法によって導入された遺伝子のコピー数を決定した後、それらのタバコ・カルスからタンパク質を抽出し、GUS 活性を測定した (Fig. 1)。その結果、明らかに IS12 を含む形質転換タバコ・カルスにおいて高い GUS 活性を示すカルスが得られたことがわかり、この IS12 によって転写活性が促進されていることが明らかになった。

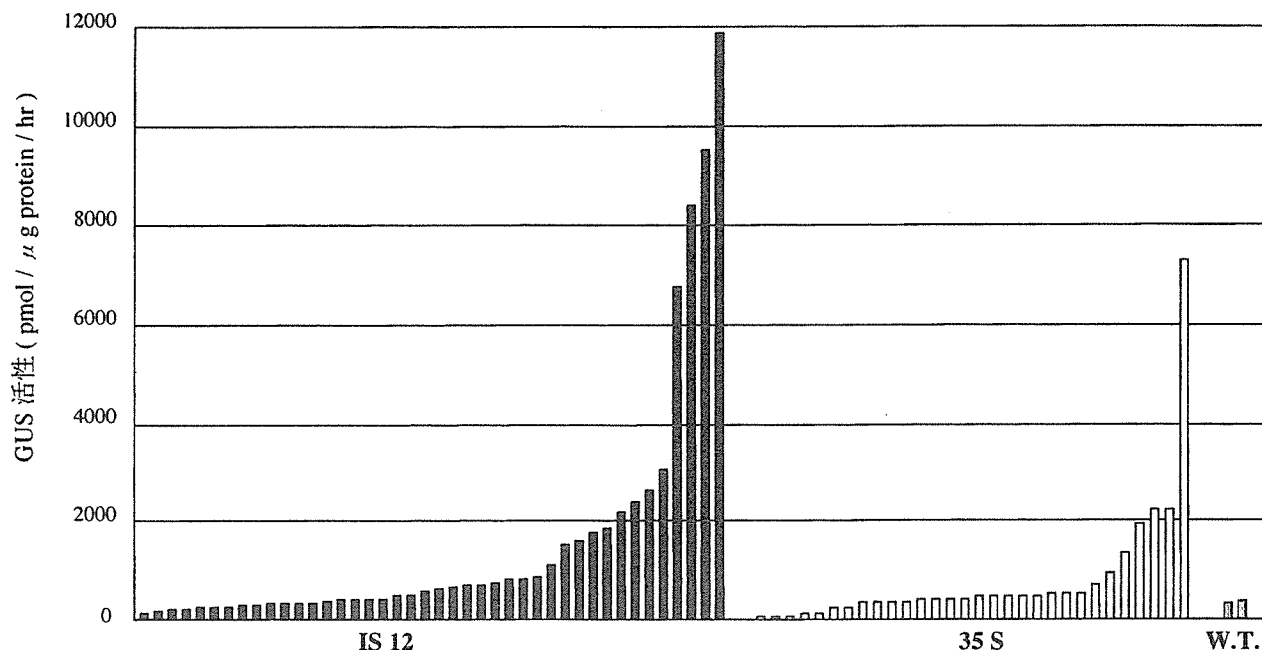


Fig. 1. GUS activity in individual calluses of transformed tobacco cells.

③シトウ 2, 4 倍体の花粉稔性調査: シトウ 2, 4 倍体の花粉を用いて同様の花粉稔性調査を行ったが、低温での発芽率向上はみられなかった。適温である 25°C では 4 倍体の発芽率は 2 倍体の発芽率の約 6 割しかなかった。

シトウ 2 倍体を含む 5 品種の夏期、冬期の花粉稔性調査: シトウ 2 倍体は、カリフォルニアワンダー、Sweet Banana、シグナル、ラルクと比較して、夏期、花粉稔性がほとんどない場合があることが明らかになった。

ちぐさ 4 倍体果実の形態、種子数: 2 倍体果実と比較して、4 倍体果実では新鮮重 6 割、果皮の厚さは同じ、種子数は 2 割、果実長は 6 割、直径はほぼ同じであった。

果実の倍数性調査: ちぐさ 2 倍体の葉では、2C, 4C に相当するピークが見られ、4 倍体の葉では 4C, 8C に相当するピークが見られた。また果実では、2 倍体では 2C から 128C、4 倍体では 4C から 128C に相当するピークが見られ、ともに高次倍数体となっていることが明らかとなった。

④EMLE を MeOH-H₂O に溶解させ、直接分取 HPLC に供した。化合物 1-6 を単離し、NMR および LSI-MS で構造解析を行った。化合物 1 は上記の分析および HPLC で標品と保持時間が一致したことにより glycyrrhizin すなわち 3-O-[β-D-glucuronopyranosyl-(1→2)-β-D-glucuronopyranosyl] glycyrrhetic acid と同定できた。

化合物 3 の NMR データを 1 と比較した。¹H-NMR と ¹³C-NMR において、1 と共通してみられる 2 つの β-glucuronopyranosyl 基 1 位以外に α-glucopyranosyl の 1 位 (H-1''', C-1''') のピークが観察され、また、C-4'' には glycosylation shift が見られたことから、3 は 1 の C-4'' に 1 分子の glucose が結合した 3-O-[α-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucuronopyranosyl-(1→2)-β-D-glucuronopyranosyl] glycyrrhetic acid と推定された。また、HMBC スペクトルにおいて H-1''' と C-4'' の間に相関シグナルが認められた。さらに、高分解能 LSI-MS において分子式 C₄₈H₇₂O₂₁ が推定されたこと、低分解能 LSI-MS において [M+H-Glc]⁺ が観察されたこともこの構造を支持している。

化合物 5 は ¹³C-NMR において 4 つのアノメリック炭素のシグナルが観測されたこと、3 のスペクトルと比較して C-4''' に glycosylation shift が見られたこと、HMBC において H-1''' と C-4''' の間に相関シグナルが認められたこと、高分解能および低分解能 LSI-MS の結果から 3 の C-4''' に 1 分子の glucose が結合した 3-O-[α-D-glucopyranosyl-(1→4)-α-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucuronopyranosyl-(1→2)-

β -D-glucuronopyranosyl] glycyrrhetic acid であることがわかった。

化合物 2 は LSI-MS のデータは化合物 1 と同様であった。NMR スペクトルもほぼ同じであり、 ^{13}C -NMR において、C-29 および C-30 と帰属されるピークの化学シフトのみが異なっている。このことから、2 は、C-20 の立体配置が 1 と逆の 3-O-[α -D-glucuronopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl] liquiritic acid であると考えられた。同様に、4 は 3 の立体異性体 3-O-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucuronopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl] liquiritic acid、6 は 5 の立体異性体 3-O-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucuronopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl] liquiritic acid であることがわかった。Fig. 2 に化合物 1-6 の構造を示す。

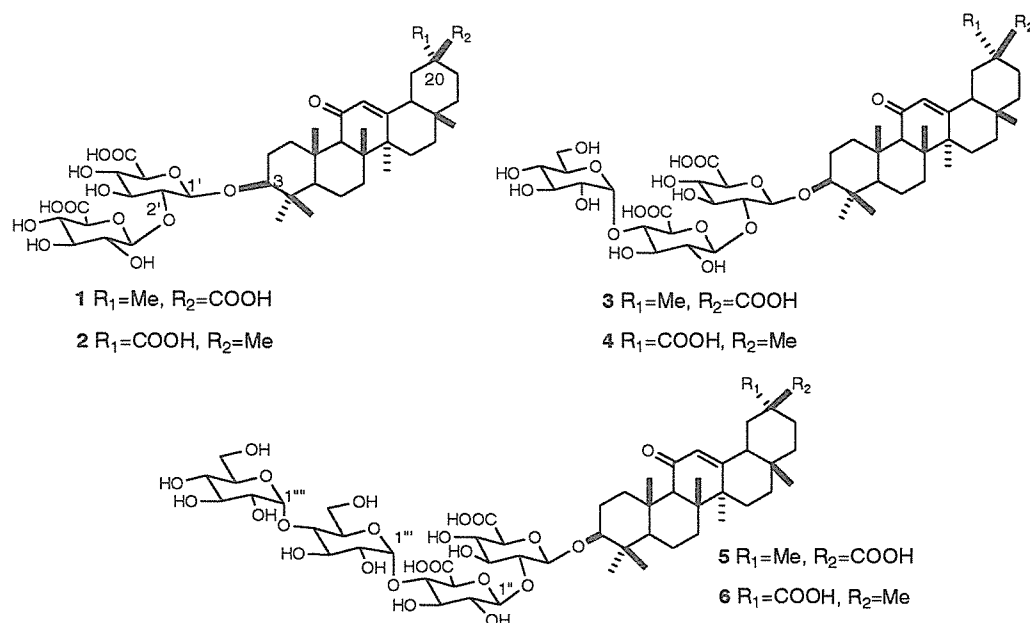


Fig. 2 Structures of compounds 1~6.

構成成分の構造と味の関係を検討するため、単離した化合物それぞれについて官能試験を行った。その結果、アグリコンが同じ化合物の間では、糖鎖が長いほど甘さが弱くなる傾向があった。ジグルコシル体である 5 および 6 は sucrose と同程度の甘味しか示さなかった。興味深い点は、カンゾウの主成分である 1 よりもマイナー成分である 2 の方が甘さが強いこと、しかしながらモノグルコシル体では 1 と同じアグリコンを持つ 3 の方が 2 の誘導体である 4 よりも強い甘味を持つことである。

⑤(i)密蒙花、クチナシ、サフランの HPLC による比較分析

分析の結果、密蒙花の主な色素成分として、クチナシ、サフランと同様の *trans*-crocetin-digentiobioside ester (crocin, C-1)、*trans*-crocetin-monogentiobioside-monoglucoside ester (C-2)、*trans*-crocetin-monogentiobioside ester (C-3)、*cis*-crocetin-monogentiobioside ester (C-4) が含有されていることが明らかとなった。密蒙花、クチナシ、サフランでは、色素成分の組成比に差が見られたが、これは気候等の栽培条件によっても変化することが予想されるため、この差によって密蒙花をクチナシ、サフランと判別することは困難であると思われた。密蒙花にのみ 330nm 付近に λ_{max} をもつ 2 つのピーク (Compound 1、Compound 2) が検出されたので、この 2 つの成分を指標成分とし単離、構造決定を行った。

(ii)密蒙花黄色素指標成分の同定

2 成分を密蒙花黄色素より単離し、各種分析 (IR、MS、NMR) を行い Compound 1 は acteoside (3,4-dihydroxy- β -phenethyl- O - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-4- O -caffeoyl- β -D-glucopyranoside); $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$ (molecular weight 624) と同定した。また Compound 2 は poliumoside (3,4-dihydroxy- β -phenethyl- O - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-4- O -caffeoyl- O - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside); $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{O}_{19}$ (molecular weight 770) と同定した (Fig. 3)。

(iii)モデル食品からの添加回収実験

密蒙花、クチナシ、サフラン黄色素にて着色したモデル食品 (中華麺、クッキー) からの PDA 検出器付

HPLCによる色素と指標成分の添加回収率を Table 1 に示した。クロセチン誘導体は密蒙花、クチナシ、サフラン黄色素にて着色した食品すべてより検出されたが、acteoside、poliumoside は密蒙花黄色素にて着色された食品のみから検出された。クロセチン誘導体、acteoside、poliumoside の添加回収率は低く、ばらつきが見られるものの、acteoside、poliumoside を密蒙花の指標とし、PDA 検出器付 LC/MS にて分析を行うことによって、密蒙花黄色素で着色された食品とクチナシ、サフラン黄色素にて着色された食品を判別することができた。また acteoside、poliumoside の定性分析として、LC/MS による分析を行ったところ、密蒙花色素で着色した食品からのみ acteoside、poliumoside の分子イオンピークに相当する m/z 623、769 のピークが検出された。

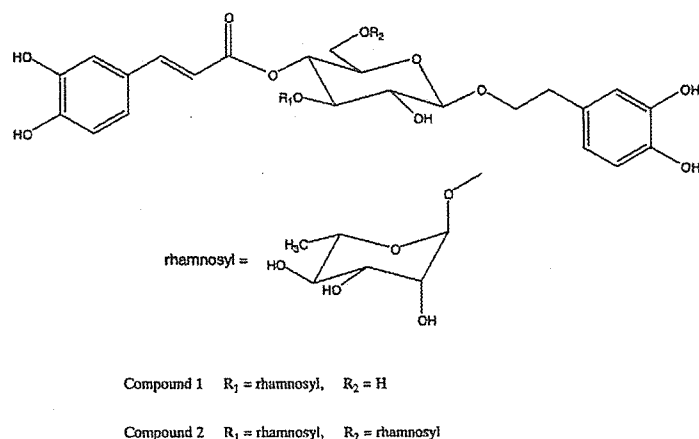


Fig. 3 The structures of Compound 1 (acteoside) and Compound 2 (poliumoside).

Table 1 Recovery of pigments and marker compounds from model foods

Model food	Colorant	Recovery (%)					
		C-1	C-2	C-3	C-4	Acteoside	Poliumoside
Chinese Noodle	Buddleja yellow	43.0	10.0	35.0	77.5	45.5	42.5
	Gardenia yellow	32.3	36.1	31.3	66.4	N.D.	N.D.
	Crocus yellow	17.6	9.0	28.0	87.4	N.D.	N.D.
Cookie	Buddleja yellow	35.2	25.6	37.0	40.3	60.0	71.3
	Gardenia yellow	26.6	23.7	36.3	35.5	N.D.	N.D.
	Crocus yellow	60.7	26.6	69.3	95.2	N.D.	N.D.

Values are expressed as mean of three experiments. N.D.: not detectable

4. 考 察

①西洋ワサビは自然界においても光誘導不定芽形成によって栄養繁殖しているが、その分子機構についてはこれまでほとんど解明されてこなかった。シロイヌナズナにおいては、茎伸長のような光形態形成反応において、PIF3 タンパク質や PKS1 タンパク質がフィトクロムタンパク質に結合することが明らかにされており、特に PIF3 タンパク質は核タンパク質であり、DNA 結合能も持つことが確認されている。今回単離された西洋ワサビの ArPIF3 因子および ArPKS1 因子も酵母の two-hybrid 法によってフィトクロムに結合することが確認されたことから、西洋ワサビにおける光誘導不定芽形成においても光情報伝達に関与することが示唆された。このような事実とこれまでの研究結果を考え合わせると、西洋ワサビにおける光誘導不定芽形成においては、数種フィトクロムおよびクリプトクロムが光受容体として機能し、そこで受容された光情報は ArPKS1 因子等を介して核内に伝えられ、ArPIF3 因子を介して光誘導型遺伝子の発現が起こり、その結果、サイトカイニンが合成され、このサイトカイニンによって不定芽形成が引き起こされるものと考えられる。

ニンジンにおいては、これまでの結果から、C-ABI3 因子が胚特異的乾燥耐性獲得の主たる制御因子であることを明らかにしてきたが、本年度の研究により、C-ABI3 因子存在下で ABA 依存的に発現誘導される *DcECP* 遺伝子プロモーターのシス配列が明らかとなり、この配列は ABA 応答性配列であり、このシス配列に結合する核タンパク質が胚特異的に存在することも明らかとなった。このような結果とこれまでの結果を考え合わせると、ニンジンにおいては、胚特異的な転写制御因子である C-ABI3 因子を介して ABA の情報

が伝達され、DcECP タンパク質群が発現することで乾燥耐性が獲得されるものと考えられる。

一方、*C-ABI3* 遺伝子を過剰発現させて乾燥耐性を付与したニンジン形質転換培養細胞では、非形質転換培養細胞に比べてカロテン含量の変化は見られなかった。このことは、*C-ABI3* 遺伝子の機能から予想されたことではあるが、実際にカロテン含量に影響がないことが確認されたことから、*C-ABI3* 遺伝子を用いることで、食品としても利用できる乾燥耐性植物を遺伝子組換え技術を用いて育成する可能性が開けた。

②アグロバクテリウム法による植物細胞の形質転換では、導入遺伝子がゲノム上のどの領域に挿入されるかは完全に不確定で、これを予測することはほぼ不可能である。そのため転写が活発に行われている active site、あるいはクロマチン凝縮や DNA のメチル化等の要因でジーン・サイレンシングが起こっている cryptic site のどちらかに遺伝子を意図的に挿入することはできない。遺伝子が染色体上の active site もしくは cryptic site のどちらに挿入されるかは全く偶然によるものである。

昨年度までの研究によって、IS1 および IS2 を導入した植物の遺伝子導入ベクターを作成し、これを用いることによって、タバコおよびニンジン植物体という双子葉植物への遺伝子導入効率が高まることを見いだした。本年度行ったイネ培養細胞への遺伝子導入においても、イネ・カルスにおける遺伝子導入効率の上昇がみられた。この結果は、抗生物質耐性遺伝子である npt II を発現しているカルス数の増加が生じたことを示している。このことから、導入した遺伝子が cryptic site に挿入された場合において、双子葉植物のみならず、単子葉植物においても、これらの因子によってジーン・サイレンシングが抑制されていることが示唆された。

③シトウ 4 倍体における低温での花粉稔性向上は品種により異なることが明らかとなった。また、シトウ 2 倍体を含む 5 品種の夏期、冬期の花粉発芽率を比較したところ、シトウでは夏期の発芽率が低いことが明らかになった。このような不安定性が夏期、シトウの単為結果を誘導すると推測される。日本の通常のベル型品種の発芽率は夏期に低下しないので、安定した果実生産のためには、これらとの交配により花粉稔性の安定したシトウを作出することが望ましい。

果実の形態に関しては、昨年度のシトウ 4 倍体と本年度のちぐさ 4 倍体との傾向から、直径は 2 倍体同様であるが、果実長が減少するとまとめられる。ちぐさ 4 倍体の開花後から完熟期までの果実の直径と長さを調べた結果より、2 から 3 週にかけて 4 倍体の長さの増加が抑制されていることが明らかとなった。種子数も割合は異なるが減少するとまとめられる。

果実の倍数性を見ると、2 倍体では 7 つのピークが検出されたが、4 倍体においては 6 本のみで、256C に相当するピークが見られなかった。検出感度、サンプル数の問題もあるので、さらに分析をする予定である。

④化合物 3 と 4 の存在比は 1 と 2 のそれと同じく約 5 : 1 である。したがって、立体異性体である 1 と 2 の間に、配糖化を行う CGTase との親和性の差は無いと考えられる。

Fig. 2 より、分析した試料にはより長い糖鎖を持つ構成成分も含まれていると考えられるが、化合物 1 - 6 の官能試験の結果から、これらが強い甘味を持つとは考えにくい。品質の良い EMLE を製造するためには、配糖化反応を制御する、反応後に除く、などの方法により不必要に長い糖鎖を持つ成分を少なくする必要があるだろう。

⑤密蒙花黄色素を分析した結果、色素性分はクチナシ、サフラン黄色素にも含まれる成分であったが、密蒙花に特徴的な成分として acteoside、poliumoside を含有することがわかった。密蒙花、クチナシ、サフラン黄色素にて着色したモデル食品を作成し、その抽出液を PDA 検出器付 LC/MS で分析したところ、密蒙花黄色素を添加したものからのみこれらの成分が検出された。acteoside、poliumoside のような phenylpropanoid glycoside が通常の食品素材から見出されたという報告はないため、同成分を指標とする密蒙花黄色素の分析法を開発できた。

5. 結論

①西洋ワサビにおいては、光誘導不定芽形成に関与する光受容体や光情報伝達を司る因子が明らかとなり、その概略が明らかとなった。また、このような因子の遺伝子操作によって不定芽形成による繁殖効率を高めることが可能となった。ニンジンにおいては、胚特異的な乾燥耐性獲得を制御する分子機構の一端が明らかとなり、その転写制御因子を過剰発現させることで ABA 依存的に乾燥耐性を付与することも明らかとなった。さらに、そのような遺伝子組換え植物においては食品添加物であるカロテンの含量には影響がないことも明らかとなり、乾燥耐性植物育成への利用の可能性が示された。

②さらにタバコ培養細胞を用いた実験においてはこれらの因子を導入することによりカルスの再生効率が

上昇することが示され、cryptic site の影響が打ち消されていることが示されたのみならず、遺伝子導入されたタバコ・カルスにおいて、明らかに IS12 を含む形質転換タバコ・カルスにおいて高い GUS 活性を示すカルスが得られたことが見いだされた。この IS12 によって GUS 遺伝子の発現量が上昇するという結果が得られた。すなわちこれらの因子は導入された遺伝子の不活性化を抑制するのみならず、その近傍の遺伝子の転写を促進する機能を有する事が示唆された。

ここで得られた IS1 および IS2 は、植物における遺伝子導入において、ジーン・サイレンシング等による遺伝子発現活性のバラツキ、不安定性を解消し、さらにおそらく染色体の構造変化を引き起こすことにより、これらが挿入された近傍の遺伝子の転写活性を上昇させる因子である。遺伝子組換え植物体の作出において、これらの因子を用いることにより、導入遺伝子の安定かつ高い発現が得られるようになり、導入した後にスクリーニングおよび育種すべき組換え植物体の数を激減させることが可能となり、また組み換え植物体の製品・品種の安定性を確保することが期待される。

③トウガラシ属において染色体倍加による倍数性を利用した改良を試みているが、シシトウ 4 倍体では低温 (15°C) における花粉発芽率の向上はみられなかった。シシトウ 2 倍体では夏期花粉発芽率が低下することが明らかとなった。ちぐさ 4 倍体のコルヒチン処理当代の果実の形態、種子数を調査したところ、シシトウ 4 倍体とほぼ同様の傾向が見られた。よって一般にトウガラシ属の 4 倍体は、果実の直径は変わらないが、長さが減少し、種子数も減少することが推測された。

④酵素処理カンゾウの構成成分の分析を行ったところ、製造原料であるカンゾウ抽出物の主成分である 1 とマイナー成分である 2 がグルコシル化を受けた化合物の存在が明らかになった。今回分析した試料は 1 つであるが、構成成分の構造や存在比は予想されたものとほとんど同じであり、酵素反応により予期しない成分が多く生成する可能性は低いと言える。

⑤密蒙花黄色素の色素成分 C-1 ~ C-4 は *trans*-crocetin-digentiobioside ester (crocin)、*trans*-crocetin-monogentiobioside-monoglucoside ester、*trans*-crocetin-monogentiobioside ester、*cis*-crocetin-monogentiobioside ester であった。また、密蒙花黄色素は acteoside、poliumoside という phenylpropanoid glycoside を含有することがわかった。この acteoside、poliumoside を指標成分とする PDA 検出器付 LC/MS 分析により、密蒙花黄色素を判別する方法を確立できた。

6. 研究発表

Liu, H.-M., Akiyama, T., Sugimoto, N. & Maitani, T. Isolation and identification of main constituents in an enzymatically hydrolyzed licorice extract sweetener. Food Addit. Contam. in press (2001).

Akiyama, T., Yamada, M., Yamada, T. & Maitani, T. Naringin glycosides α -glucosylated on ring B found in the natural food additive, enzymatically modified naringin. Biosci. Biotechnol. Biochem. **64**, 2246-2249 (2000).

Akiyama, T., Washino, T., Yamada, T., Koda, T. & Maitani, T. Constituents of enzymatically modified isoquercitrin and enzymatically modified rutin (extract). J. Food Hyg. Soc. Japan **41**, 54-60 (2000).

Akiyama, T., Yamada, T. & Maitani, T. Analyses of enzymatically glucosylated flavonoids by capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A **895**, 279-283 (2000).

Liu, H.-M., Sugimoto, N., Akiyama, T. & Maitani, T. Constituents and their sweetness of food additive enzymatically modified licorice extract. J. Agric. Food Chem. **48**, 6044-6047 (2000).

Ko, S., Thitamadee, S., Yang, H., Eun, C., Sage-Ono, K., Higashi, K., Satoh, S. & Kamada, H. Comparison and characterization of *cis*-regulatory regions in some embryo-specific and ABA-responsive carrot genes, *DcECPs*. Plant Biotechnol. **18**, 45-54 (2001).

Ko, S., Eun, C., Satoh, S. & Kamada, H. Analysis of *cis*-regulatory elements in carrot embryo-specific and ABA-responsive gene, *DcECP31*. Plant Biotechnol. **18**, 55-60 (2001).

Shiota, H. & Kamada, H. Acquisition of desiccation tolerance by cultured carrot cells upon ectopic expression of *C-ABI3*, a carrot homolog of *ABI3*. J. Plant Physiol. **156**, 510-515 (2000).

Saitou, T., Hashizume, A. & Kamada, H. Genes for phytochrome A in horeseradish : isolation of cDNAs and analysis of expression during light-induced formation of adventitious shoots from hairy roots. Plant Cell Rep. **19**, 1212-1218 (2000).

Mishiba, K., Ishikawa, K., Tsujii, O. & Masahiro, M. Efficient transformation of lavender (*Lavandula latifolia* Medicus) mediated by *Agrobacterium*. *J. Hort. Sci. Biotech.* 75, 287-292 (2000).

石川恵子、久保木均、佐藤恭子、米谷民雄、布村伊：4倍体シトウ果実の形態とカプサイシノイド含量。日本食品化学学会誌 7, 74-77 (2000)。

Ishikawa, K., Sato, K., Ogiwara S. & Nunomura, O. The segregation of PMMoV resistance in the backcross generation of *Capsicum annuum* and *C. chinense*. *Capsicum and Eggplant Newsletter* 19, 97-100 (2000).

Ogawa, Y., Ishikawa, K. & Mii, M. Highly tumorigenic *Agrobacterium tumefaciens* strain from crown gall tumors of chrysanthemum. *Arch. Microbiol.* 173, 311-315 (2000).

Aoki, H., Kuze, N., Ichi, T. & Koda, T., Analytical method for Buddleja colorants in foods. *J. Food Hyg. Soc. Japan* in press.

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社