

# 東海大学紀要 農学部

## 第 42 卷

2 0 2 3

---

高速液体クロマトグラフィーを用いたアセトアミノフェン

**O**-硫酸体とチロシン **O**-硫酸体の UV 検出による測定法

.....森田千紘・元山優作・谷口玲央真・上田裕人・木下英樹  
小野政輝・黒木勝久・榊原陽一・水光正仁・安田伸..... 1

バクテリオシン産生乳酸菌で作製したヨーグルト投与による

豚糞便中の多剤耐性菌殺菌効果の検証と豚肉の食味変化

.....福地雄大・原口梨花・山中猛・中島勇貴・日比友之・大貫琴音  
神鷹孝至・森川充実・金子博・中野佑志・石井直行・伊藤正規  
浦部一浩・安田伸・石川潤一・石田光晴・木下英樹..... 9

ブドウ‘巨峰’と‘シャインマスカット’における

偽受精胚珠培養および葯培養法を用いた半数体誘導の試み

.....安田喜一・中村勇揮・廣田真也・松永 涼  
鈴木健人・金子 博・富永晃好・八幡昌紀.....21



# 高速液体クロマトグラフィーを用いたアセトアミノフェン O-硫酸体とチロシン O-硫酸体の UV 検出による測定法

森田千紘<sup>1</sup>・元山優作<sup>2</sup>・谷口玲央真<sup>2</sup>・上田裕人<sup>3</sup>・木下英樹<sup>1,2</sup>  
小野政輝<sup>1,2</sup>・黒木勝久<sup>4</sup>・榊原陽一<sup>4</sup>・水光正仁<sup>5</sup>・安田伸<sup>1,2</sup>

Determination of Acetaminophen *O*-sulfate and Tyrosine *O*-sulfate by High-performance Liquid Chromatography with UV Detection

Chihiro MORITA, Yusaku MOTOYAMA, Reoma TANIGUCHI, Yuto UEDA, Hideki KINOSHITA,  
Masateru ONO, Katsuhisa KUROGI, Yoichi SAKAKIBARA, Masahito SUIKO and Shin YASUDA

(Received 30 November 2022 ; accepted 28 December 2022)

## Abstract

We have recently established a method for chemical synthesis of acetaminophen *O*-sulfate (APAPS), which was a modified procedure based on that used for the tyrosine *O*-sulfate (TyrS) synthesis. Current study was designed to set up a simple method to quantitatively determine APAPS and TyrS using high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection. In addition to being the target compounds for the chemical synthesis, these two sulfated chemicals were selected as the metabolites capable of generating from their parent molecules upon Phase-II sulfate conjugation in the body. Under an isocratic separation with a mobile phase (methanol : water, 40 : 60 (v/v)) and ODS column, APAPS and TyrS were detectable at 241 nm with their retention time of 1.70 min and 1.65 min, respectively. Calibration curves using the data from peak area and height demonstrated that the detection and quantification limits after a 20- $\mu$ L injection for APAPS were 2.29-3.55 nM and 6.93-10.8 nM, respectively, while those for TyrS were 0.199-0.659  $\mu$ M and 0.602-2.00  $\mu$ M, respectively. Intra- and inter-day assay precision confirmed that the variances defined as the relative standard deviation in their peak area and height for APAPS were 0.89-4.53%, while those for TyrS were 0.77-7.15%. Collectively, this analytical setting will be a useful tool for estimating the yields of APAPS and TyrS produced during their chemical synthesis, and possibly for further sulfated metabolite research as well.

## 緒言

硫酸化は、細胞質に存在する可溶性の硫酸転移酵素により触媒され、生体内ではステロイドホルモンや神経伝達物質であるカテコールアミン類の恒常性維持だけでなく、生体外異物や薬物の不活性化ならびに排泄を担う主要な薬物代謝反応経路の1つとして知られる(1-4)。しかしながら、化合物の硫酸化される位置によっては弱いながらも活性が維持される場合(5-7)や、ヒドロキシ

アリルアミンなどのある種の化合物の硫酸化が、結果的に発ガン性物質を生じる代謝活性化を引き起こす事例もある(8)。そのため、硫酸化を経て各々の化合物がどの程度不活性化されるのかを精査する代謝物の生理機能に関する研究は不明な部分も多く残っている。

アセトアミノフェン (*N*-acetyl-*p*-aminophenol ; APAP) は世界で広く用いられる解熱鎮痛薬の1つであり(9, 10)、主に肝臓でグルクロン酸体や硫酸体に代謝され、尿中へと排出される。近年の研究では、吸収された

<sup>1</sup> 東海大学大学院農学研究科

<sup>2</sup> 東海大学農学部バイオサイエンス学科(現食生命科学科)

<sup>3</sup> 尚綱大学生生活科学部

<sup>4</sup> 宮崎大学農学部応用生物科学科

<sup>5</sup> 宮崎大学キャリアマネジメント機構

連絡先：安田伸 e-mail : shin.yasuda@agri.u-tokai.ac.jp

APAP の20-46% が APAP *O*-硫酸体 (APAPS) になることが報告されている (10).

チロシン (Tyr) は、必須アミノ酸の一種フェニルアラニンが肝臓でヒドロキシ化されて生じた後、*L*-Dopa や dopamine などの神経伝達物質に変換されるほか (11)、タンパク質を構成する主要なアミノ酸としても知られている。タンパク質結合型の Tyr が翻訳後修飾の過程で硫酸化される一方で、遊離体の Tyr もまた *L*-Dopa や dopamine と同じく硫酸転移酵素 SULT1A3 の基質となって硫酸化され、チロシン *O*-硫酸 (TyrS) に代謝変換されることが報告されている (12-14)。

現状では安価で十分量の硫酸化代謝物の入手と続く生物活性などの機能性研究が容易ではない場合も多く、硫酸化代謝物の潜在的な機能性については不明な部分もある (15)。我々はこれまでに既存の TyrS 合成法 (16) を参考に APAPS の有機合成法を確立し (17)、そこで得られた APAPS とその類似化合物を用いて抗酸化活性の差異について検証を行ってきた (18)。しかしながら、APAPS 合成時に薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography ; TLC) により合成物の有無を確認しているものの (17)、定量性には優れておらず、さらに安定して高収量の APAPS を得るには未だ課題が残っている。そのため、合成の早い段階で各工程における合成物の生成量を少量のサンプルによりモニタリングすることができれば、収量および収率向上のための合成条件の改良が容易となる。

そこで本研究では、高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography ; HPLC) を用いた APAPS と TyrS の UV 検出による測定を定量的に行うため、汎用的な ODS カラムと水-メタノールを移動相とするアイソクラティック溶離法に基づくシンプルな手法の設計を目的とした。これら2つの化学物質は、体内で第 II 相薬物代謝における硫酸抱合時に親分子から生じる硫酸化代謝物であり、これまでも有機合成を行っていることから選択した。

## 材料および方法

### 試薬類

TyrS の標品 (H-Tyr (SO<sub>3</sub>H) -OH, sodium salt · 0.1 H<sub>2</sub>O (≧98%), K00228) を渡辺化学工業株式会社 (広島) より購入した。APAPS の標品 (APAPS potassium salt, 純度 ; 97.0 ± 1.6%) は、TyrS 合成法 (16) に基づいて我々が以前に確立した方法で APAP と硫酸を用いて有機合成したものを使用した (17)。HPLC グレードの

メタノールは富士フィルム和光純薬 (大阪) より入手した。TLC 用の silica gel 60 F<sub>254</sub> (1.05554.0001) プレートおよび silica gel 60 (1.05748.0001) プレートは Merck 社より購入した。*n*-ブチルアルコール、イソプロパノール、ギ酸、ニンヒドリン、アセトンはナカライテスク (京都) より購入した。本研究では、MilliQ グレードの水を使用した。

### 装置と HPLC の測定条件

HPLC による APAPS と TyrS の分離検出条件の設定は、移動相に溶解し調製した試料溶液を用いて、既報 (17, 19) を一部改良して行った。HPLC システムには、日本分光製の UV 検出器 (UV-2075 Plus) とフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器 (MD-4010) を備えた LC-2000 PLUS シリーズとクロマトグラフィーシステム (ChromNAV Ver.2) を使用した。即ち、YMC 社製 ODS カラム、(YMC-Pack ODS-A, 内径4.6 mm x 150 mm, 粒子径 3 μm, 細孔径12 nm) を用いた逆相クロマトグラフィーによるアイソクラティック溶離法により、移動相 (メタノール : 水, 40 : 60 (v/v)) とともに、温度30℃, 試料注入量20 μL, 流速0.7 mL/min, 検出波長241 nm (APAPS), 272 nm (TyrS) における UV 検出を行った。化合物の真正性を確認する際には、PDA 検出器により得られる UV 吸収スペクトルを参照した。

### 検量線の作成

APAPS を移動相に溶解し、1 mM のストック溶液を調製した。その後、最大濃度100 μM を等倍ずつ希釈することにより、異なる濃度 (0.0244, 0.0489, 0.0977, 0.195, 0.391, 0.781, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM) の APAPS 標準溶液を調製した。これらを HPLC に供し、ピーク面積、ピーク高、溶出時間を測定した。これを3回繰り返した。ピーク面積およびピーク高より  $y = ax + b$  の直線式を求め、直線性を決定係数 ( $r^2$ ) で表した。

TyrS を移動相に溶解し、1 mM のストック溶液を調製した。その後、最大濃度1,000 μM を等倍ずつ希釈することにより、異なる濃度 (1.95, 3.91, 7.81, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μM) の TyrS 標準溶液を調製した。上述の APAPS と同様に3回繰り返して測定を行った。

検出限界 (DL ; detection limit) 値と定量限界 (QL ; quantitation limit) 値は、次の等式 (DL = 3.3σ /slope, QL = 10σ /slope) により算出した。なお、σは標準物質を含まないブランク試料の測定値の標準偏差、slope は検出限界付近の4測定点における検量線の傾きを表す。

### 日内変動および日間変動率の測定

APAPS (0.195  $\mu\text{M}$  と 50  $\mu\text{M}$ ) と TyrS (7.81  $\mu\text{M}$  と 500  $\mu\text{M}$ ) の標準溶液をそれぞれ 2 つの異なる濃度で調製した。日内変動率の算出のために、これらを同日中に 10 回繰り返し測定した。日間変動率の算出のために、3 別日にそれぞれ 10 回、3 回、3 回の繰り返し測定を行い、各測定日におけるデータの平均値を使用した。

### 硫酸化代謝物の合成と HPLC による測定

既報 (17) に従い、APAP (1 g) を予め 20 分かけて少量ずつ濃硫酸 (10 mL) と混合し、さらに所定の時間反応後に 2 mL ずつ回収した。次に、回収液を碎氷とともに水酸化バリウムと炭酸ガス処理により中和した反応液約 20 mL を得た。これより 100  $\mu\text{L}$  を回収し、遠心濃縮および乾固後に等量の移動相に再溶解し、次に 1/1,000 となるように希釈後、HPLC に供することで、APAPS 生成物の定量を行った。この実験を 2 回繰り返した。

### 統計解析

実験結果は、一部を除き、3 または 10 回測定時の異なるデータより得た平均値  $\pm$  標準偏差で表した。変動率として表す際には、標準偏差を百分率で表した相対標準偏差 (%RSD; % of relative standard deviation) 値を使用した。

## 結果および考察

近年我々は、Jevons による既存の TyrS 合成法 (16) をもとに APAPS の有機合成法を確立した (17)。しかしながら、TLC による簡易的な APAPS の検出では定量性に課題があり (17)、収量と収率の向上を図る条件検討を行うためには、少量のサンプルで定量性に優れた HPLC を導入する必要がある。そこで本研究では、HPLC を用いた APAPS と TyrS の UV 検出による測定法の確立を行うため、検量線の作成、検出限界および定量限界値の決定、日内および日間変動率の確認を行うこととした。

### 分析法の確立

HPLC-UV 検出により 0.781  $\mu\text{M}$  の APAPS と 62.5  $\mu\text{M}$  の TyrS の標品を個々に 20  $\mu\text{L}$  ずつ注入してクロマトグラムを得た結果、それぞれ 1.70 min (Fig. 1 A) および 1.65 min (Fig. 1 B) の溶出時間とともにシングルピークが確認できた。同時に、PDA 検出器により得られた UV 吸収スペクトルを図内に示した。APAPS では 241 nm 付近

に極大吸収波長が認められた。TyrS では 263 nm 付近に極大吸収波長を認めたものの、本研究では既報に従って 272 nm で測定した (20, 21)。ピークの溶出時間から化合物がカラムに保持されにくく溶出時間が短い可能性が考えられるものの、本条件における APAP の溶出時間は約 3.34 min であるため (17)、少なくとも APAPS と APAP は異なる溶出時間にピークとして分離することが可能である。同様に、本条件では TyrS と Tyr についても異なる溶出時間に別のピークとして分離できることを確認している (data not shown)。本 HPLC 法による APAPS と TyrS の検出は、UV 吸収のある混合物が存在しない場合には有効である。しかしながら、目的化合物や試料によってはピークが他の成分と重なる可能性もあるため、その際には移動相の組成など分離溶出条件のさらなる検討を必要とする。

### 検量線の作成

異なる濃度の APAPS 標準溶液 (0.0244-100  $\mu\text{M}$ ) を 3 回繰り返し測定し、得られたピーク面積 (Fig. 2 A) およびピーク高 (Fig. 2 B) の平均値より検量線を作成した。その結果、検量線の  $r^2$  にはピーク面積を用いた際の 0.9998 とピーク高を用いた際の 0.9906 の両方で高い直線性が得られた (Table 1)。この時 APAPS の検出限界付近の低濃度 4 点 (0.0244-0.195  $\mu\text{M}$ ) における検量線においては、 $r^2$  がピーク面積およびピーク高でそれぞれ 0.9994 および 0.9997 と、低濃度領域でも高い直線性を認めた。

次に、異なる濃度の TyrS 標準溶液 (1.95-1,000  $\mu\text{M}$ ) を 3 回繰り返し測定し、得られたピーク面積 (Fig. 2 C) およびピーク高 (Fig. 2 D) の平均値より検量線を作成した。その結果、検量線の  $r^2$  にはピーク面積を用いた際の 0.9996 とピーク高を用いた際の 0.9929 が得られ、両方で高い直線性が認められた。TyrS の低濃度 4 点 (1.95-15.6  $\mu\text{M}$ ) においては、 $r^2$  がピーク面積およびピーク高でそれぞれ 0.9948 および 0.9993 と、ここでも高い直線性を認めた。

次に、ブランク試料の測定値と Table 1 に示す検出限界付近の 4 測定点における検量線の情報をもとに、検出限界と定量限界値を算出した。その結果、APAPS の DL と QL はピーク面積でそれぞれ 2.29 nM および 6.93 nM、ピーク高ではそれぞれ 3.55 nM および 10.8 nM であり、これ以上の濃度で検出または定量可能であった (Table 2)。一方、TyrS の DL と QL はピーク面積でそれぞれ 0.659  $\mu\text{M}$  および 2.00  $\mu\text{M}$ 、ピーク高ではそれぞれ 0.199  $\mu\text{M}$  および 0.602  $\mu\text{M}$  であった。我々は、これまで硫酸体の有機合成時に、合成物の有無を TLC 後の UV 検出

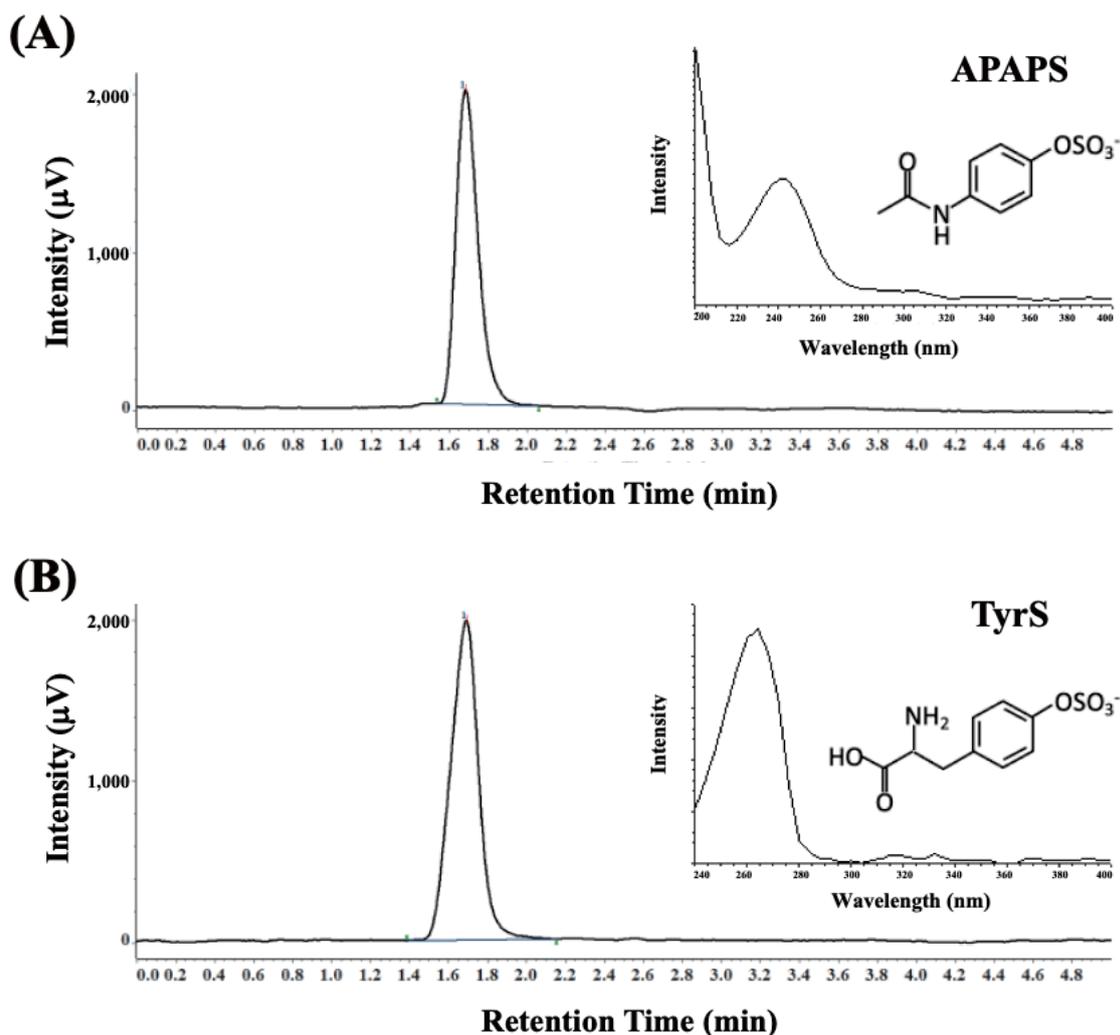


Fig. 1. HPLC Chromatograms of standards of APAPS (A) and TyrS (B). A twenty-microliter aliquot of 0.781  $\mu\text{M}$  (4.20 ng injection) APAPS or 62.5  $\mu\text{M}$  TyrS (356 ng injection) was applied to HPLC. Detection was performed for APAPS at 241 nm and for TyrS at 272 nm. The retention times for APAPS and TyrS were 1.70 min and 1.65 min, respectively.

Table 1. Calibration curves of APAPS and TyrS in HPLC analysis.

	Range ( $\mu\text{M}$ )	Raw Data	Equation	$r^2$
APAPS	0.0244-100	Peak Area	$y = 21,571x - 3,737$	0.9998
		Peak Height	$y = 1,760x + 2,992$	0.9906
TyrS	1.95-1,000	Peak Area	$y = 331.5x + 300.0$	0.9996
		Peak Height	$y = 20.07x + 538$	0.9929
Calibration curves with 4 points closer to their detection limit				
APAPS	0.0244-0.195	Peak Area	$y = 19,509x + 88$	0.9994
		Peak Height	$y = 2,460x + 6$	0.9997
TyrS	1.95-15.6	Peak Area	$y = 294.4x + 697.1$	0.9948
		Peak Height	$y = 34.59x + 29.65$	0.9993

$x$ , conc. ( $\mu\text{M}$ );  $y$ , peak area or height;  $r^2$ , determination coefficient.

またはニンヒドリン呈色により簡便に確認してきた (17). TLC 上のスポットやバンドの濃さを数値化することが可能な ImageJ 画像処理ソフトウェア ver 1.53t (NIH) を用いることにより, 一定量以上で化合物の検量線を半定量的に作成することが可能である. そこで, 異なる量の APAPS と TyrS を TLC 上にスポットし, 半定量的に検出可能な限界値を先行的に調べた結果, いずれも  $1\ \mu\text{L}$  スポット時に約  $70\text{--}80\ \text{ng}$  以上の量が必要であった (data not shown). 本研究における HPLC-UV 検出条

件の APAPS と TyrS の定量限界は  $0.04\text{--}0.06\ \text{ng}$  および  $3\text{--}11\ \text{ng}$  であったため, TLC よりも検出感度と定量性の面から優れていることが確認できた. これまでに, HPLC-UV 検出における APAPS の DL と QL にはそれぞれ  $10\ \mu\text{L}$  測定時に  $51\ \text{ng/mL}$  ( $0.51\ \text{ng}$ ) と  $103\ \text{ng/mL}$  ( $1.03\ \text{ng}$ ) (22) や,  $20\ \mu\text{L}$  測定時にそれぞれ  $0.2\ \mu\text{M}$  ( $1.08\ \text{ng}$ ) と  $6.4\ \mu\text{M}$  ( $34.4\ \text{ng}$ ) (23) が報告されている. 生体試料中に APAPS をスパイクした際と, 移動相中に調製し外挿法を基本とした際の検量線における APAPS の DL や

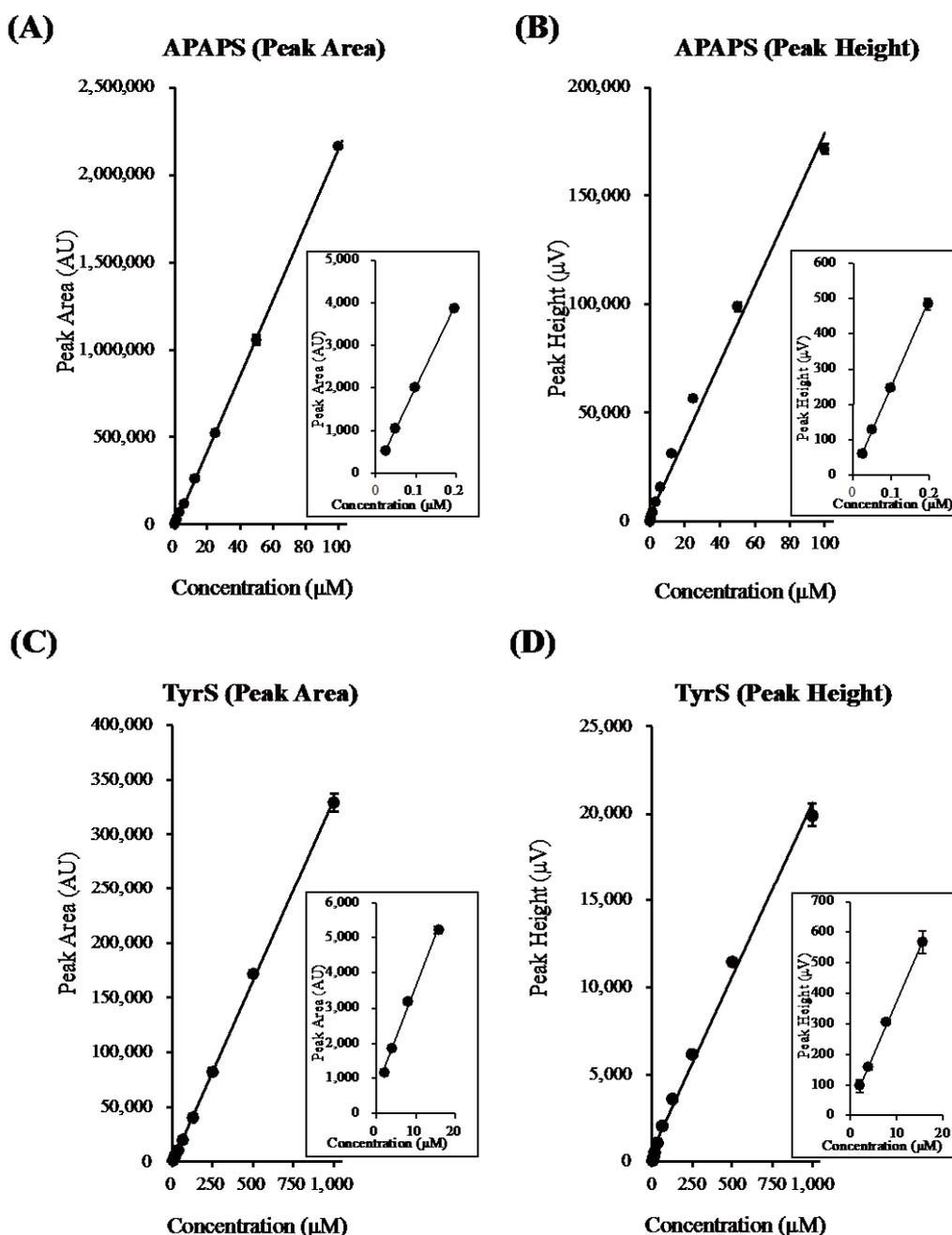


Fig. 2. Calibration curves for APAPS (A, B) and TyrS (C, D). Calibration curves were drawn by plotting the data from peak area (A, C) or peak height (B, D), respectively. Detection was performed for APAPS at  $241\ \text{nm}$  and for TyrS at  $272\ \text{nm}$ . The range of concentration injected for APAPS was  $0.0244\text{--}100\ \mu\text{M}$ , while that for TyrS was  $1.95\text{--}1,000\ \mu\text{M}$ .

QLを単純に比較することはできないものの、本 HPLC-UV 検出では十分な感度で定量が可能であることが認められた。TyrS においては、イオンペア逆相 HPLC と蛍光発色の組み合わせによる検出において、0.13-19  $\mu\text{g/mL}$  (0.46-66.7  $\mu\text{M}$ ) (20) または 20  $\mu\text{g/mL}$  (70.2  $\mu\text{M}$ ) までの濃度範囲で良好な直線性ととも、ピコモルオーダーの検出感度が報告されている (21)。本研究における HPLC-UV 法は蛍光法ほどの感度ではないものの、UV 吸収のある混合物が存在しない場合には、APAPS と TyrS の測定に十分に適用可能であると考えられる。

#### 日内変動と日間変動率

APAPS と TyrS の測定精度を調べるために、異なる 2 つの濃度において繰り返し測定を行い、得られた値の変動率と相対標準偏差値 (%RSD) で表した。その結果、本実験条件における 2 化合物の溶出時間は、10 回繰り返し測定時の日内変動率として 0.22-0.54%，3 別日にそれぞれ 10 回、3 回、3 回の繰り返し測定時の日間変動率として 0.57-4.25% が示された (Table 3)。APAPS のピーク面積とピーク高の日内変動率は、低濃度 0.195  $\mu\text{M}$  で 2.10-2.18%，高濃度 50  $\mu\text{M}$  で 0.89-2.09% であり、日間変

動率はそれぞれの濃度で 4.12-4.53% と 2.28-4.31% であった。同様に、TyrS の日内変動率は、低濃度 7.81  $\mu\text{M}$  で 2.72-3.24%，高濃度 500  $\mu\text{M}$  で 0.96-1.06% であり、日間変動率はそれぞれの濃度で 4.84-7.15% と 0.77-3.21% であった (Table 3)。これらの結果は、ピーク面積およびピーク高のいずれの測定データにおいても良好な精度と再現性を示すものであった。

#### APAPS の合成と HPLC による測定

これまでに我々が行ってきた APAPS と硫酸との反応条件では (17)、APAPS 合成時に安定して高収量を得るには未だ課題が残っている。そのため、先行して APAP 1 g と 10 mL の硫酸との反応溶液より経時的にサンプリングを行い、本 HPLC 手技を用いて中和後の試液中の APAPS 生成量についての情報を得ることとした。本条件では、原料の APAP と生成物である APAPS は異なる溶出時間にピークとして分離できている (17)。その結果、20 分反応よりもむしろ 30-60 分反応後に APAPS 生成量が高い傾向にあった。さらに、APAP 1 g 当たりの APAPS 生成量を推定値として算出した結果、最大 100 mg 付近まで合成できていることを確認できた (Fig. 3)。

Table 2. Detection and quantitation limits for APAPS and TyrS determined in HPLC analysis.

	Peak Area		Peak Height	
	DL ( $\mu\text{M}$ )	QL ( $\mu\text{M}$ )	DL ( $\mu\text{M}$ )	QL ( $\mu\text{M}$ )
APAPS	0.00229 (0.0123 ng)	0.00693 (0.0373 ng)	0.00355 (0.0193 ng)	0.0108 (0.0582 ng)
TyrS	0.659 (3.76 ng)	2.00 (11.4 ng)	0.199 (1.13 ng)	0.602 (3.43 ng)

Data shown in the parentheses indicate the calculated amount of test chemicals within a 20- $\mu\text{L}$  injection to HPLC. DL; detection limit, QL; quantitation limit.

Table 3. Intra- and inter-day assay precision for APAPS and TyrS determined in HPLC analysis.

	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Intra-day (n=10)			Inter-day (n=3)		
		Retention Time (min)	Peak Area (AU)	Peak Height ( $\mu\text{V}$ )	Retention Time (min)	Peak Area (AU)	Peak Height ( $\mu\text{V}$ )
APAPS	0.195	1.66 (0.54)	4,244 (2.10)	519 (2.18)	1.71 (4.25)	4,175 (4.12)	495 (4.53)
	50	1.76 (0.32)	1,094,462 (0.89)	101,827 (2.09)	1.78 (1.01)	1,100,968 (4.31)	101,460 (2.28)
TyrS	7.81	1.63 (0.38)	3,329 (2.72)	288 (3.24)	1.63 (0.613)	3,290 (4.84)	287 (7.15)
	500	1.93 (0.22)	169,822 (0.96)	10,960 (1.06)	1.93 (0.57)	171,270 (0.77)	11,275 (3.21)

Variation (%RSD, as shown in the parentheses) in the intra-day data is shown from the mean of 10 replicated injections. Variation in the inter-day data is shown from the mean of 3 separated days with 10 or 3 replicated injections. AU; arbitrary unit, %RSD; % of relative standard deviation.

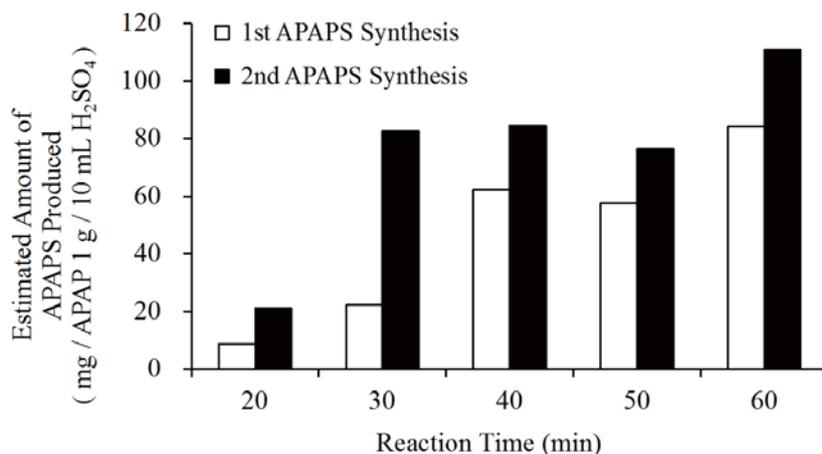


Fig. 3. Effect of reaction time on the production of APAPS. APAP (1 g) was reacted with 10 mL sulfuric acid for indicated periods including a 20-min premixture. Data shown represent estimated amounts of APAPS produced in two independent experiments.

これらの値は、同条件のもと我々が以前報告した際の、APAP 1 g と硫酸10 mL とを40分間反応後に分離精製し、最終的に得られた APAPS 91.1 mg (17) に匹敵するものであった。現状では、APAP が硫酸に完全には溶解しにくく、飽和に近い状態で反応を行っていると考えられる。今後はより低濃度の APAP を用いて同様の実験を行い、APAPS の生成量に加えて APAP の検出量とともに反応の効率性や進行状況を検証していくこともまた重要である。

生体内における硫酸化は、これまで異物代謝と不活性化ならびに排泄の面より注目されてきた。しかしながら、個々のフェノール性化合物の生理活性の増減に硫酸化がどの程度貢献しているのかを定量的に調べることができれば、将来的には硫酸化代謝後の化合物の効能を予測できる可能性がある。我々はこれまでに、ナフトール異性体とそれらの硫酸化代謝物を用いて抗酸化活性試験を行うことにより、薬物代謝の過程で硫酸化代謝されても、必ずしも常に活性が低下する訳ではないこと、硫酸化される位置に依存して活性が保持されることを明らかにした (24)。また、硫酸化代謝物のインドキシル硫酸が、マクロファージの細胞内酸化レベルを亢進し、さらには食欲能を低下させることを報告してきた (25, 26)。硫酸化代謝の生理的意義を明らかにするためにも、硫酸化により化合物がどの程度の活性を保持しうるのかを個別に調査することは (15)、薬物代謝後の化合物の生理活性を予測する上でも重要である (27)。従って、APAPS や TyrS のみならず様々な硫酸化代謝物の生理機能や有効性について明らかにしていくためにも、収量・収率の面で効率の良い硫酸体合成法の設計と導入、続く代謝物レベルでの機能性研究を力強く推進していくことが重要である。

## まとめ

以上より、HPLC-UV 検出による本手技が、APAPS と TyrS のクロマトグラムにおける検出ピークの面積と高さの両方において、定量性、検出感度、実験精度と再現性の面より、少量サンプルの測定に有用であることを明らかにした。従って、本手技が化学合成時に生じる APAPS や TyrS の収率の推定や、さらなる硫酸化代謝物の研究においても有益なツールとなることが期待される。

## 謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会 JSPS の科研費基盤研究 (C) (JP20K05881) および先進生命科学研究所のプロジェクト研究の助成を受けて実施されたものです。

## 要約

我々は最近、既存のチロシン *O*-硫酸体 (TyrS) 合成法を基本としたアセトアミノフェン *O*-硫酸体 (APAPS) の有機合成法を確立してきた。本研究では、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた APAPS と TyrS の UV 検出による測定を定量的に行うためのシンプルな手法の設計を目的とした。これら2つの化学物質は、体内で第 II 相薬物代謝における硫酸抱合時に親分子から生じる硫酸化代謝物であり、これまででも有機合成を行っていることから選択した。移動相 (メタノール:水, 40:60 (v/v)) と ODS カラムを使用したアイソクラティック溶離では、APAPS が 241 nm, TyrS が 272 nm で検出可能であり、保持時間はそれぞれ 1.70 分と 1.65 分であっ

た。ピーク面積とピーク高のデータを使用した検量線より、それぞれ20  $\mu\text{L}$  注入後の APAPS の検出限界と定量限界はそれぞれ 2.29-3.55 nM と 6.93-10.8 nM, TyrS の検出限界と定量限界はそれぞれ 0.199-0.659  $\mu\text{M}$  と 0.602-2.00  $\mu\text{M}$  であった。日内および日間変動率の分析により、ピーク面積とピーク高における APAPS の相対標準偏差が 0.89-4.53% で、TyrS が 0.77-7.15% であることが確認できた。以上より、本手技が化学合成時に生じる APAPS や TyrS の収率の推定や、さらなる硫酸化代謝物の研究においても有益なツールとなることが期待される。

## 引用文献

- Mulder, G.J. and Jakoby, W.B., 1990, Sulfation. in *Conjugation Reactions in Drug Metabolism* (Mulder, G.J. ed.), Taylor and Francis, London, pp.107-161.
- Falany, C.N. and Roth, J.A., 1993, Properties of human cytosolic sulfotransferases involved in drug metabolism. in *Human Drug Metabolism: From Molecular Biology to Man* (Jeffery, E.H. ed.), CRC Press, Boca Raton, pp.101-115.
- Weinshilboum, R. and Otterness, D., 1994, Sulfotransferase enzymes. in *Conjugation-Deconjugation Reactions in Drug Metabolism and Toxicity* (Kaufmann, F.C. ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp.45-78.
- Suiko, M., Kurogi, K., Hashiguchi, T., Sakakibara, Y. and Liu, M.-C., 2017, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **81**, 63-72.
- Dueñas, M., Surco-Laos, F., González-Manzano, S., Gonzalez-Paramas, A.M. and Santos-Buelga, C., 2011, *Eur. Food Res. Technol.* **232**, 103-111.
- Valentová, K., Káňová, K., Di Meo, F., Pelantová, H., Chambers, C.S., Rydlová, L., Petrásková, L., Křenková, A., Cvačka, J., Trouillas, P. and Křen, V., 2017, *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2231. doi: 10.3390/ijms18112231.
- Kanova, K., Petraskova, L., Pelantova, H., Rybkova, Z., Malachova, K., Cvačka, J., Kren, V. and Valentova, K., 2020, *J. Agric. Food Chem.* **68**, 11197-11206.
- DeBaun, J.R., Smith, J.Y.R., Miller, E.C. and Miller, J.A., 1970, *Science* **167**, 184-186.
- Jozwiak-Bebenista, M. and Nowak, J.Z., 2014, *Acta Pol. Pharm.* **71**, 11-23.
- Ohashi, N. and Kohno, T., 2020, *Front. Pharmacol.* **11**, 580289. doi.org/10.3389/fphar.2020.580289
- Fernstrom, J.D. and Fernstrom, M.H., 2007, *J. Nutr.* **137**, 1539S-1547S.
- Sakakibara, Y., Suiko, M. and Liu, M.-C., 1994, *Eur. J. Biochem.* **226**, 293-301.
- Suiko, M., Sakakibara, Y., Nakajima, H., Sakaida, H. and Liu, M.-C., 1996, *Biochem. J.* **314**, 151-158.
- Yasuda, S., Idell, S. and Liu, M.-C., 2007, *Biochem. J.* **401**, 497-503.
- Yi, L., Dratter, J., Wang, C., Tunge, J.A. and Desaire, H., 2006, *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 666-674.
- Jevons, F.R., 1963, *Biochem. J.* **89**, 621-624.
- 森田千紘, 谷口玲央真, 吉田実央, 徳永祐希, 木下英樹, 小野政輝, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, 安田伸., 2022, *東海大学紀要農学部* **41**, 39-46.
- Morita, C., Tokunaga, Y., Ueda, Y., Ono, M., Kinoshita, H., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. and Yasuda, S., 2022, *J. Toxicol. Sci.* **47**, 421-428.
- Weber, C.C., Kulkarni, S.A., Kunov-Kruse, A.J., Rogers, R.D. and Myerson, A.S., 2015, *Cryst. Growth Des.* **15**, 4946-4951.
- Suiko, M., Fernando, P.H., Arino, Y., Terada, M., Nakatsu, S. and Liu, M.-C., 1990, *Clin. Chim. Acta* **193**, 193-198.
- Suiko, M., Fernando, P.H., Nakamura, T., Ohshima, T., Liu, M.-C. and Nakatsu, S., 1992, *Bull. Fac. Agric. Miyazaki Univ.* **39**, 141-146.
- QI, J.F., Honda, Y. and Mineshita, S., 2002, *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **33**, 263-275.
- Jensen, L.S., Valentine, J., Milne, R.W. and Evans, A.M., 2004, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **34**, 585-593.
- Sugahara, S., Fukuhara, K., Tokunaga, Y., Tsutsumi, S., Ueda, Y., Ono, M., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. and Yasuda, S., 2018, *J. Toxicol. Sci.* **43**, 213-221.
- Tsutsumi, S., Tokunaga, Y., Shimizu, S., Kinoshita, H., Ono, M., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. and Yasuda, S., 2020, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **84**, 1023-1029.
- Tsutsumi, S., Tokunaga, Y., Shimizu, S., Kinoshita, H., Ono, M., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. and Yasuda, S., 2020, *J. Toxicol. Sci.* **45**, 569-579.
- Beekmann, K., Actis-Goretta, L., van Bladeren, P.J., Dionisi, F., Destailats, F. and Rietjens, I.M.C.M., 2012, *Food Funct.* **3**, 1008-1018.

# バクテリオシン産生乳酸菌で作製したヨーグルト投与による豚糞便中の多剤耐性菌殺菌効果の検証と豚肉の食味変化

福地雄大<sup>1</sup>・原口梨花<sup>2</sup>・山中猛<sup>3</sup>・中島勇貴<sup>4</sup>・日比友之<sup>1</sup>・大貫琴音<sup>1</sup>  
神鷹孝至<sup>3</sup>・森川充実<sup>3</sup>・金子博<sup>3</sup>・中野佑志<sup>3</sup>・石井直行<sup>3</sup>・伊藤正規<sup>3</sup>  
浦部一浩<sup>3</sup>・安田伸<sup>1,2,4</sup>・石川潤一<sup>5</sup>・石田光晴<sup>6</sup>・木下英樹<sup>1,2,4</sup>

Verification of multidrug sterilization effect in pig feces and change in taste  
of pork by administering yogurt made with bacteriocin-producing lactic acid bacteria

Yudai FUKUCHI, Rinka HARAGUCHI, Takeshi YAMANAKA, Yuki NAKASHIMA Tomoyuki HIBI, Kotone ONUKI, Takashi KOTAKA, Atsumi MORIKAWA, Hiroshi KANEKO Yushi NAKANO Naoyuki ISHII, Masanori ITO, Kazuhiro URABE Shin YASUDA, Junichi ISHIKAWA, Mitsuharu ISHIDA and Hideki KINOSHITA

(Received 30 November 2022; accepted 11 January 2023)

## Abstract

Multidrug-resistant bacteria are a global health and development threat. Therefore, in this study, we thought that multidrug-resistant bacteria could be killed by bacteriocin-producing lactic acid bacteria and yogurt made from *Lactococcus lactis* MBR916 was administered to Berkshire pigs in the late stage of fattening. There was no difference in the total number of bacteria and the number of colistin sulfate- and enramycin-resistant bacteria in porcine feces between the control group and the test group. However, the numbers of colistin sulfate-resistant *Escherichia coli* and coliform bacteria were significantly lower in feces on day 27 of administration in the test group than in the control group ( $p < 0.05$ ). There were no 3rd generation cephalosporins-resistant bacteria. Microbiota analysis showed a decrease in the proportion of *Bacillota* and an increase in the *Bacteroidota* in the test group. In the results of the analysis of the meat quality of the loin core, total lipid content was 2.43% in the control group and 2.54% in the test group, however, there was no significant difference. The free amino acid of the loin core tended to be lower in the test group. The taste analysis using a taste recognition sensor showed a low sourness in the test group compared with the control group. In the taste test, it was judged that the meat color was light, and the meat-like taste (richness), flavor, tenderness of the meat, and juiciness were low scores in the test group. However, the total deliciousness was rated high in the test group. These results suggest that the administration of yogurt made from *Lactococcus lactis* MBR916 may affect the drug-resistant bacteria and intestinal microbiota and may improve meat quality in pigs.

## 緒言

現在、家畜に対し疾病治療を目的とした動物用医薬品や、飼料中の栄養成分の有効利用を目的とした飼料添加物として抗生物質が与えられている。牛、豚、鶏などの家畜は日常的にこれらを投与されている。しかし、家畜

に抗生物質を使用すると薬剤耐性菌が生き残り、増殖することがあり、近年抗生物質に耐性を示す菌の出現が問題となってきている。耐性菌の中でも複数の抗生物質に耐性を示す「多剤耐性菌」は、人への感染とその拡大が危惧されている。代表的なものとして、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性腸球菌

<sup>1</sup> 東海大学農学研究科

<sup>2</sup> 東海大学農学部

<sup>3</sup> 東海大学農学教育実習センター

<sup>4</sup> 東海大学生命科学研究科

<sup>5</sup> 宮城県産業技術総合センター

<sup>6</sup> 宮城大学食産業学類

(VRE) といった薬剤耐性グラム陽性球菌, 次いで, 多剤耐性緑膿菌 (MDRP), 多剤耐性アシネトバクター (MDRA) といった薬剤耐性グラム陰性桿菌などがあげられる (1).

乳酸菌はグラム陽性, カタラーゼ陰性の球菌または桿菌であり, 発酵食品での味や食感を向上させるために重要な役割を担っている. プロバイオティック乳酸菌の補給は, 有益な細菌と有害な細菌との間の効果的な微生物バランスの維持, 豚における栄養消化率の向上, 成長および免疫調節作用を通して健康へと寄与することが知られている (2). 離乳子豚への乳酸菌の給餌も酸化防御機構を改善し, それによって酸化ストレスを改善したという研究報告 (3) のほか, さらに豚肉に対する乳酸菌の肉質改善効果も報告されている (4).

乳酸菌の抗菌効果は乳酸をはじめとする有機酸, 栄養素の競合および抗菌性物質の生成に寄与する (5). このような乳酸菌の様々な機能性の一つとして抗菌物質であるバクテリオシンの産生があげられる. 一般的にバクテリオシンは幅広い pH 範囲で活性があり, 熱安定性を持ち, プロテアーゼによって不活性化される特徴を持ち (6), 乳酸菌のバクテリオシンは抗生物質および化学的食防腐剤に対する代替品として注目されている. 乳酸菌のバクテリオシンは一般的に真菌類やグラム陰性菌には抗菌活性がなく, 主に生産菌と類縁なグラム陽性菌に抗菌活性を示す. もっとも代表的な乳酸菌のバクテリオシンであるナイシン A は, 米国の安全認証である GRAS (Generally Recognized As Safe) 物質として認められており, 世界50か国以上で広く食品保存料として利用されている. また, 日本においても2009年3月2日に食品添加物として指定されている.

*Lactococcus lactis* MBR916 (以下, MBR916株) は, ハックルベリーより単離されたバクテリオシン産生株である. 以前の研究により, 本菌が産生するバクテリオシンは, 抗菌スペクトルが広く, pH, プロテアーゼ (アクチナーゼ E), 熱安定性も非常に高いことを明らかにしている (7). また, 本菌および本菌が産生するバクテリオシンは, 食品由来の多剤耐性菌を殺菌する効果があることを報告した (7). しかしながら, 実際に家畜に投与した際の多剤耐性菌の抑制効果については不明である. そこで本研究では, 本バクテリオシン産生乳酸菌で作製したヨーグルトを豚に投与することにより豚糞便中の多剤耐性菌数を減少させることができるかを検証した. また, 多剤耐性菌対策は社会貢献の意味合いが強く, 代替となる家畜飼料を作製したとしても, 家畜の生育コストが上がるのみで生産者の利益となりえないことが考えら

れる. そこで付加価値の創出のため, 投与後の肉質改善効果についても検証した.

## 材料および方法

### 使用乳酸菌とヨーグルトの作製

MBR916株はオートクレーブ (121°C, 15 min) で殺菌した MRS broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) を用い, 24時間37°Cで培養した. さらに同培地, 同条件にて2度継代培養した. 次いで, 本培養液を2%ペプトン添加スキムミルク培地に2%接種で37°C, 24時間培養した. さらに同培地, 同条件にて2度継代培養したものをヨーグルト (乳酸菌数9.66 log CFU/g) として本試験に使用した.

### 豚へのヨーグルト投与試験

豚への乳酸菌投与試験は, 東海大学動物実験委員会での承認を得て, 動物実験に関する各種ガイドラインに従って実施した (承認番号171098「乳酸菌を用いた多剤耐性菌の抑制と機能性家畜飼料への応用」). 東海大学農学部農学教育実習センター牧場において2017年6月22日に生まれたパークシャー種4頭を用いて試験した. 7月20日までの28日間を授乳期間とし, 離乳後9月10日までの52日間, 子豚すこやかおよび豚はつらつ (くみあい配合飼料くまもとハイパー A-EX, ジェイエイ北九州くみあい飼料, 福岡) で飼育後, 10月19日まで硫酸コリスチン (2.5 g力価/トン), エンマライシン (3.0 g力価/トン), クエン酸モランテル (30.0 g力価/トン) (駆虫剤) を含む混合飼料 (くみあい配合飼料くまもと B-EX, ジェイエイ北九州くみあい飼料, 福岡) で39日間飼育した (2018年7月に硫酸コリスチンの使用は禁止されている). その後, 11月14日まで抗生物質添加なしの飼料 (くみあい配合飼料くまもと C-EX, ジェイエイ北九州くみあい飼料, 福岡) で26日間飼育後, 対照区2頭 (去勢オス2頭), 試験区2頭 (去勢オス1頭, メス1頭) に分け, 12月11日まで27日間, 対照区は混合飼料 (くみあい配合飼料くまもと C-EX) を2.7 kg/日, 乳酸菌投与区 (以下試験区) は混合飼料に加え, 上記の通り作製したヨーグルトを0.3 kg/日を1日2回に分けて与えた. 水は自由飲水とした. ナンバリグは対照区の去勢オス2頭を1番, 2番とし, 試験区では去勢オスを3番, メスを4番とした. 肥育後, 屠殺場にて屠殺し枝肉を得た.

### 豚糞便サンプルの回収

ヨーグルト投与前 (0日目), 投与16日目および27日

目の糞便サンプルを直接豚から採取し、50 ml 容ファルコンチューブに回収した。その後、各豚から回収したサンプルを1 g ずつ15 ml ファルコンチューブに分取し、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて冷凍保存した。

### 体重測定

各豚に対しヨーグルト投与を行い、0日目、7日目、16日目、21日目、27日目に体重測定を行った。飼料を豚に与える前に1頭ずつ体重測定を行い、期間増体重を算出した。また、期間増体重を用い飼料要求率を求めた。期間増体重(1 kg 当たりの飼料要求率)は、出荷生体重+期末生体重-期初生体重で、飼料要求率は、期間飼料消費量÷期間増体で求めた。

### 菌数測定用培地の作製

糞便中の総菌数の測定には GAM 寒天培地(日水製薬、東京)を用いた。GAM および1.5%寒天を三角フラスコに入れ、オートクレーブで滅菌( $115^{\circ}\text{C}$ , 15 min)し、GAM 寒天培地を作製した。

多剤耐性菌用培地には GAM 寒天培地にフィルター滅菌した硫酸コリスチン( $8\ \mu\text{g}/\text{ml}$ )(富士フィルム和光純薬、大阪)とエンラマイシン( $16\ \mu\text{g}/\text{ml}$ )(Abcam, Cambridge, England)を添加したものを用いた。

硫酸コリスチン耐性大腸菌および大腸菌群の菌数測定には、硫酸コリスチン含有 XM-G 寒天培地(日水製薬)を用いた。XM-G 寒天培地を三角フラスコに入れ、オートクレーブで滅菌( $115^{\circ}\text{C}$ , 15 min)し、フィルターを通した硫酸コリスチン( $8\ \mu\text{g}/\text{ml}$ )を添加し作製した。

基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ(Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase: ESBL)産生大腸菌および大腸菌群の測定には、第3世代セファロsporin系薬剤である Cefotaxime(バイオメディカルサイエンス、東京)( $6.25\ \mu\text{g}/\text{ml}$ )および Cefazidime(東京化成工業、東京)( $30\ \mu\text{g}/\text{ml}$ )を添加した XM-G 寒天培地(日水製薬)を用いた。

### 生菌数測定

冷凍保存しておいた豚の糞便サンプル1 g を9 ml の滅菌ペプトン水に懸濁し、 $10^{-1}$ サンプルとした。その後、9 ml の滅菌ペプトン水を用い、適宜段階希釈を行った。本希釈液を0.1 ml または1 ml 培地に添加し、 $37^{\circ}\text{C}$ で48時間嫌気(総菌数および多剤耐性菌数測定)または好気培養(大腸菌および大腸菌群)を行った。培養後、ProtoCOL 3(Symbiosis, Frederick, MD, USA)にて生菌数をカウントし、サンプル1 g 当たりの生菌数( $\log\ \text{CFU}/\text{g}$ )を算出した。

### 糞便の菌叢解析

凍結した糞便サンプルを Novogene Corporation(Beijing, China)に依頼し、次世代シーケンサーによる16S rDNA の V3-V4領域の配列解析により菌叢解析を行った。

### 肉質の測定および味認識装置による分析

飼養試験終了後にと殺した対照区と試験区の豚肉のロース芯を $-80^{\circ}\text{C}$ に冷凍保存した。肉質はロース芯(第4~5胸椎)を用い全脂質含量測定(解凍1日目)、脂肪酸分析(解凍1日目)、肉色測定(解凍1日目と5日目)、ドリップロス(解凍5日目)、クッキングロス(解凍1日目のサンプルを $80^{\circ}\text{C}$ で30分間加熱)、テクスチャー試験(解凍5日目)、遊離アミノ酸分析(解凍5日目)にて評価した。

また味認識装置による分析では、解凍5日目にロース芯10 g を精秤し、15%エタノール溶液を50 ml 加え、ホモジナイザーで2分間均質化した。これを遠心分離(3,000 rpm, 15 min)し、メスフラスコへ濾過した。残渣に75%エタノール溶液を30 ml 加え、また遠心分離(3,000 rpm, 15 min)して濾過し、15%エタノールで100 ml に定容し、試料溶液とした。本溶液を味認識装置(インテリジェントセンサーテクノロジー、神奈川)にて分析した。

### 豚肉の食味試験

対照区と試験区に差があるかどうか明らかにするため、食味試験を行った。嗜好型パネルとして宮城大学の学生6名をパネラーとした。解凍5日目のロース芯を厚さ3 mm にスライスし、 $3\ \text{cm} \times 3\ \text{cm}$ に成型し提供した。沸騰させ、 $80^{\circ}\text{C}$ にしたお湯で加熱(1 min)し、各豚肉を評価した。評価には、食べる前に判断する項目として肉の香り、肉色を評価した。食べてから判断する項目としては、やわらかさ(食べ始め)、やわらかさ(数回噛んだ後)、ジューシー感(多汁性)、肉の甘味、肉様の味(コク)、風味(香りを含む味の総評)の程度、風味(香りを含む味の総合)の好ましさ、脂っぽさ、総合的なおいしさの計11項目について評価した。試験結果は5点法により点数化し、その平均を求めた。

### 統計解析

統計解析は統計解析用ソフト IBMSPSS Statistics Ver.22(New Orchard Road Armonk, NY, USA)を用い t 検定および Tukey の HSD 検定による有意差検定を行った。各試験において n 数は3~6で、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

## 結果および考察

### 豚への投与実験

投与前にヨーグルト中にバクテリオシンが産生されているかを寒天拡散法により試験したところ、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002<sup>†</sup> に対する抗菌活性が確認された（データ未記載）。

ヨーグルトは混合飼料の上に添加する形で投与したが、嗜好性は非常に高く、通常飼料のみの給餌と比較して食べ終わる時間も短かった。これはヨーグルトが水分を多く含むことや、乳酸が嗜好性を高める一因となったのではないかと推察された（8,9）。また、投与期間中、下痢や体調不調などの症状は観察されずヨーグルトの安全性も問題ないと考えられた。

豚への投与を行った27日間での増体量は Fig.1 の通りの結果となった。対照区は1番で19.5 kg、2番で22.5 kg 増体した。試験区の増体量は3番で22kg、4番では22.5 kgであった。増体量の平均は対照区で21.0 kg、試験区では22.2 kg と試験区の方が若干多かったが、投与期間中の飼料要求率は3.47 および3.64 と試験区の方が高くなった。これは投与したヨーグルトの量（300 g/day）のためであると考えられる。しかしながら、日本飼養標準（4）の肥育期（70～115 kg）の飼料要求率は3.61であることや、またスキムミルクは単価それほど高くはないという点を踏まえ、経営面でそれほど問題となる値ではないと考えられた。

### 総菌数と多剤耐性菌数の測定

肥育期までの期間中に豚に対し与えていた抗生物質である硫酸コリスチンおよびエンラマイシンの両抗生物質を添加した培地を使用し、耐性菌の菌数を測定した。エンラマイシン耐性菌はガス産生菌が多く観察され、混釈法ではうまくいかなかったため塗抹法にて行った（Fig. 2A）。総菌数は、抗生物質を添加していない GAM 寒天培地で測定した。対照区の総菌数は Day0 において  $9.79 \pm 0.18 \log \text{CFU/g}$ 、Day14 にて  $10.38 \pm 0.36 \log \text{CFU/g}$ 、そして Day27 では  $9.78 \pm 0.05 \log \text{CFU/g}$  という結果が得られた。硫酸コリスチンおよびエンラマイシン耐性菌数は、Day0 において  $5.80 \pm 0.11 \log \text{CFU/g}$ 、Day14 にて  $6.08 \pm 0.75 \log \text{CFU/g}$ 、Day27 では  $6.22 \pm 0.68 \log \text{CFU/g}$  であった。試験区の総菌数では Day0 において  $9.74 \pm 0.15 \log \text{CFU/g}$ 、Day14 にて  $10.06 \pm 0.10 \log \text{CFU/g}$ 、そして Day27 では  $9.60 \pm 0.08 \log \text{CFU/g}$  と対照区と殆ど変わらなかった。耐性菌数は、Day0 において  $5.93 \pm 0.43 \log \text{CFU/g}$ 、Day14 にて  $7.98 \pm 1.34 \log \text{CFU/g}$ 、Day27 では  $6.21 \pm 0.70 \log \text{CFU/g}$  であり、Day14 にて少し高い傾向が見られたが、対照区と試験区の間には有意な差は見られなかった。そこで耐性菌の一部に対してグラム染色を行ったところ、耐性菌のほとんどはグラム陰性の桿菌であったことが分かった（データ未記載）。そのため、大腸菌および大腸菌群に着目し以下の実験を行った。

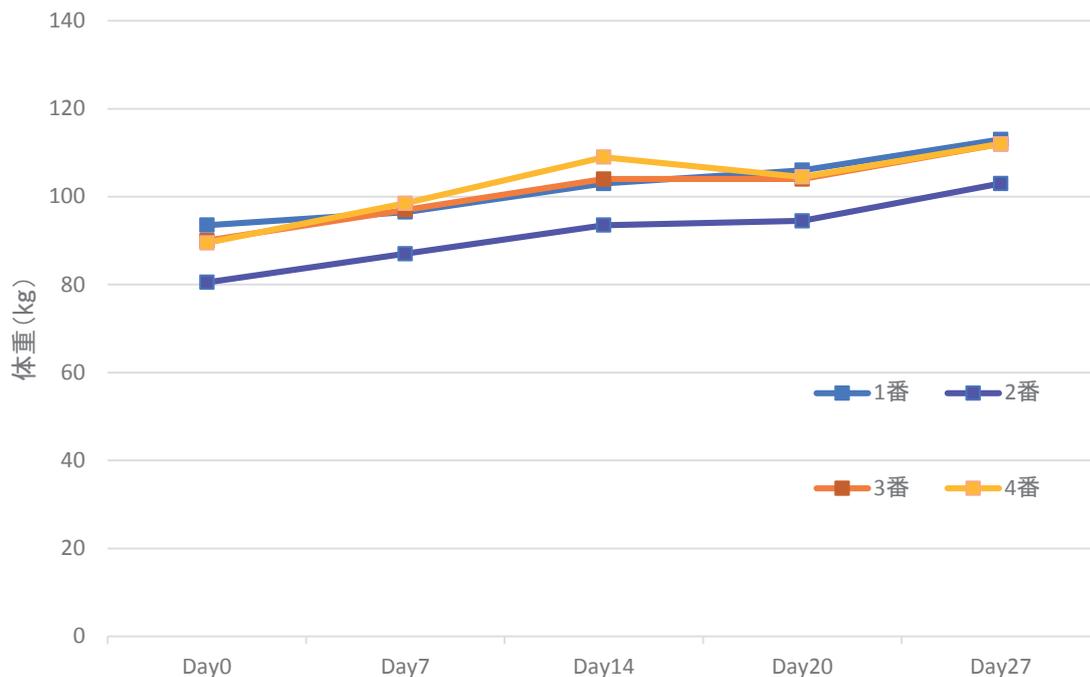
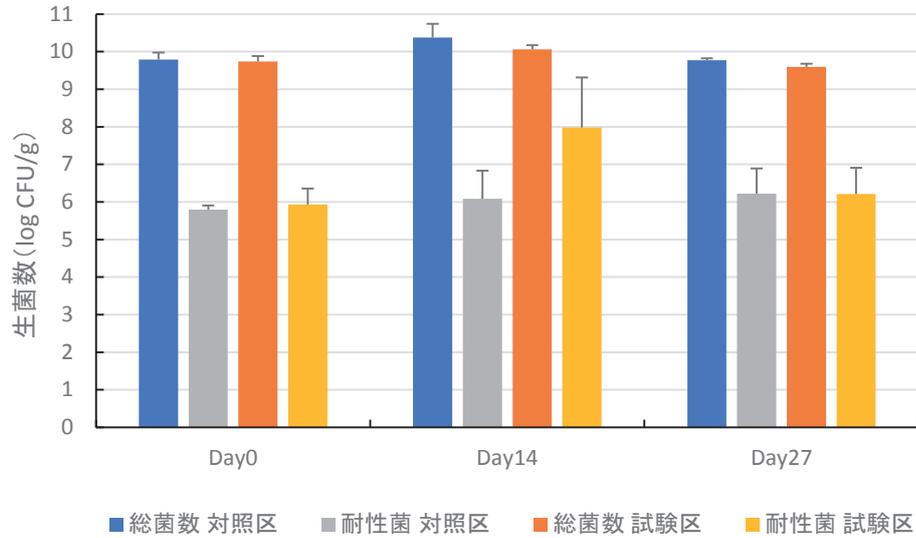


Fig. 1. サンプル投与後の各群における体重の推移。  
1番、2番が対照区、3番、4番が投与区の個体を示している。

(A)



(B)

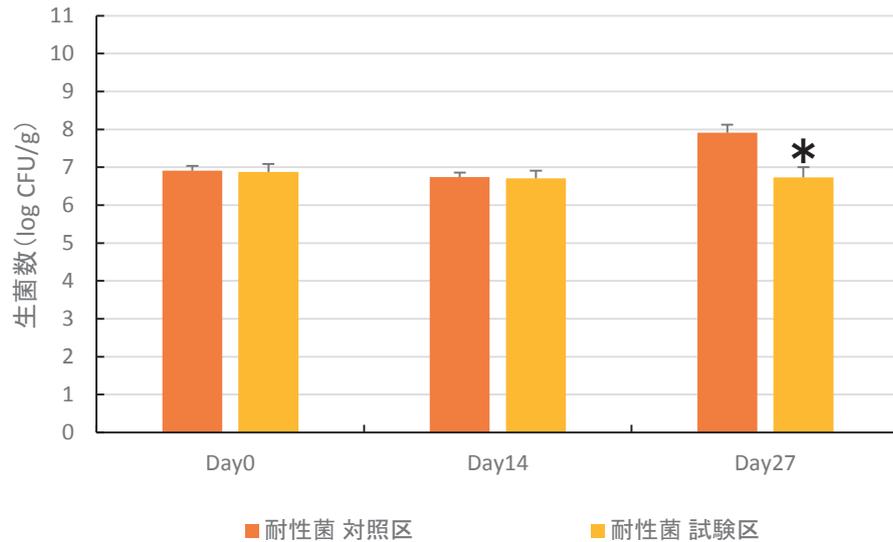


Fig. 2. 豚糞便中の生菌数測定結果. (A) 総菌数と多剤耐性菌数, (B) 硫酸コリスチン耐性大腸菌および大腸菌群の生菌数. \*: 対照区に対する有意差 ( $p < 0.05$ ).

### 硫酸コリスチン耐性大腸菌の測定

Fig. 2 Bにはこれまで家畜の飼料添加物として長年使用されてきた硫酸コリスチンに対して耐性を示す大腸菌の測定結果を示した. 対照区の耐性菌数は Day0 において  $6.91 \pm 0.13 \log \text{CFU/g}$ , Day14 では  $6.91 \pm 0.13 \log \text{CFU/g}$ , Day27 においては  $7.91 \pm 0.22 \log \text{CFU/g}$  であり, 試験では Day0 において  $6.87 \pm 0.13 \log \text{CFU/g}$ , Day14 では  $6.87 \pm 0.13 \log \text{CFU/g}$ , Day27 においては  $6.73 \pm 0.22 \log \text{CFU/g}$  という結果となり相当数の耐性菌が存在していることが明らかになった. また, Day27 においては対照区では耐性菌が増加していたが, 試験区では耐性菌の増加

は有意に抑えられているということがわかった ( $p < 0.05$ ). 福田らは, 健康な豚糞便中からプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1*) の保有状況を調査したところ, 80検体中37検体 (46.3%) で耐性遺伝子を保有する大腸菌が検出されたと報告している (10). 農林水産省は専門委員会を開き人へ感染した際のリスクを検討した結果, 硫酸コリスチンの飼料添加物として使用するのは適切でないと判断し, 2018年7月に飼料添加物としての指定を取消し, 現在使用を禁止している. 柿田らは, 2018年4月~2019年3月に沖縄県の豚および鶏におけるコリスチン耐性遺伝子の保有実態を調査しところ, コリ

スチン耐性遺伝子 (*mcr-1*, *mcr-3*, *mcr-5*) を保有する大腸菌および大腸菌群が健康豚の38.1%, 食鳥検査で全部もしくは一部廃棄となった鶏の40.8%から分離されたと報告しており (11), 使用禁止となった現在でも多くの大腸菌および大腸菌群が耐性遺伝子を保有したまま存在している可能性が推察される。本試験においてバクテリオシン含有ヨーグルトの投与でコリスチン耐性大腸菌および大腸菌群の抑制が見られた理由は不明であるが、ヨーグルト投与による腸内 pH の低下, 腸内細菌叢の変化, バクテリオシンなどが考えられる。しかしながら, バクテリオシンに関しては, 本菌の産生するバクテリオシンがグラム陰性菌に作用するかはまだ不明であるため, 今後実施していく必要がある。

### ESBL 産生菌測定

ESBL 産生菌は, 感染症治療のため広く使用されている 3 世代セファロsporin 系薬に耐性を示す細菌であり, 病院内における集団感染の原因菌となっている。近年, 抗生物質の不適切な使用等により ESBL 産生大腸菌および大腸菌群が増えており大きな社会問題となっている (12)。今回の実験では Cefotaxime および Ceftazidime に対する耐性菌数を計測したところ, 耐性菌は確認されなかった。

### 菌叢解析

各豚の Day0, Day14, Day27 におけるサンプル 1 g から得られた 16S rDNA の配列解析による菌叢解析結果を Fig. 3 に示した。対照区, 試験区とともに *Bacillota* 門の割合が半数以上閉めていることがわかった。次いで *Bacteroidota* 門の割合がどの区でも多かった。対照区, 試験区のどちらにおいても *Bacillota* 門と *Bacteroidota* 門が 9 割以上を占めており, 豚において *Bacillota* 門と *Bacteroidota* 門が多く存在しているという報告と一致している (13)。試験区と対照区を比較したところ, 試験区では *Bacillota* 門の割合が減少し, *Bacteroidota* 門の割合の増加が顕著であった (Fig. 3 AB)。ただ, 他の豚への乳酸菌や酵母の投与研究では, *Bacillota* 門の割合が増加し, *Bacteroidota* 門の割合の減少するという報告がある (14, 15)。これに関して, MBR916 株で作製したヨーグルトがバクテリオシンを含んでいるためなのか, 菌体の特性なのかは不明であるため, 今後抗菌試験などを実施していく必要がある。

*Bacilli* 網の *Streptococcus* 属では, Day0 では対照区, 試験区ともに大きな差はなかったが, Day14 で対照区での割合が増え, Day27 では対照区での割合がさらに増加

し, 試験区での割合は Day0 からわずかに増加したのみであった (Fig. 3 C)。バクテリオシンは類縁菌に対して抗菌作用を示すことから, 試験区の *Streptococcus* 属の菌は MBR916 株の産生するバクテリオシンによって殺菌された可能性もある。しかし, 実際に腸管内でバクテリオシンが効いているのは不明である。また, *Megasphaera* 属の割合は Day0 以降では大きく減少した。*Megasphaera elsdenii* は豚の腸内細菌であり (16), 乳酸を酢酸, プロピオン酸, 酪酸などの短鎖脂肪酸に変換する重要な細菌である (17)。短鎖脂肪酸は宿主の腸の健康に重要な役割を果たすことから, *Megasphaera* 属は豚の健康にとって重要な菌であると考えられる (18)。本試験では対照区, 試験区ともに存在割合が減少したため, サンプル投与の影響ではないと考えられ, また *Megasphaera* 属の割合の減少による豚の下痢の症状は確認されなかった。

### 肉質の測定

ロース芯の肉質分析では, 全脂質含量は対照区 2.43%, 試験区 2.54% となり試験区がやや高かった (データ未記載)。ロース芯の脂肪酸組成および筋肉間脂肪, 皮下脂肪内層, 皮下脂肪外層の脂肪酸組成は有意な差はなかった (データ未記載)。肉色は, 解凍 1 日目では a\* 値と b\* 値で試験区が, 解凍 5 日目では a\* 値が若干低かったものの有意な差は見られなかった (データ未記載)。ドリップロス, クッキングロスも区間での有意差はなかった (データ未記載)。テクスチャー試験 (せん断性) は, 試験区で若干低い値を示したが, こちらも有意差は見られなかった (データ未記載)。

Fig. 4 にはロース芯の遊離アミノ酸含量を示した。有意差は見られなかったものの遊離アミノ酸含量は全体的に試験区の方が低い傾向を示した (Fig. 4 A)。呈味性別で比較すると, 対照区と試験区で旨味系アミノ酸の小計は 0.77  $\mu\text{mol/g}$ , 0.72  $\mu\text{mol/g}$ , 甘味系アミノ酸は 0.87  $\mu\text{mol/g}$ , 0.83  $\mu\text{mol/g}$ , 苦味系アミノ酸は 1.93  $\mu\text{mol/g}$ , 1.62  $\mu\text{mol/g}$  と試験区の方がやや低い傾向を示した (Fig. 4 B)。

### 味認識装置による分析

各区でのロース芯の味認識装置による分析を行ったところ, 苦味雑味, 渋味刺激, 旨味, 塩味, 苦味, 渋味, 旨味コクの項目で対照区と試験区は, 有意差は見られなかった (Fig. 5 A)。しかしながら, 酸味については, 対照区が 3.85, 試験区が 2.98 となり, 試験区では酸味が低い傾向が見られた。

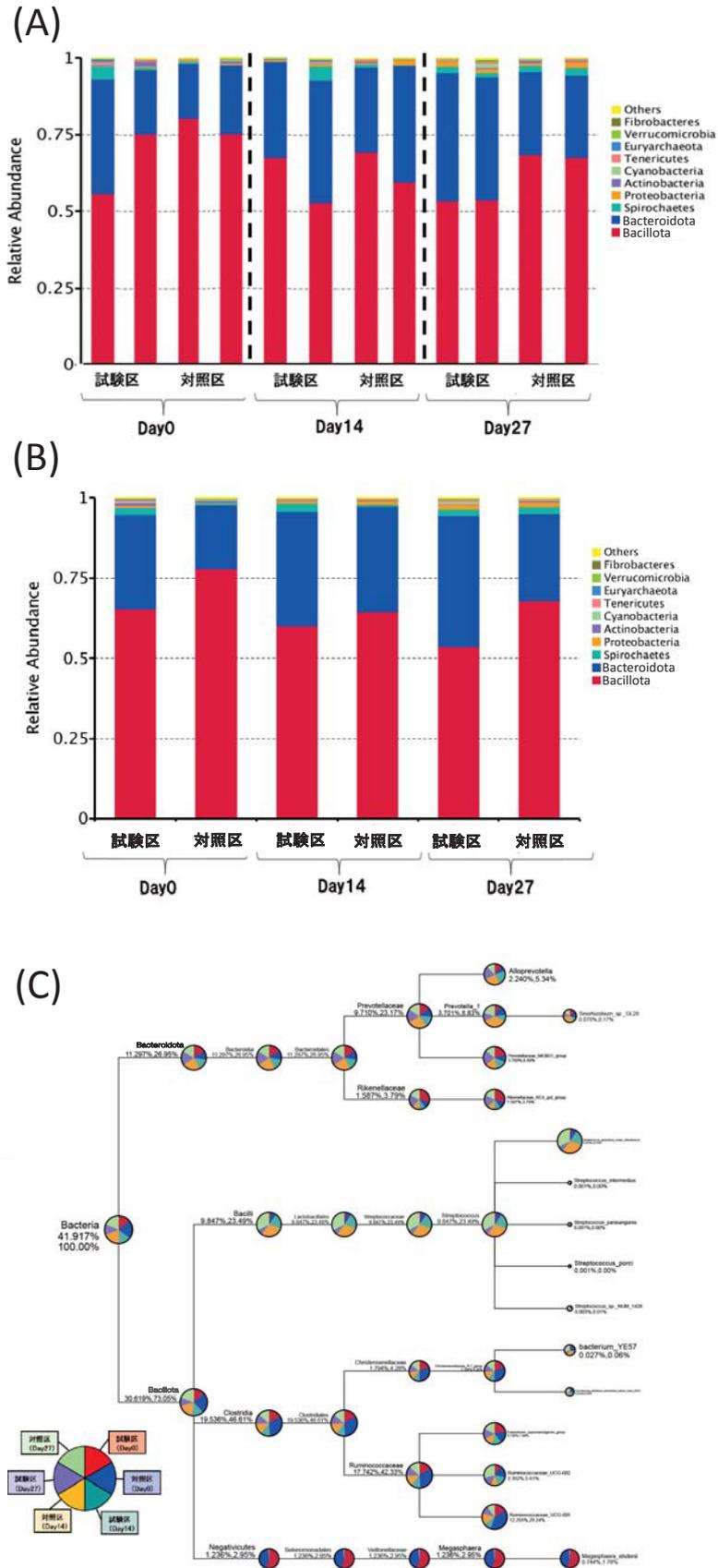


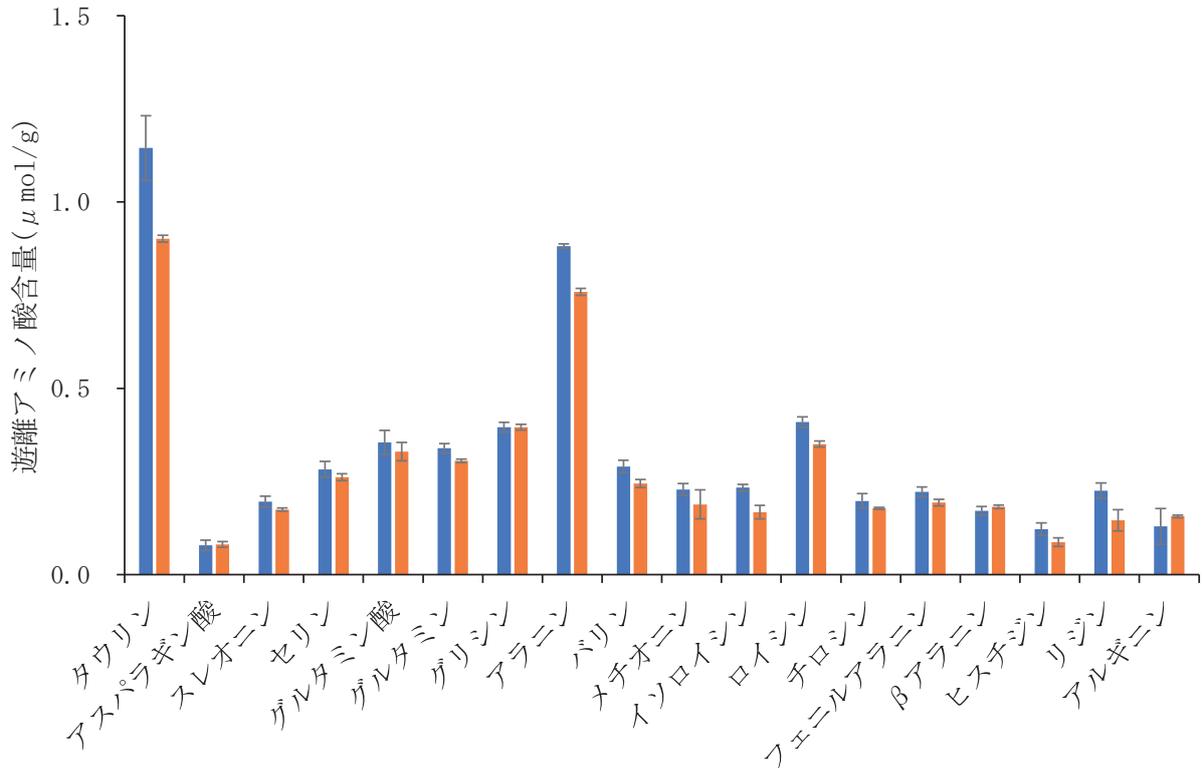
Fig. 3. 16S rDNA の配列に基づいた豚糞便中の菌叢解析. (A) 個体別の各門の相対的存在量, (B) グループ別の各門の相対的存在量, (C) グループ別の存在割合. 赤: 投与区 (Day0), 青: 対照区 (Day0), 深緑: 投与区 (Day14), 黄色: 対照区 (Day14), 紫: 投与区 (Day27), 淡緑: 対照区 (Day27).

**食味試験**

Fig. 5 Bには嗜好パネルを用いた味覚試験の結果を示した。対照区と比較し、試験区では肉色が淡いと判断され、肉様の味（コク）、風味（香りを含む味の総合）の

程度、風味（香りを含む味の総合）の好ましさ、総合的なおいしさの項目が高く評価された。肉の柔らかさや多汁感の項目は低評価となった。低く評価された理由として、試験区の豚は対照区の豚と比較し、発育が良好で

(A)



(B)

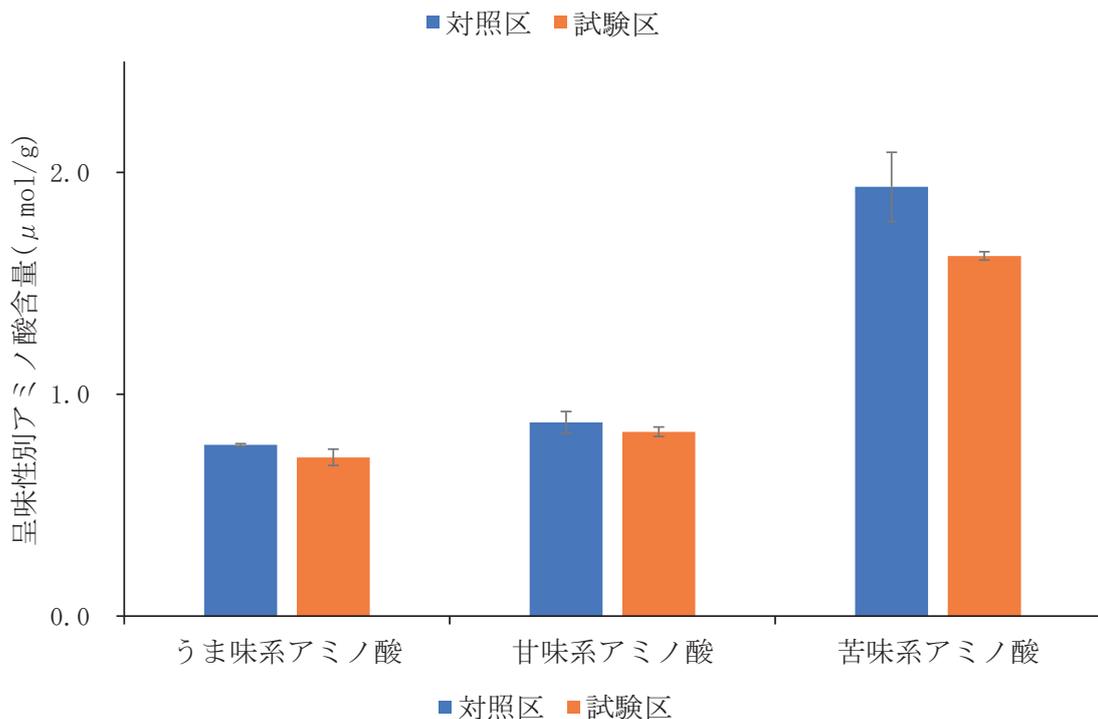
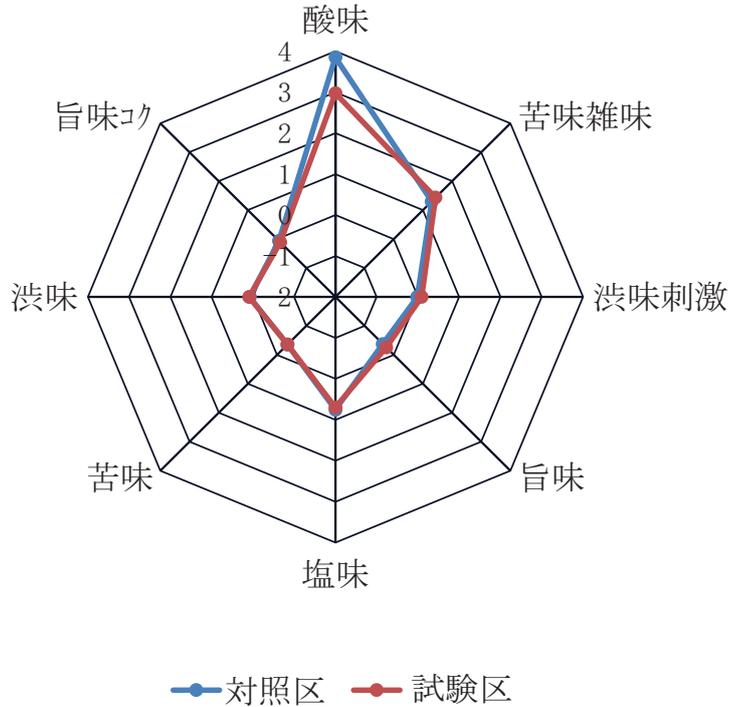


Fig. 4. ロース芯のアミノ酸含量. (A) 各遊離アミノ酸含有量. (B) 呈味性別アミノ酸含有量.

あったため、筋繊維が強固になった可能性が考えられた(19)。しかしながら、これらの試験は6名の学生で行ったため、かなりバイアスがかかっている可能性もある。

今後、付加価値を見出すためには多くの様々な層のパネルで食味試験を実施していく必要があるだろう。

(A)



(B)

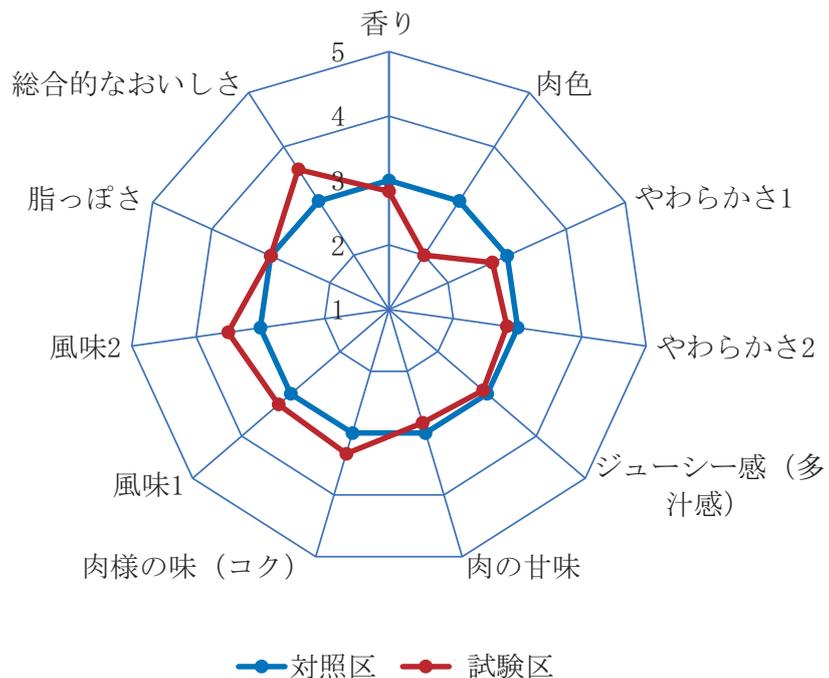


Fig. 5. ロース芯の味覚試験結果. (A) 味認識装置による分析結果. (B) 嗜好パネルを用いた味覚試験結果.

## 総括

本試験は近年、問題となっている多剤耐性菌の増加に対して、バクテリオシン産生乳酸菌により作製したヨーグルトが有効であるかを豚への投与試験により検討した。その結果、総菌数および硫酸コリスチンおよびエンラマイシン耐性数には影響が見られなかったが、硫酸コリスチン耐性大腸菌および大腸菌群数が投与27日目で減少した。腸内細菌叢の変化も見られたためバクテリオシン自体が効いているかは不明なものの腸内細菌叢のコントロールにより多剤耐性菌数もコントロールできる可能性が示唆された。また、食味試験を行ったところ、いくつかの項目で食味に差が見られ、総合評価では試験区の方が評価が高かった。しかしながら、本試験では農場での出産数の影響で2個体ずつしか使用できなかったため、今後正確なデータを得るためには個体数を増やして再試験の必要がある。また、本菌が産生するバクテリオシンが多剤耐性菌に殺菌作用を示したかは不明であるため、今後豚に対してヨーグルトではなく精製したバクテリオシンを投与する必要もあると考えられる。上記のような課題もあるものの、本実験では *Lactococcus lactis* MBR916菌株で作製したヨーグルトの投与が、豚の腸内細菌叢に影響を与え、薬剤耐性大腸菌を減らし、肉質改善効果が期待できる可能性が示され今後の研究の進展が期待される。

## 謝辞

本研究は、公益財団法人伊藤記念財団の支援を受け実施致しました。この場を借りて御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) 鈴木明子, 小林寛伊, 2015, わが国の感染制御の歴史, *Healthcare-Associated Infection*, 8, 1-9.
- 2) Dowarah R, Verma AK, Agarwal N., 2017, The use of *Lactobacillus* as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review, *Anim Nutr*, 3, 1-6.
- 3) Runjun Dowarah, Ashok Kumar Verma, Neeta Agarwal, Putan Singh, Bhoj Raj Singh., Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets, 2018, *PLOS ONE*, 13, 3.
- 4) Yoshihito Suda, Julio Villena, Yu Takahashi, Shoichi Hosoya, Yohsuke Tomosada, Kohichiro Tsukida, Tomoyuki Ahimazu, Hisashi Aso, Masanori Tohno, Mitsuharu Ishida, Seiya Makino, Shuji Ikegami, Haruki Kitazawa, 2014, Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* as immune-health promoting factor to improve growth performance and productivity in post-weaning pigs, *BMC Immunol*, 15, 24.
- 5) Samson Baranzan Wayah, Koshy Philip., 2018, Characterization, yield optimization, scale up and biopreservative potential of fermentin SA715, a novel bacteriocin from *Lactobacillus fermentum* GA715 of goat milk origin, *Microb Cell Fact*, 17, 125.
- 6) 朝倉邦造, 光岡知足 (編), 1997, 腸内細菌学, 朝倉書店, 東京, p346.
- 7) 石川潤一, 木下英樹, 菰田俊一, 須田義人, 石田光晴, 2016, 乳酸菌を用いた多剤耐性菌の殺菌効果の検討とプロテアーゼ耐性バクテリオシンの評価, *ミルクサイエンス*, 65 (3), 179-190.
- 8) 飯塚悟, 金丸芳, 横石和也, 松長辰司, 新居雅宏, 2016, 乳酸菌発酵米飼料を活用した「阿波ポーク」生産技術の開発, 徳島県畜産研究所研究報告第15号, 25-29.
- 9) 森田幹夫, 坂代江, 清宮恵美, 津田和之, 真原隆治, 2010, 納豆残さの添加が豚の健康に及ぼす影響, 茨城県畜産センター研究報告書第43号 19-25.
- 10) 福田千恵美, 薦田博也, 川西郁馬, 岩下陽子, 関和美, 渡邊仁, 2019, 健康豚糞便中のプラスミド性コリスチン耐性遺伝子保有状況, 香川県環境保健研究センター所報, 18.
- 11) 柿田徹也, 岡野祥, 加藤峰史, 宮平勝人, 高良武俊, 久場由真仁, 仁平稔, 喜屋武向子, 2021, 沖縄県の豚, 鶏におけるコリスチン耐性遺伝子保有腸内細菌科細菌及びカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の保有実態, *日獣会誌*, 74, 569-575.
- 12) DrJohann D D Pitout M D, Kevin B Laupland M D, 2008, Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern, *THE LANCET Infectious Diseases*, 8 (3), 159-166.
- 13) Lamendella R, Domingo JW, Ghosh S, Martinson J, Oerther DB, 2011, Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. *BMC Microbiol*, 2011, 11, 103.
- 14) Donghyun Shin, Sung Yong Chang, Paul Bogere, KyeongHye Won, Jae-Young Choi, Yeon-Jae Choi, Hak Kyo Lee, Jin Hur, Byung-Yong Park, Younghoon Kim,

- Jaeyoung Heo, 2019, Beneficial roles of probiotics on the modulation of gut microbiota and immune response in pigs, PLOS ONE, 14, 8.
- 15) Zhongwei Zhang, Lili Cao, Yan Zhou, Shujin Wang, Shujin Wang, 2016, Analysis of the duodenal microbiotas of weaned piglet fed with epidermal growth factor-expressed *Saccharomyces cerevisiae*, BMC, 16 (1), 166.
- 16) Kim HB, Borewicz K, White BA, Singer RS, Sreevatsan S, Tu ZJ, Isaacson RE, 2011, Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs, Veterinary Microbiology, 153 (1-2), 124-133.
- 17) Zhang J, Chen X, Liu P, Zhao J, Sun J, Guan W, Johnston LJ, Levesque CL, Fan P, He T, Zhang G, Ma X, 2018, Dietary *Clostridium butyricum* induces a phased shift in fecal microbiota structure and increases the acetic acid-producing bacteria in a weaned piglet model, ACS Publications, 66 (20), 5157-5166.
- 18) Xie M, Chen G, Wan P, Dai Z, Hu B, Chen L, Ou S, Zeng X, Sun Y, 2017, Modulating effects of dicaffeoylquinic acids from *Ilex kudingcha* on intestinal microecology *in vitro*, ACS Publications, 65 (47), 10185-10196.
- 19) 田淵賢治, 野崎宏, 竹本英男, 2011, 生菌入り混合飼料プリモス 25 添加飼料給与が豚の発育および肉質に与える影響, 香川畜試報告, 46, 13-18.



# ブドウ‘巨峰’と‘シャインマスカット’における 偽受精胚珠培養および葯培養法を用いた半数体誘導の試み

安田喜一<sup>1</sup>・中村勇揮<sup>1</sup>・廣田真也<sup>1</sup>・松永 涼<sup>1</sup>・  
鈴木健人<sup>1</sup>・金子 博<sup>2</sup>・富永晃好<sup>3</sup>・八幡昌紀<sup>3</sup>

Methods of pseudo-fertilized ovule culture and anther culture  
for induction of haploidy in grapevine ‘Kyoho’ and ‘Shine Muscat’

Kiichi YASUDA, Yuki NAKAMURA, Shinya HIROTA, Ryo MATSUNAGA,  
Kento SUZUKI, Hiroshi KANEKO, Akiyoshi TOMINAGA and Masaki YAHATA

(Received 30 November 2022; accepted 11 January 2023)

## Abstract

In Japan, grapevine’s breeding is dependent on tetraploid breeding, and the most of cultivars including diploids have highly genetically heterozygous. These factors are barriers to strategic breeding and genome analysis. In this study, pseudo-fertilized ovule culture and anther culture method were performed for production of dihaploids of ‘Kyoho’ and haploids of ‘Shine Muscat’. Soft X-ray irradiation significantly reduced germination fertility of the ‘Kyoho’ and ‘Shine Muscat’ pollen at 1,500 Gy and 1,000 Gy, respectively. When the ovules obtained by crossing these pollen grains were cultured on 1/2MS medium containing 0.5% malt extract, 12 ovules developed into embryoids after a month of culture. Two of these ovules formed callus by secondary culture on WM medium containing  $4.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeatin. On the other hand, when anthers collected from flower buds 28 days before full bloom were cultured on NN medium supplemented with 0.25 ppm BA-NAA and  $50 \mu\text{M}$  spermine, the rate of callus formation after 9 weeks was 80% and 16% for the ‘Kyoho’ and ‘Shine Muscat’, respectively. SSR analysis of 84 calli of the ‘Kyoho’ and 7 calli of the ‘Shine Muscat’ derived from anther culture revealed that most of the callus was derived from anther somatic cells, except for 1 callus generated from ‘Kyoho’. This callus was presumed to be dihaploid with half of the SSR alleles reduced, but the results of *Vitis* MYB haplotype analysis suggested that culture variability had occurred. Although we were not successful redifferentiation into plantlets from the calli in this report, the results provided fundamental knowledge for producing grape haploids.

## 緒 言

ブドウ (*Vitis* spp.) は、ブドウ科のつる性落葉果樹であり、ワインをはじめとする加工原料や生食用の果実として世界的に重要な果樹の一つである。日本では、生食用として芳醇で良食味の噛み切りやすい（果肉崩壊性）果実を有する欧州種 (*V. vinifera* L.) の導入を図ったが、高温多湿な気候では栽培が困難であった。そのため、欧州種と比べて耐湿性や耐病性に優れる米国種 (*V. labrusca* L.) との種間交雑により、多くの欧米雑種が育

成されてきた。その代表的な品種として‘巨峰’が挙げられ、欧米雑種‘石原早生’（四倍体‘キャンベルアーリー’）と欧州種‘センチニアル’（四倍体‘ロザキ’）の交雑から選抜された四倍体の着色系大粒品種である。その優れた品質と栽培特性は、我が国のブドウ産産を70年間支えており、‘ピオーネ’、‘藤稔’、‘安芸クイーナ’および‘クイーナニーナ’等の主要品種の中間母本としても利用され続けてきた。しかし、それゆえ日本の大粒系品種の育種は高次倍数性に依存しており、遺伝様式が複雑であることから戦略的な育種が難しい上、分子生物学

<sup>1</sup> 東海大学農学部応用植物科学科

<sup>2</sup> 東海大学農学教育実習センター

<sup>3</sup> 静岡大学学術院農学領域

連絡先：安田喜一 e-mail: yk964422@tsc.u-tokai.ac.jp

的手法を活用した遺伝解析の障壁となっている。一方、‘シャインマスカット’は、ブドウ安芸津21号（欧米雑種‘スチューベン’×欧州種‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’）×欧州種‘白南’の交雑から育成された二倍体の黄緑系品種であり、植物ホルモン処理による無核栽培で四倍体と同等もしくはそれ以上の果実肥大を示す(1,2)。また、果皮が比較的薄いものの、裂果性が低いため、「皮ごと食べられる種なしブドウ」として消費者と市場から極めて高いニーズがあり、品種登録後10年以上経過した今でも爆発的に普及・作付面積の拡大が進んでいる。優れた果実特性をもつ反面、一部の病害に対する罹病性や「かすり症」、「未熟果粒混入症」、「果梗部黒変症」といった生理障害発生等、品種としての改善点は多く残されている。中間母本として既に利用が進んでおり、‘雄宝’や‘マスカサートーン’等の黄緑系品種のみならず、‘ヌーベルローズ’、‘スカーレット’、‘コトピー’および‘富士の輝き’等の着色系品種の育成に寄与している。

前述のように、日本のブドウ育種は‘巨峰’を中心とした倍数性育種に依存しており、戦略的な育種の障壁となっている。また、‘シャインマスカット’は二倍体ではあるものの、ヘテロ接合性が高く、後代への目的形質の導入や分子生物学的手法を用いた遺伝解析は容易ではない。これらの打開策の一つとして、半数体の育成が挙げられる。すなわち、優良な四倍体品種を二倍性半数体にゲノムを減数させ、その中から優良な形質を有するものを選抜することで、高次倍数性に依存した日本のブドウ育種を二倍体育種に回帰させることが可能であると考えられる。また、‘シャインマスカット’のような優良な二倍体品種から半数体を作成することは、ゲノム解析の貴重な材料を提供するとともに、コルヒチン等による人為的な倍加処理を通して完全なホモ接合の倍加半数体（純系）を作成することで、戦略的育種と育種年限の短縮に寄与することが期待される。ブドウにおける半数体作成の試みは、主に薬培養法を用いて国内外で精力的に行われているが、半数体作成の事例はほとんどなく、薬体細胞由来カルスもしくは植物体の獲得にとどまっている(3,4,5,6,7)。

偽受精胚珠培養は、軟X線などの放射線を照射して精核を不活化した花粉を用いた交配後、胚珠を培養することで雌性配偶子由来の半数体の再生を図る技術である。特に、ウリ科植物ではその技術が確立しており、これまでに多くの半数体が得られている(8)。果樹では、カンキツ属植物でブンタン‘晩白柚’に軟X線を照射した‘福原オレンジ’の花粉を交配して得られた不完全な種子を

培養することで、半数体の作出に成功している(9)。一方、薬培養は、減数分裂過程の花粉を含む薬を組織培養により植物体へ再生させ、雄性配偶子由来の半数体を獲得する技術であり、被子植物ではチョウセンアサガオで初めて作出が報告された(10)。日本でも、イネ(11)、アブラナ科植物(12)、タバコ(13,14)およびアワ(15)等、多くの植物で薬培養法による半数体作出に成功している。ブドウにおいては、前述のように薬培養の試みは多くなされているが、偽受精胚珠培養に関する報告はほとんどなく、軟X線照射の花粉への影響や最適な培養条件などの基礎的な知見も得られていないのが現状である。

そこで本研究では、日本の優良品種‘巨峰’と‘シャインマスカット’のそれぞれの二倍性半数体および半数体作出を目的とし、軟X線を照射した花粉を用いた偽受精胚珠培養および植物組織培養の効率化に利用されるポリアミンを用いた薬培養を行った。

## 材料および方法

### 植物材料

東海大学農学教育実習センター植栽の‘巨峰’（[*V. labrusca* L. × *V. vinifera* L.] × *V. vinifera* L.）および‘シャインマスカット’（[[*V. labrusca* L. × *V. vinifera* L.] × *V. vinifera* L.] × [*V. vinifera* L. × *V. vinifera* L.]）の2品種を供試した。

### 花粉への軟X線照射と稔性調査

5月下旬に、両品種の花穂から開花直前の花蕾を採取し、取り出した薬をペトリディッシュ内でシリカゲルとともに同封し、25℃暗所条件で4時間程度静置することで開薬した。開薬後、プラスチックペトリディッシュ（φ90×20 mm）ごとSOFTEX SV-100AW/I. I. 特型（ソフテックス（株））内に静置し、目的の照射線量になるように照射時間を算出し、0分（0 Gy）、22分（500 Gy）、44分（1,000 Gy）、66分（1,500 Gy）で軟X線を照射した。照射後すぐに、染色稔性と発芽稔性を調査した。染色稔性は、アセトカルミン溶液（FUJIFILM Wako）を滴下したスライドガラス上で花粉を染色後、調査花粉数に対する染色花粉数を百分率で算出した。発芽稔性は、スライドガラス上の20%ショ糖、1%寒天（FUJIFILM Wako）培地上に花粉を付着させ、湿箱に入れて25℃暗所条件で6時間静置後、光学顕微鏡下で観察し、調査花粉数に対する花粉管の発芽した花粉数を百分率で算出した。調査は5反復で行い、JMP（SAS）のHSD-Tukey多

重検定を用いて統計処理した。なお、照射前後は温度の影響を受けないように氷上で取り扱い、交配まで $-40^{\circ}\text{C}$ で冷凍貯蔵した。

#### 軟 X 線照射花粉を用いた交配と胚珠培養

‘巨峰’×‘巨峰’で試験区あたり3花穂の計9花穂、および‘シャインマスカット’×‘シャインマスカット’と‘巨峰’×‘シャインマスカット’で試験区あたり2花穂の計8花穂について、除雄後に軟 X 線を照射した花粉を用いた交配を実施した。交配50~60日後にすべての果実を収穫し、着粒と含核の程度を調査した。果実をエタノールにディッピング後、0.1%塩化ベンザルコニウム溶液に5分間、3%次亜塩素酸ナトリウム溶液に6分間浸漬することで滅菌し、その後、滅菌水で5分間3回洗浄した。それらの果実から胚珠を取り出し、プラスチックペトリディッシュ ( $\phi 90 \times 20 \text{ mm}$ ) 内の3%スクロース、0.8%ゲランガム (FUJIFILM Wako) および0.5%マルトエキストラクト (Difco Laboratories) を含む1/2MS培地 (16) (pH 5.7) 上に置床した。培養1ヵ月後に実体顕微鏡下で生育調査を行った。

#### 葯培養

両品種の満開28日前の花穂を採取し、培養まで28日間冷蔵保存した (Fig. 1)。花穂を70%エタノールにディッピング、0.1%塩化ベンザルコニウム溶液内で10分間、0.6%次亜塩素酸ナトリウム溶液内で15分間攪拌滅菌後、

滅菌水で5分間3回洗浄した。滅菌した花穂から花蕾を切除し、取り出した葯をプラスチックペトリディッシュ ( $\phi 90 \times 20 \text{ mm}$ ) 内の培地上に25葯/シャーレを等間隔で置床した。2%スクロース、0.5%ゲランガム (FUJIFILM Wako) NN培地 (pH 5.7) (17) を対照区とし、6-ベンジルアミノプリン (BA) と1-ナフタレン酢酸 (NAA) もしくは2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) (ナカライテスク) を同濃度 (0.1 ppm, 0.25 ppm, 0.5 ppm) で添加した6区、0.25 ppm区に50  $\mu\text{M}$  プトレシン二塩酸塩標準標品 (PTC), スペルミン (SPM), スペルミジン (SPD) (FUJIFILM Wako), それら3種混合の8区、計15区を設けた。ポリアミンは、熱失活を防ぐため、フィルター滅菌後、50 $^{\circ}\text{C}$ 程度まで冷ました培地へ添加した。培養9週後に、実体顕微鏡下で葯の外観とカルス形成を調査した。反復はなしとした。

#### DNA マーカーを用いたカルスの倍数性解析

‘巨峰’と‘シャインマスカット’の葯培養由来カルス (継代培養期間最大6ヵ月)、それぞれ107個体と3個体から安田ら (18) の手法従って改変 CTAB 法 (19) によりゲノム DNA を抽出した。すなわち、乳鉢内で液体窒素を用いて凍結・粉砕し、粉砕物を2.0 mL チューブ内で予熱した CTAB 溶液1 mL とメルカプトエタノール10  $\mu\text{L}$  を加えて混和、ブロックインキュベーター (PowerBLOCK Shaker, ATTO) で65 $^{\circ}\text{C}$ , 1,500 rpm, 30分間振とうした。RNase を4  $\mu\text{L}$  添加して37 $^{\circ}\text{C}$  15分間処理



Fig. 1 Flower stage of ‘Kyoho’ (left) and ‘Shine Muscat’ (right) 28 days before full bloom day used for anther culture. The full bloom day was defined as the day when 80% of the flowers in the field were in full bloom.

Bars = 5.0 cm

後、室温、14,000 rpm、5分間遠心分離して得られた上清について、フェノール/クロロホルムとクロロホルム/イソアミルアルコール抽出およびイソプロパノール沈殿を実施し、DNAペレットをTE buffer 50  $\mu$ Lに溶解した。微量分光光度計 (NanoDrop2000c, ThermoFisher Scientific K.K.) でDNA溶液の濃度を測定後、2.5 ng $\cdot$ L<sup>-1</sup>に調整してPCRに用いた。ブドウMYBハプロタイプ解析には、対照として葯を採取した2品種 (野生型)、『ヌーベルローズ』、『マスカットノワール』、『テレキ5BB』および『クインニーナ』の幼葉から同様の方法で抽出したゲノムDNAを供試した。

Simple sequence repeat (SSR) 解析には、Ciprianiら (20) の構築したマーカーのうち安田ら (21) が選抜したVChr2b (F: 5'-CCTCCTGCGAACAAGTCTGT-3', R: 5'-GTTGCTGGATTTGTGGAAGG-3'), VChr10b (F: 5'-CCA TGCCAACCGAACAAC-3', R: 5'-CAGAAATCTCGTGT CGCTCA-3') および VChr19a (F: 5'-TGGATTCACCATT GTCCTCA-3', R: 5'-CGAGGATACCAACAAGAATGAA-3') を用いた。PCR反応は、GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix 5.0  $\mu$ L (Promega), 2.0  $\mu$ M F/R primer mixture 1.0  $\mu$ L, Nucleotide free water (Merck) 3.0  $\mu$ L および 2.5 ng $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup> genome DNA 1.0  $\mu$ L の計10.0  $\mu$ L の混合溶液を用いて、94 $^{\circ}$ C 3分の前処理後、熱変性94 $^{\circ}$ C 30秒、アニーリング53 $^{\circ}$ C 35秒、伸長72 $^{\circ}$ C 35秒の32サイクルで行った。PCR増幅産物は、20%ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) 後、エチジウムブロマイド (EtBr) で染色して紫外線照射下で可視化した。

ブドウMYBハプロタイプ解析には、Kobayashiら (22, 23) および Azumaら (24) の構築した *VvMYB1a* (F: 5'-AAAAGGGGGCAATGTAGGGACCC-3', R: 5'-GAACCTCCTTTTTGAAGTGGTACT-3'), *VIMYB1-2* (F: 5'-CACCCTTGAAAAGAAGGTC-3', R: 5'-TCTTGA TCCAGCTCAGCTAAC-3'), *VIMYB1-3* (F: 5'-GGACGT TAAAAATGGTTGCACGTG-3', R: 5'-GAACCTCCTTTT TGAAGTGGTACT) および *VIMYB2* (F: 5'-GCTGAG CATGCTCAAATGGAT-3', R: 5'-TCCCACC ATATGATGTC ACCC-3') を用いた。PCR反応は、*TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> Hot Start Version 5.0  $\mu$ L* (TaKaRa), 2.0  $\mu$ M F/R primer mixture 1.0  $\mu$ L, Nucleotide free water (Merck) 3.0  $\mu$ L および 2.5 ng $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup> genome DNA 1.0  $\mu$ L の計10.0  $\mu$ L の混合溶液を用いて、95 $^{\circ}$ C 3分の前処理後、熱変性94 $^{\circ}$ C 30秒、アニーリング60 $^{\circ}$ C 30秒、伸長72 $^{\circ}$ C 90秒の34サイクル、最終伸長72 $^{\circ}$ C 5分で行った。PCR反応後の産物は、2%アガロース電気泳動後、EtBrで染色して紫外線照射下で可視化した。

## 結果

### 軟X線照射花粉を用いた交配と胚珠培養

軟X線を照射した花粉の染色稔性は、『巨峰』では試験区間に有意差がなかったのに対して、『シャインマスカット』においては照射量が少ない試験区で低い稔性を示し、0Gy照射区で76.2%に対して1,500 Gy照射区では82.1%と有意に低かった (Fig. 2, Table 1)。発芽稔性は、

Table 1 Effect of acetocarmine staining and pollen germination of the pollen on total radiation dose of soft X-ray in 'Kyoho' and 'Shine Muscat'.

Cultivar	Total radiation dose (Gy)	Pollen fertility (%)	
		Staining <sup>z</sup>	Germination <sup>y</sup>
'Kyoho'	0	58.2 a <sup>x</sup>	11.2 a
	500	63.2 a	12.6 a
	1,000	60.8 a	11.9 a
	1,500	60.0 a	5.3 b
'Shine Muscat'	0	76.2 b	19.3 a
	500	77.0 ab	12.0 b
	1,000	81.4 ab	4.5 c
	1,500	82.1 a	4.1 c

<sup>z</sup> The number of pollen grain stained by 40% acetocarmine solution / the total number of pollen grains  $\times$ 100.

<sup>y</sup> The number of germinated pollen grain on medium containing with 20% scrose and 1% agar / the total number of pollen grains  $\times$ 100.

<sup>x</sup> Different letters represent significant difference in HSD-Tukey's multiple range test, 5% level (n = 5).

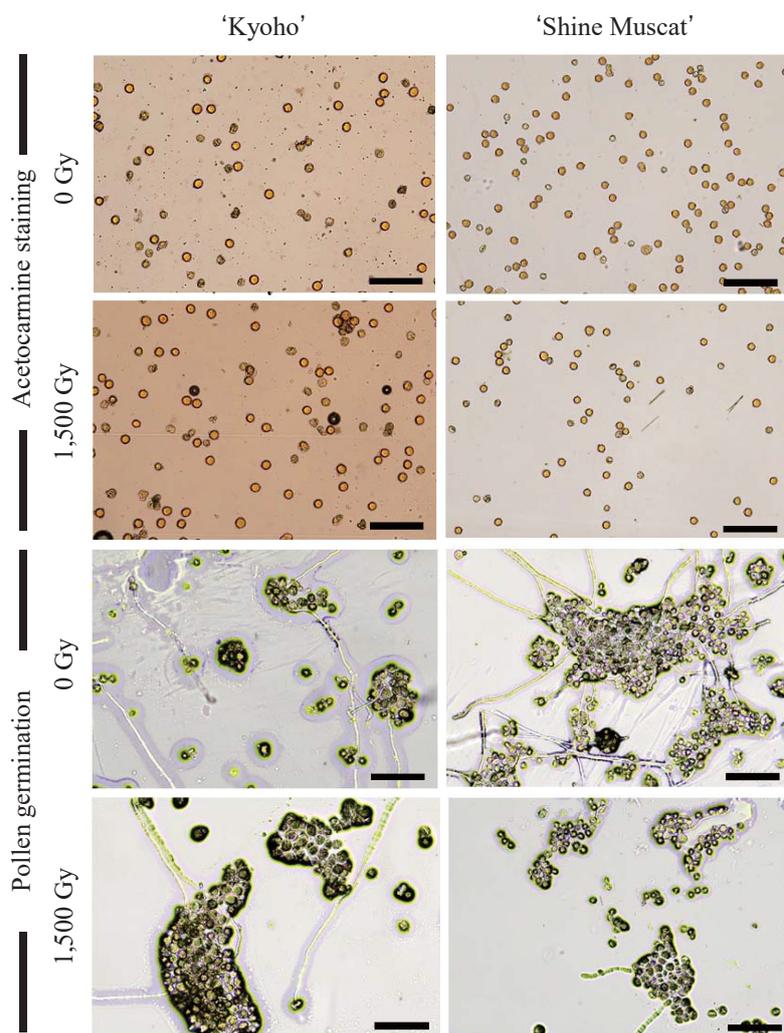


Fig. 2 Effect of acetocarmine staining and pollen germination of the pollen on soft X-ray irradiation in 'Kyoho' and 'Shine Muscat'. Bars = 100  $\mu$ m

両品種で照射量が高い試験区で低い稔性を示し、'巨峰'では1,500 Gy 照射区で5.3%と0~1,000 Gy 照射区より有意に低い値であった。一方、'シャインマスカット'では500 Gy 照射区で12.0%と0 Gy 照射区の19.3%より有意に低く、1,000 Gy と1,500 Gy 照射区においてそれぞれ4.5%と4.1%とさらに低下した。

これらの花粉を用いた交配を行ったところ、'巨峰'×'巨峰'から9花穂中4房、'巨峰'×'シャインマスカット'から8花穂中すべて、'シャインマスカット'×'シャインマスカット'から8花穂中4房の果実が収穫できた(データ略)。花粉への軟X線照射量と着粒、含核の程度および着粒した果粒の大きさとの間に一定の関係性はなかった(Table 2, 一部データ略)。これらのうち、軟X線照射花粉を用いた交配から得られた膨らん

だ胚珠のみ、以下の偽受精胚珠培養に供試した。

胚珠培養後、多くの胚珠が褐変化し、1ヵ月後の調査において、'巨峰'×'シャインマスカット'の1,000 Gy と1,500 Gy 照射区および'シャインマスカット'×'シャインマスカット'から得られた胚珠はすべて褐変化し、その後も変化はなかった(Table 3)。一方、'巨峰'×'巨峰'の500 Gy と1,500 Gy 照射区および'巨峰'×'シャインマスカット'の500 Gy 照射区からそれぞれ4個体(発生率としてそれぞれ6.6%, 7.0%および3.7%)の胚様体が発生した。これらの胚様体は発生後すぐにガラス化したため、メスで緑色の組織部をカットした後、 $4.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ゼアチンを含むpH 5.7のWM培地(25)上で二次培養を行ったところ、'巨峰'×'巨峰'と'巨峰'×'シャインマスカット'の500 Gy 照射区の胚様体からそれぞれ

Table 2 The results in the crosses using soft X-ray-irradiated pollen of 'Kyoho' and 'Shine Muscat'.

Cross combination		Total radiation dose of soft X-ray to pollen (Gy)	No. of florets crossed	No. of berries set	Percentage berry set (%) <sup>z</sup>	Total No. of ovules and seeds <sup>y</sup>			
Seed parent	Pollen parent					Developed ovule	Extremely small seed	Small seed	Normal seed
	'Kyoho'	0	15	8	53.3	28	0	0	0
		500	21	20	95.2	61	4	1	2
		1,000	18	7	38.9	8	0	1	0
		1,500	26	20	76.9	57	12	3	1
'Kyoho'		0	31	19	61.3	50	13	12	1
		0	20	13	65.0	21	15	11	2
		500	40	26	65.0	79	10	8	4
		500	29	10	34.5	29	4	0	1
	'Shine Muscat'	1,000	26	8	30.8	17	1	2	1
		1,000	27	23	85.2	87	1	0	0
		1,500	34	25	73.5	65	16	13	1
		1,500	30	21	70.0	53	14	3	5
'Shine Muscat'		0	15	13	86.7	29	0	0	1
		500	15	2	13.3	7	1	0	0
		1,000	15	10	66.7	34	1	0	2
		1,000	15	4	26.7	13	0	0	0

<sup>z</sup> The number of berries set / the number of florets crossed × 100.

<sup>y</sup> Long diameter: 0 mm < developed ovule ≤ 1 mm < extremely small seed ≤ 2 mm < small seed ≤ 4 mm < normal seed.

Table 3 Appearances of ovules after a month of pseudo-fertilized ovule culture on 1/2 strength MS medium.

Cross combination		Total radiation dose of soft X-ray to pollen (Gy)	No. of ovules used	Appearances of ovules		
Seed parent	Pollen parent			Browning	Yellowing	Embryoid
'Kyoho'	'Kyoho'	500	61	44 (72.1) <sup>z</sup>	13 (21.3)	4 (6.6)
		1,000	8	7 (87.5)	1 (12.5)	0 (0)
		1,500	57	46 (80.7)	7 (12.3)	4 (7.0)
	'Shine Muscat'	500	108	97 (89.8)	7 (6.5)	4 (3.7)
		1,000	104	104 (100)	0 (0)	0 (0)
		1,500	118	118 (100)	0 (0)	0 (0)
'Shine Muscat'		500	7	7 (100)	0 (0)	0 (0)
		1,000	47	47 (100)	0 (0)	0 (0)

<sup>z</sup> The numbers in brackets represent percentage.

1個体ずつカルスが形成された (Fig. 3). これらのカルスは増殖が乏しく、再分化せずに枯死した。

#### 葯培養と得られたカルスの倍数性解析

両品種とも、培養5培養週後から肉眼で観察できるカルスが発生し、培養9週後には葯を覆うほどに旺盛な増殖を示した (Fig. 4). 9週後に調査を行ったところ、一部の試験区を除いて'シャインマスカット'より'巨峰'で生存率とカルス形成率が高い傾向にあり、品種間もしくは倍数体間差異が存在することが示唆された (Table 4). 両品種ともに NN BA-NAA 0.25 ppm+SPM で最も高い生存率とカルス形成率を示し、'巨峰'ではともに80%であり、'シャインマスカット'ではそれぞれ56%

と16%であった。本試験で用いたオーキシン2種の比較において、2,4-DよりNAAで総じて高い値を示したが、濃度間には一定の傾向は見られなかった。さらに、3種のポリアミンの添加の影響は、SPM添加区においてその前駆体であるPTCとSPD添加区より高い生存率とカルス形成率を示し、3種混合添加区よりも高かった。最終的に、'巨峰'と'シャインマスカット'の葯培養より、それぞれ84個体と7個体のカルスを獲得できた。

'巨峰'の葯培養由来カルス84個体について、4アレルがすべてヘテロ接合であるVChr10bでSSR解析を行った。その結果、84個体中78個体で明瞭な増幅バンドが確認され、そのほとんどで野生型の葉と同様に4アレルが検出されたのに対し、1個体(K-1-9-16)のみ2ア

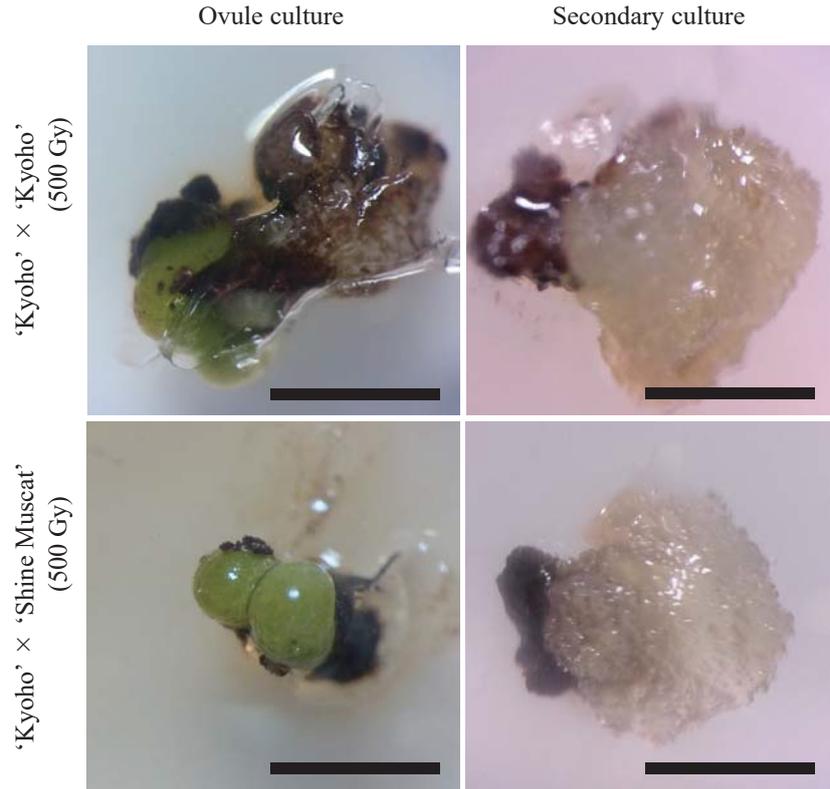


Fig. 3 Embryoids after a month of pseudo-fertilized ovule culture on 1/2 strength MS medium and calli generated from these embryoids after three weeks of secondary culture on MW medium (Yahata et al., 2022) containing  $4.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeatin, pH 5.7.

Bars = 2.0 mm



Fig. 4 Callus formation in anther culture of 'Kyoho' and 'Shine Muscat' on NN medium containing polyamines.

Bars = 1.0 mm

レルに減数していた (Fig. 5, 一部データ略). 'シャインマスカット' の葯培養由来カルス 7 個体は, 2 アレルがヘテロ接合である VChr2b と VChr19a で SSR 解析を行い, すべての個体で野生型の葉と同様に 2 アレルが検出された. SSR 解析でアレルの減数が確認された K-1-9-16 について, 果皮色の決定に関与する MYB 遺伝子座で

構築された 4 つの DNA マーカーを用い, MYB ハプロタイプ (24,26,27) を調査した (Fig. 6). その結果, '巨峰' では *VvMYBA1a*, *VIMYBA1-2*, *VIMYBA1-3* および *VIMYBA2* のすべてが存在するハプロタイプ A/A/E1/E2 であったのに対し, K-1-9-16 では *VIMYBA1-2* のみが検出された (Fig. 7, Table 5).

Table 4 Effect of addition of plant hormones and polyamines to NN medium on callus formation in anther culture of 'Kyoho' and 'Shine Muscat' (9 weeks after culture).

Cultivar	Growing condition	Control <sup>z</sup>	BA-NAA 0.1 ppm	BA-NAA 0.25 ppm	BA-NAA 0.5 ppm	BA-NAA 0.25 ppm + PTC <sup>y</sup>	BA-NAA 0.25 ppm + SPM	BA-NAA 0.25 ppm + SPD	BA-NAA 0.25 ppm + Tri
'Kyoho'	Survival <sup>x</sup>	0 ( 0) <sup>w</sup>	6 (24)	6 (24)	9 (36)	11 (44)	20 (80)	15 (60)	13 (52)
	Callus formation	0 ( 0)	6 (24)	6 (24)	6 (24)	11 (44)	20 (80)	15 (60)	13 (52)
'Shine Muscat'	Survival	0 ( 0)	0 ( 0)	4 (16)	4 (16)	10 (40)	14 (56)	8 (32)	8 (32)
	Callus formation	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	1 ( 4)	4 (16)	1 ( 4)	1 ( 4)

Cultivar	Growing condition	BA-2,4-D 0.1 ppm	BA-2,4-D 0.25 ppm	BA-2,4-D 0.5 ppm	BA-2,4-D 0.25 ppm + PTC	BA-2,4-D 0.25 ppm + SPM	BA-2,4-D 0.25 ppm + SPD	BA-2,4-D 0.25 ppm + Tri
'Kyoho'	Survival	2 ( 8)	4 (16)	2 ( 8)	5 (20)	9 (36)	6 (24)	8 (32)
	Callus formation	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	1 ( 4)	4 (16)	0 ( 0)	2 ( 8)
'Shine Muscat'	Survival	2 ( 8)	4 (16)	8 (32)	6 (24)	8 (32)	6 (24)	10 (40)
	Callus formation	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)

<sup>z</sup> Control is only NN base medium. Phytohormones and/or polyamines added to the NN medium in other experimental sections are shown.

<sup>y</sup> PTC: 50 μM putrescine, SPM: 50 μM spermine, SPD: 50 μM spermidine, Tri: 50 μM (PTC + SPM + SPD).

<sup>x</sup> Those that maintained a yellowing without browning were considered to be suevival.

<sup>w</sup> (Number of anthers corresponding to growing conditions / number of anthers used) × 100. 25 anthers were tested for each.

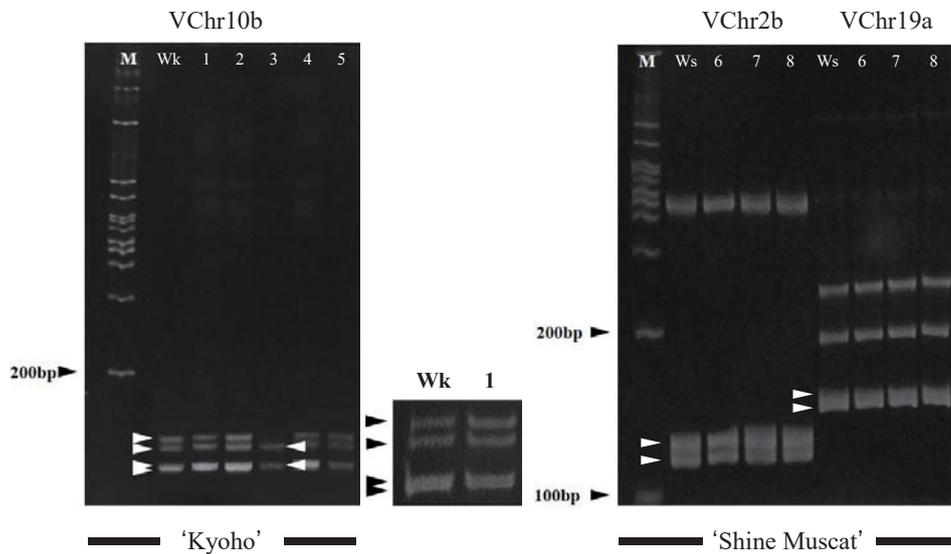


Fig. 5 SSR analyses in the calli obtained from anther culture of 'Kyoho' and 'Shine Muscat'. M: 100bp ladder, Wk: the leaf of 'Kyoho', Ws: the leaf of 'Shine Muscat', 1-5: the calli derived from 'Kyoho', 3: K-1-9-16, 6-8: the calli derived from 'Shine Muscat'. The centered electrophoretic image was shot by the single-lens reflex camera.

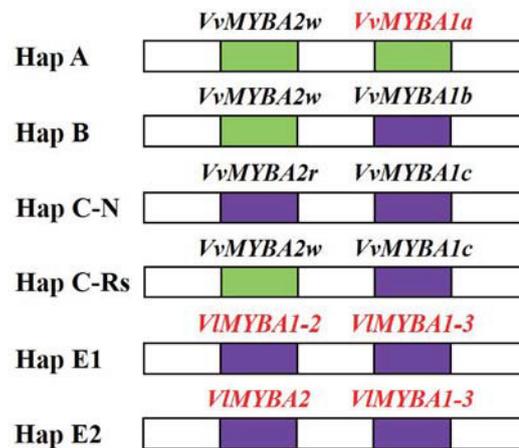


Fig. 6 *Vitis* MYB haplotypes at the color locus in 'Kyoho'. (Azuma et al., 2011)

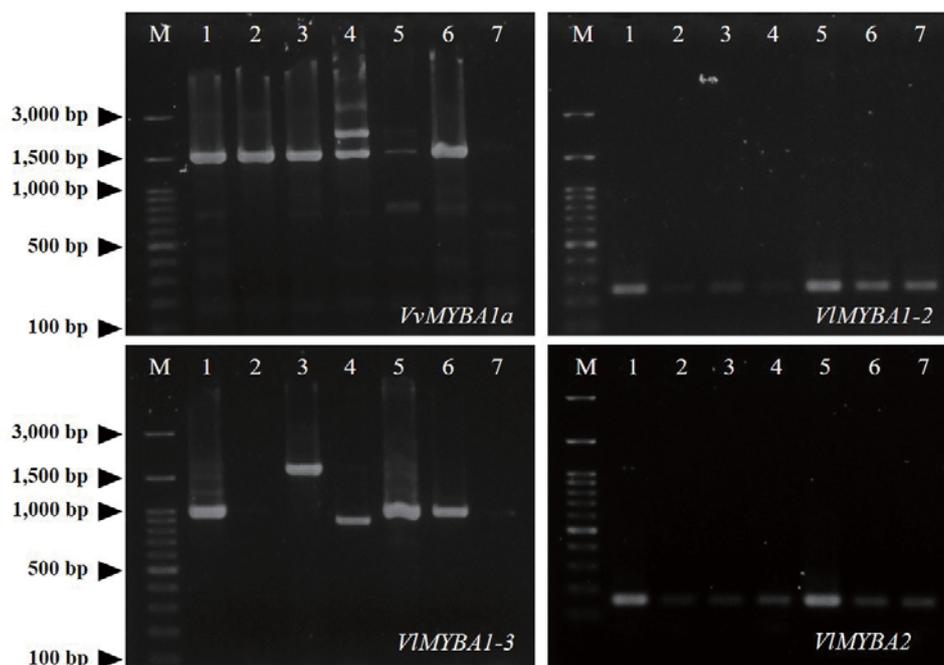


Fig. 7 Polymorphism detected in 4 MYB-related genes for *Vitis* MYB haplotype analysis of the leaves of 'Kyoho' and the 5 cultivars, and the callus derived from anther culture of 'Kyoho'. M: 100bp ladder, 1: 'Kyoho', 2: 'Shine Muscat', 3: 'Nouvelle Rose', 4: 'Muscat Noir', 5: 'Tereki 5BB' for stock, 6: 'Queen Nina', 7: callus K-1-9-16.

Table 5 *Vitis* MYB haplotype analysis of the callus K-1-9-16 derived from anther culture of 'Kyoho', and the leaves of 'Kyoho' and the 5 cultivars.

Cultivar or callus	Ploidy level	Skin color	Band pattern				<i>Vitis</i> MYB haplotype
			<i>VvMYBA1a</i>	<i>VIMYBA1-2</i>	<i>VIMYBA1-3</i>	<i>VIMYBA2</i>	
'Kyoho'	4x	Black	+	+	+	+	A/A/E1/E2
K-1-9-16	2x <sup>z</sup>	-	-	+	-	-	-
'Shine Muscat'	2x	White	+	-	-	-	A/A
'Nouvelle Rose'	2x	Red	+	-	Insertion (824 bp) <sup>y</sup>	-	A/B
'Muscat Noir'	2x	Black	+	-	Deletion (155 bp)	-	A/C
'Teleki 5BB'	2x	Black	-	+	+	+	E1/E2
'Queen Nina'	4x	Red	+	+	+	-	A/A/A/E1

<sup>z</sup> Estimated ploidy based on the result of SSR analysis.

<sup>y</sup> Insertion and deletion in *VIMYBA1-3* to distinguish between haplotype B and C (Azuma et al., 2011; Azuma, 2017) .

## 考 察

軟 X 線を照射した花粉の発芽稔性は、照射量の増加に伴って顕著な稔性低下が見られ、'巨峰'の1,500 Gy 照射区、'シャインマスカット'の1,000 Gy と1,500 Gy では10%を下回った。一方、軟 X 線照射花粉が種子形成へ及ぼす影響については、両品種ともに0 Gy 照射区の果実に種子が少なかったため、明らかにすることができなかった。カンキツ類のヒュウガナツでは1,000 Gy、スイカでは2,000 Gy を超えると花粉の発芽稔性が低下することが報告されており (28, 29)、ブドウにおいても同様の影響があると考えられた。また、ブドウは単為結果性を有しており、1,000 Gy や1,500 Gy の高い照射量でも

比較的多くの果実と発達した胚珠を得ることができた。花粉の発芽稔性低下と精核不活化との関係は不明であるが、花粉へのダメージの指標と考えれば、'巨峰'と'シャインマスカット'の偽受精胚珠培養における花粉への軟 X 線照射量は、それぞれ1,500 Gy と1,000 Gy が適度であると示唆された。軟 X 線照射花粉を用いた交配から得られた510の胚珠をすべて培養したが、胚様体は3試験区12個体 (2.4%) であり、二次培養を通してカルス形成に至ったものはわずか2個体 (0.4%) であった。Nakajima ら (30) は、開花前の未受精胚珠培養において、2,4-D とサイトカイニンであるホルクロルフェニユロンもしくはチジアズロンを添加した 1/2MS 培地上で10%程度の効率で不定胚形成カルスを発生させて

いる。本研究の培養条件は一定で行ったが、ブドウの偽受精胚珠培養からのカルス形成および植物体再生には、糖の種類、植物ホルモンおよび培養環境などの詳細な検討が必要であると考えられた。

薬培養における培地組成間の比較において、オーキシンの種類は 2,4-D よりも NAA で良い結果が得られた。これまでのブドウの薬培養の報告において、Murayama (31) は、*V. vinifera* を供試し、BA 添加の 1/2MS 培地を基本培地とした 2,4-D と NAA の比較では、カルス形成に差がないことを報告している。また、Rajasekaran ら (32) は、*V. vinifera* と台木品種 (*V. vinifera* × *V. rupestris*) を供試し、NN 培地を基本培地とした同様の試験で、NAA よりもむしろ 2,4-D で高いカルス形成率を報告している。これらの報告と本研究の結果の差異から、植物ホルモンを含む培地組成より種・品種間の遺伝的背景が、カルス形成に大きな影響を及ぼすと示唆された。3 種のポリアミン添加の比較では、SPM で最も高い生存率とカルス形成率を示した。カンキツ類のクレメンティンの薬培養において、PTC と SPD の混合区より SPD 単独処理で最も高いカルス形成率を示した (33)。また、*V. vinifera* においても、胚培養ではあるものの、SPM、PTC、SPD およびガダベリンを用い、これらを添加したすべての試験区でカルスが誘導され、植物体への再分化に成功している (34)。本研究の結果からも、ブドウの薬培養において培地にポリアミンを添加することで、効率的にカルスを誘導できることが明らかとなった。

ブドウにおける偽受精胚珠培養は、軟 X 線照射の労力、微小な花による高い交配難易度および四倍体や強樹勢による低い着果率に加え、偽単為結果による未受精胚珠からのアポミクシス胚や胚乳核からの三倍体胚などの期待しないカルスもしくは胚形成の可能性がある。一方で、薬培養は、本研究の手法でも‘巨峰’で 80% のカルス形成率を示し、繊細な培養ではあるものの、操作性は胚珠培養より簡便である。また、薬や花糸からの体細胞由来のカルスもしくは胚発生があったとしても、その選抜は比較的容易である。そのため、これら 2 つの手法を比較すると、ブドウの半数体作出のためのカルス誘導は、偽受精胚珠培養法より薬培養の方が効率的であると考えられる。

Flow cytometry (FCM) を用いたブドウカルスの倍数性の確認が容易ではないため、我々はこれまでに SSR とブドウ MYB 関連遺伝子の DNA マーカーによる倍数性解析を提案している (18)。「巨峰」と‘シャインマスカット’の薬培養由来カルスの倍数性を調査するために SSR 解析を実施したところ、ほとんどのカルスが野生

型と同じアレルを有しており、それぞれ四倍体と二倍体の薬体細胞由来であることが明らかとなった。一方、‘巨峰’の薬培養由来カルスの 1 個体において、野生型が 4 つのヘテロアレルを有する VChr10b が 2 アレルに減数した。第 10 染色体のみの解析ではあるものの、この個体は雄性配偶子由来の二倍性半数体である可能性が示唆された。この個体について MYB ハプロタイプ解析を行ったところ、ハプロタイプ E1 の片方の遺伝子 *VIMYBAI-2* のみが検出される予せぬ結果が得られた。さらなる詳細な解析が必要であるが、MYB 関連遺伝子が座乗する第 2 染色体の一部で培養変異が生じた可能性があると考えられた。Prado ら (35) は、6 品種の *V. vinifera* の体細胞胚形成からの再分化個体について FCM と SSR 解析を行い、多様な倍数性変異と極めて低い頻度で SSR アレル内に変異が発生していることを報告している。さらに、Schellenbaum ら (36) は、SSR および Methylation-sensitive arbitrarily primed - Amplified fragment length polymorphism (MSAP-AFLP) により、2 品種の *V. vinifera* の体細胞胚は SSR アレルを高度に保存していたが、脱メチル化のレベルに多くの変異が生じていることを明らかにしている。本研究では、最大 6 ヶ月間培養した薬培養由来カルスを供試したため、これらの報告と同様に一部の DNA 配列に培養変異が生じたと考えられる。

以上の結果より、偽受精胚珠培養法において、花粉に及ぼす軟 X 線照射の影響および当胚珠培養条件では胚様体とカルス形成効率が極めて低いことが明らかとなった。また、薬培養法において、オーキシシンには NAA を用い、ポリアミンの中でも SPM を添加することがカルス誘導効率を向上させることを明らかとなった。‘巨峰’の薬培養由来カルスより、培養変異の可能性は否定できないものの、二倍性半数体に減数したと思われる 1 個体を作成できた。今後、多様な品種に適した薬培養条件の検討および不定胚形成カルスか否かの確認と早期再分化系の確立により、ブドウの半数体作出が期待されると思われる。

## 謝 辞

本研究は、科学研究費補助金 (JP20K06036) の助成を受けて実施した。また、2021 年度果樹園芸学研究室専攻生諸君には、COVID-19 感染拡大下の制限ある研究環境の中で、圃場での試料採集・調整に多大なご協力を頂いた。ここに記して、深く感謝の意を申し上げます。

## 要約

日本のブドウ品種は四倍体育種に依存しており、二倍体品種においてもヘテロ接合性が高いため、戦略的な育種やゲノム解析の障壁となっている。本研究では、'巨峰'と'シャインマスカット'の偽受精胚珠培養法と葯培養法を行い、それぞれ二倍性半数体と半数体の作出を試みた。'巨峰'と'シャインマスカット'の花粉に軟X線を照射したところ、それぞれ1,500 Gyと1,000 Gyの照射で顕著に発芽稔性が低下した。それらの花粉を交配して得られた胚珠を0.5% マルトエキス抽出液含有の1/2MS培地上で培養したところ、培養1ヵ月後に12個体が胚様体へと成長し、4.4 mg・L<sup>-1</sup>ゼアチン含有のWM培地上での二次培養により2個体がカルスを形成した。一方、満開28日前の花蕾から採取した葯を0.25ppm BA-NAAおよび50 μM スペルミンを添加したNN培地上で9週間培養したところ、'巨峰'と'シャインマスカット'でそれぞれ80%と16%のカルス形成率を示した。葯培養由来'巨峰'84個体と'シャインマスカット'7個体のSSR解析により、'巨峰'1個体を除いたほとんどのカルスが葯体細胞由来であることが明らかとなった。この1個体はSSRアレルが半数に減少した二倍性半数体と推定されたが、ブドウMYBハプロタイプ解析の結果から培養変異が生じていることが示唆された。本研究では、カルスから植物体への再分化に成功しなかったが、ブドウの半数体作出のための基礎的な知見を得ることができた。

## 引用文献

- 1) 山田昌彦・山根弘康・佐藤明彦・平川信之・岩波宏・吉永勝一・小澤俊治・三谷宣仁・白石美樹夫・吉岡美加乃・中島育子・中野正明・中畝良二, 2008, ブドウ新品種'シャインマスカット', 果樹研報, 7, 21-38.
- 2) 山田昌彦, 山根弘康, 佐藤明彦, 2017, ブドウ新品種'シャインマスカット'の育成と普及, 園学研, 16, 229-237.
- 3) Leal, F., Loureiro, J., Rodriguez, E., Pais, M. S., Santos, C. and Pinto-Carnide, O., 2006, Nuclear DNA content of *Vitis vinifera* cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from anther culture, *Plant Cell Rep.*, 25, 978-985.
- 4) Mauro, C. I. M., Nef, C. and Fallot, J., 1986, Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon. *Plant Cell Rep.*, 5, 377-380.
- 5) Murayama, T. 1989. Plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* via embryogenesis. *Plant Tissue Culture Letters*, 6, 152-154.
- 6) 新美善行, 1987, ブドウの葯培養における光条件及び低温処理がカルス形成に与える影響, 広島農短大報, 8, 337-340.
- 7) Rajasekaran, K. and Mullins, M. G., 1979, Embryos and plantlets from cultured anther of hybrid grapevines, *J. Exp. Bot.*, 30, 399-407.
- 8) Galazka, J. and Niemirowicz-Szczytt, K., 2013, Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits, *Folia Hort.*, 25, 67-78.
- 9) Yahata, M., Yasuda, K., Nagasawa, K., Harusaki, S., Komatsu, H. and Kunitake, H., 2010, Production of haploid plant of 'Banpeiyu' pummelo [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] by pollination with soft X-Ray-irradiated pollen, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 79, 239-245.
- 10) Guha, S. and Maheshwari, S., 1964, *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*, *Nature*, 204, 497.
- 11) Niizeki, H. and Oono, K., 1968. Introduction of haploid rice plant from anther culture, *Proc. Japan. Acad.*, 44, 554-557.
- 12) Kameya, T., 1970, Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*, *Japan. J. Breeding.*, 20, 82-87.
- 13) 中田和男・田中正雄, 1968, 葯の組織培養による花粉からのタバコ幼植物の分化, *Japan. J. Genetics*, 43, 65-71.
- 14) 田中正雄・中田和男, 1969, 葯培養によって得られたタバコの種類と半数体の染色体数倍加処理について, *Japan. J. Genetics*, 44, 47-54.
- 15) 伴 義之・国分禎二・宮司佑三, 1971, 葯培養における粟半数体の育成, 鹿児島大学農学部学術報告, 21, 77-81.
- 16) Murashige, T. and Skoog, S., 1962, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
- 17) Nitsch, J. P. and Nitsch, C., 1969, Haploid plants from pollen grains, *Science*, 163, 85-87.
- 18) 安田喜一, 廣田真也, 松永 涼, 金子 博, 戸村大河, 富永晃好, 八幡昌紀, 2022, 四倍体ブドウ品種'巨峰'の葯培養由来カルスのDNAマーカーを用いた倍数性解析, *DNA 多型*, 30, 6-12.
- 19) Doyle, J. and Doyle, J. L., 1987, A rapid DNA isolation

- procedure for small quantities fresh leaf tissue, *Phytochem. Bull.*, 19, 11-15.
- 20) Cipriani, G., Marrazzo, M. T., Gaspero, G. D., Pfeiffer, A., Morgante, M. and Testolin, R., 2008, A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping, *BMC Plant Biol.*, 8, 127.
- 21) 安田喜一, 森上千聖, 佐藤真衣, 金子博, 松山知樹, 2021, ブドウ (*Vitis* spp.) 12品種を用いた近縁品種間の SSR マーカーによる品種識別, *DNA 多型*, 29, 50-54.
- 22) Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N. and Hirochika, H., 2005, Association of *VvmybA1* gene expression with anthocyanin production in grape (*Vitis vinifera*) skin-color mutants, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 74, 196-203.
- 23) Kobayashi, S., Ishimaru, M., Hiraoka, K. and Honda, C., 2002, *Myb*-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis, *Planta*, 215, 924-933.
- 24) Azuma, A., Kobayashi, S., Mitani, N., Shiraiishi, M., Yamada, M., Ueno, T., Kono, A., Yakushiji, H. and Koshita, Y., 2008, Genomic and genetic analysis of *Myb*-related genes that regulate anthocyanin biosynthesis in grape berry skin, *Theor. Appl. Genet.*, 117, 1009-1019.
- 25) 八幡昌紀, 勝見 樹, 香取千文, 橋本 望, 古田真子, 周藤美希, 富永晃好, 向井啓雄, 安田喜一, 國武久登, 2022, スノキ属在来野生種ナガボナツハゼの *in vitro* シュートへのコルヒチンおよびオリザリン処理による倍加個体の作出とその特性, *園学研*, 21, 1-10.
- 26) Azuma, A., 2017, Genetic and environmental impacts on the biosynthesis of anthocyanins in grapes, *Hort. J.*, 87: 1-17.
- 27) Azuma, A., Udo, Y., Sato, A., Mitani, N., Kono, A., Ban, Y., Yakushiji, H., Koshita, Y. and Kobayashi, S., 2011, Haplotype composition at the color locus is a major genetic determinant of skin color variation in *Vitis* × *labruscana* grapes, *Theor. Appl. Genet.*, 122, 1427-1438.
- 28) 小原敬弘, 田中満稔, 又川浩司, 矢野臣祐, 2008, 軟 X 線照射花粉を利用した 'トサブentan' の無核果実生産, *高知農技セ研報*, 17, 81-88.
- 29) Sugiyama, K. and Morishita, M., 2000, Fruit and seed characteristics of diploid seedless watermelon (*Citrullus lanatas*) cultivars produced by soft-X-irradiated pollen, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 69, 684-689.
- 30) Nakajima, I., Kobayashiand, S. and Nakamura, Y., 2000, Embryogenic callus induction and plant regeneration from unfertilized ovule of 'Kyoho' grape, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 69, 186-188.
- 31) Murayama, T., 1989, Plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* via embryogenesis, *Plant tissue culture letters*, 6, 152-154.
- 32) Rajasekaran, K. and Mullins, M. G., 1979, Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines, *J. Exp. Bot.*, 30, 399-407.
- 33) Chiancone, B., Tassoni, A., Bagni, N. and Germana M. A., 2006, Effect of polyamines on in vitro anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan, *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 87, 145-153.
- 34) Ebadia, A., Aalifar, M., Farajpourcand, M. and Fatahi Moghaddam, M. R., 2016, Investigating the most effective factors in the embryo rescue technique for use with 'Flame Seedless' grapevine (*Vitis vinifera*), *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 91, 441-447.
- 35) Prado, M. J., Rodriguez, E., Rey, L., González, M. V., Santos, C. and Rey, M., 2010, Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis-regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers, *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 103, 49-59.
- 36) Schellenbaum, P., Mohler, V., Wenzel, G. and Walter, B., 2008, Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (*Vitis vinifera* L.), *BMC Plant Biol.*, 8, 78.

紀 要 委 員 会

委員 長 川 邊 隆 大  
委員 平 野 将 司  
佐 藤 祐 介

---

EDITORIAL COMMITTEE OF PROCEEDINGS

Chairman Takahiro Kawanabe  
Member Masashi Hirano  
Yusuke Sato

Published by  
School of Agriculture, Tokai University  
9-1-1 Toroku, Higashi-ku, Kumamoto-shi, Kumamoto,  
862-8652, Japan

---

東 海 大 学 紀 要 農 学 部

第42巻 2023

2023年3月15日発行

発行所 東海大学農学部  
〒862-8652 熊本県熊本市東区渡鹿9丁目-1-1  
電話 096(382)-1141

印刷所 有限会社ベストプロセス  
〒862-0920 熊本県熊本市東区月出3丁目2-62  
電話 096(284)-1628

---

# PROCEEDINGS OF SCHOOL OF AGRICULTURE TOKAI UNIVERSITY

---

Vol. 42    2 0 2 3

---

Determination of Acetaminophen *O*-sulfate and Tyrosine *O*-sulfate by High-performance Liquid Chromatography with UV Detection

..... Chihiro Morita, Yusaku Motoyama, Reoma Taniguchi, Yuto Ueda, Hideki Kinoshita,  
Masateru Ono, Katsuhisa Kurogi, Yoichi Sakakibara, Masahito Suiko and Shin Yasuda ..... 1

Verification of multidrug sterilization effect in pig feces and change in taste of pork by administering yogurt made with bacteriocin-producing lactic acid bacteria

..... Yudai Fukuchi, Rinka Haraguchi, Takeshi Yamanaka, Yuki Nakashima Tomoyuki Hibi,  
Kotone Onuki, Takashi Kotaka, Atsumi Morikawa, Hiroshi Kaneko Yushi Nakano Naoyuki Ishii,  
Masanori Ito, Kazuhiro Urabe, Shin Yasuda, Junichi Ishikawa, Mitsuharu Ishida  
and Hideki Kinoshita ..... 9

Methods of pseudo-fertilized ovule culture and anther culture for induction of haploidy in grapevine 'Kyoho' and 'Shine Muscut'

..... Kiichi Yasuda, Yuki Nakamura, Shinya Hirota, Ryo Matsunaga,  
Kento Suzuki, Hiroshi Kaneko, Akiyoshi Tominaga and Masaki Yahata .....21