

を備えていることも明らかにできた。以上をとりまとめると、この化学合成的研究遂行の結果により、全く新たな美白化粧品素材の、極めて強力な候補として提案できたこととなる。

ここで、発想を全く転換して、新規美白化粧品素材候補を天然素材から探索することにし、その詳細を第二章に構成した。従来の美白関連化粧品素材はそのほとんどが植物材料に限定されていた。著者の所属している生物機能化学研究室では長年にわたり昆虫を材料とした化学的研究、特にカイコの休眠ホルモン研究を行ってきており、その一環として、昆虫のN-アセチルドーパミン(NADA)多量体を含むカテコールアミン誘導体についても、現在研究中である。昆虫は漢方薬素材として一部で使用されているにもかかわらず、これを美白化粧品の材料とする研究は皆無であった。そこで、昆虫材料の中に新美白化粧品素材の候補を探すこととしたのである。蟬の抜け殻(蟬退)は解熱や抗炎症機能を持つとされる漢方薬である。この材料に関する極めて最近の研究では、NADA二量体の多種異性体中の二つが単離構造決定されているが、NADA二量体類はクロロゲン酸と同様、類似のカテコール部分構造を含む。そこで、このNADA二量体を蟬退より精製し、美白剤としての可能

性を探った。化粧品として実用化するためには、抽出などの試料取り扱い条件が厳しく限定される。そこで、メタノール-ジクロロメタン混液が使用されていた従来の抽出条件を再検討することから開始した。その結果、化粧品の許可範囲であるエタノールやエタノール-水混液でも標的とする二量体を抽出できることを見だし、実用化上の障害を除くことができた。ついで、得られたNADA二量体の位置異性体および立体異性体についてチロシナーゼ阻害活性の有無を検討した。その結果、NADA二量体の異性体はいずれも明瞭な阻害活性を示すことを明らかにするとともに、異性体の種類により、阻害機構が異なるという興味深い事実を明らかにできた。この異性体の中でも、トランス異性体の一種は特に阻害活性が強く、現在美白剤として実用化されているアルブチンを凌駕するほどであった。この結果は、天然物の中から全く新規な美白剤候補を発見し、提案するところとなった。

以上述べたように、本研究では化学合成および天然物有機化学的視点の両面から新美白化粧品素材開発を目指してきたが、その結果、二種類の、全く新規、かつ、極めて有力な美白剤候補を提案することができた。

生物機能応用科学専攻

氏名	サンタサップ チュチャート
学位記番号	生博 甲第 125 号
学位記授与の日付け	平成 14 年 3 月 25 日
学位論文題目	Development of Novel Rhizobium Inoculants for the Improvement of Bean Production in Northern Thailand (北タイにおけるマメ科作物の生産性向上を目的とした新規根粒菌接種資材の開発)
論文審査委員	主査 教授・小畑 仁 教授・田代 亨 教授・久松 眞 助教授・妹尾 啓史 新潟大学 教授・大山 卓爾

要 旨

タイ北部山岳地帯では、換金作物の一つとしてインゲンの栽培が推奨されている。この地域には肥沃度の低い土壌が多く、また、経済的な理由から化学肥料の施用が

必ずしも十分に行えないことから、高い窒素固定能を有する根粒菌の接種利用が広く行われている。根粒菌接種資材には、(1) 経済性、(2) 良好な保存性、(3) 高い根粒占有能力(接種した根粒菌が土着の根粒菌よりも優先

的にマメの根に根粒を形成する能力) (4)高い窒素固定能力, が要求される。しかし, 従来一般的に用いられてきたピートを担体として作製された根粒菌接種資材は, (2)~(4)の点を必ずしも十分に満たすものではなかった。そこで本研究では, これらの点を改善した新規な根粒菌接種資材を開発することを試みた。

まず, 資材作製に用いる根粒菌の生理的状态の側面から検討を行った。インゲン根粒菌 *Rhizobium tropici* CIAT899 を飢餓培養すると, 高い菌密度で数ヶ月間生残でき, この時には Al^{3+} と Mn^{2+} のストレスに対する耐性が高まり, タイ北部に広く分布する Al^{3+} と Mn^{2+} の含量の高い酸性土壤に接種した時の生残性が向上することを見出した。土壤での生残性の向上は土着菌よりも優先した根粒形成に有利である。この結果から, 飢餓生残状態にした菌体を用いて根粒菌資材を作製することが保存性と根粒占有能力を高めるために望ましいと考えられた。

次に根粒菌資材を作製する際の担体として新規な素材を用いることにより, 資材の保存性, 土壤中での生残性, 根粒占有能力をさらに高めることを試みた。火山灰土壤団粒, 木質炭化物, 焼結ケイソウ土など数種の多孔質素材を選定し, それらを担体として CIAT 899 を飢餓生残期に至るまで培養し, 緩やかに乾燥して接種資材を作製した。乾燥状態の資材を室温で保存したところ, いずれの多孔質素材の場合も1年の長期保存の後にも資材中で高い根粒菌密度が維持された。また, これらの資材を土壤に接種したところ, 菌体のみを接種したときと比較して, CIAT 899 の生残性が高まった。多孔質素材に含まれる毛管孔隙が乾燥状態での資材の保存の際に根粒菌の生残部位となること, また, 土壤に接種された際に細菌を捕食する原生動物から菌体を保護する役割を果たすことが推察された。

多孔質素材を担体として作製した根粒菌資材が根粒形成に及ぼす影響をポット試験ならびに圃場試験で調べた。播種の際に少量の資材を種子の直下に施用してインゲンを栽培した。その結果, 従来広く用いられてきたピート

を担体とした資材と比較して, 根粒数, 根粒重, 接種菌による根粒占有率が著しく上昇した。根粒の大部分は根の上部に形成され, サイズの大きな成熟した根粒の形成が目立っていた。これらの傾向は土壤団粒を担体として用いた場合に特に著しかった。以上のような根粒形成の状況から考えて, 栽培するインゲンの品種と親和性が高く, 栽培する土壤環境で高い窒素固定能を発揮する根粒菌株を選抜して資材を作製することにより, インゲンの生育促進と収量増加を達成できると推察された。

ところで, 圃場試験において, 接種根粒菌の占有率を調べる, すなわち, 個々の根粒が接種根粒菌によって形成されたのか, 土着根粒菌によるものなのかを判定するためには, 従来免疫学的な手法が用いられてきた。しかし, 抗体の作製に時間と費用がかかるため, これに代わる方法の確立が望まれていた。圃場試験ではサンプリングした根粒は, 保存のために乾燥することが通常行われる。この乾燥根粒に含まれる根粒菌のゲノム DNA を抽出・精製し, Repetitive DNA PCR fingerprinting を行って, 根粒菌株を識別する手法を開発した。乾燥根粒に含まれる根粒菌からの DNA の様々な抽出・精製法を検討した結果, 次のような簡便な方法で得た DNA を鋳型とした Repetitive DNA PCR fingerprinting により, 根粒菌株の識別を行うに足りるクリアーな fingerprint が再現性良く得られることが見出された。(1)滅菌水で膨潤させた乾燥根粒を破碎し, 根粒菌体の懸濁液を得る, (2)懸濁液を加熱し, 根粒菌ゲノム DNA を抽出する, (3)エタノール沈殿法により DNA を粗精製する, (4)粗製精した DNA を Sephadex G-50 カラムで精製する。上記の圃場試験における接種根粒菌による根粒占有率はこの方法によって調べたものである。

以上の結果から, 本研究で開発した手法を用いて作製した根粒菌接種資材は, 保存性と根粒占有能力に優れ, しかも土壤団粒や木質炭化物は現地で安価に入手できることから経済性にも優れており, タイ北部におけるインゲンの生産性向上に大きく貢献できる可能性を有していると考えられた。