

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

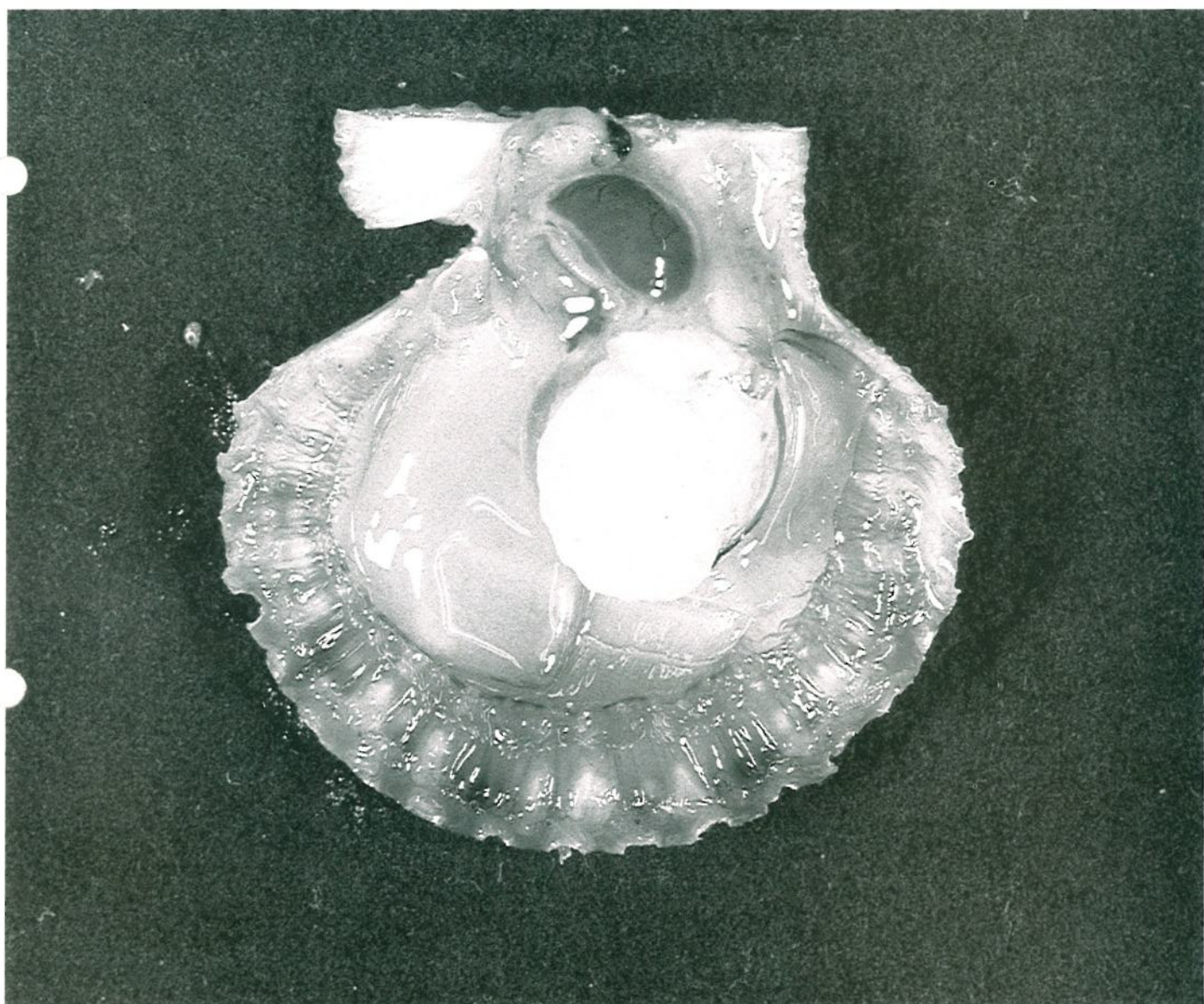
TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 4 号

JANUARY 15, 1988



ヒオウギガイ 3 倍体 (満 11 ヶ月)
生殖腺の発達が悪く、消化管が透けて見える
(性別不明)

(本文 1 ページ参照)

| | | |
|-----------------------|---------------|----|
| 本 号 の 紙 面 | 国内情報..... | 1 |
| | 水産, 育種, 遺伝子操作 | |
| | 文献情報..... | 16 |
| | 特別情報..... | 21 |
| | 外国特派員便り..... | 28 |
| | お知らせ..... | 31 |

目 録

国内情報

染色体操作と貝類の育種

——二枚貝人為3倍体の作出——…………… 1

エレクトロポレーションによる外来遺伝子の導入…………… 4

雑種細胞の物理的選抜法…………… 7

カンキツの合成周縁キメラの作出法…………… 10

フキ葉肉プロトプラストからの植物体再生…………… 12

文献情報

担子菌 *Schizophyllum commune* の電気融合…………… 16

トマトの葉肉プロトプラストからの再分化

プロトプラスト培養と植物体再分化の効率化に重要な要因…………… 17

Thalictrum minus におけるベルベリン生産能力の高い

コロニー選抜のための新しいバイオアッセイシステム…………… 18

透明帯除去ハムスター卵子に体外受精させた豚精子の

染色体の観察…………… 19

特別情報

海洋微生物研究の展開方向…………… 21

米国での海洋バイオテクノロジー研究とリタ・R・コルウェル教授…………… 27

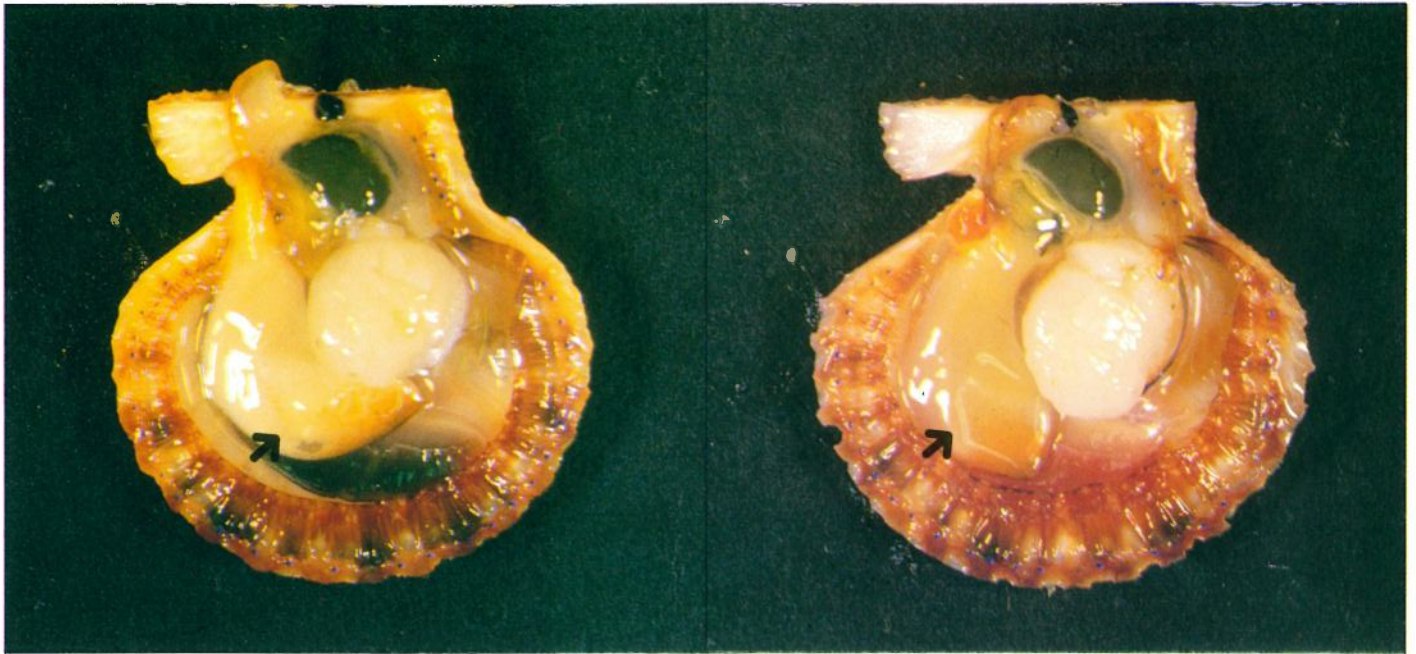
外国特派員便り

第12回国際食用きのこ会議に参加して…………… 28

お知らせ

遺伝資源配布あっせん事業…………… 31

植物遺伝資源配布目録…………… 31



染色体操作と貝類の育種 (本文1ページ参照)

左：ヒオウギガイ 2倍体雌の全体像 (満11ヵ月)

雌の生殖腺 (矢印) はオレンジ色で、産卵期には雌雄を肉眼で判別できる (雄の生殖腺は乳白色)

右：ヒオウギガイ 3倍体の全体像 (満11ヵ月)

生殖腺 (矢印) の発達は悪く、しかも半透明で、消化管がすけて見える (性別不明)

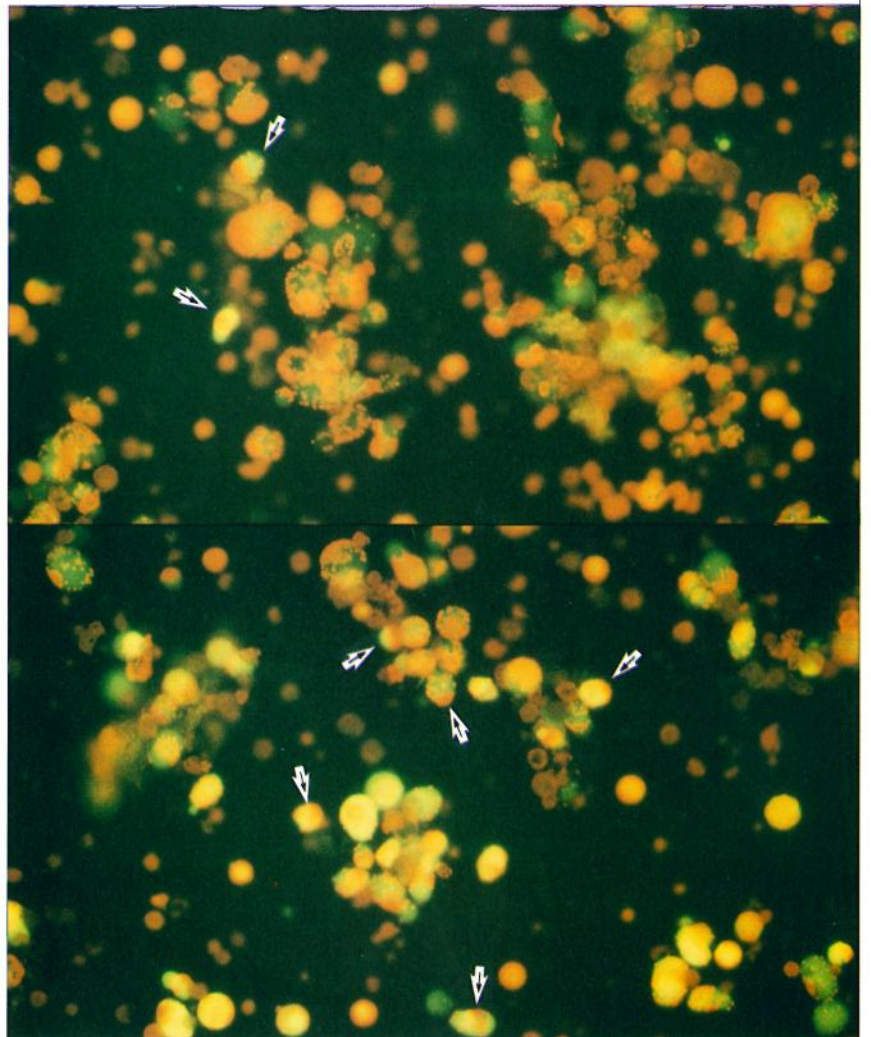
雑種細胞の物理的選抜法

(本文7ページ参照)

上：融合直後のプロトプラスト集団

下：ソーティング後のプロトプラスト集団

矢印は雑種プロトプラスト



国内情報

染色体操作と貝類の育種

——二枚貝人為3倍体の作出——

水産庁養殖研究所

和田克彦

はじめに

水産動物の染色体操作は人為倍数体や人為単為発生などが考えられ、近年魚貝類を中心に急速に研究が進みつつある。倍数体や単為発生は自然界でも特殊な種においてその存在が知られていた。また、実験動物として発生学や遺伝学の材料として用いられる両生類、棘皮動物、軟体動物あるいは魚類などでも人為的に倍数体や単為発生を誘発することはかなり古くから行われている。しかし産業的価値のある生物でこれらの原理を応用して、染色体操作を応用し育種に結びつけた研究はごく近年になるまで行われなかった。

魚貝類では人為倍数体の研究は多くの種で研究されており、主として成熟分裂あるいは第一卵割の阻害による方法がとられている。目的としては、細胞の大型化、不妊化、雑種の利用が考えられている。また人為単為発生には雄の遺伝子を破壊し、雌のみの遺伝子で発生させる雌性発生および逆に卵の遺伝物質を壊して精子由来の遺伝子で発生させる雄性発生之二つが考えられる。この応用は、性決定に与える遺伝の影響が強い種では性の統御(例えば全雌魚の生産)、片親によく似た子を多数作る選抜育種の効率化、ホモ接合体の確率の増大による悪性遺伝子の除去などが想定されている。

これらのうち、人為単為発生については貝類では、まだ正常な個体が得られたという報告はなく、将来の課題である。したがって、ここでは貝類の人為3倍体について当所で行っている研究について述べる。なお、アワビ類については北里大学を中心にエゾアワビで行われており、既に総説が出ているので参照

されたい¹⁻³⁾。

二枚貝で3倍体が誘起されたのは米国産のカキ *Crassostrea virginica* が初めてであろう⁴⁾。その後オオノガイの類 *Mya arenaria*⁵⁾、イタヤガイの類 *Argopecten irradians*⁶⁾ およびマガキ *Crassostrea gigas*⁷⁾ などがそれに続いている。これらは全て米国で行われた研究であり、いずれも受精直後のサイトカラシンB(以下CBと略)で処理することにより3倍体を誘起している。この他、加圧処理や高温処理により3倍体を誘起しようとした試みはあるが、CB程に利用されていない。日本では二枚貝を用いたこの類の研究は少ない。そこで我々は、当所周辺で養殖が行われている二枚貝としてヒオウギガイとアコヤガイをとりあげ、人為3倍体の誘起条件と育成された倍数体の育種への利用の研究を始めた。ヒオウギガイはイタヤガイ科に属し近年西日本で養殖が盛んになりつつあり、ホタテガイのように閉殻筋(貝柱)のみを利用できるほか、軟体部全体を食用に供することもできる。水温や塩分の急変にやや弱い難点があり、育種によって養殖に適した品種の育成が望まれている。アコヤガイはよく知られているように、日本を代表する養殖業である真珠養殖に用いられている母貝であるが、近年死亡率が高くなり問題となっている。人為3倍体の研究は、不妊化を利用して、成熟時や産卵期の死亡や味の低下などを防ぐことあるいは真珠養殖における挿核手術への利用などを目的に研究が行われている。

1. 倍数体の判定法の開発

両種の染色体数については既に Wada (1976)⁸⁾、Komaru & Wada (1985 a)⁹⁾ および Komaru & Wada (1985 b)¹⁰⁾ によって、

アコヤガイで $2n=28$ およびヒオウギガイで $2n=32$ と判明している。人為3倍体が誘起できたかどうかを判定するには種々の方法が考えられる。それらは、第一あるいは第二極体の放出が阻止されるのを直接顕微鏡で観察する方法が最も早い、卵が小さい種ではなかなか難しい。次に卵割中の染色体数を数えることは、押しつぶし法やドロップ法で可能であるが、これらもトロコフォーラ期の細胞のエアードライ法と同様、明瞭な中期核板を多数得るためには多大の時間と労働を必要とする。D型幼生以降成貝に至るまでは分裂細胞自体を得るのが難しく、染色体像を得ることは一層手間を必要とする。倍数性を判定するには、染色体を計数することが最も確実な方法であり、最終的には、これによらなければ染色体操作が成功したかどうかはわからない。しかし上述のように、貝類では染色体の観察技術が未熟であるため、著しく能率が悪く、多数の個体を分析するには時間と忍耐を必要とする。魚類では、赤血球の核の大きさが倍数体では大きいので、その大きさに判定される場合が多いようである。ほとんどの貝では、赤血球がないのでこの方法は使えない。そこで近年進歩の著しいDNAの蛍光染色法を応用して、静止期(間期)の核のDNA量を相対的に比較する方法が用いられるようになって来ている。米国で行われた二枚貝の3倍体の研究では、この原理を応用したフロ

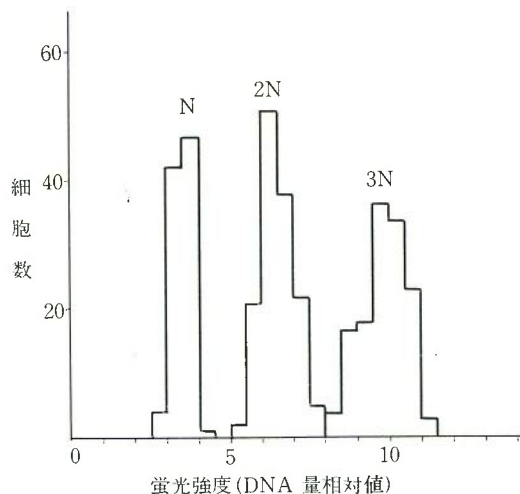


図1. 顕微蛍光測光法によるヒオウギガイの倍数性の判定(N:精子, 2N:2倍体鰓細胞核, 3N:3倍体鰓細胞核), 古丸(1987)¹³⁾

ーサイトメトリーという方法がとられている。ところが、この手法を用いるには、非常に高価なセルソーターが必要であるうえ、材料の標本を調整するのに手間がかかる欠点がある¹¹⁾。そこで、我々は培養細胞などで用いられている顕微蛍光測光法を用いたところ、より安価で簡便な方法を用いて大量のサンプルの倍数性を判定することができるようになった。以下にその方法について簡単な述べる^{12, 13)}。

まず、後述する方法で、CBにより処理された受精卵から発生した稚貝の鰓細胞の染色体を通常のエアードライ法で観察した。染色体により倍数性を判定された個体の鰓細胞(染色体用にカルノア液で固定されたもの)を50%酢酸中で切りきざみ、単離された細胞をスライドガラスに滴下し乾燥する。この状態で冷蔵庫に保存すれば、一日程度結果は変わらない。スライドガラス上にはコントロールとして精子あるいは正常2倍体の細胞も同時に滴下しておく。DNAの染色はDAPI液で行い、カバーガラスで封入したものを蛍光顕微鏡の励起光(紫外線)で照射し、核1個あたりの蛍光量を顕微測光装置により測定する。図1にヒオウギガイの結果の一部を示した。2nおよび3n個体の平均蛍光値は、コントロールとして用いた精子核の約2倍および3倍の値であり、蛍光の強さは倍数性にほぼ比例していた。このDAPI染色と顕微蛍光測光法を組合せた方法は、①精度が高く、DAPIによる蛍光は紫外線で励起しても退色がややゆるやかで安定している、②染色等操作が非常に簡単である、③全ての発育段階のほとんどの組織の細胞の倍数性を判定できる。もちろん血球の核でも測定できるので、採血可能なサイズに達したものであれば生かしたまま判定ができる、などの特徴があり、貝類のみでなく魚類の倍数性判定法として広く利用しうると思われる。

2. 人為3倍体の誘起条件の検討^{14, 15, 16)}

二枚貝では3倍体を誘起する処理法としてはCB(0.1~1 mg/l)、水圧(200~600 kg/cm²)、高水温(35~36°C)などが試みられてい

るが、稚貝以上にある程度数を量産できたのはCBのみであろう。我々はヒオウギガイの受精卵を0.1mg/lと0.5mg/lのCB海水に一定時間浸漬した後、DMSO(100 μ l/l)で洗滌することによって、極体放出の阻害による3倍体の誘起を試みた。その結果0.5mg/lの濃度で媒精後15分から15分間の処理区で59個体中39個体(66.1%)で3倍体の稚貝が得られた(表1)。同じ濃度で媒精後20分から10分間処理を行った区では、30個体中14個体(46.7%)が3倍体であった。0.1mg/lで媒精後15分から30分まで処理した区では、3倍体は得られなかった。この他媒精後20分から10分間200kg/cm²の水圧を加えることにより、30個体中7個体の3倍体の作出例がある。ヒオウギガイの第一極体は水温26°Cでは、媒精してから20~25分ごろに放出されるので、これらの処理法では第一還元分裂が阻害されて3倍体が誘導されたと考えられる。

次にアコヤガイでの実験例では、CB(0.1mg/l)海水で媒精後15分から15分間(25°C)処理した区で77%(17/22)、また5分後から15分間の区で40%(8/20)の3倍体稚貝が得られた。この場合、前者で第二極体、後者で第一極体の放出が阻止されて3倍体が誘起されたものと思われる。この他の例としては、0.5mg/l CBで媒精後20分から30分間の処理で、100%(20/20)の稚貝が3倍体になった(同じ時間帯で0.1mg/l CBでは80%(16/20))。また低温処理(6~7°C)でも3倍体の稚貝が作出できたが、幼生の歩留りが低く、3倍体の割合が高くかつ幼生の生残率のよい条件の検討が必要である¹⁶⁾。このように、現在までのところCBが3倍体の量産には最も

表1 ヒオウギガイの人為倍数体の出現率の比較
(古丸, 1987)¹³⁾

| 処理法 | 無処理 対照区 | サイトカラシB 0.5mg/l | サイトカラシB 0.1mg/l |
|------------|------------|--------------------|--------------------|
| 分析 個体数 | 20 | 59 | 28 |
| 2倍体 | 20 | 20 | 28 |
| 3倍体 (%) | 0 (0) | 39 (66.1) | 0 (0) |

注) 受精後15分から15分間処理。倍数性の判定は5カ月齢の稚貝の鰓細胞のDNA量の比較によった

適当な処理法と言えるが、特に初期発生に及ぼす影響をできるだけ少なくする方法の開発が必要である。

3. 人為3倍体における配偶子形成¹⁴⁾

育種への応用が最も注目される人為3倍体の特徴は、不妊性であろう。魚類の場合、3倍体雌の卵形成は抑制されるが、雄は種によっては精子の形成や二次性徴が現われることがあるという。これまで人為3倍体二枚貝の生殖腺の季節変化を詳細に追跡した例は少なく、カキやイタヤガイ科の種で産卵期に成熟がおこらなかったという報告がある程度である。我々は作出できた人為3倍体ヒオウギガイを養殖場で飼育し、定期的に採取して生殖腺などの観察を行っている。これまでのところ、産卵期になっても3倍体の生殖腺は、2倍体と異なり肉眼で雌雄を判別することは困難であった。組織学的な調査では、2倍体の生殖腺が精子あるいは卵母細胞で満たされている時期でも、人為3倍体の生殖腺の内部にはすき間のある個体が多かった。これまでの観察では成熟した卵や精子の認められた人為3倍体はなかった。しかし少数の卵母細胞を持つ個体や精母細胞を持つ個体も観察され、配偶子の形成がある程度進行する個体もみられるようである。

更に詳細な生殖腺の観察に加え、成長、生残、生理学的特性などの調査が必要である。また、アコヤガイについても同様の調査を行う予定である。

おわりに

CBによって作出された人為3倍体マガキの種苗が既に米国で商業的に生産されており、日本にも逆輸出されようとしているという。マガキはJapanese oysterと呼ばれ、もともと日本原産で毎年種苗が米国や仏国に輸出されている。米国西岸には適当な養殖カキ類がないのでマガキが盛んに養殖されているが、天然採苗が難しいため、人工採苗が行われるようになり育種の研究が進みつつある。米国食品医薬品局(FDA)は1985年6月にCBで作出したカキの安全宣言を行ったという。

日本では天然種苗が豊富なためか、コスト的に見合わないためか、マガキを人工採苗しようという動きはあまりない。しかし、最近になって広島県のように人工採苗や育種の研究を開始したところもあり、その他の二枚貝についても各地の水産試験場などで染色体操作の研究が行われつつある。二枚貝の育種研究が染色体操作を契機に一層進展することを期待したい。

文 献

- 1) 荒井克俊・内藤文隆・藤野和男(1984) 東大海洋研大槌臨海研究センター報告 9 : 74-78
- 2) 内藤文隆・荒井克俊・藤野和男(1985) 水産育種 10 : 19-25
- 3) 藤野和男(1987) 第7回基礎育種学シンポジウム報告(岐阜大学) p. 29-39
- 4) Stanley, J. G., S. K., Allen, Jr. & H. Hidu, (1981) *Aquaculture* 23 : 1-10
- 5) Allen, S. K. Jr., P. S. Gagnon, & H. Hidu, (1982) *J. Hered.* 73 : 421-428
- 6) Tabarini, C. L. (1984) *Aquaculture* 42 : 151-160
- 7) Chaiton, J. A. & S. K., Allen, Jr. (1985) *Aquaculture* 48 : 35-43
- 8) Wada, K.T. (1976) *Jap. J. Malacol. (Venus)* 35 : 9-14
- 9) Komaru, A. & K.T. Wada. (1985a) *Bull. Res. Inst. Aquaculture* 7 : 105-107
- 10) Komaru, A. & K. T. Wada. (1985a) *Jap. J. Malacol. (Venus)* 44 : 249-259
- 11) Allen, S. K., Jr. (1983) *Aquaculture* 33 : 317-328
- 12) 内村祐之・古丸明・和田克彦・家山博史・山本勝・古田弘文(1987) 水産育種 12 : 57-70
- 13) Komaru, A., Y, Uchimura, H. Ieyama, & K.T. Wada (1987) *Aquaculture* (in press)
- 14) 古丸明(1987) 養殖 8 : 74-77
- 15) 和田克彦・古丸明・内村祐之・林崎孝志(1987) 日本水産学会昭和62年度秋季大会講要 p 148
- 16) 和田克彦・古丸明・内村祐之 (未発表)

国内情報

エレクトロポレーションによる 外来遺伝子の導入

農林水産省九州農業試験場

西口正通

はじめに

植物に外来遺伝子を導入し形質転換させる方法として、根頭癌腫病の病原細菌であるアグロバクテリウムを利用する手法が確立されている。この手法はアグロバクテリウムに含まれる Ti プラスミドの T-DNA と呼ばれる部分が、細菌の感染により植物の染色体に組み込まれる現象を利用している。したがって、この手法による形質転換の対象植物は、アグロバクテリウムの感染宿主に限定される。それらは主に双子葉植物であり、イネ、ムギ等の重要作物を含む単子葉では一部の例外を除き適用できない。

一方、最近微生物を介さずに遺伝子を直接

細胞に導入し、形質転換させることが行われている。これは直接遺伝子導入法と呼ばれるが、目的とする遺伝子およびその上流と下流に各々植物で機能するプロモーターおよびターミネーターをもつ DNA をプロトプラストに導入し、形質転換植物を得る方法である。これは微生物の機能を利用しないので、対象とする植物は双子葉、単子葉を問わない。

遺伝子をプロトプラストに導入する方法として、ポリカチオン法、リボソーム法、ポリエチレングリコール法およびマイクロインジェクション法等があるが、最近注目されているものにエレクトロポレーション (electroporation) による手法がある。これは短い電気パルスを与えることによりプロトプラストの細胞膜に一時的に孔を明け、遺伝子の導入

をはかるというものである。エレクトロポレーションという言葉は Neumann (1982)¹⁾により用いられたのが最初であると思われる。電気の意の「electric」と孔形成の意の「pore formation」を合わせてエレクトロポレーション (electroporation) とつけられた。

現在エレクトロポレーションには2種類のタイプのパルス波形、減衰波および矩形波が用いられている。前者は装置が簡単で安価であり、後者はパルス波形の条件を細かに制御することができるという特徴をもっている。

ここでは筆者らが矩形波を用いて行った研究を中心にして述べてみたい。

1. ウイルス粒子およびウイルスRNA導入

プロトプラストへ導入するマーカー遺伝子としてウイルスを用いて行った結果²⁾について述べる。この系の特徴はウイルス粒子あるいはウイルスRNAがプロトプラストに導入されると、自己増殖し多くのウイルス粒子ができる。したがって、ウイルスに特異的な蛍光抗体でプロトプラストを染色すれば、ウイルスが導入されたプロトプラストと導入されなかったプロトプラストが区別でき、プロトプラスト集団中でウイルスの導入された割合を感染率が表わすことができる。しかもプロトプラストの培養は1~2日で十分であるから短時間で結果がでる。逆に、この系では導入されたウイルスの数については明らかではない。

タバコモザイクウイルス (TMV) 粒子あるいはTMV-RNAをタバコ葉肉プロトプラストへ導入したが、TMV粒子は長さ約300nm、幅約18nmの桿状をしており、分子量約 4×10^4 キログルトン、TMV-RNAは約6.4kbからなる一本鎖で分子量は約 2×10^3 キログルトンである。

通常エレクトロポレーション用のチャンパーとして、筆者らは分光光度計用のマイクロキュベットに電極としてアルミホイルを固定して使用している。エレクトロポレーションに関係する要因としてパルス時間、電界強度 (電圧を電極間の距離で割った値、V/cmで表わされる) などがあるが、表1は電界強度

表1 タバコ葉肉プロトプラストの生存率およびTMV粒子、TMV-RNAの感染に及ぼすパルス時間の影響 (Nishiguchi *et al.* 1987)²⁾

| 実験番号 | 導入物質 | パルスの長さ(ミリ秒) | | | | | | | | | |
|------|---------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 0 | 0.1 | 0.2 | 1 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 30 |
| 1 | TMV-RNA | 0 (90) | 65 (87) | 85 (86) | 86 (63) | | | | | | 87 (43) |
| | TMV粒子 | 0 (85) | | 4 (72) | | | | | | | 89 (64) |
| 2 | TMV粒子 | 1 (82) | | | 19 (80) | 31 (81) | 38 (78) | 42 (78) | 54 (76) | 60 (71) | |

数字は、プロトプラストのウイルス感染率 (%) を示し、カッコ内の数字は、プロトプラストの生存率 (%) を示す

を一定にしてパルス時間を変化させたときのプロトプラスト生存率およびTMV粒子、TMV-RNAの感染率を示したものである。プロトプラストの生存率はパルス時間が長くなるに従って低下する。ウイルスの感染はTMV-RNAについては0.2ミリ秒でプラトーに達するのに対し、TMV粒子では10ミリ秒のパルスでプラトーに達した。このことはパルス時間の長さによりプロトプラスト表面に生ずる孔の大きさが異なり、長くなるにしたがって、孔が大きくなりTMV粒子のような大きな物質がプロトプラストに導入されると考えられる。

図1はTMV-RNAを用い電界強度 (電圧) の影響をみたものであるが、500V/cm (150V) でプラトーに達する。一方、TMV粒子で行った実験においては電圧が高くなるにしたがって生存率は低下し、ウイルス感染は583V/cm (175V) で最大になった。同じ10ミリ秒のパルスで比較するとTMV-RN

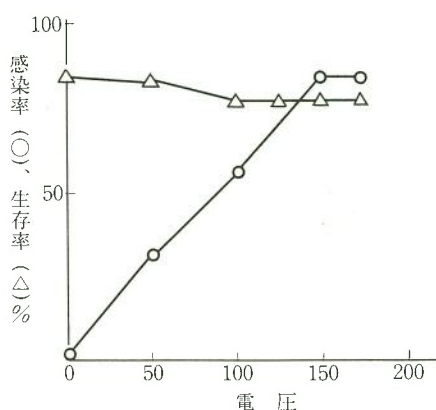


図1 タバコ葉肉プロトプラストの生存率およびTMV-RNAの感染に及ぼすパルス電圧の影響

A導入の方がより低い電界強度で最大になる。

添加するウイルスの濃度についてはTMV粒子およびTMV-RNAの場合各々 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ および $10\mu\text{g}/\text{ml}$ でプラトーに達することがわかっている。またプロトプラストの密度は通常 $1\sim 3\times 10^5/\text{ml}$ で行っているが、これより高密度だと感染率は低下し、低密度では感染率は高くなり、ある程度プロトプラスト数を確保するため区を多くしなければならない。この他電界強度を用いる溶媒についてはマニトール溶液を用いているが緩衝液等の電解質の添加は電界強度を低下させ、導入効率を下げる。この点は緩衝液選定の必要な減衰波を用いる電界強度を用いるシステム^{3, 4)}と異なっている。

以上ウイルスをマーカー遺伝子として用いた実験により、電界強度の諸条件が明らかになった。これらの条件は次に述べるDNAの導入条件の参考になる。

2. DNAの導入

DNAをプロトプラストに導入する際によく使用されるマーカー遺伝子はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)あるいはネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ(NPT-II)などである。前者はクロラムフェニコール耐性遺伝子であり、その発現産物の検出方法が容易であるので主に遺伝子導入後の一過的な遺伝子発現を調べるのに使用される。後者はカナマイシン等の耐性遺伝子であり、プロトプラスト培養中の選択マーカーとして使用できるので導入遺伝子が染色体に組み込まれた形質転換植物を得る実験に用いられる。

筆者らはCAT遺伝子上流にカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーター、下流にTiプラスミドのノパリン合成酵素のターミネーターをもつプラスミドを用いたタバコ葉肉プロトプラストへ導入することを試みた⁵⁾。この実験系ではプロトプラストに導入されたプラスミドDNAは核へ移行し、その転写機構によりDNAからmRNAが合成され、細胞質に移動し翻訳されタンパク質がつくられる。このタンパク質を基質であ

るクロラムフェニコールとともに反応させアセチル化されたクロラムフェニコールを検出することになる。

1で述べた電界強度の条件を参考に、CAT遺伝子の導入を行った結果、プロトプラスト密度を 5×10^5 個/mlにして10ミリ秒のパルスで500V/cmの電界強度で与えたときCATの発現量が最大になった。これはTMV粒子導入の最適条件より少し弱い条件である。TMV-RNAの導入がプラトーになる0.2ミリ秒のパルスではCAT遺伝子の発現量はごくわずかであった。用いたプラスミドは約4.9kbの二本鎖DNA、分子量は約 3.2×10^3 キログラムであり、TMV-RNAより大きく、TMV粒子より小さい。三者の導入条件を分子量からだけで比較することはできないが、TMV粒子とTMV-RNAの両条件を指標にしてDNAの導入条件を設定することが可能であると考えられた。

このDNA導入においては図2のように、加えるDNA量にしたがってCAT遺伝子の発現量も直線的に増加した。またプラスミドDNAのほかにキャリアーDNAを加えるとCATの発現量が增大することも明らかになっている。

次のステップとして形質転換植物を得るためにNPT II遺伝子をもつプラスミドを用いた同様の実験を行っているが、前二者の実験(TMVおよびCAT)と異なり、この実験では電界強度後プロトプラスト

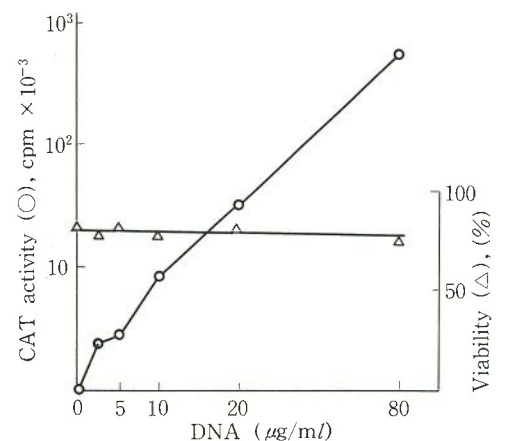


図2 タバコ葉肉プロトプラスト中のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)活性に及ぼすCAT DNA濃度の影響 (Nishiguchi et al. 1987)³⁾

トを培養し、分裂させ、さらに植物体に再生させなければならない。したがってDNAの導入条件としてはCAT実験と変わらないが、細胞分裂、再生をできるだけ阻害しないという要件が新たに加わる。

予備実験では、CATを用いて行ったエレクトロポレーションの最適条件は、細胞分裂等に影響をもたらす。またエレクトロポレーションをDNA存在下で行った区はDNAを含まない区よりもプロトプラストへのダメージが大きく細胞分裂頻度も低下する。したがってCAT遺伝子の発現の最適条件よりはやや弱い条件を使用することが望まれる。

実際にトウモロコシで行われた形質転換の実験ではCAT実験の条件より弱い値で行われている⁶⁾。エレクトロポレーションにより得られる形質転換率は1~2%といわれている^{6),7)}が、筆者らも同程度の頻度でカルスを得ている(西口ら、未発表)。

おわりに

エレクトロポレーションは他の遺伝子導入法と比較して、操作が容易であり、再現性も高く、現在までのところ、遺伝子の導入(一過的発現を含む)に用いられたのは、タバコ、ニンジン、トマトをはじめトウモロコシ、イネ、コムギなど双子葉、単子葉植物を問わない。ただプロトプラストを用いなければなら

ないので、形質転換植物を得るにはプロトプラストから植物体の再生可能な系に限定されている。この点さらにプロトプラストからの再生系の拡大が望まれる。一方、エレクトロポレーションによる遺伝子導入は完全に細胞壁をもたないプロトプラストでなくともおこり得るので、部分的に細胞壁をなくした細胞を用いて形質転換植物を得ることも考えられる。いずれにしてもエレクトロポレーションは今後ますます遺伝子の基礎的、応用的研究に用いられるだろう。

文 献

- 1) Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang & P.H. Hofschneider(1982) *EABOJ* 1: 841-845
- 2) Nishiguchi, M., T. Sato & F. Motoyoshi (1987) *Plant Cell Rep.* 6: 90-93
- 3) Fromm, M. E., L. P. Taylor & V. Walbot (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5824-5828
- 4) Okada, K., T. Nagata & I. Takebe (1986) *Plant Cell Physiol.* 27: 619-626
- 5) Nishiguchi, M., T. Sato & F. Motoyoshi (1987) *Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour.* 3 (in press).
- 6) Fromm, M. E., L. P. Taylor & V. Walbot (1986) *Nature* 319: 791-793
- 7) Shillito, R. D., M. W. Saul, J. Paszkowski, M. Müller. & I. Potrykus (1985) *Bio/Technology* 3: 1099-1103

国内情報

雑種細胞の物理的選抜法

農林水産省農業生物資源研究所
倉田啓而

はじめに

融合雑種細胞は2種のプロトプラストを化学融合剤または電気刺激で処理することによって得られるが同種融合プロトプラストと未

融合プロトプラストをも含むため、このまま培養すると多数の再分化個体の中から雑種個体を選抜しなければならず、広いスペースと多くの労力を必要とする。これを避けるためにはカルスまでの段階で選抜することが必要であり、従来は遺伝子マーカーを利用してき

た。プロトプラストにこのマーカ―を付与するには長時間をかけてその材料を作り出さなければならず、融合実験を始めるまでに時間がかかり、対象も制限されると同時に特定の形質を持つものが選抜される場合が多かった。

細胞融合の研究対象を一般化するためには遺伝子マーカ―に頼らず、マイクロマニピュレーターやセルソーターを利用することであり、その方法が検討されてきた。この方法だと種々の形質をもった雑種細胞の選抜が可能となる。マイクロマニピュレーターは選抜精度は高いが収量が少ない欠点を持つ。セルソーターは機械が高価であることと選抜精度の低いことに難点があるが、短時間に多量の雑種細胞をえることができる。ここではセルソーター利用の現状について紹介する。

1. 測定、分別、捕集の原理

セルソーターを使用して、細胞集団から特定の細胞を選び出すには基本的に2種のパラメーターを使う。一つには細胞のサイズ、いま一つには発光強度の差を利用する。植物プロトプラストは大きさが不均一であるため細胞のサイズは利用出来ず、発光強度が一般的に使われる。発光強度には植物細胞のもつ葉緑体やある種のアルカロイド (Serpentine) の発光する自家発光も使用できる。前者は488nmのレーザー光で励起すると680nmの赤色発光、後者では443nmの青色発光を発光する。一般的な植物培養細胞では発光物質が存在しないためFDAやFITCなどの発光染色剤で染色し、葉肉プロトプラストと組合わせて融合プロトプラストを作る

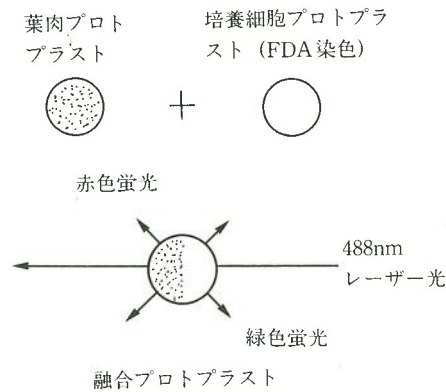


図1 雑種プロトプラスト認識の原理

と便利である。培養細胞どうしの場合にはもう一方をFITC (赤色発光を発する) で染色する。

このような材料から作った雑種プロトプラストにレーザー光を当てると2種の発光が観察され、その識別が行われる (図1)。雑種プロトプラストの分別は次のように行なわれる。プロトプラストは径100μmのシース液の水柱の中を一つずつ並んで流出され、レーザー光を通過するとき、雑種および非雑種プロトプラストに分析される。水柱はグラウンドプレートの位置で水滴となり落下するが、この時点でレーザー光で分析されたデータに基づき、水滴に(+)または(-)の電荷が与えられる。帯電した水滴はさらに落下し、偏向プレートにより左、右に引き寄せられ分別される。例えば、雑種プロトプラストに(-)荷電を与えると左側のチューブに集まる (図2)。

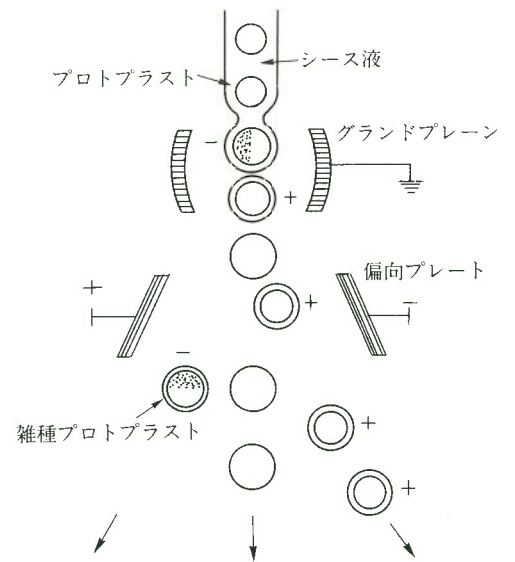


図2 雑種プロトプラスト分別の原理

2. 分別、捕集

雑種プロトプラストをセルソーターで分別するには幾つかの留意点がある。一つはソーティング条件の設定である。セルソーターは本来、動物細胞用に設計されたものであるため、これを脆弱な植物プロトプラストの分別に使用するためには種々の条件を設定する必要がある。私どもの使用したセルソーターはEPICS-Vである。ソーティング条件は

ノズルの孔径 $100\mu\text{m}$ 、ソーティング温度 4°C 、レーザー光 458 または 488nm で 400mW 、プロトプラストの流速 7m/秒 以下とした。使用フィルターはグリーン 525nm バンドパス、レッド 630nm ロングパスのものを使用した。これらの条件は機械の種類が限られるためいづれの研究者もほぼ同じである。

プロトプラストの調整も重要な課題で、材料植物の発育令ならびに分離用酵素の種類、濃度、処理時間などを検討し、物理的刺激に強いものを作ることである。また、直径が小さなプロトプラストの材料を選ぶのも一つの条件である。これは、 $100\mu\text{m}$ のノズルから秒速 7m の速度で噴き出されるため、多くの場合プロトプラストは破壊されてしまう。染色にはFITCまたはFDAをアセトンに溶解し、 $5\mu\text{g}/10\text{ml}$ の濃度となるようにプロトプラスト溶液に加え 15 分間染色を行なう。種々考慮して得たプロトプラストを用い、私どもの研究室で実験した結果⁵⁾、ペチュニア花卉、ナタネ、キャベツ、トマトの子葉およびタバコ、ナタネの培養細胞から得たプロトプラストは正常に分画された。このほか、ペチュニア、*Euphorbia*の葉⁶⁾、キャベツの葉、ナタネの胚軸⁴⁾、タバコ属の葉¹⁾、オオムギの葉とニンジンの培養細胞³⁾、*Catharanthus*の培養細胞³⁾、ムラサキの培養細胞⁷⁾等のプロトプラストが分別されている。

細胞融合法も重要な要素である。融合処理後のプロトプラスト集団を分析し、分別集団を決定しなければならない。これに相当量のプロトプラストを必要とするため、多量のプロトプラストを融合処理しなければならない。それには電氣的融合が適している。私どもはキャベツ葉肉プロトプラストと西洋ナタネ培養細胞プロトプラストとの融合を電気刺激により行なった。

以上の条件を整えてキャベツ葉肉と西洋ナタネ培養細胞プロトプラスト(FDA染色)との融合プロトプラスト雑種プロトプラストの分別・捕集を試みた。融合プロトプラスト集団の発光蛍光による2パラメーター分析ヒ

ストグラムは明瞭な3集団を示し、中央の集団が雑種プロトプラストの集団であった。融合時の雑種プロトプラストの割合は1%内外であり、ソーティング後50%となったことから約50倍に濃縮できたことになる。その結果をグラビア写真2に示す。

セルソーターで集めた雑種プロトプラスト集団にも半数に近い非雑種細胞が含まれていたが、その理由の一つにプロトプラストのサイズや比重の違いが考えられる。サイズや比重の異なるプロトプラストがシース液と共に移動するとき、プロトプラストの速度に違いが生じ、レーザー光で分析されたプロトプラストがグランドプレーンに至る僅かな距離を移動する時間のずれが、荷電のタイミングを狂わせたものと思われる。またFDA染色が十分に強くないと葉肉プロトプラストの持つ低強度の緑色蛍光と区別のつき難い場合も起こり、雑種プロトプラストの純度の低下を引き起こす原因となる。

おわりに

セルソーターを使用して雑種植物を得ているのはGalbraithのグループ¹⁾とGlimeriusのグループ⁴⁾のみであり、本機の本格的な実用化もこれからという段階である。セルソーターは日本のメーカーでも作られているが高価な機械であり、気軽に購入できるものではないので、共通利用するのが望ましい。

文 献

- 1) Afonso, C.L. et al. (1985) *Bio/Technology* 3: 811-816
- 2) Alexander, R.G. et al. (1985) *Protoplasma* 128: 52-58
- 3) Brown, S. et al. (1984) *Physiol. Veg.* 22: 541-554
- 4) Glimerus, K. et al. (1986) *Plant Science* 45: 133-141
- 5) 倉田啓而ら(1987) 日本育種学雑誌 37(別冊1): 128-129
- 6) Redenbaugh, K. et al. (1982) *Z. Pflanzenphysiol.* 107: 65-80
- 7) 山形光ら(1987) 日本農芸化学雑誌, 講演要旨集 62: 709

国内情報

カンキツの合成周縁キメラの作出法

農林水産省果樹試験場口之津支場
久原重松

カンキツの合成周縁キメラとしては Bizarria⁶⁾ が有名で、我が国では小林ミカン、金柑子温州が知られている^{5,7)}。カンキツの茎頂起原層は三層とされ各層の分担器官についてはすぐれた報告があり^{4,5,6,7)}、起原層第一層の分担器官は茎と葉の表皮、果皮の表皮と果肉であり、第二層のそれは葉の棚状組織と海綿状組織、茎の皮層、果皮のアルベドとフラベドの大部分で、第三層は葉、果実の維管束、茎の内皮と木部であるとされている。

合成周縁キメラはこれら三つの起原層のいくつかが異なったカンキツ品種の組織で構成されている。この場合起原層を構成している品種の遺伝的形質は、その起原層の分担器官上の形質として発現される強い傾向がある。この関係は分担器官の示す形質から合成周縁キメラの茎頂起原層における品種構成が推定されていることでもわかる。

周縁キメラでの同じような関係が病害抵抗性という形質についても認められるかどうかは、人為的な周縁キメラの作出によって既存の品種に抵抗性を附与し、重要病害を防除するという新しい技術分野を考えるうえで重要である。場内の樹について調査した結果、かいよう病に抵抗性でそうか病に罹病性の温州ミカンとかいよう病に罹病性でそうか病に抵抗性のナツダイダイの合成周縁キメラである小林ミカンが、かいよう病にもそうか病にも抵抗性であること、さらにトリステザウルス病にも抵抗性があることがわかった^{2,4)}。これと国内におけるもう一つの合成周縁キメラである金柑子温州について行なった調査の結果とから、病害抵抗性についても他の形質の場合と同様に、起原層を構成している母品種の抵抗性形質はその起原層の分担器官上で発現

されるらしいことが示された⁴⁾。

こうして周縁キメラの利用による病害防除の可能性が示されたが、このことを確かめ、さらに実際防除に役立てるためにはカンキツの合成周縁キメラを人為的に作出できることが必要である。このため以下に述べる方法で周縁キメラの作出を試みた。

1. キメラ候補植物の作出

福原オレンジと川野ナツダイダイの珠心胚実生を鹿沼土に播種して暗黒下で発芽させて徒長苗を作り、苗が約7～8cmに伸長した時期に5～7日間散光に当て、葉を展開させるとともに緑化させた。次にこれら幼苗の茎部を、長さ2～2.5cmにわたって削り、次いで福原オレンジと川野ナツダイダイ幼苗の削り取り部分を密着させてラポラトリーフィルムを巻きつけ固定した。これを殺菌土または鹿沼土に植え、散光下に10～15日おいて接ぎ木幼苗を接着させ寄せ接ぎ苗を得た。

この寄せ接ぎ苗を接着部のほぼ中間の高さで横に切断し、さらに接着部がやや高くなるように削った後ラポラトリーフィルムで覆い、約20日間室内散光下に置いた。切断後10～15日で切断部にカルス層から形成された不定芽が数個伸び始めたので、芽の長さが3mmに達する時期に両植物の接合部付近から発生している芽を1～2個残して他を除去した。その後ガラス室または網室に3カ月～1年置いて育苗した。こうして得られた候補植物は切断後約100日で検定可能な大きさに生長した。

2. キメラ植物の選抜

カンキツに広く存在するナリンジン、ヘスペリディンおよびネオヘスペリディンをマー

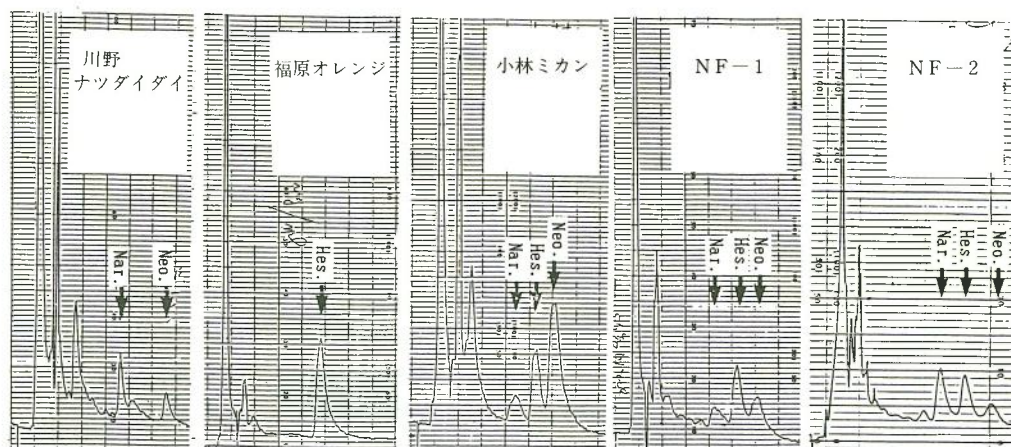


図1. 液体クロマトグラフによるマーカー物質の検出

NF-1とNF-2は川野ナツダイダイと福原オレンジのキメラとして選抜したものである。

・小林ミカンはナツダイダイと温州ミカンのキメラである。

Nar. : ナリンジン Hes. : ヘスペリディン Neo. : ネオヘスペリディン

カー物質とした。ナリンジンとネオヘスペリディンは川野ナツダイダイに存在し、福原オレンジに存在しないこと、逆にヘスペリディンは福原オレンジに比較的多量に存在し、川野ナツダイダイには僅かにしか存在しないことから、ナリンジン、ネオヘスペリディンと比較的多量のヘスペリディンを含む個体をキメラ植物であるとして選抜した。

検出には個体あたり直径5mmのパンチで葉片を約5枚採取し、これに80%エタノール2.5mlを加えて得た抽出液を用いた。検出はナリンジン抗血清、ヘスペリディン抗血清それぞれを用いて酵素結合抗体法によりナリンジンとヘスペリディンそれぞれを検出する場合と、20%アセトニトリルを用いた液体クロマトグラフによって検出を行う場合、ナリンジンの検出を酵素結合抗体法で行い、次にナリンジンを含むことが判明した個体について液体クロマトグラフによるヘスペリディン、ネオヘスペリディンの検出を行う場合のいずれかによって実施した。

こうして選抜を行った結果、初めから205本目に次いでその後の314本目に比較的多量のナリンジンとヘスペリディン、ネオヘスペリディンを含む第1次選抜植物が得られた(図1)。これらの葉はいずれも川野ナツダイダイと福原オレンジの中間的な形状を呈した。また、これらの植物については前者をNF-1(写真1)、後者をNF-2とした。



写真1. NF-1(高接ぎ樹)

3. 第2次選抜

多胚性カンキツの実生には低率ながら交雑胚に由来する個体が含まれ得るので、第1次選抜で得られたナリンジン、ヘスペリディンおよびネオヘスペリディンを含有する植物であっても、これらが含有されるような自然交雑にもとづく実生である可能性が否定できない。そのためNF-1とNF-2の作成に用いた実生それぞれが珠心胚由来のものであることを確かめることが必要であった。

先ず接ぎ木の接合部より下方の実生部分から伸長した枝について同様な検定を行ない、

一方が福原オレンジで他方が川野ナツダイダイであることを確かめた。また接ぎ木部より低い実生部分から伸長した枝がない場合には、母品種の実生部分約1cmを切り取ってラフレモン苗に腹接ぎし、活着後接ぎ木部から切断し、切断面から不定芽を出させ、これについて検定を行った。

以上によりこれまで人為的に作出できなかったカンキツにおける合成周縁キメラが容易に作出できるようになり、キメラとして組み入れるカンキツの種類と起原層を考慮することで計画的な新しい形質の品種育成が可能となった。さらに、一つの起原層に病害抵抗性の組織が導入されるとき、その起原層の分担

器官上で抵抗性が発現される傾向のあること⁴⁾はカンキツのかいよう病、トリストザウイルス病などの難防除重要病害の防除を優良品種の育成と併行して解決できる可能性を示している。

文 献

- 1) Frost, H. B. *et al.* (1942) *Genetics* 27: 619-634
- 2) 久原重松 (1977) 今月の農薬 21(8): 48-51
- 3) 久原重松 (1984) 九州農業研究 46: 237
- 4) 久原重松ら (1987) 日植病報 53: 82-83
- 5) 佐村利兵衛ら (1928) 農及園 3: 1044-1047
- 6) Tanaka, T. (1927) *Jour. Genet.* 18: 77-85
- 7) 田中諭一郎 (1980) 日本柑橘図譜 142-144, 養賢堂

国内情報

フキ葉肉プロトプラストからの植物体再生

愛知県農業総合試験場

矢部和則

はじめに

フキは、北海道から九州まで広く自生するキク科植物で、古来から栽培される栄養繁殖性野菜である。

今津ら (1961, 1962 a, b) によれば、フキは雌雄異株で栽培種の愛知早生ブキや水ブキではほとんど雌株しかみられず、更に3倍体 ($2n=87$, $X=29$) で不稔性のため交雑育種が極めて困難な作物である。現在の主要品種は、いずれも野生種から選抜されたもので、品種改良がほとんどなされていない。

フキの作付面積は、全国で約1,030haある。愛知県には知多半島を中心にビニールハウスによる抑制栽培や促成栽培など約280haの作付面積があり、生産額は21億円に達し、重要な特産野菜となっている。しかし、各産地とも低収やウイルス病、*Verticillium* 病などの被害がみられ、無病株の確保とともに多収性、耐病性品種の育成に対する期待が大きい。そ

こで、交雑育種の困難なフキの品種改良には細胞、組織培養による育種法の開発が重要となっている。この課題を解決するため、フキの葉肉プロトプラストの単離、培養を試み、育種利用の可能性を検討した。

1. フキ葉肉プロトプラストの単離

供試品種は、愛知早生ブキを用いた。プロトプラストの単離材料は、地下茎の茎頂を培養して得た無菌植物体の葉肉を用いた。長さ3~5cmの若葉を細断(幅1mm)し、0.1%ペクトリアーゼ Y 23, 0.5%セルラーゼオノズカRS, 0.5%ドリセラーゼ, 0.5Mマンニトールを含む酵素液に入れ、27°C, 80回/分の振とうを120分行いプロトプラストを単離した。単離後、0.5Mマンニトールを含むCWP塩液 (Morgan & Cocking 1982) を用い、2分(100×g)の遠心で2回洗浄した。葉肉プロトプラストの収量は、55葉当たり2.7×10⁵個で、大きさが30~50μm、中にアントシ

アン色素を有するものも見られた (写真 1, A)。

2. プロトプラストの培養

プロトプラストの初期培養に供試した培地は、表 1 に示すように B 5 (Gamborg *et al.* 1968) 又は MS (Murashige & Skoog, 1962) の無機塩に 8 P (Kao & Michayluk, 1975),

又は MS のビタミン類を組合せ、種々の種類のオーキシン類、サイトカイニン類を加用したものを用いた。プロトプラストの培養密度は 1×10^5 個/ml とし、25°C、弱光下で培養した。

その結果、ホルモンを加用した 1/4 濃度 MS 無機塩、1/2 濃度 MS ビタミン類の培地でプロトプラストの分裂がみられた (写真 1, B)。

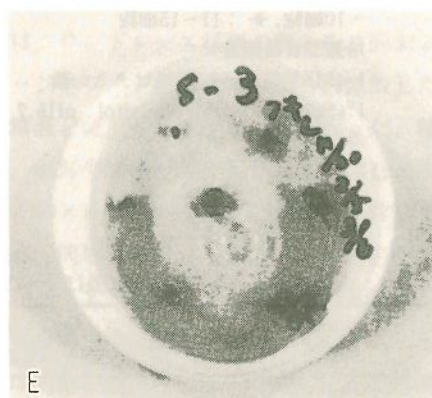
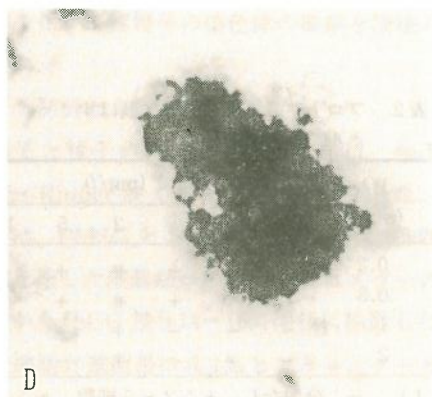
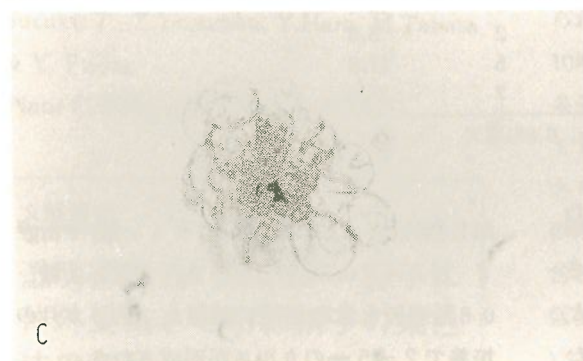
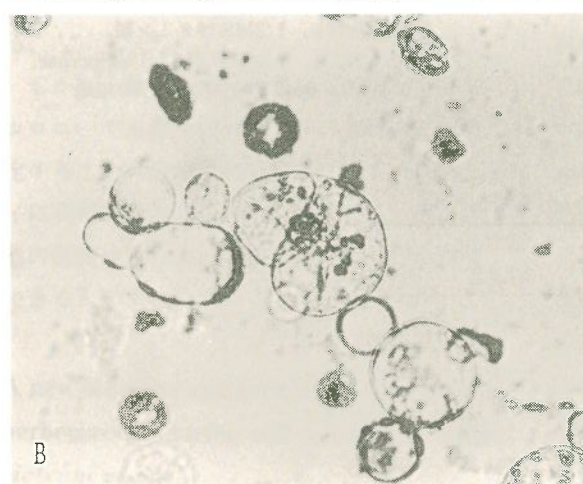
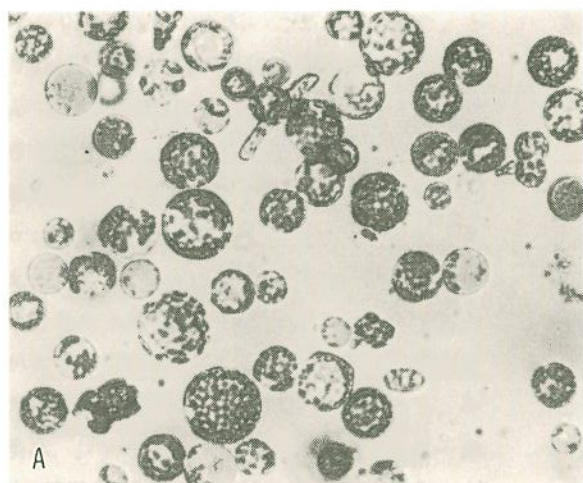


写真 1 フキ葉肉プロトプラストからの植物体再生

A: 単離された葉肉プロトプラスト, B: 第 1 細胞分裂,
C: セルクラスター, D: コロニー, E: カルスからの茎葉分化,
F: 再生植物体

表1 フキのプロトプラスト培養供試培地 (0.5M Mannitol, pH 5.7)

| Minerals | Vitamins | Sucrose | Glucose | NAA | 2,4-D | BA | Zeatin | プロトプラスト ¹⁾ 分裂 |
|----------|----------|---------|---------|------|-------|------|--------|-----------------------------|
| | | % | % | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | |
| B5 | 8p | 1 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | | 0.5 | 分裂なし |
| 1/4MS | 1/2MS | 1 | | 1 | | 0.5 | | コロニー形成 |
| 1/4MS | 1/2MS | 1 | | | 1 | 0.5 | | 第1分裂 |
| 1/4MS | 8p | 1 | 1 | 1 | 0.25 | | 0.5 | 分裂なし |
| 1/4MS | 8p | 1 | 1 | 1 | 1 | | 0.5 | 分裂なし |

1) 培養43日後

表2 プロトプラストの分裂に及ぼすホルモンの影響¹⁾

| BA (mg/l) | NAA (mg/l) | | | | | |
|--------------|------------|-----|---|---|---|----|
| | 0.2 | 0.5 | 1 | 2 | 5 | 10 |
| 0.2 | - | - | - | ≡ | + | + |
| 0.5 | - | - | + | ≡ | + | - |
| 1 | - | - | - | + | - | - |
| 2 | - | - | - | + | - | - |

1) - : 分裂なし, + : 2~5細胞, ≡ : 6~10細胞, ≡ : 11~15細胞
 培養22日後調査
 1/4MS無機塩, 1/2MSビタミン類
 1%Sucrose, 0.5M Mannitol, pH5.7
 の培地供試

表3 プロトプラストの分裂に及ぼすNH₄NO₃と他のMS無機塩濃度の影響¹⁾

| MS無機塩 の希釈 ²⁾ | NH ₄ NO ₃ (mg/l) | | | | | |
|----------------------------|--|-----|-----|-----|-------|-------|
| | 0 | 200 | 400 | 800 | 1,600 | 3,200 |
| 1/1 | - | - | - | - | - | - |
| 1/2 | + | ≡ | ≡ | ≡ | + | - |
| 1/4 | ≡ | ≡ | ≡ | ≡ | + | - |
| 1/8 | ≡ | ≡ | ≡ | + | + | + |

1) - : 分裂なし, + : 2~5細胞, ≡ : 6~10細胞, ≡ : 11~15細胞, ≡ : 16~20細胞,
 培養22日後調査
 2) 0~3,200mg/lのNH₄NO₃を含むMS無機塩を希釈し, 1/2MSビタミン類, 1mg/l NAA, 0.5mg/l BA, 1% Sucrose, 0.5M Mannitolを含むpH5.7の培地

表4 カルスからの茎葉再分化に及ぼすホルモンの影響

| Medium ¹⁾ No. | NAA | BA | 移 植 | 茎葉再分化 | 同左率 % |
|-----------------------------|------|------|------|-------|----------|
| | mg/l | mg/l | カルス数 | カルス数 | |
| S-1 | 0 | 1 | 64 | 0 | 0 |
| S-2 | 0 | 2 | 28 | 4 | 14.3 |
| S-3 | 0 | 4 | 28 | 4 | 14.3 |
| S-4 | 0.02 | 1 | 35 | 2 | 5.7 |
| S-5 | 0.02 | 2 | 28 | 1 | 3.6 |
| S-6 | 0.02 | 4 | 28 | 9 | 32.1 |
| S-7 | 0.2 | 1 | 55 | 2 | 3.6 |
| S-8 | 0.2 | 2 | 28 | 5 | 17.9 |
| S-9 | 0.2 | 4 | 28 | 7 | 25.0 |

1) MS無機塩, MSビタミン類, 3%Sucrose, 0.8%寒天

これに対し, B5培地や8Pビタミン類を加えたMS培地では分裂がみられなかった。さらに, 1mg/lナフタレン酢酸(NAA)と0.5mg/lベンジルアデニン(BA)を含む1/4濃度MS無機塩と1/2濃度MSビタミン類の培地ではコロニーが形成された(表1, 写真1. C, D)。これらのコロニーを, 1/4濃度

MS無機塩, 1/2濃度MSビタミン類, 1mg/l NAA, 0.5mg/l BA, 1%しょ糖, 0.8%寒天を含む培地に移植し, 約3カ月の培養で2~5mmのカルスが形成された。

プロトプラストの初期分裂に及ぼすホルモンの影響を見るため, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10mg/lのNAAと0.2, 0.5, 1, 2mg/lの

BAを組合せ加用した1/4濃度MS無機塩、1/2濃度MSビタミン類、1%しょ糖、0.5Mマンニトールを含むpH5.7の培地でプロトプラストを培養した。その結果、表2に示すように、2mg/ℓNAAと0.2~0.5mg/ℓBAの組合せで分裂が最も盛んであった。

プロトプラストの分裂に及ぼすアンモニウム塩とMS無機塩の濃度の影響を明らかにするため、硝酸アンモニウムを0, 200, 400, 800, 1,600, 3,200mg/ℓ含むMS無機塩を1/1~1/8濃度に希釈した修正MS培地(1/2濃度MSビタミン類、1mg/ℓNAA, 0.5mg/ℓBA, 1%しょ糖, 0.5Mマンニトール)を作成し、プロトプラストを培養した。その結果は、表3に示すように、200mg/ℓの硝酸アンモニウムを含むMS無機塩を1/4濃度に希釈した培地条件が最適であった。

3. 植物体の再生

直径2~5mmとなったカルスを3%しょ糖、1mg/ℓBA, 0.8%寒天を含むMS培地に移植したところ、約1カ月で茎葉の再分化がみられ(写真1, E), さらに、写真1, Fに示すように植物体が再生された。

プロトプラスト由来カルスからの茎葉再分化に及ぼすNAAとBA濃度の影響をみるため、0, 0.02, 0.2mg/ℓのNAAと1, 2, 4mg/ℓのBAを組合せた3%しょ糖, 0.8%寒天を含むMS培地でカルスを培養した。その結果、表4に示すようにNAAが低濃度でBAが高濃度ほど茎葉の再分化率が高く、0.02mg/ℓNAAと4mg/ℓBAを含む培地

で最も再分化率が高かった。

4. 今後の研究方向

一連の培養試験により、フキ葉肉プロトプラストから植物体を再生させるための基本的な培養系が確立された。これにより、愛知早生ブキと形質の良い水ブキや多収性が期待される秋田大ブキなどとの細胞融合による高品質、多収性品種の育成、あるいは野生ブキとの融合による耐病性の導入など育種利用の可能性が開かれた。フキは栄養繁殖性であり、体細胞雑種における稔性の問題もないので、実用品種の育成が期待される。

付記：本報告は、農林水産省一般別枠研究「細胞融合・核移植による新生物資源の開発」の成果の一部である。

文 献

- 1) Gamborg, O.L, R.A. Miller & K. Ojima (1968) *Exp. Cell Res.* 50 : 151-158
- 2) 今津 正・藤下典之(1961) 園学雑 30 : 281-298
- 3) 今津 正・藤下典之(1962a) 園学雑 31 : 23-29
- 4) 今津 正・藤下典之(1962b) 園学雑 31 : 293-302
- 5) Kao, K.N. & M.R. Michayluk (1975) *Planta* 126 : 105-110
- 6) Morgan, N. A. & E. C. Cocking (1982) *Z. Pflanzenphysiol.* 106 : 97-104
- 7) Murashige, T. & F. Skoog (1962) *Physiol. Plant* 15 : 473-479
- 8) Yabe, K., T. Nishio & K. Takayanagi (1986) *Japan J. Breed.* 36 : 131-137

文献情報

担子菌 *Schizophyllum commune* の電気融合

菌類のプロトプラスト融合は、交配における不和合性の壁をこえて雑種を形成する方法として現在広く用いられている。ほとんどの場合、融合はPEGを使用する方法で行なわれているが、比較的融合率が低いためとプロトプラストが密集してしまつて一つずつを拾い出すのが困難なため、雑種細胞の選抜には栄養要求性突然変異の相補性を用いるのが普通である。しかし、突然変異株の使用は、突然変異処理によって必要な性質が失われることがままあるという問題点を含んでいる。また商業的に重要な栽培品種である *Agaricus bisporus* では突然変異の導入や解析が困難である。

電気融合法は、融合の頻度を高めるために開発された方法で、哺乳動物由来の細胞、植物や酵母のプロトプラストに関して、迅速で有効な方法であることが報告されている。高率で融合を行うことが出来、かつプロトプラストが密集しないため、マイクロマニピレーターで直接融合細胞を拾う、全細胞のなかからアイソザイムパターンによる選抜を行なうなどの手法と組み合わせれば突然変異株を用いなくて済む融合方法になりうるとして期待されている。

電気融合法の担子菌プロトプラスト融合に対する適性を調べるための第一歩として、本報文では担子菌 *Schizophyllum commune* の栄養要求性突然変異株を用いて、融合条件の検討を行った。

Schizophyllum commune の栄養要求性1核菌糸 (A2B1 *ura-1*, A4B47 *nic-3*) を *Tricoderma harzianum* 由来の酵素でプロトプラスト化した。

30 μ l のプロトプラスト懸濁液 (3~5 \times 10⁴ 個のプロトプラストを含む) をクロムメッキしたスチール電極間 (間隔1.5mm) に入れ、交流電場、ついで直流方形波パルスを加えて融合を行なった。

まず、顕微鏡での観察によって大まかな条件を求めた。2 MHz 交流電場100~130 V/cm を加えると、80%までのプロトプラストが鎖状に配列した。顕微鏡での観察による直流方形波パルスについての最適融合条件はパルス幅20 μ s、パルス適用回数3回、パルス電圧1.4~2.2 kV/cmであった。薄い酵素溶液のなかにプロトプラストをおくことによって融合率は向上し、上記の条件下で30%の融合が観察された。

次に、融合操作後のプロトプラストを最少培地および、必要な栄養源を補足した同じ培地の両方で培養し、5日後に各培地上のコロニー数を比較することによって融合率を求めた。最適パルス電圧は2 kV/cmで融合率は6.8%であった。1 kV/cm以下では融合は起こらず2 kV/cmを超えるとプロトプラストの破壊が起こった。

融合操作は行わず、他は同様に処理したプロトプラストを培養したところ2週間後でも融合処理を行った場合の0.05%未満のコロニーしか最小培地上で生育しなかった。この少数のコロニーは菌糸融合によるものと考えられる。

いま、二つの細胞の間で融合が起こり、6.8%の細胞がヘテロカリオンであるとすれば、顕微鏡下での融合率は約20%になるはずである。この数値は実際に観察されたもの(30%)よりも小さいが、これは、実験ごとのばらつきの他に、プロトプラストの破壊および多細胞間の融合がおこっているためと考えられる。

融合産物について調べたところ、得られたヘテロカリオンのすべてが結果的には2核菌糸であったものの、少なくとも初めの3日間は、クランプコネクションを作らず、見かけ上1核菌糸のような形態をとっているという現象がみられた。

以上、融合後安定なヘテロカリオン菌糸の形成にいたるまでの過程については、今後の研究を待つ必要があるものの、*Schizophyllum commune* を用いて電気融合で6.8%の高頻度でヘテロカリオンが得られることが示された。この結果は、他の担子菌、特に栄養要求性マーカーが得られない *A. bisporus* の

ヘテロカリオン形成のための大きな助けとなるであろう。

(抄訳 横野 健)

Heterokaryon formation in the basidiomycete *Schizophyllum commune* by electrofusion of protoplasts

Sonnenberg, A.S.M. & J.G.H. Wesseles
Theor. Appl. Genet. 74 : 656-658 (1987)

文献情報

トマトの葉肉プロトプラストからの再分化：プロトプラスト培養と植物体再分化の効率化に重要な要因

通常の交配が困難な野性種から栽培品種に優良形質を導入するために細胞融合を用いるには、プロトプラストから効率よく植物体が再分化する必要がある。トマトのプロトプラストでは、効率よくかつ再現性のある培養および再分化の方法がないため、培養が困難なものの一つとされてきた。本報では、トマトのプロトプラストの培養と植物体再分化を効率よくするために必要な条件について述べる。その条件とは、母植物の前処理、プロトプラストの培養方法、植物体再分化のための培養方法の三つである。

トマト (*Lycopersicon esculentum*) の4種の栽培品種を用い、それぞれ *in vivo* (温室, 18~20°C), および *in vitro* (MS培地, 20~25°C, 16時間日長, 2,000 lux) で生育させ、展開しきった若い葉を材料とした。

1 母植物の前処理

分裂し植物体になり得るプロトプラストを得るためには、母植物をそれに適した生理的条件にする必要がある。ナスやトマトについては、弱光や短日にさらすことが生存率の高いプロトプラストを得るために効果的であることが報告されている。これは、光が少いと植物はペクチンの割合の少いうすい細胞壁を合成するので、低濃度の酵素でもプロトプラストの単離が可能であり、細胞のダメージが少いためと説明されている。また低温も生存

率の高いプロトプラストを安定して得るためによく用いられる。これは、細胞内の酵素活性を低下させることによって単離の際のストレスに耐えさせるのではないかと推測されている。本実験では、*in vivo* で生育させた母植物は、プロトプラスト単離の7~10日前から18~20°C, 8時間日長, 2,000 luxにおき、最後に10時間暗黒とした後、暗黒下4°Cで6時間低温処理を行った。*in vitro* で生育させた母植物も同様に暗黒および低温処理を行った。低温処理はプロトプラストの収量の低下を招いたが、得られたプロトプラストの分裂頻度は高かった。

2 プロトプラストの培養方法

本実験では培地はLCMを用いた。これはB5培地を改良し、7%マニトール, 1%しょ糖, 0.5%ぶどう糖, 1 mg/l NAA, 0.5 mg/l 6-BAP, 0.5 mg/l 2,4-Dを加えたものであり、浸透価は530±10 mOsm/kgである。単離したプロトプラストは25°C暗黒で培養すると、4日目には細胞壁を再生して分裂を開始した。この時の細胞分裂にはオーキシン、特に2,4-Dが必須であった。しかもそのままの2,4-D濃度で培養を続けると、形成されたカルスは7~10日後に褐変してしまうので、培地から徐々に2,4-Dを除く必要がある。本実験ではそのために二つの方法を用いた。一つは、直径6 cmのシャーレに液体培地1.6 mlをいれて培養し、4日目ごとにオーキシンを含まない培地(6-BAP 0.75 mg/lを含む)を0.4 mlずつ添加してオーキシンを希釈する方法である。他の一つは、プロトプラストを0.5%の寒天で固めたLCM培地のドロップ(100 μl)にとじこめ、9 cmのシャーレにそれを6個はりつけ、そのまわりに液体培地6 mlをいれ、培養4日目以降週2回の割で液体培地1.0 mlをオーキシンを含まない上記培地と交換して希釈する方法である。このどちらの方法を用いても、プロトプラストは同じ位の分裂頻度を示し、カルスは順調に生長した。

3 再分化のための培養方法

カルスからの植物体再分化のためにはMSにゼアチン, IAAを添加した培地で培養す

る必要がある。しかしカルスを直接この培地に移植すると、急激に浸透価が低下するため、褐変枯死してしまう。したがって、徐々に浸透価を下げながらカルスの緑化を促す必要がある。本実験では、培養25日目頃、1~2mmとなったカルスをまず、MSに0.2Mマニトール、7.3mMしょ糖、0.5mg/ℓ 6-BA P、0.05mg/ℓ NAAを添加した培地（浸透価250±10mOsm/kg）に移植した。ここでカルスは緑色となり、急速に生育した。14日後にホルモンを除いた上記培地に2mg/ℓ ゼアチン、0.1mg/ℓ IAAを添加した培地に移植したところ、緑色の不定芽原基が形成された。これをMSに同様のホルモンと2%しょ糖を加えた培地に移植すると、不定芽は発育し、これを切り取って発根させることより、植物体へ発育した。

培養の際の最適浸透価は、品種(遺伝子型)、母植物の生育条件(*in vivo*または*in vitro*)などにより少しずつ異っており、さらに検討が必要ではあるが、以上述べた三つの条件を組み合わせて培養することにより、トマトの葉肉プロトプラストから効率よく植物体が得られるようになった。

(抄訳 有賀小海)

Regeneration of leaf mesophyll protoplasts of tomato cultivars (*L. esculentum*): factors important for efficient protoplast culture and plant regeneration

Tan, Mei-Lie M. C., Ellen M. Rietveld, Gijssbert A. M. van Marrewijk, & Ad. J. Kool
Plant Cell Reports 6 : 172-175(1987)

文献情報

Thalictrum minus におけるベルベリン生産能力の高いコロニー選抜のための新しいバイオアッセイシステム

黄色のイソキノリン系アルカロイドであるベルベリンは、オウレン、キハダなどに存在し、日本では防腐剤として使用されている。

近年、このベルベリンがオウレンや *Thalictrum minus* の培養細胞によっても生産されることが報告されている。しかし、組織培養を用いてベルベリン生産を工業的に行うには、ベルベリン生産能力の高い細胞を選抜して用いる必要がある。細胞のベルベリン生産能力は、従来は、コロニーに含まれるベルベリンを化学的に定量することによって検定されてきた。しかしながら、定量のためには個々のコロニーに含まれるベルベリンを抽出する必要があること、また、小さなコロニーではそれが少量であるため化学的定量が困難であることなどの問題があった。前者の点については、生産したベルベリンの大部分を培地に放出する性質をもつ細胞の作出によって解決された。本報では、培地に放出されたベルベリンを、その抗菌性を利用したバイオアッセイシステムを用いて定量し、生産能力の高いコロニーを選抜する方法について述べる。

いくつかのバクテリアのベルベリンに対する感受性を検定した結果、明瞭な生育阻害領域が形成されることから、バイオアッセイには *Bacillus cereus* MT 2026 (FERM P-8279) を用いることにした。ベルベリンによって形成される *B. cereus* の生育阻害領域の直径は、ベルベリン濃度100~1,000mg/ℓ の範囲で、その対数表示と直線関係にあることが確認された。

Thalictrum minus L. var. *hypoleucum* Miq. の懸濁培養はすでに確立されたものを用い、LS培地にNAA 10^{-5} Mと6-ベンジルアデニン 10^{-6} Mを添加した培地で培養した。孔径1.41mmのステンレスメッシュを用いて細胞塊を集め、寒天培地で2~3週間培養した。形成されたコロニーを直径約3mmに切り分け、それぞれを小さな円筒型の寒天片(直径6mm, 高さ3mm, LS培地)においた。これをペトリ皿に並べて2週間培養した。寒天片の上でコロニーは順調に生育し、放出されたベルベリンによって寒天片は黄色となった。この寒天片のベルベリン量を測定することにより、各コロニーのベルベリン生産能力を知ることができる。寒天片に含まれるベルベリン量をバイオアッセイするために、本報では寒天二

層法を用いた。コロニーを除いた寒天片を、厚さ2mmの寒天板（第一層）上に18時間おいて、寒天片のベルベリンを寒天板に浸透させた。その後、この寒天板の上に *B. cereus* のはいた寒天培地を流し固め（第二層、厚さ1mm）、25°Cで1晩培養した後、第二層に形成された *B. cereus* の生育阻害領域を測定した。この方法を用いて1,000個のコロニーのバイオアッセイを行った結果、その13%でベルベリン生産能力が高いことが示された。とりわけ、その能力の高い4個のコロニーを選んで、液体培地に移植し、懸濁培養して増殖させたところ、培養を経るにしたがってその能力は低下してしまった。これは、用いたコロニーが単一細胞起源ではなかったためと考えられる。ベルベリン生産能力の高い細胞は余分なエネルギーを必要とするので分裂能力が劣り、分裂能力の高い、ベルベリン生産能力の低い細胞が多く増殖したのであろう。今後は、プロトプラストを用いるなど、単一細胞からコロニーを形成させることが必要である。

しかし、本報で報告した方法では、小さなコロニーでも個々のベルベリン生産能力を検定することが可能であるので、バイオアッセイに利用可能な適当なバクテリアさえあれば、他の抗菌作用のある物質の定量にも広く利用できるものであろう。

（抄訳 有賀小海）

A new bioassay system for screening high berberine-producing cell colonies of *Thalictrum minus*

Suzuki, T., T.Yoshioka, Y.Hara, M.Tabata, & Y. Fujita

Plant Cell Reports 6: 194-196(1987)

文献情報

透明帯除去ハムスター卵子に体外受精させた豚精子の染色体の観察

Rudak *et al.* (1978)により人精子の染色体観察法が報告されてから、人精子の染色体異

常に関する数多くの研究が行われている。この方法は、ハムスターの透明帯除去卵子に人の受精能獲得精子を *in vitro* で侵入させ、雄性前核形成後の染色体を観察するものである。透明帯を除去したハムスター卵子には、人以外にも牛、馬そして豚などの受精能を獲得した精子が侵入することが報告されている。しかしながら、人精子の染色体観察法は家畜では適用されていない。今回の実験では、この方法を用いて豚精子の染色体の観察を実施した。

1. 材料および方法

卵子と精子の処理および媒精には、修正 Krebs-Ringer 液（BWW液）を使用した。卵子は、PMSG と hCG 投与により過剰排卵処理を施した成熟雌ゴールデンハムスターの卵管から、hCG 投与14~16時間後に採取した。卵丘細胞と透明帯は0.1%ヒアルロニダーゼと0.1%トリプシンによりそれぞれ除去した。精液は、ランドレース種豚1頭から2回およびラージホワイト種豚1頭から3回採取した射出精液を使用し、実験を計5回行った。精子は、66%牛卵胞液と1%BSAを含むBWW液で 50×10^6 個/mlの濃度に希釈し、37°Cで4~6時間培養を行った後、パコール密度勾配遠心法により運動性を有する精子を集め、BWW液で最終濃度 25×10^6 個/mlに希釈した。媒精は、精子懸濁液100 μ lの微小滴に透明帯除去ハムスター卵子5~10個を入れ、3時間培養して行った。卵子の細胞質中に膨化した精子頭部あるいは雄性前核と精子尾部を観察して精子の侵入の判定を行い、侵入の認められた卵子を20%牛胎児血清を含むHam F10培養液で12~14時間培養した。その後、有糸分裂を停止させるため、0.4 μ g/mlコルセミドを含むHam F10培養液に卵子を移し、さらに4~6時間培養を行った。染色体標本の作製は、0.01%ポリビニールアルコールを含む1%クエン酸ナトリウムで卵子を15分間低張処理し、Tarkowski(1966)の方法に従い実施した。染色体標本は、Lichtenberger(1983)の方法に従ってキナクリン染色し、部分的に分染された染色体を蛍光顕微鏡で観察した。

2. 結果および考察

ハムスター卵子への豚精子の侵入率は80.1% (185/231)であった。この結果は、他の方法により受精能を獲得した豚精子あるいは人、馬および牛の精子について報告されている透明帯除去ハムスター卵子への侵入率とほぼ一致した値であった。

今回の実験では比較的高濃度 (25×10^6 個/ ml) の精子を使用した。ハムスター卵子との体外受精により十分に分析可能な染色体像を得ることができた。標本中には豚精子とハムスター卵子の半数性の染色体像がみられ、精子侵入卵子のうち16.8% (31/185) から染色体分析可能なハムスターと豚の分裂中期核板が得られた。染色体の識別は、形態や分染様式に基づいて行った。豚精子の分裂中期核板20個について染色体分析を行った結果、X染色体を有するものが10個、Y染色体を有する

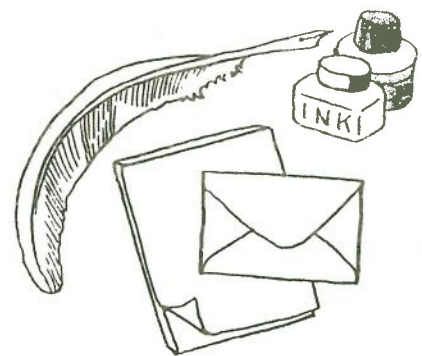
ものが9個観察された。1個の分裂中期核板からは、X染色体とY染色体を共に有すると思われる染色体像が得られた。

より精度の高い分染法を用いてさらに多くの精子を分析することにより、正常な豚の精子における染色体の異数性の出現率や、転位などの構造異常の発生率が解明されるであろう。精子の染色体分析は、豚の初期胚の研究にも役立つ。精子形成時の染色体異常が豚の繁殖成績に及ぼす影響についても大いに役立つものと思われる。

(抄訳 菱沼 貢)

Visualization of pig sperm chromosomes by *in-vitro* penetration of zona-free hamster ova

Creighton, P. & J.A. Houghton
Reprod. Fert. 80 : 619-622 (1987)



特別情報

海洋微生物研究の展開方向

東京大学海洋研究所
清水 潮

この特別情報は、生研機構と(社)マリノフォーラム21との共催で、11月5日に行われた海洋バイオテクノロジーフォーラム「バイオで拓く海洋資源」の中で講演者の1人である東京大学海洋研究所教授清水潮博士の講演内容です。先生には、この特別情報のために原稿に改めて手を入れていただきました。なおそのフォーラムでの主講演者でありました米国メリーランド州立大学のリタ・R・コルウェル教授の研究と米国での海洋バイオテクノロジー研究についても清水先生に紹介していただきました。

海洋微生物の特性

1. 海洋微生物の三つの特性

従来から海洋に住む微生物(細菌)の特性として低温性、耐圧性、好塩性の三つが指摘されてきた¹⁾。

(1) 低温性

海洋は基本的には低温の環境であり、熱帯海域のように表層では30℃近くの温度の所でも、水深1,000mでは5℃以下に下がる。海洋の平均水深は3,800mだから、海の大部分は5℃以下の温度になる。このような低温環境に生息している細菌は当然ながら低温に適応しており、中には低温でしか生活できないようなものもある。

低温細菌の研究は古くから行われており、とくに20℃以下、ときには10℃以下でしか増殖できないような好冷細菌についての生理学的な研究がMoritaらによって進められた。また低温細菌のもつ低温性の酵素の利用も検討されている。これについては単に低温で強い活性をもつ酵素の利用という面ばかりでなく、低温細菌の酵素が中～高温で失活することを逆に利用するような考え方もみられる。

(2) 耐圧性

海の中では10m深くなるごとに約1気圧の圧力が重なっていくので、10,000mの深海では、1,000気圧という高压になる。そのような所に住む細菌—高压細菌—についても、古

くからZoBell, Moritaらによって基礎的な研究が進められてきた。従来は深海の海水、堆積などの試料を現場の高压を保ったまま揚げてくる器機がなかったので、研究はもっぱら、大気圧でも死ぬことのない細菌相手に限られていた。それでもなお、高压細菌の酵素の圧力にたいする特性など興味ある研究が行われ、また深海底の細菌がつくる抗腫瘍物質など、応用面での研究も行われている²⁾。

(3) 好塩性

大部分の海洋細菌は食塩にして2.5～3%の塩濃度を最も好み、0.05%以下あるいは15%以上の濃度では増殖しない。しかし海洋に

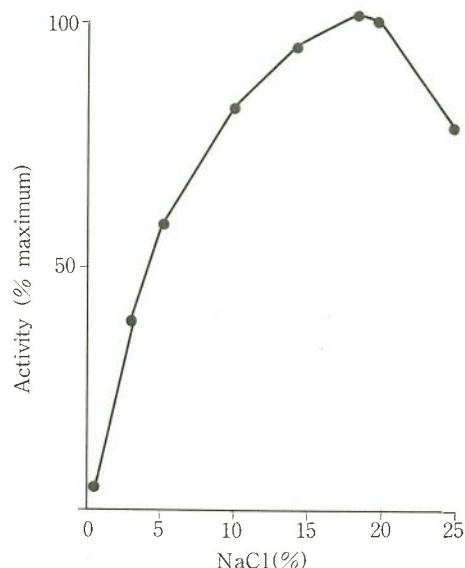


図1 海洋細菌の産生する好塩性プロテアーゼの活性に対する塩濃度の影響

住む細菌の塩にたいする依存性はさまざまである。

Duong³⁾は相模湾海水から、高濃度の食塩に耐性のある細菌を分離し、そのもつタンパク質分解酵素を精製し、その性質を調べた。その結果、この酵素自身も高濃度の食塩中で最も活性が高いことがわかり、現在これを魚しょうゆ(ヌクマム)の製造に利用することの試験が行われている。

好塩性というのは海洋細菌のもつ重要な特性と考えられる。これについて現在細胞膜のエネルギー論の面から精力的な研究が進められており⁴⁾、海洋細菌と陸上細菌の基本的な違いが微生物生理学の面から明らかにされようとしている。

2. 海洋微生物の第4の特性——他の生物との深いかかわり合い——

海洋微生物の第4の特性は、微生物を含めて海洋に住む多くの生物の生活場所の特性から生まれるものである。

海のほとんどすべての生物は海水というメディアの中に生活している。このメディアには微生物が充満しているということが特徴である。

海水中の細菌の数を数えること自体、今でも続いている大きな問題であるが、いずれにせよ、例えば、沿岸海洋では、海水中の細菌数は1ml当たり $10^3 \sim 10^7$ になり、これを陸上動物の生活するメディアである空気中のそれと比べると、10万倍から1,000万倍の密度になる。このことは、空気中よりも海水中の方が微生物の生存には当然ながら好都合であることを示している。

海の動植物は微生物がこのように濃密に分散している所、いわば細菌のスープの中で生活している。このことから、陸の動植物よりもはるかに密接な関係を微生物との間にもたざるを得ないことになる。

そのような関係としては、たとえば動植物体表への付着(魚の表皮でも1cm²当たり $10^3 \sim 10^6$ 程度の細菌が数えられる)から、動植物体内への細菌の侵入、病原性から、さらに進んだ相互関係としての共生があるだろう。ま

た細菌自身が原生動物などに捕食されて食物連鎖の過程に入っていくことも、海の物質循環の中では重要な位置を占めている。

近年、海の微生物の生理・生態をこのような他の動植物との、あるいは微生物同志の間の関わり合いの中で探るという傾向が、大きな研究の流れとして確立されようとしている。また、その中で海の微生物がわれわれの生活にも多くの貢献を生み出すことが期待できるような多彩な生物活性をもっていることが明らかになってきている。

海の微生物と他種生物との相互関係

1. 深海底の生態系

海の生態系の中での微生物の相互関係については、近年つぎつぎに新しい話題が生まれてきている。その中でも深海底の熱水・温水の湧き出し口周辺での大規模な生物群集の発見は、研究者たちに大きな衝撃を与えた。

この種の生物群集は最近わが国周辺の海底でも数多く発見され、かなり普遍的な現象であることがわかってきた。また、生物群集の中の動物の種類も、例えば貝類についてもしろり貝だけでなく、他の種の貝類もつぎつぎに発見されてきている。

動物の種類が何であれ、それらの生存を支えているのが、細菌であることもわかっている。細菌は海底から浸み出る湧水の中に含まれる硫化水素、メタン、水素、一酸化炭素を酸化し、有機物をつくり、それを一方では食物連鎖を通して直接に動物に供給している。

注目すべきことに、貝類の共生細菌の中に、従来(といっても数年前から)知られていたイオウ細菌だけでなく、メタン酸化細菌もいるということがどうやら事実であるらしい。イオウ細菌にせよ、メタン酸化細菌にせよ、高い濃度の有機物が存在する動物細胞の中で、それぞれイオウ、メタンの酸化能力を発揮しているのは不思議なことである。

深海底の生物群集には、イオウ細菌、メタン酸化細菌のほかにも多くの種類の独立栄養細菌が存在すると思われるが、これらの中には未知の多くの種類が含まれ、共生性のイオウ細菌、メタン酸化細菌のように、今まで考

えられなかったような生理特性を発揮するものも少なくないと考えられる。これら微生物がもつ巧妙な能力を分子のレベルで解明し、さらにわれわれがそれを自由に操れるようになるのもそう遠くない将来のことであろう。

2. 海の動物と微生物

海に住む動物と微生物との間の相互関係は、深海底の特殊な環境の生物群集にだけみられるものではもちろんない。古くからサンゴにゾーザンテラ (Zooxanthellae) と呼ばれる微細藻類が共生し、その光合成による栄養をサンゴに補給していることはよく知られていた。またカイメンに多くの種類のラン藻や細菌が共生していること⁵⁾、ラン藻はユムシにも共生していることなども報告されている。

また共生から寄生に話をひろげれば、海の

動物には腸内だけでなく、体表にもきわめて多数の細菌が付着、増殖している。

このような寄生・共生関係を営む中で、細菌と宿主である動物の双方が多くの種類の生物活性物質をつくっていることが近年注目されてきた。ここでは一例としてわれわれも研究に参加している動物毒素の研究をあげる。

フグ毒 (テトロドトキシン) は1960年以来、イモリ、カエル、魚、タコ、カニ、貝、ヒトデ、ヒラムシ、ヒモムシなど多くの動物、とくに海産動物がもっていることがわかってきた (表1)。

このように分布のひろいこと、その一方で同じ動物でも場所、季節さらに個体によって毒の含有量に大差があることなどから、フグ毒の起源を食物連鎖を通して追跡する研究がわが国の研究者たちによって行われてきた。

表1 フグ毒をもつ生物

| 動植物の種類 | 動植物名 | 学名 |
|-------------|-------------|--|
| 脊椎動物 両生類 | イモリ | <i>Taricha torosa</i> <i>T. rivularis</i> <i>T. granulosa</i> <i>Notophthalmus viridescens</i> その他 |
| | カエル | <i>Atelopus varius</i> <i>A. chiriquiensis</i> |
| 魚類 | フグ科魚類 | <i>Fugu</i> spp. |
| | ツムギハゼ | <i>Gobius criniger</i> |
| | アオブダイ | <i>Ypsiscarus ovifrons</i> |
| 棘皮動物 | トゲモミジガイ | <i>Astropecten polyacanthus</i> |
| | ヒラモミジガイ | <i>A. latespinosus</i> |
| | モミジガイ | <i>A. scoparius</i> |
| 節足動物 甲殻類 | スベスベマンジュウガニ | <i>Atergatis floridus</i> |
| | ウモレオウギガニ | <i>Zosimus aeneus</i> |
| 剣尾類 | カブトガニ | <i>Carcinoscorpius rotundicauda</i> |
| 軟体動物 腹足類 | ボウシュウボラ | <i>Charonia sauliae</i> |
| | オオナルトボラ | <i>Tutufa lissostoma</i> |
| | バイ | <i>Babylonia japonica</i> |
| | ハナムシロガイ | <i>Zeuxis siquijorensis</i> |
| | アラレガイ | <i>Niotha clathrata</i> |
| | カコボラ | <i>Cumatium echo</i> |
| | テングニシ | <i>Pugilina ternotana</i> |
| | 頭足類 | ヒョウモンダコ |
| 扁形動物 | オオツノヒラムシ | <i>Planocera multitentaculata</i> |
| | ツノヒラムシ | <i>P. reticulata</i> |
| 紐形動物 | ミドリヒモムシ | <i>Lineus fuscoviridis</i> |
| | クリゲヒモムシ | <i>Tubulanus punctatus</i> |
| 環形動物 | エラコ | <i>Pseudopotamilla ocellata</i> |
| 海藻類 紅藻類 | 石灰藻 | <i>Jania</i> sp. |

表2 フグ毒(テトロドトキシン)を産生する細菌

| 学名 |
|-----------------------------------|
| <i>Vibrio alginilyticus</i> |
| <i>V. anguillillum</i> |
| <i>V. cholerae</i> |
| <i>V. costicola</i> |
| <i>V. parahaemolyticus</i> |
| <i>Listonella pelagia</i> |
| <i>Shewanella putrifaciens</i> * |
| <i>Photobacterium phosphoreum</i> |
| <i>Aeomonas hydrophyla</i> |
| <i>Plesiomonas shigelloides</i> |
| <i>Alteromonas alga</i> sp. nov. |
| <i>A. tetradona</i> sp. nov. |

<1987年10月現在>

*印は松居らの報告(1987)

その結果1985年頃になって、フグ毒の起源がバクテリアにあるという事実が明らかにされた^{6,7)}。

われわれの研究では、フグ毒をつくる細菌の種類はかなり多様で(表2)、ビブリオ科の多くの細菌、アルテロモナス属の一部の細菌にまたがっている^{8,9)}。今後の研究の進展によってフグ毒をつくる細菌の種類もさらに増えることが予想される。

海の細菌がなぜフグ毒のようなものをつくるのか、また、どのような環境のもとでそれを多量につくるのかということは未だ全くわかっていない。この問題は食品衛生の面からも解明を急がれる問題であろう。

また、他の面では、フグ毒を細菌を用いて安価に生産できれば、その用途(鎮痛、麻酔など)に向けての新たな研究も開けるのかもしれない。

フグ毒ときわめて似た作用をもち、またフグ毒と同等以上に食品衛生の面で問題になる麻ひ性貝毒についても、その起源が海洋細菌にあるということがしだいに確からしくなってきた。これに関する研究で特に興味深いのは、麻ひ性貝毒の生産者であると従来考えられていたうずべん毛藻について、その細胞の核の中に共生している細菌が毒の真の生産者であるとする児玉らの報告であろう。

さらに、フグ毒、麻ひ性貝毒の数十倍の強さの毒をもつパリトキシンについても、ビブリオ属の細菌がそれをつくったという報告もあり、また貝毒ネオスルガトキシン、プロスルガトキシンについても、それをつくる細菌が分離されている。

海洋の動植物がつくる生理活性物質は現在約3,000種見つけられているといわれる。これらの中に、その生産を直接、間接に細菌に負っているものは果たしてどのくらいあるだろうか。

3. 海の植物と微生物

(1) 海藻と微生物

海藻や海の植物プランクトンの表面には多くの細菌が付着しており、これらを除去して藻類の無菌培養をつくるのがむずかしいことは、研究者が日常よく経験するところである。

一方、細菌が藻類の増殖と成長に役立っているということも、Provasoliによるアオサを用いての実験以来よく指摘されている。また、これに関連して、赤潮藻類の大量発生を引き金になる物質が、海底堆積中の含窒素有機物であり、そしてそれは堆積中で細菌によってつくられ蓄積されるのであろうということも推定されていた。

このような藻類の増殖・分化に影響を与える物質として、まず植物ホルモンが考えられる。以前、芝らは海藻葉体の表面の細菌組成を研究し、その細菌のあるものが植物ホルモン、オーキシンをつくることをほぼ確かめていた。しかし、植物ホルモンの微量測定は困難な仕事で、海水、海底堆積中の植物ホルモンの量、あるいはその起源については研究が行われていなかった。

最近、丸山らは海洋での植物ホルモンの分布、その起源の解明について一連の研究を行い、海洋細菌、とくに海底堆積中の細菌、海藻・植物プランクトンの付着細菌が高率に植物ホルモンを産出することを報告した¹⁰⁾。また、海底堆積中に有機栄養源、あるいは海藻などを埋めておくと、堆積中でオーキシンなどの植物ホルモンが産出され、海水中に溶出

してくることも確かめている。赤潮現象の解明、あるいは防除のためには、このような基礎的な研究も必要とされるだろう。

藻類と微生物との関係については、海藻の病気に関与する細菌についての研究も絵面らによって行われており、例えばコンブの病原細菌から分離した溶藻類酵素をコンブ細胞融合に使うなどの試みも行われている。

(2) 海草と微生物

海にはふつうの植物（顕花植物）も生育し、中にはアマモのように藻場をつくって、海洋の生産に重要な位置を占める生態系を構成しているものがある。

アマモは根茎をもっているため、陸上植物の場合と同様、特殊な根圏の微生物が存在していることが期待される。謝らはアマモの根圏微生物を研究して、多数の窒素固定細菌を分離している¹¹⁾。これらはいずれもビブリオ科に属する細菌で、その多くは新種である。この中には窒素を固定するばかりでなく、寒天を分解する能力をもっているものがある。難分解性の寒天を分解して炭素源栄養とし、また同時に窒素を固定して窒素源栄養とする細菌が存在するという事は、海洋ならではのことであろう。

(3) 海の微生物がつくる拮抗物質

海の微生物は海洋の動植物に寄生・共生するばかりでなく、海底堆積の上、いわゆるデトライタス上など、さまざまな界面に付着して生活しているものが多い。その中では当然ながら、同じような生活をする多種の微生物との間に栄養や場所の取り合いが生じ、拮抗関係が現れる。

海洋細菌について抗菌物質あるいは溶菌物質をつくるものの比率を調べてみると、きわめて高いことに気づくが、そのことを説明する理由として一応さきのような拮抗関係があげられる。

例えば Shanta ら¹²⁾ は相模湾・東京湾を中心に、海水、デトライタス、海底堆積、動植物プランクトンから細菌を分離し、腸炎ビブリオ、ブドウ球菌にたいする抗菌力の有無を調べた。その結果は表3に示すように、抗菌力をもつ菌株は最高45%にのぼり、植物プ

表3 プランクトン等由来の細菌株のうち、抗菌活性をもつものの比率

| 分離源 | 海域 | 菌株数 | 増殖阻害 | |
|--------------------|-----|-----|--------|----------------|
| | | | Vibrio | Staphylococcus |
| 海水 (5 μ ろ過) | 東京湾 | 35 | 0.0% | 0.0% |
| | 相模湾 | 47 | 6.4 | 6.4 |
| | 駿河湾 | 44 | 0.0 | 2.3 |
| 懸濁粒子 | 東京湾 | 28 | 0.0 | 0.0 |
| | 相模湾 | 45 | 6.7 | 8.8 |
| | 駿河湾 | 43 | 9.3 | 9.3 |
| 堆積 | 東京湾 | 20 | 0.0 | 0.0 |
| | 相模湾 | 19 | 5.3 | 0.0 |
| 植物プランクトン | 東京湾 | 20 | 0.0 | 5.0 |
| | 相模湾 | 20 | 20.0 | 45.0 |
| 動物プランクトン | 油 壺 | 99 | 5.1 | 6.1 |
| | その他 | 163 | 1.8 | 0.6 |
| 総 計 | | 583 | | |

ランクトンに付着している細菌には抗菌力をもつ菌株がとくに高率に見られた。この比率は海域によっても異なり、東京湾からの細菌に抗菌株が少ないことが注目される。

Shanta ら¹²⁾ は抗菌物質を産生する菌株についても分類も行っているが、抗菌株にはアルテロモナスに属すると思われるものが多いようである。アルテロモナスには既知の種類にも抗菌物質を産生するものが知られている。また、フグ毒産生菌にもこの属の菌がみられ、また、つぎに述べるプロテアーゼインヒビター産生菌もアルテロモナスであり、特殊な生理活性をもつ海洋細菌としてはビブリオ科細菌とともに注目されるグループといえるだろう。

より直接的な微生物間の拮抗作用、すなわち微生物による他種微生物の捕食は、絵面らによって研究されている。かれらの研究の結果、海洋中には細菌を捕食する原生動物、ブデロビブリオ、フェージが広く分布していることがわかった。また、一方、逆にウイルス（魚病ウイルス）を殺す物質を産生する細菌も彼らによって発見されており、微生物間の拮抗関係はきわめて多様であることが示唆されている。

プロテアーゼインヒビターは陸上では高等動物から微生物にいたるまで存在することが知られている。しかし微生物での分布は限られており、その多くは放線菌がつくるもので

ある。今田らは各地から分離した海洋細菌約3,000株についてスクリーニングを行い、3株のプロテアーゼインヒビター産生株を見つけている。このうちとくに強いインヒビター活性をもつ1株はアルテロモナス属の新種であることがわかった¹³⁾。この菌は2種のプロテアーゼインヒビターを産生する。このうち分子量の小さい(1,500~1,700)ものについてはアミノ酸配列が決定された。陸上のプロテアーゼインヒビターは高等動物のものから微生物のつくるものまで、アミノ酸配列の点で共通性をもっており、同一の祖先型の遺伝子に由来するものであることをうかがわせるが、海洋細菌のもつインタヒビターは、これらとは遺伝的にも全く異なるものであることが示唆された。

海洋微生物研究の展開方向

海洋微生物は陸上の微生物とは異なる特性をもっており、それぞれの特性に関連した課題にもとづく研究がおこなわれていることを述べてきた。将来は、微生物と海洋の動植物との間のさまざまな相互関係、また微生物と他の微生物との間の相互関係をめぐる基礎研究、応用研究がさらに大きく進展するだろうと思われる。

ここで研究の展開方向を考える上で見逃すことの出来ない重要な問題がある。

それは微生物研究の基礎、応用を問わずみられる研究方法の歴史的な転換である。その転換は、微生物の遺伝子の情報をわれわれが直接読むことが可能になり、また同時に遺伝子の一部を自由に操ることができるようになったことにもとづいている。

新しい分子遺伝学的な方法で、従来は解明できなかった問題が解明できたり、あるいは従来は困難であった操作がきわめて容易になったりというようなことが、海洋微生物とその関連の分野でもますます多くなってきている。

発光細菌はほとんどの種が海洋に固有のものである。その中には発光魚の発光器官に共生しているものがあるが、そのような場合には発光細菌と宿主の魚との間には対応関係が

あり、一つの種の魚に共生するのは一つの種の発光細菌に決まっている。この発光細菌と宿主との種対種の対応関係はよく調べられているが、発光魚の中にはその発光器官からどうしても細菌が分離できないものが何種類かある。最近、Haygoodら¹⁴⁾は、この問題を分子遺伝学的手法を用いて見事に解決し、発光器官の中の細菌を、分離培養することなしに同定することに成功した。

また、これとは異なる方法ではあるが、やはり分子遺伝学の方法を用いて、青木らは最近、養魚場、病魚から分離した細菌についてそれが特定の魚病細菌であるかどうかの識別を容易に迅速に行なう方法を開発している。

海洋微生物のもつさまざまな生理・生化学的側面についても、今後の研究はますます分子のレベルで行われるようになっていくと思われるが、そのさいには分子遺伝学的方法の重要性がより一層高まっていくだろう。

また、多彩な生理・生化学機能をもつ多くの種類の海洋微生物の利用についても、分子遺伝学を用いる方法は今後さらに発展するだろう。

紙面の関係でその全容は報告できないが、本稿に発表した多くの研究は、農林水産省「バイオテクノロジー先端技術シーズ培養研究、海洋微生物の有用形質の探索に関する研究」の研究成果を含んでいる。

文 献

- 1) 多賀信夫編(1974) 海洋微生物, 東京大学出版会, pp.230
- 2) Fusetani, N. *et al.*(1987) *Experientia* 43: 464-465
- 3) Duong *et al.*(1981) *Can. J. Microbiol.* 27: 505-510
- 4) Tokuda, H. & T. Unemoto (1985) *Microbial Sci.* 2: 65-71
- 5) Wilkinson, C.R.(1978) *Marine Biol.* 49: 161-185
- 6) Noguchi, T. *et al.*(1986) *J. Biochem.* 99: 311-314
- 7) Yasumoto, T. *et al.*(1986) *Agr. Biol. Chem.* 50: 793-795
- 8) Siaidu, U. *et al.*(1987) *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1714-1715
- 9) Simidu, U. *et al.* 未発表.

- 10) Maruyama, A. *et al.* (1986) *J. Appl. Bacteriol.* 61 : 569-574
- 11) Shieh, W. Y. *et al.* (1987) *Agr. Biol. Chem.* 印刷中
- 12) Shanta, N. *et al.* (1987) *Appl. Environ. Microbiol.* 53 : 2957
- 13) Imada, C. *et al.* (1985) 日本水産学会誌, 51 : 799-803
- 14) Haygood, M. G. & D. H. Cohn (1986) *Gene.* 45 : 203-209

米国での海洋バイオテクノロジー研究と
リタ・R・コルウェル教授

Dr. コルウェル教授(1934年生)は米国有数の微生物学研究者で、米国微生物学協会の会長もつとめ、現在はメリーランド大学微生物学科教授、メリーランドバイオテクノロジー研究所長の職にある。また同時に米国大統領の科学上の最高諮問機関である National Science Board の一員として、米国の科学行政、とくにバイオテクノロジー関連の行政に参与している。

コルウェル教授の研究は、海洋細菌の分類・生態・分子生物学、病原菌の自然界での分布、海洋汚染に関連しての微生物などに関するものが多い。彼女の精力的な研究活動については米国内でも有名で、400を超えるオリジナルの研究業績のほかに、「環境の中のビブリオ」、「海洋科学とバイオテクノロジー」など、10数冊の著書・編書がある。

近年コルウェル教授は海洋バイオテクノロジーの発展に力を尽し、政府、民間に働きかけてメリーランド州ボルチモアにメリーランドバイオテクノロジー研究所を創設した。この研究所は基礎部門、応用部門、医学バイオテクノロジー部門、海洋バイオテクノロジー

部門の4部門に分れ、それぞれの部門は別の建物と年間それぞれ数億~数十億の予算をもって活動している。

コルウェル教授らをはじめとして、米国の海洋バイオテクノロジーに関連する研究についてはつぎのようなものがあげられる。

水産増養殖に関する研究：米国においてもいくつかの魚種について、その成長ホルモンのクローニングと、微生物を用いてのそれらの生産が行われている。また、カキのような無脊椎動物についても成長ホルモン様物質の探索とクローニングが試みられている。また、海藻類の育種、細胞融合による新種の創造なども行われている。

海洋生物がつくる生理活性物質：ホヤ類からの抗ウイルス・抗白血病物質 (didemnins)、軟体サンゴ・ヤギからの抗腫瘍物質、カイメン、イソギンチャクからの多くの薬理性物質など、精力的に探索が行われている。これらのあるものは、臨床的にも用いられ始め、また生合成の遺伝子支配についての研究も行われている。

海洋での物質の劣化・汚損：微生物の付着についても多くの研究が、現場装置を用いるなどして行われている。ある種のビブリオが動物幼生の付着のための誘引物質を出すことがわかり、これは、逆にカキ養殖などに利用されている。

極限環境の微生物：サーマルベント、熱水鉱床から分離した高熱細菌・高圧細菌について、化学物質や酵素の利用をはかる研究は、やや長期的な視点の研究になるが、現在いくつかの研究機関で進められている。

今後10年の間に、これら研究の成果がつぎつぎに現われてくるものと期待される。

外国特派員便り

第12回国際食用きのこ会議に参加して

農林水産省林業試験場
古川久彦

第12回国際食用きのこ会議が1987年9月20～26日の1週間、西ドイツのブラウンシュバイクで開催された。この会議は1950年オランダをはじめとするヨーロッパのいくつかの国の提案で始められたもので、経営的にまだまだ未熟であったきのこ栽培を学問的、技術的研究の基礎の上になんて発展させることを目的として出発したものである。したがってこの会議の特徴は、研究が主体である一般の国際学会とは異なり、きのこ産業にかかわっている学者、研究者、技術者、指導者、生産者、加工流通関係者などが参加して研究成果や調査結果を報告し、討議や意見交換をおこなって世界的視野のもとに交流を深め、きのこ産業のレベルアップを図ろうとするところにある。また会期中にきのこ栽培の現場（栽培農家）、種菌工場、研究所、加工工場、市場などの現場視察も組まれることも、他の学会にはみられない特徴であろう。4年毎に各国もち廻りで開催されるが、1974年に第9回の会議が日本で行われた。それまでの会議の話題といえば、ほとんどがマッシュルーム（ツクリタケ）に限られていた。しかし、日本での会議以降はシイタケ、ヒラタケ、エノキタケ、フクロタケ、キクラゲなど多くの食用きのこが話題の中に加わるようになり、会議の名称も International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi とも呼ばれるようになった。

ブラウンシュバイクは、ハンブルグから東南方向へバスでほぼ3時間、古い歴史をもつ建物が多い静かな落ち着いた町で、郊外には軍の研究所が集っていたそうであるが、戦後は農業関係の研究学園都市となっており、広大な森林の中に国立の試験研究機関が点在して、理想的な研究環境をかもし出している。

筑波研究学園都市の建設にあたっても手本となった町でもある。今回の会議は、この研究学園都市の中にある土壤微生物研究所の Dr. Grabbe を会長に、関連研究所のスタッフや大学のメンバーによって能率的に運営された。会場にはこの町の市民会館があてられ、約30カ国、およそ500名が参加し、日本からは13名が出席した。

研究発表は、きのこの遺伝、育種、生理・生態、種菌問題、栽培基質の改善、栽培技術、病虫害、加工・流通など多分野にわたり、約140題が報告された。今回の会議でとくに目立ったのは、シイタケやヒラタケに関する課題が多く、とくに東南アジアと欧米の研究者によって発表されていたことである。しかもこられる内容は、いずれも生理・生態的性質の検討からはじまり、中には画期的な栽培体系の開発に及ぶものまでであった。また会場の展示コーナーには、ヨーロッパの各国から Hauses や Somycel などの種菌メーカーや栽培関係の施設メーカーが多数出品展示し、ビデオやパネルによって種菌や栽培施設の宣伝をしていたが、これらの内容も合わせてみると、今の世界のきのこ栽培の技術は私たちが予想していた以上のレベルにまで到達していることを知り、まさに井の中の蛙の思いであった。バイオテクノロジーに関する発表件数はこの会議でも比較的多かったが、そのほとんどは *Agrocybe*, *Pleurotus*, *Agaricus* 各属を材料としたプロトプラストの調製と融合に関するものであった。この分野では私たちが行っている内容と比較してそれ程の相違はなく、むしろ日本の方が先んじているように思えた。栽培に関しては、とくに本会議で大きく取上げられたものとして、熱帯地域のきのこ栽培がある。これは香港、マレーシア、台

湾、インド、パキスタン、メキシコの各国から食用きのこの研究と栽培の現状および将来の見通しについて報告されたものであるが、このことからこれらの国がきのこ生産について、いかに力を注いでいるかを知ることができる。ヒラタケ属の栽培の主題は大型栽培施設によるものがほとんどで、マッシュルームの栽培体系の中にヒラタケ(またはシイタケ)を導入することがすでに行われている。そして、当然のことながらそれに付随して生じてくる栽培基質の問題も検討されており、イスラエルからは綿殻の利用が報告された。とくに注目されたのは、ヒラタケ栽培にともなう生ずる人体への影響である。この問題は西ドイツの医学者によって報告され、ヒラタケの胞子が生産者に与える医学的影響とそれに対する予防について、割当られた時間を超過すること30分におよんだが、今世界各国で大きな話題となっている問題だけに、聴衆の誰一人の不満もなく、静かにかつ真剣に聞き入ったものである。また、それに関連して遺伝・育種部門では、ヒラタケの Sporeless の系統作出も報告されている。

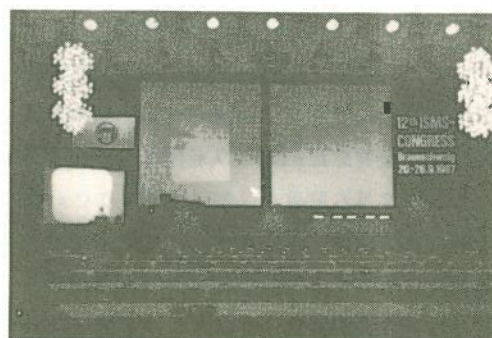
シイタケ栽培に関しては、アメリカ、スイス、タイ、台湾、香港などの国から報告されたが、内容は種菌の接種方法や鋸屑培地による栽培などで、中でもタイの女性研究者から報告された子実体形成に關与する生理的要因の研究は、その深い内容と優れた発表態度に万場の拍手を受けた。その他の栽培きのこについては、ノウタケ、フクロタケなどの栽培法の改善について、3~4の報告がなされた。種菌製造に関しては、栽培体系が菌床による大型施設栽培に傾いていることもあって、その主題は液体培養菌についてのものが大勢を占めていた。病虫害に関する報告は比較的多く15題におよんだが、内容はいずれも農薬による防除法にとどまり、病原微生物や害虫の生理・生態および病理学的検討についてはきわめて浅く、もの足りなさを感じた。とくに細菌性病害に關したものが多かったところをみると、世界的な風潮のように思えたが、これはいわゆる画一的な施設栽培の結果であろう。きのこの医薬的効果に關しても数題の

発表がなされたが、中でも日本の森寛一博士による「シイタケなどのきのこの食の抗腫瘍効果」の報告は、多くの人の関心をよんだ。

菌根性きのこに関しては、数年来つねに取上げられてきたトリフに関する報告は影をひそめ、最近では *Boletus*, *Suillus*, *Lactarius* 属の種に關心が移っているようである。菌根性ではないが日本の根田氏らがポスターセッションで発表した「木質腐朽性の *Pulveroboletus* の1新種」も、栽培可能な新食用きのことして注目を集め、多くの人達から質問をうけた。この他、栽培基質の改良や栽培施設などの報告もあったが、とくに栽培施設については、全自動システムによる空調装置やコンポスト製造や床への敷込み装置など、大型栽培施設に關したものが多く、きのこの工場的生産体系の到来を痛感したものである。

会議の最終日には土壤微生物研究所を見学した。ここは研究設備が完備しており、マッシュルームのコンポストの改良やシイタケの原木栽培の研究も行なわれていた。またイナワラや広葉樹を主とした木質資源に対しヒラタケ菌を作用させて粗飼料化する研究も精力的に進められている。これについては、日本ではすでにバイオマス変換研究で手がけており、内容的にはわれわれの方が先んじているが、完備した研究施設と充実した研究スタッフなどの研究体制は、おそらく日本の数倍も進んでいるといえよう。

会議終了後、オランダのマッシュルーム研究所およびトレーニングセンターと、フランスのマッシュルーム研究所および洞穴栽培を見学した。これらの研究所はいずれも国公立ではなく、生産者組合が設立したものである。



第12回国際食用きのこ会議会場

経費の一部は国の補助もあるが、ほとんどは生産組合の出資によって運営されている。研究所で得られた成果は直ちに生産農家で応用され、また、トレーニングセンターで研修を受けた生産者は現場の指導者として活躍するなど、自分達の力によって技術の向上に努め

ている。

研究内容の紹介や栽培の実態などについては別の機会にゆずりたいが、日本の補助金制度のあり方や、行きづまりの多い農村行政の問題などと合わせ考えると、この違いの大きさをひしひしと感ずるものである。



遺伝資源配布あっせん 事業のご案内

生研機構は、農林水産ジーンバンクに保存されている遺伝資源の配布についてあっせんを行っています。昭和62年9月1日から、今までの植物遺伝資源に加えて微生物遺伝資源についても配布されることになりました。ここに、生研機構が行っている遺伝資源あっせんについて紹介し、広く御利用をお待ちいたします。

あっせん内容は

生研機構は、遺伝資源の配布を希望される企業等のニーズに応じて、申し込みから配布手続きの完了まで一貫してお世話いたします。

1. あっせんの受付

生研機構は、農業生物資源研究所を中心とする農林水産ジーンバンクに対する遺伝資源配布申請を受付ける窓口となります。この際、配布された遺伝資源を用いて行う研究のテーマ、目的等を提示して下さい。

2. 配布遺伝資源に関する情報の提供

生研機構は、あっせん申込みをされた方に対して、国の遺伝資源配布制度の紹介、配布可能な遺伝資源についての情報および遺伝資源の特性等についての紹介をします。

3. 事務手続きの紹介及び代行等

農林水産ジーンバンクに希望する遺伝資源が保存されているかどうかの照会や遺伝資源の配布にいたるまでの手続きを代行します。

あっせん経費は

遺伝資源配布のあっせん手数料は、以下のとおりです。

1. 基本料金 1,500円

基本料金は、生研機構に遺伝資源の配布あっせん申込書を出していただいた時点で申し受けます。

2. 付加料金 所要額

付加料金は、あっせんのために特別に要した費用（職員出張旅費、調査費等）を申し受けます。

《お問い合わせ先》

農林水産ジーンバンクからの遺伝資源配布あっせんに関するお問い合わせは、下記をお願いいたします。

生研機構 企画部

〒160 東京都新宿区新宿6丁目24-16

日本生命新宿6丁目ビル3階

T E L (03) 205-6565

F A X (03) 205-6566

生研機構
出版案内

農林水産ジーンバンク

『植物遺伝資源配布目録』

生研機構では、貴重な遺伝資源を広く活用していただくために、遺伝資源配布のあっせんを行っています。この「植物遺伝資源配布目録」は、企業の皆さんの研究開発に、農林水産ジーンバンクの遺伝資源をより多く活用していただくこと、農林水産省から著作権使用許可を得て発行したものです。

この目録に掲載されているのは、主として品種名等所在情報のみですが、その生育特性およびパスポートデータ等については、御希望により生研機構が照会のお手つだいをします。

遺伝資源をより多く有効に御利用いただくために実費にてお願いたします。どうぞ御検討の上、注文いただくよう御案内いたします。

仕様

B 5 版上製 416頁

表紙NTラシャ、くるみ、ダークグリーン

内容

利用手引

目次（植物名）

品種名一覧（41,646品種）

植物遺伝資源配布規定

植物別の種子配布用品種数、品種当たりの

受入種子量ならびに配布種子単量

原産地コード

植物名の索引

頒価（送料こみ）

2,500円（ただし生研機構への出資者2,000円）

第3号の訂正とお詫び

国内情報 4頁 表2の欄外

NV: タイワンツマグロヨコバイ(誤)

NV: タイワンツマグロヨコバイ(正)

編集後記

BRAIN テクノニュース第4号をお届けします。9月末に創刊号を出して以来、購読者数も順調に伸び、200社（団体）を超えるほどになりました。これも皆様の御支援と御協力の賜物と感謝するとともに、御期待にそえるよう益々内容の充実と向上を

図りたいと考えています。次号は「畜産」特集で、これからの家畜の改良についての座談会記事と泌乳機能、木材・タケ・ササの飼料化、豚の体外授精等ホットな国内情報などを予定していますので御期待下さい。

(大畑)

ブレイン テクノニュース (第4号)

昭和63年1月15日発行

発行者 渡邊 五郎

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

東京都新宿区新宿6丁目24-16 日本生命新宿6丁目ビル3F
TEL. 03-205-6565 FAX. 03-205-6566

編集 農林水産技術情報協会

東京都中央区日本橋兜町15-6 製粉会館6F
TEL. 03-667-8931 FAX. 03-667-8933

©Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 1988