

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

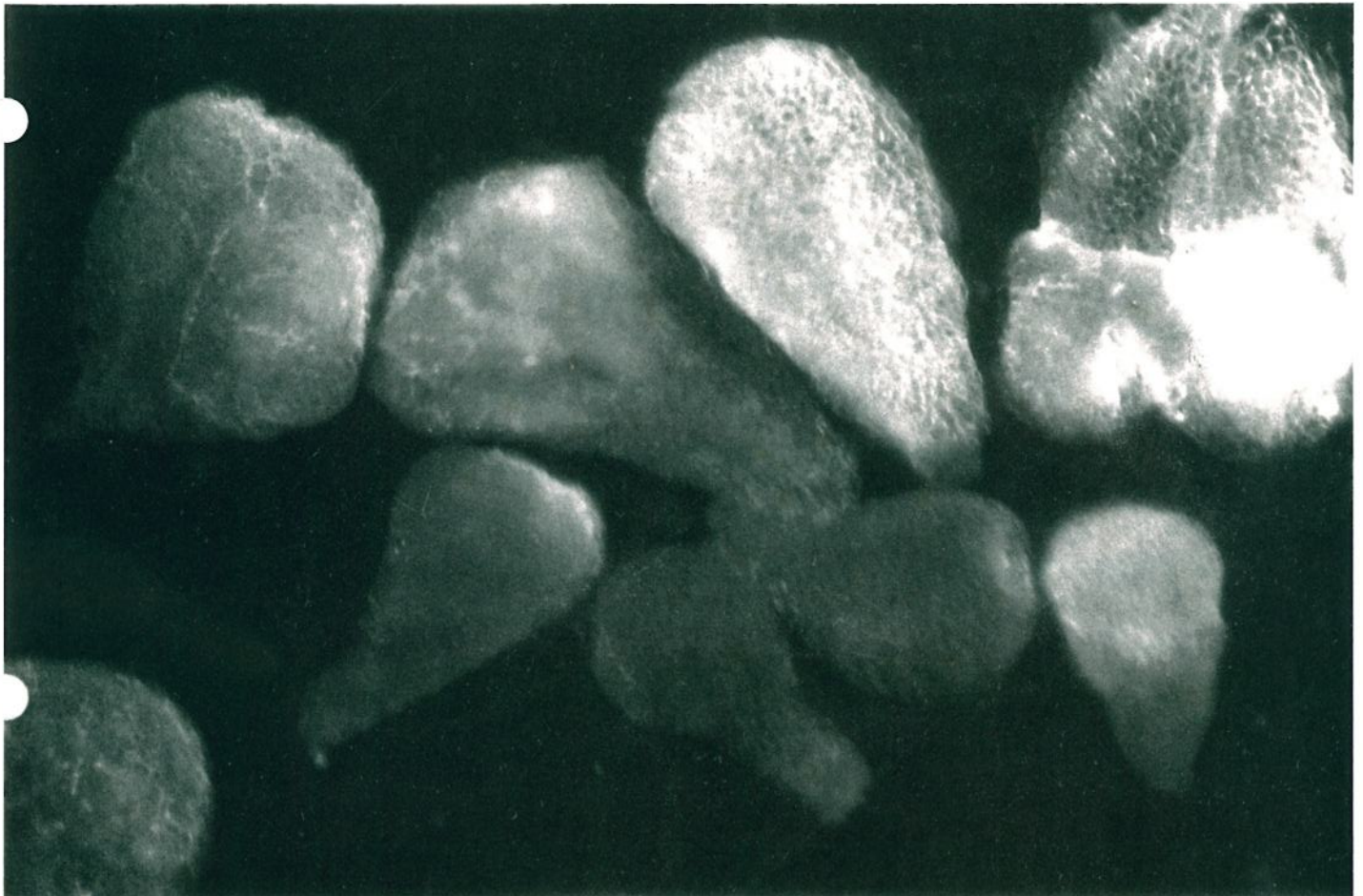
TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 10 号

NOVEMBER 15, 1988



イネ体細胞より誘導された不定胚

(株)ナーサリーテクノロジー提供

本号の紙面

国内情報	1
フローサイトメトリーの育種への応用, ウイルスDNAの遺伝子解析, 人工染色体	
文献情報	14
組換え植物体の花色, 新しいウイルスベクター	
外国特派員便り	18
ヨーロッパの水産ハイテク	
特別情報	20
組織培養技術最前線, 植物バイテクの現状	
国際学会レポート	30
第5回国際植物病理学会議	

目 次

国内情報

- フローサイトメトリーの植物育種への応用…………… 1
- Bean golden mosaic virus — 1 本鎖 DNA ウィルスーの遺伝子解析… 4
- 人工染色体の作成…………… 7
- DNAプローブ法による組換え DNA の検出…………… 10

文献情報

- アンチセンスチャルコン合成酵素遺伝子を導入した組換え
植物体の花色の変異…………… 14
- 形質転換トマトにおけるアンチセンス RNA によるポリガラクトツロナーゼ
遺伝子発現の抑制…………… 15
- ジェミニウィルスを用いた新しいウィルスベクターの開発…………… 16

外国特派員便り

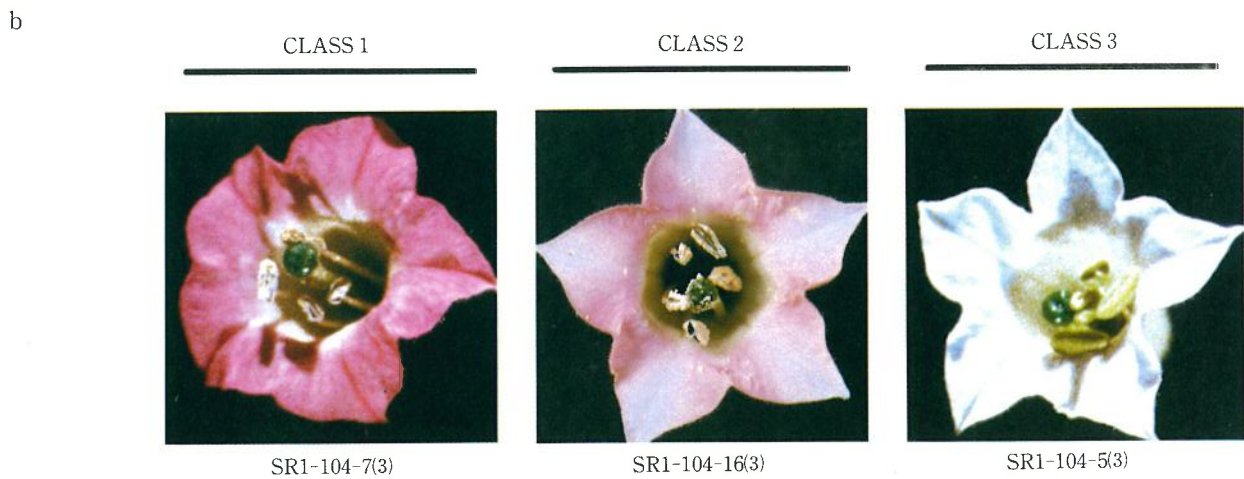
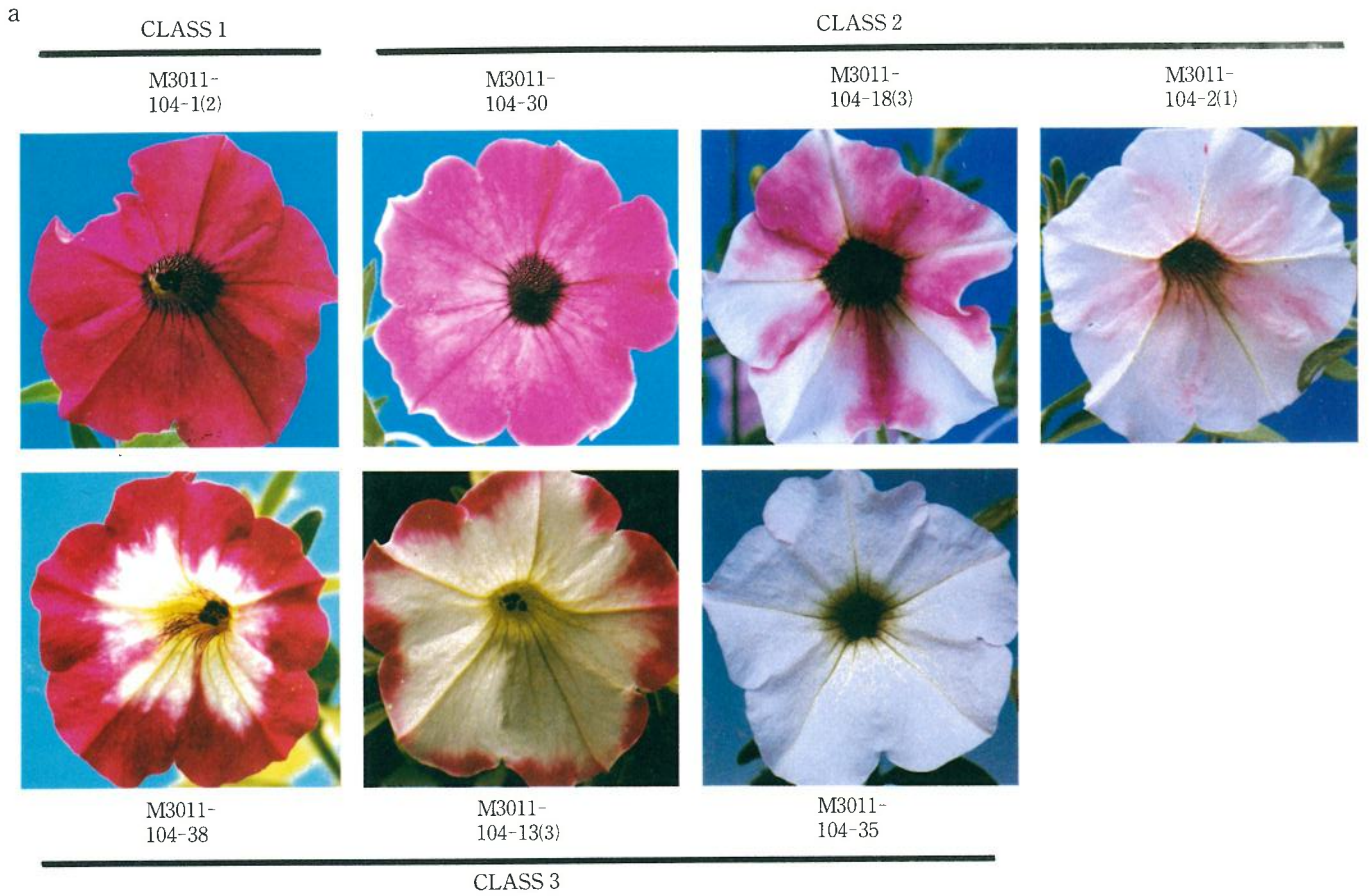
- ヨーロッパにおける水産ハイテクノロジー…………… 18

特別情報

- 植物組織培養技術の最前線
第 1 回植物組織培養コロキウムから…………… 20
- 植物バイオテクノロジーの現状…………… 25

国際学会レポート

- 第 5 回国際植物病理学会議
バイオテクノロジーの現状…………… 30
- 土壌病害の生物的防除研究の現状…………… 32



組換え植物の花色の比較

a: ペチュニア VR hybrid, b: タバコ SR1 組換え体ペチュニアの花色は三つのクラスに分けられる。タバコにおいても三つのクラスに分けられ、40個体中36個体は Wild-type と区別がつかない (クラス 1), 3 個体がクラス 2, 1 個体が全く白色 (クラス 3)

本文 14 ページ参照

ネイチャー・ジャパン (株) の許可を得て転載

国内情報

フローサイトメトリーの植物育種への応用

日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所

神代 隆

はじめに

セルソーター (Fluorescence activated cell sorter) は蛍光標識された物質の蛍光強度を連続的に検出し、さらに特定の蛍光強度をもつものを分取することが可能な装置である。この装置を用いてのフローサイトメトリーでは、細胞懸濁液は高速で流れる鞘液 (Sheath) の中に噴射され、その流れがレーザービーム照射位置を通過するときに、分散光と蛍光を発生する。それぞれの強度をコンピューターで解析し、ある強度のものを分取するように指示を与えると、落下途中の水流が超音波振動により液滴を形成し、分取しようとする細胞を含む液滴のみが $+$ 、あるいは $-$ に荷電される。荷電した液滴は高電圧の偏向板の間を通過するとき $-$ 、あるいは $+$ 極に偏向されて分取が完了する。この方法によって毎秒数百から数千の割合で細胞を分取することが可能である。

セルソーターには一般的にアルゴンイオンレーザーが搭載されるが、この場合得られる励起光の波長は514, 488, 457 nmと紫外域などであり、これでおもな蛍光色素を励起することができる。さらに、蛍光を検出する光電管は通常2個以上であり、2重、3重の蛍光染色を施した試料を解析することができる。

セルソーターは動物細胞を解析する目的で開発されたことから、この装置を植物細胞に応用した例は必ずしも多くはないが、最近、植物への応用例が増える傾向にあるので、ここでは、植物の育種という面からフローサイトメトリーの応用例を、われわれの経験を含めて紹介したい。

1. 倍数性, 異数性

染色体の観察に多小の経験がある研究者なら誰しも思うことであるが、染色体数の同定は、ことに小さな染色体を多数持つ植物種については容易ではなく、異数性細胞の混在が予想される場合などは、数多くの分裂細胞を観察しないと、確信のあるデータは得られない。このような場合、きわめて多数の細胞を扱えるセルソーターは信頼性の高い結果を提供することになる。

セルソーターにかける前には細胞を単離する必要がある。これにはプロトプラスト化が適当であるが、さらに簡便な方法としては単離核を用いる方法がある。われわれの経験では単離核を用いた方が誤差の小さい、きれいな結果が得られる。単離核の調製は Galbraith et al.(1983) の方法に従えば、いたって簡単である。まず、1g程度の試料(どの組織でもよいが、葉を用いることが多い)を用意し、界面活性剤を含む緩衝液中でメスを用いて細かく切刻む(ここで核が遊離する)。40 μ m程度のメッシュを通して大きな夾雑物を除き、DNAと特異的に結合する蛍光色素(DAPI, Chromomycin, Propidium Iodide, Hoechst 33258など)で染色し、セルソーターで解析する。図-1はこのような方法で解析したタバコの葉から単離した核をDAPIで染色したものの結果である。二つのピークが認められるが、Channel numberの小さい方が細胞周期のG1(G0)期、大きい方がG2, M期に相当するものである。横軸はlinear scaleで示してあるが、二つのピークのChannel数はちょうど2倍となっている

2 国内情報

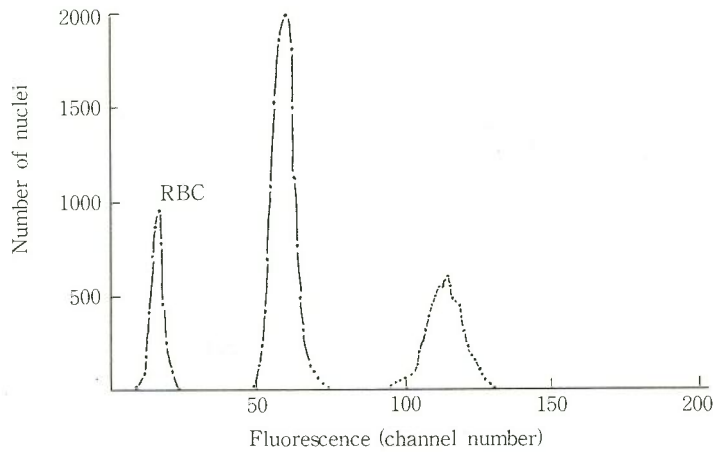


図1 タバコの葉から単離した核の蛍光量の分布
(DAPI染色, UVレーザーで励起, RBCは内部標準のヒヨコの赤血球を示す)

点が重要である。このようにして、例えば倍数性が異なると思われる試料をそれぞれ流して、データを取り、それが標準の試料に比べてどこにピークを持つかを調べれば、倍数性、あるいは異数性が推定できる。一つの試料につき数千個も流せば、十分信頼できる推定値が得られる。試料の絶対的なDNA量を知りたいときには、DNA量が分った標準試料を分析試料に加えておき、蛍光量の比を用いて推定することができる。標準試料としてはヒヨコの赤血球(2.33pg/核)がよく用いられる。

2. 細胞周期の解析

上と同様な方法で培養細胞の細胞周期を解析することができる。この場合は単離核を用いるよりはプロトプラストを用いた方がG2, M期の細胞の割合をより正確に推定することができる。また、プロトプラストを単離後、RNaseを処理して細胞中のRNAを除いておく方がよりシャープなピークを得られる。この方法ではS期の細胞の割合は二つのピークに挟まれた部分となる。さらに正確にS期の細胞の割合を推定する場合には、解析前にBrdU処理を施し、BrdUに対するモノクローナル抗体を蛍光標識したものをを用いる(Gratzner 1982)。また、分裂期(M期)の細胞の割合を知るためには、細胞内部の構造を推定するパラメーターである90°散乱光(Zu-

cker et al. 1988)を用いる方法などがあるが、これらは植物細胞ではまだ試みられてはいない。

細胞周期の解析は、例えば、プロトプラストの培養初期にどの程度の細胞が分裂を開始しようとしているのかについての情報を与え、この結果をもとに培養条件の設定ができることになる。

3. 染色体

上の二つの方法は核当たりのDNA量を測定していたが、さらに、光電管の感度を高めることにより、個々の染色体をDNA量の差に基づき分類することができる。染色体の解析に必要なとされる条件は、1)高い分裂指数を持つ細胞集団が得られること、2)染色体の大きさにある程度の変異があることであるが、植物では染色体解析の例はきわめて少なく、*Petunia* (Conia et al. 1987), *Haplopappus* (DeLaat and Blass 1984)での試みがあるのみである。この主な原因として細胞周期の同調化を行ったとしても100%の分裂指数を示す細胞集団が得られないことと、後述する細胞断片の混入が挙げられる。ある程度分裂指数が高まった細胞集団が得られたとして、染色体解析の方法は、1)プロトプラスト化、2)穏和な条件でのプロトプラストの溶解、3)核の除去、4)染色、5)セルソーターによる解析となる。ここで問題となるのは、染色体分画に存在する細胞の細かい断片である。これらが蛍光色素と非特異的な結合をして、微弱な蛍光を発生し、染色体のピークを隠すことになる。このように、染色体の解析においては、細胞の断片の除去法が最大の問題点となる。

4. 融合細胞の分取

細胞融合で体細胞雑種植物を作ろうとする場合の最も大きな問題点は雑種細胞の選抜である。特定の遺伝的マーカーを持つ組合せでは雑種細胞の分取は必要ないが、実際の育種場ではこのような選抜マーカーは期待でき

ない。そこで、融合しようとする2種類のプロトプラストをそれぞれ異なる蛍光色素で染色しておき、両方の蛍光を発するプロトプラストを選ぶ方法は普遍的な選抜法を提供することになる。このような細胞の選抜はマイクロマニピュレーターを用いて行うことができるが、セルソーターを使えばはるかに効率がよい。

まず、培養細胞由来のプロトプラストと葉肉プロトプラストとを融合させる場合は、培養細胞のプロトプラストに赤以外の蛍光色素を与える。よく用いられているのが FITC, FDA などの黄色系の蛍光を発する色素である。488nm の励起光を与えた場合、融合細胞はクロロフィルが発する赤い蛍光と色素が発する黄色の蛍光を同時に持つ細胞として認識される。一方、培養細胞由来のプロトプラスト同志を融合させた場合には、前述の黄色系の蛍光色素のほか RITC などの赤色系の色素を用いれば、前例と同じ原理で雑種細胞を認識することができる。しかし、葉肉プロトプラスト同志の融合の場合は、たとえ黄色系の色素で過剰に染色したとしてもその背後にあるクロロフィルから赤い蛍光が発せられて、融合細胞との区別を困難にする。そこで、除草剤などを処理して一方のプロトプラストからクロロフィルを減少させておき、そこに黄

色系の蛍光色素を与える方法がとられている。

図-2 は融合前と後の蛍光分布の比較である。融合処理により赤と黄色の両方の蛍光を持つプロトプラストが出現している。この領域に分取域を設定してその後の分取操作を行うが、分取に関する細かな条件設定については省略する。

プロトプラストの分取に特異的な問題点としては、1)植物細胞はセルソーターで分取できる限界に近い大きさを持つので、ノルズの口径を大きいものにする必要があり、このことで分取の正確さが損われることになる、2)プロトプラストは大きさ、重さにかんがりの変異があり、Sort Delay を設定するのが難しい、3)プロトプラストの壊れやすさから、かなり低い Sheath 圧で運転する必要がある。融合処理を受けていないプロトプラストを分取した場合、細胞の生存率はほとんど低下しないが、融合細胞は融合時に細胞膜に一時的な損傷を受けていることから壊れやすくなっており、このような条件設定が必要である。

これまでに Afonso et al. (1985) や Alexander et al. (1985) により融合細胞が分取されているが、上述のように、融合細胞のセルソーターによる分取は必ずしも容易ではない。今後、単離法や分取法にかかわる詳細な条件設定、そして、植物プロトプラストの分

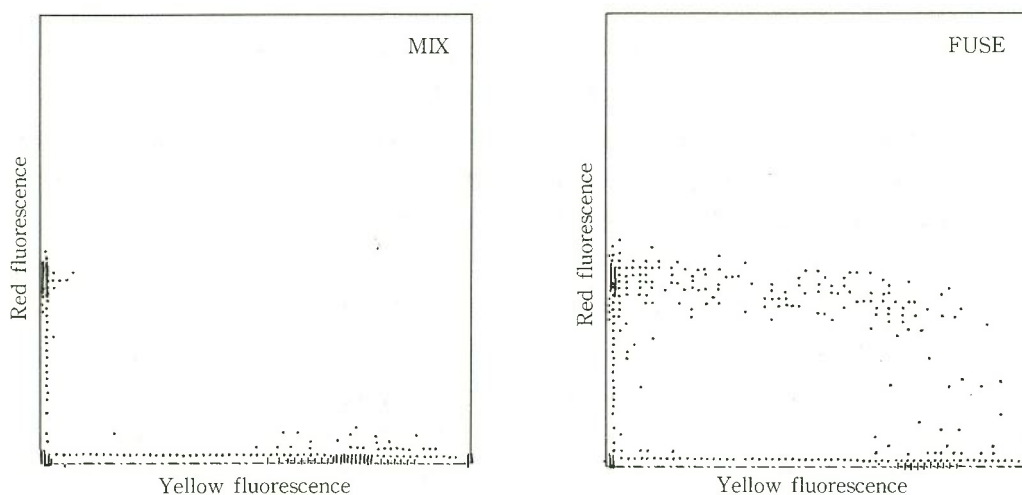


図2 融合前後の蛍光分布

(プロトプラストAは葉肉由来、プロトプラストBは蛍光染色 (FITC) した培養細胞由来、励起波長488nm)

取を目的とする新しい分取原理の開発が必要である。

おわりに

以上述べたように、セルソーターは植物の育種という場面に限っても多方面での応用が可能である。現在、さまざまな物質に対する蛍光抗体が比較的容易に入手できるようになってきた。今後、このような蛍光抗体を用いることにより、特定の物質の有無、あるいは相対的な量を細胞ごとに解析することが可能と考えられる。さらに多くの場面でフローサイトメトリーを用いることによって、セルソーター自体を植物細胞に適したものに改良することが期待される。

文 献

1. Afonso, C.L., K.R. Harkins, W.A. Thomas-Compton, A.E. Krejci and D.W. Galbraith (1985) *Bio/Technology* 3: 811-816
2. Alexander, R.C., E.C. Cocking, P.J. Jackson and J.H. Jett (1985) *Protoplasma* 128: 52-58
3. Conia, J., C. Bergounioux, C. Perennes, P. Muller, S. Brown and P. Gadal (1987) *Cytometry* 8: 500-508
4. DeLaat, A.M.M. and J. Blaas (1984) *Theor. Appl. Genet.* 67: 463-467
5. Galbraith, D.W., K.R. Harkins, J.M. Maddox, N.M. Ayres, D.P. Sharma and E. Firoozabady, (1983) *Science* 220: 1049-1051
6. Gratzner, H. (1982) *Science* 218: 474-475
7. Zucker, R.M., K.H. Elstein, R.E. Easterling, and E.J. Massaro (1988) *Cytometry* 9: 226-231

国内情報

Bean golden mosaic virus — 1本鎖DNAウイルス — の遺伝子解析

東京農業大学 総合研究所

池上正人

はじめに

1977年、当時アメリカ合衆国のイリノイ大学にいた Goodman 博士は、インゲンに黄斑モザイク症状を示す bean golden mosaic virus (BGMV) が双球粒子構造をとり、その核酸が環状の1本鎖DNA(ssDNA)であることを報告した。同年にイギリスの Harrison 博士らも双球粒子構造をとる maize streak virus (トウモロコシ条斑ウイルス, MSV) の核酸が環状の1本鎖DNAであるとした。1981年に国際ウイルス分類委員会は、ウイルス粒子の構造が双球状で、ウイルス核酸が環状 ssDNA であるウイルス群をジェミニウイルス群と命名した。ジェミニとは日本語で“双子”という意味で、グループ名はウイルス粒子が双球構造をとっていることに由来す

る。現在までに上に述べた BGMV や MSV 以外に、cassava latent virus (CLV), tomato golden mosaic virus (TGMV), tobacco leaf curl virus (TLCV) など合計15種類のウイルスがジェミニウイルス群に属するとされ、また計7種類のウイルスが罹病葉の電子顕微鏡観察などからジェミニウイルス群に属するであろうと推定されている。ジェミニウイルスには、タバココナジラミ伝搬型のもの、ヨコバイ伝搬型のものがある。前者には、BGMV, CLV, TGMV, TLCV, MYMV などが含まれ、後者には MSV などが属する。

本稿では、BGMV のゲノム構造についての筆者らの研究を紹介する。

1. BGMV DNA のクローニングと感染性

BGMV ゲノムは2粒子系ゲノム(それぞ

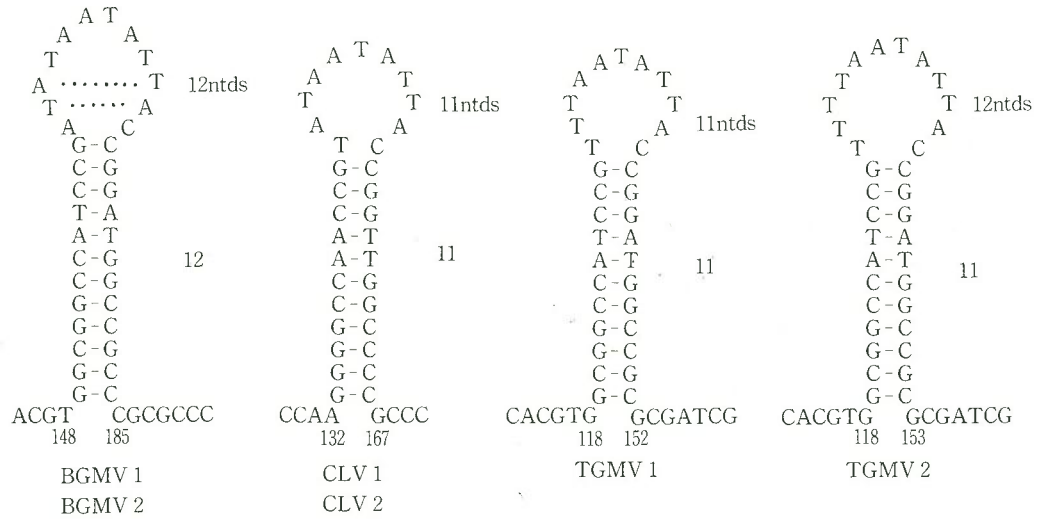


図2 BGMV, CLV, TGMV ゲノム DNA の共通配列内にみられるステム・ループ構造

DNA にもみられ、それらの構造はお互いに極めてよく似ている (図2)。ステムは九つのGC対と二つのAT対からなり、このAT対はループの付け根にある塩基対から数えて4あるいは5塩基離れたところに存在する。ループは11~12塩基からなり、TT, TTT, TAあるいはATAに続いてTAATATTACという塩基配列が存在する (図2)。このよう

な共通したステム・ループ構造がジェミニウイルスDNAの複製に重要な働きをしているものと推定される。共通配列の中で、ステム・ループを構成する塩基配列以外の配列は、BGMV DNA, CLV DNA, TGMV DNA間で異なり、この異なる配列がウイルスの宿主域あるいは粒子の会合に関わりをもつものと推定される。

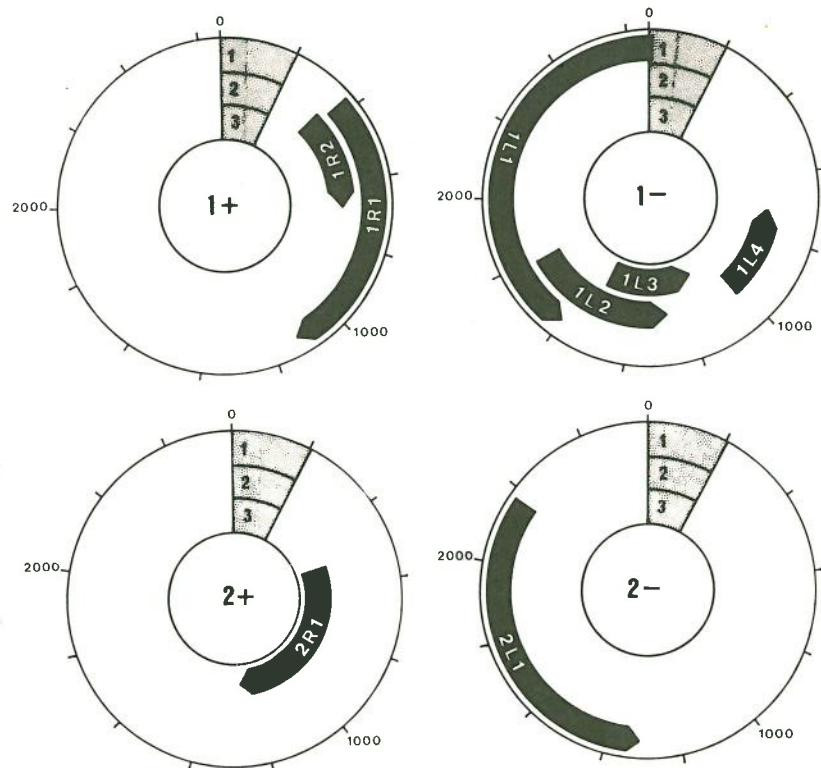


図3 BGMVゲノムDNAと同じ塩基配列をもつ鎖(1+, 2+)とBGMVゲノムDNAに相補的な塩基配列をもつ鎖(1-, 2-)の中にみられるORF
 は共通配列の領域を示す。

ATGを翻訳開始コドンとし、TAA, TAGあるいはTGAを翻訳終止コドンとするオープンリーディングフレーム(ORF)が、BGMV dsDNAのうちBGMV ssDNAと同じ塩基配列の鎖(+鎖)(1+, 2+)とBGMV ssDNAに相補的な塩基配列の鎖(-鎖)(1-, 2-)の中から探索された⁶⁾。それによると、BGMV dsDNAには8個のORFが存在する(図3)。BGMV dsDNA 1のウイルスDNA鎖(1+)にみられるORFのうち、最も分子量の大きなタンパク質をコードしているORFが外被タンパク質の遺伝子である。その他のORFから翻訳されるタンパク質の機能については知られていない。BGMV dsDNAの他、CLV dsDNAおよびTGMV dsDNAのORFについても報告され、CLV dsDNAおよびTGMV dsDNA上にはそれぞれ13個、5個のORFが存在する。この3種類のジェミニウイルス dsDNA上のORFの分布およびORFがコードしているタンパク質の分子量は極めて類似している。

おわりに

BGMVゲノムの構造解析等の研究成果から、遺伝子操作によるBGMV DNAの遺伝子導入ベクター化の可能性が生じてきた。筆者らはBGMV DNAのすべてのORFにつ

いて外来遺伝子導入の可能性について調べたところ、ORF 1R1(図3参照)に外来遺伝子を組み込むことが可能であることがわかった。

ジェミニウイルスには、イネ科植物に感染するウイルスもあり、イネ科植物用ベクターとしての構築に期待がもたれる。この点に関する筆者らの研究については、また別の機会に紹介したい。

文 献

- 1) Haber, S., M. Ikegami, N.B. Bajet and R.M. Goodman (1981) *Nature* 289 : 324-326
- 2) Ikegami, M., S. Haber and R.M. Goodman (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 : 4102-4106
- 3) Ikegami, M., T. Morinaga and K. Miura (1987) *Virus genes* 1 : 191-203
- 4) Ikegami, M., T. Morinaga and K. Miura (1988) *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54 : 233-237
- 5) Morinaga, T., M. Ikegami and K. Miura (1983) *Proc. Japan Acad. B* 59 : 363-366
- 6) Morinaga, T., M. Ikegami, K. Shimotohno and K. Miura (1987) *Microbiol. Immunol.* 31 : 147-154
- 7) Morinaga, T., M. Ikegami and K. Miura (1987) *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 53 : 549-553
- 8) Morinaga, T., M. Ikegami, T. Arai, K. Yazaki, and K. Miura (1988) *J. gen. Virol.* 69 : 897-902
- 9) Stanley, J. (1983) *Nature* 305 : 643-645
- 10) Hamilton, W.D.O., V.E. Stein, R.H.A. Coutts and K.W. Buck (1984) *EMBO J.* 3 : 2197-2205

国内情報

人工染色体の作成

京都大学理学部生物物理学教室
丹羽修身

はじめに

染色体は遺伝情報の担体であるが、その研究には多くの切り口からの道筋が考えられる。遺伝情報の発現の場、遺伝情報の複製、組換

えおよび分配の単位等、様々な側面をもつ染色体を、研究の目的に応じて分子生物学的、実験的取扱いが容易な単純な系に還元すること、人工染色体作成の意義はこのように考えることもできる。基礎生物学的問題における重要性だけでなく、種々の応用的局面におい

て染色体工学，細胞工学の発展のためにも極めて重要な意義もつことは明らかであろう。安定で効率的な遺伝子発現，細胞分裂における安定な維持，分配を可能にするベクターとしての意味は明らかであるからである。

1. 酵母の人工染色体

染色体の複製と分配という機能的側面に注目して最初に作られた人工染色体は，パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の系である¹⁾。すなわち，染色体の複製起点 (ARS)，紡錘体微小管の付着部位である動原体のDNA (CEN) および染色体末端の特殊なDNA配列 (テロメア) の三つを必須要素として含み，さらに染色体の存在を指示する遺伝的選択マーカーもつけ加えられた。興味あることに，これらの要素の単なる結合だけでは安定な染色体としては不十分であり，別にDNAを挿入して全長が55キロ塩基対 (kb) 程度にすることにより満足な安定性が得られた。しかし，正常な染色体に比較すると，体細胞分裂における安定性は100分の1程度でしかなく，染色体のコピー数の制御もあまり正確ではない。また減数分裂における染色体の挙動についてもほぼ正常な染色体に近いが，正確さについては十分とはいえない。染色体上の機能的部品を結合して作った人工染色体は，正常な染

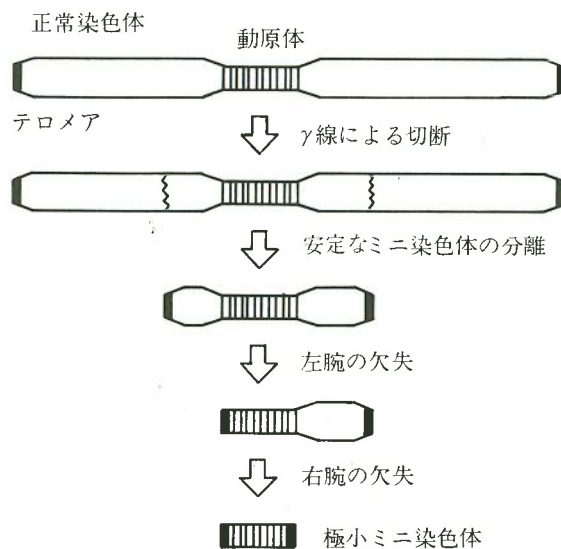


図1 システム的なミニ染色体の作成
中央のくびれた部分は多くの反復DNA配列を含む動原体領域を示す。

染色体上にある何らかの因子を欠落しているとも考えられる。

2. 分裂酵母のミニ染色体

我々の研究グループでは出芽様式で増えるパン酵母ではなく，分裂様式で増殖する分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いているが，動原体DNAをクローン化することに成功していることもあって，パン酵母で採用された方法による人工染色体の作成は実現していない。分裂酵母の動原体領域には数種類以上の反復DNA配列が集中して存在しており，構造解析が困難であるだけでなく，おそらく機能単位としてもパン酵母のCEN (<200塩基対) よりもはるかに大きいと考えられる²⁾。そこで我々は正常な染色体の動原体を含むごく限られた染色体領域だけからなるミニ染色体を，正常染色体の腕部の大部分を欠失させることによって作成した (図1)。分裂酵母は3本の染色体をもつが，染色体IIIを1本余分にもつ異数体は不安定である。この異数体にガンマ線を照射し染色体切断を誘発し，生残酵母菌の中から，安定な部分異数性を示す株を遺伝的方法で分離した。この方法で，530kbのDNAからなるミニ染色体 Ch16を得た³⁾。なお，以後の研究から Ch16の末端テロメアは染色体の切断点に *S. pombe* のテロメアDNA配列が新たに合成付加されたものであることが明らかになった⁴⁾。Ch16は有糸分裂では安定であり，脱落の頻度は 10^{-4} のオーダーである。

Ch16は短いながらも左右の腕をもつ。そこで，それぞれの腕部に適当なマーカーをつけ，その消失を目印として腕部の欠失した派生体ミニ染色体を次に分離した。この方法で Ch16の動原体は140 kbの領域の内部にあることを明らかにした。さらに，右腕だけをもつミニ染色体の腕をガンマ線で切断し，最終的に約120 kbの極小ミニ染色体 Ch10を分離することができた (図1)。遺伝学的解析の結果，Ch10はその大部分が反復配列領域であり，遺伝学的な方法では動原体と区別できない領域からのみなることがわかった。

Ch 10は体細胞分裂において安定であるから、すくなくともこの分裂においては、染色体腕は必須領域でないといえる。さらに、我々の経験は、他の高等動植物においても、同様の方法で極小染色体を作成できる可能性を示している。とくに、テロメアが比較的単純な合成的付加機構により作られるのは興味深い。

3. 減数分裂における異常な挙動

我々が作成した一連のミニ染色体は、上述したように、体細胞分裂においては安定に維持され分配も正しくおこなわれる。またコピー数の制御も正確である。しかし、減数分裂においては、興味ある二つの欠損表現型を示す。通常減数分裂においては、染色体の複製後、姉妹染色分体構造をとりながら、相同染色体の対合、キアズマを介した二価染色体の形成がおこり、相同動原体の「還元的」分離がおこる。これは減数第一分裂の特徴であり、姉妹染色分体の結合は維持され、その分離は減数第二分裂ではじめておこる。我々のミニ染色体の示す第一の異常は、姉妹染色分体の開裂が第一分裂で高頻度でおこることである。オリジナルなミニ染色体 Ch 16の場合、約10%の頻度でおこる。Ch 16の作成の手順から考えて、あるいは他のいろいろな証拠から、Ch 16の動原体は正常であると考えられるので、この異常な頻度の原因は動原体以外の欠損に求められるが、現在のところその原因はわかっていない。一方、様々なミニ染色体派生体の中に、明らかに動原体領域の一部が欠損したと考えられるものが分離されたが、このミニ染色体は50%の高頻度で減数第一分裂での姉妹染色分体の開裂をおこす。したがって、動原体領域も姉妹染色分体の結合の制御に関係していることも疑いない。動原体の反復DNA配列の中に、この機能に関係しているものがあるかも知れない。

分裂酵母のミニ染色体が示す第二の異常は二価染色体の形成頻度である。減数分裂における染色体の分離パターンは、酵母においては四分子解析法で正確に決定できる。この分離パターンから二価染色体が形成されたかど

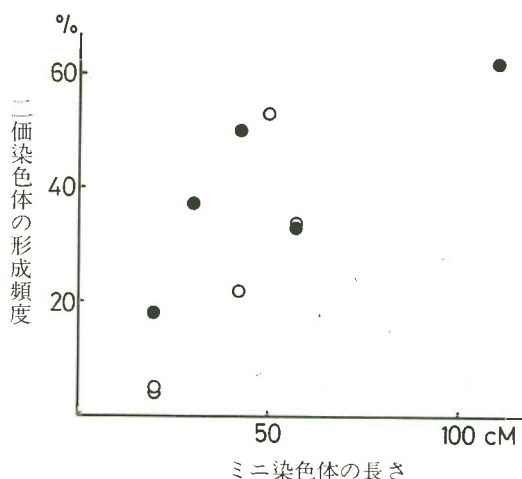


図2 ミニ染色体の長さとお二価染色体形成頻度

ミニ染色体の長さは組換え単位 (cM) であらわした。二価染色体の形成頻度は染色体の分離パターンから推測されたものである (Niwa et al. 未発表および文献4)。●印は同じ長さのミニ染色体間、○印は異なる長さのミニ染色体間での対合。二つのミニ染色体の間の相同部分の長さを cM であらわした。

うかを推測することができるが、この方法で求めた二価染色体の形成効率は、ミニ染色体の遺伝学的長さと関係することがわかった (図2)。すなわち、組換えが活発におこる染色体腕部の長さが長いほど、二価染色体形成の頻度が高くなることがわかった。逆に、動原体領域は物理的には長いDNAを含むが、組換えが抑制されているために、二価染色体形成には関与しない。Ch 10のような動原体領域からのみなる極小染色体は、減数分裂における分離がほぼランダムになる。

相同染色体の対合は極めて重要な基礎的研究課題であるし、応用的にもその人工的制御技術は大きな意味をもつ。残念ながら、現在のところ、この重要な生物現象の理解はほとんど進んでいない。コムギの5 B染色体の例でも明らかのように、染色体の対合を支配する正および負の細胞因子が存在する⁵⁾。また、染色体でシスに機能するDNA配列が存在することも、我々の研究の例をあげるまでもなく明らかであろう。今後さらに多くの系で人工染色体が作られ、分子レベルでその挙動が解析されることにより、減数分裂における染色体の挙動の制御機構の全体像が見えてくることを期待したい。

文 献

- 1) Murray, A.W. and J.W. Szostak (1983) *Nature* 305: 189-193

- 2) Nakaseko, Y. et al.(1986) *EMBO J.* 5 : 1011-1021
- 3) Niwa, O. et al.(1986) *Mol. Gen. Genet.* 203 : 397-405
- 4) Matsumoto, T. et al. (1987) *Mol. Cel. Biol.* 7 : 4424-4430
- 5) Sears, E.R.(1976) *Ann. Rev. Genet.* 10 : 31-51

国内情報

DNAプローブ法による組換えDNAの検出

農林水産省 農業生物資源研究所

美濃部脩三

はじめに

生物学の分野に遺伝子操作技術が導入されて、すでに10数年を経過した。近年は基礎的研究分野に限らず、応用分野に特に著しい進展があり、数多くの新しい形質をもつ組換え微生物が作りだされ、利用されるようになってきた。たとえばDNAポリメラーゼや制限酵素など遺伝子操作に欠くことのできない酵素類の多くは強力な発現ベクター系にその遺伝子を導入した形質転換菌で生産されているのである。有用タンパク質の生産性は、この手法の導入により、著しく向上するようになり、微生物産業や医薬などの分野に波及している。一方、農業分野にあつては、農薬耐性や病害虫耐性などの有用な形質を農作物に導入する研究が続けられてきた。遺伝子操作により有用形質を備えるに至った作物を実際に利用していく過程には遺伝的安定性や環境への適合など検討すべきいくつかの課題がある。特に、形質転換体の安全性を確認する上で、導入したDNAの検出、挿入位置の確認、変異の追跡などの検出・監視技術の確立は必須である。ここでは近年進展の著しいDNAプローブによる検出技術について報告する。

1. ブロッキングとハイブリダイゼーションの原理

核酸の塩基GとCあるいはAとT(U)が塩

基対をつくり、相補的な塩基配列をもつ2本の鎖は2重鎖に会合する。この2重鎖は高温で解離し、2重鎖の1/2が解離する温度をT_m値という。T_m値より低い温度では、互いに相補的な塩基配列をもつDNA(又はRNA)鎖は再会合するようになり、この過程をアニーリング(焼きもどし)という。DNA鎖が解離する条件下で一定の配列をもつDNA(又はRNA)を加え、アニーリングするとDNA鎖の相補的な領域と結合し、混成鎖(ハイブリッド)を形成する。

Gillespieらは変成させたDNAをニトロセルロースのフィルターに固定し、アイソトープで標識したRNAをプローブ(探針)として用いて、DNA-RNAのハイブリッドを形成させ、RNAプローブと相補的なDNA配列を検出した。その後、DNAをプローブとする様々な固相法のシステムが開発されるようになった。ニトロセルロースやナイロンのメンブランに変成DNAを固定する操作をブロッキング法といい、フィルター上に小点状にDNAを固定する方法をドットブロッキング、制限酵素などで切断し、電気泳動により分離した断片をゲルから直接メンブランに固定する手法をサザンブロッキングという。サザンブロッキング法に対してノーザンブロッキングは変成RNAを固定相とする方法である。いずれも固定された核酸同士の再会合は少なく、プローブとの効率よいハイブリッド形成が可能になり、目的とするDNA配列の正確かつ鋭敏な検出手法とな

ってきた。従来、ブロットイングとハイブリダイゼーションの工程は、3、4日を要したが、ブロットイングの手法等の改良を行い1、2日で結果がえられるようになった。

2. DNAプローブの標識化

プラスミドに挿入されているDNAはそのまま標識してプローブとして使用することも可能であるが、制限酵素で切り出して標識した方がより効率的なプローブとして利用できる。標識にはプライマーを用いる各種の手法が開発されているが、通常、ニックトランスレーション法が用いられている。反応は表1の条件で行い、15°Cで3時間反応させたのち0.5M EDTA (pH 8.0)を2 μ l加えて反応を止め、エタノール沈澱を行う。試料は乾燥後、TE緩衝液に溶解し、95°Cで3分間加熱急冷したのち、ただちにプローブとして使用する。精製を要する場合は、われわれはSephrose 2Bカラムをとおして精製している。

表1 ニックトランスレーションによるDNAの標識化

[試薬]		
①dNTP混合液	dATP, dGTP, dTTP	各100 μ M
②酵素溶液	DNAポリメラーゼ I	0.5units/ μ l
	DNase I	10pg/ μ l
③10 \times buffer	tris, pH7.5	500mM
	MgSO ₄	100mM
	DTT	1mM
	BSA	500 μ g/ml

[反応条件]	
DNA	0.5 μ g
dNTP混合液	10 μ l
酵素溶液	5 μ l
10 \times buffer	5 μ l
α - ³² P-dCTP	10 μ l(100 μ Ci)
水を加えて全量を50 μ lにする。	
反応は15°C, 3時間	

表2 合成オリゴヌクレオチドの5'末端の標識化

[試薬]		
10 \times kinase buffer	tris, pH7.6	0.5M
	MgCl ₂	0.1M
	DTT	50mM
	スベルミジン	1mM
	EDTA	1mM

[反応条件]	
合成オリゴヌクレオチド	0.5 μ g
10 \times kinase buffer	5 μ l
T4ポリヌクレオチドキナーゼ	20units
γ - ³² P-ATP (>3000Ci/mmol)	10 μ l(100 μ Ci)
水を加えて全量を50 μ lにする。	
37°C, 30分	

合成したオリゴヌクレオチドの標識は表2の反応液で5'末端をリン酸化する。

3. ブロットイング法の検討

組換えDNAをメンブランに固定し、DNAプローブによって検出する手法は近年、著しい改善がみられた。同じ原理に基づきながら、多様な方法が実際には用いられている。

a. コロニーハイブリダイゼーション法による形質転換菌の検出

形質転換菌の選抜に用いられる最も一般的な手法である。コロニーを寒天培地上で数時間以上培養したのち、滅菌したニトロセルローズフィルターに密着させて転写する。アルカリ溶液で溶菌し、DNAをフィルターに固定したのちハイブリダイゼーションを行う。図1はイネ萎縮ウイルスのcDNAクローンの選抜の例である。イネ萎縮ウイルスのゲノムは12本に分節した2本鎖のRNAであるが、この2本鎖RNAを抽出し、変成したの

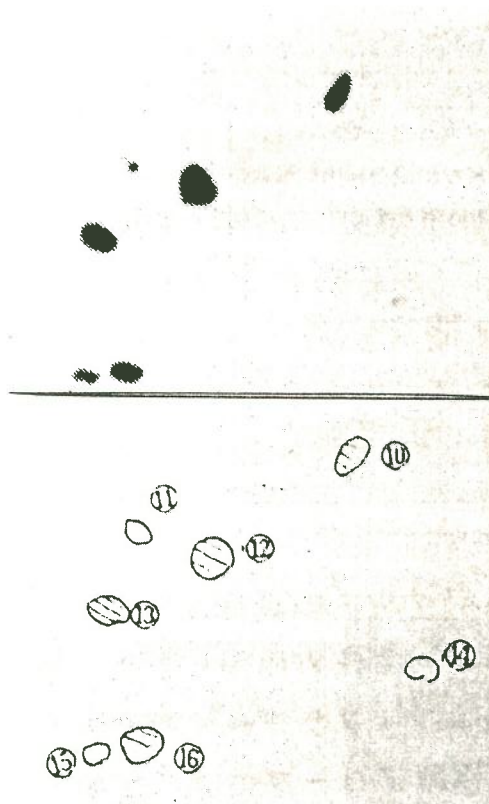


図1 コロニーハイブリダイゼーションによる形質転換菌の検出

ち、cDNAを合成し、クローニングした。この実験は5番目に大きな分節S5の全長のcDNAクローンを選抜することを目的としたもので、プローブとして、以前に得られた最長のcDNAをもちいた。272個の形質転換菌のうち、このプローブと反応し、S5のcDNAクローンとして確認されたものは20数個であったが、なかでも強く反応するクローンに全長鎖のcDNAが挿入されていることがわかった。この結果は、DNAプローブは検出すべき配列以外の領域を取り除くことによってより高感度の検出が期待できることを示している。コロニーハイブリダイゼーションは多くの形質転換菌から特定な配列を含むクローンを選抜する手法であり、薬剤耐性マーカー等で選抜できない系でも簡単に利用できる。

b. サザンブロッティング法による検出

サザンブロッティング法は1975年にE. M. Southernによって開発されたプロットハイブリダイゼーション法であるが、今日ではいくつかの改良が加えられて、高感度で迅速な検出手法として、使用目的も多様化してきた。この手法はDNAを制限酵素により切断し、電気泳動により分離したのち、メンブランに転写し、DNAプローブにより特定配列を検出する方法である。DNA分子内における特定な配列の検出、挿入位置の確認、コピー数や周辺の構造などを検討するため活用されて

きた。ゲルからメンブランへのプロットイングも数々の改良が進められている。われわれは、主として、電気的なプロットイングを試みてきたが、セミドライプロットイング装置（日本エイド一社製）を用いて良好な結果を得ている。泳動後のゲルを変性溶液（1.5M NaCl, 0.5N NaOH）中で30分間処理し、そのまま、図2のように転写装置の中に組み込む。ろ紙はゲルよりはみ出さないように注意して密着させる。ナイロン製のメンブランを使用し、ゲルに気泡の入らないように密着させる。5cm×10cm、厚さ1cmのアガロースゲルで、160mA、4V、30分間で転写できる。この条件下ではDNAはナイロンメンブランに共有結合しているためにbakingやUV架橋操作を省略できる利点がある。

プラスミドpBR322に挿入したイネ萎縮ウイルスゲノムのcDNAを上記の手法によって検出した例を図3に示した。クローニング過程で混入した断片やpBR322の配列から目的とする配列をもつDNA断片が識別できる。都合のよいDNAプローブを選び出すことができれば、ウイルスや病原細菌の変異株の検出も可能である。われわれは野外で採取した昆虫ウイルス（顆粒病ウイルス）のサザンブロッティングによる検出を行い、制限酵素EcoRIの切断点の変異により、3種の多型（RELP）を示す系統を検定した（図4）。病原細菌や糸状菌の中には、病原性の変異がはげしく、多くの変異株が見出されているものがある。多型を示すDNAプローブを利用し

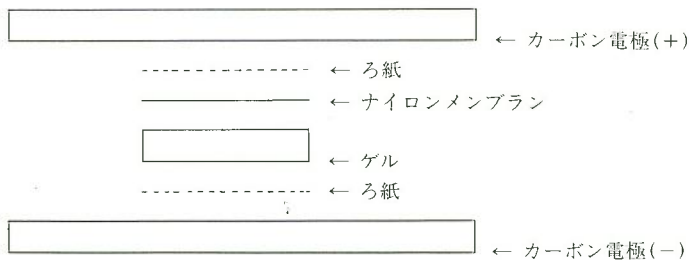


図2 セミドライプロットイング装置によるDNAの転写

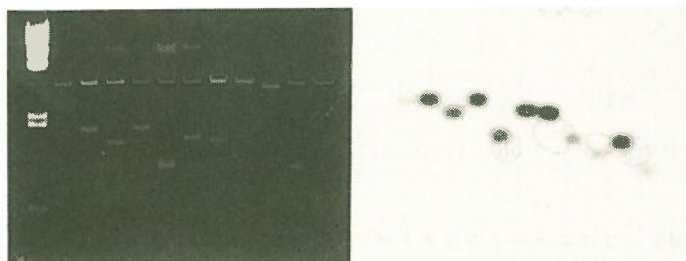


図3 サザンブロッティング法による挿入cDNAの検出

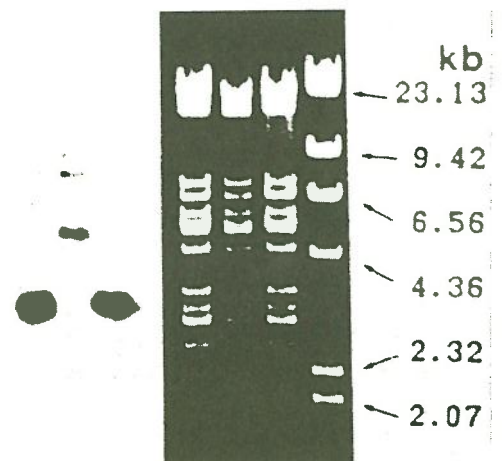


図4 サザンブロッティング法による変異の検出

て、変異株の分類や変異の分子レベルの機構の解明などの研究に活用することができるだろう。

4. ハイブリダイゼーションの条件の検討

ハイブリダイゼーションの反応はイオン強度や温度などの様々の条件によって影響を受ける。標準的な条件はイオン強度0.9M(6×SSCに相当)で、温度は T_m 値より25°C低く設定して行う。 T_m 値は次式①により算出される。

$$T_m = 82.3^\circ\text{C} + 0.41 (\%G + \%C) - 500/n \quad \text{①}$$

(n:最も短いDNA鎖)

オリゴヌクレオチド(20ヌクレオチド前後)をプローブとする場合は②式によって T_m 値を算出し、5°C低い温度で行う。

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T) \quad \text{②}$$

ホルムアミドを含む溶液は1%につき0.7°C下げて行う。たとえば50%ホルムアミドでは T_m 値は35°C低くなる。洗浄は一般的にはイオン強度を下げて行う。しかし、オリゴヌクレオチドの場合は著しく感度を落すこともあるので注意を要する。

5. オリゴヌクレオチドプローブの利用

オリゴヌクレオチドをプローブとする手法は合成機の普及によって急速に進展した。この手法により遺伝子の単離や点変異の検出まで可能になった。

a. 部分的に決定されたアミノ酸配列による遺伝子の単離

タンパク質の部分的なアミノ酸配列を決定すれば、その配列から塩基配列を推定し、プ

ローブを合成することができる。たとえば5個のアミノ酸配列を決定すれば、15塩基のヌクレオチドの配列を推定できる。われわれはこの手法で既にいくつかの遺伝子の単離に成功している。

b. 点変異の検出

②式の T_m 値から推定すると一塩基のミスマッチは2~4°Cに相当するが実際には10°C近い影響があることが観察されている。 T_m 値の変動を利用して点変異を検出できる。人為的に組換えDNAを点変異で標識すれば、これを識別し、追跡することはより確実になる。

6. ま と め

DNAプローブによる組換え体の検出と追跡は、微細な変異・変動まで監視できるようになった。自然界には永年にわたってDNAレベルの変異・変動が生じてきた。

このDNAの動的な変化の足跡も同時に観察できるわけであり、DNAプローブ法は、生物学分野の研究に大きく寄与することが期待できる。

文 献

- 1) 国野嘉幸ら編(1987) 実験操作プロット法, ソフトサイエンス社 pp. 545
- 2) Maniatis T. et al (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory pp. 361
- 3) Gillespie D. and S. Spiegelman (1965) *J. Mol. Biol.* 12: 829-842
- 4) Denhardt, D. (1966) *B.B.R.C.* 23: 641-646
- 5) Southern, E.M. (1975) *J. Mol. Biol.* 98: 503-513
- 6) Meinkoth J. and G. Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138: 267-284
- 7) 村杉 章 (1988) 生化学 60: p. 48-50

文献情報

アンチセンスチャルコン合成酵素遺伝子を導入した組換え植物体の花色の変異

ある特定RNAの相補鎖RNAを用いることによりタンパク質合成を抑える研究が最近さかんに行われている。このようにタンパク質合成を抑制する相補鎖RNAはアンチセンスRNAと呼ばれている。チャルコン合成酵素はフラボノイド合成の鍵となる酵素で花冠、花茎、葯に分布している。著者らはこの色素合成に関与しているチャルコン合成酵素のアンチセンスRNAを産生する組換え植物体を作製し、野生型とは花色の異なる植物体を得ることに成功した。

Petunia hybrida Violet 30よりチャルコン合成酵素のゲノミッククローンを単離しチャルコン合成酵素をコードしている領域を断片化した後、アグロバクテリウムバイナリーベクター BIN 19のCaMV 35Sプロモーターの下流へ逆向きに挿入した。このベクターを *Agrobacterium tumefaciens* 4404株を用いて *Petunia* VR hybridsと *Nicotiana tabacum* SR 1へ導入した。250 μ g/mlのカナマイシンを含む培地で選抜し植物体を再生した。このようにプロモーターの下流に逆向きに挿入したことによりこの組換え植物体はチャルコン合成酵素の相補鎖RNAを産生することになる。

カナマイシンの選抜培地から再生した植物体の花は野生型の花と比較したところ3クラスに分けられた。

その内訳はペチュニアでは

○クラス1 (25選抜個体内12個体)

野生型の花と区別できないもの

○クラス2 (25選抜個体内8個体)

花冠で色素の欠失部分が見られるが花茎は野生型と同じもの

○クラス3 (25選抜個体内5個体)

花冠と花茎の両方に色素の欠失の見られるもの

タバコでも同様に

○クラス1 (40選抜個体内3個体)

○クラス2 (40選抜個体内3個体)

○クラス3 (40選抜個体内1個体)

しかし、葯はどのクラスとも野生型と変わらなかった。また、タバコの組換え体で野生型と区別できるクラス2, クラス3の個体数が少ないのはペチュニア由来のチャルコン合成酵素遺伝子をタバコに導入したためではないかと著者らは推察している。そこで、変異株の多く得られたペチュニアについて生化学的分析を行った。3クラスの組換え植物体の花冠と花茎からタンパク質とmRNAを抽出し、ウェスタンブロットおよびノーザンブロットによりチャルコン合成酵素とそのmRNAの含有量を調べた。その結果、クラス1の植物体では花冠、花茎とも酵素とmRNAが野生型とほぼ同量検出された。クラス2の植物体では花冠にのみ検出された。クラス3の植物体では両器官とも検出されなかった。これらチャルコン合成酵素とそのmRNAの分析結果は形態の結果と一致していた。また、組換え植物体の核DNAの分析から内因性チャルコン合成酵素の遺伝子には変化がなかった。よって、本実験で得られた結果は体細胞変異、相同性組換え、遺伝子変換のためにおきたのではなく、アンチセンスRNAの効果によるものであると結論している。最後に、組換え植物体個々のクラスについてアンチセンスRNAの発現量を分析した。その結果、導入されたアンチセンスチャルコン合成酵素の遺伝子のコピー数と実際のアンチセンスRNAの発現量には相関がなかった。また、同程度のアンチセンスRNAの発現量でも表現型に差異があった。たとえば、アンチセンスRNAの発現量が非常に低いものでも大きな花色の変異が見られる植物体があった。これらのことから、本実験でのアンチセンス遺伝子の効果のしくみは非常に複雑で、組換え遺伝子の染色体への挿入部位の違いによってアンチセンス遺伝子の発現は量的にも質的にも変化するものと考えられる。

バクテリアを使っての実験結果から、センスRNAとアンチセンスRNAとが細胞内で結合するためにリボソームによるタンパク質

合成が阻害されると考えられている。しかし、本実験の結果を見る限りでは単に、アンチセンスRNAがセンスRNAに結合するだけでタンパク質合成が阻害されるのではなく、さらに複雑なしくみが関係している可能性がある。

原因はどうか、遺伝子導入によって変異種を作出することに成功した訳であり、近い将来分子育種によって作製された植物が実用化されるものと思われる。(口絵参照)

(抄訳 丸田嘉幸)

An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation

Alexander R. van der Krol, Peter E. Lenting, Jetty Veenstra, Ingrid M. van der Meer, Ronald E. Koes, Anton G. M. Gerats, Joseph N. M. Mol and Antoine R. Stuitje
Nature 333: 866-869 (1988)

文献情報

形質転換トマトにおけるアンチセンスRNAによるポリガラクトツロナーゼ遺伝子発現の抑制

アンチセンスRNAによる特異的な遺伝子発現の調節は、細菌では自然に見られるメカニズムであるが、高等真核生物では見いだされていない。しかし、アンチセンスRNAをカエルの卵母細胞やショウジョウバエの胚中に導入した場合には、特異的な遺伝子の発現が減少したと報告されている。また、アンチセンスRNAは、マウスのL細胞、ニンジンのプロトプラストあるいは形質転換タバコなどの系に人工的に導入され、特異的な遺伝子発現の抑制が示されている。本報告では、トマトのポリガラクトツロナーゼ(PG)遺伝子が、導入されたアンチセンスRNAによって発現が著しく抑制されたことについて紹介する。

PGは、トマト果実の軟質化に重要な役割

を果たしており、果実が成熟するときにPG mRNAが蓄積して、あらたに合成される。まず、トマト(*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Ailsa Craig)から分離したPG cDNAクローン(pTOM6)を用いて、PGアンチセンスRNAがトマトで発現する系を作製した。pTOM6の5'末端側の730bpの断片を逆向きにし、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターとノパリン合成酵素遺伝子の間に連結させ、*Agrobacterium tumefaciens*のバイナリーベクター Bin 19に導入した。さらにこれを、*Escherichia coli* TG-2から*A. tumefaciens* LBA系統に接合によって移行させ、トマトの茎片を用いて形質転換を行わせた。カナマイシン耐性をマーカーとして選抜し、得られた3個体のトマト(GR15, 16, 17)を供試して、解析を行った。

各形質転換体の葉からDNAを抽出し、pTOM6の挿入部分をプローブとしてゲノミックサザンを行った結果、形質転換体からは非形質転換体に存在しないバンドが検出された。また、GR16と非形質転換体の葉と果実からpoly(A)⁺RNAを抽出し、ノーザンブロット法による解析を行った結果、GR16からPGアンチセンス遺伝子による三つの転写物が検出され、形質転換体でPGアンチセンス遺伝子の発現が認められた。さらに、RNAドットハイブリダイゼーション法でPGアンチセンスRNAの定量を行ったところ、GR16では成熟果、未熟果、葉とも同程度発現し、成熟果中のPG mRNAは非形質転換体の6%で、PGアンチセンスRNAのレベルはPG mRNAの60%であった。また、SDS-PAGE法によっても、形質転換体果実のPGタンパクは、非形質転換体より減少していた。PG活性もGR16では、非形質転換体の10%であった。

次に、PGは成熟の過程で色素リコピンと平行して蓄積して行くことを利用して、異った成熟過程におけるPG活性を比較したところ、GR16果実の全成熟過程でPG活性は減少していた。

GR16のF₁12個体のうち、8個体でPG活性が低下し、ゲノミックサザンによっても、

PGアンチセンス遺伝子の存在が認められた。

以上の結果から、PGアンチセンスRNAによってPG活性の減少を認めたが、この抑制のメカニズムについては解明されていない。PG mRNAのレベル低下は、核中の転写、プロセッシングまたは移行などの過程で起きるのか、あるいはds-RNAのハイブリッドの低下によって起きるのかとも考えられる。

アンチセンスRNAによる植物遺伝子発現の調節機構に関しては、まだわからない点が多い。しかし、進化や植物育種分野においても、アンチセンスRNAによる植物の遺伝子発現の調節は有用でかつ重要であると考えられ、今後の発展が期待される。

(抄訳 宮坂 篤)

Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes

Smith, C.J.S., C.F. Watson, J. Ray, C.R. Bird, P.C. Morris, W. Schuch and D. Grierson

Nature 334: 724-726 (1988)

文献情報

ジェミニウイルスを用いた新しいウイルスベクターの開発

植物に外来遺伝子を導入する方法としては、Tiプラスミドを用いた形質転換法、エレクトロポレーションやマイクロインジェクションなど直接細胞にDNAを導入する方法、植物ウイルスをベクターとして用いる方法などがある。これらの中で、植物ウイルスベクターによる形質転換法は、単一細胞あるいはプロトプラストからの再生系を必要としないこと、外来遺伝子を組み込んだベクターが細胞内で複製するためコピー数が増幅できることなど、他の方法にはない特徴を持っている。しかし、これまで主に研究がなされてきたCaMV(カリフラワーモザイクウイルス)では、宿主範

囲が狭いことや、ベクターに挿入できる外来DNAの大きさに限界があることなどから実用化には至っていない。ところが最近、ジェミニウイルスを用いた新しいウイルスベクターの開発が試みられている。ジェミニウイルスは、2種類の一本鎖DNAゲノム(A, Bゲノム)を持つウイルスで、複製中間体である2本鎖DNAは、クローニングしたのち、容易に改造、再感染させることができる。またそのクローンDNAは、アグロバクテリウムを介して植物に感染(agroinfection)させることも可能である。さらに、双子葉植物、単子葉植物いずれにも感染できることから、ジェミニウイルスを用いることにより、より汎用性の高いウイルスベクターの作成が期待できる。

そこで、ジェミニウイルスグループに属するTGMV(トマトゴールドモザイクウイルス)のAゲノムの複製中間体2本鎖DNAから外被タンパク質遺伝子の部分を削除し、かわりにnpt(ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ)遺伝子を組み込んだ組み換えゲノム(TAneo)を作製した。そして、このTAneo, 1.6コピーと、Bゲノムの2本鎖DNA 2コピーをそれぞれ連結し、TiプラスミドのT-DNAボーダー配列間にクローニング(pBin19 A1.6neo B2)、タバコにagroinfectionを行った。21日後、全DNAを抽出し、Aゲノムまたはnpt遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、20個体中4個体でTAneoに相当する開環状・スーパーコイル状2本鎖DNAおよび一本鎖DNAが検出された。また、あらかじめBゲノム2本鎖DNA 2コピーを連結して形質転換したタバコに1.6コピーのTAneoをagroinfectionをした場合は、TAneoが検出された個体がさらに効率よく得られた。これより、agroinfectionにより一部の細胞に導入された1.6コピーのTAneoから1コピーのTAneoが生じ、それがウイルスゲノム同様に自己複製しながら植物全体に移行して行ったと考えられる。さらに、TAneo 1.6コピーを連結し、バイナリーシステムでタバコに形質転換したところ、agro-

infection の場合と同様に、細胞内で TAneo が増殖していることが確認された。得られた形質転換体では全染色体に 1.6 コピーの TAneo がマスターコピーとして存在しており、そこからコピーされた TAneo が細胞質中で増幅すると考えられる。すでに A ゲノムを形質転換した植物では、それがメンデル遺伝することが報告されていることから、この TAneo のマスターコピーも次代に遺伝するものと考えられる。また、npt 活性を調べたところ、TAneo の増幅に比例して活性の増加が認められた。

ジェミニウイルスは、宿主範囲が広いだけでなく、遺伝子発現やウイルス複製の様式が CaMV ほど複雑ではない。また、外被タンパク質遺伝子を欠失させるとほとんど病徴

を示さないなどの利点がある。さらに、ジェミニウイルスベクターに組み込んだ外来遺伝子が、ベクターと共に染色体上のマスターコピーから飛び出して細胞内で増殖し、コピー数を増加させることが明らかとなった。したがって、このベクターは、組み込んだ外来遺伝子を強力に発現させたい場合に特に役立つと考えられる。今後の植物遺伝子工学におけるジェミニウイルスベクターの利用が期待される。(抄訳 高橋英樹)

Gene amplification and expression in plants by a replicating geminivirus vector

Hayes, R. J., I. T. D. Petty, R. H. A. Coutts and K. W. Buck

Nature 334: 179-182 (1988)



外国特派員便り

ヨーロッパにおける水産ハイテクノロジー

農林水産省 農林水産技術会議事務局

松里寿彦

昭和63年6月上旬、フィンランド、ノルウェーなど欧州5カ国について、バイオテクノロジーを中心とした水産ハイテクノロジー関連研究の現状を調査する機会を得た。目的は異なるが、昨年は、アメリカ、カナダを再訪する機会にも恵まれ、自ずと、水産バイオテクノロジー、ハイテクノロジーのみならず水産全般について我が国と欧州、北米諸国との差異を強く意識せざるを得ない。もとより管見ではあるが、ここでは欧州におけるバイオテクノロジーを含めた水産ハイテクノロジーの研究の現状の一端について報告する。

最初に訪問したフィンランドは多数の淡水湖と長い海岸線に恵まれた人口500万人の魚食国（国民1人当たり水産物年間消費量、約40kg弱）である。この国の水産研究において最も印象深かったのは、水産物輸出入国としての検疫、食品衛生を含めた体制の完備、孵化場などにおける給餌、水質管理の自動化、および官学民の研究交流である。第一の点については、欧州の特徴でもあろうが、例えばフィンランドは、大型ニジマスの欧州における

強力な輸出国の一つであるが、同時に小型ニジマスの輸入国でもある。また、イワシ類のマリーネの輸出国であるが原料の多くは輸入している。このような複雑な、成熟した輸出入の状態は、魚の検疫や食品としての安全性等についての諸制度の機能的な整備につながっている。孵化場などにおける自動化については、気候の厳しさと、この国の得意とする精密機械工業力の結合であろう。特に、水温変動の激しい、酸性、低酸素湖水の水質管理技術は、養殖用淡水の欠乏している我が国にも導入すべき技術であろう。また、湖水と海水を利用した汽水魚の孵化、育成技術も我が国より進んでいる。魚類バイオテクノロジーについては、ヘルシンキ大学遺伝研究所を中心に、官、民研究機関が共同で研究に取り組みつつある。次の訪問国ノルウェーも同様であるが、官・民・学の所属を越えたプロジェクト研究組織体制は、北米よりも欧州で発達



フィンランドにおける大西洋サケ養殖場(右端 養殖魚家)



西ドイツHelgoland国立海洋研究所内海水ろ過装置

しており、バイオテクノロジーのような新しい研究分野では特に効率的であろう。親目的で、かつ科学技術立国に対する強い意欲を感じた。

ノルウェーは欧州における水産大国の一つである。「水産バイオ研究会」の名簿を見ても官・民・学を挙げて意欲的な研究開発を行っていることがわかる。特に、ノルウェーにおいては、養魚家の団体が官・民・学と結合し、プロジェクト研究を推進するとともに、多数の国際研究集会を組織し、支援していることと、私企業の研究意欲の高さには驚かされた。世界の最新知識・技術の収集のための最も効率の良い方法は、国際研究集会を招へいすることであることは常識ではあるが、このように実行することは難しい。私企業の研究開発に興味深かったのは、A製薬メーカーにおける多様な魚病ワクチン開発と、対米輸出を考慮した「無病種苗」の生産、およびギンダラ、オヒョウ、大西洋サケ等新養殖魚種開発であった。魚病ワクチンの開発は、人用ワクチン製造技術を応用したハイレベルの研究であり、魚用医薬品の使用規制の厳しい、北米、欧州諸国の潜在的需要を見込んだものであろう。「無病種苗」は、米国等における、特定疾病の発生の無い養殖場の親魚からの種苗のことであり、「無病」の要件を満たすためには、5～7年間の疾病管理が必要である。魚病の検疫制度が徐々に強化されている現状に合せた種苗生産輸出国を目指す技術開発である。新魚種の開発については餌料、催熟、孵化等、水産増養殖技術の最先端の技術を駆使しており、我が国が開発した海産魚の種苗

生産技術のいくつかは、スケールアップされるとともに巧みに合理的に取り入れられていることにある種の感動すら覚えた。我が国沿岸より概して環境条件の厳しいフィヨルドで育てられた養殖技術が再び我が国に導入される日も近いと思われる。

西ドイツでは、国立海洋研究所における、淡・海水の循環再利用システムと同研究所の客員研究員制度に興味深かった。本年はともかく、我が国の淡水の欠乏は今後ますます深刻になるものと思われるが淡・海水の浄化、再利用の研究は西ドイツに比して十数年遅れているように思う。活性汚泥からバイオフィルターへの研究の展開が必要であろう。このような高水準の研究は、同研究所の持つ客員研究員制度が支えている。常時100人以上の外来研究者の収容可能な宿泊、研究施設などは、島国で国際社会から孤立しがちな我が国にこそ必要ではなからうか。

イタリアでは、二大鉄鋼メーカーの魚類養殖の説明を受けたが、シロチョウザメなど新しいグルメ材の開発と、現場に密着した魚病診断技術開発が印象に残った。

狭義のバイオテクノロジーに限定するならば、欧州と我が国との研究レベルに大差はないが、欧州のバイオテクは、着実に養殖技術体系の内に組み入れられつつあると思われる。我が国においては、まず、現在の養殖技術を科学的に再構築することが必要であり、それによっではじめてバイオテクノロジーの産業への利用も可能となるとと思われる。

最後に、欧州調査の機会を与えて下さった関係各位に感謝致します。

特別情報

植物組織培養技術の最前線

第1回植物組織培養コロキウムから

農林水産省 農業生物資源研究所

大山勝夫

日本植物組織培養学会が発足して以来、今年で20年目を迎えた。これを記念して去る7月19・20日の両日にわたり、生研機構の協賛を得て、つくば市・ノバホールにおいて第1回コロキウムを開催した。これには700余名の参加があり、「植物組織培養技術の実用化の現状と今後の展望」について講演とポスター展示による発表があり活発な討論が展開された。以下、その大要をとりまとめた。

1. 組織培養技術の進歩

基調講演として京大、山田康之教授、ならびに東北大、駒嶺 穆教授からそれぞれ次の話題が提供された。

まず、山田教授は、現在の植物細胞工学が1930年代後半、WhiteとGautheretによる組織培養の成功が端緒となり、その後1950年代における細胞大量培養の実現や全能性の証明、1970年代のプロトプラスト培養を中心とする細胞操作の進展にもなっており、近年ではエレクトロポレーションやマイクロインジェクションなど最先端の技術手法が追求されるようになったこと、一方、分子生物学の分野では1950年代から1970年代にかけて、生命現象が遺伝子DNAによって制御された生体情報システムであることが明らかにされ、いわゆるバイオテクノロジーと呼ばれる組換えDNAなどの画期的技術が確立されてきた歴史的發展の経過から、現時点は植物細胞工学と分子遺伝学の合流が要求されている時代であると強調した。すなわち、現在までの植物組織培養研究領域では組織培養技術を用いることにより、生命の本質を細胞レベルで解析し、かつ利用しようとするものであった。こ

のように細胞レベルでの生命現象の把握は重要であり、植物の実態を総合的に見ているともいえる。しかし、現在、分子、遺伝子レベルで生命現象を解析しうる技術の行使が期待されていることから、ここに植物細胞工学と分子生物学の相互的合流が植物生命現象の解明にあたり必要とされる時代に到っていることを指摘した。また、研究には「不易」と「流行」の2面があり、前者は時代を越えて変らない実体の本質に係るものであり、後者はその時点において要求される時代的背景に依存するものとされている。そこで、われわれ研究者はこの両面が複雑に分ちがたく結びついていることを認識し、研究の本質は常にこの不易と流行の両面を統一するものとして捉えなければならない。どの時代においても、この両者の研究は科学の進歩に必須であり、「不易」のみの追求では研究は独断、硬直に陥りマンネリ化し、学問の大きな進歩は期待できないし、「流行」のみでは軽佻浮薄に落ち、実体の把握が困難となり、一次的解決に終わることになることをいましめたい。ここで、「不易」と「流行」の両面を統一して捉えていく必要性を強調した。

つぎに、駒嶺教授は、植物生理学の実験系としての植物細胞培養系の意義について言及した。植物生理学における方法論の一つは、さまざまな因子を外部からinputした場合、植物細胞がこれに反応してoutputする現象や細胞機能を定量的に測定し、input-outputの因果関係を解析することである。こうした視点から、植物生理学の実験系として成立する条件としては一定のinputに対し、一定のoutputが生ずることであり、それには1)環境が完全に制御できること、2)素材とな

る細胞集団ができるだけ homogenous であることが必要である。1)の条件は, *in vitro* system である植物細胞培養系では十分に満たされており, また, 2)の条件も最近10年間に細胞分画法などの進歩によって満たされるようになった。これらのことから植物培養細胞系は植物生理学の優れた実験系であり, 植物細胞機能を工学的に利用するバイオテクノロジーの観点から優れた生産系であることを強調した。この点は山田教授が提起した「不易」と「流行」の両面と共通するものであった。培養細胞系における植物体細胞のライフサイクルには脱分化—増殖—分化の局面があ

り, そのおのおのの局面でさまざまな生理現象や細胞機能が発現しているが, これらを分子レベルで解明するための実験系として, 対象とする現象や細胞機能ができるだけ小さい単位, すなわち単細胞でしかも同調的におこなうことが要求される。このような立場から, 植物の培養細胞系を実験系とした植物生理学へのアプローチについて問題提起がなされた。

両教授は現時点における組織培養技術の到達点と今後の方向を展望したうえで, それぞれの研究室における最近の成果を紹介した。

以下, これらを含めた全発表課題について要約した。

2. 培養系

	対象作物	目 標	要 約
1. 駒嶺(東北大)	ニチニチソウ	同調培養	リン酸飢餓処理による同調培養系確立 細胞壁多糖類代謝 タンパク合成解析
	ニンジン	全能性発現のモデル系	不定胚分化の誘導同調化 Embryogenic細胞塊 State 1の段階でDNA, RNA合成の局在化 極性発見と不定胚分化
	イネ	不定胚形成系	イネ インディカ型, サスペンション 培養系→不定胚誘導 60%
	ハクニチソウ	管状要素の分化モデル系	単離葉肉細胞系を用い 管状要素の分化と細胞周期との関係
2. 河合ら(千葉大)	サルビグロシス	プロトプラスト培養系とアントシアニン生成	カルス→プロトプラスト→分裂→コロニー→明所下でアントシアニン生成と蓄積→カルス→シュート分化
3. 浅野(生物研)	ノシバ (<i>Zoysia japonica</i>)	プロトプラスト培養系	ノシバ種子由来カルス→プロトプラスト→Agarose二層法で培養→5-6日目分裂→2週間後コロニー形成→カルス
4. 小林ら(筑波大)	ニンジン	不定胚誘導・人工種子	高濃度ショ糖(0.7M), CdCl ₂ (500μM)および貴金属等のストレスが不定胚誘導に効果, これら不定胚由来人工種子の発芽良好
5. 中村ら(名大)	コーヒー	体細胞胚誘導と微細構造	外植片(葉)→体細胞胚誘導 2段階法(2.4D+BAP→NAA+2ip)良好 1段階法(BAP)不良 体細胞胚形成過程の表面微細構造と細胞内小器官を電子顕微鏡で観察
6. 日高ら(果樹試・興津)	カンキツ類	脱分化, 分化, 胚様体形成	糖と糖関連物質の効果検討 カルス増殖にガラクトース, グルコース, ラクトース, シュクロースが効果的 胚様体形成にガラクトース, ラクトース, セルビオース, マルトースが効果があり糖と糖関連物質による分化の方向制御の可能性示唆
7. Liu, H. Jら(神戸大)	コムギ	脱分化と器官形成	コムギ21品種について未熟胚培養 カルス形成には品種間差異なし 未熟胚→直接発芽は品種により顕著な差異 カルスからの芽・根の分化は品種間差異あり, 遺伝的要因大 器官分化に対してカゼイン分解物(CH)の効果認む
8. 島田ら(石川農短大)	ムギ類	再分化植物の染色体変異	大麦(母)×小麦由来培養細胞→2n=28(23-29の変異)→再分化植物 2n=28(全体の78.3%) 小麦(母)×大麦由来カルスからの分化にAgNO ₃ の効果認む 再分化植物の染色体構成調査中

	対象作物	目 標	要 約
9. 岡ら (日本たばこ)	トウガラシ・ロ ゴット	胚珠培養一雑種育成	トウガラシ (品種本鷹の爪 日光 太長) 母×ロゴットで正常個体を得る 雑種性確認 交配後31日目以上の段階で胚 珠摘出培養がよい
10. 今西(山形大)	トマト・野生種	種間雑種の育成と再分化 能	トマト栽培種×野生種 (<i>L. peruvianum</i>) の胚珠培養により雑種個体F ₁ を得た このF ₁ を用い栽培種(母)と戻して交雑し B ₁ F ₁ を得る B ₁ F ₁ 個体の再分化能を調査
11. 久島ら (筑波大)	イネ科植物	大量迅速育苗	イネ・トウモロコシ種子→培養→マルチプ ルシュート→再生植物 クローン植物多数 得る
12. 谷口ら (広島大)	一年生植物 多年生植物 樹木等52種	苗条原基	茎頂→苗条原基→クローン増殖系の確立 常温保存および凍結保存可能 単細胞・カルスからの苗条原基誘導 苗条原基から胚様体誘導 倍数体苗条原基の作出も可能
13. 福井ら (岐阜大)	ササユリ	大量増殖	種子→胚培養→子球→鱗片培養系ならびに 茎頂培養→子球鱗片培養系 両培養系によりさらに子球を増殖させ馴化 することにより、効率的な大量増殖可能
14. 秋田ら (協和発酵)	ジャガイモ	大量増殖	シュートの大量増殖(Phase 1)→塊茎誘導 (Phase 2)の各Phaseにおける至適培養条件 を検討し、ジャーファーマンターにおける 大量培養の基本スキーム確立

3. 細胞選抜・細胞生理

	対象作物	目 標	要 約
1. 小山ら (東北大)	ニンジン	低リン酸ストレス耐性細 胞株の選抜	ニンジン培養細胞から難溶性リン酸 AI の生 成にともなう低リン酸ストレス耐性をもつ細 胞を選抜した。この LPT 株は難溶性リン酸 の利用が可能。この特性はリン酸資源の有 効利用の点から注目される
2. 黒田ら (四国農試)	ジャガイモ	リジン耐性細胞の選抜	プロトプラスト培養系を利用し、UV 照射 により変異を誘起し、リジン耐性細胞株を 選抜した。再生個体においてもリジン耐性 認められる。変異体は親植物と異なったア ミノ酸代謝を示す
3. 水口ら(京大)	タバコ	パラコート耐性カルスの 選抜	プロトプラスト由来カルス→パラコート含 有培地→生存株の選抜→再生個体 (パラコ ート抵抗性) → 自殖後代も耐性維持。これ ら耐性細胞組織ではSOD活性が高い
4. 伯井ら (神戸大)	タバコ	シアン耐性呼吸鎖の活性	タバコ培養細胞株について増殖ステージご とにチトクローム鎖およびシアン耐性鎖の 存在と稼動状況を調べたところ、全増殖サ イクルを通じシアン耐性鎖がフルに稼動し ていることなどが明らかにされた

4. 細胞融合

	対象作物	手 法	組 合 せ	要 約
1. 山田(京大)	イネ	電気融合法 (非対称)	細胞質雄性不稔イネ A58×フジミリノ	サイブリッド細胞株→再生個体 アイソザイムパターンより雑種性確認
2. 島本(植工研)	イネ	電気融合法 (非対称)	イネと野生種(4種)	雑種カルス→再生個体 雑種性確認・稔性有 2組合せで種子形成
3. 石井ら (キッコーマン)	ミカン	P E G 法	オレンジ×カラタチ ネーブル×グレープフルーツ ネーブル×温州ミカン ネーブル×マーコットタンゴール オレンジ×温州ミカン オレンジ×シトレンジ	雑種細胞→胚様体→再生個体 雑種確認 植物体再生 植物体再生 1個体 雑種 植物体再生 植物体再生 雑種 植物体再生 雑種

	対象作物	手 法	組 合 せ	要 約
4. 志賀ら (サカタ)	アブラナ科	電気融合法 (非対称)	ハクサイ×キャベツ-1 ダイコン×キャベツ-1 ダイコン×キャベツ-2 ダイコン×キャベツ-2 ハクサイ×カリフラワー ハクサイ×ケール	細胞質雄性 植物体再生数 46 不稔個体 4 " 106 0 " 122 0 " 14 2 " 780 調査中 " 65 調査中
5. 田口(タキイ)	アブラナ科	テキストラ法	ハクサイ×キャベツ	赤キャベツ×ハクサイ 雑種細胞 雑種カルス→不定芽→再生個体 27個体 9個体で雑種性確認 7個体で自殖種子を得る
6. 岡村ら (キリンビール)	ジャガイモ	PEG法 電気融合法	<i>S. photinocarptum</i> × <i>S. tuberosum</i> トマト野生種×ジャガイモ	雑種細胞選抜→コロニー→カルス 雑種性確認 雑種細胞→コロニー→カルス→ 134系統の雑種 植物体, 稔性有 青枯病, 軟腐病抵抗性確認
7. 坂本ら (三井東圧)	イネ	電気融合法 (非対称)	細胞質雄性不稔イネ ×栽培種農林8号	融合細胞→コロニー→カルス→雑種性確認 →植物体→サイブリッド作出に成功
8. 林ら(カゴメ)	トマト	電気融合法	トマト栽培種×野生種 (<i>L. chilense</i>)	融合細胞→分裂→コロニー→小カルス→再 生個体 雑種性確認 体細胞雑種 自殖 稔性有
9. 日向ら (東北大)	イネ	電気融合法	イネ・ヤマボウシ×紫大黒	葯→カルス→プロトプラスト→融合細胞→ コロニー→カルス→9個体再生植物 2倍体 3個体, 3倍体 6個体
10. 丹野ら (植工研)	ニンジン	PEG法 (非対称)	ニンジンCMS系統 ×可稔系統	胚軸→カルス→プロトプラスト 片親→X線 他片親 ヨードアセトアミド 処理→融合→コロニー形成→胚様体→幼植 物体→雑種性確認
11. 今泉ら (PL学園)	ジャガイモ ベニバナ	電気融合法	ジャガイモ(メイク イン) ×ベニバナ	融合細胞→コロニー→カルス 雑種性未確認

5. 遺伝子組換え

	対象作物	目 標	要 約
1. 岡田(東大)	タバコモザイク ウイルス	植物ウイルス工学の構築	TMV-RNA遺伝子の操作系の確立とTMV の遺伝子地図の作成にともない人為的に特 定の性質をもつTMVの作成が可能になる 隣接細胞に移動しないTMV, 他の葉に広が れないTMV, さらに人工弱毒ウイルスの 作成が試みられた
2. 岩淵(北大)	コムギヒストン	コムギヒストン遺伝子の 転写制御因子の解析	クローン化し, その一次構造も決定された コムギヒストンH ₃ とH ₄ 遺伝子についてそ の転写制御要因に関する成果レビュー
3. 服部ら(名大)	サツマイモ	貯蔵蛋白質遺伝子の構造 と器官特異的発現の制御	サツマイモのスポラミン遺伝子を中心にそ の構造や発現機構についてレビュー
4. 内宮(筑波大)	タバコ	DNA直接導入法の確立 と矮化遺伝子の発現	タバコ, イネのプロトプラストにDNAを 直接導入し形質転換体を得た さらにその後代における形質発現とその分 離を調べた また, Riプラスミドの矮化遺伝子の発現に ついての考察が加えられた
5. 斉藤ら (千葉大)	シロイヌナズナ	器官特異的発現遺伝子制 御の解析	<i>A. thaliana</i> の茎および根に特異的に発現 する遺伝子の多重遺伝子族の構成を部分的 に解明 さらにTiプラスミドを用いた遺伝子導入 法を解析
6. 菅谷ら (筑波大)	タバコ	矮化遺伝子導入と細胞特 異的発現	RiプラスミドT-DNA遺伝子群の中の012 遺伝子(矮化)を導入した形質転換体につ いて細胞特異的発現と植物体形態的変化の 関係を解明 さらに細胞レベルでの特異的発現から形態 形成との関連を示唆
7. 斉藤ら (筑波大)	西洋わさび	形質転換体におけるパー オキシダーゼ・アイソザ イムの解析	Riプラスミド形質転換体・非形質転換体 の間でパーオキシダーゼ アイソザイムパ ターンの差異認めず 毛状根から不定芽形成に光が必要

	対象作物	目 標	要 約
8. 出野ら (三井石油化学)	ズボイシア	スコポラミン高生産株の 取得	ズボイシアの苗条に <i>Agrobacterium rhizo-</i> <i>genes</i> を感染し、感染不定根を得る 継代と選抜を繰り返すことにより、スコポ ラミン生産性の高い株を取得した

6. 二次代謝

	対象作物	目 標	要 約
1. 山田(京大)	セリバオウレン ヒヨス	ベルベリン産生 スコポラミン産生	セリバオウレン培養細胞からベルベリン高 産生細胞を選抜した さらに(s)-テトラヒドロベルベリン(THB) からベルベリンを合成する際の THB オキ シダーゼの全塩基配列を決定した
2. 駒嶺(東北大)	ニンジン	代謝的分化モデル系	ニンジン培養細胞におけるアントシアン合 成と不定胚分化誘導が共通した誘導機構に よるものと示唆 アントシアン生成は細胞増殖と負の相関が 認められる
3. 西 (富山医薬大)	ニンジン	ファイトアレキシン	ファイトアレキシン誘導に関する細胞内 情報伝達機構の検討 エリシターによる二次代謝活性促進または 誘導等についてレビュー
4. 藤田 (三井石油化学)	ムラサキ細胞 オウレン細胞	シニコン産生 ベルベリン産生	大量培養基礎因子 1. 酸素の供給溶存酸素 6ppm. 2. 攪拌方式の検討 3. 培養装置に ついてそれぞれ至適条件を示す 培養液当り生産性向上のため高密度培養 法の検討を含めたレビュー
5. 古谷(北里大)	ツクヌキユーカリ	細胞培養による植物変異	(-)-Mentholをツクヌキユーカリ培養細胞に投与、 新変換物を獲得 蚊の忌避作用をもつ配糖体の 生産 Digitoxigenin, 2-Phenylpropionic acid およびTabersonineの変換例についてレビュー
6. 高田ら (PCCテクノロジー)	苔類ゼニゴケ	二次代謝産物と光照射	プラスチック製光ファイバー利用 光源を 培養槽内に入れて培養法を検討した 光ファ イバー利用による細胞増殖効率化可能 光断続 照射でも培養可能
7. 吉田ら (茨城大)	タバコ	細胞外分泌機能 温度感受性突然変異株	突然変異株誘導に適切なγ線量1,000R近辺 にあることを明らかにした 紫外線についても検討 目下のところ突然 変異株は出現していない
8. 上田(京大)	クチナシ	イリドイド生産細胞株の 選抜とその分布	培養細胞のイリドイド配糖体生産性につい て検討 世界各地産のクチナシの培養細胞から単離 されたイリドイド配糖体の分布を調査し、 イリドイド生成経路から進化過程を論ず
9. 藤本ら (四国化成他)	マリーゴールド	殺線虫物質の生産 α-terthienyl	種子由来カルスおよび毛状根の α-terthienyl 含量および殺線虫活性を調べ、緑色で固いカ ルスおよび毛状根で強い殺線虫活性を認む
10. 小林ら(京大)	アキカラマツ	ベルベリン生産と半連続 培養	アキカラマツ培養細胞のアルギニン酸カル シウムによる固定化培養細胞系を確立し、 ベルベリン生成と酸素供給の関係を調べる 10日毎の培地交換による半連続培養でベル ベリン生産能 (50mg/1day) 保持
11. 齊藤ら (千葉大)	センダイハギ	ルビナルカロイド生合 成	種子由来カルスおよび不定根発生カルスに おけるアルカイド蓄積量は 色カルスのみ に認められ、ルビナルカロイド生合成と クロロプラストが密接に関係している
12. 嵯峨ら (ライオン応研)	ナス科ズボイシ ア交配種	トロパンアルカロイド生 産	形質転換体毛状根 3種クローンについて 培地条件とアルカロイド生産能の関係を検 討 毛状根の増殖と物質生産に至適条件の 検討が重要
13. 小泉ら (PCCテクノロジー)	<i>Atropa belladonna</i>	アルカロイド生産と細胞 外透過	ベラドンナ培養根中に生産される Scopolamine, Hyoscyamine などの代謝物 質の透過促進に BuOH処理が有効
14. 江坂ら (広島大)	カボチャ	アスコルビン酸酸化酵素	カボチャ培養細胞におけるアスコルビン酸 酸化酵素の分泌や生合成が CaCl ₂ 添加で促 進される

特別情報

植物バイオテクノロジーの現状

Current Status of Plant Biotechnology

ワシントン大学 (シアトル) 微生物学部

教授 E. W. ネスター博士

Dr. Eugene W. Nester

この特別情報は、本年8月開催した国際テクノロジーフォーラム「遺伝子組換えによる植物の改良」のなかで、米国ワシントン大学微生物学部E. W. ネスター博士が講演されたものです。講演要旨の翻訳は東京大学農学部の奥 尚博士にいただきました。

植物バイオテクノロジーの最近の進歩には非常に大きなものがあり、科学論文には毎週のように新しい成功が報告されている。したがって、この短い総説では、①植物細胞へDNAを導入する方法、②導入されたいくつかの有用遺伝子の2点に限って最近の報告から選び、話題提供を行いたい。

1. DNAの導入

植物細胞にDNAを導入するために多くの方法が用いられている。最も一般的な方法は以下のものである。

- 1) *Agrobacterium* による形質転換
- 2) 植物プロトプラストへの電気穿孔法 (エレクトロポレーション) によるDNAの導入
- 3) DNAの直接吸収
- 4) 微小物体を衝突させる方法

(1) *Agrobacterium* による形質転換

Agrobacterium を介した形質転換は、外来遺伝子を植物に導入する方法として最も一般的なものである (総説は文献1を参照)。*Agrobacterium tumefaciens* およびそれと非常に近縁な種である *A. rhizogenes* は自然界ではそれぞれ、根頭がんしゅ病および毛根病と呼ばれる腫瘍をひきおこす。両微生物ともDNAのある断片 (t-DNA)、即ち、tumor-

inducing (Ti) プラスミドの一部分を植物細胞に導入して腫瘍をひきおこす。この場合、t-DNA は植物の核DNAの一部に組み込まれている。この t-DNA にはオーキシシンやサイトカイニンの生合成をつかさどる酵素と、オパインと呼ばれる異常アミノ酸の合成をつかさどる酵素に関する遺伝情報がコードされている。その結果、形質転換細胞はオーキシシンやサイトカイニンの欠乏した培地で生育する能力と特異的オパインを合成する能力を持つ。

t-DNA のバクテリアから植物への転移には Ti プラスミド上の virulence あるいは *vir* という一連の遺伝子の発現が必要である。これらの遺伝子は植物細胞には導入されないが、t-DNA のプロセッシングと転移をつかさどっている。さらに、これらの遺伝子は *Agrobacterium* が傷のある植物細胞のない所で増殖している場合には発現しない。一方、傷のある植物細胞が多くの異なるフェノール系物質を合成すると *vir* 遺伝子の発現が誘導される。*vir* 遺伝子の産物のひとつは、遺伝子のある特定の部分に特異的に作用するエンドヌクレアーゼである。この酵素は末端境界配列にニックを入れ、その結果1分子の1本鎖の線状DNAが形成され、植物の染色体に組みこまれるようである。t-DNA は、それ自身の転移には必要でないために、腫瘍形成に必要な遺伝子のすべてを削除したり、植物に有用な遺伝子と置き換えることができる。植物にDNAを導入するために *Agrobacterium* を用いる主たる利点は、DNAの特定の断片が、通常、植物細胞の核に導入されることである。植物細胞に対して少ない割合の細菌を用いれば、ただ一つの t-DNA のコピーが組

み込まれた細胞を選抜することが可能である。さらに、*Agrobacterium*は非常に広い宿主範囲を持っており、事実上、すべての双子葉植物の形質転換が可能である。*Agrobacterium*を用いる最大の欠点は、ほとんどの単子葉植物が全く形質転換されないか、あるいはほとんど形質転換されないことである。つまり、コムギやライムギ、イネは我々の知り得る限り形質転換されない。しかしながら、いくつかの報告は*Agrobacterium*からのt-DNAがトウモロコシに転移し²⁾、組み込まれる³⁾ことを強く支持している。イネ科、アヤメ科およびユリ科に属する他の単子葉植物も安定に形質転換されてきているように思われる。それゆえに適切な培養条件下で適切な*Agrobacterium*の系統を用いれば、さらに多くの単子葉植物の形質転換が可能であることが証明されるであろう。

(2) 電気穿孔法(エレクトロポレーション)

遺伝子は、単子葉および双子葉の両植物とも、プロトプラストに核酸を加え電界の中に入れることによって導入することができる⁴⁾。このテクニックは、ある種のt-DNA構造の酵素活性が測定されたことで非常に有効であることが証明された。即ち、三つの下流域の配列と同様に上流域の配列の役割がDNAの電気穿孔法を用いることにより測定され、一過性の遺伝子発現が認められている。最近、カナマイシン耐性遺伝子が近交系トウモロコシに電気穿孔法によって導入された⁵⁾。選択マーカーの発現はカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35sプロモーターによる制御下で観察された。形質転換体は、カナマイシンを含有する培地上での生育により選抜された。そして、形質転換細胞から植物体が再生された。これらの植物体がカナマイシン耐性遺伝子を保持していることはSouthern hybridizationにより示された。不幸にも、プロトプラストから再生されたトウモロコシは不稔であり、種子は得られなかった。それにもかかわらず、DNAの良好な転移と組み込み、そして特にプロトプラストから完全な植物体への再生ということは重要であり、

この方法による他の単子葉植物の形質転換の可能性を強く示唆している。電気穿孔法は双子葉植物にはあまり利用されていない。なぜならば、それは*Agrobacterium*系の成功のためであり、DNAを取り込ませるにあたってプロトプラストの段階を必要としないからである。電気穿孔法を用いることの最大の欠点の一つはおそらくプロトプラストからの完全植物体再生の困難さにあろう。

(3) 高速微小物発射法(High Velocity Microprojectiles)

最近、植物細胞にDNAとRNAを導入する新しいテクニックが報告された⁶⁾。核酸は高速微小物発射法を用いることにより多くの異なる細胞に導入できる。この方法はDNAあるいはRNAで被覆したタンゲステンの球から成り、一種のガンで加速される。初期の実験では1cm²のタマネギの表皮組織の細胞の約90%が微小発射物を含有していた。明らかに多くの細胞は微小発射物の侵入によっても生存しており、一過性の酵素活性が発現し、そして安定な形質転換体も得られた。

最近の実験では*Chlamydomonas reinhardtii*の葉緑体変異体の変異領域とホモログな野生型のDNAと置換することにより形質転換が可能であることが示されている。さらに、DNAは酵母細胞にも導入することができ、この場合には酵母のミトコンドリアを安定的に形質転換することができた。安定な形質転換はミトコンドリアゲノムのホモログな組換えを意味する。

2. 植物に導入された有用形質

多くの有用形質がいくつかの植物に導入されている。ここでは導入された三つの性質の遺伝子について手短かに述べる。これらは、①昆虫に対する抵抗性、②ウイルスに対する抵抗性、③除草剤に対する耐性である。

(1) 昆虫抵抗性

昆虫抵抗性として導入された遺伝子は主として*Bacillus thuringiensis*(BT)からのもの

のである。この微生物は多くの昆虫に対して毒性を持つタンパク質を生産する。異なるBTの系統は内生孢子の形成過程において殺虫活性の異なるタンパク質を合成する。ほとんどのBTは鱗翅目すなわち、ガやチョウの幼虫に特異的に致死的なタンパク質を合成する。しかし、ある系統は双翅目に、他の系統は鞘翅目に特異的である。殺虫活性は、この生物が孢子を形成するときに作られるタンパク質の結晶に存在する。その結晶は昆虫の幼虫の中腸におけるアルカリ条件下で溶解し、放出されたタンパク質の中腸での加水分解過程で小さな毒性断片になる。この昆虫毒素は他の生物には無毒ということで特徴的である。さらに、これは毒素に対する耐性は非常に遅いペースで進む。しかしながら、それらの利用は化学的な殺虫剤よりも費用がかかり、野外条件での環境に放出した場合に不安定であるという理由から、ごく限られたものであった。

しかし、これらの遺伝子は今やタバコとトマトに導入されている。遺伝子を導入されたタバコの場合、不完全な形ではあるが活性の高い遺伝子がTiプラスミド上のマンノシン合成酵素プロモーターにつながれて導入された⁷⁾。同じプロモーターはカナマイシン耐性を発現するために用いられた。殺虫活性の測定は、毒素に対するモノクローナル抗体を用いると同時に、このタバコの葉を食べた後の *Manduca sexta* の幼虫の致死率をもって行われた。高度なカナマイシン耐性と虫害に対する防護には強い相関が認められた。ある植物個体では幼虫は3日以内に全個体が死亡し、虫害もほとんど認められなかった。

BT由来の遺伝子のトマトへの導入も *Agrobacterium* を用いた形質転換により行われた。これらの研究者もタンパク質をコードしている遺伝子を不完全な形で用いた⁹⁾。しかしながら、彼らは非常に強力なCaMVの35sプロモーターを用いた。再生されたトマトを昆虫を用いて検定すると、この幼虫は植物を加害しても生きているにもかかわらず、幼虫の加害率の減少のためにわずかな被害しか認められなかった。

昆虫抵抗性植物を作出する他の試みとしては、ササゲのトリプシンインヒビターをコードしている遺伝子の導入がある。この抵抗性の機構はセリンプロテアーゼインヒビターに属するポリペプチドの合成にある。これらのインヒビターは様々なプロテアーゼの触媒部分と反応し、それゆえにプロテアーゼの機能を妨げることにあるが、植物には害がない。ある研究では、インヒビター遺伝子は *Agrobacterium* 系の35sプロモーターにつないで導入された⁹⁾。カナマイシン耐性遺伝子はこのプロモーターのもとでも発現した。カナマイシン耐性植物が再生され、ササゲのトリプシンインヒビターの合成の有無でさらに選抜された。高レベルの合成が認められた植物では、ある鱗翅目昆虫の幼虫に対する被害はごく限られたものであった。

(2) ウイルス抵抗性

バイオテクノロジーにより植物をあるウイルス病から保護することではかなりの成功がある。ウイルス抵抗性を与えるためには三つの大きな試みがある。これらは、①ウイルスの外被タンパク、②外被タンパクのアンチセンス転写、③サテライトRNAを発現する遺伝子の導入である。

いくつかの研究室では、タバコモザイクウイルス¹⁰⁾、アルファルファモザイクウイルス¹¹⁾、ジャガイモXウイルス¹²⁾の外被タンパクの発現を形質転換植物で認めており、植物のそれぞれはタバコモザイクウイルス、アルファルファモザイクウイルス、ジャガイモXウイルスから保護された。これら植物の被接種葉では対照植物に比べて退緑、え死などの病斑が少なかった。これらの研究は、最近、キュウリモザイクウイルスにも適応されている¹³⁾。このウイルスはおそらく五つのRNAを含有しており、その一つは小さなサテライトRNAである。外被タンパク遺伝子を発現する形質転換再生タバコでは、接種後16日で対照区が100%病徴を現したのに比べ10~20%と保護された。

キュウリモザイクウイルスの例¹³⁾では、ウイルス外被タンパクのアンチセンス転写物

のウイルスに対する保護効果が調べられた。Northern 分析によると、アンチセンス RNA は外被タンパク RNA とほぼ等量合成されていることが示された。アンチセンス植物は、接種源の濃度を高くするとその抵抗性がやぶられたが、多少とも抵抗性であった。このことはアンチセンス構成物が低レベルの接種源に対しては有効であろうことを示唆している。しかしこのデータは、外被タンパクのアンチセンス RNA が、外被タンパク DNA ほどには効果的でないことを示しているといえる。

(3) 除草剤耐性

今日、市場には 100 以上もの除草剤が市販されており、高効果で動物には無害という新除草剤の開発はたゆまなく行われている。多くの除草剤は選択的ではなく、ある特定の代謝物を合成するすべての緑色植物あるいは生物を殺す。いくつかの研究室では、ある種類の除草剤に対する耐性を植物に導入している。この除草剤は glyphosate, chlorsulfuron および bromoxynil である。

Glyphosate 耐性: Glyphosate は現在では最も広く利用されている除草剤であり、それゆえにこの除草剤に対して耐性を持つ形質転換植物を得ることは、他の除草剤に対するものよりも多くの努力がはらわれている。Glyphosate は芳香族アミノ酸の合成に必要な enol pyruvyl shikimate-5-phosphate synthase (EPSP synthase) という酵素を阻害することによってすべての植物を枯らす強い効力を持っている。ある研究グループ¹⁴⁾は、*Salmonella typhimurium* から glyphosate 耐性の EPSP synthase を分離した。この耐性遺伝子は *Agrobacterium* を仲介した形質転換を行い、オクトピン合成酵素プロモーターの制御下でタバコに導入された。この形質転換再生植物は、glyphosate に対して対照植物に比べ少なくとも 3 倍の耐性を示した。この研究では、通常、芳香族アミノ酸の生合成の場である葉緑体における抵抗性遺伝子の産物に関する検討はなされていない。しかしながら、他のグループ¹⁵⁾は、ペチュニアに導入されたペチュニアからの野生型の EPSP

synthase が CaMV の 35 s プロモーターによる制御下で glyphosate に対して耐性を付与することを示した。この場合、標的酵素は葉緑体に局在していた。ペチュニアの cDNA クローンのトランシットペプチド配列が大腸菌の glyphosate 耐性遺伝子と融合されて、その構成物がタバコに導入された場合には、野生型の EPSP 遺伝子の過剰発現のものよりも高い耐性を示すトランスジェニック植物を再生することができた¹⁶⁾。

Chlorsulfuron 耐性: Chlorsulfuron も広範囲に有効な除草剤であり、これはロイシン、イソロイシン、バリンなどの分枝型アミノ酸を合成する acetolactate synthase (ALS) を阻害する。この除草剤に対して耐性の突然変異は、*Salmonella*, *Saccharomyces* および *Chlamydomonas* から分離されている。さらに、抵抗性の半数体のタバコは *Arabidopsis* と同様に得られている。植物 ALS 酵素は核にコードされており、アミノ末端に葉緑体トランシットペプチドを含んでいる。これらの突然変異遺伝子が *Agrobacterium* の形質転換系を用いてタバコに導入された場合、その形質転換細胞は除草剤に耐性であった。同様に、タバコが *Arabidopsis* の ALS 耐性遺伝子で形質転換されると、そのタバコは Chlorsulfuron に耐性であった。

Bromoxynil 耐性: Bromoxynil は光合成の電子伝達系を阻害する benzonitrile 系の除草剤である。Bromoxynil を 3,5-dibromide-4-hydroxybenzoic acid にすみやかに代謝する *Klebsiella pneumoniae* が分離された¹⁷⁾。

この物質は bromoxynil に比べ、植物細胞に対して 1% 以下の毒性しか示さない。この nitrolase はバクテリアのプラスミドにコードされているが、クローン化されてタバコとトマトに導入された。Nitrolase 活性を示す植物は bromoxynil に耐性であった (D. Stalker 私信)。

文 献

- 1) Melchers, L. S. and P. J. J. Hooykaas (1987) *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology* 4: 167-220

- 2) Grimsley, N., T. Hohn, J. W. Davies and B. Hohn (1987) *Nature* 325 : 177-179
- 3) Graves, A. C. F. and S. L. Goldman (1986) *Plant Mol. Biol.* 7 : 43-50
- 4) Fromm, M. E., L. P. Taylor and V. Walbot (1986) *Nature* 319 : 791-793
- 5) Rohdes, C. A., D. A. Piece, I. J. Mettler, D. Mascarenhas and J. J. Detmer (1988) *Science* 240 : 204-207
- 6) Klein, T. M., E. D. Wolf, R. Wu and J. C. Sanford (1987) *Nature* 327 : 70-73
- 7) Vaeck, M., A. Reynaerts, H. Hofte, S. Jansen, M. De Beuckeleer, C. Dean, M. Zabeau, M. van Montagu and L. Leemans (1987) *Nature* 328 : 33-37
- 8) Fischhoff, D. A., K. S. Bowditch, F. J. Perlak, P. G. Marrone, S. M. McCormick, J. G. Niedermeyer, D. A. Dean, K. Kusano-Kretzmer, E. J. Mayer, D. E. Rochester, S. G. Rogers and R. T. Fraley (1987) *Bio/Technology* 5 : 807-813
- 9) Hilder, V. A., A. M. R. Gatehouse, S. E. Sherman, R. F. Barker and D. Boulter (1987) *Nature* 330 : 160-163
- 10) Nelson, R. S., S. M. McCormick, X. Delannay, P. Dube, J. Layton, E. J. Anderson, M. Kaniowska, R. K. Proksch, R. B. Horsch, S. G. Rogers, R. T. Fraley and N. Beachy (1988) *Bio/Technology* 6 : 403-409
- 11) Turner, N. E., K. M. O'Connell, R. S. Nelson, P. R. Sanders, R. N. Beachy, R. T. Fraley and D. M. Shah (1987) *EMBO J.* 6 : 1181-1188
- 12) Hernenway, C., R. X. Fang, W. K. Kaniewski, N. H. Chua and N. E. Tumer (1988) *EMBO J.* 7 : 1273-1280
- 13) Cuozzo, M., K. M. O'Connell, W. Kaniewski, R. X. Fang, N. H. Chua and N. E. Tumer (1988) *Bio/Technology* 6 : 549-557
- 14) Comal, L., D. Fauciotti, W. R. Hiatt, G. Thompson, R. Rose and D. Stalker (1985) *Nature* 317 : 741-744
- 15) Shah, D. M., R. B. Horsch, H. J. Klee, G. M. Kishore, J. A. Winter, N. E. Tumer, C. M. Hironaka, P. R. Sanders, C. S. Gasser, S. Aykent, N. R. Siegel, S. R. Rogers and R. T. Fraley (1986) *Science* 233 : 478-781
- 16) della Cleppa G., S. C. Bauer, M. L. Tayler, D. E. Rochester, B. K. Klein, D. M. Shah, R. T. Fraley and G. M. Kishore (1987) *Bio/Technology* 5 : 579-584
- 17) McBride, K. E., J. W. Kenny and D. M. Stalker (1986) *Appl. Env. Microbiol.* 52 : 325-330



国際学会レポート

第5回国際植物病理学会議

バイオテクノロジーの現状

農林水産省 農業生物資源研究所

本吉総男

9月20日から27日まで京都で開催された第5回国際植物病理学会議での主な企画の一つは、新しいバイオテクノロジーにスポットライトをあてたことであろう。シンポジウムⅡ「植物保護におけるバイオテクノロジー」というタイトルで2日にわたり、20の課題が発表され、また他のセクションでも、かなり多くのバイオテクノロジーに関する研究発表があったことは特筆される。

5年前の国際学会では、バイオテクノロジーはそれほど問題にはならなかった。しかし、分子生物学的な技術を取り入れた新しいバイオテクノロジーは、その急速な発展によって、植物を対象とする研究分野でも、この数年間に著しい発展をみた。その意味で、今回のバイオテクノロジーに関するプログラムの企画は、タイムリーなものであったといえよう。

植物病理学は、ウイルスや微生物から高等植物にわたる分類、生理、生態、生化学などの基礎分野、診断、治療、防除、育種などの応用分野に関係し、広範囲にして多様であるが、それぞれのなかに、分子生物学を基礎とするバイオテクノロジーが浸透し、定着しつつあることが強く感じられた。それらを網羅することは不可能なので、ここでは上記のシンポジウムでのトピックスを中心に、筆者が関心をもつ課題を展望してみたい。

1. エレクトロポレーションによる遺伝子機能の研究

ある単離した遺伝子の発現や発現調節機構を調べるために、プロトプラストが利用される。ある単離した遺伝子に適当なプロモーターとポリアデニレーション・シグナル(ター

ミネーター)を接続し、プロトプラストに導入すると、その遺伝子の一時的な発現(transient expression)が観察される場合がある。このシステムを利用して、いろいろに操作された遺伝子をプロトプラストに導入し、その発現の仕方を解析することによって、遺伝子発現や発現調節に関する知見を得ることができる。

Th. Horn 博士(Friedrich-Miescher-Inst., Bazel)は、エレクトロポレーションを利用して、カリフラワーモザイクウイルスDNA上の遺伝子転写および翻訳制御の解析を行い、またその制御は宿主や組織の違いにも依存して異なることを示した。大橋祐子博士ら(農業生物資源研)はウイルスの感染や薬剤(サリチル酸など)のストレスによって誘導されるタンパク(感染特異的タンパクと総称される)の一種PR 1aのコードをもつ遺伝子のプロモーターを単離し、プロトプラストへのエレクトロポレーション実験の結果から、このプロモーターの機能の発現はサリチル酸によって誘導されることを確かめ、ストレス誘導性の遺伝子の制御機構の解明に歩を進めた。

2. ウイルスの遺伝子操作

大部分の植物ウイルスはRNAウイルスであるが、試験管内でRNAウイルスを合成することは数年前までは困難な技術であった。しかし、1984年の仙台での国際ウイルス学会でAhlquist博士がブロムモザイクウイルスの感染性RNAをcDNAクローンを鋳型にして試験管内で合成したことを発表して以来、この技術は、定位置突然変異作出技術と組み合わせることによって、ウイルス遺伝子の機

能を解析するための重要な技術になった。

今回もいくつかのウイルスに対して、新たに試験管内感染性RNA合成系が確立し、ウイルス遺伝子の機能の解析に使われていることが報告された(オオムギ斑葉モザイクウイルス: A.O. Jackson 博士, UCLA, Berkeley; ササゲモザイクウイルス: A. van Kammen 博士, Agricultural Univ. Wageningen など)。

この手法によるウイルスの遺伝子解析はTMVで最も進んでいる。岡田吉美博士のグループ(東大)は、これらの手法を利用して、外被タンパクによるアセンブリーが起こらないように操作したRNAをもつ変異ウイルスを用いて、遊離の外被タンパクがウイルスの宿主における全身感染(葉から葉への移行を観察)に必要であることを証明した。また、トマトのTMV抵抗性遺伝子の一つ *Tm-2* の作用にうかって増殖できる突然変異体を上記手法によって作り、その変異に関するRNAのヌクレオチドの位置から、*Tm-2* 遺伝子は、ウイルスの細胞間移行の機能の阻害に関係することを示唆した。

3. 形質転換法によるウイルス遺伝子機能の解析と抵抗性植物の作出

形質転換植物を作って、導入した遺伝子や制御領域の機能を研究する手法が、最近常用されるようになった。

R. N. Beachy 博士(Washington Univ., St. Louis)らがTMV(普通系)の外被タンパクを導入して、TMV抵抗性を示す形質転換タバコを作ったことは、一般にもよく知られるところとなったが、彼らの研究は、宿主植物内でのウイルス間相互作用研究のための実験系を確立したことに、もう一つの重要な意義がある。今会議では、Beachy 博士の講演の焦点は、遊離の外被タンパクのウイルス干渉機構に関するものであった。TMVの外被タンパク遺伝子を生産する形質転換タバコは、ウイルス粒子の形で接種したTMVの増殖を抑えるが、TMVのRNAを接種した場合TMV生産抑制はほとんど現れない。このこ

とから、干渉の機構として、TMV粒子の脱外被の阻止またはTMVの複製に必要な宿主細胞内の部位の外被タンパクによる占有の二つの現象を想定している。

L. S. Loesch-Fries 博士ら(Agrigenetics Advanced Science Co., Madison)はRNA型多粒子系ウイルスの一つであるアルファルファモザイクウイルス(AIMV)の4種のRNAのうち、P3というタンパクのコードをもつRNA3のcDNAをタバコに導入し、形質転換植物を作った。P3は形質転換植物の細胞壁に蓄積され、AIMVの細胞間移行に関係するとみられている。今後その機能についての研究の発展が期待される。

Beachy 博士らの研究の応用面における目標は、ウイルス抵抗性植物の作出である。ウイルス外被タンパク遺伝子による抵抗性形質転換植物の作出は、TMV, AIMV, ジャガイモXウイルスおよびキュウリモザイクウイルスでも成功し、一部は野外実験も行われている。抵抗性の効果はタバコとTMVの組合せよりも、タバコと他のウイルスとの組合せのほうがはっきりでるらしい。TMVの外被タンパク遺伝子は普通系TMVのものが使われているが、トマト系TMV(トマトモザイクウイルスともいう)に対しても干渉する。

D. C. Baulcombe 博士(Inst. Plant Sci. Res., Cambridge)らはキュウリモザイクウイルス(CMV)のサテライトRNAのcDNAをタバコに導入して、CMVに対する抵抗性を付与した。サテライトRNAにもいろいろな種類があり、彼らの使ったサテライトRNAは、CMV本体による病徴発現を抑制するものであるが、逆に病徴を強めるものもある。したがって、サテライトRNAを生産する形質転換植物の実用化を考えると、サテライトRNAが植物に対して無害であり、その性質が安定してはならない。彼らの研究はそのような観点から、異なるサテライトRNA間の組換え体を作り、サテライトRNAの機能を解明することに重点を置いている。

トマトの育種では、*Tm-1*, *Tm-2* および *Tm-2²* という、優れたTMV抵抗性遺伝子が利用できる。しかし、このような抵抗性遺伝

子の最大の欠点は、それらの作用にうちかつ TMVの突然変異体が自然界に生じたとき、抵抗性遺伝子としての役をなさなくなることである。筆者らはトマト栽培種と野生種の雑種(遺伝子型 $Tm-2/Tm-2^2$)にトマト系 TMVの外被タンパク遺伝子を導入すると上記のような変異体の増殖をもある程度抑制することを知った。

4. 抵抗性遺伝子単離の試み

ウイルス遺伝子がウイルス抵抗性を与えるための外来遺伝子として利用できることが分かったが、他の病原微生物に関しては、宿主に付与すべき抵抗性遺伝子の候補は見つかっていない。オーソドックスな観点からは、植物がもつ抵抗性遺伝子を単離し、改良する技術の開発が望まれる。これはバイオテクノロジーが発達した現在でも大変難しいが、トラ

ンスポゾンを利用して目標とする遺伝子を釣り上げる方法が有望視されており、この方向を目指す2,3の研究の発表があった。

J.L. Bennetzen 博士 (Purdue Univ., West Lafayette) からは、トランスポゾン $Mu 1$ とさび病菌 *Puccinia sorghi* に対する抵抗性遺伝子 $Rp 1^F$ をもつトウモロコシのなかから感受性への突然変異を生じたものを選抜し、この変異は子孫に遺伝することを確かめた。これらの突然変異は $Rp 1^F$ 遺伝子の中または近傍に $Mu 1$ が挿入され、抵抗性遺伝子の不活化によって生じたと考えられる。Bennetzen 博士らはクローン化した $Mu 1$ をプローブとして、トウモロコシ変異個体内の $Mu 1$ を検出し、 $Mu 1$ 部位と隣接する DNA 配列の分析を行っている。

今後はこのような抵抗性遺伝子の単離、構造と機能に関する研究が主要なものになって行くであろう。

国際学会レポート

第5回国際植物病理学会議

土壌病害の生物的防除研究の現状

農林水産省 農業研究センター

駒田 旦

8月20日から27日まで、京都国際会館において、第5回国際植物病理学会議が開かれた。60余カ国から2,100余人が参加して、イネの病害、植物保護におけるバイオテクノロジー、植物病害の生物的防除、殺菌剤研究の最近の進歩の四つのテーマについてのシンポジウムと16のセッションミーティングで約100のセッションが開かれ、600に及ぶ口頭発表がなされたほか、650余のポスター発表も行なわれた。これら研究発表の中から筆者の専門(土壌病害)についてレポートする。

土壌病害分科会では、すでに第1回国際植物病理学会議の5年前にパークレーで国際会議を開いていた。しかもその時のスローガン

"Prelude to Biological Control" であって、それ以来世界の土壌病研究者は共通のそして究極の目標を生物的防除においてきた。今回の会議は25周年記念に当たるので、生物的防除に関するさまざまな研究報告が行なわれたが、実用化の域に達しているものは少なく、これが生物的防除の実用化の困難さを現しているといえよう。その中で目にとまった報告を以下に紹介する。

抑止土壌

フランス INRA のアルプベット博士は、フザリウム病に対する抑止性を異にする土壌に、グルコースと EDTA 鉄または EDTA を様々なレベルで添加すると抑止性のレベルが

変ることから、抑止性はC源と鉄に対して土壌微生物と病原菌との間に競合が起こることによって生じる。またそれに関係するのは非病原性フザリウム菌とEDTAと同様に鉄とキレートを作る性質のある物質シデロフォアを分泌する蛍光性シュードモナスであり、この両者を用いてフザリウム病の生物的防除が可能であったと報告した。——非病原性フザリウム菌には栄養の競合ばかりではなく、次のような機能も関係しているのではなかろうか。

非病原性フザリウム菌による交叉防御

小川(技会事務局)らは、サツマイモ体内や土壌から分離した非病原性(あらゆる作物に対して)のフザリウム菌を、サツマイモ苗の基部切口に接種したのち植えつけることによってサツマイモつる割病の生物的防除に成功した。この現象は非病原性フザリウム菌の生きた芽胞細胞の接種の場合のみにみられるところから、基部切口道管の単なる閉そくによるものではない。また本菌の病原菌に対する拮抗作用によるものでもない。本菌を接種した基部切口から離れた部分で、病原菌の発芽や発芽管伸長が抑制されるので、この交叉防御現象は全身的に現われるといえる。非病原性フザリウム菌は液体培養によって大量増殖でき、それをソルビトールを分散媒とした真空凍結乾燥か自然乾燥によって長期保存が可能であり、それをを用いた農家圃場での試験で、ベノミル剤による薬剤防除と同等の高い防除効果を得た。——土壌病害の生物的防除の世界でも数少ない実用化例の一つといえることができる。

親和性植物との混植

木島(栃木農試)は、ユウガオとネギとの混植という伝統農法のもとではユウガオつる割病の発生があまりみられないことに注目して、ネギの根圏細菌からの拮抗菌株の探索を行い、ネギ属の根に親和性はあるが病原性のない細菌株シュードモナス・グラディオリM-2196を発見した。本菌株を根に接種したニラやネギと混植することにより、ユウガオ

つる割病をはじめとして、トマト根腐萎ちょう(萎ちょう病菌レースJ3による)、イチゴ萎黄病など、フザリウム病やバーティシリウム病がポット試験ばかりでなく圃場試験でも防除された。——これも生物的防除の実用化の好例。シュードモナス・フルオレッセンスを始めとして種々の根面・根圏細菌による土壌病害の生物的防除についての多くの報告があったが、着想の面白さと効果の高さ、実用化レベルに達している点から本報告はその頂点に立つものと評価できる。

拮抗性糸状菌と土壌処理の組合せ

イスラエル ヘブライ大学のチュット博士は白絹病菌やリゾクトニア菌に対して拮抗性(寄生性)のあるトリコデルマ・ハージアナムを圃場の土壌から分離・培養して、臭化メチルの処理量を減らして土壌消毒したり、太陽熱土壌消毒後の圃場に施用することにより、インゲンの白絹病や根腐病を6カ月以上も防除することができた。

生物的防除以外にも土壌病害研究に以下に紹介するような新しい流れがみられた。

リモートセンシング

土壌病害に侵された植物は地上部にしおれや変色といった顕著な病変が現れる。駒田(農研センター)らはこれに着目して、ハクサイ黄化病、ハクサイ・キャベツ根こぶ病等の発生した野菜産地のカラーあるいは赤外カラー写真を、高度1,000mから小型飛行機で撮影し、画像の色と実際の発病程度との関係を調べた。その結果、写真の画像濃度と畑の発病程度とは、いずれの病気の場合にも高い負の相関関係を示すことが明らかとなり、空中写真画像の解析によって野菜産地におけるこれら土壌病害の発生程度を、広域、迅速にかつ畑単位に把握できることがわかった。

なお、こうして得た畑ごとの発病程度のデータは、病気の発生に関するさまざまな要因についての畑ごとの情報とともに圃場カルテに記録され、これら土壌病害の発生の予測と総合防除指針の提示を行う重要な情報を提供

することになる。

嫌気発酵による残渣処理

萩原（農研センター）らは、ダイコン、ハクサイ、キャベツなど多汁質の野菜残渣を、大型のプラスチック袋に詰め、密封することにより、常温で残渣中の土壌病原菌を死滅させ得る方法を開発した。温度は低いより高い

方が死滅処理は短期間で済み、20～30℃で約1カ月を要した。残渣の嫌気発酵中に生成した酢酸をはじめとする有機酸の集積による酸性化が病原菌を死滅させる一つの要因と考えられる。本法はダイコン萎黄病をはじめとするフザリウム病、パーティシリウム病、根こぶ病などに有効であり、実用化の可能性の高い技術である。

編集後記

BRAIN テクノニュース10号をお届けします。本ニュースの編集に当っては、購読会員の皆様の御要望にこたえるよう年2回程度会員ならびに外部の方々の御意見・御要望を伺うための懇談会を開催しています。本年度は第一回として、食品

製造関係者をお願いして11月22日当協会懇談会をもつことにしています。懇談会とは別にして御意見・御要望がありましたら生研機構あるいは当情報協会まで是非お知らせ下さいますようお願いいたします。

(大畑)

ブレイン テクノニュース (第10号)

昭和63年11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

〒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3F
TEL. 03-205-6565 FAX. 03-205-6566

編集 (社) 農林水産技術情報協会

〒103 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