

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 11 号

JANUARY 15, 1989



受精卵分割により作出された
羊の1卵性5つ子

(本文 27 ページ)

本号の紙面

| | |
|---|----|
| 国内情報 | 1 |
| 微生物源除草剤, 牛の体外受精, 核の顆粒状物質, モノクローナル抗体による抗酸菌の同定, PCBを食べる菌, 大豆プロトプラスト | |
| 文献情報 | 19 |
| ベゴニアの不定胚, 昆虫の視覚系, リボザイムの人工合成, ウイルスの干渉効果, 高殺虫性タンパクなど | |
| 外国特派員便り | 27 |
| ケンブリッジ畜産バイテク社 | |
| 国際学会レポート | 30 |
| 薬剤耐性シンポジウム, 国際クロマトシンポジウム | |

口 絵

国内情報

- 微生物源除草剤ピアラホスの開発…………… 1
- 完全培養系による牛の体外受精…………… 4
- 中間径繊維タンパクに対するモノクローナル抗体で
認識される核の顆粒状物質…………… 7
- モノクローナル抗体の抗酸菌同定への応用…………… 10
- PCBを食べる菌をつくる…………… 13
- 大豆プロトプラスト調製法の改良…………… 16

文献情報

- ベゴニア葉組織からの不定胚形成の研究…………… 19
- 昆虫の視覚系における偏光感受ニューロン…………… 20
- RNAの切断機能をもつRNA(リボザイム)の人工合成…………… 22
- キュウリモザイクウイルス系統間における進化面より見た
相互関係——CMV RNA 2について…………… 23
- トランスジェニックプラントを用いた
ウイルス干渉効果の解明…………… 24
- 野生のインゲンマメより発見された高殺虫性レクチン様
タンパク質 Arcelin とその進化について…………… 25

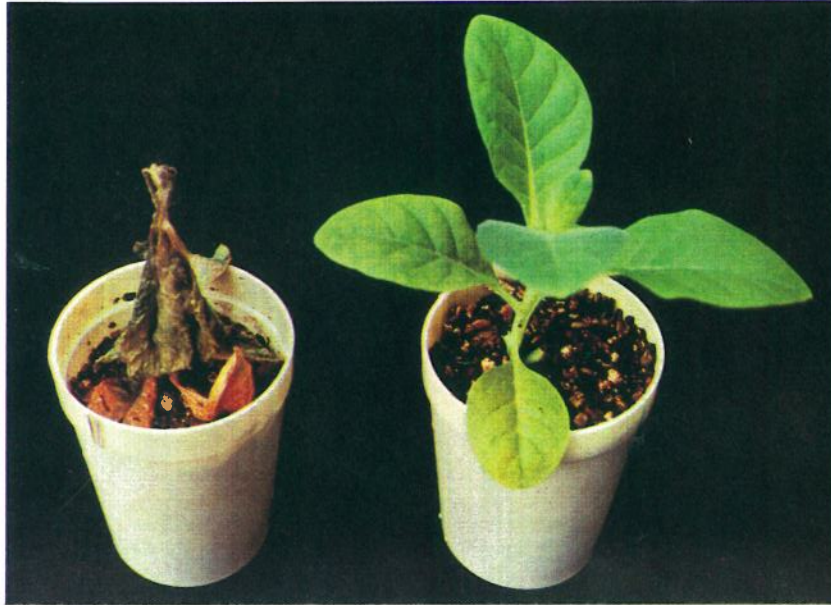
外国特派員便り

- ケンブリッジ畜産バイオテクノロジー社(略称A.B.C)を訪問して…………… 27

国際学会レポート

- 薬剤抵抗性シンポジウム…………… 30
- 第17回国際クロマトグラフィーシンポジウム…………… 32

微生物源除草剤ピアラホスの開発



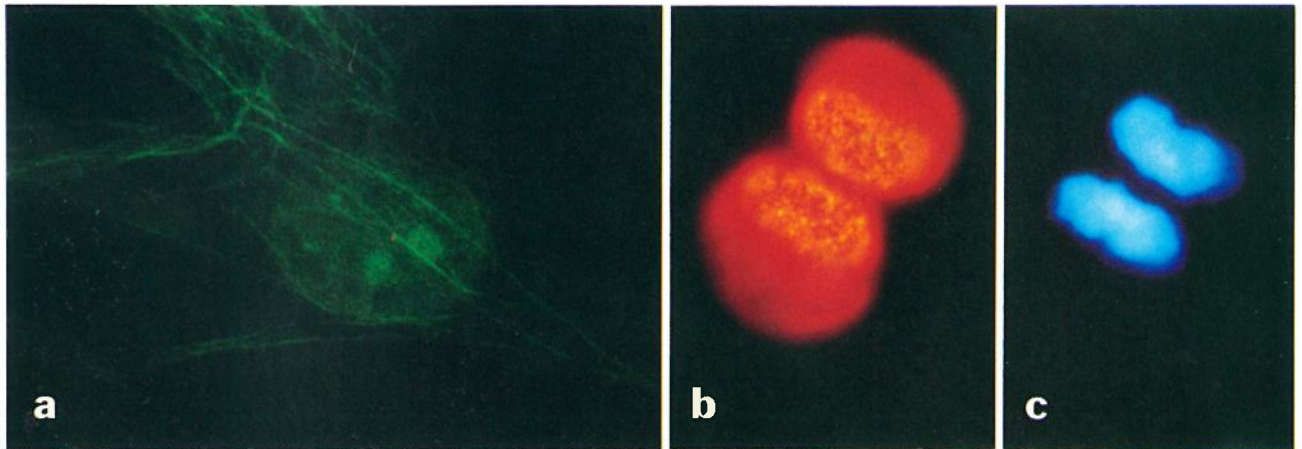
非導入植物

耐性遺伝子導入植物

ピアラホス耐性遺伝子を導入した耐性植物 (タバコ)

本文 1 ページ

中間径繊維タンパクに対するモノクローナル抗体で認識される核の顆粒状物質



AC54 MAbによる間接免疫蛍光染色

a: ハムスター BHK21/C13 細胞, 間期, 中間径繊維と核の顆粒,

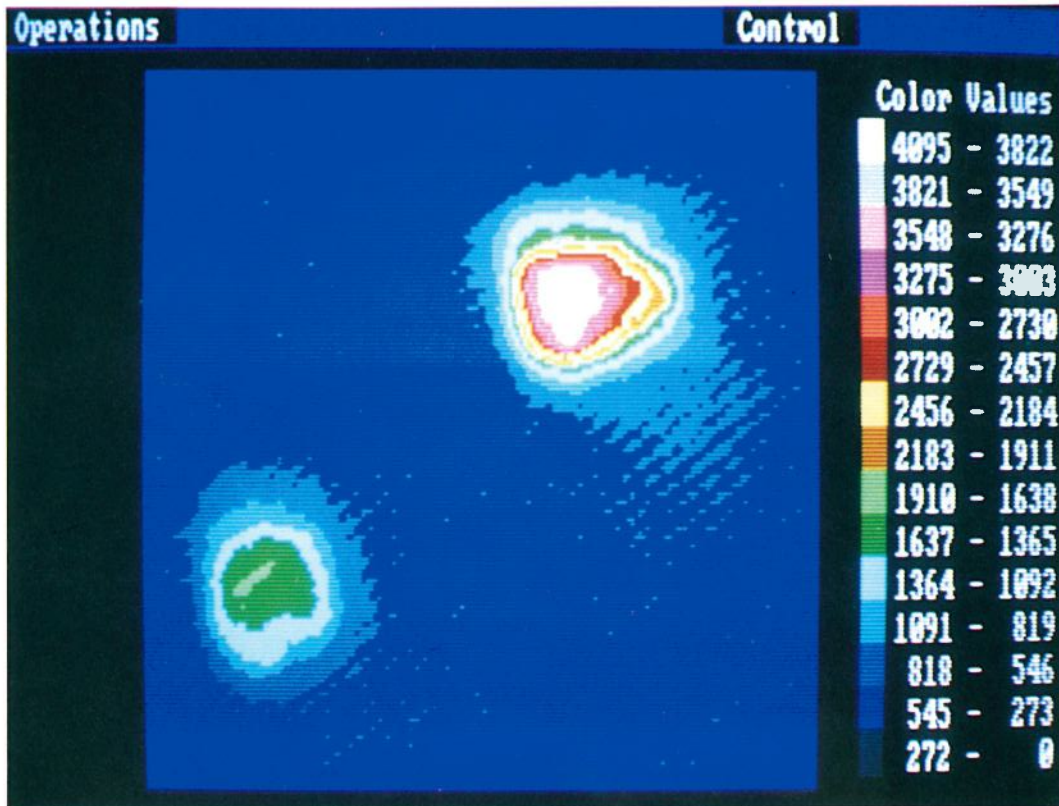
b: ヒト HeLa 細胞, 分裂期,

c: b と同一部位 (ヘキスト 33258 による二重染色),

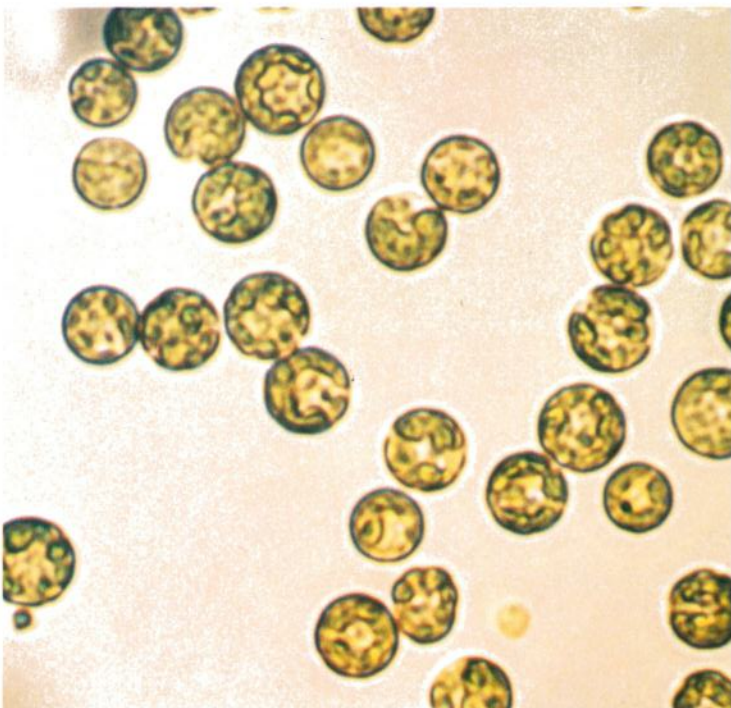
染色体 (c, 青色) と対応した位置に核顆粒 (b, 橙黄色) が局在している,

(本文 7 ページ)

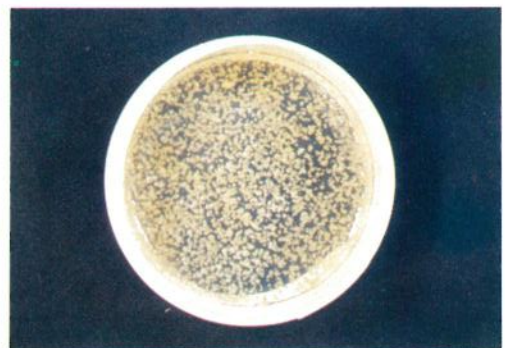
大豆プロトプラスト調製法の改良



1. Calcofluor Whiteで蛍光染色したプロトプラスト化大豆細胞の蛍光画像解析図
左下：完全なプロトプラスト
右上：細胞壁の残存する細胞



2. 大豆（エンレイ）葉肉プロトプラスト



3. 大豆葉肉プロトプラスト由来コロニー

国内情報

微生物源除草剤ビアラホスの開発

明治製菓株式会社 生物産業開発部

金子邦夫

1. はじめに

近年、環境問題への関心が高まり農薬による環境汚染についても種々論じられている。このような状況の中で、作物残留、公害問題等を引き起こす心配のない農薬が求められている。微生物代謝産物は一種の天然物であり、自然界における物質循環の中で容易に代謝・分解されるので、これらの要求にかなったものである。

微生物代謝産物の農薬への応用、即ち微生物源農薬は、プラストサイジンSの開発成功が契機となり、カスガマイシン、ポリオキシン、バリダマイシンなど植物病害防除剤によって進展し、更に、殺虫剤テトラナクチンも開発された。

ここでは、世界で初めて実用化された微生物源除草剤ビアラホス（商品名：ハービーエース）について紹介する。

2. 発見の経緯

明治製菓の研究所では、放線菌の培養液を用いて植物病害防除剤のスクリーニングを実施してきた。その中で植物に極めて強く葉害作用を示す培養液を認めた。その培養液から活性成分を精製・単離し、その化学構造を検討したところ、L-2-アミノ-4-[(ヒドロキシ)(メチル)ホスフィノイル]プチリル-L-アラニル-L-アラニンのユニークなトリペプチドであった(図1)。本物質の化学構造からビアラホス(bialaphos)と命名された。

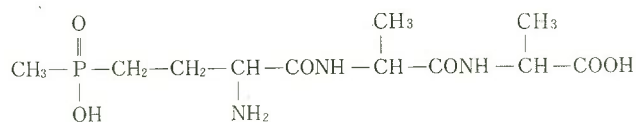


図1 ビアラホスの化学構造

3. 除草活性

ビアラホスの植物に対する殺草作用を検討したところ、通常の使用量では土壌処理効果は認められず、植物の緑色部に処理すると極めて多くの種類のイネ科、広葉雑草に対して非選択的な殺草スペクトラムを有することが明らかとなった。

製剤処方を検討し、農薬としての適用性を確認するため(財)日本植物調節剤研究協会を通じ農林水産省および都道府県の各種農業試験場で非選択性茎葉処理型除草剤としての薬効薬害試験を実施し、良好な試験結果を得た。

4. 作用機構

グルタミン合成酵素(GS: Glutamine synthetase)は、微生物や植物でグルタミン酸合成酵素とともにアンモニアの同化に関与していることが知られており、また植物の光呼吸に伴って放出されるアンモニアの再同化にもGSがかかわっていると考えられている。

ビアラホスを数種の植物に処理したところ、グルタミンの減少およびアンモニアの増加が認められた。しかし、ビアラホスにグルタミンを添加し、植物に処理しても殺草作用の減少は認められなかった。一方、アンモニアの増加は、①反応は速やかで処理後数時間で認められた。②アンモニア濃度の増加率は極めて顕著で、無処理の30倍から100倍に達し

た。③一度増加したアンモニア濃度は一過性でなく持続した。これらより、ビアラホスの殺草活性発現の主な機構は、作用点としてGS活性が阻害され、その結果植物体内にアンモニアが蓄積し、アンモニアの毒性によって発現すると考えられる。

5. 生産技術の確立

発酵生産物質を企業化する場合、重要課題の一つは低コスト高純度生産方式の確立であり、優良菌株の育種、培地・培養条件の検討が不可欠である。今までの菌株育種は、経験的あるいは試行錯誤的な変異処理が一般的であり、合目的なアプローチに欠けた面があることも否めない事実であった。

ビアラホスの生産技術確立のために、図2に示した進め方に基づき検討を進めることとした。

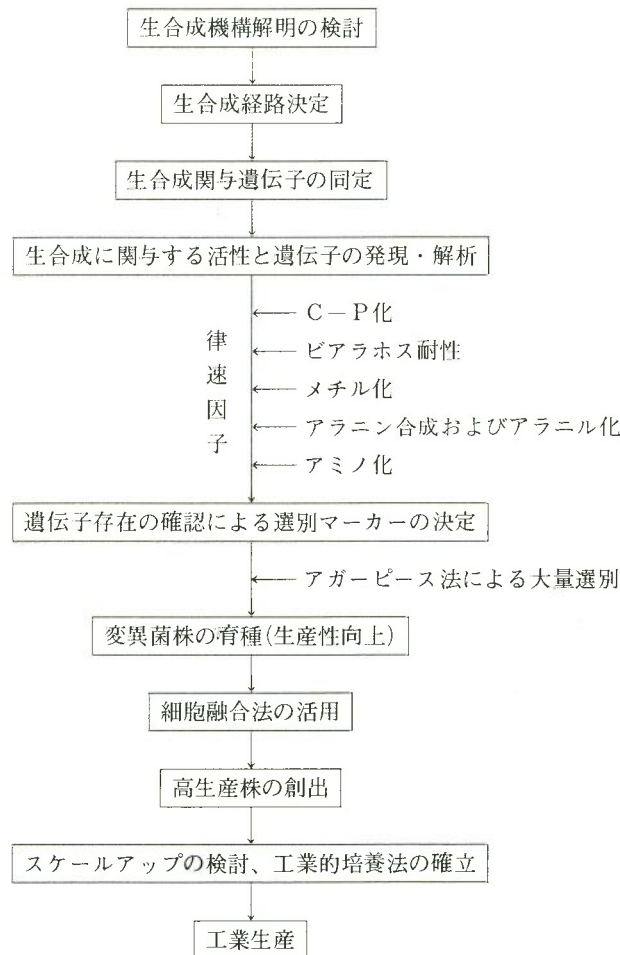


図2 生産技術確立の進め方

イ) 生合成機構解明, 生合成経路決定

ビアラホスの生合成機構解明のための検討を行ない、図3に示す13段階からなる生合成経路を明らかにした。この中の9段階については、各生合成反応に関与する生合成欠損変異株(図3中のNP-47, NP-46等9種類)を採取し、それらの蓄積物を単離、同定するとともに、生合成順序についても、培養液の³¹P-NMR分析や変異株間のコシンセシス、培養変換等によって確認した。

ロ) 生産菌の遺伝子解明

ビアラホス生合成経路の各段階に関与する遺伝子をクローニングするため、生合成欠損変異株を受容菌に用いセルフクローニングによって生産性を相補する遺伝子を得た。各生合成段階(図3中の1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13)の遺伝子は、図4に示すとおりビアラホス生産菌の染色体上に35kbにわたってクラスター構造をなしていた。自己耐性遺伝子(図4, bar)およびこれら遺伝子の発現、転写を調節する遺伝子(図4, brp A)も同じクラスターの下流に配座していた。段階11のアラニル化遺伝子もこのクラスター上に配座していたが、このクラスター上に存在しないアラニル化遺伝子もあった。このことは、このクラスター上以外にも生合成に関与する遺伝子があることを示唆している。

ハ) 生産菌の育種改良

生合成経路の中で、ビアラホス産生に大きく関与している自己耐性化、C-P化、アミノ化、メチル化、アラニル化の遺伝子に注目し、各々の機能を改善した菌株を一般的変異処理によって育種し、アガーピース法により選別した。それら菌株を組み合わせ細胞融合を行ない、双方の親株の有用遺伝形質を持った安定的で優良な交雑体を得た。例えば、メチル化活性を増強した変異株とアラニル化活性を増強した変異株との細胞融合によって、両活性が共に増強された交雑体を得られ、生産性は大幅に向上した。

ニ) 生産のスケールアップ

放線菌の大量液内培養は、高酸素条件下で行うことが常識であった。この方法でビアラホスを大型発酵槽へ適用したところ、従来の

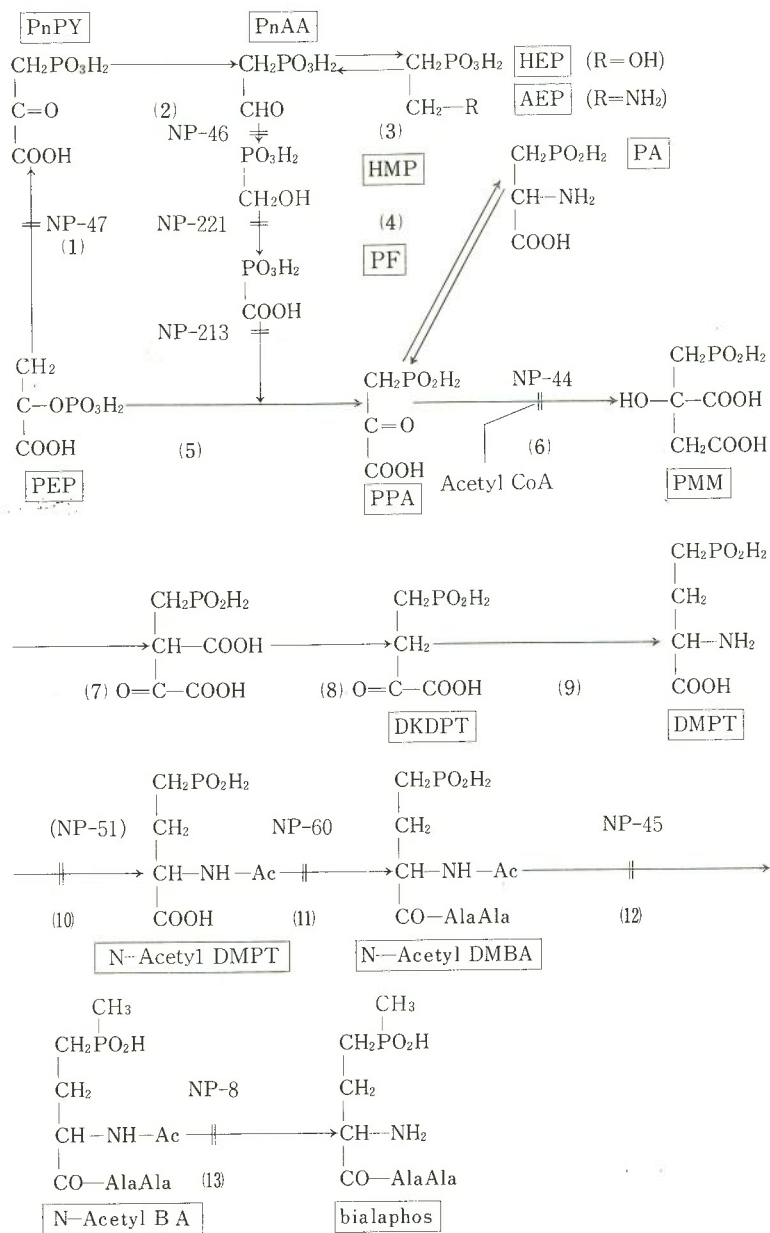


図3 ピアラホスの生合成経路

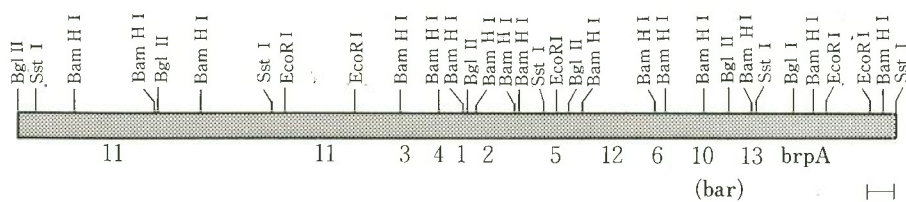


図4 ピアラホス生合成遺伝子

経験に比べ著しく生産性が低下した。このため、酸素消費側である生産菌に着目して菌生化学的アプローチによって、ピアラホス発酵の低酸素培養を特徴とする安定な工業的発酵法を確立した。

以上のように、ピアラホスの生産技術確立にあたっては、生合成経路を確認し、生合成に関与する遺伝子解明の研究を行ない、細胞融合技術の開発を行なうとともにスケールアップの諸条件を検討して低酸素培養法を確立

し、安定な工業生産に成功するに至った。

6. おわりに

ビアラホスの最大の特徴は、放線菌 (*Streptomyces hygroscopicus* SF-1293) によって産生される世界で初めて実用化された微生物源除草剤である。また、本剤の企業化にあたって、ビアラホス生産菌の生合成機構およびそれに係わる遺伝子を解明し、それらを背景とした細胞融合等の技法を用い優良菌株の育種に成功したことである。加えて、低酸素

培養法の導入によりスケールアップの問題点を解決し、工業的生産に成功したことでもある。

最後に、本研究の過程より見いだされたビアラホス耐性遺伝子は、理化学研究所微生物制御研究室とのビアラホス耐性植物創出の共同研究に利用されており、口絵に示すとおり、タバコで耐性遺伝子の導入、再生に成功している。他の有用植物へのビアラホス耐性遺伝子導入、再生研究も進められており、この面でも今後大いに発展することが期待されている。

国内情報

完全培養系による牛の体外受精

農林水産省 畜産試験場

塩谷康生

はじめに

哺乳動物の体外受精は本来卵管内で起こる精子と卵子の合体という生命発生の原点を体外で再現される技術である。受精のメカニズムの解明法として、実験動物主体に研究がすすめられ、繁殖効率の向上のためだけではなく、受精の阻止法や発生異常の基礎的研究として取り組まれてきた。イギリスでルイズと名づけられた赤ちゃんが生まれ (1978年7月)、試験管ベビーという語が広く知られるようになるとともに、医学分野では卵管に障害のあるかたへの治療法として注目され、広く行われた。畜産分野では多くの研究者の努力にもかかわらず試験管子牛の誕生は米国における1981年6月のヴァージルの出生まで待たねばならなかった¹⁾。その後、畜産試験場の花田らによって1985年12月に未成熟卵子を利用した体外受精によって子牛が生産され²⁾、牛の体外受精技術が現実的な畜産技術として認められることになった。その理由や

研究の現状を体外受精にとって重要な4過程についてのべる。

- ① 卵子の採取と体外成熟
- ② 精子の受精能獲得
- ③ 受精卵の体外培養
- ④ 体外培養卵の正常性

1. 卵子の採取と体外成熟

牛の卵子に精子が侵入して、受精が成立するためには卵子が成熟している必要がある。卵子の成熟は2回の減数分裂によって染色体数を半減し、受精の際に侵入した精子由来の核との合体を準備することである。卵子の成熟は一般には21日の性周期毎に1個ずつ発育した卵胞のなかで起こる。外部から性腺刺激ホルモンを投与することによって一度に多数の卵子を成熟させることができ、この過排卵処理技術を利用したのが、現在行なわれている胚移植である。しかし、体外受精のために体内で成熟させた卵子を採取するにはその時間的關係や、手術が必要など、いろいろと制

約が多い。米国で行なわれた体外受精による子牛の生産はこの制約のなかで行なわれたもので、実際の畜産技術としての応用性は低いものである。

一方、牛の卵巣には潜在的な能力のある未成熟卵子が多くあり、体外において卵胞から取り出し、適正な環境に置くことによって、自然に成熟することが知られていた。しかし、このような卵子は核の成熟は行なわれるが、卵の細胞質が完全には成熟せず、体外受精後、個体への発育には不十分であると考えられていた。

このようななかで畜産試験場では食肉処理場で処理される雌牛の卵巣から未成熟卵子を採取し、体外成熟させた後に体外受精に用いて、世界で初めて子牛を生産することに成功した。食肉処理場で処理される雌牛の卵巣からは大量にかつ簡単に未成熟卵子が採取できるので、牛の体外受精技術が安価な胚の生産法として注目されるようになった。

未成熟な卵子は適正な環境に置くことによって成熟するが、その環境条件について培養温度、培養時間、培養液に添加するホルモンについて検討した。

哺乳動物細胞は37°Cで培養されるのが一般的であるが、牛の直腸温度は38~39°Cで、深部体温はより高い。37°Cと39°Cで培養した場合の体外での卵子の成熟を検討した。その結果、39°Cで培養した場合は培養開始17時間で66%の卵子が第2成熟分裂中期に達し、20時間で80%以上が成熟を示し、37°Cで培養するより1時間程度短縮された。この温度は精子の処理、さらに体外受精後の発育までにも有効で、体外受精の一連の培養をこの温度で行っている。

生体内で排卵された卵子の生存時間は短く、卵子が受精し、発生する能力は排卵後の時間経過とともに失われていく。排卵後速やかな受精が必要となる。体外で自然に成熟させた卵子でも同様と考えられるが、この時間（成熟のための培養時間）は20時間から24時間の範囲であれば問題がないことを実験的に示した。このために卵子採取後の実験計画は翌日の作業内容によって柔軟に対応できることが

明らかになった。

成熟の過程は生体では発情と密接に関連しており、ホルモンによって制御されている。体外で自然に成熟する場合、成熟にホルモンが必要か否かについて、単に核の成熟を検討するのではなく、成熟後の胚盤胞への発育という観点から明らかにした。卵子の成熟培養のためには培養液に性腺刺激ホルモンやステロイドホルモンを添加することが行われている。これらのホルモンを添加せずに成熟させた卵子でも、添加して成熟させた卵子と同様に第2成熟分裂中期に達し、その後の体外受精によって胚盤胞まで発育し、移植後子牛に発育することが明らかになった。

1頭の牛の卵巣から採取できる未成熟卵子の数は10個程度であるので、今後この採取効率を増加させることと同時に、潜在的に数百のオーダーで存在する卵巣内の卵子の利用法が必要である。

2. 精子の受精能獲得

精子が卵子に侵入するためには雌の生殖道内で一定時間滞在し、機能的な変化を起こす必要がある。これによって精子の運動性に変化が起き、精子頭部前半部にある先体において先体反応が起き、卵子に侵入可能になる。

体外で受精能獲得を誘起することが家畜精子では長いこと困難であったが、現在ではいくつかの方法が開発されている。米国においてイオン濃度を高めた培養液で精子を洗浄することによって、誘起でき、体外受精による子牛の出生が報告された¹⁾。高イオン濃度液による精子処理は種雄牛によって受精能獲得の程度が大きく違い、個体によって受精率が変動することに問題点があった。

先体反応に先立ってCaイオンが精子内に取り込まれる必要があり、細胞内にCaイオンを運ぶ作用があるイオノフォアA 23187で精子処理すると、生体内で認められるのと同じ先体反応を化学的に誘起できる。花田は精子に対するイオノフォアの最小有効量を決定し、作用時間を最短有効時間にコントロールする条件を作り出した²⁾。この方法はほとん

どすべての種雄牛の精子に効果的で、受精率も高く、これによって体外受精による子牛の生産ができた²⁾。

イオノフォア処理時に用いる牛血清アルブミンを多量に含む培養液で精子を前培養することによって受精能を獲得する精子もあり、このような精子を選択して用いれば、体外受精の一連の作業が単純化できるので、実験には好都合である⁴⁾。

血液凝固作用のあるヘパリンは glycosaminoglycan とよばれる多糖類で、受精能獲得や先体反応に有効な物質である。ヘパリンを加えた培養液で精子を前培養することによって精子は受精能を獲得する⁵⁾。

ここにあげた方法のなかでどれかを応用すれば、現在体外受精が困難な精子はほとんどないと考えられる。しかし生体内すなはち卵管内での受精の際には少数の精子しか卵子の周囲にはおらず、これに比べて体外の受精の際には多数の精子が卵子の周囲には存在する点で体内受精と体外受精は少し異なる面もある。体外で引き起こした受精能獲得、ひいては体外での受精率が生体内での受精率と同じなのかどうか、逆に体外での受精率が種雄牛の受胎率判定の材料にならないかなど、今後解明すべき点やその応用面は大きい。

3. 受精卵の体外培養

牛の体外受精において、受精後の初期胚は卵管に移植すれば個体に発育するが、牛では開腹手術によらなければならない。これを避け、非手術的に子宮に移植するためには、体外で少なくとも6～8日間培養して、桑実胚から胚盤胞まで発育させる必要がある。しかし、牛の受精初期胚は体外に取り出すと、8細胞期あるいは16細胞期で発育を停止するとされていた。実験動物のマウスでは2細胞期にこの発育阻害が認められ、2細胞期ブロックとよばれている。

この発育阻害を乗り越えるのにいくつかの方法がある。マウスでは培養液のなかにEDTAを加えることによって発育する。卵管から分泌される卵管液あるいはその抽出物も培

養に有効である。また、他種動物の卵管に一時的に移植することによっても発育阻害が解除される。培養した動物細胞の上で卵子を培養することも行なわれている。

畜産試験場では主に二つの方法を用いている。ひとつは他種動物の卵管を利用するもので、牛卵子では生きている兎の卵管が利用できる。兎の卵管は扱いやすく、また他種動物の胚の一時的な培養器として古くから用いられてきた。前述した畜産試験場における体外受精子牛はこの方法によったものである。4細胞期以上に発育した体外受精卵を偽妊娠誘起した家兎の卵管に移植し、5日後に回収することにより、胚盤胞が得られる⁶⁾。

もうひとつは培養法の検討である。牛における発育阻害はマウスでみられる程強いものではなく、培養法を改良することによって克服できる。畜産試験場では培養液を従来用いていた Ham's F10 から成熟用に用いていた TCM 199 に変えることによって7～9日間体外培養することにより胚盤胞を得ることができた。その際重要なことは培養液に添加する血清によって胚盤胞への発育率が異なることである⁷⁾。また、受精に用いた精子によって、高い受精率が得られているにもかかわらず、胚盤胞への発育率が個体によって変動する⁸⁾。受精初期胚では利用するエネルギー源が発育ステージによって異なり、培養液に含まれるエネルギー源（グルコースなど）を変えることによって効率良く胚盤胞が得られる可能性も明らかになった⁹⁾。

現在のところ、得られる胚盤胞は体外受精に用いた卵子の10～30%であり、食肉処理場で集める1頭の牛の卵巣からは1個程度である。今後この数を増加させる研究が必要である。

4. 体外培養卵の正常性

家兎卵管を一時的な培養器として利用した場合の体外受精由来の牛胚盤胞の正常性はほぼ完全に証明されたといえる。すでに新鮮胚移植では家畜改良事業団家畜改良技術センターから59% (111/189) の受胎率が報告されて

いる。凍結胚でも43%(6/14)の分娩率であった⁶⁾。

体外で7～9日間培養することによって得られた胚盤胞の正常性は子牛が生産できたことで証明されている⁷⁾。しかし、胚盤胞の出現する時期が7, 8, 9日間と3日間にわたること、すべての胚盤胞が拡張期あるいは脱出期胚盤胞まで発育するわけでないことなどから、それぞれの胚盤胞の完全な個体への発育性については今後追求する必要がある。

当研究室で研究に当たられた都道府県からの依頼研究員、当省流動研究員および派遣研究員の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Brackett, B.G., D.Bousquet, M.L.Boice, W.J. Donawick, J.F.Evans and M.A.Dressel(1982) *Biol. Reprod.* 27 : 147-158
- 2) 花田・塩谷・鈴木(1986) 日本畜産学会大会講演要旨
- 3) 高橋・花田(1984) 家畜繁殖学雑誌30 : 30-38
- 4) 塩谷・桑山・上田・斎藤・大田・花田(1988) 家畜繁殖学雑誌 34 : 39-44
- 5) Parrish, J.J., J.L.Susko-Parrish and N.L.First (1985) *Theriogenology* 24 : 537-549
- 6) 桑山・塩谷・岩崎・奥山・福島・花田(1988) 家畜繁殖学雑誌 34 (投稿中)
- 7) 藤谷・桑山・塩谷・花田(1988) 家畜繁殖学雑誌 34 (投稿中)
- 8) 山田・佐藤・北村・塩谷・花田(1988) 家畜繁殖学会講演要旨 p.67
- 9) 佐藤・塩谷・山田・北村(1988) 家畜繁殖学会講演要旨 p.63

国内情報

中間径繊維タンパクに対するモノクローナル抗体で認識される核の顆粒状物質

日本たばこ産業株式会社 生命科学研究所

亀井碩哉

1. 中間径繊維と核の顆粒

高等動物細胞では細胞骨格や核マトリックスが核の構造形成や機能の調節に対して何か重要な役割を持っていると考えられる¹⁾。しかし、これは十分には解明されていない。細胞骨格と核との機能的な関連を示唆する顕著な例として、増殖の調節が異常である癌細胞で細胞骨格の一種のストレスファイバーが乱れたり消失したりしていることが多いという現象がある。

私はストレスファイバーの主要な構成成分であるアクチンに対するモノクローナル抗体の作成を試みた。その過程で、細胞質の繊維を認識するモノクローナル抗体(AC19 MAAbなど)とともに、細胞質の繊維の他にも核も認識するモノクローナル抗体(AC54 MAAb)

を得た(口絵a)。これらのモノクローナル抗体で認識される細胞質の繊維は当初微小管かとも思ったが、脳から抽出した微小管タンパクはこれらの抗体とは反応しなかった。あれこれ試した末、これらの繊維がコルヒチン処理で核の脇に凝集することや、界面活性剤などで抽出されにくい52kDのタンパクがこれらの抗体に反応することなどから、細胞質の繊維は中間径繊維であり、抗原タンパクはデスミンであることがわかった。

中間径繊維とは高等動物細胞に存在する3種の主要な細胞骨格(他の二つは微小管とストレスファイバー)のうちの一つである。中間径繊維は3者の中で最も構造的に安定なもので、核や細胞質の小器官などの細胞内での極性配置に関与していると考えられている。核の脇には中間径繊維が密集する部位があり、そこから細胞質および核の周囲に繊維が延び

ているが、核内には入らない。AC54 MAb によって認識される核の顆粒は、核を囲む中間径繊維とは離れて分布しており、また、細胞によっては核小体の部位に密集している場合もあった(口絵 a)。核内に、中間径繊維タンパクのデスミンと共通のエピトープを持つタンパクが顆粒状の構造をつくって存在していると考えられた²⁾。

当時、愛知がんセンターの佐藤周子さん(88年6月急逝)が微小管関連タンパクのMAP-1に対する抗体で核内の斑点状物質を検出して細胞の増殖や癌との関係を調べていた³⁾。核内斑点という点ではAC54 MAbの認識する核顆粒はMAP-1類縁抗原とよく似ていたが、核小体への分布に関してはまったく異なっていた。文献的にも種々の核内の斑点状物質が報告されていたが、それらのほとんどはMAP-1類縁タンパクと同様に核小体には分布しないものであった。これらの事からAC54 MAbで認識される核内顆粒が何か未知のものではないかと考えられた。そこで改めてニワトリ筋胃のデスミンを抗原としてモノクローナル抗体を作成した。その結果、AC54 MAbと同様に核の顆粒と細胞質の中間径繊維の両者を認識するモノクローナル抗体DSB389 MAbとDSB860 MAbおよび、中間径

繊維に関係した種々のモノクローナル抗体を得た。

2. 核顆粒と染色体

癌細胞はレチノイン酸(ビタミンAの体内活性体)などの添加によって正常細胞と同様の増殖上の制御を受けるようになる場合がある。また、癌細胞によっては中間径繊維が細胞分裂期に断片化することが知られている。そこで、種々の癌細胞や正常細胞、レチノイン酸を加えて培養した癌細胞などについて、上で得た種々のモノクローナル抗体を使って、核内顆粒や中間径繊維その他の細胞構造に関して何か差異が得られはしないか検討した。

そうしたスクリーニングの中で、DSB389 MAbは多くの細胞では中間径繊維と核顆粒を認識するが、HeLa細胞(図1 a)や肝細胞では中間径繊維をあまり認識せず、おもに核顆粒のみを認識することがわかった。したがって、これらの細胞とDSB389 MAbとの組合せで核顆粒の性質について、中間径繊維の存在にじゃまをされずに検討することができるようになった。さらに、HeLa細胞の分裂期では核の顆粒が細胞中央の染色体があると思われる部位に局在することを見いだした。

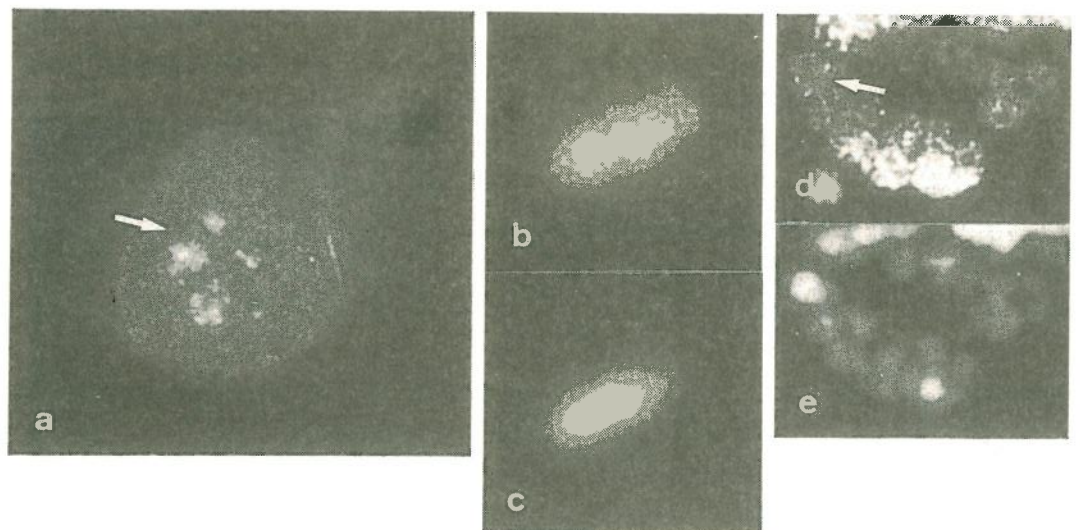


図1 中間径繊維タンパクに対するモノクローナル抗体で認識される核の顆粒
DSB389 MAbによる間接免疫蛍光染色。a: ヒト HeLa 細胞, 間期。b, c: 同, 分裂期。d, e: 分裂期細胞を低張液で処理して染色体の集団を分散させたもの。c, e: それぞれ b, d と同一部位。DNA をヘキスト 33258 で染色。a, d の矢印: 核顆粒が一行に配列またはロープ状のもので連結されている。

これはまったく予期していないことだった。そこで、3種の抗体(AC54 MAb, DSB389 MAb, DSB860 MAb)のそれぞれと、DNAを染色するヘキスト33258との二重染色、および紡錘体を認識するモノクローナル抗体との二重染色により、これらの抗体で認識される顆粒の存在する位置が染色体であることを確認した(図1b, c)。分裂後期の細胞では顆粒は染色体とともに両極に分離していた(口絵b, c)。分裂期の細胞を回収し、染色体標本をつくる要領で低張液処理し、染色体を分散させて観察すると、顆粒は個々の染色体の周囲に存在していた。観察を繰り返す中で、核の顆粒は核内にランダムに分散しているのではなく、規則的に配列していること、しかも核顆粒が何かロープ状のもので連結されているか、またはロープ状のものの一部をなしていることがわかってきた(図1a, 矢印)。同様の連結は染色体の部位に顆粒がある場合にも見られた(図1d, 矢印)。

これまでにわかった核顆粒の性質についてはさらに次のような事柄がある。

顆粒状一桿状。600個以上/核(HeLa細胞)。各々の細胞内では、大きさがほぼ揃っている。短径0.3 μ m以下。核膜付近および核内でDNAまたはクロマチンに近接して分布。核膜孔の分布とは一致しない。列をなして配列するが、サークル状に配列する場合もある。0.5% Triton X-100, 2M NaCl 溶液処理でも溶出分散しない。

これらのことから、核顆粒はクロマチンまたは核マトリックスの一部であり、細胞分裂に際してはクロマチンの凝縮体である染色体と行動を共にすることが考えられる⁴⁾。

現在までに前記のMAP-1類縁タンパクの他にも36kDや40kDの核マトリックスタンパク、Sm抗原、核内RNP顆粒、核膜孔複合体、PCNA(cyclin)などの種々の物質が核内で顆粒状ないし斑点状に分布することが知られている。また、核膜の裏打ち構造のラミナを構成するラミンA, B, Cは、中間径繊維タンパクと近縁のタンパクで、アミノ酸配列上ホモロジーの高い部分があることが知られている。しかし、これらの中で間期と分

裂期を通じて今回の核顆粒と類似の分布様式をとるのはChalyら⁵⁾の核マトリックスに対するモノクローナル抗体I1が認識する物質だけである。だが、詳しくみると一致しない面も存在する。すなわち、(1)I1抗体では中間径繊維は検出されていない。(2)I1抗体が認識する核内顆粒は核膜との関係はなさそうである。

3. 核マトリックスと染色体

核膜ないし核マトリックス成分と染色体との関係を考える上で次の二つの物質がよく知られている。一つは、核マトリックス成分の一つでDNAの高次ねじれ構造の緊張を取るDNAトポイソメラーゼIIである。トポイソメラーゼIIは、間期細胞ではDNAが核マトリックスに付着する部位になっており、分裂期には、染色体形成の芯になると考えられている。他の一つは核膜付近に分布するペリクロミンで、分裂期には染色体を包み込むように分布する⁷⁾。私は、中間径繊維タンパクに対するモノクローナル抗体で認識される核顆粒は、上記の二つの物質とは別の形で核マトリックスと染色体を関係づける役割を果たしているのではないかと考えている⁴⁾。つまり、

- ① 間期細胞核では、一列に連なった核顆粒が、一つの染色体を構成することになる一群のクロマチンの足場となって、それらを核内の一定の領域に保持する。
- ② 分裂期の細胞では、一群のクロマチンをまとめて一つの染色体を構成するようにする。

というような、核内でのクロマチンの構造保持的な役割があるのではないだろうか。

これはまったくの作業仮説である。今後、この核顆粒の実体やデスミンと共通エピソードを持つと思われる構成タンパク、細胞核内での3次元的分布や増殖にともなう変化などを追求することにより、間期細胞核の中で核顆粒がクロマチンの構造保持に対して、上記のような役割を果たしているのか、あるいは、また別の役割を持っているのか探って行きたいと思っている。

文 献

- 1) Newport, J.W. and D.J. Forbes (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 535-565
- 2) Kamei, H. (1986) *Cell Str. Func.* 11 : 367-377
- 3) Sato, C., K. Nishizawa, H. Nakamura, Y. Komagoe, K. Shimada, R. Ueda and S. Suzuki (1983) *Cell Str. Func.* 8 : 245-254
- 4) Kamei, H. 投稿中.
- 5) Chaly, N., T. Bladon, G. Setterfield, J.E. Little, J.G. Kaplan and D.L. Brown (1984) *J. Cell Biol.* 99 : 661-671
- 6) Earnshaw, W.C. and M.M.S. Heck (1985) *J. Cell Biol.* 100 : 1716-1725
- 7) McKeon, F.D., D.L. Tuffanelli, S. Kobayashi, and M.W. Kirchner (1984) *Cell* 36 : 83-92

国内情報

モノクローナル抗体の抗酸菌同定への応用

農林水産省 家畜衛生試験場

西森 敬

1. はじめに

Mycobacterium avium-*Mycobacterium intracellulare*-*Mycobacterium scrofulaceum* complex (MAIS) と呼ばれる31の血清型からなる細菌群¹⁾は豚の抗酸菌症いわゆる豚の結核の原因菌の一つである。この豚の抗酸菌症の原因菌はかつては人型結核菌や牛型結核菌の強毒が主であったが、結核行政の成果と豚の飼養形態の変化に伴って、これらの抗酸菌は減少し、かわって MAIS の分離頻度が高まり、特にオガクズを敷き料に使用している養豚農家において近年集団発生がみられ、屠場での病変保有率は出荷豚の90%以上を占める農家もある。汚染農家における飼養効率や屠場での屠殺前の検査において異常が見られないが、リンパ節はもちろんのこと扁桃や糞便から無数の MAIS が分離される。

さらにこの MAIS は人においては近年人型結核菌にかわって抗結核剤に抵抗性を示す非定型抗酸菌として結核症の重要な原因菌となってきたため、MAIS による豚の抗酸菌症は公衆衛生上重要な問題になっている。それゆえにこの抗酸菌症の発生している農家では出荷豚の商品価値の低下と出荷の制限等の問題が生じている^{2,3,4)}。

ところで一般に抗酸菌は発育が遅く、しかも MAIS は他の抗酸菌に比べ、生化学的に特徴的な性状が少なく血清型が決定されることで確定されているのが現状である。MAIS は S 型コロニーを形成し、型特異的な表面抗原を産生する。それは人型結核菌のような R 型コロニーの抗酸菌には存在しない。Schaefer はこの特性を利用して凝集反応を開発し、MAIS を各血清型に分けた。しかしながら、兔抗血清を用いた凝集反応では抗酸菌間の交差反応のため吸収血清の作成を必要とし、しばしば凝集反応の特異性を確かめるために凝集素吸収試験を必要とした⁵⁾。また Brennan らはこの型特異表面抗原を生化学的に分析する過程で、血清型によってアルカリ耐性の脂質抽出物の薄層クロマトグラフィー (TLC) プロファイルが異なることを発見した⁶⁾。現在、TLC プロファイルと凝集反応を併用して同定している。そこで我々はより迅速で正確な血清学的同定法を開発する目的で型特異抗原に対するモノクローナル抗体の作成を企てた。

2. モノクローナル抗体の作成

血清特異抗体価を上げるには全菌体よりも GPL 抗原がより好ましいように考えられるが、糖脂質に対するモノクローナル抗体を作

成するにはキャリアタンパクとの複合体で免疫するよりは、サルモネラ菌に吸着させる方法が使われている^{7,8)}。また、これまでの報告から前者の精製糖脂質での免疫では抗体価が上がりづらく、IgM タイプ以外のモノクローナル抗体が得られにくいことが予想された。それゆえに我々は日本での分離頻度の高いMAISの血清型4, 8, 9のそれぞれの菌体浮遊液でBALB/cマウスを免疫し、常法に従ってこのマウスの脾細胞と8-アザグアニン耐性のミエローム細胞(P3-U1)をポリエチレングリコール4000で融合させ、得られたハイブリドーマをHAT培地で選択し、全菌体浮遊液で血清型特異抗体産生クローンを選択した。その結果、表1に示すようなモノクローナル抗体が得られた。これらのモノクローナル抗体は5種のMAIS以外の抗酸菌や抗炭菌以外の細菌とは反応しなかった。

3. モノクローナル抗体の認識する抗原の検討

血清型4に対する9つのモノクローナル抗体はMAISの血清型1から43に対するELISA反応性試験においてすべて血清型4に特異的モノクローナル抗体であった(表1)。これは、これらの抗体がBrennanらの報告したGPL抗原⁶⁾に反応することを示唆していた。

実際、図1に示すように1H4の抗体はGPL-4にのみ結合した。さらに驚くことに、この抗体は弱アルカリ処理前のGPLのすべての極性GPLに結合した。これにより抗原決定基の違いに強く関与すると報告されているO-アセチル基⁹⁾が弱アルカリ処理によって水酸基に置換されても抗原性に変化がみられないという疑問が生じた。この解答は今後の正確なGPL-4の構造解析によって得られるだろう。

血清型8に対するモノクローナル抗体はそのMAISの各血清型との反応性の違いから、表1に示すように5つの群にわけた。血清型6の菌体がBrennanらが報告した血清型8に特異的なGPL-8⁶⁾を微量成分として持っているため(図-1)、多くの抗8抗体が血清型6と交差反応を示した。GPL-6(図-1)に対するモノクローナル抗体を作成すれば、血清型6と8の鑑別は容易になることが示唆された。

血清型9に特異的に反応するモノクローナル抗体が1株得られた。この抗体は血清型特異抗原であると報告されたGPL-9-I^{6,11)}に結合した(図-1)。

以上の結果からMAISに対するモノクローナル抗体の作出技術が確立し¹⁰⁾、この方法を使えばすべてのMAISの血清型に対するモノクローナル抗体の作成が可能であり、引

表1 *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare*-*M. scrofulaceum* complex の各血清型菌体を抗原としたELISAと凝集反応におけるモノクローナル抗体の反応性

| モノクローナル抗体 | 各血清型菌に対する各ELISA反応性*1 | | | | | | | 各血清型菌に対する凝集反応*2 | | | | |
|-----------|----------------------|---|---|---|----|----|------------|-----------------|---|---|---|----|
| | 4 | 6 | 8 | 9 | 17 | 21 | 1と他24種の菌*3 | 4 | 6 | 8 | 9 | 21 |
| 抗4型抗体 | | | | | | | | | | | | |
| 1H4と他8抗体 | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| 抗8抗体 | | | | | | | | | | | | |
| 6GA | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 3ACと他2抗体 | - | ± | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - |
| 2C1, 2CB | - | - | ± | - | - | ± | - | - | - | + | - | + |
| 4D3と他6抗体 | - | + | + | - | - | + | - | - | + | + | - | + |
| 6C4, 7B5 | ± | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 抗9型抗体 | | | | | | | | | | | | |
| 2F3 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 5F7 | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - |

*1 培養上の反応性を405nmの波長の吸光度の程度で表わした：- < 0.05 ≤ ± < 0.1 ≤ +

*2 培養上清の反応性，+：完全凝集，-：部分的凝集あるいは凝集なし

*3 血清型2,3,5,7,10,11,12,13,14,15,16,18,19,20,22,23,24,25,26,27,28,41,42,43

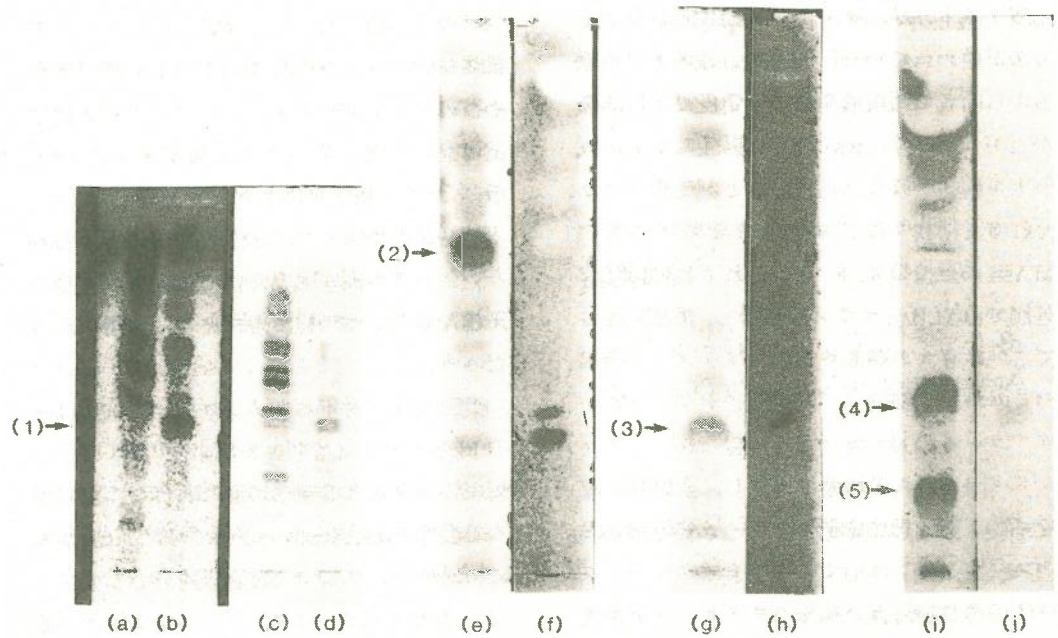


図1 Glycopeptidolipid (GPL) の薄層クロマトグラフィー酵素免疫染色⁷⁾

a と b は弱アルカリ処理前の血清型4の脂質をチャージした。他は弱アルカリ処理後の脂質をチャージした:c と d, 血清型4; e と f, 血清型6; g と h, 血清型8; i と j, 血清型9。血清型4の脂質を展開したクロロフォルム-メタノール-水の比率を60:15:2, 他は65:25:4とした。a, b, e, g と i のプレートはオルシノール試薬でGPLを検出した。他はモノクローナル抗体の結合するGPLを検出した:c と d, 1H4; f と h, 3AC; j, 5F7。1から5の数字は主要な血清型特異的のGPLを示す:1, GPL-4; 2, GPL-6; 3, GPL-8; 4, GPL-9-I; 5, GPL-9-II¹⁾。

続き、血清型2および6に対するモノクローナル抗体の作成に応用し、血清型特異抗体産生クローンを得た。

4. 野外株同定への応用

日本で豚から分離される抗酸菌の大部分はMAISであり、その中で血清型2, 4, 6, 8, 9が90%以上を占めることが報告されている²⁾³⁾⁴⁾。そこで、豚から分離された抗酸菌をコロニー性状、発育速度、および5種のモノクローナル抗体での凝集反応で同定する迅速法の有用性について検討した。凝集反応は血清型2, 4, 6, 8, 9の各々に対するモノクローナル抗体と被検株の菌体浮遊液とをマイクロタイタープレート上で37°C 1晩反応させ、凝集の有無を観察した。使用した菌株はさらに2週間かけて生化学的性状検査¹²⁾を行って確認同定を行った。その結果、表2に示すように41株のMAIS中37株(92%)を2週間

表2 豚から分離された抗酸菌の迅速同定法の成績

| 生化学的同定法 | 迅速同定法 | | 計 |
|---------|-------|-----|-----|
| | MAIS | その他 | |
| MAIS | 37株 | 4株 | 41株 |
| その他 | 0 | 7 | 7 |
| 計 | 37 | 11 | 48 |

早く同定することができ、その他の抗酸菌をMAISと同定することはなかった。

今後、血清型特異的モノクローナル抗体の種類を増やせば、環境および人由来抗酸菌の迅速同定も可能となる。

文 献

- 1) Tsang, A.Y. et al.(1983) *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 285-292
- 2) 板屋民子ら(1982) 日獣会誌 35: 241-247
- 3) 柚木弘之(1982) 豚病学 2版: 506-515
- 4) Yachida, S. et al.(1973) *Jap. J. Vet. Sci.* 35: 459-471
- 5) Schaefer, W.B.(1979) *Methods Microbiol.* 13: 324-344

- 6) Brennan, P.J.(1981) *Rev. Infect. Dis.* 3 : 905-913
 7) Fredman, P. et al.(1985) *FEBS Lett.* 189 : 23-26
 8) Hakomori, S. et al.(1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113 : 791-798
 9) Miyosi, I. et al.(1986) *Mol. Immunol.* 23 : 631-638
 10) Nishimori, K. et al.(1987) *Infect. Immun.* 55 : 711-715
 11) Yanagihara, D.L. et al.(1985) *J. Clin. Microbiol.* 21 : 569-574
 12) 斎藤肇(1982) *臨床検査* 26 : 1539-1544

国内情報

PCBを食べる菌をつくる

通商産業省 微生物工業技術研究所

古川謙介

1. PCB分解菌

1974年、筆者はウィスコンシン大学、Matsumura 教授のもとに留学した。有機水銀分解菌の研究をやる予定であったが、PCB分解菌を探すと言われて戸惑いを感じた。PCBはその当時、水銀、カドミウム、六価クロム等とともに重大な環境汚染物質であり、厚生省が魚の接種量を制限した程である。もともとPCBは優れた物理的・化学的性質により工業製品として絶縁油、熱媒体、機械油、可塑剤、塗料などに広く使用された。このように化学的に不活性なPCBを分解する微生物を見いだすのは困難視されていた。1973年、AhmedとFochtは初めてビフェニル質化菌が低塩化PCBを分解することを報告した。筆者らはその後ビフェニルを単一の炭素源として利用する菌が広く環境中に分布しており、これらが各種のPCB成分を塩化安息香酸へとコメタボリズムにより酸化分解すること、PCBの生分解性は塩素置換により大きな影響を受けることを明らかにした。そのうち、菌学的性質を調べたPCB分解菌は16株で、15株は *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella* などのグラム陰性菌で、1株はグラム陽性菌 *Arthrobacter* である。

2. PCB分解経路と酵素系

上記のPCB分解菌および他の研究機関で分離されたPCB分解菌のほとんどは図1に示す代謝経路で多くのPCB成分を塩化安息香酸へ分解する。この代謝経路において四つの酵素が関与している。酸素添加酵素(A)によりビフェニル/PCBはジヒドロジオール化合物(図中化合物II)、次いでジヒドロジオールは脱水素酵素(B)によりジオール(化合物III)へと変換され、リングメタ開裂酸素添加酵素(C)により、ジオールの1,2-位が開裂して黄色化合物IVが生成する。メタ開裂物質は、ヒドロゲナーゼ(D)により塩化安息香酸(化合物V)へと加水分解される。多くのPCB分解菌のリングメタ開裂酸素添加酵素(2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase)

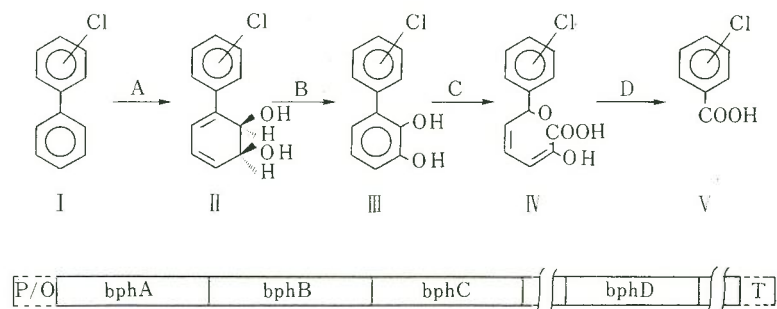


図1 細菌によるPCB分解経路とbphオペロンの構造

nase)を精製したところ、この酵素は分子量が26万、サブユニット分子量が3.3万で二価鉄を必須の補因子とし、その構造は(α -FeII)₈のオクタマーを形成していた。また、ヒドロゲナーゼは分子量が12万、サブユニット分子量が3万でテトラマーであった。四つの酵素をコードしている遺伝子を *bph A*, *bph B*, *bph C* および *bph D* と命名し、次いでこれらの酵素遺伝子のクローニングを行った。

3. PCB分解遺伝子のクローニング

北九州のビフェニル製造工場より分離した PCB 分解菌 *P.pseudoalcaligenes* KF 707 株の染色体より、PCB 分解遺伝子をクローニングした。KF 707 株染色体 DNA の *Xho* I 断片を RSF 1010 由来の広宿主域ベクター、pKF 330 の *Xho* I サイトに連結し、*P.aeruginosa* PAO 1161 株を形質転換した。約 8,000 の形質転換株より 1 株がビフェニルをメタ開裂して黄色化合物を蓄積した。この形質転換株は *bph A*, *bph B*, *bph C* を含む KF 707 株由来の 7.9kb 組換え DNA 分子を保有していた。サブクローニングにより *bph A* のみをもつ組換えプラスミド pM FB 4, *bph A*, *bph B* の二つをもつ pM FB 6, *bph A*, *bph B*, *bph C* をもつ pM FB 2 を作成した。これらのプラスミドを保有する組換え体により諸種のビフェニル化合物から、ジヒドロジオール、ジオールおよびメタ開裂物質を効率良く蓄積生産することができた。リングメタ開裂酵素添加酵素(2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase) 遺伝子, *bph C* (707) を含む約 2 kb DNA の塩基配列を決定した。*bph C* は fMet およびストップコドンを含めて 897bp の読取枠が認められ、プロセスされたアミノ酸数は 297 であった。*bph C* の上流には *bph B* (脱水素酵素遺伝子) と考えられる読取枠が存在した。最近、ヒドロゲナーゼ遺伝子 *bph D* のクローニングに成功した。KF 707 株においては *bph ABC* はこの順序で遺伝子クラスターを形成しているが、*bph D* は *bph C* のすぐ下流には存在せず、*bph C* と *bph D* の間

には約 3 kb の機能不明な DNA セグメントが存在していた。これらの *bph* 遺伝子クラスターはビフェニルにより誘導されるオペロンを形成している。

4. トランスポゾンによる *bph* 遺伝子の部位特異的変異

Tn 5-21 は西独の R.Simon により構築された Tn 5 の誘導體である。Tn 5 のネオマイシン耐性 (Nm^r) 遺伝子の代わりにテトラサイクリン耐性 (Tc^r) 遺伝子とプロモーターを欠如させた *lacZ* 遺伝子を導入した promoter probe transposon である。この *lacZ* 遺伝子上流には、N 末端の七つのコドンが除去され、SD 配列とフレームの異なる三つのストップコドンが配置してある。複製能を欠いた λ ファージに Tn 5-21 を転換させた λ_{467} : Tn 5-21 を用いて、KF 707 株よりクローニングした *bph ABC* へ random transposon mutagenesis を行った。その結果、Tn 5-21 が *bph ABC* 上のランダムな位置に転移したクローン 48 株が得られた。これらの Tn 5-21 挿入変異プラスミドの機能は 4-クロロビフェニルからの代謝物を同定することにより行った。*bph A* は約 4 kb, *bph B* は *bph A* の下流約 1 kb, *bph C* は *bph B* の下流約 1 kb にマップされた。諸種の *bph ABC* : Tn 5-21 を保有するプラスミドを親株 KF 707 株に接合伝達し、*bph* 遺伝子の double crossover recombination により Tn 5-21 のみが *bph A* に挿入された変異株が各種取得できた。これらの変異株は BP⁻Tc^r の表現型を示す。*bph A* 上に転移した Tn 5-21 は *bph* オペロンプロモーターの下流にプロモーターレス *lacZ* をもつので *lacZ* はビフェニルにより誘導的に生産された。

5. 諸種 PCB 分解菌の *bph* 遺伝子の相同性

PCB 分解菌は当初稀な菌であろうと考えられていた。しかし、ビフェニル資化菌は自然界に比較的広範に分布しており、これらが PCB の分解に関与している。そこで我々は、

ビフェニル代謝ないしPCB分解遺伝子が自然界にいかに分布し、いかなる相同性を持ち、いかに構成されて、いかに機能しているかに興味をもった。そこでまず、*bph ABCD*をクローン化した北九州由来の *P. pseudoalcaligenes* KF 707 株と米国シカゴ由来の *P. paucimobilis* Q 1 株より、PCB分解のキー酵素である 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase (23 OHBPO) をそれぞれ精製し、酵素の性質を調べた。Q 1 株の酵素も KF 707 株の酵素と同じく分子量26万、サブユニット分子量3.3万、二価鉄を補因子としその構造は (α -FeII)₂ のオクタマーを形成していた。基質特異性は共に 2,3-dihydroxybiphenyl に特異的に作用し、3,4-dihydroxybiphenyl は全くアタックしない。一方、Q 1 株由来の酵素はカテコールに活性を示すが、KF 707 株の酵素はカテコールに作用しない。そこで両酵素の抗体を作製し、免疫学的性質を調べたところ、KF 707 株とQ 1 株の酵素は相手の抗体に対して全くクロス反応を示さなかった。そこでQ 1 株の 23OHBPO 遺伝子、*bph C* (Q 1) をクローン化し、707株の同遺伝子と塩基配列を比較した。*bph C* (Q 1) は *f*-Met およびストップコドンを含めて900bpで *bph C* (707) の 897bp とほぼ同一であったが、塩基配列のホモロジーは59%、また塩基配列より推定されるアミノ酸配列のホモロジーは38%と非常に低かった。しかし、両酵素は部分的に高いホモロジーを示すドメインが数カ所認められ、この酸素添加酵素の機能部位であると考えられる。現在、タンパク質工学的手法を用いて23OHBPOの機能部位を同定している。このように北九州由来のKF 707 株とシカゴ由来のQ 1 株の23OHBPOは酵素的性質は極めて類似しているにもかかわらず、免疫学的性質、DNAレベル、アミノ酸レベルでのホモロジーが低いことが明らかになった。そこで、研究室保存の諸種のPCB分解菌15株の *bph* 遺伝子について、KF 707株の *bph ABC* とQ 1 株の *bph C* をプローブとし

てホモロジーを検討した。KF 707株の *bph* 遺伝子と同じか、極めて類似した *bph* 遺伝子クラスターを有する株は、15株中6株、他の3株も高い相同性を有していたが、Q 1 株を含む6株は酵素の免疫学的ホモロジー、DNAホモロジーとも認められなかった。一方、Q 1 株の *bph C* をプローブとした場合、いずれの菌株にもホモロジーのあるDNAは認められず、またQ 1 株の23OHBPO抗体とクロス反応を示す株も存在しなかった。KF 707株の *bph* 遺伝子が何故自然界に広く分布しているのか、もともと *bph* 遺伝子はどのような機能を持っていたのか等、いわば“遺伝子エコロジー”の観点から研究を進めているところである。

6. PCB資化菌創製の試み

ビフェニル/PCBは同一酵素で(塩化)安息香酸へと代謝される。したがって、理論的には *bph ABCD* を安息香酸/塩化安息香酸資化菌に導入し発現してやれば、ビフェニル/PCB資化菌が作れるわけである。我々は最近、*P. putida* KF 715株から *bph ABCD* 遺伝子をクローン化することに成功した。KF 715株の *bph* オペロンはKF 707株と異なり、*bph C* と *bph D* の間にエキストラDNA (3 kb) を含んでおらず、*Xho*I 9.5kb断片に *bph ABCD* の四つの遺伝子を全てコードしている。そこでこの *bph ABCD* (715) 遺伝子を広宿主域ベクター pKF 330 に導入し、ヘルパープラスミド pRK 2013 とともに安息香酸資化菌、*P. aeruginosa*、*P. putida*、*Achromobacter xerosis* に導入した。その結果、これらの株はいずれもビフェニルを唯一の炭素源として利用する能力を獲得し、諸種のPCB成分を塩化安息香酸へと分解した。同様に *bph ABCD* を塩化安息香酸資化菌に導入してやればPCBを資化できる菌株の創製ができるわけで、現在、各種の塩化安息香酸資化菌の分離を行っている。

国内情報

大豆プロトプラスト調製法の改良

農林水産省 農業生物資源研究所

酒井富久美

1. はじめに

これまで、高等植物のプロトプラストは植物ウイルス学、生理生化学および細胞生物学など広い研究分野で、よい実験材料として利用され、またバイオテクノロジーを用いる作物育種の研究においては、欠かすことのできない素材となってきた。そのために、プロトプラストは数多くの植物種のさまざまな器官や組織および培養細胞から、活性の高い状態で得られるようになった。しかしながら、植物種によってはプロトプラストの調製が未だ容易でないものもある。ここで取上げる大豆もその一つで、野生種 (*Glycine canescens*, および *G. clandestina*) で再生能のあるプロトプラストが得られているが^{1,2)}; より重要な栽培種 (*G. max* L.) では依然として、プロトプラストの調製さえ容易ではなく、調製のた

めの酵素処理過程に長時間を要する結果、得られたプロトプラストの分裂・増殖活性さえ低い。栽培種の大豆細胞はプロトプラスト化すると全能性を欠落するのではないかという懸念さえ持たれた。しかし最近になって漸く、栽培種大豆未熟種子の子葉から、長時間の酵素処理によって調製したプロトプラストによる個体再生が報告され³⁾; その考えは否定された。そこで、何故酵素処理に長時間を要するのかという点に問題をしばって、プロトプラスト調製法の改良を検討した。

2. 大豆細胞壁に含まれる β -1, 3-グルカン

植物のプロトプラスト調製では、まず細胞を遊離させるために、polygalacturonase を主酵素活性とするペクチナーゼが必要であるが、主役を演じるのは β -1, 4-グルコシド結合を切断するセルラーゼである。プロトプラストの調製によく用いられる酵素類を表1に示す、大豆の場合、遊離細胞は比較的容易に得られるが、それにセルラーゼを作用させても、完全なプロトプラストにするのが困難であった。顕微鏡観察による形状で、球形のプロトプラストになっていると判断しても、細胞壁を特異的に染色できる蛍光色素を用いてその細胞を染色し蛍光画像解析すると、細胞壁が未だ残っているものがあって、完全にプロトプラスト化されていないことが明らかになった(口絵)。したがって、大豆の細胞壁はセルラーゼによって切断されない部位を持っているのではないかと推測された。

Klein らは大豆培養細胞プロトプラストを培養すると、細胞壁再生の初期過程で、セルロース以外に β -1, 3-グルカンが合成される

表1 プロトプラストの調製に用いる酵素

| 商品名 | 主酵素活性 | 起源 | メーカー |
|------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|---------------|
| Macerozyme R10 | Polygalacturonase | <i>Rizopus</i> sp. | ヤクルト本社 |
| " R 200 | " | " | " |
| Pectolyase Y 23 | Pectin Lyase, Polygalacturonase | <i>Aspergillus japonicus</i> | キッコーマン |
| Pectinase Protoenzyme "UEDA" | Polygalacturonase | <i>Asp. niger</i> <i>Asp.</i> sp. | Sigma 上田化学 |
| Cellulase "Onozuka" R10 | Cellulase | <i>Trichoderma viride</i> | ヤクルト本社 |
| Cellulase "Onozuka" RS | Cellulase | " (mutant) | " |
| Cellulase YC | Cellulase | <i>Tri. viride</i> | キッコーマン |
| Cellulysin | Cellulase | " | Calbiochem |
| Driselase | Cellulase, Hemicellulase | <i>Irpex lacteus</i> | 協和醸酵 |
| Meicelase | Cellulase | <i>Tri. koningi</i> | 明治製菓 |
| Cellulosin- P | Cellulase | <i>Asp. niger</i> | 上田化学 |
| Funcelase | β -1, 3 Glucanase | <i>Tri. viride</i> | ヤクルト本社 |

ことをすでに報告している⁴⁾。酵母やカビの細胞壁の骨格構造は β -1,3-グルカンで、それらのプロトプラスト調製には β -1,3-グルカナナーゼが有効である。そこで、大豆の細胞壁の構造には、通常の植物細胞壁とは異なる β -1,3-グルコシド結合が、何らかの役割を果たして存在している可能性に着目し、プロトプラスト調製用酵素として、従来のセルラーゼとペクチナーゼの組合せに β -1,3-グルカナナーゼを主酵素活性とする Funcelase (表1 最下段) を作用させることにした。

3. 大豆葉肉プロトプラストの調製における β -1,3-グルカナナーゼの効果⁵⁾

用いた大豆は日本で広く栽培されているエンレイ、タマホマレ、スズユタカの他に、農林1号、ペキンの5品種で、温室で育てた播種後10日目前後の本葉を70%アルコールと2%アンチホルミンで表面殺菌し、これを3~4mmに細断して酸素処理に供した。酵素はペクチナーゼとして Pectolyase Y23, セルラーゼとして Cellulase "Onozuka" R S の組合せを用い、これに Funcelase を0.5%の濃度になるよう添加して用いた。添加の場合、得られる細胞の数は無添加の2倍程度になるが、プロトプラスト化率(完全にプロトプラストになった細胞が全細胞に対して占める割合)は約15%と低く、Funcelase 無添加の50%という値を大きく下まわった。結果的に、プロトプラストの収量は予想に反し Funcelase 添加の場合の方が低くなった。しかし、Funcelase が細胞を遊離させる過程に効果がみられたことに注目し、ペクチナーゼ酵素液(Pectolyase 0.05%, potassium dextran sulfate (PDS) 0.5%, mannitol 0.5M, pH 5.4) による遊離細胞の単離(マセレーション), およびセルラーゼ酵素液(Cellulase "Onozuka" R S 0.5%, PDS 0.5%, mannitol 0.5M, pH 5.4) によるプロトプラスト化の二段階に分け、各々に Funcelase を0.5%の濃度で添加してその効果を調べた。

マセレーションの過程においては、90分間の酵素処理で2~3倍量の細胞が Funcelase

の添加によって得られた。この増加量には用いた大豆の品種により若干の差はあるものの同様の傾向を示した。細胞間接着にも β -1,3結合が介在していると考えられる。さらに、得られた遊離細胞を用いてそのプロトプラスト化反応を調べた結果、Funcelase 添加の場合は2時間の酵素処理で、殆んど全ての細胞がプロトプラストになった(口絵)。その時のプロトプラスト収量は全ての品種で、葉片1g当たり $3 \sim 5 \times 10^6$ 個で、従来の5~8倍に増加した。これに反し、セルラーゼのみの Funcelase 無添加の場合は、4時間酵素処理を行っても、約50%のプロトプラスト化率が得られなかった。

以上の結果、大豆葉肉組織からプロトプラストを調製するには、二段階法で行い、そのどちらかのステップの酵素液にも Funcelase を添加して用いるのが、極めて有効であることが明らかになった。Pectolyase Y23, Cellulase "Onozuka" R S および Funcelase の3種の酵素を混合して一段階反応を行うとプロトプラスト化反応が何故、十分進行しないかは未だ明らかでないが、一つの理由として、マセレーション酵素の作用で生じた分解物による Funcelase 活性の阻害が考えられる。

4. 大豆培養細胞プロトプラスト調製に及ぼす β -1,3-グルカナナーゼの効果⁵⁾

品種はエレインを用い、種子中の子葉よりカルス誘導し、Murashige & Skoog (MS) 液体培地中でけん濁培養を行って培養細胞とした。酵素液は Cellulase "Onozuka" R S (1.0%) と Pectolyase Y23 (0.05%) を用い、これに Funcelase を0.5%の濃度で添加して、その効果を検討した。図1は培養細胞けん濁液1mlから得られたプロトプラストの収量と反応時間の関係である。葉肉細胞の場合とは異なり、培養細胞では Funcelase の効果が一段階酵素処理で顕著にみられた。すなわち Funcelase 無添加では2時間処理でも殆んどプロトプラスト化できないのに対し、添加の場合は 1.6×10^6 個のプロトプラストが得られた。この値は3時間処理で得られる数量の

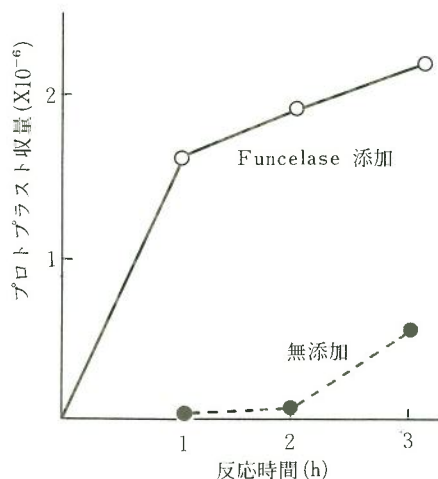


図1 大豆培養細胞プロトプラストの調製に対するFungelaseの効果

培養細胞けん濁液(植え継ぎ3~4日目)1ml. 無添加酵素液(Pectolyase Y23 0.05%, Cellulase "Onozuka" RS 1.0%, PDS 0.5%, Mannitol 0.5M, PH 5.4) 5ml. 30°C

75%にも達しており、Fungelaseを用いると非常に短時間の酵素処理(30°C, 1~2時間)で多数のプロトプラストを調製できるようになった。

5. 得られたプロトプラストの培養

バクテリアでは、球形であるが細胞壁が部分的に残っている細胞をスフェロプラストと呼び、プロトプラストと区別される。植物の場合、この区別はあまり厳密に行われていないが、大豆のように遊離細胞からプロトプラスト化が容易でない場合は得られた細胞がプロトプラストであることを確認する必要がある。今回得られた細胞は細胞壁に特異的な蛍光染色で全く染まらないので、プロトプラストと呼んでよい。それをホルモン添加MS培地で培養すると3日目で染まるようになり、細胞壁が再生されたことも確認された。さらに培養を行うと分裂が生じ、その頻度は50%に達した。培養20~30日目で多数のコロニーを形成した(口絵)。5~10mm大のカルス状に成長したものはNAAとZeatinを含むMS培地に移すと約1カ月後には根の分化がみられた。

6. おわりに

大豆葉肉および培養細胞からのプロトプラスト調製に β -1, 3-グルカナーゼを主酵素活性とするFungelaseを新たに使用することにより、これまで困難であった葉肉組織から大量のプロトプラストを短時間に調製できるようになった。培養細胞からも、従来の方法に比べて処理時間が1/3~1/4に短縮されて、かつ多量のプロトプラストが得られるようになった。大豆の細胞壁の構成に β -1, 3-グルカンが重要な部分を占めている可能性が考えられる。さらに、マセレーション段階でもFungelaseが有効であることから、細胞間接着物質にも β -1, 3-結合が含まれているかも知れない。大豆以外にもプロトプラスト化の困難な植物にもこれと同様のことがあてはまる可能性がある。

上述の改良法で得たプロトプラストは未だ個体の再生までには至っていないが、従来の方法で得られるプロトプラストの分裂頻度(10~20%)よりもはるかに高い値を示した。これはプロトプラスト調製の際、酵素処理の時間を短縮できたことによると考えられる。今後さらに培養条件を詳細に検討することによって植物体再生が十分に期待できよう。

大豆は植物性タンパク質および油脂源として、重要な作物であり、寒地・暖地をとわず全国的にさまざまな品種が栽培されている。今後はプロトプラストを素材にした、バイオテクノロジーによる大豆の育種が展開されるものと思われる。

文 献

- 1) Newell, C.A. and H.T. Luu (1985) *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4: 145-149
- 2) Hammatt, N. et al. (1987) *Plant Science* 48: 129-135
- 3) Wei, Z. and Z. Xu (1988) *Plant Cell Reports* 7: 348-351
- 4) Klein, A.S., et al. (1981) *Planta* 152: 105-114
- 5) 山地チカ子・酒井富久美(1987) 日本育種学雑誌 37(別 2): 54-55

文献情報

ベゴニア葉組織からの
不定胚形成の研究

2,4-D(0.125mg/ℓ), BA(0.25-0.5mg/ℓ), CM(10% V/V)あるいはCH(0.2% W/V)を含むSH液体培地で液体培養を行なうと、50日後に球状胚、心臓型胚、魚雷型胚、子葉型胚が形成される。不定胚と不定芽はともに葉組織の表皮細胞に由来するが、不定芽では不定胚に類似した形態形成が見られない。不定芽は外植片から、直接出芽してくるのに対し、不定胚形成過程では、球状胚になると外植片から培養液中に放出される。さらに魚雷型胚と子葉型胚になると将来頂芽となる頂端部と根になる基端部の存在が見られる。また、ときには正常な受精胚と同様に胚柄様の構造体が見られ、頂端分裂組織が存在する。しかし、不定芽は葉原基しか見られない。

ベゴニア (*Begonia fimbristipula* Hance) は自然飲料や薬用植物として知られている。また、ベゴニアの葉から抽出される(アントシアニン)から良好な食品色素を精製できる。筆者らはベゴニアにおけるカルス誘導と不定根、不定芽分化について研究し、アントシアニンの含量と関係する要因と、芽分化に影響を与える要因を以前報告した。本報告では、ベゴニア葉組織外植片からの不定胚誘導に有効な培地、培養条件について検討を行った。さらに走査型電子顕微鏡と組織切片法を用いて、不定芽および不定胚形成過程に見られる形態変化について比較検討を行なった。

走査型電子顕微鏡と組織切片の観察によって、ベゴニア不定胚が葉組織の表皮細胞に由来し、しかも上表皮細胞が下表皮細胞より不定胚形成率が高いことが考察された。表皮細胞が培養後5日に分裂をはじめ、10日後には葉脈とその付近の表皮細胞が分裂を繰り返す。約20日後に、葉組織から外側に細胞塊が突出し、球状胚が形成される。25日後に、球状胚は培養液中に放出される。さらに約35日後に

心臓型胚が形成され、50日後になると球状胚、心臓型胚、魚雷型胚、子葉型胚が培養液中に検出されるようになる。これらの不定胚はホルモンフリーの1/2濃度のSH培地に移植すると完全な植物体に分化する。

ベゴニアの不定胚形成の過程においては、球状胚から魚雷型胚後期までに分裂細胞が両頂端に集中し、将来頂芽となる頂端部と根となる基端部が明確に形成されることから、極性の存在は明かである。また、その中に維管束の原基も見られる。その後正常な受精胚と同様に胚柄様の構造体と形成層原基も観察されるようになる。また、双子葉、頂端分生組織も形成され正常な受精胚と同様な形態となる。

次に筆者らは、ベゴニアの葉組織からの不定胚形成に及ぼす、植物生長調節物質の効果を検討した。2,4-Dを処理すると、ベゴニアの外植片からカルスが形成されるが、NAA, IAA, IBA, PCPAは主に不定根を誘導する。細胞分裂促進ホルモン(KT, BA, 2ip, ZT)のうちどれか一つと、NAAを同時に処理すると、不定芽が形成される。2,4-D, BA, CMが同時に存在すると、不定胚が形成される。さらにベゴニアの葉組織を外植片として用い、2,4-D, BA, CMを種々の濃度で含む培地で培養し、これらのホルモンが及ぼす濃度効果を調べた。2,4-D(0.125mg/ℓ), BA(0.25~0.5mg/ℓ), CM(10% V/V)濃度にして培養すると、もっとも不定胚形成率が高く、正常な不定胚が得られる。また、これらのホルモンが不定胚形成過程ではいずれも必須で、連続的に培養するときのみ、不定胚の形成が見られる。

外植片から不定胚が形成される過程では、外植片からまずカルスが形成され、そのカルス中より不定胚が形成される例が多いが、外植片から直接不定胚が形成される例もある。ベゴニアは後者にあたる。このベゴニアの不定胚形成による無性的な繁殖系を用いて、経済的に多量な植物体を得られる。また、不定胚形成には植物生長調節物質が重要である。生長促進物質オーキシンあるいは細胞分裂促進ホルモンサイトカイニンだけで不定胚が形

成される植物もあるが、まずオーキシンで誘導し、その後サイトカイニンに移植することにより、不定胚が形成される植物もある。また、オーキシンとサイトカイニンの量比により不定胚が形成される場合もある。ペゴニアはこれらの植物とは異なり、2,4-D, BA およびCM (あるいはCH) のいずれも必須で、しかも同時に存在しないと、不定胚の形成が見られない。

不定胚形成が多くの植物種で観察される。しかしながら、現在に至ってなお、不定胚形成過程における生理、生化学的な変化やその制御機構は不明な点が多い。そこで本稿においては、ペゴニア葉組織の表皮細胞から誘導される不定胚および不定芽の形態形成過程を比較検討したうえ、葉組織からの不定胚の誘導に対する植物生長調節物質の及ぼす効果を検討してきた。その不定胚形成系を用いることにより、各段階の大きな不定胚が多量に得られ、不定胚の形成の制御にかかわる生化学および生理的な研究に良い材料となるであろう。

(抄訳 李 筠)

柴背天葵葉片培養体細胞胚状体発生的研究

張 兰英・李 耿光・郭 俊彦

植物学報 30(2) : 134-139 (1988)

文献情報

昆虫の視覚系における
偏光感受ニューロン

ミツバチが空の偏光を航空術のために利用しているということを、カール・フォン・フリッツが指摘して以来、多くの昆虫に偏光を検知する能力のあることが明らかになってきた。偏光検知のメカニズムとはどのようなものであろうか。生理学的な最近の研究によると、昆虫の偏光検知には複眼の一部にある偏光感受視細胞と間脳にある偏光感受視葉ニューロン (POL ニューロン) が関与しているこ

とがわかっている。ネイチャー誌 vol. 331-4 (1988年) に掲載された論文で、トーマス・ランバート博士はコオロギの偏光感受視細胞—POLニューロン系における偏光感受のプロセスを電気生理学的実験を使って明らかにした。以下はその紹介である。

まず、偏光感受器の場所は、複眼の中で個眼 (ommatidium) がある一定方向に並んでいる背端部 (dorsal rim area) に限定されている。個眼の方向とはその中の感桿 (rhabdom) の方向 (図1の黒い棒) によって定まっており、特定の向きの偏光を感受するための重要な特質であるといわれている。感桿の中の微細構造をみると、個眼の長軸とは垂直な方向に、互いに直交する2種類の微絨毛 (microvilli) がはえている (図1の個眼断面図)。この微絨毛に存在する視物質の光吸収度が偏光面に依存しており、特定方向の偏光に対してのみ反応するというのである。

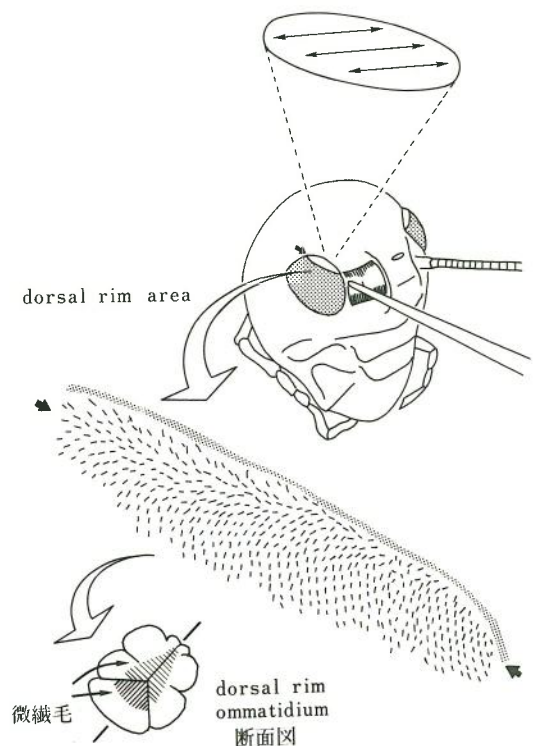


図1 コオロギの複眼背端部と感桿の方向

実験では同博士は、複眼背端部にさまざまな方向 (eベクトル) の偏光をあて、POLニューロンに突き刺した電極に伝わるスパイク頻度を測定した。複眼背端部の長軸に対する偏光の角度を横軸にとり、スパイク頻度を

縦軸にとったグラフが図2に示されている。スパイク頻度の変化は、自然発生の頻度（暗状態で測定されるもの）を境に興奮と抑制の部分を持つ正弦関数を示した。興奮と抑制の間隔はちょうど90度である。これは感桿における互いに垂直な微絨毛の存在と関連がありそうである。

では、このようなスパイク頻度の変化から偏光受容器とPOLニューロンの間の刺激の伝達の仕組みをどのように考えることができるのだろうか。図3はそのモデルである。偏光受容器からPOLニューロンへの刺激の伝達に二つの回路があると考えられる。偏光受容器には微絨毛の方向に依存して、互いに直交する二つの偏光に最大感度を示す部分があり、それぞれが回路のスイッチに相当する。回路の一方はPOLニューロンを興奮させる方に働き、他方は抑制する方に働く。そして、各回路の相対的な反応レベルの差によってPOLニューロンのスパイク頻度が決定されるというわけである。このモデルは、視細胞の構造とPOLニューロンの実験結果をよく説明している。

さて実験では、19本のPOLニューロンが測定され、最も高頻度にスパイクが生じる偏光の角度が記録された。その結果、複眼背端部の長軸に対して平均35度、85度、155度に感度が集中するグループにまとめられることがわかった（図4）。この原因は複眼背端部の感桿の分布から明らかに説明することができる。図1に示されているように複眼背端部における感桿の方向はランダムではなく、背端部の長軸に対して扇を開いたような配置をしている。この扇形をよくみると感桿の方向はほぼ三つのタイプに分けられる。たくさんの感桿が特定の方向に向いているということは感桿の反応も揃って一斉に起こることを意味している。すなわち、特定の三つの方向の偏光に関してシンクロした刺激が視細胞からPOLニューロンに伝達されると考えられる。このような複眼背端部の構造が偏光検知に大きく寄与していると思われる。

偏光方向を検知するメカニズムはどのようなものであろうか。現在までに二つのモデル

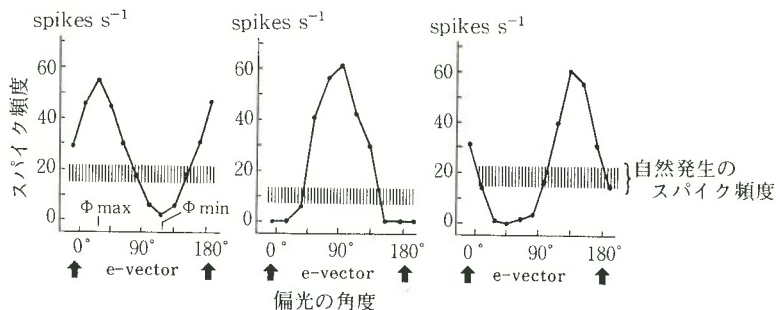


図2 POLニューロン(3本分)の反応

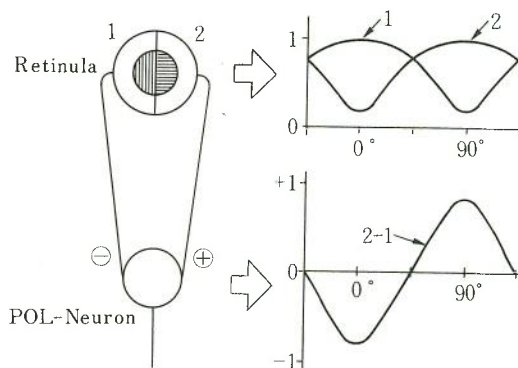


図3 POLニューロンの反応モデル

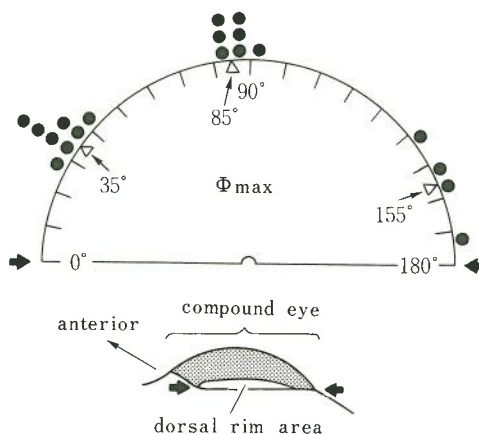


図4 最大頻度スパイクを生じる偏光の方向

が提出されている。一つは「同時モデル」(simultaneous model)といわれるもので、三つのタイプの偏光受容器の反応を比べることによって即座に偏光の方向を決定するというものである。もう一つは「走査モデル」(scanning model)といわれるもので、ある一つのタイプの偏光受容器について反応が最大となるような方向を捜し出し、その方向の偏光を特定するという方法である。後者の場合、残りの二つのタイプの偏光受容器は太陽の方向を補助的に計測するのに使われるとも

いわれている。

今回の実験は二つのモデルを検証するようなものではなかった。しかし、少なくとも明らかとなったことは、昆虫の視覚において偏光を感受しPOLニューロンに興奮と抑制の反応を引き起こす偏光感受システムが存在するということである。

(抄訳 野間口真太郎)

Polarization-opponent interneurons in the insect visual system

Thomas Labhart

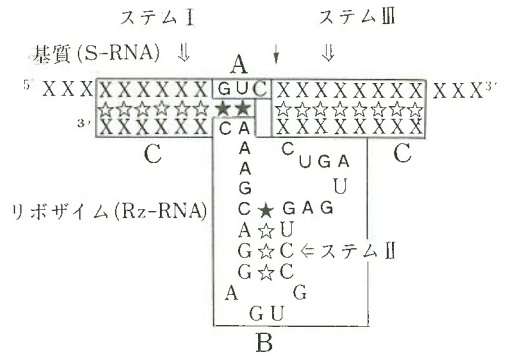
Nature 331 : 435-437 (1988)

文献情報

RNAの切断機能をもつRNA (リボザイム)の人工合成

自然界においてRNA分子が自分自身の特定部位を酵素的に自分で切断する(すなわち触媒的自己切断)機能を持っていることが発見されたのはごく最近のことで、テトラヒメナのリボソームRNA前駆体やイモリ由来の反復配列DNA転写RNA(tRNA)のほか最近では植物において病気に関連して複製する小環状RNA分子でもいくつか見出されている。すなわち、タバコリングスポットウイルスのサテライトRNA(sTRSV)や lucerne transient streak virus のウイルソイド(sLTSV)(ウイルソイドのように mRNA 活性を欠き、高度に塩基対を組んだ桿状構造をとった環状一本鎖のサテライトRNAを呼ぶ)のほかアボカドサンプロッチウイルソイド(ASBV)などは、植物体において単位長よりも長いプラス鎖とマイナス鎖として存在するが、これは複製時に環状RNA(ウイルソイド分子)が鋳型となってコンカテマー(鎖状体)を生成し、それが特異的な触媒的自己切断によって生じたものと考えられている。RNAの触媒的自己切断には二価金属イオンと中性以上のpHが必要で、5'GUC[↓]3'や5'GU

A[↓]3'などの特異的部位で切断される。ribozyme(リボザイム)とはこのような触媒活性のあるRNAをいう。この領域構造は共通しており、約15塩基のしかも断続的な保存配列と独特の2次構造を持っている。これらは3分岐のステム(塩基対, 2本鎖らせん)



I・II・IIIが切断部位およびよく保存された2つの1本鎖ループを囲んでできている。ふつうこれらのRNAの自己触媒的切断は分子内反応であり、1分子内に必要な機能を全て持っている。そこで、sTRSV RNAの+鎖より自己切断領域を単離し、その基質RNAと酵素活性RNAを分析し、他の自己切断領域の例と比較することにより新たに高度な配列特異性を持ったエンドリボスクレアーゼ活性のあるオリゴヌクレオチドを設計した。これはTn9(トランスポゾン9)クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)のmRNA配列の3カ所をターゲットとするribozymeとして設計・構築したもので、実際に切断活性が示され実験は成功した。

sTRSV RNAでは5'GUC₃₅₁[↓]A₁^{3'}で切断が起こる。このRNAよりcDNAをクローニングし、ステムIII末端のループ内にBamHIリンカーを挿入したミュータントを作製し、in vitro 転写したところ、RNAの切断活性は保存されているとともに、この活性は+鎖のtRNAのみで認められた。このことからステムIII末端のループは切断活性に不要である(すなわち2本の1本鎖RNA〈基質(S-RNA)とribozyme(Rz-RNA)〉に分割して操作できる)ことが明らかになった。

そこでこの結果を基に、S-RNAとRz-RNAの配列を各々変異させることにより新

たな配列特異的エンドリボヌクレアーゼ活性を持った **ribozyme** の設計を sTRSV をモデルにして試みた。S-RNA と Rz-RNA にはそれぞれ構造上の条件がある。すなわち、〔領域A〕……S-RNA の切断部位に隣接して必要な $5' \text{GUC}_{351} 3'$ 構造、〔領域B〕……Rz-RNA にあり、領域Aと一部相補的に対合する高度に保存された配列と二次構造を含む、〔領域C〕……領域Bをはさみ Rz-RNA の両端にあり、領域Aと相補的に塩基対を組むことにより反応を安定化する。以上の条件のもとに、さらに次の3点をパラメーターとして **ribozyme** を設計した。

① 通常S-RNAの切断部位は $5' \text{GUC}_{351} \downarrow \text{A}_1 5'$ であるが、sLTSVでは $5' \text{GUA} \downarrow \text{U}_{162} 3'$ 、イモリでは $5' \text{GUC} \downarrow 3'$ のほか $5' \text{GUA} \downarrow 3'$ や $5' \text{GUU} \downarrow 3'$ 、 $5' \text{CUC} \downarrow 3'$ でも切断活性が示されたが $5' \text{GUG} \downarrow 3'$ では切断は起こらなかった。 $5' \text{AUC} \downarrow 3'$ や $5' \text{UU} \text{C} \downarrow 3'$ では切断の効率が落ちた。本実験では $5' \text{GUC} \downarrow 3'$ を用いた。

② 領域BのステムIIやその先のループは不要と考えられ、ASBVではループがない。

③ S-RNAとRz-RNAの切断反応には領域Cの塩基対のサイズとタイプが重要で、**ribozyme**としての反応特異性や活性を左右する。ここではそれぞれ両端に8塩基対サイズのものを用いた。

一方、S-RNAとしてCAT遺伝子のmRNAを用い、その中に $5' \text{GUC} \downarrow 3'$ 配列を任意に3カ所選び、その各々についてRz-RNAすなわち**ribozyme**(RzCAT-1, RzCAT-2, RzCAT-3)を設計・合成した。これらのS-RNAとRz-RNAを用いて切断実験を行ったところ、すべての**ribozyme**において設計どおりの位置で触媒的な切断が起こり、自然の切断と同様その末端は $5' \text{-OH}$ であった。

ribozymeがこのように自由に合成できることが明らかになったが、これにより、新たな基質特異性を持たせたり、RNAのマッピングを行える可能性があるほか、*in vivo*での**ribozyme**配列の組み込み発現による特定遺伝子の発現阻害など、**ribozyme**のanti-

gene活性は今後各種の遺伝子やウイルスの治療や解析に有望な手段となる。

(抄訳 難波成任)

Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities

Haseloff J. and W.L. Gerlach.

Nature 334: 585-591 (1988)

文献情報

キュウリモザイクウイルス系統間における進化面より見た相互関係——
CMV RNA 2 について

キュウリモザイクウイルス(CMV)は世界中に広く分布し、多数の植物を犯すウイルスとして知られている。そのゲノムは3種の1本鎖RNAからなり、分子量の大きいものからRNA-1, -2, -3と呼ばれている。また、宿主範囲や病原性を異にする多くの系統が存在することも、本ウイルスの特徴の一つである。それらの系統は、血清型や核酸間のhybridizationの程度から、二つのサブグループに分けられている。本論文では、サブグループIに属するFny系統のRNA-2の全ヌクレオチド配列を決定し、既知のQ系統(サブグループII)の配列と比較するとともに、他のウイルスも含めてその進化の過程について触れている。

Fny-CMVのRNA-2のヌクレオチド配列は、RNA-2のほぼ全長に近いcDNAクローンからdideoxynucleotide chain termination法により、また5'と3'の両末端については、RNAの直接配列決定法により決定された。その結果、Fny系統のRNA-2は全長3,050ヌクレオチドからなり、Q-CMVの3,035ヌクレオチドよりも若干長かった。またAUGコドンは5'-末端側から87-89ヌクレオチドの部位にあり、そこから2,571ヌクレオチドに及ぶ長いopen reading frame(ORF)が存在していた。このORFは857アミ

ノ酸からなる分子量96,720のポリペプチドをコードしていると考えられた。このORFに相当するORFは、Q-CMVのRNA-2にも存在しているが、Q-CMVの方が分子量がやや小さい。

次いで、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列における相同性が、Q-CMVとFny-CMVとの間で検討された。ヌクレオチド配列では、両RNA間の相同性は71%であったが、RNAの中央部分1/3では、5'-および3'-末端側よりも高い値を示した。一方アミノ酸レベルでの相同性は73%とヌクレオチド配列の場合と大差ないが、中央領域では89%と高い相同性を認めた。更に、3'-末端側の約400ヌクレオチドの非翻訳領域でも、ヌクレオチド配列の相同性は62%であり、しかもその2次構造モデルは酷似していた。また、5'-末端の非翻訳領域中にもQ-CMVのRNA-1とRNA-2で保存されている配列が存在していた。

以上の結果から、Fny-CMVとQ-CMVはサブグループIとIIに分けられてはいるが、Fny系統とQ系統は互によく似た配列を有しており、特にORFの中央部分におけるアミノ酸配列の相同性は著しく高かった。

同じ3分節ゲノムを有するブロムモザイクウイルスやアルファルファモザイクウイルスのRNA-2と、またタバコモザイクウイルス-RNAのコードする183Kタンパク質のread through部分の配列と、上記Q-CMVのRNA-2とを比較した場合に、配列の中央部分で相同性が認められるということが、既に報告されている。更に、動物のアルファウイルス群に属する sindbis virus のコードする非構造タンパク質の一つとも相同性があるといわれており、これらウイルス間での進化上の類縁関係について興味を持たれる。特にこの保存された配列は、ウイルス複製過程においてウイルスコードのタンパク質あるいは宿主のタンパク質と相互作用を生じるために必要な配列である可能性があると思われ、今後、詳細な研究を期待したい。

(抄訳 柄澤 明)

Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 2

Rizzo, T.M. and P. Palukaitis

J. Gen. Virol. 69: 1777-1787 (1988)

文献情報

トランスジェニックプラントを用いたウイルス干渉効果の解明

植物は動物と異なり免疫作用を持っていないために、動物のようにウイルスの防除にワクチンなどのような免疫作用を利用することは困難である。しかし、植物には一度ある系統のウイルスが感染すると、そのウイルスと近縁関係にある他の系統のウイルスが侵入しても、そのウイルスには感染しなくなるという現象、すなわち、干渉効果がある。今日、この現象を多くのウイルス防除に適用し、幾つかの成果をあげている。

この干渉効果の現象が発見されてから50年以上になるが、干渉効果のメカニズムについてはまだ不明な点が多い。しかし、現在、干渉効果のメカニズムとして二つの仮説が考えられている。ひとつは、あるウイルス(干渉ウイルス)が植物体に感染すると、その植物体で増殖し、そのウイルスのコートタンパク(CP)が作られる。すると、後から同種または近縁種のウイルス(攻撃ウイルス)が侵入してきても、干渉ウイルスのCPが攻撃ウイルスの脱外被を阻害したり、又は、そのCPが攻撃ウイルスのRNAを包み込み、攻撃ウイルスの複製に干渉し、攻撃ウイルスの感染を阻止する。2番目は、初めに感染している干渉ウイルスの(+鎖)RNAによって、後に侵入してきた攻撃ウイルスの(-鎖)RNAと雑種を形成してしまい、それによって攻撃ウイルスの複製を阻止するという仮説である。そこで、BeachyらはAgroinfectionの方法を用いてTMVのCPの遺伝子をタバコのXanthiに組み込んだトランスジェニック

ラントを作り、ウイルスの干渉効果の解明を試みた。

TMVのCPの遺伝子を組み込んだもの(line 3404と3646)と組み込まないもの(line 306)の2種類のトランスジェニックプラントを作り、各々からプロトプラストを作製し、エレクトロポレーションおよびPEG法によりTMV粒子を接種した。その結果、CPの遺伝子を組み込んだline 3404では、組み込まなかったline 306と比べてはるかにTMVの感染率が低下した。しかし、感染したプロトプラストに対して各プロトプラスト当たりのウイルスの増殖量には差が認められなかった。次に、この感染率の低下を知るために、以下の実験を試みた。それぞれ2種のプロトプラストにTMVの粒子を接種して、TMVの(+)鎖および(-)鎖のRNAとCPの合成量を経時的に測定した。CPの遺伝子を組み込んだline 3404では、TMVの両鎖のRNA、およびCPの合成は認められなかったが、組み込まなかったものでは経時的に合成量が増加した。このことより、TMV感染阻害はRNAの複製の前に起こっているということが判明した。次に、TMVのRNAをそれぞれ2種のプロトプラストにエレクトロポレーションで接種して、TMVの感染率を経時的に測定したところ、感染率は両方とも経時的に増加した。この実験結果より、TMV感染阻害はウイルスの(+)鎖RNAとの雑種形成や、RNAをCPが包み込むことによって起こるのではなく、ウイルスの脱外被の時に起こることが推測された。

WilsonはTMV粒子をpH 8.0で処理すると、ウイルスの脱外被の初期に起こると考えられているTMVの5'末端側の変化が起こり、これによって*in vitro*トランスレクション活性がアップすることを見出している。そこで、この方法を利用してBeachyらはTMV粒子をpH 8.0で処理してエレクトロポレーションおよびPEG法で2種のプロトプラストに接種したところ、両プロトプラストはTMVに感染した。このことより、TMV感染阻害はウイルスの脱外被の初期に起こることが判明した。更に、CPの遺伝子を組み込んだ

タバコのトランスジェニックプラントと組み込まなかった植物を用いても同様の結果が得られた。以上のことより、ウイルスの干渉効果は、先に感染していた干渉ウイルスのCPが後に侵入してきた攻撃ウイルスの脱外被の初期の段階を阻害することによって起こることが判明した。

しかし、HemenwayがPVXを用いて同様な実験を行なったが、上記の結果を得ることができなかったこと、コートタンパクを持たないRNAのみからなるウイロイドにも同様な干渉効果があることより、ウイルスの干渉効果の機構は複雑であると考えられる。

(抄訳 笹谷 孝英)

Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection

Register III, James and Roger N. Beachy (1988)

Virology 166 ; 524-532

文献情報

野生のインゲンマメより発見された高殺虫性レクチン様タンパク質 Arcelin とその進化について

植物は昆虫などの外敵から身を守るため、いろいろな防御機構を持つように進化してきた。なかでも、ある種のタンパク質は抗生物質のような作用を持つものもあり、外敵に対する防御機構として重要な働きを演じている。

インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) の種子は Phytohemagglutinin (PHA) と呼ばれる炭水化物結合性レクチンを持ち、貯蔵性害虫であるヨツテンマメゾウムシ (*Callosobruchus usmaculatus* F.) に対して抵抗性を示すが、インゲンマメゾウムシ (*Acanthoscelides obtectus* Say) に対しては抵抗性反応を示さない。しかし、メキシコでインゲンマメゾウムシに対して抵抗性のインゲンマメの野生種が発見された。この野生種は栽培種

のインゲンマメには含まれていないタンパク質を多量に含んでおり、このタンパク質を Arcelin と名付けた。更に、Arcelin には4種類があること、Arcelin と PHA を制御している遺伝子は連鎖していること、また、両者とも糖タンパク質であり、アミノ酸組成などもいくつかの点で似ていることがわかっている。

作用があるかについて、精製した Arcelin タンパク質を用いて実験し、更に、Arcelin-1 に対する cDNA をクローニングして塩基配列を決定するとともに、Arcelin-1 とレクチンの塩基配列を比較した実験について示す。

Arcelin が直接的にインゲンマメゾウムシの抵抗性に関連していることを証明するために、まず、PHA を含むが Arcelin は含まないインゲンマメの種 Sanilac と Sanilac を戻し交配することによって PHA を除いたインゲンマメ L12-56種と、Sanilac に Arcelin-1 の遺伝子をいれた SARC1-7種の3種類のインゲンマメを用いて、インゲンマメゾウムシに対する抵抗性を見たところ、Arcelin を含む SARC1-7種のみが抵抗性を示した。次に、抵抗性を示さなかった Sanilac 種の粉末を作り、これにいろいろな量の精製 Arcelin を混ぜて人工マメを作り、このゾウムシに対する抵抗性を見たところ、Arcelin 濃度が高くなるにつれてこのゾウムシに対する抵抗性は高くなった。このことから、Arcelin タンパク質がインゲンマメゾウムシに対する抵抗性因子であることが実証された。

次に、Arcelin-1 に対する cDNA をクローニングして塩基配列を決定し、今までに判明しているレクチン遺伝子の塩基配列と比較した。SARC1-7種より mRNA を取り出し、pARC7 cDNA クローニングベクターを用いて cDNA ライブラリーを作り、Arcelin-1 のクローンを選びだし、Arcelin-1 と考えられ

る 269 個のアミノ酸をコードしているクローンを得た。この Arcelin-1 をコードしている塩基配列とレクチン遺伝子の塩基配列とを比較すると、PHA とは 78%、レクチン様タンパク質とは 81% の相同性が見られた。また、アミノ酸配列では、PHA とは 58%、レクチン様タンパク質とは 61% の相同性が見られた。以上のことより、これらのタンパク質をコードしている遺伝子は進化的に互いに関係が深いと推定される。

栽培種と野生種の約 90% のインゲンマメは PHA を持っているが、Arcelin を持っているのは野生種の約 10% のみである。また、両者のアミノ酸配列が似ていることや Arcelin と PHA の両者の遺伝子は連鎖していることなどより、Arcelin と PHA はホモジニヤスな遺伝子で、Arcelin のひとつ、あるいは、いくつかの遺伝子は PHA の遺伝子より反復、または、分岐によって生じてきたと仮定される。あるいは、Arcelin の遺伝子は PHA の遺伝子ファミリーの内のある遺伝子のひとつか、または、そのいくつかより分岐してできてきたとも考えられる。レクチン遺伝子のこのような現象は、進化の過程からして最近のことであると考えられる。なぜならば、レクチンは Arcelin や PHA と違い葉や茎や根からかならず少量は検出されること、また、PHA を欠いたインゲンマメの中に PHA とは作用の異なるレクチン様物質が見出されることなどより、PHA の遺伝子はレクチンの遺伝子の反復、または、分岐によって生じてきたものと考えられる。

(抄訳 笹谷 孝英)

Insecticidal Activity and Lectin Homology Arcelin Seed Protein

Osborn, T. C., C. Alexander, S.S.M. Sun, C. Cardona and F.A. Bliss
Science 240 : 207-210 (1988)

外国特派員便り

ケンブリッジ畜産バイオテクノロジー社
(略称 A. B. C.) を訪問して生研機構
廣川 治

昨年9月19日から10月2日にかけて、生研機構主催の「欧州の植物・家畜分野におけるバイオテクノロジー最新研究開発動向調査団」の一員として、ヨーロッパ5カ国、6カ所の研究施設を訪問したので、そのうちの1カ所、標題の会社について見聞したことを被露したい。

ロンドン北部100kmのところにあるケンブリッジ市内の、あまりに有名なケンブリッジ大学構内にその会社はある。当社は1986年までは、Animal Research Station, Cambridge (略称A. R. S.) の名で知られた畜産関係の先進的な研究を推進していた政府機関の一部、特に実用化水準にあると判断された胚移植技術(E T技術)関係部門を企業化する形で同年設立されたものである。設立にあたって、その技術的な推進役として迎えられたのが、Dr. Polge氏であり、A.R.S.を永年リードしてきた彼の退官が1986年であったことも組織再編のタイミングが同年となったことと関係があるように思われる。

同社設立の際の資本参加は、政府とベンチャー企業であり、技術的な部門のトップはScientific DirectorということでこのDr. Polge氏が就き、マネジメント部門には、このベンチャー企業から送り込まれたらしいPhilip Paxman氏が、Chief Executive Commercialとして就いている。

職員数は、約30人ということでこじんまりとした感じではあった。

主な事業としては三つあり、胚移植関係研究の受託研究、受精卵移植関係技術の技術者養成、受精卵および受精卵移植の供与である。

まず、胚移植関係研究の受託研究であるが、今のところ、「豚の初期胚の凍結保存技術の

開発」、「牛成長ホルモン遺伝子を豚の卵子へ注入し、トランスジェニックピッグを作る研究」、「DNAプローブ法による胚の段階での雌雄判別法の開発」を考えており、まだ、受託先の決まっていない研究もあるらしく、日本の企業の参画も大いに歓迎するとのことであった。なお、将来的には、核移植によるクローン羊作出技術の研究もやりたいとの話もあったが、これは、英国農業食糧省のエジンバラ研究所で、最近なされつつあると言う報告の影響かと推察される。

トランスジェニックピッグについては、ここでも既に何頭か(現地では20頭と聞いたのであるが、フィールドから考えるとやや疑問が残る。)作出できているとのことであるが、実際にみせてもらうことができた(写真1)。注入した融合遺伝子は、構造遺伝子として牛の成長ホルモン遺伝子を用い、それにプロラクチン遺伝子由来のプロモーター部分をつないだものとDr. Polge氏は語ってくれた。また、その豚の成長も速いとのこと、およそ1歳と説明のあった個体はコントロールより大きいとも語った。トランスジェニックピッグ(成長ホルモン遺伝子とメタロチオネイン遺伝子由来のプロモーターを組み込まれた)の欠点として挙げられている関節炎の多発、無気力症状について、特に、コメントはなかった。

次に事業の柱である技術訓練コースであるが、常設コースが三つ、希望に応じて開設するコースが三つとパンフレットにはあった。実際に当日会ったのは、インド系の2名であり、どのコースに所属するのかは、聞きそびれて判らなかつた。

常設コースの中身は、一般コースと呼ばれる2週間でE T技術の基礎を習得させるとい

うもの、上級コースと呼ばれる3カ月間で、マイクロマニピュレーター操作により胚分割、遺伝子注入等を行うことを含む高度技術を習得させるといいうもの、既に人工受精技術を持っているものに対して3週間でET技術を習得させるといいう3コースである。

適宜開設コースの中身は、第1に、牛以外の家畜、実験動物、さらに野生動物のET技術習得をさせるコース、第2に、実験動物に対する体外受精技術(IVFと略す)の習得を目的として、医学、動物実験に従事するテクニシャンを対象としたコース、第3に、主に研究者を対象としたET、IVF技術およびマイクロマニピュレーターによる胚操作技術を習得させるコースの三つである。

技術を習得させますといったところで、実績のない会社であることから、ARS時代に作出した様々な動物を飼養、展示することでコマーシャル効果をねらっているらしく、「Geapの名で知られている世界初の羊と山羊とのキメラ(写真2; 1982年に誕生)」、「ET技術を使って山羊に生ませた羊(写真2)」、「代表的な乳牛であるホルスタイン種と西部劇によく出てくる牛で顔が白く体が褐色のヘレフォード種とのキメラ牛」、「8細胞胚時に分割して作出した1卵性(クローン)の五つ子羊(表紙)」、「ET技術を利用して作ったほぼ同じ時期に生まれた12頭の兄弟羊」等、日本では絶対にみることができないET技術

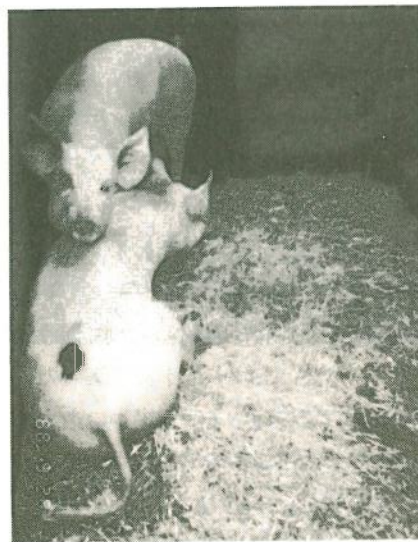


写真1: トランスジェニックピッグ

およびその関連技術の成果を見ることができたのは圧巻であった。

事業の3本柱の最後が受精卵および受精卵移植の実施で、1989年の事業を開始すべく準備していることのことであった。

受精卵は双子生産用受精卵で双子1組分で40ポンドの価格設定を考慮しており、卵子は、と畜場から入手する卵巣由来のもの、精子は英国の牛乳生産者団体であるMilk Marketing Board(略称M. M. B.)の優良種雄牛のものとするとのことであった。受胎率65%をうたい文句にBULL POWER MASTERCALFの名で売り出すとのこと、それについてはM. M. B.の全面的バックアップが必要であるはずで、販売用のパンフレットを見せてもらったが、このあたりがマネージメントの最も重要な部分であろうと推察された。

以上三つの事業のほか、トランスジェニック動物の系統的確立への協力、胚分割、ET利用多胎技術の応用としての優良家畜増殖への協力、研究計画の作成、企業化に当たってのフィージビリティスタディと企業の研究開発に対するコンサルタント業務も将来的には行う予定とのことであった。

ここまで述べてきたところから判るように同社の案内をしてくれたのは、Dr. Polgeその人であったが、氏がさかんに言っていたのは、この地がケンブリッジの大学構内にあり大学の協力、助言が得やすいということ、また、そもそも英国農業食糧省の研究所を出発として発足していることから、今後とも同省



写真2: 左が羊と山羊のキメラ
右が山羊が産んだ羊

の畜産関係研究所の技術、研究の成果を取り入れることができるということ、牛乳の生産調整を行い、英国種雄牛の7割を持っているといわれる英国酪農産業の一大拠点であるM. M. Bと深い関係を持ちながら事業を進めているということであった。私企業とはいえ、公的機関との関係を協調せざるを得ないところにこの会社の前途が多難であることを感じた。今日、日本国内に第3セクター方式と呼ばれるような半官半民の組織ができてきており、ともすれば、役所が何かと口をはさみ設立の趣旨に反して、不自由な採算性の低いものとなる傾向もあるが、マネジメント部門の長として、親企業から人材を派遣している同社のやり方には、納得するところがあった。

受精卵移植あるいはETと呼ばれる技術については、我が国においても、公的機関のみ

ならず、企業が実用段階の技術として取り組んでおり、年々その成果も大きくなっている状況にあるが、今回A. B. C.を訪れて、トランスジェニックピッグを始めとした、動物を対象とした様々の試みの成果を見て、依然として、基礎技術研究への我が国の取り組みの甘さ、遅さを痛感した。畜産業は、欧米においては長い歴史を持ち、まさに農業の基本部門ということもあって、一般企業での研究開発も盛んに行われているようである。我が国にあっても、家畜を扱うためには相当のフィールドを必要とすることから、一農家で取り組めるような研究開発ではないので、大手企業のより一層の参画が望まれるところであり、また、国、地方自治体の理解、協力も必要だと感じた。



国際学会レポート

薬剤抵抗性シンポジウム

農林水産省 果樹試験場

石井英夫

第196回米国化学会大会が1988年9月25日から30日にかけてロサンゼルス市で開かれた(写真1)。筆者は科学技術庁国際研究集会派遣研究員として同学会のシンポジウムの一つ、「薬剤抵抗性(耐性)打破を目指した基礎的かつ実用的な研究のアプローチ」に出席する機会を得たので、その概要を紹介したい。今回の大会では薬剤抵抗性シンポジウムを企画した農薬部会のほか合計27の部会によるシンポジウム、ポスター発表等が行われ、会期初日の登録者数が実に7,000名を超える大規模なものとなった。分析化学や無機化学からバイオテクノロジーに至る幅広い研究領域をカバーするものだけに、我が国からも通産省や民間企業等からの専門家が参加していた。

筆者が主として出席した薬剤抵抗性シンポジウムでは、農業生産の安定性に深い関わりを持つ、1)害虫やダニ、2)病原菌それに3)雑草の各種薬剤に対する抵抗性(耐性)の問題が論じられた。はじめに殺虫剤・殺ダニ剤抵抗性のセクションで、G.P. Georghiou(アメリカ)が概説、抵抗性の発生事例が今日まで495件に上り、その半数以上が農業害虫であると述べ、ピレスロイド抵抗性などの重要性が増していると指摘した。L.B. Brattstenや



写真1 薬剤抵抗性シンポジウムの会場となったホテル

T.M. Brown(共にアメリカ)は薬剤の代謝によるカーバメート系ならびに有機リン系殺虫剤に対する抵抗性の発現やその遺伝について触れ、また、W.D. Gelernter(アメリカ)は微生物源の殺虫剤としてBT剤を取り上げ、各種の殺虫剤に抵抗性を持ったColorado potato beetleにも有効なものが最近開発されたと述べた。彼は更にいわゆる生物農薬は開発に要する年数や費用の点で従来の化学合成農薬よりも優れるとし、その有用性を説いた。次いでT.J. Dennehy(アメリカ)らは、殺ダニ剤抵抗性のハダニが薬剤による選択圧のない条件下では次第に集団の中で衰退する例をあげ、その理由は環境に対する適応度(fitness)の低さにあるとした。S.L. Riley(アメリカ)はワタの害虫の抵抗性によってピレストロイド系薬剤の効果が低下している現状を紹介し、併せて抵抗性害虫のモニタリングの結果や各地においてとられている抵抗性問題の回避対策について説明した。

筆者の専門分野である殺菌剤耐性に関するセクションでは合計12の講演があった。まずH.V. Morton(スイス)は、耐性菌に対抗する戦略について概説し、今後は新規薬剤の開発の段階で耐性発達のリスクを評価する必要があると述べた。また、耐性発達のリスクの

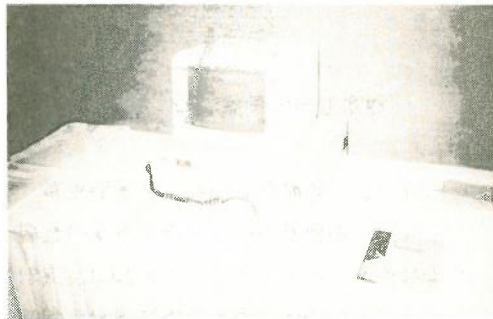


写真2 薬剤耐性菌管理用のソフトウェア「RESISTAN」

高い薬剤を作用機構の異なる他の薬剤と混用したりあるいは交互に使用したりして、耐性菌に対する選択圧を減らすという従来の対策に加えて、病害抵抗性の作物品種を栽培して病害発生の圧力自体を減少させることも重要であるとした。最近、菌の細胞膜の構成成分であるエルゴステロールの生合成を阻害する薬剤、いわゆる EBI 剤が多数開発されているが、D. Berg ら（西ドイツ）はこれに対する黒穂病菌等の耐性機構を生化学的手法を用いて調べた。その結果、薬剤の取り込みや解毒、作用点であるチトクローム P-450 への結合に関しては耐性菌と野生型菌の間に違いはなかったが、脂肪酸組成に差異が見られたという。同じく EBI 剤について D. W. Hollomon（イギリス）も、耐性菌問題の現状と耐性の生化学的機構を総説、彼の所属するロングアシュトン試験場（ブリストル大学）ではオオムギうどんこ病菌のトリアジメノール（EBI 剤の一種）耐性に関して分子遺伝学的な研究をスタートさせていた。筆者が以前 1 年間滞在したオランダ、ワーゲンゲン農科大学からは L. C. Davidse が参加、メタラキシルなどのフェニルアミド系殺菌剤に対する耐性はターゲットである RNA ポリメラーゼ I の薬剤との親和性の低下に起因するとし、薬剤と受容体タンパクの結合を調べる目的でフォトアフィニティーラベリングの手法を用いていると述べた。続いて、チオファネートメチルやベノミルなどのベンゾイミダゾール系薬剤耐性の基礎研究の成果が 2 題紹介された。住友化学㈱の藤村らは、同社が見出したジエトフェンカルブや MDPC などの *N*-フェニルカーバメート系化合物に対するベンゾイミダゾール耐性菌の感受性の増大について、アカパンカビを供試して分子遺伝学的に解析した。ベンゾイミダゾール系薬剤の作用点とされる β -チューブリン（微小管タンパク、チューブリンの β -サブユニット）遺伝子を構造解析した結果、ベンゾイミダゾール耐性、ジエトフェンカルブ感受性を発現する変異体では、翻訳産物の 198 番目のアミノ酸が野生株のグルタミン酸からグリシンに変化していた。また、筆者らは、ベンゾイミダゾール耐性菌に特異

的に有効な *N*-フェニルカーバメート、*N*-フェニルホルムアミドキシム（日本曹達が見出した DCPF や CDPF など）の両系統の化合物の作用機構に触れた後、土壌病原菌の代謝毒素として我が国で単離、同定された微小管阻害剤リゾキシンがベンゾイミダゾール感受性菌のみならず、耐性菌にも高い抗菌活性を示すことを報告、菌のチューブリン分子の中にベンゾイミダゾール系薬剤に対するものは異なる結合部位が存在する可能性を指摘した。インドの D. Lalithakumari はイネのいもち病菌およびごま葉枯病菌のプロトプラストを調製、有機リン系薬剤耐性菌と感受性菌でプラスミド DNA のパターン比較等を行っていたが、筆者の知る限り、植物病原糸状菌の殺菌剤耐性にプラスミドが関与することが明確に立証された例はまだない。

さて、殺菌剤耐性菌対策としては現在、前述のように作用機構の異なる薬剤との混用あるいはローテーションが一般的であるが、W. E. Fry（アメリカ）らはジャガイモ疫病菌のメタラキシル耐性菌を例として、菌の集団中の耐性発達のシミュレーションモデルを紹介、また P. A. Arneson（アメリカ）も、コンピューターの利用による耐性菌の管理に触れた。ロビーでは学生の実習用に作製されたソフトウェア『RESISTAN』の実演も行われ、コーヒブレークの合間に自分でキーをたたき参加者も見られた（写真 2）。

耐性菌のセクションではこのほか、カンキツ類の貯蔵病害を引起すペニシリウム属菌の各種薬剤に対する耐性（J. W. Eckert, アメリカ）、耐性発達の予知（K. J. Brent ら、イギリス）に関する講演があり、最後に M. Wade（イギリス）と C. J. Delp（アメリカ）が主として関連企業が構成メンバーとなっている殺菌剤耐性委員会（FRAC）の活動現況等を紹介してお開きとなった。

最近、米国環境保護局（EPA）が農業用薬剤の発ガン性についてのレポートを発表し、話題になっているが、アメリカ 23 州の地下水から 17 種の薬剤が検出されたとする報告や、大気中に微量含まれる揮発性の突然変異原の分析法、食物中の残留農薬の同時分析法の改

良等に関するポスター発表もあった。また、水核不活性細菌など遺伝子組換え技術によって作出された微生物の環境への放出とその評価に関する報告のように興味あるものも多かった。

シンポジウム会場からシャトルバスでコンベンションセンターへ足を運ぶと、我が国における全国科学機器展を思わせるような多数のブースが立ち並び、アミノ酸配列からタンパク分子の3次元構造を予測するソフトウェ

アなどが紹介されていた。

筆者は薬剤薬剤抵抗性シンポジウムの後、オランダやイギリスの知人とロサンゼルスから約40マイル離れたリバーサイドを訪問、カリフォルニア大の Prof. Eckert の計らいでカンキツの試験場や貯蔵、出荷施設等を訪ねる機会にも恵まれ、ホテルのテレビで見たソウルオリンピックや大統領候補者の討論会とも併せて、短い滞在期間の割には思い出に残る今回の訪米であった。

国際学会レポート

第17回国際クロマトグラフィーシンポジウム (17th International Symposium on Chromatography)

農林水産省 食品総合研究所

後藤哲久

この学会は、1956年にロンドンで、イギリス、西ドイツ、フランスの3カ国のクロマトグラフィー関係団体の協力で、その第1回会議が約300名の参加者を得て開かれた。以来、2年に1度の割合で開催され、現在ではヨーロッパを中心とする、クロマトグラフィー分野最大の国際研究集会となっている。今回は、その第17回目の会議で、1988年9月25日から9月30日にわたり、オーストリア・ウィーンでヨーロッパを中心に30カ国以上、約1000名の参加者を得て開かれた。日本からの参加者は、波多野京都大学名誉教授をはじめ10数名であった。ただクロマトグラフィー発祥の地であるソビエトからの参加者は4名と少なかった。

1956年の第1回以来今日までの間に、クロマトグラフィーの分野では、ガスクロマトグラフィー(GC)の進歩と普及、1970年代後半の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の発展と普及といった、基礎的な研究と、機器メーカーの高性能な機器の開発への努力とがあいまった発展を経験している。今回は、このGCとHPLCの間に超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)が、その姿をクロマト

グラフィー研究者のものからクロマトグラフィー利用者のものへと変えつつある新しい技術として示され、この分野の進歩の早さを感じさせた。

今回の会議は、フランスの E.Lederer 教授の Early History of Chromatography と題するオープニングレクチャー(実際には教授が病気で欠席したため、大会会長の J.F.K. Hüber 教授による代読)で幕をあげ、口頭による発表が約100題、ポスターによる発表がプログラム上は約370題(実際には2割弱とみられたキャンセルがあった)が、実質5日間にわたって発表され、討論の対象となった。この研究発表の会場に隣接して、クロマトグラフィー関係の機器、試薬等の展示会も開かれ、世界各国から約60社のメーカーおよびその代理店等が最新の装置等を展示していた。日本からは、島津製作所、日本分光、日立製作所等が、代理店、子会社、OEMの相手先ブランドと出展方法はバラバラであったが、最新のGC、HPLC、GCMSといった装置を、欧米のメーカーといっしょに展示していた。

口頭発表は、開会式に続いてのオープニングレクチャーと、毎朝1題の特別講演(表1)

表1 特別講演の演題と演者

| | |
|--|---------------------|
| Affinity chromatography in molecular biology | J.M. Egli (France) |
| Recent developments in capillary gas chromatography | P. Sandra (Belgium) |
| Design and engineering of stationary phases in HPLC—An integration of material science in separation technology | K.K. Unger (FRG) |
| Electrophoresis, electrochromatography and related separation techniques employing narrow tubes and high electric fields | J.H. Knox (UK) |
| An examination of separation problems in biotechnology | F.E. Regnier (USA) |

を除いて、A、B、二つのセッションに分かれて2会場で行なわれた。各セッションでは、まずテーマごとに基調講演がなされ、それに引き続いて関連の一般の研究発表が行なわれた。また、これとは別に、いくつかのテーマについては特別のセッションとして討論時間が設けられていた。ポスターによる発表は、クロマトグラフィーの利用という点からみて比較的近いものをまとめる形で、会期を前半と後半に分け、各々2日ずつポスターを掲示し、掲示時間の最後の約2時間が討論時間に指定され、発表者は各自のポスターのところで質疑を行なった。

口頭発表の多くの時間が、HPLCおよびその関連応用分野の発表に割かれたのは、HPLC全盛の今日を見るとき当然の感があった。その中でもHPLCの生化学分野への応用、特にタンパク質等の高分子生化学物質の分離への利用(B.K. Karger教授ほか)といった分野は、今日のクロマトグラフィーを分析化学の1分野から解放し、多くの分野の研究者の共通の道具としての位置づけをより確固とする上でも興味深かった。その一方で、従来、感度その他の事情で、HPLCの検出器としてはあまり用いられたことのないような機器を検出器として用いた研究(例:波多野教授—ESRの利用)は、HPLC全盛の今、さらにその応用を広げていくものとして興味深い分野であった。

ガスクロマトグラフィーに関しては、技術的には、特に目新しいものはあまりなかったが、検出器としてフーリエ変換型赤外分光光度計(FTIR)、質量分析計(MS)等を使用し、感度・選択性・定性能力を大幅に向上した装置(R.J. Leibbrand博士ほか)、自動化を押し進めたものに関する発表が目についた。また、日本では、特に学問的な場で、あまり用いられていない、リテンションインデックスを用いた研究(B. Hoder博士ほか)は、ガスクロマトグラフ装置の進歩につれてより有用なものになっているように見られた。GCで特に注目すべきことは、後ほどふれるポスターセッションの部分を含めて、発表された研究のほとんどが、キャピラリーカラム、特に溶融シリカ(FQ)キャピラリーカラムを用いて行なわれていたことである。これは、FQキャピラリーカラムの先進国である米国といえども、分析の公定法で使用されているGCの多くがまだパックドカラムである時代に対する、クロマトグラファーからの決別のメッセージのようでもあった。

薄層クロマトグラフィー(TLC)は、実用的な分析手段としての利用は減らないものの、今回のシンポジウムの口頭発表は基調講演を含めてわずか3題、しかもうち1題は他のクロマトグラフィーとの組合せがテーマということで、研究としての一つの時代が過ぎたようであった。これとは反対にSFCは、基調講演でSFCと超臨界流体抽出(SFE)の可能性の議論がなされ、分離カラムにHPLC用のパックドカラムを用いたものと、ガスクロ用よりさらに内径の細いFQキャピラリーカラムを用いたもの、検出器についてもHPLC用のものの流用、GC用のものの流用と、GCとHPLCの中間に割り込むような形で登場したSFCを象徴するような発表が多く、また、SFCがクロマトグラフィー研究者の占有物から、より広範な応用への道を確実に歩き始め、多くの分野で研究の対象とされつつあることを印象づけるものであった。

これら以外のクロマトグラフィーとしては、電気的な作用を利用したもの等があるがどれもごく少数の発表がなされただけであった。

また、全般を通じて、光学異性体等の分離に対する関心が高かったことは、このような物質の分離の困難さを越えて、これらの分離に対する需要があることを示すものであった。

ポスターセッションで取り上げられていたテーマは、口頭発表のものと比較してより実地的なものが多く、特定の物質名がタイトルに出たものの比率が高かった。ポスターセッションの発表で目についたのは、HPLCにおける検出器としてのマルチチャンネルダイオードアレーディテクターの使用であった。これは機器メーカーの開発努力と、その定性能力が多くのクロマトグラファーに受け入れられた結果といえる。ガスクロマトグラフィーでは、MSが検出器として多用されていたが、その一方で、GCの最も一般的な検出器である水素炎イオン化検出器(FID)の欠点であった、酸素を含む物質での感度低下を克服する検出器として、分子内の酸素を検出するO-FIDといったものを利用したものも報告されていた。このようにHPLC, GCを通じてより定性性の良い、選択性の高い検出方法への関心は非常に高いものがあった。

SFCはGC, HPLCと異なりポスターセッションでも、基礎的・理論的な研究が多くを占め、また、口頭発表の数に比較してポスターの数が少なく、応用分野がまだ未成熟な普及途上の手法であることを示していた。

これら以外にも電気泳動、イオンクロマト等の発表もあり、また、クロマトグラフィーの対象となっている物質も、工業製品や生体成分を構成する高分子から、環境中の汚染物質等と、今日のクロマトグラフィーの範囲の広がりを感じさせた。

今回のシンポジウム全般を見たとき、クロマトグラフィーの基礎的な研究の成果が、機器メーカー等の努力によって確実に現実の装置となり、それを利用した実際の分析法が開発され、さらにごく一般のユーザーに普及して、データーを積み重ねていく姿が多くの研究発表の中にみられた。次回は、1990年に、オランダのアムステルダムでの開催が予定されているので、日本からより多くの、特にクロマトグラフィーの応用分野での研究者の参加が望まれる。

編集後記

平成最初のBRAINテクノニュース、11号をお届けします。BRAINテクノニュースも、早いもので発刊以来3年目に入りました。お蔭様で号を重ねるごとに内容も充実してくるよう思われ、関係者一同喜んでます。しかし、扱う研究分野に偏りがあり、また、ニュース源も狭いのではないかと反省もしています。こ

のような点を改めるため購読会員をはじめ、いろいろな分野の方々から御意見を伺うため編集懇談会を開いています。1月17日には主として筑波の研究機関の企画連絡室長との懇談会を予定しています。本誌の編集についてお気付きの点、御意見がありましたら是非お聞かせいただき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11号)

平成元年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

〒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