

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

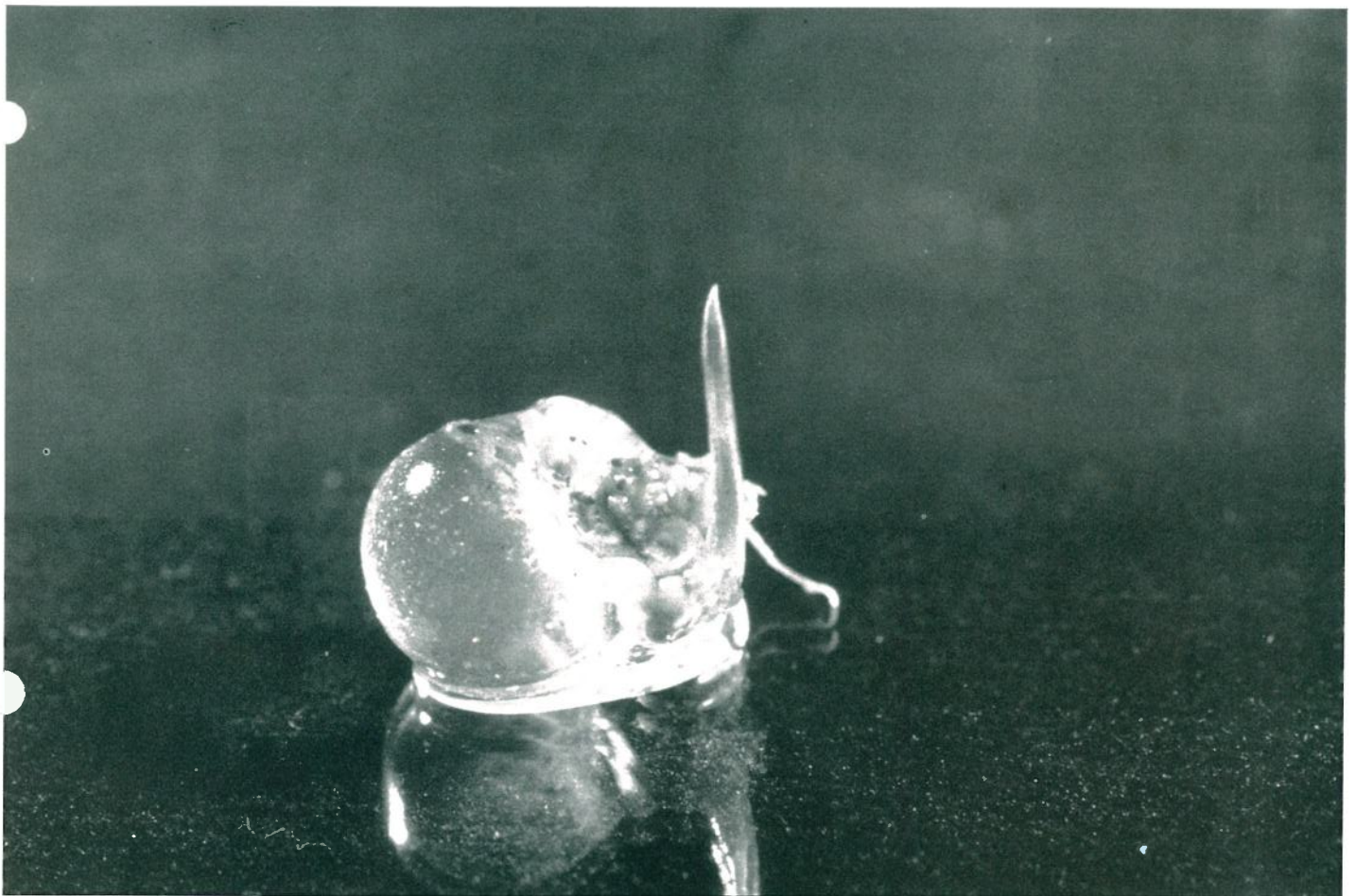
TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 13 号

MAY 15, 1989



イネの人工種子からの発芽

(本文 1 ページ参照)

本号の紙面

国内情報	1
イネF ₁ の大量増殖培養, 海産魚の産卵制御, ストレス誘導物質と遺伝子, 酵母の液胞生理機能欠損変異株	
文献情報	11
クチナーゼ遺伝子発現の誘導, 嫌気性セルロース分解菌による窒素固定, タイズのリボキシゲナーゼ遺伝子, ファイトアレキシン生合成酵素	
海外便り	16
米国の植物バイテク見聞	
特別情報	19
生物の生存戦略の解明と利用—農水省大型プロジェクト	
お知らせ	22
出版案内と購読料	

口 絵



国内情報

吉田 泰二

イネF₁の大量増殖培養法 …… 1

廣瀬 慶二

海産魚の最終成熟と産卵制御 …… 3

門脇 光一

低酸素ストレス誘導物質と遺伝子の同定 …… 6

北本 勝ひこ

酵母 (*S.cerevisiae*) の液胞生理機能欠損変異株の単離とその性質 …… 8

文献情報

クチン・モノマーによる植物病原菌のクチナーゼ遺伝子発現の誘導 …… 11

嫌気性セルロース分解細菌による窒素固定 …… 12

ダイズ・リポキシゲナーゼ-3遺伝子の単離および解析 …… 13

ファイトアレキシン生合成酵素をコードするmRNAの誘導 …… 14

海外便り

西尾 剛

米国の植物バイオテク見聞——コーネル大学留学記 …… 16

特別情報

望月 龍也

生物の生存戦略の解明と高度利用をめざして——農水省大型プロジェクト研究 …… 19

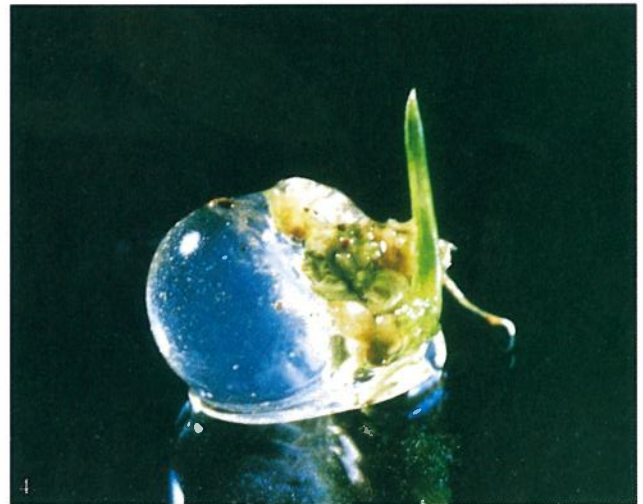
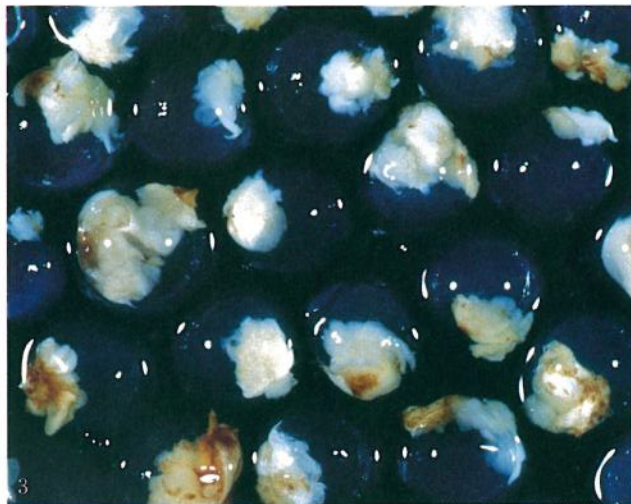
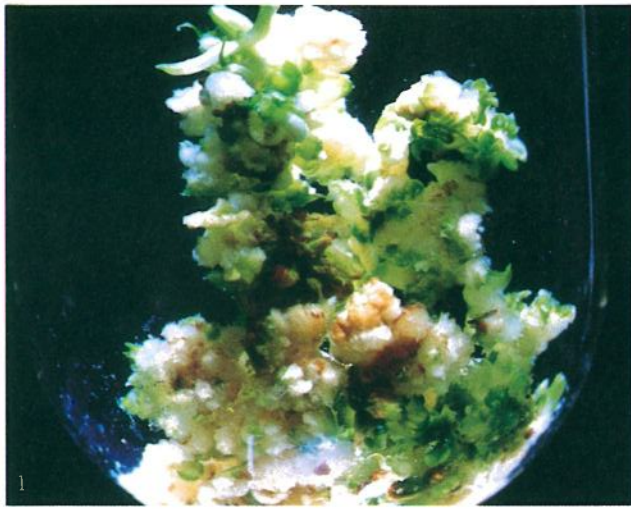
お知らせ

出版案内：微生物遺伝資源配布目録，生研報告No.4～7 …… 22

消費税実施に伴う購読料の改訂について

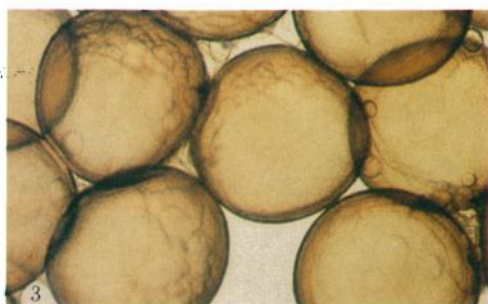
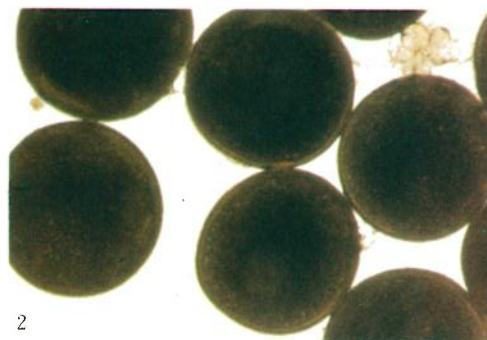
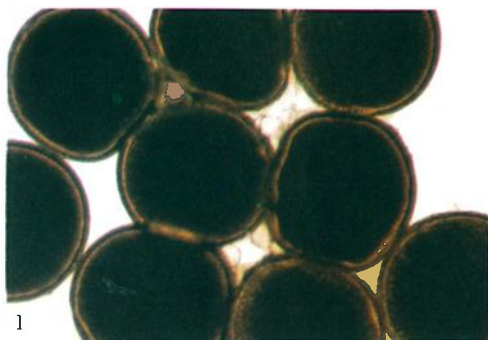
イネF₁の大量増殖培養法

(本文 1 ページ参照)



1. 維持されている培養系
2. 胚様体
3. 人工種子
4. 人工種子からの発芽
5. 人工種子から生長したイネ

海産魚の最終成熟と産卵制御 (本文 3 ページ参照)



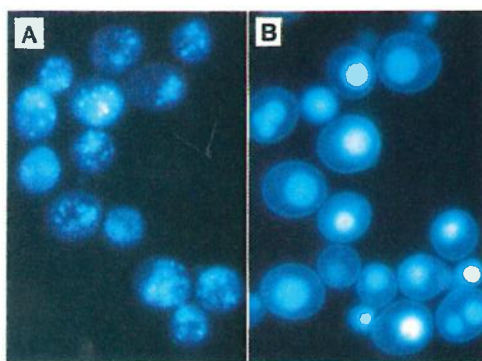
In vitro マコガレイの卵成熟 (GVBD)

1. 実験開始時, 第三次卵黄球期~最終成熟直前の卵
2. $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, 10ng/mlで24時間培養, 卵がやや大きくなり, GV (丸くやや明るい部分) がみえる
3. 上記のステロイドを含む液で48時間培養, GVBDを完了し, 卵は透明になり大きくなっている

酵母(*S.cerevisiae*)の液胞生理機能欠損変異株の単離とその性質

(1)

(本文 8 ページ)



左(1): クロロキン染色による液胞の蛍光顕微鏡観察

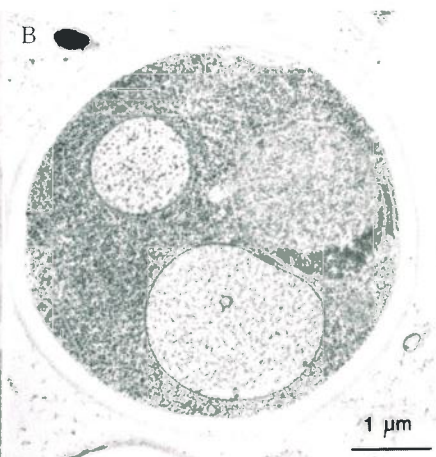
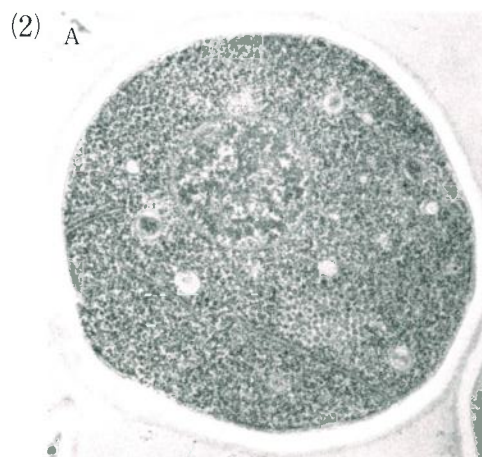
A; *slp1*変異株 KL197-1A

B; 野生株 A13-18

下(2): 凍結置換法による超薄切片像

A; *slp1*変異株 KL197-1A

B; 野生株 A13-18



国内情報

イネF₁の大量増殖培養法

農林水産省 農業研究センター 育種工学研究室

吉田 泰二

はじめに

イネF₁品種の採種は細胞質雄性不稔を利用して行われている。これは三系育種法と呼ばれ、不稔系、それを維持するための維持系、稔性を回復するための回復系の三系統を用い、不稔系と回復系を交配することにより種子を得る方法である。中国では、この方法を用いて、1985年には840万ha、栽培面積の26.4%に、主としてインディカ同士のF₁(印印F₁)品種を普及させ、普通品種に比べて35%の増収を得ている。しかし、この方法は、受粉率を高めるために種子親と花粉親とを交互に田植すること、両親の出穂期を合わせるために2回に分けて田植えすることなど、その複雑な採種法のため、多くの問題点が指摘されている。これらの問題点の解決のため、様々な試みが行われている¹⁾。組織培養を用いてF₁品種を大量増殖させることも、解決策の一つと考えられる。

本研究では、イネF₁、特に、大きなヘテロシスが期待されるジャポニカとインディカとのF₁(日印F₁)の大量増殖培養法について検討した。研究は1988年2月に開始され、その結果、培養系の作出、胚様体の形成、人工種子の作成に成功した^{2,3)}。

1. 培養系の作出

3種類の日印F₁種子を用いた(表1)。種子の胚をメスで分離し、70%エタノールで30秒、1%次亜塩素酸ナトリウム液で15分滅菌した。培地は、硫酸銅と塩化コバルトを0.025mg/ℓ、モリブデン酸ナトリウムを0.25mg/ℓ、ミオイノシトールを100mg/ℓ加え、ショ

糖を3%に変更したN6⁴⁾改変培地を用いた。ホルモンは、オーキシシンとして、0.2ppm 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、サイトカイニンとして、2.0ppm ガイネチンかベンジルアミノプリンを用いた。直径25mm試験管に12mlの培地を入れ、3個の成熟胚を沈め、毎分2回転の回転培養をした。温度は25℃、光条件は200~400luxとした。1か月後に、作出された培養系を同様の方法で維持保存あるいは大量増殖させた。

供試した3組合せ、全てから培養系の作出が認められた(表1)。培養系は、主として、

表1 培養系の形成数

F ₁	BAP	Kinetin
Japonica-A/Indica	3/9	3/9
Japonica-A/H87-50	2/9	4/9
Japonica-B/H87-36	3/9	5/9

注) 形成数/試験数

莖頂部より形成され、形態的には、多数のシュート原基(苗条原基^{5,6)})、ならびにグリーンスポットと白いコンパクトなカルス(E-カルス, Embryogenic callus⁷⁾)からなっていた(口絵1)。これらは、25℃の条件下で、6週間後に0.75gになり、以降、2週間ごとに、重量比で、3倍の増加となった。培養温度を30℃以上に上げるか、あるいは、振盪培養を行うことにより、更に、急速な大量増殖が可能であると考えられる。

2. 胚様体の形成

苗条原基とグリーンスポットを含んだE-カルスを、30~35℃・暗黒・静置で7~10日培養した。処理はシャーレ中において行い、

培地は培養系の作出用培地と同じものを用いた。

胚様体は、普通、化学ストレス（培地条件の変化）、あるいは、環境ストレス（培養条件の変化）を与えることにより形成されることが多い。本研究では、高温処理、暗黒処理、静置処理の軽い環境ストレスを与えることにより、胚様体の形成が認められた（口絵2）。1gの培養系当り、およそ18個の胚様体の形成が認められた。一般的に、イネの培養系は、長期培養により再分化能力が失われることが知られているが、本培養系は、培養開始から9か月後においても胚様体形成能の低下は認められなかった。したがって、遺伝的安定性が確認できれば、長期培養系からのF₁の大量増殖も可能であると考えられる。

3. 人工種子の作成

胚様体を、1%アルギン酸ナトリウムを含むホルモンを含まないN6改変培地に加え、50mM塩化カルシウム液中に滴下し人工種子を作成した（口絵3）。

人工種子から2種類の方法で再分化を試みた。

<開放系>ボンソル合成培土上に播種し、種子が隠れるように灌水し、30,000lux（12hr）、30°Cで発芽させた（人工種子の作成と発芽は無菌条件では行わなかった）。

<閉鎖系>9cmシャーレに12mlのホルモ

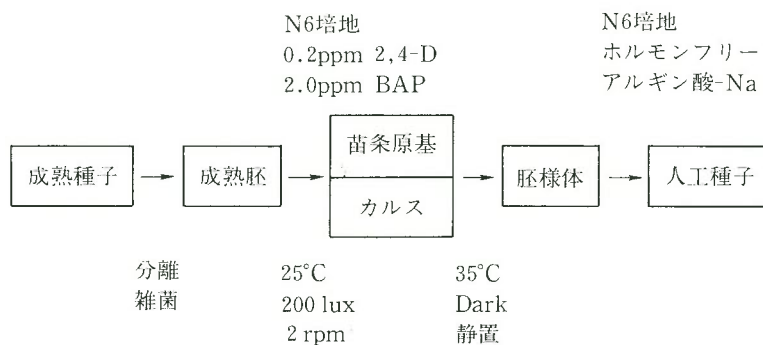


図1 基本的手法

ンを含まないN6改変培地を入れ、人工種子を7~10個、置床した。温度は25~27°C、光条件は1,000~3,000luxとした（この場合、全ての過程を無菌条件で行った）。

開放系においては、発芽が認められたが、生育させることはできなかった（口絵4）。閉鎖系においては、発芽は比較的容易であり、また、発芽したものは、すべて、生育させることができた（口絵5）。

おわりに

本研究で用いた基本的手法を図1にまとめた。このように、イネF₁の組織培養を用いた大量増殖も可能になりつつあるが、今後は、コスト面での引き下げが最大の問題となると考えられる。

本研究は、農林水産省特別研究「バイオナリーサリースステムの開発に関する研究」の一部（課題名 イネの胚様体）として行われた。

貴重なF₁種子を提供して頂き、また、イネに関する様々な知見を教えて頂いた農業研究センター作物第一部の丸山清明氏と荒木均氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 丸山清明(1988) 遺伝 42(5) : 28-31
- 2) 吉田泰二・大槻義昭・小田文明・高 在頼(1988) 育種学雑誌(別2) : 140-141
- 3) 吉田泰二・大槻義昭・小田文明(1989) 育種学会雑誌(別1) : 62~63
- 4) Chu, C.C., C. C. Wang, C. S. Sun, C. Hsu, K. C. Yin, C. Y. Chu and F. Y. Bi (1975) *Sci. Sin.* 18 : 659-668
- 5) Tanaka, R. and H. Ikeda (1983) *Jpn. J. Genet.* 58 : 65-70
- 6) 田中隆荘(1983) 種苗産業と育種新技術CMC, 東京, pp.171-197
- 7) Nabors, M. W., J. W. Heyser, T. A. Dykes and K. J. DeMott (1983) *Planta* 157 : 385-391

海産魚の最終成熟と産卵制御

農林水産省 水産庁養殖研究所 繁殖生理部長

廣瀬 慶二

はじめに

わが国の魚介類の増養殖の中心は淡水生物から海産生物に移行している。昭和50年当時の海産養殖魚の生産高は10万トン台であったが、最近では19万トン以上にも達している。それにともない。以前はハマチとマダイが養殖対象種であったが、最近ではギンザケ、ヒラメ、アジ、シマアジ、ハタやマグロと対象が広がりつつある。増養殖業の変化にともない、成熟・産卵に関する研究も淡水のキンギョ、コイやニジマス等から海水のタイ、ブリやヒラメ等に移りつつある。海産魚の成熟や産卵に関する研究は今緒についたばかりであり、今後大きな展開が期待されている。ここでは、最近の筆者が携わった研究結果を中心にし、海産魚の卵成熟と産卵制御について記述してみたい。

1. 卵巣の発達様式

魚類の卵細胞の発達様式は、三つに大別できる¹⁾。完全同時発達型 (complete synchronism) では、卵巣内の卵母細胞のすべてが同時に成長し、排卵・産卵され、一生に一回の産卵後、死亡する。サケやヤツメウナギがこの型に入る。部分同時発達型 (incomplete synchronism) には2~3の卵発達群があり、一年に一回の産卵があり、産卵後に死亡しない。ニシンやマコガレイがこの型に入る。非同時発達型 (metasynchronism) は、卵巣内に様々の発達群の卵母細胞があり、数多くの産卵を繰り返す産卵期間が長い。マダイ、ヒラメ、ブリ、カタクチイワシ、イワシ等の数多くの海産魚がこの型である。海産の養殖対

象魚種のほとんどがこの型に属している。しかし、これらの魚種のすべてが同じ発達様式を示すものではない。長い産卵期間中毎日産卵を繰り返す種から、数日から1~2週間に一度の割合で産卵期に数回の産卵を行う魚種まであり、種特有の成熟・産卵リズムと産卵行動をもっている。この様な複雑な非同時発達型の解明が海産養殖魚の安定した種苗生産に欠かすことができないが、この方面の研究はほとんど進んでいない。その理由は、海産魚が淡水魚に比較し家魚化し難く、移動や環境条件の変化により卵巣の発達が影響をうけやすく、ときに卵細胞の発達を停止するからである。

2. 最終成熟

最終成熟 (final maturation) とは、魚卵が卵黄 (yolk) の蓄積を修了した後、核 (胚胞) が動物極に移動し成熟分裂を再開し、2回目の成熟分裂の中期で排卵するまでの過程を言う。サケ²⁾ やアユ³⁾ の卵成熟誘起ステロイドは、 $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17\alpha, 20\beta$ -diOHprog) であることが明らかになっている。淡水魚に比べ、海水魚のこの分野の研究は遅れている。イギリスのCanarioとScott⁴⁾ は、 $17\alpha, 20\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one がカレイの卵成熟ステロイドであると報告しているが、確かめるための bioassay に問題があり、まだ確定されていない。

筆者は、卵黄形成を終了したマコガレイ (*Limanda yokohamae*) を用いて卵成熟とステロイドとの関係を調べた⁵⁾。卵黄形成に伴い estradiol- 17β (E_2) と testosterone (T)

が増加し、最終成熟時にはE₂とTが減少し、17α-hydroxyprogesterone (17α-OHprog) と17α, 20β-diOHprogが急激に増加する。産卵後は17α, 20β-diOHprogは減少する。個体レベルでの卵成熟にともなう血中ステロイドの変動は、HCG (human chorionic gonadotropin) をマコガレイ1尾当たり1000 IU投与し、経時的(6, 24, 48, 72, 96時間後)に尾柄部血管より採血し調べられた(図1)。HCG投与6時間後でTは急増し、24時間には元の値以下まで減少する。E₂は徐々に減少し、それにともない17α-OHprog, 続いて17α, 20β-diOHprogが最終成熟時に増加する。ステロイドの産生は、卵を囲む濾胞

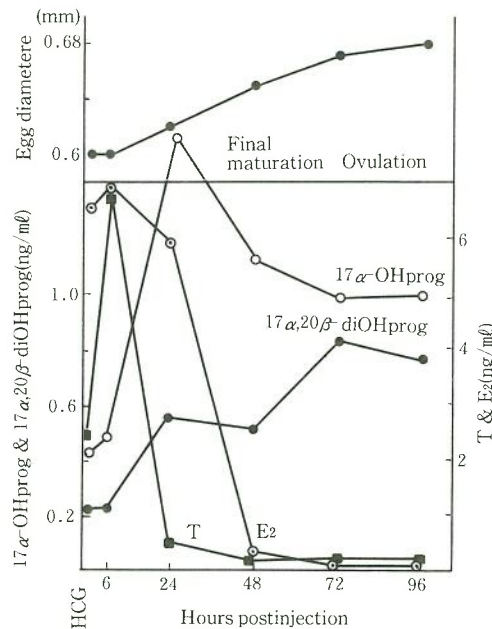


図1 HCG投与後のステロイドと卵径の経時的変化

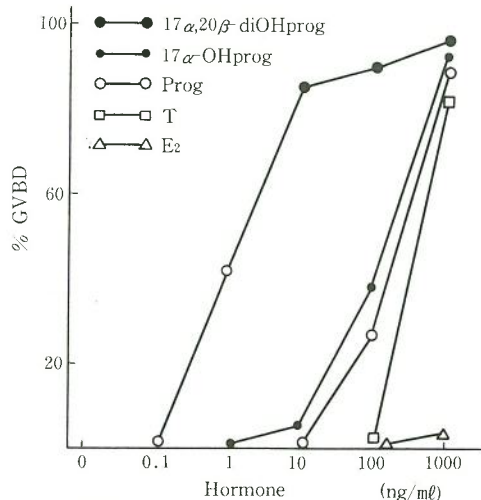


図2 各種ステロイドのマコガレイの卵成熟(GVB D)誘起能

組織で行われ、最終成熟時のゴナドトロピン(GtH)のサージにより濾胞での20β-hydroxysteroid dehydrogenase活性が高まり、黄卵形成中には, progesterone (P)→17α-OHprog→androstenedione (A)→T→E₂であったのが, P→17α-OHprog→17α, 20β-diOHprogの代謝経路に変わることがアユやサケで明らかにされている³⁾。今回の結果は、このようなステロイド代謝のシフトがマコガレイにも存在することを暗示している。

次に、これらのステロイドがマコガレイの卵の成熟分裂(germinal vesicle breakdown; GVBD)を直接促しているかどうかを *in vitro* assay法で確かめた(図2)。Ringer液に卵黄形成を完了した卵巣卵とともに様々な濃度の各種ステロイドを添加し、試験管内でGVBDが起こるかどうかを調べた(口絵参照)。その結果、progesterone系のステロイド、特に17α, 20β-diOHprogが最も高い割合でGVBDを促し、1 ng/mlで41.7%を示した。マコガレイの最終成熟時の17α, 20β-diOHprogの血中濃度0.5~0.6 ng/mlでGVBDを誘起することから、前述したようにこのステロイドがマコガレイの成熟誘起ステロイドである可能性がある(図2)。しかし、まだ確定するまでには研究が進んでいない。マコガレイは海産養殖魚の代表的な卵の発達様式である非同時発生型ではないが、淡水魚のキンギョ、コイやニジマスとはホルモン分泌パターンが違う。代表的な非同時発生を示すマダイやブリの卵成熟や産卵のリズムについて内分泌生理学的な面から今研究が進められている。これらの多回産卵魚が卵成熟や産卵時にどのようなホルモンの産生や分泌パターンを示すか興味あるところである。

3. ホルモンによる産卵制御

海産魚の養殖対象種は拡大しつつあり、新しい魚種では卵黄形成まで達しているが産卵し難い場合が多い。また海産魚では輸送等のストレスにより卵の崩壊を生じ易く産卵しない例などがあり、このようなときにホルモンを使用し産卵を促す必要がある。わが国では

HCGまたはサケやハクレンの脳下垂体が一般に用いられている。近年、LHRH（黄体形成ホルモン放出ホルモン）やGnRH（生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン）が用いられている。これらは、アミノ酸10個からなるデカペプチドで種特異性も弱いと考えられている。しかし、このペプチドを生理食塩水に溶解し魚に投与した場合、数時間でその効力が失活するため徐放性を持たせるためコレステロールペレット状にし魚に埋没している⁶⁾。筆者らは、マダイの周年産卵法を確立するためにLHRH-Aのコレステロールペレットを作成し、ダイに投与した。魚の産卵期は一年の限られた月に行われるため研究の効率が上がらない。研究をより効率的に進める上で、常時成熟した魚が入手できる必要がある。

産卵末期（5月25日）から3オマダイを自然日長—高温（25℃）で7月15日まで飼育し、以降長日—低温（15℃）下で飼育を続けた。8月16日より毎月1回LHRH-A100 μ gを含むコレステロールペレットを投与した。その結果、8月16日と9月16日の2回投与したタイでは10月15日にはGSI（生殖腺体重比）が上昇し排卵個体が認められた。9月16日に投与を開始した個体は2回目の投与直後に排卵した。さらに、11月7日にペレットを投与した場合、12月2日には産卵を開始していた（図3）。このようにLHRHペレットと飼育環境の調節を組み合わせることによってマダイを産卵期外でも成熟・産卵させることができる。

LHRHコレステロールペレットは2～3週間の効力しかないため⁷⁾、より長期間のホルモン処理に筆者らはポリマーのLHRHペレットを放射重合法で作成した。このペレットからLHRHが0.5～0.6 μ g/日の割合で100日以上も安定し一定量を放出する。筆者らはポリマーペレットによりボラやウナギの成熟・産卵に成功している（未発表）。しかしながら、LHRHペレットを用いた産卵制御技法はまだ確立していない。すなわち、ホルモンの放出パターンや魚種による適正投与量も明らかでない。さらに、多回産卵魚の産卵リズム

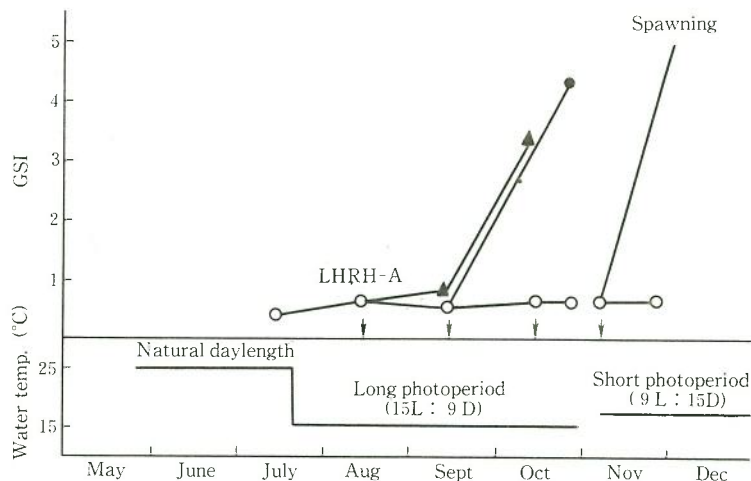


図3 LHRH-Aコレステロールペレットによるマダイの成熟促進結果
○-○; 対照, ▲-▲, ●-●; LHRH投与, ↓; LHRH-A投与

ムが徐放性LHRHペレットのホルモン放出パターンと同期するかどうか解明しなければならぬ重要な問題である。

おわりに

海産魚の成熟に関する研究は今緒についたばかりであり、淡水魚でのこの分野の研究に比べ遅れている。農林水産省では昭和63年から大型研究「生物情報の解明と制御による新農林水産技術の開発に関する総合研究」の中で魚類の産卵に関する研究が開始され、海水魚の成熟や産卵の内分生理学的研究が進められている。近い将来、魚の脳—脳下垂体—生殖腺系のホルモン情報の伝達様式や産卵リズムが解明されると考えられる。

文 献

- 1) Marza, V. D. (1983) *Histophysiologie de l'ovogenese*, 81pp. Hermann, Paris
- 2) Nagahama, Y. and S. Adachi (1985) *Develop. Biol.* 109: 428-435
- 3) Suzuki, K., B. Tamaoki, and K. Hirose (1981) *Gen. Comp. Endocrinol.* 45: 473-481
- 4) Canario, A. V. M. and A. P. Scott (1987) *Proc. 3rd Inter. Symp. on Reprod. Physiol. of Fish.* p.251, Mem. Univ. Newfoundland
- 5) Hirose, K. (1987) *Proc. 3rd Inter. Symp. on Reprod. Physiol. of Fish.* 257-258, Mem. Univ. Newfoundland
- 6) 廣瀬慶二・新井 茂(1988) *養殖研究報* 16:

国内情報

低酸素ストレス誘導物質と遺伝子の同定

農林水産省 農業生物資源研究所 適応性遺伝子研究室

門脇 光一

はじめに

植物は、乾燥、低温、湛水、光、高温などのさまざまな外的環境条件により影響を受け、それらが自己の代謝能力を越えたとき、生育障害や死にいたる場合がある。これらの現象は、植物が動物と異なり移動することができないため、より顕著に観察されてきた。このようなさまざまな外的条件の変化にともない、細胞中では通常と異なる一群のタンパク質が、特異的に合成されることが明らかにされ、現在注目されている。同じような劣悪条件にさらされても、ある条件下で順化することにより、著しく植物のその環境への適応能力が高められることが知られており、この順化中に特定のタンパク質群が誘導されていることから、これらの一部が適応性の獲得と密接に関連していると推察されるからである。

湛水状態を含めた湿害の原因には数多くの要因が関わっているが、そのうちの一つには、低酸素環境下による細胞死があると考えられる。著者らは、低酸素ストレスにより誘導される物質を同定し、その発現機構を明らかにしてきた。

1. 低酸素（嫌気）下におけるイネ細胞中のタンパク質合成の変化

まずはじめに、生体のまわりの環境の酸素分圧が下がることにより、細胞中のタンパク質合成はどのように変化するかを調べた。実験では、ろ紙上を好気下とし、嫌気条件は、

植物をアルゴンガスを連続通気した緩衝液に浸漬することで作り出した。一定期間嫌気下にさらした根に、アイソトープ [^{35}S] でラベルしたメチオニンを取り込ませ、産物を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分別し、ポリペプチドパターンを比較した。図1に示されるように、好気下から嫌気下へ環境が変化することにより、新しいバンドの出現や消失がみられ、激的に細胞中でのタンパク質合成パターンに変化が生じることがわかった。化学物質、ウイルス、傷害、高温などが生体のタンパク質合成に影響することが

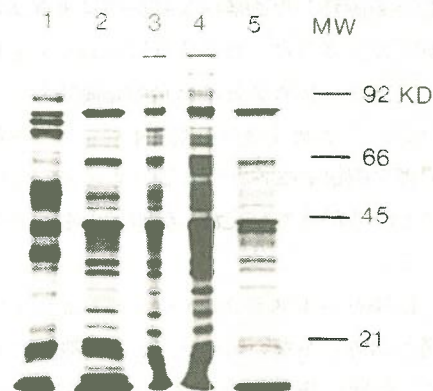


図1 低酸素ストレスによるタンパク質合成の変化

1. 好気条件下
2. 低酸素下に6h放置したもの
3. " 12h
4. " 24h
5. " 72h

上記処理を行なったイネ幼根に、 ^{35}S メチオニンのパルスラベルを3h行ない、産物をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後のフルオログラム

明らかにされてきたが、低酸素というストレスもまたこのような著しい変化をもたらすことが示された。ストレスのもとで発現してくるタンパク質の一部は、細胞の生命維持に必要なタンパク質と考えられるため、次に嫌気下で誘導、発現するタンパク質の同定を行なった。

2. イネアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) の誘導と蓄積

イネの脱分化細胞の液体培養中に、培地へエタノールが著しく分泌されることが経験的に知られている。著者らは、このエタノールの生産の原因は、酸素分圧の下がった環境で細胞を延命させるため、ADHがなんらかの役割を担っているのではないかと作業仮説を立て、ADHに焦点をあてた。

イネ幼根を嫌気条件下に移し、一定時間ごとにADHの酸素活性を測定したところ、移行後徐々に、細胞中のADH活性は上昇し、24時間後には約8倍にまで高まることが明らかとなった¹⁾。また、嫌気条件下の細胞に³⁵Sメチオニンをとり込ませ、タンパク質の2次元電気泳動を行なったところ、ADHの活性染色と分子量²⁾に基づき、ADHと推察されるスポットが同定された¹⁾。嫌気下でADHが存在することが示されたので、より詳細に発現様式を明らかにするため、免疫手法を用いた。

まず、イネADHの単離、精製を各種カラムクロマトグラフィーにより行なった。その後、家兎を用いて、イネADHに対する免疫抗体を作成した。次の好気下および24時間嫌気ストレスを与えたイネ幼根に³⁵Sメチオニンのパルスラベルを行ない、その産物に対し、得られた抗イネADH抗血清を作用させ、合成産物中のADHの有無を調べた。その結果、好気下でのADHの存在は検出できなかったが、嫌気下では存在が確認された。つまりADHは嫌気下に移されることで新たに合成されることが明らかとなり、しかも分子量のわずかに異なる2種のポリペプチドの存在が認められた。嫌気ストレスにより誘導

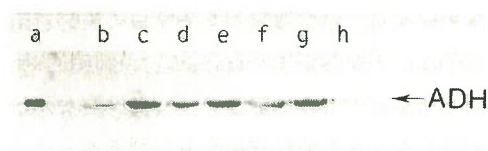


図2 低酸素条件下におけるADHの細胞中での蓄積

- a. 240ngの精製イネADH
- b. 好気下
- c. 低酸素下に6h放置したもの
- d. " 12h
- e. " 24h
- f. " 36h
- g. " 48h
- h. 好気下

上記処理したイネ幼根細胞中のADH含量を、ウェスタンブロット法で定量したもの

合成されたADHの細胞中での蓄積を、ウェスタンブロット法により検討したところ、好気下でもADHは存在しており、嫌気条件下になることにより、ADHは増加、蓄積し、一定量に達することが明らかになった(図2)¹⁾。

ADHのmRNAも嫌気下で新規に合成されたことから³⁾、以上の結果を総合するとイネ幼根の細胞中において、好気下でADHは非常に安定な(合成と分解の速度が遅い)状態で存在しているが、嫌気条件下に変化することにより、新規に転写、翻訳され、しかも量的に調節されていることが示された。

おわりに

近年嫌気条件下でアルドラーゼ、グルコースホスフェートイソメラーゼ、ピルベートデカルボキシラーゼなどが誘導されることが次々に明らかにされてきた。これらは一連の解糖系酵素であるため、嫌気下の細胞で、NAD⁺のリサイクルとエネルギーの生産や、pHの安定に働いているのではないかと推察される。またADHやアルドラーゼ遺伝子の塩基配列解析、およびそれらのプロモーターとレポーター遺伝子を結合したキメラ遺伝子の植物細胞への導入実験により、それらの遺伝子の5'非翻訳領域中の共通塩基配列が嫌気ストレスによる遺伝子発現に関与するものではないかと注目されている⁴⁾。トウモロコシを中心に進行しているこれらの遺伝子レベル

での研究に、水生植物であるイネのADH遺伝子などの結果が加われば、低酸素という情報を何がどのように認識し、制御が行なわれているかが多面的に議論できるであろう。

また、一方ヒートショックプロテインのように、動物や植物、そして微生物にいたるまで普遍的に観察されるストレス誘導タンパク質をコードする遺伝子も、単離されている⁵⁾。いずれも遺伝子情報の発現、制御にとって興味深いモデルケースであるのみならず、従来耕地としては不適であった過酷な環境下でも生育できる形質転換作物の作出などに、有用な知見を与えることが期待される。

文 献

- 1) Kadowaki, K., M. Matsuoka, N. Murai and K. Harada (1988) *Plant Sci.* 54 : 29-36
- 2) Igaue, I. and M. Yagi (1982) *Plant Cell Physiol.* 23 : 213-225
- 3) Ricard, B., B. Mocquot, A. Fournier, M. Delseny and A. Pradet (1986) *Plant Mol. Biol.* 7 : 321-329
- 4) Dennis, E. S., W. L. Gerlach, J. C. Walker, M. Lavin and W. J. Peacock (1988) *J. Mol. Biol.* 202 : 759-767
- 5) Schöffl, F., E. Raschke and R. T. Nagao (1984) *EMBO J.* 3 : 2491-2497

国内情報

酵母(*S.cerevisiae*)の液胞生理機能 欠損変異株の単離とその性質

国税庁 醸造試験所 第4研究室

北本 勝ひこ

はじめに

細胞内で周囲の原形質から明確に区別され、水溶液を満たした空間である液胞は、植物細胞、特に成熟細胞では全体積の90%以上を占める巨大なオルガネラである。従来、液胞は“不活性な二次代謝物の溜る空間”、“細胞のごみだめ”といった見かたがなされていたが、近年種々の植物組織から液胞を調製する方法が開発され、液胞に関する生化学的研究も盛んになっている。酵母の液胞は Matile が単離に成功して以来、均一で多量の酵母細胞を得ることが容易であるために、この分野での先導的役割を果たしてきた。

1. 液胞の機能

酵母(*S.cerevisiae*)では、液胞は全体積の25%を占める最も大きなオルガネラである。その機能としてはアミノ酸などの中間代謝物の貯蔵庫としての機能、および多くの加水分

解酵素(プロテアーゼA, プロテアーゼB, カルボキシペプチダーゼY, リボヌクレアーゼ, フォスファターゼ, α -マンノシダーゼ等)が局在することから分解反応を担うリゾゾーム様機能の二つが想定されている。単細胞生物である酵母は、液胞というコンパートメントを細胞内に持つことにより、アミノ酸などのN源の貯蔵¹⁾や、過剰のCaのように細胞質での代謝にとって高濃度に存在することが好ましくない物質の液胞への隔離により、細胞質の恒常性を維持していると考えられる。

そこで、これらの液胞機能の遺伝学的解明を目的として下記のような変異株の単離を試みた。

2. 液胞生理機能欠損変異株の単離

液胞内にはリジン、ヒスチジン、アルギニン等の塩基性アミノ酸が高濃度に蓄積されること、また *S.cerevisiae* はリジンの分解系を持たないことが知られているので、液胞の機

能が欠損した場合には高濃度リジン(10mM)添加培地や、リジンアナグロであるS-アミノエチル-L-システイン(AEC)添加培地(0.5mM)で生育できなくなると考えた。

S. cerevisiae X2180-1 A株由来のA13-18(a *lys 1*)を親株として独立に変異処理をして得た12,000のコロニーからリジン感受性株15株、AEC感受性株62株を単離した。これらの株について細胞質と液胞内のアミノ酸プールの分析を行い²⁾液胞内リジンが減少し、細胞質のアミノ酸は親株と変化のない株を目的とする変異株として単離した。得られた変異株のうちKL97株は光学顕微鏡レベルで液胞がまったく認められず、またリジンに対しても高い感受性を示したので、KL97株(*slp 1*変異株)についての詳細な解析を行った³⁾。

3. *slp 1* 変異株の性質

1) 遺伝子的解析

KL97株と野生株A56-1-1A(α *ade 1*)をかけ合わせ、四分子分析を行い、10mMリジン添加プレート上での増殖を調べた。40組の4孢子についてすべて2Lys^r:2Lys^s分離を示したことから、核性の単一遺伝子(*slp 1*: small lysin pool)に変異を有することがわかった。これら4孢子はリジン感受性のほかにヒスチジン感受性、位相差顕微鏡観察により液胞が認められないという性質についてもすべて同様に分離したことから、この*slp 1*変異が多面発現を示すことが明らかとなった。この変異は劣性変異であり、*slp 1/sl p 1*ホモ2倍体は孢子形成能がなかった。

2) 増殖特性

20種類のアミノ酸を10mMとなるよう培地に添加し、増殖に対する影響を調べた。これらのうちで、リジン、ヒスチジンのみで増殖が抑えられた。これらの二つのアミノ酸は液胞に局在しかつ分解系を持たないアミノ酸として知られる。液胞局在性アミノ酸であるが分解系を持つアルギニンでは増殖阻害は認められなかった。無機イオンでは、Ca²⁺、Cd²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺などの重金属により野生株より

も著しい増殖阻害が認められた。

3) 液胞関連酵素活性

液胞内局在性酵素であるプロテアーゼA、プロテアーゼB、カルボキシペプチダーゼYの活性は*slp 1*変異株では親株と比べ、それぞれ50.0%、10.4%、17.0%と低下していたが、液胞膜標識酵素である α -マンノシダーゼはほぼ同じ活性を有していた。

4) *slp 1* 変異株の顕微鏡による観察

クロロキン染色による液胞の蛍光顕微鏡観察(口絵1)や、凍結置換法による電子顕微鏡観察(口絵2)から、*slp 1*変異株では液胞形成が不完全であり、小さな小胞のみが観察された。これらのことから、*SLP 1*遺伝子は液胞形成に必須であることが示唆された。

4. *SLP 1* 遺伝子のクローニング

酵母、大腸菌のシャトルベクターでありセントロメアを持つYCp系ベクター、YCp G11(*TRP 1*, G418^r)を用いた酵母遺伝子ライブラリーから、KL397-30A(a *trp 1 slp 1*)の変異を相補するプラスミドを選択した。得られた形質転換株からプラスミドを回収し、約7.7kbの*Bam*HI断片を持つpYKK100を取得した。この1コピーベクターにつながれたpYKK100による形質転換体は、リジン感受性、ヒスチジン感受性、顕微鏡による液胞観察の結果から、すべて野生型に復帰したことから、この*slp 1*変異が一遺伝子による多面発現であることが確認された。

クローニングした*SLP 1*遺伝子の塩基配列の解析を行った結果、*slp 1*変異を相補する断片上に691個のアミノ酸残基をコードするオープンリーディングフレームが存在した。アミノ酸配列から予想される*SLP 1*遺伝子産物の分子量は、79,270であり、ヒドロパシープロファイルからは比較的親水性のタンパク質と推定された。コンピュータのデータベースによるホモロジー検索の結果、これまで知られているタンパク質との有意な相同性は認められなかった。クローニングした*SLP 1*遺伝子を用いた遺伝子破壊を行ったところ、*SLP 1*遺伝子は生育には必須ではないが、遺

伝子破壊された株では、顕微鏡観察の結果すべて液胞は認められなかった⁴⁾。

おわりに

植物細胞はもちろんのこと、酵母においても液胞というオルガネラの形成に関する変異株はこれが初めてである。最近、S. Emrら⁵⁾のグループが、液胞内に局在するカルボキシペプチダーゼY遺伝子の上流配列に細胞外に分泌されるインベルターゼの構造遺伝子をつないだ融合遺伝子を用いて、本来液胞にいくべきタンパク質が細胞外に分泌される *vpt* 変異株 (vacuolar protein targeting mutant, 現在は *vps*: vacuolar protein sorting と改名) を多数分離している。そして、これらの変異株を形態的に正常な液胞を持つA, 小さな液胞となるB, 液胞が認められないCの三つのグループに分類している⁶⁾。ゴルジ体でのタンパク質のソーティング (仕分け) がどのようになされているかは興味ある問題であるが、このようにして取得された *vpt* 変異株のグループCと筆者らの取得した *stp 1* 変異株が形態的特徴のほかアミノ酸プールが小さい等の共通点を持つことは興味深い。

また、和田ら⁷⁾は液胞形態に欠損のある九つの相補性群からなる変異株 (*vam* mutant) を分離しているが、このうち *vam 5* 変異株は *slp 1* 変異株と同一であることが報告されている。これまで、やや研究が遅れていた感のある液胞が *slp 1* 変異株をはじめとして *vps* 変異株や *vam* 変異株とによりその生理機能が解明されることが期待される。

文 献

- 1) Kitamoto, K., K. Yosizawa, Y. Ohsumi and Y. Anraku (1988) *J. Bacteriol.* 170: 2683-2686
- 2) Ohsumi, Y., K. Kitamoto and Y. Anraku (1988) *J. Bacteriol.* 170: 2676-2682
- 3) Kitamoto K, K. Yosizawa, Y. Ohsumi and Y. Anraku (1988) *J. Bacteriol.* 170: 2687-2691
- 4) 北本勝ひこ・和田洋・安楽泰宏(1988) 日本細胞生物学会講演要旨 p. 71
- 5) Robinson, J. S., D. J. Klionsky, L. M. Banta and S. D. Emr (1988) *Mol. Cell Biol.* 8: 4936-4948
- 6) Banta, L. B., J. S. Robinson D. J. Klionsky and S. D. Emr (1988) *J. Cell Biol.* 107: 1369-1383
- 7) 和田 洋・大隅良典・安楽泰宏(1988) 日本細胞生物学会講演要旨 p. 71



文献情報

クチン・モノマーによる植物病原菌のクチナーゼ遺伝子発現の誘導

植物病原菌のあるものは、植物体の構成成分を分解する酵素を産生する。この酵素は病原菌が宿主に侵入したり、蔓延するときに産生され、病原性に重要な役割を果たしている。また、このような酵素の多くは、基質の存在に応じて合成される誘導酵素である。

Fusarium solani f.sp. *pisii* はクチナーゼによってクチクラ層を破壊し、植物体内に侵入する。植物体への侵入力には胞子内に存在するクチナーゼ量が関係している。しかし胞子内のクチナーゼ量がきわめて微量であることから、この酵素が直接クチクラ層への侵入に関与しているとは考えられなかった。そこで、クチナーゼを産生するための宿主認識機構があると考えられ、最近の研究からクチンのモノマーである 10, 16-dihydroxyhexadecanoic acid と 9, 10, 18-trihydroxyoctadecanoic acid がその引き金となっていることがわかってきた。すなわち、植物体上に胞子が付着すると、胞子内の微量のクチナーゼによってクチンのモノマーが生じ、これが引き金となって胞子はクチナーゼを産生して宿主への侵入を果たすと考えられている。本論文では、これらのクチン・モノマーと菌体内のタンパク質因子によってクチナーゼ遺伝子の転写が誘導されることを、runoff transcription 法によって証明している。

まず 10, 16-dihydroxyhexadecanoic acid で前処理した菌体から核を抽出し [32 P]UTP 存在下で転写反応を行った後、クチナーゼ遺伝子転写産物への取り込み量を測定した。その結果、前処理時間の増加に伴ってラベル量も増大し、28時間後にピークに達した。すなわち、クチン・モノマーの前処理によってクチナーゼ遺伝子の転写は誘導されることを示している。次に、前処理を行わずに菌体から核を抽出し、これにクチン・モノマーを加

えて転写反応を行ない、クチナーゼの cDNA をプローブにしてハイブリダイゼーションを行なった。その結果、クチナーゼ遺伝子による転写産物はほとんど検出されなかった。ところが、菌体からの抽出液を加えると、転写産物の著しい増加が認められた。これに対して、抽出液単独では影響しなかった。更に一連の実験から、この反応に関与している抽出液中の因子はタンパク質性の物質であることが示唆された。また、遺伝子の転写開始を阻害する抗生物質 novobiocin はクチン・モノマーとタンパク質因子に同時処理した場合、クチナーゼ遺伝子の転写を阻害したが、クチン・モノマーによって前処理を行なった菌体の核に対しては、まったく影響を示さなかった。この結果から、クチン・モノマーとタンパク質因子は preinitiation complex の形成に作用しており、クチナーゼ遺伝子の転写の開始を制御していると考えられた。

このようなクチン・モノマーとタンパク質因子による転写の誘導は、クチナーゼ遺伝子に特異的に起こるものかを調べるため、アクチン遺伝子について同様な実験を行った。その結果、クチナーゼ遺伝子の転写が誘導されるような条件下でも、クチンの cDNA にハイブリダイズする転写産物の増加は認められなかった。このことから、クチン・モノマーはクチナーゼ遺伝子に特異的に作用していることが示唆された。更に、クチン・モノマーの類縁化合物を用いてこの反応の基質要求性を調べた結果、クチン・モノマーである 10, 16-dihydroxyhexadecanoic acid と 9, 10, 18-trihydroxyoctadecanoic acid に対する要求性がきわめて高いことが明らかとなった。これらがクチンの構成成分としてのみ自然界に存在することから、クチナーゼ遺伝子の制御機構は植物との接触を識別するための有効なメカニズムであると考えられる。

以上のように、糸状菌の病原性関連遺伝子の一つであるクチナーゼ遺伝子の発現調節機構は徐々に解明されてきたが、クチン・モノマーがどのようにして転写の開始を誘導するものか、菌体中のタンパク質因子はどのような役割を果たしているものか、などについて

はまだ不明な点が多い。このような糸状菌の侵入機構の分子レベルでの解明は病害防除への利用につながるものであり、今後更に詳細な研究が期待される。

(抄訳 宮下俊一郎—東北大)

Transcriptional activation of a cutinase gene in isolated fungal nuclei by plant cutin monomers

Podila, G. K., M. B. Dickman and P. E. Kolattukudy

Science 242 : 922-925 (1988)

文献情報

嫌気性セルロース分解
細菌による窒素固定

空気中には多量の窒素ガスが含まれているが、この空中窒素をアンモニアに還元し、細胞タンパク質に転換する一連の過程(生物窒素固定)を行なうことができるのは、マメ科植物の根粒菌や他の少数の二等微生物に限られている。さらに最近の研究から、これら窒素固定菌が植物の根圏や土壌、水圏など自然界に広く分布していることが明らかになってきた。ところで、この窒素固定菌は糖類をエネルギー源として利用しているが、自然界に豊富に存在する植物のセルロースをエネルギー源として窒素固定を行なう菌は存在しないのだろうか? ここで紹介する論文では、土壌や淡水泥から分離された嫌気性セルロース分解細菌が、セルロースをエネルギー源として空中窒素固定を行っていることを報告するとともに、その菌が生態系において炭素・窒素の循環に重要な役割を果している可能性を強調している。

著者らは、土壌や淡水泥をセルロースを含む無窒素培地(MW-C培地)に直接まき、嫌気的条件下(気相を窒素ガスとする)で培養し、増菌したものをさらにMW-C培地で培養をくりかえして最終的に4分離菌株を得

た。そして、それらの特徴と窒素固定能について検討を行った。その結果、分離菌株はすべて $3 \sim 6 \times 0.6 \sim 0.8 \mu\text{m}$ の桿菌であり、細胞壁はこれまでに報告されたグラム陰性セルロース分解細菌と似ていた。また実験を行った培養条件下では孢子形成は認められなかった。分離された細菌はすべて絶対嫌気性で、多糖類、ヘキソース、ペントースなどを炭素源として利用するが、マルトース、グリセロールなどは利用できなかった。しかし、これら分離菌株を分類同定するまでには至らなかった。次に、窒素固定能を調べるためにまず、4分離菌株のひとつ、B3Bと、以前に淡水泥などから分離された嫌気性セルロース分解細菌の中のひとつ、C7(*Clostridium* strain)を用いて、アセチレン還元法によりニトロゲナーゼ活性を測定した。するとMW-C培地のみで培養した菌はいずれもアセチレンをエチレンに還元したのに対して、 NH_4Cl 添加MW-C培地で培養した菌ではいずれも還元反応は認められなかった。これは培地中のアンモニアが、ニトロゲナーゼ合成を抑制したためと考えられる。この結果より、両分離細菌は分子状窒素をアンモニアに還元する反応を触媒する酵素であるニトロゲナーゼを持っていると考えられた。また、これら2分離菌(B3B, C7)を、セルロース分解物であるセロビオースを含む無窒素培地を用い、気相を窒素ガスまたはアルゴンガスとして培養した。その結果、両分離菌はアルゴンガス存在下ではまったく増殖しなかったのに対して、窒素ガス存在下では旺盛に増殖した。これらのことは、分離されたセルロース分解細菌がセルロースをエネルギー源として空中窒素を固定し生育していることを示している。

現在までの研究では、窒素固定能を持つ嫌気性セルロース分解細菌が自然界にどのくらいの数分布しているのか明らかではない。しかし、実際にセルロースが豊富に存在する環境では、窒素源が不足していることが多く、窒素固定能を持ちセルロースを分解できる細菌は優先的に増殖できると考えられることから、ここでは報告した嫌気性セルロース分解細菌は自然界に広く分布している可能性が高

いと考えられる。それではこの細菌は生態系でどのような役割を果たしているのだろうか？ これまでの研究から、自然界で固定される全窒素の約60%は細菌の窒素固定によるとされており、一方、枯死した植物に含まれるセルロースはほとんど微生物により分解されると考えられている。したがって、窒素固定を行なうセルロース分解細菌が自然界に広く分布していれば、生態系における炭素や窒素の循環に重要な役割を果たすかもしれない。今後、この細菌の自然界での分布や生態系での役割について、さらに詳しい研究が期待される。

(抄訳 高橋英樹—東北大)

Nitrogen fixation by anaerobic cellulolytic bacteria

Leschine, S. B., K. Holwell and E. Canale-Parola

Science 242: 1157~1159 (1988)

文献情報

ダイズ・リポキシゲナーゼ-3遺伝子の単離および解析

ダイズ (*Glycine max*) 種子におけるリポキシゲナーゼ (lox) には4種類のアイソザイム (lox-1, -2, -3A, -3B) が確認されており、それぞれの基質特異性、産生物、および至適 pH などに違いがある。この酵素は約95,000ダルトンの、単一のポリペプチド鎖よりなる。これらは、ダイズ種子タンパク質中において1~2%を占めており、また、主要作物としてのダイズの商品的価値に無視できない影響を与える存在として注目されている。すなわち、脂質の過酸化による豆臭、タンパク質の品質低下などであるが、一方では、脱脂ダイズ抽出液を添加することによるパン製造時のカロチノイド系色素の脱色、小麦グルテンのテクスチャー改善などの効果もある。

lox-1については、Shibataら(1987)によ

ってcDNA塩基配列からその全アミノ酸の推定配列が明らかになっており、更に“lox-1-like”タンパク質の部分配列の報告(Startら1986)もある。

本実験においては、lox-3アイソザイムのcDNAおよびゲノムのクローニングを行ない、その全基塩配列の決定、および明らかになっている他のアイソザイム (lox-1, lox-1-like) の推定アミノ酸配列との比較を行った。

サイズ分画により濃縮したmRNAを用いて作成したcDNAは、hybridization select法およびimmunoprecipitation法を用いて選抜し、loxアイソザイムをコードするクローンとしてp3H9(約580bp)を得た。このクローンの3'末端172bpの非翻訳領域をプローブとして、lox-1, -2, -3各欠損株より抽出したRNAに対してdot blot hybridizationを行ったところ、lox-3欠損株にのみ反応せず、このクローンがlox-3をコードしていることがわかった。また、このp3H9インサートを用いて約700,000個のフェージゲノミックライブラリーの中からゲノムクローン3H9・19・1を選抜した。更に完全長のcDNAを得るために再度クローニングを行い、p3H9インサートをプローブとしてほぼ完全長のcDNA, p3H9FLを得た。

ゲノムDNAは9か所のエクソン(86~950塩基)と8か所のイントロン(93~448塩基)よりなっており、すべてのエクソン-イントロン連結部はGT-AG法則に従っていた。推定アミノ酸配列によるアミノ酸数は857個、分子量は96,663ダルトンであった。

5'末端側の非翻訳領域は、最初のメチオニンコドン(ATG)の上流約46塩基であった。典型的TATAボックスが転写開始点から約30塩基上流にあり、また、転写開始点の約80塩基上流にはCAATボックスの代わりにCAAG配列が認められた。

3'末端側の非翻訳領域には、4か所にポリアデニレーションシグナルが存在していた。cDNAクローンp3H9およびp3H9FLでは、ポリA配列までの3'側非翻訳領域がそれぞれ148塩基および196塩基と異っていたが、これは4か所のポリアデニレーションシグナルの

うち少なくとも2か所がポリA付加にそれぞれ関与しているためであると考えられた。

また、この lox-3 の推定アミノ酸配列と、先に挙げた2種類の cDNA 配列、すなわち、Shibata ら (1987) の lox-1 および Start ら (1986) の “lox-1-like” の部分配列との相同性を調べた。このうち “lox-1-like” の配列は Axelrod の lox-2 の cDNA 配列 (私信) と全く同一であることが明らかとなった。

塩基配列および推定アミノ酸配列の比較結果は次のとおりである。

lox-1 と “lox-1-like” (lox-2) タンパク質は83%のホモロジーをもち、塩基配列レベルでのコーディング領域では89%のホモロジーが存在した。しかし、lox-3と lox-1、あるいは lox-3 と “lox-1-like” (lox-2) 間ではアミノ酸配列でそれぞれ70%および73%、塩基配列においてはそれぞれ74%と73%のホモロジーであった。

生化学的、酵素学的には、lox-1と、lox-2 および lox-3 の間に、熱安定性、至適 pH 等に関して大きな違いがあるため、lox-1 を type 1、その他を type 2 として分類している。このように大きく性質が異なるグループ間で、lox-1 と lox-2 のアミノ酸および塩基配列の相同性が、同じグループ内でのそれよりも高いということは大変興味深い。

今後、これらのアイソザイムの活性中心が見出されることにより、その部分のアミノ酸および塩基配列の比較によって、各アイソザイムの関連性がより詳細に解明されるものと期待される。

(抄訳 村山晶子—東農大)

Isolation and characterization of a soybean (*Glycine max*) lipoxygenase-3 gene

Richard L. Yenofsky, M. Fine and C. Liu
Mol. Gen. Genet. 211 : 215-222 (1988)

文献情報

ファイトアレキシン合成酵素をコードする mRNA の誘導

高等植物は病原体の感染に対して様々な反応を示す。いわゆる全身感染と呼ばれる場合には、病原体はまず侵入細胞内で増殖し、その後周辺の細胞だけでなく、植物体全体へと感染範囲を広げる。これに対し、感染が病原体の侵入細胞とそのごく周辺の細胞のみに限定される場合を局部感染と呼び、特に細胞が感染を受けた後速やかに死に至る過敏反応 (hypersensitive reaction) について、宿主植物の抵抗性との関連について種々議論されてきた。なかでも、低分子量の二次代謝産物であるファイトアレキシン (phytoalexin; 以下 PA) 産生に関しては、その抗菌性の確認以来、多くの研究が行われている。

ダイズの疫病は、疫病菌 (*Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*; 以下 PMG) がダイズ根部に感染し、ダイズを枯死させる重要な病害である。本菌がダイズに感染した場合にも、全身感染と局部感染の2種類の反応が認められ、レース 3 が感染した場合には全身感染 (親和性)、レース 1 の場合には局部感染 (非親和性) となる。後者の場合、菌の侵入開始後イソフラボノイド系の PA の合成・蓄積が行われ、菌糸の細胞内伸長を抑制する。本 PA の生合成に関わる二つの酵素について、これまで詳細な研究が行われている。その酵素はフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (phenylalanine ammonia-lyase; 以下 PAL) とチャルコンシンターゼ (chalcone synthase; 以下 CHS) である。すでに両酵素をコードする mRNA から cDNA がクローニングされているが、本稿ではその cDNA を用いて2酵素の mRNA の蓄積過程を追及した論文を紹介する。

Habereder らはダイズ (cv. Harosoy 63) 幼苗の主根を PMG の遊走子懸濁液に浸して接種し、PAL、CHS 両酵素の活性がどの

様に変化するかについて検討した。同様に、elicitorと呼ばれるPA産生誘導物質（この場合はPMGの細胞壁成分である β -グルガン）をダイズ培養細胞に処理し、酵素活性の誘導についても調べた。その結果、非親和性レースの接種では、接種後8時間目で顕著なCHSの活性増加が認められ、これは親和性レースを接種した場合の約2倍、水処理の約3倍であった。培養細胞に対しては、この効果は更に顕著で、elicitor処理後10時間目でCHSは60倍、PALは約14倍に増加した。この結果は、非親和性の組合せでは、接種後14時間目までに多量のPAが蓄積するとする従来の結果と一致する。

次に、両酵素のmRNAの誘導について、それぞれに対するcDNAを用いて検討した。cDNAはPAL、CHSの場合ともに、インゲンマメから分離したmRNAより調製したものであったが、ダイズの粗RNA抽出物中にも、そのcDNAとハイブリダイズする分子が存在し、その大きさはPAL-cDNAに対しては2.6kb、CHS-cDNAに対しては1.6kbであった。この大きさは、インゲンマメからの各々の酵素のmRNAの大きさとほぼ同一であったために、これらのRNA分子は両酵素のmRNAであると推察された。

これらPALとCHSのmRNAの転写は接種後どのように行われるのか、経時的に調

べた結果、接種後1時間までのごく早い時期から親和性、非親和性に関係なく、mRNAの活性は有意に上昇しはじめることが明らかとなった。親和性の組合せでは、その後活性はしばらく同じレベルを保つのに対して、非親和性の場合には、7時間後までほぼ直線的に活性の増加を示した。CHS-mRNAの翻訳活性についても同様の変化が認められた。

以上の結果、非親和性菌の感染時にはPA産生に直接関わるmRNA量が増大することにより、PAの生成・蓄積が誘導されることが示唆された。mRNAの活性上昇は、接種後1時間目までは親和性の場合にも認められ、この時期は菌の細胞への侵入時期にも当たっていることから、その後の菌の挙動がPA産生に直接関わっているのではないかと興味を持たれ、今後の展開が期待される。

（抄訳 柄澤 明—東北大）

Rapid induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs during fungus infection of soybean (*Glycine max* L.) roots or elicitor treatment of soybean cell cultures at the onset of phytoalexin synthesis

Habereder, H., G. Schröder and J. Ebel.
Planta 177: 58-65 (1989)



海外便り

米国の植物バイテク見聞

——コーネル大学留学記——

農林水産省 野菜・茶業試験場 育種第1研究室

西尾 剛

<自然に恵まれた大学町>

1 昨年（1987年）9月はじめから昨年8月末までの1年間、コーネル大学で植物の遺伝子組み換えの研究を行うために米国に滞在した。コーネル大学は、ニューヨーク市からナイアガラの滝の方に向かって飛行機で1時間ぐらい、ニューヨーク州のイサカという小さな町にある。イサカは、氷河でできた細長い湖の一端にある自然に恵まれたたいへん美しい町で、いわば大学町である。コーネル大学は、100年以上の伝統を有し、古くて美しい建物が今でも講義や研究に使われており、それらの建物が緑の中うまく配置されている。この大学は半分私立で半分州立の複雑な大学で、ハーバードやエールなどのアメリカ東部の有名私立大学で構成されるアイビーリーグの一つである。農学・生命科学学部（College of Agriculture and Life Science）は州立に属する。

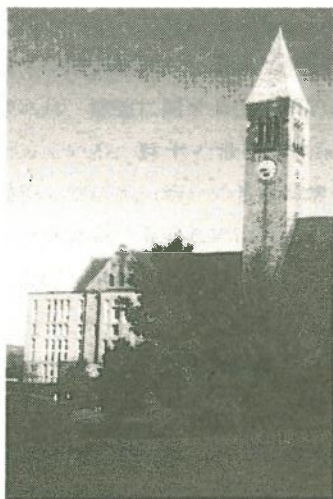


図1 コーネル大学のシンボルの時計台

<自家不和合性に関与する糖タンパク>

農学の分野では、コーネル大学は、西部のカリフォルニア大学と共にアメリカで最も有名で、筆者が専門とする植物育種や植物バイテクの分野でも、多くの研究者がおり、最先端の研究がなされていた。中でも植物からの遺伝子の単離の研究は精力的に行われていた。筆者が滞在したDr. Nasrallahの研究室では、アブラナ科植物の自家不適合性に関係すると考えられる糖タンパク質の遺伝子の研究がなされていた。

自家不適合性の研究は、遺伝学的にも、生理生化学的にもキャベツ、ハクサイ、ダイコン等のアブラナ科植物において最も進んでおり、これらの植物ではまた自家不適合性を利用したF₁採種の技術が実際の種苗生産に広く用いられている。自家不適合性は、多くの種において、S遺伝子という1遺伝子座の複対立遺伝子（S₁, S₂, S₃……）によって支配されている。S遺伝子が同一の個体間の交雑では不和合となり、アブラナ科植物では花粉管が柱頭組織内に侵入できず、そのため受精できない。花粉と柱頭表面との間でお互いのS遺伝子の識別があるものと考えられ、その認識反応に関与する認識物質を見いだす試みが多くなされてきた。

アブラナ科植物では、S遺伝子が異なれば異なる等電点を有する糖タンパク質が柱頭にあることが知られている。これらの糖タンパク質はS遺伝子に伴って遺伝し、柱頭の表層にある乳頭状突起細胞にだけ見られる。このような証拠から、この糖タンパク質はS遺伝子にコードされており、自家不適合性の認識反応の特異性に関与していることが強く示唆さ

れている。この糖タンパク質をコードしている核DNAが最近 Dr. Nasrallah の研究室でクローニングされた。筆者は、このDNAをアブラナ科植物に入れることによって、このDNAがS遺伝子とどのような関係にあるかを明らかにすることを目的として研究を行った。

<形質転換技術を用いた自家不適合性の研究>

Dr. Nasrallah 研究室は、分子生物学の研究室であり、微量のタンパク質や核酸を扱う技術は高度なものを持っているが、組織細胞培養に関する研究蓄積は全くなかった。そのため、培養に必要なインキュベーターやピンセットの購入から始めた。形質転換に用いるアグロバクテリウムの系統や接種法、培養条件等を検討した結果、ナタネおよびブロッコリーでそれぞれ数系統の形質転換植物が得られたので、現在それらの植物およびその後代においてDNA供与体と同じ糖タンパク質が同じ組織で合成されるかどうか、またDNA供与体と同じ自家不適合性の認識反応の特異性がみられるかどうかを検討されている。ナタネやブロッコリーの形質転換法が確立できたので、更に他のS遺伝子の系統からとったDNAをこれらの植物に入れる研究もなされている。アブラナ科植物の形質転換技術を用いた自家不適合性の研究は発展の可能性が大きいため、植物育種や組織細胞培養を専門とする二人の日本人研究者が現在当研究室でポスドクとして研究している。

<パーティクルガンを用いた形質転換法>

植物の形質転換技術は、筆者が行った研究のように単離した遺伝子の機能の解明のため、またその遺伝子の育種上の利用のため、大変興味を持たれていた。アグロバクテリウムを用いた植物の形質転換法は、既にタバコでは方法が確立されており、植物における遺伝子発現の研究に広く用いられている。しかし、単子葉植物は一般にアグロバクテリウムに感

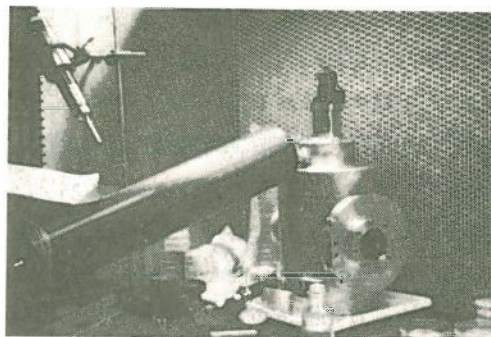


図2 パーティクルガンの装置

ウムによる形質転換は難しい。アグロバクテリウムを用いた形質転換が困難な作物では、プロトプラストに直接DNAを入れる方法が用いられているが、プロトプラストからの植物体再生ができない植物では利用できない。そこで、コーネル大学のある研究室では、新たな形質転換技術の開発研究が行われていた。

コーネル大学の開発で現在注目されている方法は、パーティクルガンによる方法である。これは径 $1.2\mu\text{m}$ 程度のタングステン粒子にDNAを付着させ、それを植物細胞に打ち込むものである。DNAを付けたタングステン粒子の懸濁液をナイロンの円柱状のものに小滴にして付け、火薬を使って鉄砲の玉のように発射する。先にストッパーがあり、タングステン粒子だけがストッパーの穴を通り抜けて植物組織に当たる。粒子が小さく空気抵抗の影響があるため、粒子が通るところは真空にする。このようにしてタングステン粒子は植物組織の表層に入り、DNAが細胞に導入される。この方法によりタバコでは既に形質転換植物が得られている。また、イネやトウモロコシでもキメラではあるが形質転換した植物が得られたとのことであった。この方法はプロトプラストからの再分化技術を必要としないため、アグロバクテリウムが利用できない作物の形質転換法として期待されている。また葉緑体やミトコンドリアへの遺伝子導入法としての利用の可能性もあり、それを目的とした研究もなされていた。

<花粉管を通してのDNA導入法>

花粉管を通してDNAを導入するという方

法も試みられている。受粉後数分おいて花柱を切断し、切口にDNAの溶液を乗せて、遺伝子を受精卵に入れるというものである。この方法を用いて稲で形質転換植物が得られたとのことであった。この方法は全く組織細胞培養技術を必要としないため、再分化能の低い植物種での利用が可能と考えられるが、この方法の形質転換技術としての信頼性については慎重な検討が必要と思われる。

<オタワでのワークショップ>

滞在期間中にカナダのオタワで開かれた植物組織培養・遺伝子操作ワークショップに参加する機会があった。ナタネの小孢子培養技術の開発・改良、麦の薬培養技術の改良、アブラナ科植物やナスの細胞融合、DNAのマイクロインジェクションによる形質転換、葉緑体やミトコドリアのプロトプラストへの導入等最先端の研究の講演が多数なされた。とくに注目されたのは、モンサント社でなされたTMV外皮タンパク質の遺伝子、BTトキシンの遺伝子および除草剤抵抗性遺伝子が導入されたトマトの圃場試験の発表であった。

<開花に関するシンポジウム>

ミネソタで開かれた植物の開花に関するシ

ンポジウムにも参加した。ここでは、花成誘導に伴うタンパク質の変化に関する研究や、葯等の花の器官で特異的に発現する遺伝子の研究、自家不適合性、雄性不稔、また古くから研究されている花成物質「フロリゲン」の研究などの講演があった。トウモロコシのT細胞質による雄性不稔とごま葉枯病のTトキシン感受性の分子生物学的研究は特に印象的であった。

<自由な発想ができる研究環境>

筆者は、米国における植物バイオテク研究の情報収集を主たる目的として訪米したのではないため、米国やカナダの研究を広く見渡すことができなかったが、世界の最先端の研究の一部を身近に見ることができた。現在日本では、これまで多くなされてきた外国における基礎研究を基にした応用研究や実用化研究だけでなく基礎的先導的研究の必要性が叫ばれている。米国におけるような基礎的先導的研究を行うためには、研究者が雑務に追われず自由な発想で研究に専念できる研究環境の整備が必要であることを強く感じた。



特別情報

生物の生存戦略の解明と高度利用を目指して

(農林水産省大型プロジェクト研究 (農林水産系
生態秩序の解明と最適制御に関する総合研究))

農林水産省 農林水産技術会議事務局 研究開発課

望月 龍也

はじめに

〈今こそ必要な生態系との調和〉

農林水産業は、太陽エネルギーと地球上に広く分布する無機成分を材料として、生物の高度な営みの複雑な連鎖系によって食料や被服、建築材料などの生物資源を生産し、再び生物の働きによって分解・還元するシステムである。そして生産活動によるインパクトが農林水産業の展開する生態系の復元閾値を超えない限り、本来生態系と協調して発展できる性質をもっている。

しかし森林・農耕地の砂漠化、酸性雨、海洋汚染、炭酸ガス濃度上昇による温室化、フロンガスによるオゾン層の破壊など、地球規模での環境問題が顕在化し、これら生態系における複雑な循環を通じて生産環境の機能を低下させ、農林水産業の健全な発展を妨げる危険性をはらんでいる。

一方わが国の農林水産業は、多様な気候条件と豊富な降水量、広大な海洋に恵まれ、これまで一貫して国民に多様な生物資源を供給してきた。しかし本来気候、土壌、海洋などの自然条件に生産性を大きく左右される農林水産業では、十分な生産をあげるために化学肥料、薬剤等の資材多投型技術に傾斜し、生態系の秩序と調和を乱す場合のあったことも事実である。

今後わが国の農林水産業が、国民のニーズに応え、生産性を向上しつつ高品質かつ安全な食料、資材等を安定して供給するためには、わが国の恵まれた自然生態系の構造と機能を十分に解明し、その成果を生産の場に生かすことにより、生態系と調和しつつこれをより高度に活用する合理的技術の開発が強く望ま

れている。

本大型プロジェクト研究は、以上のような基本認識を背景として、生態系を構成する生物個体間の情報交換、個体群における再生産と密度制御、異種生物集団における多様性と安定性など、生態系の秩序と調和に関わる諸機能の解明に基づき、革新的な生産技術、生産環境制御技術の開発を目指すものであり、平成元年度から10年計画で総額50億円(初年度417百万円)の研究費と延べ500人の研究者の投入を予定している。

1. 研究体系

本研究は、基本的に、農林水産業の展開する生態系に研究材料を求めるが、研究手法は農学、林学、水産学といった枠に止まらず、フェロモンやアレロパシー物質などの生態相関物質を研究する化学生態学、ゲーム理論などを取り込んだ行動生態学、個体群動態理論、遺伝生態学、さらには行動学や社会学等人文科学を含め最新的手法、成果を取り入れた、学際的研究として実施される。本研究の研究体系は以下の通りである。

① 生物個体の情報交換と行動様式の解明・制御系

本系では生物個体間の交信、誘引、忌避などの情報交換に関わるフェロモン、アロモン、カイロモン、アレロパシー物質などの化学物質や電磁波、音波などの物理因子を近年の先端的計測、分析技術を駆使して解明する。また摂食、繁殖など個体および種の維持に関わる行動様式を、進化理論を取り込んだ戦略モデルやゲーム理論等による数理的解析手法を利用して解析する。これらを通じ農林水産生

物個体の最適制御技術の開発を目指す。

② 生物群の形成機構と構造・機能の解明・制御系

本系では魚類、昆虫、樹木、野草などにおける個体群の形成機構、密度圧等による個体群の自己調節機構、移動・回帰に伴う方向探知機構、個体群内部の齢構成と再生産機構などについて、生理生態学的手法や個体群動態理論などを利用して解明し、その最適制御技術の開発を目指す。

③ 異種生物集団の構造と機能の解明・制御系

本系では海洋、天然林、半自然草地、微生物集団などにおける、競合、拮抗など異種生物間相互作用や栄養構造的多様性などの解明に基づき、生態系内の異種生物集団の安定性や生態系の復元閾値を解明し、有用生物集団の選択的資源増大技術の開発を目指す。

④ 生物種の変異と種分化機構の解明・制御系

本系では寄生者-宿主関係、捕食-被捕食関係など異種生物種間における共進化、すなわち相互依存的遺伝変異機構について遺伝子、酵素レベルでの解明を目指す。

⑤ 共通基盤技術系

本系では以上の各系の研究を実施するために必要な新しい隔測技術や情報数理解析技術などを開発する。

⑥ 生物資源の安定生産・管理技術系（平成5年度よりスタート）

本系では以上の各系の研究で得られた成果を総合して農林水産業の展開するフィールドに適用し、生態系と調和しつつその機能を高度に利用するための合理的技術体系の開発を

目指す。

2. 開発の期待される技術

本研究はこのような研究体系により農林水産業に関する広範な分野を対象に展開される。開発の期待される主要技術は以下のとおりである。

① キク科、イネ科などの雑草、野草、作物から新たなアレロパシー物質が単離・同定され、さらに化学構造の解明により、それらの合成が可能となる。またアレロパシー物質およびアレロパシー作用を有する植物の利用により、雑草およびセンチュウ防除のための、農薬に頼らない合理的な作物管理技術が開発される。

② 昆虫のフェロモンについては、シロイチモジヨトウの性フェロモンなどで主要成分以外の微量成分の高精度の検出法が確立し、それらの役割が解明され、フェロモンを利用した、より確実な行動制御技術が開発される。またアブラムシなどの寄生蜂が寄主を発見する際に働いているカイロモンの単離・同定・構造解析が進み、カイロモンの利用により、天敵蜂による害虫防除の効率化が図られる。さらにハナバチなどが訪花に際して利用しているアロモンの単離・同定・構造解析も進み、果樹や牧草などで受粉の効率化が図られる。

③ 植物体の葉上、根圏土壌、ルーメン、サイレージ、発酵食品などの微生物集団において、微生物相互間に働く競合、拮抗現象の物質的な基礎が解明され、拮抗微生物の施用や常在微生物の機能強化による有害微生物の防除技術、ルーメン発酵や微生物を利用した

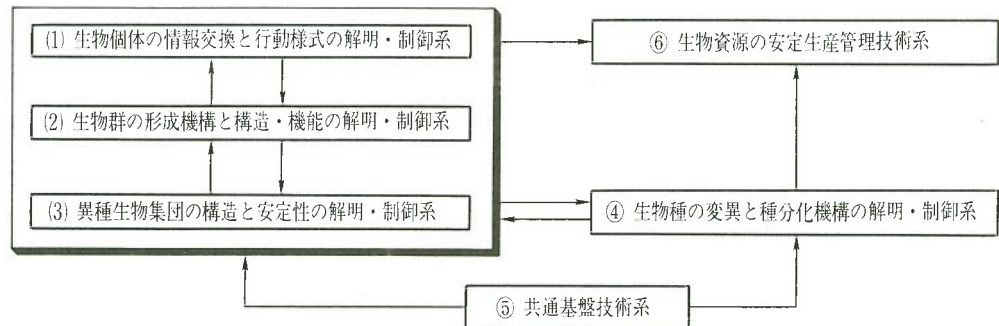


図1 農林水産系生態秩序の解明と最適制御に関する総合研究の体系

食品製造などの効率向上技術が開発される。

④ イネーイネ縞葉枯病ウイルスーヒメトビウンカ、バラ科果樹ー黒星病など寄主、病原菌、媒介者間での共進化機構が遺伝子レベルで解明され、バイオテクノロジー等の利用により、病原側の変異に対して安定した抵抗性品種の育成が可能になる。

⑤ 北上山地や阿蘇山などに広がる半自然草地(野草地)を構成する草種相互間のアレロパシー現象や植生の差異および牛、山羊など放牧家畜の摂食制御に関わる嗅覚刺激物質などが解明され、これらの成果に基づき、半自然草地の安定維持と有効利用による低コスト放牧技術が開発される。

⑥ 海藻類が分泌するウニ、アワビなど植食動物に対する忌避物質が単離・同定・構造解析され、これを利用して植食動物による海藻幼植物に対する摂食加害の制御が可能となり、磯焼け岩礁域におけるアラメ・カジキなどの海中林の効率的な造成技術が開発される。

⑦ ベニザケ、サクラマスなどのさけ・ます類において、回帰を支配するバイオリジカル・オートジャイロ機能(方向探知機能)および母川記憶力に関わる匂い物質の単離・同定とその感知機能が解明され、これら機能強化のためのさけ・ます類の遺伝的改良、母川匂い物質による刷り込みの強化などにより、

回帰率を飛躍的に向上させる技術が開発される。

⑧ マイワシ発生初期の減耗要因および成熟期の餌量条件と再生産能力の関係などが解明され、大変動をくり返すマイワシ資源の的確な長期予測技術が開発される。

⑨ 家具などの需要が拡大し、また広益面から保全が望まれている広葉樹の天然林について、カンバ、シデなどの低利用林からブナなどの有用林への自然更新による効率的な誘導促進技術及び天然林の維持・保全技術が開発される。

おわりに

このように本研究は広範な研究領域を対象とし、基礎から応用まで様々な研究段階のテーマが相互に密接な関係をもって展開する。また目的達成のためには独創的かつ高水準の研究開発が要求される。このため本研究では省内研究機関のみでなく、大学や民間研究機関の研究勢力をも結集し、目的に見合った最適のスタッフをそろえたとともに、国際的な研究交流も強化し、研究水準の向上と研究の効率的な推進をはかることとしている。

また本研究の成果が広く農林水産業に活用される技術として結実するためには、民間研

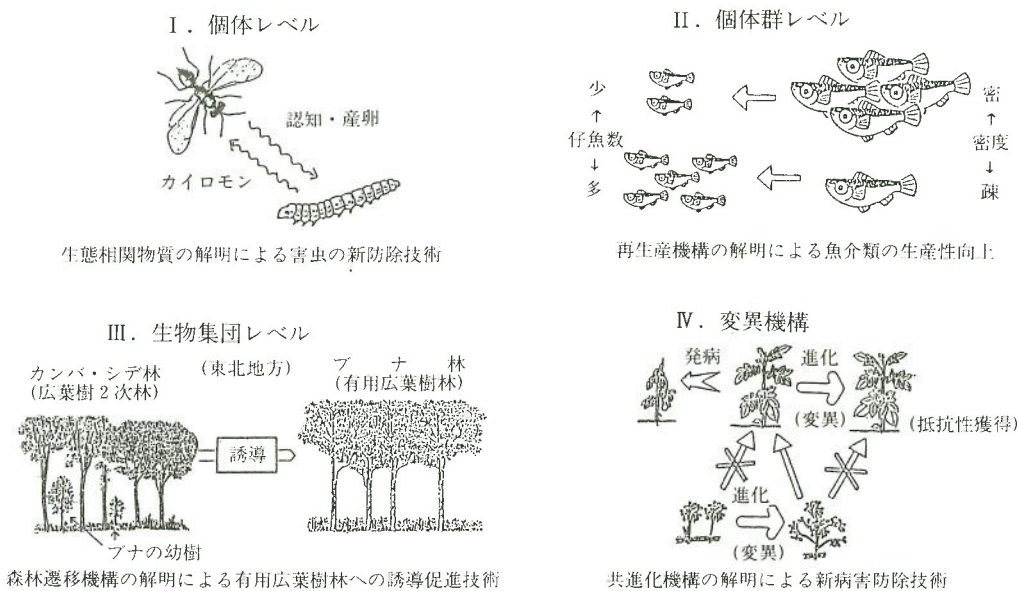


図2 「農林水産系生態秩序の解明と最適制御に関する総合研究」

—— 飛躍的な技術革新のための基礎づくり ——

究機関との連携が不可欠と考えられる。計画初年度については、大半の課題が極めて基礎的色彩の濃い研究であり、民間研究機関からの参画はごく一部に限られている。しかし今後研究の進展に伴ない、効率的な研究推進の

ためには民間研究機関との連携が必要となる課題が多数出てくるものと想定される。本プロジェクト研究の展開に御注目いただき、適切な御助言、御支援をお願いしたい。

生研機構
出版案内

生研報告 No. 4 ~ 7

生研機構では、昭和63年度に実施した調査事業の成果を、生研報告としてこのたびとりまとめました。内容などは次のとおりです。

◎生研報告 No. 4 「芝草の品種・管理を考える」, 「芝草の品種改良を考える」

内容：標記座談会の要約

体裁：A 5 版 49ページ

◎生研報告 No. 5 「62年度漁業白書から見た水産業の動向と技術的課題」

内容：標記研究会の要約

体裁：A 5 版 38ページ

◎生研報告 No. 6 「欧州の植物・家畜分野における最新研究開発動向調査報告」

内容：1988年9月19日～10月2日に実施したヨーロッパ調査の報告書

体裁：A 5 版 59ページ

◎生研報告 No. 7 「畜産副生物等の有効利用技術について」

内容：標記研究会の要約

体裁：A 5 版 42ページ

連絡先：生研機構企画部

Tel 03 - 205 - 6565

お知らせ——消費税実施にともなう購読料の変更について

BRAIN テクノニュースをご愛読下さり、まことに有難うございます。税制改革により、平成元年4月1日より、雑誌購読料にも消費税が課税されます。

つきましては、本年度より購読料を下記のとおり変更させていただきますので、ご了解下さいますようお願い申し上げます。

記

年間購読料 30,900円 (消費税を含む) 旧 (30,000円)

編集後記

今後の編集のあり方を考える参考にするため、先日読者の皆様アンケートをお願いしましたところ、多数の方々から回答を戴きました。ご協力有難うございました。一つ一つのご指摘にすぐ具体的に応えきれるとは申し上げられませんが、これからの編集に生かしてまいりたいと考えております。中に書かれておりまし

た「BRAIN テクノニュースらしさを、今のまま伸ばすように」とのお励ましを力に、3年目を迎えた編集に新たな気持ちで取組んでまいります。本誌に対するご意見は、いつでも結構ですから、今後ともお寄せ下さいますようお願いいたします。

(伊澤 記)

ブレイン テクノニュース (第13号)

平成元年 5 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, 1989