

# 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 20 号

JULY 15, 1990



### 表紙説明

出芽細菌による線虫の生物防除

体表面に出芽細菌の胞子が着生したダイズ  
シストセンチュウの感染期幼虫

(写真提供 西澤 務氏)

### 本号の紙面

- 国内情報..... |  
遺伝子組換え野火病抵抗性タバコ、遺伝子組換えによるルシフェラーゼの生産、低アミロース高アミロペクチン小麦品種とめん適性
- 文献情報..... 9  
ライボザイム、新しい $\gamma\delta$ 型T細胞、酵母での人プロインシュリン生産、形質転換の視覚的マーカー、胚性幹細胞導入外来遺伝子の生殖細胞系への伝達
- 国際学会レポート..... 17  
作物と病害虫の相互関係モデル研究集会
- 特別情報..... 19  
地域バイテク研究の主要成果、ライボザイムをめぐる特許論争

## 口 絵

### 国内情報

米山勝美

遺伝子組換えによる野火病抵抗性のタバコへの導入 ……1

中野衛一

遺伝子組換えによる酵素ルシフェラーゼの生産とその応用 ……3

黒田 晃

低アミロース，高アミロペクチン小麦品種とめん適性 ……6

### 文献情報

エイズウイルス(HIV-1)に対する治療薬になる可能性を秘めたライボザイム ……9

新たな $\gamma\delta$ 型T細胞の発見 ……11

酵母における人プロインシュリンの生産 ……12

トウモロコシの形質転換の新しい視覚的マーカーとして使える調節遺伝子とは？ ……13

胚性幹細胞に導入した外来遺伝子の生殖細胞系への伝達 ……14

### 国際学会レポート

小泉信三

作物と病害虫の相互作用のモデリングに関する国際研究集会に参加して ……17

### 特別情報

澤田紀一

地域バイオテクノロジー研究「培養幼植物体レベルにおける特性検定及び

選抜技術の開発」の主要成果(中間とりまとめ) 1989年度 ……19

増澤 力

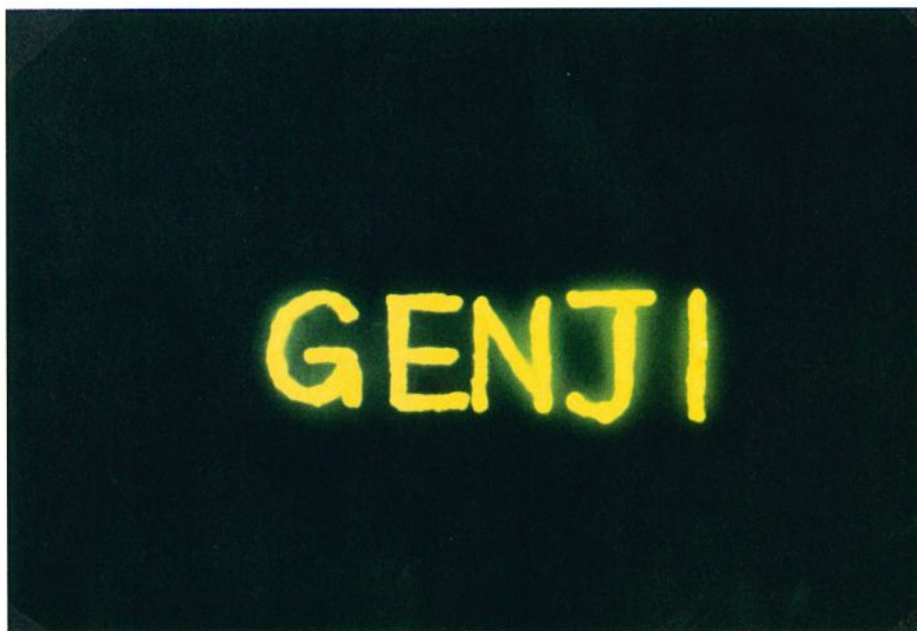
遺伝子操作の最近技術「リボザイム」をめぐる特許論争——Nature誌から ……25

遺伝子組換えによる野火病抵抗性のタバコへの導入 (本文 1 ページ)



タバトキシン解毒酵素遺伝子を導入したタバコ(右)と  
非導入タバコ(左)への野火病菌接種結果

遺伝子組換えによる酵素ルシフェラーゼの生産とその応用  
(本文 3 ページ)



ゲンジボタルのルシフェラーゼ遺伝子を導入した大腸菌をメンブ  
ランフィルター上に生育させて画いた字をルシフェリン溶液に浸して  
発光させた



# 遺伝子組換えによる野火病抵抗性の タバコへの導入

明治大学農学部 植物病理学研究室

米山 勝美

## 1. はじめに

病原微生物が植物を侵して病気を引き起こすには、一般に病原菌が宿主植物に侵入・定着するまでの段階に発揮される力（侵略力）と植物を加害して発病させる力（発病力）が必須であるといわれる。言い換えれば、これら能力のどちらか一つを阻止することができれば、植物を病原菌の侵害から防ぐことができるものと期待される。病原菌の発病力には、病原菌の分泌する毒素、酵素などが関与する。今日までの病害制御剤には病原菌の発病力を特異的に阻止するものは開発されておらず、病原菌に直接殺菌力を示すか、病原菌の侵略力を阻止して病害防除効果を発揮する薬剤のみである。

筆者らは、植物病原細菌や糸状菌の発病力に関与する毒素に注目し、遺伝子工学的手法を用いて病原菌の生産する毒素を分解あるいは不活性化する解毒酵素遺伝子を植物へ導入し、植物自体に病原菌の発病力に対する抵抗性を付与して病害を防除する戦略を考えた。

そこで、植物体の形質転換系が比較的容易とされているタバコに発生する病気で、しかも毒素生産性と病斑形成が密接に関係するタバコ野火病菌を選び、毒素不活化酵素遺伝子のクローニングと、植物への導入を試みた。その結果、タバコ野火病菌自体より、毒素の不活化酵素遺伝子を単離することができ、さらに、この遺伝子をタバコに導入して、毒素耐性および野火病抵抗性植物を作出することに成功した<sup>1,2)</sup>。

ここでは、植物病原細菌および糸状菌の生産する毒素に対する解毒酵素遺伝子を植物に

導入して病害抵抗性植物を育種する戦略について、タバコ野火病菌を例に紹介することとする。

## 2. 植物病原菌毒素と病原性

植物病原菌の生産する毒素は、病理学的見地から、一般に宿主特異的毒素と非特異的毒素に分けられる。宿主特異的毒素は宿主植物のみに毒性を示し、宿主以外の植物や完全な抵抗性品種には作用しない。したがって、病原菌の病原性の強弱は毒素の生成量に関係し、また植物の病害抵抗性の強さは毒素に対する抵抗性の強さで決定される。これまで確認された宿主特異的毒素の生産菌は全て糸状菌に属し、しかも、そのほとんどが *Alternaria* 属と *Helmithosporium* 属に集中している。

一方、非特異的毒素は、宿主はもちろんのこと、宿主以外の植物にも広く毒性を示す。宿主特異的毒素と違って、毒素が病原性と直接関係するとは限らないが、病徴の発現、宿主の代謝異常など加害要因として重要である。たとえば、糸状菌毒素では、イネごま葉枯病菌のオフィオボリン、イネばか苗病菌のジベレリンなど、また植物病原細菌の生産する毒素はいずれも非特異的毒素で、タバコ野火病菌のタブトキシン、インゲンかさ枯病菌のフェゼオロトキシンなど、病徴の発現と関連しているものもある。

このように、毒素が主要因となり、宿主の生理・生化学的代謝を阻害して病気を引き起こす場合には、毒素を解毒することにより病害を軽減あるいは防除できると期待される。

### 3. タバコ野火病菌毒素タバトキシン

タバコ野火病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* の生産する毒素タバトキシンをタバコ葉に処理すると、タバコ野火病に特徴的なクロロシスと呼ばれる黄色病斑を形成する。したがって、病原菌の生産する毒素タバトキシンと病斑の形成とは密接に関係すると考えられている。タバトキシンの構造は、タバトキシニン- $\beta$ -ラクタムとL-スレオニンからなるジペプチドである<sup>3)</sup>。その活性本体はタバトキシニン- $\beta$ -ラクタムであり、アミノ酸代謝におけるグルタミン合成酵素(GS)を強く阻害する<sup>4)</sup>。病徴発現の機構は、GS阻害により細胞内に異常な量のアンモニアが蓄積し、そのアンモニアの作用によってクロロシスを生じるものと考えられている。

### 4. 毒素解毒酵素遺伝子の探索

タバコ野火病菌の毒素タバトキシンはタバコ以外の植物、動物、藻類、細菌など広範囲の生物に毒性を示すが、生産菌であるタバコ野火病菌に対しては当然のことながら全く作用しない。これは、タバコ野火病菌が自己の生産する毒素に対して特異な耐性機構を有するものと推定される。

このような自己耐性機構は生理活性物質の生産菌、とくに抗生物質の生産菌である放線菌においてよく知られている。たとえば、カナマイシン生産菌のアセチル化酵素、ストレプトマイシン生産菌のリン酸化酵素、ピアラホス生産菌のアセチル化酵素などがある。

除草剤ピアラホスの場合を例にあげると、ピアラホスはタバトキシンと同様、GS阻害剤である。その生合成における中間化合物にもGS阻害活性があり、生産菌はそれら活性中間体をアセチル化して、活性のないアセチル化合物としてピアラホス生合成を進行する。そして最終的に脱アセチルして活性のあるピアラホスとして細胞外に分泌する<sup>5)</sup>。

筆者らは、このピアラホス生産菌の有するアセチル化酵素遺伝子を植物に導入して、除

草剤耐性植物を作出する研究過程において、タバコ野火病菌の場合にも同様に、タバトキシンに自己耐性を示す何らかの耐性遺伝子が存在するものと推測し、この遺伝子を単離・同定し、植物に導入して病害抵抗性を付与するアイデアを得た。

そこで、タバコ野火病菌の染色体DNAを制限酵素で切断し、ベクターに連結後、大腸菌に形質転換をしてタバトキシン含有最少培地で選抜し、耐性株を得た。これら耐性株のプラスミッドDNAの機能解析により、タバトキシンのアセチル化酵素を支配する遺伝子を含むDNA断片が検出された。さらにDNA解析を進めたところ、この遺伝子DNAは531ヌクレオチドからなり、その産物は177個のアミノ酸残基よりなる分子量約19,200のたんぱく質であると推定された。

このように病原菌自体が自己の生産する毒素に対して不活化酵素を有している可能性があり、生産菌自体に毒素不活化遺伝子を求めることは遺伝子探索の一つの近道であると思われる。また、病原菌自体から目的の遺伝子が単離できない場合、とくに宿主特異的毒素のような場合には生産菌以外の生物から解毒酵素あるいは遺伝子を探索することも可能であろう。

### 5. 毒素耐性および病害抵抗性形質転換植物

クローニングされたタバトキシン不活化酵素遺伝子(ttrと呼ぶ)は、植物発現ベクターのカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター下流に結合し *Agrobacterium* を介して、リーフ・ディスク法によりタバコに導入した。分化した幼植物体が目的遺伝子を発現しているかどうかを見るために、形質転換タバコの葉片をタバトキシン含有培地に置床してカルス形成で検定したところ、試験した15株中からタバトキシンで枯死せず、毒素耐性を示す12株が得られた。

さらに、これらの5株について野火病に対する抵抗性を検討した。タバコ野火病菌( $10^7$ 細胞/ml)を形質転換および対照タバコに付傷接種し、多湿箱内、25°C照明下で発病させ

ると、約1週間後、対照タバコではタバコ野火病に特徴的な黄色病斑が見事に形成されたが、供試した形質転換タバコの全てにおいて、接種部位における黄色病斑の形成は全く認められなかった(口絵)。つまり、タバコ野火病菌の生産する毒素に対し解毒能力を有する形質転換タバコは、タバトキシン耐性ばかりでなく、タバコ野火病菌に対しても病害抵抗性を示すことが明らかとなった。

## 6. おわりに

遺伝子工学的手法を用いて、これまで除草剤耐性、植物ウイルス病抵抗性、害虫抵抗性など数々の形質転換植物が作出されているが、植物細菌病や糸状菌病に対する抵抗性植物の創製に成功した例は見当たらない。

上述した病原菌の生産する毒素を分解あるいは不活化して病害を防除する手法は、これまでの病害制御剤や病害抵抗性品種の育種では見られない全く新しい戦略である。しかも、それぞれの病原菌に応じた解毒酵素遺伝子がクローニングできるならば、毒素が主要因となる植物細菌病および糸状菌病に対して広く応用することが可能であろう。

実際、この手法は毒素を解毒する単一酵素

遺伝子の導入により比較的簡単に抵抗性を付与することができるため、今後の抵抗性品種の育種にはかなり有望な方法であると思われる。その際、いかに農業上有効な手段であっても、その商品が経済的採算性に合わない場合には、企業的研究努力にあまり期待することはできない。とくに、市場性の少ない植物体の開発では、国公立の研究機関が積極的に研究の推進をはかり、農業への応用をはかることが必要であろう。

今後、この手法が農業上重要な多くの植物病害に適用されることにより、植物病害防除の基礎的知見の発展に役立つとともに、病害抵抗性植物の育種がますます進展することを期待する。

## 文 献

- 1) Anzai, H., K. Yoneyama and I. Yamaguchi (1989) *Mol. Gen. genet.* 219: 492-494
- 2) 米山勝美・安西弘行 (1989) 植物防疫43: 635-638
- 3) Stewart, W.W. (1971) *Nature* 229: 174-178
- 4) Sinden, L.S. and D.R. Durbin (1968) *Nature* 219: 379-380
- 5) Kumada, Y., H. Anzai, E. Takano, T. Murakami, O. Hara, R. Itoh, S. Imai, A. Satoh and K. Nagaoka (1988) *J. Antibiot.* 41: 1838-1845

### 国内情報

## 遺伝子組換えによる酵素ルシフェラーゼの生産とその応用

キッコーマン(株) 研究本部

中野 衛一

### 1. ルシフェラーゼ

ホタルをはじめとして、オワンクラゲや発光細菌など、光を発する生物は少ない。発光に関与する酵素は一般にルシフェラーゼと呼ばれているが、発光のメカニズムは一種類ではなく、生物種により異っているので、ル

シフェラーゼにもまた、いくつかのタイプが存在する。

発光に関与するもう一つの重要な物質は、ルシフェリンと呼ばれる化合物である。ホタルのルシフェリンは図1に示される構造をもち、種々のホタルやヒカリコメツキといった発光性昆虫に共通である。一方、ルシフェラーゼの方もこれら昆虫で類似性が示唆され、

例えば、北米産ホタル (*Photinus pyralis*) のルシフェラーゼに対する抗体は、別のホタルやヒカリコメツキのルシフェラーゼと交叉反応をすることが知られている<sup>1)</sup>。

ホタルの発光には、ルシフェラーゼとルシフェリンの他に、ATPと酸素が必要とされ、 $\text{ルシフェリン} + \text{ATP} + \text{O}_2 \rightarrow \text{オキシルシフェリン} + \text{CO}_2 + \text{AMP} + \text{PPi}$  の反応の際に光が発せられる。反応にATPが要求されることが、他の発光生物には見られない特徴であり、故に、ホタルのルシフェラーゼはATPの高感度測定に不可欠となっている。近年、ホタルルシフェラーゼの利用は単なるATPの定量にとどまらず、幅広い用途が考え出されており、北米産ホタルを出発材料とする従来の製造法では、その安定供給には限界があるとうと考えられていた。

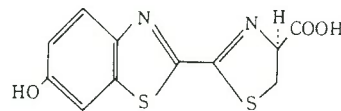


図1 ルシフェリン

筆者らはホタル由来のルシフェラーゼを大腸菌を用いて生産することを計画し、1985年秋頃より研究を開始した。我が国で最も一般的なホタルであるゲンジボタル (*Luciola cruciata*) に狙いを定め、ルシフェラーゼ遺伝子のクローニングを行った訳であるが、その経緯<sup>2)</sup> および詳細<sup>3)</sup> については既報を参照していただき、本稿では主として、ルシフェラーゼの生産と利用の面より紹介したい。

## 2. ゲンジボタルのルシフェラーゼ

ホタルは世界に2千種前後生息するといわれているが、そのほとんどは陸生である。これに対し、日本の代表的なホタルであるゲンジボタルやヘイケボタルの幼虫は水中生活をし、ホタルの中では少数派に属している。

陸生ホタルである北米産ホタルのルシフェラーゼについては、だいぶ前からカリホルニア大 DeLuca らのグループで研究が続けられていたが、ゲンジボタルなど水生ホタルのルシフェラーゼについては、ほとんど何もわか

っていなかった。そこでまず、ゲンジボタルの発光器より mRNA を調製し、ルシフェラーゼ cDNA をクローニングした<sup>4)</sup>。得られた cDNA の解析より、全長は 1993bp で、その中に 1644bp のオープンリーディングフレーム (ORF) が含まれていることがわかった。この結果より、ゲンジボタルのルシフェラーゼは 548 アミノ酸残基よりなる分子量 6 万のたんぱく質と推定された。

予想はされていたが、北米産ホタルの方がやや先行し、そのルシフェラーゼの配列は少し前 DeLuca らにより発表されていた<sup>4)</sup>。それによると、北米産の場合 550 アミノ酸残基からなる分子量 6 万 1 千の酵素で、ゲンジボタルとは二つのアミノ酸残基分の大きさの違いがあるだけである。また、両者のアミノ酸配列を比較してみると、驚くほど一致する部分が多く、相同性は 67% と計算された。

そこで更に、同じ水生であるヘイケボタル (*Luciola lateralis*) のルシフェラーゼについて調べてみた。その結果、ヘイケボタルルシフェラーゼもまた 548 アミノ酸からなっていて、ゲンジとヘイケでは実に 94% の相同性があることがわかった<sup>5)</sup>。

面白いことに、ホタルから精製した酵素の諸性質を調べてみると、ゲンジボタルの酵素はむしろ北米産ホタルのものと良く似ていた<sup>6)</sup>。ヘイケボタルのルシフェラーゼは、熱安定性においてゲンジボタルや北米産のものよりやや優れているのである<sup>5)</sup>。

## 3. ゲンジボタルルシフェラーゼの大量生産

動物由来のたんぱく質を大腸菌等で生産しようとする場合、目的のたんぱくが菌体内で凝集体を形成し不活性となる場合がしばしばある。そのような場合、精製工程に加え、活性化のための複雑な工程が必要なので、工業化は困難となる。

ゲンジボタルルシフェラーゼ cDNA を大腸菌 pUC 系プラスミドで発現させてみたところ、幸いなことに、活性をもつルシフェラーゼが生産されていることがわかった。例えば、組換え体大腸菌をメンブランフィルター



上に生育させ、それをルシフェリン溶液に浸すと、組換え体の存在する部分が光を発生（口絵）、活性型ルシフェラーゼの存在を直接目で確かめることも可能である。

このプラスミドベクターを用いた組換え体の生産するルシフェラーゼの量は、しかしながら、あまり多くはなく、しかも生産量の大幅な変動がしばしば見られた。発現量を高めるようプラスミドを更に改変すると、そのプラスミドの安定性が極度に低下してしまい、生産物ルシフェラーゼが宿主に何らかの悪影響を与えている様子である。

ほとんどの場合、組換え体で生産しようとするたんぱく質は宿主にとって全く役に立たないものなので、程度の差はあるが、宿主の生育に悪影響を及ぼすこととなる。したがって、生産量を高めようとするほど、菌株が不安定になってしまうのである。

この問題を解決すべく、筆者らは既にスリーパーベクターというメジャー由来の工業用ベクターを開発している<sup>7)</sup>。スリーパーベクターを用いると、ターゲット遺伝子は宿主染色体に組み込まれ、プラスミドのように脱落する心配は全くなくなる。コピー数は染色体と同じなので、ターゲット遺伝子の発現を完全に制御でき、普段生産物はほとんど作られない。生産は組換え体を42°Cで20分ぐらい培養すると開始される。その際、ターゲット遺伝子は宿主染色体より切り出されて自己増殖し、500~1000倍のコピー数となり、それにもなって目的の産物が大量生産されるのである。

スリーパーの系で数種の酵素の工業生産に成功しているが、動物由来の酵素ではルシフェラーゼが最初のケースであった。プラスミド上のルシフェラーゼ遺伝子部分をスリーパーに乗せ組換え体大腸菌を作製してみると、予想通り大量のルシフェラーゼが安定的に生産された。生産量はプラスミドを用いた場合の約100倍程度となり、ここにルシフェラーゼの大量供給が可能となったのである。

#### 4. ホタルルシフェラーゼの利用

ホタルルシフェラーゼの利用はおおよそ3分野に大別される。まず第1はATPの測定とその応用分野、第2は放射性物質に代るマーカーとしての利用、そして第3に光そのものをイベントやレジャーで使用するなどであろう。

第1の分野では既に利用が行われており、今後も着実に需要が増えるものと考えられている。ATPの測定は高感度( $10^{-12}$ M)広測定域(3~6桁)で行なえるため、単にATPの定量のみならず、ATPの生成/消費を伴う各種酵素反応の鋭敏な検出系として、あるいは微量の生体内ATPを検出して細菌数などのリアルタイムな測定用にと、幅広い応用分野がある。特に汚染微生物の測定は、生産・流通の各段階で実に多くの潜在需要があるものと予想される。ここで普及のネックとなっている問題点の一つは測定機器と測定用キットが比較的高価なことであるが、ルシフェラーゼの大量生産法の確立によりキットの大量供給が可能となったので、今後需要が増えるに伴い急速にコストダウンが可能となると思われる。もう一つの問題は測定の対象によって若干の工夫が必要なことである。例えば、牛乳中の微生物数の測定には工業用水中の微生物の測定法をそのまま適用できず、それに合ったサンプルの前処理が必要なのである。製造工程などは公にできない場合が多く、どうしても利用する現場で前処理法を開発しなければならない、普及のネックとなる。

第2の分野ではレポーター遺伝子としての利用が有名であるが、酵素免疫測定法やDNAプローブ法への適用も考えられ開発が進められている。第3については今後の研究開発に待つべき点が多いが、アイデア次第では面白い展開が期待できよう。

#### 5. ホタルルシフェラーゼの人工変異

近年酵素などたんぱく質を人工変異し、その性質を改善しようという試みが盛んに行な



われ、たんぱく質工学という分野が生まれて  
いる。微生物由来の酵素などをターゲットと  
した場合、せっかく苦勞して優れた変異体  
をつくり出しても、自然界からのスクリー  
ニングによりそれを超える酵素がすぐに発見  
されるかもしれないという不安が常にある。

その点、ホタルのように特定の動物のみが  
持つ酵素の場合、その性質の改良にこの研  
究手段は極めて有効であろう。筆者らは現  
在までにゲンジボタルルシフェラーゼの人工  
変異体をいくつか得ているが、その内容に  
ついては別の機会に発表することとしたい。

## 文 献

- 1) Wienhausen, G. and M. DeLuca (1985) *Photochem. Photobiol.* 42: 609-611
- 2) 中野衛一 (1988) バイオサイエスとインダストリー 46: 3190-3192
- 3) Masuda, T., H. Tatsumi and E. Nakano (1989) *Gene* 77: 265-270
- 4) De Wet, J. R., K.V. Wood, M. DeLuca, D.R. Helinski and S. Subramani (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7: 725-737
- 5) 梶山直樹・辰巳宏樹・中野衛一 (1990) 日本農芸化学会 1990年度大会講演要旨, p202
- 6) 梶山直樹・増田力・辰巳宏樹・中野衛一 (1988) 日本農芸化学会 昭和63年度大会講演要旨, p.316
- 7) 中野衛一 (1987) 蛋白質・核酸・酵素 32: 1133-1140

### 国内情報

## 低アミロース, 高アミロペクチン 小麦品種とめん適性

農林水産省 農業研究センター 小麦育種研究室

黒田 晃\*

### 1. はじめに

日本の小麦は、その中庸なたんぱく含量から主にめん用として利用されてきた。小麦のめん適性は、最終的には官能試験によって評価され、現在は昭和60年に国産小麦品質評価法研究会によって標準化された試験方法が用いられている。めんの官能試験の評価項目は、めんの外観、色、食感など6項目からなり、100点満点で採点される。中でもめんの食感中の粘弾性（めんのもちもち感を言う）は25点という高い配点となっている重要な項目である。このことはもち性やねばりのある食品を好む日本人の嗜好性の中で、めんのテクスチャーにおいてもその例外ではないことを示している。

日本は小麦の消費量の約80%を輸入に頼っているが、その多くは国内産小麦を利用し難

いパン等の用途である。ところがオーストラリア産小麦銘柄 ASW は、めん適性の評価が高く、めん用として国内産小麦と混合して利用されている。ASW の特長としてめんの粘弾性が優れており、このことが高い評価を得ている理由の一つと考えられる。

### 2. めん適性の向上と品質育種

国内産小麦の品質の向上が急がれるなかで、新品種の育成においては、品質を第一とした系統の選抜・評価を行っていく必要がある。めん適性の向上を目指すなかで、めんの粘弾性の改良は大きな目標の一つであるが、めんの官能試験は製めん、ゆでめんなど試験を行うまでの準備に多大の労力と時間を要し、試験点数が限られるほか、試料として小麦粉数百gを要することなど育種の初期世代の選抜技術としては適当でない。そこで育種への応



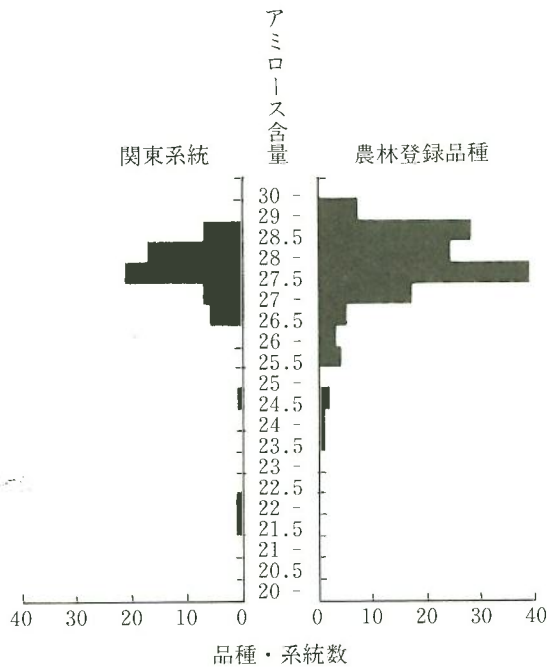


図2 小麦農林登録品種・関東系統のアミロース含量の分布

とその父本の関東79号の2系統が見い出された。また農林67号、チホクコムギ、関東51号など両者の中間程度のやや低いアミロース含量を示すグループが認められ、農林登録品種、関東系統のいずれもアミロース含量において三つのグループに分けることができた。

アミロース含量の明らかに異なる関東107号と関東地方の代表的品種農林61号のでんぷんの熱糊化特性を明らかにするためにでんぷんビスコグラフを行なった。その結果を図3に示す。この2品種・系統間のでんぷんビスコ

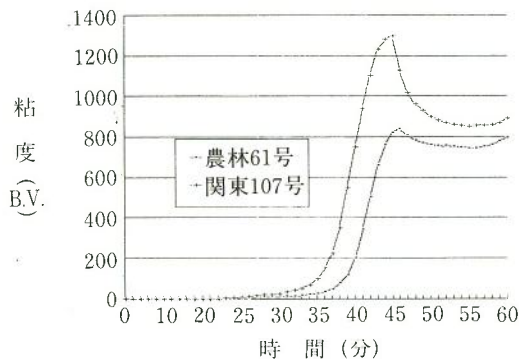


図3 関東107号と農林61号のでんぷんビスコグラム

グラムには、糊化開始温度、最高粘度、ブレークダウンに明らかな違いが認められ、でんぷんの熱糊化特性が異なることがわかった。関東107号は農林61号に比べて糊化がより低い温度から始まり、最高粘度が極めて高く、またブレークダウンも大きいという特長を示した。

## 6. おわりに

上記のように最も低アミロースであった二つの関東系統が親子であること、関東107号を交配母本に用いた後代の系統から同様の低アミロース系統が得られていることなどから、この低アミロース性は遺伝的特性と考えられる。現在、関東107号の諸特性をより改善する目的で、これを交配母本に用いた育成系統を養成し、収穫から播種までの間にアミロース含量の検定を行い、低アミロース系統の育成に努めている。また広く海外の遺伝資源についてアミロース含量の変異を明らかにするとともに、その遺伝様式を解明するため研究を続けている。まためん粘弾性はアミロース含量だけで全てを説明できるものではないと考えられており、他の構成成分の影響と育種における選抜への導入の可能性についても検討を進めている。

文末であるが、小麦育成系統の品質評価にあたり製めん官能試験に御協力いただいている製粉協会製粉研究所 渡辺修所長、オートアナライザー使用にあたり御助言をいただいた北海道立上川農業試験場土壌肥料科 稲津脩科長に厚くお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 農林水産省食品総合研究所 (1985) 小麦の品質評価法—官能検査によるめん適性 pp. 1-8
- 2) Oda, M. et al (1980) *Cereal Chem.* 57(4): 253-254
- 3) 黒田晃・小田俊介・宮川三郎・瀬古秀文(1989) 育種 39 (別2): 142-143

\* : 現 石川県農業総合試験場 畑作特産科

文献情報

エイズウイルス(HIV-1)に対する治療薬になる可能性を秘めたライボザイム

RNAには様々な機能を担ったものがあるがライボザイムは酵素活性を持ったRNAで、相補的な結合によって標的となるRNAの特定の塩基配列を認識して切断する。この反応は、1本のRNA鎖が特定の部分で自己のRNA鎖を切断する反応として、まず植物RNAウイルスの遺伝子から発見され、その後、脊椎動物にまでその存在が知られるに至った。この文献は、ライボザイムがエイズウイルス(HIV-1)に対する治療に使用できる可能性があることを示したものである。最近、標的遺伝子の塩基配列に相補的なRNA(アンチセンスRNA)を細胞内に取り込ませてその遺伝子の発現を抑える手法が用いられるようになり、治療にも応用しようという試みも行われている。この論文は、これを更に一歩進めたものである。

アンチセンスRNAは遺伝子の発現を抑えるので、抗ウイルス、抗癌剤として使用しうることが明らかになったが、発現阻止のための量的問題などによる制約がある。もしライボザイムを用いれば、標的のRNAと相補的に結合するだけでなく消化切断することができるので、ライボザイムを消費せずに多量の標的RNAを処理することができる。自己切断反応の中間体の構造としてハンマーヘッド型とヘアピン型が知られている。このうちハンマーヘッド型グループは構造がよく似ており、活性中心に、13塩基が保存された5' GAAAC(N)n GUN(N)n CUGA(N)GA 3' [N=G, C, U, A] という配列があり、3方に枝別れした構造をとっている(図1)。このうちRNAの切断はGUX[X=C, U, A]の部分で起こる。この構造は2本のRNA鎖に分かれていてもよく、この場合、一方が触媒、GUX配列のある方が基質になる。そこで著者らはライボザイムをHIV-1に対する治療に利用す

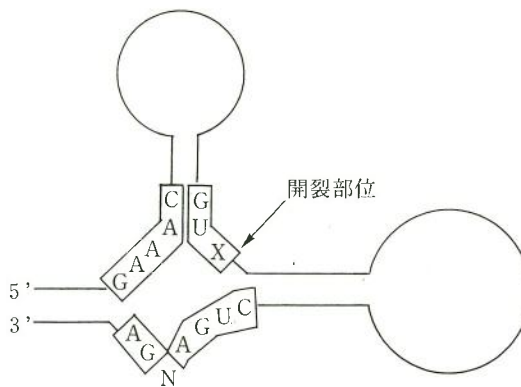


図1 ハンマーヘッド型グループの活性中心の構造

るために、細胞内でも安定で、HIV-1 RNAを切断するようなハンマーヘッド構造を設計した。もしライボザイムがHIV-1のgag遺伝子RNAを標的にして切断すると、gag遺伝子由来のp24抗原が減少するはずである。ライボザイムとして図2のAとBの2種類のデザインを考えた。どちらの場合も活性中心

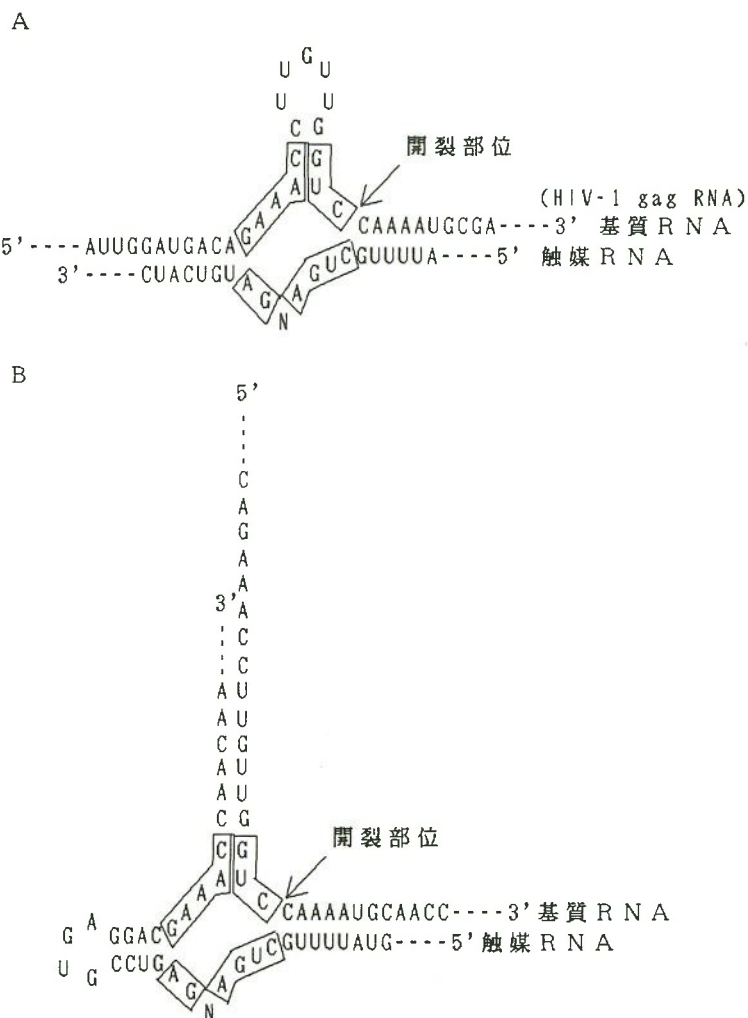


図2 HIV-1RNA切断用ライボザイムの構造



の他に、基質となる RNA と結合して安定なハンマーヘッドを形成するような相補的塩基配列が付けてある。このデザインにそって構築した DNA から T7 RNA ポリメラーゼによって合成した RNA を用いて反応を行ったところ、Bの方が効率は良かったがどちらも基質 RNA を切断した。開裂したフラグメントの塩基配列を調べたところ、予想どおりの位置で開裂が起っていた。また、細胞内では触媒 RNA の 5' 末端に GpppG というキャップ構造が付いているので、その影響を調べるためキャップの付いたものと付かないものとを比較したが、反応は同じように進んだ。触媒 A に比べて B の方が効率が良かったのは四つの部分に分かれて保存されている塩基配列のうち三つが 1 本の鎖に集まっているためではないかと考えられる。

ライボザイムが治療に使えるかどうかは触媒 RNA が細胞内の複雑な環境下でも機能を発揮できるかどうかにかかっている。そこで抗 gag 触媒遺伝子をヒト細胞用発現ベクターに組み込み、CD4<sup>+</sup>HeLa 細胞にトランスフェクトし、ライボザイムを生産しているクローンを選択した。次に、この細胞に HIV-1 を感染させ、7 日後に PCR 法を用いて結果を判定したところ、gag mRNA が切断されているだけでなく、侵入してきたウイルス粒子由来の RNA も切断されていることがわかった。感染 7 日後の細胞中にある可溶性 p24 抗原を定量したところ、触媒 RNA 発現細胞では 0.14~0.23ng/ml だったのに対し、非発現細胞では 10ng/ml 以上だった。また、細胞中の HIV-1 proviral DNA 量 (HIV は RNA ウイルスだが、遺伝子は細胞内で一旦 DNA に読み換えられ、細胞の染色体に組み込まれる。これを proviral DNA と言う。この DNA からウイルス由来の mRNA が作られる) も発現細胞では非発現細胞の 100 分の 1 であった。この結果も侵入してきたウイルス由来の RNA が切断されることを示唆している。

触媒 RNA の毒性を調べるため、発現細胞と非発現細胞の生存率、細胞付着性、倍化時間を比較したが差は認められなかった。RNA, DNA の含有量や形態上の変化もなかった。

また発現細胞を 9 か月間培養したが、細胞毒性を示す兆候を示さなかった。

この実験結果から、生物学的に活性のある触媒 RNA が細胞毒性を示すことなく安定して発現し、ウイルスの gag mRNA, proviral DNA, p24 抗原の減少をもたらしていることが明らかになった。

HIV-1 に対する治療法で問題になるのはこのウイルスが大変変異しやすいことであるので、この点も考慮する必要がある。遺伝子発現の阻害剤としてオリゴヌクレオチドを用いた研究によって、翻訳開始コドン、スプライシングサイトなど高度に塩基配列の保存されている部位を標的にした方が結合しやすいことが示されている。これらの部位や *tat*, *rev* 等のウイルス遺伝子発現制御因子の結合部位など変異に非常に感受性の高い部位が触媒 RNA の標的として理論上適している。あるいは、一つの遺伝子に対して複数のライボザイムを用いることによって確実性を高めることもできる。したがって、ライボザイムはまったく新しい抗 HIV-1 治療薬になる可能性がある。

著者らは「ひとたび遺伝子療法と組み合わせればライボザイムの治療薬としての全ての可能性を実現することができよう」と結んでいる。実用に供するまでにはいかに目的の細胞にライボザイム遺伝子を入れ込むかといった問題があり、まだ越えねばならない山は大きい。ライボザイムは病気の治療ばかりでなく様々な遺伝子産物の *in vivo* での機能解析に威力を発揮しそうである。

(抄訳 犬丸茂樹——家畜衛試)

### Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents

Sarver, N., E.M. Cantin, P. S. Chang, J.A. Zaia, P.A. Ladne, D.A. Stephens and J.J. Rossi  
*Science* 247:1222-1225(1990)

## 文献情報

新たな  $\gamma\delta$  型 T 細胞  
の発見

Tリンパ球は抗原特異的免疫応答において中心的役割を持つ細胞である。ほとんどすべての免疫応答は、T細胞による標的抗原の認識によって開始される。この抗原認識はT細胞表面上の膜たんぱく質複合体であるT細胞リセプター(TCR)を介して行なわれる。TCRを構成する2本のポリペプチド、 $\alpha$ および $\beta$ 鎖の遺伝子がクローニングされ、その構造が明らかにされたのは1984年のことであった。

ところが1986年になって、 $\alpha$ および $\beta$ 鎖とは異なるポリペプチド、 $\gamma$ および $\delta$ 鎖からなるTCRを持つT細胞( $\gamma\delta$ 型T細胞)が存在することが示され、それ以降この細胞の性状・機能に関する研究が世界中のグループによって精力的に進められている。それは $\gamma\delta$ 型T細胞が従来型のT細胞( $\alpha\beta$ 型T細胞)と共通した諸形質をもつ一方、後に述べるようにいくつかの点で $\alpha\beta$ 型T細胞と異なるユニークな性質をもっており、この細胞が免疫系において重要かつ固有の働きをもっていることが予想されるからである。実際にこれまでも $\gamma\delta$ 型T細胞がある種の細菌感染に対する免疫応答や自己免疫疾患に関与することを示唆するデータが報告されており、 $\gamma\delta$ 型T細胞の研究が新たな免疫応答経路の発見につながることを期待されている。

最初にクローニングされたTCR $\gamma$ 鎖の遺伝子はマウス由来のものであったが、マウスにおける $\gamma\delta$ 型T細胞の性状・組織内分布に関する研究はこれまで遅れていた。その理由は、マウスの $\gamma\delta$ 型T細胞を検出するための抗体が得られなかったことによる。その抗体(抗 $\gamma\delta$  TCRモノクローナル抗体)が最近MITの利根川教授のグループによって作成され、これによってマウスにおける $\gamma\delta$ 型T細胞の動態・組織内分布の全体像が急速に明

らかにされつつある。

ここで紹介する論文においては、上記の抗体を用いての皮膚・小腸上皮・子宮粘膜上皮等の上皮組織中における $\gamma\delta$ 型T細胞についての組織学的検索結果が報告されている。その中でも、子宮・膈・舌の粘膜上皮中に存在する $\gamma\delta$ 型T細胞の発見とその性状の解明が特筆される。

これまでも皮膚や小腸上皮内に $\gamma\delta$ 型T細胞が存在することが間接的に示されていたが、今回の研究により、これら皮膚・小腸上皮内の $\gamma\delta$ 型T細胞の分布の全体像が明らかにされたばかりでなく、子宮・膈粘膜等の中の $\gamma\delta$ 型T細胞の存在が示された。このことは、外界あるいは体腔に接している上皮組織のほとんどすべてに $\gamma\delta$ 型T細胞が存在することを意味し、 $\gamma\delta$ 型T細胞の生理的機能との関連から言えば、この細胞が体表から侵入する病原体に対する第一線の防御反応を担っているとの仮説を支持する。

彼らは更に、子宮・膈内に存在する $\gamma\delta$ 型T細胞の性状・起源を明らかにするために、この細胞が持つTCR $\gamma$ 鎖遺伝子の塩基配列をPCR(ポリメラーゼ・チェーン・リアクション)法で検索した。TCRの各たんぱく質鎖( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ )はそれぞれ可変部と不変部と呼ばれる領域からなっている。このうち可変部領域はTCRが抗原を認識する際の特异性を担っている領域であり、そのアミノ酸配列、したがってその遺伝子の塩基配列は各T細胞(集団)によって異なっている。したがってこの領域の配列を調べることにより、それぞれのT細胞集団間の関係を推定できる。子宮・膈内の $\gamma\delta$ 型T細胞が持つTCR遺伝子塩基配列の分析結果により次の二点が明らかとなった。第一は、このT細胞集団が持つTCR可変部領域の配列が集団内で均一であることである。この点は、 $\alpha\beta$ 型T細胞あるいは成熟胸腺内の $\gamma\delta$ 型T細胞と大きく異なっている点であり、子宮・膈内 $\gamma\delta$ 型T細胞がある特定の抗原(自己抗原?)を認識することにより、その生理的機能を発揮するものであることを示唆している。第二に、このT細胞が持つTCRの配列は成熟マウス胸腺内の

$\gamma\delta$ 型T細胞や皮膚・小腸上皮の $\gamma\delta$ 型T細胞のものとは異なっており、胎生後期の胸腺に一過性に出現する $\gamma\delta$ 型T細胞のものと一致していることである。このことから、子宮・膈内の $\gamma\delta$ 型T細胞が、成熟期胸腺や皮膚・小腸上皮内の $\gamma\delta$ 型T細胞とは独立した細胞集団であり、胎生後期胸腺に一過性に現われるT細胞を起源とすることが示された。

以上の結果は $\gamma\delta$ 型T細胞の生理的機能に関する今後の研究にとって重要な基礎的知見となるものである。

$\gamma\delta$ 型T細胞の生理的機能と関連して興味深いのは、この細胞の存在比率がマウス・ヒトでは低い(末梢血T細胞の数~10数%)のに対し、ウシ・ニワトリなど家畜では高い(同30~40%)ことである。したがって、 $\gamma\delta$ 型T細胞の機能を知るためにこれら家畜は絶好の系といえ、その研究の進展が望まれる。

最後に、ここで紹介した研究を中心的にすすめている糸原重美氏は農水省家畜衛生試験場から利根川研究室に留学中の若手研究者であることを記しておきたい。

(抄訳：桜井通陽——家畜衛試)

### Homing of a $\gamma\delta$ thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia

Itohara, S., A.G. Farr, J.J. Lafaille, M. Bonneville, Y. Takagaki, W. Haas and S. Tonegawa

*Nature* 343 : 754-757 (1990)

#### 文献情報

### 酵母における人プロインシュリンの生産

大腸菌を異種たんぱく質の生産に使用した場合、強力なプロモータと菌体内でのたんぱく質分解を防止するための *lon* 欠損株の使用により、多量に生産することは可能である。しかし、多くは inclusion body と呼ばれる

たんぱく質塊を形成し、生理活性を保ったたんぱく質を生産した例は少なく、さらに菌体内のたんぱく質を精製するには大腸菌の細胞毒素を除くという困難な操作が必要となる。一方、分泌ベクターを使用する生産試験では、ラットのプレプロインシュリンと $\beta$ -ラクタマーゼのプロモータ・シグナル融合遺伝子の発現で菌体内に生産された場合より10倍以上長い半減期を持つプロインシュリンの生産が認められたが、菌体外へ生産される量は細胞質に蓄積される量に比べかなり少ない。

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は遺伝学的な知識の蓄積が多く、さらに潜在的な毒性が無いことが知られているため、遺伝子操作による多くの異種たんぱく質の発現用に宿主として使用され、巨大スケールでの発酵試験も行なわれている。プロインシュリン (PI) もしくはその類似物の生産は1984年より酵母の性フェロモンである $\alpha$ 因子の分泌系を利用した分泌たんぱく質としての生産が試みられてきた。分泌過程で作用する KEX 2 プロテアーゼ (塩基性アミノ酸残基が二つ重なる部分を認識する) の作用を受ける PI ではこの作用により完全な形での分泌物はわずかしか生産されていない。一方、認識部位を除いた PI 類似物では高収率で生産されることから、インシュリン生産のための前駆体生産に関してはこの $\alpha$ 因子分泌系は適しているが、PI 生産に関しては不向きであることが示された。さらに改良された方法でも分泌するまでの分解等により低収量 (せいぜい数十 mg / l) にとどまった。また、galactokinase-proinsulin 融合たんぱく質による菌体内生成でも収量はほとんど高くならなかった。

そこで酵母菌体内で高発現するヒト過酸化分解酵素 (SOD) と PI との融合たんぱく質 (SOD-PI) を生産させることについて検討が加えられた。この両たんぱく質の架橋部分はシアノゲンプロマイドで分解できるメチオニングループを使用し、メチオニン残基を含まない PI を化学処理の後簡単に精製することが可能な系を開発した。さらに ADH 2-GAPDH (アルコール脱水素酵素とグリセロールデヒド-3-リン酸脱水素酵素) の融合プロ

モータを利用し、ぶどう糖存在の有無により発現制御することで、菌体増殖時の SOD-PI 発現の弊害をなくすように作成したベクター pYASI 1 (ADH 2-GARDH-SOD-PI 融合遺伝子と選択標識として LEU 2 遺伝子を持つ) を使用し、その形質転換体の 200 l スケールでの PI 生産の条件について検討を加えられた。

選択圧のない状態で 200 l の発酵スケールまで菌体が増殖するまで約 60 世代の分裂が必要であり、この間 PI 遺伝子の発現能力が保持される必要がある。これを満足させる培養培地条件等が検討され、通気条件下で通常の栄養培地 (1% 酵母エキスと 2% Bactopeptone, 発現抑制用の炭素源として 3% ぶどう糖を使用) を使用することにより可能であることが示された。また、SOD-PI 発現条件下ではこのベクターの安定性が極端に (数世代で脱落してしまう) 低下することもわかった。

バッチ式の発酵試験ではぶどう糖量を 5% まであげ、30°C で行うことにより、700mg SOD-PI/l の収量をあげることができたが、ぶどう糖量をさらにあげると収量が落ちることがわかった。そこで 30°C でぶどう糖を 1.5 g/l/h で 40 時間添加で菌体をほぼ定常期まで増殖させた後、ADH2-GARDH プロモータが働くエタノールを 1g/l/h で 24 時間添加に切り替える fed-batch 式の試験で 1.2 g/l の収量にあげることができ、さらに試験温度を 26°C に下げることにより収量の増加が期待できた。この条件下で 200 l の fed-batch 式の発酵試験を行なったところ、1.5g/l の融合たんぱく質が回収でき、この差は菌体内での分解によるロスが発酵温度低下により抑制されたためであろうと考えられた。

なお、菌体当たりでの SOD-PI たんぱく質の生成量はバッチ法が 13mg/l/OD と高かったが、菌体量が 55~60OD (1OD は 0.25g cell dry weight/l) と低いため、ぶどう糖・エタノール切り替えの fed-batch 法における 8~11mg/l/OD, 150 OD と比較して、菌体量が 3 倍近く上昇し、総生産量では最高値を示すこととなった。

このように得られた SOD 融合たんぱく質

は化学処理により、容易に回収することが可能であった。以上、PI の酵母による産業的にも利用し得る発酵系について紹介した。

(抄訳 後藤邦康——国税庁醸造試験所)

### A process for the production of human proinsulin in *Saccharomyces cerevisiae*

Tottrup H.V. and S. Carlsen

*Biotechnology and Bioengineering* 35 : 339-348 (1990)

#### 文献情報

### トウモロコシの形質転換の新しい視覚的マーカーとして使える調節遺伝子とは？

トウモロコシ中のアントシアニン色素生成がどこで、あるいはいつ起こるかということは、転写活性化因子とされている R たんぱくの生産に支配されている。現在まで、R 遺伝子で決定される 50 の異なった着色パターンが報告されている。ここでは、プロモーターにつながれた転写ユニット (R 遺伝子の一つである Lc 遺伝子由来) を含むベクターをトウモロコシ細胞に導入するため、パーティクルガンを用いた。このキメラ遺伝子は、通常、Lc 遺伝子だけでは色素生成が誘導されない細胞に自律的な色素生成を誘導する。パーティクルガンでこの DNA を撃ち込んだ後、組織中の着色した細胞数を数えることにより遺伝子発現量を知ることができるため、この R 遺伝子はトウモロコシにおける遺伝子発現の研究においてレポーター遺伝子として有用なものである。R 遺伝子はまた形質転換植物体を得るための安定的な形質転換細胞株を選択するための視覚マーカーとしても有用である。以下内容を説明する。

トウモロコシは、アントシアニン色素を集積できる能力をもっている。植物中の色素生成は、少なくとも 10 の遺伝子に支配されていて、アントシアニン生合成系での調節および構造たんぱく質をコードしている。R 遺伝子群は、



トウモロコシの植物体と種子でのアントシアニン生成量、局在場所、タイミングを決定しているものと考えられる。穀粒頂部の着色を担っている R-nj 遺伝子は、トランスポザブル因子 Ac による Tagging で、クローン化された。そして、本遺伝子は他の三つの R 遺伝子、P, S, Lc (異なった着色パターンを表現する遺伝子) と相同であることが見いだされた。R-nj と Lc との相同性から、Lc 全部の cDNA のクローニングができた。この cDNA でコードされているたんぱく質は転写活性化因子と DNA 結合たんぱく質という特徴を持つ。これらのことから、著者らは、異なる R 遺伝子によるアントシアニン色素の着色パターンの違いは、R 遺伝子の転写、翻訳産物ではなく、むしろ、R 遺伝子のプロモーターの違いを反映していると考えた。

この仮説を証明するため、R 遺伝子発現解析のための *in vivo* アッセイ系で、パーティクルガンを用いて、カリフラワーモザイクウイルスから得たプロモーターを結合した完全な Lc たんぱくコード領域を組み込んだベクター pPHI443 をコートした微粒子をトウモロコシ穀粒に撃ち込んだ。撃ち込んでから 14~36 時間で糊粉層に着色細胞が検出された。pPHI443 DNA がいない場合は機能性 R 遺伝子が欠けているため糊粉層の細胞は着色しなかった。Lc 遺伝子は普通、糊粉層細胞に着色させないので、この実験結果は、複数の R 遺伝子は機能的に相同で、R 遺伝子のプロモーターを交換することで新しい組織に着色を起こさせようという著者らの考えを支持するものである。

導入された R 遺伝子でコードされるたんぱく質が、内生 R 遺伝子の産生たんぱく質に見られるような阻害因子に同様に阻害されるかどうかを調べるため、多種のトウモロコシ組織を pPHI443 とアナログベクターである pPHI459 ( $\beta$ -グルクロニダーゼ GUS がコードされている) のプラスミッドで形質転換した。それぞれのマーカーの表現はあらゆる組織で同時に観察された。pPHI443 導入による細胞の着色はすべての細胞の自律的な表現型を示したが、GUS の組織化学的染色パ

ターンは非自律的であった。細胞の自律的表現の一つの利点は、前述のように着色細胞数を明確にカウントできるということである。すなわち、発芽実生中に見られる赤色細胞数は、撃ち込まれた pPHI443 量をあらわしていることになる。

以上のように、R 遺伝子はトウモロコシの発生生物学や分子遺伝学を研究するうえで有用な適用場面があると考えられる。まず、組織特異的なプロモーターの研究に使える。R 遺伝子の発現による視覚化は複雑な生化学アッセイや高価な組織化学的染色を必要とせず、遺伝子撃ち込み後、14 時間で達成され、多くの細胞で数週間着色は持続する。また、形質転換した植物をそのままの形で確認することができ、異なるプロモーターの作用を Common standard (GUS) で標準化でき、さらに体細胞分裂で安定的に伝わり、種子を介して次代に伝えることも可能である。これからの利点を応用して、今後、遺伝学での展開が大いに期待されると著者らは結んでいる。

(抄訳 前田万里——中国農試)

#### A regulatory gene as a novel visible marker for maize transformation

Ludwig, S.R., B. Bowen, L. Beach and S. R. Wessler

*Science* 247: 449-450 (1990)

#### 文献情報

### 胚性幹細胞に導入した 外来遺伝子の生殖細胞 系への伝達

生物個体の生殖細胞系に外来の遺伝子を導入することは、特定の遺伝子の機能を調べるうえでもっとも有力な方法の一つで、この研究も含めていろいろな角度から研究がすすめられている。

培養細胞の中に外来遺伝子を導入した場合に、外来遺伝子と細胞自体の DNA の間に homologous recombination (相同性の組換

え)が生じて、低率ではあるが特定の染色体座位の遺伝子が導入した遺伝子に取り換えられることが知られている。この研究では、マウスの胚性幹細胞に homologous recombination を利用して他の遺伝子を導入してキメラマウスの作出を試みている。

マウスの胚性幹細胞(embryonic stem cell, 略して ES 細胞)は、着床前の早期胚に由来する多分化能、増殖能をもつ培養系の細胞集団で、これを blastocyst と合体させてキメラマウスに発生させることができる。したがって、必要とする遺伝子を ES 細胞に導入することによりキメラマウスに新しい形質をもちこむことが可能となるわけである。

この研究では、電気融合法によって *c-abl* 遺伝子(オンコジーン)を導入した 129/Sv/Ev 系マウスの XY blastocyst 由来の ES 細胞 CCE 株の 2b1 株を用いて、CD-1, MF1, C57 BL/63 系統のマウスの blastocyst をホストとして注入してキメラマウスを作出した。2b1 株の細胞は、毛色について黒(b), アグウチ(A), そして酵素 GP 1-1° をホモにもち、雄キメラの生殖腺内で高増殖性を示す。マウスの方は、CD-1, MF1 はアルビノ(c), C57 BL/6 は黒(b), 非アグウチ(a)をそれぞれホモにもつので、ES 細胞とのキメラ個体は毛皮に現れる毛色の異なる斑によって容易に検出される。

キメラ胚は、3.5日目の blastocyst をホストにして、ES 細胞を10~15個注入して作出し、胚移植により個体とした。結果は表1にみるように移植にした胚の31~42%が個体となり、キメラはその32~52%であった。キメラマウスの毛皮にみられる ES 細胞のコロニー形成の程度はいろいろで、主としてホスト系統の遺伝的背景に依存していた。ホストが

CD-1系ではコロニー形成が悪く、C57 BL/6 系では良好、MF1 はその中間であった。

次に作出された雄のキメラマウスの生殖腺に導入された ES 細胞が次世代に伝えられているかどうかを調べるために交配試験が行われた。生まれた個体の毛色から ES 細胞を識別できるように、CD-1, MF1 系をホストの blastocyst とした雄キメラにはアルビノ系の雌、C57 BL/6 系由来の雄キメラには(C57 BL/6×DBA/2) F<sub>1</sub> 雌をそれぞれ交配した。

CD-1, MF1 系をホストとした雄キメラについては、それぞれ11頭, 9頭を交配し、1419 (80~180頭/雄), 260 (14~41頭/雄)の個体をとって調査したが、ES細胞由来の個体はえられなかった。

一方、C57 BL/6 系をホストとした雄キメラは、17頭に妊性が認められ、368 (3~79頭/雄)の個体がえられた。17頭中6頭から ES 細胞由来のアグウチ個体が17頭えられた。さらに、その10頭中6頭に、ES 細胞2b1株に存在する突然変異遺伝子(*c-abl* 導入の際に生じた末端部の変異 *c-abl*<sup>m1</sup>) がサザン法による DNA 分析から検出されている。

以上の結果は、キメラ個体の生殖細胞系に ES 細胞を経由して外来遺伝子を入れて発現させる可能性を立証したものである。homologous recombination を利用し遺伝子を導入した ES 細胞からキメラ個体を作成し、その生殖細胞に新しい形質を入れる手法は、新しい形質転換動物作出法として注目されている。畜産領域においても広く関心がよせられ、その応用も検討されている。一方においては、ホストとする blastocyst の遺伝子構成とキメラマウス生殖腺における ES 細胞の分化にみられたように基礎的な部分で未解決の問題も

表1 2b1株の細胞注入によるキメラマウスの作出率

ホストのblastocyst の遺伝子型	移植した blastocyst数	出生個体数 (%)	キメラ個体 (出生個体中の%)	表現型雄の 個体(キメラ個体中の%)
CD-1	156	49 (31)	20 (41)	15 (75)
MF1	189	80 (42)	42 (52.5)	27 (64)
C57BL/6	331	106 (32)	29 (32)	21 (71)

多く、この手法は高等動物の発生分化の研究モデルとしても有用で、期待がよせられている。

(抄訳 村松 晋——畜産試験場)

**Germ-line transmission of a *c-abl* mutation produced by targeted gene disruption in ES cells**

Schwartzberg, P. L., S. P. Goff and E. J. Robertson (1989)

*Science*, 246 : 799~803



国際学会レポート

## 作物と病害虫の相互作用のモデリングに関する 国際研究集会に参加して

農林水産省 農業研究センター 水田病害研究室

小泉 信三

### はじめに

本年1月7日から10日にかけてハワイ大学で「作物と病害虫の相互作用のモデリングに関する国際研究集会」が開かれた。筆者は本研究集会に科学技術庁科学技術振興局の国際研究集会派遣研究員として参加する機会を得たのでその概要を報告したい。

### 集会の目的と参加範囲

本集会は、アメリカ合衆国国際開発庁（USAID）とハワイ大学の共同プロジェクトである農業技術普及のための国際基準位置ネットワーク（IBSNAT）、作物保護のための国際合同体（CICP）およびハワイ大学の植物病理・作物土壌学部の3者により開催された。本集会の目的は、作物の生長に及ぼす病害虫の影響をシミュレートする計算機モデルに関し、その考え方と方法論や情報交換の場を与えること、参加者相互のコンピューター技術の向上をはかること、そして、病害虫が作物に与える影響の数量化に必要な最少データセットを確立し、病害虫の収量に及ぼす影響を研究する国際的な協力網の礎を形成することであった。

本研究集会では主催者側が参加者全員に形式ばらない自由な討論をさせたいという意向のため、参加人数を制限したため、参加した研究者の数は36名と少人数であった。しかし、本研究集会が世界的な観光地であるハワイで開催されたためか、作物と病害虫の相互作用のモデリングに関心を持っている研究者が世界各国にいるためか参加人数の割には本会の

参加国はアメリカを含め、カナダ、イギリス、ニュージーランド、オランダ、スウェーデン、スイス、フランス、西ドイツ、マレーシア、フィジー、日本と12か国に及んだ。また、参加者の専門も、植物生理、昆虫、植物病理、農業気象、土壌肥料等と多彩であった。なお、わが国からの参加は筆者だけであった。

### IBSNATプロジェクト

会議の主な主催者であるIBSNATプロジェクトは農業生産技術をコンピューターを用いたシステムアナリシスの手法を用いて普及しようとする目的で1982年に設立され、現在世界30か所に研究協力網を持っている。本プロジェクトは既に上述の設立趣旨にのっとり、トウモロコシ、ラッカセイ、ダイズ、コムギ、ブドウの生育、収量を予測する計算機シミュレーションモデルを開発し、世界各国の研究協力網から送られる気象、土壌、施肥、栽培法に関するデータから上記のモデルで作物の生育、収量等を予測している。また、予測値と実際値の適合性を検討することで、モデルの改良を行うとともに各種データの蓄積も行っている。さらに本プロジェクトは上述のモデルのシミュレーションから世界各地における最も好適な栽培法を決定する支援システム（DSSAT）を開発し、世界各国の研究協力網にこれらの情報を提供している。

### 集会の内容

本集会は会議の主催者であるIBSNATプロジェクトの説明から始まり、各日とも午前中は45分ずつ6課題の口頭の研究発表があり、



午後は参加者各自が持ち寄ったコンピュータープログラムの実演と説明が行われた。

病害虫の分野では病気や害虫の発生を予測するシミュレーションモデルが既に幾つか開発されているが、病害虫と作物の相互作用については量的に十分に解明されているとはいえない。このため作物生育と病害虫の発生を結合し、病害虫による被害を作物モデルに取り込んだ計算機モデルはわずかしかなかった。筆者は、本集会でこの結合モデルとは少し異なるイネ群落内でのいもち病菌の胞子の飛散・付着量を予測するモデルについて講演したが、フランスの S. Savary はラッカセイとさび病、スイスの B. Graf はイネと雑草、USDA の S. Schneider はダイズとシストセンチュウの結合モデルをそれぞれ発表した。これらの結合モデルはいずれも作物の乾物生産をモデル化し、これに病害虫、雑草のモデルを組み込んだものであり、病害虫の被害を作物の側からみた点でこれまでの病害虫の発生モデルとは異なっていた。

ところで、上記のモデルでは病害虫による作物への毒素的な作用についてはあまり検討されていなかったが、オランダの L. Bastiaans はイネといもち病について上述の作用について実験を行い、葉いもち病の発生程度の増大に伴い、病斑による生葉の減少以上に葉の光合成が抑制されることを報告した。そして、彼は、既にオランダで開発されているイネの生長モデル MACROS に彼の実験結果を組み込み葉いもちのイネの生育におよぼす影響を試算した結果を午後のセッションで実演した。彼のこの報告は筆者にとっても興味深いものであった。しかし、彼はモデルの中にいもち病の発生を断片的に病斑面積としてしか組み込んでおらず、彼自身も希望していた

が、今後、いもち病発生のシミュレーションモデルと上記のモデルの結合が必要であると感じた。

ハワイ大学の J. Yuen は、作物と病気の結合モデルに農薬の散布の効果を取り込んだモデルを開発し、このモデルに過去の気象データをインプットして収量を計算し、農薬散布の経済効果について報告した。計算機シミュレーションでは圃場試験と異なり労力と時間がかからないため、このような計算機の使用法も多くなると考えられる。

本研究集会では最後の日の午後に集会の内容の印刷、本会の今後の方向、協力体制とネットワーク作り、作物と病害虫の相互作用のモデリングに関する技術的問題点、農家の防除意思決定の支援システムなどが議論された。この中で結合モデルのモデリングの問題点として座長から、1) モデルの進展と実証のためのデータのセット、2) 病害虫の影響を作物モデルに結合するのに必要なデータ等が指摘され、参加者で議論が行われたが、作物関係の研究者には病害虫の被害をかなり単純にとらえる傾向があり、個々の病害虫を専門に研究している研究者と意見の食い違いがみられる場面もあった。

#### おわりに

病害虫の被害は1作物に限っても病害虫の種類ごとに多様であり、また、数種の病害虫の作物への複合的な被害についてはほとんど知られていない。本研究集会に参加して、筆者は作物の病害虫の相互作用のモデリングから示された基礎データの不足とその充足の必要性を痛感した。

特別情報

## 地域バイオテクノロジー研究 「培養幼植物体レベルにおける特性検定及び 選抜技術の開発」の主要成果 (中間とりまとめ)

1989年度

農林水産省 農業生物資源研究所

澤田 紀一

この資料は、地域バイオテクノロジー研究「培養幼植物体レベルにおける特性検定及び選抜技術の開発」1989年度分科会において、参加各試験研究機関の協力を得て取りまとめられたものである。

地域バイオテクノロジー研究開発促進事業は、農林水産技術会議事務局振興課の所管により全国の国公立農業関係試験研究機関が参画した大プロジェクト研究として七つの大課題が設定され、昭和61年度から5か年計画でスタートした。研究開始以来4年間を経た現在、参画各研究機関においては当初の予想をはるかに上回る多くの具体的成果が見られるまでにいたった。

地域バイオテクノロジー研究の大課題の一つ「培養幼植物体レベルにおける特性検定及び選抜技術の開発」は、8県の公立試験研究機関と4国立地域農業試験場、農業研究センター及び農業生物資源研究所が参加して研究が進められている。平成元年度には宮崎県において開催した現地検討会や2月の分科会の中で、これまでに得られた研究成果の中間的なとりまとめを行い、残された1年間の効率的な研究推進を図ろうとしている。

本資料は、当該課題に係る「中間とりまとめ」を要約し、より平易に整理して参考に供するものである。

### 1. 試験研究の背景と目的

組織・細胞培養を利用した特性検定及び選抜技術の開発は、①培養系において多様な遺伝的変異に富み、②細胞・幼植物体レベルを用いて試験管内で多くの個体(細胞)を取り扱うことを可能とし、③圃場レベルの検定に先立って一定の環境条件のもとで効率的に特性検定が可能である等、利点が多い。そこで、本研究では地域特産作物について培養系を用いた変異の拡大と選抜手法等の新育種法を開発し、得られた育種素材について従来の圃場レベルでの特性検定と合わせ、その実用化について検討する。

### 2. 公立研究機関における主要成果

#### (1) 総括表

県名	対象作物	主要研究成果	普及の可能性	残された問題点
青森	ナガイモ ニンニク	困難とされていたニンニクでカルスからの再分化個体を得た。また、ニンニク茎頂培養とコルヒチン処理により人為4倍体の獲得に見通しが得られた。一方、カルス由来ナガイモの分化個体も圃場レベルの検定に移行した	ニンニクの再分化技術は、今後増殖法への進展も期待される	ナガイモの再分化率向上とプロトプラスト培養系の検討
秋田	ミョウガ 食用ギク	食用ギクで管状花由来カルスよりの再生系が確立された。一方、変異誘発剤処理による変異拡大技術が開発された。また、イネでは懸濁カルスからの再分化率の向上が図られた	食用ギク再分化系を利用した変異の拡大	ミョウガの脱分化、再分化条件。食用ギクの選抜技術。イネの圃場検定

(つづき)

県名	対象作物	主要研究成果	普及の可能性	残された問題点
茨城	ハクサイ キャベツ	両作物ともに胚培養利用により変異の拡大を図り、軟腐病耐病性素材を選抜した。一方、種子に $\gamma$ 線を照射し、軟腐病抵抗性素材を選抜、次代でも耐病性を確認。圃場レベルで検定した	従来の育種体系に本手法を導入。効率化が期待できる	ハクサイの体細胞再分化系の安定化により、試験管内選抜法の開発
山梨	タラノキ ワラビ	タラノキ未展開葉柄部からカルスを誘導、改良MS培地で不定胚形成、さらに、正常な幼植物体育成に成功した	不定胚形成系を利用した大量増殖技術へ	培養系の利用による優良系統選抜技術の開発
岐阜	ハクラン ハウレンソウ	ハクランで胚軸由来再分化系を開発し、その系を利用して変異の拡大を図り、早生性で小玉の株を得た、自殖第2世代まで追跡調査した。また、ハウレンソウでの不定胚誘導系を確立した	実用形質の安定性が確認されれば、育種素材として利用可能	ハウレンソウ抽台性の検定等
兵庫	イネ	再分化能を維持したイネ・カルスの懸濁培養系を確立。この系を用い、変異処理により早生短稈突然変異系統を作出した。一方、イネ縞葉枯病ウイルスの簡易ELISA法を開発した	育種素材として有用。簡易ELISA法は既に実用化へ	縞葉枯病ウイルスにおけるウイルス検定法の開発
和歌山	エンドウ カスミソウ	エンドウで未熟葉由来カルスからの再分化系を得るとともに、カスミソウでも茎頂由来カルスからの再分化に成功。短節間性、ロゼット化しにくい有望系統が得られた	低ロゼット系統は種苗配布の予定	作型、地域別選抜
宮崎	サトイモ	サトイモ遺伝変異拡大法の開発が進み、試験管内で草丈、耐塩性、早晩性を異にした変異系統を選抜、塊茎分割培養の利用による特性の早期固定化を図り、圃場検定まで進めた	育種技術として利用効果が大きい	圃場検定による優良性の検証

(2) 研究手法別進捗状況

① 培養系の進展：地域特産作物では未だ安定した培養系が得られていなかったが、本研究の中で、ナガイモ、食用ギク、エンドウ、カスミソウでカルスからの再分化系が、また、タラノキ、ハウレンソウで不定胚形成系が開発された。

県名	作物名	茎頂系培養	胚培養系	カルス誘導	カルス→分化	カルス→不定胚	プロトプラスト→再生	側芽培養系
青森	ナガイモ			○	◎困難とされていた再分化系に成功			
秋田	ニンニク	○		○	○			
	食用ギク			○	◎管状花由来カルスより			
茨城	イネ			○	○向上			
	ハクサイ		◎	○	○			
	キャベツ			○	○			
山梨	タラノキ			○	○	◎不定胚による大量増殖 実用化へ		
	ワラビ			○	○			
岐阜	ハクラン			○	○←		○	
	ハクサイ			○	○←			
	キャベツ			○	○←			
	ハウレンソウ			○	○		◎全国に先がけて不定胚 誘導系開発	
兵庫	イネ			○		◎再分化率の維持が可能となる		

(つづき)

県名	作物名	茎頂培養系	胚培養系	カルス誘導	カルス→分化	カルス→不定胚	プロトプラスト→再生	側芽培養系
和歌山	エンドウ シュコンカ スミソウ	○		○	◎未熟葉由来カルスからの再分化 ○茎頂由来カルスからの再分化条件解明			
宮崎	サトイモ カンショ	○ ○		○ ○	○			○ △胚様体組織を誘導

◎顕著な成果 ○成果 △見込みあり

② 遺伝変異の拡大：EMS 等化学物質，培地組成， $\gamma$ 線等の変異源を用いた情報基礎データの集積をみた。今後の利用が期待されるとともに，ここでは $\gamma$ 線と培養系の利用で好結果が得られていることに注目したい。

県名	作物名	用いた培養系	変異源	結果
青森	ナガイモ ニンニク	茎頂培養組織 茎頂，カルス	EMS, MNNG コルヒチン, EMS	茎色やや淡色一定の傾向なし 染色体変異率高める，EMS の適性濃度決定
秋田	ミョウガ 食用ギク	生長点近傍組織他 管状花由来カルス	なし EMS MNNG	再分化未だ 一定の傾向なし，茎葉分化なし 再分化率やや向上，その他一定の傾向なし
山梨	タラノキ・ワラビ	カルス	紫外線 アクリジンオレンジ他 $\gamma$ 線，ホルモン	再分化なし，試験継続中 各化学物質の処理限界を明らかにした 各処理限界を明らかにした 上記の処理で糖含量，酸度の変異を認める
岐阜	ハクラン ホウレンソウ	カルス→再分化 種子 カルス→再分化 種子	培地組成他 ニトログアニジン EMS	葉の形態，結球時期，玉の大小等の形質に変異 葉に奇形 抽台の早晩に変異 フザリン酸に対する感受性に変異
兵庫	イネ	幼穂 カルス	$\gamma$ 線 BA 又は EMS	稔性変異が現れる 短稈早生変異を認める
和歌山	エンドウ シュコンカ スミソウ	種子・カルス カルス	$\gamma$ 線 $\gamma$ 線	変異拡大のための適性線量決める 変異拡大のための適性線量決める 再分化に対し10kR 以下で影響なし ロゼット化しにくい有望系統得る
宮崎	サトイモ カンショ	茎頂培養 側芽	MMU, コルヒチン, 紫外線	これらの化学物質を用いて効率的に遺伝変異を誘起することに成功した 葉柄長，腋芽数などに変異の拡大を認める

③ 細胞選抜技術：様々な実用形質について培養系と幼植物体レベルで比較が行われ，選抜技術の基礎が築かれた。また，耐病性について病原菌毒素を選抜圧とした研究は，今後の進展が期待される。

県名	作物名	目標	選抜法	得られた結果
青森	ナガイモ ニンニク	根腐病抵抗性 良質多収系統	菌培養ろ液 菌接種 試験管内球形成 カルスの増殖程度	菌培養ろ液を用いた選抜・培地条件の確立 菌接種後の反応比較，カルスと数種のナガイモ幼植物間 球形成低温要求性と圃場での早晩性相関あり，試験管内選抜の可能性 カルス形成能の品種間差異



(つづき)

県名	作物名	目 標	選 抜 法	得 ら れ た 結 果
秋 田	イ ネ	低温感受性	カルス低温処理	カルス生重ヒデヒコ>染分(低温処理)無菌芽生えヒデモチ低温での枯死率高い
	食 用 ギ ク	特性検定の簡易化	SDS-PAGE 電気泳動	判然とした傾向認められない
茨 城	ハ ク サ イ	軟腐病抵抗性	菌の形態、菌ろ液による選抜	菌接種24~36時間後菌の形態変化から耐病性カルスを判別
山 梨	ワラビ・タラノキ	食味関連成分	試験管内接種	菌ろ液による抵抗性カルス選抜と再生
			変異誘導→選抜	試験管内で幼苗に菌を接種選抜可 ストマイで除菌
岐 阜	タ ラ ノ キ	萌芽性	頂芽切除	カルスごとのアク、糖、酸の含量が変異源によって差あり、また、この中に優良と思われるものあり
	ハ ク ラ ン	結球性	GA、幼苗処理	側芽の萌芽性の難易度を明らかにする
	ホウレンソウ	軟腐病抵抗性	軟腐病培養ろ液	GAの幼苗に対する反応から結球性予測
兵 庫	イ ネ	軟腐病抵抗性	12~16時間日長下培養	抵抗性再分化個体を得る
		萎ちょう病抵抗性	萎ちょう病菌培養ろ液	培養系で抽台の早晚性の判断が可能
		縞葉枯病抵抗性	保毒虫→ウイルス接種	耐性株選抜中
和歌山	エ ン ド ウ	米品質	タンパク含有率	ウイルスの接種可能 ELISA 検定で早期に確認
		節間伸長	生育調節剤・温度	ローリー法によるたんぱく含有率の初期選抜可能性あり
		茎えそ病抵抗性	ウイルス粗汁液	試験管内と圃場同一傾向示す 生育調節剤で品種間差拡大しない 20℃黄色光で拡大
宮 崎	シュッとコンカスミソウ	ロゼット性	温度 生育調節剤	抵抗性について試験管内でも圃場と同一傾向
	サ ト イ モ	試験管内選抜法	選抜圧(塩など)	ロゼット化の誘導条件得られず
		変異体の選抜		アンシミドール添加により培地での伸長程度と圃場でのロゼット性に相関
				草丈、耐塩性、早晚性、耐冷性試験管内選抜技術の開発
				たんぱく質電気泳動による品種分類手法の確立
				コルヒチン、UV、MNU処理により草丈長、短、芋の大小
				耐塩性の強弱等、変異系統選抜

④ 圃場レベルの検定：①~③の成果をふまえ、ほとんどの県で圃場試験まで進行しているので、最終年度の成果が期待される。

県名	作物名	現 在 ま で の 到 達 点
青 森	ナ ガ イ モ ニ ン ニ ッ ク	① アイソザイムパターン等による選抜簡易・効率化が進められたが、品種間では差が認められない。培養カルスでは多くのバンドが検出された ② ナガイモの病害抵抗性系統の特性検定、選抜技術の有効性の検証について実験を実施中 ③ ニンニク多収系統について、現在網室内で栽植中 ④ ナガイモおよびニンニクで再分化個体を馴化・栽植中
秋 田	ミ ョ ウ ガ 食 用 ギ ク イ ネ	① 食用ギクについては、それぞれの選抜系統について圃場検定ならびに実用化のための検証実施中 ② 今後の耐冷性選抜にあたり、再分化(整一、同調化)に適した培養条件の検討を進めつつある
茨 城	ハ ク サ イ	① 試験管内で軟腐病菌を接種し、耐病性検定の効率化を目的に現在実施中 ② 抽台性の検定技術(温度・光)について開発中 ③ γ線・変異拡大→軟腐病抵抗性(得)→次世代で抵抗性発現(圃場レベル)
山 梨	タ ラ ノ キ ワ ラ ビ	① 培養幼植物の馴化条件を検討するとともに有用形質(萌芽性食味等)発現について調査中 ② 選抜個体について圃場試験の準備
岐 阜	ハ ク ラ ン ホウレンソウ	① 軟腐病耐病性について葉脈への菌接種によりその強弱を早期に検定 ② 抽台性の早期検定法。耐暑性

(つづき)

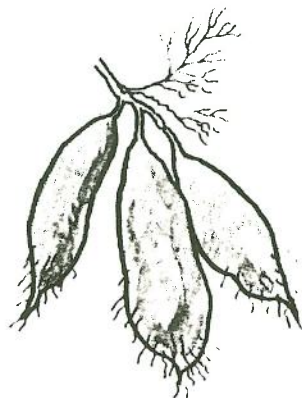
県名	作物名	現在までの到達点
兵庫	イネ	③ 萎ちょう病，培養ろ液およびフザリウム酸添加培地で耐性株 ④ ハクラン培養株自殖後代，変異(結球期，大小)→小玉株選抜した ⑤ ハクラン軟腐病抵抗性株，その後代検討中 ① 酵素結合抗体法により幼植物について縞葉枯病の早期検定法を開発した(ELISA法) ② 培養幼植物体における白葉枯病，いもち病抵抗性の検討・選抜法の簡易化
和歌山	エンドウ シュッコンカス ミソウ	① エンドウ茎えそ病ウイルス35℃190日以上保存可能 ② エンドウ培養レベルで選抜した短節間形質は圃場でも発現 ③ エンドウ培養レベルで選抜した茎えそ病抵抗性は圃場レベルでも発現した ④ シュッコンカスミソウのロゼット性に関する生育調節剤添加培地で選抜基準の設定が得られ，圃場レベルまで進んだ
宮崎	サトイモ	① 塊茎分割培養法を利用した変異体の早期固定法を開発した。この方法で増殖すれば，その後の変異はみられない ② 試験管内での草丈による選抜効果が圃場でも確認された

3. 国立研究機関における主要成果

場所	対象作物(目標)	主要研究成果	普及の可能性	残された問題点
東北農業試験場	イネ (耐冷性選抜法の開発)	無菌苗で暗，低温処理により品種間差の確認 イネ約からの再分化個体の耐冷性検定	耐冷性検定法として有効	再分化率の向上。 再分化個体の染色体倍加法の確立
北陸農業試験場	イネ (薬培養系内実用形質の選抜)	イネ通常カルスの33倍の再分化能をもつ高embryogenicカルスの作出に成功した 不定胚由来再分化植物を得る	薬培養における育種効率の向上に結びつく	この系を用いた選抜系の開発
中国農業試験場	イネ (薬培養系内実用形質の選抜)	特定の品種で，薬・胚培養から再分化イネ・カルスに白葉枯病菌の接種試験を行ったが未だ想定した結果が得られていない	基礎的知見の提供	普遍性のある再分化系の確立 病理研究者との研究協力
九州農業試験場	小麦 (赤かび病抵抗性選抜)	小麦の胚培養によるカルス形成に品種間差異を認める。バルボッサム法により半数体作出。赤かび病菌培養ろ液による反応差	基礎的知見の提供	抵抗性と密接に関連したマーカーの検索
農業研究センター	小麦 (半数体作出)	バルボッサム法により小麦半数体作出。受粉小花数の20%~30%まで向上 半数体幼胚→10数個体以上の半数体の増殖に成功	実用化技術として普及の可能性あり	大麦野生種と交雑不可能な小麦についての対策。(トウモロコシ花粉の利用)
農業生物資源研究所	イネ	脱分化時の体細胞変異について分子レベルのアプローチがなされ，リボゾームDNA変異発見 培地による変異出現の差異 プロトクローンにおける分化率の変異の解析を行った	基礎的知見の提供	研究の深化。応用研究へ(プロトクローンの変異)

4. 成果の公表（学会発表等・公立研究機関）

- |               |                                                                                                                                                                     |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 青森県畑作園芸試験場    | ニシキク培養個体における染色体数の変異<br>育種学会 第76回 1989秋                                                                                                                              |
| 秋田県農業試験場      | イネ約培養におけるアミノ酸添加の効果<br>育種学会 第75回 1989春<br>イネの培養系を利用した低温ストレスの検討<br>東北育種談話会 1989夏                                                                                      |
| 岐阜県農業総合研究センター | ハウレンソウの不定胚誘導<br>育種学会 第75回 1989春<br>ハクランのカルス由来植物の変異<br>育種学会 第76回 1989秋                                                                                               |
| 和歌山県農業試験場     | シュッコンカスミソウの培養幼植物体レベルにおけるロゼット性検定法(1)<br>育種学会 第74回 1987秋<br>シュッコンカスミソウの培養幼植物体レベルにおけるロゼット性検定法<br>育種学会 第77回 1990春<br>エンドウの培養幼植物体レベルにおける節間伸長性検定法<br>園芸学会 1990春           |
| 兵庫県中央農業技術センター | イネ縞葉枯病簡易検定法の培養幼植物体への適用<br>関西病虫害研究会報 No. 30 1988<br>ELISA法の簡易化によるイネ縞葉枯病ウイルス保毒虫検定<br>近畿中国地域農林水産省研究成果発表会<br>1988 11月<br>イネ懸濁培養における継代培地へのマンニトール添加の効果<br>育種学会 第77回 1990春 |
| 宮崎県総合農業試験場    | 圃場栽培及び組織培養で生産されたサトイモ・ハスイモ塊茎タンパク質電気泳動パターンの比較<br>園芸学会九州部会 1989 9月                                                                                                     |



## 特別情報

# 遺伝子操作の最新技術「リボザイム」をめぐる 特許論争— Nature 誌から

生研機構

増澤 力

## はじめに

1989年3月バイオテクノロジー研究調査の一環として、オーストラリア国立研究機関(CSIRO)の植物工学研究所を訪れた。そこで説明に現れた研究者 Dr. Gerlach が「現在遺伝子の働きを押える方法が二つある。すなわち、アンチセンス RNA を利用する方法とウイルスを利用する方法である。我々は、最近第三の方法を見付けた。それは、RNA が RNA 自身を切断するもので、これをリボザイムと呼んでいる。その研究成果を1988年8月18日付の Nature 誌(334: 585-591, 1988)に発表した(本誌 No. 11: 22, 1989年の文献情報参照)。同じ現象を他の研究者が独立に他の植物について見出し、Nature誌に発表している。さらに、この技術は設計に基づき合成したリボザイムが、任意の遺伝子の働きを押えることができ、例えば、エイズの治療にも応用できる」と熱っぽく説明してくれたのを思い出す。

その後、この半年の間に Nature 誌上にリボザイムの特許論争関連記事があい次いで出た。これらの記事は、生研機構の「出資会社」が主として特許、ノウハウの蓄積を目指すだけに大いに筆者の関心をそそった。また、最先端技術を目指す皆様にもご参考になるかと考えて、ここにその大要を紹介したい。

## 1. 特許論争の経過

1989年8月3日付の Nature 誌(340: 332, 1989) ニュース欄に、大略次のような記事が出た。「シドニー通信員 Tania Ewing 発、最

近オーストラリアの CSIRO の植物工学研究所がフランスの会社 GROUPE LIMAGRAIN と CSIRO の所有する遺伝子の働きを押えるリボザイムの特許に基づき、A\$ 67.5 million (約70億円)の技術契約を結んだ」というものである。

それから2か月ほど経過した10月12日付の Nature 誌(341: 473, 1989)に、次のような続報記事が出た。「既報のオーストラリアの特許は、1986年に先願の米国の特許とコロラド大学 Uhlenbeck の論文などの先行技術により成立しないだろう。したがって、折角の CSIRO とフランスの会社との契約は無意味なものとなるだろう」とやや冷かし気味の調子であった。

偶然に、同日付けの発表により、1989年度のノーベル化学賞が、RNA の触媒機能の発見「リボザイム」の研究業績で、エール大学の Sidney Altman (1939年生) とコロラド大学 Thomas R. Cech (1947年生) に与えられることになった。

この時期のオーストラリアの国立研究機関は、財政の厳しいこともあって、「実用化を目指した利益のあがる研究をせよ」との圧力を受けていた。このとき史上最大の技術契約が成立したことは、拍手をもって迎えられた。これが、Nature 誌の恐らく誤報である記事により打撃を受けたので、CSIRO (オーストラリア) は激怒したのである。

さらに、それから2か月経過した12月7日付の Nature 誌(342: 609-613, 1989)に、編集長の John Maddox が Commentary の欄5頁にわたって、上記の誤報記事の謝罪と米国およびオーストラリア間の特許論争調査結果について、“The great gene shears story”



と題する積明文を掲載した。

リボザイム (ribozyme) は、1970年代の末に RNA が酵素の助けを借りないで RNA を切断することが知られ、Cech がリボザイムと命名したものである。その後 Cech と Altman が独立にそのメカニズムを解明し、1982～86年にかけてその結果を専門誌に発表した。それまで遺伝情報の仲介役に過ぎなかった RNA が、酵素の働きを持つことがわかり、大変な反響を呼んだ。その後、多くの研究者がこの現象に関心を持ち、現在までこの種のリボザイムは 100 以上も見付かっている。また、最近「RNA が生命の起源」と考える説や植物、動物に対する応用研究も話題となっている。なお、彼ら二人がノーベル賞を貰うことについては、異論がないようである。

米国の特許：Cech, Zaug and Been の 3 名が、1986年12月3日に米国において、76件の特許請求の範囲 (claim) のある特許を申請した。同時に特許協力条約に基づき、ヨーロッパ、日本など(多分オーストラリアは除く)に保護を申請した。これが、1987年12月2日に受理され、1988年6月17日に世界知的所有機関のジュネーブ事務所によって国際公開された (PCT/US87/03161, WO88/04300 公開)。なお、この権利は米国の Biochemicals Corporation (USB) に譲渡されている。

米国の特許制度では、世界でも少数派であるが、特許が出願されたかどうかは、特許になるまでわからない。また、学会発表後1年間(我が国では6か月間)は、発表により新規性が失われないとされている。厳密に言うると、この Cech の一部の特許請求の範囲も、自分自身の発表で特許にならないものもある。

オーストラリアの特許：CSIRO (Gerlach, Haseloff and Jennings) は、米国に遅れること約1年、1987年12月15日にオーストラリアにおいて特許を申請した。重要なことは、オーストラリアの特許 (PCT/AU88/00478, WO89/05852 公開) は米国の Cech の初期の研究と申請された特許を知っており、そして、これとは別物だと主張していることである。

なお、オーストラリアには、ニュージーランド、南アフリカなどとともに “Provisional

Patent” (出願時に仮明細書だけで、1年以内に完全な明細書を提出すればよい) の制度が残っている。

Uhlenbeck の論文：彼は、Cech と同じコロラド大学であるが、共同研究者ではない。彼は、リボザイムを長年研究しているオーストラリア・アレード大学の Symons が行った研究 (すなわち、lucerne transient streak virus の virusoid が自己切断する付近にスクレオチッドからなる独特の二次構造 “hammerhead structure” がある) に興味を持った。そしてリボザイムとして働く最小構造を知るため、avocado sunblotch viroid のスクレオチッド配列に対応する二つの RNA を合成し、19のスクレオチッドがこれに当たることを合成したリボザイムを用いて証明し、1987年8月13日付の Nature 誌 (328:596, 1987) に発表した。

一般に特許の要件として、新規性 (novel) と非自明性 (non obvious) とが必要であるが、リボザイムの特許に関しては、少なくとも1987年8月以降は、Uhlenbeck の論文により公知であるといえる。

## 2. John Maddox 編集長の釈明

以下 Nature 誌 Commentary 欄に出た Maddox の釈明内容を紹介しよう。

Nature 誌は、オーストラリアにおいて遺伝子操作の新技術に関する (上記10月12日のニュース記事) 誤報により、大変非難されてきた。真相は Nature 誌 (オーストラリア) が知っているよりもっと興味があり複雑だろう。

オーストラリアにおける現地調査の結果、「オーストラリアの特許が米国の特許のため全く駄目になる」という確信は薄らいだが、非常に関係が深いことは明らかだ。両者の特許請求の範囲の相互関係は、複雑で差異が明瞭でない。したがって、オーストラリアの特許権利主張は、「相当の論議を呼ぶ」と言っても間違いではない。

そうであっても、Nature 誌は直接関係者に調査結果を説明する義務があると思ってい

る。以下、二つの Nature 誌のニュース記事および米国とオーストラリア特許とについての調査結果報告は、読者にとって興味がありかつ参考となるであろう。

現今では、科学研究結果を実用化する企業が、成果の商業化を急ぐあまり、研究者とトラブルが生じている。そこで、次の点に注意しなければならない。

- ① 企業化指向が強くなり最先端研究がオープンに議論できないようになる。
- ② 研究成果の特許性を失わない企業の宣伝限界を見極める。
- ③ 多くの分野の研究者が知らねばならない特許法の微妙さ。

そのほか、研究者とニュース・メディアとの接触の仕方も重要である。

確かに Nature 誌の記事は、バランスに欠けていた。しかし、当事者は否定するが、彼らの協力はほとんど得られなかった。

Maddox の調査によると、この誤報がでた原因として、次の諸点が指摘できる。

先ず 8 月 3 日のニュース記事に、「CSIRO の保有している特許により」とある、これがもし出願中というのなら、米国特許の権利を譲渡された米国 USB 側の弁理士も、そう目くじらも立てなかつただろう。

オーストラリアの Nature 誌通信員 Tania Ewing が、CSIRO の植物工学研究所長 Dr. Peacock に、米国の特許と Uhlenbeck の論文の特許成立に与える影響について取材をしたが、「我が方には、弁理士がついているから特許になることは確実だ」と言っていた。それ以上、弁理士への接触等の取材は許されなかった。

さらに Tania Ewing は、米国とオーストラリア両特許の内容を見ていない。もし見ていたら、この様な結論は出なかったと思われる。

また Dr. Peacock は、オーストラリア特許庁から「この件に関して先行技術 (prior art) がある」との報告を受けていたが、その事実を明らかにしていない。

Stephan Castile (オーストラリア特許庁担当官で偶然にこの取材に関係した人物) は、

この件に関する Tania Ewing の取材に対して、「先行技術があって特許にならない」と誤解を受けるような返答をした。

Nature 誌は、慣習として米国とヨーロッパにおいて、前週の世界中の主要な科学情報を関心のあるジャーナリストに提供している。ワシントンとシドニーの間では、16時間の時差があるので、申し合わせにより事前に両方で情報の交換を行なっている。このことが不幸にして誤解を増幅した。

また、各国により特許制度の差異があり、これもその一因となろう。

以上の事件の経過により、ロンドンとワシントンで活躍する記者と同様に、各地方に駐在する通信員からも、学ばねばならない教訓がある。

- ① 提供された情報の取り扱い（これがないとジャーナリストは困る）。
- ② 読んでいなくて一方的利益のある側だけの情報に基づく資料の内容に言及する。
- ③ 16時間時差のある両大陸にまたがる件の情報追求の困難さ。

これらにより、今回はオーストラリアの特許権利主張に対する当然の疑義が、不当に拡大されたのである。

## おわりに

ここで、簡単に両国特許の技術内容の差異に触れておこう。Maddox は釈明文の半分をこれに当てており、それぞれの研究者によって明らかにされた五つのリボザイム構造図を用いて、内容を論じている。是非、原文をご覧ください。

遺伝情報が DNA から mRNA により伝達されるが、先ず構造配列 (exon) と介在配列 (intron) の全部を含んだ pre-mRNA が複製され、続いて RNA 自身によって intron が切り落され、必要な exon が結合される (splicing)。これが、RNA の一つの重要な役目としてのリボザイムの作用である。リボザイムの内容も、次々に発表される新しい研究論文により順次明確になり、現在では例外はあるが、Uhlenbeck の前掲の論文による ham-

merhead 構造をとるヌクレオチッドを中核としたものと考えている。

米国の特許は、Science (231: 470, 1986) に示されるように、*Tetrahymena* の pre-mRNA が分子間反応により、予め決められた場所で intron を触媒的に切断するという発見に基づいている。特許請求の範囲も、19 のヌクレオチッドを除いた *Tetrahymena* から得た天然の intron (L-19 IVS) による酵素的な働きで、RNA を切断する働きではない。このほかの重要な特許請求範囲は、*Tetrahymena* のリボザイムの修飾型 (modified version) の利用である。

ここで問題となるのは、この酵素 (endonuclease) の特許請求の範囲が非常に全般的 (general) なので、その後の特許請求の範囲が、これに含まれているかどうかである。この点は、単なる特許法の問題を越えて、企業化の際の実用化の難易の判断となる。

一方、オーストラリアの特許は、いくつかの植物ウイルスと関連ある RNA における自己切断を観察して、“hammerhead” 原理を適用した効率的なリボザイムが合成できる方法を示している。その主要部は、前掲の

Gerlach の論文 (Nature 334: 585, 1988) の研究によっている。すなわち、予め決めた処方により RNA リボザイムを合成する。ここでは、リボザイムの切断活性部が、基質の RNA 分子の目的とした切断場所のいずれかの側に、RNA の配列が (Watson-Crick の塩基相補性) 付着するような RNA の短鎖に囲まれている。

そして、「米国の特許のリボザイムとは別物だ」と主張している。その理由として、米国の特許のリボザイムは *Tetrahymena* に天然に存在するものであり、グアニンかまたはその誘導体の存在が必要である。したがって、オーストラリアの特許のリボザイムより特異性が小さい。オーストラリアの特許のリボザイムは、リボニュークレオチッドの予め決められた配列で、任意の RNA を切断できる。換言すれば、目標とした RNA 配列を不活性化できるのである。

これら両国特許の優位性の判断は、多くの問題を含んでおり、非常に難しく、Maddox も指摘しているように、もし争いになっても、法廷が決着をつける問題であろう。

#### 編集後記

表紙の写真を提供していただいた西澤務氏は、出芽細菌による線虫の生物的防除について優れた業績をあげられ、本年度科学技術庁長官賞を受賞された方です。細菌による線虫の防除機構などについて興味ある写真を多数お貸しいただきましたが、表紙の構成上1枚

に絞らざるを得ませんでした。購読会員の皆様にも、本誌の表紙にふさわしい写真をお持ちの方は、生研機構あるいは当協会まで是非お知らせいただきますようお願いいたします。

(大畑記)

ブレイン テクノニュース (第20号)

---

平成2年7月15日発行

発行者 佐野宏哉

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