

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 21 号

SEPTEMBER 15, 1990



表紙説明

細胞融合(種内融合)により作出した
ヒラタケ菌株の栽培試験

両親に比べて収量が高く、肉質がしっかりしており、
栽培時の子実体の揃いがよい。

(写真提供 大改正武氏)

本号の紙面

- 国内情報..... 1
ショウガプロトプラストからの植物体再分化, 人工生理活性物質の分子設計, 植物の増殖性細胞核抗原遺伝子, 遺伝子構成による枯草菌の孢子形成, カイコによる毒物検定, キチン分解酵素のバイオコントロールへの利用
- 文献情報..... 20
根粒菌の宿主特異性, 外来遺伝子の挿入によるミニマウス, 哺乳類の性決定, バキュロウイルスベクターによる幼若ホルモンエステラーゼの発現, カイコ前胸腺刺激ホルモンのクローニング
- 特別情報..... 27
気違い牛と農林大臣,
カイコにおけるホルモンの働き

口 絵

国内情報

木村貞夫

ショウガプロトプラストの培養と植物体再分化 ……1

中馬達二・森 正隆・岡田健太郎・島崎和子

人工生理活性物質の分子設計 ……4

鈴鹿 巖

植物の増殖性細胞核抗原遺伝子の構造 ……6

佐藤 勉・小林泰夫

遺伝子再構成による枯草菌の孢子形成 ……10

栗林茂治

カイコ孵化幼虫による毒物等の検定 ……13

平八重一之・日比忠明

海洋細菌のキチン分解酵素遺伝子のクローニングと

そのバイオコントロールへの利用 ……16

文献情報

根粒菌の宿主特異性を決定するシグナル物質 ……20

外来遺伝子の挿入によって得られたミニマウス——ピグミー遺伝子座の分断 ……21

哺乳類の性決定をめぐる問題——ZFY遺伝子は精巢分化決定要因ではない ……23

バキュロウイルスベクターによる幼若ホルモンエステラーゼの発現と効果 ……24

カイコ前胸腺刺激ホルモンのクローニング ……25

特別情報

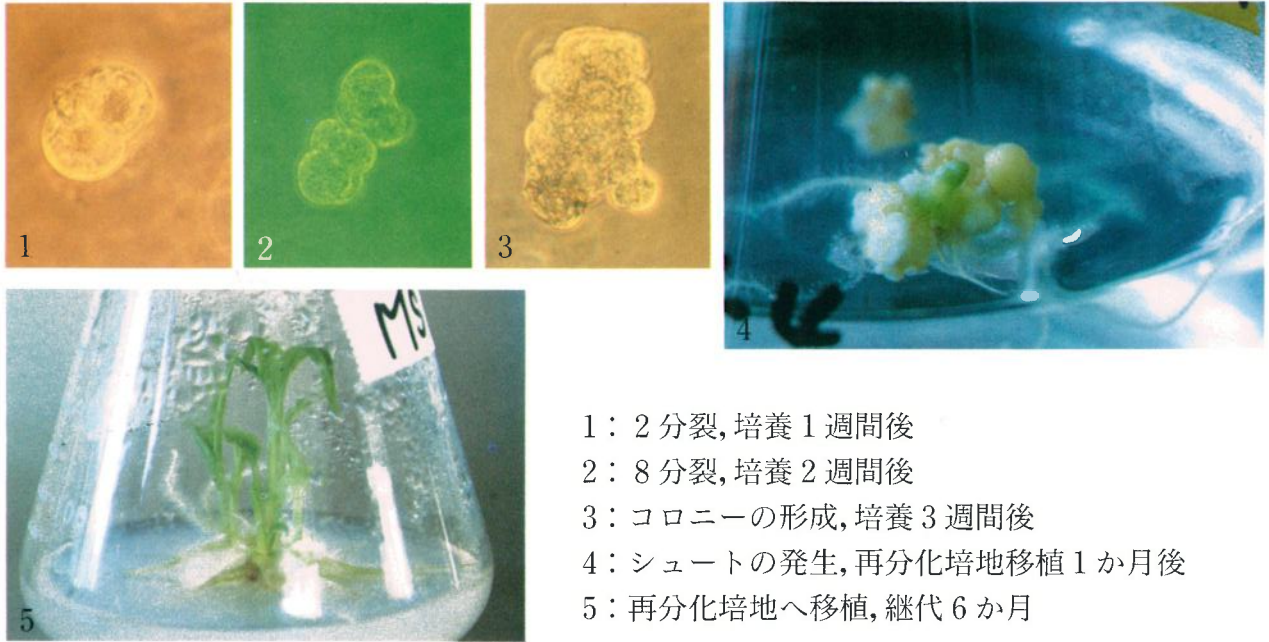
斎藤康夫

気違い牛と農林大臣 ……27

小林勝利

カイコにおけるホルモンの働き ……29

ショウガプロトプラストの培養と植物体再分化 (本文 1 ページ)



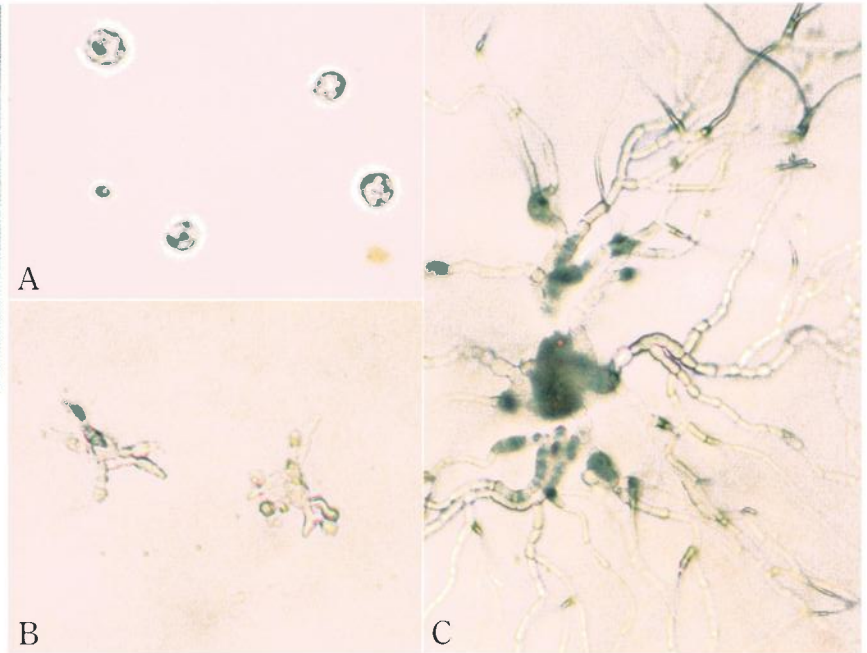
- 1: 2分裂, 培養1週間後
- 2: 8分裂, 培養2週間後
- 3: コロニーの形成, 培養3週間後
- 4: シュートの発生, 再分化培地移植1か月後
- 5: 再分化培地へ移植, 継代6か月

海洋細菌のキチン分解酵素遺伝子のクローニングとそのバイオコントロールへの利用 (本文 16 ページ)



1. *Alteromonas* sp. およびキチナーゼ遺伝子を導入した大腸菌によるコロイダルキチンの分解

- A: *Alteromonas* sp.
- B,C,D: *E. coli* DH 5 (pBR322-chi)
- E: *E. coli* DH 5 (pBR322)



2. キチナーゼ遺伝子を導入した大腸菌コロニーの周辺における *B. cinerea* 分生胞子の生育

- A: *E. coli* DH 5 (pBR322-chi)による透明帯上で20°C, 48h培養
- B: *E. coli* DH 5 (pBR322-chi)による透明帯上で20°C, 168h培養
- C: *E. coli* DH 5 (pBR322)コロニー周辺で20°C, 168h培養

国内情報

ショウガプロトプラストの培養と植物体再分化

長崎県総合農林試験場 環境部

木村 貞夫

1. はじめに

ショウガは熱帯アジアを原産地とする香辛料植物であるが、古くからわが国に伝来するとともに、今日では世界的にも広く使用されるハーブの一種である。長崎県は大ショウガの産地として知られ、また、種ショウガの供給地でもあるが、連作による根茎腐敗病 (*Pythium ultimum*, *P. zingiberum*) の発生のために産地の移動を余儀なくされている。したがって、耐病性をも含む品種改良への期待は大きいにもかかわらず、開花・結実性を欠くため交雑による品種改良の方途は閉ざされていた。ところが、近年バイオテクノロジーの進展にともない、細胞融合による体細胞雑種の作出と変異の拡大等、画期的な育種法の展開が期待できるようになった。ナス科、イネ科、アブラナ科、ミカン科等の有用作物では、すでに細胞融合の技法により体細胞雑種植物が作出されている。しかし、未だショウガ科植物についての報告は見当たらない。そこで、ショウガ科の体細胞雑種植物の作出を目標に、その前提となるショウガプロトプラストからの植物体再分化技術を開発したので紹介する。

なお、本研究は農林水産省の助成による地域バイオテクノロジー研究開発促進事業「細胞融合による地域振興作物の改良技術の開発」課題のもとに、1986～1989の3年間にわたり実施したものである。

2. プロトプラストの分離

プロトプラストの分離源としては、葉肉細胞とカルス細胞がある。はじめに、温室栽培のショウガ葉身を材料に用いて、葉肉細胞か

らのプロトプラスト分離法を検討した。ショウガ葉身のうち、仮茎中の未抽出葉、抽出未展開葉、展開第一葉からはプロトプラストを分離できたが、葉令が古くなると分離できなかった。葉令の若い葉身から分離するプロトプラスト量は概して少なく $10^0 \sim 10^3$ cells/mlに過ぎず、しかも分離量は著しく不安定であり、ほとんど分離されないことが多かった。このため、ショウガ栽培時の遮光処理、遮光程度、表皮の剝皮、酵素処理法、減圧浸透、等についても検討したが、プロトプラストの分離量と不安定性を改善する条件は見いだせなかった。さらに、茎頂培養により再生した無菌ショウガを材料に用いても、葉肉および根茎細胞からのプロトプラスト分離の困難性は変わらなかった。そのうえ、分離した葉肉および根茎プロトプラストの比重が軽く、遠心処理によっても沈澱しないため、プロトプラストの培養に必要な洗浄・精製の操作も容易ではないことが明らかになった。

そこで、カルス細胞からのプロトプラスト分離を試みた。畑に栽培中の大ショウガ (品種：茂木在来、長崎2号) から常法により茎頂を切り出し、MSまたはB5(2,4-D $2 \sim 2.5$ mg/l) 培地を用いてカルスを誘導した。誘導したカルスを、Abdullah¹⁾ がイネプロトプラストからの植物体再分化に成功した方法により16日間懸濁培養後酵素処理したが、プロトプラストは全く分離できなかった。そこで、3種類の液体培地MS, B5, R2(2,4-D 2 mg/l)を用いて、200ml容の三角コルベンにカルス1gと培地40mlを加えて、25°C、13時間照明/日の恒温器内で1週間巡回振とう培養した。1週間毎に新鮮培地と交換し、交換時にはステンレスメッシュを用い

てカルスを砕いた²⁾。3種類の培地を培養当初に使用したが、B5とR2培地ではカルスの増殖が劣ったので、11週目からはMSのみを用いた。カルスは1週間の懸濁培養により、6~10倍に増殖した。16週間培養後、培地を交換して3日後に酵素処理してプロトプラストを分離した。分離したプロトプラストを2重のナイロンメッシュで濾過後、濾液を95×g、5分間遠心して酵素液を除去、0.52M D-マンニトールの洗い液で3回遠心・洗浄、精製してトーマ血球計算盤により測定した結果、プロトプラストの密度は $10^5 \sim 10^6$ cells/mlに達した。また、4、8、25週間各々懸濁培養したカルスについても分離量は安定し、品種間の差異も認められなかった。本法により安定してプロトプラストの分離ができるようになり、以後の培養試験に供した。

3. プロトプラストの培養と植物体再分化

茎頂から誘導したカルスを、1~3か月間隔で継代して8か月後にMS液体培地(2,4-D 2mg/l, シュクロース3%)を用いて16週間旋回振とう培養、1段階法によりプロトプラストを分離・精製、密度を 4×10^5 cells/mlに調整して25°C、暗黒下で23日間培養した。プロトプラスト培養には、糖濃度が異なる5種類の培地を供試、アガロース・ビーズ法と液体培養法で行った。なお、アガロース・ビーズ法では、ナースカルスを添加してその効果を調べた。試験の結果、培養を開始して5~7日目には2分裂(口絵1)、10~14日後には4~8分裂(口絵2)するとともに、小コロニー(口絵3)を形成した。3週間後のコロニー形成率は、MS-1培地で有意に

低いを除くと、概して1%前後であった。コロニー形成率について、アガロース・ビーズ法と液体培養法を比較すると後者がやや低く、ナースカルス添加の効果は認められなかった。また、コロニーからカルスを誘導するために移植する際に、アガロース・ビーズのほうが取扱いやすい。したがって、ショウガプロトプラストの培養には、ナースカルス無添加のアガロース・ビーズ法が適しているといえる。

プロトプラスト培養に供試した5種類の培地のうちのひとつで、コロニーの形成率が有意に低い理由を検討するため培地の浸透圧を測定した結果(表1)、MS-1培地の培養前は741 mOsmol、培養後は912 mOsmolであるのに対して、その他の培地の培養前の浸透圧は644~680 mOsmol、培養後は701~748 mOsmolと低いことが判明した。

コロニーを形成したアガロース・ビーズを3~4 mm角に切り取り、4種類のカルス誘導用軟寒天培地MS、B5、R2、N6-C(2,4-D 2 mg/l, シュクロース6%, 粉末寒天0.5%)に移植し、25°C、暗黒下で培養した結果、10日後にはカルスの形成が肉眼でも認められるようになった。50日後には供試したすべての培地上にカルスを形成したが、形成率と形成量にプロトプラスト培養培地の影響がみられた。すなわち、プロトプラスト培養培地MS-2(シュクロース14.6%)でカルス形成量が多く、MS-3では少なかった。また、MS-5では、培養40日後にカルスが褐変した。カルス形成量は、R2-CとN6-Cの両培地が優れた。

表1 培地の糖濃度及びプロトプラスト培養前後の浸透圧とコロニー形成率

プロトプラスト 培養培地	糖濃度			培地の浸透圧		コロニー 形成率 %
	シュクロース %	グルコース %	D-マンニトール %	培養前 mOsmol	培養後	
MS-1		10		741	912	0.0
2	14.6			644	739	1
3	2	5	3	679	748	1
4		1	9.5	680	706	0.1~1
5	1		9.5	656	701	1

4. プロトプラストからの植物体再分化

プロトプラスト由来カルスを8種類の再分化培地に移植して、25°C、13時間照明（200～2000 lux）条件下で80日間培養した結果、カルスは直径2～3mmに肥大して球状胚の形状を呈し、移植3週間後には発根、45～80日にかけてグリーンスポットを生じた。これらをホルモンフリーのB5寒天培地に移植すると、グリーンスポットからシュートを伸長し、30日後には草丈10mmの小植物体を再生した（口絵4）。

植物体の再分化には45日以上の日数を要し再分化率も著しく低いため、前記した8種類の培地に約1か月培養したものを前培養として、B5培地（IAA 0, 0.05mg/l, BAP 0, 0.5, 1, 2mg/l, シュクロース3%, 粉末寒天1%）に再移植、後培養におけるグリーンスポットおよびシュートの発生状況を調べた結果（表2）、移植して13日後にはグリーンスポットを生じ、21日後にはシュートの発生が確認された。50日後にはグリーンスポットが増加するとともに、新たにシュートを再分化したカルスもみられた。3か月後には、シュートの発生が増加（口絵5）する一方、グリーンスポットの状態に留まるものも

見られた。プロトプラスト由来カルスからの植物体再分化には、前培養期間を含めて最も早いものでも52日、遅いものでは約4か月を要した。オーキシンとサイトカイニンの有無が再分化に及ぼす影響は判然とせず、R2とN6の前培養培地についても同様であった。なお、発生したシュートのうち、葉緑体を欠くアルビノがかなり認められた。以上の結果から、ショウガプロトプラスト由来カルスからの植物体再分化には、試験の範囲内において条件的にかなりの幅が存在するとともに、イネ等他の作物に比較して長時間を要することが明らかになった。再分化したショウガは、品種長崎2号、茂木在来とともに馴化処理後、土を詰めたポットに移植して栽培し、順調に生育した。

5. おわりに

ショウガプロトプラストから植物体再分化に至る各過程の培地条件を中心に検討して、カルスの懸濁培養にはMS、プロトプラストの培養にはMS-2、形成したコロニーからのカルス誘導にはR2とN6、再分化にはB5の各培地が適合することを明かにし、細胞培養実験系を確立した。培養の各過程において、適合する基本培地がそれぞれ異なる理由

表2 ショウガプロトプラストからの植物体再分化とIAA, BAP及び前培養培地の影響

前培養培地 (12/21移植)			再分化培地 (1/23移植) (後培養)				グリーンスポット (G, S)発生数及び 植物体再分化			
基本 培地	カイネチン mg/l	シュクロース %	基 本 培 地	IAA mg/l	BAP mg/l	シュクロース %	2月 5日	3月 13日	4月 14日	4月 21日
R2	0	6	B5	0	0	3	1	再分化		
	1	4		0	0	3	0	1	再分化	
	1	4		0	0.5	3	0	1	8	—*
N6	0	6		0	0.5	3	0	0	0	再分化
	0	4		0	1	3	0	0	1	G, S
	0	6		0	1	3	0	0	0	G, S
	0	4		0	2	3	0	0	再分化	
	1	4		0	2	3	0	0	3	—
R2	0	6		0.05	0.5	3	0	0	1	再分化
N6	1	4		0.05	0.5	3	0	4	4	再分化
R2	0	6		0.05	1	3	0	1	4	—
N6	0	4		0.05	1	3	0	0	1	G, S
R2	0	6		0.05	2	3	0	0	1	再分化
N6	0	4		0.05	2	3	0	0	2	再分化

*—: 調査なし (別試験に供試のため)

については、今後の検討を必要とする。

ショウガの細胞培養実験系の確立は、細胞融合による体細胞雑種植物の作出のための基礎技術になるとともに、変異の幅の拡大に役立ち、ひいては遺伝子操作による品種改良への道をも拓くものとする。

文 献

- 1) Abdullah, R., E.C. Cocking and J.A. Thompson (1986) *Bio/Tech.* 4:1087-1090
- 2) 大槻義昭ら (1988) 育種学雑誌 38:(別冊1) 78-79

国内情報

人工生理活性物質の分子設計

日本たばこ産業(株) 生命科学研究所
中馬 達二・森 正隆
岡田健太郎・島崎 和子

はじめに

生体になんらかの影響をあたえる、いわゆる生理活性物質を自由に設計する分子デザインは、今後、医薬、農薬業界をはじめとする化学産業分野で最も必要とされる技術であろう。日本たばこ産業(株)生命科学研究所では生理活性物質の合理的な設計に関する研究の一環としてワモンゴキブリの性フェロモン、ペリプラノンの構造改変を進めている。ここではコンピューター支援によるフェロモン分子の立体構造の精密解析、生物活性検定、人工

フェロモン(ミミックス)の分子設計の可能性について述べる。

1. ワモンゴキブリの性フェロモン、ペリプラノンの配座解析

ワモンゴキブリの性フェロモンは主成分としてペリプラノン-A(1)とB(2)が単離され、その構造は図1に示すように決定されている。ジャーマクレン骨格に複数の酸素官能基がついた複雑な立体構造を有するペリプラノンはその合成に多段階の合成経路を必要とし、工

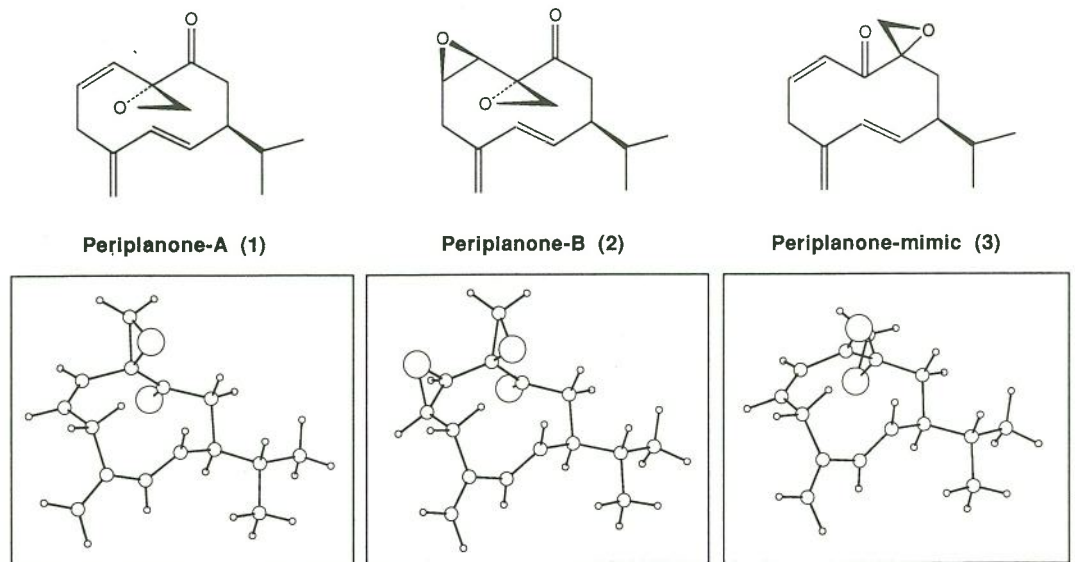


図1 天然ペリプラノンA(1), B(2)と人工フェロモン(3)の構造
(上段:平面構造, 下段:安定配座)

業合成に困難がある。そこでペリプラノン骨格の変更を行って、より単純な構造をもつ人工ペリプラノンの分子設計を目指した。

合理的な構造変更を行なうためには、天然ペリプラノンの精密構造解析を行い活性発現に必要な構造因子を決定することが必要である。精密配座解析の手段としてNMR解析、X-線結晶解析が知られているが、NMRは時間平均の構造、X-線はあるひとつの安定配座の情報を与えるのみで安定配座の統計的解析結果を与えるものではない。それに対してコンピューター支援による計算化学的手法による配座解析は分子力学、分子軌道法、分子道力学計算法を理論基盤として、可能な安定配座すべてについて統計的な解析結果を与えるものである。またNMR、X-線は測定データであるのに対し計算化学的手法は予測を目的としたシミュレーションであり、現在、分子設計には不可欠な研究ツールとなっている。

ペリプラノンA(1)とB(2)の配座解析はX-線結晶解析、NMR解析、計算化学的解析の結果、図1のような共通した安定配座をとると考えられる。すなわち、ジャーマクレン型10員環の立体配座は boat-chair 型でイソプロピル基の配向はエカトリアルである。スピロエポキシ基、カルボニル基に含まれる2個の酸素原子は10員環平面に対して上下180度（エポキシ酸素は紙面上部、カルボニル酸素は紙面下部）に分かれて位置する。この共通構造が性フェロモン活性発現に必要であるという仮説の上に立ち、この共通安定配座を活性発現因子として人工フェロモン設計の構造的指標にした。

2. 生物活性評価システム

分子設計を行う場合、その成功の鍵を握っているのは、活性評価システムの構築と言っても過言ではないだろう。分子改変にともなう、変わる生物活性を正確にモニターできなくてはならないし、目標としている生物活性以外の活性が現れたとき見逃さない検定システムが必要である。

昆虫性フェロモンの認識は触角におけるフェロモン受容細胞で行われる（図2）。受容細胞の興奮は中枢神経に伝わり、運動神経系を経て、誘引、性的興奮行動等のフェロモン行動が誘発される。我々は、改変分子の生物活性を精密に評価するため、行動検定と受容細胞興奮検定を併せて行った。行動検定では性フェロモンで誘起される興奮移動、翅上げ行動をモニターし、受容細胞興奮検定では触角にある受容細胞全体の興奮を電圧変化として検知した。この生物活性評価システムで、ペリプラノン分子改変にともなう性フェロモン活性の強さとその質の変化を正確にモニターすることを行った。

3. 人工ペリプラノンの分子設計

ペリプラノン-Aの10員環に付いたケトン基とスピロエポキシ基を入れ換えた改変分子(3)の合成は数段階ながら天然ペリプラノンのそれと比較して簡略化される。この改変によってこの分子の配座が天然ペリプラノンの安定構造と違ってしまえば活性が消失してし

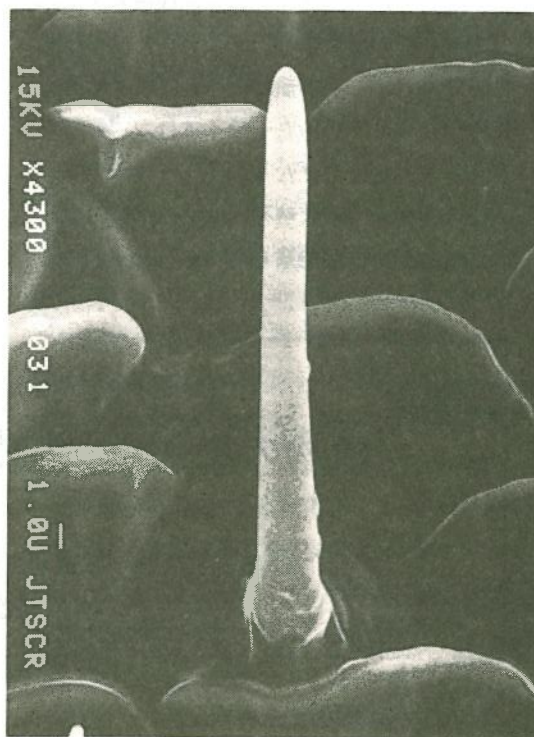


図2 ワモンゴキブリの触角上にある性フェロモン感覚毛
フェロモン受容細胞はこの感覚毛の内部に位置する

まうことが考えられるので、合成に着手する前に、コンピューター支援による分子力学計算でこの改変分子の安定配座の予測を行った。その結果、改変分子(3)の安定配座は、天然ペリプラノンに共通する10員環配座をもつこと、酸素原子の空間位置がよく一致する(天然ペリプラノンのスピロエポキシ酸素、カルボニル酸素の空間位置が、改変分子(3)のカルボニル酸素、スピロエポキシ酸素のそれぞれとそれぞれ一致する)ことが確認された(図1)。こうして配座の整合性が確認され、実際に改変分子(3)の合成が行われた。合成された改変分子(3)は結晶を与え、そのX-線結晶解析、NMR解析の結果は、計算化学手法によって予測された主要配座の座標とよく一致した。

前述の行動検定と受容細胞興奮検定によりこの改変分子の生物活性評価を行った結果、この物質はワモンゴキブリ雄に対し性フェロモン活性をもつことが明らかになった。すでにペリプラノン様の性フェロモン活性をもつことが報告されている、Germacrene-D, Verbanyl methylcarbonate のいき値が10から100ナノグラムであるのに対してこの改変分子(3)は天然ペリプラノンと同様にナノグラム以下のいき値を示す。すなわち、分子改変により合成ルートが簡略化され、しかも強力な性フェロモン活性をもつ人工性フェロモンが設計されたことになる。

この改変分子は天然型ペリプラノンと同一の10員環配座、官能基をもつが、分子内のケ

トン基とエーテル基の位置が入れ替わっており、本質的には天然型ペリプラノンとは全く異質の構造である。このような物質が性フェロモン活性を示したことは、フェロモンの骨格配座や官能基の空間配座など3次元構造を配慮した人工フェロモンの分子設計の可能性を示すものであろう。

おわりに

天然型ペリプラノンと安定配座が一致する官能基位置異性体がフェロモン活性をもつことは、天然フェロモン分子の安定配座を指標とした人工フェロモンの分子設計の可能性を示していると考えられる。フェロモンに限らず人工生理活性物質の分子設計にはさらに分子の疎水性、表面電荷密度等様々な因子の解析が必要であるが、少なくとも、立体因子は分子設計の際には重要な因子の一つであろう。

望まれる生理活性を持つ分子構造を自由に設計するには、まだまだ多くの知見が必要であろう。しかし、コンピューター支援計算化学的解析、X-線結晶解析、NMR解析等を総合的に組み合わせた精密配座解析技術、精密立体制御の合成技術、そして活性物質認識時に起こる情報伝達回路での様々な生体反応の精密な検知技術等、物理化学、有機化学、生物学分野の専門知識とこれらを有機的に結び付ける学際的なセンスがこの夢を実現する最強の武器であることはまちがいない。

国内情報

植物の増殖性細胞核抗原遺伝子の構造

農林水産省 家畜衛生試験場 慢性毒性研究室
鈴鹿 巖

はじめに

増殖性細胞核抗原 (proliferating cell-nuclear antigen, PCNA) は1978年に Miyachi

らによって自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) 患者血清に含まれる抗核抗体の抗原の一つとして見い出された。他方1981年に Bravoらは増殖細胞に特異的に出現

する分子量36kDaの酸性たんぱく質を見出し、細胞周期の速く回転する細胞の核に多量に検出されることから“サイクリン”(cyclin)と名づけた(卵成熟促進因子の構成たんぱく質p56^{cdc13}および酵母の増殖開始にかかわるたんぱく質CLNにもサイクリンの名が冠せられているが全く別の物質である)。1984年に両者が同一物質であることが証明され、この抗原は“PCNA/サイクリン”とよばれるようになった。PCNA/サイクリンが重要な機能を担っていることはDNA複製期(S期)とカップルした量的変動を示し、哺乳類や鳥類などの動物界に広く分布していることから予想されていたが、1987年になりにはわかに脚光を浴びるようになった。それはPCNA/サイクリンが“DNAポリメラーゼ δ の活性を促進する補助因子”と同一たんぱく質であるという発見である。さらに1987年にPrelichらおよびBravoらは*in vitro*のSV40 DNA複製系の再構成過程でDNA合成に必要な細胞側因子“SV40 DNA複製促進因子”を発見し、この因子が δ 補助たんぱく質およびPCNA/サイクリンと同一たんぱく質であることを証明した。その結果DNAポリメラーゼ δ とPCNA/サイクリンの登場により、哺乳類細胞のDNAは二つの酵素(α 型と δ 型)の作業分担によって複製されるという新たな複製モデルが提唱されるに至った。さらに、PCNA/サイクリンの発見はDNA複製装置の活性化と細胞増殖(周期)の調節に同一の因子が関与していることを初めて示したことになり、PCNA/サイクリンはS期にDNA複製を開始するシグナル伝達の究極的標的の一つであると考えられる。

この様なPCNA/サイクリンの機能の解明と同時にそのcDNAの構造解析が進行していた。1986年にMoriuchiら¹⁾によってラットの、また1987年にAmendralら²⁾によってヒトPCNA/サイクリンのcDNAクローンが単離された。そのコーディング領域を比較すると261個のアミノ酸のうち、わずか4個しか変わらない。この極めて高いアミノ酸配列の相同性(98.5%)はPCNA/サイクリンが哺乳類間で強く保存され生命現象の維持に必須

の役割を演じていることを示唆している。そこで筆者らは、PCNA/サイクリンがDNA複製に必須なたんぱく質であること、しかも異種哺乳類間で強く保存されていることなどから類推して、その遺伝子が植物界にも保存されている可能性が高いと予想した。この仮説を実証するために、高等植物で以下に示すような探索を試みた結果、予想通り、PCNA/サイクリン遺伝子は植物界に保存されているという結論に至った³⁾。

1. 植物の増殖性細胞核抗原の検出

ダイズの根の先端の組織切片を用いて、免疫組織化学的方法でヒト抗PCNA抗体と反応させた結果、抗体と反応する抗原がその分裂組織の核に局在した。さらに、ダイズの根の先端から抽出したたんぱく質分画の中に、ヒト抗PCNA抗体と反応する抗原がイムノブロット法によって検出された。そのサイズは約34kDaであり、ラットのPCNA/サイクリンのサイズとほぼ一致している。これに対して、ダイズ種子のたんぱく抽出物にはヒト抗PCNA抗体と反応する抗原は認められなかった。これらの結果³⁾は、植物細胞にPCNA/サイクリンの同族体の存在を示唆するものであり、哺乳類のPCNA/サイクリンが増殖期の細胞に見いだされ、かつその核に局在するという事実とも符合する。

2. イネ増殖性細胞核抗原遺伝子の単離

ダイズの根の先端にヒト抗PCNA抗体と反応する抗原が見出されたので、この抗原の遺伝子を単離するために、まずイネの緑葉からDNAを抽出して、その制限酵素消化物をラットPCNA/サイクリンcDNAをプローブに用いて、サザンブロットハイブリダイゼーションを行ったところ、5種類のイネの標品(Indicaの1品種とJaponicaの4品種)について、ラットプローブと反応する明瞭な単一の5~6kbバンドを検出した。そのコピー数はハプロイドゲノム当たり約1コピーと推定した。そこでイネ(Nipponbare)のゲレムD

NAの *Hind* III 消化物の5 kb断片をCharon 28にクローン化し、次いでpUC18にサブクローンした。このクローンに対し“pCJ-1”と命名した³⁾。そのインサートDNAの塩基配列を解析した結果、イネPCNA/サイクリン遺伝子のほぼ完全な構造が判明した⁴⁾。

イネPCNA/サイクリンのコーディング領域は263個のアミノ酸からなり(ラットは261個のアミノ酸からなる)、分子量は29,275 Daと推定された。そのアミノ酸配列をラットと比較すると、64%の相同性を、また保存的置換を含めると80.6%の相同性を持つことがわかった。図1にアミノ酸配列の一部(41番目から80番目)を示す。動物ではラット⁵⁾、ヒト⁶⁾ およびショウジョウバエ⁷⁾のPCNA/サイクリンの構造が決定されている。

次に、他の高等植物にPCNA/サイクリン遺伝子が保存されているかどうかを検討した。まずダイズおよびタバコのゲノムDNAとラットプローブとサザンブロットハイブリダイゼンションを行ったところ、シグナルの強度およびサイズに違いがあるが、ラットプローブと反応するDNA配列が見つかった。そこで、イネPCNA/サイクリンの遺伝子の一部をプローブに用いて、イネ、ダイズ⁸⁾およびニチニチソウ⁹⁾からPCNA/サイクリンのcDNAを単離して、その構造を解析し推定されるアミノ酸配列を比較したところ、これらの4種の植物間で極めて高い(87.5%)アミ

ノ酸の相同性が認められた(図2)。この結果は、PCNA/サイクリンが植物界に強く保存されている証拠である。

3. イネ増殖性細胞核抗原遺伝子の発現

イネのクローン化DNAをプローブとして、イネの発芽間もない根および芽などの分裂の盛んな組織から抽出したpoly(A)⁺RNAとのノーザンブロットハイブリダイゼンションを行ったところ、プローブと反応する転写物が認められた³⁾。そのサイズは約1.2kbで、ラットのPCNA/サイクリンのmRNAのサイズとほぼ一致した。これに対し、イネ緑葉のような分裂の終わった組織から分離したpoly(A)⁺RNAの中には、プローブと反応する転写物は見い出されなかった。イネPCNA/サイクリン遺伝子が分裂組織で発現していることは、哺乳類のPCNA/サイクリンのmRNAがDNA合成期に増加することと符合する。同様の結果はニチニチソウの同調培養系でも観察されている⁹⁾。

おわりに

哺乳類で見つかったPCNA/サイクリン遺伝子が植物界に保存され、その分裂組織で発現しているという結果は驚くべき重要な発見である。おそらく、その共通の原始型遺伝子

41		80
Rice	DSSHVALVAL LLRSEGFEHY RCDRNLSMGM NLNNMAKMLR	
	*****: ** * *****: * *****: ** ** *: * *:	
Rat	DSSHVSLVQL TLRSEGFDTY RCDRNLAMGV NLTSMKILK	

図1 イネとラットのPCNA/サイクリンcDNAから推定されるアミノ酸配列一部

(★)は同一アミノ酸を、(:)は類似度の高いアミノ酸を示す

41		80
Rice	DSSHVALVAL LLRSEGFEHY RCDRNLSMGM NLNNMAKMLR	
Soybean	-----I-----K	
Vinca	-----P-----	

図2 植物のPCNA/サイクリンcDNAから推定されたアミノ酸配列の比較
(-)はイネと同一アミノ酸であることを示す

が動物界と植物界に分岐する10億年以前にすでに発生していたと思われる。そして、その機能的重要な故に、生物の進化の過程で、その変異が強く制約を受けて動植物界に保存されたと考えられる。最近、下等真核生物である出芽酵母からも⁹⁾、PCNA/サイクリン類似体が単離され、酵母のDNAポリメラーゼIIIおよび哺乳類のDNAポリメラーゼ δ のプロセシビティーを促進することが報告された。

哺乳類におけるシグナル伝達等に必須の役割を果たしているプロテインキナーゼ¹⁰⁾やカルモジュリン¹¹⁾、また、分裂酵母のS期の開始とM期の開始の双方に不可欠であるp34^{cdc2, 12)}等の植物同族体が、著者らのPCNA/サイクリンの研究とほぼ同時期に発見されている。

これらの発見は細胞増殖や分裂の分子機構が従来の子測以上に普遍的であることを示唆している。植物の細胞増殖やその分裂の調節機構の研究は、植物細胞の特殊性のために動物や酵母に比べて格段に立ち遅れてしまったが、動植物界に共通遺伝子の探索が切っ掛けとなって、今後、急速な進展が期待される。そして増殖あるいは分裂を演出するマスター遺伝子群の発現の実体がやがて明らかになるであろう。最近の報告によるとショウジョウバエのPCNA/サイクリン遺伝子の発現はホメオドメインたんぱく質により直接制御されているらしい⁷⁾、そのたんぱく質の仲間が植物に存在するかどうかは依然として不明であるが、生育途上で、細胞の特徴を決定する遺伝子群の探索は、例えば、将来C3植物細胞にC4化の場を獲得させる手法の開発に重要

な手がかりが得られるのではないかとと思われる。

なお、本研究は著者が農業生物資源研究所分子育種部生育遺伝子研究室滞在中に実施した研究の一部である。

文 献

- 1) Moriuchi, T., K. Matsumoto, T. Koji and P. K. Nakane (1986) *Nucleic Acid Symp. Ser.* 17 : 117-120
- 2) Almendral, J. M., D. Huebsh, P.A. Blundell, H. MacDonald-Bravo and R. Bravo (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 1585-1579
- 3) Suzuka, I., H. Daidoji, M. Matsuoka, K. Kadowaki, Y. Takasaki, P.K. Nakane and T. Moriuchi (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 3189-3193
- 4) Suzuka, I., S. Hata, M. Matsuoka, S. Kosugi and J. Hashimoto (投稿準備中)
- 5) Moriuchi, T., T. Koji and P.K. Nakane (投稿準備中)
- 6) Travali, S., D-H. Ku, M.G. Rizzo, L. Ottavio, R. Baserga and B. Calabretta (1989) *J. Biol. Chem.* 264 : 7466-7472
- 7) Yamaguchi, M., Y. Nishida, T. Moriuchi, F. Hirose, C-C. Hui, Y. Suzuki and A. Matsuoka (1990) *Mol. Cell Biol.* 10 : 872-879
- 8) Kodama, H., M. Ito, N. Ohnishi, I. Suzuka and A. Komamine (投稿準備中)
- 9) Bauer, G.A. and P.M.J. Burgers (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 7506-7510
- 10) Lawton, M. A., R.T. Yamamoto, S.K. Hanks and C.J. Lamb (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 3140-3144
- 11) Jena, P. K., A.S.N. Reddy and B.W. Poovaiah (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 3644-3648
- 12) John, P. C.L., F.J. Sek and M.G. Lee (1989) *Plant Cell* 1 : 1185-1193

国内情報

遺伝子再構成による枯草菌の孢子形成

東京農工大学 農学部 応用生物科学科

佐藤 勉・小林 泰夫

1. はじめに

細胞分化のメカニズムを解明することは現代生物学の重要な課題の一つである。この細胞分化の現象は、多細胞生物に限らず、多くの単細胞の微生物、酵母や細菌などでも観察される。高等生物の細胞分化において、トピックスとして話題を集めたのは、利根川博士らによる DNA 再構成の発見である¹⁾。それまで DNA は不変で、高等生物の分化した細胞のどれもが全く同じ遺伝情報を持っていると考えられていたが、この発見により少なくとも免疫細胞では分化時に DNA が変化し、それにより各細胞固有の抗体を産生するようになるということが明らかとなった。免疫細胞においては DNA の再構成が分化の中核を担っているのである。さて、本稿で扱うのは枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の孢子形成期における DNA 再構成の現象である。

2. 枯草菌の孢子形成

枯草菌は、グラム陽性の桿菌で環境の劣化に伴い増殖を停止し、一連の形態学的、生化学的变化を経て、外部環境に抵抗性を持った休眠性の孢子を形成する。孢子は適当な栄養条件下に移されると発芽して増殖を繰り返す。

枯草菌の孢子形成の遺伝学的解析は1960年代から始まり、多くの孢子形成能欠損突然変異株が分離されて、現在まで約50種類の孢子形成遺伝子が知られるようになった。それらはその遺伝子に突然変異が起きたとき、どの段階で孢子形成が停止するかによって *spo0*, *spoII*, *spoIII*, *spoIV*, *spoV*, *spoVI* の6種類に分類されている。1980年代にはそれらの遺

伝子のクローン化が活発に行われた。1980年代後半になると孢子形成における各遺伝子の関係、発現の順序などがわかってきた。これらの遺伝子がネットワークをつくり、それが孢子形成過程で逐次的に発現して孢子の構築を行うことが次第に明らかになってきた。これらの孢子形成遺伝子の制御については他の総説があるのでそれを参照されたい²⁾。我々も多くの孢子形成遺伝子をクローン化し、解析を進めてきたが、その内の一つが今回明らかになった DNA の再構成を起こす *spoIVC* である。

3. *spoIVC* 遺伝子のクローン化

spoIVC 変異株は孢子形成が第IV期で停止する。我々はまずこの遺伝子をプロフェージ形質転換法により、枯草菌のファージ ϕ 105 にクローン化した³⁾。*spoIVC133* 変異を相補する部位は、クローン化した 3.6kb *EcoRI* 断片上に存在していた。また、我々とは独立に Yudkin らは遺伝学的研究より *spoIVC* は二つのシストロンより成り立っていることを示唆した⁴⁾。

4. *spoIVC* の構造

我々は、次にこの *spoIVC* 遺伝子の構造を決めるため塩基配列の決定を行った。その結果、二つの ORF が見いだされた。それらは互いに向き合って存在し、各々の C 末端側は 87bp オーバーラップし、アミノ酸残基数はそれぞれ 500 と 155 であった。この結果は Yudkin らの遺伝学的研究とよく一致し、我々は、それぞれを *cisA*, *cisB* と呼ぶことにし

た⁵⁾。さて、*cisA* の ORF ができると次に他のたんぱく質とのホモロジー検索を行った。コンピューターの画面を見ていると驚いたことに DNA インベルターゼとして知られる Hin, Gin, Pin 及びトランスポゾンのリゾルベースなどと非常に高いスコアを示した⁵⁾。サルモネラのべん毛相変異は DNA の逆位により起こるが、それを直接に制御しているのが Hin である。また、リゾルベースはトランスポゾンの解離に働く。この2種類の組換え酵素に特徴的なことの一つはそれらの酵素をコードする遺伝子の周辺で DNA 再構成が起こるといことである。我々は、この事実をもとに以下の実験を行った。

5. DNA再構成

孢子形成期のいろいろな時期の細胞から DNA を抽出し、*EcoRI* で切断し、クローン化した 3.6kb *EcoRI* 断片をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行った。*cisA* 産物が組換え酵素であるならば、孢子形成のある時期に、*cisA* 周辺領域で再構成が起こると考えたからである。幸運にもこの予測は当たり、孢子形成開始期より3時間後 (T_3) に 3.6kb の他に新たな二つのシグナル 2.8kb, 5.4kb が検出された (図1 a)。このことは孢子形成期の枯草菌細胞内で DNA 再構成が起こることを示している。さらに、*cisA* の発現時期を S1 マッピングにより調べ

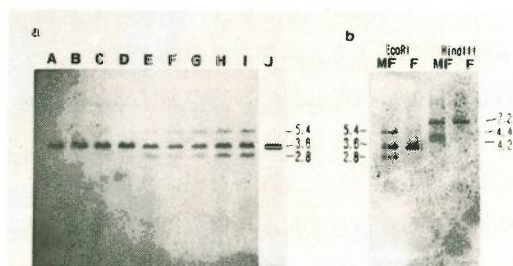


図1 (a) 孢子形成期における DNA 再構成の時間的变化

JH642株(野生株)のDNA(A-I); 1S47株(*cisA* 変異株)のDNA(J); 栄養増殖期(A), T_0 (B), T_1 (C), T_2 (D), T_3 (E), T_4 (F), T_5 (G), T_6 (H,J), T_8 (I)

(b) T_7 におけるフォアスポアでの DNA 再構成

細胞全体(母細胞及びフォアスポア)から得たDNA (MF), 精製したフォアスポアから得たDNA(F) (文献2より)

た結果、 T_3 において強いシグナルが見られ、また *cisA* の変異株では DNA の再構成は見られなかった。

これらの結果は、Hin やリゾルベース等と同様、*cisA* 産物も組換え酵素として働き、*cisA* 周辺領域を組換えていることを強く示唆している。またこの再構成の結果 44kb の DNA が欠失し、その DNA 上に *cisA* が存在していることが最近我々の研究により明らかとなった。

さて次に我々が注目したのは、枯草菌は形態学的にみて孢子形成期には二つの染色体 DNA をもつということである。つまり孢子形成期の細胞は隔膜で仕切られた大小二つの画分(小さい方は将来孢子となるフォアスポア、大きい方は孢子形成を助ける母細胞)に分かれ、それぞれ染色体をもっている。DNA 再構成がこのどちらの DNA で起こっているか興味をもたれるところである。これを調べるため、 T_7 期の細胞よりフォアスポアを抽出し、DNA を精製した。この DNA を *EcoRI* で切断し、前述のプローブでサザンハイブリダイゼーションを行った。この結果、フォアスポアではバンドに変化が見られず、DNA 再構成は起こっていないということが明らかとなった(図1 b)⁹⁾。言い換えれば DNA 再構成は母細胞でのみ起こる。この現象のポイントは母細胞は孢子の成熟と共に消失してしまうので再構成された DNA は子孫に受け継がれることはないといところにある(図2)。トランスポゾンの解離やべん毛相変異における DNA の逆位が全く偶然に起こるのに対し、この孢子形成期の DNA 再構成はプログラムされていて不可逆的であるという点で大きく異なっている。

6. SigK

枯草菌の孢子形成の特徴はプロモーター認識能の異なるシグマ因子をもつ多様な RNA ポリメラーゼによる遺伝子発現の調節である²⁾。枯草菌には現在9種類のシグマ因子が知られているが、このうち SigK は孢子形成後期の母細胞にのみ現われスポアコート遺

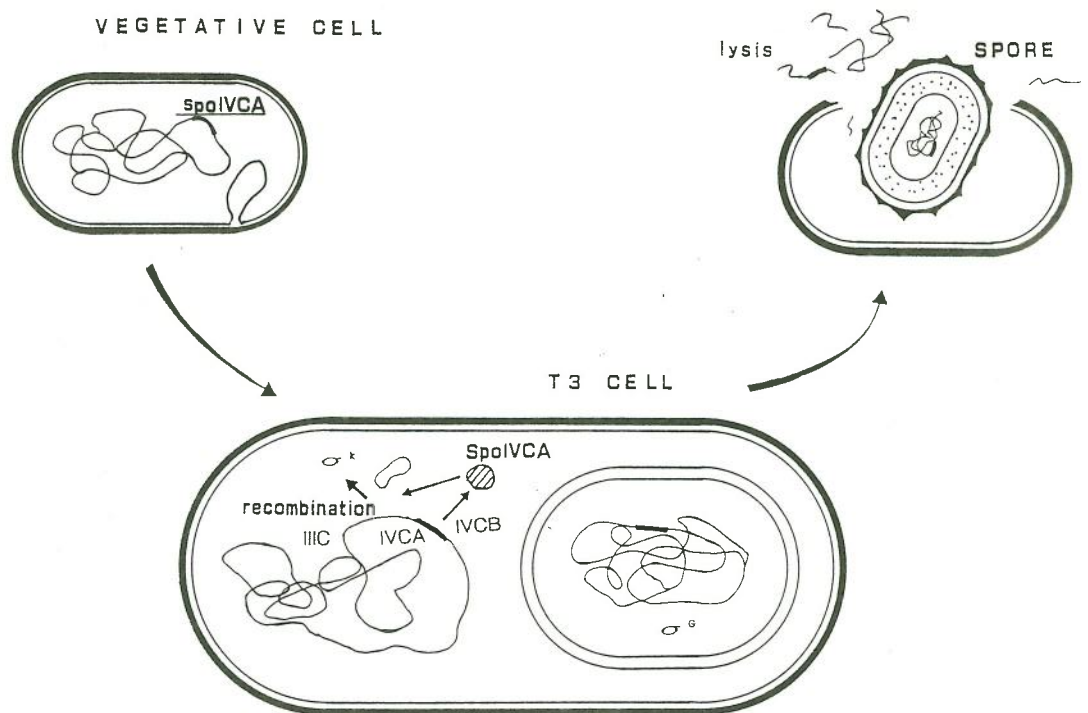


図2 胞子形成とDNA再構成

栄養細胞では*spoIVC*は発現しない。胞子形成開始3時間後(T₃細胞)には、胞子形成細胞は母細胞とフォアスポアに分かれる。母細胞では*spoIVC cisA* 遺伝子が発現して、部位特異的組換え酵素が産生され、DNAの再構成が起こる。その結果、新たな胞子形成遺伝子*sigK*が構築され、胞子形成は次の段階へ進む。一方、フォアスポアでは*spoIVC cisA* 遺伝子は発現せず、DNAの再構成は起こらない。フォアスポアは成熟胞子となって培地中に遊離し、母細胞は溶菌する。

伝子や他の胞子形成後期遺伝子の転写に関与する。スポアコート遺伝子産物はフォアスポアの外側に沈着しスポアコートを構築する。LosickらはこのSigKを精製し、N末端側のアミノ酸配列を決定した⁶⁾。驚いたことにその配列はSpoIVCB、すなわち我々が、*cisB*として塩基配列を決定した産物と同一であった。*cisB*の塩基配列から予想されるアミノ酸配列は、この遺伝子の産物が、シグマ因子のN末端側のアミノ酸配列と高いホモロジーをもつたんぱく質であることを示していた。一方、遺伝子地図上の*spoIVC*の近傍には*spoIIC*⁷⁾が存在し、これはシグマ因子のC末端側のアミノ酸配列と高いホモロジーをもつたんぱく質をコードしていることが明らかとなっていた。これらの事実を考え合わせ、彼らは胞子形成期にDNA再構成が起き、*spoIVCB*と*spoIIC*が結合し、*sigK*遺伝子ができると推定した。そして再構成が起こった後のDNAのクローニングを行い推定される結合部分の塩基配列を決定したところ*spoIVCB*のN末端側と*spoIIC*のC末端側とが結合し

ていることがわかった⁸⁾。我々は、組換え酵素からのアプローチによりこのDNA再構成の現象を明らかにしたが、彼らは我々とは独立にSigKからのアプローチにより同じ現象を明らかにしたのである。

7. DNA再構成の意味

さて、我々及びLosickらの研究により胞子形成開始期より3時間後に組換え酵素SpoIVC CisAが発現し、母細胞のDNAを組換え、その結果新たな胞子形成遺伝子*sigK*が生じることが明らかとなったが、次に何故枯草菌はこのようなDNA再構成による制御を行っているのであろうかという疑問が生じた。我々はこの*sigK*遺伝子を胞子形成後期の細胞からクローン化し、*sigK*遺伝子を運ぶ特殊形質導入ファージを*cisA*及び*cisB*の変異株に溶原化させた。*cisA*や*cisB*の変異株は通常胞子を全く作らないが、このファージを溶原化させると、いずれの変異株も野生株と同レベルまで胞子形成能を回復した。このこ

とは *cisA* 遺伝子すなわち組換え酵素遺伝子が欠損していても、染色体上に再構成された *sigK* 遺伝子があれば、孢子形成は起こるということを示している。つまり、あらかじめ *sigK* 遺伝子が染色体上があれば組換え酵素は不用で、DNA 再構成はバイパスされる。さらにこの結果から組換え酵素 SpoIVC Cis A は *sigK* の構築以外には、孢子形成には関与していないということが明らかになった。この結果から考察されることは、DNA 再構成は進化の過程でトランスポソンの挿入などにより、偶然に枯草菌が獲得した制御機構ではないかということである。現在我々は他の *Bacillus* においても孢子形成期における DNA 再構成が普遍的な現象かどうかについて検討中である。

8. おわりに

先に述べたように免疫細胞は、DNA 再構成により各細胞に特異的な抗体産生遺伝子を構築し、侵入する外敵に備える。DNA レベルでの変化が起こるともはや元には戻れない。いうなれば専門細胞となるのである。ラン藻 (*Anabaena*) は窒素源がなくなると栄養細胞 10個に 1個の割合で窒素固定を専門に行うヘテロシストを分化する。ヘテロシストは、DNA 再構成 (欠失) によりニトロゲナーゼ遺伝子を構築し、他の細胞に窒素源を提供す

る⁹⁾。免疫細胞、ヘテロシスト、そして枯草菌孢子形成期の母細胞に共通するのは、これらが専門細胞として機能しているということ及び、体細胞 (母細胞) で DNA 再構成が起こるということである。生殖細胞 (フォアスポア) で DNA 再構成が起こっては種の維持が不可能になるためであろう。今後他の生物においてもこのような現象が見つかれば、分化における DNA の再構成という現象がより普遍性を増してくるかもしれない。

文 献

- 1) Toneyawa, S. (1983) *Nature* 302 : 575-581
- 2) 小林泰夫 (1989) 由良隆ら編 遺伝子の発現と制御 I p.191-217 日本分子生物学会編 シリーズ分子生物学の進歩 4 丸善
- 3) Fujita, M. and Y. Kobayashi (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199 : 471-475
- 4) Farquhar, R. and M.D. Yudkin. (1988) *J. Gen. Microbiol.* 134 : 9-17
- 5) Sato, T., Y. Samori and Y. Kobayashi (1990) *J. Bacteriol.* 172 : 1092-1098
- 6) Kroos, L., B. Kunkel and R. Losick, (1989) *Science* 243 : 526-529
- 7) Errington, J., S. Rong, M.S. Rosenkrantz and A.L. Sonenshein (1988) *J. Bacteriol.* 170 : 1162-1167
- 8) Stragier, P., B. Kunkel, L. Kroos and R. Losick (1989) *Science* 243 : 507-512
- 9) Golden, J.W., S.J. Robinson and R. Haselkorn (1985) *Nature* 314 : 419-423

国内情報

カイコ孵化幼虫による毒物等の検定

農林水産省 蚕糸・昆虫 農業技術研究所 育蚕技術研究室

栗林 茂治

はじめに

最近では理化学的分析技術が高精度化し、環境汚染物質などを ppb 単位以下の微量まで正確に検出するけれども、物質が全く不明の

場合には適用が容易でないし、検出値が生体にどんな影響を及ぼすかという毒性に関連したことがらについては生物検定の助けを借りなければならぬ。薬物の生体内代謝や複合汚染などの問題がクローズアップされるにつ

れて、毒性を総合的に評価する生物検定の重要性が改めて見直されている。

わが国で古くから飼育されてきたカイコは、化学農薬が使用され始めた当初から汚染被害を受けたこともあって、有用動植物のうちでも薬物類に最も感受性が高いものとして知られている¹⁾。またカイコは斉一な個体群がいつでも大量に準備でき、扱いやすいなど、生物検定に合った適性²⁾を備えている。このようなカイコの特性を環境汚染物質等の簡易検定に利用する目的で一連の手法の組立てを行った。

1. 毒物等の種類の判定

(1) カイコの中毒症状の観察

環境汚染問題等が起こると、まず原因物質の本体を追及する必要が生ずる。

カイコ幼虫が現わす中毒症状は薬物の種類によって特徴的な場合が多い。そこで幼虫に各種薬物を濃度別に添食し、苦悶、嘔吐、挙動、歩行性などに現われる症状の特徴をあらかじめ詳細に調べておけば、これを利用して未知薬物をカイコ幼虫に添食または接触させて現われる中毒症状の特徴を調べることによって未知薬物の性質や大まかな類別が可能になる。類症もあるのでこれだけで原因物質の特定はできないが、原因として疑わしい物質

の範囲をしぼりこむことができる。

(2) カイコ体液のエステラーゼ活性の検定
カイコが有機燐系またはカーバメート系の薬剤に被毒すると体液のエステラーゼ活性が低下する。これを検定する試薬の基質としてA液(β -naphthylacetate 10mg を acetone 2 ml に溶かし、それに 1/10 M のリン酸緩衝液 (PH 7.0) を加えて全量を 50ml としたもの)と、指示薬としてB液(naphthanil diazo blue-B の 50mg を 10ml の蒸留水に溶かしたもの)を準備しておき、検定にあたってカイコが壮齢であれば尾角を切って体液を濾紙上に取り、孵化幼虫であれば数10頭を生理的食塩水を加えて磨砕し、その液を濾紙上にとって、約10分後にA液とB液の混合液(5:1)に浸す。現われる呈色が淡い褐色であればエステラーゼ活性が阻害されているから有機燐系またはカーバメート系の薬剤による被毒と判定され、赤褐色であれば活性は阻害されていないからこれら活性阻害剤による被毒ではないと判定される。

(3) 孵化幼虫—薄層クロマト検定法

薬物は薄層クロマトプレートの薄層上を溶媒とともに移動する際に分離・精製され、溶媒の展開距離に対するその移動距離の比率(Rf値)は一定条件下で再現性がある。そこで常法³⁾にしたがって市販の薄層プレート上に薬物標準品の試料を添付、溶媒によって

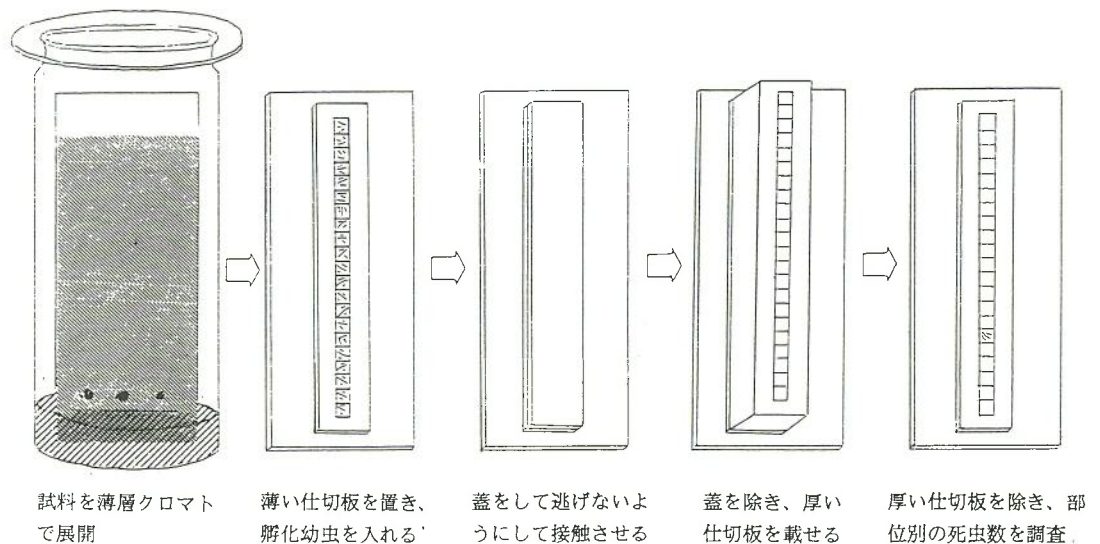


図1 「薄層クロマト—カイコ孵化幼虫接触法」による薬物の種類の判定の操作手順

展開後、乾かし、プレート上の試料添付部位から溶媒が浸透した先端までの各部位に図1の方法で孵化幼虫を接触させ、死虫の現われる部位から Rf 値を判定する。このように展開溶媒をいろいろに変えて薬物・溶媒の Rf 値を求め検定の基準にする。未知薬物の検定にあたってはさきと同じ要領で、抽出濃縮した試料を薄層プレート上で展開させ、プレート上の各部位に孵化幼虫を接触させ、致死虫の現われる部位から Rf 値を求め、標準薬剤による溶媒別の Rf 値表に照らして薬物の種類を判定する。薬物間で Rf 値が同じ場合も少なくないが、展開溶媒の種類を変えれば Rf 値もずれてくるから、溶媒を何種類も用いることと、検定にあたって標準薬剤を常に併用することが精度を高めるうえで大切である。薄層クロマトプレート上の薬物移動部位の判定に一般に用いられている発色剤の噴霧または紫外線の照射等は、薬物の種類によってかなり特異性があるし、検出感度もそれほど高くないが、カイコによるこの判定法は毒性のあるものであればほぼ万能的に検定できる。

2. 毒物の量の判定

(1) 孵化幼虫—桑葉円盤法

毒物等の本体が突き止められたら次は量の判定である。

標準薬剤を段階希釈し、その所定量を面積 1 cm² の円形に打ち抜いた桑葉面にマイクロシリンジで均一に塗布して、25°C の定温室内でカイコ孵化幼虫20匹に一定時間（3～24時間）給与する。この方法で葉の薬量と致死率との関係を葉種別にあらかじめ調べておく。汚染度未知の桑葉を検定するに当っては、その葉を同じように円形に打ち抜き、孵化幼虫に同じ時間給与してその致死率を調査し、致死率と薬量の関係表に照合すれば薬量が求められる。桑葉をリーフパンチで打ち抜いてカイコに給与するだけで検定ができ、抽出、精製などが不要で、操作が極めて簡単、しかも検定過程における薬物の損失がなく、1～2g のごく少量の試料によって検定ができる。

試料の採取部位による汚染の違いに起因する検定結果のふれはあるが、これらは検定の繰返しを多くすることで改善できる。

(2) 孵化幼虫—乾燥残留接触法

図2のように標準薬剤を揮発性溶媒で段階希釈し、それぞれから 0.1ml ずつを別の試験管にとり、溶媒が揮発しきって薬剤が管底で乾燥状になったところに孵化幼虫20匹をそれぞれ差し入れ、綿栓をして25°C の定温器内に放置し、一定時間（6～24時間）後に致死率を調べる方法であらかじめ検定の基準を作っておく。汚染度未知の桑葉等を検定するに当っては、化学分析の常法⁴⁾にしたがって当該薬物を抽出し検液とする。簡便法としては被検植物葉（通常10g、汚染度が低い場合には50～200g）を細切して、その約5倍量の溶剤（その物質を抽出しやすい溶媒、アセトニトリル、ベンゼンなど）中に浸漬、ときどき振動させながら薬物を溶媒中に溶出させ、その濾液をそのまま、あるいは溶媒を蒸発させ濃縮して検液とする。この検液を n-ヘキサ

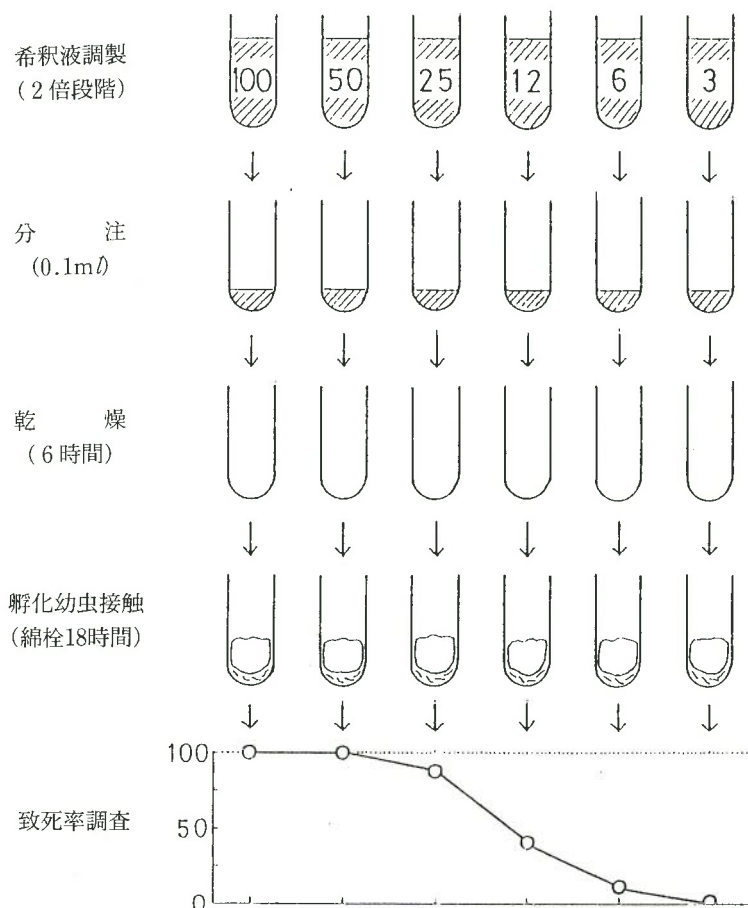


図2 「カイコ孵化幼虫—乾燥残留接触法」による薬物の量の判定の操作手順

ンやメタノールのような揮発性溶媒で段階希釈し、検定基準を作った場合と同じ要領でカイコ孵化幼虫を接触させ、致死率を調べ、薬量を求める。薬物量は次式によって算出される。

$$\text{薬物残留量(ppm)} = \frac{D}{\frac{a}{b} \cdot V}$$

ただし a : 分析に用いた試料の重量 (g)

b : 供試虫の50%が致死する希釈溶剤の液量 (mL)

V : 試験管に分注する液量 (mL)

D : 標準薬剤によって調べた50%致死薬量 (試験管当り, μg)

本法による検出限界は薬物の種類によって大差があり、毒性の強いものは1試験管当たり0.03 μg 程度、10gの桑葉を試験とした場合には生葉重当たり0.02ppm程度の汚染まで感知し、試料量を増せばそれに応じてさらに低濃度まで検出が可能になる。

おわりに

以上の手法は実際には組合わせて用いるが

その手順は紙面の都合で割愛する。たかだか数ミリに満たないカイコ孵化幼虫が毒物等に鋭敏に反応し、その種類や量をかなりの確に判定することに驚嘆する。毒性のあるものであればほぼ万能的に、毒性に関連させて検出できること、少量の試料で足りること、手法が簡便であることなどがこの検定法の特徴である。卵は蚕種業者からいくらでも入手できるし、孵化幼虫は人工孵化法と孵化前後の冷蔵の組合せで常時供給が可能である。カイコは人類との長いかかわり合いの中で生物検定に合った適性を備えており、環境汚染や農薬の開発・利用のいろいろな分野において、とくに化学的分析法と結びついて毒性を評価するための検定に役立つことが期待できる。

文 献

- 1) 栗林茂治 (1966) 大気汚染と養蚕 蚕試資料 20 : 1-102
- 2) 細辻豊二編 (1985) 最新農薬生物検定法 全国農村教育協会 pp. 961
- 3) 石川正幸他編 (1968) 薄層クロマトグラフィー 南山堂 pp. 317
- 4) 後藤真康・加藤誠哉編著 (1987) 増補残留農薬分析法 ソフトサイエンス社 pp. 348

国内情報

海洋細菌のキチン分解酵素遺伝子のクローニングとそのバイオコントロールへの利用

農林水産省 農業生物資源研究所 微生物機能利用研究室

平八重一之・日比 忠明

はじめに

キチンは N-アセチル-D-グルコサミンの重合した多糖質で、甲殻類、昆虫類、菌類などの構成成分として生物界に広く分布しており、セルロースと並ぶ重要なバイオマス資源でもある。一方、キチナーゼを代表とするキチン加水分解酵素は、上記の生物に加えて、細菌や高等植物にも存在する。従来、キチナーゼは、主として、菌類の細胞壁の構造解析や

プロトプラストの調製などに利用されてきたが、最近、植物や根圏微生物のキチナーゼが、植物の生体防御に極めて重要な機能を果たしていることが明らかにされたことによって、このキチナーゼの機能を、遺伝子工学的手法を用いて、積極的に、植物病害のバイオコントロールに応用しようという研究が注目されるようになった。

私たちの研究室では、各種キチナーゼ遺伝子のクローニングとそのバイオコントロール

への利用を目的として、現在、海洋細菌（平八重ら、1990）、昆虫病原糸状菌（Havukkalaら、1990）およびイネ（Nishizawaら、1990）について、それぞれのキチナーゼ遺伝子のクローニングとその遺伝子解析を進めている。ここでは、最初に、植物の生体防御に果たすキチナーゼの役割について、その概要を説明した後、私たちの海洋細菌での研究の現状を簡単に紹介する。

1. キチナーゼと植物の生体防御

キチンを分解する細菌、放線菌および菌類などの微生物は、海泥、海水、土壌、堆肥中などから分離される。従来、土壌にかに殻などのキチンを加えると、土壌病害が軽減することが知られていたが、これは、キチンの添加によって土壌中に生息するキチン分解菌が増加し、これらの分泌するキチナーゼが土壌病原菌の細胞壁キチンを分解する結果、病原菌の増殖が阻害されるためである。このような現象をさらに積極的に応用し、遺伝子工学的手法を用いて、根圏や葉面の非病原微生物に新たにキチナーゼ活性を付与したり、あるいは菌本来の活性を増強させることができれば、バイオコントロールの新たな手段が提供されることになる。

細菌のキチナーゼでは、現在、*Serratia marcescens*を中心に、酵素やその遺伝子に関する研究が急速に進んでおり、既に、そのバイオコントロールへの応用も試みられている。すなわち、*S. marcescens*のキチナーゼ、分子量58kDaと52kDaの2種について、それぞれの遺伝子（chi Aおよびchi B）がクローニングされ、全塩基配列が明らかにされている。さらに、chi A遺伝子を導入・発現させた大腸菌を、*Sclerotium rolfsii*で汚染した土壌中に灌注したところ、インゲンマメでの発病が約半分に抑制されたという報告がある。また、chi Aを*Pseudomonas fluorescens*に導入した例では、対峙培養した*Fusarium oxysporum* f. sp. *redolens*の菌糸の伸長が阻害されるとともに、ハツカダイコン種子へのバクテリアゼーションによって、発病の軽減

が認められている。

一方、高等植物のキチナーゼについては、植物自身にまったくキチンが含まれていないにもかかわらず、マメ類、ムギ類など多くの植物でその存在が認められており、その意義について、従来から疑問が持たれていた。しかし、最近になって、これらの植物キチナーゼがいずれも、ウイルス、細菌、菌類などの病原体の感染によってその発現が誘導されること、これまでその機能が不明であった感染特異的たんぱく質（PRプロテイン）の一部はキチナーゼであることが示されたことなどから、現在では、植物キチナーゼは、同じく植物に含まれる β -1,3-グルカナーゼなどとともに、植物の生体防御機構の一部を構成する重要な溶菌酵素であると認識されるようになった。植物病原菌類（糸状菌）の細胞壁は、キチン、その脱アセチル化物であるキトサン、 β -1,3-グルカン、 β -1,4-グルカン（セルロース）、およびたんぱく質などを主成分として構成されている。このような病原菌類の感染に対して、植物キチナーゼは、菌糸あるいは孢子発芽管の細胞壁を溶解することによって、直接、菌の侵入・拡大を阻止するが、それと同時に、加水分解によって低分子化したキチンやキトサンの断片が、菌のRNA合成を阻害する一方、植物に対するエリシターとして働いて、ファイトアレキシンの生産、フェニルプロパノイド代謝系の活性化、プロテアーゼインヒビターの合成など、植物の防御機構に関わる一連の反応を誘導する。植物のキチナーゼ遺伝子としては、これまでに、インゲンマメ、タバコ、ジャガイモ、キュウリ、オオムギ、イネなどでそれぞれのクローニングが得られている。これらの単離遺伝子について、そのプロモーターを強化したり、あるいはコピー数を増やすための加工を施した上で、もとの植物あるいは異種の植物に導入することによって、病害抵抗性を強化したトランスジェニック植物を作り出せる可能性がある。また、微生物のキチナーゼ遺伝子を植物に導入することも、当然考えられるが、既に*S. marcescens*のchi A遺伝子をタバコに導入・発現させた例が報告されている。

2. 海洋細菌 *Alteromonas* sp. のキチン分解酵素遺伝子のクローニング

私たちは、海洋細菌 *Alteromonas* sp. が高いキチナーゼ活性を持っていることから、最初に、この菌の産生するキチナーゼが植物病原菌類の生育を阻害するか否かについて検討することにした。対象として用いた菌は、宿主範囲が広く、重要な植物病原糸状菌の1種、灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* である。*Alteromonas* 菌をコロイダルキチンを含む寒天培地上で培養すると、コロニーの周囲にキチナーゼが分泌され、これによってキチンが分解されるため、培地が透明になる。こうして形成された培地の透明帯の上あるいはその周りに、*B. cinerea* の分生孢子懸濁液を接種し、培養を続けたところ、*B. cinerea* のコロニーがまったく成長して来なかった。この段階では、ここで認められた発育阻害が、*Alteromonas* 菌の産生するキチナーゼ以外の代謝産物によるという可能性もまだ否定できないが、やはりキチナーゼによる可能性が最も高いと考え、次に、この酵素の遺伝子のクローニングを行うことにした。

Alteromonas 菌の全 DNA の *EcoRI* 断片をプラスミド pBR322 に挿入し、これを大腸菌 DH5 株に導入した後、0.1% のコロイダルキチンを含み、LB 培地と Jamarin S 培地（人工海水培地）とを 1:1 で混合した寒天培地上で、30°C、1 週間培養して、スクリーニングを行った。人工海水培地は、本来の *Alteromonas* 菌において、そのキチナーゼ生産に必須の組成を持つ培地である。この結果、約 3,800 個のコロニーの中から、周囲に透明帯を形成する 3 個のキチナーゼポジティブクローンを得た（口絵 1）。ただし、形成された透明帯の面積から推定すると、これらクローンのキチナーゼ分泌量は親菌株より劣る。3 個のクローンはいずれも約 12kbp の挿入 DNA 断片を有し、その中に、*Bam*HI, *Eco*RV, *Sac*I, *Sac*II および *Xho*I の認識部位を 1 か所、*Ava*I および *Sph*I の認識部位を 2 か所、それぞれ同一位置に含んでいること

から、3 個とも同一のクローンであることが示された。

3. キチナーゼ遺伝子を導入した大腸菌による *Botrytis* 属菌の生育阻害

上記によって得られたキチナーゼ遺伝子導入大腸菌株 DH5(pBR322-chi) が、遺伝子の供与菌である *Alteromonas* sp. と同様に、*Botrytis* 属菌に対する生育阻害効果を示すか否かについて検討した。DH5(pBR322-chi) 株を、コロイダルキチンを含む LB 培地上で生育させ、十分に透明帯を形成させた後、透明帯の上およびその周辺部に、*B. cinerea* および *B. fabae* の分生孢子懸濁液を滴下し、20°C で培養した。その結果、*B. cinerea* の孢子発芽率は 1.7% で、対照として、培地に、あらかじめ、DH5(pBR322-chi) 株を接種しなかった場合やキチナーゼ遺伝子を含まず pBR322 だけを有する大腸菌株 DH5(pBR322) を接種しておいた場合の孢子発芽率約 58% に比べて、著しい発芽抑制が認められた（表 1）。同様の孢子発芽抑制効果は、*B.*

表 1 キチナーゼ遺伝子導入大腸菌のコロニー周辺に接種した *Botrytis* 属菌分生孢子の発芽率(%)

<i>E. coli</i> strain	<i>B. cinerea</i>	<i>B. fabae</i>
DH5 (pBR322-chi)	1.7	20.8
DH5 (pBR322)	57.8	70.3
無接種	58.6	69.1

fabae の場合にも観察された。さらに、孢子発芽後の菌糸伸長も著しく阻害され、両菌ともコロニーを形成するまでに至らなかった。対照とした区では、LB 培地であるために両菌の生育速度は遅いが、それでも 10 日間の培養によって径約 10mm のコロニーを形成した。

DH5(pBR322-chi) 株との対峙培養によって、発芽や菌糸伸長が阻害された上記の *Botrytis* 属菌を光学顕微鏡で観察すると、

B. cinerea, *B. fabae*ともに、孢子、発芽管および菌糸先端部の顕著な膨潤・肥大が認められ(口絵2), キチナーゼによる細胞壁の分解と合成阻害が起きていることが示唆された。

以上の実験結果から, *Alteromonas* sp. からクローニングされたキチナーゼ遺伝子は, 大腸菌でも発現し, さらに, 大腸菌の菌体外へ分泌されたキチナーゼが, 対峙培養した *Botrytis* 属菌の孢子発芽および菌糸伸長を著しく阻害することが明らかにされた。

おわりに

今回, 実験対象とした *Alteromonas* sp. のキチナーゼは, その基質に対する特異性から, 正確には, エキソ型キチナーゼあるいは同じくキチンをエキソ型に分解できるN-アセチルグルコサミニダーゼと推定される。一般に, 植物キチナーゼにはエンド型のもが多く, エンド型キチナーゼの方が溶菌活性が高いとされている。しかし, *Alteromonas* sp. のキチナーゼが *Botrytis* 属菌に対して著しい生育阻害効果を示し, また, 既に述べた *S. marcescens* のキチナーゼもエキソ型であることから, これらエキソ型キチナーゼも植物病原菌類のバイオコントロールに十分利用できるものと考えられる。

現在, *Alteromonas* sp. のキチナーゼ遺伝

子を含む約12kbpのDNAクローンについて, その詳しい構造解析を行うとともに, この遺伝子を加工して, 根圏細菌や葉面細菌に導入・発現させる方向で, さらに研究を進めている。実際のバイオコントロール技術として実用化し得る段階に至るまでには, 技術上の問題に加えて, 安全上, 法規上など, まだまだ多くの問題があるが, バイオコントロールの新技術として, その進展が期待される。

文 献

- 1) 平八重一之・平田暁子・阿久津克己・西沢洋子・I. Havukkala・原 三郎・日比忠明(1990) 平成2年度日本植物病理学会大会講演要旨予稿集 p.42
- 2) Havukkala, I., K. Hirayae, Y. Nishizawa, S. Hara and T. Hibi(1990) *5th Internatl. Colloq. on Invertebrate Pathol. and Microbial Control, Abstr.* 印刷中.
- 3) Nishizawa, Y. and T. Hibi (1990). *FEBS Letters* 投稿中.
- 4) Shapira, R., A. Ordentlich, I. Chet and A.B. Oppenheim(1989). *Phytopathology* 79: 1246-1249.
- 5) Sundheim, L., A.R. Poplawsky and A.H. Ellingboe (1988) *Physiol. Molecular Plant Pathol.* 33: 483-491
- 6) キチン, キトサン研究会編(1988) キチン, キトサン, 技報堂出版 pp.268
- 7) キチン, キトサン研究会編(1990) キチン, キトサンの応用, 技報堂出版 pp.321



文献情報

根粒菌の宿主特異性を決定するシグナル物質

根粒菌と宿主であるマメ科植物との関係に特異性があることは、古くから知られていた。例えば *Rhizobium meliloti* はアルファルファに根粒を形成するが、ソラマメにはつくらない。しかし、特異性を決定している宿主-根粒菌間の認識機構は、長い間謎であった。根粒形成や宿主特異性の機構に関する研究は、最近では根粒菌の遺伝子の解析を中心に進んでいる。根粒形成に関与している遺伝子 (nodulation genes, *nod*) が根粒菌で多数見つかり、その中で根粒菌の異なるグループ間で相補性があり、互換可能な遺伝子を共通遺伝子 (common *nod*)、互換性がなく、宿主特異性の決定に関与している遺伝子を宿主特異性遺伝子 (host-specific *nod*) と呼んでいる。これら *nod* 遺伝子のうち、調節遺伝子である *nodD* の発現は構成的だが、他の *nod* 遺伝子は菌が宿主の根の分泌物や抽出物にさらされたときにのみ発現する。そして *nod* 遺伝子と大腸菌の β -ガラクトシダーゼ (*lacZ*) 遺伝子を融合させ、根から出されるシグナル物質をスクリーニングした結果、それがフラボノイドという予想外の物質であることが判明したのが1986年である。フラボノイドで誘導された *nod* 遺伝子は次に宿主特異性の決定や、根毛の変形 (Root hair deformation, Had) を引き起こす。*R. meliloti* の *nod* 遺伝子をルテオリン (アルファルファの分泌するフラボノイド) で発現させたときの培養上澄をろ過滅菌した液は、アルファルファに対して Had 活性を示すがソラマメに対しては示さないことから、*R. meliloti* はこの条件下でアルファルファに特異的なシグナル物質を細胞外に生産していることが示された。根粒菌側からのこの最初のシグナル物質の生産に関与している遺伝子は、common *nodABC*、及び host-specific *nodQ* と *H* であり、*nodABC* によ

り作られる共通的な物質を *nodH* 産物がアルファルファを特異的に修飾しているものと考えられるに至っている。しかしこの物質の構造は全く不明であった。そして *R. meliloti* の作るシグナル物質の精製、構造決定に初めて成功したのが本報告である。

R. meliloti の野生株のルテオリン誘導培養上澄を有機溶媒で抽出したところ、Had 活性はブタノール可溶、酢酸エチル不溶画分に認められた。この画分を逆相クロマトで更に分画を試みたが、微量であるため成功しなかった。そこで *nod* 遺伝子の全領域を含む組換えプラスミドを親株へ導入し、*nod* 遺伝子群のコピー数を増やしたところ (プラスミドのコピー数 5~10)、Had 活性は 100 倍以上に上昇し、HPLC の逆相クロマトグラムで二つの紫外吸収ピークが出現した。Tn5 による *nodA* や *nodC* 遺伝子の挿入失活で、HPLC ピークと Had 活性が消失したことから、シグナルの生産には *nodABC* 遺伝子が必要であることが示された。精製を容易にするために、細胞外多糖類を生産しない特異株にプラスミドを導入し、同様に培養して抽出し、HPLC の逆相クロマト、セファデックス LH 20 カラム、DEAE カラムにより分離した結果、220nm に吸収を持つ単一のピークが認められ、さらに HPLC による逆相クロマトで、近接した二つのピークに分かれた。それらはともにアルファルファに対して Had 活性を示したが、ソラマメには示さなかった。誘導した菌の培養液 10 l から、4 mg の物質が精製された。化学分析の結果、二つのピークは同じ分子の還元末端の糖の C-1 位での α 及び β アノマーに相当しており、この物質を Nod Rm-1 と命名した。質量分析、化学修飾、NMR により構造決定された Nod Rm-1 は *N*-acyl-*N*-acetyl- β -1,4-D-glucosamine tetrasaccharide で、還元末端の糖の 6 位の炭素がスルホン化していた。脂肪族鎖は非還元末端糖に結合しており、2,9-hexadecadienoic *N*-acyl 基であった。ここで発見された Nod Rm が植物特異的共生シグナルであると筆者が考える根拠は、以下の 3 点である。(1) 物理化学的性質の異なる 3 種類の精製法において、

この分子の存在とアルファルファに対する Had 活性が常に相関していた。(2)転写の誘導や遺伝子のコピー数の増加により *nod* 遺伝子の活性を上げると、問題の分子の生産も増大した。一方 *nodA* または *nodC* 遺伝子が Tn5 で不活性化されると、この物質は生産されなくなった。(3)根毛の変形で見た NodRm の生物活性は非常に高く、かつ特異的で、 10^{-2} ~ 10^{-3} ナノモルという低濃度でアルファルファに対して十分な活性を示し、一方ソラマメに対しては示さなかった。精製物質中にオーキシンやサイトカイニン、インドール酢酸のような植物ホルモンが混在して Had 活性に関与している可能性については、分析結果や濃度の点から否定している。

この物質の骨格を形成している N-アセチル-D-グルコサミンは、グラム陰性細菌の細胞壁の主成分であるペプチドグリカンとリポド A の構成成分である。Nodシグナルは *nod* 遺伝子産物により、N-アセチル-D-グルコサミンから新たな合成経路を経て作られるのか、あるいは細胞壁中の巨大分子の分解により作られるのか、という点は、今後の課題である。糸状菌細胞壁が分解してできるある種のオリゴサッカライドは、ナノモルオーダーの低濃度で植物にファイトアレキシン生産を引き起こすなどのエリシター活性を示すが宿主特異性はなく、この点で NodRm とは決定的に異なっている。エンドウのレクチン遺伝子をクローバーに導入したところ、エンドウの根粒菌がクローバーに感染するようになったという最近の知見により、根粒菌とマメ科植物の特異的な認識に植物根のレクチンが関与していることが裏付けられた。NodRm-1シグナルはレクチンリガンドとしての構造的な特徴を有しており、根毛の細胞質膜上にある植物レクチンが、Nodシグナルに対する植物側のレセプター複合体を形成していることが考えられる。マメ科植物と根粒菌の特異的な認識機構に関しても、ようやく分子のレベルで語られるようになった。共生機構は以前に考えられていたよりもはるかに複雑そうであるが、研究の速度は今後ますます速まることが期待される。

(抄訳 宮下清貴——農環研)

Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal

Lerouge, P.P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet J.C. Promé and J. Dénaire
Nature 344 : 781-784 (1990)

文献情報

外来遺伝子の挿入によって得られたミニマウス——ピグミー遺伝子座の分断

実験用マウスでは、これまでに1000以上の自然発生突然変異が知られているが、その特性を分子レベルで記述することが難しいために、それらの変異の解析をさらにすすめることには限界があった。これに対して外来遺伝子をマウス生殖細胞に組込む方法は、上で述べた問題点を克服できるものと考えられている。その理由は、外来遺伝子自身（遺伝子の種類は関係ない）が挿入突然変異の変異原となり得るし、その遺伝子をプローブとして変異の生じたゲノム部位をクローニングし、分子レベルで解析することができるためである。事実、挿入突然変異マウスの作出はトランスジェニックマウスを応用できる主要な分野の一つとなっている。挿入突然変異の中には、すでに知られている自然発生の突然変異と同じものが生じることがあり、Xiangらが今年サイエンス誌2月23日号に報告した「ミニマウス」もその一例である。以下にそれを紹介する。

ヒトのグロビン遺伝子の2.8kb断片を導入した雌マウスの子孫の中で、導入遺伝子をホモに持つ個体は、導入遺伝子を持たないあるいはヘミに持つきょうだいよりも著しい発育の遅滞を示した。このホモ個体をここではミニマウスと呼ぶ。

もともとの雌マウス（基礎マウス）の表現

型は正常であり、サザンブロット解析からは、導入遺伝子がタンデムにつながった部分の他に、6.0kbと8.6kbのバンドが得られた。子孫の間でこの二つのバンドは分離したので(6.0kbのバンドをもつA系統と8.6kbのバンドをもつB系統)、基礎マウスは2か所の遺伝子の挿入を受けていたことになる。8.6kbのバンドの濃さは基礎マウスよりも子孫のB系統の方が強いので、基礎マウスはおそらくこの導入遺伝子についてはモザイクであったのだろう。

分離したA、B両系統ともホモ個体はミニマウスであった。さらに、A、B間の交配で得られたA/B型もミニマウスとなった。このことから、A、B両系統それぞれの、挿入によって分断された遺伝子座は対立関係であることが示唆された。なお、基礎マウスはA/B型であるのにミニマウスとならなかったのは、上で述べたようにB系統の導入遺伝子がモザイクであったためと解釈できる。

この突然変異の最も顕著な特徴は体がミニサイズであることで、ホモ個体は生後1週間で他のきょうだいと区別が付き、活力は正常であるが10週齢では正常個体の体重の40%となる。しかし、成長ホルモンとソマトスタチンの血中レベルは正常であるという。

次に、A系統の6.0kbの断片は、導入遺伝子とゲノムDNAとの接合部位を含むものと仮定してクローニングし、最終的に導入遺伝子近傍のゲノムDNA配列0.5kbを分離した。この断片をプローブとしたサザンブロット解析では、野生型(+ / +)では10.0kb、A系統ヘミ個体(A / +)では10.0kbと6.0kb、ホモ個体(A / A)では6.0kbのバンドが得られた。ところがB系統のヘミ個体(B / +)では10.0kbのバンドだけが得られ、ホモ個体(B / B)では全くシグナルが得られなかった。つまり、B系統ではこの0.5kbのゲノム配列が欠損しており、データは示していないがこの欠損は正常遺伝子座の40kb以上におよぶという。ちなみにA/B型では6.0kbのバンドだけが得られ、AとBとは同じ遺伝子座であることが確かめられた。

このミニマウスと同じような表現型上の特

徴を持つ、ピグミー(pg)という自然発生の劣性突然変異は第10染色体上に位置することが報告されている。上で述べた0.5kb断片も第10染色体上に位置することがわかったので、ピグミー遺伝子座とミニ遺伝子座との関係を交配試験によって検討した。その結果、pg / +とA / +、またはB / +との交配からミニマウスが生じ、両者は対立関係にある、つまり同じ遺伝子座であることが明らかになった。さらに0.5kb断片をプローブとしたサザンブロット解析から、pg遺伝子座はBと同じバンドパターンを示し、正常遺伝子座に対して40kb以上に及ぶ欠損を生じていることがわかった。

基礎マウスのピグミー遺伝子座のそれぞれに、別個の挿入突然変異が生じた様式の最も簡単な説明は：まずA系統を示す挿入が起こり、数回の細胞分裂の後、一つの細胞中に、組換えによって、挿入部位の一部とその近傍のゲノムDNAに欠損を生じ、この変異がB系統を示す、というものである。B系統の方がコピー数が少ないこと、B系統は0.5kb断片が欠損していること、さらに基礎マウスがモザイクであることなどは上に述べた考え方で矛盾なく説明できる。

ピグミー突然変異は45年も前に知られていたが、遺伝子座のクローニングや遺伝子産物の同定など分子レベルでの解析ができなため、成長ホルモン抵抗性ヒト矮性症候群のモデルとしての有用性は限られていた。その意味で今回得られた挿入突然変異マウスは有益なモデルとなるだろう。また、これらのマウスの解析によって得られる知見によって、成長と発生に関わる多様な経路をより深く理解することも期待できるだろう。

(抄訳 粟田 崇——畜産試験場)

Mini-mouse: Disruption of the pygmy locus in a transgenic insertional mutant

Xiang, X., K.F. Benson and K. Chada
Science 247: 967-969

文献情報

哺乳類の性決定をめぐる問題——ZFY遺伝子は精巢分化決定要因ではない

哺乳類の性は、Y染色体上に存在する精巢決定遺伝子(TDF)によって決定すると考えられてきた。ヒトでは、この遺伝子がY染色体短腕先端部の偽常染色体領域(pseudoautosomal region, PAR)に近接した部分、すなわちPARより60kbの領域に位置しており、胎児の未分化な生殖腺を精巢に分化させる機能をもつ。TDFの位置と機能については、精子形成時の減数分裂でX、Y両染色体間のキアズマの異常分離が原因で発生したXX型男性、XY型女例などの性異常症例のゲノム分析をもとにして研究されている。

最近までの研究によると、TDFのもっとも有力な候補はZFY(zinc finger protein Y)であろうと考えられていたり。このZFYは、Cys-Cys、His-Hisのペアにはさまれた30個前後のアミノ配残基からなるポリペプチドのフィンガープリントを13回くりかえした構造を示している遺伝子発現の調節たんぱくである。

Palmerら²⁾は、ZFYを欠く14例のXX型男性を対象にして、Y染色体由来のPARの存在をPCR法で調査した。14例中、3例のXX型男性と1例のXX型間性において、PARとそれに続くTDFを含む領域が検出されており、4例とも精子形成は欠くけれども生殖腺として精巢が分化している。この結果は、TDFはPARより60kbの範囲に位置しているが、ZFYとは別なものであり、しかもZFYは未分化の生殖腺を精巢に分化させる遺伝子ではないということを示すことになる。ヒトに関する他の研究でもXX型男性の多くが、PARに続くTDFを含む60kb区間をもっていることが報告されているが、例外的にTDF、ZFYともにマイナスの症例も見つかっている。これらの症例はTDF領域を欠くが、TDFによって調節されている下流

域の突然変異によるものではないかとも考えられている。

マウスでは、TDF、ZFYに対応する遺伝子としてそれぞれTdf、Zfy-1とZfy-2が知られている。Koopmanら³⁾は、マウスのTdf、Zfy-1、Zfy-2とそれらの機能について報告している。成熟した正常マウスの精巢では、Zfy-1、Zfy-2の転写が認められているが、精巢分化が始まる交配後12.5日の胎児ではどちらの転写も認められなかった。そこで、PCR法によりZfy遺伝子の転写を詳しく分析したところ、Zfy-1は胎児と成体の生殖腺で転写が検出されたが、Zfy-2は成体の精巢でのみ転写が検出された。また、生殖細胞の増殖が阻害される突然変異We^eホモ個体の胎児精巢では、Zfy-1、Zfy-2ともにその転写は認められなかったし、生殖細胞を欠く性異常XXSxr個体においても同様の結果が観察されている。

これらの結果を総合すると、マウスにおいてもZfy-1、Zfy-2はTdf、すなわち未分化の生殖腺を精巢に分化させる遺伝子ではないことが明らかである。しかし、Zfy-1は常に生殖細胞の分化にともなっており、精巢分化にはかかわらないが精子形成に関与する遺伝子ではないかと考えられている。

いずれにしても、ヒト、マウスとも精巢決定遺伝子といわれるTDF(Tdf)がZFT(Zfy-1、Zfy-2)とは異なる遺伝子であることが明らかにされたのであるが、TDF、ZFTともにその本態や構造が解明されたわけではない。

ヒトでは、ZFYに類似した遺伝子ZFXがX染色体短腕部に見出されている。したがって、正常女性は1本のX染色体が不活化しているので生殖腺の分化に関係するZFXは1dose、正常男性はZFYとZFXの2doseということになり、ZFYまたは、ZFX 1doseでは胎児の生殖腺が精巢に分化できないのではないかと考えられている。一方では、最近話題になっているショウジョウバエの性決定と同様のalternative splicingによる遺伝子発現の調節機構が、TDF、ZFYをめぐる哺乳動物の性決定にも存在するのではないかともいわれている。ともかく性分化の分子生物

学をめぐる話題は、その考え方、研究手法、そして成果を含めて世界中の研究者にとって最先端の関心事になっている。

(抄訳 村松 晋——畜産試験場)

- (1) **Thumbs down for zinc finger**
Burgoyne, P.S.
Nature 342: 860-862 (1989)
- (2) **Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor**
Palmer, M.S. et al
Nature 342: 937-939 (1989)
- (3) **Zfy gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination**
Koopman, P. et al.
Nature 342: 940-942 (1989)

文献情報

バキュロウイルスベクターによる幼若ホルモンエステラーゼの発現と効果

バキュロウイルス科のサブグループの一つである核多角体病ウイルス (Nuclear polyhedrosis virus: NPV) は、主要な昆虫病原ウイルスであり、強い病原性と優れた伝播性を示すことから、害虫防除のための微生物殺虫剤として利用されているものもある。

一方、近年、NPVは遺伝子工学的手法により、外来遺伝子発現ベクターに改造された。このバキュロウイルスベクター系では、外来遺伝子が極めて多量に、しかも、本来の遺伝子産物が有する生物学的活性を保った形で得られるため、現在、多種多様な遺伝子の発現に利用されている。

本論文において著者らは、微生物殺虫剤と遺伝子発現ベクターというNPV利用における二つの長所を組合せることにより、新しいNPV利用法の可能性を示した。すなわち、組換え体ウイルスを殺虫剤として利用しようというものである。

著者らは、ヤガ科の害虫 *Heliothis vires-*

cens の cDNA ライブラリーから得られた幼若ホルモンエステラーゼ (JHE) 遺伝子を、*Autographa californica* NPV (AcNPV) に導入した。この JHE は、幼若ホルモン (JH) を不活化する酵素で、昆虫の変態において重要な役割を果たしていると考えられている。また、AcNPV は、農業上重要な害虫を含むヤガ科昆虫 (*Spodoptera* 属, *Trichoplusia* 属, *Heliothis* 属など) の幼虫に感染するため、培養細胞における JHE 遺伝子の発現のみならず、害虫における組換え体ウイルスの殺虫効果も調査できるという利点を持っている。本論文では、*Spodoptera frugiperda* 由来の培養細胞 (Sf21 細胞) と *Trichoplusia ni* 幼虫に組換え体ウイルスを感染させ、JHE の発現を検討している。

Sf21 細胞に組換え体ウイルスを感染させると、未感染細胞では全く認められない JHE 活性が、感染10時間後に検出され、48時間後に培地 1 リットルあたり約 75mg の JHE に相当する最大活性に達した。この値は、正常な *H. virescens* 幼虫の体液中でピーク時に検出される JHE 活性の 2 倍である。また、アミノ酸配列から予測されていたように、発現した JHE はただちに細胞外に分泌されるため、JHE 活性の 94~98% は培地中に認められた。

Sf21 細胞と *T. ni* 幼虫のそれぞれに組換え体ウイルスを感染させて得た培地及び体液に含まれる JHE と *H. virescens* の終齢幼虫体液に含まれる虫固有の JHE を比較したところ、酵素反応性、熱安定性、各種阻害剤に対する感受性及び抗原性が全て一致した。

ただし、培地中の JHE と虫固有の JHE を精製し、電気泳動法などで分析した結果、前者の分子量は 66kDa であるのに対し、後者は 62kDa であった。このわずかな差異は、糖鎖の違いによるものであり、昆虫の種により JHE に対する糖鎖の付加が異なるという知見がすでに得られていることから、Sf21 細胞と *T. ni* 幼虫における糖鎖付加反応の違いを反映したものと理解された。

また、培地から得られた JHE をタバコスズメガ *Manduca sexta* 幼虫に注射すると、脱皮後体色が黒化し、さらに JH アナログを

投与すると再び緑色の体色に戻ることから、JHEが昆虫体内で anti-JH として作用することが確認された。

組換え体ウイルスの殺虫剤としての効果を検討したところ、*T. ni*の1齢幼虫にウイルスを食下させた場合、多くの感染幼虫で摂食性の低下と発育阻害が認められた。これらの感染幼虫の体液 JHE レベルは、正常個体の脱皮時期のレベルには達するものの、最終齢幼虫のピーク時のレベルと比較すると、その10%に過ぎなかった。また、JHE 遺伝子以外の遺伝子を組込んだ組換え体ウイルスの感染では摂食性の低下や発育阻害が認められなかったことや、JH アナログを投与すると摂食性や発育がある程度回復することから、摂食性の低下及び発育阻害は高レベル JHE が生体内の JH タイターを低下させることにより引き起こされたものであることが示唆された。

このように感染幼虫の摂食性が低下することは、JHE を組込んだ組換え体ウイルスを殺虫剤として用いる上で大きな利点となるが、このような効果が認められたのは1齢幼虫だけであった。その原因としては、2齢幼虫以降ではウイルスによる JHE の生産が少なくしかも遅いため、ホルモンの生合成を上回ることができない等の可能性が考えられている。さらに、昆虫体内では、JHE の不活化が迅速に行われるため、培養細胞に比べて JHE の発現が極めて悪い。したがって、以上のような *in vivo* での発現に係わる問題を解決しない限り、JHE を組込んだバキュロウイルスを殺虫剤として実用化することは難しいと考えられる。

JHE 以外にも、羽化ホルモン、利尿ホルモン及び PTTH 等の昆虫生理活性物質あるいは BT 毒素などをコードする遺伝子がバキュロウイルスに組込まれ、昆虫での発現及びその影響が調べられ始めており、イギリスでは野外での実験も進められている。本論文の結果からもわかるように、組換え体ウイルスを殺虫剤として実用化するためにはまだまだ多くのハードルをクリアしなければならないが、今後の研究の展開によっては、近い将来

特定の昆虫にのみ極めて有効に作用し、人畜無害な殺虫剤が誕生することも期待できよう。

(抄訳 小林 淳——蚕糸昆虫研)

Expression and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector

Hammock, B.D., B.C. Bonning, R.D. Possee, T.N. Hanzlik and S. Maeda
Nature 344: 458-461 (1990)

文献情報

カイコ前胸腺刺激ホルモンのクローニング

前胸腺刺激ホルモン (PTTH) は前胸腺におけるエクダイソンの合成、分泌を促進する機能を持つ脳神経ペプチドであり、昆虫の分化における内分泌制御機構において中枢的役割を果たしている。すでに、本論文の著者らは、カイコ (*Bombyx mori*) を材料として PTTH を単離し、アミノ末端13残基のアミノ酸配列を報告している。さらに、著者らは、カイコ PTTH は、分子量が約 30kDa で、同一(あるいは、きわめて近似した)のサブユニットがジスルフィド結合を介して会合した2量体構造であることを明らかにし、さらにサブユニットのアミノ末端104残基のアミノ酸配列を決定した(発表準備中)。本論文は、カイコの cDNA のクローニングと塩基配列分析の結果にもとづいて、カイコ PTTH の全アミノ酸配列を明らかにしたものである。

カイコ5令幼虫の脳から mRNA を分離し、cDNA 発現ライブラリーを作成した。他方、アミノ末端15残基の合成ペプチドを BSA と結合して、その抗体を調整した。この抗体を用いて、上記の発現ライブラリーをスクリーニングし、3個の陽性クローンを得た。そのうちの1クローンをプローブとして、さらにスクリーニングを行い、最終的に7個の陽性クローンをえた。それらは、PTTH の pre-pro 体と考えられる 224 アミノ酸残基(分子

量, 26,027) からなる読み取り枠を含んでおり, シグナルペプチド(29残基), p2K (21残基)および p6K (57残基)と仮に命名した機能未知の2種のペプチド, およびPTTHのサブユニット(109残基)を, 5'側よりこの順にコードしている。これらの各ペプチドの間には, 複数の塩基性アミノ酸残基からなる切断部位が存在する。3'側の109残基からなるペプチドのアミノ酸配列は, アミノ末端から104残基まで, 41番目をのぞいて, アミノ酸配列分析の結果と完全に一致したので, この部位109残基がPTTHのサブユニットと決定された。41残基目は, ペプチドのアミノ酸配列分析においては, いかなるアミノ酸も検出されなかったが, 遺伝子解析の結果からAsnと決定され, 2残基後にThrが存在するところから, 41番目のAsnは糖鎖の結合可能部位であると推定される。糖鎖結合可能部位の存在が確認されたことは, PTTHが糖たんぱく質であることを示唆している。

PTTHの分子量は, ゲル濾過からは22kDaと, SDS電気泳動からは30kDaと推定されたが, アミノ酸配列から推定される分子量は, そのいずれよりも小さい。また, pre-pro-PTTHのcDNAの長さは, ノザンハイブリダイゼーションから推定した脳のmRNAの大きさ(1.0~1.2kb)とよく符合している。これらの事実から, PTTHは, まず109残基のPTTHのサブユニットを含む224残基のアミノ酸からなる先駆体ペプチド(pre-pro-PTTH)として合成され, ジスルフィド結合による2量体の形成, 糖鎖の結合, ペプチド先駆体の切断部位における切断などを経て, ホモ2量体構造をもつ成熟したPTTHが生ずるものと推論された。なお, pre-pro-PTTHのアミノ酸配列ならびに遺伝子の塩基配列についてのホモロジー検索の結果, 見るべき相同性を有する既知たんぱく質は見いだせ

なかった。

PTTHサブユニットをコードするcDNAを, 大腸菌に導入したところ, 天然のPTTHと同様の活性が発現した。このことは, クローニングした遺伝子が, PTTHの真の遺伝子であることを示すとともに, 糖鎖は活性の発現に必須でないことが示唆された。

³⁵Sで標識したcRNAをプローブとして, カイコ5令幼虫の脳について, *in situ*ハイブリダイゼーションを行なった。その結果, PTTH遺伝子の転写産物は, 脳の背側方2対の分泌細胞にのみ認められ, カイコにおいて, PTTHがこれらの細胞で生合成されることが示された。これらの細胞は, PTTHを認識するモノクロン抗体にも反応することが知られている。また, タバコスズメガ(*Manduca sexta*)においても, 同様に位置の2対の細胞がPTTH産生細胞であるとされている。

以上のように, 前胸腺刺激ホルモンの遺伝子がクローニングされ, アミノ酸配列が決定されたことは, これまで実験形態学的研究が主流であった前胸腺刺激ホルモンに関する研究が, 分子レベルの研究へ発展させたものと言うことができよう。今後, この結果を基礎に, 昆虫の分化, 変態過程と前胸腺刺激ホルモン遺伝子の発現, さらに, 分子レベルにおけるホルモン機能の解明など, 昆虫の分化, 変態に関する分子レベルの研究が発展することを期待したい。

(抄訳 鈴木昭憲——東大農)

Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone

Kawakami, A., H. Kataoka, T. Oka, A. Mizoguchi, M. Kimura-Kawakami, T. Adachi, M. Iwami, H. Nagasawa, A. Suzuki and H. Ishizaki

Science 247:1333-1335 (1990)

特別情報

気違い牛と農林大臣

東京バイオテクノロジー専門学校
齋藤 康夫

英国の権威ある自然科学誌である“Nature”誌に表記のような題を持つ論評が掲載された(Nature 345, 277; 1990年5月24日)。気違い牛とはウシ海綿状脳症(BSE)にかかったウシをいい、英国で最近発生し、ヒトにも伝染する可能性もある致死的な恐ろしい病気であることから、牛肉需要が低下するさざしを見せており大きな社会的脅威となっている。この論評はこのウシの病気について解説し、対策を取るべき責任者である農林大臣に、牛肉は安全であるという空々しい宣言をするよりも、ヒトの健康に対するBSEの危険性について現実的な評価をすることが英国の公衆へのBSEの脅威に対する最善の対策であろうという提言を行ったものである。この問題に関連して同じ“Nature”誌に“伝染についての新しい脅威”(Nature 345, 280; 1990年5月24日)、“ネコに海綿状脳症が発生”(Nature 345, 194; 1990年5月17日)という二つのNewsが掲載されている。

ウシ海綿状脳症および類似する病気

これらは潜伏期が異常に長いことによってユニークな形で分類されている遅発性ウイルス感染〔症〕(slow virus infection)のうち、病原体の不明な病気の一類で、その症状は、一様に神経病理学的によく似た亜急性海綿状脳症を示す。その特徴は、①数か月から数年にわたる潜伏期の後に、②徐々に発病し、③規則正しい遷延性経過をとり、④予後の悪い感染症とされている。ウイルス粒子がビリオン(virion)と呼ばれるのに対し、その病原体をプリオン(prion)と呼ぶ。その群の典型がヒツジのスクレピー(scrapie)病であり

潜伏期は1～5年である。病徴としては進行性の運動失調、ふるえ、筋無力化であり、かわきを訴え、からだを物にこすりつける特有の動作を繰り返す。組織学的には小脳、視床下部の神経細胞の空胞化とグリア細胞の増殖が認められる。伝染は母から仔へと胎盤をとおしての垂直伝播が見られ、ヤギ、マウスへの脳内接種を行なえば同様発症する。感染した動物には病原体に対する抗体様の活性が認められず、また遠心による特定分画への感染価集中はみられない。また、紫外線、核酸分解酵素等に対し安定である。以上の点からウイルスの概念からでは説明しにくい。そこで病原体の本体としてたんぱく質(ペプチド)、多糖類、変化した細胞膜、DNAを持つウィロイド、特別のウイルスなどの仮説が出されているがいずれも未実証である。

クロイツフェルト・ヤコブ病(Creutzfeldt-Jakob disease)はヒトの海綿状脳症で1968年に発見され、ヒトの中高齢者に亜急性神経疾患をおこす。その病徴は筋痙攣、痴呆ときに運動失調をおこす。組織学的には大脳皮質の海綿状化、小脳顆粒細胞の変性が見られる。患者の脳乳剤をチンパンジーの脳に接種すると発症する。潜伏期は約1年(?) 予後は不良で死亡する。

その他ヒトを宿主とし、ニューギニア高地人のある種族に集団的に発生するクルー(Kuru)病、伝播性ミンク脳症なども同じ群に属する病気と考えられている。

どうして英国のウシに海綿状脳症(BSE)が発生したのか

オックスフォード大動物学部リチャード、

サウスウッド卿は、1980年代の初期、ヒツジの内臓から製造した飼料をウシに与えたことによっておこったものと推定している。

ヒツジのスクレピーはBSEと非常に良く似かよっている。スクレピーは母親から仔へ垂直伝播する。ウシでの垂直伝播は証明されていないが、その可能性は除外できない。なお、ヒツジおよびウシの内臓を含んだ飼料は英国では禁止された。

BSE やスクレピーはヒトを含む他種の動物にも感染するのであろうか

英国人はウシの福祉を心配するわけではなく、当人自身又は子供の福祉を心配している。

若しスクレピーの病原体がヒツジからウシへと伝染するなら、ヒトも感染するのであろうか。もしそうであるならばそれは致命的な病気であるから大変なことになる。英国の一匹の5才のシャムネコの死後その脳を検鏡したところ海綿状脳症であったことが発見されたという報告は、その心配に拍車をかけた。ヒツジ→ウシ、ヒツジ→ネコといった異った動物の種間での伝染が一般的におこるのではないかと考えさせられるからである。また、海綿状脳症は罹病した動物の死後脳を顕微鏡検査して穴のあいていることを観察して初めて確認できる。そのため海綿状脳症でありながら他の神経的な病気、例えば狂犬病と誤認されて見逃される可能性も考えられる。このネコの場合も原因はウシ又はヒツジの内臓が入ったペット飼料を食べたことにあると推定される。このためヒトの食物鎖の中に感染因子が入らないようにする政府の動物飼料の規制の強化要求が再び高まった。また、ペット食品製造協会は協会員にウシの神経組織や内臓を使わないよう警告を発した。労働党の農業スポークスマンはブタや家畜の飼料にヒツジ又はウシの内臓を用いることを禁止することを求めているが、現在のところ研究文献によればこれらの動物は感受性ではない。もしウシからヒトへの感染が可能で、おこったとするとその病気をクロイツフェルト・ヤコブ病と区別できず、また潜伏期間が長いと長年

月待たねばならないという難点がある。

ウシからヒトへのBSEの伝染を予防する政府の施策の問題点と困難性

病原因子をウシからヒトへと伝染させないため英国政府は次のような予防策をとっている。すなわちその規制は罹病したウシは屠殺しその死体は破棄する。また屠殺場に送られた他のウシの脳や脊髄は解剖によって取り除き、ヒトの食物鎖の中に入れてないようにするものである。

しかし、ここには多くの問題点や困難性があり容易ではない。リード大学のリチャード、レーシー教授は最も急進的な意見を持ち、それは発病したウシが出たら、そのウシの群れ全体を屠殺してしまえというものである。これは同じ群れのウシは病気に接触し又は同じ飼料を食べたことにより病気にかかっている可能性があるという推定に基づいている。これは600万頭ものウシを屠殺することになり政治的に不可能であり、不必要なことである。また、罹病ウシ1頭につき656ポンド、それ以外1頭820ポンドの補償金を支払うとして、数十億ポンドを政府が支払うことになる。より意味のある意見として、ウシでもヒツジと同様の母仔伝播があるとして、英国獣医協会は感染したウシの子孫からの繁殖を禁止すべきであると主張した。英国労働党は更に一歩進めてBSEにかかったウシの子孫をすべて屠殺すべきであると主張した。しかし、この病気の潜伏期が長いこと、英国ではウシの血統関係追跡のシステムがないなどの問題点があり労働党案でも600万ポンドの予算が必要である。勿論いかにお金がかかろうとも英国農民が牛肉需要の減少を食止めるための経済的費用の方がはるかに多いであろう。

農林大臣であるジョン、ガンマーはこの問題の責任者であるが、彼の立場にある者に役立つ基本的なきまりがいくつかある。第一に危険がないとか、その危険は無視できるとは決して言うべきではない。その代り常に危険があり、それは計算できるというべきである。又、彼は現在のような転機を予想するにはお

どろくべき想像力が必要だったと言うべきである。さらに彼は BSE の原因について文献的に未知であることを強調すべきである。スクレピーの起源、汚染された飼料との関係、垂直伝播の問題、BSE がヒトに感染するかなどみな証明がなくまた想像にすぎない。若干の事項について言葉の魔術を使うのも全く無分別とは言えないだろう。すなわち、現在までのところおおざっぱに言って千頭のウシが発病した。もし、その原因がスクレピーならば、またその防除法が適当に行われていたならば、同数のウシが今後 5 年間に発病し、それ以降は消え去るだろう。もしウシからヒトへの BSE 因子の伝染が厳密に規制された内臓に含まれていたとすると、汚染された飼料を食べたウシよりも、汚染された牛肉を食べることの方が病原を獲得する危険が多いとは考えにくい。そしてその危険性はすでに除去されている。(もし BSE が CJD をおこせないなら) 過去 5 年間、英国で牛肉を食べた人

が CJD と接触した確率は 0 から最大 100 万分の 1 の範囲であろう。そのことは次の約 30 年間に 50 例の CJD の発生を見ることになるだろう。これは現在 1 年間に 30 例の発病があることと対比される。

英国以外での BSE の発生の可能性

英国以外の国、例えば米国やフランスで、BSE が発生する可能性がある。何故ならば BSE は発病動物の死後、その脳を顕微鏡検査して、小さな孔があることを観察して初めて確認されるからである。こうした検査なしに他の神経障害、例えば狂犬病として見逃されていた可能性が考えられる。米国農務省も同様の見解を持ち、ウシの脳を未同定の神経性の病気を対象として検査する新しいプロジェクト研究を始めている。Lesion を含む標本は多分英国にも送られて更に検査されるものと思われる。

特別情報

カイコにおけるホルモンの働き

株式会社ロッセ中央研究所

小林 勝利

1. はしがき

今日、地球上には 180 万種以上の昆虫が生息し、全動物の 70% 以上を占めるといわれ、その総個体数は 10^{18} 、昆虫の体重の総和はヒトの全体重の 15 倍に達すると推計されている。

昆虫に見られる脱皮・変態、休眠および体内時計などの数々の生理機能はまさに 3 億 6 千万年に及ぶ継代の過程で発達した昆虫類の不良環境克服、食餌の競合回避や生殖等を含めた種属の維持にかかわる生体機構である。

以下、主題について概述する。

2. 成長・分化のホルモン制御

昆虫の一生の過程に見られる各種の生理現象のホルモン制御については、1910 年代から多くの研究が行われてきたが、昆虫全体に通ずる統一的な調節機構を解明するまでには至っていない。しかし、昆虫の脱皮と変態等についてはほぼその機構が明らかにされてきている (Kerkut と Gilbert, 1985)。

カイコの脱皮・変態にかかわる内分泌器官としては、1930~'40 年代に、アラタ体と前胸腺が見出された。アラタ体からは幼若形質の維持にかかわる幼若ホルモン (JH) が、前胸腺からは脱皮および変態を促す脱皮ホルモ

ンがそれぞれ分泌される。この前胸腺からのホルモン分泌はさらに脳の神経分泌細胞から分泌される脳ホルモン（前胸腺刺激ホルモン：PTTH）によって上位支配されている（図1）。

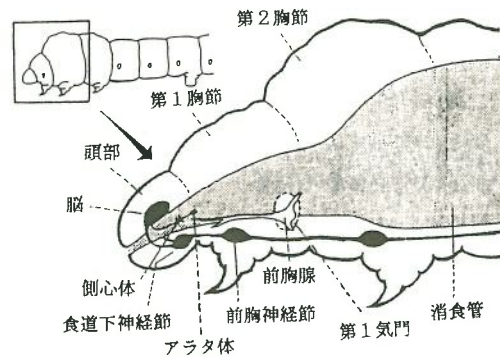


図1 カイコ幼虫の内分泌器官の存在位置

まず脱皮・変態の制御の仕組みを見ると、これはJHと脱皮ホルモンのバランスによるといえる。すなわち、幼虫期には若齢幼虫ほど、また同一幼虫齢期では齢の中期頃まではアラタ体の活性が強く、このようにJHが十分に存在する条件下では、PTTHの刺激により前胸腺から脱皮ホルモンが分泌されると、JHと脱皮ホルモンの作用により幼虫脱皮が起こり次の幼虫齢期へと進む。カイコの孵化幼虫では通常4回脱皮を繰り返して5齢幼虫（終齢幼虫）となるが、5齢幼虫期には急速にアラタ体の活性が低下する。この状態でPTTHの刺激を受けた前胸腺から脱皮ホルモンが分泌されると、蛹化が起こり、幼虫から蛹へと変態する。

ここに見られるJHの合成の制御は、脳の神経分泌細胞から分泌される神経ペプチド、アラトトロピンとアラトヒピンによりもたらされ、前者が活性を促進し、後者がその抑制に働くと考えられているが、アラトヒピンの化学構造は未決定である。

つぎに蛹期にはアラタ体の活性が低下しており、この状態で、PTTHの刺激を受けた前胸腺から脱皮ホルモンが分泌されると成虫化が進行し、羽化して蛾（成虫）となる。

タバコスズメガにおいては、分泌されたPTTHは前胸腺細胞の膜受容体に結合し、

Ca²⁺の細胞への取り込みを増加させると同時に、cAMP依存性プロテインキナーゼを活性化させ、エクジソン合成を促進するといわれるが（Rountreeら、1987）、エクジソンの合成・分泌の調節系の働きは今後の課題の一つでもある。ちなみに前胸腺の分泌活性の制御に関する知見にはこの他にも知られることが少なくない。

ところで、鱗翅目昆虫の羽化には、その脳内にある生物時計が明条件に反応し、脳起源の羽化ホルモン（EH）の放出時期を決定する。

昆虫の休眠は卵（カイコ）、幼虫（ニカメイガ）、蛹（セクロピアサン）、成虫（コロラドハムシ）の各期に見られるが、カイコの卵休眠は母蛾の蛹期において食道下神経節から分泌される休眠ホルモン（DH）の有無により支配されている。蛹期にDHの分泌量が反応閾値以下か、欠除すれば不休眠卵を産む蛾となる。

休眠ホルモンは蛹の卵巣に作用してトレハラーゼ活性を高め、休眠卵においては結果的にソルピトールとグリセロールの含量を増大させている。これらの多価アルコールは耐凍性あるいは過冷却点降下能を与えると共に、高濃度の多価アルコールは生体内の自由水量を減少させて生化学反応速度を低下させることから、こうした代謝調節機構は厳冬期の外界条件に対応する生命保存システムとしての役割を担うものと見られる。

3. 昆虫ホルモンの構造

脱皮ホルモン（Ecds）：昆虫ホルモンの中で化学構造が最初に決定されたホルモンは脱皮ホルモンで、1954年にButenandtとKarlssonによりカイコ蛹から結晶化され、エクジソンと命名された。全構造は1965年に決定された（図2）。

現在までに昆虫由来のエクジステロイド（脱皮ホルモン活性物質の総称：Ecds）として15種が同定されているが、すべてC₂₇コレステロール骨格および多数の-OH基を持つことなど脊椎動物のステロイドホルモンとは相当異なっている。

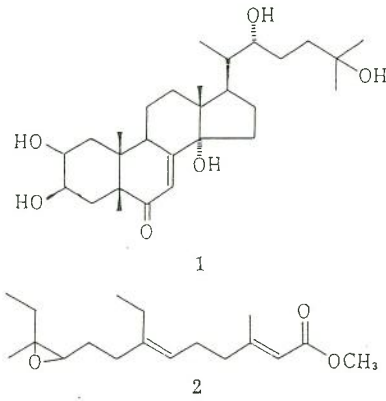


図2 昆虫の脱皮ホルモンと幼若ホルモンの構造

- 1: エタジソン
- 2: 幼若ホルモン-I
(最初に同定されたホルモンのみを示す)

幼若ホルモン (JH): 1967年に Röller らによりセクロピアサンの雄蛹から得られ, JH-1の構造が決定された (図2)。これまでに5分子種の JHが昆虫から同定されている。JHはセスキテルペンで, この種の化合物をホルモンとして利用しているのは昆虫のみである。

前胸腺刺激ホルモン (PTTH: 脳ホルモン): 1958年に小林と桐村によりカイコ蛹の脳から抽出された (Kobayashi, 1990)。PTTHは Ecds や JH と異なり, ペプチド系のホルモンで, 最近石崎と鈴木グループによりカイコの 30kDa-PTTHをコードしている cDNA がクローニングされ, 塩基配列が決定されたこ

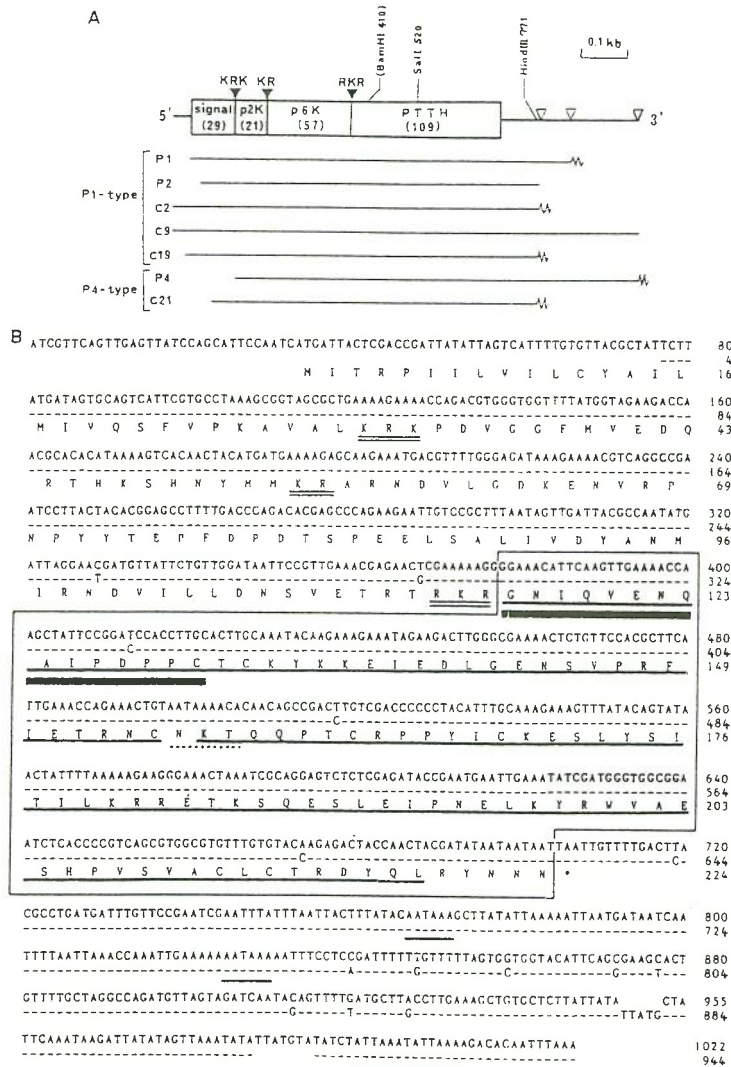


図3 カイコのプレプロPTTH cDNAの構造
A図のPTTH(109残基のアミノ酸)相当部分が
B図の枠内に示される

とは(図3, Kawakamiら, 1990)極めて大きい業績といえる。これに先立ち, 彼らは同一原材料から分子量の小さい5kDa-PTTH(4分子種がある)を単離し, ボンビキシンと命名し, ゲノムDNAコードボンビキシンIIの塩基配列を明らかにした(Iwamiら, 1989)。この物質はカイコにホルモン活性を示す30kDa-PTTHと異なり, カイコには活性を示さず, エリサンにのみ活性を示すインスリン族脳神経ペプチドであることが知られた。エリサン本来のPTTHの構造は今後の研究に待たれるが, 脊椎動物のホルモンと同じインスリン族ペプチドがボンビキシンII遺伝子として生物進化の過程で保存され, 昆虫体から発見されたことは, 分子進化という視点で大きい意味を持つものといえる。なお, 5kDa-PTTHはエリサンの脳間部の神経分泌細胞で, また30kDa-PTTHはカイコの脳の側方神経分泌細胞で, それぞれ免疫組織化学的にその存在が確認されている。

羽化ホルモン(EH): 1977年に諸星と普後によりその抽出が行われ, その後精製されたEHには4分子種があり, いずれも分子量約8,000で, 最近遺伝子に結合したEH-II(図4)が合成された(Konoら, 1990)。

休眠ホルモン(DH): 1957年に長谷川によりカイコの脳-食道下神経節連合体から抽

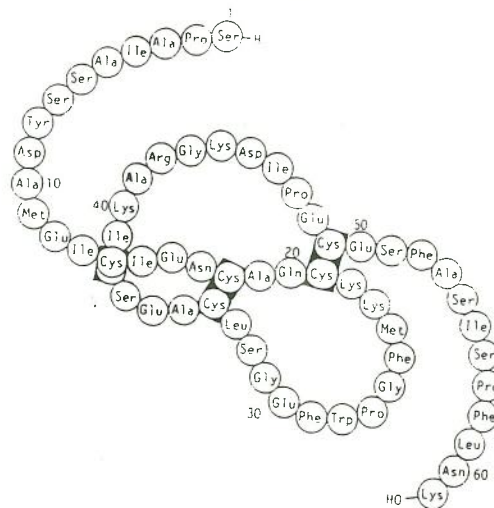


図4 カイコのEHの構造

出され, その後の研究で, DA-A(分子量約3,000)とDA-B(分子量約2,000)の2種が存在することが知られた(山下, 1986)。

4. あとがき

昆虫ホルモンによる生体の制御機構に関しては本文に述べた成長および分化以外に生殖, 生理的体色変化, 行動, 再生, 水分代謝等研究が行われて, 多くの知見が得られているが, 例えばエクジステロイドや神経分泌系の分泌物(神経ペプチド-ホルモン)の機能等無脊椎動物に共通するところが少なくない。

今後さらに進めねばならない昆虫ホルモンに関する生理学や化学的研究領域に加えて, 今や分子進化の視点で分子生物学の領域まで展望される。生理活性物質からみた地球生物の共通性とその進化の中に有用な昆虫機能が見出されることを確信し, 斯学の深化発展を期待するものである。

文 献

- 1) Kerkut, G.A. and L.I. Gilbert (1985) Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, 7: 564pp and 8: 595pp Pergamon Press, Oxford, New York
- 2) Rountree, D.B., W.L. Combest and L.I. Gilbert (1987) *Insect Biochem.* 17: 943-948
- 3) Kobayashi, M. (1990) *Sericologia* 30: 137-146
- 4) Kawakami, A., H. Kataoka, T. Oka, A. Mizoguchi, M. Kimura-Kawakami, T. Adachi, M. Iwami, H. Nagasawa, A. Suzuki and H. Ishizaki (1990) *Science* 247: 1333-1335
- 5) Iwami, M., A. Kawakami, H. Ishizaki, S.Y. Takahashi, T. Adachi, Y. Suzuki, H. Nagasawa and A. Suzuki (1989) *Devel. Growth Differ.* 31: 31-37
- 6) Kono, T., H. Nagasawa, H. Kataoka, A. Isogai, H. Fugo and A. Suzuki (1990) *FEBS* 263: 358-360
- 7) 山下興亜(1988) 池庄司敏明他著 昆虫生理生化学 朝倉書店 199-225

編集後記

遺伝子組換え微生物による作物病害のバイオコントロールの方法として、抗生物質生産遺伝子、病原菌の生産する毒素を無毒化する遺伝子あるいは非病性遺伝子の利用などが考えられているが、最近キチナーゼ遺伝子の利用が注目されている。本誌のなかでも触れられているように、キチナーゼ遺伝子では根圏、

葉圏に常在する微生物へ導入して微生物農薬として利用する場面と、作物へ導入して作物に病気に対する抵抗性を付与する場面とが想定される。いずれの場合にもキチナーゼ遺伝子の利用では人畜や生態系に対する影響が少ないのではないかとと思われる。

(大畑記)

ブレイン テクノニュース (第21号)

平成2年9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