

# 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 27 号

SEPTEMBER 15, 1991



### 表紙説明

#### ニワトリとウズラの胚盤葉キメラ

卵黄から分離したウズラ胚盤葉細胞をニワトリ受精卵(胚)の胚盤葉(胚盤下腔)に注入し、体外培養法により孵化させた。頸部と尾部の羽毛にウズラの色素の発現が認められている。

(写真提供 内藤 充氏)

### 本号の紙面

国内情報	1
タバコ立枯病菌の非病原性化プラスミド、植物体再分化関連カルシウム結合タンパク、タンパク質分泌装置の再構成、ヒトゲノムの自動解析システム	
文献情報	13
悪環境に強い植物、窒素固定微生物の作出、クリ胴枯病菌の二重鎖RNA、葉緑体mRNAのプロセッシング、植物のステアロイル-ACP不飽和化酵素のクローニング、癌遺伝子産物結合タンパク	
海外便り	21
フランスでの1年5ヵ月	
国際学会レポート	24
FFTC国際セミナー	
特別情報	27
OECD第4回バイテク安全性政府専門家会合 生分解性プラスチック	

## 目 録

### 国内情報

根岸秀明

*Pseudomonas solanacearum* の非病原性突然変異株から  
分離した非病原性化プラスミド…………… 1

梶原英之

植物体再分化関連カルシウム結合タンパク質…………… 4

徳田 元

タンパク質分泌装置の再構成…………… 6

添田栄一・村上康文

ヒト・ゲノムの自動解析システムの開発…………… 9

### 文献情報

悪環境に強い植物は作れるか?…………… 13

非マメ科植物に感染する新規窒素固定微生物の作出…………… 14

クリ胴枯病菌における二重鎖RNAの機能…………… 15

葉緑体mRNA 3' 末端のプロセッシングには

核にコードされたRNA結合タンパク質が必要…………… 16

高等植物のステアロイル-ACP-不飽和化酵素のクローニング…………… 17

タンパク質をプローブとしたクローニング法による癌遺伝子産物

c-Mycタンパク質と特異的に結合するタンパク質の単離と解析…………… 19

### 海外便り

川澄俊之

フランスでの1年5ヵ月…………… 21

### 国際学会レポート

花田俊雄

FFTC主催による国際セミナー「野菜生産における肥料,  
マルチ, 灌漑システムの利用」に出席して…………… 24

### 特別情報

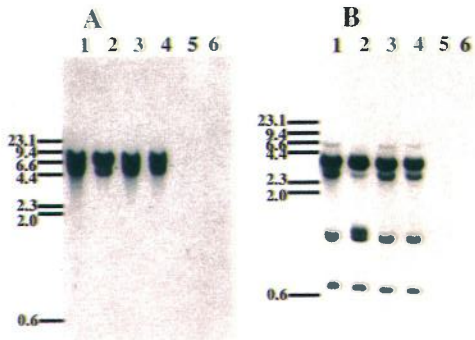
長谷部 亮

OECD第4回バイオテクノロジーの安全性政府専門家会合に出席して…………… 27

常盤 豊

生分解性プラスチックについて…………… 29

*Pseudomonas solanacearum* の非病原性突然変異株から分離した  
非病原性化プラスミド  
(本文 1 ページ参照)



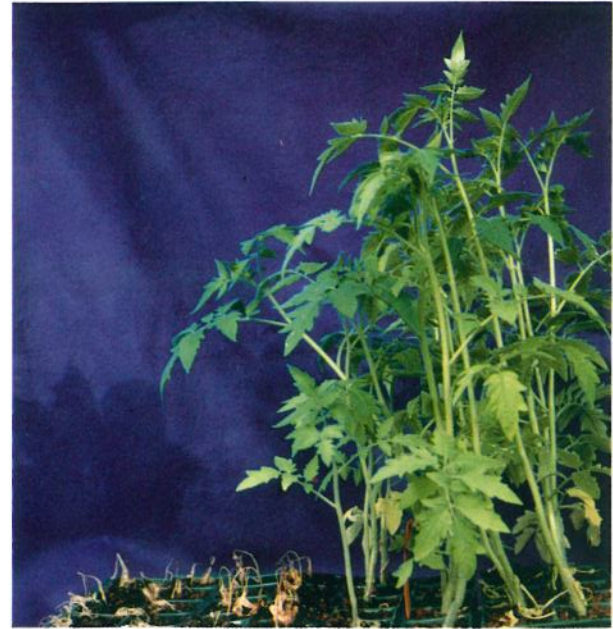
1. pJTSP1 をプローブとした *P. solanacearum* 全DNAのサザンブロットハイブリダイゼーション分析

A : 全DNAを *Eco*RIで切断

B : 全DNAを *Pst*Iで切断

レーン 1 : U-7, レーン 2 : M4S,

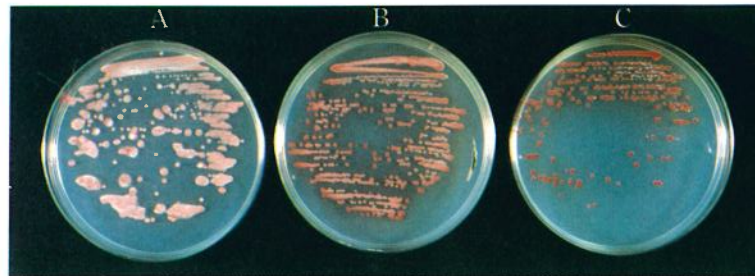
レーン 3 : M21S, レーン 4 : M26S



3. 形質転換体のトマトに対する病原性

A : U-7, B : 形質転換処理U-7,

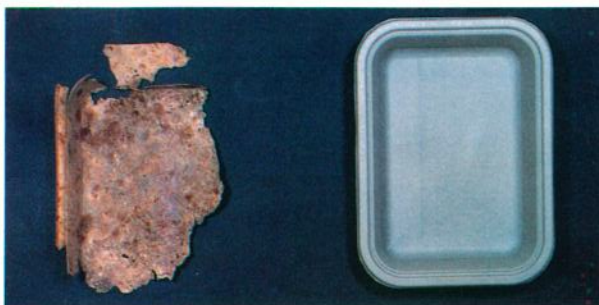
C : M4S, D : 形質転換体(U-7:pJTSP2)



2. 形質転換体のコロニーの形態

A : U-7, B : M4S, C : 形質転換体(U-7:pJTSP2)

生分解性プラスチックについて (本文 29 ページ参照)



完全な生分解性プラスチック

ポリカプロラクトン(PCL)と生でんぷんからなるブレンド体容器の土壌中での分解

左 : 6 カ月土壌中に埋没後の状態

右 : 土壌に埋没する前の状態

## 国内情報

# *Pseudomonas solanacearum* の非病原性突然変異株から分離した非病原性化プラスミド

日本たばこ 植物開発研究所 横浜センター

根岸 秀明

## 1. はじめに

*P. solanacearum* E.F. Smith はタバコ立枯病やナス科植物の青枯病を引き起こし、激甚な被害をおよぼす植物病原細菌である。本菌がある種の実験条件下で突然変異を起こし、病原性を喪失することはよく知られている。しかし、この現象に対する説明は十分になされていない。また、非病原性に関与する、あるいは制御する遺伝子に関しては、現在までのところほとんど知られていない。

タバコ立枯病の生物防除に用いることを試みられた非病原性突然変異株 M4S は、*P. solanacearum* の病原性野生株 U-7 を静置培養することによって得られた菌株である。著者らはその諸性質を野生株である U-7 と比較することによって病原性あるいは非病原性に関与する因子を明らかにしようと試みてきた。そして、M4S に、親株の U-7 には存在しない、ゲノム由来であろうと思われるプラスミド pJTPS1 が存在することを発見した。さらにこのプラスミドが病原性の変化に関与しているかどうかを明らかにするため、薬剤耐性のマーカーを付与した組換えプラスミドを構築し、野生株への形質転換を行なった。そして、形質転換体の諸性質とプラスミド上の遺伝子の発現等について検討した。

## 2. プラスミド pJTPS1 について

*P. solanacearum* の自然発生の非病原性突然変異株、M4S から約 6.6kbp の環状 2 重鎖のプラスミド DNA、pJTPS1 を分離した。pJTPS1 は M4S の親株である病原性菌 U-7

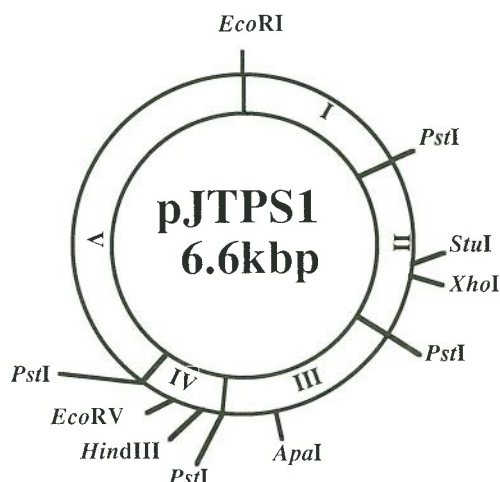


図1 pJTPS1 の制限酵素地図

からは検出されなかった。このプラスミドは、*ApaI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *PstI*, *StuI*, *XhoI* などの制限酵素認識部位を持っていた (図1)。

pJTPS1 と相同な DNA が U-7 や他の U-7 由来の突然変異株に存在するかどうか検討するため、pJTPS1 をプローブとして、全 DNA のサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果 M4S を含む全ての菌株に pJTPS1 と相同な直鎖状 DNA が存在していること、環状 DNA としては M4S にのみ存在することが判明した。したがって、pJTPS1 はゲノムまたはメガプラスミド由来であろうと推測された<sup>9)</sup>(口絵1)。

## 3. 組換えプラスミド pJTPS2 の構築と形質転換

図2に示した方法で薬剤耐性プラスミドを構築した。コスミドベクター pRK415 に *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* の *iaa* オ

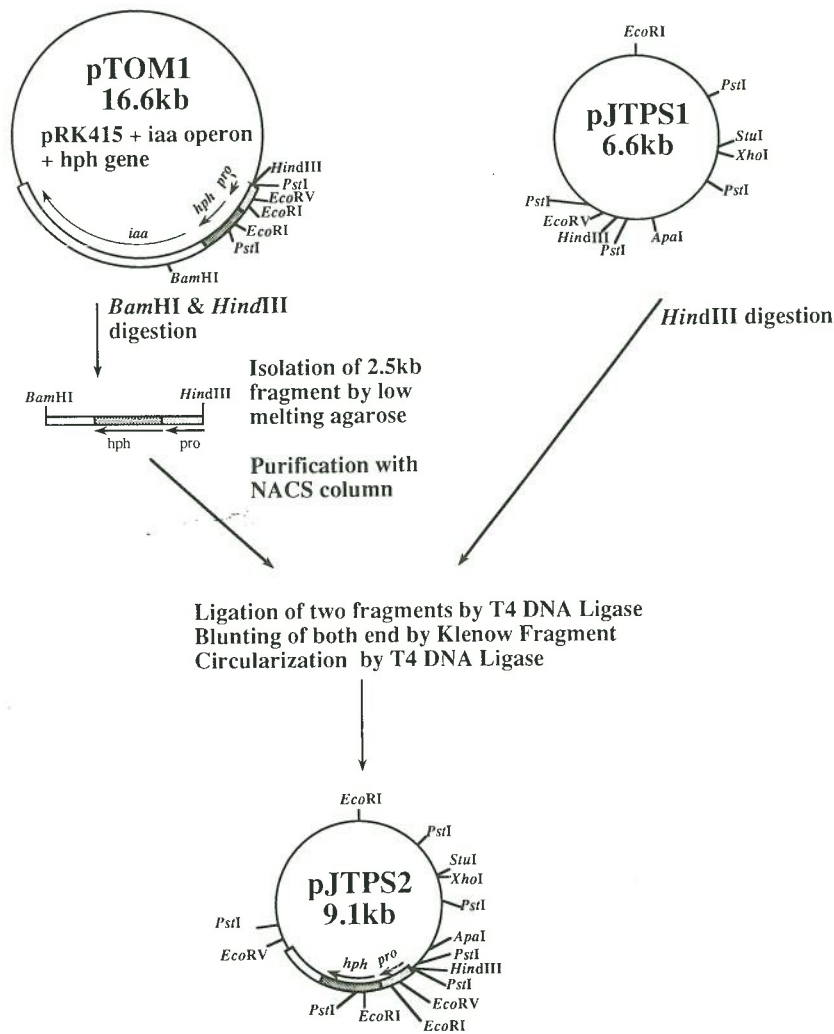


図2 ハイグロマイシン耐性プラスミドの構築

ペロンを組み込み、さらに *iaa* のプロモーターの後ろにハイグロマイシン耐性遺伝子を組み込んだプラスミド pTOM1 を *Bam*HI と *Hind*III で切断し、2.5kbp の断片を低融点アガロースゲルと Nacs カラムで分離精製した。この断片と *Hind*III で切断し直鎖化した pJTSP1 を T4 DNA ligase で *Hind*III 部位同士を結合し、さらに両端を Klenow fragment で平滑末端にし、もう一度 T4 DNA ligase を用いて、環状にした。

次に Boucher らの方法に準じてこの DNA を用いて M4S の親株である U-7 の形質転換を行い、DNA 1 $\mu$ g あたり 10<sup>4</sup> の効率でハイグロマイシン耐性コロニーを得た。

このハイグロマイシン耐性コロニーから数コロニーを無作為に選び Comai and Kosuge の方法でプラスミドを分離し、サザンハイブ

リダイゼーションで組換え DNA がハイグロマイシン耐性コロニーから選抜した菌体中に存在することを確認した。

#### 4. 形質転換体の諸性質

##### (1) コロニー形態

野生株 U-7、非病原性株 M4S、形質転換体 U-7 : pJTSP2 の TZC 培地上でのコロニー形態を比較したところ、病原性野生株は周囲が乳白色で流動性のコロニーを形成したが、M4S は、非流動性のコロニーを形成した。形質転換体は M4S に近い非流動性のコロニーを形成した(口絵2)。また、3 菌株とも最小培地(グリセリンを 4m/l 含んだ MM 培地)でも生育した。

##### (2) 菌体外多糖

*P. solanacearum* の病原性、萎凋作用の主要因であるとされている菌体外多糖の生成量を、主成分である N-アセチルガラクトサミンを標準として Akiyama らの方法を用いて比較したが、U-7 と比較して、M4S は 10 分の 1 以下、形質転換体は検出限界以下であった。

##### (3) 病原性

播種 1 週間後または 4 週間後のトマト幼苗の根に 1 個体あたり、10<sup>9</sup> 個の細菌を有傷接種した。接種 1 週間後には、U-7 と U-7 に DNA なしで形質転換と同様の処理を加えたものを接種した植物体は発病し萎凋したが、M4S と形質転換体を接種した植物体はまったく発病しなかった(口絵3)。

##### (4) 植物中での増殖

タバコへの葉肉注射によって植物体内での菌量の推移を検討したところ、U-7 は接種 24 時間後に最大数となり、以後緩やかに減少し始めた。M4S は過敏反応を引き起こし、接種 3 日以内に検出限界以下となった。形質転換体は接種 3 日後でも増殖中であり、過敏反応は引き起こさなかった。また、U-7 を接種したタバコは個体全体が萎凋枯死したが、M4S または形質転換体を接種したタバコは発病しなかった。

## 5. プラスミド pJTPS1 上の遺伝子の発現

pJTPS1 上の DNA が発現しているかどうか検討するため、U-7、U-7 由来の突然変異株および形質転換体から全 RNA を抽出し、pJTPS1 をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーション分析を行った。pJTPS1 を *EcoR* I と *Pst* I で切断して得られる 5 個の断片をそれぞれプローブ (I : 1.1 kb, II : 1.1 kb, III : 1.2 kb, IV : 0.5 kb, V : 2.7 kb) とした。M4S と形質転換体から抽出された全 RNA 中には、全てのプローブと相補性のある RNA がそれぞれ検出されたが、U-7 やその他の突然変異株から抽出された RNA 中には一つのプローブとのみ相補性のある RNA が検出された (図 3)。プローブに用いた DNA の大きさと検出された RNA の大きさから少なくとも 2 個の遺伝子が M4S と形質転換体では発現しているが、他の菌株では発現していないことが示された。

## 6. 考 察

この研究で、非病原性突然変異株 M4S に存在するプラスミド pJTPS1 が病原性菌 U-7 の非病原性への変化に何らかの役割を持つことが明らかになった。pJTPS2 による U-7 の形質転換体は M4S と同様に非流動性のコロニーを形成し、トマトやタバコに対して

病原性を失った。タバコに葉肉注射された形質転換体は、萎凋も過敏反応も引き起こさず、U-7 と M4S との間であった。さらに形質転換体は病原性に重要な関わりを持つといわれている菌体外多糖の産生能も失った。

ノーザンブロットハイブリダイゼーションの結果は、pJTPS1 上の少なくとも二つの遺伝子が M4S と形質転換体で発現し、U-7 の染色体あるいはメガプラスミド上の相同遺伝子は発現していないことを示した。プラスミド形状になることによって、染色体あるいはメガプラスミド状の相同遺伝子の発現を抑制しているメカニズムから解放されるためであろうと思われる。

このプラスミド pJTPS1 の非病原性に関与する機能は、Carney and Deny<sup>20</sup> が報告している *P. solanacearum* の非病原性遺伝子 *avirA* とは異なっている。*avirA* は種特異的な非病原性遺伝子でありタバコに過敏反応を引き起こし、*P. solanacearum* の宿主範囲を制限するものである。*avirA* の機能はいくつかの植物病原細菌で報告されている非病原性遺伝子の機能に似ており、それらは遺伝子対遺伝子仮説において、植物側の抵抗性遺伝子に対応するものであるとされている。pJTPS1 の機能はいくつかの植物病原糸状菌で見つけられている、プラスミド様 DNA や 2 本鎖 RNA のような非病原性化因子<sup>21</sup> に似ており、pJTPS1 が *P. solanacearum* の非病原性化因子を有する可能性がある。

現在、pJTPS1 上の遺伝子とその役割を解

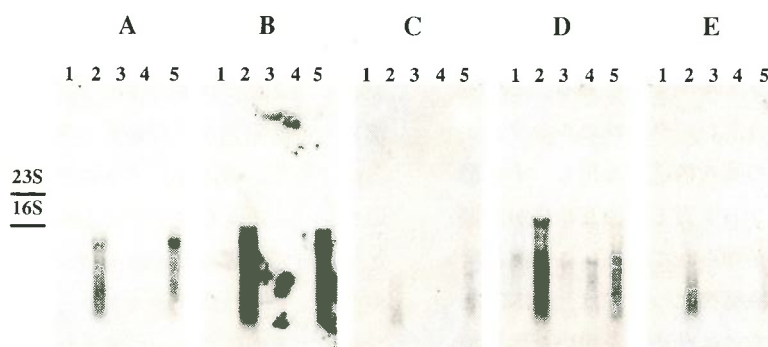


図 3 pJTPS1 をプローブとした *P. solanacearum* 全 RNA のノーザンブロットハイブリダイゼーション分析  
 プローブは A: フラグメント I (1.1 kb), B: フラグメント II (1.1 kb), C: フラグメント III (1.2 kb), D: フラグメント IV (0.5 kb), E: フラグメント V (2.7 kb)  
 レーン 1: U-7, レーン 2: M4S, レーン 3: M21S, レーン 4: M26S, レーン 5: U-7(pJTPS2)

明するため pJTPS1 の全塩基配列の決定を急いでいる。

文 献

1) Buck, K.W.(1986) An overview. Fungal Viro-

logy. Crc Press, Inc. Boca Raton

2) Carney, B.F. and T.P. Denny(1990) *J. Bacteriol.* 172 : 4836-4843

3) Negishi, H., T. Yamada, T. Shiraishi., H. Oku and H. Tanaka (1990) *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 56 : 687-690

国内情報

植物体再分化関連カルシウム結合タンパク質

農林水産省 農業生物資源研究所 適応性遺伝子研究室

梶原 英之

はじめに

私たちはカルスから植物体への再分化に関与するであろう再分化関連タンパク質因子の候補として、動物のバルブアルブミンまたはオンコモジュリンにN末端アミノ酸配列が類似したカルシウム結合タンパク質を単離した。そしてそのアミノ酸配列に基づいて合成したオリゴペプチドに対する抗体を作製することによって、そのタンパク質の再分化過程における発現を調べた<sup>1)</sup>。

植物に限らずカルシウム結合タンパク質は細胞内で生理学的に重要な役割を持っていることが知られている。カルシウム結合タンパク質としてよく知られるものにプロテインキナーゼCやトロポニンなどがあるが、この他に古くからよく研究されたものとしてカルモジュリンやバルブアルブミンもある。これらのカルシウム結合タンパク質はカルシウムイオンによってその高次構造が変化し、その酵素活性や他のタンパク質との相互作用が制御されていることが知られている。この高次構造の変化や制御機構等については、NMR<sup>2)</sup>やキャピラリー電気泳動法<sup>3)</sup>を用いた解析で詳しく調べられており、特にカルモジュリンや細胞内に存在するカルシウムイオンは細胞内の情報伝達に深く関与していることが示唆されている。

カルシウム結合タンパク質は生理学的に重要であることから、これまで動植物で数多く分離および同定されてきた。そして植物の分野で特に馴染みの深いものとしては、アミラーゼやコンカナバリンAなどがある。しかし、ごく一般的に動物の筋肉などに広く存在し、カルシウムイオン濃度の調節をおこなっていると考えられているバルブアルブミンというカルシウム結合タンパク質はまだ植物においては同定されていなかった。そこで我々は動物のバルブアルブミン、またはこれに相当するタンパク質が植物にも存在し、何等かの重要な役割、特に細胞内の情報伝達に関与するのではないかと考え、一連の研究を行った。

1. バルブアルブミン類似タンパク質の同定

まず手始めとしてイネの胚芽および葉に存在する全タンパク質を抽出し、それらのN末端アミノ酸配列を一つひとつ決定することからはじめた。この時、イネの胚芽には千個近いタンパク質が存在することや、他の組織などと比べて非常に高い割合でN末端アミノ酸がブロックされた状態であり、コンカナバリンAによる染色によって糖タンパク質が多量に多いことなどがわかった<sup>4)</sup>。我々はこの2次元電気泳動法(分子量と等電点)とアミノ酸配列解析(N末端アミノ酸配列)で得られる情報(その他として必要に応じ、糖鎖の有

無, 内部のアミノ酸配列, アミノ酸組成など)を合わせてタンパク質ライブラリー<sup>4)</sup>と呼んでいるが, 同様にイネの葉についてもタンパク質のライブラリーを作製し, 未知のタンパク質の探索を始めた。この作業過程において, イネからもクローニングされ, 植物でよく知られているタンパク質, 例えば, リブローサー1, 5-ニリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ大サブユニット, スーパーオキシドジスムターゼ, およびプラストシアニンなどがそれぞれ2個ずつ同定され, 2次元電気泳動ゲル上に異なるスポットとしてマッピングされた<sup>5)</sup>。

もちろん, これまでに知られているタンパク質のどれとも相同性を持たないものや, その他興味深いタンパク質も多く同定された。それと同時に, 動物の筋肉や脳で存在が報告され, カルシウムイオン濃度を調節する役割を持つと考えられているパルブアルブミン, またはガン細胞に特異的に発現するオンコモジュリンとタンパク質のN末端アミノ酸配列において相同性を持つタンパク質が同定された(図1)。これは分子量は27kDaであり, 等電点は5.0の少なくともコンカナバリンAと結合する精鎖を持たない酸性タンパク質であった。

## 2. パルブアルブミン類似タンパク質の精製

生化学的にタンパク質の解析を行う場合, どうしてもそのタンパク質を精製し, そのタンパク質に対する抗体を作製する必要がある。このために, このタンパク質が酸性タンパク質であることを利用して, 陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた手法で精製を行った。この精製されたタンパク質を用いてマイクロ

表1 パルブアルブミン類似タンパク質のマイクロフィルトレーション法によるカルシウムイオン結合テスト

タンパク質	カウント(cpm)
タンパク質なし	23.7
粗タンパク質	64.6
精製したパルブアルブミン類似タンパク質	91.8
カルモジュリン	301.4

タンパク質をフィルター上に置き, EDTAで洗った後, 放射性のカルシウムイオンを与えた。結合した放射性のカルシウムイオンの量を液体シンチレーションカウンターで測定することにより結合能を調べた。

フィルトレーションアッセイ法で実際にカルシウムイオン結合能があるかどうか調べた(表1)。その結果, 実際にカルモジュリンよりも結合能はやや弱いと考えられるが, 十分なカルシウムイオン結合能があることがわかった。これはパルブアルブミンに類似し, カルシウムイオン結合能を持つことにより, パルブアルブミン類似カルシウム結合タンパク質と名付けた。

## 3. アミノ酸配列の解析と抗体の作製

陰イオン交換クロマトグラフィー以外の方法も用いて何度か精製を試みたが, 完全なまでにはパルブアルブミン類似タンパク質を精製できず, これを直接ウサギに注射し, ポリクロナール抗体を作製するには不相当であると考えられた。そこで, ペプチド合成機を用いて, N末端アミノ酸配列に基づき30アミノ酸よりなるペプチドを合成し, これをウサギに注射することによってパルブアルブミン類似タンパク質に対する抗体を得ることとした。この方法によって簡便に非常に特異性の高い抗体を作製することができた。

生物	アミノ酸配列
イネ	AGGV DDAPLVGNKA PDFFAEEVFF QQFINV
シーラカンス	AVAKLLAAD VTAALLEGCKA DDSFNHKVFF QKTGLA

図1 パルブアルブミン類似タンパク質のN末端アミノ酸配列と動物(シーラカンス)のパルブアルブミンのアミノ酸配列の比較  
同じアミノ酸の場合は網かけしてある。



## 4. パルブアルブミン類似タンパク質の発現

この合成ペプチドに対する抗体を用いてパルブアルブミン類似タンパク質の局在性や発現を解析した。このタンパク質はイネにおいて最も葉に多く存在したが、根やカルスには少なかった。そして当初、このタンパク質は27kDaのモノマーであると考えられていたが、非還元状態におけるSDSポリアクリルアミド電気泳動によると、55kDaを示し、ホモダイマーであるらしいことがわかってきた。また、このタンパク質はトウモロコシなど他の単子葉植物にも存在することがイムノブロット法を用いた解析で明らかにされた。このタンパク質は熱ショック、光などは全く誘導されることがなかった。しかし、このパルブアルブミン類似タンパク質がカルスには少なく、葉には多いことに着目し、イネのカルスの再分化過程における発現をイムノブロット法を用いて調べた。すると、このタンパク質はカルス増殖培地から再分化培地へ移植すると、2日から3日目に急速な誘導が観察された。しかも、このタンパク質は再分化率の低い系統のカルスでは発現せず、または発現し

ても少なく、移植後10日以上経ってからであった。

このように、このパルブアルブミン類似カルシウム結合タンパク質はイネの再分化と密接な関係があることが示唆された。また、このタンパク質の生理学的な機能や構造については解析中であるが、最近、カルシウムイオンと植物ホルモンとの関係に関する報告<sup>7)</sup>も相継いでいるので、さらに詳しくパルブアルブミン類似カルシウム結合タンパク質について解析していきたいと考えている。

## 文 献

- 1) Kajiwara, H. et al. *Plant Cell Physiol.* in press
- 2) 伊倉光彦・引地邦男 (1988) カルシウムイオンと細胞機能, 共立出版 152-160
- 3) Kajiwara, H. et al. *J. Chromatogr.* in press
- 4) 梶原英之ら (1988) 第74回日本育種学会講演要旨 p. 390-391
- 5) Hirano, H. (1989) *J. Protein Chem.* 8 : 115-130
- 6) 梶原英之ら (1990) 日本植物生理学会1990年度年会 p. 51
- 7) Boss, W.F. et al (1989) *Second Messengers in Plant Growth and Development*, Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 111

## 国内情報

## タンパク質分泌装置の再構成

東京大学 応用微生物研究所

徳田 元

## 1. はじめに

細胞内のリボゾームで合成されたタンパク質は、その後細胞内の特定の場所、あるいは細胞外に運ばれてはじめてタンパク質の持っている機能が生理的意味を持つようになる。多くのタンパク質について、この過程で生体膜を通過する段階が存在する。タンパク質の

膜透過・分泌という現象は、真核細胞、原核細胞を問わず普遍的に観察され、その機構は現在細胞生物学の最も興味ある研究課題の一つになっている。また、有用タンパク質を微生物を用いて大量生産させるという応用面からもその機構の解明は重要である。

## 2. 大腸菌のタンパク質膜透過系

原核細胞である大腸菌には、細胞内部に膜は存在しないが、細胞質膜（内膜）の外に更にもう一種の外膜と呼ばれる膜構造がある。内膜と外膜の間隙であるペリプラズムには、各種の加水分解酵素などが保持されている。外膜やペリプラズム空間に存在するタンパク質は、細胞質のリボゾームで合成された後、細胞質膜を越えて所定の場所に運ばれる。これら細胞質膜を通過するタンパク質は、分泌型タンパク質と呼ばれており、リボゾームでは前駆体型のタンパク質として合成される。前駆体タンパク質には、成熟体タンパク質には存在しない20~30個のアミノ酸からなるシグナルペプチドを持っている。シグナルペプチドは膜透過するために必須であり、膜透過の過程でシグナルペプチダーゼによって切断される。

大腸菌における分泌型タンパク質の膜透過には、各種のタンパク質因子が関与していることが遺伝学的解析によって示唆されている<sup>1)</sup>。またタンパク質の膜透過は、ATPとプロトン駆動力をエネルギーとして要求することも明らかとなっている<sup>2)</sup>。タンパク質因子には、SecA, SecB, SecD, SecE, SecF, SecY等がある。この内、SecA, SecBは可溶性タンパク質として精製され、その機能が詳しく解析されている。前駆体タンパク質が高次構造を形成すると膜透過されにくくなるが、SecBは合成された前駆体タンパク質の構造を、膜透過に適したある程度ほぐれた状態に保つ機能を持っている。タンパク質の合成と膜透過が完全には共役していない大腸菌では、このような機能がある方が効率良く膜透過されるのであろう。しかし、SecBタンパク質は膜透過装置を構成している因子ではなく、通常の*in vitro*実験系はSecBが存在しなくても膜透過活性を示す。また*in vivo*においても必須のタンパク質ではない。

SecAは分子量約10万の膜表在性タンパク質であり、膜透過に共役したATP分解活性を持つ必須の因子である。膜表在性因子とし

て膜透過装置を構成していると考えられている。SecD, SecE, SecF, SecYはこれらの遺伝子の塩基配列の解析から、すべて膜内在性の因子であることが推定されている。膜内在性の因子が膜透過装置を構成するかどうかは、これらの因子を分離精製し、人工的膜構造体であるリポゾームに組み込んでその機能を調べる再構成系が必要である。筆者らは先ず大腸菌の細胞質膜を界面活性剤オクチルグルコシドで可溶化し、リポゾームに組み込んでタンパク質膜透過活性を再構成することに成功した<sup>3)</sup>。この様な未精製標品からの再構成は、筆者らのグループの他に米国のWicknerらのグループ<sup>4)</sup>とBlobelらのグループ<sup>5)</sup>によってほぼ同時に報告されている。筆者らとWicknerらのグループの再構成系では、SecYタンパク質が重要であることが示唆された。しかしBlobelらのグループは、SecYが無いプロテオリポゾームでも膜透過活性があると報告し、SecYがはたして必須かどうか未精製標品からの再構成系では、確定しなかった。Wicknerらのグループは更に精製を進め、SecY, SecEおよびバンド1と呼ばれる3種のタンパク質が主要成分となる分画を得、これを用いると膜透過活性が再構成されることから、SecE, SecYはどちらも必須であり、バンド1も膜透過装置の構築に何等かの関与をしていると報告した<sup>6)</sup>。しかし3種のタンパク質は別々に精製されていないので、すべてが必須かどうか彼らの報告から断定することはできない。筆者らはこの点について明らかにすることを試みた。

## 3. SecEとSecYの精製

SecEは単独でも大腸菌で大量発現されるが、SecYの大量発現には、同時にSecEの発現も誘導することが必要である<sup>7)</sup>。SecYの発現を単独で誘導すると細胞に致死的であり、SecEはこの致死作用を中和すると考えられる。このことは、SecEとSecYが膜中で相互作用をしていることを示唆している。

大量発現したSecEとSecYはすべて細胞質膜に局在する。そこで、大量発現した細胞

から、細胞質膜を調製し、SecEとSecYの精製を試みた。SecEはこれを単独で大量発現した細胞より、またSecYはSecEも大量発現している細胞から精製した。細胞質膜をオクチルグルコシドで可溶化し、pH7.5で強陰イオン交換カラムで分離するとSecEは素通り画分に得られた。一方、他の大部分のタンパク質は樹脂に強く吸着した。素通り画分をゲルろ過カラムで精製し、純度80%以上のSecE標品が得られた<sup>9)</sup>。疎水性の極めて高いSecYの精製は、容易ではなかった。樹脂に吸着させると、SecYは広範なフラクションに溶出されてしまい、純度が上昇しないばかりか収率の低下が著しかった。またSecYの可溶化をpH6付近で行うと、SecYを含む少数のタンパク質のみが特異的に沈澱画分になることが見いだされた。沈澱画分に回収されたSecYの可溶化を、各種の条件下で試みたが成功しなかった。種々の条件を検討した結果、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)、150mM NaCl、10%グリセロール、2.5%オクチルグルコシドで可溶化し、強陽イオン交換樹脂で分画するのが最適であることがわかった。この条件下では、SecY以外の大部分の膜タンパク質は素通り画分に得られた。これに対してSecYを含む数種のタンパク質のみが樹脂に弱く吸着し、素通り画分の直後に回収されてきた。これをさらに、ゲルろ過カラムで精製すると、純度80%程度の標品が得られた<sup>9)</sup>。

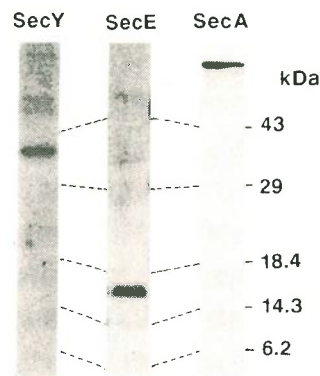


図1 SecY, SecEおよびSecAの最終精製標品  
SDS-ポリアクリルアミドゲル(13.5%)電気泳動後、クマシーブリリアントブルーで染色した。

図1は、SecEとSecYの最終精製標品および既に精製していたSecAのSDSゲル電気泳動による分析結果である。これらの標品を用いて再構成を試みた。

#### 4. タンパク質膜透過装置の再構成

筆者らの再構成法は、オクチルグルコシド希釈法と凍結融解法を組み合わせたものである。SecY, SecEを大腸菌リン脂質と2.5%オクチルグルコシド存在下で反応後、緩衝液で40倍に希釈しオクチルグルコシドの濃度を下げる。この過程で疎水的なSecEやSecYはリン脂質二重層に組み込まれる。プロテオリポゾームを超遠心で回収し、緩衝液に懸濁

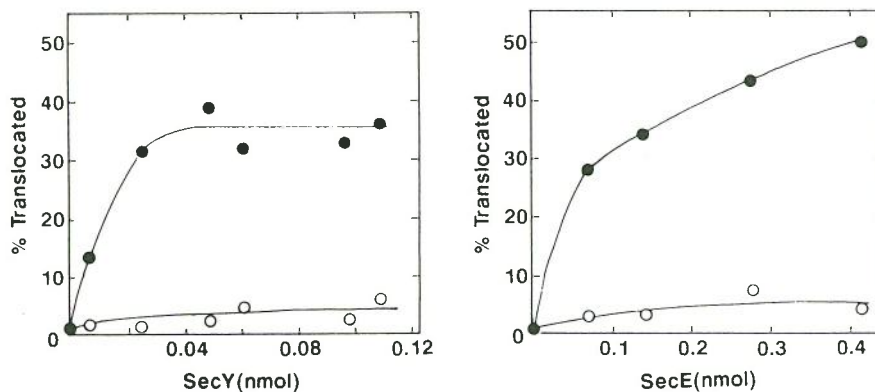


図2 SecY, SecEおよびSecAによる大腸菌タンパク質膜透過装置の構築  
Aは1.9μg(0.14nmol)SecEと各々の量のSecYを用い、またBは3μg(0.06nmol)SecYと各々の量のSecEを用いてプロテオリポゾームを再構成した。SecA存在下(●)と非存在下(○)で膜透過した基質量を、加えた基質量を100として%で示した。

後ドライアイス/エタノールで急速に凍結し、室温で融解する。融解後の試料は凍結前に比べ濁度が増加している。これは凍結融解によってプロテオリポゾームが融合したことを示している。融解後の試料をごく短時間（通常5秒以内）バスタイプのソニケーターで処理すると試料は透明となる。この凍結融解とその後の超音波処理は、再構成活性とその再現性を上昇させることが報告されているが、筆者らの系でも同様であった。

こうして得られたプロテオリポゾームを用いて、タンパク質の膜透過活性を調べた（図2）。タンパク質の膜透過は、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで標識した前駆体タンパク質を用い、精製 SecA と ATP 存在下で行った。図2Aは SecY 依存性を、図2Bは SecE 依存性を調べたものである。SecY と SecE の両方が再構成活性に必須であることが明らかとなった。また、SecA 非存在下では極めて活性は低い。これらの結果から、SecE, SecY, SecA はいずれも必須の因子であり、どれを欠いても膜透過装置は構築できないこと、またこの3種のみで装置が構築できることが、別々に精製した因子を用いてはじめて明らかとなった<sup>9)</sup>。

## 5. おわりに

SecD や SecF は膜透過反応後期に関与しているとされている。現在筆者らの研究室で

は、これらの因子が実際にどのような役割を果たしているかを再構成系で調べている。膜透過装置が SecA, SecE, SecY の3種のみで構築できることは明らかとなったが、これが細胞における装置の全容であるとは思われない。他の因子がどう関与してくるかを明らかにすることが今後の課題である。

## 文 献

- 1) Bieker, K.L., G.J. Phillips and T.J. Silhavy (1990) *J. Bioenerg. Biomembr.* 22 : 291-310
- 2) Mizushima, S. and H. Tokuda (1990) *J. Bioenerg. Biomembr.* 22 : 389-399
- 3) Tokuda, H., K. Shiozuka and S. Mizushima (1990) *Eur. J. Biochem.* 192 : 583-589
- 4) Driessen, A.J.M. and W. Wickner (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 3107-3111
- 5) Watanabe, M., C.V. Nicchitta and G. Bolbel (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 1960-1964
- 6) Brundage, L., J.P. Hendrick, E. Schiebel, A.J. M. Driessen and W. Wickner (1990) *Cell* 62 : 649-657
- 7) Matsuyama, S., J. Akimaru and S. Mizushima (1990) *FEBS Lett.* 269 : 96-100
- 8) Tokuda, J. Akimaru, S. Matsuyama, K. Nishiyama and S. Mizushima (1991) *FEBS Lett.* 279 : 233-236
- 9) Akimaru, J., S. Matsuyama, H. Tokuda and S. Mizushima (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 6545-6549

## 国内情報

# ヒト・ゲノムの自動解析システムの開発

理化学研究所 ジーンバンク室

添田栄一・村上康文

## 1. ヒトゲノム解析計画と DNA 塩基配列決定

ヒトゲノムの本体は、22対の常染色体と1対の性染色体(男性ではXY, 女性ではXX)

に巻きついた長いDNA分子である。染色体の大きさによって、DNAの長さは異なるが、その塩基数は5千万から2億5千万の範囲にある。その塩基の並び(シークエンス)を決め、遺伝暗号を解読し、遺伝学の研究基盤を

作ろうというのがゲノム解析計画の目標である。その最大の障害となっているのがシーケンス技術能力である。

## 2. ゲノム解析の必然性とシーケンスの自動化

ヒトゲノムには、5~10万種類の遺伝子がひもに通したビーズのように存在する。その本体であるゲノム DNA は生命現象を代表する二つの機能を有する。すなわち、生殖細胞系では人間ひとり作るために使われる必要な情報を正確に複製できる機能と、個体形成系では、人間が生命を維持するために必要な情報を発現できる機能をもっている。

ゲノム DNA は、先祖から正確に継承された遺伝情報伝達物質であるのみならず、そのシーケンスは現代人の同性間では 500 塩基に 1 個程度の配列の違いしか見出されない。このことから、ゲノム DNA の全シーケンスは、たとえ誰の DNA であれ、生命現象の謎を解き明かす永久不滅のデータベースとなることが理解できよう。

ただし、このためには二つの問題点がある。第一はその情報量の膨大さである。ウイルスは別としていかなる生物でもそのゲノムの大きさは数百万塩基以上もある。ただしその内容は DNA の基本構造である AGCT が繰り返されるだけである。幸いなことにコンピュータは 2 種類のシグナルで、ゲノムの AGCT の 4 種類のシグナルで情報を伝えるのでいわば同質の情報処理技術で対応できる。

第二は、どのようにして DNA の暗号を読み取れるかである。膨大なゲノム DNA のシーケンスを前にして新技術と機器を開発し、一気に突破口を求める方法と現在の技術を改良し、その効率を上げる二つの方法が考えられる。我々は後者の方法をとった。これまで研究室の手作業で行っていたシーケンス法を逐次機械化しオートメーション化していくことに焦点をおいたのである。

## 3. ゲノム・シーケンスへの道 —ショットガン方式—

サンガー法、およびマクサム・ギルバード法は、1970年後半に、ほぼその技術を完成した。その後、これらを越えるシーケンス技術の改革はない。長鎖 DNA のシーケンスは、1回の実験で得られる300~400塩基の読み取りを基に組み立てられる。通常、個々の DNA に対して研究者が作戦を練り、シーケンスを完成していくが、ゲノムプロジェクトではそのような手間暇は許されない。

ショットガン法は以下の処理をへてシーケンスが決定される。目的とする DNA を超音波でランダムに切断し、そのうち1000塩基以上の DNA 断片を回収する。遺伝子操作で大腸菌に組み入れ（ショットガンライブラリーの作製）、断片 1 分子 1 分子を大腸菌内で増幅させる。こうして得られた断片をサンガー法でその末端から300~400塩基を読み取り、コンピュータに入力する（シーケンス原データ）。断片のシーケンスのうち重複する部分を求め、長い DNA のシーケンスを構成する方法である。

超音波による DNA の切断はほぼランダムであり、目的とする DNA の約 4 倍量の DNA のシーケンス原データを得れば、4 万塩基対の DNA シーケンスでも 95% は完成する。本法では同一箇所を 4 回以上シーケンスすることになる。これは一見無駄に見えるが、シーケンスの精度を上げるのに役立つ。通常、シーケンスは 3% 以上の読み違いがあるとされるがショットガン法ではこれを 0.03% 以下にする。シーケンスの誤差をいかに下げるかが今日の重要な課題である。

## 4. シーケンスの工業化

ヒトゲノム解析計画によって大規模シーケンスの要求は増えている。この潜在的需要に応える方策の一つは、1回につき300~400塩基の断片を大量に生産するオートメーションによる工場方式である。しかし、そのため

にはいくつかの障害を乗り越える必要がある。

- 1) 出発材料供給のルーチン化、試料調製等の手間のかからないこと。
- 2) できるだけ長いシーケンスの読み取りとその精度を高めること。
- 3) 各工程がオートメーション化でき、工程の各能力がほぼ同一であること。また、工程数ができるだけ短いこと。
- 4) 稼動中に危険が伴わないこと。

ショットガン方式はシーケンスのオートメーション化に適合する最短距離にある。これまで我々はこの方式に基づく要素技術を開発し、各工程を組み立てるに至った。さらに、蛍光法、PCR等の新技術を導入し、その工程を短縮する努力をしている。

#### 5. シーケンス要素技術の自動化

ショットガン法では①大腸菌・M13ファージベクター系で構築したライブラリーを出発材料とする。以下、②ファージプラークの選択(プラークセクター)、③ファージDNAの抽出と精製、④シーケンス反応(反応機)、

⑤シーケンスゲルの作製(ゲル作製機)、⑥反応物のゲルへの注入(試料注入機)、⑦シーケンス電気泳動(蛍光法シーケンサー)、⑧シーケンス原データの編集(コンピュータ・ソフトウェア)、そして⑨これらの各工程を結び流れを制御する搬送ラインとシステムコントローラである(図1)。

これらの機器のほとんどは科学技術振興調整費(代表和田昭允東大教授)、および理化学研究所遺伝子構成研究(代表遠藤勲理研主任研究員)の指導と支援下で作製された。このうち、反応機と蛍光法シーケンサーはすでに市販されているが、今回はこれに改良を加え、自動化ラインに加えられた。各機器の製作担当とその能力を表1に示す。計画の当初は研究室の実験操作をロボットで忠実に繰り返すことを目標とした。しかし、DNAの取り扱いに必要なエタノールによる濃縮やフェノール抽出等の操作を微量かつ多数行なう場合、遠心分離を避けなければ自動化、スピード化は困難である。したがって設計の段階では、遠心分離と試料の希釈化を避け、微量化を図った。このため、実験室の操作とは異なった

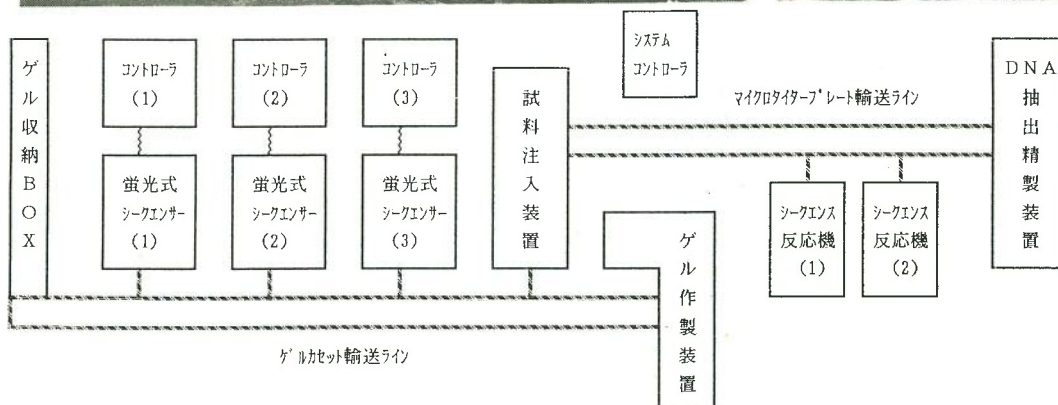
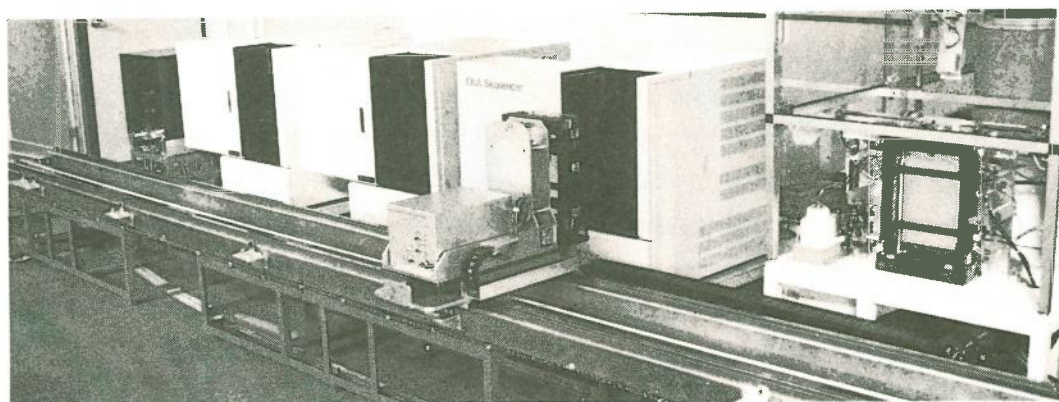


図1 ヒト・ゲノム自動解析システム構成図

表1 シークエンシング・システムの構成装置の能力（現在値）

構成装置	開発担当機関	予定能力（/台）	台数
プラークセレクター	セイコー電子工業	1 プラーク/0.5分	1
DNA抽出・精製装置	東ソー	24サンプル/80分	1
シークエンス反応装置	セイコー電子工業	24サンプル/150分	2
ゲル作製装置	コスミック	(18ゲル)	1
試料注入装置	セイコー電子工業	16サンプル/60分	1
蛍光法シークエンサー	日立製作所	16サンプル/4時間	3
		(450塩基/サンプル)	3
結合編集	三井情報開発	600サンプル/日	
搬送ライン	理化学研究所		
システムコントローラ	理化学研究所		

作業工程も随所に見られる。たとえば、大腸菌の培養液からファージ粒子を集め、鋳型DNAを抽出濃縮するためフィルターを使う自動化機器や、 $1\mu\text{l}$ 以下の試薬や酵素を注入、攪拌、分注するシークエンス反応機の作業形態である。このような苦労は出来上がればコロンプスの卵として風化する。今回は処理能力等当初からの目標が明確化されていたので、これに対処できるアイデアが浮かんだのである。

## 6. 染色体DNA解読への道

以上のようにM13ライブラリーから全塩基配列決定に至る全工程の機械化は可能になった。各機器の1日の処理能力は10万塩基を目標にしている。1日10万塩基読み取れるシステムが完成すれば年間3千万塩基の能力ができる。ただし、ショットガン法でヒト染色体は、4倍以上の120億塩基のシークエンスが必要であるのでこのレベルの全解読には約400年間を要する。

今回完成した自動化ラインの特徴は、水1滴の1/10にも満たない微量の化学反応を一度に多数処理できる点にある。化学工場のプラントというより精密機器の組立て工場といったイメージをもつ（図1）。今後ラインを稼働させ、各要素機器の能力のバランスを取るコントローラーシステムを調整するのが課題であるが、実用化は時間の問題である。このことより世界で初めてDNAシークエンスの完全自動化の実例を示し、ゲノムDNAに対処できるモデルを内外に示したことに意義があると信ずる。



## 文献情報

悪環境に強い植物は  
作れるか？

どんな悪環境にも耐えられる植物を遺伝子工学の手法を用いて作ることができたら……厳寒の地や灼熱の砂漠で実る穀物、大気汚染の中でも青々と繁る木々……そんな楽しい想像をかき立ててくれる実験結果が報告された。

最近マスコミを賑わすオゾン、大気汚染の元凶二酸化イオウ、低温、強すぎる光、このようなストレスを植物が受ける時、悪役として登場するのが、活性酸素と呼ばれる一団である。多くの生物に欠かすことのできない酸素ではあるが、その還元分子種であるスーパーオキシドラジカル ( $O_2^-$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、ヒドロキシラジカル ( $OH\cdot$ )、それに一重項酸素や過酸化脂質は、反応性に富み生物にとって有害な物質となる。特に  $OH\cdot$  は  $O_2^-$  と  $H_2O_2$  から金属イオンを触媒として Haber-Weis 反応により生じ、膜系の破壊や DNA の損傷などを引き起こす主犯格である。

これらの活性酸素から生物を守る機構の要の酵素の一つにスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) がある。二分子の  $O_2^-$  を一分子の  $H_2O_2$  と  $O_2$  に不均化して消去する酵素であり、生体中で  $OH\cdot$  が生成する機会を低く抑えている。含まれる金属により Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD の三種類に分類される。

著者らは、タバコ (*N. plumbaginifolia*) のミトコンドリアに存在する Mn-SOD の cDNA を用い、同じタバコ (*N. tabacum*) の中で過剰生産させることを試みた。ストレスが生じたとき、内在性の防御機構だけでは防ぎきれない活性酸素を SOD 量を増加させ、元から断とうという考えである。この時、cDNA をそのまま用いてミトコンドリアへターゲティングされるようにしたベクターと、シグナルペプチドをエンドウの Rubisco のものと交換し、葉緑体へターゲティングされるようにしたベクターを構築した。

Mn-SOD が、ミトコンドリアと葉緑体で発現したことは、それぞれの分画顆粒での酵素活性と金コロイドを用いた免疫電顕法で確認された。形質転換体の Mn-SOD の活性は、その生育ステージにより顕著な差が認められたが、生育の進んだ葉で 50 倍から 30 倍に増加していた。若い葉では、mRNA の発現量が同程度であるにもかかわらず、活性の増加は数倍であった。内在性の SOD も含めた活性を見ると、高々 3 倍程度の増加であったが、Cu/Zn 型や Fe 型ではなく、Mn 型の SOD が増えたところに、次に述べる酸素ストレス抵抗性のポイントがある。

形質転換体の  $O_2^-$  に対する抵抗性の強さは、以下の測定法で調べられた。3 種の生育ステージの葉よりリーフディスクを打ち抜き、暗所 (23°C) で methyl viologen (MV) を含む培地に 16 時間静置後、光を 2 時間当て、さらに 16 時間 30°C で静置し、(1) 細胞より漏出する電解質を測定した。(2) 蛍光強度より光化学系 II の量子収率を測定した。(3) 光照射時間と MV の濃度を変えてクロロフィルの分解量を測定した。これらいずれの方法でも形質転換体は、非形質転換体と比べて酸素ストレスに対して強い抵抗性が示された。光照射下では、葉緑体へターゲティングされた形質転換体のほうがミトコンドリアへターゲティングされたものより効果的であった。しかし、暗条件下で実験すると、Mn-SOD の発現量が多い生育の進んだ葉では強い抵抗性が認められたが、発現量の少ない若い葉では、かえって酸素ストレスにより障害を受け易くなっていた。

SOD は、 $O_2^-$  を消去するが、同時に  $H_2O_2$  を増加させる。光照射下では葉緑体中の  $H_2O_2$  消去系が働いているが、暗所では働かないため、そのバランスを中途半端に変えることは、 $OH\cdot$  を生成する機会を増やすことになる。このことが、暗所での酸素ストレスに対する抵抗性の減少や、これまでに報告された SOD に対する正反対の評価の原因であろうと、著者らは推論している。

こうしてできた植物は、はたして低温や環境汚染に対して抵抗性があるだろうか？ 植



物のMV抵抗性と他のストレス抵抗性とは相関があるとして、著者らは、生物試験に自信を見せているが結果は示されていない。しかし、著者らのグループにより昨年のUCLAシンポジウムにおいて、「Mn-SOD高発現の形質転換体はオゾンの曝露に対して障害を受けにくくなっていた」ことが示され、大きな反響を呼んだと聞く。生物試験に関する詳細を大いに期待したい。

(抄訳 早川孝彦—植工研)

### Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants

Bowler, C., L. Slooten, S. Vandenbranden, R. De Rycke, J. Botterman, C. Sybesma, M. Van Montagu and D. Inzé  
EMBO J. 10 : 1723-1732 (1991)

#### 文献情報

### 非マメ科植物に感染する新規窒素固定微生物の作出

共生窒素固定研究を進展させるにあたり、共生系を持たない禾本科作物(イネ、ムギ等)に窒素固定する根粒を誘導させることの意義は極めて大きい。昨年の国際会議で、“イネにアセチレン還元(窒素固定)能を示す根粒を誘導した”とする世界で初めての報告が、中国の研究者によってなされ注目されている。デンマークでは、イネ・ムギ等の非マメ科作物に感染して根粒を形成し、窒素固定能を示す形質転換根粒菌が“新規微生物”として国際特許に申請され、その翻訳文が特許庁から公表されているので、その概要を紹介する。

特許で請求している非マメ科の範囲は、イネ、コムギ、オオムギ、ソルガム、フトモモ、ユーカリの6種類であり、それぞれの種に感染する形質転換根粒菌(新規微生物)は、それぞれ異なった材料(菌株および培地成分)を基に作られており、*Rhizobium tritici*(コ

ムギに感染して窒素固定する根粒を誘導する)、*R. hordei*(オオムギ)、*R. sorghi*(ソルガム)、*R. oryzae*(イネ)、*R. RI*(ナタネ)、*R. eul*(ユーカリ)と命名されている。

上述の新規微生物の調製には、3種類の根粒菌と、各々の根粒菌に対応する宿主植物からの抽出成分を用いているが、最初は、宿主を異にする2種類の菌株を両菌株の宿主植物からの抽出物を添加したYMA(イースト・マンニット寒天)培地上に両菌株が交差するように画線する。宿主植物の抽出物を添加した寒天培地に生育する親菌株のコロニーは着色しているが、両菌株が交差した位置には、着色したコロニーの他に乳白色のコロニーが形成される。この乳白色のコロニーを形成する菌株( $F_1$ トランス接合体とよんでいる)の性質は親菌株のそれと異なり、植物に対する感染能を失っている。この $F_1$ トランス接合体と別の種類の根粒菌を用い、 $F_1$ トランス接合体の調製に供した菌株と今回使用した菌株の宿主植物からの抽出物を添加したYMA培地上に両菌株が交差するように画線し、交差する位置から得られる乳白色のコロニー(全体のおよそ3%)を形成する菌株が目的の形質転換体の新規微生物であり、非マメ科に根粒を誘導するとしている。しかし、こうして調製された新規微生物を、そのまま接種したとしても根粒は誘導されない。根粒を誘導させるためには、該当する新規微生物を調製するに要した全ての宿主植物からの抽出物で種子表面を被覆することが必要である。こうして調製された新規微生物による非マメ科への根粒形成率は約75%、播種8~12週後には、径1~2mm、長さ4mm程度の根粒が確認できるようになり、植物体の窒素含有量も増加するとしている。また、非マメ科に誘導された根粒は、小粒ではあったが、その内部は赤褐色を呈していた。

新規微生物接種後95日を経過したオオムギに、 $N^{15}$ 標識の窒素ガスを与え、23時間後に測定した $N^{15}$ の数値を示している。その数値を基に固定窒素に由来した割合を算出してみると、莖葉で0.16%、根で0.64%という高い値となる。イネ、コムギなどの圃場試験の結

果も示してあり、これによると新規微生物の接種による固体乾物重の増加は、無接種区に比べて十数倍にもなっている。

最後に、本書に記載されているコムギに感染する新規微生物 (*R. tritici*) の調製法を紹介しておく。F<sub>1</sub> トランス接合体の調製には、Aarhus (地名) 土壌で栽培したインゲンから分離した *R. phaseoli* とニューギニアのパプアに生育しているギンネムから分離した *R. cowpea* bv. *leucaena* の2菌株を供し、得られた F<sub>1</sub> トランス接合体にクローバーから分離した *R. trifolii* を接合させることによって得ている。

(抄訳 赤尾勝一郎—生物研)  
伊藤 晃—農産化学研)

公表特許公報(A) 昭63-501924, 新規微生物  
1988年8月4日

#### 文献情報

### クリ胴枯病菌における二重鎖RNAの機能

糸状菌では二重鎖 RNA (dsRNA) が頻繁に見出される。これらの因子の大部分は、宿主 (糸状菌) に対して明らかな影響を与えないとされている。クリ胴枯病菌である *Cryphonectria parasitica* では、dsRNA をもつ菌株は、孢子形成能の低下や菌叢形態の変化などばかりでなく病原性の低下を示す。これらの dsRNA は、菌糸融合によって dsRNA をもたない病原性の強い菌株 (virulent 株) に移行し、病原性の低い菌株 (hypovirulent 株) になる。実際に、virulent 株によって引き起こされた胴枯病に dsRNA をもつ hypovirulent 株を塗布すると virulent 株が病原性の低下を示すことから、hypovirulent 株は本菌の生物的防除に利用されてきた。

本菌における病原性低下の機構を解明するためには、病原性低下に関係する dsRNA の構造的、機能的解析が必要であり、hypovirulent 株、EP713 で解析が進められてきた。

EP713 菌株の dsRNA は、12.7kb の L-dsRNA, 8~10kb の M-dsRNA, 0.6~1.7kb の S-dsRNA からなる。これまでに、おのおの dsRNA は、poly(A): poly(U) 同種重合体 (homopolymer) ドメインをもち、両末端がほぼ同じ配列をもつこと、M-と S-dsRNA は、内部欠失 (internal deletion) によって L-dsRNA から派生したことが示唆された。さらに、病原性の低下に関係した dsRNA は、virulent 株にはないポリペプチドをコードしていることがわかった。

最近、EP713 菌株の L-dsRNA の全塩基配列が決定され、dsRNA の構造的性質ばかりでなく遺伝子発現に関係した機構についての論文が続けて3報報告された。

著者らは、L-dsRNA の全長をカバーする cDNA クローンをつくり、全塩基配列を決定した。L-dsRNA の全塩基配列は、poly(A): poly(U) ドメインを除いて 12712bp であり、二つの長い ORF (読み取り枠、ORFA と ORFB) があった。ORFB の開始コドンは、ORFA の終止コドンとオーバーラップしていた。つまり、ORFA と ORFB の接合点の配列は、5'UAAUG-3' であった。

L-dsRNA の ORFA を含む合成転写産物 (transcript) の *in vitro* 翻訳 (translation) の結果、29kDa と 40kDa の二つのポリペプチド (p29 と p40) が検出された。さらに、p29 と p40 はオーバーラップしていない一つの ORF (ORFA) にコードされ、p29 は翻訳中にポリプロテインから自己分解によって放出されることが示された。p29 のアミノ酸配列は、potyvirus (ジャガイモ Y ウイルスグループ) にコードされたシステインプロテイナーゼ HC-Pro の配列に類似しており、両者はグリシンジペプチドで開裂する。一方、ORFB からも p29 のように自己分解によって放出されるポリペプチドが認められた。このため、これらのポリペプチドによる自己分解過程は、dsRNA の遺伝子発現において主要な役割を演ずるものと考えられる。

ORFB の C 末端にはヘリカーゼモチーフが認められた。これは、potyvirus の管状封入体タンパク質や eIF-4A などのヘリカーゼ様

タンパク質と高い相同性が認められたため、ORFBのC末端領域は、レプリカーゼとして機能するポリプロテインをコードするものと考えられた。

次に、著者らはM-dsRNAとS-dsRNAの解析を行った。PCRマッピング解析とハイブリダイゼーション解析から、M-dsRNAとS-dsRNAは、L-dsRNAの内部欠失の結果であり、L-dsRNAの5'末端の~155ヌクレオチドと3'末端の~450ヌクレオチドは保存されていることが示された。S-dsRNAは0.6~0.8kbのいくつかの断片からなるが、複製能力をもっていることから、複製に関与したシス調節因子(cis-acting element)がこの両末端に存在することが示唆された。

本菌の病原性の低下に関与したdsRNAはウイルス様粒子由来ではないが、L-dsRNAは様々なウイルスゲノムと類似性があることから、著者らは、病原性の低下に関与したdsRNAの遺伝情報は、ウイルスの遺伝情報と類似すると考えている。

今後、本菌で確立された形質転換系を利用してdsRNAをもたないvirulent株にL-dsRNAのコード領域を導入することによって、病原性の低下の出現を調査すればdsRNAの機能についてより詳しい知見が得られるものと期待される。あるいは、dsRNAの両末端に複製に関与するシス調節因子があることから、本菌に外来遺伝子を導入して発現させる系を開発することができるかもしれない。

(抄訳 本郷正史—東北大農)

#### Cotranslational autoproteolysis involved in gene expression from a double-stranded RNA genetic element associated with hypovirulence of the chestnut blight fungus

Choi, G.H., R. Shapira and D.L. Nuss  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1167-1171 (1991)

#### Virus-like genetic organization and expression strategy for a double-stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight

Shapira, R., G.H. Choi and D.L. Nuss

*EMBO J.* 10: 731-739 (1991)

#### The contribution of defective RNAs to the complexity of viral-encoded double-stranded RNA populations present in hypovirulent strains of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*

Shapira, R., G.H. Choi and D.L. Nuss  
*EMBO J.* 10: 741-746 (1991)

#### 文献情報

葉緑体mRNA 3'末端のプロセシングには核にコードされたRNA結合タンパク質が必要

高等植物におけるプラスチドの前駆体 mRNA はポリシストロニック RNA の切断、5'及び3'末端のプロセシング、イントロンのスプライシング等により成熟 mRNA となり、その蓄積量は、植物の発育ステージ、組織、光条件により異なっている。またプロプラスチド及びエチオプラストがプラスチドへ分化する際に認められるプラスチド mRNA の蓄積量の変化には、プラスチド遺伝子の転写活性は関与せず、転写後の反応である前駆体 mRNA のプロセシング及び成熟 mRNA の安定性によりコントロールされると考えられている。植物プラスチド mRNA の3'非翻訳領域には、ステム・ループ構造をとる逆向き反復(IR)配列が存在しており、このIR配列が前駆体 mRNA のプロセシングシグナルとして機能し、さらに mRNA を安定化させる機能を持つこと、加えて、葉緑体タンパク質との相互作用を持つことがこれまでに明らかにされていた。そこで本研究では RNA 結合タンパク質に着目し、このタンパク質のプロセシング及び mRNA 安定性への影響を検討した。

ホウレンソウ葉緑体から抽出したタンパク質の中には、多量のプラスチド遺伝子翻訳タンパク質が存在しており、そこで mRNA 3'末端のプロセシングに関与しているタンパク質のみを抽出するため、陰イオン交換カラ

ムによる FPLC, 及びプラスチド遺伝子の一つである psbA mRNA を担体としての RNA アフィニティークロマトグラフィーによって葉緑体可溶性タンパク質の分画を行った。分画タンパク質中には数種のタンパク質の存在が認められ、前駆体 psbA mRNA 3' 末端のプロセッシングのみでなく、他のプラスチド遺伝子である rbcL, petD, rps14 mRNA に対してもプロセッシング活性を持つことが認められた。このタンパク質画分は 28kDa の RNA 結合タンパク質 (28RNP) に富んでおり、またこのタンパク質が前記の rbcL, petD, rps14 mRNA 3' 末端とも結合したことから、28RNP と RNA との結合は、塩基特異的なものではなく、RNA の二次構造、すなわちステム・ループ構造によるものであろうと考えられた。28RNP の機能について解析するため本タンパク質遺伝子のシーケンズを行った。その結果、ポリ A テールの存在が認められ、このタンパク質が核のゲノムにコードされていることが明らかとなった。またアミノ酸配列から、28RNP には、グルタミン酸、グリシンに富む酸性アミノ酸 N 末端領域、さらに他の RNA 結合タンパク質のアミノ酸配列との比較より、それぞれ 87 アミノ酸からなる、2 カ所の RNA 結合領域の存在が示唆され、さらに RNA 結合領域において高い保存性を示す、8 および 6 アミノ酸からなるコンセンサス配列 RNA-CS1, CS-2 が 28RNP の RNA 結合領域でも認められた。

ウェスタンブロット、ノーザンブロットの結果から、ホウレンソウ各組織における 28RNP の発現量とプラスチド mRNA の蓄積量とに相関関係が認められ、28RNP がプラスチド mRNA 量を調節しているのではないかと考えた。そこで、28RNP 特異的 IgG アフィニティークロマトグラフィーにより葉緑体可溶性タンパク質から 28RNP を除去し、28RNP のプロセッシング及び mRNA の安定化に関する機能について検討した。前駆体プラスチド mRNA を 28RNP を含む葉緑体可溶性タンパク質中でインキュベートした結果、RNA はプロセッシングを受け、また成熟 mRNA に 28RNP が結合していることが認めら

れた。一方 28RNP を除去した葉緑体可溶性タンパク質中では、プロセッシングは起こらず、また前駆体 mRNA の分解が認められた。これらのことから次の二つの可能性が示された。① 28RNP それ自身がプロセッシング活性を持つ。② 28RNP 自体はプロセッシング活性を持たないが、RNase 活性を持つタンパク質と結合することによってプロセッシング活性を得る。しかし、28RNP 特異的 IgG による免疫アフィニティークロマトグラフィーによって、28RNP のほかにも分子量の異なる 2, 3 のタンパク質と一緒に分離されたこと、28RNP の酸性 N 末端領域がタンパク質—タンパク質結合に携わっている可能性があること、28RNP cDNA をブルースクリプトベクターに入れて大腸菌で発現させたところ、発現タンパク質にはプロセッシング活性がなかったことから、二番目の可能性が高いと考えられる。

以上のことから、28RNP がプラスチド前駆体 mRNA のプロセッシング及び成熟 mRNA の安定性にとって必要なタンパク質であることが明らかとなり、さらに 28RNP の発現がプラスチド遺伝子の発現を調整することが示された。

(抄訳 小林晃——東北大農)

#### Chloroplast mRNA 3' end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein

Schuster, G. and W. Gruissem  
*EMBO J.* 10 : 1493-1502 (1991)

#### 文献情報

#### 高等植物のステアロイル—ACP—不飽和化酵素のクローニング

植物の脂質中の飽和／不飽和脂肪酸比率 (S/US) は植物の温度適応性と関係が深く、また貯蔵脂質の品質を決める最大の要因である。S/US は数種の不飽和化酵素と、脂肪酸をグリセロール骨格につけるアシル化酵素の基質

選択性により決定されると考えられている。

ここで紹介する Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase は、葉緑体内で合成されたステアリン酸を不飽和化しオレイン酸にする反応を触媒するが、部分精製したサフラワールの酵素について、①葉緑体のストロマに約 70kDa の二量体として存在する可溶性の酵素であること、②フェレドキシン、フェレドキシン NADP レダクターゼをコファクターとして必要とし、また酸素を必要とすること、③基質特異性は Stearoyl-ACP  $\gg$  Stearoyl-CoA  $>$  Palmitoyl-ACP の順であることなどが既にわかっていた。今年になってアメリカの二つのグループがアボカド及びサフラワールの酵素を精製し、その情報を用いてヒマ、キュウリ、サフラワールの cDNA を初めて取った。以下にこれを紹介する。

材料として Shanklin ら<sup>1)</sup> はアボカドの中果皮を用い、一方 Thompson ら<sup>2)</sup> は開花後 16~18 日のサフラワールの胚を用いた。アシルキャリアープロテインを結合させたアフィニティークラムを用いて、アボカドの場合は約 750 倍、サフラワールの場合は約 900 倍にまで酵素が精製された。

Shanklin らは、精製したアボカドの酵素の特性がサフラワールのそれと一致することを確かめた。そして、ヒマとキュウリの cDNA ライブラリーを、精製したポリクローナル抗体を用いてスクリーニングし、それぞれについてこの酵素の cDNA クローンを得た。ヒマとキュウリの cDNA クローンには 1188bp の同じ大きさの読み取り枠 (ORF) が含まれていた。その ORF にはアミノ酸配列で 98%、塩基配列で 80% の高い相同性があり、この酵素が高等植物間でよく保存されていることがわかった。

一方、Thompson らは、精製されたサフラワールの酵素を 4 種のプロテアーゼで分解し、得られた断片のアミノ酸配列を決めた。次にそこから予想できる PCR 用のプライマーを合成し、cDNA バンクから取った DNA を鋳型として PCR を行い 107bp の増幅された DNA 断片を得た。この塩基配列の中の 50bp のオリゴヌクレオチドを用いて、cDNA バン

クをスクリーニングした。得られた 1533bp の cDNA クローンには、ヒマやキュウリと同じ 1188bp の大きさの ORF が含まれており、予想されるアミノ酸配列は、先に決定されていたペプチド断片のアミノ酸配列とほぼ一致していた。また異なるプロテアーゼ処理で得たペプチド断片のアミノ酸配列から、mature な酵素の N-末端が予測されていたが、これは予想される翻訳開始点から 99bp 下流に存在することがわかった。最初の 33 個のアミノ酸残基は葉緑体へのトランジットペプチドであろうと推測された。次に、得た cDNA のコードするタンパクが目的の酵素活性を示すかどうか調べるために、Shanklin のグループは酵母に、Thompson のグループは大腸菌に、クローニングした cDNA をそれぞれの発現ベクターにつないで導入した。前者の実験では、cDNA が正方向に入ったプラスミドを導入したときにのみ、抽出液中に酵素の抗体と反応する約 37kDa のタンパクができ、酵素活性が現れた。後者の実験では、トランジットペプチドを削った cDNA を含むプラスミドを導入したときにのみ、約 40kDa のタンパクのバンドが SDS/PAGE ゲル中に現れ、また酵素活性が検出された。以上のことを総合して、両グループは単離した cDNA が Stearoyl-ACP-desaturase をコードしていると結論した。

動物や菌類起源の Stearoyl-CoA-desaturase 及びらん藻の  $\Delta 12$  desaturase とのアミノ酸配列の比較から、この酵素はそれらとは起源を異にすると考えられた。一方、酵母の脂肪酸合成酵素の  $\beta$ -サブユニットとの比較では、アシルキャリアープロテインとの結合に関与することが予想される共通のアミノ酸配列が見出された。

高等植物では 9 位が不飽和化されなければ、それ以降の不飽和化は進まないことから、脂質中の S/US を決める上でこの酵素が果たす役割は非常に大きいと考えられる。Site-directed mutagenesis による活性部位の研究や、トランスジェニック植物を用いた機能の解析がこれから進むものと思われる。また、ヒマではこの酵素の mRNA の転写に関する

組織特異性（未熟種子特異的）が調べられており、genomic DNAのプロモーター領域を調べることで、組織特異的な転写の機構が解明されていくであろう。

（抄訳 林 泰行——植工研）

1) **Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs**

Shanklin, J. and C. Somerville

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 : 2510-2514 (1991)

2) **Primary structures of the precursor and mature forms of stearoyl-acyl carrier protein desaturase from safflower embryos and requirement of ferredoxin for enzyme activity**

Thompson, G.A., D.E. Scherer, S.F. Van Aken, J.W. Kenny, H.L. Young, D.K. Shintani, J.C. Kridl and V.C. Knauf

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 : 2578-2582 (1991)

文献情報

タンパク質をプローブとしたクローニング法による癌遺伝子産物 c-Mycタンパク質と特異的に結合するタンパク質の単離と解析

癌遺伝子である Myc タンパク質およびその遺伝子は細胞の増殖や分化に関与し、核に存在するリン酸化されているタンパク質であることが知られているが、詳細な分子レベルでの機構は不明であった。Myc タンパク質はそのC末端側の85アミノ酸残基に塩基性に富むヘリックスループヘリックス構造をした部分 (bHLH) と同じく塩基性に富むロインジッパー構造をした部分 (bZip) を持っている。この bHLH 構造を持つタンパク質は動植物にも広く存在し、二量体化するのに関与しており、この部分を欠失させたものはその活性がなくなることが知られている。これ

らのことからC末端領域は、このタンパク質の機能において重要であり、未知の何等かのタンパク質がこの部分に結合し機能を持つものと仮定し、その未知タンパク質の遺伝子のクローニングを行った。

彼らは c-Myc タンパク質のC末端側と結合するタンパク質をクローニングするために、従来よく使われてきたような DNA プローブではなく、タンパク質をプローブとしたクローニング法（機能的クローニング法）を用いている。この方法によれば、標識した既知のタンパク質をタンパク質プローブとして、目的とする未知のタンパク質をブランク上で発現しているクローンを突き止めることが可能である。未知の機能性タンパク質遺伝子のクローニングのために、まずヒト c-Myc タンパク質（既知タンパク質）のC末端領域92アミノ酸部分とグルタチオンS-トランスフェラーゼのC末端領域を融合させ、その融合タンパク質を大腸菌内で発現させた。融合タンパク質を大腸菌より精製し、この融合タンパク質に含まれるチロシン残基を放射性のヨウ素を用いてラベルした。これとは別にヒヒのリンパ細胞より得た cDNA を  $\lambda$ gt11 で発現させ、その発現したタンパク質と融合タンパク質とが結合するようなクローンを捜したところ、幾つかのポジティブなクローン (Max と命名) を得た。この中で二つのクローン、Max11 タンパク質 (124アミノ酸) と Max14 タンパク質 (131アミノ酸) を得て、さらにヒトからは151アミノ酸からなるクローンを得た。

この Max タンパク質は他の bHLH-Zip タンパク質とホモロジーがあることがわかった。そこで c-myc 遺伝子にポイントミューテーションを入れたり、一部を削ったものからタンパク質を合成し、これと Max タンパク質との間での結合能が変化するかどうかを調べた。その結果、全くポイントミューテーションを入れないものが最も結合能が高く、N末端側を削ったものでは Max に対する結合能に変化はなかったが、C末端側89アミノ酸を削ったものは全く結合能を示さなかった。また、Max タンパク質は c-Myc タンパク質のみな

らず、N-Mycタンパク質やL-Mycタンパク質とも結合能を示したが、他のbHLHやジッパー構造を持つタンパク質とは結合能を示さなかった。

Mycタンパク質およびMaxタンパク質それぞれに対する抗体はそれぞれダイマー化を阻害し沈澱を形成したが、Mycタンパク質とMaxタンパク質が会合した後にどちらか片方の抗体を加えると、会合した状態で沈澱が形成された。また、抗体の存在することで、DNAへの結合も阻害された。

Myc-Maxタンパク質複合体が特定のDNA塩基配列に対して結合するかどうか、c-Mycタンパク質が結合するコンセンサス塩基配列(CACGTG)を含む合成オリゴヌクレオチドを用いて調べたところ、それぞれ単独ではDNAに結合することはないが、Myc-Maxタンパク質複合体を形成したときのみDNAに結合することがゲルシフトアッセイ法によってわかった。また、c-Mycタンパク質のロイシンジッパー領域を欠失させたものは特異的なDNAへの結合能がなくなるが、N末端領域を欠失させたものはDNAへの結合能に対して変化はなかった。特に、c-Mycタンパク質の塩基性領域を欠失させたものは、Myc-

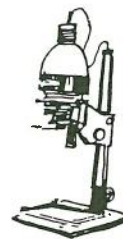
Max複合体形成に関して影響はなかったが、DNAへの結合能は完全に失われた。

以上のようにMycタンパク質のC末端付近のbHLH-Zip構造は、DNA結合に参与する塩基性領域と二量体化に参与するHLH-Zip領域部分に機能的に分割可能であることがわかった。また、今回単離されたMaxタンパク質はc-Mycタンパク質、N-Mycタンパク質、およびL-Mycタンパク質にのみ作用し、他の似たような構造を持つタンパク質には作用しなかった。つまり高次構造を含めたbHLH-Zip構造が厳密に結合に重要であることが示唆される。Max遺伝子はノーザン法によると多くの細胞で発現し、サザン法では他の生物でもよく保存されていることが認められ、生物の分化に深く関与していることが考えられた。

(抄訳 梶原英之——生物研)

**Max: Ahelixloop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc.**

Blackwood, E.M. and R.N. Eisenmann  
*Science* 251: 1211-1217 (1991)



海外便り

## フランスでの1年5ヵ月

農林水産省 食品総合研究所 微生物検索研究室

川澄 俊之

去る平成2年3月31日、科学庁長期在外研究員（及び農水省オールギャランティー）として1年5カ月のパリ滞在を終え、エールフランス直行便で小雨にけぶる成田空港に帰着しました。不思議なことに、やっと日本に帰ってきたという帰巢感？より、日本を離れたときには全く持ち合せていなかった日本に対する客観的な意識の方を強く感じたのを記憶しています。あれから早いもので一年が経過し、当時の生活が良き思い出となって今も事あるごとに思い出されます。

私がお世話になった研究室は、パリ第7大学、ジャック・モノー研究所の遺伝生化学研究室（直訳）で、そのこのボスは Dr・コヒヤマという日本出身の（現在はフランス国籍ですが）方です。マスターを終えてすぐフランスに渡り、以来三十有余年、DNA レプリケーションが御専門で、私自身のテーマであった好塩性古細菌の酵素学的、遺伝学的研究にもその辺からの興味をお持ちのようでした。この研究所はメトロの Jussieu 駅の目の前の広大なパリ第7大学の一部にあります（と云うより、第7大学の建物の一部に研究所の看板がかかっているだけです）。その名の通り、ノーベル賞科学者のモノー博士の理想、即ち分子生物学に対する共通の passion を持つ様々の異なった専門技術を持った科学者を結集するという理想を実現するべく創設され、一昨年、丁度20周年の記念行事を催したところです。構成は1988年現在で25研究室、1研究室平均8人、staff scientist 115名、内外からの visiting scientist 34名、学生63名、engineer と technician 79名、そして女性ばかりの15名の事務スタッフです。研究内容は、①molecular structure and interactions, ②

moleoular genetics, ③cellular differentiation and development という大きな三つの研究テーマのもとに構成されており、それぞれ①では核酸構造とタンパクの相互作用、制御シグナルの性質、膜構成成分の相互作用、タンパクの触媒活性に関する研究、②では細胞分裂、DNA複製・修復、タンパク分泌、ポルフィリン生合成の制御、ゲノム進化についてのバクテリア、下等真核生物を用いた遺伝学的研究、③では昆虫、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物、植物ウイルス等の発生過程における遺伝子発現の研究が行なわれています。応用的な研究を行なう研究機関との共同研究にもオープンであるけれども、確固とした基礎研究の目的を堅持しており、この姿勢が他の優秀な研究機関との密な交流を生み、ひいては自らの実力をつけていく事になっているものと思いました。有名なパスツール研究所に比べると規模は小さく、知名度も劣りますが、反面、常に活きのいい大学生に囲まれ明日のフランスを担うであろう若者の生態を知るには格好の場所でした。

また、立地条件も申し分なく、歩いてすぐにノートルダムやパンテオン等々著名な歴史的建造物が力強く現代に生きており、北側は道路を挟んでセーヌ川に面し多くのブキニストが店を連ね、シーズンには世界各国の観光客が冷やかに立ち寄ってあれこれ物色しています。日本人観光客はあまり見かけず、オペラ座界限の高級ブティックや高級デパートで沢山の買物袋を下げ、リスト片手に厳しい顔つきで足早にノルマを消化している様子です。さて東は静かな大植物園に隣接し、行きつけの店で買ったギリシャ風サンドウィッチでもかじりながら、近代建築の必要性和古き



良き時代のパリを残すというジレンマに悩まされる都市機能の拡大政策などに思いを駆せつつ息抜きに散歩するにはもってこいでした。大学の屋上に出ると、360度のパリ・パノラマが楽しめます。アパルトマンの屋根にトゲのごとく密生する茶色の小煙突群の向こうには遠く、白亜のサクレクールや百歳になったばかりのエッフェル塔が霞んで在り、そのまた向こうのパリの新都心デファンス高層地区には宇野元総理のパリサミット・新凱門等が望めます。さほど広くないパリ市内にしかしながら圧倒されるほどの歴史の記念碑を今も大切に保存し得ている、しかも近代化を歴史という流れのなかに見据えて積極的に見事に取り入れていくフランスという国の偉大さ、思想というものを、この屋上からいつも感心して眺めておりました。

さて、毎朝バスティーユ近くの自宅を9時半頃出て、ワイパーに駐車違反キップが無い事に今日一日のラッキーな始まりを予感し（前夜に15分/1フランのチケットを2フラン分買って、ダッシュボードに置いておけば9時半までは安心なのですが……）、こけら落としを済ませたばかりの新生バスティーユオペラを左手に、バスティーユ広場のロータリーに果敢に突っ込み、自己主張の強いドライバー達が作る混沌とした車のうねりに、流され、抗して、レ・アール地区（古きパリの面影を求めてパリっ子に今最も人気があるらしい）に抜け出し、サンルイ島を渡りながら右手にノートルダムを拝し、トゥール・ダルジャンの脇を通過してセーヌを渡りきったところが大学です。車で十分ばかりの通勤ですが、途中tabacに寄ってマルボロを買い、エスプレッソ片手に新聞に目を通すサラリーマンやLOTO（国家宝くじ）の当選番号を見渡して、au revoirと店を出て研究所へと向かいます。10時頃に「Salut!」と声をかけつつ皆が揃い、オバちゃん達は昨夜の出来事、テレビの番組にひとしきり花を咲かせ、今日の仕事が始まります。データ供給の担い手は勿論、ドクターを目指す学生で、チュニジア、モロッコ、アイルランド、フランスの、彼ら5人が実に熱心に研究に励んでおりました。その内3人

が無事ドクターを獲得し、故国へ帰る日を愉しみにしつつも、故国でのポスト探しに頭を悩ませていました。感心した事の一つに、論文審査員がこのスタッフだけでなくその道の専門家を招いて実質的に(?)構成されているということです。なんと厳しい質疑応答がなされていることでしょうか。自分でアレンジした晴れの日、少々顔が強ばって、彼と一緒に歴史を歩んでいる奥様に見送られながら会場に向かう演者の口からは、もはや日頃のジョークも出てきません。思わず、頑張っ てこいとポンと肩をたたかだけの私でした。

研究室の部屋数は4室、そこに総勢10名、プラス私のような外来者が常に2~3名、しかも実験室と居室は区別なしでスペースは我が研究所の方が恵まれているでしょう。パリにおけるスペース不足は大都市共通の悩みです。そういえばこの3年間に地価は50%の値上がりとか、これをどう解決していくのか、我が国において有効な解決策のない現状を憂い、フランス政府の政治手腕、及びフランス国民の叡知を期待して見守っているところです。

私の仕事は本研究室において古細菌で見付けたプロトオンコジーン myc 類似タンパクの作用機作の解明を大きな柱として、それに関連したところもやってみようということでした。オンコジーンはがん細胞に発現されているのみならず酵母等の微生物にもその存在が知られ、生物の増殖に必須の基本的な制御機構に参与していることが示唆されており、この機構の解明はがん形成機構の解明に止まらず、生物一般の増殖制御の解明という、大変大きな意味を持つものと考えられています。mycは核内リン酸化タンパクでDNA複製に参与しているらしいが、未だはっきりした機能は明らかではありません。また、mycタンパクが単独で作用しているのか、あるいは他のタンパクとの相互作用によってその機能を発現しているのかといった点についても不明です。私は大腸菌によって大量生産したヒト myc タンパクと相互作用する未知タンパクの検出を試みました。myc を大量に発現している HL60 というヒト細胞を材料に選び、その細胞抽出液、及び単離精製した核の抽出液につ

いてmycアフィニティカラムを作成してmycと結合するタンパクの検出を試みました。数多くの試行錯誤の後、DMSOで分化誘導を行なったHL60の核抽出液中にmycと特異的に結合するタンパクの存在が見出だされました。がん遺伝子関連の既知タンパク質の抗体によってこの未知タンパクの同定を試みましたが、いずれもこのタンパクには反応しませんでした。最終的には精製して部分アミノ酸配列の決定、遺伝子のクローニング、遺伝子発現機構の解明、等の大きな仕事に進めるとは思いましたが、時間切れで中断せざるを得ませんでした。しかしながら、この発見によって応募した現地の医学研究基金から延長期間中の滞在費が保証されることになった事は大変ラッキーでした。これらの仕事と平行して好塩菌のDNAポリメラーゼ遺伝子のクローニング、mycタンパクリン酸化酵素の検索、変性mycタンパクのrefoldingタンパクによる再活性化の試み、等々多岐にわたる仕事に手を出してきました。これらすべてが今まで全く経験の無い分野の仕事で、一つひとつの実験の意味をバックグラウンドを含めて理解することには大いに時間がかかり、かなりきつい事ではありましたが今でも貴重な経験をさせて戴いたものと思っております。帰国してからはこれらの経験から少しでも役に立つ点を利用し、今までに無い研究の芽を見出だすことが最大のテーマとなります。

さて、生活にまつわる様々な面もご紹介したいのですが、紙面の都合上割愛させて戴き

ます。所得に比例したチケット料金の大学食堂；食事・各国料理・中華街・日本人居住区；均一なメトロ料金；車・住居・配偶者探し・その他実に諸々の内容を含むミニコミ誌；車内で突然歌いだす車中アルバイト(?)；若者の質素な生活；建築物のセンスあふれるライトアップ；人をよけないすれ違い；お犬様；乗客のマナー；マグレブ諸国を含む人種のるつぼ；立ち会い・無痛の出産；クリスマス・正月・ヴァカンス；スキー場；英語は通じるか；治安；公園・競馬場等の市民の憩いの場；交通・買物・車・車検・駐車場；周辺都市開発；Roland Garros；革命200年祭；アパルトマンの生活；通りの名前；そして夜の街，etc. これら諸々の生活断面についても多くの思い出がありますが、これらはガイドブックに譲ることにします。

1年5カ月、あつという間の月日の中で、仕事、言葉、人種、科学、世界、社会、文化、出産、子育て、etc、これらがいちどきに思考と対応とを迫ってきて、一つひとつの明快な整理が出来ないままに数々の思い出が残っていきました。仕事に限って云えば、ありきたりになりますが、持ち帰った技術、進め方、分野等々出来る限り有効利用して、今回の留学の所産の一つにしたいと強く感じています。彼らをさらに深く知り、ずっと付き合っていくためにしなくてはならない事が山ほどあり、今後それが自分の糧になっていけばこれほど幸せなことはないのではと思う今日この頃です。

国際学会レポート

## FFTC主催による国際セミナー「野菜生産における肥料，マルチ，灌漑システムの利用」に出席して

農林水産省 中国農業試験場 施設栽培研究室

花田 俊雄

### はじめに

野菜・茶業試験場の安井前部長（故人）から電話があり，FFTCが主催する国際セミナーが明年早々タイ国チェンマイ市で開催される。ついては，日本から2名の野菜研究者をこの会議に出席させる予定なので，マルチ，被覆資材に関して発表してみないか，とのお誘いがあったのが丁度昨年（1990年）の今ごろでした。FFTCとは何ぞやから始まって，発表の内容をどの程度にしたらいいのかなど，図書室での下調べが済み，やっとその気になって受諾の返事をしたのが電話の2日後。日本からは熱帯農業研究センター沖縄支所の筆者（当時）と野菜・茶業試験場の荒木陽一主任研究官（現農業研究センター）が出席することが決まりました。以来，FFTC側と数回の手紙やファックスの往復があり，原稿の締切が12月20日であることをしっかりと頭に記憶。しかし実際の執筆が始まったのは12月に入ってからで，もちろんチェンマイ大学へ原稿を郵送したのは締切日を5日も過ぎてからのことでした。

### 会議開催の背景

FFTCとは国際機関の一つで，アジア太平洋地域食料肥料技術センター（Food and Fertilizer Technology Center for Asian and Pacific Region）の略称である。研究拠点はAVRDCと同じ台湾にあり，研究組織はIRRIなどに比べると陣容は劣るが，広報活動では例年アジア地域を中心に農業生産に関するセミナーを開催し活発な情報交換を行なっ

ている。今回の「野菜生産における肥料，マルチ，灌漑システムの利用」（Workshop on Vegetable Production through the Use of Fertilizer, Mulching and Irrigation Systems）に関する国際研究集会も，FFTCがタイ国チェンマイ大学と共同で，マルチ，ドリップ灌漑の実証試験を行なって良好な成果を得たことから，野菜栽培における農業資材のより効率的な活用を図る目的で広くアジア各国の研究者に呼びかけて開催する運びとなったものである。

わが国の野菜栽培では，マルチや被覆資材を用い，灌漑設備を整え，肥料を多用する生産様式が極く一般的なものとなっている。しかし果たしてそのようなやり方が他のアジア諸国でも野菜生産技術として普遍的に通用しているのだろうか。そういった疑問に対する答を得たいというのも，今回の会議に参加する目的の一つであった。

平成3年1月21日（月）夕刻，空港でチェンマイ大学のスタッフの出迎えを受けて無事会場のオーキッドホテルに入り，やつと長旅の緊張から解放された。チェンマイは北緯19度，標高314mに位置し，1月の平均気温は21.3℃，降水量は21mmである。日中は日差しが柔らかく，夜間は多少肌寒さを覚えるが，空気は澄みわたりさわやかな晩秋のような気候で，会議開催中の数日間は極めて快適な毎日を送ることができた。

### 会議の主導権は台湾とタイ

会議はホテルのコンファレンスルームを会場として行われた。参加者は，招待を受けた日本2名，アメリカ合衆国2名，フィリピン

2名、マレーシア2名、台湾2名、韓国1名の研究者のほか、主催者側であるFFTCや台湾の研究者、種苗関係者、タイ国の大学、農業省関係者など概ね50名の出席であった。

日程は、1月22日（火）午前9時から参加者の登録、開会、来賓挨拶とセレモニーが続いた後、早速講演第1日目のカントリーレポートが始まった。午後からはテクニカルレポートの一部の講演も行なわれた。翌1月23日（水）はエクスカージョン。チエンマイ大学農学部試験圃場の見学のほか、マルチ用プラスチックフィルム生産工場、農友種苗の農場、その他をバスで視察した。さらに1月24日（木）は講演第2日目でテクニカルレポートが朝から終了予定時刻の午後5時をオーバーするまで続き、熱心な討議が行なわれた。会場の熱気はその夜ホテルのプールサイドで開かれたフェアウエルパーティーまで続いた。発表が行なわれた14の講演の題目と演者は表1に示すとおりである。

このような国際会議をリードするのはやはり声が大きくてなめらかな英語を話す人である。日本を代表する2名もそれなりに発言はしたが、やはりFFTC、台湾、フィリピン、アメリカ合衆国勢の迫力にはかなわなかった。しかし多少言葉のハンディはあっても主催地のタイ国の研究者の何かを吸収しようとする態度と積極的な発言も目を引いた。つまり会議の流れの主導権は台湾、タイ国の人が握っていたのである。

#### アジアの中の日本、農業研究の勢力図

会議の中で特に注目を集めた話題は、マルチ、被覆資材の熱帯と温帯での利用場面の違いであった。近年農業生産資材として、プラスチックマルチの普及は著しいものがある。プラスチックマルチの被覆による土壌水分・地温の調節、病害虫・雑草の防除、肥料の溶脱防止といった効果は、多くの野菜で生育・収量の向上をもたらしてきた。かかる背景から「野菜生産における肥料、マルチ、灌漑システムの利用」と題する研究集会も開催されたのである。しかしカントリーレポートの中

表1 国際研究集会の講演内容と演者  
カントリーレポート

1. 台湾における肥料、マルチ、灌漑を利用した野菜生産  
Chin Chyu Tu (台湾)
2. 韓国の野菜生産における肥料、マルチ、灌漑システムの利用  
Suh Hyo Duk (韓国)
3. マレーシアにおける野菜生産  
Mohd. Zain Karim (マレーシア)
4. フィリピンの野菜生産における灌漑、マルチの状況  
Rodel G. Machirang (フィリピン)

#### テクニカルレポート

5. 野菜生産におけるマルチ、灌漑方式、窒素施用の影響  
Paibool Wivutvongvana, Methi Ekasingh, Jaturong Puangmanee, Thanom Klodpeng, Manee Nikorpun and Pipop Lumyong (タイ)
6. プラスチックマルチとドリップ灌漑によるマスクメロンの生産向上  
Yung Wu Chen (台湾)
7. タイの野菜生産におけるマルチと灌漑の効果  
Ampar Tantisira (タイ)
8. 栽培管理法がハクサイ、トマトの生育に及ぼす効果  
Adisak Sajjapogse (タイ)
9. 野菜生産における水の有効利用のための灌漑法  
荒木 陽一 (日本)
10. 野菜生産におけるドリップ灌漑システムの利用  
William James Lamont Jr. (アメリカ合衆国)
11. 野菜生産におけるマルチと被覆資材の効果  
花田 俊雄 (日本)
12. トウガラシの生育に対する各種反射プラスチックマルチの効果  
Mohamad Razi Ismail (マレーシア)
13. 野菜生産における被覆資材の利用  
N. S. Mansour (アメリカ合衆国)
14. 野菜生産におけるプラスチックマルチの利用  
William J. Lamont Jr. (アメリカ合衆国)

で、マルチ、ドリップ灌漑などが農家に普及している状況が紹介されたのは、日本、韓国、台湾の3カ国であり、フィリピン、マレーシア、タイなどでは試験場段階の技術のように受けとめられた。これは農業資材の市場供給程度の違いもあろうが、より本質的な問題として資材利用場面での温帯と熱帯地域の気象条件の差異も大きく関わっている。つまりプラスチックマルチは温帯では効果が高いが、熱帯ではマルチ被覆によって土壌からの蒸発が抑制され、潜熱による大気への熱の移動がなくなるため、地温が著しく上昇するなどの問題があり、温帯での技術がそのまま移転できず実用性が薄いからである。

また会議の中で日本の研究者の発表はかなり注目されたようである。それは単に増収した、しないという論議ではなく、増収をもたらす効果の裏付けデータがしっかりしていたからである。

荒木氏は、野菜生産における水の有効利用のための灌漑法について、氏のこれまでの研究成果に基づいて発表を行った。野菜生産ではドリップ灌漑が水の有効利用の点で優れていること、ドリップ灌漑の灌水開始点は従来の土壌水分を指標とするやり方よりも、野菜の生育に直接影響を及ぼす体内水分を指標とする方が優れており、増収効果が高く灌水量も節減できること、また一回の灌水量については、従来の量で表す方式では土壌の種類により湿潤土層深が異なり汎用性が無いので、湿潤土層深で表した方が適していることを報告した。

また筆者は、我が国で行われてきたマルチに関する既往の研究成果や熱帯農業研究センター沖繩支所で得られた研究成果を紹介しながら、温帯、亜熱帯、熱帯地域におけるマルチ、被覆栽培の在り方について報告した。特に強日射、高温条件下でのプラスチックマルチと有機物マルチの効果の差異や、通気性被覆資材の遮光、土壌水分の安定、地温の上昇抑制などの気象緩和効果を強調した。

そのほか特に興味を引かれた発表は、N.S. Mansour 博士のアメリカ合衆国における被覆資材の新しい方向で、不織布のべたがけ被覆が省力的な野菜栽培技術としてかなり普及している状況がスライドを使って詳細に紹介された。

一方東南アジアの国々の研究者の発表では、温帯の技術の熱帯での検証、追試といったニュアンスの強いものが多かったように感じた。このようにマルチ、被覆資材、灌漑技術に関して日本の研究レベルは高く、今後もアジアの中で先導的な役割を果たしていくことにな

ろう。

#### 日本人に残した会議の印象

1月25日(金)チェンマイからバンコックへ移動。朝7時前の早朝の出発にも関わらず、チェンマイ大学の関係者はホテルや空港で我々を暖かく見送ってくれた。強く握り交わす握手。Thank you, Thank you と何度も繰り返される互いの感謝の言葉。タイ国の人々のホスピタリティは深く、厚かった。その日はバンコック到着後 AVRDC の現地圃場視察があり、そして翌1月26日(土)、バンコックを発って日本に帰国した。

チェンマイからの帰路、車や飛行機の中あるいはホテルで荒木氏と語り合った。荒木氏は今回の報告に対する反省として次のように述懐した。内容が高度に過ぎて、現地の実情に合わなかったような気がする。日本でも実際に使用されているドリップシステムのスライドを示し、もう少しカントリーレポート的に説明すべきであったか。また東南アジアの実情を垣間見て、日本の昭和30年代までの灌水方法が用いられていると理解した。今後技術協力などの問題が発生した場合、如何に対応すべきか深く考えさせられた研究集会であった。筆者の受けた印象は日本の農業研究の視点はまだまだ国内中心で、もつと東南アジア、熱帯を発想の起点とした技術に真剣に取り組んでもいいのではないか。しかしすごいエネルギーを感じる研究者もいるので、熱帯の野菜研究も今後に期待できよう。こういう機会に得られた多くの研究者とのつながりを大切にしたいものだ、という点であった。

## 特別情報

OECD第4回バイオテクノロジーの  
安全性政府専門家会合に出席して農林水産省 バイオテクノロジー課  
長谷部 亮

本年6月24日から28日まで、パリのOECD本部において、バイオテクノロジーの安全性に関する政府専門家会合が行われた。わが国からは、バイオテクノロジーに関わる5省庁（科学技術庁、農林水産省、厚生省、通商産業省、環境庁）の専門家を始め関係団体など計13名が出席した。ここでは、本会合の概要を報告したい。

## OECDとバイオテクノロジー

OECD（経済協力開発機構）は、経済に関する先進工業国間の国際協力機関であり、欧州諸国、米国、日本など24カ国からなり、パリに本部を置いている。

OECD加盟諸国は、バイオテクノロジーの分野でも先進国である。このためOECDのCSTP（科学技術政策委員会）は、各国が協調・連携してバイオテクノロジーの産業レベルでの健全な発展と振興を行えるよう調整を図っている。OECD/CSTPでは、今から8年前の1983年には既に特別委員会（アドホックグループ）を設置し、さらにこれを発展拡大して1988年からは各国の政府専門家（約100名前後）を集めて、バイオテクノロジーの安全性についての議論を年1回のペースで進めてきた。

OECDの議論の成果は、公表され加盟諸国の施策に反映される。例えば、1986年の勧告‘Recombinant DNA Safety Considerations’を受けて、わが国でも各省（農林水産省、厚生省、通商産業省）の組換え体産業利用指針が整備された。このように、OECDの本専門家会合は、産業レベルでのバイオテクノロジーの安全性に関しての非常に重要な会議と位

置づけることができる。

## 今回合会のポイント

今回で4回目を迎える専門家会合は、おそらくその歴史の中でも重要な会合と位置づけられるであろう。これには三つの理由がある。第一に第1回会合から進められてきた生産工程での組換え体の利用法（GILSP）及び組換え体の小規模野外試験に関する原則（GDP）についての議論が終結し、今秋には正式に公表することが決定したこと、第二に組換え体の野外試験の進め方について、新たな提案が行われたこと、第三にバイオテクノロジーを用いた食品の安全性の議論が開始されたことである。要するに、今回合会から、前回合会までの一般的抽象論に終止符を打ち、作物や食品といった個別具体的なプロダクトを念頭に置いた議論へと転換が行われたのである。

## 組換え体の野外試験についての新しい考え方

今回、米国は小規模野外試験（GDP）の次の段階の試験（いわゆる大規模野外試験）を検討するために作業文書（「作物品種開発のための Performance Trials（実証試験、以下PTという）」）を提出し、これが本会合の検討材料となった。

提出された文書によれば、PTの概略は以下のようなものである。①PTでは、作物品種開発の中で、従来の作物の利用目的（農作物）を想定しており、他の新規目的（作物による医薬品生産など）は想定していないこと、②PTは、慣行的な管理方法で行われる圃場

試験であって、周囲と隔離された環境下で行われるものでは必ずしもないこと、③ PT は、導入形質の発現評価や予測外の弱点を見つけ出すために行うものであること、④ PT では、圃場試験の数や大きさ（面積）を問題とするのではなく、GDPの次の開発段階の試験であること、⑤モデル農作物として、6作物（トマト、ジャガイモ、ワタ、モロコシ、イネ、コムギ）を検討対象と考えてみる、などである。

当然のことながら、この討議文書は大きな反響を呼んだ。筆者は米国に比べれば、組換え体の野外試験に慎重な欧州諸国の反応に興味をもってしたが、欧州諸国も、PTを進んで受け入れ、さらにPT概念を発展させようとしていることには驚きであった。この背景には、具体的にプロダクトベースで考えると、GDPでは実際的な試験を行うことが不可能であったり、その必要性が薄い場合があることを出席者全員が承知していたためであろう。

PTについては本会合での討議は2点に絞られた。第一はPTとGDPの関係についてである。討議の結果、PTを必ずしもGDPの次の段階の野外試験と位置づける必要はなく、プロダクトの種類によっては、GDPを行わないで実験室、温室段階の試験から直接PTに移行できる場合があることが確認された。また今秋公表されるGDP正式文書の前文に、GDPが必ずしも野外試験にとって必須なものではないことが、明記されることになった。

第二は、PTの適用範囲の拡大についてであった。これは主に欧州諸国から提案され、その結果、米国提案の6作物以外の作物とともに、生ワクチン、生物農薬、家畜、窒素固定菌、魚、生物的環境浄化などもPTとして扱うための資料整理を各国が分担して行うこととなった。

このように、PTは当初の米国提案以上に対象生物を広げ、さらにGDPにとって代わる、より現実的な野外試験の概念として位置づけられてゆくことが考えられる。

## 組換え食品の安全性の考え方

組換え作物の各国での野外試験の進展に伴って、特に食用を目的とした組換え作物については、その食品としての安全性評価法を早急に確立することが求められている。そのため今回会合から組換え食品を中心としたバイオテク応用食品の安全性についての検討が開始された。

本会合では、議長諮問委員会が予め準備したバイオテク応用食品の安全性に関する文書について熱心な討議とともに修文作業を行った。その結果、数次にわたる改訂作業が行われた後、会議終日には本会合の結論である中間報告が示された。

その中間報告では、バイオテク応用食品の安全性については、'Substantially equivalence'（実質的に同じ）という概念が採用され、以下の3原則が確認された。①導入された新しい形質が特定され、さらにその形質転換による2次的影響を考慮して、無害と確認できる組換え食品は、そのもととなる食品と実質的に同じと考える。②実質的に同じと見なされた組換え食品は従来の食品と同様な安全評価に基づき取り扱う。③実質的に同じとみなすことのできない新食品は類似の食品などで得られる知見を参考にして評価する。

また、実質的に同じとみなすことができるためには、以下の条件を満たす必要があることが確認された。第一に新たに付与した形質が、食品の安全性や栄養価に質的・量的に影響を及ぼすかどうか、第二に形質転換の結果、2次的な悪影響がでないかどうか、第三に形質転換の結果、伝統的な加工調理法に変更を加える必要があるかどうかである。

実質的に同じとみなされる組換え食品の例として、遺伝子組換えによりウイルスに対する抵抗性を付与したジャガイモの例が挙げられた。ウイルスに自然感染したジャガイモは長い間、安全に摂取されている。このジャガイモとウイルス抵抗性を付与した組換えジャガイモとはジャガイモの中でウイルスコートタンパクを発現している点には、何も変わり

がなく、この組換えジャガイモは、ウイルスに自然感染したジャガイモと実質的に同じとみなされる。

いずれにしても、今回の会合の結果、食用を目的として開発された組換え作物も、その食品が、従来の食品と比べて実質的に同じと認定されれば、特別扱いせず食用に供することができるようになる訳であり、これは組換え作物の研究開発部門からみても朗報といえよう。

### おわりに

OECD会合は、これまで年1回のペースで開催され、検討が進められてきた。本年からこれを年2回開催することになり、今回は12月に行われる。その結果、以前にも増して検討のスピードアップが図られよう。

さて、今回の会合を受けたわが国の対応で

あるが、野外試験および食品の安全性とも農林水産省にとって、重要な問題である。野外試験については、周知のように当省の指針「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づいて進められているところである。今回会合の緩和の動きを受けて、直ちに本指針の緩和に結びつくものとは認識していない。これはOECDでの新しい野外試験の考え方についての議論が開始されたばかりであるからである。今後、OECDでの検討の進展及びわが国の試験事例数の増加に伴って、本指針の緩和もあり得ると考えている。組換え食品の安全性については、当省としては得られる食品が科学的にみて安全とOECDの考え方に基づいて評価されるよう、導入遺伝子などを考慮した食用目的の組換え作物の育種開発を行ってゆく必要があると考えている。

### 特別情報

## 生分解性プラスチックについて

工業技術院 微生物工業技術研究所

常盤 豊

プラスチックは「豊かで、便利な」現代文明を演出するだけでなく、省資源・省エネルギーの面からもなくてはならない素材である。しかし一方、膨大な量のプラスチック廃棄物は、埋めても腐らず、燃やすと高熱や有害ガスを発生し、適正な処理が難しく環境への影響が深刻になってきている。また、自然環境中に放置されたプラスチックの糸、ロープ、フィルム等が、野生生物に危害を与えている。

このような背景から、欧米ではプラスチックに対する批判が高まり、プラスチックの使用を法律で規制する動きやリサイクル運動が活発である。しかし、人間活動の法律による規制や公德心・道徳心の向上という消極的な対応だけでは、プラスチック廃棄物問題の解

決は困難と考えられる。そこで最近、土の微生物で腐る生分解性プラスチックが、プラスチック廃棄物問題を解決する切札の一つとして注目されている。

### 1. 生分解性プラスチックの種類

生分解性プラスチックとは、土や海など環境中にいる微生物の作用によって、分解されるプラスチックのことをいう。つまり、生分解性プラスチックは、微生物を敵と見ていた従来の“腐らないプラスチック”に対して、微生物を味方にした“腐るプラスチック”であり、廃棄後のことを考えていなかった従来の素材開発の思想を根本から変えさせるもの



表1 生分解性プラスチックの種類

A 生分解性プラスチック (Biodegradable plastics)	
① 微生物産生型	例: PHBおよびその誘導体
② 天然高分子型	例: 酢酸セルロース, ニトロセルロース
③ 合成高分子型	例: ポリエステル-ナイロン共重合体
④ 天然-合成高分子複合型	例: アミロース-ポリエステル共重合体
B 生物崩壊性プラスチック (Biodisintegrable plastics)	
⑤ 脂肪族ポリエステル型	例: PCL-汎用プラスチックブレンド体
⑥ でん粉型	例: でん粉-ポリエチレンブレンド体
⑦ 天然鉱物型	例: PCL-CaCO <sub>3</sub> ブレンド体

である。

現在開発が進められている生分解性プラスチックについて、表1に示した。完全に分解されるタイプと一部が分解されて形が壊れるタイプ(生物崩壊性プラスチック)の二つがある。

## 2. 生分解性プラスチックの開発

### (1) 微生物産生型

微生物産生型では、多くの微生物の貯蔵物質であるポリヒドロキシ酪酸(PHB)やその誘導体(PHBとポリヒドロキシ吉草酸PHVとの共重合体)の研究が、英国ICI社、東工大、米国マサチューセッツ大などで盛んに行われている。特に、ICI社はPHBとポリヒドロキシ吉草酸からなる共重合体「バイオポール」を1990年5月にドイツの化粧品メーカー、ウエラ社と共同でシャンプーボトルとして試験販売した実績がある。しかし現在のところ、PHB等の微生物産生プラスチックは、たいへん高価なので、汎用品としてよりむしろ新

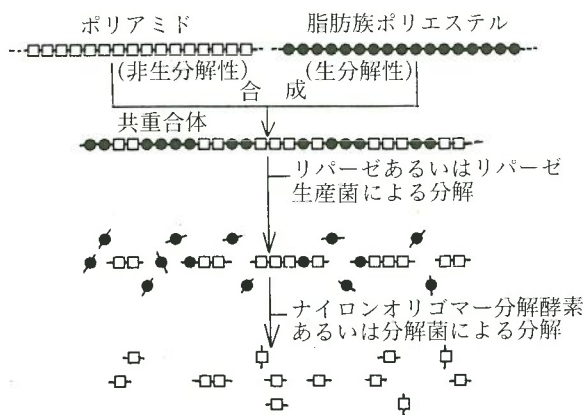


図1 脂肪族ポリエステルとポリアミド(ナイロン)からなる共重合体の生分解経路

規の機能性素材としての利用が期待される。

### (2) 天然高分子型

天然高分子型は、天然高分子の生分解性に着目して、ニトロセルロース(セルロイドの原料)、アセチルセルロース(写真フィルムに利用)、グラフト化セルロース等のように天然高分子を化学的に修飾したものや、セルロース、でん粉等を物理的に加工したものである。これらは経済性の点で合成高分子型と競合するが、物理化学的性質から利用分野が違ってくと予想される。

### (3) 合成高分子型

石油化学系の合成高分子は、汎用性が期待されるもので種々の原料から多くの生分解性プラスチックの分子設計が可能である。

#### ①脂肪族ポリエステル

合成された固体状のプラスチックの中では、種々の脂肪族ポリエステルが微生物によって完全に分解される<sup>2)</sup>。このポリエステルは、1977年に起源の異なる種々のリパーゼや豚肝臓エステラーゼによって分解されることが発見された<sup>2)</sup>。リパーゼやエステラーゼは微生物をはじめ動植物界に広く分布しているので、脂肪族ポリエステルは自然界で微生物などにより分解される生分解性の合成高分子物質であることがわかった。

#### ②脂肪族ポリエステルとポリアミドの共重合体(CPAE)<sup>3)</sup>

脂肪族ポリエステルは生分解性であるが、融点が低く耐熱性や機械的強度などの物性が劣り広い用途は期待できない。そこで、脂肪族ポリエステルの物性を改善するため、脂肪族ポリエステルにポリアミド(ナイロン)を多数交互に導入した共重合体(CPAE)が開発されている。図1には、CPAEの生分解過程を示した。CPAEのリパーゼによる分解性は、ナイロン含量が増大するとともに低下した。CPAEは、脂肪族ポリエステルに比べて、融点や引っ張り強度などの物性が改善された新規の生分解性プラスチックであり、ポリエチレンと同等の引っ張り強度を持つ厚さ0.02mmの透明なフィルムも得られている。なお、このCPAEでは、生分解されにくいナイロン部分も短いブロックにし、微生物で

分解されやすいように工夫されている。

#### (4) 天然—合成高分子複合型のプラスチック

脂肪族ポリエステル(PCL)に微生物が作るポリヒドロキシ酪酸(PHB)を混ぜたブレンド体が開発されている。これは、PCLより融点が高く、かつ、加工物性もよいものであり、微生物でPHB—PHV共重合体を作るのに比較して、簡単に一定組成の生分解性プラスチックが得られ、コストも低くなるという利点がある。

また、PCLに生でん粉を40%～85%の高配合で均一分散させた生分解性プラスチックが報告されている<sup>4)</sup>(口絵)。これは、PCL単独より弾性率が向上する、でん粉の熱変成がほとんどない、などの利点がある。

### 3. 生物崩壊性プラスチックの開発

生物崩壊性プラスチックの利点は、使用後埋め立て処理された場合に体積が減少するため、埋立地の延命化や地盤の安定化に効果があることである。また、誤って環境中に放置されても野生生物に与える危害は、従来のプラスチックに比べ少ないと予想される。さらに、生物崩壊性プラスチックにおいては、崩壊後小さくなって残存する汎用プラスチック部分が、光分解性プラスチックと異なり、分子量や化学構造の変化をとまわず元のままであるので安全性が高いと理解されている。生物崩壊性プラスチックの残存部分が、土壤中に安定に存在し、土壤改良剤などに利用できれば、その使用範囲はたいへん広くなると期待される。

#### (1) 脂肪族ポリエステル型の生物崩壊性プラスチック<sup>4)</sup>

PCLと汎用プラスチック(ポリエチレン、ポリプロピレン、6-ナイロン、ポリスチレン、ポリエチレンテレフタレート)との配合比や相構造を制御することによって、高い崩壊性を示すブレンド体が開発されている(図2)。

#### (2) でん粉型の生物崩壊性プラスチック

米国やカナダで市販されている、生でん粉の配合割合6～10重量%のLDPEの崩壊は、



図2 生物崩壊性プラスチック  
脂肪族ポリエステルにポリエチレン(LDPE)あるいはポリスチレン(この場合発泡体)を配合した試作品

生分解だけでなくLDPEの光分解や酸化分解との組合せで起こっていると考えられている。

一方、渦流高速混合機を用いて、生でん粉を40～85重量%と高配合に含み、アミラーゼの作用で崩壊するLDPEブレンド体やポリプロピレンブレンド体が開発されている<sup>4)</sup>。これらは、樹脂部分がでん粉高配合のため連続できず、また、でん粉との間に隙間ができ表面積が増大するため、アミラーゼを作用させると高い崩壊性を示した。

#### (3) 天然鉱物型の生物崩壊性プラスチック

PCLに含水ケイ酸マグネシウム(タルク)や炭酸カルシウム等の天然鉱物を高配合(30～70重量%)に充填したブレンド体が開発されている(図3)。これは、PCL部分が生分解された後、天然の鉱物しか残らないので「環境調和型プラスチック」と考えられる。同時に、充填する天然鉱物の粒径を調整することによる生分解速度の制御方法も確立された。このブレンド体の特徴は、①PCL単独に比べ曲げ弾性率が大い、②価格が安い、③熱変性しにくいので成形加工が容易、



図3 生物崩壊性プラスチック  
「環境調和型プラスチック」  
脂肪族ポリエステルのポリカプロラクトンと炭酸カルシウム(50:50重量比)とのブレンド体

④燃焼カロリーが低いので焼却しやすい、などの点である。

特に、PCLと炭酸カルシウム（珊瑚などの生物由来）からなるブレンド体は、PCLの生分解によって生じた有機酸により炭酸カルシウムが可溶化され反応環境を中性に維持するとともに、ブレンド体の表面積を増大させるため、高い生物崩壊性を示した。また、空気がなく嫌気的な環境における有機物の微生物分解産物であるギ酸、酢酸、酪酸などの有機酸によっても、このプラスチックに含まれる炭酸カルシウムは可溶化された。このことから、このプラスチックは有機酸が蓄積されやすい埋立地が湖沼の底泥などにおいて速やかに分解することが期待される。このブレンド体は、生物崩壊性と化学崩壊性をあわせもった興味ある素材である。

#### 4. 今後の展望

生分解性プラスチックの開発は、埋め立てや焼却処理、リサイクルなどとともに、プラスチック廃棄物問題の解決策の一つとして位置付けされる。また、廃棄物の回収処理システムから洩れた散乱ゴミの対策方法として、生分解性プラスチックへの期待は大きい。生分解性プラスチックは、短期、中期及び長期の各ステップを経ながら社会に定着していくと思われるが、当面は屋外レジャー用品や短期使用の袋や容器への利用が考えられる。これらは、全プラスチックの3割程度である。将来、生分解性プラスチックが社会に広く普及してくるとそれらの生物学的なリサイクル（bioconversion）技術の開発も重要になってくる。例えば、使用後のプラスチックは庭で堆肥にするとか、都市部では収集して堆肥に

して近郊の農地に還元して資源の循環を図るというcompostingが考えられる。さらに、使用後の生分解性プラスチックを微生物によりメタンやエタノール、微生物産生プラスチックなどへ転換する発酵技術の開発も重要なテーマとなってくる。

一方、生分解性プラスチックは、新規の機能性高分子としての展開も期待される。例えば、農林業分野であればマルチフィルムやひも、鉢などに用いると作業の省力化に役立つ。また、肥料や農薬の遊離基材や医療の分野での利用も期待される。

生分解性プラスチック開発の技術的な課題は、物理化学的性質や経済性の改善とともに、それぞれの用途に応じた生分解速度の制御技術の確立である。また、生分解性プラスチックにおいては、色素、安定剤、可塑剤など各種の添加物がプラスチックの分解とともに溶出してくるので、安全性の高い添加剤の開発や、添加剤を必要としない生分解性プラスチックの開発も必要である。分解産物の安全性については、分解されて低分子量になったモノマーやダイマーだけでなく、一部分が分解を受けただけで、比較的高分子量の状態で見逃されているものについても注意を払う必要がある。

#### 文 献

- 1) Tokiwa, Y. et al. (1976) *J. Ferment. Technol.* 54 : 603
- 2) Tokiwa, Y. and T. Suzuki (1977) *Nature*, 270 : 76
- 3) Tokiwa, Y. et al. (1990) *ACS Symposium Series*, 433 : 136
- 4) Tokiwa, Y. et al. (1990) *Polym. Mats. Sci. Eng.* 63 : 742-746

#### 編集後記

本誌も創刊号発行以来4年が経過し、今回27号をお届けすることができました。これも購読会員の皆様の温い御理解と執筆者の方々のひとかたならぬ御協力によるものと感謝しています。本誌の構成・内容については、御期待にそえるよう、つねづね心がけてまいり

ましたが、次号からは新しく、地域のバイテク研究成果あるいは生研機構出資のバイテク研究成果を、新しい欄を設けて随時紹介することになりました。今後とも御指導、御支援のほど宜しくお願いいたします。

(大畑記)

#### ブレイン テクノニュース (第27号)

平成3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. 03-3205-6565 FAX. 03-3205-6566

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. 03-3667-8931 FAX. 03-3667-8933