

表紙説明

中央：DNA結合色素DAPIで発色したトビイロウンカ師管中のマイコプラズマ様微生物(MLO)の蛍光顕微鏡写真  
 左上：黄萎病罹病イネ上で師管液を吸汁中のトビイロウンカ  
 (口針を切断して師管液を採ることができる)  
 左下：イネに刺ったトビイロウンカの口針切り口から溢出する師管液  
 右下：罹病イネから採取した師管液中のMLO  
 (破裂したMLOの断片やDNAと考えられるものが多い)

(本文 9 ページ)

本号の紙面

国内情報	1
コムギのNCヘテロシス, 野菜成分の培養ヒト細胞への作用, 組換えウイルス感染カイコでのタンパク生産, MLO検出法	
出資プロジェクト情報	12
芝草プロトプラストからの植物体再成	
地域の先端研究	14
ポリエチレン袋を用いたツクネイモの組織培養	
文献情報	16
害虫の新防除法, genome scanning, 雌マウスの雄化	
海外便り	20
カリフォルニア大留学記	
国際学会レポート	23
第1回細胞・組織培養世界会議	

## 口 絵

### 国内情報

木下俊郎

コムギのNCヘテローシス利用…………… 1

篠原和毅

野菜成分の2・3の培養ヒト細胞に対する作用…………… 3

小林 淳

組換えウイルスの感染を利用したカイコによるタンパク質の生産…………… 6

河部 暹・川北 弘

マイコプラズマ様微生物検出法の開発…………… 9

### 出資プロジェクト情報

大川原良次・猪熊千恵・杉浦清之・金子誠二

各種芝草におけるプロトプラストからの植物体再成…………… 12

### 地域の先端研究

松本英紀

ポリエチレン袋を用いた組織培養によるツクネイモの大量増殖…………… 14

### 文献情報

作物害虫の新防除法出現か?…………… 16

Genome scanning…………… 17

外来性*Sry*遺伝子をもつ細胞遺伝学的な雌マウスの雄化…………… 18

### 海外便り

楠本憲一

カリフォルニア大留学体験記——アフラトキシンの生成経路について…………… 20

### 国際学会レポート

三橋 淳

第1回細胞・組織培養世界会議に出席して…………… 23

無脊椎動物関連発表の紹介

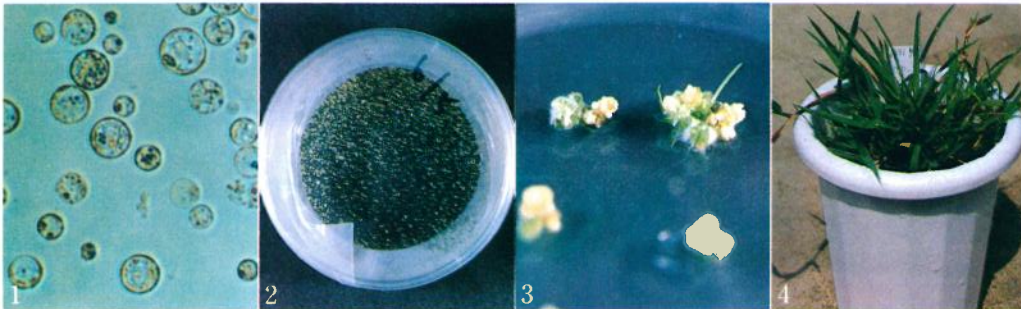


コムギのNCヘテローシス利用 (本文 1 ページ)



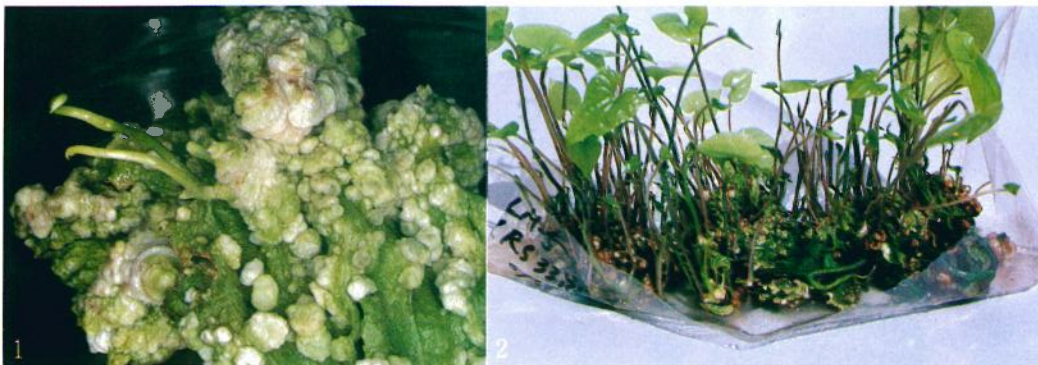
1. オバータ細胞質による春播→秋播への変化 (春先の札幌圃場), 左; Chinese Spring, 右; (*ovata*) C.S.
2. オバータ細胞質によって生じる分けつ数の異常な増加  
左; ホロシリ (標準品種), 右; (*ovata*) C.S.
3. 正常細胞質 (左) とオバータ細胞質 (右) を有する F<sub>2</sub> 集団間における出穂性分離の差異 左端 2 行が euplasm で, 次の未出穂のが *ovata* 細胞質
4. 小麦研究の記念碑 (北大圃場)

各種芝草におけるプロトプラストからの植物体再生 (本文 12 ページ)



- ノシバ (*Zoysia japonica*) プロトプラストからの植物体再生  
 1: 単離直後のプロトプラスト, 2: プロトプラスト由来のコロニー  
 3: カルスからの植物体再生, 4: 定植し温室にて育成中の植物体

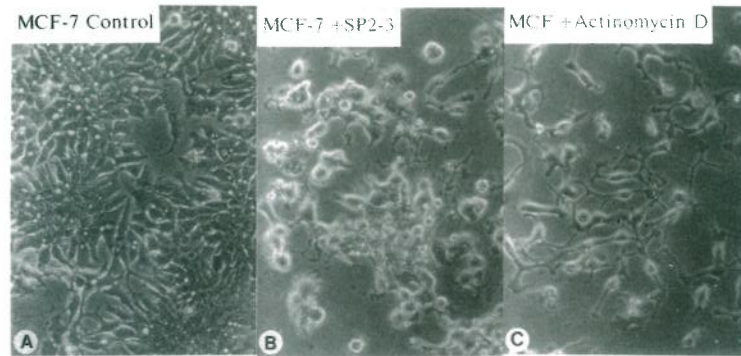
ポリエチレン袋を用いた組織培養によるツクネイモの大量増殖 (本文 14 ページ)



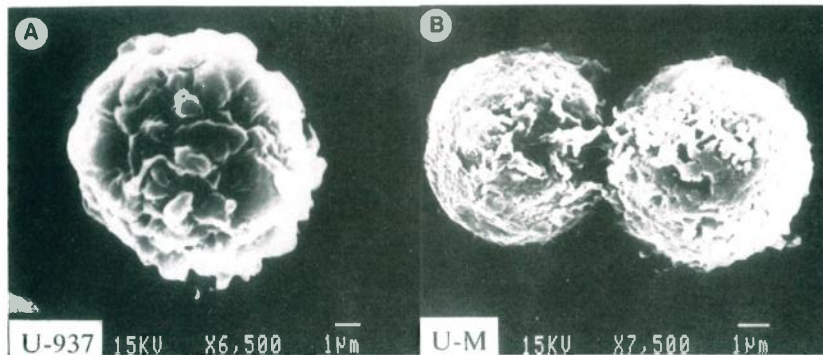
葉に形成されたむかご様体:  
形成初期

ポリ袋で連続培養し, むかご様体から  
発生した幼植物

野菜成分の2.3の培養ヒト細胞に対する作用 (本文 3 ページ)

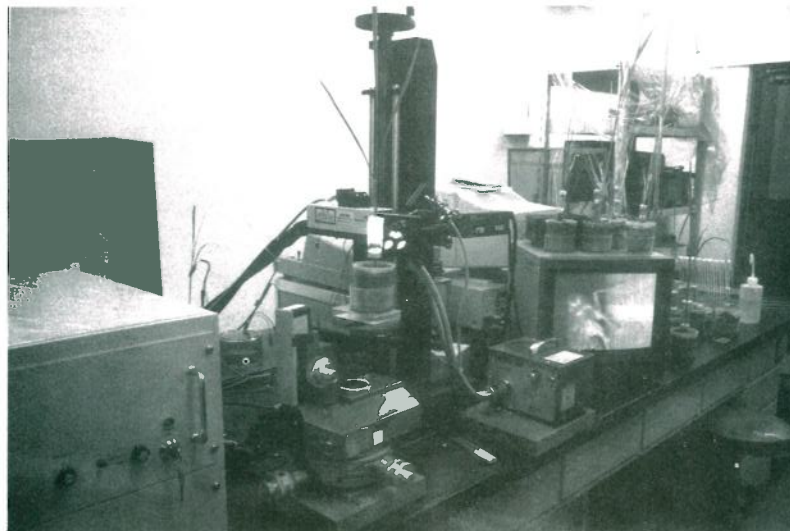


ホウレンソウ非透析性画分で処理したヒト乳がん細胞(MCF-7)  
A: 無処理, B: 2 µg/mlのホウレンソウ非透析性画分(SP2-3)処理  
C: 1 µg/mlアクチノマイシンD処理



ヒト単芽球細胞(U-937)及びU-937細胞から樹立したマクロファージ様細胞株(U-M)の走査型電顕写真

マイコプラズマ様微生物検出法の開発 (本文 9 ページ)



スタイレクトミーによる師管液採取に使用するYAGレーザー発振装置



## 国内情報

## コムギのNCヘテローシス利用

北海道大学農学部

木下俊郎

1951年の木原・深沢による核置換法の研究<sup>1)</sup>によって、コムギの核(N)と種々の近縁種の細胞質(C)よりなるNC雑種が多数育成された。

これらのNC雑種の中には細胞質雄性不稔性や単為生殖による半数体作出などのように育種的に役立つものが含まれている。

今年の7月に北大で開催された木原均博士記念「コムギの細胞質遺伝工学に関する国際シンポジウム」では、コムギの細胞質遺伝の分子遺伝学的基礎から実用育種に至る広範な課題について熱心な討議が行われ、細胞質遺伝学の発展に寄与する有意義なシンポジウムとなった。

## 1. NCヘテローシス

木原(1979)の定義によれば、コムギの核(N)と外来種の細胞質(C)との相互作用により生じるヘテロ効果の中から育種に有用となり得る現象をNCヘテローシスと言う<sup>2)</sup>。代表的なモデルとしてはタルホコムギ(*Aegilops squarrosa*)由来の細胞質の利用があげられよう。木原生物学研究所を中心に国内の数種の研究機関およびアメリカのワシントン州立大学との数年間にわたる協力プロジェクトが行われ、その結果を集約するならば、余り顕著なヘテローシス効果は見出されなかったものの、もし*squarrosa*細胞質に対して適応する核遺伝子型が選ばれ、それに対してプラスに作用するような環境条件に恵まれるならば、かなりのNCヘテローシス効果を期待できることがわかった<sup>3)</sup>。現在*squarrosa*

細胞質を有する「ハチマン」、「ホロシリ」、「タクネ」および「チホク」などの育種材料が育成されているので、是非今後のコムギ育種へ利用してほしい。

また、この一連の研究に引き続き、*Aegilops ovata*由来の細胞質についてもNCヘテローシス研究が著者の研究室で行われているので、その結果を紹介する。

2. *ovata*細胞質遺伝子の多面作用

常脇らの一連の核置換研究<sup>4)</sup>によって *Ae. ovata*細胞質を導入した実験系統(*ovata*) Chinese Spring (C.S. と略称)が作られた。京都や倉敷における栽培では(*ovata*) C.S.はC.S.に比べ出穂が約10日ほど遅延した。すなわち *ovata*細胞質は栄養生長期間の延長をもたらす。ところが同じ材料を札幌(北緯43度)の秋播条件下で栽培すると、1978年からの数年にわたる秋播栽培の結果からC.S.は常に積雪下で全個体が枯死して越冬しないのに、(*ovata*) C.S.の方は半数以上が生存した(口絵)。しかも越冬直後は生育が遅いものの、その後分けつが旺盛となり、出穂日が遅延することもある。また、「ホロシリ」のような標準品種に比べて約30%も分けつ数が増加した(口絵)。しかし、無効分けつも増加するために種子重への寄与はほとんどなかった。

制限環境条件下におくと春化要求度を調査できるが、(*ovata*) C.S.や(*ovata*) P168並びにそれらを片親に用いて作られた各種の交雑F<sub>1</sub>個体では、*ovata*細胞質の作用により播性が1ランク程度高まった。すなわち、C.S.は播性Ⅲであるのに対して、(*ovata*) C.S.はⅣに変わり、このために越冬できるようにな

ったわけである。

つぎに短日条件による出穂日の遅延についても調べたところ、ここにも *ovata* 細胞質による効果が認められた。すなわち、P168は24時間(長日)日長と12時間(短日)日長の間での出穂遅延が10.9日であったのに対して(*ovata*)P168では49.0日まで増大した<sup>5)</sup>。

抗生物質の一つであるストレプトマイシンに対する耐性を個体レベルでは幼苗の白化程度、細胞レベルではカルスの74日間培養後における生長抑制程度により調べたところ、(*ovata*) C.S. は他の異質細胞質や *euplasm* の C.S. よりも個体と細胞の両レベルで高い耐性を示した<sup>6)</sup>。

このように各種の生理形質について *ovata* 細胞質による多面作用が認められた。

### 3. 変異性の拡大

(*ovata*) 農林26号は雄性不稔であるが、(*ovata*) 農林26号×P168の後代からは木原(1980)によって(*ovata*) Yellow Fertile という稔性系統が育成された。これは P168 の有する C-Sat-2 という染色体上にある稔性回復遺伝子 (*Rfov*) を有し、しかも同染色体にある黒色穎遺伝子 (*BD*) は1D染色体との転座により劣性黄色穎 (*bd*) に変わっている。ただ染色体の対合異常により稔性は不安定であった<sup>7)</sup>。

著者らは(*ovata*) Yellow Fertile×ハルヒカリの交雑実験を試みた。両親共に春播型であったが、後代からは春播型と秋播型の両方の固定系統が多数得られた。そこで代表的な春播と秋播の系統を用いて播性に関する遺伝子型を調べた。すなわち、各種の播性遺伝子 (*Vrn*) に関する同質遺伝子系統の Triple Dirk (C),(D), (E) および (F) と (*ovata*) 系統との間で相反交雑を行い、F<sub>2</sub> における出穂日の分離を調べた。 *euplasm* と *ovata* 細胞質の両 F<sub>2</sub> 集団間には出穂日の分離について著しい差異が認められた(口絵)。 *euplasm* の下での遺伝子分析によって *ovata* 細胞質を有する春播および秋播系統の遺伝子型を推定したところ、春播型では *Vrn1*, *Vrn2*, *Vrn3*,

*Vrn4* のホモ型、秋播型は *Vrn1*, *Vrn2*, *Vrn3*, *vrn4* のホモ型であった。両遺伝子型は *euplasm* の下では顕著な春播性を示す。しかし *ovata* 細胞質下ではそれぞれ春播の極晩程度と秋播になり、各相反交雑の分離から *ovata* 細胞質により出穂性変異は著しく拡大することが明らかになった。因みに春播型で極晩生である (*ovata*) 系統の持つ遺伝子型は *euplasm* に変えると極早生となった。したがって、*ovata* 細胞質に適応する核遺伝子構成は *euplasm* の場合とは全く異なると考えられる。

耐冬性について *ovata* 細胞質を有する春播及び秋播の10系統について、冬季屋外の-14℃, 24時間の条件にさらして、その後の凍害程度を調べたところ、耐冬性は両親 (Yellow Fertile とハルヒカリ) の中間かまたは超越型を示し、播性Vの品種の耐冬性に匹敵する耐冬性系統が得られた<sup>8)</sup>。

### 4. 生長解析

予備的な収量試験によれば、(*ovata*) 系統は春播条件における成績が有望であった<sup>9)</sup>。そこで点播と条播の両条件下で *ovata* 細胞質を有する YH1, YH2, YH3 と標準品種「ハルヒカリ」や「ハルユタカ」との生産力を比較した(表1)。

YHの各系統は点播条件では標準品種より良好な成績を示したが、通常の条播条件ではむしろ収量が低かった。

生長解析をしたところ、(*ovata*) 系統は播種から花芽分化に至るいわゆる栄養生長期間が6日(YH1)ないし18日(YH2, YH3)も拡大するのにかかわらず、生殖生長期以降では両者にほとんど差異がみられなかった。生長率(CGR)と全乾物重(TDW)をみると、栄養生長期間では(*ovata*) 系統の方が著しく大

表1 (*ovata*) 系統のYH1, YH2, YH3の種子収量

系 統	点 播	
YH 1	15.3g/plant	223g/m <sup>2</sup>
YH 2	29.4	208
YH 3	24.8	163
ハルヒカリ	16.9	267
ハルユタカ	18.4	386

であったが、生殖生長期や成熟期に進むと差はなくなり、登熟時ではむしろ小さくなった。YHの各系統は成熟期の乾物重では種子重への分配が小さくなり、反対に枯葉重や根重が増加した。栄養生長期に分げつが盛んであったため、分げつは過繁茂を引き起こし、各分げつ間の競争が起こったために無効分げつや枯葉数が増大したと考えられる。

このように現行の栽培条件下では (*ovata*) 系統の利用についてはなお問題点が多い。しかし、(*ovata*) 細胞質に対して適応する核遺伝子型が見出され、それに対応する栽培条件や気象条件が確立されれば、*ovata* 細胞質によるNCヘテロシスの利用は成功するかも知れない。また一方では飼料作物としての利用も考えられる。ただ稔性回復遺伝子(*Rfov*)について、C-sat-2由来のものがよいのか、C.S.に含まれる複数遺伝子の方がよいのかはなお検討する必要がある。

最後に口絵の「小麦研究の記念碑」について説明する。1976年北大の創基100年に際して、木原スクールの弟子や後輩からの募金により建てられたものである。木原博士が最初に実験用の小麦種子を播かれた場所にゲノム分析を象徴する台座が置かれている。坂村徹博士や木原均博士によるコムギの遺伝研究が

その後の輝かしい発展を遂げる礎となったことを記念する次の言葉が刻まれている。

Wheat genetics entered a fresh phase with SAKAMURA's discovery (1918) that the species might have 14, 28 or 42 chromosomes (diploid), and with KIHARA's work on the cytology of hybrids between species with different numbers of chromosomes.

(by A. E. WATKINS 1930)

## 文 献

- 1) Kihara, H. (1951) *Cytologia* 16 : 177-193
- 2) Kihara, H. (1979) *Seiken Ziho* 27-28 : 1-13
- 3) Kihara, H. (1980) *Seiken Ziho* 29 : 1-8
- 4) Tsunewaki, K. (1980) Genetic diversity of the cytoplasm in *Triticum* and *Aegilops*. *Japan Soc. Prom. Sci. Tokyo*, p. 290
- 5) Kinoshita, T. and H. Kihara (1983) *Proc. 6th International Wheat Genetics Symp. Kyoto*, 507-512
- 6) Kinoshita, T. and T. Mikami (1984) *Seiken Ziho* 32 : 31-38
- 7) Kihara, H. (1980) *Seiken Ziho* 29 : 9-17
- 8) Kinoshita, T. (1988) *Proc. 7th International Wheat Genetics Symp. Cambridge Vol. 2*: 1133-1138
- 9) Kinoshita, T., I. Takamura and T. Inukai (1990) *Asian Jour. Plant Sci.* 1 : 31-39

## 国内情報

# 野菜成分の2, 3の培養ヒト細胞に対する作用

農林水産省 食品総合研究所 機能成分研究室

篠原和毅

## 1. はじめに

ホウレンソウ、ニンジン、トマトなどの野菜はビタミン類、ミネラル類、緑黄色素類や繊維等を豊富に含み、健康の維持、増強に寄

与している不可欠な食品である。近年、野菜が単に栄養機能のみならず、発がんや老化予防等重要な生理的機能を有していることが明らかにされてきており、その重要性が注目されている。既に、ビタミンC、カロチノイド、繊維等野菜成分が抗変異原性、抗腫瘍性、発がんプロモーション抑制活性、抗酸化性、コレステロール低下作用、整腸作用等の生理機

SHINOHARA Kazuki

能を有することが明らかにされている。しかしながら、生理的機能性が明らかにされた成分は極く一部であり、多種多様の成分を含む野菜中には未知の生理機能を有している成分が多数存在しているものと予想される。われわれ人間を含め、多くの動物は野菜等植物性の食物を日常摂取している。このことは野菜成分が生体内の細胞機能の発現や調節に何らかの作用を果たしていることを示唆する。なかでも野菜の生体防御機能は、発がんや老化等の予防の観点からも重要な機能の一つである。生体中には、外部から入ってきたウイルスや微生物、がん細胞のような異物に対して食作用や異物に対する抗体、その他の免疫物質を分泌することによって排除する生体防御機能がある。この生体防御機能を担当しているのが単球、マクロファージ、キラー細胞、リンパ球のB細胞、T細胞といった免疫系の細胞である。このような細胞系に野菜成分が如何に作用しているかを検討することによって野菜の生体防御機能が明らかになることが期待される。

そこで、われわれは生体防御機能を担当している2, 3の培養細胞やがん細胞に対する野菜抽出物の影響について検討した。

## 2. 野菜類の培養動物細胞増殖促進活性

われわれは先にサイネココツカスやスピルリナ等の好熱性藍藻の抽出液が2, 3のヒト由来の無血清培養リンパ芽球様細胞等の増殖を促進することを認め、その活性本体が光合成色素フィコシアニンタンパクであることを明らかにした<sup>1,2)</sup>。これらの結果は、同じ光合成生物である野菜中にも同様な細胞増殖促進機能を持つ成分が存在することを示唆するものである。そこで無血清培養した2, 3の細胞に対する種々野菜の水溶性抽出液の増殖促進効果を調べた。その結果、ホウレンソウ、ニラ、ニガウリ、チンゲンサイ、ニンジン、サツマイモ、ブロッコリー等の抽出液中にヒト肺がん及び乳がん細胞に特異的な抗体を産生するハイブリドーマ細胞(HB4C5及びSI102細胞)やマクロファージ細胞の前駆細胞であ

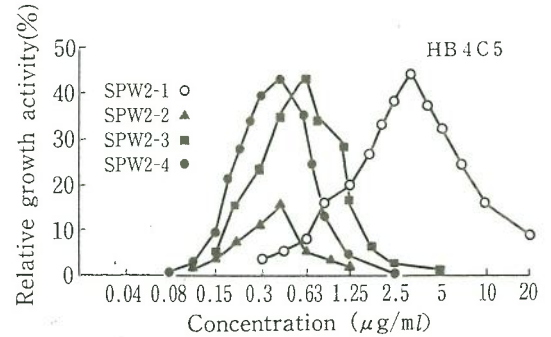


図1 ホウレンソウの水可溶高分子抽出物(SP)のセファデックスG-25ゲル濾過クロマトグラフィーによって分画された4画分(SPW2-1, SPW2-2, SPW2-3及びSPW2-4)のハイブリドーマ細胞(HB4C5)に対する増殖促進活性

る単芽球細胞(U-937細胞)等の増殖を促進する成分が存在することを認めた。これらの野菜抽出液の増殖促進活性は20~40%であった。

ホウレンソウの水可溶高分子抽出物(SP)をセファデックスG-25ゲル濾過クロマトグラフィーによって分画した結果、大きく4画分(SPW2-1, SPW2-2, SPW2-3及びSPW2-4)が分離され、ハイブリドーマ細胞、HB4C5に対する増殖促進活性はSPW2-1, SPW2-3及びSPW2-4に認められた。現在、さらに活性本体の分離・精製を行っている(図1)。

また、ニラ、ニガウリ、キヌサヤエンドウ、ナス、ダイコン、サツマイモ等のエタノール可溶性抽出物中にも促進活性成分が存在していることも認めた。

一方、野菜等に含まれている数種の植物性ポリフェノール化合物の培養細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。その結果変異原性が確認されているケルセチンが種々のヒト由来の細胞に対して細胞致死効果を示すが、その配糖体であるルチンやカテキン等のポリフェノール化合物はほとんど示さないことも明らかにした<sup>3)</sup>。

## 3. ホウレンソウ成分の腫瘍細胞壊死活性

がんの発生は食品あるいは食生活と関連があることが疫学的研究からも指摘されている。また、肉食主義者には肉類を多食する人より



もがんになる率が低いこと、また喫煙している人でも緑黄色野菜を毎日食べていると肺がんや子宮頸がんのリスクが低くなるという報告もある。これは野菜成分中に発がん抑制効果を有する成分が存在していることを示唆するものである。上述のように、野菜が変異原物質や発がん物質の生成や活性を抑制する抗変異原性や発がんプロモーション抑制作用等の機能を有することが既に確かめられている。われわれはホウレンソウ抽出液をゲル濾過分画した画分を用い、数種のヒト正常組織由来の培養細胞及びがん組織由来の培養細胞の増殖に及ぼす作用を検討した。その結果、 $1 \mu\text{g/ml}$ の抽出画分で24時間処理した場合に、正常培養細胞より、がん細胞、特に乳がん(MCF-7)、肝がん(HuH-7)や肺がん(QG-90)等がん由来の培養細胞の増殖をより強く阻害することが確かめられた。MCF-7細胞の場合には、本画分で処理すると細胞は細くなり、培養プレートから剝がれ、死滅した。この現象は制がん剤アクチノマイシンDで処理した場合と同様であった(口絵)。

#### 4. ホウレンソウの単球/マクロファージ細胞活性化作用

単球やマクロファージ細胞は生体防御機構の初期の段階を担当している細胞群である。われわれはまず、前記のマクロファージ前駆細胞であるU-937単芽球細胞を発がんプロモーターであるTPAで処理することにより、初めてヒト由来のマクロファージ様細胞株(U-M細胞)を樹立すると共に(口絵)、U-M細胞が食作用を有すること及びインターロイキン1や腫瘍細胞壊死因子等の生理活性物質を産生することを確認した<sup>4)</sup>。続いてU-937及びU-M細胞等を用い、野菜抽出液の活性化作用を検討した結果、ホウレンソウの画分がこれら単芽球及びマクロファージ細胞を活性化することを確認した。このホウレンソウ画分による活性化に伴い、乳がん細胞、MCF-7細胞が顕著に死滅すること及び腫瘍細胞壊死因子の分泌が促進されることも認めた(図2)。ホウレンソウ画分から活性本体を分離し、分子量16,000の糖タンパクであることも明らかにした。

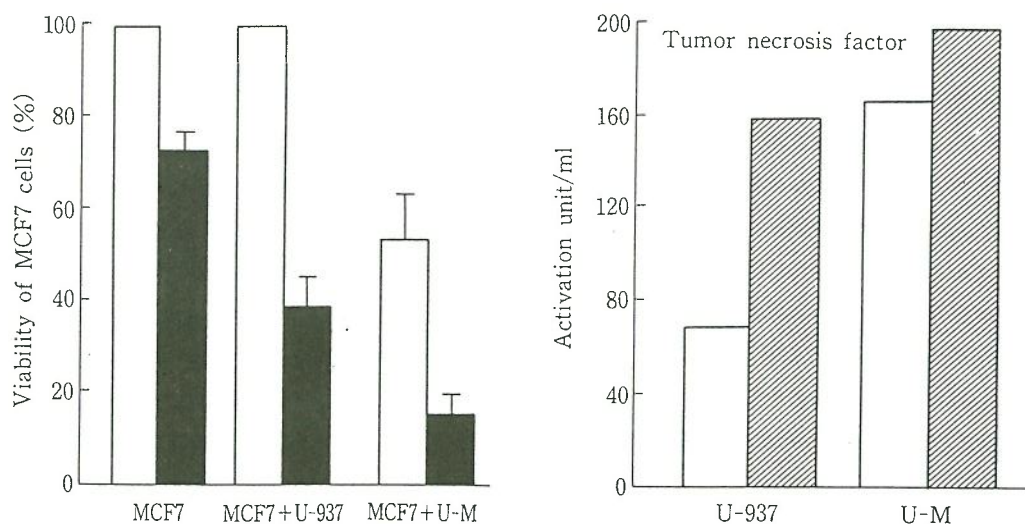


図2 ホウレンソウ非透析性画分のU-937及びU-M細胞活性化作用

左：ヒト乳がん細胞(MCF-7)壊死作用

□ 無処理区    ■ 処理区

右：腫瘍細胞壊死因子分泌促進作用

□ 無処理区    ▨ 処理区

### 5. 野菜の抗体産生促進活性

一方、野菜抽出液中には、がん細胞に特異的な抗体の分泌を促進することも確かめられた。すなわち、ヒト肺がん及び乳がん細胞に特異的な抗体を産生するハイブリドーマ細胞(HB4C5及びSI102細胞)に野菜抽出液を添加し、培養したのち、培地中の抗体(IgMあるいはIgG)量を測定した結果、ニラ、サツマイモ、ニンジン、キヌサヤエンドウ等の抽出液がこれら細胞による抗体産生を促進することを認めた。

### 6. おわりに

このように培養動物細胞を用いた研究により、野菜成分が細胞増殖活性、腫瘍細胞壊死

作用、マクロファージ系細胞の活性化作用、抗体産生促進活性等の新規な生体防衛的機能を有することが明らかになった。われわれはこのような発がん抑制効果を持つ医食同源的な野菜を食べることにより、健康を維持・増進し、発がん、老化、遺伝毒性等を予防しているといえる。今後、さらに既知の成分はもとより未知の成分の生理機能が解明されるものと期待される。

### 文 献

- 1) Shinohara, K. et al. (1986) *Agric. Biol. Chem.* 50 : 2225-2230
- 2) Shinohara, K. et al. (1988) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 24 : 1057-1060
- 3) Kong, Z-L. et al. (1990) *Agric. Biol. Chem.* 54 : 2029-2037
- 4) Kong, Z-L. et al. (1990) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 26 : 949-954

#### 国内情報

## 組換えウイルスの感染を利用した カイコによるタンパク質の生産

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所 細胞工学研究室

小林 淳

人類は、カイコが生産するタンパク質性繊維の絹糸を古くから利用してきた。また、その間カイコは、多量かつ良質な絹糸を作りだすタンパク質生産生物へと品種改良されてきた。ところが近年、昆虫病原ウイルスの一つであるバキュロウイルスを外来遺伝子発現のためのベクターとして利用する技術が確立され、さらに、組換えウイルスを昆虫に感染させることが可能になったことから、カイコを絹糸以外のタンパク質生産に利用する道が開かれた。

本稿では、最近、蚕糸・昆虫研において作出されたカイコ核多角体病ウイルスベクター系での実例をまじえながら、バキュロウイル

スベクターの概要及びカイコ幼虫を利用したタンパク質生産について述べ、最後に、今後の課題について若干触れることにする。

### 1. バキュロウイルスベクター系

バキュロウイルスは、節足動物、特に昆虫に特異的に感染するウイルスである。ベクターとして利用されているのは、このウイルスのサブグループの一つ、核多角体病ウイルス(Nuclear Polyhedrosis Virus; NPV)である。NPVのゲノムは2本鎖の環状DNA(約130kb)であり、ウイルス粒子は棒状でエンベロープに包まれている。

NPVの最大の特徴は、感染細胞の核内に多角体と呼ばれるタンパク質の結晶を形成す

KOBAYASHI Jun

ることである。多角体は多数のウイルス粒子を包埋しており、そのため、このようなウイルス粒子は、野外において紫外線などの不活化要因にさらされず、長期間活性を保つことができる。多角体は、主にポリヘドリンと呼ばれるタンパク質から構成されており、感染後期には、細胞の全タンパク質の20~30%がポリヘドリンで占められる。

NPVが、ウイルスの増殖には直接関係の無いポリヘドリンタンパク質を多量に生産することから、ポリヘドリンをコードする遺伝子のプロモーターに外来遺伝子を繋げば、外来遺伝子産物が多量に得られるであろうことは容易に想像される。このような発想のもとに開発されたのが、バキュロウイルスベクターである。

テキサスA&M大学のSmithらは、1983年に *Autographa californica* という蛾のNPV (AcNPV) を組換えて、ヒトの $\beta$ -インターフェロンを昆虫培養細胞で発現させることに成功した。その後、数多くの外来遺伝子がバキュロウイルスベクターを用いて作られており、また、ベクター自体にもさまざまな改良が加えられてきている。しかしながら、組換えウイルスを得るために用いられる基本的な手法は、Smithら以来現在に至るまで、ほとんど変わっていない。

すなわち、100kb以上もあるNPVのDNAの適当な位置に外来遺伝子を直接組込むことは不可能なので、まず、外来遺伝子を大腸菌のプラスミドとウイルスDNAの断片から作られたトランスファーベクターに組込み、次に、このトランスファーベクターとウイルスDNAを、昆虫培養細胞に同時に導入 (co-transfection) し、両者の間で相同的組換え (homologous recombination) を行わせ、最後に、昆虫培養細胞を用いたブランク純化法あるいは限界希釈法などにより、外来遺伝子の組込まれた組換えウイルスを単離するのである。

バキュロウイルスベクター系の最大の特徴は、真核生物のベクター系としては最も効率良く、しかも、本来有していた生物学的活性を保った形で外来遺伝子産物が得られること

である。これに対し、優れた発現効率を示す大腸菌の発現系では、多くの場合遺伝子産物が不溶化し、生物学的活性が認められない。なぜならば、原核生物である大腸菌では、多くの真核生物のタンパク質の機能獲得に必要な翻訳後の修飾 (リン酸化、糖鎖の付加、切断等) などが十分に行われないからである。

バキュロウイルスベクター系のこのような特徴は、この発現系が、基礎生物学の分野において極めて有用であり、また、医薬などの応用生物学の分野においても、大きく貢献できる可能性を示すものである。

## 2. カイコ幼虫を用いたタンパク質生産

カイコにおける最初のバキュロウイルスベクター系は、1984年に鳥取大学の前田ら (現カリフォルニア大学デービス校) によって作出された。前田らは、ヒトの $\alpha$ -インターフェロンをカイコ由来の培養細胞のみならずカイコ幼虫で発現させることに成功した。しかも、インターフェロンの濃度は、培養液中より体液中の方が高かった。同じ系で作られたインターロイキン-3でも、カイコの体液中における濃度は培養液中の濃度をはるかに上回った。

蚕糸・昆虫研でも、最近、カイコのバキュロウイルスベクター系を独自に作出した。このベクター系は、カイコ胚子由来の付着性培養細胞株 NISES-BoMo-15AIIc、カイコ核多角体病ウイルスの野生株 BmNPV-P6E 及び4種類のトランスファーベクター pBm 1~4 (pBm 1~3はポリヘドリンとの融合タンパク質発現用、pBm 4は非融合型外来遺伝子発現用) からなる。

このベクター系を用いて、1991年にサントリー株式会社の協力により、酵素活性を有するアフリカツメガエルの $\alpha$ -アミド化酵素 (AE-II) を発現させることに成功した。 $\alpha$ -アミド化酵素は、生理活性ペプチドのC末端のアミド化反応を触媒することにより、ペプチドを活性化する酵素である。AE-II 遺伝子産物は、N末端に分泌シグナルを持ち、C末端近傍に膜結合領域を有する。そして、それ



らの間に $\alpha$ -アミド化反応を触媒する二つの酵素活性領域がある。今回の発現には、発現産物の検出や精製を容易にするため、膜結合領域以降のC末端をコードするDNAを取り除いた変異型AE-II遺伝子を用いた。

この変異型AE-II遺伝子を、非融合型トランスファクターpBm4に組み込み、組換えウイルスBm4AE-IIを得、さらに、この組換えウイルスを、BoMo-15AIIc細胞とカイコ幼虫の両方に感染させてAE-IIの発現をみた。その結果、予想通り培養細胞では培養液中に、カイコ幼虫では体液中、それぞれAE-II遺伝子産物の存在が確認された。発現量は、培養細胞では感染後5日目に250ng/ml培養液のピークを示したのに対し、幼虫では感染後4日目に40 $\mu$ g/ml体液中に達した。したがって、カイコ幼虫におけるAE-II遺伝子の発現効率は、培養細胞より100倍以上も高く、前田らのベクター系における結果同様、カイコ幼虫を用いたタンパク質生産の有効性が証明された。また、カイコ幼虫で作られたAE-II遺伝子産物には正常な酵素活性が認められた。

### 3. 今後の課題など

カイコは、極めて家畜化の進んだ昆虫であり、おとなしく、逃げだすこともない。日本をはじめとする養蚕の伝統をもつ国では、カイコを屋内で大量かつ効率的に飼育する技術が確立しており、したがって、繭を生産するための養蚕技術を、組換えウイルスによるタンパク質の大量生産のために転用することは、比較的容易である。現在、昆虫培養細胞の効率的な高密度大量培養技術の確立（低コスト培養の開発を含む）が試みられているが、まだカイコにとって代われるほどの実用性の高いシステムはできていない。

とはいえ、カイコ幼虫を用いたバキュロウイルスベクター系によるタンパク質生産システムには、多くの改良すべき点が残されている。特に、組換えウイルスの感染と発現した外来遺伝子産物の回収・精製には、多くの労力が必要とされるため、簡便化のための何ら

かの改善策が必要とされる。

最近、一定時間冷蔵した幼虫にウイルス液を塗布した人工飼料を食べさせることにより、多角体に包埋されていない組換えウイルスを高い頻度で感染させられることが証明された。したがって、この接種法は、現在行われているカイコ一匹ずつへの注射に比べれば、大量の幼虫に同時に感染させる手法として有望である。その他、ポリヘドリン遺伝子ではなく、p10遺伝子（ポリヘドリン遺伝子同様、大量に発現するNPVの遺伝子）などのプロモーターを外来遺伝子発現のために用いれば、多角体に包埋された組換えウイルスが得られるので、この多角体をカイコ幼虫に食べさせることにより感染させることも可能であろう。

一方、発現産物の回収・精製に関しては、体液中に分泌されたもののほうが、細胞内あるいは細胞膜中に局在するものよりも、比較的少ないステップで精製できるはずである。したがって、分泌シグナルを持つベクターを作成すれば、外来遺伝子は $\alpha$ -アミド化酵素などのようにカイコ体液中に分泌されてくることが期待される。現在、蚕糸・昆虫研では、このようないわゆる「分泌型ベクター」の作成が試みられている。他にも、まだまだ、精製の効率化のための改良法が考えられるが、紙面の都合上省略する。

最後に、ベクター自体の改良もさることながら、ベクター系に適したカイコの品種改良（ウイルス感受性や低コスト飼料適合性など）も今後の重要な課題の一つであることを指摘して本稿を締めくくりたい。

### 文 献

- 1) 井上元ら(1990) 蚕糸昆虫研報告 1: 13-25
- 2) Kobayashi, J. et al. in preparation
- 3) Luckow, V.A. and M.D. Summers (1988) *Biotechnology* 6: 47-55
- 4) Maeda, S. (1989) In *Invertebrate Cell System Applications* (J. Mitsuhashi, ed.), pp. 167-181, CRC Press, Boca Raton, FL.
- 5) Maeda, S. (1989) *Ann. Rev. Entomol.* 34: 351-372
- 6) Miller, L.K. (1988) *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 177-199

国内情報

# マイコプラズマ様微生物検出法の開発

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所 生体情報部

河部 暹・川北 弘

## 1. はじめに

マイコプラズマ様微生物(MLO, Mycoplasma-like organism)は、1967年に日本の土居らが初めて発見した<sup>1)</sup>。以来これに関する研究が世界中で活発に行われ、現在では200種以上の植物の病気の原因となることが知られる重要な微生物群である。しかし、今もってその正体には謎が多い<sup>2)</sup>。これはMLOがウイルス並みに小さく電子顕微鏡でしか観察できないこと、人工培養できず細菌学的研究の道が閉ざされていること、単離・精製できないことなどによる。

著者らは罹病植物組織の電顕写真を見ると師管内に高密度でMLO粒子が存在することに着目し、罹病植物の師管液を採取してMLO研究の突破口になる高濃度MLO含有液を得ようとして一連の研究を開始した。これまでの研究から、師管液は細胞等の粒状物もしくは固形物をほとんど含まない、無色・透明で栄養成分に富む、言わば天然の培養液であることが分っており、採集した師管液が高濃度にMLOを含有するなら、MLOの特性解明や抗体生産に有用な材料となると考えたからである。

研究を開始して見ると、微量の師管液中のMLOの検出に手間取り、また後述の「スタイルクトミーによる師管液採取」に使用したレーザー発振装置が本来の用途と違うものであったことなどにより予想外の苦労した。しかし、どうやら所期の成果を挙げることができたので<sup>3)</sup>、以下概要を報告する。

## 2. 罹病及び健全植物からの師管液採取

この研究はイネの黄萎病MLOを対象に実施した。師管液採取には移植後約2カ月のイネを用いた。罹病イネは、栃木県病害虫防除所の福田充氏より供与された黄萎病罹病イネ上で吸汁・発育させた保毒ツマグロコバイにより幼苗時に感染させたイネの中から、病徴が明瞭に現れたものを選んで使用した。

師管液の採取にはトビイロウンカの口針を利用した。トビイロウンカは好んで口針をイネ葉鞘部組織に刺入し先端を師管に到達させ、師管液を吸汁するので、この時にレーザー光線を発射して口針を切断する。いわば微細な管である口針先端部が師管まで突き刺さった状態で残れば、切り口から師管内の高圧(約10気圧)により師管液が溢出してくるので、これを毛細管により採取する(表紙写真)。レーザー光線の使用は敏捷な昆虫が驚いて口針を抜く間を与えず瞬間的に的確に切断するためである。図1はレーザー光線による口針切断法を示す。このような昆虫口針(stylect)の利用による師管液採取法をスタイルクトミー(stylelectomy)と呼び、色々な植物の師管液採取を可能とする唯一の方法となっている<sup>4)</sup>。

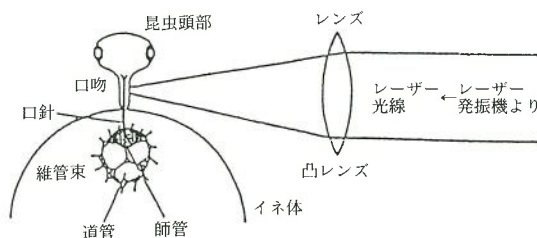


図1 植物の師管液を採取するため、昆虫の口針をレーザー光線で切断する方法

口吻は半透明でありレーザー光線を吸収せず、濃く着色した口針だけがエネルギーを吸収して焼き切れる。

KAWABE Susumu, KAWAKITA Hiroshi

MLOの媒介者であるツマグロヨコバイを用いない理由は、形態上の違いから、ヨコバイの口針は、切断すると内部液圧により押し出されてしまい、師管液流出に至らないからである<sup>4)</sup>。口針には現在使用中のNEC製YAG(イットリウム・アルミニウム・ガーネット)レーザー発振機(SL129Nd)による昆虫口針切断装置の写真を載せたが、本研究の実施時にはこれは未購入で、農業生物資源研究所の大野清春室長より色素レーザー発振装置を借用した(色素液には $1 \times 10^{-4}$ Mローダミン640のエタノール溶液を用い波長643nmのレーザーを発振)。この装置ではレーザービームの絞り込みや口物の適切な箇所にビームを当てるための照準装置は、有り合わせの長焦点距離凸レンズや単眼の携帯顕微鏡を利用して組み立てたものであった。出力エネルギーが小さく、室温が高まる度に色素液温度も上昇しエネルギーが低下し切断できなくなり、頻繁に照準装置を調整しなければならないなどの難点があった。

1切断口針から採取できる師管液の量は0~数十 $\mu$ lである。罹病イネはMLO病の特徴である萎黄叢生症状によりイネ体が貧弱になり、一般に健全イネより切断口針からの師管液流出率が低く、流出しても採取量が少ない。

### 3. 師管液中のMLOの検出

スタイレクトミーにより得られる師管液は通常は数 $\mu$ lと微量であるため、含有されるMLOを検出する方法が問題である。一般にMLOの存在確認は電顕観察がベストであるが、これが難しかった。何度も、バッファ液や固定液の組成を変えて、病イネの師管液を寒天で固めて固定・包埋と切片作成を繰り返し、健全イネのものと比較しながら電顕観察を試みたが、いっこうにMLO粒子が見えなかった。一時は、師管に昆虫が刺入した口針を切断する師管液採取法では何らかの固形物濾過機構が働いてMLO粒子は採取できないのかも知れないと研究をあきらめかけたほどである。

しかし、新たに研究グループに加わった若手研究者且原真木(科学技術庁特別研究員)及び中島一雄(熱帯農業研究センター、基盤技術研究部)の両君からDNA結合蛍光色素DAPI(4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール)染色による蛍光顕鏡観察に関する情報もたらされ<sup>5)</sup>、研究は一挙に進展した。ここでも試行錯誤はあったが、微量(約0.1~0.5 $\mu$ l)の師管液をスライドガラス上に滴下し、滲透圧を師管液と同程度に調整したDAPI溶液を同量混入してカバーガラスで覆い、マニキュア液を周囲に塗り封入し、30分ほど放置してから蛍光顕微鏡で観察した。蛍光顕微鏡(ニコン製マイクロフォトFXA)は当所発生分化研究室(木口憲爾室長)より借用し、観察法について同研究室の若原真路子氏の指導を受けた。

蛍光顕微鏡で観察すると、健全イネの師管液でも若干の不定型の発色の弱い蛍光物が見られたが、病イネの師管液では無数の粒子が夜空に輝く星のように鮮やかに輝き、両イネ間の差異は明瞭であった。この球あるいは楕円形の発色体は径0.5 $\mu$ mないしそれ以下であり、ブラウン運動を示した。表紙にこの発色粒子の蛍光顕微鏡写真を掲げた。

### 4. 電顕観察によるMLOの確認

病イネ師管液のみがDNAを含む粒子を高濃度で含むことが確認されたので、改めてこの粒子を電顕で観察する作業を進めた。高張・高濃度のグルタルアルデヒド固定液で仮固定した後、寒天で固めて固定・包埋し超薄切片を作り電顕観察した像を表紙に、罹病イネ師管中のMLOの像を図2に示した。

病イネ組織切片の師管中と同じMLOが病イネからの採取師管液中にも認められる。なお、病イネ師管液では多くの電子密度の高いより小型の粒子が認められるが、これは固定・包埋過程で破裂したMLOの断片やDNAと考えられる。MLOを破壊しない固定・包埋法の確立が望まれる。

以上の結果から病イネからレーザー・スタイレクトミーにより採取した師管液はMLOを



高濃度で含有することが明確になったが、これは直接的には MLO の診断に利用できよう。従来の唯一の診断法、時間も手数も掛かる病イネの組織切片の電顕観察に比べれば、はるかに簡便で迅速な診断が可能になるが、高額なレーザ装置を必要とする難点がある。

## 5. おわりに

MLO の発見後四半世紀になるが、当初の活況に比べてこのところ MLO 研究は低調であった。人工培養と純化の困難が研究着手をためらわせたのである。しかし、今回の成果は微量ではあるが無色透明で夾雑物の少ない師管液に高濃度で含まれる MLO を得て研究材料とすることを可能にした。的確な診断に役立つ抗体の作成、さらには人工培養法の開発等に進展し、MLO 研究に新たな展望が開けるものと期待している。

なお、筆者らは蚕糸・昆虫農業技術研究所に所属し、本課題は昆虫機能研究の一環として実施してきた。昆虫機能研究は、新しい病害虫防除技術や有用物質生産技術を開発し、21世紀の農業や生物産業に寄与することを目指すものである。しかし、多様で特異な発達を遂げた昆虫機能を解明する基礎研究の発展は直接的な実用技術開発だけでなく、これにより得られる知見が、他分野の研究や技術開発にブレークスルーをもたらすという意義も重視したい。

本研究は、昆虫の媒介機能研究の成果を植



図2 黄萎病罹病イネ組織切片の師管中のMLO

物病理研究に結び付け、MLO 研究の壁に突破口を開こうとするものである。上述の昆虫機能研究の意義を実証するささやかな例として、この研究の一層の進展に努めたいと思う。

本研究の推進にご助力頂いた方々、特に終始激励と有益なご助言を頂いた熱帯農業センターの村上伸夫基盤技術研究部長に心からお礼を申し上げる。

## 文 献

- 1) 土居養二(1967)日植病報 33: 259-266
- 2) 後藤正夫(1981)新植物細菌病学, ソフトサイエンス社, 133-148
- 3) Kawabe, S. et al.(1991) *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 57: 274-277
- 4) Kawabe, S. et al.(1980) *Plant Cell Physiol.* 21: 1319-1327
- 5) Russel, W. C. et al.(1975) *Nature* 253: 461-462

出資プロジェクト情報

## 各種芝草におけるプロトプラストからの 植物体再生

ジャパン・ターフグラス

大川原良次・猪熊千恵・杉浦清之・金子誠二

### はじめに

単子葉植物の形質転換体を効率的に得る方法としては、目的とする植物のプロトプラストを単離して、導入する遺伝子をポリエチレングリコール (PEG) または、電圧ポレーションにより、直接とりこませる方法が行われてきた。この場合、植物体を効率良く再分化することが可能な培養系を確立することが不可欠であり、逆にいえば、このような培養系に限られた植物種でしか確立されていないことが形質転換体作出の妨げになってきたと思われる。

近年、胚や花粉管を通じての遺伝子導入やパーティクルガンを用いるなど、プロトプラストを用いることなく遺伝子導入を行うことが可能であるとの実験例もトウモロコシ、イネなどで報告されてきている。しかしながらこれらの手法はいまだ開発段階にあり、実験的に再現性が得られなかったり、目的とする遺伝子が、植物体内で局在化する可能性があるなどの問題点があり、いまだ安定した技術としては確立されていない<sup>1)</sup>。

したがって、植物体を効率良く再分化できるプロトプラストを安定して供給できる培養系を確立することが、PEG または電圧ポレーションを用いて、遺伝子を導入して安定した形質転換体を得るために必要である。

芝草では、今まで *Lolium* 属、*Poa* 属、*Agrostis* 属などの、牧草として使用されている草種のみが研究の対象とされてきた。プロトプラストからの植物体の再分化に関しては、

OKAWARA Ryoji, INOKUMA Chie, SUGIURA  
Kiyoyuki, KANEKO Seiji

ケンタッキーブルーグラス (*Poa pratensis*<sup>2)</sup>), ペレニアルライグラス (*Lolium perenne*<sup>3, 4)</sup>), トールフェスク (*Festuca arundinacea*<sup>3)</sup>), レッドトップ (*Agrostis alba*<sup>5)</sup>) などの草種での成功例が近年報告されている。

ジャパン・ターフグラスでは、エバーグリーン<sup>®</sup>の芝草を作出することを目的としている。その一環として、C<sub>4</sub> 植物で暖地型の芝草であるノシバ (*Zoysia japonica*) と C<sub>3</sub> 植物で寒地型の芝草であるクリーピングベントグラス (*Agrostis stolonifera*) を対象に、プロトプラストからの再分化に関する研究を行い、これに成功したのでその概要を以下に報告する。

### ノシバプロトプラストからの植物体の再分化<sup>6)</sup>

市販のノシバ種子を表面滅菌後、5mg/l の 2, 4-D を含む LS 培地 (しよ糖 30g/D) 上で培養 (28°C, 暗所) することにより、MS または N 6 培地と比較して、7 倍近い効率で、embryogenic callus (Eカルス) を誘導することができた。

このようにして形成された Eカルスを 2, 4-D 3mg/l とアミノ酸 (L-グルタミン 876mg/l, L-アスパラギン酸 266mg/l, L-アルギニン 174mg/l, グリシン 7.5mg/D), しよ糖 20g/l, ソルビトール 30g/l を含む N 6 培地で振盪培養 (120rpm, 28°C) することにより、再分化能があり、同時にプロトプラストの単離にも適した比較的細かい細胞塊からなるサスペンション培養が得られた。細かい細胞塊を得るために、定期的に 1 mm メッシュで“うらごし”した。

これらのサスペンション培養のうち Z2a からは、安定して  $3 \times 10^7$ /g.FW. 程度のプロトプラストが単離された。使用した酵素液は 2%セルラーゼオノズカ RS, 2%マセロザイム R-10, 0.1%ペクトリアーゼ Y-23, 0.5M マンニトール, 3mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.7mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 3mM MES, (pH 5.6) からなり, 28°C, 40rpm で 4 時間処理することによりプロトプラストを単離した。

プロトプラストの培養には K8p 培地を用い, さらに培養 3 週間後に 2, 4-D 1mg/l しょう糖 60g/l の MS 培地で培養を続け, 最終的に MS 培地で植物体の再分化がみられた (口絵 1~4)。

#### ベントグラスプロトプラストからの植物体の再分化<sup>7)</sup>

市販のベントグラス種子 (ペックロス) を表面滅菌後, 5 mg/l の 2, 4-D を含む MS 培地で培養 (25°C, 暗所) して, 形成された embryogenic callus (E カルス) を 2, 4-D 2 mg/l とアミノ酸 (L-グルタミン 876mg/l, L-アスパラギン酸 266mg/l, L-アルギニン 174mg/l, グリシン 7.5mg/l, プロリン 1151 mg/l), しょう糖 30g/l, ソルビトール 30g/l を含む N 6 培地<sup>7)</sup> で定期的に 1 mm メッシュで “うらごし” を繰り返しながら培養 (120 rpm, 25°C) することにより, ノシバの場合と同様に, プロトプラストの単離に適したサスペンション培養を得ることができた。

このようにして誘導されたサスペンション培養のうち, PC1 からは, 安定して  $1 \times 10^7$ /g.FW. 程度のプロトプラストが単離された。使用した酵素液は, 3%セルラーゼオノズカ RS, 1%ドリセラゼ, 2%マセロザイム R-10, 0.1%ペクトリアーゼ Y-23, 0.5M マンニトール, 7mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.7mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 7mM MES (pH 5.6) からなり, 28°C, 40rpm で 3 時間処理することによりプロトプラストを単離した。

プロトプラストの培養には, K8p 培地 (110 g/l グルコースを含む) を用い, 3 週間後に, サスペンション培養に用いた N 6 培地に移し

て再懸濁し, 最終的に MS 培地に置床することにより, 植物体の再分化がみられた。

#### おわりに

以上, 芝草におけるプロトプラスト培養の概要をまとめてみた。現在これらの培養系を用いて, 形質転換体の作出と細胞融合などの実験を試みている。

ノシバに関しては, 今後各地より収集した優良な自生系統から同様の培養系を確立するとともに, 細胞融合による *Zoysia* 属の種間雑種の作出などにより, 冬期間の芝草としての品質を向上することが可能になるとも考えられる。

形質転換技術の利用については, 冬期間の休眠, 耐寒性といったノシバにとって重要な形質の生理機構が十分に明らかにされているとはいえ, 今後の研究の進展をまって考えていきたい。また, 病害虫耐性の付与もターゲットの一つとなりうるが, クリーピングベントグラスほどの重要性はないと考えている。

クリーピングベントグラスは, ゴルフ場などで広く用いられている寒地型の芝草であり, 日本の高温多湿な環境条件では病害虫が多発するため, 年間を通じて健全な草地を維持することが困難である。したがって, 形質転換により病害虫耐性を付与することができれば, ジャパン・ターフグラスが目的とするエバーグリーンの芝草を作り出すことに一歩近付くことができると考えている。

#### 文 献

- 1) Potrykus, I. (1990) *Bio/Technology*, 8 : 535-542
- 2) Van der Valk, P. et al (1988) *Euphytica*, Sup.: 169-176
- 3) Dalton, S. J. (1988) *J. Plant Physiol.* 132 : 170-175
- 4) Creemers-Molenaar, J. et al. (1989) *Plant Science*, 63 : 167-176
- 5) Asano, Y. and Sugiura K. (1990) *Plant Science*, 72 : 267-273
- 6) 猪熊千恵ら (1991) 育種学雑誌 41 別冊 1 : 60-61
- 7) 杉浦清之ら (1991) 芝草学会春期大会講演要旨集 : 71-72



地域の先端研究

## ポリエチレン袋を用いた組織培養 によるツクネイモの大量増殖

愛媛県農業試験場

松本英紀

### はじめに

愛媛県の宇摩地方に栽培されているヤマノイモは、ヤマトイモ群に属するツクネイモが中心であり、品質が良くて好評であるが、種芋に関する問題が多い。

その一つは、生産費に占める種芋代の割合が極めて高いことである。そのため、自家採種される場合が多いが、種芋として必要な量は生産量の30%にも達すると言われている。

二つ目は、種芋のウイルス病汚染である。愛媛県で栽培されているツクネイモのほとんどにモザイク症状がみられ、他県でもウイルス病による被害が問題になっている。その対策として、無病株の選抜や茎頂培養によるウイルスフリー株の作出が試みられているが、従来の増殖法によると、農家配布までに長年月を要し、その間にウイルス病再汚染の恐れがある。

以上の問題を解決するために、優良系統やウイルスフリー株を急速に大量増殖する必要があり、その方法として組織培養が試みられている。著者もツクネイモの増殖法を検討し、その過程で、肥大した葉に球状体が形成されることを観察した。この球状体は容易に発芽・発根し、節に形成されるむかごと同様な機能を有していることから「むかご様体」と呼称し、大量増殖に用いることとした。

この技術を使用するのは市町村又は農協と考えられるが、これらの多くは高度な技術と規模の大きな施設を持たない。実用化するためには、容易な技術であることと種芋の生産

費が安くなければならない。この培養法の容易さには問題ないが、培養期間が長く、その間の移植回数が多いことは生産費を高くする。そこで袋培養について検討した結果、各種のプラスチック製袋が滅菌しないで使用でき、チャック付きの袋で連続して培養できることが明らかになった。この培養法により、器具及び労働に要する費用の節減、培養室の有効利用が可能と考えられたので、むかご様体による増殖とともにその概要を述べる。

### 1. むかご様体による大量増殖法

本法は、シュートの増殖、葉の肥大、むかご様体の形成、幼植物の育成、順化育苗又はむかごと及び小塊茎の作成からなっている。ツクネイモはシュートから直接発根しないために順化が困難なので、節にむかごを形成させて発根させるのが一般的である。本法の特徴は、葉にむかご様体を形成させ、多数の幼植物を育成して順化することであり、そのための培養はすべて液体培地を用いた静置培養である。

シュートの増殖は、しよ糖 20g, BA 0.2~0.02mg 加用 2/3MS 培地で行ない、このシュートを、しよ糖 30g, BA 0.5~1.0mg 加用 2/3MS 培地に浸漬して葉を肥大させた。

表1 むかご様体形成に及ぼすNAA, BAの影響

NAA (mg/l)	BA (mg/l)		
	0.5	1.0	2.0
0	9.7	34.7	54.5
0.5	12.6	36.4	25.3
1.0	7.2	11.3	6.3
2.0	0	16.8	14.7

(注) 表中の数字は形成度

MATSUMOTO Hideki

肥大した葉をしよ糖 50g, BA 2.0mg 加用 3/2MS (1/2N) 培地に移植すると、葉の表裏全面にむかご様体が形成された(表1)。そのまま放置しておけば発芽・発根して幼植物になるが、培養期間が長くなるために枯死するものが多くなった。そこで、しよ糖 20g, BA 0.2mg, NAA 0.02mg 加用 2/3MS 培地に移植すると順化可能な幼植物に生育した(口絵)。

この幼植物の集塊を、パーミキュライトを詰めたポットに移植し、ポリ袋で覆って順化、そのまま育苗すると一枚の葉から30~50本の苗の育成が可能であった。

また、発芽・発根したむかご様体を、しよ糖50~70g加用MS培地に移植すると、むかご及び小塊茎の形成も認められた。苗の育成は一時期に集中しなければならないが、むかご及び小塊茎は容易に貯蔵できるので一年中作成できる。労力、施設が有効に利用できるので、このほうが有利と考えられた。

## 2. ポリ袋を用いた組織培養

シュートの増殖におけるポリ袋(170×240×0.04mm)の利用については、容器が安く使い捨てであるなどの利点があり、しかも培養ビンと比較してツクネイモの生育に差はなかった。

葉の肥大から順化までの培養は、チャック付きの袋で、植え換えることなく連続して行った。すなわち、袋にシュート2~3本と肥大化培地 50mlを入れ、約20日後にむかご様体誘導培地になるように、しよ糖 70g, BA 2.0~3.0mg 加用 2.3倍 MS 培地 50mlを追加した。2~3カ月後にはむかご様体が形成され発芽・発根してきた。この時期に 2/3MS 培地 100mlを追加して幼植物を育成した(口絵)。

順化は袋を開いて隅を切り取り、しよ糖の入った培地を除去、水を張ったバットの上に

置き、底面給水によって行った。さらに、順化後の袋にパーミキュライトを入れ、袋をポット代わりにして育苗も可能であったが、過湿による腐敗が多かった。

袋の中でむかごや小塊茎を作る場合は、むかご様体が発芽・発根してから、しよ糖50~70ml加用 1/2MS 培地 100mlを追加した。むかごや小塊茎の作成までには長い期間を必要とするので、袋は培養室から出して実験室の窓際に置いた。温度変化の著しい所に置いても雑菌による汚染が多くなることはなかった。

## おわりに

本法によるむかご様体の形成は比較的容易である。もし、形成に失敗したとしてもシュートが伸びてくるので、その節にむかごを形成させれば無駄にはならない。培養コストの低減については、ポリ袋を用いることにより可能であり、改良点はあるが実用性はあるものと考えられる。

袋培養試験の過程では、種々の袋について滅菌法を検討したが、あるときプラスチック製の袋が極めてクリーンであることに気が付いた。滅菌しないで使用できると、作業上の利点が多い。培養容器と共に滅菌するのに比べ、液体培地だけの場合一度に多量できる。

袋は安く、破損することもなく容易に使用できる。形が変わるために植物の大きさに応じたスペースで培養できる。最も大きな利点は、連続培養が可能なことである。特別な器具も必要とせず、現場の小規模な組織培養に適するものと考えられる。

欠点もある。困ったのは袋に小さな穴が生じたときである。こぼれた培地にかびが生えたことが何度かあった。完全に無菌とも言えないので、滅菌した培養用の袋の製造が望まれる。

## 文献情報

## 作物害虫の 新防除法出現か？

昆虫のみを宿主とする核多角体病ウイルス (Nuclear polyhedrosis virus: NPV) はバキュロウイルス (Baculoviridae) の一種である。このウイルスはほとんどの昆虫から分離されており、古くから農林業害虫の重要な天敵生物として研究されている。現在アメリカではタバコガの一種である *Heliothis zea* の NPV が生物農薬として市販されている。しかし自然界の NPV は、感染してから昆虫を死に致らしめるまで一定の潜伏期間を必要とする。その間に感染した昆虫が農作物に被害を与えるという問題が依然として残っていた。しかし、この問題を最近の遺伝子工学の進歩により解決できる見通しが得られた。バキュロウイルスは昆虫に感染すると、昆虫細胞の核内で結晶を作るほど多量の多角体タンパクを合成する。バキュロウイルスのこの極めて強力なプロモーターを利用したウイルス発現ベクターはすでに開発されており、外来遺伝子の発現と有用タンパク質の生産に利用されている。このウイルス発現ベクターに昆虫に対する速効性毒素タンパク質の遺伝子を導入した組換えウイルスを昆虫に感染させ、ウイルスの感染に伴う毒素タンパク質の発現により、昆虫を即死させることが最近報告された。

アメリカジョージア大学の M.D. Tomalski と L.K. Miller らは、シラミダニの一種である *Pyemotes tritici* の毒素タンパク質 (Tox 34) をコードする遺伝子をクローニングし、その cDNA をバキュロウイルス発現ベクターに導入した組換えウイルス vEV-Tox34 を作成した。このウイルスを昆虫の培養細胞に接種したところ、接種後36時間を経過した培養細胞の培養液と細胞の抽出液から、毒素タンパク質の抗体と反応するペプチドが検出された。彼らはこのペプチドの生物活性を調べるため、5  $\mu$ l の組換えウイルス感染細胞の培

養液を *Galleria mellonella* の5齢幼虫に注射して、野生型ウイルス感染細胞の培養液を注射した虫と比較した。その結果、野生型ウイルスを注射した虫は典型的な NPV の症状を示したのに対して、組換えウイルス感染細胞の培養液を注射した虫は NPV の症状を示さず、精製毒素タンパク質を接種した虫と同じように、けいれん症状を起こして死亡した。彼らはさらに、多角体を形成する組換えウイルスを作成した。若齢幼虫に対して低濃度の多角体を経口接種すると、接種虫がけいれんを起こし、野生型のウイルスを接種した虫より早く死亡した。

一方、NERC Institute of Virology and Environmental Microbiology (イギリス) の L.M.D. Stewart らも同じ実験を試みた。彼らはサソリ (*Androctonus australis*) が持つ昆虫神経毒素である AaHIT をコードする遺伝子を *Autographa californica* NPV の p10 プロモーターにつなぎ、多角体を形成する組換えウイルス AcST-3 を作成した。それを培養細胞に接種して、培養液から HPLC により AaHIT を精製した。それを *Musca domestica* の蛾に、1頭当たり5ng ずつ接種したところ、50%の接種虫が接種後3時間以内にけいれんを起こし、24時間後に死亡した。組換えウイルスの多角体を *Trichoplusia ni* の3齢幼虫に接種した結果、これらの虫は野生型のウイルスを接種した虫と異なる病徴を示した。3齢の *T. ni* 幼虫に一定濃度の組換えウイルスの多角体を接種した後、キャベツを用いて飼育をしたところ、組換えウイルスを接種した虫では野生型のウイルスを接種した虫よりキャベツの摂食量のはるかに低いことがわかった。

これらの研究結果は、いわば NPV の感染特異性や継代性などを用いて、特定の害虫のみを持続的に防除する試みであり、今後のバイオコントロールに新しい道を開くものである。

(抄訳 朱亜峰——植工研)

ZHU Yafeng

**Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene**



Tomalski, M.D. and L.K. Miller  
*Nature* 352 : 82, 4 July, 1991

Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific-toxin gene

Stewart, L.M.D. et al.  
*Nature* 352 : 82, 4 July, 1991

文献情報

Genome scanning

ある特定の遺伝子を同定するためには、通常、まずその遺伝子のローカスの極近傍にある分子マーカーを同定し、それを手がかりとして chromosome walking 等を行うという戦略をとる。しかし、本論文では上記の手順を全く踏まずに直接目的の遺伝子を捕まえることに成功した。その方法は DNA fingerprinting assay に類似した方法で、ゲノム中に散在する繰り返し配列をプローブとして高解像度のサザンブロットを行うというもので、Brilliant et al. は genome scanning と名付けている。DNA fingerprinting assay で用いられるプローブが通常ゲノム当たり60コピー程度であるのに対し、genome scanning で用いるプローブは1000コピー程度と高頻度に存在する配列を用いる点の特徴である。

マウスの pink-eyed unstable mutation,  $p^{un}$  は、目および皮膚の色素が薄くなるという突然変異であり、野生型への復帰個体がでやすい不安定な突然変異として知られている。 $p^{un}$  は  $p$  locus の他の突然変異に比べ  $10^3 \sim 10^5$  も野生型へ復帰しやすいのであるが、その理由はわかっていない。本論文はその理由を明らかにする目的でマウスの近交系で、同質遺伝子系統を用いて行われた。同質遺伝子系統を用いれば、 $p^{un}$  ホモ個体と野生型個体の DNA の差は  $p^{un}$  突然変異かあるいは性に関係した差だけになるはずであるとの仮説に基づいたものである。

$p^{un}$  ホモの雌雄個体、野生型の雌雄個体、 $p^{un}$  ホモ個体から野生型に復帰した雌雄個体を材料として、*Apa*I で切断した DNA を 60 cm という長いゲル（陰極端のゲルの厚さを 5 mm, 陽極端のゲルの厚さを 1 cm としたくさび型のゲルを使用した）で泳動し、ハプロイドケノム当たり 1000~2000 コピー散在していることが知られているレトロウィルス様の intracisternal A particles (IAP) をコードする sequence family の 1 kb の断片をプローブとして、サザンブロットを行った。その結果、個体間で明らかに異なる五つのフラグメントが検出できた。そのうちの四つはマウスの性差に基づくものと考えられ、残る一つ、2.9kb のフラグメントは  $p^{un}$  ホモ個体でのみ強くハイブリダイズし、 $p^{un}$  突然変異に関係するものと考えられた。この 2.9kb フラグメントを P28 にクローニングし制限酵素地図を作成し、IAP sequence ではない 0.39kb の非反復配列のフラグメントを単離した(28RN)。28RN をプローブとして、13種類の制限酵素で切断した  $p^{un}$  ホモおよび野生型の DNA とサザンブロットを行ったところ、*Sst*I を用いた場合に限って、 $p^{un}$  ホモで 2 本のバンドが検出されること、その他の場合には  $p^{un}$  ホモでも野生型でも 1 本のバンドが検出されるがそのバンドの濃さは  $p^{un}$  ホモの方が 2 倍濃く検出されることがわかった。これらのことは、 $p^{un}$  ホモ個体の DNA ではこの部位が重複を起こしていることを示唆している。実際、 $p^{un}$  ホモ個体からの全ての野生型復帰個体では 1 本の *Sst*I フラグメントしか検出されず、バンドの濃さも野生型と変わりなかった。すなわち、表現型と  $p^{un}$  の重複とが密接にリンクしていることが明らかとなった。したがって、 $p^{un}$  の表現型は、dosage effect か、position effect, あるいは regulatory sequence の破壊によるものと考えられた。また、 $p^{un}$  ホモからの野生型復帰突然変異が高頻度で起ることから、この  $p^{un}$  の重複がタンデムな head-to-tail で起こっていることが示唆された。これらの点は今後、詳細な遺伝子解析により明らかにすべきであると考えられた。

Genome scanning 法は点突然変異を検出

できるかどうかは疑問であるが、重複や欠失といった突然変異を検出するには適した方法であると思われる。特に、同質遺伝子系統を用いて高解像度のサザンプロットを行えば、1コピーの差異を検出でき、分子マーカーや遺伝子産物の同定といったプロセスを全く経ずに遺伝子の同定を行える点で非常に優れていると思われる。

(抄訳 吉田薫——東大農)

YOSHIDA Kaoru

#### Direct molecular identification of the mouse pink-eyed unstable mutation by genome scanning.

Brilliant, M.H., Y. Gondo and E.M. Eicher  
*Science* 352 : 566-569 (1991)

#### 文献情報

### 外来性 *Sry* 遺伝子をもつ細胞遺伝学的な雌マウスの雄化

哺乳動物の性は、第一義的にY染色体上の精巣決定遺伝子(ヒトでは *TDF*, マウスでは *Tdy*)によって決定されることが報告されており、その機能について多くの分子遺伝学的な研究がおこなわれている。ヒトでは、Y染色体短腕先端部の偽常染色体領域(pseudo-autosomal region, 略してPAR)に隣接している35kbの領域にY染色体特異的なDNAが存在しており、*TDF*もその中に含まれている。このY染色体特異的なDNAからは、ヒトの性決定遺伝子と考えられている *SRY* (sex-determining region Y) 遺伝子がクローニングされており、それを基にしてマウスの *Sry* もクローニングされている。

本論文では、著者らの実験結果を中心としてマウスの *Sry* 遺伝子の性決定に対する関与の状態がまとめられている。

まず *Sry* 遺伝子を含むY染色体由来の14kbのDNA片をマウスの受精卵に注入して形質転換胚を作成し、それらの胚の染色体構成と

生殖腺の分化から外来性 *Sry* 遺伝子が性決定に及ぼす効果を研究している。大部分の胚はXX型の雌かXY型の雄に分化していたが、少数の胚は性染色体構成がXX型で生殖腺は精巣が分化し、PCR法によって *Sry* 遺伝子の存在も検出されている。この結果は、マウスの *Sry* 遺伝子が生殖腺原基を精巣に分化させる機能をもっており、本来XX型で雌になる胚であっても外来性の *Sry* 遺伝子の注入で性転換させられることを示している。

性転換したこれらのXX型雄マウスは、内部生殖器も外部形態も正常な雄ではあるが、精巣は正常個体の1/4~1/5と小さく、精原細胞から以降の生殖細胞の分化が認められず不妊である。これは、それらの雄と正常雌の交配実験からも確認されている。*Sry* 遺伝子は、生殖腺を精巣に分化させることを決定するが、生殖細胞の分化はさらに別な要因によるものと考えられる。

しかしながら、*Sry* 遺伝子をもつXX型形質転換マウスのすべてが雄に性転換しているわけではない。*Sry* 遺伝子をもちながら表現型も正常で妊性を示すXX型の雌も生じており、*Sry* 遺伝子の機能発現にはまだ問題が残されている。

ヒトの *SRY* 遺伝子とマウスの *Sry* 遺伝子は、ともに生殖腺を精巣に分化させる機能をもっているが、それらの機能の種間差については十分に明らかになっていない。そこで、ヒトのY染色体由来の *SRY* を含む25kbのDNA片をマウスの受精卵に注入し、形質転換胚の性決定へのヒトの *SRY* 遺伝子の影響が調査されている。その結果、*SRY* 遺伝子をもつXX型の胚において、生殖腺が精巣に分化している例はなく、マウスでは外来性のヒト由来 *SRY* 遺伝子による性転換は生じないことが明らかになっている。ヒトとマウスでは、両遺伝子の機能は同じであり、シーケンスにも類似性はあるが、アミノ酸残基には多少の差異が認められ、その機能にも種による差異が存在していることが明らかである。

これらの事実に基づいて著者らは「*Sry* 遺伝子が *Tdy* 遺伝子そのものである」と結論している。しかし、*Sry* 遺伝子をもつXX型

形質転換マウスがすべて雄になっていないのは何故かという問題が残されている。その理由としては、注入した外来性 *Sry* 遺伝子の発現には位置効果が重要であろうとも考えられている。いろいろな意見はあるにしても、「*Sry* 遺伝子は Y 染色体上、言い換えれば雄だけに存在し、生殖腺原基の分化を精巢に決定する引き金になる遺伝子であるが、その発現には未解決の要因が関与する」ということになるであろう。哺乳動物の性決定機構が

*Sry* 遺伝子によって片付いたわけではなく、今後に残された問題も多い。

(抄訳 村松 晋——畜試)

MURAMATSU Susumu

**Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*.**

Koopman, P., J. Gubbay, N. Vivian, P. Goodfellow and R. Lovell-Badge  
*Nature*, 351 : 117, 9 May, 1991





海外便り

## カリフォルニア大留学体験記 アフラトキシンの生成経路について

農林水産省 食品総合研究所

楠本憲一

多くの方々の御尽力により、平成元年4月から2年間カリフォルニア大学デービス校は環境毒性学部で研究生活を経験してきた。研究課題はアフラトキシン生合成に関する研究で、受け入れ先が渡航費と滞在費を全て受け持つというオールギャランティーにより生活費が保証された。実は、生まれて初めて飛行機に乗り、海外に渡ったので、成田空港では非常に緊張し、また、飛行機の中では眠れないという田舎者丸出しの様子であった。ご存知のようにアメリカの西海岸と日本とは8時間の時差があり、西海岸の玄関口であるサンフランシスコに到着した午前10時というのは、日本時間で言うと午前2時になるわけである。もうろうとしながらも、州都サクラメント行きの飛行機に乗り換えるためにでかい空港内をさまよい歩くと、折しも外は大嵐であった。その飛行機はなんと30人乗りの双発のプロペラ機で、悪天候のために2時間遅れるとのことだった。州都に行くのにこんな飛行機しかないのかと驚いたが、しかたがないのでたどたどしい英語で研究室に電話して飛行機が遅れることを伝えた。空港内のロビーで日本語をしゃべるアメリカ人がいて、寄付を呼びかけられたりしているうちに昼食時間となった。現地では現地時間に合わせた行動をするようにと聞いていたので、空港内のサンドイッチ屋でツナサンドを買ったが、そんなものがのどを通るはずもない。なにせ、機内食が10時間の間に3回も出たのだった。そんなこんなで大雨の中やっと小さな飛行機に乗り込んでかなりの低空を飛ぶこと50分、大揺れに揺れて気分が悪くなった。山脈を越え

て内陸部に入った途端に天気もよくなり、やっとサクラメント空港に到着した。ここは州都かと疑うほどに広大な畑の中の空港で、遙か遠くに雪の積もったシェラネバダの山々が見えた。この山脈には標高四千メートルを超える山もある。迎えてくれたのはジーンという40代の男性のSRA(テクニシャン)であった。彼の英語は帰る前になってやっと聞き取れるようになったのだが、ぶつぶつとつぶやくようにしゃべるのですごくわかりにくく、さっそく言語コンプレックスにかかってしまった。あとでほかのアメリカ人にも聞いてみたところ、彼らですら時として聞き返さなくてはならないほどわかりにくいということだったので、やっと安心したと言う次第である。サクラメントからデービスまでは高速道路で約30分。デービスの第一印象は、とにかく広い！土地が広いので普通の建物はほとんどが平屋建てないし二階建てだった。大学の建物でも高層ビルは少なかった。彼に一日付き合ってもらって、日常生活の必需品を買った。そうして、気の遠くなるような一日がやっと終わったのだった。

次の日、学部の事務書類にサインして、研究室に顔を出して挨拶して回り、自分の机をもらって、読むべき論文をどっさりもらった。それにしても、アメリカ人の喋る英語はなんと速いのだろう。研究室には3人の中国人がいたが、彼らは立派に討論や雑談の中に加わっているのだった。今にして思えば、外国語を操るといえるのは慣れの要素がかなり入るのだが、そのほかにもある種の才能が必要とされることを痛感した。日本に帰る間際になると、自分でも驚くほど英語の聞き取り能力があるのがわかった。しかし、相手と同じペー

KUSUMOTO Kenichi

スでしゃべろうとすると、頭の中には文面ができていのに、口がそれについて行かなかった。ある本に、日本語をしゃべるときと英語をしゃべるときとは、使う筋肉が違うということが書かれていたが、なるほどそのとおりだった。LとRは非常に頻繁に英単語中に存在しているが、それらの発音が日本語ばかりしゃべっていた人間には大変困難なのだ。大学関係の人たちは我々外国人には最初は非常に丁寧にしゃべってくれるが、一步学外に出ると容赦なしである。しかも、発音が悪いために、こちらの言うことをわかってもらうのがひと苦勞であった。言語のことについては、2年ぐらい当地で暮らしてもあまり多くの事は望めないという印象が残った。

さて、研究室の紹介が遅れてしまった。私が給料をもらっていた先生は、デニス・シェー博士（謝頭堂博士）で、もともと台湾の出身であり、マサチューセッツ工科大学で博士を取得した方である。現在は教授である。20年以上に亘ってアフラトキシンの疫学的研究と生合成の研究をされてきた。アフラトキシンはカビの仲間である *Aspergillus flavus* や *Aspergillus parasiticus* が産生し、天然物の中で最も発がん性が強い毒素であることがネズミやマスを使って明らかにされている。アメリカや東南アジアではこれらのカビが農産物を汚染し、問題になっている。人間の肝臓がんが多い地域にはアフラトキシンの汚染も多いことから、おそらく人間にとっても発がん物質ではないかといわれている。この毒素の生合成経路についてはかなりの部分が明らかになってきて、10段階以上の酵素反応によりアセチルコエンザイムとマロニルコエンザイムから合成されるのだが、そのうち三つの酵素については最近になって精製がなされた。シェー博士の研究室が10年以上前から着目していた反応はアフラトキシン生合成の中間体の一つである VHA のアセチル基を加水分解する反応を触媒するエステラーゼであった。一般に毒素や色素、抗生物質生産など二次代謝と呼ばれる経路に関わる酵素は、その活性発現が培養の後期に最大になるため、同じ時期に活性が上昇するタンパク分解酵素に

より加水分解されてしまい、極めて不安定で、精製が困難である場合が多い。ところが、この酵素に関しては、菌体を培養後期にガラスビーズで破碎して、その上澄液を基質である VHA と混合するだけで反応が起こるといって、極めて扱いやすいものだった。最初の頃は放射性同位元素で標識した基質を使用して、薄層クロマトグラフィーで反応の経過を追っていたが、最近は高速液体クロマトグラフィーに変えている。まず、私とその研究室に通い始めたときには、その酵素反応がどのようなものであるのかを確立した学生が博士を取って研究室を出ていくところであった。そのジュリーから、今までに彼女が実験に用いていたタンパク質精製用のカラムなどを引き継ぎ、その使用の仕方についてひと月ほど手ほどきを受けた。なにしろ私にとって、タンパク質は学生実験以来扱ったことのなかった代物であったので、慣れるまでにはかなり時間がかかった。周りにタンパク質の精製をやっている人がいないので、実験がうまくいかないときには遠くまで聞きに行かなければならないなど、何かと不便であった。菌体からタンパク質を抽出する方法として、従来はガラスビーズとミキサーを使用していたが、液体窒素で菌体を急速に凍結した後ブレンダーで粉碎する方法を採用したところ、初発にグラム単位のタンパク質を用いた精製ができるようになった。培養後期の菌体由来の酵素を DEAE カラム、ヒドロキシアパタイトカラム、FPLC カラム、疎水性カラムを使用して精製を進めたところ、SDS 電気泳動において 32kDa と 34kDa のタンパク質のバンドが得られた。酵素の活性がセリンエステラーゼ阻害剤である DFP により阻害されることがわかったので、放射性同位元素で標識した DFP と精製画分を混合して反応したところ、上記の二つのタンパク質が標識された。DFP は酵素の活性残基に直接共有結合して阻害することがわかっているため、二つのタンパク質のうち一つは酵素活性に関与していることが示唆された。また、これらを非変性電気泳動にかけると、二つのバンドが重なったと思われる太いバンドが得られた。これらのことから、二つのタ

ンパク質は静電的性質，分子量が極めてよく以ており，またどちらもセリンエステラーゼであるので，目的の酵素にはアイソザイムとして二つあることが考えられる。ただ，本酵素は疎水性カラム，FPLCカラムで酵素活性が低下してしまい，比活性が上昇しなかった。

以上のように研究はあまりうまくは進まなかったが，アメリカには見るべきところがたくさんあった。まず，いろいろな人種が混ざった国である。西海岸にはアジア系の人々が特に多く，韓国，中国，日本，ベトナムが多いが，みんなそれぞれのお国なまりのある英語を流暢にあやつり，社会に溶け込んでいた。しかし人種差別をするアメリカ人は西海岸にもたくさんいた。

次に，人種の多さが幸いして，いろいろな国の料理を食べられるということだ。とくに中国系の人々は結束力が高いので有名で，どこに行っても中華街は見る事が出来るが，私の行ったところでは，サンフランシスコとニューヨークがすごかった。なにしろ，町の中には中国語しか喋れない人がいっぱいいるのだ。それはおもに年輩の人だが，たまに若い人でも喋れない人もいる。それでも彼らは職を得て賃金をもらえるのだ。そういう人たちが作

って食べる料理はいつ食べても絶品であった。アメリカ人があまり来なくて，中国人だけが食べに来る店に好んで我々は行ったが，そういう店だと英語が出来る人が支配人ぐらいしかいない。だけでも味はすばらしく，おなかがいっぱいになってもせいぜいひとり二千元というところだった。ほかにもタイ，イタリア，などいろんな料理が安く食べられたのは幸運であった。

また，アメリカ人の社会では，人々は総じてあまり働かないが，賃金が高いという印象を持った。したがって，カリフォルニア大学をでても就職できないというような，失業率の高さも納得できる。賃金当たりの効率が悪いのだ。日本や韓国，台湾，香港などに押され気味の経済の原因をかいま見た気がした。これも広大な国土，低い人口密度が競争心を低下させたような気がする。いろんな意味で勉強になった2年間でしたが，不毛の土地が広がる場所よりは，やはり，少しぐらい狭くても水や雨の多い日本が一番という感じがします。

最後に，この在外研究の機会を与えて下さった技術会議事務局国際研究課，食品総合研究所の皆様は紙面を借りて，お礼申しあげます。



## 第1回細胞・組織培養世界会議に出席して 無脊椎動物関連発表の紹介

東京農工大学

三橋 淳

日米組織培養学会共催による第1回細胞・組織培養世界会議が1991年6月15日から20日まで、米国ロスアンゼルス市に隣接するアナハイムで開かれた。筆者は本会議の session in depth(SID)の座長として招待され、会議に参加し講演を行ったので、筆者が出席した無脊椎動物関係のシンポジウムや研究発表を以下に紹介する。アナハイムはディズニーランドで知られている町で、会場のマリOTTホテルはディズニーランドに近接した場所にあり、ホテルの窓から園内のスペースマウンテンなどが見える距離であった。

本会議は16日朝から始まったが、前日の15日にはサテライトミーティングの一つとして、無脊椎動物魚類組織培養国際会議と、歴史部会の講演があり、その後で歓迎パーティが開催された。

無脊椎動物魚類組織培養国際会議は4年毎に開催されてきた会議で、今回は8回目に当たったが、たまたま細胞・組織培養会議と開催年が重なったため、そのサテライトミーティングとして行われたものである。この会議は午前中は「無脊椎動物細胞培養における研究の傾向」と題するシンポジウムと午後の一般講演に分かれていた。シンポジウムはノートルダム大の M. Fraser 博士が座長を務め以下の5題の講演があった。

**Lynn, D.E.:** 無脊椎動物の新細胞系樹立の継続的必要性。現在、400種類を超す細胞系が存在すると思われるが、その80%は鱗翅目および双翅目昆虫由来である。しかしそれら細胞が由来したセルタイプは殆ど分かっていない。まだ重要な害虫、益虫で細胞系が作ら

れていない種はたくさんあり、多くの無脊椎動物から新しい細胞系を作る研究は将来に亘って継続されるべきである。

**Fallon, A.M.:** 昆虫細胞・組織のトランスフェクション。蚊の防除を遺伝子操作で行うことを目的として、雌の蚊の生殖を遺伝的に阻害する方法を探索している。ヒトスジマカ細胞を用い、ポリブレンまたはリン酸カルシウムにより、0.1%の確率で、トランスフェクションを起こすことができた。

**Kurtti, J.J. & Munderloh, U.G.:** 節足動物細胞培養における *Borrelia burgdorferi*。 *B. burgdorferi* はマダニ媒介性のスピロヘータでライム病の病原体である。このスピロヘータは細胞表面寄生者であるが、培養細胞に対しても同様の反応を示し、細胞の種類によって異なる親和性を示した。ダニ由来の細胞は昆虫由来の細胞より親和性が強かった。またダニ細胞と共存培養すると、22回継代後も感染性を失わなかった。

**Koval, T.M.:** 無脊椎動物細胞で放射線によって誘導可能なプロセス。鱗翅目昆虫由来細胞は双翅目、直翅目、鞘翅目昆虫あるいはマダニ類由来の細胞より放射線や薬物に対する抵抗性が強い。実験に用いたイラクサギンウワバ細胞 TN-368 は DNA 修復機構や障害によって誘起される細胞の回復機構をもっている。この機構は actinomycin D や cycloheximide で阻害されることが分かっている。これはこのシステムが照射を受けない細胞には見られない転写、翻訳活性に依存していることを示す。その結果照射された細胞ではある種のタンパクが非常に多くなり、非照射細胞に見られないタンパクが出現したりする。

**Lawrence, P.O.:** インビトロにおける寄生

虫に対する薬剤のスクリーニング、問題と展望。ヒトを含む動物寄生虫病の薬剤による治療法開発には実験的に感染させた動物が使われているが、体外培養された寄生虫を材料に用いることができればそのメリットは大きい。しかし、インビトロ実験系開発にはいろいろな問題がある。たとえばホルモンの、あるいは抗ホルモンの働く薬剤はインビトロで培養された寄生虫の適正な時期に投与されなければ期待される効果を示さない。インビトロで得られる寄生虫のステージは必ずしも薬物検定に適したステージではない。インビトロでは薬剤は直接寄生虫に作用するので、生体内の代謝による薬物活性の変化を考慮しなければならない、などである。これらの問題があるにもかかわらず、インビトロでのスクリーニング系の開発は大変価値あるものと期待されている。

次に一般講演では7題の講演があった。そのうち培地に関する発表が2題あり、Vaughn, J.L. & Fan, F. はバキュロウイルス増殖のための無血清低コスト培地を開発し、そのコストは \$1.80/l であると述べた。また Goodwin, R.H. は昆虫培養細胞の増殖には polyunsaturated fatty acid とステロールが適正なバランスで含まれていることが必要で、これなくしては細胞はホルモンや成長因子に反応できないとの見解を示し、これら物質は培地中で不安定であるので、適当な酸化防止剤の添加などにより、保護しなければならないと述べた。

培養細胞そのものについての発表は2題あり、Linn, D.E. はタマゴバチ由来の細胞系はエクダイソンを投与すると、凝集して筋肉のような収縮運動を示すと述べ、Dübendorfer, A. & Liebig, B. はコロラドハムシ胚子組織の初代培養を行い、遊出した細胞が分化して幼虫組織を作ること、またベシクル状に増殖した細胞を植え継ぐことにより、連続継代性細胞系が得られたと報じた。

ウイルスに関する講演が3題あり、Sohi, S.S. & Caputo, G.F. および Sohi, S.S. & Cook, B.J. はトウヒノシントメハマキの細胞

に、同種の核多角体病ウイルスを接種し、ウイルス複製に及ぼす M.O.I. などの条件を検討、さらに接種後の多角体出現の時間的経過などについて報告した。また、Schärer, Ch., Naim, H., Vallan, C. & Koblet, H. はヒトスジシマカ細胞と脊椎動物細胞 BHK にセムリキホレストウイルスを接種し、BHK ではウイルスは細胞表面でだけ成熟するが、蚊の細胞では細胞内と表面の両方で成熟するなどのいくつかの違いを報告した。

本会議では無脊椎動物関係の SID が二つ、workshop が二つと一般講演が行われた。

SID の第一は昆虫培養細胞のテクノロジーと題し、オハイオ大の W.F. Hink 博士と筆者が座長を務めた。5題の講演があり、バキュロウイルス expression vector を使った外来タンパクの生産とそのための細胞培養に関するものであった。演題は次のとおりである。

Hink, W.F.: 異なった培地で培養した細胞における組み換え体タンパクの発現

Jarvis, D.: 安定的に形質転換した鱗翅目昆虫細胞における外来タンパクの連続的発現

Davidson, D.J., & Castellino, F.J.: 昆虫細胞におけるヒト・プラズミノーゲン cDNA 発現の際のオリゴ糖プロセッシング

Vanlier, F.L.J., de Gooyer, C.D., Kool, M., van den Hombergh, J.P.T.W., de Vaan, M. M.J.A.C.M., Vlak, J.M., & Trampen, J.: 二段階バイオリクターシステムでの組換え体バキュロウイルスの生産

Mitsuhashi, J.: バイオテクノロジーのための昆虫細胞培地の開発

SID の二番目はバイオテクノロジーにおける無脊椎動物細胞・組織と題し、テキサス A & M 大の M. Summers 博士とノートルダム大の M. Fraser 博士が座長を務めた。演題は四つでいずれもバキュロウイルス expression vector を用いた研究の報告であった。各演題は次のとおりである。

Summers, M.D.: バキュロウイルス expression vector

Matsuura, Y.: 組換え体バキュロウイルスを用いた昆虫細胞での外来遺伝子発現

Wojchowski, D.M., Lynch, K., Akar, J., Whitford, W., & Weiss, S.: 生物活性を持つ エリスロポイエチン結合タンパク, バキュロウイルスを媒体とする発現システムの最適条件に対するモデル

YangKang, C.: バキュロウイルス expression vector を用いた昆虫細胞における HIV の高発現レベルのための分子的領域

無脊椎動物細胞培養に関する一般講演は GIBCO 社の S.A. Weiss 博士を座長として行われ、8 題の講演があった。このうち 2 題は軟体動物の血球 (Boulo, V. et al.) と初代培養に対する外来遺伝子のエレクトロポレーションによる導入の試み (Ellis, L.L.) についてであった。昆虫細胞系作出に関する講演も 2 題あり、ヤガの 1 種からの連続継代性細胞系の樹立 (Khurad, A.M. et al.) とチャイロコメノゴミムシダマシ脂肪組織の初代培養 (Easton, C.M., & Horwoth, K.L.) についてであった。また、無血清低コスト培地の開発 (Godwin, G. et al.) とカイコ細胞系の無血清培地への馴化 (Belloncik, S. et al.) の発表があった。バイテク関連では、昆虫細胞の高密度培養における組換え体タンパク生産 (Weiss, S.A. et al.), 双翅目、鱗翅目細胞でトランスフェクションにより誘導できる遺伝子の発現 (Fallon, A.M.) の 2 題の発表があ

った。

Workshop の一つは海生無脊椎動物細胞培養と題し、夕食後 8 時から 11 時すぎまで元養殖研の町井昭博士と NOAA の A. Rosenfield 博士が座長を務め、動物の各グループの研究者が代わるがわるの発表を行った。実際は workshop のタイトルにこだわらず、恒温動物、変温動物、無脊椎動物 (昆虫、クモ類、甲殻類、淡水・海水軟体動物、海綿) に及ぶという広範な討議となった。主として培養の困難さ、問題点が討議された。

もう一つの workshop は無脊椎動物細胞系を樹立する方法と題し、USDA の D.E. Lynn 博士が座長となり、フリーディスカッションを行い、まだ細胞系の作られていない昆虫からの細胞系樹立、培養困難な組織の培養法、そしてここでも昆虫以外の無脊椎動物の細胞をいかに培養するかについて、それぞれの専門家が意見を述べた。

このほかポスターセッションに無脊椎動物関係の発表が 4 題あり、うち 2 題はバイテク関係、1 題は無血清培地、1 題は軟体動物組織培養に関するものであった。

本会議では主体はもちろん脊椎動物細胞培養で、とくに医学関係のセッションが多かった。また植物組織培養のセッションもいくつかも行われた。



BRAIN テクノフォーラム開催のご案内

# 快適さの科学

—人間をセンサーとして考える—

主催：生研機構

後援：農林水産省

## 演題及び講師

### 1. 「おいしさ」評価の最前線

より良い商品を創るために、従来の官能検査の限界にせまる手法について

味の素株式会社 食品総合研究所 山口 静子

### 2. 色・香りに関して人は何を連想するか

体温、脳波、瞳孔面積などの変化を利用して「快適性」を客観的に評価する

人間生活工学研究センター 研究開発部長

(前・通産省 工業技術院 製品科学研究所) 栗山 洋四

### 3. 景観の快適性を考える

コンピュータグラフィックスを用い、アイカメラなど各種の技術によって

「快適性」を評価する

東京大学工学部 教授 篠原 修

### 4. 自然を取り入れた住居環境の快適性

匂い、音、光などの住居環境が人間の生理、心理面に及ぼす影響について

鐘紡(株)カネボウ化粧品 美容研究所 島上 和則

### 5. 総合討論

座長 農林水産省 食品総合研究所 素材利用部長 齋尾 恭子

- 日 時 平成3年12月12日(木) 10:00~16:30
- 場 所 九段会館 〒102 東京都千代田区九段南1-6-5 電話 03-3261-5521
- 参加人員 お申し込み先着150名様限り
- 申し込み方法 ファックスまたはハガキにて(連名も可)、勤務先、所属、住所、電話番号を御記入のうえ、12月6日までにお申し込み下さい。
- 参加費 個人：15,000円(消費税を含む)  
団体割引料金：4人以上でお申し込みの場合、4人目以降の方の参加費は1人当たり5,000円になります。なお、団体割引は50名様までとさせていただきます。
- 送金方法 お申し込み頂いた方には参加券と一緒に請求書を送付させていただきますので、請求書記載の口座にお払い込みください。
- 申し込み先 〒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  
生研機構 企画第1課(志藤、伊地知、作間)  
電話 03-3205-6565 FAX 03-3205-6566

#### 編集後記

生研機構が発足して5年が経過し、出資プロジェクト研究も順調に進んでいます。一方、地域の公立あるいは企業の試験研究機関でも地域農業に密着した興味深い成果が次々出てまいりました。これらを積極的に紹介するため、前者については「出資プロジェクト情報」、後者については「地域の先端研究」の項

を本号より新しく設けましたので御期待下さい。本誌の内容については、より広い購読会員の皆様に親しんでいただけるよう心がけてまいりましたが、今後とも一層の御理解と御支援のほど、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28号)

平成3年11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