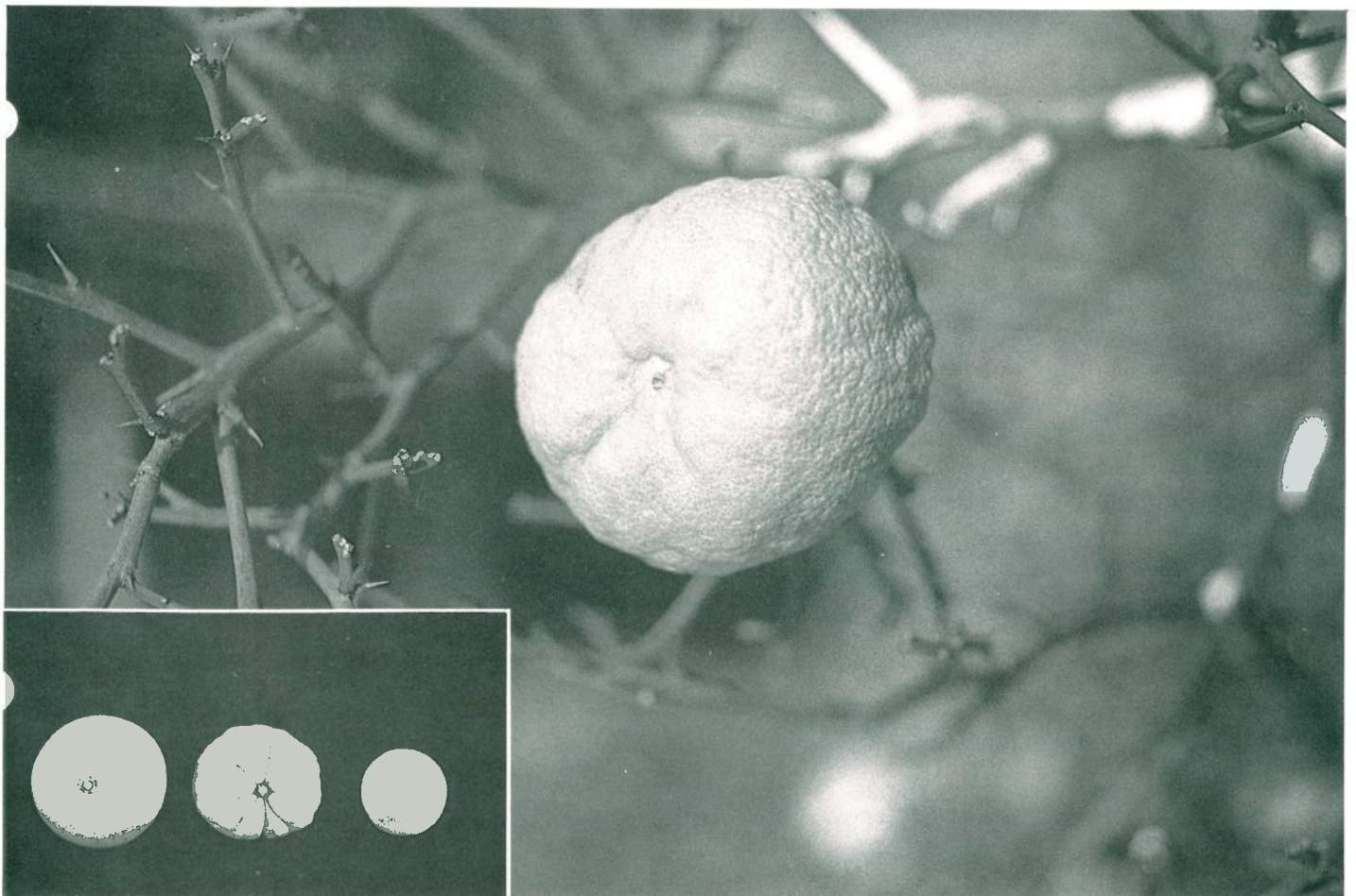


BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

MAY 15, 1992



表紙説明

オレンジの培養細胞とカラタチの葉から単離したプロトプラストを融合させて得た体細胞雑種“オレタチ”の果実

写真は初結果のもので、果実は不整形だが、翌年結果した果実はかなりオレンジに近かった。左下の写真は、左から“オレンジ”、“オレタチ”、“カラタチ”の果実

(写真提供 小林省藏氏)

本号の紙面

総説	1
昆虫の生体防御反応系と利用技術	
国内情報	6
人工酵素, 組換え放線菌によるアピデシンの生産, タバコ培養細胞でのキチナーゼ遺伝子発現	
出資プロジェクト情報	15
通気攪拌型培養槽によるイネカルスからの植物体再生	
地域の先端研究	17
サトイモの不定胚形成と植物体再生	
文献情報	19
糸状菌の抗生物質耐性遺伝子, C4光合成遺伝子, 選択マーカー遺伝子の安全性	
海外便り	23
USDA, BARC-Eastでの1年	
国際学会レポート	26
第18回国際冷凍会議に参加して	

口 絵

総 説

芦田正明・土谷正和

昆虫の特異な生体防御反応系と利用技術…………… 1

国内情報

大久保捷敏

人工酵素による天然酵素様反応の生起…………… 6

百瀬春生

組換え放線菌による抗菌ペプチド“アピデシン”の生産…………… 9

福田裕二

タバコ培養細胞でのキチナーゼ遺伝子の発現…………… 12

出資プロジェクト情報

中園敦之・滝川健次・館山重春・須田秀雄・岡本彰宏・内堀博雄・松野司法

通気攪拌型培養槽によるイネカルスからの植物体再生…………… 15

地域の先端研究

軽部 稔

サトイモの不定胚形成と効率的な植物体再生…………… 17

文献情報

糸状菌の欠失可能なB染色体上に存在する抗生物質耐性遺伝子…………… 19

C 4 光合成遺伝子の発現調節…………… 20

選択マーカー遺伝子は安全か？…………… 21

海外便り

磯部 尚

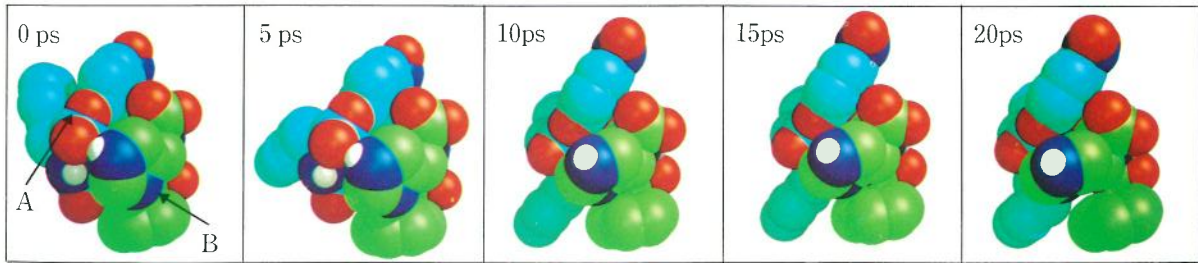
USDA, BARC-Eastでの1年…………… 23

国際学会レポート

小綿寿志

第18回国際冷凍会議に参加して…………… 26

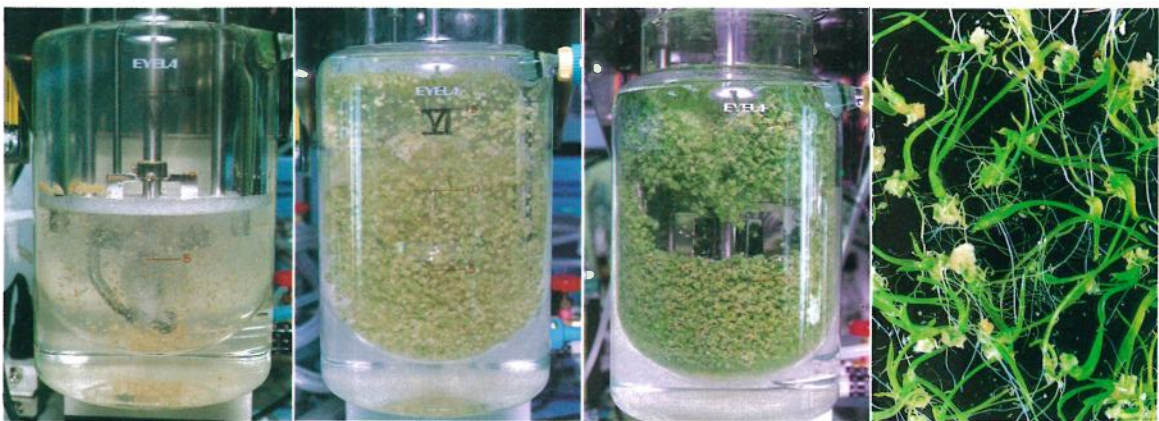
人工酵素による天然酵素様反応の生起 (本文 6 ページ)



N-アセチル-L-フェニルアラニン基質(左)と人工酵素Z-L-Leu-L-His(右)との多点相互作用反応

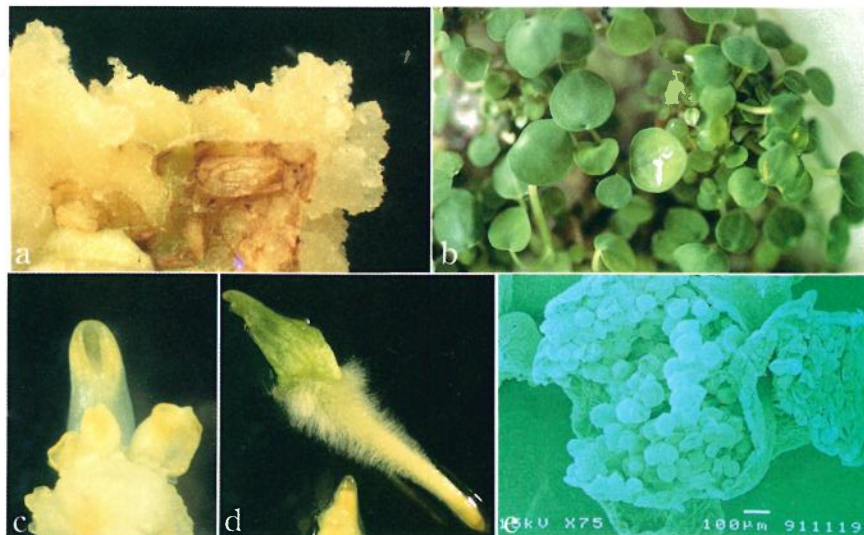
赤=酸素, 青=窒素, 白=水素, 水色=基質炭素, 緑=人工酵素炭素;
A=基質エステル部位炭素, B=人工酵素イミダゾリル部位活性窒素原子

通気攪拌型培養槽によるイネカルスからの植物体再生 (本文 15 ページ)



培養開始1週間目 同3週間目 同6週間目 再生植物体(培養終了後)

サトイモの不定胚形成と効率的な植物体再生 (本文 17 ページ)



カルスからの不定胚形成と再分化

- a: 塊茎から誘導したカルス, b: カルスからの植物体再生
c: 不定胚, d: 不定胚からの発芽・発根
e: カルス内部の球状胚

昆虫の特異な生体防御反応系と利用技術

北海道大学 低温科学研究所

芦田正明

和光純薬工業株式会社 大阪研究所

土谷正和

1. はじめに

我々哺乳類と昆虫類の生体防御機構は共通点もあるが異なる面も多い。昆虫に特異的な生体防御機構の一つが医療機器の汚染検査に応用できるかもしれないことがわかってきた。昆虫の生体防御機構について簡単に説明し、その防御機構の一つがなぜ医療機器の汚染検査に応用できると考えられているのかを述べることにする。

2. 昆虫の生体防御反応

昆虫の体内に侵入した異物（カビ、バクテリアなど）に対する生体防御反応は主に二つに類別できる。細胞性のもので液性のものである。細胞性生体防御反応には血球細胞による貪食、大型異物を血球細胞でとりこんで隔離してしまう“被のう”形成の二つが主要なものである。また液性のものである侵入したバクテリアや、組織が受けた傷害に反応して産生される抗菌性ペプチドやレクチンによる防御反応が知られている。

一般に生物体内で異物（非自己）に対する生体防御反応が始まるには、まず異物を非自己として認識する必要がある。我々高等脊椎動物では非自己の認識に免疫グロブリンが重要な役割を演じているが、昆虫には免疫グロブリンは存在しないとされている。昆虫における非自己の識別機構はどのようなものなのか？ 生物における自己・非自己の識別機構は現代科学の神秘の内でも最高のもの

の一つと言われている。その意味でも昆虫における非自己の認識機構は昆虫の生体防御機構研究者の間で注目を集めている。

3. フェノール酸化酵素前駆体カスケード (proPO カスケード)

カビの菌糸などの大型異物のまわりに“被のう”が形成されると常に異物の周囲の細胞間隙に黒色素メラニンが生じることは古くから知られていた。メラニンはチロシンなどのフェノール性物質に酵素（フェノール酸化酵素, PO と以下略称）が作用して生成される。メラニン生成過程で生じるキノンは非常に反応性に富み、ポリペプチド鎖中のアミノ酸残基側鎖のアミノ基と反応しタンパク分子同士を共有結合で結合する。その結果大型異物は細胞と不溶化したタンパクで覆われて血液内で物理的に隔離されることになる(図1)。

我々は“被のう”形成時にどのような仕組みで異物の周囲にメラニンが生成されるのか

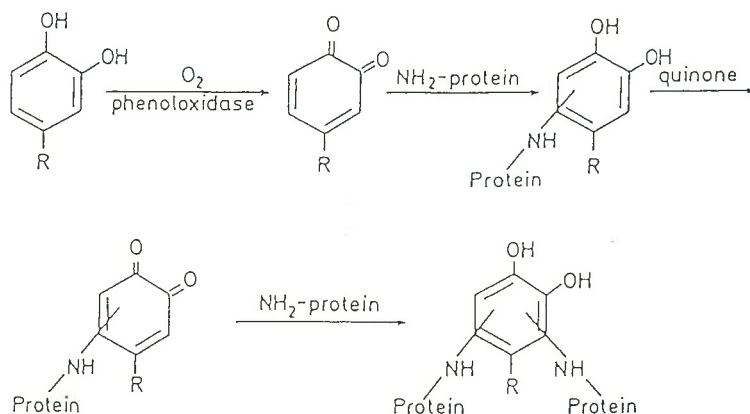


図1 キノンとタンパクの反応

フェノール性物質がフェノール酸化酵素により酸化され、生じたキノンは不溶性のタンパクを生成することを示す模式図。

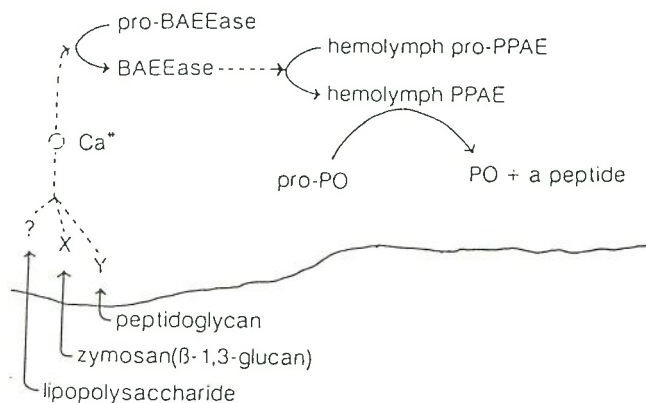


図2 フェノール酸化酵素前駆体カスケード (proPOカスケード)の模式図

点線は未解明の部分。図の説明については本文参照。略号：pro-PO, フェノール酸化酵素前駆体；PPAE, pro-PO活性化酵素；pro-PPAE, PPAEの前駆体；PO, フェノール酸化酵素 (pro-POがPPAEの作用で活性化したもの)；BAEEase, α -N-benzoyl-L-arginine ethyl esterを加水分解する酵素として発見された；pro-BAEEase, BAEEase前駆体；X, β -1,3-グルカン認識タンパク；Y, ペプチドグリカン認識タンパク。

リポポリサッカライド (LPS) を特異的に認識するタンパクは報告されていない。しかしLPSがカスケードを活性化するという報文もあるのでLPS認識タンパクについては？を記した。LPSによるカスケードの活性化にはペプチドグリカンや β -1,3-グルカンの1000倍程度の濃度が必要である。proPOカスケードは Ca^{++} などの二価金属イオンがないと活性化されない。カルシウムを要求するステップを○で示した。

表1 家蚕幼虫血液の血漿画分中のproPOカスケードの引金をひく物質の検索

物 質	カスケードの引金をひく活性
Heat killed bacteria :	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	yes
<i>Escherichia coli</i>	yes
<i>Staphylococcus aureus</i>	yes
<i>Bacillus thuringiensis</i>	yes
<i>Bacillus subtilis</i>	yes
Cell wall fraction from	
<i>Staphylococcus aureus</i>	yes
<i>Escherichia coli</i>	yes
Lipopolysaccharide from	
<i>Escherichia coli</i>	no
<i>Salmonella enteritidis</i>	no
Peptidoglycan from	
<i>Micrococcus luteus</i>	yes
Glucan :	
zymosan	yes
laminarin	yes
starch	no
dextran T 10	no
cellulose	no
Dextran sulfate	no
Inulin	no
Chitin (colloidal)	no
Kaolin	no

を研究してきた。1980年代の初めに昆虫血液の新しい採りかたが発見され、血液内でのフェノール酸化酵素活性の調節機構に関する研究が飛躍的に進展した。その結果をまとめたものが図2である。フェノール酸化酵素 (PO) は不活性化前駆体 (proPO) から限定加水分解により活性化される。proPO活性化酵素 (PPAE) はセリンプロテアーゼの一種であるが、この酵素も昆虫血液内では前駆体 (proPPAE) として存在している。昆虫血液内での proPO 活性化の仕組みはまだその一部分が解明されているだけであるが、一種のカスケード反応であることが明らかにされている。現在このカスケードは proPO カスケードと一般に呼ばれている。このカスケードは血液の血漿部分に存在する。proPOカスケードをどのような物質が活性化するかを調べてまとめたものを表1に示した。表から proPO カスケードはカビの細胞壁成分である β -1,3-グルカン (β G) や、バクテリアの細胞壁成分であるペプチドグリカン (PG) により活性化されることがわかる。エンドトキシンと総称されるバクテリアのもう一つの細胞壁成分であるリポポリサッカライド (LPS) には反応しない。家蚕血漿 1 ml に PG や β G が数ピコグラムから数十ピコグラムの濃度で存在すれば proPO カスケードを活性化することができる。グラム陰性菌も陽性菌も PG をその細胞壁成分として持つことから proPO カスケードはほとんどすべてのバクテリアやカビに反応し、活性化されることになる。proPO カスケードは昆虫の一生の間 (1 令幼虫から成虫まで) 常に血液内に存在している。また、proPO カスケードが活性化される条件下では血球細胞による細菌の貪食、血球細胞の運動能の増加などが観察されている。さらに、ある種の寄生蜂は宿主内に卵を生みつける際に proPO カスケードを破壊してしまい、卵のまわりをメラニン層でとりかまわれるのを防いでいるらしいこともわかっている。数年前ミシガン大学の Rizki 博士は昆虫体内で生じた異常組織に対する自己免疫反応の一つが proPO カスケードの活性化であると報告している。これらの観察結果は proPO

カスケードが昆虫の生体防御機構の一つとしてかなり重要な役割を担っている可能性を示している。昆虫病理学を研究している研究者の間で proPO カスケードに対する関心が急速に高まっているのが現状である。

4. β -1,3-グルカン認識タンパクとペプチドグリカン認識タンパク(カビと細菌の細胞壁成分と特異的に結合するタンパク)

生物における自己・非自己の識別機構は現代科学が解明をめざしている神秘の内でも最高のものの一つと言われていることはまえに記した。proPO カスケードは体内に生じた異常組織を含めて体内に侵入したほとんどの異物に対して反応し活性化される。いいかえると proPO カスケードの活性化と昆虫における非自己の認識とはかなり密接な関係ある現象と言えそうである。proPOカスケードの活性化機構を解明すれば昆虫における自己・非自己の識別機構にせまることができるかもしれない。われわれの研究室でここ数年の間にペプチドグリカン(PG)と特異的に結合するタンパク(PG認識タンパク, 以下 PGRP と略称)と β -1,3-グルカン(β G)と特異的に結合するタンパク(β G認識タンパク, 以下 β GRP と略称)を世界に先駆けて家蚕血液から単離精製することに成功した。これらのタンパクは β GやPGと結合して proPO カスケードを活性化する。いいかえると、これらタンパクが存在しない血漿中では β GやPGがあっても proPO カスケードが活性化されない。PGRPや β GRPは図3に模式的に示すように昆虫における細菌の貪食やカビの菌糸の周囲における被のう形成などの生体防御反応の発動のきっかけ(非自己の認識)に直接かかわっている可能性が高い。PG-PGRP複合体あるいは β G- β GRP複合体がどのような活性を持つかはまだ明らかでない。しかし研究が進展すればPGRPや β GRPの昆虫生体防御機構における役割の全体像が浮びあがってくるにちがいない。proPOカスケードを持たない昆虫はまだ発見されてい

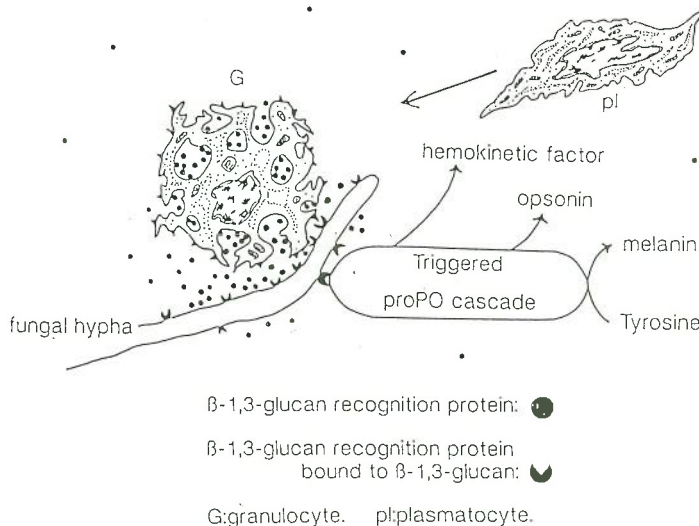


図3 β -1,3-グルカン認識タンパク(β GRP)の働きについての仮説

カビ菌糸(fungal hypha)が昆虫体腔内に侵入すると血漿中の β GRPが菌糸細胞壁の β -1,3-グルカン(β G)に結合する、この β Gと β GRP複合体はproPOカスケードを活性化する。カスケードが活性化されると血球細胞による貪食能促進因子(opsonin)や血球細胞運動能促進因子(hemokinin factor)が産生され、プラズマ細胞(pl, plasmatocyte)を菌糸の近くへ呼びよせ“被のう”形成を助ける。またチロシンが酸化されてメラニンが菌糸の周囲で合成される。

β G- β GRP複合体は β GRPを顆粒中に持つ顆粒細胞(G, granulocyte)表面に認識されて脱顆粒を誘発する。この脱顆粒は菌糸周囲での β GRPの濃度を高めるため上に述べた一連の反応が一層効果的に進行する。

ない。この事実は、proPOカスケードの異常は致死に至るほどこのカスケードが昆虫の生存にとって重要であることを暗示している。

5. proPOカスケードの特徴

β -1,3-グルカンなど細菌細胞壁成分で活性化されるカスケードとしては哺乳動物血漿中の補体系、カプトガニの血球細胞破碎液中の血液凝固系が著明で、よく研究されている。proPOカスケードは β GやPGで活性化されるカスケードでセリンプロテアーゼ前駆体を含むなど、補体系やカプトガニ血液凝固系と似ている面もあるが、カスケードの最終産物がPOという金属を含む酸化酵素であることは全く異なる点である。昆虫は好氣的条件に非常にうまく適応した生物といわれている。酸素を使って基質のチロシンを酸化するPOを利用しているのもその好例かもしれない。昆虫は身体の細胞一つひとつにまで直接空気中の酸素を供給できる体制を持っている。したがって昆虫はヘモグロビンやイカ、エビなどが持つヘモシアニンのような呼吸色素を持

たない。血漿中の proPO はヘモシアニンから進化して生じたという説もあるが、proPO の遺伝子についての解析が進めば、この説の真否も将来明らかになると思われる。

6. 医薬品や医療機器の汚染検査薬としての proPO カスケード

医薬品や医療機器のカビやバクテリアによる汚染検査薬として、カブトガニの血球細胞破砕液（血液凝固系）が広く使われている。この検査法はカブトガニ（*Limulus* 属）の名をとってリムルステスト呼ばれている。リムルステストではグラム陰性菌の細胞壁成分のリポポリサッカライド（LPS）とカビの細胞壁成分の β -1,3-グルカンが数 pg/ml から数十 pg/ml の濃度で存在すれば、それらを感度よく検出できる。

リムルステストは汚染検査法として優れた特性を持っているからこそ欧米および日本で盛んに使われているわけであるが、問題点がないとはいえない。一つはグラム陽性菌による汚染を検出できないこと。二つめは検査薬

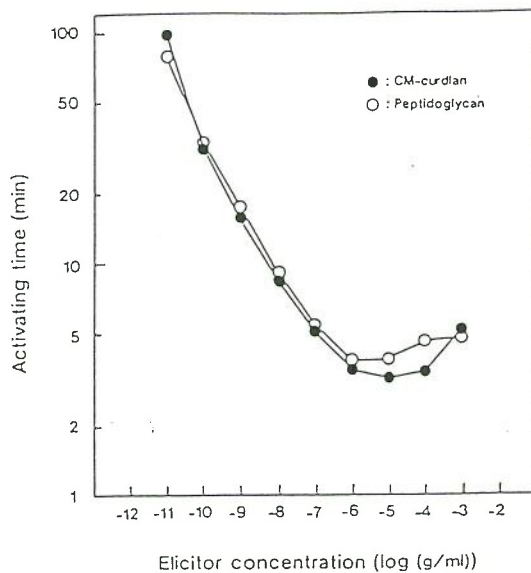


図4 家蚕血漿proPOカスケードの細菌細胞壁成分に対する反応性

エリシター (elicitor, proPOカスケードを活性化する物質)としてカルボキシメチル化カードラン(カードランは藻類の一種から調製した β -1,3-グルカン)とペプチドグリカンを選んで用いた。活性化時間(activating time)はエリシターを加えてからproPOカスケードのproPOの一定量が活性化されるまでの時間を示す。

の供給の問題である。リムルステストに対する需要は先進国に於ても急速に高まっており、もし発展途上国においても先進国なみにリムルステストが使用されることになれば、検査薬となるカブトガニ血球細胞破砕液の供給に問題が生じると指摘されている。

昆虫の proPO カスケードを汚染薬として活用する可能性についての研究は、和光純薬工業株式会社において進められている。これまでの研究によれば家蚕血漿を用いて、 β G や PG を数 pg~数十 pg/ml の濃度で検出・定量できることが明らかになっている(図4)。LPSやキチンなどを高濃度(mg LPS or chitin/ml)で与えると proPO カスケードは活性化されるが、これは LPS あるいはキチン中に混入している PG あるいは、 β G による活性化であろうと推測している。現在家蚕幼虫血漿を PG や β G による汚染の検査薬として市場に供給するための様々な研究開発が進行中である。

もし昆虫 proPO カスケードが汚染検査薬として製品化されると、これとリムルステストを併用すればグラム陽性菌、陰性菌、カビによる汚染検査が可能になる。この併用によって前述したリムルステストのかかえる問題点の一つが解決される。家蚕はいくらでも希望の頭数入手できるので家蚕血液の供給にはまったく問題がない。この点、カブトガニに依存するリムルステストに比して proPO カスケードを使う汚染検査法が有利なのは明らかである。リムルステストで使われている血液凝固系と proPO カスケードはいずれもセリンプロテアーゼ前駆体を含むカスケードなので、この両者をうまく組み合わせれば、将来 proPO カスケードで LPS も検出・定量できるようになるかもしれない。

医薬品・医療機器の汚染検査薬は世界的にみて今後需要が増えても減ることはない。限られた資源に依存しない検査薬の出現が待望されている。家蚕の proPO カスケードは、この期待にこたえる可能性のある有力な候補である。

7. おわりに

昆虫体腔内に侵入した異物の周囲にどのような仕組みでメラニンが生成されるか調べているうちに、生物体内での非自己の認識という現代科学の諸領域の中でもっとも神秘性に富む現象に取り組むことになった。さらに昆虫血液の予想もされなかった新しい活用の可能性が明らかになり、昆虫生体防御機構の研究成果の一つが人類福祉に貢献できるのも夢でなくなりつつある。昆虫の proPO カスケードに関する研究は1950年代初めに名古屋大学名誉教授（現、岡山理科大学教授）大西英

爾博士により、その基が築かれ、その後つねに日本における研究が世界の研究をリードしてきた。日本で育った proPO カスケードに関する研究を応用する技術を確立するとともに、昆虫の生体防御機構におけるこのカスケードの働きをさらに明らかにしてゆきたいと思っている。

文 献

- 1) 芦田正明 (1988) 科学と生物 26 : 425-436
- 2) Ashida, M. and H.I. Yamazaki (1990) Molting and Metamorphosis (Ed. by E. Ohnishi and H. Ishizaki), pp. 239-265, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo / Springer-Verlag, Berlin



国内情報

人工酵素による天然酵素様反応の生起

熊本大学 工学部

大久保捷敏

1. 人工酵素へのアプローチ

天然酵素は6群に分類され、約2500種存在すると言われている。これらの酵素あるいは微生物の利用は、固定化酵素あるいは固定化微生物(immobilized enzyme or living cell)によって行われており、立体選択的に一方のエナンチオマーのみと反応すること(立体特異性)が可能となっている。しかしながら、酵素や微生物は天然に存在する基質および反応への利用に限られており、このような基質特異性(substrate specificity)が逆に欠点となっている。したがって基質特異性に融通がきき、立体選択性にも優れ、かつ非天然型反応にも適用しうる人工酵素(artificial enzyme)の開発は非常に重要である。

一般的に分子設計した天然酵素様触媒による立体選択性制御は、図1に示したように酵素と同様にエナンチオマー基質の取り込み時に分子認識を行なわせるか、または反応時にエナンチオマー(遷移状態のそれを含む)間での反応速度に差異を生じさせることにより可能となる。とりわけ後者の制御は、活性化エンタルピー(ΔH^\ddagger)および活性エントロピー(ΔS^\ddagger)、すなわち全体としては活性化自由エネルギー(ΔG^\ddagger)で制御されており、高活性な人工酵素開発のためには、この ΔG^\ddagger をいかに下げる(ΔH^\ddagger を小さく、 ΔS^\ddagger を大きくする)かが問題となってくる。また、立体特異性の発現のためには、一方のエナンチオマー(遷移状態を含む)の活性化自由エネルギーを下げ、できれば同時に、他方のエナ

ンチオマーに対して負触媒効果をもたせることが必要である。 ΔS^\ddagger 項の制御としては、いかに基質を効率よく取り込み(相互作用する機会を生み)より嵩ばった(rigidな)遷移状態を取るかが重要となり、 ΔH^\ddagger 項の制御としては取り込んだ(相互作用し得る)基質の多点相互作用による位置決め(location)および配向(orientation)が重要となってくる。このため、触媒と基質間にはまず多くの相互作用をする機会(エントロピー要因)と活性化エネルギー低下(一方のエナンチオマーでは不安定化)のための効果的な多点相互作用(エンタルピー要因)が要求されることになる。

本稿では、これまで当研究室で行なってきた立体選択機能性人工酵素の開発を中心に概観したい。

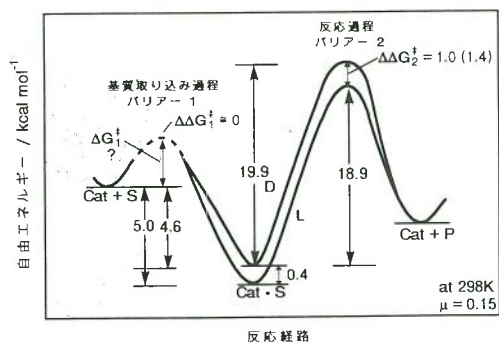


図1 立体選択的加水分解反応のエネルギーダイアグラム

Cat=ジペプチド型Z-L-Leu-L-His, S=N-アセチル-L(D)-フェニルアラニンp-ニトロフェニルエステル

数値は、 $\text{Cat} + \text{S} \rightleftharpoons \text{Cat} \cdot \text{S} \rightarrow \text{Cat} + \text{P}$ の各過程から、カッコ内のそれは $\text{Cat} + \text{S} \rightarrow \text{Cat} + \text{P}$ の全反応から求めた。

OHKUBO Katsutoshi

2. ペプチド型人工酵素による天然酵素様アミノ酸エステル加水分解反応の生起

生体触媒において発現する高度な分子認識は、基質取り込み過程と反応過程においてわずかに数 kcal の弱い相互作用（静電、疎水、スタッキング相互作用、水素結合など）を巧みに利用した多点相互作用により実現している。その意味で、人工酵素が一方のエナンチオマーのみと特異的に反応するためには、人工酵素と基質間の多点相互作用により両者の反応部位間に距離的な遠近差を生じさせること（一方のエナンチオマーと相互作用のない（取り込まない）場合を含む）で、反応速度論的制御の分子認識機能をもたせることが重要であると考えられる。そこで、酵素様機能の発現部位（分子認識活性部位）として比較的シンプルな求核反応部位 L-ヒスチジンを含むジ-またはトリ-ペプチドを系統的に分子設計し、それらを疎水力で基質の取り込みを促進する部位となる合成生体膜（二分子膜）中に配列した人工酵素を構築した。これら人工酵素によるアミノ酸エステルの立体選択的加水分解反応を行なったところ、ジペプチド

型 Z-L-Leu-L-His またはトリペプチド型 Z-L-Leu-L-His-L-Leu が高活性、高立体選択的に加水分解反応を行なうこと、これらの人工酵素-基質間の多点相互作用である(a)側鎖間疎水（またはスタッキング）相互作用および(b)アミド間水素結合が生じていることを明らかにした¹⁻³⁾ (図2参照)。

(a)(b)のような相互作用は(a)が極性、(b)が非極性という相反する溶媒系で強められることから、極性勾配をもつ膜内に人工酵素と基質を一定の配向をもって適切に配置させ、バランスよく上記多点相互作用を成立させる必要がある。このような多点相互作用を通じての基質立体選択的分子認識反応のエネルギーダイアグラムは、図1のように例示され、エナンチオマー-基質間において基質取り込み過程でのバリアー1にはエネルギー差はほとんどなく、反応過程バリアー2においてそれを生じ、天然酵素様の分子認識触媒作用が発現され、イオン強度 (μ) 0.15において、エナンチオマー速度比 (L, D基質反応速度比) 28.6を与えた。この人工酵素の天然酵素様活性を高めるためには、両者の相互作用の強化が望まれるが、同時にそれを行なうことは困難であるので、反応水溶液中のイオン強度

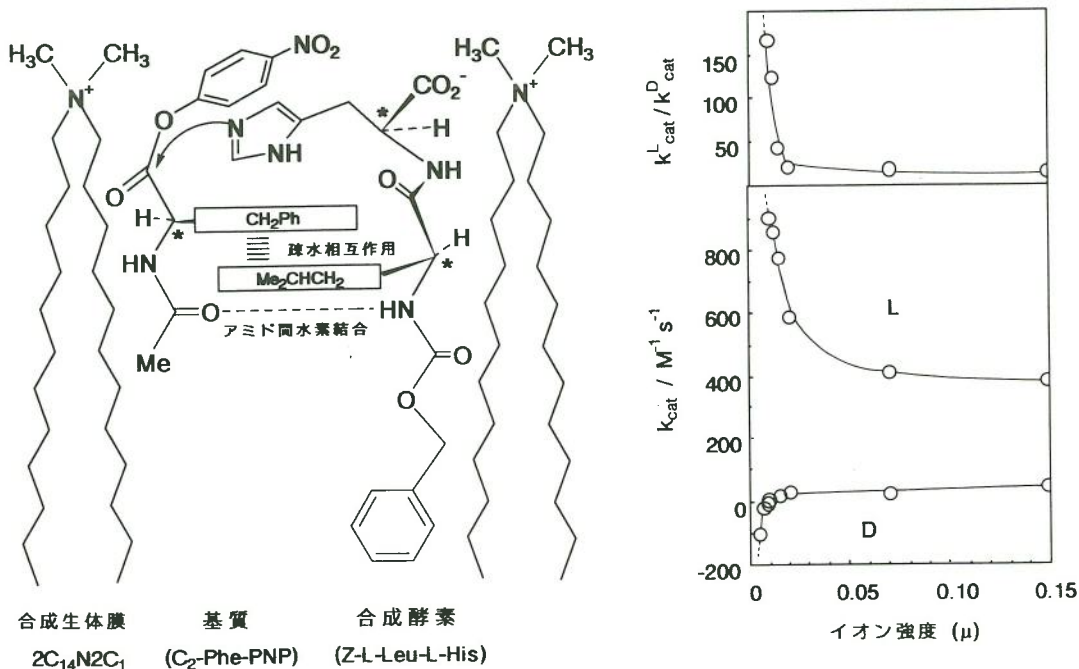


図2 ペプチド型触媒による立体選択的アミノ酸エステル加水分解反応の人工酵素-基質間多点相互作用および天然酵素様活性と基質立体選択能

(μ) を低下させベシクル膜内 (とりわけ極性頭に近い部分) の非極性低下をはかり, (a) 疎水相互作用の強化による天然酵素様活性の向上を期待した。図2に示すように, このイオン強度の低下により, ジペプチド型人工酵素 (Z-L-Leu-L-His) を用いたN-アセチルアミノ酸エステルの加水分解反応ではL(D)体基質で極めて速く (遅く) なり, イオン強度 0.01 ではエナンチオマー速度比 (k_{cat}^L/k_{cat}^D) は 167 ± 21 倍 (相当光学純度 99% 以上) にも達した⁴⁾。さらに低いイオン強度下での詳細な解析により, 人工酵素は明らかにD体基質に対して負触効果 (無触媒反応より反応速度が低下) を示し, 人工酵素-D体基質の複合体形成により一般塩基の基質求核攻撃の抑制を通じて無限大のエナンチオマー速度比をもたらすことが明らかとなった。したがって本系においては, 一方のエナンチオマーのポテンシャル障壁を「正の触媒効果」で低下させ, もう一方のエナンチオマーに対しては「負の触媒効果」により無触媒時のポテンシャル障壁よりさらに高くすることによって極限の分子認識 (基質の一方と極めて迅速に反応し, 一方を排斥する) が達成されたと考えられ, この種の酵素モデル反応では従来にない極めて興味深い人工酵素による天然酵素様反応の生起をみたことになる。

3. 酵素様反応の分子動力学解析

以上は主に, 反応速度論的解析により立体選択性発現のメカニズムを探り, 加水分解反応の反応性および立体選択性を通して, 人工酵素-基質間の反応相互作用を「予見する」ものであった。合成生体膜中の人工酵素・基質相互作用状態をNMR等のスペクトル解析で直接「見る」には, サンプルの溶解度, ピークのブロードニングなどの問題により困難も多いが, 分子あるいは分子間の幾何学的位

置 (geometry) に関する情報を高感度 NMR の NOESY (nuclear overhauser and exchange spectroscopy) から得ることができる。さらにそれらの情報に基づく分子動力学 (molecular dynamics; MD) 解析によって現象の視覚化をはかることが重要となり, 前述の人工酵素と基質の相互作用状態のMD計算を行ない, 反応過程を動的に「見た」 (口絵参照)。まず求核部位である人工酵素のL-ヒスチジン側鎖イミダゾリル基の求核性不對電子軌道をもつ窒素原子と基質エステル部位の求電子性カルボニル炭素は初めは離れた位置 (反応できない位置) にあるが, 時間の経過とともに人工酵素のイミダゾリル基のN原子が基質のカルボニル炭素のほうへ向きを変えながら接近し, 20ps 後にはこれらの反応部位は最も反応をおこしやすいように位置することが明らかとなった。このような相互作用の動的変化とともに, 人工酵素-基質間の多点相互作用なびに反応状態 (特に, 遷移状態) などについて分子軌道 (molecular orbital; MO) 解析, とりわけ反応の遷移状態過を含むプロセスについての IRC (極限反応座標) MO解析を行なうことにより⁵⁾, 優れた人工酵素の分子設計が可能になると期待される。

文 献

- 1) Ohkubo, K., H. Ishida, K. Yamaki, M. Kawata (1991) *Chem. Lett.*: 1723-1726
- 2) Ohkubo, K., S. Miyake (1987) *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*: 995-1001
- 3) Ohkubo, K., K. Hirayama, K. Yamaki (1985) *Israel J. Chem.*, 25: 282-287
- 4) Ohkubo, K., M. Kawata, T. Orito, H. Ishida (1989) *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*: 666-667
- 5) Matsuzaki, K., H. Ishida, S. Sakaki, K. Ohkubo (1991) *Proc. Kyushu Int. Symp. Phys. Org. Chem.*: 652-653

国内情報

組換え放線菌による抗菌ペプチド
“アピデシン”の生産

東京理科大学 基礎工学部 生物工学科

百瀬春生

1. はじめに

抗生物質の多くは、人類を病原菌から解放するのに大いに貢献してきた比較的低分子性の物質である。しかし、耐性菌の出現や、生体系、生態系への影響というマイナス要因も同時に提供してきた。一方、自然界では、血液中のディフェンシン、チーズ乳酸菌のナイシン、酵母のキラー因子などに見られるように、ペプチド性あるいはタンパク質性の高分子物質が微生物防除の役割をになっている事実が明らかにされており、開発次第では新しい応用の可能性が考えられる。しかし、その作用機作については、他の抗生物質に比べてまだほとんど研究されていない現状である。

ベルギーの Casteels らによってミツバチ (*Apis mellifera*) の体液から分離同定された抗菌ペプチド“アピデシン”(apidaecin)¹⁾もその一つで、プロリン6個、アルギニン3個を含んだアミノ酸残基18個からなるユニークなペプチドである。アミノ酸組成の若干異なる3種(I a, I b, II)が知られているが、いずれもほぼ同程度にグラム陰性細菌の生育を静菌的に阻害する。筆者らは、この興味あるペプチドの遺伝子を化学合成して、組換え微生物により発酵的に生産することを計画した。

2. 放線菌の分泌発現ベクター系の活用

幸い、筆者の研究室では、村尾らによって1972年に発見された放線菌の一種である

Streptomyces albogriseolus S-3253 の分泌するタンパク質性のプロテアーゼ阻害剤 SSI (*Streptomyces subtilisin inhibitor*)²⁾ の遺伝学的研究が進んでいた。分子量11,500のサブユニットの2量体からなるこのタンパク質は、熱や酸、プロテアーゼなどに対し安定で、SSI 構造遺伝子前後に存在するきわめて特徴的なプロモーター、SD 配列、シグナル配列、ターミネーターによって菌体外に多量分泌生産される³⁾。この SSI 遺伝子領域は、別の放線菌である *S. lividans* 66 と pIJ702 の組合せからなる宿主ベクター系⁴⁾ にすでにクローニングされ、構造も明らかになっているので、この組換えベクターの中の SSI 構造遺伝子のすぐ下流に、放線菌のコドン使用頻度⁵⁾ にあわせて化学合成したアピデシン遺伝子を連結し、SSI-アピデシン融合タンパク質として菌体外に生産させることにした。こうすることにより、(1) SSI の強力な分泌発現機構により目的物を菌体外に多量に生産し、容易に回収できる、(2) 細胞内外のプロテアーゼその他の要因でとかく分解されやすいペプチドが、安定な SSI をプロテクターとして無傷で生産できる、(3) 目的の融合タンパク質を分離精製する過程で、SSI 活性(抗 SSI 抗体との免疫活性およびプロテアーゼ阻害活性)によって目的物をモニターできる、などのメリットが同時に期待される。

3. SSI-アピデシン融合タンパク質の
分泌生産

図1に示したように、SSI 構造遺伝子の3' 末端側に、スペーサーのオリゴヌクレオチドを介して前述の化学合成したアピデシン(Ib)

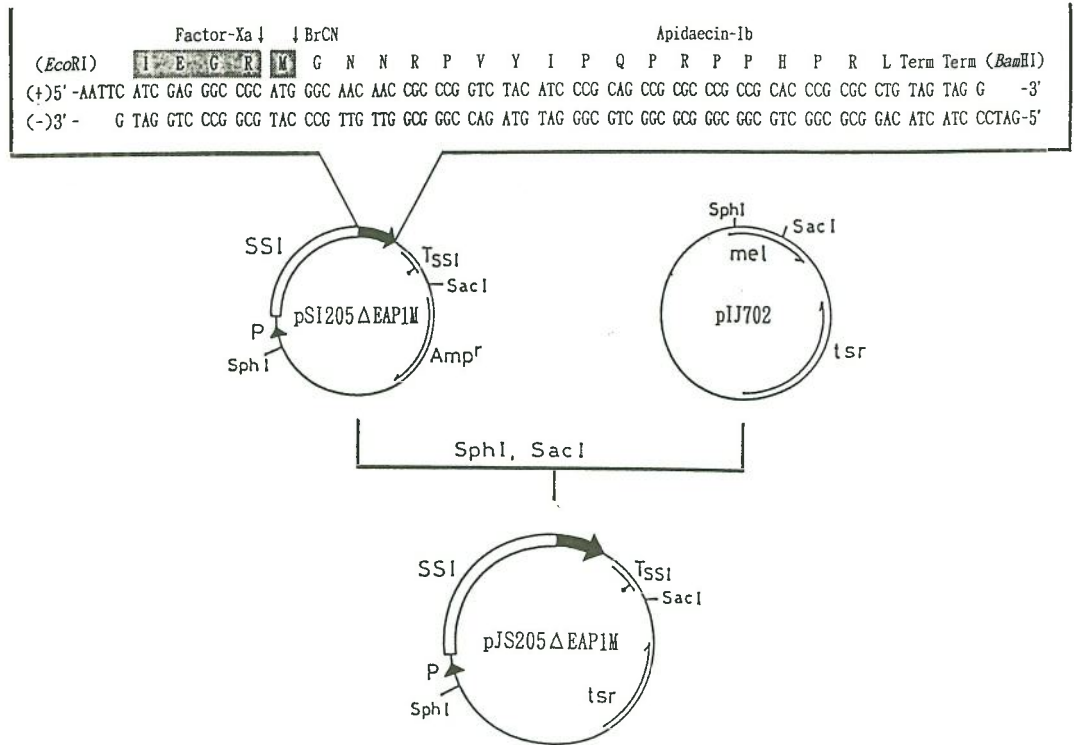


図1 SSI-アピデシン複合遺伝子の設計と放線菌分泌発現ベクターの構築
 PはSSIプロモーター, T_{SSI}はターミネーター, melはチロシナーゼ(メラニン色素形成)遺伝子,
 Amp^rはアンピシリン耐性遺伝子, tsrはチオストレプトン耐性遺伝子を示す。

遺伝子を連結した。このスペーサ DNA 部分は、菌体外に分泌生産された融合タンパク質を分離精製した後、SSI分子からアピデシンを切り離す目的で挿入したものである。すなわち、血液凝固因子ファクター Xa によつて酵素的に認識切断されるアミノ酸配列 (Ile-Gly-Arg) と、BrCN によつて化学的に認識切断されるメチオニン残基とをコードしている。このスペーサー部分と SSI 調節領域のすべてを含む SSI-アピデシン複合遺伝子を、前述の放線菌ベクター pIJ702 にクローニングし、得られた組換えベクターを宿主菌 *S. lividans* 66 に導入した。

さて、pIJ702 上のチオストレプトン耐性遺伝子 (*tsr*) を選択マーカーとして分離した形質転換株を、SSI 生産培地で培養したところ、期待通り培養上清に SSI-アピデシン融合タンパク質が蓄積していた。図 2 は、この融合タンパク質の分離プロセスの一例を示している。実験は、上清を硫酸沈殿後、タンパク質を DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにかけ、前述の方法により SSI 活性を示す画分を得た (図 2 A)。この SSI 活

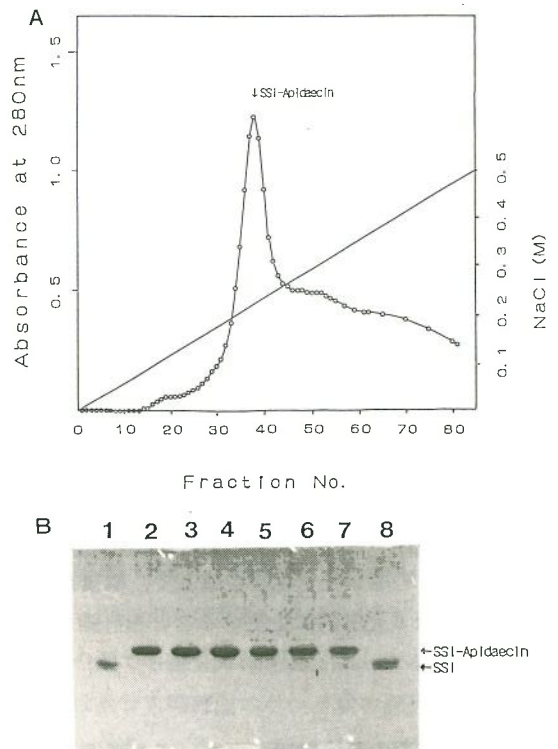


図2 SSI-アピデシン融合タンパク質の分離
 A: DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによる溶出パターン
 B: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターン
 2-7のレーンは、図Aのピークをなす6本の画分をサンプルとした。1, 8のレーンはSSI標品。

性画分は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、SSIより分子量の大きい、ほぼ均一なタンパク質であることがわかった(図2B)。さらにアミノ酸の組成分析により、SSI-アピデシン融合タンパク質の理論値と一致した。また、融合タンパク質の生産量は、培養上清1 l 当り200mg以上と計算された。

4. 融合タンパク質からのアピデシンの単離と抗菌活性

単離された融合タンパク質は、さらに逆相-HPLCで精製し、ファクター Xa または BrCN を作用させて、SSI 分子からのアピデシンの遊離を試みた。ファクター Xa の場合(スパーサー部分にメチオニンを含まないよう設計された遺伝子を使用)、還元カルボキシメチル化⁶⁾により切断を容易にして実施したが、用いた反応条件では非特異的切断が若干起こり、ヘテロなペプチドが遊離する結果となった。これに対し、BrCN を作用させた場合には、反応物について逆相-HPLCによる分画を行ったところ、単一のピークの画分に大腸菌(グラム陰性)に対する生育阻害活性が明らかに認められた。しかも、この画分のタンパク質のアミノ酸組成は、アピデシン Ib の理論値と完全に一致した。

5. おわりに

こうして、ミツバチ由来の抗菌ペプチドであるアピデシンの発酵生産と単離に一応の成功を収めたが、今後は、この発酵生産の最適化を検討して生産効率を上げ、得られた十分量の組換えアピデシンを用いて作用機作を調べる予定である。またさらに、筆者の研究室で新たに構築しつつある進化工学⁷⁾の手法を用いて、アピデシンの抗菌活性の上昇や改質

等を研究してゆく予定である。初回の実験で単離したアピデシンを用いて、その抗菌活性をグラム陽性菌である *Bacillus* 属の数株についてもテストしたところ、プロテアーゼ力価の低い変異株については阻害活性を示した。この事実は、作用機作が部分的にせよグラム陰性、陽性の細菌に共通であることを暗示している。

この研究は、筆者の研究室の助手田口精一博士、大学院修士課程学生前野正文君の協力によるものである。また、オリゴヌクレオチドの化学合成、アミノ酸の組成分析には、現学習院大学教授三浦謹一郎博士の元研究室の東大工学部熊谷泉助教授や平尾一郎助手の助力を得た。これらの方々に深謝いたします。

文 献

- 1) Casteels, P., C. Ampe, F. Jacob, C. Vaeck and P. Tempst (1989) *EMBO J.* 8 : 2387-2391
- 2) Hiromi, K., K. Akasaka, Y. Mitsui, B. Tomomura and S. Murao, eds. (1985) *Protein Protease Inhibitor—The case of Streptomyces subtilisin inhibitor (SSI)*. Elsevier, Amsterdam
- 3) Taguchi, S., K. Nishiyama, I. Kumagai, H. Momose and K. Miura (1991) *Mol. Gen. Genet.* 226 : 328-331
- 4) Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward and H. Schrempf (1985) *Genetic Manipulation of Streptomyces—A Laboratory Manual*, The John Innes Foundation, Norwich
- 5) 田口精一・百瀬春生 (1992) 蛋白質 核酸 酵素 37 : 245-257
- 6) Taguchi, S., M. Maeno and H. Momose (1992) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36 : 749-753
- 7) 百瀬春生 (1991) ペプチドを用いた進化工学システムの構築(生物の環境適応能の分子進化学的解析・利用技術の開発に関する調査, 平成2年度成果報告書) 科学技術庁研究開発局, p. 75 ~ 84

国内情報

タバコ培養細胞でのキチナーゼ遺伝子の発現

工業技術院 微生物工業技術研究所 植物細胞研究室

福田裕二

1. はじめに

植物は、光、温度、風、塩濃度、冠水、傷害、ウイルスや病原菌の感染など様々な環境からのストレスに対応している。最近では植物のこれらストレスへの適応反応のいくつかが発現レベルで理解されつつある。なかでもウイルスや病原菌の感染によつておこる過敏反応 (Hypersensitive reaction) の過程で植物体内に一群の PR タンパク質 (Pathogenesis-related proteins) が誘導される現象がタバコなどで知られ、これら PR タンパク質がウイルスや病原菌に対する防御機構として働くことが予想されている。実際、タバコでは PR タンパク質は十数種類あるとされ、そのうちその機能の明らかにされているものにキチナーゼとグルカナーゼがある。これらはカビや細菌の細胞壁を分解することから病原菌の侵入を防ぐ役割を担っていると推定されている。また PR タンパク質の誘導は遺伝子の発現レベルで調節されていることもわかっている¹⁾。即ち、植物はウイルスや病原菌の感染といった外来の刺激に反応して一連の遺伝子群を発現させる機構を備えている。外来の刺激をどのように感知し、それを細胞内に伝え、遺伝子の転写をすすめるのか興味を持たれる点である。我々の研究室ではタバコのキチナーゼ遺伝子の解析と外来の刺激に対する遺伝子の発現様式について研究を行ってきた。以下ではキチナーゼを中心に最近の研究を紹介したい。

HUKUDA Yuji

2. タバコのキチナーゼについて

タバコでは TMV (Tobacco mosaic virus) の感染などで誘導されるキチナーゼにはその性質から酸性キチナーゼ (PR-P, Q) および塩基性キチナーゼがあることが知られていた。その後各キチナーゼに対応する cDNA や遺伝子の解析により^{2,3)} 現在では図 1 に示すようにタンパク質の構造上から三つのクラスに分類されている。タンパク質の N 末端側にレクチン部分 (ヘベインドメインと呼ばれている) を持つものをクラス I キチナーゼ、クラス I キチナーゼとアミノ酸配列が類似しているがレクチン部分をもたないものをクラス II キチナーゼ、クラス I, II キチナーゼとアミノ酸配列の類似していないものをクラス III キチナーゼと分類している。塩基性キチナーゼ

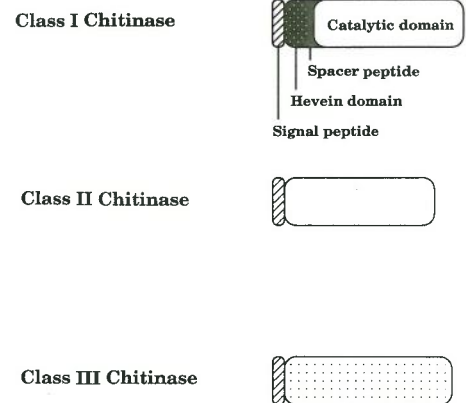


図1 タバコ・キチナーゼの分類

クラス I (塩基性)キチナーゼはレクチン部分 (ヘベインドメイン) を有する。クラス II (酸性)キチナーゼはレクチン部分を持たないが、クラス I キチナーゼとアミノ酸レベルで 65% のホモロジーを有する。クラス III キチナーゼはレクチン部分を持たず、クラス I, II キチナーゼともアミノ酸レベルでのホモロジーはない。

はクラス I に、酸性キチナーゼはクラス II に分類される。クラス I キチナーゼはキチン結合部位としてレクチン部分を持つため他のキチナーゼより酵素活性が強い。またクラス I キチナーゼは細胞内の液胞に存在し、クラス II, III キチナーゼは細胞間隙に存在する。このように各キチナーゼは酵素活性や細胞内の局在性が異なることから、病原菌に対する防御の役割の違いが予想される。例えばクラス II, III キチナーゼは細胞間隙に存在することから病原菌の侵入に対して最初に働く防御酵素群であり、さらに植物細胞内に病原菌の侵入が進むと液胞に誘導されたクラス I キチナーゼが防御に働くという二段階の防御システムが考えられている。しかも外からの刺激に対するこれらキチナーゼ遺伝子群の発現の様式も異なる可能性がある。

3. キチナーゼ遺伝子の発現様式

クラス I キチナーゼ（塩基性キチナーゼ）は TMV や病原菌の感染によって誘導される PR タンパク質の一つであることは上述した。タバコのクラス I キチナーゼに対する cDNA や染色体遺伝子群が単離され、その発現様式は遺伝子の転写レベルでさらに詳細に調べられた。その結果、クラス I キチナーゼ遺伝子の発現は TMV や病原菌の感染だけでなく、サリチル酸や植物ホルモンであるエチレンによっても誘導されることがわかった。またクラス I キチナーゼは植物体では通常若い葉ではほとんど発現していないが、葉の生長に従って（下位の葉ほど）蓄積され、また根では常に発現している。さらにタバコカルスでは植物ホルモンのオーキシンとサイトカイニンによってその発現が調節されている。このようにクラス I キチナーゼ遺伝子の発現は様々な要因によって調節を受けている。我々の研究室ではタバコのクラス I キチナーゼをコードする三つの染色体遺伝子を単離している。これら遺伝子群の 5' 転写上流領域の解析から共通に保存されている DNA 領域が複数存在することがわかった。これらの保存領域がクラス I キチナーゼ遺伝子の転写に重要な働き

をすること、即ち転写調節領域として働くことが推定される。外からの刺激が細胞内に伝達され、活性化され転写調節因子がこれら転写調節領域に結合してキチナーゼ遺伝子群の転写を促進すると予想される。様々な要因で発現調節されているクラス I キチナーゼにおける転写調節因子と転写調節領域を解析するには外からの刺激と遺伝子発現を解析する系が必要である。我々の研究室ではトランスジェニックなタバコ植物体やプロトプラストを用いた系⁴⁾で解析を続けているが、以下ではタバコ培養細胞を用いた系について紹介したい。

4. タバコ培養細胞でのキチナーゼ遺伝子群の発現

植物体で外来の刺激に対する遺伝子の発現誘導を解析する場合、刺激を受けた部位での反応とそれに伴うホルモン等の二次的な誘導の区別がつきにくく、また組織による誘導の差や細胞の状態による誘導の差が見られる。その点、タバコ液体培養は生長が速く、比較的均質な細胞を多量に得られる利点がある。そこでタバコ液体培養細胞で刺激に対するキチナーゼ遺伝子群の発現誘導の解析を試みた。植物体では病原菌の感染によってキチナーゼ遺伝子群の発現が誘導される現象がタバコ液体培養細胞でも再現できるかどうか調べた。いくつかの植物病原菌とタバコ液体培養細胞を共存させ、キチナーゼ遺伝子の発現誘導をクラス I（塩基性）およびクラス II（酸性）キチナーゼ遺伝子の cDNA をプローブとしてノザンプロット法で解析した。その結果、植物病原菌の共存によりクラス I および II キチナーゼ遺伝子の発現誘導が起こることがわかった。さらに植物病原菌の細胞壁画分であるエリシターの添加によるキチナーゼ遺伝子の誘導を解析した。タバコ液体培養細胞にジャガイモ疫病菌 *Phytophthora infestans* より調製したエリシターを添加し、クラス I およびクラス II キチナーゼ遺伝子の誘導をノザンプロット法で解析した。その結果を図 2 である。クラス I およびクラス II キチナーゼ遺

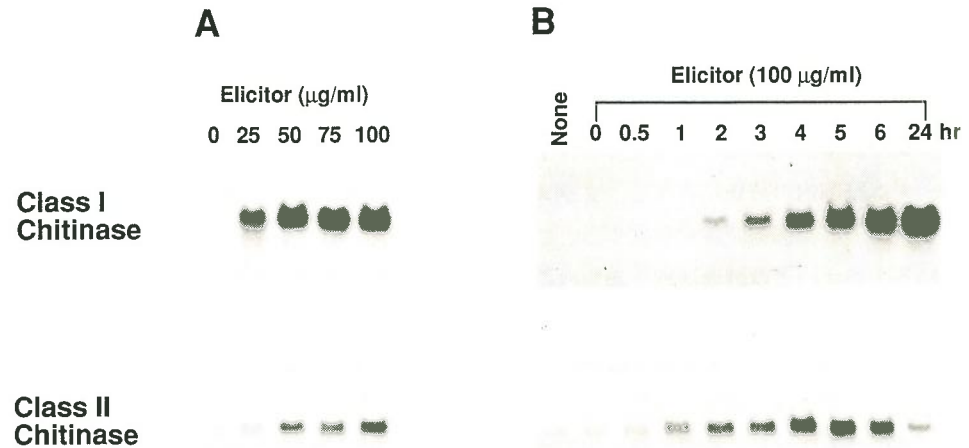


図2 タバコ液体培養細胞でのエリシターによるクラス I (塩基性), II (酸性)キチナーゼ遺伝子の発現誘導の解析
 A: 各エリシター濃度での6時間後のクラス I, IIキチナーゼ遺伝子の誘導
 B: エリシター(100 μ g/ml)による各キチナーゼ遺伝子群の誘導の経時的変化

伝子とも低濃度(50 μ g/ml)のエリシターで短時間のうちに誘導されることがわかる。またクラス I キチナーゼ遺伝子の発現誘導は24時間後も上昇するのに対して、クラス II キチナーゼの遺伝子発現誘導は24時間後に減少しており両者の遺伝子発現様式に差が見られる。これらキチナーゼ遺伝子の誘導はサリチル酸によっても起こることが確かめられた。本来植物体で観察された病原菌の感染やエリシターの接種によるキチナーゼ遺伝子群の発現誘導が、このように液体培養細胞レベルでも再現されたことから、この系を用いて様々なアプローチによる解析が可能となった。例えば、エリシターによるキチナーゼ遺伝子群の誘導に伴う核タンパク質の解析やプロトプラストでのエリシターによるキチナーゼ遺伝子の一過的な発現誘導の解析等である。

現在、我々は GUS (β -glucuronidase) 遺

伝子をレポーター遺伝子として用い、クラス I キチナーゼの転写調節領域を連結し、遺伝子導入したタバコ培養細胞を得ている。これらトランスジェニックな培養細胞でのエリシターによる GUS 遺伝子の誘導を解析することにより遺伝子発現誘導に関わる DNA 領域、それら転写調節領域に作用する転写調節因子の解明を目指している。

文 献

- 1) Ward, E.R. et al. (1991) *The Plant Cell* 3: 1085-1094
- 2) Shinshi, H. et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 14: 357-368
- 3) Payne, G. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 98-102
- 4) Fukuda, Y. et al. (1991) *Plant Mol. Biol.* 16: 1-10

出資プロジェクト情報

通気攪拌型培養槽による イネカルスからの植物体再生

(株)ナーサリー・テクノロジー
 中園敦之・滝川健次・舘山重春・須田秀雄・
 岡本彰宏・内堀博雄・松野司法

1. はじめに

単子葉植物であるイネのカルスからの液体培養による植物体大量再生技術は、イネクローン苗大量生産システム技術のキーファクターと考えられるが、その開発の必要性が認められながらも、難度の高い技術開発が要求されるため研究は進んでいなかった。当社では、従来よりこの開発を主眼とした精力的な取り組みを行い、フラスコ振盪培養での基本培養技術の開発を経て、この度他に先駆けて通気攪拌型培養槽を用いて再生植物体を5週間で1あたり5000個体レベルで、大量に再生する技術を開発した。

開発の第一段階では、生物系研究者を集合したプロジェクト体制を組み、フラスコ振盪培養による基本培養系を確立した。これは、N6培地を基本にし、シュークロース、ソルビトールやNAA, KIN等を加えた培地組成と6週間の培養期間の途中で、培地を交換または添加することを特徴とする培養方法であり、これにより基本的な液体培養技術開発の目処がついた¹⁾。なお、培地交換せず6週間連続培養し植物体を得る方法等の培養技術も別途開発した²⁾。

第二段階では、通気攪拌型培養槽を用いての植物体再生を目指して、前記条件や方法の改良並びに微妙なバランスからなる通気攪拌等培養環境条件の設定を、新たなプロジェクト体制で行った。開発は、先ず研究者個々の

基礎的アイデアを重視し、培養の基本的要因を探ることから始め、次いで主要要因と考えられる事項について担当分担し、組織的に培養条件を変化させ、適切な値を求めべく進めた。

プロジェクトは、生物系と工学系研究者の協力のもと、1レベルを中心に約80基の培養槽を用いて進めた。

2. 通気攪拌型培養槽による植物体再生

通気攪拌型培養槽による再生植物体の誘導を以下の方法で達成した。

カルスの誘導は、シャーレを用い、剥皮したササニシキ完熟種子を誘導培地上で8日間培養し、胚盤から誘導されたカルスを切りとり、新鮮培地で継代した。2週間後同一組成の液体培地に移植し、フラスコで振盪培養した。1週間後、500mlフラスコに100mlのカルス増殖培地を入れたものに、1mm以下のサイズのカルス500mgを置床し、以後同様の方法で1週間毎に継代し、増殖させた¹⁾。

植物体再生は、2.5lの通気攪拌型培養槽を用いて1mm以上のサイズのカルスを初期誘導培地800mlに200mg置床し、21日間培養した。培地組成は1/2 N6基本培地、1%シュークロース、3%ソルビトール、0.4ppm NAA, 0.5ppm KIN, 100ppm カゼイン加水分解物、12mM プロリン、25mM MESとした。21日目に1600mlの新鮮な交換培地と交換し、更に21日間培養した。交換培地の組成は、1/2 N6主要無機塩、1/2 MS 微量無機塩、ビタミン、1.5%シュークロース、1.5%ソルビトール、1.0ppm NAA, 0.5ppm KIN, 1000ppm カゼイン加水分解物、12mM プロリン、

NAKAZONO Atsuyuki, TAKIGAWA Kenji,
 TATEYAMA Shigeharu, SUDA Hideo,
 OKAMOTO Akihiro, UCHI BORI Hiroo,
 MATSUNO Shiho

2.5mM MES である。培養条件は、攪拌速度 60rpm 通気量は培地交換前100~500ml/min, 交換後 60ml/min, 温度30℃とした。再生植物体数は本実験での培養条件内では、通気量を増大させるとともに増加し 100ml/min で 2948個体/最終培地 1 l (以下同じ), 300ml/min で4277個体/l, 500ml/min で4783個体/lであった。なお、再生植物体は茎葉部が 3 mm 以上のものを計数した。

培地への酸素供給効率が再生植物体数に影響を及ぼすことは、フラスコでの誘導実験で確認されており、誘導に効果的な酸素供給効率は、酸素移動速度係数 K_{La} で表現するとフラスコで 32.8hr^{-1} であった。通気攪拌型培養槽では、初期誘導時の 800ml の培地に対し、通気量 500ml/min のとき K_{La} が 26.5hr^{-1} となりフラスコに近い条件になっている。

なお、誘導時の培養物の重量変動、培地中溶存酸素濃度、糖濃度やフラスコ内の CO_2 の経時変化等培養過程の解明に取り組んだ³⁾。

また、槽内への酸素通気により植物体誘導期間が短縮されることも確認した。

開発当初長期間にわたりファーメンター培養による植物体再生はみられなかった。既に実績のあるフラスコ培養との類似点を見いだすべく、培地流動条件やガス交換条件等に関する検討を続けたが見るべき成果はあがらなかった。フラスコとファーメンターの対比観察を続けながら工夫・改良を重ね、培地への酸素供給効率をフラスコに合わせるべく通気条件を選び、増殖時のカルスが均一流動し、容器底部へ滞留しないような流動条件にしたことにより、再生植物体数の飛躍的向上が見られた。具体的には、次のような点に着目して開発を進めた。

- ①目標の再生植物体数を確保するため、流れ状況の目視観察によりカルスの滞留がないように通気量、攪拌回転数を操作し、これらの操作量及び CO_2 、光照射条件、培養温度等の環境条件を、前期後期等の培養ステージに応じて適切に保つ。
- ②酸素移動容量係数 K_{La} をパラメータとした酸素供給条件や培養物に加えられるシアストレス条件等の定量的な指標解析を行う。

③再生植物体数の増大をはかるため、培地量、培養期間、培地交換期間、交換回数等の培養方法を適切に選定する。

④培地組成の検討、なかんずく、NAA, KIN 等のホルモン、カゼイン加水分解物、MS 等の無機塩、糖の濃度等をバランスよく配合するべく努める。

⑤使用するイネカルスは再分化能の高い良質なものを選抜する。

3. おわりに

今後の課題は、再生植物体数を安定的に確保するため pH, DO 等の培養制御パラメータの選定と、再現性のある培養条件の確立、更なる再分化効率向上のための適切な培養条件の選定、30 l, 1 kl レベルの培養槽によるスケールアップ培養技術の実証、再分化能力の高いカルス誘導のための技術開発、活着率が高く、高密度置床に耐える良質植物体の確保、培地コスト・ランニングコスト低減と変異が少なく、食味が良く、高収量のイネ F₁ 品種を開発することである。

今後、開発に残された期間、研究者間の技術交流と協力を深め、力を合わせて前述の課題解決、技術確立とシステム開発に向けて、努力していく所存である。

なお、当社では優良イネクローン苗生産システムの開発を目的として、本稿紹介の研究開発と並行して、イネカルス誘導、再分化から苗生産、供給迄の各種研究テーマを掲げて開発が進められており、その一端は各種学会発表や文献等の中で紹介されている^{4,5)} ので参照されたい。

文 献

- 1) 小林等・廣澤孝保 (1991) 育種41(別2): 254-255
- 2) 塚原正義・廣澤孝保 (1991) 植物生理学会第31回シンポジウム要旨: 90
- 3) 滝川健次・小西晴夫・内堀博雄・曾我部陵・館山重春・中園敦之 (1992) 育種42(別1): 18-19
- 4) 中園敦之 (1992) シー・エム・シー 種苗工場開発マニュアル, 139-149
- 5) 中園敦之 (1991) 植物工場学会 SHITA REPORT No. 1 種苗工場, 42-49

地域の先端研究

サトイモの不定胚形成と効率的な植物体再生

鹿児島県バイオテクノロジー研究所

軽部 稔

1. はじめに

「サトイモ」は、ヤマ（山）イモに対するサト（里）イモ、里すなわち村につくる芋という意味からその名がきたといわれ、原産地はインドを中心とした東南アジア地域と考えられている。日本への伝来は古く縄文時代まで遡るといわれているが、千五百年程前に中国で書かれた品種の特徴と三百年程前の日本の書物に記載されている品種の特徴は現在の品種と非常によく似ているといわれ、ごく一部を除いては、渡来時の品種が三千年に亘って栽培されていると考えられている。

日本で栽培されているサトイモは主として3倍体で、交雑による育種ができなかったことが、品種の分化が進まなかった大きな理由としてあげられる。

近年、全国的に組織培養への取り組みが盛んになり、各地でプロトコム様カルスからの植物体再生系を用いたサトイモの育種が行われている。サトイモは比較的早くから培養対象作物として取り組まれ、ウイルスフリー株の作出や大量増殖技術などが報告されてきた。しかし、完全に脱分化したカルスからの効率的な植物体再生系や不定胚形成系、プロトプラストからの植物体再生系など培養技術としてはまだたくさんの未開発分野が残されており、取り組みが早かったわりに技術開発が遅れている作物とすることができる。したがって、これらを解決することによりさらに効率的な育種操作が可能になってくると考えられる。

鹿児島県は全国的にも大きなサトイモの産地であり、品種としては石川早生丸、大吉を中心に、えぐ芋、蓮葉芋、土垂などが栽培されている。筆者らはサトイモの育種手法の確立をテーマとして、ひとつは体細胞変異利用や変異誘発原利用のため、もうひとつはプロトプラストからの植物体再生系の基礎技術として、効率的なカルス培養系の開発に取り組んできた。今回、えぐ芋について不定胚經由の効率的なカルス培養系を確立したのでその概要を紹介する。

2. 不定胚形成と植物体再生

培養容器内で養成したえぐ芋の塊茎（芋）を図1のように分割し、NAA及びBAを添加したMS培地に置床して、25℃暗黒条件下でカルスを誘導した。約1カ月で黄白色でフライアブルなカルスが形成された（表1、口絵参照）。

このカルスを誘導培地と同じ組成の培地で継代するとともに、ホルモンフリーのMS培地に置床して再分化を促したところ、誘導したカルスのほとんどから再生植物体を得ることができたが、カルス形成量及び継代時の増殖状況から NAA 5mg/l, BA 5mg/l 添加区

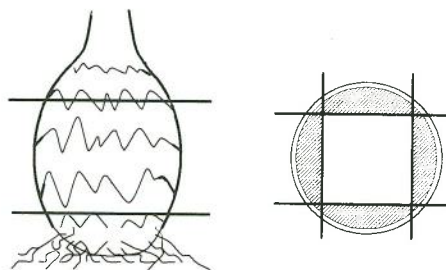


図1 塊茎の分割

表1 カルス形成と増殖の程度

BA (mg/l)	NAA (mg/l)			
	3.0	5.0	7.0	10.0
0	±	±	±	±
3.0	++	+++ (++)	+	+
5.0	+	+++ (+++)	++ (++)	++
7.0	+	++ (+)	++ (+++)	+

()内は継代時のカルス増殖程度

がもつとも効率的なカルス形成条件であることがわかった。このカルスでは継代中にも連続的に再分化が起こり、多数の植物体を容易に得ることができた(口絵参照)。

カルスの増殖のスピードと再分化個体数については表2に示した。カルスは40日で約11倍に増殖し、1gのカルスから約650個体が再分化した。

再分化の過程で、発生の起源が不定胚に由来すると思われる個体がみられたため、継代中のカルスを詳細に観察したところ、球状胚やさらにステージの進んだ不定胚が観察された。そこで個々の不定胚をカルスからはずしホルモンフリーのMS培地に移すと、明らかな極性を示し、発芽・発根した。また縦切片を観察したところ、基部は明らかにカルスから独立した組織形態を示していた。さらにこれらの分化が旺盛なカルスを走査型電子顕微鏡で観察したところ、カルス内部に多数の球状胚が形成されていた(口絵参照)。

以上のことから、一連の植物体は不定胚由来であることが明らかになり、サトイモにおける初めての不定胚形成の報告となった。同時に、一連の植物体再生系はきわめて効率の高い系であり、積極的な育種への応用が期待できる技術である。

表2 カルスの増殖と再分化(再分化培地はホルモンフリー)

カルス重 (mg)	カルスの増殖(40日後)		カルスからの再分化(40日後)	
	生重(mg)	同左比(倍)	生重(mg)	再分化個体数
71 (1,000)	801	11.2	454	46.7 (657.7)

3. おわりに

最初の項で述べたように、サトイモの品種分化は自然界の突然変異に限られていた。それが最近になって培養技術を用いることにより積極的な育種が可能になってきたところである。ただ、優れた品種を育成するためには、どれだけの個体群の中から選抜するかが重要であり、そのためには材料になる植物体をできるだけ多く、しかも容易に得られる手法が重要になってくる。また、X線照射等積極的に突然変異を誘起する手法等を用いる場合でも、植物体再生効率の高い培養系が必須条件となる。この点今回開発した手法は画期的といえることができる。

この試験で用いたえぐ芋の鹿児島県での栽培面積はそれほど大きくはない。多収ではあるが丸芋率が低いことがその主な理由である。今後こうした育種手法を用いて丸芋率の高いタイプが育成できれば、産地への大きな貢献となろう。また、栽培面積で約50%を占める石川早生丸や約25%を占める大吉等の品種についても同様の培養系を開発するとともに、これらのカルス培養系を基本にしたプロトプラストからの植物体再生技術を開発し、育種技術としての可能性をさらに拡大していきたいと考えている。

文 献

- 1) 飛高義雄(1974年)農業技術大系 10
- 2) Tim W. Yam, et al. (1990) *Plant Cell Reports* 9: 459-462

文献情報

糸状菌の欠失可能な B 染色体上に存在する抗生物質耐性遺伝子

植物病原糸状菌は宿主植物に感染を成立させるためにファイトアレキシンの代謝分解、毒素の分泌、細胞壁の分解など多くの能力を保持しているが、その遺伝学的解析はほとんど行われていなかった。しかし、近年アカパンカビや酵母を材料とした分子生物学の進歩により植物病原糸状菌においても分子遺伝学的解析が可能になってきた。現在まで既に数種の糸状菌において形質転換系が開発され、病原性に関与する遺伝子のクローニングが行なわれている。

Nectria haematococca(=*Fusarium solani* f. sp. *pisii*)はエンドウに根腐病を引き起こす病原菌で、エンドウのファイトアレキシンであるピサチンに対して感受性の低いことが知られている。これは *N. haematococca* がピサチンを脱メチル化することにより毒性の低い物質へ代謝する能力を有しているためである。著者らは先に、*N. haematococca*のゲノムライブラリーを用いて *Aspergillus nidulans* を形質転換させ、*A. nidulans* にピサチン耐性を与える DNA 断片のクローニングを行なった。得られた DNA 断片はピサチン脱メチル化能 (Pda) を有する菌 (Pda⁺) のゲノム DNA とハイブリダイズし、Pda をもたない菌 (Pda⁻) とはハイブリダイズしなかったことから、この DNA は脱メチル化遺伝子であると考えられ *Pda6* 遺伝子と名付けられた。また、*Pda6* 遺伝子はチトクローム P450 の構造遺伝子をコードしていることも明らかとなった。

今回紹介する論文では、まず *Pda6* 遺伝子を保持する二つの異なる系統間で交配を行ない、その後代の Pda について検討した。結果として、すべての後代が Pda⁺ になると期待されたが、交配によって形成された子のう胞子は、Pda⁺ : Pda⁻ = 4 : 4 の分離比を示

した。また、得られた Pda⁻ 後代のゲノム DNA は *Pda6* 遺伝子と相同性が認められなかった。これらの結果より Pda は減数分裂時に不安定で、正常に減数分裂が行なわれないことが示唆された。

次に、*Pda6* 遺伝子と染色体との関連について検討するために、パルス・フィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) を行ない *N. haematococca* の染色体の分離を試みた。本方法では 50kb~10Mb に及ぶ巨大 DNA の分離が可能である。先の交配で得られた Pda⁺ と Pda⁻ の後代とその両親の巨大 DNA を PFGE によって解析したところ、Pda⁺ の後代とその両親にのみ 1.6Mb の染色体が存在しており、Pda⁻ の後代には存在しなかった。さらに *Pda6* 遺伝子をプローブとしてハイブリダイゼーションを行なったところ、Pda⁻ の後代はどの染色体ともハイブリダイズしなかったが、Pda⁺ の後代とその両親では 1.6Mb 染色体とのみハイブリダイズした。よって *Pda6* 遺伝子は 1.6Mb 染色体に存在していると考えられた。

さらに交配で得られた多くの Pda⁺ 後代を PFGE で解析したところ、1.6Mb 染色体を保持せず、1.5Mb あるいは 0.9Mb の染色体を有する Pda⁺ 後代が確認された。この染色体は *Pda6* 遺伝子や、1.6Mb 染色体と相同性を認められたことにより、1.6Mb 染色体の欠失によって生じた染色体であることが示唆された。さらに、この 1.5Mb 染色体をもつ Pda⁺ 分離株と Pda⁻ 系統間で交配を行なったところ、1.6Mb 染色体を再構成している後代が観察された。これらの結果より *Pda6* 遺伝子の位置する染色体は容易に切断と再結合をもたらす性質をもつと考えられた。

これまで示したように、*Pda6* 遺伝子が存在する染色体は必ずしも必要ではなく、構造的にも不安定であること、減数分裂時に不安定で正常に分裂が行なわれないことから B 染色体と考えられた。B 染色体は植物、動物で既に報告されているが、最近になって糸状菌でもその存在が確認されている。*N. haematococca* の B 染色体と今まで知られている B 染色体との大きな違いは、少なくとも一つの

特異な機能遺伝子が存在することであり、*N. haematococca* では生理学的に重要な *Pda6* 遺伝子をもっている。

N. haematococca はエンドウなどの植物に病気をもたらすと同時に、腐生菌としても存在する。ピサチンが欠乏した環境下では、*Pda*⁺ の表現型が現われないことから、染色体に存在している *Pda6* 遺伝子は必須ではない。しかし *N. haematococca* が *Pda6* 遺伝子を維持していくためにはピサチンが選択的に働いているものと示唆される。

また、*Pda6* 遺伝子をもつ B 染色体が他の糸状菌に遺伝して、エンドウにおける感染性を与えているかどうかは不明であるが、B 染色体のもつ遺伝学的性質は、それらが植物病原糸状菌の宿主特異性や遺伝子の変異に関与していることを示唆している。

(抄訳 小林 隆——東北大)

KOBAYASHI Takashi

A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome

Miao, V.P., S.F. Covert and H.D. Vanetten
Science 254: 1773~1776 (1991)

文献情報

C 4 光合成遺伝子の発現調節

光合成系の遺伝子発現は重要な問題であり研究例も多い。しかし、制御に関わる因子は多様で、単純な転写調節だけでは説明がつかない。本報文は双子葉植物の C 4 光合成系において、興味深い結果を報告している。

高等植物はその光合成の機構によって C 3 植物と C 4 植物に分かれる。前者は二酸化炭素の固定をまずリブローズ二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBPCase) でおこない、後者はホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPCase) により、C 4 化合物に CO₂ を固定する植物で、単子葉植

物ではトウモロコシ、双子葉植物でも本報文であつかうヒユ科の *Amaranthus* 等がそれにあたる。

C 4 植物の成葉では RuBPCase は維管束鞘細胞に存在し、葉肉細胞で PEPCase によって固定された CO₂ は維管束鞘細胞で放出され、今度は RuBPCase で固定される。この機構は RuBPCase のオキシゲナーゼ活性による光呼吸を抑制し、C 3 植物に比べその光合成を効率の高いものになっている。

この葉肉細胞と維管束鞘細胞の効率的な役割分担の図式は、葉の発生段階や多様な C 4 光合成の代謝経路を考慮すると単純ではなく、それぞれの細胞に特異的で精妙な遺伝子発現の制御がなくてはならない。単子葉で C 4 植物のトウモロコシでは細胞の位置と光による光合成系の構築に転写レベルの制御が明らかになっているが、RuBPCase では転写後の制御もあることが報告されている。*Amaranthus* でも RuBPCase 発現の光による制御が、転写以外に翻訳の開始およびペプチド鎖の延長の段階でなされることが示唆されている。

Amaranthus は C 4 植物のなかでも、NA D-ME タイプに属し、維管束鞘細胞葉緑体にも光化学系 II の活性があるなど、トウモロコシ等とは異なった特徴がある。そこで、*Amaranthus* の葉の発生過程における、RuBPCase (大サブユニット (LSU, 葉緑体遺伝子コード) および小サブユニット (SSU, 核遺伝子コード)), PEPCase, ピルビン酸オルトリン酸ジキナーゼ (PPdK) の C 4 光合成遺伝子について発現の局在パターンを調べた。

Amaranthus hypochondriacus の葉は、二つに折り畳まれた状態の 5 mm 長のものと、展開後の 10mm 長の葉の切片を材料に用いた (以下、未展開葉、展開葉とする)。どちらの葉でも維管束は明確であったが、展開葉では維管束鞘細胞のリング状の配列がより顕著になる。

まず各酵素に対する抗体を用い酵素タンパク質の葉内での局在を蛍光抗体法で調べた。RuBPCase (LSU, SSU) は展開葉ではほぼ維管束鞘細胞のみに見出されたが、未展開葉では葉肉細胞にも認められ、C 3 植物的であつ

た。PEPCaseは展開葉、未展開葉いずれも葉肉細胞のみに存在することが認められた。PPdKはPEPCaseと同様のパターンで、また表皮ではいずれの酵素も認められなかった。

次に各酵素の mRNA の局在をアンチセンス RNA (ジゴキシゲニン-11-UTP-ラベル) を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法で検討した。RuBPCaseは、両サブユニットとも酵素ペプチドと mRNA の局在はきわめてよく一致した。つまり、未展開葉では葉肉細胞にも存在した RuBPCase タンパク質とその mRNA は、展開葉では維管束鞘細胞にのみ認められるようになった。また PPdK の mRNA はほぼ葉肉細胞のみに認められ、この結果も酵素タンパク質の局在と一致した。

しかし、PEPCase の mRNA は葉肉細胞だけではなく維管束鞘細胞にも明らかに認められ、酵素タンパク質の分布とは異なる結果となった。別のアンチセンス RNA プローブを用いるなどの特異性の検討によっても、PEPCase の mRNA が未展開葉、展開葉ともに維管束鞘細胞にも存在することに間違いのないものと考えられた。この mRNA と酵素タンパク質の局在の不一致の理由として、考えられる可能性には、①抗体が光合成とは関係のない PEPCase を認識している、②実際に機能していない mRNA をみている、③ RNA のプロセッシング、翻訳調節などの転写後のプロセスが関与している、などが挙げられる。

いずれにしても C₄ 光合成経路の構築には複雑な制御機構が考えられ、とくに双子葉植物を含む多様なメカニズムの解明が待たれる。

(抄訳 網野真一——東大理)

AMINO Shin-ichi

Regulation of C₄ gene expression in developing amaranth leaves

Wang, J.-L. et al.

The Plant Cell 4 : 173-184 (1992)

文献情報

選択マーカー遺伝子は安全か？

遺伝子工学によって優良な形質を付与された作物の実用化がよいよここ数年のうちに実現しようとしているが、ここきて形質転換のマーカーとして用いられている抗生物質耐性遺伝子、特にカナマイシン耐性遺伝子 (NPT II) の安全性が重要な問題としてクローズアップされてきた。現在用いられている技術では形質転換された植物を選抜するため NPT II などのマーカー遺伝子も一緒に導入している。そのため再分化した植物にはこのマーカー遺伝子も残存し、抗生物質耐性の形質を発現し続ける。このことによって何らかの問題が引き起こされるのではないかという可能性が指摘され、様々な議論が行われている。カナマイシン耐性遺伝子の植物遺伝子工学利用に関する安全性を考えるうえでの問題点を整理すると以下の4点になる。①この遺伝子の産物は毒性をもつか？②医学的に経口投与された抗生物質が、形質転換植物を同時に摂取することで不活化されてしまうのではないか？③植物から病原バクテリアへのカナマイシン耐性遺伝子の転移が医学的な問題を生じるか？④この遺伝子の環境への拡散によって問題が生じるか？

第1の点に関しては、この遺伝子を導入された植物にしる、哺乳類の培養細胞にしる、それによって何らかの不都合が生じたとする報告はない。また、この遺伝子の産物であるカナマイシン不活化酵素を人や動物が摂取すると、消化管のなかで速やかに不活化・分解されることがわかっている。実際、この遺伝子を導入されたトマトを食べさせられたネズミには何の悪影響も認められなかった。これらの知見はこの遺伝子の産物が我々に対し毒性を持つ心配は無いであろうことを示している。カナマイシン耐性を獲得したバクテリアは我々の消化管の中や食物の中に沢山おり、

毎日少なくとも見積もっても 1.2×10^8 のカナマイシン耐性バクテリアを食物と共に食べている。

第2の疑問に関しては、抗生物質は経口的に投与される事があるが、NPT II はタンパクであるから消化の過程で分解されてしまい、しかもその活性にATPを必要とすることから、ATPが殆ど無い消化管の中では働かない。更に経口投与されるカナマイシン及びネオマイシンは全体の0.36%にすぎない。

第3の点に関しては形質転換植物の持つNPT II 遺伝子DNAは胃や小腸で分解されてしまい、生き残る事は殆ど考えられない。人の腸内には既に 10^{12} のカナマイシンやネオマイシン耐性のバクテリアが住んでおり、耐性形質の微生物間での転移も起こっている。そこでは植物からのNPT II の転移など殆ど問題にもならないと考えられる。

最後の問題に関してはカナマイシン耐性のバクテリアは土壤中に普遍的に生息しており、耐性形質の転移も起こっている。それに比べれば、植物からの耐性遺伝子の転移の可能性は遙かに低いと考えられる。またNPT II 遺伝子が授粉によって作物から近縁の植物に移ったとしても、特に変わった形質となるわけではない。

NPT II 遺伝子はマーカーとして有用であるだけでなく、育種家にとってもこれとリンクした有用形質遺伝子を持った個体を同定する手段として有効であり、立法府や監督機関にとっても形質転換植物を識別する手段となる。最近 Cre/Lox 部位特異的組換えを利用してマーカーを容易に除去する方法が開発さ

れた。これは洗練された科学的に興味深い方法であるが、モデル植物であるタバコではうまくいっているものの、より農業的に重要な作物ではまだ成功していない。栄養繁殖をする作物では、交配によって優良なゲノムがかき回されてしまうため、この系の適用は特に厄介である。したがって、もし規制機関がマーカーを除去する決定をしたとするとジャガイモ、リンゴ、イチゴ、サツマイモ、キャッサバ、料理用バナナその他の作物へのバイオテクノロジーの適用は非常に困難になるであろう。種子繁殖をする作物でも、進行しつつある成果のうち破棄され新たにデザインしたベクターを使って作り直しになる物もあるだろう。もしこうなったら、現在進行中の形質転換作物の実用化は5~6年遅れる事であろう。マーカー遺伝子とそのコードするタンパクは人と環境の双方に何等の危険性も持たず、むしろ多くの利点を持つ物である。そして、マーカーの利用を禁止あるいは制限する科学的な理由はなく、また、その除去をする必要も全く無いと考えられる。その他の多くのマーカー遺伝子も人と環境に危険な物ではないと考えられるが、農業への広範な利用に際してはケースごとの試験が必要であろう。

(抄訳 大島正弘——生資研)
OSHIMA Masahiro

Selectable marker genes: safe for plants?

Flavell, R.B., Ed Dart, R.L. Fuchs and R.T. Fraley

Bio/ Technol. 10 : 141-144 (1992)

海外便り

USDA, BARC-Eastでの1年

農林水産省 家畜衛生試験場 鶏病支場 第3研究室
磯部 尚

科学技術庁長期在外研究員として1990年10月1日から1年間、アメリカ合衆国メリーランド州 Beltsville にある米国農務省(USDA)家畜家禽学研究所・原虫病研究室にて“鶏コクシジウム症の細胞性免疫”に関する研究を行って来ました。USDA の Science and Education 事務局(日本の農林水産省技術会議事務局に当たるとと思われる)に所属する ARS (Agricultural Research Service) は、全米を西太平洋地区、中南部地区など8地区に分け、私の行った研究室はその中の Beltsville 地区に所属し、“つくば農林団地”のような植物、森林、家畜家禽、栄養物、資源、生産物の開発・管理など農業に関係する研究機関の集まったセンター(BARC: Beltsville Agricultural Research Center)の東地区に位置しています。もともとは家畜寄生虫研究所(Animal Parasitology Inst.)に所属していたが、組織再編のため建物、施設はそのまま、現在、家畜家禽学研究所(Livestock and Poultry Science Inst.)の13研究室の一つに組み込まれています。

原虫病研究室(PDL: Protozoan Diseases Lab.)のボスは Dr. Ruff で、その下に生化学、微生物、寄生虫、免疫、分子生物の各分野を専門にする研究者が各々1人ずつ計5人おり、他にポスドク2人、海外からの visiting scientist が3人いました。またサポート部門としては、原虫株の継代、供給、コンピューター専門などの研究補助およびラボ・テクニシヤンの計8人が研究室専属で、その他動物管理員15人、洗浄・培地係3人、写真係1人を蠕虫研究室、人畜共通伝染病研究室、寄生虫

分類研究室の3研究室と共に擁していました。更におもしろいことに、中学生が理科の実習の単位のためや、summer school の高校生、メリーランド大学の獣医・動物学専攻の学生が、勉強と実益を兼ねたアルバイトに来ていて、簡単な作業や雑務を手伝っていました。PDL の年間の研究開発予算額は153万ドル(約2億円)で、運営費・雑費経費を差し引いた研究者1人当たりの研究費は約300~500万円でした。民間や大学との共同研究などでいくら grant を取れるかで研究者一人ひとりの予算やポスドク、ラボ・テクニシヤンの数が決まってしまう。アメリカでは農林・獣医・畜産学関係の予算が厳しく、ある大学では学部を閉鎖するところもあると聞きました。ポスドクの1人 TJ も東部の大学に良い就職先を探していたが無いとこぼしていました。また、Poultry Science の学会でも学術講演の他、USDA の grant に関する session があって、予算の増大、grant の審査などに関する不満げな質問が大学関係者から飛び出していました。

PDL の主な研究活動は、鶏コクシジウムに関する分子生物学的、免疫学的研究で、特に遺伝子組換えワクチンの研究、鶏の細胞性免疫、サイトカインの研究に力を入れています。共同プロジェクトとしては、日本のメーカーと鶏コクシジウムの組換えワクチン開発と、ドイツのミュンヘン大学と鶏T細胞サブセットの表面マーカー及びサイトカインの研究を行っていました。私は免疫学者の Dr. Lillehoj の下で二つの違った方向から鶏コクシジウムに対する鶏の細胞性免疫の働きを調べました。一つは、鶏コクシジウム症での原虫排除に細胞障害性T細胞が働いているかど

うか。働いていれば標的細胞表面に主要組織適合抗原(MHCクラスI)の表現があるかどうかを *in vitro* で調べました。しかしMHCクラスIが表現されていたり、されていなかったり明確な結果は得られませんでした。他の一つは、免疫抑制剤デキサメサゾンの鶏コクシジウム及び鶏の免疫系に対する影響を調べました。その結果、デキサメサゾン処理により、増体の低下、腹腔脂肪の増加、脾臓の萎縮が見られ、免疫学的にはCD8陽性T細胞、レセプターとして $\gamma\delta$ 鎖を持つT細胞、Ia陽性細胞、ナチュラルキラー細胞、IgM、IgG陽性B細胞が比率及び数的にも減少していました。これに対して、CT3、CD4及びレセプターとして $\alpha\beta$ 鎖を持つT細胞が増え、特にCD4陽性T細胞(ヘルパーT細胞)は著しく増えていました。またコンカナバリンAに対する脾臓T細胞の増殖反応、インターロイキン2(IL-2)及び γ -インターフェロン(γ -IFN)の産生は抑制されていました。抗体産生については、血清IgG及び胆汁IgAとも実験によって産生が抑制されていたり増強されていたり、明確な結果は得られませんでした。一方、寄生虫学的にはデキサメサゾン処理鶏で、初感染及び再感染においてもオーシストの産生が増え、排出期間も伸びていました。これらのことから、CD4陽性T細胞を除く免疫系細胞の減少、T細胞機能の低下がコクシジウム感染に対する感受性を増強し、再感染に対する抵抗性を低下させたものと思われる。また、デキサメサゾン処理により鶏においてCD4陽性T細胞が増加することは、マウスにおけるヘルパーT細胞のサブセットTh2細胞が増えるものと類似しており、鶏においてもヘルパーT細胞にサブセットがあり、 γ -IFN、IL-2、IL-4、IL-5などリンホカインの分泌の違いによって区別できるのか、作用的にお互いを抑制しあっているか等の点を更に調べれば興味深いと思われました。これらの成果はテキサスでの学会(第80回Poultry Sci. Meeting)で発表する機会を与えてくれました。

PDLでは2週間に一度ずつセミナーを行い、自分の実験データを紹介し、研究の位置

づけ、方向など活発な討議を行っていました。私も拙い英語で一度行ないましたが、おもしろいことにその日の担当者がドーナツやコーヒーを用意して、みんなに聞いてもらうのです。また隣の蠕虫研究室でも毎週セミナーを行っておりランチを食べながら気軽に行っていました。その他来訪者のセミナー、ワシントン近郊の研究所や大学で開かれた寄生虫研究会の月例会、デラウェア大学での大学院卒業論文発表会、国立衛生研究所(NIH)での大学院コース、獣医学会、家禽学会などいろいろな会合に参加できる機会がありました。また偶然にも私が行った直後に行なわれたPDLの研究レビューにも参加できました。レビュー班は民間人、大学及び国立研究機関から推薦された3人で構成されていました。レビューは3日間続き、研究者への個別インタビューが中心で、ラボ・テクニシャン、ポスドク、visiting scientistも参加する全体会議もありました。その他研究センターの上部の職員やプログラム・スタッフ(日本では技術会議の研究管理官)との行政的会合、施設見学も行なわれていました。内容的には日本の場合とほぼ似た感がありましたが、1研究室のレビューのためか規模が小さく、at homeな感じがしました。しかし、過去に成果の挙がらない人や研究室はスクラップされたことがあるそうで、研究者は自分の研究の重要性、成果をスライドや資料を使って熱心にレビュー班メンバーにアピールしていました。

研究所は建物がレンガ造りのためか少し古めかしい趣がし、中の研究室や実験室もスペースが狭く、機械設備も筑波の方が整っているぐらいでした。しかし、研究者の層が厚く、研究補助などの研究体制が異なるのと、情報量、物のやり取りが頻繁なので総合力で米国が勝っている感があります。また、実験に使用する牛、羊、豚などの家畜の数が多いこと、鶏舎・動物舎は建物は古いものの、冷暖房などの管理が行き届いている点も、省エネで施設費用をカットする日本と違って羨しい感じがしました。個人的には、鶏の免疫系細胞に対する各種モノクローナル抗体、遺伝的背景の違う鶏及びフローサイトメーターが頻繁に

使用できました。また、動物管理、培地・緩衝液の作製、テクニシャン、秘書など研究補助体制が日本より充実していて作業がし易かったです。しかし一方で、人手不足がディスプレイで補うためか知らないが、とにかくプラスチック製品をよく使うので、毎日山のようなゴミが出るし、RI、注射針、バイオハザードなどの処理は厳しく言われているものの、ガラス、缶、紙類の処理についてはうるさくなく、区別もせずにとんどんを放り捨てている点が気になりました。以上のように全体的な感じとして以下の二面を感じました。まず、お金の使い方、エネルギー・コストの違いがあるかも知れませんが、本当の意味で日本は豊かになったのだろうか。確かにアメリカは今経済状態が良くないと言われているからではないのかと。反対に言えば、まだ無駄ができるのは余力がある証拠ではな

いかと。一方、日本は贅肉を落して効率良く行うことによって今の経済発展を遂げたかも知れないが、ギリギリの切り詰めも限度があるのではないかと。即ち、住宅問題、労働時間の問題も含め日本は本当の豊かさを築く必要があるのではないかと感じました。反対にアメリカ人は一般に体型が大きいので、たくさん食べるし、国土が広いので、広い居住空間が必要であるみたいでした（ただし、研究室が狭いのは不思議だが）。家畜で言えば、アメリカ人は飼養効率が悪く、少しコストが掛かり過ぎるので、精神的な面を別にして、ぎすぎすした世紀末に生き残れるのは、物理的に日本人の方ではないかと感じました。したがって相反する二面を持ったアメリカと日本は、足して2で割ればちょうどま行くのではないかと勝手な感想を持った次第です。とにかく瞬く間に過ぎた1年間でしたが、中身の濃い充実した1年でした。



国際学会レポート

第18回国際冷凍会議に参加して

農林水産省 北海道農業試験場 農村計画部 農地農業施設研究室
小綿寿志

1. はじめに

筆者が研究を進めるうえで常に論文を参考にしてきたカナダ農務省の研究員 C. Vigneault氏に論文請求したのは2年前のことであった。しばらくして届いた返事の手紙の最後に、「来年8月にモントリオールで国際冷凍会議が開かれる。自分は出席するからお前も来ないか」と書かれてあった。それまで国際冷凍学会の存在さえ知らなかったが、この案内を受けて以来何とかして行って彼に会いたい欲望にかられた。当たれば儲け物の気持ちで科学技術庁の国際研究集会派遣候補者の募集に応募したところ、幸いに申請が認められ今回の国際学会出席が実現した。ここに紙面を借りて関係各位に謝意を表する次第である。

2. 会議の概要

国際冷凍協会(IIR: International Institute of Refrigeration)は各国政府が条約に基づき加入している冷凍専門分野における唯一の公的な国際機関(本部:パリ)である。日本では日本冷凍協会が水産庁の指示により連絡事務を担当すると共に、国内委員会を同協会内に設置し活動している。国際冷凍会議は4年毎に開催されるIIRの10専門委員会(表1参照)が一堂に会する会議であり、今回は1991年8月10日から16日までの1週間にわたり、カナダ、モントリオールのコンベンションセンターにおいて、“New Challenges in Refrigeration”をテーマに開催された。出席者数

KOWATA Hisashi

表1 IIRの委員会の担当分野

委員会	担当分野
A1/2 A3	極低温物理, 極低温工学 ガスの液化と分離
B1 B2	熱力学, 熱および物質の伝達 冷凍機械
C1 C2	凍結乾燥, 低温生物学, 医学的応用 食品の科学と技術
D1 D2/3	コールドチェーンと冷蔵庫 陸上/海上低温輸送
E1 E2	空気調和 ヒートポンプとエネルギー回収

は約1000人であり、日本からは大学・研究機関から約20名、民間から約30名、合計50余名が出席した。会議全体はIIRの委員会の区分をさらに細分化した約60の小セッションで構成され、提出された論文の総数は486編(内日本から32編)であった。しかし、実際にはドロップアウトが予想外に多く、3割くらいではないかという関係者もいた。会議の公用語は英語と仏語で、論文にも仏語の要旨が求められたが、実際には仏語の講演になると退席者が目立った。

3. D1委員会における発表

筆者はD1委員会において「Ice-pond refrigeration system for long-term potato storage」と題して講演発表を行った。内容はアイスポンドにおける積層式製氷において、温度-風速積算値(TWIN: Temperature-Wind Integrated Number)と名付けられた寒度指数を導入することにより、効率的な自動製氷が実現されたこと、氷融解水を利用した冷房システムの冷房性能が馬鈴しょ貯蔵に十分かつ省エネであること、さらにこのシス

テムにより越冬馬鈴しょの品質を良好に保持したまま7月まで約10カ月間貯蔵することが可能であること等であり、日本においてはアイスポンドの農業利用として先例のない研究である。

筆者と同類の研究は件の C. Vigneault 氏からの発表のみであった。氏は、外気導入による積層式製氷と融解水の予冷への利用、溜置き式アイスポンドを利用した馬鈴しょ貯蔵庫冷房、および雪を庫内に搬入して庫内空気を冷却する方法などの実験結果を紹介した。

一般に欧米では、長期貯蔵用馬鈴しょは萌芽抑制のため薬剤や放射線照射で処理しているが、筆者の研究はいずれの処理にも頼らずかつ省エネな技術であることから聴講者の関心は高く、休憩時間にも C. Vigneault 氏を始め3、4名から質問、意見を受けた。指摘された点は施設の建設コストの低減対策、庫内の温度分布の均一性、ガス環境制御技術との組み合わせの有効性などに関してである。

D1 委員会の他の発表論文は表2に示すとおりであり、また聴講した他のセッションではとくに「貯蔵中のガス制御の効果」、「食品のフリーズドライ技術」、「輸送中の温度制御技術」、「食品の凍結と解凍のモデル化」、「食品保存における放射線照射の利用」などに関する研究発表が筆者の興味を引いた。会議全体としてはヒートポンプに関する研究発表の件数が際立って多かった。

4. テクニカルツアー

会議と並行して合計17のテクニカルツアーが行われたが、筆者が参加した3件について訪問先の概要を簡単に説明する。

(1) プロヴィゴ社集配センター (Boucherville)

北米でも有数の近代的な青果物の物流センターで、広さ 10,000m² の建物内には入庫待ちのための冷却フロアの他に、品目別に温湿度が調節される (例えばブロッコリ、ニンジン、カット野菜等用は 0℃, 95% RH) 約 250m² の冷蔵庫が約 20 あり、40 冷凍トンの冷凍機 5 機により冷房されている。冷蔵庫群の中

表2 D1 委員会における発表論文名

番号	論文名	国名
388	オランダの公設冷蔵庫における肉のマテリアルハンドリングについて	オランダ
390	オープン型ショーケースの荷配列の熱効率に対する影響	イタリア
392	キューバにおけるコールドチェーンの過去および将来展開について	キューバ
394	青果物冷蔵庫の技術的・構造的要素を最適にしたときの効果	ルーマニア
395	冷凍品を扱う高層冷蔵庫の防火のために新しく応用したコンクリートプレハブ建造物	スイス
397	赤外線温度画像と画像処理による冷蔵庫の品質管理	イタリア
400	冷蔵庫の扉の選定	アメリカ
401	冬季冷熱の最も簡単な蓄熱方法	カナダ
402	アイスポンドシステムによる馬鈴しょ長期貯蔵	日本
404	溶接欠陥とアンモニア冷凍機の安全性との関係	スウェーデン

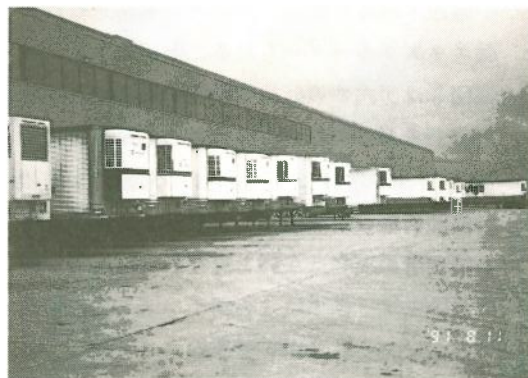


図1 荷受けのために並んだ保冷コンテナ (プロヴィゴ社集配センター)

の一室にはバナナの追熟チャンバーが並んでいる。建物の片側には同時に約30台の冷凍機付きの保冷コンテナをつけることができ (図1)、世界中から集められ貯蔵・予冷された青果物はここからチェーン店へダイレクト輸送される。従業員数は約200人で、交替制で24時間操業している。

(2) ハイドロセア社水耕団地 (Mirabel)

アリゾナ大での実験に基づき商業化した、北米で最初の水耕栽培団地である。オランダのシステムが導入された約 30,000m² の温室内 (図2) では、毎週 8,000 ダースのポストン型レタスを生産している。人工光は用いず、は種から収穫まで、夏季で約45日、冬季で約90日を要するという。生産は気象観測所とリンクした集中コンピュータシステムで制御されている。収穫後は附属の処理施設内で包装・箱詰めし、予冷後に自社の保冷車で主にモ

ントリオール市内に運ぶ。

(3) 食品研究開発センター (Saint-Hyacinthe)

この研究所はカナダ農務省の32の研究機関の中で最も新しく、先駆的技術を国内の食品工業に導入するために1977年に創設された。企業の研究者に高度な研究施設を提供し、所内のパイロットプラントにおいて食品保存や食品加工に関わる200以上のプロジェクトが実施されている。農水省の食品総合研究所よりさらに企業との結びつきが強い性格である。

所内見学では、チーズの熟成チャンパー、バキュームクッカー、凍結乾燥器、プレートフリーザー、マーガリン加工システム等珍しい施設・機器の他に、食総研でも開発した2軸エクストルーダーも見ることができた。

図3は所内の放射線照射実験施設でみた看板であるが、筆者の質問に対して担当研究者は、「カナダ国内で4、5カ所の馬鈴しょ用放射線照射施設が稼働しているが、日本のような消費者の反発はないと思う」との返答であった。

5. おわりに

今回の会議出席の最大の収穫は、同類の研究を行っている C. Vigneault 氏と直接意見



図2 苗を移植したスタイロフォーム板が浮かぶ養液プール (ハイドロセア社水耕団地)

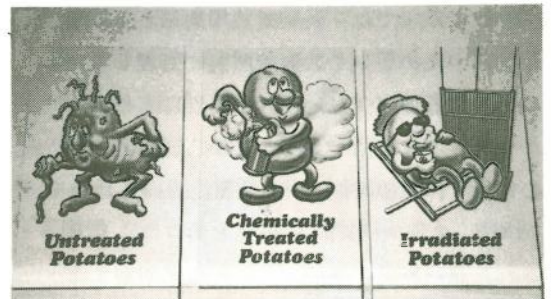


図3 馬鈴しょの放射線照射処理のPR看板 (食品研究開発センター)

交換ができたことであり、今後の研究に対し示唆と刺激を与えてくれた貴重な経験であった。アイスポンドシステムについては、民間と共同で実証試験を実施中であり、寒地における同技術の普及を目指して研究を進めている。

編集後記

前号と一緒に1～30号の総目次をお届けしましたが、いかがでしたでしょうか。当初はおぼつかない足どりでしたが、執筆者や購読会員、関係の皆様の御協力と励ましによって、何とかここまで来られたものと、心から感謝しています。紙面の構成と内容については一層皆様に喜ばれるよう心がけますので、今後ともよろしく願いいたします。

2月下旬に農水省の研究機関の企画調整部長および企画連絡室長の皆様の御出席を得て編集懇談会を開かせていただきました。そのときの御意見等を参考にして、本号から適宜総説を巻頭に掲載することにしました。御希望の課題・執筆者等御紹介いただければ幸いです。

(大畑記)

ブレイン テクノニュース (第31号)

平成4年5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