

表紙説明

さび病菌の重複寄生菌

中央：コムギ赤さび病菌 (*Puccinia recondita*) の孢子堆に寄生し、黒色球形の分生子殻を形成してひも状の孢子塊 (矢印) を噴出する重複寄生菌 (*Eudarlucacaris*)

左下：ヤナギ類のさび病菌 (*Melampsora humilis*) の人工培養コロニーに寄生し、黒色球形の分生子殻を形成し、液滴状の孢子塊 (矢印) を噴出する重複寄生菌 (*E. caricis*)

(写真提供 佐藤豊三氏)

本号の紙面

総説	1
植物の病害抵抗性と発病の機構	
国内情報	4
虐められて強くなる酵母, ウイルスの増殖を抑制する新規化合物, オゾンによる植物の傷害機構	
地域の先端研究	14
組織培養によるササユリの増殖	
文献情報	17
ミニサテライト反復領域の利用によるDNAタイプの分類, 茎頂の発達とdUTPase, BNYVVのRNA 3と病徴, 組換え狂犬病ワクチンの野外試験	
海外便り	22
欧州における大量培養技術設備調査	
特別情報	25
組換え実験小動物の利用規定	

口 絵

総 説

奥 八郎

植物の病害抵抗性と発病の機構…………… 1

国内情報

大淵 薫

虐められて強くなる酵母…………… 4

多田全宏

ウイルス増殖を抑制する新規ジアシルフロログルシノール誘導体の合成…………… 7

榊 剛

オゾンによる植物の傷害発現機構…………… 11

地域の先端研究

春木和久

組織培養を利用したササユリの増殖と球根の生育促進…………… 14

文献情報

ミニサテライト反復領域を利用してのDNAタイプの分類への試み…………… 17

茎頂の正常な発達とdUTPase…………… 18

BNYVVのRNA 3 にコードされる 2 種のタンパク質が病徴に与える影響…………… 19

組換え狂犬病ワクチンの大規模な野外試験…………… 20

海外便り

中園敦之・館山重春

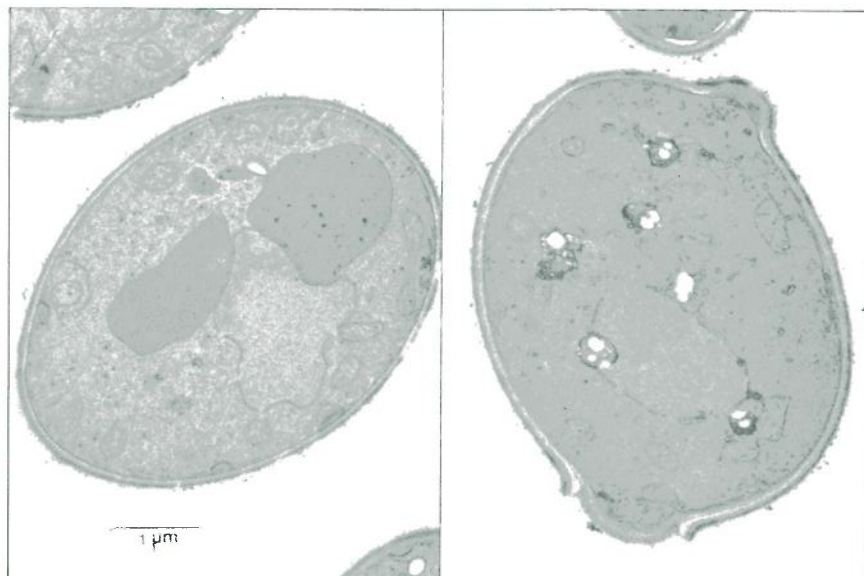
欧州における大量培養技術・設備調査…………… 22

特別情報

長谷部 亮

組換え実験小動物の利用に係る規定について…………… 25

虐められて強くなる酵母 (本文 4 ページ)



酵母細胞の透過型電子顕微鏡写真

左：正常な酵母細胞，右：圧力によって障害を被った酵母細胞

組織培養を利用したササユリの増殖と球根の生育促進

(本文 14 ページ)



暗黒条件下での液体振とう培養



約3カ月の液体振とう培養で得られたササユリの球根

植物の病害抵抗性と発病の機構

岡山大学 農学部

奥 八郎

1. はじめに

生物は一般に、その進化の過程において異物を排除し、自己を護る仕組みを獲得してきた。高等植物の微生物あるいはウイルスに対する抵抗性もその仕組みの一つであると考えられる。一方、病原微生物はその抵抗性に打ち勝って、植物に寄生し、栄養を吸収する。そのために必要な性質を病原性という。したがって、これらの仕組みを分子レベルで解明できれば、環境に、人類に無害な病害防除法を編み出す基礎となるであろう。

2. 植物の病害抵抗性

病害抵抗性は、二つに分けることができる。

1) 静的抵抗性

これは、植物が生れながらにして持っている性質が、病原菌の侵入や蔓延に不都合な場合の抵抗性で、例えば、表皮の厚さ、硬さなどは角皮侵入を行なう菌の侵入に影響を与え、サポニン、フェノール性成分など抗菌性物質を植物成分として含有する場合も抵抗性の原因となる。これらは、それぞれの性質や物質の生産を支配する遺伝子によって決まっています、感染を受ける前から発現しているもので、preformed resistanceと呼ばれることもある。また、これらの性質や成分は環境条件によって変動するので、我が国ではしばしば圃場抵抗性と呼ばれる。

2) 動的抵抗性

高等植物が微生物やウイルスの攻撃に積極

的に反応して起こす防御反応のことで、active defenseとも呼ばれ、病害抵抗性の本質は動的抵抗性にあるといっても過言ではない。

植物の細胞、組織が病原体の攻撃を受けると、健全植物にはみられない、一連の形態的、生理、生化学的反応を引き起こし、病原体の侵入、蔓延をくい止めようとする。これら諸反応は殆んど同時に作動するので、その大元を支配する遺伝子があるはずで、これを抵抗性主動遺伝子、真性抵抗性遺伝子という。この遺伝子は健全植物細胞では発現していないが、病原菌の生産する、あるいは宿主と病原との相互反応の結果生成する何らかの物質を認識することによって発現し、その結果一連の防御反応が作動するものと考えられている。

この動的抵抗性を誘発する物質はエリシターと呼ばれ、その作用の仕組みとしては、植物の原形質膜にエリシターを認識するレセプターが存在し、両者の結合の結果第二のシグナル分子が形成され、抵抗性主動遺伝子を作動させ、その遺伝子の生産物が一連の抵抗反応を支配する遺伝子を発現させると考えるのが合理的であろう。

エリシターには特異的エリシターと非特異的エリシターが存在し、前者は抵抗性品種の主動遺伝子（この場合は垂直抵抗性遺伝子という）を特異的に活性化するが、後者は品種にかかわらず植物の種のレベル、あるいは種を越えて抵抗性を発現させる。病原菌の生産するエリシターとしては、ペプチド、多糖類、キトーサン、高級脂肪酸などが知られ、多糖類の中には特異的エリシターが報告されている。金属イオン、紫外線なども非特異的にファイトアレキシン（後述）を誘導する。

レセプターがエリシターを認識してから、

動的抵抗性が発現するまでのシグナル伝達に Ca^{2+} 関与しているという報告もあるが、筆者らはタンパクのリン酸化が関与していることを証明した。動的抵抗性の具体例をあげる。

(1) パピラの形成：角皮侵入菌が侵入を始めると間もなく、被侵入細胞壁の内側に乳頭状の突起を生じ、この突起をパピラと呼び侵入に対する抵抗反応の一つと考えられる。

(2) 過敏反応：抵抗性の強い植物に病原菌が侵入すると、被侵入細胞が急激に死んで、その中で侵入菌が閉じ込められたような形で死ぬ。ウイルス病では壊死斑が形成され、ウイルスはその中に閉じこめられている。このような現象を過敏反応というが、その機構については不明な点が多く残されている。

(3) 化学的抵抗性：化学的な動的抵抗性には二つの場合が考えられる。第一は、もともと植物体に含まれる抗菌性成分が感染によって増加する場合、これには生合成自体が増加する場合と、配糖体など、前駆体から感染の刺激によって遊離、活性化する場合がある。第二はファイトアレキシンの生合成である。

ファイトアレキシシンとは、健全な植物体中には認められず、感染の刺激あるいはエリシターの作用によって、感染初期に植物が生合成し、蓄積する抗菌性物質のことで、現在多くの植物から多くのファイトアレキシシンが同定されている。化学的には、イソフラボノイド、セスキテルペノイド、ポリアセチレン等々が知られている。

低分子で、抗菌性を有しないが、病原菌の感染を阻害する物質も知られており、感染阻害物質と呼ばれる。

また、感染植物体中に、健全植物には存在しないタンパク質が現われ、その生産量と抵抗性の強さが相関することからPR-タンパク (pathogenesis related protein) と呼ばれている。PR-タンパクは最初、比較的低分子で、酸に可溶、低等電点、タンパク分解酵素で分解され難く、細胞間隙に分泌され、明らかな酵素活性を有しないものと定義されたが、最近そのうち4種類が1,3-glucanase 活性を、また別の4種類が chitinase 活性を有することが明らかにされた。これらは抗菌的酵素と

して糸状菌の膜壁に作用する。

感染による急激な細胞壁のリグニン化や、hydroxyproline-rich glycoprotein の生成は、侵入に対する防壁として抵抗性に役立つと考えられている。

3. 病原菌の病原性

植物病害の約80%が糸状菌病であるといわれるので病原糸状菌の病原性について述べる。

上述のような、植物の種々抵抗性にもかかわらず、病原菌はそれを侵して感染し、植物から栄養を吸収して増殖する。地球上の殆ど糸状菌が腐生菌であるので、植物病原菌は栄養的に腐生菌から寄生的適応によって進化してきたものと考えられ、この寄生的適応によって獲得した性質が病原性であろう。病原性は腐生菌にはみられない性質であるので、これを特異的に阻害することができれば、腐生菌や環境に悪影響を与えることなく、病害を防除できる。

病原性には次の三つが不可欠である。

1) 宿主に侵入する性質

病原菌が植物に寄生し、栄養を摂るためには先づ保護表皮を突破して植物体内に侵入しなければならない。寄生的適応の低い病原菌は植物体表面にできた傷口から侵入するが、適応の進んだ病原菌はそれぞれ独自の侵入法を備えている。いもち病菌や灰色かび病菌のように角皮侵入を行なう病原菌は、セロファンやポリビニールフォルマールなどの人工膜にも孔をあけ、気孔侵入を行なうさび病菌の夏胞子は、気孔と同じ大きさの穴をあけたインドゴムに湿度の高い側へ侵入する。最近のいもち病防除剤の多くが、いもち菌の侵入力を阻害する。

2) 宿主の動的抵抗性に打ち勝つ性質

植物体に侵入した病原菌は第二の難関として、植物の発揮する動的抵抗性に打ち勝たなければならない。いもち病菌をトマトの葉に接種すると、侵入した直後に死ぬ。これは、角皮侵入菌であるいもち病菌は、トマトにも侵入できるが、トマトの防御反応に負けて殺されたことを示している。

病原菌は宿主の動的抵抗性に打ち勝つ種々の仕組みを備えている。先づ第一の方法としては、毒素や有害な酵素を分泌して植物細胞を殺し、腐生的に栄養を摂る方法である。この方法は寄生的適応の低い菌に見られるが、絶対寄生菌のように寄生的適応が進んだ菌ではその可能性はない。宿主細胞の死は自身の死を意味するからである。

オオムギに親和性のうどんこ病菌を接種しておく、侵入細胞付近に非親和性レースのみならず、オオムギには病原性のない、メロンやエンドウのうどんこ病菌が感染できるようになる。このことは、病原菌が自身の宿主の抵抗性発現を抑制する機構をそなえていることを示している。いくつかの病原菌が、宿主の防御反応発現を抑制する物質を生産することが知られていてサプレッサーと呼ばれるが、筆者らの研究例について述べる。

エンドウ褐紋病菌は孢子発芽液中にエリシターとサプレッサーを分泌する。エリシターは分子量約7万の多糖類で、サプレッサーは数種あり、何れも低分子の糖ペプチドで、最近その2種類の全構造が判明し、サプレスチンA、Bと名付けられた。サプレスチンAはエンドウのファイトアレキシンであるピサチンの生合成を阻害する。エンドウに対しては非病原性のキク花腐れ病菌をサプレスチンBと共に接種するとエンドウに感染できるようになるので、Bは褐紋病菌の病原性因子であると考えられる。サプレスチンAとBの間には、ピサチン生合成抑制効果に対して協力作用がみとめられる。サプレスチンBは、*in vitro*では種々の植物の原形質膜ATPaseを阻害するが、*in vivo*ではエンドウのATPaseだけを特異的に阻害し、褐紋病菌の非宿主のATPaseを阻害しない。ATPaseの阻害作用は一時的である。

サプレッサーが宿主の防御反応を抑制する作用は、プロトンポンプATPaseを阻害することにより、宿主の細胞機能が一時的に弱るためであると考えられる。

罹病性の宿主にのみ害作用を示し、抵抗性品種や非宿主には無害な毒素、宿主特異的毒素を生産する植物病原菌が、*Alternaria*、

*Helminthosporium*を中心に、14種程知られているが、最近の研究によると、これらの毒素は、毒素として植物に可視的な害を与える前に宿主の抵抗反応を抑制する、即ちサプレッサーとして働く時期があるという。

最近ピサチンの3位のメチル基を脱メチルする酵素の遺伝子が *Nectria haematococca* から取り出され、病原性のない *N. haematococca* やトウモロコシの病原菌、*Cochliobolus heterostropus* に導入したところ、これらの菌がエンドウに感染するようになったという。このことは、ファイトアレキシンの分解能が病原性にとって重要であることに加えて、ピサチンがエンドウの抵抗性に重要な役割を担っていることを示している。

3) 植物を加害して発病させる性質

微生物が高等植物に感染し、栄養関係を結ぶだけでは病原菌とはいわない。植物、特に作物を加害して、減収や品質低下をひきおこすから病原菌として防除を必要とするわけである。病原菌が植物を加害する性質は、それらが生産する毒素や酵素の作用による。宿主特異的毒素以外にも多くの非特異的毒素が加害要因として関与している。野菜の軟腐病には細菌の強力なペクチン分解酵素、樹木の白色腐朽には腐朽菌のリグニン分解酵素、褐色腐朽にはセルロース分解酵素が関与している。

4. おわりに

以上概説したように、植物の病害抵抗性、病原体の病原性の仕組みの全貌が明らかにされつつある。さらにこれらの基礎研究が進展し、人類に、環境に無害な病害防除法が次々と開発されるであろう。

文 献

- 都丸敬一他(1992)新植物病理学, 朝倉
 奥 八郎(1988)病原性とは何か, 農文協
 奥 八郎(1992)植物の病害抵抗性, 発病機構とその制御に関する研究 平成4年度日本農学会受賞論文要旨, 9-12
 西村正暘・大内成志編(1990)植物感染生理学, 文永堂出版

国内情報

虐められて強くなる酵母

工業技術院 微生物工業技術研究所 細胞水研究グループ

大淵 薫

1. はじめに

微生物や動植物の細胞を触媒とするバイオリアクターの物質生産や環境浄化への応用範囲は、細胞の生理的な許容条件が制約になることが多い。生物の優れた機能の応用範囲を広げたいという実用的な要請から、好熱性や好アルカリ性などの異常環境に適応した微生物の探索が盛んに行なわれている。生物種の多様性は、生物が自分の生存条件を拡張して種の繁栄を図ってきたことの結果とみなすこともできる。地球の環境変化と進化の歴史を経て、現在通常環境で生きている多くの細胞の遺伝子が、異常環境で生きた過去の記憶

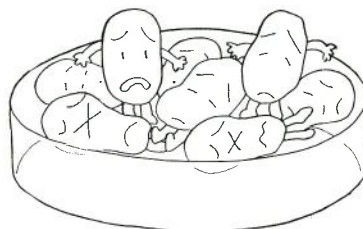
の一部を保存していることが期待される。この考え方をもとに、細胞水研究グループは酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を材料として細胞の許容条件を広げるもう一つの基礎的なアプローチを模索してきた。

2. 熱ショック応答

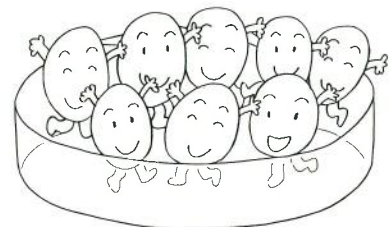
生物の細胞は、生理的に適した温度より10℃ほど高い温度に短時間さらされる形で少し虐められると、熱ショックタンパク質(HSPs)とよばれる一群のタンパク質を合成して、より高い亜致死的な高温に過渡的に耐えられることが知られている。この応答は熱ショック応答と呼ばれるが、HSPsはバクテリアから



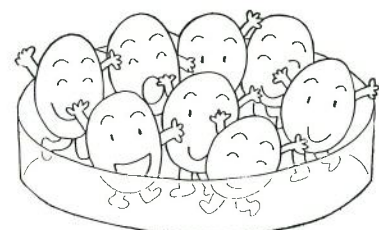
30℃で増殖する酵母



熱ショック処理をしないと、50℃で死ぬ。



40℃で熱ショック処理



熱ショック応答すると、50℃への耐性ができる。

図1 熱ショック応答による二次ストレス耐性の獲得

Obuchi Kaoru

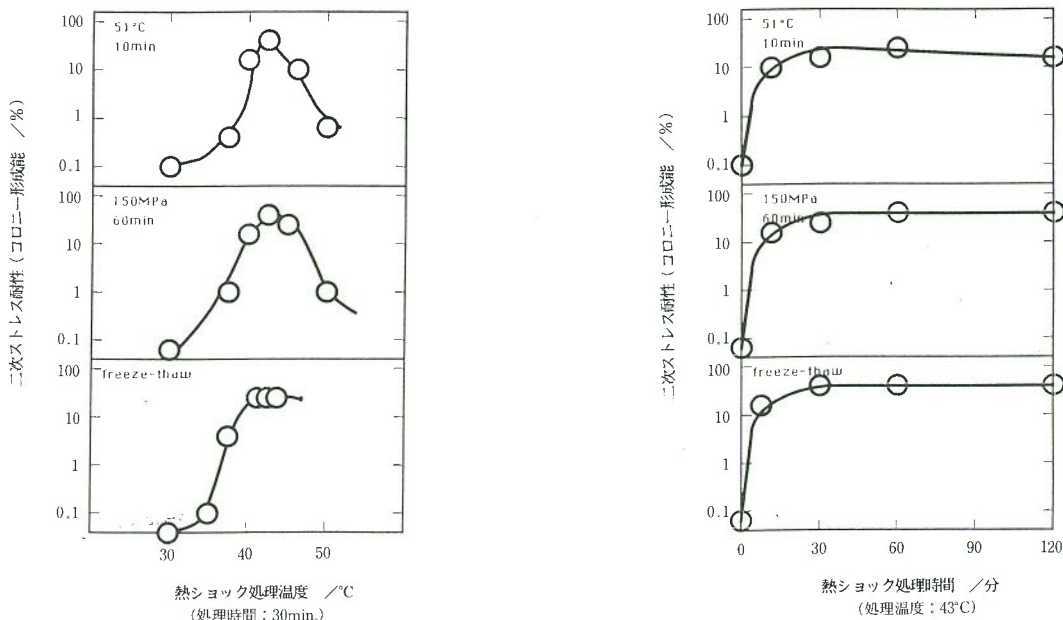


図2 二次ストレス耐性の熱ショック条件依存症

ヒトに至るまで相同性が高く、進化の歴史の初期に遺伝子に組み込まれたと考えられている。この仕組みを利用し、遺伝子上にプログラムされた異常環境耐性を活性化するスキームを図-1に示す。図では二次的な異常環境を50°Cの耐熱性で示したが、酵母細胞では150MPa(地球上には実在しない15,000mの深海の水圧に相当!)に対する耐圧性¹⁾や急速凍結融解に対する耐性²⁾で評価しても同じ結果になることが、細胞水グループの研究によって明らかになった。

この耐熱性や耐圧性は、熱ショックの代わりにエタノール環境のストレスでHSPsを誘導しても獲得されるが、HSPsの合成を阻害する条件で熱処理を行なうと獲得されなかった³⁾。したがって、HSPs合成の結果として二次ストレス耐性が得られることが明らかになった。さらに、酵母細胞が獲得した三種類の異常環境耐性は、共通の熱ショック条件(処理温度及び処理時間)依存性をしめした(図-2)⁴⁾。

3. 交差耐性の獲得

酵母は、熱ショック応答によって耐熱性ととも耐圧性や急速凍結融解に対する耐性を獲得したが、それ以外の二次ストレスに対する耐性を獲得するだろうか。細胞水グループ

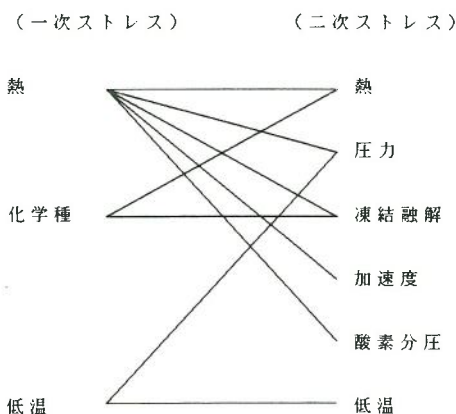


図3 酵母の交差耐性

の研究から、図3に示すような熱やそれ以外のストレス応答による様々な二次ストレス耐性の獲得を示す結果が得られている。

一次環境ストレスが、過渡的に異なる二次環境ストレスに対する耐性をもたらすことを、交差耐性とよぶ。酵母細胞が広い交差耐性を示すことは、生命を過渡的に護る共通のメカニズムが遺伝子に眠っており、外界からの脅めによってそれを覚醒させ得ることを示唆している。

4. 細胞水の構造化⁴⁾

こうして獲得される環境耐性は HSPs 合成

の他、細胞内の水の構造化とも連動していることがわかった。細胞中の水分子の運動性から核酸、タンパク質や膜脂質などの生体高分子に結合した結合水、生体高分子との相互作用の影響がまったく無い自由水、及びその中間の水の三種類の状態の水が存在する。このうち結合水は、 -50°C の低温でも凍らないという性質を利用して氷温下の核磁気共鳴法でその量と運動性を評価することができる。酵母細胞の熱ショック応答によって、不凍水が増えるとともにその運動性が低下すること、二次ストレス耐性と同様、この変化がHSPs合成によって生じることがわかった。

一方氷温下の細胞懸濁液の示差走査熱測定を行って凍る水の挙動を調べたところ、熱ショック応答によって融点が約 8°C 低下した。氷の大きさが極めて小さいときには、氷の融点はその大きさに依存することが知られている。熱ショック応答によるHSPs合成の結果細胞内の自由水の領域が小さいコンパートメントに区切られて、小さな水しかできなくなった結果、凍結融解耐性が増したと考えられる。さらにコンパートメント化は自由水領域の水の活量を低下させ、生体高分子の温度変性や圧力変性を防ぐようになったと考えている。

5. 細胞膜の安定化⁵⁾

高い圧力や急速凍結融解によって細胞が死ぬときにリン脂質の二分子膜とタンパク質などからなる膜構造が壊れていることが電子顕微鏡観察(口絵参照)などによって明らかにされている。ストレス応答によって細胞がこれらの二次ストレスに対する耐性を高めることは、ストレス応答が膜構造の破壊を防ぐ効果を有することを示唆する。

凍結融解処理の結果細胞損傷がおこると、膜の流動性が高まること炭素原子核の核磁気共鳴実験によって明らかになっている⁶⁾。この方法を用いて細胞膜の流動性の温度依存性を調べたところ、熱ショック応答をしない細胞では 50°C 以上で流動性の増加が認められるのに対し、熱ショック応答した酵母では 85°C

$^{\circ}\text{C}$ 以上でもこのような変化が認められなかった。同じ温度領域でのDSC(示差走査熱量測定)の結果はNMRの結果にこれに対応した結果を示した。即ち、 55°C 付近のタンパク質変性と協動的な脂質の相転移が、熱ショック応答によるHSPs合成の結果抑制された。このことは熱ショック応答が膜のタンパク質構造を過渡的に安定化することを示している。

6. 今後の課題

細胞の仕組みを生命の維持に不都合な環境条件にあわせるうえで、急激かつ短期的な環境変化に過渡的に耐えるのと、緩慢かつ長期的環境変化に何世代にもわたって耐えるのでは異なる戦略が用意されているかも知れない。こうした仕組みを実用的に活かすためには、双方の仕組みの異同を明らかにする基礎的な研究が必要である。細胞水グループでは酵母の耐圧性安定変異株等を得て、その耐性の解析を行なっている。過渡的な耐性と長期的な耐性に関与する遺伝情報や、タンパク質の機能の解析を行い、実用的な系への発展の可能性を追求したい。

文 献

- 1) Iwahashi, H., S.C. Kaul, K. Obuchi and Y. Komatsu, (1991) *FEMS Microbiol. Lett.* 80 : 325
- 2) Komatsu, Y., K. Obuchi, H. Iwahashi, S.C. Kaul, M. Ishimura, G.M. Fahy and W.F. Rall (1991): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174 : 1141
- 3) 大淵 薫・S.C. Kaul, 岩橋 均・小松泰彦 (1991): 凍結及び乾燥研究会誌 37 : 40
- 4) Obuchi, K., H. Iwahashi, S.C. Kaul and Y. Komatsu, (1992): in "Physics and Chemistry of Ice (Maeno, N. and T. Hondoh, ed.)", 220-227, Hokkaido University Press, Sapporo
- 5) Obuchi, K., H. Iwahashi, S.C. Kaul and Y. Komatsu, (1992): "High Pressure and Biotechnology (Balny, C., R. Hayashi, K. Heremans and P. Masson, ed.)", in press, John Libbey Eurotext Ltd., London
- 6) Obuchi, K., S.C. Kaul, H. Iwahashi, M. Ishimura and Y. Komatsu, (1990): *Cryo-Letters* 11 : 287

ウイルス増殖を抑制する 新規ジアシルフロログルシノール誘導体の合成

東京農工大学 農学部 生物有機化学研究室

多田全宏

1. はじめに

多くの植物は何等かの抗菌物質を有している。人類は長い歴史のなかで経験的にこの事を知り、これらの抗菌物質を含む植物のあるものを香辛料や香料や生薬として、あるいは農薬として利用してきた。花は植物の生殖組織であるためか、これらの抗菌物質が最もたくさん含まれている組織であると報告されている。しかし花の化学成分に関する報告は非常に少ない。我々は植物の花に含まれる抗菌物質の構造とこれらの物質の示す様々な生理活性について研究してきた。その結果、オトギリソウ科植物に含まれる抗菌物質が、強い「抗ウイルス活性」と「抗アレルギー活性」を示すことがわかった。これらの生理活性物質を分離し、構造を決定し、類似化合物を合成し、活性発現に必要な最小部分構造を推定しようとする一連の研究の中から、強い抗ウイルス活性を示す新規ジアシルフロログルシノール誘導体を合成することができた。以下これまでの研究経過についてのべる。

2. 抗ウイルス活性を示すフロログルシノール型天然物

「オトギリソウ」は古来、外傷薬として利用されてきた。我々はこれまでにオトギリソウ科植物、「ビヨウヤナギ」(*Hypericum chinense*)の花から、chinesin Iおよびchinesin II¹⁾、「オトギリソウ」(*Hypericum erectum*)の花から otogirone、根から otogirin²⁾と命

名した強い抗菌活性物質を単離し、各々の構造を図-1のように決定した。これらの物質の持つ生理活性について種々検討したところ、いずれも強い「抗ウイルス活性」³⁾と「抗アレルギー活性」⁴⁾を示すことが解った。Chinesinsはエンベロープを有するRNAウイルスである家畜の水疱性口内炎ウイルス(VSV)とエンベロープを有するDNAウイルスであるヘルペスウイルス(HSV-1, HSV-2)に対し強い合成阻害活性を示したが、エンベロープを有しないDNAウイルスであるポリオウイルスに対しては活性を示さなかった。これらの物質の構造を比較して見ると、いずれも分子内にフロログルシノールの部分構造がある。最近抗ウイルス活性を示すフロログルシノール型天然物に関して、我々のグループ以外からも、いくつかの報告がされている(図1)。

Sessiliflorene, sessiliflorol A, およびBは *Melicope sessiliflora* から単離され、ヘルペスウイルスに対して活性を示すアシルフロログルシノール誘導体である⁵⁾。

Isomallotochroman, butyrylmallotochromanolは *Mallotus japonicus* から単離され、ヘルペスI型ウイルスの合成を阻害する⁶⁾。同じ植物から得られた mallotojaponin と mallotochromene は human immunodeficiency virus (HIV) の逆転写酵素を強く阻害することが報告されている⁷⁾。

また *Eucalyptus grandis* から得られた euglobal-G1, G2, G3⁸⁾、および *Syzygium polycephaloides* から得られた syzygiol は発癌ウイルスである Epstein-Barr ウイルスの活性化を阻害する⁹⁾。

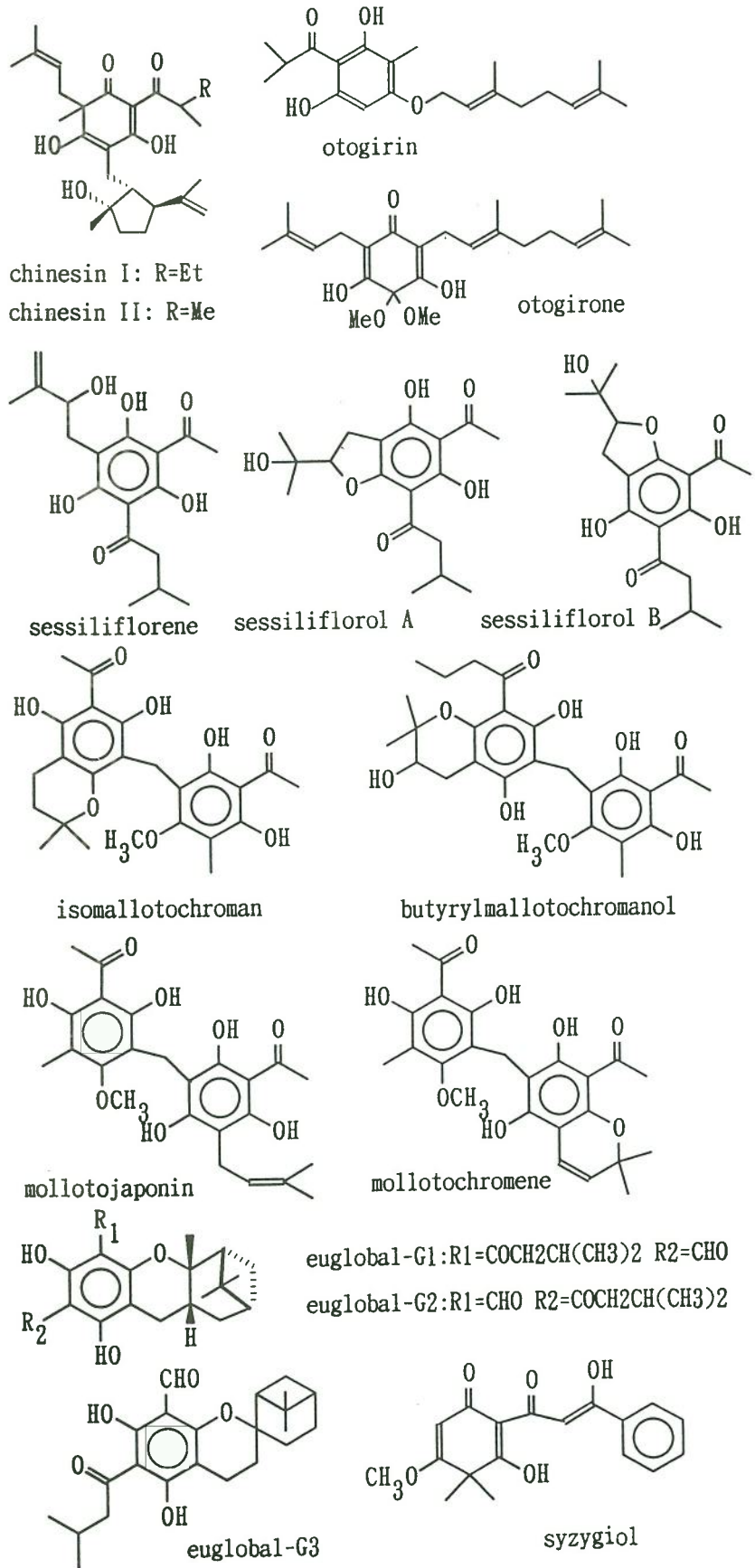


図1 抗ウイルス活性を有するフロログルシノール型天然物の構造

3. アシルフロログルシノール誘導体の合成と抗ウイルス活性¹⁰⁾

以上の抗ウイルス活性を示す天然フロログルシノール誘導体の構造から、これらの活性発現に必要な最小構造単位はアシルフロログルシノールまたはアルキルフロログルシノール

であろうと推定し、幾つかのフロログルシノール誘導体を合成し、それらの化合物の構造と抗ウイルス活性の関係について検討した。

合成は図2のような経路で行った。Lewis酸の存在下、フロログルシノールを各種カルボン酸によりアシル化し、モノアシルフロログルシノール(4-8)およびジアシルフロログルシノール(9-20)を合成した。モノアシル

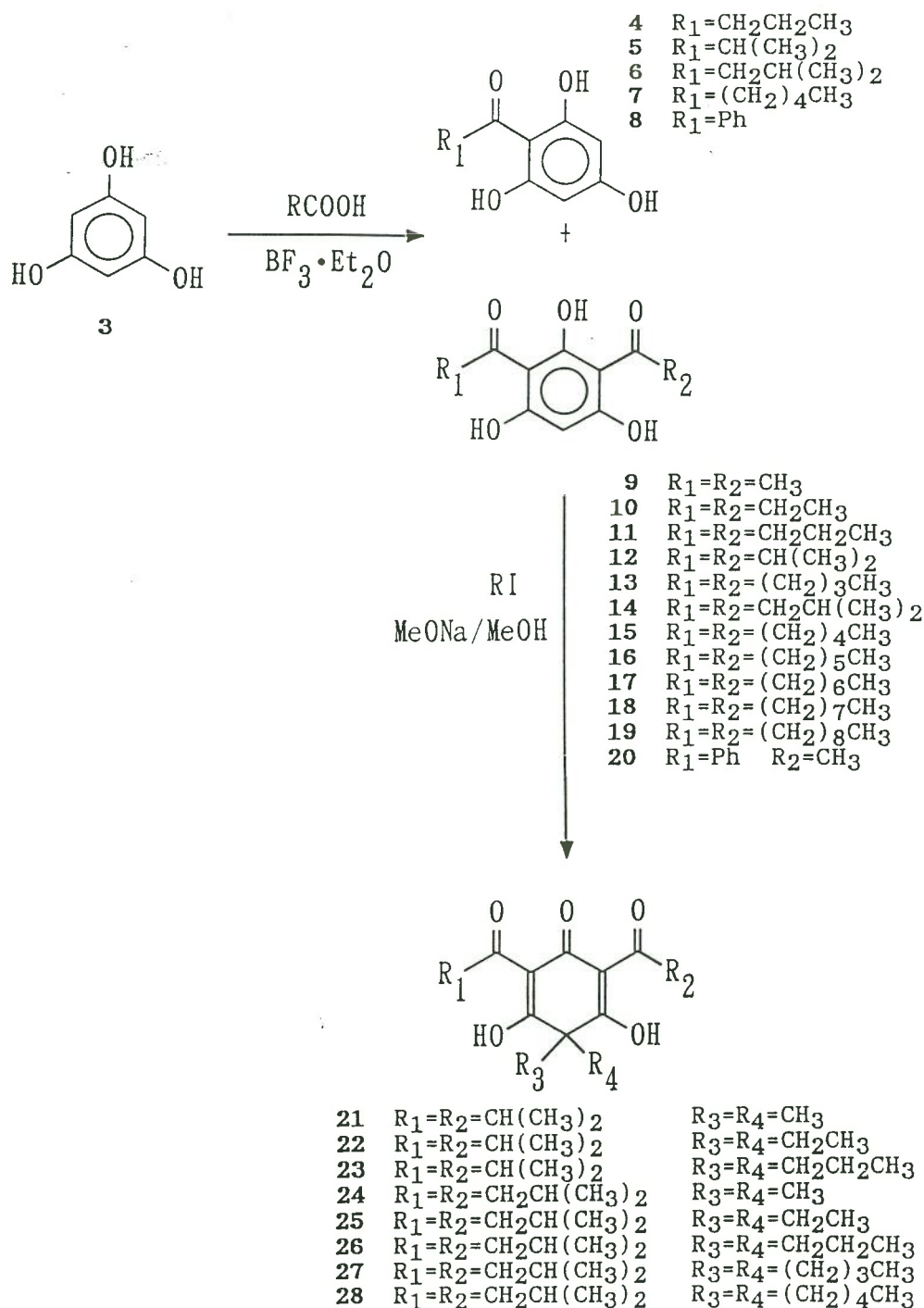


図2 アシルフロログルシノール誘導体の合成経路

化とジアシル化の制御はカルボン酸の量によって行った。Chinesinsが6員環上の一つの炭素原子上に二つのアルキル基を有することから、次に塩基の存在下、ハロゲン化アルキルによってジアシルフロログルシノールのアルキル化を行い、2,6-ジアシル-4, 4-ジアルキルシクロヘキサン-1,3,5-トリオン(21-28)を合成した。

以上のようにして合成した化合物にはいずれもHSV-1と、VSVに対する増殖阻害活性が見られ、アシルフロログルシノールの部分構造がこれらの物質の抗ウイルス活性発現に必要な部分構造であることを示していた。次に、chinesins (I, II)とこれらの合成化合物を用いて、VSVに対する増殖阻害活性と構造との相関について検討した。ジアシルフロログルシノール(11, 12, 14, 15)は相当するモノアシルフロログルシノール誘導体(4, 5, 6, 7)に比べ、ウイルスの増殖を強く阻害した。アシル基の炭素数が5または6のジアシルフロログルシノール(12, 13, 14, 15)に最も強い活性が認められ、0.4~1.0 $\mu\text{g/ml}$ でVSVの増殖を 10^{-3} ~ 10^{-5} に抑制した。アシル鎖長の増加または減少に伴い、活性は弱くなった。抗ウイルス剤は抗ウイルス活性が強くても、

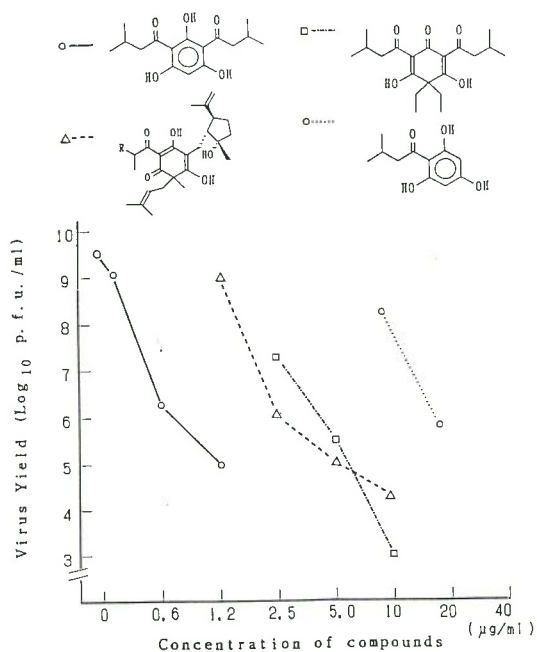


図3 Chinesinsおよび合成アシルフロログルシノール誘導体のHEL細胞中のVSVに対する抗ウイルス活性

細胞毒性が強いと使用できない。2,6-ジアシル-4, 4-ジアルキルシクロヘキサン-1, 3, 5-トリオンは2~8 $\mu\text{g/ml}$ で同様の活性を示したが、細胞毒性は比較的lowかった。化合物25は10 $\mu\text{g/ml}$ でVSVの増殖を 10^{-6} にまで抑制することができた(図3)。

化合物12を用いてVSVに対する増殖阻害の作用機構について調べたところ、ウイルスのRNAとタンパク質の合成を阻害していることがわかった。

エイズウイルス(HIV)もVSVと同じエンベロープを有するRNAウイルスであるので、これらの物質のHIVに対する活性について検討しているが、現在までに満足できる強さの活性物質は得られていない。

文 献

- 1) Nagai, M. and M. Tada, *Chcm. Lctt.* 1987, 1337-1340
- 2) Tada, M., K. Chiba, H. Yayada and H. Maruyama (1991) *Phytochemistry* 30 : 2559-2562
- 3) Tada, M., T. Takakuwa, M. Nagai and T. Yoshii (1990) *Agric. Biol. Chem.* 54 : 3061-3063
- 4) Tada, M., K. Chiba, T. Takakuwa and E. Kojima (1992) *J. Med. Chem.* 35 : 1209-1212
- 5) Chan, J.A., E.A. Shultis, S.A. Carr, C.W. Debrosse, D.S. Eggleton, T.A. Francis, L.J. Hyland, W.P. Johnson, L.B. Killmer, D.B. Straiger and J.W. Westley (1989) *J. Org. Chem.* 54 : 2098-2103
- 6) Arisawa, M., A. Frjita, T. Hayashi, K. Hayashi, H. Ochiai and N. Morita (1990) *Chem. Pharm. Bull.* 38 : 1624-1626
- 7) Nakane, H., M. Arisawa, A. Fujita, S. Koshimura and K. Ono, *FEBS Lett.* 1991, 83-85
- 8) Takasaki, M., T. Konoshima, T. Shingu, H. Tokuda, H. Nishino, A. Iwashima and M. Kozuka (1990) *Chem. Pharm. Bull.* 38 : 1444-1446
- 9) Nishizawa, M., H. Yamada, J. Sano, S. Ito, Y. Hayashi, H. Ikeda, Chairul, M. Shiro and H. Tokuda, *Tetrahedron Lctt.* 1991, 211-212
- 10) Chiba, K., T. Takakuwa, M. Tada and T. Yoshii, *Biosci. Biotech. Biochem.* 投稿中

オゾンによる植物の傷害発現機構

北海道東海大学 工学部 生物工学科

榊 剛

1. はじめに

オゾン(O₃)は光化学オキシダントの主成分であり、自動車や工場の排ガスに含まれる窒素酸化物と炭化水素から、光化学反応によって二次的に生成される大気汚染物質である。近年、自動車数の増加に伴って都市域におけるオキシダントの発生が深刻化しており、O₃によると思われる植物被害もしばしば観察されている。

O₃は酸化力が強く、様々な生体成分と反応するが、とりわけ脂肪酸の不飽和二重結合との反応性が高く、不飽和脂肪酸の破壊に基づく生体膜脂質の変性がO₃の初期傷害であると考えられてきた。事実、単離細胞やオルガネラの懸濁液に高濃度のO₃を通気すると、膜脂質の不飽和脂肪酸が分解されることが確かめられている。しかし、植物体をO₃に曝した場合には、可視傷害が発現しても脂肪酸の分解は認められないとする報告もあり、一致した結論が得られていない。そこで本研究では、O₃に曝した植物の傷害発現の仕組みを明らかにする目的で、葉の脂質及び脂肪酸の変化に着目して研究を行った。

2. オゾン傷害と脂質変化

ホウレンソウ(*Spinacia oleracea* L.)を温室内でO₃(0.5 ppm, v/v)に曝すと、数時間を経て葉がしおれ始め、最終的にはクロロシスなどの可視傷害が発現して枯死に至る。そこで、O₃に曝した葉の脂肪酸組成を経時的

に分析したところ、O₃処理を始めてから約8時間が経過し、可視傷害が顕在化し始める段階になって初めて不飽和脂肪酸の分解が起こった¹⁾。一方、脂質組成について調べたところ、O₃処理開始の初期から著しい変動が認められ、特にモノガラクト脂質(monogalactosyldiacylglycerol; MGDG)を含む2, 3種類の膜脂質がすみやかに減少し、代わってトリアシルグリセロール(triacylglycerol; TAG)が大量に蓄積することを見出した¹⁾。MGDGは葉緑体膜の主要脂質であり、その著しい減少は葉緑体膜の構造破壊につながる。このことは、O₃による植物の初期傷害として、不飽和脂肪酸の分解よりもむしろ膜脂質組成の変動が重要であることを示唆している。一方、TAGは種子などに多量に含まれ、発芽時のエネルギー源となる中性脂質であるが、通常緑葉細胞にはほとんど存在しない。そこで、O₃によって引き起こされるこれら脂質変化の機構を明らかにするために、その代謝経路を調べることにした。なお、ホウレンソウ葉において見出されたこれらの脂質変化は、O₃感受性植物のタバコ、ダイコン、トマト、ソラマメ、ヒマ、インゲンなどをO₃に曝した場合にも共通して見出された。

3. 脂質変化の代謝経路

O₃に曝したホウレンソウ葉から葉緑体を単離し、等張液に懸濁して保温したところ、O₃処理2時間以内に葉緑体内で遊離脂肪酸の生成が著しく高まっていることを見出した²⁾。更に、遊離される脂肪酸の種類から、O₃によってMGDGを加水分解する酵素、ガラクトリパーゼの活性が上昇していること

が明らかになった³⁾。遊離脂肪酸には毒性があり、光合成などの生理機能を阻害することが知られており、このことが、 O_3 による植物傷害の一つの要因になっていると考えられる(図-1)。一方、 ^{14}C で標識した遊離脂肪酸を O_3 処理葉に与えたところ、acyl-CoAを経て1,2-ジアシルグリセロール(1,2-DAG)に結合し、すみやかにTAGに代謝変換されることが明らかになった³⁾(図-1)。

この結果は、 O_3 に曝した植物葉内で遊離脂肪酸を代謝する反応系が作動していることを示している。そこで、この代謝系を明らかにするため、遊離脂肪酸の受容体となる1,2-DAGの由来に注目して研究を行った。その結果、①MGDGと O_3 によって増加するTAGは、結合する脂肪酸の位置特異性、及び分子種組成がきわめて類似していること、② ^{14}C で葉脂質を標識したハウレンソウを O_3 に曝したところ、MGDGからガラクトースがはずれて1,2-DAGが生成し、これに遊離脂肪酸が結合してTAGが合成されていること³⁾。③MGDG→1,2-DAGの反応は、葉緑体のガラクトシルトランスフェラーゼによって触媒されていること^{3,4)}、及び、④遊離脂肪酸はガラクトシルトランスフェラーゼを活性化する作用を持ち、自身の受容体となる1,2-DAGの生成を促進していること⁴⁾、などが明らかになった。したがって、 O_3 によってMGDGは二つの経路で代謝され、一方は遊離脂肪酸を経て、他方は1,2-DAGを経てともにTAGに変換されており、結果として、 O_3 に曝された植物葉ではMGDGが減少しTAGが多量に蓄積したものと結論された。

4. オゾンによる植物傷害の機構

以上の結果をまとめて考えると、図-1に示すような植物傷害の機構が示唆される。即ち、 O_3 はまず葉細胞に侵入し、ガラクトリパーゼという葉緑体酵素の活性を著しく上昇させる。その結果、ガラクトリパーゼは葉緑体膜に作用し、MGDGを次々に加水分解して遊離脂肪酸を生成する。この遊離脂肪酸の毒性

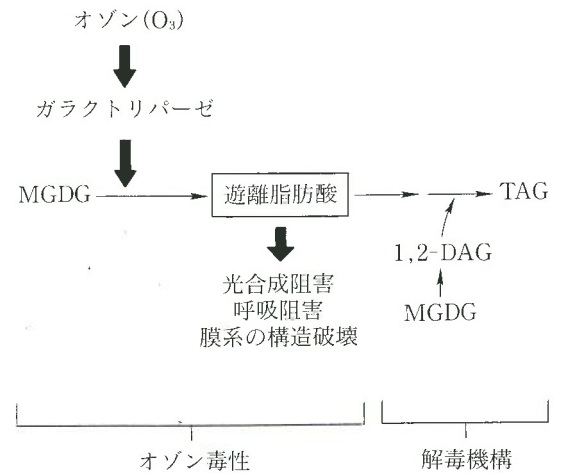


図1 オゾンによる植物傷害とその解毒機構
MGDG ;モノガラクト脂質
1,2-DAG;1,2-ジアシルグリセロール
TAG ;トリアシルグリセロール

が、 O_3 による植物の生理機能傷害に関与していると考えられる。一方、植物細胞には遊離脂肪酸をTAGに代謝し解毒する反応系があらかじめ備わっており、 O_3 接触の初期にこの反応が強力に作動してTAGが蓄積したものと考えられる。しかしながら、傷害が更に進行し、葉緑体膜脂質(MGDG)の減少が許容限度を超え、遊離脂肪酸の代謝もままならず最終的に枯死に至るものと考えられる。

5. おわりに

以上が、我々の研究から明らかになった、 O_3 による脂質変化と傷害発現の筋道である。もし、これらの仮説が正しければ、 O_3 によってガラクトリパーゼ活性が上昇する機構を抑えてやれば、あるいはガラクトリパーゼそのものを欠損する植物が得られれば、 O_3 に対し抵抗性を示すのではないかと期待される。遺伝子工学的手法を用いてガラクトリパーゼ欠損植物を作出するため、現在ガラクトリパーゼ抗体の調製を行っている。更に、もしこれらの脂質変化が O_3 特有の現象ならば、TAGなどの脂質成分を分析することで、野外植物の O_3 傷害の診断に使えるかもしれない。そのためにも、様々な環境ストレスに曝された植物で、上記の脂質変化が発現するかどうかを検討する必要がある。なお本研究は、著者が国立環境研究所(旧国立公害研究所)

に在職中に行ったものである。

文 献

- 1) Sakaki, T., J. Ohnishi, N. Kondo and M. Yamada (1985) *Plant Cell Physiol.* 26 : 253-262
- 2) Sakaki, T., K. Saito, A. Kawaguchi, N. Kondo and M. Yamada (1990a) *Plant Physiol.* 94 : 766-772
- 3) Sakaki, T., N. Kondo and M. Yamada (1990b) *Plant Physiol.* 94 : 773-780
- 4) Sakaki, T., N. Kondo and M. Yamada (1990c) *Plant Physiol.* 94 : 781-787

BRAIN 国際テクノフォーラム

免疫研究のフロンティア 家畜感染症への応用

主 催：生研機構

協 賛：獣医免疫研究会 後援：農林水産省家畜衛生試験場

日 時：平成4年10月26日（月）13～18時

場 所：全共連ビル（東京都千代田区平河町2-7-9, TEL 03-3265-3111）

< 講 演 >

総合司会 日本生物科学研究所 山内 一也

1. 動物の健康増進のための免疫学的アプローチ

ガルフ大学獣医学部（国際獣医免疫委員会 委員長）

Bruce N. Wilkie

2. ISCOM による免疫反応の誘導

スウェーデン農科大学獣医学部 Bror Morein

3. 抗原捕捉器官としてのニワトリのファブリシウス嚢と新しいワクチン接種法への応用

熊本大学 医学部 浴野 成生

4. リポソームとワクチン

岡山大学 医学部附属分子細胞医学研究施設 保田 立二

5. 家畜感染症の診断・予防へのサイトカインの応用と展望

農林水産省 家畜衛生試験場 横溝 祐一

参加費：15,000円

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 担当者：谷口, 上田, 玉木

TEL 03-3205-6565 FAX 03-3205-6566

地域の先端研究

組織培養を利用したササユリの 増殖と球根の生育促進

島根県農業試験場

春木和久

1. はじめに

ササユリは本州中部以西に分布する芳香のある白色から淡紅色の花をつけるユリで、かつては島根県内にも多数自生していた。しかし、地域の開発がすすむにつれてしだいにその自生地が少なくなり、現在ではその姿をみるのが難しくなっている。また、山間部に残るわずかな自生地でも、心ない人たちによる乱獲によってその数が激減しているのが現状である。

中国山地の奥部にある吉田村では現在でも多数のササユリが自生しており、村で保護しているにもかかわらず、開花時期には不法採取がしばしば発生している。そこで、同村ではこのササユリを観光資源として「村おこし」に利用しようと、ササユリの保護だけでなく積極的な増殖と栽培方法の検討を始めている。また、農業試験場でも同村の依頼を受けて、ササユリの増殖法の研究を行っている。

組織培養を利用した大量増殖についての研究はすでに各地の研究機関で行なわれており、その成果も多数発表されている。しかし、組織培養で得られた小球は、テッポウユリなどと異なって、植え付け後開花までに数年を必要とするので、早く開花させるためには培養時にできるだけ大きな球根を作ることが必要となる。当場では現在、液体培養を利用したササユリ小球の生育促進法を検討しているので、その概要を紹介する。なお、この研究は農林水産省の「地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業」(平成3～7年度)

により実施しているものである。

2. 無菌植物体の育成と増殖

培養母材となるササユリの無菌植物体は優良個体の種子または花卉基部、花梗切片から育成した。種子は開花後50～60日頃のさやを滅菌して摘出し、ホルモンフリーのMS培地に置床して培養を行なった。また、滅菌した開花前のつぼみから花卉基部あるいは花梗を切り取り、BA 0.5mg/l およびNAA 0.5mg/lを含んだMS培地に置床した。いずれも約3カ月後には小球が形成されたので、ホルモンフリーMS培地を入れた植物培養用フラスコに移植して培養を続けた。

ササユリの増殖は、無菌植物体の球根切片を用いて行なった。BA 0.1mg/l およびNAA 0.1mg/lを添加したMS培地に約3mm角のりん片切片を置床したところ、2カ月後に切片1個当たり約1個の小球が得られた。約3g(直径約2cm、りん片15枚)の球根を利用したとすれば、この球根から約3mm角の切片は200～250個取れるので、このような球根からは2カ月後には200～250個の小球が得られることになる。このようにして得られた球根をホルモンフリーのMS培地に移植し、1個当たり0.15～0.35gになったものを球根の生育促進のための実験に利用した。

3. 固形培地による球根肥大

ホルモンフリーのMS培地(ゲルライト0.2%で固化)を用いて植物培養用フラスコで実験を行なった。0.3～0.4gの小球を200mlフラスコに5個ずつ植え付けて60日間培

HARUKI Kazuhisa

表1 固形培地でのササユリ球根の肥大

照度	培養開始時重量	2カ月後	
		重量	肥大率
	g	g	
3000 lx	0.37	0.77	2.1
1000 lx	0.33	0.65	2.0
暗黒	0.39	0.69	1.8

注) 値は20個の平均値
肥大率=調査時の重量/培養開始時の重量

養し、培養開始時の重量と培養終了時の重量を測定して球根の肥大率を調査した。培養は3000lx, 1000lx, 暗黒条件で行なった。その結果、肥大率は明るいほうがやや高く、培養開始2カ月後には約2倍の肥大率で球根の重量は0.65~0.77g(直径約10mm)となった(表1)。

4. 液体培地による球根肥大

500ml 三角フラスコに 300ml の培地と約0.15gの小球を10個入れ、直径9mmの除菌フィルターを付けたアルミホイルでふたをして旋回式振とう培養(100rpm)を暗黒条件で行なった。培地は、MS培地にしよ糖あるいはグルコースを30, 45, 60g/lを添加したもの

を用いた。1カ月毎に球根の重量を測定して培地を新しいものと交換し、3カ月間培養を続けた。しよ糖を用いた場合には球根のりん片が開くものが多く、グルコースを利用した場合に比べて正常な球根が少なかった。グルコースを添加したもののなかでは30g/l添加区で球根肥大が良く、培養開始2カ月後(2回目の培養後)には培養開始時の重量の8.3倍、培養開始3カ月後(3回目の培養後)には培養開始時の重量の20.5倍(重量3.7g, 直径約20mm)になった(表2)。

次に光条件について検討した。グルコース30g/lを添加したMS培地を利用して約0.33gの小球を上記と同様な方法で3000lx, 1000lxおよび暗黒条件で培養を行なった。培養開始2カ月後(2回目の培養後)、培養開始3カ月後(3回目の培養後)ともに明るい条件で培養したもののほうが球根肥大率が高かったが、分球する球根やりん片の開く球根が多数みられた。これに対して、暗黒条件で培養した場合にはよくしまった球根が得られた。暗黒条件での肥大率は2カ月後には4.4倍、3カ月後には7.7倍であり、重量2.55g(直径約15mm)まで生育した(表3)。

このように、液体培養を行なうと固形培地

表2 液体振とう培養における糖の種類、濃度と球根肥大

糖	濃度	培養開始時重量	1カ月後		2カ月後		3カ月後	
			重量	肥大率	重量	肥大率	重量	肥大率
	g/l	g	g		g		g	
しよ糖	30	0.15	0.39	2.6	1.07	7.1	2.45	16.3
しよ糖	45	0.17	0.59	3.5	1.58	9.3	3.34	19.6
しよ糖	60	0.17	0.57	3.4	1.50	8.8	3.03	17.8
グルコース	30	0.18	0.56	3.1	1.50	8.3	3.70	20.5
グルコース	45	0.18	0.52	2.9	1.31	7.3	3.40	18.9
グルコース	60	0.17	0.48	2.8	1.05	6.2	2.21	13.0

注) 表1に同じ

表3 液体振とう培養における光条件と球根肥大

光条件	培養開始時重量	1カ月後		2カ月後		3カ月後	
		重量	肥大率	重量	肥大率	重量	肥大率
	g	g		g		g	
3000 lx	0.34	0.85	2.5	2.35	6.9	4.56	13.4
1000 lx	0.33	0.73	2.2	1.65	5.0	3.23	9.8
暗黒	0.33	0.73	2.2	1.45	4.4	2.55	7.7

注) 表1に同じ

に比べて球根肥大が速く、培養開始2カ月後では固形培地に比べて2～4倍の肥大率を示した。さらに、3カ月培養することによって直径20mmの球根を得ることも可能となった。

5. おわりに

自生地で開花しているササユリの球根を調べてみると、直径が30mm前後で開花しているものがみられる。今回の実験では3カ月の培養で20mm以上の球根も得られており、このような球根を定植した場合、定植後比較的短期間で開花することが期待される。得られた球根は現在移植してその後の生育を調査中である。現在のところ、開花した個体は観察されていないが、1年程度の球根養成で開花可能な球根が得られることを目標にして研究を続けている。

現在ササユリの栽培試験はほとんど行なわ

れておらず、栽培方法は未知の部分が多い。自生地から採取してきたササユリは、畑や植木鉢に植えておくと、その翌年は開花するものの、しだいに草勢が弱くなり、ついには消滅してしまうことをしばしば経験している。ウイルスに感染するためか、あるいは栽培環境が不適切なためか明らかではないが、平坦部での栽培はかなり難しいものと考えられる。今までは栽培試験に必要な球根の確保が困難であったために、ササユリの栽培試験を計画しても実施が難しかった。しかし、以上述べてきたようにササユリの増殖が可能となって同一クローンの球根が必要なだけ入手できるようになれば、今後は栽培試験もすすめることができるようになると思われる。今後は自生地の個体数減少をくいとめるためだけでなく、新しい作目としてもササユリが利用されるようになることを期待したい。



文献情報

ミニサテライト反復領域を利用したDNAタイプの分類への試み

ミニサテライト DNA とは、特定の塩基配列を持つ短い領域（約20塩基程度）が直列に数十個前後連続したものである。ミニサテライト DNA は多大の多型性を示し、染色体上に散在している。当然のことながら、ミニサテライト DNA はメンデル遺伝をし、サザンブロット法等で検出可能である。このミニサテライト DNA はジェフリースらが1985年に発見して以来、今日までに多くの種類のミニサテライト DNA が発見され、親子鑑定などに利用され始めている。

実際の例として、ヒトの *DIS8* 座位にあるミニサテライト DNA を利用した解析を以下に紹介する。このミニサテライト DNA は20塩基からなる配列がタンデムに連続したものであり、制限酵素 *Hae* III で切断可能な領域を持つ A タイプと切断不能な T タイプが組み合わされたものである。彼らは A タイプおよび T タイプそれぞれ特異的にアニールするプライマーと、近傍の非ミニサテライト DNA 領域にアニールする領域間で PCR 法で行い、アガロース電気泳動によって分析している。そしてこの手法を MVR-PCR (minisatellite-PCR) 法と命名し、特許出願をしている。あらかじめクローニングされたミニサテライト領域を基質に、適当な条件で MVR-PCR を行うと、ラダー状に A タイプおよび T タイプに由来するバンドが出現した。このバンドパターンは調査したコーカーサス人 (251人) と日本人 (83人) の間で、最初の50反復領域において必ずミスマッチが見られた。これらの解析は必ずしもクローニングする必要はなく、ゲノム DNA をそのまま用いても同様の結果が得られた。コーカーサス人 (251人) および日本人 (83人) の集団において、最初の50番目までに A タイプ、B タイプ、および A と B のどちらにも属さない O タイプの出現

する頻度はそれぞれ72.9%、25.5%、および1.6%であった。また、ミニサテライト DNA の反復数が50より少ないものは、その母集団によって異なり、コーカーサス人と日本人とでそれぞれ5.6%と23%であった。

このミニサテライト DNA を利用して最も有効とされるものに親子の鑑定がある。仮に父親が A 型 B 型、母親が C 型 D 型とすればその子供は四つのケースが考えられるが、例えば A 型 C 型になるという具合である。ある裁判では98.9%の確率で父親ではないと伴定されたという。また、コーカーサス人において、DNA の多型性は32の種類に分類できたという。

解析に用いた *DIS8* のミニサテライト DNA は非常に多型を示すが、幾つかの突然変異が見出されている。いずれも組換えによるものと思われるが、同じ座位間および異なる座位間の両方で起きたと考える組換えが観察された。組換えは配偶体あたり0.0122の確率で発生しており、通常の約700倍もの高率であった。

以上のように、ミニサテライト DNA を利用すれば、親子鑑定などの手段として非常に有効な方法である。ただし、遺伝病の連鎖マーカーとしてはやや不適と考えられるが、10 ng 程度で解析可能なこと、MVR-PCR 法を用いて解析すれば、異なる研究室で得られたデータとも比較検討でき、広くデータベースを構築することもできる。そしてこの方法は親子鑑定のみならず、DNA の変異などの研究対象としても有用であると考えられた。

(抄訳 梶原英之——生資研)

KAJIWARA Hideyuki

Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing.

Jeffreys, A.J., A. MacLeod, K. Tamaki, D.L. Neil and D.G. Monkton
Nature 354 : 204, 21 November, 1991

文献情報

茎頂の正常な発達と dUTPase

著者らは茎頂組織の発達過程をあきらかにする目的で茎頂組織に特異的な発現を示す遺伝子をトマトの *anantha* ミュータントを使って解析している。

トマトの *anantha* ミュータントでは花芽が組織分化以前の段階にとどまり、分裂組織が分枝し続ける。その結果花芽はカリフラワーのような外観を呈する。彼らはこのミュータントの茎頂、発達中の葉、野生型株の花のタンパク質プロフィールを比較し、*anantha* の花芽の頂端に多量に存在しているいくつかの茎頂特異的なタンパク質を見いだした。そして、このうち一つ、P18と呼ばれるタンパク質に対するポリクローナル抗体を用い、*anantha* の茎頂由来の poly(A)⁺RNA より作成した発現ライブラリーから、対応する cDNA クローンを得た。この cDNA の配列より予想される P18 のアミノ酸配列をもとにタンパク質のデータベースを検索した結果、P18 タンパク質は dUTPase であることが示唆された。そこで著者らはさらに、P18 フラクションには dUTPase 活性があること、またこの活性は抗 P18 抗体によって阻害されることを示し、P18 タンパク質は dUTPase であることを明らかにしている。

dUTPase は大腸菌などでは常にかなり高い活性を保っている。この酵素は、(1) dTTP の合成経路の一つとしての働き、また、(2) dUTP をすみやかに除去し、dUTP が DNA 中に取り込まれた際に細胞内で起こるウラシルの除去とそれに引き続く DNA 鎖の切断を予防する機能を果たしているとされている。(2)に関連して、例えばクラミドモナスにおいて、dUTPase 活性の変動によってクロロプラスト DNA の分解が制御されていることが知られており、dUTPase が形態形成に関与している可能性もある。

著者らは、組織化学的手法により P18 タンパク質やその mRNA の組織内における局在性を調べており、それによると初期の花芽の茎頂で P18 遺伝子が高い活性を示したのは apical dome (AD) と provascular strand (PV) の細胞群であり (これは *anantha* ミュータントにおいても、野生型においても同様であった)、P18 遺伝子は AD の領域ではどの細胞でも一様に強く発現していた。そして、茎頂から離れるにつれて、他の細胞では発現が急激に弱くなるのに対し、PV の細胞群ではその発現レベルを保つというパターンが観察された。また、一般の栄養生長を行うシュートの茎頂では、花芽とほぼ同様に AD と PV の領域で P18 遺伝子の強い発現がみられるが、花芽と異なり茎頂の最外層 (L1 層) ではこの遺伝子がほとんど発現していないという興味深い特徴を示した。著者らは以上のような観察より、P18 遺伝子の発現は茎頂の一定の領域内においては細胞周期に無関係に一律に発現しており、それは細胞の meristematic potential (PV などの維管束系の細胞は形成層をつくるという面から茎頂の組織と類似しているとも考えられる) のマーカーとも考えられるものではないかと述べている。また、dUTPase が茎頂の発達においてどの程度の重要性を持っているのかを今の時点で云々するのはまだ早いようであり、まず DNA 合成系を形成している他の要素がどのように調節されているのかを知ること、また dUTPase の活性を (例えば遺伝子組換えで) 変化させることにより茎頂の性質にどのような変化が現れるのかを調べるのが今後の課題であるとしている。

(抄訳 浜田和行——日本たばこ・植開研)

HAMADA Kazuyuki

A meristem-related gene from tomato encodes a dUTPase: analysis of expression in vegetative and floral meristems

Pri-Hadach, A., D. Hareven and E. Lifschitz

The Plant Cell, 4: 149-159 (1992)

文献情報

BNYVVのRNA 3にコードされる2種のタンパク質が病徴に与える影響

分子生物学的手法の発達によって、様々な植物ウイルスとその宿主植物との間における相互作用が、分子レベルで解明されている。本稿で取り上げるビートえそ性葉脈黄化ウイルス(BNYVV)は、テンサイの根部を犯すウイルスで糖含量や収量の減少をもたらす重要な病原ウイルスであり、その病原性解明に向けてヨーロッパおよび日本で精力的な研究が進められてきた。本ウイルスは、furovirus群に属し、4種の1本鎖(+)RNAをゲノムとして持っている。RNA1と2はウイルスゲノムの複製およびパッケージングに関与し、RNA3は根中でのウイルスの増殖や移行に、またRNA4は菌(*Polymyxa betae*)による伝播に関与すると考えられている。本ウイルスを様々な植物体に接種すると、RNA3の有無によって病徴が著しく変化する。シーケンス解析の結果、RNA3には分子量25kDaのポリペプチド(P25)をコードするORF(open reading frame)の他に、6.5kDa及び4.6kDaのポリペプチドをコードするORFが存在した。これらORFと病徴との関連性を明らかにするため、様々なRNA3のミュータントクローンを*in vitro*で作成し、そこから得られる転写物をRNA1, 2と共にツルナの葉に接種して病徴の観察を行なった。

試験したディレーションミュータントのうち、ORFの外側にディレーションをもつP25は、野性型である完全長のRNA3を接種したものと同一病徴yellow spot(YS)を示した。それに対し、P25のORFの内部にディレーションやフレームシフト、ポイントミューテーションを行い、P25が不完全または発現しないよう処理したミュータントを接種した場合は、RNA1と2のみを接種したときの病徴と類似し、マイルドな病徴であった。この結果からYS病徴誘導は、完全長のP25

が重要である。

一方、本実験で用いたディレーションミュータントの中で、YS病徴よりも強いnecrotic spot(NS)病徴を示すものが存在した。P25のORFの3'末端から下流には、6.5kDaポリペプチドをコード可能なORFがP25のORFとオーバーラップして存在しているが、通常このORFは発現しない。NS病徴を示したミュータントは、P25のORFの3'末端を除くすべてのORF領域がディレーションされたもので、その結果ORFの発現が可能となりNS病徴を誘導するものと考えられた。次に、このNS病徴を誘導するミュータントのORFの3'末端にGUS遺伝子を結合させ、GUS活性を測定した。コントロールとして用いた野性型の配列にGUS遺伝子を連結した場合と比べて高いGUS活性が認められ、本ORFは実際に植物体中で発現していることが明らかとなった。また、本ORFの内部に終止コドンを作り、不完全なタンパク質を発現させたところ、NS病徴は失われ、マイルドな病徴を示した。以上より、本ORFの発現がNS病徴誘導に関与していることが示されたことから、本ORFをORF Nとした。

さらにこのORF NをBNYVVとは全く無関係のDNAウイルスであるカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)のgene IIの位置に組み込み、CaMVの宿主であるがBNYVVに対しては非宿主であるカブの葉に接種した。gene IIは、CaMVの虫媒伝染のファクターをコードしており、ウイルスの感染性、パッケージング、移行には、必須ではないことがわかっている。CaMVに感染したカブ葉は葉脈透過やマイルドなモザイクを示すが、CaMV/BNYVVキメラ体に感染したカブは、えそを誘導した。これより、Nタンパク質はBNYVVのコードする他のタンパク質等は必要とせず、それ自身で植物体にえそを誘導することが示された。えそがこのタンパク質によって直接的に引き起こされるのか、または植物体に過敏反応を誘導することによって生じる、間接的な現象であるかは不明であるが、Nタンパク質は極端な疎水性であることがアミノ酸配列から予想されていることから、

細胞の膜構造に結合しやすく、過剰発現によって膜構造に影響を与え、その結果細胞死をもたらしている可能性もあると著者らは結論づけている。

(抄訳 小河原孝司—東北大農)

OGAWARA Takashi

Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3 influence symptom phenotype on leaves

Jupin, I., H. Guilley, K.E. Richards and G. Jonard

The EMBO Journal 11: 479-488 (1992)

文献情報

組換え狂犬病ワクチンの
大規模な野外試験

狂犬病は発病した場合、ほぼ100%死亡する極めて危険な人畜共通伝染病である。本病は数千年前より知られていたにも拘らず、現在も世界中で多発している。欧州や北米では毎年野生動物の狂犬病が多数認められ、それらの動物の捕獲が行なわれてきたが効果はなく、本病の予防対策に苦慮してきた。1978年より、欧州では弱毒生ワクチンによる経口投与が主としてキツネに行なわれ、ある程度の効果を上げてきた。しかし、このワクチンはスカンクに効果がなく、げっ歯類には病原性がある。そのうえ病原性の逆変異の可能性もあることから、さらに安全で効果のあるワクチンの開発が望まれてきた。最近、狂犬病ウイルス(ERA株)の糖タンパクをコードするG遺伝子を挿入した組換えワクチニアウイルス(VVTGgRAB)が構築され、この組換えウイルスが野生動物の経口生ワクチンとして有用かつ安全なことがキツネやアライグマで実験的に確認された。また著者らは先に小規模な野外試験を行ない、このワクチンの野外での安全性を確かめた。そこで、つぎに、このワクチンのキツネにおける有効性を野外で検

討するために、ベルギー南部の2,000km²の地域で大規模な野外試験が行なわれた。この論文はその成績を示したものである。

ワクチンはプラスチック袋に入れた10⁸以上の感染価の組換えウイルスを、植物と動物タンパクに魚油を混ぜて合成ポリマーで固めた餌に挿入したもので、動物が摂取した痕跡を検査するために150mgのテトラサイクリンも添加してある。ワクチンの散布は1989年11月、1990年4月及び10月の3回に分けてヘリコプターで行なわれた。合計25,000個のワクチンが平均80mの高さから投与された。ワクチン散布後、1990年1~3月、4~10月及び1990年11月~1991年4月の3期間に合計10頭の狂犬病に罹ったキツネと178頭の健康なキツネが採集された。これらのキツネは死体で発見されたか、ハンターによって撃たれたもので、狂犬病の診断と歯でのテトラサイクリンの有無によるワクチン摂取の検査が行なわれた。

最初の採集時期(1990年1~3月)の摂取率は74%(17/23)で、狂犬病と診断されたキツネで6/9頭、健康なキツネで11/14頭であった。第二回目の採集時(1990年4~10月)では親キツネで80%(25/31)、仔キツネで49%(27/55)であった。後者の摂取率の低さはほとんどの仔キツネが3月に生まれたばかりで、巣穴から離れていないためと考えられた。最後の採集時期(1990年11月~1991年10月)では81%(64/79)であった。狂犬病の発生は最初の期間に認められたものの、1990年4月以降、ワクチン散布周辺部で1頭のキツネで確認された以外他の動物や家畜からはまったく報告されず、劇的に減少した。したがって、組換え生ワクチンの散布が野生動物の狂犬病の予防に有効なことを明らかにした。

しかし、同時にいくつかの問題を指摘した。第一に、最初のワクチン散布後、摂取率が高かったにも拘らず、狂犬病に罹ったキツネも多数発見されたことである。この点について、彼らはワクチン散布後、これらのキツネが既に狂犬病の潜伏期間中であつたのではないかと推測している。第二は、仔キツネの摂取率の低さである。49%は狂犬病の拡散防止に必

要な免疫動物の基準値以下である。一般に基準値 (P) は $P \geq 1 - K_T / K$ で表される。 K_T は狂犬病の流行が維持されるのに必要なキツネの密度で、 K は実際のキツネの密度である。 K_T はおよそ 0.4 頭/ km^2 で、 K は欧州において 1 頭/ km^2 である。 K を 2 頭/ km^2 の過剰数値とした場合、 80% のキツネが免疫されねばならない。したがって、今回の成績は仔キツネが親から独立して餌をとるようになる秋にワクチンを散布する方がより効果的であることを示した。しかし、親キツネの摂取率が $74 \sim 81\%$ であったことは、この実験区域で再び狂犬病の感染や伝播が起こらないであろうと推測している。最後に、ワクチン散布の経済性について言及している。1980~89年の間におけるベルギーでの狂犬病対策に掛かった費用は年平均で $10,000 \text{ km}^2$ 当り $400,000 \text{ ECU}$ s (EC 貨幣) で、今回の試験区域に概算すると $88,000 \text{ ECU}$ s であった。これには人の治療、動物の狂犬病診断、感染した家畜に対する補償及び

キツネの淘汰に要した費用を含んでいるが、家畜のワクチン接種費や従事した人の給料は含まれていない。今回の野外試験におけるワクチン、ヘリコプター及び個人経費を含む全費用は $118,000 \text{ ECU}$ s と見積もられた。今後、ワクチン散布は中断するか特定の地域に限定できることから、組換え生ワクチンによって狂犬病フリーの地域を長期間維持していくことは経済的にも妥当なことと考えられた。

以上の報告は、これまで悲観的でしたらあった野生動物における狂犬病の予防に光明を照らすものであり、このワクチンの普及は世界の狂犬病の撲滅に大いに貢献するものと思われる。

(抄訳 源 宣之——岐阜大農)

MINAMOTO Nobuyuki

Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine

Brochier, B. et al.

Nature 354 : 520, 26 December, 1991



海外便り

欧州における大量培養技術・設備調査

(株)ナーサリー テクノロジー

中園敦之・館山重春

ナーサリーテクノロジーの研究は、基礎的研究から大量生産システムの開発まで多岐にわたり、現在は、小型ジャーファーメンターを用いて植物体を再生させるに至るまで着実に成果を上げてきている。

当システムにとって、大型培養装置での植物体再生は不可欠な技術であるが、その技術の多くは、まだ未知なものを多く含んでいるのが実態である。植物を中心とする生物培養のスケールアップの実情を知り、研究者と討論を行うため今回イギリス、ドイツを中心として大型培養槽を用いて研究及び生産に携わっている関係機関、研究所を訪問する機会が得られたので、この紙面をお借りして皆様に紹介してみたい。なお、今回の訪問先での培養目的は、医薬や有用物質の生産、生物の生育解析等多彩で、用いる生物も、植物あり微生物ありであったことを事前に了解しておいて頂きたい。

今回の調査は、1991年10月15日から27日までで、その訪問先は、イギリス(IFR, Sheffield Univ.), ドイツ(GBF, DIVERSA, Düsseldorf Univ. KFA), オランダ(Delft Univ.), ベルギー(SmithKline Beecham)の計8カ所であった。

この度の調査にあたっては、バイオインターナショナル社(カナダ:トロント)三澤代表にご協力いただき、訪問先へもご同行願うことになり、イギリスを皮切りに調査を開始した。

まず最初に訪れたのは、ロンドンより東北へ国鉄で2時間弱のノーウィッチにある、国立のIFR(Institute of Food Research)であ

る。列車での景色はイギリスの田園風景を余すことなくみせてくれ、いたるところに青々とした緑の芝生が見られ、数多くのラグビーグラウンドが目飛び込んできた。ちょうどこの時期ラグビーの世界カップがイギリスで開催されており、イギリスの伝統的強さが納得できた次第であった。我々の目的地IFRは、ノーウィッチ駅より更に車で20分程の所にあり、静かな環境に恵まれた研究所であった。ここは、農業、食品研究委員会に所属する、全英七つの研究所の一つで食品に係わる中、長期の研究を行っている。Prof. Dr. M. J. Rhodes, Dr. P. Wilson, Dr. R.J. Robinsの歓迎を受け、早速培養槽に関しディスカッションを行った。IFRでは500lまでの大型培養槽による毛状根培養を行っており、培養槽内部に独特のアイデアを盛り込んだ保持金具を設け大きな成果を得ていた。この装置開発には、長年の経験と、研究所内部にある工作・加工グループのさまざまな技術が集大成されており、その点に対し大きな自信を持っていた。また、外部企業との契約培養も行っており、数多くのパートナーを期待しているようであった(写真1)。

ロンドンの北、国鉄で2時間半のシェフィールドでは、Sheffield Univ. 構内にある研究会社PSL(Plant Science Ltd.)のDr. A.M. Staffordを訪ねた。PSLは、Sheffield Univ.の化学、バイオテクノロジー、分子生物学等の研究学部の共同出資によりなる研究会社であり、企業からの委託を受けて研究を行っている。Prof. Dr. Fowlerが社長であるが、当日は不在のため残念ながら会うことができなかった。カルチャーバンクとしての500のセルラインを持っていることが自慢であった。

NAKAZONO Atsuyuki, TATEYAMA Shigeharu

この会社は一時財政的に困難な時期もあったが、近年再び持ち直しているとのことだった。Dr. Stafford は、いたって気さくな方で、我々の質問、疑問点などに熱心に耳を傾け、とてもすてきな女性であった。ここは、大型エアリフト培養で著名なところであり、その培養を見学させていただいたが、培養槽の運転は休止中であった。植物細胞培養にエアリフト型培養槽が必ずしも最適とは言えない、と言うのが最近の考えのようである。

ハノーバーからベルリン方面に国鉄で1時間の所に位置しているのが、ブランシュウィッグである。ドイツの昔ながらの町並みが見られる静かな町だが、町の中心から約20分の所にドイツ国内13のリサーチセンターの一つGBF(Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH)がある。1976年に設立され、現在七つの建家があり、600名で四つの研究パートを有する研究所である。今回訪れたのはBio Chemical Eng'g Div. の Prof. Dr. W.-D. Deckwerである。お酒好きするようなきさくなおじさんといった感じの方で、研究概要、数多くのパイロットプラントについて熱心に説明していただいた。パイロットプラントは、四つの研究パートに対するサービス部門が運転しており、15~6,000 lクラスまでの発酵槽が所狭しとならび、壮観であった。多くは通気攪拌型培養槽であり、歴史的経緯から下部攪拌式を採用しているとのことであった。現在は各種の微生物や動物細胞の培養が中心である。我々が訪れたときカナダよりのミッションがきており、千客万来の様であ

った(写真2)。

DIVERSAは、ハンブルグより高速道路で30分、タバコ公社の建物の一部を使い35人の社員が働く研究所が作られており、発酵槽の容量が最大75klもあり、工場という感のある所であった。Dr. K. Westphal, Dr. J. Ulrichの案内で植物細胞のための大型培養槽が稼働しているところを見学したが、スケールアップに対する基本的考えは、小型から大型まで培養時の状態が同じであるように設計すること(例えばシアストレス)で、培養槽に工夫をこらして操業していた。また操業は少人数でできるようコンピューター利用の管理システムにも気を配っている。1年程前、国のプロジェクトが完了、現在は植物細胞のみの契約培養を行っている。そのプロジェクトは成功裡に終わったが、その秘訣は、生物系、工学系の技術者が一つのグループとなり研究を行った際、用語の定義をはじめあらゆることについて討議し、コンセンサスを得たことにあると聞かされ、これからのバイオ系の研究にとって示唆に富むお話であった。

Düsseldorf Univ. は医学部から発展し現在約17,000人を擁し、その構内は、学生で活気あふれる印象であった。Prof. Dr. A. W. Alfermannは、一見とりつきにくい感じの先生であったが、まったく違い、親切に、また実に真剣に我々の調査に対応いただくことができた。ここでは、植物を材料に、生合成レギュレーション、バイオトランスフォーメーション、光合成培養等色々の研究を広く行っている。ただ、培養槽は20l程度の小型の自



写真1 Norwich, IFRにて。
右から Drs. Rhodes, Wilson, Robins,
中園, 館山



写真2 Braunschweig, GBFにて。
Dr. Deckwerと三澤コンサルタント

家製培養装置のみであった。そのため、彼は、自らの運転で、デュッセルドルフより車で約1時間程の、KFA (Forshungszentram Julich gmbH) へ我々を案内してくれた。ここは、核に関する研究施設を持っている関係上、入口では、入門許可のため、パスポートの提示が必要なほど立ち入りが制限されていた。90%が政府の資金で運営され、総員4,700人その中バイオ関連では150人が働いている。バイオでは、アミノ酸生産、細菌によるエタノール生産、廃液処理、酵素のタンパク工学などが主な研究課題である。

Mr. M. Karutz の案内のもと、300 l クラスの微生物や動物細胞用の培養設備を見学することができた。Dr. Alfermann は以前この設備を借用し、研究を行ったことがあり、大学と密接に結びつきながら研究等行っているようである(写真3)。

ドイツを後に残る訪問先は2カ所である。その一つ Delft Univ. は、アムステルダムとロッテルダムとの間に位置している。デルフトでなんといっても有名なものが、青く色づけされた焼き物「デルフト焼き」である。我々が訪れた日は、ちょうど花市が町の中央広場を中心に開かれており、球根、色とりどりの花、そしてさまざまな出店に多くの人々が集まり、勿論「デルフト焼き」の多くの店も大変な賑わいぶりであった。Delft Univ. は、現在 Leiden Univ. と共同で、研究機関「Bio-technology Delft Leiden」を創設、Plant Cell を対象とした研究を行っている。Prof. Dr. J.J. Heijnen より大学の動向等をお聞きし、若手研究者の案内のもと植物培養設



写真3 Düsseldorf Univ. にて。
Prof. Alfermann と筆者

備を中心に見学させていただいた。ニチニチソウ細胞をモデルとしてシアストレス、酸素移動速度などの工学的視点にたった研究や、彼らの研究に対する意気込み等実に精力的である印象を受けた。特に発酵の排ガスと細胞の生育促進効果についての知見は参考になった。

最後に訪れたのは、ベルギーのブリュッセル郊外に位置する、大製薬会社 SmithKline Beecham の研究所と工場である。ここには1,200人の従業員が生産と研究に携わっている。Dr. M. Comberbach の案内のもと、研究設備、抗生物質ヴァージニアマイシン生産用の200k l 醗酵槽、血清肝炎ワクチンなどの生産設備を見て回った。他の医薬品生産設備同様、バイオハザード等の施設が完備しているのは勿論、工場施設周辺に500m幅のグリーンベルト地帯をさりげなく配置してあるすばらしい施設であった。

今回訪問した先は、我々のターゲットである大型培養槽での植物再分化を行っているところではなかったが、大型培養槽に対する、アプローチ法、考え方等参考になる点が多かった。しかし、何よりの成果は、訪れた我々の技術内容説明、技術上の課題、疑問点に熱心に耳を傾け、貴重なご意見をお聞かせ願えたことで、しかも、設備についてもいたってオープンに見学できたことであろう。今回訪問させていただいた先生、関係者の皆様は、バイオ技術発展のため、積極的、意欲的に行動していると感じたのも、あながち思いすごしではなく、実に有意義な調査であった。

欧州における大量培養技術・設備調査について思いつくまま筆を走らせた。内容的に不満足な点が多々あると思うが、これが皆様の何かのご参考になれば幸いである。

特別情報

組換え実験小動物の利用に係る規定について

農林水産省 バイオテクノロジー課

長谷部 亮

1. 背景と経緯

動物分野における組換え DNA 技術の応用については、近年種々の組換え動物の開発が相次いで報告されています。特に実験動物の分野においては、高血圧マウス等の疾患モデル動物や変異原性試験用マウスなどが開発されており、新医薬品の開発や、各種化学物質の検定等に大きく寄与するものとしてその実用化が強く期待されています。

農林水産省では、組換え体の利用に係る安全の確保を図り、農林水産業・食品産業及びこれらの関連産業の健全な発展に資することを目的として「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」(平成元年4月通達)を定めていますが、この中には組換え植物及び組換え微生物に係る審査基準は示されているものの、組換え動物については具体的な審査基準を示していませんでした。これは、指針策定当時では、組換え動物の開発がまだ進んでいなかったこと、さらに一口に動物といっても、大動物、小動物、昆虫、魚等動物の種があまりにも多様であるため一般的審査基準を示すことが困難であることがあげられます。

しかしながら、動物についても海外を中心として相当の知見も集積され、特に実験動物の分野で実用性の高いものが作出されていること、また、科学技術庁・文部省の実験指針においても平成3年の指針改訂により初めて組換え動物の封じ込め等についての基準が示されたことなどから、わが国においても組換え動物の産業利用の安全確保に関する審査基

準を策定する条件が整ってきました。

そこで、農林水産省では、農林水産技術会議において平成3年8月から組換え実験動物の審査基準の策定に着手し、平成4年4月8日に、組換え実験小動物の利用に係る規定を盛り込むため、「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」を一部改正しました。

2. 主なポイント

1. 適用対象者

この規定の対象となる事業者は、組換え実験小動物の生産又は販売を行う事業者です。すなわち、自ら組換え実験小動物の生産・増殖を行って販売する事業者とともに、国外から組換え体を輸入して(場合によっては、増殖・飼育を伴わずに)販売する事業者及び他の事業者から購入して販売する事業者(いわゆる仲介業者)も含まれます。

ただし、単なる輸入の代行を行う事業者や、販売業者等の委託を受けて運送のみに従事する事業者は含まれません。これらの事業者の行為については、実質的な輸入・販売者が必要な手続きを行うべきものであるからであり、言い換えれば、農水省指針の対象となるのは、自らの名で生産・販売をする事業者に限られます。ちなみに、輸出もまた販売の一つの形態に含まれます。

なお、大学等がその業務として実験動物を商業ベースでなく関係者に提供する場合は、本指針の対象とはなりません。

また、実験小動物のユーザー、例えば製薬メーカーなどの検定部門等が組換え実験小動物を購入して試験を進める場合には、本指針

の対象とはならず、従来どおり実験指針の適用を受けることになります。

2. 組換え実験小動物の範囲

「組換え実験小動物」とは、特に整備された環境の下（バリア施設など）での利用が一般的な実験動物のうち、組換え体の実用化が最も進んでいるマウスを中心に、これと同等な管理が可能と思われるラットその他のげっ

歯類をいいます。なお、その他の動物（ウサギ、ニワトリなど）についても今後の開発状況によっては、組換え実験動物としての利用が想定されますが、これらについては、その種、性状、利用目的等からみて適当と判断されるものについては、本規定を準用することができることとしています。

組換え動物の開発状況

1. 研究開発の動向

動物分野における組換え DNA 技術の応用については、欧米先進国などでここ 2～3 年の間に種々の組換え動物の作出が相次いで報告されている。

(1) 実験動物の例（疾患モデル動物などとして、主に実験施設等において閉鎖的に利用される）

マウス（がん遺伝子を導入した疾患モデル）：ハーバード大学（米）、東京大学、東海大学他
マウス（ヒトアポプロテイン A-I 遺伝子を導入した高脂血症モデル）：ロックフェラー大学（米）

マウス（ヘモグロビン点突然変異遺伝子を導入した鎌状赤血球貧血モデル）：国立医学研究所（英）

マウス（B 型肝炎ウイルス遺伝子を導入した肝がんモデル）：東京大学

マウス（lacZ 遺伝子を導入した変異原性試験用モデル）：ヘーゼルトン社（米）、MI 社（蘭）

マウス（lacI 遺伝子を導入した変異原性試験用モデル）：ストラタジーン社（米）

(2) 家畜等の例（特定の形質の改良などを行い、主に開放系での利用を目的とする）

コイ（マス GH 遺伝子を導入して成長を促進するもの）：アラバマ農業試験場（米）

ヤギ（乳内にヒト血栓溶解剤 TPA を生成させるもの）：インテグレイテッド・ジェネティクス社（米）

ヒツジ（乳内にヒト血液凝固第 IX 因子を生成させるもの）：動物生理学研究所、PPL 社（英）

ヒツジ（システイン遺伝子を導入して羊毛の生産を促進するもの）：アデレード大学（豪）

ブタ（ブタ GH 遺伝子を導入して成長を促進するもの）：アデレード大学（豪）、タフト大学、ベルツビル農業研究センター（米）他

2. 組換え DNA 技術を応用した疾患モデル動物の作出について

組換え動物のうち、特に実験動物の分野では、疾患モデル動物の作出が積極的に行われている。

疾患モデル動物の作出は、従来、突然変異を主とした選抜に頼ってきた。これに対し、組換え DNA 技術を応用することにより、特定の遺伝子を組み込んでその形質を発現させれば、がん、難病等の発生機序の解明及びその予防、治療法の知見の集積が容易となる。例えば、ヒト由来の遺伝子を組み込んだ場合は、従来の疾患モデル動物よりもヒトに近い病状を示すので、よりの確な予防、治療法の確立に資することができる。

このように、組換え DNA 技術を応用して作出した疾患モデル動物には優れた面があり、既に海外では実用化され、我が国でもこれらの開発・利用について大きな期待が寄せられている。

我が国における実用化が間近とみられる組換え実験動物の例

- ・活性化がん遺伝子を導入したがんモデルマウス（オンコ・マウス）
→発がん機構の解明、発がん物質の検定、抗がん剤のスクリーニング
- ・遺伝子組換えによる高脂血症マウス
→脂質代謝、動脈硬化の研究
- ・遺伝子組換えによる変異原性試験用モデルマウス（ミュータ・マウス）
→変異原物質の検定、変異原活性のスクリーニング

組換え実験小動物に係る規定の概要

1 定義

「組換え実験小動物」とは、宿主として動物（マウス、ラットその他のげっ歯類に限る。）の細胞を用いた組換え体（個体への分化を伴わない状態で利用されるものを除く。）のうち、実験動物として利用されるものをいう。

2 組換え実験小動物の利用

(1) 一般的事項

- ・安全性評価が行われた組換え実験小動物は、(3)及び(4)に定めるところにより取扱う。（ただし、組換え実験小動物の特性に応じて、利用方法等に対する条件を付することがある。）
- ・組換え実験小動物の利用に当たっては、「動物の保護及び管理に関する法律」等実験動物の利用に関する諸規定を遵守すること。

(2) 評価項目

宿主、供与 DNA、ベクター、組換え実験小動物等の項目（基本的に植物及び微生物と同様）

(3) 組換え実験小動物の取扱いに係る設備・装置

- ① 組換え実験小動物の取扱いに係る設備・装置は、他の区域と明確に区別して設置された作業区域内に設置すること。
- ② 飼育施設又は作業区域の出入口、吸排気口等には必要と考えられる逃亡防止設備を設けること。
- ③ 飼育容器は、組換え実験小動物の力や振動によって、ふた等が容易に開かないようにすること。

(4) 組換え実験小動物の取扱いに係る作業要領等

① 組換え実験小動物の取扱いに係る作業要領

- ・組換え実験小動物の飼育管理は、非組換え動物の飼育容器と明確に区別すること。また、組換え実験小動物は個々の識別を行うことが望ましいが、個体識別を行うことが難しい場合には、飼育群ごとに管理すること。
- ・組換え実験小動物に係る廃棄物の処理
- ・組換え実験小動物を運搬する場合は、堅固で、かつ、組換え実験小動物が逃亡しないような構造の容器に入れる等の逃亡措置を講ずること。
- ・設備・装置の保守管理

② 組換え実験小動物の譲渡

- ・組換え実験小動物を譲渡する際には、譲受人に対して次の事項を告知すること。
 1. 当該動物が組換え体であること。
 2. 当該動物を用いて行う実験は「組換え DNA 実験指針」等の定めるところにより行わなければならないこと。

3. 農林水産大臣への確認手続き

組換え実験小動物を生産・販売しようとする事業者は、生産・販売に先だて、農林水産大臣の確認が必要です。すなわち、生産・販売しようとする組換え実験小動物について、所定の様式により安全性評価、その利用に係

る設備・装置、作業要領等について記載し、当該組換え実験小動物の利用が本指針に適合しているか否かの確認を農林水産大臣に求めることができます。

確認申請手続きについて、さらに詳細を知りたい方は、別途、当課（電話03-3502-8111内線4496）までに御連絡下さい。

新作ビデオのご紹介

生研機構はこの度、バイオテクノロジー研究の最先端分野で、今までに確立された基礎技術の普及を図るためにマニュアルビデオを企画制作しました。全5巻は次のような構成です。

バイオテクノロジーマニュアルシリーズ

◆植物編

- 第1巻 植物バイオテクノロジーの世界 (上映時間30分)
- 第2巻 植物の遺伝子組換え技術 (上映時間32分)
- 第3巻 クローニングとシーケンシング (上映時間44分)
- 第4巻 DNA分析技術の応用 (上映時間25分)

◆畜産編

- 第5巻 牛の体外受精技術 (上映時間38分)

第1巻は植物分野の技術全体の流れを、第2巻～4巻ではイネの遺伝子組換えを中心とした技術手順をマニュアルとしました。また第5巻では「和牛屠体の卵巣を利用した体外受精技術」を紹介しています。

構成にあたっては、具体的な技術を手順を追って紹介するだけでなく、これらの研究開発の方向が見えるように配慮しました。映像で紹介できなかったデータ類は添付した解説書に記載してあります。若手研究者だけでなく、高校生や生物系及び農学系大学生のオリエンテーション用として最適の内容です。

どの巻も、基礎知識があることを前提にしているため内容は高度ですが、生産現場での応用例も合わせて紹介している第1巻及び第5巻は、バイオテクノロジー入門編として、一般の方にもご覧いただけます。ぜひご購入してご活用ください。

定価 各30,000円(税込み) 送料 600円

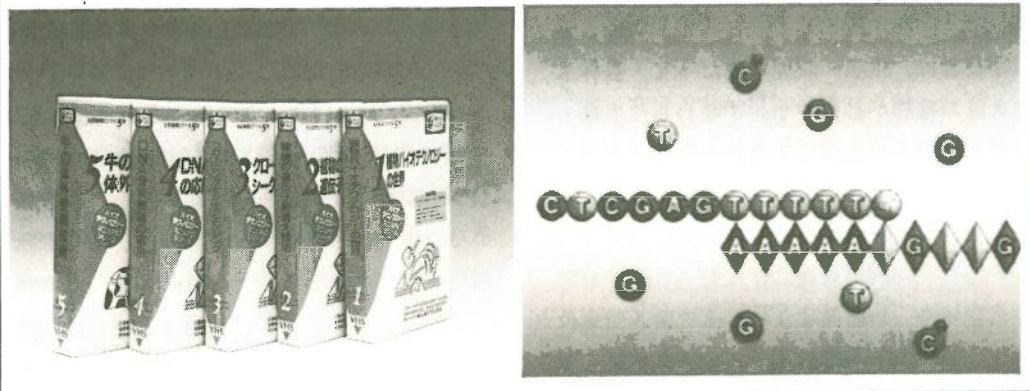
全5巻特別価格 140,000円 送料 1,000円

植物編全4巻 110,000円 送料 1,000円

お申し込みは販売を担当している下記まで

(社)農山漁村文化協会(略称 農文協)

〒107 東京都港区赤坂7-6-1 Tel 03-3585-1141 Fax 03-3589-1387



編集後記

本号の表紙には、佐藤豊三氏(農環研)の御厚意により、さび病菌に重複寄生する菌類の写真を掲載させていただきました。さび病菌は活物寄生菌で一般に人工培養できないとされていましたが、最近、コムギ黒さび病菌、コムギ赤さび病菌、エンバク冠さび病菌、ナシ赤星病菌、マツこぶ病菌、ヤナギのさび病菌などでは人工培養できるようになりました。

菌類に寄生するウイルスや細菌、原生生物は知られていますが、さび病菌に寄生する菌類は珍しいものです。最近、環境にやさしい農薬として微生物農薬が注目されていますが、今回御紹介しました重複寄生菌 *Eudarlucacaricis* も微生物農薬としての検討が行なわれています。

(大畑記)

ブレイン テクノニュース (第32号)

平成4年7月15日発行

発行者 佐野宏哉

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

〒160 東京都新宿区新宿6丁目24-16 日本生命新宿6丁目ビル3F
TEL. 03-3205-6565 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

©Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 1992