

表紙説明

「遠心処理により前核を可視化したウシ受精卵前核へのDNAの注入」ノルマルスキー顕微鏡写真

(本文 1 ページ参照)

(写真提供 結城 惇)

本号の紙面

総説…………… 1  
 トランスジェニックアニマルによるタンパク生産  
 国内情報…………… 4  
 乾燥で誘導される遺伝子, 酵母のキラー遺伝子, マダイのイリドウイルス感染症  
 出資プロジェクト情報…………… 13  
 バイテクによる実験動物生産技術  
 地域の先端研究…………… 16  
 天然記念物エヒメアヤメの増殖  
 文献情報…………… 18  
 植物の色素発現制御遺伝子, 植物の耐冷性の改変, シアノバクテリアのミオグロビン, 植物ウイルス移行タンパク, 7種DNAプローブの同時可視化  
 海外便り…………… 24  
 英国AFRC植物科学研究所を訪ねて

## 口 絵

### 総 説

結城 惇

トランスジェニックアニマルによるタンパク質性物質の生産…………… 1

### 国内情報

篠崎一雄

乾燥ストレスで誘導される遺伝子…………… 4

後藤邦康

酵母の染色体上に存在するキラ―遺伝子について…………… 7

反町 稔

マダいのイリドウイルス感染症…………… 10

### 出資プロジェクト情報

上田 進

バイオテクノロジー技術を使った優良な実験動物の生産技術…………… 13

### 地域の先端研究

古谷 博

天然記念物エヒメアヤメの増殖…………… 16

### 文献情報

植物の色素発現パターンを制御する遺伝子…………… 18

遺伝子操作による植物の耐冷性の改変…………… 19

シアノバクテリアのミオグロビン…………… 20

植物ウイルス移行タンパク質…………… 21

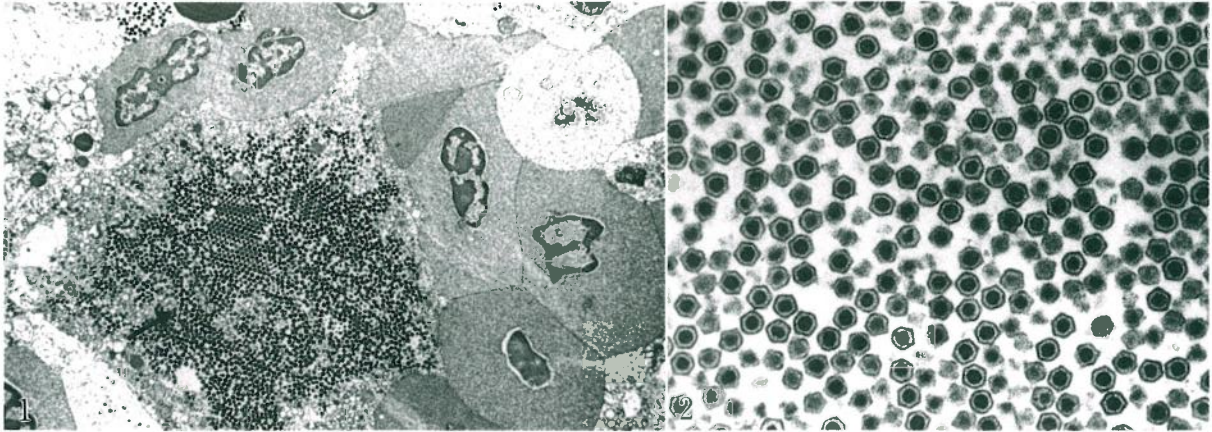
デジタルイメージマイクロスコープを用いてDNAプローブ7種の同時可視化……………22

### 海外便り

蒲生卓磨

英国AFRC植物科学研究所を訪ねて…………… 24

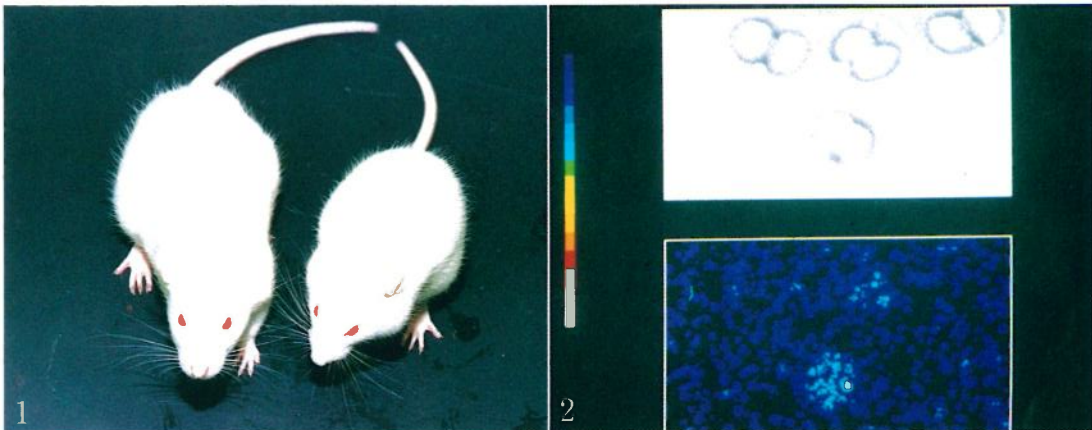
マダいのイリドウイルス感染症 (本文 10 ページ)



1. イリドウイルスに感染したマダいの脾臓にみられる肥大細胞の電顕像  
白血球系と考えられる細胞の細胞質に多数のウイルス粒子(矢印)の増殖像がみられる。

2. マダいのイリドウイルスの電顕像

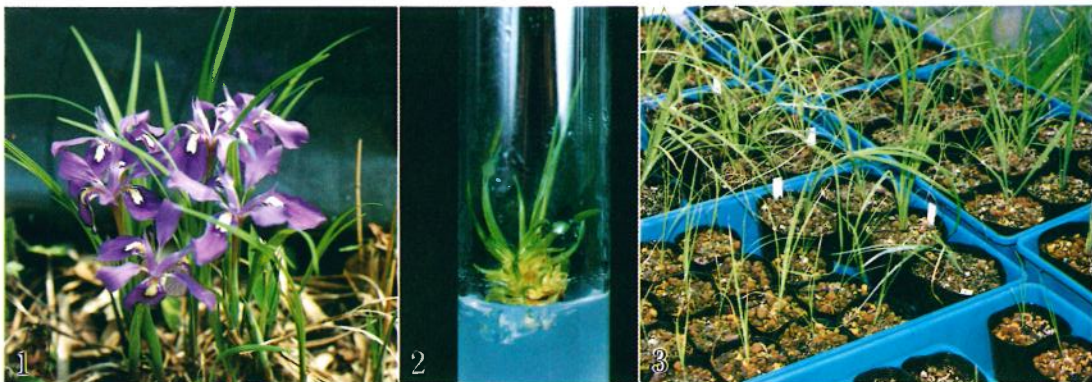
バイオテクノロジー技術を使った優良な実験動物の生産技術 (本文 13 ページ)



1. 小型トランスジェニックラット(右)

2. ルシフェラーゼ導入トランスジェニックマウスの卵細胞

天然記念物エヒメアヤメの増殖 (本文 16 ページ)



1. エヒメアヤメ自生地の開花株

2. エヒメアヤメの地下茎腋芽茎頂から誘導した多芽体

3. 鉢植えて養成中の再生植物

# トランスジェニックアニマルによる タンパク質性物質の生産

ワイエスニューテクノロジー研究所

結城 惇

## 1. トランスジェニックアニマルとは

遺伝子を単離するクローニング技術はわずか20年で普及し、いまではヒトを含む多くの生物種の遺伝子がクローン化されている。クローン化された遺伝子は生体外では単なる物質、DNA にすぎないが、これを生体内に導入すれば遺伝子として機能する。DNA を生体内に導入する方法は先ず単細胞生物で確立され、現在では動植物個体にまで導入できるようになった。特に哺乳動物の生殖系列に導入された外来 DNA を持つ哺乳動物はトランスジェニックアニマルと呼ばれている。

トランスジェニックアニマルを作出するトランスジェニック技術の特徴は、雌雄の交配能力に頼らずに異種の生物の DNA を導入できることで、導入した DNA は生殖細胞を含むトランスジェニックアニマル個体のすべての細胞に分布し、その子孫へもメンデルの法則によって伝達される。導入する DNA は多くの場合純化されたもので遺伝子としての作用も特定されている。

トランスジェニック技術は哺乳動物に外来遺伝子を付与するだけでなく、挿入突然変異、アンチセンスの導入等により、哺乳動物が本来持っている遺伝子の活性を阻害することも可能にした。

## 2. トランスジェニックアニマルによる タンパク質性物質の生産

極く少数の例外を除けば、遺伝コードは生

物種にかかわらず普遍的であるため、生物学的に遠縁の生物種から得られた遺伝子も、導入された動物でも元の生物で合成されるタンパク質と同じアミノ酸配列を持つタンパク質を合成する。したがって、マウスにヒトの成長ホルモン遺伝子を導入すればヒトの成長ホルモンがマウスの体内で合成される。

ホルモン等のヒトの生理活性物質は血液や切除した臓器から超微量にしか得られないものが多い。このような生理活性物質を大量に生産する方法として増殖能力の高い微生物を宿主とする生産系が利用されたが、糖鎖の付加等動物個体での生理活性に重要なタンパク質の修飾過程が哺乳動物と微生物では異なることが知られ、動物特にヒトの生理活性物質の生産にトランスジェニックアニマルが活用され始めている。

## 3. 今話題となっている例

肺気腫治療薬ヒト  $\alpha_1$  アンチトリプシンを乳中に分泌するトランスジェニックヒツジの開発研究は世界で最も早くから着手され、最も良好な結果を出した好例として上げられる。開発された系統のうち最も良好なヒツジはその乳中 1 l に 30 g ものヒト  $\alpha_1$  アンチトリプシンを分泌する。この濃度は、カゼインの乳中濃度と比較すれば理解し得ることながら、培養細胞系で生産される生理活性物質の濃度が 1 l 当たり良くても 0.02 g であることを知る人にとっては驚異的な数値である。このトランスジェニックヒツジを開発したベンチャー会社にドイツの製薬会社が 1800 万ドルも出資するというニュースも話題になっている。

血栓溶解剤ヒト TPA を乳中に分泌するト

ランスジェニックヤギもアメリカで開発された。また、最終確認はされていないものの、血栓溶解剤ヒト protein C を乳中に分泌するトランスジェニックブタもアメリカから報告され、ヒトラクトフェリンとヒトリゾチームを乳中に分泌するトランスジェニックウシも、アメリカに本社を置くオランダのベンチャー企業から発表された。

ラットは実験動物ながら高い泌乳能力を持ち、1日に平均5mlものミルクを分泌する。著者らはヒトの成長ホルモンを分泌するトランスジェニックラットを作出した。この中の1系統はミルク1ml当り11mgものヒト成長ホルモンを分泌した。この値は、ラット1匹が毎日細胞培養液2.75lに相当する導入遺伝子産物を生産していることになる。

以上の例はいずれも乳中にヒトタンパク質を大量に分泌するトランスジェニックアニマルだが、血液中に輸血用ヒトヘモグロビンを生産するトランスジェニックブタの作出成功例がアメリカで話題になった。これは、ブタにヒトの活性型ヘモグロビンを構成する $\alpha$ -グロビンと $\beta$ -グロビンの遺伝子を導入したもので、このブタの血液にはブタのヘモグロビンだけではなくヒトのヘモグロビンも検出される。このトランスジェニックブタは、ものによっては血液でもヒトタンパク質の生産が可能であることを示しただけではない。 $\alpha$ -グロビンと $\beta$ -グロビン各2分子、計4分子からなる複合タンパク質をもトランスジェニック技術で生産できることを示した最初の例となる。

#### 4. 乳腺利用法の特徴

導入遺伝子の産物は生体に多かれ少なかれなんらかの生理活性を有する。したがって導入遺伝子産物が過剰に合成されれば、生体はその副作用による生育阻害を被ることになる。このため単細胞生物系を含むどの系でも、遺伝子導入による物質生産では導入遺伝子産物が生体内に蓄積しないよう工夫されてきた。乳腺で合成されたカイゼンや乳清タンパク質等の乳タンパク質は、乳汁中に分泌され、体

内に蓄積されないため、動物個体への影響を抑えることができる。また、導入遺伝子産物の合成が泌乳期間に限定されることも動物への影響を抑えることに役だっている。

乳腺はまた高いタンパク質生産能を備えている。ウシでは1日20l以上300日間もミルクを出し、乳中のタンパク質の濃度は1l当り30gに達する。ウサギのような小動物でさえ50ml以上のミルクを40日間も分泌し続ける。乳腺は量的にも優れたタンパク質生産系である。

遺伝子操作による生理活性物質生産の課題は、生理活性のあるタンパク質の合成だった。多くの動物タンパク質では個体内で機能するためには糖鎖の付加、リン酸化等の修飾が必要になる。人間社会が必要とする生理活性物質にはヒトのタンパク質が多い。哺乳動物の乳腺はヒトのタンパク質を活性ある形に修飾することが示され、質的にも乳腺を活用する生理活性物質の生産系は細菌の系に比し優れている。

#### 5. ヒトヘモグロビンを生産するブタ

アメリカとイギリスのグループでそれぞれ独立にヒトヘモグロビンを血中に生産するトランスジェニックマウスが報告された。これらのマウスはマウスとヒトのヘモグロビンを持つだけでなく、マウスとヒトの雑種型ヘモグロビンも持っていたが、いずれも活性を持つヘモグロビンだった。

マウスに導入したヒト $\alpha$ -グロビンと $\beta$ -グロビンの遺伝子をブタに導入したところ、ヒトの活性あるヘモグロビンを血中に合成するトランスジェニックブタが得られたという。ヘモグロビンは赤血球とその前駆細胞に局在するため、ヒトグロビンに対する抗体産生等の問題はみられず、これらのブタは順調に生育しているという。

上記のように導入遺伝子産物が大量に体内に留まると、宿主動物の生育に影響を与えるため一般的には用いられない。しかし、赤血球とその前駆細胞にはこれらの細胞に特異的に機能するDCR(後述)がクローン化されて

おり、導入した遺伝子はすべて機能するためトランスジェニックアニマルの作出効率は高く、細胞内に局在する遺伝子産物の生産に注目される系である。

## 6. トランスジェニックアニマルのデザイン

宿主動物で生産されるタンパク質のアミノ酸配列は導入する構造遺伝子で決定される。例えばヒト成長ホルモンを生産させる場合にはヒト成長ホルモンの構造遺伝子を導入する。高等生物の構造遺伝子の安定な発現にはイントロンが必要なため、メッセンジャー RNA のコピーである cDNA よりはゲノム DNA のほうが望ましい。

選択した構造遺伝子を乳腺で発現させるには、カゼイン等のミルクタンパク質の遺伝子発現制御領域をその構造遺伝子に試験管内で接続してから宿主動物に導入する。最も一般的に使われているミルクタンパク質の遺伝子発現制御領域はマウスの WAP (乳清酸性タンパク質) とヒツジの  $\beta$ -ラクトグロブリンの遺伝子発現制御領域の二つである。この遺伝子発現制御領域の働きにより、導入遺伝子は泌乳期の乳腺で特異的に発現する。この方法により、本来脳下垂体で合成される成長ホルモンを乳腺で合成させることができる。

遺伝子発現制御領域には、発生時期特異性、臓器特異性、遺伝子の発現強度を支配するエンハンサー、メッセンジャー RNA の合成開始点、等が含まれる。合成されたタンパク質を細胞外に分泌させる場合にはリーダー配列に対応する塩基配列をタンパク質の N-末端に対応する部分につける。

哺乳動物の場合、遺伝子発現の制御はエンハンサーだけでは十分ではないらしく、上記の DNA も組み込まれた宿主動物の染色体上

の位置によって発現特異性や発現量が異なる。DCR は染色体の構造を制御することによって遺伝子の発現を制御するといわれる、最初に見いだされた塩基配列で、DCR を試験管内で導入する遺伝子に付加することによって染色体上の導入位置に無関係に発現させ得ることが示された。しかしこの DCR は赤血球とその前駆細胞に特異的に働き、乳腺等他の組織では使えない。

## 7. おわりに

遺伝情報は 5 炭糖をリン酸で結合した骨格構造上に直線状に並んだ 4 種の塩基の配列で決定される。この配列に外から DNA を挿入して、遺伝子として無意味な配列に変えることによってこの遺伝子を不活化することができる。この挿入突然変異により、物質の生産に不用の物質を取り除くことができる。例えば、乳汁中の乳タンパク質をあらかじめ取り除いておけば、導入遺伝子産物のみを乳汁中に分泌する動物を作出できる。

このように遺伝子を直接不活化する方法はまだマウスでのみ可能である。トランスジェニック技術による遺伝子の不活化にはこの他に、アンチセンス RNA による特定遺伝子の活性阻害や、特定遺伝子を発現する細胞を破壊する遺伝子手術法がある。

いままで報告された成功例は、ヘモグロビンを除けば単純タンパク質に限られている。しかし複数のタンパク質分子が複合体を作ってはじめて活性を示す物質も多く、今後活性のある複合体を生産するトランスジェニックアニマルの作出も試みられよう。現にヒトヘモグロビンを生産するトランスジェニックブタを作出したベンチャー企業では、一足とびにトランスジェニックブタによるヒトへ移植する臓器の開発に取り組んでいるという。

国内情報

## 乾燥ストレスで誘導される遺伝子

理化学研究所 ライフサイエンス筑波研究センター

篠崎一雄

### 1. はじめに

陸上植物は地表に根をおろし移動できないため地球上の厳しい環境変化に応答し、適応することによって生存し、子孫を残している。このような環境の変化には光・温度・乾燥・風・冠水・塩濃度などの変化があり、昆虫や動物による傷害・微生物やウイルスによる感染、大気汚染などのストレスも含まれる。植物は種々の環境変化をキャッチして生理的レベルにおいても、遺伝子発現レベルにおいても種々の応答をして、植物全体として環境変化や種々の環境ストレスに適応している。

陸上植物の多くは土壌から根を通して水やミネラルを吸収し、光合成によって得たエネルギーと空気中の二酸化炭素によって生長に必要な物質を合成している。したがって土壌中の水分の欠乏は植物の代謝、生長に重大な影響を与える。植物は乾燥ストレスに対し個体レベル、組織レベルあるいは細胞レベルで種々の応答反応を行い乾燥から植物体を防御している。最近、植物は遺伝子発現レベルでも乾燥ストレスに応答していることが明らかにされ、乾燥ストレスによって発現誘導される遺伝子がクローニングされ、その機能と発現制御機構が明らかにされつつある。

### 2. 乾燥ストレスに対する植物の応答と ABA の役割

植物細胞は水が十分供給され細胞の膨圧が最大のときに生長や生理的応答の効率が最も

よい。植物は乾燥によって引き起こされる水分ストレスにより、タンパク質合成やクロロフィルの生合成が早い段階で抑制され細胞の生長が阻害される。さらに中程度の水分ストレスにより植物ホルモンアブシジン酸 (ABA) の生合成が誘導され、気孔が閉じて水分の蒸散が抑えられる<sup>1,2)</sup>。さらに乾燥が進むと呼吸の増加やプロリンの蓄積が進み細胞に致命的な影響がでてくる。乾燥ストレスに対する応答の中には細胞の浸透圧変化に直接起因するものもあるが、その他の多くの応答反応は遺伝子発現レベルでの変化に関係している。細胞内の水分の減少によって poly (A)<sup>+</sup>RNA の比率やタンパク質合成のパターンに特異的な変化が起こることが報告されており、乾燥により引き起こされる特異的な生化学的レベルでの変化が遺伝子発現の変化に起因していることが予想された。実際に乾燥ストレスにより遺伝子発現のパターンが大きく変化し、多くの遺伝子の発現が特異的に誘導あるいは抑制されることが明らかとなった<sup>3)</sup>。

後で述べるように乾燥で誘導される遺伝子は ABA で誘導されるものが多い。ABA は種々の生理機能があるが、特に種子成熟期における乾燥や休眠に重要な働きをしていること、また生長期の植物においては環境変化によるストレス、特に乾燥・低温・塩濃度の変化などにより誘導されてストレス応答に重要な役割を果していることが示されている。

### 3. 乾燥ストレスにより誘導される遺伝子

筆者らは1989年に理化学研究所に移り新しいプロジェクトをスタートしたが、そのとき

SHI NOZAKI Kazuo

に考えたことは、植物独自の遺伝子発現の制御機構とシグナル伝達系について分子生物学的に研究しよう、しかも、単に一つの遺伝子だけを扱うのではなく、なるべく多くの遺伝子群を扱うことにより、システム全体を理解する方向に研究を進めて行こうということであった。材料としては将来性のあるモデル実験植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いることにした。環境ストレス応答の分子レベルでの研究はやっと始まったばかりであり、筆者は乾燥ストレスをとりあげ、乾燥という環境シグナルが植物細胞内においてどのように変換され、どのように伝達されて遺伝子の発現を調節しているのかを分子レベルで明らかにすることを目的に研究を開始した。また乾燥で誘導される遺伝子の産物が植物の耐乾燥性とどのように関係しているのか機能面も追求することにした。

乾燥ストレスによって誘導される遺伝子はディファレンシャルスクリーニング法を用いてクローニングした。他の多くの環境応答性の遺伝子、あるいは植物ホルモン誘導性遺伝子の多くはこの方法を用いてクローニングされている。シロイヌナズナのロゼット状の植物体を濾紙上で10時間ほどゆっくりと乾燥し、図1のように生重量が未処理のときの10~20%になった植物から poly(A)<sup>+</sup>RNA を調製し cDNA ライブラリーを作製した<sup>4)</sup>。図1に示すように乾燥したシロイヌナズナは水をあたえたと回復し、鉢植えにすると生育する。乾燥処理した植物と未処理の植物より調製した cDNA をプローブに用いてディファレンシャルスクリーニングを行い、乾燥処理した

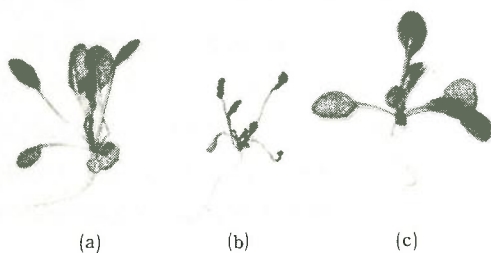


図1 シロイヌナズナの乾燥と吸水による回復

- (a) 乾燥前、(b) 10時間乾燥したもの  
(c) bの乾燥した植物を吸水させ4時間放置したもの

植物から調製した cDNA プローブと強くハイブリッド形成するファージプラークを選別した。このようにして乾燥条件下で強く発現する9種類の cDNA クローンを得た。単離した cDNA クローンは responsive to desiccation の頭文字をとって RD と命名した。9種の RDcDNA の塩基配列を決定し、タンパク質のデータベースとの相同性の検索を行ったところ、6種の RD について相同性のあるタンパク質が見出された。相同性が見出された cDNA クローンは2種のチオールプロテアーゼ (RD19, RD21)、ソラマメの種子タンパク質 USP (RD22)、低分子量の物質の輸送に働くチャンネル膜タンパク質 (RD28)、親水性のタンパク質である RAB や Dehydrin (RD17)、と低温で誘導される lti140 (RD29) である。ノーザンハイブリダイゼーション法により RD 遺伝子の乾燥による転写レベルでの発現誘導を解析した結果、いずれの遺伝子も乾燥ストレスにより転写レベルで誘導されることが明らかになった(図2)<sup>4)</sup>。しかし各遺伝子間で乾燥による誘導の経時変化がことなっていた。このことは RD 遺伝子群が複数のシグナル伝達系を介して誘導されているこ

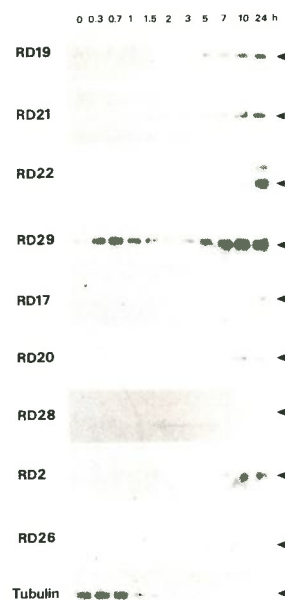


図2 乾燥ストレスで誘導される RD クロンのノーザンハイブリダイゼーション法による解析

数字は乾燥後の時間(h)、コントロールのチューブリン遺伝子は乾燥後1時間程で mRNA が消失する。



とを示唆している。次に ABA が RD 遺伝子の誘導に関与しているかどうかについてノーザン法により解析した。6 種の RD クローンは ABA により誘導されるのに対し、3 種の RD クローン (RD19, RD21, RD28) は ABA による誘導を受けなかった。RD29 は乾燥により二段階に誘導されるが、前半の発現は ABA によらずに乾燥で誘導される。したがって図 3 に示すように乾燥ストレスによる遺伝子の発現誘導に関するシグナル伝達経路は ABA を介した経路と ABA を介さない経路 (恐らくセカンドメッセンジャーを介した経路) に分けられ、乾燥ストレス応答には少なくとも 2 種以上のシグナル伝達系と遺伝子発現制御系が存在していると考えられる<sup>1)</sup>。現在 RD 遺伝子のプロモーターと GUS レポーター遺伝子のキメラ遺伝子を作成し、発現様式の異った RD 遺伝子 (RD29 と RD22) の発現制御に関する調節領域について解析を進めており、転写制御機構を調べることでシグナル伝達系の解析を行っている。

### 3. 乾燥ストレスによる遺伝子の発現制御

植物では乾燥、高塩濃度、低温などの浸透圧ストレスによって ABA が誘導され、種々の遺伝子が ABA によって誘導される。また図 3 に示したように ABA は種子が成熟し、乾燥するときにも増加し種子の乾燥からの保護や休眠に関与すると考えられている一群の遺伝子の発現を誘導する。その中でもイネの

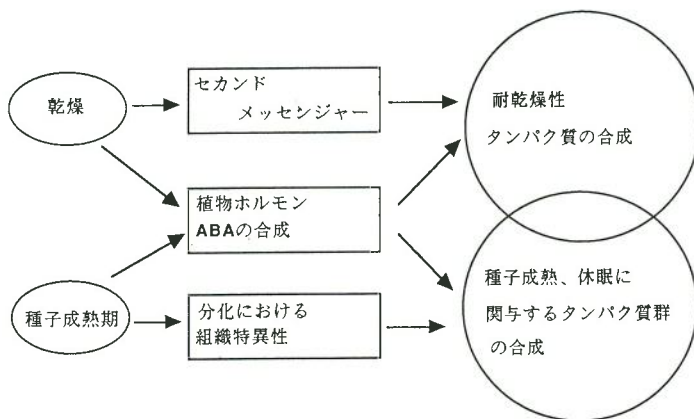


図3 乾燥ストレスおよび種子成熟期における遺伝子発現制御と ABA の役割

*rab* やコムギの *Em* 遺伝子について ABA による転写レベルでの発現誘導に関与する転写開始上流域の塩基配列 (シスエレメント) とその配列に結合する調節タンパク質 (トランスエレメント) の解析が進められてきた<sup>2, 3, 6)</sup>。その結果、ABA で誘導される遺伝子の転写開始の上流域には (T/C) ACGTGG をコアとする共通配列 (ABRE) が存在し、この配列と結合するタンパク質がイネ核抽出液中に存在することが示された<sup>6)</sup>。イネプロトプラストを用いた導入遺伝子の一過性発現の実験により上記の配列が ABA による遺伝子の転写誘導に重要な役割をはたしていることが示された<sup>6)</sup>。最近、サウスウエスタン法により ABRE に結合するタンパク質の cDNA がクローニングされた。この DNA 結合タンパク質はロイジンジッパー構造を持ち、保存性の高い塩基性領域で DNA 結合する bZIP タイプのタンパク質であることが示された<sup>5)</sup>。しかし ABRE の配列は光や嫌気、傷害などで誘導される遺伝子の転写開始領域にも見い出されることが示され、他のシスエレメントの役割についても解析が進められている<sup>1)</sup>。

乾燥ストレスにより誘導される RD 遺伝子には ABA によらずには誘導されないものが 3 個存在しているが、我々は主として RD29 遺伝子を用いて乾燥による誘導に関するシス領域の同定を進めている。乾燥誘導に関する領域と ABA による誘導に関する領域が転写開始領域の別の場所に存在することを示唆するデータを得た。現在それらのシス配列と結合するタンパク質因子について解析を進めている<sup>1)</sup>。

### 4. おわりに

乾燥ストレス誘導性遺伝子の発現制御とシグナル伝達系について研究を進めているが、これらの遺伝子の解析から耐旱性植物の作出へどのような戦略が考えられるであろうか。多くの遺伝子が誘導されて細胞を乾燥から保護していると考えられるので、これらの遺伝子群を効率よく発現できるように制御系を改

良するか、あるいはシグナル伝達系を制御して、これらの遺伝子群を乾燥時に効率的に発現させることが考えられる。このためには基礎となる乾燥ストレス誘導性遺伝子の発現制御とシグナル伝達系の分子レベルでの解明が必要である。

## 文 献

- 1) 篠崎一雄・篠崎和子 (1992) 蛋白質核酸酵素, 37: 1190-1199
- 2) Skriver, K. and J. Mundy, (1990) *Plant Cell* 2: 503-512
- 3) Bray, E. (1991) in *Absisic Acid* (eds. Davies, W. J. and H.G. Jones) 81-98, Bios Scientific, Oxford
- 4) Yamaguchi-Shinozaki, K. et al. (1992) *Plant and Cell Physiol.* 33: 217-224
- 5) Guiltinan, M.J. et al. (1990) *Science*, 250: 267-271
- 6) 篠崎和子・篠崎一雄 (1991) 植物の化学調節 26: 128-137

## 国内情報

# 酵母の染色体上に存在する キラ－遺伝子について

国税庁 醸造試験所

後藤邦康

## 1. はじめに

1963年、醸造等に用いられる酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の中に近縁の酵母を殺す性質を持つ株が存在することが見いだされ、殺す側の株をキラ－株という。これらのキラ－性は細胞質に存在するウイルス様粒子中の二重鎖 RNA (dsRNA) にコードされている。これらのキラ－性の実用化については他の総説を参考にさせていただきたい<sup>1)</sup>。また、清酒醪中では主にK 1型、ワイン醪ではK 2型キラ－が主に分布する。

1983年にキラ－性に対して感受性の高い酵母(*Candida glabrata* IFO 1998)を指標菌として用いることにより、それまでキラ－性を持たない株と考えられていた酵母からも弱いキラ－性を持つ株が見いだされた<sup>2)</sup>。これらの株はKHR (Killer of Heat Resistant, 至適 pHが6前後, 40°Cまで安定)とKHS (Killer of Heat Sensitive, 至適 pHが4前後, 25°C以下で安定)の二つのグループに別れる。本

稿ではこの2種のキラ－についてこれまで行ってきた結果について概観したい。

## 2. キラ－遺伝子のクローニング

二つの弱いキラ－は接合や細胞融合の結果から、それぞれ独立の優勢遺伝子であると推定され、菌株の同定や細胞融合時の優勢標識として利用された。ところが、これらのキラ－は従来のキラ－性が脱落して行く条件、シクロヘキシミド処理や37°C培養においても、弱いキラ－性は脱落せず、*S. cerevisiae*では初めて染色体上に遺伝子がコードされていると考えられた。遺伝解析の結果、KHRは第IX染色体、KHSは第V染色体上にコードされる優勢遺伝子であった<sup>3)</sup>。

両キラ－性が発現している株の全DNAを制限酵素 *Sau* 3 A で部分分解し、ベクター(多コピー系の YEp24 または単コピー系の YCpG11 を使用した)の *Bam* HI 部位に挿入し、酵母でのキラ－性発現で選択し、両遺伝子をクローニングした。ただし、KHR性は接合や細胞融合から、遺伝子のコピー数が増えることにより増殖が遅れる傾向が認められ

たため、クローニングベクターには単コピーベクターを用いた。

### 3. KHR について

KHR 遺伝子の DNA 配列から、遺伝子内には約 33kDa のタンパク質をコードし得る 888bp のオープンリーディングフレーム (ORF) が存在し、構造的には既知の dsRNA キラートキシンとの類似性はなく、新規な遺伝子であった<sup>4)</sup>。当遺伝子を多コピーベクターに移し、酵母内で発現させると通常培養では生育阻害がみられた。しかし、低 pH (pH 4.0) 下では、遺伝子の多コピー化による生育阻害が起こらなかった。そこで、低 pH 下で振とう培養することにより菌体増殖を行った後、キラートキシン生成培地へ移植する 2 段培養法で、従来の 3 倍以上高いトキシン濃度の高い培養上清を取得することができた。

この培養上清を限外ろ過濃縮し、ゲルろ過及び疎水クロマトグラフを行うことで、キラートキシンは SDS-PAGE で単一バンド (分子量約 20kDa) まで精製された。精製トキシンは単純タンパク質で、モノマーで機能した<sup>5)</sup>。さらに、このアミノ末端は Ile-Cys-Gly-Ile であり、2 番目の Cys は分子内の他の Cys とジスルフィド結合で結ばれていた。なお、この配列は KHR 遺伝子から推定される<sup>142</sup>Ile から始まっていた。

これらの知見から、KHR トキシンは分子量的にも、成熟トキシンの構造からもプレプロ構造を持つタンパク質であると考えられた。そこで、プレ部分の構造を知るために、KHR 遺伝子のプロモータ・シグナルの下流に、レポーター遺伝子として白麹菌 (*Aspergillus shirousami*) のグルコアミラーゼを用いた融合タンパク質の酵母で発現を試みた。この融合遺伝子には、KHR 遺伝子の ORF の N-末端よりの 36 個のアミノ酸残基を含み下流にグルコアミラーゼ遺伝子の<sup>14</sup>Ser 以降の cDNA を挿入した。このベクターを酵母に導入し、可溶性澱粉を含む寒天培地上で生育させ、沃素澱粉反応でグルコアミラーゼ活性の分泌を確認した (図 1 A)。分泌されたグル

コアミラーゼを精製し、その N-末端を決定したところ、KHR 遺伝子の<sup>31</sup>His から始まる配列が確認された。以上の結果から推定される KHR トキシンの分泌までの工程を図 1 B に示した。

### 4. KHS について

KHR 遺伝子区同様に DNA 配列の決定を行ったところ、708 アミノ酸をコードする ORF を持ち、N-末端近傍は疎水アミノ酸が多く存在しシグナル配列を形成していた。さらに、推定されるアミノ酸配列から予測される

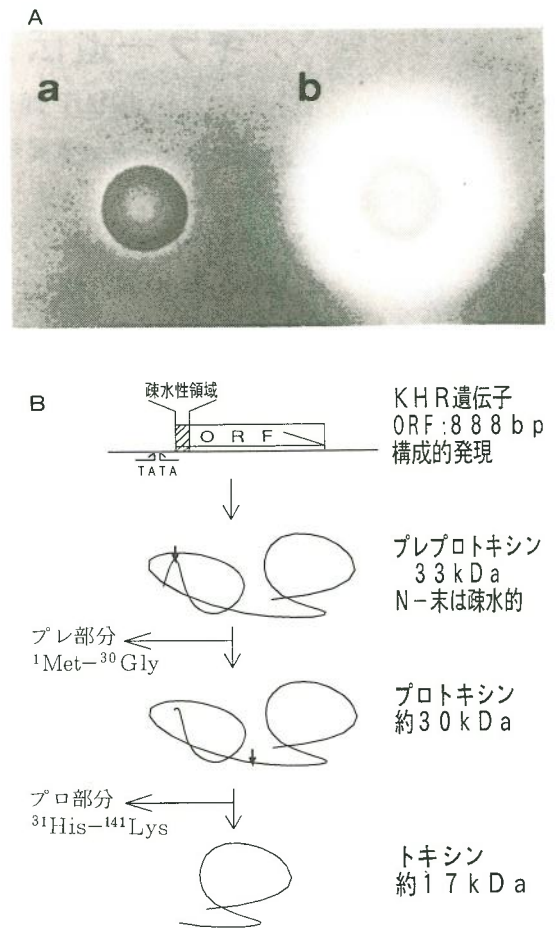


図 1 KHR 遺伝子のシグナル部の利用と KHR トキシンの分泌工程

- A ; a : ベクターのみを導入した形質転換株
- b : KHR 遺伝子のシグナル下流にグルコアミラーゼ構造遺伝子を挿入した融合遺伝子を含むベクターを導入した形質転換株
- B ; DNA 配列より予測されるタンパク質・融合タンパク質・精製トキシンの構造から予測される KHR トキシンの分泌工程

分子内の疎水残基の分布より、最も解析の進んでいるK1トキシンの作用に重要とされる細胞膜と相互作用を行う二つ以上の疎水性領域を持つことが予測された。

構造から類似性を有すると推定されたK1トキシンの作用の相違を見るために種々の検討を試みた結果を表1に示した。KHSトキシンの場合、細胞壁や壁構成成分によるキラー性の阻害、感受性株への作用時期やキラートキシンの接触後の細胞内容物(ATP等)の漏出など、K1トキシンの類似性が確認された。しかし、KHRトキシンの場合、K1と全く異なる挙動を示し、K1トキシンの既知のキラー作用とも異なる挙動を示したため、現在のところ作用機構については不明である。

KHSトキシンの場合、KHRと同様に精製することができ、分子量約75kDaの単純タンパク質であった。このN-末端構造はDNA配列から予測される<sup>37</sup>Alaから始まり分子量的にもほぼ精製トキシンの(約75kDa)と一致した<sup>6)</sup>。

表1 キラーの性質

	KHR	KHS	K1	K2
トキシン	タンパク質	タンパク質	タンパク質	糖タンパク質
分子量(kDa)	20	75	9.5+9.0	16
遺伝子	染色体DNA	染色体DNA	dsRNA	dsRNA
至適pH	6.3	4.8	4.7	4.3
作用pH	5.5-7.0	4.0-5.5	3.0-6.0	2.5-5.5
作用温度(℃)	>40	~30	~25	~35
細胞壁及び成分による阻害	なし	あり	あり	あり
内容物の漏出	なし	あり	あり	あり
感受性株の作用時期	増殖期 安定期	増殖期	増殖期	増殖期
作用機作	不明	K1様	*7形成	K1様

## 5. 分布と発現

両キラー遺伝子の類似配列の醸造用中心とした酵母(30株)中での分布を見たところ、KHR遺伝子類似配列を持たないものが低頻度ではあるが存在する。一方、KHS類似配列に関しては供試株全てにその存在が認められた。さらにKHS類似配列を持つ発現・非発現株において転写レベルでの発現について検討したところ、非発現株ではmRNAの転

写は認められず、さらに、実験室株で遺伝子破壊を行ったところ生育性等に影響は見いだされなかった。以上より、両遺伝子類似配列は必須遺伝子でないと思われる。

キラー性発現については実用酵母中KHRは発現頻度(16株中3株)がKHS(16株中6株)よりも低く、両キラー性を同時に発現するものも存在する。しかし、発現株は清酒・焼酎醪から分離される酵母では7株中KHSキラーが1株認められるのみで、ワイン・ビール酵母の出現頻度に比べ低い傾向があり、分布には片寄りがある<sup>7)</sup>。

## 6. おわりに

今回分離した二つのキラーは構造的には全く異なるもので、それぞれ今まで見いだされていない新規なものであった。作用的にはKHSが比較的多くみられるK1類似作用機構と近いものと考えられるが、KHRについては不明で、今後さらに検討を加えていくことにより新しい機作を持つサイトトキシンのように利用の可能性はある。

両遺伝子はトキシンを酵母菌体外に分泌するために必要なシグナル構造を持ち、酵母用の分泌ベクターとしての利用が可能である。さらに、感受性株の認識等についての検討はまだなされておらず、今後の進展が期待される。我々はK1類似の作用性を有するdsRNA依存キラー性で、感受性株の分布が全く異なるキラー株をブラジルより分離しており<sup>8)</sup>、今後これらの構造解析等を行うことにより感受性株の認識に関する検討が進むことが期待される。

## 文 献

- 1) 大内弘造(1990)「酵母のニューバイオテクノロジー」秋山裕一監修, 医学出版センター, pp. 47-72
- 2) Kitano, K. et al. (1984) *J. Ferment. Technol.* 62: 1-6
- 3) 北野一好ら(1988)「酵母のバイオテクノロジー」平野正編, 学会出版センター, pp. 1-8
- 4) Goto, K. et al. (1990) *Agric. Biol. Chem.* 54: 979-984

- 5) Goto, K. et al. (1990) *Agric. Biol. Chem.* 54 : 505-509
- 6) Goto, K. et al. (1991) *Agric. Biol. Chem.* 55 : 1953-1958
- 7) 後藤邦康ら (1991) 日本醸造学会誌 86 : 969-973
- 8) 後藤邦康ら (1990) 日本醸造学会誌 85 : 895-899

## 国内情報

## マダイのイリドウイルス感染症

農林水産省 養殖研究所 病原生物研究室

反町 稔

## 1. はじめに

1990年秋に四国のいくつかのマダイ養殖漁場で大量斃死が発生し、病魚からは既報の魚類病原体は検出されず、原因不明であるものの伝染性疾患が強く疑われ大きな問題となった。養殖研究所では県水産試験場の依頼を受け、県水試の協力のもとに疫学的、病理学的、ウイルス学的検討を行って原因解明を試みた結果、この大量斃死はイリドウイルス科のウイルスによる感染症であることが判明した。本病は、水温の低下に伴って10月から11月になると徐々に終息したが、1991年には6月になると再び発生し、7、8月には西日本各地の養殖漁場で前年にも増して大規模な被害が報告され大問題となった。本年もすでに各地で発生が伝えられ、夏期の高水温時の被害が危惧されている。ここでは本病の紹介と現在までの研究の概要を述べる。

## 2. 病魚の症状

病魚は外観的には体色が黒化もしくは褪色し、動作は著しく緩慢となり摂餌をせず水面を力なく遊泳し死に至る。体表や鰭に出血性のスレ、眼球の軽い突出や出血を伴うものもあるが、外観症状の顕著でないものも多い。

内部所見では貧血による鰓の褪色が最大の特徴であるほか、鰓弁先端部からの出血、囲心腔内の出血、肝臓の褪色、脾臓の肥大などもしばしば観察される。

病理学的には脾臓の病変が最も顕著であり、顕微鏡では細胞質が塩基性色素に均質に濃染もしくは顆粒状に染まる肥大球形化した細胞が多数観察されるのが特徴である(図1)。肥大細胞は心臓では心内膜下に、鰓では鰓弁の中心静脈洞内皮および中肋の軟骨膜に接する組織間隙中に、腎臓では間質組織と糸球体内に観察される。肝臓における肥大細胞の出現は他の臓器に比べると少ない。

これらの肥大細胞を顕微鏡で観察すると、細胞質に平面的には5ないし6角形を呈し、直径200~240nmでエンベロープ等の構造物をもたない比較的大型の多数のウイルスの増殖像がみられる(口絵)。ウイルス粒子は細胞

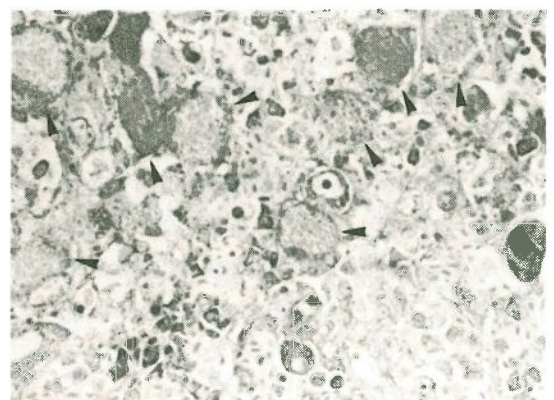


図1 マダイ病魚の脾臓に出現した肥大細胞(矢印, HE染色)

SORI MACHI Minoru

質でのみ増殖し、核内には観察されない。

本病に特異的な肥大細胞の脾臓、腎臓、心臓、鰓などにおける感染は、血管系を介していると推定され、特に造血組織での出現が顕著であること、成熟赤血球での感染が観察されないことなどから、これらの肥大細胞は白血球系の細胞であると推定される。また、病魚の鰓には強度の貧血が認められることから、本病は白血球系細胞の病変とそれに伴う貧血が病気の主徴であり、大量斃死はこれらの病変に起因すると考えられている。

### 3. 原因ウイルス

培養細胞によるウイルスの分離培養は比較的困難である。病魚の脾臓磨砕ろ液をBF-2, FHM, RTG-2, CHSE-214, KRE-3細胞などの魚類由来細胞に接種し20~25℃で培養すると、数日後にはいずれの細胞においても肥大球形細胞の出現を特徴とするCPEが発現するが、他の魚類ウイルスにみられるような急激な細胞の崩壊は示さない。また、いずれの細胞も感受性は低く、ウイルス感染価は $10^{3-5}$ TCID<sub>50</sub>/ml程度であり、したがって現状では培養細胞によるウイルスの検出感度はあまり高くない。CPE (cytopathic effect: 細胞変性効果) の発現は20℃よりも25℃の方が顕著であるが、継代とともに感染価は低下する傾向もみられ、培養手法については今後の検討が必要である。

本ウイルスは $10^{-4.5}$ MのIUDR処理によって増殖が抑制され、エーテル、クロロホルムに感受性、熱(55℃, 30分)および酸(pH3)に不安定な性質を示す。また、15~30℃で増殖し、適温は25℃前後であるが、37℃の増殖は認められない。

脾臓や腎臓の組織切片にフォイルゲン反応による核酸染色を施して観察すると、肥大細胞の細胞質内が淡赤紫色に染ることから、本ウイルスはDNAウイルスに属する。

これらの結果と、電顕観察でウイルス粒子は中等大で六角形を呈し細胞質でのみ増殖することから、本ウイルスはイリドウイルス科に属するものと考えられる。

イリドウイルスによる感染症は、現在までに昆虫、両生類、魚類などで知られているが、比較的報告例は少なく、魚類においてもリンホシスチス病やVEN(ウイルス性赤血球壊死症)を除けば1980年代に入ってから研究されたものが多い。

魚類のイリドウイルス感染症として最も古くから知られているリンホシスチス病は、海産魚ではヒラメ、ブリ、マダイ、スズキ、クロソイなど多数の魚種で知られている。リンホシスチス病は罹病魚種にもよるが、外観症状がきわめて醜悪になることから比較的容易に診断が可能な疾病で、今回の疾病とは明らかに異なるものである。また、VENも多種類の海産魚にみられるが、本病は赤血球内に封入体を形成するのを特徴とするのに対して、マダイ病魚の赤血球には封入体はまったく観察されない。これらのほかに海産魚、淡水魚でイリドウイルスによる疾病がいくつか報告されているが、症状、病理所見、ウイルス粒子の大きさ、性状などからいずれもマダイのウイルスとは異なり、今回の大量斃死の原因となったウイルスは既報の魚類イリドウイルスとは異なる新しい種と考えられている。

### 4. 発生状況と罹病魚種

本病の発生は10~30g程度の当才のマダイ稚魚に圧倒的に多くみられるが、1~2年魚などの大型魚での発生も報告されている。6月中頃から10月上旬頃までの水温が22~23℃以上の高水温期に多く、特に25℃を超える7、8月の被害が大きい。水温が20℃以下に下がる10月下旬頃には本病は自然に終息する。

一方、一部の地域ではマダイ以外でも同一漁場で飼育されていたブリ、カンパチ、スズキ、イシダイなどでの斃死が報告され、病理組織学的にも電顕観察によってもマダイと同一の疾病であることが確認され、本病はスズキ目の多種類の魚種が本病に罹病することが明らかにされている。

マダイ病魚の脾臓磨砕ろ液あるいはウイルス培養液をマダイ、ブリの腹腔内に接種すると、いずれも自然発病魚と同様に脾臓、鰓等

に球形化した肥大細胞が出現して死亡し、これらの魚種に対して顕著な病原性があることが確認されている。また、感染実験の結果から稚魚も小さいほど感受性が高く、水温25～30℃で発病が高く、20℃では発病は著しく低下し、15℃での発病は認められない。これらの結果は、自然発病の傾向とほぼ一致するものである。

マダイ、ブリ以外の魚種については、実験感染による再現は行っていないが、自然発病魚の症状から同様に病原性を有するものと考えている。いずれにしても、1990年に四国の養殖マダイで最初に発生したイリドウイルス感染症は、想像以上に急速に拡大・伝播し、1991～92年には九州、四国、紀伊半島沿岸等の主要なマダイ生産県ほぼ全域に蔓延し、罹病魚種もマダイばかりでなく多種類に及ぶこと、マダイでは稚魚から親魚までが罹病することなどから、海面養殖漁業に及ぼす影響が強く懸念されている。

## 5. 病魚の診断

病魚の診断は肉眼的な解剖所見では必ずしも症状が顕著でないものも多く、確実ではない。上述したようにマダイでは病魚の脾臓に特異的に肥大細胞が出現することから、脾臓のスタンプ標本にギムザ染色を施し、光顕観察によって肥大細胞を確認すればほぼまちがいない。ブリ、カンパチなどではマダイと比べて肥大細胞の出現数が少ないので精査する必要がある。

培養細胞によって本ウイルスの特徴的なCPEが確認されれば、診断はほぼ確実といえよう。しかし、培養法は現在のところ日時を要し、感染価が低い場合CPEの発現が顕著でない。日常の診断にはギムザ染色を施したスタンプ標本の観察により肥大細胞を確認することが、どこでも誰でもできる迅速簡便な診断手法であろう。養殖研究所においても現在ウイルスの精製と抗血清の作成を急いでいるが、ELISA等による迅速診断法の開発は今後の課題である。

### 生研機構からのお知らせ

## 「バイオテクノロジーマニュアル」

### 優秀作品賞受賞

本誌前32号で御紹介しました生研機構企画のビデオ「バイオテクノロジーマニュアルシリーズ」が、技術マニュアルとしての優秀性を認められ、(財)日本視聴覚競会(後援文部省)が実施する1992年教育映画祭・優秀映像教材ビデオの部で「優秀作品賞」を受賞しました。

販売 農文協 TEL 03-3585-1141

## 出資プロジェクト情報

# バイオテクノロジー技術を使った優良な 実験動物の生産技術

株式会社 エヌティーサイエンス  
上田 進

## 1. はじめに

昭和63年に株式会社エヌティーサイエンスが発足して既に4年が経過し、時の経過の速さに改めて驚いているしだいである。設立当初は、異なった文化をもつ親会社からの出向社員の混成チームであるため、意思の疎通を欠くことがあり、研究開発に関わる苦勞にとどまらず、その調整に多大な労力が割かれた。その甲斐あってか、今では比較的順調に研究も進展してきている。

本プロジェクトの目的は、遺伝子組換え技術を用いて新たな実験動物を作製すること、すなわち、トランスジェニック動物の作製である。従来、実験動物は、兄妹交配を重ねることによる遺伝的背景の均一化や、維持継代の間に生じる突然変異による疾患動物の選抜、あるいは、特定形質をもつ動物を選抜することにより、作製されてきた。しかしながら、本プロジェクトでは、既知の遺伝子を受精卵の核に人為的に導入することによって、この遺伝子の形質を発現させようとするものである(表紙参照)。また、これに加えて実験動物の系統管理、および、微生物汚染に対する管理に関わる新たな技術を確認しようとするものである。以下に現在までに得られた知見の一部について記したい。

## 2. ラットの小型化

安全性試験でよく使用されるラットを、より扱いやすく、しかも、飼育管理の経済効率

を高めるために、ラットの小型化を試みた。下垂体の成長ホルモン産生細胞で、アンチセンス RNA を発現させ、成長ホルモンのメッセンジャー RNA を捕捉すれば、メッセンジャー RNA からタンパクへの翻訳が阻害され、成長ホルモンの産生、分泌量が低下し、小型化が期待できる。このために、ラット成長ホルモン遺伝子のアンチセンス DNA にラット成長ホルモンプロモーターをつなぎ、さらに導入遺伝子の転写をよくするために、もともとラット成長ホルモンプロモーターに存在する塩基配列である、甲状腺ホルモン感受性配列(Thyroid hormone response elements)を4コピー分付加した(図1)。そして、このように構築された遺伝子は、まず培養細胞でその転写活性を確認した後、マイクロインジェクションによって胚に導入された(図2)。この結果、遺伝子の導入が確認された4匹のトランスジェニックラットを得ることができた。この内の1匹(♀)は他の同腹ラットに比較して体重が2/3と小さかった(口絵1)。そしてこのラットから11匹の産仔が得られ、これら産仔の4匹に遺伝子が伝達されていることを確認した。

これら遺伝子の導入が確認できた小型のラットについて、成長にともなう体重の推移を、

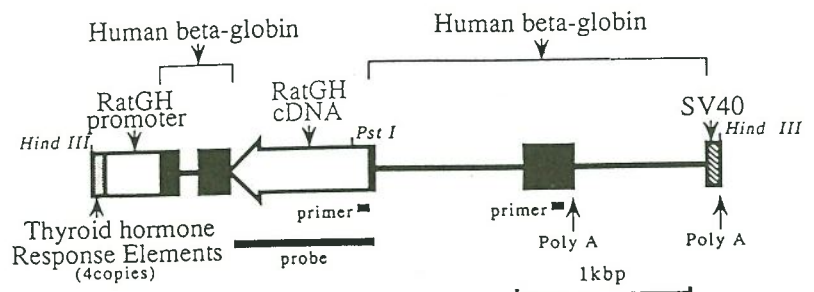


図1 ラット成長ホルモンのアンチセンスDNAの構築



14 出資プロジェクト情報

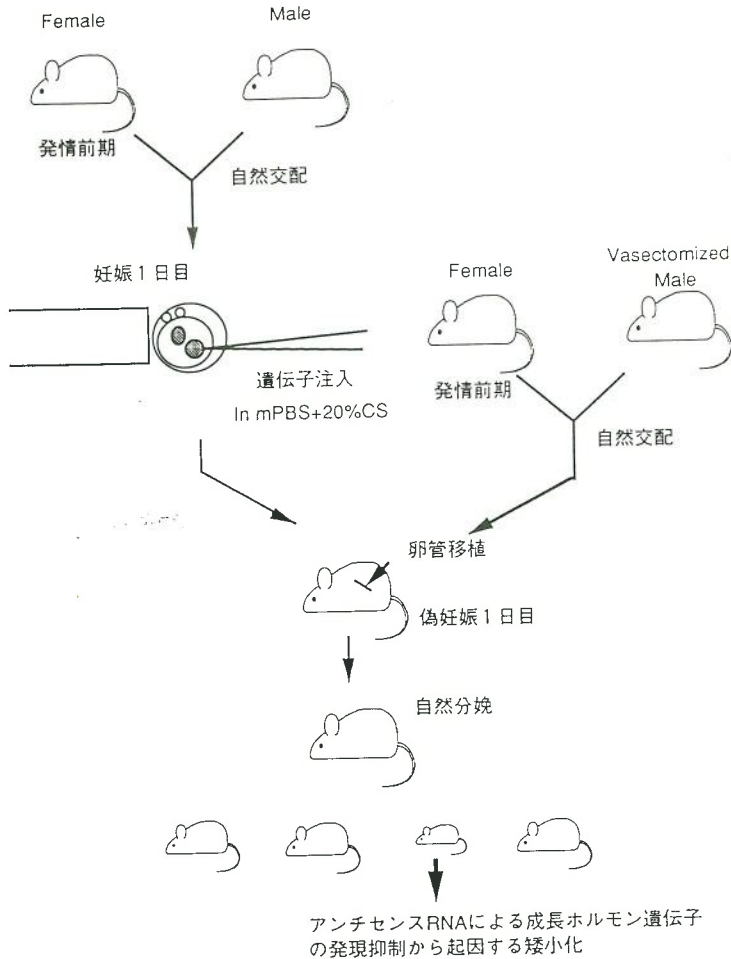


図2 マイクロインジェクション

同腹の遺伝子が導入されていないラットと比較したところ、とくに雄において顕著な差がみられた。すなわち、雄においては対照と比較して約30%、雌においては対照と比較して約15%の体重の減少が観察された。

3. ルシフェラーゼ導入マウス

その形質ができるだけ多くの器官組織で発現し、マーカーとなり得るような遺伝子を導入したマウスを作ることを試みた。ルシフェリンの酸化を触媒することによって、ホタルの生物発光反応に関与している酵素、ルシフェラーゼの遺伝子をマウスに導入した。あらゆる器官でこの遺伝子を発現させたいことから、プロモーターとしてニワトリのβ-アクチンプロモーターを使用した。

この遺伝子の導入が確認されたマウスについて、種々の器官を化学発光法で測定したと

ころ、強弱の差はあるもののほとんど全ての器官でルシフェラーゼ活性が検出された(口絵2)。そして、おもしろいことに脳、心筋、骨格筋に高いルシフェラーゼ活性がみられた。

ルシフェラーゼ遺伝子導入マウスは、変異原性試験、生殖試験等に利用することができ、さらに、ルシフェラーゼ遺伝子導入マウスの組織から線維芽細胞をとり、ルシフェラーゼ活性を検出した後に培養系に戻すと、増殖分裂し生存しているところから、胚性幹細胞(ES細胞)での相同組換えの選択のマーカーとなり得る。

4. PCR法を用いた微生物の検出

実験動物としてのニワトリは、インターフェロンの発見、Tリンパ球、Bリンパ球の発見等重要な発見に寄与してきている。また、ニワトリにとどまらずその受精卵も、細胞培養用に使用されたり、ウイルスや細菌を増殖させるのに使用されている。このように実験動物として使われるには、微生物の汚染は好ましくない。なかでも特別な臨床症状を呈することなくウイルスを保持している、すなわち、ウイルスキャリアーのニワトリを実験に使用すれば、誤った実験結果が導かれることになるのは自明であろう。

ニワトリに腫瘍を引き起こすヘルペスウイルス科のマレック病ウイルスは、急性期にはBリンパ球で増殖し、慢性期に移行するとTリンパ球で増殖するようになる。そしてTリンパ球に腫瘍を引き起こす。このウイルスに感染したニワトリのなかには、臨床症状を示さないでウイルスキャリアーになるものがあり、また、これらが様々なストレスによってウイルスを排泄するようになり、本病の根絶を困難にしている。そこで、本病ウイルスに感染していることを証明する手段として、ウイルス核酸をPCR法を用いて検出することを試みた。

マレック病ウイルスは三つの血清型に分類されており、1型が強毒株である。この1型に共通なDNA配列がマレック病ウイルスゲノムのgA遺伝子領域に存在するところから、

この gA 遺伝子の翻訳開始点から数えて、694 から893塩基の間200塩基対を増幅するように22マーのプライマーを合成して増幅の反応条件を検討した(図3)。マレック病ウイルスでトランスフォームしたTリンパ球の細胞株であるMSB1細胞を、マレック病ウイルス感染Tリンパ球のモデルとして使用した。MSB1細胞から抽出したDNAの検出限界は、1/10細胞分のDNAであった。MSB1細胞には約10コピーのマレック病ウイルスゲノムが存在しているといわれていることから、検出感度はほぼDNA1分子となり理論値どおりの結果が得られた。

### 5. おわりに

以上、本プロジェクトの成果の一部を記したが、今後はこれまでに得られたトランスジェニックラット、トランスジェニックマウス のホモ化を進めていくとともに、種々の生化学的検査、形態学的検査を行わなければならない。また、疾患モデル動物をはじめとして

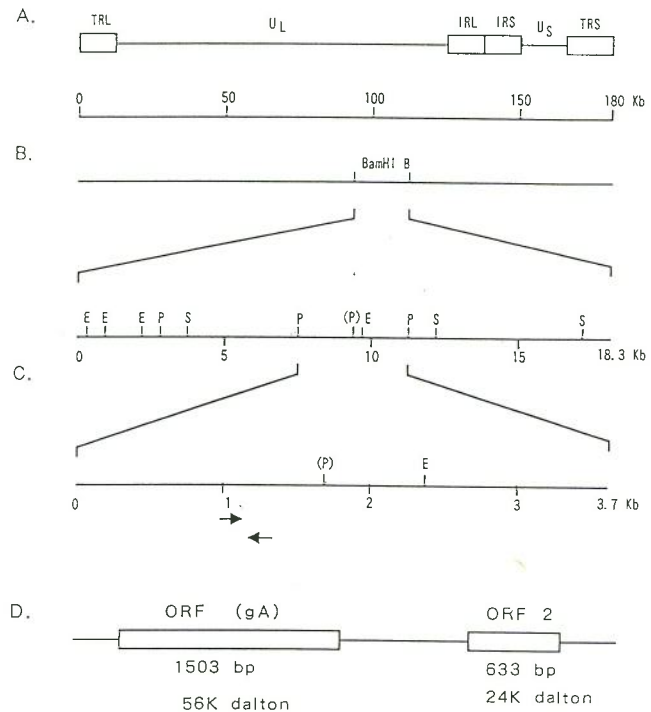


図3 マレック病ウイルスゲノム

もっと多くのトランスジェニックアニマルを作製していきたいと考えている。



## 天然記念物エヒメアヤメの増殖

広島県立農業技術センター 生物工学研究所

古谷 博

### 1. はじめに

エヒメアヤメ *Iris rossii* Baker は別名「誰故草：タレユエソウ」とも呼ばれ、葉長15～30cmの小型のアヤメで、4月中下旬に10～15cmの茎の先端に径4cmくらいの愛らしく美しい青紫色の花をつける（口絵参照）。

この植物は今から15～16万年前の第四期洪積世の頃、中国東北部から朝鮮半島を南下し当時陸続きであった玄海を越えて我が国に渡ってきた植物である<sup>1)</sup>。山陽地方西部から四国、九州の限られた山地にだけ自生しており、愛媛、広島、山口、佐賀、大分県内の群生地は「エヒメアヤメ南限地帯」として大正14年に国の天然記念物に指定されている。

広島県内では2か所の自生地が地域指定され、現在、地元の保存会の人達が地域ぐるみで保護と保存に努めている。しかし、その他の自生地では乱獲、開発造成工事、生態系の変化などから次第に姿を消し絶滅の危機にある。近年、県内のかつての自生地である市町村では、農村地域活性化の一法としてエヒメアヤメを公園や自然歩道の景観植物として利用する試みがなされている。

エヒメアヤメは根が深くまで伸びるために移植や株分けによる栄養繁殖が難しい。また、種子による増殖も可能ではあるが、自然条件では一般に種子が得にくいうえに開花までに年数がかかるため、組織培養による短期大量増殖法の確立が要望されてきた。

そこで、当研究所で2年前から研究に取り組んだ結果、自生株の地下茎腋芽の茎頂から

多芽体を誘導することに成功し、更に増殖多芽体から再生植物を育成する培養系を確立することができたので、その概要を紹介する。

### 2. 地下茎の腋芽茎頂からの多芽体誘導

培養に先立ち、自生地の開花株を抜き取り地下部の形態を観察したところ、発達した根と地上に伸びている葉との境界部分の地下茎（塊茎）に、翌春萌芽する芽が数個認められた（図1）。そこで、この塊茎の腋芽茎頂培養を以下の方法で行った。

地下茎より腋芽部分を採取して流水で十分に洗った後、70%エタノール溶液に数秒浸漬し、更に7%さらし粉上澄み液に15分間浸漬して殺菌した。その後、クリーンベンチ内で滅菌水により3回洗浄して培養に供試した。

茎頂は実体顕微鏡下で約5mmの大きさに摘出し、基本培地に Murashige and Skoog (1962) を2倍量に希釈した培地（1/2 MS培地）と Nitsch and Nitsch (1967: Nitsch培地）を用い、植物ホルモンの $\alpha$ -ナフタレン酢酸（NAA）とベンジルアデニン（BA）を組み合わせて添加した培地に置床した。

培地はしょ糖 30 g/l、寒天 8 g/l を加え、pH 5.7 に調整して、20 $\phi$ ×90mm の試験管

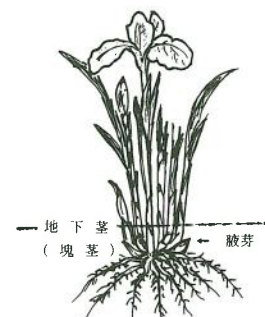


図1 培養部位

FURUYA Hiroshi

表1 エヒメアヤメ茎頂からの多芽体誘導培地の試験結果

NAA (mg/l)	BA (mg/l)			
	0	0.2	2.0	5.0
0	×	M <sub>3</sub>	M <sub>8</sub>	×
0.2	S <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>12</sub>
2.0	-	-	-	-

(注) Nitsch培地, S:シュート形成  
M:多芽体形成(小数字は芽数)  
-:カルスまたは褐変枯死

表2 エヒメアヤメ多芽体から伸長したシュートの発根培地の試験結果

植物ホルモン (mg/l)	発根率(%)	根数 (本)	根長 (mm)	二次根 発生(%)
BA 2.0 + NAA 0.2	15	1.0	7	0
NAA 0.2	65	4.1	61	92
IBA 2.0	85	3.8	55	94
ホルモンフリー	75	3.0	47	23

(注) Nitsch培地, 不定芽移植2か月後に調査  
-:カルスまたは褐変枯死

に6mlずつ分注し、2重のアルミホイルで栓をしてオートクレーブで15分間滅菌した後で使用した。培養は温度25°C、照度約3,000 lux、16時間照明の条件下で行い、置床4か月後に茎頂の生育を調査した。

その結果、BA 0.2~2.0 mg/l及びBA 2.0~5.0+NAA 0.2 mg/l添加区において1茎頂から5~10個の芽を有する多芽状集塊(多芽体)の形成が認められた(表1、口絵参照)。なお、形成した多芽体の芽の数は供試した培地ではNitschの方が1/2 MSより多い傾向にあった。

### 3. 多芽体の増殖及び植物体再生

茎頂から誘導した多芽体を約5~10mmの集塊に分割(平均5.3個/多芽体)してBA 2.0+NAA 0.2 mg/l添加したNitsch培地に移植し、2か月間培養後に多芽体の増殖及びシュートの伸長について調査した。次に、増殖多芽体から伸長したシュートを再生植物に育成するための発根培地について検討した。

なお培養は、25φ×100mmの試験管を用い培地量10mlとした以外は、茎頂培養と同様の条件下で行った。

その結果、分割移植した多芽体のほとんどが、その形態が維持されたまま増殖すると共に1試験管当たり約3本のシュートが伸長することが認められた。

次に、増殖多芽体から伸長したシュートを発根培地に移植して2か月間培養した結果、NAA及びIBA添加培地に移植したものは70~80%発根が認められ、二次根の形成も良

い再生植物に育成できた(表2、口絵参照)。

以上の結果、地下茎の腋芽茎頂から多芽体を誘導し、分割移植して継代培養すれば器内増殖が可能であり、多芽体から伸長したシュートを発根培地に移植すれば、再生植物が得られる培養系が確立できた。

### 4. おわりに

エヒメアヤメは生育の遅い植物であり、茎頂から多芽体を誘導し、分割移植して増殖するまで4~5か月かかる。その後は3~4か月ごとに3~5個に分割して継代培養を行えば器内増殖でき、1年間に1芽からおよそ20~30個の多芽体が得られる。

現在、培養を開始してから2年以上経過しているが、多芽体の増殖率は少し落ちてはきているものの、その形態は維持されている。また、再生植物は順化後鉢植えで養成中であるが、既に分けつも見られ種子繁殖による実生個体よりも生育が良い(口絵参照)。

エヒメアヤメはすでに絶滅寸前にあり、培養材料を得ることすら難しい状態にある。また、本手法は地下部を外植体として供試するために、材料の無菌化が比較的困難である。したがって、今後は培養植物の器内保存と他の組織からの増殖、あるいは種子からの大量増殖法の検討を行い、天然記念物エヒメアヤメを「幻の花」にしないよう増殖と保護のために試験を続けていきたいと考えている。

### 文 献

- 1) 原田一郎(1985) 誰故草の復活: 中国新聞社

## 文献情報

植物の色素発現パターンを  
制御する遺伝子

アントシアニン生合成系の遺伝子群はトウモロコシの変異を用いて遺伝学的に詳しく解析され、関連遺伝子は二つに分類されている。一つは色素の合成酵素遺伝子群で、単離された遺伝子は植物種間でよく保存されている。もう一つは前者の発現を調節する遺伝子群である。赤や紫のアントシアニン系色素の濃さや発現部位は植物種によって多様である。発現パターンの多様性は、植物によって異なる調節遺伝子があり、個々の生合成系遺伝子がそれぞれ調節されて生じるのか、それとも共通にもっている調節遺伝子の発現様式が違うために生じるのだろうか。これまでにトウモロコシでは調節遺伝子、*c1*および*R*遺伝子群が単離されており、転写因子としての性質が明らかにされている。キンギョソウでもアントシアニン生合成系の調節遺伝子座 *delila* (*del*)が見つかった。これまでの研究から、*del*遺伝子座は花の花筒部(5枚の花弁が癒合した部位)で複数のアントシアニン生合成系遺伝子の発現に関与することがわかっている。本論文では *del* 遺伝子のクローニングをおこない、その構造から色素発現パターンの進化について考えている。

*del* 遺伝子のクローニングはトランスポゾンタッキング法でおこなわれた。*del* 劣性変異体では、ときどき花筒のアイボリーの所々に赤い色素が生じる。これは体細胞でトランスポゾンが *del* 遺伝子座から離脱するためである。また、自家受粉により次代に7.5%の野生型への復帰体が生じるが、これは生殖細胞でトランスポゾンの離脱が起こるためである。変異体と復帰体のゲノム中のトランスポゾンの分布を比較したところ、*Tam2* 挿入領域の1か所に違いが発見されたことから、*del* 領域のクローニングがおこなわれた。

*del* 遺伝子の発現は着色する前の蕾ではわ

ずかであるが、花が強く着色すると同時期に最大となる。*in situ* ハイブリダイゼーションをおこなうと、*del* 遺伝子は花冠の表皮細胞で特異的に発現しており、アントシアニンの分布や *nivea*, *pallida*, *incolorata* などの合成酵素遺伝子群の発現パターンとよく一致していた。しかし変異体では *Del<sup>+</sup>* RNAがないにもかかわらず花の先端部では色素生産がおこなわれている。このことは *del* 遺伝子の発現が花の先端部での色素合成に必要とされないことを示している。

DEL タンパク質は644個のアミノ酸からなり、*myc* ファミリーなど真核生物の転写調節因子の特徴である helix-loop-helix (HLH) 領域や酸性アミノ酸領域を持っており、トウモロコシの *R* 遺伝子ファミリーと全長にわたって高い相同性があった。*del* 遺伝子が発現しなくとも色素が生産されている部位では *del* 以外の調節遺伝子が働いていると考えられる。*del* cDNA をプローブにしてゲノムをスクリーニングしたところ、*del* ファミリーに属する少なくとも四つの遺伝子が得られた。これらがその他の部位での色素生産を調節しているのかもしれないし、トウモロコシの *c1* に対応する別の調節遺伝子があるのかもしれない。

分類学上遠縁であり、植物体での色素発現パターンが全く異なるトウモロコシとキンギョソウにおいて、調節因子 DEL と R が機能的に共通のタンパク質であったことから、植物種による色素発現パターンの多様性は、共通にもっている調節遺伝子の発現様式が異なっているためと考えられる。それでは *del* 遺伝子を色素発現パターンの異なる植物に導入したらどうなるだろうか。はたして導入された植物の色素発現パターンが変わるだろうか？

(抄訳 岩淵万里——植物工学研究所)

IWABUCHI Mari

## A common gene regulates pigmentation pattern in diverse plant species

Goodrich, J. et al.

*Cell* 68: 955-964 (1992)

## 文献情報

遺伝子操作による植物の耐  
冷性の改変

植物の低温に対する感受性は葉緑体膜のホスファチジルグリセロール（以下 PG）を構成する脂肪酸の不飽和度と密接に関係していることが知られている。例えばホウレンソウやシロイヌナズナなどの不飽和脂肪酸の比率が高い植物は耐冷性であるが、カボチャのように不飽和脂肪酸の比率が低い植物は耐冷性をもたない。この PG の脂肪酸不飽和度は、葉緑体に存在するグリセロール-3-ホスフェトアシルトランスフェラーゼによって支配されていると考えられている。著者らは、低温感受性植物であるカボチャ及び耐冷性植物であるシロイヌナズナのグリセロール-3-ホスフェトアシルトランスフェラーゼの cDNA をタバコに導入することによって、タバコの PG の不飽和脂肪酸の比率及び耐冷性を改変することに成功した。

カボチャ及びシロイヌナズナのグリセロール-3-ホスフェトアシルトランスフェラーゼの cDNA に、カリフラワーモザイクウイルスの 35 S プロモーターを結合し、これをアグロバクテリウムを用いてタバコ (*Nicotiana tabacum* var. Samsun) に導入して、各 15 個体の形質転換植物体を得た。これらの形質転換植物体の大部分は、PG の不飽和脂肪酸の比率が大きく変化していたが、特に変化の顕著な各 5 植物体を選抜しその後の調査を行った。イムノブロットングにより、これらの形質転換体中には、シロイヌナズナまたはカボチャのグリセロール-3-ホスフェトアシルトランスフェラーゼの mature size のものが、葉中、さらに葉緑体の可溶性画分に存在しており、葉の全タンパク質量のおよそ 0.1 ~ 1.0% を占めていることが示された。通常、葉中でこの酵素タンパク質量は全タンパク質量の 0.01% 以下であるので、形質転換体では外来酵素タンパク質が過剰に発現していること

がわかる。またこの外来酵素タンパク質は、内生酵素と同様に葉緑体に輸送され、プロセッシングされるものと考えられる。

形質転換植物体中の脂質の脂肪酸組成を分析すると、PG の脂肪酸組成のみが顕著に変化していた。すなわち、カボチャの酵素遺伝子を導入した植物では PG の不飽和脂肪酸の比率が対照植物に比べて減少し、逆にシロイヌナズナの酵素遺伝子を導入したものでは増加した。脂質各クラスの構成比率や PG 以外の脂質中の脂肪酸組成は、この酵素の導入によって全く影響を受けなかった。このことは、外来グリセロール-3-ホスフェトアシルトランスフェラーゼの発現はグリセロ脂質の合成経路には影響を与えず、PG 合成の際の脂肪酸の選択特性を変化させていることを示している。

形質転換植物の耐冷性の調査は、①低温下での光合成の光阻害の程度を 1℃に 4 時間おいた後の酸素発生量の低下率を指標として調べる、② 1℃に 10 日間おいた際のクロロシスや葉の障害の程度を視覚により判定する、の二つの方法で行っている。カボチャの酵素遺伝子を導入した形質転換植物では、対照区に比べて、低温下での光阻害の程度、葉の障害の程度ともに増大し、低温に対する感受性が増大した。逆にシロイヌナズナの酵素遺伝子を導入した植物では、光阻害程度も障害も対照区に比べて低減し、耐冷性が増した。

以上の結果は、PG の不飽和脂肪酸の比率はグリセロール-3-ホスフェトアシルトランスフェラーゼに支配されていること、また、適当なアシルトランスフェラーゼを導入することにより、PG の不飽和脂肪酸の比率を変化させることができ、遺伝子工学的に耐冷性を付与し得ることを示している。耐冷性は様々な要因によって支配されているものと考えられるが、本報告はアシルトランスフェラーゼと PG の不飽和脂肪酸の比率、耐冷性との関係を明らかにし、遺伝子操作により低温に弱い植物に耐冷性を付与する道を開いたものである。

（抄訳 浜岡 陽—— JT 植物開発研究所）

HAMAOKA Yoh

## Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants

Murata, N. et al.

*Nature*, 356 : 710, 23 April (1992)

### 文献情報

### シアノバクテリアのミオグロビン

今回窒素固定シアノバクテリアの一種 *Nostoc commune* で発見されたミオグロビンはシアノグロビンと呼ばれ、分子量12.5kDaの可溶性ヘムタンパクで、アミノ酸配列は下等真核生物の *Paramecium caudatum* と *Tetrahymena pyriformis* に相同性がみられる。

多くのシアノバクテリアはニトロゲナーゼを有し  $N_2$  の還元を行っている。総じてこのような光合成細菌は生物的窒素固定に大きく関与している。ニトロゲナーゼは分子状  $O_2$  に弱く、そのためシアノバクテリアは  $O_2$  濃度を抑制するなど様々なメカニズムで窒素固定を行っている。例えば、あるものは好氣的反応と窒素固定反応を部位や時間で分離し、あるものはヘテロシストといった窒素固定のために分化させた細胞を形成する。このヘテロシストへの分化の過程で構造的、生理的に変化して窒素固定に都合のよい還元状態を作り出す。この分化の過程で *nif* オペロンの誘導など遺伝子の発現も大きく変化している。

このようなヘテロシスト化するシアノバクテリアは熱帯から極地まで広く分布し、また様々な高等および下等植物と何らかの関係を持つものが多い。その中で *Nostoc commune* ははっきりとしたコロニーをカルストの石灰岩の凹部に作る。著者らは *Nostoc commune* UTEX584 という系統から *nifUHD* 遺伝子群を分離して、塩基配列を調べることでこの遺伝子群の *nifU* と *nifH* の間に118コドンからなる ORF があることを明らかにした。この ORF (*glbN*, シアノグロビン) はすでに知られている *nif* 遺伝子とは塩基およびアミ

ノ酸配列での相同性が認められないが、原生動物の *Paramecium caudatum* および *Tetrahymena pyriformis* のミオグロビン (それぞれ116と121アミノ酸からなる) とその大きさおよびアミノ酸配列で明らかな相同性が認められた。

著者らは *glbN* 遺伝子を発現ベクター (pT7-7) にサブクローニングして大腸菌で発現させ、その細胞抽出物中に 12kDa のタンパクを電気泳動により確認した。*glbN* 遺伝子を導入した大腸菌のペレットは赤色を呈し、封入体は光学顕微鏡で認められなかった。

大腸菌のペレットからタンパクの精製過程でタンパクの色は赤色から茶褐色に変化した。これは他の生物のミオグロビンやヘモグロビンの精製過程でよくある自己酸化反応のためと考えられる。

大腸菌で発現・精製した *glbN* タンパクはモノマーで 412nm にソーレー吸光を示し、sodium dithionite による還元で 422nm に、一酸化炭素により 419nm にシフトしたことから一酸化炭素と結合する部位を外部に持ち、おそらく分子状酸素との結合部位と共通であろう。アミノ酸配列中にシステイン残基がないことからヘム基は非共有結合的にアポタンパクに結合していると考えられる。

このシアノグロビンの *Nostoc commune* UTEX584 での発現は有機窒素がなく (分化したヘテロシストがある) 空気の供給を制限した条件に限られる。

今回見つけられた *Nostoc* のシアノグロビンはほかの既知のミオグロビンより小さいが原生動物の単量体グロビンと高い相同性があり、これらの機能は今のところ明らかになっていない。それに対して、*Vitreoscilla* といった真核細菌のヘモグロビンとはあまり相同性がない。これらの単量体ヘムタンパクは共通の起源を持つのか? このことがグロブリンの発生成立過程の解明のヒントになるだろうか? 著者らはシアノグロビンが窒素飢餓によりその発現が誘導されることと *glbN* が二つの *nif* 遺伝子 (*nifU* と *nifH*) の間に存在することから、窒素固定における酸素濃度の調節に関与している可能性を指摘している。

(抄訳 河邊邦正——北海道農試)

KAWABE Kunimasa

**Myoglobin in a *Cyanobacterium***

Potts, M., S.V. Angeloni, E. Ebei and D. Bassam

*Science*, 256: 1690-1692 (1992)

## 文献情報

## 植物ウイルス移行タンパク質

昆虫の媒介や傷口から細胞壁を乗り越え、植物に植物ウイルスが侵入したとしよう。このとき、侵入した細胞でたとえ複製できたとしても、植物体組織レベルで感染が成立するためには植物ウイルスと宿主の特異的な相互作用の結果引き起こされる周囲の細胞への移行が必要である。子ウイルスが宿主の中を移行する過程は能動的なものであり、大きく分けて二つのレベルがある。一つは細胞間（近距離）移行、もう一つは維管束組織を介した組織間（遠距離）移行と呼ばれる。植物ウイルスは細胞間の伝播をする際、原形質連絡(plasmodesmata)を介して細胞壁の障壁を乗り越えている。原形質連絡とは細胞壁をまたいで隣合った植物細胞の細胞質同士をつなぐ構造である（機能上動物のギャップ構造に相当する）。通常この構造を通して植物ホルモンを含めた細胞間のシグナル伝達が行なわれ、水や栄養分のやりとりも行なわれている植物のいとなみにとって重要なものである。

タバコモザイクウイルス(TMV)の場合、細胞間移行には分子量 30kDa の移行タンパク質(movement protein; この術語は完全には確定していない)が必須である。このタンパク質が原形質連絡に局在することはすでに明らかにされていたが、直接原形質連絡の機能に影響を与えることが次のように示された。移行タンパク質を構成的に発現する形質転換体植物をまず作成した。その植物体の原形質

連絡を通過可能な分子の大きさの限界(排除限界)を調べると、コントロールの植物に比べて3~4倍大きくなっていることが示されたのである。この結果から移行タンパク質は原形質連絡の“穴”を広げることによってウイルスの移行の速度を高めると想像される。なお、局所壊死病斑を形成するタバコで形質転換体植物を作成すると原形質連絡の排除限界の分子の大きさが2~3倍大きくなる。さらにウイルスを接種すると病斑を乗り越え、細胞間の移行が可能になることが示された。

このTMVの移行タンパク質は全体268アミノ酸残基からなる(U1株場の場合)。C端から55アミノ酸残基を削った移行タンパク質を発現する形質転換体を作成したところ、この移行タンパク質は細胞壁に局在して原形質連絡に作用し、細胞間移行が不能なウイルスをも相補することができる。一方、同様の解析で73アミノ酸残基を削った移行タンパク質は細胞質にとどまり、細胞間移行が不能なウイルスを相補できなくなることが明らかとなった。このようにして移行タンパク質の機能単位が明らかにされつつある。移行タンパク質は原形質連絡にこのような影響を与えるが、しかし結果として起きる原形質連絡の構造変化は電子顕微鏡下では認めることはできない。

TMVの移行タンパク質が、大腸菌で発現、精製され一本鎖の核酸と結合する能力を持つことが示された。そして直径約1.5~2.0nmの長い構造体を形成することも電子顕微鏡で観察された。この大きさは移行タンパク質を発現する形質転換体の原形質連絡の排除限界から予想される穴の大きさと同等のものであり、ウイルスの細胞間移行をつかさどる実体をみていると想像される。

原形質連絡と移行タンパク質との相互作用は宿主域を決定する可能性がある。変異した移行タンパク質を発現する形質転換体植物を作成すると、ウイルスの正常な移行タンパク質による細胞間移行を拮抗的にかえって邪魔し、結果としてウイルス抵抗性の植物が作成される可能性がある。実際に自然界にはTm-2と呼ばれる遺伝子をもつトマト、N遺伝子を持つタバコがこの細胞間移行レベルでの



阻害によって通常の TMV に対して抵抗性を示すことが明らかとなっている。

そのほかに植物側の未知のリン酸化酵素によって移行タンパク質がリン酸化を受けている事実が最近明らかになった。cAMP の存在下で細胞間移行に関する変異体の温度感受性が抑制されることから cAMP に依存したリン酸化を受けることが想像されている（訳者の確認実験では移行タンパク質のリン酸化は cAMP によって上昇しない）。

以上のような原形質連絡とウイルスの移行タンパク質の相互作用は原形質連絡の構造と機能、そして植物の生理状態との関連を明かにする糸口を我々に提供しているように思われる。その意味でこの領域の研究はウイルスの分野のみならず、通常の生理状態においても重要な役割を果たす原形質連絡を理解するという意味で広く植物の科学にとって興味深い問題を提示している。

（抄訳 渡辺雄一郎——帝京大理工学部）

WATANABE Yuuichiro

#### Plant virus movement proteins

Doem, C.M., M. Lapidot and R.N. Beachy  
*Cell* 69: 221-224 (1992)

#### 文献情報

デジタルイメージマイクロスコープを用いて DNAプローブ 7種の同時可視化

近年、非放射性プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションの手法が実用化されてきた。その多くはビオチン (Bio), ジゴキシゲニン (dig), ジニトロフェノール (DNP) 等のハプテンで標識したプローブを免疫蛍光法で検出するものである。この手法を FISH (fluorescein *in situ* hybridization) と呼んでおり、理論上はプローブに複数の標識を行えば、detector の数に比例して識別し得るターゲットも増えることになる。しかしながら、従来の顕微鏡システムでは、カラーフィルム

に数度の露光を行うことになり、複合的に標識されたプローブからのイメージを十分に表示し、解析することは困難である。

著者らは、CCD (charge coupled device, 電荷結合素子) カメラをベースにしたデジタルイメージマイクロスコープを用いてこの制約を解消し、コンピュータソフトウェアによって画像処理を行って 7 種のプローブからのシグナルを色彩化し同時に表示することを可能にした。ここでは、PCR 法を用いたプローブの効果的な標識法と *in situ* ハイブリダイゼーション実験による検出例について紹介する。

まず、ヒトクロモソーム特異的なセントロメアのプラスミドクローン、ならびにクロモソーム特異的プラスミドライブラリーを鋳型としてベクター PCR 法によって挿入 DNA 部分を増幅させた。この際、dNTPs 混合液中に、Bio, dig および fluorescein isothiocyanate (FITC) (または DNP) で修飾した dUTP を単独で、あるいは組み合わせて添加することにより最大 7 種類の標識を行った。これらのプローブを DNase I 処理によって鎖長 250bp 程度とした後、ヒトの中期クロモソーム、間期の核を供試して *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。プローブの検出にあたっては、Bio, dig 標識はそれぞれ Ultralite 680 (赤外光) 結合ストレプトアビジン、及び rhodamine 結合抗-dig IgG を用い、DNP 標識は抗-DNP マウスモノクローナル抗体と反応後、FITC 結合抗マウスヤギ抗体で検出した。また、FITC 標識プローブについては直接検出を行った。なお、クロモソームは、4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) により副染色を行った。次に、上述の方法で発生したプローブからのシグナルを CCD カメラを搭載した蛍光顕微鏡下でとらえ、8 bit gray scale でデジタル表示した。すなわち、FITC, rhodamine, Ultralite 由来のシグナルを 3 段階の gray scale で表示し、これらをスタンダードとして 3 種類が組み合わせられた中間的シグナルを目で識別して 7 段階の gray scale として分離した。次いで、各々の gray scale を色彩におき換え、著者らの開

発したソフトウェアを用いて多色像として同時に表示した。DAPI染色のシグナルも同様に処理し、合わせて表示した。

以上の方法で、*in situ*ハイブリダイゼーション後のシグナルを解析した結果、クロモソームのセントロメア特異的なプローブは、クロモソーム上の1か所に7色のシグナルとして検出された。また、クロモソーム特異的ライブラリーをプローブとしたクロモソーム染色の結果、ターゲットとするクロモソームがそれぞれ異なった色調として現われ、他のクロモソームはDAPI染色のシグナルを呈した。さらに、ギムザ染色によってt(2;14)の転座が示された。リンパ球由来の中期クロモソームを供試し、クロモソーム2, 14に特異的なプローブを用いて*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。その結果、転座の生じたクロモソーム相互の状況が明瞭に示された。

この他、クロモソーム上の特定の遺伝子に対するプローブを用いることによって、複数の遺伝子を同時にマッピングすることも可能であった。

本報のPCR法によるプローブの標識は、従来のニックトランスレーション法と比較して必要とされる鋳型DNA量が少なく、挿入DNA部分のみが増幅されることから、ベクターシーケンスによる交叉反応を減じる。

CCDカメラと色彩化のためのコンピュータソフトウェアの性能が、同時検出し得るプローブ数を増大させるには重要と考えられる。CCDカメラは広大な波長域の光に対して敏感で、目に見えない赤外光色素も容易に撮ることができる。近年では、650~900nmの波長

域の蛍光団も報告されており、プローブの検出に際し有用と思われる。赤外光色素は、繁用されている7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid (AMCA) や Cascade Blue 等の青色光に比べ、i) 長波長域では、サンプルの自家蛍光が最少限に抑えられる、ii) DAPI(青色光)による副染色が可能である、iii) フィルターからの rhodamine シグナルの漏れが少ない、などの点で有利である。

FISHは基礎研究にも診断にも有力な手法になりつつある。本報に示されたように、複数のプローブを同時可視化し得ることは、サンプル数が限定される診断の場合には特に重要である。

さらに、適切な対照を設定することにより、遺伝子量の評価や遺伝子地図の作成にあたって統計的解析によらず容易にデータを得ることが可能であろう。

また、プローブの標識には、fluoresceinのような免疫的検出のステップを経ずに直接検出し得る蛍光試薬を用いることが望ましい。この種の蛍光色素を結合した他のヌクレオチドも、間もなく実用化されるものと思われる。

(抄訳 平井智美——茨城生工研)

HI RAI Satomi

#### Simultaneous visualization of seven different DNA probes by *in situ* hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy

Ried, T., A. Baldini, T.C. Rand, and D.C. Ward

*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89: 1388-1392

(1992)

海外便り

## 英国 AFRC 植物科学研究所を訪ねて

農林水産省 農業生物資源研究所 分子育種部  
蒲生卓磨

### 1. はじめに

日英二国間協力による植物分子生物学に関する研究の打ち合わせのため、本年3月12日から10日間の日程で英国 AFRC (農業食糧研究会議) の中央本部と植物科学研究所 (IPSR) を訪問したので、AFRC の機構と研究所の概要を紹介したい。

### 2. AFRC の機構と研究内容

#### 1) 機構と運営

AFRC は王室憲章により設立された組織で、教育・科学省 (DES) の傘下であり、農業水産食糧省 (MAFF) の委託を受けて運営され、研究を行っている。予算は主として DES により維持されているが、1991年度では、DES が65%、MAFF 22%、その他の財源は13%である。研究会議は所属する研究所及び英国高等教育研究所 (HEIs) における研究に対して責任をもつと共に、スコットランド農業水産省 (SOAFD) 所属の研究機関における研究についても助言を行っている。研究内容は食糧、農業、環境に関する非医学分野の生物学及び物理学とその関連分野で、その機構は農業食糧研究サービス (AFRS) と呼ばれ、産業 (農業) に直接必要な研究や個人のセクターを補完する研究を行っている。

中央本部はロンドンより列車で西へ50分程行ったスインドン市にある。庁舎は駅の裏に隣接してある。同一場所には、他に三つの研究会議の中央事務所がある。

AFRC の事務局長は、タンパク質の結晶画像解析で著名な Dr. Tom Blundell 教授。委員会は大学教授 (8名)、MAFF (2名)、民間会社 (3名)、農業団体 (2名)、スコットランド農水省 (1名)、農業経営者 (2名) により構成されている。その下に評価委員会 (9名)、計画委員会 (27名)、研究・予算委員会がある。研究・予算委員会の中に植物・環境研究委員会があり、大学教授 (8名)、研究所長 (5名)、MAFF (2名)、民間会社 (2名) により構成され、研究計画が策定される。この委員会の委員長はノッチング大学の Cocking 教授。

#### 2) 所属の研究機関

AFRC には、動物 (3研究所)、エンジニアリング (1)、食糧 (1) 及び植物・環境 (2) の研究部門があり、その中にいくつかの研究所がある (1図)。

植物・環境部門には、畑作研究所 (IACR) と植物科学研究所 (IPSR) がある。IACR では、土壌管理、植物栄養、植物生理・代謝、植物保護、生物統計学に関する戦略的ならびに応用研究を中心に分子生物学、遺伝学などを応用して研究すると共に、農業環境に関する研究を行っている。IPSR は作物に関する遺伝学、生化学、細胞生物学、植物ウイルス学のより基礎的なテーマを主体に研究を行うように仕分けられており、IPSR は植物バイオテクノロジーの技術開発、植物育種のための新しい素材作物の作出、主として耐病性、環境耐性、新医薬資源の作出、工業的に重要な生理活性物質、繊維や化学的食糧資源などの開発に関係する新しい知識の創生に関する研究を行うのが目標である。

GAMOU Takuma

## Agricultural and Food Research Council

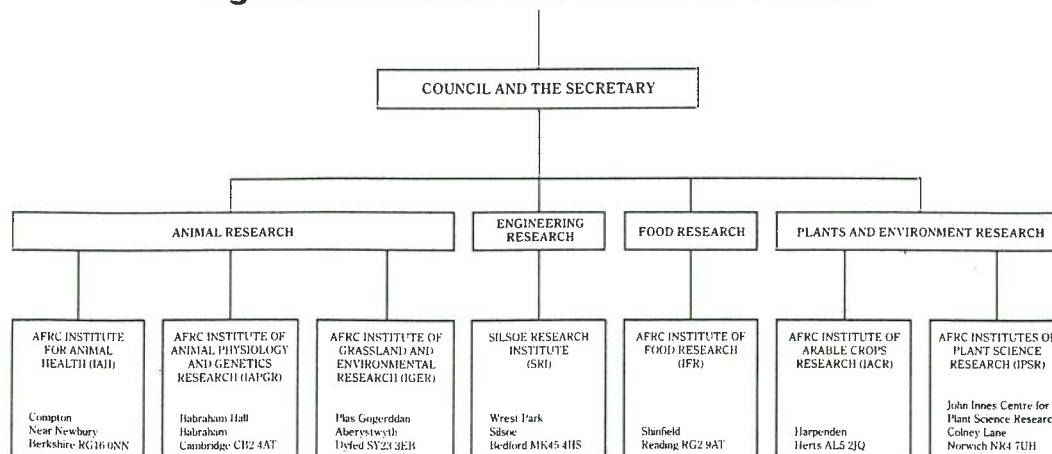


図1 英国農業食糧研究会議（AFRC）に所属する研究機関

### 3. 植物科学研究所（IPSR）

この研究所には、有名なジョン・インネス研究所を中心に、ケンブリッジ・ラボラトリー、窒素固定研究ラボラトリーと最近新設された民間のセインズベリー・ラボラトリーが含まれる。

窒素固定研究ラボラトリーを除き、ロンドンの東北部のノーリッチ市郊外にある。新設の2研究施設はジョン・インネス研究所に接続して建てられている。世界各国の研究者や近くにある East Anglia 大学の学生や多くのポスドクの研究生が研究に参加しており、極めて活気がある。植物生物学の各分野の著名な学者が多い。

#### 1) ジョン・インネス研究所

研究所長は R.B. Flavell 教授。1910年にメルトンの故 John Innes の遺産により設立され、John Innes 財団により管理されている。1967年に East Anglia 大学と連合関係をつくるため、ノーリッチの現在地へ移設した。予算的には AFRC により支援され、植物科学研究所の中心研究所として機能している。政府及び JI 財団からの予算の他、民間会社、国内外の科学財団からの研究費により運営されている。4 研究部よりなる。

応用遺伝部：部長は D.R. Davies 教授。主としてエンドウを材料に、研究内容は種子タンパク質、リポシキゲナーゼ、細胞培養、形

質転換、遺伝子のマッピング、澱粉及び脂質生成・代謝の遺伝、根粒菌の集団遺伝学及び進化など。

遺伝部：部長は D.A. Hopwood 教授。研究内容は放線菌の遺伝学的研究、根粒菌とマメ科植物との共生関係の分子遺伝学、キンギョソウについてのトランスポゾンによる突然変異の誘発、遺伝子の単離及び花器官の分化形成機構の研究など。

細胞生物部：部長は K. Roberts 教授。研究材料はコムギ、オオムギ、シロイヌナズナなど。研究内容は細胞培養、染色体の構造、染色体及び遺伝子の単離、遺伝子の物理地図作成、遺伝子の染色体への *in situ* ハイブリッド、形質転換など。

ウイルス研究部：部長 J.W. Davies 教授。CaMV, TMV, ジェミニウイルス、イネツングロウイルスやビート、キャッサバ、ササゲなどのウイルスについて、分子生物学的研究が行われており、植物ウイルスに関する世界の中心的研究機関。

#### 2) ケンブリッジ・ラボラトリー

1989年にケンブリッジにあった植物育種研究所の基礎研究部門をジョン・インネス研究センターへ移設したもの。所長は C.N. Law 教授。3 研究部がある。

穀物植物研究部：部長は Dr. M.D. Gale。研究対象はコムギ、オオムギ、ライムギなどの穀物植物。研究内容は耐病性、環境抵抗性、RFLP によるマッピング、遺伝子の単離、量

的形質支配遺伝子、貯蔵タンパク質、ホルモン産生などに関する遺伝学的研究。

分子遺伝部：部長は M.W. Bevan 博士。研究対象はシロイヌナズナ、ジャガイモなど。研究は澱粉合成系関連遺伝子、パタチン、PAL, win 2 遺伝子のプロモーター、シスエレメント、トランスファクター、トランスポゾン・タギングなど。

アブラナ科植物研究部：部長は D.J. Murphy 博士。研究対象はシロイヌナズナを中心にナタネなどアブラナ科植物。研究は細胞培養、形質転換、RFLP マッピング、耐病性、脂肪の生成機構及び関連遺伝子、自家不和合性、光合成など。

PBIC: ノーリッチへ移転した植物育種研究所の施設は、種苗会社のユニバーに売却され、コムギ、オオムギ、トマト、エンドウ、ナタネ、アブラヤシ、チャなどを対象にバイオテクノロジーの技術を導入して育種の研究を行っている。新しい名称は Plant Breeding International Cambridge (PBIC)。とくに、コムギのタンパク成分の研究成果をもとに、電気泳動成分による選抜と RFLP を用いた形質の固定技術が実用化され、製パン用コムギの原原種がここから供給されている。担当部長は Peter Payne 博士。

### 3) セインスベリー・ラボラトリー

スーパーマーケットなどの経営者セインスベリー氏の個人的資金により設立された研究施設。トマト、タバコなどを対象に研究内容

は病原ウイルス・細菌の分子生物学、耐病性関連遺伝子の cDNA クローニングなど。

### 4) 窒素固定研究ラボラトリー

ブライトン市のサセックス大学構内にある。研究材料はアゾトバクター、クレブジエラなど単生窒素固定菌。研究はニトロゲナーゼ、窒素固定機構及びその関連遺伝子など窒素固定の基礎的研究が中心。

## 4. おわりに

英国内をレンタカーで移動したが、道路がよく整備されており、効率的に行動できた。右ハンドルのため、日本とほとんど同じように運転できる。高速道路はいずれも無料であり、田舎の道路には信号がなく、渋滞はほとんどないので（ラウンドアバウトと呼ばれるロータリーを規則に従って通る方式）、列車よりも短時間で移動できる。

米国に比べて円の換算レートからみると物価は高いようである。しかし、訪問したノーリッチでは家賃、物価は比較的安く、暮らし安いように感じた。植物科学研究所の研究レベルは高く、しかも優れた研究者の密度も高いので、留学には適した研究機関と思う。しかし、ベンチフィーを要求されることがあるので、留学される方は、学位を持ち、しかも研究テーマに関係した論文を英文で発表しておくことが必要であろう。

#### 編集後記

バルセロナオリンピックと甲子園の高校野球に明け暮れた今年の夏もようやく終わりましたが、皆様には、いかがお過ごしでしょうか。少々御紹介が遅れましたが、今年3月から8月にかけて、本誌の編集関係者が大きく変わりました。生研機構の担当者は、岩井純夫企画審議役(新任)、小田茂企画第一課長(新任)、

谷口泰企画第一課員(新任)、当協会の担当者は、草場緋紗夫常務理事、大山勝夫情報部長(新任)、大畑貫一調査員となりました。引き続き御指導、御支援のほど、よろしく願います。

(大畑記)

### ブレイン テクノニュース (第33号)

平成4年9月15日発行

発行者 佐野宏哉

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

〒160 東京都新宿区新宿6丁目24-16 日本生命新宿6丁目ビル3F  
TEL. 03-3205-6565 FAX. 03-3205-6566

編集 (社)農林水産技術情報協会

〒103 東京都中央区日本橋兜町15-6 製粉会館6F  
TEL. 03-3667-8931 FAX. 03-3667-8933