

表紙説明

孵化10日後の黒マグロ稚魚(体長7mm)

(本文 1 ページ参照)

本号の紙面

国内情報..... 1
 マグロの成長ホルモン、ナシの自家結実
 品種、遺伝子操作により花色を交える、
 昆虫のメラニン合成
 出資プロジェクト情報..... 12
 遺伝子組換えによる低タンパク酒米品種
 の開発
 地域の先端研究..... 15
 サツマイモの遺伝子操作
 文献情報..... 18
 雄性不稔タバコの作出、昆虫のクチクル
 硬化酵素、インフルエンザウイルスのイ
 オンチャンネル活性、形質転換植物から
 の選択マーカーの除去は必要か
 海外便り..... 23
 シドニー大学畜産学部での1年
 特別情報..... 26
 最近のバイオテック機器情報

口 絵

国内情報

宮崎信光

マグロの成長ホルモンとその応用…………… 1

佐藤義彦

ナシの自家結実性品種の育成…………… 3

芦刈俊彦

遺伝子操作により花色を変える…………… 6

麻生陽一

昆虫のメラニン合成…………… 9

出資プロジェクト情報

角谷直人

遺伝子組換えによる低タンパク酒造原料米品種の開発…………… 12

地域の先端研究

西口正通・森 昌樹

サツマイモの遺伝子操作…………… 15

文献情報

花粉母細胞のカロース壁を分解する遺伝子の導入による雄性不稔タバコの作出…………… 18

昆虫のクチクル硬化に関与する酵素…………… 19

インフルエンザウイルスのM₂タンパク質はイオンチャンネル活性を持っている…………… 20

形質転換植物からの選択マーカー遺伝子の除去は社会にとって必要か…………… 21

海外便り

押部明德

シドニー大学畜産学部での1年…………… 23

特別情報

井上英男

最近のバイオテック機器情報…………… 26

ナシの自家結実性品種の育成 (本文 3 ページ)



自家受粉した二十世紀とおさ
二十世紀の雌しべにおける花
粉管伸長

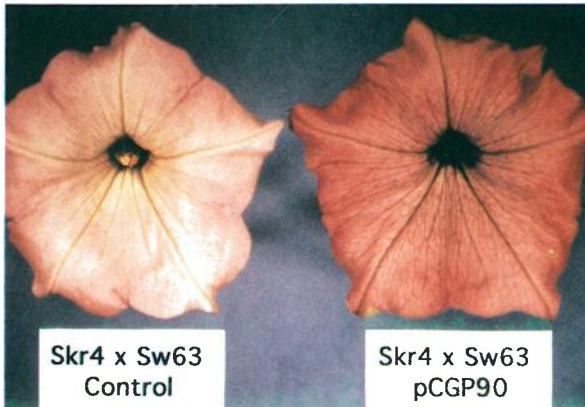
左: '二十世紀'

自家受粉された花粉は発芽し、
花粉管を伸長させるが、雌しべ
の基部で伸長を停止し、受精・
結実には至らない。

右: 'おさ二十世紀'

自家受粉された花粉は発芽し、
花粉管は雌しべの中を順調に伸
長した後、受精・結実に至る。

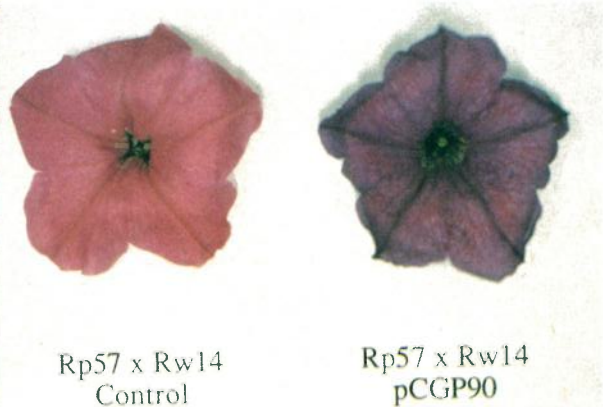
遺伝子操作により花色を変える (本文 6 ページ)



1. フラボノイド3', 5'-水酸化酵素の遺
伝子を導入することにより、ペチ
ュニアの花の色が薄いピンクから濃いピン
クに変化した

左: 元株(Skr4×Sw63; hf1, hf2, ht1)

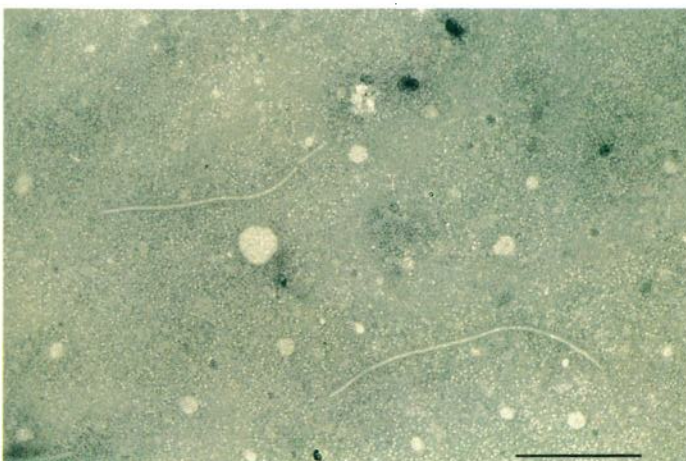
右: 組換えペチュニア



2. フラボノイド3', 5'-水酸化酵素の
遺伝子を導入することにより、ペチ
ュニアの花の色がピンクから紫色に
変化した

左: 元株(Rp57×Rw14; hf1, hf2, Ht1)

右: 組換えペチュニア



サツマイモの遺伝子操作

(本文 15 ページ)

サツマイモ斑紋モザイクウイルス (強毒
系統) の電顕写真 (宇杉氏原図)

右下のスケールは500nm

国内情報

マグロの成長ホルモンとその応用

大洋漁業株式会社 中央研究所

宮崎 信光

1. はじめに

当研究所では、1986年に魚類成長ホルモン研究を嚆矢とした海洋バイオ研究に着手し、その対象として世界的規模で通用する魚種である黒マグロを選定した。また、当社では水産物の安定供給を目的とした養殖事業を行っているが、養殖事業においては新魚種（養殖可能な）の開発ということが研究の大きな課題の一つとなっている。そこで我々は日本人の味覚に適した黒マグロの養殖を最終目標とした、「黒マグロの人工孵化・育成技術の研究」という課題で1987年より5年間生研機構の融資を受け研究を行ってきたが、その一部として成長ホルモン（GH）の研究を続けてきた。私自身が実際に研究を行ってきたわけではないが、全体の進行に関わった立場から、ここではその研究成果の一端を紹介するとともに、今後の方向について述べることにする。

2. マグロ成長ホルモンの単離

GHは脳下垂体前葉の好酸性細胞で生産される分子量約22,000のペプチドホルモンであり、その名のとおり生物の成長を促進させるホルモンである。本ホルモンを単離精製するにあたり、魚類のGH活性を迅速に測定する方法はまだ確立されていないため、その分子量が種類を問わず22,000前後であること、および非還元状態でSDS-PAGEにかけると見掛け上の分子量が18,000にシフトすることを

指標としてGHを純化した。最終的にGHであることの確認は、既知魚類GHとの比較によるアミノ酸組成分析結果と部分アミノ酸配列のホモロジー、更にニジマス稚魚への腹腔内注射による成長促進活性の測定等により行った。

3. マグロ成長ホルモンの微生物による生産

マグロ脳下垂体より常法に従い mRNA 画分を得た後に、岡山—Bergの方法により cDNA を作成した。この cDNA で大腸菌 DH 1 株の形質転換を行った結果約50,000個の形質転換体を持つ cDNA ライブラリーを得た。そこで、目的のマグロ成長ホルモン（以下 tGH）の cDNA を保持する大腸菌をスクリーニングするために、先に述べた GH タンパクの部分アミノ酸配列から推定して作成した 2 種類の 15mer のオリゴヌクレオチドプローブ（N 末側「アミノ酸 50～54 番目」、C 末側「アミノ酸 163～167 番目」）を用いてコロニーハイブリダイゼーションを行った。得られた陽性のコロニーより大腸菌を単離し、菌体から得た組換えプラスミドを用いてサザンハイブリダイゼーションを行い、挿入断片の大きさが tGH をコードするのに十分な長さと考えられる組換えプラスミドを得た。塩基配列の解析の結果、このタンパク質は分子量 23,093（アミノ酸で 204 個）の tGH 前駆体として翻訳され、翻訳後 N 末端から 17 個のアミノ酸が切断されて成熟型 tGH（分子量 21,275 アミノ酸 187 個）になることが判明した。

次に、tGH cDNA のN末端側 17 個のシグナル部分を除去し開始コドン (ATG) を付加した cDNA を、発現ベクターとして使用した pKK 223-3 に挿入し、種々の検討を行った。具体的には、まず Miki らの方法に従って発現ベクターの複製開始点を pUC 19 のそれと置換したところ、プラスミドのコピー数を 10~20 倍に増大させることができた。更に、SD 配列-開始コドン (ATG) の距離、宿主大腸菌の検討、cDNA のタンデム化について検討した。その結果、SD 配列-開始コドンの距離が 13bp で宿主を大腸菌 JM 109 にしたときに、タンデム化発現ベクターにより全菌体タンパク質の約 20% の r-tGH 生産が認められた。

生産された r-tGH は封入体を形成しており生物活性を確認するには再生処理が必要であった。そこで、菌体を氷冷下ダイノミルで破碎後、リゾチームおよびデオキシコール酸で処理し r-tGH 封入体画分を得て、この封入体画分を塩酸グアニジン溶液に溶解後、室温で 2 日間反応させた。更に、この反応液に疎水クロマト用樹脂 F P-O T 13 を加え r-tGH を吸着させた後に樹脂を水洗し塩酸グアニジンを完全に除去した。最後に 30% イソプロパノール溶液で溶出した結果、菌体 90 g から r-tGH が 555mg 得られた。高純

度の r-tGH を得るには更に HPLC が必要とされ、最終的な収量は 75mg であった。

4. 生物活性

再生した r-tGH の生物活性はニジマス稚魚へ腹腔内注射し体長および体重の増加率を脳下垂体から抽出した tGH 投与群と比較して評価した。r-tGH および tGH を体重約 20 g、体長約 15cm のニジマス稚魚の腹腔内に 1 週間おきに 4 回、1 回に 1 尾あたり 1 μ g 投与した。コントロールには生理食塩水を投与し、投餌は飽食まで行った。

その結果、r-tGH 群は tGH 群と同様の成長率を示し、コントロール群との比較では体重では 7 日目、体長では 21 日目で有意の差を示した (図 1)。また、飼料転換効率は 28 日間の飼育期間で r-tGH および tGH の両群とコントロール群で有意の差を示したが、肥満度では差がなかった。以上より r-tGH は tGH と同様の成長促進効果を有するとともに、tGH が飼料効率を高めることも明らかになった。また、肥満度に差が認められないことより tGH 投与群においても体長、体重のバランスがとれたかたちで成長することも明らかになった。

5. 成長ホルモンの応用

黒マグロの生活史において tGH が養殖上の観点から利用できる場面は、種苗生産の場と育成の場と考えられる (図 2)。我々は黒マグロの養殖にとって、現在最も望まれているのは種苗の安定供給と判断し、種苗生産の場での tGH の利用を第 1 目標とした。そこで問題となるのは魚に対する tGH の投与方法である。方法としては餌に混ぜての経口投与、腹腔内注射、薬浴等が考えられるが、いずれにしる最も効果的な投与方法を決定するには、最終的には実際の黒マグロの仔稚魚での検討を行う必要がある。そこで「黒マグロの人工孵化・育成技術の研究」の中で行ってきた黒マグロ人工種苗生産研究の経過を若干述べる

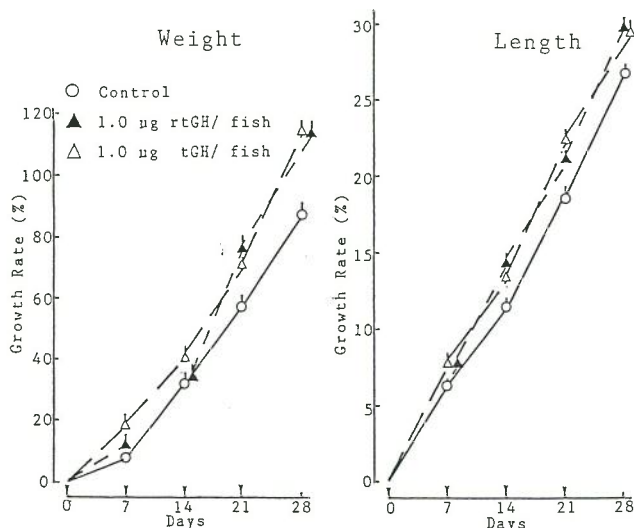


図 1 ニジマス幼魚における r-tGH と tGH の成長促進効果

こととする。

当社では、(有)奄美養魚と共同で1987年から黒マグロの天然種苗(20~30cm, 200~300g)を使用しての育成研究を行ってきたが、1992年6月26日夜、その中の20尾の5才魚(推定尾叉長180cm, 推定体重100kg)と、40尾の4才魚の一部が産卵を始めた。産卵は約9日間続き、合計で約300万粒の受精卵(直径は約1mm)を得ることができた。採捕後にすぐ陸上の水槽に移し孵化・飼育を行った。当初の孵化率は50%前後であったが、ベストの状態では約80%に達した。孵化仔魚の大きさは3mm強であったが、約一か月後には10mm前後に成長した十数万尾の黒マグロ稚魚を得ることができた(表紙)。餌は当初はワムシ、続いてアルテミア等の動物プランクトン、成長するに従い生餌、配合飼料等を与え、最終的には百数十日後に約20cmの幼魚(横縞があるのでヨコワと呼ばれる。)まで成長させることに成功した。

6. おわりに

現在我々はtGHの実用化を目指して研究を進めているが、前に述べたように実用化上の一の問題点はその投与方法にある。今回の黒マグロの産卵孵化時には、幼魚の段階まで成長させること、およびそのための諸

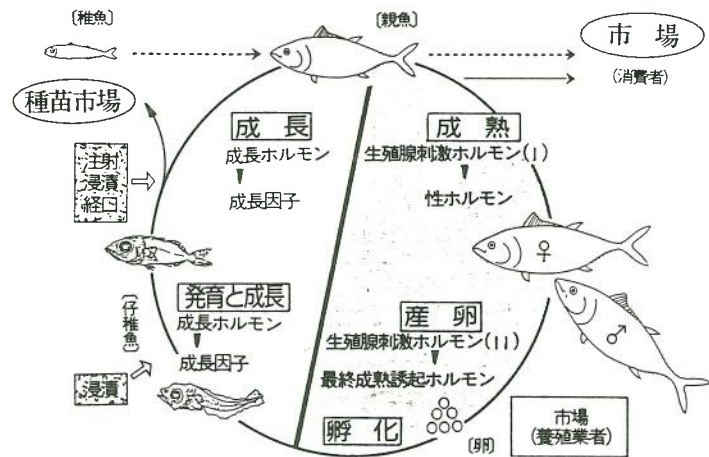


図2 黒マグロの成熟と成長

条件の検討が最優先であり、tGHの投与方法試験を行うまでには至らなかった。次シーズンの産卵孵化時には、孵化仔魚を使用してのtGHの基礎的な実験を積重ね、黒マグロ種苗の安定した生産に是非ともつなげていきたいと考えている。

また、r-tGHを産業的に利用するために1992年2月農林水産省から「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」の適合確認を受けており、既に研究用試薬としての販売を始めている。r-tGHを広く全国の研究者に使用していただき、各種のデータの蓄積を行いその応用の道を広げていき、将来は水産動物薬として使用し、我国の増養殖に貢献していきたいと考えている。

国内情報

ナシの自家結実性品種の育成

農林水産省 果樹試験場 育種第2研究室
佐藤 義彦

1. 近親交配防止システム

雄しべも雌しべも正常であるのに、同一品

種の花粉を受粉した時には花粉管の伸長が抑制されて受精・結実に至らない。この性質を自家不結実性といい、近親交配を抑制し、集団内の遺伝的多様性を高める機構であり、被子植物の半数以上の種がこの性質を持っている。

SATO Yoshihiko

ニホンナシも自家不結実性であり、自家受粉すると花粉は花粉管の伸長を開始するが、雌しべの基部で伸長を停止し、受精には至らない。また、特定の品種間においても同様の現象が見られる（交配不結実性）。

自家不結実性には一对の複対立遺伝子が関係している。現在までに $S_1 \sim S_7$ の遺伝子と11対の遺伝子型（例： $S_1 S_2$ ）が知られていて、同一の遺伝子型を持つ品種どうしでの交配では受精しない。つまり、花粉と雌しべの持つ遺伝子が等しい場合に花粉管の伸長が阻止される。

2. 春の風物詩「受粉作業」

本来、ニホンナシは自家不結実性であるので、連年安定生産や高品質果実生産のために受粉樹を混植して昆虫による受粉を期待したり、手作業により受粉を行わなければならない。昆虫による受粉は開花期の低温などの気象要因により影響されるため、一般的には人工受粉が行なわれている。

受粉の適期は短く、天候不順の時期に当たるため短期間に多くの労力を要するが、昨今、栽培者の高齢化、後継者不足、さらには労力の雇用が思うに任せない状況では受粉作業の労力は経営規模拡大の制限要素の一つになっている。

果樹試験場ではこのような問題を解決するために自分の花粉でも受精できる自家結実性品種の育成を試みている。

3. 元祖「自家結実性品種」

近年、鳥取県の長昭信氏のナシ園で‘二十世紀’の突然変異体とみられる自家結実性の‘おさ二十世紀’が発見され、昭和54年に種苗登録された。‘二十世紀’では自家受粉した場合、結実率は10%以下であるが、‘おさ二十世紀’では自家受粉で90%以上の結実率を示し、他家受粉した場合と変わらない。開花期が天候不順の場合や他品種の花粉を遮断した場合にも開花期に枝を振動させる程度でよ

く結実する。

4. なぜ自家受精できるのか？

‘おさ二十世紀’に‘二十世紀’の花粉を受粉した場合にはよく受精・結実するが、‘二十世紀’に‘おさ二十世紀’の花粉を受粉した場合にはほとんど受精しない。このような現象から‘おさ二十世紀’は、花粉の機能は変化していないが雌しべの機能だけが変化したもの(stylar-part mutant)で、同じS遺伝子型を持つ花粉であっても花粉管の伸長が阻止されずに受精可能になったものと推定された。その後、雌しべのS遺伝子型を分析した結果、‘おさ二十世紀’は‘二十世紀’($S_2 S_4$)の S_4 遺伝子が突然変異を起こして $S_2 S_4^{sm}$ 遺伝子型(smは雌しべにのみ変異が生じたことを示す)となったものであることが判明した(図1)。

5. 自家結実性は遺伝する

効率的に自家結実性品種を育成するためには自家結実性の性質が次の世代(後代)にどのように遺伝するか(遺伝様式)を明らかにすることが極めて重要である。

ほとんどの場合、‘おさ二十世紀’($S_2 S_4^{sm}$)と従来の自家不結実性品種を交配することにより、後代(子供)の約半分が自家結実性となる。ただし、‘幸水’($S_4 S_5$)など S_4 遺伝子を持つ品種に‘おさ二十世紀’($S_2 S_4^{sm}$)を交配した場合は自家結実性個体は現れない。したがって、交配親のS遺伝子型に注意して交配計画を立てなければならない。

6. 自家結実性育種にエース登場

‘おさ二十世紀’×‘おさ二十世紀’後代の中から S_4^{sm} ホモ接合体($S_4^{sm} S_4^{sm}$ 遺伝子型)で黒斑病抵抗性の系統を選抜した。この系統を交配親として用いることにより、ほとんどの場合において後代の全てが自家結実性

となり、‘おさ二十世紀’を交配親とした場合より効率的に自家結実性品種の育成ができる。さらに、黒斑病罹病性の‘おさ二十世紀’と黒斑病抵抗性で自家不結実性品種の品種（例：豊水など）の後代では、自家結実性で黒斑病抵抗性の個体は全体の25%を占めるに過ぎないが、選抜系統を交配親として用いれば後代の全てが自家結実性・黒斑病抵抗性品種となる。しかし、 S_4 遺伝子を持つ品種に S_4^{sm} ホモ接合体系統を交配しても交配不結実性を示した後代は得られないので注意を要する（図2）。

7. S_4 遺伝子を持つ品種を捜せ！

‘おさ二十世紀’、 S_4^{sm} ホモ接合体系統のいずれを交配親に用いる場合でも片親に S_4 遺伝子を持つ品種を用いると自家結実性個体を得る確率が低い。そのため、予め交配親が S_4 遺伝子を持つか否かを知っておく必要がある。従来、このような遺伝子型の分析には最低5年以上の年月を必要とした。しかし、 S 遺伝子型の未知な品種に S_4^{sm} ホモ接合体系統の花粉を交配し、結実率を調査することにより僅か2～3か月で S_4 遺伝子を持つか否かを判定することができる。

8. 受粉作業が不要になる日を目指して

たとえ自家結実性で黒斑病抵抗性であったとしても品質が劣っている品種として成立たない。これまで、‘おさ二十世紀’と従来

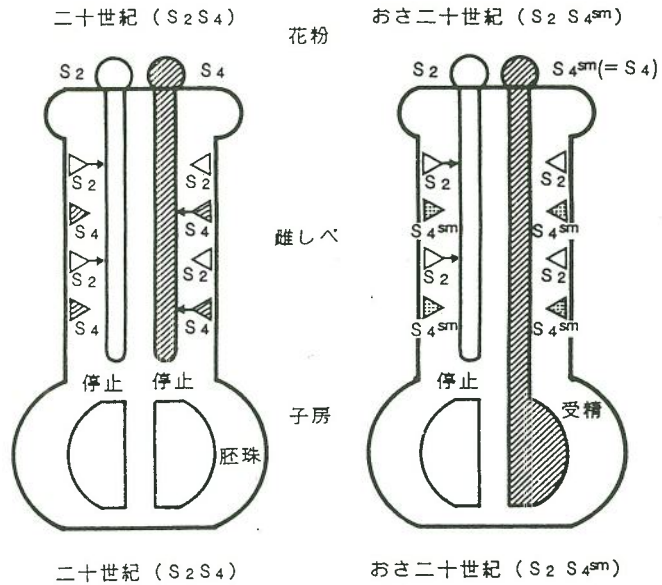


図1 ‘二十世紀’の自家不結実性および‘おさ二十世紀’の自家結実性の仕組み(模式図)

の自家不結実性品種との交雑実生を調査してきたが、自家結実性・黒斑病抵抗性で幸水・豊水の果実品質に肩を並べるような系統を選抜するには至っていない。しかし、中でも比較的品質の優れた系統を交配母本として選抜し、世代を進めている。近い将来、黒斑病に強く、幸水・豊水程度の品質を持ち、受粉作業のいらぬ品種が育成されるものと思われる。

自家結実性品種では受粉作業の必要がなくなるが、結果量が多いため摘果に要する時間が増加する懸念があり、自家結実性品種を普及させるためには摘蕾などを重視した栽培体系の確立や安定した効果を持つ摘果剤の開発が必要である。

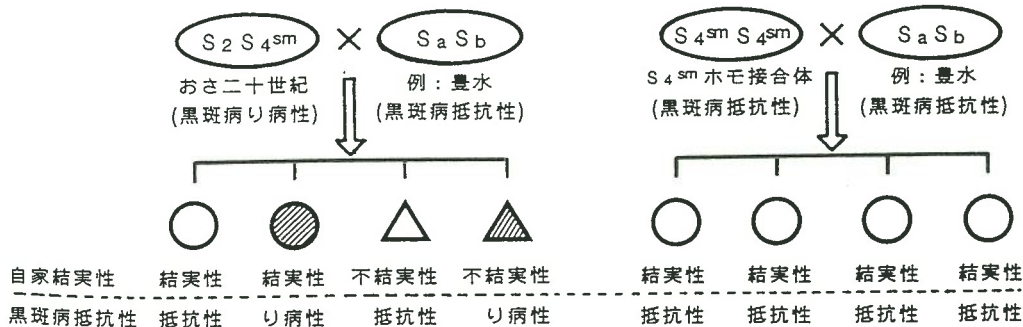


図2 ‘おさ二十世紀’、 S_4^{sm} ホモ接合体系統を交配親とした場合の自家結実性ならびに黒斑病抵抗性の遺伝様式
a, b: 4以外の数字を示す。

国内情報

遺伝子操作により花色を変える

サントリー株式会社 基礎研究所 分子育種研究室

芦刈 俊彦

1. はじめに

市場には多種多様な色の花が溢れているが、園芸の世界において花の色を変えることは育種の大きな目標である。これらの花々は伝統的な交配による育種技術で産み出されたものであり、多くの育種家達の努力の賜物であろう。ところが、ある種の花では交配可能な植物種が持つ遺伝資源に限度があるため、交配による育種では作り出せない花の色が存在する。この代表例が青いバラである。つまり、バラのように青い色素を作る能力のない植物種は種間でいくら交配しても青い色を作り出すことはできないという育種の限界が存在する。

一方、最近の遺伝子工学技術の進歩により、1980年代から植物の形質転換が可能になった¹⁾。この技術を用いれば生物間の隔壁を取り除くことが可能であり、全く別の生物種の遺伝子をも植物に導入することができる。我々の研究室では遺伝子操作技術を用いた花の育種を行っているが、本稿では花色の調節について青花の育種を中心に紹介し、現在までの研究の概要を述べたい。

2. 色素合成経路

花の色は花弁に蓄積する色素に依存する。花の色素にはいくつかの種類が知られているが、赤から青にかけてはフラボノイド系色素のアントシアニジンが重要な役割を果たして

いる。図1はアントシアニジンの合成経路を示しているが、アントシアニジンはアミノ酸のフェニルアラニンからカルコンを経て合成される。アントシアニジンの色調は種々の要因により変化するが、基本的にはB(フェノール)環の水酸基の数により色が決まる。例えば、B環に水酸基を1つしか持たないペラルゴニジンはオレンジ色を示し、2個持つシアニジンは赤色を示す。さらに、水酸基を3個持つデルフィニジンは青色を示す。ところで、この水酸基の数はフラボノイド 3'-水酸化酵素(以下、3'-水酸化酵素)とフラボノイド 3', 5'-水酸化酵素(以下、3', 5'-水酸化酵素)と呼ばれる2種類の酵素の働きにより制御されており、これらの酵素が花の色の決定に大きな役割を担っている。3'-水酸化酵素は3'位に水酸基を一つ付加する酵素でこの酵素のみが存在するとシアニジンが蓄積し、花は赤色を呈する。3', 5'-水酸化酵素は3'位と5'位に水酸基を導入することができ、この酵素が存在するとデルフィニジンが蓄積することから、花は青色を呈することになる。また、両水酸化酵素が存在しない場合はペラルゴニジンが蓄積しオレンジ色を呈することになる。

ところで世の中には青の花を持たない園芸植物が数多く存在する。特に切り花市場における3大品種であるバラやキク、カーネーションは、いずれも青の花を持たない。生化学的研究から、これらの花はいずれも花弁に3', 5'-水酸化酵素を持たないためにデルフィニジンが合成されず、その結果として青い花ができないことが明らかとなった。そこで他の青い花から3', 5'-水酸化酵素の遺伝子を分離し、

ASHIKARI Toshihiko

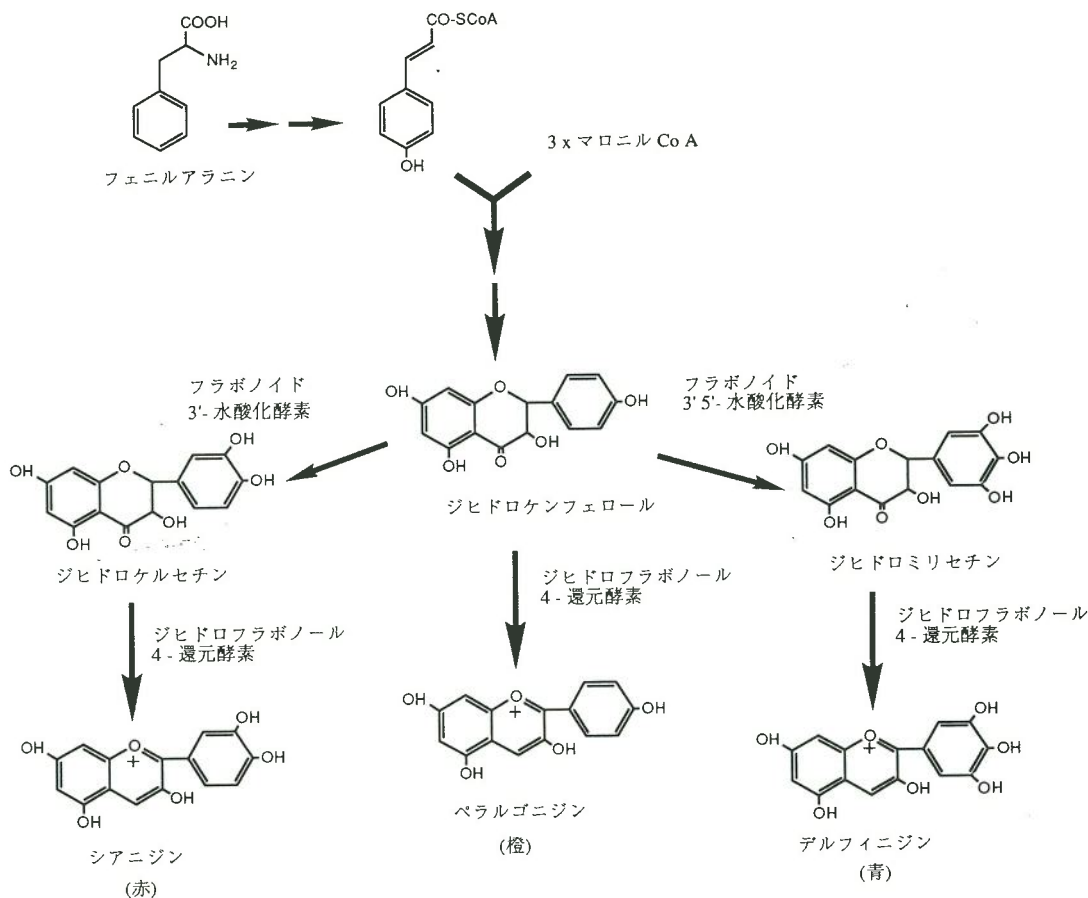


図1 アントシアニジンの合成経路

それらの花に導入すれば青い花ができるのではないかと考えたところから本研究は始まっている。

3. 3', 5'-水酸化酵素遺伝子のクローン化

3', 5'-水酸化酵素遺伝子の分離源として遺伝学的背景がよく知られているペチュニアを用いた²⁾。ペチュニアでは染色体地図が作成されており、3', 5'-水酸化酵素活性を制御する遺伝子座として Hf 1 と Hf 2 の 2 つが知られている³⁾。ところがこの酵素自身についてはほとんど知られておらず、研究は酵素の性質を調べるところから始めた。花卉抽出液を粗精製して調べたところ、この酵素は i) 膜画分に存在し、ii) NADPH を要求すること、さらに iii) 一酸化炭素やチトクローム P-450 特異的な阻害剤により活性が阻害されることから、本酵素がチトクローム P-450 の一種であることが示唆された。ところでチトクローム P-450 はプロトヘムを含むモノオ

キシゲナーゼで主に脂溶性の化合物の水酸化反応を触媒する酵素であり、ミクロソーム画分に存在して疎水性が高いことから、精製が難しいとされている。特に植物由来のチトクローム P-450 タンパク質の精製例はなく、我々の場合も可溶化の段階での失活が著しいなど、困難を極めた。ところで、チトクローム P-450 遺伝子の構造は哺乳類を中心に既に 100 種以上が知られている。これらの構造比較によるとヘムが結合する領域でアミノ酸の配列がよく保存されていることが明らかとなった⁴⁾。そこで、タンパク質とは別に遺伝子からの攻略として、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法により、花卉特異的なチトクローム P-450 遺伝子を単離する方法を考えた。初めに酵素の発現時期を調べるため、花の発生段階を 5 つのステージに分けて、それぞれについて 3', 5'-水酸化酵素の活性を測定したところ、第 3 ステージ (つぼみが開花し始める頃) での活性が最も強いことが明らかになったので、このステージの花弁を集めて

mRNA を抽出し、cDNA ライブラリーを複製した。この cDNA ライブラリーを鋳型としてチトクローム P-450 で保存されているヘム結合領域に対応した合成オリゴ DNA とベクタープラスミドの一部の配列を持つ合成 DNA を用いて PCR 法により遺伝子の増幅を行ったところ、得られた PCR 産物の 1 つからチトクローム P-450 と考えられる塩基配列が認められた。この cDNA クローンをを用いて花卉特異的 cDNA ライブラリーをスクリーニングすると、新たなチトクローム P-450 cDNA が得られ、さらに新しいクローンが得られるたびにそのクローンをを用いて cDNA ライブラリーをスクリーニングした。また、得られた塩基配列の情報を基に新たなオリゴ DNA を合成して PCR を行い、さらに同じ手順を繰り返すことにより、芋蔓式にチトクローム P-450 遺伝子群を吊り上げた。その結果、約 20 種のチトクローム P-450 群が得られたので、それらの中から求める 3', 5'-水酸化酵素の遺伝子をスクリーニングすることになった。選択方法は、得られた cDNA を用いて Northern 解析により発現パターンを調べ、さらに Restriction Fragment Length Pattern (RFLP) により Hf 1 や Hf 2 との連鎖を調べて、最後に酵母の発現系を用いて形質転換酵母での 3', 5'-水酸化酵素の活性を調べるという方法で行った。これら上述の作業は非常に手間がかかったが、運良く Hf 1 と Hf 2 に対応するクローンをそれぞれ単離することができた。

4. 形質転換植物

遺伝子が得られたので、この遺伝子を植物に戻し、花卉の色がどのように変化するかを検討する必要がある。遺伝子を導入する植物として、形質転換の系が確立しているペチュニアを用いた。品種としては 3'-水酸化酵素と 3', 5'-水酸化酵素の両方の遺伝子に変異を持つためにアントシアニンの生合成がほとんど起こらない株 (Skr 4xSw63; hf1, hf2, ht1) とさらに 3'-水酸化酵素のみを持つ株 (Rp57

xRw 14; hf 1, hf 2, Ht 1) の 2 系統を用いた。Hf1 cDNA を植物のバイナリーベクター上のカリフラワーモザイクウイルス由来の 35 S プロモーターの下流につなぎ、アグロバクテリウム感染法を用いてペチュニアに導入したところ、組換えペチュニアの花弁で 3', 5'-水酸化酵素活性の上昇が認められた。組換えペチュニアの花は薄いピンクから濃いピンクにかわり、花の脈は紫色に変化した (口絵 1)。花弁に存在するアントシアニジンを分析したところ、組換えペチュニアではデルフィニジンの 3' 位と 5' 位の水酸基がメチル化されたマルビジンの量が元株の 5 倍程度に増加しており、挿入した 3', 5'-水酸化酵素遺伝子の発現が組換えペチュニアで確認された。別の品種の Rp 57 xRw 14 では、花の色はピンクから紫色に変わり (口絵 2)、花弁でのマルビジンの増加が認められた。

ペチュニアはもともと 3', 5'-水酸化酵素を持つ植物種であるが、バラやカーネーションといった天然には青の花を持たない植物種にもこの遺伝子の導入を行っている。果たしてどのような色の花が咲くことであろう。

5. おわりに

以上のように同じ遺伝子を導入したにもかかわらず組換えペチュニアの花弁の色は品種により異なっており、それぞれの植物の持つ遺伝的背景により青の発色は異なると考えられる。青の発色機構は他の色に比べて複雑であることが知られている。デルフィニジン系の骨格の導入は大きな要因であるがそれ以外にも糖やアシル基による修飾、金属イオン、コピグメンテーションさらに色素の蓄積場所である液胞の pH 等の要因があり⁵⁾、今後の課題として取り組んでいかなければならない。

今回は青を中心に紹介したが、色素の合成経路を人為的に変化させることにより様々な色を作り出すことが可能である。例えば、最も簡単な例として白い花があるが、これは色素合成系の最初の段階であるカルコン合成酵素やアントシアニジン合成の最後に関係する

ジヒドロフラバノール還元酵素の発現を抑さえることにより作り出すことが可能である。また、黄色やオレンジ、赤といった花色を作り出す方法も容易に推測できるだろう。残念ながら、現在のところおおまかに色を変えることができるだけで、園芸家が求めるように微妙な色調を自由に作り出すことはできない。今後の研究の進展が望まれる。

最後に、この研究はサントリー株式会社とオーストラリアのカルジンパシフィック社との共同で行われていることを付け加える。

文 献

- 1) Zambryski, P.(1988) *Ann. Rev. Genet.* 21: 1-30
- 2) Cornu, A.(1984) *Genetics in Petunia*, Sink, K.C.(ed), Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp.35
- 3) Stotz, G.et al.(1985) *Theor. Appl. Genet.* 70: 300-305
- 4) Nebert, D.W.et al.(1989) *DNA* 8: 1-14
- 5) Forkmann, G.(1991) *Plant Breeding* 106: 1-26

国内情報

昆虫のメラニン合成

九州大学 農学研究科 蛋白質化学工学教室
麻生 陽一

1. はじめに

メラニン (melanin) はチロシン、ドーパ、あるいは o -ジヒドロキシ化合物である他のカテコールアミン類がチロシナーゼ (tyrosinase) あるいはフェノールオキシダーゼ (phenoloxidase) の触媒作用によって合成される黒色の生体高分子である。メラニンはきわめて安定であり激しい化学処理によってしか分解されない。たとえば、試験管内でドーパを酸化し、そのまま数時間放置しておくと、ガラス壁に黒色のメラニンが付着し酸やアルカリで処理しても、有機溶媒を使用しても除去できないようになる。このように温和な条件下ではメラニンをその構成単位に分解できないために、メラニンの正確な化学構造は不明である。分解産物の分析からいくつかの種類

の構造単位とその組成比が、また、X線回折、ESR、IR等の分光学的な解析から全体構造が推測された結果、メラニンは規則構造を持たず、種々の酸化/還元中間体が複雑に重合した高分子であると考えられている。脊椎動物ではメラニンはメラノサイト (melanocyte) 中で生合成される色素である¹⁾。一方、無脊椎動物、特に昆虫ではメラニンとその合成を触媒するチロシナーゼやフェノールオキシダーゼ(以下これらを酸化酵素と総称する)が、体内に侵入した異物の包囲化 (encapsulation), 傷の修復 (wound healing), クチクル硬化 (cuticular sclerotization) など様々な生理作用に利用されており、メラニン合成は色素の合成だけでなく生体防御においても重要な役割を果たしていると考えられる^{2,3)}。

2. 酸化酵素

メラニン合成はチロシンからドーパへの酸化反応、あるいはドーパの酸化反応によって開始される。どちらの反応も酸化酵素によって触媒される。ドーパは水溶液中にあって酸化されやすい物質であるために後者の反応は

酸化剤やアルカリ条件において非酵素的にも容易に進行し得るが、前者の反応は酵素作用を必要とする。昆虫の幼虫のクチクル(表皮)には活性な酸化酵素が存在する。クチクルに存在する酸化酵素には、摩砕することによって容易に抽出されるものと、トリプシン等のタンパク分解酵素によってしか可溶化されないものの2種類がある。これら酵素と次に述べる体液中のプレ酵素の3者の関係は明らかにされていない。

体液中には通常の状態では活性な酵素が見られず、不活性なプレカーサであるプレ(あるいはプロ)酸化酵素が存在する⁴⁾。このプレ酵素はタンパク質分解酵素による限定分解を受けて活性な酵素に変換される。酸化酵素によって反応性が高い化合物が中間体として生じるが、これはクチクル硬化のようにタンパク質間の架橋物質となる可能性がある。また、酸化酵素は他のタンパク質のチロシン残基を酸化されやすいジフェノール誘導体に変化させる場合もある。すなわち、体液中におけるプレ酵素の不用意な活性化は生物によって致命的なものになるので、活性化システムは厳密に制御される必要がある。哺乳動物の血液凝固系のようなカスケード系の存在が発見されたことにより、体液中に侵入した異物にตอบสนองして迅速かつ局所的にプレ酵素が活性化される仕組みが次第に明らかにされつつある⁵⁾。

ドーパの酸化によって475nmに吸収極大を有する赤色のドーパクロム(ドーパキノイミン)の生成が観測されるが、酸化酵素の直接の生成物はドーパキノンである。ドーパからキノイミンに至る反応機構の速度論的解析や、酸化の際に他の化合物が共存している場合の反応経路や生成物などについても研究が続けられている。

3. ポスト酸化酵素反応

酸化酵素の作用によってドーパが酸化されると、その後続く反応は自発的に進行してメラニンが生合成されることが通説であった。しかしながら、1980年代になってマウスのメ

ラノーマにドーパクロム変換因子(dopachrome conversion factor)をはじめとしていくつかの因子が見いだされ、哺乳動物においてもメラニン合成は酸化酵素だけが触媒するわけではないことが示された⁶⁾。昆虫においても、タバコスズメガ(*Manduca sexta*)クチクルに、ドーパキノイミンからジヒドロキシインドール(5,6-dihydroxy indole)への反応を促進するタンパク質が発見され、ドーパキノイミン変換因子(DOPA quinone imine conversion factor, QICF)と命名された⁷⁾。QICFは至適pH 6~7で、L-ドーパおよびそのメチルエステルのクロームに作用し、酸化酵素の存在下ではメラニン合成を促進する。しかしカルボキシル基を有しないドーパミンなどの酸化物に対しては反応性が低い⁸⁾。カイコ(*Bombyx mori*)の体液やクチクラにもQICFが存在し、その活性は体液では5齢終期に、クチクルでは中期に上昇することがわかった⁹⁾。ニクバエ(*Sarcophaga bullata*)の体液中からはN-アセチルドーパミンの酸化生成物に作用し、最終的にN-アセチルノルエピネフリンを生じさせるイソメラゼが発見され、その生理的役割は毒性の高い酸化中間物を他の化合物に変化させるものとされた¹⁰⁾。また、酸化酵素はジヒドロキシインドールからインドールキノンへの酸化も触媒する⁷⁾(図1)。

4. おわりに

生物体の内部が傷害などによって空気中にさらされると、その部分が黒化する現象がしばしば観察される。そこで、メラニン合成を触媒する酸化酵素の構造と機能については古くから興味を持たれていた。最近、プレ酵素のカスケード的な活性化機構、クチクラ硬化の生化学的機構、チロシンやドーパからドーパキノイミンへ至る過程の有機反応論的な機構、ドーパキノイミンからメラノクロームへ至る過程に関わる因子などが次第に明らかになってきた。これらの研究の難しさはメラニンの構造と同様にその合成経路や反応中

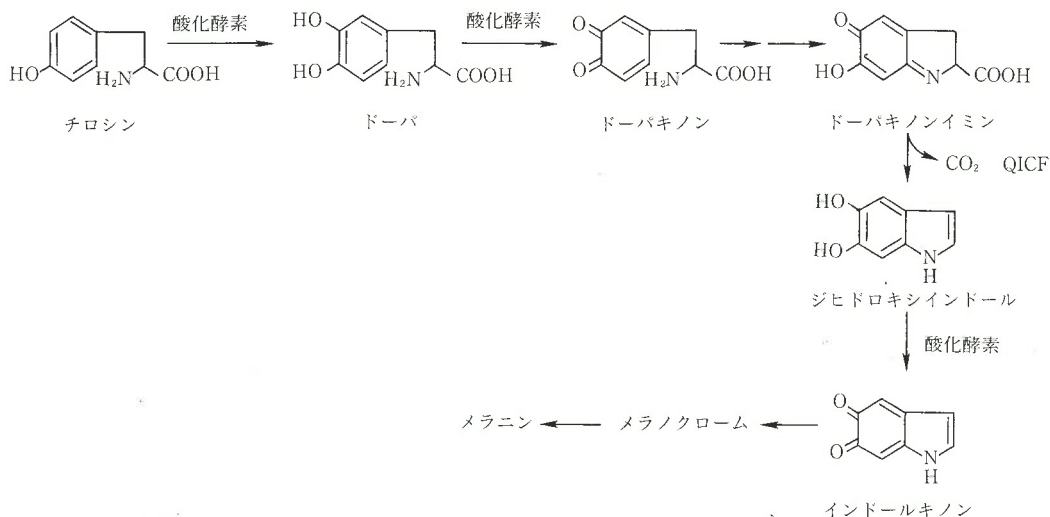


図1 昆虫のメラニン合成 (共重合過程を無視した推定図)

間体の構造が間接的にしか理解できない点にある。メラニン合成に関与する酵素群の構造とその性質に関する研究がさらに進むことが望まれるとともに、過去に報告された結果のうち、解釈が不明確なままに残されている事象を新たな観点から洗い直すことも必要と思われる。

文 献

- 1) 及川淳・井出宏之 編(1982)「色素細胞」, 講談社サイエンティフィック, 講談社
- 2) Kerkut, G.A. and L.I. Gilbert (ed.)(1985) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Pergamon Press, Oxford
- 3) 麻生陽一 (1991) *化学と生物* 29: 760-761
- 4) Aso, Y. et al. (1984) *Insect Biochem.* 14: 463-472
- 5) 名取俊二ら 編 (1991) 「無脊椎動物の生体防御」, 学会出版センター
- 6) Murray, M. et al.(1983) *Dev. Biol.* 100: 120-126
- 7) Aso, Y. et al.(1985) *Insect Biochem.* 15: 9-17
- 8) Aso, Y. et al.(1989) *Insect Biochem.* 19: 401-407
- 9) Aso, Y. et al.(1990) *Insect Biochem.* 20: 685-689
- 10) Saul, S.J. and M. Sugumaran (1989) *FEBS Lett.* 249: 155-158

出資プロジェクト情報

遺伝子組換えによる 低タンパク酒造原料米品種の開発

株式会社 加工米育種研究所

角谷 直人

1. はじめに

加工米育種研究所は、昭和63年3月に加工米として需要の大きい、酒造好適米およびもち米の新品種の育成を行うための研究所として設立された。

加工米育種研究所は、分散型の研究体制をとっている。第1チームは仙台市にあるICRビル内にあり、細胞融合による正常稔性型サイブリッド、ソマクローナル変異等、主として細胞レベルでの研究を行っている。第2チームは静岡県磐田郡豊田町の日本たばこ産業(株)遺伝育種研究所内にあり、遺伝子組換えによる低タンパク酒造原料米品種の開発等、主として遺伝子レベルでの研究を行っている。第3チームは栃木県塩谷郡喜連川町にある麒麟麦酒(株)植物開発研究所内にあり、従来育種法による酒造原料米の育成の研究を行なっている。

分散型の研究体制であったが、発足後、4年半を経過し、年に2回の研究打ち合わせ会、酒米研究会への参加等により、各研究チーム間の交流も進み、仲間意識も強まってきている。いずれの研究者も酒造原料に関する知識が豊富になり、問題意識をもって研究に取り組んでいる。

各チームともそれなりに研究成果が挙がってきているが、今回は第2チームの丸田研究員が行っている、遺伝子組換えによる酒造原料米品種の開発の状況を紹介したい。

2. 酒造原料米での低タンパク化の必要性

酒造米の成分の内、タンパク質含量は特に重要である。原料に用いた白米のタンパク質含量が高いと、清酒のアミノ酸含量も高くなり、酒の味がすっきりしなくなる他、日光によって着色し易くなる。タンパク質は主として、米の表層部で高いので、精米して使用している。60%精米した米を使用して造ったものを吟醸酒、50%精米してつくったものを大吟醸酒と呼び、精米するほど高級な酒になる。

3. アンチセンスグルテリン遺伝子の導入による低タンパクイネの育成

イネ種子中に含まれる貯蔵タンパク質のうち、80%がグルテリンで、残りがプロラミンとグロブリンである。そこでグルテリン含量を遺伝子操作により、低減することにより、全タンパク含量を低減できるとの想定のもとに研究を進めた。

タンパク質の合成を制御する方法として、植物中でアンチセンスRNAを産生させる方法が研究されており、既にペチュニアの花色制御、トマトの熟度制御等に使われている。したがって種子の貯蔵タンパク質含量制御でも、アンチセンスRNAを産生させる方法が有効であると考えられた。また、種子中の貯蔵タンパク質であるグルテリンを効率的に低減させるためには、種子中で特異的に働くプロモーターが必要である。そこでグルテリンの完全長のcDNAを単離するとともに、これをプローブにして、ゲノミックDNAライ

KADOTANI Naoto

ブラリーからグルテリン遺伝子をスクリーニングし、プロモーターを単離した。

導入用遺伝子を構築するため、まず、グルテリンのプロモーター領域を制限酵素で切り出し、プラスミッド pUC 19 にサブクローニングした。次にこのベクターに、グルテリンの完全長 cDNA をアンチセンスの方向に、更に下流に Nos のターミネーターを連結して、導入用ベクター (pANG 2) を作成した。

遺伝子導入は、イネ栽培品種、日本晴およびアキヒカリを対象に行なった。これらの品種から薬を採取して A A 培地で振盪培養し、プロトプラストの単離に適した培養細胞系を得た。培養細胞を酵素処理して、プロトプラストを調整し、この懸濁液に CaMV 35S プロモーターにハイグロマイシンフォスフトランスフェラーゼ (HPT) 遺伝子を連結したプラスミッド、ならびにアンチセンスグルテリンベクター pANG 2 を添加した後、直流パルスを添加し、エレクトロポレーション (co-transformation) を行なった。

R 2 液体培地で 1~2 か月培養後、ハイグロマイシンを含む固形培地で培養し、ハイグロマイシン耐性のコロニーを選抜した。このハイグロマイシン耐性コロニーを再分化用培地で培養し、植物体を再生した。再分化植物をポットへ移植して育てた結果、日本晴 23 個体、アキヒカリ 10 個体の植物体が得られた。

形質転換植物の葉から DNA を抽出して、サザンハイブリダイゼーション法により、導入した遺伝子の存在を調べた。その結果、日本晴 23 個体中、HPT 遺伝子を保持している植物体は 20 個体あり、そのうち、グルテリンアンチセンス遺伝子を保持している植物体は 5 個体であった。アキヒカリでは 10 個体中、HPT 遺伝子を保持している植物体は 4 個体で、そのうち、グルテリンアンチセンス遺伝子を保持している植物体は 2 個体であった。グルテリンアンチセンス遺伝子の保持が確認された植物体については、ポット栽培を継続し、S 1 種子を採取した。

S 1 種子について、1 粒ずつ乳鉢で粉碎した後、タンパク質の粗抽出液をポリアクリル

アミドゲル電気泳動で分離し、クマシーブルーで染色した後、デンシトメーターにかけ、クマシーブルーの染色度合いを数値化し、1 粒ごとにおけるグルテリンの含有量を算出した。その結果、日本晴の形質転換体 8 個体中 2 個体 (日本晴 NO.1, NO.14) でグルテリンが顕著に低減していた。図-1 は日本晴の対照と形質転換体についてランダムに選んだ 20 粒の分析結果をヒストグラムで示したものである。日本晴対照のグルテリン含有量の分布の 95% 信頼区間よりも低い米粒が、日本晴形質転換体には 20 粒中 10 粒あり、グルテリンアンチセンス遺伝子によるグルテリン含有量の低減効果は明らかであった。アキヒカリの形質転換体では、2 個体中 1 個体 (アキヒカリ NO. 1) でグルテリンが顕著に低減していた。

形質転換体の S 1 種子を播種して、S 1 世

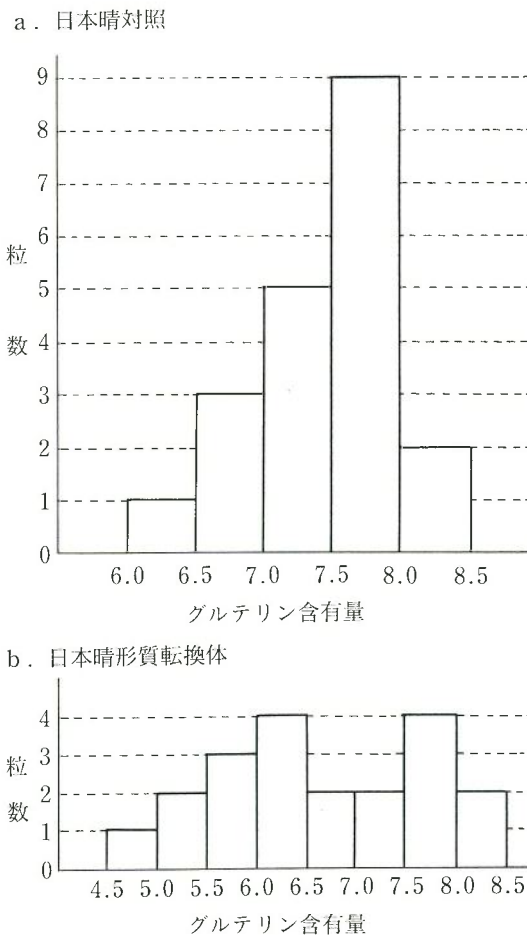


図1 グルテリンアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体におけるグルテリン含量のヒストグラム (グルテリンの含有量は1粒中の26kDaグロブリンの含有量を1としたときのグルテリン含有量で示した)

14 出資プロジェクト情報

代を温室で育て、葉からDNAを抽出し、サザンブロットィングによりDNA解析を行なった。その結果、日本晴 NO.1 では17個体中6個体が、日本晴 NO.16 では16個体中3個体が、アキヒカリ NO.1 では16個体中7個体がグルテリンアンチセンス遺伝子を保有して、かつHPT遺伝子が除去されていた。

4. 今後の方向

日本晴とアキヒカリで、グルテリンアンチセンス遺伝子の導入により、グルテリン含量の低減した形質転換体の作成に成功し、更に自殖世代でハイグロマイシン抵抗性のマーカー遺伝子の除去に成功した。

加工米育種研究所では、遺伝子組換えによる酒造原料米の低タンパク化の研究テーマに

おいても、実用性を重視して研究を進めている。この観点から、コトランスフォーメーションとその後の自殖により、抗生物質抵抗性マーカーであるHPT遺伝子を除去してある。したがって、本研究で得られたイネの組換え体は酒造原料として、安全性のパブリックアクセプタンスが得られ易いものと考えられる。

日本晴とアキヒカリの組換え体については、平成5年度から非閉鎖系試験に移行する予定であり、今後は、安全性と実用性の評価に重点をおいた研究が必要になる。将来、酒造原料米に本遺伝子組換え技術を本格的に使用していくことを考えると、低タンパク化を実用レベルにまで高めること、日本晴、アキヒカリ以外の多数の品種についてもグルテリンアンチセンス遺伝子を導入することが重要である。



サツマイモの遺伝子操作

農林水産省 九州農業試験場 育種工学研究室
西口正通・森 昌樹

1. はじめに

我が国でのサツマイモの生産は約120万トンであり、世界的には、中国、インドネシア、ウガンダ、ベトナムについて第5位を占めている。サツマイモは戦中派には救荒作物としての苦いイメージをもたせるが、最近では低カロリー、高ビタミンのヘルシー食品として見直されはじめ、澱粉原料などを除いた国民一人当たりの年間消費量は増大している。また現在サツマイモ生産の約30%を占める澱粉原料用では、国産澱粉の自由化問題とかかわり、成行きによっては生産農家に大きな影響をもたらす。

九州地域においてはサツマイモ生産は全国生産の約半分を占め、特に澱粉用原料については9割を占める大生産地であり、サツマイモの動向には大きな関心がよせられ、安定生産・高品質化・多用途化等が望まれている。特に九州地域においては温暖・多雨の気候条件から難防除病害虫の発生が多いが、サツマイモにおいてもウイルスによる帯状粗皮病が発生し、サツマイモの収量および品質に大きな影響をもたらしている。このような問題に対処するため、バイオテクノロジーを用いた研究を行っている。ここではその一端を紹介したい。

2. 遺伝子導入実験系

遺伝子導入にはアグロバクテリウムを用い

た方法およびエレクトロポレーション等を用いた直接遺伝子導入法の2種類の手法がある。ここではエレクトロポレーションを用い、サツマイモプロトプラストへの遺伝子導入実験を行った¹⁾。

まず、サツマイモより常時良好なプロトプラストを得るために、懸濁培養細胞(品種、中支8号)の系を確立した。村田²⁾のプロトプラスト単離用酵素液に培養細胞を浸漬し、プロトプラストを調製した。さらに導入するDNAとしてハイグロマイシン耐性遺伝子(HPT)、その上流にカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターを、下流にTiプラスミドのノパリン合成酵素(NOS)のターミネーターをもつプラスミド、pUC19-HPT(図1)を用いた。

上記のプロトプラストとDNAを含むエレクトロポレーション用緩衝液を混合し、エレクトロポレーションを行った。条件は0.75 kv/cmの電界強度、100μFDおよび10ミリ秒の減衰波である。エレクトロポレーション後、ハイグロマイシン存在下で培養し、生育してくるカルスを得たが、その出現頻度は非選抜区のカルス数に比較して約1%であった。

ハイグロマイシン耐性カルスよりDNAを調製し、サザンハイブリダイゼーションを行ったところ、供試したすべてのカルスDNAで陽性の反応を得た(図2)。このことから

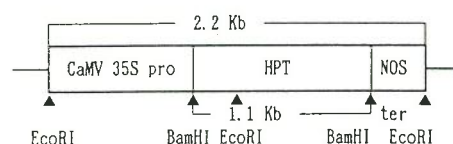


図1 導入に用いたプラスミドpUC19-HPT

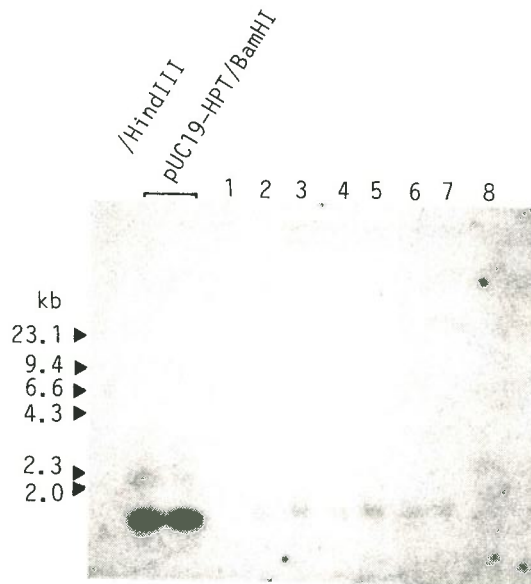


図2 ハイグロマイシン耐性カルスDNAのサザンハイブリダイゼーション¹⁾
 レーン1：対照カルス， レーン2-8：耐性カルス

導入したHPT遺伝子は確かにサツマイモの核DNAに導入されていることが確認された。なお、本試験で供試したカルスについて再生実験を行っているが、対照区も含めて再生個体は得られていない。今後は効率良く再生する品種あるいは条件を検討する必要がある。またプロトプラストでなく、エレクトロポレーションは細胞壁をもつ細胞にもDNAが導入できる報告もあり、その手法を開発することも重要である。この他アグロバクテリウムを用いた手法も有力な手法と考えられる。

3. 遺伝子の単離

上述したようにサツマイモの遺伝子導入系を開発するとともに、他方サツマイモへ導入すべき有用形質として私達はウイルス病抵抗性を取りあげている。これは、はじめに述べたように九州地域においてウイルスによる帯状粗皮病が問題となっている背景がある。

帯状粗皮病はサツマイモ塊根部の表面に縦に細かい亀裂が生じ、それが塊根の周囲に帯状に出現する。このためサツマイモの収量、品質ともに大きく低下する。本病はサツマイモ斑紋モザイクウイルスの強毒系統(SPFMV

S)の感染によることが明らかにされている³⁾。周知のようにウイルスの外被タンパク質遺伝子導入によるウイルス抵抗性の付与はタバコモザイクウイルス(TMV)をはじめこれまで種々の植物ウイルスで明らかにされている。私達はSPFMV-Sの外被タンパク質遺伝子導入による帯状粗皮病抵抗性サツマイモの開発を目的に同遺伝子のクローニングと構造解析を行った。

本ウイルスは、ウイルス分類上ジャガイモYウイルス(PVY)と同じグループ(ポティウイルス)に属し、長さ850~880ナノメートルの紐状ウイルスである(口絵)。遺伝子として一本鎖、(+鎖)のRNAをもち、その塩基数は約1万と推定される。

本ウイルスRNAを単離し、cDNA合成を経て、大腸菌にクローニングした。さらにその一部の塩基配列を決定し、外被タンパク質をコードする領域を確定した⁴⁾。SPFMV-Sの外被タンパク質は315アミノ酸残基(図3)からなり、遺伝子は945塩基数であった。他のポティウイルスの外被タンパク質とのアミノ酸レベルでの相同性は、プラムポックスウイルス(PPV)、タバコエッチウイルス(TEV)、PVY、ダイズモザイクウイルス(SMV)およびタバコベインモットリングウイルス(TVMV)とおおの52、50、50、49および44%であり、これまで知られている他のウイルスとは明らかに異なる、ユニークなウイルスである。特に、外被タンパク質のコア領域(ウイルス間で保存性が高く、ウイルス粒子の形に重要であると考えられる)に接するN末端側のアミノ酸残基数が、殆どのポティウイルスでは約30アミノ酸残基であるのに対し、本ウイルスでは77アミノ酸残基と長く、これまでに報告されているなかではPPV(D系統)の93残基に次ぐ長さをもっていることが明らかになった。外被タンパク質領域以外のタンパク質コード領域についても現在解析中であるが、これまでのところこの領域のアミノ酸配列もPPVとの相同性が最も高くなっている。

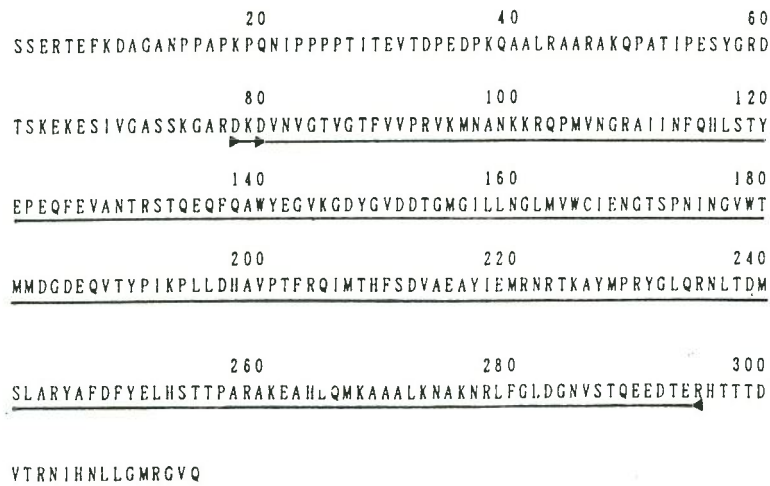


図3 サツマイモ斑紋モザイクウイルス(強毒系統)の外被タンパク質の
 アミノ酸配列(Mori et al., 投稿準備中)
 矢印はトリプシン切断部位, 下線部はコア領域

4. 今後の方向

上記の外被タンパク質遺伝子を植物体内で発現させるためには、この遺伝子上流に植物で機能する転写開始シグナル(プロモーター)、および終結シグナル(ターミネーター)の間に組み込んだDNAを構築し、サツマイモへ導入することになる。さらに、得られた形質転換サツマイモに関しSPFMVに対し抵抗性を示すか検討しなければならない。このためにはサツマイモに関し効率的なウイル

ス検定法がない現在、上記のウイルス遺伝子を利用したウイルス検出法もあわせて開発していく必要があると考えている。

文 献

- 1) 上原泰樹ら(1992):九州農業研究54:21
- 2) 村田達郎(1987):学位論文 p.159
- 3) 宇杉富雄ら(1990):日本植物病理学会報 56:423
- 4) 森昌樹ら(1991):第14回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 p.136

文献情報

花粉母細胞のカロース壁を分解する遺伝子の導入による雄性不稔タバコの作出

被子植物の花粉母細胞は、グルコースの β -1, 3重合体であるカロースを生成分泌し、周囲に厚いカロース壁を形成する。減数分裂が終了すると、葯壁のタペート細胞の分泌するカラーゼ (β -1, 3グルカナーゼの一種) によってカロース壁が分解され、四分子から小孢子が遊離する。カラーゼの活性は厳密に制御されており、減数分裂の第2分裂の頃から活性が認められ花粉遊離期にピークに達する。

ペチュニアの細胞質雄性不稔系統には、カロースの分解が通常より速いものや遅いものがあり、カラーゼ活性の制御不良を不稔の原因とする説がある。しかし、タペート細胞の肥大、特異なミトコンドリアタンパクの発現など他のいろいろな現象も観察されており、不稔の機構の解明は容易ではない。

著者らは、カロースの分解制御と不稔との関連と、花粉形成におけるカロース壁の機能を研究するため、タバコを用いてカロース分解酵素の遺伝子工学的操作を試みた。

カラーゼの遺伝子は単離されていないため、病原菌の感染により誘導されるタバコの液胞型塩基性 β -1, 3グルカナーゼの遺伝子に改変を加えて使用している。発現のプロモーターとして、35Sプロモーターと著者らが以前から研究しているアラビドプシスの葯特異的プロモーターを用いている。しかし、35Sプロモーターの場合はタペート細胞での発現が極めて低いため、稔性には特に影響がなかった。

この葯特異的プロモーターは、減数分裂の初期からタペート細胞中で特異的に発現する性質を持ち、通常のカラーゼ活性が認められるよりもかなり早く発現するものである。これを用いた場合、形質転換植物はさまざまな程度の雄性不稔性を示した。完全不稔の植物

では、カロース壁は花粉母細胞には通常に形成されたが、減数分裂が始まると消失した。減数分裂自体は正常に進行し、四分子の形成と花粉の遊離は観察されたが、花粉の形態は正常ではなく、他の花粉と粘着しやすく、その後速やかに破裂した。

通常の花粉では、カロース壁の内側にスポロポレニン (カロチノイド重合体) という特殊な物質が規則正しく集積し、特異的な花粉の外膜構造が形成される。この不稔植物の花粉にも、スポロポレニン様の物質の蓄積自体は観察されたが、規則正しい構造は形成されなかった。このように、花粉の細胞壁構造が異常になったため、花粉内外の浸透圧差への耐性を失い、花粉が破裂するに至ったものと推定している。また、この不稔植物では、タペート細胞の肥大も認められた。

本研究により、カロース壁の早期分解が雄性不稔を起こすことが確認され、カロース壁が花粉の正常な形成のために必須であることが示された。カロース壁なしでも減数分裂は正常に進行しており、カロース壁は、主として、花粉外膜の正常な形成のために必要であることが判明した。また、カロース壁欠失による花粉形成の異常の結果としてタペート細胞の肥大が起きることも明らかとなった。

カラーゼは pH 6.3 以上では活性がない酵素であり、葯内腔の pH はカラーゼ発現の時期に 7.0 から 6.0 まで変化することが知られている。ペチュニアの雄性不稔系統に特異的に認められるミトコンドリアタンパクが葯内腔の pH 変化に関与するとの説もあり、これによってカラーゼ活性が影響を受け不稔が生じる可能性も考察している。一方、本研究で用いた塩基性の β -1, 3グルカナーゼは pH 7.0 でも活性を示す酵素であり、この性質がこの実験では重要な意義を持っていた。

本研究は、遺伝子工学による雄性不稔植物の作成例としても注目される。ただし、先行の Mariani ら (Nature 347: 737~741, 1990) の葯特異的プロモーターによる RNase 発現の方法では、稔性回復の方法も示されており、本研究がこれを凌ぐ技術を提供しているとは

いえない。よって育種への応用の面よりは、カ
ロース壁の機能と花粉の形成について重要な
知見を提供している点を評価すべきであろう。

(抄訳 小鞠敏彦—JT 遺伝育種研究所)

KOMARI Toshihiko

**Premature dissolution of the micro-
sporocyte callose wall causes male sterility
in transgenic tobacco**

Worrall, D., D. L. Hird, R. Hodge, W. Paul,
J. Draper and R. Scott

The Plant Cell 4: 759-771(1992)

文献情報

昆虫のクチクル硬化に
関与する酵素

昆虫のクチクル硬化 (cuticle sclerotiza-
tion) は、クチクル (角皮) 中においてキチン
やタンパク質間を共有結合的に架橋する反応
である。幼虫やサナギでは脱皮期に新たに形
成されたクチクルを再度強固にする必要があり、
クチクル硬化は昆虫の生体防御システム
の一環をなす重要な化学反応である。クチク
ル硬化の生化学的機構については古くから論
議があるが、現在主として二つの説に集約さ
れている。一つはキノタンニング (quinone
tanning) と呼ばれるものである。すなわち、
表皮細胞からクチクル中に分泌されたカテコ
ール化合物がフェノールオキシダーゼによっ
てキノンに酸化され、これがタンパク質のア
ミノ酸側鎖と反応してカテコール-タンパク
質となる。この反応が次々に生じることに
よって架橋が形成されるというものである。
もう一方は、カテコールアミンの β 位の側鎖
が活性化され、この部位で架橋が生じるとい
う説で、「 β -硬化」(β -sclerotization) と呼
ばれる。後者の場合、*N*-アセチルド-パミ
ン (NADA) の α - β 位の炭素間が2重結合と
なったデヒドロ NADA (dNADA) がバッタ
のクチクルから単離され、dNADA のキノン

体が β -硬化の主体をなす化合物であるとさ
れている。

本論文はショウジョウバエのサナギのクチ
クル硬化に関与する酵素について調べたもの
である。まず、クチクル結合性のフェノール
オキシダーゼの基質特異性を調べた。その結
果、本酵素は、*N*- β -アラニルド-パミンが
最も良い基質であること、金属キレート剤で
は阻害されず、フェニルチオ尿素 (PTU) で
もほとんど阻害されないが、アジ化ナトリウ
ム等によって阻害されることがわかった。こ
の阻害の様式とシリングアルダジン (syring-
aldazine) の酸化を触媒することからラッカ
ーゼ (laccase) 型のフェノールオキシダーゼ
であると推測した。

次に、dNADA の生成に関与する酵素につ
いて調べた。クチクルから得られたタンパ
ク質画分に NADA を添加して HPLC で調
べた結果、反応生成物として、*N*-アセチル
ノルエピネフリン (NANE), NADA キノン、
dNADA および dNADA-NADA2 量体が検
出された。この試料をさらにゲルろ過によっ
て A, B, C の三つの画分に分けた。いずれの
画分も NADA を dNADA に変換する不飽和
酵素 (NADA desaturase) の活性はなかった
が、3者を混合すると NADA から dNADA
とそのダイマーが生成された。A はフェノ
ールオキシダーゼ活性を有し、前述のラッカ
ーゼとは異なり、PTU で強く阻害され、シ
リングアルダジンを酸化しないことから *o*-ジフェ
ノールオキシダーゼが含まれていることがわ
かった。また、B はチロシナーゼの共存下で
も NADA に作用しなかったが、B を C およ
びチロシナーゼと混合すると NANE, dNA
DA および 2 量体を生成した。そこで、B に
は dNADA 互変異性化酵素 (NADA quinone
methide: dehydro NADA tautomerase) が
存在することがわかった。さらに、C は
NADA キノン異性化酵素 (NADA quinone
isomerase) 活性を含んでいた。すなわち、
ショウジョウバエの NADA desaturase 系は
単一の酵素ではなく、3種の酵素から構成さ
れると考えられた。著者らは前にニクバエ

(*Sarcophaga bullata*) おいて、これら3種の酵素によって dNADA が NADA から生合成されることを明らかにし、 β -硬化の概念を拡張して「キノンメチド硬化」と呼ぶことを提唱している。本論文は、ショウジョウバエの場合もその説が当てはまることを示唆している。

フェノールオキシダーゼは昆虫ではクチクル硬化だけでなくメラニン生成や傷ついた表皮の修復にも密接に関与している興味深い酵素である。一般的にこのような研究は酵素タンパク質自体の構造や特性よりも、それが触媒する反応と生理的現象との関係に興味が集まる傾向にある。昆虫を含めて無脊椎動物の特異な生体防御機構の全容を明らかにするためには、今後、タンパク質および酵素化学的側面からの研究の進展が望まれる。

(抄訳 麻生陽一—九大農学研究科)

Aso Yoichi

Studies on the enzymes involved in puparial cuticle sclerotization in *Drosophila melanogaster*

Sugumaran, M. et al.

Arch. Insect Biochem. Physiol. 19: 271-283 (1992)

文献情報

インフルエンザウイルスの M_2 タンパク質はイオンチャンネル活性を持っている

インフルエンザAウイルスは宿主細胞表面に存在するシアル酸レセプターを介して、エンドサイトシスにより細胞内に侵入する。侵入当初ウイルスはリソソーム内に存在するが、リソソーム内は酸性のためウイルス糖タンパク質に構造変化がおき、ウイルス脂質二重層とリソソーム膜とが膜融合し、ウイルスマトリックスタンパク (M_1) に包まれたり核タンパク質 (RNP) が細胞質内に放出される。放出後速やかにRNP複合体は M_1 より

離れるが、 M_1 の離脱は酸性条件下で効率よく起きることが明らかになっているため、離脱はリソソーム内ですでに始まっており、また複合体内部へプロトンを送る機構が存在すると考えられている。

著者らは、この機構としてホモ4量体を形成しているウイルスマトリックスタンパク (M_2) の機能に着目した。Amantadine は本ウイルスの脱外被阻害剤である。これまでに本薬剤抵抗性のウイルスが分離されておりシーケンス解析の結果、脂質二重層を貫通している M_2 タンパク内疎水性領域 (26~43アミノ酸残基) に変異が認められていた。そこで著者らは、 M_2 タンパクの膜貫通領域にポイントミューテーションを起こした6種のミュータント M_2 を作成し、本タンパクの機能解析を行った。野生型および変異型 M_2 タンパクをコードする mRNA を、それぞれ *Xenopus laevis* 卵母細胞にマイクロインジェクションし培養したところ、細胞膜上で M_2 タンパクの発現が認められた。そこで電圧固定法により M_2 タンパクのイオンチャンネルとしての機能を検討した。その結果、野生型、変異型タンパク発現細胞において、膜におけるイオンの透過性に違いが認められ、また Amantadine 処理によるイオン透過性の変化が野生型タンパク発現細胞では認められたものの、変異型タンパク発現細胞では認められず、 M_2 タンパクがイオンチャンネル、もしくはイオンチャンネルを活性化するタンパクであることが示唆された。

イオン透過選択性に関し、2種の変異体を用い Na^+ , Cl^- , K^+ について検討した。一方の変異体では Na^+ が Cl^- より、もう一方の変異体では、 Cl^- が Na^+ より透過性が高く、また Na^+ と K^+ の透過性は両変異体とも同じであった。イオンの通り道と思われる、膜貫通領域における変異がイオン透過選択性に影響を与えたことから、 M_2 タンパク自体がイオンチャンネルであることが明らかとなった。

つぎに何が M_2 タンパクの形成するイオンチャンネルを活性化するのか検討した。酸性下にあるリソソーム内においてイオンチャン

ネルが活性化していると考えられるため、イオンチャンネルはプロトンにより活性化されると予想された。そこで電圧固定法を用いてpHの違いによる、イオン透過性の変化を調べた。pHが低下するほど、イオン透過性は増大したため、イオンチャンネルの活性は、pH環境により調整されており、プロトンにより活性化されることが明らかとなった。

以上の結果より次のような解離のメカニズムが示唆された。ウイルスの細胞内侵入後、酸性下にあるリソソーム内でプロトンによりM₂タンパクの形成するイオンチャンネルが活性化され、ウイルス粒子内部へのプロトン輸送が始まり、その結果M₁とRNPとの結合力が低下する。そのため細胞質中に放出されたヌクレオカプシドは速やかに解離する。

このようにM₂タンパクはイオンチャンネルを形成することでpH環境を調整し、ウイルスの感染に関して重要な役割を果たしていることが本研究で明らかとなった。

(抄訳 小林晃一東北大農)

KOBAYASHI Akira

Influenza virus M₂ protein has ion channel activity

Pinto, L.H., L.J. Holsinger and R.A. Lamb
Cell 69: 517-528(1992)

文献情報

形質転換植物からの選択 マーカー遺伝子の除去は 社会にとって必要か

社会には形質転換植物の利用に対する不安があり、そのため80年代半ばに予想されたよりも実用化の進展は遅れている。中でも問題になっているのは抗生物質耐性遺伝子を選択マーカーに使うことである。こうした背景があるため、DaleとOwの91年末の論文(Dale, E.C. and Ow, D.W.(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 10558-10562)が大きな関心を引くに至った。彼らは従来の方法でルシフェラーゼ遺伝子(*luc*)とハイグロマイシン耐性

遺伝子(*hpt*)をタバコに導入した。*hpt*の両側には新しい試みとしP1ファージの組換え酵素(Cre)の認識配列である34塩基対の*lox*配列を入れた。このタバコに、続いてCreをカナマイシン耐性遺伝子(*npt*)をマーカーとして導入した。その結果、予想通りCreの働きにより*lox*で挟まれた*hpt*が除去され、*luc*だけが残った個体が得られた。*luc*とCre-*npt*は別の座にあるため自家受粉によって得られた後代では分離し、最終的に*luc*だけが残った個体が得られる。

選択マーカーの除去は可能になったが、実際にそうする必要はあるだろうか？これについて意見の一致を見ることは困難であるが、以下の3点を考えに入れなければならない。

①マーカーの除去には2回の遺伝子導入と後代での望ましいゲノタイプの個体の選抜が必要のため実験植物ではともかく作物、更には木ではマーカーを残す従来法に比べて長い期間が必要になり適用困難である。②摂取された遺伝子自体およびその産物にも毒性はなく消化器の中で分解されてしまう。また他の病原体への転移も考えにくい。とは言っても人に使われる薬剤は使用しないことでリスクは更に低減されるであろう。③リスクは社会に認知されなければならない。研究者は薬剤マーカーのリスクは非常に低いと考えているが、安全性や情報公開に関して社会の受取り方は異なっており、科学者や企業はマーカーの除去技術をどう扱うべきかについて考える義務と責任がある。しかし、専門家はリスクに対する社会の懸念を不合理でバカげたものとして片づけてしまい、社会の無知と知性を過小評価してしまう。一方、社会は抗生物質の無差別な利用について悪いイメージを持っており、また科学、特にハイテクの知識は多くの消費者にとって受け入れが難しいため、両者の間には誤解が生じ易く、懸念が生れてしまう。

これらの問題を考えていくためには前提として、全ての情報が明らかにされていなければならない。人々は受認できないと考えるリスクを避ける権利を持っている。もし形質転

換植物が有害であるとみなしたならば、食用にすることを避けるかもしれない。このことは科学者の見地からは誤りであるが、消費者は倫理的な点から、そのような遺伝子の摂取を避ける根拠となるような情報を手に入れる権利を持つべきである。人々は選ぶ権利を持っており、その結果薬剤マーカーを含んだ食品はあまり受け入れられないかもしれない。したがって実用面から考えるとマーカーの除去が考慮されることになる。マーカー遺伝子が病原体に取り込まれる可能性に関しては、もはや各個人の選択にまかされた問題ではない。科学者は食品として提供する前に、危険性がないことをきちんと確認する必要がある。そうしたとしても、リスクを望まない人に間接的ではあってもリスクを負わせる権利があるかどうかは難しい問題である。こうしたことを考えると〈公開の原則〉が新たな重要性を持ってくる。反対意見のある社会に対し、企業や多くの国の政府は沈黙を守る傾向があるが、それは誤った対応であり、情報に基づ

いた同意の形成が倫理的、商業的かつ政治的に上意下達より望ましい。科学情報は社会が理解できるよう十分に明確かつ信頼できるよう公正に伝えられなければならない。これまで企業は薬剤マーカーの問題について説明を怠ってきた。

遺伝子除去技術の開発によって〈クリーン〉な植物の作成が可能となったので、倫理と実用主義の観点からこの除去技術は歓迎され広く用いられることとなろう。作物の遺伝子組換えは消費者と環境にとって多くの利点があり、ハイテク企業は誠実に、かつ社会の情報に基づいた選択と最大限の受容のために責任を負わねばならない。

(抄訳 大島正弘一 生資研)

OSHIMA Masahiro

Removal of selectable marker genes from transgenic plants needless sophistication or social necessity?

Bryant J. and S. Leather

Tibtech. 10 : 274-275 (1992)

海外便り

シドニー大学畜産学部での1年

農林水産省 草地試験場 乳牛飼養研究室

押部 明德

はじめに

1990年11月から1年間、科学技術庁長期在外研究員としてシドニー大学畜産学部で、成長ホルモン（GH）が反芻家畜の乳腺血流量（MBF）に及ぼす効果についての実験を行った。1年間で得られた成績とその間に感じたことを併せて紹介したい。

実験開始まで

1980年代後半から、合成成長ホルモン（rbST）を投与して反芻家畜の泌乳量を増加させる試験が米国を中心に盛んに行われた。しかし、作用メカニズムの解明は遅れていて、特に、乳の材料を運ぶ乳腺への血流量に rbST が作用を及ぼすかどうかは明らかにされていなかった。日本では rbST が使えないし、MBF の高精度な測定方法がなかったのでシドニー大学の Annison 畜産学部長に相談したところ「rbST は簡単に手に入るし使える。MBF も超音波プローブを使えば測れる。Dairy Unit の外科手術の Gooden 博士と内分泌の Wynn 博士が協力してくれるだろう」との返事をもらってシドニー大学畜産学部に行った。畜産学部の大学院研究施設は市内から約 60km の内陸部にある。ここには Dairy Unit の他に獣医、肉牛、家禽、馬、土壌講座の研究施設が広い放牧地の中に点在している。Dairy Unit の古びた施設を案内してくれた Wynn 博士は、私の第一印象を見透かしたように「どうだ？ 日本の施設に比べれ

ば古くてボロいだらう。」と言った。Dairy Unit のメンバーは講師の Gooden 博士と Wynn 博士、実験助手が 3 人、牧童 1 人と彼の犬が 2 匹、博士課程の学生が 5 名、なぜか豚の専門家も 1 人同居している。私は、科学技術庁長期在外研究費ではこの実験の費用を到底カバーできないのを心配していたが、これは Wynn 博士の「心配するな。費用は豪州羊毛公社から引き出せる。」で片付いてしまった。シドニー大学はニューサウスウェールズ州（NSW）立の大学であるが、研究費用の多くの部分は豪州羊毛公社、NSW 酪農公社等の農業団体からの委託研究費や出資によって賄われている。研究費はほぼダイレクトに研究担当者に渡る。これに豪州の件費の安さなどを考慮すると実質研究費は日本の大学に比べて恵まれているのかもしれない。しかし、成果の査定は厳しい。

The trouble after troubles

日本で予想しなかった問題がでてきた。『動物の福祉』の問題である。NSW で動物実験を行う者は動物福祉委員会によって審査され、それぞれの免許を受けなければ実験ができない。Gooden 博士は「日本では獣医でも、この外科手術の免許取得には時間がかかるぞ。」と言ったが、結局、彼の委員への働きかけのおかげで免許は受けられた。局所血流量を測る方法には希釈法、磁気プローブ法等があるが、超音波の発信部と受信部を内蔵した小型プローブを目的の血管の外側に設置して測定する Transit time 超音波プローブ法が最も精度が高い。緬羊の MBF を測定するには幅 4 mm のプローブを直径約 3 mm の外

OSHIBE Akinori

腸骨動脈の周囲に外科手術によって固定する方法がとられ、この術式は Gooden 博士らが既に確立していた。しかし、プローブと薬剤注入用のチューブを同時設置する術式は確立されていなかった。Gooden 博士は「簡単にできる。」と言って手術のデモンストレーションをしたがプローブは作動しない。そのため9頭の綿羊を使い、プローブの固定方法、チューブの種類、麻酔方法を替えて手術を行った結果、原因は動脈とチューブの弾力性の違いから動脈が屈折してしまう、全身麻酔では覚醒までの時間にさらにこれが助長されるためであると分った。この問題はプローブを鼠経管で包み込んで固定する、チューブは外径0.5mm以下のものを使い、麻酔は硬膜外麻酔で行うことによって改善された。しかし、ここまでで試験に使う予定の綿羊を全て使い果たしてしまった。「試験に使う綿羊はもういない。」と言う私に Wynn 博士は「心配するな。なんとかする。」と言って車を飛ばし、600km離れた町からトレーラー一杯の綿羊を買ってきてくれた。

Keep going !

最初に、rbST の投与によって MB F が変化するかどうかを見るために、頸静脈から rbST を連続注入し、合計 108 時間の MB F の変化を測定した。結果は、MB F は rbST 注入開始48時間後には約20%増加し、また、血漿 GH の変化と MB F の変化の間に時間のずれのあることが分った。次の実験は、この時間のずれに着目し、GH によって分泌が刺激されるホルモンである IGF-I の変化と MB F の変化の関係を探ることにした。実験方法は最初の実験とほぼ同様であるが、動物を替え rbST の注入期間を延長し、血漿 IGF-I 濃度も測定した。結果は、GH は rbST の注入開始後すぐに上昇するが、血漿 IGF-I の上昇は約24時間後から始まる。MB F の有意な増加は更に遅れ約36時間後から始まる。しかし、乳量の増加は MB F の上昇に先行して始まっており、rbST の注入を

止めると、先ず GH、次に乳量、その後に血漿 IGF-I と MB F が下降することが分った。さらに、rbST には直接的な MB F 増加作用がないことを証明するために、rbST を量を変えて乳腺動脈へ直接注入した。その結果末梢血の GH 濃度を上昇させない量では MB F は変化せず、rbST に直接的な MB F 増加作用がないことが証明された。これらの結果から、rbST の投与によって MB F は確実に増加する。しかし、この増加は泌乳量増加の原因ではなく結果ではないかと考察された。つまり、rbST の投与で IGF-I の分泌が促進され、これが乳腺を活性化する。活性化された乳腺ではおそらく一時的な酸素不足等が起こりこれを補うために MB F が増加するのではないかと推察された。

Dairy Unit 流実験推進術

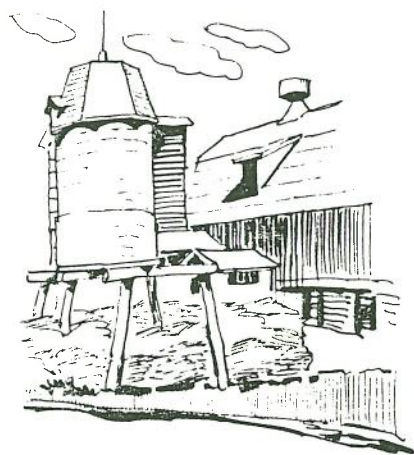
試験中にも致命的なトラブルが起きたが、Wynn 博士は「心配するな。何とかする。」で解決してくれた。血流量計の一台がダウンした時には僅か1日で4,000km離れた医学研究所の機械が空輸され、γカウンターが故障した時には州立農業研究所が機械を空けて待っていてくれた。Dairy Unit には目を見張るような最新型の機械や施設はない。最初、こんな所でなぜ世界のトップクラスのレポートが書けるのか不思議であったが、彼らにとって手元に所有している機械類は重要ではなく、必要なものは機械に限らず人まで借りてくる。重要なのはそれができる研究者のネットワークである。このネットの上での人の移動も盛んで、大学と CSIRO 等の間で日常的に研究者が移動している。このネットは国内だけでなく旧英連邦全体に及んでいるが、海外への人の移動は『商売下手のオーストラリア。旨い部分はクレバー・カントリーに取られてしまう。』の一因になっているらしい。

おわりに

オーストラリアの不況は深刻で、豪州羊毛

公社は巨額の累積赤字のために1991年の初めに農家への羊毛支持価格制度を中止したことは私も知っていた。しかし、同時に研究機関への研究費の供給も中止され、Wynn博士の研究費が危機的な状態であったことは、この実験が終わるまで知らされなかった。連邦平

均の失業率は既に11%を超えている。しかし、難民と移民は引続き受け入れている。多文化国家オーストラリアではオーストラリア人の定義すら曖昧である。しかし、この几帳面さとは程遠い寛容さがオーストラリア人気質なのではないかと考えている。



特別情報

最近のバイオテック機器情報

(株)島津製作所 技術研究本部

井上 英男

1. はじめに

最近のバイオテクノロジーの急速な発展の様子はブレインテクノニュース誌上にも見かけるように、動植物から人間に至るまで遺伝子レベルでの改造が行えるほどに進んでいる。これらの進歩の原動力はなんといっても分子生物学を始めとする分子レベルでの学問の発達をもたらした人間の知的活動であるが、研究活動を支える機器の発達も大いに寄与していると言える。ここ数年に限っても、数多くの機器が開発されているが、紙面の都合もあり、筆者の能力の及ばない領域も多いので、ここでは遺伝子組換え植物を作出するプロセスで活躍しているバイオテック機器を中心に紹介してみたい。

2. 遺伝子の導入

天然の植物には含まれていない遺伝子を導入して、新しい形質を獲得した植物としてアメリカではトマト、ワタなどがいよいよ市場に出回るようになり、日本でも農林水産省を中心に実施している環境アセスメントの実験が進み、間もなく一般圃場に形質転換植物が現れようとしている。

目的の遺伝子を植物に導入するためには、数種の方法がある。アグロバクテリウムは感染時にT_iプラスミドの働きによってDNAを植物の染色体に挿入するという性質があるので、この性質を利用して主として双子葉植物に外来遺伝子を導入する方法が確立されて

おり、実験用キットも販売されている。

イネ、ムギ、トウモロコシ等の主要穀物や、ラン、ユリなど花卉には単子葉植物が多く、外来遺伝子導入にT_iプラスミドベクターの利用が難しい場合が多い。これらの植物には直接細胞内にDNAを取り込ませる方法が用いられている。プロトプラストの作成とその再分化法が確立している植物では電気パルスを使ったエレクトロポレーション法による外来遺伝子の導入がよく用いられるようになった。この手法で遺伝子を導入する装置の一例を図1に示す。プロトプラスト化されて表面にでた細胞膜の脂質二重層分子配列が、電気パルスによって誘起された膜間電圧によって乱され、膜の内外で物質の移動が促進されるためにDNAの細胞内導入が起きるのであると考えられている。脂質分子の配列の乱れはパルス印加終了後、短時間で修復するように挙動する。この方法でゲノムDNAに外来遺伝子が組み込まれる割合は 10^{-4} から 10^{-5} という低頻度であるが、遺伝子導入チャンバーには通常 10^6 個以上のプロトプラストが入っているので、一実験で数個ないし数十個の外来遺伝子が導入された細胞が出現することになる。多数の細胞の中から遺伝子が導入され



図1 島津遺伝子導入装置GTE-10

INOUE Hideo

たものだけを選抜するために、導入目的の遺伝子とともにハイグロマシ、カナマイシン、ピアラフォス等の薬剤耐性遺伝子を選抜マーカーとして同時に導入し、これらの薬剤耐性のあるプロトプラスト、転換植物を容易に選抜している。エレクトロポレーション法を使って形質転換植物を作出した例としては植物工学研究所、農業生物資源研究所、筑波大生物科学系等によるイネが有名であるが、その他の単子葉植物でも成果が発表されている。エレクトロポレーション法とよく似た方法で、プロトプラストに遺伝子を導入する方法としてポリエチレングリコール (PEG) 法もあるが、いずれの方法が優れているか比較した例がないようである。

エレクトロポレーション法と並んで最近よく用いられる方法にパーティクルガン法がある。導入目的のDNAでコーティングした直径0.1~0.3 μ mの金属微粒子を火薬、圧縮気体等の圧力で植物に撃ち込み、細胞壁、細胞膜を貫通させて直接細胞内にDNAを導入する方法である。図2にその一例を示す。この方法の利点は植物をプロトプラスト化、再分化の過程を経ることなく、細胞壁を有する植物細胞に直接遺伝子を導入できることであり、単子葉植物の形質転換には特に有用である。トランスジェニック植物が得られたという報告も出始めている。ただこの方法は現在発展中で、トランスジェニック植物が得られる効率もまだエレクトロポレーション法には及ばないようであるが、プロトプラストに較べて植物体が得られ易い形態である組織・細胞にDNAを導入するので用途は拡がると予想される。また、この方法では標的植物は単細胞にまで分離されていないので、転換体がキメラになる可能性もあるので注意を要する。上



図2 バイオ・ラッド パーティクルデリバリーシステムPSD-1000/He

に述べた方法はトランスジェニック植物を作出するのに有効な方法であるばかりでなく、遺伝子発現を簡便で効率的に調べることができるトランジェントアッセイ系 (一過的発現系) において必須の技術になっている。さらに、マイクロマニピュレータを用い微小なガラス針を通して顕微鏡で観察しながら、標的細胞に目的DNAを注入するマイクロインジェクション法も、遺伝子発現が転写レベルや翻訳レベルで直接検出できるので今後の応用が期待される。

3. 導入遺伝子の確認

上記の方法で得られたトランスジェニック植物に本当に目的の遺伝子が導入されたかどうか確認する必要がある。一番簡単な方法はアメリカ Cetus 社によって開発されたPCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法の利用である。まず導入遺伝子のDNA配列は既知であるので適当なプライマーを設計し、DNAシンセサイザで合成する。試料植物から抽出したDNAに一組のプライマーと耐熱性ポリメラーゼを加え、サーマルサイクラーを用いてほぼ95°Cと50°Cとの間を循環させる。導入遺伝子が存在すれば両プライマー間のDNAが大量に増幅されてゲル電気泳動等で確認できる。ただPCR法は一組のプライマー間の核酸塩基数が数塩基以上変動がなければ違いが認められないので、正確に目的遺伝子が組み込まれていることを確かめるためには、さらにサザン・ブロット法を行うことが望ましい。この場合のプロープにもDNAシンセサイザはよく用いられるようになった。さらにプロトプラスト培養を経た場合とか、パーティクルガンで遺伝子導入した場合を含めて最終的には導入遺伝子の全DNA配列を確認することが多くなっている。これは最近多数の種類のDNAシーケンサが市販されていることにもよると思われる。このことは遺伝子操作実験が普及するにつれて放射性同位元素の使用をできるだけ少なくしたいという各方面からの要望にも答えることになる。この装置の一例を図3に示す。

トランスジェニック植物を作出する目的は、導入遺伝子が植物の中で、とりわけ特定の位置に特定の時期に発現されて、遺伝子に対応するタンパク質が産生されることである。そのため目的のタンパク質の検出が重要になり、ウエスタン・ブロッティング法がよく用いられる。ゲル電気泳動で分画されたタンパク質の中に目的のタンパク質が存在するかどうかは、目的タンパク質を抗原とする抗体によって検出する。抗体の作製のために導入遺伝子の配列からペプチドシンセサイザで抗原になるペプチドを合成することが多い。さらに導入遺伝子が予期されたタンパク質に完全に翻訳されているかどうか確認するためには、図4に示しているようなペプチドシーケンサが威力を発揮している。

以上のような過程でトランスジェニック植物を作出するのに活用されているバイテク機器の概略を紹介したが、なんとと言っても最近のヒットはPCR法とこれに関連する機器である。話は少し外れるが、PCR法を使ったDNA塩基配列決定の新しい方法を一つ紹介



図3 島津DNAシーケンサDSQ-1NA

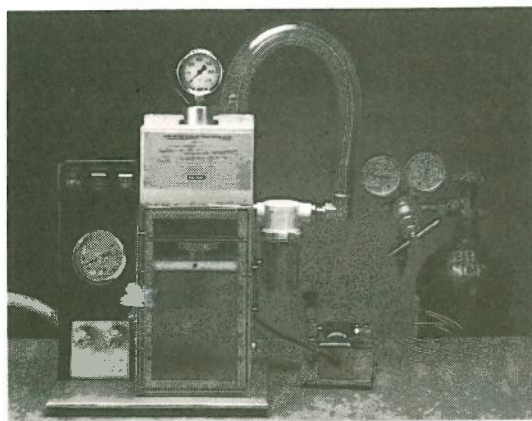


図4 ABIペプチドシーケンサ473A

する。配列を決定しようとする遺伝子が極めて微量な場合、適当に制限酵素で切断しプラスミドに挿入する。挿入された断片を含む領域を増幅する一組のプライマーを合成し、片方のプライマーをビオチン化しておく。PCR反応後、ストレプトアビジンでコートされた磁性粒子と混合して、粒子上にDNAを保持する。この粒子上の一本鎖DNAを鋳型として、第3の蛍光標識されたプライマーを用いてサンガー反応を行い、DNAシーケンサで自動的に配列を決定することにより微量のDNAの配列が解析される。

4. おわりに

組換え植物を作出する方法はほぼ確立されたと言えるが、今後は必要な形質を獲得するためのような遺伝子を導入するかという問題に移って来ている。その一方法として最近ヒトを始めとしてイースト、イネと次々に構築され始めたデータベースの有効利用が注目される。農業生物資源研究所と農林水産先端技術研究所との共同によるイネ・ゲノム・データベースの構築を例にとると、イネ染色体から得られた多数のクローンの核酸配列をDNAシーケンサで決めて付属のパソコンにセーブする。このデータは自動的にホモロジー解析が行われた後シーケンサ全体をコントロールしているワークステーションに送られる。ゲノム解析チームでは昼夜を問わずシーケンサからデータが送られて来るのを自動的に処理し、チーム内で蓄積された全データ、ジーンバンク等の他の動植物全般にわたるデータベース等とホモロジー検索を高速に行う必要があるため、高性能のワークステーションとこれを効率よく操作するソフトウェアが必要になる。今後活躍するバイテク機器製品はコンピュータとの連結とこれらを効率よく操作するソフトウェアの構築が欠かせない要素になりつつあるといえる。

なお、ここに挙げられたバイテク関連機器の機種は筆者がたまたま装置の写真を利用できるものを示したもので、他のメーカーの優秀な機器が多数あることは言うまでもない。

編集後記

明けましておめでとうございます。
平素はご無沙汰していますが、皆様にはよい年を迎えられたこととお喜び申し上げます。

お蔭様で本誌も6歳になりました。これはひとえに購読会員、執筆者ならびに関係の皆様のご支援、ご理解によるものと感謝しています。

本誌の構成につきましては、毎年編集懇談会を開いて、各分野の方々のご意見を参考にしながら、ほぼ現在のようになっております。今後は、できるだけ広い分野のホットな情報を掲載し、内容も一層充実させていきたいと考えていますので、よろしくお願いいたします。
(大畑記)

ブレイン テクノニュース (第35号)

平成5年1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