

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution



表紙説明

組織培養で四倍体化したブドウの新品種「福岡9号」(中央)と四倍体化した染色体(右下)

(本文 22 ページ参照)

本号の紙面

総説..... 1
 イネ組織培養における体細胞突然変異
 国内情報..... 7
 イネの高率形質転換法, 昆虫の抗菌タンパク, 組換え微生物のモニタリングシステム, 焼酎廃液の生物処理法
 地域の先端研究..... 22
 組織培養によるブドウの四倍体化
 文献情報..... 26
 ウイルスRNAと形質転換植物のmRNAとの組換え, 昆虫の生殖と共生微生物, 植物の抵抗性遺伝子と病原菌の非病原性遺伝子との掛け引き, タキソールの全合成
 海外便り..... 32
 植物トランスポゾン研究

目 次

総 説

大野清春

イネ組織培養における体細胞突然変異…………… 1

国内情報

神代 隆

アグロバクテリウムによるイネの高効率形質転換……………7

門野敬子・山川 稔

昆虫の抗菌性タンパク質、カイコセクロピンBによる植物病原細菌の増殖抑制…………… 11

西村直行

組換え微生物モニタリングシステムの開発…………… 14

小幡孝之

甘藷焼酎蒸留廃液の生物処理法の開発…………… 18

地域の先端研究

能塚一徳

組織培養を活用したブドウの四倍体化法…………… 22

文献情報

ウイルスRNAと形質転換植物の転写産物 (mRNA) の間の組換え…………… 26

昆虫の生殖に係わる共生微生物の移植…………… 27

感染現場における植物の抵抗性遺伝子と病原菌の非病原性遺伝子の掛け引き…………… 29

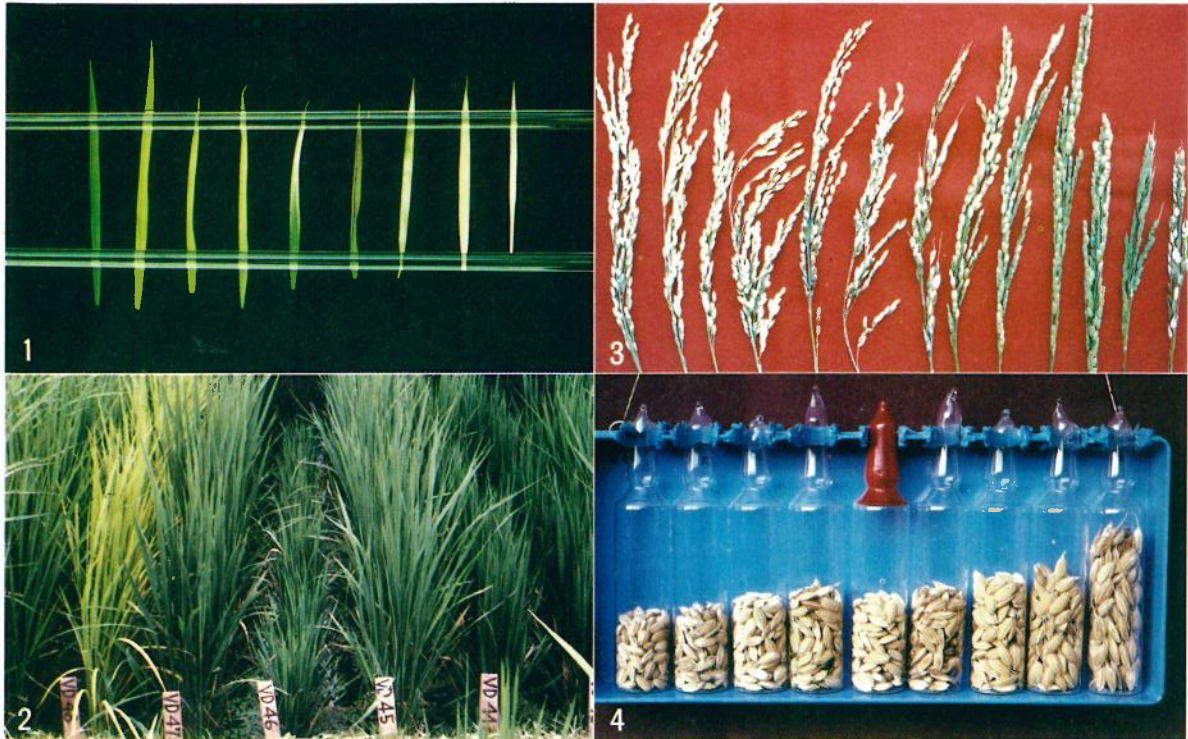
タキソールの全合成…………… 30

海外便り

廣近洋彦

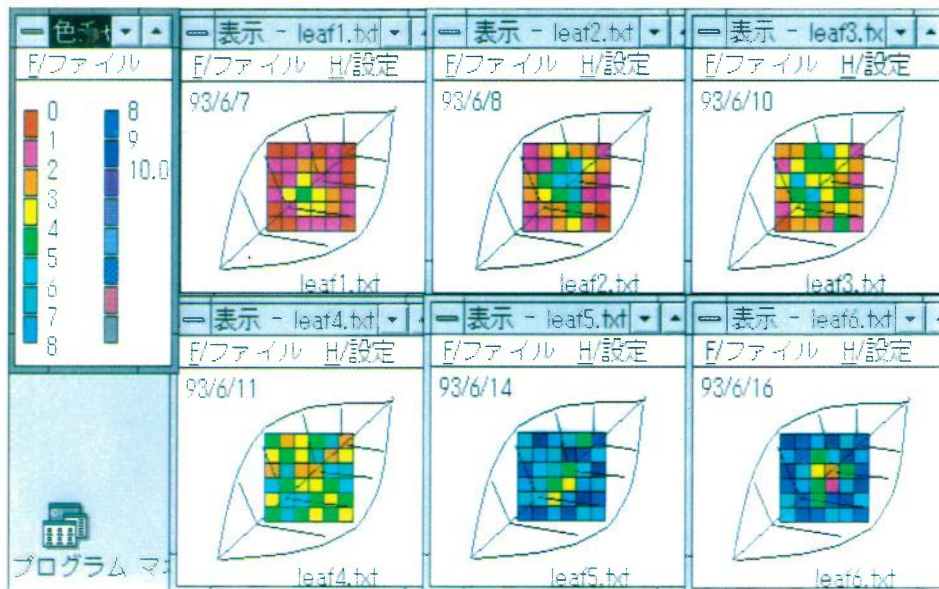
ドイツ及びイギリスにおける植物トランスポゾン研究の現状…………… 32

イネ組織培養における体細胞突然変異 (本文 1 ページ)



1. 復原個体の次代で分離して得られたイネ葉緑体突然変異体
左から, 対照, 黄緑, キサンサ×2 (致死), マキュラータ, 病斑葉, 横じま, アルビノ×2 (致死)
2. 草丈, 形態, 葉緑等の突然変異体, 3代目で固定している
3. 分離した穂長, 粒形, 種子稔性の変異体
4. 粒形および粒重の突然変異体, 赤印が対照の農林8号

組換え微生物モニタリングシステムの開発 (本文 14 ページ)



組換え微生物の動態モニター結果の表示 (等濃度分布)

1枚の葉を36区分に分け, 各区分に存在する微生物の濃度を色分けして表示してある

イネ組織培養における体細胞突然変異

農林水産省 農林水産技術会議事務局

大野清春

培養細胞においては様々な変異（体細胞突然変異）が誘発される。イネでも体細胞突然変異は、脱分化や継代培養の過程で高頻度に誘発され、種々の培養条件や培養期間により、突然変異スペクトラムや頻度に差異を生じ、また、復原個体中より農業形質の突然変異体が多数得られる。体細胞突然変異はゲノム、染色体、遺伝子、および細胞質のすべてのレベルで起き、放射線や化学突然変異誘発原より広い変異スペクトラムを示している。このような広範な突然変異の誘発の機構は遺伝情報の安定性と多様性の出現という生命現象の本質にも関わる極めて現代的な研究課題であり、また、育種的に新しい変異拡大手段として利用できる。実際に、イネ、トマト、ジャガイモ等でも品種育成がおこなわれており、細胞レベルでの育種技術として大量増殖、ウイルスフリー、胚培養、薬培養とならぶ“体細胞突然変異育種”技術として確立してきた事を示している。

1. はじめに

培養細胞においては成長、形態、栄養要求性などの様々な変異が観察され、また、継代培養により再分化能の失われる事も多い。イネ培養細胞からの復原個体中にアルビノや倍数体が出現する事は、植物体が初めて得られた1968年より報告された。さらに、イネの単一花粉起源のカルスからの復原個体の解析¹⁾、純系のイネ種子カルスからの復原個体の解析により、出現した多くの農業形質の変異が培養過程における突然変異である事が明らかにされ²⁾、その育種的利用の可能性が示された。

その後、多くの植物でも植物体の復原が容易になり、得られた植物体に種々の変異体が含まれている事が明らかとなり、これらは培養による変異として somaclonal variation と通称され広く関心をもたれるようになった³⁾。培養により出現する変異体には組織培養の after effect などによる生理的変異体と、有性生殖を経由しても遺伝する突然変異体（体細胞突然変異体）が含まれている。

体細胞突然変異は、脱分化や継代培養の過程で高頻度に誘発され、培地や種々の培養条件あるいは培養期間などにより、頻度あるいは突然変異スペクトラムに差異を生ずる。体細胞突然変異は、ゲノム突然変異、染色体突然変異、遺伝子突然変異、細胞質突然変異、閉鎖突然変異（ホモ突然変異）等に分類されて、DNA レベルでの解析も急速に進展しつつある^{4,5)}。

2. ゲノム・染色体突然変異

種々の植物培養細胞において染色体数や構造に変異が生じる事はよく知られている。イネの培養細胞においても異数性細胞が多く観察されており、たとえば、薬置床後55日で形成された花粉起源カルスの染色体数は 2,4-D または NAA により形成されたカルスのいずれも観察した70%以上の細胞で極めて大きな染色体数の変異を示した。この例のように培養細胞においては種々の倍数性や異数性が極めて短期間にも生じうる。多くの異数性細胞の出現は2倍体や、4倍体などの細胞での2-4極の不規則な核分裂や不分裂その他の染色体行動の異常とその倍加の繰り返しによ

り出現する。

このような培養細胞からの倍数体や異数体の復原は容易に推定され、実際に報告例も多い。イネ花粉カルスからの復原個体中には倍数体が多数出現し、半数体 (42%)、2 倍体 (46%)、3 倍体 (8%)、4 倍体 (1%)、異数体 (3%) が見いだされた¹⁾。また、5 倍体を得た例もある。カルスにおける異数性や半数性の細胞の頻度からみて再分化の過程で

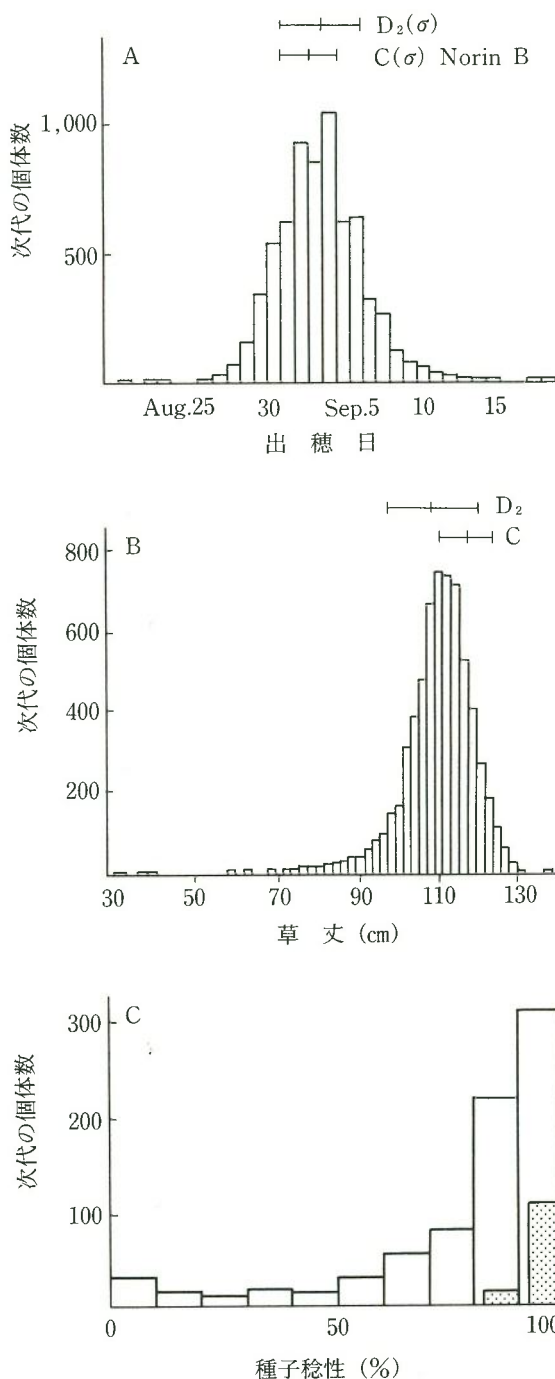


図1 イネカルスより復原した個体の次代における農業形質の変異

表1 遺伝的にホモの *Oryza sativa* 種子由来のカルスより分化した個体の次代D₂系統に観察された突然変異

変異した形質	系統数	%
正 常	214	28.1
倍数体 (4×)	12	1.6
種子稔性 (Fer.)	273	35.8
草丈 (Ht.)	19	3.5
出穂日 (Hd.)	3	0.4
形態 (Mor.)	1	0.1
葉緑体 (Ch.)	27	3.5
Fer. と Ht.	74	9.7
Fer. と Ht.	14	1.8
Fer. と Mor.	7	0.9
Fer. と Ch.	59	7.7
Ht. と Ch.	3	0.4
Ch. と Mor.	1	0.1
Fer., Ht. と Hd.	11	1.4
Fer., Ht. と Mor.	2	0.3
Fer., Ht. と Ch.	27	3.5
Fer., Hd. と Ch.	2	0.3
Fer., Mor. と Ch.	1	0.1
Fer., Ht., Hd. と Mor.	1	0.1
Fer., Ht., Hd. と Ch.	9	1.2
Fer., Ht., Mor. と Ch.	1	0.1
合 計	762	100

は2倍体が半数体に対し、また、2倍体や半数体が異数体に対し優位に立つ何らかの選抜が働いている事を示唆している。

3. 遺伝子突然変異

a. 農業形質

培養細胞における農業形質の突然変異の頻度を明らかにするため、農林8号の純系種子75粒のカルスより1121個体を得て、当代約800個体およびその次代、三代で、出穂期、草丈、形態、種子稔性について調査した。当代において種子稔性が80%以下に低下した個体の頻度は59%と高く、また、次代では葉緑体変異は8.4%と放射線処理に匹敵する高頻度で突然変異体 appeared。早生、晩生両方向の変異が誘発されており、14日早生、あるいは14日以上晩生変異体 が得られた (図1)。さらに、次代集団の草丈は低い方へ偏り、短稈突然変異が多く誘発されていた。しかし、20%長稈となった突然変異体も得られている。次代で分離して出現した変異体の一

部については対照との交雑実験により劣性の遺伝子突然変異である事が明らかにされた。調査5形質について正常な次代系統は28%のみであり2形質異常の変異が重複して誘発されている系統も多かった(表1)。育種的にも有用な突然変異体も多く得られ容易に固定系統としても得られた(口絵1,2,3,4参照)。

培養の過程で同一細胞あるいはカルス内で次々と変異が誘発されており、平均して分化個体一個体あたり1.1の変異が誘発されていた²⁾。この事は他の解析されていない生理・生化学的形質にも高頻度の突然変異が誘発されていると考える事が自然であろう。

b. DNAにおける突然変異

DNAレベルの変異に関しては、アルコール脱水素酵素遺伝子で塩基置換による変異が検出されている。イネではLörzらのグループが⁶⁾、アクチン、ATP/ADPトランスポーター、蔗糖合成酵素などハウスキープ遺伝子や構造遺伝子をプローブにして、培地条件や培養期間による復原個体における遺伝子構造への変異に対する影響を調べた。復原個体ではいずれの遺伝子においてもDNAの変異が生じていた。基礎培地の種類や2,4-D濃度の差異はこれら遺伝子のRFLPパターンの変異出現には関係しなかった。そして、遺伝子構造変異はカルス誘導期や増殖時に高く再分化過程では低下した。1個のカルスから由来するカルス間においても、これら遺伝子に多くのRFLPパターンの差異が見られ、カルス自身がすでに遺伝的にモザイク状態である事が示された。また、培養期間の長さによっても変異が増大し、イネアクチン遺伝子においては28日および67日間培養したカルスからの復原個体を比較したところ、それぞれ6.3%および23%のRFLPの変異が見られた。

c. コピー数の変動

培養過程においては遺伝子の構造上の変化のみならず、コピー数の増加や減少がみられる。Kikuchiら⁷⁾はイネの胚から1.7kbと1.4kbの*Bam* HIの反復配列をクローン化し、それぞれpRB 301とpRB 401というクローンを得た。これらのDNAをプローブと

して、脱分化や再分化過程でのコピー数の変動を調べたところ、pRB 301は胚の時期に100コピー程度であったものが、カルス段階には5000コピーに増加し、一方、pRB 401では10000コピーあったものがカルス過程では1-5コピーに減少する事を見いだした。また、両配列のコピー数の変動は、脱分化、再分化過程で可逆的であった。塩基配列およびサザン解析によりpRB 401の起源はイネ葉緑体DNAのリボソームタンパク質S12の3'末端およびS7遺伝子の部分が核DNAに転移した結果に基づく事が示された。Zhengら⁸⁾も同様にイネ培養細胞からカルスでコピー数が増加するクローンを得た。カルスでコピー数の増幅する4.5kbの*Bam* HIの反復配列が45kbの長さを単位とする染色体外の環状DNAの一部として挙動している事が、パルスフィールド電気泳動やエキソヌクレアーゼへの耐性により明らかにされた。この45kbの環状DNA中には7kbを単位とする直列型の反復配列が数コピー並んで配列しており、これら環状DNAの全DNAに対する割合は培養過程でほとんど変化せず一定であり、約1%程度であった。

d. DNAのメチル化

DNAのメチル化は遺伝子の発現調節の一つの機構として働き、発生や分化の過程で細胞の一部染色体領域を不活性化させている事が知られている。Brown⁹⁾およびMullerら⁶⁾は、培養によって生じた体細胞突然変異をしめすトウモロコシおよびイネの復原植物では、アクチン遺伝子や蔗糖合成酵素遺伝子が種子由来の植物体に比較して、顕著にメチル化を受けている事を見いだした。これら遺伝子のメチル化は培養過程で生じるRFLPによって検出される遺伝子の構造変化の頻度にも相関関係がある事から、メチル化が体細胞突然変異の一要因と考えた。Tanakaら¹⁰⁾はDNAのメチル化と分化との関係についてプロトクローンをういイネ全DNAレベルでの5-メチルシトシンの差異について解析した。5-メチルシトシンの量は分化可能なカルスと分化能を失ったカルスにおいて差異はなく、

また、プロトクローンとそれより分化した植物体の葉におけるレベルとも差異はなかった。カサの DNA のメチル化のレベルは 5-アザシチジン処理によっても有意に低下し、また、カサが古くなるにつれメチル化は高まるなど生理的条件により大きく変動する事が明らかにされた。培養によるメチル化の変動は他にも報告があるが、メチル化された部位が DNA の再編成のホットスポットになるのか、また培養過程で生じた DNA 再編成を受けた部位が不活性であるためメチル化を受けるのかは今後の研究を待つ必要がある。

e. トランスポゾン

トウモロコシやタバコでは培養過程でトランスポゾンが活性化され染色体の他の部位に移行する事が報告されている。Hirochika¹¹⁾はイネにおいてレトロポゾンが培養により活性化されるかどうか 2 個の新しいレトロポゾンファミリー (Tos 17, Tos 18) を用い解析した。Tos 17 のサイズは 4.3kb であり、培養細胞でのみ転写産物が見いだされコピー数も増加した。また復原植物や遺伝子を導入した植物においても同様にコピー数が増加する事を明らかにした。またトランスポゾンが遺伝子の open reading frame 中に転移した例も見いだした。体細胞突然変異誘発の一因とも考えられるトランスポゾンと形質変異との関連をより明確にしていく必要がある。

4. 細胞質突然変異

単一種子由来のプロトクローン (コロニー形成後 1 カ月) の DNA に対し葉緑素 DNA をプローブとして解析したところ、このような培養初期では葉緑素ゲノムは安定していた。一方、継代期間 11 年の単一種子由来のプロトクローンおよび 8 年の単一花粉由来のプロトクローンについて同様に解析したところ、種子プロトクローンでは 100% が、また、花粉プロトクローンでは 70% のクローンで葉緑体ゲノムが部分的に欠失しており、10 種類の欠失パターンが確認できた¹²⁾。

同様にミトコンドリアゲノムについてもミ

トコンドリア DNA をプローブとして解析したが、67% で欠失を起こす領域がみられた。誘導初期のカサでは欠失は起こらず長期培養細胞ではゲノム上のほとんどの領域でゲノムの再編成が起こる事が示された¹³⁾。

単子葉植物の薬培養ではアルビノ個体が時には数 10% という高頻度に出現する。Harada¹⁴⁾らはイネの薬培養によって得られたアルビノの葉緑素 DNA をサザン法によって解析したところ、7 系統では葉緑体ゲノムが広範に欠失しており、これらのアルビノは葉緑体 DNA の欠失突然変異である事が示された。しかしながら、他の 13 系統のアルビノでは欠失は検出されなかった。このようなすべての葉緑体遺伝子をそなえているアルビノが多数存在することから、Maruta¹⁵⁾らはイネ薬培養アルビノ個体における葉緑体遺伝子の発現抑制を転写レベルで解析した。葉緑体リボソームタンパク質 L2 遺伝子 (*rpl 2*) をプローブとした時に 2.7kb の RNA がアルビノ特異的かつ大量に蓄積している事を見いだした。葉緑体遺伝子の転写は単一プロモーターによる隣接する複数遺伝子の共転写 (ポリシストロニック) であり *rpl 2* が 2.7kb の転写単位に含まれている事から、アルビノで蓄積する RNA は転写直後の前駆体 mRNA であることを RT (逆転写) - PCR 法を用い解析をした。その結果、アルビノにおいては *rpl 2* のイントロンのスプライシングが行われず、そのため、成熟 mRNA およびタンパク質が合成できずアルビノとなり、また、前駆体 mRNA (2.7kb) が大量に蓄積する事が示された。この現象の頻度は解析したアルビノの 96% に達した事から、薬培養のアルビノの主要な原因はスプライシング変異であるといえる¹⁴⁾。

5. 閉鎖突然変異 (ホモ突然変異)

種子由来カサから復原した植物体当代 (約 3000 個体) の中に 1.8% の頻度で短稈形質を保持したホモ突然変異体が得られた。このホモ変異形質は少なくとも 8 世代は安定して

遺伝した。ところが、他の正常な品種、あるいは通常のメンデル遺伝をするモチ遺伝子や短稈細葉系統との正逆交雑で得られた F_1 , F_2 , F_3 , F_4 においてはいずれも変異形質（短稈）は消失した。このような遺伝的特性をしめす突然変異体は複数の品種で得られ、ホモ突然変異体間での正逆交雑では、短稈の突然変異形質は F_1 , F_2 , F_3 世代で安定していた¹⁵⁾。ホモ突然変異の遺伝様式は Holliday (1987) が提案した DNA のメチル化による Epimutation に似ている¹⁶⁾。そこでカルスと植物体のメチル化の差異および 5-アザシジン処理によるメチル化の差異と生長について比較したが有意な差異は認められなかった。非メンデル遺伝を示すホモ突然変異は脱分化・再分化の過程での DNA のメチル化あるいは脱メチル化による遺伝子発現の修飾ではないといえる。このような特定の突然変異体間でのみ遺伝する遺伝現象は閉鎖遺伝と名付けられた。通常の突然変異と違った強い発現調節機構が長期間遺伝する事は全く知られていなかった現象であり、今後その分子機構を明らかにしていく必要がある。

6. 体細胞突然変異の生成機構

体細胞突然変異が脱分化過程に誘発され、その出現頻度が培養期間に依存することが、ゲノムおよび染色体の構造、表現型（遺伝子レベル）、あるいは分子レベルでの解析から明らかにされてきた。このような広範な突然変異の誘発の機構は遺伝情報の安定性と多様性の出現という生命現象の本質にも関わる極めて現代的研究課題といえる。突然変異の生じる機構として、培養過程でトランスポゾン（転移因子、反復配列）の活性化が示唆されている。また、培養によって活性化される Ac エlement ではメチル化がはずれ、活性化されなかった Ac エlement では強くメチル化されている事から、メチル化の変化が関与しているという考えもある。一方、植物細胞の脱分化に使われるオーキシンが細胞のホメオスタシスに種々の障害を与える結果、

DNA の修復、複製あるいは遺伝子の発現に影響し、DNA（染色体）の切断、転座などゲノムレベルでの再編成を含めた体細胞突然変異を生じる事も十分考えられる。その際に、閉鎖突然変異で特定形質に関与する遺伝子がホモで抑制されたり、アルビノのサプライシングに関する変異のようにサプライシング酵素遺伝子がホットスポットとなる事から遺伝情報制御機構の一部にホットスポットがある事も考えられる⁵⁾。今後さらに分子レベルでの解析を進める事が必要であり、それによって突然変異の制御技術開発も可能となろう。

7. 体細胞突然変異育種

以上に示したように、脱分化させたイネ培養細胞は遺伝的に不安定であり、復原個体は正常なもの他に何らかの突然変異が誘発されているものも多い。ところで、細胞レベルでの育種は変異の拡大、選抜、固定等を、既存の個体レベルでの育種システムよりも効率的に行う事により成立する技術である。体細胞突然変異はゲノム、染色体、遺伝子、および細胞質のすべてのレベルで起き、放射線や化学突然変異誘発原より広い変異スペクトラムを示している。そして、遺伝子突然変異により、変異の幅も広がり、農業上有用な特性も多数出現する。したがって、体細胞突然変異は育種的にみて新しい変異拡大手段といえる。この突然変異の頻度は、培地条件を変える事により、増減できる可能性も示されている。実際に、イネにおいても品種・系統の育成が報告されつつある。紋枯病抵抗性の中間母本¹⁷⁾、ハイブリッド育種の素材としての細胞質有性不稔系統¹⁸⁾あるいはプロトクローンからの品種“はつあかね”、“初夢”、“夢かおり”の育成がなされている。また、トマト、ジャガイモ等でも品種育成がおこなわれている。この事は体細胞突然変異の利用が細胞レベルでの育種技術として大量増殖、ウイルスフリー、胚培養、薬培養とならぶ“体細胞突然変異育種”技術として確立してきた事を示している。

文 献

- 1) 大野清春 (1975) 農技研報告, D 26 : 139-222
- 2) Oono, K (1978) *Trop. Agric. Res. Series*, 11 : 109-123
- 3) Larkin, P. J., Scowcroft, W. R., (1981) *Theor. Appl. Genet.* 60 : 197-214
- 4) 大野清春 (1985) 植物培養細胞の変異と選抜, pp.111-177 講談社
- 5) Oono, K., (1991) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 14, Rice, pp.285-303, Springer-Verlag
- 6) Muller, E., Brown, P. T. H., Hartke, S., Lorz, H., (1990) *Theor. Appl. Genet.* 80 : 673-679
- 7) Kikuchi, S., Takaiwa, F., Oono, K., (1987) *Mol. Gen. Genet.* 210 : 373-380
- 8) Zheng, K. L., Castiglione, S., Biasini, M. G., Biroli, A., Morandi, C., Sala, F., (1987) *Theor. Appl. Genet.* 74 : 65-70
- 9) Brown, P. T. H., (1989) *Genome*, 31 : 717-729
- 10) Tanaka, Y., Oono, K., (1993) *J. Plant Res.* 106 : 351-355
- 11) Hirochika, H. et al. in preparation
- 12) Fukuoka, H. et al. submitted
- 13) Kawata, M. et al. submitted
- 14) Maruta, I. et al. submitted
- 15) Oono, K., (1985) *Mol. Gen. Genet.* 198 : 377-384
- 16) Holliday, R., (1987) *Science*, 238 : 163-170
- 17) Xie, Q. J., Linscombe, S. D., Rush, M. C., Jodari-Karimi, F. (1992) *Crop Science*, 32 : 507
- 18) Ling, D. H., Ma, Z. R., Chen, M. F., Liang, C. Y., He, B. S., (1991) *Acta Genetica Sinica* 18 : 132-139



アグロバクテリウムによるイネの高効率形質転換¹⁾

日本たばこ産業株式会社
遺伝育種研究所

神代 隆

アグロバクテリウムによる形質転換法は双子葉植物に適用可能とされてきたが、供試組織の選択、ベクターの改良などにより、アグロバクテリウムによって高い効率で単子葉植物のイネへの遺伝子導入が可能であることが明らかになった。得られた多数の形質転換体についてサザン分析、後代への遺伝およびT-DNAのボーダー配列を調査した結果、目的遺伝子がイネのゲノムに安定的に組み込まれていることが確認された。

1. はじめに

外来遺伝子の植物への導入が内外の数多くの研究室で試みられている。目的とする遺伝子が単離できれば、対象の植物種あるいは品種に導入し形質転換体を得るという操作が必要になる。*Agrobacterium tumefaciens*のTiプラスミドが植物へ遺伝子を導入する際ベクターとして使用できることが明らかになって、植物の遺伝子組換えの道が開け、それ以来、タバコ、ジャガイモ、ナタネなどの双子葉植物では、方法の多少の差異はあるものの、Tiプラスミドをベクターとした形質転換法が一般的に用いられている。

病原菌としてのアグロバクテリウムの宿主範囲は、主として双子葉植物であることから、一部の例外的な植物種を除いた単子葉植物には、この形質転換法は適用できないとされてきた。したがって、主要な穀類であるイネ、コムギ、トウモロコシなどの単子葉植物にはエレクトロポレーション法やパーティクルガンによる方法が用いられている。

近年、アグロバクテリウムを用いてイネ、トウモロコシなどの単子葉植物への外来遺伝子導入が試みられ、抗生物質抵抗性カルスの

獲得、GUS遺伝子の発現、さらには個体の再生などが報告されている。しかし、このような報告は必ずしも、アグロバクテリウムが単子葉植物を安定的に形質転換したとはみなされない。Potrykus²⁾は、これらの報告では、1) アグロバクテリウムの付着による形質発現の可能性、2) 内在微生物の形質転換による発現の可能性が完全には否定できないことを指摘している。

したがって、アグロバクテリウムによる単子葉植物の安定的形質転換を証明するためには、バクテリアで発現しない遺伝子の使用を前提として、1) 形質転換体ごとに異なったゲノムの位置への外来遺伝子の導入の確認、2) 後代への導入遺伝子の伝達、3) 後代での導入遺伝子と期待される形質発現の完全な相関の確認、4) T-DNAのボーダー配列の確認が必要である。

私たちはアグロバクテリウムを用いたイネの形質転換を試みてきたが、このたび、上述のすべての基準を満たすイネの形質転換体を得たので、以下に、方法の概要、得られた形質転換体の特性などを紹介する。

2. 強病原性アグロバクテリウムの利用

アグロバクテリウムにはさまざまな菌系が存在するが、その中でA 281はその強病原性

に基づく広宿主範囲に関して注目されている。A 281 から T-DNA を除去した菌 EHA 101 が開発されており、種々の植物の形質転換に活用されている。この菌が持つ Ti プラスミド、pTiBo 542, の vir 領域に関しては詳細な分子解析がなされ、強病原性をもたらす領域は virB, G であると特定されている。私たちは、この vir B, G を含む断片を T-DNA を持つプラスミドの中に配置したバイナリーベクターを作出し、スーパーバイナリーベクターと名付けた。このベクターが高い形質転換効率を示すことはすでにトマトなどの植物において報告したとおりである³⁾。イネの形質転換ではこのスーパーバイナリーベクターの他に通常のバイナリーベクターを用いた。また、アグロバクテリウムとして EHA 101 と双子葉の形質転換で最もよく用いられている LBA 4404 を用いた。したがって、2 種のベクターと 2 種の菌による 4 種の組み合わせを比較検討したことになる。その結果、LBA 4404 と組み合わせたスーパーバイナリーベクターが高い遺伝子導入効率を示し、EHA 101 と通常ベクターの組み合わせがそれについて良い結果を示したので、以下の項では、これら 2 種の組み合わせを用いて得られた結果を中心に詳述する。

3. 方法の概要

1) 外植片の種類と感染特性

ハイグロマイシン抵抗性 (hpt) と GUS 遺伝子をそれぞれ 35S プロモーターの下流に配置した遺伝子を T-DNA 部分に挿入したベクターを用いた。なお、GUS の構造遺伝子中にはヒマのカタラーゼ遺伝子のイントロンを配置し、バクテリア内部でこの遺伝子が発現しないようにデザインしてある。

アグロインフェクションなどの初期の試みでは生長点組織が主として用いられていたもので、まず、さまざまな植物組織を用いてアグロバクテリウムの感染性を調査した。芽生えの生長点、幼根、胚盤、未熟胚、胚盤カルス、懸濁培養細胞など分裂活性の高い組織を選定

した。

それぞれの組織にアグロバクテリウムを感染させ、除去した直後に GUS アッセイ (青色に発色する基質を利用) をおこなって、青色スポットの出現頻度を指標に最適組織を選定した。根の切片以外のすべての供試組織で GUS 発現が認められた。青色スポットが最も高い頻度で見られたのは胚盤由来のカルスであり、生長点組織、未熟胚がこれについだ。

2) 抵抗性カルスの選抜

GUS の一過性発現が見られた組織をハイグロマイシンを含む選択培地に移して、抵抗性カルスの増殖の有無を調査したところ、増殖が認められたのは胚盤カルス、懸濁培養細胞、未熟胚のみであった。これらの増殖部位ではすべて GUS 発現が認められたことから、形質転換が成立している可能性が高いと考えられる。

3) 抵抗性カルスからの個体再生

もっとも高頻度で抵抗性カルスの増殖が見られた胚盤カルスを以降の実験に使用した。選択培地で増殖した細胞塊を個体再生用培地に移植し、再生個体を得た。再分化個体の一部から葉片を採取し、GUS 発現を検定したところ、ほとんどの個体が濃い青色に染色された。

4. 形質転換効率、形質転換体の特徴

形質転換効率を正確に評価することは難しいが、ここでは、アグロバクテリウムと共存培養するカルス片の数を分母とし、ハイグロマイシン抵抗性で GUS 陽性の個体を再生させた抵抗性カルス数を分子として、発現形質転換効率を推定することにしたい。これまで用いたイネ品種 (月の光、朝の光、コシヒカリ) いずれにおいても 20% 前後という高い効率で形質転換体を得られている。日本稲品種のなかではコシヒカリは培養が容易とは言い難いが、この品種でも他の品種と同等の形質転換効率を示したことは注目される (表-1)。

多くの形質転換実験が目標とするのは、目的遺伝子の存在以外については元品種と同等

な特性を示す個体の作出であろう。したがって、抵抗性カルスから高率で再生個体を得たとしても、それらが形態異常や不稔性を示した場合、全体としての形質転換効率は低くとどまることになる。この形質転換法の真の効率を推定するために、形質転換体を温室で栽培し形態の諸特性を評価した。これまで調査した個体はすべて正常な形態を示し、4倍体や異数体などの変異体は見られていない。さらに、稔性に関しても、低頻度で低い種子稔性を示す個体が出現したものの、約75%の個体が正常な結実率（80%以上）を示した。

5. 安定的形質転換の証明

1) 異なったゲノムサイトへの導入の証明

再生個体からDNAを抽出し、*Hin* d IIIで処理した後サザン法によって、目的遺伝子のイネゲノム中への組み込みを調査した。プローブとしては *hpt* あるいは *GUS* 断片を用いた。なお、T-DNA 領域には *Hin* d III 認識部位が1カ所のみ存在するので、異なった形質転換体間では、異なったハイブリダイゼーションパターンを示すことが予想され、同時に導入遺伝子のコピー数を推定することも可能である。12の独立な形質転換体を分析したところ、同一カルスから再生したクローンは同一のパターン、そして、独立の形質転換体は異なったパターンを示した（図-1）。また、いずれのシグナルも、アグロバクテリウムが付着した場合に予想されるシグナルのサイズとは異なっていた。これらのことは、目的遺伝子がイネゲノムにランダムに導入されていることを強く示唆している。

2) 自殖第1代での発現形質の分離比

形質転換体の自殖種子でのハイグロマイシン抵抗性と *GUS* 発現の分離状況を20の独立な形質転換体について調査したところ、15個体が両形質とも1因子分離に適合する分離比を示し、残りは2因子分離と思われる分離比を示した。一部の系統のS1個体について上記と同様なサザン分析を行った結果、分子レ

表1 スーパーバイナリーベクターでの形質転換効率

品 種	実験	カルス数			形質転換効率 (B/A, %)
		共存培養 (A)	HPT抵抗性 ¹⁾ カルス	HPT-R, GUS ²⁾ 再分化個体 (B)	
月の光	1	42	20	12	28.6
	2	112	35	15	13.4
	3	64	48	18	28.1
	4	65	29	13	20.0
	5	45	18	7	15.6
	6	88	24	16	18.2
朝の光	1	86	19	11	12.8
	2	77	23	15	19.5
コシヒカリ	1	74	16	13	17.6
	2	138	34	26	18.8
	3	215	49	40	18.6

注) 1) アグロバクテリウムと共存培養したカルスの中でハイグロマイシン培地で増殖したカルス数

2) アグロバクテリウムと共存培養したカルスの中で選抜条件で再分化したカルス数

ベルでの導入の遺伝子分離が観察され、この結果はそれぞれの個体での目的遺伝子の発現と完全に一致した。

3) 左右のT-DNA ボーター配列の確認

タバコなどをアグロバクテリウムで形質転換した場合、T-DNA の両側の25bpのボーター配列でT-DNA が切断されて植物細胞

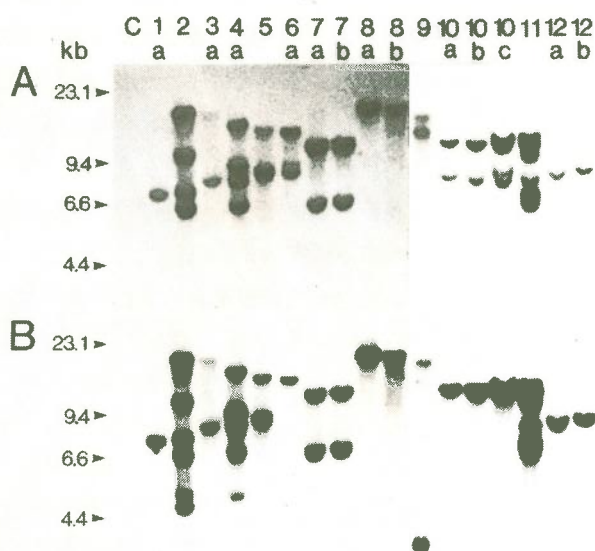


図1 サザン法による形質転換体当代での導入遺伝子の確認

A: HPT遺伝子をプローブとした, B: GUS遺伝子をプローブとした。レーンの数字は形質転換体を示す(同じ数字で異なるアルファベットは同一カルス由来のクローン), C: 対照(非形質転換体)

へと導入されることが明らかになっている。この実験で得られたイネの形質転換体にどのような形態でT-DNAが挿入されているのかを詳細に調べるために、いくつかの形質転換体で、T-DNAの左右端の塩基配列を決定した。その結果、右端領域については、1個体でタバコで報告されているのと同じ塩基で切断されており、2個体についてはタバコの場合より2塩基多く同一の配列が観察された。一方、左端領域での切断部位は右に較べても変動するとの報告が多いが、イネでも、左ボーダーの内部の異なる部位で切断されていることが明らかになった。これらの結果は、イネでも、双子葉植物の場合と同様のメカニズムでアグロバクテリウムによってT-DNAが植物の染色体へと移行することを示唆している。

6. おわりに

形質転換体間での異なった導入位置、次世代での形質発現、そして導入遺伝子の存在と形質発現との相関、T-DNAのボーダー配列の確認などの結果から、形質転換体と思われる個体で見られた外来遺伝子の発現は、アグロバクテリウムの付着などによってもたら

されたものではなく、イネゲノム中に安定的に組込まれた遺伝子の発現によるものであると結論できる。

イネの形質転換法としては、プロトプラストへのエレクトロポレーション、最近ではパーティクルガンが広く用いられている。したがって、アグロバクテリウム法がイネへも適用可能であることが明らかになったことでイネの形質転換法の選択肢が一つ増えたことになる。これまでの結果から明らかになっているこの方法の特徴を挙げるならば、稔性のある正常個体を高率で獲得できること、ゲノムへ導入される外来遺伝子の再編成が少ないことである。今後、さらに多くの個体を解析し、これらの点を確認することとしたい。

文 献

- 1) Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) *Plant Journal* (in press)
- 2) Potrykus, I. (1990) *Bio/tech.* 8: 535-542
- 3) Saito, Y., Komari, T., Masuta, C., Hayashi, Y., Kumashiro, T. and Takanami, Y. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 83: 679-683



昆虫の抗菌性タンパク質，カイコセクロピンB による植物病原細菌の増殖抑制

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所
生体防御研究室

門野敬子・山川 稔

昆虫の抗菌性タンパク質は、細菌の侵入が起こった後、短時間のうちに数種類が一括して合成誘導される。カイコ幼虫に大腸菌を注射した後に得られる免疫体液を用いて、各種植物病原細菌の増殖抑制効果を調べたところ、非常に有効であった。そこでこの因子を特定するために、代表的な昆虫由来抗菌性タンパク質の1つであるセクロピンに的を絞り、カイコセクロピンBを人工合成して同様に効果を調べた。結果は良好で、カイコ体液の場合と傾向が一致しており、セクロピンBがカイコ免疫液中の主要な抗菌因子であることがわかった。セクロピンなど昆虫由来抗菌性タンパク質遺伝子の植物への導入による細菌病抵抗性付与の可能性が示された。

1. はじめに

生物は体内に細菌などの異物が侵入したときに、それを排除して身を守る“生体防御機構”を備えているが、昆虫は脊椎動物に存在するような抗原-抗体反応による免疫系を持たない。昆虫の生体防御機構は血球による異物捕食や包被化などの細胞性防御反応と、フェノールオキシダーゼ活性化系によるメラニン化、リゾチーム、レクチンや複数の抗菌性タンパク質による液性防御反応から成っている。昆虫の抗菌性タンパク質は、これまでに15種以上の昆虫からの報告があり、分析技術の向上によって今後さらに多くの昆虫から新たな種類のものが見つかる^{1,2)}と期待される。

昆虫の抗菌性タンパク質は、大きく分けて3つの種類に分類される。1) セクロピン (Cecropin) 型；分子量約4kDaで、部分的なアミノ酸配列の違いにより複数種類が存在する。セクロピアサン、カイコ、サクサン、ツェツェバエなど種々の昆虫から分離されており、セクロピンに類似するものとしてザルコトキシシンI (センチニクバエ)、アンドロ

ピン (ショウジョウバエ)、バクテリシディン (タバコスズメガ) などがある。タンパク質分子中にジスルフィド結合はなく、熱耐性である。2) アタシン (Attacin) 型；セクロピンと異なり分子量が約9-28kDaと大きい、分子内にジスルフィド結合はない。セクロピアサン、タバコスズメガ、カイコ、ツェツェバエで報告があるほか、これに類似するものとして、ザルコトキシシンII (センチニクバエ)、ディプテリシン (センチニクバエ、ハエの1種、ショウジョウバエ) がある。3) 昆虫デフェンシン (Insect defensin) 型；デフェンシンはもともと脊椎動物の白血球の細胞内顆粒から発見された抗菌性タンパク質であるが、ゴミムシダマシ、ハエとヤンマの1種およびネッタイシマカからもそれぞれ類似のものが分離された。分子量約4kDaと小さいが、システイン残基を6個持ち、ジスルフィド結合によるタンパク質の折り畳み構造が存在する。ほかにザーペシン (センチニクバエ)、ロイヤリシン (セイヨウミツバチ) が類似している。上記3種類のいずれにも属さないものとして、アバエシン、アピダエシン、ヒメノプタエシン (セイヨウミツバチ)、ザルコトキシシンIII (センチニクバエ)、コレオプテリシン (ゴミムシダマシの2種)、ド

ロソシン（ショウジョウバエ）などがある。当研究室においても種々の昆虫を用いて新規の昆虫由来抗菌性タンパク質の探索を行っている。

昆虫の抗菌性タンパク質は、体表の傷や細菌の侵入が起こった後、短時間のうちに一過的に合成が誘導される。おもな合成部位は脂肪体と血球細胞であり、多種類の抗菌性タンパク質やレクチン、リゾチームなどが一括して誘導される点特徴的である。私達の研究室ではこのような刺激応答と遺伝子の発現機構についての基礎的な研究と並行して、昆虫の特異機能を利用することを目指した研究も進めており、その1つが昆虫の抗菌性タンパク質遺伝子を植物に導入して、病気に強い形質転換作物を作出することである。

2. カイコ免疫体液の抗菌活性

数年前に私達の研究室では、カイコ幼虫に大腸菌を注射した後、採取した体液（免疫体液）の加熱上清を植物病原細菌の培養液に加え、細菌に対する増殖抑制効果を調べた³⁾。その結果、果樹・野菜等の根頭がんしゅ病菌、トマトかいよう病菌、野菜等の軟腐病菌、レタス腐敗病菌、イネもみ枯細菌病菌、ナス科野菜等の青枯病菌、クワ縮葉細菌病菌、アブラナ科野菜の黒腐病菌、イネ白葉枯病菌、の9種類（学名は表1を参照）のうち、イネもみ枯細菌病菌、青枯病菌を除く7種類で効果が見られ、免疫していないカイコ体液を加えた場合に比べ85～95%増殖が抑えられた。カイコを大腸菌で免疫したことによって、体液中に誘導されてきた物質が植物の病原細菌に対しても有効に働くことが明らかとなった。

3. 合成カイコセクロピンBの抗菌活性

カイコの免疫体液に植物病原細菌の増殖を抑制する因子が存在することは明らかになったが、この段階では因子の同定までには至らなかった。そこで私達は、この因子がどのような物であるのかを調べる実験に着手した。

チョウやガなどの鱗翅目昆虫では、血液中に誘導されてくる抗菌性タンパク質の主なものはセクロピンとアタシンである。セクロピン類の抗菌スペクトルは幅広く、特にA、B型はグラム陰性および陽性の両方の細菌だけでなく、マラリア原虫に対しても効果のあることが知られており、バクテリアの原形質膜にイオノフォアのように作用して最終的には細胞壁を破壊する。一方、アタシンやデフェンシンの抗菌スペクトルは狭く、静菌的であったり、細菌の増殖ステージによって影響を受ける⁴⁾。そこで、すでに報告されているカイコセクロピンBのアミノ酸配列および当研究室でクローニングしたカイコセクロピンBcDNAの塩基配列⁴⁾をもとに、天然型と同じペプチドを人工合成した。カイコセクロピンBは37個のアミノ酸（RWKIFKKIEKM-GRNIRDGIVKAGPAIEVLGSAKAIGK）からなり、N末端側半分は親水性で塩基性アミノ酸に富んでいるのに対して、C末端側半分は疎水性で全体としては両親媒性であり、 α -ヘリックス構造をとっている。カイコ体液中にはC末端がアミド化されたものと、そうでないものが存在している。そこで両者をそれぞれ合成し、大腸菌と黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を細菌増殖阻止円法により確認した（図1）。新鮮な大腸菌または黄色ブドウ球菌の培養懸濁液を寒天培地に加えてプ

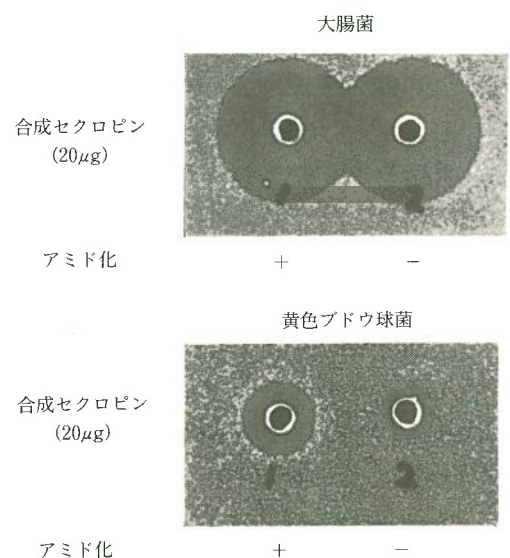


図1 合成カイコセクロピンBの増殖阻止円

レートを作製し、ゲルパンチャーで穴を開けて、ここへ抗菌活性を調べたい試料を滴下し、37°Cで1晩静置する。すると寒天中の菌が増殖して一様に白濁するが、試料中に抗菌活性があると、試料が浸透した部分に抗菌活性に応じた菌の増殖しない透明な増殖阻止円が出来る。大腸菌に対してはアミド化の有無で差がなく、黄色ブドウ球菌では差が見られ、合成セクロピンが正しく生物活性を持つことが確認された。以下の実験ではアミド化セクロピンBを用いて各種植物病原細菌に対する増殖抑制効果を調べた。それぞれの植物病原細菌の培養系に合成セクロピンを0~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の各種濃度となるように加え、25°Cで1~2日間培養後、600nmの波長で吸光度を測定した。これにより、50%有効阻害濃度を算出し、各種植物病原菌について比較した(表1)。結果は、カイコ体液を添加した場合と全く同じ傾向で、イネもみ枯細菌病菌、ナス科野菜等の青枯病菌に対しては効果がなく、今回新たに加えた麦類の黒節病菌をはじめとするその他の菌に対しては非常に有効であることがわかった。このことは、カイコセクロピンBがカイコ体液中の主要な抗菌性因子であることを示している。

4. おわりに

カイコの抗菌性タンパク質セクロピンBが、植物の病原細菌に対しても有効に働くことが明らかとなった。現在アメリカでは、セクロピアサンのセクロピンA, Bおよびアタシンを用いて、またこれらのアミノ酸配列を改変して、より殺菌活性の強いものを作り出し、これらの遺伝子をタバコ⁵⁾やリンゴ⁶⁾に導入して、細菌病抵抗性の高められた植物体を得ることに成功している。

植物の病虫害抵抗性の付加を外来遺伝子の導入により行った例としては、植物病原ウイルスの外被タンパク質遺伝子、真菌類や昆虫の外表面キチン質を分解する酵素であるキチナーゼの遺伝子、また昆虫の病原細菌である*Bacillus thuringiensis*の結晶毒素タンパク

表1 各種植物病原細菌に対する合成カイコセクロピンBの抗菌活性

細菌	50%有効増殖阻害濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> N1001 ^a	0.4 ± 0.0
<i>Clavibacter michiganense</i> pv. <i>michiganense</i> N1044 ^b	3.1 ± 0.3
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> N1393 ^c	4.2 ± 0.7
<i>Pseudomonas cichorii</i> NL7630 ^d	1.7 ± 0.5
<i>Pseudomonas glumae</i> N1169 ^e	> 50
<i>Pseudomonas solanacearum</i> N1023 ^f	> 50
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i> S6804 ^g	2.1 ± 0.7
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>japonica</i> N1072 ^h	0.5 ± 0.0
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> N1076 ⁱ	1.8 ± 0.5
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i> N1086 ^j	1.8 ± 0.2

a 果樹・野菜等の根頭がんしゅ病菌, b トマトかいよう病菌, c 野菜等の軟腐病菌, d レタス腐敗病菌, e イネもみ枯細菌病菌, f ナス科野菜等の青枯病菌, g クワ縮葉細菌病菌, h 麦類の黒節病菌, i アブラナ科野菜の黒腐病菌, j イネ白葉枯病菌

質遺伝子を組み込んだものなどが知られている。これらに続いて、昆虫抗菌性タンパク質遺伝子の導入は複数の病原細菌に効果があるものとして期待される。

昆虫の抗菌性タンパク質の利用の1つとして、遺伝子組換えによる細菌病抵抗性作物の作出の可能性が提案されたわけであるが、その他にもカンジダ菌やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)などの医学上重要な菌に対して有効な抗菌性タンパク質が昆虫から発見されたことから、医薬品としての利用も期待されている。これには培養細胞や実験動物などで安全性を十分に検討せねばならない。これは植物への遺伝子導入においても同様で、その抗菌活性にのみ注目するだけでなく植物自体への影響や組換え植物を摂取した場合の人体への影響も考慮に入れねばならず、プロトプラストや動植物での調査が必要である。これには多量のタンパク質が必要となるが虫体では微量しか作られず、また人工合成には経済的な面からも困難がある。そこで私達はカイコ核多角体病ウイルス発現ベクター系によるカイコセクロピンBの大量発現にも着手しており、現在、組換えウイルス感染カイコ体液からセクロピンの回収、純化を進めている。タンパク質の大量生産の面でも昆虫の寄与するところは広がると期待される。

文 献

- 1) Kimbrell, D.A. (1991) *Bio Assays* 13 : 657-663
- 2) 山川 稔 (1994) 遺伝 48 : 17-23
- 3) Yamakawa, M. et al. (1990) *Agric. Biol. Chem.* 54 : 2175-2176
- 4) Taniai, K. et al. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1132 : 203-206
- 5) Jaynes, J. M. et al. (1993) *Plant Sci.* 89 : 43-53
- 6) Norelli, J. et al. (1993) Abstracts of '6th International Congress of Plant Pathology', 190pp

国内情報

組換え微生物モニタリングシステムの開発

(株)島津製作所 中央研究所
西村直行

植物および土壌における組換え微生物の動態をモニターするために、微生物に導入された DNA を PCR 法を用いて検出する方法の開発をおこなった。試料として、土壌もしくはタバコ葉に *Agrobacterium* の DNA または菌体を混入したものをを用いた。溶菌操作は、EDTA、SDS 混液で行い、精製法は①フェノール・クロロフォルム、②陰イオン交換樹脂、③陽イオン交換樹脂、④ガラスビーズを単独もしくは組み合わせて用いた。DNA の回収量は Hoechst 33258 による蛍光強度、純度は PCR の阻害度により判定した。

その結果、精製法として、陽イオン交換樹脂とガラスビーズの併用が回収量、純度とも最も優れていた。この方法を用いて、土壌またはタバコ葉に既知量の菌体を混入した試料を精製し、精製液の段階希釈液の PCR により、試料中の菌体量を測定したところ、1g 試料中に 10^3 個以上存在する細菌の数を定量的に検出する事が可能であった。さらに、組換え微生物の動態をモニターした結果の画像表示ソフトの開発を行った。

1. はじめに

新たな世紀を迎えようとしている人類にとって環境汚染の防御技術の開発は緊急を要する課題の一つである。このような状況の中で、最近、Nature 誌は1989年に起こったエクソン社のバルディーズ号による重油流出事故の重油が、原油を分解する細菌や藻類によってかなり除去されたことを報じている。河川、土壌、森林等に蓄積された環境汚染物質を微生物を用いて除去する技術がこのように注目されるようになってきたが、いわゆる微生物による環境修復計画（バイオレメジエイショ

ン）に用いた微生物による新たな環境汚染を防ぐために、微生物、特に組換え微生物の環境アセスメントは重要になってきた。したがって、野外環境に組換え微生物を導入する場合、導入生態系での組換え微生物の動態を高感度にモニタリングする系を確立する必要がある。

PCR は、検体中の特定の DNA 配列を数十万倍にも増幅できる方法であり、環境中の微生物のモニタリングにも使用されるようになってきている。しかし、環境由来物質には、PCR を阻害する物質が多量に含まれている事が多く、環境由来物質から抽出した DNA は、しばしば PCR の増幅効率を低下させ、検出感度の低下をきたす。

土壌からの細菌 DNA の回収には、菌体回

NISHIMURA Naoyuki

収法と直接溶菌法がある。菌体回収法は、遠心分離等により細菌を土壌由来物質と分離、回収した後、溶菌し、DNAを回収する方法である。この方法は、土壌中の不純物を取り除きやすくするが、一般的に操作が煩雑で、迅速性に欠ける。他方、直接溶菌法は、土壌中で細菌を直接溶菌し、DNAを回収する方法であり、迅速性に優れているが、不純物が混入しやすい。

土壌から菌体回収法により細菌DNAを回収し、PCRにより増幅する方法については、種々の方法が考案されている^{1,2)}。

ここでは、今回、私達が開発した、直接溶菌法により細菌DNAを高純度、高回収率で回収し、PCRとの組み合わせにより、特定の細菌を高感度に検出できる方法について紹介する。さらに、組換え微生物の動態をモニターした結果の画像表示ソフトの開発も行ったので合わせて紹介する。

2. 土壌中の細菌DNAの精製方法の検討

まず、土壌中に存在する細菌のDNAの精製方法として最適な方法を選択するための研究を行った。

試料として、100mgの土壌（北陸農業試験場より供与を受けた入善土壌）と6 μ gの *Agrobacterium rhizogenes* A4 (A4)のDNAを単独もしくは混合して用いた。溶菌は、試料に0.1% SDS, 0.1M EDTAを加え、10分間、室温で振とうする事によって行った。12,000rpm 1分間遠心し、上清を採集後、精製を行った。精製法の検討には、①フェノール・クロロホルム②陰イオン交換樹脂 [DEAE-Sephrose, fast flow (Pharmacia)] ③陽イオン交換樹脂 [S-Sephrose, fast flow (Pharmacia)] ④ガラスビーズ [ELU-QUIK ((S&S))] を単独もしくは組み合わせて行い、1 mlの緩衝液で抽出した。

DNAの回収量は、蛍光物質である Hoechst 33258を溶解した緩衝液に、各抽出液を添加し、蛍光光度計にて、蛍光強度を測定す

表1 土壌中の微生物DNAの精製方法の検討

A. Double purification : (First purification : S-Sephrose)

Second purification	DNA Recovery (%)		PCR positive (dilution) Elutant (+100 copies A4 DNA) from soil
	A4 DNA	A4DNA in soil	
Phenol / Chloroform	57.4	82.9	10
DEAE-Sephrose	46.3	58.3	10
Glass beads	89.2	79.6	1

B. Double purification : (First purification : Phenol / Chloroform)

Second purification	DNA Recovery (%)		PCR positive (dilution) Elutant (+100 copies A4 DNA) from soil
	A4DNA	A4DNA in soil	
S-Sephrose	64.0	56.4	10
DEAE-Sephrose	45.5	46.1	1
Glass beads	50.7	62.4	1

DNAの回収率は、土壌もしくは燐酸緩衝液にA4 DNAを添加した試料からの精製液中のDNA回収量より求めた。精製液の精製度は土壌からの精製液がPCR阻害を示さなくなる希釈倍率により求めた。精製は、1段階目にS-Sephroseまたはフェノール・クロロホルム、2段階目に他の3方法を用いて行った。実験値はtriplicateで行った実験の平均値で表している。

る事により求めた。

DNAの精製度は、DNAを添加していない土壌からの抽出液およびその10倍段階希釈液10 μ lと100コピーのA4精製DNAをPCR緩衝液中に添加し、50サイクルのPCRを行った時の抽出液による阻害の程度により決定した。PCR用プライマーは、A4の毛状根誘導遺伝子領域内の塩基配列をもとに作製したオリゴヌクレオチド [forward primer : d (GTTAGGCGTGCAAAGGCCAAG, reverse primer : d (GCGTATTAATCCCGTAGGTC)] を用いた。検出は、PCR反応液を3%アガロース中で電気泳動を行い、臭化エチジウムによるDNAの染色により行った。

4種の精製方法を用いて土壌中の微生物DNAの精製を試みたが、どの方法を用いても、単独で、高純度、高回収率にDNAを精製することは困難であった (data not shown)。そこで、2種類の方法を組み合わせてDNAの精製を試みた。精製法としてフェノール・クロロホルム法または陽イオン交換樹脂法を用いた場合、土壌からのDNAの回収率が良好であったので (date not shown)、この2方法のうち、どちらかでDNAを粗精製した後、他の3方法を用いてさらに精製を行った。2段階精製液のDNA

の回収率と、PCR 障害度で表した精製度を示したのが表1である。陽イオン交換樹脂法とガラスビーズ法を併用した場合、およびフェノール・クロロホルム法と陰イオン交換樹脂法またはガラスビーズ法を併用した場合に、PCR の障害度が低かった。この3方法をDNA の回収率の点で比較すると、陽イオン交換樹脂法とガラスビーズ法の併用が最も優れていた。

以上の結果、および精製法の簡便さなどを考慮して、土壌からのDNA の精製法として

陽イオン交換樹脂法とガラスビーズ法の併用を選択した。

3. 土壌中の細菌の定量的検出の検討

組換え微生物を散布する場合を想定し、土壌に一定量のA4細菌を添加し、先の溶菌および、精製方法を用いて精製した後、PCR を行い、定量的に検出出来るかの研究を行った。試料には、50mg の土壌に 0.75×10^2 , 0.75×10^4 , または 0.75×10^6 個のA4細菌を加えたものを用いた。溶菌は、SDS/EDTA で行い、S-Sepharose とガラスビーズを併用して精製を行った後、 $200 \mu l$ のTE [10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA] で抽出を行った。抽出液もしくはその段階希釈液をPCR 反応液に $10 \mu l$ 添加し、PCR を行い、PCR 反応生成物が得られなくなる希釈倍率をもとにして試料中の菌数を算出した。

図1に示すように、50 mg の土壌あたり 0.75×10^2 個の細菌を混入したものでは、抽出液の2.5倍希釈で1/3(3本中1本)に、5倍希釈で3/3に、10倍希釈で1/3にバンドが検出された。 0.75×10^4 個の細菌を混入したものでは、10倍希釈、 10^2 倍希釈で3/3に、 10^3 倍希釈で2/3にバンドが検出された。 0.75×10^6 個の細菌を混入したものでは、 10^3 倍、 10^4 倍希釈で3/3、 10^5 倍希釈で2/3にバンドが検出された。

以上の結果、検査数は少ないが、3つのうちどれかにバンドが検出されなくなった時の希釈率とバンドの検出率より添加した細菌の数を算出すると、それぞれ 0.66×10^2 個、 1.32×10^4 個、 1.32×10^6 個となり、添加した細菌数を反映している事が示されている。

なお、土壌に 0.75×10^2 個の細菌を混入したもので、2.5倍希釈で、3本のうち2本にバンドが検出されなかったのは、抽出液中にPCR 障害物質が残存する事になると考えられる。

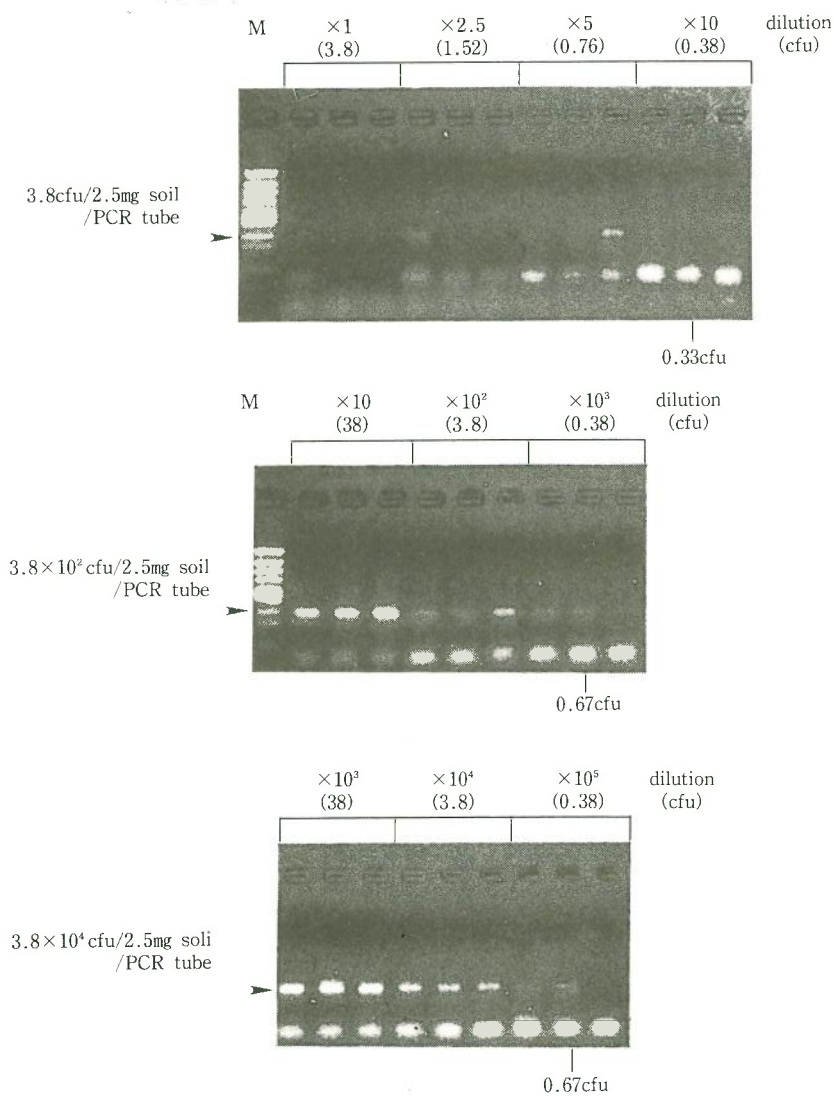


図1 土壌中の微生物の定量的検出
50mgの土壌に 0.75×10^2 , 0.75×10^4 または 0.75×10^6 個のA4細菌を添加した試料からの精製液 ($200 \mu l$) またはその段階希釈液 $10 \mu l$ を用いてPCRを行った。なお、精製液を希釈せずで使用した場合、PCR tube中に、それぞれ、2.5mgの土壌および 3.8 , 3.8×10^2 または 3.8×10^4 個のA4細菌が混入されていることになる。

4. 植物葉上の細菌の定量的検出の検討

植物体に一定量の A 4 細菌を添加し、先の溶菌および精製方法を用いて精製した後、PCR を行い、定量的に検出出来るかの研究を行った。

植物体としては、タバコ幼葉を用いた。試料には、50mg のタバコ幼葉に 10^4 、または 10^6 個の A 4 細菌を加えたものを用いた。試料をホモゲナイザー (S-205 池田理化) でホモゲナイズした後、SDS/EDTA で溶菌を行った。精製方法は、土壌の場合と同じ方法で行った。

図 2 に示すように、50mg のタバコ幼葉あたり 10^4 個の細菌を混入したものでは、抽出液の 10^2 倍、 10^3 倍希釈で 3/3 にバンドが検出されたが、 10^4 倍希釈ではバンドが検出されなかった。 10^6 個の細菌を混入したものでは、 10^4 倍希釈で 3/3 に、 10^5 倍希釈で 2/3 にバンドが検出されたが、 10^6 倍希釈ではバンドが検出されなかった。

以上の結果、土壌の場合と同じようにして、添加した細菌の数を算出すると、それぞれ、 2×10^4 個、 1.32×10^6 個となり、添加した細菌数を反映している事が示されている。

5. 組換え微生物の動態をモニターした結果の画像表示ソフトの開発

組換え微生物の動態をモニターした結果をパソコン処理によって画像表示するために、MS-WINDOWS ver. 3.0 上で MS-EXCEL ver. 4.0 を働かせ、次の 3 つの機能を行うプログラムを開発した。

① 等濃度分布

任意の測定時間における組換え微生物の測定濃度を 1 つの画面上に表示するプログラムで、存在微生物の濃度範囲をあらかじめ 20 以下のレベルに分割して各測定位置の濃度をこのレベルに分類し、各レベルを色分けして表示する (口絵)。等濃度の範囲がどのように分布しているか、地図のように表示できる。

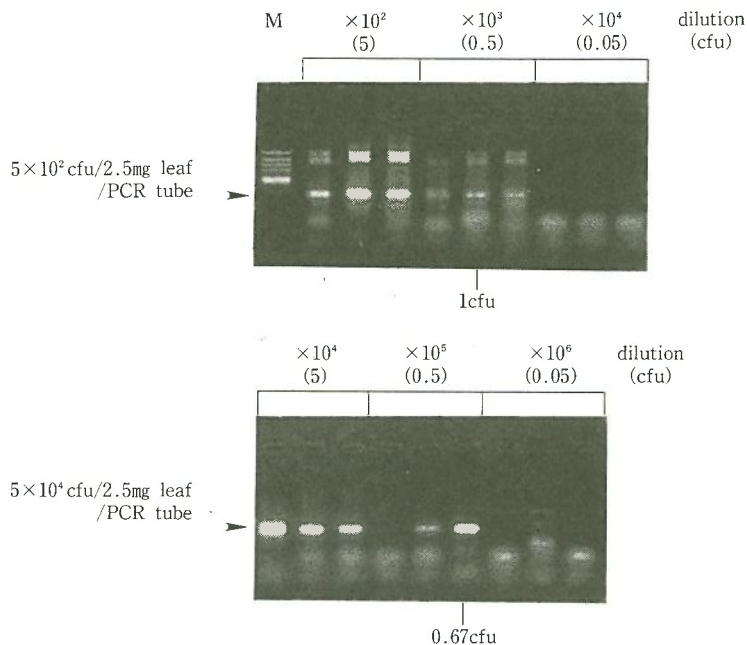


図 2 植物葉上の微生物の定量的検出

50mg のタバコ幼葉に 10^4 または 10^6 個の A 4 細菌を添加した試料からの精製液 ($200 \mu\text{l}$) またはその段階希釈液 $10 \mu\text{l}$ を用いて PCR を行った。なお、精製液を希釈せずに使用した場合、PCR tube 中に、それぞれ、2.5mg の葉および 5×10^2 または 5×10^4 個の A 4 細菌が混入されていることになる。

② 定濃度時間変化

① のプログラムで分割されたレベルの任意の濃度範囲の領域が時間の経過と共にどのように変化して行くかを 1 つの画面上に表示する。

③ 要素点濃度変動

組換え微生物濃度を測定した任意の位置 (要素点) における濃度の経時変化をグラフで表示する。

上記の 3 つの機能を持ったプログラムがかなりの高速で (勿論使用するパソコンの MPU に依存する) CRT 上にカラー表示すると共に、カラーコピーが出来る。なお、本プログラムは NEC PC-98 用に作製されているが、IBM-PC に変換可能である。

6. おわりに

今回用いた溶菌、精製法により、高純度、高回収率で土壌中の A 4 細菌より DNA が回収され、段階希釈法と PCR 法の併用により 1g 土壌中に 10^3 個以上存在する細菌の数を定量的に検出することが可能となった。しかし、

グラム陽性細菌では、SDS/EDTA では溶菌しにくく、細菌の種類により、溶菌方法を検討する必要がある。また、添加した細菌数が少なく希釈の少ない場合にバンドが薄くなる傾向がある（図1上段）。これは、阻害物質の残存により、PCRが抑制されているためと考えられる。なお、今回用いたPCRの条件では、50回以上PCRを行っても、バンドはほとんど濃くならなかった。したがって、土壤中に存在する細菌数が少ない場合は、耐熱性DNA polymeraseをPCRの途中に加えたり、nested PCRを行う事により、さらに結果を明瞭に出来ると思われる。また、今回用いた溶菌、精製およびPCR法により、土壤中と同様に、タバコ葉上に存在する細菌の数も、定量的に検出することが可能となった。しかし、タバコ葉を用いた場合、非特異的なバンドが多数認められた（図2）。これは、今回用いたプライマーが、葉中のDNAと非特異的にアニーリングしているためと思われるので、特異性の高いプライマーの選択

が必要であろう。また、段階希釈とPCR法の併用による定量化は、サンプル数が多くなるとともにサンプルの希釈など操作が煩雑となり、その間に汚染の可能性も高くなるので細心の注意が必要となる。最近、定量的PCR法として、competitive PCR法が使用されるようになったが、今後その検討も必要であろう。

なお、この研究は、島津製作所・中央研究所 軸屋博之、南井善尋、戸崎奈美、清松博子、井上英男との共同研究によるものであり、一部は農林水産省「組換え体の生態系導入のためのアセスメント手法の開発」研究の委託により行った。

文 献

- 1) Pillai, S. D. et al. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2283-2286
- 2) Steffan, R. J. et al. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2185-2191

国内情報

甘藷焼酎蒸留廃液の生物処理法の開発

国税庁 醸造試験所

小幡孝之

本格焼酎は年間約25万kl生産されているが、それに付随して33万t程度の蒸留廃液が生産されている。その処理法としては飼料、肥料等に活用されているが、pHが4前後と低く、水分も90~95%と多量に含んでいるため用途としての限界があり、半量は海洋投棄に依存している。これら蒸留廃液のうち、粘度が高く処理の最も困難とされている甘藷焼酎の廃液を取り上げ、その処理法を開発した。廃液に多くの固形分（浮遊物）を含んでいる場合、それを除くことが生物処理を行う際の第一関門となるが、その関門を植物性繊維を強く凝集する酵母M111株を用いて固液分離を行うことで通過することができた。液部分については、実験室規模で排水処理用酵母 *Hansenula anomala* J-224株の酵母処理槽、酵母溶解細菌 *Rarobacter faecitabidus* の消化槽および活性汚泥処理を連結して、河川放水が可能なまで浄化できる生物処理システムを構築した。

OBATA Takaji

1. はじめに

「個性的な香りの強い安い酒」というイメージのあった本格焼酎（乙類焼酎ともいい、アルコール発酵したもろみを単式蒸留機で蒸留した焼酎）が、製造法の改良により香味がソフトになって消費量が伸び、最近では年間25万kl程度が生産されている。この本格焼酎の製造にともない蒸留廃液も付随的に生産されるが、その量は33万t程度と推定されている。廃液の処理方法としては、製造場の多くが中小規模で南九州に集中していることもあり、家畜の飼料、農地還元、海洋投棄等が主に採用されている。しかし、後で触れるように廃液はpHが低くかつ水分を90~95%含んでいるため、飼料としては効率が劣り、また肥料としては土壌の溶脱や地下水汚染といったリスクがあり、それらによる処理量としてはほぼ限界に達している。そして残余の廃液処理は海洋投棄に依存しているのが現状である。近年の地球規模での環境問題が論じられている状況にあって、引き続き海洋投棄が容認されていくかどうかは厳しい見通しの下で、処理コストの低い陸上処理方法の速やかな開発が望まれている。ここで、醸造試験所が甘藷焼酎の蒸留廃液を対象として、最近開発した生物的処理システムについて説明する。

なお、廃液を焼却により処理している例があるが、燃烧エネルギーと排煙処理等のランニングコストが海洋投棄と比較して高いこともあり、採用はごく一部にとどまっている。

2. 蒸留廃液の性状

蒸留廃液の性状の一例を表1に示した¹⁾。

表1 蒸留廃液のBOD等

主原料	pH	SS (ppm)	BOD (ppm)	COD (ppm)
米	4.07	33,200	63,500	33,100
甘藷	4.14	64,300	41,900	48,700
麦	3.95	31,500	37,700	26,700
白ヌカ	4.15	33,300	73,000	34,200
泡盛	—	—	42,000	—

本格焼酎は多様な原料を使用し、蒸留も常圧、減圧といった方法があるため一様ではないが、いずれもBOD値で数万ppmの有機物と5%前後の固形物（浮遊物）を含んでおり、これらが生物的な処理を困難にしている。とりわけ、甘藷焼酎の蒸留廃液（以下、単に廃液という）は原料由来の繊維質やペクチン等の高分子有機物を含んでいるため、粘度が高く処理が困難とされていたので、研究対象として選定した経緯がある。

3. 廃液の生物処理

固形分を比較的多く含んだ蒸留廃液を生物的手法を採用して処理する場合、まず固液分離操作により固形分を除く必要がある。この操作を省略すると①処理水と処理微生物との分離が悪くなり、その結果微生物濃度が低下する、②処理中に固形物が可溶化する、といった現象がおり処理効率が低下するからである。

(1) 廃液の固液分離法の開発

当所では、廃液の固液分離法を開発するに際して、その濾過性が改善されるかどうかをメルクマールにして検討し、①凝集性酵母 *Hansenula anomala* を用いた接触処理法²⁾、②放線菌 S-20 株が生産する酵素を用いた処理法³⁾、③植物性繊維に凝集促進能を持つ酵母 M111 株を用いた処理法⁴⁾、の3方法を開発した。①の処理には菌体濃度として 10^8 cells/ml 以上を必要としたので、菌体取得のため規模の大きい培養と回収工程が必要と

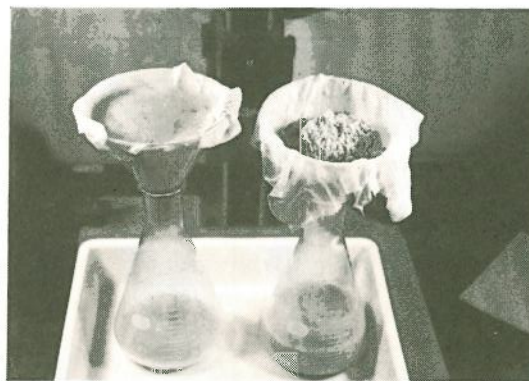


図1 M111株の添加による廃液固形分の凝集
左：無添加，右：M111株添加

なる、②ではS-20株が生産する酵素（主として、ポリガラクトナーゼ）反応を進めるため、廃液を50°C、20時間保つ必要がある、等の煩雑さがあつたのに対して、③はM111株の培養液を廃液に添加すると、図1に見られるように固形分は直ちに凝集し容易に固液分離が可能となつたことから、③を採用することとした。

(2) M111株の性質

M111株は出芽と分裂により増殖し、生育条件によって真性菌糸 (true mycelium) または分節型分生子 (arthroconidium) の二形性を示し、子のう胞子 (ascospore) を形成しないこと等から、*Geotrichum* 属の酵母と同定された。本菌はグルコースに対して微弱な発酵能を示し、pH3~9の範囲で、温度は35°Cまで生育が認められ、至適生育温度は28°Cであつた。

各固形物に対する凝集能を検討したところ、表2に示したようにトマトジュースに含まれる固形物の植物繊維からカオリンやタルクといった鉱物質まで広範囲の固形物に凝集能を示した。また、本菌体を Proteinase K で処理すると、植物性繊維にはその機能を失つたが、鉱物質には保持していたことから、両グループ間では凝集作用が異なり、かつ前グループについては菌体表層のタンパク質が関与しているものと推定されている。

(3) M111株の培養と凝集条件⁵⁾

凝集に必要な菌体の培養条件を検討した。まず培養液としては廃液の上澄液の利用が考えられたので、YPD培地 (yeast extract 1

表2 M111株の各種固形物との凝集能

固形物	凝集能
甘露焼酎廃液	++
アピセル	+
ろ紙繊維	++
セルロースパウダー	+
トマトジュース	++
パルプ廃液	++
カオリナイト	+
タルクパウダー	++
活性炭	++
CM-セルロース	-
カゼイン	-

++ 強い凝集能, + 凝集能を示す, - 凝集能を示さず

表3 脱水前後の廃液の組成

	脱水前	脱水後
pH	4.2	4.2
COD	32,000ppm(19,200)	20,400ppm(18,300)
BOD	24,000ppm(20,300)	19,500ppm(19,200)
全窒素	2,820ppm(1,060)	880ppm(870)
全リン	1,050ppm(450)	390ppm(340)
全糖	— (9,060)	9,210ppm(6,290)
還元糖	— (2,280)	— (1,540)
固形分	42,600ppm	6,500ppm
粘度	210mpa*s	—

() は上澄液の成分値

%, polypeptone 2%, glucose 2%) と対比したところ、30°C、48時間培養で、 1.5×10^8 cells/ml と YPD 培地の約2倍量の菌体が得られた。培養時に通気量が少ない条件下で培養すると、本菌は菌糸状に生育し、増やすと単細胞状に生育した。凝集能から見ると単細胞状の方が高かつ表面積も大きいことから、条件としては十分な通気と28°C前後の温度が最適であつた。

凝集時の菌体濃度の影響を調べたところ、添加後濃度で 10^7 cells/ml 付近が最適で速やかに凝集し、 5×10^7 cells/ml を超えると凝集は強固になつたが、濾液に菌体の漏出が認められた。この時の廃液の温度と濾過性の改善との関係は、温度の上昇とともに向上し、60°C付近で最高となり、80°Cでは急激に低下した。この結果は表層タンパク質が凝集に関与していることを、再度示していた。

(4) 脱水機を用いた廃液の固液分離

市販のツインクロス式脱水機 (図2参照) を用いて、M111株の添加により廃液の固液分離が実験室のデータと同様に可能かどうかを確認した。廃液とM111株の培養液をそれぞれのフィード量に調節して混合槽に送入し、内装の回転ドラムで混合攪拌され、廃液の凝集を誘導しながら濾布のうえに流下される。凝集によって生じた濾液は濾布上で自然濾過され、残つた固形物は上から降りてくる同質の濾布との間で圧搾されながら脱水され、固液分離が行われる構造になっている。添加後の菌体濃度を 3×10^7 cells/ml として廃液温度60°Cで実施したところ、40kg/m²・hrの脱水速度が得られ、固形物の水分も81.5%と良

好な結果が得られた。脱水機による脱水前後の廃液の組成をみると、表3に見られるように、分離前に比較してBOD等の変化は小さいが、固形物は4.2%から0.65%へと減少しており、約85%が除去されていた。また濾液には原廃液のような粘性はなく、残存していた固形物は顕微鏡観察から、大部分は焼酎酵母またはそれ由来の不溶成分であった。

(5) 固液分離後の脱水濾液の酵母処理⁶⁾

固液分離により得られたケーキは飼料あるいは肥料としての用途が考えられ、該当機関に検討を依頼することとして、濾液部分について研究を進めた。当所では高濃度の有機物を含む廃水の処理について、清酒製造場等から排出される洗米排水を対象に酵母を用いた処理システムの開発を進めており、その処理技術を採用して実験室スケールで実施し効果を確かめた。

脱水濾液の処理に *Hansenula anomala* J-224 を用い、pH 4.5、温度 35°C の条件で、1 l の三角フラスコに 200 ml の濾液を入れ、ロータリー振とう機で攪拌しながら一日一回、100ml の処理水を抜き、新たに100ml の濾液を加える2日滞留の回文式で行った。2週間継続して処理を行ったが安定して浄化されており、処理水のBOD平均値は6800ppmとなり65%が除去され、固形物を除いた上澄液ではBODは3500ppmと82%除去されていた。しかし、この過程で固形分が0.65%から1.4

%と増加しており、検鏡等の結果、酵母処理の過程で増殖したJ-224株の菌体と当初から含まれていた焼酎酵母によるものであった。

そこで、①酵母処理の後方に設置する活性汚泥処理の負荷を軽減する、②同処理の沈澱槽における活性汚泥の分離低下を回避する、等のために酵母菌体を消化する消化工程を設けた。当所では既に酵母を溶解する細菌 *Rarobacter faecitabidus* を酵母処理槽に連結した活性汚泥槽から分離しており、本菌を用いて処理を行った。処理条件は脱水濾液を酵母処理した時とpH 7~8、温度30°Cに変えた以外は同条件で行った結果、排水の固形分は処理前の1.4%から約0.7%まで低下し、その減少量は酵母処理時に増加したJ-224株の菌体量に相当していた。このことは *R. faecitabidus* が死菌体より生菌体に対しはるかに高い溶解活性を示すという特性を反映しているものと考えられる⁷⁾。

そして固形分除去とともにBODも約40%除去され、平均値で3900ppmまで低下した。

4. 廃液の生物処理システム

以上の結果に基づき、図2のような廃液の一括処理システムを構築した。①最初にM111株培養液を廃液に添加して含まれている固形分を凝集し、濾過性を改善して脱水機で固液分離を行う。その際に得られた脱水濾液

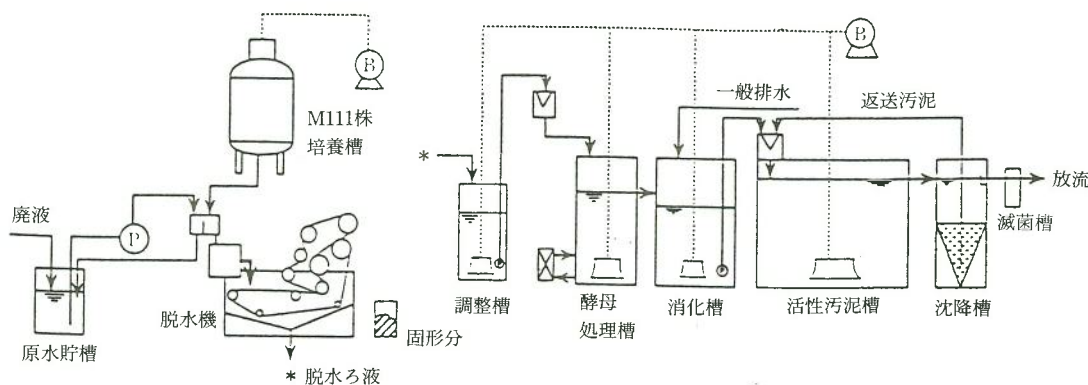


図2 廃液の生物処理システム

は M 111 株の培地として使用することが可能である、②脱水濾液は酵母槽で *H. anomala* J-224 株を用いて酵母処理が行われる、③酵母処理水は消化槽で *R. faecitabidus* により消化され、酵母槽で増加した酵母菌体が溶解されるとともに BOD の低下が図られる、④得られた排水は BOD 濃度が 3900ppm 程度と活性汚泥処理に移行するにはまだ高すぎるので、処理水の 2～3 倍の一般排水（低濃度排水または蒸留の冷却水）と混合希釈し、活性汚泥槽で処理して滅菌放流する、というシステムである。

小規模実験では一括処理が可能であることを示すことができたが、今後、実用スケールでこれらの処理効果を確認していくとともに、海洋投棄等の処理方法と対比してその有用性を確認していくこととしている。また、麦製や米製の蒸留廃液の処理方法についても、現在、鋭意検討しているところである。

文 献

- 1) 西谷尚道 (1977) 新版醸造成分一覽 (日本醸造協会) p.159
- 2) 鈴木 修・佐藤俊一・家藤治幸・下飯仁・蓼沼 誠・吉沢 淑 (1991) 日本醸造協会誌 86(2):137
- 3) 佐伯 宏・佐藤俊一・家藤治幸・下飯仁・小幡孝之・飯村 讓 (1991) 総合研究プロジェクト別環境保全研究成果集 (環境庁) 6-1
- 4) 家藤治幸・城至純治・飯村 穰・小幡孝之 (1994) 日本農芸化学会誌 68(1):33
- 5) 高峯和則・瀬戸口真治・間世田春作・浜崎幸男・武宮重人・小幡孝之 (1994) 日本醸造協会誌 89(4):315
- 6) 鈴木 修・下飯 仁・家藤治幸・飯村穰・小幡孝之 (1994) 日本醸造協会誌 69(4):321
- 7) 蓮尾徹夫・山本奈美・斎藤和夫・蓼沼誠 (1984) 日本醸造協会誌 79(7):510

地域の先端研究

組織培養を活用したブドウの四倍体化法

福岡県農業総合試験場 園芸研究所
能塚一徳

ブドウの主要品種である「巨峰」は、大粒の優れた四倍体品種であるが、結実性や熟期など改良すべき点も多い。ところが、育種に用いる四倍体品種が極めて少なく、変異幅も小さい。そこで、福岡県農業総合試験場では、組織培養系を利用して、効率良く四倍体化する方法を確立し、平成5年度までに35品種を四倍体化した。これらは、果粒の大きさ、熟期、味、色、形、耐病性等じつに変異に富んでいる。

平成5年度までに結実した8品種の果粒重は、1.5～2倍の大きさとなった。このうち、パッファローの四倍体は、極早熟で、ジベレリンによる無核化が可能な大粒系統であり、新品種候補に対して農水省が行う、系統適応性検定試験に供している。

開花した四倍体系統は、すでに育種母材として利用している。また、35品種のうち10品種が無核品種であり、実用化した胚珠培養により、大粒・無核品種を効率的に育成する。

1. はじめに

Nozuka Kazunori

昨年九月、私は中国新疆ウイグル自治区

のトルファンとカシガルのブドウ産地を訪れる機会を得た。案内してくれたウイグル族のエスケル氏は、福岡県の園芸研究所で果樹の研修を受けた、いわば教え子の一人である。ここはタクラマカン砂漠周辺のアアシスであり、北回りシルクロードの通過地点でもある。年間降水量は10mm前後で、降水時期は冬季に限られており、ブドウの生育期間にはまず雨は降らないと考えてよい。食べたブドウは純粋の欧州種であり、じつに美味であった。欧州ブドウの原生地は、コーカサス、カスピ海沿岸地方とされているが、「ここがブドウの古里です」と、彼は胸を張って説明してくれた。シルクロードの東の端から日本に辿り着いた欧州ブドウは、1186年に現・山梨県の雨宮勘解由によって発見され、「甲州ブドウ」として日本で初めてブドウ栽培が行われた。しかし、約400年を経過した慶長6年(1601年)においても、わずか160本余りにしか増加しなかった。

2. 四倍体品種：「巨峰」について

さらに約400年を経過した現在、日本のブドウ栽培面積は約26,000haを超え(1990年果樹統計による)、そのうち、「巨峰」は、約25%を占めており、九州では60%を上回る最も主要な品種となった。しかし、有史以前か

らの、4000年以上の歴史をもつブドウ栽培で、「巨峰」はきわめて特殊な品種である。それは、「巨峰」が経済栽培が行われた最初の四倍体品種だからである。

「巨峰」は、昭和18年に静岡県の大井上康氏によって育成された。「石原早生」と「センチニアル」を両親としているが、いずれも自然突然変異で生じた四倍体品種である。

「巨峰」は、日本人好みの味を持つ大粒性の優れた品種であるが、結実性や熟期など、改良すべき点も多い。「巨峰」の誕生以降、育成された四倍体大粒品種群は「巨峰群」とも呼ばれている。これらは、四倍体の育種母材が限られていること、すべてが「巨峰」の血を引いていることなどから、形質の変異幅は小さく、よく似通っている。「巨峰」を超える優れた品種を育成するには、無数の変異に富んだ二倍体品種を元に、「巨峰」とは全く異なる形質の四倍体育種母材を人為的に作出する必要がある。

3. ブドウの人為四倍体化法

ブドウの人為四倍体作出に関する研究は、Darman¹⁾、山根²⁾らによって行われており、いずれも鉢植えの植物体にコルヒチン処理する方法が用いられた。しかし、この方法では四倍体獲得の効率が悪く、芽や葉に毛の多い

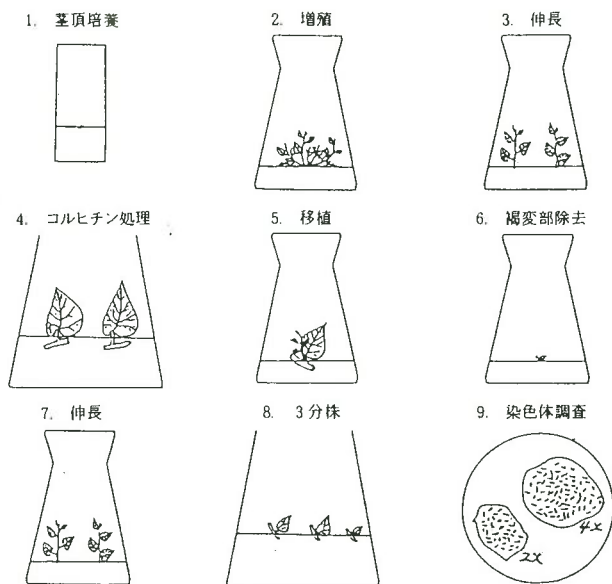


図1 ブドウ四倍体化法の概要

米国系品種の染色体倍化は不可能であった。そこで、ブドウのすべての品種で効率的に四倍体を得る、試験管内コルヒチン処理法を確立した。技術確立に至ったデータはすべて割愛させていただくが、この方法の概要を図1に示し、簡単に説明する。

- 1) 茎頂培養³⁾: 基本培地はMS培地⁴⁾とし、ベンジルアデニン(BA)を5 μ M添加した液体培地に、0.5~1.0mmのやや大きめの茎頂を置床する。
- 2) 増殖: 肥大した茎頂を、上記の培地に寒天を8g/l添加した固体培地に移し、伸長したシュートを切り分けて増殖する。BAに対する反応は品種によって異なる。伸長してくるシュートの腋芽の発育程度を観察し、腋芽の発育を抑えられたシュートを得るBA濃度(2~5 μ M)を判断する(=伸長培地)。
- 3) シュート伸長: 伸長培地でシュートを伸長させる。
- 4) コルヒチン処理: 加熱溶解した伸長培地に、濾過滅菌したコルヒチンを添加する。濃度は0.05%とする。
伸長培地で旺盛に伸長中のシュートの、採取可能な最も若い腋芽を、1本のシュートから1個を切り取る。頂芽部は切除し、葉を付けた腋芽のみとする(図1)。
図のように腋芽部と一部の茎を培地に埋没させ、葉は培地に接触させない状態で2日間処理する。
- 5) 移植: 処理が終了したら、滅菌水で洗浄し、新しい伸長培地に移植する。
- 6) 褐変部除去: コルヒチンの薬害を受けた切口部や葉が褐変し、褐変物質が培地中に溶解して腋芽の伸長を妨げる。処理後2~3週間で褐変した切口部と葉を切除し、新しい伸長培地に移植する。
- 7) シュート伸長: 処理腋芽からシュートが伸長する。コルヒチンの薬害がひどく生育の悪い個体は、再度褐変部を除去し、新しい培地に移植する。
- 8) 三分株: 伸長した個々のシュートの腋芽を切り分け、3個体とする(区分キメ

ラ状の個体では、これによって完全な四倍体が得られることがある)。

- 9) 染色体調査: サンプルは、生育旺盛な(移植後5~10日目)シュートの幼葉を用いる(根端は不可、周縁キメラの可能性あり)。

8時から24時までの16時間照明で培養し、頂芽部のサンプリングは、細胞分裂頻度の高い9時から13時までに行う。

表1 平成5年度までに得た四倍体系統と期待される有用形質

品 種 名	主要な有用形質	備考
1. 無核品種		
モヌッカ	高品質	
ルビー シードレス	赤,果皮強	
プサ シードレス	高品質	○
F-4075	マスカット香,大粒	
ブロンクス シードレス	高品質,早熟	○
サフォークレッド	赤,品質良	
ヒムロット	早熟,耐病性	
安芸シードレス	剥皮性,耐病性	△
安芸津2号	大粒,雌株系統	
プリマ シードレス	果皮強	△
2. 有核欧米雑種		
笛吹	大粒,果皮強,晩生	◎
宝満	大粒,豊産	
マスカット ルビー	高品質,鮮紅色,小粒	
シャイラー	極早熟,剥皮性,強健	◎
バッファロー	極早熟,ジベで無核化	◎
レッドポート	極早熟,赤,狐臭	○
スーパーハンブルグ	着色性	◎
福岡8号	豊産,晩生	△
3. 有核欧州種		
リザマート	極大粒,長楕円果粒	
ハリリ セフ	極大粒,高品質	
バラディー	極大粒,晩生,果肉硬	
サバルカンスキー	極大粒,鮮紅色	
モルゲンシェーン	大粒,高品質	
ルビーオクヤマ	大粒,マスカット香,赤色	
甲斐路	大粒,耐裂果・脱粒性	△
イタリア	大粒,マスカット香	
博多ホワイト	大粒,マスカット香	
紅三尺	赤,極豊産	
ネオ マスカット	耐裂果・脱粒性	△
白南	肉質良	
ピッテロピアンコ	指状珍奇果形	
ニューナイ	長々楕円珍奇果形	
甲州三尺	耐裂果性,耐病性	△
4. その他		
S-9110	耐虫(フィロキセラ)性	◎
V. coignetiae	耐病性	

注) ◎: 1993年までに2回以上結実
○: 1993年初結実
△: 1994年結実見込み

前処理は2~3°Cの冷水、約24時間処理とし、固定はアセトアルコール(3:1)、アセトオルセインで染色し、押しつぶし法により染色体を観察する。

10) 発根・順化・鉢上げ：確実に四倍体であることを確認した個体は、1/4濃度のMS培地に0.001μMのナフタレン酢酸を添加した発根培地で発根させ、順化の後に鉢上げ、定植する。

4. 作出したブドウ四倍体系統の形質

この方法によって、1984年から1993年までに35品種・系統を四倍体化した(表1)。

私の研究室は、昭和49年に施設ブドウ育種の指定試験地として発足した。設定された育種目標は、高品質、大粒、早熟、無核、耐暑性など、かなり欲張ったものであった。目標に近い品種を育成する手段の一つとして、この染色体倍化法があり、さらに、無核品種間の交配を可能にする胚珠培養も実用化している。四倍体化した35品種・系統のうち、10の無核品種・系統が含まれる。1993年には、四倍体無核品種間の初開花の花房を用いて交配を行い、胚珠培養によりようやく1個体を得た。今後は本格的に実施し、当初の育種目標を達成したい。

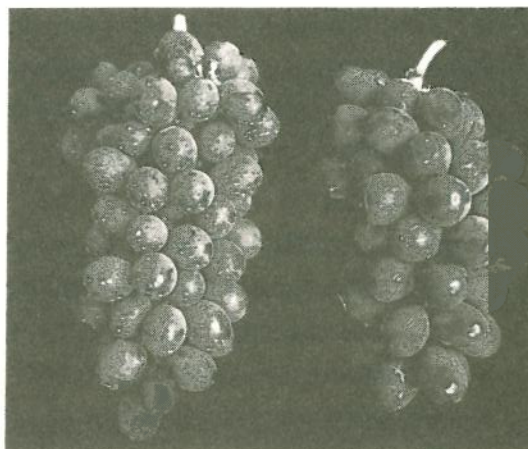
結実した四倍体品種の果粒重は1.5~2倍に増加している(表2)。このうち、バッファローの四倍体は、極早熟でジベレリンにより無核化できるという特徴から、第8回ブドウ系統適応検定試験に供しており、優秀性が認められれば品種登録されることになる(図2)。

また、四倍体系統は原二倍体品種の形質をよく保持しているが、果実の肉質、耐裂果性など、一部の形質が変化することが考えられる。いずれにしても四倍体化に伴うの生理生態、果実特性等の変化については、これからの研究課題である。

今後は、作出した四倍体系統を、三倍体無核系統作出の母本としても用い、後代の果実特性についても解析したい。

表2 二倍体と四倍体の果実特性

品種名	倍数性	調査年月日	果房重(g)	果粒重(g)	糖度	酸度	備考
バッファロー	2X	1991.8.1	247	3.2	14.8	0.67	
	4X	1991.7.22	370	6.5	16.2	0.82	
シャイラー	2X	1991.9.6	145	2.8	18.9	0.41	
	4X	1991.9.6	189	4.7	16.6	0.35	
S-9110	有核 2X	1993.8.27	178	2.2	16.1	0.94	
	有核 4X	1993.8.27	96	3.7	18.6	0.68	
	無核 2X	1993.8.27	225	2.2	16.9	0.82	ジベレリン処理
	無核 4X	1993.8.2	499	3.6	18.3	0.85	ジベレリン処理
レッドポート	2X	1993.8.19	—	5.6	14.0	0.32	
	4X	1993.8.19	—	9.5	14.0	0.33	初結実小果房



二倍体 四倍体(福岡9号)

図2 バッファローの果房の比較

5. おわりに

この四倍体化法は、ブドウの育種母材の作出のために確立した。しかし、試験管内でシュート形成する他の作物にも利用可能であろう。また、薬培養や花粉培養で得られた半数体の二倍体化、胚培養などで得られた雑種の復二倍体化などにも活用したい。

文 献

- 1) Dermen, H. (1954) *J. Hered.* 42: 159-162
- 2) 山根弘康・栗原昭夫 (1980) 果樹試験場報告E-3:1-13
- 3) Barlass, M. and Skene, K. G. M. (1978) *Vitis*, 17:335-340
- 4) Murashige, T and Skoog, F. (1964) *Physiol. Plant.* 15:437-497

文献情報

ウイルス RNA と形質転換植物の転写産物 (mRNA) の間の組換え

植物ウイルス RNA 間の組換えの他、葉緑体 RNA 様配列が植物ウイルス RNA 中に見られる、あるいは欠失変異株がウイルス RNA を発現している植物体中で野生型に復帰する等の報告があり、これらはウイルスと他の RNA の組換えが起きることを示唆している。このような例が少ないのは、組換え体の生存率が低い、あるいは生存不可能なため組換え体が検出できないためと考えられる。

外被タンパク質遺伝子のようなウイルスゲノム断片の導入によるウイルス抵抗性植物が得られている。本抵抗性は導入に用いたウイルス及び類縁のウイルス系統に対して発揮されるが、他のウイルスには示されない。

植物のウイルス抵抗性は、複製阻害よりもウイルスの移行阻害の機構による方が多いと言われており、この場合本来感染しないウイルスが侵入した場合においても、侵入細胞ではウイルス複製が起こる。したがって、ウイルスゲノム断片を導入した植物において、侵入したウイルスの複製中に、植物体内の導入遺伝子 mRNA と出くわすこともあり、そこで RNA 間の組換えがおこり、侵入ウイルスとは異なるウイルスが出現することも考えられる。

上記の様な RNA 組換えを証明するためにプロモウイルスグループのササゲモットルウイルス (CCMV) を材料として実験を行った。CCMV のゲノムは複製タンパク質をコードする RNA 1 と 2 及び移行タンパク質と外被タンパク質の二つをコードする RNA 3 から成り立っている。これら RNA の cDNA から感染性のある RNA が得られる。CCMV の外被タンパク質遺伝子の 3' 末端 2/3 を発現している形質転換植物に外被タンパク質遺伝子の 3' 末端 1/3 を欠失している変異株を接

種する。この変異株は移行が出来ず全身感染しない。外被タンパク質遺伝子の中央部 1/3 は変異株及び植物の mRNA の両方に存在するが、もしここで組換えがおこれば野生株と同様に全身感染を引き起こすウイルスが生ずる可能性がある。このような系を用いて、宿主染色体由来 mRNA と複製中のウイルス RNA 間の RNA 組換えを以下のように証明した。

CCMV RNA 3 の完全長 cDNA の外被タンパク質遺伝子と 3' 末端非翻訳領域の結合部分付近に 3 塩基のマーカとなる変異を導入した。この変異は CCMV の生存あるいはタバコ (*Nicotiana benthamiana*) の形質転換及び接種に用いるウイルスの調製には影響しない。

接種した変異株は外被タンパク質遺伝子の 3' 末端より 119 塩基欠失している。本 RNA と完全長 CCMV RNA 1 と 2 の転写産物を一緒に接種するとササゲにも *N. benthamiana* にも全身感染しなかった。しかし、この変異株はプロトプラストにおいては増殖した (つまり複製はするが、移行が阻害されると考えられる)。

外被タンパク質遺伝子の 5' 末端 118 塩基を欠失しているが、RNA 3 の 3' 末端非翻訳領域を含む本遺伝子を形質転換ベクター (NPT II を含む) に導入し、*N. benthamiana* の形質転換に用いた。

カナマイシン耐性の 57 植物体から NPT II 高発現の 6 個体を選び、全 RNA を抽出し、上記導入遺伝子の mRNA の存在を確認した。CCMV のウイルス粒子あるいは野生型の転写産物を接種した形質転換植物は全身感染したので、この形質転換植物の CCMV に対する抵抗性は不十分であった。

60 個体の形質転換植物に欠失変異株を接種し、14 日後にノーザンハイブリダイゼーションで検定した結果、1 個体 (5-58) で全身感染していた。本植物からウイルス粒子の RNA を抽出し、ウイルスゲノムの 3a 遺伝子の 3' 末端から RNA 3 の 3' 末端にいたる cDNA を PCR により増幅し、塩基配列を決定した。

その結果、3塩基のマーカ変異は確認された。さらに、そのゲノムには数か所で欠失が見られ、外被タンパク質遺伝子の読みとり枠(ORF)が13コドン分変化していた。これらのアミノ酸の変化にも関わらず本植物の汁液はササゲ及び *N. benthamiana* の両方で典型的な CCMV による全身病徴を生じさせ、ウイルス粒子の RNA は通常の収量で両植物から得られた。したがって、5-58における RNA 組換えは形質転換植物体内の mRNA と接種源ウイルス RNA の間の通常でない異常な相同組換えにより突然変異株を生じたことが明らかになった。検定した 125 個体のうち 3 系統に由来する 4 個体で組換えウイルスが生じた。mRNA とウイルス RNA に共通する 338 塩基に関し、通常の相同組換えでは説明できず、いずれの組換え体の塩基配列も明らかに通常でない異常な相同組換えに由来することが示された。生き残るには必ずしも野生株と同一の塩基配列に復帰する必要はない。

以前の報告ではプロモウイルスゲノムの非翻訳領域内のみでの RNA 組換えであったが、本研究では接種した形質転換植物の 3% で ORF 内での組換えが示された。組換え体が生存するには、組換えられた ORF のタンパク質が十分に機能することが重要であると考えられる。

組換えが起こり易い要因として mRNA に CCMV RNA 3' の完全な 3' 非翻訳配列が存在することである。ウイルスの(-)鎖 RNA の合成はこの配列上で開始されるので、この配列をもつ mRNA で合成が始まり、ウイルス RNA へ切り変わる(スイッチ)こともあり得る。この組換えは既報告のテンプレート(鋳型)スイッチモデルと一致する。3' 非翻訳配列はウイルス RNA の安定性に関与するのでよく導入 DNA に組入れられる。

RNA ウイルス複製中の組換えにより、ウイルスの進化が速められ、宿主範囲、媒介昆虫の特異性に変化を及ぼす。これらの性質は数種ウイルスにおいて外被タンパク質が関与しているとされる。以上のように形質転換植

物体内のウイルス関連 mRNA は複製中の RNA ウイルスとの組換えに利用可能なため、RNA 組換えはウイルスゲノム断片導入植物に関する安全性評価の解析時には考慮すべきである。

(抄訳 西口正通一生物研)

(NISHIGUCHI Masamichi)

Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts

Greene, A. E. and R. F. Allison

Science, 263:1423-1425 (1994)

文献情報

昆虫の生殖に係わる共生微生物の移植

最近とくに注目されている昆虫の共生微生物は、宿主昆虫の生殖に係わるリケッチアである。リケッチアは細菌の一種で、宿主昆虫の細胞内に寄生して生活している。昆虫の共生リケッチアは *Wolbachia* 属に分類されており、卵を通じて子孫に伝わる。この共生微生物は、宿主である昆虫に奇妙な現象を引き起こす。例えば、寄生蜂の中には雌だけで繁殖できるものがある。その蜂にはリケッチアが共生しており、このリケッチアをその蜂から取り除くと、雌しか産まなかった系統が雌雄両性を産むようになる。

ここで紹介するのは、昆虫の細胞質不和合性に係わるリケッチアである。細胞質不和合性とは、初めは蚊で見つかった現象で、リケッチアに感染している系統(A)と感染していない系統(B)とが交尾したとき、片方のかけ合わせ(A雌×B雄)から産まれた卵は正常に発育するが、逆の組み合わせ(B雌×A雄)では発育しない。これは、A系統にリケッチアが共生しているためで、リケッチアを持った系統の雄が、持たない系統の雌と交尾すると、雌が産んだ卵の発育が抑制されてし

まう。昆虫の両系統が異なるリケッチアの系統を持つと、正逆交雑どちらにおいても産下卵は発育しない。もちろん、同じ系統のリケッチアを持つ昆虫系統の雌雄が交尾した場合は、卵の発育は正常である。この現象に昆虫の核の遺伝子は関与しておらず、母親を通じて子孫につたわるリケッチアが支配しているため、細胞質遺伝と同様の遺伝現象として扱われてきた。このリケッチアは抗生物質によって、昆虫体内から除くことができる。リケッチアを一旦失った昆虫の雌は、持たない系統と同じ形質を示し、リケッチアを持った雄との交尾では、子孫を残すことはできない。ただし、不和合の組み合わせでも少数ながら正常に発育する場合もある。蚊で見つかった細胞質不和合性は、その後いろいろな虫で見つかり、ショウジョウバエからも見つかる。

本論文は、ショウジョウバエ (*Drosophila simulans*) に共生しているリケッチアを抗生物質により取り除き、新たに蚊 (*Aedes albopictus*) に共生しているリケッチアをショウジョウバエに感染させても、リケッチアが同様に雌を通じて子孫に伝わり、細胞質不和合性に関与することを示したものである。この研究グループは、すでにショウジョウバエ同士でリケッチアの移植を行っており、今回の研究ではショウジョウバエと蚊のように系統学的に離れた昆虫間でリケッチアの移植導入を行ったわけである。まず、テトラサイクリンを与えてショウジョウバエの共生リケッチアを殺し、リケッチアのいないショウジョウバエを作った。そして、そのショウジョウバエの卵に、蚊の卵の磨砕液 (リケッチアを含む) を微量注入した。ショウジョウバエに注入した蚊のリケッチアの定着、増殖の有無は、PCR によるリケッチアの遺伝子の増幅によって判断した。PCR にはリケッチアの 16S リボソーム RNA 遺伝子に特異的なプライマーを用いた。6 世代にわたって調べ、1 雌に由来する一つのコロニーで PCR 産物が確認された。ショウジョウバエ本来のリケッチアの リボソーム RNA 遺伝子と蚊のリケ

ッチアのものとは、特定の制限酵素による切断部位が異なるので、どちらのリケッチアに由来したものなのかを判断できた。それによると、この PCR 産物は、一度除去したショウジョウバエのリケッチア由来のものではなく、注入した蚊のリケッチアのものであった。このコロニーの個体を用いてかけ合わせ実験を行い、産まれた卵の死亡率を調べた。このリケッチアを獲得したハエの雌とリケッチアをなくしたもとのハエの雄とのかけ合わせでは死亡率は低く (5.4%) 卵の発育は正常であったが、雌雄逆の組み合わせでは卵の死亡率は 67.5% であった (一方向不和合性)。また、もともとのショウジョウバエ本来のリケッチアをもった系統と蚊のリケッチアに置き換えた系統とのかけ合わせでは、雌雄どちらの組み合わせでも卵の死亡率は高かった (両方向不和合性)。

ハエの卵が発育する際、DNA に結合し蛍光を発する物質である DAPI で染色すると、リケッチアは分裂している核の中心小体の付近に分布しているのが観察される。蚊のリケッチアに置き換えられた卵で観察したところ、そのリケッチアはもとのショウジョウバエのものと同様の分布を示した。これらのことから、蚊からハエに入れたリケッチアでも、ハエの子孫に伝搬し、ハエ本来のリケッチアと同様の分布を示し、さらに細胞質不和合性を司ることが確認できた。

一般に共生微生物は宿主昆虫に特異的で、ハエと蚊のように比較的系統的に離れた昆虫同士では共生微生物の種類が異なり、移植は難しいと考えられている。Walbachia 属のリケッチアは、系統的に離れた昆虫にも共生しており、今回の報告はこの生殖に係わるリケッチアは昆虫の進化の途上で特定の昆虫種と共生関係を樹立して細胞内に入り込んだものではなく、後から侵入したものであることを裏付けている。またこのことは、このリケッチアを経済的に重要な昆虫に共生させ、生殖を制御しようという試みにもつながる。しかし、いまだに細胞質不和合性の機構の詳細は不明で、ここしばらくの研究の進展から目が

離せないといったところである。

(抄訳 野田博明—蚕昆研)

(NODA Hiroaki)

Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart

Braig, H. R., H. Guzman, R. B. Tesh and S. L. O'Neill

Nature 367:453, 3 February, 1994

文献情報

感染現場における植物の抵抗性遺伝子と病原菌の非病原性遺伝子の掛け引き

宿主植物と病原菌の相互関係は、gene-for-gene 説によってモデル化されているように、宿主植物が持つ抵抗性遺伝子 (*R* gene) と病原菌が持つ非病原性遺伝子 (avirulence gene) のあるなしの組み合わせによって決定されている。しかしながら、両遺伝子の産物のどのような相互作用によって病原菌の感染が成立するか否かについての決定的な答えは、物質レベルでも遺伝子レベルにおいても未だ見出されていない。最近、病原菌側の *avr* gene についての遺伝子レベルでの研究が活発化され、種々の病原菌においてその遺伝子構造や、産物の同定が明らかにされつつある。

著者らの研究は、トマトと葉かび病菌 (*Cladosporium fulvum*) を実験モデルとして、*R* gene と *avr* gene の関係を明らかにするための大きな手がかりとなる証拠をつきとめた。まず、過敏反応 (HR 反応) を誘導させる race-specific protein elicitor (AVR 4; Mr 12,000) を単離し、その N 末のアミノ酸配列を用いてそれをコードする遺伝子 (*avr* 4; 135 A. A.) の単離に成功し、その構造を明らかにした。この *avr* 4 を本来これを持たない別のレースに導入したとこ

ろ、親和性を示していた *C. fulvum* に対する抵抗性遺伝子 (*Cf* 4) を持つトマトに HR 反応を引き起こさせた。*Cf* 4 を持つトマトに対して親和性または非親和性を示す各々のレースにおいて、すべてのもので *avr* 4 とホモロジーを持つ遺伝子の存在が認められ、*avr* 4 の塩基配列に基づいて設定したプライマーを用いてそれぞれのレースで PCR を行ったところ、すべてのレースで同じサイズの遺伝子が増幅された。さらにそれを用いた RFLP 解析においても多型は認められなかった。それではなぜ、レースによって親和性、非親和性と反応が分かれるのか? 増幅された遺伝子の塩基配列を調べたところ、*Cf* 4 に対して親和性を示すレースに限って *avr* 4 と比べて 1 bp の変異が認められ、その変異の位置は 3 カ所に分類され、すべてシステイン残基がチロシン残基 (コドン TGT → TAT) に置換されていることが明らかになった。すなわち *avr* gene がコードする race-specific protein のシステインがチロシンに置換されることにより、S-S 結合が消失してタンパクの立体構造に変化をもたらすと考えられる。その結果として *R* gene (*Cf* 4) がコードしていると推定されるレセプターに結合できなくなり親和性に変わる。また、今までに報告されている病原細菌より単離された *avr* gene の産物には HR 反応を直接誘導するものではなく、今回明らかにされた結果は、*avr* gene のタンパクがレース特異的に HR 反応を誘導し、*R* gene と直接的に作用して宿主抵抗性の発現を決定していることを強く示唆している。

植物側の *R* gene に関する研究においては、Map-based cloning や Transposon Tagging などの手法により、様々なアプローチが試みられている。*R* gene の単離に至った例はまだ少ないものの、興味深い知見も得られていることから、これまで未知とされてきた宿主植物と病原菌との関係が分子レベルで明らかにされる日もそう遠くはないであろう。

(抄訳 橋本尚子—植工研)

(HASHIMOTO Hisako)

Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene

Matthieu H. A. J. Joosten, Ton J. Cozijnsen and Pierre J. G. M. De Wit
Nature 367 : 384, 27 January, 1994

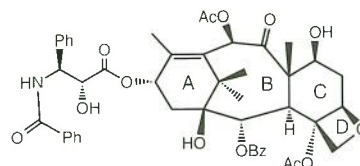
文献情報

タキソールの全合成

タキソール 1 は1971年いちょう科の植物である西洋イチイ Pacific yew (*Taxus brevifolia*) より単離，構造決定された。本化合物は高度に官能基化された特異なトリシクロペンタデカン基本骨格を有し，この分子の構造的な複雑さと新規さのために数多くの合成化学者の興味を引くこととなった。タキソール 1 が注目されるのはその複雑な構造ばかりでなく，抗ガン剤としての可能性とその新規な作用機構についてもである。本化合物は難治性の卵巣ガンに対して顕著な活性を有しており，1992年米国でこの病気の治療薬として認可された。タキソール 1 はこの他に乳ガンや肺ガンさらにはメラノーマなどにも有効であり社会的な関心も極めて高い化合物である。

タキサン系の化合物の合成については，これまで30以上のグループによる報告がある。しかしながらそれらの多くはタキサン型ジテルペンの基本骨格の合成についてが主であり，中でも最も複雑なタキソール 1 の全合成という点ではほど遠いものであった。その意味で Nicolaou らの今回の合成は極めて意義深いものである。

Nicolaou らは本化合物合成にあたり綿密な逆合成分析を行い，図 1 に示したような結合の構築を順次行っていく合成戦略を立てた。すなわち 1) 将来A環とC環となるべき2つのシクロヘキサン誘導体をそれぞれ別途調製しておき，これらをまず Shapiro 反応を利



Taxol 1

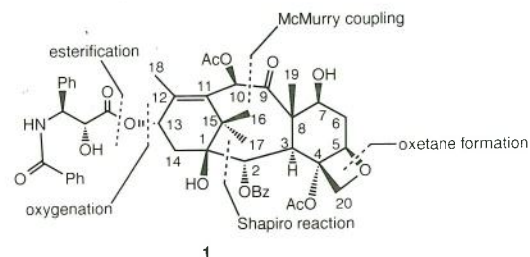


図 1 タキソール 1 と Nicolaou らの合成戦略

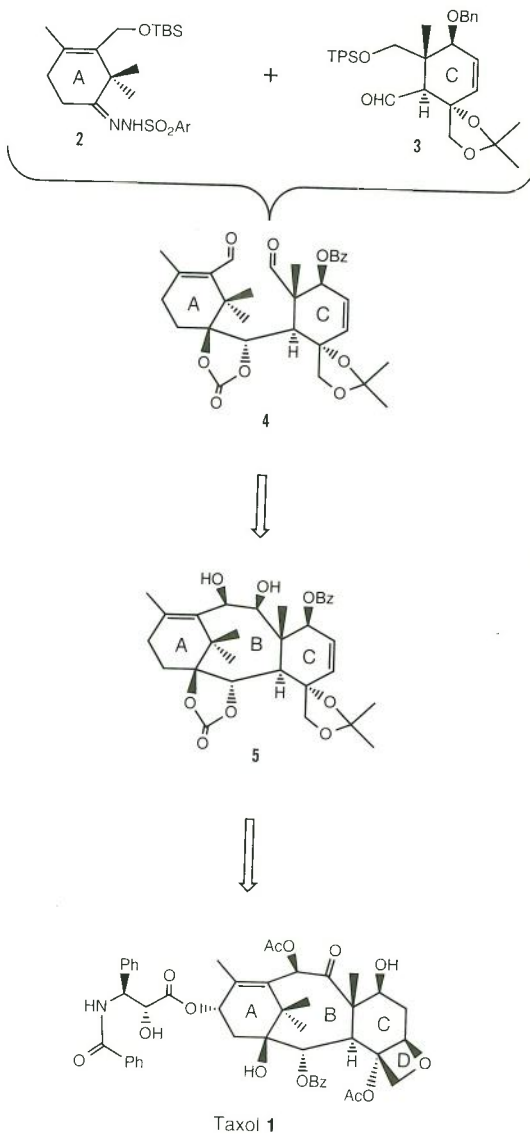


図 2 Nicolaou らの合成概略

用して縮合する。これにより1位と2位の間の炭素-炭素結合を形成すると同時に2位の水酸基の立体を制御する。2) McMurryの縮合反応を行い9位と10位の間の炭素-炭素結合を形成させ、同時に10位の水酸基の立体を制御する。3) オキセタン環を形成する。4) 13位のアリル位のメチレンを酸化して酸素官能基を導入する。5) 側鎖アミノ酸とのエステル化反応を行う。図2に彼らの全合成の概略を示す。

タキサン型ジテルペンの基本骨格合成において最大の問題は、B環の8員環をどのように構築するかである。というのも合成化学的な常識から言って、8員環形成は極めて困難な反応であり、これをどのように克服するかが、本化合物の合成の成否を左右するといっても過言ではない。NicolaouらはこれをMcMurryの縮合反応をジアルデヒド4に適用することで克服しようとした。しかしながらこの場合反応点である2つのアルデヒド基を如何に空間的に近づけるかが重要となってくる。そのためにNicolaouらは1位と2位の2つのジオールを環状保護基で保護することで、分子全体のコンホメーションを固定化してこの問題を解決し、23%という低収率ではあるが、環化生成物5を得ることに成功した。これでタキソール合成に必要な炭素基本骨格はすべて揃ったことになる。しかしながら彼らはここまでの合成をすべてラセミ体で行っているために、天然型タキソール1を合成するためには何れかの段階での光学分割が必要となってくる。そのために彼らは化合物5で光学分割することを考え、これを(-)-

カンフェン酸エステルへと変換した後にジアステレオマー分離し、同時に得られた結晶のX線結晶解析を行うことにより光学活性な天然型の絶対配置を有する5を得ることに成功した。その後、彼らは上述の合成戦略に基づいてオキセタン環の生成と、13位のアリル位酸化次いで側鎖アミノ酸を導入することにより、ここに始めて天然由来物質に依存しない人工的なタキソール1の全合成に成功したのである。

彼らの合成はコンバージェントな合成戦略をとっているにも関わらず、中間体2及び3の縮合から数えて26工程を要し、化合物2、3それぞれの調製を考慮すると40工程を越える合成となっている。したがって本合成がタキソール1そのものの大量合成に道を開くものではないことは明らかである。しかしながら、本全合成が高く評価されるのは、それが人間の英知の挑戦ばかりでなく、天然からは決して得ることができないような水溶性を持つ化合物の合成やまたタキソール耐性腫瘍に対する新規活性化化合物の合成に可能性を開くものであり、今後の展開が大いに期待されるからである。

(抄訳 恵畑 隆—日本たばこ, 生命研)

(EBATA Takashi)

Total synthesis of taxol

Nicolaou, K. C., Z. Yang, J. J. Liu, H. Ueno, P. G. Nantermet, R. K. Guy, C. F. Claiborne, J. Renaud, E. A. Couladouros, K. Paulvannan and E. J. Sorensen
Nature, 367: 630, 17 February, 1994

海外便り

ドイツ及びイギリスにおける植物トランスポゾン 研究の現状

農林水産省 農業生物資源研究所 形質転換研究室
廣近洋彦

1. はじめに

農林水産省の研究プロジェクト「イネ・ゲノムの効率的解析手法及び遺伝子分子地図の利用技術の開発」に関する海外調査のため、本年3月に12日間にわたってドイツのマックスプランク研究所（植物育種学研究所）、イギリスのAFRC（農業食糧研究会議）の植物科学研究所を訪問し、ゲノム研究の現状について調査する機会を得た。ここでは、トランスポゾンの研究を中心に、特に印象に残った研究及び研究環境について紹介する。

2. マックスプランク研究所における研究

ケルン市の郊外に位置する植物育種学研究所は400人の人員を擁し、研究者はその内約半数である。ディレクターは、分子生物学、分子遺伝学の分野で著名なK. Hahlbrock, H. Saedler, J. Schell, F. SalaminiとP. Starlingerである。ディレクターのもとにグループリーダーがおり、グループの大きさはポストドク、学生、テクニシャンをあわせて10人前後である。世界をリードする研究を支える要因として、人事の流動性とディレクターの力が大きいと感じられた。研究所では頻繁にセミナーが行われており、世界中の最新の情報をいながらにして得ることが可能である。滞在中にもコーネル大学のTanksleyのグループと、ミシガン州立大学のSomervilleのグループのセミナーがあった。セミナー会場で、ディレクターが一番前の席にすわり、盛んに質問をしていたのが印象的であ

った。

5人のディレクターのうち4人がトランスポゾンの研究に関わっている。StarlingerとSaedlerは、大腸菌のトランスポゾンの研究で多くの業績をあげたが、1980年代になって植物のトランスポゾン分子遺伝学的研究を始め、現在でもトランスポゾン研究で世界をリードしている。

Saedlerの下にいるA. Gierl（現ミュンヘン工科大）は、トウモロコシのトランスポゾンのうちAcと並びよく研究されているSpm/Enの解析を行っている。Acと同様に、シロイヌナズナやタバコに導入し、遺伝子単離（トランスポゾン・タギング）に利用する研究も行われている。シロイヌナズナにおいて高い転移能が示され、遺伝子単離に使える状況にある。一方、トウモロコシでの内在性トランスポゾンを利用した遺伝子単離も行われている。トウモロコシのごま葉枯病菌には3つのレースが知られているが、そのうちレースOに対する抵抗性遺伝子の単離が進められている。突然変異体の分離は、アイオワ州立大学のP. Petersonのグループが行っており、351,301個体のスクリーニングにより18の変異体を得られた。現在、分子レベルでの解析が行われている。多くの場合、抵抗性遺伝子は優性であるが、この遺伝子は例外的に劣性である。このことが、変異体のスクリーニングを容易にしている。Saedlerのグループは、キンギョソウの花器官制御遺伝子の研究でも世界をリードしている。

Z. Schwarz-SommerとH. Sommerは、トランスポゾンタギングで単離されたこれらの遺伝子の分子レベルでの解析を進めると

HIROCHICA Hirohiko

もに、それらの遺伝子の突然変異体を多数分離し、遺伝子機能を解析するという地道な研究も進めている。Schellのグループでは、T-DNA タギングによる遺伝子単離が行われている。T-DNA タギングの有効性を最初に示した C. Koncz は、発生、分化に多面発現する遺伝子を単離した。この遺伝子の産物は、Gタンパクの β -サブユニットと相同性をもつとともに、転写調節因子の特徴もつことが構造解析から示された。このほかにも T-DNA の挿入による変異体は数多く分離されているようである。T-DNA タギングは有効な方法であるが、問題点も指摘されている。それは、かなり高い頻度で T-DNA の挿入によらない変異が生じるという点である。Koncz は、T-DNA の組み込みの失敗に基づく DNA の再編成に起因すると推定している。R. Walden は、エンハンサーを連結させた T-DNA によるタギング法を開発している。この方法では、優性の突然変異を誘発できるため、倍数性に関係なく細胞レベルでの突然変異体の分離が可能である。この方法を用いて、すでにオーキシンのシグナル伝達に関与すると推定される遺伝子が単離されている。さらに、アルミニウム耐性遺伝子やポリアミン合成に関与する遺伝子等の興味ある遺伝子も単離されつつある。

3. AFRC 植物科学研究所における研究

AFRC 植物科学研究所には、ノーリッチ市郊外にあるジョン・イネス研究所、ケンブリッジ・ラボラトリー、セインズベリー・ラボラトリーと、ブライトン市にある窒素固定研究ラボラトリーが含まれ、今回、ノーリッチの研究所を訪問した。窒素固定研究ラボラトリーは、今年の秋にノーリッチに移転し、民間の資金で設立されたセインズ・ラボラトリーを除き一つの研究所に統合される予定である。ジョン・イネス研究所の所長であり、国際植物分子生物学会の会長でもある R. B. Flavell 教授が新しい研究所の所長になる予定である。Flavell 教授は、植物ゲノムの解析、特に反復配列の研究で著名である。

AFRC 研究所では、多くの研究者が色々な方面からゲノム研究に関与している。

E. Coen と C. Martin のグループはキンギョソウのトランスポゾンとトランスポゾン・タギングによって単離された花関連遺伝子の解析を行なっている。Martin のグループは、*Tam 4* トランスポゾンの挿入による花色変異体を分離したが、予想に反し色素の合成に変化が見られなかった。変異体では花弁の表皮細胞の形態に変化がみられ、そのために光の反射が変化し色調が変化することが分かった。細胞の形態を決定する遺伝子として注目される。キンギョソウの *Tam 3* トランスポゾンの転移頻度を調節する因子として温度と *Stabiliser* 遺伝子が知られているが、作用機構は全く不明である。*Stabiliser* とは異なった座位に転移を抑制する新たな遺伝子が同定され、2 コピー逆方法に配置された *Tam 3* そのものが、この遺伝子の実体である可能性が示された。作用機構は不明であるが、形質転換植物で見られる co-suppression のような遺伝子間相互作用の一つとしてとらえうるものと考えられる。少なくとも5つのグループがトウモロコシの *Ac/Ds* を利用したタギングの研究を行っており、その中で最も成功をおさめたのは J. Johns のグループである。Johns はストレプトマイシン耐性遺伝子を利用し、転移の頻度及び時期を調べるのに有効な系を開発したことで有名である。この系を利用し異種植物における *Ac/Ds* の転移機構に関する基礎的な研究を続けており、最近の成果は、Cell 等の雑誌に発表されている。このようなトランスポゾンの基礎的な研究と並行して、トマトの葉かび病抵抗性遺伝子の遺伝学的解析とタギングによる遺伝子単離を行っている。最近、トマトの葉かび病抵抗性遺伝子 *Cf-9* の単離に成功した。以下、簡単にその実験について紹介する。まず、これらの遺伝子のマッピングから始めた。その結果、これまでとは異なる結果が得られ、10 番染色体にマップされていた *Cf-9* は、1 番染色体にマップされた。*Ds* は近傍に転移する傾向があるので、*Ds* の挿入による突然変

異を効率的に単離するためには、*Ds* が目的とする遺伝子の近傍に挿入された系統を得ることが必要である。これまでに50近くの *Ds* 導入系統でマッピングが行われ、*Cf-9* から約3cMのところ、*Ds* が導入された系統が得られた。*Cf-9* は優性であり、*Ds* の挿入による変異体は、葉かび病菌に対して感受性になる。このような変異体を選抜することは容易ではない。そこで、次に述べるようなユニークな方法で変異体の選抜が行われた。*Cf-9* に対する菌の非病原性遺伝子 *avr 9* がすでに単離されるとともに、その遺伝子産物であるタンパク質を *Cf-9* をもつ植物に接種すると過敏感反応を起こし、細胞が壊死することが明らかにされている。*avr 9* 遺伝子と *Ac* の転移酵素遺伝子を導入した系統と先に述べた *Ds* を導入された系統 (*Cf-9* 遺伝子をもつ) を交配する。交配により *Ds* の転移が誘発されるとともに、過敏感反応が起こる。過敏感反応のため大部分の F_1 植物は成長を阻害されるが、*Ds* の挿入により *Cf 9* 遺伝子に変異した植物は正常に成長する。このようにして15万の F_1 植物から68の変異体を得られた。遺伝子の解析から、膜貫通型で細胞外領域にロイシンリピートをもつタンパクをコードすることが示された。非病原性遺伝子産物による認識機構を考えるうえで興味ある構造である。葉かび病抵抗性遺伝子は11種類知られているが、そのうち *Cf-1* と *Cf-4* が *Cf-9* の近傍にマップされているので、これらの遺伝子も近い将来、同様な方法で単離されるものと期待される。3つのグループが、シロイヌナズナでのタギングを行っている。C. Dean と J. Coupland はタギング系の開発に成功した。それぞれ、これまでに *drl-1* (突然変異形質として葉や根の異常を示す) と *alb 3* (突然変異形質としてアルビノ) 遺伝子の単離に成功しているが、これらの研究の過程で一つの問題点が指摘された。T-DNA タギングで指摘された問題と同じく、*Ds* の挿入を伴わない突然変異が誘発されることである。例えば、Dean は分離された突然変異の40%近くは *Ds* の挿入によらな

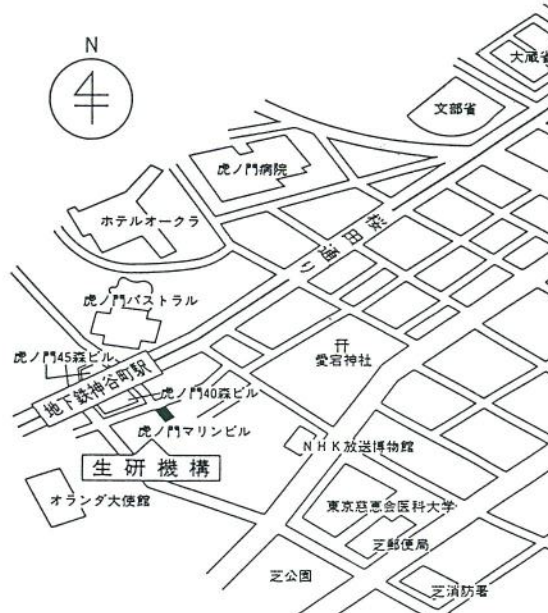
いという結果を得ている。その原因として、内在性のトランスポゾンの活性化が考えられ検討されたが、既知のトランスポゾンでは説明できないことが示された。Dean は、M. Bevan のもとでクロモソーム・ウォーキングによる遺伝子単離も行っている。Bevan は EC におけるシロイヌナズナのゲノム解析の中心的な存在であり、Bevan 自身は染色体4番と5番の一部を担当し、YAC コンテイング作りを進めている。この研究の一環として花芽誘導の時期を調節する遺伝子の一つが YAC 上にマップされている。N. Harberd は、クロモソーム・ウォーキングとトランスポゾン・タギングで *gai* 遺伝子の単離を試みている。この遺伝子の変異体は、矮性でジベレリンに非感受性である。そのため、この遺伝子はジベレリンの受容またはシグナル伝達に関与する遺伝子として注目されている。現在、*gai* から10cMの位置に *Ds* が挿入された系統が得られるとともに、*gai* をほぼカバーする YAC クローンも得られており、遺伝子単離は時間の問題と思われる。P. Dale は、Johns の開発した *Ac* と *Ds* をそれぞれ挿入した Ti プラスミドを利用して、ナタネにおけるタギング系の開発を試みている。今後、耐病性や油の合成を支配する遺伝子を単離したいとのことであった。

4. おわりに

今回、ヨーロッパを視察して驚いたのは、予想以上に多くの研究者がトランスポゾンに関連した研究をしていることである。本稿では、取り上げなかったが、染色体の主要な構成成分として、また植物の進化を調べるための指標としてもトランスポゾンが研究されている。日本でも植物のトランスポゾンの研究者が増えることを期待したい。本稿でとりあげた研究者の多くが、30代から40代前半であり、10から20人規模のグループのリーダーとして研究を行っているのが印象的であった。今回の訪問は、研究の現状を知るだけでなく、日本との研究体制の違いを知るうえでも大変有益であった。

お知らせ

生研機構は6月30日以降下記奥付きのように住所を変更しました。なお交通は、営団地下鉄日比谷線の神谷町駅下車（徒歩2分）が便利です。



編集後記

本誌の購読につきましては、平素から格別のご愛顧をいただき厚くお礼申し上げます。

皆様により喜ばれる誌面に改善するため、毎年農水省の試験研究機関の企画調整部長等で構成する編集懇談会を開催して意見を伺っています。また、本年2月には、報道、企業、団体、大学、農水省および公立試験研究機関の有識者にお集りいただき、本誌の編集についてご意見をいただきました。

これらのご意見を踏えて、本号から総説、

国内情報、地域の先端研究には要旨をつけることにしました。また、次号(9月発行)からは表紙の写真をカラー化し、デザインも一部変更することになりました。新しい企画等編集について今後とも積極にご意見をいただきますようお願いいたします。また、表紙にふさわしい写真をお持ちの方は遠慮なくお知らせいただきますようお願いいたします。

(大畑記)

ブレイン テクノニュース (第44号)

平成6年7月15日発行

発行者 浜口義曠

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

〒105 東京都港区虎ノ門3丁目18番19号 虎ノ門マリンビル10F
TEL. 03-3459-6565 FAX. 03-3459-6566

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