

CODEN : BTEEEC

TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 45 号

SEPTEMBER 15, 1994

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution



レテノール・モルフォ
(本文 5 ページ参照)

発行=生物系特定産業技術研究推進機構

総 説

古澤 巖

遺伝子組換え植物による医薬品生産…………… 1

国内情報

窪津 彰

モルフォ蝶の美しさの秘密と新素材開発…………… 5

村上元威

化学修飾リパーゼによる脂質の改質…………… 8

小松田隆夫

植物体再分化能の遺伝子マッピング……………11

藤森 嶺

スズメノカタビラを枯らす微生物……………15

文献情報

植物におけるプログラムされた細胞死……………19

フェロモン流 (pheromone plume) の連続性と蛾の飛翔行動……………20

ウイルス外被タンパク質の移行および粒子形成における独立した役割……………21

遺伝子組換えバキュロウイルスの野外試験……………22

国際学会レポート

西 和文

第5回国際大豆研究会議に参加して……………24

特別情報

今井 裕

トランスジェニック家畜を利用した異種臓器移植へのチャレンジ

Dr. White の講演会を聞いて……………27

遺伝子組換え植物による医薬品生産

京都大学 農学部
古澤 巖

組換え植物体を用いた物質生産は自然のエネルギーと圃場を用いた生産系であり、特別な装置を必要とせず、また、生産系は種子として恒久的に保存できるところに特徴がある。植物ウイルスの高い増殖能力を用いた異なる2つの方法で有用タンパク質を合成した系について述べる。また、遺伝子組換え技術を用いて新たな酵素を導入し、新しい二次代謝産物を合成した例についても述べる。

1. はじめに

有用タンパク質の大量生産システムとしてこれまで細菌、イースト、昆虫の幼虫、動物細胞、植物細胞や植物個体など多くの系が用いられてきた。いずれの系も特徴があり有効な系である。ここでは植物個体を用いた医薬品生産について述べてみたい。なお、ペプチドの大量生産には目的の遺伝子の mRNA を大量に合成する必要があり、強力なプロモーターの利用や強力な合成能をもつウイルスの増殖能を利用した系がある。植物個体を用いた物質生産は自然界からの太陽エネルギー、二酸化炭素及び水を利用した系であり、そして無機肥料と圃場があれば十分である。したがって、安価でかつ特別な装置を必要としないうえ、形質転換体として得られた植物は種子として恒久的にその性質を保持することができるので大変有効である。

2. ヒト γ -インターフェロン (IFN) の生産

真核生物においては mRNA は DNA から RNA ポリメラーゼ II によって合成されるが、RNA ウイルスではウイルスの mRNA はゲ

ノム RNA から RNA 複製酵素によって合成される。われわれはこの2つの合成系を融合させ mRNA 増殖システムを構築し、植物個体を用いた IFN の生産を試みた。すなわち、

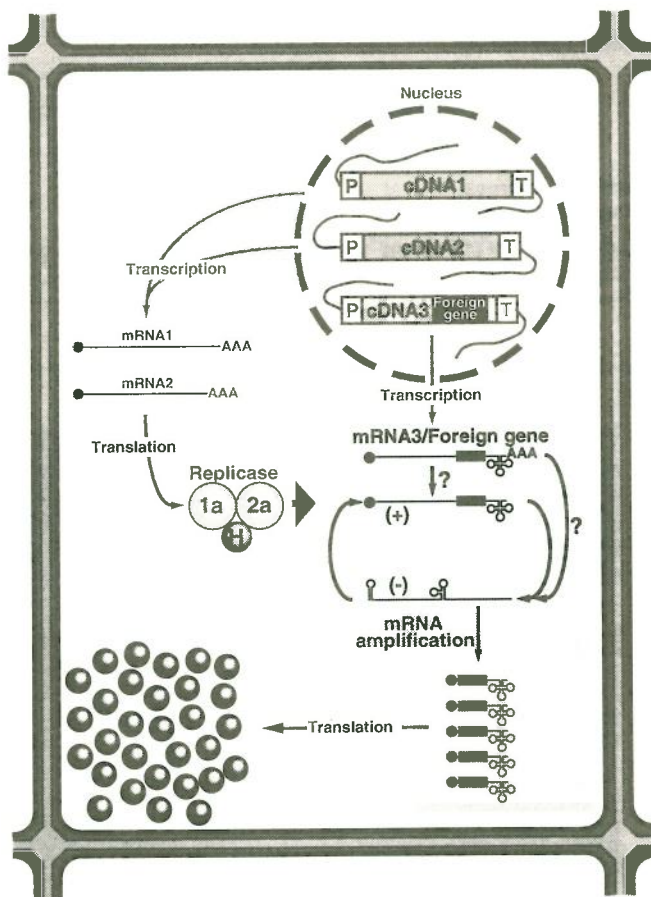


図1 mRNA増幅による外来遺伝子産物の大量生産システムの模式図

ウイルスの RNA 複製酵素遺伝子を植物の染色体 DNA に組み込み、植物の遺伝子発現システムを用いて RNA 複製酵素を細胞内に発現させる。さらに、そのような細胞に本酵素に認識されるシス配列を持った mRNA が転写されるように染色体 DNA に組み込んでおく。この結果、mRNA として転写された RNA はウイルスの RNA 複製酵素によって細胞質内で大量に増殖される (図 1)。この様な RNA に IFN 遺伝子を組み込んでおくことで細胞内で IFN の生産が期待される。

ブロムモザイクウイルス (BMV) はイネ科植物を宿主とする RNA ウイルスである。しかし、プロトプラストのような細胞レベルではタバコ細胞でも増殖は可能である。

BMV は 3 種のゲノ RNA 1, 2 及び 3 と 1 種のサブゲノム RNA 4 からなっている。それぞれの RNA は 1a, 2a, 3a 及び外被タンパク質を合成することができる。その内 1a と 2a はウイルスの複製酵素の構成タンパク質であり、3a はウイルスの細胞間移行に関与するタンパク質であるとされている。外被タンパク質は感染の過程でマイナス鎖 RNA 3 から転写される RNA 4 から翻訳される。ウイルス RNA の 3' 末端は tRNA 様構造といわれる各 RNA に共通した塩基配列をもっており、ウイルスの RNA 複製酵素によって認識され、まずゲノム RNA と相補的なマイナス鎖 RNA が合成される。さらに、マイナス鎖の 3' 末端を認識して複製酵素は次々とプラス鎖 RNA を大量に合成する。最終的には 1 細胞当たり $1 \sim 2 \times 10^6$ 個の粒子が合成され、ウイルス粒子を構成するタンパク質量は全可溶性タンパク質の 50% にもなる。われわれは、このようなウイルスの RNA 増幅能力を利用して IFN の mRNA 増幅システムを構築した。まず、BMV RNA 1, 2 及び 3 を用いて cDNA 1, 2 及び 3 を合成し、ベクターにクローニングした。これらを基本にして、CaMV の 35SRNA プロモーター配列の下流に正確にウイルス RNA が転写されるように cDNA を接続し、つぎにこれらのベクターを用いて、種々の形質転換用ベクターを構築した (図 2)。RNA 複製酵素を発現しているタバコ植物を作製した。しかし、この系では増幅させたい mRNA 以外の複製酵素の mRNA もそれ自身から合成された細胞中の複製酵素によって自己複製されるので、いわゆる“ウイルス”としての影響を植物に与える可能性がある。その場合は本来の目的からすると好ましくない。そこで RNA 1 と 2 の cDNA を組み込む際に複製酵素の認識部位である 3' 末端の tRNA 様構造を欠失した cDNA を組み込むことにした。この転写産物は 1a 及び 2a の mRNA としての活性はあるが、ウイルス RNA として自己複製できない。このような形質転換植物からプロトプラストを調製し、*in vitro* で合成した RNA 3

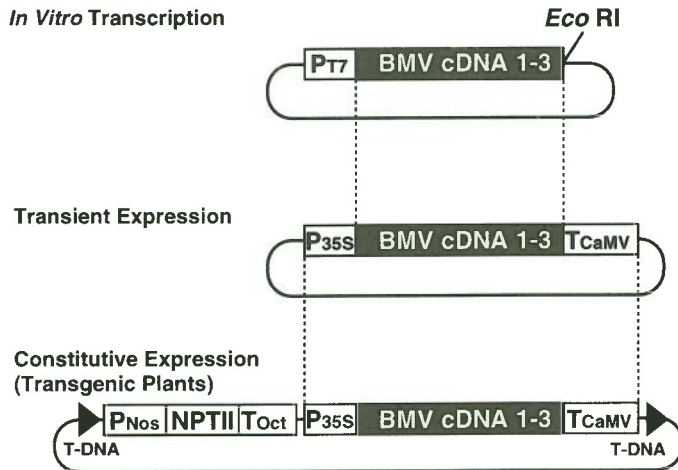


図 2 システム構築のために用いた各種プラスミドの模式図

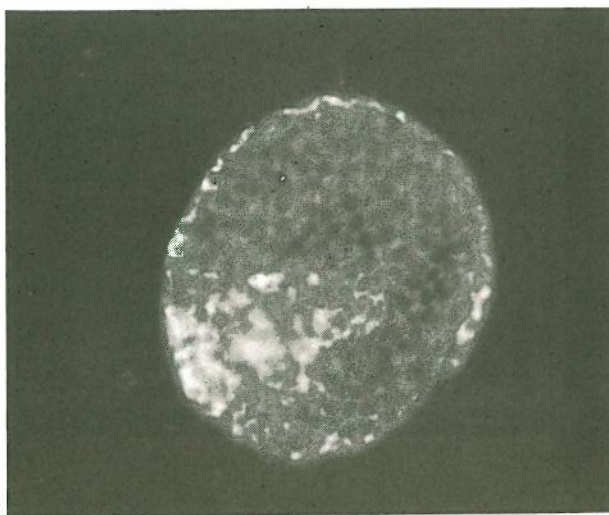


図 3 タバコプロトプラスト中に合成された IFN FITC でラベルされた IFN 抗体で染色した。

のみを接種した場合にもウイルス粒子を接種した場合と同程度に外被タンパク質が合成されたことから、ウイルス RNA 3 の複製及び RNA 4 の転写には十分な複製酵素が植物細胞から供給されていることが示唆された。このような細胞ではウイルスの複製酵素に対するシス配列を持った RNA を細胞内に導入することによって大量の mRNA が増幅されると考えられる。このシステムを用いる場合は当然 RNA 複製酵素認識部位としてのシス配列が必要であるから、IFN 遺伝子をウイルスの遺伝子と置き換える必要がある。我々はウイルスの遺伝子産物の中で最も合成量の多い外被タンパク質遺伝子に的を絞り、外被タンパク質のコーディング領域に存在する 4 個の AUG コドンを利用して IFN と外被タンパク質との融合タンパク質となるように RNA を合成し、*in vitro* 翻訳系においてそれら RNA の翻訳活性を調べた。その結果 2 番目の AUG を利用して IFN を組み込んだ場合に翻訳能が最も高く、さらに、IFN 遺伝子の挿入によって 1 番目の AUG からの融合タンパク質の翻訳がほとんど起らず、大部分は 2 番目の AUG から翻訳された IFN そのものであった。外被タンパク質遺伝子を IFN 遺伝子に置換した RNA 3 (CP2IFN) を RNA 複製酵素を発現しているタバコ細胞に接種したところ、細胞の可溶性タンパク質の約 10% が IFN であることが分った (図 3)。シンドビスウイルスの干渉効果から算出した IFN 活性は authentic な IFN の 1/5 であった。しかし、純化した IFN を用いなかったのでその値が低く算出されたものと思われる。合成された IFN は正しくプロセッシングされ糖鎖修飾も受けていた。しかし、泳動パターンが authentic な IFN と異なることから糖鎖の組成は異なるものと思われる²⁾。CP2IFN を組み込んだ形質転換用ベクターを BMV の RNA 複製酵素を発現しているタバコに *Agrobacterium* を用いて導入した。再生した個体の一部を取り、IFN の抗体を用いてウエスタン分析を行い、IFN を合成している個体を選抜した。その結果、細

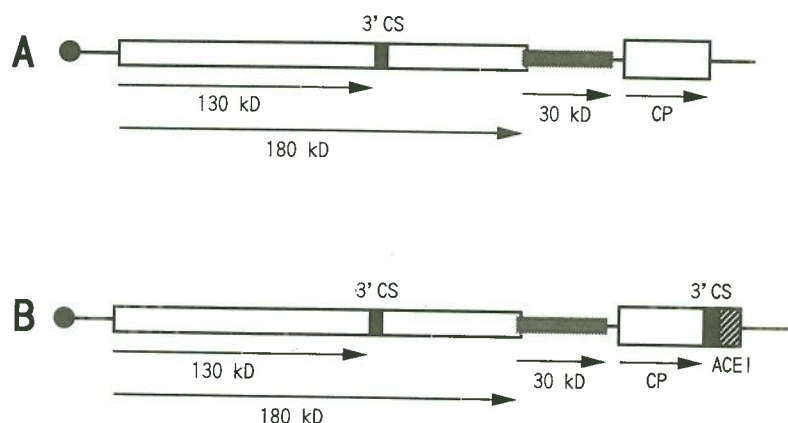


図4 Wild typeのTMV(A)及びACEIを合成するTMV(B)の遺伝子構造

胞の可溶性タンパク質の約 1% が IFN であることが分った²⁾。この値は期待した量よりも少なく、改良点を残した。現在、個体レベルでの生産増大に向けて種々の試みを行っている。

3. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitor (ACEI) の生産

タバコモザイクウイルス (TMV) はタバコに感染し、その増殖量は非常に高い。TMV はタバコの葉に接種すると増殖しながら全身に拡がり 1 週間後には新しく展開した葉に病徴が現れ大量のウイルス粒子 (2 g/汁液 l) が形成される。図 4 に示すように、TMV は 4 つの遺伝子 180kDa, 130kDa, 30 kDa 及び外被タンパク質遺伝子 (CP) をもっており、30kDa と CP が存在しないと TMV は全身に広がることができない。そこでリードスルー現象を用いて ACEI を CP の C 末端に融合タンパク質の形で結合し、ACEI 合成を行う。この場合は同時に野生型 CP も生産される TMV も作られているので TMV は植物の全身に拡がって増殖する。この場合のリードスルー現象とは 130kDa のストップコドンである UAG (アンバー) がタバコ細胞中に存在するサプレサーによってある確率でチロシンに読みとられることによって 180kDa が合成される。この現象に必要なシス配列及びアルギニンのコドン CP と目的の遺伝子との統合部位に挿入しておく authentic な CP が合成されると共に目的の遺伝子と CP

の融合タンパク質も合成され TMV は全身に拡がると共に融合タンパク質によって形成された TMV も合成される。ACEI は12個のアミノ酸からなるペプチド (Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys) で血圧降下剤として用いられている。TMV の C 末端に UAG (アンバー)-CAATTA (3'CS)-AGA (Arg) 配列及び ACEI 配列を挿入する。In vitro でこのキメラ RNA を合成し、タバコに接種する。このキメラ TMV は増殖・移行を繰り返しながら全身に拡がり、正常な CP と融合タンパク質からなる CP (約20%) に包まれた TMV が形成される。感染葉からの TMV の純化は簡単であり、その純化程度はかなり高い。TMV を純化後、トリプシン処理を行い、ACEI を融合タンパク質から分離する。最終的に生葉 1g から約 100 μ g の ACEI が得られている³⁾。このような方法でインフルエンザウイルスやエイズウイルスの抗原エピトープに対する TMV ワクチンの作製も試みられている (岡田私信)。

4. Scopolamine の生産

トロパンアルカロイドである scopolamine は血圧降下剤として知られている。scopolamine は, hyoscyamine が hyoscyamine 6-hydroxylase (H 6 H) によって酸化され, 6-hydroxyhyoscyamine となり, 同じ酵素 H 6 H によってさらに酸化され最終的に合成される。Atropa belladonna は hyoscyamine を大量に蓄積している植物であることが知られており, A. belladonna への H 6 H 遺伝子の導入により, scopolamine の大量生産が試み

られている。Hyoscyamus niger から H6H の遺伝子をクローニングしたのち, CaMV の35SRNA プロモーターの下流に接続し, Agrobacterium を介して H 6 H 遺伝子を A. belladonna に導入した。その結果, 形質転換体植物の葉に scopolamine が蓄積されていることがわかった⁴⁾。新しい酵素付加による 2 次代謝産物の生産である。

5. おわりに

有益なタンパク質を大量に生産する手段としてこれまで, ウイルス, バクテリア, イースト, 培養細胞系などいろいろと試みられてきたが, 何れの系も目的とするタンパク質によって, 適, 不適がある。例えば, 原核生物であるバクテリアではタンパク質の修飾ができない。また, 動物細胞の培養ではコストがかかるなど, それぞれ問題を持っている。一方, いわゆる“分子農場”という考え方がある。これは高等植物を利用した圃場における有用タンパク質の生産である。有用遺伝子を植物に組み込んだ系であるので, その植物が得られればその種子を播種し, 採種することでほぼ恒久的に物質生産系が確保できる。

文 献

- 1) Mori, M., et al. (1993) *J. Gen. Virol.* 74: 1225-1260
- 2) Mori, M., et al. (1993) *FEBS Lett.* 336: 171-174
- 3) Hamamoto, H., et al. (1993) *Bio/Tech.* 11: 930-932
- 4) Yun, D-J., et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11799-11803

国内情報

モルフォ蝶の美しさの秘密と新素材開発

(株)クラレ 物性研究所

窪津 彰

走査電子顕微鏡で観察すると、その微細構造とそのものもつ特性との間に深い関連のあることがよく判る。ここでは自然界の生物にみられるその関係の一つで、翅の色が美しいことで有名なモルフォ蝶の翅の発色機構が、その表面を覆っている鱗片の表面微細構造によって発現していることを、観電子顕微鏡写真で示す。この知見がヒントとなり、偏平断面でしかも周期的ねじれのある新しい繊維が開発され、モルフォ蝶の鱗片表面のように偏平繊維が立ち並ぶように織り上げた布を作り出すことに成功した。これが現在でも当社の高付加価値商品の一つで、優れた光沢特性をもつ衣料用素材「デフォール」であり、この誕生につながった経緯について紹介する。

1. はじめに

微細構造とそのものもつ特性とが密接な関係にあるのは当然だが、なかでも自然界、とくに生物にみられるその関係りには驚くべきものが多数ある。走査電子顕微鏡はそれら微細構造とのかかわりを明らかにするための有用な観察手段である。ここではこれまでにおこなってきた走査電子顕微鏡の観察結果のうちからモルフォ蝶をとりあげ、その美しい発色が翅の微細構造とどのように関係しており、それが当社の新しい繊維素材の開発²⁾にどのようなかかわりを持ったかについて紹介する。

2. モルフォ蝶の翅の発色構造

南米のアマゾン河流域に生息するモルフォ蝶は翅を広げると20cmにもなる大型の蝶である(表紙)。とくにその翅の表の色がコバルトブルーでしかもメタリックな光沢を有するレテノール・モルフォはその美しさで有名

である。この翅の色は見る角度によって微妙に色調が変化することあつて、その特性を生かして翅を絵画のように張り合わせたブラジル特産のモルフォ蝶の額飾りもまた有名である。

モルフォ蝶の美しい発色部分の表面を走査電子顕微鏡で観察すると低倍率では鱗片の配

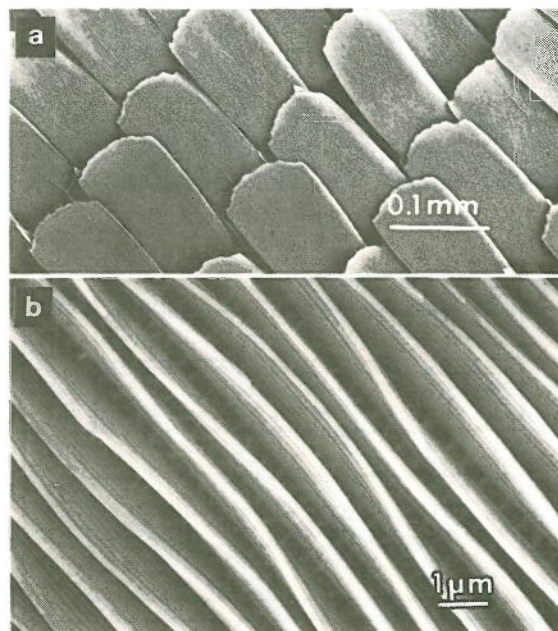


写真1 モルフォ蝶の翅発色部の表面

a) 弱拡大、鱗片の配列

b) 鱗片表面の拡大

KUBOTSU Akira

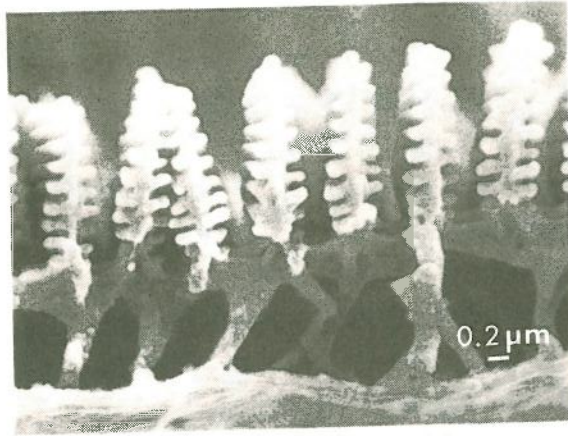


写真2 発色鱗片の断面構造

列が見え(写真1-a), その一枚の表面をさらに拡大すると, その生えている方向に細かいたて筋のある薄い板を立てて並べたような構造が見える(写真1-b)。板の並びに直交方向の断面を見ると板の両面に細長い棚が約 $0.2\mu\text{m}$ の間隔で規則正しく7~9段ついており, これが筋状に見えていたことが判る(写真2)。鱗片表面に光をあてると, 入射光はこの微細で細長く, しかも規則正しい線り

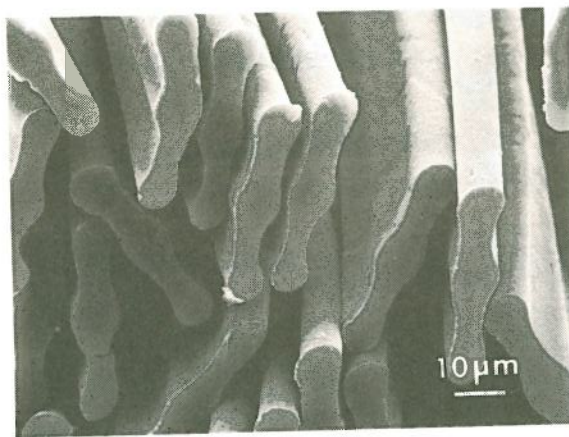


写真3 複合扁平繊維の断面形状

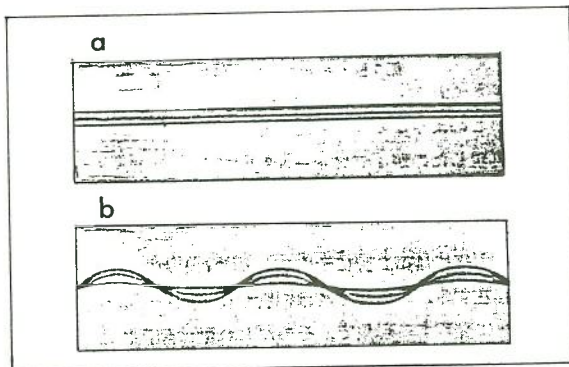


図1 複合扁平繊維のねじれ発生状態

- a) 単繊維, 熱処理前
- b) 熱処理後, 変性成分側の収縮で繊維にねじれを生ずる

返しのある棚構造に進入, 反射する際にいわゆる多重干渉現象をおこし, あの美しい色が干渉色として発現しているのである。

翅の色が干渉色であるならば本来の翅の色(色素)はどんな色であろうか。発色している翅の表面に濡れやすく適当な屈折率をもつ液体を一滴落とすと, 棚構造の空間に侵入して屈折率差が小さくなりそこで干渉が起こらなくなって色素の色が見えるが, その色は翅の裏側の色と同じ褐色である。すなわち本来全体が褐色の蝶だが, 表面側だけが干渉を起こす特異な構造の鱗片で覆われているためにあのように美しい色がでていたのである。翅の表側でも白色模様の部分や裏側の褐色の鱗片の表面は明らかに異なり, 干渉を起こすような微細構造はない。

3. 繊維新素材への応用

モルフォ蝶の鱗片の発色構造(多重干渉構造)はあまりにも精巧, かつ微細であり, これを人工的に作り出すのは容易ではない。しかし, 丁度その頃新しい繊維素材開発を目的に扁平な断面をもつ繊維を検討していた時であったので, 扁平断面繊維を蝶の発色鱗片の表面のように薄い板を立てて並べたような状態にできないか, そうすれば干渉色は得られないにしても, これまでにない特異な反射, 光沢をもつ織布が得られるのではないかという発想につながった。

織布はタテ糸とヨコ糸が交互に重なっているためその交点で扁平な繊維は横に寝てしまい, 鱗片表面のようにこれを立てて並んだ状態に保つことは非常にむづかしい。種々試行錯誤の結果, なんらかの工夫で繊維にねじれを与えその周期が織布の重なり周期とうまく合うようコントロールできればその可能性があることがわかった。多くの検討のすえ単一組成の繊維では不可能と判断され, これに代わって性質の異なる異種ポリマーを組み合わせ状態にした繊維(複合繊維)が研究された。その結果通常の繊維に用いられるポリエステルとこれを少し変性したポリエステルと

を断面中央ではり合わせた複合偏平繊維³⁾を用いると、二種のポリマーの熱収縮率の差で繊維にねじれを与えられることが見出だされた(写真3, 図1)。ポリマーの変性度, 繊維の延伸条件, 適合織組織, 熱処理条件などの詳細な検討により, 苦勞の甲斐あって見事に偏平繊維が立ち並んだ, モルフォ蝶の翅の表面構造を連想させる織布を得ることができた(写真4)。

この織布を波打たせた状態にすると窪んだ部分では立ち並んだ繊維の平面に平行に入射する光が多くなって正反射光が減少するため非常に濃色に見え, また突出した部分では繊維が倒れるため繊維の偏平面で正反射する光が多くなって強い光沢を示す(図2)。予想どおり, これまでの織布では見ることはできなかったベルベット様の光沢が得られた。さらに偏平繊維が用いられることにより織布自体が特徴のあるドライな風合を有し, ドレープ性がきわめて良好であるという予想外のすぐれた性質が得られた。1984年に「デフォール」の商品名で発売され, その新しい素材感が好評を博した。この新素材開発により1988年繊維学会より「技術賞」を受賞した。

4. おわりに

ここで取り上げたモルフォ蝶に限らず, 生物はきわめて精緻, 巧妙かつ合理的な微細構造を有しており, これが研究開発のヒントになることも多い。平素何気なく見ている自然の摂理には微細構造が深くかかわっており, 研究するものにとって限りない興味の対象と



写真4 新素材「デフォール」生地表面状態

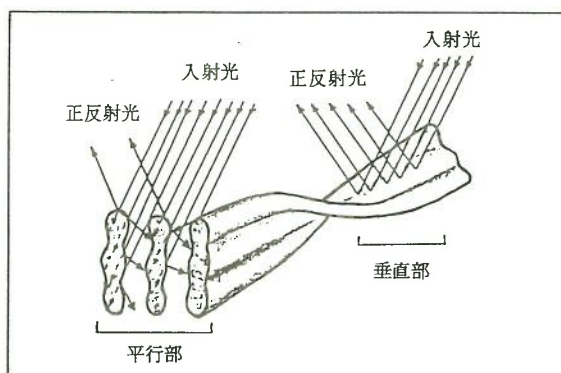


図2 「デフォール」の光沢特性

いえる。今後も自然にかかわる微細構造観察により有用な知見を得るとともに, これが豊かな生活に結びつけられることを期待したい。

文 献

- 1) 平野豊・窪津彰 (1988) 繊維学会誌, 44(3):102
- 2) 窪津彰・安井照夫 (1988) 化学, 43(2):107
- 3) クラレ:特開昭 59-22809, 59-59920

国内情報

化学修飾リパーゼによる脂質の改質

雪印乳業(株)技術研究所

村上元威

リパーゼは、エステル合成反応や交換反応をも触媒することが知られているが、反応に適している水の少ない系中で溶解・分散させることは困難である。そこで、この酵素タンパク質の表面に脂肪酸を結合させ、酵素に疎水性を付与することによって、有機溶媒や油脂中でも容易に分散し、高い活性を期待できるリパーゼの調整法を確立した。また、修飾に用いる脂肪酸の種類による基質特異性の変化についても検討を行った。本稿では酵素の化学修飾法について概説し、特に脂肪酸修飾リパーゼの有用脂質成分合成への応用について紹介する。

1. はじめに

リパーゼは工業的には、食品分野を中心として、カカオ代用脂などの付加価値の高い油脂の製造、魚油などからの食品素材の製造やフレーバー剤の製造などに用いられている。

他に医薬品関連分野の有機合成反応や臨床診断用酵素への応用、フェロモン合成、製紙工業への応用、液晶などの合成等にも応用されるなど、その用途は幅広い¹⁾。

リパーゼはアミラーゼ、プロテアーゼなどと比較して、学術的な基礎研究の面でも、工業的な利用の面でも、遅れをとっていた。この原因の一つには、リパーゼの基質である油脂は水に対して不溶であることがあげられる。これは、水に不溶性である基質と、水溶性である酵素を用いるが故に反応系が不均一になり、速度論的な解析などが困難になるという結果をもたらすからである²⁾。

しかし、近年の遺伝子工学、タンパク質工学といった分子生物学の発展によりリパーゼの研究も飛躍的に進み、分子レベルの解析も急速に行われ始めてきた。また、上記の不均一反応系を解消するために酵素自体を脂溶性

に改変するような酵素修飾法の研究が各方面で行われている。そこで本稿では、タンパク質工学研究の領域の中で、特にリパーゼに関して進んでいる化学修飾について、著者らが開発した水溶性活性エステルを用いた脂肪酸修飾リパーゼを中心にして紹介したい。

2. リパーゼの化学修飾

酵素の化学修飾は反応機構の解析や活性部位の検索の有力な手段として学術的、基礎的な目的で従来からよく使用されてきた。産業上の利用面から見ると、アフィニティークロマトグラフィーやパイオリアクターで用いる固定化担体への結合手段として今後必要なものであり、産業上の重要度は増すと考えられる。

一方、リパーゼは加水分解反応のみならず、エステル合成反応やエステル交換反応をも触媒する事が広く知られてきており、この分野についての多くの知見が蓄積されてきている。Klibanov^{3,4,5)}らの報告以来有機溶媒中での酵素反応が注目を集めており、特にリパーゼは基質が水に対して不溶であることから、この研究の代表的なターゲットとなっている。

有機溶媒中で酵素反応を行うメリットとして山根らは以下のようなことをあげている⁶⁾。

MURAKAMI Mototake

- ①脂溶性基質の溶解度を高めることができる。
- ②熱力学的な平衡を加水分解から合成へとシフトさせられる。
- ③水に依存する副反応を抑制できる。
- ④固定化がしばしば不要である。
- ⑤固定化が望ましいときでも、担体は表面上への単なる沈着で十分である。
- ⑥低沸点溶媒からの生成物の回収が容易である。
- ⑦酵素の熱安定性が向上する。
(高温での熱失活には水が関与している。)
- ⑧微生物汚染がない。

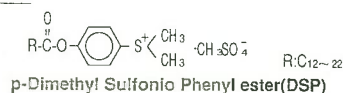
これらの特徴は、食用油脂のような流動性を持つ基質だけを用いてもあてはまると考えられる。

しかしながら、本来水溶性のタンパク質であるリパーゼを有機溶媒や油脂中で用いると凝集した状態になり効率的な反応を行うためには分散性を付与する必要がある。稲田らはポリエチレングリコール (PEG) で酵素を修飾しエステル合成・交換反応を行っている⁷⁾。これらの研究の中では、PEG 修飾リパーゼを用い、酢酸インドキシルの加水分解、ラウリン酸とラウリルアルコールからのラウリン酸ラウリルの合成、トリラウリンとエタノールからラウリン酸エチルの合成、N-ラウリルステアリン酸アミドの合成など多種多様な反応の検討がなされている。中らはポリ(2-アルキル-2-オキサゾリン)を酵素修飾剤として用い、カルボジイミド法を用いて酵素へ導入しエステルの合成について検討を行っている⁸⁾。奥村らはエポキシ樹脂硬化剤や製紙用途に大量に工業生産されているアルケニルコハク酸無水物をリパーゼ修飾に用いエステル合成活性が向上すると報告している⁹⁾。また、以上に述べた共有結合による酵素修飾の他に岡畑らは、静電的相互作用もしくは水素結合により、リパーゼ表面をジアルキル型両親媒性脂質で被覆した、酵素-脂質複合体を調製し、エステルの合成・交換を行っている¹⁰⁾。

3. 水溶性活性エステルを用いた化学修飾

筆者らは脂肪酸修飾リパーゼを調整するに当たり、岡井らの開発した水溶性活性エステル剤 p-ジメチルスルホニオフェノール (DSP) を用いている¹¹⁾。この DSP はゴムの加硫促進剤の合成中間体として広く利用されている化合物であるが、岡井らはペプチド合成試薬としてこれを利用し、生理活性ペプチドが容易に合成可能となることを明らかにしている。また、本試薬類は和光純薬^(株)より市販されており、容易に入手することかできる。

活性エステル



修飾反応 $\text{Lipase} + \text{FA-DSP} \rightarrow \text{Lipase-FA} + \text{DSP}$

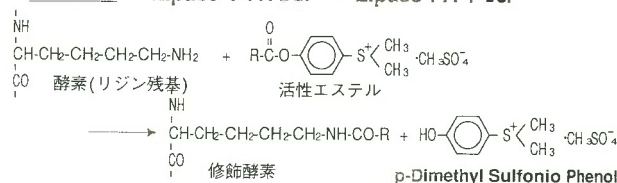


図1 水溶性活性エステルを用いた酵素修飾法

図1に DSP-脂肪酸エステルを用いた酵素修飾法の概略を示す。本法では、水溶液中で反応が可能だけでなく、反応温度が低温でかつ pH が中性域での穏和な反応条件下で十分な修飾結果を上げることが可能である。また、修飾剤として用いる脂肪酸も鎖長、飽和度の異なるほとんどのものが使用可能であるほか、ペプチド合成用の保護基なども使用可能で、おおよそカルボン酸を官能基に持つものならほとんどのものを結合させることができると考えられる¹²⁾。そして、この DSP を用いる修飾法の利点は、PEG 修飾酵素調製に用いられている塩化シアヌルのようなスペーサー物質を必要としないところにもある。本酵素修飾反応は、酵素のリジン残基もしくは N 末端のアミノ基に直接脂肪酸がアミド結合するだけであり、食品素材の加工という場面を考えると安全性という面で有利と考えている。

4. 脂肪酸修飾リパーゼを用いた反応

図2に有機溶媒中で脂肪酸修飾リパーゼを用いてエステル交換反応を行った結果を示す¹³⁾。ステアリン酸修飾リパーゼを用い、有機溶媒(ヘキサン)中でトリオレインとリノ

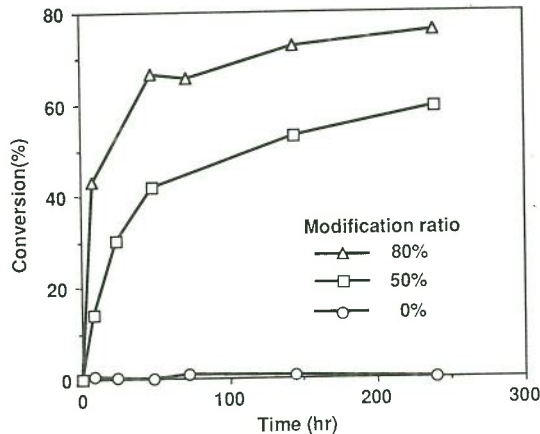


図2 ステアリン酸修飾リパーゼを用いたエステル交換反応

ール酸を基質として反応を行った。その活性は未修飾のものより圧倒的に高く、酵素中のリジン残基の80%をステアリン酸で修飾したリパーゼの初速度は未修飾のもの約40倍であった。ステアリン酸の修飾により修飾酵素の分散性は修飾率が増加するにつれて直線的に増加していった。初速度は分散性が増加するにつれて対数的に増加していった¹³⁾。

図3にエステル交換における脂肪酸修飾リパーゼの基質特異性の変化を示す。ステアリ

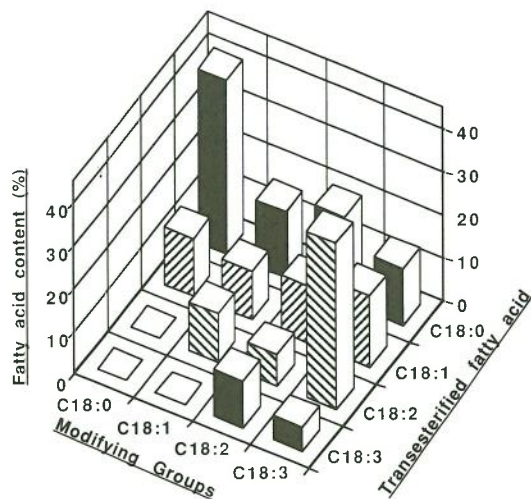


図3 脂肪酸修飾リパーゼによる基質特異性の変化

ン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸修飾リパーゼの選択性を明らかにするために、トリパルミチンとステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸の等量混合物をエステル交換の基質として用いた。ステアリン酸修飾リパーゼを用いたエステル交換反応においては、ステアリン酸が選択的にエステル交換された。一方、リノレン酸はリノール酸及びリノレン酸修飾リパーゼによってのみエステル交換された。この反応の挙動から、脂肪酸修飾を行ったリパーゼは修飾に用いた脂肪酸によって選択性が変化することがわかった。この技術を応用すると反応系に対して結合させる脂肪酸の種類、構成、量を加減することによって最適な修飾リパーゼを調製することが可能となる。

このほかにも、ジエチルエーテルと水の2層系でのリン脂質(ホスファチジルコリン)の加水分解、含水ジエチルエーテル中でのホスファチジルコリンとエイコサペンタエン酸のエステル交換反応、水飽和ヘキサン中でのコレステロールリノール酸エステルの合成、エタノール中でのリノール酸エチルの合成など、有機溶媒中で脂肪酸修飾リパーゼを用いて検討を行い、未修飾のリパーゼより高い活性を得ることができることを明らかにしている¹²⁾。

5. おわりに

リパーゼは有機溶媒中で有用な物質を作るために用いられている。例えば、ZarkとKlivanovらは光学活性のあるアルコールと酸のエステル化を酵素の広い応用技術として報告している⁴⁾。これらの結果はリパーゼが広い基質特異性を持ち異なったタイプの反応を触媒するたいへん有用な酵素であることを明らかにするものである。リパーゼの有機溶媒中で活性発現のために化学修飾は、操作が容易かつ低コストであることから、遺伝子工学的な手法より有効であると思われる。今後さらに、反応系への最適化などの検討を続けていけば、化学修飾酵素がエステル合成・交

換反応における問題の一つの解決手段となるのではないかと考えている。

文 献

- 1) 岩井美枝子 (1992) リパーゼ, 幸書房, 256
- 2) 島田裕二・杉原耿雄・富永嘉男 (1991) バイオサイエンスとインダストリー, 49:11
- 3) Zaks, A. and Klivanov, A. M. (1984) *Science*, 224:1249
- 4) Zaks, A. and Klivanov, A. M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3192
- 5) Margolin, A. L., Tai, D. F. and Klivanov, A. M. (1987) *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7885
- 6) 山根恒夫 (1991) 日本農芸化学会誌, 65:1103
- 7) 稲田祐二・安島綾子 (1988) 油化学, 37:1097
- 8) 中健介・塩崎真・森本正雄・宮本真敏・中條善樹・三枝武夫 (1989) *Polymer Preprint*, 38:2942
- 9) 奥村昌和・石井信人・藤原正美・西康隆 (1989) 油化学, 38:237
- 10) 岡畑恵雄・居城邦治 (1990) 化学と工業, 43:1242
- 11) Okai, K. and Kouge, K. (1990) *Chem. Express*, 5:1034
- 12) Murakami, M., Kawanari, M. and Okai, H. (1993) ACS symposium series 528 "FOOD FLAVOR and SAFTY", 170
- 13) Murakami, M., Kawasaki, Y., Kawanari, M. and Okai, M. (1993) *J. Am. Oil Chem.*, 70:571

国内情報

植物体再分化能の遺伝子マッピング

農林水産省 農業生物資源研究所 細胞育種部
小松田隆夫

オオムギ未熟胚カルの茎葉再分化率は遺伝子的支配を受けて品種間差が大きい。アズマムギ (再分化率1%) と関東中生ゴールド (同70%) の F_2 は0-96%, BC_1F_1 は0-93%の連続的再分化率を示した。標識遺伝子をマーカーにして QTL マッピングをしたところ, 第2染色体長腕上の連鎖群である穂の条性 v , アイソザイム遺伝子 $Idh-2$, $Est-11$ と連鎖する再分化関連遺伝子が検出された。この遺伝子座は全遺伝分散の65%以上を説明する主働遺伝子で $Shd 1$ と命名された。この $Shd 1$ 遺伝子をアズマムギへ導入した準同質遺伝子系統の再分化能は関東中生ゴールドに比べて全く低下せず $Shd 1$ 遺伝子がアズマムギゲノムのなかでも機能することが明らかになった。

1. はじめに

試験管内で培養している植物細胞に適当なホルモンなどを与えて再び植物体を分化させることができる。これを再分化と呼ぶ。再分

化の誘導には培地組成や培養環境が重要なこととは言うまでもないが, それ以上に重要な条件は培養細胞自体が植物体に再分化できる能力を備えているということである。培養細胞が十分な再分化能を維持していれば, 外界からの刺激に良好に反応して茎葉や胚へと再分化を開始する。

植物細胞の再分化能は実験材料の遺伝的構

KOMATSUDA Takao

成に強く影響される。植物の科、属、種、そして品種系統の違いによって再分化能に差異のあることは広く認められている。このことは再分化能を遺伝的に制御する仕組みが存在することを意味している。もしこの再分化能を支配している遺伝子が1～数個であれば反復戻し交配や遺伝子工学的手法でこの遺伝子を目的の品種や植物種へ導入して再分化能を改変することができる。また再分化能に関与している遺伝子と密接に連鎖するマーカーがあればこれを使って選抜を確実にこなすだけでなく、連鎖地図にもとづく遺伝子クローニングの出発点とすることができる。再分化能に関連する遺伝子のマッピングにはこのような意義がある。

2. 関連する研究の状況

培養細胞からの植物体再分化能に関する遺伝子研究の歴史は意外に古く1980年にアルファ¹⁾のカルスからの不定芽分化に関与する2つの優性遺伝子が報告された。同様にトウモロコシ²⁾では、未熟胚の初代カルスからの再分化にはおもに2つの遺伝子が関わっていると報告された。トマト³⁾でも長期継代したカルスからの再分化能を2つの優性遺伝子がコントロールすると報告されている。近年RFLPをはじめとする分子遺伝マーカーが飛躍的に増加し、またこれを解析するためのソフトの開発によって、再分化関連の遺伝

子も連鎖地図上に位置づけることが可能になった。すなわちトウモロコシで3例⁴⁻⁶⁾、オオムギ⁷⁾とトマト⁸⁾で1例ずつ、再分化能をコントロールする遺伝子マッピングが過去2年間で報告されている。

トマト⁸⁾では野生系統から栽培系統へ戻し交配で導入された1個の再分化関連遺伝子が第3染色体にRFLPマッピングされた。この遺伝子はもう1～2個の遺伝子と共に働いて、茎カルスからの再分化と根からの再分化率を決定する。この遺伝子はカルス細胞の全能性を長期間保持する作用を持つと報告されていることは注目される。トウモロコシの3例のうち2例^{4,6)}では花粉からの再分化能に関与する遺伝子が第1, 2, 3, 6, 8, 9, 10染色体上の特定の部分に位置づけられ、残る1例⁵⁾では胚カルスからの再分化能に関与する遺伝子が第1, 2, 3, 9染色体上の特定の箇所に位置づけられた。特に第9染色体上の1個の遺伝子は花粉および胚由来カルスの再分化能に共通でしかも強い効果を持つようである。このように大きな効果をもつ遺伝子は、すでに報告されている2個の遺伝子²⁾の一つである可能性がある。なぜなら同じ交配組合せで実験しているからである。交配に供したトウモロコシの極低再分化の系統ではこの遺伝子に損傷が生じているのではないかと論議されているが、詳しいことはわかっていない。オオムギ⁷⁾では未熟胚カルスの再分化能に関して大きな効果を持つ遺伝子が第2染色体上

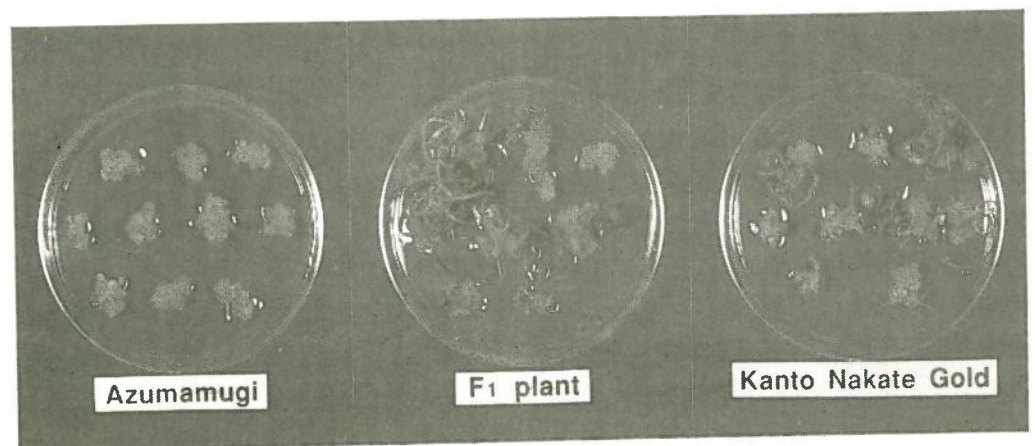


図1 オオムギ未熟胚カルスの再分化能の比較

二条品種関東中生ゴールド(右)は70%以上の再分化率を示すのに対し、六条品種アズマムギ(左)は培養条件を問わず再分化率が1%程度と低い。F₁雑種の再分化率は両親の中間より高い。

にマッピングされた。再分化能の遺伝様式やカルスの形態などトウモロコシとの類似性を見る限り、オオムギの極低再分化能系統でも同様の遺伝子欠損を生じている可能性がある。オオムギカルスの再分化能の遺伝子について以下で詳しく述べることにする。

3. オオムギの再分化能の遺伝

受精後10-12日経過したオオムギ未熟胚をオーキシンである2, 4-Dを含む培地で培養すると3-4日でカルス形成が始まり、1-2か月のうちに緑色の茎葉が分化する。この初代カルスの再分化率はそのカルスを1年程長期継代した場合の再分化率と高い相関を示した。したがってこの培養系は短期間のうちに初代カルスで品種の再分化能をテストすることができるので遺伝実験に適する。遺伝実験の交配親には表現型の大きく異なる品種を使う方が有利である。そのため国内や海外のオオムギ181品種をスクリーニングし、その中から再分化能が比較的高い品種と低い品種とを合計20品種程選んだ⁹⁾。

つぎにこれらの品種の再分化能をより詳しく評価するためにさらに数種類の培地や異なる環境条件下で培養して再分化率を比較した。すると品種間の再分化能の差は培養条件を問わずに有意だった。そこで再分化能に関する統計遺伝学的情報を得るため総当たり交配をおこなった¹⁰⁾。その結果、再分化率の広義遺伝率は0.78、狭義遺伝率0.71といずれも高く、また遺伝子数1-2個と比較的少ない推定値だったこと、さらに細胞質の影響が無いことから、再分化率がおもに核遺伝子に支配されており、核遺伝子の操作によって再分化能を改変することが可能な事が明らかになった。

このような分析を通じて最終的に選定した品種は、再分化率70%以上の分化率を示す二条品種関東中生ゴールドと培養条件を問わずに再分化率が1%程度ときわめて低い六条品種アズマムギだった(図1)。これらの品種間交配で得たF₁未熟胚カルスの再分化率は両親の中間より高く、優性遺伝子の作用で再

分化率が高まることがわかった。またこのF₁未熟胚カルスの再分化率はアズマムギを他の品種と交配した場合よりも環境変動が小さく、安定だった。これらの理由から、アズマムギと関東中生ゴールドの組合せをそれ以降の遺伝実験に使うことにした。

まず交配実験の分離世代を使って再分化能に関与する遺伝子数の推定を試みた。アズマムギと関東中生ゴールドのF₂¹¹⁾およびアズマムギとF₁との戻し交配でできたBC₁F₁¹²⁾各々約100個体からそれぞれ自殖未熟胚をとって培養し再分化率(%)の分布を調べた。仮に再分化能が1遺伝子支配であれば再分化率の頻度分布としてはF₂で三頂性、BC₁F₁で二頂性の分布が期待できる。しかし実際の再分化率はF₂で0-96%、BC₁F₁で0-93%の連続的分布を示した。これは関与する遺伝子数が複数であるため、または培養実験の環境変動が大きいためのいずれか、あるいは両方の理由によると考えた。そこで再分化能を量的形質と見なし、量的遺伝子座(QTL)のマッピングをおこなった。

4. QTL マッピング

オオムギカルスからの茎葉分化に関与する個々の遺伝子を染色体上に位置づけるため、既知の標識遺伝子をマーカーを使ってQTLマッピングをおこなった⁷⁾。使った遺伝子は穂の条性、葉耳着色、渦性、春播性(2遺伝子座)、そしてアイソザイム(5遺伝子座)の計10遺伝子座である。その結果、穂が二条型の個体は六条型の個体よりも有意に高い茎葉再分化率を示すことがわかった(図2)。つまり穂の条性を決定する遺伝子座*v*と茎葉分化能は連鎖しており、その組換え価は約10%であった。同時に再分化能は二つのアイソザイム遺伝子*Idh-2*、*Est-11*とも組換え価12%、21%で連鎖していた。これら3つの標識遺伝子*v*、*Idh-2*、*Est-11*はすべて第2染色体の長腕に乗っていて互いに連鎖していることがあきらかになったので、この茎葉分化に関与する遺伝子座を*Shd 1* (Shoot differ-

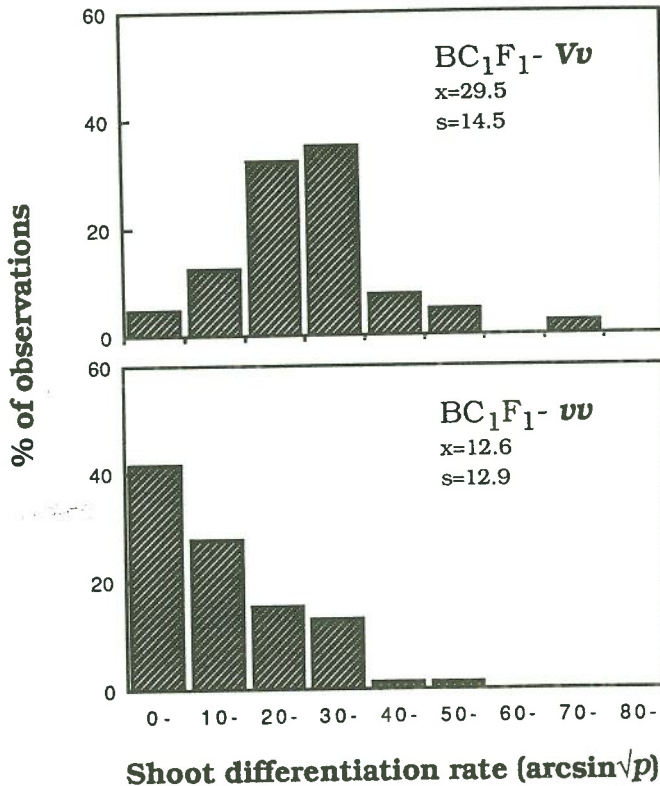


図2 オオムギ再分化率と条性遺伝子座との連鎖関係
BC₁F₁で穂が二条型の個体(Vv)は六条型(uv)の個体よりも有意に高い再分化率を示す。

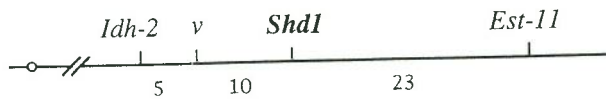


図3 オオムギ再分化能の遺伝子マッピング
茎葉分化率に関与する遺伝子座(*Shd1*)は第2染色体の長腕上にあり、穂の条性(二条・六条)を決定する遺伝子*v*と密接に連鎖していることが明らかになった。数字は組換え価。

entiation 1) と命名し、連鎖地図を作成することができた(図3)。*Shd 1*は今回使ったアズマムギと関東中生ゴールドの2品種の関係に限って言えば、茎葉分化に関する全遺伝分散の65%以上を説明できるので1種の主働遺伝子とみなすことが出来る。

現在この *Shd 1* 遺伝子を反復戻し交配によってアズマムギへ導入しているところである。これまで戻し交配を5回重ねた準同質遺伝子系統が出来上がっている。これらの系統の再分化能は関東中生ゴールドにくらべて全く低下しない。このことは *Shd 1* 遺伝子がアズマムギのなかでも充分機能していることを示している。

私たちは準同質遺伝子系統作成と平行的に

RFLP分析をおこなっている。この目的のひとつは、*Shd 1* 遺伝子と密接に連鎖するマーカーを検索して遺伝子クローニングの材料とすることである。これまでに海外から分譲されたオオムギのプロープ^{12,13}を使って分析したところ、*Shd 1* 遺伝子に緊密に連鎖するマーカーが徐々に見つかってきており、それらのマッピングが現在進行中である。

5. 今後の方向

関東中生ゴールドをはじめとする日本の二条オオムギ品種の未熟胚カルスは形態的に互いに似通っていて、再分化率も他のグループの品種と比べてそろって高い。育種系譜を見るとこれら日本の二条オオムギ品種の多くは単一の外来品種ゴールデンメロンから二条性遺伝子と高分化能をうけついでいる。そこで二条性遺伝子と再分化能関連遺伝子が連鎖しているのではないかと考え、今回の遺伝実験でこれを証明することができた。

今後の仕事として興味あることの一つは、*Shd 1* 遺伝子以外の再分化関連の遺伝子座を検出し同定することである。たとえばアズマムギと関東中生ゴールドの2品種の場合、別の再分化関連遺伝子が第3染色体上の過性遺伝子の近くに存在し、関東中生ゴールドの遺伝子がアズマムギの対立遺伝子に対して優性で分化率を高める。この遺伝子と過性遺伝子との組換え価は40%以上とかなり大きいので、より正確に同定するためにはRFLP分析が有効である。RFLP分析によってそれ以外の染色体上にも遺伝子座が検出される可能性がある。また今回は全く異なる品種同士で交配した場合、全く新しい遺伝子座が同定される可能性は高い。

6. おわりに

細胞が再分化能を保持する機構には本来多数の遺伝子が調和的に関与しているものと考えられる。再分化能の低い品種系統ではこれらの遺伝子のいくつかに何等かの変異が生じ

て機能していない、と考えられている。もし植物の栽培化に伴って種々の遺伝子変異が累積してきたという仮説に立てば、多くの植物種で野生系統にはきわめて高い再分化能が保存されているという事実とよく符合する。なおこれらの遺伝子産物に関する報告はまだ無く、同質遺伝子系統や突然変異体を使った生理生化学的解析は今後の重要な課題である。

文 献

- 1) Reisch, B., Bingham, E. T. (1980) *Plant Sci. Lett.* 20 : 71-77
- 2) Hodges, T. K. et al. (1985) In : Zaitlin M. et al. (eds) *Biotechnology in Plant Science*. Academic Press. New York, pp.15-33
- 3) Koornneef, M. et al. (1987) *Theor. Appl. Genet.* 74 : 633-641
- 4) Cowen, N. M. et al. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84 : 720-724
- 5) Armstrong, C.L. et al. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84 : 755-762
- 6) Wan, Y. et al. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 85 : 360-365
- 7) Komatsuda, T. et al. (1993) *Theor. Appl. Genet.* 86 : 713-720
- 8) Koornneef, M. et al. (1993) *Plant J.* 3 : 131-141
- 9) Ookoshi, S. et al. (1991) *Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour.* 6 : 189-207
- 10) Komatsuda, T. et al. (1989) *J. Hered.* 80 : 345-350
- 11) Komatsuda, T. et al. (1991) *Japan. J. Breed.* 40 : 249-251
- 12) Graner, A. et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 83 : 250-256
- 13) Kleinhofs, A. et al. (1993) *Theor. Appl. Genet.* 86 : 705-712

国内情報

スズメノカタビラを枯らす微生物

日本たばこ産業株式会社
植物開発研究所 横浜センター
藤森 嶺

雑草防除技術の新技术として微生物の利用が検討されている。雑草の病原菌を活性本体とする微生物農薬を作ろうとするものである。植物病原菌の宿主特異性のために、標的とする雑草のみが枯れて他の植物は枯らさず、しかも環境中に残存しないことを特徴としている。

現在、芝地での難防除雑草であるスズメノカタビラの微生物防除剤の開発が、日本と米国の共同研究で行われている。使用する微生物はザントモナス・カンバストリスの一菌株で、バクテリアを利用した微生物除草剤の開発は世界最初である。

1. はじめに

農薬の使用は現代の農業において必須の手段になっている。しかし、農薬自体の毒性が問題とされるようなことが過去に起り、さらには環境への影響について社会的関心が高ま

るなど、省力化のメリットだけでは済まない面もクローズアップされてきている。

私達は化学農薬とは異なる手法として微生物農薬の開発を進めている。本稿では私達の開発成果の一部を紹介し、防除手段として微生物を利用することの価値を示してみたい。微生物除草剤の研究は雑草に対する植物病原菌の研究が出发点となるが、商業化の例が少ないこともあって実用化の過程を知るための

文献は少ない。したがってここで紹介する内容も私達の学会での口頭発表が中心であることをおことわりしておく。

2. 微生物除草剤と化学除草剤のちがい

化学除草剤は植物に特有な代謝系の特定の部位を標的として阻害し、植物を枯らす薬剤である。特有な代謝系としては、光合成系、光合成色素生合成系あるいは特異なアミノ酸生合成系などがあげられる。

化学除草剤の効果を発揮させるためには、防除したい雑草に有効なだけの量を使用すれがよい筈である。しかし農作業の実際としては対象となる雑草にのみ除草剤散布をすることは不可能であり、雑草の内部に浸透していく他に環境中に流出するいわば無駄な散布の部分を含まざるをえない。しかも効果の確実性を求めるために、最低必要量を超えた除草剤を使用する心理が使用者側に働らくことも否定できない現実であろう。化学剤を使用し続ける以上は、人間を含む動物に対して、より安全であり、残留性がより少ない物質が選ばれることが求められ続けなければならない。

一方、微生物除草剤は自然界に存在する微生物の中から選んだ宿主特異性の高い植物病原菌を利用するものである。散布の段階では高濃度の散布をするが、たとえ標的とする雑

草以外の植物や土壌へ散布されても、その植物病原菌は生存し続けることはできず、自然界のレベルに戻ってしまう。標的の雑草中ではその雑草が枯死するまで増殖するが、その後はその植物病原菌も生存する基盤を失い、やはり自然界のレベルに戻ってしまう。このようにして使用量の大小とはかかわりなく標的雑草の内部でのみしか生存しえないということの意味は大きいと思われる。これが「環境に優しい農薬」といえる大きな理由である。

本稿ではスズメノカタビラの微生物除草剤の開発過程について紹介する。

3. スズメノカタビラの病原菌の発見

スズメノカタビラはイネ科に属し、芝地における難防除の雑草である。特にゴルフ場のグリーンにおいては、スズメノカタビラのみを枯らす化学除草剤がないために現在でも手取り除草が行われている。

スズメノカタビラの防除に植物病原菌を利用することを考えたのは米国ミシガン州立大学のロバーツである。スズメノカタビラの植物病原菌としてザントモナス・カンペストリス (*Xanthomonas campestris*) の1菌株を発見し、微生物除草剤として利用する特許を出願したり。バクテリアを微生物除草剤に利用する試みはこれが最初と思われる。今までに商業化された微生物除草剤には Lu-Bao (中国)、DeVine (米国)、Collego (米国) そして BioMal (カナダ) があるが、いずれも糸状菌の植物病原菌を用いている。これは健全な標的雑草に対して病原菌を散布して確実に罹病させようとするれば糸状菌の胞子を使用する方が有利であり、バクテリアではなかなか侵入させることができないと考えられるからである。ところがゴルフ場の場合は芝の刈り込みが頻繁に行われ、特にグリーンでは毎日刈り込みが行われる。当然芝の中に生えているスズメノカタビラも刈り込まれており、そこへ病原菌の散布を行えばたとえバクテリアであっても付傷接種を施したようなこととなり、確実に罹病させることができる。

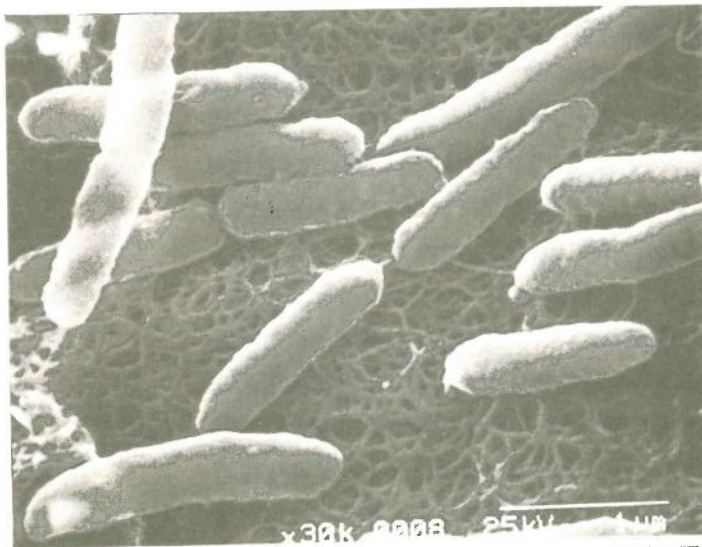


写真1 スズメノカタビラを枯らすバクテリアP-482の走査電顕写真 (西野友規撮影)

ロバーツが発見したザントモナス・カンペストリスの1菌株よりさらに強病原力を示す菌株の探索が私達の提携先であるマイコジェン社でまず開始され、引き続き私達も日本国内で探索を開始した。普通、病原菌の発見は病徴部位からの採取に始まるが、ここに与えられた手法は健全にみえるスズメノカタビラを採集してきてその中に存在するザントモナス・カンペストリスを探し出すというものであった。これはランダムスクリーニングを行ったようなやり方であったが、その結果強い病原力を有するものを発見することができ、また米国でも日本でも多数の地域から同等の性質をもった菌株を発見することができた。健全に育っているとみえる植物体からの細菌の採取であるので、見つけられた菌株を病原菌と称してよいのかどうか議論のあるところではあるが、高濃度で付傷接種すればスズメノカタビラのみならず萎凋症状を引き起こすものである。日本で見つけられた菌株の中でP-482とよぶ菌株は最も病原力の強かったものであり、商業化の候補菌株とした。

P-482菌株の宿主範囲試験としては現在までに主要芝草16種36品種、イネ科植物5種14品種、有用作物43種73品種、その他雑草8種について行い、現在もその他の果樹などに対する試験を続行中である²⁾。その試験の方法は、温室内でのハサミ接種もしくは針接種によるものであるが、P-482はスズメノカタビラに対して極めて高い病原性を示し、その他の植物には病原性を示さなかった。ごくわずかの例外として同じ *Poa* 属に属するケンタッキグラスは接種した際の付傷部分が白化する程度の過敏反応のようなものが認められ、またラフブルーグラスでは接種葉に限り軽微な萎凋反応がみられ低感受性が示されたが全身感染はみられなかった。これらについても、常時刈り込みが行われる芝生では葉先が刈り取られてしまうために実用上の問題はないと考えた。したがってP-482をゴルフ場等の芝生の中のスズメノカタビラ防除用に利用することは適切であると判断した。

スズメノカタビラの葉先の傷口より侵入し

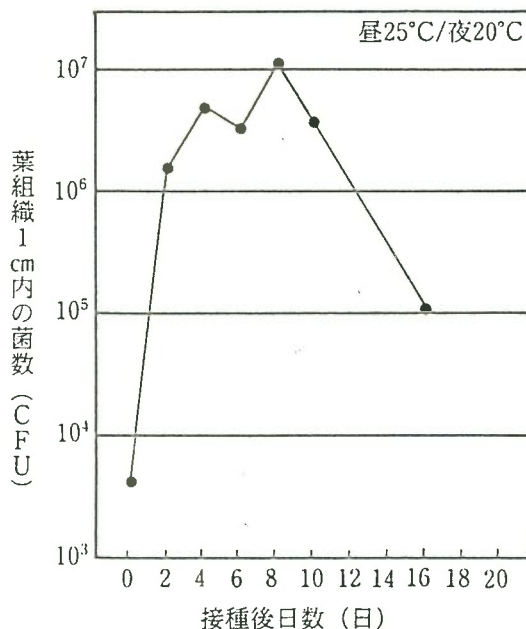


図1 葉組織内のP-482の増殖パターン

たP-482は、導管部内を通過して増殖を続け全身に移行する。菌体増殖による導管詰まりにより葉は萎凋し、やがて植物体全体が枯死すると考えられる。10⁶CFU/mlの濃度のP-482をスズメノカタビラの葉にハサミで付傷接種した場合、25°C、100%湿度下に一晚置いた後温室(昼25°C/夜20°C)に移すという条件では、図2のような菌数の変化がみられた²⁾。温室に入れた時点をも0日目として、以後16日目に接種葉が枯死してしまうまでの間、葉先1cmの葉片中の菌数を測定したものである。接種部位付近のP-482は急速に増殖し続け8日目頃まで増殖が続くが、以後は葉の萎凋と共に菌数の減少がみられ、16日目以後は葉が完全に枯れてしまうため菌数測定も不可能となった。このような増殖の様子は温度依存性があり、微生物除草剤として使用する場合は気温が高くなるにつれ枯死させる時間が短くなる。

4. スズメノカタビラ用微生物除草剤の開発

微生物を利用した除草剤の開発ステップを表1に示した。スズメノカタビラ用微生物除草剤についてはザントモナス・カンペストリスのP-482の発見をもって「植物病原菌の発見」と「評価」の項目はクリアできたと考

表1 微生物除草剤の開発ステップ

開発項目	内 容
植物病原菌の発見	標的雑草の植物病原菌の発見、コッホの原則での検定
評価	発見した病原菌の病原力、宿主範囲、適応温度範囲等の評価
大量培養	商業化に適した培養法の検討
保存、安定化	病原菌の長期保存法の開発
補助剤	効果を高めるための補助剤の検討
製剤化	実用に適した剤型の開発
圃場試験	圃場での効果試験
安全性試験	毒性の試験
残留性試験	環境中、作物中の残留の調査
効果試験	公的機関での効果試験
農薬登録	登録作業

えている。「大量培養」については、必要とされる時期と場所に供給することと、商業化にあたってのコスト低減の両面が考えられる。今まで商業化され、あるいは考えられてきた微生物除草剤は糸状菌であったために大量培養が大きな技術的障壁であった。米国で商業化されたクサネムの一種のノーザン・ジョイントベッチ防除用の微生物除草剤“Collego”の場合は炭そ病菌を活性本体としているが、この菌の場合はタンク培養で胞子を生産することが比較的容易であったものとみられ、幸運な例ともいえそうである。Collegoの開発経緯は行本³⁾、山田⁴⁾あるいは郷原⁵⁾が記している。P-482の場合はバクテリアであるのでタンク培養にむいており、生産面での主な課題は培地組成の検討などのコスト低減化の技術開発である。問題となるのは次の「保存・安定化」、「補助剤」そして「製剤化」の段階であり、今後微生物農薬が次々と開発されて農薬の一つの形として定着するための最大の技術的ポイントとなる部分である。当面は冷凍保存を中心とした特別な保存方法をとらざるを得ないと考えているが、輸送上の問題や保管場所の面から、できれば2,3か

月室温で保存できるような製剤を完成させていきたい。微生物剤の場合は化学剤のような何年にもわたる長期保存は考える必要はなく、適時に必要量使用する体制が確立することに力を注ぐのがよいと思われる。

圃場試験以後の各項目は化学剤の場合と大きなちがいはないと思われるが、「残留性試験」に関しては化学剤が分解性を問われるのに対して、微生物剤は自然界に普通に存在する微生物であっても高濃度散布をすることになるので、自然界でのバックグラウンドレベルに濃度が低下する証明は求められることになるであろう。

5. おわりに

化学農薬のかかえる問題点を解決するためには化学農薬自体が改良されていかねばならないが、微生物農薬のような別の手法も開発され選択肢の幅を広げ、その中から最も好ましいものを選んでいく努力も重要と思われる。ここに開発途中の微生物除草剤の紹介をさせていただいたのも、多くの方に微生物農薬について関心をもっていただきたいと考えたからである。企業での開発だけでなく、国の機関や大学などを含めた共同研究の体制作りも必要と思われる。

文 献

- 1) Roberts, D. L. (1994) 特公平 6-25045
- 2) 今泉誠子 (1994) 葉たばこ研究 125: 50-55
- 3) 行本峰子 (1988) 植物防疫 42: 201-204
- 4) 山田昌雄 (1992) 農業技術 47: 481-487
- 5) 郷原雅敏 (1994) バイオコントロール研究会レポート (日本植物病理学会) 4: 50-59

文献情報

植物におけるプログラム
された細胞死

植物において、プログラムされた細胞死というものの一例として病原体に対する過敏反応をあげることができる。強抵抗性の植物が病原体の感染を受けると、感染部位には速やかに壊死斑が形成され、細胞死がおき病原体の分散を防いでいる。これが過敏反応と呼ばれる現象であるが、本反応は活性酸素の一時的な増大、防御遺伝子の発現、抗菌性物質の蓄積、および植物細胞壁の形態変化と関わり合いが深い。また、病原体の感染により壊死病斑を生じた植物は、その後の同種または異種病原体の感染を免れるという、全身獲得抵抗性 (SAR) を示すことが知られている。

過敏反応の原因が病原体の毒素によるものなのか、病原体の攻撃に対する植物の反応により引き起こされる細胞死のプログラムの活性化によるものなのか、まだ明確なことはわかっていない。本来病原性細菌の感染によって過敏反応は誘導されないが、Greenberg らのグループは、病原性細菌の感染により壊死斑を形成したシロイヌナズナのエチルメタンスルホン酸処理変異体、*acd 2* (accelerated cell death 2) 植物を用いて過敏反応について解析を行った。*acd 2* 植物を野生型と戻し交配したところ、F₁ 雑種は病原性細菌に対して黄化病徴を示したため、病原性細菌の感染による *acd 2* 植物における壊死斑の形成は、劣性形質であることが明らかとなった。さらに形態のマーカー遺伝子を持つシロイヌナズナの多種系統との交配により、*acd 2* 遺伝子は第 4 染色体に無花弁形態遺伝子 (*ap 2*) と連鎖して存在していることが示された。続いて *acd 2* 植物が示した病原性細菌に対する壊死斑形成反応と、野生型植物が示す過敏反応とが同じ反応である

のか否か 3 つの点に着目して検討した。

まずはじめに変異体における病原性細菌の増殖量を調べた。*acd 2* 植物における病原性細菌の増殖量は、野生型の 1/10 から 1/50 であり、過敏反応を示した野生型における非病原性細菌の増殖量と同じであった。

2 つめに過敏反応の出現に関与しているグルタチオン S トランスフェラーゼ (GST1)、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL1)、病原性関連タンパク質 1 (PR1) 遺伝子の発現を調べた。野生型では非病原性細菌の感染によってのみ発現する、これらの防御遺伝子は、*acd 2* 植物において、非病原性細菌の感染のみならず、病原性細菌の感染によっても発現した。

最後に細胞レベルで病原性細菌の感染に対する植物の反応を観察した結果、*acd 2* 植物では、速やかな細胞死、電解質の漏出および細胞壁の形態変化が認められた。以上の点から野生型植物では誘導されず、*acd 2* 植物では誘導された病原性細菌による壊死斑形成は過敏反応であることが明らかとなった。

acd 2 植物を無菌状態で育てたところ、病原体などの外部からの刺激がないにもかかわらず、下位葉に自発的に壊死斑を形成する個体が発現した。そこでこの個体について検討を行った。自発的壊死斑形成葉では、抗菌性物質 Camelexin の蓄積、および細胞壁の形態変化が認められた。また防御関連遺伝子である PAL1、リポキシゲナーゼ (LOX1)、GST1 の転写量は野生型および健全 *acd 2* 植物の 10 倍、PR1、 β -1,3-グルカナーゼ (BGL2)、PR5 の転写量は 5~50 倍であった。ゆえに自発的壊死斑形成葉においても過敏反応と同様の反応が起きていることが明らかとなった。またこれらの個体の上位健全葉における防御関連遺伝子の発現を調べたところ、GST1 および SAR 発現に関与していると考えられている PR1、PR5、BGL2 遺伝子の転写量は野生型の 5~15 倍と、高いレベルにあった。一方で SAR 発現には関与していない PAL1、LOX1 遺伝子の転写量は野生型と同じであった。さらに SAR 発現に必須であ

る、サリチル酸の蓄積も認められた。また実際に病原性細菌を上位健全葉に接種したところ、細菌の増殖に対し抵抗性が示された。よって自発的壊死斑形成個体では SAR が発現していることが明らかとなった。

これら変異体を用いた解析から、過敏反応の誘導には病原体の毒素、または病原体自身の感染は必要ではなく、細胞死のプログラムが活性化した結果であること、さらに *ACD 2* 遺伝子はプログラムされた過敏反応を負に制御していることが示唆された。現在著者らは *ACD 2* 遺伝子のクローニングをしており、今後 *acd 2* 表現型の分子レベルの解明が期待される。

(抄訳 小林 晃—東北大)

(KOBAYASHI Akira)

Programmed cell death in plants :

A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions

Jean T. Greenberg, Ailan Guo, Daniel F. Klessig and Frederick M. Ausubel
Cell 77 : 551-563 (1994)

文献情報

フェロモン流 (pheromone plume) の連続性と蛾の飛行行動

蛾のフェロモン源への飛行行動を研究する際、従来は化学物質の構造と濃度、視覚情報と風速の変化の影響に重点が置かれてきた。しかしフェロモンの流れの構造自体も飛行行動に多大な影響を与える。

著者らはスジマグラメイガ *Cadra cautella* の雄に、1本の連続した匂いのフィラメントからなる帯状フェロモン流と、匂いの塊 (パルス) と清浄な空気が交互に現れるパルス状フェロモン流を与え、風洞試験を行った。

パルス状フェロモン流を与えた場合、帯状

フェロモン流を与える場合よりもフェロモン流に到達する雄の数が多かった。帯状フェロモン流に沿って飛行するときには、雄は風上に向かいゆっくりとジグザグに進んだが、パルス状フェロモン流の中では高速で飛行し、ほぼ直線的に風上へ向かった。

ある種の雄蛾の自律的な方向転換 (転回) の頻度は、瞬間フェロモン濃度によって決定されている。スジマグラメイガにおいてフェロモン量の増大は転回の頻度を微減させただけであったが、フェロモン流の構造変化は雄の転回の角度や頻度に著しい影響を与えた。

帯状フェロモン流の中では、風向と直交する方向 (以下直交方向) へ向かう転回の頻度が高く、フェロモン流の中心軸 (以下中心軸) からのずれは大きかった。すなわち直交方向に飛行すると、結果的に雄の位置は側方にずれる。一方、パルス状フェロモン流中では雄の転回は抑制され、側方へのずれも小さくなった。

フェロモン流の断続性の影響を検討するため、異なるパルス頻度のフェロモン流を雄に与えた。雄は、帯状フェロモン流に対し、ゆっくりしたジグザグ飛行を示し、パルス頻度の高い流れに対しては高速で直線的に飛行した。低いパルス頻度のフェロモン流中では、パルス間の清浄空気中でのジグザグ飛行と、パルスによる風上方向への飛行が交互に起きたが、これは個々のパルスへの接触の度に雄が応答していることを示唆している。次に1個のパルスに対する雄の反応を調べるため、ジグザグ飛行中の雄に1個の短い (0.25秒) パルスを与えたところ、雄はパルスに触れると一瞬の無反応時間の後、短時間だけ風上へ向かった。

以上から、雄はフェロモン流の全体的特徴と、その内部構造の微細な変化の両方に対応して飛行パターンを変化させるといえる。雄内部の転回プログラムが抑制されることによる飛行軌跡が直線的になると仮定すると、雄とフェロモンパルスの相互作用によって飛行のパターンが予測できる。

パルス状フェロモン流が直線的な飛行を引

き起こすためには、以下の要素が必要である。(1)パルスの頻度が閾値を超えており、雄が転回を開始する前に次のパルスに触れる。(2)パルスや清浄な空気に対して応答しない時間がある。(3)パルス中のフェロモン量は風上方向への飛翔を引き起こす閾値より高く、直角方向への旋回を引き起こす値より低い。さらにフェロモンへの接触が短時間となり、かつ中心軸から僅かに外れても次のパルスに接触できる程度に、パルスは風向方向には偏平で直交方向には広がりを持つ形である必要がある。このようにフェロモン流の構造による方向転換と視覚に依存した走風性から、蛾の様々な飛び方を説明できるだろう。

以上、フェロモン流の構造と蛾個体の相互作用が、蛾の飛翔行動の制御機構に不可欠な役割を果たしていることが明らかにされた。

(抄訳 深谷 緑—蚕糸昆虫研)
(FUKAYA Midori)

Fine-scale structure of pheromone plumes modulates upwind orientation of flying moths

Mafra-Neto, A. and R. T. Cardé
Nature 369 : 142. 12 May, 1994

文献情報

ウイルス外被タンパク質の移行および粒子形成における独立した役割

植物ウイルスの感染した植物内でのウイルスの全身的な蔓延は、プラズモデスマタを介した細胞間移行と、通導組織を介した遠距離移行という2つの異なるプロセスより成り立っている。全身感染はウイルスと宿主の特異的な相互作用によると考えられているが、現在までのところ、ウイルス側の因子として“移行タンパク質 (MP)”および“外被タンパク質 (CP)”の存在が明らかにされてお

り、その役割に興味を持たれてきた。

Dolja らは、大腸菌由来の β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を、potyvirus 群に属する tobacco etch virus のゲノム RNA の全長から翻訳されるポリタンパク質の N 末端領域付近に挿入した組換え体 (TEV-GUS) を作製し、さらにその TEV-GUS の CP に様々な変異を導入することで、potyvirus における CP の役割を解明した。TEV-GUS は、intact な TEV と同様の感染能力があるが、GUS の基質を感染葉に処理することで感染細胞から隣接細胞あるいは全身組織へのウイルスの移行を可視化および定量できる。まず第 1 のグループとして CP の 154 番目のアミノ酸を Asp \rightarrow Arg に (R₁₅₄D) 198 番目を Arg \rightarrow Asp に (D₁₉₈R)、両方を入れ換えたもの (DR) を、第 2 のグループとして N 末端の 5-29 番目のアミノ酸を欠失させたもの (Δ N) を作製した。各ミュータントは、タバコ品種 Xanthi nc のプロトプラストにおいて正常な RNA の複製を示したにもかかわらず、全身感染宿主であるタバコ品種 Burley 49 に全身感染しなかった。接種後 3 日目の GUS アッセイの結果、R₁₅₄D、D₁₉₈R では細胞間移行が全く抑えられており、 Δ N はわずかに細胞間移行が認められたが、このミュータントは葉脈周辺の細胞に侵入する能力、あるいはそこで増殖する能力のいずれかを欠いていた。各ミュータントにおけるこのような細胞間移行能および全身感染能の欠失は、TEV の正常な CP を発現する形質転換タバコ (FL3.3) のもとで補われ、回復した。この FL3.3 の上位葉について、接種後 10 日目の GUS 活性を測定したところ、病徴部分では、TEV-GUS、各ミュータントとも同程度の値を示したが、葉全体では DR で TEV-GUS の 55%、R₁₅₄D、D₁₉₈R で 7%、 Δ N で 1.5% の値を示した。したがって感染細胞内における増殖能力は、TEV-GUS および各ミュータントで異なると考えられた。さらに筆者らは CP の役割を解明するため、N 末の 29 アミノ酸を欠く CP (Δ N29)、C 末の 18 アミノ酸を欠く CP (Δ C18) およびジャガ

イモYウイルスのCP (E11) をそれぞれ発現するタバコを作製し、TEV-GUS, DR, ΔN を接種した。DR ではΔC18およびE11において、ΔN ではすべての植物において細胞間移行が回復したが、遠距離移行はTEV-GUSのみが可能であった。これらのことから、CPのN末端およびC末端領域は、細胞間移行を促進するという付随的な役割を持つと考えられた。また、細胞間移行に関しては、potyvirusのCP間で相補性に厳密な特異性が認められなかったことから、細胞間移行および遠距離移行において、それに関与するウイルス側の因子と対応する宿主側の因子が異なると考えられた。

Doljaらは、ウイルス側の因子の構造的な変化が、機能的・形態的な変化と関連があるのかを検討するため、TEVの抗血清を用いてイムノプロットおよび電子顕微鏡観察を行った。TEV-GUS, ΔN, DRに感染したFL3.3ではCPの蓄積が認められたが、ウイルス粒子は、非トランスジェニックプロトプラスト、FL3.3の病徴部分、さらにその部位より得た部分純化ウイルスのうち、TEV-GUSおよびΔN感染植物にのみ認められた。これよりCPのコア領域中の154番目、198番目のアミノ酸が、ウイルス粒子の形態形成およびその安定性において重要な役割を果たしており、FL3.3のようにトランスに野生型のCPが供給されるような条件下であっても、DRが全身的に移行しにくいのが、その安定性の欠如のためであると考えられた。

以上のことから、植物体内でのpotyvirusのウイルス粒子の形成、細胞間移行、遠距離移行に、CPはそれぞれ独立した機能を果たすということが示唆された。CPがpotyvirusの全身移行に必要な唯一のタンパク質なのか、あるいはCP以外にも移行に関与するタンパク質があるのかどうかは解っていないが、これらについては今後の解析が期待されるところである。

(抄訳 宮下享子—東北大)
(MIYASHITA Kyoko)

Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants

Dolja, V. V., R. Haldeman, N. L. Robertson, W. G. Dougherty and J. C. Carrington

EMBO J. 13: 1482-1491 (1994)

文献情報

遺伝子組換えバキュロウイルスの野外試験

生物農薬を遺伝子組換え技術により改良することは潜在的に非常に有効であり、特にバキュロウイルスに対しては適用しやすい方法である。遺伝子工学の主要な目標は害虫を殺すスピードを増加させることであり、それには節足動物や細菌の産生する昆虫特異的毒素や昆虫ホルモン・酵素が利用される。最近遺伝子組換えされたバキュロウイルスの野外試験が報告された。

試験には、サソリの昆虫特異的毒素を産生するように改変された、バキュロウイルスに属する核多角体ウイルスが用いられた。キャベツの *Trichoplusia ni* の3齢幼虫に対し、組換えウイルスと遺伝子操作を行っていない元ウイルスを散布した。

核多角体ウイルスの散布によりキャベツの食害は抑制されるが、組換えウイルス散布ではさらに食害程度は軽く、元ウイルスと比較して23-29%の被害軽減効果があった。この効果は組換えウイルスの幼虫を殺すスピードが元ウイルスよりも10-15%速いためであった。組換えウイルスが産生するサソリ毒により幼虫は麻痺し、死亡する前に植物体から地上に落下する。例えば組換えウイルス散布後11日では全体の62%の幼虫が地上で麻痺または死亡していたが、元ウイルスの散布では地上に落下する現象は認められなかった。実際には、組換えウイルス施用による死亡率の比

ークは散布後約11日であるのに対し、元ウイルスでは散布後約16日であった。

しかし、11日後、16日後の死亡率は組換えウイルスよりも元ウイルスの方が高かった。これは一次感染した幼虫から他の幼虫に感染する二次感染の効率に起因すると考えられた。すなわち、元ウイルスに感染した幼虫は死亡後も植物体上にとどまり多量のウイルスを放出するのに対して、組換えウイルスに感染した幼虫は地上に落下し、二次感染に寄与しにくい。また、幼虫体内で増殖するウイルス量も元ウイルスの約1/10である。

以上のように、殺虫能力に優れ、しかも二次感染しにくいバキュロウイルス殺虫剤が遺伝子組換えの手法を用いて得られ、野外試験でもこの性質は確認された。伝搬性が低い特

性は遺伝子組換え生物の安全性を評価する際に重要である。遺伝子組換えバキュロウイルスの環境に対する安全性は、特に寄主範囲の観点から議論されているが、今後は、伝搬性・残存性・寄主範囲等を含めた総合的な評価が必要であろう。

(抄訳 木村 雄輔—植工研)

(KIMURA Yusuke)

Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide

Cory, J. S., M. L. Hirst, T. Williams, R. S. Hails, D. Goulson, B. M. Green, T. M. Carty, R. D. Possee, P. J. Cayley and D. H. L. Bishop

Nature 370 : 138, 14 July 1994



国際学会レポート

第5回国際大豆研究会議に参加して

農林水産省 九州農業試験場
西 和文

1. チェンマイへの道

第5回国際大豆研究会議は、1994年2月20日から26日までの7日間、タイのチェンマイ市で開催されました。会場になったのは、隣接する2つのホテルで、そのうちの1つはこの会議がこけらおとしという新築直後の新しいホテルでした。

実質的な会議は21日から始まるということで、ギリギリに滑り込むというスケジュールをたて、大阪国際空港を離れたのは20日正午前でした。途中、寄港地のマニラ空港が一時閉鎖されていて上空待機になるという得がたい体験をして、バンコクへ向かいました。バンコクからは国内線ですが、国際線からの乗り継ぎ客はチェンマイで入国手続をすればいいということで、胸にワッペンをつけてもらって出発しました。機内には今度の研究会議の参加者らしい人もみられたものの、どうやら日本人らしいのは私一人のようでした。ウツラウツラ居眠りをしていたら流暢な日本語で話しかけられてビックリ。アメリカ人の参加者で、日本に滞在中ということでした。会場ではこのほか韓国やブラジルからの参加者と日本語で議論をすることができ、語学力に自信のない私としては、いつときの息抜きになりました。

会議が行われたチェンマイはタイ北部の中心都市です。かつては王都であった時代もあり、中心部には古い堀やレンガを積み上げた石垣なども残っています。美人の多いことでも有名です。周辺の山岳地帯には少数民族が

住み、民族ごとに異なる衣装で装いをこらした姿は絵になる光景です。夜の名物はナイトバザール。目抜き通りにたくさんの屋台が並び、深夜までにぎわいます。産業的見地からすると、チェンマイ周辺はタイ国におけるダイズ栽培の中心地です。しかもこの時期がちょうど生育期（タイのダイズは雨期前半、雨期後半、乾期の3時期に栽培されます。チェンマイ周辺では水田裏作としての乾期ダイズの栽培が盛んです）に当り、会議中現地見学も行われ、開催場所としては最適地という感じでした。

2. 会議の概要

会議は市内の2つのホテルを会場にして行われました。21日はタイ国王女の臨席のもとに午前中開会式が行われ、午後は講演発表、22～23日は午前中は全体会議とポスターセッション、午後は講演発表、24日は現地圃場とタイ国ダイズ研究の中心というべき Chiang Mai Field Crops Research Center の見学、25日は Soybean in Tropical Agriculture という特別シンポジウムというスケジュールでした。参加者は世界37か国745名、うち日本からの参加者は20名でした。会議の裏方にはタイのダイズ研究者だけでなく、タイ農業局に属する研究者のほとんどが何らかの協力をしたということで、裏方も含めた参加者総数は約1,000名になるだろうという話でした。

会議では全体会議のほかに7つのセッション（Genetic Improvement, Biotechnology, Crop Protection, Utilization, Technology Adoption, Crop Science I および Crop Science II）に分かれて講演およびポスター

NISHI Kazufumi

セッションが行われました。全体会議で行われた講演の中では、農業研究センター齋尾恭子次長(当時)が Soybean Foods ; Nutritionally and Industrially Valuable と題してダイズのもつ栄養的価値と日本の大豆食品について紹介した講演がかなりの注目を集めました。同じ日本人だということからでしょうか、タイの友人やパーティで同席したインドの研究者などから齋尾次長の講演に関連して、日本の大豆食品について私自身が質問を受けてしまいました。私が出席した Crop Protection のセッションでは、アジア、中東、アフリカ、アメリカ、南米などの地域の研究者から、病害虫の発生状況が報告されました。ダイズがタンパク源として重要視されその栽培が広がっていると同時に、旧来からのダイズ栽培地域に限らず新興栽培地域においても、病害虫問題が栽培上のネックの1つとなってる現状が浮き彫りにされました。

会議では、現地圃場とダイズ研究現場の見学がプログラムに組み込まれており、私も参加しました。タイのダイズ栽培は、北部、中部および東北部の3地域で盛んです。1 ha 当たりの収量は1.2tということですから、栽培技術としてはかなり高いレベルにあると考えてよいと思います。ダイズは乾期、雨期前半および雨期後半の3時期に栽培されていますが、乾期ダイズは灌漑水の得られる地域でのみ栽培されています。今回会議が開催されたチェンマイ市のある北部タイでは、灌漑設備がよく整っており、水稲後作として乾期

ダイズが広く栽培されています。見学に訪れた圃場は整然と区画され、ダイズが本当にすくすく育っていました。病害を研究しているものの立場からいいますと、きれいに管理された圃場よりもいろいろな障害が出てダイズの生育が順調でない圃場の方が興味深いのですが、訪れた圃場では、*Rhizoctonia* 菌よるものと考えられる立枯れ株をようやく探し当てることができた程度でした。実をいいますと、私は昨年のほぼ同じ時期にタイ国を訪れ、ダイズ病害の発生実態調査を行っています。その時にはべと病やモザイク病がかなり発生している圃場も見かけましたし、さび病がこの地域の最量要病害であることも知りました。見学に訪れた圃場は一種の展示圃であり、生育は順調で、培土もきれいに実施され、雑草防除などの管理もよく行き届いていました。機械化はあまり進んでいないようですが、小型の動噴などは使用しているということでした。

タイ国のダイズに関する研究は、大学と農業局傘下の試験場で行われています。台湾に本拠を置く国際研究機関である AVRDC (Asian Vegetable Research and Development Center) もタイ国内でダイズの育種を行っています。農業局傘下の試験場の中では、チェンマイ市にある Chiang Mai Field Crops Research Center が、ダイズ研究の中心です。この試験場では、ダイズの育種、栽培、病害虫などの研究が進み、タイ国内で最も普及している Chiangmai 60 などの品種育成の実績があります。育成圃場を中心に見



図1 タイ国のダイズ栽培について説明に聞きいる会議参加者



図2 タイ国のダイズ畑

学させていただきましたが、収量性などともに、さび病およびモザイク病に対する抵抗性検定が実施されていました。

3. 雑 感

わずか1週間程度のあわただしい訪問、それもほとんどがホテルに缶詰状態で過ごしたわけですが、チェンマイ名物のナイトバザールは、合間を見て一人でゆっくり見物してきました。電気製品から骨董品、民芸品から趣味の品まで、丹念に見て回ると何でもそろっているといわれるバザールです。ニセ物もあるということですが、変わったものもまた探して当てることができるようです。あちこちのぞいていて、日本の10銭硬貨が売られていたのにはびっくりしました。山岳少数民族も民族衣装に身をつつんで粗末な店を出していたりします。そんな中をのぞきこんでいたら

変わった形の笛があり、それが何ともいえぬもの悲しい音色を出します。しばらく演奏を聞かせてもらったりもしました。

タイは近年著しい経済発展をとげている国です。町中では新しいビルの建設現場を何度も見かけましたし、豊富な商品、バンコクの町の殺人的ともいうべき車の洪水などを見ていると、経済発展のエネルギーの大きさがひしひしと感じられます。一方、土地と労働力に恵まれ、潜在的な農業生産力も膨大ではないかと考えられます。近年ダイズは豆腐やエダマメなどの食用として、油料用として、また家畜の飼料用として消費量が急増しており、需要に生産が追いつかない状態だということです。今回の会議がタイ国のダイズ栽培の発展に少しでも貢献できたら幸いと思いつつ、タイ国をあとにして大阪に向かう飛行機に乗り込みました。



特別情報

トランスジェニック家畜を利用した 異種臓器移植へのチャレンジ

Dr. White の講演会を聞いて

農林水産省畜産試験場 繁殖部

今井 裕

本年5月31日の生研機構の主催で行われた異種臓器移植に関するDr. White (英国・ケンブリッジ大学) の特別講演を聴く機会に恵まれたので、その概略とともに、このような医学領域とは全く異なった畜産領域にいる立場から異種臓器移植に関する感想を述べてみたい。

彼らの仕事はすでに、1992年12月に補体抑制遺伝子を導入したトランスジェニックブタ作出として新聞報道されているが、今回の講演では作出されたブタの異種臓器移植に向けた応用の可能性について詳しいデータが紹介された。トランスジェニックブタそのものはこれまでも多くの報告があり、取り立てて珍しいものではないが、この新聞報道の時点で補体抑制遺伝子を導入したトランスジェニックブタを作出することの意義と異種臓器移植への応用について理解できた人は恐らくそんなに多くはなかったのではないかと思われる。同種臓器移植ですら免疫的な拒絶反応を克服するために多くの問題があると聞くし、一挙に異種臓器移植というのはあまりにも突飛であり、本当に可能なのかという疑念がある。この講演では、異種臓器移植が単なる夢ではなく、現実味のある第一歩を踏み出したことを伺わせるに充分であった。

新聞報道からしばらくして、BBC (英国放送協会) が異種臓器移植に関するドキュメントを行っていた。ここでは、異種臓器移植の倫理的側面はひとまず置き、この医学上の重要な問題を解決する新技術として、Dr. White が考えているストラテジーを実用化レベルに達した後のことまで見据えてストレ

ートに、ある意味で好意的に情報提供していた。臓器提供を待ち望んでいるほとんどの患者が、延命が可能であるならば異種動物の臓器であっても提供を受けたいとのコメントは印象的であった。

さて、同種間移植を飛び越えて異種臓器移植が望まれる背景には、絶対的な臓器提供者 (ドナー) の不足がある。英国での腎移植を例にすると、昨年6,500人の患者が腎移植を必要としていたのに対して、実際に手術が行われたのは1,700件に過ぎなかった。近い将来には、この比率は10倍にもなると予測されている。勿論、異種臓器を半永久的な臓器としてみるのは技術的にもまた患者側の抵抗もあろう。レシピエントにうまく適合したドナーが現れるまでの一時的な臓器とDr. White は位置づけており、これだけでも医療現場での意義は大きいと思われる。

異種臓器移植が表面化してきたことには、臓器移植分野の技術的な成熟と無縁ではない。同種臓器移植による生着率および術後の生存率は近年大きく高まってきている。さらに、Dr. White のかつての研究課題であったサイクロスポリンを含む免疫抑制剤の進歩があげられる。その代表的な例が1992年6月に米国ピッツバーグ大学で行われたようなヒト-ヒト間での肝移植であり、近縁種といえども本質的に異種移植であるヒトとヒト間でかなりの期間免疫拒否反応を抑制することが可能になってきたことは臓器移植分野での技術の進展を伺わせる。

Dr. White が示した異種臓器移植を可能にするためのストラテジーは極めて単純明快で夢があり、聞く人を魅了する。以下その概略を紹介しよう。

IMAI Hiroshi

まず、異種臓器移植で最も大きな壁は、移植後15分以内に起こる超急性免疫拒絶反応である。この現象の主体は、ヒト血液中に存在する異種動物に対する自然抗体であり、ヒト補体が結合し活性化されることによって異種臓器に対して短時間のうちに深刻な細胞傷害性が誘起される。自己の組織は補体の作用を抑える補体抑制因子によって保護されているが、これには種特異性があり、例えばヒトに移植されたブタの臓器に対してはヒト補体抑制因子は作用し得ず、ヒト補体の直接的な攻撃にさらされることになる。しかし、異種臓器移植では同種臓器移植の時に見られるような組織適合性抗原による拒絶反応は、抗原の構造が著しく異なるためにそれほど問題とはならないと考えられている。モルモットに鳥の臓器を移植した場合には、種としてはかなり離れているにも係わらず補体を欠損していれば免疫的な拒絶反応は比較的緩やかであることが、このような例として知られている。したがって、移植臓器に対するヒト補体の機能を抑制することができれば臨床応用に大きく近づくことができる。言い換えれば、移植する異種臓器にヒトの補体抑制因子を発現するようにしておけば、ヒトは自分の組織と間違えて拒否反応を示さないのではないかというのが彼の考えるストラテジーの出発点である。補体抑制因子に関する研究の歴史は比較的新しい。今回ブタ受精卵への遺伝子導入に用いられている DAF と呼ばれる遺伝子でさえ、クローニングされたのは1988年である。現在では、これ以外に CD 59、MCP といった補体抑制遺伝子がクローニングされているが異種臓器移植のためにどの補体抑制因子を標的とすべきかについてはやってみないとわからない部分が多いようである。

異種臓器移植の対象となる動物種はまずヒト臓器との相対的な大きさから家畜ブタ、ミニチュアブタ、ヤギ、サル、イヌが候補となる。しかし、安定した臓器提供、繁殖性、動物愛護の観点から家畜ブタは多くの利点がある（実際には、彼らのグループは動物愛護団体からの多くの非難を浴びているようである

が)。加えて、移植組織にヒトの補体抑制因子を発現させるためには、外来遺伝子導入による形質転換を行う必要がある。この点でも、家畜ブタは遺伝子導入実験において研究の蓄積がある。家畜受精卵への遺伝子導入技術は1985年にブタ、ヒツジで成功して以来数多くの試みがなされており、この技術の進展が、Dr. White の研究に果たしている部分は非常に大きい。

上記の理由によって、彼らは家畜ブタを用いた補体抑制遺伝子の一種であるヒト DAF 遺伝子を DAF そのもののプロモータを用いて受精卵に導入し、トランスジェニックブタを作出した。このブタは、ヒトの補体抑制遺伝子を様々な組織で発現していた。問題は、このブタの組織がヒトの血液にふれたとき超急性拒絶反応が起こるかどうかという点であったが、少なくとも2時間程度拒絶反応が抑えられることから、確かにヒトの補体抑制遺伝子が機能していると考えられる。その後、米国の DNX 社が同様の考え方からヒトの DAF 及び CD 59 と呼ばれる補体抑制因子を導入したトランスジェニックブタを作出し、その臓器をサルに移植することにより19時間もの延命効果を確認している。これらのことから、異種の補体抑制遺伝子を導入することによって超急性拒絶反応は解除されていることが確認されたわけである。

彼が、このストラテジーに基づいた異種臓器移植が臨床試験に移るまでの期間を今後2～3年と設定しているが、現在のところはトランスジェニック動物の作出とその解析に留まっており、解決すべき問題も少なからずある。現在の家畜ブタでのトランスジェニック動物作出効率は、遺伝子を導入した総卵子数に対して約1%というあまりにも厳しい数字である。Dr. White のグループでは遺伝子導入卵子の移植後の受胎率が高く、このことが従来の効率を上回る2.3%という高い効率に反映していると思われる。ブタは多胎動物であるので、少なくともマウスレベル（5—10%）にまで遺伝子導入効率が上げられれば研究はもっと進展するかもしれない。もう一

つ重要な点は、補体抑制遺伝子を出来る限り多くの組織で多量に発現させることである。これも、Dr. White のグループに限らず、また補体抑制遺伝子だけの問題ではなくすべてのトランスジェニック動物作出に一般的な課題である。ゲノム内で個々の遺伝子の発現を調節する領域はあまり長大でその解析には困難を伴う。もし明らかになったとしても、マイクロインジェクション法による遺伝子導入では、染色体内に本来あるべき位置とは異なった領域に、しかも複数コピーの遺伝子が挿入される。この結果は、多くの場合導入遺伝子の発現の低下をもたらす。この点を改良するため、彼らが当面考えていることは導入遺伝子を含む長大な補体抑制遺伝子のゲノムを導入して、これを一つのユニットとして発現させようという考え方である。最近、酵母の人工染色体 (YAC ベクター) を用いたこのような試みが行われるようになっており、いくつかの成功例がある。もう一つの重要なブレイクスルーはブタにける胚性未分化幹細胞 (ES 細胞) 株の作出である。この細胞は初期胚に導入することによって個体を構成するほとんどすべての組織に分化する性質を持つ多能性幹細胞であり、また次世代に子孫を残すうえで重要な機能を有している生殖細胞へ分化能をも有するので、遺伝子を導入した ES 細胞の遺伝形質を次世代に伝達することが出来る。また、培養細胞と同様に取扱えるので遺伝子導入も容易である。マウスではすでに ES 細胞株が樹立され、標的遺伝子導入法 (ジーンターゲットイング) による遺伝子機能解析は研究手法として常套手段になってきている。もしもブタで ES 細胞株が作出されれば、マイクロインジェクション法の欠点であった標的遺伝子導入と遺伝子発現量の問題は一挙に解決できる。つまり、ブタの補体抑制因子遺伝子調節領域の支配下にヒト補体抑制因子を発現させることも可能となろう。このような目的に使用できそうなブタの ES 細胞株の作出には未だ成功していないので今後のこの研究分野の進展が期待されるところである。

異種臓器移植を目指した研究はまだ5年に満たない全く新しい研究分野である。補体抑制因子をヒト型に変更するといっても Dr. White が言及しているように多くの補体抑制因子中でどれを標的にしたらよいのか、まだまだ機能の不明な補体抑制因子の存在も予想される。さらに、超急性拒絶反応に補体が関与していることは良いとしても、ヒトが本来有しているブタに対する自然抗体の攻撃をどのように回避してゆくのかという問題もある。

畜産研究に携わるものにとって家畜を対象として開発されてきた多くの技術は畜産領域に還元されることを前提して行われてきた。それ以外の領域で利用されることはこれまで考えられなかったことである。しかし、異種臓器移植の主役が家畜となりつつあり、それが医学領域で活用されヒトの福祉に役立ってゆき、これまで畜産領域にはなかった新たな目標を持ちうることは非常に好ましいことであろう。また、医学領域での家畜の利用は異種臓器移植にとどまらず、病態モデル動物の作出へも発展して行こうとしている。これによって、新しい家畜の生産業が出現するとともに、家畜におけるトランスジェニック研究が活性化され、家畜改良も役立っていけばその波及効果は計り知れない。しかし現実の問題として、現在わが国で家畜を使ったこの種の応用・基礎を包含するビッグプロジェクトをすぐさま実行に移す予算、設備は残念ながらない。わが国の補体抑制因子に関する研究は世界的にもトップレベルにある。Dr. White も自ら述べているように、彼がこの研究の開始を決意したのは日本人の補体抑制因子に関する研究論文が発端となっている。私共のもとにも、家畜ブタを対象とした同種の研究を望む医学領域からの要請がすでに2年ほど前からあった。しかし、Dr. White が行っているのと同程度の実験を行うとすれば少なくとも300頭程度のブタのポピュレーションが必要である。さらに、遺伝子導入動物作出に伴う閉鎖系の、Dr. White に言わせればヒルトンホテルなみの冷暖房完備の飼育施設が必要となる。300頭という頭数は私の所

属する畜産試験場のブタ全頭数を上回る。これらのブタを1-2種類のトランスジェニック実験にすべて使用することには現状では無理がある。この意味で、この種の実験を国立の1研究機関で対応することは困難で、産・官・学による密接な共同研究体制が必要となってきた。すでに、欧米では家畜乳汁中に有用医薬物質を産生するトランスジェニック

家畜が作出され、日本の企業も参画してトランスジェニック産業なるかつて存在しなかった産業形態が出現しつつある。わが国においても、トランスジェニック動物の有用性についての社会的コンセンサスが浸透し、夢と現実の落差が早急に埋められることを願ってやまない。



バイオテクノロジーの最新情報誌

「BRAIN テクノニュース」 購読のご案内

昭和62年9月の創刊以来、生研機構では、企業や自治体で進められているバイオテクノロジーを中心とした研究開発の一層の発展を願い、「BRAIN テクノニュース」の紙面の充実に努めて参りました。

バイオテクノロジーを中心とする生物系産業技術は、“次代を担う技術”として21世紀に花開くと言われており、多くの企業、国や地方自治体で活発な研究が行われています。

「BRAIN テクノニュース」は、最新の研究情報、外国重要文献の翻訳抄録、国内外の学会・シンポジウム情報、諸外国の研究開発動向などをわかりやすく正確に、かつ技術内容を詳しくまとめて、定期的（隔月刊）お届けするものです。

このたび、個人でご購読いただく場合の購読費も設定いたしましたので、定期購読についてご検討いただきますよう、ご案内申し上げます。

◇ 本誌の概要 ◇

1. 発行：隔月刊（奇数月発行）
2. 年間購読費

法人購読費	30,900円	（1年6冊 消費税込み）
個人	20,600円	（ // // ）

◇ ご購読者の特典 ◇

1. 生研機構主催のBRAINテクノフォーラムに、ご購読者割引料金で参加いただけます。
2. 『BRAIN バイテク関連記事抄録集』（年間12冊）を無料でお送りいたします。
3. 『BRAIN 畜産先端技術海外情報』をご希望により無料でお送りいたします。
4. 生研機構の活動についての情報を優先的に提供します。

● ご購読のお申し込み、お問い合わせは

生研機構（生物系特定産業技術研究推進機構）東京事務所 企画部まで
〒105 東京都港区虎ノ門3丁目18番19号 虎ノ門マリビル10F
TEL 03-3459-6565 FAX 03-3459-6566

編集後記

懸案であった表紙の写真を本号からカラー化するとともに、デザインも一新しましたが、いかがでしょうか。本号の写真は当協会の梅谷さんの推せんで、モルフォ蝶を取りあげました。この蝶の美しさの秘密は、翅表面の微細構造とそこから反射される光の魔術によることが明らかにされました。(株)クラレはこのメカニズムを人工繊維に応用して新素材「デ

フォル」を開発しました。この間の経緯は本文(5頁)を参照して下さい。最近昆虫機能の利用がいろいろな分野で注目されていますが、「デフォル」は、その見事な成功例といえるでしょう。

今後とも表紙は美しいカラー写真を続けますので、バイテクに関係するカラー写真をお持ちの方は是非お知らせ下さい。(大畑記)

お詫びと訂正

前号(44号)の表紙の発行月日

“July 15, 1994”が落ちていました。

お詫びして訂正いたします。

ブレインテクノニュース(第45号)

平成6年9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