

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

CODEN : BTEEEC

TECHNO NEWS

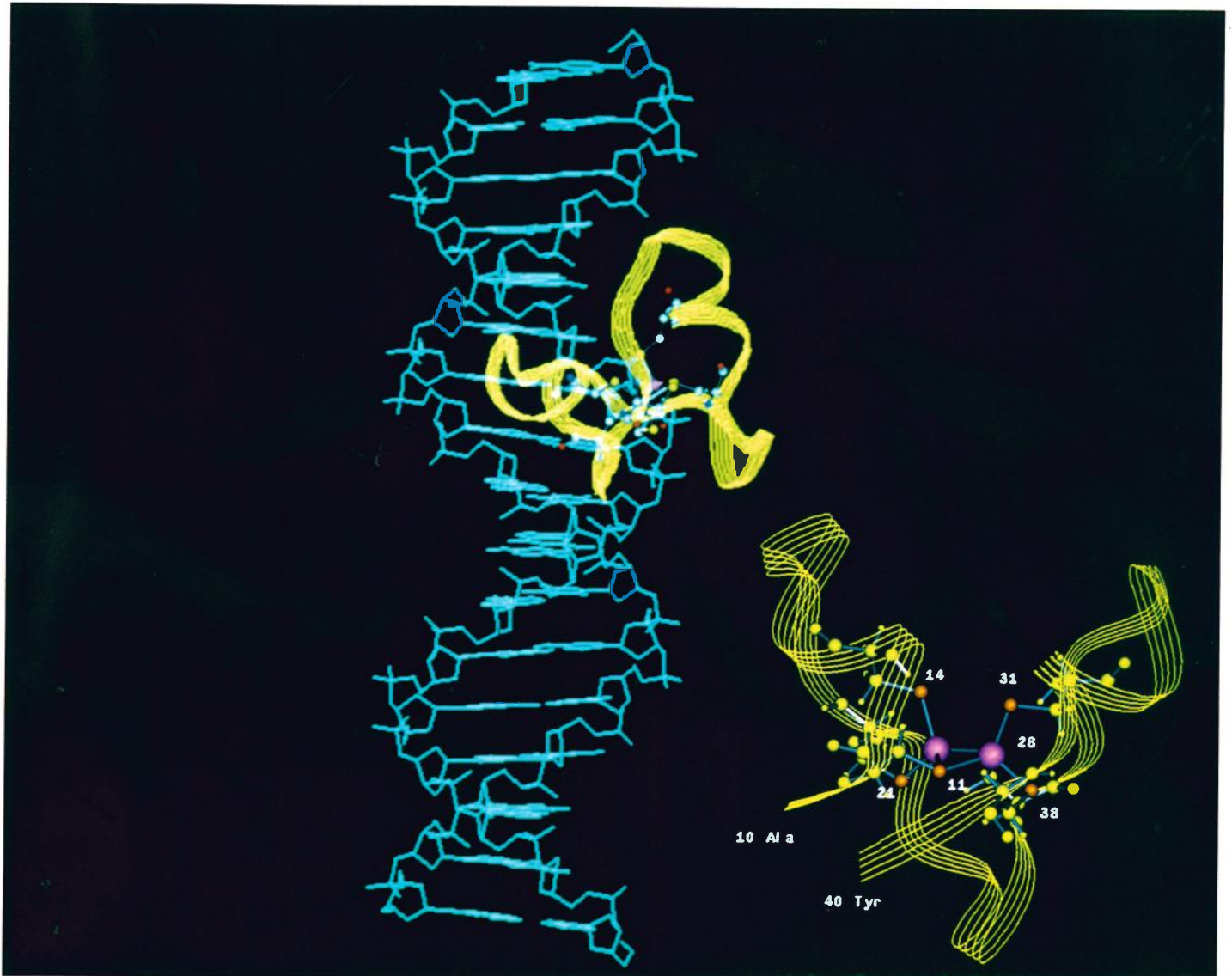
〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 46 号

ミニ特集：NMR

NOVEMBER 15, 1994



タンパク質・核酸複合体のNMR（核磁気共鳴）による構造解析
（説明：裏面参照）

総 説

荒田洋治

NMRとライフサイエンス…………… 1

国内情報

甲斐荘正恒

拡がるNMRのフロンティア…………… 4

京極好正

遺伝子の研究に果たしてきた NMR の役割…………… 9

矢崎芳明

^{31}P NMR による植物細胞内の pH の測定……………13

北本勝ひこ

融合遺伝子を用いた麹菌 (*Aspergillus oryzae*) によるキモシンの生産……………16

八木繁実・中村 達

ヤドリバエの人工飼育……………19

地域の先端研究

野村幸雄

子房培養を用いたラッキョウの種間交雑による変異幅の拡大……………23

文献情報

c-mos 遺伝子欠損マウスにおける卵子の単為発生……………26

DNA shuffling を用いたタンパク質の試験管内高速進化……………27

磁石で融合細胞を選抜する……………29

国際学会レポート

早川孝彦

第4回国際植物分子生物学会に参加して……………30

(表紙写真の説明)

NMR (核磁気共鳴) によって決められた発芽酵母 GAL 4 タンパク質の DNA 結合ドメインと、その部分がエンハンサー領域 UAS_G に結合しているところ。ドメインは Zn フィンガーモチーフを持ち 2 個の Zn に 6 個のシスチン残基の S が配位している。右下の図は結合部位の拡大図。(12頁, 文献 No. 8 参照)

NMR とライフサイエンス

機能水研究所
荒田洋治

1. NMR とは何か

核磁気共鳴 (NMR) は磁性物理学発祥の地オランダで積み重ねられた多年にわたる地味な基礎研究が実って、第二次世界大戦終了直後、アメリカで最初の実験が成功した。

NMR は、原子核の磁性を測定する実験物理学の一手段と考えられていた時期を経て、最初、有機化学、続いて化学一般、さらに生物学、そして医学へと、きわめて短時間の間に浸透していった。

NMR がこれほど短時間に、しかも驚くほど広い範囲にわたって、その重要性を認められた最大の理由は、それが単に原子核を測定対象としているのではなく、原子核をとりまく電子の状態を敏感に反映することによる。すなわち、同じ原子核、例えば水素原子核 (プロトン) であっても、周りの電子の環境が異なれば、区別して見るのできるのである。

このことは、つぎのことを意味する。

- 1) 分子のなかの同じ種類の原子を別々に見ることが出来る。
- 2) たとえ同一分子であっても、高分子のなかに組み込まれた場合には、周りの環境が完全に同じでない限り、互いに区別して見る事が出来る。すなわち、同じヒスチジンであっても、タンパク質分子のなかの異なる部位に存在すれば、区別して見えるのである。

科学者は、これまでさまざまな実験手段を手にしたが、NMR のように、マイクロからマ

クロにわたって、精緻かつ多彩な情報をもたらす方法に出会ったことはかつてない。

2. ライフサイエンスにおける NMR の利用

1) マクロに見る

過去20年間に、NMR は、化学の世界を超え、想像もしなかった方向に発展した。従来、物理化学的な方法は、単離精製した分子を対象とすることが暗黙の了解になっていた。たとえば、可視紫外分光法では、測定に用いる光が試料を通過する必要がある。したがって、不透明なものは測定の対象にならない。

これに対して NMR は、長い波長の電波を測定に用いる。電波は、金属など特別な場合の他は自由に試料を通過する。すなわち、細胞であれ、組織であれ、人体であれ、NMR の標的になる。化学的にいえば不均一な複合系が測定の対象となることが明らかになったあと、医学、生物学における NMR の新しい世界が開けた。

まず第一に、細胞を破壊することなく、細胞のなかの化学現象を、分子1個づつ手に取ってみることが出来る。例えば、リン酸イオンの NMR を測定することによって、細胞内の pH を測定することが出来る。また、細胞内の代謝過程を追跡することが可能である。現在では、インビボ (in vivo) NMR と総称されているこのアプローチを世界で誰よりも早く手がけた研究者の一人が、本誌に執筆していただいている甲斐荘正恒博士 (東京都立大学理学部教授、当時味の素中央研究所主任研究員) である。

第二に、水を単に水として捉え、対象中の水の分布を画像化することが可能である。

NMR イメージング (MRI) と呼ばれているこの方法は、生物学、医学の分野で今や不可欠な方法となった。現在では全国どここの病院でも、MRI の検査を受けることができる。植物などにおいても同様に、水の分布を画像化することがルーチン的に行われている。

さらに、上述の二つのアプローチを合わせ持つ方法が発展しつつある。すなわち、化学を画像化するのである。今後、空間分解能、時間分解能がさらに向上すれば、この分野における NMR の未来は、ほとんど無限といってもよい。

2) ミクロに見る

生体分子の重要な特徴は、三次元的な形を持つ点である。タンパク質や核酸がその典型的な例である。近年 NMR の高分解能化がすすみ、これらの生体高分子の一点づつを詳細に見ることが可能になった。こうして分離されたスペクトル情報から、タンパク質の三次元構造を構築する方法を確立したのはスイスのグループである。

後出の国内情報を執筆していただいた甲斐荘正恒教授は、タンパク質構造研究のための方法論の開発で世界をリードしておられる。また京極好正教授は、タンパク質と核酸の相互作用解析で大きな成果を上げてこられた。筆者は多年にわたり、多機能巨大タンパク質の研究に突破口を開くべく、免疫グロブリンの構造解析を行ってきた。

NMR によって水溶液中の生体高分子の三次元構造解析が可能となったことによって、結晶を対象とする X 線結晶解析と NMR の関連がさらに密接となった。日本でも若手研究者が着実に力を付けつつある。今後日本における構造生物学の進歩の原動力となるであろう。

3. NMR の将来

ライフサイエンスにおける NMR は、今後さらに発展が期待されている。NMR は、期待されるに値する十分なポテンシャルをもつ。しかしそれには、NMR 装置の更なる高

性能化がはからなければならない。

NMR 装置のハードウェアの開発は、これまでアメリカ、ヨーロッパ主導で行われてきた。しかし、近年 NMR 装置の心臓部ともいえる超伝導磁石の開発において、日本の技術が世界の注目を集めている。

NMR 分光計は、プロトンの共鳴磁場をもって表すことが習慣になっている。1993年の時点で、最高の磁場をもつ分光計は、600 MHz であった。この装置は、アメリカ、ドイツ、日本 3 国から発売されているが、磁石はいずれもイギリスまたはドイツ製である。ちなみに、600MHz 分光計は1994年現在、世界で 160 台、そのうち日本で 30 台が稼働している。

1994年になって、750MHz 分光計が稼働を開始した。世界で最初に測定結果を発表したのは、ペンシルバニア大学のスタンレー・オペラ教授である。この装置には、日本の JMT 社の超伝導磁石が使われている。これに続いて、日本で、農業生物資源研究所(つくば)に 750MHz 分光計が導入され、今後の発展が期待されている。さらにアメリカ、ヨーロッパでいくつかの研究室に搬入が始まり、今年中には、さらに何台かが動き出すはずである。

750MHz の装置は、分解能、感度の点で、これまでの 600MHz あるいはそれ以下の装置に比較して群を抜く性能をもっている。これによって、タンパク質、核酸などの高次構造研究が飛躍的に進むことが予想される。これは、とりもなおさず、例えば遺伝子発現の制御機構など、これまで知ることの出来なかった現象に対して、微細な分子レベルでの情報を提供することは疑いない。

上述の 600MHz、750MHz 分光計の開発の経緯から見て、NMR の高性能化のために、今後日本の技術の果たす役割が世界の期待を集めている。しかしこれは、一研究グループのレベルをはるかに超える予算措置を必要としている。

例えば、アメリカでは、1997年をめざして 2000万ドルの予算のプロジェクトがスタート

した。日本が、今や世界に誇る技術をもつことが明らかになった以上、一刻も早く NMR の高性能化に着手すべきである。この機を逸すると、日本は 600MHz の時代に逆戻りし、再び世界の後塵を拝することになるであろう。

4. 結 語

バイオサイエンスにおける NMR の国際会議は、1965年のポストン会議以来、隔年、世界各国で開催されてきた。1978年には、第 8 回会議が日本（奈良）で藤原鎮男教授（東大理，当時）、大西俊一教授（京大理，当時）、宮澤辰雄教授（東大理，当時）を組織委員として開催された。その後20年を経て、1998年に再び日本において、この会が開催されることが決定した。組織委員は、本誌の執筆に当たっている甲斐荘、京極、荒田の3名である。この会には、日本からの参加者に加えて、アメリカ、ヨーロッパなど世界各国から 400 名を超える参加者が見込まれている。これによっても、日本に対する世界の期待が

明らかである。

バイオサイエンスの基礎研究において NMR の果たす役割は、今や万人の認めるところとなった。さらに、NMR のもたらす基礎情報は、応用面においても、ほとんど無限の可能性をもっている。

農業分野に限ってみても、環境の変化に対応できる農作物の品種改良など、今後21世紀に向けて、NMR のミクロ、マクロの両面からの研究の意義は計り知れないものがある。例えば、霜害と氷核タンパク質の関連を、従来のタンパク質化学的、分子生物学的アプローチによる成果をもとに NMR によって解明することは、基礎論としても興味があるばかりでなく、研究結果は、応用的にも大きな意義をもつと考えている。

高性能、高分解能 NMR は、ビッグサイエンスといってよい段階に達した。NMR の今後は、国家プロジェクトを、どこで、誰が、何を目的にして開始するかにかかっている。NMR がそれに値する十分なポテンシャルをもっていることは疑いない。



国内情報

拡がる NMR のフロンティア

東京都立大学
甲斐荘正恒

1. はじめに

NMR は量子力学に支配されるミクロの世界の物理現象である。このような、いわば物質の存在に関する最も微弱な現象を通じて、いかに様々な知見が得られるかは想像を絶する程である。しかも、NMR に限っては、他の方法とは異なり、原理・測定法の発見、応用分野の成長から、成熟・停滞と続くライフサイクルとは無縁のようである。誕生以来、NMR は約50年の歴史を持ちながら、未だにだ燃え盛る太陽、とっては大袈裟かもしれないが、とにかく応用分野に供給するエネルギーの源はますます衰えを知らない。あらゆる意味で異常な生命力は、まるでブラックホールのように、新しい科学技術の最先端を呑み込み新たなエネルギーを生み出している。新たな研究所の設備として、何はともあれ、高分解能 NMR 装置を導入しなくてはならない気分になるのは、このエネルギーのしからしめる所であろう。但し、とことん付き合えば必ず応えてくれるのが NMR であるが、通り一遍の付き合いでは NMR の本当の素晴らしさは判らない。

NMR はラジオ波分光とも呼ばれる。これは、利用する電磁波がラジオに利用される数メートル (100MHz のラジオ波の波長は3メートル) 程度の波長を持つことに由来する。このような微弱なエネルギーを持つ長波長の電磁波を用いて、分子の構造をÅ以下の分解能で決定したり、あるいは人体を数mm程度の分解能で画像化することができ

るのは、一種のパラドックスともいえる。他の構造研究方法である X-線回折法や電子顕微鏡の世界では、解析精度を向上させようと思ったら、電子線や X-線のエネルギーを上げる必要がある。ラジオ波を用いる NMR は本質的に非破壊的、無侵襲的手段である。試料に与える影響が僅かであるというこの本質的な特徴が、原子の位置情報の高精度化と両立し得るという点が、NMR の価値と可能性を高めていることは疑いのないところであろう。NMR により得られる原子の位置情報は静止画像的な構造情報に止まらない。物質の原子レベルでの動きは 10^{-9} ~ 10^3 秒といった途轍も無い幅広い時間領域で入手する様々な手法も発達している。この中には水溶液内におけるタンパク質や核酸等生体高分子の揺らぎ、それらの分子内部表面や表面に結合した水の動的な存在状態に関する情報、生体における物質代謝、あるいは人体における血流速度等、様々な「動き」が含まれている。このような動的構造情報は、NMR が微弱なエネルギーを持つラジオ波を用いる方法であるために、非破壊・無侵襲的に得られる。

我が国において最先端 NMR 装置が導入されたことを機会に、国際的舞台で一線に立って活躍されている荒田・京極両先生とともに“拡がる NMR のフロンティア”についてご紹介できる機会を持つことができるのは筆者にとり大変名誉なことではある。しかしながら、限られた紙面において NMR の魅力の全てについて語り尽くすことは到底期待できない。いずれにせよ、海に漂う氷山ではないが、現在我々が垣間見る NMR の応用分野自体が、NMR が持つ無限の可能性の極く一部に過ぎないのである。

KAINOSHO Masatsune

2. NMRによる分子構造の決定

NMRは、あらゆる化学の領域における分子構造決定手段として不可欠となっている。この中には有機化学・無機化学における反応生成物の構造決定や定量分析、複雑な天然物の構造決定のように、NMRの最大の応用分野が含まれている。最近におけるこの分野の最も顕著な進歩は、疑いもなくタンパク質や核酸等、いわゆる生体高分子の立体構造決定法としてのNMR技術である。従来は単結晶を対象とするX-線回折が殆ど唯一の生体高分子の立体構造の決定手段であった。分光学的手法という全く新しい原理に基づく、溶液状態における生体高分子の構造決定手段を持つことになったことの意義は大きい。

この手法の原理を判りやすく説明しよう。立体構造を決定しようとするタンパク質がアラニン残基を5個含んでおり、そのメチル基のシグナルが分離して観測され、かつそれらがどのアラニン残基に由来する（“帰属”という）のが明らかとなっているとしよう。我々はこのような帰属の確定したNMRシグナル（この場合はアラニンのメチル基）を利用して、タンパク質の立体構造情報を得ることができる。今、仮に5個のアラニン残基がタンパク質のポリペプチド鎖に概ね均等に存在するとする。このタンパク質の立体構造が溶液中で単一であれば、これらのアラニン残基のメチル基間、あるいはアラニンのメチル基と他のアミノ酸残基間の相対位置は立体構造によって規定されるために一定である。当然のことながら、このようなアラニンのメチル基間の空間的距離情報を満足する立体構造は無数に存在するであろう。しかし、他のアミノ酸残基の特定原子団とのアラニンのメチル基との相対位置に関しても、数多くの原子間距離に関する情報を積み上げて行くことにより、徐々に全ての空間距離制限を満足する構造は少数に絞られて行き、最終的には単一の立体構造に集束する。核オーバーハウザー（NOE）効果という、空間的に近距離に

ある原子間にのみ観測できる現象の有無を定性的に用いることにより、タンパク質の立体構造を決定できることを実証したのはスイス工科大学のWüthrich博士の不朽の業績である。

溶液内の立体構造は多くの場合、結晶中のものとよく一致する。しかしながら、タンパク質の立体構造がそれらの機能を果たす場溶液-において決定できるようになったことの意味は大きい。現在においては、NMRによるタンパク質構造決定は、低分子量のタンパク質に限れば、完全にルーティン的な技術となりつつある。我々が、最近、Wüthrich法を用いて決定したチオールプロテアーゼ阻害剤ヒトシスタチンAの主鎖の立体構造を示したものが図-1である。シスタチンAは98個のアミノ酸残基がペプチド結合でつながった一本の鎖からできており、分子量は約10 kDa程度である。分子量が増大するにつれNMRシグナルが混み合い、一本の連続線で示される通常のNMRスペクトル（周波数軸が一つあるために1次元NMRスペクトルと呼ばれる）を用いる限り、近距離にある原子の組を特定することは困難である。同じく、スイス工科大学のErnst博士の最大の功績は、NMRスペクトルを複数の周波数軸で表現する方法を発展させたことであり、この功績によりノーベル賞を受賞したことは衆知の通りである²⁾。2次元NMRではスペクトルは二つの直交する周波数軸で定義される

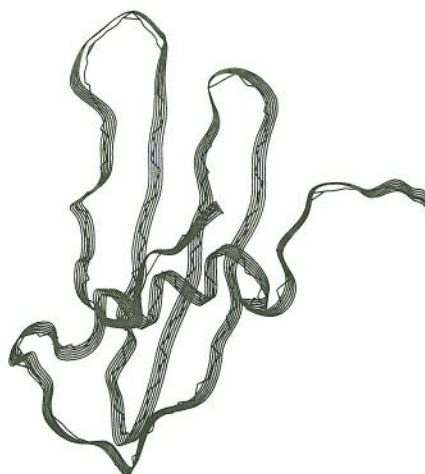


図1 NMR法により決定したシスタチンAの水溶液内における立体構造（楯真一ら、未発表）

平面に突き出た山塊として表現される。線から面へと、NMR スペクトルの周波数軸が拡張されることによりシグナルの重なりは著しく軽減される。現在では NIH の Bax や伊倉により開発された、周波数軸としては水素核 (^1H) 以外に、 ^{13}C や ^{15}N 等を用いる多次元 (3, 4 次元) NMR 測定技術が急速に発展している³⁾。図-1のシスタチンAの構造決定においても、実は大腸菌の高発現系を用いて生産した ^{13}C , ^{15}N -均一標識した試料を用いて行なっている。この結果 Wüthrich 博士の方法によるタンパク質の構造決定の対象となる分子量範囲は、20kDa (アミノ酸残基数として 200 前後) を超える段階まで達している。

3. NMR とライフサイエンス

タンパク質が機能を果たす場としての水溶液において、タンパク質の立体構造が決定できることの意味が深く、かつ重い。しかしながら、新たな方法の登場を迎える高揚のなかで、NMR 法が本来持つ素晴らしい特質を見失い、徒に構造決定手段としての NMR 法の効率化のみに狂奔するのは愚かなことである。NMR に期待される役割は、結晶化が困難な場合のタンパク質の構造決定に、X-線解析の代打要員としてベンチを温めることにはない。ましてや、一流どころの X-線解析の専門家が、より高分子量のタンパク質複合体に研究の中心を移しつつあるなかで、彼等

の抜けた穴を埋めるために大車輪で頑張る必要もない。NMR は溶液内において立体構造変化を高感度に検出する能力により、本質により肉薄した情報を我々にもたらしてくれる。

例えば、タンパク質の機能-構造相関について我々が長年行ってきた研究を例にとる。対象とするタンパク質はセリンプロテアーゼ阻害剤 SSI である。SSI は大阪府立大学の村尾教授 (当時) により 1972 年に放線菌から単離精製された⁴⁾。このインヒビターはダイマーとして 23kDa の分子量を持ち、プロテアーゼとの複合体形成時には 78kDa の高分子量タンパク質となる。このような高分子量タンパク質においてはその立体構造を X-線解析的な意味で決定することは望めない。実際には、SSI-プロテアーゼ複合体の結晶構造が決定されているうえに、さらに NMR により同様な意味を持つ構造情報はそれ程必要がないのである。問題は SSI-プロテアーゼ複合体の異常な安定性の原因を解明するとともに、もう一つの機能的特徴であるインヒビター活性の幅広さを分子構築原理から同時に解明することである。結晶構造が X-線解析により精密に解かれてた後にも、この最も重要な疑問は残っていたのである。我々は、プロテアーゼと複合体を形成することにより SSI のどの部分の構造変化が誘起されるのかを徹底的に調べた。実際には、SSI の各アミノ酸残基の主鎖ペプチドのカルボニル炭素を選択的に ^{13}C -標識し、その NMR の共鳴線の位置 (化学シフトという) を複合体形成前後で比較した^{4~6)}。構造変化のない部分は、化学シフトが誘起されず、構造変化の起きる部分は、その大きさに応じて化学シフトが誘起される筈であると、考えたわけである。図-2はそのようにして得られた SSI のカルボニル炭素の化学シフト変化をペプチド鎖に沿ってプロットしたものである。この図を一瞥しただけで、SSI のペプチド鎖の後半部分に構造変化が集中して起きていることが明らかである。我々は、SSI に様々な構造的擾乱を与え、その応答を全く同じ NMR 手法で調べた。その結果、この部分は SSI の構造調

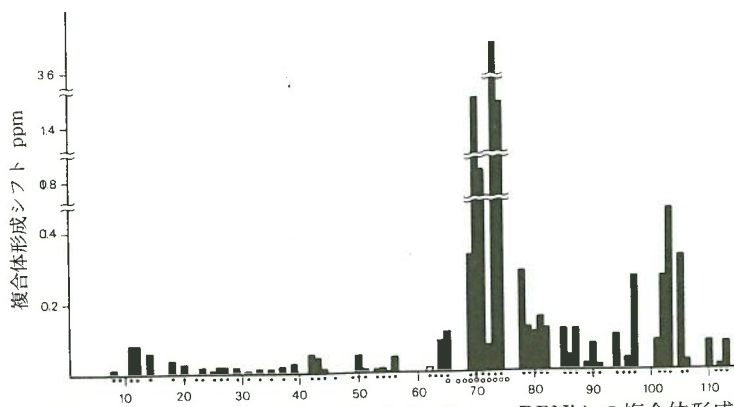


図2 アルカリプロテアーゼズブチリシンBPN'との複合体形成に伴うSSIの主鎖カルボニル炭酸シグナルの化学シフト変化
横軸はSSIサブユニットの残基番号⁶⁾

節部分としての機能を持っており、プロテアーゼとの複合体形成時において、プロテアーゼとの接触界面に合わせて巧みに最も安定な構造に変化することが明らかとなった。このようなタンパク質の分子認識機構は、荒田グループによる抗体の研究においても見られる重要な原理であることが明らかとなっている。

ライフサイエンスにおける NMR の役割は紹介したような、タンパク質等の生体物質の構造と機能に関する研究に限定されるわけでない。酵素反応の立体化学をはじめ、様々な目的に NMR は利用されてきた。この方面における、NMR の役割として忘れてはならないのは次項に述べる *in vivo* NMR の応用であろう。NMR の持つ非破壊性・無侵襲性を最大限に利用したこの種の応用は除々に高度化し、最終的には我々が単離したタンパク質や核酸等を用いて行なっている研究と、生体や細胞を丸ごと対象とする *in vivo* NMR の方法論の境界は融合することになるであろう。

4. *in vivo* NMR の現状と将来

NMR はエネルギーとして弱いラジオ波を用いる分光学的方法であるために、生体に及ぼす影響に関しては比較的小さいことが考えられる。しかしながら、強い静止磁場中に生体が置かれ、高い出力のラジオ波を照射され続けられれば、何等かの悪い影響が危惧されることも当然である。また、生体や細胞は純粋な物質が均一に混合したものとは本質的に異なっている。生命の本質は、構成物質の局在性と深く関わっており、その意味で物質の不均一性こそ生体の最も重要な特徴である。*in vivo* NMR の源流は今から約20年前に遡る。我々は生体や食品等の特徴付ける“不均一系”試料の NMR スペクトルに大きな興味を持っていた。これらは完全に磨り潰し、混合し、均一にすることにより、その意味を失う点において共通している。アオキ種子の丸ごとを¹³C-NMR で測定した結果、その種子に含まれる苦味配糖体アウクピンの見事なシ

グナルが得られた。種子には様々な物質が含まれてはいるものの、固体物質は著しく NMR の線幅は広く、また少量存在するのはシグナル強度が弱いなどの理由により、種子のスペクトルでは細胞質に多量に溶存するアウクピンと蔗糖のみが観測された⁷⁾。

磁場の生体への影響という観点からは、やはり当時我々が試みた微生物発酵過程の³¹P や¹³C-NMR による追跡⁸⁾、鳥卵の孵化過程の³¹P-NMR による追跡などがあげられる⁹⁾。

図-3のように、孵化の開始直後と孵化直前の³¹P-NMR スペクトルは著しくことなっている。これは、発生の過程に伴い、高エネルギーリン酸物質が生産・蓄積されて行く過程を反映している。現在では、NMR に空間位置の情報を付け加えるための様々な技術進歩が達成されたために、医療診断技術として既に実用化されている MRI (Magnetic Resonance Imaging; NMR 画像) だけでなく、特定空間の NMR シグナルを高度選択的に測定することが可能となっている (MRS; Magnetic Resonance Spectroscopy; スペクトロスコピーと呼ばれている)。装置の進歩も大きく、人体のようなマクロ試料から、細胞一個のようなマイクロ試料に至るまで、様々な空間分解能での画像化が進展している。

本部分における、大きな期待の一つは“機能画像”(“functional imaging”) と呼ばれる画像化技術である¹⁰⁾。この技術は未だ確立し

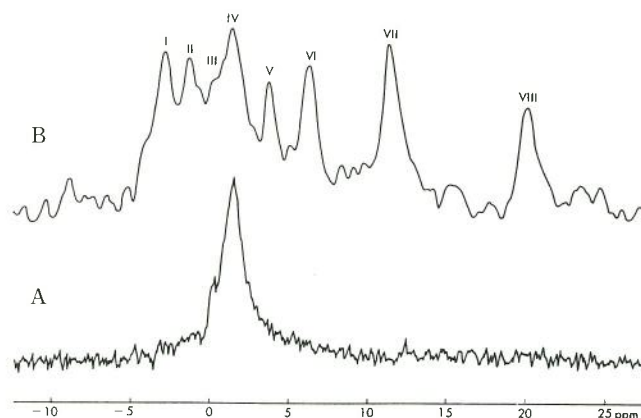


図3 セキセイインコの孵化過程に伴う³¹P-NMRシグナルの変化
A) 孵化開始直後のスペクトル、リン貯蔵タンパク質ホスビチン(IV)のシグナルのみが見られる; B) 孵化前日のスペクトル、ATP(IV~VIII)、ホシホクレアチン(V)等の高エネルギーリン酸化合物が生産されているのが明らかに判る。これらのスペクトルは同一卵により得られた。⁹⁾

たものではないが、一例をあげれば、様々な作業を行わせつつ、脳内の血中酸素レベルに依存した NMR パラメータを利用して画像化を行なう。このような作業により活性化される部位の画像化は脳機能の理解にとって重要な知見となる。MRI は、PET (Positron Emission Tomography) とは異なり、正常な代謝過程を保ちつつ画像化が可能であるために今後の進歩が期待できる。

in vivo NMR 装置の進歩は急速であり、現在は純物質を対象とする NMR 法に利用されているだけの様々な多次元 NMR 技術が、将来は in vivo NMR へと拡張され、革新的な成果が得られることが期待できる。微生物や植物組織などには、そのような応用が比較的容易に可能となるであろう。

5. 今後の進歩

与えられた紙面はとうに尽きてしまったが、一言だけ付け加えさせて頂きたい。NMR の進歩の一つ方向は疑いもなく高磁場化である。これは、NMR の測定感度が磁場強度の 1.5 乗倍に比例して向上すること、および化学シフト差が磁場に比例して増大することにより、測定が容易になると考えられているからである。但し、磁場強度が高くなると悪い点もある。例えば、共鳴周波数は磁場強度に比例して高くなるために、生体中や水溶液に吸収される効率が良くなる。このことはマイクロ波の加熱調理器を考えればわかることである。とくに、塩濃度が高いような系ではこの問題は深刻でなる。恐らく、様々な目的に合わせて、磁場強度の異なる複数の装置を持つことは重要であろう。現在の最高磁場強度は 750 MHz (^1H -NMR の共鳴周波数) であるが、恐らく今世紀末迄には 1GHz (1000MHz) の装置が登場することになる。ここでは全くふれなかったが、固体の NMR も最近になり大きく進歩した。特定の原子間の空間距離の精密な決定法など、固体 NMR の応用には幾つかの重要なものが含まれている。

測定した NMR データ処理を行なうため

のワークステーションの進歩、データ処理関係のソフトの進歩は急速である。NMR においては、独創的なアイデアと技術革新が結び合い、海中深く没していた氷山が忽然とその威容を現すことは一つも珍しいことではない。我が国における最近の装置環境の向上がそのような独創的研究の発展の素地となることを願うばかりである。

文 献

- 1) Wüthrich, K. (1991) (京極・小林訳), “タンパク質と核酸の NMR - 二次元 NMR による構造解析”, 東京化学同人, 東京
- 2) Ernst, R.R. et al. (1987) “Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions”, Oxford University Press, Oxford
- 3) 伊倉光彦 (1992) “多次元 NMR と蛋白質の構造解析への利用”, 蛋白質・核酸・酵素, 臨時増刊「タンパク質工学の進展」37: 492
- 4) Hiromi, K. et al. (1985) “Protein Protease Inhibitor - The Case of *Streptomyces* Subtilisin Inhibitor (SSI)”, Elsevier, Amsterdam
- 5) 甲斐荘正恒・三宅洋子 (1988) “安定同位体-NMR による SSI-ズブチリシン複合体の構造化学的研究”, 農化誌, 62: 1822
- 6) Miyake, Y. and M. Kainosho (1994) “Nuclear Magnetic Resonance Studies on *Streptomyces* Subtilisin Inhibitor and its Complexes with Proteinases”, in “Molecular Aspects of Enzyme Catalysis”, Ed. Fukui, T. and K. Soda, Kodansha, Tokyo
- 7) Kainosho, M. (1976) *Tetrahedron Lett.*, 4279
- 8) 甲斐荘正恒 (1982) “生体試料の NMR による研究法”, 「医薬と微生物生産(上)」, 213, 学会出版センター, 東京
- 9) 甲斐荘正恒 (1986) “安定同位体と NMR”, 放射線医学大系 特別巻 2 「磁気共鳴診断(別冊)」中山書店, 東京
- 10) Ogawa, S. et al. (1993) *Biophys. J.* 64: 800

遺伝子の研究に果たしてきた NMR の役割

大阪大学蛋白質研究所
京極好正

1. はじめに

1953年に Watson と Crick が DNA の 2 重らせんモデルを提唱したとき以来、生命現象も分子で説明されるだろうという期待で分子生物学が誕生した。しかしその後の展開は分子構造からはずれて、塩基配列の解読に重点が置かれ、分子生物学というよりは分子遺伝学として隆盛が続いた。遺伝子のもたらすものはタンパク質である。タンパク質の方は、アミノ酸配列そのものというより、それによって規定された立体構造が機能と重要なかわりを持つ。遺伝子解読の流れが確立された現在、再び生体高分子の構造に関心が集まり、いわゆる構造生物学が隆盛を迎えている。構造生物学にあつて、構造解析の三種の神器は X 線解析、電子顕微鏡、NMR であろう。NMR のもたらす多彩の情報と適用上の制約については別稿で述べられていると思われるので、本稿ではそのような NMR が、遺伝子関連の研究にいかに関立ってきたか、また今後はどのようなことが期待されるかを述べてみる。

2. 塩基対形成の検証

A と T (または U)、G と C の間で塩基対が形成されることが複製や転写の際の基本であるが、これが物理的に実証されるのは比較的近年である。2 本鎖 DNA オリゴマーの単結晶解析、tRNA の結晶構造がそれを示しているが、溶液の中では、合成ポリヌクレオ

チドの紫外外部吸収の浅色効果等で間接に認められていた。モデル化合物を用いた実験では赤外線吸収の実験が溶液中での塩基対の強さ、特異性を示したのものとして最初であるが¹⁾、DNA/RNA 自身について水溶液中で塩基対の情報を与えてくれるのは NMR しかない。近年核酸合成技術の進歩から配列の決まった塩基対数 10~30 程度のものを 10mg オーダーで大量に作ることはそう難しくない。そうい

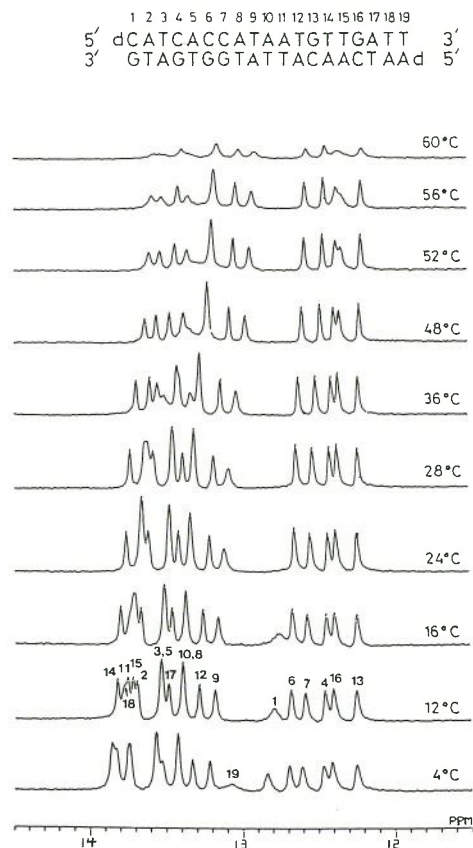


図1 $\phi 80$ ファージのCroリプレッサータンパク質が結合するオペレーター領域 O_R3部位のイミノプロトンシグナルとその温度依存性

図中の番号は上記配列の番号に対応している。温度を上げて行くにつれて、両末端および端に近い A-T 対から切れてシグナルが見えなくなる様子がわかる。²⁾

った材料を軽水中で高分解能 NMR を測定すると、塩基対で水素結合したイミノプロトンのシグナルのみ観測できる (図 1)²⁾。これを NMR 的な技術で何番目の塩基対に由来するかを決める (帰属という) ことが出来るので、後はこれを利用して情報を引き出せる。たとえば、ミスマッチを含む 2 本鎖を用いて Watson-Crick 型塩基対が形成されているか否かを見るのに使える。また温度を上げたり、塩濃度を変えた時その塩基対はどれ位まで安定なのかを見ることも出来る。単に安定性のみでなく、DNA 鎖の変形などにも重要な指標として使える³⁾。測定の限界は通常の 500MHz 程度の装置なら塩基対数 30 位であるが、もっと大きな組換え中間体の Holliday 構造や⁴⁾、バルジ構造、tRNA など 30~50 塩基対のものにも適用されている。ここでは超高分解能 NMR 装置が威力を発揮するだろう。

3. 核酸の構造多形の検証

Watson と Crick が提唱した 2 重らせんモデルは X 線の繊維写真にもとづいているが、その型は一般に水溶液や高湿度中でとる B 型といわれるものである。DNA の構造は基本的には 2 重らせんであるが、その形は外的環

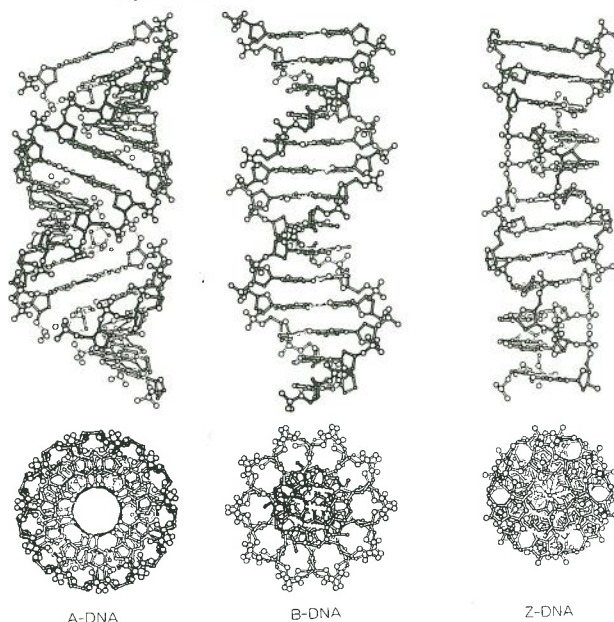


図 2 DNA の多形
DNA の代表的な形 3 種の模式図を示す。⁵⁾

境や塩基配列によって支配される。乾燥状態やアルコール沈澱では A 型に、また G と C が交互にあり、高塩濃度下では左巻の Z 型になる (図 2)⁵⁾。この場合 C がメチル化されると生理的条件下でも Z 型になりやすいということも知られている。このほかにも塩基配列によっては局所的に塩、薬物、タンパク質の影響で構造を変える場合がある。このような際どの型をとるかは簡便には円偏光二色性の測定で見られるが、部分的な変化が生じた場合は、スペクトル上では平均化されて見にくい。こんな場合、NMR だと、DNA オリゴマーを用いて、糖部のシグナルの結合定数から、個々のヌクレオチドの構造に関する情報をとることが出来る。糖の部分は 5 員環を形成しているが、この環は比較的柔らかくパッキングを起こして構造が変わりやすい。この糖の形と A, B, Z 型との対応がついていて、A 型は C3' endo, B 型は C2' endo~O4' endo, Z 型は G 残基は C3' endo, C 残基は C2' endo をとる (図 3)。この形は糖のプロトンの J 値で決められるので、高分解能 NMR で各炭素の H シグナルが隣の炭素の H で分裂する程度によってこれを決めることが出来る⁶⁾。こういうことが出来るのも、やはりシグナルがよく分離して観測されることが必要で、それには塩基対数 20~30 位のもので今のところ限界だが、特定の位置だけ ¹³C 標識するような技術が進めば、もっと大きなオリゴマーでも特定部位の構造が決められるだろう。この類の測定は D₂O 中에서도出来るので材料が揃えばイミノプロトンの測定よりやさしい。特に薬物などの結合による局所的構造変換、結合様式の研究によく用いられているし⁷⁾、¹³C で標識された DNA を用いれば、タンパク質の結合による構造変換、特に曲がりとか、2 重らせんの巻戻り等の存在の有無の研究に用いられるだろう。

4. 転写制御タンパク質の構造と結合モチーフ

これまでは核酸の構造の方に重点を置いて説明してきたが、遺伝子の複製、発現、翻訳、

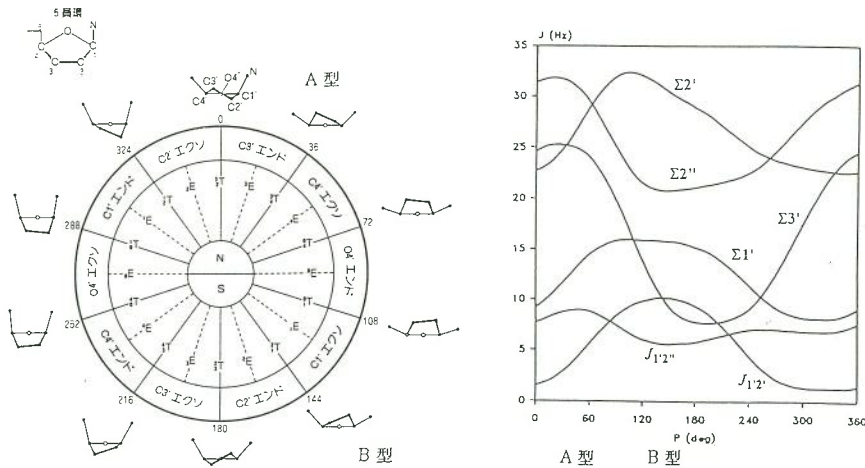


図3 β リボース環のパッキングの擬回転角表示(左)⁵⁾。糖環中のプロトンの結合定数Jおよびその和と擬回転角表示(右)⁶⁾。

いずれの段階にもタンパク質がかかわっている。特にメッセンジャーRNAの作られる発現の段階では転写制御因子と呼ばれるタンパク質が各種存在して、直接DNAと相互作用するとともに、RNAポリメラーゼとも直接、間接に接触している。この転写制御因子は原核生物、真核生物を問わず存在するが、真核生物の場合は特に発生、分化、がん化等の機構と密接に関連しているので、精力的な研究がされ、数え切れない転写制御因子が日々同定、精製されている。これらのタンパク質はその一部で制御遺伝子の特定の塩基配列を識別して結合するが、その部位は特定のアミノ酸配列を持ち、特定の立体構造をとると予想される結合モチーフというものを持つことが明らかになってきた⁸⁾。結合モチーフの構造は転写制御因子の中のアミノ酸100個前後のDNA結合ドメインそのものであったり、その中の1部であったりする。したがってクローニング技術の発達した現在、その部分のみを大量発現させ、¹⁵Nや¹³C安定同位体標識した試料が得られれば、現在のNMRと計算技術からすれば、その構造を決めることはそんなに難しくない。こうしてNMRは結合モチーフの立体構造決定には大きく寄与してきた⁹⁾。勿論X線結晶解析で決められたものも多く、結晶さえ出来れば、DNAとの複合体など分子量的に大きなものはX線解析の方が有利である。しかしNMRには結晶化

しないでも出来るという強みがある。

DNA結合モチーフの種類は最初は大まかに、ヘリックス-ターン-ヘリックス(HTH)、Zincフィンガー、ロイシンジッパー(bZip)というものが知られていたが(図4)、現在では β リボンや β シートでDNAの塩基配列を識別しているものも見付かっている。先の3種はいずれもDNAの主溝に α ヘリックスがはまり込むという型のものであるが、それぞれの亜種も沢山見付かり、さらに最近では、アミノ酸配列上の相同性は全く無いにもかかわらず、立体構造上非常に近いというものがいくつか見付かっている¹⁰⁾。このことは単にDNA結合モチーフに限らず、他の機能を持つタンパク質でも指摘されていることでもあり、今新たに相同性のないアミノ酸配列から同様の立体構造を予測できる方法の開発が待たれている。

5. まとめ、タンパク質・核酸複合体の構造研究に及ぼすNMRの役割

上述の1~3を総合すれば、必然的に特定の塩基配列を識別するタンパク質が、どのようなモチーフを持ち、どのような位置に結合し、その結果DNAにどのような変化が生じているかをNMRで見ることが出来るはずである。事実そのような成果もいくつか出されており^{11,12)}、構造生物学へ寄与してきている(表紙写真参照)。しかし、一番の問題は

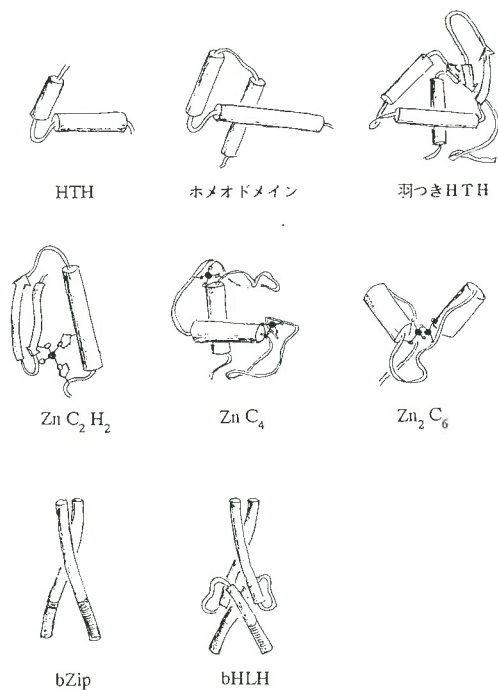


図4 α ヘリックスを認識部位に持つDNA結合モチーフの各種

最上列はヘリックス-ターン-ヘリックス(HTH)と変種, 2列目はZnフィンガーの変種, 下段は塩基性ロイシンジッパー(bZip)と塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス(bHLH)。

分子量の壁であり, タンパク質・DNA複合体の分子量が30000を超えるものについて各原子の位置を全部決めるというのは難しいであろう。その意味では複合体の結晶が得られれば, X線単結晶解析の寄与の方が今のところは大きい。NMRが今後のこの分野で果たす役割は今の路線を続けて行くならば, タンパク質・核酸の片方, または1部に安定同位体標識をして, その部分のシグナルからの情報を組み立てて行くとか, 結晶構造のわかっているものにやはり同位体標識をして, NMRの特徴である動きのある構造や結合様式の変異体との関連など明らかにして行くことであろう。その際は超高分解能NMRが使える。また, 一方, 固体NMRの手法と, 特定の部位の同位体標識と組み合わせて, 特定の原子間の距離を求めることによって, 転写制御因子-DNA-RNAポリメラーゼ複合体やクロマチンのような巨大複合系の構造や動的な挙動を見て行くことも考えられる¹³⁾。いずれにせよ, NMRという手法は非常に情

報量の多いものであるから, その手法を十分に使えば, まだまだ汲みとれる情報は多く存在し, また, 現在気のつかない画期的な方法が出てくることも充分期待される。

文 献

- 1) Kyogoku, Y., R. C. Lord and A. Rich (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 57: 250-257
- 2) Lee, S. J., H. Akutsu, Y. Kyogoku, K. Kitano, Z. Tozuka, A. Ohta, E. Otsuka and M. Ikehara (1985) *J. Biochem.*, 98: 1463-1472
- 3) Katahira, M., H. Sugeta, Y. Kyogoku and S. Fujii (1990) *Biochemistry*, 29: 7214-7222
- 4) Chen, S.-M., F. Hoffron, W. Leupin and W. J. Chazin (1991) *Biochemistry*, 30: 766-771
- 5) 京極好正 (1989) “遺伝子と遺伝の情報 I” 松原謙一編 岩波講座-分子生物学 1, 29-66
- 6) van Wijk, J., B. D. Huckriede, J. H. Ippel and C. Altona (1992) *Methods in Enzymology*, 211: 286-306
- 7) Sakaguchi, R., M. Katahira, Y. Kyogoku and S. Fujii (1991) *J. Biochem.* 109: 317-327
- 8) Shirakawa, M., W. J. Fairbrother, Y. Serikawa, T. Ohkubo, Y. Kyogoku and P. E. Wright (1993) *Biochemistry*, 32: 2144-2153
- 9) Pabo, C. O. and F. T. Sauer (1992) *Ann. Rev. Biochem.*, 61: 1053-1095
- 10) Vnister, G.W., S. J. Kim, C. Wu and A. Bax (1994) *Biochemistry*, 35: 10-16
- 11) Lee, S.J., M. Shirakawa, H. Akutsu, Y. Kyogoku, M. Shiraiishi, K. Kitano, M. Shin, E. Ohtsuka and M. Ikehara (1987), *EMBO J.* 6: 1129-1135
- 12) Billeter, M., Y. Q. Qian, G. Otting, M. Müller, W. Gehring and K. Wüthrich (1993) *J. Mol. Biol.*, 234: 1084-1094
- 13) Smith, S. O. and O. B. Peersen (1992) *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 21: 25-47

^{31}P NMR による植物細胞内 pH の測定

農林水産省 農業生物資源研究所
矢崎芳明

1. はじめに

NMR (核磁気共鳴) 分光法は、物質の分子構造解析の手段として威力を発揮してきたが、超伝導磁石の強磁場化による感度・分解能の向上、コンピュータ技術の進歩、多次元 NMR 法の導入などに支えられて、益々大きく発展している。また、化学以外でも生物学から医学に至るまで、NMR の応用範囲が広まった。NMR 法は静磁場と比較的弱い高周波磁場を用いるので、生体に対し無侵襲・非破壊的に細胞内生理状態を測定できる優れた手法になりうる¹⁾。in vivo NMR 法が植物細胞の研究に本格的に適用されたのは、動物細胞に遅れ1980年代になってからであるが、植物細胞には液胞が存在するので、細胞質と液胞それぞれについて解析可能であり、NMR の応用価値が動物細胞よりも高いものと考えられる。生体を研究する上で有用ないくつかの核種の NMR があるが、なかでも ^{31}P NMR 法は、細胞の生理状態を知る上で重要な細胞内 pH やリン化合物濃度を測定しうる。酵素活性は pH によって著しく影響を受けるので、細胞内 pH の測定は、代謝や生理状態を知る上できわめて重要である。さらに、細胞内 pH がどのように調節されているかにも多くの興味がある²⁾。しかし、従来の方法 (微小 pH 電極法、放射性同位元素でラベルした弱酸の膜内外の分布解析、蛍光色素法など) では植物細胞において細胞質と液胞の pH 測定を同時に非破壊で行うことは非常に困難であった。

そこで、NMR の特徴である無侵襲・非破

壊的な測定が可能な ^{31}P NMR による細胞内 pH の測定法を解説し、植物細胞に適用した実験例について紹介したい。

2. 原 理

Moon と Richards は、赤血球の細胞内 pH を ^{31}P NMR を用いて初めて測定し³⁾、植物では Roberts らが、トウモロコシ根端細胞の細胞質と液胞の pH 測定を行えることを示した⁴⁾。この測定法は、無機リン酸 (Pi) の化学シフトが pH によって変化することを利用したものである。原理的には、化学シフトが pH に依存して変化するピークが観測されるならば pH 測定が可能であるが、ほとんどの細胞において容易にピークを観測でき、その化学シフトが生理的 pH 範囲で pH に対し敏感に変化することなどから、無機リン酸がよく用いられる。

無機リン酸は pH によって解離状態が変化し、中性 pH 付近では HPO_4^{2-} および H_2PO_4^- として存在する。化学交換のない場合にはこれら 2 つのイオンは、 ^{31}P NMR スペクトル中で互いに約 2.4ppm 離れた 2 つのピークとして観測される。しかし、溶液中ではこれら 2 つのイオンは互いに非常に速く交換しあうので、実際に観測されるピークは 1 つでその位置 (化学シフト) は 2 つのイオンの存在比によって決まる。そこで、無機リン酸の化学シフトを pH の関数として測定すると、いわゆる滴定曲線と相似の (校正) 曲線が得られる。従ってあらかじめこの特性を調べておけば、 ^{31}P NMR スペクトル中の無機リン酸の化学シフトから細胞内 pH を測定することが可能である。

3. 方法

無機リン酸の化学シフトは、pH 以外にイオン強度⁵⁾や Mg^{2+} との結合⁶⁾の影響を受けるので、できる限り細胞内でのイオン強度や Mg^{2+} 濃度の条件を再現した溶液を用いて較正曲線 (calibration curve) をつくるのが望ましい⁷⁾。例として溶液組成は、1 mM KH_2PO_4 , 100mM KCl, 2 mM $MgSO_4$ で pH 7.0未満で、25mM MES-Tris, pH 7.0以上で25mM HEPES-KOHの緩衝液を用いた較正曲線を図1の挿入図に示す。pKaは約6.8で中性付近である。液胞 pHは、較正曲線において化学シフトがpHによってあまり変化しない領域に相当するので、細胞質 pHよりも測定精度がおちる。

³¹P NMR スペクトルの測定は、プロトンをデカップルしない条件で行う。測定する試料の大きさは、NMR装置で測定できるNMR試料管の外径によって規定されるが、通常は10mm管を使用することが多い。測

定中の細胞の生理状態を一定に保つために、細胞懸濁液の場合は酸素や空気の通気装置を必要とし、根端組織の場合は還流装置を必要とする^{8,9)}。例としてバリアン社製 VXR 500 S NMR分光計を用い、繰り返し時間を0.3秒、植物培養細胞で細胞0.36g(新鮮重)を3.6mlの培地に懸濁した試料では、積算時間は8分から32分程度を必要とする。細胞内 pH測定のみが目的ならば、無機リン酸の化学シフトが測定できればよく8分程度で充分であるが、他のリン化合物(ATPなど)のピークも観測したい場合、数十分積算の方がよい。図1に典型的な植物細胞の³¹P NMRスペクトルの例として酸素を通気した状態でのニチニチソウ培養細胞のスペクトルを示す。³¹P NMRスペクトル中には、G 6 P(グルコース6-リン酸)を代表とする糖リン酸、細胞質無機リン酸、液胞無機リン酸、ATP(アデノシン三リン酸)などに由来するピークが観測される。このスペクトル強度から細胞内のATPやPiなどエネルギー代謝に関与したリン化合物も定量できる。ただし、リン脂質に結合しているリンや核酸中のリンなどは、緩和時間が短いため線幅が広がり、高分解能NMRスペクトルでは検出しにくいので、比較的分子運動の盛んな、いわゆるフリーなリン化合物の濃度が得られる。

4. 実験例(低酸素ストレス下での細胞内 pHの変化)

イネは湛水した水田で生育する。しかし他の作物、例えば麦やダイズのような畑作物などでは、洪水等により土壌が滞水すると根の呼吸が妨げられ、たちまち生育阻害(過湿障害)を起こす。もしも畑作物にイネのような強い耐湿性をもたせることができれば、農作物の生産性向上・安定的な食料生産に寄与することができる。このためには、イネのもつ耐湿性(低酸素ストレス耐性)の機構を明らかにしなければならない。そこで、NMRを用いて細胞内 pHを測定することにより、低酸素ストレス耐性機構を細胞内 pH調節機構と関連づけて解明しようとした。

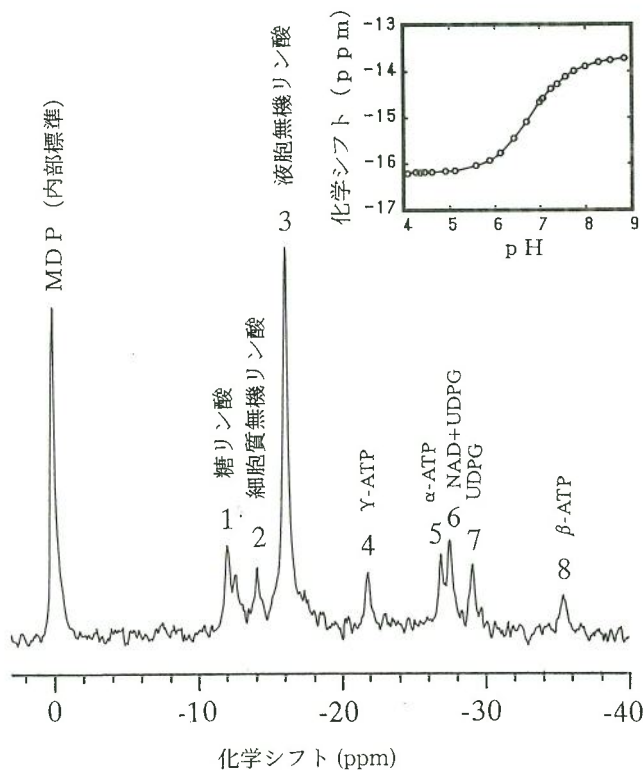


図1 ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) 培養細胞の³¹P NMRスペクトル

化学シフトの基準はMDP(methylene diphosphonic acid)、酸素通気状態で32分間積算した。挿入図は無機リン酸の化学シフトのpH依存性を示す較正曲線。

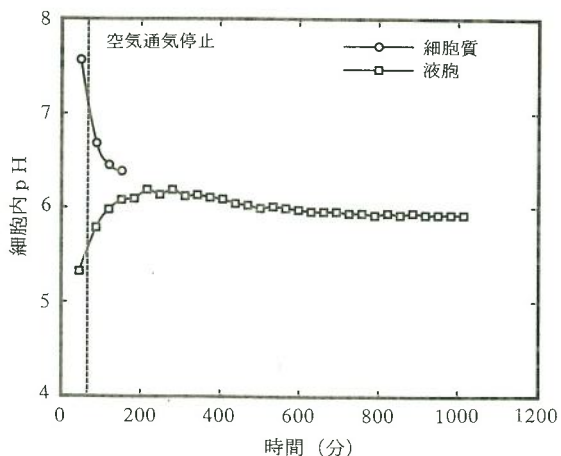


図2 空気通気停止により低酸素ストレスを与えたタバコ (*Nicotiana tabacum* var. BY-2) 培養細胞の細胞内pHの変化

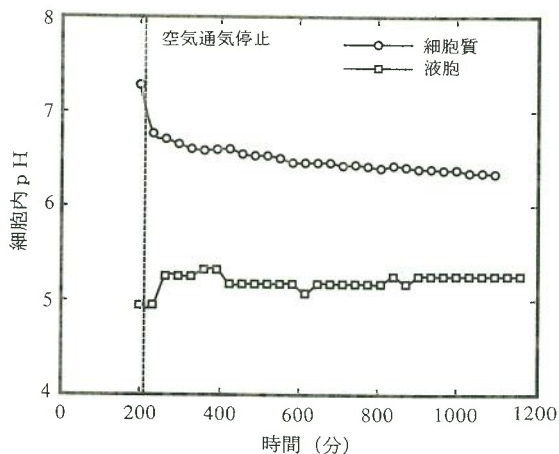


図3 空気通気停止により低酸素ストレスを与えたイネ (*Oryza sativa* var. Musashikogane) 培養細胞内pHの変化

実験試料として低酸素ストレスに強いイネ培養細胞、低酸素ストレスに弱いニチニチソウとタバコ培養細胞を用いた。NMR 試料管への通気条件を変えることにより低酸素ストレスを与えた場合の細胞質・液胞 pH の変化を、 ^{31}P NMR スペクトルの無機リン酸の化学シフトから測定した。

窒素通気によって無酸素状態にすると、何れの細胞でも細胞質が有意に酸性化した。イネとそれ以外の細胞に本質的な差異は見られなかった。しかし、酸素通気を停止して徐々に低酸素状態にした場合、イネとそれ以外の細胞に大きな差が見られた。すなわち、ニチニチソウとタバコ培養細胞では細胞質の酸性化・液胞のアルカリ化が起こり、最終的には両者の pH 差がなくなった (図2) が、

イネ培養細胞は液胞がアルカリ化せず細胞質の酸性化も小さく、両者の pH 差がなくなることはなかった (図3)。これは、酸素通気の停止によって単に酸素濃度が下がるだけでなく二酸化炭素が蓄積するため、実際二酸化炭素濃度を高くすると細胞質の酸性化は、イネが他の細胞よりも小さいことがわかった。従って、イネが低酸素ストレス耐性において他の植物よりも優れているのは、二酸化炭素が同時に蓄積するような環境でも細胞質の酸性化を小さくすることができることである。この成果は低酸素ストレス耐性の細胞レベルでの評価法として有用であると考えられる。

5. おわりに

植物の環境ストレス耐性機構の解明は、ストレス耐性植物の作出による農作物の生産性向上・安定的な食料生産に寄与するものと考えられる。一方 NMR により、高感度で物質の構造解析が可能になったほか、細胞を非破壊のまま細胞内の情報 (例えば pH) を計測できるようになった。そして、環境ストレスの中でも低酸素ストレスをはじめ低温ストレスや塩ストレスなどで、ストレス応答の過程で細胞内の pH が変化するという事実が明らかにされてきている。今後形質転換体を作成していく場合、より敏速に目的としたストレス耐性機構が機能しているかを評価できることが望ましい。そのためには、細胞レベルで機能発現を評価することが研究の効率化、加速化につながるものと考えられる。*in vivo* NMR 法によりストレス耐性機構の機能発現の指標となる現象を測定する手法 (評価法) を開発することができれば、環境ストレス耐性機構の解明と制御に大いに役立つことが考えられ、今後益々重要な研究手法になるものと思われる。

文 献

- 1) Gadian, D.G. (1982) "Nuclear magnetic resonance and its applications to living systems", Oxford University Press, New York

- 2) Smith, F. A. and J. A. Raven (1979) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 30 : 289
- 3) Moon, R. B. and J. H. Richards (1973) *J. Biol. Chem.* 248 : 7276
- 4) Roberts, J. K. M. et al. (1980) *Nature* 283 : 870
- 5) Gadian, D. G. et al. (1979) "Biological Application of Magnetic Resonance", ed. by Schulman, R. G., Academic Press, 463
- 6) Jacobson, L. and J. S. Cohen, (1981) *Bioscience Reports*, 1 : 141
- 7) Roberts, J. K. M. et al. (1981) *Biochemistry*, 20 : 5389
- 8) Lee, R. B. and R. G. Ratcliffe, (1983) *J. Exp. Bot.* 34 : 1213
- 9) Yazaki, Y. et al. (1988) *Plant Cell Physiol.* 29 : 919

国内情報

融合遺伝子を用いた麹菌(*Aspergillus oryzae*)によるキモシンの生産

国税庁 醸造試験所
北本勝ひこ

麹菌は清酒や味噌、醤油などの我が国の伝統的醸造食品に使用されている糸状菌である。麹菌は遺伝学的解析の遅れから、分子生物学的研究は酵母などに比べ遅れていた。しかし、その酵素タンパク質を多量に菌体外に生産する能力と、食品に使用されてきた実績からの安全性から異種タンパク質生産の宿主として、最近、注目を浴びつつある。

本稿では、麹菌による異種タンパク質生産に関する研究のうち、チーズ凝乳酵素であるキモシンの生産について、発現プラスミドの種類や培養方法による生産量の増大について紹介する。

1. はじめに

今年、遺伝子組換えを利用した食品の第1号として、我が国で初めて組換えキモシンが食品添加物として認可された。キモシンはチーズ生産のために使用される凝乳酵素であり、仔牛の第4胃から抽出される。しかし、チーズ生産量の飛躍的な増加と、キモシンを生産するための仔牛の減少とあいまって、現在はキモシンの不足状態が続いている。これにともない、代替酵素としてカビ由来の凝乳酵素であるムコールレンニンと呼ばれるプロテアーゼが使用されている。しかし、チーズを古くから食べているヨーロッパ人にとって本来のものと微妙な味わいが異なると言われていた。そこで、遺伝子組換えによるキモシン生産の研究が進められ、現在では米国、欧州で大腸菌や酵母を用いて組換えキモシンが生産

され、これを利用して製造したチーズがすでに販売されている。

このような異種タンパク質の生産の宿主としては、歴史的に大腸菌がよく使用されており、近年では酵母による生産も増えている。最近、糸状菌を宿主とした異種タンパク質生産の研究が世界的に進められている。現在、筆者らの研究室では、清酒製造に古くから使用されている麹菌である *A. oryzae* の分子生物学的解析を進めており¹⁾、*A. oryzae* のもつアミラーゼなどの酵素を多量に生産する能力の解析のための研究の一環として、麹菌を用いた異種タンパク質生産の研究を進めている。ここでは、麹菌によるキモシンの分泌・生産に関する最近の研究について紹介する。

2. 異種タンパク質を生産させる宿主として麹菌の優れている点

成長ホルモンなどの組換えタンパク質の生産は、これまで主として、大腸菌や酵母など

KITAMOTO Katsuhiko

を用いて行われている。これら2つの微生物は、遺伝学的な解析が非常によくなされている代表的なものであり、洗練された生産のシステムも確立されている。それに対して、麹菌は分子生物学的研究が遅れていたことから、異種タンパク質生産の研究も最近になってようやく始められるようになった。しかしながら、麹菌は次のような優れた特性をもつことが知られており、異種タンパク質生産の宿主として有望なものである。

- ① 菌体外に多種類の酵素タンパク質を多量に分泌する。
- ② 高等真核生物と同様にタンパク質に糖鎖を付加することができる。
- ③ 清酒などの食品製造に永年使用されてきた実績からDNA規制の面で安全な宿主 (GRAS, Generally Regarded As Safe) として認められている。
- ④ 発酵や生産物の精製などのダウンストリームプロセスの詳細な研究成果の裏付けがある。

一般に、大腸菌や酵母では、生産されたタンパク質の菌体外への分泌は多くはないが、麹菌は、 α -アミラーゼなどの酵素を菌体外に多量に分泌するする能力があり、強力な分泌能をもつことが知られている。異種タンパク質生産におけるこの分泌の有利な点として①生産物を回収するために細胞を溶解する必要がない。②細胞内に不溶性の生産物が蓄積することが避けられる、③生産物の精製が容易である、④菌体内に毒性のあるタンパク質が蓄積することによる宿主細胞の生育阻害を

防ぐことができる、などが挙げられる。

これらのことから、酵母と同様に麹菌の遺伝子操作を行うことが可能となれば、異種タンパク質生産の宿主として、麹菌は最も優れたものの一つとなると考えられ、現在形質転換法や宿主ベクター系などの遺伝子組換え技術の研究も進められている。

3. キモシン cDNA の取得とグルコアミラーゼ遺伝子プロモーターを用いた発現・分泌²⁾

まず、キモシンが特異的に分泌されている、仔牛第4胃から抽出した mRNA より cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、すでに報告されている塩基配列をもとに合成したオリゴ DNA をプライマーとし、PCR 法によりキモシン cDNA を取得した。

次に、すでに我々がクローニングした *A. oryzae* のグルコアミラーゼ遺伝子 (*glaA*)³⁾ のプロモーター領域の下流に、キモシン cDNA を連結したプラスミドを作製した (図 1A)。この発現プラスミドは、選択マーカーとして *argB* を持っている。これを *argB*-株である *A. oryzae* M-2-3 に形質転換により導入した。得られた形質転換株 CHY-1 を、グルコアミラーゼが誘導されるように DPY (デキストリン-ペプトン-イーストエキス) 培地で 30°C, 3 日間培養した。ベクターのみを導入した対照株においては、培養上清から凝乳活性は認められなかったが、CHY-1 株の培養上清からは、約 10U/l の凝乳活性が認められた。この培養上清に対して、抗キモシン抗体を用いてウエスタン解析を行ったところ、分子量 36kDa の位置にシグナルが検出され、分泌されたプロキモシンのプロ配列が培地中でプロセッシングされ成熟型の酵素が生産されていることが確認された。この実験から、グルコアミラーゼ遺伝子のプロモーターの支配下でキモシン cDNA が mRNA に転写され、活性のある凝乳酵素が生産・分泌されることが確認されたが、その生産量は期待したものに比べ非常に少ないものであった。澱粉やデキストリンによりグル

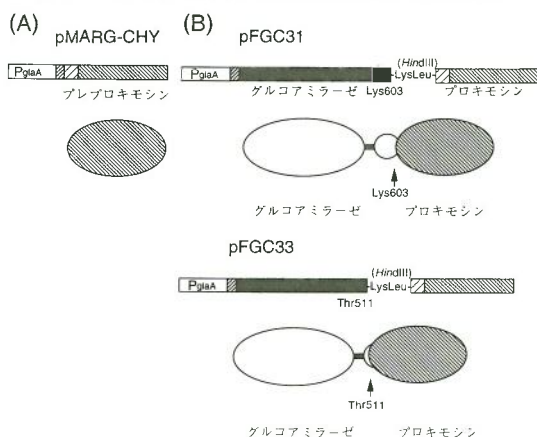


図1 キモシン発現遺伝子の構造

コアミラーゼ遺伝子は誘導発現されることが知られているが、実際、グルコアミラーゼ遺伝子プロモーターに直接連結したプレプロキモシン cDNA は、このような誘導条件下で mRNA が多量（グルコアミラーゼと同等に）に転写されていることがノザン解析で確認された。しかし、分泌されたキモシンの量が少ないことから、タンパク質への翻訳から菌体外へ分泌生産されるまでの間で、何らかの問題があることが考えられた。一般に、異種タンパク質が少量しか生産されない原因の一つとして、タンパク質に翻訳されたものが小胞体での製品検査（Quality control）ではねられてしまうことが考えられている。これを避けるために、本来の宿主の酵素タンパク質との融合タンパク質作製が試みられ、これにより生産量が増大することが報告されている。そこで、次にキモシンをグルコアミラーゼとの融合タンパク質として生産させることにより、生産量の改善がみられるかどうかについて検討した。

4. 融合遺伝子の作製による異種タンパク質の発現・分泌⁴⁾

グルコアミラーゼ遺伝子との融合遺伝子は図1Bのように2種類を作製した。1つは、*glaA* 遺伝子の Lys 603 までをコードする部分（GA 1-603）をプロキモシン cDNA と読みとり枠が一致するように接続したプラスミド pFGC 31であり、もう一つは Thr 511 までをコードする部分（GA 1-511）同様に接続した pFGC 33 である。これらの融合遺伝子を、麴菌 M-2-3 株に形質転換により導入し

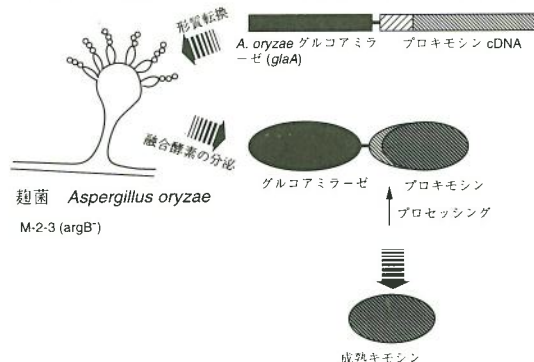


図2 融合遺伝子を用いた麴菌 *A. oryzae* によるキモシンの生産

た。pFGC 31（GA 1-603）を導入した F 102 株では 0.07mg/l、pFGC 33（GA 1-511）プロキモシン融合遺伝子を導入した F 316 株は 0.3mg/l のキモシンを生産した。キモシン遺伝子を直接 *glaA* プロモーターで発現させた形質転換株 CHY-1 では 0.06mg/l のキモシン生産量であったので、pFGC 33 では分泌量が約 5 倍に上昇しており、融合遺伝子の利用の効果が認められた。ウェスタン解析の結果、培地中に分泌された融合タンパク質は、短時間に自分自身のプロテアーゼ活性によるプロセッシングにより成熟型キモシンが生成されたことが示唆された（図2）。

5. 固体培養による生産量の改善

清酒製造における麴の製造は蒸した米を堆積した固体培養により行われる。このような固体培養では、グルコアミラーゼなどは多量に生産されるが、液体培養ではその生産量は極端に低下することが知られている。そこでキモシン生産においても、固体培養でその生産量が増加することを期待して実験を行った。液体培養で成績の良かった pFGC 33 導入株を用いて小麦フスマによる固体培養を行ったところ 22mg/kgフスマの高い生産性が確認された。さらに、フスマ培養時に硫酸アンモニウムを添加することにより、キモシンの生産は 150mg/kgフスマとさらに増大した（表1）。融合遺伝子の利用により、約 5 倍、さらに固体培養により約 500 倍と、初めの CHY-1 株から比べると、2500 倍もの生産性向上が達成されたことになる。しかし、麴菌は本来、 α -アミラーゼやグルコアミラーゼを数 g から数 10g のオーダーで生産する能力があると言われていたので、さらに生産量の増加が可能であると考えている。

麴菌の生産する酵素は、液体培養に比べ固体培養では一般に高い生産性を示すことが知られている。その機構についてはいまだ多くの謎が残されている。酵素剤等の製造においては、米国や欧州ではタンクを用いた液体培養が主体であるのに対し、我が国では、麴製造のノウハウの蓄積によると思われるが、伝

統的にフスマなどを用いた固体培養が今でも用いられている。前者がスケールアップをしたときの操作性の良さから、後者はその高い生産性からだと思われる。今回のような組換えキモシンの生産においても、我が国の伝統的な固体培養が高い生産性を示すことが確認されたことは、先人の知恵を再度詳しく研究することの重要性を感じさせる。

6. おわりに

麹菌 (*A. oryzae*) を利用した高等生物由来異種タンパク質生産としては、上記キモシンの他にタウマチン (植物)、ラクトフェリン (ヒト)、リゾチーム (ヒト) の研究がある。麹菌では、初め遺伝学的な解析の進んでいた *A. nidulans* での生産が研究されたが、最近では、より分泌能が高い *A. niger* や *A. oryzae* での研究が精力的に進められている。これらについては、詳しい総説^{5,6)}があるので参照されたい。

美味しいお酒を造るために我が国で長い間使用されてきた麹菌が、遺伝子組換えによる酵素生産の宿主として利用され、我々の日常

表1 麹菌 *A. oryzae*によるキモシン生産

プラスミド	培養法	キモシン生産量
pMARG-CHY(<i>glaA</i> プロモーター プレプロキモシン cDNA)	液体培養	0.06 mg/l
pFGC33 (<i>glaA</i> プロモーター アミノ酸 1-511)-プロキモシン cDNA)	液体培養	0.30 mg/l
pFGC33 (<i>glaA</i> プロモーター アミノ酸 1-511)-プロキモシン cDNA)	固体培養	22.0 mg/kg
pFGC33 (<i>glaA</i> プロモーター アミノ酸 1-511)-プロキモシン cDNA)	固体培養 (pH 制御)	150.0 mg/kg

生活で活躍する日がやってくるのもそう遠い将来でもないと思われる。

文 献

- 1) 北本勝ひこ (1994) 食品工業, 37: 22-28
- 2) Tsuchiya K, K. Gomi, K. Kitamoto, C. Kumagai, Y. Jigami, G. Tamura (1993) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 327-332
- 3) Hata, Y., K. Tsuchiya, K. Kitamoto, K. Gomi, C. Kumagai, G. Tamura, S. Hara (1991) *Gene*, 108: 145-150
- 4) Tsuchiya, K., T. Nagashima, Nakamura, K. Gomi, K. Kitamoto, G. Kumagai, G. Tamura (1994) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58: 895-899
- 5) 五味勝也 (1994) 化学と生物, 32: 269-275
- 6) 土屋幸三 (1993) 醸造協会誌, 88: 506-511

国内情報

ヤドリバエの人工飼育

農林水産省 国際農林水産業研究センター
八木繁実・中村 達

害虫に対する天敵の利用は生物的防除の有効な手段であり、なかでも寄生性天敵であるヤドリバエの利用は、これまで有効性を認められながらも室内飼育の難しさから研究例が少なかった。人工飼料を用いて、このハエの簡易大量累代飼育を試みようというのがこの研究の主な目的である。同時に、このような人工飼育の過程でこれまで未知とされていたヤドリバエの寄主生体内での成長・発育のメカニズムが明らかになってきた。

1. はじめに

最近、「生物農薬」という言葉が国内でよ

く使われるようになってきた。ウイルス、バクテリア、カビなどの微生物や、捕食・寄生性天敵を用いての、いわゆる生物的防除は古くから害虫防除の重要な手法の一つであった。その後、化学農薬全盛の時期を経て、近年は

YAGI Shigemi and NAKAMURA Satoshi

「持続可能な農業」(sustainable agriculture) の有力な技術としてバイオテク手法も加え、この防除法は再び世界的に注目され、各地で普及しつつある。その例として、天敵としての寄生バチの利用がよく知られており、北アメリカやヨーロッパではこのような天敵を大量増殖して販売する企業が出現し、国内でもハウスでの防除に卵寄生バチが使われるようになった(矢野, 1994)。一方、寄生バエは天敵としての有効性は認められているものの、飼育の困難さからかその研究は少なく、生理・生態も未だ不明な点が多い。

今回は、寄生バエの中で、天敵として最も重要な位置を占めるヤドリバエ(Tachinidae)の人工飼料による飼育について、私共が行っている研究の一端を述べたい。

2. ヤドリバエとは

ヤドリバエは双翅目のなかでも大きなグループで、そのほとんどの種類は他の昆虫に内部寄生する。分類上は短角亜目環縫群のなかのヤドリバエ科に属するハエの総称ということになる(嵐, 1989)。そしてヤドリバエに近い科として、ハナバエ科、イエバエ科、ニクバエ科、クロバエ科、ヒツジバエ科がある。これらのハエの一部では、寄生バチとは異なり、哺乳類、両生類から無脊椎動物に至るまでの幅広い寄生が見られるが、他は食植性、腐食性、食菌性、肉食性である。したがって、ヤドリバエは高度に昆虫に依存して寄生生活をするよう進化してきたグループであろうと考えられている(嵐, 1989)。

3. ブランコヤドリバエ

ヤドリバエの産卵方法は大きく分けて卵生、卵胎生、微小卵生の3通りあるが、ブランコヤドリバエは日本では卵生のヤドリバエの代表的な種で、広くアジアに分布し、寄主範囲が広く、雌成虫が主に鱗翅目幼虫の体表に直接産卵し、寄生する。ブランコヤドリバエはアワヨトウ、ハスモンヨトウ、ヨトウムシな

どの農業害虫の天敵としてよく知られている。実際、筑波でも手近に得られる野外から採集してきたアメリカシロヒトリやクワゴマダラヒトリの幼虫から、かなり高率でこのハエの蛹(困蛹)が得られる。生物的防除に有効と思われるこの天敵も、今まで室内で年間を通しての累代飼育が難しかったが、最近、効果的な簡易飼育法が試みられ、ある程度の成功を収めることが出来、室内でこのハエを年約7世代飼育することにより、受精卵を周年供給することが可能となった(Nakamura, 1994)。

ブランコヤドリバエを天敵として野外で使用するには、多くの解決しなければならない問題があるが、まず、均質のハエを簡単に常時大量に安く供給し得る技術、すなわち、簡易大量累代飼育が必要である。そのため人工飼料によるハエ幼虫の無菌飼育を行った。得られた結果は未だ目標には遠いが、いままで知られていなかったハエ幼虫の成長・発育のメカニズムもわかって来たので紹介する。

4. 人工飼育の方法

寄主アワヨトウ幼虫に産卵させたブランコヤドリバエの卵(図1)を、一つ一つ丁寧にピンセットで剥がし、集めたハエ卵を表面殺菌した後、プラスチック製の組織培養用容器に、1ウエル当たり1個ずつ入れる(図2)。各穴には、あらかじめ昆虫の組織培養用培地やカイコの血清などを組み合わせた人工飼料を入れておく。卵は25°Cで4日後には孵化し、このプラスチック製ウエルの中で、アワヨトウ幼虫の体内と同じように成長・発

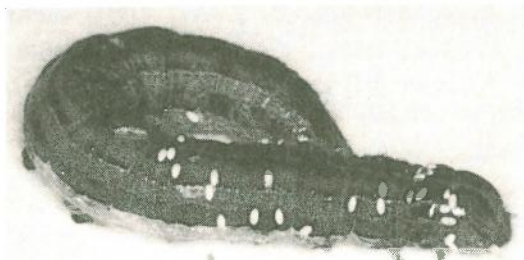


図1 寄主アワヨトウ幼虫に産卵されたブランコヤドリバエの卵
白い楕円形の粒が卵

育して行くことが観察された。しかも、寄主幼虫体内での発育と同じような呼吸のためのファネル（漏斗）をハエ幼虫が作った場合には、その後の発育が良好であることが判明した。そして、ファネルを高率で作らせるには、人工飼料の組成ばかりでなく、寄主幼虫体内と同様、ハエ幼虫がこの液体飼料中で尻を上にし、後部気門より呼吸出来るような状態を作り出すことが重要であり、それには、飼料中に脱脂綿を加えるとよいことがわかった（図2）。

5. ファネルとは何か

寄主体内でハエが作るファネルには二種類あり、寄主の気管支につながるファネルと、直接寄主の皮膚につながるファネルがあるといわれている（Clausen, 1940）。ブランコヤドリバエは、寄主に侵入する時に開けた穴にぶらさがりながら、後者のファネルを作る。そして、ハエ幼虫は自分の身体の廻りにファネルを作り、それが幼虫の発育とともに変化し、その先端は細い柄の様な形に成長するといわれている（図3）。それではファネルはどのようにして出来るのであろうか。Salt (1968) は、侵入した「異物」に集まっ

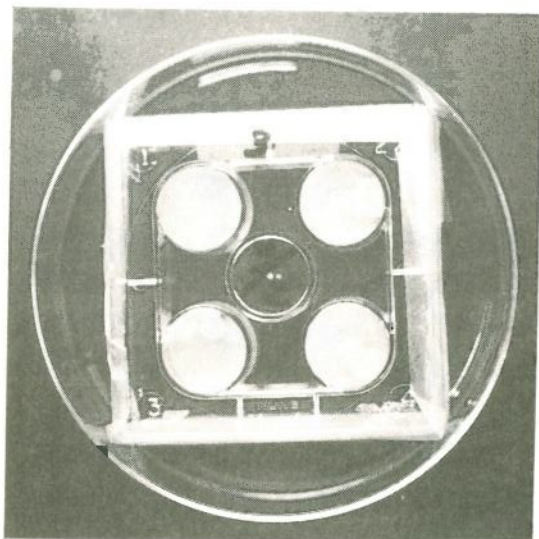


図2 ブランコヤドリバエ人工飼育用のプラスチック製組織培養用容器

滅菌した脱脂綿入りの人工飼料（牛乳：鶏卵卵黄=1：1）に、ハエ卵が1ウエル当たり1個入れてある。

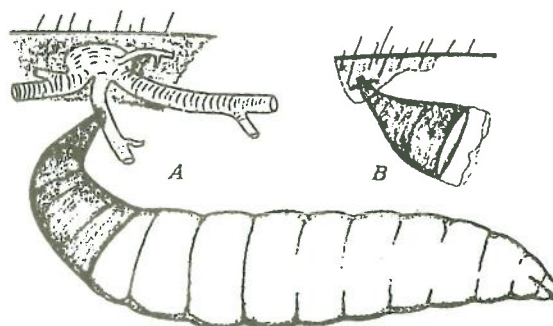


図3 ヤドリバエにおける二種類のファネル (Clausen, 1940の一部を改変)

A：寄主の気門に近い気管支に出来るファネル
B：ハエ幼虫が寄主の皮膚に開けた穴に直接つながっているファネル



図4 ウェル内の人工飼料（昆虫組織培養用培地 IPL41+リピッド溶液：カイコ血清=1：1）中で出来たファネル（矢印）とハエ幼虫
出来たファネルは図3 Bのそれとよく似ている。

て来る寄主の血球細胞を利用して、ハエ幼虫が作り上げるものと推定している。今回初めて報告されたウェル中で出来たファネル（図4）は、寄主体内でのそれと類似していることから、寄主の血球細胞が存在しなくても、ハエ幼虫は寄主の血清を利用し、自らも様々な物質を体外に分泌してファネルを構築するものと考えられる。

6. 人工飼育の結果と今後の展望

今まで得られた結果をまとめると、①既にふれた様に、飼料に脱脂綿を入れるとハエ幼虫のファネル形成率が高まり、飼育成績が向上する、②カイコに比べ牛胎児血清によるファネルは貧弱でその形成率は低く、無血清飼料ではファネルは全く形成されない、③飼料中のカイコ血清の濃度が高い程飼育成績がよく、カイコ血清のみの飼料の場合、約13%のハエ成虫が得られた（Yagi, 1994）（表1）。

表1 ブランコヤドリバエの人工飼育

培地の種類	供試卵数	发育した幼虫の齡		囲蛹形成 (%)	ファネル形成 (%)	成虫 (%)
		I (%)	III			
IPL41・L	53	74	0	0	0	0
IPL41・L +FBS(1:1)	46	85	7	0	9	0
IPL41・L +BMH(1:1)	184	84	38	32	65	1
BHM	56	86	36	32	75	13

IPL41・L：昆虫組織培養用培地IPL41にリピッド溶液を加えたもの、FBS：牛胎児血清、BMH：カイコ血清

これらの結果はブランコヤドリバエがアワヨトウを寄主とした場合に比べ成虫化率が低く、成虫までの日数も長くかかり、不完全なものといえる。しかし、卵性のヤドリバエを寄主体外で卵から成虫にまでさせた報告はこれが最初であり、今後は、すでに囲蛹化が確認されている（中村ら、未発表）牛乳と鶏卵卵黄（Takasu and Yagi, 1992；図2）など、簡単で安価な人工飼料の開発、カイコ血清中に含まれる有効成分の化学分析、大量飼育に適した簡単な飼育容器の開発、特に囲蛹化・成虫化を促すための容器の改良などの研究が必要と考えられる。

③の結果は、予想されたことかも知れない。しかし、実験の過程で寄主生体外でもファネ

ルが形成されるという事実が得られた。寄生者が寄主の生体防御反応をどのようにうまく利用してファネルを形成するのか、ファネル形成のメカニズムとその機能、さらにいえば、ヤドリバエにとって寄主と非寄主とは生理・生化学的にどのような違いが存在するのか、非寄主の体内ではハエの成長・发育はどのように抑えられてしまうのか、など今後この分野での基礎研究の発展が優れた人工飼料開発につながるものと期待される。

文 献

- 1) Clausen, C. P. (1940) *Entomophagous Insects*, McGraw-Hill, New York, 688pp
- 2) Nakamura, S. (1994) *Appl. Ent. Zool.* 29: 133-140
- 3) Salt, G. (1968) *Biol. Rev.* 43: 200-232
- 4) 嵐 洪 (1989) *インセクトリウム*, 26: 4-9, 46-51, 88-94, 120-126
- 5) Takasu, K. and S. Yagi (1992) *Appl. Ent. Zool.* 7: 171-173
- 6) Yagi, S. (1994) 4th SICONBIOL Abstract 29, Report (IICA) 1-8
- 7) 矢野栄二 (1994) *植物防疫* 48: 248-251



子房培養を用いたラッキョウの 種間交雑による変異幅の拡大^{1,2)}

福井県農業試験場

野村幸雄

ラッキョウの種間交雑を試み、花粉親となるネギ属野菜の花粉の貯蔵法と交配後のラッキョウの子房培養法を明らかにし、ラッキョウとネギ属野菜との種間雑種の効率的な作出を可能にした。ネギ、タマネギなど数種のネギ属野菜の花粉を採取し、 -30°C で貯蔵することにより、ラッキョウの開花期まで花粉の活性を維持できた。交配5日後にラッキョウの子房を採取し、MS、5%しょ糖、pH 5.8、0.8%寒天培地に置床し、 25°C で培養することで、ネギ、タマネギなどとの種間雑種を効率的に作出できた。得られた種間雑種は両親の中間の性質を示し、園芸作物として有用な形質を持つものも出現した。

1. はじめに

ラッキョウの栽培種には種子稔性がなく、これまで交雑育種が試みられたことはなかった。しかし、西谷³⁾の報告からラッキョウの近縁野生種で種子稔性のあるヤマラッキョウなどを花粉親に用いれば、通常の交配方法でラッキョウの主要栽培種であるラクダ系品種との交雑が可能であることがわかった。この報告に基づいて、より遠縁の種間雑種作出を可能にする胚培養技術を利用すれば、ラッキョウと他のネギ属野菜との種間雑種の作出も可能であると考えられ、他のネギ属野菜が有する味、臭い、色などの有用形質をラクダ系品種に導入することを目的に本実験を行った。

ラッキョウの開花期に交配できるよう、正常花粉を有するネギ属野菜の花粉の貯蔵法について検討した。さらに、交配後、雑種胚を救出するためのラッキョウの子房培養法を明らかにし、いくつかのネギ属野菜との交配を試みた。この結果、ネギ (*Allium fistulosum*)、タマネギ (*A. cepa*)、分球性タマネギのボンベイオニオン (*A. cepa*)、リーキと同一種の無臭ニンニク (*A. ampeloprasum*)、ニラ (*A. tuberosum*) などとラッ

キョウ (*A. chinense*) との種間雑種を得ることができた。

本稿では、ネギ属野菜の花粉の貯蔵法、ラッキョウの子房培養法およびラッキョウとネギとの種間雑種の特性について述べる。

2. 種間交雑の方法

1) ネギ属野菜の花粉の貯蔵温度の検討

ラッキョウには花粉稔性がほとんどないことから、花粉親には花粉稔性のある他のネギ属野菜を用いた。ネギ属野菜の多くは4月から6月にかけて開花し、最も開花が遅いニラでも9月である。一方、ラッキョウの開花期は10月下旬～11月上旬であるため、ラッキョウの開花期まで他のネギ属野菜の花粉を貯蔵する必要があった。

材料には、ネギ (浅黄系九条)、タマネギ (淡路中高黄) など計6種類の野菜を用いた。開約後12時間以内の花粉を藪ごと採取し、薬包紙で包みシリカゲルの入ったポリエチレン容器に入れて密封し、通常家庭用冷蔵庫で得られる 5°C と、通常の冷凍庫で得られる -30°C で貯蔵した。

5°C 貯蔵の場合、6カ月後の花粉発芽率は採取時の約半分まで低下し、18カ月後には供試した全ての材料の花粉発芽率が0となった。 -30°C 貯蔵の場合、花粉発芽率の低下が

少なく、特にネギとタマネギの花粉は、貯蔵開始30ヵ月後でも高い発芽率を示した。

以上のことから、短期間の貯蔵の場合は5°Cでも有効であるが、長期間になると-30°Cで貯蔵する必要があると考えられた。したがって、本試験では、ラッキョウの開花期に発芽率の高いネギ属野菜の花粉を得るため、花粉は開約後12時間以内に採取し、-30°Cで貯蔵した。

2) 交配適期の判定と交配後の管理

ラッキョウは雄性先熟であるため交配適期は開花5~7日後になり、その頃になると柱頭がよく肥大し、花粉が付着しやすくなる。交配後5日目頃に子房を摘出するが、培養中の雑菌発生等を防止するために交配から子房摘出までは花が濡れないように管理した。

3) 子房の最適な培養条件

ラッキョウと他のネギ属野菜を交配しても、受精胚の座死によって種子を形成しない。雑種植物を得るためには受精胚を救出する必要があり、そのための子房培養法をラッキョウとネギとの組合せで検討した。

子房培養は、交配後の子房を採取し、2週間培養して、子房の内部から胚を摘出して培養する方法を取った。本試験では効率的に雑種個体を得るため、交配後の子房採取時期、基礎培地の種類、培地中のしよ糖濃度、培養温度について検討を行った。

子房を交配後5日目に採取し培養すると最も多くの雑種胚を得ることができ、受粉後に子房を培養に移すタイミングが非常に重要であることがわかった。基礎培地では、MS⁴⁾培地がB5⁵⁾培地より優れ、MS培地のしよ糖濃度が5%のとき最も多くの雑種胚を得る

ことができた。培養温度は、25°Cのとき最も多くの雑種胚を得ることができ、次いで20°C、30°Cの順で、35°Cでは雑種胚を全く得ることができなかった(図1)。

以上のことから、ラッキョウとネギの交配後5日目に、子房を採取して、しよ糖濃度5%のMS培地に置床し、25°Cで2週間培養後、肥大した子房の中から胚を摘出して培養する方法が、最も多くの雑種胚を得られることが明らかになった。

3. 種間交雑によって得られた雑種植物の特性

この方法を用いて、他のネギ属野菜を花粉親としてラッキョウとの交配を行い、表1のとおり多くの種間雑種を得ることができた。花粉親のちがいににより交雑親和性に差が見られ、ネギ(浅黄系九条)との親和性が最も高かった。それぞれの雑種性についてはイネのrDNAをプローブにしたRFLP法⁶⁾によって確認された。得られた雑種の中で、ラッキョウとネギとの種間雑種の形態特性と生態的特性について述べる。

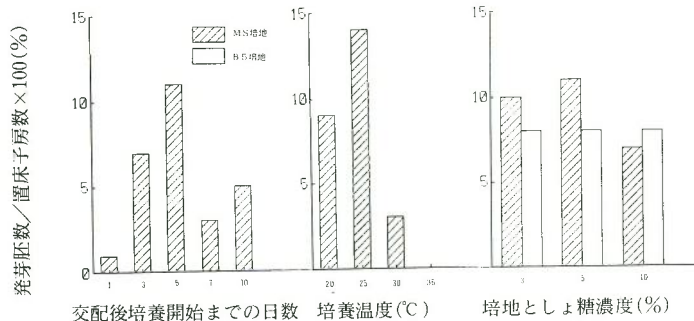


図1 ラッキョウ子房培養条件の検討

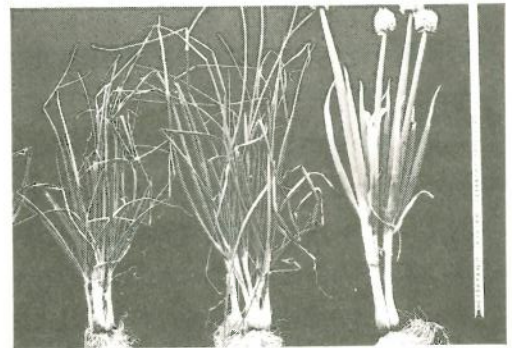


図2 ラッキョウとネギ(浅黄系九条)との種間雑種

左: ラッキョウ 中: 種間雑種 右: ネギ

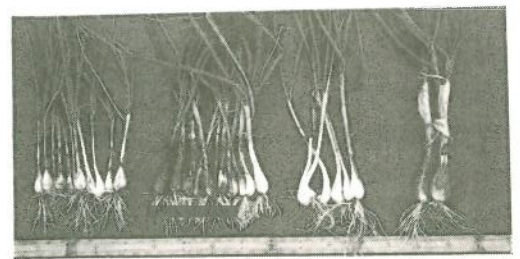


図3 ラッキョウと在来ネギとの種間雑種
左から ラッキョウ1株, 種間雑種3株

表1 子房培養によるラッキョウとネギ属野菜との雑種獲得率

花 粉 親	置床 子房数①	発芽 胚数②	②/① ×100	得られた 雑種個体数
タマネギ (淡路中高黄)	415	9	2.2	7 ¹⁾
ボンベイオニオン	450	4	0.9	4
ニラ (ワイドグリーン)	457	2	0.4	1 ¹⁾
無臭ニンニク	405	13	3.2	12 ¹⁾
ネギ (浅黄系九条)	111	16	14.4	16

1) 胚発芽後、ネクロシスなどによる退化が見られたため、発芽胚数より小さい値となった

子房培養の条件検討の試験を含めて、これまでに得られたラッキョウとネギ (浅黄系九条) との種間雑種は 100 個体以上になった。それらの葉はやや立性で、葉幅はラッキョウよりやや広く両親の中間的な形態を示した。また全個体が地下部にラッキョウと同じような白色のりん茎を形成した (図 2)。分球数はラッキョウが 5、ネギが 6 であるのに対し、種間雑種では 3~7 の個体が多かった。りん茎の 1 球重は、ラッキョウでは 14g 前後であるのに対し、種間雑種では 14~18g をピークとする正規分布を示した。1 株球重は、ラッキョウでは 80g 前後となり、種間雑種では 40~120g を中心に、幅広い分布を示した。

りん茎の色に関しては、在来ネギとの種間雑種の中にもりん茎が赤く着色するものもあり (図 3)。交配したネギの品種によってりん茎の色が異なることが判明した。

ラッキョウは長日で花芽が形成され、夏季休眠後に抽苔を開始する。一方、ネギは低温で花芽が形成され、温度の上昇とともに抽苔し、夏季でも生育を続ける。種間雑種は夏季に休眠しないものが多く、半数以上の個体が 7 月から 8 月にかけて開花し、ネギの開花期 (4 月下旬~5 月上旬) とラッキョウの開花期 (10 月下旬~11 月上旬) との間であった。

なお、雑種個体のうちで、花粉が発芽能力を有していたのは 1 個体であった。

以上のように、ラッキョウにネギの形質が導入され、分球数の増大、収量の向上、高温での生育など、従来の育種手法では得られなかった形質の獲得や変異幅の拡大を達成することができた。

4. おわりに

花粉の貯蔵と子房培養によってラッキョウの品種改良が可能になったが、この手法をその他のネギ属植物に応用することにより、ネギ属植物全体の品種改良につながるものと考えられる。

また、得られた種間雑種の植物としての特性を明らかにしつつあるが、多収性、耐病性、味、色、大きさなど有用形質について、今後十分把握して新品種としての利用を判断していきたい。

文 献

- 1) Nomura, Y. and K. Makara (1993) *Japan. J. Breed.* 43 : 13-21
- 2) Nomura, Y., M. Maeda, T. Tsuchiya and K. Makara (1994) *Breeding Science*, 44 : 151-155
- 3) 西谷信一郎 (1987) 大阪府立大学 学位論文
- 4) Murashige, T. and F. Skoog (1962) *Physiol. Plant*, 15 : 473-497
- 5) Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima (1968) *Exp. Cell Res.* 50 : 151-158
- 6) Honda, H. and A. Hirai (1990) *Japan. J. Breed.* 40 : 339-348

文献情報

c-mos 遺伝子欠損マウスにおける卵子の単為発生

動物卵子は受精直前に減数分裂のいずれかの段階で停止し、受精とともに減数分裂を再開する。その生物学的意義は、卵子が受精直前の減数分裂途中で停止することによって精子と出会う確率を高めるため、すなわち、受精効率を上げるためと考えられている。1971年、MasuiとMarkertはMPF(卵成熟因子)の研究で、偶然成熟卵中に細胞分裂を抑制する因子を発見しCSF(細胞分裂抑制因子)と名づけたが、その実体は長い間不明であった。

一方、c-mos 癌遺伝子はモロニー肉腫ウイルスゲノム中に見いだされたウイルス性癌遺伝子v-mosの細胞ホモログとして多くの原癌遺伝子の中で最も早く単離された。しかし、細胞性原癌遺伝子が正常細胞の増殖、分化など発生段階で重要な役割を果たしていることが明らかにされてきたにもかかわらず、正常組織においてc-mosの発現が検出されなかったことからその機能は長い間不明であった。1985年にVande Woudeらがマウス雌雄両生殖組織(卵巣、精巣)でc-mos mRNAが発現していることを見出し、さらに、その発現が生殖細胞(卵母細胞、精細胞)のみに限られていることが確認されたことから、c-mosが生殖細胞の形成、分化、あるいは初期発生に関与している可能性が示唆された。さらに、1988、89年、Sagataらは、アフリカツメガエルの未受精卵と抗Mos抗体やantisense oligonucleotidesを用いて、c-mosタンパク質(pp39mos)がCSFであること、c-mosタンパク質が卵成熟のinitiatorとして働くことなどを示していた。

今回、2つのグループがマウスES細胞を用いて遺伝子相同組換え法により、c-mos遺伝子欠損マウスを作成し解析することによって、哺乳類の生殖細胞におけるc-mosの役割を

明らかにしようと試みた。作成されたc-mos欠損マウスは、雌雄とも野生型マウス(非欠損マウス:wild type)と同様に成長した。しかし、c-mos欠損マウスの生殖能力を調べて見ると、雄では正常であるが、雌では生殖能力が極めて低く、週齢が進むと高率に卵巣奇形腫を生じた。c-mos欠損マウスの未成熟卵を採卵して*in vitro*で培養したところGVBD(germinal vesicle breakdown)はwild typeマウスと同様に起こり、c-mosタンパク質が未受精卵のmaturationに必須ではないことがわかった。この結果はZahoら(1990, '91)の、抗mos抗体をマウス未受精卵にmicroinjectionした実験の結果とは異なるものである。また、c-mos欠損マウスの卵子は*in vivo*でも*in vitro*でも第二減数分裂中期に進み、Cooperら(1989)がマウス卵母細胞にc-mosのantisense oligonucleotidesをinjectionした実験の結果から予想されたように、受精せずに活性化され単為発生してしまう卵子が高率に認められた。以上のように雌性生殖細胞におけるc-mosの重要性が明らかとなったが、一方で精子形成には必須ではないことも示された。正常マウスでの精巣でのc-mosの発現はハプロイドになった精細胞に見られ、そのmRNAはプロテインキナーゼ活性に必要なATP結合部位を欠いたタンパクをコードした異常な構造であり、精子形成過程にmosが機能していないことは予想されていた。同様に、わずかな発現が認められる体細胞(胸、心臓、腎臓、乳腺など)のcell cycleにも必須でないことが示された。

c-mos欠損マウスを解析することにより、マウス(哺乳類)におけるmosの役割がアフリカツメガエル(両生類)と同様に未受精卵の第二成熟分裂中期で停止させることが確認された。一方で、アフリカツメガエルの未受精卵を用いた実験で予想されたoocyte maturationにおけるinitiatorとしての機能(c-mos RNAに対するantisense oligoをinjectionするとGVBDが起らず第二成熟分裂へと進まない:Sagata, 1988)

がマウスでは認められず、脊椎動物でも種間で機能に差が見られることがわかった。c-mos タンパク質のアミノ酸配列には動物種間で高い変異があることが知られており、有性生殖の進化の中で mos がどのように変化してきたのか興味深い。c-mos の機能に関していくつかの機能が明らかになったが、c-mos 欠損マウスの成熟卵子のうち、単為発生しなかった卵子の一部は受精能を失っている（精子が penetration しない）など、新たな事象も観察された。mos の機能の解析は、細胞周期制御の機構を明らかにするうえで、またヒトの不妊症や卵巣奇形腫形成のメカニズムなど医学分野でも重要と思われる。さらに、生殖細胞形成の機構や遺伝子の生殖細胞特異的発現機構など、今後の詳細な解析が待たれる。

(抄訳 谷口 隆秀—STAFF 先端技術研)

TANIGUCHI Takahide

Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs

Colledge, W. H., M. B. L. Carlton, G. B. Udy and M. J. Evans

Nature, 370 : 65, 7 July, 1994

Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice

Hashimoto, N., N. Watanabe, Y. Furuta, H. Tamemoto, N. Sagata, M. Yokoyama, K. Okazaki, M. Nagayoshi, N. Takeda, Y. Ikawa and S. Aizawa

Nature, 370 : 68, 7 July, 1994

文献情報

DNA shuffling を用いたタンパク質の試験管内高速進化

タンパク質工学の目標である高機能・新機能タンパク質の作出にむけて、タンパク質の構造と機能の関連を探る試みが現在世界各国で進められており、主に立体構造の研究によ

って現存のタンパク質の機能を説明することが可能になり、一部のタンパク質群においては、より多様な酵素活性を持ったタンパク質をデザインすることができるようになった。しかしこのようなアプローチは非常に時間と労力がかかり、また見付け出された新規タンパク質へのデザインが、多様な構造と機能を持つタンパク質において必ずしも一般則化できないことが難点であった。考えて見れば、自然は進化という壮大なスケールの「タンパク質工学」を繰り返し行ってきたとも言えるし、その基本は変異の蓄積と、その機能を常に環境の中で試してきたということである。

人類もこのような戦略をかなり以前から取り入れてきた。自然突然変異の選抜や放射線や化学物質等の変異原処理によって有用な変異体をスクリーニングして、実用に供してきた。しかしこの方法は生体内の DNA に間接的に変異を導入するものであり、効率が悪く、求める変異体のスクリーニングに多大の労力を要した。

1993年度のノーベル化学賞は、PCR 反応の開発者である K. Mullis とオリゴヌクレオチドプライマーを用いた特定位置への変異の導入法の開発者である M. Smith に贈られたが、これらの二つの技術は、多様な遺伝子変異体を作成する基本技術であり、これにより試験管内進化テクノロジーと呼ぶべき技術が一般化した。現在変異体のバラエティーを作成するために用いられている手法は、長さの一定な多様な配列を持つ DNA を合成し、遺伝子の一定の部位に導入し多様な変異体を作成する（カセット変異法）手法と、PCR 反応をわざとエラーを起こしやすい条件で行い、突然変異体を作成する手法に大別される。しかし自然界においては配列の似た遺伝子間の相同組換えの繰り返しもまた遺伝子配列進化にとって重要であることが、おもにコンピュータを用いた遺伝子アルゴリズムの研究から指摘されている。

本論文では、モデル遺伝子として TEM-1 という β -ラクタマーゼを用い、強力な抗生物質である cefotaxime に対する抵抗性を指

標にして、著者が DNA shuffling と名付けた方法により遺伝子の進化（この場合は高度な薬剤耐性を獲得することを指す）を高速化する実験を行っている。DNA shuffling の方法は次の通りである。①まず野性型 TEM-1 遺伝子を通常の PCR で増幅する。②つぎに、この増幅された断片 (0.9kbp) を DNase I でランダムな箇所 で切断する (大体 0.1~0.3kbp)。③小さい断片を精製し、PCR 反応をプライマーなしで行う (断片のアセンブリーがおこる。この過程で 0.7% 程度の点突然変異が生じる)。④プライマーを加え、通常の PCR を行う。⑤反応産物をプラスミドに組み込み、大腸菌を形質転換し、耐薬剤性を検定する。

通常 cefotaxime にたいして $0.02\mu\text{g/ml}$ 程度の MIC (最少阻害濃度) しか持たない野生型の TEM-1 遺伝子に、この DNA shuffling のサイクル①~⑤を 3 回繰り返すことによって、得られた変異体 (ST-1) は $320\mu\text{g/ml}$ の MIC を示した。この時点でアミノ酸が置換する変異は 4 つ、サイレントな置換は 4 つ (さらにプロモーター変異が 1 つ) であった。このうち重要でない変異を除く目的で、さらに同じサイクルを野生型の DNA を加えて 2 回おこなった (バッククロス)。代表的な変異体 (ST-2) は $640\mu\text{g/ml}$ の MIC と、ST-1 に比べてあまり変化していないが、ST-1 に起こったサイレント変異はすべて野生型に復帰していた。ただし、ST-1 のアミノ酸置換型変異のうち 3 つは不変であったが、1 つは野生型に復帰し、あらたに 3 つのアミノ酸が置換されていた。またあらたに 2 つのサイレント変異があり、プロモーター変異を入れると全体で 9 個の変異が起こっていた。最終的に得られた ST-2 は野生型の 32000 倍の cefotaxime 耐性を獲得したことになる。これを従来型進化テクノロジーによって得られたものと比較すると、たとえば点突然変異によって得られた変異体は $0.08\sim 0.16\mu\text{g/ml}$ 、突然変異の二重、三重変異体でも $10\sim 30\mu\text{g/ml}$ 程度、カセット変異法や PCR 変異法でも $0.3\mu\text{g/ml}$ 程度の MIC し

か得られておらず、現在のところ最高の耐薬剤性を持っていることになる。

次にこの方法で変異した箇所を調べると、ST-1 と ST-2 に共通であった 3 つの変異のうち 2 つはすでに同定されているものであった。しかしこの 3 カ所のみの変異体は $10\mu\text{g/ml}$ の MIC しか示さなかった。したがって ST-1 にみられる 4 つ (共通の 3 つと 1 つ) あるいは ST-2 にみられる 6 つ (共通の 3 つと 3 つ) の変異が TEM-1 の β -ラクタマーゼ活性の増強に十分であると結論づけられる。

新しい手法である DNA shuffling は非常に魅力的な手法である。従来の変異体作成法による進化テクノロジーは、たとえば酵素タンパク質の活性調節が少数の限られたアミノ酸に由来するという前提で行われてきた。しかし現実に別種の生物から同じ酵素をとり、配列を比較すると、数十ものアミノ酸が異なることも稀ではない。部位特異的な変異体を作成してそのうちの一つを変異させ、活性を消失させることはできるが、さらに活性を上昇させるためには、いくつもの変異をいろいろな組み合わせで作成しなければならず、膨大な労力を要する。本論文より野性型酵素の 32000 倍もの耐性を持つ酵素が創出された理由は、新しいタンパク質デザインの原理が示されたと言うよりも、より実際の生物に近い形の生物型超進化手法により、求める変異 (しかもポジティブで有用な変異) を見付け出すまでの時間が大幅に短縮されたからだと言えよう。今後、高機能かつ新機能なタンパク (あるいは DNA, RNA でも可) を求めるユーザーにとって、従来型の変異体作成技術や立体構造からの機能予測技術と組み合わせることによって、新しい DNA shuffling 技術が広く普及することが考えられる。

(抄訳 松本 隆一生物研)

MATSUMOTO Takashi

Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling

Stemmer, W. P. C.

Nature, 370 : 389, 4 August, 1994

磁石で融合細胞を選抜する

細胞融合は、植物のバイオテクノロジーにおいて重要な技術の一つであるが、融合した雑種細胞を効率よく選抜することが重要なポイントとなっており、この問題を解決するためにマイクロマニピュレーションやフローサイトメトリー等の技術が開発されている。

今回報告された雑種細胞の選抜方法はマグネティック・セル・ソーターという磁石を用いた画期的な方法である。この方法は従来、動物細胞において用いられた手法であるが、今回、ジャガイモの細胞融合にこの手法を応用し、植物においても効率よく雑種細胞ならびに雑種植物が得られたと報告されている。

マグネティック・セル・ソーターによる雑種細胞の選抜方法だが、融合細胞の片親のプロトプラストにビオチン化したレクチンを結合させストレプトタビジンを通してマイクロビーズ状の磁石を結合させる。もう一方の片親には薬剤耐性マーカー（今回はカナマイシン抵抗性）を有するプロトプラストを用い、融合処理後、マグネティック・セル・ソーターにかける。ここで選抜される細胞は、雑種細胞および磁石を結合させた片親同士の融合細胞である。これらの細胞をさらに選抜培地（カナマイシン含有培地）に置床することにより雑種細胞のみが生育可能となる。

実験は、*S. tuberosum* 間の種内および *S. bulbocastanum* との種間において細胞融合を行った。

S. tuberosum 間の細胞融合において選抜培地上でのマグネティック・セル・ソーターによるカルスからの茎葉の再生率は82%、一方ソーティングを行っていない対照区では72%であった。これらを植物体まで再生し、フィンガープリント法でDNAの分析を行ったところ、調査した個体の内、ソーティング処理を行った区では35.8%が雑種植物であった

のに対し、対照のソーティング処理を行わなかった区では雑種植物は8%であった。

S. tuberosum と *S. bulbocastanum* との細胞融合についても再生した植物について同様にDNAの調査を行ったところ、ソーティング処理を行った区では81.8%、対照のソーティング処理を行わなかった区で27.9%が雑種植物であった。さらに染色体の調査を行ったところ、種内、種間雑種植物の半数が正常な染色体数を示した。*S. tuberosum* と *S. bulbocastanum* の雑種植物については形態の調査を行い両親の形態を合わせ持っていることを確認した。

マグネティック・セル・ソーターを用いることにより *S. tuberosum* 間の種内で4.5倍、*S. bulbocastanum* との種間において3倍もの雑種植物を得ることに成功した。この値は蛍光染色を用いたソーティング法に比較して若干低めであるが、後述の方法が雑種細胞を調査しているのに対し、本方法は再生した植物を分析していることから、決して低い値とはいえないと考えられる。また、マイクロマニピュレーションやフローサイトメトリーと比較して、時間やコストがかからないことを利点としてあげられる。

S. tuberosum と *S. bulbocastanum* との雑種植物について、*S. bulbocastanum* のPVY, PVX 抵抗性を有することから、抵抗性母本としてこの後、有効に育種に用いられると考えられる。しかし、この手法の最大の難点は、片親に選抜マーカーを持つ形質転換体を用いることであり、特に食用作物においては人間が食べることから、この点をさらに改良していく必要があると考えられる。

(抄訳 斎藤靖人—日本たばこ、植開研)

(SAITO Yasuhito)

Selecting somatic hybrid plants using magnetic protoplast sorting

Dorr, I., S. Miltenyu, F. Salamini and H. Uhrig
Bio/Technology, 12: 511-515 (1994)

第4回国際植物分子生物学会に参加して

植物工学研究所

早川孝彦

1. はじめに

第4回国際植物分子生物学会は、広大な敷地を誇るオランダ、アムステルダムのRAI国際会議センターで行われた。参加人数3000名余り、発表ポスター数も2000以上と言う大きな学会であったが、この広大なセンターでは、もう一つや二つ同規模の学会が開けそうである。3年前の米国アリゾナ州ツーソンでの第3回大会もそうであったが、会場から会場への移動が大変で時間のロスが大きかった。ここは狙いを定めてテーマを絞った情報収集が得策であったようだ。

植物の分子生物学の発展の一翼を狙ったものにアグロバクテリウムによる植物の形質転換に関する研究がある。植物にガンを起こす土壌細菌が今日このような学問の発展を促すことになろうとは誰が想像出来たであろう。いや、今回大会委員長を勤めた Schilperoort 博士や閉会前の講演を行った Schell 博士、その他基調講演を行った Bevan 博士や Willmitzer 博士、教科書をひもとけば当時の精力的な研究に名を連ねる彼らは、今日この分野の発展を感じとっていたのかもしれない。そんな郷愁を持って学会を振り返ってしまうのも、水の都アムステルダムの魅惑的なたたずまいが原因だったのかもしれない。

2. 基調講演を聞いて

さて、基調講演は、1. Genome Project, 2. Signal Transduction, 3. Metabolism,

HAYAKAWA Takahiko

4. Interaction, 5. Development, 6. Gene Regulation のようなキーワードでくくることが出来る。ここには、この3年間に著しく発展した植物分子生物学の分野が集約されていたかと思う。1:この中で、アラビドプシスのゲノム解析と共にイネのゲノム解析が取り上げられ、日本から Sasaki 博士が発表されたことは嬉しいことであり、さらなる発展と世界の科学への貢献が望まれる。2:光受容体は、フィトクローム・青/UVA レセプター・UVB レセプターが知られており、アラビドプシスの突然変異株を用いて光によるシグナルトランスダクションの経路の解明が精力的になされている。エチレンによる一連の酵素の誘導に関するカスケード反応もそうであるが、kinase の関与が強く示唆された。光のシグナルトランスダクションについては、Quail 博士のレビューに詳しい (*Cell* 76: 427, 1994)。3: Willmitzer 博士は、炭素代謝の鍵酵素をクローニングし、それらの過剰生産や発現抑制を形質転換植物を用いて行うことにより炭素代謝におけるシンクとソースの関係を精力的に研究している。また、脂質代謝についても、脂肪酸の不飽和化酵素が相次いでクローニングされたことにより大きな進展をみせ、後述するようにナタネへの応用は、今大会のハイライトの一つであった。4:もう一つのハイライトは、なんと言っても耐病性遺伝子の単離であろう。基調講演では、病原体と植物の相互作用と言う面からワーゲニンゲン農業大学の de Wit 博士やセインズベリー研究所の Johnes 博士の報告があった。また、メルボルン大学の Clarke 博士により自家不和合性の研究の進展がレビューされた。興味深いことに、相互作用と言うメ

カニズムを抽出していくと、アブラナ科によくみられる自家不和合性という現象も病原体との相互作用と同じ部類に属してしまうことである。さらに詳しくは、Lamb 博士のレビューを参照されたい (*Cell* 76:419, 1994)。5: 花の形態形成に関しては、カルテックの Meyerowitz 博士が精力的に研究を進めており、大きく発展した分野の一つである。6: また、コサプレノン等の遺伝子のレギュレーションには、多くの関心が集まっているが、これから発展していく分野であろう。

3. トピックスを追って

a. 耐病性遺伝子

先にも述べたように、トウモロコシのトランスポゾンを用いたり、いわゆる map-based と呼ばれる RFLP を利用した方法を用いて耐病性に関与する遺伝子の単離が相次いでなされた。これらの成功の影には、病原体側の avirulence 遺伝子の単離と解析が大きくものを言った。セインズベリー研究所の Johnes 博士等は、トマト葉かび病菌 (*Cladosporium fulvum*) の avirulence gene である Avr 9 を CaMV の 35s プロモーターやウイルスゲノムに組み込む形で人工的に植物体の中で発現させ過敏感反応を生じさせることにより、トランスポゾン (Ac/Ds) により抵抗性に関与する遺伝子が破壊されたか否かを判定しながら Cf 9 遺伝子を単離した。交配等によるエレガントな手法は、廣近博士の報告を参照されたい (ブレインテクノニュース44:32-34, 1994)。カリフォルニア大学バークレー校の Baker 博士のグループも、Ac を利用して、タバコの TMV 抵抗性遺伝子 (N gene) の単離を試みた。N gene を Ac で破壊し、TMV に対して過敏感反応を示さなくなった個体を選抜して行く。選抜時に温度感受性の TMV 株、即ち 28°C 以上では過敏感反応を生じないが、28°C 以下では過敏感反応を生じる株を用いたのがミソである。TMV をスプレーした後、30°C で 3 日間、24°C で 2 日間育成する。30°C の間に TMV

は全身に移行し、24°C になることにより過敏感反応を起こす。全身で過敏感反応が生じるので N gene が破壊されていないものは枯死することになる。このようにして彼らは、60000 個体の形質転換タバコより 7 つの候補を選抜し、最終的に N gene を同定した。N gene であることの証明は、タバコをこの遺伝子で形質転換することにより確認された。

植物が本来持っていない遺伝子を植物に導入し耐病性の形質を付与しようという試みは、ウイルスの外被タンパク質によるウイルス抵抗性が有名であるが、今大会では、ラトガース大学の Tumer 博士の powkweed antiviral protein を始めとして、動物の ATP の修飾酵素である 2-5A synthetase、ウイルスのレプリカーゼ、barnase (R Nase) の利用等、多彩なウイルス抵抗性遺伝子の発表があった。また、サイトカニン合成酵素の一つである bacterial isopentenyl transferase や二次代謝産物を合成する tryptophan decarboxylase が、これまで効果的な遺伝子が見つかっていないアブラムシや white fly に効果があるという興味深い報告もあった。

b. 油成分の改良

ナタネは、形質転換が比較的簡単で、多くの企業が油成分の改良を目指して参入している。アンチセンスの技術や油の生合成系の酵素遺伝子へのいち早いアプローチによりカルジーン社が優位に研究を進めていると思われていた。しかし、今回デュポン社は、オレイン酸不飽和化酵素を単離しアンチセンスでその発現を抑えることにより、実に 83% 以上の高オレイン酸ナタネの開発に成功した。デュポン社は、IMC というナタネ会社を持っており、ここが交配育種で開発した高オレイン酸ナタネとの交配によってオレイン酸含量は 88% までに高められた。健康食として高オレイン酸の食用油はニーズが高く、今後の展開が大いに注目される。

c. public acceptance

組換え植物の一般社会への受け入れの成否は、私企業にとって死活問題である。今大会のセッションのひとつでは、消費者団体の代



東京駅のモデルにもなったアムステルダム中央駅



RAI国際会議場前でくつろぐ参加者

表といった立場の演者をたて、片や、Flavr Savrで有名なカルジーン社を呼んで激論を戦わせていた。Flavr Savrは、発表以来人気があるらしいが、消費者は、味とコストで選択しているようである。日本でも学会の中でこういった取り組みを進めて行きたいものである。

4. おわりに

アムステルダムの街での興奮はまだまだ続くのであるが、紙面の都合上一部のみを紹介させていただいた。Schell博士は、本学会を「植物の分子生物学ではなく、植物のサイエンスへ発展させて行きたい」という趣旨の総括をした……と思う。3年後の大会は、アジアのシンガポールである。日本のサポートはぜひとも必要と思われる。研究者のひとりとして植物のサイエンスに貢献していきたいものである。

編集後記

電子顕微鏡や組換えDNAで経験したように、新しい実験器機あるいは実験技法が開発されると、それを利用した分野の研究が飛躍的に進展します。そしてその実験器機・技法自体も急速に改良されて、利用分野は益々広がっていきます。

本号で取り上げたNMRも同じように思われます。原子核の磁性の測定手段として登場したNMRが、有機化合物の構造決定や定量分析、複雑な天然物の構造決定をはじめタンパク質や核酸の高次構造の解析、生体内物質の無侵襲・非破壊測定まで可能にしました。有機化学、生物学、医学への貢献には計り知れないものがあります。

本号では、荒田洋治先生（機能水研究所長 元東大教授）の企画により、この分野における第一人者の先生方に、NMRがライフサイエンス研究に果たす役割について執筆していただきました。

NMRがバイオ研究の発展に多彩な情報を提供してくれるものと期待しています。

なお、本誌では「国内情報」には要旨をつけることになっています。しかし本号のNMRのミニ特集では荒田先生にNMRについての総説を要旨的に書いていただきましたので、NMRについての「国内情報」の要旨は省かせていただきました。（大畑記）

ブレインテクノニュース（第46号）

平成6年11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