

CODEN : BTEEEC

TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 48 号

BRAIN  
Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

MARCH 15, 1995



乳用牛の借り腹牛に2個の肉用種の胚を移植して誕生した双子  
(本文6ページ参照)

発行=生物系特定産業技術研究推進機構

## 総 説

結城 惇

トランスジェニック動物——研究の現状と将来展望…………… 1

## 国内情報

吉岡博人

果実の軟化制御酵素…………… 3

角川博哉

遺伝子診断法によるフリーマーチン判定…………… 6

横山真也

赤潮藻を殺滅する細菌…………… 9

井濃内 順

ゴキブリの脳神経活動の光学的計測……………13

## 地域の先端研究

福島護之

体外受精に由来する高品質の牛胚盤胞を生産するための培養法……………17

## 文献情報

*Saccharomyces cerevisiae* におけるプリオン……………20

トランスポゾンタギングによるトマト葉かび病抵抗性遺伝子 *Cf-9* の単離……………21

遺伝子操作で生まれた巨大なサケ……………22

## 特別情報

荒田洋治

生体系NMRの最近の進展……………24

中島臯介

細胞育種技術の進捗状況 1994年度……………26

### 表紙写真の説明

ホルスタイン種（乳用牛）に黒毛和種（肉用種）の胚を複数移植して、肉用基畜を増産することが実用化されている。しかし、その双子生産としての成功率は高くなく、単子として出生する率が高い。そのような複数胚移植由来の単子には、死滅した胎子の影響・痕跡が残されていることがある。



# トランスジェニック動物—研究の現状と将来展望

雪印乳業株式会社  
結城 惇

1980年代に開発された基本技術を活用し、病態モデル動物、動物工場、移植用臓器生産ブタの開発研究を牽引車とする本格的な研究開発の時代に入った。現状のトランスジェニック技術は他の生物系の遺伝子操作同様、多数の宿主を操作し最適な成果物を選択することを原理としているが、多数の個体を短期間に処理できない動物を宿主とするため、よりの確な知見に基づくよりの確な実験デザインを必要とするようになった。

## 1. はじめに

昨年12月20日、生研機構主催によるBRAIN国際テクノフォーラムが東京虎の門パストラルで開催された。「トランスジェニック動物—応用技術化への新しい動き—」と題し、近年の主要成果である「ヒト型抗体生産マウスの作出」、「ブタ乳腺を標的としたジーンファーマーミング」、「病態モデル動物の作成」の3題が各分野の第一人者によって講演された。

いずれも、学術的にも広くインパクトを与えるものと考えられる。座長の適切な運営による総合討論での質疑応答は出席者の関心と理解の高さを示していた。もう一つの重要な成果である移植用臓器生産ブタも生研機構主催によるテクノフォーラムでとりあげられており、演者の1人である山村研一教授によって導入された日本のトランスジェニック動物研究は本格的な取り組みの時代を迎えている。

## 2. 今までの成果

1980年にマウス生殖系列への外来DNAの導入成功が報告されて以来、トランスジェニック動物に関する基本的な事項の多くはその

後の10年間に解決された。

マイクロインジェクション法は導入するDNAの大きさと生物学的な機能に左右されずに使用でき、また動物種に関わらずトランスジェニック動物を入手できるため、唯一汎用性のあるDNA導入技術として確立している。

1985年にはすでに、マウス以外の小動物、ウサギとブタ、ヒツジの2種類の家畜へのDNA導入にも成功した。これらの動物での遺伝子操作を成功に導いた遠心処理による受精卵前核の可視化法は、トランスジェニック家畜作出法として定着している。

培養増殖によって遺伝的に相同な卵を多数入手できれば、既知の遺伝子操作法の多くが動物個体にも適用できる。マウスES細胞はこの条件をほぼ満たしており、まれにしか起こらない生物現象を利用したgene targeting等の諸技術がマウス個体へも適用できるようになった。

トランスジェニック動物作出技術で先ず実現されたのは優性遺伝形質の導入で、ラット成長ホルモン遺伝子を導入したスーパーマウスが代表例である。トランスジェニック技術による優性形質の導入はいまもトランスジェニック動物研究の多数を占めており、交雑不可能な動物種の遺伝子はもとより、植物やバクテリアの遺伝子、さらには天然にはない遺伝子をも導入できるため、多方面にわたり適

用が試みられている。

トランスジェニック技術は優性遺伝形質の導入のみならず劣性遺伝形質の作出をも可能にした。gene targetingにより外からDNA断片を宿主動物の狙った遺伝子に挿入し、その塩基酸列を乱すことによって不活化する方法で、欠損遺伝子を修復する方法とは導入するDNA断片が異なるだけである。アンチセンス法と遺伝的手術法はES細胞を使わずに内在性遺伝子を不活化できるため、マウス以外の動物種へも適用できる。

1980年代後半には最初のトランスジェニック動物の特許がアメリカで出され、研究成果の権利を学術面だけでなく、産業面でも保護する道が拓かれた。

### 3. トランスジェニック動物研究の現状

トランスジェニック動物研究開発機関は集計されたものだけでもすでに、世界では300を超える。やはり大学が多数を占めるが企業も90近くを占め、テクノロジーとしての有用性が認められている。初期の主要な研究は大学によってなされたが、近年のトランスジェニック動物研究の90%を占める病態モデル動物と動物工場の作出研究は、ベンチャー型企業が主役となってきている。対象とする動物種は依然としてマウスが多いが、より経済価値の高いウシ、ブタ等大型動物を研究対象とする研究機関も80に達している。

安価で短期間に成果が出、豊富な技術が使えるため大部分の病態モデル動物はマウスの遺伝子操作によって作られてきた。ヒト病因遺伝子の導入、あるいはヒト遺伝子欠損病に対応するマウス遺伝子の不活化による病態モデルマウスは数多く報告されているが、免疫不全、アルツハイマー病、ウイルス感染症、循環器病関連モデルマウスが話題の中心を占めている。ヒト遺伝子を導入したモデル動物では従来の病態モデル動物に比べ、ヒトと実験動物との種差は少なくなっているところに特徴が見出される。

マウスは物質生産にも利用できる。gene

knock-outの手法でマウス内在性遺伝子を不活化することによってマウスの抗体生産能を不活化したうえ、YACクローニングを駆使して2つの長いヒトDNAを導入し、ヒト抗体のみを生産するマウスの作出に成功した。

トランスジェニック技術と家畜のタンパク質生産能力を結びつけて、家畜をバイオ医薬品の生産工場にしようとする試みは1980年代半ばにはすでに始まり、アルファ1アンチトリプシン、アルブミン、血液凝固因子VIII、IX、アンチスロンビンIII、ラクtofフェリン等のヒトタンパク質を乳中に分泌させることに成功している。その結果、飲料、食肉、羊毛を中心とする畜産物の概念が変わっただけではなく、ミルクすなわち乳牛という概念も変わった。いまでは牛乳は勿論のこと、ヒツジ、ヤギからブタ、ウサギ、ラットのミルクまでバイオ医薬品の生産に利用する試みがなされている。

乳腺には初期に予測された以上の利用価値が見出され、本来細胞外に分泌される分泌性タンパク質だけではなく、細胞膜に局在するタンパク質、あるいは細胞外で不溶化するタンパク質をもミルクに回収されることが示されている。今回の「ブタ乳腺を標的としたジーンファーマーミング」では、乳腺の能力をそのまま利用する研究を一步進め、遺伝子導入によって乳腺の能力を改善している。

### 4. 課 題

技術面では、マウスで成功した技術をマウス以外の哺乳動物一般に適用可能とすることであり、またすでに確立された技術のキット化による普及が課題となる。実用面では経済性、簡便性を追究した新技術の開発が課題であり、アメリカではDNX社が、日本では(株)ワイエスニューテクノロジー研究所が生研機構出資事業の一環として担当している。

### 5. 将来展望

FDAは医薬品として純化されたtPAを1

グラム \$ 22,000 相当に認可している。トランスジェニック技術による乳中への外来遺伝子産物の生産は 10g/l 以上を期待でき、ミルクからの回収率を考えても、ミルク 1 l 当たりの価値は飲料乳の数万倍以上である。この魅力は投資家を誘い込むだけでなく意欲的な研究者をも誘い込む要因となり、欧米での先進的な研究を支えている。

トランスジェニック動物への関心は日本でも高く、研究開発機関数はアメリカに次いで多いが、各機関の担当グループは小さく、医・薬・農にわたる数多くの魅力的な課題が放置されている。BRAIN 国際テクノフォーラムの開催を機会に、トランスジェニック動物研究センター設立を中心とする研究開発体制整備の機運が醸成されることを期待する。

## 国内情報

# 果実の軟化制御酵素

農林水産省 果樹試験場  
吉岡博人

最近、アメリカのカルジーン社はアンチセンス RNA 遺伝子を導入することによってポリガラクトナーゼ (PG) 遺伝子の発現を抑制し、日持ち性の高い品種“フレーバーゼーバー”を開発した。しかし、PG 遺伝子の抑制は果実の日持ち性を改善するが果実の軟化は抑制せず、リンゴなどのように軟化すると商品性が低下する果実には適用できない。この点を改善するには果実の軟化機構の解明が重要であり、軟化に重要な役割を果たすペクチンの構造変化とそれに関与する酵素について検討した。

## 1. はじめに

果実は雌しべの子房や果托組織が肥大したものである。これらの組織では授精後の一定期間は細胞分裂によって細胞数は増加するが、その後は分裂が停止して糖や有機酸、水分などの吸収が活発となり、細胞は急激に肥大生長する。生長が一定段階に達すると果皮の着色や香気の発生、澱粉の糖化、果肉の軟化などの成熟現象が顕在化して果実は完熟する。果実はこの時点で収穫されるが、収穫後も成熟は進行するために長く置くと過熟状態となって商品性は低下する。鮮度の高い高品質の果実を消費者に提供するためには、樹上で充分完熟させた後に、収穫後の成熟の進行、なかでも果肉の軟化の進行を適度に抑制することが果実の流通・貯蔵分野の重要な研究課題

となっている。最近、遺伝子工学を利用した鮮度保持技術の開発も行われている。トマトではアメリカのカルジーン社がアンチセンス RNA 遺伝子の導入によってポリガラクトナーゼ (PG) 遺伝子の発現を抑制し、日持ち性の高い品種“フレーバーゼーバー”を開発している。また、成熟促進ホルモンのエチレン生成関連酵素の発現を抑制したトマトやバナナなどの開発も進められている。しかし、PG 遺伝子の抑制は果実の日持ち性を改善するが軟化自体は抑制せず、エチレンの生成抑制は軟化だけでなく、着色や香りの発生などの成熟現象の発現全体を抑制するため、全ての果実で適用できる方法ではない。したがって、果実の流通を考えると軟化のみを適度に調節できることが理想的である。そのためには果実の軟化機構の解明が重要であるが、必ずしも明白でない。ここでは軟化に重要な役割を果たすペクチンの構造変化とそれに関与する酵素について解説したい。

YOSHIOKA Hiroto

## 2. 軟化に伴う細胞壁ペクチンの構造変化

果実の軟化は細胞壁の多糖類、中でもペクチンが可溶化して細胞間の結合力が低下するために生じる（図1）。ペクチンは細胞壁の中層にあって植物細胞同士を結合する役割をはたしており、その分子構造は基本的にはD-ガラクトuron酸が $\alpha(1\rightarrow4)$ 結合したポリガラクトuron鎖であり、ガラクトuron酸残基のカルボキシル基の一部はメチルエステル化されている。ポリガラクトuron鎖の所々には $\alpha$ -L-ラムノースが $(1\rightarrow2)$ 結合で挿入されおり、そのラムノース残基にガラクトースやアラビノースからなる糖鎖が側鎖として結合している。

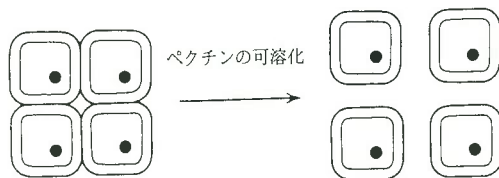


図1 果肉組織の軟化時における変化

果実の軟化時におけるペクチンの可溶化は成熟時に活性が増大するポリガラクトuronナーゼ (PG) によって、ポリガラクトuron主鎖が加水分解されるためと考えられてきた<sup>2)</sup>。しかし、PGのアンチセンス遺伝子を導入してPG遺伝子の発現を阻害した組換え体トマトでは、PG活性の発現やペクチン分子の低分子化は抑制されるが、上述のように軟化の進行は抑制されない。また、軟化や着色などの成熟現象の発現が阻害されている突然変異体品種であるrinトマトに、PG遺伝子を導

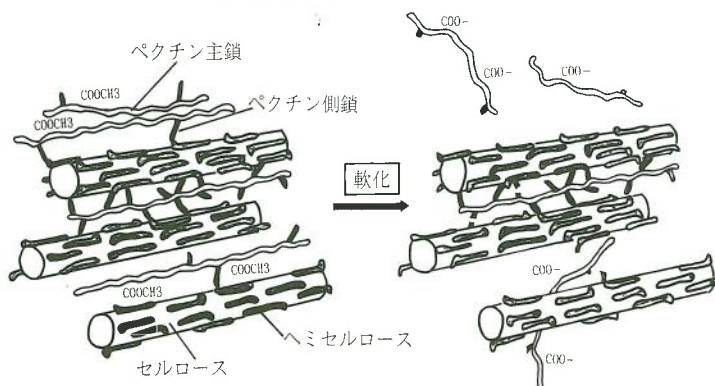


図2 軟化に伴う細胞壁構造の変化

入して果実内でこの遺伝子を発現させた場合には、PG活性の増大やペクチンの低分子化は認められるが、果肉の軟化は誘導されないことが明らかになっている。これらのことから、ペクチンの分子内のガラクトuron主鎖の加水分解だけでは、成熟時におけるペクチンの可溶化や軟化を導かないと考えられる<sup>3)</sup>。

私たちは、もともとPG活性がほとんど検出されず、軟化時にペクチン分子がほとんど低分子化されないままで可溶化されるリングを用いて軟化機構の研究を行った。De Vriesら<sup>4)</sup>はリングのペクチンは側鎖が密に分布している“hairy regions”と、分布の少ない“smooth regions”からなっているが、筆者らはペクチン分子をコンカナバリンAカラムで分画することによって、軟化時に可溶化されたペクチンがラムノースや側鎖多糖の含量が非常に少ない“smooth regions”のペクチンであることを認めた<sup>5)</sup>。同時にペクチンの側鎖多糖からガラクトースとアラビノースが顕著に消失した。リングにはガラクトuron酸残基のメトキシル化の程度が様々に異なるペクチン分子が含まれるが、軟化時にはこのうち特に高メトキシルペクチンが脱メトキシル化され、遊離のカルボキシル基が増大する<sup>6)</sup>。側鎖多糖の分解や、遊離のカルボキシル基の増大に伴う負電荷の増大によってペクチン分子の構造変化が起こり、特に“smooth regions”のペクチンは不安定化して可溶化し、軟化を引き起こす可能性が示唆される（図2）。

## 3. 側鎖多糖分解酵素の検索

リングの細胞壁面分よりEDTAと高濃度の食塩を含む緩衝液によって調整した粗酵素液をヒドロキシアパタイトカラムで分画すると、4つの $\beta$ -ガラクトシダーゼ (GA-ase I~IV) と1つの $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ (AF-ase) 活性が検出される（図3）。それぞれの画分はリングから調整したペクチンを基質にしてガラクトースとアラビノースを遊離する。軟化時にGA-ase II~IV活性



は徐々に低下するが、GA-ase I と AF-ase 活性は増大する。したがってペクチン側鎖多糖は、軟化時にこれら酵素活性の増大によって加水分解を受けるものと考えられる。

ペクチン側鎖多糖は、キシログルカンなどのヘミセルロースと結合して細胞壁ネットワークを形成していることが示唆されており、とくに endo-型の酵素で側鎖多糖が切断されるとペクチン分子の物理的性質に大きな影響を受けると予想される。

GA-ase は、すでにいくつかの果実で精製・純化され、その性質が明らかにされているが、いずれも多糖類を末端から加水分解してモノマーのガラクトースを遊離する exo-型の酵素である。ペクチン側鎖多糖はガラクトース以外の糖種も多量に含まれているが、exo-型の酵素が果実組織内でのペクチンの可溶化にどの程度影響するかは明かでない。リンゴから調整した AF-ase 画分についてリンゴのペクチンやアラビノガラクトランを基質にして調べた結果では、endo-型様の活性を示唆する結果が得られている。しかし、精製された酵素標品による結果ではなく、他の endo-型のグリコシダーゼが混入したための結果である可能性もある。今後酵素タンパク質の精製・純化が必要である。一方、トマトなどでは軟化時にキシログルカンナーゼ活性が増大することやキシログルカンが低分子化することが知られており、ヘミセルロースやペクチンを含む細胞壁全体の大きな構造変化が生じている可能性が示唆されている。ペクチンの可溶化がこれら変化の総体の結果として生じていることも考えられる。

#### 4. おわりに

今後さらに軟化を引き起こす酵素の検索とその分離・精製を進める必要がある。それに

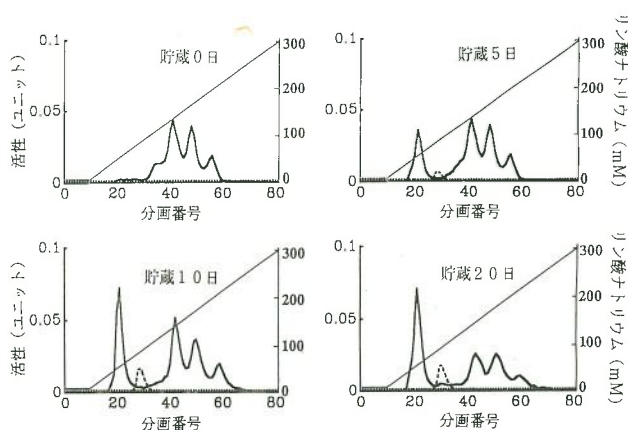


図3 リンゴの軟化に伴うGP-ase(実線)とAF-ase(破線)活性の変化  
細胞壁からの抽出液をヒドロキシアパタイトカラムで分画

よって軟化の鍵となる遺伝子を分離すれば、アンチセンス遺伝子の導入などによって軟化しにくい果実の開発が可能になると考えられる。果実にはリンゴのようにパリパリした肉質のものやモモのようにメルティング質のものなど様々である。このような肉質の違いは細胞壁の成分やその変化によってもたらされるものである。軟化機構の解明によって肉質の形成機構も明らかになっていくものと考えられる。したがって、貯蔵性の向上とともに肉質の改善にも役立つものと考えられる。

#### 文 献

- 1) Kramar, M. et al. (1990) *Hort. Biotech.* 347
- 2) Huber, D. (1983) *Hort. Rev.* 5: 169
- 3) Fischer, R. and A. Bennett (1991) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 675
- 4) De Vries, et al. (1983) *Carbohydr. Polymers*, 3: 193
- 5) Yoshioka, H. et al. (1994) *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 63: 173
- 6) Yoshioka, H. et al. (1992) *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117: 600
- 7) Yoshioka, H. et al. (1995) *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 64 (印制中)

国内情報

## 遺伝子診断法によるフリーマーチン判定

農林水産省 北海道農業試験場

角川博哉

畜産においてはメス畜に肥育畜用途だけでなく繁殖用途も考えられることが望ましい。しかしウシでは異性双子（オス子牛とメス子牛の双子）が誕生した場合に、メス子牛の90%程度がフリーマーチン（freemartin）と呼ばれる繁殖不能な個体になることが知られている。

筆者はPCR法（Polymerase Chain Reaction, DNA連鎖合成増幅法）を応用して、オス特異的DNAを高感度に検出する新しいフリーマーチン判定法（PCR判定法）を開発した。この判定法は従来法に比べ約千倍の感度をもつこと、多検体を同時に検査可能であること、判定結果を得るまでの時間が短く、要する労力が極めて少ないことなどの長所がある。

### 1. フリーマーチン現象について

フリーマーチン現象は、オスとメスの異性双胎子が母牛の子宮内で、互いに血管が吻合して血液の交流が起き、オス胎子由来の物質によってメス胎子の性腺の正常な発育が阻害され正常な卵巣が形成されないことが原因とされている。フリーマーチンは性成熟期に達しても発情を示さない。フリーマーチンの生殖器は、一般に陰核が大きく陰毛は多く長く、また、膣長は7cm以下と正常の1/2~1/3程度ものが多く見られる。内部生殖器検査を行うと子宮頸管の欠如、中腎傍管（ミューラー管）の未発達（索状）などが認められる。解剖学的には卵巣は雄性化して精巣様になっていて、ときには精細管構造が認められることがある。これらの形態異常の程度は様々である。

フリーマーチン現象については古くから調査されており、Marcum (1974) によると胎子期の血管吻合のために血液中にオスの白血球細胞とメスの白血球細胞が混在（キメラ）しており、その混在率（キメラ率）は90%以上から1%以下まで様々である。

現在ではフリーマーチン判定は、このよう

な混在が認められるかどうかを顕微鏡を用いて観察する染色体検査法、さらに膣長の測定や外部生殖器の形態観察などにより出生後早期に行われている。しかし、染色体検査法には判定結果が得られるまでに4日程度の時間が必要となるうえに、各検体ごとに約1時間の顕微鏡観察が必要で、高度の判定技術と時間を要するという欠点がある。また膣長の測定と生殖器の観察にはあいまいな部分があり、正常と区別できない個体が存在するといった問題がある。また、内部生殖器の触診は直腸検査が可能となる生後8か月以降でないといふ実施できないといった問題もある。

キメラ率の程度と不妊の関係については、染色体検査法で容易に検出可能な5%以上のキメラ率の場合には完全に不妊であるといわれているが、オスの白血球が1%以下で混在するフリーマーチンも存在する。また通常の染色体分析ではこのような低いキメラ率の場合は検出が困難なため、低率キメラのフリーマーチンの生殖器の形態異常や受胎能力との関係については明らかではない。

### 2. PCR法の反応条件の検討

PCR法は、特殊なDNA合成酵素（主にTaqDNAポリメラーゼ）を用いて、試験管内で目的のDNA断片を数時間で数百万~数

KADOKAWA Hiroya



千万倍に増幅する方法（約2時間で理論的には10億倍に増幅することが可能）で、アガロース電気泳動と組み合わせて目的のDNA断片が試料中に存在するかどうか短時間に確認できる。

筆者は、対象メス子牛がフリーマーチンであるならば、その血液中にはオス白血球が存在するはずであり、PCR法によりその中に含まれているオスDNAを増幅・検出が可能であると考え、新しいフリーマーチン判定法の開発を行った。

ところがオスDNAを増幅しようとしても多量に共存するメスDNAが、オスDNAの増幅を妨害することが判った。そのため、メスDNAが共存することを克服するPCR法の反応条件（プライマーの種類、鋳型DNA量およびPCR反応の総液量、アニール温度等）を検討することにした。

検討に当たってはホルスタイン種のオス血液から Higuchi (1989) の方法を用いて白血球DNAを簡易抽出したDNA溶液を、同じくメス血液由来DNA溶液で種々の濃度で混合し、疑似的なフリーマーチンのDNAとしたものを試料とした。オスDNAの増幅産物は、アガロース電気泳動により確認した。その結果、btDYZ（上流側：5'-CCTTTAGG-GGAAAATGGACTGACA，下流側：5'-ATGTGACACTGCTGGAAGG）をプライマーとして用い、アニール温度を60°Cにした場合に染色バンドが最も明瞭で、メスDNA1万に対して1の割合で混入したオスDNAでさえも検出可能であることが判り、この新しいPCR判定法は、染色体検査法に比べて1000倍も高感度な方法であることが判った。

### 3. 異性双子のメス子牛への応用

前記の試験ではオスDNAとメスDNAを混合した疑似的なフリーマーチンDNAを試料としてPCR法の反応条件を検討した。次に筆者は、実際にオスとメスの異性双子として誕生したメス子牛にこの方法を応用して、

本判定法の有効性を検討した。

ホルスタイン種と黒毛和種の異性双子のメス子牛18頭から無菌的に採血し、従来の染色体検査法とPCR判定法の両方を行い結果を比較した。あわせて外部生殖器の形態等を調査した。その結果、両方の全ての判定結果が完全に一致した。

さらにPCR判定法により誕生直後にフリーマーチンと判定されたウシ2頭と正常ウシ1頭を9か月間供試し、採血時期の違いにより判定結果に変動が無いことを確認した。

### 4. 複数胚移植由来単子メスへの応用

ウシにおいては子牛の増産のために複数胚移植が行われているが、その多子生産としての成功率は必ずしも高くなく、単子が出生する率が高い。オスとメスの双胎子状態の場合にフリーマーチン現象が観察されるが、これは異性双子が誕生する場合に限らず、妊娠途中にオス胎子のみが死滅した場合にもフリーマーチン牛が誕生する可能性が考えられる(Wijeranteら, 1977)。複数胚移植後に誕生した単子メスがフリーマーチンである可能性も考えられるが、どの程度の割合で単子メスの中にフリーマーチンが存在するかについての調査はこれまではない。このことを明らかにするために複数胚移植由来単子メス22頭（胚の品種の内訳は黒毛和種17頭、アンガス種3頭、ヘレフォード種2頭）にPCR判定法を適用して検査した。100細胞の染色体検査法とPCR判定法を併用して検査し、染色体検査法では検出できずPCR判定法により検出されるキメラ牛を低率キメラと判定した。また各個体について膈長測定や直腸検査等により生殖器の形態の観察を行った。

生殖器の形態観察が可能であった供試牛20頭の全ての外部形態は正常であり、触診上も内部生殖器は正常であった。21頭は染色体検査法とPCR判定法の両方で正常メスであると判定された。しかし、1頭のアンガス種メスは生殖器の形態観察および染色体検査法では正常と判定されたものの、PCR判定法で

血中 DNA にオス DNA が 1%以下に混在している低率キメラであることが検出された。

この個体の外陰部の形態 (図 1), 内部生殖器の肉眼的形態・解剖所見は直腸検査の観察結果と同様に正常であり, フリーマーチン個体で認められる異常形態は認められなかった。しかし, 卵巣の組織学的所見では卵巣のごく一部分に精細管に類似する構造の存在が認められた。この構造は, 既に報告されている異性双子として誕生しフリーマーチンであるメス個体で認められる精細管構造と同様のものではなかった。

供試牛 22 頭中 21 頭は正常な生殖器を有すること, 5%以上のキメラ牛は存在しなかったことなどから, 複数胚移植由来の単子メスの大部分は正常な繁殖能力をもつものと考えられる。また複数胚移植由来のメスに PCR 判定法による検査を行うことにより繁殖用途としての供用も考えられる。

低率キメラと判定された個体は, 肥育牛として屠殺されたために実際に繁殖能力を有していたかどうかは不明であった。しかし, この個体の生殖器の外部形態や卵巣の大部分が正常であったことから繁殖能力を持っていた



図 1 新しい方法によりキメラであると判定された複数胚移植由来単子メス牛の外陰部

可能性もあり, 今後はこのような低率キメラの繁殖能力について調べる必要がある。

## 5. おわりに

異性双子として誕生し, 本判定法により正常と判定されたメス 1 頭は, 陰核がやや大きかったもののその後の継続観察にて性成熟に至り人工授精によって受胎・分娩し正常に泌乳している。

最近, 超音波画像診断法の発達により, 自然発生の双胎子の中にも妊娠中途に一方の胚のみが死滅・消失し単子が誕生する現象, すなわちミッシング・ツイン (missing twin) が存在することが明らかになってきた。Wijerante ら (1977) によると, 通常分娩の単子メス子牛の 2.9%には“幻のオス双子”がいる可能性があり, さらに, “幻のオス双子”が原因となった単子のフリーマーチンが存在する可能性がある。

ウシにおいては, リピーターブリーダー (repeat breeder) と呼ばれる原因不明の繁殖不能牛の存在が知られている。この原因の一部に単子のフリーマーチンが考えられ, 今後 PCR 判定法を利用した検査体制が整えば明らかになると考えられる。

## 文 献

- 1) Higuchi, R. (1989) *Perkin Elmer/Cetus Newsletter*, 2:1
- 2) Perret, J., Y.C. Shia, R. Fries, G. Vassart and M. Georges (1990) *Genomics*, 6: 482-490
- 3) Marcum, J. B. (1974) *Anim. Breed. Abstr.* 42: 227-242
- 4) Wijerante, W. V. S., I. B. Munro and P. R. Wilkes (1977) *Vet. Rec.* 100: 333-336

## 赤潮藻を殺滅する細菌

日本たばこ産業株式会社 海水総合研究所  
横山真也

赤潮に対しては従前、薬剤撒布・物理的除去等を中心とした防除対策が検討されてきたが、いづれも実用上十分ではなかった。近年、赤潮の自然の消長における微生物の関与が明らかになり、これを応用した微生物学的手法が環境にやさしい赤潮防除法として注目されはじめた。筆者は、代表的赤潮形成藻の1つである *Heterosigma akashiwo* を対象として赤潮藻殺滅細菌の探索を行い、特異な殺藻活性を有する新種の海洋性細菌、*Caulobacter* sp. JT 0152 を見出した。

JT 0152 による殺藻は、① JT 0152 が菌体外に放出する物質による *H. akashiwo* の光合成阻害、游泳力減退、形態異常の誘発、② 細菌による *H. akashiwo* への攻撃、破壊、分解の2段階の過程からなっており、②の過程が生じるためには①の過程を経ることが必須であった。

### 1. はじめに

赤潮は浮游性の微細藻類（植物プランクトン）の大量発生に起因する現象である。赤潮は養殖等沿海の諸産業に大きな被害をもたらす。例えば愛媛県の宇和海中部では、1994年の1年間に、養殖ヒラメ・ハマチ・真珠を中心に8億円余りの被害を被っている<sup>1)</sup>。本報文では、筆者が見出した殺藻細菌、JT 0152 に関する知見を中心に紹介する。微生物学的赤潮防除研究の現状の詳細については成書<sup>2)</sup>を参照されたい。

### 2. 赤潮防除の背景

従前検討されてきた主要な赤潮への対応策は、①薬剤・凝集剤撒布による殺藻・沈降等の化学的方法、②濾別・遠心分離等の物理的除去・殺滅、③生け簀の移動・機械の操業停止等による被害の回避等である。①については戦後一時硫酸銅の撒布などにより効果をあげていたが<sup>4)</sup>、現在は環境汚染等の問題によりほとんど実施されていない。②については霞ヶ浦のアオコ（主として *Microcystis* 属の

藍藻）に代表される閉鎖水域の微細藻除去において一部実用化されているが<sup>5)</sup>、海洋では実用には至っておらず、現状では消極的な③の対策のみが実施されているに過ぎない。

藻類の消長への微生物の関与については古くから研究がなされており、大型プランクトンによる摂食の他、細菌等の産生物質による藻類生育の促進・阻害、シアノフェージや粘液細菌、放線菌、糸状菌（カビ）による溶藻等が知られてきた<sup>3)</sup>。これとは別に藻類が生産する有機物を利用する微生物も知られており、これらの現象は、特に湖沼等閉鎖水域において藻類に関わる生態系を特徴づける要素として位置づけられてきた<sup>8,9,10)</sup>。海洋でも、主として珪藻に対する溶藻細菌<sup>6,7)</sup>の存在は知られていたが、最近になって、赤潮藻とそれを殺滅する細菌の自然状態での消長の相関<sup>11,12,13,14)</sup>等の生態学的知見をはじめとして、赤潮藻を殺滅する細菌<sup>15,16,17)</sup>や、ウイルス<sup>18)</sup>に関して、数多くの報告がなされるようになった。この結果、赤潮の自然消滅への微生物の関与、及びその応用としての微生物学的赤潮防除の可能性が論議されるようになった<sup>2)</sup>。

日本たばこ産業(株)海水総合研究所では塩専売事業における製塩産業支援技術開発の一環として、製塩用イオン交換膜の汚染防止の視点から赤潮防除の研究を行っている。ここ



では、筆者が主要な赤潮藻の1つである *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada を対象として探索した殺藻細菌の1つについて紹介する。なお、実験に供した藻株のうち、系統名に NIES を付するのは(助)地球・人間環境フォーラム (GEF)<sup>20)</sup>から分譲を受けた株である。

### 3. 赤潮藻 *H. akashiwo* に対する殺藻細菌の探索

*H. akashiwo* (Hada) Hada は黄色植物門ラフィド藻綱に属し、近縁の *Chattonella antiqua* や *C. marina* とともに大規模な赤潮を形成する代表的な藻である。*H. akashiwo* の形態はジャガイモ状、色は茶黄色で、2本の鞭毛を持ち、細胞を回転させながら活発に游泳する<sup>20)</sup>。*H. akashiwo* による赤潮は日本近海においては減少の傾向にあるが、近年では、ニュージーランド等でサケ科魚類への被害が報告されている<sup>21)</sup>。

*H. akashiwo* に対する殺藻細菌の探索は、1次選抜として、*H. akashiwo* NIES 6 (以下系統名を省略) の培養液と混合培養して *H. akashiwo* 細胞に異常を起こす試料(海水・砂等)を選び出した。2次選抜では、選び出した試料から単離した細菌をそれぞれ培養して *H. akashiwo* 培養液に接種し、1次選抜時 *H. akashiwo* に認められていた異常の原因となった細菌を特定し、殺藻細菌とした。

上記探索で得られた菌株の1つ、JT 0152 の培養液を *H. akashiwo* の培養液に添加したところ、*H. akashiwo* の細胞は沈降し、色は茶色から緑色に変わり、後に褪色した。顕微鏡で観察したところ、*H. akashiwo* 細胞は JT 0152 の添加によって球状に変形し、游泳力を失い、やがて破裂し、変色・褪色した。緑色化までに要する時間は1~2時間であった。同様の添加実験を *Anacystis* sp. JT 6001 (藍藻)、*Olisthodiscus luteus* NIES 15 (ラフィド藻)、*Cricosfaera roscoffensis* NIES 8 (ハプト藻)、及び *Brachiomonas submarina* NIES 75 (緑藻) に対しても行った。24時間の共培養の結果、種により幾分の生育抑

制あるいは促進は認められたが死滅に至るものではなく、JT 0152 による殺藻に対象特異性があることが明らかとなった。

JT 0152 は、極鞭毛あるいは柄を有する等の形態・生理学的諸特徴から *Caulobacter* 属の海洋性細菌と同定した。海洋性の *Caulobacter* は現在 *C. maris*, *C. halobacterium* の2種が知られるのみである。JT 0152 をこれら2種と比較した結果、資化性・生育可能塩濃度その他の性質がいずれとも完全には一致せず、更に、DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる相同性は双方の種に対して10%未満であったことから新種と考えられる。

### 4. JT 0152 による *H. akashiwo* の殺藻機序

*H. akashiwo* 培養液に対し、JT 0152 培養液を、最終濃度が OD<sub>660</sub> として 0.2 となるように添加したところ、3時間程度でクロロフィル a が減少した(図1)。これは *H. akashiwo* 細胞が死滅して分解されつつあることを示している。一方、JT 0152 の培養上清や、煮沸した培養液、及びここには示さないが、超音波で菌体を破碎した培養液、凍結・融解による生菌の活性を抑制した培養液を添加してもクロロフィル a の減少は認められず、生菌を添加した場合のみ殺藻が起った。また、殺藻に際して生菌が *H. akashiwo* 細胞の周辺に蝟集すること、激しく振盪する等により

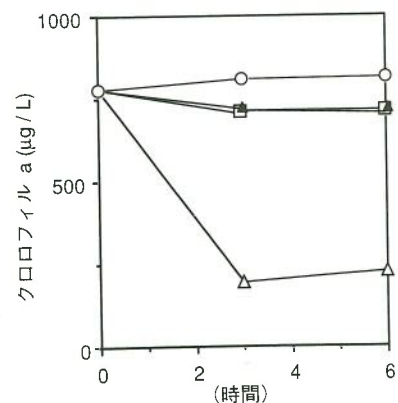


図1 *H. akashiwo* に対する JT0152 培養液の影響

クロロフィル a の減少量は *H. akashiwo* の分解量に相応する。○：対照区(培地添加)，△：JT0152培養液添加，▲：JT0152培養上清添加，□：JT0152培養液(煮沸)添加。

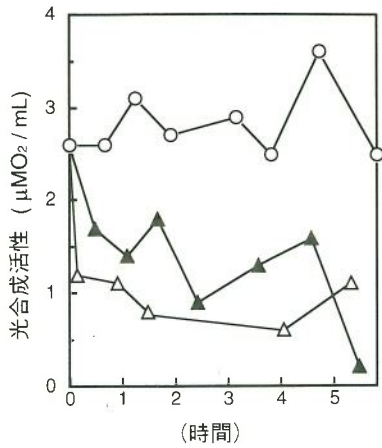


図2 *H. akashiwo* の光合成に対する JT0152培養液上清の影響  
 ○：対照区(培地添加)，▲：JT0152培養液添加，△：JT0152培養上清(煮沸)添加。

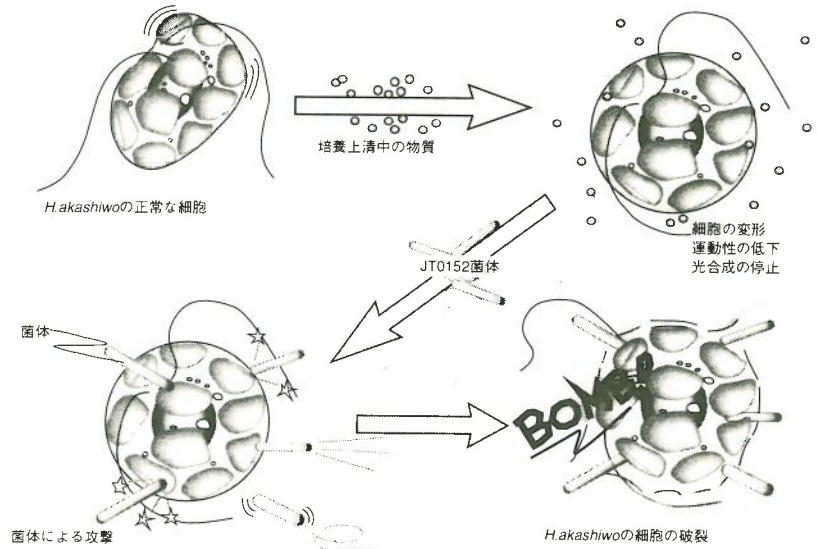


図4 *H. akashiwo* に対する JT0152 の推定作用機序

JT 0152 と *H. akashiwo* 細胞の接触を阻害すると殺藻が抑制されること等の事実から、いくつかの殺藻細菌でも知られるように<sup>3)</sup>、JT 0152 は生菌と藻細胞の直接接触により殺藻を行なっていることが示唆された。

これに対して *H. akashiwo* の光合成活性は、細胞を死滅させる作用のなかった培養上清を添加したのみで大幅に阻害された(図2)。このとき *H. akashiwo* の細胞は変形し、游泳力を失っていた。この現象は煮沸した培養上清を添加した場合にも認められ、JT 0152 は生菌による殺藻活性とは別に、*H. akashiwo* の光合成の阻害、細胞の変形等を

惹き起こす物質を菌体外に生産していることが明らかとなった。

生菌による殺藻は、上清物質の活性に依存しており(図3)、*H. akashiwo* 培養液に海水で洗って培養上清を完全に除去した JT 0152 菌体を添加しても殺藻は認められず、*H. akashiwo* が培養上清の作用を受けたときにのみ殺藻が起こった。

したがって、JT 0152 による *H. akashiwo* の殺滅は以下の2つの過程からなるものと推定された(図4)。第1の過程は JT 0152 が菌体外に生産する物質によるもので、*H. akashiwo* の細胞を変形させ光合成と游泳活性を阻害する。第2の過程は JT 0152 生菌による殺藻であり、生菌が第1の過程を経た *H. akashiwo* を攻撃して細胞を破壊・分解する。このような殺藻機序はこれまで報告されておらず、新規の作用機序であると考えられる。

5. おわりに

日本近海では、海洋汚染等の人為的要因がなくても季節的・海洋構造変化にともない必然的に植物プランクトンが大量発生し、藻の種類によっては魚介類の餌料として重要な役割を担っている。赤潮防除を必要とする主要な理由は海洋・海水を利用する産業上の要請であり、防除は可能な限り生態系と調和している

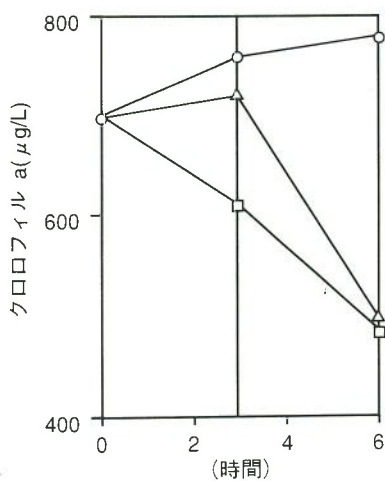


図3 *H. akashiwo* に対する JT0152 菌体と培養液上清の影響  
 ○：0時間に培地，3時間目に洗浄した生菌体を添加。△：0時間にJT0152培養上清，3時間目に洗浄した生菌体を添加。□：0時間にJT0152培養液，3時間目に培地添加。

ことが望ましい。微生物学的赤潮防除には、生態系への調和という点で大きな期待が寄せられている。実際、生態系における殺藻細菌は、赤潮の衰退にともなって衰退することが示されており<sup>11,12,13,14)</sup>、微生物利用の安全性を示唆している。しかし、微生物学的赤潮防除はその概念の成立自体が新しく、技術の実用化という点に関してはようやく検討に入ろうという段階である。今回紹介した研究についても、今後、①詳しい殺藻の作用機作、作用物質の特定を行った上でのJT 0152の実用の適否、②人体への安全性・環境への影響、③利用形態、例えば、生菌を撒布するのか、*Caulobacter* 属の付着性を利用するなどにより海域に細菌を定着させるのか、あるいは特異性・殺藻作用などの一部の機能を抽出して利用するのか、等々の問題を検討していく必要がある。また、最良の赤潮防除法の構築という意味では、赤潮の発生の予察、原因藻種の特定(分類・同定)、藻種ごとの対応のあり方、発生の抑制等を含む広い視野に立った赤潮研究の中で、微生物学的手法を的確に位置づけていくことが必要であろう。

#### 文 献

- 1) 水産庁発表(1994) 日刊水産経済新聞, 12月7日付け
- 2) 石田祐三郎・菅原庸(1994) 赤潮と微生物, 恒星社厚生閣
- 3) 山本銆子(1986) 藻類の生態, p439-504, 内田老鶴圃
- 4) 岡市友利(1987) 赤潮の科学, pp.5-36, 恒星社厚生閣
- 5) 小笠原保(1992) 資源環境対策, 28: 1439-1445
- 6) Baker, K. H. and D. S. Herson (1978) *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 791-796
- 7) Sakata, t. et al. (1991) *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56: 1147-1152
- 8) Münster, U. et al. (1990) *Aquatic Microbial Ecology*, pp.8-46
- 9) 古城方和・久宝佳苗(1984) 発酵工学, 62: 181-188
- 10) 古城方和ら(1984) 発酵工学, 62: 425-431
- 11) 今井一郎(1993) 平成4年度赤潮対策技術開発試験報告書「マリンバイオテクノロジーによる赤潮被害防止技術開発試験」, 25-37
- 12) Fukami, K et al. (1991) *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57: 2321-2326
- 13) 吉永郁生・石田祐三郎(1990) 平成元年度赤潮対策技術開発試験報告書「マリンバイオテクノロジーによる赤潮被害防止技術開発試験」, 78-83
- 14) 吉永郁生・石田祐三郎(1993) 平成4年度赤潮対策技術開発試験報告書「マリンバイオテクノロジーによる赤潮被害防止技術開発試験」, 69-81
- 15) Ishio, S. et al. (1989) *Environmental Science and Toxicology*, Elsevier Sci. Publ. N.Y., 773-787
- 16) Imai, I et al. (1993) *Mar. Biol.* 116: 527-532
- 17) 今井一郎(1992) 平成3年度赤潮対策技術開発試験報告書「マリンバイオテクノロジーによる赤潮被害防止技術開発試験」, 22-36
- 18) Nagasaki, K et al. (1994) *Mar. Biol.* 119: 307-312
- 19) 財地球・人間環境フォーラム編(1991) GEF 保存株リスト'91
- 20) 原慶明・千原光雄(1987) 赤潮生物研究指針, pp.554-566, 秀和
- 21) Chang, F. H. (1990) *New Zealand J. Marine and Freshwater Res.* 24: 461-469



## ゴキブリの脳神経活動の光学的計測

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所  
井濃内 順

脳・神経系の機能を明らかにするためには、個々の神経細胞レベルで行われる情報処理メカニズムの研究とともに、多数の個性の異なる神経細胞が一体となって動作し、遂行される情報処理のメカニズムの解明が重要である。近年、このような素子としての個々の神経細胞の活動とシステムとしての神経回路の活動の同時観測を可能にする光学的多点計測法が注目されている。

本稿では、雄ワモンゴキブリ脳の嗅覚神経系回路における情報処理メカニズムについて、われわれの光学的多点計測法を用いた解析例などを含めて概説する。

### 1. はじめに

脳・神経系において情報はどのように伝達、処理されるのか。この問題には、電気生理学的手法によって明らかにされる個々の神経細胞の形態、その生理学的性質や神経結合だけでは答えることができない。脳・神経系の情報処理のメカニズムを知るには、個々の神経細胞の働きと、さらに個性の異なる細胞が協調したシステムの働き（神経回路の特性）の両方を統一的に理解する必要がある。最近、発達した素子としての個々の神経細胞の活動とシステムとしての神経回路の活動の同時観測を可能にする光学的多点計測法が情報処理のメカニズムを解析する新しいアプローチとして注目されている。われわれは、光学的多点計測法を適用して、昆虫の脳・神経系における情報処理のメカニズムの解明を目指している。そして、昆虫脳内の複数の神経細胞の活動の様子を高速（時間分解能：0.6msec）、高分解能（128×128画素）のリアルタイムの画像として捉え、解析することの出来る光学的計測システムを構築し、雄ワモンゴキブリの脳の嗅覚神経系回路において、触角からの感覚情報が処理される様子を記録・解析することに成功した。

### 2. ワモンゴキブリ嗅覚神経系の形態学的解析と電気生理学的解析

ワモンゴキブリは、比較的大きな脳をもち、嗅覚神経系の基本構造や機能が明らかにされている<sup>1,2)</sup>。

雄ワモンゴキブリの触角（片側）には餌の匂いを受容する約97,000個の嗅受容細胞と性フェロモンの匂いを受容する約92,000個の嗅受容細胞が存在する。餌の匂いを受容する嗅受容細胞はアルコールやエステルなどの多くの匂いに応答し、応答する匂いの種類や数は細胞ごとに異なるのに対して、性フェロモンの匂いを受容する嗅受容細胞は性フェロモンの匂いのみ特異的に応答する。これらの嗅受容細胞は匂い分子との反応によって生じた信号をその軸索を介して中大脳の神経細胞へと送っている。餌の匂いを受容するそれぞれの嗅受容細胞は1本の軸索を中大脳（触角葉）の約125個の小糸球体（径40～80 $\mu$ m）のどれか一つに投射し、性フェロモンの匂いを受容する嗅受容細胞のそれは1個の大糸球体（径100～150 $\mu$ m）に投射している。嗅受容細胞は糸球体（球形の神経叢）中で2次神経細胞である出力神経細胞（興奮性応答を示す）および中大脳内局所介在神経細胞（抑制性応答を示す）上にシナプスを形成する。出力神経細胞は多くの嗅受容細胞軸索からの入力を受け取るとともに局所介在神経細胞によ

る情報処理過程を経たのち、その信号を神経線維を介して前大脳のキノコ体、側葉とよばれる部位へ伝え、そこで他の前大脳神経細胞とシナプスを形成し、さらに処理を受ける。

ここまで述べてきたように、電気生理学的手法などを用いてワモンゴキブリの嗅覚神経系の個々の神経細胞の形態が同定され、生理学的性質も調べられ、さらに神経細胞どうしの接続と、そのシナプス伝達の特徴についても明らかにされてきている。このように1個の脳の嗅覚神経系細胞のレベルでの情報処理については、多くの知見が得られている。しかし、実際には脳では嗅覚神経系回路における神経細胞間の協調的な活動により情報処理が行われている。ではいったいシステムとしての神経回路レベルではどのように匂いの情報処理がなされているのであろうか。

### 3. 脳神経活動の光学的計測法

光学的多点計測法は脳神経活動を高い時間・空間分解能で捉え、神経回路などにおける空間的広がりをもった神経活動の動態を解析できる新しい手法である<sup>3)</sup>。脳神経活動を光学的に計測する手法は外因性光シグナル計

測と内因性光シグナル計測の二つに分類できる(表1)。両者とも神経活動を反映した光シグナルを計測するものであるが、外因性光シグナル計測では神経活動そのものを直接的に捉えるのに対して、内因性光シグナル計測は神経活動にともなう代謝変動を捉えるもの

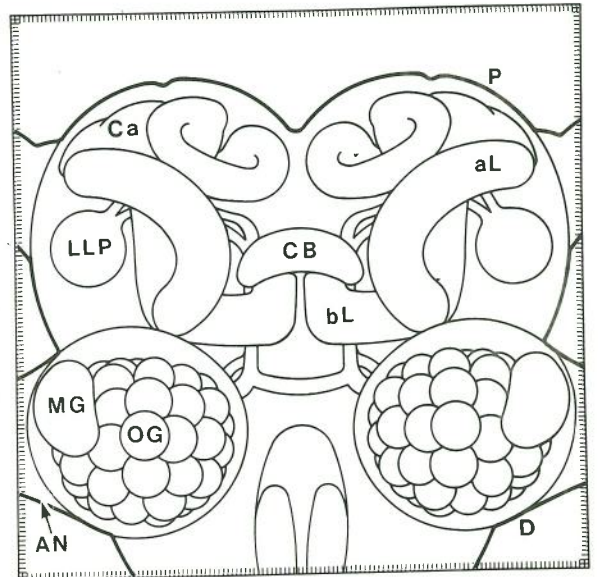


図1 雄ワモンゴキブリ脳(正面)と画像センサーとの相対的位置関係を表す。

外側の正方形が128×128画素のセンサーで、1画素は約23μm平方に対応している。AN:触角神経; aL:α-ローブ; bL:β-ローブ; Ca:キノコ体傘部; CB:中心体; D:中大脳; LLP:前大脳側葉; MG:大糸球体; OG:小糸球体; P:前大脳。

表1 脳神経活動を光学的に計測する二つの手法

#### 外因性光シグナル計測

脳を電位感受性色素で染色し、脳神経活動に伴う膜電位変化を蛍光や吸光の強度変化に変換して、神経活動そのものを捉える(1次シグナル)。

主な特徴

1. 応答時間はマイクロ秒以下の Fast Dye に属する電位感受性色素を用いるので膜電位変化に対して十分追従する。
2. 膜電位変化そのものの計測であるので、生理的な膜電位変化領域では、電位変化の極性や大きさも光シグナル変化に反映される。  
→興奮性細胞と抑制性細胞の巧みな配置により形成された神経回路の機能的構造を解析できる。

#### 内因性光シグナル計測

神経活動上昇に起因する代謝変動を捉える(2次シグナル)。

主な特徴

1.
  - a. 神経組織に照射する光波長により、異なる由来のシグナル変化が記録できる。  
例. 480-590nm:局所的血流量の変化, 600-630nm:血液中の酸素量の変化, 810-940nm:毛細血管の膨張, 収縮による光散乱光変化
  - b. 神経組織から照射する光波長非依存的なシグナル変化も記録できる。神経組織からの光散乱光変化
2. 時間経過が遅い(秒のオーダー)。
3. 外来の色素を用いないので無侵襲性に優れている。

である。

われわれが、光学的多点計測法を用いて昆虫の脳の神経回路機能を解析したいと考えた当時は、この手法を昆虫の脳に適用した例がなかった。そのため、われわれは、まず、昆虫脳内の神経細胞の活動の様子を高速、高分解能のリアルタイムの画像として捉え、解析するために光学的計測システムを構築した(図1)。そして、ワモンゴキブリの脳を膜電位感受性色素(RH 414)で染色し、神経細胞の膜電位変化を蛍光の強度変化に変換することにより外因性光シグナルを測定し、神経活動の様子をリアルタイムの画像として可視化することができた。

#### 4. ゴキブリの嗅覚神経系回路における神経活動の光学的計測

構築した高時間・空間分解能の光学的計測システムを用いて、雄ワモンゴキブリの *in vivo* 脳において、触角からの感覚情報が脳の嗅覚神経系回路において処理される様子を神経活動の時間的・空間的パターンとして捉えた。電気刺激(300 $\mu$ sec)を片側の中大脳(触角神経)に与えると、約28msec後に中大脳周辺部などの複数個の糸球体に相当する領域に、神経活動が現れる。図2は触角神経に電気刺激を1回与えたときの測定領域中の任意な9点を選び、その点での光シグナルの時間的な変化を波形で表わしたものである。中大脳における神経活動に、特に注目してみると、興奮的な神経活動(上向きの光シグナル変化)のみならず、抑制的な神経活動(下向きの光シグナル変化:この図には示されていない)も観察され、興奮性領域と抑制性領域が混在すること、また興奮性領域と抑制性領域の空間的分布は均一ではなく、しかも時間的に変化することがわかった。そして、同側中大脳に最初に現れた神経活動は、次に反対側中大脳、同側前大脳の順に現れ、やがて、これらの神経活動領域は消失する。しかし、興味深いことに、いったん神経活動が消失した刺激した側の中大脳には再び神経活動が現れた。この神経活動の時間的・空間的な

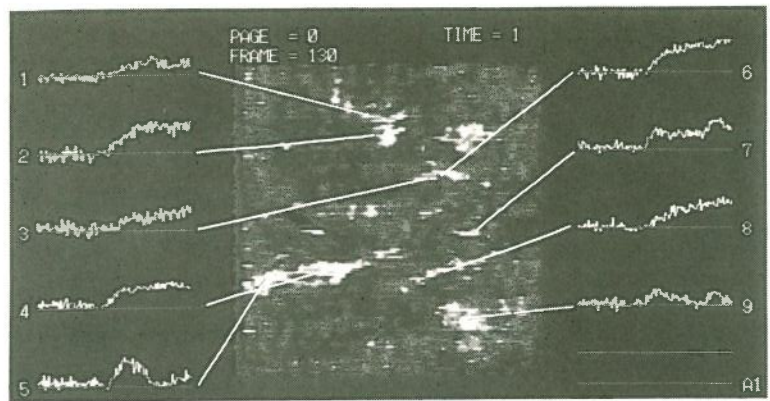


図2 16,384個の画素から代表的な9点を選び、図の右側の中大脳(触角神経)へ電気刺激(300 $\mu$ sec)を与えときのその点での神経活動の時間的な変化を波形で表わした(図1参照)。トレースの時間は76.8msecである。

パターンは刺激直後に現れたそれと同様であった。また、これらの結果からは、両側の中大脳を連絡する機能的な神経経路の存在が初めて示唆された。

触角に匂い刺激(アルコールの1種)を200msec与えると、同側の中大脳の背側部、前大脳キノコ体傘部および $\alpha$ -、 $\beta$ -ローブと反対側の $\beta$ -ローブに対応すると思われる領域に神経興奮が引き起こされた。これらのうち、キノコ体傘部での興奮が最も強く、その持続時間も長かった。また、化学構造の類似したアルコールの匂い刺激に対しても、応答の強さに違いはあるが、時間的・空間的に類似の神経活動のパターンを示した。このことは化学的構造の似た匂いは、嗅覚神経系において同じ様な情報処理過程を経て、同様な匂い(分子)として識別されることを示唆している。

中大脳の糸球体構造に存在する神経回路における匂い情報処理メカニズムに関して、匂い情報処理は中大脳の複数の糸球体全体に広がった神経回路において行われるのか、あるいはごく限られた糸球体を含む神経回路で行われるのかという興味ある問題がある。われわれの得た結果は、匂いの情報処理は中大脳のごく限られた糸球体を含む神経回路で行われるという考えを支持している。このことは、匂い刺激に対する中大脳での神経活動の時間的・空間的パターンの解析によって、中大脳レベルでの匂い識別のメカニズムの解明に寄



与できる可能性を示している。

最近, Lieke はミツバチの中大脳スライス標本および *in vivo* の中大脳に  $4 \times 4$  画素のセンサーを用いた光学的計測法を適用して中大脳の内因性光シグナルの応答を記録し, 嗅覚神経系の機能を解析している<sup>4)</sup>。彼は, 電気刺激によって中大脳スライス標本から生じる光シグナル応答を Picrotoxin (GABA 感受性 Cl<sup>-</sup>チャンネルのブロッカー) での処理前後で比較することにより, 中大脳神経回路における抑制の強さが空間的に均一でないことを報告している。また, *in vivo* のミツバチの中大脳では匂い刺激 (カーネーション) によって, ごく限られた糸球体を含む領域のみに内因性光シグナルが観察されるので, 中大脳における匂いの情報処理はごく限られた糸球体を含む神経回路で行われることを述べている。

われわれが直接的に, 中大脳の嗅覚神経系における神経活動そのものを外因性光シグナルとして測定・解析した結果と, Lieke が間接的に中大脳の嗅覚神経系の神経活動を観察した結果は一致していることになる。

## 5. おわりに

われわれは, 光学的多点計測法を用いて外因性光シグナルを記録して昆虫の脳神経機能を解析できることを初めて示すことができた。

光学的多点計測法は, 従来の電気生理学的手法や形態学的手法では解析することが難し

い神経回路レベルでの情報処理メカニズムを解析できる新しいアプローチである。ただし, 光学的多点計測法にも短所がないとは言えない。それは, 得られる光シグナル応答は個々の画素のカバーする領域に含まれる神経細胞の総和であり, 光学的応答の由来を明らかにすることは一般的には難しい点である。しかし, いくらか問題があるにしろ, この方法が神経回路を構成する細胞集団の間での神経情報の伝達を直接捉える有力な手段であることは明らかである。

今後, 光学的多点計測法を細胞内記録法などの電気生理学的手法と組み合わせることによって, 昆虫の嗅覚神経系における匂い識別の神経メカニズムについて調べたいと思っている。さらに, 視覚など他の感覚系の情報伝達経路を明らかにし, 嗅覚や視覚などの複数の感覚情報の統合が脳においてどのようになされるのかも明らかにしていきたい。

## 文 献

- 1) Boeckh, J. and K.-D. Ernst (1987) *J. Comp. Physiol.*, 161: 549-565
- 2) Boeckh, J. et al. (1990) "Olfactory bulb and antennal lobe", In D. Schild (ed.), "Chemosensory Information Processing", Vol.39, Springer-Verlag, Berlin, pp.201-227
- 3) Grinvald, A. et al. (1981) *Physiol. Rev.*, 68: 1285-1366
- 4) Lieke, E. E. (1993) *Europ. J. Neurosci.*, 5: 49-55

# 体外受精に由来する高品質の牛胚盤胞を 生産するための培養法

兵庫県立中央農業技術センター  
福島護之

一般の動物細胞の組織培養液に分類されるM-199培地と初期胚の培養のために開発された組成の単純な培養液に分類されるSOF培地を用いて、体外受精直後の牛初期胚の培養条件と胚の品質を検討した。その結果、媒精72時間までの胚をSOF培地で、以降をM-199培地で培養することによって品質の良い胚盤胞を効率良く作出できる培養方法が明らかとなった。

## 1. はじめに

牛体外受精技術の開発の当初、体外受精直後の初期胚の培養は困難なものとなれ、家兎や羊の卵管へ媒精2日目の初期胚を仮移植して5日間培養することが必須となっていた。後に、卵丘細胞や卵管上皮細胞等との共培養によりシャーレ内で7～8日間培養して胚盤胞まで発育させることが可能となってきた。しかしながら当初は、発生した胚盤胞の品質が悪く、凍結保存すると受胎率が低下する胚が多かった。現在では精子処理条件、受精条件や培養条件の改善によって凍結保存しても体内受精・体内発育した胚盤胞と遜色の無い受胎性の高い胚の作出が可能となっている<sup>2,3)</sup>が、その作出効率は20%程度と十分に改善されていない。

一方、1991年の牛肉の輸入自由化によって高品質牛肉に対する需要が高まっている。そこで、体外受精技術を用いて農家のニーズに応えられるだけの大量の体外受精胚を効率的に、また、優良な個体の胚を多数作出する要望が増加している。同時に、受精7日目の胚盤胞を構成する細胞のうち将来胎児に発育していく内部細胞塊(ICM)細胞の総細胞数に対する割合が高く、品質の良い胚を作出する事が望まれている。

受精直後の初期胚は、3～4日を卵管で、その後子宮へ下降して発生を続ける。これまで、体外受精直後の初期胚を培養する際に、一般の動物細胞の培養のために作られた完全合成培養液に分類されるM-199やHam's F-10または、胚培養のための組成の単純な培養液であるCR-1、CZBまたはSOF培地などが主に用いられてきた。いずれの培養液も胚の発生段階にかかわらず胚盤胞発生までの全期間を同じ培養液が使用されている。組成の単純なSOF培地を用いるとM-199培地に比較して胚盤胞の発生率は高いものの細胞数が少ない傾向があることが報告されており<sup>1)</sup>、効率的な胚生産を目的とした培養方法の検討が望まれている。

そこで、体外受精直後の初期胚の培養、使用条件と胚の品質を検討したところ、品質の良い胚盤胞を効率よく作出する培養方法が明らかになったので紹介する。

## 2. 培養条件の検討

### 1) 培養液の組成

Tervitら<sup>6)</sup>が報告した合成卵管液(SOF培地)のうち、初期胚の発生に抑制的に働くグルコースを除き、ウシ血清アルブミン(BSA)量を修正した培養液を用いた<sup>5)</sup>(表1)。SOF培地とM-199培地ともに1%非働化子牛血清と抗生物質を添加して使用した。

### 2) 初期胚の培養

表1 合成卵管液(SOF)の組成

成分	濃度
NaCl	107.70 mM
KCl	7.16
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19
CaCl <sub>2</sub>	1.71
MgCl <sub>2</sub>	0.49
NaHCO <sub>3</sub>	25.07
乳酸ナトリウム	3.30
ピルビン酸ナトリウム	0.30
牛血清アルブミン	3.0 mg/ml

予備試験の結果から SOF 培地を用いると媒精72時間目の8細胞の割合が増加することが明らかとなった。そこで、媒精72時間目を境に前期と後期に分けそれぞれを SOF 培地またはM-199培地で培養する4試験区を設定した。媒精72時間目に胚の周辺に付着する卵丘細胞をピペッティングによって除去すると同時に、シャーレはそのまま、胚と卵丘細胞を吸引しないように注意しながら培養液を交換した。媒精72時間目以降、48時間ごとに培養液を入れかえ、全培養期間を39°CのN<sub>2</sub>・O<sub>2</sub>・CO<sub>2</sub>ガス培養器内で媒精8日目まで培養した。

### 3) 培養結果

媒精72時間目の8細胞への発生率はM-199培地の46%に対して、SOF培地で60%と有意に高かった(表2: P<0.005)。媒精7~8日目の胚盤胞の発生率は媒精72時間以前をSOF培地で培養した場合に有意に(表2: P<0.05)高かった。しかしながら、全期間をSOF培地で培養した区では品質の低い胚盤胞が多く認められた。そこで、それぞ

れの区の胚盤胞の品質評価を行った。

### 3. 胚盤胞の品質評価

体外受精後7~8日目で胚盤胞が出現するが、その品質は必ずしも同一とはいえない。また、形態的には正常と思われても実際の発育能や受胎能を客観的に評価することは困難である。そこで、Iwasaki et al.<sup>4)</sup>が報告した2重蛍光染色法を用いて胚を構成する細胞を分別染色して構成細胞数とその割合を計測して胚の品質評価を行った。

牛胚は、受精7日目には将来胎児を形成するICMと胎盤を形成する栄養外胚葉(TE)に分化し始める。培養により得られた品質の低い胚盤胞ではICM数が少ないことが報告されている<sup>4)</sup>。そこで、両細胞を分別染色してそれぞれの細胞数を計測できれば胚盤胞の品質評価が可能となる。本法の原理は、10%家兎抗牛脾臓細胞血清とモルモット補体により傷害を受けたTEがヨウ化プロピジウム、ヘキスト33342によりピンク色に、一方、TEに囲まれて胚盤胞の内部に存在するICMは、抗体の作用を受けないためにヨウ化プロピジウムに染色されず、ヘキスト33342のみによりライトブルーに染色され、両細胞を蛍光下で分別染色するものである(図1)。

今回得られた胚盤胞を2重蛍光染色して、両細胞数を計測してみると、媒精7日目のICMの平均細胞数は、SOF培地での培養時間が長いほど少ない傾向がみられた(表3)。総細胞数に対するICM細胞数の割合は、媒

表2 体外受精した胚の発生に及ぼすSOF培地とM-199培地の影響

培養液(媒精後の時間)		供試 胚数	72時間目 の8cell≤ 胚数(%)	胚盤胞数			
72時間以前	72時間以後			総数(%)	6日目	7日目	8日目*
M199培地	M199培地	357	164(46) <sup>c</sup>	32(18) <sup>a</sup>	7	21	4
M199培地	SOF培地			46(26) <sup>a</sup>	14	15	17
SOF培地	M199培地	371	222(60) <sup>d</sup>	71(38) <sup>b</sup>	32	25	14
SOF培地	SOF培地			81(44) <sup>b</sup>	40	33	8

a, b: P<0.05, c, d: P<0.005, \*: 6, 7と8日目は胚盤胞の出現日



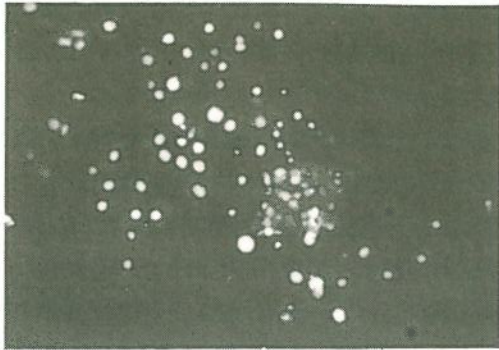


図1 2重蛍光染色によるICMとTEの分別染色像

精72時間以後をM-199培地で培養した場合に高く、品質の良好な胚が得られた。このことは、胚のゲノムが動き始める72時間を境にして、胚培養のための培養液から組成の複雑な富裕な組織培養液に変えてやることで、生体内に符合した環境が再現できることを示唆している。

以上より媒精72時間までの胚をSOF培地で、以後をM-199培地で培養することによって品質の良好な胚盤胞を従来の2倍の割合(18% vs 38%)で作出できることが明らかとなった。また、凍結した場合に高い生存率を得るには、媒精の7日目までに胚盤胞に発育した胚を用いる必要があるが、凍結可能胚数も従来のM-199のみで培養した場合の28個(媒精6日目の7個と媒精7日目の21個)に比較して約2倍の57個(媒精6日目32個と媒精7日目の25個)と多く得られ(表2)、胚の生産コストを低減できることが示唆された。

4. おわりに

今後、胚の代謝を明らかにし、胚の発育ステージに合致した培養液の組成を解明する必

表3 培養液による総細胞数と内部細胞塊細胞数

培養液 (媒精後の時間)		細胞数 (平均 ± 標準偏差)	
72時間以前	72時間以後	総細胞数	内部細胞塊 (%)
M199培地	M199培地	101 ± 33	28 ± 7 (27.7) <sup>a</sup>
M199培地	SOF培地	114 ± 28	22 ± 12 (18.9) <sup>b</sup>
SOF培地	M199培地	123 ± 25	30 ± 4 (24.5) <sup>a</sup>
SOF培地	SOF培地	94 ± 18	18 ± 4 (19.1) <sup>b</sup>

a, b : P < 0.05

要があると考えられるが、胚盤胞の生産率だけでなく、胚盤胞の二重蛍光染色法を用いた胚の品質評価など客観的な検討を行うことで、今後さらに技術の改革がなされるものと考えられる。

また、培養条件を整備することは、今後、さらに進展する新しいバイオテクノロジー技術の底辺を支える技術として重要と考えられる。

文 献

- 1) Fukui, Y., L. T. McGowan, R. W. James, P. A. Pugh and H. R. Tervit (1991) *J. Reprod. Fert.* 92 : 125-131
- 2) 福島護之・富永敬一郎・秦谷豊・内海恭三 (1992) *J. Reprod. Develop.* 38 : j49-j54
- 3) 福島護之・富永敬一郎・秦谷豊・内海恭三 (1992) 繁殖技術会誌, 14 : 1-5
- 4) Iwasaki, S., N. Yoshiba, H. Ushijima, S. Watanabe and T. Nakahara (1990) *J. Reprod. Fert.* 90 : 279-284
- 5) Takahashi, Y. and N.L. First (1992) *Theriogenology*, 37 : 963-978
- 6) Tervit, H. R., D. G. Whittingham and L. E. A. Rowson (1972) *J. Reprod. Fert.* 30 : 493-497

## 文献情報

## Saccharomyces cerevisiae におけるプリオン

プリオンとは、ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病等の病原体として提起された感染性のタンパク質である。プリオンタンパク質は細胞内の正常なタンパク質が自己修飾的に異なる形に変化することによって生じ、さらに新しい細胞に感染し、同様の過程を繰り返すことによりプリオンタンパク質を生ずる。この伝播には遺伝物質としてのDNA, RNAが関与しない。プリオンに類似したタンパク質が真核単細胞生物である酵母に存在するかは興味ある問題である。本論文では、その存在を証明するため、古典遺伝学および分子遺伝学的手法を用いて以下の実験を行った。

アスパラギン酸トランスカルバミラーゼはピリミジン生合成系の酵素でカルバミルリン酸とアスパラギン酸からウレイドコハク酸を生成する。この酵素に関する突然変異株はウレイドコハク酸を補足することによって増殖可能であるが、その取込みはアンモニアによって抑制される。Lacroute (*J. Bacteriol.*, 109:203 (1971))はこの酵素が欠損した株からアンモニア存在下でもウレイドコハク酸を取り込んで増殖できる変異株(以後、その表現型をUREと略す)を分離した。この突然変異は二つのグループに分けられる。一つは劣性変異(*ure2*)で染色体にただ一つ存在する遺伝子(*URE2*)の変異である。*URE2*については既にクローニングとシーケンシングがなされており、UREに必要な因子の生成を阻害するタンパク質Ure2pをコードしている。もう一つの突然変異[URE3]は優性であり、[ure3]との交配株の四分子解析を行うと4 [URE3]:0の分離を示すこと、[URE3]は細胞質導入によって新しい細胞に伝播されること、導入された株を5mM グアニジン塩酸を添加して培養したとき、増殖には影響が見られないが

[URE3]のcuringが100%の頻度で起こることから、染色体に依存しない細胞質因子であることがわかっている。

この[URE3]は*URE2*タンパク質(Ure2p)が欠損した*ure2*と同じ表現型UREを持つが、他方で[URE3]はその増殖に*URE2*が必要なことがわかっており、一見複雑な結果が得られているが、それを説明する次のような仮説が立てられている。*URE2*産物である正常型Ure2pはグルタチオンS-トランスフェラーゼとホモロジーがあり表現型UREを負に制御している。すなわちウレイドコハク酸の取り込み(URE)に関与するタンパク質の転写促進因子(Gln3p)を不活性化する。ところがこの正常型Ure2pは極めて低い頻度ではあるが変形型Ure2pに変わることにより本来のGln3pに対する不活性化作用を失い、生じた変形型はさらに自己修飾的に正常型のUre2pを変形型Ure2pに変える。したがって、変形型Ure2pが細胞質因子として新たな細胞(*URE2*)に導入されればその細胞も[URE3]となる。

本論文の実験ではこの仮説を証明するために*URE2* [URE3]株の*URE2*を特異的に削除することで*ure2*株を造り、これに*URE2*を高発現する多コピー型プラスミドを導入したところ野生型株が得られ、さらこれらの株の中から[URE3]株を選択した。この株を選択圧のない条件で培養したプラスミドを脱落させ*ure2*株とした中にUREの表現型を保持している株が認められた。しかしこの株に*URE2*を高発現する多コピー型プラスミドを再び導入したがUREの表現型を維持している株は見られなかった。このような[URE3]の欠損は一旦*ure2*株となった間にUre2pが生成しなかったことに起因すると考察している。さらに多コピー型プラスミド導入による*URE2*の高発現で多量にUre2pを生成させることによって[URE3]への頻度が50~100倍上昇したことが示された。また、*URE2*のプロモーターをガラクトースで作動するGAL1プロモーターにつなぎ変えてたプラスミドを用いた実験においてガラ

クトース存在下の培養で *URE2* を高発現させると [URE3] への転換頻度が上昇すること、さらに *URE2* のコドンの一部を終止コドンに変換した遺伝子の導入では [URE3] への転換が見られなかったことから、[URE3] は *URE2* が単に多コピーとなったことによるだけでなく、その産物である Ure2p からの転換によって生じたことが示された。

これら一連の実験結果は提起された仮説と符合し、酵母におけプリオン類似タンパク質の存在を示唆している。さらにその存在の確証を得るためには Ure2p タンパク質の精製とその不活性型への *in vitro* での変換が必要と思われる。もし、酵母にもプリオン類似タンパク質が存在すれば、環境適応あるいは有用形質発現へのこの類のタンパク質の関与も考えられ、興味ある新たな課題が生まれる。研究の今後の進展が期待される。

(抄訳 飯村 穰一醸造試験所)

(IIMURA Yuzuru)

**[URE3] as an altered *URE2* protein: Evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae***

Reed B. Wickner

*Science*, 264 : 566-569 (1994)

文献情報

トランスポゾンタギングによる  
トマト葉かび病抵抗性遺伝子 *Cf-9*  
の単離

植物の病原体に対する抵抗性反応は、植物の持つ抵抗性遺伝子 (*R*) と病原体の持つ非病原性遺伝子 (*Avr*) との組み合わせにより、特異的に生じると考えられている。トマトの葉かび病菌 *Cladosporium fulvum* のレースの中で *Avr 9* を持つものは、28アミノ酸からなるペプチドを分泌し、抵抗性遺伝子 *Cf-9* を持つトマトに壊死反応を誘導する。本論文は *Cf-9* をトランスポゾンタギングにより分離・解析したものである。

Jones, et al. はトウモロコシのトランスポゾンである *Ac-Ds* 系を用いて抵抗性遺伝子の単離を試みた。まず、*Cf-9* (第1染色体の短腕上に座乗) から3センチモルガンの位置に *Ds* を挿入した形質転換トマトとその *Ds* を活性化するための stabilized *Ac* (自身では転移不可) を導入したトマトを用意し、両者を交配することで *Ac, Ds* に関してはヘテロ、*Cf-9* についてはホモの個体を得た。次にその個体を *Cf-9* を持たないが *Avr 9* をホモに持つ形質転換トマトと交配した。得られた  $F_1$  では、*Cf-9* と *Avr 9* をヘテロに持つ個体は発芽後すぐに壊死を生じ死んでしまうが、*Cf-9* に *Ds* が挿入された変異体では正常に発芽・成長すると予想された。約16万個の種子のうち118個体が生き残ったが、詳細にこれらの  $F_1$  集団を調べた結果、少なくとも37以上の独立した *Ds* の挿入により *Cf-9* の発現が影響されていることが明らかになった。また、28の変異体は同じ約3 kb のゲノム上の領域に *Ds* の挿入が認められた。これらの個体はいずれも *C. fulvum* のレース5 (*Avr 9* を持つ) に対して感受性であることから、筆者らは *Cf-9* がタグされたと判断し、さらに詳細な検討を続けた。

本実験に用いた *Ds* はその配列中に大腸菌での複製開始起点とクロラムフェニコール耐性遺伝子とを含んでいる。そこでプラスミドレスキュー法を用いて *Cf-9* の単離を試みた。単離された *Cf-9* は863アミノ酸のタンパク質をコードする読み枠 (ORF) を有していた。予想されるタンパク質 (*Cf-9* タンパク質) は7つの構造ドメインを持つと予想された。最も大きなドメインCは24アミノ酸のロイシンリッチリピート (LRR) を28コピー連続して持ち、タンパク質同士の相互作用に何らかの機能を果たしていると予想された。また、C末端側には膜貫通ドメインFが存在するが、その前後のアミノ酸配列から *Cf-9* タンパク質のほとんどが細胞質外に露出しており、細胞質内にはわずか21アミノ酸のC末端ドメインが存在すると考えられた。また、細胞質外ドメインには22か所のN-グ



リコシル化部位が存在することから、Cf-9タンパク質は細胞膜に固定されLRRにより構成される細胞質外糖タンパク質であることが明らかとなった。

Cf-9をプローブとしたゲノミックサザンを行うと、品種Money-maker (Cf0)とそのCf-9同質遺伝子系統であるMoney-maker (Cf9)より得られたゲノムDNAとハイブリダイズした。Cf9とCf0とを比較すると、Cf9では少なくとも11のバンドが検出されるが、その内の幾つかはCf0と共通であり、残った数本のバンド(6.7kbのバンドを含む)がfunctionalなCf-9を持つものであると考えられた。実際にCf9とCf-9が由来した野生種*L. pennellii*とを交配して得られるF<sub>2</sub>では、6.7kbのバンドを含めた3本のバンドがCf-9の表現型と共に分離することから、Cf-9は小さなマルチジーンファミリーを構成していると考えられた。Cf-9を用いたノザン分析では、Cf9と同じ強さのバンドがCf0より検出されたが、移動度は若干Cf0より検出されるバンドの方がはやくかった。この移動度の違いが両者の表現型の差となって現れているものと考えられた。

これまで報告されているLRRドメインを持つタンパク質を2つに分けると、1)レセプター様プロテインカイネース 2)抗菌性ポリガラクトナーゼ阻害タンパク質の2種となる。Cf-9タンパク質はその両者と同一性を有するが、レセプター様プロテインカイネースとの同一性から、Cf-9タンパク質が*Avr9*産物と結合した後抵抗性反応を発現するために何らかの情報伝達を行う可能性が示唆されるが、Cf-9タンパク質の細胞質ドメインは極めて小さく、カイネース様の働きをするとは考えにくい。最近相次いで単離されたタバコのタバコモザイクウイルス抵抗性遺伝子*N*やアラビドプシスの*Pseudomonas*抵抗性遺伝子*RPS2*も同様にLRRドメインを有するが、これらはいずれも膜貫通ドメインを持たない細胞質タンパク質であると予想されており、Cf-9とは異なっている。また、プロテインカイネースとして機能すると

考えられている同じトマトの*Pseudomonas*抵抗性遺伝子*Pto*は、ミリスチル化されることで膜と関係すると予想されているが、LRRドメインは持たない。すなわちひと口に抵抗性遺伝子といっても、個々の構造や機能はそれぞれに特徴的であり、その産物がどのように抵抗性反応を誘導するのか今後の解析が待たれる。

(抄訳 柄澤 明一東北大農)

(KARASAWA Akira)

#### Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging

Jones, D. A., C. M. Thomas, K. E. Hammond-Kosack, P. J. Balint-Kurti and J. D. G. Jones

*Science* 266: 789-793 (1994)

#### 文献情報

### 遺伝子操作で生まれた 巨大なサケ

近年、魚の受精卵の核に特定、単離した遺伝子を注入して作出するトランスジェニック魚の研究が行われている。本技術が確立されれば、遺伝子の導入により優れた養殖魚の作成が可能となり、水産養殖上極めて有効な育種手段となると考えられる。

ここでは成長ホルモン遺伝子を用いた研究を紹介したい。成長ホルモンは成長促進活性を有することから、魚の長い生産サイクルを短くさせる効果が期待される。従来、魚類の成長ホルモン遺伝子を注入するときは、この遺伝子にマウスメタルチオオニンプロモーター(ラット成長ホルモン遺伝子を注入したトランスジェニックマウスを作出するさいに用いるプロモーター)を構築して使用していた。しかし、この遺伝子を注入したトランスジェニック魚には顕著な成長促進効果は現われなかった。そこで、遺伝子を導入した個体内で

外来遺伝子を発現させ、生理活性を持たせるためには、魚類自身の染色体上の遺伝子を導入する必要があると考えられていた。

Robertらは、ベニザケから成長ホルモン遺伝子を含む染色体DNAを用いて遺伝子(pOnMTGH1)を構築し、ギンザケの受精卵に注入した。注入した3000以上の卵のうち、1才まで生存した6.2%の個体の鱭の組織にpOnMTGH1 DNAの存在が確認された。pOnMTGH1 DNAを注入した群と、注入しない対照群を用い、体重と個体数の関係をプロットした。その結果、両群ともほぼ同一の度数分布を示したが、pOnMTGH1 DNAの注入群には、対照群に比べ体重の重い巨大な個体がみられた。巨大な個体のほとんどの鱭の組織からpOnMTGH1 DNAが検出されたので、pOnMTGH1の存在が成長を促進したと考えた。トランスジェニックされた魚は通常の個体の平均37倍の重さになり、より早く成長することがわかった。

また、トランスジェニック魚は早熟で体色が銀化していた。これはスモルト化と呼ばれ、

サケが春に川から海に降海するときに必要な生理的適応象である。春になりスモルト化すると、血液中の成長ホルモンの値が急激に上昇することが知られている。トランスジェニック魚の血液中の成長ホルモンの値は冬でも対照群より40倍以上高く、pOnMTGH1からの成長ホルモンの大量放出と生理的効果は、通常の季節的な脳下垂体からの生合成や分泌とは無関係であることが示された。

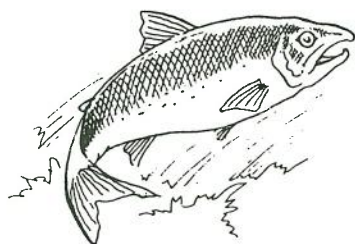
このように成長ホルモン遺伝子の導入によってギンザケの顕著な成長促進効果が現れたことは誠に悦ばしいことである。今後、この方法により、他の遺伝子を使用しても同様なトランスジェニック魚が作出されることを期待したい。

(抄訳 川添一郎—マルハ, 中研)

(KWAZOE Ichiro)

#### Extraordinary salmon growth

Robert H. D., Y. Y. Timothy, A. B. Carlo, M. D. Edward, S. Penny, C. Woon-Khiong  
*Nature*, 371: 209, 15 September, 1994



# 生体系NMRの最近の進展

機能水研究所

荒田洋治

## 1. はじめに

核磁気共鳴 (NMR) は、疑いもなく、実験化学の最も重要な方法である。バイオテクノロジーにおけるNMRの現状と将来については、昨年のブレインテクノニュース第46号「ミニ特集：NMR」において解説されている。

NMRは、生体系を対象にして、これまで他のいかなる方法をもってしても知る事の出来なかった多くの事実を明らかにしつつある。この分野は今後さらに爆発的に発展することが期待されている。

この点に鑑み、平成6年12月8日、生物系特定産業技術研究推進機構、農業生物資源研究所、機能水研究所の共催により、つくば研究支援センターにおいて、ワークショップ「生体系NMR：1994」を開催した（世話人荒田洋治）。この分野の進歩を議論するには、国際的な視点に立つことが必須であることから、国内からの4名の演者に加えて、海外から2名の研究者を招聘し、講演およびそれに続く討論は全て英語で行った。

## 2. ワークショップの概要

### (1) 生体系NMRにおける安定同位体の利用 甲斐荘正恒教授（東京都立大学理学部化学科）

近年のNMRの進歩を化学の側から支えたのは、安定同位体標識法である。この方法は、生体分子を $^2\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ などの安定同位体

によって標識することによって、NMR解析を極めて幅の広いものとする。

わが国における発酵技術は、世界に冠たるものがある。演者の甲斐荘正恒教授は、有機化学の深い造詣と素晴らしいアイデアの切れ味を持ち、日本の発酵技術を縦横に駆使して、世界をリードする研究を行ってきたこの分野の第一人者である。最近、甲斐荘教授は核酸の安定同位体標識のための方法を次々に開発し、世界の注目を集めている。

甲斐荘教授は、安定同位体標識法の現状と将来について、永年の研究成果を熱烈に語った。出席者は、改めて同教授の研究のレベルの高さ、生体系NMRの今後の研究における重要性に深い感銘を受けた。

### (2) ミリストイル化リカバリンのNMR：脂肪酸が共有結合したタンパク質の攻め方 伊倉光彦教授（オンタリオ大学、カナダ）

演者の伊倉教授は、北海道大学理学部出身で、過去6年、アメリカ・NIHについてカナダ・オンタリオ大学において活発な研究を行っている。とくに最近は、新しい分野を次々に開拓し、アメリカ、ヨーロッパの学会において、注目を集めている代表的な研究者の一人である。

講演では、同教授の最近の研究成果の中から、タンパク質に脂肪酸が結合した場合のNMR解析法について、興味あるアイデアを紹介した。今後、生体系のNMRが、横の広がりを必要とすることに鑑み、極めて意義深い研究成果である。

### (3) NMRによるHIV-1プロテアーゼ/阻害剤複合体の溶液構造を動的挙動に解析 山崎俊正博士（農業生物資源研究所）

ARATA Yoji



山崎博士は、最近まで、アメリカ・NIHのデニス・トーチャ博士の研究室において、NMRの研究を行い、昨年10月より、つくばの農業生物資源研究所において研究を開始した若手の研究者である。同研究所には、日本で最初の750MHz分光計が導入された。

講演では、HIV-1プロテアーゼ/阻害剤複合体のNMR構造解析の結果を報告した。最新のNMR測定技術によって、見事な成果が得られている。

#### (4) NMRを用いた免疫グロブリン分子の構造解析

嶋田一夫教授（東京大学薬学部）

嶋田教授は、NMR測定技術に深い造詣を持ち、さまざまな新しいアイデアを駆使して、タンパク質のNMR構造解析に取り組んでいる。本講演では、免疫グロブリンの抗原結合フラグメントFvについて、安定同位体標識法により、抗原抗体反応機構を構造化学的に解明した研究成果を報告した。

とくに、抗原結合部位の動的な構造が抗原認識に深く関わっているという研究結果は、NMRによってのみ知りうる成果として注目される。

#### (5) SH3の構造と分子認識

稲垣冬彦博士（東京都臨床医学総合研究所）

稲垣博士は、細胞内シグナル伝達系の分子論的機構に興味を持ち、NMRによって研究を行っている。講演では、約50残基からなる機能ドメインSH3の三次元構造をNMRによって決定した結果について報告した。同博士はさらに、得られた構造をもとに、SH3による認識の機構について議論した。

シグナル伝達系の研究が広い範囲の研究者の関心を集めているとき、稲垣博士によりSH3の精密な構造が提出されたことは極めて意義深いものである。今後この方面の研究の発展に繋がることが期待される。

#### (6) NMR Studies of Transient Features in Protein Structures in Solution, Professor Kurt Wüthrich (ETH, Zürich, Switzerland)

Wüthrich教授は、生体系のNMR研究の分野における世界の第一人者である。同教授は、スイスETHにあって、20年以上の年月を費やし、NMRによって、水溶液中のタンパク質の三次元構造が決定できることを示した。現在は、非常に多種類のタンパク質の三次元構造決定の研究、得られたNMRデータのデータベース化などを進めるとともに、タンパク質、核酸などにおける認識に、水がどのように関わっているかに興味をもって研究を行っている。

講演では、NMRによるタンパク質の三次元構造決定に関する最近のレビューに始まり、NMRデータをもとに、タンパク質構造の動的側面に関して、極めて示唆に富む研究成果が議論された。NMRによる生体分子の動的構造の解析は今後ますます重要になってくることが予想されるが、Wüthrich教授の講演はこの方面の研究に大きな影響を与えるものと考えられる。

### 3. ま と め

本ワークショップには、予想を上回る百人以上の研究者が集まり、極めて活発な討論が交わされた。若手の研究者が多数出席し、東北、関西からの出席者もあった。この分野に対する関心、期待の大きさを物語るものである。講演において議論された研究のレベルはいずれも高く、このワークショップが、日本における生体系NMRの今後を担う若手の研究者に大きな刺激を与えたことは極めて意義深いことであったと考えている。

終わりに、本ワークショップの開催に当たり、ご理解とご援助をいただいた生研機構ならびに農業生物資源研究所の関係者各位に深く感謝の意を表す。また、機能水研究所のスタッフには、会議の運営について、協力いただいた。あわせて感謝したいと思う。

## 特別情報

## 細胞育種技術の進捗状況

1994年度

農林水産省 農業生物資源研究所 細胞育種部

中島阜介

この資料は、1994年12月1日現在の細胞育種技術の進捗状況について、農業研究センター、農業生物資源研究所、野菜・茶業試験場、果樹試験場、草地試験場、森林総合研究所、北海道農業試験場、中国農業試験場、九州農業試験場、及び熊本県農業研究センター、群馬県農業総合試験場、大阪府立大学農学部の協力を得て取りまとめたものである。

## 1. 特記事項—本年度の特徴—

- カルジーン社の日持ちの良い組換えトマトがアメリカで食品として売り出された。一方、奈良県が農業生物資源研究所との共同でうどんこ病抵抗性の組換えイチゴを育成した。遺伝子組換え技術は植物分野でも着実に広がり、いよいよ商品化の時代に入った。それによって遺伝子導入法などの基本特許の多くが外国のものである点が論議をよんだ。しかし、イネにおいてJ Tがスーパーバイナリーベクター法を、農研センターがポリカチオン法を開発し、多くの研究者の意表をついたのも今年度であった。遺伝子導入法については、染色体の特定部位への導入法や巨大DNA導入法など今後の課題は多いが、わが国における独創的な研究成果が期待される。
- イネゲノム研究の成果が世界的な評価を受けた。これらの成果を活かし、遺伝子組換えに利用できる有用遺伝子の単離を広く進めていくことが、国際的に競争していくために必要である。
- バイオテクノロジーの実用化が進むなかで、基盤技術としての培養系の重要性が再確認されている。細胞・遺伝子操作に供試しうる培養系の確立さらには高度化に向け、培養研究を科学として進める必要がある。地道な努力の積み立てがもたらす成果の波及効果は大きい。

〔用語解説〕

## 培養系

- 茎頂培養系……………茎頂を切り出して培養し、直接植物体を得る培養系
- 腋芽培養系……………腋芽を切り出して培養し、植物体を得る培養系(樹木)
- 枝条・端・培養系……………枝の先端部分を切り出して培養し、植物体を得る培養系(樹木)
- 胚培養系……………受精後の胚又はそれを含む器官を取り出して植物体を得る培養系
- 葯培養系……………葯を培養して花粉由来の半数体又は倍数体を得る培養系
  - カルス経由, 胚経由を含む
- 花粉培養系……………花粉を培養して花粉由来の半数体又は倍数体を得る培養系
  - カルス経由, 胚経由を含む
- 未受精胚培養系……………未受精の胚を含む組織・器官を取り出して培養し、雌性生殖細胞由来の半数体又は倍数体を得る培養系, カルス経由, 胚経由を含む
- 体細胞不定芽形成系……………体細胞を培養した不定芽形成系で植物体を得る培養系
- 体細胞胚形成系……………体細胞を培養した不定胚形成系で植物体を得る培養系
- 懸濁細胞培養系……………Explant→カルス→振盪培養(懸濁細胞)→プレーティング→不定芽又は不定胚→再分化植物を得る培養系
- プロトプラスト培養系…プロトプラスト→不定芽又は不定胚→再分化植物を得る培養系

## 技術

- 遺伝資源保存技術……………カルス, プロトプラスト, 茎頂培養由来の植物等を試験管内又は液体窒素中で保存し, 保存後再分化させる技術
- 大量増殖技術……………植物体を大量に増殖する技術, 培養系は何を用いてもよい
- ウィルスフリー化技術…ウィルスをフリー化する技術, 培養系は何を用いてもよい
- 人工種子形成技術……………主として体細胞胚系を用いて人工種子を作成する技術
- 試験管内受精技術……………胚珠に花粉を受精させるなど試験管内で雑種植物を得る技術
- 半数体育種技術……………葯(花粉), 胚珠培養, 種間交雑(*H. bulbosum*法等)によって半数体を作り, 育種年限を短縮する技術
- 細胞選抜技術……………培養細胞(培養系は何を用いてもよい)によって, 変異の誘起, ストレスによる選抜を行い, 育種の効率化を図る技術
- 細胞融合技術……………細胞融合により体細胞雑種の植物体を作成する技術
- 組換えDNA技術……………特定の遺伝子, DNAをベクターの使用その他の方法で他の植物に導入して, その形質を再分化植物で発現させる技術

NAKAJIMA Kousuke, 現: 農林水産省草地試験場

2. 細胞育種技術の現状

作物群	分類 作物名	植物体再分化技術										細胞育種技術										備考： × 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術
		培養系技術	莖頂培養系	腋芽培養系	枝条・端・培養系	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	未受精胚培養系	体細胞不定芽形成系	体細胞胚形成系	懸濁細胞培養系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術	半数体育種技術	細胞選抜技術	細胞融合技術	
普通作物	イネ	◎	—	—	◎	◎	○	△	◎	◎	◎	◎	△	○	—	△	×	◎	○	○	◎	
	コムギ	○	—	—	◎	◎	○	×	○	○	○	—	—	—	×	×	◎	○	×	○		
	オオムギ	○	—	—	◎	◎	○	×	○	○	○	—	—	—	△	×	◎	△	×	○	1-3)	
	ダイズ	◎	—	—	◎	△	×	×	○	◎	△	○	—	—	—	×	×	×	○	×	○	
	ササゲ	◎	—	—	◎	△	×	○	×	×	△	△	—	—	—	×	×	×	×	×	△	
	アズキ	◎	—	—	◎	×	×	×	◎	×	×	○	—	—	—	×	×	×	△	×	△	
	バレイショ	◎	—	—	◎	◎	○	×	◎	○	◎	◎	◎	◎	◎	×	×	◎	◎	◎	◎	
	カンショ	◎	—	—	○	△	×	×	○	○	○	○	△	△	—	×	○	○	○	×	○	
	トウモロコシ	○	—	—	◎	○	○	△	○	○	○	△	△	—	×	○	○	○	○	×	○	4)
	ソルガム	×	—	—	○	△	×	×	○	△	○	△	×	×	—	×	×	×	○	×	△	
特用作物	テンサイ	○	—	—	△	△	×	○	*	△	* <sup>1)</sup>	△ <sup>2,3)</sup>	○	○	*	×	×	△ <sup>4)</sup>	△	△ <sup>5,6)</sup>	△	
	サトウキビ	◎	—	—	○	○	△	×	◎	○	◎	◎	◎	◎	×	×	○	△	△	△		
	コンニャク	◎	—	—	×	×	×	×	×	△	×	×	△	○	◎	×	×	×	×	×	×	
	イグサ	◎	—	—	△	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ナタネ	◎	—	—	◎	◎	◎	×	◎	○	◎	△	△	—	×	×	◎	○	○	○		
	ラッカセイ	○	—	—	○	△	×	×	◎ <sup>7,8)</sup>	◎ <sup>9-13)</sup>	×	△	△	○	×	×	×	×	×	×	◎ <sup>14,15)</sup>	
	クワ	◎	—	—	×	△	×	×	◎ <sup>16)</sup>	△	×	×	◎	◎	×	△	×	×	×	×	×	△
	チャ(カメリア)	◎	—	—	◎	◎	×	○	○	×	×	×	△	○	×	△ <sup>17)</sup>	×	△	×	×	×	
飼料作物	イタリアンライグラス	○	—	—	◎	○	×	×	○	○	○	○	×	○	×	×	×	×	○	×		
	オーチャードグラス	○	—	—	△	×	×	×	○	△	○	△	×	×	○	×	×	×	×	×	△	
	チモシー	△	—	—	△	△ <sup>1)</sup>	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	トールフェスク	△	—	—	◎	○	×	×	○	○	◎	×	×	×	×	×	○	×	◎	◎		
	ペレニアルライグラス	△	—	—	◎	◎	×	×	△	△	○	○	×	×	×	×	○	×	△	×		
	メドウフェスク	△	—	—	◎	×	×	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	スミズブロムグラス	×	—	—	×	×	×	×	×	△	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ダリスグラス	×	—	—	×	×	×	×	×	△	△	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	バヒアグラス	×	—	—	×	×	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	パニカム	×	—	—	△	×	×	×	×	○	○	△	×	×	×	×	×	×	×	△	×	
	ローズグラス	×	—	—	×	×	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ネピアグラス	×	—	—	×	×	×	×	×	○	○	△	×	△	×	×	×	×	△	×	×	
パールミレット	×	—	—	×	×	△	×	×	○	○	△	×	△	×	×	×	×	△	△	×		
アカクローバ	○	—	—	◎	×	×	×	×	○	△	△	△	×	○	×	×	×	△	△	×		
シロクローバ	○	—	—	◎	×	×	○	×	○	△	○	△	×	○	×	×	×	×	×	○		



作物群	分類	植物体再分化技術										細胞育種技術							備考：× 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術			
		培養系技術	茎頂培養系	腋芽培養系	枝条・端・培養系	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	未受精胚培養系	体細胞不定芽形成系	体細胞胚形成系	懸濁細胞培養系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術		半数体育種技術	細胞選抜技術	細胞融合技術
	作物名																					
飼料作物	アルファルファ	○	—	—	◎	△	×	×	×	◎	◎	○	○	◎	○	○	×	×	○	○	◎	
	パーズフットレフォイル	×	—	—	×	×	×	×	△	×	×	○	△	×	×	×	×	×	△	△	○	
	スタイロサントス	×	—	—	×	×	×	×	△	×	△	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
芝草類	ベントグラス	×	—	—	×	×	×	×	×	◎	○	○	×	△	×	×	×	×	△	×	○	
	レッドフェスク	△	—	—	○	×	×	×	×	△	△	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ノシバ	×	—	—	×	×	×	×	×	△	×	△	×	△	×	×	×	×	×	×	△	
	ケンタッキーブルーグラス	×	—	—	×	×	×	×	△	○	△	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
野菜	キュウリ	○	—	—	○	△	×	×	◎	◎	○	◎	×	○	—	×	×	△	×	△	○	
	メロン	○	—	—	○	△	×	△	○	◎	×	◎	△	○	—	×	△	○	×	○	○ <sup>1)</sup>	
	スイカ	○	—	—	△	△ <sup>2,3)</sup>	△	×	○	○	×	×	×	○	—	×	△	△	×	×	△ <sup>4)</sup>	
	カボチャ	○	—	—	○	×	×	×	○	○	×	×	×	△	—	×	△	△	×	△	△ <sup>5)</sup>	
	トマト	◎	—	—	◎	○	×	×	○	△ <sup>6)</sup>	×	○	△	○	—	×	×	△	○	○	◎	
	ナス	◎	—	—	○	◎	△	×	○	◎	○	◎	×	○	—	×	×	◎	×	◎	○ <sup>7)</sup>	
	ピーマン	◎	—	—	○	◎	×	×	○	△	×	△	×	○	—	×	×	◎	×	×	×	
	ダイコン	◎	—	—	◎	○	△	×	○	×	×	△	×	×	—	×	×	×	×	△	×	
	キャベツ	◎	—	—	◎	○	○	×	○	○	×	◎	×	○	—	△	△	○	△	◎	△	
	ハクサイ	◎	—	—	◎	◎	◎	×	○	○	×	○	×	△	—	×	○	○	×	○	△	
	ブロッコリー	◎	—	—	◎	◎	◎	×	○	○	×	◎	×	○	—	×	△	○	×	○	△	
	イチゴ	◎	—	—	×	◎	△ <sup>8)</sup>	×	○	○	×	△	○	◎	◎	×	×	△	△	×	◎ <sup>9)</sup>	
	タマネギ	◎	—	—	△	△	×	△	○	○	○	△	×	○	△	×	×	△	△	△	△	
	ネギ	○	—	—	△	×	×	×	○	△	○	△	×	○	○	×	×	×	△	×	×	
	ニンニク	◎	—	—	×	×	×	×	○	○	×	×	○	◎ <sup>10)</sup>	◎	×	×	×	×	△	×	
	アスパラガス	◎	—	—	△	○	△	×	○	◎	◎	○	○	◎	○	×	×	△	△	×	△	
	エンドウ	○	—	—	△	×	×	×	×	△	×	△	△	△	—	×	×	×	×	×	○	
	インゲンマメ	◎	—	—	○	×	×	×	×	△	×	×	×	×	—	×	×	×	×	×	△	
	ニンジン	○	—	—	×	△	×	×	○	◎	◎	◎	△	◎	—	○	×	×	○	◎	○	
	セロリー	○	—	—	×	×	×	×	×	◎	◎	◎	△	◎	—	○	×	×	○	○	○	
レタス	○	—	—	×	×	×	×	○	○	○	◎	◎	◎	—	○	×	×	×	○	○		
ゴボウ	○	—	—	×	×	×	×	△	×	×	×	×	×	—	×	×	×	×	×	×		
サトイモ	◎	—	—	△	×	×	×	△	△	×	×	○	◎	◎	×	×	×	×	×	×		
ヤマノイモ	○	—	—	×	×	×	×	△	△	×	×	△	◎ <sup>11)</sup>	○	×	×	×	×	×	×		
ハウレンソウ	○	—	—	×	×	×	×	△	△	×	△	×	△	—	×	×	×	×	×	×		
フキ	◎	—	—	×	×	×	×	×	×	×	○	○	◎	◎	×	×	×	△	×	×		
キク	◎	—	—	△	×	×	×	◎	△	△	○	○	○	◎	×	×	×	×	×	○		

作物群	分類	植物体再分化技術										細胞育種技術										備考： × 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術		
		培養系技術	莖頂培養系	腋芽培養系	枝条・端・培養系	胚培養系	薬培養系	花粉培養系	未受精胚培養系	体細胞不定芽形成系	体細胞胚形成系	懸濁細胞培養系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術	半数体育種技術	細胞選抜技術	細胞融合技術		組換えDNA技術	
作物名																								
花	ツツジ類	◎	—	—	△	×	×	×	△	×	×	○	◎	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ユリ類	◎	—	—	◎	×	×	×	◎	×	×	△	△	◎	◎	×	△	×	×	×	×	×	×	
	チューリップ	△	—	—	△	×	×	×	○	×	×	×	×	△	△	×	△	×	×	×	×	×	×	
	カーネーション	◎	—	—	△	×	×	×	○	△	△	△	○	○	◎	×	△	×	△	×	×	○	○	
	ラン類	◎	—	—	◎	×	×	×	◎	×	×	△	×	◎	◎	×	×	×	×	×	△	△	△	
	ストック	×	—	—	×	×	×	×	△	×	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	スターチス類	◎	—	—	×	×	×	×	×	×	×	△	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	トルコギキョウ	△	—	—	×	×	×	×	◎	×	×	○	×	○	×	×	×	×	×	△	×	△	△	
	ペチュニア	◎	—	—	×	○	×	○	◎	×	×	◎	×	◎	○	×	△	△	×	◎	◎	◎	◎	
	ヒマワリ	○	—	—	○	×	×	×	○	○	×	○	×	○	×	×	×	×	×	×	×	○	○	
	リンドウ	○	—	—	×	△	△	×	△	△	×	△ <sup>1)</sup>	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ガーベラ	◎	—	—	×	×	×	○	△	×	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	グラジオラス	◎	—	—	×	×	×	×	×	○ <sup>2)</sup>	×	×	×	◎	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	
	フリージア	◎	—	—	×	×	×	×	×	△	×	×	×	◎	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	
シクラメン	○	—	—	○	△	×	×	○	○	△	△	×	○	×	×	×	×	×	×	×	△	△		
き	ペゴニア類	×	—	—	×	×	×	×	◎	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
	プリムラ類	○	—	—	△	△	×	×	△	×	×	×	△	○	×	×	×	×	×	×	×	×		
	ゼラニウム類	◎	—	—	◎	△	×	×	○	○	×	○	×	○	○	×	×	×	×	×	×	×		
	バラ	○	—	—	×	×	×	×	○	○	△	△	×	◎	○	×	×	×	△ <sup>3)</sup>	×	○	○	○	
	ツバキ	○	—	—	○	×	×	×	△	○	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
果	ブドウ	◎	—	—	○	△	△	○	◎	◎	○	△	◎	◎	◎	×	×	△	×	△	○	○		
	カキ	◎	—	—	○	×	×	×	△	△	×	○	×	◎	×	×	×	×	×	△ <sup>1)</sup>	△	△		
	クリ	○	—	—	×	×	×	×	△	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×		
	ビワ	○	—	—	×	×	×	×	×	△	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×		
	オウトウ	◎	—	—	○	×	×	×	△	×	×	○	△	◎	○	×	×	×	×	△	×	×		
	西洋ナシ	◎	—	—	×	×	×	△	△	×	×	○	○	◎	○	×	×	×	×	△	×	×		
	パイナップル	◎	—	—	×	×	×	×	◎	×	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×		
	ブルーベリー	◎	—	—	△	×	×	×	○	×	×	×	△ <sup>2)</sup>	◎	×	×	×	×	×	×	×	×		
	キウイ	◎	—	—	△	×	×	×	◎	×	○	○	△	◎	×	×	×	×	×	×	×	◎		
	樹	ザクロ	◎	—	—	×	×	×	×	○	×	○	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	
カンキツ		◎	—	—	◎	◎	○	◎	△	◎	◎	◎	○	◎	◎	×	×	○	○	◎	◎	◎		
リンゴ		◎	—	—	○	△	△	○	◎	△	×	○	○	◎	◎	×	×	△	×	×	◎	◎		
日本ナシ		◎	—	—	×	×	×	×	△	△	×	×	○	◎	◎	×	×	×	×	×	×	×		
モモ		◎	—	—	◎	×	×	×	○	○	×	×	△	◎	◎	×	×	×	○	×	△	△		

植物群	分類	植物体再分化技術										細胞育種技術							備考：× 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術				
		培養系技術	莖頂培養系	腋芽培養系	枝条・端・培養系	胚培養系	薬培養系	花粉培養系	未受精胚培養系	体細胞不定芽形成系	体細胞胚形成系	懸濁細胞培養系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術		半数体育種技術	細胞選抜技術	細胞融合技術	組換えDNA技術
	植物名																						
植物群	スモモ	◎	—	—	○	×	×	×	△	×	×	△	△	◎	◎	×	×	×	×	×	×	△	
	アンズ	△	—	—	○	×	×	×	△	×	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	△	
	ウメ	<sup>3)</sup> △	—	—	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
樹	スギ	○	×	○	◎	×	×	×	×	×	△	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	<sup>1)</sup> △	
	ヒノキ	×	×	○	◎	×	×	×	×	△	△	△	×	○	×	<sup>2)</sup> △	×	×	×	×	△	<sup>3)</sup> △	
	アカマツ	×	×	△	◎	×	×	×	×	×	△	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	
	クロマツ	×	×	○	◎	×	×	×	×	×	△	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ワカマツ	×	×	◎	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	カラマツ	×	○	○	◎	×	×	△	×	○	×	△	×	△	×	×	×	△	×	△	△	<sup>4)</sup> ○	
	グイマツ雑種	○	×	○	◎	×	×	×	△	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	
	イヌマキ	×	×	△	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ヒムロ	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	カリビアマツ	×	×	○	○	×	×	×	×	○	△	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ドイツトウヒ	×	×	○	○	×	×	×	○	◎	◎	○	△ <sup>5)</sup>	◎	×	○	×	×	×	×	×	○	
	ラジアータマツ	○	×	×	◎	×	×	×	×	○	○	△	○	◎	×	△	×	×	×	×	×	△	
	テーダマツ	×	×	×	◎	×	×	×	×	○	○	△	×	◎	×	○	×	×	×	×	△	<sup>6)</sup> △	
	ギンドロ	◎	×	◎	×	×	×	×	○	×	○	◎	△ <sup>7)</sup>	○	×	×	×	×	×	×	○	×	
	ヤマナラシ	×	×	○	×	○	×	×	◎	×	○	◎	×	○	×	×	×	×	×	×	○	<sup>8)</sup> ○	
ヒロハハコヤナギ	◎	×	◎	×	○	×	×	○	×	×	○	×	○	×	×	×	△	×	○	×	×		
木	ポプラ類	◎	×	◎	×	○	×	×	○	○	◎	△	◎	×	×	×	○	△ <sup>9)</sup>	○	○	○	○	
	トチノキ	○	◎	×	△	△	△	×	◎	×	×	×	○	×	×	×	△	×	×	×	×	×	
	シラカンバ	◎	○	◎	×	×	×	×	○	△	○	△	×	◎	×	○	×	×	×	×	×	×	
	クヌギ	×	◎	×	◎	×	×	×	○	○	△	×	◎	×	○	×	×	×	×	×	×	×	
	コナラ	×	◎	×	◎	×	×	×	△	○	○	△	◎	◎	×	×	×	×	×	△	×	×	
	ミズキ	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	キハダ	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ミツマタ	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	キリ	◎	×	×	×	×	×	×	○	×	△	×	◎	○	△	×	×	×	×	×	×	×	
	ミズメ	○	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	シナノキ	×	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	サクラ	○	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	フユボダイジュ	×	○	×	×	×	×	×	△	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ユーカリ	◎	◎	○	×	×	△	×	△	△	△	◎	△ <sup>10)</sup>	◎	×	×	×	×	○	△	○	○	
	アキニレ	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	



植物群	分類	植物体再分化技術										細胞育種技術							備考： × 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術			
		培養系技術	莖頂培養系	腋芽培養系	枝条・端・培養系	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	未受精胚培養系	体細胞不定芽形成系	体細胞胚形成系	懸濁細胞培養系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術		半数体育種技術	細胞選抜技術	細胞融合技術
樹	イヌエンジェ	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ケヤキ	×	◎	×	×	×	×	×	△	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ハゼノキ	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ニセアカシア	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ヤマモモ	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
木	カジノキ	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	コウゾ	×	○	◎	×	×	×	×	○	×	○	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	△
	タバコ	◎	—	—	◎	◎	◎	○	◎	◎	○	◎	◎	◎	—	—	◎	◎	◎	◎	◎	◎

〔技術評価〕

- × 未開発 研究が行われていないか、または実施されていても未だ成果が報告されていない。
- △ 報告あり 1報でもポジティブな報告がある。
- 可能 複数の研究者から報告があり、再現性が確かめられている。
- ◎ 安定技術 該当培養系を用いた開発研究が行われている。

3. 細胞育種技術の進捗状況文献 1994年調査で新たに△、○または◎になったものを中心に記載

普通作物

- 1) オオムギ  
Wan, Y. and P.G. Lemaux (1994) *Plant Physiol.* 104 : 37-48
- 2) オオムギ  
Ritala, A. et al. (1994) *Plant Molecular Biology*, 24 : 317-325
- 3) オオムギ  
Hagio, T. et al. *Plant Cell Reports*, (in press)
- 4) ソムガム  
Rother, S. et al. (1994) Abstracts 8th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, p. 131 (S7-20)

特用作物

- 1) テンサイ  
確実な文献情報はないが、海外の種苗会社で行われていると推定される。
- 2) テンサイ  
Pedersen, C. et al. (1993) *Plant Science (Limerick)*, 95 : 89-97
- 3) テンサイ  
Hall, R.D. et al. (1993) *Plant Cell Reports*, 12 : 339-342
- 4) テンサイ  
Ferrant, V. and J. Bouharmont (1994) *Sexual Plant Reproduction*, 7 : 12-16
- 5) テンサイ  
Hall, R.D. et al. (1992) *Molecular and General*

- Genetics*, 234 : 306-314
- 6) テンサイ  
Hall, R.D. et al. (1992) *Molecular and General Genetics*, 234 : 315-324
  - 7) ラッカセイ  
Eapen, S. and L. George (1993) *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 35 : 223-227
  - 8) ラッカセイ  
Schnall, J.A. and A.K. Weissinger (1993) *Plant Cell Reports*, 12 : 316-319
  - 9) ラッカセイ  
Baker, C.M. et al. (1994) *Plant Cell Reports*, 13 : 159-163
  - 10) ラッカセイ  
Baker, C.M. and H.Y. Wetzstein (1994) *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 36 : 361-368
  - 11) ラッカセイ  
Chengalrayan, K. et al. (1994) *Plant Cell Reports*, 13 : 578-581
  - 12) ラッカセイ  
George, L. and S. Eapen (1993) *Oleagineux*, 48 : 361-364
  - 13) ラッカセイ  
Wetzstein, H.Y. and C.M. Baker (1993) *Plant Science*, 92 : 81-89
  - 14) ラッカセイ  
Eapen, S. and L. George (1994) *Plant Cell Reports*, 13 : 582-586

- 15) ラッカセイ  
Gurdip, S.B. et al. (1994) *The Plant Journal*, 5 : 745-753
- 16) ラッカセイ  
Mansur, E.A. et al. (1993) *Plant Science*, 89 : 93-99
- 17) クワ  
片桐 幸逸・Nguyen Tien Thinh (1994) 日本蚕糸学会関東支部第45回講演要旨, p. 6

- 18) チャ  
青島 洋一(1994) 茶業研究報告 第79号(別冊) : 46-47

## 飼料作物・芝草類

- 1) チモシー  
Abdullah, A.A. et al. (1994) *Plant Breeding*, 112 : 342-345

## 野菜

- 1) メロン  
Yamaguchi, J. and T. Shiga (1993) *Japanese Journal of Breeding*, 43(2) : 173-182
- 2) スイカ  
Xue, G.R. et al. (1983) *Zhiwu Shenglixue Tongxun (Plant Physiology Communications)* No. 4: 40-42
- 3) スイカ  
Xue, G.R. et al. (1988) *Hereditas, China*, 10(2) : 5-8
- 4) スイカ  
Choi, P.S. et al. (1994) *Plant Cell Reports*, 13(6) : 344-348
- 5) カボチャ  
Katavic, V. et al. (1991) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 24 : 35-42
- 6) トマト  
Chen, L.Z. et al. (1994) *Breeding Science*, 44 : 257-262
- 7) ナス  
岡山農試 (1994) 平成5年度近畿中国研究成績・計画概要集, 3-3-0902
- 8) イチゴ  
埼玉園試 (1994) 平成5年度関東東海地域生物工学会研究会, 試験研究成績・計画概要集, 1-35
- 9) イチゴ  
奈良農試 (1994) 平成5年度近畿中国研究成績・計画概要集, 2-4-0502
- 10) ニンニク  
青森県・住友化学 (1994) ながいも及びにんにく優良種苗生産に関する技術協力の成果報告書
- 11) ヤマノイモ  
京都府農試 (1994) 平成5年度近畿中国研究成績・計画概要集, 3-5-0201

## 花き

- 1) リンドウ  
中野 優ら (1994) 育種学雑誌, 44(別1) : 88
- 2) グラジオラス  
Barbara, S. (1994) *Plant Cell Reports*, 13 : 386-389
- 3) バラ  
Laurence, A. et al. (1993) *Euphytica*, 71 : 83-90

## 果樹

- 1) カキ  
田村美穂子ら (1993) 園学雑誌, 62(別1) : 126-127
- 2) ブルーベリー  
鈴木 卓 (1993) 北海道大学農学部邦文紀要 18 : 165-214
- 3) ウメ  
中川 文雄ら (1994) 園学雑誌, 63(別1) : 88-89

## 樹木

- 1) スギ  
西田 謙吾ら (1993) 第43回日本木材学会大会研究発表要旨集, p. 108
- 2) ヒノキ  
岡村 政則ら (1994) 日本日本林学会誌, 76 : 601-603
- 3) ヒノキ  
Wang, Y.N. et al. (1994) Abstracts 8th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze, p 97
- 4) カラマツ  
Klimazewska, K. (1994) *ibid*, p 104
- 5) ドイツトウヒ  
Beaulieu, B.M. et al. (1994) *ibid*, p 193
- 6) テーダマツ  
Isii, K. (1994) Abstract collection of Asian-Pacific symposium on forest genetic improvement, p 92
- 7) ギンドロ  
Son, S.H. et al. (1991) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27 : 161-168
- 8) ヤマナラシ  
Ebinuma, H. (1994) Proceeding of International Wood Biotechnology Symposium, Tokyo, 119-121
- 9) ポプラ類  
Li, Z. (1994) Abstract collection of Asia-Pacific symposium on forest genetic improvement, p 97.
- 10) ユーカリ  
Cao, Y. et al. (1994) Abstract collection of Asia-Pacific symposium on forest genetic improvement, p 91

#### 編集後記

昨秋、埼玉県、兵庫県、広島県の公立研究機関を訪ね、バイオ研究の現状を視察する機会に恵まれました。

各機関とも地域の農業に密着した課題について、着々と成果を挙げておられました。担当の研究者は30代で、海外の研究集会への出席、国際的な学術雑誌への投稿も積極的に行なわれているようでした。今回の訪問で得られた情報の一端は本誌47～48号に紹介させて

いただいておりますが、お会いした研究者の共通の声として、地方の研究成果は、中央の研究機関の成果にくらべ広く知っていただく機会が少ないことを漏らしておられました。

本誌では今後「地域の先端研究」を充実し、地域の情報を積極的に取り上げていきたいと考えていますので、どしどし情報をお寄せいただきますようお願いいたします。

(大畑記)

## ブレインテクノニュース (第48号)

平成7年3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