

CODEN : BTEEEC

TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 51 号

BRAIN  
Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

SEPTEMBER 15, 1995



マツタケの自生（中央）とマツタケの菌根（左下）  
（本文1ページ参照）

発行=生物系特定産業技術研究推進機構

## 総 説

小川 眞

菌根性きのこの人工栽培，現状と展望…………… 1

## 国内情報

長崎慶三

ウイルスによる赤潮の崩壊…………… 4

内藤 充

始原生殖細胞の移植による生殖系列キメラニワトリの作出…………… 8

早川孝彦・中島直香・小野明美

グルタミン合成酵素のトランジットペプチドを用いた葉緑体へのタンパク質の移送……………12

## 地域の先端研究

佐々木義隆・鈴木邦夫

サケ・マス類異質三倍体による IHN 抗病性魚の作出……………15

太田 明

ホンシメジの人工栽培……………19

## 文献情報

「鉄仮説」の検証，植物プランクトンは地球の温暖化を防げるか？……………22

*Ustilago maydis* における自己／非自己認識の分子メカニズム……………23

ジャガイモを食べるとコレラに強くなる!？ 究極の機能食品……………24

遺伝子操作で脂肪を増やす：4型グルコース輸送担体の脂肪組織への過剰発現……………25

## 海外便り

馬替由美

バーモント大学での2年間——スエヒロタケの不和合性因子の研究——……………27

## 特別情報

菅原七郎

哺乳動物卵子の体外取扱法の課題，とくに，体外培養系について……………29

# 菌根性きのこの人工栽培

## — 現状と展望 —

株式会社 関西総合環境センター 生物環境研究所

小川 真

### 1. はじめに

「菌根性きのこの人工栽培」というテーマは私にとって、もっとも心の痛むもののひとつである。というのも、学生の頃、浜田稔先生からマツタケの菌株をいただき、「一本ぐらい作ってみろ」といわれてこの方、いまだに栽培マツタケができないからである。

「土からはえるマツタケなら、土で育つはず」と、軽く考え、赤土に栄養源を加えて菌糸を植えておいたら、偶然白くて小さなマツタケの原基ができた。1962年11月のこと、「これでわが人生もバラ色か」と、有頂天になって、方法や条件、栄養剤、菌株等々、色々かえて実験を試みたが、一向に原基は育たず、再現性もなかった。

その後、当時協和発酵の研究所におられた川合正允さんと、またマツタケの仕事を再開した。目的は人工的にマツタケ感染苗をつくるということだったが、種菌作りの途中でまたもや偶然、以前と同じ菌株が原基を作った。これは前のより大きく、ダルマ形になったが、ひだが分化せず、たった一個で終わった。望みなきにしもあらずと、植物体の抽出物やさまざまな物質を加えてみたが、音沙汰なく、そのままになった<sup>2)</sup>。

いつも今一步という所でマツタケにうちやられている。すっぱり諦めて、ほかの駄物—といったら、きのこに叱られるが—に鞍がえした方がと思うのだが、そこがマツタケ、つかなわぬまでもと意地になる。そんな、いわゆるマツタケ憑きが今も十数人は生き残って頑張っている。

なぜ、これほど難しいかという云い訳を残念ながら、またくりかえさなければならない。純粹培養による栽培というテーマに絞ってみると、世界的にもほとんど成功した例はなく、引用できる報告も少ない。これまでに成功したといわれているのはホンシメジも含めて、いずれも腐生性をもった菌根菌で obligate symbiont でないものが多い。以下、なぜ、さほどに厄介かということについて述べてみよう。

### 2. 菌根性きのこはどこからきたのか

菌根とよばれているものの中には大きくわけて二つのグループ、外生菌根と内生菌根がある。前者はいわゆる、きのこ、担子菌や子菌の一部が木本植物、中でもマツ科、ブナ科、カバノキ科、ヤナギ科、フタバガキ科などにつくるもので、菌糸は細根を包むが、細胞内に侵入しないという特徴がある。後者の中には VA 菌根、一人によって Vesicule がないので、A 菌根ともいう—やツツジ、ランなどの菌根があり、原則として菌糸は根を包まず、細胞の中に侵入する。いずれも養水分吸収を助ける働きや根を保護することが知られており、農林業での利用価値も高い。

菌根の起源についてみると、植物に普遍的に見られる VA 菌根がもっとも古く、陸上植物が出現してまもなく、共生状態に入ったといわれているほどで、汎世界的に分布している。これにくらべて、外生菌根をつくる植物群はいずれも白亜紀以後に現われ、第三紀に入ってからふえたもので、共生するきのこも当然、その頃から分化し始めたと考えられる。きのこ類は植物との関係がきわめて深く、落葉や木材の中のリグニンやセルロースはほ



とんどのこによって分解され、高木のほとんどのがきのこと共生しているなど、とくに森林とその成り立ちに深くかかわっている<sup>3)</sup>。

外生菌根をつくる双方の生物が新しいとすれば、当然まだ遺伝的に不確実な性質を持ったものが多く、菌根性きのこの中に変異が多いのもうなづけることだろう。菌根性きのこがどこから来たのか、何時、どのようにして菌根共生の状態に入ったのか、化石もなく、ほとんど知られていないので、現存のものをみて想像をたくましくするしかない。

菌根性きのこはきのこ類の種の40%以上ともいわれており、日本だけでも1,000種は下らない。菌根性きのこは特定の科または属にほぼ限定されており、*Amanita*, *Lactarius*, *Russula*, *Laccaria*, *Scleroderma* など、その成員のほとんどが菌根をつくるというものも多い。一方、今、人工栽培可能な菌根菌として話題になっているホンシメジ<sup>4)</sup>を含む *Lyophyllum* 属の菌はほとんど落葉や材木、他の菌の死菌体を分解する腐生菌で、菌根菌と思われるのはホンシメジとシャカシメジだけである。しかもこれらの菌根は判別しにくいほどあいまいな形をしており、擬菌根といわれるグループに属している。

ワカフサタケなどの *Hebeloma* 属も栽培できる菌根菌として知られているが<sup>5)</sup>、この属の菌も大半が腐生菌で、ナガエノスギタケなどは動物の巣穴の中の落ち葉で育ち、入ってきた根に菌根様のものをつくるという<sup>6)</sup>。また、イグチの類、*Boletus* などを含む *Boletaceae* の菌の中にもザイモクイグチと命名されたのこ屑で育つきのこがあったり、オオキノボリイグチのように木の根元に生え、菌根をほとんどつukらないものがある。この仲間にもヤマドリタケのように人工栽培できたといわれるものがある<sup>7)</sup>。

おそらく、元来、森林の中で木材や落葉を分解していた菌がその腐生的能力をうしなつて、有機物の中に入ってきた根に共生し、菌根菌になったか、もしくは、樹木の根に寄生して養分を吸収し、次第に病原性をうしなつて共生するようになったか、いずれかと思わ

れる。

前者の例として、落葉分解菌のムラサキシメジをあげることができる。この菌は本来フェアリーリングを作って落葉を白色腐朽させる性質をもっているが、落葉の分解が進んだ所ではその下に若い根が集まり、菌糸がこの根にからみつく。菌根とはいえないが、根はほとんど変形することなく、よく枝分れし、間接的に共生しているようにみえる<sup>8)</sup>。

また、*Paxillus* 属のヒダハタケは針葉樹林の地上やよく腐った木の根元から出ているが、完全な菌根をつくらない。木が生きている間は数本はえていたが、ある時台風で木が倒れると、その翌年、倒木の根から大量に出たことがある。おそらく、死んだ新しい根を分解して栄養をとったのだろう。元来病原性をもったものが、菌根に移行しなかった例のようにみえる。マツタケも菌根菌の中では病原性を残している方で、菌糸をアカマツの芽生えに接種すると、苗は死んでしまう。また、日本のアカマツにアメリカマツタケの菌糸をつけると、根がしおれるといったように、もとは病原菌であったと思われるふしがある(小川、未発表)。

さらに、菌根菌の中にはまだ新しい宿主を探しているように見えるものもある。例えば、ベニテングタケは元来北半球にあってカバノキ科に共生するが、ブラジルでは *Pinus* やユーカリにも共生するようになったという。*Laccaria*、キツネタケの仲間のように、*Pinus*, *Quercus*, *Fagus*, *Betula* と何にでも共生できるものもあれば、カラマツにつくきのこのように、シロヌメリイグチ、ベニハナイグチなど、特定の種が特定の相手にしかつかないという例もある<sup>9)</sup>。

菌根性きのこの性質は何も寄主選択性や機能の点だけで変異にとんでいるというだけではない。土壌や有機物の中に広がる菌糸の形態、コロニーのつくり方や生息場所、菌根の形、色、侵入のしかたなども、種もしくは属や亜属ごとに異なっている。そのちがいは菌糸や菌根から逆にきのこの種やグループを同定できるほどである<sup>9)</sup>。

これほど性質の異なるものが、なぜ、一様に人工的な培地上で子実体をつくらないのか。しかも、外生菌根だけでなく、VA菌根もそのほかのものも、共生体の地衣類でさえ、共生状態でしか繁殖器官をつくらないというのはなぜか。奥深いところに大切なキーが隠されていると思うのだが、いまだに見つかっていない。

### 3. 人工栽培のキーを探す

1981年の Giltrap<sup>10)</sup>のレビューによると、菌根性きのこの人工栽培実験は日本でマツタケ菌糸の培養が成功した頃から始まっていた。1960年～70年代に *Boletus* (*Xerocomus*), *Suillus* など、イグチの仲間の子実体やその原基ができたと報告された<sup>11-13)</sup>。ただし、いずれの材料もカンパ類に外生菌根をつくるが、パーオキシダーゼを生産する点や落葉を分解するなど、腐生性を残したものであった。使われた培地はいずれも Hagem Modess 培地などで、特殊な物質を用いたものではない。一方、ヤマドリタケを用いた Ohyama<sup>7)</sup> の場合は子実体形成促進物質として、サイクリック AMP を使い、効果があったという。後に示されるように Ohta<sup>4)</sup> も子実体形成促進のために、数種の物質を用いている。

純粋培養では不完全な子実体原基しかできないが、マツなどの芽生えを同時に培養すると完全な子実体ができたとする例が、*Hebeloma* で知られている<sup>5)</sup>。しかし、Ohta<sup>4)</sup> によると、ホンシメジの場合はさほどの効果がないということから、腐生性がつよい系統、たとえば木材分解能を持っているものでは生体由来の物質を必要としないのかもしれない。

いずれにしても、これまでに人工培地上で生きた植物体を必要としないで子実体を形成したものは、その種または属が条件次第で、ある程度デンプンやセルロース、木質、落葉などの多糖類を分解する性質を残していたものに限られるようである。ホンシメジの場合でも各地から収集したもののうち、純粋培養で子実体を形成できるのはごくわずかであり、

マツタケの場合も、特定の系統に限られていた。このような点から考えても、子実体形成能力がいかに強く遺伝子に支配されているかがわかる。単に栄養源の補強や子実体発生条件の調節で何とかなるほど、生やさしいものではないらしい。

ひるがえって、栽培きのこのような腐生菌について考えてみると、とりたてて栄養源を工夫しなくとも、容易にきのこをつくることができ、培養も簡単である。菌根性きのこは2,3の例外を除いて成長が遅く、多糖類を分解する能力、酵素生産性を完全に欠いている。二糖類のシユークロースのようなものも分解せず、単糖と糖アルコールに依存している。窒素源もアミノ酸などの有機態を好み、ビタミン要求性もつよい。生理的性質の上で腐生菌ともっとも異なっているのは炭素源の資化性の点である。

おそらく、腐生菌は多糖類を分解し、グルコースをトレハロースからグリコーゲンにかえて貯える過程で、子実体形成に必要なものを作るのだろう。一方、菌根菌はこの一連の代謝能力を失ったために、必要な物質ができず、寄主植物の生体から直接うけざるをえなくなったのではないだろうか。菌根菌でも自然状態では大量の子実体を出せるのだから、子実体形成能力、いわゆる生殖成長の過程に欠陥があるのではない。ただ、そこへ至るきっかけ物質ができないだけかもしれない。またこのきっかけ物質はさほど複雑なものではなく、生物の形態形成にとって、ごく普遍的に必要なものなのかもしれない。

ひとつの研究の方向として、菌根菌にむりに何かを与えたり、腐生性の形質導入を試みたりするより、腐生菌の適当なものに変異を与え、例えば、糖代謝にかかわる遺伝子を欠損させ、人為的に菌根菌をつくるなど、攻め口をかえるのもおもしろい。最近のように遺伝子解析が進んでくると、菌根共生の謎がとけるのもそう遠くないように思える。

もうひとつの問題は、生体の中でまったく異質な細胞が接して何をしているのか、物質がどのように移動しているのか、共生の細胞

生理について知識がないという点である。我々が使っている抽出精製、培養などの手法はまだ、いずれもこの問題を研究するのに適していない。どんな研究でもいえることだが、方法の開発が成功につながるキーとなることだろう。これから研究しようとしている人に「頑張って下さい」というより“Good luck”と申し上げる。

#### 引用文献

- 1) 小川眞・浜田稔 (1975) 日菌誌, 16: 406-415
- 2) 川合正允・小川眞 (1976) 日菌誌, 17: 499-503
- 3) 小川眞 (1992) 夢自然 (きのこ), 山と溪谷社, 111pp.
- 4) Ohta, A. (1994) *Mycoscience*, 35: 147-151
- 5) Debaud, J. C. and G. Gay (1987) *New Phytol.* 105: 429-435
- 6) 相良直彦 (1989) きのこ動物, 108pp, 築地書館
- 7) Ohshima, Y. *et al.* (1974) *Mushroom Science IX (part I)*. p.719
- 8) 小川眞 (1983) きのこの自然誌, 244pp, 築地書館
- 9) 小川眞 (1987) 土と微生物, 24: 9-17
- 10) Giltrap, N. J. (1981) *Trans. Brit. mycol. Soc.* 77: 1
- 11) Pantidou, M. E. (1964) *Canad. J. Bot.* 42: 1147-1149
- 12) McLaughlin, D.J. (1970) *Mycologia*, 62: 307-330
- 13) McLaughlin, D. J. (1974) *Mycologia*, 66 (1): 197-202

#### 国内情報

## ウイルスによる赤潮の崩壊

農林水産省 水産庁 南西海区水産研究所  
長崎慶三

微小な植物プランクトンの一種であるヘテロシグマの異常増殖によって起こる赤潮は実に劇的な消長を示す。特にその消滅は驚くほど唐突であり、まさに一夜にして海面の色が一変してしまう。この唐突な赤潮崩壊にウイルスが関与している可能性が最近になって指摘された。研究の進め方によっては、このウイルスを用いることにより、赤潮防除を目的とした生物利用農薬的な応用に結びつけることができるかもしれない。本稿では、赤潮とウイルスの関与について言及する。

### 1. はじめに

「赤潮」という言葉は知っていても、「赤潮」という現象について実際にはよく知らないという方が多いと思う。増養殖業をはじめとする様々な水産業に対して被害を与えるこの「赤潮」の正体は、肉眼ではみえないほど微小なプランクトンの異常増殖によって生ずる水域（海や湖）の着色現象である。赤潮の原因となるプランクトン種は数十種以上のほり、それぞれ被害を与える対象生物も異なるし、発生期間や推移状況も様々である。

るし、発生期間や推移状況も様々である。

*Heterosigma akashiwo* は、強固な細胞壁構造をもたないラフィド藻と呼ばれるグループに属する、長径10~30 $\mu$ m程度のメークインのような形をした植物プランクトンである(図1)<sup>1)</sup>。毎年初夏になると、日本各地の沿岸域において実に濃密な赤潮を形成し、しばしば漁業被害をもたらす。赤潮発生域の海水はあたかもしょう油を流したかのような茶~黄褐色を呈し、そうした状態が1週間から10日あまりのあいだ継続する。

しかしながらその海面の色はある日を境として激変する。具体的にいうならば茶~黄褐

NAGASAKI Keizo





図1 赤潮藻 *Heterosigma akashiwo* の光顕写真，細胞の長径は $15\mu\text{m}$ 前後

色から緑褐色へと変化する。これは、海水に赤・黄系統の色調を与える *H. akashiwo* が海水の表層から姿を消し、共存していた他種のプランクトン (*Prorocentrum triestinum* 等) の色調にとって変わられたためである。では、前日までその水域で栄華を誇っていた *H. akashiwo* はどこへいったのか。なぜ他種のプランクトンの動態と連動せず *H. akashiwo* だけが姿を消してしまうのか。そうした疑問にこたえることが、プランクトンの群集生態を知る上で、また赤潮の崩壊機構を知る

上で重要であるに違いないと筆者は考えている。ここではとくに、*H. akashiwo* の生存戦略を念頭に置きながら、赤潮崩壊へのウイルスの関与を中心に述べてゆく。

## 2. ヘテロシグマ細胞内のウイルス発現

1992年、筆者の所属する研究室で毎年行っている広島湾湾奥部での連続調査の中で、現場海水中に細胞内にウイルス粒子を有する *H. akashiwo* 細胞がはじめて見つかった (図2, B)<sup>2)</sup>。ウイルスは粒径約 $0.18\mu\text{m}$ であり、断面は五角形または六角形、典型的な球形 (=正20面体) ウイルスであると考えられた。また、粒子内部には電子密度の高い球形のコアがあり、核酸が詰まっている様子がうかがわれた (図2, C)。宿主細胞内でウイルスは、ある種の藻類で過去に観察されたように「ウイロプラズム」と呼ばれる特殊な (正常細胞内にはみられない) 構造体表面で行われ

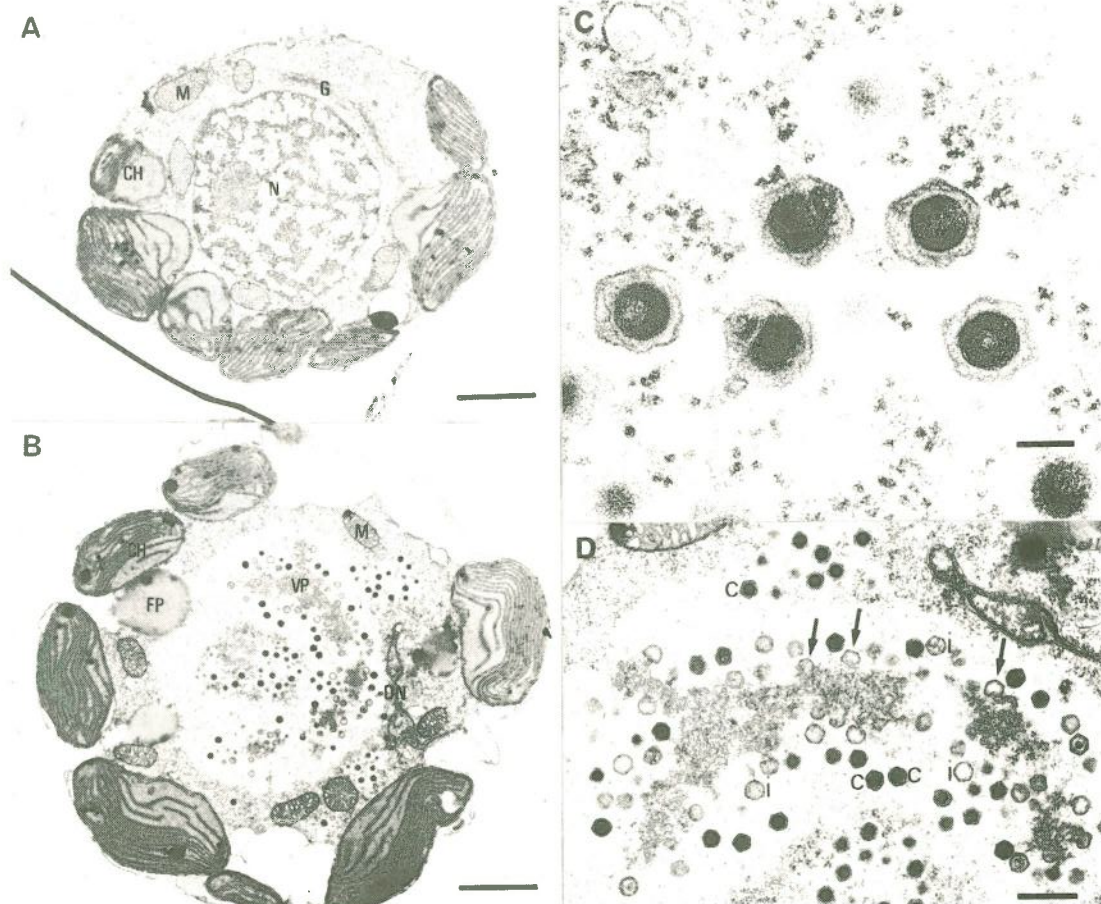


図2 *Heterosigma akashiwo* の電顕写真

A: 正常細胞 (バーは $1\mu\text{m}$ )，B: ウイルス発現細胞 (バーは $1\mu\text{m}$ )，  
C: ウイルス粒子拡大像 (バーは $0.1\mu\text{m}$ )，D: ウイルス合成部位拡大像 (バーは $0.5\mu\text{m}$ )

るようである。まず最初に外殻(カプシド)が組み立てられ、正20面体の空ウイルスが完成し(図2, Dのi)細胞質中に放出された後、その中に核酸が挿入される(図2, Dのc)。このような形態形成の方式は、大腸菌を宿主とするバクテリオファージ等で知られているパターンと類似している。

この年、上記のような知見が得られたことは、いくつかの幸運に恵まれた上でのことだった。白状すると、当時、透過型電子顕微鏡をもたなかった筆者の研究所では、この仕事を独力で行うことはできなかった。このときご協力をいただいた方々には、現在の自分に興味深いテーマを与えるきっかけを作っていただいたわけであり、今も感謝している。余談であるが、現場海水中のサンプルを透過型電子顕微鏡で観察するために超薄切片を作る仕事は、透過電顕を使った経験のある人ならあまり乗り気のしない仕事である。水中に懸濁した細かい泥粒子はたやすく新品のダイヤモンドナイフをスクラップにしてしまい、切片にナイフマークならぬナイフギャップ(溝)さえ作らせてしまう。

### 3. 赤潮崩壊とウイルス発現

*H. akashiwo* 細胞内でのウイルス発現現象が発見されたこと、ウイルス粒子の形態がわかったこと、この二つの知見に基づき、次の興味は「いつウイルス発現が起こるのか」「ウイルス発現の意味あいは何か」という点に移った。1993年、さらに密な現場(広島湾湾奥部)でのサンプリングを通して、前者の疑問に対するひとつの解答が得られた。

この年、5月下旬から順調に増殖を続けた*H. akashiwo* 個体群は、6月中旬に1mlあたり数万細胞以上の密度の赤潮を表層で形成した後、劇的な赤潮崩壊現象を呈した。6月17日に68,000細胞/mlであった赤潮が、翌19日の同じ時刻には4細胞/mlまで激減したのである(図3)。この唐突な赤潮崩壊現象は以前から知られており、膨大な数の細胞から成る個体群が一斉にその性状を変化させる理由が何であるかということは、多くの赤潮

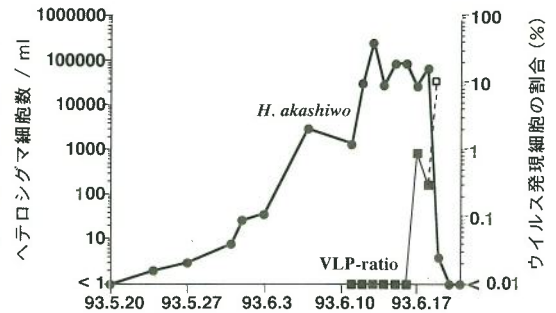


図3 1993年初夏の広島湾湾奥部における*Heterosigma akashiwo*の細胞密度(●)とウイルス発現細胞の割合(■)の変動

研究者の疑問点であった<sup>3)</sup>。

われわれは連日の採水によって得られた*H. akashiwo* 個体群の電顕試料の観察を行った。その結果、赤潮初期から中期にかけてはウイルス発現細胞が全く観察されなかったのに対し、赤潮崩壊前々日および前日の試料中には1%以下の割合でウイルス発現細胞が観察された。さらに赤潮崩壊前日の試水をそのまま継続培養し、翌日(すなわち赤潮崩壊当日)固定したものを観察した結果、11.5%の*H. akashiwo* 細胞でウイルスの発現が確認された<sup>4)</sup>。この11.5%という数字は、細胞内にすでに正20面体のウイルス粒子を作り終えた段階のもの割合であり、実際にはウイルス発現のスイッチが入りながらも、まだその段階に至っていない細胞(すなわち電顕観察では正常細胞と判定される)は含まれていない。したがって、実際にはより多くの細胞がウイルス発現途上にあると想像できる。

いずれにしてもこの結果は、赤潮の唐突な崩壊現象と、*H. akashiwo* 細胞内でのウイルス発現とが関連している可能性を強く示唆するものであった。赤潮崩壊前日に現場からラボに持ち帰られた*H. akashiwo* 個体群は、ウイルスを発現しながら死滅することが運命付けられていたのである。

### 4. 感染説と溶原化説

なぜ赤潮崩壊期に同調的にウイルスの発現が起こったのか。唐突な赤潮崩壊の機構を知る上で、この疑問に答えることは重要である。



ウイルスという言葉のイメージは、動物植物を問わず「病気」とリンクしていることが多い。現場環境中にいたウイルスが赤潮を形成する個体群に対して同調的に感染し、個々の細胞の死滅を招いたと考えることもできる。仮にこの考え方を「感染説」と呼ぶ。では、環境中に浮遊するウイルスが同調的に感染するためには何が必要か。ウイルスはそれ自身代謝等の生物活性をもっていないから、同調的变化を起こすのは宿主側であろう。とすれば例えば、赤潮状態の継続により変化した環境要因に対応して *H. akashiwo* 個体群の性状（被感染性）が変化し、一斉にウイルスによる感染を受ける可能性も考えられる。

しかしながら、筆者はこれまでに、膨大な量の試料を観察してきたが、一度として宿主細胞表面に吸着した状態にあるウイルス粒子を観察したことがない。ウイルスを放出しながら崩壊していく過程にある細胞のまわりにある細胞が、放出されたウイルスによる感染を受けないように見受けられるのはなぜなのだろうか。いまひとつ感染説に対してすっきりしない印象があるのはこのためである。

もう一つ考えられるのは、宿主細胞のゲノム内に溶原化した状態にあるウイルス遺伝子が、赤潮の進行に伴う環境条件の変化等により誘導され、個体群としては同調的なウイルス発現を示すという可能性である。これを「溶原化説」と呼ぶことにする。この考え方に従えば、赤潮の崩壊は *H. akashiwo* 個体群自らの高密度な増殖により生じた「自発的の死滅」であると解釈できる。同一の、あるいは近しいウイルスが溶原化した宿主細胞にはウイルスは感染しないというフェージの一般的性質（免疫性）<sup>5)</sup> から考えれば、放出されたウイルスが周囲の（同一個体群中の）細胞に対して感染しないということも説明できる

かもしれない。ウイルスが分離されれば、ハイブリダイゼーションによる溶原化の有無を特定できるのだが、現在はまだウイルスが分離されていない。ウイルスの分離が急務であることはいうまでもない。

「感染説」か「溶原化説」か。現在、筆者の所属する研究室では、両仮説に基づくアプローチを進めている。しかしながら、放出されたウイルスの果たす役割の生物学的意義を知るという大きなテーマがその先に待っている。

## 5. おわりに

一般にウイルスの宿主特異性は高く、宿主以外の生物に対しての感染はきわめて例外的な事象として扱われている。赤潮防除のためのツールとしての応用を考える場合、この性質は重要である。生態系に与える影響を最小限に抑えながら、ターゲットである赤潮生物を駆除することこそが、現場で用いられる人為的な赤潮対策としてまず要求されるからである。現場に端を発したこの研究が、ラボを介して、もう一度現場にフィードバックされるのはいつのことだろうか。

## 文 献

- 1) Honjo, T. (1993) In "Toxic Phytoplankton Blooms (eds. by Smayda, T. J. and Shimizu, Y.)", Elsevier, New York, pp. 33-41
- 2) Nagasaki, K. *et al.* (1994) *Mar. Biol.*, 119 : 307-312
- 3) Honjo, T. *et al.* (1978) *Bull. Plankton Soc. Japan*, 25 : 7-12
- 4) Nagasaki, K. *et al.* (1994) *J. Plankton Res.*, 16 : 1595-1599
- 5) 松代愛三 (1975) 溶原性, UP BIOLOGY, 東京大学出版会, pp.10-12

## 国内情報

## 始原生殖細胞の移植による生殖系列キメラニワトリの作出

農林水産省 畜産試験場 育種資源研究室

内藤 充

発生に伴い卵子や精子に分化する細胞である始原生殖細胞の移植により、注入したドナー細胞由来の個体を高率に生産する生殖系列キメラニワトリの作製法を開発した。また、始原生殖細胞の凍結保存法を開発し、生殖系列キメラニワトリを介して、凍結保存した始原生殖細胞由来の個体を作成することにも成功した。これらの技術は、トランスジェニックニワトリの作製や、鳥類の遺伝資源の保存法の開発に応用可能である。

ープの成果を中心に概説する。

## 1. はじめに

鳥類の胚操作研究は、受精卵（胚）の体外培養法の開発<sup>1)</sup>を契機として、新たな進展を見せている。特に、操作胚を高率に孵化させることが可能となった<sup>2)</sup>ことから、胚操作の結果を個体レベルで解析できるようになり、発生学のみならず、畜産の分野においてもその利用価値が大いに高まることとなった<sup>3)</sup>。

キメラとは1個体の中で遺伝的に異なった細胞が共存する状態を言い、生殖細胞がキメラになった個体を生殖系列キメラ (germline chimera) と呼んでいる。生殖系列キメラからは、ドナー細胞あるいはレシピエント細胞由来の配偶子（精子あるいは卵子）が両者の遺伝子が混在することなしに産出されることになる。したがって、ドナー細胞に何らかの操作を加えておけば、その操作されたドナー細胞由来の個体を作成することになる。

最近になって、鳥類の始原生殖細胞を扱う技術が開発され<sup>4)</sup>、生殖系列キメラの作製や生殖細胞の凍結保存技術の開発が可能段階になってきた。ここでは、体外に取り出したニワトリ始原生殖細胞を生殖系列キメラニワトリを介して個体に再構築する技術の開発と、始原生殖細胞の利用による鳥類遺伝資源の保存法の開発について、筆者らの共同研究グル

## 2. 始原生殖細胞の移植

始原生殖細胞は、発生に伴い精子や卵子に分化する細胞であり、一般に胚体外に発生した後に動物種により異なる様々な移動経路を通り、生殖隆起に到達するという性質を有している。鳥類では始原生殖細胞は胚盤葉上層が起源であるが、ニワトリにおいては孵卵18時間頃<sup>5)</sup>の原条期には生殖三日月環と呼ばれる部位の胚盤葉下層に移動し、その後血管系の発達に伴い血流中を循環し、孵卵の3日目頃までに生殖隆起に到達する<sup>5)</sup>。その後、生殖巣の中で発生を続け、孵卵の17日目頃に生殖細胞数はピークに達した後、急激に減少する。そして、孵化後個体の中で精子や卵子へと分化する。特に、鳥類では始原生殖細胞が生殖隆起に到達する前に一時的に血流中を循環する性質があるため、哺乳動物に比べ移植の操作を格段に行い易いという利点を備えている。

始原生殖細胞の移植による生殖系列キメラの作製については、これまでウズラでは注入細胞の後代への伝達<sup>6)</sup>が確認されていたが、最近、筆者ら<sup>6,7)</sup>の共同研究グループではニワトリにおいて、注入した始原生殖細胞由来の個体を効率的に生産する生殖系列キメラの作製に成功した。その方法は以下のとおりである（図1）。ドナー細胞由来の個体とレシピエント細胞由来の個体を区別するために、羽

NAITO Mitsuru

色の異なる2種類のニワトリ受精卵を用意する。ドナーとなる始原生殖細胞は、孵卵約53時間の初期胚（ステージ13-15）<sup>8)</sup>の血液より濃度勾配遠心分離法<sup>4)</sup>により血球細胞から分離する。この始原生殖細胞をレシピエントとなる初期胚（ステージ14-15）の血流中に注入し、その後胚発生を進め孵化させる。この時、体外培養法を用いると始原生殖細胞の移植の操作が行い易くなる。卵殻に小さな窓を開けて操作することも可能である。実際に、白色レグホーン種とロードアイランドレッド種を用いて、ドナー胚の血液より分離した始原生殖細胞100個をレシピエント胚に移植して作製した生殖系列キメラからは、ドナー細胞由来の個体が最高11.8%の割合で得られた。さらに、白色レグホーン種と横斑プリマスロック種を用いた実験から、レシピエント胚からあらかじめ血液を除去（4-10 $\mu$ l）して始原

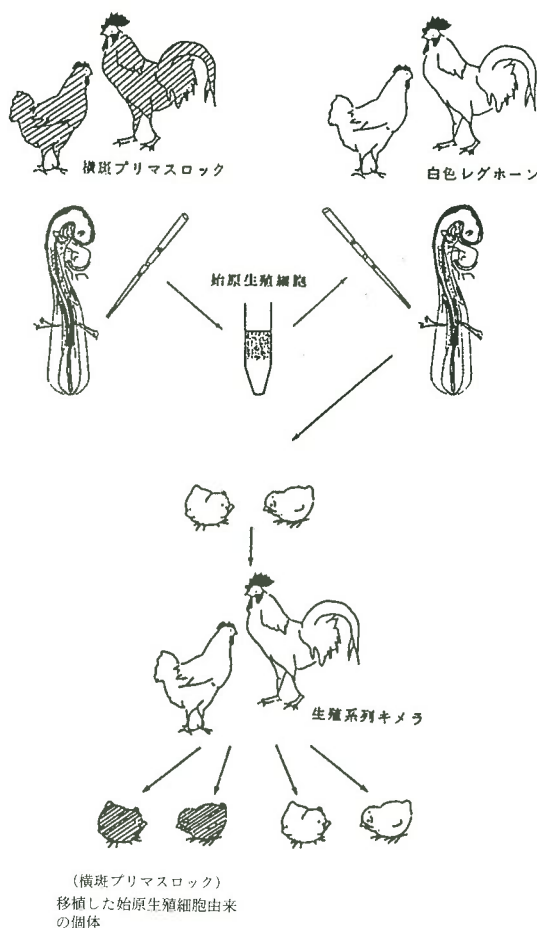


図1 始原生殖細胞の移植による生殖系列キメラニワトリの作製

表1 横斑プリマスロック種の始原生殖細胞200個をあらかじめ血液を一部抜いた白色レグホーン種の初期胚に注入して作製した生殖系列キメラの後代検定

鶏番号	検定期間(週)	検定雛数	黒色雛数	黒色雛の割合(%)	黒色雛(♂:♀)
♂8237	25	255	50	19.6	22:24
8238	16	180	55	30.6	24:24
8240	42	376	80	21.3	42:35
8245	56	644	298	46.3	143:126
8246	37	483	47	9.7	22:21
8250	32	404	49	12.1	24:23
♀8236	49	268	0	0.0	0:0
8241	51	199	4	2.0	3:1
8244	51	284	32	11.3	10:22
8248	48	282	26	9.2	11:15
8251	48	240	5	2.1	2:3

表2 白色レグホーン種の始原生殖細胞200個をあらかじめ血液を一部抜いた横斑プリマスロック種の初期胚に注入して作製した生殖系列キメラの後代検定

鶏番号	検定期間(週)	検定雛数	白色雛数	白色雛の割合(%)	白色雛(♂:♀)
♂8244	9	70	57	81.4	26:29
8226	68	820	631	77.3	313:293
8229	8	68	57	83.8	24:32
♀8231	64	239	229	95.8	118:98

生殖細胞数を減少させたところに、ドナーとなる始原生殖細胞200個を注入したところ、生殖系列キメラにおける生殖細胞の置き換え率を上げることができた（表1、表2、図2）。特に、白色レグホーン種から横斑プリマスロック種へ始原生殖細胞を移植した場合、その逆の組み合わせの場合に比べ、作製されたキメラ個体からドナー細胞由来の個体が著しく高い効率で得られることが明らかとなった。この理由として考えられることは、両品種の産卵性の差に見られるように、レシピエント胚における白色レグホーン種の生殖細胞の増殖が横斑プリマスロック種のそれを上回っていたことによるのではないかと推測される。その結果、個体によっては得られた後代の大半がドナー細胞由来となった例が観察された（表2）。

始原生殖細胞の移植では、ドナー細胞は複数の胚より採取するため、雄と雌の両者の始



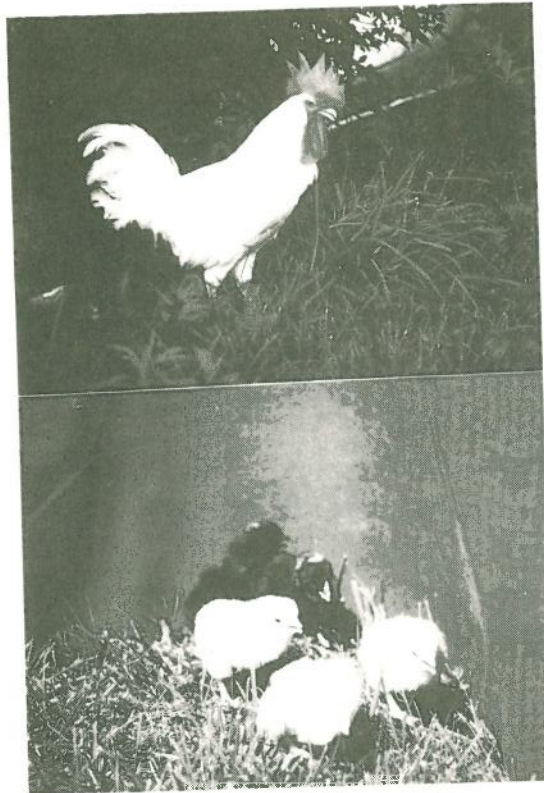


図2 始原生殖細胞の移植により作製した生殖系列キメラニワトリ（上）とその後代（下）

原生殖細胞をレシピエント胚に注入することになる。したがって、約半数のドナー細胞はレシピエント胚と性が異なることになる。この際、異性胚に移植された始原生殖細胞が正常に精子あるいは卵子に分化できるのか、特にW染色体を持つ精子ができるのかどうかは興味ある問題である。すべてのドナー細胞がレシピエント胚の中で正常に卵子や精子に分化した場合、ドナー細胞由来の個体の雄と雌の比率は雄キメラからは3:4、雌キメラからは3:1の割合で得られるはずである。実際に、キメラ個体より得られた移植した始原生殖細胞由来の個体の性を調べた結果、雄キメラ、雌キメラともその後代での性比の偏りは観察されなかった。したがって、異性胚に移植された始原生殖細胞が正常な配偶子に分化する可能性は極めて小さいと考えられる。一方で、雄胚に導入された雌の胚盤葉細胞の消長をW染色体特異的配列をプローブとして調べたところ、注入した雌の胚盤葉細胞由来の細胞は、キメラ個体が成熟するまでにほとんど消失してしまったことが報告されてい

る<sup>9)</sup>。

始原生殖細胞の移植では、移植に用いる品種の組み合わせにより生殖系列のキメラ率が影響されるものの、注入した始原生殖細胞が確実に生殖系列に取り込まれ後代に伝達されることから、その利用価値は極めて高いと言える。

### 3. 始原生殖細胞の凍結保存

ニワトリの始原生殖細胞の凍結保存は、胚操作研究上極めて有用な技術になるとともに、受精卵が多量の卵黄を含むために卵子あるいは受精卵の凍結保存が不可能である鳥類の遺伝資源の保存に応用することが可能となる。ニワトリの精液の凍結保存については既に実用レベルに達している。

筆者ら<sup>10)</sup>の共同研究グループは、ニワトリ初期胚の血液から分離した始原生殖細胞を液体窒素中で凍結保存し、融解後異なる品種の初期胚に移植して生殖系列キメラを作製し後代を生産して、凍結保存した始原生殖細胞由来の個体を生産することに成功した。その方法は次のとおりである。ドナーとなる初期胚（ステージ13-15）より血液を集め、濃度勾配遠心分離法<sup>4)</sup>により始原生殖細胞を血球細胞より分離する。これを凍結保護剤として10% DMSOを含む培養液に浮遊させ、凍結用チューブに入れる。この際、十分な数の始原生殖細胞を採取することが困難なので、液量をできるだけ少なくして細胞密度を上げるようにする。この始原生殖細胞の浮遊液を-80°Cまで毎分1°Cの割合で温度を下げた後、液体窒素（-196°C）に入れ保存する。融解は液体窒素から取り出した凍結用チューブを4°Cの水に入れることにより行う。凍結融解した始原生殖細胞を培養液で洗浄した後、あらかじめ血液を一部抜いたレシピエント胚（ステージ14-15）の血流中に移植する。その後は培養により胚発生を進めて孵化させる。以上の方法を用いて、白色レグホーン種と横斑ブリマスロック種とを用いて、凍結保存した始原生殖細胞の移植を行った。液体窒素中に4

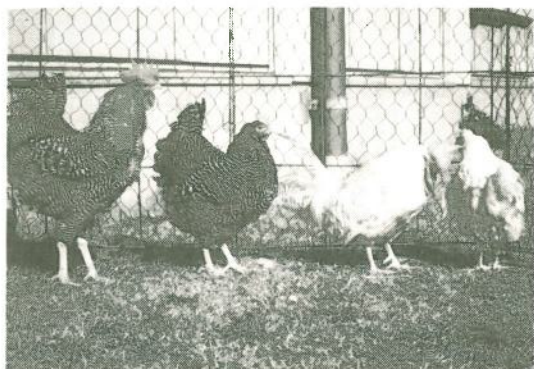


図3 凍結保存した横斑プリマスロック種の始原生殖細胞を白色レグホーン種の初期胚に移植して作製した生殖系列キメラニワトリ（白色レグホーン種、雄雌）とその交配により生まれた後代（横斑プリマスロック種、雄雌）

～5か月間保存した始原生殖細胞の生存率をトリパンプルー染色により調べたところ94.2%が生存しており、形態的に正常であった。この始原生殖細胞をレシピエント胚に移植して作製した生殖系列キメラから、凍結保存した始原生殖細胞由来の個体が作出された（図3）。これらの個体はいずれも正常な繁殖成績を示した。今後、始原生殖細胞の *in vitro* での培養、増殖技術が確立されれば、始原生殖細胞の凍結保存技術は鳥類の遺伝資源保存のための実用技術とすることができる。

#### 4. 今後の課題

始原生殖細胞の移植による生殖系列キメラニワトリの作製技術が開発されたことから、今後は始原生殖細胞の *in vitro* での操作技術の開発に研究の重点が移ることになるであろう。特に、外来遺伝子の導入によるトランスジェニックニワトリの作製のためには、始原生殖細胞への遺伝子導入法を開発する必要がある。しかし、始原生殖細胞に外来遺伝子を導入し発現させることは可能であるが、染色体に効率的に外来遺伝子を組み込ませることは現在ところ不可能である。そのためには、始原生殖細胞の *in vitro* での培養法を開発する必要があるが、現在のところ外来遺伝子の

導入に応用できる培養法は開発されていない。したがって、始原生殖細胞を利用したニワトリへの効率的な遺伝子導入法を開発するためには、今後この方面の研究に精力的に取り組む必要があると思われる。

ここで紹介した筆者らの研究成果は、田島淳史（筑波大学農林技術センター）、保田叔昭（熊本大学医学部）、桑名貴（環境庁国立水俣病研究センター）各博士との共同研究として行われたものである。

#### 参考文献

- 1) Perry, M. M. (1988) : *Nature*, 331 : 70-72
- 2) Naito, M., K. Nirasawa and T. Oishi (1990) *J. Exp. Zool.*, 254 : 322-326
- 3) Naito, M. (1993) Proc. 10th AVIAGEN Symposium, Ed. Gavora, J. S., p.41-47
- 4) Yasuda, Y., A. Tajima, T. Fujimoto and T. Kuwana (1992) *J. Reprod. Fert.*, 96 : 521-528
- 5) Kuwana, T. (1993) *Dev. Growth Diff.*, 35 : 237-243
- 6) Tajima, A., M. Naito, Y. Yasuda and T. Kuwana (1993) *Theriogenology*, 40 : 509-519
- 7) Naito, M., A. Tajima, Y. Yasuda and T. Kuwana (1994) *Mol. Reprod. Dev.*, 38 : 153-161
- 8) Hamburger, V. and H. L. Hamilton (1951) *J. Morphol.*, 88 : 49-92
- 9) Shaw, D. L., R. S. Carsience, R. J. Etches and A. M. Verrinder Gibbins (1992) *Biochem. Cell Biol.*, 70 : 1218-1229
- 10) Naito, M., A. Tajima, T. Tagami, Y. Yasuda and T. Kuwana (1994) *J. Reprod. Fert.*, 102 : 321-325

## 国内情報

# グルタミン合成酵素のトランジットペプチドを用いた葉緑体へのタンパク質の移送

植物工学研究所, \*三菱化学横浜総合研究所

早川孝彦・\*中島直香・\*小野明美

葉緑体を遺伝子工学の手法を用いて改良し、より活性化させることにより、植物体の高機能化を目指した。まず、グルタミン合成酵素のトランジットペプチドを用いて、効率的に外来遺伝子を葉緑体へ移送する系の確立を図った。次に、形質転換イネを用いて、植物体で外来遺伝子が葉緑体へ移送されることを確認した。光合成機能やストレス下での抵抗性能の向上等、今後、その応用が大いに期待される。

## 1. はじめに

葉緑体は光合成の中核であり、炭酸同化の他、窒素や硫黄の同化、アミノ酸や脂質の生合成も司っている。葉緑体を遺伝子工学の手法を用いて改良し、より活性化させることは、植物細胞、ひいては植物体全体の高機能化につながると考えられる。1994年3月に開催された植物バイオテクノロジー予測ワークショップ（英国科学技術開発センター主催）では、最も市場性の高い技術または応用分野に光合成効率の改良が挙げられており、葉緑体改変に対する期待は大きい<sup>1)</sup>。

葉緑体の改変には、二つの方法がある。一つは、葉緑体を直接形質転換する方法である。最近、葉緑体が原核生物型のタンパク質合成系を持つことを利用して、細菌由来のBT毒素遺伝子をタバコの葉緑体ゲノムに導入し、葉緑体中で高発現させたことが報告された<sup>2)</sup>。その着眼点の良さには敬服させられるばかりだが、パーティクルガンを利用した葉緑体の形質転換は、タバコ以外の植物ではまだ成功していない。もう一つは、トランジットペプチドを持つキメラタンパク質を細胞質で発現させた後、葉緑体へ移送する方法である。これまでに、除草剤耐性の性質を植物に付与するなどの報告<sup>3)</sup>があるが、穀物等の単子葉植物での応用例は見当たらない。私たちは、イ

ネ由来のグルタミン合成酵素 (GS) のトランジットペプチド (TP) を利用して有用タンパク質をイネ葉緑体へ移送することにより葉緑体の改良を試みた。

## 2. *in vitro* での葉緑体へのタンパク質の移送

TPを用いたタンパク質の移送実験において、効率的な移送にはTPに続く数十アミノ酸の成熟領域の配列が必要なが報告されている<sup>4,5)</sup>。そこで最初に、GSのTPの成熟領域の配列の必要性について検討した<sup>6)</sup>。GS（京都府立大学竹葉剛助教授より譲与）の成熟領域が1, 23および54アミノ酸残基含まれた長さのTP領域を酵母ミトコンドリア由来のマンガン型スーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD) 遺伝子上流につないだ。*in vitro* で mRNA 合成を行うため、これら3種類のキメラタンパク質を含むDNA断片をpBluescriptII KS+に挿入し、GSC~E-SODを構築した。さらに、SODのコーディング領域をpBI 221のβ-グルキュロニダーゼ (GUS) と交換しGSC~E-GUSを構築した。また、イネRuBisCOスモールサブユニットのTP（成熟領域22アミノ酸を含む）を持つRbcS-SODも構築した（図1）。

これらのベクターを鋳型として、RNAを合成した後、<sup>35</sup>Sメチオニンでラベルした長さの異なる3種類のプレカーサータンパク質を得た。移送実験は、Mishkindら<sup>7)</sup>の方法に従い、ハウレンソウの無傷葉緑体を用いて

HAYAKAWA Takahiko, NAKAJIMA Naoka,  
ONO Akemi



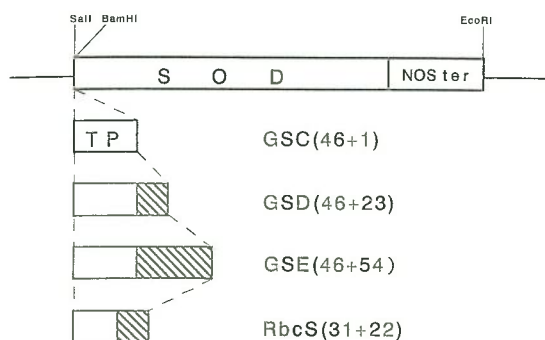


図1 *in vitro*での翻訳に用いたトランジットペプチドを持つSOD遺伝子の構造  
斜線部は、GSの成熟領域に由来する配列。括弧内はTPと成熟領域のアミノ酸の数を示す。

行った。この時点でイネの無傷葉緑体を用いることを検討したが、イネの無傷葉緑体の単離は容易でなく、最終的には、ホウレンソウの無傷葉緑体を利用した。

図2にGSC~E-SOD, RbcS-SODのキメラタンパク質の*in vitro*での移送実験の結果を示す。GSC-SOD, GSD-SOD, RbcS-SODでは、ストロマ画分(s)に移送されたSODのバンドが認められるが、GSE-SODでは、認められなかった。成熟領域の配列が長くなりすぎ、2次構造が膜透過に適さない形になったと考えられる。また、チラコイド膜(t)まで移送されるタンパク質は認められなかった。SODは、分子量24kDaの比較的小さいタンパク質である。そこで、分子量の異なるGUS(約68kDa)を用いて同様の実験を行ったところ、成熟領域を含まない形のGSC-GUSでもストロマへの移送が確認され、分子量の違いによる差は見られなかった。これらの実験結果から、GSのTPを利用した移送では、成熟領域の配列が必ずしも必要でないことが推察された。GSC型のTPのように、余分のアミノ酸配列が少ないTPを利用



図2 SODタンパク質の*in vitro*での葉緑体への移送  
-: 翻訳産物, s: ストロマ画分, t: チラコイド膜画分  
-mRNAは、mRNAを添加せず翻訳合成させた対照区を示す

することは、活性を保持したままタンパク質を葉緑体へ移送したい場合に有利であろう。

### 3. *in vivo*での葉緑体へのタンパク質の移送

次に、上述のキメラタンパク質が効率的に葉緑体へ移送されているかを形質転換イネを用いて調べた。図3に示す3種類のベクターを用いてエレクトロポレーション法により形質転換イネを得た。前述したようにイネの葉より無傷葉緑体を単離することはたいへん困難であるが、以下の方法により、少量の無傷葉緑体と考えられる画分を単離した。この画分のGUS活性を、シグナルペプチドを持つGUSおよび、シグナルペプチドを持たないGUSを発現している形質転換植物で比較した。

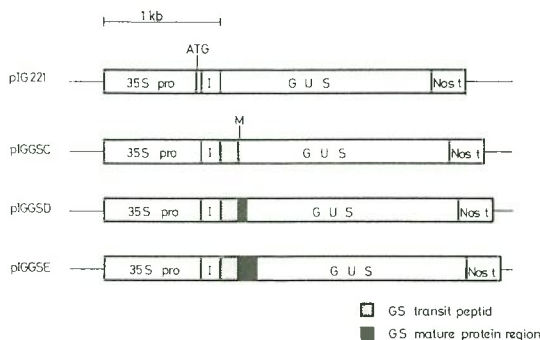


図3 イネ形質転換用ベクターの構造  
35S pro: CaMVの35Sプロモーター, i: ヒマカラゼ由来のイントロン, Nos t: ノバリン合成酵素のターミネーター

形質転換イネの自殖後代より得た比較的若い葉を、氷冷した330mMソルビトールを含むHEPES緩衝液中で千切りにした。細胞質成分が滲出した緩衝液を、エッペンドルフチューブ中に入れた等張のHEPES緩衝液を含む40%パーコールに素早く重層し、4°Cで10,000rpm、5分間遠心した。この操作を数回繰り返して、得た沈澱物を葉緑体画分とした。単離した葉緑体画分および、形質転換体の葉についてGUS活性測定およびタンパク質の定量を行い、比活性を求めた(図4)。

その結果、シグナルペプチドを持たないGUSを発現している形質転換体では、葉緑体画分の比活性が、全体の活性に対し60%程

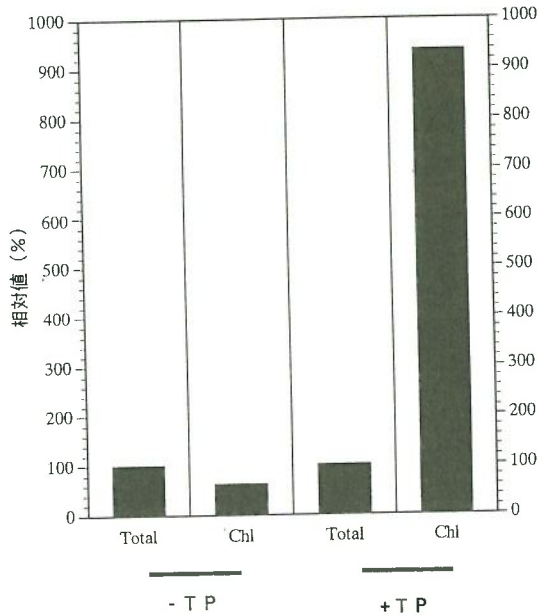


図4 形質転換イネの葉緑体中のGUS活性  
 全葉(Total)を100%とした時の葉緑体画分(Chl)の割合を示す  
 -TP: TPを持たないGUSを発現している形質転換イネ  
 +TP: TP (pIGGSD)を持つGUSを発現している形質転換イネ

度に低下していた。これに対し、シグナルペプチドをもつGUSを発現している形質転換体では、葉緑体画分での比活性が約10倍に増加した。葉緑体画分でGUSの比活性が上昇したことは、シグナルをもつ場合、葉緑体にGUSタンパク質が移送され、濃縮されたことを示唆している。このような系で、シグナルの長さによる移送効率等を、そのGUS活性の濃縮の度合いから推し量ることも可能であり、今後、さらに比較検討していきたいと考えている。しかし、こうして得られた葉緑体画分の intactness については明確ではなく、今後は、intactness や再現性も確認する必要がある。

さらに、林らは、GSC型のSOD発現ベクターを用いて形質転換イネを作出した(林ら:投稿準備中)。この形質転換イネは、活性酸素に対して強い抵抗性を示したが、免疫電顕の観察から、葉緑体にMn-SODが効率

的に移送されていることが確認された。この結果は、GSのTPが有効に機能していることをより直接的に示した。

#### 4. おわりに

最近Ogawaら<sup>8)</sup>は、免疫電顕の観察から、ホウレンソウ葉緑体中のSODの70%以上がチラコイド膜から5nm以内に存在することを示した。このことは、目的タンパク質を単に葉緑体のストロマへ移送するだけでなく、ストロマ内での局在化にも配慮する必要があることを示唆した。今後、より効率的な葉緑体の改良を目指して、目的タンパク質の活性を保持しながらタンパク工学的に表面荷電を変え膜に結合させたり、チラコイド膜貫通ドメインを利用して、膜結合型のキメラタンパク質を合成させたりする試みも重要な課題となるであろう。本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構からの再委託研究「植物機能利用に関する調査研究」として行われた。

#### 文 献

- 1) 山口彦之 (1995) 研究ジャーナル, 18: 35-41
- 2) McBride, K. E. *et al.* (1995) *Bio/Technology*, 13: 362-365
- 3) Cashmore A. *et al.* (1985) *Bio/Technology*, 3: 803-808
- 4) Gavel, Y. and G. von Heijne (1990) *FEBS Lett.*, 261: 455-458
- 5) Lubben, T. H. and K. Keegstra (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 5502-5506
- 6) 早川孝彦・中島直香 (1995) 日本農芸化学会誌, 69: 565-567
- 7) Mishkind, M. L. *et al.* (1987) *Methods in Enz.*, 148: 274-294
- 8) Ogawa, K. *et al.* (1995) *Plant Cell Physiol.*, 36: 565-573

## サケ・マス類異質三倍体による IHN 抗病性魚の作出

北海道立水産孵化場  
佐々木義隆・鈴木邦夫

サケ・マス類10魚種を用いて5種類の浮上魚と6種類の孵出仔魚からなる異質二倍体および4種類の浮上魚と9種類の孵出仔魚からなる異質三倍体が得られた。浮上魚に対してサクラマスから分離したIHNウイルス株を接種し、生残率から抗病性を比較した。IHNウイルスに対して抗病性の低いサクラマスおよびヒメマスは、抗病性の高いサケ、カラフトマスおよびオショロコマとの交雑により抗病性が高まる傾向を示し、とくにサクラマスとカラフトマスの交雑魚では、カラフトマスのゲノム比が大きいほど抗病性が高まる傾向がみられた。

### 1. はじめに

異種間、異属間の交雑は、雑種強勢や両方の有利な特性を有する種の作出を目的に行われ、サケ・マス類では二倍体雑種の作出が試みられているが、生残性、成長、妊性等の問題で産業種としては普及していない<sup>1)</sup>。近年、染色体操作による倍数比技術の育種への導入が試みられ、二倍体雑種(異質二倍体)では生存性を持たないが、異種精子の媒精直後に加圧処理あるいは加温処理によって第2極体の放出を阻止し、母系ゲノム2組と父系ゲノム1組を有する三倍体雑種(異質三倍体)とすることで生存性を回復するケースが報告され<sup>2,3)</sup>、高成長性や抗病性を持つ優良種を作出する有効な手段であると考えられる。

IHN (Infectious hematopoietic necrosis: 伝染性造血器壊死症) はサケ・マス類に対する病毒性が強く、現在ワクチンも薬剤も無いことから増殖事業や養殖において問題となっている伝染性ウイルス感染症の一つである<sup>4)</sup>。サケ・マス類の異質二倍体および異質三倍体におけるIHNに対する抗病性に関する研究は少なく、検討された魚種も限られている<sup>5,6,7)</sup>。著者らは抗病性の高い魚の作出を目的に種々の異質二倍体および異質三倍

体の作出を試み、IHN 抗病性について検討を行った。

### 2. 交雑の組み合わせと生残性

異質二倍体および異質三倍体の作出には、シロサケ、カラフトマス、ギンザケ、サクラマス、ヒメマス、マスノスケ、ニジマス、大西洋サケ、オショロコマおよびイトウの10魚種を用い、各18種類の作出を試みた(表-1)。成熟時期の異なる組み合わせについてはドライアイスペレット法を用いて、精子をペレット状に凍結し、解凍後、受精に用いた。

異質二倍体の作出には通常の乾導法を用い、異質三倍体作出における倍加処理には加温処理法(20°C 5分の前処理の後に魚種ごとに25°Cから29°Cの温水に20分から25分の浸漬処理)あるいは加圧処理法(700気圧6分間の処理)を用いた。

異質二倍体では、サクラマス雌×オショロコマ雄、サクラマス雌×カラフトマス雄、サケ雌×ヒメマス雄、カラフトマス雌×ヒメマス雄、カラフトマス雌×サクラマス雄の5種類で浮上魚が得られ、カラフトマス雌×マスノスケ雄、ニジマス雌×カラフトマス雄、ニジマス雌×サクラマス雄、ニジマス雌×マスノスケ雄、ニジマス雌×大西洋サケ雄、ニジマス雌×オショロコマ雄の6種類で孵出仔魚が得られた。



表-1 異質二倍体および異質三倍体の生残性

魚種		異質二倍体			異質三倍体			倍加処理条件	
雌	雄	発眼	孵出	浮上	発眼	孵出	浮上	吸水条件	倍加処理
サクラマス	オショロコマ	○	○	○	○	○	○	5分	20°C5分・27°C20分
	カラフトマス	○	○	○	○	○	○	8.9°C5分	20°C5分・27°C20分
	サケ	×			○	×		8.9°C5分	20°C5分・27°C20分
サケ	ヒメマス	○	○	○	×			5分	20°C5分・29°C20分
カラフトマス	ヒメマス	○		○	○	○	○	9.2°C5分	20°C5分・28°C20分
	サクラマス	○	○	○	○	○	○	9.2°C5分	20°C5分・28°C20分
	ギンザケ*	○	×		○	×		9.5°C15分	700気圧6分
	マス/サケ*	○	○		○	○		9.5°C15分	700気圧6分
	ニジマス*	×			○	×		9.5°C15分	700気圧6分
	大西洋サケ*	×			○	×		9.5°C15分	700気圧6分
	イトウ*	×			○	○		9.5°C15分	700気圧6分
	オショロコマ*	○	○		○	○		8.0°C6分	20°C5分・25°C25分
ニジマス	カラフトマス*	○	○		○	○		8.0°C6分	20°C5分・25°C25分
	サクラマス*	○	○		○	○		8.0°C6分	20°C5分・25°C25分
	ヒメマス*	×			○	○		8.0°C6分	20°C5分・25°C25分
	マス/サケ*	○	○		○	○		8.0°C6分	20°C5分・25°C25分
	大西洋サケ*	○	○		○	○		8.0°C6分	20°C5分・25°C25分
	イトウ*	○	×		○	○		8.0°C6分	20°C5分・25°C25分
	オショロコマ*	○	○		○	○		8.0°C6分	20°C5分・25°C25分

備考；\*は凍結保存精子使用を示す。

異質三倍体は、サクラマス雌×オショロコマ雄，サクラマス雌×カラフトマス雄，カラフトマス雌×ヒメマス雄，カラフトマス雌×サクラマス雄の4種類で浮上魚が得られ，カラフトマス雌×マスノスケ雄，カラフトマス雌×イトウ雄，ニジマス雌×カラフトマス雄，ニジマス雌×サクラマス雄，ニジマス雌×ヒメマス雄，ニジマス雌×マスノスケ雄，ニジマス雌×大西洋サケ雄，ニジマス雌×イトウ雄，ニジマス雌×オショロコマ雄の9種類で孵出仔魚が得られた。

### 3. 倍数性の確認

赤血球は扁平な細胞であり核の面積はDNA量に近似することから，赤血球の核面

積を測定し，対照魚の赤血球核面積の数値を基に，異質二倍体および異質三倍体のゲノム比から理論値と実測値の比較を行い倍数性の確認を行った（表-2）。ニジマス雌×オショロコマ雄，ニジマス雌×マスノスケ雄異質三倍体の赤血球核面積は理論値に近く，染色体が倍加されたことが示唆された。

また，核の中の仁（核小体）の最大数は種によって決まっており，倍数性に比例することから，鱭を試料に Phillips *et al.* (1986)<sup>8)</sup>の方法により仁染色標本を作製し，細胞核内の仁の最大数から倍数性の判定を行ったところ，サクラマス雌×オショロコマ雄，サクラマス雌×カラフトマス雄，カラフトマス雌×ヒメマス雄，カラフトマス雌×サクラマス雄異質三倍体で77~100%の倍加率を示した

表-2 対照魚，異質二倍体および異質三倍体における赤血球核面積の比較

魚種		測定平均値		血球核面積の理論値		
雌	雄	血球核面積 ( $\mu\text{m}^2$ )	個体数	雌	雄	理論値 ( $\mu\text{m}^2$ )
(対照)						
	オショロコマ	24.0	3			
	ニジマス	19.7	3			
	マス/サケ	26.8	1			
(異質二倍体)						
	ニジマス マス/サケ	23.0	1	19.7/2	+ 26.8/2 =	23.3
(異質三倍体)						
	ニジマス オショロコマ	32.3	11	2×19.7/2	+ 24.0/2 =	31.7
	ニジマス マス/サケ	31.3	3	2×19.7/2	+ 26.8/2 =	33.1

表-3 細胞核の仁の最大数による異質三倍体の倍加率判定結果

魚種		倍加率 (%)	倍加個体数	
雌	雄		総個体数	
サクラマス	オショロコマ	83	5	6
	カラフトマス	93	13	14
カラフトマス	ヒメマス	100	16	16
	サクラマス	77	20	26

(表-3)。

4. IHN 抗病性の検討

交雑試験を行った18種類のうち、浮上魚の得られた異質二倍体5種、染色体の倍加が確認された異質三倍体4種および対照魚4種について、IHN に対する抗病性を検討した(表-4)。平均体重は1.0~4.8gの供試魚を50から100尾用い、IHN ウイルスのサクラマス大型魚分離株(H<sub>LM</sub>-1)を体重1g当たり、200PFU 腹腔内注射して30日間観察し、生残率を求めた。

対照魚では、サクラマスが1%、ヒメマスが4%と生残率は低かったが、サケは93%、カラフトマスは99%と高かった。異質二倍体では、カラフトマス雌×ヒメマス雄を除いて69%以上と高かった。異質三倍体では、カラフトマス雌×ヒメマス雄、サクラマス雌×カラフトマス雄を除いて50%以上であった。こ

れらのことから、IHN ウイルスに対して抗病性の低いサクラマスおよびヒメマスは抗病性の高いサケ、カラフトマスおよびオショロコマとの交雑により抗病性が高まると考えられた。

抗病性の増加は両親の中間となり、増加の程度は魚種の組み合わせにより異なっていた。すなわち、異質二倍体サクラマス雌×カラフトマス雄、カラフトマス雌×サクラマス雄、サケ雌×ヒメマス雄では生残率がそれぞれ69%、78%、82%となり抗病性が著しく増加したのに対して、カラフトマス雌×ヒメマス雄では0%となり抗病性の増加は全く認められなかった。

とくに、サクラマスとカラフトマスの交雑魚では、カラフトマスのゲノム比が大きいほど抗病性が高まる傾向がみられた。すなわち、生残率をみると、サクラマスが最も低く(1%)、つぎにサクラマス雌×カラフトマス雄異質三倍体であり(17%)、カラフトマス雌×サクラマス雄異質三倍体、サクラマス雌×カラフトマス雄およびカラフトマス雌×サクラマス雄異質二倍体が続き(67%~78%)、カラフトマスが最も高かった(99%)。

なお、死亡魚および生残魚からウイルス分離を行ったところ、生残率の低い魚種では死亡魚のほとんどからIHN ウイルスが分離さ

表-4 IHN ウイルス抗病性試験

魚種		供試尾数	平均体重 (g)	生残率 (%)	ウイルス分離 (陽性尾数/検査尾数)		補体活性 (SH <sub>50</sub> )
雌	雄				死亡魚	生残魚	
(対照)							
サクラマス		100	2.5	1	6/6		
ヒメマス		100	3.8	4	6/6		
サケ		100	4.8	93		0/9	64
カラフトマス		100	2.4	99		0/9	128
(異質二倍体)							
カラフトマス	ヒメマス	37	1.0	0	5/6		
サクラマス	カラフトマス	100	2.8	69		1/7	64
サクラマス	オショロコマ	72	2.8	72		0/5	16
カラフトマス	サクラマス	100	1.7	78		0/8	
サケ	ヒメマス	100	1.9	82		0/7	64
(異質三倍体)							
カラフトマス	ヒメマス	100	1.1	12	5/6		
サクラマス	カラフトマス	100	1.3	17	6/6		16
サクラマス	オショロコマ	100	2.5	50			64
カラフトマス	サクラマス	99	1.6	67		0/7	

れた。一方、生残率の高い魚種では生残魚のほとんどの個体からウイルスは分離されなかった。

次に、抗病性の機序を明らかにするために、IHN ウイルスに対する防御に関与していると考えられている補体活性を生残魚の血清について調べた<sup>9)</sup>。補体価 (SH<sub>50</sub>; 50% spontaneous hemolytic activity) として、キンギョ赤血球と二倍階段希釈した等量の血清を混合して20°Cで20時間培養後、50%以上の溶血をした血清の最大希釈率を求めた。補体価は、生残率の高い魚種では64ないし128の高い値を示した。このことにより交雑魚の高い抗病性に補体が関与することが示唆された。

### 5. ゲノム比と抗病性

IHN ウイルスに対する抗病性の程度はゲノム比に対応する傾向がみられたことから、サクラマスとカラフトマスの異質二倍体と異質三倍体について、アイソザイム分析を行った。筋肉を試料とし、酵素はMDHを用いた(図-1)。サクラマスではaの位置、カラフトマスでcの位置に濃いバンドが形成さ

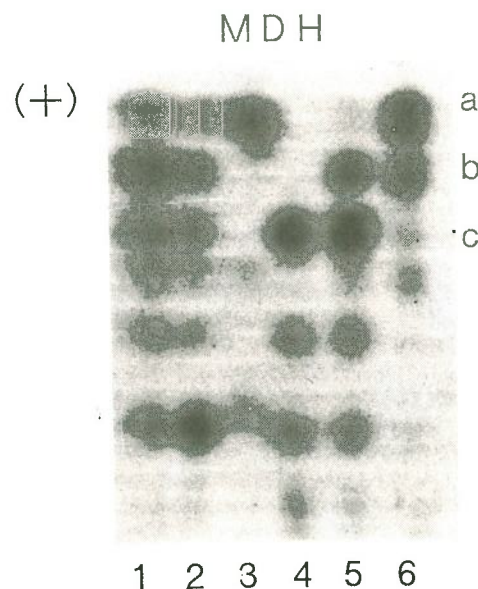


図1 筋肉から検出されたMDHアイソザイム  
1: カラフトマス雌×サクラマス雄異質二倍体  
2: サクラマス雌×カラフトマス雄異質二倍体  
3: サクラマス  
4: カラフトマス  
5: カラフトマス雌×サクラマス雄異質三倍体  
6: サクラマス雌×カラフトマス雄異質三倍体

れた。異質二倍体は正逆交雑ともに、aとcの位置と中間の位置であるbにバンドが現れた。次に、異質三倍体ではカラフトマス雌×サクラマス雄ではa, b, cの位置に3本のバンドが現れるとともに、母系であるカラフトマスのcのバンドが濃く現れた。また、サクラマス雌×カラフトマス雄ではa, b, cの3本のバンドとともに母系であるサクラマスのaのバンドが濃く現れた。このことからIHN ウイルスに対する抗病性はゲノム比を反映した結果と考えられた。

### 6. おわりに

以上のように、サケ・マス類の交雑および染色体倍加操作によってIHN ウイルスに対する抗病性の高い養殖魚を作出できる可能性が示唆され、サクラマスとカラフトマスの交雑では抗病性がゲノム比に比例する可能性が示唆された。今後はニジマス雌を用いて作出した異質二倍体および異質三倍体についても抗病性試験を行い、抗病性を有し商品価値も高い養殖魚の作出を検討する予定である。

### 文 献

- 1) 佐藤良三 (1988) 養殖, 295: 76-79
- 2) Arai, K. (1988) *Nippon Suisan Gakkaishi*, 52: 1695-1701
- 3) 鈴木亮 編 (1989) 水産増養殖と染色体操作, 恒星社厚生閣
- 4) Wolf, K. (1988) *Fish viruses and fish viral diseases*, Cornell University Press, New York, USA.
- 5) Parsons, J. E., R. A. Busch, G. H. Thorgaard and P. D. Scheerer (1986) *Aquaculture*, 57: 337-343
- 6) Hedrick, R. P., S. E. LaPatra, J. L. Fryer, T. McDowell and W. H. Wingfield (1987) *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 7: 97-100
- 7) Dorson, M., B. Chevassus and C. Torhy (1991) *Dis. Aquat. Org.*, 11: 217-224
- 8) Philips, R. B., K. D. Zajicek, P. E. Ihssen and O. Johnson (1986) *Aquaculture*, 54: 313-319
- 9) Sakai, D. K. (1992) *Annual Rev. of Fish Diseases*, 1: 223-247



## ホンシメジの人工栽培

滋賀県森林センター

太田 明

これまでほとんどの菌根性きのこは人工栽培ができないとされてきたが、数年前、日本の代表的な菌根性きのこの1つであるホンシメジの栽培（純粹培養下で成熟した子実体を形成させる）ができるようになった。栽培行程は、現在行われているきのこ栽培とそれほど変わらず、培地容積あたりの発生量にもそんな色のないことから、実用栽培も可能と考えられる。また、室内でいつでも子実体を得ることができるので、菌根性きのこの遺伝学や生理学への寄与も期待される。

### 1. はじめに

わが国の森林には数千種のきのこが発生し、ざっとその半数が菌根性である。菌根性きのこ（菌根菌）は、生きた樹木の根に菌根と呼ばれる組織を形成し、それを經由して樹木の作った栄養を得て生活している。この中間のきのこには、日本で好まれるマツタケやホンシメジ、欧州で貴重とされるトリュフなど優れた食用菌が多くあるが、室内栽培されているものは全くない。ホンシメジという名で現在市販されているきのこも、正しくはブナシメジなどの菌根性でないきのこ（腐生性きのこ）である。

ところで、栽培とは植物を人工的に育てるということであるから、表題の人工栽培という言葉には屋上に屋を架けたような感があるが、ここでは、野外栽培とは異なった人工環境下での栽培というぐらいの意味に解していただきたい。

### 2. 菌根性きのこの生活

菌根性きのこも腐生性きのこも基本的な生活環は変わらない。きのこは通常菌糸の状態では生活しており、何らかの条件で子実体（人間が食用にする部分）を形成し、そこに胞子

を作る。胞子は発芽して菌糸になる。菌根菌を室内で扱う場合の共通の性質として、胞子が培地上でほとんど発芽しない、菌糸の成長が遅い、子実体の形成が難しいなどがあげられる。このうち胞子については、培地に微量の酪酸を加えることにより、一部の種の胞子を発芽させられるようになったが<sup>1)</sup>、残りの多くの種は未だ不可能である。菌糸の培養時の特徴としては、単糖類しか利用できないものがあること<sup>2)</sup>、腐朽菌に比べ、ミネラル類（特に鉄）を高濃度で要求すること<sup>3)</sup>、最適pHと最適温度が共にやや低いものが多いこと<sup>4)</sup>などである。

純粹培養下での子実体形成は、*Hebeloma*（アシナガヌメリの仲間）<sup>5)</sup>、*Laccaria*（キツネタケの仲間）<sup>6)</sup>、*Boletus*（ヤマドリタケの仲間）<sup>7,8)</sup>などのごく限られた種で成功しているだけである。それも、生きた植物が必要であったり、菌根性が疑わしかったりして、間違いなく菌根性であるきのこが寄主植物なしで栽培できるという報告は、これまでにはなかった。

### 3. ホンシメジの性質

菌根性きのこの多くは、それぞれ寄主となる樹木が科または属の単位で決まっているが、ホンシメジはマツにもコナラにもつくという面白い性質がある。滋賀県森林センターでは、各地の林業試験場からホンシメジの菌株を分



図1 人工栽培により発生したホンシメジ

譲いただき、それらの生理的性質を調査したところ、46系統すべてがわずかではあるが木材を利用する能力を持つことが分かった<sup>9)</sup>。また、その中の数系統は、ライ麦または大麦を主成分とする培地を用いると、図1のとおり、寄主のない純粋培養下で子実体を形成することが明らかになった。純粋培養によって得られた子実体は成熟した胞子を形成し、それらは発芽促進物質を加えた寒天培地上で発芽して菌糸体コロニーを形成した。すなわち、ホンシメジの生活環を寄主のない状態で達成することができた<sup>10)</sup>。さらにその後、培地に添加する栄養源を検討したところ(表1)、栽培期間が短縮され、発生量も著しく向上した。また、上記以外の系統でも子実体を形成することが分かった。

表-1 添加液の組成 (1l 当たり)

クエン酸	1 g
りん酸1カリウム	1 g
1N水酸化カリウム	10 ml
硫酸マグネシウム	1.5 g
塩化カルシウム	1 mg
アセチルアセトン	15 $\mu$ l
塩化第二鉄	100 mg
硫酸マンガン	0.3 mg
硫酸銅	15 mg
硫酸コバルト	3 mg
硫酸ニッケル	1 mg
硫酸亜鉛	10 mg
HEPES	0.7 g

びん詰め

大麦または裸麦とおがくずをびんに入れ、水または無機栄養を含んだ液(表1)を加えて(培地200mlのとき、80g: 5g: 135ml)、数時間後によく混ぜる。

中央に接種用の棒を立てる。

滅菌

定法により滅菌する。

接種

放冷後棒を抜き、種菌を接種する。

培養

20~23℃で菌糸が充分蔓延するまで培養する(通常、約70日)。

この間に、炭酸カルシウムで pH5~5.5 にした滅菌済みピートなどを培地上に加える。

発生

室温を15℃にする。約40日で収穫。

図2 ホンシメジの栽培方法

4. 栽培方法

実際の栽培方法を図2に示した。行程としては現在一般に行われている腐生性きのこの栽培とほとんど同じである。異なるのは、培地の主成分がおがくずではなく穀類であること、通常行われる菌かきと反対に培地表面を保護する被覆を行うことである。220mlの培地を用いて子実体形成の容易な系統を栽培した場合、1本あたり約22g(生重)の子実体が得られている。培地体積あたりの収量は他の栽培きのこと同等であることから、実用的な栽培も十分可能と考えられ、現在実証試

験中である。

### 5. おわりに

ホンシメジの人工栽培が可能となった背景には、①ホンシメジのでんぷん利用力が大きい。そのため、単糖しか利用できないきのこのように浸透圧を気にすることなく十分な炭水化物が与えられる。②菌根性でありながら、木材を利用する能力がある。このことは、木材腐朽菌が子実体を作りやすいことと関係する可能性がある。③自然界でも菌糸の繁殖力が大きく、菌根性きのこの中では扱いやすいことなどがある。これらの推測が正しいとすれば、同様の性質を持つ菌根性きのこは栽培ができる可能性が高いが、これら全てに正反対ともいえる性質を持つマツタケ等は、そう簡単に栽培できないということになる。

### 文 献

- 1) Ohta, A. (1988) *Trans. mycol. Soc. Japan*, 29 : 375-381
- 2) 川合正允・阿部重雄 (1976) 日菌報, 17 : 159-167
- 3) Ohta, A. (1990) *Trans. mycol. Soc. Japan*, 3 : 323-334
- 4) Harley, J. L. (1969) *The biology of mycorrhiza*, Leonard Hill, pp.78-79
- 5) Debaud, J. C. and G. Gay (1987) *New Phytologist*, 105 : 429-435
- 6) Kropp, B. R. and J. A. Fortin (1988) *Can. J. Bot.* 65 : 289-294
- 7) Modess, O. (1941) *Symb. Bot. Upsalien-ses*, 5 : 1-147
- 8) McLaughlin, D. J. (1964) *Mycologia*, 56 : 136-138
- 9) Ohta, A. (1994) *Mycoscience*, 35 : 83-87
- 10) Ohta, A. (1994) *Mycoscience*, 35 : 147-151





## 文献情報

## 「鉄仮説」の検証

## 植物プランクトンは地球の温暖化を防げるか？

世界の外洋の表層水の20%以上は、植物プランクトンにとって十分な光と栄養素（硝酸塩、燐酸塩、珪酸塩）を有するが、それに見合うだけの量の植物プランクトンは存在しない。高硝酸塩・低クロロフィル（HNLC）海域での植物プランクトンの増殖を制限している因子について活発に議論されており、このような海域において植物プランクトンの生産を高めれば、大気中に大量に存在する二酸化炭素を減らすことが可能となるという考えも話題の一つとなっている。

植物プランクトン増殖の制限因子としては、動物プランクトンによる捕食圧、上下拡散のため臨界深度以下まで運ばれることによる光制限などの説があげられているが、「鉄仮説」もその一つである。主要な栄養素や光など他の条件が整っていても、鉄分の不足により植物プランクトンの増殖が著しく阻害されるといふ「鉄仮説」は、J.H.Martinら（*Nature* 331: 341-343, 1988）によって提唱された。実験室レベルでは、鉄の量により植物プランクトンの増殖や光合成能が制限され、補給により回復する結果が得られており、外洋における植物プランクトンの生産制御を鉄により行えることが示唆されている。

本報において、J. H. Martinらは、外洋における実験、調査により「鉄仮説」を支持する結果を幾つか示している。彼らは、HNLC海域における植物プランクトンの増殖に与える鉄の影響を実際の外洋を利用した中規模の系により実験、調査を行うことで、生態系のモデルとして推定できると考えた。まず、太平洋の赤道域の約64km<sup>2</sup>にわたる海面に鉄を補給し、その海域における反応、変化を観察した。植物プランクトンにより生産されることが知られているDMSP（dimethylsulphoniopropionate）の増加が認められ

た。一次生産量は3～4倍、クロロフィル量は3倍、そして生物量もすべての種類の植物プランクトンにおいて増加が観察された。また、この同じ実験系において、光合成のエネルギー変換効率（Kolber, Z. *et al. Nature* 371: 145-149, 1994）と二酸化炭素の吸収量（Watson, A. J. *et al. Nature* 371: 143-145, 1994）も検討された。鉄の補給により光合成能は劇的に上昇し、実験室レベルの結果と同様に外洋域においても鉄の量が光合成能を制限していることが確認された。しかしながら、二酸化炭素の吸収量は、実験室レベルでの結果をふまえた予測を大幅に下回るものであった。また、ガラパゴス諸島付近の調査では、クロロフィルを大量に含んだ上昇流に鉄分が豊富であることを見出した。

J. W. de Baarら（*Nature* 375: 412-415, 1995）は、南極海の鉄分が多い海域で春に植物プランクトンの大量増殖と海中の二酸化炭素消費量の増加を確認した。同じ海域でも鉄分が少ないと増殖がないことから鉄分の供給量が決めてと考えられた。

化石燃料の消費に伴い、大気中への二酸化炭素の放出は増大し、温暖化という地球規模の問題になっている。そこで、新たな燃料の研究とともに、放出された二酸化炭素の減少を目指して植物を利用した研究が多方面で進められ、植物プランクトン（微細藻類）の利用もその一つである。外洋のような開放系の環境では、要因が非常に多いうえに、その環境に何かを補給する場合、その環境に与える影響は予想された変化、領域だけに及ぶとは限らず、計り知れないため注意が必要である。しかし、鉄の補給により海表面の二酸化炭素吸収が促進されれば、それは効率の良い方法と思われ、今後の調査、研究が待たれる。また、二酸化炭素を多く排出する施設からの排出量の減少を目的とした、閉鎖系の環境における植物プランクトンの利用研究も期待される。

（抄訳 大栗智昭 マルハ(株)中央研）

(OHGURI Tomoaki)

## Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean

Martin, J. H. *et al.*

*Nature* 371 : 123, 8 September 1994

### 文献情報

## *Ustilago maydis* における自己／非自己認識の分子メカニズム

*Ustilago maydis* (トウモロコシ黒穂病菌) は担子菌類に分類され、感染植物上で形成される2核菌糸上に担子器、担子胞子を形成する。この担子胞子から発芽した一次菌糸には感染性がなく、感染性を獲得するためには異株(非自己)との交配が必要となる。糸状菌において性の二型性は一般的ではなく複対立的であり、自己と非自己を識別するため、すなわち selfing を防ぐために複雑な認識機構を発達させている場合がある。*U. maydis* の場合、交配を支配する自己・非自己認識系には、互いに連鎖していない2つの locus (a, b) が関与している。a locus はフェロモン様の認識系を支配し菌糸融合に作用するが、b locus は複対立的で融合後の細胞内で自己・非自己の識別に関与する。また b locus にはそれぞれ異なる homeodomain motif をもつ bE (HD1), bW (HD2) という遺伝子があり、自然界では33の対立形質が認められているため、bE, bW はそれぞれ異なる33個 (bE1~33, bW1~33) が存在すると考えられる。これまでに、異なる株由来の bE, bW タンパク質は非自己を認識してヘテロダイマーを形成し (bE1-bW2, または bE2-bW1 など)、それ以降の形態形成を活性化する転写因子となる、というモデルが考えられている。

Kämper らはこのモデルを実証するために、ヘテロダイマー形成を *S. cerevisiae* の two-hybrid system を用いて実証しようと試みた。Two-hybrid system とは酵母の GAL4 タンパク質を利用し、2種のタンパク質の相互

作用の有無を  $\beta$ -ガラクトシダーゼによる呈色反応によって判別する極めて高感度な検定法である。まず bE1-bW1, bE2-bW2 の組み合わせ、すなわち自己の組み合わせで行ったところ  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は得られなかった ( $\leq 0.02$ )。これに反して bE1-bW2, bE2-bW1 の非自己の組み合わせで試験したときにのみ高い活性が得られ (119 および 60.9)、実際にヘテロダイマーを形成していることが初めて明らかにされた。またダイマー形成と中央よりややN末端側に存在するホメオドメインとの関係を明らかにするため、bE (全長 473a.a.), bW (645a.a.) のC末端を欠失したタンパク質を用いてダイマー形成能をみたところ、各タンパク質のN末端側約 1/3 (bE:1-136a.a., bW:1-186a.a.) だけでも十分な活性量が得られており、さらに欠失の程度を大きくするに伴いダイマー形成能は徐々に低下したことから、bE-bW ヘテロダイマー形成においてホメオドメインを含まないN末端領域で非自己を認識しあうことが明らかとなった。

さらに著者らは bE2 遺伝子の N 末 12-223 アミノ酸をコードする領域に misincorporating PCR 法を用いて、ランダムに点突然変異をもつ bE2 変異体を作成し、それらを bE2, bW2 遺伝子をホモにもつ *U. maydis* FBD 11-21 株に形質転換した。全 bE2 変異体の 0.01% にあたる 9 つの形質転換体が病原性を獲得し、またそのうちの 7 つが自己と認識されるはずの bW2 と two-hybrid system によりヘテロダイマーを形成した。また別に作成した bE2 変異体から、今度は先に two-hybrid system により bW2 とダイマーを形成する 5 つをスクリーニングし、その後 *U. maydis* FBD 11-21 に形質転換したところ、5 つの bE2 変異体すべてが病原性を誘導した。ここで注目すべきは、認識機構が変化しこのように 2 つのパターンで選抜された計 12 の bE2 変異体のうちの 4 つは 1 アミノ酸置換であり、その変異箇所も N 末端の比較的広域に及んでいたことである。それに加え同じ箇所と同じアミノ酸に置換されたケースが 5

つあり (31番目 R→L, 74番目 K→E, 76番目 F→L, 87番目 H→L, 90番目 A→V), この置換を1つ以上含む bE 2 変異体は9つあることから著者らは, 非自己を認識して形成する bE-bW ヘテロダイマーは N 末端の広域で結合し, 特徴的ないくつかのアミノ酸が関与する微妙なものであると論じている。

それではこのようなタンパク質同士の相互作用はどのような機構により生じるのだろうか? 著者らはその1つとして疎水性アミノ酸による結合を検討した。Ni<sup>2+</sup>セファロースに bE 1, bE 2 変異体タンパク質をそれぞれ固定し, <sup>35</sup>S-メチオニンでラベルした bW 1, bW 2 タンパク質でインキュベートした。その後 0.5M NaCl 溶液で wash を行い, その後も bE との結合能を保持した bW タンパク質をエリューションし, SDS-PAGE を行った。その結果, bE 1-bW2, bE 2-bW 1 の組み合わせでのみ結合が認められ, また bE 2 変異体の場合, bW 1, bW 2 両方とダイマーを形成していた。以上よりこのような強塩濃度の条件下でもヘテロダイマーは安定的であったことから, その結合にはイオン性のものに加え疎水性の相互作用も含まれると考えられた。また, 前の実験で1アミノ酸置換によりダイマー形成能が変化した例は, その特徴的なアミノ酸置換により結合性質がイオン性から疎水性へ, またはその反対に変化したためではないかと推測される。

担子菌類では *U. maydis* 以外に別の研究グループで *Coprinus cinereus* (ヒトヨダケ) でも自己・非自己認識機構の解明が進められており, ある点では類似した興味深い結果が報告され, このメカニズムは種を越えて共通したものであることをうかがわせる。今後この複雑な認識系をさらに解明し, 下流の情報伝達経路に研究の目が向けられて行くものと期待される。

(抄訳 長谷部元宏-東北大)  
(HASEBE Motohiro)

**Multiallelic recognition : nonself - dependent dimerization of the bE and bW**

**homeodomain proteins in *Ustilago maydis***  
Kämper, J., M. Reichmann, T. Romeis, M. Bölker and R. Kahmann  
*Cell*, 81 : 73-83 (1995)

文献情報

ジャガイモを食べるとコレラに強くなる!  
—究極の機能性食品—

健康ブームが唱えられ, いわく“体によい”, あるいは“頭が良くなる”, といったいわゆる機能性食品が巷間にあふれている。それらの効能の真偽はともかく, “食べる”という人間の根幹に関わる欲求を満たすだけでなく, 同時に付加価値を持たせることができれば, その食品の持つ価値が増大することは間違いない。

植物の形質転換技術を用いて, 動物由来のタンパク質を発現させる試みはこれまでも多く知られている。Haqらは, 大腸菌やコレラ菌の産生するエンテロトキシン(腸管毒)に着目し, 特に腸管内で毒性のある大腸菌(enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)の毒素の一部をタバコおよびジャガイモで発現させた。この毒素は菌の生息する小腸内で発現され, 急性の下痢を引き起こすタンパク質性の毒素で, 熱に不安定な LT-ETEC 毒素も含まれる。LT-ETEC の構造はコレラ菌の産生する毒素に類似しており, 27kDa の A サブユニット 1 つに対して, 11.6 kDa の B (binding) サブユニット (LT-B) が 5 量体となって非共有結合的に結合し, ドーナツ状の構造をとる。LT-B の細胞への結合を阻害する抗体は毒素の活性を抑えることから, ワクチン開発の標的となっている。植物形質転換ベクターの CaMV 35S プロモーターの下流に連結した LT-B 遺伝子 (pLTB-110) を, アグロバクテリウムを介してタバコ (品種 Samsun) およびジャガイモ (品種 Frito-Lay 1607) に形質転換し, 成熟した葉や微小塊茎に蓄積した LT-B の



量をELISA法で検定した。形質転換個体の中で、その蓄積量が最大であったものは、葉の可溶性タンパク質1gあたり5 $\mu$ g、微小塊茎では30 $\mu$ gであった。インタクトなLT-Bを形質導入した場合に比較して、LT-Bタンパク質のC末端に小胞体局在シグナル配列であるSEKDELを付加した場合(pLTK-110)では蓄積量が増加し、それぞれ14 $\mu$ g、110 $\mu$ gとなった。SDS-PAGEによって可溶性タンパク質画分より免疫沈降したタンパク質をオートラジオグラフィにより検出したところ、興味深いことに、SDS-PAGEに先立って試料を加熱処理すると、検出されるモノマーの量が増加した。またゲル濾過によって溶出されるLT-B-SEKDELの見かけ上の分子量が約38kDaであり、大腸菌で発現させたLT-Bの5量体のそれとほぼ同じであったことから、植物体内でLT-B-SEKDELは動物体内と同じように多量体として存在していると考えられた。以降の実験では、発現量が多いことなどからLT-B-SEKDELを発現する植物を用いて行った。

植物体内で発現したLT-Bタンパク質が、実際に経口投与した際に免疫原性を持つかどうかを、BALB/cマウスにタバコの葉由来の粗タンパク質抽出液を与えることで検討した。1回の投与量は12.5 $\mu$ gのLT-Bタンパク質当量とし、4日から2週間の間隔で4回に分けて処理した。同時に投与した大腸菌由来のLT-Bタンパク質の場合と比較しても、最後の投与後約1週間での血清中のLT-B抗体(IgG)の量は全く同様のレベルであり、植物で発現しているLT-Bタンパク質が免疫原性を維持していたことが明らかとなった。粘膜組織から得た試料中のLT-B抗体(IgA)の量は、タバコのLT-Bで免疫した場合に大腸菌と比較して少なかったが、50pgのエンテロトキシン中和試験では、同じレベルの中和能力を持つことが明らかとなった。さらにpLTK-110で形質転換して得られたジャガイモ塊茎を、1回5g(15~20 $\mu$ gのLT-B-SEKDELタンパク質に相当、2~6時間で消費)、4回に分けて18日間与えた。摂

取終了後10日におけるマウス中では、期待されたとおりLT-Bに特異的なIgGおよびIgAの量が増加していた。

以上の結果から、ワクチンとなるタンパク質を発現する植物を経口摂取することで、摂取した動物体内で免疫が獲得されていることが明らかとなった。コレラやそれに類似したエンテロトキシンを産生する病気は、開発途上国において、特にそこに居住する子供たちにとって脅威となる病気である。経口的に、それと意識せずにこのような病気に対する免疫を獲得することができれば、多くの小さな生命が救われるようになるだろう。また今回紹介した手法は広い適用範囲を持つ。免疫原性を高めるために、植物体内での発現量を増やすなどの改良と共に、今後の展開を楽しみにしたい。

(抄訳 柄澤 明—東北大農)

(KARASAWA Akira)

#### Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants

Haq, T. A., H. S. Mason, J. D. Clements, C. J. Arntzen  
*Science*, 268 : 714-716 (1995)

#### 文献情報

#### 遺伝子操作で脂肪を増やす： 4型グルコース輸送担体の 脂肪組織への過剰発現

霜降り肉やトロ、フォアグラ、など脂肪は食品のおいしさを向上させ高級化する要因であり、現代の食嗜好に合致するものである。多くの水畜産資源において脂肪の迅速な蓄積を促す遺伝子操作はメリットをもたらす可能性があるが、脂肪の蓄積は動物のエネルギー代謝、運動、食欲などと深く関わっているため、人為的に操作しにくい問題であった。

グルコースは脂肪の合成に使われる。脂肪細胞への糖の吸収を支配しているのはグルコ

ース輸送担体とよばれるタンパク質であり、筋肉と脂肪組織では特に4型グルコース輸送担体 (Glut 4) と呼ばれるインスリン感受性を持つ特殊な輸送担体が主に機能している。それ以外の臓器には異なった構造のグルコース輸送担体が発現しており、いくつかのグループに分類されている。遺伝的肥満動物の脂肪組織では初期に Glut 4 の発現が増加するという報告もあり、脂肪の増加と Glut 4 との関連が注目されている。

ハーバード大学医学部の Tozzo らは、脂肪組織に特異的にグルコース輸送担体を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作成した。研究の真の目的は生理学的な観点から脂肪組織でのエネルギー代謝を研究するものであるが、脂肪組織への糖の吸収を人為的に高めることは上記のような応用を可能にするための基礎となる技術や知見を多く含んでいる。

本報告では、脂肪酸結合タンパク質遺伝子 *aP2* 由来細胞に特異的なプロモーター/エンハンサーに、ヒト Glut 4 遺伝子を繋げて脂肪組織特異的 Glut 4 トランスジェンを作成した。このものを用いて脂肪組織に選択的にグルコース輸送担体が過剰発現しているトランスジェニックマウスを得た。脂肪組織の Glut 4 はトランスジェニックマウスで無処理のマウスの約8~20倍に増加していた。トランスジェニックマウスの体脂肪重量は無処理のものに較べて有意に増加していた。この増加は1個の脂肪細胞のサイズの増大ではなく、脂肪細胞の数の増加によるものであった。

脂肪組織から調製した分散脂肪細胞を用いて以下の実験が行われた。脂肪細胞へのグルコースの取り込みはインスリンの濃度やグルコース濃度によって大きく異なるが、インスリンで刺激しない基底状態どうして比較するとトランスジェニックの脂肪細胞で約24倍グ

ルコース取り込みが大であった。インスリンで最大に刺激した条件で両者を比較してもなお3.5倍の違いがあり、Glut 4の過剰発現によってグルコースの取り込みが著しく増加している。

グルコースの主な代謝経路には(1)脂肪酸に合成されてトリグリセリドへ組み込まれる経路、(2)解糖系に入りピルビン酸から乳酸へ、(3)ピルビン酸からクエン酸回路に入り酸化されて二酸化炭素となる経路の3つがある。トランスジェニックマウスでは、このいずれの経路への代謝も著しく増加していた。グルコース濃度・インスリン濃度がともに低い条件で比較すると、トランスジェニックマウスの脂肪細胞ではトリグリセリドの合成が25倍、二酸化炭素生成が8.6倍に増加していた。吸収されたグルコースは脂肪酸よりもむしろグリセロール合成に主に使われていることも明らかになった。グルコースの酸化のキャパシティーは大きく、脂肪酸に合成される割合は実験前の予想よりもはるかに少なかったが、それでもトランスジェニックマウスの脂肪酸合成量は30倍以上に増加した。

これらの結果から、Glut 4の脂肪組織への過剰発現は、脂肪合成を著しく増加させることが明らかになった。Glut 4の発現調節は脂肪量を制御する方法として有効であると思われる。

(抄訳 伏木 亨一京大)

(FUSHIKI Toru)

#### Transgenic GLUT-4 overexpression in fat enhances glucose metabolism: preferential effect on fatty acid synthesis

Tozzo, E. P. R. Shepherd, L. Gnudi, B. B. Kahn

*Am. J. Physiol.* 268 : E 956-E964 (1995)

海外便り

## バーモント大学での2年間

—スエヒロタケの不和合性因子の研究—

農林水産省 森林総合研究所 きのこ生態研究室

馬替由美

バーモントには四季ならぬ、五季があると  
言われている。長い冬の後、春の訪れ前にや  
って来るのが mud season と呼ばれるもう1  
つの季節だ。私がバーモントに到着した時は、  
ちょうどその mud season が始まった頃で、  
あちこちが雪解けでぬかるみ、川は雪解け水  
で増水していた。アメリカというと、つい豪  
快で雄大な自然を思い浮かべてしまうが、バ  
ーモントの風景はあくまでも穏やかで繊細で、  
田圃が見あたらない以外は、予想していたよ  
りはるかに日本的だったのにはとまどった。  
おまけに、どこもかしこも日本車だらけだ。

Novotny 教授に大学の研究室に案内して  
もらうと、長年中心的な活動をしていた  
Charles Spect は MIT に移ってしまった後  
ということで、まず最初の落胆がおそって来  
た。さらに、実験器具・機器の貧困さ、時代  
遅れの実験手法への固執、思うように試薬も  
買えない研究室の経済状態がわかって来るに  
つれ、失望はさらに増し、着いて早々不健康  
な精神状態へと突入してしまった。

しかし、世界で初めて担子菌の形質転換を  
成功させ、遺伝子操作を可能にした研究室で  
ある。Novotny と Ullrich 教授も、その点  
には大変なプライドを持っているのが感じら  
れる。何か得るものが絶対にあるはずと気  
を取り直すことに努めた2年間だった。

### 担子菌の不和合性遺伝子

さて、その頃、世界で3研究室が担子菌の  
不和合性遺伝子の構造を決定し、その遺伝子  
産物の機能の解析へとしのぎを削っていた。  
イギリスの Casselton がヒトヨタケのA因子

について、ドイツの Kahman が *Ustilago* の  
b 交配遺伝子について (本誌23頁参照)。そ  
して、Novotny and Ullrich がスエヒロタケ  
のA  $\alpha$  遺伝子の構造を明らかにしていた。  
スエヒロタケのA  $\alpha$  遺伝子は、YとZとい  
う2種類の遺伝子をコードしており、交配型  
の異なるYとZが一緒になることによってA  
 $\alpha$  経路が活性化されることが明らかになっ  
た。Y、ZのゲノムDNAはそれぞれホメオ  
ボックスというDNA結合性タンパク質に特  
有な配列を持っているため、恐らくY-Z複  
合体を形成した後、転写制御因子として働く  
のだろうと推定されていた。私は、そのYタ  
ンパク質とZタンパク質が実際に複合体を形  
成することを、酵母を使ったTwo-hybrid  
system を使って証明することをテーマとし  
て選ばせてもらった。Two-hybrid system  
はその頃、Fieldsらによって開発されてか  
ら2、3年たったところで、アメリカでは非  
常にはやっていた。

最初は、周りのポスドクの真似をして、土  
日も大学に出て来て実験してみたが、その割  
には成果は出ないし、やる気も失せてくるの  
で、しばらくすると、日本の一公務員の生活  
に戻すことにした。それでも、全く雑用が無  
い毎日のため、結構実験ははかどった。結果  
的には、最初の1年間に行った実験は無駄に  
なってしまったが、2年めにTwo-hybrid  
法を用いて、YとZタンパク質は、同じ交配  
型由来の場合は複合体を作らず、異なる交配  
型由来のときだけダイマーを形成することを  
証明できた。このおかげで、論文1報にする  
ことができたのは幸いであった。

こうして、1960年代に主に Raper and  
Raper の精力的な研究によって証明された



スエヒロタケの生活環（4極性）とA因子、B因子の機能が、約30年後の今、いよいよ分子レベルの話として解明されようとしているのはなかなか exciting だった。これらの分子生物学的な研究にも、今まで Raper や Ulrich 博士がこつこつと作りあげてきたスエヒロタケの各交配型の一枚菌糸株や栄養要求性株の豊富なコレクションが寄与しており、じっくり一つの材料に固執し続けることの強さのようなものを実感した。

### 人種の問題

バーモントは、アメリカ人口における白人の占める割合が高い州である。そして、アメリカ犯罪の起こらない州でもある。それでも、というか、それ故にというか、バーモントで起きた黒人に対する人種差別が新聞で取り上げられていたこともあるし、大学の黒人学生に脅迫電話がかかってくるという事件もあった。また、ユダヤ人学生の住んでいるアパートの庭に人種差別的ないたずら書きが残されていたこともあるという。人数的には非常に大きな割合を占めていた中国人留学生も、うまくまわりの白人学生と溶け込んでいるとは到底見えなかった。実際、医学部の男子トイレに、「アジア人は奴隷だ」という落書きが発見され、教授陣の間で問題になっていた。私自身も図書館の机に「無知な白人ども！」と大きく書きなぐってあるのを見たことがある。数少ない日本人留学生は、快適に生活している人もいれば、研究室で孤立し、ノイローゼになっている人もいた。少なくとも学内には、閉鎖的な東部の陰湿な人種差別が存在している印象を受けた。

### 国際化って何だろう

しばしば、日本は国際化が遅れているという議論が知識人によってもっともらしくなされる。しかし、私が見た限り、国際化が必要なのは、むしろアメリカの方である。日本には、アメリカにあるほとんどすべての物があり、なおかつ自分達固有の文化も持っている、ということを理解していないアメリカ人は珍

しくない。現に、私は、Novotny 教授に「日本ではコーヒーやワインは飲めるのか（飲めないだろう）？ピザやアイスクリームはあるのか（食べたこと無いだろう）？」と質問された。仮にも、大学の教授ともあろう人がこうであるから、一般の人は推して知るべしである。この国の人達の、日本に限らず、他の国、文化に対する無関心ぶりは、実にたいしたものである。ふた言めには「欧米では」という枕詞を付けないと物が言えず、見かけの反省ばかりしている日本に比べ、その徹底した他国への無関心（ただし、利害がからんでくる場合は別）と表裏一体の絶大な自信。大統領が話をするときも、必ず一度は「世界の国、アメリカ」とか「世界で一番豊かな我が国」とか「世界で一番強い国家」ということばを使う。周りには無頓着なのに、絶えず一番、一番と言っていないではない不思議な国である。

### おわりに

バーモントは観光地として、夏は避暑、秋は紅葉、そして冬はスキー場が有名である。また、池や小さな湖があちらこちらにあり、あいた時間はおぼろ釣りをしていた。夏の終わり頃から秋の間、土、日は決まって釣りにつきあわされるので、子供達は不満げであった。やがて、冬が来て湖にも厚く氷が張ると、もうさすがに釣りは無理だねと言いながら、ついに氷に穴を開けて糸をたれていた。今となってはなつかしい思い出である。

アメリカの良さより、日本の良さを再認識させるれることの方が多かったこの2年間であったが、一つだけ「科学」を行う上で感心したことがある。それは、ゼミや講演会の時など、大変な実績のある教授でも、まだ何ら実験データさえ出していない学部学生と、対等に議論してくれることだった。教授も偉いけれど、学生も偉い。日本では、おのずと「分」が決まっいて、それを守ることがマナーになってしまい、分を超えた話合いなど最初から存在しないのではないだろうか。

# 哺乳動物卵子の体外取扱法の課題

—とくに、体外培養系について—

東北大学農学部 動物生殖科学  
菅原七郎

## 1. はじめに

1995年5月19日、哺乳動物卵子学会と生研機構との共催により、哺乳動物卵子の体外取扱法の問題点に関するワークショップを開催した。本稿ではワークショップにおいて討議された課題も交えながら、哺乳動物卵子を体外で取り扱う場合の課題を紹介したい。

哺乳類のバイオテクノロジー技術の実用化にとともに、哺乳動物卵子を生体外で取り扱うことが日常茶飯事になり、その取扱法も長足の進歩を遂げて多くの成果が得られている。しかし体外培養系については、色々な点で生体での生物現象と比べ、いまだに満足すべき域には至っていない。当然のことながら、生体外条件は生体内条件により近づけることが可能であるが、完全に同じにすることは絶対不可能である。したがって、卵子を体外で取り扱った場合、生体内で起こる生物現象と全ての点で全く同様に再現させることのできる体外条件を作り出すことが基本理念となる。

哺乳動物卵子を体外で取り扱う場合、扱った段階から継続して発生能を有し、その後生体に戻したときに完全な個体に発生する条件でなければならない。体外で取り扱う時の培養系条件のうちで最も重要な事柄は、a) 培溶液（その種類と組成）、b) 培養系、c) 気相（ $O_2$ 、 $CO_2$ 分圧）、d) 温・湿度である。

## 2. 体外培養系に対する取り組みと戦略

### a. 各動物種卵子の培養系

現在、体外培養系で一応1細胞期の受精卵から胚盤胞への発生が可能な動物種は、マウス（純系、雑種）、ハムスター（ゴールデン）、ラット、ウサギ、豚、牛、バブファロー（*Bubalus bubalis*）、羊、猫、赤毛ザル、人などの11種類で、哺乳類全体からみれば極めて限られた種のみである。これらの種では、それぞれ特異的な培養条件下でのみ発生し得る。しかし、発生率や個体までではなお多くの課題がある。

他方体外培養系において、卵母細胞の成熟から受精そして初期発生の過程をほぼ完全に完了させることのできる動物種は、牛を除いて殆どないといって過言ではない。

### b. 体外成熟、受精胚の課題

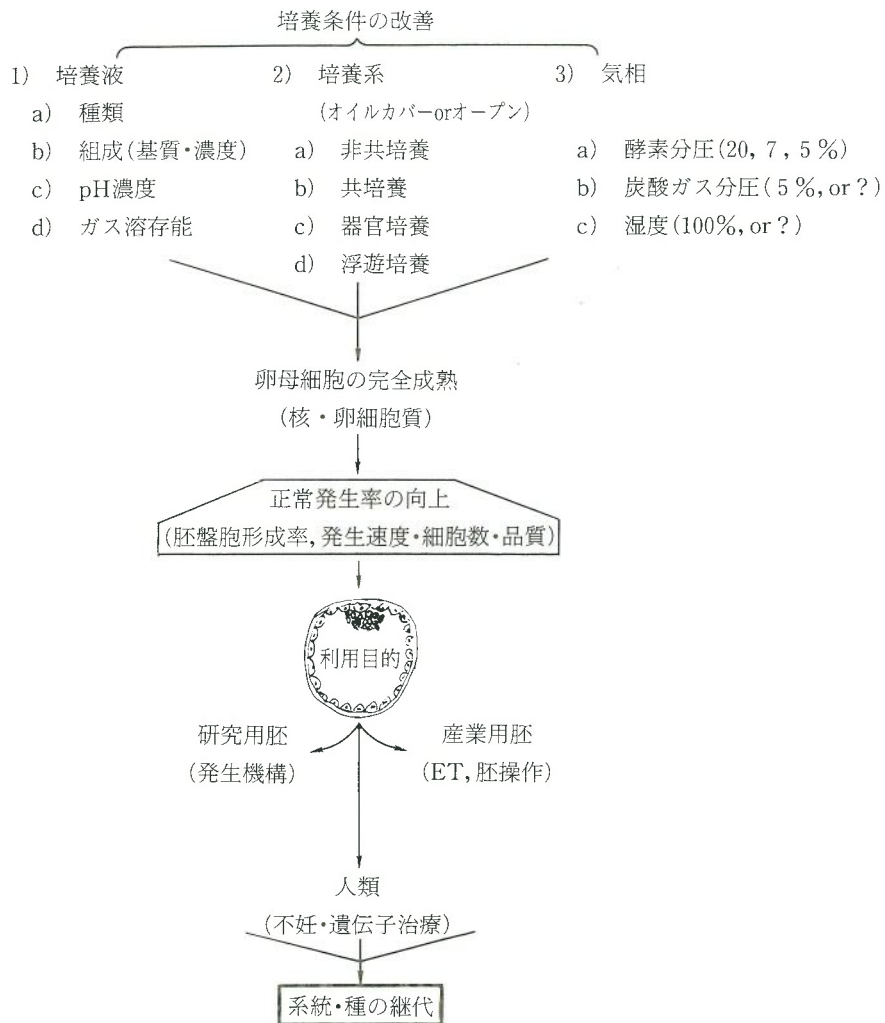
牛では屠場卵巢由来卵母細胞の体外成熟卵子から発生した胚盤胞を移植して、正常個体に発生することが確認されているが、実用的に十分な成績とはいえない。その原因として胚盤胞の発生率、胚の品質と耐凍能などが劣ることが指摘されており、それらの改善が急務とされている。

上記の課題を解決する基本的な戦略は、至適培養条件を開発すること以外にない。改善のための方策は、大きくは図示したように、培養液、培養系、気相の3者で各々の項目内と同時にそれら3者の組合せとの関連で研究開発がなされなければならない。

### c. 発生阻害解除系の進歩と課題

実際問題として、少なくとも各種動物における発生阻害は、それぞれ工夫と開発がなされ、一定の培養条件で発生阻害が解除されて胚盤胞への発生が可能となっている。

そこで牛については、1987年IVF卵子を卵胞細胞との共培養により、発生阻害が解除



哺乳動物卵子の体外培養系改善の理念 (戦略)

されることが本邦の研究者によって初めて明らかにされた。その後、8細胞期以降では胚盤胞までの発生は、共培養系でなくてもβメルカプトエタノールの添加によって可能であることも、日本の科学者によって明らかにされたことである。そのため、日本では、このような画期的成果が得られ卵子の移植も実用的に重点化されることになってきた。それを一層、確実なものとするためには、新鮮卵子のみの移植ではなく、凍結卵子の直接移植法で行うことが基本的に必要なことは自明の理といえる。

d. 体外培養胚の発生率と品質

屠場卵巢由来卵母細胞から発生した移植胚で最も問題になるのは、胚盤胞までの発生に要した時間や具体的に凍結保存時における耐凍能が基本課題といえよう。これまでのETの技術の一つの課題は移植胚の品質である。

決められた基準下では、移植胚の品質によって受胎率に直接的に影響する。さらに、凍結保存が可能と判定されたIVF胚は、凍結解凍後の損傷が生体内発生胚と比べて劣ることが指摘されており、品質の改善と胚盤胞への発生率を従来以上に高める必要がある。

3. 卵母細胞の体外成熟における問題点

IVM, IVF, IVC方式での牛胚生産では、上述のような解決されなければならない課題があり、IVF以降の培養系についての研究が推進されて、成果も得られきた。しかし、これまでの研究結果からIVMにおける卵細胞質の完全な成熟完了が必要なことが示唆されている。卵母細胞の成熟は核相(最もよい基準である)を指標とした場合、現在の培養系では82~93%が完了しているが、IVFの



受精率は2分割期に達した割合を指標とすると60~75%である。そのうち、IVCで胚盤胞期まで発生する割合は15~30%である。現在のIVC系での胚盤胞期までの発生は培養開始後7.5~10日目であり、発生速度のバラツキが大きい。この発生に要した日数が多い胚盤胞ほど、その細胞数が少なく品質が劣ることが知られている。

#### a. 卵細胞の成熟とその判定基準

上記の胚盤胞への発生率が低いこと、この事は核の成熟過程にともなって卵細胞質の成熟を完了した卵母細胞の割合がきわめて少ないことを意味する。卵細胞質の完全成熟を終了したことの早期判定法はないが、最終的には生体内発生胚盤胞と同じ品質（凍結融解後の生存性）を持っているかどうかで判定する以外にはないと考えられる。しかし、それではIVC系の良否の要因と一緒に、真の成熟との関係は求められなくなる。そこで一つの基準として、卵細胞質の成熟完了の度合は、発生阻害を越えて16細胞期以降の発生段階に達する受精卵の割合を指標とすべきである。

上記の指標を基に、再度、卵母細胞の成熟培養系の検討を行い、最終的な受精・発生率、発生速度および品質との関係で、相互評価による卵細胞質の成熟を改善して行けば直接的な胚発生率や品質向上になると考えられる。

#### b. 核の成熟と卵細胞質成熟との関係

現在の牛IVM系では核の成熟分裂に要する時間が、生体でのLH放出からその完了までの時間の約2/3以下の所要時間である。この事が核の成熟速度に卵細胞質の成熟を伴っていない最大の原因と考えられる。

それ故、核の成熟過程に同調して、卵細胞内での合成と細胞質の成熟に必要な物質が何であるかを明確にし、培養時間との関係で解析する必要がある。その他、核の成熟分裂を遅くする培養条件下での成熟培養系を作り出すか、または、現在の核分裂に同調させた卵細胞質の至適成熟培養条件を作り出すことである。

それには、これまでの培養系で行ってきた

ように、考えられる条件として基本培地、培地組成、特に成長因子やホルモンおよびオートやパラクライン因子と培養時間などとの関連で解析することが肝要と思われる。

### 4. IVF後の培養系の改善

#### a. 発生阻害の解除

各種哺乳動物の受精卵の体外培養系での発生阻害を解除させる培養条件の開発研究の結果、11種の動物種の受精卵で1細胞期から胚盤胞へ発生させることが可能になった。特に、牛では既述のように、各種細胞との共培養系で発生阻害が解除できる。それ以外低グルコース濃度（TCM-199の60%）TCM-199にEGF, TGF- $\alpha$ を添加した培地で低酸素（5%）条件下で培養することによっても発生阻害が解除される。すなわち、共培養や血清を添加しない無血清培地でもグルコース、ビルビン酸濃度の調節と成長因子（EGF, TGF- $\alpha$ ）の添加や培養液量および酸素分圧を調整することによっても発生阻害が解除され、胚盤胞への発生率も改善されることが明らかにされた。

ハムスターやラットでは体外培養系での発生阻害は、燐酸イオン(P)の存在がその原因となっていることが明らかにされている。ハムスターではP以外にグルコース濃度が阻害の要因の一つになっている。ラットではPが基本的な阻害因子である。Pは生体での発生の場合には当然のことながら存在する無機物であり、その生理的役割を果していると思われるが、生体外の培養系では阻害因子になっていることは非常に興味深く、その作用機作が問題になる。ラット2細胞期胚は、DNAポリメラーゼ $\alpha$ の阻害剤であるアヒデイコリンの処理で、G/S期にある胚は発生を中止するが、G2期のものは分割し、発生する。

各種動物受精卵の発生阻害の要因は、それぞれ異なることが推測されるが、その阻害の起こる時期が少なくとも胚ゲノムの最初に発現する時期に符合しており、その機構の解明が鍵になると考えられる。

## b. 品質の改善

体外培養系で発生した胚盤胞では、細胞数が生体内で発生した胚のそれとほぼ同じであっても比重が軽いことが知られている。この比重の差は、各割球中のタンパク質や封入体などや胚盤胞腔液中のタンパク質などの不足に起因することが考えられる。特に、IVM, IVF, IVC で発生した胚盤胞では細胞数が少なく、比重が軽い。

さらに、耐凍能と解凍後の生存能と発生能が低いことが大きな問題である。牛 IVF 卵子の培養液として TCM-199 と比べ CR1aa または mSOF を用いると、同等かまたはそれ以上に発生率が 39~46% まで向上することが報告されている。

しかし、これらの培養液で発生率が改善されても、凍結融解後の生存率については全くよくならなかった。

最近、リノール酸を添加した培養液で発生させた胚盤胞は、凍結融解後の生存性が有意に改善されることが報告された。すなわち、非共培養系で培養液として、CR1aa にリノール酸アルブミンを 0.25~1mg/ml の濃度で分割期から 168 時間継続して培養した場合、発生率は無添加区と差 (46%) が無いが、保存液 mPBS に耐凍剤として、1.5M のエチレングリコールとリノール酸アルブミンを加えた保存液で凍結保存すると、融解後の生存性が有意に高く (72%) 改善されることが報告された。

培養液へのリノール酸の添加が凍結融解後の生存性を向上させる機構は明かではないが、

添加するリノール酸は遊離型でなくアルブミンに吸着させた状態で添加し、より長く培養をすることや、保存液に添加することが有効に作用することが明らかにされた。

最近、8細胞期のマウス胚で成長ホルモンレセプターのメセンジャー RNA (mRNA) が発現しており、胚盤胞への発生率と細胞数を増加させることが示された。初期発生時におけるインシュリン以外の代謝関連のホルモン作用が示唆されたことは、非常に意味のあることで牛胚などでの効果が検討される必要がある。

## 5. おわりに

哺乳動物卵子の体外培養系は培養液、培養系と気相の3者間における各々の具体的な組合せによってすべて変わってくる。これまでの研究成果の歴史からも明かなように至適培養系の改善には、トライアンドエラーの研究の中からより効果的な培養条件が生まれている。そのような努力の結果として、1日でも早い研究成果を期待したい。

## 文 献

- 1) 菅原七郎 (1993) 哺乳動物初期胚の培養法と課題: 生殖機能系細胞の培養法, p.11-23, 菅原(七)・尾川編, 学会出版センター
- 2) Bavister, B. D. (1995) *Hum. Reprod. Update*, 1: 91-148
- 3) Leese, H. S. (1995) *Hum. Reprod. Update*, 1: 63-72

#### 編集後記

きのこの秋になりました。店頭に並べられたマツタケの値段を見るたびに、人工栽培はどこまで進んでいるのかと思うのは私だけではないのではないのでしょうか。その辺の事情をマツタケ研究の第一人者小川真さんに紹介していただきました。スーパーなどで「ホンシメジ」とって売られているものは、実はホンシメジではなくブナシメジなどを人工裁

培したものだそうです。このたび太田明さんによって、本物の「ホンシメジ」が人工栽培できるようになりました。本号では成功した技術のポイントを紹介していただきました。本物の「ホンシメジ」が私達の食卓にのぼる日が待たれます。馬替さんには米国でのスエヒロタケの不和合性因子研究の一端を紹介していただきました。(大畑記)

## ブレインテクノニュース (第51号)

平成7年9月15日発行

発行者 浜口 義 曠

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

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

編 集 (社)農林水産技術情報協会

〒103 東京都中央区日本橋兜町15-6 製粉会館6F  
TEL. 03-3667-8931 FAX. 03-3667-8933