

CODEN : BTEEEC

TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

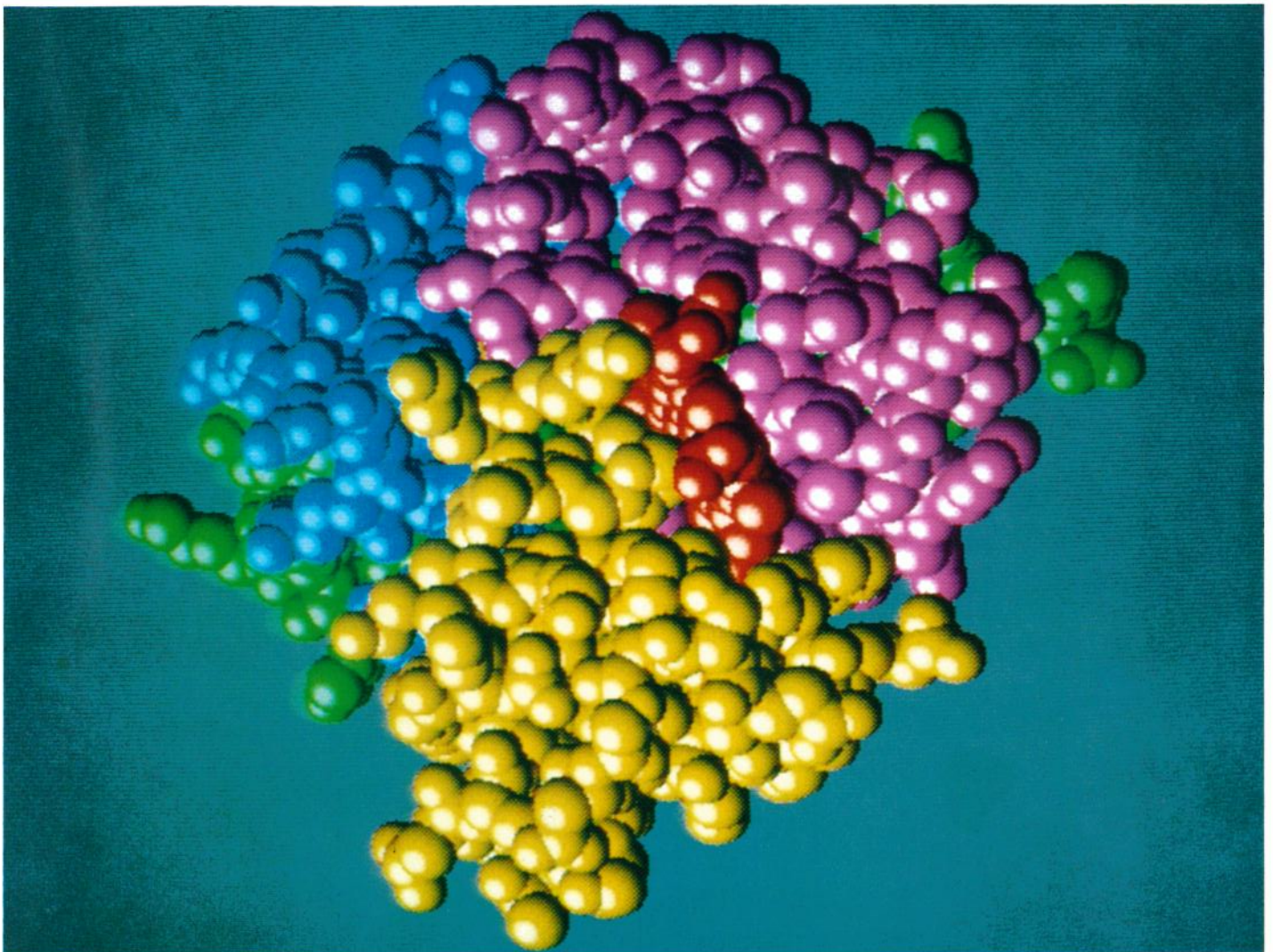
第 56 号

JULY 15, 1996

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

生研機構発足10周年記念



モジュールを色分けしたヘモグロビンサブユニット

各モジュールを空, 黄, 紫, 緑色で示す

赤はヘム

(本文33ページ参照)

発行=生物系特定産業技術研究推進機構

総 説

原田靖生

家畜排泄物処理・利用技術の現状と展望…………… 1

国内情報

杉田耕一・松永悦子・山門幹子・海老沼宏安

Multi-Auto-Transformation Vector System の開発…………… 5

廣近洋彦

レトロトランスポゾンを利用したイネ遺伝子破壊系の開発…………… 7

山田靖宙

Streptomyces 属放線菌の自己調節因子……………11

白石信夫

木材などバイオマスの液化法と液化物の利用法の開発……………16

地域の先端研究

中沢伸重

清酒酵母の分子育種……………22

文献情報

英国で発生した新しい型のクロイツフェルト・ヤコブ病……………26

ラクトース資化性 *Pediococcus* 種の乳発酵への利用……………26

変温生物の低温耐性機構——コイの Δ^9 -デサチュレースの

転写翻訳システムの解析——……………27

サイクリンは根の成長をコントロールするか……………29

海外便り

後藤千枝

昆虫のバキュロウイルスの遺伝子解析……………30

——カリフォルニア大学デービス校での1年——

特別情報

北村實彬

BRAIN セミナー「生命科学とコンピュータ」……………33

家畜排泄物処理・利用技術の現状と展望

農林水産省 農業研究センター
原田靖生

我が国では、膨大な量の家畜排泄物が発生し、悪臭や水質汚濁など環境汚染の原因となっているため、適切な処理が必要である。家畜排泄物は産業廃棄物であり、農家自らの責任で処理することが義務づけられている。したがって、処理技術はコスト、労力、技術などの点から見て、農家で実施可能なものでなければならず、技術開発には大きな制約がある。しかし、我が国の畜産を維持するとともに環境を保全するためには、実現可能な処理・利用システムを確立することが急務である。ここでは、家畜排泄物の処理・利用技術の問題点と今後の方向について概括する。

1. はじめに

環境問題に対する関心が高まるにつれて、畜産が原因となる悪臭発生や水質汚濁などの問題が大きく取り上げられるようになった。それに伴って、悪臭防止法や水質汚濁防止法が相次いで改正され、家畜排泄物の処理・利用に関する法的規制が強化されてきている。

日本飼養標準に基づいて作成した家畜の排泄物量推定プログラムを用いて試算すると、現在、我が国で1年間に発生する家畜排泄物は、ふんが6,700万t、尿が3,000万t、合計では9,700万tに達すると推定される(表1)。

る家畜排泄物中の窒素の総量は76万トン、りんの量は12万tと試算される。このように、家畜排泄物は量的にも、また質的にも極めて重要な有機資源であり、有効に利用すべきものと考えられる。

しかし、我が国の畜産は大規模化・専業化の道を辿っており、飼養頭羽数と農地面積の間にアンバランスを生じ、排泄物を有効に循環利用することが困難になってきている。その結果、悪臭の発生や水質汚濁などの影響を及ぼすことが少なくない。

このような情勢の中で、畜産を維持・振興していくためには、排泄物の環境保全的な処理・利用システムを確立することが不可欠であろう。ここでは、我が国の家畜排泄物の処

表1. 家畜排泄物の年間発生量および窒素, りんの排泄量 (1995)

畜種	飼養頭羽数 ×10 ³ 頭羽	排泄物量 (×10 ³ t)			N・P排泄量 (×10 ³ t)	
		ふん	尿	合計	N	P
乳用牛	1,951	24,493	7,234	31,727	161.4	22.5
肉用牛	2,965	20,077	7,381	27,458	150.4	16.5
豚	10,250	8,326	15,464	23,790	134.5	35.2
採卵鶏	184,364	8,092		8,092	196.7	33.9
ブロイラー	119,682	5,679		5,679	114.5	12.7
合計	—	66,667	30,079	96,746	757.5	120.8

これらの家畜排泄物には窒素, りんなど多くの肥料成分が含まれている。1年間に発生す

理・利用技術の現状について、農業利用、エネルギー利用、污水处理、悪臭防除などの点から整理し、技術的な問題点ならびに今後の方向について考えてみたい。

2. 農業利用の現状と問題点

家畜排泄物の農地への施用は最も現実的な利用法である。前述のように、我が国では1年間に約9,700万tの家畜排泄物が発生し、これを農地に均等に施用したとすると、その施用量は18.8t/ha、窒素の量としては147kg/haとなる。これだけでもかなりの量であるが、家畜の飼養密度が地域によって大きく異なることも重大な問題である。図1は、発生する家畜排泄物をすべて農地に均等に施用すると仮定した場合のha当たりの施用量を都道府県別に示したものであるが、家畜排泄物が偏在する状況が明らかに示されている。環境汚染の発生を防止するためには、農地面積と家畜の頭数の間に適正なバランスをとることが極めて重要である。

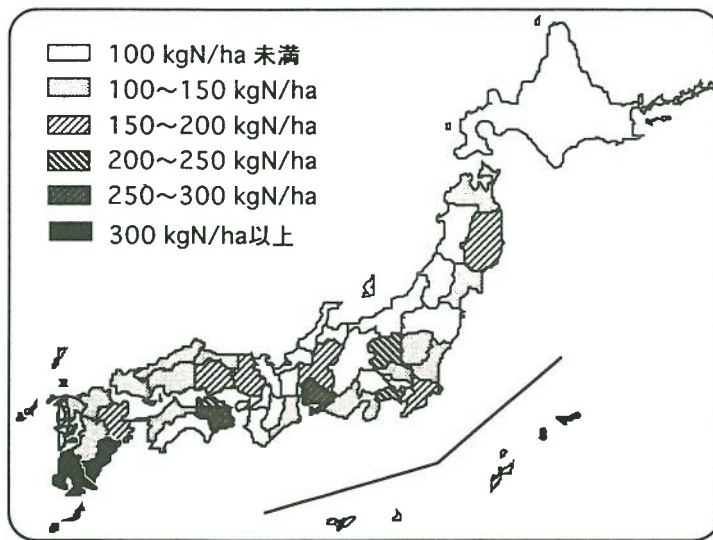


図1 農耕地単位面積当たりの窒素負荷量

しかし、それができない場合には、排泄物を適正に処理して取り扱いやすく安全で長期保存に適するように加工し、広域流通を図ることが重要であろう。堆肥化は、そのための有効な手段である。

堆肥化技術に関しては、これまでの研究で処理過程での成分変化や処理の至適条件などが明らかにされ、多くの方式が開発されており、ほぼ完成された技術と言ってもよい。今後の研究方向としては、堆肥の品質に関する研究が重要となろう。高い養分供給機能や土

壤の物理性改善機能を有する高品質堆肥の製造、植物根伸長促進機能や土壌病害抑制機能などを有する多機能堆肥の製造技術の研究も重要であろう。またこれらの堆肥の流通・販売を確立するためには、品質の評価基準ならびに簡易な品質評価法の開発が必要である。

3. エネルギー利用技術の現状と問題点

家畜排泄物をエネルギーとして利用している事例は多くないが、最も普及しているのは鶏ふんボイラーであろう。ボイラーは飼育期間中ふんを床に堆積したままであり、また床面暖房するため、鶏舎から排出される時には自然できるほどまで乾燥している。このように乾燥したふんは、直接燃焼させて鶏舎暖房のためのエネルギー源として十分利用できる。しかし、この方式は窒素含量の高い鶏ふんを燃焼させるものであり、窒素酸化物の発生を制御する対策が必要である。

スラリー状の家畜ふん尿混合物からエネルギーを回収・利用する技術としては、メタン発酵が知られている。メタン発酵は古くから行われてきた技術であり、比較的簡易な施設で可燃性のガスを得ることのできる有効な方法である。ただし、その場合、廃液の処理が問題となる。メタン発酵によって投入原料中の有機物はある程度分解され、臭気も低くなっているが、これを河川などに放流するためには、さらに活性汚泥法などの処理を行う必要がある。しかし、このように2段階の処理を行うとすればコストが高くなるため、畜産農家においては現実的ではない。廃液は、無理に処理するのではなく、むしろ液肥として有効に利用すべきであろう。そのためには農地が確保できねばならない。酪農のような草地・飼料畑を有する経営形態では廃液の施用が可能のためメタン発酵を導入できるが、農地を持たない畜産経営においてはメタン発酵は有利な処理・利用方式とは言い難い。

もう一つの問題点は、温度が低くなるとガス発生量が低下することである。つまり、エネルギーを最も必要とする冬期に十分なガス

が得られないということも、我が国でのメタン発酵の普及にとって大きな問題となっている。今後の研究方向としては、UASB法³⁾など高効率のメタン生産技術を開発するとともに、廃液の処理まで一括してできる低コストなシステムを確立することであろう。

4. 汚水処理技術の現状と問題点

畜産が原因となる環境汚染問題のうち、水質汚濁関連問題の発生件数は平成7年度で923件あり、全体の37%を占めている⁴⁾。また、水質汚濁防止法の改正により排水基準はますます厳しくなっており、畜舎汚水の効果的な処理技術の開発が求められている。

畜舎汚水の処理に最も一般的に用いられてきた方法は活性汚泥法である。活性汚泥法は昭和40年代から50年代前半にかけて広く普及し、全国の畜産農家、とくに養豚農家に多くの施設が設置されたが、その後運転を取り止める農家が多くなった。その主な理由は、維持管理が難しいことや経費がかかることであるが、排水の水質基準が厳しくなったことも大きな理由の一つになっている。すなわち、BOD、COD、SSなどの水質基準に対して各地で厳しい上乗せ基準が設定されたこと、また閉鎖系水域での富栄養化を防止する目的で窒素とりんの濃度が規制の対象に加えられたことなどである。

従来の活性汚泥法は窒素・りんの除去能力が低い⁵⁾が、運転管理法によってその能力が高まる⁶⁾ことが明らかにされ、豚舎汚水中の窒素・りんの除去に関して間欠曝気法が極めて有効であることが明らかにされている⁷⁾。

今後の研究方向としては、脱窒によるさらに効率的な窒素除去技術の開発とともに、汚水からりんを回収・利用する技術の研究も重要であろう。従来の研究はりんを除去することが目的で、利用を目的として回収する技術の研究は少なかった。りんは貴重な資源であり、生物濃縮や無機新素材の活用によってりんを効率的に回収する技術の開発が重要である。また、畜舎汚水を用いて微生物菌体、水

生植物、水生動物などのバイオマスを生産し、併せて汚水を浄化する研究も必要であろう。

一方では、空気中に汚水を蒸発させて処理する方法が研究され、一部では実用化されている。現在では、法規制や地域の住民感情などの問題から汚水を浄化しても処理水を放流できない場合が多く、汚水を蒸発させる方式が期待されている。しかし、これらの方式は太陽熱や風など自然のエネルギーを利用するため、処理効率は地域間差や季節変動が大きいため、不安定な要因が多い。また、この方式では臭気発生の可能性やアンモニアが揮散するという問題点がある。

5. 悪臭防除技術の現状と問題点

畜産が原因となる環境汚染の発生件数としては悪臭問題の件数が最も多く、全体の62%を占めており⁸⁾、悪臭防除技術の確立は極めて重要な課題である。これまでも多くの研究機関で研究が進められてきたが、悪臭防止法の一部改正により低級脂肪酸4物質やアルデヒド類など10物質が悪臭物質として追加指定されたことから、畜産の悪臭防除はますます重要な問題となり、今後さらに本格的な取り組みが必要と考えられる。

現在用いられている臭気対策としては、畜舎あるいは処理施設から高濃度の臭気を補集する局所排気装置、排気中の臭気成分を燃焼させる燃焼脱臭法、酸・アルカリなどを用いる薬液脱臭法、活性炭・ゼオライトなどに臭気成分を吸着させる吸着脱臭法、バイオフィルターなど微生物を利用した生物学的脱臭法などがある。また、各種の脱臭剤・消臭剤が市販されているが、効果や作用機作の明らかでないものが多い。

一方では、高能力の無臭化微生物を選抜し、これを活用して家畜飼養施設内での悪臭を防除する技術、また堆肥化や曝気処理など処理過程における悪臭の防除技術に関する研究が実施されている。今後の研究方向としては、より効率的な脱臭装置を開発するとともに、無臭化微生物を利用した効率的な悪臭防除技

表2. 家畜排泄物の処理・利用に関して研究すべき課題

- I. 家畜排泄物の循環利用促進技術の開発
 1. 高品質・高付加価値有機資材の製造・調整技術の開発
 2. 有機資材の品質評価基準の策定並びに簡易品質評価法の開発
 3. 有機資材の作目別施用技術の開発
 4. 家畜排泄物からの肥料成分の回収・利用技術の開発
 5. 畜舎排水の利用によるバイオマス生産技術の開発
 6. 家畜排泄物の高効率エネルギー化利用技術の開発
- II. 家畜排泄物による環境負荷の低減技術の開発
 1. 家畜排泄物の環境負荷に関する実態解析
 2. 栄養管理の高度化による排泄量の低減化技術の開発
 3. 畜舎および排泄物処理過程における臭気発生防止技術の開発
 4. 畜舎排水の高度処理技術の開発
 5. 衛生害虫・有害生物等の防除技術の開発
 6. 余剰窒素の環境保全的除去技術の開発
 7. 地球温暖化微量ガスの発生抑制技術の開発
- III. 家畜排泄物の環境保全的循環技術のシステム化
 1. 畜産経営内における適正処理・利用システムの構築
 2. 家畜排泄物の環境保全的循環システムの構築と社会・経済的評価
 3. 有機資材の地域流通支援システムの開発
 4. 地域内における環境保全的循環システムの構築

術を確立することが重要であろう。

6. おわりに (今後の研究方向)

家畜排泄物が原因となる環境問題の発生を防止するためには、まず農業利用やエネルギー利用などの技術を確立して有効利用を促進

するとともに、悪臭防除技術や污水处理技術を確立することが重要である。しかし、それだけでは対策として十分ではない。現在、我が国には、食飼料として年間約93万tの窒素が海外から輸入されており、このことも環境問題の解決を困難にしている。今後、国内での循環利用の促進を図るとともに、貿易によって集中する窒素の対策についても検討すべきであり、さらに地球環境にも配慮した総合的な対策をとる必要があろう。

家畜排泄物の処理・利用について、今後、推進すべきと考えられる研究課題をまとめてみた(表2)。これらの多くは、現在、農林水産省のプロジェクト研究において実施されており、都道府県や民間企業においても関連した研究が実施されている。これらの研究成果が期待される。

文 献

- 1) 農林水産省畜産局畜産経営課(1996)平成8年畜産経営の動向: pp.214-250
- 2) 原田靖生(1995)研究ジャーナル, 18(10): 31-37
- 3) 原田靖生(1993)研究ジャーナル, 16(5): 13-18
- 4) Osada, T. et al. (1991) *Water Research*, 25(11): 1377-1388

Multi-Auto-Transformation Vector Systemの開発

日本製紙(株) 中央研究所

杉田耕一・松永悦子・山門幹子・海老沼宏安

MATベクターシステムは、植物ホルモン・サイトカイニン合成酵素遺伝子 *ipt*¹⁾ を標識として用いる遺伝子導入システムであり、*ipt* 遺伝子による遺伝子組換え細胞の自立的な再分化 (Auto Regeneration) と、*ipt* 遺伝子を用いた再度の遺伝子導入 (Multi Transformation) が可能な点を特徴とする。*ipt* 遺伝子による植物細胞の再分化へのポジティブ効果により、遺伝子導入の難しい植物への遺伝子導入効率の向上が期待される。また、遺伝子導入第1世代 (R₀) における遺伝子導入の繰り返しは、交配を経ずに多数の遺伝子を蓄積することを可能とする。

1. はじめに

植物遺伝子工学の発達は、交配を経ずに植物へ有益な遺伝子を導入することを可能にした。遺伝子の導入過程においては、遺伝子組換え個体を選抜するため、目的遺伝子とともに、マーカーとなる標識遺伝子を導入する必要がある。現在、抗生物質や除草剤耐性を付与する遺伝子が、標識遺伝子として広く用いられている。しかしながら、これらの標識遺伝子を用いた導入システムでは、標識遺伝子が目的遺伝子とともに遺伝子組換え個体に残留するため、次のような問題を生じる。

1) 抗生物質や除草剤の培地中への添加
組換え個体の選抜のため、組織培養の培地中に、抗生物質や除草剤を添加する。これらの化学物質は、植物組織の活性を低下させる。また、選抜に用いる標識遺伝子の有効性は、植物種、組織による耐性の差異に依存する。

2) 標識遺伝子の組換え植物への残留

a) 標識遺伝子の負の効果：目的遺伝子と共に標識遺伝子を含む遺伝子組換え個体の野外放出や食品としての利用には、標識遺伝子 (遺伝子産物も含む) の環境や人体に対する安全性評価が必要である。また、過剰発現している標識遺伝子の蓄積は、遺伝子間の干渉作用など負の効果を引き起こす可能性がある。

b) 標識遺伝子の再利用：同じ標識遺伝子を用いて、再度の遺伝子導入を行うことができない。有益な遺伝子の数に比較して、実用的な標識遺伝子の数は限られているので、異なった標識遺伝子を用いて、多数の有益な遺伝子を導入蓄積することに限界がある。

これらの問題を解決するため、MAT (Multi-Auto-Transformation) ベクターシステムを開発したので紹介する。

2. 従来の標識遺伝子除去法の問題点

既に、Co-Transformation, トランスポゾン *Ac/Ds*, 部位特異的組換え系 *Cre/loxP* を用いて、カナマイシン耐性遺伝子などの従来から用いられている標識遺伝子を除去する系が報告されている²⁾。

1) 原理

これら3つの方法は、基本的に同じアイデアである。植物への遺伝子導入の際、または遺伝子導入個体の作成後に、目的遺伝子と標識遺伝子を遺伝的に連鎖しない状況にし、交配することにより次世代以降で目的遺伝子と標識遺伝子が分離したマーカー・フリー植物が作成される。また、マーカー・フリー植物の検出には、サザン分析などのDNA分析が不可欠である。

2) なぜ実用化されていないか

- ・交配が必要。
- ・通常の遺伝子組換えに比べ時間が必要。

SUGITA Koichi, MATSUNAGA Etsuko,
YAMAKADO Mikiko, EBINUMA Hiroyasu

- ・次世代でDNA分析が必要。
- ・栄養繁殖の作物や樹木に利用できない。

3. MATベクターシステム

1) システムの概要

MAT (Multi-Auto-Transformation) ベクターシステムは、「植物ホルモン合成遺伝子を標識として用いる」という新しい発想に基づいた遺伝子導入システムである。このシステムは、植物ホルモン・サイトカイニンを合成する *ipt* 遺伝子を標識遺伝子として用い、遺伝子導入後、*ipt* 遺伝子を組換え体から除くため、酵母の部位特異的組換え系 pSR1 システムを用いている。MATベクターを図1(a)に示す。pSR1 システムは、他の部位特異的組換え系と同様に、同一の2つの組換え配列が順方向の場合には脱離が生じる。この反応はRタンパク質（組換え酵素）のみで引き起こされる。また、pSR1 システムは植物細胞内で正常に機能することが報告されている³⁾。よって、図1(b)で示すように、35Sプロモーターにより発現したRタンパク質により、2つの組換え配列内に置かれた *ipt* 遺伝子は植物染色体から脱離し細胞の分裂と

もに消失するが、目的遺伝子は植物細胞内に導入されたまま保持される。

図2に、アグロバクテリウム法を用いた、タバコへのMATベクターシステムによる遺伝子導入過程を示す。(a)アグロバクテリウム感染後、*ipt* 遺伝子によるサイトカイニンの過剰生産により、ホルモン無添加培地にて多数の不定芽が分化する。(b)遺伝子組換え体が、頂芽優勢を消失した多芽体として得られる。(c)感染から6か月後、多芽体クローンの約60%より、頂芽優勢が復元した正常伸長個体得られる。(d)DNA分析により、マーカー・フリー組換え個体であることを確認する。以上のように、視覚的に容易に、マーカー・フリー組換え個体を選抜することができる。

MATベクターシステムを用いたマーカー・フリー組換え個体の作成法には、2で述べた従来の方法と比較し、大きく異なる優れた2つの点がある。

- ・肉眼で視覚的に選抜できる。
- ・交配を必要としない。

2) 効果

MATベクターシステムの特徴は、*ipt* 遺伝子による植物細胞の再分化へのポジティブ効果と、組換え個体に *ipt* 遺伝子が残留しない点にあり、次のような効果が期待できる。

- ・複数の遺伝子を多数回導入し、有益な形質を支配している遺伝子群を、徐々に改変することができる。
- ・標識遺伝子が組換え個体に残留しないので、従来の技術に比べて安全性の高い組換え体を作成できる。
- ・従来の標識遺伝子を用いた遺伝子組換え体の作成が困難な植物にも応用できる可能性

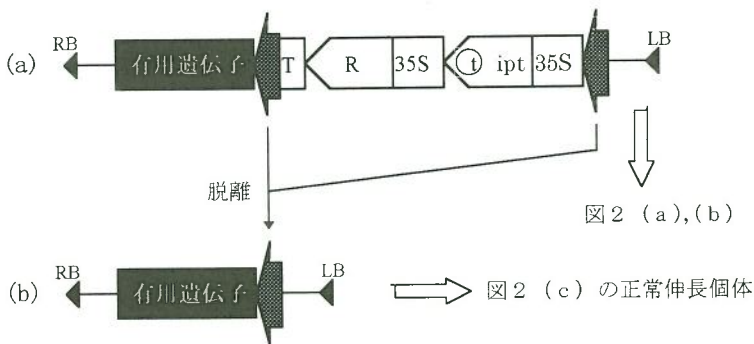


図1 MATベクターの概略図

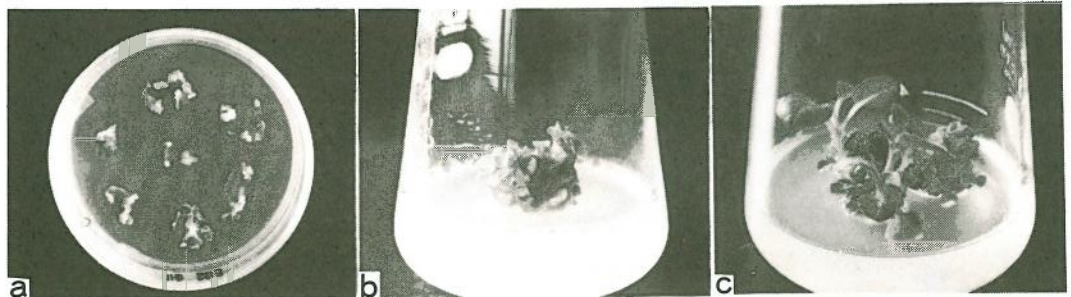


図2 MATベクターシステム
左から(a), (b), (c)

があり、遺伝子導入効率の低い植物など多くの農作物において、遺伝子組換え体の実用化が期待できる。

4. おわりに

MATベクターシステムは、非常に応用範囲の広い基本技術であると同時に、欧米が有している基本特許をクリアすることができると考えている。

1995年の11月上旬までに、MATベクターシステムについて、日本および国際特許の出願手続きを終了した。当研究所では、MATベクターシステムを用い、有益な遺伝子を蓄積することにより、ポプラ、ユーカリなどの製紙用樹木を改良していくと同時に、樹木以外の農作物への応用研究を促進するため、積極的にMATベクターを供与していく予定である。既に、英国ゼネカ社と技術評価契約を結び、農作物への応用について評価を行って

いるが、他社へのライセンス供与についても検討している。

また、MATベクターシステムを多くの研究者に利用していただき、情報交換の場とするため、MATベクター研究会（代表：日本女子大学、駒嶺 穆教授）が発足した。この研究会を通じ、様々な植物への応用研究が促進されることを期待している。

文 献

- 1) Barry, G. F., R. T. Rogers, R. T. Fraley, and L. Brand (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81: 4776-4780
- 2) Yoder, J. I. and A. P. Goldsbrough (1994) *Bio/Technology*, 12: 263-267
- 3) Onouchi, H., K. Yokoi, C. Machida, H. Matsuzaki, Y. Oshima, K. Matsuoka, K. Nakamura and Y. Machida (1991) *Nucleic Acids Research*, 19: 6373-6378

国内情報

レトロトランスポゾンを利用した イネ遺伝子破壊系の開発

農林水産省 農業生物資源研究所
廣近洋彦

イネから初めて活性のあるトランスポゾン単離した。このトランスポゾンは構造上の特徴からレトロトランスポゾンに属し、通常静止状態にあるが、培養によって活性化される。この活性化が、培養変異の一因になっていることが明らかとなった。さらに、このトランスポゾンを利用して、イネ遺伝子破壊系を開発した。この系は、ゲノム解析により構造の明かとなった大量の遺伝子の機能解析のための強力な武器となりうると期待される。

1. はじめに

現在、世界的にイネを含むモデル生物でのゲノム解析が急速な勢いで行われている。その成果として大量の遺伝子配列情報が蓄積されているが、配列情報だけから遺伝子の機能を知るには限界があり、多くの遺伝子の機能は未解明である。配列はわかっているが、機

能のわからないこれらの遺伝子の機能解明が今後の課題として残されている。機能解析のために、動物では相同組換えを利用した遺伝子破壊法 (gene targeting) が開発され、この方法で遺伝子「ノックアウトマウス」が作られ、これらのマウスの形質を調べることでより遺伝子の機能が明らかにされつつある。一方、植物においては gene targeting 法に代わりうる方法として、トランスポゾンを用いた遺伝子破壊法が注目されている。本稿で

HIROCHIKA Hirohiko

は、筆者らが最近発見したイネのトランスポゾンを利用した遺伝子破壊法について紹介する。

2. イネ・レトロトランスポゾンの単離

トランスポゾンが最初に発見されたトウモロコシでは、これまでに10種類以上のトランスポゾンが発見されている。しかし、同じイネ科に属するイネでは転移活性のあるトランスポゾンは発見されていなかった。筆者らは、最近イネから初めて転移活性のあるトランスポゾンの単離に成功した。

植物のトランスポゾンは大きく2つのグループ (DNA 型, レトロトランスポゾン) に分けられるが、イネから単離されたトランスポゾンは後者に属する。レトロトランスポゾンという名前は、その構造がレトロウイルスのプロウイルスに類似していることに由来している。レトロトランスポゾンは、まず RNA に転写され逆転写酵素の働きによって DNA となり新しい場所へと転移する。したがって、転移に伴いコピー数が増加すること、また安定な挿入変異を誘発するという性質を有する。一方、トウモロコシやキンギョソウで研究されている DNA 型トランスポゾンは、自分自身を切り出して転移をするため、転移に伴いコピー数の変化はなく不安定な変異 (穀粒や花卉にみられる斑入り) を誘発する。レトロトランスポゾンは斑入りを誘発しない

ため遺伝学的解析でその存在を知ることは困難であったが、近年、レトロトランスポゾンの逆転写酵素遺伝子に保存されている配列を利用した PCR によりレトロトランスポゾンを単離することが可能となり¹⁾、研究が飛躍的に進展した。この方法によりレトロトランスポゾンは植物に普遍的に存在することが示されたが^{2,3)}、解析された多くのものはすでに転移能を失っていると推測されている。一方、一部のものが種々のストレス条件下で活性化されることが明らかにされつつある^{4,5)}。

イネゲノム上には少なくとも32種類のレトロトランスポゾンが存在し、通常静止状態にあるが、5種類が培養によって活性化されることが明らかとなった。これらのうち最も活性の高い Tos 17 の性質について解析を行った⁶⁾。イネ種子由来のカルスを一定期間培養し、その後植物体に再生させ Tos 17 のコピー数の変化を調べた。図 1 に示されるように、培養期間に依存してコピー数が増加する傾向が見られる。このことは、培養中に連続して転移が起こっていることを示している。また、パターンが各再生植物で異なることから、個々の細胞で独立な転移が起こったことがわかる。長期間 (16か月) 培養したものでは、パターンが均一化しており、培養の過程で特定の細胞が選抜された結果と考えられる。転移の活性化は培養時に限られ、再生すると不活性な状態となり、次世代へと安定的に遺伝することが示された。転写活性と転移活性に相関がみられるため、転移は転写レベルで制御されているものと考えられる。

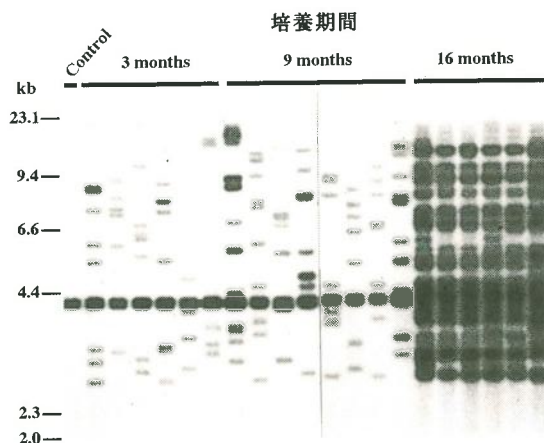


図 1 イネの培養過程における Tos17 レトロトランスポゾンの活性化
3~16か月培養した種子由来カルスより植物体を再生させ、Tos17のコピー数の変化を調べた。

3. レトロトランスポゾンによる変異誘発

レトロトランスポゾンが活性化され、遺伝子内に転移した場合にのみ突然変異が誘発される。したがって、どのような部位に転移するのかという転移の特異性はレトロトランスポゾンの特性として重要であるが、これまでほとんど解析されていない。最近、酵母のレトロトランスポゾンは遺伝子以外の領域に転移する傾向を有することが報告されている⁷⁾。Tos 17 の転移の特異性を明らかにするため

に、挿入部位の配列を解析した⁶⁾。これまでに9例について解析したが、そのうち8例がシングルコピー領域、7例が転写される領域であった。これらの結果は Tos 17の挿入領域は遺伝子であることを強く示唆している。さらに挿入部位の塩基配列の解析から、既知の遺伝子との相同性が5例で確認された。その中には phytochrome A 遺伝子, receptor-like protein kinase, 転写調節因子等の興味ある遺伝子が含まれている。以上の結果から、Tos 17は遺伝子領域に選択的に転移する性質を有することが明らかとなった。

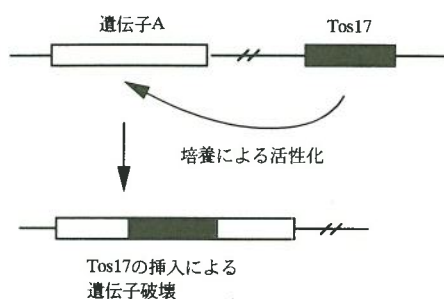
イネを含む多くの植物において培養の過程で突然変異が頻発することが知られており、大きな問題となっているが、その機構は未解明のままである。以上の結果は、レトロトランスポソンの活性化が培養変異誘発に深く関わっていることを示しており注目される。

4. 遺伝子破壊系の開発

トランスポソンを利用した遺伝子破壊法は、ショウジョウバエで初めて開発された⁸⁾。この方法では、あらかじめトランスポソンを転移させ多数の独立な挿入変異体を作成し、PCR を利用し目的とする遺伝子にトランスポソンの挿入された個体を選抜するというストラテジーがとられている。個体あたりに独立な挿入変異をできるだけ多く含み、十分な大きさの集団を得ることがこの方法の鍵となっている。この条件を満たすトランスポソンが得られれば、どのような生物種でも遺伝子破壊系を開発することが可能であり、すでに線虫⁹⁾ やペチュニア¹⁰⁾の系が報告されている。

以上に述べたように、イネを組織培養すると Tos17レトロトランスポソンが活性化され高頻度で挿入変異が誘発されるため、Tos 17はイネの遺伝子破壊系の開発に最適なトランスポソンといえる。多数の再生イネが得られれば、その中には任意の遺伝子が破壊された個体が含まれているはずである。したがって、目的とする遺伝子の破壊された個体（ノックアウトイネ）はこの集団の中から選抜す

A. レトロトランスポソンの挿入による遺伝子破壊



B. 遺伝子破壊されたイネの同定

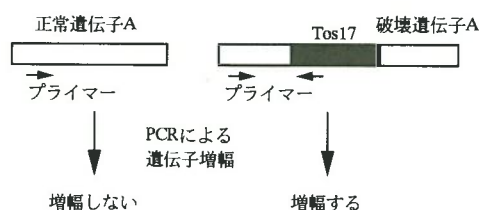


図2 Tos17レトロトランスポソンの挿入による遺伝子破壊と遺伝子破壊イネの選抜

ればよいこととなる。PCR を用いた選抜方法を図2に示す。再生イネのDNAを鋳型に、Tos 17に特異的なプライマー2種類と、目的とする遺伝子に特異的なプライマー2種類を組み合わせた計4種類のPCR反応をおこなわせる（図中には、プライマー1種類の組み合わせのみを示す）。Tos 17が目的の遺伝子に挿入した個体からのみPCR産物がえられる。イネの遺伝子数は約2万から4万と推定されているので、任意の遺伝子の破壊された個体を含む集団の大きさは、1万程度と推定される。1万の再生個体由来のDNAを直接PCRによって選抜することは容易ではないので集団をブロック化する方法が考えられる（図3）。X軸に100個体、Y軸に100個体ずつプールしDNAを調製する。PCRは感度が高いので、100個体に1個体目的とする変異体が含まれていても検出可能である。X軸、Y軸それぞれ100プールを解析し、PCR産物の得られるプールに共通する個体が目的とする変異体ということになる。これまでに、400個体の再生イネをスクリーニングした結果、*myb* 遺伝子や receptor-like protein kinase 遺伝子の挿入変異体が同定され、系の有効性が示された。系の確立には約1万の

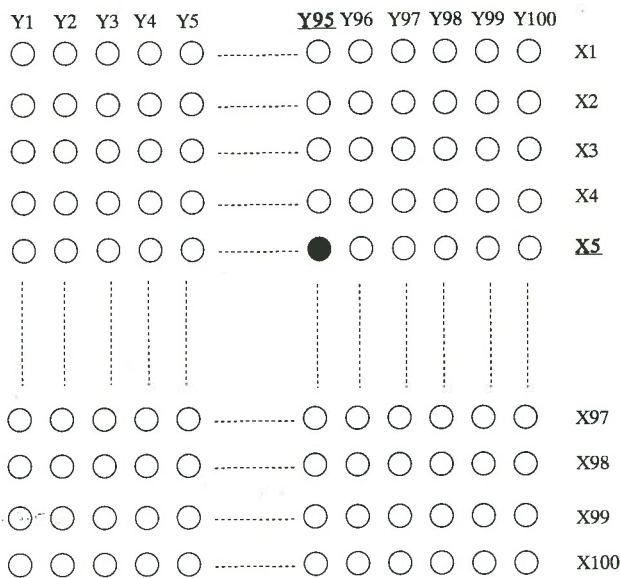


図3 DNAのプル化による遺伝子破壊イネの2次元スクリーニング
1万の再生イネ由来のDNAは200にプル化。PCRによりY95とX5の
プルで増幅がみられると、図中の黒丸で示される個体が目的とする変異
体と同定される。

再生イネが必要であるが、一旦このような系が確立されると、PCRにより目的とする遺伝子の変異体が容易に同定でき、種子として保存されている変異体ライブラリーから目的の変異体を取得し、機能解析に供することが可能である。

トランスポゾンを利用した遺伝子破壊法は、gene targeting法に較べて、容易、且つ迅速に遺伝子破壊を行うことが可能であり、ゲノム解析により構造の明かとなった大量のイネ遺伝子¹¹⁾の機能解析のための強力な武器となりうると期待される。さらには、遺伝子破壊イネを直接育種に利用することも可能と考えられる。たとえば、アンチセンス技術を利用し、有用な形質を付与したトランスジェニック植物が作出されているが、遺伝子破壊により同等な植物を得ることが可能であり、且つ組換え体ではないので実用化が容易である。

5. おわりに

ここでは、イネのレトロトランスポゾンについてのみ述べたが、培養によって活性化されるレトロトランスポゾンはタバコからも発見されており⁴⁾、同様な性質を有するレトロトランスポゾンは植物に広く分布し、培養変異誘発に深く関わっている可能性が考えられる。培養によって活性化されるレトロトランスポゾンは、PCR法を用いて容易に単離可能であり^{4,6)}、今後多くの植物でレトロトランスポゾンを利用した遺伝子破壊系が開発されるものと期待される。また、最近タバコのレトロトランスポゾンがシロイヌナズナやイネでも転移可能であることが示され¹²⁾、異種植物のレトロトランスポゾンの利用も可能と考えられる。

文 献

- 1) Hirochika, H., *et al.* (1992) *Mol. Gen. Genet.*, 233 : 209-216
- 2) Voytas, D.F., *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 : 7124-7127
- 3) Hirochika, H. and R. Hirochika (1993) *Jpn. J. Genet.*, 68 : 35-46
- 4) Hirochika, H. (1993) *EMBO J.*, 12 : 2521-2528
- 5) 廣近洋彦 (1994) *化学と生物* 32 : 652-660
- 6) Hirochika, H., *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press)
- 7) Ji, H., *et al.* (1993) *Cell*, 73 : 1007-1018
- 8) Ballinger, D. G. and S. Benzer (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 : 9402-9406
- 9) Zwaal, R.R., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 : 7431-7435
- 10) Koes, R., *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 : 8149-8153
- 11) Sasaki, T., *et al.* (1994) *Plant J.*, 6 : 615-624
- 12) Hirochika, H., *et al.* (1996) *Plant Cell*, 8 : 725-734

Streptomyces 属放線菌の自己調節因子

大阪大学 工学部応用生物工学専攻

山田靖宙

抗生物質を始め、その他有用二次代謝物質を多数生産する *Streptomyces* 属放線菌の多くはブチロラクトン型の構造を持つ微生物ホルモン様物質、自己調節因子を極微量生産し、その形態分化、二次代謝物質の生産を制御していることが明らかになってきた。現在明らかになっているこれらの自己調節因子について、その構造、生合成、レセプタータンパク質について解説する。

1. はじめに

放線菌は分類学上、原核生物に属し、真核生物に属する糸状菌や酵母類と比較すると下等な生物と考えられている。しかしながら、糸状菌と類似した形態分化を行い、基底菌糸、気菌糸、分生孢子を形成するユニークな微生物である。また、二次代謝物質生産に関しては糸状菌と同様、またはそれ以上の能力を持ち、抗生物質を始めとする様々な生理活性物質の生産者としてよく知られており、醗酵工業上重要な微生物である。さて、既知の放線菌の属で最も種の数が多いものが *Streptomyces* 属であり、streptomycinをはじめ、多くの生理活性二次代謝物質がこの属から分離されている。*Streptomyces* 属においては約25年前から形態分化あるいは二次代謝物質生産を極低濃度で誘導する微生物ホルモン様物質の存在が確認されている。これらの低分子性物質は信号伝達物質 (signal substance) または、自己調節因子 (autoregulator) と呼ばれているが、本稿では後者の名称を採用する。以下その構造、生合成、レセプタータンパク質について簡単に解説したい。

2. Streptomyces 属自己調節因子の構造

図1に既知の *Streptomyces* 属自己調節因子の構造を示した。A-factor はロシアの

Khokhlov らにより発見、構造決定された最初の自己調節因子である¹⁾。A-factor は

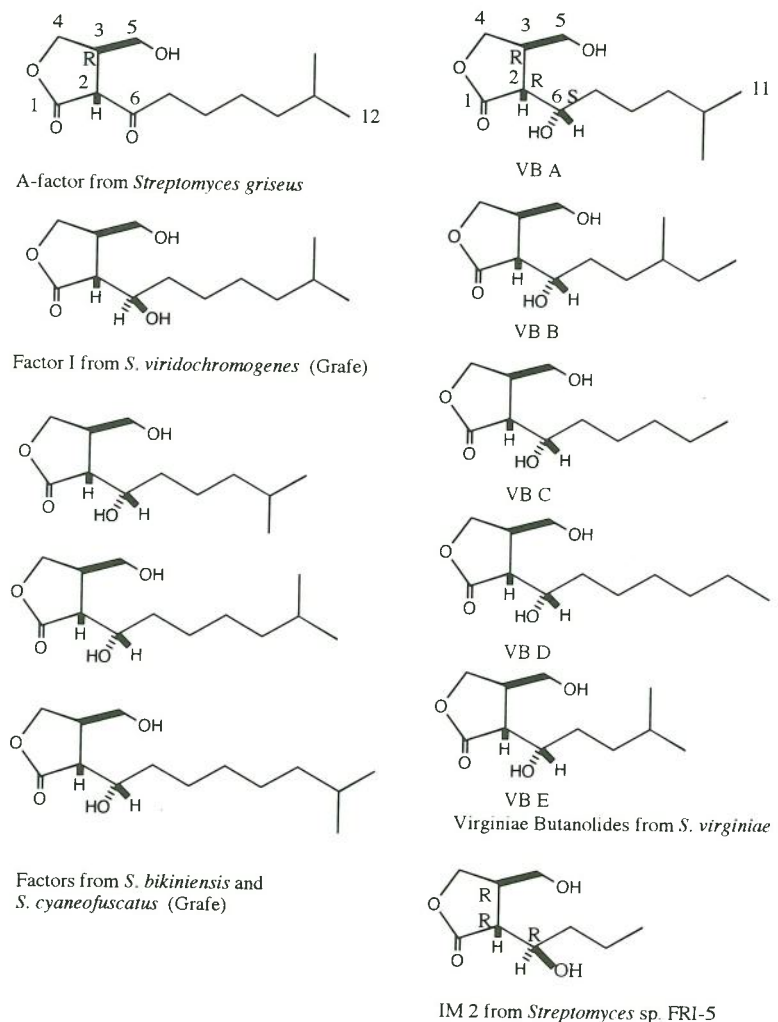


図1 Butyrolactone Autoregulator from *Streptomyces*

Streptomyces griseus において, streptomycin の生産, 及びその気菌糸, 孢子形成を誘導する。Factor 1 (*S. viridochromogenes*), と *S. bikiniensis*, *S. cyaneofuscatus* の因子は *S. griseus* において anthracycline 系抗生物質の生産と形態分化を誘導する活性を持ち, ドイツの Gräfe らにより分離構造決定された^{2,3)}。 *virginiae butanolides A-E* (VB A-E) は柳本らにより発見され, 我々により, 分離,

構造決定された因子であり, *S. virginiae* において, 抗生物質 virginamycin の生産を誘導する^{4,5)}。 IM-2 はやはり, 最初に柳本らにより, その存在が指摘され, 我々により分離, 構造決定された因子である⁶⁾。 IM-2 は D-cycloserine 生産株, *Streptomyces* sp. FRI-5 において, 青色色素の生産と抗生物質の生産パターンを D-cycloserine から showdomycin, minimycin 等の nucleoside 型に変換する機

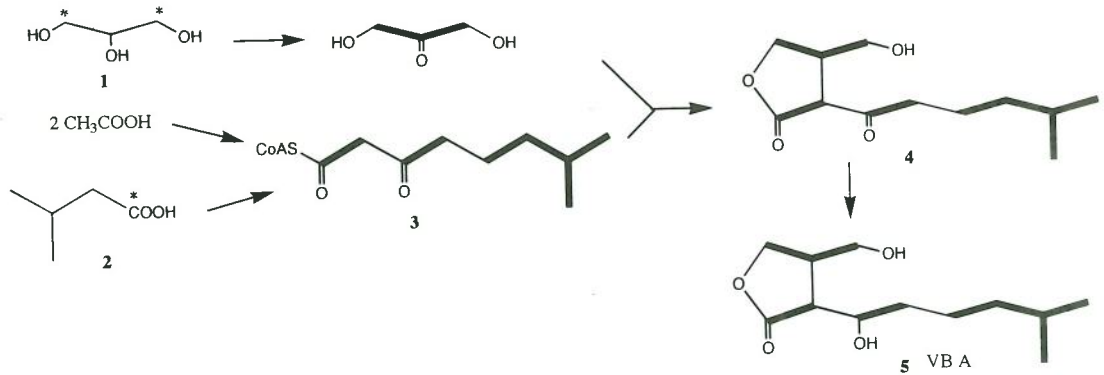


図2 VB Aを構成する分子

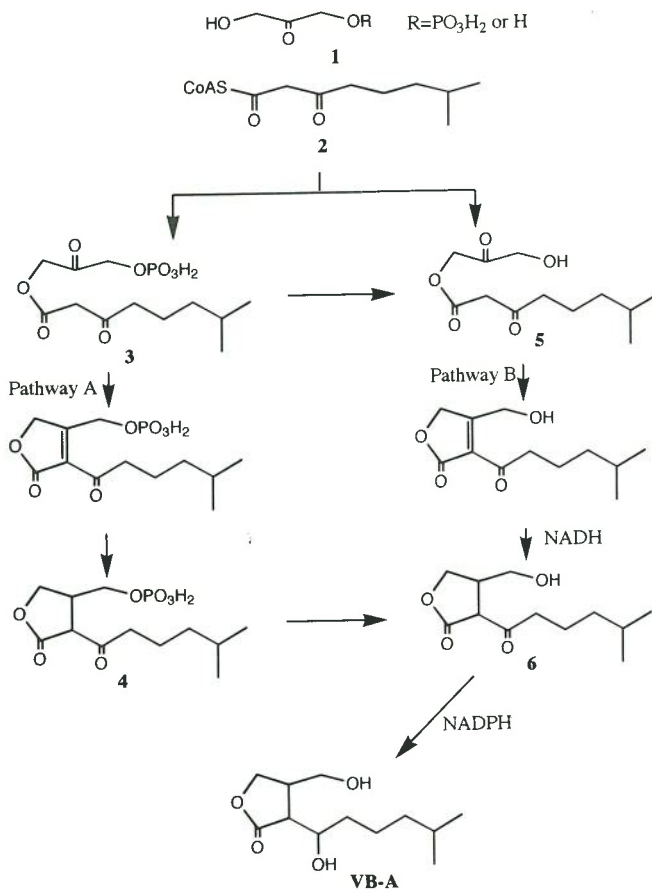


図3 VB Aの生合成経路

能を持つ因子である⁷⁾。これらの自己調節因子は数 nM の低濃度でその活性を示し, 生産量も数十 $\mu\text{g/l}$ である。構造上の共通点は, butyrolactone の基本骨格と, その C3 位に hydroxymethyl 基が置換し, C2 位には 1'-oxo, または, hydroxy-alkyl 基が *trans* の立体的な関係で置換している点である⁸⁾。絶対構造は A-factor, VB, IM-2 において, 図 1 で示したごとく, それぞれ, A-factor : 2R, 3R⁹⁾, BV : 2R, 3R, 6S¹⁰⁾, IM-2 : 2R, 3R, 6R¹¹⁾, と決定されている。相異点は, 1) C6 位の酸化還元状態で, ケト基または水酸基, 2) 水酸基の配向, VB型または, IM-2 型, 3) C2 位アルキル側鎖の長さと同数の分岐の 3 点である。butyrolactone 型自己調節因子の *Streptomyces* 属における分布は広く, 我々, 別府ら, Gräfe らの研究結果を総合して推定すると, 約 60% の種がこれらの因子を生産している。

3. *virginiae* butanolide A (VB A) の生合成

S. virginiae における VB 類の生産量は極めて微量であるため, 同位元素標識中間体の取

り込み実験は困難であるが、*S. antibioticus* の一菌株が比較的多量のVB A (数mg/l) を生産していることを見出したため、この菌株を用いて生合成研究を行った。¹³C, ²H 標識 glycerol, acetic acid, isobutyric acid, β -ketoacid thioesterの取り込み実験より、VB A 分子の構成は図2で示したようになり、特に 3-oxo-7-methyl-octanoyl CoA (3) が鍵中間体であることが明らかになった^{12,13}。この結果より、図3に示す最終3段階の生合成経路AとBを推定し、考えられる中間体、3, 4, 5, 6を合成して、*S. antibioticus* 細胞抽出粗酵素液と反応させ、生成したVB Aの収率より Pathway Bが最も可能な経路であることが判明した¹⁴。*Streptomyces* 属の主な3種類の butyrolactone 型自己調節因子は基本的にはVB Aと同様に生合成されるが、鍵中間体である 3-keto acidの生合成 starterの差異、6-dehydro型からの脱水素酵素の性質によって A-factor型、VB型、IM-2型になると考えられる。

4. VB レセプタータンパク質

butyrolactone 型自己調節因子は極低濃度で菌体外に分泌され、他の細胞の形態分化あるいは二次代謝物質生産を誘導する活性を有することから、微生物ホルモン様物質ともいえる。したがって、この低分子信号伝達物質に対応するレセプターが存在し、細胞内における情報の中継を行っている可能性が大きい。この仮説に基づき、*S. virginiae* の細胞中よりVBレセプターを検索した。図4に構造を示した³H標識VB C7を合成し、これを用いて、*S. virginiae* の細胞抽出液中にVB結合活性のあるタンパク質を確認した。このタンパク質は1ゲノム当たり、30~40分子程度しか存在せず、VBとのKd値は数nMと

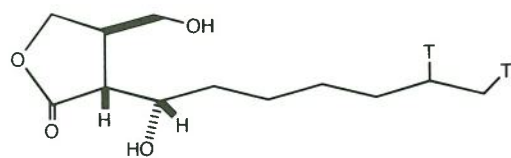


図4 Tritium labeled VBD(VBC₇)

いう強い結合活性を示した^{15,16}。VBレセプター(以下 Bar A: butyrolactone auto-regulator receptor A と略称) 精製行程中これと常に行動をともにし、その保護作用も示したタンパク質 Vbr A (*E. coli* の antiterminator NusGに相当するタンパク質)¹⁷を苦勞を重ねた末取り除き、精製に成功した¹⁸。Bar Aの分子量はSDS PAGEで26kDa、未変性状態では、ゲル濾過で52kDaの分子量を示し、ホモダイマー構造をとっていることが強く示唆された。N-末端部分、および lysylendopeptidase 消化物中より精製した peptideのアミノ酸配列を決定し、これに基づいて調製したDNAプローブを用い、Southern解析により定法どおり大腸菌に *bar A* 遺伝子をクローニングした。*bar A*の塩基配列およびアミノ酸配列を図5に示す。*bar A*は232個のアミノ酸をコードし、これに基づく分子量は25001である。各種データベースによるホモロジー検索では、類似のタンパク質は見当たらなかったが、N-末端部分にDNA結合性 repressor 共通の helix-turn-helix 構造をとるアミノ酸配列があり、ホモダイマー構造をとること、C-末端にその要因となる疎水性アミノ酸(Ala等)と酸性アミノ酸残基が多い点を考慮すると Bar Aの機能はVBとの結合によりDNAから遊離する負の repressor である可能性が大きい。

*bar A*を *S. lividans* に導入すると効率的に発現され、その細胞抽出液は強いVB結合活性を示した。また、*bar A*を *E. coli* 中で T7 RNA polymerase を利用して活性のある Bar A を大量発現させることに成功し、その性質を詳細に調べる道が開けた。我々は最近、新たな³H標識リガンドを合成し、これを用いてIM-2結合タンパク質の存在を *Streptomyces* sp. FRI-5細胞中に確認し、その精製に成功した。IM-2結合タンパク質は、分子量27kDaでホモダイマー構造をとり、Kd値は1.3nMでその性質はBar Aに類似している¹⁹。現在、IM-2結合タンパク質遺伝子(*far A*と命名)のクローニング、塩基

GGTACCGACCTGTCGGATGGTTTCGGAGGCCAG	33
CAGCGGGTCGTAGCAGCCGTTACCCGGGGTGAAGTAGCTGTGCGCCCTGGGCCACTGCGC	93
CGTCAGGGCGAATCGGTTCTCCGCGGTCCGGCTCCATCCCGTCAGAAACACTTCGGCGAC	153
CGCGCCCGGTGGACCAGCTCCCGCGGAACCGTGTGTCATGGCCGATGCGCGGGCCGG	213
TCCGCGGGTCTGGAACGCGGTTCCGCGGGCCGGGACGGCCACAGGCAGGGTTTCGTTTC	273
AACCAACACAACAGACATGGAATCCCCATAGAAACCGATCTCGCGGGAACGGGCGCTC	333
CCCGTCTCCCCGCCGATAAGATACATACCAACCGGTTCTTTGATAGCCGGATGTTGAT	393
CTATCTAGGCTGACTGGCCGGTCCCGACAGCGCGGATGCATGACAGGAGAAGCCCT	453
ATGGCAGTGCACACGAACGGGTGGCAGTGCACAGGAACGGCCGTCCGCACGCGGCAG	513
M A V R H E R V A V R O E R A V R T R Q	
N-terminus	
GCGATCGTGCGGGCAGCCGCTCGGTCTTCGACGACTACGGGTTTCGAGGCCGCCACAGT	573
A I V R A A A S V F D E Y G F E A A T V	
GCAGAGATCCTCTCGCGGGCCTCGGTACCAAGGGCGCGATGTACTTCCACTTCGCTTCC	633
A E I L S R A S V T K G A M Y F H F A S	
fr. 24	
AAGGAAGAGCTGGCCCGCGGCTGCTGGCCGAGCAGACCCTGCACGTGGCGGTGCCGAA	693
K E E L A R G V L A E O T L H V A V P E	
fr. 25	
TCCGGCTCCAAGGCGCAGAACTGGTAGACCTCACCATGCTGGTCCGCCACGGCATGCTG	753
S G S K A O E L V D L T M L V A H G M L	
fr. 42	
CACGATCCGATCCTGCGGGCGGGCAGCGGGTCCGACTGGACCAGGGGGCGGTGGACTTC	813
H D P I L R A G T R L A L D Q G A V D F	
TCCGACGCCAACCCGTTCCGGCAGTGGGGCGACATCTGCGCCAGCTCCTGGCGGAGGCA	873
S D A N P F G E W G D I C A Q L L A E A	
CAGGAACGGGGGAGGTGCTTCCGCACGTGAACCCGAAAAAGACGGCGACTTCATCGTC	933
Q E R G E V L P H V N P K K T G D F I V	
GGCTGCTTACCGGGTCCAGGCGGTCTCCCGGGTCACTCCGACCGCCAGGACCTCGGC	993
G C F T G L Q A V S R V T S D R Q D L G	
CACCGGATCTCGGTGATGTGGAACCACGTGCTGCCAGCATCGTCCCGCGTCCATGCTG	1053
H R I S V M W N H V L P S I V P A S M L	
ACCTGGATCGAAACCGGCGAGGAGCGGATCGGGAAAGTCCGCGGGCGGGCCGAGCCGCC	1113
T W I E T G E E R I G K V A A A A E A A	
fr. 21	
GAGGCTGCGGAGGCTCCGAGGCGCCTCCGACGAGTAGGAGCACCGACTTCAGGACATG	1173
E A A E A S E A A S D E *	
CCGGGCACCCAGGGGTGCCCGCATGTTGCTTCCGCGCCCCACCCGCCCGGAACGG	1233
GCCGCCGGCAACGGGGCAGCAAGAACTTCGGCCAAAAACAAGGCAACCGGCTCGGTTT	1293
ACTTGGCAATCGGGTCTGACGGTTGTATCGTATGCCGAGCGCCGCAACTCGCACCGG	1353
GCGCCGTTCCGGTGTACGTTGCGGGCAGCAGCCGCTCCCTCCAGCGGGGGTCCGGT	1413
GCCCCGCGCGGCGCTTGACCTGCCCGCATCCGAACCCAGCCCGCGGGCAGCACAGG	1473
ACGTTACAGAAACCGAGCGGTTGCTTGCCTCAGCCAAACGGTGCACGTCAGGAGTTGCC	1533
TTGACACCCAAACAGGAACGCGCTTCCGCACCCGACCCAGCTGGTGTCTCGGCGGCC	1593
GAGGCCCTTCGATCGGCAGGGTTTCGCGACGGCCTCGCTCACCAGCCATCAGAACAGCGCC	1653
GGTGTACGTAACGGGGCCTGCACTTCACTTCGAGAGCAAGGAAGCGCTCGCCGCCGGC	1713
GTCAAGCGGAGGCGGCCGAGCGGATGCGGACGATCGTCGAC	1755

図5 *barA* の塩基配列とアミノ酸配列

配列決定も終了しており、その構造の詳細な比較が可能になった。IM-2 結合タンパク質は 221 アミノ酸残基からなり、N-末端に Bar A 同様 helix-turn-helix の DNA 結合領域を持ち、その他アミノ酸レベルでの類似性の高い領域を持っていることがわかった。*S. griseus* の A-factor 結合タンパク質に関しても東大グループによる研究が進行しており、分子量 29kDa の類似したタンパク質が明らかにされた²⁰⁾。最近、そのタンパク質の精製、遺伝子のクローニングが終了し、*arpA* と命名された²¹⁾。Arp A は 276 アミノ酸残基からなり、やはりダイマー構造を取るほ

か、N-末端に DNA 結合モチーフを持つ Bar A 類似のタンパク質である。*barA* をプローブにした、*Streptomyces* sp. FRI-5 および *S. griseus* 染色体 DNA の Southern 解析結果はマイナスである。これらレセプターは総合的な構造、機能は類似しているが塩基配列のホモロジーは低い。勿論、各レセプターはそれぞれのリガンドに特異的に結合する。

5. おわりに

現在、*Streptomyces* 属の自己調節因子に関する我々の知見はまだすこぶる乏しく、また一般の認識も低いと思われる。しかし、放

線菌の土壤中を始めとする生物圏での豊富さ、多様な二次代謝物質生産能を考慮すると、これら微生物ホルモン様自己調節因子に関する今後の研究は基礎、応用ともに極めて重要であろう。butyrolactone型自己調節因子は単でユニークな構造を有し、幸いなことには、微量で有効なうえ、化学合成が容易である。今後、抗生物質の増産²²⁾、生態学的基礎研究と応用に役立つことを期待している。

文 献

- 1) Khokhlov, A. S. *et al.* (1976) *Bioorg. Khim.*, 2 : 1142
- 2) Gräfe, U. *et al.* (1982) *J. Antibiot.*, 35 : 1722
- 3) Gräde, U. *et al.* (1983) *Biotechnol. Lett.*, 5 : 591
- 4) Yamada, Y., K. Sugamura, M. Kondo, M. Yanagimoto and H. Okada (1987) *J. Antibiot.*, 40 : 496
- 5) Kondo, K., Y. Higuchi, S. Sakuda, T. Nihira and Y. Yamada (1989) *J. Antibiot.*, 42 : 1873
- 6) Sato, K., T. Nihira, S. Sakuda, M. Yanagimoto and Y. Yamada (1989) *J. Ferment. Bioengi.*, 68 : 170
- 7) Hashimoto, K., T. Nihira, S. Sakuda and Y. Yamada (1992) *J. Ferment. Bioengi.*, 73 : 449
- 8) Sakuda, S. and Y. Yamada (1991) *Tet. Lett.*, 32 : 1817
- 9) Mori, K. (1983) *Tetrahedron*, 39 : 3107
- 10) Mori, K. and N. Chiba (1990) *Liebigs Ann. Chem.*, pp.31-37
- 11) Mizuno, K., S. Sakuda, T. Nihira and Y. Yamada (1994) *Tetrahedron*, 50 : 10849
- 12) Sakuda, S., A. Higashi, T. Nihira and Y. Yamada (1990) *J. Am. Chem. Soc.*, 112 : 898
- 13) Sakuda, S., A. Higashi, S. Tanaka, T. Nihira and Y. Yamada (1992) *J. Am. Chem. Soc.*, 114 : 663
- 14) Sakuda, S., S. Tanaka, K. Mizuno, O. Sukcharoen, T. Nihira and Y. Yamada (1993) *J. Chem. Soc. PERKIN TRANS.*, 1 : 2309
- 15) Kim, H. S., T. Nihira, H. Tada, M. Yanagimoto and Y. Yamada (1989) *J. Antibiot.*, 42 : 769
- 16) Kim, H. S., H. Tada, T. Nihira and Y. Yamada (1990) *J. Antibiot.*, 43 : 692
- 17) Okamoto, S., T. Nihira, H. Kataoka, A. Suzuki and Y. Yamada (1992) *J. Biol. Chem.*, 267 : 1093
- 18) Okamoto, S., K. Nakamura, T. Nihira and Y. Yamada (1995) *J. Biol. Chem.*, 270 : 12319
- 19) Ruengjtchatchawalya, M., T. Nihira and Y. Yamada (1995) *J. Bacteriol.*, 177 : 551
- 20) Miyake, K., S. Horinouchi, M. Yoshida, N. Chiba, K. Mori, N. Nogawa, N. Morikawa and T. Beppu (1989) *J. Bacteriol.*, 171 : 4298
- 21) Onaka, H., N. Ando, T. Nihira, Y. Yamada, T. Beppu and H. Horinouchi (1995) *J. Bacteriol.*, 177 : 6083
- 22) Yang K. Y., H. Shimizu, S. Shioya, K. Suga, T. Nihira and Y. Yamada (1995) *Biotechnol. Bioengi.*, 46 : 437

国内情報

木材などバイオマスの液化法と液化物の 利用法の開発

京都大学農学部

白石信夫

おがくずや端材など木材工業廃棄物、さらにはビール、缶コーヒー、製油、デンプンなどの製造工業から出るバイオマス廃棄物の量は莫大なものがある。それらの利用法は必ずしも進んでいない。そこで、フェノールやアルコール類存在下での木材などバイオマスの液化が、最近検討されるようになった。そこで本稿では関連の液化法を紹介すると共に、木材液化がどのようなものであるかを理解するため、また、液化生成物に問題がないかを検証するためにも進められている液化機構の解明の現状、および液化物の利用法の開発状況について述べる。

1. はじめに

十数年前、筆者らは木材にエステル化やエーテル化をほどこすと熱可塑性が著しく高くなり、いくつかの例では熱流動性を直接示す材料に変化することを知った¹⁻³⁾。プラスチックのようになったということであり、溶剤に溶かすことも可能なはずだと考えられた。

そこで、化学修飾した木材を、直接溶解しようとする試みが行われるようになった。その延長線上で、最近では無処理の木材、すなわち化学修飾していない普通の木材でも、フェノール類やその他の有機化合物を用いて、液状にすることができるようになってきている。つまり、木材の液化である。現在、より合理的な液化手法を見出す開発的研究、液化機構の解明など液化に関する検討が進められているとともに、液化木材の応用についても各様な試行、検討が行われている。

2. 化学修飾木材からの溶液化および液化

木材を溶液化・液化しようとする最初の試みは、化学修飾した木材を、適切な溶剤の存在下で加熱するといったものであった。たとえば、ベンジル化木粉をジメチルスルホキシド存在下では60~80°Cに加熱すると粘稠な溶液が得られた。また、一連の脂肪酸エステル

化木材が、ベンジルエーテルやフェノール類あるいはそれらの有機ないし水性の溶液に高温高压(200~270°C, 20~150分)処理で、溶解・液化することが知られた。カルボキシメチル化木材やアリル化木材をフェノール類やホルマリンを用いて、液状にし得る(170°C, 30~60分)ことも見出された。

ついで、適当な触媒を用いると、この種の溶解・液化がずっと効果的に起こり得ることが知られた。たとえば、リグニンが部分的にフェノールで可溶媒分解(フェノリシス)し、フェノール化する条件を用いれば、フェノール類による化学修飾木材の溶解条件を80°C, 30~150分程度とかなり穏やかなものとすることができる。また、部分的にリグニンの加アルコール分解(アルコリシス)を引き起こすことのできる同様な条件を用いることにより、1,6-ヘキサジオール、1,4-ブタンジオールなどの多価アルコールに、アリル化木材やメチル化木材など多くの化学修飾木材を溶解・液化し得ることも知られた。

その後、九州大学のグループも、化学修飾木材を0.1~0.2%塩素水溶液中、低温で短時間(0°C, 5分程度)攪拌するという穏和な条件で塩素化すると、化学修飾木材の溶解性を大幅に向上させ得ることを報告した。これは、第三の溶解液化法に当たるもので、たとえば、塩素化したシアノエチル化木粉は、m-クレゾールに室温で98%溶解し、粘度の

SHIRAISHI Nobuo

高い溶液となる。リグニンの芳香環上で水素とのみ置換反応が起こる程度の穏やかな塩素化を行うだけで、木材の全ての成分がほとんど劣化せずに、中性の有機化合物に室温で溶解するという結果であり、大変興味深い。

3. 無処理木材の液化

化学修飾木材の溶解あるいは液化について上述のような検討を進めていくうちに、木材を事前に特別に処理しなくても液化し得ることが知られてきた。化学修飾木材の置換度と液化しやすさの関係を調べたところ、低置換度さらには無処理のものでも十分液化できることが順次わかってきたためである。たとえば、チップ状から木粉状の木材を、フェノールなどフェノール類、1,4-ブタンジオールなど多価アルコール類、メチルセロソルブ、ポリエチレングリコールなどのオキシエーテル類を含む多くの有機化合物のいずれかと所定の混合比で耐圧容器にとり、200~250°C程度の加熱下で30~150分処理すると、各々の木材成分の分子内での化学結合の開裂を伴った液化を起こし得る。

ついで、触媒を用いた、木材成分の加溶媒分解を併起させての液化法が無処理木材の液化にも有効に適用し得ることが知られた。たとえば、硫酸やフェノールスルホン酸を触媒として用い、フェノール存在下で木材を処理すると、150°C程度の中温・大気圧下で液化が容易に進む。また、同じ触媒系で、エチレングリコール、ポリエチレングリコールといったものを含む多価アルコール中での木材の液化も同様に進むことが見いだされた。 ϵ -カプロラクトン/多価アルコール混合系では硫酸など触媒存在下でポリカプロラクトンの生成を伴った木材の液化が150°C、数十分の反応で進むことも知られた。これらの液化条件はオルガノソルブパルプ化、すなわち加溶媒分解による木材からの脱リグニンにおける反応条件を、やや厳しくしたものである。このことは、両者に関連があるという意味で興味深い。

これらの木材の液化を連続的に行う装置の

開発も始まっており、粉末状ないし細片状の木材を連続的に投入して、たとえばフェノールおよび酸触媒と加熱下で練りながら送り出すことにより、10分以内で液化物が得られることが知られて来ている。

4. 木材の液化機構

これまでに述べてきた木材の溶解・液化は同列のものではない。シアノエチル化など化学修飾した木材をさらに穏やかな条件で塩素化したものは、室温でm-クレゾールなどいくつかの有機溶剤に溶けるということを既述したが、この場合、シアノエチル化および塩素化の過程で、木材主成分の高分子性がいちじるしく損なわれたとは考えにくい。そのさい、化学修飾が適切なものであり、合目的に行われていれば、セルロースおよびヘミセルロースは溶媒に溶解するものとなる。問題はリグニンの持つ3次元網状構造であり、シアノエチル化と軽度の塩素化によりその架橋度が著しくではないにせよ、必要な程度までは低減され、室温で有機溶剤に溶解するまでになったものと理解される（木材はセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンを主成分としており、それらの合計で約95%の含量となる）。換言すれば、リグニンの分子内結合をいちじるしく開裂しなくても、シアノエチル化と塩素化とによって、その凝集構造を緩め、架橋度を少々下げれば、化学修飾木材全体として、主成分の高分子性を保ったまま溶解するようになるということである。

それに対し、化学修飾木材さらには無処理木材の高温高圧下での液化の場合、あるいは触媒を用いてのソルポリシス（加溶媒分解）を併起させた中温での液化の場合には、まず、リグニン、ヘミセルロース、およびセルロース分子がホモポリシスないし、ソルポリシスなどヘテロリシスを受け、低分子化することが考えられる。したがって、この種の液化が木材成分のどの程度の劣化、すなわち低分子化を伴って起こるものであるのかが問題となる。その関連で、いわゆる木材の油化とここでの液化を区別しないで論議する場合もあるので、

その違いについて二、三述べる。油化の一例を挙げると、オートクレーブ中において、木粉を水および触媒 (NiCO_3 など) の存在下で水素および窒素ガスにより20気圧に加圧し、350°Cまで急速に加熱するといったものであり、この場合、55wt%の収率で油状物を得ている。その際には、木材成分中の酸素をできるだけ除去し、炭化水素化することに力点が置かれてきている。それに対して、ここでの液化法の一つであるフェノールに対し約3 wt%の硫酸存在下、150°Cで30分～3時間液化した場合の収率を表1に示す。木粉とフェノールの重量比は1:2とし、還流冷却管をつけたガラス反応容器中で液化させ、仕込み量Aと液化物重量Bとを秤量し、収率を計算している。解放系での反応であるにもかかわらず、3時間の反応においても98.3%とほとんど100%の収率が得られている。このことは、油化とは全く異なり、液化中に炭酸ガスや一酸化炭素などを生成するような極端な低分子化を伴う反応ではないことを示唆している。

表2には硫酸触媒存在下・非存在下でのいくつかの反応条件において、木材をフェノールと共に処理したときの液化の進行状況と、液化に伴って導入された結合フェノール量と

表1. 木材液化の収率

液化時間 (h)	仕込み重量 A (g)	フェノール液化木材溶液 B (g)	収率 A/B×100 (%)
0.5	306	302	98.7
1.0	306	303	99.0
2.0	306	298	97.4
3.0	306	301	98.3

を示している。硫酸触媒存在下での液化は主としてヘテロリシス、すなわちこの場合はフェノリシスによってなされること、無触媒高温 (この場合 250°C) での液化はホモリシスによりなされること、それらにおいてヘミセルロース、リグニンがまず液化され、セルロースの液化が遅れること、フェノリシスに伴ってフェノール化が起こることなどが知られているが、この表からも硫酸触媒の存否で液化度よりも結合フェノール量に大きな差がでることが知られる。また、結合フェノール量が大きいかほど未反応の遊離フェノール量を除去して得られるノボラック様樹脂の反応性が高くなり、成形後の強度も高くなること、また、その反面で結合フェノール量が大きくなると溶融温度が高くなり熱流動性が悪くなることも知られた。

なお、硫酸触媒存在下150°Cで行われる液化のさいには主としてヘテロリシス、また、酸非存在下250°Cでの液化の場合には主としてホモリシスでそれぞれ木材成分の低分子化が進むということは、リグニンのモデル化合物としてグアイアシルグリセロール- β -グアイアシルエーテル (GG) を用いてそれぞれ行った液化反応生成物の単離と化学構造の決定によってはっきりと示された⁴⁾。それらのさい単離されて来る化合物は前者で十数種、後者で50種以上となり、液化のさい生ずる低分子化合物の殆ど全てを網羅するものとなったが、発ガン性など特に問題となる物質は生じないことも知られた。多糖およびそのモデル化合物 (たとえばセロビオース) からの液化に伴う生成物についても単離と化学構造の

表2. 液化の条件と結合フェノール量

No.	触媒量 (%)	液化温度 (°C)	液化時間 (min)	結合フェノール量 (%)	注 釈
1	3	150	30	143.1	液化
2	6	150	30	147.4	液化
3	0	250	90	51.1	部分的液化 (残渣率=20.6%)
4	0	180	50	17.1	ほとんど変化なし (残渣率=89.7%)
5	0	180	50	5.0	ほとんど変化なし

同定の実験が同様に進められている。それらの中からさらに、フェノール液化の際の木材多糖成分の低分子化の主反応が、フルフラールやヒドロキシメチルフルフラールの誘導体にまで進むものではないこと、液化条件にもよるが、ほとんど完全に液化した時点で、ピラノース環単位がかなりの量残存していることも知られた。すなわち、液化条件に大いに依存するが、たとえば硫酸触媒法、150°Cで30分フェノール存在下で液化させたセルロース低分子化物（液化物）の約55%はピラノース環を保持していた。他方で木材液化物の直接の分析から、リグニンの液化物の主区分が側鎖を残していることが知られた。同時に溶媒フラグメントが、低分子化したリグニン分子中に化学結合により導入されることも確認された。それによって、リグニン低分子化物の溶剤への溶解性が大きくなり、また、フェノール類を用いる場合などでは、ヒドロキシフェニル化によりフェノール化リグニンとなつて、リグニンの反応性が増大することとなる。これらは上述のリグニンモデル実験での結果を裏付けたものとなっている。

5. 液化木材の利用

溶液状にできるということは、木材の利用に対してさらに多様な可能性をもたらす。まず、化学修飾木材の溶解ないし液化物の利用について述べる。

まず第一は、主成分の高分子性を損なわずに溶解した場合についてであるが、様々な木材成分、特にその誘導体を個々に単離して取り出せることである。これまでは、木材などからセルロースを単離し、十分精製した後、誘導体に変えるという手段でセルロース誘導体を得てきた。しかし、ここでの方法は順序が逆で、木材を原料とする新しいセルロース誘導体調製法として興味深い。

他方、液化のための溶剤として、フェノール、ポリエチレングリコールなど反応性の有機化合物を用いることができる。この場合、得られた溶解物のフェノール樹脂化やエポキシ樹脂化、さらにはウレタン樹脂化などが可

能であり、接着剤、発泡体など樹脂化成形物、さらには炭素繊維への応用が検討されている。この種のエポキシ樹脂接着剤や、カルボキシメチル化木粉のフェノール溶解物より調製した、レゾールタイプの水溶性フェノール樹脂接着剤を木材接着に用いると、JISやJAS規格を満たす耐水接着性も有していることが知られた。

発泡体などを含む成形材料も、各種の化学修飾木材の多価アルコール、フェノール、およびビスフェノール溶解・液化物から得られている。また、液化することで、繊維状物への紡糸も可能になる。新王子製紙(株)中央研究所の辻本技師らが検討しており、550m/分の速度で紡糸し、約9 μ 径のエンドレスな炭素繊維となり、900°Cまでの温度の焼結で引張り強度120kgf/mm²にまで達するものが得られる。

無処理木材からの液化物利用の具体例としても同様に、接着剤、発泡体、炭素繊維およびノボラック樹脂様成形物などがある。無処理木材を利用の方が実際的であるので、現在この種の液化物の利用の検討に関心が高まっている。

たとえば、高温高压法（250°C、90分）あるいは中温触媒法（150°C、30分、フェノールスルホン酸触媒）で液化して得られた無処理木材-フェノール溶液を樹脂化することで、通常レゾール樹脂接着剤よりも低温側（120°C）で接着でき、しかも耐水接着性に優れたレゾール型接着剤が合成されている。また、無処理木材のポリエチレングリコールあるいはポリカプロラクトン（PCL 303など）液化物から組成や反応条件を変えることにより、硬質および軟質発泡体を得ることができ、これは見かけの密度を0.04g/cm³程度まで小さくすることができ、しかも十分な物理特性を有している（写真1）。

前述の接着剤については、木材工業で工場内製造を前提として実用化を図っている企業があり、また硬質発泡体については、環境問題との関連でポリスチレン発泡体の代わりに包装用緩衝剤として、実用化への検討を始め

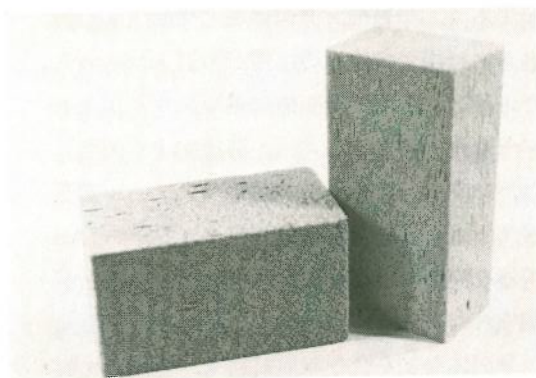


写真1 木材のポリカプロラクトン液化物から調製した発泡体

ている企業もある。他方、前出の炭素繊維については、無処理木材のフェノール液化物からの調製もその後試みられ、同様の性能を持つ製品が得られている。さらに、無処理木材のフェノール液化物から、低分子化した木材成分とは反応していない遊離のフェノールを減圧留去して粉末状物を得、木粉などの充填剤、ヘキサミン、硬化促進剤およびその他の添加物を加えた後、170~190°Cで熱圧することによって、既存ノボラック型成形物並の物性を持つ成形物を得ることもできる。成形物の曲げ強さに関しては、遊離のフェノールの留去を完全に行うほど強度も向上するということが明らかになってきている。さらに、液化の際の木材とフェノールとの反応時間を長くし、ついで遊離フェノールの留去をできるだけ完全に行ったのち、たとえば、コンパウンド（成形材料）中の微量の水や中和しきれない硫酸の存在を考慮して、酸化マグネシウム（MgO）などの効果的な硬化促進剤を適量加えると、市販のノボラックコンパウンドに近い、あるいはそれを凌駕する硬化挙動を示すようになることも知られた。これらは示差走査熱量計による硬化温度と硬化時の反応熱量の測定や、硬化過程を追跡する動的粘弾性の測定などで明らかとなった。また、液化物濃縮粉末が、ノボラック初期縮合物と同等の3次元硬化反応性を持つことが明らかになった。液化物がホルムアルデヒドとの反応なしに、ノボラック初期縮合物と同等の3次元硬化反応性を持つことは特筆に値する。しかも、コンパウンド中に、木材由来の成分を75%以上

含むという特徴もあり、最終製品（成形品）に木質感を与えることにもなっている。したがって、おがくずや端材などの有効利用法の一つとして期待され、現在ではパイロットプラントレベルでの研究も行われるようになって来ている。さらに、それらの液化生成物の熱流動性および反応性に関して、より精緻な検討が行われ、射出成形できるコンパウンドも開発されて来ている。関連の成形物を写真2に示す。

これらの無処理木材の液化法、および液化物のノボラック様成形物や、あるいは発泡体などへの転換手法は様々な物理的、化学的特徴を有する植物資源に応用できる。すなわち、デンプンやトウモロコシ子実の表皮からの発泡体や、スギの樹皮やコーヒー豆の抽出残渣、さらにOA紙からの成形物も作ることができる。

他方、木材液化物からの発泡体および成形物の生分解性と光分解性についても検討された。アルコール液化物からの発泡体サンプルを26~27°C、95%RHで6か月間土壌埋め込み試験を行い、その前後の表面状態を走査電顕鏡査するなどの検討を行い、この種の発泡体が土中微生物により分解されることが知られた。同様な実験を自然環境下で7月から翌年1月にかけて6か月間行って類似の結果を得た。また、6か月間屋外暴露することにより、試片の外観上の劣化、すなわち光分解も顕著に生ずることが知られた。一方、フェノール液化物からのノボラック様成形物につい



写真2 木粉のフェノール液化物から射出成形により調製した漆器〔塗装前(左)と塗装後(右)〕

でも、尿素樹脂成形物と比べて土中埋蔵試験を行い、後者が全く分解されない45日程度の処理でも生分解が著しく起こることが知られた。

発泡体については、引き続き^(株)日本医化器械製作所製バイオサーモアナライザーによる試験を、多種の微生物が共存する活性汚泥を用いて行った。この装置は生物細胞の生成する代謝熱を計測することにより、細胞の増殖活性を評価するというものである。汎用ポリオールからのポリウレタン発泡体（粉末状）が全く微生物増殖曲線を描けなかったのに対し、液化木材発泡体（粉末状）ではそれを明確に描き、しかもスギ粉末での場合と比較しても、より多く微生物を増殖することが知られた。これらの結果は、土壌中と同じように多種の生菌が共存する系で、木材液化物からの発泡体が生分解することを示すとともに、この評価法が定量的データを得る可能性があることも示唆している。

6. おわりに

以上、木材の溶液化・液化に関して簡単に

述べた。最近この種の研究は他の研究機関でも検討されるようになり、フェノール液化とその機作に言及した発表などが認められる。しかし、これらの検討は木材成分利用化学の分野に限られたものであり、一般的に討議されることはない。そこで、この機会にその内容を平面的に解説させていただいた。ご意見、ご教示をいただけたら幸いである。

文 献

- 1) Shiraishi, N., T. Matsunaga and T. Yokota (1979) *J. Appl. Polymer Sci.*, 24: 2361-2374
- 2) Shiraishi, N. (1991) Wood Plasticization. In "Wood and Cellulosic Chemistry", D. N.-S. Hon and N. Shiraishi eds., Marcel Dekker Inc., New York, pp. 861-906
- 3) 白石信夫 (1986) 木材学会誌, 32(10): 755-765
- 4) Lin, L., M. Yoshioka, Y. Yao and N. Shiraishi, *Holzforschung*, accepted



清酒酵母の分子育種

(財)岩手生物工学研究センター
中沢伸重

人類の貴重な遺伝子資源である清酒酵母は、接合能を持たない、胞子形成能が弱いなどの特性により交雑による育種が困難である。分子生物学的手法による解析の結果、清酒酵母が接合能を示さないメカニズムは、 a/α 二倍体細胞の非接合性と同様に a 型および α 型特異的遺伝子群が共に発現しないことによると結論した。さらにこの知見を基に清酒酵母から接合能を示す株を簡便に分離するシステムを構築した後、吟醸酵母から接合能を示す株を分離し、交雑体を造成した。

1. はじめに

清酒やビール醸造、アルコール製造などに用いられている *Saccharomyces cerevisiae* 株いわゆる実用酵母には、経験的選抜により工業的に優れた特性が数多く蓄積されている。このように実用酵母は人類にとって貴重な遺伝子資源と考えられる。それらの有用形質を支配する遺伝子を解析し育種へ応用するためには、変異誘起、性的交雑、細胞融合および形質転換などの操作が必要である。しかし、それらの操作を用いるには以下のような問題点がある。i) 接合能を持たないため他の株と自由に交雑ができない；ii) 胞子形成能をほとんど示さず、接合能を持つ減数分裂分離株が得られない；iii) 栄養要求性などの選択符号がないため細胞融合体あるいは形質転換体の選択ができない；iv) 高次倍数体であるため突然変異の誘起が容易でなく、突然変異

処理により遺伝子符号を付与し難い。

我々は実験室株の解析で使われた分子生物学的手法を用いて、実用酵母の代表株である清酒酵母協会7号の解析を進めている。本稿では、協会7号の接合型遺伝情報の解析結果を基に、接合能を有する株を簡便に取得するシステムを構築し、そのシステムを清酒酵母の育種に応用した実験を紹介する。

2. *S. cerevisiae* 接合型制御機構

S. cerevisiae の一倍体ヘテロリズム株には、 a および α の2種の接合型がある¹⁾。 a 細胞は α 細胞と接合して、 a/α 二倍体細胞を形成する。 a/α 二倍体細胞は接合能を示さないが、栄養飢餓条件下で胞子を形成する。 a および α の接合型は第III番染色体上の $MATa$ および $MAT\alpha$ 遺伝子によって決定される。接合型遺伝情報は同じ染色体上の HML および HMR 遺伝子にもコードされているが、Sir タンパク質によりそれらの発現は抑制されている(図1)。 $MAT\alpha$ 遺伝子は、 $MAT\alpha 1$ および $MAT\alpha 2$ の二つのシストロンからなり、 $\alpha 1$ タンパク質は α 型特異的遺伝子群 (α -specific gene; asg) の転写を誘導し、 $\alpha 2$ タンパク質は Tup1-Ssn6 タンパク質複合体^{2,3)} と協調して、 a 型特異的遺伝子群 (a -specific gene; asg) の転写を抑制する ($\alpha 2$ 抑制)。したがって $MAT\alpha$ 細胞は α 型を示す。 $MATa$ 遺伝子も $a 1$ および $a 2$ の二つのシストロンからなり、 $a 1$ タンパ

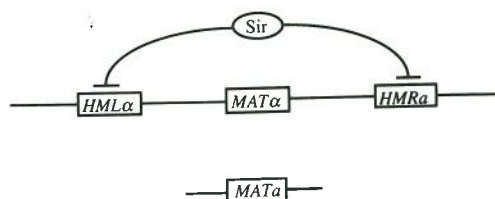


図1 第III番染色体上の HML , MAT , HMR 遺伝子座の構造と Sir による転写抑制

NAKAZAWA Nobushige

ク質は単独では機能せず、 $\alpha 2$ タンパク質の機能は不明である。したがって、*MATa*細胞では *asg* のみが発現し、*a*型を示す。*a*細胞と α 細胞の接合によって形成される *a/\alpha*二倍体細胞では、 $\alpha 2$ 抑制により *asg* の転写が抑制される。また、 $\alpha 1$ タンパク質は $\alpha 2$ タンパク質および *Tup1-Ssn6*タンパク質複合体と協調して $\alpha 1$ シストロンや一倍体特異的遺伝子群 (haploid-specific gene; *hsg*) の発現を抑制 ($\alpha 1$ - $\alpha 2$ 抑制) する。したがって、*asg* も *asg* も発現せず *a/\alpha*二倍体細胞は接合能を示さない (図2)。

3. 協会7号酵母が接合能を示さないメカニズム

実験室株に対して行われた解析法を用いて、清酒酵母の接合型遺伝情報を解析すれば、清酒酵母が接合能を持たないメカニズムを明らかにすることができると考えた。まず協会7号酵母の *HML*, *MAT*, *HMR* 遺伝子座の遺伝情報を調べた (図3⁴⁾)。染色体DNAを抽出し、制限酵素 *Hind*III 単独、あるいは *Hind*III と *Bgl*II で処理後、電気泳動し、³²Pでラベルした *MAT α* 遺伝子をプローブとしてサザン解析を行った。通常の実験室株では *Hind*III 単独消化で *HML*, *MAT* および *HMR* 遺伝子はそれぞれ約6 kbp, 4 kbp および5 kbp の大きさの断片に分離されることが知られている。*a*カセットに特異的な *Y α* 領域内には *Bgl*II 切断部位が存在するが、 α カセットに特異的な *Y α* 領域内には存在しない。したがって、制限酵素 *Hind*III 単独および *Hind*III と *Bgl*II の二重消化による電気泳動パターンを比較することによって *HML*, *MAT*, *HMR* 遺伝子座に *Y α* あるいは *Y α* のいずれの塩基配列が存在するか、また二倍体細胞の場合には、それぞれの遺伝子座が *a/a*, *a/\alpha* あるいは α/α のいずれの構造かを決定することができる。この原理に基づいて解析を行った結果、協会7号の *HML* 座は α/α , *MAT* 座は *a/\alpha*, *HMR* 座は *a/a* であることが明らかとなった。このことは協会7号は構造的に *a/\alpha*二倍体と同

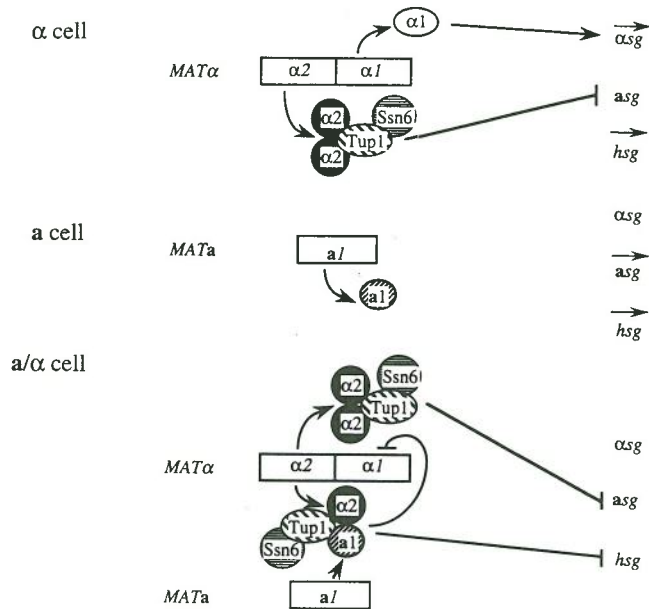


図2 *MAT* 遺伝子産物による *asg*, α *sg*, *hsg* の転写制御

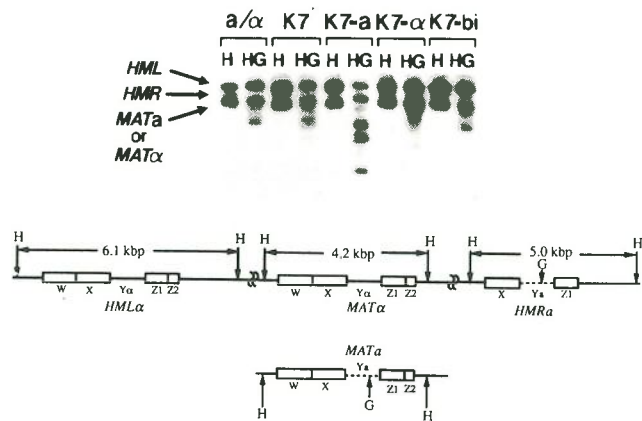


図3 協会7号酵母の *HML*, *MAT*, *HMR* 遺伝子座の接合型遺伝情報

a, α , *a/\alpha* および *K7* は、それぞれ *a*, α , *a/\alpha* 型細胞、および協会7号酵母からの染色体DNA試料を示す。
H: *Hind*III 処理, HG: *Hind*III-*Bgl*II 処理

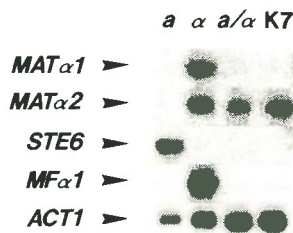


図4 協会7号酵母における接合型関連遺伝子の転写産物

a, α , *a/\alpha* および *K7* は、それぞれ *a*, α , *a/\alpha* 型細胞、および協会7号酵母からのRNA試料

じ接合型遺伝情報を持っていることを示している。

4. 協会7号酵母における接合型信号

協会7号に存在する a , α の接合型遺伝情報が正常に機能しているかどうかを知るために、接合型調節タンパク質をコードする $MAT\alpha1$, $MAT\alpha2$ および $MATa1$ 遺伝子、 a 型特異的遺伝子群の一つで、 a ファクターの分泌に関与する $STE6$ 遺伝子および α 型特異的遺伝子群の一つで、 α ファクターをコードする $MFA1$ 遺伝子の転写産物をノーザン解析により調べた (図4⁴⁾)。その結果、協会7号は a/α 二倍体細胞と同様に $MAT\alpha2$ の転写産物のみが検出された。

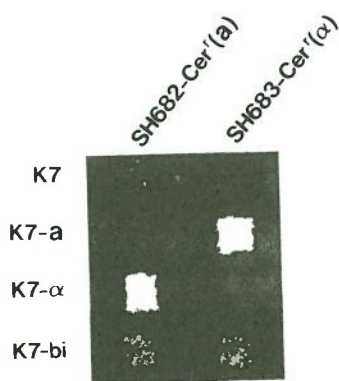


図5 協会7号酵母から分離した接合能を示す株の接合型試験

$STE6$ 遺伝子の転写産物が検出されないことより、 $\alpha2$ 抑制は正常に機能していると判断される。 $MATa1$ 遺伝子の転写産物は検出できなかったが、 $a1-\alpha2$ 抑制を受ける $MAT\alpha1$ 遺伝子の転写産物が検出されないことから、 $MATa1$ 遺伝子は転写されていると考えられる。以上の結果から協会7号が接合能を示さないのは、 a/α 二倍体細胞と同様に $\alpha2$ 抑制および $a1-\alpha2$ 抑制が正常に機能しているためと考えた。このことをさらに確

かめるためノーザン解析で用いた $MAT\alpha1$, $STE6$ および $MFA1$ 遺伝子のプロモーター部に酸性ホスファターゼ (APase) をコードする $PHO5$ 遺伝子の構造部とを連結して、それぞれ $MAT\alpha1p-PHO5$, $STE6p-PHO5$ および $MFA1p-PHO5$ 融合遺伝子を構築した。これらをセルレニン耐性選択により協会7号に導入後、形質転換体の APase 活性を測定した (表1⁴⁾)。 a/α 二倍体細胞および協会7号では、これらの融合遺伝子由来の APase 活性は低く、 $\alpha2$ 抑制および $a1-\alpha2$ 抑制が作用していることが確認された。以上の結果より、協会7号が接合能を示さないメカニズムは a/α 二倍体細胞と同様に $\alpha2$ 抑制により asg の転写が抑制され、 $a1-\alpha2$ 抑制により $MATa1$ 遺伝子の発現が抑制されるために、 asg および asg が共に発現しないことによると結論した。

5. 協会7号酵母から接合能を示す株の分離

協会7号の MAT 座には構造的および機能的に正常な a および α カセットが存在することが明らかになったので、接合能を示す株の分離が可能と考えた。分離を迅速かつ簡便に行うために、 $STE6p-PHO5$ および $MFA1p-PHO5$ 融合遺伝子を導入した協会7号を用いた。協会7号では $\alpha2$ および $a1-\alpha2$ 抑制が機能しているので、これらの融合遺伝子は発現せず、APase 活性染色を行った場合コロニーは染色されない。しかし、 a または α の接合能を持つようになれば、それぞれの融合遺伝子が発現し APase 活性染色によってコロニーは赤色を示すと考えられる (写真1)。それぞれのプラスミドを導入した協会7号を EMS で処理し、約50,000コロニ

表1. 協会7号酵母における asg , asg , および $MATa1$ 遺伝子の発現

接合型	酸性ホスファターゼ活性 (mUnit/OD ₆₀₀)		
	$MFA1p-PHO5$	$STE6p-PHO5$	$MAT\alpha1p-PHO5$
a	20.4	21.1	6.7
α	33.5	0.1	8.8
a/α	0.5	0.2	0.3
協会7号	0.8	0.6	1.4

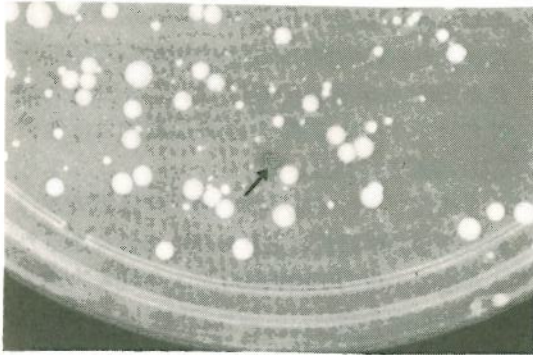


写真1 酸性ホスファターゼ活性染色で赤色を呈したコロニー(矢印)は、融合遺伝子が発現していると判定され、接合型を有する株の候補となる。菌株は吟醸酵母で、 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ のセルレニンを含むYPAD培地で、 30°C 、3日培養された。

一の中から APase 活性染色で赤あるいは桃色を呈する株を *STE6p-PHO5* 融合遺伝子を導入した株からは22株、*MFa1p-PHO5* 融合遺伝子を導入した株からは73株分離した。プラスミドを脱落させた後、我々が開発したセルレニン耐性接合型テスター⁵⁾により、これらの株について接合型試験を行った結果(図5⁴⁾)、a型および α 型を示す株がそれぞれ5株ずつ得られた。 α 型を示す5株のうち1株は同時に弱いa型も示した。これらのa型株と α 型株とをYPAD培地上で交雑させ、マイクロマニピレーターで大きな細胞を分離し、それらのクローンに対して接合型試験を行い接合能を持たないクローンを交雑体と判定した。

6. 吟醸酵母からの接合能を示す株の分離

協会7号から接合能を示す株が分離できたことから、他の清酒酵母でも同様な方法で接合能を示す株が分離できないかと考えた。岩手県内で吟醸酵母として用いられている3株に、セルレニン耐性選択により *STE6p-PHO5* および *MFa1p-PHO5* 融合遺伝子を導入した。得られた形質転換体に対して APase 活性染色を行ったところコロニーは染色されなかった。醸造特性を損なわないために EMS 処理は行わなかった。それぞれの株について約50,000コロニーの中から APase 活性染色で赤色を呈する約10クローンを見出した(写真1)。プラスミドを脱落

させた後、セルレニン耐性接合型テスターにより、接合型試験を行いa型あるいは α 型を示すクローンを選択した。次にこれらの株間で交雑し、8つの交雑体を造成した。工業技術センターで総米2.5kgの試験醸造を行った結果、得られた交雑体から吟醸香の主成分である酢酸イソアミルとカプロン酸エチルの生産能のバランスがとれている2株を選抜した。これらの株について、総米30kgの試験醸造を行っている(4月現在)。このように構築した接合能を示す株の分離システムは他の清酒酵母にも有用であることがわかった。

7. おわりに

吟醸酒を評価する場合に吟醸香が注目され、吟醸香生成能の高い吟醸酵母の育種が盛んに行われてきた。しかし2~3年前から味を重視する傾向に移行してきている。香と異なり味の場合は、一つの因子ではなく複数の因子が関与していると考えられ、特定の遺伝子を操作するだけで味を変えることは不可能である。交雑による育種では醸造特性においてバランスのとれた清酒酵母の造成が期待される。

清酒製造の因子には、酵母の他に米、麴、水および造りがある。目標とする酒質を得るためには、酵母だけでなく他の要素の検討も必要であろう。なお、本稿で紹介した接合能を示す株の分離システムは、著者が小西酒造(株)に在籍中の平成3年から平成6年までに行った大阪大学工学部応用生物工学科の大嶋泰治教授および原島 俊助教授との共同研究である。

文 献

- 1) Herskowitz, I. (1988) *Microbiol. Rev.*, 52: 536-553
- 2) Keleher, C. A. *et al.* (1992) *Cell*, 68: 927-937
- 3) Komachi, K. *et al.* (1994) *Genes Dev.*, 8: 2857-2867
- 4) Nakazawa, N. *et al.* (1994) *J. Ferment. Bioeng.*, 1: 6-11
- 5) Nakazawa, N. *et al.* (1993) *J. Ferment Bioeng.*, 1: 60-63

文献情報

英国で発生した新しい型の
クロイツフェルト・ヤコブ病

牛海綿状脳症 (BSE) の流行に伴って、英国ではクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) の疫学調査が再開された。目的は、CJD の発生に変化があるかどうかを確認し、BSE との関連を明らかにするためである。調査は英国 CJD サーベイランス・ユニットで実施され、1990年以来 207 症例について行われた。これらの症例に対し、臨床経過、危険因子の有無、DNA 解析および詳細な神経病理学的検査が行われた。同様の手法を用いた疫学調査はフランス、ドイツ、イタリアおよびオランダでも実施されている。

本論文では、1994年2月から1995年10月に英国で発病した10症例の CJD 患者が報告されているが、この症例すべてに今までの CJD とは異なる神経病理学的所見が認められた。患者の死亡年齢は19~41歳と若く、発症から死亡までの期間は7.5~22.5か月と通常の CJD に比べて長かった。臨床経過および脳波 (EEG) も散発型 CJD とは明らかに異なっており、臨床症状からはいずれも CJD とは診断されなかった。調査された8症例のプリオンタンパク質 (PrP) 遺伝子型は、いずれもコドン 129 がメチオニン・ホモ接合体で、家族性 CJD にみられる遺伝子の変異は認められなかった。

神経病理学的検査では10症例全てに海綿状変性と PrP 斑が認められた。海綿状変性、神経細胞の脱落、グリオシスは基底核および視床で最も著しく、大脳および小脳では限局性に認められた。病変の激しいところでは空胞の融合も認められた。全ての症例に共通した最も特徴的な所見は PrP 斑であった。PrP 斑の多くはクールー斑に類似し、周辺が淡明で中央に好酸性の芯を持っていたが、通常散発型 CJD に認められるものとは異なり、PrP 斑を取り囲む海綿状変性が認められた。類似の病変はスクレイピーで報告されており、'florid (花様)' 斑と呼ばれている。免疫染色でこれらの PrP 斑は強陽性に染まり、他にも小さな PrP 斑が多数認められた。PrP の沈着は細胞周囲性にも認められ、PrP 斑および細胞周囲性の PrP 沈着は大脳から小脳にかけて認められた。基底核および視床

では PrP の沈着は空胞周囲性にも認められた。これらの症例にみられた神経病理学的所見と PrP 沈着形態の違いおよび灰白質全域における PrP 沈着量の顕著な増加は、他の CJD 症例とは異なっていた。

9 症例について危険因子に関する調査が行われたが、医原性の暴露は認められなかった。また全ての患者が過去10年間に牛肉を食べているが、脳を食べたという記録はなかった。

以上の10症例は CJD の新しい臨床病理学的変異体である可能性を示唆している。通常と異なる神経病変を示した原因は不明であるが、他のヨーロッパの国々ではこのような症例が認められておらず、単に発症年齢や診断技術の向上に起因するとは考え難い。

英国における BSE 因子のヒトへの暴露は1980年代末期 (牛内臓を人食用に供することを禁止するまで) が最も多いと考えられる。これらの症例の潜伏期を5年から10年と考えると、この時期に一致する。

今回の症例は BSE 因子の暴露に起因すると考えることが、おそらく最も可能性のある解釈である。しかし、これを示す直接的な証拠はなく、他の解釈も可能である。もし、両者に関連があるのなら、今後ここに報告した新しい型の CJD が増加することが予想される。ヨーロッパあるいはその他の国、そして英国における若齢 CJD 患者の臨床的および神経病理学的所見の検討がさらに必要である。

(抄訳 木村久美子 家衛試)

(KIMURA Kumiko)

A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK

Will, R. G., J. W. Ironside, M. Zeidler, S. N. Cousens, K. Estibeiro, A. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiari, A. Hofman and P. G. Smith

Lancet, 347: 921-925 (1996)

文献情報

ラクトース資化性 *Pediococcus* 種の乳発酵への利用

イタリアの伝統的チーズ、モッツアレラの製造には *Streptococcus thermophilus* に加えて *Lactobacillus helveticus* または *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* などの乳酸菌がスターターとして利用されている。ところが、20年以上にわたるこのチーズ製造において

S. thermophilus のバクテリオファージによる感染が問題になっている。一方、*Lactobacilli* に対する感染はあまり問題になっておらず、このチーズ製造においてバクテリオファージによる感染のない *S. thermophilus* 代替の乳酸球菌が求められていた。

筆者らは、チーズ熟成期にしばしば優勢菌としてみられるホモ発酵型乳酸菌 *pediococci* のスターターへの利用を考えた。しかし、*pediococci* はラクトース資化能がなく、乳の発酵にはラクトース資化性の付加が必要という課題があった。しかし、もしこの課題が解決されれば *Pediococcus acidilactici* や *P. pentosaceus* などは *S. thermophilus* のように45°C付近の高温増殖が可能であり、食品としての安全性も確認されているため、*S. thermophilus* 代替スターターとしての可能性が考えられる。本実験で筆者らは、ラクトース資化性遺伝子を有するプラスミドを用いて *P. acidilactici* と *P. pentosaceus* にトランスホメーションし、ラクトース資化能 (*lac*⁺) の付加を試みた。

まず26株の *pediococci* についてラクトース資化性の有無を確認したが、予想どおり資化能を有する株は見つからなかった。そこで、ラクトース資化能を有する *Lactococcus lactis* C2 株を用いたラクトース資化能のない *L. lactis* LM2303株へのトランスダクションの結果得られたプラスミド、pPN-1、の利用を試みた。pPN-1は35kb長で *L. lactis* C2 に存在する56kb長のプラスミドが小型化したものであることが制限酵素地図の比較から明らかとなった。さらに、他の *L. lactis* で報告されているようなラクトースオペロンに相当する領域が含まれることが確認された。そこでこのプラスミドを用いて *P. acidilactici* と *P. pentosaceus* についてエレクトロポレーションし、*lac*⁺の形質転換体をそれぞれ得た。得られた形質転換体はいずれも親株に比べて乳内増殖性が高く、*lac*⁺の表現形は乳培地で継代維持する限りにおいては大きな低下はみられなかった。こうして得た形質転換体のモッツアレラチーズ用スターターとしての可能性を確認するために、*L. helveticus* に対する増殖阻害作用を調べたが、問題はなく、むしろ *L. helveticus* と併用することにより単独の場合に比べて乳内増殖性が改善されるという結果を得た。ここで得られた *P. pentosaceus* SPL-2 と *P.*

acidilactici SALP について800種以上の乳酸菌バクテリオファージを用いて感染性を試験したが、何れについても全く感染性は認められなかった。*P. pentosaceus* SPL-2または *P. acidilactici* SALP 株と *L. helveticus* LH100株でモッツアレラチーズを作製し、*S. thermophilus* と *L. helveticus* LH100株で作製したチーズをコントロールとして比較したところ、カード形成に要する時間がそれぞれコントロールのものに比べて60および90分延長されたものの、その品質には大きな差は認められなかった。

今回の実験で得られた形質転換体 *lac*⁺-*Pediococci* はバクテリオファージの感染を受けることなく、*S. thermophilus* 代替スターターとして、安定に一定の品質のモッツアレラチーズを製造するうえで極めて有用な菌株となり得ると思われる。我が国でも、今後、このような遺伝子組換え体の食品への利用に向けての研究がますます活発になるであろう。

(抄訳 山本直之—カルピス食品)

(YAMAMOTO Naoyuki)

Development and characterization of lactose-positive *pediococcus* species for milk fermentation

Caldwell, S. L., D. J. McMahon, C. J. Oberg, and J. R. Broadbent

Appl. Environ. Microbiol., 62: 936-941 (1996)

文献情報

変温生物の低温耐性機構

—コイの Δ^9 -デサチュレースの
転写翻訳システムの解析—

生体膜は物理化学的性質を繊細、かつ巧妙に変化させることによって環境に対応する。とりわけ変温生物（細菌から高等動植物の広範囲に渡って）は、しばしば生理的に大問題になる程の大きな、そして急激な体温変化を体験しているが、かれらは温度による障害を相殺できる生理学的、生化学的、形態学的な適応によってこれに対処している。温度変化に対する細胞における重要な反応のひとつとして、細胞膜の生理機能を維持するために温度変化で誘導される物質によって膜の流動性を確保し、その機能維持を図ることが知られている。この細胞膜の恒常性維持応答は

homeoviscous adaptation (HVA) と呼ばれている (J. R. Hazel, *Annu. Rev. Physiol.*, 57: 19-42, 1995)。

一般に、低温にさらされた変温生物は低温によって膜が硬化するのを補うために不飽和脂肪酸の割合を増加させる。これは低温下で不飽和化酵素の活性が増大するようにコントロールされているためであろうと考えられている (M. Schunke and E. Woodtke, *Biochim. Biophys. Acta*, 734: 70-75, 1983)。実際、以前から飽和脂肪酸に最初の二重結合を導入する酵素 (Δ^9 -デサチュレース ; Δ^9 -desaturase) が低温下で飼育した魚類の肝臓中で、その活性が増大することが知られていた (Schunke and Woodtke; 同上)。しかし、これまで不飽和化に関する酵素と低温耐性の作用機作については不明であった。

最近、リバプール大学とマンチェスター理工科大学のグループが遺伝子工学的手法を用いて、コイの不飽和化に関する酵素の作用機作、遺伝子の転写-翻訳のメカニズムについての検討を行ったので内容を紹介したい。

彼らはコイを30°Cで30日間飼育後、3日間かけて水温を10°Cに落としこれを維持した [30 (day 0) → 23°C (day 1), → 17°C (day 2), → 10°C (day 3)]。これらのコイから肝臓ミクロソーム画分を調整し、膜の主要成分である二種のホスホグリセライド (ホスファチジルコリン ; Ptd-Cho とホスファチジルエタノールアミン ; Ptd-Eth) の脂肪酸組成比を調べたところ、Ptd-Ethでは飽和脂肪酸を消費しながらモノエンの著しい増加とポリエンの若干の増加が認められた。これらの変化は冷却開始後2日まで急激で5日目でプラトーに達した。一方、Ptd-Choの挙動はより複雑な変化が認められた。冷却開始から24時間まで相対的に多不飽和脂肪酸の増加とモノエンの減少が一致し、その後、飽和脂肪酸の減少に伴ってモノエンが増加していった。

そこで、彼らは Δ^9 -デサチュレースの転写誘導がどの時点から始まるのかを調べるため、既に単離していたコイの Δ^9 -デサチュレース cDNA (P. Strittmatter *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263: 2532, 1988) からアンチセンス RNA プローブを作成して、 Δ^9 -デサチュレース mRNA の転写量を測定した。その結果、 Δ^9 -デサチュレース mRNA の転写量は30°C (day 0) で飼育しているコイは当然としても、低温下24時間後のコイでも低い値を

示した。転写量の増大が認められたのは低温下48時間後からであった。転写量のピークは低温下3~5日後で、その後急激に転写の減少が認められたものの、少なくとも低温下28日までは30°C飼育下の転写量の2~3倍の値を示した。低温状態が続いているにもかかわらず転写はトランジェントなものであった。

次にデサチュレースに対する抗体を用いて Δ^9 -デサチュレースタンパクの測定を行ったところ、デサチュレース活性が低いにもかかわらず30°C (day 0) 下で飼育しているコイからもかなりのデサチュレースタンパクが検出された。 Δ^9 -デサチュレースタンパクは低温下0~3日までは一定であり、3~5日の間に80%増加するという結果を与えた。

ところが Δ^9 -デサチュレース活性は Δ^9 -デサチュレースタンパクが増加し始める以前である低温下2~3日から既に急激に上昇していた。活性の上昇はデサチュラーゼタンパクが増大した3~5日目まで続いた。

以上の結果から彼らは低温誘導 Δ^9 -デサチュレースの発現は二通りの反応から生じるものと推察している。第一に既に生体中に存在している潜在酵素が低温下24~48時間で活性化される。これは別の活性化酵素が誘導されるのか、それとも翻訳後修飾が行われるのか不明であるが、何れにしてもポストトランスレーショナルな作用が関与している。第二に低温化で誘導された Δ^9 -デサチュレース mRNA の転写により Δ^9 -デサチュレース量が増加し、3~5日ごろにタンパク量がピークとなり、デサチュレース活性が更に上昇する。これらの出来事は Woodtke らが同じコイで調べた低温誘導した Δ^9 -デサチュレース活性と膜組成の変化のタイムコースと一致する (E. Woodtke and A.R. Cossins, *Biochem. Biophys. Acta*, 1064: 343, 1991)。

これらの二本立てのシステムはどの様に理解すればよいのだろうか? 彼らは以下のような推論を行っている。デサチュレース発現システムは低温の程度によって制御されているのかもしれない。比較的緩やかな水温低下では、初期の反応として潜在する不活化 Δ^9 -デサチュレースの活性化によって水温低下に備える。一方、もっと低い温度に対処しなければならぬ場合に新たな遺伝子の転写が始まりデサチュレースタンパク質を増加させる。そしてその結果、より大規模な膜の再構成が行われるのであろう。

(抄訳 佐藤信行 マルハ(株)中研)

(SATO Nobuyuki)

Cold-induced expression of Δ^9 -desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanismsTiku, P. E. *et al.*, *Science*, 2719 : 815-818 (1996)

文献情報

サイクリンは根の成長を
コントロールするか

根は分裂組織で胚発生後の器官形成によって形づくられる。細胞分裂は分裂組織の誘導、維持、増殖に必要であるが、成長において細胞周期を制御する機構については明らかにされていない。著者らは *Arabidopsis* を用い、細胞周期をコントロールをする物質の中で cyclin と cyclin dependent kinase の遺伝子 *cyc1At* と *cdc2aAt* の発現と根の成長との関係を調べた。

オーキシン処理によって側根の誘導を活性化させたとき、処理前後とも、*cdc2aAt* からの mRNA とその翻訳産物である p34タンパク質が発現しており、発現量に変化は見られなかった。このことから、*cdc2aAt* は細胞分裂に関与しているが、根の成長や側根の誘導は p34タンパク質の発現量によってコントロールされていないと思われた。一方、オーキシン処理によっていくつかの cyclin 遺伝子の発現が誘導されたが、特に *cyc1At* の mRNA は15~20倍に増加した。*in situ* hybridization によって、*cyc1At* の発現を調べたところ、*cdc2aAt* とは異なり静止期の内鞘細胞中には見られないが、側根原基の初期細胞内に蓄積された。器官が形成されていく過程で、*cyc1At* の発現が認められたのは分裂組織だけであった。また、アブラナ科の根では連続的に細胞の分裂が観察できるが、そこでも *cyc1At* の転写物は細胞分裂直前の大きな細胞にのみ蓄積され、隣接する小さな娘細胞には見られなかった。根の頂点分裂組織の成長ならびに側根の誘導と *cyc1At* 発現との関係から、cyclin の量は根の成長の鍵的役割を担っていると考えられた。

次に著者らは、*cdc2aAt* のプロモーターの下流に *cyc1At* をつなぎ、*Arabidopsis* に導入してトランスジェニック植物を作出した。

5個の形質転換体は何も処理をしなくても、wild-type にオーキシン処理をした以上に *cyc1At* の mRNA が根で発現していた。これらの植物体は *cdc2aAt::cyc1At* の強い発現によって、著しく根の成長をもたらしたことを示している。成長割合を低速度撮影で調べたところ、wild-type を100とすると、形質転換体では131.9~139.5であり、transgene が欠損した個体では wild-type と同じ割合で成長したことから、根の成長には transgene の発現が密接に関連していると考えられた。形質転換体の表皮、皮層、内皮、内鞘細胞の大きさは wild-type と比較して、ほぼ同じだったことから、形質転換体の根の成長は細胞の大きさよりも細胞数の増加によるものであった。また、側根の誘導と根の形態は wild-type と形質転換体とも区別ができなかった。オーキシンの処理でも、形質転換体の側根の成長は著しく増大したが、側根数はオーキシンを処理した wild-type と変わらなかった。

以上のことから、*cdc2aAt::cyc1At* の発現は根の分裂組織から根の成長を促進させており、細胞周期が分裂組織の活性を制御していることを示唆している。しかし、静止期の内鞘細胞で発現する *cdc2aAt* のプロモーターの下流に *cyc1At* をつないだところ、余分な側根原基は誘導されなかった。このことから新しく頂点分裂組織を形成するためには付加的なコントロールポイントが必要であると考えられた。また、根の形態は形質転換体でも変わらず、根の組織の成長が進むにしたがって、伸長が増大しただけであった。このことから、cyclin の発現は根の分裂組織の活性化や組織の成長さらに、まだ決定されていない成長を支配している内因性の制御序列において、上位の制御因子であると考えられた。この制御序列は動物とは違っており、根の成長における適応性をつかさどっているかもしれない。cyclin の蓄積量は栄養分のような環境の変化に対応して、成長のコントロールを柔軟に行うための‘加減抵抗器’として機能しているのかもしれない。

(抄訳 桂 幸次 東北大農)

(KATSURA Koji)

Control of root growth and development by cyclin expressionDoerner, P., J-E. Jørgensen, R. You, J. Steppuhn and C. Lamb
Nature, 380 : 520, 11 April, 1996

海外便り

昆虫のバキュロウイルスの遺伝子解析

—カリフォルニア大学デービス校での1年—

農林水産省 農業研究センター

後藤千枝

1. はじめに

私が大学3年生になり、研究らしきものを始めようとしていた頃、所属研究室の助手の先生は米国 USDA での在外研究を終えられ帰国されたばかりで、折にふれアメリカの話聞かせていただいた。卒業後、農水省北海道農業試験場に採用されたが、新米の研究員であった私は、部内の中堅研究員の方や大学の先輩が在外研究あるいはポスドクで出かける姿を見て「いつかは私も海外で研究してみたい」とあこがれたものである。それから10年余が過ぎ、私も在外研究の機会に恵まれ、カリフォルニア大学デービス校昆虫学科の前田研究室に平成7年1月下旬から1年間滞在させていただくことになった。

2. 大学の町デービス

デービスは人口5万人のうち約半数が学生、大学院生等で占められるいわゆる学園都市で、サンフランシスコから内陸へ約120km、州都サクラメントからは25kmの所に位置している。自転車がシンボルとなっているこじんまりとした静かな市で1昨年の交通事故死者数はゼロ、治安も非常に良い住みやすい環境である。緯度は仙台とほぼ同じだが、気候は温暖で、街路樹にオリーブが植えられ、庭にはオレンジやレモンがたわわに実をつける。夏は暑く気温が40°Cを超える日も何日あったが、大学内は24時間温度コントロールされており、夜間は気温が下がるのでさほど苦にはならなかった。

デービス校は1905年にカリフォルニア大学

Goto Chie

パークレイ校の農場として創設され、1922年に農学部となり、その数年後にデービス校として独立し学部学科を増やして総合大学となった。カリフォルニア大の9つのキャンパスの中で最大の敷地面積(2100ha)を持ち、研究費は全米でトップ20、大学の24学科が全米トップ10のレベルを誇り、特に植物学科は全米1位の難易度と聞いた。教育職員は1700名、学生数は17500人、農学、環境科学、工学、文学、理学等の学部がある。この他に法学、経営学、医学、獣医学の大学院があり、大学院生の総数は5400人という。大学新聞の名前は The California Aggie で、農学校の伝統を偲ばせる。

大学は年に一度春に一般に公開され、たくさんの市民、卒業生、生徒の友人や家族が大学を訪れる。公開日は Picnic Day と呼ばれ、1995年は第82回とのことであった。各学部、学科で研究、教育活動に関する展示や様々なイベントが行われ、大学と市民をつなぐ日として大学側もこの公開には力を入れているようである。子供向けのイベントも多く、一般の人にとっても楽しみながら科学に親しめる良い機会ではないかと感じた。昆虫学科では、昆虫やクモ類の展示、実体顕微鏡での観察、昆虫博士のなんでも相談やゴキブリ競争、さらには昆虫を材料に使った料理教室等が行われ、子供連れで賑わった(写真)。

3. 昆虫ウイルスの研究

昆虫にも病気があり、人や動物と同じようにかび、細菌、ウイルスなどの微生物の感染が病気の原因となる。実際に病気の虫を見たことがある人ほとんどいないかも知れないが、自然界では、病気が昆虫の死亡率の



写真：大学公開日，昆虫学科のあるブリッグスホールにはチョウの旗が掲げられていた。スタンフォード大学留学中の農業生物資源研究所 西澤洋子さんと筆者（右）

主要な原因となっている場合が少なくない。特に，大発生した昆虫に流行病が発生し昆虫の密度が急激に減少する事例は古くから観察報告されている。私は，最初の配属先である北海道農業試験場で畑作害虫の死亡原因調査を行い，鱗翅目害虫では病原微生物，特にウイルス病が重要な死亡原因となっていることを知った。このとき分離したウイルスは，核多角体病ウイルス(NPV)と顆粒病ウイルス(GV)であった。この2種類のウイルスはバキュロウイルス科に属しており，宿主範囲が狭く人畜に対する安全性が高いことが知られている。そこで，これらを利用した害虫防除技術の開発を目標に研究を始めた。ウイルス分離の報告例はGVに比べNPVが圧倒的に多く，培養細胞実験系の確立しているNPVでは分子生物学的な研究も先行していたが，これまで記載のなかった複数種の害虫からGVが分離されたこともあり，GVを中心に研究を進めることにした。そして，各種害虫から分離されたGVの分類，GVの病原性に関する試験の他，ウイルスゲノムの制限酵素切断地図の作成等の研究を行ってきた。

4. 在外研究と今後の課題

病原性試験の過程で，私が分離したGVはNPVの感染力を増強する物質を持つことが明らかになった。この物質を添加剤として利用すれば，より感染力の強い，つまり防除

効果の高いウイルス殺虫剤が開発できるのではないかと考え，この物質の分離精製と遺伝子の特定，塩基配列の決定を行った。在外研究のテーマの1つは，この感染力増強物質の生産技術の開発であり，前田先生が確立されたバキュロウイルスベクター系を使って遺伝子発現を試みた。現在，感染力増強物質遺伝子を導入した組換え体ウイルスを培養細胞に感染させ発現されるタンパク質を調べている。今後，幼虫を用いた生物検定による活性の確認を行い，生産効率の向上をはかる予定である。

NPVでは，前田研究室がカイコNPV，イギリスNERCのグループが*Autographa californica* NPVのゲノム全塩基配列をそれぞれ決定し，遺伝子に関する情報が多数蓄積されている。他方，GVはNPVと同じ科に属するウイルスでありながら塩基配列の決定された遺伝子が10に満たない状況であり，遺伝子解析は大幅に遅れている。私の在外研究のもう一つのねらいは，前田先生が蓄積されたNPVの遺伝子データと解析技術を活用させていただくことでGVの遺伝子解析の糸口をつかむことであった。

GVのゲノムDNAをM13でランダムクローニングしてシーケンスを行い，全ゲノムDNAの約24%の塩基配列データを得た。各クローンの塩基配列とそれをアミノ酸配列に置換したものをNPVのデータベースとホモロジー検索した結果，GVゲノムにはNPV遺伝子のホモログが多数存在することが明らかになり，大まかな遺伝子地図を作成することができた。今後，GVゲノムの塩基配列決定ならびにウイルスの感染増殖機構の解明を進め，防除効果の高いウイルス殺虫剤開発を目指したいと考えている。

5. 米国の研究者事情

米国では職業として研究員を目指す場合，大学院卒業後，2，3年契約のポスドクを2か所くらい経験し，その後長期の仕事を探すのが一般的だが，良いポストを得るのは非常に難しいらしい。私が渡米後，新たに採用に

なったポストクの女性と就職について話をしてみた。ポストクの採用は結構あるらしいが、大学の教職員の採用数は応募者に比較して少ない。その多くは数年契約のポストでありいわゆるテニユアトラックの採用はほとんどなく、年齢の高い応募者も多く若手研究者にとって厳しい現状であるとのことであった。大学のポストを狙うには、ポストクの期間にレベルの高い学会誌に論文を数多く発表し、さらに講演の技術を磨く必要がある。昆虫学科では私の滞在中に、2つのポストの募集が行われ、多くの応募者から各5人が最終審査に残った。応募者の講演が教授や学生を前に行われたので、私も学生に混じって講演を聞いてみたが、完全な公募制を勝ち抜いて大学に職を得ることは並大抵のことではないという印象を受けた。

採用後研究室を構えるとすぐに、研究費獲得競争が始まる。研究のアイデアを絶やさないことはもちろんだが、ポストクや学生を統率して効率的に研究を進めさせる技量も大切であろう。私の滞在中にも他の学科で、素晴らしい業績で採用されたがその後成果があがらずテニユアになれずに大学を去った若手准教授の例があり、終身雇用がベースである日本の現状と比較すると非常に厳しいものがあると感じた。昇進昇格にあたっては厳しい業績評価が行われ、論文数や掲載雑誌のレベルによる評価、また研究内容に関しても学外の専門家による評価があり、授業については学

生による評価が行われる。日本も、終身雇用の見直し、年功より実力重視への移行が言われているが、厳正な業績評価のシステムを確立しなければその実現は難しいであろう。

6. 消費者の立場から

在外研究中は農業生産の現場に赴く機会は残念ながらほとんどなかったが、スーパーマーケットや毎週中央公園で開かれる生産者直売市等で豊富な農産物を消費者の立場で見ることができた。スーパーでは野菜も果物も山積みで客が袋に入れたものをレジで計量する方式が一般的で、小分けしてラップ類にくるんである日本の販売方法とは大きく違っていた。どちらが効率的なのかは分からないが、秤売り方式には、選ぶ楽しさがあるように思えた。

デービス近郊はトマト産地で、市内には遺伝子組換え体トマトを作った会社がある。他の都市ではあまり見かけなかったフレーバーセイバートマトがデービスではスーパーマーケットに普通の品種と並んで売られていた。私が渡米した頃は新品種登場からだいぶ月日がたっていたせいか、パンフレットも陰のほかに数枚置いてあるだけで、入荷量もさほど多くなく、あまり目立たない存在になっていることにかえて驚いたものである。新技術と騒がれるのは短期間であり、定着していくかどうかは、消費者の評価しだいということなのであろう。

BRAIN セミナー 『生命科学とコンピュータ』

農林水産技術会議事務局

北村實彬

1. はじめに

昨年5月、文部省科学研究費補助金重点領域研究「自律分散システム」の研究成果として、オーム社から「自律分散宣言」が出版された（伊藤ら，1995）。この研究には、計測自動制御学会が中心となっているが、情報・システム・制御工学だけでなく、生物学の研究者も参加している。それは、生物システムのなかに、自律分散とみなせるものが多くあるからに他ならない。自律分散システムの特徴は、①システムを構成する各要素が自ら主体的に行動すること、および②システム全体の秩序形成は自己組織的に行われること、にあるとされている。コンピュータシステムの研究における究極の目的は、このようにネットワークで結ばれた多数のコンピュータのそれぞれが独自性を保ちつつ、互いに協調しながら全体として一つの生命体のように動くシステムの開発にあり、1992年から開始された通産省のプロジェクト「リアルワールドコンピューティング」では、“柔らかな情報処理”と並んで“超並列超分散処理”が目標とされている（通商産業省機械情報産業局，1992）。

生物、特に脳や神経系のメカニズムを研究し、その特徴をコンピュータに取り込もうとする研究、バイオコンピュータを実現しようとする研究がコンピュータ工学を中心に組み込まれている。バイオコンピュータ研究としては、①生物の働き、特に脳の働きを調べ、ソフトウェアあるいはアーキテクチャに反映

させる、②生体高分子に類似したバイオ素子を開発し、バイオチップ・コンピュータを組み立てる、③生命を人工的につくる技術を開発し、人工の知能生物、あるいは超知能コンピュータを開発する、というアプローチが考えられる（神沼・松本，1988）。これらを実現するためには、従来の高密度集積回路を中心とするコンピュータ工学と遺伝情報解析あるいは脳・神経系の研究を中心とする生命科学、それらの中間に位置するアーキテクチャやアルゴリズムなどの理論研究とタンパク質工学を背景にしたバイオ素子の開発といった4つの流れの発展が求められている。

生物の体内では、塩基の置列が遺伝「情報」を担っており、それらはアミノ酸に翻訳され、タンパク質として機能を発現する。近年、DNAの塩基配列を決定する技術が急速にすすみ、コンピュータソフトウェアの助けも借りながら、データが加速度的に蓄積されつつある。生物の中では、これらの一次元情報が三次元の構造に展開され、機能に反映されているが、まさにこの点が生きている情報機械としての生物のもつ特徴である。この“一次元から三次元”への展開の本質を理解しようとする分野は「構造生物学」と呼ばれる。昨年、科学技術庁航空・電子等技術審議会においても、構造生物学を強化しようとする方向が打ち出され、諮問第22号「構造生物学に関する総合的な研究開発の推進方策について」が出された。その中で、構造生物学研究において今後必要となる重要技術として、X線結晶解析技術、NMR解析技術、電子顕微鏡技術などの立体構造決定技術と並んでコンピュータ解析技術があげられている。とり

わけタンパク質などの生体高分子やそれと相互作用する物質の構造とダイナミックスを研究するには、立体構造の解析技術、立体構造の予測技術としてモデリングやグラフィックスを用いた構造シミュレーションの手法などが使われる。

このような計算機を用いた構造生物学の最近の話題と、バイオ素子を中心としたバイオコンピュータ研究の最近の話題をお話いただき、「生命科学とコンピュータ」と題する BRAIN セミナーが、3月22日生研機構東京事務所会議室において開催された。セミナーでは、東北大学大学院情報科学研究科の青木孝文助教授による「生体分子を用いたバイオコンピュータ」と、名古屋大学の郷子通教授による「計算構造生物学とタンパク質デザイン」のご講演をいただき、最後に総合検討を行った。講演の内容を以下に簡単に紹介する。

2. 生体分子を用いたバイオコンピュータ

東北大学大学院情報科学研究科において行われている研究を中心に「信号の多重化に基づく新しいコンピューティングのパラダイム」, 「酵素トランジスタの基礎研究」という2つのトピックスが話された。

コンピューティングには、数値計算を主とするこれまでの“Computing in Computer

World”と、近年の画像・映像などの多角的データの実時間処理を主とする“Computing in Real World”という2つのとらえ方がある。多角的データの実時間処理を実現するには、マルチプロセッサアーキテクチャに基づく空間並列処理が有効と考えられるが、その際に配線数の激増がボトルネックとなる (LSI の高密度化に伴う消費電力=発熱の問題など)。この“チップ間の通信”という問題を解決する方向として、多値論理 LSI, マルチチップ・モジュール (MCM) などが考えられる。多値論理 LSI とは、回路が「0, 1」の2状態だけでなく、たとえば「0, 1, 2, 3」の4進数を区別できるようにして、大量の情報を低消費電力下で処理しようとするアイデアである。

通常の LSI チップには、ムカデの脚のような多数の脚がついているが、MCM においては、チップ間を光で配線してしまおうという考えが研究されている (図1)。この方法では、光の強さが波長により若干変化すると予想されるため、受光部における DMF フィルタとよばれる光-電気変換素子の能力が問題になると思われた。さらに、waveguide における光の干渉や回折の影響除去の問題など、今後の研究の進展が期待された。

演者らは、情報の多重化の究極の姿は、細胞の中にあるのではないかと考えている。酵素反応に代表されるように、細胞の中で行われている情報の伝達は、無配線の分子コンピューティングではないかということで、2つめの話題の「酵素トランジスタの基礎研究」が紹介された。これは、図2のように、物質を情報担体とする分子回路網を作ろうとするもので、現在試作中の酵素トランジスタ回路 (図3) を用いた実験結果をまじえた紹介がされた。

3. 計算構造生物学とタンパク質デザイン

計算構造生物学とは、①コンピュータによりタンパク質や核酸の立体構造を予測すること、ひいては分子構造に基づいて生命活動の

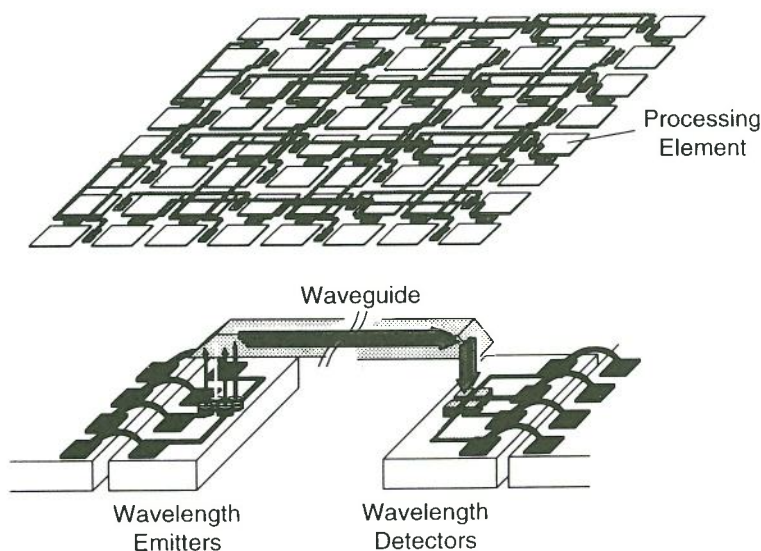


図1 マルチチップ・モジュールにおける光配線概念 (青木原図)

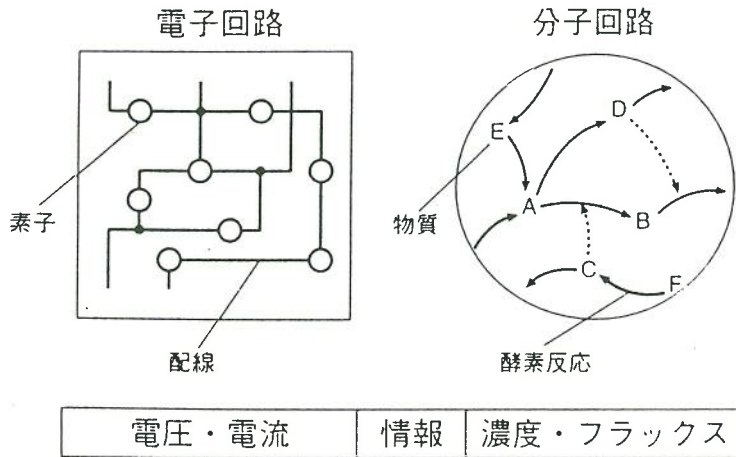


図2 物質を情報担体とする分子回路の概念図(青木原図)

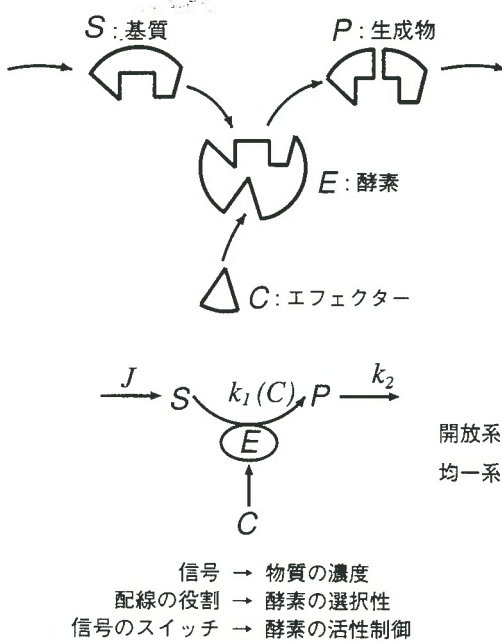


図3 酵素トランジスタのモデル(青木原図)

メカニズムを解明すること, ②ゲノム情報から直接的な機能予測を行うこと, ③動的性質(ゆらぎ)と特異的機能を解明すること, ④分子間認識のモデリングとシミュレーション, ⑤新機能をもつタンパク質やRNAのデザイン, などを行おうとするものである。

さまざまなタンパク質には, ヘリックス, ターン, ストランドなどと呼ばれる, 部分的なポリペプチド鎖の折り畳みのパターンが共通に見られる。こうした数個のアミノ酸のつくる構造またはその繰り返し構造は, 2次構造と呼ばれる。2次構造がつながって構成される球状ドメインは, それ自体で安定な立体構造を形成するフォールディングの単位であ

り, 機能の単位でもある。DNAに結合して, 遺伝子の発現の制御に関わるタンパク質群が細菌から人まで広く存在しているが, これらの中に, ヘリックスとターンとヘリックスからなる特有の部分構造が見ついている。

一方, 球状ドメイン内の部分構造として, 2次構造とは独立のカテゴリとして, 立体構造の情報(α炭素の原子座標)に基づいて決められる, モジュールと呼ばれるコンパクトな構造単位がある。

タンパク質デザインの方法として2つの方向がある。一つは *de novo* デザインと呼ばれるものである。これは, 例えばヘリックス・ターン・ヘリックス・モジュール等を利用してデザインしようとするものであるが, なかなか新機能がみえないという問題がある。2つめの方向は, 既存のタンパク質を利用して, その機能の特異性を変化させようとするものである。この方法の例として, ①アミノ酸1個の置換で機能が変わる例(セリンプロテアーゼインヒビタ), ②ループの交換で機能を加える例(RNaseにアンギオゲニンの機能をつけ加えた), ③エクソン交換やモジュール置換で変わる例(エクソン交換でラクトアルブミンをリゾチームに変換, キメラヘモグロビンにコンタクトモジュールを移植してコンタクトの相手を変える)などが紹介された。

新機能を持つタンパク質をどのようにデザインするかという問題に関しての一つの方向

として、このモジュールを（立体構造として）カタログ化する方向が考えられる。今までに約4000のモジュールが同定されており、約半分はグループ化できている（表紙参照）。機能を加算していくことが今後の課題である。

4. おわりに

平成8年度から、農林水産省では、大学等で行われている先端的研究と共同することにより新しい分野を開拓しようとする「フロンティア研究」を開始している。その中の一つに「バイオマイクロマシン開発のための基盤研究」がある。これは、生体を構成する物質の持つ高次機能を利用した生体や環境に優しいマイクロマシン等のウェットウェア開発のための基盤的研究を行おうとするもので、今回お話いただいた東北大学大学院情報科学研

究科知能システム科学研究室にも参加いただいている。「プロテイン・リフォールディング手法の開発」研究では、アミノ酸配列に秘められたタンパク質のフォールディング情報を解析し、補助機能分子等を利用した効率的なりフォールディング手法を開発しようとするもので、名古屋大学の郷通子教授に評価委員をお願いし、指導をいただいている。今後、農林水産省においても、このような生命科学とコンピュータ工学との接点の分野における研究が大きく進展することを期待したい。

文 献

- 1) 伊藤正美・市川惇信・須田信英共編 (1995)『自律分散宣言』, pp.172, オーム社
- 2) 神沼二真・松本元編 (1988)『バイオコンピュータ』, pp.351, 紀伊國屋書店
- 3) 通商産業省機械情報産業局編, (1992)『リアルワールドコンピューティング』, pp.194, 産業調査会

編集後記

生研機構が設立されて今年で10年。機構の顔である情報誌「BRAIN テクノニュース」も創刊10周年を迎えた。本号は56号だから、創刊準備号を含めてこれまで57巻が刊行されたことになる。重ねて見たら10cm近い厚さで、ずしりと重い。この重さは、中に詰められている情報の重さそのものではないかと思うと、たとえ一部だけ（13号から30号まで）でも、編集、出版等に携わった者として大変感慨深い。私事で恐縮だが、雑誌の編集などほとんどタッチしたことのないずぶの素人が、諸先輩や仲間に教えられ、助けられながら、記事の収集や編集等に奮闘したことを懐かしく思い出す。当時バイオテク研究は夢がいっぱいで、まさに花盛りであったし、本誌も情報誌として一応の形態はできあがっていたことから、原稿の依頼や編集にそれほど困難は感じなかった。とは言っても、表紙用の写真の確保をどうするかとか、期限までに原稿を全部揃え

る、ということにはやはり人並みな努力をしたし、それに何よりも購読者を増やすのに苦労した。当時の購読者はほぼ250前後。これを300まで増やせれば、なんとか収支を均衡させることができる、ということで、本誌の読者には、毎月発行の「バイオテク関連記事抄録集」や随時発行の「生研報告」というデッカイおまけがつくことなどもPRして頑張ったのだが、どうしても目標を達成できなかった。どうやら、現在でもこの数は増えていないようだ。近年、バイオテクノロジーは夢から実用化の時代に入るとともに、その情報量も膨大なものになっている。読者が本誌に期待するものも当然変わっていくだろう。かつての編集担当者として、たとえ発行部数は少なくとも、読者の要望に的確に答えていくことにより、本誌が他とはひと味違う、すばらしい情報誌として成長して行くことを期待している。
(作間 宏彦記)

ブレインテクノニュース (第56号)

平成8年7月15日発行

発行者 藤田 弘志

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

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

編集 (社)農林水産技術情報協会

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