

CODEN : BTEEEC

TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 63 号

BRAIN  
Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

SEPTEMBER 15, 1997



さし木品種試験林（千葉県君津市鹿野山県有林内）の全景

茶色に見えるのが雄花，列（写真縦方向）ごとに品種が異なっている

（本文20ページ参照）

発行=生物系特定産業技術研究推進機構

## 総 説

矢野昌裕

イネゲノム解析研究…………… 1

## 国内情報

徳富光恵・東江 栄・松岡 信

C3植物へのC4光合成回路の付与…………… 5

宍戸和夫

遺伝子組換えによるリグニン高分解性キノコ菌の作出…………… 9

太田象三・宇佐美 悟・植木 潤

植物ピルビン酸リン酸ジキナーゼ (PPDK) の低温耐性について……………12

榊井昭夫

ククメリスカブリダニによるアザミウマ類の防除……………16

## 地域の先端研究

遠藤良太

千葉県における花粉の少ないスギ優良品種の選抜とその実用化……………20

根本 久

キャベツの害虫抵抗性を活用し、コナガ被害を回避……………24

## 文献情報

液胞タンパク質の受容体, Vps 10 p のエンドソームから液胞への返送系には

VPS 29, VPS 30と VPS 35の遺伝子産物が必要……………27

植物RNAウイルスの3'末端修復にウイルスゲノムRNAが関与……………27

カルメジン遺伝子欠損による精子の受精能不全……………28

ヘリコバクター・ピロリのウレアーゼはアンモニアをつくるだけではなかった……………29

## 海外便り

門野敬子

新規幼若ホルモンエステラーゼと低分子量GTP結合タンパク質

—ケンタッキー大学での2年間—……………30

# イネゲノム解析研究

農林水産省 農業生物資源研究所

矢野 昌裕

農業生物資源研究所と農林水産先端技術研究所の共同研究で進められてきたイネゲノム解析研究は7年間の第I期を終了しようとしている。この研究プログラムでは3つの大きなテーマを設けて、イネゲノム構造の解明を行ってきた。すなわち DNA マーカーを用いた高密度遺伝地図の作成、発現遺伝子のカタログ化ならびに染色体の DNA クローンによる再構築（物理地図の作成）である。本稿では、イネゲノム解析研究の成果をまとめるとともに、今後の基礎・応用研究におけるこれらの成果の重要性を述べる。

## 1. 植物におけるゲノム解析研究の現状

この10年間で、様々な生物種のゲノム解析、すなわちその生物の形や性質を決定する遺伝子の集合体の構造解析が進められてきた。大腸菌、枯草菌、酵母、ラン藻等の全ゲノムの塩基配列解析が終了し、さらにはヒトのゲノム塩基配列の解明が精力的に進められている。植物では DNA マーカーを利用した詳細な遺伝地図の作成、遺伝地図を基にした物理地図の作成ならびに発現遺伝子の部分塩基配列解析（EST 解析）を中心にゲノム解析が進められてきた。植物のなかで最もゲノムサイズの小さなアラビドプシス（シロイヌナズナ）では、いち早くこれらの解析が開始され、フランスおよびアメリカを中心として約31000個の発現遺伝子の部分塩基配列が解析されている。またイギリスの Cambridge Laboratory を中心として詳細な遺伝地図が作成され、その遺伝地図をもとに酵母人工染色体（YAC）クローンを利用したゲノムのほとんどをカバーする物理地図が、イギリスおよびアメリカの分担で作成されている。一方、コムギやトウモロコシの作物種のゲノム解析は、遺伝地図作成を中心に進展し、現在

では様々な作物種においてその遺伝地図が作成されている。しかしながらこれらの種においては、ゲノムサイズが大きいことにより物理地図作成や EST 解析の取り組みは少ない。トウモロコシではアメリカのパイオニアハイブレッド社において、EST 解析が最近開始され、大量の部分塩基配列情報が得られているが、これらのデータは一般には公開されていない。また近年国際的な分担によるアラビドプシスの全ゲノムの塩基配列決定を目標とする研究が開始された。この研究では2002年までに全塩基配列を決定する予定である。

イネは主要穀物種のなかで最もゲノムサイズが小さく、包括的なゲノム解析の対象作物として世界各国でも注目されている。アメリカでは1980年代半ばから遺伝地図作成が開始された。日本でも少し遅れて遺伝地図作成が開始され、1991年には農林水産省の農林水産ゲノム解析研究の一部として本格的にイネゲノム解析研究（Rice Genome Research Program: RGP）が開始された。この研究は農業生物資源研究所と農林水産先端技術研究所との共同研究で進められており、3つの大きな研究課題から構成されている。すなわち1) cDNA の部分塩基配列の解析によるイネ発現遺伝子のカタログ化、2) DNA マーカーによる高密度遺伝地図の作成ならびに3) DNA クローンを利用したイネ染色体の再構

築（物理地図の作成）である。

## 2. イネ発現遺伝子のカタログ化<sup>1,2)</sup>

イネの発現遺伝子は2万から4万個と推定され、これらの遺伝子はイネの一生の様々な段階や特別な組織で働いている（図1）。したがって様々な組織から遺伝子（cDNA）ライブラリーを作成し、それぞれの塩基配列を解析することがイネの全遺伝子のカタログ作成に不可欠となる。RGPではこれまでに葉、根、穂およびカルス等の21種類のライブラリーのなかから任意に選んだクローンの部分塩基配列の解析を行い、現在までにおよそ35000個のcDNAクローンについて部分塩基配列を解析した（図1）。部分塩基配列情報を利用すれば、これまでに様々な生物で単離・同定された遺伝子の塩基配列やその翻訳産物であるタンパク質のアミノ酸配列との類似性を検索することができる。この作業によって解析されたクローンの約25%が既にデータベースに登録されている既知の遺伝子との類似性が認められ、それらの翻訳されるタンパク質の機能が推定されている。言い替えれば、約75%のcDNAクローンは新らしく単離された遺伝子となる。解析クローンはすべてが互いに異なる遺伝子ではなく、同じものの重複があることは開始当初から予想されて

いたが、各クローンの塩基配列の相互比較を行うことで、この重複程度は約50%であることが推察された。したがって現在カタログ化されているイネ遺伝子は単純に計算するとおよそ15000個ということになり、イネ遺伝子の約1/3以上は既にクローン化されたことになる。解析された塩基配列情報は順次、公的なDNAデータベースに登録しているの、イネのみならず種々の植物の遺伝子単離や解析を行う研究者によって有効に活用されている。

## 3. DNAマーカーを利用した詳細な遺伝地図の作成<sup>3)</sup>

RGPではゲノム構造解析の重要な基盤として詳細な遺伝地図作成を続けてきた。遺伝地図は染色体の組み換え率を基に遺伝マーカー（部分塩基配列が明らかとなったcDNAクローンをを用いた制限酵素断片長多型（RFLP）：以下DNAマーカーとする）の相対的な配列を示したものである。1996年3月時点で、遺伝地図上に位置付けられたマーカー数はおよそ2300個になり、この遺伝地図は植物のなかで最も充実したものとなった（図2）。これらのマーカーの約70%は前述の部分塩基配列が明らかとなったcDNAクローンを利用したものである。したがってマーカー自体が発現遺伝子であり、それらの機

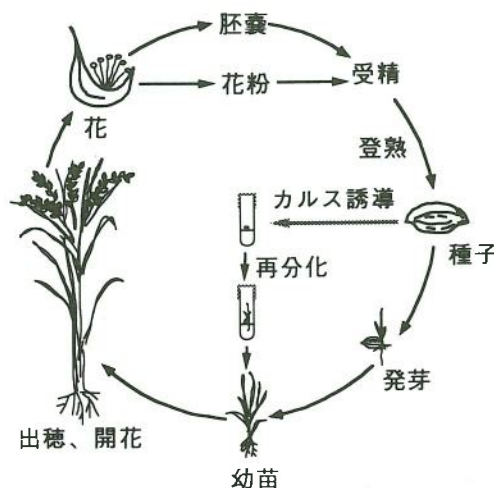


図1 イネの一生におけるさまざまな組織とそれらの組織から得られた発現遺伝子カタログ。各組織から作成されたcDNAクローンはそれらの部分塩基配列が決定されている。

| 組織       | 解析されたクローン数 |
|----------|------------|
| カルス（7種類） | 11,406     |
| 根        | 2,522      |
| 緑幼苗      | 4,891      |
| 黄化幼苗     | 4,546      |
| 幼穂（3種類）  | 3,696      |
| 穂（2種類）   | 5,626      |
| その他（6種類） | 3,073      |
| 合計       | 35,760     |

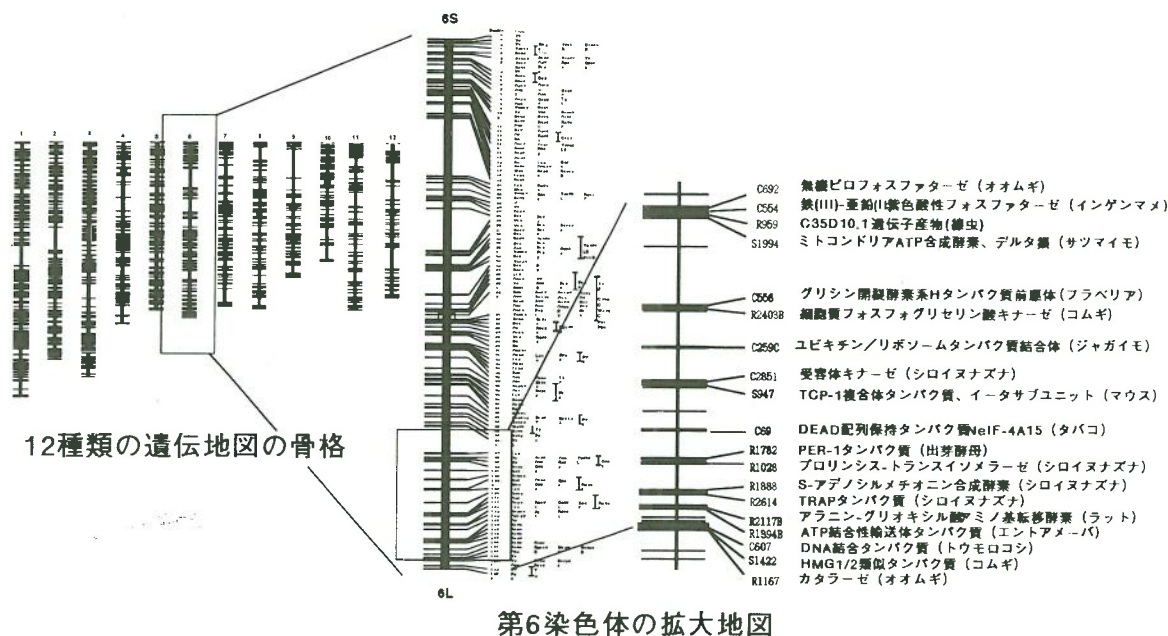


図2 DNA マーカーによる詳細な遺伝地図

左側の図は高密度遺伝地図の全体骨格 (マーカー名なし)、中央の図は第6染色体の拡大図、右側の図は第6染色体の一部の拡大図を示す。位置付けられたマーカーの一部は塩基配列情報に基づいた類似性検索によりそれらの翻訳産物が推定されている。

能は塩基配列情報から推定できるものもある (図2)。各マーカーは後述の染色体の物理地図作成において重要な標識となるばかりでなく、イネの形質遺伝学における重要な道具にも利用されている。特に DNA マーカーの利用により、これまで遺伝解析が困難であった複数の遺伝子によって決定されている形質 (一般に量的形質と呼ばれる) の解析が可能となった<sup>4,5,6)</sup>。一方、有用形質に関与する遺伝子に連鎖する DNA マーカーは育種における個体選抜の指標として注目されている<sup>7)</sup>。

#### 4. イネ染色体の DNA クローンによる 整列化 (物理地図の作成)<sup>8)</sup>

前述の遺伝地図は染色体の組み換えに基づく相対的な遺伝子の位置関係を示すものであり、絶対的な距離 (塩基対の数) を表わすものではない。12種類のイネ染色体 (ゲノム) を DNA で再構築するためには、巨大な DNA 断片をつなぎあわせた整列化地図を作成する必要がある。RGP では巨大 DNA 断片ライブラリーを作出するために酵母人工染色体 (YAC) クローンを利用した。イネゲノムの約5倍に相当する大きさのライブラリ

(インサートの平均サイズが350kbの約7000個の YAC クローン) を作成し、その中から前述の遺伝地図上に位置付けられた DNA マーカーの塩基配列を有する YAC クローンを同定して、ひとつひとつを遺伝地図にそって整列化させる作業を行った。図3には第6染色体の一部の YAC クローンの整列化状態を示す。現在、12本の染色体を平均して、約50%の領域について YAC クローンの整列化が終了している。言い替えればゲノムの約半分については DNA クローンで再構築できたことになる。最終的にはゲノムの約70%が YAC クローンで再構築されると予想しており、ゲノム解析の重要な基盤ができあがった。

#### 5. イネ白葉枯病抵抗性遺伝子 *Xa-1* の単離<sup>9)</sup>

これまでに述べたイネゲノム解析研究の成果は、イネの遺伝学や分子生物学の様々な研究領域における基盤として利用されている。遺伝地図上での位置情報のみから有用な遺伝子を単離する方法すなわちマップベースドクローニングを進めるうえで RGP の成果は重

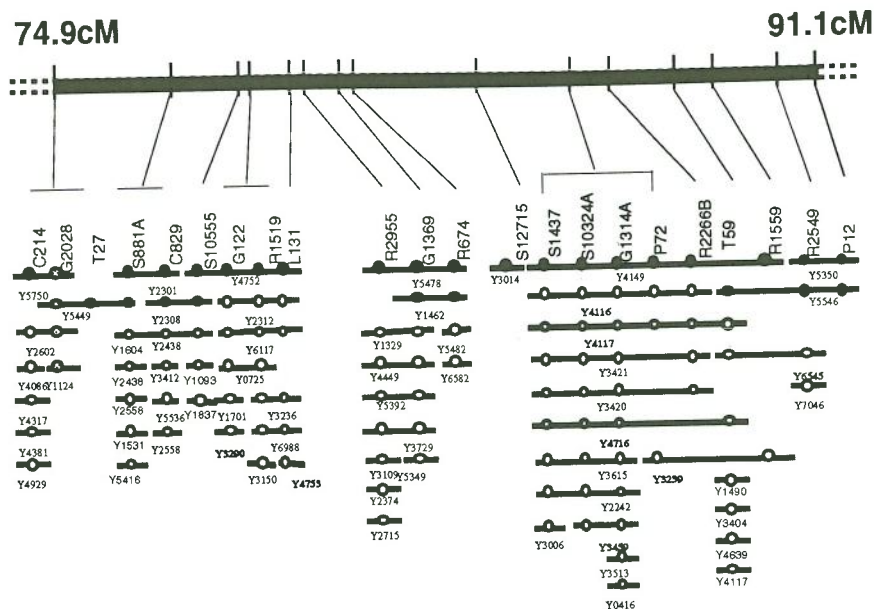


図3 第6染色体の一部におけるYACクローン整理化の例

図中の上部は第6染色体の遺伝地図の一部を示す。下部は遺伝地図にそって整理化させたYACクローン。

要な基礎となる。RGPではイネ白葉枯病抵抗性遺伝子 *Xa-1* を標的としたマップベースドクローニングを開始し、多数のDNAマーカーを利用した *Xa-1* 遺伝子領域の詳細な遺伝地図作成、*Xa-1* 遺伝子領域を含むYACクローンの選定ならびに *Xa-1* 候補遺伝子の選抜を経て、全長約6 kbの *Xa-1* 遺伝子を単離することに成功した。この応用研究では、RGPで蓄積されたDNAマーカーやYACクローンが有効に利用され、表現形のみでその存在が認識されている遺伝子の単離に道筋をつけることができた。今後多くの研究者がこの研究基盤を利用することで効率的な有用遺伝子の単離も可能となるであろう。

## 6. 今後の展開

これまで述べたように、イネゲノム解析研究の開始当初に設定された目標はすでに達成されている。これらの成果は遺伝子マッピングや単離において効果的に利用されていることから、第I期のイネゲノム研究プログラムは成功したといってもよいであろう。また、この研究は大型の研究チームを構成した新しい形の研究プログラムであった。この集中型研究の成功も今後の研究プロジェクトの企画

において参考になるであろう。研究成果の利用場面は基礎研究の場だけではなく育種における新しい選抜手法の開発においても期待されている。しかしながら、実際の育種選抜に利用するためには、解析の手間やコスト等、改善すべき点は多く残されている。いずれにしてもこの研究において築きあげられた基盤を基礎・応用の両場面で効果的に活用するためには、新たな研究プログラムの企画が不可欠である。その一環として、昨年度から生物系特定産業技術研究推進機構の「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」において量的形質に関与する遺伝子の構造ならびに発現様式の解明についての研究が開始されている。また、さらなる基盤整備としてイネの全ゲノムの塩基配列解析が企画されている。長年にわたる遺伝・生理研究の蓄積を基に、イネを作物としてだけでなく植物のモデルとしても活用していくためにゲノム塩基配列の解明は不可欠であろう。紙面の都合上、7年間にわたる研究プログラムの成果や今後の展望をすべてまとめることはできなかった。他の総説等も参考にさせていただきたい<sup>10,11,12)</sup>。

## 文 献

- 1) Sasaki, T. *et al.* (1994) *Plnat J.*, 6 :

- 615-624
- 2) Yamamoto, K. and T. Sasaki (1997) *Plant Mol. Biol.*, (印刷中)
- 3) Kurata, N. *et al.* (1994) *Nature Genetics*, 8 : 365-372
- 4) Tanksley, S.D. (1993) *Annu. Rev. Genet.*, 27 : 205-233
- 5) Yano, M and T. Sasaki (1997) *Plant Mol. Biol.*, (印刷中)
- 6) Yano, M. *et al.* (1997) *Theor. Appl. Genet.*, (印刷中)
- 7) 矢野昌裕 (1996) 農業技術 51(9) : 385-389
- 8) Kurata, N. and T. Sasaki (1997) *Plant Mol. Biol.*, (印刷中)
- 9) 吉村智美ら (1997) 育種学雑誌 47 (別1) : 75
- 10) Sasaki, T. *et al.* (1996) *Genome Res.*, 6 : 661-666
- 11) 佐々木卓治 (1996) 遺伝 別冊 8 : 97-106
- 12) Yano, M. *et al.* (1996) *Genomes of Plants and Animals*, p57-71

## 国内情報

## C 3 植物への C 4 光合成回路の付与

農林水産省農業生物資源研究所, \*名古屋大学生物分子応答研究センター  
徳富 光恵・東江 栄・\*松岡 信

農業上重要な植物は、その光合成様式から C 3 植物と C 4 植物とに分類される。C 4 植物は C 3 植物から進化した植物であり、C 3 植物に C 4 植物の光合成回路を付与することによって、C 3 植物の光合成能が大きく改良されるものと期待されている。C 3 植物であるイネに C 4 植物の炭酸固定酵素 (PEPC) の遺伝子を導入したところ、イネの PEPC 活性を C 4 植物以上に高めることに成功した。PEPC を高発現する形質転換イネでは、固定された二酸化炭素の約 1/3 が導入した PEPC を介して取り込まれていることがわかった。

### 1. はじめに

光合成は、太陽光のエネルギーを利用して大気中の二酸化炭素を炭水化物に変換する反応である。この反応には複数の過程が関与しており、また、それぞれの過程が複雑に影響を及ぼしあっている。昨今の遺伝子導入技術の飛躍的進歩により、遺伝子改変による光合成能・物質生産能の改良に期待が高まっているが、一方で否定的な考え方も根強い。すなわち、単一の酵素や機能タンパク質を改変あるいは過剰に発現させても、複雑に絡み合った光合成系全体には顕著な変化は現れない、

という主張である。我々は、複数の遺伝子を導入して新たな代謝系を付与することによって、具体的には C 3 植物であるイネに光合成的により進化した C 4 植物の光合成回路を付与することによって、イネの光合成能を改良する可能性を検討している。

### 2. C 3 植物と C 4 植物

地球上の植物は、その光合成炭酸固定の様式から、C 3 植物、C 4 植物、および多肉植物型光合成 (CAM) 植物とに分類される。イネ、ムギ、ダイズ、イモなど農業上有用な植物を含む陸上植物の 90% 以上は C 3 植物に属している。C 4 植物には熱帯・亜熱帯原産のイネ科植物が多く含まれ、トウモロコシ、

TOKUTOMI Mitsue, AGARIE Sakae,  
MATSUOKA Makoto

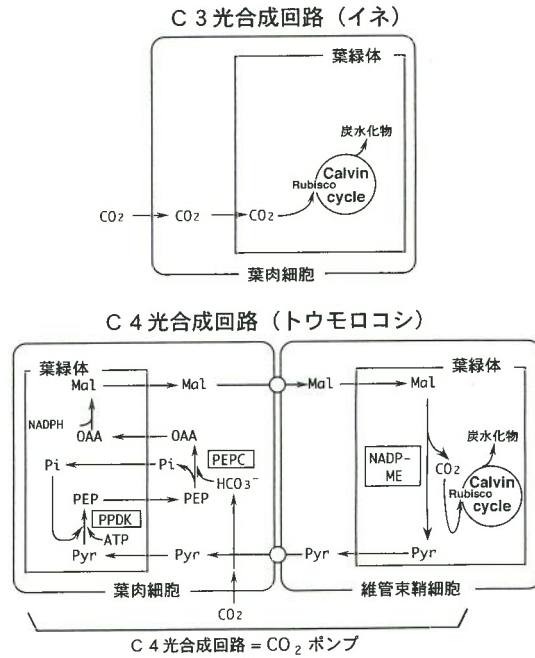


図1 C3植物とC4植物の光合成回路

サトウキビなどがこれに属す。CAM植物はベンケイソウで発見された有機酸代謝回路で光合成を行うグループであり、サボテン、パイナップルなどの多肉植物がこれに分類される。C4植物とCAM植物はともに、地球上の環境変動にともなってC3植物から進化してきたと考えられている。C4植物はC3植物に比べて高い光合成能力を発揮する。一方、CAM植物は、砂漠等の極端な乾燥地帯に適応した植物であり、その光合成能はかなり低い。

C3植物は、C3光合成回路(カルビン回路)で大気中の二酸化炭素を固定して炭水化物へと変換する。大気中の二酸化炭素はまずRubisco(リブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ)で固定されるが、Rubiscoの触媒部位が二酸化炭素よりも酸素に対して高い親和性をもつため(オキシゲナーゼ反応)、炭酸固定反応が酸素で阻害を受ける。これが光合成の酸素阻害であり、低二酸化炭素・高酸素という現在の大気組成の下ではC3植物の光合成は恒常的に阻害されている。一方、C4植物は、光合成の酸素阻害を克服すべく進化した植物である。C4植物においても、二酸化炭素の炭水化物への変換はカルビン回路を介して行われるが、カ

ルビン回路に加えてC4植物に特徴的な光合成回路(C4光合成回路)を合わせもつ(図1)。C4光合成回路は葉肉細胞と維管束鞘細胞にまたがる代謝回路で、葉肉細胞で取り込んだ二酸化炭素をRubiscoを含むカルビン回路酵素の存在する維管束鞘細胞で放出する「CO<sub>2</sub>ポンプ」として働き、Rubisco近傍の二酸化炭素濃度を高めて酸素との反応を抑制する<sup>1)</sup>。

C4光合成回路は、二酸化炭素を放出する脱炭酸酵素の種類から3つのサブタイプに分類される<sup>1)</sup>。トウモロコシに代表されるNADP-ME型C4光合成回路の場合、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPC)、ピルビン酸、Piジキナーゼ(PPDK)、NADPリンゴ酸酵素(NADP-ME)がC4光合成回路の構成に必要な主要酵素である(図1)。

### 3. C4光合成遺伝子

C4光合成回路を構成する酵素はC3植物にも存在するが、その酵素活性は非常に低い。イネとトウモロコシを比べると、イネのPEPC活性はトウモロコシの活性の1/20-40、PPDK活性は1/80-100、NADP-ME活性にいたっては1/150-200である。しかしながら、C4光合成酵素の遺伝子(C4光合成遺伝子)の構造は、C3植物とC4植物とで非常に類似している<sup>2)</sup>。よく似た遺伝子がなぜC4植物内で高発現しC3植物内では発現が抑えられているのかを、プロモーター解析によって検討した。

トウモロコシのPPDK遺伝子のプロモーターにリポーター遺伝子として大腸菌のβ-グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子を連結したキメラ遺伝子をイネに導入したところ、葉身、葉鞘、稈など葉緑体のある細胞すべてでGUSの発現が観察された<sup>3)</sup>。逆に、イネのPPDK遺伝子のプロモーターにリポーター遺伝子(ルシフェラーゼ遺伝子)を連結したキメラ遺伝子をトウモロコシに導入しても、リポーター遺伝子は発現しなかった。PEPC



遺伝子のプロモーターの場合にも同じ結果が得られた<sup>4)</sup>。これらの結果は、C4植物のC4光合成遺伝子の発現に必要な転写調節システムはC3植物にも存在すること、一方、C3植物のC4光合成類似遺伝子は、この転写調節システムを利用できないことを示している(図2)。

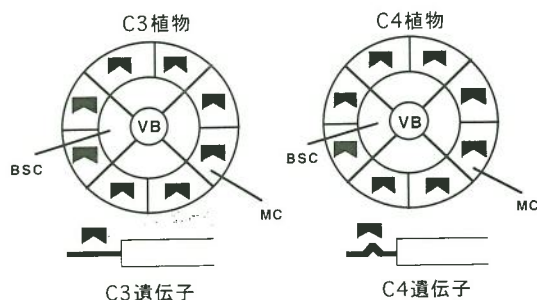


図2 C3植物とC4植物におけるC4光合成遺伝子の発現レベルの違いを説明するモデル  
VB: 維管束, BSC: 維管束鞘細胞, MC: 葉肉細胞

#### 4. C3植物へのC4光合成酵素の導入

我々は、C3植物であるイネの葉肉細胞にトウモロコシのC4光合成回路を付与するプロジェクトを行っている。閉じたC4光合成回路を駆動させるためには、PEPC, PPK, NADP-MEの最低3種類の酵素を導入する必要がある。トウモロコシの遺伝子を導入したイネの葉肉細胞では、PPDKとNADP-MEは葉緑体内に移行し、PEPCは細胞質内にとどまる、というトウモロコシと同様の存在形式をとると予想される(図1参照)。これら3種類の酵素以外の反応系はイネの酵素がそのまま利用でき、C4光合成回路が構築されると期待される。

C3植物にC4植物の光合成遺伝子を導入して光合成能を増大させる試みは、植物への遺伝子導入が可能となって以来多くの研究者

によって行われてきた。しかしながら、これまでのところC3植物のC4光合成酵素の活性をC4植物並みに高めることには成功していなかった。これまでの試みの多くは、C4光合成酵素のcDNAにC3植物の葉肉細胞内で高発現可能なプロモーター(CaMV35Sプロモーター, Cabプロモーターなど)を連結したキメラ遺伝子をC3植物に導入するというものであった。我々は、上述のプロモーター解析の結果から、C4植物の遺伝子のプロモーターがC3植物内で充分機能できることを見越し、C4植物のゲノム遺伝子をそのままイネに導入することにした。以下に、現在もっとも解析が進んでいるPEPC遺伝子導入イネ<sup>5)</sup>について紹介する。

導入した遺伝子はトウモロコシのPEPC遺伝子で、約1.2 kbの転写調節領域、エキソンとイントロンを含む全転写領域、約2.5 kbの転写終結領域を含む、全長8.8 kbの遺伝子断片である(図3)。これをアグロバクテリウムを介する方法でイネ(品種はキタアケと日本晴)の胚盤由来のカルスに導入し<sup>6)</sup>、その再分化当代(T1世代)について解析を行った。形質転換イネ89個体のうち、約85%が非形質転換イネの2-30倍のPEPC活性を、約15%が非形質転換イネの30-100倍、すなわち、トウモロコシと同等あるいはそれ以上の高いPEPC活性を示すことがわかった。また、PEPCタンパク質含量にともなってPEPC活性が増大したことから、イネ内で発現したPEPCタンパク質はすべて活性型で存在することがわかった。

PEPC導入イネの光合成特性を検討した(図4)。C3植物では、Rubiscoのオキシゲナーゼ活性のため炭酸固定反応は大気中の酸素で約30%阻害される。PEPC遺伝子導

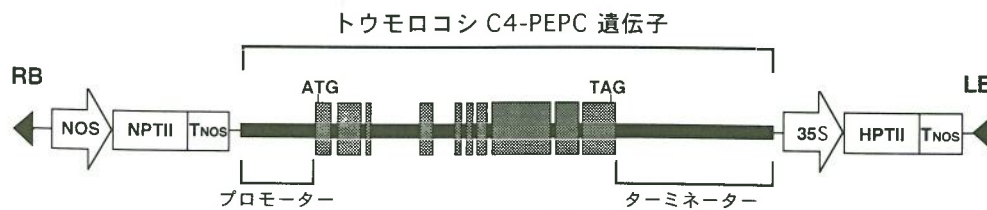


図3 トウモロコシPEPC遺伝子導入用プラスミド

入イネでは、PEPC 活性の増大にともなって酸素阻害率が30%から約20%にまで低下した。このことは、二酸化炭素の全吸収量の約1/3が酸素で阻害されない酵素、すなわち導入した PEPC で固定されていることを示している。CO<sub>2</sub>補償点の測定からも同様な結果が得られた。CO<sub>2</sub>補償点は光合成酸素阻害の指標であり、その値が低いほど酸素阻害率が低いとされている。PEPC 導入イネでは、PEPC 活性の増大にともなって CO<sub>2</sub>補償点が低下することがわかった。

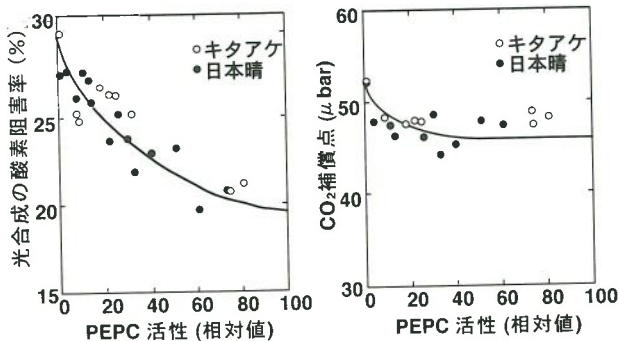


図4 PEPC 遺伝子導入イネの光合成酸素阻害 (左) と CO<sub>2</sub> 補償点 (右)  
PEPC 活性は、非形質転換イネの活性を1とした相対値で示した。

## 5. おわりに

研究開始時点においては、単一の C 4 光合成酵素を導入しただけでは C 3 植物の光合成特性は何ら変化せず、最低3種類の酵素を導入して初めて変化が現れるものと考えていた。トウモロコシ PEPC の高発現でイネの光合成酸素阻害率が変化したという本研究の知見はこれまでの既成概念を覆すものであり、単

一酵素の過剰発現で植物の代謝バランスを改変しうることを示している。現在 PEPC 導入イネの光合成特性の解析を行っているが、光合成活性それ自体には顕著な変動は認められなかった。イネの光合成能の改良には、さらに PPDK と NADP-ME を導入する必要がある。PPDK, NADP-ME についても PEPC の場合と同様にゲノム遺伝子をイネに導入し、酵素タンパク質を高発現させることができれば、次は交配によって3種類の C 4 光合成酵素を合わせもつイネを作成する予定である。我々の研究の最終目標は、C 4 光合成回路の付与によるイネの光合成能の改良であるが、単一の酵素遺伝子を導入した形質転換イネの解析を通して、光合成系を含む代謝経路の制御機構に関する新たな知見が得られるものと期待している。

## 文 献

- 1) Edwards, G.E. and D.A. Walker (1983) C3, C4: Mechanisms, and Cellular and Environmental Regulation of Photosynthesis, Blackwell, London, pp. 540
- 2) Ku, M.S.B. *et al.* (1996) *Plant Physiol.*, 111: 949-957
- 3) Matsuoka, M. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 9586-9590
- 4) Matsuoka, M. *et al.* (1994) *Plant J.*, 6: 311-319
- 5) Ku, M.S.B. *et al.*, submitted
- 6) Toki, S. (1997) *Plant Mol. Biol. Reporter*, 15: 16-21

# 遺伝子組換えによる リグニン高分解性キノコ菌の作出

東京工業大学 生命理工学部 生命理学科  
 宍戸 和夫

シイタケ遺伝子の強力なプロモーターと効果的なターミネーターを持つベクターを用いて、有用遺伝子をキノコ菌の染色体に多コピー導入し、それを極めて効率的に発現させる系を開発した。この系を用いて、ヒラタケ由来のリグニン分解酵素（マンガン(II) ペルオキシダーゼ：MnP）を高度に生産するヒトヨタケ菌の作出に成功した。この分子育種株は針葉樹由来のリグニンを高効率で分解することが示された。

## 1. はじめに

植物・木質系バイオマスは資源・エネルギーの枯渇、環境の悪化などの今日的問題に対して再生産可能で地球に優しい資源として注目を浴び、その有効利用技術開発の必要性が叫ばれている。植物・木質系バイオマスを処理して有用物質を工業的規模で生産させるためには、省エネルギー的かつ環境順応型の処理方法が要求されるが、これに適合するのが生物的处理方法である。植物・木質の主要構成成分のうち資源・エネルギーという面で有用なのがセルロースであり、これを分取しようとする場合に特に重要なのが難分解性のリグニンを分解・除去する技術である。ここで注目されるのがリグニン分解性を持つキノコ菌である。以上のような背景から、我々は遺伝子組換え技術を用いて、リグニンを高効率に分解することのできるキノコ菌の分子育種を試みた。対象としたのは極めて増殖の速いヒトヨタケである。その結果、目的とした菌株の作出に成功した。

## 2. 外来遺伝子の染色体挿入型発現 ベクターの構築

はじめに、外来遺伝子の染色体挿入型発現

ベクターの構築を行った。プロモーターとしてはシイタケ由来の *ras* と *priA* 遺伝子のもを用いた（図1）。*ras* は栄養増殖期および子実体形成過程を通じて常時高程度に発現しており、プロモーター・コンセンサス配列 CAAT, CACCC や TATA ボックス, CT モチーフなどを持つ<sup>1,2)</sup>。*priA* は子実体原基時に特異的に発現する遺伝子であるが、時期特異的な発現に係わると考えられる上流域を除いた基本プロモーターは、コンセンサス配列 GC, CAAT や TATA ボックス, CT モチーフなどを持つ<sup>3)</sup>。一方ターミネーターとしては典型的な転写終結・ポリ A 付加シグナルと付加部位を持つ *priA* 遺伝子のもを用いた<sup>4)</sup>。これらプロモーターとターミネーターの間にクローニング部位 *Bam*HI を組み入れた大腸菌プラスミドを骨格とする発現ベクターを構築した。*ras* プロモーター・*priA* ターミネーターを pUC19 に組み込んだものを pLC1<sup>4,5)</sup>、*priA* プロモーター・*priA* ターミネーターを pBR322 に組み込んだものを pLC2 と命名した<sup>6)</sup>（図1 参照）。これらベクターにより、大腸菌由来の  $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子やネオマイシン耐性遺伝子、あるいは放線菌由来のピアラホス耐性遺伝子などをシイタケ、ヒラタケ、ヒトヨタケの染色体に多コピー挿入し発現させることが可能であることがわかった<sup>4~6)</sup>。

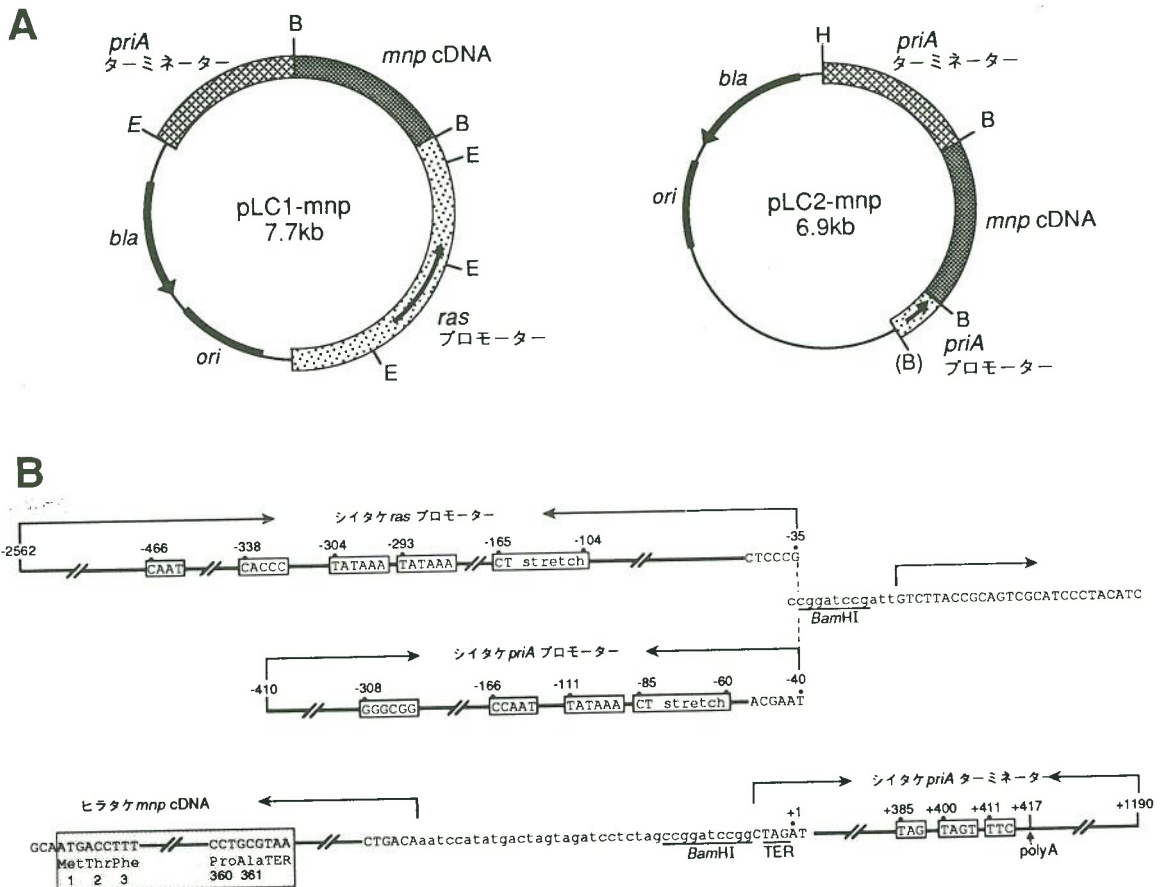


図1 組換えプラスミド pLC1-mnp と pLC2-mnp の構造(パネルA), およびシタケ遺伝子 *ras* と *priA* のプロモーターと *priA* のターミネーターの構造的特徴およびプロモーター, ヒラタケの *mnp* cDNA, ターミネーターの連結部分の塩基配列 (パネルB)

### 3. リグニン高分解性ヒトヨタケ菌株の作出

ヒラタケ由来のリグニン分解酵素(マンガン(II)ペルオキシダーゼ:Mnp)のcDNA遺伝子(*mnp*cと略称, 香川大学, 麻田らにより分離<sup>7)</sup>をpLC1およびpLC2に組み込んだ組換えプラスミドpLC1-mnp, pLC2-mnpを構築し(図1), ヒトヨタケ由来 *TRP1* (トリプトファン合成酵素) 遺伝子を持つプラスミド pCc1001と共にヒトヨタケ核菌糸 *Trp*<sup>-</sup> (トリプトファン要求性) 株(LT2-44)に導入した(同時形質転換)。2回の実験から得られた60個の *Trp*<sup>+</sup> (トリプトファン非要求性) コロニーの中から無作為に13株を選び出し, 天然のリグニンに対する分解性を検討した。その結果, リグニン分解性が元株より顕著に高まった形質転換株をpLC1-mnp から2株, pLC2-mnp から2株

分離することができた。これら4株をそれぞれTF1-2とTF1-4 およびTF2-1とTF2-7と命名した。染色体上の *mnp*cのコピー数を調べたところ, TF2-7が一番多く10コピー, 他は5~6コピーと推定された。

### 4. ヒトヨタケ分子育種株TF2-7によるリグニンの脱色・分解

TF2-7株を天然のリグニン(0.1%)と塩化マンガン(0.025%)を含むMYG培地(1%麦芽エキス, 0.4%酵母エキス, 0.4%グルコース, pH 5.6)中, 30°Cで振とう培養した。実験対照として, ヒトヨタケ核菌糸 *Trp*<sup>-</sup> 株にpCc1001のみを導入して得られた *Trp*<sup>+</sup>株を同時に培養した。その結果, 図2に示すように, TF2-7株は対照株と比較して極めて顕著にリグニンを脱色および分解することがわかった。図3にTF2-7株と対照株の培養14日のリグニン脱

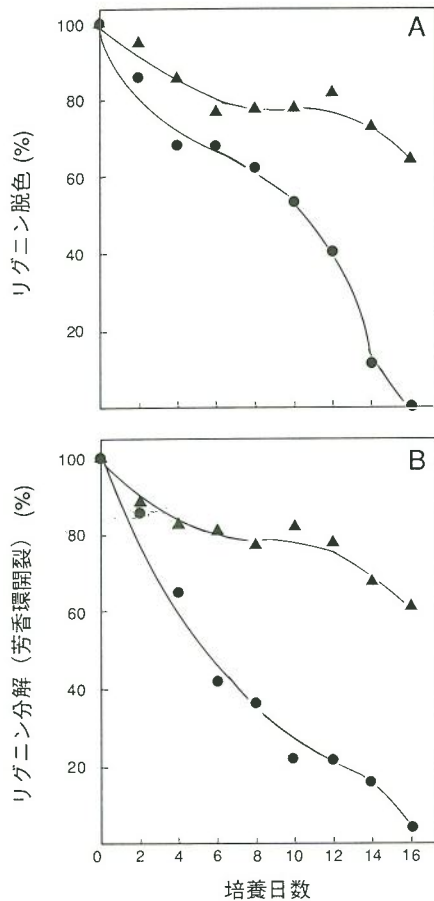


図2 TF 2-7株と対照 Trp<sup>+</sup>株によるリグニンの脱色(パネルA)および分解(芳香環開裂)(パネルB)

パネルA, Bとも, ●—●はTF 2-7株を, ▲—▲は対照 Trp<sup>+</sup>株を示す。脱色は480nmの, 分解は275nmの吸収の減少に基づく。

色の様子が示してある。同様の結果はグルコースを含まないMY培地を用いた実験でも得られた。色素 Remazol Brilliant Blue R (RBBR) を基質として培養液中のペルオキシダーゼ活性を測定したところ, TF2-7株は対照 Trp<sup>+</sup>株の30倍と計算された。TF2-7株の持つ高いリグニン脱色・分解活性は数カ月に亘る継代培養によっても失われることはなかった。

## 5. おわりに

我々は, 最近, ヒラタケ由来のマンガニン(II)ペルオキシダーゼの分泌シグナルに相当する塩基配列を先頭に付けた枯草菌由来のキ

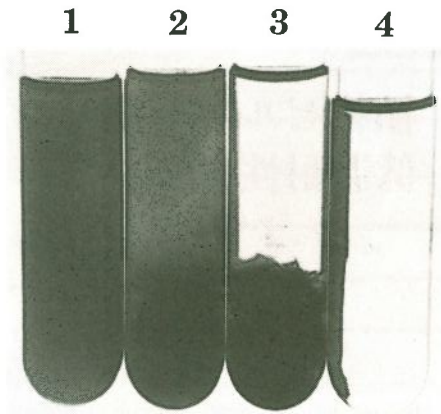


図3 TF 2-7株と対照 Trp<sup>+</sup>株によるリグニン脱色を示す写真

1: MYG+リグニン, 2: MYG+リグニン+対照株, 3: MYG+リグニン+TF 2-7株, 4: MYGのみ

シラン(ヘミセルロースの主要成分)分解酵素の遺伝子をpLC1およびpLC2ベクターに挿入し, 得られた組換えプラスミドをpCc1001と共にヒトヨタケに同時形質転換して高いキシラン分解活性を有する形質転換株の作出にも成功した。本株と今回述べたリグニン高分解性株を用いて, クラフトパルプの漂白を手始めに, 植物・木質系バイオマスからセルロース画分を分取することを試みている。これが成功すれば, 資源・エネルギーの今日的問題の解決につながり, 資源のリサイクルシステムの確立と言う面からも意義がある。

## 文 献

- 1) Hori, K. *et al.* (1991) *Gene*, 105: 91-96
- 2) Kajiwara, S. and K. Shishido (1992) *FEMS Microbiol. Lett.*, 92: 147-150
- 3) Kajiwara, S. *et al.* (1992) *Gene*, 114: 173-178
- 4) Kajiwara, S. (1993) PhD Thesis, Tokyo Institute of Technology
- 5) Yanai, K. *et al.* (1996) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60: 472-475
- 6) Ogawa, K. *et al.* (1997) submitted
- 7) Asada, Y. *et al.* (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, 1251: 205-209

## 国内情報

## 植物ピルビン酸リン酸ジキナーゼ(PPDK)の低温耐性について

日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所  
太田象三・宇佐美悟・植木潤

C<sub>4</sub>光合成において重要な酵素であるPPDKは一般に低温感受性であるが、キク科植物 *Flaveria brownii* の葉のPPDKは低温耐性を示す。*F. brownii* からPPDK cDNAをクローニングし大腸菌で発現したところ、葉由来の酵素と同等の低温耐性を示した。*F. brownii* と *F. bidentis*, トウモロコシPPDKのキメラ酵素の解析および点変異導入の結果から、酵素のC末端領域にある3カ所のアミノ酸残基が低温耐性に重要であることが明らかになった。

腸菌発現系を利用した解析を試みた<sup>4,5)</sup>。

### 1. はじめに

ピルビン酸リン酸ジキナーゼ(PPDK, EC 2.7.9.1)はトウモロコシなどC<sub>4</sub>植物のC<sub>4</sub>光合成経路においてCO<sub>2</sub>の最初の受容体であるホスホエノールピルビン酸を生成する酵素である。PPDKは核にコードされた遺伝子から前駆体タンパク質として合成され、葉緑体への移行に伴ってトランジットペプチドが切断され成熟酵素となる。PPDKの活性はC<sub>4</sub>経路を構成する酵素の中で最も低く、C<sub>4</sub>光合成全体を律速する要因の一つであると考えられている。またPPDKは一般に10°C以下の低温において著しく活性が低下する。この低温失活は活性型の4量体が不活性な2量体または単量体に解離することによって起こり<sup>1)</sup>、精製酵素では温度を戻すと再び会合し活性を回復する<sup>2)</sup>。キク科植物 *F. brownii* はC<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>中間型に分類され、そのPPDKは0°Cの低温処理においてもほとんど失活しないことが知られている<sup>3)</sup>。一方、同属のC<sub>4</sub>植物 *F. bidentis* のPPDKは典型的な低温失活型酵素である。そこで我々は *F. brownii* からこの酵素のcDNAをクローニングし、この酵素の低温耐性機構について大

### 2. *F. brownii* PPDK cDNAのクローニングと大腸菌での発現

*F. brownii* PPDK cDNAは、*F. bidentis* PPDK cDNAの配列を参考に合成したプライマーにより逆転写PCRを行い、得られた部分長cDNA断片をプローブとして *F. brownii* 葉cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより単離した。*F. brownii*, *F. bidentis*, トウモロコシのPPDK cDNAの成熟酵素部分を大腸菌発現ベクターpKK233-2に組み込んで大腸菌に導入してIPTGによる発現誘導の後、菌体を超音波により破壊しPPDKを抽出した。それぞれについて氷上での失活速度を測定したところ、大腸菌産物の低温耐性(感受性)は対応する葉由来酵素と同等であり(図2)、PPDKの低温耐性には植物細胞で生産される因子やタンパク質の翻訳後修飾は関与していないことが明らかとなった。

### 3. キメラ酵素の作成と解析

cDNAの配列から予想される *F. brownii* (低温耐性)と *F. bidentis* (低温感受性) PPDKの成熟酵素部分の配列は非常に相溶性が高く、N末端の位置が異なるほかは(トランジットペプチドの切断位置が異なるため

OHTA Shozo, USAMI Satoru, UEKI Jun

*F. brownii* PPDKの方が8残基長い) ギャップは見られない。アミノ酸置換は全部で40カ所存在するが、これらの全てが *F. brownii* PPDK の低温耐性に重要であるとは考えにくいので、酵素をN末端側、中央、C末端側の3つの部分に分け、どの部分が低温耐性に関与しているかを調べた。二つのcDNAに共通して同じ位置に存在する *EcoRI* および *NdeI* 部位を用い、N末端側・C末端側領域を相互に入れ替えることにより4種類のキメラ遺伝子を作成し、大腸菌で発現させた(図1, 2)。その結果、*F. brownii* PPDKのC末端側領域を含むキメラ酵素(100および110)は元の *F. brownii* PPDKと同程度の低温耐性を示し、逆に *F. bidentis* PPDKのC末端側領域を含むキメラ酵素(011および001)は低温感受性となった。そこで次にC末端側領域を *XhoI* 切断部位によりさらに2つに分けて相互に交換し、低温耐性を測定した。その結果、後半の領域を *brownii* 型にしたキメラ酵素(1110, 7カ所のアミノ酸置換を含む)が低温耐性を示したのに対し、前半の領域を *brownii* 型にしたキメラ酵素(1101)は耐性を示さなかった。

4. 低温耐性に重要なアミノ酸残基の同定

次に、C末端側領域の後半部分をさらに2つに分け(それぞれ3カ所および4カ所のアミノ酸置換を含む)、*F. bidentis* PPDK

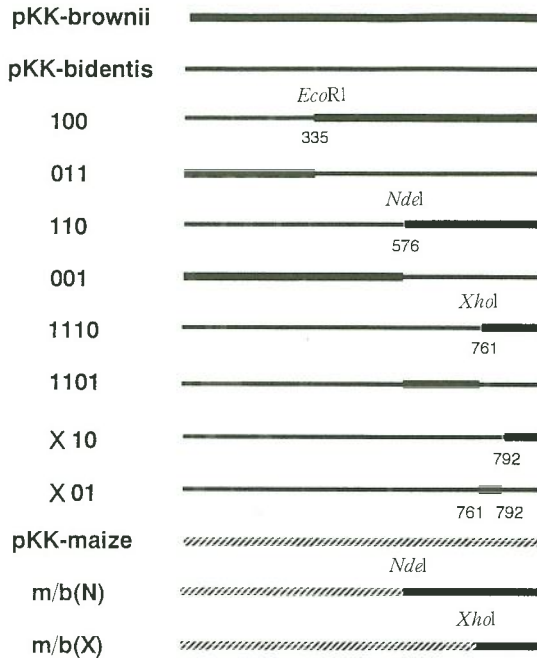


図1 実験に用いた各種キメラPPDK遺伝子(cDNA)の模式図

X10およびX01キメラ遺伝子は linking PCR 法により、他のキメラ遺伝子は図に示した制限酵素を用い作製した。ただし、トウモロコシcDNAではPCRにより *NdeI* と *XhoI* サイトを導入した後、組換えに用いた。

cDNAの相当する部分に導入して低温耐性程度の変化を調べた。その結果、最もC末端よりの部分だけで *F. bidentis* PPDKに低温耐性を付与しうることが分かった(X10)。前よりの部分を導入した酵素(X01)は低温により失活したが、もとの *F. bidentis* PPDKと比べるとやや低温耐性になっていることから、この領域に含まれるアミノ酸置換もPPDKの低温耐性に影響を与えるもの

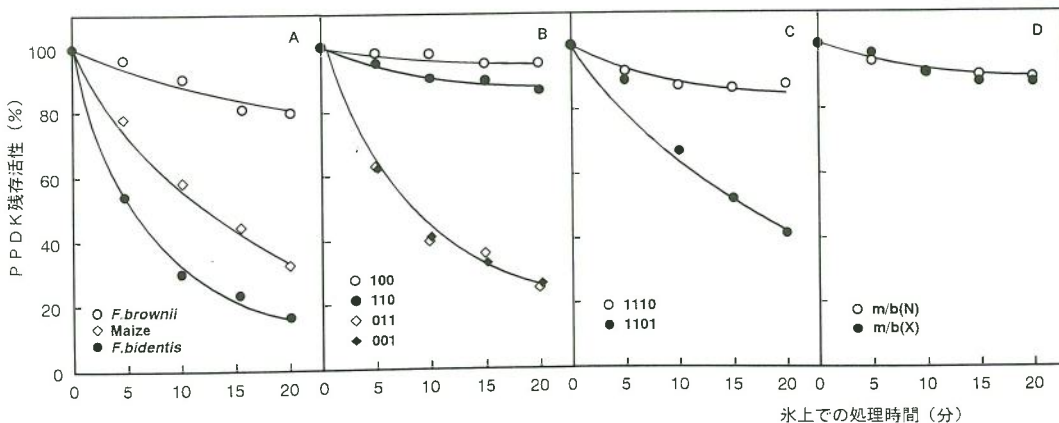


図2 キメラPPDKの低温条件下での失活パターン

PPDKを生産している大腸菌の粗抽出液を脱塩後、氷上で低温処理し活性測定を行った。測定は25°Cで行い、PEPC・MDHを共役酵素として用いてNADHの酸化速度(340nm)を測定することによりPPDK活性を決定した。

と考えられた。最もC末端よりの部分に含まれるアミノ酸置換は4カ所で、これらについて点変異により詳しく解析した。まず、キメラ酵素1110 cDNAの4カ所のアミノ酸に *F. bidentis* 型変異を一カ所ずつ導入したが、変異体PPDKはいずれも低温耐性を示し、低温耐性の付与には2カ所以上のアミノ酸が関わっていると考えられた。次に、*F. bidentis* PPDK cDNA上に *F. brownii* 型のアミノ酸置換を一つずつ導入して、低温耐性を調べた(図3)。804AS変異体は *F. bidentis* PPDKと同様に低温感受性であったが、800QP変異体は *F. brownii* PPDKよりやや弱い程度の低温耐性を獲得した。また、804ASと800QPの二重変異体は800QP変異体と同程度の低温耐性であり、804AS変異は低温耐性には影響を及ぼさないと考えられた。816IL変異体はやや低温耐性が向上し、883IVとの二重変異ではさらに低温耐性が向上してキメラX10よりも少し弱い程度になった。これらの結果から我々は、800P・816L・883Vの3カ所のアミノ酸が *F. brownii* PPDKの強い低温耐性に関与していると結

論した。

## 5. トウモロコシPPDKの改変

これまでに得られた知見を基に、トウモロコシPPDKに低温耐性を付与することを試みた。トウモロコシ(イネ科)と *F. brownii* (キク科)とは遠縁のためPPDKのアミノ酸配列の相同性は成熟酵素部分で77%であるが、*F. bidentis*の場合と同様N末端プロセシングの位置を除き配列にギャップは見られない。我々はまず *F. brownii* PPDKのC末端側領域を利用することでトウモロコシPPDKにも低温耐性を付与できるかどうか調べた。トウモロコシPPDK cDNAの相当する位置に *Nde*I および *Xho*I の切断部位を導入し、*F. brownii* PPDKのC末端側領域あるいはその後半部分を持つキメラcDNAを作成した。これらを大腸菌で発現した結果、産物はPPDK活性を示し、*F. brownii* PPDKと同等の強い低温耐性を示した。次に点変異の導入による改変を試みた。トウモロコシPPDKでは、低温耐性の付与に関与

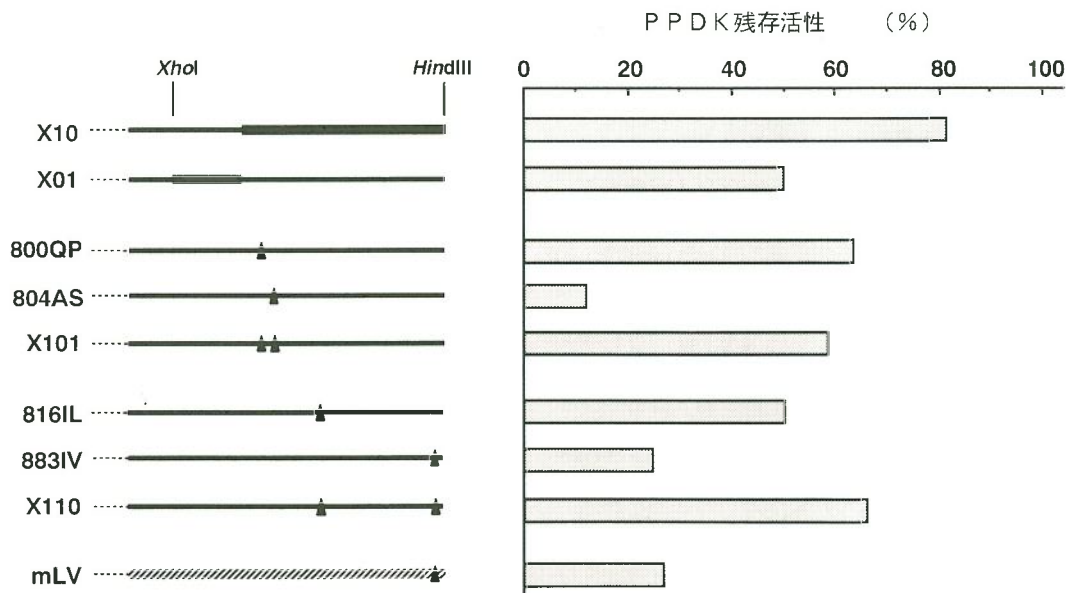


図3 キメラ及び点変異PPDKの低温耐性

X10キメラ遺伝子の *F. brownii* 部分(太線部)には、*F. bidentis* との間に4つのアミノ酸置換(アミノ酸No. 800, 804, 816, 883)が存在し、これらについて点変異遺伝子を作成した。

mLV点変異遺伝子はトウモロコシPPDKに、それ以外の点変異遺伝子は *F. bidentis* PPDKに *F. brownii* 型アミノ酸を導入したものである。

低温耐性の程度はキメラ及び点変異PPDKを生産している大腸菌の脱塩後の粗抽出液を用いて測定し、20分氷上で処理した後の活性の残存割合を示した。



していると考えられる3カ所の残基のうち2カ所(800Pおよび816Lに相当する位置)がすでに *F. brownii* PPDKと同じ残基であるので、883の位置にあるロイシン残基をバリンに変換して低温耐性を調べた。しかし、この酵素の低温耐性は元のトウモロコシPPDKと同程度であり、低温耐性を付与することはできなかった。このことは、決定した3残基だけでなく周囲の残基の配列も重要であることを示しているといえる。

## 6. サブユニットの会合状態

トウモロコシPPDKにおいては、PPDKの低温失活に伴って4量体の解離が起こることが詳しく調べられており、4量体の会合にはMg<sup>2+</sup>イオンが必要であることが分かっている。そこで、低温耐性型および感受性型PPDKのサブユニット解離・会合の状態を、室温および4°Cでゲル濾過を行って比較した。室温ではどちらの型のPPDKも溶出パターンに差はないが、4°Cでは低温感受性型PPDK (*F. bidentis* およびトウモロコシ) はみかけの分子量が半分になり、2量体に解離していることが確認された。一方、低温耐性型PPDK (*F. brownii* および m/b(X)) は室温と同じ溶出パターンで4量体は解離していなかった。また、室温においてEDTAが4量体の解離におよぼす影響について調べたところ、耐性型PPDKは10mM EDTAの存在下でも解離しないが、感受性型PPDKは同じ条件では2量体に解離することが確認された。

## 7. まとめ

低温において活性が低下するタンパク質は、失活と同時に多量体の解離が起こるものが多い。植物PPDKもこうしたタンパク質の一つで、4量体が低温下で解離することにより

活性を失う。我々の結果は、PPDKサブユニットのC末端領域が、サブユニットの相互作用、4量体への会合、そして酵素の低温耐性に強く影響を及ぼすことを示している。植物PPDKは活性型4量体を構成するのにMg<sup>2+</sup>イオンを必要とするが、*F. brownii* PPDKはEDTA存在下でも解離しないことから、*F. brownii* PPDKではMg<sup>2+</sup>イオンに対する各サブユニットのアフィニティが強く、低温においても解離しにくいものと考えられる。一方、低温耐性に関与することが明らかとなった3残基のうち2残基は疎水性のアミノ酸残基であり、似た性質のアミノ酸残基による置換でありながら酵素の低温耐性を大きく変化させている。このことはPPDKのサブユニット会合に疎水性相互作用が関与していることを示唆している。

PPDKの低温失活についてはトウモロコシの生育限界温度との関連が指摘されており、低温に適応した品種ほどPPDKが低温失活しにくい傾向にあることが報告されている<sup>6)</sup>。将来的には、*F. brownii* PPDKをトウモロコシに導入する、あるいはトウモロコシのPPDKを低温耐性型に変換することにより、トウモロコシの低温適応性を改善することができるかも知れない。

## 文 献

- 1) Shirahashi, K. *et al.* (1978) *Plant Physiol.*, 62: 826-830
- 2) Sugiyama, T. (1973) *Biochemistry*, 12: 2862-2867
- 3) Burnell, J.N. (1990) *Plant Cell Physiol.*, 31: 295-297
- 4) Usami, S. *et al.* (1995) *Plant Mol. Biol.*, 27: 969-980
- 5) Ohta, S. *et al.* (1996) *FEBS Letters*, 396: 152-156
- 6) Sugiyama, T. and K. Boku (1976) *Plant and Cell Physiol.*, 17: 851-854

## ククメリスカブリダニによるアザミウマ類の防除

日本化薬株式会社 農薬事業部 上尾研究所  
榎井 昭夫

アザミウマ類は海外よりわが国に侵入し、施設園芸作物に多大な被害をだしている。化学農薬による防除が難しく、有効な防除法の確立とともに、総合的害虫管理を推進するためにも、天敵昆虫を初めとした生物農薬の開発が必要とされる。ククメリスカブリダニは、これらアザミウマ類の天敵として、欧米を初めとする多くの国々ではすでに、商業的に生産され、実用化されている。しかし、わが国では天敵昆虫を初めとする生物農薬の商業的な生産に関する技術開発の事例が極めて少なく、総合的害虫管理推進の遅れの一因となっている。本稿では、ククメリスカブリダニを生物農薬として開発し、実用化するためにおこなっている商業的生産および実用化に向けた防除試験などを紹介する。

### 1. はじめに

世界的な人口の増加とそれに見合う食糧の生産を保証し、なお、地球環境の改善が21世紀における人類の大きな課題と言われている。そのために、農業分野、中でも作物保護にとって必須となる有害生物の防除について、近年、総合的有害生物管理 (Integrated Pest Management) が呼ばれるようになっていく。この考え自体は古く、1960年代にFAOが提唱し、定義づけているが、1980年代後半に入り、再び世界各国が採用しているのは、こうした21世紀に向けた人類の取組みとして、世界的に認識されるようになったからであろう。

総合的有害生物管理とは複数の防除法を相互に矛盾なく採用し、有害生物を経済的な被害水準以下に保つシステムである。そのためには、20世紀後半に大発展し作物保護に多大に貢献してきた化学農薬を用いた化学的防除に依存し過ぎることなく、むしろ生物的防除、耕種的防除、物理的防除などの様々な防除技術が開発されていく必要がある。天敵昆虫の

利用は、こうした意味で、総合的有害生物管理の推進に不可欠な技術として期待されている。

天敵昆虫を害虫防除に利用する技術は、近年とくに欧米を中心に発展し、天敵昆虫類の商業的な生産がおこなわれ、施設園芸農業を中心に実用的な利用が進んでいる。

作物の害虫防除への天敵昆虫の利用は、古くより提唱され、多くの研究がなされ、また、試みられてきた。欧米では100年以上の昔から、日本においても30年以上の歴史をもっている。古くは、防除の難しい害虫の天敵を海外から導入し、定着させ永続的に防除する試みがなされていた (古典的天敵放飼法)。

最近では、天敵昆虫を大量に増殖させて、継続的に放飼して害虫を防除する方法がとられるようになっていく。さらに、圃場内での天敵の定着をねらって放飼する方法 (継続的接種法) と害虫の発生時に大量の天敵を放飼し、害虫密度を低下させるが、天敵の定着を期待しない方法 (大量放飼法) がある。どちらの方法が適しているかは、使用する天敵の性質と対象となる害虫の特性を考慮して決定される。

一方、最近国際的な物流の発展に伴い、様々な害虫が日本国内でも発見されるように

なっている。とくに、オンシツコナジラミに代表されるコナジラミ類とミナミキイロアザミウマに代表されるアザミウマ類は施設園芸だけでなく露地園芸においても大きな被害を与えている。同時に、化学農薬による防除が難しいのも特徴である。

ククメリスカブリダニは、欧米諸国では、すでに商業的な生産・販売体制が整い、主に施設園芸のアザミウマ類の防除に広く使用されている天敵である。

## 2. ククメリスカブリダニの特性

ククメリスカブリダニ、*Amblyseius cucumeris* Oudemans はカブリダニ科 Phytoseiidae のアンブリセイウス属 *Amblyseius* に属するカブリダニの一種である（写真参照）。雌成虫は体長が0.3mmほど



写真 ククメリスカブリダニの雌成虫

の比較的小形のカブリダニである。雄成虫は雌より小形である。本種は、欧州、南北アメリカ、アフリカ、南アジア、オセアニアなど、広く世界に分布（W. D. Morewood 1993）している（図1）。アジア地域では、1992年に日本の埼玉県内にて採取されたとの記録がある（足立1995）。日本では *Amblyseius* 属のカブリダニが10種ほど記録されているが、その多くはハダニ類、ヒメハダニ類、ホコリダニ類を主に捕食している。一方、ククメリスカブリダニは主にアザミウマ類の幼虫を捕食することが知られている。

雌成虫は一日当たり平均1.5個の卵（25°C）を産卵し、卵は4日して孵化したのち、ほぼ12日後には成虫となり、産卵を始める。野外

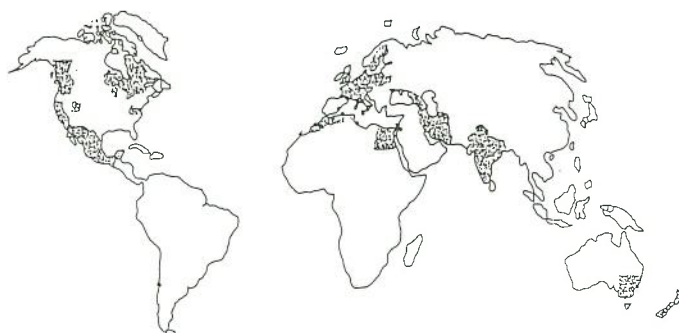


図1 世界におけるククメリスカブリダニの分布  
(W. Dean Morewood 1993)

で、ククメリスカブリダニは、アザミウマやハダニが加害する植物（キュウリ、ピーマンなどの野菜、リンゴなどの果樹など）から発見されている。比較的低温に強く、0°C以下では越冬個体が生ずるが、これには温度と日長の両方が関与するとされている。

## 3. ククメリスカブリダニの増殖

野外では、本種の成幼虫はアザミウマ類の幼虫、ときにハダニ類の卵を捕食して生活している。こうした野外で捕食している餌昆虫を大量に増殖するには、大規模な設備と多大の手間がかかり、極めて効率が悪い。室内でククメリスカブリダニを大量に、効率良く増殖させるためには、代替餌として、小規模で大量の増殖が可能であり、手間のかからないケナガコナダニが用いられる。

本種を実験用に小規模に飼育するのは比較的容易であり、国内でも足立（1995）が報告をしている。たとえば、実験に供するため、10アール分のカブリダニを生産するのは、小規模な飼育機器があれば、比較的容易である。少量であるうえに、放飼する時期が決められるからであり、また、長距離を輸送する必要がない。

しかしながら、商業的に生産するとなると、その規模、生産効率などが変わってくる。こうした生産に必要なノウ・ハウなどはほとんど公開されないため、自らの試作と実験を通して、マニュアル化していかなければならない。商業的には、農家から受けた注文に合わせて生産、発送し、品質を保証する体制と技術的

な完成が必要となる。併せて利益性を追及することになる。

現在、我々の研究所では、ケナガコナダニを餌として、ククメリスカブリダニの商業的生産技術開発を目標に、年間を通し、週200～400本（10～20株相当分）を供給できる中規模な生産試験をおこないながら、必要な技術開発、ノウハウの蓄積に取り組んでいる。

#### 4. アザミウマ類に対する捕食活性

ククメリスカブリダニの捕食活性については、小林ら（1993, '94, '95）が報告している。害虫である各種のアザミウマ類、たとえばミナミキイロアザミウマ、ダイズウスイロアザミウマ、ミカンキイロアザミウマ、ネギアザミウマの幼虫、とくに一令幼虫を好んで捕食する。捕食量は、アザミウマの種類により若干異なるが、1日当たり3.8～7.8頭を1頭のククメリスカブリダニ雌成虫が捕食する（表1）。当然ながら低温では捕食量は低下

表1 各種アザミウマに対するククメリスカブリダニの捕食活性  
（小林・榎井 1995）

| アザミウマ種       | 接種幼虫数 | 1頭当たり平均捕食数 |
|--------------|-------|------------|
| ミカンキイロアザミウマ  | 13～27 | 3.8 ± 2.88 |
| ネギアザミウマ      | 10～20 | 6.5 ± 3.10 |
| ダイズウスイロアザミウマ | 13～20 | 6.0 ± 1.94 |
| ミナミキイロアザミウマ  | 10～22 | 7.8 ± 3.53 |
| ナミハダニ（卵）     | 30～91 | 21 ± 14.3  |

し、高温になれば高くなるが、気温が40°C以上では死滅してしまう。比較的低温には強く、10°C以下では捕食はしないが、生存している。

幼虫に対しては高い捕食活性を示すが、アザミウマ類の卵と成虫を捕食することはない。作物の葉の内部に産卵された卵を、ククメリスカブリダニは捕食できないと見られる。また、成虫に対しては捕食能力がないとみられる。これら害虫であるアザミウマ以外にも各種ハダニ類の卵を捕食することが知られている。また、餌となる生物がない条件では、作物の花粉を摂食して生存することもある。

#### 5. アザミウマ類に対する放飼法と防除効果

こうした捕食の特性から、本種をアザミウマ類の防除に使用する場合には、アザミウマがすでに大量に発生している状況よりも、アザミウマの発生密度が低い段階で、本種を放飼し、アザミウマの発生密度をあげないようにする放飼法（継続的放飼）が望ましい。

ククメリスの製剤は、内容量500mlのボトル内に基剤とともに、5万頭以上のククメリスカブリダニを含んでいる。使用時には、蓋をとり、一振りして100頭が放飼されるように工夫がこらされている。また、放飼法として、現在3種の方法が試みられている。第1は、作物の葉上にほぼ均一に放飼（散布）する方法である。比較的容易であり、安価な方法であるが、葉上に製剤の基剤が残ることがある。作物としてはイチゴなどが適している。第2は、作物の植え付け後に株元に放飼する。ククメリスカブリダニは1～2日の間に、作物上に移動し、葉裏、花、果実などに定着する。キュウリ、ピーマンなどに適している。第3は上記の製剤とは異なり、紙製の小袋に100頭ずつのククメリスカブリダニが含まれていて、小袋を作物の茎などに掛ける。カブリダニは袋より脱出し作物へと移動する。トマトなど比較的背丈の高い作物に適している。

ククメリスカブリダニを用いたアザミウマの防除試験は、1994年より、各県の農業試験場などで実施され、有効性が実証されてきている。ここでは、足立（1996）のおこなった試験例を図2、3と表2で紹介する。ナスの定植時またはミナミキイロアザミウマの発生初期に、1週間おき3回ククメリスカブリダニ100頭/株を放飼した。2回目あるいは3回目の放飼後よりアザミウマの密度は抑制され始め、無放飼にくらべ45日以上アザミウマの発生を低密度に抑制した。商品化できたナス果実は、無放飼ではわずか19.2または32.4%であったが、ククメリスカブリダニの放飼により、それぞれ93.5または80.0%と大幅に向上した。

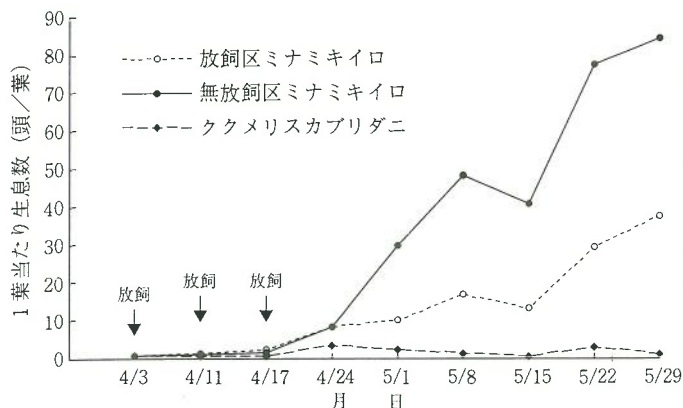


図2 半促成ナスのミナミキイロアザミウマに対するククメリスカブリダニの放飼効果 (足立 1996)

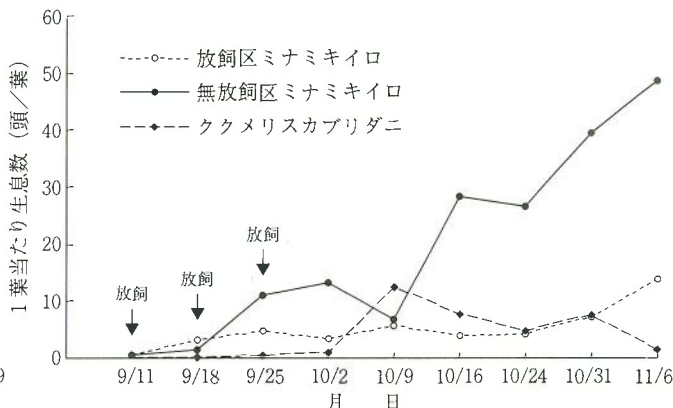


図3 促成ナスのミナミキイロアザミウマに対するククメリスカブリダニの放飼効果 (足立 1996)

表2 ククメリスカブリダニ放飼の有無とナス果実の被害状況 (足立 1996)

| 作型<br>区 | 被害程度別果実数 |    |    |    |   | 被害<br>果率 | 商品<br>化率 |
|---------|----------|----|----|----|---|----------|----------|
|         | 無        | 少  | 中  | 多  | 甚 |          |          |
| 半促成栽培   |          |    |    |    |   | %        | %        |
| 放飼区     | 25       | 27 | 13 | 0  | 0 | 61.5     | 80.0     |
| 無放飼区    | 9        | 25 | 33 | 38 | 6 | 91.4     | 32.4     |
| 促成栽培    |          |    |    |    |   |          |          |
| 放飼区     | 25       | 18 | 3  | 0  | 0 | 45.7     | 93.5     |
| 無放飼区    | 1        | 4  | 10 | 8  | 3 | 96.2     | 19.2     |

6. おわりに

欧米の諸国では、すでに多くの天敵生物が商業的に生産され、実用化されている。欧米の事例では、天敵種の品揃えができ、農家のニーズにあわせて供給できるようになって初めて、天敵昆虫を含めた生物農薬は産業として、大きく育っていった経緯がある。わが国では、わずか2種の天敵昆虫が登録・実用になっているにすぎないが、現在、開発中の天敵昆虫は多種にわたっている。天敵昆虫産業の今後の発展が期待される所であり、商業的な生産技術の開発が急務である。

文 献

1) Gillespie, R. (1989) *Entomophaga*,

34(2) : 185-192

2) Shipp, J.L. and G.H. Whitfield (1991) *Environ. Entomol.*, 20 : 694-699  
 3) Morewood, W.D. (1992) *Can. Entomol.*, 124 : 1015-1025  
 4) Morewood, W.D. (1993) *Eur. J. Entomol.*, 90 : 3-10  
 5) 江原昭三編 (1993) 日本原色植物ダニ図鑑全国農村教育協会, pp.298  
 6) ファン・レンテレン, J.C. (1993) 植物防疫, 47 : 305-310  
 7) 小林益子・榊井昭夫 (1993) 第37回応動昆大会講演要旨, 85  
 8) Rodrigues-Reina, J. M. *et al.* (1994) *J. Appl. Entomol.*, 118 : 44-50  
 9) 小林益子・榊井昭夫 (1994) 第38回応動昆大会講演要旨, 64  
 10) 足立年一 (1995) 天敵利用のはなし, 技報堂, p.138-143  
 11) 小林益子・榊井昭夫 (1995) 平成7年度農薬バイオテクノロジー開発技術研究組合公開セミナー  
 12) 小林益子・榊井昭夫 (1995) 第39回応動昆大会講演要旨, 158  
 13) 足立年一 (1996) 近畿中国地域における新技術, 30 : 44-47

地域の先端研究

## 千葉県における花粉の少ない スギ優良品種の選抜とその実用化

千葉県林業試験場

遠藤 良太

千葉県林業試験場では、林業側からのスギ花粉の抑制を目的として、1991年から林業用種苗に利用しているスギ品種の雄花の着花性に関する研究に取り組んだ。その結果、スギの着花量は品種間に差があり、しかも遺伝性が高いことが確認された。このことから、1995年には花粉の少ないスギ6さし木品種、13実生品種を選抜した。さらに、選抜品種の実用化を図るために、種子とさし穂の供給量の検討を行い、県内造林量に対応できる種苗生産体制を確立した。

### 1. はじめに

近年、スギ花粉症の患者が増大し、大きな社会問題となっている。花粉症は、花粉、大気汚染及びアレルギー体質などが複合して発病するといわれており、医薬、気象、林業など様々な分野からその対策に取り組んでいる。

スギは幹が通直で加工しやすいため、建築、土木などの材料として利用価値が高く、森林所有者が収入を得ることができる数少ない樹種の一つである。しかし、最近の林業は、木材価格の停滞、人件費の上昇などから低迷が続くなかで、スギ林を花粉発生の根源ととらえることは森林所有者にとっても好ましいことではない。すると、花粉の少ないスギの開発の目的が将来的な花粉量の抑制にあるのももちろんのこと、この開発は林業の振興にも結びつくと考えられる。

林業用の種苗については、農作物に比べると集約的な生産が難しく、しかもその生産までに長い年月を要するため、用いられる品種も危険分散を考慮して、集団選抜とそれに基づき選抜品種の交雑されたものが供給されている。実際、多数の林分から成長や形質の優れた品種（林業では精英樹という）が選抜され、それらを母樹とする採種園から種子が生

産され、種苗供給が行われている。また、スギの場合には、同一の規格や品質の木材が生産できる利点から、さし木苗が一部の森林所有者に好まれるため、これら優れた品種で造成された採種園から生産されるさし穂によっても行われている。したがって、花粉の少ないスギの開発に際しては、採種園及び採種園で種苗の供給に用いられている品種を対象に選抜を進めることにより、供給される種苗に木材生産上の優良品も加味され、林業用として普及しやすいと考えた。しかも、既存の種苗供給体制にある品種からの選抜のため、実用化も容易であると考えた。

なお、本研究は1991年から県単独で始め、1994年からは農林水産省の補助研究事業「花粉の少ないスギの選抜と検定技術の開発」を加えて実施した。

### 2. 種苗生産に用いられている スギ品種の着花性

このことについては、1970年に17種類のさし木品種が植栽された品種試験林（林業では次代検定林という、以下さし木試験林）と、1986年に39種類の実生品種が植栽された品種試験林（以下実生試験林）を用い、1991年、'92年（さし木試験林のみ）、'95年の2～3月に、雄花の着花程度を4段階（無着花：0、少し着花：1、中程度に着花：2、多く着花：3）に区分し調査した<sup>4,7,8)</sup>（表1）。

ENDO Ryota

表1 調査林の概要<sup>8)</sup>

| 名称   | 関・千・1号次代検定林                 | 関・千・6号次代検定林                |
|------|-----------------------------|----------------------------|
| 所在地  | 千葉県君津市鬼沼山県有林                | 千葉県鴨川市東条県有林                |
| 造成年月 | 1970年3月                     | 1986年4月                    |
| 面積   | 1.18ha                      | 1.50ha                     |
| 種類   | 精英樹さし木品種17<br>地スギ(地元産の実生) 1 | 精英樹実生品種39<br>地スギ(地元産の実生) 1 |
| 調査本数 | 3,515本                      | 3,621本                     |
| 配植   | 乱塊法により3反復植栽                 | 乱塊法により3反復植栽                |

得られたデータから各品種の着花個体率(雄花が着花している個体の割合)と着花指数(4段階の着花程度の平均値)を求めた。この結果を、雄花が大豊作であった1995年のさし木試験林での調査を例にとってみると、着花個体率が地スギ(対照として植栽)で86.7%であったのに対し、さし木品種では平均38.7%、また20%以下のものが半数近い8品種もあった(図1, 2)。同様な傾向は着花指数でも認められたほか、さし木試験林の1991, '92年の調査や実生試験林の調査でも確認され、本県の種苗生産用のスギ品種には地スギより着花性が低いものが多く、この中に極めて少ないものがあることが判明した。

品種間差については、着花個体率、着花指数の分散分析から、さし木、実生とも1%水準で有意であった。変動の寄与率(分散分析の平均平方の期待成分に従い求めた各要因の変動量の全変動量に対する比率)からは、さし木及び実生の品種間の変動が年次間の変動や交互作用の変動より大きかった。したがって、さし木、実生とも品種選抜による効果が年次間をとおし有効であることも明らかとなった。

雄花の着花の遺伝性は、さし木試験林と実生試験林に共通して植栽されていた品種の相関係数(親子相関)から検討した。着花個体率から求めた相関係数は0.473(1991年)、0.375(1995年)となり、親(さし木)とその子(実生)から得られた相関係数の2倍値は遺伝率に相当することから、これら品種が持つ着花の遺伝性は高いと推定された。



図1 スギ優良品種における雄花着花量の多少(千葉県林業試験場内の品種集植所)  
列ごとに品種が異なり、雄花着花性の品種差が明瞭となっている

### 3. 花粉の少ないスギの選抜

種苗生産に用いられる品種のなかに雄花の着花性の極めて少ない品種が確認されたことから、大豊作年であった1995年に着花個体率が5%以下であることを基準として、6さし木品種、13実生品種を選抜した(図2)。なお、着花個体率と着花指数の相関係数は、さし木、実生両試験林のすべての調査において0.95以上と極めて高く、着花指数でも同様な選抜が可能であった。

また、選抜品種を種苗として用いた場合の効果については、次の研究からも検証されている。大豊作の1995年には、選抜されたさし木品種であるサンプスギ林の雄花生産量は、

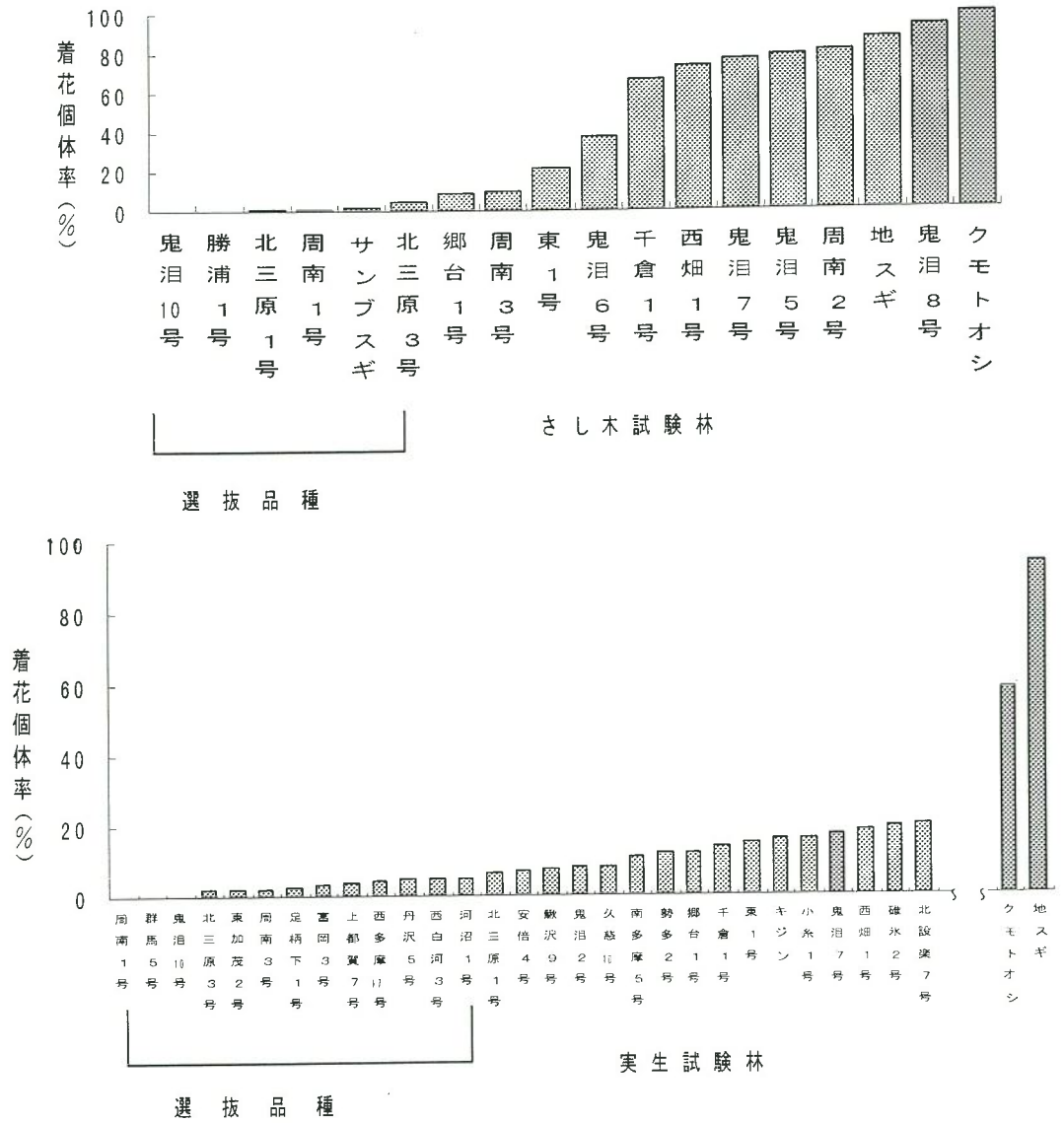


図2 1995年のさし木試験林と実生試験林の着生個体率<sup>4), 8)</sup>

地スギ林のわずか500分の1以下であった<sup>1)</sup>。さらに、並作の1996年に、選抜に用いたさし木試験林で品種ごとの雄花生産量を調査した結果<sup>2)</sup>でも、今回選抜した品種の雄花生産量は地スギの150分の1以下であった。

4. 選抜されたスギ種苗の供給体制

花粉の少ない実生品種の種子の供給は、前述したように、既存の採種園にある選抜された実生品種の親を利用することとし、これらからどの程度の供給が可能かを検討した。この際、雄花の少ない品種は雌花も少ない傾向があり通常の生産体制では十分な供給ができないため、採種園の運営によく利用されてい

るGA<sub>3</sub>による着花促進処理を加えた。詳細は省略するが、既存の資料<sup>4)</sup>からGA<sub>3</sub>処理を行った場合に推定される選抜品種の種子生産量は51kgで、1995年の県内種子供給量20kgの約2.5倍となった。そこで、採種木を著しく衰弱させるGA<sub>3</sub>処理は3年周期で行うこととしても、県内需要量に対応できると判断し、採種園の運用計画(採取圃を3分割し、毎年1区画ずつGA<sub>3</sub>処理を実施)を立てた。この運用計画は1995年から段階的に実施され、1996年以降に千葉県が供給するスギ種子は全て選抜品種のものとなっている。

なお、GA<sub>3</sub>処理を行った場合には各品種の雄花の着花状況が異なるので、採種園でGA<sub>3</sub>処理後に生産される種子は実生試験林に



供試した種子と花粉親の状況が異なり、着花量が変動する可能性がある。しかし、本県の採種園で行った着花促進試験<sup>5,6)</sup>から選抜品種と非選抜品種別の雄花着花量を比較すると、GA<sub>3</sub>処理は選抜品種でより雄花を増大させる方向に働いていた。したがって、採種園でGA<sub>3</sub>処理を行うと、選抜品種の花粉が占める割合が高くなり、生産される種子の着花性はさらに改善される可能性が高く、問題は少ないと推察された。

また、さし穂の供給については、さし木試験林で選抜されたさし穂用6品種中の5品種が採種園から利用でき、これによると苗木30,000本相当の穂の供給が毎年可能である。さし木の場合、大面積の造林は特定の病虫害が大発生する危険性があり注意が必要であるが、母樹の遺伝的性質をそのまま受け継ぐため、人家に接した森林や雄花の多い林縁部など花粉生産量の抑制が特に有効な場所で活用できると思われる。

## 5. おわりに

本稿では、花粉の少ないスギの実用化を実生品種とさし木品種について検討してきた。しかし、さし木の少数品種を多量に普及すると、植栽される苗木の遺伝的な変異が大きく低下する。生育環境において農作物より厳しい条件下にあり、しかも収穫まで長期間を要する林木では、危険分散を考慮して苗木に遺

伝的な多様性を保たせることが重要と考えられる。そこで、このスギ種苗の供給について、本県は実生品種を中心に今後行うことになっている。ただし、実生品種の供給においても、採種園での採取源が限定されることから遺伝的な変異の幅が狭まるので、追加選抜や国、他県からの導入を進め、種子の遺伝的な多様性の確保や品質向上に取り組んでいきたい。

最後に、本内容に関する研究部門は、千葉県林業試験場の岩澤勝巳研究員、小平哲夫育林研究室長の両氏を中心に行われたこと、また選抜の際には行政的な経験から当時場長だった荒巻浩行氏に助言をいただいたことを付言する。

## 文 献

- 1) 福島成樹・小平哲夫・遠藤良太 (1996) 日林関東支論, 47: 35-36
- 2) 福島成樹・小平哲夫 (1996) 日林関東支論, 48: 61-62
- 3) 関東林木育種場 (1975) 林木育種事業における育種種子の生産技術, 154pp, 茨城
- 4) 岩澤勝巳・小平哲夫 (1995) 日林関東支論, 47: 55-56
- 5) 増田勝巳 (1988) 千葉林試報, 22: 15-16
- 6) 増田勝巳 (1992) 千葉林試報, 26: 15
- 7) 増田勝巳・小平哲夫・明石孝輝 (1992) 日林論, 103: 323-324
- 8) 増田勝巳・小平哲夫・明石孝輝 (1993) 千葉林試研報, 7: 1-10

地域の先端研究

## キャベツの害虫抵抗性を活用し、 コナガ被害を回避

埼玉県園芸試験場

根本 久

アブラナ科野菜の難防除害虫コナガは薬剤のみによる防除が難しい。市販キャベツ16品種の中から、発生するコナガ個体数が少なく、被害も少なく、かつ、結球性が良い4品種を選抜した。コナガの天敵に対する悪影響の少ない選択性殺虫剤散布下で、4品種を栽培比較したところ、『新星』は最もコナガ被害が少なかった。コナガの防除対策として、この被害軽減品種と選択性殺虫剤の組み合わせは、コナガのキャベツ被害を最小限に抑ええることができた。

### 1. はじめに

コナガは東アジアを中心に世界中で問題になっているアブラナ科野菜の難防除害虫である。防除手段としては、化学防除剤が主要であるものの、多くの薬剤に対して抵抗性を示すコナガ個体群が出現していて<sup>1)</sup>、化学薬剤のみに頼る防除法は限界にきている。化学的防除剤以外の有望な防除手段としては、合成性フェロモン、天敵微生物、寄生性天敵等を活用した手法が開発されているが、ある一定の条件の地域や特定の害虫にしか効果が無い欠点があり、各手法の総合化が求められている。今回、コナガの被害回避策として、抵抗性品種と天敵に影響が少ない選択性殺虫剤を組み合わせた防除システムを紹介する。

### 2. コナガの防除戦略の選択

キャベツの食葉性害虫やアブラムシ類を薬剤で防除するうちに、コナガが優先的になることがあるが、これは殺虫剤抵抗性のコナガ個体群が増えたためである<sup>1)</sup>。薬剤の効果が期待できない状態で薬剤を使用すると、ある種の害虫が異常に増えてしまうことがあり、これをリサージェンスという<sup>2,3)</sup>。コナガなどの難防除害虫を防除する場合は、抵抗性の問題とリサージェンスが特に重要であるが<sup>4)</sup>、

抵抗性の発達には薬剤の使用頻度と相関が高い。

環境影響を含め、リスクがより少ない方法で害虫を防除するシステムを総合的害虫管理 (IPM) と呼んでいるが、総合的害虫管理は以下の3つのサブシステムからなる。すなわち、①どんな作業をするのかの意志決定システム、②予防システム、③直接的な防除手段のシステムである<sup>5)</sup>。①はア) 経済的許容水準、イ) 予察システム、ウ) 診断、エ) エキスパートシステム、オ) 偵察、カ) トラップによるモニタリングからなる。②は、ア) 病虫害雑草の対抗生物 (害虫では天敵) の働きの増強、イ) 耕作地の選定、ウ) 輪作、エ) 抵抗性品種、オ) 耕種法、カ) 肥培管理、キ) 灌水管理である。③は、ア) 化学的防除素材、イ) 生物的防除素材、ウ) 物理的防除素材、エ) 使用量や時期などの最適化手法、オ) 適正で安全な処理方法、に分けられる。

コナガの天敵としては、クモ等の地上徘徊性の天敵類が有力なものとして注目されていて<sup>6)</sup>、著者<sup>7)</sup>はコナガの防除対策として、②のア) コナガの天敵の増強、すなわち、コナガの天敵に影響が少ない選択性殺虫剤の使用を薦めている。このシステムの欠点として、天敵相が豊かでない土地や季節では適用が難しい点である。そこで、②のア) にエ) を加えて対策を考えることにした。

NEMOTO Hisashi

### 3. コナガに対する作物の抵抗性

作物の害虫に対する抵抗性は遺伝的抵抗性と生態学的抵抗性に分けられる<sup>8)</sup>。前者は、①非選好性 (antixenosis)、②抗生作用 (antibiosis)、③耐性 (tolerance)<sup>8,9)</sup>に、後者は疑似抵抗性 (psudoresistance) と誘導抵抗性 (induced resistance) に分けられる。Dickson and Eckenrode<sup>10)</sup>はキャベツとカリフラワーでウワバの一種 *Trichoplusia ni* (Hubner) とアオムシに対する抵抗性レベルの検定を行った。さらに、Dickson ら<sup>11)</sup>はコナガに対する抵抗性キャベツの育種を試みている。彼らのグループの研究によると<sup>12)</sup>、抵抗性のキャベツには正常な葉のワックスを持つ普通葉タイプと光沢葉タイプ (ワックスの異常により暗緑色で光沢のある葉を持つ系統: glossy type) があるという。

品種選抜: キャベツの国内品種では明確な抵抗性系統の報告例はない。コナガに対する抵抗性を検定するため、春から夏にかけて収穫される市販のキャベツ16品種を供試して、コナガ及びアオムシの生息数を計数した。その結果、発生個体数は多い品種と少ないものでコナガで10倍近く、アオムシ老齢幼虫では7倍近くの差があった。コナガ生息密度が低い品種は『一号』、『新星』、『YR 錦秋』、『YR 藍宝』であり、アオムシの生息密度が低い品種は『1号』、『金盃』、『中早生3号』、『YR 錦秋』であった。供試品種のうち『おきな』はアオムシ及びコナガの幼虫個体数が多かった。逆に、『1号』と『YR 錦秋』は両種とも少なかった。また、『新星』はコナガが少なく、アオムシ個体数が多かった。上記の両種に対する抵抗性が、①非選好性、②抗生作用、③耐性のどれによって発揮される

かは現在調査中であるが、アオムシとコナガで抵抗性のメカニズムが異なっている可能性がある。

### 4. コナガ抵抗性キャベツの利用戦略

Verkerk and Wright<sup>13)</sup>は、コナガの天敵に影響が少ない選択性殺虫剤とコナガ抵抗性品種との組合せを検討し、①コナガ抵抗性キャベツと選択性殺虫剤の組合せ、及び、②抵抗性がないキャベツと選択性殺虫剤の組合せを比較し、①は②よりもコナガの死亡率が4倍高いことを報告している。16品種から、コナガ密度が少なく、被害も少なく、かつ、結球性が良い、『1号』、『新星』、『YR 錦秋』、『YR 藍宝』の4品種について、選択性殺虫剤の効果を調査した。

特定の害虫の発生を阻止できても、他の病害虫の発生を阻止できないのであればその方法は有効とはいえない。キャベツ栽培では無防除の場合に、アオムシやアブラムシが問題になるが、それらはコナガの天敵に影響が少ない選択性殺虫剤で防除し、コナガはキャベツの抵抗性品種と選択性薬剤で防除することにした。選択性の殺虫剤の利用は、天敵の力も借りようとするものである。

コナガ発生密度が少なかった『1号』、『新星』、『YR 錦秋』、『YR 藍宝』と、埼玉県でよく栽培される『中早生3号』及び『金系201』の6品種の栽培ほ場に選択性殺虫剤を散布し (表1)、病害虫の発生を調査比較したところ、『新星』はコナガの生息数が少なく、黒腐病の被害が最も少ないうえ、収穫時の収量が多かった (表2)。

### 5. おわりに

現在のところ抵抗性品種だけではコナガは

表1 キャベツにおける選択性殺虫剤の処理手順\*

| 処理時期       | 薬剤の処理濃度                                 |
|------------|---|
| 定植 4 週間後   | テフルベンズロン乳剤 2,000 倍 + チオシクラム水和剤 1,500 倍液 |
| 前回処理 2 週間後 | B T 水和剤 1,000 倍 + ピリミカーブ水和剤 2,000 倍液    |
| 前回処理 2 週間後 | テフルベンズロン乳剤 2,000 倍 + チオシクラム水和剤 1,500 倍液 |
| 前回処理 2 週間後 | B T 水和剤 1,000 倍 + ピリミカーブ水和剤 2,000 倍液    |

\* 秋期収穫キャベツでは品種を問わずに通常と比較して農薬散布回数は半分以下となる。

表2 選択性殺虫剤散布下での各キャベツ品種と被害

| 品種名      | 定植期<br>(中間地) | 収穫期<br>(中間地) | 収量  | 害虫被害 | 病気被害<br>(黒腐病) |
|----------|--------------|--------------|-----|------|---------------|
| 一 号      | 12~3月        | 6~7月         | ○   | ○~△  | ○~△           |
| 新 星      | 4月           | 6~7月         | ○   | ○    | ○             |
| Y R 錦秋   | 3~4月         | 6~7月         | △   | ○~△  | ×             |
| Y R 藍宝   | 4月           | 6~7月         | ○   | ○~△  | ○~△           |
| 中早生三号    | 3~4月         | 6~7月上旬       | △   | △~×  | ○~△           |
| 金系 201 号 | 3~4月         | 6~7月上旬       | ○~△ | △    | ○~△           |

○：良好， △：やや良くない， ×：不良



図1 選択性殺虫剤散布下でのキャベツの被害状況

上：『新星』外葉部にわずかにコナガの被害がみられるが、結球部の被害はほとんどない。  
下：『金系201』外葉部と結球部が加害されている。

防除できない。そこで、抵抗性品種『新星』と殺虫スペクトルが広い非選択性殺虫剤の組合せについても調査しているが、その組合せではあまり良い結果は得られていない。それは、非選択性殺虫剤は多くの害虫種を一度に殺せるもののコナガには効果がほとんど無いため、コナガ抑止力は抵抗性品種の効果だけだからだと考える。非選択性殺虫剤の多用は天敵相を破壊するばかりでなく、天敵が排除された状態ではリサージェンスや抵抗性コナガが発生しやすく、さらに多くの殺虫剤が使用されるという悪循環に陥る可能性が高い。抵抗性品種と選択性殺虫剤の組合せは土着天敵の力も活用することができ、農薬散布回数

を減少できる環境負荷の少ない防除技術だと考える。

## 文 献

- 1) 浜弘司 (1986) 植物防疫, 40:366-372
- 2) 根本久 (1986) 植物防疫, 40:361-365
- 3) Ripper, W.E. (1956) *Ann. Rev. Entomol.* 1:403-438
- 4) Nemoto, H. (1995) *JARQ*, 29:25-29
- 5) Newton, P. *et al.* (1996) IPM entry points, In: XX International congress of entomology, The CIBA's contribution, Ciba-Geigy Ltd., Basle, pp.47
- 6) Nemoto, H. (1995) *JARQ*, 27:27-32
- 7) 根本久 (1995) 天敵利用と害虫管理, 農文協, pp.181
- 8) Panda, N. and G. S. Khush (1995) Host plant resistance to insects, CAB International, Wallingford, pp.431
- 9) Painter R. H. (1951) Insect resistance in crop plants, New York, McMillan, pp. 520
- 10) Dickson M.H. and C.J. Eckenrode (1975) *J. Econ. Entomol.* 60:687-690
- 11) Dickson, M.H. *et al.* (1986) Proceedings of the 1st international workshop" ed by N.S. Talekar and T.D. Griggs, AVRDC, Shanhua, Taiwan, pp.137-143
- 12) Eigenbrode, S. D. and A. M. Shelton (1992) Proceedings of the 2nd international workshop" ed by N.S. Talekar, AVRDC, Tainan, Taiwan, pp.65-74
- 13) Verkerk, R.H. and D.J. Wright (1996) *Pestic. Sci.* 46:171-181

## 文献情報

液胞タンパク質の受容体, Vps10p のエンドソームから液胞への返送系には *VPS29*, *VPS30* と *VPS35* の遺伝子産物が必要

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、真核細胞のモデル生物として確固たる地位を確立している。酵母を研究材料として取り扱う上での最大の魅力の一つは、様々な変異株を利用した遺伝学的手法を容易に精度良く用いる事ができるという点である。

タンパク質の分泌経路に関する研究においても、酵母を用いた遺伝学的手法は重要な役割を果たしており、多数の分泌変異株 (*sec* 変異株) を取得した Petter J. Novick と Randy Schekman の業績が挙げられる。また、液胞への輸送に関しても同様の手法が用いられ、Scott D. Emr らのグループを中心として40株以上の変異株 (vacuolar protein sorting mutants: vps mutants) が取得されている。

これらの変異株は様々な角度から検討がなされているが、その中で、*VPS10*, *VPS29*, *VPS30* と *VPS35* に変異があるものは、「液胞の形態には変化がなく、液胞に局在するべきタンパク質であるカルボキシペプチダーゼ Y (CPY) が細胞外に分泌される。(プロテアーゼ A や B (PrA, B) は正常に液胞へとソーティングされる。)」という表現型を示す。

これらの遺伝子の中で、CPY のミスソーティングの直接の原因になっているのは *VPS10* の変異である。*VPS10* は、ゴルジ体局在性の膜タンパク質をコードしており、CPY に高い特異性を示すことから、CPY 受容体であると考えられている。また、ヒトの細胞のリソソームへのタンパク質のソーティングには、マンノース 6 リン酸受容体 (MPRs) が関与していることが報告されているが、*VPS10* はこれらとも高いホモロジーを示す。

一方、*VPS29*, *VPS30* と *VPS35* は全て、可溶性のタンパク質をコードしており、人やマウス、線虫等でも高いホモロジーを示すものがあることから (機能は不明)、真核生物全般に何らかの重要な機能を果たしているものと思われる。

これらの変異株で Vps10p の局在性を見たところ、液胞に局在していることが明らかとなった。つまり、これらの変異株で CPY のミスソーティングが起こるのは、ゴルジ体での Vps10p の不足によるものと考えられる。また、ゴルジ体に局在する事が知られている膜タンパク質の Kex2p やジペプチジル

アミノペプチダーゼ (DPAP) 等も同様に、液胞にミスソーティングされる事が確認された。このことから、これら3つの遺伝子は Vps10p をはじめとするゴルジ体局在性のタンパク質の保持に関与している事が推察された。

さらにこれらの遺伝子の機能を探る目的で特に *VPS35* についてより詳しい解析が行われた。まず、*VPS10* がミスソーティングされる経路を調べるために、細胞表層への小胞輸送が遮断される *sec1* 変異株とエンドソームへの輸送が遮断される *pep12* 変異株とを用いたかけ合わせ実験を行ったところ、*VPS35* はエンドソームへの輸送系または、返送系に関わる遺伝子であることが確認された。続いて、*ups4*, *pep12* 変異株を用いて Vps10p の挙動を見た結果、*PEP12* は *VPS35* よりも下流、すなわちエンドソームからゴルジ体への返送系で機能していることが示された。*VPS29* や *VPS30* については現在のところ解析中である。

今回、酵母でエンドソームからゴルジ体への返送系に関わる遺伝子が明らかになった。このことをきっかけに急速な研究の進展が予想される。また、CPY 以外の PrA や PrB の輸送系についても、優良な知見が蓄積されてきているところであり、今後の展開に興味を持たれる。

(抄訳 岩下和裕—国税庁醸造研究所)  
(IWASHITA Kazuhiro)

#### Endosome to golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the *VPS29*, *VPS30*, and *VPS35* gene products

Matthew N. J. Seaman, Eric G. Marcusson, Joan Lin Cereghino, and Scott D. Emr  
*J. Cell. Biol.* 137: 79~92 (1997)

## 文献情報

#### 植物 RNA ウイルスの3'末端修復にウイルスゲノム RNA が関与

植物 RNA ウイルスは宿主細胞へ侵入後、ウイルス粒子より RNA が露出されウイルスの複製、増殖が始まる。しかし、これらの過程はウイルス RNA が宿主リボヌクレアーゼによる分解を受けやすく、ウイルスのライフサイクルのなかで、最も不安定な状態にある。ウイルスゲノム結合タンパク質やウイルスの膜構造物への結合などは宿主リボヌクレアーゼの影響を回避するために重要であると考えられる。

近年、リボヌクレアーゼに対する“positive”な防御機構に加え、RNA ウイルスは分解された RNA を修復する“active”な機構を持つことが知られてきた。例えばプロモ、ククモ、タバコウイルスなどのゲノム RNA 3'末端非翻訳領域に見られる tRNA 様構造は tRNA ヌクレオチド転移酵素による RNA 3'末端の修復に関与することが明らかにされた。ウイルスゲノムに tRNA 様構造を持たない RNA ウイルスにも *in vivo* で欠損したウイルス RNA を修復するメカニズムが存在することが予想される。

最近、3'末端に tRNA 様配列を持たない植物 RNA ウイルスの一つである、Turnip crinkle virus (TCV) の satellite RNA C (sat-RNA C) の 3'末端の欠損を修復する機構について新たな知見が示された。

Nagy らは TCV sat-RNA C の 3'末端 6 ヌクレオチド (nt) をディレーションしたミュータント (CA 6) を TCV ゲノム RNA とともに接種し、宿主植物で増殖した sat-RNA C 3'末端のシーケンスを調べた。その結果、CA 6 由来の sat-RNA C の 3'末端の欠損部分は修復され、wild type の 3'末端に回復していた。sat-RNA C 3'末端約 100nt は TCV ゲノム RNA 3'末端と相同性が高いため、sat-RNA C 3'末端の修復にはゲノム RNA が関与していることが予想された。

(+)鎖 TCV ゲノム RNA を、感染葉から粗精製した TCV RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (RdRp) と *in vitro* で反応させると、(-)鎖ゲノム RNA の他、TCV ゲノム (+)鎖 RNA を鋳型とした 4~8 nt のオリゴリボヌクレオチドの合成が認められた。

本研究で認められたオリゴリボヌクレオチドに類似した短い RNA 断片は T7 バクテリオファージ、大腸菌、および真核生物でも生成が確認されており、RNA ポリメラーゼ反応全般に認められる現象であると予想される。しかし、ウイルスの RdRp では初めての本報告である。

sat-RNA C 3'末 6 nt に相補的な合成オリゴリボヌクレオチドをプライマーとして、*in vitro* で RdRp 反応を行ったところ、(+)鎖 TCV sat-RNA C を鋳型とした場合、完全長の (-)鎖 sat-RNA C が合成された。同様の産物は CA 6 を鋳型として反応を行ったときにも検出された。

これらの現象から TCV sat-RNA C 3'末端修復の機構として次のモデルが示された。すなわち、宿主細胞中のリボヌクレアーゼによって分解された TCV sat-RNA C 3'末端は、TCV ゲノム RNA 3'末端由来のオリゴ

リボヌクレオチドによって補われ、(-)鎖 sat-RNA C が合成されるため、*in vivo* で RNA の欠損部が修復される。

このような機構は、sat-RNA C 3'末端の修復だけでなく、sat-RNA の複製にも関与していることが考えられ、興味深い現象である。RNA ウイルスが RNA 欠損部分を修復する機構を備えていることは、RNA ウイルスが宿主細胞内でリボヌクレアーゼによる分解を受ける機会の多いことの証でもあり、植物、動物を問わず、ウイルスに対する新たな抵抗性機構を見いだす可能性を秘めていると言える。

(抄訳 大野 浩一東北大農)  
(OHNO Hiroshi)

#### A novel 3'-end repair mechanism in an RNA virus

Nagy P. D., C. D. Carpenter and A. E. Simon  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:1113-1118  
(1997)

#### 文献情報

### カルメジン遺伝子欠損 による精子の受精能不全

最近ノックアウトマウスをもちいた遺伝子欠損個体の解析によって、生殖能や不妊に関する知見が多く得られてきている。これらの情報はヒトの遺伝性不妊症等の解明に有用な情報となることが期待されている。Ikawa らは、カルメジン遺伝子欠損雄マウスの精子は、卵子の透明帯に接着することができず、不妊になることを報告した。

カルメジンは、雄の生殖細胞の減数分裂期に特異的な抗原として同定され、小胞体膜に局在するカルシウム結合タンパクであることが分かっている。この研究により、カルメジンは精母細胞のパキテンから精子細胞にかけて発現しており、精子形成時に生成されてくるポリペプチドに結合することが明らかになった。

カルメジンのノックアウトマウスを作成したところ、カルメジン遺伝子欠損雄マウスの精子形成は正常であり、生殖細胞の数や精巣の大きさは正常型マウスのそれと差はなかった。そして、正常な交配もするにもかかわらず不妊であった。そこで、カルメジン遺伝子欠損雄マウスの精子を、交配後に雌の生殖系から採取し検査すると、生存性、運動性共に正常型マウスのそれと差はなく、卵管にも精子が存在していた。また、精巣上体精子の生存性、運動性、形態も正常型マウスのそれと

差はなかった。このように、カルメジン遺伝子欠損雄マウスの精子は正常であるにもかかわらず、透明帯内に侵入することができない。卵母細胞を覆っている卵丘細胞を除去すると、カルメジン遺伝子欠損雄マウスの精子は透明帯にしばしば接触するにもかかわらず、卵子の透明帯に接着することができなかつた。つまり、カルメジン遺伝子欠損雄マウスの精子は卵管内卵子まで到達するが、透明帯に結合することができず、受精が成立しない。カルメジンは、雌の卵巢では発現していないことから、精子側に原因があることがいえる。

生殖機能に関する遺伝子発現と作用因子の同定の研究は、現在盛んに行なわれている。ヒト男性の原因不明の不妊症の約3分の1は、透明帯への精子の結合が無い、または低いとの報告がある。カルメジン欠損マウスは、これまで原因不明とされてきた男性不妊のモデルとして有用になるかもしれない。

(抄訳 松本浩道—東北大農)

(MATSUMOTO Hiromichi)

#### The putative chaperone calmeglin is required for sperm fertility

Ikawa M., I. Wada, K. Kominami, D. Watanabe, K. Toshimori, Y. Nishimune and M. Okabe

*Nature*, 387 : 607-611, 5 June, 1997

#### 文献情報

### ヘリコバクター・ピロリの ウレアーゼは、アンモニアを つくるだけではなかった

従来、消化性潰瘍の成因はストレスによる胃酸過多であるとする「ストレスと酸の理論」が主流であった。事実、現在に至るも胃酸分泌抑制剤はすばらしい治療効果をあげている。ところが胃酸分泌抑制剤は根治的な治療法ではなく、服用を止めるときわめて高率に再発するという問題が残されたままである。

さて、消化性潰瘍の成因に対する考え方を大きくかえる契機となったのが、1982年のWarrenとMarshallによるヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*; Hp) の発見である。現在では、Hpの感染が消化性潰瘍の成因であるという考え方が主流となり、消化性潰瘍は、Hp感染症として扱われるほどにまでなっている。

最近、Harrisらは、Hpウレアーゼの役割は尿素を分解してアンモニアを生成し胃酸を中和するだけではなく、単球を活性化させ炎症性サイトカインを産生させる能力をもち、これら炎症性サイトカインが消化性潰瘍の発

症に対して中心的役割を果たしている可能性を指摘した。以下にその内容を紹介したい。

消化性潰瘍は持続的に慢性胃炎が起こることによって発症する。Hpが慢性胃炎を発症させる原因には、アンモニア、サイトトキシンやタンパク質分解酵素などがある。彼らは、①慢性胃炎の炎症部位に単球が存在すること②単球にHpの表面タンパク質を添加すると炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 (IL-1) や腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の産生を促進すること③ウレアーゼはHpの主な表面タンパク質であることなどから、ウレアーゼ自体が慢性胃炎の病因の一つではないかと考えた。

そこで、彼らはHpウレアーゼを精製し、それを用いてヒト単球の活性化と炎症性サイトカイン産生に対する影響を調べた。

まず、単球にHpウレアーゼを添加したところ、単球表面にIL-2受容体およびヒト白血球抗原-DRの発現が認められた。したがって、ウレアーゼは単球を活性化すると考えられた。

次に、単球のサイトカイン産生に対するウレアーゼ添加の効果を調べたところ、用量依存的にIL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ の産生が認められ、IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ のmRNAの転写量が用量依存的に増大した。このことから、活性化された単球のサイトカイン産生は、転写レベルで制御されていると考えられた。

更に、単球の活性化および炎症性サイトカイン産生は、Hp, ウレアーゼおよびその31kDaのサブユニット(UreA)の抗血清により阻害され、UreA部分が単核白血球の活性化に関与していると考えられた。

現在、消化性潰瘍の治療は、抗生物質の投与を中心としたHpの除菌療法が主流になってきている。しかし、抗生物質の副作用や耐性菌の出現、除菌しても消化性潰瘍が完治しない例がみつかるなどの問題も生じている。Harrisらの論文はHpと消化性潰瘍の関係を理解する上で一つの手がかりとなるであろう。今後、このような知見を積み重ねていき、Hpと消化性潰瘍の関係を理解することがより効果の高く、かつ、より副作用の少ない消化性潰瘍の治療法の開発につながっていくであろう。

(抄訳 岡本欣也—マルハ)

(OKAMOTO Kinya)

#### *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production

Paul R. Harris, Harry L. T. Mobley, Guillermo I. Perez-Perez, Martin J. Blaser and Phillip D. Smith

*Gastroenterology*, 111 : 419-425 (1996)

海外だより

## 新規幼若ホルモンエステラーゼと低分子量GTP結合タンパク質 ——ケンタッキー大学での2年間——

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所  
門野 敬子

### 1. はじめに

脱皮、変態、生殖、休眠など昆虫のあらゆる発育を制御しているホルモンに、幼若ホルモン (JH) とエクジステロイドがあり、それらの濃度調節は、生合成と代謝の2つの系により行われている。ケンタッキー大学の Jones 博士夫妻は、それぞれ毒理学センター、生物科学部で JH の代謝系に関わる酵素、JH エステラーゼ (JHE) の発現調節機構について研究しており、筆者は1995年4月より1年間オールギャランティ在外研究員として両博士のもとで新規 JHE の発現の研究に従事する機会を得た。2年目は医学部生化学科で、哺乳類の低分子量 GTP 結合タンパク質の研究を行った。

### 2. JHE 類縁体 (JHER; Juvenile Hormone Esterase-Related)

Jones らは、鱗翅目昆虫 *Trichoplusia ni* の cDNA ライブラリーで JHE 遺伝子をクリックリーニングしていた際に、強弱2種類のシ

表1 JHE と JHER 遺伝子の比較<sup>1)</sup>

| 項目             | JHE            | JHER    |
|----------------|----------------|---------|
| 遺伝子の推定コピー数     | 1              | 1       |
| mRNA のサイズ      | 3.5kb          | 2.0kb   |
| JH に対する感受性     | 有              | 無       |
| 遺伝子発現時期のピーク    | 5 齢 2 日, 同 4 日 | 5 齢 2 日 |
| シグナルペプチド配列     | 有              | 無       |
| タンパク質の分子量 (推定) | 61kDa          | 61kDa   |
| 〃 (SDS-PAGE 上) | 68kDa          | ?       |
| 触媒領域の配列        | GXSAG          | GXSCG   |
| 推定糖鎖結合数        | 3              | 3       |

KADONO-OKUDA Keiko

グナルを得た。シークエンシングの結果、強いものはいわゆる JHE クローンだったが、もう一方は部分的には JHE および他のエステラーゼと類似する部分が見られるもののいくつかの共通する特徴を欠いており、謎の遺伝子となった<sup>1)</sup>。彼等はその遺伝子発現調節機構の解明を急いでいたので、その cDNA またはタンパク質については追究せず、すぐにそのゲノム DNA をとり、上流域の各種欠損変異による転写活性を比較していた。そこへ加わった筆者は、この JHER 遺伝子を発現させて、果たしてその産物が JH エステラーゼ活性を有しているか否かを調べることがメインのテーマとなった。

さて、JHE と JHER 遺伝子はどう違うのだろうか。表1にまとめられたように、mRNA のサイズには1.5kb と両者の間に大きな差がある。JHER は血中 JH 量のピークの直後である5齢4日には発現しないことから JH に非感受性であると推定された。塩基配列から推定されるタンパク質の分子量は両者とも61kDa であるが、血中から精製された JHE の分子量は68kDa と大きく、推定される3つの糖鎖の修飾によると考えられる。JHER の虫体内からの精製は試みられていなかったので実際の分子量は不明であった (今回の組換え JHER は SDS-PAGE 上で同じく68kDa を示した)。そして JHER の、JHE およびすでに報告されているすべてのエステラーゼとの大きな違いはシグナルペプチドの共通配列がないことと、触媒領域のアミノ酸配列である。これまでに明らかにされているエステラーゼの触媒領域の配列はすべて GXSAG であるのに対して唯一 JHER だけが GXSCG であった。活性中心のセリン



はあるものの、その隣のアミノ酸の違いが活性にとれだけの影響を与えるかは不明であった。

Jones らが以前に大腸菌の発現系で何度も JHER の発現を試みたが成功しなかったため、筆者はバキュロウイルス(AcNPV)の発現系を試みるようになった。組換えウイルス感染培養細胞は、確かに活性を持っていた。この瞬間には、Jones 夫妻も加わり、"The moment of truth"と言いながらシンチレーションカウンターのディスプレイに現われる結果を待っていた。次に Km 値や各種阻害剤に対する反応性、分子量や等電点を測定した結果、JHER は明らかに JHE とは異なっていたがやはり JH 特異的エステラーゼの 1 種と考えられた。この遺伝子はシグナル配列を持たない。このことは、この酵素が細胞内で働く可能性を示唆しており、他種での存在や真の役割など今後の検討が期待される。

さて次には抗体の作製、生体内での局在、発現の時期特異性、発現機構などへ進んでいくことになるのであろうが…。2年間の予定のポストだったが、着任2ヵ月後のある日、ポストに呼ばれ、"私達は来年の春から1年間サバティカルに出ることになった。私達の留守中この部屋に残ってもいい。研究の連絡は fax や e-mail で行うので問題はない。" と言い渡された。この1年間でたくさんいたポストも去ってしまい、残ったのは私を含め2人のポストともうすぐ学位を取って出ていく院生2人。次の1年でこの先の仕事は1人で進められるかもしれないが、新たに得るものはないと判断し、移動を決めた。しかし大学にも慣れて友人も出来、周辺の地理にも詳しくなってきたところで、安全で住みやすいこの街を離れたくはなかった。そこで、昆虫にこだわらず、帰国後の研究に役立つような違う分野を経験しようと、医学部生化学科で哺乳類の低分子量 GTP 結合タンパク質の研究を行っている Andres 博士のもとへと移った。

### 3. 低分子量 GTP 結合タンパク質

GTP 結合タンパク質は、細胞膜の受容体と相互作用して細胞の外から内へシグナルを伝達する三量体 GTP 結合タンパク質と、細胞内で上流から下流へのシグナル伝達に介在する低分子量 GTP 結合タンパク質 (sGP) に大別され、後者はさらに Ras, Rho, Rab, Arf などのスーパーファミリーに分類される。sGP 遺伝子は、1981年にラット肉腫ウイルスの癌遺伝子として発見され、その後多くのヒト腫瘍組織から活性型の点突然変異体が検出された。種々の細胞膜受容体からのシグナルがこれらのタンパク質を介して伝達され、細胞分裂、筋の収縮、細胞運動、細胞形態などを制御していることが報告されている。Andres は、ポスト時代 sGP の研究を行い、ケンタッキー大に助手のポストを得た後も引き続き sGP を扱っている。ビッグラボから来ても、ラボをオープンする時には一から始めねばならない。彼自身の新規の sGP が必要であった。そこへ入ったポスト第1号(部屋には大学院生第1号と2号がいた)の筆者はまずヒト網膜の発現型 cDNA ライブラリーから GTP 結合能により、sGP をクローニングしてくる方法(GTP overlay assay)を検討することになった。種々の方法を組み合わせての検討の結果、一度に464個の陽性シグナルが得られた(出現頻度:0.24%)。3次スクリーニングの結果、7種類の既知のもの(G25K, Rap1B, Rab1A, Rab5B, ARF1, ARL3, Rac1)が大半であったが、この過程で多くの知見が得られた——スクリーニングには<sup>32</sup>PでラベルしたGTPを用いるのであるが、良好な結果の得られる期間は1週間であり、2週間を過ぎたアイソトープは全く使いものにならない。既知のものが見つかった時には、<sup>32</sup>P-dCTPを用いて直接1次スクリーニング後のグリセロールストックでPCRを行い、除外する。またこの方法で釣られてくるsGPは、GTPとの結合がかなり強い種類に限ら

れるようであること——などであった<sup>2)</sup>。

上の実験をときどき入れながら、Andresが他の方法で見つけた新規のsGPの発現、性状解析と突然変異誘導を行った。ヒト脳のcDNAライブラリーからとられたhRoc1、Rem2のラットでのホモログrRem2とRoc2のマウスでのホモログmRoc2をそれぞれcDNAライブラリーからクローニングし、GST融合タンパク質として大腸菌で発現させ、これを用いてヌクレオチドとの結合や解離特性を明らかにした。3種ともGTPとの結合では解離しやすく、一方GDPとの結合はかなり安定していること、ATP、CTP、UTPとの結合はほとんど起きないこと、GTPとの最適な結合には1~10mMといった高濃度のマグネシウムが要求されることなどで、このように微妙な種類は前述のGTP overlay assayでは検出されなかった。

hRoc1とmRoc2の塩基配列は非常に似ているが、mRoc2は脳のみで発現しており、肝臓、心臓、脾臓など、どの組織でも発現していたhRoc1とは異なっていた。さらに、mRoc2にはそのC末端側にカルモジュリン結合配列を有しており、実際、カルモジュリンとの結合が確認された。これが脳でどのような働きをしているのか興味深い。

癌化の引き金となるRasの点突然変異の研究から、GTPとの結合に関わる領域の特定のアミノ酸に変異を起こすと、そのGTP結合能が著しく上昇または低下することが知られている。hRoc1遺伝子にPCRによって変異を起こしたものはGTPとの強い結合、またはほとんど結合しない異常を誘導した。これらを哺乳類の培養細胞でtransientおよびstableな発現を行ったが、細胞に変化はなく、これは細胞の増殖や形態に直接関わっていないようであった。哺乳類や酵母では

精力的に仕事が進められているsGPであるが、植物や昆虫ではほとんど研究がなされておらず、まだこれからの分野である。

#### 4. おわりに

アメリカの大学院生は非常によく勉強する。日本では初めから研究室へ配属されて自分の実験にほとんどの時間を費やすが、向こうでは初めの1~2年間は授業にかなりのウェイトが置かれ、多量の論文を次々読みこなしてレビューなどをしなければならない。論文を読むスピードから私たち日本人にはかなわないと思ってしまう。また早朝から働く人が多く、Andresは7時、向かいのボスは5時に出勤してくる。そして手の空いた時にコンピューターの画面を睨みながら素早くサンドイッチの昼食を済ませ、また休みなく仕事をする。日本と比べ勤務時間が非常に濃密であると感じた一方、日本での皆揃ってのお茶の時間が恋しかった。

多くの方々の協力で留学の機会を得、研究面以外でも貴重な体験をすることが出来た。私の留学と同時期に夫は子供を連れてチェコへ留学していた。家族が一緒にいなかったために出来なかったこともあったであろうが、単身ならではの経験や単身だったから思いきり出来たという感もある。この在外研究の機会を与えて下さった方々と共に、単身留学を可能にしてくれた家族にもこの場を借りて感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Jones G. *et al.* (1994) *Biochem. J.*, 302: 827-835
- 2) Kadono-Okuda K. and D. Andres (submitted) *Analytical Biochem.*

**お知らせ（編集後記にかえて）**

生研機構では、インターネット上にホームページを開設し情報提供を行ってきましたが、去る6月、東京事務所のページを全面リニューアルしました。詳細は次号で紹介しますが、生研機構の種々業務の解説、フォーラム・セミナー等の紹介と共に、BRAIN テクノニュースのページも設けました。

その中に、今までに発行したテクノニュースの抄録を冊子ごと、項目ごと（総説、国内情報等）に掲載しております。現在、検索ができるよう準備中です。是非、ご覧下さい。

アドレス：<http://www.tokyo.brain.go.jp/kikaku/technonews.html>  
(柴垣記)

**ブレインテクノニュース（第63号）**

平成9年9月15日発行

**発行者** 眞木 秀郎

**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