

ラディシン遺伝子導入の組換えイネ (a, b), 非組換えイネ (c) におけるいもち病菌接種による病斑と、同遺伝子によるいもち病菌 (d), 大腸菌 (e) の生育阻害。[目次・説明参照]

目 次

総 説

実用的な遺伝子組換えイネ品種の開発..... 1
 黒田 秧 (農林水産省北陸農業試験場)

国内情報

酵素阻害タンパク質の特徴とその利用の可能性..... 6
 大坪研一 (農林水産省食品総合研究所)

イネのファイトアレキシン合成を誘導するセレブロシド型エリシターの発見..... 15
 岩田道顕 (籾植物防御システム研究所)

アブラナ属花粉アレルギー—農学と医学の接点—..... 19
 鳥山欽哉・岡田 崇 (東北大学大学院農学研究科)

穀物遠赤外線乾燥機の開発..... 22
 久保田興太郎・日高靖之・市川友彦 (生研機構)

地域の先端研究

植物ディフェンシン遺伝子の利用によるイネ耐病性育種..... 26
 荘司和明 (富山県農業技術センター)

文献情報

卵巣における growth differentiation factor-9 (GDF-9) のパラクリンの作用 30
 Elvin J. A. 他 (Molecular Endocrinology, 13:1035-1048, 1999)
 抄訳: 木村直子 (東北大)

倍数性 (Ploidy) の違いによる遺伝子発現制御 30
 Galitski, T. 他 (Science, 285:251-254, 1999) 抄訳: 家藤治幸 (国税庁醸造研)

植物ゲノムの機能解析の道具: キメラ RNA/DNA オリゴヌクレオチドが *in vivo* で
 遺伝子特異的変異を引き起こす..... 31
 Beetham, P. R. 他 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:8774-8778, 1999)
 抄訳: 小杉祐介 (東北大)

エチレンは胚珠の発達を制御している..... 32
 Martins D. D. 他 (The Plant Cell, 11:1061-1071, 1999) 抄訳: 岩井純夫 (鹿児島大)

アルコール (エタノール) はインターロイキン-8 (IL-8) と腫瘍壊死因子 (TNF) の
 産生を阻害する—p. 38経路の役割— 33
 Arbabi, S. 他 (J. Immunology, 162:7441-7445, 1999)
 抄訳: 中島 浩 (マルハ籾中研)

海外便り

植物分子遺伝学のモデルケース: エチレンの生合成とシグナル伝達系..... 35
 吉田 均 (農林水産省北海道農業試験場)

特別情報

いわゆる「ターミネーター種子」について..... 38
 田中宏樹 (生研機構)

生研機構からのご案内 [BRAIN 国際シンポジウム2000—21世紀の農業・
 環境を活かす革新技術] 14

表紙写真説明

a 抵抗性の最も組換え系統で、いもち病斑を認めない。 b: 中程度抵抗性の組換え系統で、軽度のいもち病斑を認める。 c: 非組換え体で、強度のいもち病斑を認める。 d: ラディシンの培地添加によるいもち病菌の生育阻害(返縁近傍の4カ所)。 e: ラディシン遺伝子を発現している大腸菌で、菌分裂が阻害されて線状の生育を示す。ラディシン遺伝子に関する詳細は、26頁の地域の先端研究を参照。

◀総説▶

実用的な遺伝子組換えイネ品種の開発

農林水産省北陸農業試験場

黒田 秋

イネはわが国の基幹作物であり、人口急増が予想されるアジア地域の主要な食糧供給作物でもある。近年、欧米の大手総合化学企業は、世界的な食糧戦略のもと、遺伝子組換えの基本技術に関する特許権をほぼ独占し、豊富な資金と陣容でイネの品種開発に参入してきており、国際的な競争が激化している。わが国においても、先端的な基盤技術の開発を強化し、環境や食品の安全性に配慮した国際競争力のある実用的な組換えイネ品種の開発を集中的に加速する必要がある。こうした状況と技術的な隘路および対策について概要を紹介する。

1. はじめに

21世紀半ばに世界の総人口は、今よりも40億人増え100億人に達すると予想されている。とりわけアフリカ、アジアでの人口増加が激しく、また一人当たりの食肉消費量の増加にともなう穀物消費量の急増と相まって、深刻な穀物供給不足が懸念されている。わが国においても世界的な食糧不安への対応や国内生産力の強化が重要な課題となっている。

世界の三大穀物の一つのコメは、小麦、トウモロコシとは異なり、温暖湿潤なアジアのモンスーン地帯に適応して最も高い生産性と栄養価が得られることから、アジアの人口急増に対応しうる最大の食糧供給穀物である。近年、欧米の大手総合化学企業が先端特許を取得しているバイオ企業や豊富な遺伝資源と育種・販売実績をもつ種子会社を買収、合併して傘下に収めたり、技術や資本提携したりして相次いでコメの品種開発に参入してきた。コメは今、世界的な食糧戦略のターゲットとして注目されており、イネゲノムなどの基礎的・基盤的研究とともに、種子支配を巡る遺伝子組換え研究の実用化・商品化競争が激化している。一方、組換え体の環境と食品に対する安全性が大きな社会的な問題として議論される

KURODA Shigeru

〒943-0193 上越市稲田1丁目2番1号

ようになってきた。技術的な予防対策を含めた信頼性と透明性の高い研究戦略が必要になっている。

2. わが国における組換えイネ品種開発の現状

厚生省食品衛生調査会が安全性評価指針に基づいて安全性を確認した遺伝子組換え食品は、平成11年8月現在、除草剤耐性、害虫抵抗性、日持ち性向上または雄性不稔性・稔性回復性の性質をもつ、なたね11品種、トウモロコシ4品種、ばれいしょ2品種、大豆1品種、わた3品種、トマト1品種の合計6作物、22品種である。トマト1品種以外はすべて欧米企業が開発した組換え食品である。一方、わが国において環境に対する安全性評価試験が進み、一般圃場での栽培が可能になった組換えイネは5件、7系統あり、隔離圃場試験は6件、14系統で実施中である(表1)。特に本年度に至り、総合化学企業のアグレボ社とモンサント社が相次いで除草剤耐性イネ系統の安全性評価試験をわが国に申請し、国内の隔離圃場で開始した。早ければ来春にも輸入解禁の可能性がある。

このように、わが国では国内で開発された組換えイネ系統の中で食品としての安全性評価試験を終え、商品として認可されたものはない。これまで基礎的研究のトピックスとし

表1 組換えイネの栽培試験の状況*

親品種・系統名	開発者	特徴（導入遺伝子）	①	②	③	④
日本晴 (16-2)	農業研究センター 農業生物資源研究所	ウイルス耐性 (イネ縞葉枯ウイルス 外被タンパク質遺伝子)	1990	1992	1993	1994
キヌヒカリ	農業環境技術研究所 (株) 植物工学研究所	ウイルス耐性 (イネ縞葉枯ウイルス 外被タンパク質遺伝子)	1990	1992	1993	1994
キヌヒカリ	三井東圧化学(株)	低アレルゲン米 (イネアレルゲン遺伝子の アンチセンス側)	1992	1993	1994	1995
アキヒカリ	(株) 加工米育種研究所	酒造用低タンパク質米 (イネグルテリン遺伝子の アンチセンス側)	1991	1993	1994	
日本晴 (20-2) (21-3)	農業研究センター 農業生物資源研究所	ウイルス耐性 (イネ縞葉枯ウイルス 外被タンパク質遺伝子)	1990	1992	1996	1997
月の光 (H39) (H75)	日本たばこ産業(株)	酒造用低タンパク質米 (イネグルテリン遺伝子の アンチセンス側)	1994	1995	1997	1998
系統番号4	(財) 岩手生物工学 研究センター	除草剤耐性 (ピアラフォス耐性遺伝子)	1997	1997	1999	
コシヒカリ (KA45,48,119, 130の合計4系統)	日本たばこ産業(株)	低グルテリン米 (イネグルテリン遺伝子の アンチセンス側)	1997	1998	1999	
M202 (LLRICE 06)	アグレボ・ジャパン(株)	除草剤耐性 (グルホシネート耐性遺伝子)	米国	米国	1999	
Bengal (LLRICE 62)	アグレボ・ジャパン(株)	除草剤耐性 (グルホシネート耐性遺伝子)	米国	米国	1999	
M202 (730,1107,1316,1702, 1708,1763の合計6系統)	日本モンサント(株)	除草剤耐性 (グリホサート耐性遺伝子)	米国	米国	1999	

* 農林水産技術会議事務局先端産業技術研究課の資料をもとに作成
注) ①は閉鎖系温室実験(科技厅)、②は非閉鎖系温室実験(科技厅)、③は隔離圃場試験(農水省)、
④は一般圃場での栽培が可能となった年を示す。

て組換えイネ作出に関するニュースや報告は多数あっても、実用的な価値が高く商品として有望な組換えイネ系統の開発実績は極めて乏しいのが実状である。その背景として、遺伝子組換え技術の基本的な特許が、企業合併を繰り返して集積した欧米企業の独占的状态にあり、国公立機関が行う組換えイネ品種開発の大きな障害になっている。わが国における主要農作物の実用化・商品化研究の著しい

立ち後は、1) バイオテクノロジー研究の不連続性、2) バイオテクノロジーと育種の乖離、3) 一貫した計画性と組織的な取り組みの不足が原因として考えられる¹⁾。これは基礎研究と開発研究の連携と研究組織化に関わる問題であり、バイオテクノロジー育種の将来展望を左右する重大な問題でもある。具体的な対処方策を早急に定め集中的に実施することによって、わが国の組換えイネ品種開

発の国際競争力を回復させる必要がある。

3. 組換えイネ品種開発に必要な遺伝子と技術

実用的な組換えイネ品種の開発には、従来の交雑育種法では得られない高い生産性や商品価値を産み出す目的遺伝子を確保する必要がある。また、遺伝子導入技術、形質の発現調節技術、遺伝子導入個体の選抜技術などの基本技術について、効果的な作出手法の検討と張りめぐらされた既存特許の整理と対策を行うとともに、開発計画全体の必要性や経済性、安全性を含めた事前の総合的な評価と判断が必要となる。前者の場合でも、例えば機能未知遺伝子は、遺伝子組換えにより個体での過剰発現や発現抑制を行い同定する必要があるが、その過程で用いた既存の組換え技術が同定した遺伝子の特許化に際して権利取得者から問題視される傾向にあることから、国公立機関においても権利関係の整理と経済的評価を十分に行い、既存特許への対策を強化する必要がある。権利を取得する民間企業等との技術提携や共同研究も選択肢として重要である。

1) 目的遺伝子

近年、植物の光合成や物質代謝経路に関わる酵素遺伝子やストレス誘導性および貯蔵タンパク質遺伝子等の単離が急速に進展しており、これら遺伝子の活用による植物の代謝や各種ストレス耐性の機能増強に関する成功例が増えている。例えば、植物は多数種のタンパク質を蓄積することによって、病原体による攻撃、化学反応および障害などのストレスに対応することが知られている。イネでは、発病関連タンパク質の一つであるキチナーゼ遺伝子の導入によって、いもち病や紋枯病抵抗性が高まることが報告されている。また、オオムギの湖粉層からアブシジン酸によって誘導される *HVA1* 遺伝子は、イネの乾燥や塩ストレス耐性を高めること、シロイズナズナのグリセロール骨格に脂肪酸を結合させる酵素

遺伝子 *GPAT* は、イネの低温耐性を増加させることなどが報告されている²⁾。種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現を制御して成分を改変した報告例も多い。

しかしながら、植物では生産に直結した種々の病害・虫害抵抗性遺伝子や形態、低温などのストレス耐性遺伝子の存在が推定され、染色体地図上に関連づけられているが、これまでほとんど単離されておらず、実用的な活用が著しく制限されている。イネでは、白葉枯病抵抗性遺伝子 *Xa21* および *Xa1*、いもち病抵抗性遺伝子 *Pib*、ジベレリン非感受性矮性遺伝子 *d1* などが単離され、導入効果が確認されているにすぎない。

農水省の第2期イネゲノム解析研究では、イネゲノムの全塩基配列情報の解明とともに、レトロトランスポゾンによる遺伝子破壊系統および遺伝子の連鎖地図情報に基づく遺伝子単離法による有用遺伝子の単離が開始され、形態形質に関与する遺伝子ばかりでなく、耐冷性や病害虫抵抗性遺伝子の単離とその機能解明が進められている³⁾。これらの成果が待たれる。一方、実験植物のアラビドプシスの遺伝子地図と全塩基配列はイネに先行してまもなく解明され、多数の遺伝子の機能と遺伝子ネットワークの仕組みの解明へと進展することから、これら知見を先取的にイネに活用していくことも重要である。

導入遺伝子の効果については、1個の遺伝子の導入により交差耐性 (cross-tolerance) が認められる場合があり²⁾、広い交差耐性を示す遺伝子を単離し、活用することや、耐病性については1種類でなく複数の発病や防御関連タンパク質遺伝子を多重に連結して導入した場合の累積効果も認められており、注目する必要がある。

2) 遺伝子導入技術

イネでは、日本たばこ産業 (株) が開発した単子葉植物へのアグロバクテリウムを用いた形質転換法がよく使われている。イネ種子の胚盤由来のカルスにバイナリーベクターまたはスーパーバイナリーベクターを含むアグ

ロバクテリウムを感染させる方法で、比較的大きなDNA断片を導入することができ、導入DNA断片のコピー数と再構成が少ないなどの優れた特徴がある⁴⁾。この方法の他に、エレクトロポレーション法やパーティクルガン法なども利用されているが、形質変異や不稔などが多いと指摘されている。バイナリーベクターについてもゼネカ社が特許を取得しており、組換えイネ品種の開発に当たっては特に特許問題を考慮した遺伝子導入法の選択が必要となる。遺伝子導入法は重要な基本技術であることから、国の研究機関でもさらに効果的な導入法を開発し、国際競争力確保のための技術的な基盤を作る必要がある。

3) 形質の発現調節技術

目的遺伝子の発現にとって、プロモーターの選択はPA対策上からも重要である。これまでイネでは全身に発現するCaMV35S遺伝子プロモーター(モンサント社が特許取得)が主に使われてきた。近年、それに代わる組織・器官および時期特異的なプロモーターが農業生物資源研究所などで開発されており、今後も有用な単離遺伝子の増加にともなって新規プロモーターの取得増加が期待できる。一方、目的遺伝子の過剰発現による形質発現技術とともに、発現抑制技術も重要である。しかしながら、アンチセンス技術に関する基本特許は海外の大学や企業によって完全に押さえられており、低タンパク質米やアレルゲンフリー米の開発などへの実用的な利用には許諾交渉を要する。重要な抑制技術であるだけに、国の研究機関は代替できる新規技術の開発を急ぐ必要がある。

4) 遺伝子導入個体の選抜技術

イネでは目的遺伝子の導入の確認に、マーカー遺伝子としてカナマイシン耐性遺伝子よりもハイグロマイシン耐性遺伝子の方が効果的である。いずれも欧米の企業によって特許が取得されている。後者においては、海外においてもこれまでその組換え作物の食品としての安全性評価試験の実績がなく、認可には膨

大な評価試験の実施が要求され、見通しの立たない問題を含んでいる。一方、選抜マーカー遺伝子と目的遺伝子を連結しないで導入するコ・トランスフォーメーション法では、再分化個体の後代での両遺伝子の分離を利用してマーカー遺伝子を除くことが可能である。しかし、この技術にも特許権が設定されている。PA対策上は抗生物質耐性遺伝子に代わる形態などのマーカー遺伝子の利用が望ましい。この代替技術として、国内では日本製紙(株)によって組換え体の内生ホルモンの制御を特徴としたMATベクターが開発され、マーカーフリー個体が得られる技術としても注目されている。しかし、イネでの成功例がなく、今後検討を要する課題である。

4: 北陸農業試験場における取り組み

平成9年3月の関係試験研究推進会議において、実用的な組換えイネ品種の開発を目指したイネのバイオテクノロジー育種の研究拠点に当场が位置づけられ、農業研究センターおよび農業生物資源研究所とともに三場所共同研究態勢を組み、組換え研究を推進している¹⁾。前述したように、主な基本技術は欧米の企業等によって特許化されており、品種開発推進の隘路になっている。特に遺伝子導入技術と選抜技術への対処が難しく、三場所では代替技術の開発についての検討も並行して進めている。導入技術は農業生物資源研究所が行い、当场では既存の抗生物質耐性遺伝子マーカーに代わりうる適当なものがない現状から、マーカー遺伝子を用いないで再分化個体を大量に作った後に、目的遺伝子をもった個体を検定して選抜することが実際に可能かどうかを検討している。この方法は検定に多大な労力を要する反面、組換え体のPA対策上の利点が大いと考えている。当场ではこの他、形質の発現調節技術として新規の各種プロモーターの単離を開始している。また、耐病性、耐虫性の付与を目的に既存の技術も使いながら組換え体を作成して導入遺伝子の効果を調べたり、イネなどの作物から、いもち病等

の病害抵抗性の増強に有効な新規遺伝子の単離も進めている。このような各種技術と成果を集積して体系化することにより、特許問題と安全性問題を相当程度解消した実用的価値の高い組換えイネ品種の開発が可能になることから、組織的な連携を図り、集中的に取り組んでいる。

参考文献

1) 黒田 映 (1998) 組換えイネ品種開発の展望,

農業および園芸, 73 (12), 1256-1261

2) 岸谷幸枝・横井修司 (1999) 遺伝子工学的手法による作物へのストレス耐性付与の可能性, 育種学研究, 1, 83-90

3) 佐々木卓治・矢野昌裕 (1998) イネのゲノム生物学の幕開け, 化学と生物, 36 (10), 639-645

4) 樋江井祐弘 (1995) アグロバクテリウムによるイネの形質転換, 化学と生物, 33 (5), 282-283

◀国内情報▶

酵素阻害タンパク質の特徴とその利用の可能性

農林水産省食品総合研究所穀類特性研究室

大坪 研一

1. 酵素阻害剤に関する研究の意義

酵素阻害剤については、医学、タンパク質化学、食品科学、植物学等の各分野において、さまざまな目的から多くの研究がなされてきた。医学の分野では、生体内の各種酵素との特異的反応に注目され、反応特異性の解明や生体内での酵素阻害剤の機能の解明に関する研究が行われ、診断薬や治療薬としての利用が図られている。例えば膵臓炎の診断薬としてアミラーゼインヒビターが利用されたり、筋ジストロフィーやエイズの治療薬としてプロテアーゼインヒビターの利用が図られている。

タンパク質化学の分野では、酵素との相互作用が注目され、酵素との反応特異性の解明や、酵素の活性部位の推定に関する研究が行われ、対象酵素の濃縮精製に利用されたり、酵素反応の機作の解明が行われてきた。

食品科学の分野では、酵素阻害剤による栄養阻害の観点から、阻害剤の活性測定方法や失活方法、あるいは栄養面からの成長阻害の有無の検討などの研究が行われ、食品の品質評価方法の開発や加工による食品素材の利用効率の向上といった成果が挙げられてきた。

植物学の分野では、種や属の特徴を表す指標の一つとして研究され、既知の阻害剤との構造や機能面での比較や分類が行われ、植物の分類や進化の指標の一つとして研究されてきた。また、種子における酵素阻害剤の機能についても、生体防御、調節、発芽等との関係が注目され、生命現象の解明の一環として研究がなされてきた。

OHTSUBO Kenichi

〒305-8642 つくば市観音台2-1-2

酵素阻害剤の研究の意義について、その一部を表1に示す。

2. 酵素阻害剤の種類

酵素阻害剤と言われるものには、DFP(ジイソプロピルフルオロオスフェイト)やPCMB(p-クロロマーキュリーベンゾエイト)のような低分子の化学的阻害剤、ロイペプチン、ペプスタチン、アンジオテンシン変換酵素阻害剤のような低分子のペプチド性阻害剤、ポリフェノールのような、高分子ではあるが非タンパク性の阻害剤、そしてダイズのトリプシンインヒビターや動物の血液・筋肉に存在するカルパスタチンのようなタンパク性阻害剤があるが、本稿では主として植物に存在する酵素阻害タンパク質について紹介する。

3. 植物の酵素阻害タンパク質

マメ科、イネ科、ナス科を始めとして、多くの植物にプロテアーゼインヒビターやアミラーゼインヒビターの存在が報告され、栄養学的、酵素学的あるいは植物生理学的研究の対象とされてきた。タンパク質としての構造や機能が明らかにされつつあるものも多い。

植物において、酵素阻害タンパク質がどのような機能を果たしているのかについては議論が分かれている。これまでに、①病原微生物や害虫から植物を守る防御物質である、②種子の内在性酵素の調節や保護を行っている、③種子中の貯蔵タンパク質の一つである、④別の機能を有する酵素にすぎない、などの様々な仮説が提示されているが、それぞれの

表1 酵素阻害剤の研究の意義

分野	機能	研究内容	成果・利用
植物学	種子での役割 種・属の特徴	防御、調整、発芽等との関係 既知の阻害剤と比較・分類	生命現象の解明 植物分類・進化の指標
蛋白化学	酵素との相互作用	対象酵素の探索 酵素の活性部位解明 酵素との結合性	阻害剤の生体内機能の推定 酵素反応の阻害の解明 不溶化して酵素を濃縮・精製
食品化学	栄養性の阻害	阻害剤の測定方法 阻害剤の失活方法	食品の品質評価 食品の利用効率の向上
発酵工学	微生物代謝への影響	微生物の制御技術	発酵工業への利用
医学	酵素との特異性	反応特異性の解明 体内での機能解明	診断薬への応用 治療薬への応用

仮説について根拠となるデータが得られてきていることから、酵素阻害タンパク質には多くの種類があって、それぞれが別の機能を果たすことによって、植物の生命の維持と個体の増加に寄与しているものと考えられる。

4. 植物の酵素阻害タンパク質の例

(1) プロテアーゼインヒビター

プロテアーゼはセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、金属プロテアーゼ、アスパルティックプロテアーゼの4種類があり、それらの特色とプロテアーゼの例を表2に示す。プロテアーゼインヒビターは、これらのプロテアーゼの活性を害するタンパク質であり、プロテアーゼの種類に応じて各種のインヒビターが報告されている。

表2 プロテアーゼの種類

分類	特色	プロテアーゼの例
1. セリンプロテアーゼ	活性中心にセリン残基を持ち、DFP、有機リン化合物により阻害される	トリプシン、キモトリプシン、ズブチリシントロンピン、プラスミン
2. システインプロテアーゼ	活性中心にSH基を持つ。チオール試薬、アルキル化剤、酸化剤等により阻害される	パパイン、フィシン、プロメライン、カテプシンB
3. 金属プロテアーゼ	酵素内の2価金属イオンにより活性が支配される。キレート試薬や透析により失活	サーモリシン、コラゲナーゼ
4. アスパルティックプロテアーゼ	活性中心にアスパラギン酸残基が関与。ペプスタチンやエポキシドにより失活。	カテプシンD、ペプシン、キモシン

(一島英治編、プロテアーゼ・学会出版センターより)

①トリプシンインヒビター

トリプシンインヒビターは、酵素阻害タンパク質のうちで最も有名なものの一つである。昔から、「生のダイズを食べると消化が悪い」と言われてきた。すでに1917年には、ネズミの給餌試験において、生ダイズ飼料は、蒸煮ダイズよりも栄養性が劣ることが見いだされており、1938年には、ダイズ粉の抽出液がトリプシン等によるゼラチンの液化を阻害することが報告されている。1946年にはKunitzがダイズトリプシンインヒビターの結晶化およびインヒビター・トリプシン複合体の結晶化に成功し、インヒビターがタンパク質であること、トリプシンと1:1の割合で安定的に結合することによって酵素作用を阻害することを明らかにした。また、ダイズには、Kunitz型トリプシンインヒビターより耐熱性の強いBowman-Birk型のトリプシンインヒビターも存在している。

さらに、単子葉植物である稲やトウモロコシの種子にもトリプシンインヒビターが存在しており、田代らによってタンパク質一次構造が決定された米糠中のBowman-Birk型トリプシンインヒビターは、非加熱米糠タンパク質とオートクレーブ処理した米糠タンパク質の栄養性の相違の主因と考えられている。

筆者らは、ハトムギ種子中にもBowman-Birk型の耐熱性トリプシンインヒビターが存在し、登熟中期から生合成され、胚芽部分に局在して胚乳部には存在しないことを報告している。

②シスタチン

シスタチンは、パパイン、カテプシンBなどのシステインプロテアーゼを特異的に阻害する酵素阻害タンパク質である。従来は、動物の肝臓、唾液、卵、乳などにおける存在が報告され、生理学や病理学の分野で研究が進展し、生体防御に関係していると考えられてきた。阿部らは植物起源のシスタチンとして、米のシスタチン（オリザシスタチン）を見だし、その特性を明らかにした。それによると、オリザシスタチンは、イネ種子内在性のシステインプロテアーゼであるオリザインの活性調節を行うほか、動物のシスタチンと同様に、生体防御に関係して、害虫や病原微生物等から稲の種子を防御する役割も果たしているものと考えられている。

(2) アミラーゼインヒビター

アミラーゼインヒビターは、デンプン分解酵素であるアミラーゼの活性を阻害するタンパク質である。これまでに報告された多くはデンプンの液化や粘度低下に用いられる α -アミラーゼを阻害するインヒビター（ α -アミラーゼインヒビター）であるが、デンプンの末端から β -マルトースを切り出す β -アミラーゼの活性を阻害するインヒビター（ β -アミラーゼインヒビター）が枯草菌から抽出・精製された例もある。

(3) 2機能性インヒビター

2機能性インヒビターとは、一つのタンパク質分子であって、たとえばプロテアーゼとアミラーゼの2種類の酵素を同時に阻害する機能を有するタンパク質である。パタピラマ

表3 ササゲマメトリプシンインヒビター遺伝子のタバコへの導入の結果

系統名	葉タンパク質中の インヒビター量	オオタバコガに対するバイオアッセイ		
		被食葉面積	可食虫重量	害虫生存率
-2/8	1.7 μ g/mg	52.3 \pm 7.5 %	236.4 \pm 33.3 mg	87.5 %
+5/5	9.9	21.1 \pm 1.4	63.9 \pm 9.6	37.5
-2/8	1.7	49.6 \pm 4.5	193.5 \pm 10.2	87.5
+5/21	7.0	30.1 \pm 1.5	109.8 \pm 5.9	50.0

ンの発見したインヒビターはラギ（インドに生育する雑穀の一種）に含まれており、 α -アミラーゼとトリプシンの両酵素の活性を阻害する。大麦、小麦、米に含まれるアミラーゼブチリシンインヒビターも、 α -アミラーゼと枯草菌のプロテアーゼであるズブチリシンの両者を同時に阻害する2機能性インヒビターである。

5. 酵素阻害タンパク質の利用の可能性

(1) ササゲマメトリプシンインヒビター (CPTI) による虫害抵抗性

1987年に、イギリスで、ササゲマメの一種 (cowpea) に含まれるトリプシンインヒビターの遺伝子をタバコに導入して得られた形質転換タバコが、オオタバコガの幼虫に対して抵抗性を示すことが報告された (表3)。害虫抵抗性は、発見したトリプシンインヒビターの量に比例して強かった。これは、酵素阻害タンパク質遺伝子の導入によって虫害抵抗性植物が育成された世界で初めての例である。

(2) インゲンマメアミラーゼインヒビターによる虫害抵抗性

石本らは、インゲンマメに含まれるアミラーゼインヒビター遺伝子をアズキに導入することにより、アズキゾウムシに対する抵抗性の発現することを示した。

(3) 「組み換えクローン」研究プロジェクトと酵素阻害タンパク質遺伝子の導入研究

農林水産省では、「バイオテク植物育種」研究プロジェクトの後継プロジェクトである「組み換えクローン」研究プロジェクトにおいて、各種の酵素阻害タンパク質遺伝子の導入による耐虫性イネの作出に関する研究を実施中である。

①シスタチン遺伝子の導入

シスタチンは、鞘翅目昆虫等に対して生育

抑制等の効果が報告されている一方で、穀類、豆類、果実の可食部に広く分布し、日常的に摂取されていること、シスタチン摂取によるアレルギー等がこれまでに報告されていないことなどから、人に対して安全性が高いと期待される。農水省の北陸農業試験場では、このインヒビター遺伝子を稲に導入することによって、安全で耐虫性の向上した稲を作出することを目的に研究を行なっている。

②シカクマメトリプシンインヒビター

人工合成遺伝子の導入

トリプシンインヒビターは、鱗翅目昆虫の消化酵素を阻害することが知られており、東北農業試験場ではシカクマメトリプシンインヒビター遺伝子を人工的に合成して導入した稲を材料として飼育試験を行うことにより、ニカメイチュウ幼虫の成長が抑制されることを見いだした。

③アミラーゼズブチリシンインヒビター

遺伝子の導入

筆者らの研究室では、大麦、小麦、米に含まれる2機能性酵素阻害タンパク質であるアミラーゼズブチリシンインヒビター (ASI) 遺伝子を稲に導入することによる、耐虫性稲の作出に関する研究を行っている。ASIは、これまで長く人類が食してきた主要穀類種子に含まれており、しかも酵素抗体反応検出によって、穀類種子の胚芽部および糠部にのみ存在することが確かめられていることから、可食部分の安全性は高いものと推察される。

米、小麦、大麦のASIタンパク質の一次構造を図1に示す。互いに60%以上の高い相同性のあることが判る。

我々のこれまでの研究により、米のASI (RASI) タンパク質は、分子量が21kDaであり、耐熱性が強く、貯穀害虫であるコクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*) の α -アミラーゼを *in vitro* で阻害すること (図2)、トリプシン、ペプシン、唾液アミラーゼ等を阻害しないことが明らかになっている。

北陸農業試験場において、稲の種子登熟お


```

1         10        20        30        40        50        60
RASI  APPPVYDTEGHELADGSIYVLPASPGH-GGGLTM---APRRVIPCPPLVAQETDERRKGK-FVRFTPW
WASI  DPPPVHDTDGNELRADANYVLPANRAH-GGGLTM---APGHGRRCLFVSQEQADGGQDGL-PVRIAPH
BASI  ADPPPVHDTDGHELADANYVLSANRAH-GGGLTM---APGHGRHCLFVFSQDPNGQHDGF-PVRIPTY

CAR    RELLDVDFNLRNGGSYIVPAFRGK-GGGLEL---ARTGSETCPRTVVQAPAEQSRGL-PARLSTP
PSO    EPLLDSEGLVRNGGTYLLPDRWAL-GGGIEA---AATGTETCPLTVVRSPNEVSVGE-PLRISSQ
ERY    VLLDNGEVVQNGGTYLLPQVWAQ-GGGVQL---AKTGEETCPLTVVQSPNELSDGK-PIRIEER
GLY    DFVLDNEGNPLENGGTYILSDITAF-GGIRA---APTGNERCPLTVVQSRNELDKGI-GTISSP
PRO    <QELLDVDGEILRNGGSYILPAFRGK-GGGLEL---AKTEGETCPLTVVQARSETDRGL-PASIWSP

CAC    ANSPVLDTDGDELQTGVQYVLSSTISGAGGGGLAL-GRA-TGQ-SCPEIVVQRSDLDNGT-PVIFS--
CAT    ESPLPKPVLDTNGKELNPSSYRIISIGRGGALGGDVYL-GKSPNSDAPCPDGFVFRYNSDVGSPGTPVRFIPL
NOD    QPVYDTNGQLRNGEYIVPVSQ---GAGIDV---VATGTEKCPPTIVQSSSSTK--Y-STVFK--
MIR    DSAPNPVLDIDGKLRGTNYIVPVLRDH-GGGLTVSATTPNGTFVCPVPRVQTRKEVDHDR-PLAFFP-
SPO    SETPVLDINGDEVRAENYIVSAIWGAGGGGLRLVRLDSSS-NECASDVIVSRSDFDNGD-PITITPA
      * * * * *

70       80       90       100      110      120
RASI  GGAASPRTLRVSTDVIRIFNA--ATLCVQS--TEWHVGD-EPLTGARRVVTGPLIG-PSPSGRENAFRVE
WASI  GGAPSDKIIRLSTDVIRISFRA--YTTCVQS--TEWHIDS-ELVSGRRHVITGPVRD-PSPSGRENAFRIE
BASI  GVAPSDKIIRLSTDVIRISFRA--YTTCVQS--TEWHIDS-ELVSGRRHVITGPVRD-PSPSGRENAFRIE

CAR    PRIYIGPEFYLTIEFEE-QK--PPSCLRDSNLQWVVE-ESQI---VKIASKEEELFGSFQIKPYRDD
PSO    LRSGFIPD--Y-SVVRIGFAN--PPKCAPSP--WWTVVE-DQPQQPSVKLSELKSTKFDYLFKFEKVT-
ERY    LRSTFIPDD--DEVRIGFAY--APKCAPSP--WWTVVE-DEQEGLSVKLSEDESTQFDYFPKFEQVSDK
GLY    YRIRFIAEGHPLSLKFDFAV--IMLCVGIP-TEWSVVE-DLPEGPAVKIGENKIDAM-DGWFRLEVRVSD
PRO    PRIAIRPGFSLNIEFRP-RN--PSACHRESSLQWVVE-ESQ---VKIAVKEDARGFGPFIRPHRDD

CAC    NADSKDDVVRVSTDVNIIEFVPIRDLRDLCSST--TVWRLDNYDNSAGKWWVTDTGKVGEPGNTLCSWFKIE
CAT    SGGIFEDQL---LNIQFNIP--VKLCVSY--TIWKVGN-MAYFRMLLETGGTIGQ-ADNSYFKIVKLS
NOD    SEATLPRPINYITQ-NMAFSI--KFGCNQYRGRPWTVV----RGLPEGLALKLNGY--TNTAR-VLRIK
MIR    -ENPKEDVVRVSTDNLNINFA--FMPCRWTSSTVSRDLKDYDESTGQYFVTIGGVKGNPGETISSWFKIE
SPO    DPEATVVMPTSTYQTFRNIAT--NKLCVNNVN--WGI-KHOSESGQYFV---KAGEFVSDNSNQ--FKIE
      *

130      140      150      160      170
RASI  KYGGG----YKLVSCR-----DSCQDLGVSRDGGAGA--IGASQPPHV-VV-FKKARPS
WASI  KYSGAEVHE-YKLMACG-----DSCQDLGVFRDLKGGAWFLGATEPYHV VV-FKKAPPA
BASI  KYHGAEVSE-YKLMSCG-----DWCQDLGVFRDLKGGAWFLGATEPYHV-VV-FKKAPPA

CAR    -----YKLVYCEPQQGR-LECKDLGISIDDDNN-RLAVKGDGDL-VVQFVNADREGN
PSO    KFSS-----YKLYCAKAKR---DTCKDIGIYRDQKGY-ERLVVTDENPL-VVIFKVESS
ERY    LHS-----YKLYCEGKH---EKCASIGINRDQKGY-RLVVTEDNPLTVVL-KKDESS
GLY    EFNN-----YKLVFC-PQQAED-DKCGDIGISIDHDDGTRRLVVSKNKPL-VVQFQKLDKESL
PRO    -----YKLVYCEGQKRS-DRCKDLGISIDEENN-RLVVKDGDPL-AVRVFKANRRG

CAC    KAGVLG----YKFRCPSCVDCSCTTLCSIDIGRHSDDGQIRLALSDNEAWM---FKKASKTIKQVVMAND
CAT    NFGYNLLSCPFTSIIICLRCP--EDQFCAKVGVIQNGGK-RLALVN-ENPLDVLQEV
NOD    PYSRGSRN--YKLLFCPDGS-----QCANVGTLMMLSER-KRLVVSNTLPTLVQVQFYKQYPRFAMDNHLRSV
MIR    EFCGSGF--YKLVFCPTVCGSCKVKCGDVGIYIDQKGR-RLALSDKPFVAFENKTVYF
SPO    VVNDNLNA--YKISYQFGTE----KCFNVGRYYDPLTRATRLALSNTPFV---FVIKPTDM
      * * *

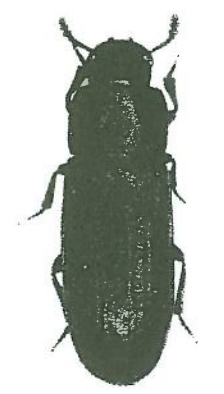
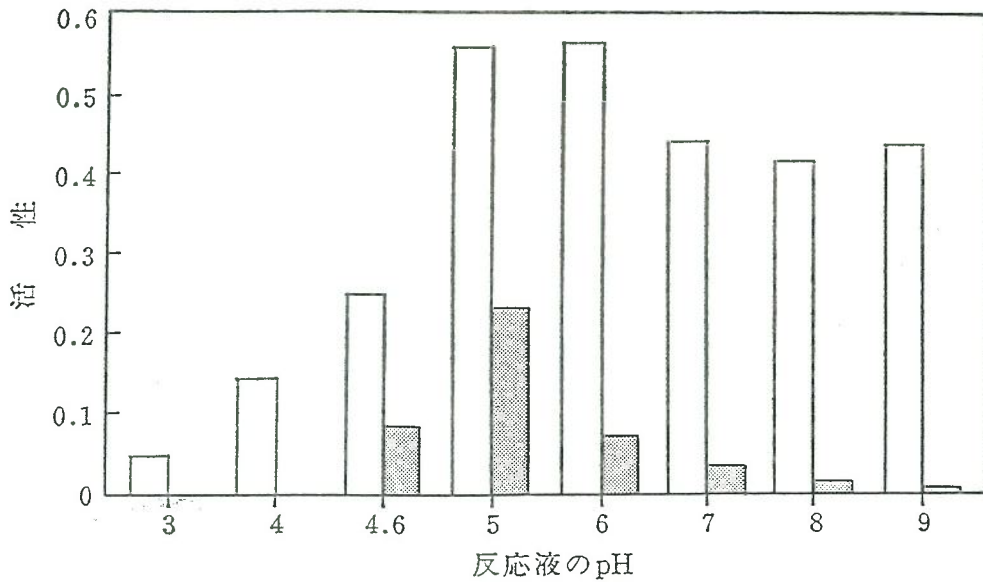
```

WASI:小麦アミラーゼサブチンインヒビター CAT:馬鈴薯のカチンシンドインヒビター
 BASI:大麦アミラーゼサブチンインヒビター NOD:シカクマメの根粒蛋白質
 CAR~PRO:各種のマメ種子のトリプトファン MIR:味覚変換蛋白質ミラクソ
 CAC:カカオマメのアルブミン SPO:甘藷のスポラミン

図1 RASI等の2機能性インヒビターおよび類似タンパク質の一次構造

よび発芽の過程で、RASIがどのように変動するかを酵素抗体法によって調べた結果を図3に示す。RASIは、開花の4日後から出現して4週間後まで増加を続け、一定含有量に到達して完熟に至り、発芽時には吸水後4日目から減少することが示された。

我々はデンマークのカールスバーグ研究所から大麦のASI(BASI)遺伝子の供与を受け、農水省生物研との共同研究により、アグロバクテリウム法によって稲(日本晴)に導入した。この形質転換稲を5世代にわたって隔離温室で自殖栽培し、安定してBASIタンパク質を



コクヌストモドキ

図2 害虫アミラーゼ活性および米SIによる阻害活性とpHとの関係
 □アミラーゼ活性 (CM アミロース・DEX 法の吸光度で表示), ■アミラーゼ阻害活性

生産する系統を選抜した(図4, 図5)。形質転換稲の種子及び葉においてBASIが存在することを示すウエスタンブロットイングの結果を図6に示す。

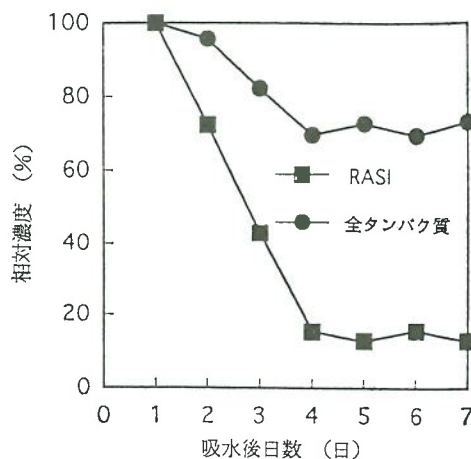
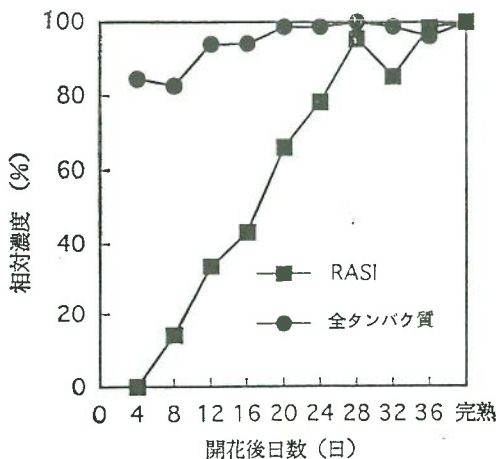
これらの形質転換稲の一部では、貯穀害虫であるカクムネヒラタムシの生育を阻害する有意な結果が得られているが、BTトキシン等に比べると、その殺虫効果は強くはないと思われる。今後は、これらの形質転換稲の種子が、アレルギーを促進したり、消化不良を起こしたりしないことを確認する実験を行なうなど、食品としての安全性に関する試験を行

うとともに、隔離圃場栽培に向けての資料を蓄積する予定である。また、RASI導入稲の作出および、より効果の高い耐虫性稲の作出にも取り組みたいと考えている。

(4) 酵素阻害タンパク質のその他の利用可能性

プロテアーゼインヒビターやアミラーゼインヒビターは上記の耐虫性植物や耐病性植物の育成に有用であるばかりでなく、表4に示すような各種の用途が考えられる。

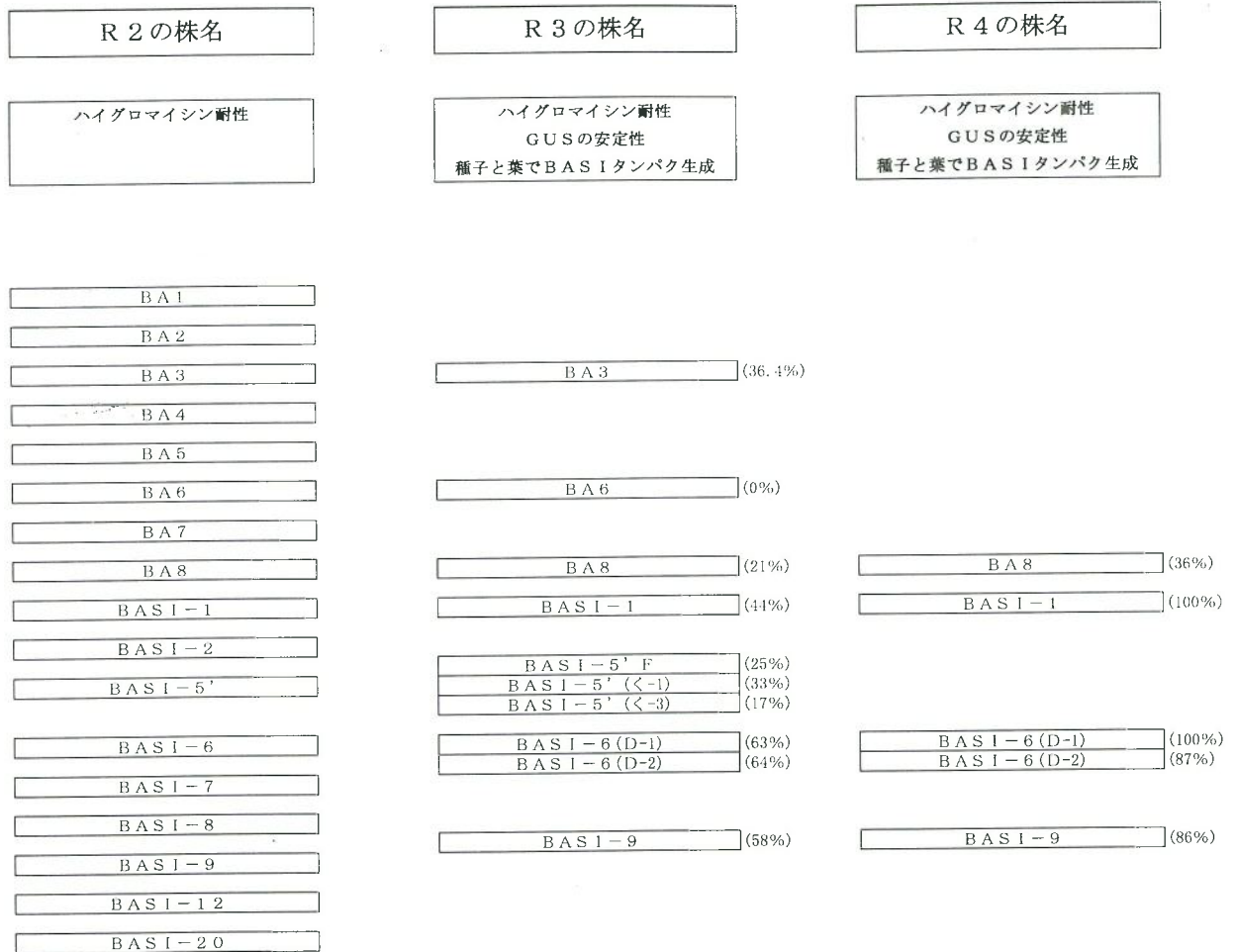
すなわち、酵素の精製過程において、酵素



登熟期における全タンパク質含量およびRASI含量の変化(完熟種子の値を100とした相対濃度)

発芽による全タンパク質含量およびRASI含量の変化(吸水後1日目の値を100とした相対濃度)

図3 登熟および発芽における稲種子全タンパク質およびRASIの変動(デンシトメトリー)



*括弧内の数値はGUS染色(+)の株数

図4 BASIcDNA 導入形質転換稲の選抜

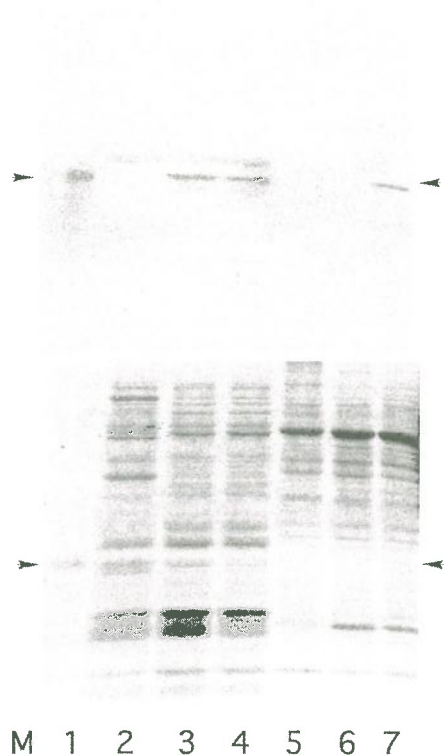
阻害タンパク質をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、その特異的結合を活用した効率の良い精製が可能となる。また、一般のタンパク質の抽出・精製においても、共存するプロテアーゼによる対象タンパク質の分解を防ぐために、プロテアーゼインヒビターが用いられることがある。

さらに、発酵工業や、食肉加工において、プロテアーゼの活性を調整することが行われる。たとえば、パパインによる食肉の軟化加工において、適度の状態でタンパク質分解を停止させるために、パパインインヒビターの添加が行われることがある。

一方、インヒビター研究の進んでいる医学

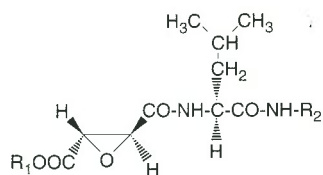


図5 隔離温室における形質転換稲の栽培
左：形質転換稲 右：日本晴



- M
- 1. BASI(1mg/ml)
- 2. seeds of Nipponbare
- 3. seeds of BA8
- 4. seeds of BA6
- 5. leaf of Nipponbare
- 6. leaf of BA8
- 7. leaf of BA6

図6 ウェスタンブロッティングおよびSDS-PAGEによるBASIの検出
上:ウェスタンブロッティング
下:SDS-PAGE
矢印はBASIを示し、BA6, BA8は形質転換稲の種類を示す



ロキシスタチンの構造

分野においては、炎症の抑制や感染防御の目的でプロテアーゼインヒビターの利用が行われているし、図7に示すような、システインプロテアーゼインヒビターの利用による筋ジストロフィーの治療も考えられている。また、小麦アミラーゼインヒビターは、対象アミラーゼの特異性（唾液アミラーゼは阻害して、膵液アミラーゼは阻害しない）を利用して、膵臓炎の診断に用いられている。

これらの用途以外にも、キノコの子実体形成促進や糖尿病予防等の新しい用途も考えられており、栄養阻害因子として、マイナスのイメージの強かった酵素阻害タンパク質も、その特性を有効に活用することにより、プラスの側面が現れるものと期待される。

文献

阿部啓子・荒井綜一(1991)植物細胞工学, 3:193.
一島英治(1983)プロテアーゼ研究小史,(一島英治編,学会出版センター):1.
K.Abe, Y.Emori, H.Kondo, K.Suzuki, S.Arai(1987) J.Biol.Chem., 262:16793.
K.Ohtsubo, K.Harada, S.Kawasaki (1989) Plant Cell Physiol., 30:699.

表4 プロテアーゼインヒビターの利用可能性

1. プロテアーゼの濃縮・精製 (リガンド)
2. プロテアーゼの抑制 (発酵工業、タンパク質の精製等)
3. 植物の病害防御 (ウイルス病、細菌病、糸状菌病等)
4. 植物の虫害防御 (ガ、甲虫、カメムシ等)
5. 医薬品への利用 (炎症抑制、感染防御、膵臓炎診断等)
6. その他 (キノコ子実体形成、食肉軟化調節等)

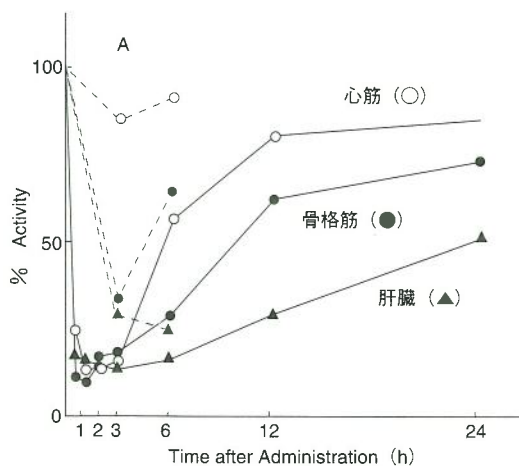


図7 ロキシスタチンの構造および筋肉プロテアーゼの阻害効果

K.Ohtsubo and M.Richardson (1992) FEBS Letters, 309:68.
大坪研一・清水博之・福井希一 (1994) 日本醸造協会誌, 89:256.
大坪研一・秋山康紀・中村澄子・吉橋 忠・田中国介・増村威宏・田代 操・川崎信二 (1999)

育種学研究, 1, 別冊1号:135.
玉井正晴 (1990) 日本農芸化学会誌, 64:1386.
V.A.Hilder, A.M.R.Gatehouse, S.E.Sheerman, R.F.Barker, D.Boulter (1987) Nature, 300:160.

生研機構からのご案内

BRAIN国際シンポジウム2000

21世紀の農業・環境を活かす革新技術

日 時：平成11年11月24日（水）10：00～17：00
場 所：農林水産省7階講堂（営団地下鉄霞ヶ関駅下車）

主 催：生物系特定産業技術研究推進機構（生研機構）

後 援：農林水産省（予定）

協 賛：農業機械学会

〈挨拶〉

10:00-10:30

〈講演〉(同時通訳付)

10:30-11:15 未来型環境制御グリーンハウス構想(仮題)

オランダ国立農業環境工学研究所 所長 Ir. A. A. Jongebreur

11:15-12:00 精密農業に関する研究

英国シルソー研究所(旧国立農業工学研究所)バイオエンジニアリング部 Dr. Nick Tillett

13:30-14:10 自律走行技術

生物系特定産業技術研究推進機構 基礎技術研究部
部長 鷹尾宏之進

14:10-14:50 ハウス栽培における自動化技術(仮題)

オランダ国立農業環境工学研究所 Dr. J. Bontsema

15:00-15:40 新素材を用いた柔らかいロボット

(株)東芝 研究開発センター 研究主務 鈴木康一

15:40-16:20 調製選別における自動化技術

(株)日立製作所 産業システム事業部 産業情報制御システム部
主任技師 加藤裕康

16:20-17:00 農作物の広域観察のためのパノラマ画像技術

三洋電機(株) 研究開発本部 メカトロニクス研究所ヒューマンシステム研究部 課長 蚊野 浩

参加費：無料(但し、資料代1,000円) なお、参加希望者は下記にお問い合わせ下さい。
お問い合わせ先：〒331-8537 埼玉県大宮市日進町1-40-2 生研機構内シンポジウム事務局(笹谷・綾部・太田)

TEL:048-654-7048 FAX:048-654-7131 E-mail:sympo@iam.brain.go.jp

◀国内情報▶

イネのファイトアレキシン合成を誘導する
セブレロシド型エリシターの発見

(株)植物防御システム研究所

岩田 道顕*

植物には高等動物に見られるような免疫系は存在しないが、植物は植物特有の防御システムを用いて病原菌の侵入を防いでいる。病原菌の侵入を受けた部位に隣接する細胞では、エリシターと呼ばれる一種のシグナル物質の働きにより抗菌物質ファイトアレキシンが誘導的に合成されることが知られている。この2月までで研究を終了した(株)植物防御システム研究所において行われた研究で、イネのファイトアレキシンの合成を誘導する新たなエリシターを発見したのでその概要を紹介する。

1. はじめに

植物にとっても病原菌は異物であるため、侵入した病原菌は植物により異物として認識される。認識された情報は、植物の細胞内へ伝達され、細胞の過敏感死やファイトアレキシンの生成など、一連の防御反応が開始される。病原菌が侵入する際の認識は、エリシターが植物細胞上のレセプターに感知されることにより行われると考えられている。エリシターは、病原菌由来の物質あるいは病原菌が侵入することにより植物から切り出されてくる物質であることが多い。

病原菌が植物に侵入する時には、両者の間で様々な化学的、生物的そして時には物理的な手段によるやり取りが行われていると推定される。その結果として、病原菌は侵入が拒絶されたりあるいは感染に成功したりするものと考えられる。この間の植物-病原菌の相互関係は複雑で、それを解析するためには非常に困難を伴う。しかし幸いなことに、エリシターは防御反応を誘導する物質と見なすことができるため、エリシターを用いて研究を行うならば、侵入場面における防御反応の誘導のみを取り出した単純化された実験系を構築することができる。また、あわよくばエリ

シターを病害防除に活用することができるかもしれない。

このような考え方を背景として、我々は、イネ-いもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) の実験系を設定し、いもち病菌培養菌体からエリシターを探索し単離するための研究を行った。

2. エリシターの探索と単離・同定

エリシター活性を検出する指標としては、イネ葉身に付傷処理した際のファイトアレキシン合成誘導活性を採用した。イネのファイトアレキシンとしてはこれ迄に15種が知られているが、その中で、抗菌活性が強くかつ蓄積量が相対的に多いファイトカサンA~E¹⁾、モミラクトンAおよびB²⁾をエリシター活性測定用の指標物質として選択した。イネ葉身内で誘導的に合成されて蓄積したこれらファイトアレキシンは、有機溶媒で抽出し、それをHPLCで定量した(図1)。また、比較的低温、高湿度、弱照度で栽培したイネにエリシターを含む試料を処理し、処理後は比較的高温、高湿度、強照度で栽培を続けると、高感度でエリシター活性を測定することができた³⁾。エリシターによる防御システムの活性化は、イネの栽培条件すなわち環境要因により大きく左右されるようである。

予備的実験で、いもち病菌菌体中にイネに対してエリシター活性を示す物質が存在していることが確認できたので、液体培養して得

IWATA Michiaki

* 現；明治製菓(株)薬品総合研究所

〒222-8567 横浜市港北区師岡町760

あると同定した。セレブロシドなどのスフィンゴ糖脂質が、植物に対してエリクター活性を持つことは未だ知られていないので、本研究はそれを明らかにした最初のものである。

3. セレブロシド型エリクターのイネに対する作用

いもち病菌から単離したセレブロシドは、イネのファイトアレキシンの合成を誘導するものであることから、いもち病の発病に対して何らかの影響をおよぼす可能性がある。人工気象室内でポット栽培したイネを用いて、いもち病に対する作用を接種実験により調べたところ、セレブロシドは、いもち病の発病を強く抑制することが観察された。さらに、セレブロシド処理といもち病菌接種との時間的關係を詳細に調べた結果では、セレブロシドが発病を抑制するためには、いもち病菌が接種されるよりも12~24時間前に処理されていなければならないことも明らかとなった(図3)⁴⁾。一方、ファイトアレキシンの誘導的合成を経時的に測定した実験結果では、セレブロシド処理2日後頃からようやくファイトアレキシンを検出できるようになることが明らかとなった。これらの実験結果は、セレブロシド処理によりイネの防御系は活性化されるが、いもち病の発病を抑制できるレベルまで

に達するためには12~24時間程度を要することを示している。さらに、そしてこの時間帯にはまだファイトアレキシンが蓄積していないためセレブロシドによる発病抑制はファイトアレキシンの抗菌作用によるものではないことも示している。セレブロシドは、元々はイネのファイトアレキシンの合成を誘導する物質として発見されたものであるが、上述の結果は、セレブロシドはイネの感染防御系を比較的短時間で活性化作用を持っている物質であることを示している。

高濃度のセレブロシド水溶液でイネ葉身を散布処理すると、2~3日後に、葉面上に多数の小褐点が形成される場合がある。これは、抵抗反応が発現するように非親和性の組み合わせで病原菌を植物に接種した場合に見られる現象と類似している。この褐点部では、細胞死を伴うことが多いことが知られている。

セレブロシドが細胞死をもたらす作用を持っているかを調べるため、イオンの漏出実験を行ったところ、セレブロシドで処理したイネ葉身切片から有意なイオンの漏出が認められ⁴⁾、セレブロシドが細胞死をもたらす可能性が示唆された。しかし、この実験では細胞死のためではなくイオンチャンネルを經由してイオンが流出した可能性もあるため、細胞死についてはさらに他の手法で確認する必要がある。

動物細胞膜に存在するスフィンゴ糖脂質および細胞内におけるその代謝物は、脂溶性シグナル分子として様々な機能と作用を持っていることが知られている。また、細胞の生と死を制御していることも知られており、セラミド(セレブロシドから糖が脱離した物質=スフィンゴ脂質)はアポトーシスを誘導する作用を持つことも数多く報告されている。最近、植物の上述のような細胞死は一種のアポトーシスであると言われている。先の実験におけるイネ葉身切片からのイオンの漏出がアポトーシスによるならば、セレブロシド-イネ細胞(組織)は、植物におけるアポトーシス研究の有用な実験系になるとと思われる。

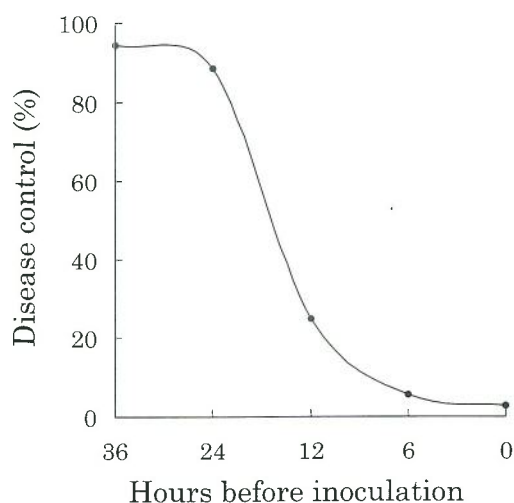


図3 セレブロシドA処理後いもち病菌接種までの時間と発病抑制効果 (Koga, J., et al. (1998) の図を改変)

5. おわりに

イネに対してエリシター活性を示すタイプのセレブロシドには、担子菌の子実体形成を誘導する作用があること⁶⁾、細胞壁グルカン合成阻害剤 aculeacin と相乗的に *Candida albicans* の生育を阻害する作用があること⁵⁾などが報告されている。また、最近、これらのセレブロシドにはDNAの複製に関与するタイプのDNA polymeraseを阻害する作用があり、それにより子実体形成が誘導されている可能性がある⁷⁾と報告されている。イネに対するエリシター作用も同じメカニズムによるのかどうかは、現在のところ不明である。

セレブロシドは培養菌体から抽出した物質であるため、いもち病菌がイネに侵入する場面において、それが実際にエリシターとして働いているのかどうかは明らかでない。しかし、セレブロシドはイネの感染特異的抗菌物質であるファイトアレキシンばかりでなく感染特異的蛋白質の遺伝子も活性化させる⁸⁾ところから、実際の感染の場面においても防御システムの活性化にシグナル物質として働いている可能性は大きい。セレブロシドのイネに対する作用メカニズム解析研究が進み、イネの感染防御システムが解き明かされていくことを期待している。

文献

- 1) Koga, J., et al. (1995). Phytocassane A, B, C and D, novel diterpene phytoalexins from rice, *Oryza sativa* L. Tetrahedron 51: 7907-7918.
- 2) Kato, T., et al. (1973). Momilactones, growth inhibitors from rice, *Oryza sativa* L. Tetrahedron Lett. 39: 3861-3864.
- 3) Koga, J., et al. (1998). A new bioassay for measuring elicitor activity in rice leaves. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64: 97-101.
- 4) Koga, J., et al. (1998). Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. J. Biol. Chem. 273: 31985-31991.
- 5) Sitrin, R. D., et al. (1988). Isolation and structure determination of *Pachybasium* cerebroside which potentiate the anti-fungal activity of aculeacin. J. Antibiotics 41: 469-480.
- 6) Kawai, G., et al. (1985). Fruiting of *Schizophyllum commune* induced by certain ceramides and cerebroside from *Penicillium funiculosum*. Agric. Biol. Chem. 49: 2137-2146.
- 7) Mizushima, Y., et al. (1998). A mushroom fruiting body-inducing substance inhibits activities of replicative DNA polymerase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 249: 17-22.
- 8) Umemura, K., et al. Cerebroside elicitors found in diverse phytopathogens activate defense responses in rice plants. (投稿中).

◀国内情報▶

アブラナ属花粉アレルゲン --- 農学と医学の接点 ---

東北大学 大学院農学研究科
鳥山 欽哉・岡田 崇

アブラナ属花粉症患者血清を用いて、カブから花粉アレルゲンのcDNA (Bra r1) をクローニングした。Bra r1は2カ所のカルシウム結合部位を持つ新規のカルシウム結合タンパク質をコードしていた。類似の花粉アレルゲンは各種牧草や樹木からも報告されている。Bra r1のカルシウム結合部位のアミノ酸を置換したところ、カルシウムとIgEに結合しなくなることを示した。このようなミュータントタンパク質は、免疫療法（減感作療法）に利用できると期待される。

1. はじめに

花粉アレルゲンは、花粉症を引き起こす原因物質であり、IgEとの反応が花粉症の症状を引き起こす。医学的見地からすると、花粉アレルゲンを単離、精製してその性質を明らかにすれば、検査、治療、さらには予防医学の研究へ発展させることができる。一方、植物学的にみると、花粉アレルゲンとなるタンパク質は、花粉形成のどの段階で生産され、花粉のどの部分に局在し、植物自身にとってどのような機能・役割を担った物質なのだろうか。

著者らは、アブラナ科植物の育種や研究に携わる人々から職業性のアブラナ属花粉症を報告した。アブラナ属花粉症は日本ではそれほど問題となっていない。しかし、後から述べるように、ヨーロッパやインドでは数多く報告され、さらに他の植物の花粉アレルゲンと共通抗原性を持つことから、アブラナ属花粉アレルゲン研究は非常に重要であることが明らかとなってきた。

ここでは、著者らがアブラナ属植物からクローニングした花粉アレルゲンの遺伝子を中心として、植物における機能の推定、農学的、医学的応用について紹介したい。

2. アブラナ属花粉アレルゲンは カルシウム結合タンパク質

カブ (*Brassica rapa*) とナタネ (*B. napus*) の成熟花粉をトリス緩衝液などに懸濁した抽出液を試料として、アブラナ属花粉症患者血清 (IgE) を用いたIEFゲルプロットを行ったところ等電点4.5のアレルゲンを検出した。次に、アブラナ属花粉症患者の血清を用いて、カブとナタネのcDNAライブラリーをIgEイムノスクリーニングしたところ、2種類のcDNAクローン (Bra r1, Bra r2) がクローニングできた。塩基配列から予想されるアミノ酸配列の相同性検索を行うと、両クローンともカルモジュリン (CaM) と相同性が見られた。しかし、分子量はCaMの約半分であり、Ca²⁺結合モチーフ (EF-hand) でのみ相同性は高くそれ以外の領域では低いので、新規のカルシウム結合蛋白質であると考えられた。Bra r1は79アミノ酸、Bra r2は83アミノ酸をコードしており、Ca²⁺結合モチーフが2カ所あった。Bra r1とBra r2のアミノ酸配列の相同性は78%であった (図1)。

Bra r1はひとりの花粉症患者 (KT) のIgEと反応する花粉アレルゲンとしてクローニングしたものである。しかし、その後の研究でヨーロッパなどで問題となっているアブラナ属花粉症患者の50%が反応するメジャーアレルゲンであることがわかってきた。

TORIYAMA Kinya, OKADA Takashi

〒981-0855 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1

	<---- EF-hand 1 ---->	<---- EF-hand 2 ---->	
Bra r 1	MAD-----AEHERIFKKFDTDGDKISAAELEEALKKLGSVTPDDVTRMMAKIDTDGDNISFQEFTEFASANPGLMKDVAKVF		79
Bra r 2	...--ATEK...D...AN...S...GD...N...H...IK...E...Y...Y...SD...R...I...		83
Aln g 4	...DHPQDQ...C...AN...S...GD...T...E...KH...E...F...F...N...R...R...V...I...		85
Bet v 4	...DHPQDK...R...R...AN...G...T...I...E...KH...E...F...D...GR...R...L...I...		85
Ole e 3	...DPQEV...R...AN...SS...G...T...T...EEIQ...E...F...E...V...R...R...V...I...		84
Cyn d 7	...---TGDM...H...R...N...L...TD...RT...TSA...E...Q...E...F...D...D...IS...CN...		80
Phl p 7	...---DM...R...N...LS...TD...RT...TSA...E...Q...E...F...D...N...IS...CN...E...		78

図1 Bra r 1と相同性の高い花粉アレルゲンのアミノ酸配列の比較。Bra r 2, カブ; Aln g 4, カバノキ; Bet v 4, シラカバ; Ole e 3, オリーブ; Cyn d 7, バミューダダグラス; Phl p 7, チモシーグラス。Bra r 1と同じアミノ酸を・で示した。2カ所のカルシウム結合部位 (EF-hand 1とEF-hand 2)を持つ。

3. 他の植物に見られる Bra r 1 タイプの花粉アレルゲン

Bra r 1タイプの花粉アレルゲン,すなわち,カルシウム結合部位を2カ所もつ新規なカルシウム結合タンパク質が,シラカバ (Bet v 4), ハンノキ (Aln g 4), バミューダグラス (Cyn d 7), オリーブ (Ole e 3), チモシーグラス (Phl p 7)などの植物から花粉アレルゲンとして報告されている (図1)。これらの花粉アレルゲンは,花粉症患者のIgEに対して互いに交差反応を示すことが報告されている。すなわち, Bra r 1タイプの花粉アレルゲンは広く植物一般に存在し,共通抗原性を持つ重要な花粉アレルゲンであることが明らかとなってきた。

さらに, Bra r 1タイプのカルシウム結合タンパク質が様々な植物に見いだされることから,植物において重要な役割を担っていると考えられる。

4. Bra r 1の発現パターンと花粉管伸長

大腸菌を用いて作製したBra r 1タンパク質に対する抗体を作製して,免疫組織化学的にBra r 1タンパク質の検出を行った。その結果,タペート組織と花粉に存在すること,花粉発育に伴い花粉に蓄積されること,水溶液に溶け出しやすいことがわかった。また,花粉管が伸長している雌しべの切片を観察したところ,伸長している花粉管に沿ってBra r 1タンパク質が検出された。次に,発芽培地中で *in vitro*

で発芽させたナタネ花粉におけるBra r 1の局在を観察したところ,特に花粉管先端部に強いシグナルが検出された。これらの結果と,花粉の発芽・花粉管の伸長にCa²⁺が重要な役割を果たしていることも考え合わせると, Bra r 1は花粉の発芽・花粉管伸長に深く関わっていると考えられた。また, Ca結合タンパク質であることから,カルモジュリンと同様にCa²⁺を通したシグナル伝達に関与していることも予想される。

5. Bra r 1の免疫学的研究と免疫療法への応用

カルモジュリンなどのカルシウム結合タンパク質はカルシウム結合の有無により立体構造が変化する。また, IgEとの結合には立体構造が重要である。そこで, Bra r 1のカルシウム結合モチーフのアミノ酸を置換した組換えミュータントタンパク質を作成して, Ca結合能と花粉症患者のIgEとの結合能を調査した (図2)。先に述べたように, Bra r 1にはカルシウム結合モチーフが2カ所存在する。モチーフ1あるいは2単独のミュータントでは, Ca結合能が半減し,両方置換したミュータントではCa結合が見られなかった。また,モチーフ1あるいは2単独のミュータントでは, IgE結合能が減少し,両方置換したものではIgE結合が激減した。これより,カルシウム結合の有無による立体構造の違いがIgEの結合に重要な役割を果たしていると考えられた。

次に, Bra r 1のミュータントタンパク質のそれぞれをマウスに免疫し,得られるIgGが

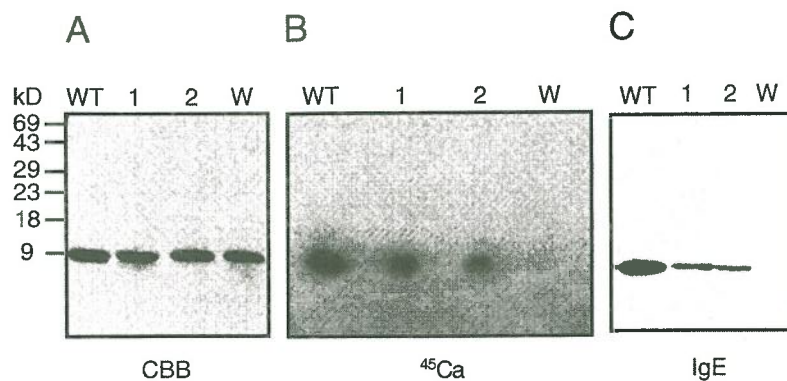


図2 大腸菌で発現させたBra r 1とミュータントタンパク質のカルシウム結合実験とイムノブロット分析。Bra r 1 (WT)、カルシウム結合モチーフ1のミュータント(1)、モチーフ2のミュータント(2)、および、モチーフ1と2のダブルミュータント(W)のタンパク質をSDS-PAGEで分画した。A,クマシーブルー染色;B, ^{45}Ca との結合を検出したオートラジオグラム。C,花粉症患者IgEと反応させたブロット。ミュータントタンパク質ではCa結合能とIgE結合能が低下している。

ネイティブなBra r 1を認識するかを調査した。その結果、いずれのミュータントに対して作成したIgGについてもネイティブBra r 1と反応することがわかった。したがって、これらのIgGはBra r 1を認識するIgEに対する遮断抗体として作用できると期待される。本研究で作成したようなミュータントタンパク質は、副作用の心配無しに免疫療法(減感作療法)に利用できると思われる。

6. おわりに

スギの花粉アレルゲンCry j 1やブタクサのAmb a 1はペクチン酸リアーゼと、スギのCry j 2はポリメチルガラクトナーゼと相同性があることが報告されている。また、シラカバの花粉アレルゲンBet v 1やチモシーグラスのPhl p 5はリボヌクレアーゼ活性を示すことが報告されている。これらの花粉アレルゲンタンパク質は、花粉の抗菌性や、花粉の発芽・伸長に重要な役割を担っていると考えられる。スギなどに比べ、ナタネは遺伝子組換え植物の作成が容易なので、花粉アレルゲンを作らないモデル植物作出研究に最適な材料である。

最近、食べるワクチンを植物で大量生産しようという分子農業も始まっている。今後花粉アレルゲンの研究を進展させるにあたり、農学と医学にまたがった学際研究が必要だろう。

本稿で紹介したBra r 1に対する花粉症患者は実のところ鳥山自身である。血清中に含まれるIgEの量が少ないので、5倍希釈の血清を用いてcDNAスクリーニングを行った。まさしく我が身を削ってクローニングしたものである。アブラナ属植物の交配実験をしているうちに、アブラナ属花粉に特異的な花粉症となってしまった。治療薬を開発して花粉症を克服しなければ、これ以上アブラナ属花粉を使った研究を続けられない。最後に一首。

アブラナの花に恋して如何せん くしゃみ
鼻水 涙ポロポロ (鳥山)

参考文献

- 1) Toriyama et al. (1995) Plant Mol Biol 29: 1157-1165
- 2) Okada et al. (1998) FEBS Lett 434: 255-260
- 3) Focke et al. (1998) Int Arch Allergy Immunol 117: 105-112

◀国内情報▶

穀物遠赤外線乾燥機の開発

生研機構

久保田興太郎, 日高靖之, 市川友彦

遠赤外線と熱風を併用して、循環する穀物を乾燥する新しい乾燥機である、穀物遠赤外線乾燥機を開発し実用化した。遠赤外線は、遠赤外線放射材を塗布した遠赤外線放射体を灯油の燃焼熱により加熱することによって、放射する方式を取った。穀物遠赤外線乾燥機は循環式熱風乾燥機に対し、省エネで、低騒音であった。また、品質についても高品質な穀物乾燥が期待される結果を得た。[本開発は、生物系特定産業技術研究推進機構の農業機械等緊急開発事業及び21世紀型農業機械等緊急開発事業の一環として行われたものである。]

1. はじめに

現在、穀物の多くは循環式熱風乾燥機で乾燥されている。循環式熱風乾燥機の燃料には灯油が用いられるが、高質なエネルギーである灯油に仕事をさせることなく、低温風、すなわち、低質なエネルギーにして、乾燥に利用している。この灯油に仕事をさせ、その排熱をも乾燥に利用すれば、完成したといわれる循環式熱風乾燥機より優れた乾燥機を開発できる可能性があると考えた。そこで、物体を加熱することにより発生し、乾燥に有効とされる遠赤外線に注目して、穀物遠赤外線乾燥機の開発を行った。なお、本開発は、生研機構と、共同開発企業の井関農機(株)、金子農機(株)、(株)佐竹製作所、静岡製機(株)、(株)山本製作所で行った。

2. 概要

穀物遠赤外線乾燥機と循環式熱風乾燥機における、熱エネルギーの利用方法を図1に示す。循環式熱風乾燥機では、灯油バーナで作り出された火炎と外気とを混合して40~50℃の熱風を作り、穀物間を通過させて乾燥を行う。穀物
KUBOTA Kotaro, HIDAKA Yasuyuki, ICHIKAWA Tomohiko
〒331-8537 大宮市日進町1-40-2

物遠赤外線乾燥機では灯油バーナで作り出された火炎で遠赤外線放射体を加熱して遠赤外線を発生し、穀物に照射して乾燥エネルギーとともに、その放射体より排出される排熱も乾燥に利用する。すなわち、穀物遠赤外線乾燥機は、遠赤外線を乾燥に用いる点で、循環式熱風乾燥機と相違している。なお、遠赤外線放射体の加熱に電気を用いることも考えられるが、実用化を考慮して安価な灯油を用いている。

穀物遠赤外線乾燥機は遠赤外線放射体を穀物の循環経路に有する構造となっている。穀物遠赤外線乾燥機の例を図2に示す。左側が穀物遠赤外線乾燥機である。右側は同じ張込量の循環式熱風乾燥機である。穀物遠赤外線乾燥機は製造コスト及び普及を考慮して、共同開発企業5社の循環式熱風乾燥機を母体に行っている。また、遠赤外線放射体は遠赤外線放射材を塗布したステンレスパイプであり、遠赤外線放射材としてシリコン樹脂系塗料を用いている。

3. 性能

(1) 乾燥性能

乾燥実験を実施するにあたり、穀物遠赤外線乾燥機と循環式熱風乾燥機を近接して設置し、環境条件を同一にするようにした。また、穀物性状に起因した乾燥状態の差を生じさせ

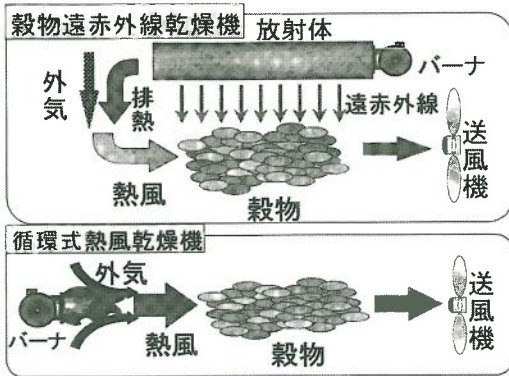


図1 穀物遠赤外線乾燥機と循環式熱風乾燥機における熱エネルギーの利用方法

ないように、同一圃場から収穫した穀物を、それぞれの乾燥機に、均等に張込むようにした。

乾燥経過の例を図3に示す。穀物遠赤外線乾燥機は乾燥初期において循環式熱風乾燥機より遅いが、その後速くなる傾向があった。乾燥初期に遅くなる原因として、遠赤外線放射体を加熱するために時間を要することが考えられる。乾燥性能を表に示す。乾燥速度は、小麦で平均0.8%/h、粳で平均0.7%/h程度であった。乾燥のために要するエネルギーについては、灯油1kgで除去できる水分質量、及び消費電力量1kWhで除去できる水分質量を求め、穀物遠赤外線乾燥機と循環式熱風乾燥機を比較した。穀物遠赤外線乾燥機と循環式熱風乾燥機の比を、それぞれ比除水率[熱]、比除水率[電気]として表わした。比除水率[熱]は小麦で平均108%、粳で平均110%程度となり、比除水率[電気]は小麦で平均124%、粳で平均140%程度となった。これは、循環式熱風乾

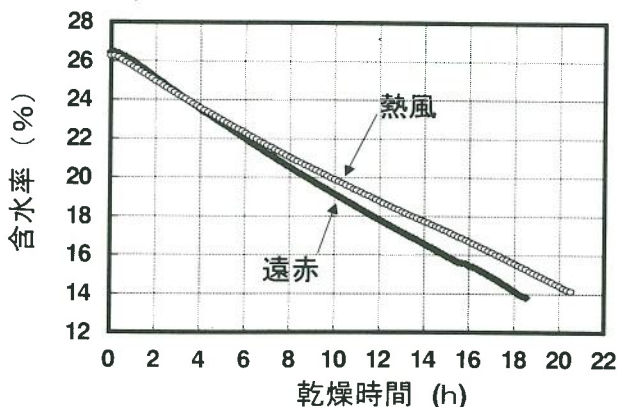


図3 乾燥経過(例)

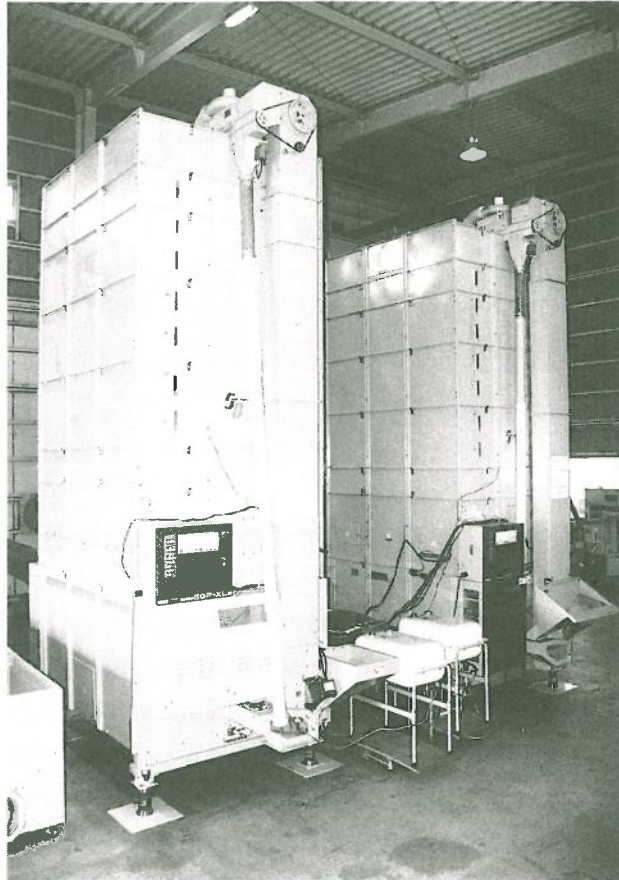


図2 穀物遠赤外線乾燥機の例(左側)

燥機と比較して、穀物遠赤外線乾燥機の消費エネルギーが少ないことを意味しており、地球温暖化の原因の一つであるCO₂の削減にも貢献できるものと考えられる。

(2) 騒音

騒音も環境問題となっている。そこで、JIS Z8731「騒音レベル測定法」にもとづき、指示騒音計(JIS C1502)を用い、乾燥機からの距

表1 乾燥性能

	小麦	粳
乾燥速度 (%/h)	0.78	0.72
比除水率 [熱] (%)	108.2	110.4
比除水率 [電気] (%)	123.8	139.9

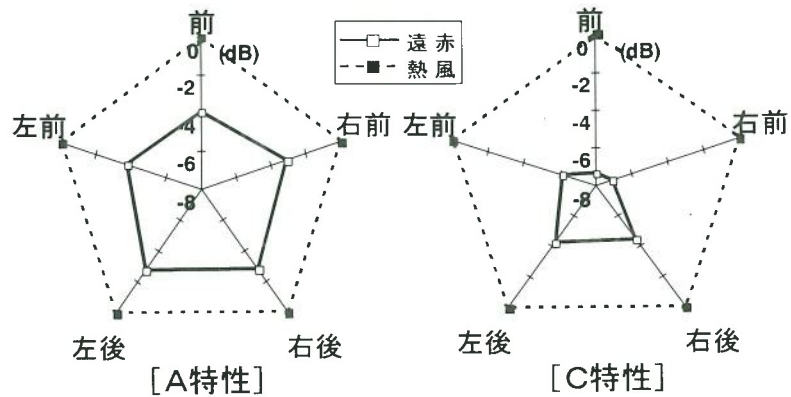


図4 穀物遠赤外線乾燥機と循環式熱風乾燥機との騒音差

離1m, 高さ1.2mの位置で多数点測定し, 一定時間の平均的な値を読み取り, 穀物遠赤外線乾燥機と循環式熱風乾燥機の騒音を比較した。なお, 乾燥機運転時騒音と暗騒音との差は10dB以上のもので測定を行った。遠赤外線乾燥機の騒音は, 前方[バーナ側]はA特性で平均75dB, C特性で平均79dB, 後方[ファン側]はA特性で平均79dB, C特性で平均82dBであった。穀物遠赤外線乾燥機と循環式熱風乾燥機との騒音差を図4に示す。前方ではA特性で約4dB, C特性で約7dB低減し, 後方ではA特性で約3dB, C特性で約4dB, 遠赤外線乾燥機の騒音が低減した。遠赤外線を乾燥エネルギーとして利用する穀物遠赤外線乾

燥機は, そのエネルギーをすべて熱風による循環式熱風乾燥機に対し, 風量を低く設定できることと, 遠赤外線放射体内で燃焼が行われるため, その放射体が消音器の役割を果たしバーナ音が小さくなるなることが, 騒音低減の要因と考えられる。

(3) 品質

品質劣化を来さないように穀物を乾燥するのが重要である。最も重要なものは, 精米のときに砕粒となる可能性の大きい, 玄米の強度の胴割れ, すなわち重胴割れを起こさないことである。乾燥前後の籾を手剥きして, 透視器を用い, 胴割れ測定を肉眼で行い, 乾燥

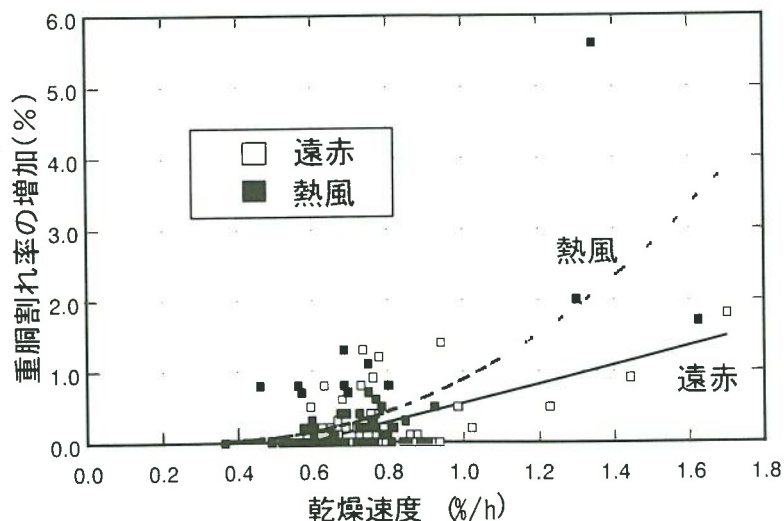
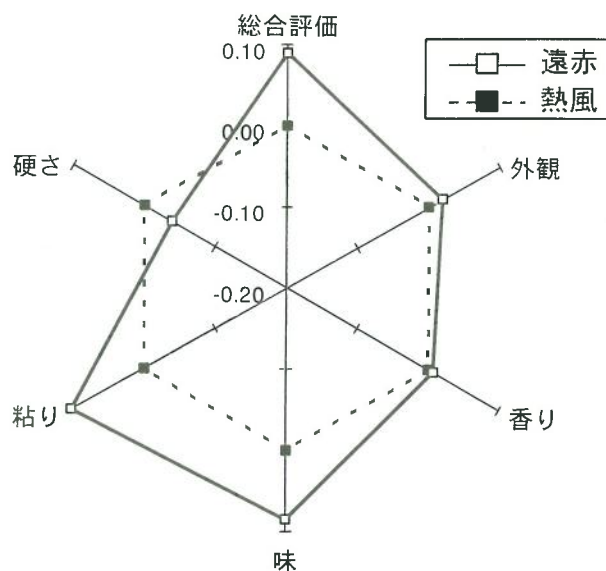


図5 乾燥速度と重胴割れ率の増加



(平成7～9年度の平均値)

図6 食味

〔(財)日本穀物検定協会試験結果より作成〕

前後の重胴割れ率の差をその増加として示した。図5に示すように、穀物遠赤外線乾燥機での重胴割れ率の増加は、2%以下であった。しかし、乾燥速度が大きい場合については、実験回数が少なく、さらに検討が必要である。また、米の食味について、外観、香り、味、粘り、硬さ、総合の各項目ごとに7段階評価する食味官能試験を実施し、穀物遠赤外線乾燥機で乾燥した米と循環式熱風乾燥機で乾燥した米の差を検討した。図6に示すように、穀物遠赤外線乾燥機で乾燥した米は循環式熱風乾燥機で乾燥した米と比較して、粘りが増大して、総合評価が高くなり、食味向上が期待される。しかし、その要因については明らかではない。

5. おわりに

穀物遠赤外線乾燥機といえども、適期収穫を励行することが必要で、当然のことながら、品質の悪い穀物を良くできるものではない。穀物遠赤外線乾燥機を適切に使用されることが望まれる。

穀物遠赤外線乾燥機が市販され、普及し始めている。さらに、日本全国からの情報を得て、改良を進める必要がある。

最後に、穀物遠赤外線乾燥機の完成は共同開発企業5社の尽力によるところが大きい。また、開発遂行にあたり、農林水産省、農協、農家等、多くの方々の協力を頂いた。関係者各位に感謝する。

◀地域の先端研究▶

植物ディフェンシン遺伝子の利用による イネ耐病性育種

富山県農業技術センター

荘司 和明

抗菌活性を有するペプチドの中には、システイン残基に富み類似の三次構造を示すディフェンシンと呼ばれる一群が存在する。カイワレダイコンの種子からクローン化した植物ディフェンシンは大腸菌の細胞分裂を強く阻害するとともに、イネいもち病菌の生育も抑制する。この遺伝子をイネに形質導入したところ、組換えイネはいもち病耐性を示すことから植物ディフェンシン遺伝子は作物の耐病性育種に有用であることが示された。

1. はじめに

一見、無防備と思われる植物は病原体の侵入に対して二重、三重の防御機構を持つことが明らかになっている。細菌や糸状菌などの病原体の攻撃に対しては、クチクラ層による物理的防御をはじめ、ファイトアレキシンと呼ばれる抗菌性の二次代謝産物を生産し防御する機構。また、過敏反応 (hypersensitive response) によって自らの細胞を破壊して病原菌を局所的に隔離し、その生長を抑制するとともに、サルチル酸、ジャスモン酸、エチレンなどの低分子物質(ストレスホルモン)の産生を誘導し、病害などの情報を素早く全身に伝え、植物体全体が一時的に病原菌に対して抵抗性を示す全身獲得抵抗性 (systemic acquired resistance; SAR) 現象が知られている¹⁾。現在、ストレスホルモンによって病原体の感染時に特異的に発現するPRタンパク質 (pathogenesis-related protein) の存在が多数認められているが、これら一連のPRタンパク質遺伝子が発現することでSAR現象が誘起されるものと考えられる。

植物ディフェンシン (plant defensin) はPRタンパク質の一種で分子量5 kDa前後の抗菌性ペプチドであり、これまで13種以上の植物に存在することが明らかになっている²⁾。著者はカイワレダイコンの種子からクローン化

SHOJI Kazuaki

〒939-8153 富山市吉岡1124-1

したディフェンシン遺伝子を利用してイネへの形質転換による耐病性育種を試みている。

2. 病害抵抗性遺伝子導入植物

植物に遺伝子導入がなされた当初、ウイルスの外被タンパク質遺伝子の導入によるウイルス病抵抗性植物が盛んに作られた。現在ではウイルス移行タンパク質遺伝子、あるいはウイルスのRNA複製酵素遺伝子等を利用したウイルス病抵抗性植物が研究されている。細菌病に対しては溶菌酵素遺伝子であるT4ファージのリゾチーム遺伝子、抗菌性ペプチドである昆虫由来のザルコトキシン、植物由来のチオニン等がある。また、糸状菌類に対してはキチナーゼや β -1,3-グルカナーゼなど菌類の細胞壁に働き溶菌を促すPRタンパク質遺伝子、リボソーム不活化タンパク質遺伝子、タウマチン様タンパク質遺伝子等を利用した遺伝子導入植物がここ数年の間に数多く報告されている。

3. 植物ディフェンシンの特性

多くの生物は、外部からの微生物の侵入に対して何らかの防御手段を持っている。その中でシステイン残基に富み、20~40アミノ酸残基からなる抗菌活性を持つ塩基性ペプチドをディフェンシンと呼んでいる。これまで昆虫や両生類、軟体動物、ほ乳類など主に動物

M A K F A S I I V L L F A A L V V F S A F E A P Y M V E A Q 30
 K L C Q R P S G T W S G V C G N N N A C K N Q C I R L E K A 60
 R H G S C N Y V F P A H K C I C Y F P C 80

図1 カイワレダイコンからクローン化した植物ディフェンシン(ラディシン)のアミノ酸配列。

N-末端側はシグナル配列で、矢印の位置でプロセッシングを受け成熟型(分子量5.7kDa)になる。下線部分は植物ディフェンシンに共通のアミノ酸配列。

の血液細胞中で多く発見されてきた。近年、様々な植物において、特に種子中にこれらディフェンシンと類似のペプチドが存在することが明らかとなり、植物ディフェンシンと呼ばれている³⁾。植物ディフェンシンの特徴は、45~54アミノ酸残基から成り、8個のシステイン残基と2個のグリシン残基、1個のグルタミン酸残基が特定の場所に共通して存在していることである。分子量やシステイン残基を8個もつことはムギ類で見出されたチオニンと呼ばれる抗菌性ペプチドと似ているが、アミノ酸配列での相同性はなく構造的にも異なることから別のグループに位置づけられている。NMRによる三次構造解析により植物ディフェンシンのシステイン残基はすべてS-S結合に使われており、2つの逆平行β-シートと1つのα-ヘリックスの3つのストランドから構成されていることが明らかになっている。α-ヘリックスは2ヶ所のS-S結合で1つのβ-シートと結合しており、いわゆる安定型のα-ヘリックス構造を示すことから、ほ乳類よりは昆虫のディフェンシンに近い構造をもっている。図1にカイワレダイコンからクローン化したディフェンシン遺伝子がコードするペプチド(ラディシンと命名)のアミノ酸配列を示す。

4. 植物ディフェンシンの抗菌性

動物ディフェンシンの一種であるセクロピンは微生物の細胞膜に入り込みカルシウムのイオンチャンネルの働きを阻害することから、植物ディフェンシンも同様の働きにより抗菌性を示すものと推定される。筆者はカイワレ

ダイコンの種子からクローン化したラディシン遺伝子について、その抗菌性を確認する試みを行った。まず最初にクローン化したラディシン遺伝子を大腸菌内で大量発現させることで抗菌性ペプチドを大量に得ることを試みた。発現ベクター(pKK223-3)のtacプロモーター下流にラディシン遺伝子を繋ぎ、IPTG添加により発現を誘導した。大腸菌はIPTG非存在下では通常の生育を示すが、IPTG添加によりラディシンを発現すると同時に生育が強く阻害される現象が認められた⁴⁾。これは菌の形態が細長いフィラメント状を呈し、細胞分裂が阻害されているためである(図

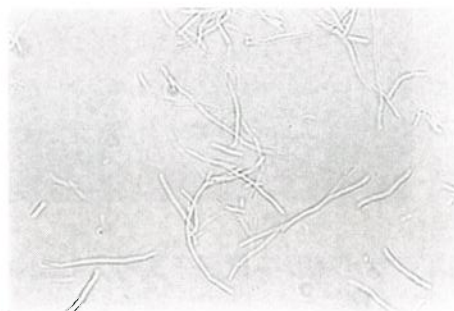


図2 ラディシン遺伝子を発現している大腸菌。細胞分裂が阻害され線状の形態を示す。

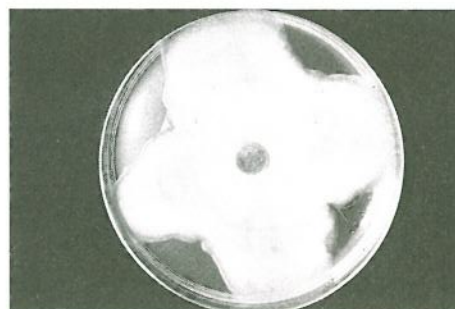


図3 ラディシンによるイネいもち病菌の生育阻害。培地4ヶ所にラディシンを添加している。

2)。また、このようなラディシンを発現している大腸菌からラディシンを精製し、イネいもち病菌の生育プレートに添加すると、いもち病菌の生育をも強く抑制した(図3)。これらのことから、ラディシンは細菌および糸状菌に直接作用しその生育を抑制すると考えられた。しかし、どのような細菌や糸状菌に対しても同様の抗菌性を示すかは現在のところ未定であるが、その作用機作から推定して幅広い病原菌に対して抗菌性を有することが期待でき、遺伝子組み換えによる耐病性獲得のためのドナー遺伝子として有望であると思わ

れた。

5. ラディシン遺伝子導入イネの育成

イネの主要病害菌であるいもち病菌には多くのレースが存在し、イネの真性抵抗性遺伝子(13種類)を持つ品種への感染能力によって特定のレース番号が与えられている。従来からの交配育種では、真性抵抗性遺伝子を利用したいもち病抵抗性育種が進められてきた。しかし、いもち菌は変異を起こしやすく、せっかく育成した抵抗性品種であっても新たに出

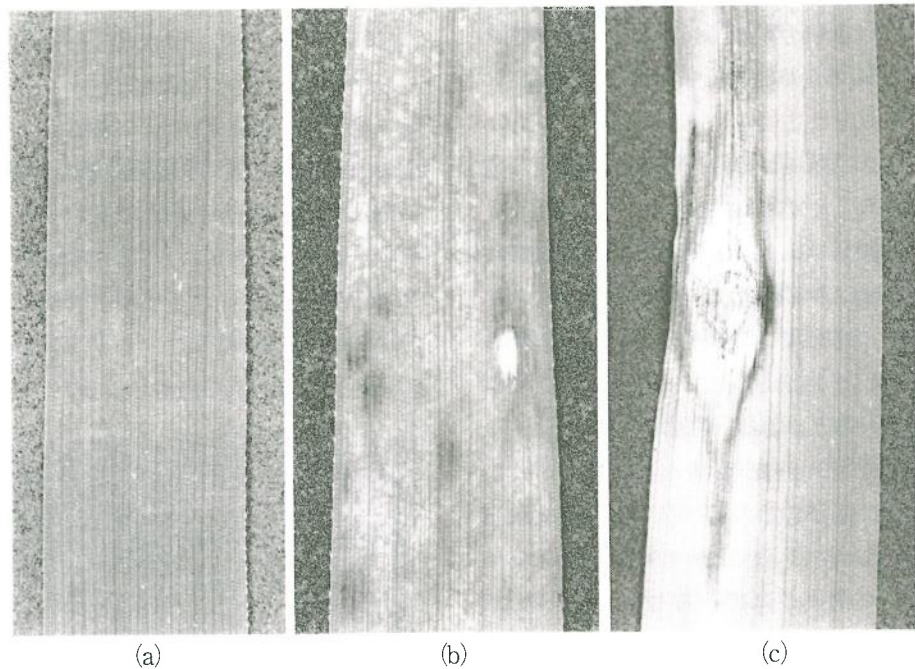


図4 ラディシン遺伝子を導入した組換えイネにおけるいもち病菌接種による病斑の違い。

(a) 抵抗性の最も強い組換え系統、(b) 抵抗性が中程度の組換え系統、(c) 非組換え体。



図5 非閉鎖系温室内での組換えイネの栽培。

現してきた別のタイプのいもち菌レースによって抵抗性が発揮できない、いわゆる抵抗性の崩壊現象が生じることが大きな問題になっている。そこで菌レースとは無関係に抵抗性を発揮できると思われる抗菌性タンパク質遺伝子を導入した形質転換体が注目されている。

ラディシン遺伝子をイネの耐病性育種に活用するため、富山県の水稲育成系統である富山36号（現在は「来夢36」という名称がついている）に導入し約90個体の形質転換体を得た。これらの形質転換体において外部形態、その他出穂期などの農業形質等に関して異常は見られなかった。また、それぞれの形質転換体から種子を取り、次世代においてサザン解析およびRT-PCR解析を行ったところ、導入遺伝子の一部が欠失した個体が見られたものの殆どの形質転換体は正常に導入遺伝子を保持していた⁵⁾。さらに、三葉期においてイネいもち病菌を接種し耐病性を調べたところ病斑が殆ど見られない系統から、わずかに抑制される程度の系統まで様々であった（図4）。現在、最も強く病徴が抑制された系統について閉鎖系温室での安全性評価を終え、非閉鎖系温室での安全性評価を行っている（図5）。これらの過程でも外部形態、花粉稔性等に異常は認められず、フェノール酸分析および揮発成分分析においても非形質転換体と同一性

を示している⁶⁾。

6. おわりに

ディフェンシンペプチドは動物の免疫系とは別の生体防御機構として、動物のみならず広く生物種に共通して存在しているメカニズムである。その中で植物ディフェンシンの存在は他のPR遺伝子同様、病原菌に対する抵抗性遺伝子として植物の耐病性に深く関わっていると思われる。植物が本来もっているこのような抵抗性遺伝子を作物の育種に広く活用することが今後ますます期待される一方、その抗菌機構についてより詳細に研究を行う必要がある、また、組み換え食品として十分な安全性評価を行う必要があると考えている。

文 献

- 1) Ryals, J., Ukness, S. and Ward, E. (1994) *Plant Physiol.*, 104. 1109-1112.
- 2) Broekaert, W. F., et al (1995) *Plant Physiol.*, 108. 1353-1358.
- 3) Terras, F. R. G., et al (1995) *Plant Cell* 7. 573-588.
- 4) 莊司 (1997) *育種学雑誌* 47 (1). 83.
- 5) 莊司 (1997) *育種学雑誌* 47 (2). 94.
- 6) 莊司 (1998) *育種学雑誌* 48 (2). 130.

◀文献情報▶

卵巣における growth differentiation factor-9 (GDF-9) のパラクリンの作用

Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary

Julia A. Elvin, Amander T. Clark, Pei Wang, Neil M. Wolfman and Martin M. Matzuk

Molecular Endocrinology, 13: 1035-1048 (1999)

transforming growth factor- β (TGF- β) スーパーファミリーに属するタンパク質は、動物における胚発生時から成体に至るまでの細胞増殖・分化、マトリックスの形成、アポトーシスの制御に広く関与している。この中でGDF-9は、マウスでは原始卵胞を除く全ての発生段階の卵胞および排卵後(受精後1.5日で消失)の卵子で特異的に発現していることが確認されている。しかしながらGDF-9ノックアウト雌マウスでは一次卵胞以降での(成熟卵胞に至るまで)正常な卵胞発育がみられず不妊であることがDongらにより報告されており、成長期の卵胞におけるGDF-9の役割が不明であった。本論文はGDF-9タンパクのマウス卵巣における局在と成熟卵胞における顆粒膜細胞および卵丘細胞におよぼすリコンビナントマウスGDF-9の作用を報告している。GDF-9の発現は一次卵胞以降の卵子でみられ、その発現量は卵胞発育とともに増加し排卵前の卵

胞内卵子で最も高くなっていた。in vitroでリコンビナントマウスGDF-9は顆粒膜細胞および卵丘細胞におけるヒアルロン酸合成酵素(HAS2), cyclooxygenase 2およびsteroidogenic acute regulator protein 遺伝子の mRNA の発現を誘導し, urokinase plasminogen activator およびLH receptor 遺伝子の mRNA の発現を抑制した。これらは排卵直前の顆粒膜細胞および卵丘細胞における発現動態あるいは卵子または卵子由来因子の存在下で顆粒膜細胞および卵丘細胞を培養した場合に誘起される発現動態と類似していた。マウスにおいて卵子由来因子は卵丘細胞の膨化に必須であるにもかかわらず, GDF-9は卵子の非存在下で卵丘膨化を誘起した。以上の結果はGDF-9は顆粒膜細胞および卵丘細胞における正常排卵および受精に必要な酵素群をパラクリン的に制御していることを示していた。卵母細胞は顆粒膜細胞および卵胞膜細胞と相互作用しながら卵胞内で発育, 分化する。長年にわたり卵子由来因子による顆粒膜細胞および卵丘細胞へのパラクリンの作用は証明されていたにもかかわらず分子レベルでの同定は明らかにされていなかった。今回の結果はGDF-9がこの因子の候補であること, 一次卵胞から排卵に至るまでの卵子発育を卵子自身が積極的に制御していることを証明するものであった。(抄訳: 木村直子—東北大学大学院農学研究科)

◀文献情報▶

倍数性 (Ploidy) の違いによる 遺伝子発現制御

Ploidy Regulation of Gene Expression

Timothy Galitski, Alok Saldanha, Cora A. Styles, Eric S. Lander, Gerald R. Fink

Science, 285, 251-254 (1999)

生物学者は細胞の通常の倍数性 (ploidy: 完全な染色体の対 (ついで) 数) は2倍体 (2n) から1倍体 (n) であると考えがちである。しかし, 高次倍数体 polyploidy (2倍体より大きいもの) の例は植物や動物では豊富にある。バナナは

3倍体 (3n) であり, 小麦は6倍体 (6n), そして少なくとも花を付ける植物の自然種の半分は高次倍数体である。高次倍数体の動物は少ないものの, 鮭やある種の両生類では倍数性を2倍化, 3倍化することでその進化を引き起こしている。

ほとんどの植物や動物はDNAが重複化する endoreduplication cycle により, ある部分に高次倍数体細胞の特殊細胞群を生じさせている。例えば megakaryocyte (血液血小板を生み出す細胞) の倍数性は16nから64n, cardiomyocytes (心臓筋肉細胞) では4nから8n, そして hepatocytes (肝臓細胞) では

2n から 8n の範囲にある。また、多くのガン細胞は高次倍数体であるが、その倍数性の増加が腫瘍の発達に関係しているかどうか現在関心が持たれている。

このように細胞の倍数性の変化は、通常の状態（多細胞期間における差異、進化過程、そして有糸分裂 mitosis や減数分裂 meiosis による DNA の複製や細胞分裂）や、病気などの異常な状態下で見られる。

細胞での倍数性の違いは、遺伝子的には DNA 配列情報は同一であるが遺伝子の相対的な量が違う、というだけであるが、細胞の生理学的、形態的、挙動の面でしばしば著しい違いを生じさせている。これが何によるのか、興味のあるところであった。

Galitski, Fink らは酵母を使った巧みな研究によりこの問題に満足すべき知見を提供した。現時点でこの種の研究に対して厳密な実験を行うことのできるのは酵母においてのみであり、酵母はゲノム上のすべての遺伝子の発現に関する解析をほぼ完全に行うことのできる唯一の真核生物細胞である。彼らは最初に、完全に遺伝的に同一であり倍数性のみの異なる (n, 2n, 3n, 4n) 酵母セットを作成した。そして倍数性の違いによる遺伝子発現機構の違いについて、最新の DNA chip テクノロジーを使用し、倍数性だけが異なる酵母株のすべての

遺伝子の mRNA レベルを解析する、というエレガントで精密な実験を行った。そして 1 倍体から 4 倍体へ倍数性が変化するにともなうて遺伝子の発現が増加、または減少する遺伝子データを 1 倍体と 4 倍体株で遺伝子発現量に 10 倍の差のあるものを検索し、倍数性が上がるにともなうて増加する遺伝子 10 ケと、減少する遺伝子 7 ケを見いだした。例えば *CLN 1* (細胞周期をコントロールする蛋白, G 1 サイクリン) は 1 倍体のものと比べ 4 倍体では 10 倍低下した。高次倍数体倍細胞や組織はふつうその 2 倍体と比較して大きく、そして代謝も活発である。G 1 サイクリンのレベル低下は、G 1 期から S 期に向かう “START” を遅らせ、その結果 G 1 期の間細胞のサイズが大きくなることが知られている。Galitski らの倍数性依存の G 1 サイクリン抑制は、高次倍数体化にともなうて細胞のサイズが大きくなることを説明できる。Galitski らは同様にして *CTS 1* (cell adhesion), *GIC 2* (cell sharp), そして *Flo11* (inversiveness) の、倍数性依存誘導に関連した表現系との関係についても満足すべき関係を明らかにした。酵母で得られたこれらの見解は他の細胞にも適応でき、今後この分野の研究の進展が期待される。

(抄訳：家藤治幸—国税庁醸造研究所)

◀文献情報▶

植物ゲノムの機能解析の道具： キメラ RNA / DNA オリゴヌクレオチドが *in vivo* で遺伝子 特異的変異を引き起こす

A tool for functional plant genomics: Chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause *in vivo* gene-specific mutations.

Beetham, P.R., Kipp, P.B., Sawycky, X.L., Arntzen, C.J. and May, G.D.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8774-8778. (1999)

シロイヌナズナをはじめとする多くの植物でゲノム解析が行われ、新しい遺伝子が単離されている一方で、これらの遺伝子の機能の

決定はそれに追いつかない状況にある。植物では、特定の遺伝子を knock out あるいは相同組換えをする技術は確立していない。アンチセンスやコサプレッションなどのジーンサイレンシング現象を利用することで、内生遺伝子の発現が抑制された形質転換体による遺伝子の解析が可能になった。しかし、この技術は、遺伝子ファミリーの中の個々の遺伝子や、他の遺伝子に類似した塩基配列をもつ遺伝子の機能解析には不向きなこと、また技術的に問題があることが知られている。最近、哺乳類の細胞で、目的遺伝子の部分配列を含んだ RNA / DNA キメラオリゴヌクレオチドを細胞内に導入することで、内生遺伝子の特定の領域に変異を作出することが可能になった。

このキメラオリゴヌクレオチドは、目的遺伝子の部分配列のプラス鎖とその相補鎖（マイナス鎖）の両端が、4塩基のチミンでヘアピン構造でキャップされている。目的遺伝子の部分配列の中央には標的になる塩基が結合する。プラス鎖はDNAのみで構成されている。一方、マイナス鎖はRNAで構成されているが、標的の塩基と、その上下流2塩基はDNAで構成されている。RNAは、リボースの2'-Oがメチル化され、RNaseHによる分解を受けないようになっている。本論文では、このキメラオリゴヌクレオチドを用いた技術が、植物細胞に適用できるかをタバコの培養細胞を用いて検討した。

キメラオリゴヌクレオチドが内生遺伝子の特定の塩基を置換することが可能であるかを、タバコのアセトラクテート合成酵素(ALS)遺伝子を用いて検討した。タバコのALSでは、196番目のアミノ酸であるプロリンの置換はsulfonylurea系除草剤に抵抗性を示し、imidazoline系などの除草剤には抵抗性を示さない。タバコの2種類のALS遺伝子(SuRA, SuRB)のうちSuRA遺伝子を目的遺伝子に設定し、196番目のプロリンに相当するコドンを中心を含む部分配列25塩基からコドン中央の塩基CをAあるいはTに置き換えた2種類のキメラオリゴヌクレオチド(CO ALS 1, CO ALS 2)を作成した。キメラオリゴヌクレオチドはパーティクルガンを用いてタバコの培養細胞に導入した。パーティクルガン処理後の細胞を、sulfonylurea系の除草剤を含む固形培地上で培養した。その結果sulfonylurea系除草剤に抵抗性、かつimidazoline系の除草剤に感受性の細胞塊が、コントロールの20倍の効率で得られた。この結果から、CO ALS 1とCO ALS 2は、タバコのALS遺伝子の、196番目のプロリンに相当するコドン構成する塩基を特異的に置換したものと予想された。

SuRA遺伝子のPCR産物をクローニングして、塩基配列を決定したところ、コドン1番目の塩基が置換されたクローンが単離された。SuRB遺伝子特異的なPCR産物については置換が認められなかった。このことから、CO ALS 1とCO ALS 2は、196番目のプロリンをコードする塩基を、SuRA遺伝子特異的に置換したことが分かった。また、置換を受けた塩基はキメラオリゴヌクレオチド上に設計したコドンの中央の塩基ではなく、5'側に隣接する塩基であることが分かった。

特定の遺伝子の特定の領域に塩基を挿入することで、フレームシフトの誘導が可能であるかをgreen fluorescent protein (GFP) 遺伝子を用いて検討した。1塩基が欠失してフレームシフトが起き、機能が欠損したGFP遺伝子を導入したタバコの形質転換体を作成した。本来の機能型GFP遺伝子の部分鎖を含むキメラオリゴヌクレオチドを設計し、形質転換植物の培養細胞に導入したところ、GFP活性のある細胞塊が得られた。GFP遺伝子にはない配列を含んだキメラオリゴヌクレオチドを処理した場合、GFP活性のある細胞は得られなかった。この結果から、キメラオリゴヌクレオチドによって、機能欠損型GFP遺伝子の塩基の欠失部分に塩基が挿入されてフレームシフトが起こり、GFP遺伝子の機能が回復したものと考えられた。

このことから、キメラオリゴヌクレオチドを用いて、(対立) 遺伝子特異的な変異(特定の塩基の置換、特定の部分への塩基の挿入)が、植物細胞で可能であることが明らかになった。これら2種類の変異を同時に起こすことが可能になれば、キメラオリゴヌクレオチドによる変異の導入はゲノムの機能解析のための有用な手段になるものと考えられる。(抄訳：小杉祐介—東北大学院農学研究所)

◀文献情報▶

エチレンは胚珠の発達を制御している。

Silencing gene expression of ethylene-form-

ing enzyme results in a reversible inhibition of ovule development in transgenic tobacco plants.

Domenico De Martins and Celestina Mariani

The Plant Cell, 11, 1061-1071 (1999)

エチレンと聞いて大方の人が思い浮かべるのは、「果実の成熟あるいはセネッセンス」といったところではないだろうか。ところが、エチレンは実に多彩な機能を持ち (Abele 等, 1992), 最近の論文では TMV の抵抗性の発現にも関与していることが報告されている。(Ohtsubo 等, 1999)。さて、生殖についてである。受粉後の花卉のセネッセンス、キュウリの雌花誘導に関与していることはよく知られており、生殖器官の発達を制御している可能性も指摘されてはいたが (Tang 等, 1994), 今一つ明確ではなかった。ここに紹介する論文はエチレンに胚珠の発達制御という機能があることを極めて明確に示したものである。

胚珠の発達は胎座の上に胚柄、珠心、珠皮の原基が形成されることにより始まるが、これらの原基には既に 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase (ethylene forming enzyme, エチレン生合成の最終ステップを触媒) の発現が認められる。次に、減数分裂が始まり大孢子嚢形成過程に移行するが、この過程でもこの酵素は胚珠、珠心、種皮で発現し続ける。珠心が退化し胚嚢が完成すると珠皮と孢子嚢に限定的に発現されるようになる (胚珠発達過程の詳細な顕微鏡写真あり。形態の不得意な人にお勧め)。この結果はエチレンが胚珠の発達の初期から成熟にいたる過程に何らかの寄与をしていることを示すものである。

では、エチレン発生を抑制すると胚珠の正

常な発達は起こらないのか?そこで、著者らはアンチセンスと co-suppression で ACC oxidase の発現を抑制したタバコの胚珠発育を探ることにする。組み換え体の中から選抜した雌性不稔個体 (花粉稔性はあり) は、珠皮が珠心を完全に覆うことができず、胚嚢細胞も未発達のままであった。ACC oxidase の発現 (エチレン生成) は胚珠の成熟を促すものと考えられる。

更に、エチレン発生剤であるエテフォンをこの組み換え体に投与すると胚珠は正常な発達を遂げること、エチレンの作用抑制剤である STS を同時に作用させた場合は未熟なままであることから、エチレンそのものの作用であることが確定できる。

この報告は何度も述べたことだが、エチレンが胚珠発達をコントロールしていることを示すものである。ところが、この現象はタバコに特有なことなのか、それとも他の植物、被子、裸子植物問わずおこる普遍的なことなのかということが、次の大きな問題になってくる。キュウリ雌花の発現機構はタバコと同様な機構で胚珠の発達を制御しているためであろうと容易に想像されるが、その他の植物ではどうなのであろうか。通常、研究者はある植物で明らかになった事実を他の植物で確かめてみることに余り高い価値をおかないのだが、いろいろな植物で確認されることを期待したい。

(抄訳: 岩井純夫—鹿児島大農学部)

◀文献情報▶

アルコール (エタノール) はインターロイキン-8 (IL-8) と腫瘍壊死因子 (TNF) の産生を阻害する --p38 経路の役割--

Alcohol (Ethanol) Inhibits IL-8 and TNF : Role of the p38 Pathway

Saman Arbabi, Iris Garcia, Gregory J. Bauer, and Ronald V. Maier

Journal of Immunology, 162:7441-7445. 1999

外傷や熱傷を負った患者がアルコールを大量に摂取すると感染症を併発するリスクが高くなることが知られている。しかしこれまでそのメカニズムは不明であった。Arbabi らはヒト単球を用いてアルコールがマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAP キナーゼ) の 1 種である p38 を介した IL-8 と TNF の産生を阻害することを報告した。

グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポポリサッカライド (LPS) は単球を活性化し種々のサイトカイン産生を促すことが知られている。

これらサイトカインの中でも IL-8 と TNF は細菌の侵入に対する急性期の炎症反応の調節に重要な役割を果たしている。一方、MAPキナーゼの1種である p38 はその分子中の隣接したセリンとトレオニン残基がリン酸化されることにより活性化され、LPS によるサイトカインの誘導など細胞内のシグナル伝達に関与していることが知られている。

健康なヒト血液より分離した単球を LPS で刺激すると、活性型 p38 が増加することが抗活性型 p38 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより確認された。しかし、LPS で刺激する前にエタノール (0.2~0.8%) で前処理を行うと、容量依存的に活性型 p38 の量が減少することが判明した。

IL-8 に関しては ELISA 法で測定を行ったが、活性型 p38 の場合と同様に、LPS の刺激により誘導される IL-8 はエタノールの前処理によって減少した。IL-8 の場合は、0.1% という低濃度のエタノール処理でも、誘導される量に減少が認められた。

また、p38 の特異的な阻害物質である SB202190 で前処理を行っても、LPS の刺激により誘導される IL-8 の量は減少した。さらにノーザンブロットによる解析でもヒト単球を

エタノールまたは SB202190 で前処理すると、LPS 刺激による IL-8 の mRNA の発現量が減少することが観察された。

TNF- α の場合、IL-8 と同様に ELISA 法で測定を行ったが、ヒト単球をエタノールまたは SB202190 で前処理すると LPS 刺激により誘導される量が減少した。

以上のような結果から彼等は、エタノールがヒト単球中でシグナル伝達に関与している p38 の活性化を阻害するため、LPS 刺激により誘導される IL-8 と TNF の量が減少すると報告した。このエタノールによる p38 活性化の阻害について、そのメカニズムの詳細については不明であるとしているが、一つの推測として、p38 のリン酸化に関与しているフォスホリパーゼ D がエタノールを誤って基質として認識してしまうために p38 のリン酸化が起こらないのではないかと述べている。

また臨床的には、重篤なけがを負った患者の 30% 程度が 0.2% 以上の血中アルコール濃度を示すため、0.1% という低濃度のエタノールが IL-8 の産生に影響を与えるという今回の実験結果は、その後の感染症予防などを考えるにあたって注目すべきことである。

(抄訳：中島浩一マルハ(株)中央研究所)

◀海外便り▶

植物分子遺伝学のモデルケース：エチレンの 生合成とシグナル伝達系 —ペンシルベニア大学での1年半—

農林水産省 北海道農業試験場
吉田 均

はじめに

1997年9月より1年6ヶ月間、科技庁長期在外研究員としてアメリカ合衆国フィラデルフィア市のペンシルベニア大学 (UPenn) にて研究する機会を得た。UPennはベンジャミン・フランクリンが1740年に創立したアメリカで最初の大学とのことで、特にビジネス・スクール (Wharton School) は世界的にも有名である。私が所属した Department of Biology は School of Arts and Sciences (文理学部、あるいは教養学部と言ったところか) に属し、約30の研究室で動物・植物・微生物の研究が行われている。植物に関しては6つの研究室によって Plant Science Institute (PSI) という組織が構成されており、分子生物学、分子遺伝学、生理学、生体高分子の構造解析といった幅広いテクニックを用いて、シグナル伝達、形態形成、電子伝達系、アグロバクテリウムの感染機構、膜タンパクなどに関する研究が行われている。

フィラデルフィアはかつての合衆国の首都でもあり鉄工業を中心に栄えた歴史ある都市だが、現在では鉄工業の衰退とともに町並みも荒れ果ててしまっていた。特に市の西部は "West Phila." と呼ばれる物騒な地域であったが、UPennはこの地域に隣接しており、キャンパス内での殺人、強盗事件などは後を絶たなかった。そういった点では日本の安全な生活が非常に恋しく思えたが、研究に関してはこれまで体験したことのない多くの刺激を得ることが出来た。

YOSHIDA Hitoshi

〒062-8555 札幌市豊平区羊ヶ丘1

エチレン生合成とシグナル伝達機構の
分子遺伝学的解析

私が所属した Dr. Joseph R. Ecker (Joe) の研究室のメインテーマはアラビドプシスを用いたエチレンシグナル伝達の分子遺伝学的解析である。Joeは40台半ばながら、その洗練された研究スタイルと成果によって植物分子生物学のトップクラスの研究者と認められている。ご存じの通りエチレンは C_2H_4 と言う単純な構造を持つガスであるが、植物の果実の熟成、病害に対する反応、発芽、花芽形成、老化と言った幅広い生理現象をコントロールする植物ホルモンでもある。古くは20世紀のはじめにNeljubowがエンドウの黄化苗を用いてエチレンによる形態異常を発見しているが、Joeの研究室ではアラビドプシスの芽生えにおいてもエチレンによって3つの顕著な反応が起こることを見出した。すなわち、①胚軸および根の伸長阻害、②胚軸および根の肥大、③茎頂部(フック)の極度の屈曲の三つであり、彼らはこれをアラビドプシスのトリプルレスポンスと呼んでいる。さらに彼らはこの反応をマーカーとして、①エチレンに非感受性の *ein* (*ethylene insensitive*) 変異体、②恒常的にエチレン反応を示す *ctr* (*constitutive triple response*) および *eto* (*ethylene overproducer*) 変異体、③組織特異的にエチレン非感受性を示す *hls* (*hookless*) や *eir* (*ethylene insensitive root*) などの変異体、④エチレン・アンタゴニストに対してエチレンと類似の反応を示す *ran* (*responsive to antagonist*) 変異体などを数多く単離し、遺伝解析によってエチレンシグナル伝達機構のフレームワークを解明し

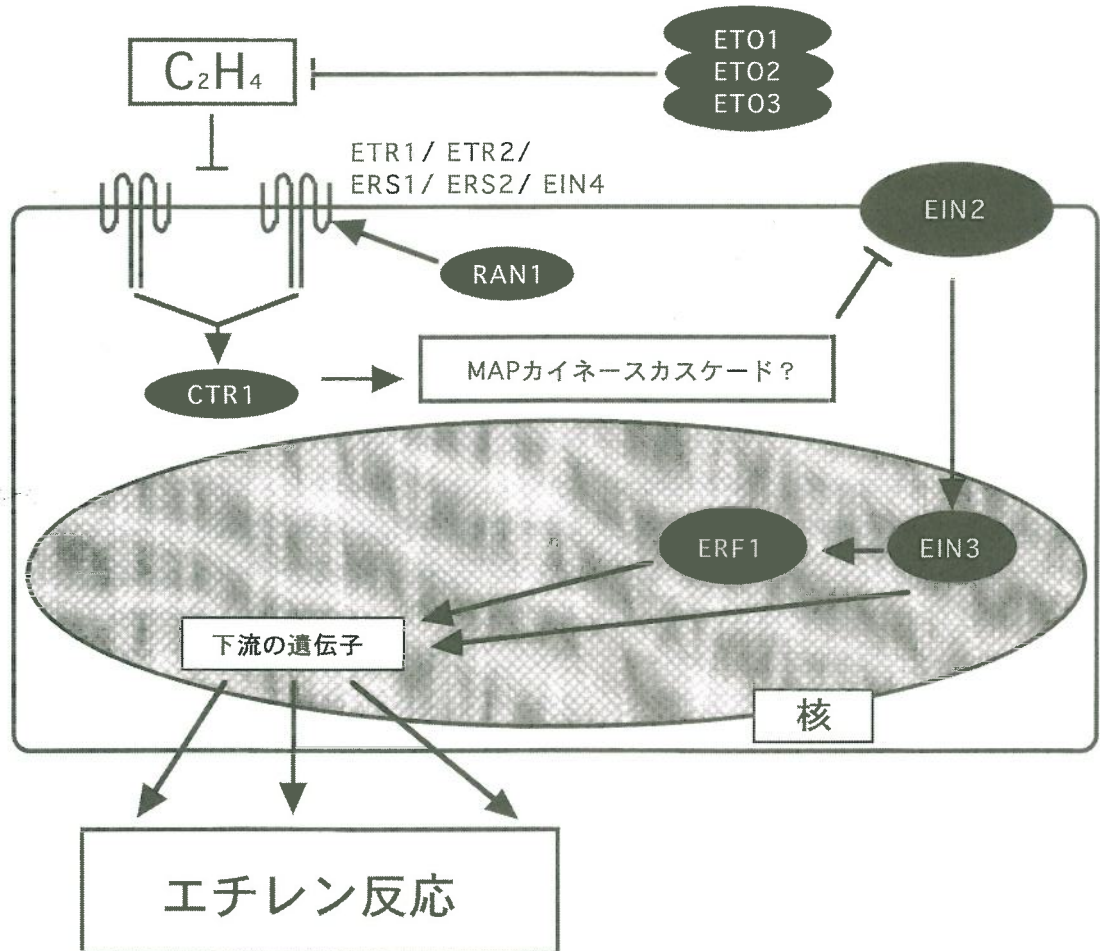


図1 アラビドプシスにおけるエチレン情報伝達機構の概要

た。さらにこれらの変異体からT-DNAタギング、ポジショナルクローニングなどによって原因遺伝子が次々と単離された。エチレンシグナル伝達系の解析は世界中で精力的に研究が行われており、次々と新しい知見が報告されている。こうした状況からもエチレンは植物のシグナル伝達機構研究の中でももっとも進んだシステムといわれている。Joeの研究室では *CTR1*, *HLS1*, *EIN3/EILs*, *ERF1*, *RAN1*, *EIN2*などの遺伝子が次々と単離され、機能およびエチレンシグナル伝達における役割が推定・確認されている(図1)。それによれば、銅コファクターのトランスポーターである *RAN1*により活性化された *ETR1*などのエチレン・レセプターが細胞膜上に存在し、ここからRaf様カイネースである *CTR1*を介してシグナルが伝達され、膜タンパクである *EIN2*を経由して核タンパク質である *EIN3/EIL*ファミリーさらには *ERF1*などが下流遺伝子

の転写を活性化するというものである。下流には形態形成に関与する *HLS1*や *EIR 1*, 病害抵抗性に関与する遺伝子群などが存在する。これは植物の多くのシグナル伝達機構のモデルともなる大きな成果といえる。現在の研究室のテーマは上記変異体のうち未解析のものに加え、新たなサプレッサー変異体の解析、イーストのtwo-hybridシステム/ミュータントパネル/グルココルチコイド誘導系/マイクロアレイなどの新しい手法を用いたシグナル伝達因子の探索など広範にわたっていた。筆者は分子遺伝学的手法によりエチレンによる形態形成およびエチレン生合成に関与する遺伝子を単離・解析する研究を行った。ここでは詳細については紹介しないが、確立されたシステムおよび豊富なゲノム情報を利用することによって1年半という限られた期間でいくつかの遺伝子を同定・単離する事に成功し、分子遺伝学的手法の有効性

や問題点を理解できた。今後も分子遺伝学的手法を応用した新奇な遺伝子の解析，今回単離した遺伝子の機能解析・農業分野での利用等をはかっていきたいと考えている。前述の通りエチレンは多くの農業形質に深く関わっているため，様々な利用法が考えられるのではないかと期待している。

研究室での生活

Joeの研究室にはエチレン関係の研究に10名弱，ゲノム解析関係に5名前後のポスドク，学生などが在籍していたが，スペイン，イスラエル，中国，日本，ロシア，台湾などアメリカ以外の出身者が多かったため，日本人であるからと言って気後れすることが少なくすんだ。Joeは基本的に研究者個人の自主性を尊重するタイプのボスで，あまり結果を厳しく要求するタイプの人ではないが，研究室には多くのミュータントという宝の山が転がっていることもあり，各自がどうしたら最も効率よく必要な結果が得られるかと言うことを常に念頭に置いてどん欲に研究を進めていた様に思う。週に1回程度のミーティングを行い，持ち回りの順番で最近の成果を紹介し時間をかけて討論を深めていたため，皆が緊張感を持って仕事をしていた。

研究設備に関しては，Joeの研究室もやはり例外ではなく，研究機器に関しては決してすばらしいとは言えなかった。おんぼろのインキュベーターやバッファー漏れのする泳動槽をだましまし使っており，日本とのあまりの違いに驚かされたが，やはり機器への投資は最小限にとどめて予算はポスドクの給料に使うというアメリカ流の研究室運営を再認識した。その根底には「人材」という資源に対する日米での認識の違いがあるようにも思えた。

私生活

研究室では研究のことだけを考えていれば

よく，また話し相手もこちらのペースに合わせてくれるところがあり快適に生活できたが，私生活はそうはいかずにつらいことも多かった。特に病気をしたときの医師の対応（38℃なんて高熱とは言わないらしい・・・），運転免許取得時の苦勞（縦列駐車の際に窓から顔を出してはいけない！？），一ヶ月以上に及ぶ市営交通のストライキ（要求を通すためには徹底的に戦う。たとえそれで市民から非難されようとも）などは一生忘れられない思い出になった。様々なトラブルの中で国民性や習慣と言ったものの違いが見えてくることもあり，コミュニケーションの難しさ，トラブルの解決法などについて常に考えさせられた。心配していた食生活に関しては，オリエンタルフードの店などで粘りのある非常においしいお米が売られていたこともあり，それほど苦にならなかった。逆にこうしたおいしい米が安い価格で日本に輸入されたときに，日本の農業は対抗できるのだろうかという危惧も抱いた。

おわりに

今回の在外研究で公私ともに多くの経験をする事ができた。北農試にいるときには経験できない1時間ほどの電車通勤というオプションもあったため，その時間を使って論文を読んだり実験の計画を立てたりと楽しむ事ができた。また，筆者の住んでいたアパートには日本人の研究者が数多く（50世帯ほど）住んでいたため，異なる分野の人たちの話を聞くこともでき，得難い経験になった。今回の在外研究を行うに当たり，多くの方々に支えて頂いた。特に北農試育種工学研究室の各位には1年半もの間，研究室を離れることを許していただいた。また，現・理化学研究所の平山隆志氏にはEcker研での研究および現地での生活において数え切れないほど相談にのっていただいた。この場を借りてみなさまに感謝したい。

◀特別情報▶

いわゆる「ターミネーター種子」について

生研機構研究開発課長

田中 宏樹

少し古くなりますが、米国インディアナ大学生物学助教授のMartha L. Crouch氏によるリーフレットを目にする機会を得ました。

時に話題となっていたテーマに関するものであったことから、本リーフレットを訳者と同じく生研機構研究リーダー久木村久氏との2人で、翻訳に取り組みました。紙面の関係でここでは、その抜粋の紹介にとどめざるを得ませんが、興味深い話題であることに変わりありません。

緒言

98年3月、後にモンサントに買収されることになるDelta and Pine社は、米国農務省との共同の成果について、特許第5723765号を付与された。同特許は、植物遺伝子発現の制御に関するものであった。

同特許は、広範で様々な適用をカバーするものであったが、その中には第2世代において、種子自身を殺すよう（種子の発芽を抑制）に、作物遺伝子进行操作する手法も含まれていた。これによって農業者が、購入した種子を増殖し、増殖した種子を発芽させることは不可能になった。

本発明は、RAFI (Rural Advancement Foundation International, 本部：カナダ) によって「ターミネーター技術」と呼ばれることとなった。そして研究者たちは本技術のもつ社会的、経済的及び環境上の意味合いを分析した (RAFI 1998)。

概説

ターミネーター技術の説明は、同特許でカバーされた多くの技術的可能性のうちの1つに絞ることとする。

ここでは、ワタを取り上げるが、ワタについては遺伝子組み替えにより除草剤耐性を付与された品種が既にある。

TANAKA Hiroki

〒105-0001 港区虎ノ門3-18-19

ワタの除草剤耐性種子の後代種子が、種子会社への補償なしには使用されないことを確保するため、種子会社は追加的に「ターミネーター」による遺伝子組み替えを行った。

ワタの種子は、通常ハイブリッドではないものが売られており、したがって「ターミネーター」による保護の候補となった。

ワタを例にとると、開発の目標は、ほぼ成熟するまでは正常に成長し、その後の段階で次世代種子を殺す毒素が種子の胚の中で作られるワタ品種を作り出すことである。

このシステムは3つの部分から成る。

- 1) 作物の成熟後期に、植物体の種子のみを殺す毒素をコードする遺伝子。
- 2) 種子特異的な毒素遺伝子を組み込んだワタを、育成者自身が8世代まで生育させる方法。本手法は、販売用種子の増殖に必要
- 3) 農家が播種した後で種子特異的な毒素遺伝子を活性化する方法

これら3つの部分は、一連の遺伝子の組み替えにより完成した。一連の遺伝子は植物体に永久に組み込まれ、通常の増殖過程により引き継がれることになる。

技術の詳細

ターミネーター特許権者はワタの LEA (Late Embryo Abundant) 遺伝子からのプロモーターを用いている。この遺伝子は最後に活性化させるべきものである。そのタンパクは種子が完全粒となって、殆どの貯蔵脂質やタンパクが蓄積され、休眠期に備えて乾燥し、親個体から離脱し、土壤中で発芽する間でしか産生されない。もし、その操作された遺伝子が同じ発現パターンをとるなら LEA-プロモーターに支配されたタンパクは成熟終期の種子中でのみ多量に作り出されねばならない。ワタ種子にとって重要なことは毒素の作用が始まる前に種子の発育段階の殆どが終了していることである。なぜなら、ワタ繊維は種皮の派生物であるからである。また、繊維をのぞいた後、種子は胚の脂質やタンパクを抽出するために破碎される。ワタという作物は種子が正常に成熟しなければ何の役にもたないものである。

毒素については、特許の中で論じられているが、*Saponaria officinales* (サボンソウ、サポニンを多く含む多年生草本の薬用植物) からの RIP (Ribosome inhibitor protein リボソーム阻害タンパク) が取り上げられている。このタンパクは少量ですべてのタンパクの合成を阻害する。細胞はすべての場面でタンパクを必要とするので、タンパクが合成できなければ急速に死にいたる。この特許によると、RIP は植物以外の生物には無害であるとされている。

ワタではターミネーター効果を完全なものにするためにワタの DNA に 3 つの要素を導入する必要がある。

① 種子特異的プロモーターによって制御される毒素遺伝子。

② 常に活性化しているプロモーターを伴った抑制タンパクをコードするシーケンス。

③ リコンビナーゼをコードするシーケンス。つまり、それは常に活性化しているプロモーターによって制御されているが、抑制タンパクにも制御されており、テトラサイクリンで無効にされるものである。

ターミネーターが他の植物に拡散するか？

ターミネーターがある条件下で同じ種の隣接する個体の種子を殺す可能性はある。しかし、その効果は第 1 世代に限られ、それ以降の世代には広がらない。シナリオは以下の通りであろう：農民がターミネーター種子を播くと、その種子はテトラサイクリンで処理されているので、リコンビナーゼが働いて、毒素をコードしてあるシーケンスが種子特異的プロモーターに隣接しており、種子の発達の終期まで到達する。種子は植物体となり、花粉も作る。花粉はすべて機能すべく準備された毒素遺伝子を持っている。普通品種の植えられる隣の圃場にターミネーター作物が植えてあると、毒素遺伝子を持ったその花粉が風や昆虫によって運ばれ受粉される。すると、種子の発育段階の終期のところで遺伝子発現が起こり種子は死ぬ。普通品種を播いた農民はその事実を知らされず、種子も正常に見えるので気がつかない。その種子を播いたときに発芽しないので、初めて異常に気がつくことになる。

枯死個体は繁殖しないので、毒素遺伝子は拡散することはない。

しかし、死んだ種子はターミネーター作物を作付けした圃場の近くの農民に深刻な問題をもたらす。どのくらいの種子が死ぬかは他交配の程度、植物の種、品種、天候、圃場の近接度等に依存する。もし多数の種子が死ぬば隣接農家に大きな損壊を与える。ごく少数の種子が死ぬばあいでも他のタンパク操作を加えたターミネーター保護品種の毒素を含有することになり、この「要因」はそれら種子のある種の用途には利用出来なくなる。

ターミネーターは GMO 生物の流出を防ぐか？

特定の遺伝的改変生物が農民の手で管理されているということは非常に重要なことである。それであれば、ターミネーターがその遺伝子を漏出 (escape) から守るということは

良いアイデアとは言えない。

第1に、どんなテトラサイクリン処理も100%有効ということはありそうもない。色んな理由で、ある種子は反応しないだろうし、また、活性のあるリコンビナーゼを生ずるのに十分なテトラサイクリンが必ず取り込まれるとは限らない。そのばあい、その個体は他のものとまったく同様に見えるが、毒素遺伝子の機能のない花粉を作ることになる。その花粉はターミネーターによって防護されていると考えられる遺伝的操作タンパクをもっていることになる。例えば除草剤耐性のようなものである。もし、この花粉が正常個体を受精させると、毒素が出来ないので種子は死なず、除草剤耐性遺伝子をもち、次世代へと進む。このように遺伝的改変生物は花粉を通じて漏出する。

もちろん、テトラサイクリン処理に失敗するとターミネーターの自殖性種子は次世代へと進む。鳥によって運ばれたり、「ボランティア」として次の作季へと進む。このように、遺伝的改変生物自身や、その形質が意図しない拡散をするのを、ターミネーターによって防ぐことができるということは非現実的である。

このような「漏出」は他の特許適用のもので、ターミネーターの遺伝的要素は性的繁殖の間に再構成（リシャッフル）されるばあいではもっとあり得ることである。そして種子の一部は毒性を失って生き残ることになる。

結論

私の分析はターミネーター特許に述べられている一適用例の細部に基づいたものである。私が論じた特殊な問題点のいくつかは種子産業で実用化以前に処理されるものと信ずるが、現在は予見も想像もされていない他の問題が生ずることは確かである。愕くべきことがあり得よう。私の考えでは、ターミネーターによって提起される潜在的生物学的問題がどのようなものであれ、ターミネーターの経済的、社会的、政治的發展性と比較すると、取るに足りないものとされるであろう（RAFI, 1998を参照のこと）。

<訳者より付言>

10月始め、Financial Times 紙は、モンサント社は、当面ターミネーター技術を利用した種子を販売しない方針であると伝えた。

編集後記

ブレイン・テクノ・ニュース第76号をお届けします。

本号では、みよりの秋に因んで、総説として、進行中のイネ・ゲノム研究を背景とした「イネの遺伝子組換え研究の現状と展望」を取り上げ、この分野で活躍しておられる黒田先生（農水省北陸農試）に執筆していただきました。また、関連した話題について、国内情報として大坪先生（農水省食総研）、さらに地域の先端研究として荘司先生（富山県農技センター）に話題提供をして戴きました。ゲノム解析・遺伝子組換え技術の研究は、ヒト、動物、植物の各分野でそれぞれ各国の研

究者が凌ぎを削っており、黒田先生も指摘するとおり、特許競走が激化し遺伝子戦争の観を呈しています。また、組み換え技術の利用には、荘司先生が指摘するように、十分な安全性評価が必要不可欠でもあります。これらの研究は、われわれの生活や生産に密接に関連している事柄だけに、今後も注意深く見守っていきたいと思います。

本号は、奇しくも1900年代最後の発行号となります。今後も、さらに充実した各分野の先端的、先進的研究情報紹介をするよう努力いたしますので、各位のご協力をお願いいたします。（畠山記）

本誌著作物の複写等について

本誌掲載の論文・記事の複写・転載を希望される方は、執筆者ならびに生研機構の許諾を得て行ってください。

ブレインテクノニュース（第76号）

平成11年11月15日発行

編集兼発行者 堤 英隆

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3丁目18番19号 虎ノ門マリビル10F

TEL. 03-3459-6565 FAX. 03-3459-6566

e-mail kikaku@tokyo.brain.go.jp

©Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 1999