

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 6 号

MARCH 15, 1988



表紙説明

ウイルスフリー化によりたくさんの大きな
花をつけたテッポウユリ

(協和発酵工業㈱提供)

本号の紙面

国内情報	1
電気細胞操作、新殺虫協力剤、 新甘味料、モノクローナル抗体	
文献情報	15
外国特派員便り	22
欧米のバイテク研究事情	
特別情報	25
細胞育種技術の進捗状況	

目 録

国内情報

- 植物および微生物のための連続電気
細胞操作装置の開発…………… 1
- 有機リン殺虫剤抵抗性への対抗策
新殺虫協力剤ジメチルカーバメートの発見…………… 4
- 高活性微生物の探索・改良
新甘味料エリスリトール生産技術の開発…………… 6
- 電気融合による *Brassica oleracea* と
B. campestris の体細胞雑種の作出…………… 9
- モノクローナル抗体を用いた豚マイコプラズマ
肺炎の新しい診断法とその野外応用…………… 11

文献情報

- 農業におけるバイオテクノロジーと育種の協力…………… 15
- サツマイモのプロトプラスト培養からの個体再生…………… 16
- 酵母 *S. cerevisiae* のヒト interleukin
1 β 分泌に有効なリーダーペプチド…………… 17
- 中国のブタが保存し続けているインフルエンザ
ウイルス遺伝子の特徴…………… 18
- 太平洋サケの繁殖統御技術の総合的開発と
その応用…………… 20

外国特派員便り

- 欧米のバイテク研究事情…………… 22

特別情報

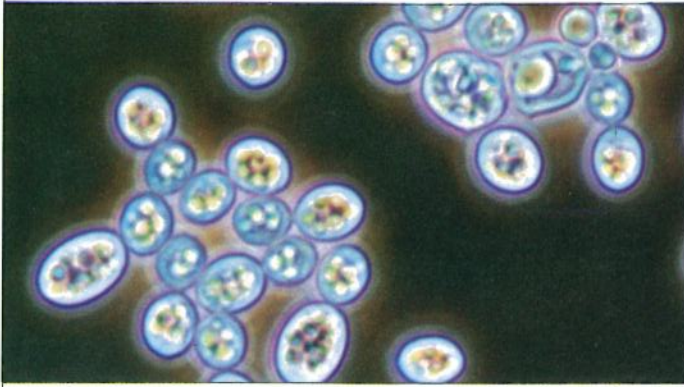
- 細胞育種技術の進捗状況…………… 25

お知らせ

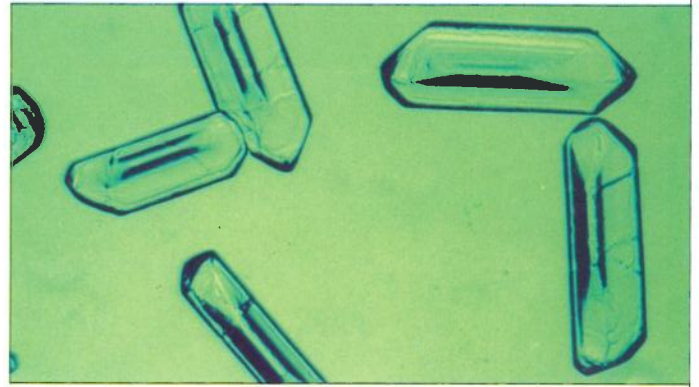
- 「微生物の長期保存法」マニュアル…………… 30

高活性微生物の探索・改良
新甘味料エリスリトール生産技術の開発

(本文 6 ページ)



エリスリトール高生産菌 *Aureobasidium* sp.



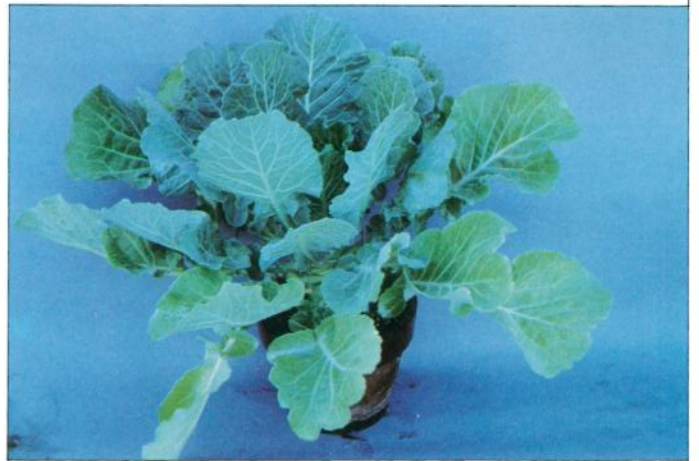
エリスリトールの結晶

電気融合による
Brassica oleracea と *B. campestris* の体細胞雑種の作出

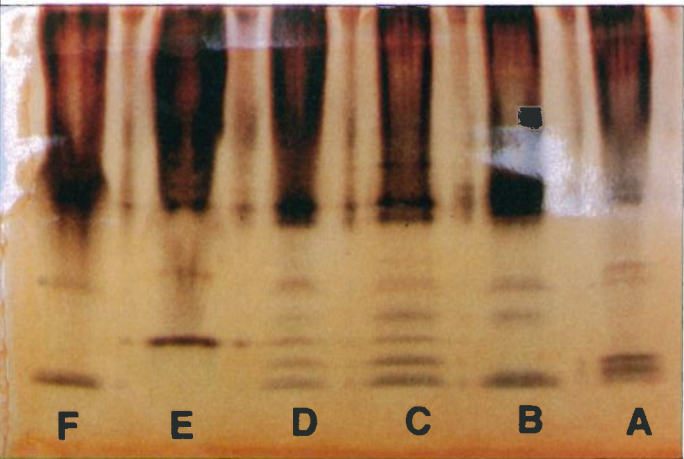
(本文 9 ページ)



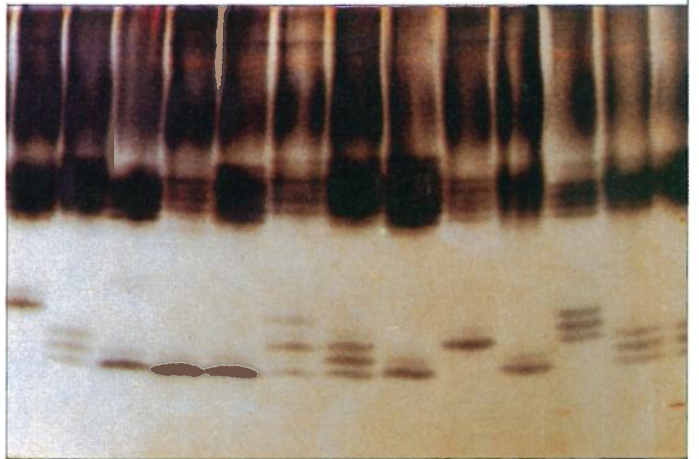
1. キャベツ+コマツナの融合植物



2. キャベツ+カブの融合植物



3. 融合植物の酸性フォスファターゼアイソザイムパターン



4. コマツナの酸性フォスファターゼアイソザイムパターン

- A: キャベツ+カブの融合植物
- B: 融合処理実験で再分化したキャベツ
- C, D: キャベツ+コマツナの融合植物
- E: コマツナ, F: キャベツ

国内情報

植物および微生物のための連続電気
細胞操作装置の開発

農林水産省農業生物資源研究所

日比忠明

植物や微生物のバイオテクノロジーの中心となる技術に、細胞融合技術と遺伝子工学技術とがある。最近、細胞融合や遺伝子の細胞内導入にあたって、電気を利用する方法が開発され、それぞれ、電気細胞融合法および電気遺伝子導入法と呼ばれている。また、著者らによって電気細胞融合と電気遺伝子導入とが、本質的にほぼ同一の電氣的条件で誘起されることも示された。このように電気を用いて細胞に遺伝的加工を施す技術を、まとめて電気細胞工学あるいは電気細胞操作という。この技術は動物、植物、微生物にわたって汎用し得る新技術で、すでに動物、微生物分野でもいくつかの報告がなされているが、現時点では植物分野での進展が最も著しく、著者らによって、実用規模の大量の植物の融合細胞あるいは遺伝子導入細胞を、高効率で連続的、自動的に作成する方法（連続電気細胞操作法）およびそのための装置（連続フローエレクトロマニピュレータ）も開発されている。

そこで、ここでは植物電気細胞工学について、その現状を紹介するとともに、連続電気細胞操作装置開発の経緯について、簡単に紹介することにした。

1. 電気細胞融合

現在、一般的に用いられている電気細胞融合法は、交流高周波電流による誘電泳動と直流パルス電流による融合誘起とを組み合わせた方法である。植物プロトプラストを用いた実際の電気細胞融合の標準的操作は、概略次のとおりである。プロトプラストを $100\mu\text{M}$ CaCl_2 を含む 0.5M マンニトール液に約 $2 \times 10^5/\text{ml}$ の濃度で懸濁し、電極間に周波数 0.5 –

2MHz 、電界強度 100 – 500Vpp/cm の交流高周波電流を流すと、プロトプラストが電極間に配向配列する。約 1 – 2 分後に、交流高周波電流を流したままの状態、パルス幅 50 – $100\mu\text{s}$ 、電界強度 0.5 – 2kV/cm の矩形波直流パルス電流を 1 – 2 回印加する。そのまま室温で 1 – 2 分間静置して融合を完了させる。この方法でタバコ葉肉プロトプラストを融合させた例では、重連して接触していたプロトプラストのほぼ全て、全プロトプラストの約 46% が融合した。タバコ葉肉プロトプラストとニンジン根部プロトプラストとを等量混合して融合させた場合には、全プロトプラストの約 26% が融合したが、そのうちの約 41% は異種どうしが 1 個ずつ融合したプロトプラスト（ 2 核ヘテロカリオン）であった、したがって全プロトプラストの約 10% が 2 核ヘテロカリオンを形成したことになる。電気細胞融合法は、従来の PEG による融合法に比べて、融合効率が高く、害作用が少なく、また、操作が簡便・迅速であることから、すでにイネをはじめ各種の植物の種間あるいは属間雑種細胞株の作成とその植物体への再分化の研究などに用いられており、いまや PEG 法にとって代わる勢いにある。

2. 電気遺伝子導入

電気遺伝子導入の原理は、細胞膜の局部的破壊とその再修復が基本的な機構であるという点で、電気細胞融合のそれと共通しており、融合のための前処理である交流高周波電流による細胞の配列操作が不要なだけにすぎない。植物プロトプラストを用いた実際の電気遺伝子導入の標準的操作は、概略次のとおりである。プロトプラストを $100\mu\text{M}$ MgCl_2 を含む

0.5Mマンニトール液に約 $2 \times 10^5/ml$ の濃度で懸濁し、これに遺伝子核酸を $1 \sim 10 \mu g/ml$ の濃度で加えた後、電極間に、パルス幅 $50 \sim 100 \mu s$ 、電界強度 $0.5 \sim 2kV/cm$ の矩形波直流パルス電流を数回印加する。そのまま $0^\circ C$ で数分間静置して導入を完了させる。この方法でタバコ葉肉プロトプラストにタバコモザイクウイルス (TMV)-RNAを導入した場合には、プロトプラストのほぼ全てが感染した。電気遺伝子導入法は、開発後間もない技術であるにもかかわらず、現在すでに、植物ウイルスの核酸やTiプラスミドによる核酸感染はもとより、直接遺伝子導入法による形質転換植物の作成や遺伝子解析のための強力な手段として利用されており、特に最近1~2年の本法の急速な普及ぶりには目覚ましいものがある。

3. 連続電気細胞操作装置の開発

細胞融合や遺伝子導入などの細胞操作によって、新たな有用形質を付与された実用的育種素材や、あるいは植物培養工学用の優良細胞株を実際に育成する際には、①プロトプラストの調製、②細胞融合あるいは遺伝子導入、③目的形質を発現している細胞株の選抜、④それらの細胞株の増殖と優良細胞株の選抜、⑤植物個体への再分化、⑥優良植物株の選抜、⑦それらの植物株の遺伝様式の解析、という長い一連の操作過程を踏まなければならない。

目的とする最終産物の育成効率には、これら各過程のそれぞれの効率がほぼ乗積として関与することになる。主要作物では、現在のところ、一部の例外を除いて、一般にプロトプラストからの再分化率が低く、また、再分化個体のうちで目的形質が発現し、本来の優良な形質が損なわれていないような個体の出現率も低い。さらに、細胞融合の場合、非対称体細胞融合によって目的遺伝子だけを導入し、余計な遺伝子を落した細胞株を拾う手法が、主流となりつつあるが、そのような細胞株の出現頻度は極めて低い。一方、遺伝子導入の場合、直接遺伝子導入法によって導入された遺伝子が、染色体上に組み込まれる頻度もまた非常に低い。以上のような点を考慮す

ると、細胞融合や直接遺伝子導入法の育種への実用化を促進するためには、従来の研究室レベルのモデル実験規模とは異なり、大量規模の融合細胞あるいは導入細胞を作成し、これらを出発材料として、以後の細胞レベル、個体レベルの選抜にかけて行くという戦略をとる必要がある。このためには、大量の雑種融合細胞（とくに2核ヘテロカリオン）あるいは導入細胞を高率、迅速に作成する技術の開発が前提となる。このような発想に基づいて、著者らが新たに開発した技法が、大量の電気融合細胞および電気遺伝子導入細胞を連続して作成する方法、すなわち連続電気細胞操作法であり、そのための装置が連続フローエレクトロマニピュレータである。装置は、リザーバ、フロー式電極、定流量ポンプおよびハーベスタから成る流路系と、交流高周波発振器、直流パルス発振器およびオシロスコープから成る電気系とで構成されている。装置の心臓部となるフロー式電極には新開発の金蒸着パネル電極を採用した。図1に本装置を用いた連続電気細胞融合法の原理と方法を模式的に示した。実際の操作は、概略次のとおりである。2種のプロトプラストを等量ずつ混合して、 $100 \mu M$ $CaCl_2$ を含む $0.5M$ マンニトール液に約 $2 \times 10^5/ml$ の濃度で懸濁した後、その一定容量をポンプによって、電極間隔 $0.2 \sim 2mm$ のフロー式電極内に導入する。周波数 $0.5MHz$ 、電界強度 $100 \sim 300Vpp/cm$ の交流高周波電流を1分間通電して、プロトプラストを電極間に配向配列させた後、パルス幅 $50 \mu s$ 、電界強度 $0.5 \sim 2kV/cm$ の矩形波直流パルス電流を数回印加する。ただちに交流電流を止め、ポンプで融合プロトプラストを導出、同時に新たなプロトプラストを電極内に導入する。以降、これら一連の過程を繰り返す。本法によってタバコ葉肉プロトプラストとニンジン根部プロトプラストを融合させた場合、至適パルス電界強度 $650V/cm$ において、2核ヘテロカリオンの形成率はほぼ二項定理に従っており、全プロトプラストの約10%を占めた。その際の2核ヘテロカリオンの作成速度は、最高約 1×10^5 個/分であった。

図2に本装置を用いた連続電気遺伝子導入

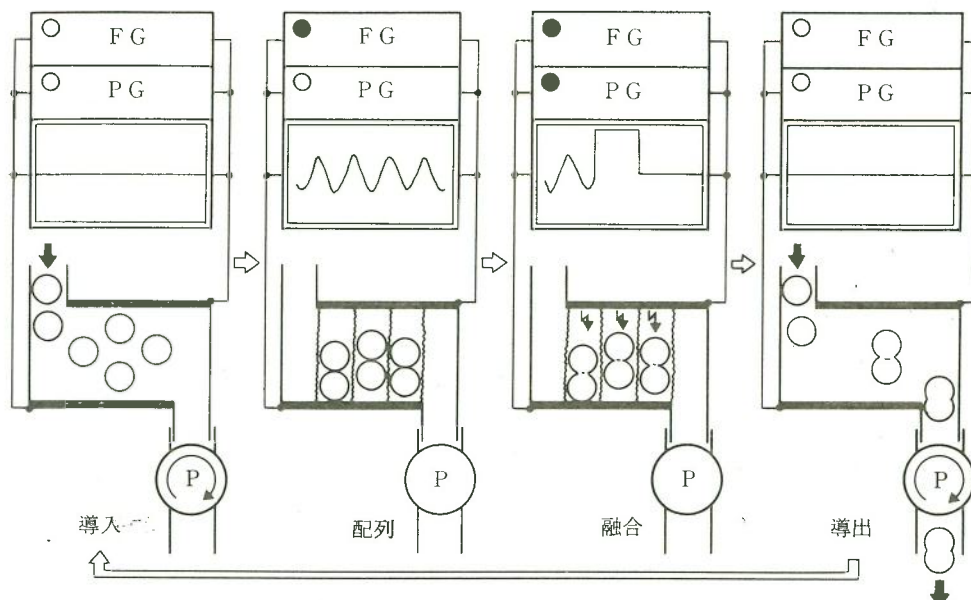


図1 連続電気細胞融合法の原理と操作模式図
FG: 交流発振器, PG: パルス発振器, P: ポンプ

法の原理と方法を模式的に示した。実際の操作は、概略次のとおりである。プロトプラストを、 $100\mu\text{M}$ MgCl_2 を含む 0.5M マンニトール液に約 $2 \times 10^5/\text{ml}$ の濃度で懸濁し、遺伝子核酸を $1 \sim 10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加えた後、この混合液を、 $50 \sim 100\mu\text{l}/\text{sec}$ の流速で、電極間隔 0.5mm のフロー式電極内を通して連続送液する。この時、電極間には、パルス幅 $50\mu\text{s}$ 、電界強度 $0.5 \sim 2\text{kV}/\text{cm}$ の矩形波直流パルス電流を 100ms 間隔で連続印加しておく。これによって、例えば、試料室容量 $100\mu\text{l}$ の電極内を $100\mu\text{l}/\text{sec}$ の流速で通過させたプロトプラストは、合計10回のパルスを受けることになる。本法によって、タバコ葉肉プロトプラストおよびササゲ葉肉プロトプラストに TMV-RNA を感染させた場合、その感染率はいずれも約95%、その際の感染細胞作成速度は、約 1×10^8 個/分であった。

現在、上に述べた細胞融合および遺伝子導入の連続操作過程を自動的に制御できる装置が、既に製品化されており、酵母など微生物の細胞融合や遺伝子導入にも適用できることが示されている。

以上のように、連続電気細胞操作法は、①融合・導入効率が高い、②細胞への害作用が少ない、③操作が簡便・迅速である、④大量・自動処理ができる、という特長をもってお

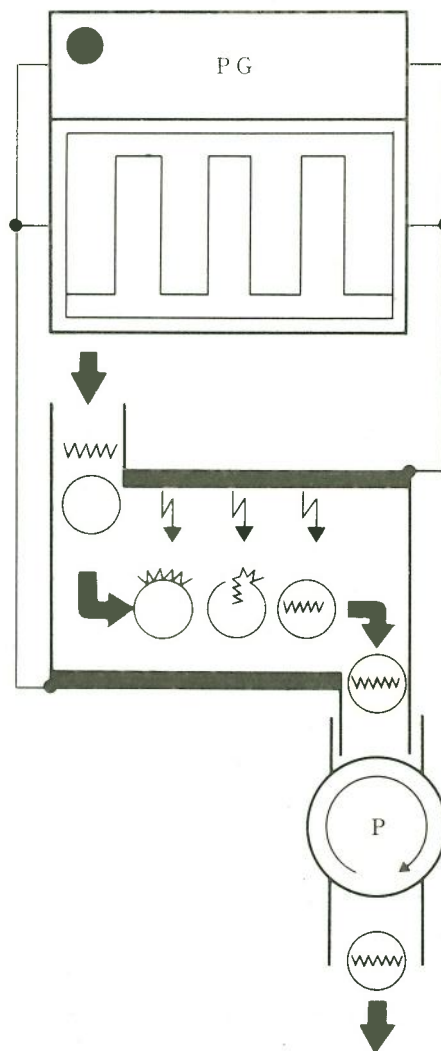


図2 連続電気遺伝子導入法の原理と操作模式図
PG: 連続パルス発振器, P: ポンプ

り、今後、植物ウイルス学や植物分子遺伝学などの基礎的研究のみならず、病害抵抗性作物をはじめとする有用育種素材の作成を目指した植物バイオテクノロジーの実用的研究を推進する上で、また、微生物バイオテクノロジーの進歩を促進する上で、ほぼ必須な日常的手法のひとつとして広く利用されて行くものと考えられる。

参考文献

1) Hibi T. *et al.* (1986) High efficiency electro-

transfection of tobacco mesophyll protoplasts with tobacco mosaic virus RNA, *J. gen. Virol.*, 67: 2037

2) Hibi T. *et al.* High speed electro-fusion and electro transfection of plant protoplasts by a continuous flow electro-manipulator, *Plant Cell Reports*, in print

3) 日比忠明(1987)「植物細胞の電気細胞融合操作法」トキシコロジーフォーラム, 10: 418

4) 日比忠明(1987)「植物細胞の電気細胞融合」, *BIO INDUSTRY*, 4: 818

5) 日比忠明(1987)「植物細胞への電気遺伝子導入」, *BIO INDUSTRY*, 4: 896

国内情報

有機リン殺虫剤抵抗性への対抗策 —新殺虫協力剤ジメチルカーバメートの発見—

農林水産省農業環境技術研究所

穴戸 孝

はじめに

1908年のサンホーゼカイガラムシから始まった殺虫剤抵抗性は1980年までに世界で420種以上の昆虫やダニで報告されている。近年、とくに農業の分野ではこの問題は年々深刻さを増し、有効な解決策のないまま今日に至っている。急速に普及したピレスロイド系殺虫剤の場合、わが国において使用後僅か1~2年でコナガの感受性が数百倍も低下したといわれている。このような状況下で、多大な費用と長年月をかけて開発した農薬を長期間にわたり有効に利用するには、薬剤抵抗性の問題を解決することが必要となってくる。これまでは、色々な薬剤のローテーションによる抵抗性の回避に重点が置かれてきたが、代替薬剤が次第に減少してきたため、最近では、抵抗性の発現を抑える協力剤や、抵抗性を獲得した害虫にのみ効果を示す負相関剤など、抵抗性の作用機作に基づいた新たな対抗策としての研究が積極的に進められている。ここでは有機リン剤抵抗性ニカメイガに卓効を示すジメチルカーバメート系協力剤の発見の経

緯について簡単に述べてみたい。

1. ニカメイガの有機リン剤抵抗性機構

昭和53年に岡山県を中心に大発生したイネ害虫ニカメイガは、長年にわたって使用されてきたフェニトロチオン、フェンチオンの有機リン剤に対する抵抗性の発達がその原因とされ、その後中・四国、新潟などの各地でその発生が報告されている。

岡山県総社市秦で採集された抵抗性(R)ニカメイガは芳香環をもつ有機リン剤すべてに抵抗性を示す。例えば、ベンゼン環を持つフェニトロチオン、フェニトロオクソン、フェンチオンではその致死量が通常感受性(S)ニカメイガの25~50倍も高く、とくにヘテロ環を持つピリミホスメチルでは抵抗性レベルは著しく高く、833倍にもなる¹⁾。このように害虫が薬剤に抵抗性を獲得する手段としては、①薬の皮膚透過性を阻む、②薬の作用を受ける箇所の変えて、薬との結合を阻む(作用点変異)、③分解酵素や薬物結合蛋白により薬を解毒するの三つが主なものである。

そこで秦系統は上記三つの抵抗性メカニズ

ムのどれに相当するかを放射性標識フェニトロチオンを用いて詳細に調べてみた。その結果、両系統間の薬剤解毒能に大きな差のあることが判った²⁾。図1はフェニトロチオンのニカメイガにおける代謝経路の大略とフェニトロチオンに対するR系統の防御機構を示したものである。フェニトロチオンはそれ自体毒性がなく、体内で酸化され、活性毒物体フェニトロオクソンに変化し、害虫の神経系に作用する。一方このオクソンはジメチルリン酸と3-メチル-4-ニトロフェノールに分解する。S系統では活性毒物体フェニトロオクソンが著しく体内に集積し、最高R系統の72倍にも達する。一方、R系統では体内のフェニトロオクソンレベルは低く、その分解物が多い。また放射性のフェニトロオクソンを直接作用させた場合も、R系統はすみやかにこのオクソンを分解する。したがって、次の問題はR系統の体内でフェニトロオクソンの分解に関与している本体何か？ということになる。放射性のフェニトロオクソンを使って調べた結果、この解毒作用は、オクソンを加水分解する酵素と、フェニトロオクソンと結合し、これを無毒化する薬物結合蛋白の二つによることが判明した。

2. 殺虫協力剤の探索とデザイン

今までの研究から、ニカメイガの有機リン剤抵抗性はフェニトロオクソンの解毒活性の増大に基づくことが判った。このR系統における活性毒物体の解毒作用を微量で阻止する物質が見つければ、これと殺虫剤とを混合して使用することによりニカメイガの抵抗性を打

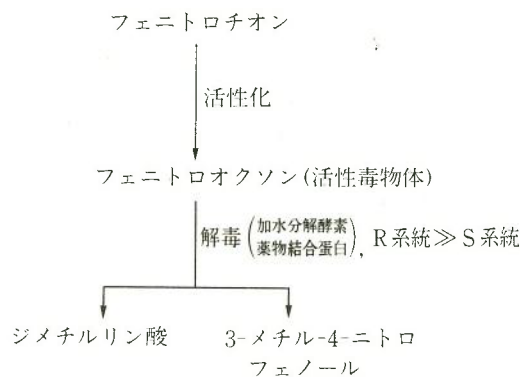


図1 ニカメイガにおけるフェニトロチオンの代謝経路と抵抗性機構

破することが可能となる。このような物質は協力剤と呼ばれ、一般にそれ自体殺虫性を持たないが、殺虫剤を解毒する酵素の働きを止め、抵抗性により効力を失ったあるいは低下した薬剤の働きを元に戻す力を持っている。

そこで今まで得られた知見をもとに、ニカメイガの抵抗性発現機構を阻害する協力剤の探索やその分子設計のための基礎研究に着手した。

有機リン殺虫剤を分解する酵素の阻害剤、あるいはこれら薬剤に協力作用を示す物質としては、現在までにK-2、DEF等のリン化合物やカーバメート化合物が知られている。最初、リン化合物を中心とした協力剤を試験したが、高い協力効果を示すものは見出せなかった。

次にカーバメート構造に着目した。また一般に酵素によって分解を受ける化合物はそれと類似の構造をもつ化合物によって逆に強く阻害を受けることが酵素学で良く知られている。この2点を組合せ、130余りの各種のカーバメート化合物を合成し、協力効果をテストした結果、図2に示したようにフェニトロチオンのベンゼン構造を片割れにもつN、N-ジメチルカーバメート(SK-2)が著しく協力作用を示すことが判明した。

またフェンチオンと同じ構造をもつSK-9も効果が高い。さらに抵抗性レベルが最も高かったピリミホスメチルのピリミジン構造をもつSK-102は合成された協力剤のなかで、最も高い協力効果を示した(表1)。すなわち、SK-102を加えることにより、フェニトロチオンは37倍、ピリミホスメチルは1,318

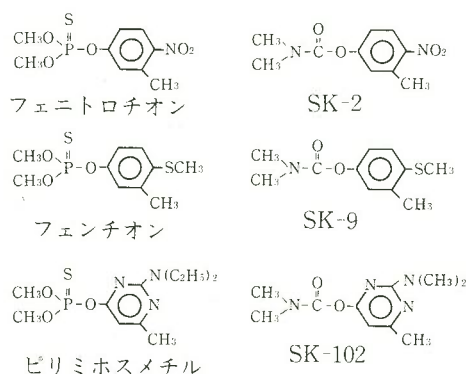


図2 新殺虫協力剤(右)の化学構造

6 国内情報

表1 抵抗性ニカメイガに対する有機リン殺虫剤とジメチルカーバメートの協力作用

殺虫剤と協力剤の組合せ	殺虫力* (LD50 μ g/g)	協力係数**
フェニトロチオン	75.3	—
+ SK-2	3.3	22.8
+ SK-9	3.4	22.3
+ SK-102	2.0	37.2
ピリミホスメチル	2000	—
+ SK-2	9.6	208
+ SK-9	6.6	302
+ SK-102	1.5	1318

* 殺虫力：通常供試昆虫の50%致死薬量で表わす

**協力係数：LD₅₀殺虫剤/LD₅₀殺虫剤+協力剤

倍もR系統のニカメイガに対し殺虫効果が高まる³⁾。この致死量はS系統のそれに匹敵するもので、協力剤として従来知られていたもののなかで最強の部類に属する。

また当然のことながら、新しく見出されたSK-102はR系統の解毒を司る加水分解酵素や薬物結合蛋白の働きを 10^{-6} Mという低濃度で阻害する。

おわりに

抵抗性対策としての協力剤の利用はこれまで多くの研究者によって絶えず提唱されて

きた。しかし実用化された協力剤はピペロニルブトキシド等のメチレンジオキシ化合物で、しかも衛生害虫に限られ、農業害虫の防除面では皆無である。この原因として、①値段が高くなる、②毒性を増す場合がある、③現在の協力剤は分解しやすく、効力不十分で、農業に適用できないなどがあげられる。しかしながら、有効な協力剤は抵抗性のため効力が低下し、使用できなくなった殺虫剤の再使用を可能にする、あるいは既存の殺虫剤をいかに長持ちさせるかという面からも大切に、協力剤の探索研究は今後も重要な課題といえよう。

現在われわれの研究室では、N,N-ジメチルカーバメート協力剤の実用化への基礎試験を続けており、さらにまた作用の異なる協力作用基を複数個分子内に持つマルチ型協力剤の開発研究も進めている。

文 献

- 1) Konno Y. and T. Shishido (1986) *J. Pesticide Sci.* 11: 393~399
- 2) Konno Y. and T. Shishido (1987) *J. Pesticide Sci.* 12: 469~476
- 3) 特願 昭61-117538号

国内情報

高活性微生物の探索・改良 —新甘味料エリスリトール生産技術の開発—

農林水産省食品総合研究所

佐々木 堯

はじめに

エリスリトールは、4炭糖の糖アルコールであり、文献上では、1874年にみられる¹⁾のが最初である。

エリスリトールは、甘味料などの食品原料の他に、医薬、農薬および化学工業原料としての用途が考えられ、古くから検討されてきた。しかし、未だ工業化されていない。

そこで我々は、有用なエリスリトールを先

端的培養技術を活用し、工業的規模で生産することを試みた。その結果、生産性の高いエリスリトール生産菌の単離および実用的特性を備えた変異株の造成に成功し、グルコースを原料とするエリスリトールの大量製造法を確立することができた(図1)。

本稿では、これまでのエリスリトール発酵の開発経緯と用途について紹介する。

なお、エリスリトールに関する開発は、農林水産省食品総合研究所と日研化学㈱の共同

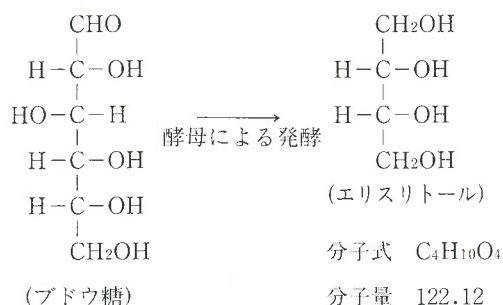


図1 エリスリトールの製法

研究で行っている。

1. エリスリトール発酵の開発経緯

エリスリトールの発酵法に関する文献の中で比較的注目されるのは、Hajnyš²⁾が分離した *Tolura* 酵母による方法である。彼らは、30%のグルコースからエリスリトールを収率約41%得たと述べている。これらの条件は、エリスリトールの他にグリセロール、リビトールを副生することが明らかにされている。

また、非糖質系原料である n-パラフィンからのエリスリトール生産については、田淵ら³⁾ および服部ら^{4), 5)} の報告がある。服部らは、*Candida* 酵母を培地 pH 4.0 以下で培養するとき、著量のエリスリトールが蓄積することを見出ししている。

エリスリトール生産菌の多くは、酵母に属するが、カビおよび細菌による生産についても報告されている。

本研究においては、最初に、国内外から多数の試料を収集し、高濃度のグルコース培地に生育する耐糖性の優れた微生物のスクリーニングを行い、その中から複数株のエリスリトール生産株を見出した⁶⁾。同定の結果、これらはいずれも *Aureobasidium* に属することがわかった。これらの株は、著しい発泡性を示し、耐糖性についても十分満足できるものではなかった。そこで我々は、紫外線、γ線、変異誘発剤などを組合せて適用することにより、泡なし性であるばかりでなく、耐糖性が驚異的に改善された菌株を取得することができた^{7), 8)}。その変異株の発酵条件について、検討を重ねてきた結果、次のような特徴が明らかになった。なお、変異株の顕微鏡

写真をグラビヤ1に示した。

- (イ) 発酵中において泡なし性であり、菌体は非凝集性である。
- (ロ) 飽和グルコース濃度(83.3%グルコース溶液)においても発酵が可能であり、エリスリトールを生成する。
- (ハ) グルコース濃度40~50%のとき、2g/ℓ・h以上のエリスリトール生成速度を示す。
- (ニ) グルコースからのエリスリトール収率は、43~52%(w/w)の高収率である。
- (ホ) 副生物は少量のグルセロールのみであるが、特定の条件下では、副生物を生成しない。
- (ヘ) 発酵の最適温度が35~37℃にあり、従来のエリスリトール生成株の中では最も高い。

エリスリトール発酵の工業化検討については、上記の菌株を用い、10ℓの発酵槽にて検討し、好結果を得た。

また、本菌株は、エリスリトール連続発酵に極めて適しており、1カ月の連続発酵試験において、回分式発酵に比べ、エリスリトール収率、発酵速度などの面で優れた結果を得られており、63年4月の日本農芸化学会で発表する予定である。

2. エリスリトールの物性および用途

エリスリトールの物性について、我々は次に示す種々の特性を明らかにした。

- (イ) 砂糖の約75%のあっさりした甘味である。
(溶解時において、吸熱作用が高く(溶解熱-180 J/g)冷感を与える⁹⁾)
- (ロ) 結晶性に優れ(グラビヤ2)、砂糖より吸湿しにくい⁹⁾。
(湿度90%で吸湿が認められない)
- (ハ) 耐熱性である⁹⁾。
(200℃、1時間加熱で分解が認められない)
- (ニ) ほとんどエネルギーにならない低カロリー甘味料である⁹⁾。
(食べたエリスリトールはほとんど、尿および糞に未変化体で排されるこ

とをアイソトープによる実験（ラット）で確認した）

(6) 瀉下作用は、他の糖アルコールより弱い¹⁰⁾。

（糖アルコールの甘味料として多量に使用されているソルビトールおよびマルチトールよりも下痢しにくいことが動物実験（ラット）にて認められている）

(7) 腸内細菌による資化性が非常に低い⁹⁾。

(8) 天然界にも多量に存在する天然甘味料である⁹⁾。

（果実類のほか、発酵食品では、ワイン、清酒、醤油などに100~1,000 mg/ℓ含まれている）

以上述べたエリスリトールの特性は、低カロリー甘味料に望まれる性質である。我々が食用に使用している低カロリー甘味料として、サッカリンナトリウム、アスパルテーム、ステビオサイドなどがある。しかし、これらは甘味の質、保形性、熱、pHなどに対する安定性の面で必ずしも満足できるものではなく、その甘味料の特徴を活かし得る分野に限定した使われ方をしている方が多いともいえる。

一方、エリスリトールは、砂糖と同様な物性（甘味度、結晶性など）で、しかもエネルギーにほとんどならない全く新しいタイプの低カロリー甘味料である。

エリスリトールの主な食品用途は、テーブルシュガー、チョコレート、チューインガム、錠菓、キャンディー、クッキーなどの低カロリー甘味料として使用するほか、高甘味度甘味料の甘味質改良、脱水加工食品、蒸溜酒のアルコール刺激緩和剤などの用途がある。

エリスリトールの化学工業分野の用途は、塗料などの樹脂の合成原料としての用途が考えられている。医薬品としての用途も現在検

討中であり、今後の検討によって更に用途が拡大するものと考えられる。

おわりに

エリスリトールは、ソルビトールおよびマンニトールと同じ糖アルコールの仲間であるが、一般には余り知られていない糖質である。

しかし、既に述べたように、エリスリトールは、果実類の中で、ワイン、清酒、醤油などに100~1,000mg/ℓ含まれており、日本人のみならず世界の多くの人々が気づかずに摂取している天然の甘味料である。

また、エリスリトールは、炭素の数において、グルセロールとソルビトールの間にあるが、その性質は、両者とも大きく異なっている。このエリスリトール生産技術を更に発展させると同時に有用物質の生産に応用していくことが今後の課題と考えている。

文 献

- 1) Hofmann A.W.(1874) *Ber.* 7: 508~514
- 2) Hajnys G. J., J. H. Smith and J. C. Garver (1964) *Appl. Microbiol.* 12: 240~246
- 3) 田淵武士・原 誠五 (1973) *農化.* 47: 485~490
- 4) Hattori, K.R. and T. Suzuki (1974) *Agr. Biol. Chem.* 38: 581~586
- 5) Hattori, K.R. and T. Suzuki (1974) *Agr. Biol. Chem.* 1203~1210
- 6) 若生勝雄・小田恒郎・川口 嶽, 春見隆文・林 清・久保直哉 (1985) 日本醸酵工学会, 大会講演要旨集 p.136
- 7) 佐々木堯・春見隆夫・貝沼圭二・石塚博明・若生勝雄・小田恒郎・川口 嶽 (1986) 日本醸酵工学会, 大会講演要旨集 p.130
- 8) 石塚博明・谷口 肇・若生勝雄・小田恒郎・川口 嶽・佐々木堯 (1987) 日本醸酵工学会, 大会講演要旨集 p.114
- 9) 日研化学㈱ 投稿準備中
- 10) 丹羽弘司・引地 登・桜井栄一・植田公孝・福勢 元 (1981) *薬学雑誌* 101: 567~574

国内情報

電気融合による *Brassica oleracea* と *Brassica campestris* の体細胞雑種の作出

農林水産省 野菜・茶業試験場

平井正志

はじめに

遠縁交雑は育種の一つの手段であるが時として非常に困難を伴う。しかし、それは成功すれば飛躍的な変異の拡大の可能性を秘めている。ライコムギ、タバコ、バレイショの耐病性などそれにまつわる育種家の苦労話はずきない。近年細胞融合という夢のような話が出現し、これまでの遠縁交雑の難関をいともたやすく突破できるかのように見えた。

しかしその後、この技術は当初考えられていたようにオールマイティーなものではなく、遠縁交雑の可能性を少し広げるだけであることが明らかになってきた。苦労して得た融合物もほとんどの場合不稔性であり、戻し交雑を行ってさらに育種を進めることが困難であった。

その利用範囲は当初考えられていたよりもはるかに限られているとはいえ、ほかの手段では代えがたいものをもっている。現在多くの育種研究者がこれを取り組んでいるのはもっともなことであろう。

当野菜育種部は以前からプロトプラストからの植物体再生系の確立に力を注いできており、現在ではキャベツ、コマツナ、ナス、トマト、レタス、フキなど、いくつかの重要な野菜でこの技術を確立している。細胞融合は当初ポリエチレングルコール法を用いて行われてきたが、操作が複雑であり、より簡便かつ効率的な細胞融合法の確立が期待される。ここでは、最近開発された電気融合法により *Brassica oleracea* と *Brassica campestris* の葉肉プロトプラストを融合し、体細胞雑種の作出を試みた。

1. 実験方法

B. oleracea としてキャベツ「ヤング」、*B. campestris* としてコマツナ「ごせき晩生」及びカブ「大藪」を用いた。プロトプラストを得る材料として野外や温室内で育てた植物を用いる場合もあるが、滅菌のため植物細胞に傷害を与えたり、また同じ状態の植物が得られないなどの問題点があり、我々はプロトプラスト調整の材料として試験管内で育てた植物を用いている。MS培地で無菌的に育苗した植物体から葉片を切り取り、約1mm幅に細断した後0.02%マセロザイムR10、0.1%メイセラゼ、改変MS(1/2MS, NH_4NO_3 のみ200mg/l, 1%ショ糖)、及び0.5Mマンニトールを含む酵素液に一液浸した。手で振とうして遊離させたプロトプラストを、50umのナイロンメッシュを通し、CPW塩を含む0.5Mマンニトール液で洗浄した。

キャベツのプロトプラストは10mMヨードアセトアミドで10分間不活化処理を行い、*B. campestris*(カブあるいはコマツナ)のプロトプラストと等量混合した。プロトプラストを0.5Mマンニトール液で約 5×10^5 個/mlの密度に調整し、BTX Model 401と付属の1ml容量の2mm幅の平行電極を用いて電気融合処理を行った。融合条件は1MHz, 200V/cmの交流を10秒流した後直流のパルスを与えて行った。パルスの強さと時間及び処理の回数を変えて検討した。

融合処理は1, 200V/cm~2, 350V/cm, 15又は30usの直流パルスを2または3回与えることによって行った。顕微鏡下での観察によると強いパルス(電圧が高いか又は時間が長い)では、融合率が高まる一方でプロトプラ

ストの破壊や三つ以上の細胞の融合が多くなり、弱いパルスでは融合率が低下した。培養後の生存率を考慮すると、約10%のプロトプラストが融合する程度が最適と考えられた。

ここではキャベツのプロトプラストの再分化に適した培養条件を用いている。他方のカブやコマツナはこの条件では再分化しないので、カブやコマツナのプロトプラストと融合させて培養してもキャベツのそのの方が生き残る可能性が高い。そこでヨードアセトアミドを用いキャベツのプロトプラストの生存能力を抑えた。すなわちキャベツはコマツナやカブのプロトプラストと融合して初めて生存能力を回復し、再分化するという条件を設定したわけである。

最適と思われるいくつかの条件で無菌的に融合後、改変MS, 5mg/l NAA, 又は, 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l NAA, 1 mg/l カイネチン, 0.5Mマンニトールを含む液体培地で $2 \sim 3 \times 10^5$ 個/mlの密度にし、6 cm プラスチックシャーレ中で20°C散光下(約100 lux)で培養した。得られたコロニーを改変MS, 0.5mg/l 2,4-D, 5mg/l カイネチン, 0.8寒天を含む培地上に移し、カルスが約2 mmの大きさのときに1 mg/l BA, 0.035mg/l GA₃を含むMS寒天培地に移植して3,000 lux, 16時間日長下で培養した。芽を分化したカルスをホルモンを含まないMS寒天培地に移して発根させた。

2. 実験結果

融合処理後多数のカルスが得られたが、キャベツ+コマツナで2個のカルスから、キャベツ+カブで6個のカルスから植物体が再生した(グラビヤ1, 2)。融合植物の確認はアイソザイム分析によって行った。アイソザイムは同一の働きをする酵素に与えられた名前である。酵素すなわちタンパク質の遺伝は遺伝子により直接に支配されているため、形態的な形質の遺伝のようなあいまいさは極めて少ない。ここで分析した酸性フォスファターゼは植物体がこの遺伝子に関してホモである場合は一本の、ヘテロである場合は3本のバンドを示す。葉の酸性フォスファターゼアイ

ソザイムをアクリルアミドゲル電気泳動で分析したところ、キャベツ+コマツナの2個体及びキャベツ+カブの3個体で3本のバンドが得られ、雑種であると確認された(グラビヤ3)。残りのうち2個体はキャベツで、1個体は黄白化して枯死した。

雑種個体を得られた融合条件は、2, 350 V/cm, 30us のパルス 2 回, あるいは 2, 350 V/cm + 1, 750 V/cm + 1, 200 V/cm の 15us 又は 30 us の 3 回のパルスの処理区であった。

考 察

電気融合法は接作が簡易で迅速な上、用いるプロトプラストの種類に応じて簡単に処理の強さを変えることができるため、従来の薬品による融合法よりも優れていると考えられる。電気融合に用いる電流の発生装置はいままでかなり高価であったが、最近は低価格のものが出回り始めており、いずれもポリエチレングルコール法は電気融合法に置き代わるものと考えられる。

ここで用いた *B. oleracea* と *B. campestris* の組み合わせは互いに比較的近縁であり、自然に交雑したものとして菜種油を搾汁する洋種ナタネなどがあり *B. napus* と呼ばれている。また胚培養子房培養によっても人工的に作出することができ、ハクランはハクサイとキャベツの組み合わせで胚培養を用いて當場で以前に作出した新野菜である。したがって今回得られた個体そのものは単なる実験植物であって、実用品種になるとか、実際の育種に用いるとかいうものではない。

融合細胞を選抜する方法は融合実験の一つのポイントであろう。融合細胞のみを選抜する方法としてはアルビノ株などを用いて形態や色で選抜する以外に生理的な特性を用いて培地上で選抜する方法がある。この方法ではいちいち人手にで選抜する必要がないので優れていると言えよう。これには例えば2種の硝酸還元酵素欠損株の相補効果を用いる方法、各種の抗生物質耐性株を用いる方法等があるが、それぞれ目的とする植物で変異株を得なければならぬ。ここで我々が用いたヨードアセトアミド法は特別な変異株を必要としな

いので多くの植物に利用できるのも便利である。

アブラナ科野菜には自家不和合性があり、他殖性である。従って固定品種の場合多くはアイソザイムでは遺伝的に多様な集団である。ここで用いたカブとコマツナはそれぞれ多くの実生を集団で用いている。同定に用いた酸性フォスファターゼを支配する遺伝子座においてカブでは2個のコマツナでは3個の対立遺伝子が存在し、1個体ごとにアイソザイムパターンが異なっていた(グラビヤ4)。したがって融合植物の親となったプロトプラストの遺伝子型は特定できない。一方の親としたキャベツは挿し木で繁殖している個体なので遺伝子型が判明している。今回はキャベツの持つ対立遺伝子がコマツナとカブのどの個体でも見いだされなかったため、融合植物を確認することができた。他殖性の植物を扱う場合にはこの個体間の変異に注意する必要がある。

3. 今後の課題

ここで示したような通常の融合細胞は二つの植物の遺伝情報のすべてを一つの融合植物の中へ持ち込む方法である。この場合融合植物の多くが不稔性になる。二つの植物が遠縁になればなるほどこの分稔性は克服しがたくなり、実際の育種に用いることができない。そこでこの弱点を取り除くため遺伝情報の一部を取り込ませる非対称融合が考案されてい

る。これは片方の親の染色体の一部をX線などで破壊しておきもう一つの親と融合させるやりかたである。ニンジンとパセリの組み合わせでは通常の融合では再分化個体を得ることができないが、パセリをX線で照射しニンジンと融合させた非対称融合では再分化した個体を得られている。この非対称融合を適当な選抜方法と組み合わせればある程度遠縁の植物から目的とする遺伝子の導入を図ることも可能である。

また片方の細胞から密度勾配遠心で核を除いて融合する方法では効率よく細胞質雑種、(Cybrid)を得ることができる。細胞質遺伝子の支配する遺伝形質は決して多くないが通常の交配育種ではこれを改良することが難しいかあるいは全くできないので注目される。ミトコンドリア遺伝子に由来する細胞質雄性不稔、葉緑体遺伝子に由来する除草剤耐性などが当面の導入の目標であろう。これらの手法は今後ますます注目されるようになるであろう。

当野菜育種部では今回の結果をもとにしてさらに他の方法では交雑できない組み合わせで細胞融合、非対称融合、細胞質雑種の作出などを試みる予定である。なおこの細胞融合の研究は当野菜育種部、育種第1研究室 西尾剛主任研究官が主として行い、1987年10月園芸学会に発表したものである。詳細については野菜・茶業試験場報告に掲載予定である。

国内情報

モノクローナル抗体を用いた豚マイコプラズマ肺炎の新しい診断法とその野外応用

農林水産省家畜衛生試験場・北陸支場

森 康行

豚マイコプラズマ肺炎 (Mycoplasmal pneumonia of swine: MPS) は、*Mycoplasma hyopneumoniae* という微生物により惹起される疾病で、豚の呼吸器病の中でも最も重要なものである。本病は、慢性経過を

取るのが特徴であり、死亡率は低いが高罹患率が極めて高く、飼料効率の低下あるいは治療・予防のための薬剤投与による支出等、養豚産業に与えている経済的損失は莫大なものとなっている。農林水産省が行った豚慢性疾病

に関する全国調査では、現在日本の屠場に出荷される豚の半数以上が本病による肺病変を有しており、ほぼ全国的に蔓延していることが明らかにされている。しかし、本病の診断、予防に関する研究は古くから行われて来たにもかかわらず、未だ確立はされていない。特に、診断法に関しては、これまでに多くの血清学的診断法が報告されているが、野外に広く応用されるには至っていないのが現状である。その最大の理由は、従来の血清反応を応用した診断法の特異性に問題があるためである¹⁾。豚からは本病の病原体である *M. hyopneumoniae* の他に、多くのマイコプラズマが分離され、これら豚由来マイコプラズマ間には多くの共通抗原が存在し、血清学的診断上の障害となっている。そこで、筆者らは *M. hyopneumoniae* に対するモノクローナル抗体を利用し、特異抗原を精製し、酵素免疫測定法 (ELISA) により本病を血清学的に診断する方法を開発した²⁾。さらに、野外豚の診断法として十分応用可能であることも確認されたので、その概要について紹介したい。

1. *M. hyopneumoniae* に対する感染豚の抗体応答

病原体のある特定の成分のみを抗原として、血清学的診断法に用いようとするときには、病原体の抗原分析を行うと共に、感染を受けた宿主がどのような抗体応答を示すかを検討

しておかなければならない。さらに、今回の場合には、豚由来マイコプラズマ間の共通抗原および特異抗原の分析を行うことも重要である。

そこで、まず *M. hyopneumoniae* 実験感染豚を用い、感染豚の抗体応答を経時的に調べた。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) により、*M. hyopneumoniae* 膜蛋白成分を分画し、各成分に対する抗体応答を、いわゆる、Immunoblotting 法により解析した。また、豚由来マイコプラズマ間の共通抗原についても同様な方法により分析した。その結果、図1に示したように、*M. hyopneumoniae* 細胞膜に存在する多くの抗原成分中、分子量約76キログルトン (kd) と46kd の膜蛋白質が強い免疫原として作用し、感染豚は早くからこれらの抗原に対する抗体を産生することが明らかとなった。さらに、これらの抗原に対する抗体は、感染後長期間にわたって産生され、MP S 診断上の良い指標となり得ることが示唆された。また、他の豚由来マイコプラズマとの交差試験において、これらの抗原 (76および46kd) は比較的特異性の高い *M. hyopneumoniae* 抗原であることも明らかとなった。このようにして、単一抗原を血清学的診断法に応用する際の重要な基礎データが蓄積され、同時に、ここで得られた知見は *M. hyopneumoniae* に対する宿主の防御能を研究する上からも重要なものとなった。

2. *M. hyopneumoniae* に対するモノクローナル抗体の作製

細胞融合を利用したモノクローナル抗体の作出は、今や微生物学あるいは免疫学の領域では、なくてはならない技術の一つとなっている。筆者らも *M. hyopneumoniae* の表面構造の解析、抗原分析および抗原の精製を目的としてモノクローナル抗体の作出を試み、多くの抗 *M. hyopneumoniae* モノクローナル抗体産生細胞株が得られている。これらモノクローナル抗体産生細胞株は、現在までに150株を越え、未だすべての株について詳しい解析が終っていないが、多くの株が

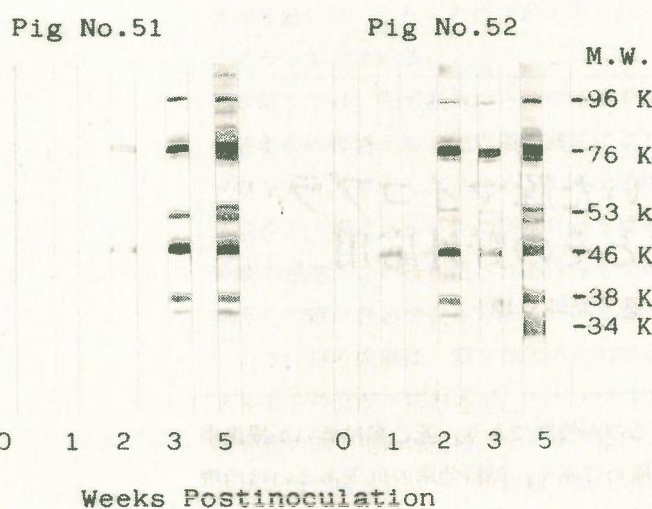


図1 *Mycoplasma hyopneumoniae* 接種豚の抗体応答
Immunoblotting法による分析

M. hyopneumoniae の 46kd 抗原に対する抗体産生クローンであった。つまり、豚に対し強い免疫原性を示す 46kd 膜蛋白抗原は、マウスに対しても強い免疫原として作用することが明らかとなった。この *M. hyopneumoniae* の 46kd 膜抗原は、前項で述べられたように M P S 診断上の一つの有用な指標となることから、モノクローナル抗体により、46kd 抗原を精製し診断に応用することを試みた。

3. モノクローナル抗体を用いた ELISA による M P S の血清学的診断

モノクローナル抗体を利用して抗原を精製し、血清反応に用いるには様々な方法があるが、感度が高くしかも多数の検査処理が容易な ELISA の応用を検討した。ELISA の術式を図 2 に示したが、まず、抗 46kd モノクローナル抗体を 96 穴のマイクロプレートに吸着させ、洗浄後界面活性剤で可溶化させた *M. hyopneumoniae* のクルードな抗原を添加する。この段階で 46kd 抗原のみを捕捉させ、結合しない他の抗原は洗浄により除去する。その後、モノクローナル抗体によって捕捉された 46kd 抗原を用いて、豚血清中の本抗原に対する抗体のみを検出する、いわゆるダブルサンドイッチ法を応用したものである。本法はマイクロプレート上で簡単に抗原精製が行え、しかも、モノクローナル抗体で捕捉された抗原は長期間安定であることが示されている。さらに、*M. hyopneumoniae* 実験感染豚の抗体応答の経時的な観察において、従来から行われていた補体結合反応³⁾ に比べ、ELISA の方が長期間にわたって抗体の検出が可能であった。このように、モノクローナル抗体を用いた ELISA は、従来の血清反応に比べ、感度、特異性および再現性の点で優れた方法である。

しかし、現在この ELISA ダブルサンドイッチ法に応用可能なモノクローナル抗体を産生する細胞は 1 株のみ (IgA モノクローナル抗体産生株) で、他の多くの株は応用することが出来ない。この原因は不明であるが、今後さらに検討しなければならない問題である。

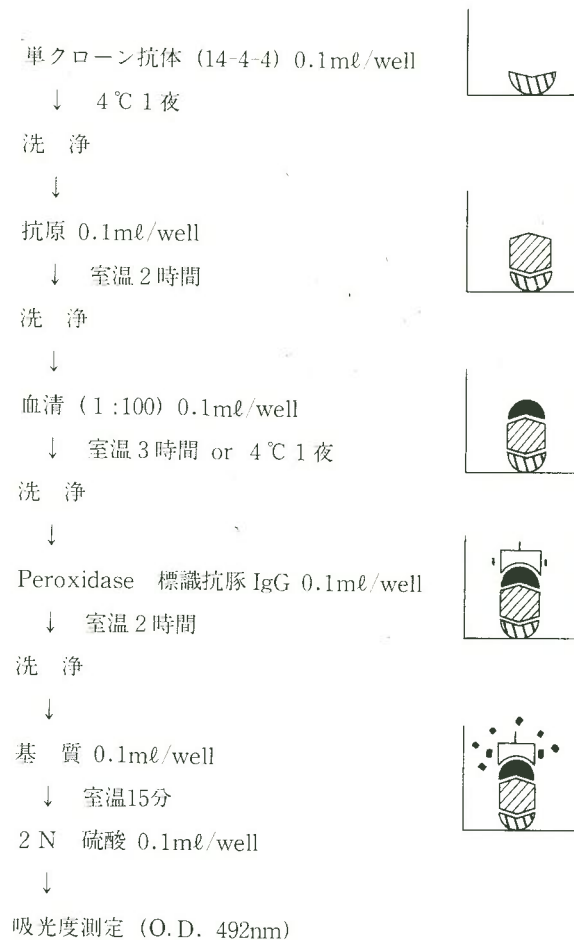


図 2 ELISA の術式

4. 野外応用

昭和 60 年度より畜産局衛生課が進めている「豚慢性疾病清浄化促進事業」の一環として全国 46 都道府県から集められた 1,461 例の豚の血清について、ELISA (モノクローナル抗体法) による M P S 抗体検査を実施した。同時に、M P S フリーの陰性対照群として 2 カ所の S P F 養豚場より 218 頭の豚血清を集め抗体検査を行った。その結果、S P F 豚群はすべて ELISA 抗体陰性であったのに対し、全国から集められた屠場出荷豚の血清は、1,461 例中 1,285 例 (88%) が抗体陽性と判定された。さらに、屠場出荷豚中肺病変検査が可能であった 1,158 頭中 689 頭 (59%) が M P S の肺炎病巣を保有していた。このように、現在わが国で飼育されている多くの豚は M P S に感染しており、それらはモノクローナル抗体を用いた ELISA によりの確に診断するこ

とが可能であった。

以上、モノクローナル抗体を用いた ELISA による MP S の血清学的診断法の概略を述べたが、現在本法をキット化し、診断薬として市販するために種々の検討が加えられている。

文 献

- 1) Freeman, M.J. *et al.* (1984) *Can. J. Comp. Med.* 48 : 202
- 2) Mori, Y., Hamaoka, T. and Sato, S. (1987) *Isr. J. Med. Sci.* 23 : 657
- 3) 森 康行・佐藤静夫 (1986) 畜産の研究 40 : 285



文献情報

農業におけるバイオテクノロジーと育種の協力

植物におけるバイオテクノロジーは、次の「緑の革命」への鍵である。生物農薬や、植物栄養を改善するために植物と土壌微生物を操作することは農業に対してそれぞれに影響を持つ。細胞生物学と分子生物学は、植物の遺伝子プールを拡大し多様化することで将来の農業に多大な影響を与えるだろう。しかし、バイオテクノロジーはそれ自体だけではこうした未来を描くことはできない。次の農業の飛躍を準備する前に、バイオテクノロジーと育種との相互依存について考えなければならない。

細胞生物学（組織培養）は、既に植物の遺伝子プールの有用性と多様性を増大させる新しい遺伝子を多く作り出している。分子生物学は病気や害虫に対する抵抗性や除草剤耐性といった一遺伝子支配の形質を選択的に導入することにより、将来遺伝子プールの拡大につかわれるだろう。

植物育種 (Plant breeding) は技能と科学の両面を持ち、バイオテクノロジーの研究者に、様々な環境での植物の能力の観察、データ収集、統計的分析の体系的な手段を提供する。育種の技能は、組織培養や外来遺伝子の導入によって生ずる小さな有益な変化を見落とさない育種家の技量と経験によるものである。

バイオの研究者と育種家が協力して仕事をすると、育種家は既知の価値のある遺伝子と、バイオテクノロジーにより作り出される新たな改良された遺伝子を、植物の全般的な能力の改善、収量の増大や特別な形質の付与、品種の多様性の創出のために結びつけて使うことができる。バイオの研究者に対し、育種は実験室で新たに発見された興味深い形質の安定性、遺伝率、適合性を決める最善の手段を提供してくれる。しばしばバイオテクノロジーの領域の多くの人は、育種は単に周縁的な価値しかないと思っているけれども、育種はバイオテクノロジーの長期的な成功にと

つての鍵となるものである。

研究された種や測定法にもよるが、一本の植物のその一生の間に 50,000~100,000 の異なる構造遺伝子が発現されると見積られている。近年の急速な進歩にもかかわらず、遺伝子や細胞に対する実験室での操作はこの複雑な機構にほんの小さな介入ができるにすぎない。この一遺伝子の機能を修飾することに対して、その他の 49,999 の遺伝子が相互に作用することが、組織培養と遺伝子導入が最大の価値を持つのに本質的なことである。商業的に使えそうな育成過程の系統に含まれる多くの形質は、現在でもバイオテクノロジーの方法のみでは調べられない。この場合バイオの研究者と育種家が育成過程で密接に共同して働くことは欠くことができない。もし研究の目的が商業化ならば、商業的に重要な遺伝子について仕事を始めるのが早ければ早い程、その“品種”が早く商業的に価値を持つようになる。育種家は商業的に価値ある遺伝子を選ぶのに重要な役割を果たす。育種技術は遺伝的に多様な集団の複雑さや、一個体の中の多くの遺伝子の複雑さをとり扱うために設計されている。

育種の戦略は作物の集団中に遺伝的多様性を作り出し、その集団の中から望ましい数個体を選抜し、そこから新しい集団を作ることである。今日 *in vitro* での選抜は力強い手段であって、何百万の細胞をすばやくふるいにかけることを可能にした。2,000,000 個の細胞のスクリーニングにはペトリ皿一枚で足りる。同数の植物を土に植えたとしたら、33ha の土地が必要で、その一つひとつを評価するには多大な時間と人手がかかることであろう。また遺伝的多様性を増すのに伝統的には別系統とのかけ合わせが行われてきたが、今日では実験室で作られた新しい遺伝子を追加することができる。そしてこうした遺伝子を商用品種にまとめるのは再び育種家の仕事である。さらに近年発達してきた実験室でのふるい分けの手法は費用が十分に下がれば、RFLP 分析 (Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis) は遺伝子型を決めるのに、コンピューターを使ったタンパク質

の配列決定は分子レベルでの表現型を決めるのに効果を示すだろう。

現在、新しく育成された品種の能力を評価する最善の方は、多くの場所で何年にもわたって圃場検定をし、実際に作られる農場でさらされるであろう環境の中で調べることである。種子会社や農家は、最終的な品種の適合性の決定から圃場検定を除くことを望まないが、バイオの研究者は初期選抜の時間と費用を低減し、ある種類の選抜試験の感度を高める有効な手段を作ることを期待している。

バイオテクノロジーも育種も農家の実践に価値のある技術の一式を持っている。バイオの研究者と育種家が共同で仕事をすることは農業のコストを下げ、生産物の多様性を創出することで、世界の農業の前途を拓く強力な新しい力となる。(抄訳 高原美規)

Biotechnology and breeding team up in agriculture

William J. Reid

Biotechnology 5 : 899-906 (1987)

文献情報

サツマイモのプロトプラスト培養からの個体再生

サツマイモの葉柄から単離されたプロトプラストは発根能力のあるカルスを形成することが報告されている。我われも、サツマイモの葉柄や茎に由来するカルスで同様の結果を得ており、また、これらは器官や遺伝子型に依存することを示した。しかし、サツマイモのプロトプラストから個体を再生できたという報告はこれまでにない。そこで、我われは、この点についての成功例を報告する。

(材料と方法) Guyana と DuclosXI の2品種を用い、それらの茎の単一の節を培養した。ビタミン類 (Morel と Wetmore による)、20 g/l のシユクロース、1 mg/l の IAA か NAA、そして、7 g/l の寒天を含む MS 培地を用い、27°C、12時間日長、62 μ Em⁻²、

S⁻¹ の照度、湿度60%のチャンバー内で培養した。4~5の節をもつ長さ4cmのシュートが4週間の培養で得られた。葉肉部の組織は、酵素によるプロトプラストの分離を抑制するので、葉柄と茎からプロトプラストを単離した。前報と同じ方法で単離したが、次の修正を行った。酵素液は1.5% w/v のセルラーゼ R-10、0.5% w/v のマセロザイム R-10で、シユクロース 19% を含み、0.05% Mes で緩衝化した。27°C 暗黒で16~18時間インキュベートした後、プロトプラストは100 μ m の篩で分離した。その懸濁液は、21% シユクロースを含む同量の Cpw で希釈し、10分間、120g で遠心分離した。浮上しているプロトプラストは、更に、シユクロースの代わりに0.25M マンニトールと0.125M の NaCl を含む Cpw 溶液で3分間、55g の遠心分離で洗浄した。

プロトプラストは、まず、0.2mg/l の2,4-D、0.5mg/l のゼアチン、0.5mg/l のNAA、0.05mg/l のMes、0.35M のグルコースを含むKM8P培地を用い、3 \times 10⁴/mlの密度で培養した。プロトプラスト懸濁液5mlをペトリ皿にプレートし、7日間27°C暗黒で、つづいて、12時間日長で培養した。21日間の培養後、二つの処理を行った。まず、最初の培地と同じ塩、及び2mg/lのゼアチンか1mg/lの2,4-Dのいずれかを含む1mlの培地を加えた。次に、プロトプラスト由来のカルスを5分間55gの遠心分離で液体培地から分離し、2mg/lのゼアチンを含む5mlの培地で再度懸濁した。第4週の終りの時期に、細胞懸濁と先に述べた二つの処理で得られたカルスを25mlのMS固形培地に移した。更に4週後、カルスを低濃度(0.25mg/l)のゼアチン培地に移した。

(結果と考察) *In vitro* 植物は、温室で育成したものと同じ程度のプロトプラストを産出した。*In vitro* 植物由来のプロトプラストは細胞質に富んでいて、培養皿の底に沈み、一方、温室で育成した植物由来のプロトプラストの90%以上は、密度低く、培地中に懸濁するか、あるいは浮上した。

細胞壁形成は24~48時間でみられ、小さな、

あるいは中間の大きさのプロトプラストでは、72時間以内に最初の分裂がみられた。しかし、比較的頻度の高い分裂は *in vitro* 植物を材料にした場合に認められた。分裂の盛んな細胞は、21日目に10~15細胞からなるカルスを形成した。この時、ゼアチン、あるいは2,4-Dが培地に含まれていると、はっきりとした形態変化が観察された。これらの培地を加えて3週間経つと、多くのカルスは塊から分離し、2極構造に類似した3~6細胞の長く伸びた形となるが、これらは器官形成には至らなかった。生長物質を含まないMS培地で培養すると、これらの長く伸びた細胞は死滅したが、2 mg/l のゼアチンを含むMS培地ではカルスを形成したが個体再生には至らなかった。

プロトプラスト由来のカルスを21日目に2 mg/l のゼアチンを含むKM8P液体培地に移すと、カルスの生長が旺盛になり、緑色で密度の高いカルスが形成された。このカルスのある部分は、小さな緑色細胞からなる生長点のような組織に分化した。この部分は、2 mg/l のゼアチンを含むMS培地で新たに培養すると、型が大きく、数も多くなった。このカルスをゼアチン0.25mg/l の低い濃度のMS培地に移すと、8週間以内に植物個体が再生した。

いくつかの植物種のプロトプラストからの植物体再生に遺伝子型が影響することはよく知られている。本実験では、品種 Duclos XI 4 の80カルスから植物体が再生したが、品種 Guyana では再生がみられなかった。Duclos XI の生長点様の組織から1~2本のシュートが分化生長し、十分に生長したシュートはIAAを含む増殖培地に移された。器官形成能のあるカルスは、低濃度(0.25mg/l)のゼアチン培地で連続的にシュートを形成した。実際に、品種 Duclos XI の4カルスから30以上の個体が再生した。

本実験において、プロトプラストから植物体再生に導くゼアチンの効果的役割が再確認された。更に、*in vitro* 条件が均一で分化全能性の高い若い植物をつくりだすので、プロトプラスト源として *in vitro* 植物を用いたことが植物体再生の成功の原因になったものと

思われる。(抄訳 山本友英)

Plant regeneration from protoplast culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.)

Darasingh Sihachakr and Georges Ducreux
Plant Cell Reports 6: 326-328 (1987)

文献情報

酵母 *S. cerevisiae* でのヒト interleukin 1 β 分泌に有効なリーダーペプチド

近年酵母 *S. cerevisiae* 分泌性のベクター構築には性フェロモンである α 因子や *S. cerevisiae* 由来のキラ毒素のリーダーペプチド配列が利用されている。しかし、両者共に多細胞生物の典型的なリーダーペプチドと異なり、特異なプロセッシングを受ける長いリーダーペプチドであるため、EGF(上皮細胞成長因子、53個のアミノ酸よりなる単純ペプチド)では正常な分泌を行なうが、ヒトインターフェロン- α 1やネズミインターロイキン-2では部分的な分泌しか起らなかった。

一方、酵母 *Kluyveromyces lactis* のキラ毒素の分泌が構造・機能的にも *S. cerevisiae* と異なり、むしろ一般の原・真核生物に近い構造の16アミノ酸よりなるリーダーペプチドにより起こることが示されている。そこで、酵母での異種タンパク質の分泌生産への応用として、ヒト interleukin-1 β (IL-1 β)のcDNAを用いた生理活性分子の分泌について検討されている。

使用分泌ベクター(YEpsec1, 8,969bp)は酵母発現シャトルベクター(pEMBLye \times 2, 8,924bp, 酵母 2 μ m DNA ARS, leu 2⁻d(通常のLEU2に比べ非選択条件下での安定性及びコピー数が増えるが、単独の栄養選択標識としては取り扱い難い), URA3(形質転換体栄養選択標識として使用), 転写開始シグナルとしてUAS_G-CYC1と終了シグナルとしてFLP遺伝子のターミネター及び大腸菌ori, amp^R, 分子内に7種類の制

限酵素の唯一の切断部位を持つ)に Sst I 部位の下流に *K. lactis* K1 のキラ毒素 (キラプラスミッドのオープンリーディングフレーム 2) のリーダーペプチドとして必要な合成オリゴヌクレオチドを挿入して構築されている。また、この合成オリゴヌクレオチドの後部にはエンドペプチダーゼの切断認識部位 Val-Gln-Gly をコードし、ポリリンカーとして acccggga も持っている。

ヒト IL-1 β はアミノ配列 121-269 をコードする (Auron *et al.*) cDNA を使用し、YEsec 1 のキラ毒素リーダーペプチド配列のすぐ下流の BamHI site の挿入し、YEsec 1-hl1 を構築した。このプラスミッドを用い酵母 *S. cerevisiae* (S150-2B) を形質転換したところ、完全培地中の 20 世代培養後でも安定であり、2 μ m DNA の少なくとも 2 倍以上のコピー数を持っていた。

YEsec 1 中の IL-1 β 配列の転写は誘導培地 (含ガラクトース) 中でのみ発現し、IL-1 β 特異的プローブによる Northern blot 法で約 1 kb RNA が認められ、UAS_C-CYC1 のプロモーター及び FL P のターミネーターが有効に働いていた。

蛋白質の発現と分泌は誘導培地での全細胞抽出物 (ガラスビーズにより粉碎) 及び培地上清 (10% TCA 沈澱物) を SDS-PAGE にかけることで確認を行なった。培養液中に YEsec 1-hl1 形質転換体には YEsec 1 等では認められない特有な 22kd のタンパク質が合成され、完全に培地中に分泌 (誘導培地) 1 ℓ あたり 1 ~ 2 mg) され、免疫学的に Th1 細胞 (IL-1 β 生産細胞) の培養上清と同一であった。しかし、Th1 から分泌される IL-1 β は約 17kd である。この差は、cDNA の N-末端側部に糖鎖付加の可能性あるアミノ酸配列 (Asn-Cys-Thr) が存在し、そこに糖鎖が付加されるために見かけ上起こることが、22kd のタンパク質を endoglycosidase H 処理で 17kd に変わることを、及び *in vivo* でツニカマイシン添加 (0.5mg/ ℓ 以上) による糖付加阻害によっても 10kd タンパク質の生成されることにより確認された。また、生成される 22kd タンパク質の N-末端のアミノ酸

残基配列の決定により、リーダーペプチドと分泌タンパク質との切断位置は *K. lactis* キラ毒素で期待される位置より 3 残基 (ポリリンカー配列部に相当) 後方の挿入 cDNA の開始位置で実際は行なわれていた。これはこのポリリンカー配列の中に *S. cerevisiae* でも von Heijne の法則 (切断シグナル配列中 Val や Phe の存在と同程度に Thr と Gly の -3 と -4 の位置でのプロセッシングの可能性が高い) に従う、新規で有用なエンドペプチダーゼ切断部位があることを示唆していた。

この 22kd タンパク質の生理活性はマウス胸腺細胞増殖試験で行なったところバックグラウンドの 7 倍を示し、天然の IL-1 β と同じ性質を有していた。(抄訳 後藤邦康)

A novel leader peptide which allows efficient secretion of a fragment of human interleukin 1 β in *Saccharomyces cerevisiae*
Baldari, C., J. A. H. Murray, P. Ghiara, G. Cesareni and C. L. Galeotti
EMBO Journal 6: 229-234 (1987)

文献情報

中国のブタが保存し続けている インフルエンザウイルス遺伝子の特徴

中国東部のブタには、ヒト集団からはすでに消失したインフルエンザ亜型 H3N2 ウイルスの抗原遺伝子が、現在なお保持されていることが知られており、本研究はその存続機構を明解にするために行われた。

1976~82 年間に中国東部の各地からホンコン屠場に搬入された、6~9 カ月齢の健康な屠殺豚の気管ぬぐい液より、11 日齢発育鶏卵の尿膜腔内接種で、32 株の H3N2 ウイルスを分離した。分離率は約 1% であった。これら 32 株のウイルス遺伝子を解析するため、BALB/c マウスに A/WSN/33 (H1N1) あるいは H3N2 ウイルスの標準株 A/HongKong/1/68 と抗原的に同じ A/Northern Territory (NT)/60/68 ウイルスの経鼻感染か、腹腔

内接種により作製されたウイルスの hemagglutinin 凝集素 (HA), neuraminidase ノイラミニダーゼ (NA) および nucleoprotein 核蛋白 (NP) に対する単クローン抗体を使用した。血清反応の赤血球凝集抑制試験はマイクロタイター法で、またノイラミニダーゼ抑制試験と ELISA は既報の方法で行った (*Virology* 122: 38-47, 1982)。

1968~75年間にヒトから分離された H3N2 ウイルスでは、親株の NT/60/68 は使用した 12 種類の HA 単クローン抗体の全てと反応したが、その反応抗体数はウイルスの分離年とともに減少し、1975 年分離の Victoria/3/75 は僅かに 4 種類の抗体と反応したにとどまった。さらに 1977 年以降の分離株 Texas/1/77 と Bangkok/1/79 では 12 種類の抗体のどれとも反応しなかった。

1976~78年間にブタから分離された H3N2 ウイルスは、12 種類の HA 単クローン抗体のうち 1~8 種類の抗体と反応したが、多くのウイルス株は、1970~75年間にヒトから分離されたウイルス株と非常に類似した反応パターンを示し、2~4 種類の抗体と反応した。これとは対照的に、1982年にブタから分離された 2 株は、さきに 1976~78年間のブタ由来ウイルスとは大きく異なり、使用した 12 種類の HA 単クローン抗体のほとんど全部と反応した。

鳥類由来の H3N2 ウイルスの抗原分析では、変化に富んだ反応パターンがみられ、12 種類の HA 単クローン抗体のうち 0~11 種類の抗体と反応した。例えば A/Duck/HongKong/7/75 は 11 種類の抗体と反応したのに対し、A/Duck/HongKong/24/76 株はこれらの抗体のどれとも反応しなかった。

ブタ由来の H3N2 ウイルスの 4 種類の NA 単クローン抗体に対する反応パターンでは、1968~77年間のヒト H3N2 ウイルスの各株と極めて類似した反応を示した。前述の HA 単クローン抗体において、1976~78年間の分離株と 62 年の分離株の間で見られた反応パターンの違いは、この NA 単クローン抗体では観察されなかった。またこれらのブタ H3N2 ウイルスでは、1975年にヒトから分離された

Japan/305/57 (H2N2) 株と同一反応を示すものは 1 例もみられなかったのに対し、鳥類由来の各ウイルスはこの株と全く同一パターンで反応した。すなわち、ブタから分離された H3N2 ウイルスの NA は、鳥類のウイルスよりも、むしろヒトのウイルスに由来したものであることが明らかである。

ヒトから分離された H3N2 ウイルスは、5 種類の NP 単クローン抗体のうち 3 種類の抗体と、全ウイルス株が反応した。これに対しブタからの H3N2 ウイルスは、1~5 種類の抗体と反応し、そのパターンは多様であった。とくに 1982 年分離の 2 株は、3~4 種類の抗体と反応し、この反応パターンは鳥類からの H3N2 ウイルスのそれと全く同一であった。すなわち、ブタ由来 H3N2 ウイルスの NPs 抗原は、あるものはヒト・ウイルスの、またあるものはトリ・ウイルスの、NPs と抗原的にそれぞれ密接に関連することを示した。また 5 種類の NP 単クローン抗体のうち、とくに 1 種類の抗体のみは今回供試したヒト、ブタおよび鳥類由来の全ウイルス株と反応し、これら各動物に維持されている特殊な抗原サイトのあることを示唆した。

1968~75年間は、ヒトから分離された H3N2 ウイルスでは、分離年とともにウイルス HA 抗原の小変異 (antigenic drift) がみられ、とくに 1977 年以降の分離ウイルスでは 12 のエピトープのすべてが認識できないまでに変化した。これに対して、1976~78年間のブタ由来 H3N2 ウイルスの HA 抗原は、ヒト集団からはすでに消失した 1970~75 年代の変異株と、また 1982 年分離ウイルスのそれは、鳥類由来ウイルスと、それぞれ密接に関連する遺伝子であった。また、ブタ由来ウイルスの NA 遺伝子も 1968~77 年間のヒト由来ウイルスの NA に、そして NP はヒトあるいはトリのウイルス遺伝子に、それぞれ起源を発するものであった。ヒト H3N2 ウイルスと動物 H1N1 ウイルスの間における遺伝子組み換え体 (reassortants) が、日本とヨーロッパではブタから、またアメリカでは七面鳥から、すでに分離されている。したがって、ブタにおける長期間の安定したウイルス遺伝子の存続

は、とくにヒト・インフルエンザの大流行ウイルスの発祥地として注目される中国においては、鳥類を起源とするウイルスと密接に関連することが容易に理解できるであろう。

(抄訳 後藤仁)

Monoclonal antibodies for characterizing H3N2 influenza viruses that persist in pigs in China

Shortridge, K.F., A.P. King and R.G. Webster
Journal of Infectious Diseases 155: 577-581 (1987)

文献情報

太平洋サケの繁殖統御技術の総合的開発とその応用

本論文は、サケ・マスを中心に開発が進んでいる繁殖の人為統御、精子保存、染色体操作とその応用、卵内への遺伝子導入の可能性、温度管理による胚発生の統御、雌雄性の統御とその応用、稚魚の成長促進についてそれぞれの技術を紹介し、サケ・マス増養殖への利用と個々の技術を総合して更に増養殖の効率を高める可能性について述べている。

水産増養殖における高度な統御技術は、サケ・マスを中心に開発され、現在ではニジマスの養殖には、これらの技術が応用されるようになってきている。

本論文では、先ず親魚から卵や精子を採取する場合の技術として光周期の調節により、成熟を6カ月早くしたり遅くしたりする技術を紹介し、更にホルモンの利用による排卵や排精の促進、この時利用されるホルモンの種類とその組み合わせ投与方法について紹介している。魚の成熟は、脳下垂体の生殖腺刺激ホルモンの支配下にあるが、サケ・マスでは、哺乳類の脳下垂体抽出物、サケから抽出される生殖腺刺激ホルモン、更に脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモンの分泌を促進するホルモンとその類似物質の利用について触れ、サケ・マスで有効な方法として体重1kg

当たり、生殖腺刺激ホルモン放出因子(GnPH)0.02mgとGnPHアナグロ(GnRHA)0.02mg/kgおよび0.1mg/kgのサケ生殖腺刺激ホルモンを中3日おいて2度注射する方法を記述している。精子凍結法は、サケ・マスで既の確立され、応用の段階に入っている。現在の問題は、成熟卵の長期保存に関する技術開発で短期保存卵や凍結保存精子は既に利用できる段階にあることを紹介している。

染色体操作法に関しては、技術的に既に確立され、雌性発生2倍体、3倍体、4倍体の作出がサケ・マスで可能となっており、第二極体放出阻止の繰り返しや第1卵割阻止によるクローン魚の作出、YY性染色体型を持つ超雄の作出、IHNVやVHSVウイルス病に強いギンザケの染色体1セットを有する異質3倍体ニジマスの作出、異質3倍性を利用した生存性の回復、3倍性による不妊を利用した養殖など染色体操作の現状とその利用について論じている。

サケ・マスへの遺伝子導入による形質の転換についても論じ、ニジマスへの抗凍結蛋白遺伝子の導入、成長ホルモン遺伝子導入について紹介している。

魚は、変温動物であり、胚の発生速度は温度によって異なる。高温下培養により胚発生の速度を早め、浮上、摂餌を著しく早めることができることから、温度管理による合理的な養殖の可能性を示唆している。

性の統御についてはホルモン処理による方法と染色体操作による方法を紹介し、ホルモン処理については直接雄性ホルモンを利用した雄化と雌性ホルモンを利用した雌化の方法を紹介している。また、染色体操作による方法として雌性発生2倍体の作出による雌化、YY超雄の作出とこの精子を通常のXX雌から得た卵に受精させて全雄集団を作る方法を紹介している。更に、養殖の場合、単に魚体のみを利用するためには、生殖腺の発達は摂餌を阻げて成長を抑制するために、成熟を抑えることが望まれる。このため、魚の不妊化を計る方法として、性決定時期に多量の雄性ホルモンを使用する方法、3倍体を作成する方法について記述し、特に3倍体の場合、雄

は成熟する力を有するため、不妊となる3倍体雌の作出について述べている。また、XX雌を雄性ホルモンによってXX偽雄とし、この精子を利用して、全雌集団を作る方法についても述べ、カナダで既に行なわれているこの方法を利用した放流試験についても述べている。

成長の促進に関しては、ギンザケのスマルト化に焦点を当て、沿岸網生養殖や稚魚放流に使用するスマルト魚の大きさ、環境条件の調整による成長とスマルト化の促進について触れ、更に性ステロイドの利用や甲状腺ホルモンの利用による成長促進の例を紹介している。哺乳類の成長ホルモンの成長促進効果、サケの成長ホルモンの成長促進効果についても触れている。

これらの個々の技術を総合して、より高い技術へ改良してゆく必要を示唆し、最後に今後数年のうちに生化学的、内分泌学的、遺伝

学的、生理学的技術をサケ・マスや他の魚の養殖へ応用するための研究努力に対して大きな期待を寄せている。

本論文は、サケ、マスで現在、バイオテクノロジーとして考えられている殆んど全ての話題について紹介しており、この方面の知見を得るには絶好の総説となっている。ただ、個々の技術は良く紹介しているが、これらの技術が社会的に与える影響やこれらの技術によって作出される魚が生態に与える影響について全く触れていない点が気になるところである。

(抄訳 山崎文雄)

The integrated development and application of controlled reproduction techniques in Pacific salmonid aquaculture.

Donaldson, E. M.

Fish Physiol. Biochem. 2, 9-24 (1986)



外国特派員便り

欧米のバイテク研究事情

生 研 機 構

亀 若 誠

はじめに

昨年11月、機構の初めての試みとして、欧米のバイテク研究の事情調査が「調査団」を派遣する形で実施された。この調査は、スイス、フランス、アメリカの3カ国、計七つの研究機関について、2週間にわたって、9名の団員で行われた。

ここでは、その中から二つの事例を紹介するとともに、期間中団員相互に意見をかわし、語り合った感想を含め、筆者なりに受けた感銘も合せて報告しておきたい。

◇二つの最前線事例◇

1. トランスジェニック豚の作出

一つは、米国マサチューセッツ州ボストンにあるタフト大学の医・獣医学校でのトランスジェニック豚の作出である。

哺乳類の受精卵へのマイクロインジェクションによる組換え体の成功例は、1982年頃、有名なラットの成長ホルモン遺伝子をマウスに組込んだ“スーパーマウス”がある。我が国でも、農林水産省のバイオテクノロジー・シーズ培養研究として、大学への委託研究の中にも、家畜への応用をめざしたテーマが掲げられている。

(1) 豚での成果のポイント

タフト大では、Karl M. Ebert教授を中心に20名程のスタッフで数年前からトランスジェニックアニマルの作出にプロジェクトチームを組んで取組みを始めており、最近豚でめざましい成果をおさめている。それは、マウスや豚での性周期の同調化、受精卵の移植等数々の技術的基礎の上に出来上がったものであるが、その中でも特記すべき点は次のよう

な事柄である。

a. 受精卵への遠心力の付与

遺伝子の注入は、受精直後の雌雄核がまだ分れている時に、このいずれかの核に注入すればその遺伝子の発現率が高いことが明らかにされている。マウスから豚や牛等への適用拡大の際の大きな障壁は、マウスでは見える雌雄核が、豚等では脂質が多く、外から見えないことにあったようである。

この障壁を打破したのが、受精卵に一定の遠心力を与えるという工夫であった。遠心力によって脂質が卵の一方に寄せられ、核が明確に見え、マウスと同じ技術レベルにもってこることを可能にしている。(この成果は1985年1月のネーチャーに掲載)

b. コンピュータと顕微鏡、テレビモニターとの結合

注入に当たっては、顕微鏡下の映像をテレビモニターし、コンピュータの力を借りて精密に計測しながら行っている模様である。また、この画像処理技術は、注入後の胚の活性をモニターすることにも役立てられており、注入後速やかに行わなければならない胚移植なども効率よく行える結果となっている。

これらの詳しい説明はなかったが、こうした電子機器の活用の重要性が強調された。

c. プロモーターの選択

注入する構造遺伝子には、研究蓄積が最も多く、また経済的効果も期待出来るラットの成長ホルモン遺伝子が用いられている。問題は、それに連結させる調節遺伝子としてのプロモーターである。“スーパーマウス”の場合、マウスのメタロチオネインプロモーターというのを使って成功しているが、豚では発現調節がうまく行かず、奇形を生じたりした

ようである。ここでは、マウスの白血病ウイルス (MLV) のプロモーターを用いている。これによって、組換え豚自身の成長ホルモンが出ている間は注入遺伝子の発現が起こらず、豚自身の発現が少なくなってきた頃、ちょうどリレーをするような形で注入遺伝子の発現に受継がれる結果となっている。

このメカニズムはよくわかっていないが、蛋白の量を感じて転写の調節をしているのではないかと見られている、成人T細胞白血病の原因ウイルス HTLV の持っている PX 遺伝子のようなものとあるいは相通するものがあるのかも知れない。

(2) トランスジェニック豚の特徴と課題

組換え豚の遺伝子の発現結果はみごとなものであり、同腹の普通の豚との比較では、通常の成長期には両者に体重差が見られないが、普通のものの成長速度が落ちてくる160~180日頃になっても組換え豚は直線的に成長と続け270日頃には30%近い体重差となっている。さらに、背脂肪層は写真で見ると、普通のものの1/2程度と薄く、筋肉質になっていると見受けられる。

この成功度は、実用化というにはまだほど遠いようである。しかし、注入して活性のある確率は5%、そのうち遺伝子発現の認められるものが約10%、即ち、1,000個の処理卵のうち、5頭程度の成功が得られるところまで来ているようである。また、これまでに、このようなインジェクション方式であっても、染色体の全く同じ位置に結合しているものが2頭みついているとのことである。

タフト大では、今後、発現率の低さ、次世代への特性の伝わり方の不安定性、等々の課題に向けてさらに精力的に取り組もうとしている。

(3) 研究開発会社設立による実用化の促進

このようなタフト大等での研究成果は、マサチューセッツ州が出資して作っているイノベーションセンターの手によって、課題ごとにその後の研究開発に向けての投資家を公募し、新研究開発会社を設立して研究を進めていくという体制が出来ている。このセンターは、そうした新研究開発会社を年間4社程度

を作ることを予定しており、公募での資金の提供の他、場所の経営やノウハウも提供する機能をも持っている。(調査団の訪問の日、このトランスジェニックアニマルの作出技術をテーマとした資金の公募が行われたとのことである)

2. ネマトーダ耐性遺伝子の単離

もう一つは、同じく米国のカリフォルニア州ダブリンにある研究会社 PCR I 社での植物遺伝子の単離についての努力の紹介である。

(1) 植物の遺伝子の解析

「遺伝子組換えによる画期的品種の作出」と一口で言っても、その組込むべき遺伝子が、前述の成長ホルモン産生遺伝子のように単離・解析されていなければ組換えようがない植物で単離されている核遺伝子の数はまだ少ないが、有名な除草剤耐性遺伝子は、この数少ない遺伝子の一つである。遺伝子の単離・解析は、遺伝子産物から遡ってその遺伝子本体を解明していくのが一般的な方法である。しかし、その物質がごく微量であったり、物質代謝の中間産物であったり、複数の遺伝子産物であったりして、この種の研究は難航しているようである。

(2) 交雑育種の知見の動員

PCR I 社の J. Mudd 所長の話によるネマトーダ耐性遺伝子の単離の戦略は、どういう物質がネマトーダに耐性を持つ原因になっているのか皆目見当つかない場合の攻め方である。これを筆者なりに解釈すると、次のように既知のものを代入して、未知数 x を求めるのに似た攻め方である。

[既知のもの]

- ① ネマトーダ耐性を持つある種のトマト
- ② Acidphosphatase (酸性条件下で正リン酸エステルを加水分解する酵素)
- ③ 雑交から得られた知見として、ネマトーダ耐性と Acidphosphatase とは連鎖し、染色体上両者はごく近い距離に位置すると推定されている。

[方法として]

Acidphosphatase 産生遺伝子をプローブとする DNA プローブ法の繰返し

[未知のものとして]

ネマトーダ耐性遺伝子

これは、一度で解の得られるものではなく Acidphosphatase 産生遺伝子とともにその近くにあるはずのネマトーダ耐性遺伝子まで連結してつり上がるまで何度も繰返すことになる。一度の試みに3週間程度を要するようであるが、このような重要な遺伝子がトマトで単離できれば、他の作物への利用が可能であり、その利益は大きいことから、この努力を続けているとのことである。

おわりに

今回の調査での見聞は、2週間という短い期間の、またわずか7機関のしかも言葉の障壁を越えて得たほんの概論である。しかし、団員個々が受けた感銘は程度の差こそあれ大きいものであった。おわりに筆者なりにそれらを3点に総括して紹介しておきたい。

(1) 「人を得る」ことへのたゆまぬ努力

第一は、「人を得る」ための努力である。ことに若い研究者を得ることの重要性を認識し、その努力が随所に見受けられる。スイスの免疫学研究所では、人を集めるに足りる各分野の第一人者を永久研究者としてまず迎え入れ、その上で大半(8割)を滞留、高齢化の弊害のない2~3年契約の研究者を世界から公募するという戦略で進めてきている。また、丁度、訪問した翌週に開所式を迎えようとしていた米国農務省の植物遺伝子発現センター(PGEC)は、「人を得るには時を惜ま

ず」の態度を貫き、構想から7年をかけてコアスタッフの人選を行ってきている。選ばれた人々は、同じコアスタッフでも、その前歴は教授クラスから一介のポストドクまでであり、求める範囲を全世界に、その尺度は実績主義で貫かれている。

なお、人選等に当たっての所長の権限の大きさにも特質すべきものがあった。

(2) 異分野との連携への努力と工夫

第二は、生物系の研究推進に工学、化学の領域、また同じ生物系でも医学、育種学など様々な異分野との連携を持つことに努力と工夫がなされていることである。前述のPGECは7名のコアスタッフを広く微生物や生化学の分野等から求めるとともに、改造した研究所の部屋の配置について、研究者が最もよく利用するクリーンベンチの中心集中化というささいなことと思われることを通じて、研究者の相互関係を持つことを求める配慮がなされている。紹介した二つの事例も、工学的知見や従来育種の蓄積が分子生物学の手法等との融合によって、問題解決への戦術上の巧妙さとなって現われている。

(3) DNA研究への特化と総合力の戦い

第三は、選定した研究機関のせいでもあるが、育種のための技術としてDNAレベルの研究にかなり特化し、そして、この分野の研究は総合力の戦いともいえる状況にあることである。

作物では、その戦略上の目標は、複数遺伝子の支配のものと思定されている耐病性や耐乾性の付与に、家畜では、次世代以降への安定した遺伝や発現の場所、時期といった調節系に特に関心が向けられている。

そして、この分野は、前述のような異分野との融合、物質面、現象面の知見の総合化、様々な特性を持った遺伝資源の保有とその情報化、さらにその上に、良くて千に一つ、万に一つに賭ける若手研究者の根気強さとが加わって、まさに総合力の戦いがくりひろげられているともいえる状況である。

我が国とは、歴史的背景、社会的体制もかなり異なるとはいえ、やはり考えさせられることが多かった見聞であった。



米国. タフト大医・獣医学校で説明を受ける団員

特別情報

細胞育種技術の進捗状況

1987年度

農林水産省農業生物資源研究所

細胞育種部

この資料は1987年12月15日現在の細胞育種技術の進捗状況について野菜・茶業試験場、果樹試験場、草地試験場、蚕糸試験場および林業試験場の協力を得て取りまとめたものです。

特記事項—本年度の特徴—

- 各作物を通じてプロトプラスト培養系ならびに体細胞胚形成系がそれぞれ着実に進展している。
- 薬培養では従来困難とされていたチャなど木本作物でその成功例がみられるようになった。
- 果樹では胚珠培養系が進展している。
- 組換えDNA技術について報告した作物別事例が増加の傾向にある。

培養系

- 茎頂培養系……………茎頂を切り出して培養し直接植物体を得る培養系
- 胚培養系……………受精後の胚を取り出して植物を得る培養系
- 薬培養系……………培地上に薬を置床して花粉由来の半数体又は倍数体を得る培養系
カルス経由, 胚経由を含む
- 花粉培養系……………培地上に花粉を置床して花粉由来の半数体又は倍数体を得る培養系
カルス経由, 胚経由を含む
- 胚珠培養系……………胚珠を培養して植物体を再分化させる培養系
- 単細胞培養系……………Explant→カルス→振とう培養→プレーティング→カルス又は胚
→再分化植物を得る培養系
- 生殖細胞胚形成系……………薬培養・花粉培養・胚珠培養からの胚形成系
- 体細胞胚形成系……………体細胞を培養した胚形成系
- プラトプラスト培養系…プロトプラスト→カルス又は胚→再分化植物を得る培養系

技 術

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

細胞育種技術の現状

作物群	分類 作物名	植物体再分化技術										細胞育種技術							備考	
		培養系	茎頂培養系	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	胚珠培養系	単細胞培養系	生殖細胞胚形成系	体細胞胚形成系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術	半数体育技術	細胞選抜技術		細胞融合技術
普通作物	イネ	○	◎	◎	○	×	○	○	○	◎	△	○	×	×	×	◎	○	○	○	× 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術
	コムギ	○	◎	◎	○	△	△	△	○	×	—	—	—	×	×	◎	○	×	×	
	オオムギ	○	◎	○	○	△	△	△	○	×	—	—	—	×	×	◎	○	×	×	
	ダイズ	◎	○	△	△	○	△	×	◎	×	×	△	—	×	×	×	△	△	△	
	ササゲ	○	△	×	×	○	×	×	△	×	—	—	—	×	×	×	×	×	△	
	アズキ	○	△	×	×	×	×	×	×	×	—	—	—	×	×	×	△	×	×	
	バレイショ	◎	◎	○	○	○	◎	◎	△	○	○	○	◎	×	×	◎	○	○	○	
	カンショ	◎	○	△	×	◎	○	△	△	○	○	×	◎	×	×	×	×	×	×	
	トウモロコシ	○	◎	○	△	△	△	△	○	△	—	○	—	×	○	○	○	△	△	
	ソルガム	—	○	△	×	×	○	△	○	△	—	—	—	×	×	○	○	△	×	
特用作物	テンサイ	○	—	△	×	△	○	×	△	△	○	○	—	×	×	△	△	×	×	
	サトウキビ	◎	○	—	—	—	△	—	○	△	○	◎	—	—	—	○	×	×		
	コンニャク	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
	イグサ	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×		
	ナタネ	◎	◎	◎	◎	○	◎	◎	○	○	—	—	—	×	×	◎	○	○	△	
	ラッカセイ	○	△	△	×	×	×	△	×	×	×	×	—	×	×	×	×	×	×	
牧草類	イタリアンライグラス	○	—	○	×	×	○	×	○	△	○	—	○	×	×	○	△	×	×	
	オーチャードグラス	○	—	△	×	×	×	△	○	×	—	—	○	×	×	×	×	×	×	
	チモシー	○	—	—	×	×	×	—	×	×	—	—	○	×	×	×	×	×	×	
	トールフェスク	○	—	○	×	×	×	×	○	×	—	—	○	×	×	○	×	×	×	
	ベレニアルライグラス	○	—	○	×	×	×	×	×	×	△	—	○	×	×	○	×	×	×	
	メドウフェスク	○	—	○	×	×	×	×	×	×	—	—	○	×	×	○	×	×	×	
	スームズブROOMグラス	—	—	○	×	×	×	×	×	△	—	—	—	×	×	○	×	×	×	
	ダリスグラス	—	—	—	×	×	×	—	×	×	—	—	—	×	×	×	×	×	×	
	バヒアグラス	—	—	—	×	×	×	—	○	×	—	—	—	×	×	×	×	×	×	
	パニカム	—	—	—	×	×	○	—	○	○	—	—	—	×	×	×	×	△	×	
	ローズグラス	—	—	—	×	×	×	—	○	×	—	—	—	×	×	×	×	×	×	
	アカローバ	○	○	—	×	×	○	—	○	○	—	—	○	×	×	×	×	△	×	
	シロクローバ	○	○	—	×	○	○	—	○	○	—	—	○	×	×	×	×	—	×	
	アルファルファ	○	○	○	×	×	○	×	○	○	—	—	○	△	×	○	○	△	○	
トウモロコシ	○	◎	○	△	△	△	△	○	△	△	○	—	×	○	○	○	×	△		
ソルガム	—	○	○	×	×	○	△	○	△	—	—	—	×	×	○	○	△	×		
ネビアグラス	—	—	—	×	×	○	—	○	○	—	—	—	×	×	×	×	×	×		

作物群	分類 作物名	植物体再分化技術										細胞育種技術							備考	
		茎頂培養系	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	胚珠培養系	単細胞培養系	生殖細胞胚形成系	体細胞胚形成系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術	半数体育種技術	細胞選抜技術	細胞融合技術		組換えDNA技術
牧草類	パールミレット	—	—	—	×	×	○	—	○	○	—	—	—	—	×	×	△	△	×	× 未開発 △ 報告あり ▲ 胚軸 ○ 可能 ● 不定芽再分化(不定芽) ◎ 安定技術 日本ナシ(含む中国ナシ)
	バーズフットレフオイル	×	×	△	×	×	○	×	△	○	×	×	×	×	×	△	△	△	△	
	スタイロサントス	×	×	×	×	×	○	×	△	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
果樹	スモモ	◎	○	×	×	△	×	×	×	×	×	○	○	×	×	×	×	×	×	
	アンズ	△	○	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ウメ	×	○	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ブドウ	◎	○	○	△	△	×	◎	◎	△	○	◎	◎	×	×	△	△	×	×	
	カキ	○	○	×	×	×	×	▲	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	
	クリ	○	×	×	×	×	×	▲	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	
	ビワ	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	オウトウ	◎	○	△	×	×	△	▲	△	△	×	◎	○	×	×	×	×	×	×	
	西洋ナシ	◎	×	×	×	△	×	○	△	△	×	◎	○	×	×	×	×	×	×	
	パイナップル	○	×	—	×	×	○	×	◎	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	
	ブルーベリー	◎	△	△	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	△	×	×	×	
	キウイ	◎	△	△	×	×	△	●	●	△	×	○	×	×	×	×	×	×	×	
	ザクロ	◎	×	○	×	×	△	×	●	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	
	カンキツ	△	◎	◎	○	◎	△	◎	○	◎	×	×	◎	×	×	○	○	◎	×	
リンゴ	◎	○	△	△	○	×	○	●	△	○	◎	◎	×	×	△	×	×	×		
日本ナシ	○	×	△	×	×	×	×	×	×	○	○	◎	×	×	×	×	×	×		
モモ	◎	◎	△	×	△	×	○	×	×	×	◎	◎	×	×	×	○	×	×		
野菜	キュウリ	○	△	△	×	△	×	△	△	○	×	×	—	×	×	×	×	×	×	
	メロン	○	○	△	×	△	×	×	○	○	×	○	—	×	×	×	×	△	△	
	スイカ	○	△	×	×	×	×	×	×	×	×	○	—	×	△	×	×	×	×	
	カボチャ	○	△	×	×	△	×	○	△	×	×	×	—	×	△	×	×	×	×	
	トマト	◎	○	○	△	△	△	×	×	○	×	△	—	×	△	△	△	△	△	
	ナス	◎	○	◎	△	×	△	○	△	◎	×	△	—	×	×	○	△	△	×	
	ピーマン	◎	○	○	×	×	△	○	×	△	×	△	—	×	×	○	×	×	×	
	ダイコン	○	◎	×	×	△	×	×	×	×	×	×	—	×	×	×	×	△	×	
	キャベツ	◎	◎	◎	○	○	○	◎	○	◎	×	○	—	△	△	○	○	◎	△	
	ハクサイ	◎	◎	◎	○	○	◎	◎	○	○	×	△	—	×	○	○	○	◎	×	
ブロッコリー	◎	◎	○	△	×	△	○	△	◎	×	○	—	×	△	○	△	△	×		
イチゴ	◎	×	△	×	×	△	×	○	△	○	◎	◎	×	×	△	△	×	×		
タマネギ	○	×	△	×	×	×	△	○	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×		

作物群	分類 栽培系 技術	植物体再分化技術										細胞育種技術							備考			
		茎頂培養系	腋芽培養系	枝状(端)培養系	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	胚珠培養系	単細胞培養系	生殖細胞胚形成系	体細胞胚形成系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術	半数体育種技術		細胞選抜技術	細胞融合技術	組換えDNA技術
	作物名																					
樹	クロマツ	×	×	○	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ワカマツ	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	カラマツ	×	×	○	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	グイマツ雑種	×	×	○	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ギンドロ	◎	×	◎	×	×	×	×	×	×	○	×	○	×	×	×	×	×	○	×	×	
	ヤマナラシ	×	×	×	×	○	×	×	×	×	○	×	○	×	×	×	×	×	○	×	×	
	ヒロハハコヤナギ	◎	×	◎	×	×	×	×	×	×	○	×	○	×	×	×	×	×	○	×	×	
	イタリーポプラ種	◎	×	◎	×	×	×	×	×	×	○	×	○	×	×	×	×	×	○	×	×	
	トチノキ	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	シラカンバ	◎	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	
	クヌギ	×	○	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	コナラ	×	○	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ミズキ	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	キハダ	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	木	コウゾ	×	×	◎	×	×	×	○	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
		ミツマタ	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
		キリ	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
		ミズメ	○	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
		クチナシ	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
		ハクチョウゲ	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
シナノキ		×	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
サクラ		×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
ジンチョウゲ	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		

この資料は、農業生物資源研究所の細胞育種部長 大山勝夫博士の承認を得て掲載します。

「微生物の長期保存法」マニュアル ——農林水産関係——

農林水産省農林水産技術会議
農業環境技術研究所

バイオテクノロジーの発展に伴って、微生物がもつ多様な機能が各分野において活発に利用されるようになり、遺伝資源としての微生物の確保の重要性が増大している。農林水産省では昭和60年度から農林水産生物遺伝資源の総合的保存・配布を目的にジーンバンク事業を開始した。これに伴い微生物の遺伝資源としての保存についても本格的な取組みが始まり、長期保存に関するマニュアルの要望が一段と高まってきた。

このような背景から、農林水産技術会議では昭和59年度から3カ年計画で特別研究「微生物の長期保存法に関する研究」を開始した。この研究は、農林水産業に関連する微生物を対象に、①保存法に関する既往の研究成果の体

系的整理、②保存に伴う活性の変化の検討、③長期保存法のマニュアル化を目標としたものである。

本書は特別研究参加研究者がワーキンググループを組織し、上記の研究成果をマニュアル化の視点からとりまとめたもので、総論と各論から構成されている。総論では微生物保存の意義や保存法について一般的な解説が行なわれている。各論では動植物病原、地力、食品の製造・加工、畜産、林産、海洋関連微生物をウイルス・ファージ、原生動物、細菌・放線菌、酵母・糸状菌、微細藻類に仕分けし、それぞれについて保存法の一覧表と関連文献が掲載されている。本書は微生物の保存・管理従事者はもとより、研究者にとってもきわめて便利で必携の書である。

連絡先：農業環境技術研究所

環境生物部長

〒305 つくば市観音台3-1-1

Tel. 02975-6-8294

編集後記

BRAIN テクノニュース 第6号をおとどけします。昨年9月に創刊号を出してから、予定どおり年度内に第6号をおとどけできましたことは、ひとえに購読会員の皆様の温い御期待と立派な原稿、資料をお寄せいただきました方々、さらには関係機関の格別の御支

援によるものと深く感謝しています。来年度第7号以降につきましても一層の内容の充実を図り、購読会員の皆様の御期待にそえますよう努力したいと思っていますので、一層の御支援をたまわりますようお願いいたします。(大畑)

ブレイン テクノニュース (第 6 号)

昭和63年 3月 15日発行

発行者 渡邊 五郎

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構
〒160 東京都新宿区新宿6丁目24-16 日本生命新宿6丁目ビル3F
TEL. 03-205-6565 FAX. 03-205-6566

編集 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. 03-667-8931 FAX. 03-667-8933