

# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

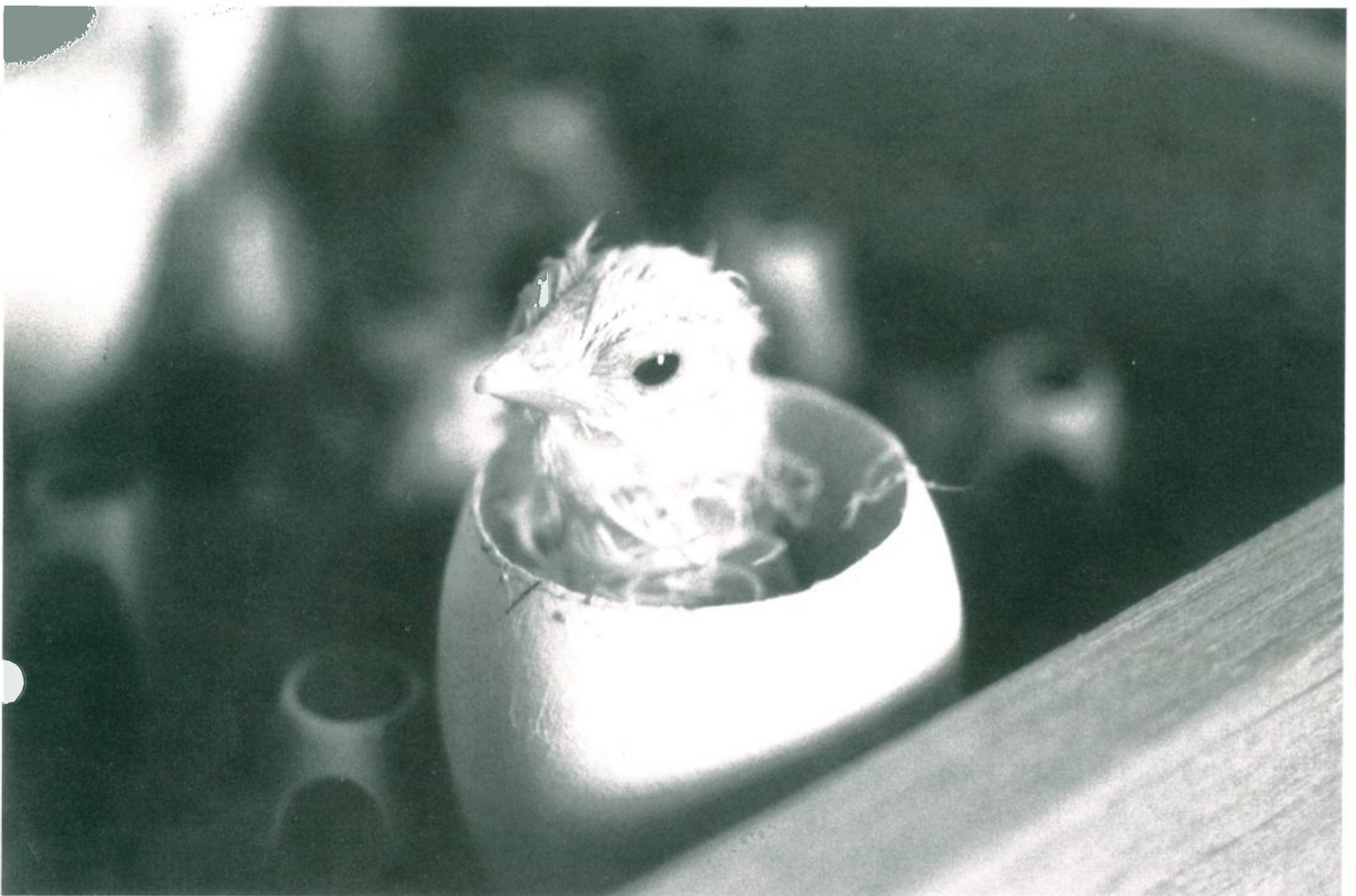
## TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

### ブレインテクノニュース

# 第 14 号

JULY 15, 1989



受精卵の体外培養でふ化した  
ニワトリのひな

(本文 4 ページ参照)

## 本号の紙面

国内情報	1
イネ新品種「初夢」、ニワトリ受精卵の体外培養、ウイルスに強い動物の作製、イネの遺伝子組換え、標的微生物の追跡	
文献情報	16
食物で変身するシャクガ、鶏生殖系列への遺伝子導入、シンドビスウイルス、マメ科根粒菌の宿主特異性、トウモロコシプロトプラスト	
海外便り	23
海外の麦育種研究事情、微生物の安全性評価	
特別情報	30
機能性絹タンパク質素材	

## 口 絵

### 国内情報

伊藤隆二

イネ新品種「初夢」の育成経過とその特性 …… 1

内藤 充

ニワトリ受精卵の体外培養 …… 4

岩倉洋一郎

ウイルス感染に強い動物の作製 …… 7

加藤 明

イネ遺伝子組換えの新技术——アグロバクテリウムによる形質転換 …… 10

松田 泉

標的微生物の追跡——イネもみ枯細菌病菌を例にして …… 13

### 文献情報

食物しだいで変身するシャクガの幼虫 …… 16

鶏の生殖系列への外来遺伝子の導入 …… 17

シンドビスウイルス——動物細胞での遺伝子発現のための広宿主域ベクター …… 18

マメ科植物—根粒菌の宿主特異性の決定に対するレクチンの関与 …… 20

トウモロコシプロトプラストのコロニー形成を増加させる培養ろ液抽出物 …… 21

### 海外便り

瀬古秀文

海外における麦育種研究事情 …… 23

長谷部 亮

微生物バイテクのポテンシャルと安全性評価——ミシガン州立大学に留学して …… 26

### 特別報告

塚田益裕

機能性絹タンパク質素材の開発 …… 30

イネ新品種「初夢」の育成経過とその特性 (本文 1 ページ参照)

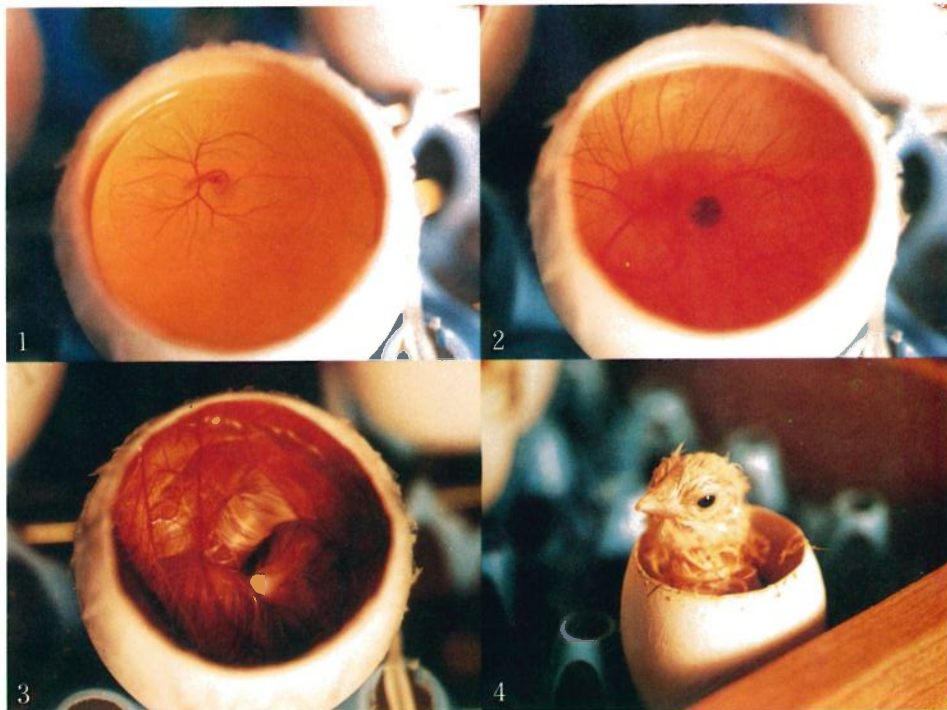


左：コシヒカリ 右：初夢



左：コシヒカリ 右：初夢

ニワトリ受精卵の体外培養 (本文 4 ページ参照)



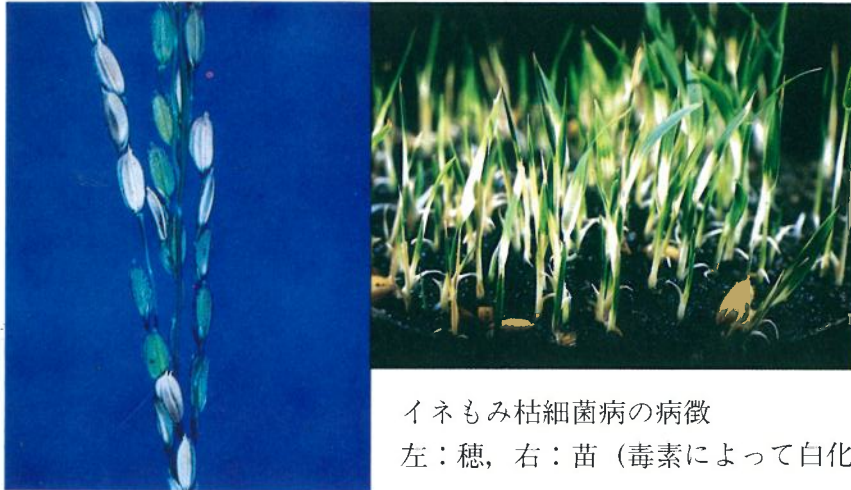
1 : 3日目胚 (培養4日目)

2 : 7日目胚 (培養8日目)

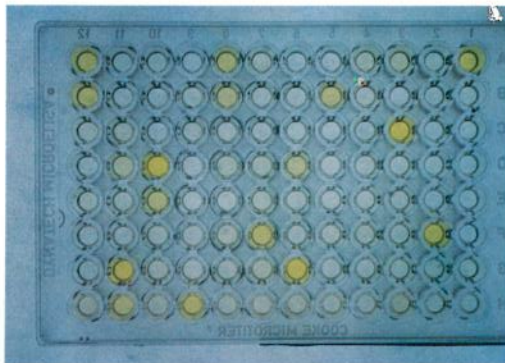
3 : 20日目胚 (培養21日目)

4 : 21日目孵化 (培養22日目)

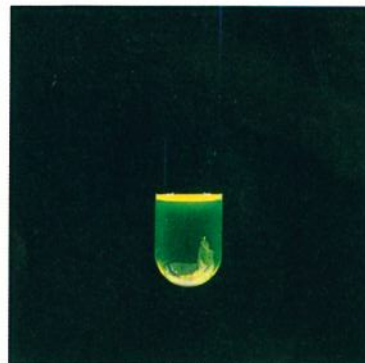
標的微生物の追跡  
 イネもみ枯細菌病菌を例にして (本文 13 ページ参照)



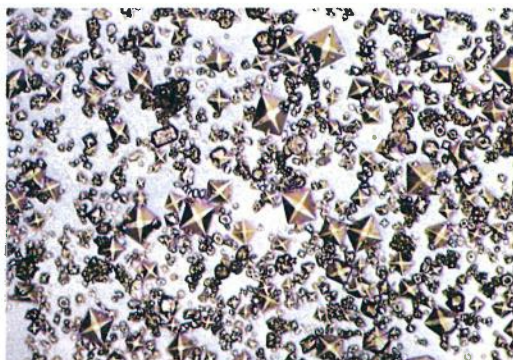
イネもみ枯細菌病の病徴  
 左：穂，右：苗（毒素によって白化する）



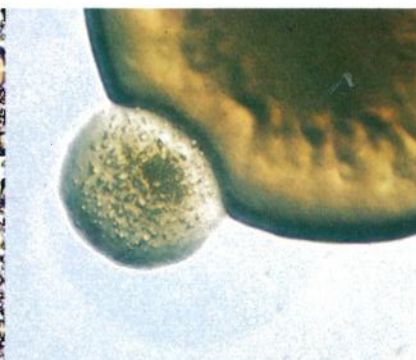
酵素抗体法(ELISA)による病原細菌  
 の検出



病原細菌の産生する緑黄色  
 蛍光色素(毒素)



病原細菌コロニー中に形成された  
 シュウ酸カルシウム結晶



病原細菌コロニー(左下)  
 雑菌コロニー(右上)  
 (結晶の有無で区別できる)

## 国内情報

## イネ新品種「初夢」の育成経過とその特性

(株)植物工学研究所

伊藤隆二

## はじめに

ある特定の品種の細胞を培養して植物体を再生させた場合、それを利用して新品種を作出できるとはそれこそ夢にも思っていなかった。ところがプロトプラストから植物体を再生する過程において、おそらく突然変異が起ったのであろう。原品種と異なる変異体が生じ、その中から良いものを選び、悪いものを捨てるという、いわゆる従来の変異体の操作を進めることによって原品種と性質の異なる新品種を生むことができるのである。植工研ではわずか3年間でコシヒカリのプロトプラスト培養から新品種を作出し、平成元年2月3日「初夢」の名で農林水産省に品種登録の申請を行った。そこで、この奇妙な方法で新品種を作出した経緯と新品種「初夢」の特性について述べることにする。

## 1. 「初夢」の育成経過

昭和60年はイネの細胞培養の当り年で、時を同じくして農水省、東北大、京都大、植工研、三井東庄の5場所でそれまで大変困難とされていたイネのプロトプラストからの植物体再生に成功した。植工研でも同年コシヒカリ、日本晴、農林14号、藤坂5号、祝糯の5品種を用い、いずれも植物体の再生に成功した。コシヒカリについては昭和60年11月、完熟胚由来のプライマリーカルスから得たプロトプラストをサスペンション細胞にしたものから培養を行い、培養開始後3週間でできたコロニーをN6増殖培地、N6再分化培地を過て再生植物体を得、昭和61年4月に幼植物をポットに移し、温室の中で育てた。

昭和61年夏期、筆者はときどき温室で原品種がコシヒカリ、農林14号のそれぞれ7、19個体（ポット栽培）のプロトプラスト由来のイネを観察していたが、原品種が栽培されていないので確かなことは解らないが、常識で考えれば、当然原品種コシヒカリ、農林14号と同じになるべき再生個体がどうも原品種と異っているのではないかと思われてきた。つまり個体間で早晩生や稈長の差があまりにも大きいのである。特に農林14号由来のものに差が大きい。しばらくしてこれは変異体だと確認したのは粒大の変異である。イネの粒大は品種固有のもので環境の変化によってそれほど変化しない形質であることが知られていたからである。8月5日の観察の記録ではコシヒカリは7個体中3、農林14号は19個体中12が変異体であろうと推定した。ただし次年度後代の圃場栽培ではすべてが変異体であったのでこの推定は正しくなかった。

一方植工研ではこの年から石川農業短大小倉先生と共同研究を組み、コシヒカリ以外の前記4品種についてのプロトプラスト由来のイネを石川農業短大の水田で栽培していた。そこで早速石川農業短大に飛び圃場を観察したが、4品種中藤坂5号、農林14号、祝糯には明かに変異体が見られた。

翌昭和62年、前年コシヒカリのプロトプラスト由来の7個体を元とした7系統群（1個体7穂ずつとり、穂ごとの系統7×7、49の系統とした）を植工研横浜圃場と石川農業短大圃場の両方で同じ材料を栽培した（図1）。62年7月石川農業短大圃場を観察すると、すべての系統が原品種よりずっと（約20cmくらい）草丈が短くなっていることが認められた。明らかにコシヒカリの変異体である。これを

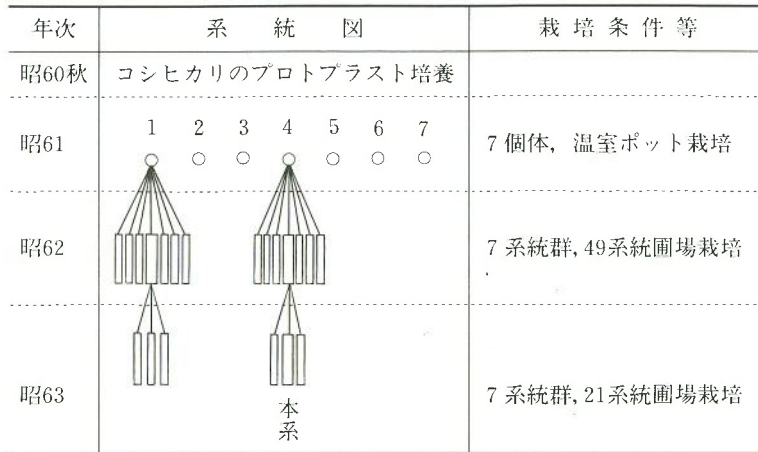


図1 「初夢」の育成経過

見た時の感激は今でも記憶に新しい。小倉先生とともに、これはプロトプラスト利用の新しい育種法になるぞと興奮の余り話しこみ、いま少しで帰りの列車に乗遅れる程であった。その後横浜圃場でもプロトプラスト由来の系統は原品種より短稈であることがはっきり認められた。そのほかの変異は両圃場とも出穂期が原品種より5,6日遅くなること及び粒大に系統群間差が認められることであった。なお1系統群内の7系統間には差が全く認められなかった。

選抜は7系統群の中から機械的に中央の1系統をとり、1系統から平均的個体を三つ選び、昭和63年には3×7、21系統を両圃場で栽植した。また前年選抜した系統種子をこみにして7系統につき生産力検定試験を行った。

昭和63年の系統の様相は前年と同様、原品

種に比べ各系統とも短稈、晩生化が認められた。系統群間には多少の稈長、粒大の差がみられた。1系統群内の系統間にもわずかに稈長の差が見られた。これらの中から短稈の程度が大きく粒大がコシヒカりに似て腹白の少ない系統を選んで「初夢」の本系とした。

## 2. 「初夢」の特性

「初夢」の特性を表1～3に示した。出穂は原品種コシヒカリより5日程度遅く、日本晴より2～3日早い関東地方の中性種である。稈長は原品種より10cm程度短くなっている。しかし穂数は原品種より1割程度多く、草型は穂数型に近い。千粒重はコシヒカリと似るがわずかに小さい。倒伏抵抗性は日本晴には劣るがコシヒカリよりは明

表1 「初夢」の特性調査成績

品 種 名	稈		芒		ふ 先 色	穎 色	粒着 密度	脱粒 難易	玄米	
	細太	剛柔	多少	長短					形状	大小
初 夢	や、細	や、剛	稀	短	黄白	黄白	や、疎	難	中	中
コシヒカリ	や、太	や、柔	稀	短	黄白	黄白	や、密	難	中	中
日 本 晴	中	中	少	短	黄白	黄白	や、疎	難	中	中

注) 植物工学研究所圃場の田植：昭和62年は6月17日、63年は6月15日。以下同じ。

表2 「初夢」の生育調査成績

品 種 名	出穂期 (月・日)	成熟期 (月・日)	稈 長 (cm)	穂 長 (cm)	穂 数 (本/m <sup>2</sup> )	耐 倒 伏 性
初 夢	8.27	10.17	85	18.2	336	や、強
コシヒカリ	8.22	10.11	94	19.2	296	極弱
日 本 晴	8.29	10.21	84	19.8	311	強

注) 昭和62、63年2か年平均、以下同じ

表3 「初夢」の収量調査成績

品 種 名	全 重 (kg/a)	玄米重 (kg/a)	収量比率 (%)	千粒重 (g)	登熟歩合 (%)	品質
初 夢	140.2	44.5	99	20.4	78.0	4
コシヒカリ	136.0	44.9	100	21.0	65.8	6
日 本 晴	138.6	42.2	94	22.0	70.5	4

かに強い。収量は横浜では原品種コシヒカリ並であるが、石川ではコシヒカリを上回る。またこの品種は稔実歩合が高い特性を持っている。見かけの品質は良好である。食味については未だ確定するに至らないが日本晴よりはよく、コシヒカリに近いと思われる。病害虫抵抗性についても十分なデータがないが、葉いもちにはコシヒカリ並に弱く、白葉枯病には強いようである。石川農業短大の成績、「初夢」の草型などから推定すると、北陸地方のように田植時期が早く穂数の確保が容易な地方で性能を発揮するのではないかと思われるが、変異の安定性や耐病性、食味などの特性検定を含めて今後の検討に俟ちたい。

### 3. プロトプラスト育種の特徴

プロトプラスト由来の個体の突然変異を利用した新しい育種法を植工研ではプロトプラスト育種と名付けることとした。

プロトプラスト育種の特徴は放射線育種と比べると、比べものにならない程変異体の出現率が高い。現在まで取扱った細胞培養は10近くの品種のうち、八つの品種はほとんどの個体に変異体となっていた。したがって放射線育種のように変異率が5～15%あればよい方で、原品種によっては変異体が全然出ないという場合もあるのと比べれば遙かに効率的である。

変異が起り易い形質は出穂期、稈長、穂長穂数、千粒重で、出穂期は早晩両方へ、千粒重は大小両方へ変異するが、稈長は短稈の出方が多いようである。ある品種の短稈化を図りたい場合、同じような形質を持ちながら早

晩生を変えたいような場合に適する育種法といえよう。また実質3年でとにも角にも品種登録の申請を済ませ、地方的適否の検定に供試するという育種年限のスピードアップはプロトプラスト育種の最大の魅力であろう。

### おわりに

プロトプラスト育種は文字通り始まったばかりで、経験的に一つの新品種として登録申請したのであって、遺伝育種学的検討は全く行われていない。したがってこの育種法、また出来た品種から何らかの欠陥が現われない保償はないし、いちおう検定した諸特性についてもさらに詳しい検討が必要である。ただ一つブリーダーとして言いたいことは、新品種「初夢」の評価がどうあろうとも、目的を明確にし、原品種の選択を誤らず数多くの個体系統を栽培すれば、遺伝育種学的に致命的な欠陥がない限り、必ず奨励に値する新品種が生れるであろうということである。我々は新品種「初夢」の名のごとく将来に夢を託しつつ今後もプロトプラスト育種を積極的に推進したいと考えている。

最後に「初夢」の育成者氏名を付記する。

伊藤隆二，助清泰教，小倉久和，  
木村雄輔，八尋義輝，林 泰行，  
島本 功

### 文 献

- 1) 林 泰行ら(1986) 育雑36 別冊 1:118
- 2) 小倉久和ら1-8(1986-89) 育雑 36-39 別冊 1:
- 3) 助清泰教ら(1989) 育雑39 別冊 1:219

## 国内情報

## ニワトリ受精卵の体外培養

農林水産省 畜産試験場 育種資源研究室

内藤 充

鳥類における胚操作は哺乳動物に比べ大きく遅れている。その理由の一つに、操作された胚を個体にまで発生させる技術がこれまで確立されていなかったことがあげられる。しかし最近、鶏の体内から取り出した1細胞期の受精卵を体外で培養し、個体にまで発生させる技術が開発された<sup>1)</sup>。このことは、鶏においても哺乳動物と同様に1細胞期の受精卵の操作が可能になった点で画期的な成果といえる。また、この技術は誘起放卵によって鶏の体内から取り出した16~64細胞期の受精卵の体外培養にも応用できることが示されている<sup>2)</sup>。1細胞期からの受精卵の体外培養による孵化率は7%<sup>1)</sup>と報告されており、実際に操作胚の培養に用いるためには、方法の改良を行い孵化率を向上させる必要がある。畜産試験場育種資源研究室では、当研究室で開発した培養条件によって1細胞期の受精卵の体外培養により高い孵化率を得ることに成功<sup>3)</sup>したので、以下その概要について述べることにする。

## 1. 鶏の体内における卵の形成

鶏では卵子は多量の卵黄を含んだ状態で排卵され、卵管漏斗部に取り込まれる。そして約30分後に卵管膨大部に入り、卵黄のまわりに卵白が形成される。産卵された卵の卵白には濃厚卵白と水様性卵白が区別されるが、卵管膨大部で分泌される卵白は濃厚卵白である。卵白の形成に約2時間30分を要した後、卵管狭部に入り、ここで内外二層の卵殻膜が約1時間かかって形成される。その後、卵は卵管子宮部に入り、子宮からの分泌液(plumping fluid)を吸収し、卵白はその重量が約2倍と

なり、一部は水様化して水様性卵白となる。子宮部では卵は約20時間滞留し卵殻の形成が行われる。この間、卵は1時間に10~15回卵管内で回転し、これによって卵白からムチン層が繊維状に分離し、これがからみあってカラザを形成する。カラザは卵黄を卵の中央に位置させる作用をもち、外からの衝撃を和らげたり、卵黄膜が直接卵殻膜に接触するのを防ぐ役割を果たしている。卵殻形成後、卵は卵管腔部を約5分で通過し、体外に放出(放卵)される。

## 2. 胚の発生

排卵された卵子は約15分以内に卵管漏斗部で受精する。受精卵の最初の分割は排卵後約4時間30分の、卵が卵管狭部に入った頃に起こる。鶏の受精卵は盤割のため、胚盤の中心に狭い溝ができることにより細胞の分割が行われる。胚盤は卵管狭部に卵が滞留している間に4~8細胞期にまで発生が進み、卵管子宮部に入って4時間以内に256細胞期にまで達する。その後活発に細胞の分割が行われ、放卵されるときには細胞数は約6万となり胚盤葉期(blastoderm stage)に達するようになる。この時期には、胚は胚盤葉上層(epiblast)と胚盤葉下層(hypoblast)に分離し、両者の間に割腔(blastocoel)を形成するようになる。また、胚盤葉と卵黄の間には胚盤下腔(subgerminal cavity)が形成される。一方、外側からは中央部の明域(area pellucida)と周辺部の暗域(area opaca)が区別され、白くリングが観察される。放卵された後は体外発生となり、胚の形成、成長の過程を経て、排卵から22日目に孵化するようになる。



### 3. 受精卵の体外培養法

あらかじめ人工授精しておいた雌鶏を、放卵後2.5～2.75時間に屠殺し、卵管膨大部より受精卵（1細胞期）を取り出す。受精卵の培養法は図1に示した三つのシステムにより構成される。取り出した受精卵をガラス瓶に移し、培養液（水様性卵白と塩類溶液を3：2に混合したもの）約20mlを入れ、ラップで口を密封する。これを41.5℃で24～24.5時間培養する。この時、胚盤が培養液に沈まないようにする（システムI）。胚盤葉期まで発生が進んだ受精卵より濃厚卵白と培養液を除去し、卵黄部分のみを鋭端部に直径約3cmの穴を開けた卵殻に移す。この時の卵は受精卵の採取当日に産卵した卵より3～4g重いものを用いる。そして卵殻に水様性卵白を満たし、口をラップで密封し保定リングで固定する。この状態で38℃、RH60%で90度の角度で転卵しながら3日間培養する（システムII）。Hamburger & Hamilton<sup>4)</sup>のステージ

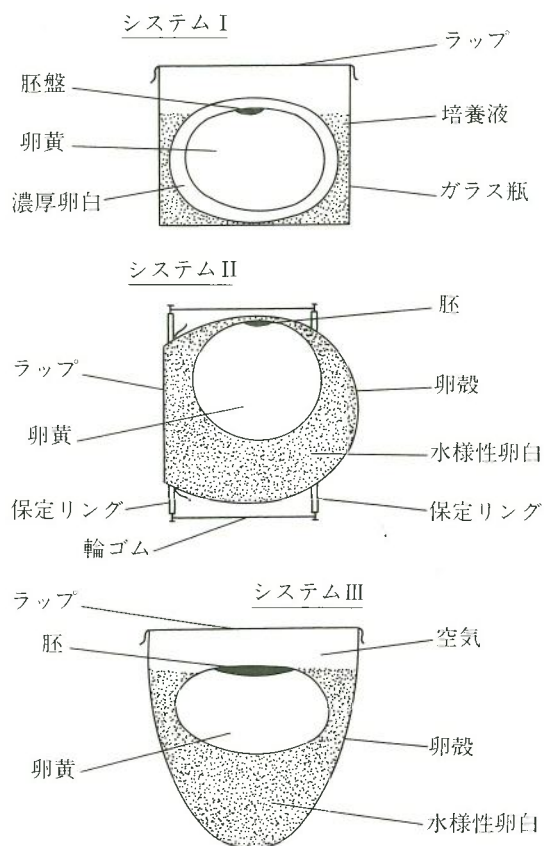


図1 ニワトリ受精卵の体外培養システム

で18～20に達した頃にシステムIIの卵内容物をラップにくるんで鈍端部に直径約4cmの穴を開けた別の大きな卵殻に移す。この時の卵は受精卵の採取当日に産卵した卵より約30g重いものを用いる。口をラップで密封した後、38℃、RH60%で30度の角度で転卵しながら14日培養する（システムIII）。その後、発生座に移し、37.6℃、RH70%で静置して孵化までの4日間培養する。培養の21日目頃より胚は嘴を上に向け肺呼吸を始めるので、ラップに穴を開け呼吸を助ける。漿尿膜に分布している血管から血液がなくなると孵化するので、その少し前（孵化の6～12時間前）にラップを取り除きペトリ皿をかぶせる。培養の22日目に孵化する。

### 4. 培養成績

上記の方法を用いて32個の受精卵を処理したところ、システムIの培養終了後約85%は胚盤葉期への発生が認められた。生存率は培養の4日目81.3%、8日目65.6%、19日目59.4%、21日目40.6%となり、孵化率は34.4%（11羽孵化）であった。比較のためにシステムIIの培養で濃厚卵白を除去しない方法<sup>1)</sup>を用いて同様に処理したところ、生存率は培養の4日目56.8%、8日目37.8%、19日目35.1%、21日目21.6%となり、孵化率は16.2%であった。このことは、システムIIの培養で濃厚卵白を除去し水様性卵白と入れ替えることにより、培養4日目の生存率を約25%高めることができたと同時に、その後の胚の生存性には濃厚卵白除去の影響はまったくみられていないことを示している。システムIの培養を終了したときの濃厚卵白は非常に柔らかく、濃厚卵白の付いた状態でシステムIIの卵殻に卵内容物を移すと濃厚卵白の一部が壊れ、そのため本来ならば比重の関係で卵黄の真上に位置する胚盤が斜め方向や横方向に向いてしまい、胚盤が培養液に沈んだ状態で培養することになってしまう。このような状態では、おそらく呼吸が妨げられるためと思われるが、胚形成が行われず、発生の初期に死ぬものが多くみられるようになる。しかし、

濃厚卵白を除去し卵黄部分のみを卵殻に移し水様性卵白中で培養することにより、胚盤は確実に卵黄の真上に位置するようになり、胚形成が正常に行われるようになった。このことが、今回用いた方法により生存率と孵化率が大幅に向上した大きな理由と思われる。この方法によって孵化した雛はその後正常に成長し、雌6羽が性成熟に達した。これらの鶏は正常な産卵成績を示し、また人工授精により受精率88.7%、孵化率96.8%の成績が得られ、繁殖成績は通常の鶏とまったく変わらないことが示された。このことはまた、濃厚卵白は胚盤葉期以降の胚の発生と孵化には必須のものではなく、水様性卵白で代用可能であることを示している。

### 5. 鶏育種への応用

1細胞期からの鶏受精卵の体外培養が可能になったことにより、多方面への応用が考えられる。発生学的には、1細胞期から孵化までの全発生過程が体外で観察できるようになったことから、個体発生のメカニズムの解明に役立てることができるようになった。また一方では、1細胞期からの胚操作が可能となり、初期胚における外来導入遺伝子の発現の解析が可能となったことがあげられる。鶏の受精卵では細胞質は不透明なため、哺乳動物の場合のように前核に直接外来遺伝子を注入することは困難であるが、細胞質へ注入された遺伝子の発現を解析することにより、トランスジェニックニワトリ作出への足がかりを得る可能性は十分考えられる。トランスジェニックニワトリの作出には大きく二つの応用面が考えられる。一つは、鶏の育種改良への応用であり、抗病性育種や、産卵や成長などの経済形質の改良などへの応用が期待できる。

鶏の経済形質の多くはポリジーンによる支配を受けているため、当面はメジャージーン的作用が明らかな抗病性育種への応用が考えられる。また、成長ホルモン遺伝子の導入なども重要な課題となるであろう。他の一つは、鶏を利用して医薬品などの有用物質を生産することである。牛や羊では乳汁中に有用物質を分泌するように遺伝的に改造して、家畜を“有用物質生産工場”として利用することがすでに行われている。鶏では卵白（アルブミン）をつくる遺伝子に外来遺伝子をつないで導入することにより、有用物質の生産を卵白中に行わせることが考えられる。大動物を用いた生産に比べ、維持、生産コストの面で鶏は優れた“有用物質生産工場”となるであろう。

鶏の育種はこれまで選抜により集団の遺伝子頻度を変えていく方法がとられてきたが、望む遺伝子を直接個体に導入できるようになれば、これまで以上に改良効果をあげることが可能となるであろう。我々は今、鶏の1細胞期の受精卵の操作を可能にする手段を手にすることができた。外来遺伝子の導入が可能となれば、トランスジェニックニワトリを用いた新しいシステムによる育種が行われるようになるであろうが、その日は意外に近いかも知れない。鶏の育種改良は新しい時代に入ったようである。

### 文 献

- 1) Perry, M.M.(1988) *Nature*, 331: 195-197
- 2) Naito, M.and M.M.Perry (1989) *Brit. Poult. Sci.* 30: 265-270
- 3) 内藤 充・葦澤圭二郎・大石孝雄(1989) 日本畜産学会 第81回大会講演要旨 p.75
- 4) Hamburger, V. and H. L. Hamilton (1951) *J. Morph.* 88: 49-92

国内情報

## ウイルス感染に強い動物の作製

東京大学医科学研究所

岩倉洋一郎

### はじめに

ヒトに限らず、家畜にとってもウイルス病は非常に厄介な問題である。適当なワクチンが利用できれば良いが、必ずしも全てのウイルスに対して有効なワクチンが開発されている訳ではない。また、多くのウイルスに対するワクチンを予め投与しておくことは経済的にも大変である。そこで動物の側をウイルス抵抗性に改良できないものかという発想が生まれてくる。

動物個体のウイルス感染防御機構としては、免疫機構を介したものとインターフェロン系を介したものが知られている。ワクチンは予めこの免疫系を刺激して抵抗性を獲得しようとするものであるが、特異性が非常に厳密で他種のウイルスはもちろん、場合によっては同じ種類のウイルスでさえ突然変異を起こすことによってこの免疫機構から逃れてしまう難点があった。これに対し、インターフェロンによる感染防御機構は広い抗ウイルススペクトルを持つことが特徴である。したがって、もし動物にインターフェロン遺伝子を導入して必要に応じ、あるいは持続的にインターフェロンの産生を行なわせることができれば、その動物は種々のウイルス感染に対して抵抗性を示すようになるはずである。

しかし、一方ではインターフェロンは抗癌剤としても知られているように、強い細胞増殖阻害活性のあることもわかっている。その他、T細胞やマクロファージといった免疫担当細胞に作用して、免疫系を活性化したり、逆に抑制したりする活性のあることも知られている。もし、生体内で大量にインターフェロンが作られ始めると一体何が起るのか？

これまでのところこのような疑問に対して答えられるようなデータはほとんどない。ただ、リンパ性脈絡炎ウイルスやアルゼンチン出血熱ウイルスに感染したときには非常に高濃度インターフェロンが誘導され、これが細胞障害性T細胞を活性化したり、発熱をうながして症状を悪化させること<sup>1)</sup>、自己免疫疾患の患者の血中にはインターフェロンが存在しており、これが、免疫系を刺激するために多分症状をさらに悪化させていること<sup>1)</sup>、エイズ、川崎病、多発性硬化症、リウマチといった病気でもインターフェロンが症状を悪化させている可能性が指摘されている<sup>1)</sup>ことから、インターフェロンを高濃度発現させたときに生体に与える影響は慎重に検討しておかなければならない。このことはインターフェロンのヒトに対する臨床応用を進めるうえでも非常に重要なことである。このような目的から私達はインターフェロン遺伝子を導入したトランスジェニックマウス<sup>2,3)</sup>を作製した。

### 1. インターフェロン遺伝子導入マウス

インターフェロン遺伝子の発現を人為的にコントロールできるように、マウスの $\beta$ 型インターフェロン遺伝子をメタロチオネイン遺伝子の転写制御領域の下流に結合した遺伝子を作製した。これによって重金属によって発現を誘導することが可能である。このDNAをマイクロインジェクション法によって、マウス受精卵の核の中に注入し、卵を里親の輸卵管に戻して誕生させ、これまでに10系統のトランスジェニックマウスを得た<sup>4)</sup>。これらのトランスジェニックマウスでは、カドミウムを投与すると予想通り血中に高いインター

フェロン活性が検出された。血中のインターフェロン活性はカドミウムによる誘導後約6時間で最高となり、5,000 IU/ml (1 IU/mlはウイルスの増殖を1/2に抑制する濃度)にも達した。その後すみやかに減少して72時間後にはほとんど検出されなくなった。導入したインターフェロン遺伝子から作られる mRNA は肝臓と精巣で検出され、これらの臓器でインターフェロンが合成されていることがわかった。

## 2. 雄トランスジェニックマウスの不妊化現象

不思議なことに、このようにして得られたトランスジェニックマウスやその子孫のマウスの中で雄のものは全て子孫を作らないことがわかった<sup>4)</sup>。精巣を調べたところ、これらのマウスでは正常の約半分に萎縮しており、精子の数も1/1000程度しかないことがわかった。精巣上皮細胞のうち特に一倍体細胞の減少が著しく、細胞の変性、脱落が認められた。精巣内のインターフェロン活性を測定したところ、数百 IU/mlの活性がカドミウムによる誘導には無関係に常に存在した。mRNAを調べてもやはり精巣では持続的にインターフェロン遺伝子が発現していることが示された。これに対し、肝臓における発現はカドミウム

による誘導が必要であった。これはインターフェロンを発現させるために用いたメタロチオネイン遺伝子の制御領域の特性であると思われる。このようにして精巣細胞は常に高濃度のインターフェロンに浸されることになり、これが精子形成細胞の異常を引き起こすことが示された。

## 3. インターフェロンによるインターフェロンの誘導

インターフェロンには $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 型の3種が存在していることが知られている<sup>1)</sup>。私達の導入した遺伝子は $\beta$ 型であり、当然 $\beta$ 型のインターフェロンが産生されてくるはずである。このことを確認するために、それぞれの型に特異的な抗体を用いて型の判定を行った。ところが全く意外なことに私達は $\beta$ 型以外に $\alpha$ 型インターフェロンも存在することを発見した<sup>5)</sup>。特にカドミウムによる誘導後の経時変化を調べたところ、最初は $\beta$ 型しか存在しなかったものが、24時間もすると完全に量比が逆転してしまうことがわかったのである。 $\beta$ 型インターフェロンによる $\alpha$ 型インターフェロンの誘導は、組換えDNAの手法を使って大腸菌の中で作らせたインターフェロンを、マウスに投与する実験によっても確かめられた。したがってインターフェロンがインターフェロン自身を誘導する能力を持っていることが初めて示された訳である。このことは、動物からウイルスに感染した場合に、ウイルスが直接誘導するインターフェロン以外に、このインターフェロンによって誘導されたインターフェロンがさらに感染防御に参加していくことを示しており、自己防衛システムとして非常に効率的にでき上っていることに感心させられる。

## 4. インターフェロン遺伝子導入マウスのウイルス抵抗性

インターフェロン遺伝子導入マウスにカドミウムを与えると血中に高濃度のインターフェロンが誘導されてくるが、これはウイルス感染防御に実際に有効なのであろうか？ ま

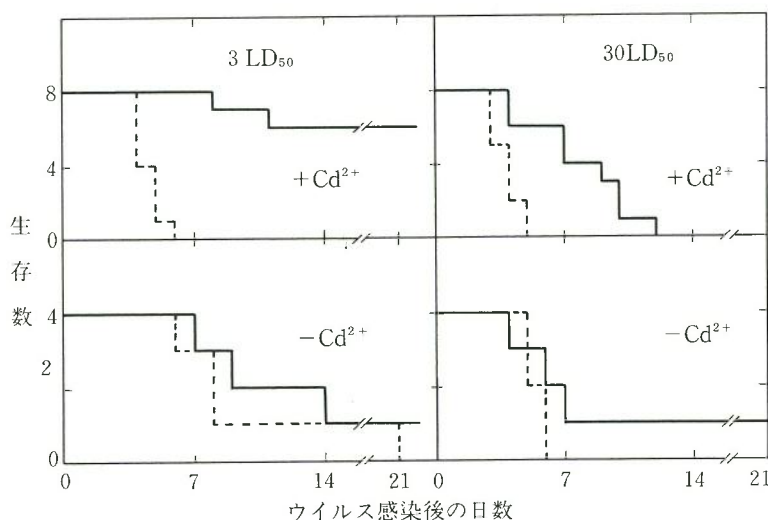


図1 インターフェロン遺伝子導入によるウイルス抵抗性の獲得  
脳心筋炎ウイルス感染後の生存数  
実線はトランスジェニックマウス、破線はコントロールの正常マウスを示す。  
カドミウムの投与は毎日行った。

ずカドミウムで誘導後、種々の臓器に存在するインターフェロン濃度を測定した<sup>5)</sup>。その結果、ほとんどの臓器でインターフェロン活性が検出され、また、インターフェロンによって誘導されることが知られている2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素の活性も上昇していることがわかった<sup>5)</sup>。そこでマウスに対して強い毒性を持つ脳心筋炎ウイルスを感染させ、ウイルス抵抗性を検討した<sup>5)</sup> (図1)。実験は4群に分けて行なわれ、ウイルス接種量を3LD<sub>50</sub> (50%致死量)にした場合と30LD<sub>50</sub>にした場合の各々について、カドミウムを毎日投与した群と投与しなかった群とに分けて観察した。図1からわかるように、3LD<sub>50</sub>接種・カドミウム投与群では、コントロール8匹が6日以内に全て死亡したのに対し、トランスジェニックマウスは3週後までにわずか2匹しか死ななかった。30LD<sub>50</sub>接種した場合には、トランスジェニックマウスでも結局12日で全て死んでしまったが、コントロール群に比べると明らかに生存日数が伸びていた。また、カドミウムの投与を行なわなかったものは、コントロールに比べて有意な差を認めなかった。以上の結果は、外から導入したインターフェロン遺伝子の誘導を行うことによって、非常に効果的にウイルス感染防御、あるいは治療が行なえることを示している。

## 5. 今後の展望

私達の結果は非常にはっきりとインターフェロン遺伝子の導入がウイルス抵抗性の獲得に有効であることを示した。しかし、今後家畜などに応用していくためにはまだいくつかの問題が残されている。一つは今回の実験で雄が不妊になったことからわかるように、高濃度のインターフェロンが持続的に存在すると非常に強い細胞障害活性が現われることである。遺伝子発現制御領域を別のものに変えれば精巢の障害は避けられるにしても、別の

部位で障害が起る可能性もある。できれば全身の細胞で低濃度発現するようなものが望ましい。また、今回はカドミウムで発現を誘導するようにしたが、実用的には毎日誘導するのは面倒なうえカドミウムの毒性も心配である。したがって、できれば誘導することなく持続的に発現するような制御領域を用いるべきである。持続的にインターフェロンが体内に存在したときの影響はまだ知られていないため、私達は現在そのような遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、生体に及ぼす影響を調べることにしている。

ところでトランスジェニックマウスは比較的簡単に作製できるようになってきたが、ウシやブタ、ニワトリなどに遺伝子を導入することはまだ非常に困難である。これは技術的問題というより、むしろ多数の動物を飼育できる施設が限られていることや、経済的な問題が大きな阻害要因であるように思われる。伝え聞くところでは海外では有用遺伝子を導入して家畜を改良する試みが盛んに行なわれているそうである。一方わが国ではまだ非常に限られた試みしか行なわれておらず、このままでは今後この領域で大きく立ち遅れることになりかねない。政府や民間関係機関による強力な援助を期待したい。

## 文 献

- 1) De Maeyer, E. and J. De Maeyer-Guignard (1988) Interferons and other regulatory cytokines. John Wiley and Sons, Inc., New York. pp.
- 2) 岩倉洋一郎(1989) 感染・炎症・免疫 19:28-38
- 3) 岩倉洋一郎(1989) 細胞工学 8(4): 17-24.
- 4) Iwakura, Y., M. Asano, Y. Nishimune and Y. Kawade(1988) *EMBO J.* 7: 3756-3762
- 5) Iwakura, Y., M. Asano and Y. Kawade(1989) "The Biology of the Interferon System 1988", (eds., Y. Kawade and S. Kobayashi), pp.335-340. Kodansha Ltd., Japan.

国内情報

# イネ遺伝子組換えの新技术 ——アグロバクテリウムによる形質転換——

農林水産省 農業生物資源研究所 形質転換研究室

加藤 明

## はじめに

われわれは最近アグロバクテリウムと Ti プラスミドベクターを用いたイネの形質転換が可能であることを示す結果を得た<sup>1)</sup>。以下ではこの研究の背景および実験結果の概要を述べる。

## 1. アグロバクテリウムによる形質転換法の長所

アグロバクテリウムと Ti プラスミドを用いた植物の形質転換はタバコ、ペチュニア等では確実に比較的容易な方法として多くの実績がある。タバコではエレクトロポレーション法をはじめ他の形質転換法も実用できるが、現在までのところトランスジェニック植物の作製には多くの場合アグロバクテリウムが用いられてきた。この理由としては、まずプロトプラスト培養が必要でないため技術的にはより容易であることがあげられる。さらに重要なことは、アグロバクテリウムを用いると 10kb 以上のサイズの DNA 断片が植物細胞に導入されることは普通であるが、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法などの細胞に DNA を直接導入する方法では、現在までに数 kb 程度のサイズの DNA の導入例が報告されている段階で、しかも、導入された DNA 断片は複雑な DNA 組み換えを受けることが多い<sup>2)</sup>。このため通常の数 kbp~10kbp のサイズの遺伝子は DNA 直接導入法では無傷のまま導入することは難しいと考えられる。

## 2. アグロバクテリウムによる形質転換の原理

アグロバクテリウム *Agrobacterium tumefaciens* は双子葉植物に感染して腫瘍を形成させる病原細菌である。腫瘍形成には菌の持つ Ti プラスミドが関与しており、Ti プラスミドに含まれている植物ホルモン合成の遺伝子が細菌から植物細胞に伝達されて遺伝子発現する結果、細胞は腫瘍化する。植物細胞に伝達される DNA は T-DNA と呼ばれ、T-DNA は植物細胞の核 DNA に組みこまれて、その後は細胞ゲノムの一部として安定的に後代の細胞に伝達されるようになる。

T-DNA にはオーキシンとサイトカイニン合成の遺伝子およびオパインという特殊なアミノ酸合成の遺伝子が含まれており、アグロバクテリウム感染により形成された植物の腫瘍組織からはオパインが検出される。また、腫瘍組織あるいはこれに由来する植物体から DNA を抽出してサザン法で調べると、Ti プラスミドの T-DNA 部分と同一の DNA 断片が検出され、植物細胞 DNA に外来の DNA が組みこまれていることがわかる。

細菌から植物への T-DNA 伝達には、T-DNA の両端にある特定の 25bp の塩基配列と Ti プラスミドに含まれている *Vir* 遺伝子群および細菌の主染色体にある *chv* 遺伝子が必須である。一方、T-DNA に含まれる植物ホルモン合成の遺伝子およびオパイン合成の遺伝子は T-DNA 伝達には関与せず、T-DNA 領域からこれらの遺伝子を除去しても T-DNA 伝達には支障はない。さらに、T-DNA 領域に任意の DNA 断片を人為的に導入しておくと、その DNA 断片を植物細

胞に伝達させることができる。こうした性質に基づいて、植物組織を腫瘍化させることなく外来遺伝子を植物に導入できる Ti プラスミドベクターが開発されてきた。

### 3. 単子葉植物への DNA 伝達

Ti プラスミドベクターは大変有用であるが、単子葉植物には応用例がなく、この方法の限界とも考えられてきた。アグロバクテリウムは単子葉植物には腫瘍形成能を示さず、病原性は認められない。にもかかわらず、Ti プラスミドベクターの優れた性質は極めて魅力的であり、単子葉植物をアグロバクテリウムによって形質転換させようとする試みは、Ti プラスミドベクターを利用しようとする人々によって継続されてきた。現在までの報告例を見ると、まず、腫瘍形成には至らないが、アグロバクテリウムは単子葉植物の細胞に、T-DNA を伝達する能力は有していることを示す結果がいくつかある。すなわち、*Chlorophytum capense* (ユリ科の植物)<sup>3)</sup>、*Narcissus* cv. "Paperwhite" (アマリリス)<sup>3)</sup>、*Asparagus officinalis* (アスパラガス)<sup>4)</sup>、*Dioscorea bulbifera* (ヤマノイモ)<sup>5)</sup> ではアグロバクテリウムの感染処理を施した部位に組織の肥大が認められ、そこにオパインが検出されている。これらの実験では、対照として *Vir* 遺伝子に欠損のある変異株では感染処理後の植物組織の肥大はおこらず、オパインも検出されないことが示されている。さらに、アスパラガスでは感染処理後得られたカルスより植物体が再生され、この植物の DNA には Ti プラスミドの T-DNA と同一の DNA が含まれていることがサザン法によって示された<sup>6)</sup>。この結果は、現在のところ、単子葉植物に T-DNA が伝達され細胞の DNA に組み込まれたことが報告された唯一の例である。

### 4. イネ科植物への DNA 伝達

アグロバクテリウムがイネ科植物に DNA を伝達できるかどうかに関しては、トウモロ

コシにアグロバクテリウムを介してウイルス感染させる研究がある。トウモロコシストリークウイルス (MSV) DNA を Ti プラスミドベクターに組みこみ、この Ti プラスミドを持つアグロバクテリウムをトウモロコシに感染処理したところ、やがて植物体のほとんどでウイルス病の病徴が見られた<sup>7)</sup>。同じ方法を用いた別のグループの研究によると、MSV 感染はトウモロコシに比べれば頻度は低いが *Hordeum vulgare* (オオムギ)、*Panicum milaceum* (キビ) その他のイネ科植物でも観察される<sup>8)</sup>。これらの結果からみると、アグロバクテリウムはイネ科植物に対して T-DNA を伝達する能力があると考えられる。しかしながら、MSV 感染実験ではたとえ 1 個でも植物細胞に MSV・DNA の伝達がおこればウイルスの自己増殖によって個体に病徴が出るのが考えられ、したがって、イネ科植物への DNA 伝達は極めて頻度の低い現象である可能性は残る。

### 5. アグロバクテリウムによるイネの形質転換

上述の背景に立って、われわれはイネ組織切片へのアグロバクテリウム感染による形質転換を試みた。約 1 cm のイネ芽ばえを切断し、切片をアグロバクテリウムを加えた MS 培地に浸して 2 日間培養したのち 2,4-D ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、クラフオラン ( $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、およびハイグロマイシン ( $20 \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含む寒天培地に移して培養を続け、生じたカルスを 3 ~ 4 週間毎に継代培養した。9 か月以上経たのち、カルスから DNA を抽出し、サザン法によって調べたところ Ti プラスミドベクターに由来する DNA 断片を検出した (図 1)。

この実験ではアグロバクテリウムは C58 株に由来する GV 3010 株、Ti プラスミドとして、pGV 3850-HP T::pFHEI 710 が用いられた (図 2)<sup>9)</sup>。pGV 3850 は pTiC 58 由来の非腫瘍性の Ti プラスミドベクターで<sup>10)</sup>、pGV 3850-HP T はこれに形質転換細胞の選択マーカーとしてカリフラワーモザイクウイルス 35s プロモーターと結合したハイグロマ



図1 アグロバクテリウムにより形質転換したイネカルスDNAからの導入したDNAの検出  
Control; 正常イネDNA  
6-1, 6-2; 形質転換体イネカルスDNA

イシン耐性遺伝子を加えたものである。(∵ pFHEI 710は pGV 3850-HP Tにカルボン合成酵素遺伝子プロモーターと結合したNPT-II 遺伝子を導入してあることを示すが、この遺伝子はイネの形質転換には直接関係はない)。サザンハイブリダイゼーションのプロープには pGV 3850-HP Tの T-DNAにあたる部分を用いた。プロープとハイブリダイズするDNA断片は正常なイネDNAには検出されず、また、ハイブリダイズしたDNA断片の分布パターンは感染させたアグロバクテリウムの全DNAに対するサザンハイブリダイゼーションのパターンとは異って、植物細胞

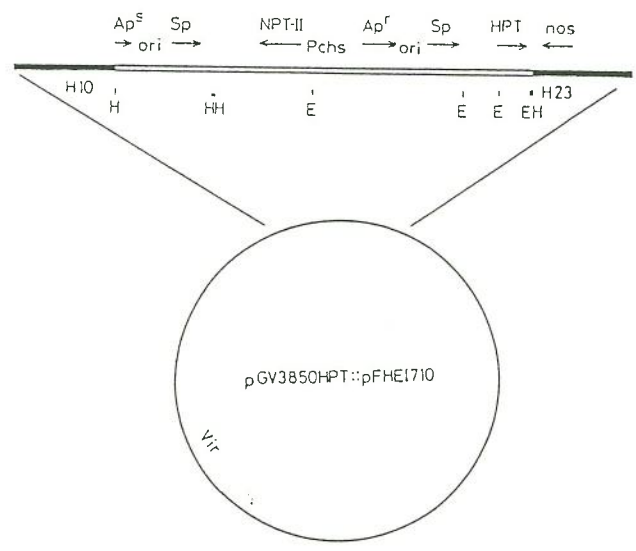


図2 イネ形質転換に用いたTiプラスミドの構造

胞ゲノムへのT-DNAの組み込みの結果生じたと考えられるサブバンドがみられた。したがって、検出したDNA断片は、万一カルスに残存したかも知れないアグロバクテリウムのDNAである可能性はなく、イネの形質転換がおこったものと断定した。なお、長期の培養を経て維持されたカルスは最終的には4種類で、このうち1個では明瞭なバンドを検出した。このカルスからは再生個体が得られており生育中である。

以上の結果からは、アグロバクテリウムによるイネの形質転換が偶然生じた頻度の低い現象か、あるいは、条件さえ整えば効率よく行いうるものか判断できない。今後は、形質転換のための諸条件の検討が必要であり、この目的のために適切なTiプラスミドベクターを作製し、効率よく形質転換細胞を検出する方法を考案することも必要かも知れない。

文 献

- 1) 加藤 明・大橋祐子 (1989) 育種学雑誌 39巻 別冊 1: 286-287
- 2) Paszkowski R. et al (1984) *EMBO J.* 3: 2717-2722
- 3) Hooykaas, G. M. S. et al (1984) *Nature* 311: 763-764
- 4) Hernalsteens, J. P. et al (1984) *EMBO J.* 3: 3039-3041
- 5) Schäfer, W. et al (1987) *Nature* 327: 529-532
- 6) Bytebire, B. et al (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5345-5349
- 7) Grimsley, N. et al (1987) *Nature* 325: 177-179
- 8) Boulton, M. I. et al (1987) *Plant Mol. Biol.* 12: 31-40
- 9) Kato, A. et al. unpublished
- 10) Leemans, M. et al (1982) *EMBO J.* 1: 147-152



## 国内情報

## 標的微生物の追跡

## ——イネもみ枯細菌病菌を例にして——

農林水産省 農業環境技術研究所 寄生菌動態研究室

松田 泉

## はじめに

自然における不特定多数の微生物の中から、目的とするもの（標的微生物）だけを選択的に検出することは、微生物生態研究において極めて重要な課題である。とくに、細菌は光学顕微鏡で確認できる大きさではあっても形態的に識別することが困難なものが多い。このため、正確に識別するには80項目以上にわたる性質を調べる複雑な同定操作を必要とすることもある。また、植物病原細菌の検出のためにこれまでに用いられてきた手法は、検定植物接種法、スライド凝集法、Ouchterlony法、ファージ法、抗生物質を利用した選択培地による分離培養法などであるが、これらの手法は複雑な操作や結果の判定に長時間を要したり、特異性や検出感度が低いことなど、検出方法自体の欠点が多かった。このため、植植物病原細菌の生態、とりわけ伝染環が十分解明されていないために、効率の良い防除法が確立されていない細菌病が多い。

筆者らはイネもみ枯細菌病病原細菌の生態の研究を行っているが、その過程で酵素抗体法などの標識抗体法<sup>1,2,3)</sup>と病原細菌の産生する特異的な物質を指標とする指標検出法によって本菌を的確かつ迅速に検出することが可能となったので<sup>4,5)</sup>、これらの研究の概要を紹介したい。なお、本研究の一部は農林水産省バイオテクノロジー先端技術開発研究「組換え体の野外環境下での安全性評価手法の開発」の一環として行われた。

## 1. 病原細菌の酵素抗体法による検出

イネもみ枯細菌病は北海道を除く全都府県

に発生し、とくに九州では被害が大きく、昭和58年度の発生面積は125千haにも達し、収量停滞の主要な原因となっている。本病原細菌は種子伝染によって箱育苗時に苗を侵すが、本田期の葉には病徴が全くみられず、出穂期の穂に突如発病するため、発生の予測も防除対策も打出せない状態にある。

本病的確な防除対策を確立するためには、病原細菌の動態、とりわけ伝染環を解明することが不可欠である。そのためには病原細菌の新しい検出・追跡手法の開発が望まれている。そこで、主として医学分野で開発利用されている標識抗体法を導入あるいは改変して植物寄生細菌を的確かつ迅速に検出する手法の確立を目指した。

まず、マクロ的検出法として各種の酵素標識抗体法(ELISA)を検討した。アルカリフォスファターゼを標識酵素とした手法では、精製 $\gamma$ -グロブリンをプレートに結合させる二重抗体(DAS)法および抗原を直接プレートに結合させる抗異種グロブリン(AGA)法、またパーオキシダーゼを標識酵素とした手法ではアビジン-ビオチン(ABC)法を用いた。供試材料として、抗血清作成に用いた抗原細菌の段階稀釈液と自然感染植物を用いた。その結果、

- ① 段階稀釈した植物寄生細菌を供試した場合、3種のマクロ検出手法として行った方法とも $1 \times 10^4$  CFU/ml以上で検出可能であった。抗原を結合させる際に低速遠沈(1500rpm)することによって、 $3 \times 10^3$  CFU/mlまで検出精度が向上した。
- ② 自然感染植物(イネ種子)を供試した場合、DASとAGA法では吸光度0.2

(405nm)以上で目的とする細菌を検出できた。

③ 特異的な抗血清さえ用意しておけば、どの目的細菌にも利用できる便利さと検出の迅速さの点でAGA法が優れていた。すなわち、酵素標識抗体法を利用した植物寄生細菌の検出の要点は、以下の項目に要約される。

- ① 免疫した抗原の種によって抗体の種特異性が異なっているが、一般に高力価の抗体を作成し、高稀釈度で利用することによって、特異性の高い抗原抗体反応が得られた。
- ② この抗体に各種の標識を試みた結果、マクロ検出手法として、アルカリフォスファターゼを標識酵素とし、抗原を直接プレートに結合させる間接法（抗異種グロブリン法）で目的とする細菌を迅速に検出できることが明らかになった。

## 2. プロテインA金コロイド法による検出

これまでに、本田に移植したイネの根および葉鞘基部には移植期から登熟期まで連続して本菌が生息していること、出穂期が近づくにつれて上位の葉鞘からも本菌が検出されることが明らかになっている<sup>9)</sup>。しかし、穂ばらみ期の止葉葉鞘においては、菌量が少ないためか検出頻度が極めて低かった。そこで、より鋭敏な各種の検出方法について検討した結果、プロテインA金コロイド法が優れていることが判明した。すなわち、リン酸緩衝液でpH7.0にした3.5%ホルムアルデヒドにグルタルアルデヒドが2.5%となるように調製した固定液で試料を1時間固定した。リン酸緩衝液で洗浄後抗血清と反応させ、再び洗浄後プロテインA金コロイド(G15)と30分間反応させた。走査電顕で観察するためにこの試料を十分に洗浄した後、導電染色液で処理して1%オスミウム酸で再固定した。その後、常法により脱水、臨界点乾燥、イオンコーティングしてフィールドエミッション型電顕(日立S900)で観察した。その結果、金粒子は本菌1個体当たり10個以上付着するものが

多く、雑菌と明瞭に区分され、止葉葉鞘内側の維管束間表面の凹陷部に生息する少数の本菌が確認された。

## 3. 病原細菌の産生する特異的な物質を指標とした検出

本細菌をジャガイモ半合成培養液で24時間培養すると、pH3付近まで低下し、生存菌数が急激に減少する。この現象には本細菌の産生する有機酸が関与していることが推察されたので、各種のカルシウム塩をペプトン0.5%加用ジャガイモ培地に0.1%加えて培養した結果、供試したすべてのカルシウム塩加用で結晶が形成された。結晶は培養温度25~40°Cで形成されたが、とくに30°C以上の高温では、わずか20時間で結晶が形成され始め、40時間で多量に形成された。糖類は結晶形成にそれほど影響しなかったが、濃度が1%以上になると結晶の形成を遅らせたり、コロニー中に多糖類が多くなり観察を困難にした。

本細菌によって形成された結晶を走査電顕で観察すると、一辺が20~数 $\mu\text{m}$ 、両ピラミッド状の結晶が主体で(口絵)、<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C NMR、GLC、原子吸光のデータから、本結晶をシュウ酸カルシウムと同定した。

さらに、本菌を高温(35~42°C)で培養すれば、鮮明な緑黄色蛍光性色素を産生することが確認された。すなわち、ジャガイモエキスを用いて作成した半合成培地、無機物にペプトン、糖を加えた合成培地など20種類の培地について比較した結果、固形培地ではぶどう糖を含むジャガイモ培地、液体培地ではAyersらの培地にペプトン、ぶどう糖を加えた培地が色素産生に最適であった。これらの培地を用いた場合、培養温度20~27°Cではほとんど色素を産生せず、28~30°Cでは淡黄色となり、温度の上昇につれて次第に緑黄色が鮮明になった。35~40°Cでは最も濃い色調となり、41~43°Cでは本菌の生育が低下し、色素産生が減少して淡黄色となった。

これらの性質を指標として本病原細菌を迅速に検出するために、この結晶形成と色素産生を同時に確認する培地を作成した。結晶形

成のためのカルシウム塩としては塩化カルシウムが最適であり、色素産生にはジャガイモエキスとぶどう糖が必要であった。これらの条件を満たす培地を検討した結果、ペプトン 5g, ぶどう糖 5g, CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O 1g, 寒天20gをジャガイモ(200g)エキスに溶かし1,000ml (pH 6.8)とする組成が最適であった。

各地の試験研究機関の保存菌株を含む約200菌株の本病原細菌を供試して、結晶形成と色素産生の有無を検討した結果、病原性があり、コロニー中にシュウ酸カルシウムの結晶を形成した菌株はすべて38°Cで緑黄色色素を産生した。本菌が高温培養時に産生する色素(毒素)は病原性と密接に関連していることが推察された。

また、異なる属および種を含む約50菌株の植物病原細菌について、この結晶形成と色素産生の有無を試験をした結果、*Pseudomonas gladioli*が少数のシュウ酸カルシウムの結晶を形成したが、本菌のような鮮明な緑黄色色素は産成しなかった(表1)。その他の菌株では、この結晶形成と色素産生は認められなかった。

この結晶と色素形成を指標として接種および自然感染イネ約500個体から本病原細菌の分離を試みた結果、1コロニーでも明瞭に識別され、確実に、また能率よく検出できた。

以上の結果、コロニー中に形成された結晶と色素を指標として、イネもみ枯細菌病菌を迅速に検出できることが明らかになった。

## おわりに

抗血清を利用した検出方法は、一度に多くの検体を処理できる良い点があるが、機械、器具、薬品などが高価であるため、少数の試料には適さないという欠点も抱えている。

微生物の産生する特異的な物質を指標とする検出手法は、培養基や培養条件などが決まれば手順は単純であり、高価な実験器具は余り必要ないなど、きわめて便利な方法であ

表1 各種植物病原細菌のシュウ酸カルシウム結晶の形成と色素産生

属	種	結晶	緑黄色色素
<i>Pseudomonas</i>	<i>glumae</i>	卅	卅
	<i>gladioli</i>	+	±
	<i>plantarii</i>	—	—
	<i>avenae</i>	—	—
	<i>cepacia</i>	—	—
	<i>caryophylli</i>	—	—
	<i>solanacearum</i>	—	—
	<i>syringae</i>		
	pv. <i>tabaci</i>	—	—
	pv. <i>lachrymans</i>	—	—
	pv. <i>mori</i>	—	—
	pv. <i>eriobotryae</i>	—	—
<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>		
	pv. <i>campestris</i>	—	—
	pv. <i>oryzae</i>	—	—
	pv. <i>glycines</i>	—	—
<i>Erwinia</i>	pv. <i>vitians</i>	—	—
	<i>carotovora</i>	—	—

\*38°Cで培養

る。しかし、検出に際し、多少の工夫が必要となる場合がある。たとえば、本菌の生育が雑菌より優位となる場合には、20時間で結晶を形成し、鮮明な色素を産生するが、高温で生育する雑菌が多い場合には、鮮明な色素を産生しないため、結晶形成の認められたコロニーを同じ条件で再培養して、色素産生の有無を判定する必要がある。

本研究ではイネもみ枯細菌病菌を標的としたが、他の標的細菌でも生理、培養、血清学的等の性質の詳細が解明されれば、それらの特異性を利用して標的細菌の野外での動向を追跡することができ、微生物農薬あるいは組換え細菌の野外でのモニタリングが可能となるろう。

## 文 献

- 1) 松田 泉・佐藤善司(1987)日植病報 53: 403
- 2) 松田 泉・佐藤善司(1988)日植病報 54: 74
- 3) 松田 泉(1988)日本植病理学会講演要旨予稿集 196
- 4) 松田 泉・佐藤善司(1988)日植病報 54: 120
- 5) 松田 泉・佐藤善司(1988)日植病報 54: 378
- 6) 松田 泉・佐藤善司(1987)日植病報 53: 122

## 文献情報

食物しだいで変身する  
シャクガの幼虫

環境の変化に反応して不連続な形態的変異を示す、いわゆる多形現象は、比較的世代の短い節足動物によくみられる。リン翅目の幼虫、蛹そして成虫の色彩にみられる季節型、アメンボやヨコバイの翅型多形、アブラムシの有性・無性の交替や、社会性膜翅目にみられるカースト制分化などがその例である。どのような環境要因が、そのような変異を引き起こすかについては、一般によくわかっていないが、温度、光周期、湿度、密度（接触やフェロモン）、そして社会性昆虫などでは、コロニーの状態などが関与していることが知られている。今回は、幼虫の食物が、シャクトリムシの形態や行動を決定するという、今まで例になかった多形現象を報告する。この現象は、寄主植物に含まれる防御物質の濃度の違いが原因となっている。

シャクガの一種、*Nemoria arizonaria* は、北米南部のアリゾナ、ニューメキシコ、テキサスそしてメキシコ北部に生息する。年二化性で、一世代目の成虫は、冬の後半から早春に、二世代目は、夏にみられる。このガの幼虫は、未記載であったが、著者は、アリゾナ南東部で、いくつかのカシの木 (*Quercus arizonia*, *Q. emoryi*, *Q. undulata*, *Q. grisea*) 上で発見した。春と夏世代の幼虫は、ふ化したときは外見上全く同様であるが、発育するにつれ違ってくる。春に現れる幼虫は、カシの花（穂状花序）を食べるのだが、発育すると、その花そっくりになる。濃い黄色の皮膚は、しわだらけで柔かな小突起がたくさんついている。胸部と腹部の背側部にも突起物が、ちょうど背中まん中にそって並んでいる。二列の赤褐色の点は、花の雄ずいのように見え、まさにカシの花そっくりだ。夏に現れる幼虫は、カシの花が枯れたずっと後にふ化するのだが、発育すると、カシの一年目の小枝

に擬態する。その皮膚は、緑かかった灰色で、花型幼虫よりしわが少なく、背側部の突起もそれほど顕著ではない。

花型幼虫の口器は、花粉を食べるのに適した小さなアゴをもっており、枝型幼虫の口器は、堅いカシの葉を食べるように大きく、頭部も大きい。二つの幼虫型は、行動においても異なる。花型幼虫は、花に置くとじっとしているが、葉や枝に置くと花へと移動する。逆に、枝型は、枝ではじっとしているが、花や葉に置くと移動するのである。

どんな環境要因が、これらの発育上の反応を引き起こすのだろうか。食物、温度、光周期などが考えられる。そこで、これらの要因が実際に使われているかどうかを調べるために、野外で採集した成虫から卵をとり、いろいろな条件下で飼育してみた。温度や光周期にかかわらず、花を食べた幼虫はすべて花型となり、葉を食べた幼虫は、すべて枝型になることがわかった。花と葉とでは、化学的組成はかなり異なるが、人工飼料を使って調べたところ、ポリフェノールの含有量が高いと、枝型幼虫が現れることがわかった。花に葉を混ぜた飼料や、タンニンを加えたものでは、ほとんどの幼虫が枝型になった。

この見事な多形現象は、どのように進化したのだろうか。栄養的に上質の花を食べる花型幼虫は、枝型幼虫より速く発育し、大きな蛹となり、蛹化率も高くなる。産卵数も、花型幼虫から成虫になったメスの方が多い。幼虫期間が短かければ、寄生や鳥による捕食からのリスクを軽減できるし、はやく羽化したガは、特に雄の場合、配偶者探しに有利であろう。だから、東の間の食物資源にもかかわらず、春に葉ではなく花を食べる行動が、進化したのだろう。枝型は、生産性は低いが、二世代目を出現させた方が、そうしないより選択的に有利であるために、そのような遺伝子が維持されている。視覚を使って獲物を探す鳥のような動物が高い捕食圧をかけるので、非常に巧みな隠蔽擬態が進化したにちがいない。

どの種類のタンニンが枝型の発達を誘起するのかは、まだわかっていない。タンニンに

は、様々な種類があり、人工飼料に加えたものも、いくつかの種類が混ざったものであった。タンニンの量によって異った幼虫型を誘起する機構もわかっていない。たぶん、タンニンの量を知る受容器があり、その情報が循環するホルモンの量に影響し、そのホルモンが、発育中の遺伝子制御を決定するのであろう。ホルモン——特に幼若ホルモンやエクジソン——は、他の昆虫の多形現象にとって、重要な要因となっている。

食物が引き起こす多形現象は、意外にもっと頻繁に見られるものなのかもしれない。多くの植食性節足動物は、多化性で、いくつかの異った植物を食べたり、分布内の様々な土地で異った化学組成をもったいろいろな寄主植物に出会うこともある。食物に含まれるシグナルは、適切な形態、生理、そして行動的な表現形質を誘導したり、また寄主特異性や寄主の異った系統の進化にも重要な役割を果たしているのかもしれない。

以上がこの論文で述べられている研究の結論であるが、この課題については、以下のような点でなお研究が深められれば良いと記者は考える。

1. 花型は、花を食べてはじめて“花型”となるのであって、ふ化した幼虫は、食物次第で枝型にもなりうる。では、春にふ化した幼虫は、どのように花を選ぶのか？ 何故葉を食べ始めないのだろうか。

2. 内的増加率から、一世代でいるより二世代でいた方が有利であるという著者の説明は単純過ぎるし、年一世代の生物の存在を無視してはいないだろうか。捕食圧の季節的変動から、例えば、休眠していた方が二世代目を出してその幼虫をたくさん捕食されるより有利となる可能性も考えられようから。

(抄訳 田中誠二——蚕昆研)

#### A diet-induced developmental polymorphism in a caterpillar

Erick Greene

Science 243 : 643-646 (1989)

#### 文献情報

### 鶏の生殖系列への外来遺伝子の導入

鶏では初期胚へのアクセスや、胚の *in vitro* での培養が難しいことから、今まで報告された生殖系列への遺伝子の導入法は放卵直後の卵に複製能力のあるレトロウイルスを注入する方法に限られていた。これに対し、マウスでは初期胚の操作によりDNAの注入、レトロウイルスの感染、胚の幹細胞を用いての生殖系列のキメラの作出など様々な遺伝子操作が行われている。しかし鶏の場合、放卵後であれば胚へのアクセスは容易だが胚はすでに哺乳類でいえば胞胚もしくは原腸胚の段階に達している。ここに報告されているのは、複製能力のあるウイルスを使わずに形質転換鶏を作出するため、抱卵されていない卵の胚に複製能力を欠いたレトロウイルスを注入する新しい遺伝子導入法である。ここで使われている複製能力のない鶏細網内皮症ウイルス (REV) のベクターME111は注入とほぼ同時に胚の細胞に感染するので成鶏となつてから血液や精液を調べれば注入時にベクターに感受性をもつ体性および生殖性の幹細胞が胚に存在していたかがわかる。ME111にはREVのTn5ネオマイシン抵抗性遺伝子と単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)のチミジンキナーゼ(TK)遺伝子が含まれている。ベクターを含んだ細胞培養液を胚盤葉の胚下腔に注入し、注入口を封じた後ふ化させる。成長した後、血液と精液から抽出したDNAを制限酵素で処理し、ベクターに特異的なプローブを用いてハイブリダイズさせ、分析した。ポジティブコントロールとしてME111を、ネガティブコントロールとして未処理の鶏の精液および血液を同様に処理して使用した。注入した2,599個の卵のうち、38%がふ化した。血液を分析した760羽のうち、173羽にベクターに特異的なシーケンスが検出された。血液分析でポジティブであ

った82羽の雄のうち、33羽は精液にもベクターに特異的なシーケンスが検出された。さらにこのうち4羽( $G_0$ とする)と交配し次世代( $G_1$ )の血液を分析したところ、2.4%から8.4%までの頻度でベクターのシーケンスが保持されていた。また、これら $G_1$ の血液由来のDNAをTK遺伝子をプローブとしてハイブリダイズして分析したところ、対応するバンドが認められた。

ME 111 よりタイターが100倍も高い欠損REVの報告もあるので、これを用いてゆけば欠損REVによる生殖系列モザイク鶏の作出が効率的に行えるであろう。また鶏白血病ウイルスなど他のレトロウイルスの複製能力の欠損したものをベクターとすることもできるだろう。それによって遺伝子の様々な部分に転換を起こすことができるかも知れない。

この実験に用いた胚は少なくとも $10^4$ の細胞を持ち、胚盤葉の外層に胚盤葉上層を形成しはじめた段階のものである。始原生殖細胞はこの層にあるが、体性幹細胞との区別はまだできない。この実験では抱卵前の胚の胚盤葉に欠損REVのベクターME 111を注入することにより血液、精液の両方の前駆体に感染を起こすことができた。精液の分析でポジティブであった個体の $G_1$ の血液の分析によって、ベクターのシーケンスが生殖系列を介して伝えられたことが明らかになった。次世代をとるために使われた“モザイク鶏”である $G_0$ および $G_1$ に複製能力のあるウイルスが検出されなかったことから、 $G_1$ にベクターのシーケンスが検出されたのは $G_0$ の胚への注入によるものだといえよう。

このアプローチは分化過程における細胞系統の関係の研究やベクターに媒介される遺伝子の発現の研究の一つの手法となるであろう。鶏の胚の胚盤上層の細胞は*in vitro*で培養されており、また幹細胞の胞胚腔内注入によってキメラも作られている。生殖系列の細胞が*in vivo*でREVに対し感受性をもつということから、形質転換マウスを作る場合にマウスの幹細胞を*in vitro*で用いたのと同じように、鶏の幹細胞を*in vitro*で用いる方法も考えられる。

この研究の結果は、抱卵されていない鶏の胚がREVベクターによる感染に感受性のある生殖系列の幹細胞を提供できること、遺伝的情報を鶏の生殖系列へ導入するために複製能力欠損REVベクターが使えることを示している。簡便で効率の良いこの方法を用いてゆけば、研究者および育種家の双方とも鶏の遺伝的操作を実際に行えるようになるであろう。

(抄訳 石橋朋子 兵庫種畜牧場)

### Germline transmission of exogenous genes in the chicken

Bosselman, R.A., R.Y.Hsu, T.Boggs, S.Hu, J.Bruszewski, S.Qu, L.Kozor, F.Martin, C.Green, F.Jacobsen, M.Nicolson, J.A.Schultz, K.M.Semon, W.Rishell and G.Stewart. *Science* 243: 533-535 (1989)

#### 文献情報

#### シンドビスウイルス——動物細胞での遺伝子発現のための広宿主域ベクター

遺伝情報が翻訳され、タンパク質が合成される機構が明らかになるにつれてクローニングした遺伝子あるいはそれを改変したものからタンパク質を産生させ、その活性の解析や生産が行えるようになってきた。遺伝子発現ベクターとしては、大量培養に適した大腸菌などのベクター、高等動物由来のタンパク質を活性を失わずに多量に産生するバキュロウイルスベクター、感染した個体内で目的の遺伝子を発現するので生ワクチンとして使用できるワクシニアウイルスベクターなど様々な特徴を持ったベクターが開発されている。ここで紹介するのは、シンドビスウイルスベクターの開発に関する報告である。発現ベクターの多くはウイルスを用いたもので、それぞれ宿主域が限られているが、このベクターの特徴は、宿主域が広いことである。

シンドビスウイルスはエンベロープに包ま

れた1本鎖RNAウイルスで、①宿主域が広く哺乳類、鳥類、爬虫類、両性類、カおよびショウジョウバエ由来の細胞に感染する。②ウイルス遺伝子が細胞質で早期に効率よく発現する。③RNA合成の温度変異株が得られ、培養温度を変えるだけで遺伝子の発現を調節できる。という特徴があることから、優れた発現ベクターとなり得ると考えられた。

RNAを操作することは困難なので、ファージDNAのSP6-RNAポリメラーゼプロモーター下流にウイルス遺伝子のcDNAをクローニングし、宿主細胞に取り込ませると、感染性のRNA（注：ウイルスRNAと同等のもの）が合成される。このクローンのウイルス構成タンパク質遺伝子をクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子に置き換えて（注：CATの酵素活性は、ラジオアイソトープ標識した基質をもちいて容易に検出できるので、遺伝子発現解析の指標としてよく用いられる）、組換えベクタークローン(TRCAT)を構築した。このクローンをSP6-RNAポリメラーゼで*in vitro*転写し、産生したRNAを鶏胚線維芽細胞に取り込ませ、37°Cで培養すると、4時間後からCAT活性が検出され、16~20時間後にプラトーに達した。CAT活性は、カウズラ、ハムスター、ヒト由来の細胞を用いても検出された。温度感受性を導入したクローンを用いると、30°CではCATが発現するが40°Cでは発現しなかった。鶏胚線維芽細胞にTRCATを取り込ませた場合、細胞当たり約 $1 \times 10^8$ 分子のCATが産生した。これは全細胞タンパク質の3%に相当し、シンドビスウイルス構成タンパク質の発現量と同程度であった。これに対し、他のDNAウイルス発現ベクターでは、細胞当たり、ワクシニアウイルスで $5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$ 、サイトメガロウイルスで $10^9$ くらい、バキュロウイルスで $10^7 \sim 10^{10}$ 分子の発現産物が得られる。

RNAウイルスベクターは、変異が起り易いことが懸念される。TRCATはキャプシドタンパク質遺伝子とCAT遺伝子が入れ換えてあるのでそのままでは感染性ウイルス粒子を産生しない。そこでシンドビスウイル

スを同時感染させるとキャプシドタンパク質が補われるので感染性の組換えウイルスを得ることができる。この方法でTRCATを7代継代したところ初代の1000倍の細胞がTRCATに感染し1000倍のCATを発現していた。したがってTRCATは安定でかつ継代によって増幅することが明らかになった。TRCATは増殖がよいので計算上3代継代で0.6mg、5代継代で300gのCATを生産できる。（注：3代継代時で約 $1.6 \times 10^{11}$ 、5代継代時で $2.6 \times 10^{16}$ 個の宿主細胞が同一な条件で培養できると仮定した値）。

シンドビスウイルスベクターは安定だが、やはり継代は少ない方がよい。そこで細胞当たり産生する感染性粒子数を増やすことが考えられる。組換え体はうまくエンベロープに包まれて感染性になる。これに影響する要素としては、ヘルパーとして用いるシンドビスウイルスとの量比と、包まれる遺伝子の大きさがある。シンドビスウイルスではある程度RNAに大きさの幅があっても包み込めるようであるが、遺伝子の大きさがどの程度影響するかは更に調べる必要がある。シンドビスウイルスベクターにクローニングできる遺伝子の上限は約4000塩基である。

シンドビスウイルスベクターで1000個の細胞当たり $10^{11}$ 分子の産物を得ることができ、ヘルパーウイルスを用いて継代することによって増幅することができる。したがって、このベクターは広い宿主域にわたるタンパク質の解析に向いている。また大量培養には温度感受性株をヘルパーとして用い、生産時には培養温度を変えて感染性粒子が含まれないようにするといったことも可能であろう。

（抄訳 犬丸茂樹一家衛試）

#### Sindbis virus: An efficient, broad host range vector for gene expression in animal cells

Xiong, C., R. Levis, P. Shen, S. Schlesinger, C. M. Rice and H. V. Huang  
*Science* 243: 1188-1191 (1989)

## 文献情報

マメ科植物—根粒菌の  
宿主特異性の決定に対  
するレクチンの関与

根粒菌はマメ科植物の根に感染し、根粒を形成して空中窒素固定を行なうが、その際、植物と根粒菌の間には一般に厳密な宿主特異性がある。例えばダイズと共生する根粒菌が他のマメ科植物に根粒を形成することはない。根粒菌はまず根毛の表面に付着して根毛のカーリングを引き起こし、これによって根粒菌は根毛細胞壁に抱き込まれた状態になる。根粒菌はこの部位から endocytosis 的に表皮細胞に侵入し、感染糸を形成しつつ皮層細胞の奥深く侵入する。そして皮層細胞の放射方向への分裂を引き起こして根粒が形成され、やがて窒素固定活性の発現にいたる。ごく一部の例外を除いて菌の根毛への付着と根毛のカーリングは根粒菌の感染過程の初期における最も顕著な、かつ必須の現象である。

根粒菌側の宿主特異性に関与する遺伝子は次々に同定されており、実際これらの遺伝子を含むプラスミドを挿入することで根粒菌の宿主特異性を変えることができる。しかし、それらの遺伝子の具体的な機能はほとんどわかっていない。一方、根粒菌の宿主認識にたいして植物側のどのような物質が応答するかという問題についてはさらにわかっていることは少ない。植物のもつ種特異的なレクチンが根粒菌の細胞外多糖と結合することが宿主特異性の機構であるとする説が提唱されたのは1974年のことで、それ以後様々な紆余曲折を経つつこのレクチン説はもっとも魅力的な説として多くの研究者を引きつけてきたが、決定的な証明はまだない。

本論文の著者らは、*Agrobacterium rizogenes* を用いた植物の形質転換によって、根粒菌の宿主認識と感染成立におけるレクチンの関与について新しい知見を提供している。*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (RL 248) は pea に根粒を形成するが clover には

根粒を形成しない。*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (RT 843) は clover に有効だが pea には根粒を形成しない。pea にはグルコース/マンノースと結合するレクチンがあり、これは根毛表面に局在する。このタイプの糖に対して特異性をもつレクチンは RL 248 の交互接種群の植物にのみ存在し、clover には含まれない。そこで pea のレクチン遺伝子 (*psl*) を clover に導入することによって RL 248 による根粒形成が誘導されるかどうかを調べた。ゲノミックな *psl* を挿入したバイナリーベクター pBin 19 または full length の *psl* cDNA (*cpsl*) を挿入した発現ベクター pAGS 35 S を構築し、これらを *A. rizogenes* (L B A 1334) に組み込んだ。これらのベクターはともに reporter として neomycin phosphotransferase gene (NPT II) をもっている。L B A 1334 によって誘導された clover の hairy roots は 86% が NPT II 活性を示し、高い頻度で形質転換が起きていることを示した。pBin 19 *psl* または pAGS 35 S *cpsl* をもつ L B A 1334 によって形質転換した hairy roots はいずれも本来の clover にたいする菌 RT 843 によってだけではなく、RL 248 によっても根粒を形成し、形成された根粒は RT 843 による正常な根粒と形態的に変わらず、窒素固定活性も示した。この根粒が間違いなく RL 248 によって形成されたものであることは rifampicin 耐性を付与した RL 248 の利用、RL 248 菌の O-抗原に対するモノクロナル抗体との反応、その他の指標によって確認された。*psl* を挿入されていない pBin 19 をもつ L B A 1334 によって形質転換された hairy roots は native な clover の根と同様に、RL 248 によって顕著な根毛のカーリングを起こすがその後の感染プロセス、すなわち菌の植物細胞への侵入、したがって感染糸の形成が起こらない。この結果は RL 248 の宿主認識において、少なくともその一部は根粒菌と宿主のレクチンの相互作用が決定しており、また根のレクチンは根粒菌の植物細胞への侵入、ないしは感染糸の形成のメカニズムに関与していることを示すものである。



さて、根粒菌が特定の宿主植物の根毛表面に付着することが宿主認識の最も重要な鍵であるとするのが従来最も一般的に行なわれている考えであり、レクチン説の背景にもこの考えがある。しかし、一方で根粒菌の根毛表面への付着は根圏での菌の増殖と同様の非選択的現象であることを示唆する観察結果も少なくなく、根毛のカーリングこそが宿主認識の最も顕著な表現型であるという考えにたつ研究者もいる(例えば、東, 1987)。本研究の結果は少なくとも pea のレクチンの場合、レクチンの関与する宿主特異性の決定機構が、菌の根毛への付着や根毛のカーリングの段階ではなく、それよりも後のプロセスにあることを示している。最近の多くの研究によって、菌の根毛への付着より以前も含めて、共生成立にいたるいろいろな段階で宿主による根粒菌に対する選択の機構が働いている可能性が示されており、マメ科植物—根粒菌の共生における宿主特異性の決定機構は決して単純ではないようである。

この報告は宿主植物側の遺伝子操作によって宿主—共生微生物間の特異性を変更した最初の例であり、同時に *A. rizogenes* をもちいたいわゆる transgenic roots が植物—根粒菌の相互作用の植物側からの解析に有効な実験系となり得ることを示している。

(抄訳 河内 宏—生物研)

### Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis.

Diaz C. L. L. S. Melchers, P. J. J. Hooykaas, B. J. J. Lugtenberg and J. W. Kijne  
*Nature* 338 : 579-581 (1989)

#### 文献情報

トウモロコシプロトプラス  
トのコロニー形成を増加さ  
せる培養ろ液抽出物

トウモロコシのプロトプラストからの植物

体再生の報告は非常に少なく、その再生系の確立が望まれている。

双子葉植物のプロトプラスト培養では、フィーダー培養法やナース培養法で増殖の速い懸濁細胞の培地から抽出した Conditioned Medium (CM) と呼ばれるものを培地中に加えることで、コロニー形成の頻度を高めることに成功している。また、オオムギの葯培養では、子房培養培地から抽出した分子量が約 600 の Conditioned Medium Factor (CMF) を加えることにより、培養初期の細胞分裂率を高めている (Kohler & Wenzel 1985)。

トウモロコシ懸濁細胞の培地中には CMF と呼ばれる要素が蓄積され、適当な培養密度の Black Mexican Sweet (BMS) のプロトプラスト培養培地にそれを加えるとコロニー形成の頻度が高まることを、筆者らは前報 (Somers ら, 1987) で報告している。また、対数増殖期にある懸濁細胞の培地から抽出した CMF の活性が高いことも示している。CMF はプロトプラストの活性化や細胞壁形成の誘導よりも、むしろ細胞分裂の頻度を高める働きがある。トウモロコシだけでなく他の単子葉植物を含めて培養細胞の生長を外生の物質で調節するということを理解するためには、CMF の化学的特性を明らかにすることが重要なステップである。特殊な培地を供給すれば単子葉植物でもカルスの生長や分化をコントロールできるが、筆者らは、懸濁細胞の培地から抽出した CMF がトウモロコシ培養細胞の生長、分化をコントロールするのではないかと考えている。

この実験の目的はコロニー形成を高める能力を保持する BMS 懸濁細胞の培地から抽出された CMF の種類を決定し、BMS プロトプラスト分裂に対する効果を測定することと、CMF の物理的、化学的特性を明らかにすることである。

CM の抽出は対数増殖期である培養 4 日後に行った。すなわち BMS 懸濁細胞の培地をワットマン No. 1 ろ紙でろ過し、ろ液をマニトール濃度が 8% になるように調整後、0.22 $\mu$ m のニトロセルロースフィルターでろ過滅菌し

た。CMの保存は $-14^{\circ}\text{C}$ で行った。プロトプラストの分裂に対する活性の測定は以下のように行った。BMS懸濁細胞から単離したプロトプラストは0.8%アガロースを含むMS 2 D 8 M+CM培地 (Somers ら, 1987)で培養を行った。培養密度は $5 \times 10^4$ 個/ml, 温度は $25^{\circ}\text{C}$ で行なった。コロニー形成の頻度は培養8~10日後に4細胞以上のコロニー数を測定することで評価した。また, 生存細胞率はTTC (2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride)の活性で評価した。CMをBMSプロトプラスト培養培地に添加することでコロニー形成の頻度はCM添加量の増加に伴って直線的に増加した。最適のCM割合では対照に比べてコロニー形成は約10倍増加した。ということは, 単一もしくは複数のCMFがCMの中に存在し, それぞれ独立に働いている可能性があった。次に, Chelex-100カラムで溶離されたCMF画分は $100^{\circ}\text{C}$  5分間加熱してもその活性は失われなかった。また, CMFの活性はpH5で最も高く安定であり,  $\text{pH} \geq 8$ ,  $\text{pH} \leq 2$ 条件下では急速に活性は失われた。CMF分画を水+エチルアセテートまたはブタノールで抽出し, その可溶物を水+イソプロパノールに混合後プロトプラスト分裂率を指標として活性を調査した。その結果イソプロパノール濃度60%までは活性が認められた。これらの結果からCMFは親水性であると考えられる。また, pH5でCMFは陰イオン樹脂, 陽イオン樹脂にも保持されないため, CMFは荷電していないと考えられる。次に, ビタミンB-12を指標として限界ろ過法によりCMFの分子量を測定したと

ころ1350よりも小さいことがわかった。これに続くBiogel P-2, P-6を用いたゲルろ過により分画されたピークとそのプロトプラスト活性の関係から明らかにされた分子量は1200であった。その結果, CMには一つの大きなCMFが存在することが示唆された。NMR (Nuclear Magnetic Resonance)分析からCMFはCMの中に $10^{-8}\text{M}$ かそれ以下のレベルの濃度で含まれていると考えられる。また, レクチンアフィニティクロマトグラフィーの結果からその構造はオリゴ糖類に類似していると考えられる。しかしながら最終的なCMFの構造は解明されなかった。

以上の結果から今回の実験ではCMを培地に加えることによりプロトプラストの分裂頻度が高くなりCMの有効性が確認された。活性が認められるCMFは一種類であることも確認された。また, 以前オオムギで報告されてきたCMF, あるいは双子葉植物を材料とした懸濁細胞の培地から得られたCMF, あるいはプロトプラスト培養で一般的に用いられている植物ホルモンとは化学的に類似していないことが明らかになった。

(抄訳 荒井 智一日本たばこ)

#### Characterization of conditioning factors that increase colony formation from <Black Mexican Sweet Corn> protoplasts

Paul R. Birnberg, David A. Somers, and Mark L. Brenner

*J. Plant Physiol.* 132 : 316-321 (1988)



海外便り

## 海外における麦育種研究事情

農林水産省 農業研究センター 小麦育種研究室  
瀬古秀文

ここ1年ほどの間に、海外の麦育種に関する情報を直接得る機会に2度恵まれた。最初は南半球の農業大国オーストラリアの小麦育種、2度目は西ドイツで開催された第12回欧州育種会議(EUCARPIA CONGRESS)の小麦、大麦育種セッションである。ここでは、この研究調査ならびに研究集会について簡単に紹介する。

オーストラリアは、ここ10年間の小麦の作付面積が1,000~1,300万ha、生産量が900~2,200万t、単収が0.8~1.8t/ha、輸出量が700~1,600万tという世界有数の小麦生産国で、日本へも100万t近くを輸出している。オーストラリアの小麦は品種、タンパク含量、品位等によりプライム・ハード(APH)、ハード(AH)、スタンダード・ホワイト(ASW)、ソフト(AS)、ジェネラル・パーパス(AGP)、フィード(AF)の銘柄に分けられ、特に西オーストラリア産のASWは製粉性、色相、製めん性などが優れているところから、わが国の日本めん用小麦品種育成の品質目標となっている。

オーストラリアの小麦育種は5州9場所で行なわれているが、そのうち4州4場所を訪問した。

クインズランド州では丘の上の緑あふれる町 Toowoomba にある州小麦研究所を訪れた。Dr. Eisemannによればクインズランド州は南北1,000kmあり、土壤肥沃度が高く、タンパク含量の高い小麦が生産される。作付は85万haでHartongという品種の作付が50%をしめている。病害はさび病、障害は穂発芽が問題であるとのことであった。品質担当のDr. Martinは乾めんや即席めんを飾った部屋で、クインズランド州産のプライム・

ハードの91%は日本とその周辺国に輸出され、中華めん等に利用されているので、日本から製めん機を購入し、試験を始める場所であると語った。

クインズランド州の南隣のニュー・サウス・ウェールズ州ではシドニーから北西へ飛行機で約1時間飛んだ麦作地帯まった中の小さな町 Narrabri にあるシドニー大学植物育種研究所を訪れた。ニュー・サウス・ウェールズ州の小麦作付面積は350万ha、Senior Plant BreederのDr. Ellisonによればプライム・ハード用品種を中心に育種を進めており、耐さび病・収量性等の改良のためにCIMMYTの品種やその後代を多用しているとのことであった。品質の初期選抜はブラベンダー製粉機とミキソグラフを用いており、後期世代の検定はオーストラリア・パン研究所に依頼している。また、クインズランド州と同様に穂発芽が問題で、雨処理施設を利用して耐性の選抜を行なうとともに、基礎研究を実施している。

南オーストラリア州では公園都市アデレードのアデレード大学ウェイト農業研究所を訪れた。Prof. Shepherdによれば、南オース



図1 オーストラリア パン研究所の  
Dr. Miskelly

トラリア州の小麦作付面積は約150万haで、ボロン過剰土壌が多いことからボロン耐性品種の育成に力をいれており、品質分析は州農業局の穀物化学部で行なっているとのことであった。また、ClipperやSchoonerなど船の名前をつけた大麦品種の育成者で、日本の大麦育種関係者にはおなじみのProf. Sparrowにはネマトダ抵抗性育種や新しく作成した全自動マイクロモルティング装置の説明を受けた。すでにカナダへ1台販売したとのことである。

西オーストラリア州ではスワン河口に展開する絵のような都市パースにある州農業局を訪れた。ここでは、多収性、耐病性、耐酸性土壌などのプロジェクトを進めており、耐病性育種のDr. Wilsonによれば最も問題なのはセプトリア（葉枯病・稈枯病）で、東部と違ってさび病は問題でないとのことであった。品質担当はDr. Crosbieで、ASWの本場だけあって日本、韓国などを強く意識した選抜を行なっており、クインズランド州と同様に製めん機を導入し、これから使いこなしてゆこうとするところであった。

なお、上記の他にオーストラリア小麦庁、プライム小麦生産組合、バルク・ハンドリング組合などの生産・流通関係機関を訪れたが、タンパク含量によるセグリゲーション、低アミロのチェック、炭酸ガスによるくん蒸など輸出商品としての小麦の品質管理対策に感心させられた。また、先端的な穀物化学の研究を行なっているCSIROの小麦部、いち早く製めん機を導入し、育成系統の最終チェックを引き受けているパン研究所も訪れることができ、有意義なStudy tourを終えることができた。

オーストラリアより帰国したところ、チェコスロバキアのDr. SpunarからEUCARPIAの展示発表への招請状が届いており、科学技術庁の国際研究集会派遣研究員として出席することができた。

欧州育種会議（EUCARPIA: European Association for Research in Plant Breeding）は1956年に第1回会議をオランダのワーゲニンゲンで開催して以来、3年おきにヨー

ロッパ各国を回って、第12回が西ドイツのゲッティンゲンでの開催となった。会員は現在、ヨーロッパ27か国、ヨーロッパ以外30か国の1,181人である。今回はゲッティンゲン大学のレベレン教授が大会委員長で、サブタイトルが“Science for Plant Breeding”であった。

出席者は会議初日現在で50か国、1,025人で西ドイツの370人を筆頭に、西ヨーロッパ751人、東ヨーロッパ172人、日本からは3名であった。



図2 EUCARPIA講演会場風景

口頭講演は“Breeding Method”, “Genome Organization”, “Mutagenesis”, “Breeding for Disease Resistance”, “Proprietary Rights for New Plant Material”, “Low-Input and Stress Tolerance in Breeding”, “Genetic Mechanisms for Hybrid Breeding”, “Applications of Biotechnology to Breeding”の8テーマについて各4講演、計32の講演が行なわれた。

“Breeding Method”, “Genome Organization”, “Mutagenesis”などは比較的基礎研究に関する発表が多く、“Breeding for Disease Resistance”ではケンブリッジのDr. ScottがEye Spotについてはフランスの品種から抵抗性の導入に成功したが、Take allについては1934年から試験を行なっているもののはかばかしい成果はなく、エン麦の抵抗性を遺伝子組換えで導入したいと述べた。“Low Input”については、やはりケンブリッジのDr. Austinが新旧品種を用いて肥料反応（N: 0~288kg/ha）を調べたところ、新しい品種はどの施肥段階でも収量が高く、1粒重が大きかったと報告した。

展示講演は小麦育種-1, -2, 大麦育種, エ

ン麦・稲育種、トウモロコシ育種などの作物別、育種法、ストレス耐性、タンパク改良などの手法別の合計33セッションに分かれ、43か国より464課題の発表があった。

小麦の展示発表では、ユーゴスラビアのノビサド大学のProf. Borojevicがイタリアを経て導入された“赤小麦”の半わい性遺伝子とアメリカ品種の耐病性、ソ連品種の耐寒性、良質を組み合わせた“Sava”、“Novosadska rana 2”、“Jugoslavija”、“Zvezda”などの品種が30~50haの農場で、9~10t/haの収量をあげた実績を強調し、10t/haの遺伝的ポテンシャルを持つ品種は出来たので、次のステップは15t/haであると述べた。基本的な戦略としては、常に複数の遺伝的に異なる品種を作付して、年による、あるいは場所による環境条件の変動に対応する方向をとっており、1ないし2品種の寡占は危険であるとの意見であった。

Dr. Borghiらはイタリア90年のパン小麦の歴史をふりかえって、Harvest Indexが0.22~0.30から0.50に、稈長は115~120から80cmに、収量は手をいれない圃場で160%、手をいれた場合には2倍近くになっている。製パン適性については、古い品種はHMWグルテニンの変異が小さいが、良質グルテニンサブユニットを持ったソ連、カナダ、オーストラリア、中米の品種の利用により最近の品種は格段に改良されていると述べた。以上の他、小麦育種のセッションではデュラム小麦の地理的分布、多収性育種における選抜法、雑種小麦、耐病性、半数体育種など29課題の発表

があった。その他、育種法、突然変異育種、ストレス耐性、代謝、タンパク改良、生化学的品種同定、分子遺伝、機器分析、育種プログラムなどのセッションで小麦に関する発表が行なわれた。

大麦の展示発表では、デンマークのカールスバーグ研究所のDr. Andersonがビールの混濁安定性に関与するプロアントシアニジンのない大麦の収量性、バニリンを用いた単粒選抜法、Ant-13が母本として有用であることなどを発表した。

西ドイツのギーセン大学のProf. Friedtらのグループは西ドイツの大麦縮萎病抵抗性品種の遺伝分析を行ない、Orgaの抵抗性遺伝子は第3染色体に座乗し、木石港-3の微動遺伝子もしくは主働遺伝子と相同であると結論した。大麦縮萎病は西ドイツの他、イギリス、フランス、ベルギーなどの冬大麦地帯に広がっており、問題であるとのことであった。日本からは大麦縮萎病抵抗性ビール大麦の育種成果について紹介した。以上の他、大麦育種のセッションでは品質、選抜法、耐病性など18課題の発表があった。また、小麦と同様に育種法、ストレス耐性など多くのセッションにおいて大麦を用いた研究が数多く発表された。

最後に、今回の研究集会はさまざまな育種分野の研究者と情報交換をしたり、かつて留学したスウェーデンの育種研究所の女性研究者と18年振りに再会し、旧交を暖めるなど有意義な5日間であった。科学技術庁をはじめ関係者の方々に御礼申し上げたい。



海外便り

## 微生物バイオテックのポテンシャルと安全性評価

— ミシガン州立大学に留学して —

農林水産省 農業環境技術研究所 土壤微生物生態研究室

長谷部 亮

## 1. ミシガン州立大学

成田からシカゴまで直行便で11時間、さらにコミューターと呼ばれる小型プロペラ機で約1時間の所に、ミシガン州の州都ランシングがある。筆者は、1987年8月初めから1年間を、このランシング郊外にあるミシガン州立大学で、科学技術庁の長期在外研究員として、研究生生活をおくる機会に恵まれた。

ミシガン州は、米国北東部に位置し、五大湖のうち、四つの湖に囲まれた湖の国である。冬は寒さが厳しく、夏は冷涼と聞いていたが、湖に囲まれているためか、内陸部に位置する同緯度の他の州に比べれば冬の寒さはそれほど厳しくはなかった。また、夏には全米を襲った50年ぶりの大干ばつに遭遇し、ミシガンでも5月末から帰国直前まで連日30℃を超える猛暑の日が続き、大学キャンパスの芝生はおろか、立木さえも枯れるものがあるほどだった。

ミシガン州立大学は、約1世紀前に農科大学としてスタートした。このため伝統的に農学関係の諸学部が充実している。また日本にはない微生物学部があり、ここでは分子生物学から微生物生態学までの微生物に関わるあらゆる分野についての専門教育・研究が学部として行われており、幅広い見識を持った微生物研究者が育成されていることを感じた。

## 2. Tiedje 教授と研究室

— 今回の留学の目的 —

筆者の今回の留学の目的は、米国での遺伝子組換え微生物の野外利用についての調査・研究を行うことであり、そのためにミシガン

州立大学土壤作物学部および微生物学部兼任教授である Tiedje 教授の土壤微生物研究室に1年間お世話になった。

Tiedje 研を選んだのには二つの理由がある。第1に、Tiedje 教授が土壤微生物学・微生物生態学の研究者として早くから組換え微生物の野外利用について関心を持ち、またこのため教授が米国政府の各種審議会の専門委員を委嘱されていた関係上、種々の情報・資料を入手しやすかったからである。第2に Tiedje 研で、分子生物学的新手法により組換え微生物の土壤中での生態解明研究を行っていたからである。

Tiedje 研は室員数が20名を超えるほどで、農学系学部の中でも指折りの大所帯の研究室であった。研究室内には、筆者が所属したグループの他に脱窒菌の遺伝子レベルから生態レベルに至るまでの解明に関する研究グループ、有機塩素系化合物の微生物による嫌気分解に関する研究グループの計3グループあり、各グループ毎に博士研究員が数名、そのもとに大学院生が数名という構成で研究が進められていた。

Tiedje 研の実験室には、一通りバイオテック関係の研究機器が揃ってはいたものの別に新奇な機器があるわけでもなく、日本の同種の仕事をしている実験室とさして変わりばえはしなかった。しかし、非常に活気は感じられた。

Tiedje 研で研究生生活を過ごすうち、Tiedje 研には研究活性維持のための興味ある研究室運営システムがあることに気づいた。

Tiedje 研では、研究室内の情報交換が盛んであった。週2回、昼休みを利用して文献紹介（ジャーナルクラブ）や研究データ検討

会（データクラブ）が行われた。データクラブは教授へのヒアリングであり、研究のチェックアンドレビューであるとともに、研究員、大学院生にとっては、他のグループでの研究の進展状況を理解する機会となっていた。ジャーナルクラブは、一人持ち時間20分で、常に最新の論文について手短かに要領よく発表されていたのが印象的であった。

Tiedje 研では、正規の大学職員は Tiedje 教授と専門技術者 2 名のわずかに 3 名である。研究の主力をになう 10 名前後の博士研究員は教授に平均 2 年の契約で雇われている。筆者の滞在期間中にもこの 1/3 は交替した。彼らの国籍は実に様々で、また専門分野も分子生物学から生態学に至るまで非常に幅広かった。彼らの、自分の専門分野に固執することなく専門外の話題についても熱心に理解しようという姿勢には、学ぶべきものがあつた。また競争社会の米国において、彼らが平日はしっかり働き、土日、休暇にはゆっくり休む生活習慣も印象的であった。

見知らぬもの同士が仲良くなる最も簡単な方法は、同じテーブルを囲んで飲食を共にすることにあるといわれる。Tiedje 研には昼休みの勉強会の他に、ランチクラブ、ビールクラブと呼ばれる昼食会と飲み会（決して高額なお金は使わない）があり、これらを通じて研究以外にも人間的に相互の理解が深まり、研究面にとってもプラスとなっていた。

Tiedje 教授は研究面での先見性とともな政治力もある研究者である。教授は研究面では土壌微生物生態研究に分子生物学的手法を積極的に導入することを試み、いわゆる“分子生態学 (Molecular Ecology)”という新しい研究領域の開拓をめざしている。一方、教授はミシガン州立大に微生物生態研究のナショナルセンターを設置すべく、そのまとめ役を引き受けていたが、昨年米国科学財団 (NSF) は、この設置を許可した。Tiedje 教授はまだ 50 歳前後であるが、今後、土壌微生物・微生物生態分野の世界的なリーダーの一人となるものとの印象を受けた。



写真1 James M. Tiedje 教授 (教室にて)

### 3. 米国での組換え微生物の野外試験

#### — Tiedje 研での情報収集 —

米国では 1987 年より、全米の各地で組換え微生物の小規模野外試験を米国環境保護局 (EPA) の監督のもとに進めている (表 1)。これらの現状と問題点については筆者が「農業および園芸」誌 11 月号 (1988) にまとめたが、情報の提供、資料の収集にあたっては Tiedje 教授より、大変お世話になった。

米国で実際に行われていたこれら野外試験の現地には残念ながら訪問する時間がなかった。しかしながら、モンサント社の野外試験についてはその申請書類や EPA の審査書類などの貴重な資料を教授を通じて入手することができた。また B T I 社の試験については、教授が EPA の審査委員会の議長をした関係上、ワシントンでおこなわれた公開審査会を傍聴することができ、その生々しい雰囲気にも触れることができた。

ところで、留学中に英国ウェールズのカージフ市で組換え微生物の野外放出についての世界最初の国際会議「Release of Genetically Engineered Microorganisms 1 (REGEM 1)」が開かれたが、この会議にも研究室から教授および筆者も含めて 4 名参加した。この会議では、Tiedje 研の研究成果を発表するとともにカリフォルニア大 Lindow 教授より、アイスマイナステストについて、またモンサント社の関係者から、彼らの野外試験の進捗状況についての報告を聞くとともに、ヨーロ

表1 米国における組換え微生物の野外試験実施状況

試験目的	宿主及び遺伝子操作	実施者	実施時期	実施場所
氷核形成能欠如細菌の散布による霜害防止	<i>Pseudomonas syringae</i> の氷核形成遺伝子の除去	①California大学 ②AGI社	1987年4月	California州
マーカー菌の利用による放出モデル試験	<i>Pseudomonas fluorescens</i> への <i>E. coli lacZY</i> 遺伝子の導入	Monsanto社, Clemson大学	1987年10月	South Carolina州
窒素固定菌の改良による微生物肥料の開発	<i>Rhizobium meliloti</i> への窒素固定遺伝子の増強	BTI社	1988年4月	Wisconsin州
植物導管棲息菌の利用による微生物農薬の開発	<i>Clavibacter</i> sp.に <i>Bacillus thuringiensis</i> の毒素生産遺伝子の導入	CGI社, USDA	1988年5月	Maryland州

ッパの研究動向にも触れることができた。

また、ランシングで開かれたミシガン州の農業普及員向けのバイオテクノロジーセミナーでは、昨年、米国連邦議会技術評価局(OTA)の出版した“Field-Testing Engineered Organisms: Genetic and Ecological Issues”の編集者である Val Giddings 博士を教授より紹介して頂いた。ちなみに、この本は米国連邦議会議員向けに組換え体の野外利用に関わる問題点を分かりやすく整理・解説した好著である。

さらに、研究室ではたまたま教授を訪れていたEPAのこの問題についての最高責任者である Vice acting chairman の John Moore 氏とも会見することができた。

米国に一年滞在し、この組換え体の野外利用についての米国の取り組み方を総括すると以下ようになる。第1に米国のねらいは組換え体の野外利用を通して国際競争力を失った米国農業再建手段の一つとしたいという点である。第2に、さらに組換え体の野外利用というバイオテクノロジーの応用分野においても、米国は世界の指導的立場を堅持しておきたいという点である。第3に、しかし現時点では、組換え微生物の野外利用については世界的にもまだ合意が得られていない段階であるため、米国でも慎重に手探りで民意にも気を配ってこれを進めているという印象を受けた。

#### 4. 組換え微生物の野外利用に対するハードル— Tiedje 研での研究—

組換え微生物の野外利用については、政治的、社会的、倫理的な側面から今後とも議論の対象となるであろうが、科学的にはその安全利用のために、主に四つのハードルを乗り越えなければならない。その四つのハードルとは、①組換え微生物の野外での検出技術、②組換え微生物の野外での拡散・移動メカニズム、③組換え遺伝子の野外での伝播のメカニズム、④組換え微生物の生態系に与える影響である。これらについては、EPAやNSFの援助で、米国内の大学や政府研究機関で現在、多額な研究費で集中的に研究が進められている。

Tiedje 研でも、これらの支援を受けて、野外からの組換え菌の検出技術として、特に土壌中での組換え細菌の検出をDNAプローブ法と呼ばれる新手法で検出することを試み、これに成功した。筆者も、この手法を土壌微生物生態研究の重要な武器とすべく、これを学んできた。

この方法の原理は以下のようなものである。まず組換え細菌の特異的なDNA塩基配列をクローニングした後、これをラジオアイソトープで放射化し、DNAプローブを作成する。次に土壌から全土壌細菌を回収・溶菌した後、この全DNA中にある目的DNAとDNAプロ



プローブとの相補的な塩基配列がハイブリダイゼーションすることを利用して目的組換え細菌の土壌からの検出を行うものである。

ところでこの方法は今まで相当困難なことと考えられてきた。その理由は二つある。第1に土壌から細菌を分離し、さらに莢雑物の少ないDNAを得る良い方法が今までなかったこと、第2に土壌のような多種多様な微生物が共存している環境から目的細菌だけを見つけ出す感度がこれまでのDNAプローブ作成法になかった点である。

Tiedje 研の Holben 博士らは、この2点を解決した。第1の点については、あらかじめ低速遠心で土壌細菌を糸状菌菌糸・土壌粒子と分離した後、PVPの腐植酸との結合・沈澱力を利用して、土壌細菌と腐植酸との分離を改善させ、莢雑物の少ないDNAを得ることに成功した。第2の点については、目的菌のプローブを作成する際にM13 primer extension法を利用することでプローブの検出感度を飛躍的に引き上げることに成功した。

しかし、この方法はまだ完全に完成された方法というわけではない。用いた土壌は比較的研究のやりやすい埴壤土であり、腐植含量の高い土壌や粘土質の土壌で果してこの方法がそのまま適用できるかまだはっきりしていない。また検出感度にもさらに改善の余地はある。しかし、いずれにしても今まで不可能であろうと考えられていた事を突破したことは画期的なことであり、Holben 博士らのこの研究は大いに評価すべきものであるといえる。

Tiedje 研では、この方法を利用して、土壌中での組換え細菌の挙動解析や、さらに土着微生物相に及ぼす影響についての研究を開始し、筆者もこのプロジェクトに参画して、いくつかの予備実験を行った。

Tiedje 研以外でも、全米の各地で、この四つのハードルをクリアーするために、様々な研究が進められている。その中で、検出研究とともに、組換え微生物の野外での極度の増殖・拡散を防止するための自殺遺伝子による生存性の制御に関する研究や、遺伝子の伝播を防止するためのベクターの不具化につい

ての研究が、急速に進展し、それぞれ成果をあげている。

しかし、その一方で最も重要な組換え微生物の生態系に与える影響については、これといった斬新な評価手法がなく、小規模野外試験のように、実地に試験をせざるをえない状況であり、今後の研究の発展が最も期待されているところである。

## 5. おわりに

筆者が米国から帰国してから約9か月後の本年4月20日付で農水省は「農林水産分野における組換え体の利用のための指針」を公表した。この指針により、一定の手続きを踏めば、組換え体のうち、組換え植物についてはわが国でも開放系利用が可能となった。しかし、組換え微生物の開放系利用については、開放系での安全性に関する十分な知見の集積に努め、今後具体的な安全性評価のあり方を検討するというところで、今回の指針では、事実上凍結されている。このことは微生物が植物と異なって、肉眼では見えないこと、その増殖が著しく大きいことなどから、適正な配慮であるといえよう。

とはいっても植物と異なる微生物の特性を生かして、開放系で利用することを目的とした組換え微生物の開発研究は今後一層増大すると予測される。これは組換え微生物の利用とは、今まで未利用であった微生物の持つ遺伝資源を組換え技術により、より有効に活用することにあるからである。組換え微生物の開発研究者にとっては、この野外での安全性の確保といった関門をいかにしてクリアーするかということについても、注意を払いかつそれなりの工夫が要求されるといえよう。

換言すると、組換え微生物の野外利用に関する研究とは、単に野外での利用を目的とした組換え微生物の開発研究に終始するものではなく、野外環境での組換え微生物の有効性の検討や生態系への安全性の評価等を含む総合的試験研究と捉えるべきであり、それなりの研究体制の整備がわが国でも必要ではなからうかと、現在、感じている。

特別情報

## 機能性絹タンパク質素材の開発

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所 物質変換技術研究室

塚田益裕

### はじめに

絹は光沢と風合い(手触り)に優れた特徴を持ち、合成繊維等の他繊維に見られない良好な染色性、吸・放湿性等も備えているために今まで専ら高級衣料素材として利用されてきた。このような絹の特性の発現機構を明らかにすることを目的に、あるいはタンパク質の組成と構造に対する純粋な科学的興味から絹タンパク質の構造と物性に関する研究が古くから進められてきた。その結果、絹タンパク質の分子構造の全容は未だ解明されていないが、アミノ酸組成や結晶領域、非結晶領域とによって構成される高次構造に由来する多様な機能特性が明らかにされつつあり、従来からの衣料分野だけでなく他の産業分野での高度利用の可能性が見出されつつある。特に絹は衣料用途を目的として、カイコによる絹タンパク質の生産を効率的に行う技術が確立されており、年間を通して比較的純粋なタンパク質素材が随時入手することができる。また調整方法を選ぶことによって従来の繊維はもとより、溶液状、粉末状、膜状あるいは多孔質体等形を自由に変えることができ、結晶性や水に対する溶解性もかなり任意に制御することも可能となっている。また、絹タンパク質が更に人体等生体組織との適合性にも富むことも知られつつある。このような利点に加え近年のバイオテクノロジーの進歩に触発されてプロテインエンジニアリングも急速に進展し、バイオ素材としての絹タンパク質の利用に強い関心が寄せられており、絹タンパク質の構造を人為的にデザインする技術の開発も試みられるようになった。

絹タンパク質に関する研究は農水省蚕糸試

験場の創立(1911年)以来、重要課題の一つとして進められてきており、優れた基礎的研究成果を蓄積してきたが、1988年10月に行われた改組により新たに発足した蚕糸・昆虫農業技術研究所においては、従来の蚕糸技術に係わる研究に加えて昆虫機能の解析と利用技術の開発を行うこととなり、著者の所属する加工利用部においてもカイコのほかに昆虫由来の生体高分子素材の物性と機能の解明、高度利用技術の開発も併せ行うこととなった。

ここでは、絹の構造と物性に関する研究成果の中から非衣料分野における利用開発を目的とした機能性絹タンパク質素材の開発研究の現状を紹介し、今後の展開方向に触れてみたい。

### 1. 絹タンパク質素材の調製方法

カイコが吐糸して作り出す繭糸は、絹の本体である硬タンパク質のフィブロイン繊維のまわりを膠状のセリシンが覆う形で構成されているが、フィブロインとセリシンとは後にも述べるように化学組成を異にし、化学反応性も大きく異なっている。

このようなカイコによる吐糸過程を経て固化された絹はそのまま、あるいはセリシンを除いて衣料用原糸として利用できるが、非衣料分野での利用を考えるには先ず繭糸等の繊維状試料を溶液化させ、これを原料として用いることが有利である。水溶液の蒸発の方法を適宜選択することで異なる形状の絹タンパク質が調製できるが、非衣料素材として利用する場合にはまず繭糸を不溶化させる必要がある。絹タンパク質の試料は成熟したカイコの体内の繭糸腺からも、あるいは繭糸を中

性塩で溶解した水溶液からも調製することができる。すなわち、成熟したカイコを解剖して絹糸腺を取り出し、腺細胞をピンセットで除去することにより液状の絹物質を得ることができる。あるいは、また繭糸、絹糸等のように繊維構造を持つ絹タンパク繊維を、塩化カルシウムや臭化リチウム等の中性塩の濃厚溶液で一旦溶解させた後、純水で透析置換した再生絹タンパク質溶液を用いることも可能である。こうして調整できる絹タンパク質溶液は攪拌等機械的な作用や加熱、有機溶媒処理等により分子構造を変え易く、微生物の繁殖等も受け易いため試料溶液の取り扱いには特に注意する必要があるが、このような水溶液から冒頭に述べたような各種の形態の試料を調整することができ、またこれらの試料から構造と物性に関する貴重な知見を得ることができる。

## 2. 絹タンパク質の基本構造

(モデル化合物による絹の構造解析)

家蚕の絹フィブロインは、約20種類のアミノ酸によって構成されているが、そのうちアラニン(Ala)、グリシン(Gly)、セリン(Ser)で80%以上を占めている。一方、絹セリシンの構成アミノ酸の30%以上はセリンでAla、Glyは20%に満たない。家蚕絹フィブロインの結晶領域はGly-Ala-Gly-Serといった比較的規則的なアミノ酸周期で構成されることが知られている。これに対し、絹セリシンの結晶領域のアミノ酸周期は完全には解明されていないが、主要なアミノ酸組成の解析結果から判断して、Serのホモポリマーを主体とした周期となっているものと推定できる。

通常絹タンパク質では結晶部分と非結晶部分とがいわゆる房状構造を取って構成されていると考えられており、吸湿性や伸び易さ等の性質は結晶領域の特性に基づくというよりむしろ非結晶部分の特性に依存するものと推定できる。このような複雑な微細構造の特徴を解明する場合、結晶部分の解析はX線回折の手法により容易に行うことができるが、非結晶領域については難しいため絹タンパク

質自体を研究対象として用いる代わりに、構造解析が容易なモデル化合物を用いて検討することが有益である。

著者ら<sup>1)</sup>は、絹フィブロインの結晶部分に対応したモデル物質にAla-GlyとSer-Glyとのコポリマーを選び、その分子構造と理化学的性質とを検討した。その結果モデル物質のポリペプチド主鎖はセリン残基のC $\alpha$ の位置を中心にして折りたたまれ、固体状態ではcross  $\beta$ 構造を取って結晶化すると推定した。次に、絹セリシンのモデル物質としてのポリ-L-セリシンの構造特性と理化学的特性を調べたところ、モデル物質ではcross  $\beta$ 型の分子鎖はシート状に重なって結晶を形成しシート間に側鎖が入り込むこと、側鎖間あるいは側鎖と主鎖のペプチド間で水素結合を形成するものと判断した<sup>2)</sup>。モデル物質を溶かした溶媒を適当な条件下に放置すると結晶形態の一つである球晶を形成する。球晶中の試料分子の側鎖は球晶の半径方向に向き、かつ主鎖はそれに垂直に向くものと考えた。このように絹そのもので論議することが困難な構造はモデル物質の構造解析により推定することが可能となった。絹セリシンの熱分解挙動は、非結晶領域と結晶領域の熱分解の寄与とに分解することにより、絹の熱的性質等の全容を考察できることも判っている<sup>3)</sup>。

## 3. 絹タンパク質の新しい利用技術

このような絹タンパク質の利用法を考える場合、生体高分子である絹タンパク質の優れた特性を念頭において仕事を進める必要がある。特に留意すべき点は、絹が外科用縫合糸の例に見られるとおりに生体と良好な親和性を持っていることである。

蚕糸・昆虫農業技術研究所では、養蚕に重大な被害を及ぼす微粒子病原虫の同定を簡易に行うため、スチレンのラテックス粒子に微粒子病原虫に対する抗体を結合させ、これと微粒子病原虫胞子との凝集反応の起こり方で判定する微粒子病原虫の同定法を開発しているが、これに関連して、著者らは絹タンパク質が各種の病原微生物や微粒子病原用の貼付

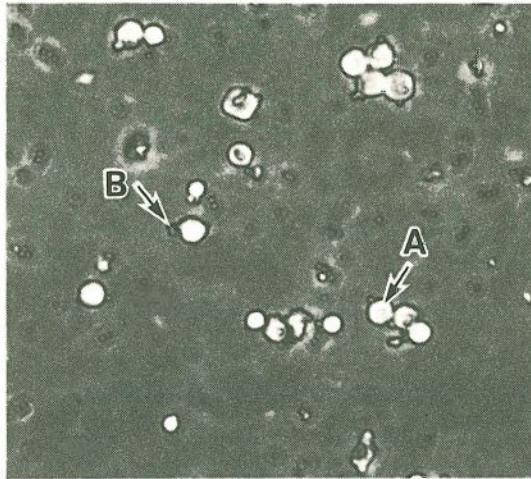


図1 核多角体病とその抗体感作担体における吸着反応の顕微鏡写真  
(A) 核多角体病, (B) 抗体感作担体

剤として利用できることを見出した。この方法を上述のラテックス法に応用した場合には、供試原虫を付着固定した後、抗体感作担体を用いてその凝集反応を顕微鏡で観察することにより効率的・経済的に供試原虫の識別・同定が可能である(図1)。なお、この方法によると対象微生物を一旦固定することにより抗体感作担体を反復処理することができるので同一の個体についての連続観察が可能である。

抗原抗体反応に絹を用いる研究は、鐘紡でも積極的に進められており、絹フィブロイン膜の表面に抗体を包括固定化させることにより酵素免疫測定を可能にする技術を開発した。抗体の固定化状態は良好で保存安定性に優れ、かつ非特異的吸着による定量障害、分離障害も少ないことから、免疫化学的測定が可能であるとしている。このように、絹フィブロインは、試料マトリックス中に抗体を包含することで、様々な診断のシステムづくりの上でも役立つ貴重な生体タンパク質であるともいえよう。一方、絹タンパク質はさまざまな方面から医用材料として用いるための研究素材としても利用されはじめた。最近、末梢静脈内試料複膜系留置法により、絹フィブロインの血液適合性が調べられ、14日留置後の結果によると絹フィブロイン膜は良好な血液適合性を示して、試料表面では血栓の形成が抑制されることが確かめられている<sup>4)</sup>。

蚕糸・昆虫農業技術研究所でも、絹タンパク質を医用分野で幅広く利用することを目指して、工業技術院製品科学研究所と共同研究を進めてきた。著者ら<sup>5)</sup>は、湿潤状態における絹フィブロイン膜の酸素透過性を検討し、低含水率の領域においても絹フィブロイン膜は良好な酸素透過性を示すことを確認するとともに、酸素透過性と微細構造との関係を分子レベルで解明した。コンタクトレンズ素材として多用される同一含水率の2-ヒドロキシエチルメタクリレート膜の酸素透過係数と同等あるいは若干低い同係数値を示すことから、絹フィブロイン膜は酸素透過を必要条件とするコンタクトレンズ素材を始めとする各種の医用膜への応用が可能であろうと考えられる。

絹フィブロイン膜に対する酸素透過性は、酸素透過係数で表わされ、その次元表示は「 $\text{cm}^3(\text{S.T.P}) \cdot \text{cm} / \text{cm}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{cmHg}$ 」のように複雑である。絹膜の酸素透過性能を直感的に理解するため金魚を入れたビーカーの水表面を通常のポリ塩化ビニリデン膜と酸素の透過性が良い絹フィブロイン膜で覆い2時間後の金魚の状態を調べたところポリ塩化ビニリデン膜で覆った区は金魚が浮き上がったのに対して、絹膜を用いた区では覆いをしなかった対象区と同様、全く異常は見られなかった(図2)。



図2 酸素透過膜を用いた金魚の生存実験  
左; 対照区, 中; 絹製の酸素透過膜,  
右; 家庭用ラップ膜

絹フィブロイン膜は可視光領域付近でも透過率が98%であることから、無色で透明度の高い膜であると同時に、水蒸気の透過性も良好である。人工皮膚素材等の用途を想定すると生体組織との適合性を有することに加え、

水蒸気の透過性が良好であることが必要であるが、このような絹の特性は人工皮膚素材に望まれる特性を満たしているものと思われる。また、湿潤状態における絹膜の力学的特性を調べたところ、メタノール溶液中で、30、60分処理して不溶化した試料の伸度はそれぞれ100%、70%、強度は両試料とも0.8kg/cm<sup>2</sup>で十分に強靱であることが知られた。

箕浦ら<sup>6)</sup>は、マウス由来の繊維芽細胞L929を用い、試料膜の表面上に10%の子ウシ血清を含んだ細胞浮遊液(約10万/ml)を加え、所定時間培養して絹フィブロイン膜上での細胞の付着・増殖の実験を試みた。その結果、絹フィブロインは、従来、細胞の付着性が良好であるといわれているコラーゲンに匹敵する優れた細胞付着・増殖能力を持つことを確かめている。

絹フィブロイン水溶液に溶媒を加えた後、物理的条件を適切に設定することにより数ミクロンから数百ミクロンの孔径を持つスポンジ状の多孔質体が得られる(図3)、有効表面積が大きいこと絹タンパク質の物理化学的吸着性が良いこと等の特徴を利用することで、多孔質体は医薬徐放体として利用することも可能であろう。

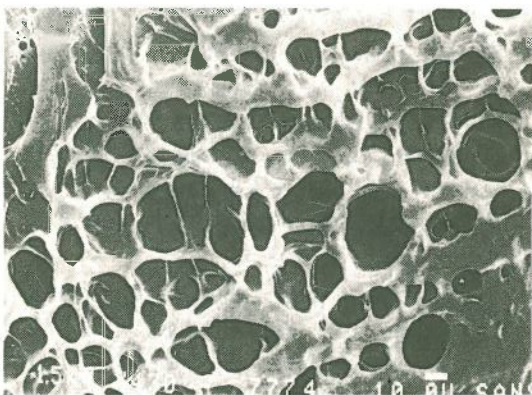


図3 広い表面積を持つ絹の多孔質体の走査型電子顕微鏡写真

北村らは、絹フィブロイン成膜条件と膜界物性との関連性を検討するとともに、イオンの透過性を明らかにした。さらに、絹タンパク質膜の物質透過性の特徴を活用した利用例の一つに、パーバレーションによる水一タノールの分離の検討もされている。広津らによれば、膜厚が約20μm以上となると水の

選択透過性が現れること、厚さとともに選択性が増加し透過速度が減少すると報告している。

絹タンパク質を構成するアミノ酸には反応性の高い分子側鎖を有するものが多い。こうした部位の特性あるいは絹素材の物理的またはイオンの結合力を活用して、絹タンパク質を酵素固定化担体として利用しようとする試みがある。朝倉<sup>7)</sup>は、包括法によりグルコースオキシダーゼを絹フィブロイン中に含有させた場合、試料膜中の酵素活性が遊離酵素の場合と殆ど変わらない膜が得られたことから、酵素含有膜がグルコースセンサーとして利用できることを明らかにした。担体に絹フィブロインを用いることで、活性が遊離酵素の場合とほとんど変わらない膜が得られること、酵素の活性のpH領域が広くなり膜の温度安定性も向上すること、膜中の酵素活性は1か月以上経過しても低下しないことを確認した。また酵素の担体としてゼラチンを用いた場合の酵素活性は、絹を用いた場合に比べて酵素の固定化が不十分であり、安定性の点においても劣っているとされている。

上記の酵素の物理的包含法に対して絹の活性基と酵素とを化学的共有結合による固定化法も試みられており、絹の分子側鎖の内反応性の高いチロシン側鎖部分に、ジアゾ法を適用したもの、あるいはカルボキシル基部分にアジド法を適用してアルカリフォスファターゼ、リボヌクレアーゼ等の酵素固定を行った実験例が知られている。こうした実証例は反応性に富んだ絹タンパク質がバイオセンサーあるいはバイオリクターの担体として実用化できる可能性の高いことを示唆するものであろう。

衣料用上、繊維素材として全く用いられていない絹セリシンには絹フィブロインの場合よりも反応性に富んだチロシン等のアミノ酸が多く含まれている。したがって、担体結合法によりこうした反応性部分に酵素を結合させることにより物理的機能性を生かした絹セリシンの有効利用技術が開発できるものと期待できる。こうした目的で絹フィブロインのアミノ酸側鎖部分のうち、チロシンの側鎖部

分をスピララベルし、ラベル位置の分子運動性が朝倉ら<sup>8)</sup>により検討された。その結果、試料膜は高い熱安定性を示すこと、試料分子のスピララベルを施しても試料本来の構造が保持されることが実証された。さらに著者ら<sup>9)</sup>は、今後絹タンパク質の有効利用を図るには絹の試料分子と酵素とがどのような相互作用を有するかを分子レベルで十分検討しておくことが重要と考えた。可塑剤としてポリビニールアルコールあるいはポリビニールピロリドンを用いて作製した絹セリシン膜にカルボニル基、水酸基、アミノ基、アミド基をそれぞれ有する4種類のスピララベル分子を包括させた試料膜のESRスペクトルを測定し、含水状態でのスピララベル分子の運動性あるいは各官能基と膜構成分子間の相互作用の解析を試みた。その結果、セリシンの分子側鎖とスピララベル分子のC=O(NH<sub>2</sub>)との間で水素結合が形成される可能性が高いものと推定した。このように、今後、絹フィブロインはもとより絹セリシンの構造特性を活用することにより非衣料分野での高度利用技術の開発に大きな期待を持つことができる。

#### おわりに

以上述べたように、最近絹タンパク質の構造と物性に関する研究が進展して、多様な機能が解明されつつある。中でも、絹タンパク質の非結晶領域は、分子側鎖が長くて化学反応性に富んだアミノ酸部分が多く含まれるため、今後はこうした部位の理化学的特性をどのように制御するかが新規な利用を考える上での大切な決め手となるものと考えられる。絹

セリシンのアミノ酸組成は絹フィブロインの場合に比べて側鎖に極性基を持つものが多く含まれ、また反応性に富んだアミノ酸残基が多いことから、こうした反応性部分を人工的にデザインして絹タンパク質の機能をさらに向上させることができれば付加価値の高い利用方法がさらに開発できよう。絹タンパク質の物理的特性を利用し、付加価値の高い新素材の研究開発をさらに進展させるためには、絹タンパク質の構造と機能との関係を更に多角的に解析し、新たな利用開発に関する基礎的知見を豊かにすることが必要である。そのことにより、絹タンパク質が持つ新たな機能性が見出され衣料素材としての利用の高度化はもとより工業素材、医療素材として絹を利用する技術が発展するものと考えている。

#### 文 献

- 1) Tsukada, M., G. Bertholon and K. Hirabayashi (1982) *Sen-i Gakkaishi* 38: 451-456
- 2) Tsukada, M., M. Nagura and H. Ishikawa (1985) Proceedings of the 7th International Wool Textile Conference 1: 383-388
- 3) 塚田益裕・奈倉宣正・石川 博(1985) 日蚕雑 54: 43-47
- 4) 野一色泰晴・伊藤 啓・宮本武明・河完 植 (1988) 繊維学会シンポジウム 予稿集 3 C 15
- 5) Minoura, N., M. Tsukada and M. Nagura (1989) *Polymer* (in press)
- 6) 箕浦憲彦・相羽誠一・富士原行彦・田口和宏・塚田益裕(1988) 第5回生体繊維と生医学材料に関するシンポジウム講演要旨集 3 C 01
- 7) 朝倉哲郎(1987) *バイオインダストリー* 4: 878-886
- 8) 朝倉哲郎・吉水広明・塚田益裕・瀬戸山幸一・光田慶一(1987) *繊維学誌* 43: 335-353
- 9) 塚田益裕・朝倉哲郎・吉水広明(1988) 日蚕雑 57: 460-465

#### 編集後記

農水省では、本年4月「農林水産分野における組換え体利用のための指針」を公表した。これに定められた手続きを踏めば、組換え植物については野外で利用できる道が開けた。しかし、組換え微生物については、安全性の評価法が確立されていないことから、今回の指針では、事実上凍結されている。現在、農水省では組換え微生物を野外で利用する場合の安全性の具体的

評価方法について鋭意研究を進めている。そこで本号では、その一環として米国に留学した長谷部氏に米国におけるこの分野の研究の現状について、また、松田氏には野外での標的細菌の検出法の具体的事例について紹介していただいた。この分野の研究に多少なりとも御理解いただければ幸いである。

(大畑記)

ブレイン テクノニュース (第14号)

---

平成元年 7 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 (社) 農林水産技術情報協会

〒103 東京都中央区日本橋兜町15-6 製粉会館6F  
TEL. 03-667-8931 FAX. 03-667-8933