

# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

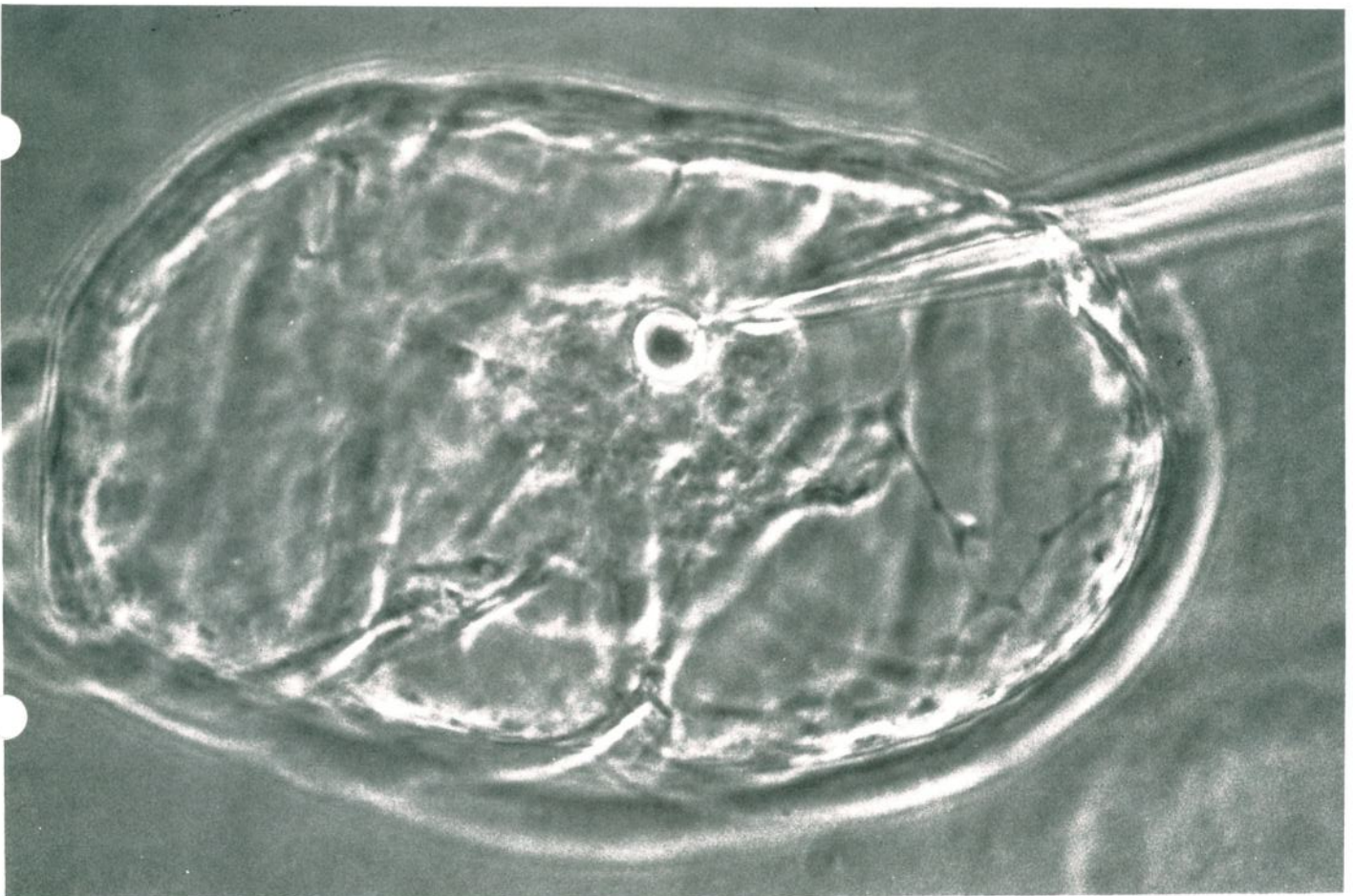
TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

## 第 16 号

NOVEMBER 15, 1989



細胞核へのマイクロインジェクション

この方法を用いてトマトカルスを直接形質  
転換した。

(豊田秀吉氏提供)

### 本号の紙面

国内情報	1
イントロンカセットによる遺伝子発現制御, イネ光合成能力の遺伝的機構, 未受精胚珠からの半数体作出, トマト培養系による青枯病抵抗性個体選抜, 炭疽病菌莢膜形成遺伝子のクローニング	
文献情報	15
細菌プラスミドの酵母への伝達, アクチベーター因子転移の視覚的検出, ゲノム・マッピング	
国際学会レポート	19
ジベレリンシンポジウム東京1989	
特別情報	22
農林水産分野における組換え体利用指針	

## 口 絵

### 国内情報

吉松忠憲・名川文清

イントロンカセットによる遺伝子発現制御…………… 1

長峰 司

酸素ガス交換量からみたイネの光合成能力の遺伝的機構と  
新系統の作出…………… 4

加藤紀夫

タバコ未受精胚珠からの半数体作出…………… 7

豊田秀吉

トマト培養細胞系による青枯病抵抗性個体の選抜と育成…………… 9

内田郁夫

炭疽菌における莢膜形成に必要な遺伝子領域のクローニング……………12

### 文献情報

細菌プラスミドの酵母への伝達…………… 15

タバコ幼植物におけるトウモロコシの

アクチベーター因子転移の視覚的検出…………… 16

射程圈に入ったGenome Mapping…………… 17

### 国際学会レポート

横田孝雄

ジベレリンシンポジウム東京1989…………… 19

### 特別情報

伊藤 洋

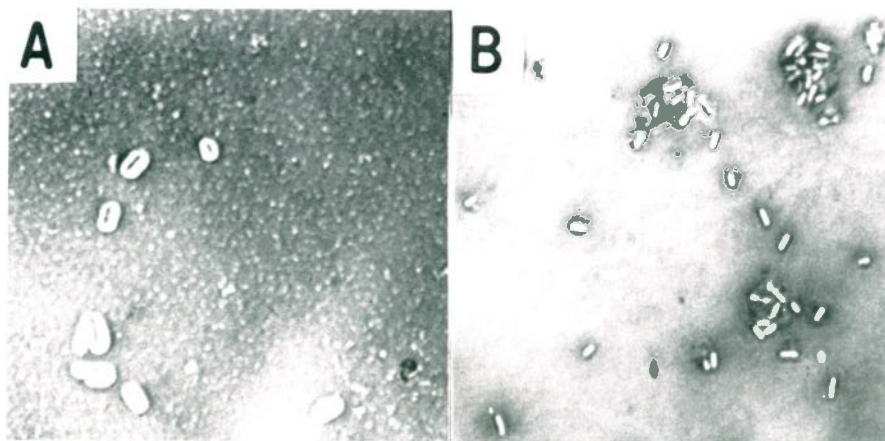
「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」について…………… 22

タバコ未受精胚珠からの半数体作出 (本文 7 ページ)



1. ルスチカタバコの胚珠から出現し、生育中の胚様体
2. 培養により得られたルスチカタバコの半数体植物 (左, 中) と二倍体の親植物 (右)
3. タバコの胚珠から分化した柱頭, 花柱様組織

炭疽菌における莢膜形成に必要な遺伝子領域のクローニング  
本文 (12 ページ)



大腸菌が発現した莢膜

A : 大腸菌 MC1061(pCAP1), B : 大腸菌 MC1061(pHY300PLK)  
菌体周縁の不染部が莢膜

## 国内情報

## イントロンカセットによる遺伝子発現制御

湧永製薬株式会社 生命工学研究所

吉松忠憲・名川文清

## 1. はじめに

最近の分子生物学の発展により、生体における遺伝子発現の制御機構が明らかにされてきている。遺伝子発現は、おもに遺伝子からRNAへの転写を調節することにより行なわれているが、転写後のスプライシングや翻訳の段階での調節なども遺伝子発現において重要な役割を果たしていることがわかってきた。このような転写後の現象を人工的に制御することができれば、転写段階での調節が困難であった遺伝子の発現も制御できるようになり、遺伝子工学や生命現象の解明に役立つと考えられる。そこで、私たちは転写後の過程であるイントロンのスプライシングに着目し研究を進めてきた。ここでは、私たちが開発した、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主とした人工イントロンによる遺伝子発現制御法について紹介したい<sup>1)</sup>。

## 2. イントロンについて

イントロンは、遺伝子発現の際 mRNA 前駆体に読みとられ、その後、核内において mRNA 前駆体から取り除かれる領域である。イントロンが mRNA 前駆体から取り除かれる過程が“スプライシング”と呼ばれている。イントロンの内部には共通した配列が存在しており、スプライシングに重要であることがわかっている。核内にはスプライシングに関与する多数のタンパク質と数種の RNA との複合体であるスプライソゾームが存在しており、この中に含まれる RNA (small nuclear RNA; snRNA) にはイントロンの共通配列に

相補的な配列を持つものがある。これらの配列とイントロンの共通配列の間に塩基対が形成されることによつて、イントロンの領域が認識されると考えられている<sup>2,3)</sup>。

## 3. イントロンによる遺伝子発現制御法

遺伝子発現の過程で除去されるイントロンを、遺伝子発現の制御に利用する方法としてどのようなことが考えられるであろうか？ 正常なタンパク質が作られるためには、イントロンが遺伝子発現の過程で正しく mRNA 前駆体から除去されなければならないが、もしイントロンが取り除かれずに mRNAに残れば本来のものとは異なったタンパク質が作られることになる。私たちはこの点に着目した。すなわち、イントロンの配列を mRNA に残すか残さないかを自由の操ることができれば、遺伝子発現をイントロンによつて制御することが可能であると考えたのである。

そのためには、次の二つの問題点を解決する必要がある。まず第一に、いかにしてイントロン配列だけを目的とする遺伝子内に挿入するかである。なぜならば、イントロン配列以外の余分な配列を同時に挿入すると、イントロンがスプライシングされた後に残った余分な配列のために遺伝子の機能が損われてしまう可能性があるからである。第二に、挿入されるイントロンのスプライシングを、いかにして自由にコントロールするかである。私たちは、以下に述べるようにまずイントロン配列のみを遺伝子へ挿入することができる人工のイントロンを設計し、つぎにこの内部構造を修飾することによつて、低い温度ではスプライシングされないが高い温度ではスプラ

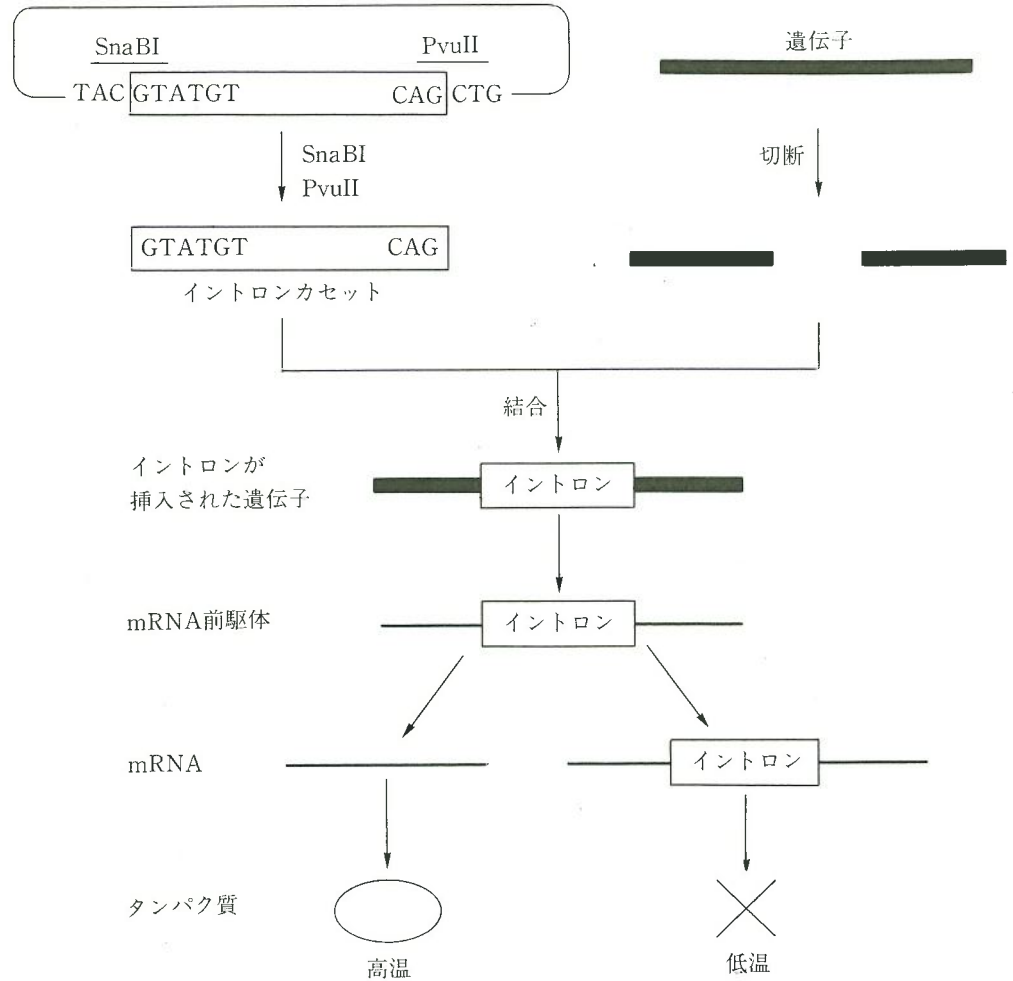


図1 インترونカセットによる遺伝子発現制御法

インシングされる“低温感受性”のイントロンを作製し、イントロンによる温度での遺伝子発現の制御を可能にしたのである(図1)。

(1) 人工イントロンの作製

酵母 *S. cerevisiae* のイントロンの共通配列は、イントロンの5'末満の GUAUGU、内部の UACU AAC および 3'末満の AG であることが知られている。私たちは、5'末満の配列が、制限酵素 SnaBI の認識切断部位の配列 TACGTA と重なっていること、3'末満の配列が制限酵素 PvuII の認識切断部位の配列 CAGCTG と重なっていることに着目し、これらの制限酵素の認識切断部位の配列を両端に持つ人工のイントロン(Artificial Intron; AI) を作製した。制限酵素の SnaBI と PvuII で切断すると、GTATGT で始まり AG で終わる 104 塩基対からなるイントロン配列のみを“イントロンカセット”としてプラスミド

から切り出すことができる。このようにして切り出したイントロンカセットを、目的とする遺伝子を平滑末端となるように切断したところに挿入することにより、イントロン配列のみを挿入した遺伝子を簡単に構築することができる(図1)。

(2) 低温感受性イントロンカセットの作製

イントロンが正しくスプライシングされるためには、snRNA とイントロンの共通配列との間での塩基対形成が必要である。この塩基対形成が高温で阻害されず低温で阻害されればスプライシングが低温感受性になると考えた。そこで、イントロンの共通配列と塩基対を形成できるさまざまな長さの配列をイントロンの中に挿入し、スプライシングを調べた。その結果、期待どおり高温ではスプライシングされるが低温ではスプライシングされない2種類のイントロンを見いだした(図2

a)。そのうち AI-3 は GUAUGU に相補的な13塩基の配列が導入されており、AI-4 は UACUAAC に相補的な17塩基の配列が導入されている。塩基対の長さがこれらより長いものや短いものは、温度でスプライシングをコントロールできなかった。AI-3や AI-4は、低温で図 2 a のようにイントロン内部で塩基対が形成され、その結果 snRNA との塩基対形成が阻害されスプライシングされないが、高温ではイントロン内部の塩基対が形成されずスプライシングされるだろうと考えられる。

(3) 低温感受性イントロンカセットによる遺伝子発現制御

低温感受性イントロンを挿入することで、遺伝子発現を制御することができるかどうかについて酵母のウラシル合成系の遺伝子の一つである *URA3* 遺伝子を用いて調べた。低温感受性イントロン (AI-3, あるいは AI-4) を挿入した *URA3* 遺伝子は、いずれも 36°C ではコントロール同様に *ura3* 変異を相補したが、23°C では *ura3* 変異を相補できないことがわかった (図 2 b)。このことから、これら *URA3* 遺伝子の発現が低温で阻害されていることが明らかである。したがって、おそらくどのような遺伝子でも、これらのイントロンを挿入するだけで発現を温度で制御できるようになると考えられる。

4. おわりに

以上のように、私たちは、挿入するだけで目的とする遺伝子の発現を温度で制御することができる低温感受性イントロンを作製することに成功した。

低温感受性イントロンによる遺伝子発現制御法は、さまざまなことに利用できると思われる。たとえば、強いけれども調節することがむずかしいプロモーターを用いて外来遺伝子を発現させる場合に、その発現を温度により調節することが可能になる。また、クローニングされているが機能がわかっていない遺伝子の低温感受性変異株を作製することができ、その遺伝子の機能の解明に役立つであろう。

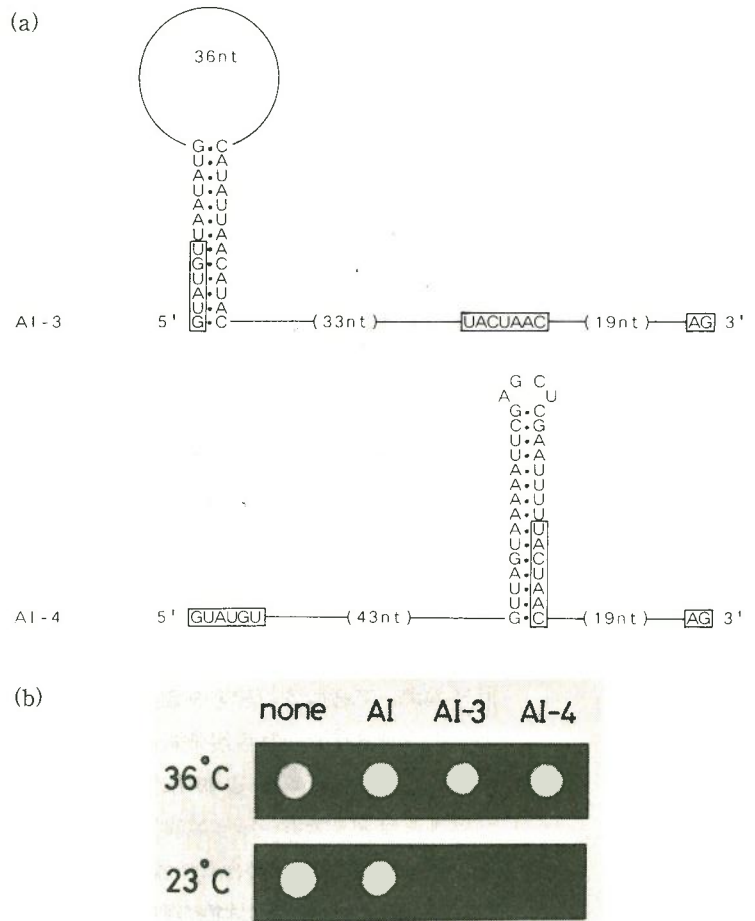


図 2 (a) 低温感受性イントロンの構造  
イントロンの共通配列を四角で囲み、塩基対が形成されるところを・で示した  
(b) 低温感受性イントロン-*URA3* 遺伝子を導入した酵母の表現型  
細胞約5000個をスポットし、3日間培養した

ここでは、温度によって遺伝子発現を制御する方法について紹介したが、利用するイントロンを工夫することにより、他の方法によって遺伝子発現を制御することも可能であろう。たとえば、人工イントロン内にオペレーター配列を挿入すれば、リプレッサータンパクによって転写を調節することができるかもしれない。また、最近開発された PCR 法 (Polymerase Chain Reaction)<sup>4)</sup> を用いて天然のイントロンをカセット化することにより、そのイントロンが持っている制御システムをそのまま利用することができるかもしれない。このように、イントロンカセットを利用すれば、今までとは異なった新しい方法で遺伝子発現を制御することが可能になるのではないだろうか。また、ここで述べたイントロンカ

セットを利用した発現制御法を酵母以外の他の生物に応用することも今後の課題である。

## 文 献

- 1) Yoshimatsu, T. and F. Nagawa (1989) *Science*, 244 : 1346-1348
- 2) Green, M. R. (1986) *Annu. Rev. Genet.* 20 : 671-708 ; Padgett, R. A. et al (1986) *Annu. Rev. Biochem.* 55 : 1119-1150
- 3) Guthrie, C. and B. Patterson (1988) *Annu. Rev. Genet.* 22 : 387-419
- 4) Saiki, R. K. et al (1985) *Science*, 230 : 1350-1354; Saiki, R. K. et al (1986) *Science*, 239 : 487-491

### 国内情報

## 酸素ガス交換量からみたイネの光合成能力の遺伝的機構と新系統の作出

農林水産省 農業生物資源研究所  
植物探索導入研究チーム  
長峰 司

### 1. はじめに

植物の物質生産は光合成に依存している。これまでの作物の光合成能力向上に関する研究は、単位土地面積当たりの光合成器官の拡大・維持および受光態勢の改良による光利用効率の向上に重点がおかれていた。イネの「十石」, 「低脚烏尖」やコムギの「農林10号」などの半矮性遺伝子はこのような群落構造の改善に大きな役割を果たしてきた。イネやコムギの多収性品種は、草型育種(角田, 1964)と呼ばれるように群落構造の変化をとおして群落全体の光合成能力を「量」的に向上させ

ることにより育成されてきたといえる。今後、作物の物質生産能力、収量性の改良に対して光合成能力の「質」的改良, すなわち個葉の光合成能力の遺伝的改善が重要となるであろう。植物の光合成能力は葉身から放出される酸素量(酸素ガス交換量)を測定して迅速かつ簡便に推定することができる。ここでは、酸素放出量に基づく栽培稲種内における光合成能力の変異, その遺伝分析, 新系統の作出について報告する。

### 2. イネの酸素放出量の変異

イネ品種の光合成能力を改良する最も容易な方法は種内に存在する遺伝的変異を利用することであろう。そこで、アジア栽培稲(*Oryza sativa* L.)の4品種群(Nakagahra, 1978)から広く材料を選択した。すなわち、インディカ25品種, ジャポニカ25品種, ジャバニカ25品種, シニカ16品種の合計91品種について個葉の光合成能力を比較した。葉身から放出される酸素濃度を図1に示す多点式酸素放出量測定装置(Nagamineら, 1987)で測定して個葉光合成能力とした。測定葉片は主稈の最上位完全展開葉の中央部から作成し、人工気象室内で24時間インキュベートした。測定条件は照度: 7万ルクス, 温度: 25°C,

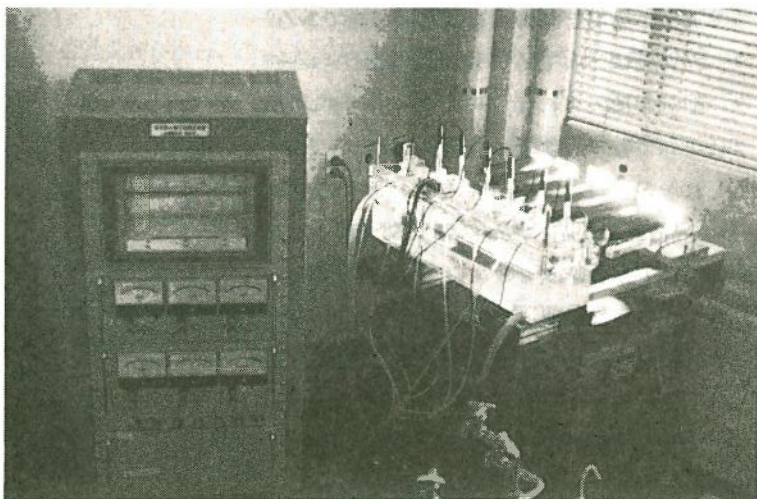


図1 多点式酸素放出量測定装置

HEPES 緩衝液の pH: 7.2, 反応セル内炭酸水素ナトリウムの最終濃度: 20 mM とした (Nagamine ら, 1987)。測定は移植後 20~26 日に行ない, 1 品種につき 4 個体を用い平均した。用いた品種の間では最高値は  $895 \mu\text{mol O}_2/\text{dm}^2/\text{hr}$ , 最低値は  $501 \mu\text{mol O}_2/\text{dm}^2/\text{hr}$  であり, 大きな差があった。変異の大きさを最高値/最低値比で示すと 1.84 であった。この比は, イネの炭酸ガス交換速度を測定して得た比, 1.80 (IRRI Annual Report, 1968), 1.70 (秋田, 1980) とほぼ等しく, トウモロコシの 3.0 (Heichel and Musgrave, 1969) と比べると低いが, ダイズ (小島, 1968) の 1.44 より高く, アジア栽培稲は光合成能力の変異が大きいことがわかった。したがって, イネの光合成能力の改良に栽培稲内に存在する光合成能力の変異を利用できると考えた。

4 品種群の酸素放出量を最高値~最低値, 平均値で示すと, インディカ品種群:  $598 \sim 895, 724 \mu\text{mol O}_2/\text{dm}^2/\text{hr}$ , ジャポニカ群:  $651 \sim 884, 772 \mu\text{mol O}_2/\text{dm}^2/\text{hr}$ , ジャバニカ群:  $501 \sim 799, 613 \mu\text{mol O}_2/\text{dm}^2/\text{hr}$ , シニカ群:  $664 \sim 811, 722 \mu\text{mol O}_2/\text{dm}^2/\text{hr}$  であった。ジャバニカ品種群は他の品種群より酸素放出量が低かった。この群の多くの品種は単位葉面積当たり葉身乾物重が軽かつ広い葉を持ち, 葉身の構造と酸素放出量との間になんらかの関係があると考えられる。鮫島 (1985) は, アジア栽培稲の 4 品種群間における炭素同位体分別値 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) を測定し, ジャバニカ, ジャポニカ群がインディカ, シニカ群より分別能が弱いことを報告した。4 品種群間で酸素放出量による分析結果と炭素同位体分別値による分析結果は必ずしも一致しないが, とくにジャバニカ品種群の光合成能力が低いことは興味深い。

### 3. イネ酸素放出量の遺伝的機構

中国産改良種「窄葉青 8 号」(高放出量) × 日本産在来種「信州金子」(低) と日本産在来種「十石」(高) × 中国産在来種「納西」(低) の 2 組合せの正逆交雑による  $F_1$ , それぞれの  $F_2$  雑種集団, ならびに高放出量親を戻し

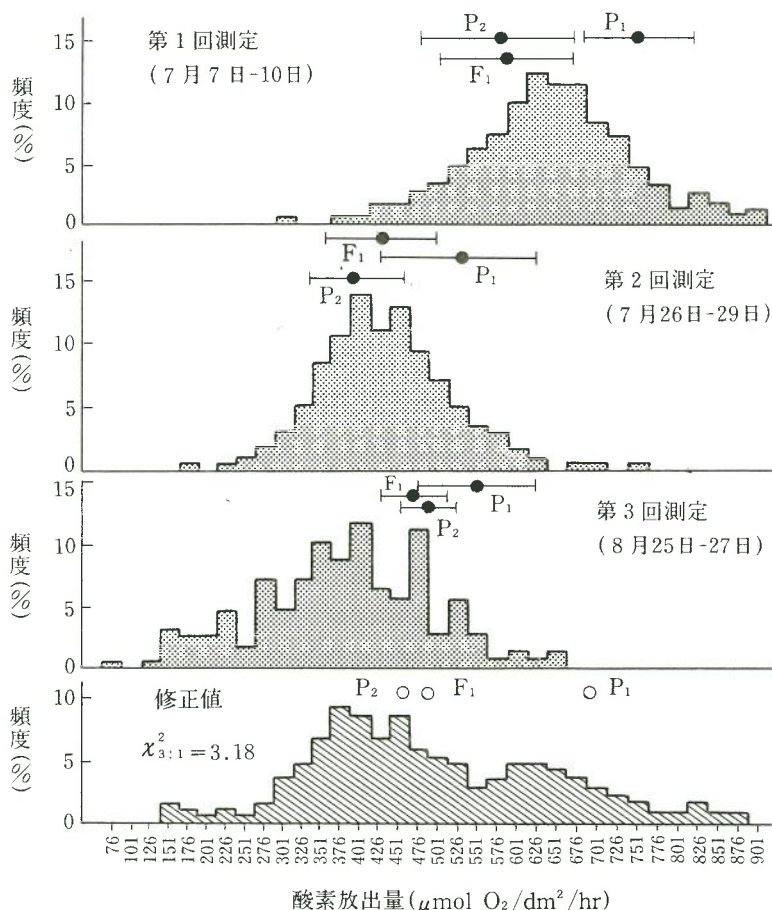


図2 窄葉青 8 号 ( $P_1$ ) × 玉錦 ( $P_2$ ) の  $F_2$  雑種集団における酸素放出量の分布

交雑親とする  $B_1F_1$  雑種集団を養成した。分けつ期に行なった測定の結果, すべての組合せで  $F_1$  の酸素放出量は低放出量親の値に近かった。 $F_2$  集団,  $B_1F_1$  集団の放出量の分布は正規分布に近い変異を示し, いずれの組合せにおいても単一時期の測定値からは酸素放出量の遺伝様式を単純には推定できなかった。すなわち, 図 2 の例に示すように, 3 回の測定時期における  $F_2$  集団の酸素放出量の変異は, それぞれ正規分布に近かった。これは, 集団内の各個体の生育ステージに大きな差があり, 各個体の酸素放出量を同一条件で分析できなかったためと考えた。そこで, 「窄葉青 8 号」(高放出量) と日本産在来種「玉錦」(低) の  $F_2$  集団について酸素放出量を 3 時期測定し, あわせて個体別に出穂期を観察調査した。そこで  $F_2$  集団のそれぞれの個体について酸素放出量の値が高いと考える出穂期前 35 日に近い測定時期の値を修正値とした。図 2 の最下段に示すように, 修正した値は両親



の値より広い範囲にわたって連続的な分布を示したが、二頂分離と見なすことができた。551  $\mu\text{mol O}_2/\text{dm}^2/\text{hr}$  を境に2群に分け、 $\chi^2$ 検定を行なったところ、酸素放出量は単遺伝子分離とみてもよい結果であった。修正した  $F_1$  の値は低放出量親の値に近かった。以上の  $F_1$ 、 $F_2$  の結果から酸素放出量は低放出量が優性の単一の主動遺伝子によって支配されていると結論した。以上は、遠縁交雑による光合成能力の遺伝的機構のうち、単一遺伝子により発現していることを明らかにしたものである。この例から、光合成能力の機構の多くには遺伝的分析が可能な要因が明確に存在すると結論できる。Hayashiら(1977)は炭酸ガス交換速度からみた個葉光合成能力は低速度が優性の単遺伝子分離をすることを明らかにした。鮫島(1985)は、 $F_2$  は炭素分別能の強弱による二つの集団に分離しており、弱分別能親に近い値を示す個体が多かったことを報告した。酸素放出量を測定して得た結果は、測定方法は異なっても Hayashiら(1977)や鮫島(1985)の、光合成能力は単遺伝子支配で、しかも低能力は優性であるという結果を明確に裏付けるものであった。

#### 4. 後期世代における高・低放出量系統の作出

「窄葉青8号」×「信州金子」の  $F_2$  世代で高放出量と判定した九つの  $F_3$  系統は、系統平均値で最低 392  $\mu\text{mol O}_2/\text{dm}^2/\text{hr}$ 、最高 501  $\mu\text{mol O}_2/\text{dm}^2/\text{hr}$  を示し、系統間の差は小さかった。一方、 $F_2$  世代で低放出量と判定した九つの  $F_3$  系統は、最低 275  $\mu\text{mol O}_2/\text{dm}^2/\text{hr}$ 、最高 432  $\mu\text{mol O}_2/\text{dm}^2/\text{hr}$  で、高放出量群と比べて系統間の平均値の差が大

きかった。さらに、この群には高放出量群と同程度の値を示す系統が出現したので、 $F_3$  世代で低放出量と高放出量が分離したと考えた。 $F_2$  個体の酸素放出量と  $F_3$  系統平均酸素放出量との間には正の相関があった。したがって、 $F_2$  世代における酸素放出量の選抜は高放出量系統の作出に有効と考えた。しかも高放出量は劣性形質であるので、選抜により高放出量系統を比較的短年次で確立できると考えた。

品種間の組合せでは、草型、出穂期などの農業形質が同じで、酸素放出量のみが異なる系統の作出は困難であったが、放射線突然変異系統間の組合せ、「MGS 755」×「MGS 69」の雑種第5代で草型、葉色、穂型、出穂期がほとんど同じで酸素放出量のみが異なる高放出量系統 (510  $\mu\text{mol O}_2/\text{dm}^2/\text{hr}$ )、低放出量系統 (272  $\mu\text{mol O}_2/\text{dm}^2/\text{hr}$ ) を作出できた。今後は、確立した系統を用いれば光合成能力の遺伝分析をより詳しく行えるであろう。

#### 文 献

- 1) 秋田重誠 (1980) 農技研報告 D51 : 1-58
- 2) Hayashi, K., T. Yamamoto and M. Nakagahra (1977) *Japan. J. Breed.* 27 : 49-56
- 3) Heichel, G. H. and R. B. Musgrave (1969) *Crop Sci.* 9 : 483-486
- 4) IRRI Annual Report (1968) *Plant Physiology*, 17-45
- 5) Nakagahra, M. (1978) *Trop. Agric. Res. Ser.* 11 : 77-82
- 6) Nagamine, T., T. Takita and J. Kawakami (1987) *Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resources* 3 : 115-125
- 7) 小島睦男 (1968) 農技研報告 D23 : 97-154
- 8) 鮫島宗明 (1985) 農業生物資源研究所報告 1 : 63-84
- 9) 角田重三郎 (1967) 日本学術振興会 1-135

## 国内情報

## タバコ未受精胚珠からの半数体作出

日本たばこ産業(株) 植物開発研究所

加藤 紀夫

## 1. はじめに

半数体植物を作出し育種に利用できれば、通常7～8年を要する育種期間を2～3年程度に短縮することが可能になる。従来の育種方法において期間を要する主因は、F<sub>1</sub>個体を作成するための親植物の固定化にあった。半数体植物を利用した場合は、コルヒチン処理等の倍加処理により短時間で固定系統を得られる。さらに半数体植物では、遺伝子の劣性形質がヘテロで存在する優性形質によって覆い隠されることなく発現するので、突然変異株の作成や遺伝子操作等を用いた育種においても有効である。

半数体植物は葯に含まれる雄性配偶子である花粉及び胚珠に含まれる雌性配偶子の卵とその他の半数性の細胞が起源となりうる。現在のところ花粉培養及び葯培養による花粉に由来する半数体作出技術の方が先行しているが、種によっては作出に成功していない、または頻度が著しく低い(ウリ類、トウモロコシ)、葉緑体を欠損したアルビノ個体が数多く出現する(イネ)、異数体が高頻度で出現する(ペチュニア)、雄性不稔系統には応用できないなどの問題点を含んでいる。未受精胚珠(子房)培養による胚嚢内の半数性細胞を起源とする半数体作出技術は、それら葯培養による欠点を補う可能性を持つものである。

以上のような意義もあり近年未受精胚珠培養に関する技術開発も進展しつつある。特にこの分野は中国において研究が進展しており Zhu ら<sup>1)</sup>によるタバコとコムギでの成功を皮切りにトウモロコシ、イネ、ヒマワリ、ユリなどの成功例が報告されている。中国以外で

はカナダのガーベラ、オランダのテンサイなどの成功例があるが、現在までのところデータの蓄積量は依然として少ないのが現状である。そこで我々は未受精胚珠培養の技術を確立するために、タバコ及びルスチカタバコを材料とした研究に着手した。

## 2. ルスチカタバコにおける培養系の検討

実験材料には *N. rustica* として自社で保有している1系統を用いた。開花前の様々なステージの蕾を採取し、常法に従い滅菌後、胎座付きの胚珠を摘出し実験に供した。条件を N6+kinetin 8 mg/l + IAA 0.5 mg/l + sucrose 5% とし培養を行ったところ、多数の植物体を作成することができた。胚珠から植物体が発現する際には最初にカルスが出現し不定芽または不定胚が得られる場合と直接胚発生が起きる場合が観察された。いずれも頻度は高く培養された子房の90%以上で1子房当たり5～10個程度の胚様体またはカルスが生じた。そこでこの系における必要条件を調べるためにカイネチン濃度、IAA濃度、無機塩組成、糖濃度を変え実験を行った。その結果、次のことが明らかになった。

① カイネチンは 4 mg/l でも植物体の誘導は可能であるが、8 mg/l 条件下で最も頻度が高く、16 mg/l では胚珠の成長が全く認められなかった。

② IAA は植物体の誘導自体には必ずしも必要ではなかった。

③ 無機塩組成では塩濃度が低い White 培地では植物体の発生は認められず、MS、N6 などの塩濃度が高い培地において良い結果が得られた。特にリン酸とカリの濃度が高

いN6培地が最も適しているようであった。

④ 糖濃度については2.5~10%の間では明瞭な違いが見出せなかった。

以上の結果よりルスチカタバコの未受精の胚珠は比較的高濃度のカイネチンの存在により何等かの刺激を受け発生が誘導されるものと考えられた。また、植物体の誘導が可能な胚珠のステージはかなり幅が広く、花卉長にして5mm程度から開花直前の20mm位のものまで可能であった。

培養で得られた植物体の倍数性を根端の染色体と孔辺細胞の葉緑体数により調べたところ、鉢上げした18個体のうち11個体が半数体で7個体が二倍体であった。植物体の発生起源については現在調査中である。得られた半数体植物は二倍体に比べ多少小型で葉幅が狭く、薬培養等で作出され報告されている半数体と同様の諸形質を有していた。

### 3. ルスチカタバコの系統間差

今回おもに実験に用いた系統以外のルスチカタバコについても同様の結果が得られるか否かを他の8系統を用いた調査した。培養条件は先ほどの実験で明らかにした最適条件を参考とし、さらにカイネチンの感受性の差を考慮して8mg/l区と4mg/l区を設けた。その結果、3系統では全く植物体が出現せず、残りの5系統も実験に用いた系統よりも低い頻度でしか植物体が得られず、最も良かったものでも培養された子房当たり50%の率であった。以上より、同種内においても最適の誘導条件がかなり異なる可能性のあることが判明した。

### 4. タバコにおける培養系の検討

材料には *Nicotiana tabacum* cv. BY-4 を用いた。様々なステージの蕾を採取し、常法による滅菌処理後、胚珠が胎座に付いた状態で摘出し管ピンに置床した。培地には White, MS, Nitsch '69, Heller, N6 などの培地組成を用い、それらにカイネチン、ベンジルアデニン、ゼアチンなどのサイトカイニン類、

IAA, NAA, 2・4-D などのオーキシシン類、ABA, ジベレリンなどを単独で、もしくは組み合わせで効果を調べた。これらの条件下では植物体の誘導には全く成功しなかったが、この実験により興味深い現象が観察された。サイトカイニンを含まない培地へ置床されたものは、多少の胚珠、胎座の肥大が認められた後、褐変し枯死してしましたが、サイトカイニン類を含む培地に置床された胚珠は高い頻度で、柱頭、花柱に極めて類似した組織への分化が起こったのである。Hicks ら<sup>2)</sup> は非常に若い花芽についてのみ、ホルモンフリーの条件下において柱頭、花柱様組織への分化が起こることを報告している。今回この柱頭、花柱様組織の分化は胚珠のみならず子房基部の組織からも観察された。この系におけるこれらの現象は、胚珠及び子房基部組織に残存する心皮のときに一度発現した分化能がサイトカイニンの存在により、再発現したものと推測された。

以上の結果より、タバコの未受精胚珠培養による半数体誘導は、通常用いられる植物ホルモンの添加による方法だけでは困難であると考えられた。そこでタバコの薬培養等で報告されている外植片を一旦糖飢餓条件におき胚様体への分化を誘導する手法<sup>3)</sup>を参考とし、検討を行った。その結果、開花直前の花芽から採取した胎座付きの胚珠を2~3日間程度蒸留水で飢餓培養し、SK<sup>4)</sup>+kinetin 2mg/l +2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid 0.5 mg/l +sucrose 5%+gellangum 0.2%, pH 5.7 の培地に移植すると胚珠からカルスが誘導できることを見出した。このカルスからはタバコ葉片から誘導したカルスとほぼ同条件でシュートを誘導することができた。得られた植物体の発生起源については未調査である。染色体数により倍数性を調べてみると、ほとんどが二倍体であったが、現在までに半数体も1個体出現している。この系を安定的な半数体作出の系に確立するためには今後の実験が必要であるが、植物ホルモン以外を用いて分化の方向を変えることに成功した報告はあまり多くなく、興味深い結果である。

## 5. おわりに

本研究によりルスチカタバコの未受精胚珠からの半数体作出のための培養条件の概要を把握することができたが、タバコについては1例の半数体を得たものの系の確立には至っていない。これはタバコの場合、胚嚢を取り囲む2nの珠心細胞が培養条件下で柱頭、花柱様組織へと分化しやすく、その結果胚嚢が崩壊してしまうことが、原因の一つと考えられる。今回の結果は、未受精胚珠培養による半数体作出技術の進展の可能性を示すとともに半数性の細胞と二倍性の細胞と一緒に培養せざるを得ない胚珠培養の難しい一面をも示している。本研究により見出されたタバコの未受精胚珠からの糖飢餓処理によるカルス誘導技術は、植物ホルモンを添加する以外の手法によっても組織の分化の方向を調節できる可能性を示唆しており、今後更に研究を進展させたい。

またルスチカタバコの半数体作出頻度には、系統間差もかなり存在することが明らかになった。培養時においてこのような系統間差が発現することは他の種においても報告されて

いる現象であるが、実際に育種技術の一環として培養を用いるときには大きな障害となりうる。近縁種において培養時に発現する諸性質の違いは親植物の置かれている環境の違いが一因としてあるが、今回は遺伝情報の違いに起因していると考えられる。培養時における不定胚形成能、カルス形成能などの諸性質は自然界においても育種の選抜段階においても淘汰圧がかかっていないことが予測される。そのような条件下では、以上のような諸性質に係わる遺伝的変異は中立遺伝し、確率に従い集団内に浸透すると考えられ、その結果として、近縁とされる植物間でも *in vitro* の系で培養したときに大きな反応の違いが生じるものと思われる。今後はこのような問題もクリアできる培養系の確立が望まれる。

## 文 献

- 1) Zhu, Z. and W. Haishan (1979) *Acta Genetica Sinica* 6 : 181-183
- 2) Hicks, G. S. and A. Mchughen (1974) *Planta* 121 : 193-196
- 3) Imamura, J. et al (1982) *Plant Cell Physiol.* 23 : 713-716
- 4) Chen, Y. (1986) *Haploids of Higher Plants in Vitro*. Springer-Verlag, 3-25

### 国内情報

## トマト培養細胞系による青枯病抵抗性個体の選抜と育成

近畿大学農学部 植物病理学研究室

豊田 秀吉

### 1. はじめに

細胞選抜技術を使用して病害抵抗性植物を作出する場合、病原因子が明確であれば、それを選抜のターゲットにすることができる。最も端的な例が、病原菌が宿主特異的毒素を生産する病害である。このような病害では、毒素が病原性決定因子として作用するので、

毒素に感受性であれば宿主は罹病性となる。すなわち、毒素抵抗性変異を選抜すれば容易に抵抗性個体を育成することができる。

青枯病の場合、侵入した病原細菌 (*Pseudomonas solanacearum*) は導管内で増殖し、最終的には多量の細胞外多糖類などを生産して導管閉鎖を引き起こす。これによって植物は水分の上昇が妨げられ、結果的には萎ちょう症状が誘起されることになる。一方、同病

原菌から非病原性株を分離して、宿主植物に接種しても、顕著な細菌増殖は観察されない。このような事実は、感染の非常に早い段階で病原性を決定する何等かの特異的な宿主-寄生者相互反応が存在することを想定させた。青枯病菌の病原性決定に特定の毒素が関与しているかどうかについては不明であったが、実際には未知の毒素が感染の場面に関与する可能性もあると考え、毒性物質のスクリーニングを行うことにした。その結果、病原菌培養濾液に毒性が認められ、濾液そのものを選抜剤として用いることができるものと思われた。

筆者らの研究室では、植物の品種改良、特に病害抵抗性植物を育成する目的で、種々の細胞工学的手法を検討してきた。そして、そのために必要な組織培養技術の改良<sup>1)</sup>や、またそれらを用いた実際の応用結果<sup>2)</sup>についてもすでに報告してきた。そこで、本論では、上述のトマト青枯病抵抗性について、筆者らが行った体細胞変異個体の選抜結果<sup>3)</sup>とその新品種育成のプロセスを紹介することにする。

## 2. 抵抗性変異細胞の選抜法

### (1) 病原菌培養濾液による *in vitro* での選抜

青枯病菌の培養濾液を選抜剤に用いる場合、濾液中に毒素が存在するかどうか、またその毒素が青枯病菌の病原性株によってのみ生産されるかどうかを確認する必要がある。もちろん、濾液中の毒性物質が実際の感染場面で作用しているかどうかはこの段階では不明であるが、分離された細胞の再生個体に病原菌を接種することで、細胞感染における濾液抵抗性個体の有効性を明らかにすることができると考えた。

筆者らの実験では、青枯病菌の病原性株と非病原性株を PCG 培地で 2～3 日間培養し、無菌濾液をオートクレイブ処理して培養濾液とした。両菌株の培養濾液をそれぞれ MS 培地に添加し、トマト（品種、福寿 2 号）葉から誘導したカルスを培養した。筆者らの研究室では、トマト葉外植片からのカルス誘導と

その再分化条件を確立していたので<sup>3)</sup>、薬剤処理試験に適した friable なカルス組織を分離して本実験の材料とした。このようなカルスを青枯病菌の培養濾液存在下で培養した。その結果、非病原性株の培養濾液を加えた培地ではカルスが正常に増殖したのに対して、病原性株の培養濾液では、ほとんどのカルスが培養数日後ですみやかに褐変化して死滅した。このような結果から、病原性株のみが毒性物質を生産して培地中に分泌しているものと考え、毒素抵抗性カルスの選抜を行うことにした。

トマトカルスを病原性株の培養濾液添加培地で培養すると、ほとんどのカルスは褐変化するが、さらに培養を継続すると、褐変化したカルスから新しいカルスの増殖が認められ、濾液抵抗性細胞の存在が予想された。そこで、これらの細胞が真に濾液抵抗性であるかどうかを検討するため、また生理的にエスケープした非抵抗性細胞を除くため、同培地および濾液無添加培地への移植・継代を繰り返した。このようなプロセスによって、濾液抵抗性カルスを分離することができた。

再分化個体は発根後常法で馴化させ、病原菌を接種して発病の有無や程度を検討した。まず、通常の対照個体（播種後 3 週間程度の幼苗が再生体と同程度の生育を示した）に接種し、発病の過程を明らかにした。それによると、対照個体では接種後数日で下葉に黄化症状が認められ、その後数日以内に急速に全身萎ちょうした。これに対して、濾液抵抗性選抜個体にはそのような黄化症状は観察されず、感染初期には強い抵抗性を示した。しかしながら、1 か月程度が経過して第 1～第 2 花房が形成される時期になると、選抜個体においても上位に部分萎ちょうが出現し、その後すみやかに萎ちょう・枯死することが示された。このような結果は、トマトと青枯病菌が次に述べるような関係にあることを示唆する。すなわち、植物体内に侵入した病原菌は比較的早い時期に毒性物質を生産し、これによって下葉を黄化・枯死させる。このことは、病原菌の生産する毒素が植物のもつ抵抗反応を打破し、病原菌が増殖するのに好都合に働

いたものと考えられた。その結果、この期間に病原菌は急速に増殖し、トマトの上部にまで到達して萎ちょう症状を出現させることが可能となる。一方、濾液抵抗性個体はこの毒素に対して抵抗性で、病原菌の増殖を抑制できる。そのため細菌が増殖するには通常よりも長い期間が必要となる。しかしながら、抑制作用は完全なものではないので、細菌が徐々に増殖し、そのレベルが萎ちょう出現に十分になると、もはや植物は抵抗性を発揮できなくなると考えれば、筆者らの結果を説明しやすい。

## (2) 病原菌接種による再生体自殖後代での選抜

前項で示したように、濾液選抜した抵抗性個体は感染の初期段階では強い抵抗性を発揮した。このことは、青枯病菌が感染の初期段階で生産する毒素が人工の培地中にも分泌されることを示すもので、細胞選抜自体は適切であったことを意味する。しかしながら、植物がその一生を通じて十分な抵抗性を発揮するためには幾段階かのステージで病原菌の増殖を抑制しなければならない。今回の場合のように後期の病原力にかかわる因子が病原菌の培養濾液中に存在しなければ、細胞選抜も非常にむずかしくなることは言うまでもない。

以上のような状況を克服するためには、再分化個体に病原菌を接種して抵抗性個体を分離する方法、すなわち後代選抜法が有効となる。すなわち、生育の最終ステージ（果実収穫期、播種後4か月程度）まで追跡することで、完全抵抗性個体を分離することができる。実際のこのような実験では、抵抗性変異が劣性形質である可能性もあらかじめ考慮し、再生体の自殖後代（R2世代）を用いた。表1にその選抜結果を示す。この試験では、R2世代における表現型を、感受性（接種後の非常に早い時期に発病する個体）、中度抵抗性（感染初期には抵抗性を示すが、1か月程度経過して発病する個体）および強度抵抗性（収穫に至るまで、まったく発病しない個体）に分類した。表の結果からも明らかなように、後代選抜でも前項と同様の中度抵抗性（すなわち、培養濾液にも抵抗性示す）が分離される

表1 トマト再分化個体への青枯病菌接種結果

系統番号	接種個体数	罹病性個体数	抵抗性個体数	
			中度	強度
LNSR-3	83	83	0	0
-8	29	29	0	0
-9	41	41	0	0
-10	52	52	0	0
-14	48	48	0	0
-16	51	51	0	0
-17	31	31	0	0
-19	22	22	0	0
-21	41	41	0	0
-22	25	25	0	0
-1	65	58	7	0
-4	51	45	6	0
-11	31	28	3	0
-13	54	48	6	0
-5	58	12	26	20
-6	43	22	19	2
-12	48	16	19	13
-15	40	35	2	3
-20	46	40	5	1
-2	46	0	10	36
-7	42	0	1	41
-18	36	0	12	24
対照個体	25	25	0	0

だけでなく、果実収穫に至る全過程を通じて抵抗性を示す系統が分離された。しかしながら、表現形質の分離は非常に複雑で、それらの多様性から考えると、今回選抜された個体の青枯病抵抗性は単純な遺伝様式ではないようである。いずれにしても、筆者らの選抜個体がどのような抵抗性を獲得したかについては不明点も多く、今後の遺伝学的、生理生化学的解析を必要とする。

## 3. おわりに

筆者らが選抜した青枯病抵抗性系統は実際の青枯病汚染圃場でも有効に抵抗性を発現する系統であったが、次の自殖後代（R3世代）の圃場試験では、初期発病する個体も出現することから、形質分散をおさえ品種の固定化操作を行う必要があった。そこで、R3からR5世代まで、強度抵抗性個体を圃場レベルで選抜したところ、完全に抵抗性を示す個体、すなわち、自殖後代に接種しても形質の分散しない品種の固定化に成功した。今後の研究

としては、栽培環境の異なる地域での圃場試験や系統の異なる青枯病菌による接種試験を行い、本選抜系統の有効性をさらに検討する必要があるものと思われた。

#### 文 献

1) 豊田秀吉 (1989) 組織培養 15: 273-277

- 2) 豊田秀吉 (1986) 組織培養 12: 119-123  
 3) Toyoda, H., K. Shimizu, N. Kita, Y. Matsuda, and S. Ouchi (1989) *Plant Cell Rept.* (in press)  
 4) Brettell, R.I.S. and D.M. Ingram, (1979) *Biol. Rev.* 54: 329-345  
 5) 豊田秀吉・大形 浩・松田克礼・茶谷和行・平井篤造 (1985) 植物組織培養 2: 70-73

#### 国内情報

## 炭疽菌における莢膜形成に必要な遺伝子領域のクローニング

農林水産省 家畜衛生試験場 細菌製剤研究室

内田 郁夫

### 1. はじめに

炭疽は典型的な土壌病の一つとされておりおもに草食獣の伝染病であるが、人にも感染する。我が国では、本病は家畜法定伝染病に指定されており、ヒトでは届出伝染病となっている。

原因菌である炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) は Koch (1876) により人類史上初めて発見された病原菌であり、ついで Pasteur (1881) が高温培養法で本菌を弱毒化し、同時にこれを生ワクチンとして実用化に成功したことは余りにも有名である。

炭疽菌の病原因子としては二つの因子が知られている。一つは菌が産生する外毒素であり、他の一つは莢膜である。両者は互いに独立した因子であるが、炭疽菌が完全な病原性を発揮するためには両者の共存が必要である。この内の毒素の産生が菌の保有する質量約 110Md のプラスミドにより支配されていることが明らかとなった<sup>1)</sup>。また、このプラスミドは 42°C の連続継代により脱落することから Pasteur の発見した高温培養による本菌の弱毒化は 110Md プラスミドの脱落に起因したものであろうと推測されている。

一方、もう一つの病原因子である莢膜は、

他の病原細菌の莢膜と同様に宿主の食菌作用や抗体および補体作用から菌を守るために重要であると考えられている。莢膜は生体内でよく形成されるが、培地上での発現には、血清あるいは重ソウを加えた培地上で 5~20% の炭酸ガスを必要とする。好気下では莢膜を発現せずラフ型の集落を形成する。しかし、炭酸ガス存在下ではスムーズで粘稠性に富んだ集落が出現し莢膜を発現する。炭酸ガス存在下で培養を継続すると、スムーズでムコイド状の集落からフィラメント状の側枝発育が生じ、これから得られた菌は莢膜形成能を欠き、集落形態もラフ型となる。現在では、このようにして無莢膜変異株が、病原性の極めて不安定な Pasteur ワクチン株に代わって動物用のワクチンとして使用されている。また、他の多くの病原細菌の莢膜が多糖体で構成されているのに対して、炭疽菌の莢膜は D-グルタミン酸ポリペプチドにより構成されていることがきわめて特徴的である。

近年、この病原因子の一つである莢膜形成能も菌の保有する質量 60Md のプラスミドにより支配されていることが明らかにされた<sup>2)</sup>。しかしながら莢膜の生合成や、発現機構に関する詳細はほとんど不明である。

著者は、莢膜発現に必要な遺伝子領域 (以下 Cap 領域) をクローニングすることに成功

した。以下にその研究の概要を紹介する。

## 2. Cap 領域のクローニング<sup>3)</sup>

毒素非産生の有莢膜株 Davis 株由来の 60 Md プラスミド (pTE 702) を制限酵素 *Xba*I で部分消化し、大腸菌と枯草菌のシャトルベクターである pHY 300PLK に結合後、大腸菌に形質転換した。得られた転換体を抗莢膜血清を用いた寒天ゲル内沈降反応でスクリーニングしたところ、6.2kb の *Xba*I 部分消化断片との組換え体 pCAP 1 を保有する転換大腸菌のみが陽性を示した。また、この大腸菌は顕微鏡下で実際に莢膜を発現していることも観察された (口絵)。しかも興味深いことに、大腸菌における莢膜の発現は炭疽菌においてと同様に炭酸ガスの存在に依存していた。pTE 702 の制限酵素切断地図とクローニングされた領域の位置を図 1 に示した。

## 3. Cap 領域の遺伝子解析<sup>5)</sup>

Cap 領域の最小域は約 3.2kb であることが明らかとなった。この領域の遺伝子解析を行なうため領域内の制限酵素切断点を利用して種々のフレームシフトミュータントを作出した。これらのミュータントを用いて大腸菌内で相補試験を行い Cap 領域のシストロン分析を行なった。この結果、Cap 領域には三つのシストロン (*cap B*, *cap A*, *cap C* の順に配列) が存在することが明らかとなった (図 2)。さらに Cap 領域の遺伝子産物を大腸菌のミニセルを用いて解析した結果、*cap B*, *cap C* および *cap A* はそれぞれ 44kd, 16kd および 46kd (Cap B, Cap C, Cap A) のタンパクを産生していることが判明した。

さらに Cap 領域を含む 3,244bp の全塩基配列を決定したところ、シストロン分析で同定された三つのシストロンにそれぞれ対応する open reading frame (ORF) が検出された。各 ORF の開始コンドから 5' 側上流にそれぞれ、プロモーター配列および SD 配列が検出された。

プロモーター検索用ベクターを用いて調べ

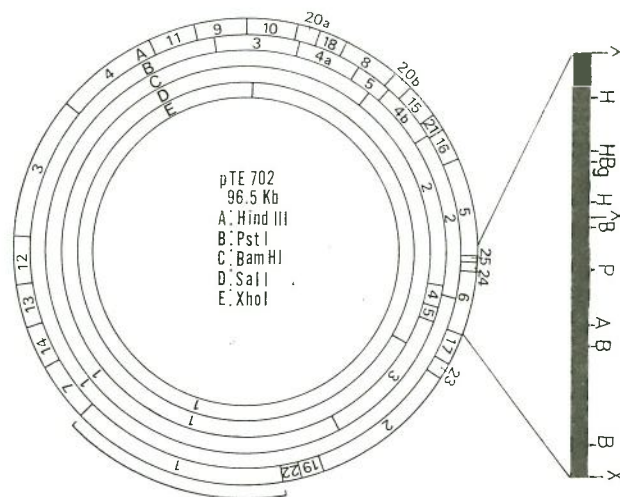


図 1 pTE 702 の制限酵素切断地図<sup>4)</sup>

—: 複製遺伝子座位, ■: Cap 領域を含む断片, X: *Xba*I, H: *Hind*III  
Bg: *Bgl*II, B: *Bam*HI, P: *Pst*I, A: *Aat*I

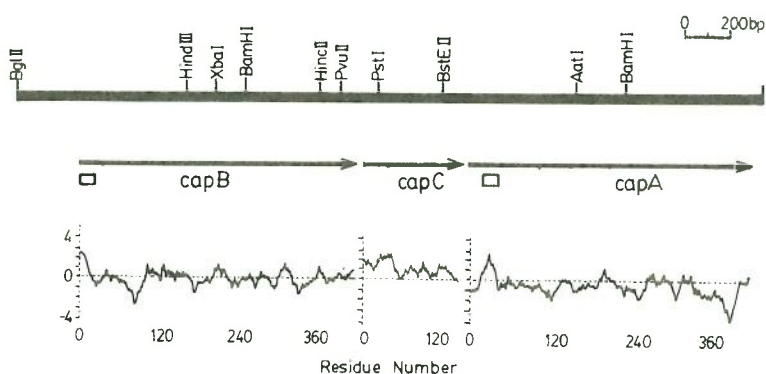


図 2 Cap 領域のプロティンマップ

グラフは各タンパクの疎水性パターンを示す。横軸はアミノ酸数を、縦軸の+値は疎水性を、-は親水性を示す。矢印は CapA, CapB および CapC タンパクのそれぞれをコードする ORF を示す。□: CapA および CapB の N 末端部に存在する疎水性アミノ酸配列

たところ、これらのプロモーターが実際に大腸菌内で働いていることがわかった。すなわち Cap 領域の三つのシストロンはそれぞれ独自のプロモーターを有する独立したシストロンであることが判明した。

全塩基配列から推定される各タンパクのアミノ酸配列について疎水性の分析を行った結果を図 2 に示した。推定アミノ酸配列から算出される Cap B, Cap C および Cap A タンパクはそれぞれ 397, 149 および 411 個のアミノ酸からなり、それらの分子量はミニセルを用いて同定したものとほぼ同じであった。各タンパクの疎水性のパターンをみると Cap C は非常に疎水性に富んだタンパクであることが判明した。また、Cap B および Cap A の N



末部に20個程度の疎水性のアミノ酸配列が存在していた。

疎水性のタンパクは細胞膜に親和性があるといわれている。そこで Cap 領域の各タンパクの大腸菌内における局在について調べた結果 Cap C は細胞膜中に局在し、Cap B および Cap A の場合はその疎水性の N 末部が細胞膜中に、他の部分が細胞質に局在していることを示す成績が得られた。

冒頭にも述べたように炭疽菌の莢膜は D-グルタミン酸ポリペプチドにより構成されていることが知られているが、その生合成のメカニズムに関しては不明である。Cap 領域が産生する三つのタンパクは D-グルタミン酸ポリペプチドを産生するための酵素である可能性が考えられる。

一方 D-グルタミン酸ポリペプチド産生 *Bacillus* 属菌として *Bacillus natto*, *B. licheniformis* および *B. megaterium* などが知られている。*B. natto* では、菌体外に粘液物質として産生され、*B. licheniformis* および *B. megaterium* では炭疽菌と同様莢膜として産生される。これらの菌が産生する D-グルタミン酸ポリペプチドは炭疽菌の莢膜の成分と共通抗原性がある。しかし、著者が調べた限りにおいてはこれらのグルタミン酸ポリペプチド産生菌の DNA にはクローニングされた炭疽菌の Cap 領域と相同性を示す DNA は検出されなかった。このことは炭疽菌における D-グルタミン酸ポリペプチドの生合成のメカニズムと他菌種のものとは異なっていることを示すものかも知れない。

#### 4. おわりに

クローニングされた Cap 領域の遺伝子解析および遺伝子産物の解析結果は今後炭疽菌莢膜の生合成メカニズムや炭酸ガス依存性などの発現調節機構を解明するための基礎知見となるであろう。

また、Cap 領域は血清学的に交差反応を示す他のグルタミン酸ポリペプチド産生 *Bacillus* 属菌の DNA と相同性を示さない。したがってクローニングされた Cap 領域は DNA プローブとして炭疽の診断に応用できる可能性が考えられ、現在これを検討しているところである。

本研究は農林水産省の特別研究「農業生物における遺伝子発現機構の解明」の中で、東大医科研(吉川昌之介教授)との共同研究により行なわれた。

#### 文 献

- 1) Mikesell, P. E., B. E. Ivins, J. D. Ristrop and T. M. Dreier (1983) *Infect. Immun.* 39 : 371-376
- 2) Uchida, I., T. Sekizaki, K. Hashimoto and N. Terakado (1985) *J. Gen. Microbiol.* 26 : 49-66
- 3) Makino, S., C. Sasakawa, I. Uchida, N. Terakado and M. Yoshikawa (1988) *Molecular Microbiol.* 2 : 371-376
- 4) Uchida, I., K. Hashimoto, S. Makino, C. Sasakawa, M. Yoshikawa and N. Terakado (1987) *Plasmid* 18 : 178-181
- 5) Makino, S., I. Uchida, N. Terakado, C. Sasakawa and M. Yoshikawa (1989) *J. Bacteriol.* 171 : 722-730

## 文献情報

細菌プラスミドの  
酵母への伝達

異なる分類群間の遺伝情報の伝播は細菌の *Agrobacterium tumefaciens* とある種の高等植物の間で行われることが知られている。この *A. tumefaciens* から植物への DNA の伝達は Ti プラスミドを介して行われるが、その機構は細菌の接合伝達と類似することが判明している。また最近、接合性プラスミドが Ti プラスミドの植物への DNA 伝播に必要な機能と置換しうることが明らかにされている。

細菌の接合が生物界間の遺伝情報伝達の機構として働くかが調べられた。その結果、大腸菌 (*Escherichia coli*) のプラスミドが真核生物である酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) へ伝達されることが明らかにされた。

細菌のプラスミドの伝達には *tra* 遺伝子群と DNA 伝達に *cis* に作用する配列である *oriT* (origin of transfer) および *oriT* に作用する遺伝子産物をつかさどる *mob* 遺伝子が必要である。ここでは細菌の広宿主域プラスミドの R 751, 自己伝達性の無い Col E1, 腸内細菌のみを宿主とする F を用い、各プラスミドの遺伝子について略号を用い、R 751 では *tra-R*, *mob-R*, *oriT-R* と記し、Col E1 ではそれぞれ *tra-C*, *mob-C*, *oriT-C*, F では *tra-F*, *mob-F*, *oriT-F* とする。

自己伝達プラスミド pDPT 51 (R 751 に *mob-C* を付加したもので *tra-R*, *mob-R*, *oriT-R* をもつ) と酵母と大腸菌のシャトルベクターである YEp 13 (酵母の 2  $\mu$ m プラスミドと *LEU 2*, pBR 322 由来の *oriT-C* をもつ) を共存させると pDPT 51 は *trans* に働き YEp 13 を可動化する。両プラスミドを共存させた大腸菌を供与菌とし、通常の細菌の接合条件で *Leu 2* の酵母を受容菌としたところ  $3 \times 10^{-7}$  の割合で *Leu*<sup>+</sup> の酵母が出現した。この *Leu*<sup>+</sup> の酵母には YEp 13 が存在す

ることが確かめられたが、pDPT 51 は酵母での複製に必要な配列を持たないために検出されなかった。YEp 13 の伝達率は  $3 \times 10^{-8}$  から  $5 \times 10^{-5}$  程度であったが供与菌と受容菌の比によって変化し、最大で  $7 \times 10^{-2}$  程度まで高めることができた。一方、大腸菌どうしの接合実験では  $3 \times 10^{-1}$  程度であった。また、YEp 13 のみを持つ大腸菌を酵母と混合しても *Leu*<sup>+</sup> となるものは観察されなかったことから、DNA の伝達は接合性プラスミドに依存することが判明した。

この酵母への接合伝達が細菌のそれと同じ機構であるかどうかを確かめるためにその物理的各種の条件が調べられた。直接 YEp 13 を加えても *Leu*<sup>+</sup> 菌は得られず、DNase I を添加しても DNA の伝達は阻害されないことから菌体外の DNA による形質転換の可能性は否定される。また、供与菌をクロロホルム処理により殺菌すると *Leu*<sup>+</sup> 菌は得られず、供与菌が生きていることが要求されることが判明した。供与菌を遠心分画して得られた上清には活性がなく、菌体を含む沈澱との混液からのみ *Leu*<sup>+</sup> 菌が得られたことから DNA の伝達は菌体外の要因は関与しないことが示される。さらに、ミリポアフィルターで仕切られた状態では *Leu*<sup>+</sup> 菌は得られないことから菌体の接触が必要であることがわかった。

一方、遺伝的条件として *mob* の要求性を検討するため、pDPT 51 (*mob-C* を持つ) と R 751 を用いて比較したところ酵母の *oriT-C* に対応する *mob* の要求性が認められた。*oriT* の要求性は *oriT-C*<sup>+</sup> と *oriT-C*<sup>-</sup> のプラスミドを共存させることによって確認された。さらに宿主域の限られた F プラスミド (*tra-F*, *mob-F*, *oriT-F* をもつ) に 2  $\mu$ m DNA 由来の配列と *LEU 2* 遺伝子を付加したプラスミドを構築し、その自己伝達を調べたところ、低率ながら伝達が認められた。また pDPT 51 に *LEU 2* と 2  $\mu$ m DNA の配列を付加した場合もほぼ同様な結果が得られた。

以上の結果から細菌の接合と、物理的・遺伝的に同じ機構で細菌と酵母の間においても行われることが判明した。しかし、細胞表面の相互作用に必要な *tra* 遺伝子が細菌と酵母

の系でも働くかどうかは不明で、今後の問題として残された。

この様に、細菌からの DNA の伝達が真核生物である酵母に対しても行われることから、Ti プラスミドのように特殊なものでなくとも動植物細胞に対しても同様な DNA の伝達が行われ得ることが示唆される。この研究で明らかにされた接合による DNA の伝達は異なる分類群間の遺伝子の伝達機構であり、進化の上でも大きな影響を与えてきたことが考えられる。たとえば、系統発生上の不合理もこのような遺伝子の転移を考えることで説明できるかもしれない。また、この研究で行われた酵母の形質転換系は迅速で効率も良く、他の真核細胞の形質転換系としても有力なものとなる可能性が考えられる。

(抄訳 平塚和之一東大農)

#### Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast.

Heinemann, J. A. and G. F. Sprague

*Nature* 340 : 205-209 (1989)

#### 文献情報

#### タバコ幼植物におけるトウモロコシのアクチベーター因子転移の視覚的検出

染色体上を動き回る遺伝子のことをトランスポゾンといい、多くの生物においてその存在が知られている。調査したい遺伝子の中または近傍にトランスポゾンが転移すると、その遺伝子は正常に機能しなくなることが多い。これによって、突然変異体を得ることができ、また、トランスポゾンを目印として遺伝子を単離することができる。植物のトランスポゾンに対する関心も高く、これを利用して、従来困難であった遺伝子産物（タンパク質等）の不明な遺伝子の単離ができると期待されている。研究の進んでいるトウモロコシとキンギョソウのトランスポゾンは、他の植物の中

でも転移することが最近明らかにされた。

この手法を活用する上での最大の問題点は、転移率と突然変異率の低さである。一般的に、トランスポゾンを持つ個体から得た種子のうち、トランスポゾンが転移を起こしたことを示すものは1%前後とされている。さらに、遺伝子の数は非常に多いので、転移したトランスポゾンがねらった遺伝子に命中する確率は低い。したがって、おそらく100万以上の個体を選抜に供しなければ目標とする突然変異体は得られないことになる。

本報では、トランスポゾンが転移を起こした個体を目で選り分ける方法を開発している。用いたトランスポゾンはトウモロコシのアクチベーター因子 (Activator element, Ac) である。Ac をタバコに導入し、タバコの中で転移させるのであるが、巧妙な細工を加えて転移の検出を容易にしている。細工というのは、ストレプトマイシン (Sm) 耐性遺伝子 (streptomycin phosphotransferase, SPT) のプロモーターと構造遺伝子の間に Ac を挿入し、SPT::Ac 遺伝子を構築している点である。このままでは、Ac が障害となって SPT が働かず Sm 感受性であるが、Ac が植物中で転移すると、邪魔者がいなくなって SPT が発現し Sm 耐性になるのである。Sm を含む培地で育てると、感受性植物は白色、耐性植物は緑色となるので、Ac の転移が容易に検出できる。

この SPT::Ac 遺伝子をさらにカナマイシン耐性遺伝子と接続し、カナマイシン耐性をマーカーとしてタバコに導入した。つまり、ふたつの薬剤耐性遺伝子を巧妙に使い分けているのである。形質転換体から得た種子を Sm を含む培地で発芽させ調査した。Ac が転移を起こす時期によってさまざまな場合が生じることになる。受精以前の段階で転移した場合には完全な緑色植物が生じる。胚発生以降の転移の場合には斑入りの植物となる。この場合、転移の時期が早いほど緑色のセクターが大きくなる。

17個体の形質転換体について調査したところ、9個体から次代に斑入りと緑色の子孫が出現した。緑色植物の出現頻度は1%から

9%であった。このうち、2個体由来の緑色植物のDNAをサザンハイブリダイゼーションによって分析したところ、導入したSPT::Ac遺伝子からAc部分が欠失していることが確認された。また、約半数の緑色植物において転移したAcが新たな部位に挿入されていた。この転移したAcが突然変異を引き起こすのであるから、緑色植物を選抜することによって、突然変異を起こした可能性のある植物を効率よく選び出すことができるわけである。

斑入り植物の緑色の斑点の数についても、個体あたり1~2個のものから10個以上のものまで個体間差が認められた。遺伝分析の結果、斑点数の多いものはSPT::Ac遺伝子をホモに持っており、少ないものはヘテロ型であった。したがって、細胞あたりのAcの数が多いほど転移の頻度が高いことになる。

Acの本来の宿主であるトウモロコシでは、逆に、Acの数が多いと転移が抑えられるという現象が知られている。トウモロコシの中には、不完全なAcであるディソシエイション因子(Dissociation element, Ds)が多数存在している。このDsの存在が転移の抑制に関連している可能性もあると考察している。

トランスポゾンによる突然変異とその他の突然変異の大きな違いは、遺伝子のクローニングが可能であるという点である。しかし、本報でも述べているように、多数の植物体を扱わなくてはならないのが大きな問題である。ここで示された手法を用いれば、突然変異体選抜の母集団の大きさを約百分の一にすることができる。今後は、例えば、受精直後にだけ高頻度で転移し、一度転移すれば以後安定化してしまう、というように、制御可能なトランスポゾンの開発が望まれる。

(抄訳 小鞠敏彦-日本たばこ)

### Visual detection of transposition of the maize element *activator* (Ac) in tobacco seedlings.

Jonathan D.G. Jones, Francine M. Carland, Pal Maliga and Hugo K. Dooner.  
*Science* 244: 204-207 (1989)

#### 文献情報

### 射程圏に入った Genome Mapping

今春米国ではDOE(エネルギー省)からヒトゲノム(約 $3 \times 10^9$ 塩基対)の全塩基配列という壮大プロジェクトが提唱されライフサイエンス研究者に大きな波紋を投げかけている。このプロジェクトにはDOE, NIH(国立衛生研究所), HHMI(ハワードヒューズ医学研究所), コールドスプリングハーバー研究所などが参加し、更に国際協力の必要性からHugo(ヒトゲノム機構)が設立され、わが国でも学術審議会等でゲノムプロジェクトの推進が議論されている。確かにヒトゲノム塩基配列はヒトの遺伝病、癌、老化等医学的波及効果が大きいと考えられる。それ故に過熱している特定遺伝病の研究競争をオーガナイズし、このプロジェクトを全塩基配列に及ぶものにするには前途多難である。現在の主な関心は単一遺伝子支配の遺伝病であり、最も遺伝子連鎖解析が進んでいるのが肉繊維症遺伝子のクローニングは非常に多くの研究者と従来ある最も確実な技術の集積に加えてカンター(コロンビア大)開発の最新技術である巨大DNA用パルスフィールド電気泳動法に依るところが大きい。莫大な研究費を投資することによって新技術が次々と開発され研究目標達成期間が短縮されると期待されている。

近年ヒト染色体全体に平均10センチモルガン間隔のRFLPマーカーを持つ遺伝子連鎖地図が開発され、NIHのワトソンは「1センチモルガン地図を5年以内に完成できる」と公約した。最近遺伝子連鎖地図から物理地図への橋渡的役割を持つ技術がX線および蛍光色素を用いて開発され、ワトソンの公約も現実味をおびてきた。遺伝子の連鎖地図は病原遺伝子の位置範囲を狭めるために有力な手段となり、現在5センチモルガン地図が作成中である。しかし実際にその遺伝子を取り出し

て分析するにはマーカーの間が遠すぎる（センチモルガンは約  $10^6$  塩基対）のため不十分である。物理地図作成とは、実際に扱えるDNA断片を染色体に沿って並べることである。病原遺伝子がRFLPマーカーにより1センチモルガン以内に限定され、その区間に物理地図ができるとその病原遺伝子を取り出すことが可能となる。

このほど遺伝子連鎖地図から物理地図作成への発展に威力を発揮する技術が開発された。一つはカルフォルニア大のクックスとメイヤーズの方法である。X線が染色体をランダムに切断できることから特定の染色体断片が入ったハイブリッドセルが作成でき、またX線で壊された部分によって切り離される頻度を調べることでその切れ目の染色体上順序を決定できるという方法である。このことは連鎖地図が物理的に均等な間隔を持つマーカーを持ってない欠点をカバーできる。また10センチモルガン程度の染色体をクローン化できる可能性を示している。もう一つは、エール大のワードらによって開発された方法である。従

来のインサイチュアハイブリダイゼーションにおいてプローブDNAを蛍光標識することにより解像度・検出スピードを向上させ、実際6か月で100の順番を決めている。今後異なる蛍光色を各々のプローブに標識し、それらを同時に識別する装置が開発されれば1年で4000~5000をマップできると考えられている。詳細な物理地図を作るため巨大DNAを扱えるオールソンのYACベクターの発展が期待され、わが国の理研プロジェクト、慶大プロジェクト(Keioストラテジー)の中でも大きな位置を占めている。物理地図完成後のシーケンシングについてはロボット化の研究が進んでいるが、ヒトゲノムプロジェクトが全染色体に及ぶというより、とりあえずヒト最小染色体21番が焦点に入ったといえるだろう。

(抄訳 齊藤 彰一生物研)

#### Genome mapping goal now in reach

Leslie Roberts

*Science* 244: 424-425 (1989)



国際学会レポート

## ジベレリンシンポジウム東京1989 (Gibberellin Symposium Tokyo 1989)

東京大学 農学部

横田孝雄

植物生長ホルモンの一つであるジベレリン (GA) に関する国際シンポジウムが東京大学の山上会館で1989年7月20日から23日にわたって開かれた。このシンポジウムはGAが日本で初めて発見されてから50年経過したのを契機に、それを記念して催されたものである。講演は外国から20人および国内から19人の招待者によって行われ、さらに国内からの60人余の一般招待者の参加があった。なお、本シンポジウムは東京大学 (学術研究奨励資金) および植物化学調節学会の後援のもと民間会社の協賛を得て開かれたものである。

現在6種類の植物ホルモンの研究が知られているが、GAはその研究の初めから単離に至るまで日本人の手によってなされたという唯一のホルモンであり、研究の独創性と新規性の点で世界で高い評価を得てきたものである。最初にGAの歴史的経緯について、田村 (東大名誉教授) の講演から要約することとしよう。

すなわち、GAの研究は徒長現象を示すイネ (ばか苗) の植物病理学的研究から始まり、90年前の1898年に堀はその原因はフザリウム菌 (現在では *Gibberella fujikuroi* と同定されている) の感染によるものであることを報告した。1926年には黒沢が病原性物質 (徒長物質) は菌によって分泌されることを明らかにしている。そして1938年、藪田と住木は病原性物質を結晶として単離し、gibberellin と命名するに至った。第二次世界大戦後、日本と欧米で化学的研究、生理学的研究ならびに応用研究が盛んに行われ、GAは植物の伸長生長など様々な機能を有する植物ホルモンであることが明らかにされたのである。

さて、光などの外部環境刺激はGA生合成および代謝酵素の合成 (ないしは活性化) を

促進し、生じたGAが生長促進やさまざまな反応を引き起こすと考えられる。本シンポジウムの概要を解説するにあたっては以上の点を念頭においた。

### 植物の矮性形質とGA

GAには現在79種類もの多くが知られている。トウモロコシの矮性突然変異体はGA欠損によって起こるが、Phinney (UCLA) はこれらを研究して、植物の茎の伸長にはGAが必要なこと、および生長に必要な活性GAはGA<sub>1</sub>唯一であることを提示してきた。本シンポジウムでは矮性と特に関係すると思われるGA<sub>1</sub>合成系における様々な酵素を抽出する試みについて報告した。一方イネやトウモロコシの生殖器官においてはGA<sub>4</sub>も活性GAである可能性が示され、その生合成酵素系について追究された (東大 高橋, 小林, 室伏)。また矮性トウモロコシの種子にはGA合成能が備わっている (すなわち矮性が発現していない) ことが明らかにされた (室伏)。エンドウとスイトピーの突然変異体をもちいてGA生合成やGAに対する感受性を支配する15種の遺伝子が特定された (オーストラリア・タスマニア大, Reid)。

### GAの生合成をつかさどる酵素群

GAの生合成には様々な酵素が関与しており、これらにより① *ent*-カウレンの合成、② *ent*-カウレンの酸化とGA<sub>12</sub>への変換、③ GA<sub>12</sub>およびそれ以降のGAの酸化による様々なGAの合成へと導かれる。したがって、植物の生長を理解する上では、これらの酵素

を解明することが重要である。中でも活性GAであるGA<sub>1</sub>が生成するのに重要な3β-ヒドロキシラーゼが植物種子から精製され、その性質がかなり明らかとなり、またこの酵素は生長にともなって増減する一方、植物の種類によって性質を異にすることが明らかとされた(理研 神谷; ブリストル大 Mac-Millan)。一方、Graebe(西独 ゲッチンゲン大)は長くGA生成酵素研究に中心的な役割を果たしてきたが、キュウリ胚乳には3β-ヒドロキシラーゼの他に13-ヒドロキシラーゼ、12α-ヒドロキシラーゼおよびC-20オキシダーゼが存在することを明らかにした。莖葉部や根(インゲン)にも、GA生成酵素が存在することが明らかにされた(グラスゴー大 Crozier)。単子葉類の栄養組織におけるGA<sub>1</sub>の合成は二つ前の前駆体であるGA<sub>19</sub>を酸化する酵素の活性に支配されていることが明らかとなった(ブリストル大 Hedden)。またent-カウレンの生成と生長との間には正の相関があることも発表された(オランダ・ネイメヘン大 Barendse; オレゴン大 Moore)。その他GAの代謝や配糖体化についても発表があった(環境研 腰岡; 東独・植物生化学研究所 Sembdner)。

#### GA作用の分子生物学

GAの作用の重要なものとして、伸長生長の他に、穀類の発芽時におけるα-アミラーゼの合成促進がある。Lentonら(ブリストル大)は小麦の発芽時においては内生のGA<sub>1</sub>がα-アミラーゼのm-RNAの量を決めていることを示唆した。赤沢ら(名大)はイネ種子のプロトプラストや核を用いてα-アミラーゼ遺伝子の発現を分子生物学的に解析した。Jonesら(カルフォルニア大、パークレイ)は大麥においてGAはm-RNA合成における転写を支配するとともに、転写後においてはα-アミラーゼの活性と安定性に必要なカルシウムイオンの小胞体(ER)への移動を調節していることを示した。一方、Hooleyら(ブリストル大)は糊粉細胞の表面にGA受容体があり、それがGAと反応すると、α-

アミラーゼが分泌されることを示した。山口(東大)はGAの分子レベルでの機能を明らかにする手法として活性型GAを認識するモノクローナル抗体を開発した。

#### 形態形成とGA

光条件は形態形成にとってきわめて重要である。Zeevaartら(ミシガン州立大)は長日条件下に起こるハウレンソウの抽苔(茎伸長)はGA生成経路の後半部を司る酵素の合成(または活性化)を伴うことを明らかにした。フィトクロムはタンパク性光受容体であり、植物の様々な生長現象に関わっている。レタスの発芽においては赤色光によりフィトクロムが励起すると、その情報はGA生成系を活性化してGA<sub>1</sub>含量を高め、レタス種皮に含まれるアブシジン酸の発芽抑制能を打ち消して発芽にまで至らしめることが明らかにされた(東大 井上)。一方Rappaport(カルフォルニア大 デービス)はササゲの茎伸長は、フィトクロムが近赤外光を受けることにより促進されるが、その際莖と葉においてGA<sub>1</sub>の合成と不活性化が起こるとともに、GAが葉から莖へ移動することを見いだしている。このように、GAの合成は植物の光受容と密接な関係があることが示された。

以上の他にもGAの生理作用に関する様々な解析が行われた。Pharis(カルガリー大)は木本および草本植物における花芽形成にGAが関与している証拠を示した。Juntilla(ノルウェー トロムゼ大)は樹木の生育におけるGAとの関係について発表し、幼若な苗においてはGA<sub>1</sub>が重要な役割を果たしているが、成木の育成についてはGAとの関係が不明のままであると示した。幼若苗におけるGAの作用部位は頂端下の分裂組織と考えられた。柴岡(大阪大)と勝見ら(ICU)はGAは、微小管の配向を細胞伸長軸に対して横向きに整えることにより伸長の促進を行うことを示した。また、タマネギの鱗茎がGA処理により伸長生長を開始することも同様の理由で説明された(柴岡)。谷本(名市大)は根の生長にきわめて微量なGAしか必要でな

いことを示し、このことを矮性種の植物においても根が正常に伸びられることの理由とした。また、鎌田ら(筑波大)はRiプラスミドで誘導された毛状根の組織では内生GAが根の伸長に重要であるとともに、アルカロイド生産に関する特定の酵素の合成を促進することも明らかにした。一方、GAのメチルエステルにはある種のシダ植物の造精器を誘導する作用があることが知られていた。しかしながら、内生の造精器誘導物質は既知ジベレリンとは異なる物質であり、しかもその含量は超微量であった。Mander(オーストラリア国立大)と山根(東大)は質量分析と化学合成によって、フサシダ科の造精器誘導物質として数種の物質の構造を明らかにした。それらの構造はGAときわめて共通性の高いものであった。竹能(東北大)はこれら物質による造精器および造卵器形成の仕組みを明らかにした。

#### 植物生長調節剤としてのGAならびに 生育抑制剤

GAの産業への応用に関して際だっているのはタネなしブドウ生産への利用である。本シンポジウムにおいても応用に関する新しい研究が発表された。Bukovac(ミシガン州立大)はサワーチェリー増産のためのGA処理方法について、Kuo(台湾 アジア野菜研究開発センター)は熱帯圏における高温、乾燥、増水等のストレスをGA処理により緩和することによる増産への可能性について、桂ら(野菜・茶試)は花成の困難なサトイモ科植物はGA処理により花が咲くことを明らかにし、GAはサトイモ科の育種に利用できる可能性を示した。一方、GAの作用を利用するのではなく、その生合成を抑制することによって増産効果を出すことができる。すなわち、生育抑制剤といわれるものである。Radema-

cher(西独 BASF)はGA生合成の三つの段階(上述)に対応する3種の阻害剤(生育抑制剤)の構造と作用機構を概括した。また応用例として生育抑制に伴う倒伏防止、果実の収穫能率の向上、観賞用植物の整姿、芝生の刈り取り回数の減少などについて解説した。中山(クマイ化学)は新型の生育抑制剤として開発されたシクロヘキサンカルボン酸(またはシクロヘキサントリオン)系の作用機作は2-オキソグルタレート要求性の可溶性GA酸化酵素の阻害にもとづくものであることを示した。一方、三木(中外製薬)はイネの倒伏防止剤として利用されているイナベンフィド(4-ピリジン系)の作用は他のアゾール系阻害剤と同じく、*ent*-カウレン酸化酵素の阻害にもとづくことを示した。泉と大塩(住友化学)はウニコナゾール(トリアゾール系)はイネに対してGAの生合成阻害のほか、サイトカニンおよびエチレンの合成促進をおこすことを明らかにした。これらの作用はウニコナゾールが示す生育抑制、花成促進、緑葉化などの様々な現象と関連を有するものと推測された。横田(東大)はウニコナゾールはGAばかりでなくブラシノステロイドやステロールの生合成をも抑えることを明らかにする一方、これらの合成抑制作用のみでは生育阻害作用を説明できず、他の未知の要因が働いていることを示唆した。

以上、本シンポジウムで講演された、GAの生理学・生化学から応用的な面にいたるまで要約した。GAに関する研究はようやく酵素学的レベルまで及び、また分子生物学に基づくさらに深い理解へと進みつつあると言えよう。将来への発展が大いに期待される分野である。

なお、本シンポジウムの内容はSpringer-Verlagより出版される予定である。



## 特別情報

「農林水産分野等における組換え体の利用  
のための指針」について

農林水産省バイオテクノロジー課

伊藤 洋

## 1. はじめに

近年のバイオテクノロジーの研究開発の進展には目覚ましいものがある。なかでも生命現象の基礎となる遺伝情報を司る DNA を操作する“組換え DNA 技術”については、この技術の基本的手法が確立された1973年から15年余りの間に、急速に各種の産業分野に浸透してきている。

最近における組換え DNA 技術の利用の動向をみると、既に微生物や培養細胞を用いた物質生産については、実用化の段階に到達しており、先行している医薬品分野では大腸菌などの微生物や動物細胞を用いてヒト成長ホルモン、インシュリン、インターフェロンなどの医薬品の生産が行われており、化学工業分野でも微生物を用いて各種の酵素やアミノ酸などの商業生産が開始されている。

一方、農林水産業及び食品産業の分野においても、米国では豚のオーエスキー病生ワク

チンや組換え枯草菌で生産されたでんぷん分解酵素 $\alpha$ -アミラーゼが販売されており、オランダではチーズ製造用凝乳酵素キモシンの商業生産が開始されている。日本でも枯草菌や酵母を用いた飼料アミノ酸などが実用化されてきている。

遺伝的メカニズムの複雑な高等動植物に新たな形質を導入する個体レベルの組換え体の研究開発も急速に進展してきており、植物については、タバコ、トマト、ジャガイモなどのナス科植物のほか、重要農作物としてのイネ、トウモロコシ、大豆などでも病虫害耐性、除草剤耐性などの形質導入が行われている。さらに、最近ではアンチセンス RNA の手法を用いてトマトの貯蔵性の向上やペチュニアの花色操作なども行われている。これに伴い育種上有用な特性を持った組換え植物が相次いで作出されてきており、米国を中心とした先進諸国では、既に50件を超える組換え植物の野外試験が実施されている(表1)。

このように組換え DNA 技術については、農林水産業や食品産業の分野においても、急速に研究開発と実用化が進みつつあるが、他方、これにより新たな形質を導入された生物(組換え体)に関しては、人体や生態系への影響に十分留意しながら秩序ある利用を図っていく必要がある。

農林水産省においては、組換え体の利用に係る内外の状況等を踏まえ、農林水産業、食品産業その他の農林水産省の所管する産業分野(農林水産分野等)における適切な利用を通じて、農林水産分野等の健全な発展に資するため、先般、「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」を制定したところである。以下指針制定の経緯及び指針の内

表1 諸外国における組換え体の野外利用試験の実施状況  
(1988年11月現在)

国名	種類	1986	1987	1988	計
米 国	植 物	3	13	17	33
	微生物	1	6	22	29
ベ ル ギ ー	植 物	1	1	4	6
	微生物		1		1
フ ラ ン ス	植 物		3	4	7
	微生物		1		1
イ ギ リ ス	植 物		1	2	3
	微生物	1	2		3
オ ラ ン ダ	植 物			2	2
	微生物			1	1
ス ペ イ ン	植 物			2	2
ニュージーランド	植 物			1	1
アイルランド	微生物			1	1
オーストラリア	微生物		1		1
イ タ リ ア	微生物			1	1
計	植 物	4	18	32	54
	微生物	2	11	25	38

容について説明を加えたい。

## 2. 指針制定の背景及び経緯

1970年代後半以降、組換え DNA 技術を安全に利用するためのガイドラインづくりが世界各国で進められてきている。当初は、実験を対象にしたものであったが、研究開発の進展や知見の増大により産業利用指針の策定や農業・環境利用に関する検討が行われてきている。

### (1) 研究ガイドライン

1973年のコーエン・ボイヤーの組換え実験の成功によって組換え DNA 技術が手法的に確立されたわけであるが、これと同時に一方では組換え DNA 実験のリスクについての指摘がなされ、これを契機に組換え DNA 実験に関する安全性の確保を図るべきだとする社会的風潮が強まった。これに対応し、1976年に米国 NIH (国立衛生試験所) が「組換え DNA 分子に関する研究のための指針」を策定した。これは、微生物の外部への漏出を抑制する構造と機能を持った実験室で行う「物理的封じ込め」と、特殊な培養条件以外では生存が困難とするような「生物学的封じ込め」という二つの手段を併用した安全性の確保を内容としたものである。その後、1976年～78年にかけて、英国、フランス、西ドイツ等の先進国においても、NIH のガイドラインにならって、同様の内容のガイドラインが策定されている。

また、我が国においても、NIH のガイドラインを踏まえ、組換え DNA 実験の安全確保に必要な基本的要件を示すことを目的として、文部省が1979年3月に大学や大学付属研究機関等を対象とした「大学等の研究機関等における組換え DNA 実験指針」を、また、同年8月には科学技術庁が国公立試験研究機関及び民間企業を対象とした「組換え DNA 実験指針」を策定している。

これらの指針は、その後の知見の集積等によって物理的封じ込めの基準緩和が図られてきているほか、DNA 供与生物の範囲の拡大等の改訂が図られてきている。

### (2) 産業利用段階のガイドライン

1980年代に入ると、組換え DNA の産業利用が、インターフェロンやインシュリンなどの医薬品分野によって進んできたことや、組換え体の特性もある程度明らかにされてきたことから、組換え体の産業利用のあり方について検討する必要性が生じてきた。このような状況に対応し、OECD 科学技術政策委員会が83年から3か年にわたって本格的に検討を行い、その結果を踏まえて86年7月に勧告を行った。

この勧告の内容は、大規模工業利用（いわゆるタンク培養）と農業・環境利用（開放系利用）とに大きく分けられ、大規模工業利用については、組換え体の安全度レベルに応じて GILSP (優良工業製造規範)、カテゴリー 1～3 の4段階の基準に分類して、それぞれ一定の封じ込め条件下での利用を行うこと、農業・環境利用については、ケース・バイ・ケース (個別案件ごとの審査) 及びステップ・バイ・ステップ (実験室から温室、小規模野外試験、さらに大規模野外試験と段階的に開放系に移行) の原則をもとに利用を行うことと、それぞれ考え方が示されている。

### (3) 各国の産業利用ガイドラインの策定状況

このような OECD の動きに合わせて、86年以降、欧米の主要国では産業利用を意識したガイドライン等の策定作業が進められ、関係省庁における組換え体の利用のための審査体制も整備されてきている。

組換え DNA 技術の先進国である米国では、組換え体を利用して作出された医薬品、食品、農業資材などの製品の規制の一環として、ガイドライン等の策定が進められてきている。連邦政府各省庁の所掌については、これを明確にするため、大統領府科学技術政策局 (OSTP) の調整フレームワークが1986年6月に策定されている。これによれば、組換え体のうち、植物及び動物は農務省 (USDA)、微生物を利用する場合、農薬、肥料などは環境保護庁 (EPA)、動物用ワクチンは農務省、食品及び医薬品は食品医薬品局 (FDA) が、それぞれ主として所掌することとされている。

また、このフレームワークの中で各省庁はガイドラインや既存の法律を根拠とする組換え体の取扱いに関する基準、さらには審査のための体制等を定めている。

一方、西欧諸国においては、1986～87年にかけて組換え体の大規模工業利用に関し、英国、西ドイツなど、多くの国でOECDの勧告に沿ったガイドラインを策定しているが、組換え体の農業・環境利用については各国の対応は大きく四つに分けられる。

まず、英国、オランダ、アイルランド及びスイスでは、ガイドラインが策定され、これに基づき組換え体の審査を行っている。次に、フランス、ベルギー及びスペインでは、ガイドラインは策定されていないが、OECDの勧告を直接受けた形で審査委員会が組織され、組換え体の審査が行われている。さらに、デンマークでは遺伝子工学法が制定されており、これに基づき野外試験が許可制とされており、西ドイツでもこれに追随する動きがある。また、イタリア、ギリシャでは野外試験等に対するガイドラインや審査体制が未だに整備されていない。

このように各国の対応がまちまちであることから、今後、1992年のEC市場統合に向けて、欧州各国での規制等の統一を図るため、OECD勧告及び英国等のガイドラインを参考にしつつ、EC閣僚理事会指令の策定作業が進められている。また、OECDにおいても、勧告のフォローアップ作業の一環として、各国の野外試験の評価手法の統一を図るため、GDP(優良開発規範)という概念が提案・検討されており、近々その成案が公表される予定である。

#### (4) 我が国における産業利用指針の策定状況

我が国でも、既に工業的な利用(タンク培養等)については、1986年に通商産業省及び厚生省が、それぞれの所管分野を対象とした「組換えDNA工業化指針」及び「組換えDNA技術応用医薬品等の製造のための指針」を制定し、これに基づいて工場内で一定のルールの下に組換え体を利用した化学製品や医薬品の生産が行われている。

農林水産省においても、OECDの勧告の内容を踏まえ、1986年12月に農林水産分野での組換え体の利用のための指針案を公表し、各方面の意見を聴取しつつ、その成案化のための検討を進めてきた。今回の「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」は、上記のような状況を踏まえ、工業的な組換え体の利用のみならず、組換え植物等を開放系で利用する場合も対象として制定されたもので、平成元年4月20日付けの農林水産事務次官依命通達として関係業界団体や都道府県にあてて通達されたところである。

### 3. 指針の概要

#### (1) 指針の目的

本指針は、農林水産業、食品産業その他の農林水産省の所管する産業分野(以下「農林水産分野等」という)において、組換えDNA技術により新たな形質を導入された組換え体を適切に利用するために必要な基本的要件を示し、組換え体の利用に係る安全確保を図り、もって農林水産分野等の健全な発展に資することを目的とする。

#### (2) 安全性評価の原則等

農林水産分野等において組換え体を利用しようとする者(事業者)は、当該組換え体について、有害な形質の有無などの安全性評価を行い、組換え体の種類及び利用形態並びに安全性の程度に応じた利用区分により組換え体を利用するものとする。

この場合、事業者の属する産業分野の範囲には、農林水産業、食品産業のほか、農薬、肥料、飼料、飼料添加物、動物用医薬品、食品用酵素などの農林水産省が所管する関連資材の生産に関わる産業分野を含んでいる(図1)。

#### ア 組換え植物

指針でいう組換え植物とは、宿主として植物(子実体を形成する菌類、すなわちキノコ類以外の菌類及び微小藻類を除く)の細胞を用いた組換え体(タンク培養等により個体への分化を伴わない状態で利用されるものは除く)をいい、次により利用を行う。

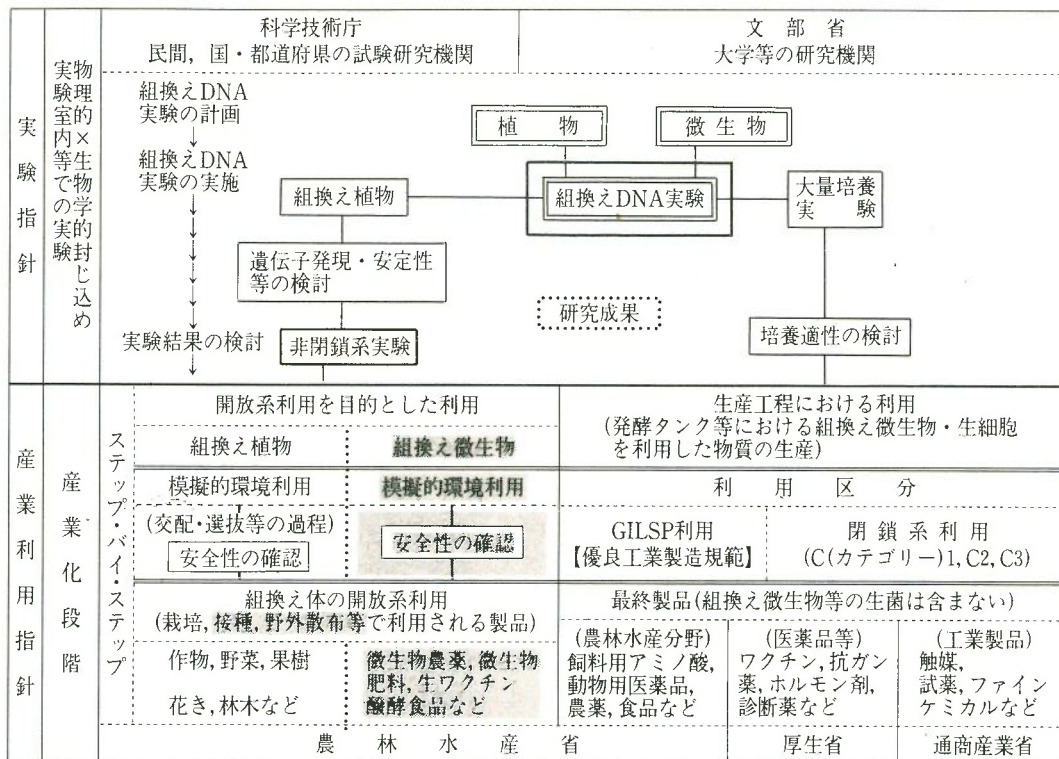


図1 農林水産省の指針と他省庁の指針との関係

① 模擬的環境利用

育種に必要な素材を確保するための組換え体を増殖させる場合、非閉鎖系実験(88年12月に科学技術庁が実験指針の補足として考え方を公表した実験室以外の温室、網室等における小規模な栽培実験)の結果等を踏まえ、一定の画された区画において模擬的環境利用を行い、開放系利用のための安全性の確認を行う。

この場合、組換え植物の特性及び開放系における利用形態並びに周辺の生物を考慮し、必要と考えられる隔離は場等を設けて、一定の作業区域で栽培を行うものとする。

② 開放系利用

模擬的環境利用により、安全性が確認されたものについては開放系利用を行うことができる。

イ 組換え微生物

指針でいう組換え微生物とは、キノコ以外の菌類及び微小藻類を含む微生物の組換え体であり、次により利用を行う。なお、動植物細胞を宿主とする組換え体で個体への分化を伴わない状態で利用されるものについては、組換え微生物として取り扱うこととしている。

① 生産工程における利用

人に対する病原性がなく、宿主となる生物は長期にわたって安全に産業利用が行われているなど極めて安全であると認められるものについては、GILSP(優良工業製造規範)利用として最小限の封じ込め条件下で利用できるものとしている。また、その他のものについては、安全性の程度に応じ、カテゴリー1~3利用として、それぞれ一定の封じ込め条件下で利用する。

② 開放系利用を目的とするものの利用

生産工程でGILSP利用またはカテゴリー1利用に分類される組換え微生物について、模擬的環境利用において管理しながら段階的に開放系利用に移行するなど基本的な利用の枠組みのみを示し、事業者は、安全性に関する十分な知見の集積に努めるものとしている。これは、開放系利用における利用を目的とする組換え微生物の利用形態が、①農薬、肥料等野外への散布、②動物用生ワクチン、弱毒ウイルス等動植物個体への接種、③発酵食品等多様であり、個々の利用形態に応じた具体的な安全性評価のあり方をさらに検討することが必要であることによる。

## (3) 設備・装置その他組換え体の管理

組換え体の利用に当たっては、組換え体の種類、利用区分等に応じ、必要な設備・装置を設置するとともに、組換え体の栽培または培養、廃棄物の処理、保管等につき一定の作業要領に従う。また、事業者は、業務管理者等を任命するとともに、必要な調査審議を行う業務安全委員会を設置するなど管理体制を整備することとしている。

## (4) 農林水産大臣の確認

事業者は、組換え体を利用するに当たって、安全性評価、設備・装置等がこの指針に適合していることの確認を農林水産大臣に求めることができる。なお、この確認に当たっては、農林水産技術会議に設ける組換え体利用専門委員会（動物用医薬品にあっては、中央薬事審議会のバイオテクノロジー特別部会）において必要な調査審議を行うこととしている。

## (5) その他

指針の第6章でその他として、当面の指針の運営上の事項等について以下のように規定している。

ア 前述のとおり開放系における利用を目的とする微生物については、事業者は、その安全性に関する十分な知見の集積に努めるものとする。

イ 組換え動物については、当分の間、一定の管理された環境で飼育管理を行うものとし、組換え体の安全性評価につき事業者から農林水産大臣に確認の申請があれば、個別事例毎に確認を行うこととしている。これは、

現在の組換え動物の研究開発の対象が昆虫から魚介類、大型家畜まで生物学的にも多種多様であり、利用形態も多岐にわたることなどから、詳細については今後の検討を待つこととし、具体的な規定を設けなかったものである。

ウ 組換えDNAを含むウイルス、ウイロイドなどの非細胞生物であって、ワクチンや弱毒ウイルスのように動植物個体へ直接の接種を目的とするものについては、当分の間、組換え微生物に関する規定を準用する。この場合、接種を受けた動植物個体は組換え体には含まれないものとする。

エ セルフクローニングに由来する生細胞または生物などについても、組換え体の安全性評価を行ううえでの知見として重要であることから、当分の間、組換え体として取り扱うものとする。

## 4. おわりに

以上指針の概要について、解説を加えてきたが、紙面の制約から詳細な説明は省かせていただいた。疑問の点や具体的な産業利用の案件があれば、当バイオテクノロジー課あて直接照会いただければ幸いである。今後、この指針の適切な運用が、他のバイオテクノロジー振興施策の推進と相まって、農林水産業、食品産業及び関連産業におけるバイオテクノロジー利用推進の一助となれば幸いである。

## 編集後記

本誌でも、最近ワープロ原稿による投稿が増えてきました。読みやすく、初稿ゲラ刷りのミスも少なくなり喜んでます。しかし、ワープロ原稿になって却って増える印刷ミスもあります。例えば同音漢字の打ち違い、行のダブリやヌケです。前者はワープロミスで

ときどき吹き出すような面白いミスがあります。後者は字間、行間の詰った原稿の場合多く、校正でもミスを発見しにくいものです。20字×20行でほどよい字間と行間をとった原稿は、視力の衰えた老編集子には、このほかありがたく感じられます。(大畑)

ブレイン テクノニュース (第16号)

---

平成元年11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

© Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 1989