

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

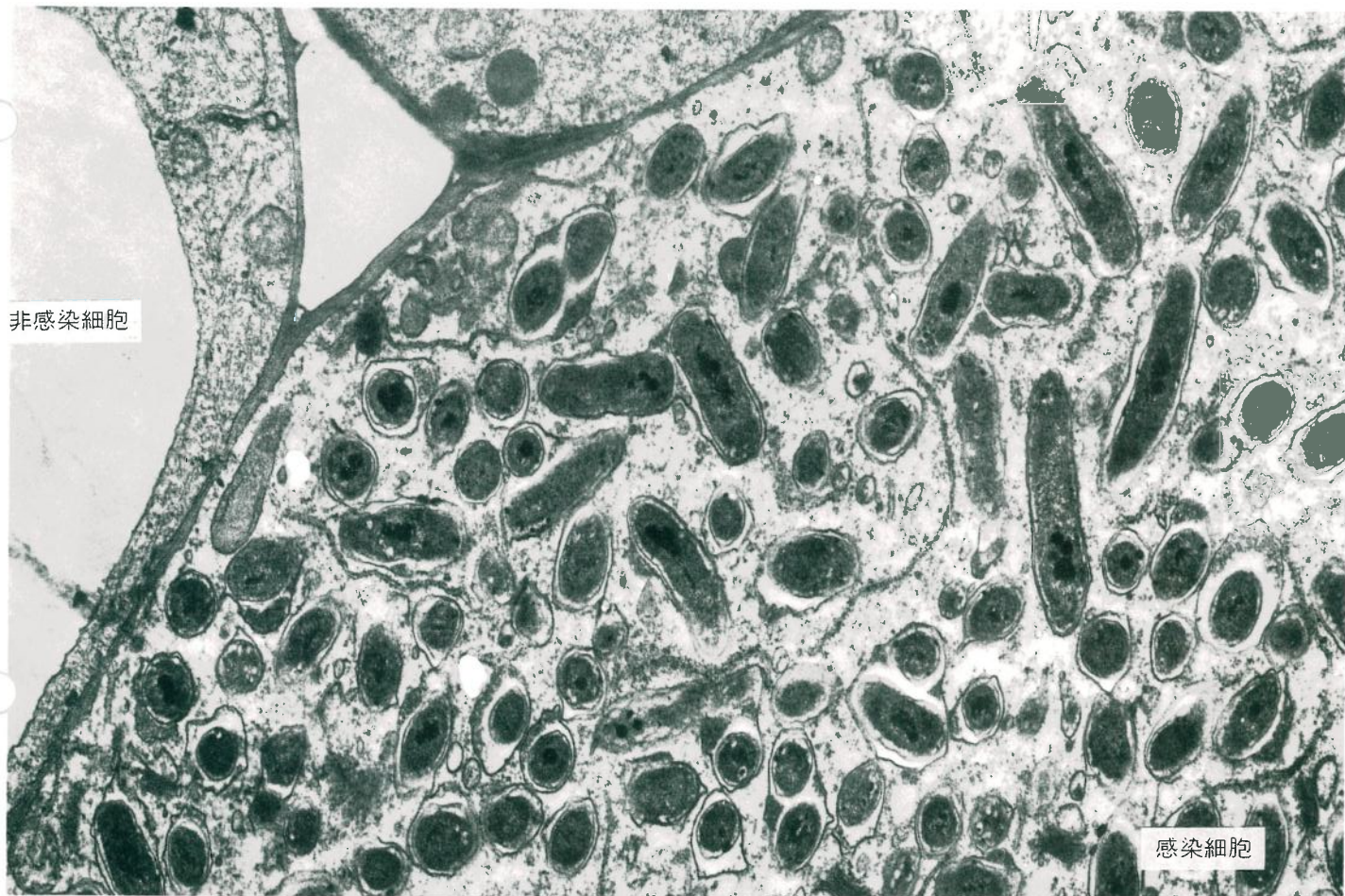
TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 22 号

NOVEMBER 15, 1990



表紙説明

播種後14日目のダイズの若い根粒の
電子顕微鏡写真

根粒の形成は播種(根粒菌接種)後4~5日目に
始まり、12~13日目に窒素固定活性が発現する

(写真提供 河内 宏氏)

本号の紙面

- 国内情報..... 1
超根粒着生ダイズ、窒素固定菌の遺伝子
改造、合成リボザイムの利用、たんぱく
質の一次構造中の機能性ペプチド、レー
ザー光による細胞融合
- 文献情報..... 17
植物によって生産された抗体、組織培養
による竹の開花・結実誘導、昆虫ウイル
スRNAの植物体内での合成、チョウと
アリの共生関係、エンドウにおける性発
生の発現予知、プラスミノーゲン活性化
因子インヒビター遺伝子導入マウスの静
脈閉鎖、酵母における染色体工学
- 国際学会レポート..... 26
第8回窒素固定国際会議
第7回国際植物組織培養学会

口 絵

国内情報

赤尾勝一郎

超根粒着生突然変異体ダイズの選抜とその特性…………… 1

魚住武司

窒素固定菌の遺伝子の改造…………… 3

多比良和誠

合成リボザイムの利用…………… 6

河村幸雄

たんぱく質の一次構造中の生理機能性ペプチド配列

——食品たんぱく質で生体機能調節は可能か——…………… 11

佐藤俊一・稲場文男

レーザー光による細胞融合…………… 14

文献情報

植物によって生産された抗体…………… 17

組織培養による竹の開花・結実の誘導…………… 18

昆虫ウイルスゲノムRNAの植物体内における感染性ウイルス粒子の合成…………… 19

チョウの幼虫とアリの共生関係を増強する振動コミュニケーション…………… 20

エンドウにおける性発生は

アラビノガラクトサン・たんぱく質の形質発現により予知される…………… 21

プラスミノーゲン活性化因子インヒビター1遺伝子を導入した

トランスジェニックマウスにおける静脈閉鎖の発生…………… 23

Saccharomyces cerevisiae における

プラスミドの部位特異的組換え系を用いた染色体工学…………… 24

国際学会レポート

河内 宏

第8回窒素固定国際会議に参加して…………… 26

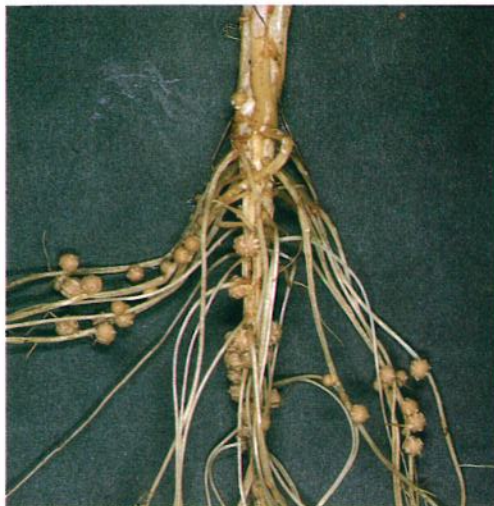
大野清春

第7回国際植物組織培養学会に参加して…………… 28

超根粒着生突然変異ダイズの選抜とその特性



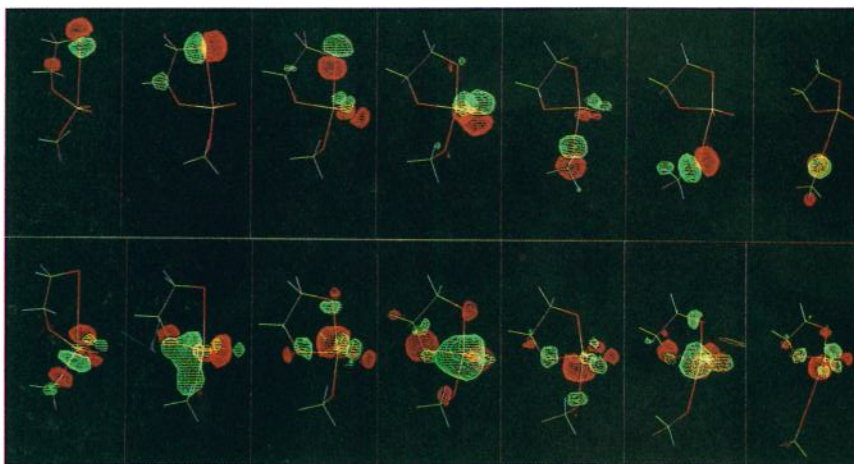
超根粒着生変異体 En6500



原品種 エンレイ

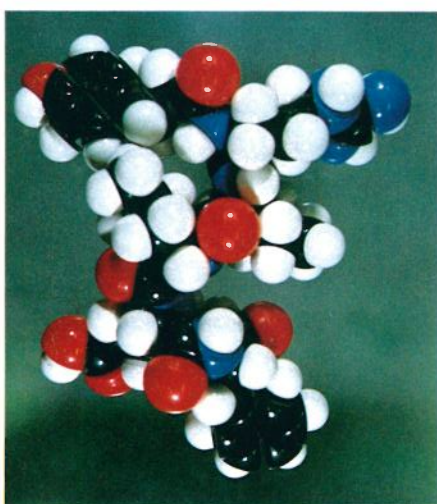
超根粒着生突然変異体En6500による根粒着生(根粒菌接種後25日目)

合成リボザイムの利用



コンピューターグラフィックスで描いたRNA切断部位のフロンティア軌道の変化

上段は HOMO (最高被占軌道) の変化, 下段は LUMO (最低空軌道) の変化。左から右へ反応は進み, まず2' 酸素がりんを攻撃し, 最終的には5' 酸素がりん原子からはずれて切断反応が完結する。



たんぱく質の一次構造中の機能性ペプチド配列

ダイズのACE阻害ペプチドの分子模型

- 黒：炭素原子
- 白：水素原子
- 青：酸素原子
- 赤：窒素原子

国内情報

超根粒着生突然変異ダイズの選抜とその特性

農林水産省 農業生物資源研究所 窒素固定研究室

赤尾勝一郎

はじめに

マメ科植物と根粒菌による共生窒素固定は植物・共生微生物双方の多くの遺伝子が関与する複雑な現象であるが、菌側の根粒形成遺伝子の目ざましい進展に比べ、宿主（植物）側の研究は立ち遅れている。宿主側の研究を進展させるためには、根粒形成に関与した様々な宿主側の変異体を確保することが重要と考え、ダイズの栽培品種「エンレイ」を、突然変異誘発剤エチルメタンスルフォネイト（EMS）で処理し、根粒形成に関与した変異形質を現す個体の選抜を試みた。処理した約10,000粒の後代（M₂）の中から通常に比べてはるかに多量の根粒を着生する超根粒着生変異体を1個体（En 6500）得ることに成功したので、その選抜方法と得られた変異体の特性を紹介する。

1. 選抜方法

原品種にはダイズの栽培品種「エンレイ」、突然変異誘発剤にはエチルメタンスルフォネイト（EMS）を用いた。種子のEMS処理には0.5%の水溶液を用い、これに4時間浸漬した。処理を終えた種子は、水洗いしたのち播種し温室で栽培し、M₁種子を確保した。EMSで処理した種子は約10,000粒、得られたM₁種子は約7000粒であった。M₁種子の半数は温室で、残りは圃場で栽培し、莢が黄化し始めた個体から順次掘り起こして根粒の着生状態を調べ、根粒数の多いもの、中間のもの、非着生のもの等の変異体（M₂）を選抜した。この変異体の中に極めて多量の根粒

の着生するものが1個体（超根粒着生変異体 En 6500）のみ見いだされた。

2. 超根粒着生変異体

この変異体は1984年、オーストラリア国立大学のグループによってダイズ品種“Bragg”から初めて分離され、一昨年、アメリカでも同じくダイズ品種“Williams”から分離されている。わが国においても独自にこの種の変異体を分離し、互いに材料を交換して研究を進展させることが必要である。現実には、上述の理由の他に、ダイズの品種は一般に適応地域が狭く、例えばオーストラリアで用いられた品種Braggはわが国での栽培に適していないことと、既に分離された変異体を使用する際には種々の制約があり、とくに農業生産場面への応用は困難であることが予想されるので、独自に分離することが必要であった。

3. 変異体 En6500の根粒着生

播種床には滅菌したパーミキュライトを用い、播種時に種子当り1mlの混合菌体液を接種した。播種後4日目に幼植物を水耕ポットに移し、無窒素で栽培し²⁾、根粒の着生数を経時的に調査した。根粒着生数の経時的推移を図1、根粒菌接種後25日目における根粒着生の状態を口絵に示した。根粒数の調査は根粒菌接種後7日目から25日目まで行ったが、7日目の時点では肉眼的観察は困難であり、ルーペを用いて実施した。根粒数は12日目まで急速に増加するが、その後は緩やかな増加を示した。変異体 En 6500 に着生した根粒数はいずれの時点においても原品種に比べ

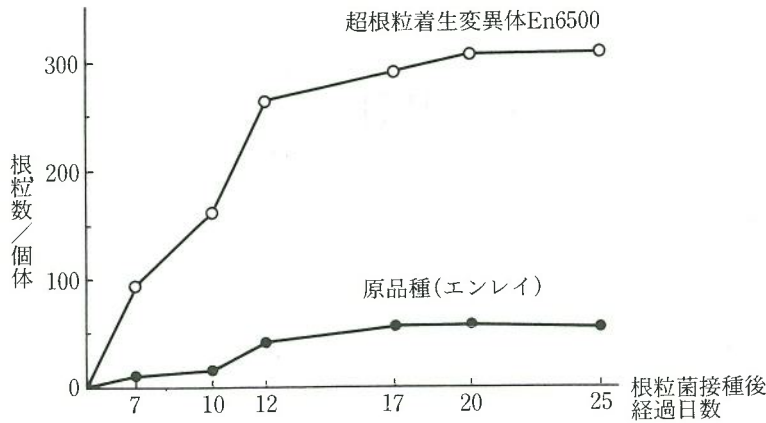


図1 原品種エンレイと超根粒着生変異体En6500における根粒着生数の推移

て極めて多く、7日では原品種の9倍、25日目では6倍という極めて大きな違いを示した。また、口絵から明らかなように、変異体 En 6500における根粒の着生部位には特徴があり、主根にとりわけ多く着生する傾向が認められた。

4. 根粒形成の無機態窒素による抑制

接種菌株は A 1017 と IRj 2101 の 2 菌株で、根粒着生数の調査に用いた菌密度よりも一桁高い 10^8 cells/ml の混合菌体液を用い、この菌体液に播種後 8 日目の幼植物の根を 1 時間浸漬する接種法を用いた。根粒菌接種後直ちに窒素濃度 ($\text{NO}_3\text{-N} : \text{NH}_4\text{-N} = 2 : 1$) 0 mM, 1.2mM, 6mM の 3 段階の培養液を満たした水耕ポットに移して栽培した。

根粒着生数、根粒重あるいは根粒による窒

素固定能（アセチレン還元法）の窒素による影響を原品種との比較において調査した結果を表 1 に示した。原品種エンレイは培養液中の窒素濃度が 1.2 mM ですすでに根粒着生は著しく抑制され、根粒重も僅か 0.6mg となり、窒素固定能も検出限界以下となった。一方、変異体 En6500では、6mM (84ppm) の高濃度の窒素存在下においても無窒素の約 4 割に低下するにとどまり、この着生数は原品種の無窒素の 2 倍に匹敵した (表 1)。このように今回選抜した変異体 En 6500 には無機態窒素に対する強い耐性の備わっていることが明らかとなった。

5. 根粒形成機構の解析

超根粒着生変異体は根粒の形成を制御する遺伝子を欠失していると推定されている。私たちは今回紹介した変異体 En 6500 の他に、根粒非着生のもの、主根にのみ根粒の着生するもの、無効根粒の着生するものなどの変異体の選抜を進めており、変異体 En 6500 は、これらの変異体とともに、根粒菌の感染から窒素固定能の発現に至る共生成立機構、とくにその初期過程を解明するための貴重な素材である。

6. 農業生産場面への応用

ダイズは子実生産に多量の窒素を必要とするので、高収量を得る目的で多量の窒素を施肥しても、施肥窒素のために固定窒素の供給が低下し、もっぱら栄養生長が促進され、過繁茂あるいは徒長による倒伏を招き、収量低下の原因となる。ダイズ栽培には、施肥窒素による栄養体の生長は収量を高めるために不可欠であるが、同時に窒素固定を高いレベルに維持することが大変重要である。こうした背景のもとに、1980年の第4回国際窒素固定シンポジウムで窒素肥料施用下でも窒素固定能力が抑制されないマメ科作物の作出の重要性が指摘された³⁾。今回得られた超根粒着生変異体 En 6500 には施肥窒素の共存下においても、なお相当数の根粒を着生するという特

表1 原品種「エンレイ」と超根粒着生変異体「En6500」の根粒着生量、アセチレン還元活性および生育に及ぼす無機態窒素の影響

		根粒数 No./plant	根粒乾物重 mg/plant	アセチレン還元活性 $\mu\text{M/plant/h}$ $\mu\text{M/g/h}$		個体乾物重 g/plant
0mM	エンレイ	104	105	4.9	46.0	1.3
	En6500	591	179	5.6	31.4	0.8
1.2mM	エンレイ	3	0.6	ND	ND	5.6
	En6500	406	212	4.0	23.1	1.8
6mM	エンレイ	0.7	0.1	ND	ND	7.1
	En6500	218	84	1.2	11.4	2.3
LSD(0.05)		132	94	2.6	16.4	1.4

性を持ち、この形質は農業生産上極めて有用と考えられる。

おわりに

今回得られた超根粒着生変異体 En 6500 の特性の詳細はこれからの問題である。変異体 En 6500 には、植物体の生長および根粒の窒素固定能の比活性（根粒 1 g 当りの活性）が、原品種よりも低い（表 1）などの解決すべき点も残されており、変異体 En 6500 は私たちに夢を与えてくれると同時に、これからは正念場だとした激励しているようでもある。

いずれにしても、従来の化学肥料、農薬多投型の農業が環境汚染、省資源、農地の持続性などの面で曲がり角にきており、生物の機能を有効に活用して自然生態系調和型農業を推進していくための貴重な素材になるものと考えている。

文 献

- 1) 蒲生卓磨 (1989) 農及園 64: 663-668
- 2) 赤尾勝一郎・河内 宏(1989) 土肥誌 60: 53-55
- 3) 米山忠克ら (1984) 農及園 59: 1333-1338

国内情報

窒素固定菌の遺伝子の改造

東京大学農学部

魚住 武司

1. はじめに

マメ科の作物に共生する根粒菌が空中窒素を固定して窒素肥料を節約する効果は古くから知られており、その固定量は地球上で年間約8000万トンと推定されている¹⁾。これは工業的に Haber-Bosch 法で固定される量とほぼ同じである。一方、最近イネ、コムギなどの非マメ科植物の根圏にも、*Azospirillum lipoferum* などの窒素固定菌が生息し、窒素固定を行なっていることが注目されている²⁾。その固定量はマメ科に比べて十分の一程度であるが、これを改良強化することができれば、世界的な農産物の増産と省エネルギーに役立つと考えられる。

日本でもイネ根圏における窒素固定能が、イネの品種によって著しく異なることが示され³⁾、窒素固定能の特に強いイネの根圏から微好気的な *Azospirillum* の他に、通性嫌気性の窒素固定菌 *Klebsiella oxytoca* NG13が

Oyaizu らによって単離同定された⁴⁾。本菌株は無菌的に栽培したイネに接種すると有意な窒素固定能を示すことが報告されている⁵⁾。

筆者らは *K. oxytoca* NG13 の窒素固定遺伝子群をクローン化し、その構造と機能を解析するとともに、その染色体上の窒素固定能発現調節遺伝子を計画的に改変することによって窒素固定能を強化することができたので以下に紹介したい⁶⁾。

2. 窒素固定酵素とその遺伝子

各種の窒素固定菌の菌体内で空中窒素(N_2)を固定する酵素(ニトロゲナーゼ)は、菌種間で性質が類似しており、分子量5~6万の2種のサブユニット(α と β)各2個からなり、分子量は約22万であって、MoとFeを含む補因子(cofactor)を持っている。本酵素の触媒作用によって N_2 を固定して2分子の NH_3 とするためには、約8個の電子(還元力)と約16個のATPが必要である。ニト

ロゲナーゼに電子を与えるのは、分子量約3万の同一のサブユニット2個からなるニトロゲナーゼレダクターゼであり、両者は複合体を作って窒素固定を行なう。

すべての窒素固定菌のなかでその窒素固定遺伝子が最もよく解析されているのは *Klebsiella pneumoniae* M5al である。本菌は、1950年代にブタンジオールの発酵生産菌として知られていたものであるが、1972年に R. A. Dixon らが、その窒素固定能が大腸菌へ接合伝達し得ることを発見し、その後クローン化によって、その窒素固定 (*nif*) 遺伝子群の構造と機能が解析されてきた (図1)^{7,8)}。

K. pneumoniae の *nif* 遺伝子群は、そのすべてが染色体上の一個所に存在し、20個の遺伝子からなっており、その全長は約24kbであり、7~8個のオペロンに分かれている。*nifD* と *nifK* からはニトロゲナーゼの2種のサブユニットが、*nifH* からはニトロゲナーゼレダクターゼが合成される。電子伝達系と FeMo 補因子の生成に関与する各種遺伝子も窒素固定能の発現に必要である。

nifLA オペロンは、他のすべての *nif* オペロンの発現の制御に関与しており、*nifA* 産物は活性化因子として働くが、NH₃ などの固定された窒素源の存在下では *nifL* 産物が抑

制因子として働く。*nif* プロモーターは、-24領域に CTGGCAC, -12領域に TTGCA のコンセンサス配列をもっており、大腸菌などの普通のプロモーターとは全く異なっている。*nifL* 産物の作用機構は不明があるが、なんらかの方法で *nifA* 産物の活性を抑制すると考えられている。

一方、*nifLA* オペロン自体は、さらに高次の窒素代謝制御系である *ntrBC* 遺伝子によって制御されている⁹⁾。固定された窒素源 (アンモニアなど) の欠乏下では *ntrB* 産物が *ntrC* 産物をりん酸化し、りん酸化された *nifC* 産物は *nifLA* オペロンのほか、ヒスチジン、アルギニンなどの吸収資化のための遺伝子やグルタミンシンセターゼ遺伝子の転写を活性化するなど、窒素同化系全体が誘導される。

窒素源がある程度欠乏して *nifLA* オペロンが発現しても、利用可能な窒素源が培地中にわずか1mMでも存在すると、*nifL* 産物が他の *nif* 遺伝子群の発現を抑制する。このように、空中窒素固定の系は *ntrBC* と *nifLA* による2段階の制御を受けており、窒素源が全く欠乏したときに初めてニトロゲナーゼ系が働くようになっている。これは、窒素固定のための高いエネルギー要求を考えると実に

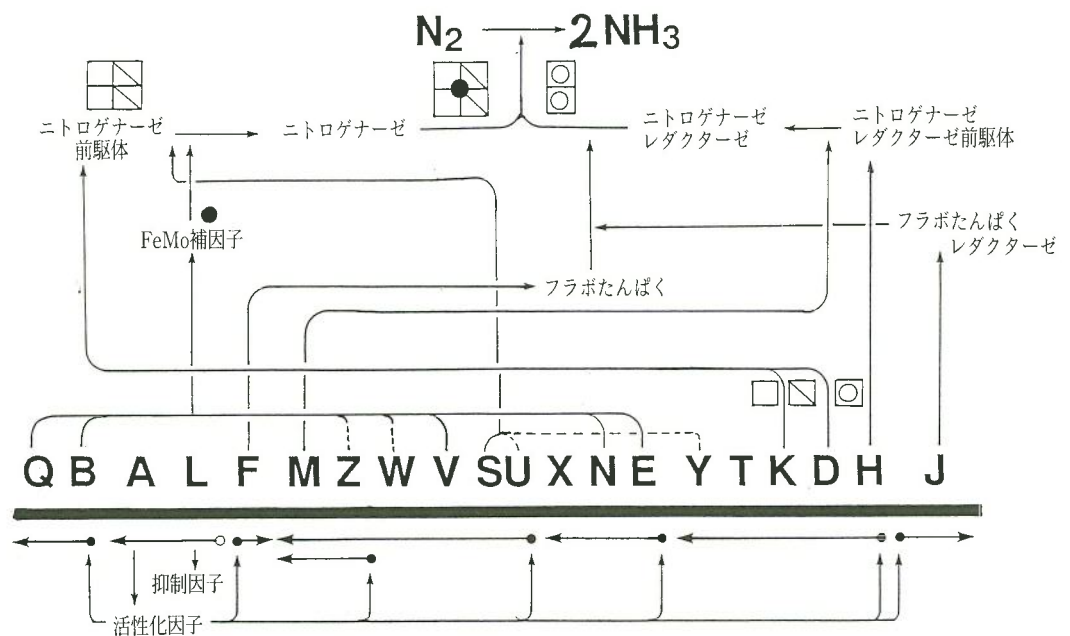


図1 *Klebsiella* の窒素固定遺伝子群の構造と機能^{7,8)}

合理的な調節である。したがって、窒素固定菌の窒素固定能を改良強化するためには、アンモニアによる抑制がかからない変異株をつくる必要がある。

3. *K. oxytoca* の *nif* 遺伝子群のクローン化

筆者らは、駒形らによって分離されたイネ根圏の窒素固定菌の遺伝子を解析するために、既知の *K. pneumoniae* M5a1 の *nif* 遺伝子 DNA をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行なったところ、NG13 株（のちに *K. oxytoca* と同定された⁴⁾）が M5a1 株と極めて相同性の高い *nif* 遺伝子群を持つことを発見した¹⁰⁾。つぎに NG13 株の全 *nif* 遺伝子群を含む 26kb の DNA 断片をクローン化し¹¹⁾、その *nifLA* オペロンの全塩基配列と *nifB*, *nurF* プロモーターの塩基配列を決定した¹²⁾。 *K. oxytoca* と *K. pneumoniae* の塩基配列のホモロジーは 96~98% であり、*nifA* 産物（524 アミノ酸）については、その N 末端側の半分に 6 アミノ酸の置換が認められたが、C 末端側は完全に一致していた。

4. *K. oxytoca* の窒素固定能の強化

イネ根圏で窒素肥料と併用したときに窒素固定能の発現が抑制されないような変異株を造成することを目的とし、クローン化した *nifLA* オペロンの窒素固定能抑制遺伝子 *nifL* の中央に *Tc^r* 遺伝子を挿入して *nifL* を失活させ、さらに *nifA* 遺伝子の上流に構成的な（常時発現する）合成プロモーターを付加して活性化遺伝子がアンモニアの存在下でも常に発現するプラスミド pNOY9Cm(*nifL*^{-A^c}) を作成した。このプラスミドで野生株 NG13 を形質転換したのち、*in vitro* の組み換えによってクロモゾーム上の *nifLA* オペロンを人工的な *nifL*^{-A^c} に置き換えた変異株 R16 を作成した。この変異株では、15mM のアンモニア存在下においても、ニトロゲナーゼ活性がアンモニア非存在下の 42% 程度発現した。さらに、*nifA* 遺伝子を構成的に発現する多

表 2 *K. oxytoca* の野生株(NG13)と改良株(R16)のニトロゲナーゼ活性⁶⁾

菌 株	遺伝子型 宿主/プラスミド	ニトロゲナーゼ活性*		
		-NH ₄	+NH ₄	+NH ₄ /-NH ₄ (%)
<i>K. oxytoca</i> NG13	<i>nif</i> ⁺	12,127	0	0
<i>K. oxytoca</i> R16	<i>nifL</i> -A ^c	11,828	4,923	42
<i>K. oxytoca</i> R16(pNOA102)	<i>nifL</i> -A ^c / <i>nifA</i> ^c	9,356	8,055	86

*アセチレン還元能 (n mol/20hr)

コピープラスミド pNOA102 を R16 株に導入すると、その窒素固定能はアンモニア存在下においても非存在下とほとんど同程度に発現し、ほぼ完全な脱抑制が達成された（表 1）⁶⁾。

密閉系の光チャンバー中で無菌的にポット栽培した 2 系統のイネに上記の改良菌株 R16 と R16 (pNOA102) を接種し、30~100 日間栽培してイネの乾燥重量と窒素含量を測定したところ、無接種のものに比べておよそ 5~20% の増加を示すデータが多かった。また、¹⁵N 硫酸の希釈実験によっても空中窒素の固定が証明された¹³⁾。

5. おわりに

イネ根圏の窒素固定菌 *K. oxytoca* NG13 の遺伝子の改良強化は、試験管内におけるアンモニアによる抑制の解除という点では十分に達成された。特に R16 株では染色体上の遺伝子が改造されており、プラスミドを持たないので遺伝子の脱落などの恐れがなく、性質が安定していて、実用の可能性が高いと考えられる。

本菌株はアンモニアの存在下でも常に窒素固定能を発現するので、そのためのエネルギー負担が大きく、野生株 NG13 に比べてその生育力はおよそ 90% 程度である。したがって自然環境中で野生株以上に無限に増殖する恐れは全くなく、むしろ自然消滅する運命にある。その点では環境問題に関する安全性は非常に高いと考えられる。実用的にはむしろ、接種した菌株が自然界でどれほどの期間存続

できるかが問題であるが、この点に関しては今後慎重に検討する必要がある。ある程度大規模な実験ができれば、窒素固定能の有効性に関しても安定したデータが得られ、実用性についての評価ができるであろう。

文 献

- 1) 中村道徳 (1980) 生物窒素固定, 学会出版センター, 東京 pp. 6, 102
- 2) Doebereiner, J. and F.O. Pedrosa (1987) *Nitrogen-fixing Bacteria in Nonleguminous Crop Plants*, Science Tech Publishers, Madison pp. 4
- 3) Sano, Y., T. Fujii, S. Iyama, Y. Hirota and K. Komagata (1981) *Crop Science* 21: 758-761
- 4) Oyaizu, M. and K. Komagata (1988) *J. Gen. Appl. Microbiol.* 34: 127-164
- 5) Fujii, T., Y.-D. Huang, A. Higashitani, Y. Nishimura, S. Iyama, Y. Hirota, T. Yoneyama and R. A. Dixon (1987) *Plant and Soil* 103: 221-226
- 6) Kim, Y.-M., M. Hidaka, H. Masaki, T. Beppu and T. Uozumi (1989) *J. Biotechnol.* 10: 293-302
- 7) Dixon, R.A. (1984) *J. Gen. Microbiol.* 130: 2745-2755
- 8) Walter, A., A. Rump, W. Klipp, U.B. Priefer and A. Pühler (1988) *J. Mol. Biol.* 203: 715-738
- 9) Ninfa, A.J. and B. Magasanik (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5909-5913
- 10) Uozumi, T., W.L. Barraquio, P.L. Wang, F. Murai, K.S. Chung and T. Beppu (1983) *Proceedings of the IVth International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms, 1982*, Kohdansha, p. 314-319
- 11) Wang, P.-L., S.K. Koh, K.-S. Chung, T. Uozumi and T. Beppu (1985) *Agric. Biol. Chem.* 49: 1469-1477
- 12) Kim, Y.-M., K.-J. Ahn, T. Beppu and T. Uozumi (1986) *Mol. Gen. Genet.* 205: 253-259
- 13) 金英美・日高真誠・正木春彦・別府輝彦・魚住武司 (1990) 日本農芸化学会大会講演要旨集 p. 172 (2Va9)

国内情報

合成リボザイムの利用

通産省 工業技術院 微生物工業技術研究所 微生物育種研究室
多比良和誠

1. はじめに

昨年度のノーベル化学賞の栄光は、コロラド大学の Tom Cech とエール大学の Sidney Altman に与えられた。受賞理由はもちろん酵素活性を持つ RNA 分子, つまりリボザイムの発見である。最近はリボザイムに関する総説¹⁾も多数出ており, 数年前と違い「リボザイムとは何か?」という説明をする必要もなくなった。1981年に Cech らにより発見された最初のリボザイムは, たんぱく質の助けを借りずに, 自らイントロンを取り除き, 上流と下流のエクソンを連結させた (スプライ

シング)。この切断反応は従来の RNase などによる RNA の切断機構と異なり 3' 端にりん酸基は残らない。切断部位リボース環の 2' 水酸基がりんを攻撃する求核種として働かない点では DNase による DNA の切断反応と似ている。実際, この種のリボザイムを用いて DNA も切断できることが最近報告されており^{2), 3)}, RNA→DNA→たんぱく質という進化の流れを仮定する上での重要な機能となっている。

Cech による歴史的なりボザイムの発見以来, Altman の RNaseP を初め多くの RNA 酵素が続々とみつかっている。新規のリボザイムとしては植物ウイルスのウイルソイドや

イモリのサテライト RNA 由来のものがあり、Haseloff と Gerlach はこれらの保存された塩基配列に注目し、もともと分子内反応を起こす(シスに働く)新規リボザイムをトランスに働く型に換えている(図1)⁶⁾。彼らは保存された塩基配列を片方の RNA 鎖に集め、他方の鎖には保存された切断部位(GUC)のみを残した。すると、人工合成されたリボザイムが RNA 酵素としてトランスに働き、基質 RNA 鎖の GUC の後の矢印の部位で切断が起きた。また、YYYYY……で示してある領域が基質の認識部位となるので、GUC を含む切断したい箇所(XXX XX……)に相補的な塩基配列を付加することによって、どのような配列を持つ RNA も部位特異的に切断することも実証した。以上のことは、ハンマーヘッド型と呼ばれる図1のリボザイムが基質特異性の高い人工 RNase として利用できる可能性を秘めており、内外で注目を集めている。

2. RNA 切断反応のコンピュータシミュレーション

Haseloff と Gerlach によりトランスに働くリボザイムが開発され、また、このリボザイムによる切断でリン酸基が3' 端に残ることも明らかとなった。ちょうどその頃、工業技術院にもクレイのスーパーコンピュータが導入され、理論計算をする環境が整った。量子力学を分子の問題に適用する際、最も信頼できる正統的な方法として、非経験的分子軌道法(ab initio 法)があるが、生化学や分子生物学の目から見ると信じられないほど小さな分子しか計算できない。我々も RNA 切断時の中間体のみを的を絞って ab initio 分子軌道計算を始めた⁵⁾。

計算結果を図2に示すが、ここで最も注目すべきことは、先に予測したとおり⁶⁾、中間体の5' 配位りんから5' 酸素を切り離す正反応よりも2' 酸素を切り離す逆反応の方が容易な点である。この結果は、たとえ2' 酸素がりんを攻撃して5' 配位りん中間体を形成してもほとんどの場合は2' 酸素側の結合が切れて元の反応体に戻ることを示唆している。つま

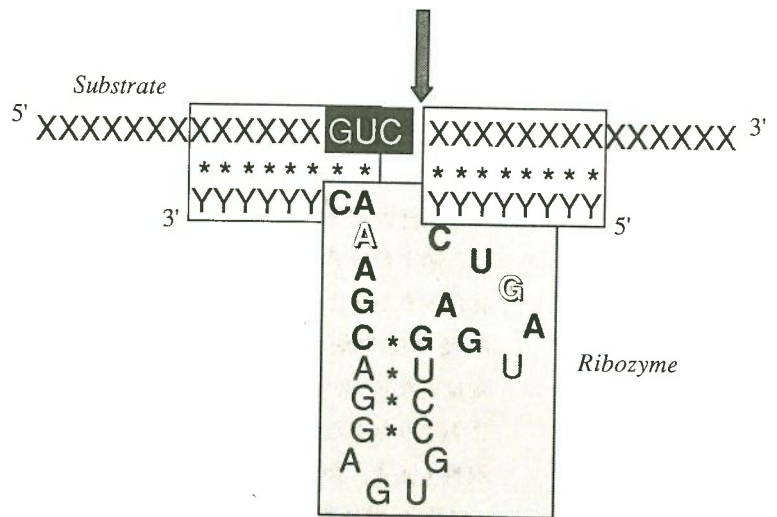


図1 トランスに働くリボザイム

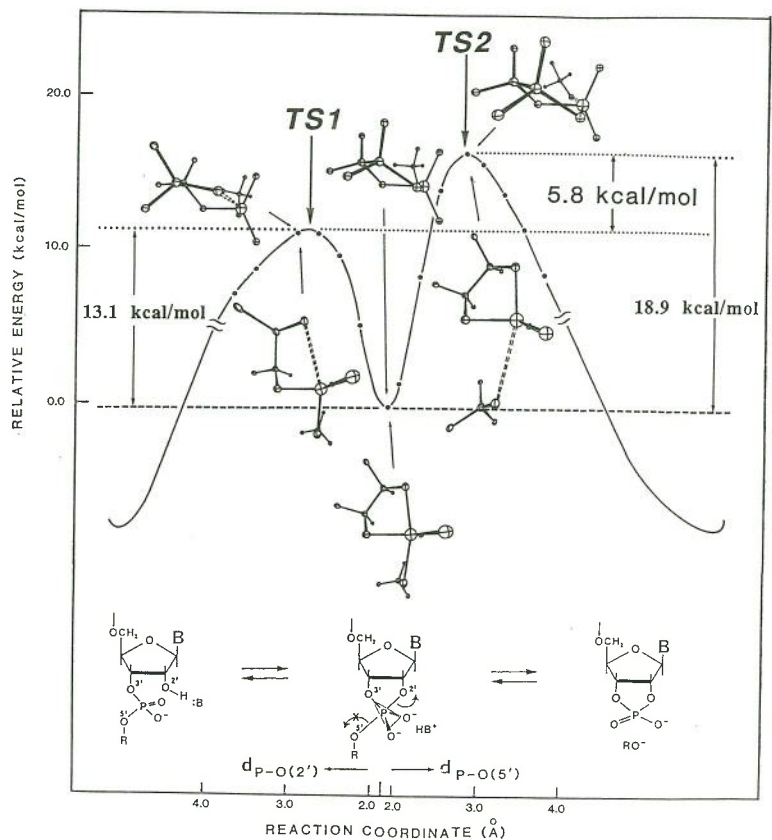


図2 RNA切断反応の分子軌道計算

り、この切断反応における律速段階は5' 酸素側の切断である。もし、リボザイムが十分利口だと(進化していると)すると、酸触媒などにより律速段階(TS2)を安定化させているはずである⁷⁾。

3. リボザイム反応の利用 (pGENE8459 の構築)

分子軌道計算がある程度進んだ昨年、リボザイム活性を実際に使ってみようと考え始めた。図1のリボザイム構造から明らかなように、トランスに働くリボザイムの活性部位の5'及び3'領域がターゲットRNAとの結合部位となっている。そこで、5'および3'端にあまり余分な配列を付けない方が、基質特異性も高く、余分な配列のために触媒能を保つのに必要な高次構造が乱されることもないと思われ、単純に考えた。5'端はプロモータのすぐ下流にリボザイム配列をつなぐことで調製できる。3'端にもターミネータを付けても良いが、種に関係なく使えるユニバーサルなターミネータとしてリボザイム活性を利用できるのではないかと考え図3のようにデザインした⁸⁾。まずは、*in vitro*でチェックするために、T7プロモータの下流にリボザイムを連結した。この最初のリボザイムは酵母由来のSFL1のmRNAをターゲットとしてトランスに働くリボザイム (Ribozyme for SFL1) である。さらに、このリボザイムの3'端の処理に、もう一つのリボザイム (3' Processing Ribozyme)

me) を当てた。“3' Processing Ribozyme”は転写されると図3に示してあるように分子内で塩基対 (***) の領域) を形成し、GUCの後 (DNAではSal I認識部位内にある) で、切断を起こす。また、3'末端の短いステム/ループ構造が mRNAの安定性に寄与しているというデータもあるので、切断後の“Ribozyme for SFL1”の3'端はそのような構造をとれるようにデザインしてある (図4)。

4. pGENE8459からのリボザイムの転写

従来から、特定の長さのRNA転写産物を*in vitro*で調製する場合、使用するプロモータから特定の長さの位置で切断された鋳型DNAを用いていた。制限酵素で切断された線状鋳型DNAの3'端でRNAポリメラーゼが外れるので、そこがRNA転写産物の3'端となるラン・オフ法である (図5)。ところが、pGENE8459プラスミドDNAを鋳型とすれば、制限酵素で切断する前の環状DNAを鋳型としても、“Ribozyme for SFL1”に相当する全長58塩基のRNAを得ることができた⁸⁾。つまり、“3' Processing Ribozyme”

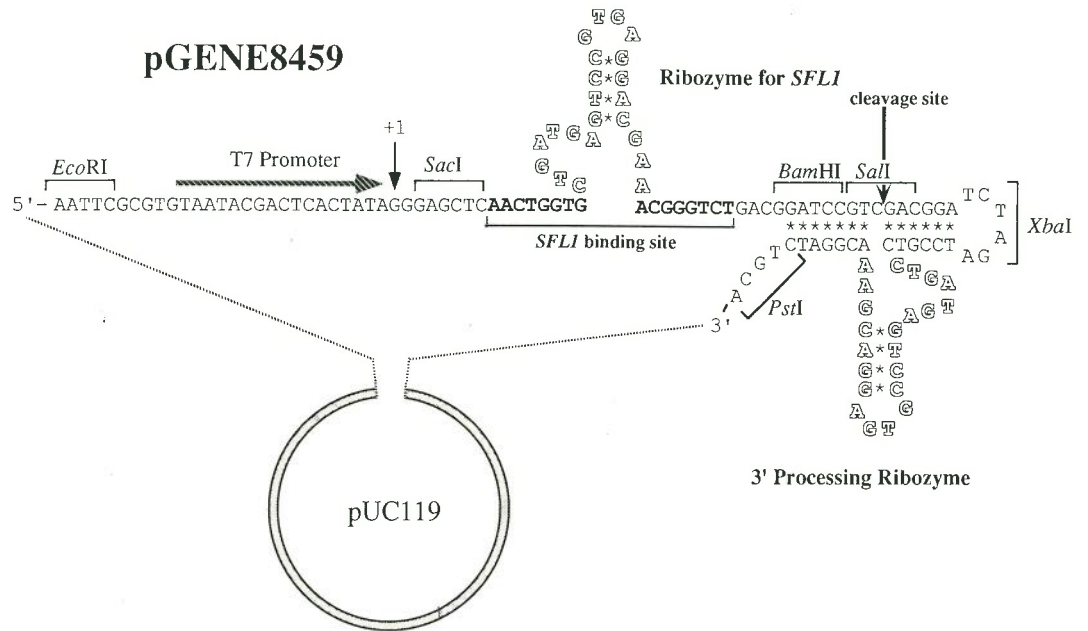


図3 リボザイム発現ベクター

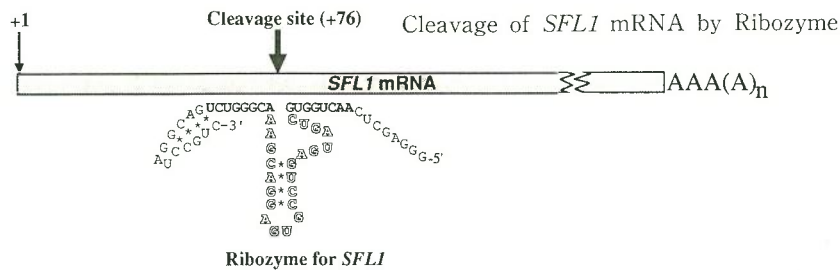


図4 合成リボザイムとターゲットRNAの複合体

5. pGENE8459 シリーズの利用

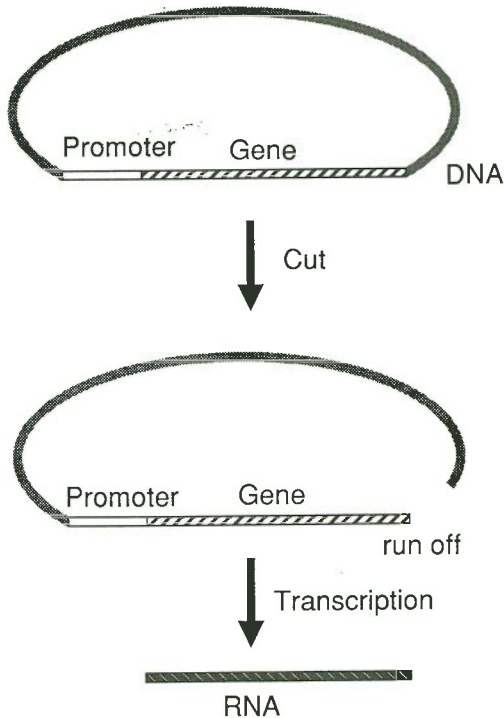


図5 ラン・オフ法の模式図

が設計どおりに働いた訳である。ラン・オフ法だと、RNAポリメラーゼが線状DNAの3'最末端の塩基に達する前に外れることがあるので、短いRNAを作る場合はどうしてもゲル上でラダーが目立つ。しかし“3' Processing Ribozyme”のように、シスに働くリボザイム活性を用いると、一旦転写された長いRNA鎖が切断されるので特定の長さのRNAがうまく合成できる。

また、合成された“Ribozyme for *SFL1*”は設計した位置(図4)で、ターゲットである*SFL1* mRNAを切断した⁹⁾。つまり、pGENE8459の最初のリボザイムはトランスに、また2番目のリボザイムはシスにうまく作用したことになる。

筆者はさらに5'端と3'端を処理するpGENE8459v3を構築し(図6)、“5' Processing Ribozyme”と“3' Processing Ribozyme”が設計どおりに働くことを明らかにした⁹⁾。この構築を用いると、例えば*EcoRI/PstI*断片を発現しているRNAに対応するDNAのどの部位に挿入しても、転写後5'と3'端が処理された均一の“Ribozyme for *SFL1*”を得ることができる。また、“Ribozyme for *SFL1*”領域はカセットになっており、どのような配列にも入替え可能である。例えば、*in vivo*で5'cap構造の役割やmRNA 3'末端のpoly Aの役割を調べたい場合、pGENE8459やpGENE8459v3を利用して、それらの構造を取り除くことができる。また、塩基配列に依存したRNAの安定性を調べる場合、種々の配列をカセットに挿入することができる。もっと利用価値が生かせるのは、RNAウイルスの研究においてかもしれない。RNAウイルスを*in vitro*で転写させて活性などを調べる場合、活性を損う恐れがある余計な配列を5'端や3'端に残したくない。pGENE8459v3のカセットにRNAウイルスの配列だけを導入することにより余計な配列の混入を避けることができる。さらに線状DNAを鋳型とするラン・オフ法よりも環状pGENE8459v3 DNAを鋳型とし用いた方が転写効率が良いことがわかった。これはRNAポリメラーゼがよりナチュラルな環状DNAを鋳型として好むためと思われる。短いRNAを単離する場合、転写効率および転写産物の純度などの面からpGENE8459v3シリーズの方がラン・オフ法より優れている。しかし、トランスに働くリボザイムの*in vivo*における発現ベクターとして利用する

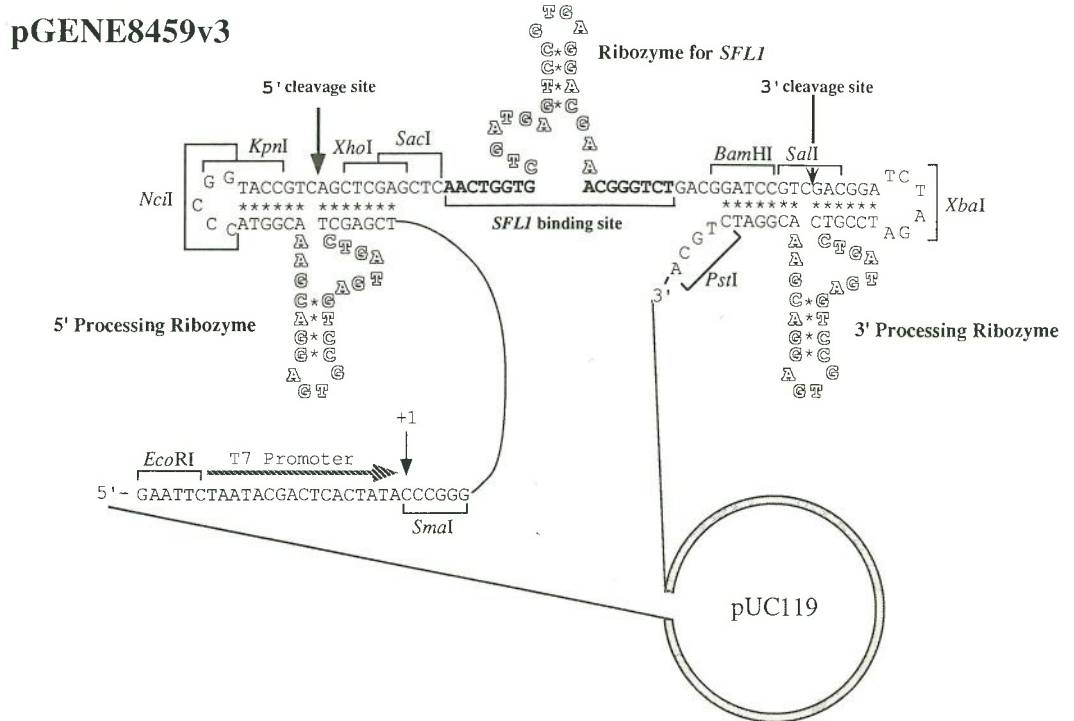


図6 5'端および3'端処理用ベクター

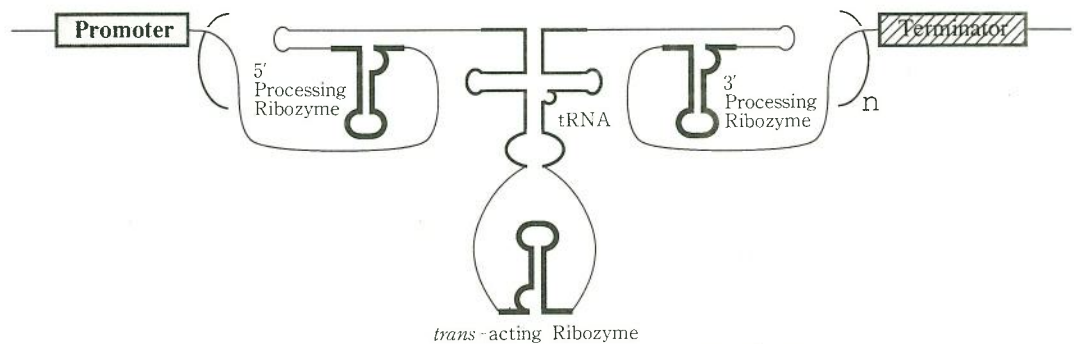


図7 安定リボザイム多量発現ベクターとしての可能性

には、もう少し工夫が必要かもしれない。というのは、昨年度末、“短いリボザイムを *in vivo* で使うと安定性が悪い”という報告も出ているからである¹⁰⁾。Cotten と Birnstiel はリボザイムを tRNA 内に埋め込むことにより、活性のあるリボザイムの発現に成功している¹¹⁾。もし、tRNA 内に埋め込まれたリボザイムが十分安定なら、pGENE8459v3 のカセットに tRNA・リボザイムのハイブリッドを導入することができる。さらに、EcoRI/PstI 断片をタンデムにつなぐことにより、みかけ上のコピー数を上げることもできるであろう。例えば、図7で $n=20$ の場合、1分子の RNA 転写産物から20分子の tRNA・リボザイムのハイブリッドを得ることができる。

また、mRNA 用の pol II 転写系と tRNA 用の pol III 転写系を併用することも可能かも知れない。

6. おわりに

最近、エイズウイルス HIV-1 の RNA をターゲットとしたリボザイムが *in vivo* でうまく働いたという報告がなされた¹²⁾。また、この原稿をば書き終えた昨日、Tom Cech と会談する機会に恵まれたが、彼のグループもハンマーヘッド型リボザイムを抗ウイルス剤などの医薬品として開発し始めたようである。遺伝子治療などにおけるリボザイムのポテンシャルは高そうである。

文 献

- 1) Cech, T.R. (1986) *Sci. Amer.* 255 : 64-75
筆者も専門外の人のために平易な総説を書いているので別刷希望者は多比良まで：電子情報通信学会誌 73 : (4)316-325 (1990)
- 2) Herschlag, D. and T.R. Cech (1990) *Nature* 344 : 405-409
- 3) Robertson, D.L. and G.F. Joyce (1990) *Nature* 344 : 467-468
- 4) Haseloff, J. and W.L. Gerlach (1988) *Nature* 334 : 585-591
- 5) Taira, K., M. Uebayasi and K. Furukawa (1989) *Nucleic Acids Res.* 17 : 3699-3708
- 6) Taira, K. (1987) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 60 : 1903-1909
- 7) Taira, K., M. Uebayasi, H. Maeda and K. Furukawa (1990) *Protein Engineering* 3 : 691-701
- 8) Taira, K., M. Oda, H. Shinshi, H. Maeda and K. Furukawa (1990) *Protein Engineering* 3 : 733-737
- 9) Ohme-Takagi, M., H. Shinshi, M. Oda, T. Uchimaru, S. Nishikawa and K. Taira (1990) *Nucleic Acids Res. Sympo. Ser.* 22 : 49-50
- 10) Cameron, F.H. and P.A. Jennings (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 9139-9143
- 11) Cotten, M. and M.L. Birnstiel (1989) *EMBO J.* 8 : 3861-3866
- 12) Sarver, N., E. Cantin, P. Chang, P. Ladne, D. Stephens, J. Zaia and J. Rossi (1990) *Science* 247 : 1222-1224

国内情報

たんぱく質の一次構造中の生理機能性ペプチド配列

—食品たんぱく質で生体機能調節は可能か—

農林水産省 食品総合研究所 蛋白質研究室

河村 幸雄

はじめに

遺伝子操作技術の一般化，たんぱく質の一次構造解析法の進歩により，DNA側とたんぱく質側の両者から一次構造の判明したたんぱく質の数は，今や20,000以上となっている。これにともなって，コンピューターによるホモロジー（相同性）検索の範囲が飛躍的に増加し，たんぱく質の一次構造上の特徴から，旧来のたんぱく質研究からではとうてい予測できなかった事実が判明してきている。

代表例は，我々に身近な食品たんぱく質では，従来全く異なると思われていた鶏の卵白リゾチーム（酵素たんぱく質）と牛乳のたんぱく質 α -ラクトアルブミンがほとんど同じ分子であることや，大豆のトリプシンインヒビターに細胞増殖活性があることなどである¹⁾。また，たんぱく質の部分構造（ペプチド）にそのたんぱく質本来の機能とは関係のない作用，とくに我々の生理機能と深い関係

のある作用を示すペプチド配列のある例がわかってきた²⁻⁶⁾。

食品と健康の間に深い関係のあることは，世界的な疫学的調査から明らかなことである。現在では，栄養不良に起因する疾病より過栄養の弊害を考えなければならない状況にある。食品に関連する生理機能としては，循環系に対する影響がまず第一に考えられる。脳梗塞，心筋梗塞，動脈硬化，高脂血症，高血圧症などいわゆる成人病である。そこで，我々の研究室ではそれらの予防作用を示すペプチド配列が食品たんぱく質中にあるかどうかを調べ，その分離と構造決定を行っている。ここでは，高血圧防止作用を示すペプチドについて紹介する。

1. 食品と生体の血圧調節系

食塩と高血圧の関係はよく知られているが，生体内で血圧は，ナトリウムの他，神経系，ANP（心房性利尿ペプチド），レニン-アン

ジオテンシン系などいくつかの系で調節されている。レニン-アンジオテンシン系で血管収縮ホルモン・アンジオテンシン-IIの生成と平滑筋弛緩ホルモン・ブラジキニンの分解の両者に関わっているのが、アンジオテンシン変換酵素(ACE)であり、この相乗効果により血圧調節作用は強力である。そのため、現在、臨床で、ACE阻害剤のカプトプリル⁷⁾やリジノプリルが、経口の血圧降下剤として、高血圧の治療に使われている。

このACEは、たんぱく質分解酵素の一種であるので、理論上ある種のペプチドがACEの作用を抑制する可能性が考えられる。そこで、このようなペプチド配列が食品たんぱく質の一次構造中に存在するか否かどうかが、また消化管プロテアーゼの作用で生成してくるかどうかを調べた。

2. 大豆とイワシのたんぱく質には高血圧防止(ACE阻害)ペプチドが存在する

西欧、特にアメリカにおいて、日本型食事が注目されるようになって久しいが、大豆とイワシはその代表的な食品であり、量的にも多く安価で、経験的に健康によいことが知られてきている。そこで、これらを材料として、我々の、胃および腸でのたんぱく質の消化の

モデル実験を試験管内で行った。

(1) 大豆

大豆から分離たんぱく質を調製し、まず胃の消化酵素であるペプシンにより消化分解しその消化物がACEの作用を抑制するかどうかを測定したところ、抑制することがわかった。我々の体の中では、実際には小腸の消化酵素でさらに分解を受けるので、ペプシンの消化物を小腸のプロテアーゼ・トリプシンで分解した。このペプシン・トリプシンによる分解物は、ペプシンによる分解物よりも強いACE抑制効果を示した。

このことは、我々が大豆(たんぱく質)を食べたときに、腸管内に血圧降下作用を持つ分解物(ペプチド)が生成していることを示している。そこで、このACEの阻害物質が何であるか確かめるため、各種のクロマトグラフィー操作を行い、最終的に高速液体クロマトグラフィーで単一のピークになるまで精製し4種類の物質を得た。これらの物質は、種々のテスト結果からいずれもペプチドであること、純粋であることが確認できた。

これらのACE阻害を示す生理機能性ペプチドの一次構造(アミノ酸配列)を決定したところ、アミノ酸が6個あるいは7個連なった構造を示し(口絵)、1000~3000分の1gという微量で効果があった。次に、興味のある

ACE INHIBITING PEPTIDE IN SOYBEAN 7S CONGLYCININ

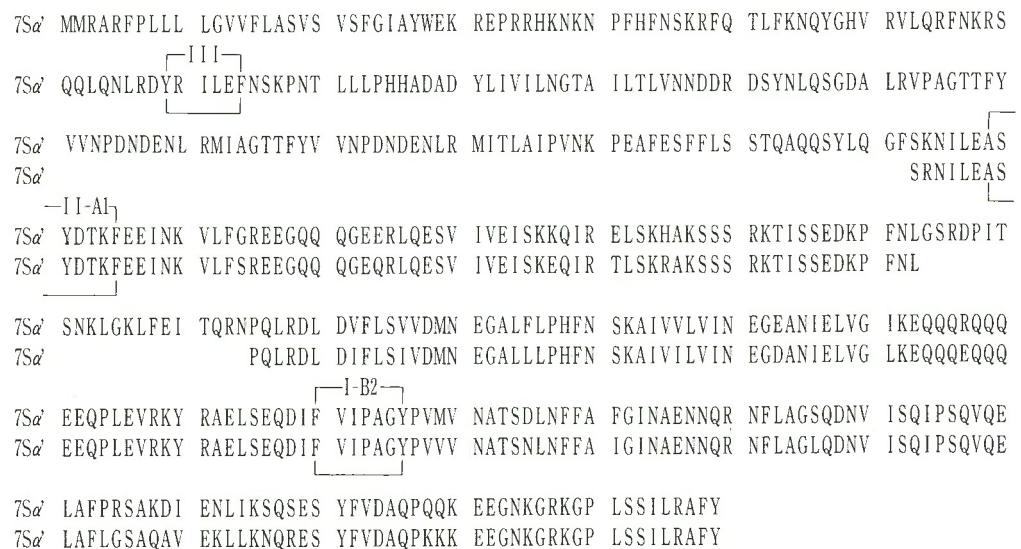


図1 大豆7Sコングリシニン中のACE阻害ペプチドの位置

ることは、これらのペプチドが、どのたんぱく質由来かということである。そこで、これらのペプチドのアミノ酸配列を基にコンピューターによる相同性検索を行った結果、これらのペプチドと同じ配列が、大豆のグリシニンとコングリシニンというたんぱく質の一次構造上に認められた(図1)^{8,9)}。この結果は、分離されたACE阻害ペプチドが、両者を合わせると大豆たんぱく質の80%を占める主要たんぱく質起源であることを強く示唆する。

食品由来の生理機能性ペプチドという観点からは、食品素材として資源量の多いことと同時に含有量の多いこと、すなわち主要成分由来であることが必要とされるが、この点からも大豆のACE阻害ペプチドは有望である。

(2) イワシ

イワシは、大豆と共に日本の代表的かつ伝統的なたんぱく質資源である。近頃では、イワシ油に多いEPAやDHAなどいわゆる生理機能性脂質源としても注目されている。このイワシの筋肉たんぱく質にも血圧調節作用のあるペプチドのあることが明らかとなった。分離精製の詳細は省くが、イワシの筋肉たんぱく質由来のACE阻害ペプチドは、アミノ酸11個よりなり、胃の消化酵素の作用で生成する。このペプチドは、先述の大豆のペプチドとは構造的にはなんの関係もないが、より強力な血圧降下作用を示した¹⁰⁾。

イワシのペプチドで栄養生理学的に興味のあるのは、胃で遊離されたウンデカペプチドが小腸のプロテアーゼでさらにアミノ酸3個のトリペプチドに切断されることと、それが元より強力な作用を示すことである¹¹⁾。アミノ酸3個のペプチドは腸管から吸収される大きさであるので、イワシ筋肉中のACE阻害ペプチドは、食品由来の生理機能性ペプチドとして実際に経口経腸で効果を示すか否かの優れたモデルペプチドである。現在、このような低分子量ペプチドに対するモノクローナル抗体を使ってペプチドの腸管吸収の研究を行っているが、低分子量の生理機能を持ったペプチドについては経腸で効果を示す可能性が十分考えられる。

おわりに

たんぱく質の一次構造中に存在する生理機能性ペプチド配列に、食品として摂取されたときに意味があるかどうかは、本稿でも少し述べたが、学問的には消化管での安定性や吸収という解決しなければならない問題はあ。しかし、我々が日常食で慣れている大豆やイワシのたんぱく質に、このような高血圧の予防に関係のあるペプチド配列のあること、および、それらが消化管で生成することが明らかになったことは、食品たんぱく質由来の生理機能性ペプチドの研究の第一段はクリアされたと考えられる。

たんぱく質およびペプチドは、「遺伝子の発現産物であり、遺伝子操作技術を用いた人為的改質による物質生産および分子育種の対象である」という他の物質にはない特質がある。したがって、正の方向の生理機能を示すペプチド配列の決定やたんぱく質への組み込みが、食品による疾病予防・生理機能の制御に果たす役割は今後ますます重要になると考えられる。

文 献

- 1) Priestle, J.P. et. al. (1988) *EMEO J.* 7: 339
- 2) Hazato, T. and Kase, R. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139: 56
- 3) Pikard, L. et. al. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54: 562
- 4) Diershacher, M. D. and Rouslahti, R. (1984) *Nature* 309: 30
- 5) Brantle, V. et. al. (1986) *Eur. J. Pharmacol.* 125: 309
- 6) Hobbs, M.V. et. al. (1987) *J. Immunol.* 138: 2581
- 7) Ondetti, M.A. et. al. (1977) *Science* 196: 441
- 8) 佐本将彦・小幡静雄・杉本敏男・河村幸雄 (1990) 日本農芸化学会誌 64: 556
- 9) Kawamura, Y. et. al. submitted
- 10) Kawamura, Y. et. al. in preparation
- 11) 中島秀司・佐竹幹雄・河村幸雄 (1990) 日本農芸化学会誌 64: 556

レーザー光による細胞融合

東北大学電気通信研究所

佐藤 俊一・稲場 文男

1. はじめに

細胞工学や遺伝子工学などをはじめとするバイオテクノロジーの分野においては、細胞の精密な操作技術が必要不可欠となっている。その代表的なもののひとつに細胞融合を挙げることができるが、この技術は基礎的研究からさまざまな応用にわたる非常に幅広い用途がある。

細胞融合法としては、これまでにセンダイウイルスなどを用いる生物学的方法、ポリエチレングリコール (PEG) などを用いる化学的方法、電気パルスを印加する物理的方法が開発されてきた。現在は PEG や電気パルスを用いる方法が一般的に利用されているが、いずれにしても一度に大量の細胞を非選択的に融合するため、処理した細胞集団から目的とする融合細胞を選別するには特別な細胞種や手法が必要であった。また、細胞全体に薬品や外的刺激が加わるため、細胞への損傷が無視できず、融合率もかなり低いという難点もあった。

われわれは以前よりレーザー光を用いた個別的な生体細胞の微細加工や微細操作法の研究開発を進めてきているが、これまでに捕捉、転送、回転、切断、穿孔、移入、移植、融合などといった細胞操作がレーザー光だけを用いてほとんど非接触で実現可能であることを明らかにしてきた¹⁻⁵⁾。これらの細胞操作のうち、本文では紫外域パルスレーザー光を用いた細胞融合法について紹介する。なお、レーザー光をピンセットのように用いて、安全かつ遠隔的に、細胞の捕捉、転送、回転を行うことのできるレーザー光トラッピング法に

ついては他の文献^{2, 4, 5)}を参照されたい。

2. レーザーマイクロプロセッシング装置¹⁾

レーザー光を細胞の微細加工や微細操作に用いる長所としては、まず第一に光の遠隔的制御が可能であるため細胞を非接触で無菌的に扱えるという点を挙げることができる。また、レーザー光はその優れたコヒーレント特性に基づいて、光の波長程度までビームを絞り込むことができるという特長を持っているため、可視域や紫外域のレーザー光ビームを集光して細胞の特定の部分に照射すれば、ミクロンないしサブミクロン程度の微細で精密な細胞加工が可能である。その際紫外域のパルスレーザー光を用いれば、より小さいレーザー光ビームスポットの形成や、光化学作用や非線形光学作用による局所的な照射効果の誘起などが期待され、細胞微細加工にとってはより有効な方策をもたらすものと判断される。さらにレーザー光ビームは制御性に優れていることも長所のひとつとして挙げることができる。

このような検討に基づいて、われわれは図1に示すようなレーザーマイクロプロセッシング装置を開発した。レーザーにはエキシマレーザー光励起の波長可変色素レーザーを用いている。このレーザー光は倒立型の光学顕微鏡に導かれ、内部のダイクロイックミラーと対物レンズによって、ステージ上の細胞試料に照射される。通常の対物レンズは紫外光の透過率がきわめて低いいため、本装置ではカールツァイス社のウルトラフルアール(×32)を用いている。ステージは圧電素子モータによって最小約4nmの距離分解能で2次元

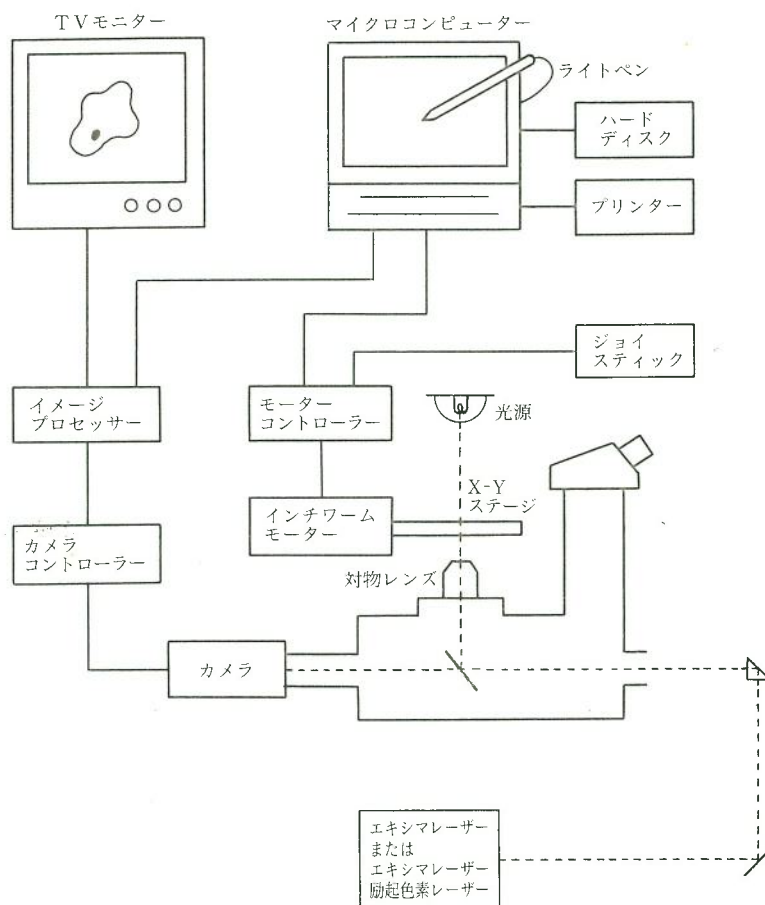


図1 紫外域レーザー細胞精密マイクロプロセッシング装置のブロック図

に移動できるようになっている。細胞試料の像は CCD カメラによって TV モニタ上に映し出されるが、そのビデオ信号は同時にイメージプロセッサに送られる。レーザーを含めた全ての機器はマイクロコンピュータによって制御されているため、TV モニタを監視しながら、マイクロコンピュータによってレーザー光照射位置や照射条件の設定などの全操作が実現できる。

3. レーザー細胞融合の実験

以上のような装置を利用して、われわれはレーザー光による個々の生体細胞の切断や穿孔などの実験を行い、微細で精密な細胞加工が可能なることを実証した。その一連の実験の一部として行った細胞融合の実例^{3,6)}を図2に示す。細胞にはマウスのミエローマ細胞を用い、レーザー光は波長 355nm, パルス幅約 10ns, パルス数 30 の条件下で実験を行った。

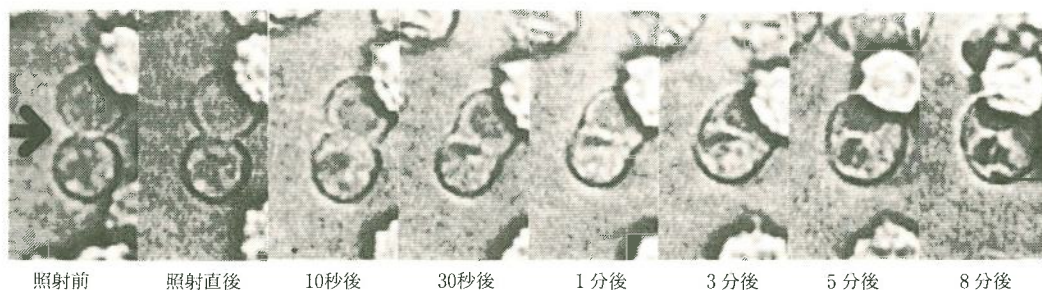


図2 紫外域パルスレーザー光照射によるマウスミエローマ細胞の融合の経過

この例では、濃度が5%のPEGを用い、その細胞凝集能を利用して2個の細胞同士を接着状態にしているが、この程度の濃度ではPEGによるとみられる細胞融合はほとんど観測されず、また毒性もほとんど問題にならない。レーザー光は2個の細胞が接している部分に選択的に照射されており、他の部分へのレーザー光照射の影響はほとんどないものと考えられる。図より2個の細胞はレーザー光照射後次第に形状を変えていき、30秒前後には楕円状となっていることがわかる。さらに8分後にはほぼ完全な球形となっており、レーザー光照射により細胞融合が実現していることがわかる。

このようなレーザー光照射による細胞融合はPEGを含まない培養液中においても確認することができたが、接触状態にある細胞の割合が相当少なく、またその融合の確率が数%程度と低いこともあり、そのためわれわれはいまのところ主に低濃度のPEGを用いて実験を行っている。最適なレーザー光照射条件を検討するために、レーザー光の1パルス当りのエネルギーと照射パルス数を変えて実験を行ったところ、1.5 μ J、30パルス程度において最大の融合率を示し、その値はほぼ50%に達することが観測された。

4. おわりに

以上われわれが行っているレーザー光を用

いた細胞融合法についてその一部を紹介した。この研究はまだ始まったばかりであり、融合細胞の生存率や分裂能、融合の機構や最適なレーザー光の波長、出力パルス幅などについての詳しい検討は今後の課題であるが、融合率については予備的な実験値よりさらに改善するものと期待できる結果が得られている。

このような所要の細胞同士を個別的に融合させるだけではなく、他のほとんどの細胞操作がレーザー光を用いて物理的に行えることは、精密、高速で安全かつ制御性に優れた新しい細胞操作手段の実現を強く示唆するものであり、今後多くの研究者、技術者が関心を持たれ、より精練された実用的技術として育成されることを切に願うものである。

文 献

- 1) 牧野和浩・佐藤俊一・稲場文男(1988)日本レーザー医学会誌 9(3): 375-378
- 2) 大弓正志・芝田洋・佐藤俊一・稲場文男(1990)日本レーザー医学会誌 10(4): 27-30, 31-34
- 3) 佐藤俊一・稲場文男(1989)細胞工学 8: 1089-1092
- 4) 佐藤俊一・稲場文男(1990)光学 19: 513-514
- 5) 佐藤俊一・稲場文男(1990)医学のあゆみ 154: 630
- 6) 木村正人・日暮栄治・佐藤俊一・田口喜雄・稲場文男(1990)医用電子と生体工学 28(特別号): 224



文献情報

植物によって生産された抗体

ほ乳動物によって分泌され、異種物質を認識、中和あるいは不活性化する作用を持ち、病気に対する免疫機構の一端を担う抗体を産生する形質転換タバコを作製するのに成功したという論文が A.H. Hiatt 氏によって発表された (*Nature* 344: 469-470, 1990)。原著は *Nature* 342: 76-78 (1989) に掲載されており、これは動物が特異的に作製する免疫グロブリンを成り立ちが異なり抗体産生能力を持たない植物において作らせたという興味深い内容である。彼はこの実験結果を基にして作物に抵抗性を付与することができる可能性および特定抗体を農作物の成分として大量生産することなどが考えられると論じている。しかし現在の生化学的知見に基づいて考えると一般的には理解しにくい部分があり、検討をしておかなければならない点がいくつか認められる。本研究の概略を紹介する。

1. まず特定の抗体をコードしている mRNA を得るために目的の抗原（この研究では低分子りん酸エステル）を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を選抜する。正常な脾細胞は増殖能力に制限があるが、これにガン細胞であるミエローマ細胞を融合させると、無限増殖が可能で特定の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が得られる。

2. mRNA から合成した cDNA のうち、IgG を構成する H 鎖 (Heavy chain, γ -chain) と L 鎖 (Light chain, κ -chain) をコードするものを選別する。

3. 各 cDNA を plasmid vector (pMON 530) に組み込み *Agrobacterium tumefaciens* に導入する。

4. H 鎖および L 鎖の cDNA を組み込んだ *A. tumefaciens* 液にタバコの葉片を浸し形質転換させる。

5. 形質転換したタバコ細胞から植物体を

再分化させる。

6. H 鎖および L 鎖をアSEMBルさせるため各々に対応する cDNA を組み込んだタバコを交配し、F1 タバコの種子を得る。F1 タバコでは H 鎖と L 鎖がアSEMBルして産生される。

7. このタバコの抽出液からアフィニティークロマトグラフィー法で IgG を調製する。

8. 用いた抗原 (低分子のりん酸エステル) に対する抗体を使用して ELISA 法で検定したところ、動物細胞から得たモノクローナル抗体と同様に、抗原と特異的に反応した。

このような実験レベルでの成功は下記のような実用上および研究上の新しい可能性をもたらすものと Hiatt 氏は紹介している。

1. 抗体の大量生産. 育成したタバコからアフィニティークロマトグラフィー法で目的の抗体を容易に純化することができる。抗体産生量は植物個体によってまちまちであったが多いものでは全たんぱく質の 1% に達した。実際に大量生産を試みたわけではないが、上記結果は価格的に特定抗体の大量生産が可能であるレベルにある。

2. 植物の生長制御の研究. 生長調節ホルモンや代謝制御物質に対する特異抗体の植物体内における発現によって、これらの物質の産生や代謝の機構が解明される可能性がある。

3. 病害抵抗性. 糸状菌、細菌およびウイルス等病気の発現に必須な物質に対する特異抗体産生機能を作物に導入することにより病徴の軽減が期待できる。

4. 生物的解毒. 公害物質等の有害成分を植物が取り込んだ場合、それが 2 万以下の分子なら細胞壁にある孔を通して細胞質内に移動することができる。有害物質 (環境汚染物質、産業廃棄物、殺虫剤および除草剤) と結合する抗体が細胞質に産生されていれば、それらの物質を捉えて植物体内に蓄積し、人間生活の環境から排除するのに利用される。

本報告のように人間生活にとって利用価値の高い抗体を植物体内で産生することができるという結果はバイオテクノロジー研究の成果として期待を受けやすいが、本研究においても詳細にみると下記のような実際のおよび

学問的な面における基礎的な疑問の解明が不足しているように思える。

1. リン酸エステルのような低分子抗原以外で実用価値の高いウイルス、細菌および糸状菌等に特異的なたんぱく質、あるいは多糖、酵素等の高分子成分を抗原にした場合に産生される抗体のアミノ酸配列が一定であるとしても機能を発現するために重要である活性部位の立体構造 (folding) が植物細胞中で動物細胞と同様に組み立てられるのか。

2. 動物とは成り立ちの異なる植物の細胞内でH鎖とL鎖のアセンブルのような現象が普遍的に起こり得るのか。

ここで紹介したような研究方向は学問的アプローチの推進方向の一つであり、研究ポテンシャルを向上させるための手段の一つとして捉えるのは妥当なところである。また、その実用上の見通しに関しては抗体を種々の病理学的診断や分類同定に用いている訳者にとって大変興味のあるところであるが、形質転換植物および抗体産生機構に関しては正確に評価する分野にいないので、専門分野の研究者によって詳しく解説されることを望んでいる。

(抄訳：大村敏博——農研センター)

Antibodies produced in plants

Hiatt, A.H.

Nature 344: 469-470 (1990)

文献情報

組織培養による竹の開花・結実の誘導

竹は一生の終わりに一度だけ開花・結実する。このシステムは、開花・結実までの期間 (=寿命) が12~120年と非常に幅があり、特定の地域の竹が一斉にその時期を迎えるという点で興味深いものがある。このあたりの基礎的な生理についてよくわかっていないことから、竹の育種は極めて難しいとされてき

た。このため *in vitro* で茎頂培養等により開花させようという研究はこれまでも行われてきたが、植物体は得られても開花に成功したという報告はまだない。

私達は今回、二つの種、*Bambusa arundinacea* Willd と *Dendrocalamus brandisii* Kurz において *in vitro* で開花を誘導するシステムを開発した。小穂を含んだ外植体の継代培養でも花序形成に成功し、稔性のある種子も得ることができた。

このシステムをさらに改良することによって、品種改良への途が開け、また一年生の植物のように毎年竹の種子を得ることができるようになり、さらに竹の開花生理を解明することができよう。以下具体的な内容について述べる。

改良ホワイト培地 (pH 5.8, しょ糖 2%, 寒天 0.4%) で種子を発芽させ、8日後、温度 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 、照度 500 ルックスの下に置いて5~6cmの草丈になるまで育てる。その後、生長点から子葉鞘までの3~4cmを切り取り、それを庶糖 2% を含んだMS培地に移し 28°C 、500ルックス、ロータリーシェーカーで毎分120回転の条件の下で振とう培養すると、シュートが伸びてくる。

さらに、これらのシュートを切り取り、ココナッツミルクや生長ホルモンを加えたMS培地で継代培養し、その生長を調べた。各培地10反復の試験の結果、しょ糖を2%、ベンジルアミノプリン 0.5ppm、ココナッツミルク 5% を加えた培地の成績が一番良くて、平均一容器当たり15~20本のシュートが得られた。

この培地で3代継代したところ、*B. arundinacea* の70%、*D. brandisii* の40%で通常の小穂が発生した。これは0.5~1cmの長さで外穎・内穎があり、雄ずい・雌ずいも正常なものであった。

両種とも15~20本のシュートのうち60%程度が花序を形成し、残りは栄養生長性のものであった。そこで、花序形成したシュートと栄養生長性のシュートをそれぞれ培養して維持した。栄養生長性のシュートについては、両種とも0.5ppm酪酸で24時間処理した後ホワイトの液体培地で15日間培養して発根させ、

土壌に移植した。

花序形成したシュートは同じ培地で継代培養に成功した。さらに、両種とも結実し、*B. arundinacea*からは50粒、*D. brandisii*から5粒のいずれも正常な子実を得ることができた。

現在、さらに花序形成・結実し易い培養条件を検討しているが、ここで報告した観察結果は、貴重なものであり、また、今後さらに実験を行うことによって

- ①長く栄養生長を続けていた状態から一回結実性の花序形成に移る仕組みを生理学的あるいは分子レベルで解明すること
- ②早熟な花序形成を誘起するサイトカイニンの特異的な役割を解明すること
- ③特定の地域の竹が一斉に開花し、枯れていく原因を解明すること

が可能になるであろう。

竹は世界の産業および国内の経済にとって重要な地位を占めている。この発見は竹の品種改良、種間あるいは属間雑種の生産、あるいは毎年結実する竹を作り出すことに途を開くものであり、大きな可能性をもったものである。

ここに記載した二つの種の他、最近では *D. strictus* についても成功した。

(抄訳 吉田岳志——生研機構)

Precocious flowering and seeding behaviour in tissue-cultured bamboos

Nadgauda, R.S., V.A. Parasharami and A. F. Mascarenhas

Nature 344 : 335-336 (1990)

文献情報

昆虫ウイルスゲノム RNA の植物体内における感染性 ウイルス粒子の合成

ほとんどのウイルスの宿主範囲は分類学的に近縁な生物に限られている。しかしながらウイルスの中には少数ではあるが、自然界に

おいて宿主が昆虫と脊椎動物、あるいは昆虫と植物といったように二つ以上の門にまたがるものがある。このようなウイルスは、長年にわたる昆虫と脊椎動物あるいは植物との相互作用の中で、互いに遠縁の宿主内でも感染・増殖できるよう適応してきた結果生じたものか、それとも宿主が本来、遠縁であっても本質的にウイルスが感染・増殖できる共通の条件を備えているのか、いずれであるかは未だ不明であるが、この問題はウイルスの宿主範囲決定機構を解明するうえで興味あるものである。

この論文では、自然界では植物への感染・増殖が認められていないある種の昆虫ウイルスをいろいろな植物細胞に接種し、非宿主とされている植物細胞が本質的に昆虫ウイルスを増殖させる条件を備えているかについて検討を行っている。

Flock house virus (FHV) は単一球形粒子の Nodavirus 群に属し、甲虫の *Costelytra zealandica* に感染する昆虫ウイルスとして知られている。FHV の植物への感染は自然界では見られないが、FHV-RNA をオオムギ、ササゲ、アカザ、タバコに接種したところ無病徴感染し、全ての接種葉において新たな FHV-RNA および virion の合成が認められた。特にオオムギのプロトプラストに FHV-RNA を接種したところウイルスの合成率が高まった。次に FHV-virion を接種した場合には FHV-RNA を接種した場合よりも合成量は少なかったが、Progeny virion は確かに合成されていた。このことから、非宿主とされていた植物細胞でも、FHV-virion 合成に必要な factor を備えていることがわかった。しかし、オオムギのプロトプラスト内での FHV-virion 合成率は *Drosophyla* 培養細胞内での合成率に比べてかなり低く、植物細胞と昆虫細胞の間にはウイルス増殖過程に違いがあると考えられる。そこで *Drosophyla* 培養細胞とオオムギのプロトプラストの両者に、FHV-RNA を接種し、FHV-virion の合成量の経時的変化を比較したところ、*Drosophyla* 培養細胞では感染初期に急増し、接種後約20時間前後に再び増加したが、オオ

ムギのプロトプラストでは初期の増加のみであった。このことから、*Drosophyla* 培養細胞では Progeny virion がさらに新たな Progeny virion を合成できるのに対し、オオムギのプロトプラストではこの過程が十分に進行しないと考えられた。

次に植物体における FHV の全身感染について検討した。*Nicotiana benthamiana* では接種葉以外の葉にも微量ではあるが FHV 活性が認められた。FHV ゲノムは、RNA 1, RNA 2 と RNA 1 から産出される subgenomic RNA 3 からなり、各々、protein A, protein α , protein B をコードしている。現在これらのたんぱく質の機能についてはほぼわかっているが、いずれのたんぱく質も植物細胞内でウイルスの移行に関与しているとは考えられていない。したがって接種葉以外の葉にもウイルス活性が認められたことは、FHV が植物ウイルスに一般的にみられるような能動的な細胞間移行システムではなく、維管束系における転流によって移行したためと考えられる。

以上の結果は、FHV が非宿主である植物細胞においても、昆虫細胞と若干の違いこそあれ本質的にはウイルスを感染・増殖させる能力をもっていることを示唆している。

今後はウイルスの感染・増殖過程に関してより一層昆虫細胞と植物細胞を比較検討するとともに、ウイルスが能動的に宿主に対し適応していくものなのかを追求することによって、ウイルスの宿主選択機構が解明されるものと考えられる。

(抄訳 富岡啓介—東北大農)

Genomic RNA of an insect virus directs synthesis of infectious virions in plants

Selling B.H., R.F. Allison and P. Kaesberg
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 434-438
(1990)

文献情報

チョウの幼虫とアリの共生関係を強化する振動コミュニケーション

チョウの幼虫が出す振動が、アリとの共生関係をより強固にすることが示された。

シジミタテハ科 (Riodinidae) やシジミチョウ科 (Lycaenidae) の幼虫には、分泌器官から出したアミノ酸や糖などをアリに提供する代わりに、アリが捕食者から防衛するという共生関係を形成するものがある。捕食性昆虫に見つけられたときアリの保護がないと、幼虫はほとんど生き残れないので、この共生関係は幼虫にとって一種の保険のようなものであると考えられている。また、シジミタテハ科の幼虫には、分泌器官の他に振動小突起と呼ばれる分泌機能のない一対の器官を持つものがあり、アリに振動を伝えると考えられている。

シジミタテハ科の一種、*Thisbe irenea* はパナマのパロ・コロラド島に生息し、幼虫はアリと共生関係を形成している。この幼虫の出す振動、すなわち「合図」を小型のマイクで検出したところ、3~5令幼虫は全て弱い「合図」を出していることがわかった。

「合図」は、マイクを幼虫の体に直接取り付けたとき、または幼虫が乗っている物体に取り付けたときには検出できたが、マイクがわずかでも離れると検出できなかった。これは、この「合図」が、空気を振動させて伝えられるのではなく、幼虫や幼虫が乗っている植物体などの物体を振動体として伝えられるもの (substrate-borne) であることを示している。波形および周波数特性分析を行ったところ、「合図」は1秒あたり平均16個の単純なパルスの繰り返しで構成されていて、もっとも強度の大きい周波数は平均896Hzであり、周波数のスペクトルはおおよそ1480~370Hzの範囲であった。

一対ある振動小突起を一つでも取り除くと、幼虫は「合図」を出すことができなくなった。

しかし、この幼虫も餌を食べ、共生関係を保ち、蛹になり、結局成虫になった。また、脱皮して次の令の幼虫になると振動小突起は再生し、再び「合図」を出すようになった。1、2令幼虫においてはまだ振動小突起は発達しておらず、「合図」を出さなかった。

「合図」がアリとの共生関係にどのような影響を与えるのかを調べるために、振動小突起を取り除いて「合図」を出せなくした幼虫と正常な「合図」を出す幼虫を用いてアリとの関係を観察した。その結果、「合図」を出せなくした幼虫でも分泌器官は正常なのでアリの世話を受けるが、「合図」を出す幼虫はアリを一層引き付けることが野外および実験室内の両方において観察された。このように、「合図」はアリとの共生関係をいっそう強固なものにする機能を持っているのである。

T. irenea の他にも、シジミタテハ科の幼虫には、振動小突起が存在し、「合図」を出し、アリと共生関係を形成するものがあることを見いだしている。ところが、シジミタテハ科の一種、*Eurybia* の幼虫は振動小突起を持たないにもかかわらず、「合図」を出すことを見いだした。しかし、どのようにして「合図」を出しているのかまだわかっていない。一方、分泌器官やアリとの共生関係を持たない19種のシジミチョウ科、2種のアゲハチョウ科、2種のシロチョウ科、21種のタテハチョウ科の幼虫では「合図」は検出できなかった。

シジミチョウ科においも、同様の「合図」を出すにもかかわらず振動小突起を持たない19種の幼虫が知られている。これらの幼虫がどのようにして「合図」を出すかはまだわかっていない。したがって、「合図」はシジミタテハ科において2タイプ、シジミチョウ科において少なくとも1タイプ存在しており、アリとの関係で「合図」発生のメカニズムが少なくとも3タイプ存在することがわかった。さらに、「合図」を出さない種はアリと共生関係を持たないので、「合図」は共生関係を形成する重要な要素であると考えられる。

埋められたアリが掘り返してもらうために仲間を引き寄せるときや、食べ物に仲間を呼

び寄せるときに、「合図」のような振動を出すアリがいることが知られている。このように、アリは振動をコミュニケーションの道具として使用していることが知られている。したがって、アリとの関係においてチョウの幼虫が出す「合図」は、アリのコミュニケーションシステムを利用しているのかもしれない。

最新の昆虫のコミュニケーションに関する研究により、音波のシグナルが求婚、競争、仲間の認識、社会性昆虫のコミュニケーションや防御において出されることが知られている。また、「合図」はアリと関連して出されていて、さらにシジミチョウ科の幼虫にはアリの幼虫の血液を食物とするものがあり、このように宿主との関連で出されることがさえある。

共生関係において、食物のような物質的な利益の交換だけではなく、この研究で証明されたように、異種間でのコミュニケーションがその進化に重要な役割をしていることは大変興味深いことである。

(抄訳 安田哲也——蚕昆研)

Enhancement of symbiosis between butterfly caterpillars and ants by vibrational communication

P.J. DeVries

Science 248 : 1104-1106 (1990)

文献情報

エンドウにおける性発生はアラビノガラクタン・たんぱく質の形質発現により予知される

被子植物における花器はその内部に生殖細胞を持つ。花芽分化組織はほぼ茎頂付近に発達し、花器自体は圧縮された枝の相同器官であるとみなされる。生殖器官である雄ずいや心皮は、その発育や形態形成において葉に類似しているが、生殖細胞を内部に保有する構造(葯、胚珠)に対応するものは、栄養器官には存在しない。したがって、被子植物にお

いては、動物におけるとは異なり、栄養生長の期間を経た後に生殖器官の分化が起こるのが一般的である。現在までのところ、花における生殖細胞の生長・分化を制御する分子機構はまだ明らかにされていない。本稿においては、生殖細胞のもととなる細胞の原形質膜アラビノガラクトサン・たんぱく質における抗原決定基の発現を改変し、配偶子、接合子、球形期の胚に影響を与える始原生殖細胞における初期のかつ特異的な発生制御機構が述べられている。

モノクローナル抗体 MAC 207 は、顕花植物の原形質膜にのみ見出され、L-アラビノースを有する AGP のグループに共通な抗原決定基を認識する。MAC 207 に対する抗原決定基は、エンドウの栄養分裂組織、原基および器官（茎、葉、根）、ならびに未分化の花芽のすべての細胞に存在するが、分化しつつある花芽を材料とした場合、発生しつつある雄ずいや心皮の特定の細胞はその抗原決定基をもたないことが示された。

そのような細胞は、雄ずいにおいては花弁原基から分離し、四つのクラスターとして出現する。ついでそれらクラスターは、花粉嚢へ分化する。それぞれの花粉嚢の外側の境界は、MAC 207 に反応する表皮および2層からなる葯壁によって明瞭に示される。雄性配偶体において減数分裂、および最後の細胞分裂が完了すると、抗原決定基は、花粉粒の栄養細胞の原形質膜に再び現われるが、生殖細胞や精子中には再び現れない。

MAC 207 に反応しない細胞は、心皮においては各々の胚珠の中心部近くに単一の集合体を形成する。これらの細胞は、最終的には珠心とよばれる胚嚢とそれを取り巻く2層からなる組織に分化する。珠心は、一对の MAC 207 に反応する外皮によって覆われる。胚珠のなかの配偶体組織は、発生のいかなる段階においても、MAC 207 に対する抗原決定基を再発現することはない。

受精後、接合子、球形期の胚および胚乳は、MAC 207 に対して全く反応しない。しかし、その抗原決定基は、分化がさらに進んだ心臓型期の胚には再び現れ、受精後10日頃には胚

軸中に、15日目までには子葉中に発現し、さらに成熟した魚雷型期の胚になれば普遍的に観察される。

MAC 207 抗原決定基を発現しない細胞は、すべて有性生殖に関係した組織のなかにもみられる。そのような雄ずい中の組織は、小孢子嚢を形成し、他方、心皮のそれは大孢子嚢を形成する。したがって双方の不反応性の孢子体構造は、形態形成のうえでは相同である。われわれの知る限り、この報文で述べられている細胞表面の抗原決定基発現の変化は、種子植物における二つの生殖器官の系統を特異的に決定する生化学的な変化として認識された最初のものである。MAC 207 抗原決定基は球型期の胚から存在しなくなるが、孢子体の主要な栄養器官系が確立したときのみ再び発現する。そして、その完全な再発現は、発生後の生長・分化が完全に回復したことを示すものである。

われわれが、エンドウに対する MAC 207 について述べたことと本質的に同じことが、他の双子葉植物 *Arabidopsis thaliana* において、さらには単子葉植物のトウモロコシにおいても認められる。その MAC 207 抗原決定基が不反応性の細胞中にマスクされているものなのか、あるいは糖たんぱく質から欠落しているのか、さらには全ての AGP が発生過程で生殖組織から排除されるのかはまだ不明である。葯から調製した系のイムノブロッティングによれば、糖たんぱく質が存在しないことが示されている。この問題を更に解明するためには、MAC 207 に反応する AGP の中核をなすたんぱく質をコードしている遺伝子発現の追究が必要である。

被子植物の発生において、われわれは、MAC 207 抗原決定基が消失する短時間のステージがあることを認めた。これは、孢子嚢の系統の決定時に始まり、そして胚発生の間に終わるもので、この間に受精が起こる。

栄養細胞に存在する MAC 207 抗原決定基は、細胞分化において失われず、またニンジンの培養体細胞の胚分化の間において常時存在することは、AGP 発現の変化は胚分化自体には関係づけられず、特異的に有性生殖に

関係づけられることを示している。

MAC 207 に反応するニンジンの可溶性 AGP は、ベータ鎖のグルカンに結合するレクチンである。

花器に特異的な相補 DNA のクローンは、最近トマトから単離された。そして、花の形態形成を制御すると思われる他の遺伝子は、*Arabidopsis* やトウモロコシを対象とした研究において報告されている。これらの遺伝子の幾つかは、現在クローン化されているが、AGP 発現に関係するらしいものはない。むしろ、MAC 207 によって認識される AGP が雄性孢子嚢ならびに雌性孢子嚢（および栄養細胞を除いた配偶体）から排除されることは、受精に関係した配偶子自体の特性発現の前兆である可能性を示唆するものである。

（抄訳 室伏 旭——東大農）

（協力 大山勝夫——生物研）

Sexual development in the pea is presaged by altered expression of arabinogalactan protein

Pennell R.I. and K. Roberts

Nature 344 : 547-549 (1990)

文献情報

プラスミノゲン活性化因子インヒビター-1 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスにおける静脈閉鎖の発生

プラスミノゲン活性化因子は、血管系における繊維素溶解能を調節しており、プラスミノゲンに作用して活性型の酵素であるプラスミンに転換する。また、これらの繊維素溶解能を調節する主要な酵素は、内因性のプラスミノゲン活性化因子インヒビター (PAI-1) により直接非活性化される。一方、血栓の発生は、血中の PAI-1 の上昇を伴う場合のあることが知られているが、この PAI-1 の上昇と血栓の発生との因果関係については不明な点も多く、慢性的な繊維素溶解能

の低下が血栓の発生を引き起こすか否かについては知られていない。この論文では、ヒト PAI-1 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作出して、血栓障害と PAI-1 の因果関係が調べられた。

トランスジェニックマウスの作出に使用された導入 PAI-1 遺伝子 DNA の構造は、げっ歯類のメタロチオネインプロモーター 1、ヒト血管内皮細胞の PAI-1 遺伝子に対する cDNA および牛成長ホルモンに Poly (A) を付加した塩基配列からなる。このトランスジェニックマウスでは、生後約 3 日齢において尾の先端部に明確な皮下出血が認められる。この変化はマウスの日齢と共に進行し、12 日齢までに尾の先端は壊死を起こして脱落した。さらに、これらのマウスの後肢には浮腫が認められた。組織学的に見て、この尾に認められる壊死と後肢の浮腫は静脈閉鎖の結果と考えられた。この生後 3 日齢に認められる壊死像は、静脈に局所的に存在し、出血および浮腫の部位と一致する。したがって、この時期に認められる筋肉の退行性変化と炎症は、極めて早期の閉鎖性の血管障害が起こっていることを示している。

また、2 週齢までに尾の壊死部は脱落するのに対し後肢の浮腫は回復した。これは、代償機構によるものか、あるいは導入 PAI-1 遺伝子の発現が低下したためと考えられる。そこで、生後の時間の経過に伴う壊死部位と PAI-1 DNA, mRNA およびたんぱく質との関係を調べた。まず、上記の障害を示すマウスの尾から DNA を抽出してヒト PAI-1 cDNA のプローブとハイブリダイゼーションしたところ、両者の間でハイブリッドが形成された。この結果から、1~10 コピーの導入 DNA を持つ 13 匹のトランスジェニックマウスを選別した。これらすべての例において、静脈閉鎖の症状が認められた。また、PAI-1 活性および mRNA の検定結果は、PAI-1 遺伝子の発現は組織学的な状況と一致していることを示していた。次いで、13 匹のトランスジェニックマウスのうちの 6 匹から後代を作出して、6 種の組織における PAI-1 遺伝子の発現が調べられた (表 1)。その結果は、第 2

表1 トランスジェニックマウスの各組織におけるPAI-1 DNA, mRNAおよびたんぱく質

表現型	組 織									
	脾臓	肝臓	腎臓	心臓	脳	肺				
(a)										
コントロール	ND	6.1	ND	0.8	0.1	0.1				
正常尾	5.8	6.9	8.0	1.1	1.1	0.2				
短 尾	438.2	176.3	126.5	12.7	12.2	7.0				
(b)		DNA ¹⁾			mRNA ²⁾		たんぱく質 ³⁾			
	日 齢	4	7	28	4	7	28	4	7	28
コントロール		0	0	0	<0.5	<0.5	<0.5	10	4	6
正常尾		4	2	2	1.4	2.5	<0.5	11	10	9
短 尾		11	8	8	5.6	3.5	<0.5	210	98	21

(a) 各組織におけるPAI-1たんぱく質のレベル (ng/組織重量)

(b) 肝臓におけるPAI-1の, 1) DNAのコピー数, 2) 総RNA量に対するmRNA量(pg), 3) たんぱく質量 (ng/組織重量)

および第3世代においても4日齢の時点では、各組織のPAI-1たんぱく質のレベルと静脈閉鎖の発生との間に直接的な関係を示していた。すなわち、導入遺伝子が発現している短尾のマウスでは、いずれの組織においてもPAI-1たんぱく質量は著しく高値を示し、特に脾臓ではその傾向が顕著に認められた。また、4~28日齢の間に、肝臓におけるPAI-1 DNAのコピー数には明らかな変化はみられなかったが、PAI-1のmRNAおよびたんぱく質量は、正常あるいは正常尾を有する非導入遺伝子発現マウスに近い値にまで低下した。この低下は後肢の静脈血栓の程度の軽減と一致する。これらの結果は、いずれもPAI-1導入遺伝子の発現と血栓の発生との間の密接な関係を証拠付けるものであった。

さらにPAI-1導入遺伝子の発現が低下した原因を知るために、28日齢のトランスジェニックマウスに対してZnSO₄投与が行われた。その結果、この処置により各組織におけるPAI-1遺伝子の発現量は基礎値から4日齢の時点の高値にまで上昇し、血中のPAI-1レベルも投与も20倍にまで上昇が認められた。しかし、PAI-1遺伝子発現の再開により、後肢の静脈閉鎖による浮腫が再発したか否かについては触れていない。マウスおよび鶏の実験においても、内因的なメタロチオネインのピークは生後間もないことが知られている。これらのことから、生後4週齢までの導入

PAI-1遺伝子発現の低下は、内因性のメタロチオネイン発現に対する調節機構が正常に機能した結果と考えられた。

以上の結果から、PAI-1の動態が静脈閉鎖の発生に密接に関連していることが示され、両者の因果関係が明らかにされた。著者等は、この知見が静脈閉鎖疾患に対する診断および処置法の開発に重要なものであるばかりでなく、血栓障害のモニタリングおよび内因性の溶血素システムの調整による予防の可能性を示していることを指摘している。

(抄訳 河野友宏——東農大)

Development of venous occlusions in mice transgenic for the plasminogen activator inhibitor-1 gene

Erickson L.A., G.J. Fici, J.E. Lund, T.P. Boyle, H.G. Polites and K.R. Marotti
Nature 346: 74-76 (1990)

文献情報

Saccharomyces cerevisiae におけるプラスミドの部位特異的組換え系を用いた染色体工学

組換えDNA技術は、新しい遺伝子を導入した系統を作出するうえで最も重要な役割を果たしている。しかし、プラスミドやファージなどの環状DNAベクターを用いて操作できるのは、100kb以下のDNA断片で、扱える遺伝子数も限られることから、最近数百kbの巨大DNA断片をクローニングするための人工染色体ベクターが酵母で開発、研究されている。巨大DNA断片を染色体に組み込む方法としては、相同の塩基配列をもつ特定の染色体領域に起こる部位特異的組換えを利用したバクテリオファージ、P1の*cre-lox*部位特異的組換え系が、酵母の染色体組換えに適用されている(Sauer 1987)。本報では、*Zygosaccharomyces rouxii* から分離したプラスミド、pSR1の部位特異的組換え機能を

利用し、*Saccharomyces cerevisiae* の染色体の特定の領域を欠失、逆位させたり、異なる染色体間で組換えを起こす方法について述べる。

Z. rouxii のプラスミド pSR1 は、*S. cerevisiae* の 2 μ m プラスミドとよく似た構造をもつ全長 6,251bp からなる環状 DNA 分子であるが、2 μ m プラスミドや *S. cerevisiae* のゲノム DNA と相同性は全くない。pSR1 はそれぞれ、959bp の 1 対の逆方向反復列を持ち、その両端の 2,654bp と 1,679bp がループ構造をとっている。2,654bp のループから逆方向反復配列にかけての約 2.1kb の領域が特異的組換え部位 (RS: Recombination Site) である。プラスミド分子内の組換えは、逆方向反復配列中の 58bp の領域で開始され、2,654bp のループ部分にコードされている R たんぱくによって触媒される。そこで、*S. cerevisiae* の染色体の目的部位に pSR1 の RS 断片を挿入し、R 遺伝子を組込んだベクターで形質転換させることにより、染色体を改造することを考えた。

単相の NA 87-11A 菌株の第 XV 染色体における *RAS1* および *HIS3* 領域に YIp プラスミドを用い RS 断片とそれぞれ同一方向あるいは逆方向に挿入した。この菌株は、*RAS1* と *HIS3* 領域の間に *ADE2* 領域をもつ。これに *ade2* の遺伝子型をもつ単相の SH986 菌株を融合することにより複相の染色体を作り、R 遺伝子を組込んだプラスミド pMH153 で形質転換したところ、RS 断片を同一方向に挿入した場合には二つの RS 間の組み換えが起こり、*RAS1-HIS3* 間の *ADE2* を含む 180kb の領域が欠失し、形質転換体の 90% 近くが Ade⁻ の表現型に変わった。一方、RS 断片をそれぞれ逆方向に挿入した場合、形質転換体はほとんど Ade⁺ であったが、*RAS1-ADE2-HIS3* の領域に逆位が起こることが、組換え後の RS 断片近傍の染色体 DNA の制限酵素解析により明らかにされた。

異なる染色体間での組換えは、単相の第 V 染色体 (710kb) の *URA3* 領域と、第 XV 染色体 (1,130kb) の *HIS3* 領域に RS 断片を挿入することによって試みられた。RS 断片がそ

れぞれの染色体のセントロメアに向かって同一方向に挿入されると、二つの RS 間の組換えにより、それぞれ 930kb と 910kb の組換え染色体ができることになる。pMH153 によって形質転換された 55 個のコロニーのうち 11 コロニーから 900kb 前後の移動度の異なる染色体のバンドがパルス・フィールド・ゲル電気泳動によって検出された。一方、RS が第 V 染色体と第 XV 染色体においてセントロメアに向かって逆方向に挿入された場合、セントロメアの無い 540kb の染色体と 2 個のセントロメアを持つ 1,320kb の染色体が作られることになる。このような染色体は細胞に致死をもたらすことが考えられ、形質転換体として出現した 52 個のコロニーからは組換え染色体は検出されなかった。さらに、この形質転換体は培地上での生育が極端に衰えていた。

RS と R たんぱくによる組換え頻度はかなり高く、組換え体のスクリーニングも容易である。この部位特異的組換え系は、それぞれ遺伝形質の異なるハイブリッド細胞に用いると、さらにバリエーションが広がり、使用頻度も高まるだろう。改造された染色体には 1 ~ 2 コピーの RS が残存するが、R 遺伝子を含んだプラスミドをキュアリングすることにより、新たな組換えを防ぐことができる。

本法により、真核生物の染色体に巨大 DNA 断片を挿入したり、削除することが可能と考えられ、例えば代謝経路に関与する多数の遺伝子群の導入や、染色体異常による不妊クローンの作成など応用範囲も幅広く、植物など他の生物の細胞工学・染色体工学においても果たす役割は大きいと思われる。

(抄訳 若生忠幸——東北大農)

Chromosome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* by using a site-specific recombination system of a yeast plasmid
Matsuzaki H., R. Nakajima, J. Nishiyama, H. Araki and Y. Oshima
J. Bacteriology 172: 610-618 (1990)

第8回窒素固定国際会議に参加して

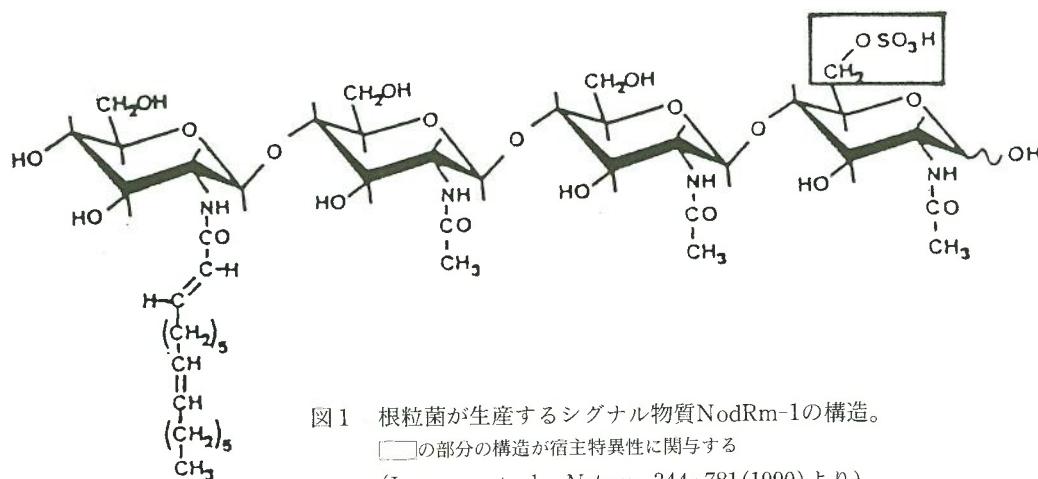
農林水産省 農業生物資源研究所 窒素固定研究室

河内 宏

窒素固定国際会議(International Congress on Nitrogen Fixation)は、1ないし2年おきに開催される生物的窒素固定に関するもっとも重要な研究集会で、第8回にあたる今回は米国テネシー州ノックスビル市で5月20～26日の1週間開催された。参加者は約700名、およそ400のポスター発表と60の招待講演が行われた。この会議は生物的窒素固定研究のあらゆる分野を含んでいるが、今日この分野での研究の主力はマメ科植物—根粒菌の共生窒素固定系に注がれており、今回の会議での発表の大半と討議の中心は共生窒素固定に関するものであった。間1日のエクスカージョンをのぞいて講演は連日朝9時から夜10時まで間断なく行われたが、会議の中心となるポスターの発表は広い会場に期間中を通じてすべてが展示され続けたので、参加者は関心のある講演を聞き、その合間に繰り返しポスターを発表をながめ、討論するというようにして一週間を過ごした。以下、筆者が興味をひかれたいくつかの話題について紹介する。

根粒菌からのシグナル物質の発見

根粒菌が宿主植物を認識し、感染成立にいたる最初の相互作用を引き起こすシグナル物質を単離同定したフランスのDenarieらの発表は今回の会議のハイライトといえよう。この物質は4個のアシルグルコサミンを骨格とする分子量およそ1000の化合物(図1)で、きわめて低い濃度で感染の最初のステップである根毛の変形を引き起こすことができる。これは人為的に根粒形成(*nod*)遺伝子の発現を誘導したアルファルファ根粒菌の培養液中から単離されたが、重要なことはこの物質の合成にはすべての根粒菌に共通に存在する*nodA*, *B*, *C*遺伝子が関与しており、宿主特異性に関係する側鎖の修飾には宿主特異的な*nodH*, *Q*遺伝子が関与しているということである。このことは、この物質が多くのマメ科植物—根粒菌共生系において普遍的な重要性をもつということを予想させるもので、実際いくつかの研究室ではアルファルファ



菌以外から同様なシグナル物質を単離しようとする試みが始められていた。この状況は、1985年にオレゴン州立大で行われた第6回の会議でやはりアルファルファを材料として植物根の分泌するある種のフラボノイドが根粒菌の *nod* 遺伝子の発現を引き起こすシグナル物質であることがはじめて報告されたときとよく似ている。その後1年ほどの間に、多くのマメ科植物で対応する根粒菌の *nod* 遺伝子の発現を促すのに特異的なフラボノイドが次々と同定され、*nod* 遺伝子の発現機構の研究の前進の契機となった。微生物側からのシグナル物質については、その探索がいまのところ植物を用いたバイオアッセイによらなければならないため、フラボノイドの場合ほど短期間にデータが集積するとは期待できないが、今後微生物側からのシグナル物質が次々に単離同定されて行くであろうことは疑いない。

遅れている植物側の研究

根粒菌が植物に感染すると感染を受けた根の部位は根粒と呼ばれる特異な瘤を形成し、根粒菌はこのなかで植物細胞と共生して窒素固定能を発現する。共生窒素固定に関わる植物側のもっとも重要な機能は共生の場としての根粒の形成にあるといつてよい。しかしマメ科植物がもつこうした根粒形成の分子レベルでのメカニズムは今日まだほとんど解明されていない。感染後、根粒が形成される過程で発現する一群の特異的な植物遺伝子産物—いわゆる *nodulin*—の発現機構やその機能については、レグヘモグロビン遺伝子の発現調節機構や、植物細胞と共生微生物の境界膜に局在する *nodulin-26* の構造と機能などをめぐって、いくつかの重要な発表があった。しかし、成熟した根粒の生理研究は別にして、根粒形成過程すなわち植物側からの共生機構の研究は、研究人口が少ないということもあるが大きく前進しているとはいえず、発表数も過去2回の会議に比べて少ないように思われた。感染初期における微生物側からのシグナル物質が特定されたことにより、今後このシグナルの受容機構をはじめとして宿主植物

側の研究が新しい展開をみせるかも知れない。

非マメ科植物への根粒形成の可能性

根粒菌の *nod* 遺伝子を組み込んだ *Agrobacterium* がマメ科植物根に根粒様構造（疑似根粒とよばれる）を形成することはすでに1985年に示されていたが、最近ではある種のホルモン処理などによっても似たような現象が観察されており、さらに何の外部刺激がなくても自発的に疑似根粒を形成する植物ミュータントもとられている。根粒菌の *nod* 遺伝子の発現を介さない疑似根粒が、はたして共生窒素固定の場としての正常な根粒と共通の性格を持つものかどうかまったく疑問がないわけではないが、いずれにしても根粒形成はすべて植物側にプログラムされており、根粒菌のシグナルがこれをオンするという考え方が現在支配的である。だとすればこのプログラムがマメ科植物に特有なものなのか、それともプログラム自体はすべての植物に共通に保持されており、これをオンするためのシグナルの受容機構がマメ科植物に固有のものなのかという疑問が生ずる。これに関連してイネ、ムギなどの単子葉植物に根粒を形成させようという試みがいくつか発表され、この中には実際イネに窒素固定根粒を形成させたという中国からの報告もあり、話題になった。中国からの報告は窒素固定活性とともにレグヘモグロビンの発現も認めたというもので、事実とすればきわめて衝撃的なものだが、発表されたデータは共生窒素固定根粒の形成を証明するのに十分なものとは必ずしもいえず、発表者が実験の詳細を秘密にしたこともあって、多くの人は懐疑的であった。しかし、根粒菌の宿主特異性に関与する遺伝子を操作することにより、あるいは植物ホルモンや酵素処理などの補助的手段を用いた場合、窒素固定活性や関連する植物側の遺伝子発現は示されていないが、構造的にはほぼ正常にちかい根粒が形成される場合があり、少なくとも、ある条件のもとできわめて低い頻度ではあるものの、根粒との相互作用によって単子葉植物が根粒（様構造）を形成しようということ

は事実のように思われる。

根粒形成が基本的に植物側にプログラムされるといっても、感染—根粒形成—窒素固定能発現という比較的長い時間的経過をたどる一連のプロセスの各段階で複雑な植物—微生物相互作用が働いていることは疑いがなく、感染初期段階だけでなくその以降も植物・微生物双方からの共生の相手に対する認識と選択の機構が働いている。認識・感染の初期過

程の分子論的理解は主として微生物側からの研究によって現在もっとも急速に前進しているが、機能的な側面も含めて、共生成立にいたる複雑なプロセスの全体像が解明されるためには今後、植物側、微生物側双方からの分子生物学的アプローチを中心とした組織的な研究がますます重要になっているといえるだろう。

国際学会レポート

第7回国際植物組織培養学会に参加して

農林水産省 農業生物資源研究所 細胞情報研究室

大野 清春

1. はじめに

第7回国際植物組織培養学会が、1990年6月24～29日にかけて、オランダ王国アムステルダム市のRAI国際会議場でR.A. Schilperoort博士を大会委員長として開催された。今回、参加する機会を得たので本学会の概要等について紹介することとしたい。

国際植物組織培養学会は第1回が1965年米国で開催された。参加者はほぼ100名であり、日本人参加者は4名で、林氏ら3名が発表を行っている。第2回は1970年フランスで開催され、43題の発表の内、建部氏や新関氏らにより、タバコのプロトプラスト培養、イネの蒴培養を含めた4題が日本人により発表されている。第3回は1974年に英国で行なわれ、同様に日本から4題の発表がなされている。第4回はカナダのカルガリー大学で開催され、48の口頭発表の内6題が日本人の発表による。他にポスター発表が300題あり、日本人の発表が11題含まれている。全体としては400人をこえる参加者の学会となってきたが、日本人の参加者は約20名と少なかった。第5回は1982年日本の箱根で開かれた。この時の会議

参加者は日本人300人、外国人400人と世界各国から多数の参加があった。第6回は米国ミネソタ大学で開催されたが、北米で開かれたことおよび、おりからのバイオテクノロジーの興隆初期でもあり、参加者は約1500名と倍増した。日本からの参加者はリストにのっているもので約100名となっている。第5回までの発表者はほとんどが大学あるいは公的研究機関の研究者であるが、第6回では企業に所属する研究者の発表が急増している。これは企業におけるバイオテクノロジーの研究が成果を挙げつつあることを示している。

2. 学会における研究の動向

本学会は単に植物の組織培養に関するものばかりでなく、細胞生物学を中心とした広く植物科学に関連した基礎研究と産業への応用に関する学会である。

アムステルダム市における第7回国際植物組織培養学会は、オランダが花卉類の育種栽培に力を入れているのを反映し、参加者は前回よりもさらに増加し、参加者2200名の大きな学会となった。参加者はオランダ250人、英国210人、フランス190人、アメリカ180人、

西ドイツ160人、日本130人であり、インド、中国からも多数の参加者があり、参加国数は70か国に及んでいる。日本からの参加者は約80名が大学および国公立研究機関、50名が企業からである。発表題数は約1400題であり、日本からの発表は約80題であった。

研究分野別の発表数は研究の現状と将来の動向を考えるのに有効であるので次に示す。

第7回植物組織培養学会における研究分野別の発表登録課題数

A. 遺伝的操作と増殖

大量増殖	242(7)
プロトプラス・細胞・組織培養	160(6)
遺伝子導入	152(6)
突然変異・体細胞突然変異	107(7)
体細胞雑種と細胞器導入	77(6)
薬・花粉培養の応用	46(6)
操作あるいは増殖した植物の解析	43(7)
薬・花粉培養の発育の見地からの解析	36(6)

B. 形態形成と代謝

体細胞胚の形成	132(7)
形態形成	95(6)
植物生長調節物質	53(6)
一次代謝	29(6)
胚発生における遺伝子の調節	16(7)
光生物学	16(5)

C. 二次代謝

生産量増大のための戦略	54(5)
輸送と蓄積	49(5)
生合成における酵素	40(4)
新物質生産	21(6)
大規模培養	19(6)
ゼノバイオティクスの生物変換	16(6)

D. バイオテクノロジーと発展途上国

21(5)

E. 低温保存

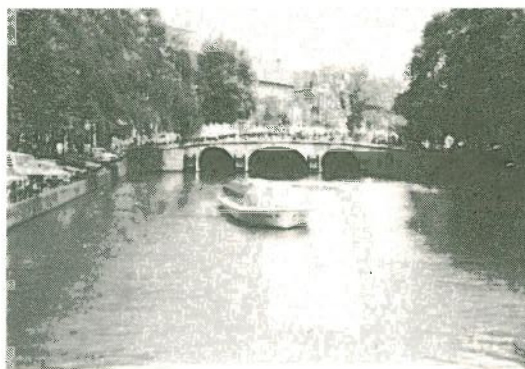
22

微生物と植物細胞のインターラク

ション 12

その他 2

()は口頭発表の内数
他はポスター発表



アムステルダムの運河 会議の合間の
エクスカージョンでの市内の遊覧

このように最大のセッションは種苗の大量増殖に関するもので、242題(17%)の発表がなされた。これは、農作物、工芸作物、樹木等あらゆる植物において研究が進められていることを示しており、また、企業からの発表も多く植物産業上の技術として、組織培養による種苗増殖法が確立しうること示している。次いでプロトプラス培養等、細胞操作の基本に関するものが160題である。ここでは、インビトロで綿の繊維を作る試みなど新しい技術としての展開をさぐる報告もあった。

バイオテクノロジーの中心分野である遺伝子導入は、152題と前回に比べて急増した。また、細胞融合では77題、細胞操作した植物の特性に関するものは43題の発表があった。遺伝子導入は1983年の植物における最初の報告以来、タバコ、ペチュニアなどで多くの報告がある。本学会でも、トウモロコシ、イネ、オオムギ、アルファルファ、メロン、ブラシカ、トマト、ジャガイモ等で遺伝子導入の報告がなされた。遺伝子導入はカナマイシン抵抗性遺伝子、GUS遺伝子等のマーカー遺伝子の導入が多く、わずかにスーパーオキシドデスムターゼ、除草剤抵抗性遺伝子の導入が報告されていた。このように実用形質の導入になると単離・解析されている遺伝子が限られていることもあり、新しい有用遺伝子の確保がこの技術の発展の上でも極めて重要である。いずれにしても、マーカー遺伝子の導入については、一般的な技術になっており、今学会での発表の中で遺伝子導入手法としてパーティクルガンの利用の報告が20題もあった



学会におけるポスター発表とディスカッション

のは特筆すべきであろう。細胞融合は1978年のポマトの作出報告以来、多数の研究が行なわれたが、本学会ではより制御された融合技術の開発やゲノム DNA の一部、オルガネラの導入等、遺伝子導入技術で対応できない領域への展開が認められる。特にウィルス抵抗性 PLRV, PVX 等のジャガイモへの導入、TMV 抵抗性のタバコへの導入、ミトコンドリアの導入によるブラシカ、イネ、ビートでの細胞質雄性不稔の作出など実用化への方向で確実に研究の進展がうかがえた。

体細胞胚形成は培養細胞から個体を复原する最も基礎的技術といえ、さらに大量増殖技術への応用へと展開している。イネ科、マメ科、パーム、コーヒー、キャッサバ、クリ、あるいはバナナなどにおいて複数の研究グループの報告があり、他の作物での発表、胚形成過程における遺伝子発現の解析等を含め132題の発表があった。体細胞突然変異は107題の発表があり、トウモロコシ培養細胞中でのトランスポゾンの挙動などに興味深いものがあつた。体細胞突然変異は、培養の過程において、ゲノム、染色体、遺伝子に種々の突然変異が誘発される現象であり、12年前からその育種的な意義が認められている。培養細胞の遺伝的安定性という見地からも現在の植物組織培養研究の重要な課題の一つとなっている。近年では特にそのメカニズムに強い関心がよせられている。

二次代謝産物の生産は、培養細胞の直接的利用として多大の関心がよせられている。この分野の発表は6セッション合わせて199題であった。これは、この分野が停滞している

のでなく、細胞、遺伝子操作などの分野へ多くの新しい研究者の流入が生じていることを示している。

ところで過去の植物組織培養学会における中心的なトピックスをあげてみると

1978年 イネの薬培養による品種育成

1982年 細胞融合と細胞選抜

1986年 二次代謝産物の実用化

イネプロトプラストの分化

などが主要なものであろう。

1990年は、遺伝子操作技術の広範な展開、

胚発生などにおける分子生物学

をあげることができよう。

このようなトピックスにおける日本の研究者の寄与はいずれの場合においても極めて大きいことは注目すべきことである。これは、日本における植物組織培養研究者の層が大変厚いこととも関係していよう。ちなみに IAPTC の日本人会員(日本植物組織培養学会：事務局；東大農学部微生物利用学研究室内、Tel 812-2111 内線 5142—の会員は同時に国際植物組織培養学会の会員として登録される)は、1986年の771名から1988年の1218名で1988年度の全世界の会員数は72か国3714名である(1990年現在では日本人会員は1500名になる)。日本人会員は、IAPTC のほぼ1/3の多数をしめている。これから考えると、日本からの学会参加者および発表数はまだまだ少ないといえる。

植物バイオテクノロジーに対して世界の研究者や企業の関心は相変わらず高く、また、研究者層もますます厚くなってきている。今後さらに、基礎的研究や技術の応用で多大の成果のであることを期待したい。

(本学会のプロシーディングはすでに市販されているので詳細な発表課題については参照されたい)

Nijkamp H.J.J. ら編

Progress in Plant Cellular and Molecular Biology

Kluwer Academic Publishers

Dordrecht, The Netherlands pp. 810

編集後記

本誌の構成は「国内情報」、「文献情報」、「海外便り」、「国際学会レポート」とときどき入れる「特別情報」からなっています。このなかで「海外便り」というのは、現に外国に滞在されている方からの情報を載せることにしていますが、連絡の往復に時間がかかって、

ときどき抜けることもあります。本号も都合がつかなくて抜けてしまいました。海外に長期滞在されている適当な方をご存知の方は、産、官、学どなたでも結構ですから御紹介いただければ幸いです。

(大畑記)

ブレイン テクノニュース (第22号)

平成2年11月15日発行

発行者 佐野宏哉

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