

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

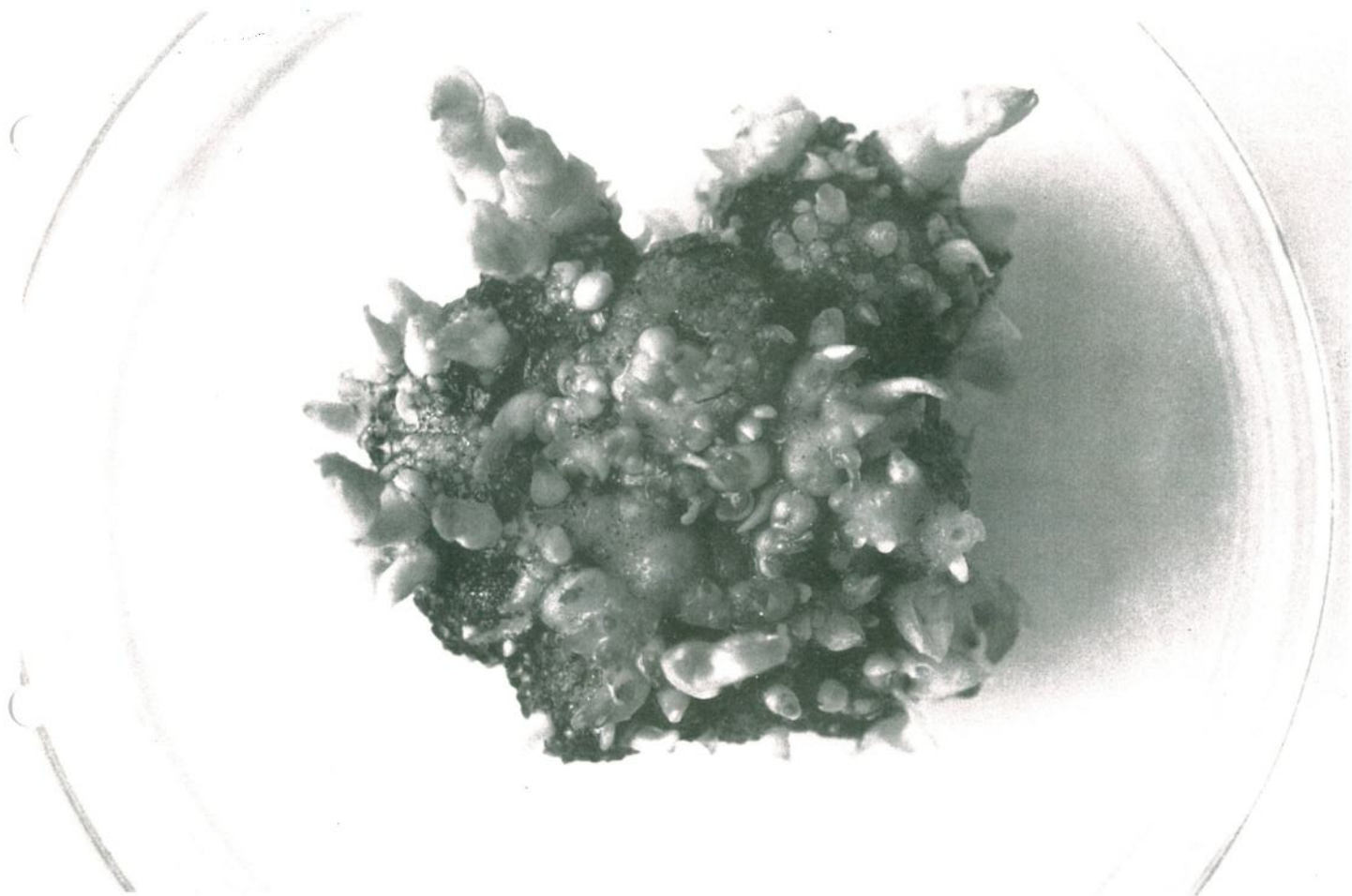
TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 23 号

JANUARY 15, 1991



表紙説明

シオデの茎頂組織の多芽体化

多数の不定芽形成

(本文 8 ページ参照)

本号の紙面

- 国内情報..... 1
クラミドモナス炭酸脱水素酵素, 属間交雑によるコムギ半数体作出, シオデの連続多芽体培養, ハイブリッドミツバチふくおかハイクイーン, 発光細菌による微生物センサー
- 文献情報..... 16
高温耐性誘導に必要な HSP 104, 非病原性遺伝子の植物病原細菌の感染における役割, 花を変える, 雄性不稔植物の作り方, 植物プランクトンのウイルス感染
- 国際学会レポート..... 23
日米セミナー「病原体と宿主植物の分子戦略」
- 特別情報..... 26
根粒菌の共生機構

口 絵

国内情報

福澤秀哉

クラミドモナス炭酸脱水素酵素の分子生物学…………… 1

稲垣正典

属間交雑を利用するコムギ半数体の作出…………… 5

黒田 秧

シオデの連続多芽体培養による大量増殖…………… 8

深江義忠

ハイブリッドミツバチ「ふくおかハイクイーン」の作出…………… 11

軽部征夫

発光性細菌を用いる新しい微生物センサー…………… 13

文献情報

高温耐性誘導に必要なHSP104…………… 16

非病原性遺伝子 *avrB*₂ は

病原細菌が植物に感染するうえで重要な働きをしている…………… 17

花を変える…………… 18

雄性不稔植物の作り方…………… 20

植物プランクトンのウイルス感染と一次生産の減少…………… 21

国際学会レポート

羽柴輝良

「病原体と宿主植物の分子戦略」に関する日米セミナーに参加して…………… 23

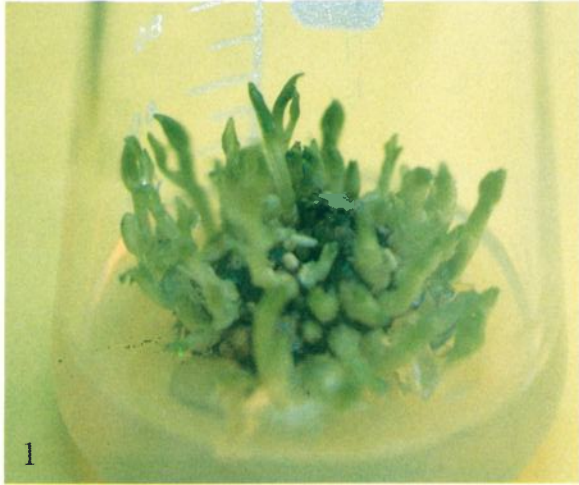
特別情報

宮下清貴

根粒菌の共生機構について…………… 26

シオデの連続多芽体培養による大量増殖

(本文 8 ページ参照)



1. 多芽体からの不定芽の伸長
2. 切り出した不定芽からの発根
3. 葉片からの不定芽形成
4. 幼植物

国内情報

クラミドモナス炭酸脱水酵素の分子生物学

東京大学 応用微生物研究所

福澤 秀哉

はじめに

光合成生物にとって CO_2 は固定基質であるが、現在の大气レベルの CO_2 濃度 (0.04%) は光合成の律速段階となっている。つまり光合成生物は CO_2 ストレスにさらされているといえる。特に水生光合成生物にとっては、いかにして低濃度にしか存在しない溶存無機炭素 (CO_2 , HCO_3^-) を効率よく利用するかが課題となる。

炭酸脱水酵素 (カーボニックアンヒドラーゼ: CA) は水中で CO_2 と HCO_3^- の交換反応を触媒する亜鉛酵素で、動植物に広く分布する。光合成生物においては細胞内外に微量しか存在しない CO_2 を水和・脱水することにより CO_2 の輸送を促進して、光合成時における細胞の CO_2 に対する親和性を高める働きをしていると考えられている¹⁾。特に微細藻類においては細胞外の CO_2 濃度 (培養中に通気する空気の CO_2 分圧) によって細胞の光合成特性が変化することが知られている。あらかじめ高 CO_2 濃度 (5%) で通気培養しておいた細胞 (高 CO_2 細胞) では、低レベルの溶存無機炭素を有効に利用する能力が低下する。しかし、この細胞を低 CO_2 条件 (0.04% CO_2 を含む通常の空気で通気する条件) に移すと数時間後には細胞が CO_2 に対して高い親和性を示すように適応し、これと同時に CA 活性が上昇してくる。単細胞緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) においても細胞を高 CO_2 濃度 (5%) で通気培養すると CA 活性は低下し、 CO_2 濃度を大气レベル (0.04%) まで低下させると CA 活性が誘導される。この CA 活性の調節は遺伝子発現の段階で調節されること

が明らかになってきた。ここでは、 CO_2 濃度の変動と光によって調節される CA の構造及び生合成とその遺伝子の発現調節について我々の研究結果を中心に述べる。

1. クラミドモナス CA のサブユニット構成²⁾

クラミドモナス細胞においては CA 酵素タンパク質は細胞の表層に存在していると考えられている。またコンカナバリン A のカラムに酵素が結合することから、マンノース型の糖鎖を含んでいることが示唆されている³⁾。クラミドモナス CA は還元剤 DTT 処理により活性が消失するとともに分子量約 80 kDa (低角レーザー光散乱法では 76 kDa) のホロ酵素が大小 2 種類 (A, 35 kDa と B, 4 kDa) のサブユニットに分離したことから、各サブユニット間はジスルフィド結合 (S-S 結合) によって会合していることが推測された。また、A サブユニットはホロ酵素中に 2 個存在するが、SDS ゲル電気泳動ではさらに 35 kDa と 36.5 kDa に分離した。大サブユニットと小サブユニットのモル比は 1 : 1 であり、ホロ酵素の分子量を考慮すると CA ホロ酵素は 2 個の大サブユニットと 2 個の小サブユニットからなるヘテロ四量体 (図 1 参照) であることが示唆された。また亜鉛の含量を原子吸光法で測定したところ、ホロ酵素 1 分子当たり亜鉛は 2 個存在することが明らかとなった。部分アミノ酸配列の解析から A サブユニットに動物 CA で明らかにされている亜鉛結合部位 (Gln-Phe-His-Phe-His) が存在することが示された。これまで知られていた動物の CA 酵素はすべて単量体で活性をもつのに対し、

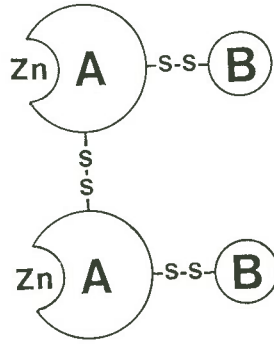


図1 クラミドモナス炭酸脱水酵素のサブユニット構成のモデル²⁾
 大小サブユニットはそれぞれAとBで示してある。ただし大サブユニットは2種類のサブコンポーネント(A₁, 35kDaとA₂, 36.5kDa)から成っている。サブユニット間のジスルフィド結合は—S—S—で示した。糖鎖は大サブユニットに結合している。

今回明らかにされたクラミドモナスCAはヘテロ四量体の構造をもつ新しいタイプの酵素であることが明らかになった。

2. CAの一次構造と生合成⁴⁾

クラミドモナスCAの構造と生合成過程を明らかにするためにCAタンパク質をコードするcDNAを単離して構造を明らかにした。

まず酵素の部分アミノ酸配列を決定し、この配列をもとにクラミドモナスに特徴的なコードン使用頻度を考慮して作成した合成オリゴヌクレオチドプローブ2種類(Pr68とPr56)を使用してcDNAライブラリーをスクリーニングした。得られたクローンのうち挿入断片の長さが最長のクローン(gtCA1, gtCA3)について塩基配列を決定したところ、以下の事実が明らかとなった。gtCA3は30bpの5'非翻訳領域、377個のアミノ酸をコードする1131bpのコード領域、790bpの3'非翻訳領域、21個のポリAからなっていた。またgtCA1はgtCA3に比べて少し短く5'非翻訳領域が21bp、ポリAの数が11個でその他の部分はgtCA3と完全に一致した。gtCA3の挿入断片を試験管内で転写・翻訳させてできるタンパク質はクラミドモナスCAに対する抗体と反応し、その分子量は約41kDaであったことから、得られたcDNAは確かにクラミドモナスCAタンパク質をコードしていることが明らかになった。前駆体のN末端には20個の疎水性の高いアミノ酸からなるシグナルペプチドが存在し(図2参照)、その直後21番目のシステイン残基が大サブユニットのN末端(Cys-20)であった。さらにこれに続

<i>Chlamydomonas</i> CA	MARTGALLVALALAGCAQACIYKFGTSPD [▼] SKATVSGDHDHGLNGENW [○] E [○] GGKDGAGN [○] AW [○] ----CKTGRK [○] QSPINVPQYQVLDG	80
Human CAI	ASPDW [○] GYDDKNGPEQMSKLYPIANGN [○] QSPVDIKTSETKHD	41
Human CAII	SHHW [○] GYGKHNGPEHMKDFIAKGERQSPVDIDHTAKYD	40
Human CAIII	AKEM [○] GYASHNGPDHMKELFPNAKGEN [○] QSPVELHTKDIRHD	40
<i>Chlamydomonas</i> CA	KGSRI [○] IANGLQ [○] TQW [○] SY [○] PD [○] LM [○] SN [○] GT [○] SVQV [○] IN [○] NG [○] H [○] TI [○] QW [○] NT [○] Y [○] YAGHATIAIPAMHNQT [○] NR [○] I [○] VDV [○] LEM [○] RP [○] ND [○] AADR [○] VTAVPT	160
Human CAI	TSLK [○] -----PISVSY [○] NP [○] ---ATIAKEI [○] LN [○] GH [○] S [○] FHW [○] N [○] FEDND [○] -----NBS [○] --VLKGG [○] PFSD [○] SY [○] RL [○] F	91
Human CAII	PSLK [○] -----PLSVSY [○] LD [○] ---AITS [○] LR [○] I [○] DN [○] GH [○] AF [○] N [○] VE [○] FDD [○] SO [○] -----DKA [○] --VLKGG [○] PL [○] Q [○] GT [○] Y [○] RL [○] I	90
Human CAIII	PSLQ [○] -----PWSVSY [○] LD [○] ---GISAK [○] T [○] IL [○] NG [○] R [○] K [○] TV [○] RV [○] FD [○] DT [○] -----D [○] BS [○] --ML [○] RG [○] GL [○] PG [○] Y [○] RL [○] R	90
<i>Chlamydomonas</i> CA	IQ [○] F [○] H [○] F [○] H [○] ---ST [○] ---SE [○] H [○] LL [○] AG [○] K [○] I [○] VP [○] LE [○] L [○] H [○] I [○] V [○] H [○] Q [○] V [○] T [○] E [○] LE [○] AC [○] GG [○] CF [○] SV [○] T [○] GL [○] ---FQ [○] DD [○] GG [○] PD [○] DEL [○] LE [○] PI [○] FAN [○] PS [○] REG [○] T	230
Human CAI	IQ [○] F [○] H [○] HW [○] GS [○] T [○] NE [○] H [○] GS [○] E [○] HT [○] VD [○] GV [○] K [○] Y [○] SA [○] EL [○] H [○] V [○] A [○] HW [○] NS [○] AK [○] Y [○] SSL [○] AE [○] AA [○] SK [○] AD [○] GL [○] AV [○] IG [○] VL [○] M [○] K [○] VG [○] E [○] AN [○] PK [○] L [○] Q [○] V [○] LD [○] AL [○] Q [○] AI [○] K [○] -T	169
Human CAII	IQ [○] F [○] H [○] HW [○] GS [○] LD [○] GG [○] SE [○] HT [○] VD [○] K [○] K [○] Y [○] AA [○] EL [○] H [○] L [○] V [○] HW [○] NT [○] -KY [○] G [○] D [○] F [○] G [○] AV [○] Q [○] PP [○] D [○] GL [○] AV [○] L [○] GI [○] F [○] CK [○] VG [○] SA [○] K [○] P [○] GL [○] K [○] Q [○] V [○] VD [○] V [○] LD [○] AI [○] K [○] -T	167
Human CAIII	IQ [○] F [○] H [○] HW [○] GS [○] SD [○] D [○] H [○] GS [○] E [○] HT [○] VD [○] GV [○] K [○] Y [○] AA [○] EL [○] H [○] L [○] V [○] HW [○] NP [○] -KY [○] NT [○] F [○] KE [○] AL [○] K [○] Q [○] R [○] D [○] GI [○] AV [○] IG [○] I [○] F [○] L [○] K [○] Q [○] H [○] ENG [○] EF [○] Q [○] I [○] FL [○] D [○] AL [○] D [○] K [○] I [○] -T	167
<i>Chlamydomonas</i> CA	FS [○] N [○] L [○] PAG [○] TI [○] IK [○] L [○] G [○] ELL [○] PS [○] DR [○] D [○] Y [○] VT [○] Y [○] EG [○] SL [○] TP [○] PC [○] SE [○] GL [○] L [○] HW [○] MT [○] Q [○] DR [○] IS [○] F [○] G [○] W [○] NR [○] Y [○] RL [○] AV [○] L [○] G [○] L [○] KE [○] C [○] NST [○] Y [○] E [○] TAAD [○] AG [○] H [○] H [○] H	310
Human CAI	KGKRAP [○] FT [○] N [○] FD [○] PS [○] TL [○] LP [○] SS [○] LD [○] FW [○] TY [○] PG [○] SL [○] TP [○] PL [○] Y [○] ES [○] V [○] TW [○] IT [○] CK [○] ES [○] IS [○] V [○] SS [○] EQ [○] LA [○] Q [○] FR	227
Human CAII	KGKSAD [○] FT [○] N [○] FD [○] PR [○] GL [○] LP [○] ES [○] LD [○] Y [○] MT [○] YP [○] GS [○] LT [○] TP [○] PL [○] LE [○] CV [○] TW [○] IT [○] VL [○] KE [○] PI [○] SV [○] SS [○] EQ [○] VL [○] K [○] FR	225
Human CAIII	KGKEAP [○] FT [○] K [○] FD [○] PS [○] QL [○] LP [○] AC [○] RD [○] Y [○] MT [○] Y [○] GS [○] LT [○] TP [○] PC [○] EE [○] CV [○] W [○] LL [○] KE [○] PM [○] TV [○] SS [○] Q [○] MA [○] K [○] LR	225
<i>Chlamydomonas</i> CA	HRRLLNH [○] AH [○] LE [○] EV [○] PAAT [○] SE [○] PK [○] HY [○] FR [○] RV [○] ML [○] AE [○] SA [○] NP [○] DA [○] Y [○] T [○] CK [○] AV [○] AF [○] GO [○] NR [○] FR [○] NP [○] OY [○] ANG [○] R [○] T [○] IK [○] L [○] AR [○] Y [○] H	377
Human CAI	-----S [○] LL [○] SN [○] VE [○] GD [○] NA [○] VP [○] M [○] Q [○] HN [○] RP [○] TP [○] LP [○] L [○] K [○] GR [○] TV [○] R [○] -AIS [○] F [○] K	260
Human CAII	-----K [○] LN [○] FN [○] GE [○] GE [○] PE [○] EL [○] M [○] VD [○] N [○] WR [○] PA [○] OP [○] L [○] K [○] NR [○] Q [○] IR [○] -AIS [○] F [○] K	259
Human CAIII	-----S [○] LL [○] SS [○] AE [○] NE [○] PP [○] VL [○] SN [○] WR [○] PP [○] Q [○] IN [○] NR [○] V [○] VR [○] -AIS [○] F [○] K	259

図2 クラミドモナス炭酸脱水酵素(CA)とヒトCAイソ酵素(CAI, CAII, CAIII)のアミノ酸配列の比較⁴⁾
 アミノ酸は1文字表記で示している。クラミドモナスと一致するアミノ酸残基は箱で囲ってある。マンノース型の糖鎖が付加する可能性のあるアスパラギン残基は(▼)で示した。亜鉛が結合すると予測されるヒスチジン残基は(●)で、ヒトCAで活性に必要とされているアミノ酸残基は(○)で示した。矢印は、シグナルペプチドと大サブユニット間および大小サブユニット間を示す。

いて小サブユニットのN末端(Ala-341)が見いだされた。このことから、CAは推定分子量41,626 Daの前駆体としてまず合成され、シグナルペプチドの除去・大小サブユニット間のプロセッシングが行なわれると考えられた。このように大・小両サブユニットが1本の前駆体から生成する点はCAの大小サブユニットの組成比が2:2とした先のサブユニット構成のモデルとよく一致する。また前駆体の推定分子量は *in vivo* ラベル実験において検出された前駆体の分子量(42kDa)⁹⁾とよく一致した。cDNAの配列から予測される大サブユニットの分子量は35,603 Daであり化学的に除糖した場合の分子量32kDa⁹⁾よりも大きいことから、大サブユニットのC末端部位はプロセッシングの過程で除去されている可能性が示唆された。この点を明らかにするためには大サブユニットのC末端を決定する必要がある。また大サブユニットの内部にはマンノース型の糖鎖の付加部位(Asn-Xaa-Thr/Ser)と考えられるアスパラギン残基(Asn-101, Asn-135, Asn-297)が見いだされた。さらにS-S結合の形成に関与すると考えられるシステイン残基は大サブユニットに4か所、小サブユニットには1か所(Cys-351)見いだされた。この小サブユニット中のCys-351は大サブユニットとのS-S結合に寄与していると考えられる。

ヒトCAは7種類のイソ酵素の存在が示されているが、その中でCA IとCA IIはすでに結晶構造の解析が行なわれており、亜鉛の配位するヒスチジンははじめとする活性に必要なアミノ酸残基が知られている。クラミドモナスCAはヒトCAと約20%の相同性を示し、ヒトCAで活性に必要とされているアミノ酸残基はいくつかの例外をのぞいてよく保存されていた(図2参図)。興味深いことに4kDa小サブユニットにも活性に必要とされるアミノ酸残基(Asn-359, Arg-361)が見いだされたことから、小サブユニットは、ホロ酵素の中で活性部位の近傍に位置することが予想された。ここで示したようにクラミドモナスCAの両サブユニットがどちらも共にヒトのCAと有意な相同性を示すことから、ク

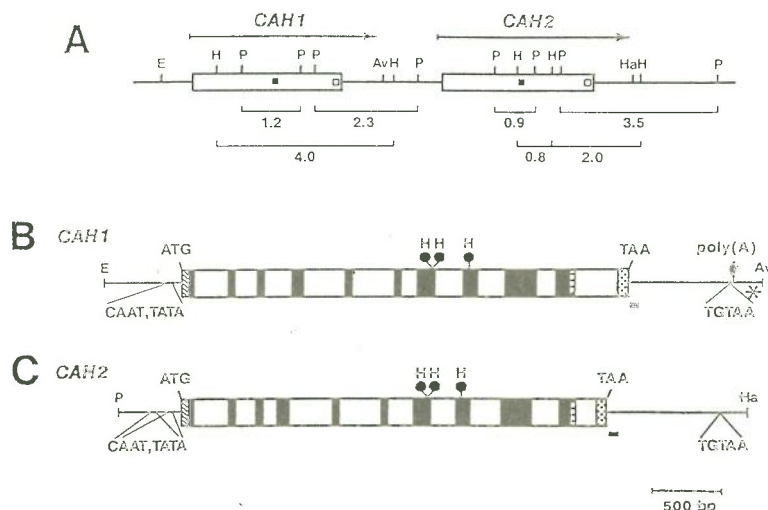


図3 クラミドモナス炭酸脱水酵素遺伝子の構成⁷⁾

(A)イントロンを含めたコード領域を箱で示した。2種類のプローブ(Pr68とPr56)に相当する位置をそれぞれ(■)と(□)で示した。(B,C)CAH1ならびにCAH2遺伝子の構造^{7,8)}。タンパク質をコードしている領域のうちシグナルペプチドは斜線、大サブユニットは黒塗りの箱、小サブユニットは点を打った箱でそれぞれ示した。Hは亜鉛の結合するヒスチジン残基を示す。遺伝子の5'上流部位に認められるプロモーターの要素(CAAT, TATA)ならびに3'下流部位にみられるポリAシグナル(TGTA)が示されている。

ラミドモナスCAもヒトCAと共通の祖先から進化し、その進化の過程でサブユニットにプロセスされる過程を獲得したと考えることもできよう。

最近になって高等植物(ホウレンソウ⁹⁾とエンドウ⁹⁾)葉緑体CAをコードするcDNAが単離され一次配列が明らかになったが、クラミドモナスの配列とは相同性が認められなかったことから、葉緑体CAはクラミドモナス細胞表層CAやヒトCAとは進化上別の起源をもつのかも知れない。

3. CA 遺伝子の構造と発現^{7, 9)}

まずCA遺伝子のコピー数を知るために、cDNAのスクリーニングに用いた合成オリゴヌクレオチドプローブ2種類(Pr68とPr56)を用いたゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行なったところ、CAをコードする遺伝子は2コピー存在すると考えられた。EMBL3を用いてゲノムライブラリーを作成し、これをPr68でスクリーニングしたところF1, F9の2種類のファージが得られた。得られたファージDNAにはさきに述べた

cDNA に対応する遺伝子 (CAH1) が 3.4kb にわたって見いだされた。さらにその下流約 2 kb 離れた位置にタンデムに CAH1 と構造のよく似た第 2 の遺伝子 (CAH2) が発見された (図 3 参照)。両遺伝子は共に 10 個のイントロンにより分断された 11 個のエキソンからなっていた。CAH2 のイントロを含めたコード領域の長さは 3.3kb で CAH1 よりも小さいが、遺伝子がコードする前駆体ポリペプチドは 380 個のアミノ酸残基からなり CAH1 の 377 個よりアミノ酸 3 個分大きい。また二つの遺伝子産物のアミノ酸配列を比較すると 91.8% の相同性を示し、ヒト CA で明らかにされている活性に必須な亜鉛と結合する 3 個のヒスチジン残基や活性に必要とされている残基がよく保存されていたので、第二の遺伝子は CA のイソ酵素をコードしていることが強く示唆された。

二つの遺伝子が転写レベルで CO₂ 濃度と光によってどのように調節を受けているのかを明らかにする目的で、両遺伝子の発現を、遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドプローブ (40mer) を用い、ノーザン法により解析した。まず CA 活性が誘導されてくる条件、即ち高 CO₂ 細胞 (5% CO₂ を含む空気を通気して培養した細胞) を低 CO₂ 条件 (0.03% CO₂) に移した時の mRNA 量の変動を調べた。CAH1 mRNA (2.0kb) は高 CO₂ 条件では検出されず誘導後約 1 時間で多量に誘導されたが、CAH2 mRNA (2.0kb) は高 CO₂ 条件で検出されていたのが低 CO₂ 条件下では抑制された。また低 CO₂ 細胞 (通常ので通気して培養した細胞) を高 CO₂ 条件 (5%) に移すと、CAH1 mRNA は 1 時間で検出されなくなり、一方 CAH2 mRNA は誘導されることが判明した。つまり二つの遺伝子は環境の CO₂ 濃度の変動に対してまったく逆の応答をすることが明らかとなった。

さらに CAH1 mRNA は暗黒下では検出できず CO₂ 濃度の低下に加えて光照射下ではじめて誘導されてくることから、CAH1 遺伝子の発現には光照射が必須であることが明らかになった。これに対して、CAH2 の発現に光はむしろ阻害的であることが明らかに

なった。また光合成電子伝達系の阻害剤 DC MU の添加により CAH1 mRNA の誘導が阻害されることから、CAH1 遺伝子の活性化には光合成が必須であることも明らかとなった。さらに弱光条件では、光合成を行なわせる赤色光のみ細胞に照射するよりも青色光を含む光を照射した場合の方が、転写レベルの誘導に効果的であることも明らかとなった⁹⁾。

おわりに

今後は、生物の環境変動 (特に CO₂, 光) のシグナルに応答した遺伝子発現の調節という観点から、CA 遺伝子の発現調節機構の解明が待たれる。また CA の機能を遺伝子工学的な手法を用いて、他の生物に導入し、CO₂ 固定の効率化をはかる研究も進められてゆくであろう。

なお、この研究は東京大学応用微生物研究所第 7 研究部の諸氏のご協力と宮地重遠先生 (現、海洋バイオテクノロジー研究所) のご指導のもと遂行されたことを記し、深く感謝致します。

文 献

- 1) Aizawa, K. and S. Miyachi (1984) *FEMS Microbiol. Rev.* 39 : 215-223
- 2) Kamo, T., K. Shimogawara, H. Fukuzawa, S. Muto and S. Miyachi (1990) *Eur. J. Biochem.* 192 : 557-562
- 3) Toguri, T., S. Muto and S. Miyachi (1986) *Eur. J. Biochem.* 158 : 443-450
- 4) Fukuzawa, H. S. Fujiwara, Y. Yamamoto, M. L. Dionisio-Sese and S. Miyachi (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 4383-4387
- 5) Fawcett, T. W., J. A. Browse, M. Volokita and S. G. Bartlett (1990) *J. Biol. Chem.* 265 : 5414-5417
- 6) Roeske, C. A. and W. L. Ogren (1990) *Nucl. Acids Res.* 18 : 3413
- 7) Fujiwara, S., H. Fukuzawa, A. Tachiki and S. Miyachi (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press)
- 8) Fukuzawa, H., S. Fujiwara, A. Tachiki and S. Miyachi (1990) *Nucl. Acids Res.* 18 : 6441-6442
- 9) Dionisio-Sese, M. L., H. Fukuzawa and S. Miyachi (1990) *Plant Physiol.* 94 : 1130-1110

属間交雑を利用するコムギ半数体の作出

農林水産省 熱帯農業研究センター

稲垣 正典

はじめに

作物の品種改良の目的は優良な品種の育成であり、その手段は遺伝的組換えとこれに続く系統選抜である。しかし、農業情勢の急激な変化と新しい需要に即応した品種を早急に育成することも品種改良の効率の観点から重要である。すなわち、品種改良を効率化し育種年限を短縮することは今後ますます必要となる。その一つの解決策は、半数体を利用して選抜の対象となる系統の遺伝形質を早期に固定し選抜を効率的にする半数体育種法の確立であると考え、研究に着手した。

1. 半数体の作出と利用

半数体は2倍体が有する1対のゲノムのうち一方のみのゲノムの組成を有し、すべての遺伝子について半接合の状態にあるので遺伝子が優性・劣性に関わらずその作用は直接に発現する。そのため、遺伝子分析、染色体対合、突然変異の誘発などの細胞遺伝学的研究に広く利用されてきた。また、半数体は染色体を人為的に倍加すれば、すべての遺伝子について完全な同型接合の半数体倍加系統（純系）となる。したがって、人工交雑による品種改良に際し、交雑後の雑種初期世代で半数体を作成してその染色体を倍加する方法を用いれば、すべての遺伝子について一挙に固定した系統を得ることができ、育種に要する年月を飛躍的に短縮することができる。

コムギの半数体を人為的に作出する方法として、異種細胞質の利用、放射線の利用などが考えられてきた。さらに、薬培養による半数体作出の研究も近年進展してきた。しかし、

これらの方法は効率の点で不十分であり実用化するには解決すべき問題点が残っている。

属間交雑を利用するコムギ半数体の作出方法は、オオムギ野生種 *Hordeum bulbosum* L. と交雑後、受精した卵から花粉親の染色体が細胞分裂の過程で選択的に排除される結果、コムギの染色体のみからなる半数性の胚が形成される現象を利用するものである¹⁾。この現象はタバコやジャガイモにおいて野生種と交雑した場合に偽受精により半数体が発現する機構とは異なる。

2. 交雑不和合性とその克服

コムギと *H. bulbosum* との交雑和合性は両親の遺伝子型によって大きく影響される。日本のコムギ品種についてみると、在来品種間の雑種後代に由来する農林61号、ミクニコムギなどの品種は交雑和合性を示すが、祖先種に欧米の品種を頻繁に含むハルヒカリ、タクネコムギなどの品種は交雑不和合性を示す傾向にあった²⁾。交雑不和合性は、コムギの5Bおよび5Aの染色体に座乗するそれぞれ *Kr1* および *Kr2* の優性遺伝子が関与することがすでに明らかにされている。この交雑不和合性を打破するために *H. bulbosum* 系統の選抜や植物生育調節物質2,4-Dの処理を試みたが、結果は不満足なものであった²⁾。しかし、2,4-D処理により交雑和合性の品種で胚形成率が向上したことから、2,4-D処理は受精後の胚の発育を促進する効果を有すると推察された。

一方、花粉親として *H. bulbosum* の代わりにトウモロコシを用いるとコムギの遺伝子型に関わりなく受精し、その後 *H. bulbosum*

との交雑の場合と同様にトウモロコシの染色体が消失することが明らかにされた³⁾。しかし、この場合、胚は無菌培養に供試しうるに十分な大きさまで発育できず崩壊するので、半数体を獲得するためには交雑直後にコムギ小花そのものを無菌培養し胚の発育を促進する必要がある⁴⁾。そこで、トウモロコシ花粉による受粉と2,4-D処理を組合せることによって、コムギとトウモロコシとの受精卵からトウモロコシの染色体が消失した後2,4-D処

理により半数性胚へ発育させようと試みた。その結果を表1に示した。期待通り、*H. bulbosum* と交雑和合性を示した品種農林61号および Chinese Spring ばかりでなく、*H. bulbosum* と交雑不和合性を示した品種ハルヒカリおよび Highbury においても胚を形成させることに成功し(図1)、これに続く胚培養によって半数体に再生することができた(図2)。さらに、20品種について調査した結果、いずれの品種においても半数性胚を得る

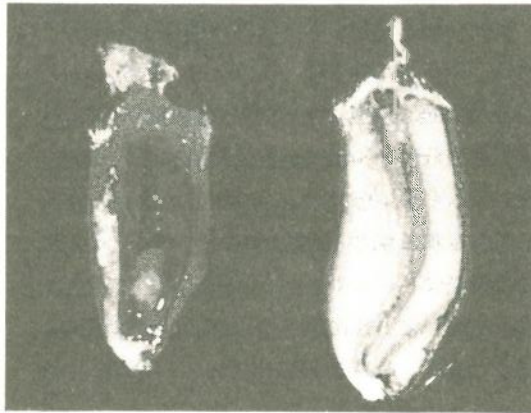


図1 コムギ品種Chinese Springの自家受粉種子(右)およびトウモロコシとの交雑種子(左) 交雑種子には未熟胚が形成されるが胚乳はみられない。

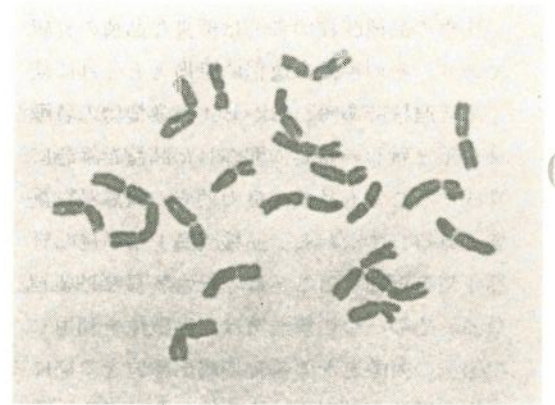


図2 コムギ品種Highburyとトウモロコシとの交雑から得られた植物体の染色体 本数はコムギの半数体を示す21本である。

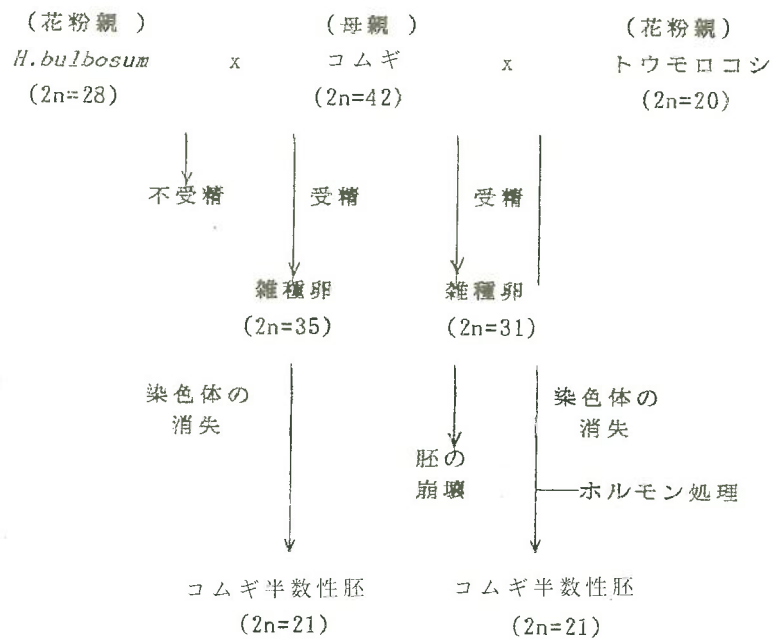


図3 *H. bulbosum* およびトウモロコシとの属間交雑を利用するコムギ半数体作出の過程の模式図

表1 コムギ4品種とH.bulbosumおよびトウモロコシとの交雑における胚形成率(%)

花粉親	コムギ品種				
	2,4-D 処理	農林 61号	Chinese Spring	ハルヒ カリ	Highbury
なし	なし	0.0	0.0	0.0	0.0
	あり	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>H. bulbosum</i>	なし	23.6	16.9	0.0	0.0
	あり	38.5	25.0	0.0	0.0
トウモ ロコシ	なし	0.0	0.0	0.0	0.0
	あり	22.1	19.1	20.3	7.5

ことができ、トウモロコシ花粉および2,4-Dの効果を確認した⁶⁾。*H. bulbosum*およびトウモロコシとの属間交雑を利用するコムギ半数体作出の過程を模式図で示すと図3のとおりである。コムギ半数体の作出の成否は、*H. bulbosum*との交雑においてはコムギの交雑不和合性遺伝子の有無により決定され、トウモロコシとの交雑では受精後の胚の発育の可否によると考えられる。トウモロコシとの交雑における半数体作出の成功は2,4-Dによって胚の発育を促進した結果と推察される。

3. 半数体作出の効率

属間交雑を利用するコムギ半数体作出の操作とその効率については、*H. bulbosum*を花粉親とした場合の例がすでに示されている⁶⁾。この方法に準拠してトウモロコシを花粉親とした場合の半数体の作出効率をみると表2のようである。2か年の試験結果の平均では、受粉したコムギ小花100個当たり8.7個の半数体の作出であり、1穂当りに換算すると2.5個の半数体の作出であった。この効率は、コムギの品種改良に半数体育種法を適用するうえで必ずしも十分ではないが、今後、交雑

表2 トウモロコシとの交雑を利用するコムギ半数体作出の効率

年次	供試したコムギの 材料	小花の数	得られた 胚の数(%)	再生した 植物体の 数(%)	半数体 の数/ 穂
1989	20品種	1128	245(21.7)	107(9.5)	2.7
1990	11F ₁	2975	342(11.5)	235(7.9)	2.2

操作法および無菌培養法の改善により作出効率はさらに向上すると予想される。

おわりに

コムギにおいて属間交雑を利用する半数体作出法が1975年に報告されて以後、トウモロコシ花粉と合成ホルモンとを組合せた方法でコムギの半数体を容易にかつ多数得ることができるまでに15年を要した。筆者がこの研究に着手してからでも10年を要した。このようにして得られた半数体倍加系統は、今後コムギの品種改良を促進するために積極的に利用されよう。また、遺伝子解析の材料として量的形質における連鎖の研究に有効であろう。他方、花粉親の染色体の完全消失を阻止する方法を確立すればコムギへ異属遺伝子を導入することも可能になるなど、分子遺伝学および組織培養技術の発展とともに属間交雑の利用に関する研究には今後期待するところが大きいといえる。なお、本研究は、連合王国植物育種研究所(現植物科学研究所)で開始され、農業研究センター、パリ南大学および国際乾燥地農業研究センター(ICARDA)で継続して実施されてきたものである。

文 献

- 1) Barclay, I.R. (1975) *Nature* 256: 410-411
- 2) Inagaki, M.N. (1986) *Japan J. Breed.* 36: 363-370
- 3) Laurie, D.A. and M.D. Bennett (1987) *Theor. Appl. Genet.* 73: 403-409
- 4) Laurie, D.A. and M.D. Bennett (1988) *Theor. Appl. Genet.* 76: 393-397
- 5) Inagaki, M.N. and M. Tahir (1990) *Japan J. Breed.* 40: 209-216
- 6) Inagaki, M.N. (1988) *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp. Cambridge*, 1109-1114

シオデの連続多芽体培養による大量増殖

農林水産省 四国農業試験場 育種工学研究室

黒田 秧

はじめに

今日の食生活の多様化やグルメ志向によって、地域特産作物や資源作物が見直され、農家の栽培意欲も高揚している。資源作物の一つ、シオデ (*Smilax Oldhami* Miq.) は、ユリ科に属するつる性の多年草で、日本各地の原野や山林に自生しており、4～6月頃のアスパラガスによく似た若芽や腋芽を食する。その比類ないまろやかさと洗練された風味は、昔から“山菜の王”と呼ばれ珍重されてきた。シオデの名はアイヌ方言のシウオオンテに由来し、漢名は牛尾菜。東北地方ではヒデコ、シウウデとも呼ばれている。秋田のヒデコ節はこの山菜を歌いあげた民謡として有名である。

しかし、シオデは自然環境の変化や乱獲によって激減しており、現在では山麓のごく限られた場所に自生する貴重なまぼろしの山菜である。繁殖は株分けや実生で行われるが、実生繁殖では発芽率が低く、発芽までに1年、収穫までに4年以上の栽培期間を必要とする。また、貯蔵根をもたないために、春先の発芽数は少なく、若芽採取後の再生力も弱く、加えてウイルス病の発生率が高いことなど栽培化を妨げる諸問題が山積している。シオデの産地化を狙う地域からは、ウイルスフリー苗の大量確保とともに、強健・多収系統の育成と栽培管理技術の確立が望まれている。

シオデの経済栽培を実現するためには、その基本技術として組織培養によるウイルスフリー苗の大量増殖技術の開発が不可欠である。組織培養を利用したシオデ苗の増殖に関する研究成果は、最近の3年間に集中しており、野外で採取した若芽の節や茎切片を用いた増

殖法¹⁻³⁾と茎頂組織を用いた大量増殖法^{4, 5)}に大別される。本稿では、後者の増殖法、すなわち著者らが開発した茎頂組織の多芽体化と連続多芽体培養による苗大量増殖法^{4, 5)}について概要を述べる。

1. 茎頂組織の多芽体化

種苗のウイルスフリー化には茎頂培養が有効である。また、種苗の均質化を図るためには、遺伝的変異が発生しにくい培養法の適用が重要である。そこで、茎頂組織を脱分化(カルス化)させることなく効率的に多芽体を誘導するための培養条件について検討した。

実験材料には、播種2年後の植物体の地下部に形成した冬芽を用いた。冬芽の茎頂部分を覆う稚葉を除去した後、トリトンX-100で洗浄し、70%アルコールで3分間、5%アンチホルミンで5分間表面殺菌処理を行い、茎頂先端の0.3mm程度を摘出した。茎頂培養には、MS基本培地にオーキシシンとしてNAAまたは2,4-D、サイトカイニンとしてBAまたはカイネチンの各種濃度を組合せた30g/lしよ糖を含む固形および液体培地を用いた。その結果、茎頂組織の脱分化は、NAAよりも2,4-Dによって誘導され、緻密で固いカルスの形成が認められた。一方、茎頂組織の腋芽の伸長を抑制し、脱分化させずに組織を肥大・増殖させるには、0.5mg/l NAAとその1/5～1/1濃度のBAの添加が効果的であり、培養開始1.5か月前後には肥大化した組織表面の全域から不定芽形成が認められ、次第に多芽体状の集塊に発達した。このような茎頂組織の多芽体化は、固形静置培養と液体回転培養の双方で起こり、とりわけ後者において

多芽体形成速度が優れていた。しかし、NAAに代わる2,4-D添加は、すべての添加濃度区において茎頂組織からの不定芽形成に無効であった。

2. 不定芽伸長と連続多芽体培養

多芽体培養を効率的な苗生産に結び付けるためには、多芽体の一層の肥大化とともに、多数の不定芽の形成と旺盛な伸長を連続的に促すNAAとBAの最適な組合せ濃度を見いだす必要がある。

そこで、同一条件で茎頂培養した1.5か月後の肥大組織を集め、1組織を2～3個に分割して25組合せの試験区に移植し、2か月間培養の後に組織重の増加倍率と5mm以上に伸長した不定芽の本数を調査した。組織重の増加倍率からみた組織の肥大化は、BA濃度に強く依存して起こり、不定芽の形成数もBA濃度に影響を受け、BAの0.25と0.5mg/l添加区で多く、2.5mg/l添加区では形成が阻害された(表1)。

最適組成を絞り込むために、伸長した不定芽すべてを切除し、残った球状の肥大組織をそのままの形で、あるいは再度細分割して同じホルモン組成の新しい培地に移植し、同様の調査を繰り返し行ったところ、0.5mg/l NAAと0.5mg/l BAの組合せ区においてすべての移植組織が肥大化し、安定した不定芽数が得られた(表紙)。組織重と不定芽数との間にはほぼ比例関係が成り立ち、組織1g

当たり約3本の不定芽が伸長した。また、多芽体を一時的に0.2mg/lカイネチン添加培地に移植することで、多芽体の伸長が一層助長された(口絵1)。

さらに、伸長した不定芽から採取した茎頂組織ならびに茎の節間部や葉片を多芽体増殖培地に移植した場合においても、組織片の肥大による多芽体と不定芽の形成が認められたことから(口絵3)、これら組織片も苗増殖に利用可能なことが明らかになった。

3. 発根と馴化

切除した不定芽(苗条)からの効率的な不定根形成(発根)条件の検討も、苗増殖にとって重要である。苗条からの発根率と発根数におよぼすMS基本培地、しよ糖、IAAの各濃度およびゲル化剤種類の影響を調べ、最適な発根培地組成を検討した。

苗条移植1か月後の発根率は、MS基本培地を1/3濃度にし、IAA濃度を2mg/l、しよ糖濃度を30g/l添加した場合に高く、発根個体当りの根の本数も増加した。また、ゲル化剤はゲランガムよりも寒天の方が発根率が高く、これらを総合した組合せ条件において発根率95%、発根数6.4本(平均値)の結果が得られた。また、発根後の根の伸長は、寒天よりもゲランガムの方が優れていた(口絵2)。このようにして得られた発根苗条の馴化については、培養ビンのアルミホイル蓋に穴を開けて除湿し、2週間後にパーミキュライトと

表1 茎頂由来分割組織の肥大増殖と不定芽形成におよぼすNAAとBAの添加効果(培養2か月後の結果)

NAA (mg/l)	BA (mg/l)				
	0	0.05	0.25	0.5	2.5
0	4*(0)**	17(0.7)	45(1.5)	140(4.7)	65(0)
0.05	4(0.2)	16(0.7)	105(7.7)	105(4.4)	140(0)
0.25	5(0.2)	21(1.5)	66(5.8)	108(5.2)	67(0)
0.5	4(0)	21(0.5)	83(4.7)	132(5.4)	123(0)
2.5	4(0.2)	49(2.2)	100(4.4)	118(6.0)	95(0)

*: 移植組織の重量増加倍率。 **: ()内の数値は組織1個当たり形成した5mm以上の不定芽の本数。いずれも10個体の平均値で表示。

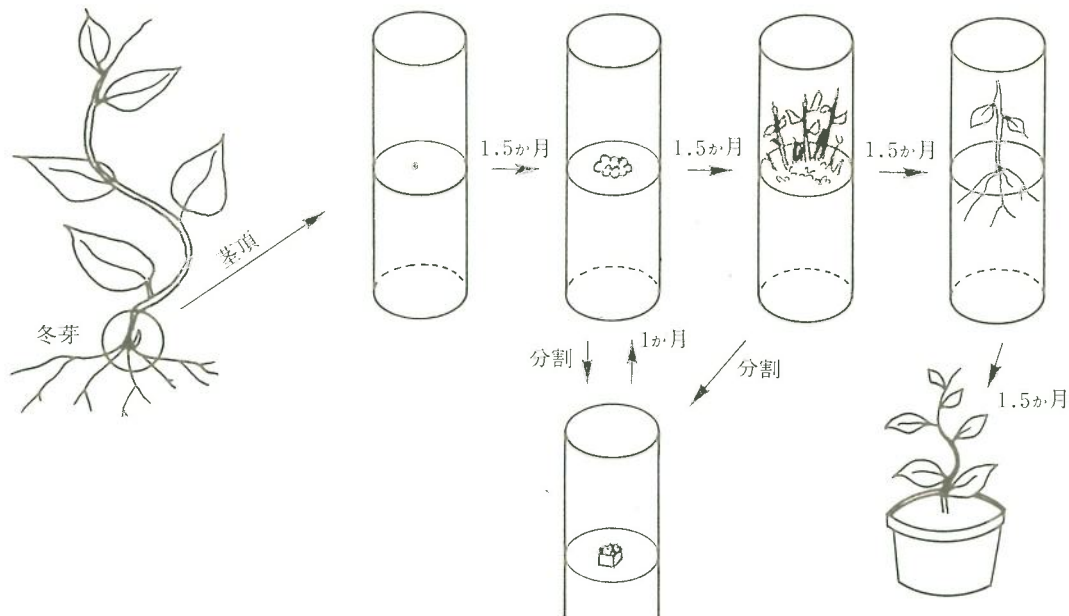


図1 シオデの連続多芽体培養による大量増殖の概要

ピートモスを1：1の割合に混合した培土に鉢上げすることで、90%程度の活着率が得られた（口絵4）。

以上のようなシオデの冬芽の茎頂組織の培養から馴化・鉢上げに至る過程の概要を苗生産システムとしてまとめ、図1に示した。このシステムでは、茎頂培養によって6か月後に苗が得られ、しかも多芽体や茎葉の分割を行い、多芽体培養と不定芽の切除を繰り返し連続的な拡大再生産を行った場合に、茎頂1個から1年間に生産可能な苗本数は約3万本と推定された。

なお、培養苗のウイルスフリー化に関しては、シオデの感染ウイルスの種類が現在のところ未同定であるため、正確な判定を行うことができないが、組織の電顕観察ならびにキュウリモザイクウイルスのELISA検定の結果は陰性であった。

おわりに

シオデ苗の均質化とウイルスフリー化が期待できる茎頂培養は、カルスや不定胚培養と比較して増殖効率が劣る欠点がある。この問題は、茎頂組織を多芽体化し、連続的に多芽体培養を繰り返すことによってほぼ解消することができたが、培養過程の効率化と省力化

については一層の工夫が必要である。本法の特徴である連続多芽体培養は、多芽体形成率と発根率が低いアスパラガスを含めた同じユリ科作物の増殖にも適用可能と考えられる。また、栽培上の利点として、実生繁殖では収穫までに要する栽培期間が4～5年を要するのに対して、本技術を適用した培養苗の利用では2年程度の栽培期間の短縮が期待できる。シオデの強健・多収系統の育成は今後の課題である。

本研究は、当场において徳島県農業試験場池田分場の川村泰史研究員とともに実施したことを付記し、合わせて徳島県でのシオデの産地化に期待したい。

文 献

- 1) 村田 徹・井沢弘一（1988） 東北農業研究 41：305-306
- 2) 田沢一二・笹原健夫（1988） 育種雑 38（別1）：34-35
- 3) 山本友英・福里和朗（1989） 日作紀 58（別1）：236-237
- 4) 黒田 秧・川村泰史（1989） 育種雑 39（別2）：62-63
- 5) 川村泰史・黒田 秧（1990） 徳島農試報 27：39-43

国内情報

ハイブリッドミツバチ 「ふくおかハイクイーン」の作出

福岡県農業総合試験場 畜産研究所

深江 義忠

はじめに

生産を目的として飼育する家畜群にとって、生産環境の整備とともに遺伝的素質を向上させるための品種改良は重要な課題であり、ミツバチも例外ではない。

セイヨウミツバチがわが国に導入されて百十余年になるが、国内での本格的な品種改良はほとんど行われておらず、アメリカなどの諸外国から民間レベルで小規模な輸入が試みられているに過ぎない。

ミツバチの品種改良が進まない最大の原因は、ミツバチの交尾が空中を飛翔しながら行われるため、計画的な交配が困難なことにある。従来、養蜂家によって行われてきた育種方法は、優秀な成績を示した蜂群から次世代の女王蜂を養成する方法である。この方法で、ある程度目的を達することができるものの、継続して安定した女王蜂を生産する保証は得られない。

優れた系統蜂群を長期にわたって維持するためには、セイヨウミツバチが全く棲息しない離島等に隔離蜂場を設けて計画的な交配を行う方法があるが、労力や経費がかかりすぎて個々の経営での改良は困難であり、公的機関による対応が必要と考えられる。

計画交配のもう一つの手段として、人工授精技術の利用がある。ミツバチの人工授精に関する研究は意外に古く、1927年に Watson により研究が開始されている¹⁾。アメリカのデーダント社では人工授精技術の利用で近交度の高い系統間の交配を行い、スターラインやミッドナイトなどのハイブリッドミツバチを作り出している²⁾。また、Holm は人工授精を用いてチョーク病抵抗性ミツバチ品種の

育成を試みている³⁾。わが国においては、農林水産省畜産試験場や玉川大学において研究が行われていて⁴⁾、自然交尾をした女王蜂に劣らない女王蜂も得られているが、基本的には実験の段階であり普遍的技術にはなっていない。

福岡県農業総合試験場では畜産関係重要研究課題の一つとして、1985年から5か年計画で海外と国内から導入した有望な種蜂を選抜し、離島での自然交配と人工授精技術の利用で、近親交配による系統蜂群の養成を行うとともに、これら系統間の組合せにより、穏和で集蜜性、耐病性などに優れたハイブリッドミツバチの作出に取り組んだのでその概要を紹介する。

1. 素材としての系統蜂群の能力

ハイブリッドミツバチの素材として、1983～1987年に海外からはアメリカ、オーストラリア、イタリア（以下各々、米国系、豪州系、イタリア系）から、また国内から2系統（以下、A系、B系）のイタリアン系種蜂を、年次計画にしたがって導入した。これに、福岡県農業総合試験場が保有している系統（以下、畜研系）を加えた6系統について、女王蜂の産卵能力、集蜜能力などを調査し、交配のための選抜を行った。

つぎに、選抜した系統蜂群を一群当たり6,000～7,000頭の蜂数に人工分蜂して無王蜂群を作った。その蜂群内に各系統から養成した王台（女王蜂さなぎ）を交配計画に基づいて移入して、他のミツバチとの交雑を防ぐため玄界灘に浮かぶ玄界島と相島の二つの島および山中に設けた隔離蜂場へ移して女王蜂の

養成を行った。

各隔離蜂場で養成した系統蜂群について女王蜂の産卵性、群勢（蜂量・蜂児数）、働き蜂の耐病性、性質（刺習性）および集蜜性について選抜を行った。この結果、女王蜂の産卵能力の指標となる建勢期の蜂量および産卵育児数でA系、畜研系および米国系が優れていた。

真菌が原因とされるチョーク病の発生程度は、A系に中程度、豪州系とB系には多数の発生が認められ、畜研系と米国系は少ない傾向が認められた。刺習性では、A系、B系がやや強く、イタリア系が最も強く、畜研系と豪州系は比較的穏和であった。

集蜜能力では、1群当りの平均収蜜量や蜂量1kg当たり収蜜量において畜研系が最も多収でついで米国系が多収であった。しかし、蜂量が最も多かったA系は、1群当たり平均収蜜量、蜂量1kg当たり収蜜量ともに畜研系、米国系に次ぐものであった。

以上のように、女王蜂の産卵能力、働き蜂の耐病性、性質、集蜜能力等に優れている畜研系と米国系および早春から産卵育児が良好なA系が、ハイブリッドミツバチ作出の素材として有望であり、これらの雄系を中心とした最適な組合せについて検討を行った。

2. 系統間交雑蜂群の養成およびその能力

ハイブリッドミツバチを選定するための各種異系統間交雑種の造成は、まず、離島での自然交配と試験場内での人工授精の併用により異系統間交配女王蜂を養成した。次に、こ

の女王蜂が働き蜂巣房に産卵したふ化1.5～2日齢の幼虫を用いて移虫法⁵⁾により王台を養成した。この王台を福岡県内10戸の養蜂家に配布して、養蜂家が準備した無王蜂群内で羽化をさせて女王蜂を養成した。これらの蜂群について、養蜂家が保有している蜂群を対照として2年間能力調査を行った。

この結果、女王蜂の産卵能力、働き蜂の群勢、チョーク病に対する耐病性および集蜜能力などの総合評価から、畜研系（雄）と米国系（雌）の組み合わせが他の交雑種や養蜂家保有群に比較して優れており、この組み合わせによる交雑女王蜂をハイブリッドミツバチとして選定し、「ふくおかハイクィーン」と命名した。

3. 女王蜂の大量増殖

蜂群の改良を目的とした種蜂の導入と異なり、ハイブリッドミツバチは直接生産を目的としたもので、一時に多数の導入が必要である。しかも女王蜂は一代雑種であり、その利用は1年限りである。このため、「ふくおかハイクィーン」を養蜂家へ普及促進するためには、短期間に大量の養成が可能な王台による利用が最も有効と考えられる。女王蜂の大量養成の手段としては、人工飼育による女王蜂養成の可能性を示唆した報告がある⁷⁾。著者らも、現在恒温恒湿器を用いて人工飼育を試みているが、飼育条件や給与するローヤルゼリーの質的条件等未解決の点が多く、まだ人工飼育により養成された女王蜂が交尾をして産卵に至った例は得られていない。そこで、当面は移虫法により自然王台に劣らない王台

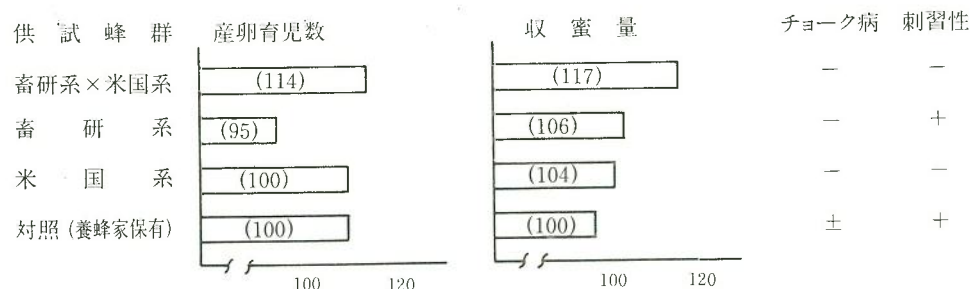


図1 「ふくおかハイクィーン」の能力と特性

- 1) 産卵産児数、収蜜量は対照(養蜂家保有群)を100とした割合。
- 2) チョーク病(—)は発生が少ない。
- 3) 刺習性(—)は刺習性が弱く性質穏和。

の効率的養成を図るため、使用する人工王わんの容積や人工王わんへのローヤルゼリーの添加効果について検討した。この結果、移虫時に人工王わん内へ100~300mgのローヤルゼリーを添加することにより、王台の養成率を高め発育のよい女王蜂を養成することが可能となった。さらに、封蓋された王台を恒温恒湿器内に移すことで王台養成の回転が早まり、養成作業も軽減されて、より効率的な女王蜂の増殖が可能になった。この技術開発によって「ふくおかハイクィーン」の普及が大幅に促進されている。

文 献

- 1) 岡田一次・藤井徹三(1987) 玉川大農研報 19: 85-94
- 2) 八戸芳夫・徳田義信(1951) 農業技術研報G(畜産) 1: 93-100
- 3) Holm, S.N.(1985) 第30回国際養蜂会議総集録 111-113
- 4) Mackensen, O. and K.W. Tucker (1970) Instrumental insemination of queen bees, *Agricultural Handbook No. 390 USDA, Louisiana*, 28
- 5) 徳田義信(1968) 新養蜂 250-222 産業図書
- 6) Watson, L.R (1927) Controlled mating of queen bees. Dadant and Sons, Hamilton, 111. pp. 50.
- 7) 吉田忠晴・佐々木正巳・大西隆男(1984) 玉川大学農研報 24: 43-52

国内情報

発光性細菌を用いる新しい微生物センサー

東京大学 先端科学技術研究センター

軽部 征夫

1. はじめに

最近、センサーの応用が種々の分野で広がっている。特に生体関連物質や有機化合物を計測する目的で開発されたバイオセンサーが注目されている。最も一般的なバイオセンサーは酵素と電極を組み合わせて構成される。これは実用化されて、いろいろの分野に応用され始めている。

酵素は一般に微生物から抽出、精製されている。微生物菌体中には多数の酵素があり、微生物そのものをセンサーの素子として用いた方が経済的に思える。また、生存状態の微生物を用いると素子の寿命を長く保てる可能性もある。このような考えから、微生物を素子として用いる微生物センサーが開発された。

微生物センサーは微生物を固定化した膜と電極やトランジスターを組み合わせて構成される。微生物を生存させたまま多孔性の高分子

膜に吸着させて素子とする。ここでは光デバイスと微生物を組み合わせた新しい微生物センサーを紹介する。

2. 発光細菌を用いるセンサー

発光性細菌は外界からの刺激に反応してその発光強度が変化する。したがって発光性細菌と発光を検知するデバイスを組み合わせると、発光を指標として有機化合物を計測できると予想される。そこで、発光性細菌 *Photobacterium phosphoreum*(海洋性 MT10204 三井東圧(柳牧口氏より譲受)を培養し、これをニトロセルロースメンブランフィルター上に吸着固定した。この発光性細菌膜の発光面をフォトンカウンターの受光部に向けてフローセル(通液型セル)に装着した(図1)。

本システムにグルコース溶液を移送したところ、次第に発光量が増加し、約1分間で最

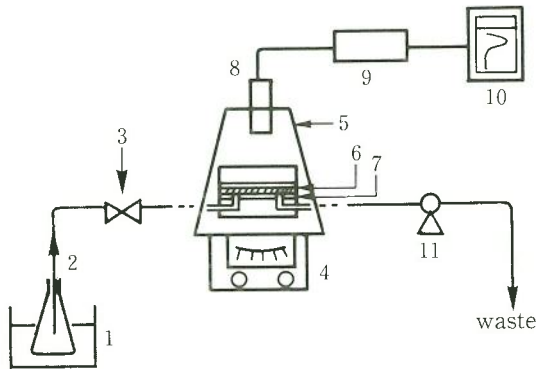


図1 発光細菌を用いるセンサーシステム

- 1) 恒温槽、2) 緩衝液槽、3) 注入口、4) ルミノメーター、
5) 暗箱、6) 固定化細菌、7) シリコンゴム、8) ホットプレート、
9) エレクトロメーター、10) 記録計、11) ペリスタポンプ

大の発光量が得られた。発光はその後次第に減少し、もとの値に数分間でもどることもなかった。さらにグルコース以外の糖類、アミノ酸、有機酸をシステムに移送し、その応答性について調べてみた。この結果、ガラクトースおよびマルトースには応答し、その応答値はグルコースの場合の10%ぐらいであることがわかった。一方、有機酸とアミノ酸に対しては定常値より減少する傾向にあり、これらには応答しないと思われた。

エタノールなどのアルコール類をセンサーシステムに適用すると応答が得られた。しかし、すでに述べたようにグルコースなどの糖類にも応答することからアルコール類を選択的に計測するためには工夫を必要とする。

そこで、発光性細菌膜の表面を多孔性のテフロン膜で被覆してフローセルに装着した。揮発性の化学物質はテフロン膜を通過できるが、糖類はこの膜を通過することはできないことになる。実際にグルコースをシステムに適用したが、応答は得られなかった。このセンサーシステムに各種のアルコール類を適用したところ、エタノール、2-プロパノール、1-ブタノールには応答した。これらのうち1-ブタノールに対する応答値はエタノールの3倍であった。メタノールに対する応答は得られなかった。実際に各種濃度のエタノールをこのシステムに適用したところ、発光量とエタノール濃度 $4 \sim 20 \text{mg l}^{-1}$ の間で直線関係が認められ、これを用いてエタノールを計測できることがわかった¹⁾。

発光性細菌の発光量はグルコース濃度ある

いは活性のある菌体量に依存している。したがって発光を阻害する物質が存在すれば、この発光量の減少を指標としてこの物質を計測することができるはずである。実際、発光は微生物の代謝によって起るのであるから、この代謝過程を阻害する物質があれば、これを検知することが可能である。

そこで、この原理を応用して重金属イオンの検知を試みた。すなわち、一定量のグルコースを発光性細菌膜に移送すると発光が増加し、定常発光量が得られる。この状態でヒ素、鉛、銅、クロムなどを注入したところ、クロムに対して可逆的な発光強度の減少が観察された。詳細に検討したところ、注入した重クロム酸カリウム ($6 \sim 60 \mu\text{g}$) と発光強度の減少値との間に良い相関関係が得られた。したがって、この原理を用いて、クロムの定量が可能である。このように発光を指標として毒物や環境汚染物質の計測が可能であることがわかった。

3. 組換え大腸菌を用いるセンサー

すでに発光性細菌を用いる微生物センサーについて述べた。発光は代謝過程に依存しており、代謝系が明確な微生物を用いることにより、さらに高感度な発光型微生物センサーを構築することが可能と考えられる。一方、発光反応を司る酵素であるホタルルシフェラーゼの遺伝子が単離されており、これを大腸菌などの異種細胞に導入することが可能になっている^{2),3)}。そこで、代謝系が最も明確になっている大腸菌にルシフェラーゼ遺伝子(図2)を導入し、菌体内でルシフェラーゼを発現させ、この発光量を指標とした新しい微生物センサーの構築を試みた。

ホタルルシフェラーゼがクローニングされたプラスミドを形質変換した組換え大腸菌を培養し、これを緩衝液中に懸濁させた状態で図3に示すシステムのキューベット中に入れた。このシステムにルシフェリンや阻害剤を添加し発光量をフォトカウンタで測定した。グルコースが発光量に及ぼす影響を調べたが顕著な影響は認められなかった。一方、ルシ

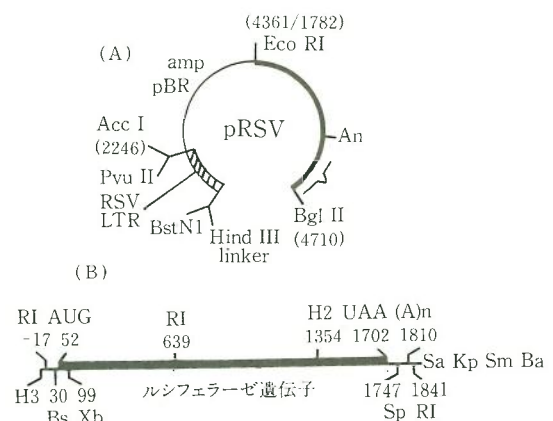


図2 ルシフェラーゼ遺伝子を含む組換えプラスミド

フェリンの濃度の増加とともに発光量は増加することが明らかとなった。

最近、農薬など環境中に放出された毒性物質の迅速、簡単な測定方法の開発が要望されている。すでに述べた組換え大腸菌を用いると、菌体内のATP量を *in situ* モニタリングすることによってそれらの環境汚染物質による代謝阻害を高感度に検出できると思われる。

そこで、センサーシステムにルシフェリンを注入し、応答性を調べた。その結果、ルシフェリン注入後4分以内に最大発光強度が得られ、約30分間その発光強度が維持された。そこで、ルシフェリン濃度と発光強度との関係について調べたところ、ルシフェリン濃度0.01~0.06mMと発光強度の間に直線性が認められた。

次に本システムに各種の抗生物質、毒物、農薬類を適用し、その応答性について調べた。親水性で分子量の小さいアジ化ナトリウムを注入したところ、50 ppbで発光強度が20%減少した。しかし、クロラムフェニコールのような疎水性で分子量の大きい物質では殆どその影響が認められなかった⁴⁾。

そこで膜の透過性を増加させるためにEDTAで菌体を前処理したところ、未処理菌と比べて環境汚染物質による発光量の減少が著しく起ることがわかった。TCA回路の阻害剤で、農薬の成分でもあるfluoroacetic acidや抗生物質のネオマイシンについても検討したところ、菌体をEDTA処理すると高感度に検出できることがわかった。このように、菌体内のATP量(ルシフェラーゼ発光

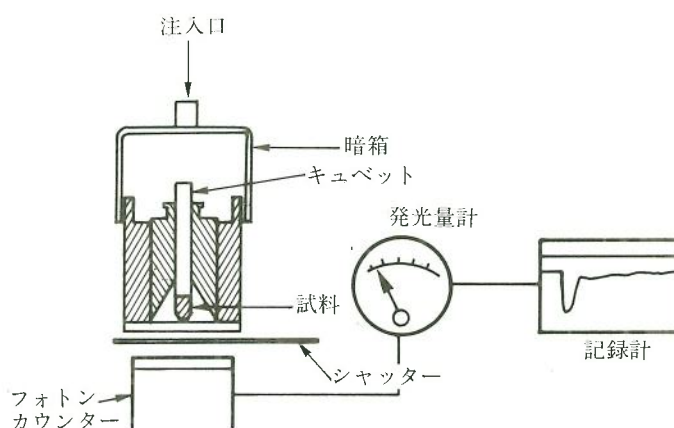


図3 発光大腸菌を用いるセンシングシステム

の基質の一つ)をモニタリングすることによって、発光量の減少を指標として環境汚染物質を高感度に測定できることがわかった。

4. おわりに

以上、発光細菌や組換え大腸菌の発光を指標とする発光検知型の微生物センサーについて述べてきた。今後、各種の変異株を利用し、これにルシフェラーゼ遺伝子を導入することにより、各種の環境汚染物質の高感度計測が可能になると予想される。

また、発光反応の検知に用いられる光デバイスも種々開発されており、これらと光ファイバーなどの光応用システムを結合させることにより、さらに高感度な微生物センサーシステムを構築することも夢ではない。

文 献

- 1) Sode, K., S. Lee, K. Nakanishi, J.L. Marty, E. Tamiya, I. Karube, *Biosensors and Bioelectronics* (in press)
- 2) de Wet, J.R., K.V. Wood, M. DeLuca, D.R. Helinski and S. Subramani (1987) *Mol. Cell Biol.* 7: 725-737
- 3) Wood, K.V. and M. DeLuca (1987) *Anal. Biochem.* 161: 501-507
- 4) Lee, S.M., M. Suzuki, E. Tamiya and I. Karube, *Anal. Chim. Acta*, (in press)

文献情報

高温耐性誘導に必要な HSP104

通常致死に到る高温条件でも、穏やかな熱や薬剤処理等の軽いストレスを前もって与えておくと、培養細胞や単細胞生物の生存率が顕著に上昇する現象（高温耐性）が知られている。この前処理条件に細胞を置いた場合、高温耐性を引き起こすと考えられている複数の熱ショックタンパク質の合成が一斉に誘導される。

熱ショックタンパク質として分子量 82kDa の *HSC82*, *HSP82* および 70kDa の *HSP70* 遺伝子ファミリー (*SSA1*, *SSA2*, *SSA4*) がよく知られている。前者はあらゆる温度で生育に必要で、高温時により高濃度が必要であり、後者は *SSA1*, *SSA2* の二重変異株では温度感受性になり、三つの遺伝子群が同時に機能しなくなったものでは致死性を示す。また、熱ショックタンパク質遺伝子ではなくても、細胞周期の移行阻害を起こす *ard 1*, *bcy 1*, *ras 2*^{VAL19} 変異株でも高温耐性の発現を阻害するが、定常期移行への阻害に付随する見かけ上起こる現象であると考えられている。

本報では酵母内で最も強く誘導される熱ショックタンパク質 *HSP104* について報告されている。このタンパク質は通常発現せず、高温に移されたとき、増殖期から定常期への移行期および胞子形成初期に出現する。このタンパク質はイオン交換クロマトグラフィおよび SDS-PAGE により精製され、このタンパク質に対する抗体も取得されていた。また、この遺伝子は λ gt11 ファージのクローニング部位に 3.6kbp の断片中にクローニングされていた。

この断片中の熱誘導配列の位置を決めるために、各種制限酵素断片を通常の温度条件 (25°C)、対数増殖期の細胞に 39°C 30 分処理条件および 25°C 定常期条件の細胞より全 RNA を抽出し、ノーザン分析を行ったところ、熱

ショックおよび定常期細胞より 104kDa のタンパク質をコードする 2.7kb mRNA にハイブリダイスする三つの断片が検出され、約 2 kbp の断片内に熱誘導配列の存在がわかった。

また、この断片より *HSP104* 遺伝子の一部を *LEU2* に置換した遺伝子破壊用の直鎖状断片を作成し、*HSP104* タンパク質を発現しない遺伝子破壊株を作成した。この株は通常条件では致死性を示さず、熱ショックを与えた場合、他のタンパク質の誘導に影響を与えないことがわかった。この遺伝子破壊株は 25°C での培養および対数増殖期に 25°C から 37.5°C への温度変化を与えた場合も野生株と同じ増殖速度を保ち、定常期まで移行した。また、*hsp83* 変異株のような高温条件へのシフトによる増殖速度の低下や、ポリユビキチン変異株のような 38.5°C での長期間熱ストレスでの生存率低下は認められなかった。

さらにこの遺伝子破壊株は 37°C 30 分前処理後の 50°C 20 分処理で認められる高温耐性は栄養培地で野生株の 1/100 程度に減少し、最小培地では 1/1000 以下にまで低下した。また正常な *HSP104* 遺伝子を遺伝子破壊株に導入することにより高温耐性は回復した。

以上の結果から、熱ショックタンパク質 *hsp104* は酵母が高温条件にさらされたとき、初期に発現し、高温耐性を誘導するのに必要であることが示された。しかし、このタンパク質が単独で酵母に高温耐性を発現させ得るかどうかはまだ不明である。

まだ、熱耐性に対する熱ショックタンパク質の関連については多くの矛盾した報告がある。例えば、培養細胞と同様に酵母においてもタンパク質の合成阻害剤により耐性誘導も阻害されることが報告されている (*hsp104* タンパク質の誘導も阻害剤により阻害される) が、一方これを否定する報告もある。そのような報告には阻害剤の効果が一般のタンパク質の合成阻害と同時に熱ショックタンパク質の合成阻害にも有効に働いているかどうかの検討が不十分な可能性がある。

この *hsp104* タンパク質と他の生物の熱ショックタンパク質の関連は哺乳類を除き、ほ

とんどの生物において *hsp104* タンパク質と同じ分子量のタンパク質は存在する。哺乳類において *hsp104* タンパク質が核小体内に存在し、RNA に結合もしくは、RNA 結合タンパク質と複合体を形成している。このタンパク質をコードする遺伝子はまだクローニングされてないため、*hsp104* タンパク質との構造および機能的関連は不明である。しかし、*hsp104* 変異株に熱ショックを与えた場合、野生株に比べ、核膜内側に三日月状の影が電子顕微鏡的に観察され、核小体との関連を示唆する結果もある。熱ショックタンパク質の研究が最も進んでいる生物の一つである *Drosophila* ではこのクラスの大きさの熱タンパク質の知られていない一つである。酵母における *hsp104* 遺伝子の研究より、*Drosophila* では経常的に *hsp104* 類似タンパク質が発現している可能性も存在するが、熱耐性因子の中から *hsp104* 同機能をもつ因子の解析をすることも可能である。

(抄訳 後藤邦康——醸造試験所)

HSP104 required for induced thermotolerance

Sanchez, Y. and S.L. Lindquist
Science 248 : 1112-1115 (1990)

文献情報

非病原性遺伝子 *avrBs2* は病原細菌が植物に感染するうえで重要な働きをしている

植物の病原細菌 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) には、寄生性を異にするいくつかのレースが存在する。例えば、コショウに病原性のあるレース 1 (XcvP1) は、*Bs1* と呼ばれる抵抗性遺伝子を持つ品種 ECW-10R には水浸状の病斑をつくり、宿主—病原体間で栄養授受関係を確立することができる。一方 *Bs2* および *Bs3* の抵抗性遺伝子を持つコショウの品種 ECW-20R および ECW-

30R やトマトの品種 Walter には感染することができない。これらの抵抗性品種では病原細菌の侵入行動に対して素早く反応し、細胞が自ら死ぬことによって、病原細菌のそれ以上の蔓延を防止しようとする。このような反応は過敏反応 (hypersensitivity reaction; HR) と呼ばれ、反応が生じた部位の細胞には壊死斑点が生じる。

HR 反応による壊死斑点形成に関わる遺伝子の存在は、古くから知られていた。Flor はアマのさび病の研究から、抵抗性の発現には植物の抵抗性遺伝子と病原体の非病原性遺伝子 (avirulence gene; *avr* 遺伝子) とが合致して働くことが必要であるとする仮説 (Gene for gene theory; 遺伝子対遺伝子説) を打ち立てた。前述の XcvP1 とコショウ品種 ECW-20R の組合せでは、宿主の抵抗性遺伝子 *Bs2* に対応する *avrBs2* が XcvP1 には存在していることになる。

実際にこれまでにいくつかの植物—病原体の組合せで非病原性遺伝子が同定・解析されている。Xcv でも、すでに *avrBs1*, *avrBs2*, *avrBs3*, *avrBsT* の四つの非病原性遺伝子が発見されており、中でも *avrBs1* は菌の銅剤耐性を支配する 200kbp 以上のプラスミド上に存在し、50kDa のタンパク質をコードする ORF が、*avrBs1* の表現型に関与していることが明らかにされている。

avrBs2 は *X. campestris* pv. *vesicatoria* トマトレース 1 より単離された非病原性遺伝子で、コショウ品種 ECW-20R の持つ抵抗性遺伝子 *Bs2* との組合せで HR 反応を誘導する。他の *avrBs* と著しく異なる点は、*avrBs2* 遺伝子が菌の染色体上に存在することであり、その意義に興味もたれていた。

Kearney と Staskawicz は、*avrBs2* 遺伝子の分布を、種々の *X. campestris* の strain で調べた。これまでに、*avrBs2* は Xcv の全てのレースでよく保存されていることが知られていたが、今回新たに全く宿主を異にする *X. c.* pv. *alfalfae*, *X. c.* pv. *phaseoli* 等 12 の strain を用いて southern hybridization 法により検討したところ、種の異なる *X. fragariae* を除いて全ての *X. campestris* の分化型

で *avrBs2* と相同性の高い DNA が保存されていた。さらにそれらの菌がコショウ品種 ECW-20R 上で HR 反応を誘導するかを調べたところ、7 strain で HR 反応が認められた。

病原体の側からすれば、非病原性遺伝子はその宿主範囲を狭めるものであるから、本来不要のものであるはずである。ところがこのように *X. campestris* の全ての分化型で保存されているということは染色体上に存在するという事実と共に、*avrBs2* 遺伝子は非病原性遺伝子としてだけでなく、病原体の生存上重要な働きを担っているのかも知れない。

次に *avrBs2* を持つ菌と、*avrBs2* に変異を起こした菌とで、その増殖能に差があるかどうか、感受性コショウ品種 ECW に接種して検討した。*avrBs2* をもつ野生株は、 5×10^8 colony formation units (CFU) まで増殖したのに対し、変異株は 5×10^6 CFU までしか増殖できなかった。またこの増殖能の低下は、発現ベクターにつないだ *avrBs2* により回復した。同様の結果は、*X. c. pv. alfalfae* を用いた場合でも認められた。以上の結果から、*avrBs2* は非病原性遺伝子としてだけでなく細菌の定着・増殖能を規定する重要な要因となっていると考えられた。

本研究の結果から、新しいタイプの非病原性遺伝子としての *avrBs2* の特徴が、より明確にされた。今後はその特徴と *avrBs2* 遺伝子産物との相互関係が明らかにされていくことが期待される。また、非病原性遺伝子については次第に多くの知見が集積してきたのに対し、植物側の抵抗性遺伝子については、未だにその実体は掴めていない。今後の進展を期待したい。

(抄訳：柄澤 明——東北大農)

Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*

Kearney, B. and B.J. Staskawicz
Nature 346, 385; 26 July 1990

文献情報

花を変える

キンギョソウのホメオティック遺伝子 *defA* (Sommer 他) およびアラビドプシスのホメオティック遺伝子 *agamous* (Yanofsky 他) が最近クローニングされ、植物の発生生物学は大きな一歩を踏み出した。前者は雄性不稔の遺伝子、後者は八重咲きの遺伝子でもあり、経済的価値の高いトランスジェニック植物を作成する研究に発展する可能性も大きい。これらの遺伝子はヒトや酵母の転写因子と類似のアミノ酸配列を持っており、他の多くの遺伝子の発現を制御することにより花のパターン形成がおけると示唆されている。

キンギョソウの花もアラビドプシスの花も、外側から順に、がく、花卉、雄ずい、雌ずいの四つの器官からできている。一般に花のホメオティックな突然変異体では、ある器官が別の器官の形態になる。例えばキンギョソウの *defA* では、花卉ががくに、雄ずいが雌ずいに形態変化する。また、アラビドプシスの *agamous* では雄ずいが花卉に変わり、雌ずいの部分にもう一つの花ができるため、結果的に多数の花弁とがくが繰り返す形態、つまり八重咲きとなる。この他にもアラビドプシスでは、*ap2-1* (花卉→雄ずい、がく→葉)、*ap3-1*、*pi-2* (*defA* と同じタイプの形態変化) などのホメオティック突然変異体が単離されている。

ここに紹介する二つの論文では、キンギョソウとアラビドプシスで、それぞれの利点を生かしたクローニングストラテジーが用いられている。まず、cDNA のサブトラクションを用いたキンギョソウの *defA* のクローニングについて紹介する。キンギョソウの利点はトランスポゾンの挿入突然変異体を利用可能なことである。ここでは、遺伝的に不安定な突然変異体 *defA-1* (高頻度で野生型の形質に戻るのはトランスポゾンの挿入突然変異体の

ためと予想されている)を用いた。まず、花の mRNA から cDNA のファーストストランドを合成し、これを大過剰の葉の mRNA でサブトラクトすることにより、花で特異的に発現する遺伝子の cDNA のライブラリーを得た。このライブラリーを突然変異体の cDNA プローブと親系統の cDNA プローブでスクリーニングすることにより、突然変異体では発現しない 12 の独立なクローンのグループを得た。ここで用いたプローブも、サブトラクションで花特異的にエンリッチしたものである。得られたクローンの中に *defA* 遺伝子があるかどうかを知るため、(*defA*+/*defA-1*)の自家交配による F2 において、それぞれの cDNA クローンをプローブとした RFLP と *defA-1* 表現型との共分離を調べた。一つの cDNA クローンは *defA-1* 形質と共分離する RFLP を示し、*defA* 遺伝子と予想された。この突然変異体は高頻度で復帰形質の枝をつくるが、その部分では、RFLP を示したバンドが野生型の長さに戻っており、*defA-1* がトラスポゾンの挿入突然変異体であることが証明された。実際、この cDNA クローンに対応する *defA-1* のゲノム DNA クローンは、野生型のクローンと比べて、7kb の挿入 DNA (Tam 7 と名づけた)を含んでいた。

次に、T-DNA タギングを用いたアラビドプシスの *agamous* 遺伝子のクローニングについて紹介する。この植物では最近アグロバクテリウムの T-DNA によるタギングが可能となった。T-DNA 挿入突然変異体植物の一つ、*ag-2* 植物のゲノム DNA を *Sal I* で分解した後、ライゲートして大腸菌を形質転換する。T-DNA を含む *Sal I* 断片は、T-DNA に近接する植物 DNA と共に、大腸菌の複製開始点とアンピシリン耐性遺伝子を T-DNA 中に持つので、この断片を獲得した大腸菌は薬剤耐性で選抜できる。こうしてクローニングされたゲノム DNA を、アラビドプシスの RFLP マーカーを用いてマップすると、*agamous* 遺伝子との間で 2 センチモルガン以内に位置することがわかった。このクローンをプローブとして選抜されたコスミッドクローンの一つで (*ag-2/ag-2*) の植物を形質転

換すると、突然変異がコンプリメントされ、野生型形質の植物に戻ったため、このコスミッドクローン中に *agamous* 遺伝子のあることが確認された。このコスミッドクローンをを用いて cDNA クローンを選抜した。*ag-2* 株のゲノムにおいて、この cDNA のカバーする部分を調べたところ、T-DNA の挿入が確かめられた。さらに、これとは独立に EMS 処理で得られた別の *agamous* 突然変異体植物 *ag-1* のゲノムにおいて、この cDNA に対応する部分の塩基配列を調べたところ、第 4 イントロンのアクセプターサイトをなくする塩基置換がおこっており、この cDNA クローンは *agamous* 遺伝子に対応することが確認された。

defA と *agamous* のタンパク質産物は 56 アミノ酸の類似領域を持っている。この配列はヒト血清応答因子 (SRF) および酵母の MCM1 の二つの転写因子とも強い類似性がある。この類似領域は DNA 結合部位であることがわかっているため、ショウジョウバエのホメオティック遺伝子群で“ホメオボックス”のアミノ酸配列が共通していると同様に、花のホメオティック遺伝子も共通の DNA 結合領域を持つ遺伝子群をつくるのが強く示唆される。実際、SRF-MCM1 タイプ転写因子の DNA 結合領域と類似のアミノ酸配列を持つ遺伝子が現在アラビドプシスで多数分離されつつある。

(抄訳：角谷徹仁——生物研)

Changing the flowers

North, G.

Nature 346, 19; 5 July 1990

Deficiency, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors

Sommer, H., J. P. Beltran, P. Huijser, H. Pape, W. E. Lonig, H. Saedler and Z. Schwarz-Sommer

EMBO Journal 9: 605-613 (1990)

The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles trans-

cription factors

Yanofsky, M. F., H. Ma, J. L. Bowman,
G.N. Drews. K. A. Feldmann and E. M.
Meyerowitz
Nature 346, 35; 5 July 1990

文献情報

雄性不稔植物の作り方

トウモロコシ、イネなどの穀物やトマト、アブラナなどの野菜では、いわゆる雑種強勢 (heterosis) によって生産性を上げることができる。しかし、このヘテロシス育種のために重要な雄性不稔の母体系統は極く限られた作物種でしか確立されておらず、トウモロコシなどの主要作物ではおしべを機械的に取り除いて母本にしている。そのため雄性不稔系統を確立しようとする試みがこれまで数多くなされてきたが未だに成功していない。Mariani らは組換え DNA 技術を利用した全く新しい方法で雄性不稔植物を作ることに成功した。

彼らはまず種々のタバコの雄性不稔突然変異体を解析し、それらの原因の多くがタペータム (tapetum) と呼ばれる組織の異常によることを見出した。そこでタバコ葯由来の cDNA ライブラリーからタペータムに特異的に発現している mRNA の cDNA, TA29 と TA13 を単離、同定した。さらに TA29cDNA を用いてゲノミックライブラリーから TA29 遺伝子を単離した。解析の結果、TA29 遺伝子は分子量約 33kDa のグリシンに富んだタンパク質をコードしており、葯のタペータムで特異的に発現し、相同な遺伝子はトマト、レタス、アブラナなど他の多くの植物にも存在することが明らかになった。

TA29 遺伝子は転写レベルで発現が調節されている。そこで TA29 遺伝子の 5' 上流領域 (-1477~+51) を GUS 遺伝子につないだキメラ遺伝子を構築しタバコに導入した。得られた形質転換体で GUS 遺伝子の発現パ

ターンを調べると内在の TA29 遺伝子のものと一致しており、TA29 遺伝子の 5' 上流領域 1.5kb にはタペータムで特異的に発現するのに必要な情報がすべて含まれることが明らかになった。

次にこの 1.5kb 断片を 2 種の RNase 遺伝子 (合成した *Aspergillus oryzae* T1 RNase, *Bacillus amyloliquefaciens* の barnase) につなぎタバコに導入した。その結果 TA29-RNaseT1 を持つ形質転換体が 20 個体、TA29-barnase を持つものが 115 個体得られた。これらの形質転換体は成長速度、草丈、草姿、開花時期、花色のいずれをとっても対照の個体と差がなかったが、TA29-RNase T1 形質転換体の 10% (2/20)、TA29-barnase 形質転換体の 92% (106/115) では葯の中に花粉がなかった。この花粉のない個体はもちろん種をつけなかったが、対照の個体の花粉を交配してやると正常に結実した。したがって、花粉のない TA29-RNase 形質転換体は雄性不稔であることが示された。また正常な花粉を交配して得られた後代では TA29-RNase 遺伝子のあるなしによって雄性不稔型と正常型が 1 : 1 に分離した。

雄性不稔になった個体の葯を調べたところ stage 2 (正常な葯ではタペータムが発達し、TA29m RNA のレベルが高い時期) でもタペータムは見当たらず、花粉粒の入っていない花粉囊のみが存在していた。in situ ハイブリダイゼーションによる解析でも TA29 mRNA はほとんど検出されず、また RNase T1 mRNA の量も非常に少なかった。したがって葯発生の過程で、TA29-RNase 遺伝子がタペータムで特異的に発現することにより細胞内の RNA を分解し、その結果タペータム細胞が消失して花粉粒の形成が阻害されたと考えられる。

著者らはアブラナ (oilseed rape, *Brassica napus* cv. 'Drakkar') でも同様の実験を行った。TA29-RNase T1 と TA29-barnase をアブラナに導入したところ、24 個体の TA29-RNase T1, 13 個体の TA29-barnase 形質転換体が得られた。このうち雄性不稔の表現型を示したのはそれぞれ 71% (17/24), 77% (10/

13) であった。そして、タバコの場合と同様薬の中に花粉粒はなく、タペータムも存在しなかった。したがってタバコのTA29遺伝子の5'上流転写制御領域はアブラナにおいても正常に機能し、TA29-RNaseがタペータムで特異的に発現して雄性不稔になったと考えられる。このことは、このシステムが種を超えて応用できることを示しており、ヘテロシス育種に新しい展望をもたらすと予想される。

この画期的な手法は、たねを食用にしない作物（例えばレタス、ニンジン、キャベツ）にはすぐにも応用可能だが、トマト、トウモロコシ、コムギ、イネなどではF₁世代で稔性を回復させるようなシステムを合わせて開発する必要がある。著者らはアンチセンスRNAやbarnaseのタンパク質性阻害剤などの利用を考えているが、いずれにせよこの報告は組換えDNA技術を作物育種の分野で応用した見事な成功例と言える。

(抄訳：高野 誠——生物研)

Ways to pollen sterility

Peacock, J.

Nature 347, 714; 25 October 1990

Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene

Mariani, C., M. De Beuckeleer, J. Truettner, J. Leemans and R. B. Goldberg

Nature 347, 737; 25 October 1990

文献情報

植物プランクトンのウイルス感染と一次生産の減少

天然の海水には $10^6 \sim 10^9 \text{ ml}^{-1}$ のウイルス粒子が存在する。しかし、海産のウイルスが海洋生態系の中でどのような役割を果たしているかについてはほとんど知られていない。このような中で本論文は、ウイルスを分離し、これを植物プランクトンに感染させる実験を

行い、ウイルスが海洋の一次生産に影響を与える可能性を指摘すると共に、採用した方法がこの方面の研究にとってどのような意味を持つかを論じている。今後の海洋微生物研究にとって示唆に富む内容である。

まず著者らは、動物プランクトン、植物プランクトン、バクテリアを分離するために20~100 lの海水をグラスファイバーとメンブレンフィルター（直径142 mm, ポアサイズ $0.2 \mu\text{m}$ ）でろ過し、ろ液の中に残った粒子はアミコンホローファイバー（分子量100,000以下をろ過）かスパイラルカートリッジフィルター（分子量30,000以下をろ過、恐らくポアサイズ $0.002 \mu\text{m}$ 相当）を用いて濃縮した。この方法でバクテリア、粘土、非ウイルス状粒子を含まない様々なウイルス状粒子が得られる。著者らは、この濃縮液中の生きている粒子濃度をDAPI法で推定し、カートリッジの濃縮係数で補正した。その結果、天然海水中の $0.2 \mu\text{m}$ より小さな生きている粒子（恐らくウイルスと思われる）は $10^6 \sim 10^7 \text{ ml}^{-1}$ と推定された。

次いで著者らは、植物プランクトンに感染しているウイルスの分離と同定のために液体培養を行った。まず、f/2を添加した天然海水（電子レンジ殺菌）を用いたバッチ培養で植物プランクトンを培養し、これにウイルスを感染させるために、上記の方法で濃縮した天然ウイルス群を倍々に加えた。植物プランクトンの増殖速度は、*in vivo*でクロロフィル蛍光でモニターした。ウイルスを加えた結果、増殖速度が落ちたり、植物プランクトンの細胞溶解が生じたりした場合は、それが感染した培養液を遠心分離機にかけ、その上澄み液を未感染培養に加えて感染させることによって、その病原体ウイルスの純度を増すようにした。この作業は、元々のウイルスから複製されたものでないウイルスを希釈するために、そしてその病原体ウイルスの効果が増殖できることを確かめるために、何回も繰り返された。この方法を用いて著者らは、真核性植物プランクトンの羽状目珪藻、円心目珪藻（いずれも非常に小型で分類が不明）、クリプト藻（*Rhodomonas* sp.）、およびブラシ

ノ藻 (*Micromonas pusilla*) に感染するそれぞれのウイルスを分離した。ウイルスをその宿主の培養基に加えた場合は全て、蛍光は激減した。また著者らは、寒天培地を用いた同様な実験で原核性植物プランクトンの藍藻 (クロロコッカス) に感染するファージを分離した。

さらに著者らは、様々な植物プランクトンに感染する病原体を含む $0.002 \sim 0.2 \mu\text{m}$ の粒子が一次生産に影響を及ぼすかどうかを調べた。まず、海水から濃縮された $0.002 \sim 0.2 \mu\text{m}$ 分画を薄めて、同じ場所の海水サンプル 50ml に添加した。これらのサンプルを ^{14}C 重炭酸塩でラベルし、 $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の蛍光で4時間培養した。5回行った実験では、粒子状物質の中に取り込まれた放射能から推定された一次生産力は、平均で濃縮液を加えない対象の44% (最低21%) に下がった。その光合成の抑制者は高圧滅菌されやすかった。

著者らは、以上の結果から次のように考察している。

これらのデータはウイルスが炭素固定速度を減少させることを必ずしも証明するものではない。というのは、この実験では恐らく相対的に大きな分子量のタンパク質も濃縮されており、これらは熱に弱く、また生物活性を弱める働きを持ち得るし、また何が原因物質であれ、この実験システムの中では一次生産を抑制し得るからである。いずれにしろ、分離された病原体が感染する植物プランクトンがいずれも海洋における重要な一次生産者である、ということには意味があろう。

ウイルスと宿主の分離液は、天然の海産ウイルスと植物プランクトンの相互作用を研究するためのモデルシステムを提供してくれる。そのようなシステムは、一次生産力と天然の植物プランクトン群集構造に対するウイルス感染の影響を調べる手助けになろう。ウイルスは様々な植物プランクトンに感染できるので、海洋における栄養とエネルギーの流れの経路に影響を与え、植物プランクトンのブルームを制限し、あるいは終らせ、植物プランクトンの種の多様性を維持し、そして植物プランクトン間の遺伝物質の輸送方向を左右す

るだろう。また、海水中における藻類感染ウイルスの存在は、以前から報告されてきた天然の植物プランクトン群集における細胞溶解や、植物プランクトンや有機炭素の動向が一次生産速度と往々にして釣合わないことを説明するかも知れない。

(抄訳：松川康夫——中央水研)

Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity

Suttle, C.A., A.M. Chan and M.T. Cottrell
Nature 347, 467; 4 October 1990



「病原体と宿主植物の分子戦略」に関する日米セミナーに参加して

東北大学 農学部

羽柴 輝良

日米学術振興会と米国科学財団主催による第6回日米科学協力セミナーが1990年4月15日から1週間にわたって、ハワイ大学で開催された。前回は1985年に愛知県の犬山（故西村先生の世話役）で開催された。今回のセミナーは“病原体と宿主植物の分子戦略”と題して、アメリカ側から18名、日本側から15名、計33名の出席者によって大学のイースト・ウエスト・センターで発表と討論が熱心に行われた。日本側の世話役は近畿大の大内先生、アメリカ側はハワイ大の Dr. Patil であった。本セミナーで最も楽しみにしていたのは、1988年に京都で国際植物病理学会議が開催された際、バイオテクノロジーのシンポジウムに出席したアメリカ側の演者のほとんどが来られること、また、この2年間のアメリカ側の進歩を知ることができることであった。

紙面の都合もあり、日本側演者の内容については割愛させていただき、アメリカ側も特に印象に残った数名の研究者の発表について紹介する。初日はワシントン大の Dr. Nester が、植物病原細菌の分子生物学の発展に多大な貢献をされたカリフォルニア大の Dr. Kosuge の逝去に対し哀悼の意を表し、追悼講演“植物病原細菌と宿主植物の相互反応の分子的景観”と題して行った。続いて、近畿大の大内先生が、宿主特異的毒素が仲介する糸状菌病の分子病理学の樹立を目前に他界された、名古屋大の西村先生に対する追悼講演を“病原糸状菌と宿主相互反応の分子生物学”と題して行った。日米セミナーの発足以来、両国の柱としてセミナーを引っ張って来られた2人の巨星を欠くセミナーになってしまったが、悲しみを乗り越えて連日活発な討論と美しい親睦の輪が生れた。ここではセミナー

の順序に従って内容にふれて行きたい。

1. 植物病原細菌の分子生物学

細菌の非病原性遺伝子 (avr) は優性であるが、*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* で初めて単離されて以来、*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *X. c.* pv. *malvacearum*, *P. syringae* pv. *tomato* でも単離され、宿主選択性に関する重要な遺伝子が証明されてきた。今回、Dr. Keen (カリフォルニア大) は *P. syringae* pv. *tomato* が保持している75 kb の低コピー、プラスミドに存在する avrD について報告した。avrD 遺伝子は 34kDa のタンパク質をコードしており、pv. *glycinea* のものと相同性を有していた。この avrD タンパク質は分子量 500Da で、熱安定性の avrD エリクター (植物の防御反応を活性化する物質) を培地中に分泌する。一方、ダイズ側では抵抗性遺伝子、Rpg4 から病原体のエリクターを認識する avrD レセプターが生産され、エリクターとレセプターとの反応によって過敏反応 (HR) を誘導すると考え、“エリクター・レセプターモデル”を提唱した (図1)。しかし、非病原性遺伝子産物 (エリクター) が抵抗性遺伝子産物 (レセプター) と直接相互作用するのか、あるいは間接的に作用するかについては不明である。

植物の抵抗性に関与する過敏反応 (HR) については上述した。ところが、この HR を起こす遺伝子と宿主植物に対する病原性 (P) を起こす遺伝子はクラスターを形成しており、hrp と呼ばれている。Dr. Mills (オレゴン州立大) は *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 菌から病原性遺伝子、hrpM を見い出し、

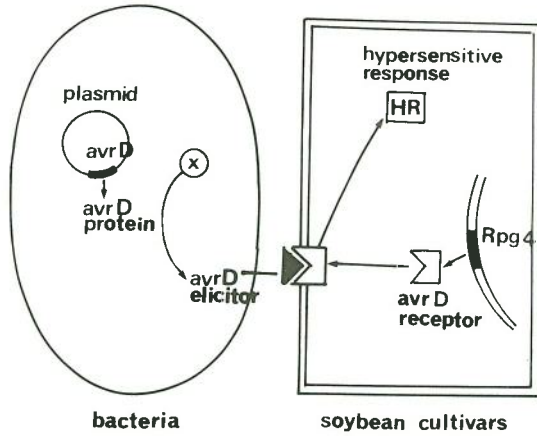


図1 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 菌の非病原性遺伝子の機能

hrpM の構造と機能についてふれた。hrpM の遺伝子座は ORF1 (hrpM1) と ORF2 (hrpM2) からなり、40kDa と 83kDa のタンパク質をコードしている。塩基配列の結果から、両タンパク質合成のプロモーター領域、転写開始コドン、停止コドン等が詳細に解析され、hrpM2 の生産物は膜透過性タンパクで、Permease であり、その合成は hrpM1 の生産、すなわち、DNA 結合タンパクによって制御されていることを示した。これらの遺伝子は *pv. phaseolicola* と *pv. syringae* 菌で高度に保存されていた。

なお、細菌病関係では Dr. Chatterjee (ミズーリ大) が細菌ペクチナーゼの分子遺伝学、Dr. Patil がファゼオロトキシン生産の分子的解析について述べた。

2. 植物側の抵抗性遺伝子

植物側の抵抗性遺伝子に関してはゲノムサイズが大きいことなどから、細菌の非病原性遺伝子をクローニングするときと同じ戦略で行うことはできない。Dr. Bennetzen (パデュー大) はトウモロコシのさび病菌、*Puccinia sorghi* に対する抵抗性遺伝子座位、Rpl の微細構造分析についてふれた。図2に示したように、トウモロコシの10番目の染色体の short arm 上にマップされた RFLP プローブ (BNL 3.04, NPI 285, NPI 422) を用いて、Rp 遺伝子クラスターの微細構造遺伝子地図を作成した。Rpl^B, Rpl^E, Rpl^D 遺伝子の

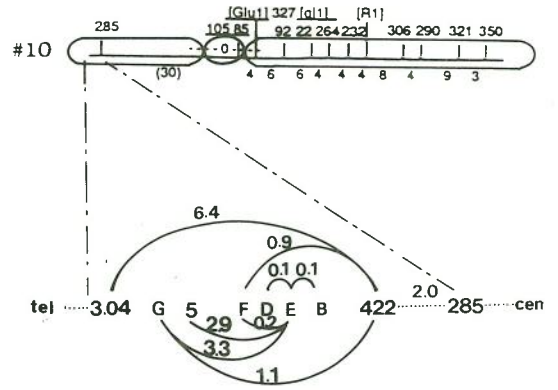


図2 トウモロコシの染色体地図(上)とさび病菌に対する抵抗性遺伝子座位(下)

間隔は 0.1cM ≒ 10⁵ bp と近接しており、遺伝子座の解析に RFLP マーカーの利用の重要性を強調した。

なお、Dr. Lam (ソーク研究所) は抵抗性遺伝子発現の制御機構について述べた。

3. 病原糸状菌の分子生物学

最後に糸状菌の病原性解析では Dr. Leong (ウィスコンシン大) と Dr. Chumley (デュボン試験場) の2者が講演した。Leong 女史はトウモロコシ黒穂病菌 (*Ustilago maydis*) の病原性の分子生物学と題し、一方、Chumley は夫人である Dr. Valent が多忙のためにピンチヒッターとして登場し、イネいもち病菌の宿主特異性遺伝子のクローニングと特性に関する戦略と題して報告した。

Leong は *Ustilago maydis* 菌において、遺伝子導入系を確立し、この導入ベクターはプロモーターとして *U. maydis* の heat shock gene promoter (hsp70 遺伝子) を持ち、ハイグロマイシン B をマーカーとしたもので、DNA 1 μg 当り 1000 個の形質転換体を得ている。本導入系等を用いて、“siderophore (鉄輸送体)” と呼ばれる鉄キレート化合物、ferrichrome, ferrichrome A の合成遺伝子の同定を行った。土壌中の拮抗微生物は siderophore を体外に放出して、体外の不溶性の Fe を可溶化して取り込み、根面微生物の発育に必要な鉄イオンを奪い取るため、根の周辺で発芽した病原菌は抑制されると考えら

れ、詳細な遺伝子解析が行われている。彼女はferrichrome, ferrichrome Aが糸状菌でも発芽因子として働いていると考え、siderophore 突然変異体を作り、遺伝子解析を行い siderophore 合成と調節に関与する遺伝子を見つけた。

日本で最も気になる、Chumleyによるいもち病菌の遺伝子解析では avr 遺伝子のクローニングに、リンクした MGR の塩基配列からウオーキングする方法を用いたことである。MGR とは *Magnaporthe grisea* repeat の頭文字を取ったもので、彼らはイネいもち病菌の遺伝子中に含まれる特殊な塩基配列の繰返し数の多少によって、多数の異なるバンドを示すことを利用して、遺伝子地図の作成を試みた。そこで、MGR 配列の一部をサブクローニングしたプローブを用いて、いもち病菌の avr 遺伝子のクローニングを行った。さらに、イネでは RELP 地図がある程度できがりつつあり、日本でもいもち病の病害抵抗性遺伝子の単離に向け努力がなされているが、病原菌側では大変遅れている。Chumley は彼らが今回、初めて RFLP マーカーを用いて作成したりリンケージマップの一部を示した (図3)。いもち病菌は5~6本の染色体からな

り、短いもので3Mb,長くて12Mbであり、5年以内にMGRマーカーと併用して遺伝子地図を完成すると述べていた。

細菌の非病原性遺伝子、病原性遺伝子に関する研究は大変進んでいる。糸状菌の遺伝子解析は細菌とは比較にならないほど複雑なために、世界的にもこの方面の研究は少なく、大変遅れている。しかも、これらの仕事は根気が必要なことから、女性の研究者がトップを走っていることも注目したい。近年、RFLPとVNTR(多数回繰返し配列)のマーカーを利用して、各種植物や糸状菌のリンケージ・マッピングが進んでいるが、ゲノムサイズが大きいこと、反復配列が近接して点在していることから、次の段階としてクロモソーム・ウオーキングやジャンピングを行って目的遺伝子に到達するにはまだ先のことのように思われる。しかし、注目しなければならないことは、細菌を扱っていた研究者が糸状菌の分野に移行していることから、予想外に早く、糸状菌の分野でも細菌のレベルに到達するものと思われる。

今回のセミナーではアメリカ側の10名の発表からも、研究の底辺の広さを垣間見ることができたとともに、日本側の10名の発表も、アメリカ側から高い評価を得ていた。本稿で述べてきたセミナーのトピックはすでに論文等で読まれた方も多と思われる。しかし、反面、この分野の研究はそれだけ進歩が早いともいえ、半年先あるいは一年先を予想することは大変困難である。今後、どのような方向に発展して行くかを考えると、心が浮き立つ思いがする。



図3 イネおよびいもち病菌のRFLP連鎖地図

特別情報

根粒菌の共生機構について

農林水産省 農業環境技術研究所 土壌微生物利用研究室

宮下 清貴

窒素は炭素、水素、酸素とともに、生物体中に最も多量に存在する元素の一つである。酸素が生物の呼吸に重要であることは古く18世紀には明らかにされたが、一方大気の8割を占める窒素は当初は生物の維持には無用なものと考えられていた。しかし窒素はタンパク質、アミノ酸、核酸等の主要構成成分であり、大気と生物圏を循環している。この窒素の循環に関与しているのは微生物（しかも細菌）であり、植物を含め他の生物は、大気中に“無尽蔵”にある窒素を直接利用することはできない。大気中の窒素は水素や酸素と結びついた形で“固定(fixation)”されて、はじめて植物が利用できるようになる。先進諸国では農業生産における肥料窒素の役割は大きいですが、低開発国の農業や、地球全体の生態系でみた場合、植物の窒素栄養における生物的窒素固定(Biological Nitrogen Fixation)の寄与は絶対的なものがある。そしてエネルギー問題や環境問題を考えるとき、生物的窒素固定の重要性は今後益々大きくなっていくことは疑いない。その中でもマメ科植物と根粒菌の共生的窒素固定は地球上の全生物的窒素固定量の半分近くを占めると見積られており、古くから農業上も重視されてきた。マメ科植物と根粒菌の共生現象は、高等生物と原核生物の関係の中でも他に類を見ない、見事な洗練された関係である。この共生関係が発見されてから既に100年、長い間神秘であった共生のメカニズムも分子生物学の発展を背景に、分子のレベルでの解明がすすみつつある。ここでは最近の知見を中心に、その概要を紹介する。

1. 共生的窒素固定とマメ科植物根粒菌

根粒菌とその宿主であるマメ科植物は共生関係を営むための一連の遺伝子をともに持っており、その遺伝子に組み込まれたプログラムに従って共生現象が営まれる。一方植物の根圏における窒素固定なども(緩い)共生関係と呼ぶことがあるが、これらは本来の共生関係(細胞内共生)とは質的に異なるものであり、たまたま環境条件の一致から、見かけ上共生関係が成立しているものと考え方が妥当であろう。

植物と共生的窒素固定を行う微生物としてマメ科の根粒菌の他に、ヤマモモやハンノキ等の樹木と共生関係を結ぶ *Frankia* があるが、後者は放線菌であり、マメ科根粒菌とは遺伝的にも全く離れた存在である。一方マメ科根粒菌は比較的均一なグループと考えられ、それはすべて *Rhizobium* 属でまとめられていた。*Rhizobium* 属の中は、宿主とする植物のグループによって細分されていたが、宿主との関係は菌株によって不規則で、混乱の原因となっていた。近年のDNAレベルでの分類の研究の結果、マメ科根粒菌は *Rhizobium* と *Bradyrhizobium* の2属に大別され、最近ではそれに茎粒を作る *Azorhizobium* が新たな属として追加されている。それらの中で *Rhizobium* 属は *Agrobacterium* 属と極めて近縁であり、全DNAの相同性やその他のデータからは両者を別の属とする理由がないことが明らかにされた。*Agrobacterium* は植物に根頭癌腫(クラウンガール)を引き起こす病原菌であり、Tiプラスミド上のT領域が植物のゲノムに組み込まれることを利用して、

植物への遺伝子導入のベクターとして広く利用されている。両者は“共生”と“病気”という違いはあっても植物組織に形態的な変化を引き起こすという点では共通であり、根頭癌腫形成に関連した遺伝子が Ti プラスミド上にあるように、根粒形成関連 (*nod*) 遺伝子や窒素固定 (*nif*) 遺伝子は *Rhizobium* の持つ大型の *sym* プラスミド上にある。これらのことから両者の違いはこのプラスミドの違いに起因していることが考えられる。事実 *sym* プラスミドを *Rhizobium* から *Agrobacterium* に移すと、*Agrobacterium* は根粒形成能を獲得した。しかし作られた根粒は不完全で、窒素固定は行われなかった。また Ti プラスミドの方は宿主域は極めて狭く、*Rhizobium* 中では複製できなかつた。これらのことから、根粒形成には *sym* プラスミド以外の *Rhizobium* の染色体上の遺伝子も関与していること、また *Rhizobium* と *Agrobacterium* は全 DNA の相同性のレベルでは区別できなくても、明らかに異なる細菌であることがわかる。根粒形成においても根頭癌腫と同様に、*Rhizobium* から植物のゲノムへの遺伝子の転移が期待された時期があったが、現在では否定されている。一方ダイズ根粒菌を中心とした *Bradyrhizobium* は、*Rhizobium* と *Agrobacterium* のグループとは系統的に少し離れて位置している。*Bradyrhizobium* では *nod* 遺伝子や *nif* 遺伝子は、プラスミド上ではなく、染色体上に位置している。これらの事実はマメ科植物と根粒菌の共生関係の進化や発展の歴史を考える上で興味深い。

2 共生のメカニズム

根粒形成の初期過程は以下の通りである。

①植物の根の根圏で根粒菌が増殖し、根毛の表面に付着する。②根粒菌が付着すると、根毛の屈曲 (*curling*)、分岐 (*branching*) といった異形化がおこる。③根粒菌の根毛への侵入とともに感染糸が形成され、伸長する感染糸を通して根粒菌は根の内部へと進んでいく。感染糸は皮層まで達すると細胞内部へ向けて口を開き、根粒菌を放出する。④放出された

根粒菌は植物細胞由来の膜に包まれ、宿主細胞は分裂を繰り返して肥大化し、根粒となる。

共生のメカニズムに関する研究は、まず根粒菌の持つ根粒形成関連 (*nod*) 遺伝子に関して始まった。先に述べたように *Rhizobium* は大型プラスミドを持ち、このプラスミド上に窒素固定 (*nif*) 遺伝子があることが確認されていた。自然突然変異で根粒形成能を喪失した株ではこのプラスミドが脱落しているかプラスミドの *nif* 遺伝子を含む部分が欠失していたことから、根粒形成能とメガプラスミドは密接に関連していることが示された。そして根粒形成能欠損変異株の復帰から選抜したクローニングの結果、例えば *Rhizobium meliloti* では *nif* 遺伝子の近傍約 20kb の範囲に *nod* 遺伝子があることが明らかにされた。クローニング技術とともに *nod* 遺伝子に関する研究を進歩させたのがトランスポゾン突然変異であり、これにより遺伝子の位置と、その遺伝子の突然変異による表現形質の変化が明らかにされてきた。こうして複数の *nod* 遺伝子が同定された。例えば *nodA, B, C, D* に突然変異が起こると宿主に根毛のカーリングを引き起こせなくなり、根粒形成能も欠損する。*nodE* ではそれが根粒形成の遅延となって現れる、などである。しかしこうした突然変異による表現形質の変化と遺伝子の実際の機能(遺伝子産物の働き)との間にはまだかなりのギャップがある。また遺伝子の塩基配列から、例えば *nodF* は大腸菌の *acyl carrier protein* と極めて相同性が高い等の情報が得られ、その機能が類推されている。

nod 遺伝子の構成は根粒菌の種によって、かなりの違いがある。*nod* 遺伝子領域の中に異なった根粒菌のグループ間でも相同性の高い部分があり、それらは共通遺伝子 (*common nodulation genes, common nod*) と呼ばれている。この中には四つの遺伝子 (*nod D, A, B, C*) が同定されている。共通遺伝子群の相対的位置は *Rhizobium* 属の中では一致しているが、*Bradyrhizobium* では D と A の間に新しいオープンリーディングフレーム (Y) が存在している。一方変異により宿主特異性が変化することから、宿主特異性の決

定に関与していることが明らかになった遺伝子 (host-specific *nod*, *nodH*, *Q* 等) も同定されている。

3. 根粒菌—宿主の相互作用

Rhizobium とマメ科植物の相互作用は高度に特異的である。例えば *R. meliloti* はアルファルファに根粒を形成するが、ソラマメには侵入できない。共生関係の成立にはパートナー間での相互作用が必要である。両者間の情報伝達に関する研究は、根粒菌の *nod* 遺伝子の発現に関する研究から始まった。即ち大腸菌の *lacZ* 遺伝子 (本来のプロモーターを欠く) をレポーター遺伝子として用い、これを個々の *nod* 遺伝子 (あるいはそれに更に上流域も含む) と融合させ、 β -galactosidase 活性を測定することで、*nod* 遺伝子の発現を調べたのである。その結果、通常の培地では *nodD* のみが活発に転写されていた。それに対して他の *nod* 遺伝子は、*nodD* 遺伝子が同時に存在し、しかも宿主の根の抽出物を加えて培養したときにのみ、高い転写活性を示した。これらのことから、*nod* 遺伝子の中では *nodD* のみが構成的に発現していること、*nodH* は制御遺伝子であり、根から分泌される物質と *nodD* の産物との相互作用の結果、*nod* box といわれる *nod* 遺伝子のプロモーター部位に働き、他の *nod* 遺伝子の転写を誘導することがわかった。そして根からの分泌物をスクリーニングした結果、発現を誘導する物質がフラボノイドであることが判明したのである。しかし *nod* 遺伝子の発現を調節している宿主側の物質はフラボノイドだけではなく、正と負に働く因子が他にも存在していることが最近では明らかにされている。フラボノイドが誘導物質として発見された当初、宿

主から分泌されるフラボノイドの違いが宿主特異性を決定していると考えられた。しかしこれだけでは宿主特異性は説明できなかった。

フラボノイドによって誘導された根粒菌の *nod* 遺伝子は、次に根毛の変形と宿主の組織の細胞分裂を引き起こす。種々の実験から *R. meliloti* では common *nod* A, B, C と host specific *nod* H, Q の働きで、ある種のシグナル物質が作られて細胞外に分泌され、それにより根毛の異形化が開始されることが明らかになった。そして遺伝子組換えにより *Nod* 因子を過剰生産するようになった株を使い、根毛の変形を指標としたバイオアッセイ系を用いることにより、主要なアルファルファ特異的シグナル、*NodRm-1* が分離され、それはスルホン化およびアシル化されたグルコサミンの 4 糖体と構造決定された (BRAIN テクノニュース第 21 号)。この物質はナノモルという微量で、無菌的に栽培したアルファルファに対して根毛の変形、皮層細胞の分裂、根粒形成を引き起こした。一方 *nodH* と *nodQ* に変異が起きた菌株では、スルホン基が欠落したシグナル物質 (*nodRm-2*) が作られた。この物質は菌の本来の宿主であるアルファルファには働かず、逆に根粒を作らないはずのソラマメに対して根毛の変形を引き起こした。このように、*R. meliloti* の宿主特異性の決定は、common *nod* A, B, C の働きで作られた *NodRm-2* の、*nodH*, *Q* によるスルホン化によってなされていると現在考えられるに至っている。

マメ科植物—根粒菌の共生機構に関する研究はまさに日進月歩であり、最新の情報も 1 年たてば過去のものとなりかねない状況である。1 世紀以上にわたる長い研究の歴史の中でも、今が黄金期といえよう。

編集後記

明けましておめでとうございます。本誌も早いもので5年目を迎えることができました。これも、ひとえに購読会員、執筆者ならびに関係の皆様の温いご理解とご協力によるものと心からお礼申し上げます。

ところで、本誌では「文献情報」源として主にNatureを利用させていただいてきました

が、Nature発行元のご意向により、引用した論文の巻、号、頁、年号等の記載方法を本号から変更しました。その他の雑誌からの引用方法ならびに「国内情報」等における文献の記載方法は従来どおりとしますのでご了承下さい。

(大畑記)

ブレイン テクノニュース (第23号)

平成3年1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5丁目ビル3F
TEL. 03-3205-6565 FAX. 03-3205-6566

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. 03-3667-8931 FAX. 03-3667-8933