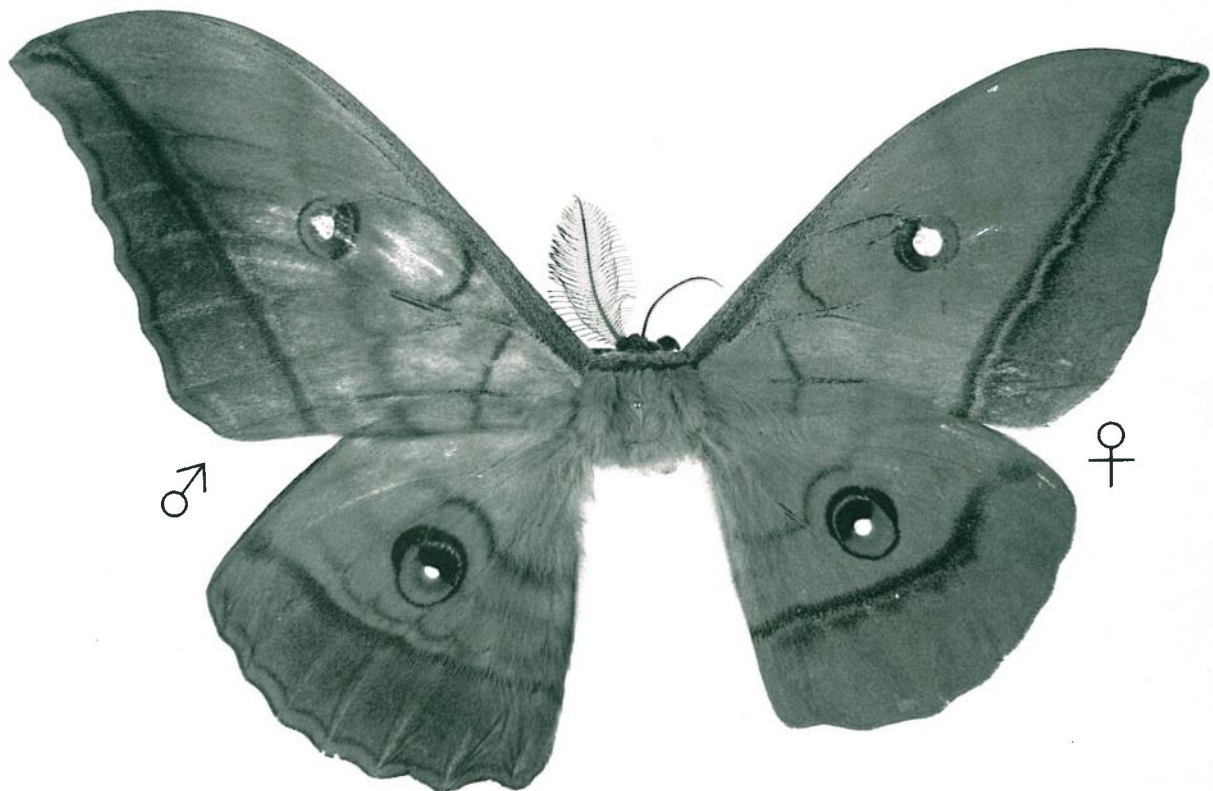


# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

NOVEMBER 15, 1992



## 表紙説明

### 雌雄同体の天蚕の成虫

右側半分は雌，左側半分は雄

右と左で翅とアンテナの形が異っている。腹部は解剖のため切除してあるが，正常雌と同じく左右4対の卵巣小管，雄と同じく1対の精巣がある。

雌雄同体を人為的に作ることによって，昆虫などの形態形成のメカニズムを解明する材料として注目されている。

〈写真提供 木内 信・竹田 敏〉

## 本号の紙面

総説	1
米アレルギーとイネ種子タンパク質	
国内情報	5
イネ・キチナーゼ遺伝子導入タバコ，アマゴの雄の産み分け，蚕受精卵への遺伝子導入	
出資プロジェクト情報	14
ウイルス抵抗性ジャガイモの開発	
地域の先端研究	17
バイオリクターによる果実酢の生産	
文献情報	20
ハイブリッド種子生産，DNAのメチル化が発生・分化に必須，植物の全身的防御反応誘導，アラビドプシスの凍結保護遺伝子	
海外便り	25
Wisconsin大学での天敵研究	

## 口 絵

### 総 説

松田 幹

米アレルギーとイネ種子タンパク質…………… 1

### 国内情報

西澤洋子・日比忠明・阿久津克己

イネ・キチナーゼ遺伝子の導入によるうどんこ病抵抗性タバコの作出…………… 5

小野里 坦

アマゴの雄の産み分け…………… 8

田村俊樹・神田俊男

蚕受精卵への遺伝子導入と発現系の開発…………… 11

### 出資プロジェクト情報

景浦 強

葉巻ウイルス抵抗性ジャガイモを遺伝子操作で開発…………… 14

### 地域の先端研究

山下純隆

通気カラム式バイオリアクターによる果実酢の生産…………… 17

### 文献情報

遺伝子工学による新しいハイブリッド種子生産技術の開発…………… 20

DNAのメチル化は発生・分化に必須である…………… 21

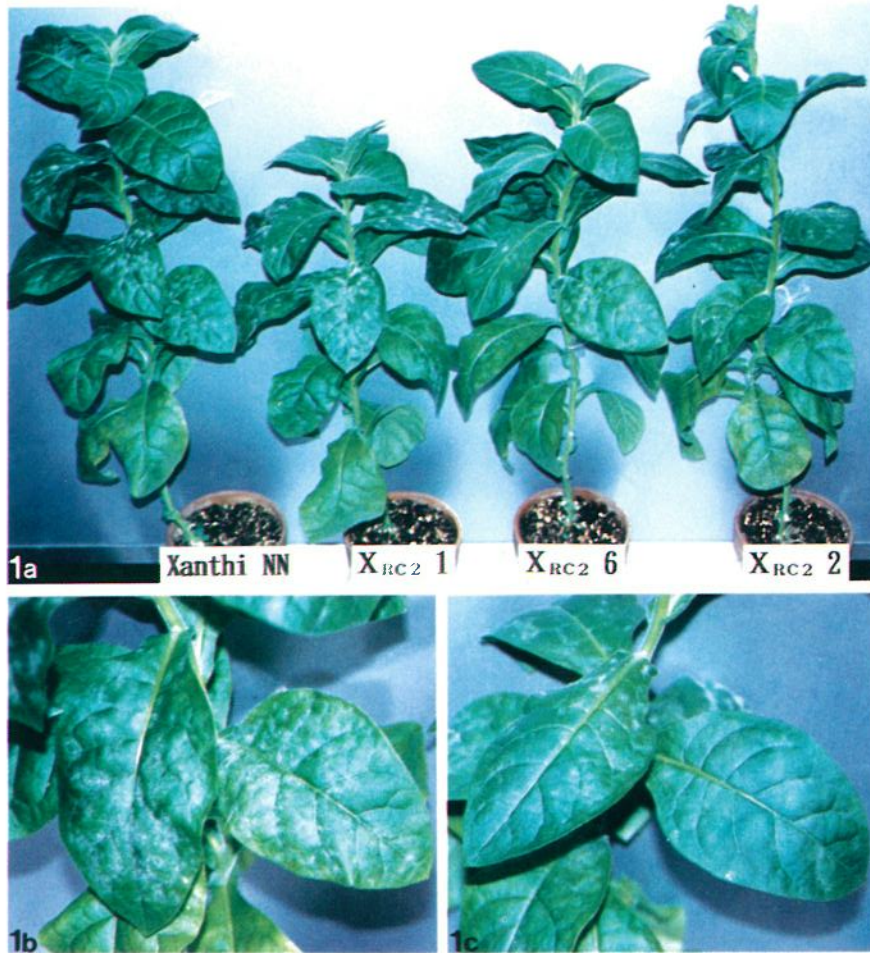
植物に全身的な防御反応を誘導するシグナルポリペプチド…………… 22

アラビドプシスの凍結保護遺伝子…………… 23

### 海外便り

Wisconsin大学での天敵研究…………… 25

イネ・キチナーゼ遺伝子の導入によるうどんこ病抵抗性タバコの作出  
(本文 5 ページ)



イネ・キチナーゼ遺伝子を導入したトランスジェニックタバコ (X<sub>RC2</sub> 1, 2, 6) のうどんこ病に対する抵抗性の増強

- a; うどんこ病菌分生孢子接種14日後の病徴, X<sub>RC2</sub> 2 (強抵抗性), X<sub>RC2</sub> 6 (中抵抗性), X<sub>RC2</sub> 1 (Xanthi NNと同等), Xanthi NN (非トランスジェニックタバコ)
- b; 接種17日後のXanthi NNの病徴
- c; 接種17日後のX<sub>RC2</sub> 2 の病徴

アマゴの雄の産み分け  
(本文 8 ページ)



精子核のみから作出された雄 (YY) で、その子は全雄となる

Wisconsin大学での天敵研究  
(本文 25 ページ)



ヤガの1種 *Heliiothis zea* の幼虫に産卵中のコマユバチの1種 *Microplitis demolitor*

# 米アレルギーとイネ種子タンパク質

名古屋大学 農学部

松田 幹

## 1. はじめに

近年、食物過敏症、花粉症、喘息などのアレルギー性疾患の患者数が増加の傾向にある。乳幼児のアトピー性皮膚炎に代表される食物アレルギーでは、日常的に摂取する食物が原因になっている場合が多い。そのため原因物質（アレルゲン）の同定が難しく、スギ花粉によるアレルギー性鼻炎やハウスダスト（家庭）、ダニによる喘息などに比べて基礎的な研究が遅れている。食物アレルギーに対しては、今のところ毎日の食事メニューの中から原因物質を含む食品を除去し、加齢による自然軽快を待つ以外に有効な治療法は確立されていない。我々の研究グループは、臨床医学領域の研究者の協力を得て、食物アレルギーの予防、治療に対する食品サイドからのアプローチを試みている。本稿では、これまでに得られた研究成果の中から米アレルギーにおける原因タンパク質の分子構造とイネ種子中での役割、さらに遺伝子工学的技術を用いた低アレルゲン米の開発について述べてみたい。

## 2. 米アレルギーと原因タンパク質

小麦や米などの穀物に対するアレルギーは、製粉業、製パン業に従事する人に高い頻度で発症する喘息などの呼吸器系アレルギーとして比較的古くから知られていた。一方、食物として経口的に穀物を摂取することによって、アトピー性皮膚炎などの食物アレルギーを誘発することが知られるようになったのは比較

的最近のことである。米飯などを食べることによって湿疹、皮膚炎などをおこす数人のアレルギー患者の血清中に、米のタンパク質に特異的に結合するIgE抗体が存在することが、群馬大学の研究グループによって最初に報告された<sup>1)</sup>。その後、数百人の規模で小児の食餌性アレルギー患者の血清IgE抗体に対する食物抗原が調べられた。その結果、年少児では卵白、牛乳に対してIgE結合陽性率が高いが、年長児になるにつれて米、小麦などの穀物に対する陽性率が高くなる傾向が認められた<sup>2)</sup>。このように、これまでは乳幼児の食物アレルギーの原因食品として、卵白や牛乳などの動物性の高タンパク質の食品が注目されてきたが、植物性で比較的タンパク質含量の低い穀物に対してもアレルギー反応を示す患者が意外に多いことがわかってきた。

精白米、すなわちイネ種子胚乳中には、乾燥重量で約10%弱のタンパク質が含まれており、それらは溶解性に基づいて主要な4種類のタンパク質に分類されている。全タンパク質の約80%が希酸または希アルカリにのみ可溶性なグルテリンで、10~15%がアルコールなどの有機溶媒に可溶性なプロラミンである。両タンパク質は、胚乳細胞のプロテインボディ中に蓄積されており、いわゆる貯蔵タンパク質である。残りの5~10%が塩溶液に可溶性なグロブリンと水にも可溶性なアルブミンで、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析では前者は分子量約26kDa、後者は14~16kDaのタンパク質が主要な構成成分となっている。

これらの4種のタンパク質を各々の溶解性に基づいて分画し、米アレルギー患者血清IgEとの反応性を調べてみると、アルブミン

とグロブリン画分により強い反応性が見られた。そこで、塩溶液可溶性のタンパク質（アルブミンとグロブリン）を分子ふるいHPLCで分画し、各ピークについて同様に調べてみると、低分子量の複数のピークにIgEと結合するタンパク質が含まれていた<sup>3)</sup>。さらに、イオン交換HPLC等を用いて分画し、最終的に分子量約16kDaのタンパク質(16kDa-アルブミン)を単離した。このタンパク質は、血清IgE抗体と特異的に結合し、米アレルギー患者の皮膚テストにおいても陽性反応を示したことから、米アレルギーにおける主要抗原の一つと考えられた。

### 3. 16kDa-アルブミンの性質と分子構造

16kDa-アルブミンは熱に対して安定であり、100°Cで1時間加熱した後もIgE抗体との結合性は残存していたことから炊飯後の米飯中でもアレルギーとしての活性を保持していると予想される。さらに、このタンパク質はペプシンでは比較的分解され易いが、トリプシン、キモトリプシンでは消化されにくく、ヒトの消化管内においても未分解のタンパク質が残存し、その一部が体内に取り込まれアレルギー反応を誘発するものと考えられる。

次に、16kDa-アルブミンに対するウサギ抗血清とマウス単クローン抗体を作製し、16kDa-アルブミンと免疫学的に交差反応性を示すイネ種子タンパク質を探索した<sup>4)</sup>。イネ種子塩可溶性タンパク質を等電点電気泳動で分離した後、特異抗体との反応性を調べると、pIが6~8の少なくとも6本のバンドが反応陽性であった。また、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、immunoblottingによって抗体との反応性を調べると、分子量14~16kDaの複数のバンドが特異的に染色された。このように、イネ種子中には分子量と等電点がわずかに異なり共通の抗原構造を持つ一群のタンパク質が存在し、これらが米アレルギーにおける主要アレルギーと考えられる。後に述べるように、これらのタンパク質はゲノム中に複数の遺伝子が存在する、いわゆる多重遺伝子の産物である。

米の主要アレルギーと考えられる16kDa-アルブミンの分子構造を明らかにするために、cDNAクローニングを行った<sup>5)</sup>。単離した16kDa-アルブミンのN末端アミノ酸配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして、登熟期イネ種子cDNAライブラリー(京都府立大学、田中 國介教授より分与)をスクリーニングした。数個の陽性クローンの中の一つ(RA17)の塩基配列を翻訳すると、16kDa-アルブミンのN末端アミノ酸配列と完全に一致する配列が存在し、成熟タンパク質のアミノ酸組成の理論値は16kDa-アルブミンのアミノ酸組成分析値とよく一致した。RA17以外にも類似の塩基配列を持つ数個のcDNAが得られたことと、後述するようにゲノム中に少なくとも数コピーの16kDa-アルブミン遺伝子が存在することから、これらの遺伝子は多重遺伝子族を形成していると考えられる。

16kDa-アルブミンはシグナルペプチドを持つ分泌型のタンパク質で、135アミノ酸残基からなる成熟タンパク質には10か所にシステイン残基が存在する。16kDa-アルブミンは遊離の-SH基を持たないことから、10個のシステインは全て分子内-S-S-結合を形成していると考えられる。このような-S-S-架橋によりコンパクトに折りたたまれた分子構造は、16kDa-アルブミンの耐熱性や、プロテアーゼに対する抵抗性に寄与していると考えられる。

### 4. 胚乳中での16kDa-アルブミンの分布

搗精度の異なる精白米(歩留り50~90%)から、単位重量あたりほぼ同量の16kDa-アルブミンが抽出されることから、16kDa-アルブミンは胚乳表面近くから中心部に至るまでほぼ全体に分布していると考えられる。胚乳細胞中での局在性を調べるために、登熟期イネ胚乳ホモジネートをしょ糖密度勾配超遠心分離により分画し、単クローン抗体を用いたimmunoblottingにより16kDa-アルブミンの分布を調べた。プロテインボディーを含む高密度画分には多量のグルテリン、プロミ

ランが存在したが、16kDa-アルブミンは全く検出されなかった。一方、ER膜等を含む低密度画分には量的には少ないが多種のタンパク質が存在し、その中に16kDa-アルブミンが検出された。さらに、蛍光抗体を用いて免疫組織化学的に局在性を調べると、抗-16kDa-アルブミン抗体ではプロテインボディーは全く染色されず、胚乳細胞の細胞壁付近や、細胞内の大半を占めるアミノプラストに囲まれた部分が強く染色された。シグナルペプチドを持つ分泌型のタンパク質である16kDa-アルブミンがどのオルガネラに局在するかはまだ明らかではないが、少なくとも、プロテインボディーには蓄積されないことは明らかであり、発芽時における窒素源としての単なる貯蔵タンパク質ではないことを示唆している。

5. 16kDa-アルブミンの機能

16kDa-アルブミンの機能を推定するために、そのアミノ酸配列についてタンパク質一次構造データベースを用いてホモロジー検索を行った結果、小麦の $\alpha$ -アミラーゼインヒビター、大麦のトリプシンインヒビターとの相同性が見つかり、16kDa-アルブミンは

“ $\alpha$ -アミラーゼ・トリプシンインヒビターファミリー”に属するタンパク質であることが明らかとなった(図1)<sup>5)</sup>。そこで、16kDa-アルブミンの酵素阻害活性を調べてみたが、ヒトの唾液および細菌の $\alpha$ -アミラーゼ、ウシトリプシン、いずれに対しても阻害活性を示さなかった。小麦、大麦の $\alpha$ -アミラーゼインヒビターは昆虫のアミラーゼを阻害する。16kDa-アルブミンに関してはまだ確認されていないが、もし、昆虫のアミラーゼに対する阻害活性を持つならば、胚乳細胞のアミノプラストの周囲に局在する16kDa-アルブミンが、でんぷんを餌とする昆虫などの外敵から種子を守るための防御機能としての役割を持つ可能性もある。

最近、スペインの研究グループによって小麦と大麦の $\alpha$ -アミラーゼインヒビターが、製粉、製パン業者のアレルギー性喘息の主要アレルゲンであることが明らかにされた<sup>6)</sup>。さらに、 $\alpha$ -アミラーゼ・トリプシンインヒビターファミリーのメンバーであるヒマ種子(castor bean)の2Sタンパク質もアレルゲンとしての活性が示唆されている。これまでにアレルギー反応における原因抗原が同定された例はまだそれほど多くはない。それにもかかわらず、一つのタンパク質ファミリーの中

	10	20	30	40	
RAP	DHHQVYSPGEQCRPGISYPTYSLPQCRTLVRRO.CVGRGASAADEQVW				
Wheat AI 28	SGPWSWCNPATGYKVSALTGCRAMVKLQ.CVGSQVPEA...VL				
Barley TI	FGDSCAPGDALPHNPLRACRTYVVSQICHQGPRLLTSDMK.				
Castor Bean	PSQQGCRGQIQ.EQQNLRQCQEYIKQQVSGQGPR.RQERSL.				
	50	60	70	80	90
RAP	QDCC RQLAAVDDGWCRCGALDHMLSGIYRELGATEAGHPMAEVFPGCR				
Wheat AI 28	RDCC QQLADINNEWCRGDLSSMLRAVYQELG.VREG...KEVLPGCR				
Barley TI	RRCC DELSAIP.AYCRCEALRIIMQGVVTWQG.AFEG.AYFKDSPNCP				
Castor Bean	RGCC DHLKQMQ.SQCRCEGLRQAIQQOQL.QGQNVFEAF.....				
	100	110	120	130	
RAP	RGDLERAAASL..PAFCNVDIPNGPG...GVCY..WLGYPRTPTGTH				
Wheat AI 28	KEVMKLTAAASV..PEVCKVPIPNPSGDRAGVCYGDWCAYPDV				
Barley TI	RERQTSYAANLVTPQECNLGTIH..G.SA.YCPELQPGYG				
Castor Bean	.....RTAANL..PSMC.....GVSPTQCRF				

図1 イネ種子アレルゲンタンパク質と $\alpha$ -アミラーゼ/トリプシンインヒビターファミリータンパク質とのアミノ酸配列の相同性

RAP: イネ種子アレルゲンタンパク質  
 Wheat AI 28: 小麦 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター  
 Barley TI: 大麦トリプシンインヒビター  
 Castor bean: ヒマ種子2S貯蔵タンパク質

から複数のアレルゲンが同定されたことから、これらの一群のタンパク質に共通な分子構造とアレルギー反応との関連性が強く示唆される。

#### 6. 低アレルゲン米創製への遺伝子工学的アプローチ

近年の植物における遺伝子工学的技術の進歩により、特定の遺伝子の発現を人為的に制御することが可能になりつつある。筆者らの研究グループもアレルゲンタンパク質を持たない新品種の米の開発を目指して、アンチセンス RNA を用いてイネ種子登熟過程での 16 kDa-アルブミン遺伝子の発現制御を試みている。イネゲノム DNA ライブラリー（京都府立大学田中教授より分与）から 16kDa-アルブミン遺伝子をクローニングし、そのプロモーター領域を含む DNA 断片に cDNA を逆向きに連結した。このアンチセンス遺伝子をエレクトロポレーションによりイネプロトプラストに導入した後、再分化させ、形質転換イネ個体を得た。それらの種子についてタンパク質含量および組成を調べると、グルテリンとプロラミンに関しては、ほとんど含量に変化は見られないが、いくつかのクロンの種子では 16kDa-アルブミン含量が有意に減少していた。このようにアンチセンス RNA を用いて、登熟期イネ種子におけるアレルゲンタンパク質の発現をある程度抑制できることがわかった。現在、導入する遺伝子に改良を加えて抑制率をさらに上げるための研究を継続している。しかし、16kDa-アルブミン遺伝子が多重遺伝子族を形成していることと、アンチセンス RNA による遺伝子の発現抑制法そのものにもある程度の限界があるため、これらの遺伝子の発現をアンチセンス RNA 法で 100% 抑制することは難しいかもしれない。

#### 7. おわりに

これまで述べてきたように、筆者らの研究グループはイネ種子から米アレルギーの主要

アレルゲンと考えられる一群のタンパク質とその遺伝子を単離し、さらにこの遺伝子の発現抑制にある程度の成果を上げつつある。しかし、重篤なアレルギー患者では微量のアレルゲンの摂取によってもアレルギー反応を誘発することが知られており、また、一部の米アレルギー患者では 16kDa-アルブミン以外のイネ種子タンパク質がアレルゲンとなっている場合もあるため、米アレルギー患者の治療食（アレルゲン除去食）として使えるような低アレルゲン米の開発にはまだ多くの問題が残されている。これらの問題を解決するために、16kDa-アルブミンのアレルゲンとしての活性部位の同定やアレルゲンタンパク質遺伝子の転写調節因子の解析など、さらに研究を進めていきたいと考えている。

本稿で述べた米アレルギーに関する研究では、主に米アレルゲンタンパク質およびその遺伝子に関する研究を名古屋大学農学部食品工業化学科（松田幹，安達貴弘，中村良）が担当し、遺伝子導入によるイネの形質転換に関する研究を三井東圧化学(株)ライフサイエンス研究所植物工学研究部（多田雄一，藤村達人，高橋正昌）が担当したことを付記する。

#### 文 献

- 1) Shibasaki M., S. Suzuki, H. Nemoto and T. Kuroume (1979) *J. Allerg. Clin. Immunol.*, 64 : 259-265
- 2) 山田一恵・岸本真知子・稲垣義彰・稲本 真・駒田英勝・山田攻功・鳥居新平 (1985) 小児科臨床, 38 : 2545-2552
- 3) Matsuda T., M. Sugiyama, R. Nakamura and S. Torii (1988) *Agric. Biol. Chem.*, 52 : 1465-1470
- 4) Matsuda T., R. Nomura, M. Sugiyama and R. Nakamura (1991) *Agric. Biol. Chem.*, 55 : 509-513
- 5) Izumi I., T. Adachi, N. Fujii, T. Matsuda, R. Nakamura, K. Tanaka, A. Urisu and Y. Kurosawa (1992) *FEBS Lett.*, 302 : 213-216
- 6) Gomez L., E. Martin, D. Hernandez, R. Sanchez-Monge, D. Barber, V. Pozo, B. Andres, A. Armentia, C. Lahoz, G. Salcedo and P. Palomino (1990) *FEBS Lett.*, 261 : 85-88

## 国内情報

# イネ・キチナーゼ遺伝子の導入による うどんこ病抵抗性タバコの作出

農林水産省 農業生物資源研究所 微生物機能利用研究室  
西澤洋子・日比忠明  
茨城大学 農学部  
阿久津 克己

## 1. はじめに

多くの植物病原菌類の細胞壁はタンパク質やグルカンなどととも、N-アセチル-D-グルコサミンのポリマーであるキチンなどで構築されている。一方、高等植物は構成成分としてキチンを持たないにもかかわらず、キチンをオリゴ糖に加水分解する酵素、すなわちキチナーゼを産生する。このキチナーゼ産生は病原菌の感染や傷害、あるいはエチレン、サリチル酸処理等によるストレスによって誘導される。また、キチナーゼは植物の過敏反応に伴って作られるPRタンパク質群 (pathogenesis-related proteins) の一つであることが明らかにされているほか、菌類の生育を阻害することが報告されている<sup>1)</sup>。これらのことから、植物のキチナーゼは、植物自身の生体防御において極めて重要な役割を担っているといえる。すなわち、病原菌類の感染に対して植物のキチナーゼは、胞子発芽管あるいは菌糸の細胞壁を溶解することによって、直接、菌の侵入、伸長を阻害すると同時に、こうして低分子化された細胞壁のキチンオリゴマーがファイトアレキシンの生産、プロテアーゼインヒビターの合成など、植物の防御機構に関わるその他一連の反応を誘導するエリシターとして働く。

これまでに、インゲンマメやタバコを始めとして、いくつかの植物からキチナーゼ遺伝子が単離されてきたが、最近、キチナーゼの機能を遺伝子工学的手法を用いてコントロー

ルすることによって、植物の病原菌類に対する抵抗性を高めようとする試みが行われつつある<sup>2)</sup>。この研究は同時に、キチナーゼの生体防御における機能とその作用機序の解明につながる点で興味深い。本稿では、イネのキチナーゼ遺伝子の構造と発現様式の解析およびイネ・キチナーゼ遺伝子を導入したトランスジェニックタバコの作出について、私たちの最近の研究を紹介したい。

## 2. イネ・キチナーゼ遺伝子の構造と その発現

私たちの研究室では、これまで、各種キチナーゼ遺伝子のクローニングとそのバイオコントロールへの利用を目的として、海洋細菌<sup>3, 4)</sup>、昆虫病原菌<sup>5)</sup>などから、キチナーゼ遺伝子のクローニングを進めてきたが、1987年に大阪大学理学部原三郎教授との共同研究によって米ぬかにキチナーゼ活性を認めたこと、さらに、細菌のキチナーゼと植物のそれとでは、酵素の構造やその基質特異性などに差があると予想されたことなどから、イネのキチナーゼを対象に、その遺伝子のクローニングを開始することにした。

まず、既知の植物キチナーゼのアミノ酸配列を比較し、2か所の保存領域に相当するオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、イネ (品種: 日本晴) の全DNAを鋳型にしてPCR (polymerase chain reaction) を行った。増幅された約500bpのイネ・キチナーゼ遺伝子断片をプローブに用いて、次に、イネのcDNAライブラリーのスクリーニングを行い、2種類のキチナーゼcDNAクローン、RCC1とRCC2を得た<sup>6)</sup>。続いて、RCC1と

NISHIZAWA Yoko, HIBI Tadaaki,  
AKUTSU Katsumi



RCC2の3'非翻訳領域、あるいは翻訳領域をプローブにして、イネのゲノミックライブラリーをスクリーニングし、それぞれのcDNAクローンに対応するゲノムDNAクローン、RCG1とRCG2、およびRCG3を単離した。これら3種類の遺伝子の翻訳領域を含む約3kbの領域の塩基配列を決定し、比較したところ、RCG2にのみ130bpのイントロンが見つかった。また、約1kbの翻訳領域では相互に高い相同性を示したが、約1.3kbのプロモーター領域では、相同性が低かった。しかし、RCG1遺伝子とRCG3遺伝子のTATAボックス付近の配列はよく保存されており、その上流には、キチナーゼ遺伝子と同様に病原菌の感染やエチレンなどで活性化されるイネの $\beta$ -グルカナーゼ遺伝子上流に見られる配列と共通の配列が存在していた。後述するように、RCG1遺伝子とRCG3遺伝子は同様な発現様式を示すことから、ここで見られた保存塩基配列が、両遺伝子の発現制御に深く関連している可能性が考えられる<sup>7)</sup>。

植物のキチナーゼは、現在、N末端側にキチン結合ドメイン(レクチンと相同性がある)を持つクラスIキチナーゼと、これを持たないクラスIIキチナーゼ、およびクラスI、IIキチナーゼとアミノ酸配列の類似していないクラスIIIキチナーゼとの三つに分類されているが、本研究で得られた3種類のイネ・キチナーゼ遺伝子は、いずれもクラスIキチナーゼをコードしていた。しかし、RCG2キチナーゼのみが、液胞に存在するキチナーゼを持つことが知られている液胞輸送シグナル配列に類似した、C末端エキストラペプチドを持っており、同じクラスに属するキチナーゼでも、それらの細胞内の局在性は異なることが予想される。

RCG1, 2, 3, それぞれの遺伝子の発現様式を明らかにする目的で、それぞれの遺伝子に特異的な領域をプローブに用いてノザン解析を行った。その結果、いずれの遺伝子も幼苗の根においては発現していたが、葉の中ではほとんど発現していなかった。しかし、RCG1とRCG3遺伝子は、傷害やUV照射、塩化水銀処理によりその発現が誘導された。ま

た、この両遺伝子はイネ懸濁培養細胞中では無処理でも活性化しているが、キチン、キトサンおよびそれらのオリゴマーやペクチン酸の添加によって、その発現が強く誘導された。さらに、イネいもち病菌の細胞壁から抽出した $\beta$ -グルガンが両遺伝子の発現を活性化することが明らかになった<sup>8)</sup>。一方、RCG2遺伝子は、塩化水銀で処理した葉でのみその発現が誘導されたが、それ以外の処理法では活性化されず、懸濁培養細胞中でも発現が認められなかった。

以上のように、同じ遺伝子族、つまり、クラスIキチナーゼをコードする遺伝子の中でも、遺伝子の構造や発現様式、および恐らく遺伝子産物の局在性の点で、RCG2遺伝子は他の遺伝子とは異なる。このことは、各遺伝子が植物の生体防御機構においてそれぞれ異なる役割を担っている可能性を示唆している。また、最近、RFLP (restriction fragment length polymorphism) マッピング法により、RCG1遺伝子とRCG3遺伝子はイネの同一染色体上に互いに近接して座乗しているが、RCG2遺伝子はこれらとは別の染色体上に座乗していることが明らかとなり、遺伝子族の分子進化的解析はもとより、遺伝子の発現活性と染色体上の位置との関連性を解明するうえで誠に興味深い。

### 3. イネ・キチナーゼ遺伝子を導入したトランスジェニックタバコの作出

前述のように、キチナーゼは感染を開始しようとする菌類に直接働き、その生育を阻害するほか、溶菌によって生じたキチンオリゴマーが、キチナーゼ自身の遺伝子をさらに活性化するとともに、それ以外の植物の防御反応をも促進することから、植物のキチナーゼ活性を高めることによって、植物の病原菌に対する抵抗性を増強することができると考えられる。そこで、単離したイネ・キチナーゼ遺伝子をタバコに導入し、得られたトランスジェニックタバコの菌類病に対する抵抗性の変化を見る実験を行った<sup>9, 10)</sup>。

まず、キチナーゼ遺伝子、RCG2の翻訳領

域を、GUS 遺伝子を削除したバイナリーベクター pBI121 中の CaMV 35S プロモーターの下流に連結し、アグロバクテリウム LBA 4404 株に導入した。この組換え菌とタバコ（品種：Xanthi NN）のリーフディスクを共存培養し、最終的にカナマイシン耐性の再分化植物体11株を得た。各株の葉から DNA を抽出し、RCG2 をプローブにしてサザン解析を行った結果、いずれも組換え株であった。さらに、RNA を抽出し、ノザン解析を行ったところ、株間に差が見られたものの、11株とも、イネ・キチナーゼ遺伝子を発現していることがわかった。また、1株に花の肥大化等の異常が観察されたほかは、形態異常は見られなかった<sup>9)</sup>。

#### 4. トランスジェニック タバコにおけるうどんこ病抵抗性の増強

上記によって得られたイネ・キチナーゼ遺伝子導入タバコのうち、10株 (X<sub>RC2</sub> 1~10) についてタバコうどんこ病菌 (*Erysiphe cichoracearum*) の感染に対する抵抗性の増強の有無を検討した。本菌の分生孢子懸濁液を組換え株および非組換え株の葉面に噴霧接種し、コロニー形成数を調べるとともに、その感染過程を光顕観察した。対照として、感受性品種 Burley21 と Hicks2 および抵抗性品種国分についても、同様の試験を行った。その結果、非組換え株では、Burley21, Hicks2 と同様に、接種 8~10日後に葉面全体にコロニー形成 (100個以上/葉) が見られたのに対し、組換え株では、コロニー形成数が20個未満の株 (X<sub>RC2</sub> 2, 5), 抵抗性品種と同様20~60個の株 (X<sub>RC2</sub> 3, 4, 6, 8~10), および感受性品種と同等の株 (X<sub>RC2</sub> 1, 7) が認められた (口絵)。抵抗性の増強を示した組換え株では、非組換え株や感受性品種に比べ、孢子の発芽率が低下し、侵入後の菌糸の伸長や分生孢子形成にも阻害がみられた。すなわち、強い抵抗性を示した株 (X<sub>RC2</sub> 2, 5) では、接種した孢子に細胞壊死がみられ、また、発芽した孢子でもその発芽管や菌糸には蛇行や壊死が起こり、付着器の形成が阻害さ

表1 イネ・キチナーゼ遺伝子を導入したトランスジェニックタバコ (X<sub>RC2</sub> 1, 2, 6) のうどんこ病に対する抵抗性の増強<sup>a)</sup>

形質転換株	孢子発芽率 <sup>b)</sup> (%)	付着器形成率 <sup>c)</sup> (%)	侵入率 <sup>d)</sup> (%)	コロニー形成率 <sup>e)</sup> (%)
X <sub>RC2</sub> 2	7.0	13.1	100	0.1
X <sub>RC2</sub> 6	13.3	18.0	83.3	0.3
X <sub>RC2</sub> 1	18.1	22.8	91.7	0.7
Xanthi NN	16.5	22.2	70.0	0.6

a) タバコ葉に1.5mlの孢子懸濁液 (1 × 10<sup>5</sup> cfu/ml) を接種した後、25°Cのグロースチャンバー内で培養した

b) 全孢子に対する発芽孢子の率

c) 発芽した孢子の1次付着器形成率

d) 1次付着器を形成した孢子の吸器形成率

e) 全孢子に対するコロニー形成孢子の率

れた。しかし、少数ながらいったん付着器が形成されたものでは、吸器の形成が100%起こった (表1)。したがって、コロニー形成の阻害は、おもに孢子の発芽率の減少と付着器形成の阻害によるものと考えられた<sup>10)</sup>。

#### 5. おわりに

イネ・キチナーゼ遺伝子を導入したトランスジェニックタバコでは、うどんこ病菌のコロニー形成数が、非組換え株の約15%に抑えられ、うどんこ病菌に対する抵抗性が増強されたといえる。今回の実験では、イネの遺伝子をタバコで発現させたが、キチナーゼが病原菌類に対する植物の防御機構に深く関与していることが確認された。しかし、恒常的に発現しているイネのキチナーゼが、直接うどんこ病菌の生育を阻害するのか、あるいは、本来タバコが持っている防御機構をより早く働かせるのか、ここで認められた抵抗性増強のメカニズムについては不明な点が多い。

現在、2世代目のトランスジェニックタバコについて抵抗性の検定を進めるとともに、イネ・キチナーゼに特異的な抗体を作成し、トランスジェニックタバコにおけるイネ・キチナーゼの発現量と抵抗性との相関、および局在性を解析している。また、うどんこ病菌接種後のタバコ自身の防御反応をトランスジェニックタバコと非トランスジェニックタバコとで比較することによって、抵抗性増強のメカニズムの解明を目指している。

## 文 献

- 1) Schlumbaum, A., F. Mauch, U. Vogeli and T. Boller (1986) *Nature* 324: 365-367
- 2) Broglie K., I. Chet, M. Holliday, R. Cressman, P. Biddle, S. Knowlton, C.J. Mauvais and R. Broglie (1991) *Science* 254: 1194-1197
- 3) 平八重一之・平田暁子・阿久津克己・西澤洋子・I. Havukkala・原 三郎・日比忠明 (1990) 日植病報 56: 369
- 4) 平八重一之・日比忠明 (1990) プレインテクノ ニュース 21: 16-19
- 5) Havukkala, I., C. Mitamura, S. Hara, K. Hirayae, Y. Nishizawa and T. Hibi (1992) *J. Invertebr. Pathol.* in press
- 6) Nishizawa, Y. and T. Hibi (1991) *Plant Science* 76: 211-218
- 7) 西澤洋子・日比忠明 (1991) 第14回日本分子生物学学会年会講演要旨集 p. 151
- 8) 西澤洋子・渋谷直人・漆原寿彦・平八重一之・日比忠明 (1991) 日植病報 57: 418
- 9) 西澤洋子・近藤賢一・阿久津克己・日比忠明 (1992) 平成4年度日本植物病理学会大会講演要旨予稿集 p. 45
- 10) 近藤賢一・阿久津克己・西澤洋子・日比忠明・奥山 哲 (1992) 平成4年度日本植物病理学会大会講演要旨予稿集 p. 45

## 国内情報

## アマゴの雄の産み分け

農林水産省 養殖研究所  
小野里 坦

## 1. はじめに

畜産と同様水産においても雌雄の産み分けは重要な課題である。一般に性は性染色体の組合せによって受精の瞬間に決まる。ヒトを含む脊椎動物の性染色体は雄ヘテロ型(XY型)で、雌は同じ形の性染色体(X)を2本もつが、雄は2本のうち1本は雌と同じで、もう一本は雄特有の染色体(Y)である。したがって卵子は最終的にX染色体を1本もち、精子はX染色体を持つX精子とY染色体を持つY精子とに分かれる。X精子が受精すれば雌がY精子が受精すれば雄が生まれる。畜産や医学ではX精子とY精子を遠心分離法や電気泳動法によって分離し、一方の精子のみで人工受精することにより雌雄を産み分ける方法が研究されている。しかし魚類ではこれと発想をまったく異にした雌雄産み分けの研究が進んでいる。

ONOZATO Hiroshi

## 2. 魚の雌雄の産み分けのメリット

1) 商品価値: イクラやカラスミのように卵巣または卵が珍重される種では雌は雄に比べて商品価値が高い。一方観賞魚では雄の方が美しい種が多く、雄の商品価値が高い。

2) 再生産効率: 1尾の雄から得られる精液は希釈によって数十尾もしくは数百尾の雌と交配可能である。したがって種苗生産を目的とした親魚養成のばあい雄の数はわずかでよいことになる。サケ・マスは一尾当りの卵数が比較的少ないため、多数の親魚を養成する。成熟するまで雌雄の判別が困難なため雌雄同数飼育することになる。成熟後は味が落ちて商品価値を失う。したがって大部分の雄は無駄にしている。雌の産み分けによって生産性をほぼ2倍にあげられる。

3) 成長率: サケ・マスの高齢魚やヒラメでは雌の成長率が雄に比べて高く、逆にサケ・マスの1年未満の若令魚やテラピアでは雄の成長率が高い。これらの魚種では雌雄間で

養殖効率に差を生じ、雌雄の産み分けが重要である。

4) 3倍体化したときの妊性：種無しスイカで知られるように、魚類においても3倍体化による不妊化が期待されていた。しかし魚類では3倍体化によって雌は不妊化できるが雄は成熟する例が多い。不妊の目的を達するには全雌3倍体を作成する必要がある。

### 3. 雌の産み分け

魚類は一般に性転換が容易であり性ホルモン処理によって単性種苗を得ることはさほど困難ではない。しかしホルモン処理をした魚を直接食卓に載せることについては消費者の根強い抵抗がある。そこで一方の性の子供のみを産出する親魚の作出を目標に研究が進んでいる。

魚類の性決定機構は種によって様々であるが哺乳類と同様XY型も少なくない。サケ科魚類はその典型である。精子の染色体を使わず卵の染色体のみから個体をつくとY染色体の入る余地が無く、子供はすべて雌になるはずである。実際サケ科魚類では殆ど例外なく雌となる。卵核のみで個体を作るには、まず精子の染色体を紫外線照射で破壊する。この精子を正常卵に媒精すると卵核のみで発生を開始する。すなわち雌性発生が誘発される。そのまま発生させると染色体が1セットしかない半数体となって孵化期前後で死亡してしまう。しかし染色体を倍数化して2セットとすると生存可能となる。染色体を倍数化させるには受精後第2成熟分裂を阻止するか、第1卵割を阻止することによって行う<sup>1)</sup>。成熟分裂阻止に比べ卵割阻止は困難であるので雌のみを生み分けるのであれば成熟分裂阻止でよい。このように雌性発生によって全雌生産は可能である。しかし雌性発生のみで全雌性発生を行おうとすると歩留まりが悪く実用的ではない。そこでより効率良く全雌生産を行うために、雌性発生魚を雌しか産ませない魚に作り替える作業を行う。まず孵化してきた雌性発生仔魚に男性ホルモンを処理して性転換させる。このばあい単に雄らしくなると

いうだけでなく、受精可能な精子を産生する機能的雄になるのである。しかしホルモン処理によって性染色体まで変えることは無いのでこの雄の性染色体はXXのままである。したがってその精子はすべてX精子となり子供は雌となる。1尾から得られる精液で多数の雌と交配ができるので莫大な雌の単性種苗生産が可能となる。ニジマスやサクラマスではすでに実用化の段階に入っており一つの孵化場で数百万の雌の単性種苗をつくることはさほど困難ではない。

### 4. 雄の産み分け

一方全雄魚生産については、山本<sup>2)</sup>がメダカで性転換によって作出したXY雌と通常の雄(XY)を交配することによって4分の1の確率で出現してくるYY雄(超雄)の作出に成功している。この雄はY精子しか産生しないのでその子はすべて雄となり全雄魚生産に応用できると考えられる。山本らは体色を黄色にするR遺伝子(Y染色体上に乗っている)を指標として正常の雌(XX)と性転換したXY雌とを区別した。しかし大部分の種でY染色体の指標となるマーカーが見いだされない。そこでXX雌とXY雌を区別するためには、後代検定すなわち性転換処理した群の雌と正常の雄と交配して、その子の性比から判断しなければならない。本来の雌の子は雌雄が1:1となるのに対し、性転換雌の子は雌1に対して雄3の割合で分離する。しかしこの性比から親の遺伝型を判定するには1腹子ごとに分離飼育しなければならないし、かつ相当数の子を調べなければならない。次世代のYY雄を正常雄(XY)から区別するときにも後代検定を必要とする。このような煩雑さから養殖の対象魚でこの方法が全雄生産に使われた例はない。

そこで筆者のところでは染色体操作によって直接超雄を作出することを試みている。雌性発生とは逆に、卵の染色体をガンマー線照射等によって破壊した後正常な精子を媒精すると精子核のみで発生が開始し雄性発生が誘起される。このばあいも半数体となるため正

常には育たない。そこで雌性発生と同様、染色体の倍数化が必要となるが、卵核が破壊されているので成熟分裂阻止法は使えず卵割阻止法を採用しなければならない。卵割に先だつて各染色体は複製されて一時的に染色体数が2セットとなる。卵割阻止によって倍数化した染色体がそのまま一つの細胞に留まるために2倍体となる。ところでX精子が受精したときはX染色体が倍化されXXの通常の雌ができる。しかし、Y精子が受精するとYY(超雄)となる。この超雄はY染色体しか持たないのでY精子しか作らない。したがってこの超雄と正常の雌と交配すると子供はすべて雄となるはずである(図1)。

これらの仮定が実際に成り立つかをアマゴを材料として調べた。アマゴは塩焼が好まれ、1年未満で商品サイズとなるが、サケ科魚類の例にもれず1年未満では雄の成長が雌に勝る。しかもアマゴの特徴であるの朱点も雄の方が鮮やかである。養殖研究所で飼育中のアマゴから採卵した卵をプールし体腔液と共に氷冷しながら陸送し名古屋大学工学部の<sup>60</sup>Co照射施設で照射した。卵を500mlもしくは1lのプラスチックの容器にとり1050Gy/hの線量率で照射線量が350Gyになるように照射した。照射後正常個体の精子を媒精し充

分吸水させた後再び10°Cに保ちながら養殖研究所に陸送した。媒精後6時間から8時間にかけて650kg/cm<sup>2</sup>の水圧を6分間処理して卵割阻止を行った。その結果350Gyの照射後もほぼ100%の卵が発生を開始した。しかし発生してくる胚はすべて半数体で生存できる個体が含まれていないことが確かめられた。媒精後7時間半前後に倍数化処理をしたときに最も倍数化率が高く3~7%の卵が正常に発眼した。孵化後摂餌開始期までの死亡率がきわめて高いが3か月以降安定した。8月中旬に標準体長が9cm以上に達した13個体中7個体が成熟し、それらはいずれも雄であった(口絵)。これが理論どおり超雄になっているか否かを知るために、4個体から得た卵をプールして約400粒ずつに分け7個体の雄性発生雄の精液を媒精し発生させた。対照として正常雄の精液で媒精した群を設けた。雄性発生雄の精液で媒精した卵は受精率、発眼率ともきわめて高く正常雄と比較して全く遜色がなかった。孵化後6か月以上経過した時点で各群とも開腹によって性比を調べた。その結果雄性発生雄の子はすべて雄であることが判明した(表1)。山本らの性転換法に比べるとこの方法は初代で超雄が得られ、かつ雄はすべて超雄であるので後代検定の必要が全くないといったメリットがある。

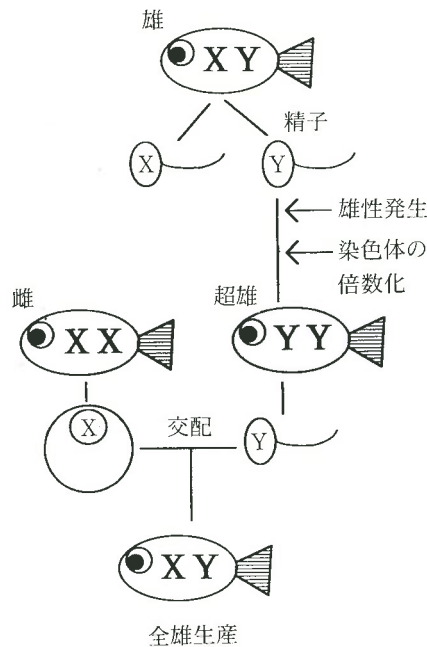


図1 染色体操作による全雄魚生産

表1 超雄(YY)の次世代の性比

父親(超雄)の個体番号	調査個体数	雄の出現数	雄の比率(%)
Control	50	23	46
6971	30	30	100
631E	30	30	100
7651	30	30	100
6E4E	30	30	100
7356	30	30	100
7C13	30	30	100
305A	30	30	100

## 5. おわりに

この方法はきわめて容易に全雄生産を可能とする点が優れている。しかし雄性発生歩留まりが低く、用いた卵のうち、成熟雄の得られる率は1%以下である。そこで現在はこの超雄を性転換してYY雌を作りYY雄と交

配して大量に超雄 (YY) を生産することを検討中である。

## 文 献

- 1) Onozato, H. (1984) *Aquaculture*, 43 : 91-97
- 2) Yamamoto, T. (1953) *J. Exp. Zool.* 123 : 571-594

### 国内情報

## 蚕受精卵への遺伝子導入と発現系の開発

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所 遺伝育種部

田村俊樹・神田俊男

### 1. はじめに

昆虫遺伝子の機能を分子レベルで解析したり、新しい機能を有する昆虫を作出するためには、外来遺伝子を昆虫の個体に導入し、発現させる技術の開発が不可欠である。ショウジョウバエではトランスポゾンを利用した外来遺伝子の導入系が確立されているが<sup>1)</sup>、他の昆虫ではこの技術は開発の途上にあり、蚊、ミバエ等の一部の昆虫で研究が進められているにすぎない<sup>2, 3)</sup>。我々は、数年来蚕を用いてこの技術を開発するための研究を行っているが、最近蚕の受精卵へのDNAの微量注射装置を開発するとともに、注射したDNAの受精卵での発現に成功した<sup>4, 5)</sup>。本稿では、その概要を紹介する。

### 2. 蚕の受精卵へのDNAの微量注射法

蚕の卵は直径が約1mm、内容積が約400nlとショウジョウバエの卵などに比べてかなり大きく、卵殻は非常に固く厚い。そのため、ガラスキャピラリーではこれを貫通させることができない。また、卵黄膜は非常に薄く、卵殻だけを取り除き卵黄膜だけの状態にすることもできない。そこで、我々は従来用いられている方法にさらに改良を加え、図1Aに

示したようなポンペの空気圧を利用した注射装置を考案した。この装置は二つのマイクロマニピュレーターでタングステン針とガラスキャピラリーを操作し、最初図1Bに示したようにタングステン針の先端で卵殻に穴を開け、次いでこの穴にガラスキャピラリーを差し込み(図1C)、DNAを注入する。従来の装置に比べ特に工夫した点は、DNAを注入するための圧力に窒素ポンペのガス圧を用いたことである。そのため、注射時にDNA溶液にかける圧力を自由に調節することができ、しかもかなりの高圧をかけることができ

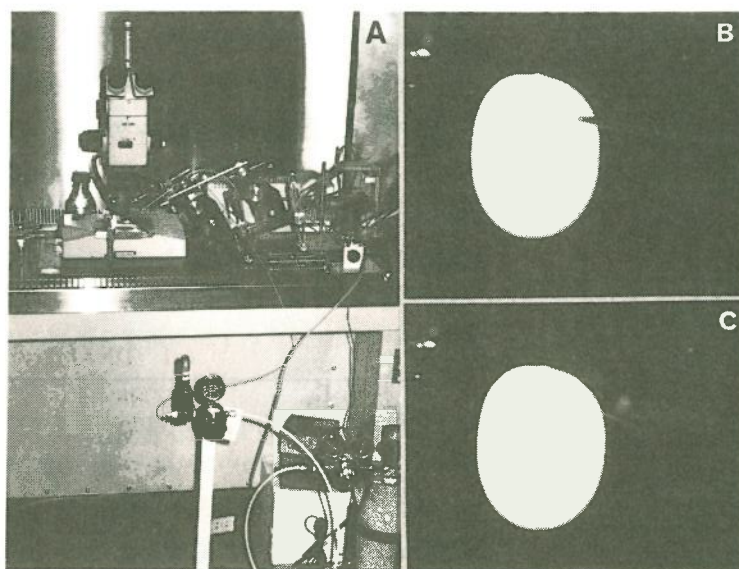


図1 蚕の受精卵へのDNAの微量注射

A; 注射装置

B; タングステン針で卵殻に穴を開けた状態

C; Bで開けられた穴にガラスキャピラリーが差し込まれ、DNAを注入しているところ

TAMURA Toshiki, KANDA Toshio

る。さらに、DNAを注入するときのスイッチとして電磁弁とこれに接続したフットスイッチを用いたため、両手をキャピラリーと卵の操作に用いながらDNAの注入操作が行える。これに加え、三方電磁弁の使用によりスイッチが切れると同時に自動的にキャピラリー内の圧力が外気圧と同じになるためキャピラリーの先端に卵中の細胞質を吸い込むことがほとんどない。

蚕の受精卵は25°Cで保護した場合、産卵2時間後に受精核ができ、以後1時間に1回の割合で核の分裂を繰り返し、約12時間後には胞胚が形成される。続いて、約25時間後に囊胚ができ、10日後に幼虫が孵化する。DNAの卵への注射時期は、他の生物の実験から推測すると発生初期であることが必要である。そこでこの方法を用いて、どの程度早い時期に卵へのDNAの注射が可能かどうかを調べた。結果は、表1に示したように、産卵直後でも約20%、産卵4～5時間後では約30%のDNAを注射した卵が孵化した。これは、従来の方法では産卵後数時間以内の卵は5%以下の孵化率しか得られない<sup>6)</sup>のに比べると今回開発された注射方法は、はるかに優れているといえる。注射は比較的容易であり、そのため、注射できる卵の数も多く、1日当り、300個以上の卵にDNAを注射することができる。

### 3. 受精卵に注射した遺伝子の発現

次にこの方法を用いて、蚕の受精卵に注射したDNAの挙動を調べた。その結果、蚕の

受精卵はDNAの分解酵素の活性が非常に高く、卵中に注射されたDNAは急速に分解される。しかし、すべて分解されるのではなく、一部は核中に取り込まれ比較的長期に残存する。そこで、この取り込まれた遺伝子が受精卵内で発現しているかどうかを調べた。

用いたプラスミドpFbCATは、蚕のフィロシH鎖のプロモーターにレポーター遺伝子としてCAT遺伝子をつなぎ、これにSV40のpolyAシグナルをつけたものである。このプラスミドのプロモーターは基本プロモーターとして高い活性があり、昆虫の培養細胞でも発現することが知られている。このDNAを受精前の卵に注射し、卵内でのCAT活性をみると、活性は産下後32時間の卵から検出可能となり、以後孵化直前の時期の胚まで連続してかなり高い活性が検出される。このことにより、少なくとも産卵直後の受精卵にDNAを注射することにより、外来遺伝子が卵内で発現することがわかる。次に、注射時期と遺伝子発現との関係を見ると、図2に示したように、産卵後8時間以内の卵にDNAを注射した場合にのみ発現し、産卵後12時間以後の卵にDNAを注射しても発現しない。これは蚕の胚の発育状態からみると、細胞膜を持たない分裂核の状態で核が分裂している時期であり、この分裂核が存在する時期の卵にDNAを注射した場合にのみ、注射したDNAは発現する。

表1 DNA溶液の蚕受精卵へ注射時期と孵化率

DNA	注射時期	供試卵数	孵化卵数	孵化率(%)
プラスミド DNA (200 $\mu$ g/ ml)	産下後30分以内	48	11	22.9
	3時間	56	11	19.6
	4～5時間	107	34	31.8
	20時間	52	46	88.5
	無処理	273	245	90.0
ゲノム DNA (200 $\mu$ g/ ml)	3時	82	12	14.6
	6時間	29	8	27.6
	24時間	60	39	65.0
	無処理	121	90	74.4

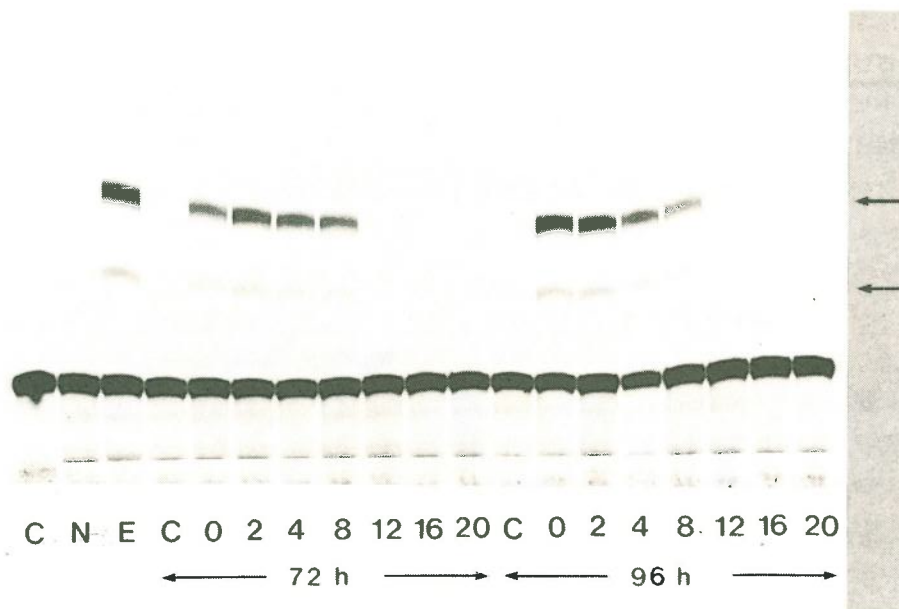


図2 受精卵に注射されたCAT遺伝子の発現

CおよびN：対照。E：市販の酵素によるCAT活性  
 0～20：DNAを注射した卵の産下後の時間  
 72hおよび96h：CAT活性を測定した卵の産下後の時間  
 (矢印はCAT酵素によりアセチル化したクロラムフェニコール)

#### 4. 遺伝子発現に及ぼすプロモーターの影響

それではこの遺伝子の発現系では、プロモーターの種類によって発現の様子はどのように変わるのでしょうか。各種のプロモーターを上流に持つCAT遺伝子を受精卵に注射した場合の遺伝子活性を比較した。環状のプラスミドDNAとして注射した場合はショウジョウバエのヒートショック遺伝子のプロモーターを持つCAT遺伝子の活性が最も高く、次いで、蚕のフィブリンとセリシン遺伝子上流領域ならびにコピアのLTRの活性が高かった。しかし、哺乳動物に感染するウイルスであるSV40の初期遺伝子のプロモーターを用いた場合にはあまり強い活性は示さなかった。また、DNAの形状によっても発現の程度は異なり、環状プラスミドではなく、これを制限酵素で切断し直線状のDNAとすると殆どどのプロモーターの活性は失われた。しかし、ヒートショック遺伝子のプロモーターの場合は直線状にしてもかなり高い活性を維持し、コピアのLTRでも僅かではあるが酵素活性が検出された。このことは、DNA

の形状により、注射された遺伝子の発現制御機構は異なっていることを示している。

#### 4. おわりに

トランスジェニック蚕を作出するための途中段階として、蚕の受精卵へのDNA微量注射法と外来遺伝子の発現系が確立されたことについてここでは述べた。トランスジェニック蚕を作る系を開発するためにはいろいろな方法が考えられるが、今後トランスポゾンの機能解析等の各方面からの研究が積み重ねられることによりこの技術は開発され、他の農業昆虫でも外来遺伝子を導入することが可能になるものと思われる。

#### 文 献

- 1) Rubin, G.M., A.C., Spradling. (1982) *Science* 218 : 348-353
- 2) Miller, L.H. et al. (1987) *Science* 237 : 779-781
- 3) Haymer, D.S. (1990) *Insect Mol. Genet. Newsletter* 5 : 2-3
- 4) Tamura, T. et al. (1990) *Jpn. J. Genet.* 65 : 401-410
- 5) 神田俊男・田村俊樹 (1991) 蚕糸昆虫研報 3 : 7-16
- 6) 蟻木理ほか (1985) 日蚕雑 54 : 428-434



## 出資プロジェクト情報

葉巻ウイルス抵抗性ジャガイモを  
遺伝子操作で開発

(株)北海道グリーンバイオ研究所

景浦 強

## 1. はじめに

遺伝子操作によって有用形質を作物に付与するアプローチは、現在の育種技術の中で最も注目され、多くの研究成果が報告されている。その中で植物病原ウイルスの外被タンパク質遺伝子の組換えによるウイルス抵抗性の付与は、各種のウイルスについてその有効性が示されている。

当研究所では、バイオテクノロジー活用による耐冷性・耐病性作物の開発研究の一環として、北海道大学農学部の植物ウイルス病学・菌学講座との共同研究を行い、ジャガイモの主要な病害の一つであるジャガイモ葉巻ウイルスに抵抗性を示す外被タンパク質遺伝子組換えジャガイモの作出に、国内で初めて成功したのでその概要を報告する。

## 2. ジャガイモ葉巻病

ジャガイモ葉巻病は、罹病種子薯の茎葉からアブラムシを媒介者として健全薯の茎葉へ感染し塊茎へ移行するサイクルをとるため、アブラムシの発生が著しい年に多発するケースが多い。したがって対策はアブラムシの防除しかなく、罹病したときはその薯を一つひとつ抜き取らなければならないという難病である。

葉巻病に罹ると、葉が退色して紫斑を形成するとともに葉が巻いて光合成が低下し、生長が抑制され、澱粉の蓄積が進まず、薯の重量や澱粉価が著しく低下する。

北海道では昭和39年にこのウイルス病が大発生し、大きな被害をもたらし、その後発生率はかなり低くなったが、昭和40年代後半に再度多発し甚大な被害をもたらした。

しかし近年は、原々種農場からの完全ウイルスフリー原種薯の供給、原種圃・採種圃におけるアブラムシ発生予察による茎葉枯凋剤処理や種子薯のELISA検定などによる無病種子薯生産の推進、一般栽培圃における種子更新の励行など一連の予防措置を施すことにより、幸い発生は下火になって来ているが、被害の大きい年も依然としてジャガイモ栽培の大敵である。

## 3. 葉巻ウイルス外被タンパク質遺伝子の導入

現在までの北海道大学農学部植物ウイルス病学・菌学講座における葉巻ウイルス遺伝子に関する基礎的解析の蓄積をもとに、葉巻ウイルスの分離と純化、そこからのRNAの分離、cDNAクローニング、外被タンパク質遺伝子の単離、塩基配列の決定などの研究を行った。

その後に、この外被タンパク質遺伝子を植物発現ベクターであるpBI121に組み込み、組換えプラスミドpBILR1を作成した。

次にこのプラスミドをトリペアレンタル接合によって *Agrobacterium tumefaciens* LB A4404株に導入した。アグロバクテリウムを介した遺伝子の導入は、双子葉植物については有効な手段として数多く報告されているが、予備的な検討の結果から、ここではリーフディスクでなくチューバーディスクへの感染法を採用した。すなわち、ウイルスフリーであ

KAGEURA Thuyoshi

ることを確認したジャガイモ（品種はマークイン、ワセシロ、男爵、トヨシロ、農林1号、紅丸を用いる）の塊茎から直径約1 cm、厚さ2～3 mmのディスクを調製し、pBILR1を保有するアグロバクテリウムの懸濁液に浸漬後、選択マーカーとして組込んだカナマイシンへの耐性を指標に再生植物体を得た。得られた個体数は品種によって異なったが、マークイン、ワセシロでは数十のカナマイシン耐性個体が得られた。なお、感染に用いたアグロバクテリウムは、カルベニシリンなどの抗生物質によって除菌した。

再生植物体への遺伝子の導入は、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーションにより確認し、さらに外被タンパク質そのものの発現をウエスタンブロット法およびELISA法によって定性、定量的に確認した。

このようにして得た組換え体は、培養瓶のMS培地上で維持されているが、マークイン、ワセシロについては、個体数を増やしウイルスの接種試験を行った。この試験は、葉巻ウイルスに感染した *Physalis floridana*（葉巻ウイルスの検定植物）で飼育したアブラムシを形質転換ジャガイモに接種することによって行ったが、非形質転換ジャガイモについては、接種1か月以内に全て葉巻病の顕著な病徴が現れたのに対し、図1に示したように形質転換体の中には約3か月後にも全く病徴が

認められない個体がいくつか得られた。

このように、実験植物としてのタバコなどではなく、広く栽培されているジャガイモの実用品種に直接葉巻ウイルス抵抗性を付与できたことは、研究・実用の両面において大きな意義を有するものと考えられる。

#### 4. 今後の展開

今後は、未検定品種についての接種試験を継続するとともに、無病徴であった形質転換個体の後代における抵抗性の調査を続ける計画である。さらに、葉巻ウイルスと同様に進めているジャガイモYウイルスの外被タンパク質遺伝子組換え体の抵抗性評価を行い、最終的には葉巻・Yの両ウイルス抵抗性のジャガイモを開発すべく研究を展開する予定である。また両ウイルス抵抗性をより高めるための組換え遺伝子の改善研究も必要となると思われる。

一方、遺伝子組換えジャガイモは実用化に向け、科学技術庁および農水省による組換え体安全性評価指針に基づき、閉鎖系温室、非閉鎖系温室、隔離圃場および一般圃場における安全性に関する諸試験を行っていく。また、その中でもう一方の共同研究者であるホクレン農業総合研究所と作物育種的評価も行っていく予定である。



図1 ウイルス外被タンパク質遺伝子の導入による葉巻病抵抗性ジャガイモの作出  
左：非形質転換体、右：形質転換体

## 5. おわりに

北海道のジャガイモ栽培における重要病害である葉巻病・Yウイルス病の対策は、原々種農場によるウイルスフリー種子薯の供給、種子薯生産者の徹底した管理による無病薯の増殖、一般栽培圃の種子更新の徹底など大きな労力と経済負担により実現している。したがって、各種ウイルス病に対する複合抵抗性品種の育成に成功すれば、安定した生産、農薬への依存度軽減、省力などにより生産コストの飛躍的な低減に直結すると期待される。

当研究所は、内外のバイオテクノロジー研

究状況から見て、スタートでやや出遅れたが、第三セクターとしての特徴をフルに活用し、多くの研究機関、研究者に支えながら効率の良い研究を進めることができ、その成果として遺伝子操作による作物育種への入口に到達できた。今回の研究成果の実用化には、まだ越えなければならないハードルが幾つかあるが、関係機関との連携を一層強固なものにし、解決を図って行きたいと思っている。

最後に、本研究には北海道大学名誉教授四方英四郎先生をはじめ、当研究所の知的支援組織である技術推進委員会の方々などの強力なご指導と、出資者の暖かいご理解があったことに対し、心から感謝する。



地域の先端研究

# 通気カラム式バイオリアクターによる 果実酢の生産

福岡県農業総合試験場 生産環境研究所

山下 純隆

で、その概要を紹介する。

## 1. はじめに

わが国でもっとも広く行われている食酢の製法である静置発酵は、発酵槽を設置するための広い面積が必要であり、また酢酸生成速度が低いことが問題である。

これらの問題を解決するために発酵槽に通気とかくはんを行う深部発酵が考案され、最近ではより一層の酢酸生成速度の向上を図るために、菌を固定化して連続的に発酵を行うバイオリアクターが開発されつつある。

酢酸発酵に用いられる酢酸菌は、増殖速度に連動して酢酸生成速度が変化する増殖連動型に近い菌であり<sup>1)</sup>、酢酸の生成速度を向上させるためには、発酵槽内の生菌数を増やすことと菌の培養条件を適正に保つことが重要である。

培地の流入と発酵液の流出が連続して行われるバイオリアクターでは、発酵液とともに菌が流出することを防止するために、様々な担体に菌を固定化したり、ろ過膜を用いたりして発酵を行い、その結果、高い生成速度を得たことが報告されている。しかし、これらの報告はすべて、合成培地を原料にしたものであり、発泡性がある天然素材としての果実酒を原料にした果実酢の生産については、報告がない。

そこで、果実酒を原料にして果実酢の生産を図るため、木綿織布を固定化担体とした通気カラム式の表面発酵型のバイオリアクターを開発し、このバイオリアクターによりキウイフルーツ酢、柿酢の連続生産を行った<sup>2)</sup>の

## 2. バイオリアクターの形態の設定 にあたって

果実酒を原料にして従来の通気かくはん式で発酵を行ったところ、発泡性のために菌に酸素を供給するどころか発酵槽内に原料を貯留することさえできなかった。もちろん、消泡剤を添加することによりこの問題は解決されるが、消泡剤が添加された果実酢は現在の消費者ニーズとは合致しない。そこで、消泡剤を添加せずに、円滑にかつ生産性に優れた発酵を行うことが可能なバイオリアクターの形態を模索した。

酢酸発酵では菌が好気性であるために、菌に対する酸素供給効率が酢酸生成速度の制限因子になりやすい<sup>3)</sup>。通気かくはん式の深部発酵において通気に空気をを用いた場合には、気体中の酸素濃度は約 270mg/l であっても、液体中に通気すると溶存酸素は約 8mg/l で飽和してしまう。深部発酵では 1~3 mg/l 以上の溶存酸素濃度があれば酢酸生成の比活性に問題はない<sup>4)</sup>とされてはいるが、酸素供給の面からは効率が悪い。さらに、菌が気体から酸素を直接摂取する表面発酵では、酸素供給の障壁は菌体膜だけであるが、液体培地中から溶存酸素として摂取する深部発酵では、気体酸素が液体培地中に溶解・拡散する酸素移動度の障壁がさらに加わることになる。したがって、酸素供給効率が優れた表面発酵をバイオリアクターに適用すると高い生産性を発揮することが推察された。

使用する酢酸菌は、*Acetobacter aceti* IFO 3283 を選定した。酢酸菌 IFO 3283 の菌膜に

YAMASHITA Sumitaka

よる表面発酵（静置発酵）においては、酢酸生成速度と気体酸素濃度との関係は Monod 型の反応が成立し、 $K_s$ （ミハエリス定数）= 14%,  $V_m$ （最大酢酸生成速度）= 2.2g/l, h（菌膜580cm<sup>2</sup>）であった。したがって、通気に空気をを用いた場合に、菌膜1m<sup>2</sup>当たりの酢酸生成速度は約23g/h, m<sup>2</sup>と計算されることから、表面発酵による酢酸生成速度の増加は、バイオリクター内の菌膜面積、すなわち担体の表面積の増加に連動すると推察された。

以上の推察を基に試作した通気カラム式のバイオリクターの概略を図1に示した。表面発酵において酢酸菌を固定化するための担体として、表面積が大きく、かつ、培地が担体上に均一に分散し、伝い流れる性質を有する木綿織布を選定した。

長方形の織布を蛇腹状におりたたんでカラムに充填し、酢酸菌培養液をカラム上部から流し込んだところ、菌は織布のろ過作用によ

り自然吸着固定された。さらに固定された菌を増殖させるため、合成培地を用いて流量24~28ml/hで連続培養を行ったところ、4~8日後に酢酸の生産が定常状態に達し、その時の酢酸濃度は49~60g/lであった。したがって、酢酸菌の固定に木綿織布を用いると、菌液を流し込むだけで特別な固定化処理を行うことなく、容易に菌を固定でき、固定された菌の増殖も極めて良好であることが判明した。

木綿織布上で菌が十分に増殖し、酢酸濃度45g/lの酢酸発酵液がカラムから排出される時の織布の保水量当たりの酢酸生成速度は、織布量が最も少ない場合に49.7g/l, hという極めて高い値が得られ、織布量が多くなるほど値が小さくなった。しかし、カラム内に空気分散用のシリコンチューブを織布と一緒に充填することにより、織布が多い場合でも酢酸生成速度を大幅に増加させることができた。また、実用上の性能を示すカラム総容積当たりの酢酸生成速度は、織布量が多いほど逆に高く、8.1g/l, hであり、シリコンチューブの充填により10.3g/l, hまで増加させることができた。この値は、従来の値に比べても高いレベルであり、5か月間の連続発酵においても安定して酢酸の生産がなされた。

### 3. キウイフルーツ酢と柿酢の連続生産

キウイフルーツおよび柿の果汁をワイン用酵母IFO2260で発酵させ清澄化したそれぞれの果実酒を原料に、木綿織布と一緒にシリコンチューブを充填したカラムで果実酢の連続発酵を行った。なお、比較のために合成培地を用いた発酵も行った。希釈率（培地供給流量÷カラム総容積）を変化させて、定常状態に到達したときの酢酸濃度と酢酸生成速度の関係を図2に示した。45g/l以上の酢酸濃度の果実酢が生成されたときのカラム総容積当たりの酢酸生成速度はキウイフルーツでは7.4g/l, h, 柿で5.2g/l, hであり、どちらも高い値であった。

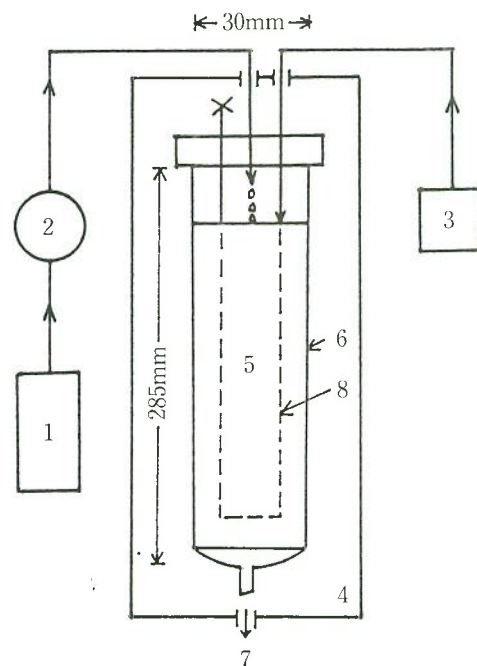


図1 酢酸発酵用リアクターの概略

- 1：培地，2：ペリスターポンプ，
  - 3：エアーコンプレッサー，4：恒温器
  - 5：木綿織布，6：ガラスカラム（総容積200ml）
  - 7：通気と発酵液の排出口
  - 8：通気用シリコンチューブ
- 注）通気用シリコンチューブは空気分散用の針穴を持つ

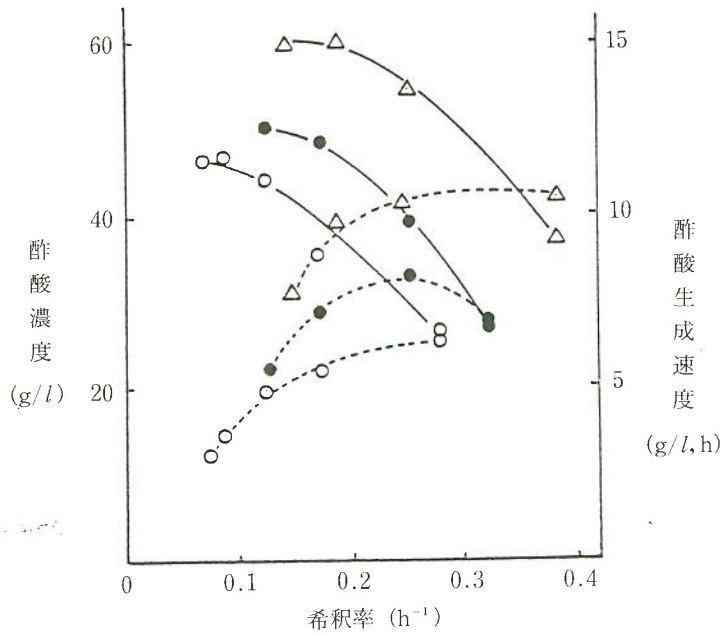


図2 連続発酵における酢酸濃度と生成速度  
 実線は酢酸濃度、破線は生成速度  
 △：合成培地酢，●：キウイフルーツ酢  
 ○：柿酢

#### 4. おわりに

バイオリクターの形態として一般的である深部発酵では、菌の酸素需要を満たすために通気かくはん操作が必要となり、そのためのエネルギーコストが大きいうえに、通気に伴う発泡が問題になる原料の場合には、消泡剤等の添加や機械的な消泡処理の操作が必要となる。しかし、担体に木綿織布を使用し、空気中の酸素を直接、菌体に摂取させる通気カラム式の表面発酵では、かくはん操作とともに消泡処理も不必要となるうえに、菌の固定化が容易で高い生産性と長期安定性も確保できる。

今後、通気に酸素を富化した空気を使用すること、表面積がより大きい担体を選定する

こと、固定化された菌に通気が十分に行きわたるような供給方法に改良することにより、さらに、生産性を向上させることが可能である。

本研究は昭和61年～平成2年度農林水産省地域バイオテクノロジー研究開発促進事業による助成を受けて実施した。

#### 文 献

- 1) 森明彦・照井堯造 (1972) 発酵工学 50(2): 70-78
- 2) 山下純隆・太田修明・末永 光 (1991) 日食工誌 38(7): 608-613
- 3) 山下純隆・馬場紀子・平野稔彦 (1989) 福岡農総試研報 B-9: 91-96
- 4) Park, Y.S., H. Ohtake, M. Fukaya, Y. Kawamura and K. Toda (1989) *J. Ferment. Technol.* 68(5): 315-319

## 文献情報

## 遺伝子工学による新しいハイブリッド種子生産技術の開発

植物育種の重要な目標の一つに、雑種強勢（両親より耐病性、収量などの形質が優れた現象）を示すハイブリッド種子の生産がある。ハイブリッド種子生産のための難点は自家受粉を防ぐことである。これまでのところ人手や機械による除雄、自家不和合性や、細胞質雄性不稔性の利用などが有効な手段として用いられている。ところが、それらは労力がかかることや自家不和合性、細胞質雄性不稔性に関わる遺伝子が限られた植物でしか同定されておらず、手法に普遍性がないという問題点がある。

1990年に著者のグループは、葯の中の花粉をとりまく組織であるタペート細胞で特異的に発現される TA29 遺伝子プロモーターの下流に RNaseT1 や barnase 遺伝子をつなぎ、雄性不稔となるタバコとアブラナの作出に成功した（Nature 347: 737-741）。barnase 遺伝子は、*Bacillus amyloliquefaciens* の細胞外で働く RNase をコードしており、この酵素には対応する barstar と呼ばれるインヒビタータンパク質が存在することが知られている。barstar は菌体中で barnase と結合することにより barnase の活性をおさえ、自分の生産する barnase により細胞死に至るのを防ぐ役割をしている。著者らは、TA29-barstar 遺伝子をもつ稔性の植物（♂）と TA29-barnase 遺伝子をもつ雄性不稔（♀）のアブラナを交配させた。次世代の植物は TA29-barstar と TA29-barnase 両遺伝子を持ち、正常な花粉を作り種子生産能力を持っていた。つまり barnase と barstar は共に次世代植物の葯のタペート細胞中で発現し、barnase の活性を barstar が複合体を作ることにより、不活性化していると考えられている。この雄性不稔植物（TA29-barnase）、稔性回復遺伝子をもつ植物（TA29-barstar）、種

子の生産能力をもつ次世代植物（TA29-barnase/TA29-barstar）の三植物を用いるシステムは、遺伝子工学の手法による画期的な採種技術であり、ハイブリッド種子生産の新しい育種法となることが期待される。

実験手法および解析結果の詳細は次のようである。TA29-barstar 遺伝子の導入は Ti プラスミドを用い、選択マーカーは bar 遺伝子を使った。41個体の形質転換植物は 1～5 コピーの導入遺伝子を持ち、タペート細胞は正常であり、雄性稔性であった。次に TA29-barstar 遺伝子がタペート細胞における barnase 活性を抑えるか否かを調べるため、TA29-barnase と TA29-barstar 遺伝子を共に 1 コピーを含む形質転換植物を両親として選んだ。もし barnase と barstar が複合体を作れば、薬剤抵抗性となる F1 世代の植物の稔：不稔の割合は 2：1 になると期待される。一方もし複合体が barnase 活性を抑えることができなければ、稔：不稔の割合は 1：2 になることが予想される。実際 9 個体中 6 個体の割合は 2：1 であり、稔性の回復が行われたことを示していた。1 個体の植物は分離様式が 1：2 や 2：1 のどちらでもなく、その理由は TA29-barstar の発現量が TA29-barnase に比べ低いからではないかと考えられている。残り 2 個体では 1：2 の割合となっており、稔性を示す植物を PCR で調べたところ稔性個体は TA29-barstar 遺伝子のみが検出されたため導入遺伝子が分離したものと考えられる。稔性の回復した植物において TA29-barstar/TA29-barnase の転写を調べたところ両遺伝子は転写されていた。野生型および雄性不稔植物の葯において、両遺伝子の転写産物は見いだされなかった。雄性不稔植物の葯中で barnase mRNA が検出されなかった理由は、barnase 活性による RNA の加水分解によるものと考えられる。2 次元電気泳動法により葯に存在するタンパク質を分析したところ、野生型では 100 以上のスポットが明らかとなったが、TA29-barnase の葯では、はるかに少ない数のスポットが同定された。一方 TA29-barstar/TA29-barnase の葯からは野生型植物のそれと比べ、同じ数のスポット像が

検出された。barstar/barnase 複合体に対し作製した抗体を用いた免疫学的検出を試みたところ、barstarにより稔性が回復した形質転換植物中では barstar と barnase 両タンパク質の存在が確認された。以上の結果から稔性回復は、barnase-barstar タンパク質複合体の形成により barnase 活性が阻害されることによると考えられている。また barnase-barstar 複合体の効率的形成とその後の雄性稔性の回復には TA29-barstar 遺伝子が TA29-barnase 遺伝子と同じレベルか、それ以上の発現をすることが必要であることが示唆されている。

これまで著者らはタバコ、レタス、チコリ、カリフラワー、トマト、ワタ、トウモロコシなどで、TA29-barnase 遺伝子の発現による雄性不稔植物の作出に成功している。この遺伝子単一でもレタスやチコリなどのように、葉が収穫物である植物の場合、より効率的な育種に役立つことが期待されている。一方 TA29-barnase 遺伝子と TA29-barstar 遺伝子との組み合わせの方法はトマト、アブラナなどのような種子や果実のハイブリッド種子生産に新しく広く道を拓いている。

(抄訳 門脇光一——生資研)

KADOWAKI Koh-ichi

#### A chimeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants

Mariani, C. et al.

*Nature* 357: 384, 4 June 1992

#### 文献情報

### DNAのメチル化は発生・分化に必須である

哺乳類では、ゲノム DNA のシトシン残基が高度にメチル化されており、このメチル化が、X染色体の不活性、ゲノムへのインプリンティング、ウイルスの潜伏、癌化、老化、あるいは、組織特異的な遺伝子発現調節による分化など多くのプロセスに関与している

可能性がある。これら多くの現象の他に、*in vitro* でメチル化し、細胞に導入した遺伝子からの転写が抑制されることや、5-アザシジンによる *in vivo* での脱メチル化とそれとともに遺伝子の再活性化、メチル化された CpG に特異的に結合する因子のクローン化などの実験結果が得られている。*in vitro* でのメチル化、あるいは脱メチル化剤を用いた実験法は、細胞内で起こるメチル化、あるいは脱メチル化を忠実に再現するものではない可能性も指摘されており、現在のところメチル化はなぜ必要なのか、メチル化はどのように制御されているのか解析手法に決め手を欠く状態にある。その原因の一つとしては、遺伝学、特に発生分化にともなう遺伝子発現調節の研究に欠かすことの出来ない線虫やショウジョウバエでは、メチル化がみられず、それにもかかわらず形態形成が起こっていることがあげられる。このような中で著者らは、メチル化が哺乳類の細胞で必須のものであるかを直接的に証明するために、先のクローン化された DNA cytosine-5-methyltransferase (DNA MTase) 遺伝子を用いた targeting による変異体を作製した。

著者らは、5' 非翻訳領域 20bp とこれに続く 27 コドン をネオマイシン耐性遺伝子に置換した DNA MTase 遺伝子と、非相同組換えで遺伝子が導入された細胞を除くためにネガティブ選択マーカーとしてヘルペスウイルスのチミジンキナーゼをつないだプラスミドを作製した。これを直鎖状にしてマウス培養胚性未分化細胞 (ES 細胞) に導入し、G418 とピリミジン誘導体である FIAU で相同組換えを起こした細胞を選抜した。その結果、両方の薬剤に抵抗性の細胞群 36 のうち 5 つで 2 回相同組換えによって、DNA MTase 遺伝子が、ネオマイシン抵抗性遺伝子の挿入されたものと置き換わった。ここで得られた変異をヘテロに持つ ES 細胞をさらに、ネオマイシン抵抗性遺伝子の代わりにハイグロマイシン抵抗性遺伝子を挿入したプラスミドで同様に相同組換えを行った。このようにして、DNA MTase の変異をホモに持った ES 細胞が得られた。



これらの ES 細胞を解析した結果、DNA MTase の変異をホモに持つ細胞では、ほとんど DNA MTase 活性はなくなり、イムノブロットングでも検出できなかった。細胞内のメチル化シトシンの割合は野生型の約 1/3 であった。それにもかかわらず、形態あるいは分裂速度に差はみられなかった。

著者らはさらに、DNA MTase 変異をヘテロに持つ ES 細胞からキメラマウスを作製した。その子孫を分析したところ変異をホモに持つ個体は生まれず、胚致死を起こしていることがわかった。変異をホモに持つ初期胚はメチル化シトシンがやはり 1/3 に減っており、生育速度が遅く、2/3 では下腹部に異常な突出物がみられ、妊娠中期には壊死した。

このように、本報文は DNA MTase の機能が培養細胞の増殖には必須とはいえないが、マウス胚の発生分化には必要なことを示し、同時にシトシンメチル化の重要性をクローズアップしたと考えられる。

植物も哺乳類同様 CpG のシトシンがメチル化の標的とされるが、CpNpG のシトシンもメチル化の対象となる。さらに、植物においてはメチル化の程度が哺乳類に較べて数倍以上高く、その機能に興味もたれている。植物においても、本報文で用いられたストラテジーで近い将来メチル化の機能に関する重要な知見が得られるものと期待される。

(抄訳 杉本和彦—生資研)

SUGIMOTO Kazuhiko

### Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality

Li, E., T.H. Bestor and R. Jaenisch

*Cell* 69: 915-926, (1992)

#### 文献情報

### 植物に全身的な防御反応を誘導するシグナルポリペプチド

病原体や昆虫の侵害に対する植物の防御反

応の一つにプロティナーゼを阻害するプロティナーゼインヒビターが知られている。植物は、病原体や昆虫によって傷つけられると、傷つけられた葉だけではなく、遠方の葉でもインヒビターのすばやい蓄積が見られることから、インヒビターを誘導するシグナルが、傷を受けた部位から遊離し、移行したものと考えられる。このシグナルは、これまで植物細胞壁由来のペクチンフラグメント、脂質由来のジャスモン酸、植物ホルモンのアブシジン酸など、さらには、ここで紹介する 18 アミノ酸からなるポリペプチド、システムインであると考えられている。

著者らは、トマト葉中にプロティナーゼインヒビター I と II を誘導するシグナルを探索した。まず、HPLC カラムから溶出した分画のインヒビター誘導活性を調べた。インヒビター誘導活性をもつ分画は、ポリペプチドの性質を示したことから、この分画のアミノ酸配列分析をした結果、18 アミノ酸からなるポリペプチドが同定された。

このポリペプチドを合成し、トマト葉を溶液中で培養したところ、天然のポリペプチドと同程度のインヒビター合成が認められた。また、このポリペプチドは、植物細胞壁由来のオリゴガラクトノイドより  $10^5$  倍以上の誘導活性を示した。

傷をつけたトマト葉の傷の部位に  $^{14}C$  ラベルした合成ポリペプチドを与えたところ、放射活性は 30 分以内に葉の全体に広がった。また、同様に合成ポリペプチドを与えた後、師部浸出液を HPLC で分析した結果、ラベルした合成ポリペプチドは 1~2 時間以内に師部に検出された。

このポリペプチドは、師部を通して全身に移行することから、著者らは、“システムイン”と名づけた。

次に、トマト葉中からシステムインをコードする遺伝子をクローニングした。システムイン cDNA の ORF は、200 アミノ酸からなる前駆体タンパク質、プロシステムインをコードし、179~196 番目のアミノ酸がシステムインをコードしていた。プロシステムインの N 末端には、リーダーペプチドに似た疎水性領域は認めら

れず、翻訳後のプロセッシングについては不明である。プロシステミンは、11のエキソンと10のイントロンからなる単一遺伝子にコードされていた。上流の10個のエキソンは5つのペアとなり、最後のエキソンがシステミンをコードしていた。5つのエキシソンのペアは互いにホモログスであったが、システミンをコードするエキソンとはホモログスでなかった。また、プロシステミン遺伝子と相同な配列は、トマトに近縁であるジャガイモでのみ認められた。

プロシステミン mRNA は、インヒビター mRNA と同様に傷によって誘導された。傷をつけていないトマトではインヒビター mRNA は認められなかったが、プロシステミン mRNA は少量ながら認められたことから、トマトはシステミンの連続的な供給を行い、傷に対して直ちに反応できるようにしているものと考えられた。また、トマトのプロシステミン mRNA は、根以外のすべての器官で認められたことから、どの器官を傷つけてもインヒビターの誘導が起こるものと考えられた。

さらに、プロシステミン遺伝子産物が、インヒビター遺伝子発現に関与しているかを調べるため、プロシステミンのアンチセンス cDNA を導入した形質転換トマトをつくり、インヒビター I と II の合成量を検討した。アンチセンス導入トマトの F<sub>1</sub> 個体の下位葉に傷をつけ、上位葉のインヒビター合成量を調べたところ、アンチセンス遺伝子を遺伝した個体は、非形質転換トマトに比べてほぼ完全にインヒビターの誘導を抑制した。

以上のことから、植物から初めて見いだされたポリペプチドホルモン、システミンが、前駆体プロシステミンタンパク質から派生することが明らかとなった。また、アンチセンス遺伝子の発現が、インヒビターの誘導をほぼ完全に抑制したことから、システミンは、インヒビターの合成を制御するシグナルトランスダクションの重要な因子であると考えられた。

(抄訳 本郷正史—東北大農)

Hongo Masashi

#### Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene

McGurl, B., G. Pearce, Orozco-Cardenas and C.A. Ryan

*Science* 255 : 1570-1573 (1992)

#### A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor protein

Pearce, G., D. Strydom, S. Johnson and C.A. Ryan

*Science* 253 : 895-898 (1991)

#### 文献情報

### アラビドプシスの凍結保護 遺伝子

植物の低温順化に、膜脂質成分の変化や、可溶性タンパク質と糖の含有量の増加が関与することが示されているが、これは分子生物学的手法の研究対象とはなりにくい。一方、ハウレンソウやキャベツには単離チラコイド膜の凍結による障害を抑制できるタンパク質が存在することが知られている。それらは、(1)低温で発現し、(2)煮沸後も可溶性で、(3)親水性タンパク質である特徴を持つ。1970年に Weiser が低温順化に際して遺伝子発現にも変化が起こることを示してからは、多くの植物より低温で発現する遺伝子が単離され、植物の低温順化を遺伝子レベルで理解しようとする研究が進められてきたが、残念ながらそれら遺伝子の機能は現在のところ明らかになっていない。

著者らは以前にアラビドプシスより低温処理 (5°C) により強く発現される4個のcDNAを、ディファレンシャルハイブリダイゼーションにより得ている。ノーザンブロットイングによれば、これら遺伝子の発現は低温処理後1~4時間内に増大し、さらに2週間後までそのレベルを維持するが、生育温度 (22°C) に戻すと4時間以内に通常の発現量にな

る。このうちの一つ (*cor47*) については, (1) 煮沸後も可溶性な分子量 47kDa のタンパク質をコードしていること, (2) これに似た遺伝子が低温順化したコムギでも発現していることを示している。最近もう一つの cDNA (*cor15*) の解析を行い, (1) 煮沸後も可溶性な分子量 15kDa の親水性タンパク質 (COR15) をコードし, (2) COR15 は葉緑体ストロマへのトランジットペプチドとよく似た配列を N 末端側に持ち, (3) 9kDa にプロセッシングされた成熟 COR15 (COR15m) が低温順化したアラビドプシスの葉緑体ストロマに存在するらしいことを示した。今回の論文では, COR15 が *in vitro* 凍結感受性酵素 (LPH) に対する凍結保護活性を持つことを示している。

サブクローンされた *cor15* 遺伝子をベクター上の T7 プロモーターを利用し *in vitro* で転写した。これを [<sup>35</sup>S] メチニオン存在下ウサギ網状赤血球ライセートを用い *in vitro* で翻訳した。10分間煮沸後も可溶性なタンパク質を SDS-PAGE で解析したところ, 低温順化したアラビドプシスの mRNA 翻訳産物で煮沸後も可溶性なタンパク質の一つと同じ分子量を示した。そこで翻訳された COR15 をゲルより精製し *in vitro* での凍結保護活性をシュクロース,  $\beta$ -Gal, オボアルブミン, BSA, RNaseA と比較した。LDH に種々の濃度のサンプルを加え -20°C, 24時間処理した後 LDH 活性を調べたところ, COR15 はおよそ

1.0  $\mu$ g/ml の濃度でほぼ完全に LDH の凍結失活を防ぐことができた。COR15 の凍結保護活性は, 効果的な凍結保護剤でタンパク質安定剤とされるシュクロースの 10<sup>8</sup> 倍, 同様に考えられている BSA など他のタンパク質の 10<sup>2</sup> ~ 10<sup>3</sup> 倍を示した。

ディファレンシャルやサブトラクション法による遺伝子の単離は, 興味深いものはあるもののその遺伝子のコードするタンパク質の機能まで解析を行うのは容易ではない。 *in vitro* とはいえ COR15 の凍結保護活性が確認できたのは, その生体内での機能を考えるうえで有用なことと思われる。著者らも指摘するように, 実際に低温順化した植物の凍結耐性に COR15 が寄与しているのか, 葉緑体の凍結障害保護に COR15m が関与しているのかは今後の実験にかかっている。その回答は COR15 の発現を低下, もしくは増大させたアラビドプシス変異体を作成し, その凍結耐性を調べることにより得られるかもしれない。  
(抄訳 片岡二郎——日本たばこ・生命研)

KATAOKA Jiro

**A cold-regulated Arabidopsis gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity**

Lin, C. and M. F. Thomashow

*Biochem. Biophys. Res. Comm.* 183 : 1103-1108, (1992)

海外便り

## Wisconsin大学での天敵研究

農林水産省 農業環境技術研究所 天敵生物研究室

野田 隆志

科学技術庁長期在外研究員として1990年10月から1年半の間、アメリカ合衆国ウィスコンシン州マジソン市にあるウィスコンシン大学マジソン校で、寄生蜂の寄主制御機構に関する研究を行ってきました。ウィスコンシン州は五大湖の一つミシガン湖の西側に位置する州で、酪農が盛んな土地として知られています。州政府が力を入れていることもあって、ウィスコンシン大学の年間予算額は全米でも指折りであり、美しい湖に面したキャンパスでは約4万人の学生が勉学にスポーツに励んでいます。私がお世話になったストランド準教授は既に世界中にその名前が知られていますが、まだ30代前半の新進気鋭の研究者であり、いわゆる大家と呼ばれる教授とは違って一緒に実験や議論をし、かつ将来も親交を温められると考えて、留学先に選びました。以下に私が行った研究の経過を失敗も含めて時間を追って述べることに致します。

## 最初の実験

私が何をやりたいか大体のところを伝えてあったので、ストランド準教授は初めに三つの研究プランを呈示してくれました。いずれも魅力的な研究でしたが、二つは既に私自身が別種の寄生蜂でやったことがある内容でしたので、折角留学の機会が与えられたからには新しいことにチャレンジしようと考え、ヤガ科のダイズ害虫である *Pseudoplusia includens* に寄生するコマユバチの1種 *Microplitis demolitor* が寄主の生体防御反応をいかに回避して寄生を成功させるかを調べる研

究を選びました。この研究は研究室の他の学生やリサーチフェローが行っている研究とは違って、ストランド自身が主に取り組んでいることも選定の理由でした。

昆虫の生体防御反応にはいくつかの種類がありますが、ある種の血球が異物を取り囲んで排除してしまう包囲化作用（エンキャプシユレーション）がよく知られています。当然寄主体内に産みこまれた寄生蜂の卵も異物として認識される筈ですが、実際には蜂の卵はふ化して発育してしまいます。実はコマユバチ科の寄生蜂は、産卵するときに、毒腺から分泌される毒液と輸卵管の一部が肥大したカリックス部（卵傘部）というところに貯えられたカリックス液（ポリドナウイルスの1種を多数含んでいる）を卵と一緒に寄主体内に注入し、これらが寄主の生体防御反応を阻止するのに重要な役割を果たしているのです。寄主の血球の性質を調べるために、まず未寄生の *P. includens* の血液を生理食塩水を入れたシャーレに採って1時間くらい置いたところ、5種類ある血球のうち、プラズマ細胞と顆粒細胞という包囲化作用を担っている2種の細胞が底面に付着して広がることがわかりました。ところが *M. demolitor* に寄生されて2時間以上経った幼虫から採った血液中の血球は、何時間置いてもほとんど遊離した状態のままだったのです。また全血球数は寄生幼虫の方が若干多くなりますが、種類別の血球数には違いがありませんでした。このことから寄生された幼虫の血球は蜂卵を異物として認識出来ないか、出来たとしても包囲化作用を起こす能力を失っていることがわかります。次に蜂から採ったカリックスウイルスを含んだカリックス液と毒液を濃度を変えて寄

Noda Takashi

主幼虫に注射し、一定時間後に採血して同じように調べたところ、0.01雌当量以上のカリックス液+毒液を注射したときには、寄生と同様に血球は遊離したままでした。この現象は0.10雌当量のカリックス液のみを注射したときにも見られましたが、毒液のみでは高濃度でも効果がありませんでした。以上のことから、雌蜂が産卵のときに注入するカリックス液には寄主の血球による生体防御反応=包囲化作用を抑える働きがあり、高濃度ではカリックス液のみで、やや低い濃度でも毒液と一緒に注入されれば効果を発揮することがわかります。カリックス液から精製したウイルスをカリックス液の替わりに用いても同じ結果が得られたことから、カリックスウイルスが実際の働きをしていることもわかりました。ここまでの結果はアメリカ滞在中に *Journal of Insect Physiology* に掲載されました。

#### 期待と落胆

最初の実験で毒液にはカリックス液の働きを助ける作用があることがわかったので、次に毒液が寄主体内でどれくらいの時間、分解されずに存在するかを追跡することにしました。これには *M. demolitor* の毒液タンパク質に対して調整されたモノクローナル抗体を用いました。抗体は7種得られましたが、このうち電気泳動パターンが大きく異なる2種の抗体(便宜的にAとBとします)を用いることにし、寄生幼虫およびカリックス液と毒液を単独あるいは組み合わせて注射した寄主幼虫の血液を、一定時間ごとに採取して毒液の存在をELISA法を使って調べたのです。その結果非常に興味あるデータが得られました。抗体Aが作用する毒液の成分は寄生後あるいは毒液注射後24時間以内に消滅したのに対して、抗体Bが作用する成分は、寄生あるいはカリックス液と共に毒液を注射した場合には、24時間後にやや低下した後再び増加して高いレベルを保ち続けたのです。毒液単独で注射したときには24時間で消えてしまいました。カリックスウイルスと毒液の機能については既に他の寄生蜂でも調べられており、

ウイルスが寄主の細胞に取り込まれて生体防御を抑える何らかの物質を生産し、毒液はウイルスが寄主細胞に侵入するのを助けるのではないかという仮説が出されていました。もし上記のデータが信頼できるとすると、ウイルス自身が寄主細胞に取り込まれた後で毒液類似物質を生産していることになり、寄生期間中何らかの機能を果たしていることになります。ところが最後に補足データとして、ウエスタンブロット法による毒液成分の存在を調べたところ、ELISA法で見られた抗体Bが反応する毒液成分の24時間以後の増加が全く見られなかったのです。ELISA法でバックグラウンドが高くてデータのふれが大きかったのは事実ですが、なぜ矛盾するデータが得られたのか今でもわかりません。結局ELISAのデータは信頼できないので廃棄して、もう一度ウエスタンブロット法でやり直すことになり、約3か月が無駄になりました。このときはちょうど留学の当初の予定期間1年が終わる頃でしたが、幸いにも半年間の延長が認められたので、中途半端に終わらないで先を続けることが出来ました。

#### 最後の追い込み

我々が毒液の追跡に手間どっている間に、共同研究者がカリックスウイルス遺伝子のcDNAプローブを調整していました。またウイルスが取り込まれる主な寄主細胞は他ならぬ血球そのものであることが予備実験でわかっていました。そこで私の最後の実験では、寄主血球をカリックスウイルスや毒液と共にインキュベートした後、*in situ hybridization*を行って、寄主血球へのウイルス感染を調べることにしました。寄主血球をカリックスウイルス、毒液、あるいはその両方と共に一定時間培養した後固定し、cDNAプローブで調べたところ、ウイルスは毒液が存在すれば1時間で寄主血球に感染すること、毒液がなくても12~18時間後には感染できることがわかりました。これは毒液がウイルスの感染を助けることを証明した最初の実験データです。この後さらに、毒液の抗体をカリックス

液+毒液と共に寄主に注射して、全部あるいは特定の毒液成分をブロックしてそれらの機能を調べる実験に取りかかる予定でしたが、残念ながらここで時間切れとなってしまいました。この続きはストランド自身が現在行っています。

### おわりに

なんだか滞在期間中、研究に没頭していたかのように書いてしまいましたが、実際には2か月に1度ぐらいの間隔であちらこちら家族旅行して、研究室の同僚に呆れられていました。行く前には、アメリカ人は皆週末は完全に仕事を離れ、1年に1回は長期休暇を取るものだと思っていましたが、これはやや認識不足だったようです。確かにそういう人も

いますが、私がお世話になったストランド準教授は朝は8時出勤、昼食はほとんど抜き、夕食をとり一旦帰った後また研究室にやってきて10時頃まで仕事をし、土日も1日1回は必ず顔を出すというペースで、長期休暇もクリスマスのおきだけという仕事人間でした。日本と違って研究費はほとんど自分で取ってこなくてはならないため、1年中どこかのグラントの応募書類作りをしていたような印象を覚えます。結局、優秀な人のところには年功序列など関係なく研究費も研究者も多く集まるというのがアメリカのシステムです。選考は公正に厳しくなされているため、本当にいい研究はどんどん進むでしょうが、もし日本でこの方式が採用されたら、先端でない研究分野は相当圧迫されそうな気がします。



ウイスコンシン大学昆虫科が入っている  
ラッセルラボラトリーズ



ビールを飲みながらディスカッションが  
できるメモリアルユニオンのテラス

生研機構からのお知らせ

BRAIN テクノフォーラム

生き物の機能に学ぶ

主催：生研機構 後援：農林水産省

日時：平成4年12月1日、10：00～17：00

会場：東京青山会館（東京都港区南青山4-17-58）

〈プログラム〉

1. ロボット開発からみた「昆虫」  
東京大学工学部 三浦宏文
2. 生き物に学ぶ味覚センサー  
九州大学電子工学部 都甲 潔
3. 人工光合成とその応用  
農水省食品総合研究所 小林昭一
4. 人工ルーメンの開発とその応用  
東北大学農学部 扇元敬司

参加費：15,000円

申し込み先：〒160 東京都新宿区6-24-16 日本生命新宿六丁目ビル3F  
生研機構 担当者：谷口，上田，玉木 (Tel. 03-3205-6565)

新作ビデオのご紹介

生研機構は、この度バイオテクノロジー研究の最先端分野で、今までに確立された基礎技術の普及を図るためにマニュアルビデオを企画製作しました。全5巻は、次のような構成です。

第1巻 植物バイオテクノロジーの世界 (上映時間30分)  
日本視聴覚教育協会 優秀作品賞受賞

第2巻 植物の遺伝子組換え技術 (上映時間32分)

第3巻 クローニングとシーケンシング (上映時間44分)

第4巻 DNA分析技術の応用 (上映時間25分)

第5巻 牛の体外受精技術 (上映時間38分)

定価 各30,000円 (税込み)、全5巻特価 140,000円

お申し込みは販売を担当している農文協まで (Tel. 03-3585-1141)

#### 編集後記

イネのバイオテク研究は、RFLPによるゲノム解析、遺伝子の導入技術の開発、光合成機作の解明、病害虫抵抗性品種の作出、ハイブリッド種子の生産、食味を支配する遺伝子の制御、アレルゲン除去イネの作出などを中心

に、着実に進みつつあります。これらの研究の現状と展望について、近く特集号を編集したいと考えていますので、ご意見、ご要望等をお寄せいただければ幸いに存じます。

(大畑記)

#### ブレイン テクノニュース (第34号)

平成4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. 03-3205-6565 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