

CODEN : BTEEEC

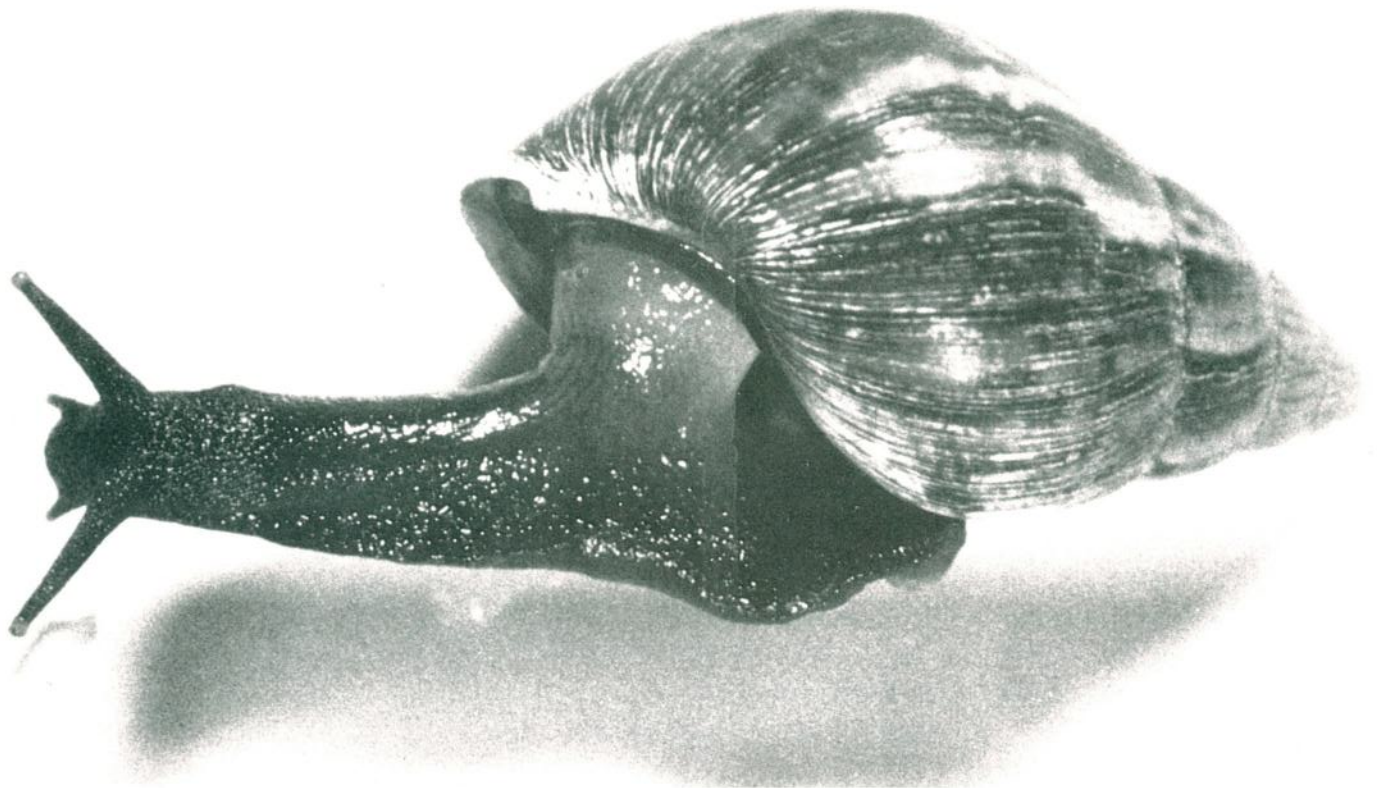
TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 36 号

MARCH 15, 1993



表紙説明

アフリカマイマイ

アフリカマイマイは作物を食い荒す有害動物で、わが国では沖縄と小笠原に生息している。体表粘液中に液性防御因子として抗菌性糖タンパク質—Achacinを産生している。

(本文 12 ページ参照)

本号の紙面

総説.....	1
トランスジェニックフィッシュ	
国内情報.....	5
原形質連絡と植物ウイルスの細胞間移行, 血小板活性化因子受容体と情報伝達機構, アフリカマイマイの抗菌性糖タンパク質	
文献情報.....	16
細胞融合による根こぶ病抵抗性作物の作 出, オオムギ由来リボゾーム不活化タン パク遺伝子の導入によるタバコの病害抵 抗性の増大, T-DNAの核転移に関する 2種のタンパク質, 抗原ペプチドのMHC 上への提示	
海外便り.....	22
コーネル大学でのルーメン微生物研究	
特別情報.....	25
細胞育種技術の進捗状況—1992年度—	

口 絵

総 説

木下政人・尾里建二郎

トランスジェニックフィッシュの現状と将来……………1

国内情報

渡辺雄一郎

原形質連絡と植物ウイルスの細胞間移行に関する話題……………5

中村元直

血小板活性化因子(PAF)受容体と情報伝達機構……………8

渕野寿子・土屋隆英

アフリカマイマイの抗菌性糖タンパク質—Achacin—……………12

文献情報

ダイコンとカリフラワーの細胞融合による根こぶ病抵抗性作物の作出……………16

オオムギ由来リボゾーム不活化タンパク質遺伝子導入タバコの

糸状菌に対する免疫性の増大……………17

Agrobacterium tumefaciens T-DNAの核転移に關与する

2種のタンパク質：Vir D2とVir E2……………18

長さおよびアミノ酸配列とも異なる抗原ペプチドが

類似のアンカーモチーフを用いてMHC上に提示される……………19

海外便り

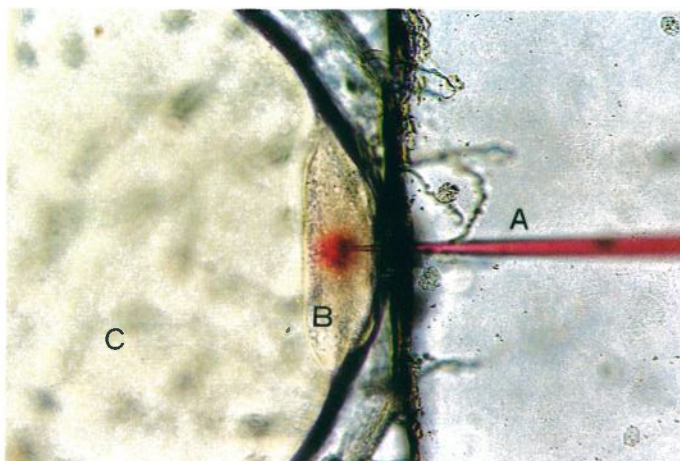
梶川 博

コーネル大学でのルーメン微生物研究……………22

特別情報

中島阜介

細胞育種技術の進捗状況—1992年度—……………25



メダカ受精卵へのマイクロインジェクション

1細胞期のメダカ受精卵をホルダーに固定し、顕微鏡下(×100)で観察しながら注入する。見やすいようにDNA溶液の代わりに色素を注入している。A;針, B;細胞質, C;卵黄

アフリカマイマイの抗菌性糖タンパク質—Achacin (本文 12 ページ)

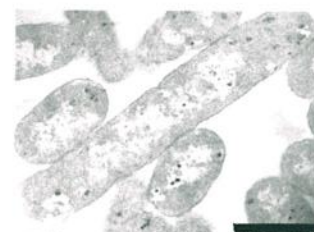


bar: 1 μm

図2 Achacinの局在



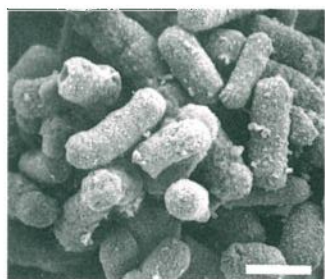
(a) コントロール



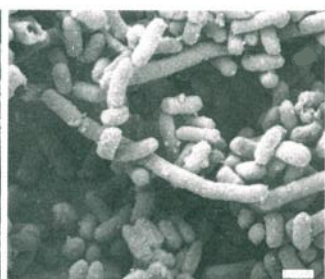
(b) +Achacin

bar: 1 μm

図4 Achacinを作用させた大腸菌の透過型電子顕微鏡観察



(a) コントロール



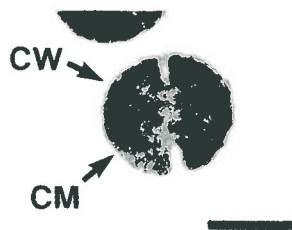
(b) +Achacin



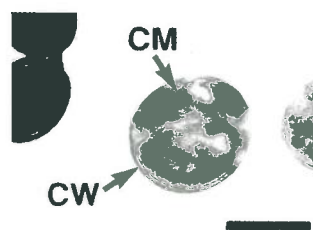
(c) +Achacin

bar: 1 μm

図3 Achacinを作用させた大腸菌の走査型電子顕微鏡観察



(a) コントロール



(b) +Achacin

bar: 0.5 μm

CW: 細胞壁, CM: 細胞膜

図5 Achacinを作用させたぶどう球菌の透過型電子顕微鏡観察

トランスジェニックフィッシュの現状と将来

京都大学農学部水産学科

木下政人

京都大学総合人間学部自然環境学科

尾里建二郎

1. はじめに

近年の遺伝子工学の発展により、生物学的に機能を持つ遺伝子の塩基配列を明らかにし、その遺伝子を試験管内で大量に増幅できるようになった。また、自由にデザインした自然界に存在しない遺伝子を作り出すことも可能となった。しかし、単離もしくは作製された遺伝子の本来の機能を解明するためには、試験管の中の研究だけでは不十分であり、個体の中での挙動を明らかにすることが必要である。1980年以降、試験管に取り出した遺伝子を再び生きた個体に戻し、本来はその動物のものではない遺伝子を持つトランスジェニック動物を用いた研究が行われるようになった。

魚類におけるトランスジェニックは1980年代半ばから始まったが、マウスやショウジョウバエに比べてまだまだ初歩的な段階にある。本稿ではトランスジェニックフィッシュの研究の現状と将来および今後の問題点について述べる。現在行われている研究の詳細については他の文献を参考にされたい^{1,2)}。

2. 魚類を用いたトランスジェニックの特徴

魚類の卵は哺乳類の卵に比べ、安価に大量に入手できること、発生が体外で進行するため観察が容易であることなどの利点がある。特にメダカやゼブラフィッシュではこれらの

利点に加えて、小型魚であるため大がかりな飼育設備を必要としないこと、水温と光の条件を調節すれば年中採卵できること、卵が透明で核または細胞質が観察しやすいこと、近交系が確立していること（メダカ）など実験魚として有利な特徴を備えている。これまでにトランスジェニックに用いられた魚種は、淡水魚ではメダカ、ゼブラフィッシュ、ニジマス、ティラピア、キンギョ、コイ、ナマズ、ドジョウ、海水魚ではサケがある。

3. トランスジェニックフィッシュの作出方法

魚類においては後述するジーンターゲットイングの技術が確立していないために、トランスジェニックフィッシュの作出には遺伝子を直接、ガラス針を用いて卵に注入するマイクロインジェクション法が広く用いられている（口絵参照）。マイクロインジェクション法には受精卵を用いる方法と卵母細胞を用いる方法がある。前者の方が人工受精などの操作が不要で親魚を傷つけないため一般的である。この場合、魚類の受精卵では核を光学顕微鏡で見ることが困難であるので、外来遺伝子は細胞質に注入される。種によっては卵膜が硬く不透明であるため、前もって卵膜に太い針で穴をあけたり、卵膜を薬品（グルタチオンを含むアリカリ溶液など）で処理するなどの工夫が必要になる。後者の方法は卵母細胞が透明で卵膜も軟らかいメダカを用いて行われている。メダカの卵母細胞は排卵の約9時間前に核を光学顕微鏡で観察することができる。この時期にマイクロインジェクションを行う

と確実に核に外来遺伝子を注入することができる。しかし、卵母細胞や精子を取り出す操作で親魚を殺さなければならず、また、マイクロインジェクション後の卵の培養や人工受精などの操作も必要となる。いずれの方法においても、遺伝子を針で注入する技術はほぼ確立されたと言ってよい。これらの方法による遺伝子の導入率は50~80%ぐらいである。

マイクロインジェクション以外の方法としては、電気パルスにより受精卵に細孔をあけ、外来遺伝子を取り込ませるエレクトロポレーション法がある。エレクトロポレーション方法では一度に大量の卵を処理することができ、特別な技術も要求されないという利点があるが、一般的に導入率が低いとされている。最近、エレクトロポレーションに用いる溶液の組成や電気パルスの諸条件の検討が行われ、ゼブラフィッシュでは高い導入率を得たという報告がある¹⁾。より改良が進められ他の魚種への応用が可能となればトランスジェニックフィッシュ作出の強力な手段となるであろう。この他に精子を外来遺伝子の運び役として用いる方法もある。これはいったん精子にエレクトロポレーションにより外来遺伝子を導入する、または、精子を遺伝子溶液中で短時間培養し外来遺伝子を精子にまわり付ける操作をした後、受精を行う方法である。しかし、この方法は未だ実用段階には至っていない。

4. これまでの研究

これまでに行われた研究の代表例を挙げる。発生における遺伝子の発現調節を解明することを目的とした、メダカへのニワトリ δ -クリスタリン遺伝子の導入実験¹⁾、プロモーターの機能を調べることを目的としたメダカへのニジマスメタロチオネイン遺伝子プロモーター・クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子の導入実験³⁾、遺伝子の胚での分布と子孫への伝達を調べることを目的としたゼブラフィッシュへのマウス熱ショックタンパク質遺伝子プロモーター・

β ガラクトシダーゼ遺伝子の導入実験⁴⁾などがある。これまでの研究によって、導入された遺伝子は個体(胚)の中でモザイクに存在すること、子孫に伝達されること、動物種が変わると発現の組織特異性が曖昧になるが発生段階に特異的な発現調節を受けること、プロモーターは本来の機能を保持しインデューサーにより誘導可能となることなどが明らかとなった。

また、セグロヒラメの不凍化タンパク質の遺伝子をサケに導入した研究では、子孫に遺伝子が伝達され、イムノブロットによりその発現が確認されている¹⁾。

5. オールフィッシュベクターの開発

魚類における分子生物学の遅れから、これまで魚類以外の生物(マウスやウイルスなど)由来の遺伝子や転写調節領域を用いた研究が多く、恒常的に発現させるためにはSV40やCMVなどのウイルス由来のプロモーターやエンハンサーが用いられてきた。また、発現の調節を調べる目的ではマウスのメタロチオネイン遺伝子のプロモーターやマウスやショウジョウバエの熱ショックタンパク質遺伝子のプロモーターが用いられている。しかし、魚類において高い発現率や正常な発現調節を得るためには魚類由来の転写調節領域が必要であると考えられる。最近、魚類由来のプロモーターとしてニジマスメタロチオネイン遺伝子プロモーター、コイおよびハマチ α グロビン遺伝子5'上流域、不凍化タンパク質遺伝子5'上流域などがクローニングされ始め、その有効性が示されている^{1,3)}。

さらに“オールフィッシュベクター”として、コイ β アクチンのプロモーターとエンハンサーおよびサケの成長ホルモンのポリA付加シグナクを含むものや、セグロヒラメから単離した不凍化タンパク質のプロモーターおよびポリA付加シグナルを含むものの2種が開発され、CAT遺伝子を用いてそれらのトランスジェニック個体内での活性が確認されている¹⁾。

6. ジーンターゲットングを目指して

卵に遺伝子を注入する方法では、遺伝子が染色体のどこに組み込まれるかは偶然によっている。この問題を解決するためには、マウスで行われているような胚性幹細胞に遺伝子を相同組換えによって導入し、その細胞からキメラ技術によって個体を形成するジーンターゲットングの技術が必要になる。魚類においてもこの技術を導入するための基礎研究が行われている。

胚性幹細胞の研究では、ニジマスの胚から抽出した因子を添加した培養液中でゼブラフィッシュの胞胚期の細胞を増殖させ、導入したマーカー遺伝子の発現に成功している¹⁾。現在ではこの細胞を再び胚に戻し各組織への分化を検討している段階である。

また、ゼブラフィッシュ⁵⁾とメダカ⁶⁾で、アルビノの胞胚に野性型の胞胚期の細胞を微小ガラス管を用いて注入し、生殖巣に野性型の精子または卵を持つ個体が作出された。これらの個体の交配によって生殖キメラの作製技術が確立されている。

7. 産業への利用

トランスジェニックは新たな形質を付与する技術であることから産業上での有用魚種の育種技術としての期待が高まっている。

商業的な魚の養殖では、餌料効率を高め成長速度を上げること、最大体長を大きくすることが重要になる。そこで、成長に関与すると考えられる成長ホルモンの遺伝子をトランスジェニックにより導入し大量発現させようとする研究が盛んに行われている。その結果、カナダの S.J. Du らはサケの若年魚で成長が10倍になったと報告している⁷⁾。さらにアメリカの T.T. Chen らは、コイの成長が20%促進されたと報告している²⁾。この分野のハイライトは、1992年シンガポールで開かれた第3回アジア水産フォーラムで発表された E.M. Donaldson らの研究である。彼らは不凍化

タンパク質（後述）遺伝子のプロモーターにサケの成長ホルモン遺伝子を結合したものをサケに導入した。1年数か月たって体長が対照の5倍になった個体を数十尾得ていると報告した⁸⁾。

冷水域で生息する魚は血液が凍結するのを防止するため不凍化タンパク質 (AFP) という特殊なタンパク質を生産する。水産業で有用なサケは AFP を生産できない。そこで Fletcher らは AFP 遺伝子を大西洋産のサケに導入し、これまでサケが生息できなかった海域での養殖を目指している^{1, 2)}。

環境汚染のモニタリングへの利用を目的とした研究も始まっている。重金属に感受性を持つタンパク質であるメタロチオネインのプロモーターに、黒色素胞を有する色素細胞に作用して体色を白化させるメラノサイトコンセンレーションホルモン遺伝子を結合したプラスミドを野性型メダカ（黒色）に導入する。すると、このメダカは重金属により水質が汚染されれば、体色が白く変化する。つまり、個体を生かしたまま継続的な汚染を視覚的に検知しようという試みである⁹⁾。

8. 今後の展開と将来の展望

ジーンターゲットングの技術や組織または発生段階に特異的に働く発現調節領域の開発が進めば、脊椎動物の遺伝子の発現制御機構や機能の解明においてトランスジェニックフィッシュは大きな力となるであろう。

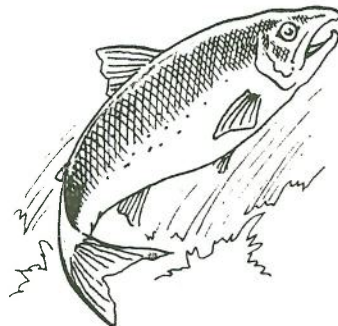
また、魚類の遺伝子クローニングが進めば、産業上有益な形質を持つ魚種の作出が期待される。特に、魚を食品として見た場合、安全性の問題から転写調節領域を含めて導入される遺伝子は宿主魚由来のものであることが望ましい。

トランスジェニックの研究が進み、有用な魚種が作出されるようになれば環境への放出とその影響が問題になってくる。生態系への影響を極力少なくするため、トランスジェニックフィッシュを不稔化するなどの方策が必要となるであろう。既にアメリカではトランス

ジェニック・コイの屋外飼育が認可され、そのための施設が内陸部に作られている²⁾。さらに、これらのものが食品となればその安全性や経済性などの検討を行っていく必要がある。

文 献

- 1) *Mol. Marine Biol. Biotech.* (Special Issue On Transgenic Fish) 1 : 251-389 (1992)
- 2) Transgenic Fish (Hew, C.L. and G.L. Fletcher, ed.) World Scientific Publishing Co., Singapore. (1992)
- 3) Inoue, K., N. Akita, T. Shiba, M. Satake and S. Yamashita (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185 : 1108-1114
- 4) 岡本 仁 (1992) *細胞工学* 11 : 600-604
- 5) Lin, N., W. Long, J. Chen and N. Hopkins (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 : 4519-4523
- 6) 若松佑子・木下政人・豊原治彦・坂口守彦・岩松鷹司・田口泰子・富田英夫・尾里健二郎 (1992) 第1回マリンバイオテクノロジー研究発表会 講演要旨集 pp. 29.
- 7) Du S.J., Z. Gong, G.L. Fletcher, M.A. Shears, M.J. King, D.R. Ideler and C.L. Hew (1992) *Bio/technology* 10 : 176-181
- 8) Donaldson E.M. (1992) Third Asian Fisheries Forum Abstract. pp. 6 Singapore
- 9) 木下政人・豊原治彦・坂口守彦・井上広滋・山下伸也・佐竹幹雄・木岡紀幸・駒野 徹・若松佑子・尾里健二郎 (1992) 第1回マリンバイオテクノロジー研究発表会 講演要旨集 pp. 26



原形質連絡と植物ウイルスの細胞間移行 に関する話題

帝京大学理工学部
渡辺雄一郎

1. 原形質連絡と移行タンパク質

タバコモザイクウイルス (TMV) に代表される植物ウイルスが、細胞同志をつなぐ植物固有の構造である原形質連絡を通して細胞間の移行をすることが広く知られるようになった。そして細胞間移行する過程には TMV の場合、ウイルス自身がコードする 30kDa タンパク質 (他のウイルスには異なる分子量でコードされるため移行タンパク質とも呼ぶ。) が機能している。このことは 5, 6 年前に我々の実験結果¹⁾、つまり人工的に作成した 30kDa タンパク質に関する変異体ウイルスが複製はするが細胞間移行が不能になったことによって明らかとなった。Beachy らの別の実験²⁾からも確かめられている。そして機能を裏付けるように 30kDa タンパク質が原形質連絡に局在する^{3, 4)}ことが確認されている。ちなみに、最近 Lucas と Beachy は、30kDa タンパク質が局在するのは主に伸長を終えた組織に見られる分岐構造をもつ“二次”原形質連絡であって、若い組織に存在する直線状の“一次”原形質連絡には見いだされない⁵⁾といっている。

2. 原形質連絡の“穴”の大きさ

どのようにして 30kDa タンパク質はウイルスの細胞間移行を促進するのであろう。Lucas らは、30kDa タンパク質が原形質連絡に局在してその“穴”の大きさを広げている

と考えた。材料として 30kDa タンパク質を構成的に合成する形質転換体植物を用い、蛍光マーカーのついた種々の分子を injection した。そして、どの位の大きさの分子が海綿状葉肉細胞の細胞間を (原形質連絡を介して) 移行するかを特殊な蛍光顕微鏡によって観察した⁶⁾。その結果、コントロールの植物では分子量 700~800 までの分子しか周囲の細胞に広がらなかったのに対し、30kDa タンパク質を構成的に合成する形質転換体植物では分子量 9400 のデキストラン (2.4nm ほどのストークス半径) が移行していくことが明らかとなった⁶⁾。30kDa タンパク質が原形質連絡の“穴”を広げているのは事実のようである。温度感受性 (許容温度 24°C / 非許容温度 32°C) の 30kDa タンパク質を構成的に発現する形質転換体を 32°C に 6 時間以上おいた場合、上で述べた穴の広がりには観察されない⁷⁾。逆にこの後 24°C に温度を戻し 6 時間以上おいた場合、再び穴は広がったことが確認されるという⁷⁾。この時 30kDa タンパク質自身の局在性には変化はないので、タンパク質自身の構造変化によって原形質連絡の穴の大きさが 6 時間で可逆的に変化したことを示している。

TMV と近縁で、移行タンパク質の機能が互換可能なタバコラットウイルス (TRV)⁸⁾を用いた類似の実験⁹⁾が報告された。*Nicotiana glauca* タバコの毛状突起 (trichome) の細胞に TRV を injection した後、時間を追って種々の物質を再度 injection し、隣り合った細胞への物質の広がりを追ったのである⁹⁾。その結果、ウイルスを前もって 5 時間ほど前に injection した毛状突起での実験に限り、周囲の細胞へ分子量 3000~4400 程の物

質が広がることが確認された⁹⁾。分子量10000ほどの物質では移行は認められない。ウイルスを前もって injection しておくことが重要で、しかも経過時間が2時間ほどでは効果は認められない⁹⁾。実際にウイルス感染後5時間の増殖によって生産される移行タンパク質がこのような効果をもたらしていると考えられる。ここで必要となった経過時間は、我々は以前見いだした事実、TMVの30kDaタンパク質が感染後2～8時間に一過的に発現すること¹⁰⁾と符合する。

3. 移行タンパク質の核酸との結合能

ZambryskiらはTMVの移行タンパク質を大腸菌で大量発現させたのち、精製をし、その生化学的な性質を調べている。その中でこのタンパク質が一本鎖の核酸に協同的 (co-operative) に結合する能力を持っていることを見いだした¹¹⁾。ただし、核酸はDNAであってもRNAであっても結合し、その配列も問わない¹¹⁾という。彼女らは、移行タンパク質は一本鎖の核酸(細胞内ではTMVのRNAを想定している)と結合して、原形質連絡に運ぶなどしてウイルスの細胞間移行を促進していると考えている。この30kDaタンパク質の中で一本鎖の核酸に結合するのに寄与するのは全268アミノ酸残基のうち112～185番目、および185～268番目である¹²⁾とされている。さらにアミノ酸残基65～86番目はタンパク質全体が活性を持つために必要な高次構造をとるのに重要な部分¹²⁾と位置付けている。次に、移行タンパク質が一本鎖の核酸と結合して形成する構造を電子顕微鏡で観察している。その結果、長く、折り畳まれたりせずに大変細い直径1.5～2.0nmというような構造体を見いだした¹²⁾。このようなものが実際の感染細胞内でできていけば、先に紹介した感染(または移行タンパク質が発現している)細胞で大きくなった原形質連絡の大きさ、2.4nmという空間を透過出来るであろう。我々はこれとは別にプロトプラストにTMVを感染させたのち、この30kDaタンパク質が

電子密度の低い構造体(感染特異的)の中に局在する¹³⁾ことを認めている。細かく見ると、その局在する場に紐状のものが確認される¹³⁾ことがあり、上で述べた核酸(期待されるのはTMV-RNA)と結合した状態の30kDaタンパク質、あるいは30kDaタンパク質が原形質連絡に移行する前の細胞質での存在様式を *in vivo*で見ている可能性がある。

4. 植物の因子と移行タンパク質との相互関係

この30kDaタンパク質とウイルス抵抗性に寄与する宿主因子、さらにある種のリン酸化酵素との相互作用があることが最近明らかとなり、多彩な宿主とウイルスの相互作用の様子が浮かびあがってきた。飯らによって、トマトのTMV抵抗性遺伝子であるTm-2とTMVとの相互作用のメカニズムが解析された¹⁴⁾。Tm-2遺伝子をもつトマトでも増殖可能となったLtb1株が単離され、その原因が調べられた。その結果、Ltb1株は30kDaタンパク質の中にアミノ酸の置換変異2個(図1)をもつことにより、Tm-2トマトでも増殖可能となったことが明らかとなった¹⁴⁾。Tm-2遺伝子産物はまだ単離されておらずその実体は明らかではないが原形質連絡に存在する何らかのタンパク質であり、野性株のウイルスが産生する30kDaタンパク質に阻害的に作用するために抵抗性を示すのではないかと考えている。Ltb1株の30kDaタンパク質ではその作用を受けない形に変異をしているのであろう。

池田らは、同様にトマトのTMV抵抗性遺伝子であるTm-2²とTMVとの相互作用のメカニズムを解析している。Tm-2²遺伝子をもつトマトでも増殖可能となった2²株が¹⁵⁾材料となった。Ltb1株と同様の解析の結果、2²株は30kDaタンパク質の中にアミノ酸の置換変異3個(図1)があることにより、Tm-2²トマトでも増殖可能となった¹⁵⁾ことが明らかとなった。これらのうち、後ろの変異2個(図1)が特に重要であることが判って

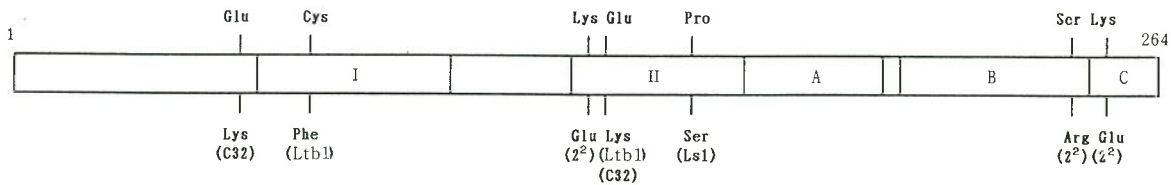


図1 TMVの移行タンパク質に関する情報

L株の264アミノ酸からなる移行タンパク質について示した。

野生株のアミノ酸と比較して(上段), 突然変異体(カッコ内で示す)で見いだされたアミノ酸変異(下段)を合わせて示す。

I, II, A, B, Cについては文献18, C32, Ltb1については文献14, Ls1については文献1参照。

きた。図1を見ると Tm-2 遺伝子, Tm-2² 遺伝子産物と相互作用する 30kDa タンパク質の領域が異なることがわかる。Tm-2 遺伝子, Tm-2² 遺伝子は相互に遺伝学的には allelic であることを考えると興味深い事実である。

最近, 我々は 30kDa タンパク質が植物細胞内でリン酸化を受けている¹⁶⁾ ことを確認した。リン酸化を受けているアミノ酸はセリンであった。全 264 アミノ酸 (株の違いでアミノ酸残基数が先のものとは異なる) のうち, 1-261 番目, 1-233 番目, 1-9/142-264 (10-141 番目のアミノ酸残基の欠失) 番目のアミノ酸残基からなる移行タンパク質を発現する変異ウイルス (それぞれ LQD261, LQD233, LQD9/142 と名付ける) を用いて解析をした結果, LQD233 の移行タンパク質ではリン酸化を受けないが LQD261, LQD9/142 移行タンパク質ではリン酸化を受けていることが確認された¹⁶⁾。リン酸化をうける部位が 30kDa タンパク質のうち C 端に近いアミノ酸配列であることが推測される。同じ変異ウイルスの植物体での細胞間移行能を調べると, リン酸化を受ける形の方が機能が増進するようである。現在, リン酸化をうけるセリン残基の特定, リン酸化と機能との関係について解析を進めている。

Beachy らは, N 端から 107, 136, 160, 176, 195, 213, 233, 259 番目のアミノ酸残基までからなる移行タンパク質を発現するような各種形質転換体植物を作成した¹⁷⁾。N 端から 213 番目以降のアミノ酸残基を持つタンパク質を発現する植物ならば, 移行タンパク質の変異ウイルスを相補することが確認され

た¹⁷⁾。同様に, これらの形質転換体に injection する実験も行っていて, 分子量 9400 のデキストランが周囲の細胞に広がることが, N 端から 213 番目以降のアミノ酸配列を持つタンパク質を発現する植物で認められている¹⁷⁾。このデータから 214 番目以降のアミノ酸配列は無くてもよい (dispensable) ように見える。確かに TMV の種々の株間でどのタンパク質のアミノ酸配列と比較してもこの領域の保存性はゲノム全領域中でもっとも低い¹⁸⁾。上述の無くてもよいという根拠になるかもしれない。しかし, 先の核酸との結合に必要な領域, リン酸化のデータなど, この最後の 50~70 アミノ酸残基の領域がやはり宿主と相互作用しており, この部分が宿主特異性を決定したり¹⁹⁾, 機能の微調整を植物側から受ける領域であることを示唆している (図1)。

文 献

- 1) Meshi, T., Y. Watanabe, T. Saito, A. Sugimoto, T. Maeda, Y. Okada, (1987) *EMBO J.* 6 : 2557-2563
- 2) Deom, C.M., M.J. Oliver, R.N. Beachy, (1987) *Science* 237 : 389-394
- 3) Tomenius, K., D. Clapham, T. Meshi, (1987) *Virology* 160 : 363-371
- 4) Atkins, D., R. Hull, B. Wells, K. Roberts, P. Moore, R.N. Beachy, (1991) *J. Gen. Virol.* 72 : 209-211
- 5) Ding, B., J.S. Haudenshield, R.J. Hull, S. Wolf, R.N. Beachy, W.J. Lucas, (1992) *Plant Cell* 4 : 915-928
- 6) Wolf, S., C.M. Deom, R.N. Beachy, W. J. Lucas, (1989) *Science* 246 : 377-379

- 7) Wolf, S., C.M. Deom, R.N. Beachy, W. J. Lucas, (1991) *Plant Cell* 5:593-604
- 8) Ziegler-Graff, V., P.J. Guilford, D.C. Baulcombe, (1991) *Virology* 182 : 145-155
- 9) Derrick, P.M., H. Barker, K.J. Oparka, (1992) *Plant Cell* 4 : 1405-1412
- 10) Watanabe, Y., Y. Emori, I.Ooshika, T. Meshi, T. Ohno, Y.Okada, (1984) *Virology* 133 : 18-24
- 11) Citovsky, V., D. Knorr, G. Schuster, P. Zambryski, (1990) *Cell* 60 : 637-647
- 12) Citovsky, V., M.L. Wong, A.L. Shaw, B.V. Venkataram Prasad, P. Zambryski, (1992) *Plant Cell* 4 : 397-411
- 13) Meshi, T., D. Hosokawa, M. Kawagishi, Y. Watanabe, Y.Okada, (1992) *Virology* 187 : 809-813
- 14) Meshi, T., F. Motoyoshi, T. Maeda, S. Yoshiwoka, H. Watanabe, Y. Okada, (1989) *Plant Cell* 1 : 515-522
- 15) 池田亮二・渡辺雄一郎・岡田吉美(1991) 第14回日本分子生物学会年会。福岡
- 16) Watanabe, Y., T. Ogawa, Y. Okada, (1992) *FEBS Lett.* 313 : 181-184
- 17) Berna, A., R. Gafny, S. Wolf, W.J. Lucas, C.A. Holt, R.N. Beachy, (1991) *Virology* 182 : 682-689
- 18) Saito, T., Y. Imai, Y. Okada, (1988) *Virology* 164 : 653-656
- 19) Holt, C.A., A.A. Vaewhongs, R.N. Beachy, (1991) 3rd International Congress of Plant Molecular Biology, Tucson, Arizona.

国内情報

血小板活性化因子 (PAF) 受容体 と情報伝達機構

日本たばこ産業(株)生命科学研究所
中村元直

1. はじめに

PAF(Platelet-activating factor; 1-*O*-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) はプロスタグランジン, ロイコトリエン等のアラキドン酸代謝産物と並ぶ強力な生物活性をもつ脂質オートコイドで, 起炎作用および降圧作用をもち, 気管支喘息, エンドトキシンショック, アナフィラキシーショックなどに関与すると考えられている。PAFは1972年に存在が認識され構造も決定されたが^{1, 2, 3)}, その受容体に関する知見は最近まではほとんど得られていない。PAFは疎水性が強く膜への非特異的結合性が高いため簡単な受容体との結合実験すら困難である。また, 受容体タンパクは細胞膜内に微量しか存在しない

め精製がむずかしいことが原因と考えられる。そこで著者らは, PAF受容体の構造, 機能を知るための手段として遺伝子レベルからのアプローチを試み, 遺伝子工学的手法を用いてモルモット肺およびヒト白血球PAF受容体cDNAのクローニングに成功した。この2つのcDNAから推定されるPAF受容体の構造および発現実験から得られた機能に関する知見を以下に紹介する。

2. PAF受容体cDNAの発現クローニング

受容体やイオンチャネルの遺伝子を発現クローニング法で得る際の宿主細胞としてアフリカツメガエルの卵母細胞が最近頻りに利用される。この細胞は高いタンパク質合成能を有するためmRNAを微量注入すると数日後にはこれにコードされているタンパク質を

NAKAMURA Motonao

大量に合成し、いわば生きた“タンパク質合成系”と言える。合成されたタンパク質は翻訳後修飾を受け、さらに細胞内の最適の場所（受容体の場合は細胞膜）へとソーティングされる。また卵母細胞はGTP結合タンパク質やホスホリパーゼCといった受容体活性化に続く情報伝達に必要なファクターも保持しており、外来性受容体がこれらとカップリングすれば、リガンド刺激後の情報伝達により卵母細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させることができる。さらに、卵母細胞にはカルシウムイオン濃度の上昇に伴って開口するクロライドチャンネルも存在する。もし目的の受容体がりガンド刺激でカルシウムレスポンスを引き起こす性質をもつならば、卵母細胞のこれらの特性を利用し、注入した mRNA 中に目的の受容体をコードするものがあるかどうか電気生理学的な手法で確認することができる。すなわち、リガンド刺激の際のカルシウムイオン濃度の変動をクロライドチャンネルの開口に伴う膜電流の変化で高感度に検出す

るわけである（図1）。このシステムをクローニングの際の検定、選抜手段とすれば、数十万もの cDNA クローンの中から最終的に1つの目的とする受容体 cDNA を選び出すことができる。実際、この方法を利用してセロトニン受容体⁴⁾ やサブスタンスK受容体⁵⁾ 等がクローニングされている。著者らはPAF刺激が受容体を介してPI代謝回転を引き起こし、イノシトール1,4,5-三リン酸(IP₃)を産生するという事実に着目し、このシステムを利用してモルモット肺の cDNA ライブラリーより PAF 受容体 cDNA をクローニングした⁶⁾。詳細は別の論文を参照していただきたい^{7,8)}。

3. PAF 受容体の構造

著者らは PAF 受容体に関して詳細な解析をするためにモルモット肺 PAF 受容体 cDNA をプローブとしてヒト白血球 PAF 受容体 cDNA もクローニングした⁹⁾。単離した遺伝

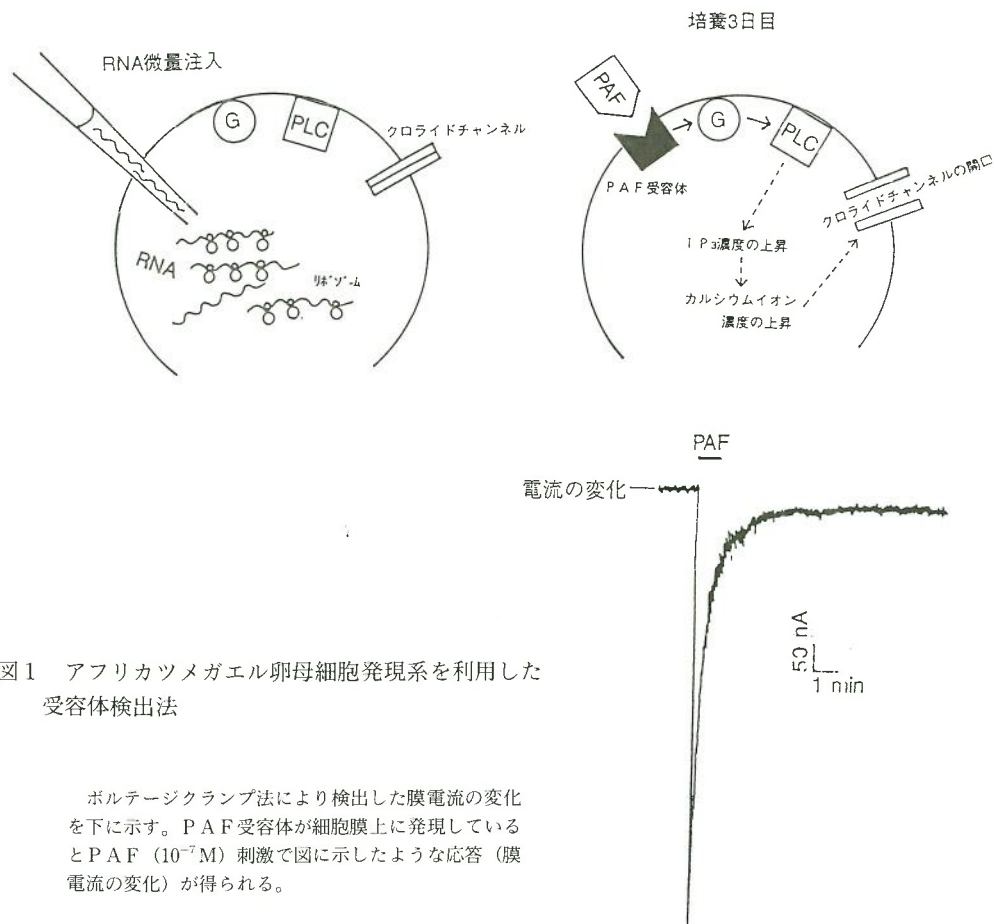


図1 アフリカツメガエル卵母細胞発現系を利用した受容体検出法

ボルテージクランプ法により検出した膜電流の変化を下に示す。PAF受容体が細胞膜上に発現しているとPAF (10⁻⁷M) 刺激で図に示したような応答（膜電流の変化）が得られる。

子から推定される両受容体の構造の比較を図2に示す。この受容体はどちらも342個のアミノ酸からなり、GTP結合タンパク質共役型受容体ファミリーに共通する7つの膜貫通領域(疎水性領域)が存在した。第2, 第3細胞外ループにはS-S結合しうる2つのシステイン残基が存在し、膜貫通領域内にはリガンド結合ポケットを形成することが予想されるいくつかのプロリン残基も存在した。また、細胞質側第3ループおよびC末端領域には数個のセリン、スレオニン残基が存在し、これらがある種のキナーゼによりリン酸化されることでPAFに対する脱感作が起こることが予想された。なお、両受容体の相同性は全体で83%であったが膜貫通部分だけを比較すると90%もあった、膜貫通部分のホモロジーが特に高いことはこの部分が受容体の機能に重要であることを示唆している。両受容体の相違点はヒト型の場合、N末端細胞外領域に糖鎖付加部位が存在しないことで、この糖鎖付加は受容体の機能には特に重要ではないのかもしれない。

4. PAF 受容体 mRNA の発現について

モルモット PAF 受容体の臓器別発現量をノーザンブロットィング法を用いて比較した

結果、白血球、腎臓、脾臓、肺の順に多く発現していることがわかり、さらに腎臓では皮質に最も多いという結果が得られた¹⁰⁾。また最近、ラットを用いた実験でPAF受容体は脳内にも広範囲に存在することも示された¹¹⁾。ヒトの場合、発現の臓器分布を調べることはできなかったが、白血球(90%以上が好中球)で多くのmRNAが検出され、また好酸球性の培養細胞(Eo1-1細胞)をインターロイキン5とGM-CSFで分化誘導することにより転写が活性化されることもわかった。

5. PAF 受容体の薬理学的特徴

クローン化したヒト PAF 受容体の薬理的解析を行うために PAF 受容体 cDNA を導入、高発現させた COS7 細胞を作成した。この細胞の膜画分を用いた結合実験から [³H] PAF および [³H] WEB2086 に対する Kd 値はそれぞれ約 1 nM, 10 nM という結果が得られ、ヒト好中球膜を用いた場合のデータとほぼ一致した。10 nM [³H] WEB2086 の特異的結合に対する種々のアンタゴニストの阻害効果を調べた結果、Y-24180 > CV-6209 > WEB2086 の順に阻害効果が強く、この機序はそれぞれの阻害薬の強さを反映すると考えられる。

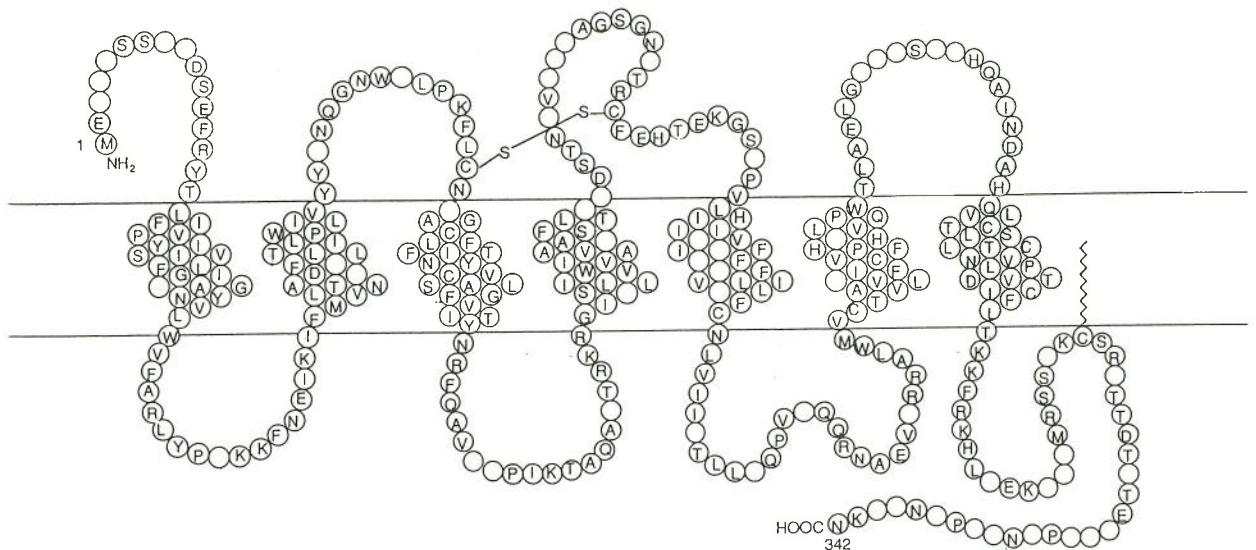


図2 PAF 受容体の構造

モルモットおよびヒト PAF 受容体のアミノ酸配列を比較し、同一アミノ酸を一文字表記で示した。

6. PAF 受容体を介する情報伝達機構

白血球, 血小板等を PAF で刺激するとある種の GTP 結合タンパク質 (おそらく Gq) を介してホスホリパーゼ C が活性化され, 細胞内 IP_3 濃度が上昇して細胞内カルシウムストアからカルシウムイオンの放出が起こる¹²⁾。著者らも, クローン化した PAF 受容体を高発現させた卵母細胞や COS7 細胞が PAF 受容体の活性化に伴い IP_3 を産生することを確認している。一方, モルモット心房を PAF で刺激した場合, ホスホリパーゼ A_2 が活性化され, その結果産生されるロイコトリエン C_4 が細胞のカリウムチャネルを開口するという結果も得られている¹³⁾。この現象に関与する GTP 結合タンパク質は G_i または G_o と予想されているが, どのようなメカニズムでホスホリパーゼ A_2 を活性化するかについては今後の課題である。

7. 今後の課題

PAF は気管支喘息だけではなくアナフィラキシーショック, DIC や糸球体性腎炎の進展 (メサングウム細胞の増殖) にも関与すると考えられている。最近, 著者らはエンドトキシン (LPS) が PAF 受容体に直接結合し活性化しうることを見いだした¹⁴⁾。生理的な意義については今後の研究を要するがエンドトキシンショックへの関与も予想される。PAF 受容体の構造を明らかにすることがこれらの病態治療に効果的な副作用のないアンタゴニストの開発に役立つにちがいない。各種病態

に対する治療開発にあたっては, PAF 受容体サブタイプが存在も明白にする必要がある。今後, トランスジェニックやジーンターゲットリングなどの手法を用いることにより, PAF 受容体と各種病態との関係がさらに明らかになることを期待する。

文 献

- 1) Benveniste J. et al. (1972) *J. Exp. Med.* 136 : 1356-1377
- 2) Dmopoulos C.A. et. al. (1979) *J. Biol. Chem.* 254 : 9355-9358
- 3) Blank, M.L. et. al. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90 : 1194-1200
- 4) Julius, D. et al. (1987) *Science* 241 : 558-564
- 5) Masu, Y. et. al. (1987) *Nature* 329 : 836-838
- 6) Honda, Z. et. al. (1991) *Nature* 349 : 342-346
- 7) 本田善一郎・清水孝雄 (1991) 実験医学 9 : 50-54
- 8) 中村元直・清水孝雄 (1992) 免疫薬理 10 : 98-102
- 9) Nakamura, M. et. al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266 : 20400-20405
- 10) Takano, T. et al. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177 : 54-60
- 11) Bito, H. et. al. (1991) *Neuron* 9 : 285-294
- 12) Shukla, S.D. (1991) *Lipids* 26 : 1028-1033
- 13) Nakajima, T. et. al. (1991) *FEBS Lett.* 289 : 239-243
- 14) Nakamura, M. et. al. (1992) *FEBS Lett.* 314 : 125-129

アフリカマイマイの抗菌性 糖タンパク質—Achacin—

上智大学理工学部
淵野寿子・土屋隆英

1. はじめに

無脊椎動物は、脊椎動物中に見いだされるような誘導 immunoglobulin システムや補体システムを欠いている。それにも関わらず体液を無菌に保っているのは、脊椎動物の免疫システムに代わる、細胞防御反応 (phagocytosing, encapsulation 等) と液性防御因子 (lectin, lysin, bactericide, enzyme 等) 両者の働きによって、外部からの侵入物質を阻止しているためとされている。中でも体液性防御因子は、微生物等の感染からの保護に役立ち、感染の非常に早い段階で、重要な役割を果たしていると考えられている。

アフリカマイマイ、*Achatina fulica* Férussac, は陸棲軟体動物で、以前よりイカ類とともにその「giant axon」が神経化学の研究材料として使用されてきた^{1,2)}。近年、その中枢から、心拍に関与するような生物活性を有する、D-アミノ酸残基を含むテトラペプチドが単離され注目されている^{3,4)}。しかし、アフリカマイマイの生体防御機構に関する研究はほとんど行われていなかった。

筆者らは、無脊椎動物の生体防御機構に関する研究を進める過程で、アフリカマイマイの体表粘液中で液性防御因子として働いているであろう抗菌性物質、Achacin を発見し、その構造と機能の解明に取り組んできた。これらの研究をもとに、免疫機構と異なり、非特異的で原始的な生命維持システムを持つ無

脊椎動物の生体防御機構を解明することを目的とした。

2. Achacin の精製とその構造

アフリカマイマイは沖縄より空輸し、2日以上絶食させてからパルス電流 (0.6~0.8 mA) で刺激し、粘液を採取した。陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー (GPC) を行うことにより、粘液の水溶性画分から分子量約15万の抗菌性物質を精製し、Achacin と命名した。なお、粘液中に存在する抗菌性物質は、Achacin のみであった⁵⁾。

アフリカマイマイ襟から poly(A)+RNA を抽出後 cDNA を合成し、cDNA ライブラリーを作製、Achacin に対する抗体を用いてスクリーニングし、陽性クローンの塩基配列を決定した⁶⁾。これをもとにアミノ酸配列を翻訳したところ、Achacin のサブユニットは、502アミノ酸残基よりなる分子量 55,820 のタンパク質であった。なお、この配列は昆虫で報告されている抗菌性物質のそれと相同性は認められなかったため、新しい型の抗菌性タンパク質であると考えられる。

Achacin の推定アミノ酸配列中に、アスパラギン結合型 (N型) 糖鎖の付加が可能な配列、Asn-Xaa-Thr または Asn-Xaa-Ser が4か所存在していた。ここ数年、糖タンパク質糖鎖の機能の重要性が認識され、微量分析が可能となってきたことから、Achacin から切り出したN型糖鎖の構造を、HPLCを用いた2次元マップ法⁷⁾で推定した。この推定構造を確認、同定するために、NMR, FAB-

FUCHINO Hisako
TSUCHIYA Takahide

MS 測定およびエキソグリコシダーゼ処理などを行い、解析中である。さらに、cDNAを用いて種々の細胞で、糖鎖を持たない、あるいは異なる糖鎖を持つ Achacin を発現させ、それらの抗菌活性を検討することにより、糖鎖が抗菌活性発現に果たす役割を解明しようとしている。

3. 抗菌作用

Achacin の細菌に対する最小生育阻止濃度を表 1 に示した。Achacin は抗菌スペクトルが広く、グラム陽性菌、陰性菌の両菌株に対して低濃度で生育阻害作用を示す。このように特異性が低く、種々の細菌に対して効果を持つ特性は、多種多様な菌が繁殖している土地で生きていくアフリカマイマイを細菌の感染から防御する体液性因子として、非常に有効であると思われる。

抗生物質等の抗菌作用には、その生育阻害の形式により、増殖を止めるが殺菌はしない静菌的作用 (bacteriostatic action) と、殺菌的作用 (bactericidal action) の 2 種類がある。この Achacin の抗菌作用を検討したところ、図 1 に示すように、Achacin はグラム陽性菌であるぶどう球菌 (*S. aureus*)、グラム陰性菌である大腸菌 (*E. coli*) のどちらの菌に対しても殺菌的作用を示した。しかし、この作用は生理食塩水中に懸濁した休止菌に対しては認められないので、Achacin は増殖期にある菌に対してのみ殺菌的に働いており⁸⁾、ペニシリンなど β -ラクタム系の抗生物質に特徴的に見られる作用と同じであった。

しかし、Achacin は分子量が約 150,000 (GPC) と大きな糖タンパク質であるため、分子量数百の抗生物質の働きと比較する際に、菌

表 1 抗菌性物質-Achacin-の概要

分子量	約 150,000 (GPC)
	約 60,000 (SDS-PAGE)
組成	タンパク質 約 90%
	糖 約 10%
抗菌活性 (最小代謝阻止濃度)	
グラム陽性菌	<i>S. aureus</i> ; 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, <i>B. subtilis</i> ; 0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$
グラム陰性菌	<i>E. coli</i> ; 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, <i>P. aeruginosa</i> ; 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$,

のどの部位に作用しているのか興味深い。また、微生物細胞内で Achacin が最初に作用する部位、あるいは代謝系 (一次作用点) を決めることが作用機序の研究上最も重要なことである。これを知るために、以下のような実験を行った⁸⁾。

CaCl₂、抗生物質等によって、細胞壁や外膜、細胞質膜等の透過性を高める処理をした菌に対する Achacin の抗菌性を測定したところ、未処理菌に対する効果と同程度であった。また、Achacin を作用させた大腸菌の、膜透過抗生物質に対する感受性は変化しなかった。しかし、*S. aureus* に EDTA を作用させてペプチドグリカン層をなくした菌は、Achacin によって未処理菌より短時間で殺菌された。さらに Achacin を作用させた大腸菌の切片を、抗 Achacin 抗体と金コロイドを用いて免疫染色したところ、細胞壁、ペリプラスム、さらに細胞質膜まで染色されていた (口絵、図 2)。

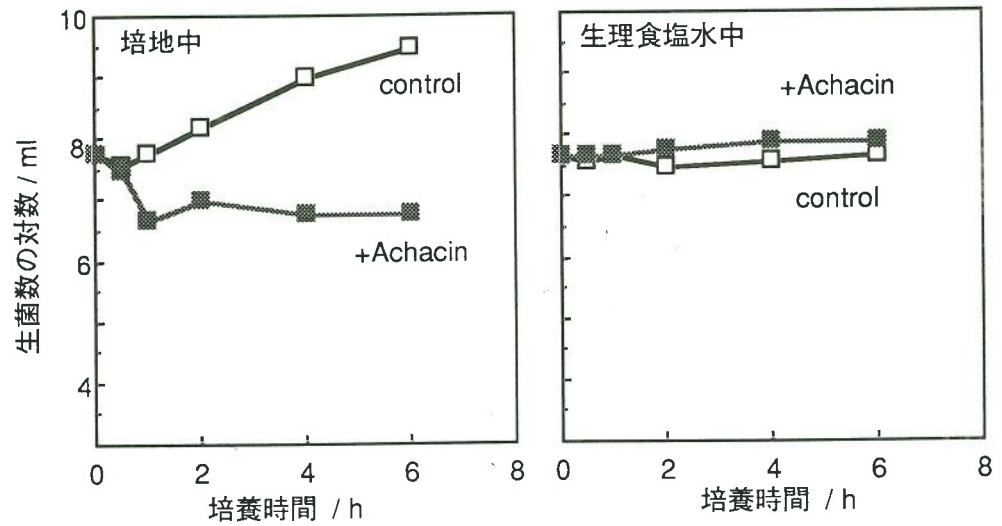
このことより、アフリカマイマイ由来抗菌性糖タンパク質 Achacin は、細胞質内には浸透しないが、大きな分子であるにも関わらず、外膜を透過して細菌の細胞質膜にまで到達していることが示された。Achacin 分子が細胞表層で分解をうけて低分子化しているのか否かは、今後検討しなければならない興味深い問題である。

次に、Achacin が実際に菌にどのような損傷を与えているかに興味を持ち、Achacin を作用させた *E. coli*, *S. aureus* を走査型電子顕微鏡 (SEM)、および透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した⁹⁾。

E. coli では、未処理菌に比べ長径が 3~7 倍長く (SEM: 口絵、図 3)、分裂隔壁が合成されていない (TEM: 口絵、図 4) ことが観察された。

S. aureus は、外見の変化が SEM ではほとんど観察されなかったが、TEM 観察したほとんどの菌体で、細胞質膜の一部が細胞壁から剝離し、細胞質中に陥入しているか、もしくは細胞膜のみ合成され、たわみを生じているかのように観察された (口絵、図 5)。

a. ぶどう球菌 (*S.aureus*)



b. 大腸菌 (*E.coli*)

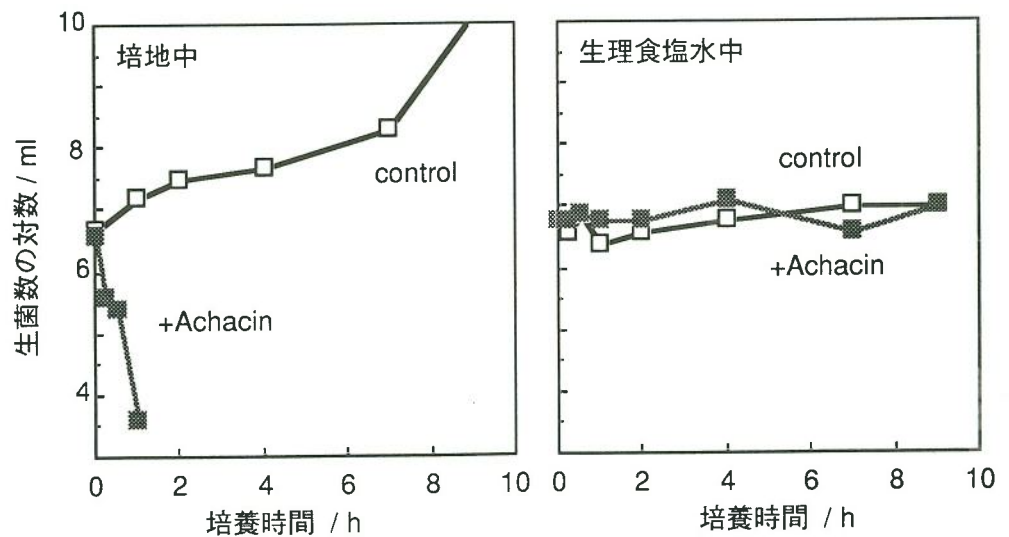


図1 Achacinの抗菌作用

このように、電子顕微鏡観察によって、Achacinは菌体の細胞壁の合成に影響を与えていることが明らかになった。なお、どちらの菌株においても、菌体の溶解、または破裂した菌体の残骸は認められなかった。

β -ラクタム系抗生物質であるペニシリン等は、増殖期にある菌に対してのみ殺菌作用を示し、*E. coli*の菌体を伸長させたり分裂隔壁の合成を阻害するなどの、細胞壁合成酵素阻害機構が解明されている^{10,11)}。これまでに述べてきたAchacinの抗菌作用は、この β -ラ

クタム系抗生物質の作用によく似ている。しかし、それらは高濃度になると菌を溶解するのに対し、Achacinは溶菌活性を示さない⁷⁾点で異なっていた。また、*S. aureus*に見られたような作用は未だ報告がない新奇なものであった。

4. おわりに

アフリカマイマイは、日本では現在移動禁止動物に指定されており、沖縄と小笠原との

ごく限られた所でのみ棲息している。棲息地はいずれも高温多湿で微生物が非常に繁殖しやすい環境下であり、多種多様な微生物が生育している土に直接触れて生活をしている。その上、アフリカマイマイの体表面は軟らかく、多糖に富んだ粘液で常に湿潤した状態にある。このように、細菌やカビの繁殖には恰好と思われる環境下で、アフリカマイマイは免疫機構を持たないにも関わらず、細菌等に侵されず個体を維持している。そこで、筆者らは免疫機構に相当する生体防御系が存在するものと考え、その体表を覆う粘液に手がかりを求めて研究を進めてきた。その結果、体表粘液中に抗菌活性を持つ物質を見だし、それを Achacin と命名した。Achacin は細菌の細胞質膜付近に攻撃 site を持ち、細胞壁の合成を阻害しているのではないかと予想している。

現在、Achacin に結合する大腸菌由来タンパク質を検索し、これらを分離、同定することによって、殺菌の作用機構を解明しようとしている。

さらに、筆者らは、アフリカマイマイ体表粘液中に、細胞凝集活性を有するレクチン (Achatinin) をも見いだしている¹²⁾ ことから、これら複数の液性防御因子、あるいは細胞性防御因子が、互いに役割分担することによっ

て、アフリカマイマイに代表される無脊椎動物が、劣悪な環境下で死滅することなく代々生存し続けているものと考えている。

文 献

- 1) Watanabe, K. et al. (1986) *Eur. J. Pharmacol.* 111 : 57-64
- 2) Furukawa, Y. and M. Kobayashi (1986) *Brain Res.* 374 : 227-235
- 3) Kamatani, Y. et al. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160 : 1015-1020
- 4) Ohta, N. et al. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178 : 486-493
- 5) Iguchi, S.M.M. et al. (1982) *Comp. Biochem. Physiol.* 72A : 571-574
- 6) Obara, K. et al. (1992) *Eur. J. Biochem.* 209 : 1-6
- 7) Tomiya, N. et al. (1988) *Anal. Biochem.* 163 : 489-499
- 8) Otsuka-Fuchino, H. et al. (1992) *Comp. Biochem. Physiol.* 101C : 607-613
- 9) Otsuka-Fuchino, H. et al. (1993) *Comp. Biochem. Physiol.* in press
- 10) Gardner, A.D. (1940) *Nature* 146 : 837-838
- 11) Schwarz, U. and A. Asmus (1969) *J. Mol. Biol.* 41 : 419-429
- 12) Iguchi, S.M.M. et al. (1985) *Comp. Biochem. Physiol.* 81B : 897-900

文献情報

ダイコンとカリフラワー
の細胞融合による根こぶ
病抵抗性作物の作出

細胞融合法は有性交配とは異なり、細胞質レベルの雑種を作出できるため、細胞質に存在する有用遺伝子、例えば細胞質雄性不稔遺伝子（ミトコンドリア）や除草剤抵抗性遺伝子（クロロプラスト）などを導入することができる。また、有性交配では得ることが困難な種間あるいは属間雑種を作出することもできるため、核内にある有用遺伝子の導入にも有効である。根こぶ病はブラシカ作物に最も大きな被害をもたらす病気の一つである。交配によって根こぶ病耐性品種を育成しようとする努力が古くからなされてきたが、多くの場合成功しなかった。まれに耐病性の品種が育成されても、数年間の栽培の後、再び罹病性になってしまう。その原因の一つは、ブラシカ属に交配可能な種に完全な耐病性遺伝子源がないことが挙げられる。一方、ラファナス属のダイコン品種には完全な根こぶ病耐性遺伝子が存在している。ここでは、この遺伝子をブラシカ属作物に導入するため、細胞融合法を用いてダイコン (*Raphanus sativus*) とカリフラワー (*Brassica oleracea*) との体細胞雑種を作出した論文を紹介する。

ダイコンのプロトプラストは用いた培養法では不定芽が分化しない。また、カリフラワーのプロトプラストもヨードアセトアミド (IOA) で処理したため、単独で不定芽が分化しない。しかしながら、この二種のプロトプラストを融合させることによって得られた体細胞雑種は、相補性により、不定芽を再生できるようになる。本研究では全部で40の再生植物体を得られ、そのうちの37個体について、葉の形はダイコンとカリフラワーの中間型であったが、花色はダイコンの白、または紫で（カリフラワーの花は黄色）、花弁は両親のいずれよりも大きかった。残りの3個体は外観

的にカリフラワーであった。アイソザイム（リン酸グルコースイソメラーゼ (PGI)）および RFLP 分析により、供試した雑種型の個体はいずれもダイコンとカリフラワーとの体細胞雑種であることが確認された。耐病性試験を行ったところ、すべての雑種がダイコンと同程度の根こぶ病耐性を示した。また、一部の雑種植物で花粉稔性が認められ、染色体を調べたところ、ダイコン ($2n=18$) とカリフラワー ($2n=18$) との染色体を合わせ持っている ($2n=36$) ことが判明した。これらの雑種植物をカリフラワーに戻交雑したところ、若干の種子が得られたので、耐根こぶ病カリフラワー品種を育成するための素材として利用できるものと考えられる。今後、根こぶ病耐性遺伝子以外の余分なダイコンの染色体を落とすための連続戻交雑が必要になるが、属の壁を突破して、今まで得ることのできなかった属間雑種を得たことに大きな意義があると言えよう。

このように、細胞融合法による有用遺伝子の導入には、雑種不稔になりやすいことや戻交配に比較的長い年月を要することなどの問題点もあるが、融合に使う片方のプロトプラスト（例えば本研究ではダイコンのプロトプラスト）に放射線照射などを施す方法、いわゆる非対称融合法を活用することによって一層飛躍的な成果が期待できるのではないかと思う。

(抄訳 劉 洪軍—植工研)

Liu Hong-jun

Production and characterization of somatic hybrids between the Japanese radish and cauliflower

Hagimori, M., M. Nagaoka, N. Kato and H. Yoshikawa

Theor. Appl. Genet. 84 : 819-824 (1992)

文献情報

オオムギ由来リボゾーム
不活化タンパク質遺伝子
導入タバコの糸状菌に対
する免疫性の増大

病原菌に対する植物の抵抗性には複数の応答経路が関与している。遺伝子導入システムの発達により、病原体が植物に感染する過程を探ることが可能となった。

著者らはさきに、type I リボゾーム不活化タンパク質 (RIP) をコードする cDNA をオオムギ種子より単離した。

RIP はコムギ tritin やリシン A 鎖と同様に、28S rRNA を特異的な RNA N-グリコシダーゼ活性によって修飾し、ターゲットとする細胞のタンパク合成を阻害するが、自身の細胞のリボゾームを不活化することはない。

ここでは、オオムギ RIP cDNA と、付傷や病原体によって誘導されるジャガイモ *wun1* 遺伝子のプロモーターを連結したキメラ遺伝子の構築と、これを組み込んだタバコにおける *Rhizoctonia solani* に対する免疫性を調査した実験結果について紹介する。

R. solani は土壌に生息し、広範囲の植物種に感染して根や莖に病徴をもたらすことが知られ、タバコに対しては壊疽を生じ、生育・収量を低下させる。

まず、オオムギ RIP (29,976 Da) をコードする全長の cDNA (1087 bp) をジャガイモ *wun1* 遺伝子の 5' 側上流に連結した。このキメラ *wun1*-RIP 遺伝子をカナマイシン耐性マーカーを有するバイナリーベクターにクローニングした後、*Agrobacterium tumefaciens* によってタバコに導入した。

これによって、カナマイシン耐性を示す個体が得られ、個体はサザン解析を行なった結果 *wun1*-RIP 遺伝子を有していた。

次に、RIP 導入植物 (R_0) と非導入対照植物を *R. solani* (2 g/l) 接種土壌に移植し、生育調査を行なった。その結果、 R_0 の各個

体は対照と比較して良好な生育を示し、10個体中3個体は無接種土壌における対照植物と同程度の生育が認められた。

さらに、これらの個体の自殖後代 (R_1) の中から、カナマイシン耐性の45個体を選抜し、同様にして接種土壌中での生育を調査した。それによると、 R_1 植物もまた病原菌存在下で旺盛な生育を示した。

また、 R_1 植物の若い葉を付傷した後、全 RNA 画分を抽出し、ノーザン解析を行なった結果、RIP mRNA の発現が認められ、可溶性タンパクのウェスタンブロットによる分析から、組織中に RIP の蓄積が示された。

これらの結果から、*wun1*-RIP 遺伝子を導入したタバコは、付傷に反応して RIP を蓄積し、土壌病原菌 *R. solani* の感染に対して免疫性が増大するものと考えられた。

今後は、RIP の細胞毒性、あるいは他の病原菌に対する適用性等が論点となるだろうが、本報の実験結果より、タバコに対する毒性は無いものと判断され、また、*R. solani* 以外の病原菌に対しては、*in vitro* で *Trichoderma reesei*, *Fusarium sporotrichoides* に抗菌性が認められた。なお、キチナーゼとの組み合わせによって更に強い生育抑制を示すことが報告されている。

近年、キチナーゼ遺伝子を導入した植物においても、*R. solani* に対する免疫性の増大が示された。しかしながら、それらの R_1 植物の免疫性は本報の *wun1*/RIP 植物に比べかなり劣る。現在、著者らは、RIP とキチナーゼを共に発現させた植物における免疫性の向上について検討している。

(抄訳 平井智美—茨城県生工研)

HIRAI Satomi

Expression of a barley ribosome-inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants

Logemann, J., G. Jach, H. Tommerup, J. Mundy and J. Schell

Bio/Technology 10 : 305-308 (1992)

文献情報

Agrobacterium tumefaciens T-DNA の核転移に関する 2種のタンパク質: VirD2 と VirE2

A. tumefaciens は双子葉植物に感染し、腫瘍を形成する。腫瘍細胞の核 DNA 中には、*A. tumefaciens* の保持する巨大プラスミド (Ti プラスミド) の特定領域である T-DNA が組み込まれている。T-DNA 領域が染色体の DNA に組み込まれる機能を持っていることから、Ti プラスミドベクター系は、高等植物の遺伝子導入、植物の形質転換に活躍している。しかし、T-DNA の核転移に関するメカニズムについては不明な点が多く、現在、転移ならびに組み込みの機構について活発な研究が進められている。Ti プラスミド上には病原性 (vir) 領域が存在し、この領域がコードする遺伝子産物が T-DNA の転移に関与すると考えられている。T-DNA はこの vir 領域から生じる 2 種のタンパク質、VirD2 および VirE2 と結合している。VirD2 は Ti プラスミドから T-DNA を切断した後、T-DNA の 5' 末端に結合する。また、VirE2 は 1 本鎖 DNA 結合タンパク質で、T-DNA 全体をカバーしている。これらのタンパク質と結合した T-DNA は、T-複合体としてアグロバクテリウム内から標的とする植物細胞の核へと転移される。

Howard らは、VirD2 の C 末側に 2 か所、核所在シグナル (nuclear localization signal; NLS) が存在することを明らかにした。この NLS は真核生物の核に存在するタンパク質に共通して保存されている配列で、特に *Xenopus* (アフリカツメガエル) の核質に存在するタンパク質の NLS と高い相同性が認められた。この 2 か所の NLS の機能を明らかにするため、この位置で VirD2 ミュータントを作製し、プロトプラスト内で融合タンパク質として発現した GUS 遺伝子の活性を測

定して細胞内所在を検討した。両 NLS を欠失したミュータントからのタンパク質は核に存在せず、細胞質にのみ検出された。また一方の NLS を欠失させた場合には、大部分が核に存在したが、一部細胞質からも検出された。さらに、NLS 領域のみを直接 GUS 遺伝子と連結して導入、発現させた場合には、融合タンパク質の 70~90% が核で検出された。このことから 2 つの NLS が VirD2 の核所在に直接関与していることが明らかになった。しかし、T-複合体は全長約 3600nm、分子量 50×10^6 Da と大きな分子であるため、1 つの VirD2 分子のみで転移が行なわれるとは考え難い。

一方、Citovsky らは、T-複合体の大部分を占める VirE2 が T-DNA 転移の際に必須であることを明らかにした。VirE2 のアミノ酸配列を分析したところ、VirD2 同様、NLS 配列が 2 か所存在した。この領域について、VirD2 の場合と同様の実験を行ない、その機能について検討したところ、この配列も直接 VirE2 の核所在に関与していることが分かった。また、彼らは VirE2 を発現するトランスジェニック植物を作成し、この植物体に *virE* 遺伝子座を不活化した *A. tumefaciens* を感染させ、腫瘍形成能について検討した。このアグロバクテリウムを野性型タバコに感染させても腫瘍は形成されないが、VirE2 を発現させた植物体に感染させた場合には、腫瘍形成能が完全に回復した。しかし、NLS が欠失した VirE2 を発現する植物体に、このアグロバクテリウムを感染させると腫瘍形成能は著しく低下、または完全に阻害された。このことから VirE2 は T-DNA の核所在に必要な不可欠な機能を有していることが示された。おそらく VirD2 に存在する NLS は、植物細胞の核孔に T-複合体を方向づけ、核内への取り込みを促進すると考えられ、また、VirE2 は、T-DNA 全体に結合することで外部のヌクレアーゼから T-DNA を保護し、核転移を促進すると考えられた。

(抄訳 小河原孝司—東北大・農)

OGAWARA Takashi

The VirD2 protein of *A. tumefaciens* contains a C-terminal bipartite nuclear localization signal: implications for nuclear uptake of DNA in plant cells

Howard, E.A., J.R. Zupan, V. Citovsky and P.C. Zambryski
Cell, 68 : 109-118 (1992)

Nuclear localization of *Agrobacterium* VirE2 protein in plant cells

Citovsky, V., J. Zupan, D. Warnick and P.C. Zambryski
Science, 256 : 1802-1805 (1992)

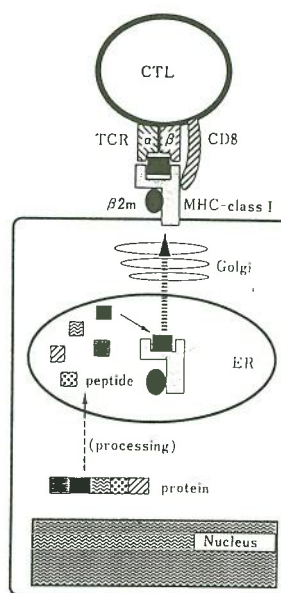


図 1

文献情報

長さおよびアミノ酸配列とも異なる抗原ペプチドが類似のアンカーモチーフを用いてMHC上に提示される

外来抗原に対する免疫反応（抗原排除機構）を簡単に整理すると、抗原断片がMHC class I分子に提示され細胞障害性T細胞(CTL)を誘導することで排除する機構と、MHC class II分子に提示され特異抗体を誘導することで排除する機構とに分けられる。例えば花粉抗原などは、class II分子上に提示され花粉に対する特異抗体の生産を誘導し、これによって排除される。一方細胞に感染するウイルスなどは、ウイルス抗原断片が細胞表面のclass I分子上に提示され細胞障害性T細胞を誘導し、感染細胞もろとも排除される(図)。これらの機構が異常になると、花粉アレルギーになったり感染が長く続いたりする。特にウイルス抗原特異的CTLは、抗体がウイルス感染細胞を防御的に監視するために必要な抗原量より、はるかに少ない抗原量でウイルス感染細胞を見つけるため、潜伏感染するウイルスに対しても有用な免疫監視集団である。マウスにおけるインフルエンザウイルス(IV)感染からの離脱に関して、CTLの役

割がよく示されており、ヒトやラットのウイルス感染においても、誘導される特異的CTLのレベルがウイルスの排除能と比例していると考えられている。このような観点から、CTLを誘導できるワクチンの開発がなされ、弱毒性ウイルス、組換えワクシニアウイルス、抗原タンパクを組み込んだリポソームの他に、感染性の全くない合成ペプチドなどが研究され、臨床応用されている。IV, HIV, EBVなどウイルス感染に対する予防ワクチン開発は、临床上、重要課題のひとつであるが、そのためには抗原エピートプについてのより詳細な理解が、CTL免疫を誘導できるワクチン(ペプチドワクチンを含む)のデザインにおいて必要不可欠と考えられる。

ここで紹介する仕事も、この流れの中にある。これまで、抗原エピートプの性質はMHC分子側への結合能と特異T細胞の反応(CTL/Th活性)強度またはT細胞受容体(TcR)への結合能によって評価されてきた。近年の結晶学の進歩とコンピュータグラフィック技術の応用により、ペプチドとMHCの結合を視覚的に評価する手法が構築された。その結果ここ2, 3年の間に、MHC分子はアミノ酸9個の長さのペプチドを好んで提示することが明らかにされた。さらに、抗原ペプチドがその両端付近に決まったアミノ酸を配置したアンカーモチーフと呼ばれる構造を有して

いることも推定されていた。紹介する報告の続報として、上記Ⅳの抗原エピートープ（核タンパクの91～99番目アミノ酸）とMHC複合体の結晶解析から、P2（アミノ末端から2番目）とPC（カルボキシ末端）部位にアンカーモチーフを有していることが示されている。

報告では、HLA（ヒトMHC）-Aw68アロタイプに結合するⅣ以外の内因性抗原ペプチドを検索した結果、そのひとつにGlu-Val-Ala-Pro-Pro-Glu-Try-Ala-Arg配列の9個のアミノ酸からなるペプチドを見いだした。この抗原ペプチドおよび他の内在性ペプチドの解析から、下線で示されるアンカーモチーフをP2部位とPC部位（Ⅳの抗原ペプチドと同位置）に含んでいた。さらに、ペプチドを含むAw68複合体の結晶構造をX線回析により分析した結果からもアンカーモチーフを含むP1-P2-P3部位のGlu-Val-AlaとPC-1-PC部位のAla-Argが、抗原ペプチドの中央部分のペプチド（P4～PC-2）に比べて、より強固にHLA分子に結合していることが示された。すなわち、1.8Åの解像度でペプチドの立体構造を解析するとP1～P3およびPC-1～PCのアミノ酸同志の繋がりだけが浮き上がり、この部位のペプチドの立体構造が固定されていることが明らかとなった。アンカーモチーフを構成するアミノ酸残基の組み合わせは、MHC（HLA）アロタイプごとに異なり多形性を有している。したがって、個々のHLAアロタイプとペプチドとの結合能は各々で異なってくるし、抗原ペプチドを提示したHLA分子の安定性にも影響すると考えられる。言い換えれば、HLAの多形性領域が、どのペプチドと結合しやすいか、さらに、ペプチド両端のどのようなアミノ酸配列がHLAの結合部位にうまくはまり込むか、を決めていると言える。

加えて報告では、前記の9アミノ酸からなるペプチドを含め内在性ペプチドの同定を試み、HLA-Aw 68/ペプチド複合体から酸性条件下で溶出させたペプチドをHPLCで分離精製しアミノ酸配列と分子量を決定した。その結果ペプチドの長さは必ずしも9アミノ酸

だけでなく9から11アミノ酸からなるペプチド断片（細胞内のストレスタンパク断片やリボソーム類似タンパク断片）を提示しており、分離された各ペプチド断片のP2, PC部位にアンカーモチーフが認められよく保存されていた。一方、主にT細胞側に提示されるペプチド部位は、P4からPC-2までを含みその長さおよびアミノ酸配列ともバラバラであった。これらの結果は、X線結晶解析から得られた結果にもよく一致しており、i) P2, PC部位とその近傍でのみMHC分子に結合していること、ii) P4からPC-2のペプチド部分はMHC側に近接しておらず、立体構造も固定されていないこと、加えて、iii) この部位のアミノ酸配列が大きく変化し、それぞれに対する特異的CTL誘導の免疫原性に寄与していること、などを示すものと考えられる。

それでは、前段で記したペプチドワクチンの開発は実現可能なのだろうか？本報告の結果も含め、以下に問題点を列記する。1) 感染症や自己免疫を惹起する抗原が同定され、抗原エピートープが判明していなければアミノ酸配列をデザインできない。2) HLAハプロタイプおよびイソタイプごとに結合するペプチドが異なる。3) ハプロタイプごとにアンカーモチーフが異なる。など、単一の抗原ペプチドを用いた特異CTLの誘導による防御という単純化した考え方では、実現可能なペプチドワクチンへの道は険しいようだ。例えば、“広く多くのMHCハプロタイプに結合する、ユニバーサルな抗原ペプチドアナログの応用”などの新しい概念を導入し、上記2), 3)を克服していくことが必要と考えられる。

しかし、本報告のX線回析による構造解析で明らかにされたMHC-ペプチド間相互作用に関する結果から、抗原ペプチドに対する抗原提示細胞とT細胞両者の認識機構が、どのようなMHC-ペプチド-TcRの分子間相互作用により成立しコントロールされているかを解析する糸口は見いだされてきたと言えそうだ。

（抄訳 渡部良広—JT医薬研究所）

WATANABE Yoshihiro

Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle
Hwai-Chen Guo, et al.
Nature, 360 : 364 (1992)

参考：“Atomic structure of human MHC molecule presenting an influenza virus peptide”
Michael L. Silver, et al.
Nature, 360 : 367, (1992)

お詫びと訂正

1993年1月15日発行の第35号の27頁図2の写真と28頁の図4の写真が入れ違っておりました。ここに、お詫びとともに訂正させていただきます。



図2 バイオラッドラボラトリーズ
パーティクルデリバリーシステム PSD-1000/He

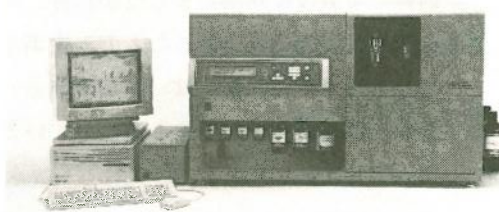


図4 アプライドバイオシステム
ペプチドシーケンサ473A

海外便り

コーネル大学でのルーメン微生物研究

農林水産省 畜産試験場

梶川 博

離日数日前に、書類を紛失してビザを無効にしてしまうという不祥事を起こし、そのため、ニューヨーク・JFK 空港の移民局で、壁に鎖でつながれた人達と並んで審査を受けるという悲惨な事態から私の留学は始まりました。また、なんとかコーネル大学のあるイサカに落ち着いてからも、私の英語が通じない、彼らの英語がわからない（在日米英国人は極めてゆっくりと英語を喋ってくれていたのだと、このとき悟りました）といったエイリアンのような生活を強いられ、さらに手に入れた車が初日で煙を噴く、階上の子供が毎日インドア運動会を開くといったように、最初の2、3か月はまさにサバイバルゲームの様相を呈していました。しかし、いろいろと様子がつかめてくるにつれ、人々は親切であるし、かといって人間関係自体はドライであるので、むしろ居心地が良くなってきたといっていでしょう。私のお世話になった、微生物学科のラッセル准教授（41才の誕生日を迎えるのと前後して教授に昇格しましたが）も、典型的なアメリカ人気質を持った人で、物事ははっきりと言うその性格には、はじめ戸惑いましたが、慣れるとむしろつきあいやすいといった人でした。

コーネル大学での研究

そのラッセル研究室では、牛の反芻胃内の細菌（ルーメン細菌）における物質代謝を、物質の膜輸送という観点からとらえることをテーマに、研究を行ってきました。ルーメン

微生物学は、いわゆる微生物学と家畜栄養学の境界に横たわる分野ですが、この研究室は其中でも、最も基礎微生物学に近いところに位置しています。乳牛の一般栄養学から、ルーメン微生物の生理・生態学へとアプローチしてきた私にとって、この研究室に参加すること自体、大きな挑戦を意味することになりました。その私に提示されたテーマは、ルーメン内のグラム陽性菌の代表的なものであると同時に、増殖能の高いことから研究効率の良いストレプトコッカス・ボビスを用い、細胞膜における特定のイオンの透過性を増大させる物質であるイオノフォアの作用機構を、イオノフォア添加時の細胞膜におけるプロトンの流れを測定することで探ろうというものでした。ラッセル研究室では、細胞膜におけるプロトン濃度勾配を、RIで標識した弱酸を用いて測定していましたが、それでは結果がでるまでに時間がかかりすぎることから、プロトンを標識する蛍光プローブを用いる方法を検討することから始まりました。ラッセル研究室で感心したことは、研究室の設備がデータをいかに効率的に生産するかという精神で貫かれていることです。決して余分なものがない代わりに、必要なものはひと通り必要なだけ揃っているという点は、ラッセル本人が直接実験に携わっていることにより可能となるのでしょうか。私に「日本製の高級品とは違うけど」といって渡されたのは、どこから引っ張り出してきたのかと思われるような見るからに無骨な蛍光光度計でした。この機械で最初は悪戦苦闘しましたが、しかし最終的にはきれいな再現性のある反応を引き出す条件を見つけだすことができました。最初に、

KAJIKAWA Hiroshi

牛肉生産において飼料効率を高める効果があるということで、その飼料中への添加が一般的となっているモネンシンの作用を検討しました。モネンシンは、ルーメン内のグラム陽性菌を中心に特定の細菌の増殖を阻害することで、ルーメン内の微生物生態系の変化およびその結果としての発酵パターンの変化を引き起こし、それが家畜全体でのエネルギー効率の改善に結びつくと考えられています。またモネンシンの個々の細菌に対する作用としては、細胞膜のナトリウムイオンとプロトンとの交換を促進することで、細胞膜におけるナトリウム勾配を消滅させ、それがナトリウムとの共輸送で取り込まれる基質の輸送を抑え、増殖を阻害するものと仮定されています。しかしその場合の疑問点は、モネンシンの添加は、ナトリウム勾配の減少と引換えにプロトンの勾配を獲得させ、それがナトリウム／プロトン対抗輸送系を通じて再びナトリウム勾配を生じさせるという、非エネルギー要求系のサイクルをぐるぐる回るだけで実質的な効果につながらないのではないかと点です。その点に関して、私達の研究は、モネンシンはカリウムイオンとプロトンの交換を促進することで、細胞膜におけるプロトン駆動力を減少させ、それが最終的にナトリウム勾配の減少にもつながるという点を示しました。これは、モネンシンに限らずラザロシドなどの類似のイオノフォアでも同様であることが判明しました。さらに、細胞内のカリウムイオンは、受動拡散により、常にいくらかの膜電位を生じさせているということをプロトノフォアの作用と、脂肪親和性イオンの電極(TPP⁺電極)を用いた膜電位の測定により明らかにしました。このTPP⁺電極は、驚いたことに、ラッセル教授が試作した、研究室内で人が動いても反応してしまうという厄介な代物であり、夜中の誰もいなくなった研究室での測定を余儀なくされました。しかし苦勞の甲斐あって、これらの結果はアメリカの細菌学の雑誌に掲載することができました。しかし、こののち行った、S. ボビスにおけるカリウムイオンの輸送系を解明する研究は、

時間切れで今後の課題として残すことになりました。

イサカでの生活

ところでコーネル大学のあるイサカ(オデュッセイの生まれたイシュケーに由来します)について触れますと、ここは本当に小さな街ではあるのですが、世界中のいろいろな国から人々が集まり、また交流する機会も多いので、外に向かって世界が広がるという感じを強く持ちました。しかし一方で、イサカの住人の構成が中産階級以上の教育レベルの高い人たちに偏っているので、典型的な合衆国社会とは性質を異にすると思われました。ところで、その中で日本人はどういった位置を占めるかといいますと、その多くが企業から派遣されてビジネススクールにMBAを取りにきている人達と、語学研修に来ている人達に集中しており、また滞在期間も、私を含め半年から2年と短期で、PhDを取りにあらゆる分野で広く分布する長期滞在型の中国、台湾や韓国の人とは対照的といえるでしょう。また、家族で来ている人が多いこともあって、どうしてもお互い同士で固まってしまうがちで、数の割には影が薄いという印象を受けました。これはイサカのような田舎町にも溢れかえっている日本製品(自動車は“席卷”, 電気製品は“支配”という言葉があてはまるでしょう)と比べるとアンバランスで、受け入れ国に対する貢献という点から決して良いとは思えませんでした。しかし、他国(中国本土を除いて)の留学生が高所得者の子弟に限られているところを考えると、一般所得層の人にも留学するチャンスのある点では、日本は良いところであると実感しました。イサカの自然に関しては、秋の紅葉の季節と初春の花の季節は、メルヘンランドの一言に尽きます。しかし、長い冬の季節には、村上春樹の“世界の終わり”そのものの雪に閉ざされた町となり、「これではまるで仕事しに来たみたいだ」とよく冗談で言ったものです。スキー場がそばにあるのと、コンサートが毎

日のようにあるのが救いでした。またアメリカでは物価が低く、特に食料品の値段には思わず喜んでしまい、自分を肥育してしまうという過ちを犯してしまいました。しかし、帰国後、買い物に行く毎にその値段に悲鳴をあげるわりには、体重が減らないのがとても不

思議です。ちなみにむこうでは、うるち米¥125/kg, 牛肉¥65~110/100g, 豚肉¥80~100/100g, 鶏肉80/100g, 牛乳¥75/kg, 卵¥100/ダース, ビール¥60~125/350mlでした。



金曜夜、研究室のメンバーと大学街のバーにて、
右から2人目筆者

特別情報

細胞育種技術の進捗状況

1992年度

農林水産省 農業生物資源研究所 細胞育種部

中島阜介

この資料は、1992年12月15日現在の細胞育種技術の進捗状況について、農業研究センター、農業生物資源研究所、野菜・茶業試験場、果樹試験場、草地試験場、森林総合研究所、北海道農業試験場、中国農業試験場、九州農業試験場、及び熊本県農業研究センター、群馬県農業総合試験場、大阪府立大学農学部の協力を得て取りまとめたものである。

1. 特記事項—本年度の特徴—

- 培養系の技術内容について一部を見直した。そのため新しく技術内容とした懸濁細胞培養系や未受精胚培養系の調査に不十分さが、さらに体細胞からの胚形成と不定芽形成が明確に分類できないものもあるため、一部にあいまいさが残った。
- プロトプラスト培養系、組換えDNA技術が着実に進展している。カキでは、アグロバクテリウム・リゾゲネスの感染による組換え体が得られた。この手法による組換え体は続々と作出されてきているが、特定の遺伝子、DNAを導入する場合は少ない。そのため、これまでの組換えDNA技術の定義と異なるので技術内容の検討が必要となるが、本年は問題提起の意味も含めて参考としてあげた。
- 最近の傾向として、組換え体の作出などが新聞や商業情報誌に掲載され、学術雑誌や学会報告で拾えないことがある。今回の調査では、これら一部を※として示した。

〔用語解説〕

培養系

- 茎頂培養系……………茎頂を切り出して培養し、直接植物体を得る培養系
- 腋芽培養系……………腋芽を切り出して培養し、植物体を得る培養系（樹木）
- 枝条・端・培養系……………枝の先端部分を切り出して培養し、植物体を得る培養系（樹木）
- 胚培養系……………受精後の胚又はそれを含む器官を取り出して植物を得る培養系
- 葯培養系……………葯を培養して花粉由来の半数体又は倍数体を得る培養系
カルス経由、胚経由を含む
- 花粉培養系……………花粉を培養して花粉由来の半数体又は倍数体を得る培養系
カルス経由、胚経由を含む
- 未受精胚培養系……………未受精の胚を含む組織・器官を取り出して培養し、雌性生殖細胞由来の半数体又は倍数体を得る培養系、カルス経由、胚経由を含む
- 体細胞不定芽形成系……………体細胞を培養した不定芽形成系で植物体を得る培養系
- 体細胞胚形成系……………体細胞を培養した不定芽形成系で植物体を得る培養系
- 懸濁細胞培養系……………Explant→カルス→振盪培養（懸濁細胞）→プレーティング→不定芽又は不定胚→再分化植物を得る培養系
- プロトプラスト培養系…プロトプラスト→不定芽又は不定胚→再分化植物を得る培養系

技術

- 遺伝資源保存技術……………カルス、プロトプラスト、茎頂培養由来の植物等を試験管内又は液体窒素中で保存し、保存後再分化させる技術
- 大量増殖技術……………植物体を大量に増殖する技術、培養系は何を用いてもよい
- ウィルスフリー化技術…ウィルスをフリー化する技術、培養系は何を用いてもよい
- 人工種子形成技術……………主として体細胞胚形成系を用いて人工種子を作成する技術
- 試験管内受精技術……………胚珠に花粉を受精させるなど試験管内で雑種植物を得る技術
- 半数体育種技術……………葯（花粉）、胚珠培養、種間交雑（*H. bulbosum* 法等）によって半数体を作り、育種年限を短縮する技術
- 細胞選抜技術……………培養細胞（培養系は何を用いてもよい）によって変異の誘起、ストレスによる選抜を行い、育種の効率化を図る技術
- 細胞融合技術……………細胞融合により体細胞雑種の植物体を作成する技術
- 組換えDNA技術……………特定の遺伝子、DNAをベクターの使用その他の方法で他の植物に導入して、その形質を再分化植物で発現させる技術

2. 細胞育種技術の現状

作物群	分類 作物名	植物体再分化技術										細胞育種技術							備考： × 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術		
		培養系技術	莖頂培養系	腋芽培養系	枝条・端・培養系	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	未受精胚培養系	体細胞不定芽形成系	体細胞胚形成系	懸濁細胞培養系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術		半数体育種技術	細胞選抜技術
普通作物	イネ	○	—	—	◎	◎	○ ¹⁾	△	○	○	◎	△	○	—	△	×	◎	○	○	◎	△
	コムギ	○	—	—	◎	◎	○	×	○	○	○	—	—	—	×	×	◎	○	×	△	△ ²⁾
	オオムギ	○	—	—	◎	◎	○	×	○	△	○	—	—	—	△	×	◎	△	×	×	×
	ダイズ	◎	—	—	◎	△	×	×	○	◎	△	○	—	—	—	×	×	×	○	×	○
	ササゲ	◎	—	—	◎	△	×	○	×	×	△	△	—	—	—	×	×	×	×	×	△
	アズキ	◎	—	—	◎	×	×	×	○ ⁴⁾	×	×	○	—	—	—	×	×	×	△	×	△
	バレイショ	◎	—	—	◎	○	○	×	◎	△	◎	◎	◎	◎	◎	×	×	◎	○	◎	◎
	カンショ	◎	—	—	○	△	×	×	○	○	○	○	○	×	◎	×	×	×	×	△	×
	トウモロコシ	○	—	—	◎	○	○	△	○	△	○	○	△	△	×	×	○	○	○	×	○
	ソルガム	×	—	—	○	△	×	×	×	×	○	△	×	×	×	×	×	×	○	×	×
特用作物	テンサイ	○	—	—	△	△	×	○	※	△	※	△	○	○	※	×	×	△	△	※	※
	サトウキビ	◎	—	—	○	△ ^{1,2)}	△	—	△	—	○ ³⁾	△	◎	◎	◎	×	×	×	◎	△	△ ^{4,5)}
	コンニャク	◎	—	—	×	×	×	×	×	△	×	×	×	○ ⁶⁾	◎ ^{7,8)}	×	×	×	×	×	×
	イグサ	◎	—	—	△	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ナタネ	◎	—	—	◎	◎	◎	×	◎	○	○	◎	△	△	—	×	×	◎	○	○	○
	ラッカセイ	○	—	—	○	△	×	×	○	○	×	×	△	○	×	×	×	×	×	×	※
	クワ	◎	—	—	×	△	×	×	◎	×	×	×	◎	◎	×	△	×	×	×	×	△
	チャ (カメリア)	◎	—	—	◎	◎	×	○	×	○	×	×	△	○	×	×	×	△	×	×	×
飼料作物	イタリアンライグラス	○	—	—	○	○	×	×	○	×	○	△	○	×	○	×	×	○	×	△	×
	オーチャードグラス	○	—	—	△ ⁴⁾	×	×	×	○	△	○	△	×	×	○	×	×	×	×	×	△
	チモシー	△	—	—	△ ⁴⁾	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	トールフェスク	△	—	—	○	○	×	×	○	×	○	○	×	×	×	×	×	○	×	△ ¹⁾	◎ ^{2,3)}
	ペレニアルライグラス	△	—	—	○	○	×	×	△	×	○	○	×	×	×	×	×	○	×	△ ⁵⁾	×
	メドウフェスク	△	—	—	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	スミズブロムグラス	×	—	—	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ダリスグラス	×	—	—	×	×	×	×	×	△ ⁶⁾	△ ⁶⁾	△ ⁷⁾	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	バヒアグラス	×	—	—	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	パニカム	×	—	—	△	×	×	×	×	○	○	△	×	×	×	×	×	×	×	△	×
	ローズグラス	×	—	—	×	×	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ネピアグラス	×	—	—	×	×	×	×	×	○	○	△	×	△	×	×	×	×	△	×	×
パールミレット	×	—	—	×	×	△	×	×	○	○	△	×	△	×	×	×	×	△	△	×	
アカクローバ	○	—	—	○	×	×	×	×	○	×	△	△	×	○	×	×	×	△	△	×	
シロクローバ	○	—	—	○	×	×	○	×	○	△	○	△	×	○	×	×	×	×	×	△	

作物群	分類	植物体再分化技術											細胞育種技術								備考：× 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術	
		培養系技術	茎頂培養系	腋芽培養系	枝条・端・培養系	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	未受精胚培養系	体細胞不定芽形成系	体細胞胚形成系	懸濁細胞培養系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術	半数体育種技術	細胞選抜技術		細胞融合技術
作物名																						
飼料作物	アルファルファ	○	—	—	○	△	×	×	×	◎	○	○	△	○	○	○	×	×	○	○	◎	
	バズフットレフォイル	×	—	—	×	×	×	×	△	×	×	○	△	×	×	×	×	×	△	△	○	
	スタイロサントス	×	—	—	×	×	×	×	△	×	△	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
芝草類	ベントグラス	×	—	—	×	×	×	×	◎	○	○ ⁹⁾	×	△	×	×	×	×	×	△	×	△ ⁸⁾	
	レッドフェスタ	△	—	—	○	×	×	×	×	△	△	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ノシバ	×	—	—	×	×	×	×	△	×	△	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×	
	ケンタッキーブルーグラス	×	—	—	×	×	×	×	△	×	△	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
野菜	キュウリ	○	—	—	○	△	×	×	○	◎	○	◎	×	○	—	×	×	△	×	△	△	
	メロン	○	—	—	○	△	×	△ ¹⁾	○	◎	×	◎	△	○	—	×	△	△	×	△	○	
	スイカ	○	—	—	△	×	△	×	○	○	×	×	×	○	—	×	△	△	×	×	×	
	カボチャ	○	—	—	○	×	×	×	○	○	×	×	×	△	—	×	△	△	×	△	×	
	トマト	◎	—	—	◎	△	×	×	○	×	×	○	△	○	—	×	×	△	○	○	○	
	ナス	◎	—	—	○	◎	△	×	○	◎	○	◎	×	○	—	×	×	◎	×	○	○	
	ピーマン	◎	—	—	○	◎	×	×	○	△ ²⁾	×	△	×	○	—	×	×	◎	×	×	×	
	ダイコン	◎	—	—	◎	○	△	×	○	×	×	△	×	×	—	×	×	×	×	△	×	
	キャベツ	◎	—	—	◎	○	○	×	○	○	×	◎	×	○	—	△	△	○	△	◎	△	
	ハクサイ	◎	—	—	◎	◎	◎	×	○	○	×	○	×	△	—	×	○	○	×	○	×	
	ブロッコリー	◎	—	—	◎	◎	◎	×	○	○	×	◎	×	○	—	×	△	○	×	○	△	
	イチゴ	◎	—	—	×	△	×	×	○	○	×	△	○	◎	◎	×	×	△	△	×	○	
	タマネギ	◎	—	—	△	△	×	△ ³⁾	○	○	○	△	×	○	△	×	×	△	△	△	△	
	ネギ	○	—	—	△	×	×	×	○	△	○ ⁴⁾	×	×	○	○	×	×	×	△	×	×	
	ニンニク	◎	—	—	×	×	×	×	○	○	×	×	○	○ ⁵⁾	◎	×	×	×	×	△	×	
	アスパラガス	◎	—	—	△	○	△	×	○	◎	◎	○	△ ⁶⁾	◎	○	×	×	△	△	×	△	
	エンドウ	○	—	—	△	×	×	×	×	△	×	△	△	△	—	×	×	×	×	×	○	
	インゲンマメ	◎	—	—	○	×	×	×	×	△	×	×	×	×	—	×	×	×	×	×	△	
	ニンジン	○	—	—	×	△ ⁷⁾	×	×	○	◎	◎	◎	△	◎	—	○	×	×	○	◎	○	
	セロリー	○	—	—	×	×	×	×	×	◎	○	◎	×	◎	—	○	×	×	○	○	○	
	レタス	○	—	—	×	×	×	×	○	○	◎	×	◎	—	○	×	×	×	○	○	○	
	ゴボウ	○	—	—	×	×	×	×	△ ⁸⁾	×	×	×	×	×	—	×	×	×	×	×	×	
	サトイモ	◎	—	—	×	×	×	×	△ ¹⁰⁾	△ ⁹⁾	×	×	○	◎	◎	×	×	×	×	×	×	
	ヤマノイモ	○	—	—	×	×	×	×	△ ¹¹⁾	△	×	×	△	△	○	×	×	×	×	×	×	
	ハウレンソウ	○	—	—	×	×	×	×	△	△	×	△ ^{12,13)}	×	△	—	×	×	×	×	×	×	
	フキ	◎	—	—	×	×	×	×	×	×	○	◎	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	
	キク	◎	—	—	△	×	×	×	◎	△	△	○	○	○	◎	×	×	×	×	×	△	

作物群	分類 作物名	植物体再分化技術										細胞育種技術							備考：× 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術			
		培養系技術	茎頂培養系	腋芽培養系	枝条・端・培養系	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	未受精胚培養系	体細胞不定芽形成系	体細胞胚形成系	懸濁細胞培養系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術		半数体育種技術	細胞選抜技術	細胞融合技術
花	ツツジ類	◎	—	—	△	×	×	×	×	×	×	○	◎	◎	×	×	×	×	×	×	×	×
	ユリ類	◎	—	—	◎	×	×	×	◎	×	×	△	△	◎	◎	×	△	×	×	×	×	×
	チューリップ	△	—	—	△	×	×	×	1)	×	×	×	△	1)	△	×	△	×	×	×	×	×
	カーネーション	◎	—	—	△	×	×	×	2)	×	△	△	○	○	◎	×	△	×	△	×	△	△
	ラン類	◎	—	—	◎	×	×	×	◎	×	×	△	×	◎	◎	×	×	×	×	×	△	△
	ストック	×	—	—	×	×	×	×	4)	×	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	×
	スターチス類	◎	—	—	×	×	×	×	×	×	×	△	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×
	トルコギキョウ	5) △	—	—	×	×	×	×	◎	×	×	○	×	○	×	×	×	×	△	6)	×	△
	ペチュニア	◎	—	—	×	○	×	○	◎	×	×	◎	×	◎	○	×	△	△	×	◎	◎	◎
	ヒマワリ	7) ○	—	—	○	×	×	×	8)	×	×	◎	×	9)	×	◎	×	×	×	×	×	○
	リンドウ	○	—	—	×	△	△	×	×	△	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×
	ガーベラ	◎	—	—	×	×	×	△	×	×	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×
	グラジオラス	◎	—	—	×	×	×	×	×	×	×	×	×	◎	◎	×	×	×	×	×	×	×
	フリージア	◎	—	—	×	×	×	×	×	△	×	×	×	◎	◎	×	×	×	×	×	×	×
	シクラメン	○	—	—	○	△	×	×	◎	10)	11, 12)	△	△	△	×	○	×	×	×	×	×	×
	ペゴニア類	×	—	—	×	×	×	×	◎	×	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×
き	プリムラ類	○	—	—	13) △	△	×	×	△	×	×	×	△	○	×	×	×	×	×	×	×	
	ゼラニウム類	○	—	—	◎	△	×	×	15) ○	15) ○	×	○	×	○	○	×	×	×	×	×	×	
	バラ	○	—	—	×	×	×	×	16) ○	△	×	△	×	◎	○	×	×	×	×	×	×	
	ツバキ	○	—	—	○	×	×	×	×	○	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×	
果	ブドウ	◎	—	—	○	△	△	○	◎	◎	○	△	◎	◎	◎	×	×	△	×	×	○	
	カキ	◎	—	—	○	×	×	×	△	△	×	○	×	◎	×	×	×	×	×	×	1)	
	クリ	○	—	—	×	×	×	×	△	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	
	ビワ	○	—	—	×	×	×	×	×	△	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	
	オウトウ	◎	—	—	○	×	×	×	△	×	×	○	△	◎	○	×	×	×	×	△	×	
	西洋ナシ	◎	—	—	×	×	×	△	△	×	×	○	△	◎	○	×	×	×	×	△	×	
	パイナップル	◎	—	—	×	×	×	×	◎	×	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	
	ブルーベリー	◎	—	—	△	×	×	×	○	×	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	
	キウイ	◎	—	—	△	×	×	×	◎	×	○	○	△	◎	×	×	×	×	×	×	◎	
	樹	ザクロ	◎	—	—	×	×	×	×	○	×	○	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×
カンキツ		◎	—	—	◎	◎	○	◎	△	◎	◎	◎	△	◎	◎	×	×	○	○	◎	◎	
リンゴ		◎	—	—	○	△	△	○	◎	△	×	○	○	◎	◎	×	×	△	×	×	○	
日本ナシ		◎	—	—	×	×	×	×	△	△	×	×	○	◎	◎	×	×	×	×	×	×	
モモ	◎	—	—	◎	×	×	×	○	○	×	×	△	◎	◎	×	×	×	○	×	△		

作物群	分類 作物名	植物体再分化技術											細胞育種技術										備考：× 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術
		培養系技術	茎頂培養系	腋芽培養系	枝条・端・培養系	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	未受精胚培養系	体細胞不定芽形成系	体細胞胚形成系	懸濁細胞培養系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術	半数体育種技術	細胞選抜技術	細胞融合技術	組換えDNA技術	
作物	スモモ	◎	—	—	○	×	×	×	△	×	×	△ ³⁾	△	◎	◎	×	×	×	×	×	×	△	報告あり
	アンズ	△	—	—	○	×	×	×	△	×	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	△	報告あり	
	ウメ	×	—	—	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
樹	スギ	○	×	○	◎	×	×	×	×	×	△ ¹⁾	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×		安定技術
	ヒノキ	×	×	○	◎	×	×	×	×	×	△ ²⁾	△	×	○	×	×	×	×	×	×	×		
	アカマツ	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	△ ²⁾	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
	クロマツ	×	×	○	◎	×	×	×	×	×	△ ²⁾	×	×	△ ³⁾	×	×	×	×	×	×	×		
	ワカマツ	×	×	◎	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
	カラマツ	×	○	○	◎	×	×	×	×	○	×	△	×	△	×	×	×	△	×	×	○		
	グイマツ雑種	○	×	○	◎	×	×	×	△ ⁴⁾	×	×	×	×	△	×	×	×	×	×	×	×		
	イヌマキ	×	×	△	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
	ヒムロ	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
	カリビアマツ	×	×	○	○	×	×	×	×	○	△	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
	ドイツトウヒ	×	×	○	○	×	×	×	○	◎	○	○	×	○	×	×	×	×	×	×	△		
	ラジアータマツ	○	×	×	◎	×	×	×	×	○	○	△	○	◎	×	×	×	×	×	×	△		
	テーダマツ	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	○	△	×	◎	×	×	×	×	×	×	△		
	ギンドロ	◎	×	◎	×	×	×	×	○	×	○	◎	×	○	×	×	×	×	×	○	×		
	ヤマナラシ	×	×	○	×	○	×	×	○	×	○	◎	×	○	×	×	×	×	×	○	△		
	ヒロハハコヤナギ	◎	×	◎	×	○	×	×	○	×	×	○	×	○	×	×	×	×	×	○	×		
	木	ポプラ類	◎	×	◎	×	○	×	×	○	○	◎	×	◎	×	×	×	△	×	○	○		
		トチノキ	○	◎	×	×	△ ⁵⁾	△ ⁶⁾	×	×	◎	×	×	×	○	×	×	×	△	×	×		
		シラカンバ	◎	○	◎	×	×	×	×	○	△ ⁷⁾	○ ¹⁾	△	×	◎	×	○	×	×	×	×		
		クヌギ	×	◎	×	◎	×	×	×	×	○	○	△ ⁸⁾	×	◎	×	○	×	×	×	×		
コナラ		×	◎	×	◎	×	×	×	△ ⁹⁾	○	○	×	◎	×	×	×	×	×	△	×			
ミズキ		◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×			
キハダ		×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×			
ミツマタ		×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×			
キリ		◎	×	×	×	×	×	×	○	×	△	×	◎	○	△ ¹⁰⁾	×	×	×	×	×			
ミズメ		○	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×			
シナノキ		×	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×			
サクラ		○	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×			
フユボダイジュ		×	○	×	×	×	×	×	△ ¹¹⁾	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×			
ユーカリ	◎	◎	○	×	×	×	△	△	△	◎	×	◎	×	×	×	×	○	△	○				
アキニレ	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×				

作物群	分類 作物名	植物体再分化技術										細胞育種技術							備考: × 未開発 △ 報告あり ○ 可能 ◎ 安定技術				
		培養系技術	茎頂培養系	腋芽培養系	枝条・端・培養系	胚培養系	葯培養系	花粉培養系	未受精胚培養系	体細胞不定芽形成系	体細胞胚形成系	懸濁細胞培養系	プロトプラスト培養系	遺伝資源保存技術	大量増殖技術	ウイルスフリー化技術	人工種子作成技術	試験管内受精技術		半数体育種技術	細胞選抜技術	細胞融合技術	組換えDNA技術
樹	イヌエンジェ	×	×	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ケヤキ	×	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ハゼノキ	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	ニセアカシア	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
木	ヤマモモ	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	カジノキ	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	コウゾ	×	○	◎	×	×	×	×	○	×	○	◎	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	△
	タバコ	◎	-	-	◎	◎	◎	○	◎	◎	○	◎	◎	◎	-	-	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎

〔技術評価〕

- × 未開発 研究が行われていないか、または、実施されていても未だ成果が報告されていない。
- △ 報告あり 一報でもポジティブな報告がある。
- 可能 複数の研究者から報告があり、再現性が確かめられている。
- ◎ 安定技術 該当培養系を用いた開発研究が行われている。

3. 細胞育種技術の進捗状況文献

1992年調査で新たに△, ○または◎になったものを中心に記載、新たに設けた項目、作目については古い文献も記載)

普通作物

イネ

- 1) Ogawa, T. et al. (1992) *Japan J. Breed.* 42 : 675-679
- 2) Vasil, V. et al. (1992) *Bio/Technology* 10 : 667-674
- 3) Fatokum, C.A. and B.B. Singh (1987) *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 9(3) : 229-234
- 4) Ling, G.K. et al. (1987) *Seiken Zihō* 35 : 34-38

- 7) 宍田幸男ら (1991) 群馬農業研究 (A) 総合 8 : 1-10
- 8) 小林光子・米内貞夫 (1991) 栃木農研報 38 : 147-160

特用作物

サトウキビ

- 1) Moore, P.H. et al. (1989) *Proc. Int. Soc. Sugarcane Technologists* 20 : 599-607
- 2) Moore, P.H. and M. Fitch (1989) Sugarcane (*Saccharum* spp.) anther culture studies. Haploid in crop improvement 1 (by Y.P.S. Bajaj, Springer-Verlag) 480-497
- 3) Taylor, P.W.J. et al. (1992) *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 28 : 69-78
- 4) Nagai, C. and A. Maretzki (1991) Gene gun transformation of sugarcane. HSPA 50th Annual Conference (Poster)
- 5) Maretzki, A. et al. (1990) Development of a transformation system for sugarcane, Abst. 7th Int. Assoc. Plant Tissue Cult., Amsterdam. 68
- 6) 下山 淳 (1986) 日作紀 55(3) : 381-382

飼料作物・芝草類

イタリアンライグラス・トールフェスク

- 1) Takamizo, et al. (1991) *MGG*. 231 : 1-6
- 2) Wang, et al. (1992) *Bio/Technology* 10 : 691-696
- 3) Ha et al. (1992) *Plant Cell Rep.* 11 : 601-604
- 4) 中住ら (1992) 草地学雑誌 38巻別号 : 111-112
- 5) Creemers-Molenaar et al. (1992) *TAG*. 84 : 763-770
- 6) Akashi and Adachi (1992) *Plant Sci.* 82 : 213-218
- 7) Akashi and Adachi (1992) *Plant Sci.* 82 : 219-225
- 8) 浅野・宇垣 (1992) 育種学雑誌 42(別2) : 272-273
- 9) Terakawa et al. (1992) *Plant Cell Rep.* 11 : 457-461

野菜

メロン

- 1) 本間ら (1992) 育種学雑誌 42(別2) : 14-15
- 2) Park et al. (1992) *Hort Sci.* 27 : 89th Annual Meeting, Am. Soc. Hortic. Sci. 618

- タマネギ
- 3) 高柳ら (1992) 育種学雑誌 42(別1): 64-65
ネギ
 - 4) 下中ら (1991) 育種学雑誌 42: 別1 64-65
ニンニク
 - 5) 佐藤ら (1991) 園芸学雑誌 60: 別2: 252-253
アスパラガス
 - 6) Kohmura, K. et al. (1992) *Plant Cell Rep.* 11: 433-437
ニンジン
 - 7) 胡ら (1992) 園芸学雑誌 61(別1): 202-203
ゴボウ
 - 8) 小林 (1992) 園芸学雑誌 61(別2): 280-281
サトイモ
 - 9) 軽部ら (1992) 育種学雑誌 42(別1): 58-59
 - 10) 村上ら (1992) 園芸学雑誌 61: 367-374
ヤマノイモ
 - 11) 甲村ら (1991) 園芸学雑誌 60(別1): 220-221
ハウレンソウ
 - 12) Goto and Miyazaki (1992) 植物組織培養 9: 15-21
 - 13) 佐藤ら (1992) 育種学雑誌 42(別1): 36-37
- 花き
- チューリップ
- 1) 西内義男 (1980) 昭和55年度園芸学会春季大会発表講演要旨, 360-361
カーネーション
 - 2) Van Altvorst, A.C. et al. (1992) *Scientia Hort.* 51: 223-235
ラン類
 - 3) Kuehule, A.R. and N. Sugii (1992) *Plant Cell Rep.* 11: 484-488
ストック
 - 4) 福住久代 (1986) 昭和61年度園芸学会秋季大会発表講演要旨, 332-333
トルコギキョウ
 - 5) Semeniuk, P. and R.J. Griesbach (1987) *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 8: 249-253
 - 6) Griesbach, R.J. and P. Semeniuk (1987) *J. Hered.* 78: 114-116
ヒマワリ
 - 7) Paterson, K.E. (1984) *Amer. J. Bot.* 71: 925-931
 - 8) Knittel, et al. (1991) *Plant Sci.* 73: 219-226
 - 9) Fischer, C. et al. (1992) *Plant Cell Rep.* 11: 632-636
シクラメン
 - 10) Geier, T. (1977) *Acta Horticulturæ* 78: 167-174
 - 11) 大橋一夫ら (1992) 園芸学雑誌 61(別1): 434-435
 - 12) 山口将憲ら (1992) 園芸学雑誌 61(別1): 430-431
プリムラ類
 - 13) 三位正洋 (1989) サクラソウ属植物の種間交雑 “バ
- イオホルティ 1” 農耕と園芸編集部編 誠文堂新光社, 29
- 14) 小田和子ら (1981) 昭和56年園芸学会春季講演要旨: 318-319
ゼラニウム類
 - 15) Qureshi, J.A. and P.K. Saxena (1992) *Plant Cell Rep.* 11: 443-448
バラ
 - 16) Lloyd, D. et al. (1988) *Euphytica* 37: 31-36
- 果樹
- カキ
- 1) 田尾龍太郎ら (1992) 園芸学雑誌 61(別1): 132-133
モモ
 - 2) Smigocki, A.C. and F.A. Hammerschlag (1991) *Plant. Sci.* 81: 253-259
スモモ
 - 3) Ochatt, S.J. (1992) *Plant Sci.* 81: 253-259
アンズ
 - 4) Laimer da Camara Machado, M. et al. (1992) *Plant Cell Rep.* 11: 25-29
- 樹木
- スギ
- 1) 石井克明・佐藤 享 (1990) 第101回日本林学会大会論文集 485-486
ヒノキ・アカマツ・クロマツ
 - 2) 笹本浜子ら (1991) 第102回日本林学会大会講演要旨集 89
クロマツ
 - 3) Ishii, K. and T. Sato (1989) Proc. 6th Int. Congr. Soc. Adv. Breed. Res. Asia and Oceania: 869-872
グイマツ雑種
 - 4) 鶴見和恒・山口善紀 (1992) 第103回日本林学会大会講演要旨集 141
トチノキ
 - 5) Kiss, J. et al. (1992) *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 30: 59-64
 - 6) Radojevic, L. et al. (1989) *Plant Cell Organ Cult.* 17: 21-26
シラカンバ
 - 7) Kurten, U. et al. (1990) *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 23: 101-105
クヌギ
 - 8) Ide, Y. et al. (1992) *J. Jpn. For. Soc.* 74: 109-113
コナラ
 - 9) Sasamoto, H. and Y. Hosoi (1990) Abstr. 7th Int. Congr. Plant Tissue Cell Cult. 36
キリ
 - 10) 木下 勲・西川浩己 (1992) 第103回日本林学会大会講演要旨集 144
フユボダイジュ
 - 11) Chalupa, V. (1992) *Plant Cell Rep.* 9: 398-401

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制作しました。全5巻は次のような構成です。

バイオテクノロジーマニュアルシリーズ

◆植物編

- 第1巻 植物バイオテクノロジーの世界 (上映時間30分)
- 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クエンシング (上映時間44分)
- 第4巻 DNA分析技術の応用 (上映時間25分)

◆畜産編

- 第5巻 牛の体外受精技術 (上映時間38分)

第1巻は植物分野の技術全体の流れを、第2巻～4巻ではイネの遺伝子組換えを中心とした技術手順をマニュアルとしました。また第5巻では「和牛屠体の卵巣を利用した体外受精技術」を紹介しています。

構成にあたっては、具体的な技術を手順を追って紹介するだけでなく、これらの研究開発の方向が見えるように配慮しました。映像で紹介できなかったデータ類は添付した解説書に記載してあります。若手研究者だけでなく、高校生や生物系及び農学系大学生のオリエンテーション用として最適の内容です。

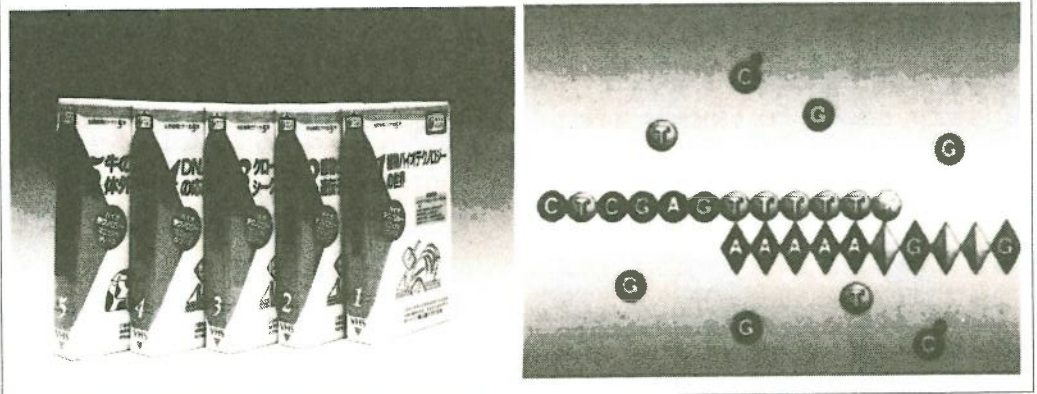
どの巻も、基礎知識があることを前提しているため内容は高度ですが、生産現場での応用例も合わせて紹介している第1巻及び第5巻は、バイオテクノロジー入門編として、一般の方にもご覧いただけます。ぜひご購入してご活用ください。

定価 各30,000円(税込み) 送料 600円
 全5巻特別価格 140,000円 送料 1,000円
 植物編全4巻 110,000円 送料 1,000円

お申し込みは販売を担当している下記まで

(社)農山漁村文化協会(略称 農文協)

〒107 東京都港区赤坂7-6-1 Tel 03-3585-1141 Fax 03-3589-1387



編集後記

購読会員、執筆者ならびに関係の皆様の温かい御理解と御協力により、平成4年度は予定どおり31～36号を発行することができました。心からお礼申し上げます。

本年は、明治26年（1893年）に農事試験場（本場）が、東京都北区西ヶ原に設置され、わが国の農事研究が本格的に始ってから一世紀になります。これを記念して、11月17日には「農業試験研究一世紀事業」記念会の開催が予定されています。

本誌は、同事業に協賛して、本年度は農業関係各分野のバイオテク研究の現状を紹介する特集号とすることを企画しています。5月発行の37号は「イネのバイオテクノロジー」を予定しています。38号以降取り上げる分野・課題は、まだ決っていませんので、御意見、御要望等を生研機構あるいは編集係までお寄せいただきますよう、お願いいたします。

（大畑記）

ブレイン テクノニュース（第36号）

平成5年3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