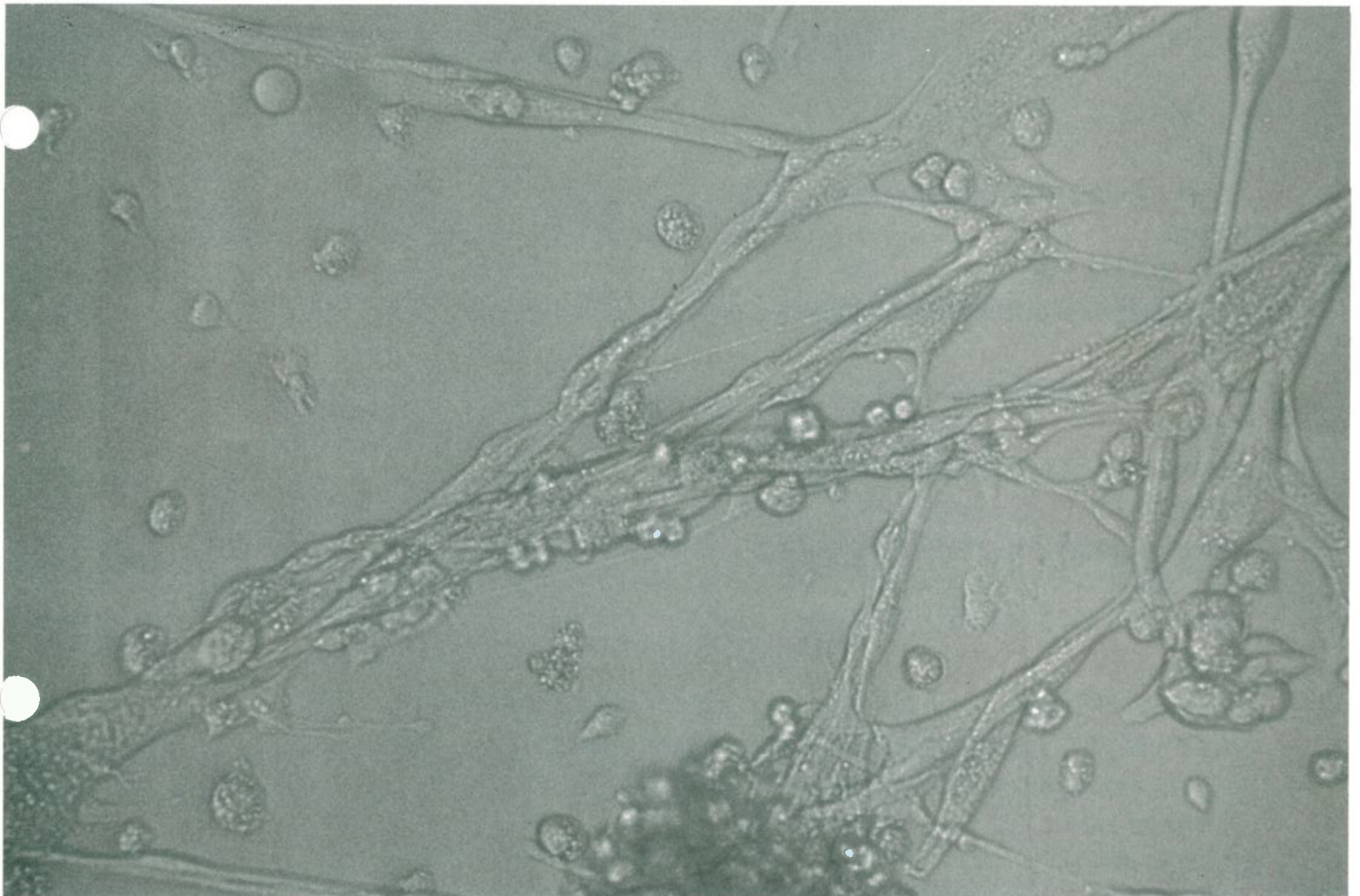


BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

MAY 15, 1994



表紙説明

拍動する昆虫筋肉の培養細胞系

絹をつくる昆虫の一種サクサンの筋肉細胞の培養系は、分裂・増殖した細胞がネットワークを形成すると、リズムカルに拍動を開始する。世界で初めて作出されたこの培養細胞系は筋肉の形成機構や薬理作用の研究などへの貢献が期待される。

(写真提供 井上 元氏)

総説	1
リボザイムの生物産業への応用	
国内情報	5
海洋微細藻類によるDHA生産, ダニアレゲン, ナタネ種子の成分改良, ビトリフィケーションの回避法, ソフトタイプチーズ	
文献情報	25
外被タンパク遺伝子導入によるウイルス抵抗機構, サリチル酸による全身獲得抵抗, イネいもち病の病原性遺伝子, アルコール発酵酵母の育種	
国際学会レポート	30
第2回国際昆虫分子生物学会	

本号の紙面

口 絵

総 説

井上 丹

リボザイムの生物産業への応用の可能性……………1

国内情報

松永 是・岩本 香

海洋微細藻類によるDHA生産とその利用……………5

奥村 康

ダニアレルゲン研究の現状……………9

村瀬淳子

遺伝子組換えによるナタネ種子成分の改良……………13

佐藤正紀

試験管内幼植物のビトリフィケーション回避法……………18

鈴木一郎

一村一品的“ソフトタイプチーズ”の開発……………21

文献情報

Cosuppression は外被タンパク質を介したウイルス抵抗性の機構を説明できる？……………25

サリチル酸の関与する植物の全身獲得抵抗性には活性酸素が働いている……………26

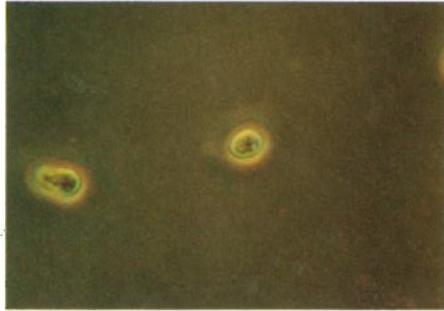
イネいもち病菌の病原性に関与する遺伝子……………27

乳酸発酵能を導入したアルコール発酵酵母の育種……………28

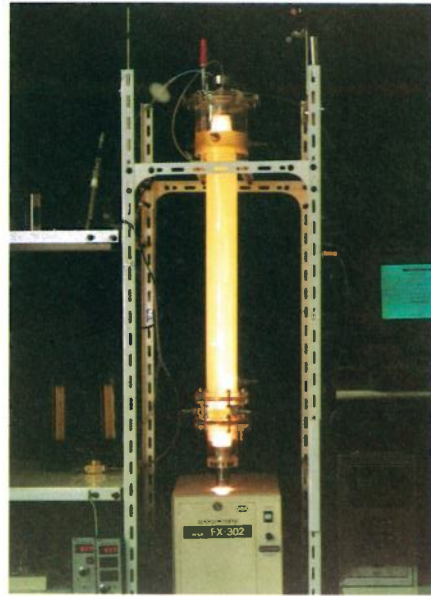
国際学会レポート

第2回国際昆虫分子生物学会に参加して……………30

海洋微細藻類によるDHA生産とその利用 (本文 5 ページ)

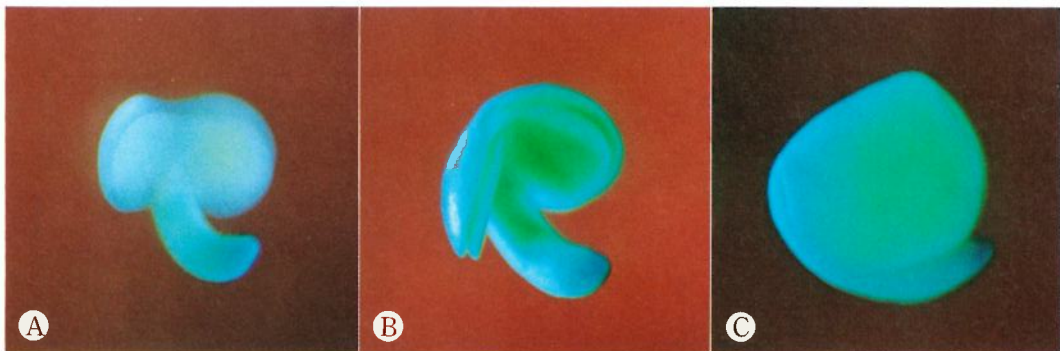


DHA含有海洋微細藻類
Isochrysis galbana



フォトバイオリアクター

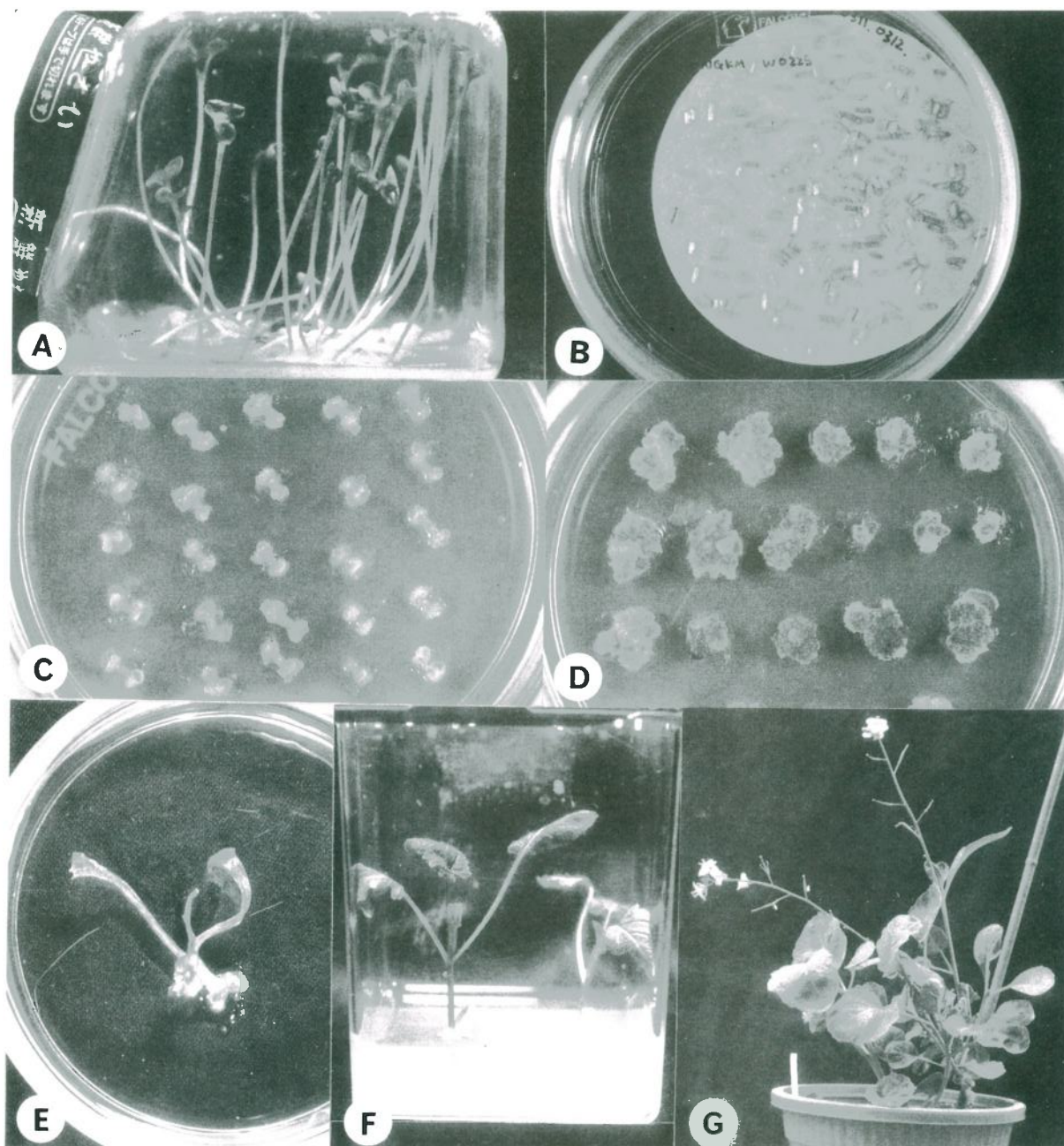
遺伝子組換えによるナタネ種子成分の改良 (本文 13 ページ)



種子特異的にGUS遺伝子を発現(青色になる)しているナタネの胚

A: 受粉後23日目の胚, B: 受粉後27日目の胚, C: 受粉後30日目の胚

遺伝子組換えによるナタネ種子成分の改良 (本文 13 ページ)



ナタネ形質転換のステップ

無菌発芽させた10~20日の胚軸を用いる(A)。遺伝子の導入にはアグロバクテリウム細菌を媒介として目的の遺伝子を植物体に組込む(B)。遺伝子導入された細胞は緑色のカルスを形成し、ここから植物体が再生する(C~G)。

リボザイムの生物産業への応用の可能性

京都大学 理学部
井上 丹

1. はじめに

遺伝子発現の RNA レベルでの制御法として、人工的にデザインされたリボザイムを用い、細胞内で特定の mRNA のみを切断しその機能を止める手法が1980年代後半に考案された。この方法の実用化に向けてさまざまな試みがおこなわれている¹⁾。この方法は、アンチセンス法としてしられる既存の手法(ターゲットとなる RNA の相補鎖を人工的に作成して対合させ、その機能を阻害する手法)延長線上にあるものとして捉えることができる²⁾。すなわち、アンチセンス法と同様に目的の RNA の特定の塩基配列に相補的な塩基配列をもってそれと対合し、さらに特定のリン酸ジエステル結合を切断する機能をもつリボザイムを作成し、RNAase 活性によりターゲットとなる RNA の機能を阻害するシステムである。アンチセンス法の応用と同様、今後、植物でのリボザイムをもちいた特異的な RNA の発現制御への応用が注目される。現時点では、この手法は、とくにエイズウイルスをはじめとする抗ウイルス剤、または抗癌剤としての応用が期待されており、すでに米国ではその実用化に向けて、臨床実験が進行している。

本稿ではリボザイムとこれを用いる特定の RNA を切断するための分子デザイン、また、それらの応用について、現状と問題点、今後の可能性について簡略に紹介する。

2. リボザイム

1980年代初期に発見された酵素活性をもつ RNA であるリボザイムは、その後、さまざまな種類のもので発見され、リン酸ジエステル結合を切断する様式により L-リボザイムと S-リボザイムの二種類に分類されている³⁾。L-リボザイムは数百ヌクレオチドからなり、5'リン酸を生じるように RNA を切断する。一方、S-リボザイムは40~50程度のヌクレオチドからなり、反応の結果2',3'環状リン酸を生じる。それぞれのリボザイムは、マグネシウムイオンなどの二価金属イオンをその活性に必要とするが、タンパク質などのファクターは酵素活性そのものに必須ではない。

L-リボザイムとしては、真核生物のミトコンドリア、葉緑体におもに存在するグループ I イントロン RNA およびグループ II イントロン RNA と原核生物、真核生物をとわず tRNA 前駆体を特異的に切断する RNAaseP の RNA 成分 P-RNA の3種類が知られている³⁾。これらはいずれも基質認識、活性部位などの機能をになう異なる構造単位が一分子 RNA 内に集積して構成されているリボザイムであり、複数の RNA とタンパク質を構成成分とする同様の活性を持つプライソゾームやリボゾームの原型と考えられている。

また、S-リボザイムは、植物に病原性のあるウイロイド、植物ウイルスのサテライト RNA などの一部となって存在しているものが多く、その二次構造の型からハンマーヘッド型リボザイム、ヘアピン型リボザイムが知られており、ほかにデルタ型肝炎ウイルス

RNAの一部分を構成するものなどが知られている¹⁾。S-リボザイムはそのサイズが小さいため化学的に合成することも可能であるなど実験を行う上での利点がある。このリボザイムは、本来は自己切断が自己触媒的に起こるRNAであるが、基質部分と酵素部分の二つの部分に分割し、それぞれを基質RNAと酵素RNAとして二分子のシステムとして再構築することが可能であり、この利点を活かして抗ウイルス剤などの開発が活発に試みられている¹⁾。

このようにさまざまなリボザイムの存在およびその性質が知られてきているが、現時点ではいずれのものについても、それらの三次構造および反応機構については解明されていない。

3. 方法とデザイン (*in vitro*)

リボザイムによるターゲットRNAの切断のためのデザインは、L-リボザイムを用いる場合もS-リボザイムの場合も同様である。基本的にはターゲットRNAに特有の塩基配列を切断部位として設定し、これに相補的に対合する塩基配列をその高次構造上活性部位の近傍にもつリボザイムを作成することにより完了する。図にS-リボザイムを用いる場合、L-リボザイムを用いる場合それぞれ2

例をあげて解説する。

A. ハンマーヘッド型リボザイム⁴⁾ (図1)

ウイロイドなどにみられるハンマーヘッド型リボザイムは、その名が示すように13の共通塩基配列を中心に金槌状の二次構造を活性中心にもつS-リボザイムである。このリボザイムは、矢印でしめす切断部位とその上流および下流の塩基配列を含む基質RNAと残りの部分から構成される酵素の二分子から成り立つシステムを構築することができる。この場合切断部位の5'側のヌクレオチドは、C、AまたはUのいずれでもよいが、その上流のヌクレオチドは共通配列の一部であるUであることが反応の効率を下げないために必要である。したがって、UA、UCまたはUUを切断したい部位にもつ任意の基質RNAに対して、対応するリボザイムを作成することができる。

B. ヘアピン型リボザイム⁵⁾ (図1)

タバコリングスポットウイルス由来のヘアピン型リボザイムは、図に示すように約50のヌクレオチドから構成されるヘアピン状の二次構造を持つ自己切断が自己触媒的に起こるRNAである。このRNAもハンマーヘッド型リボザイムの場合と同様に、基質と酵素の二つの分子に分割が可能で、酵素機能をもつ部分は塩基配列特異的に基質の切断を行うS-リボザイムとして働くことが知られている。

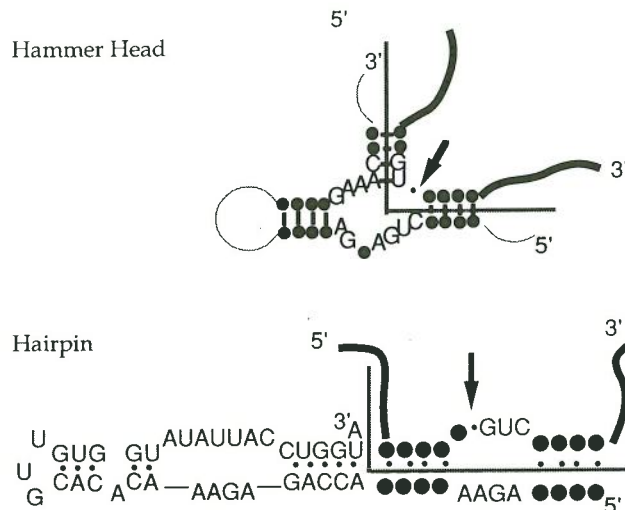


図1 ハンマーヘッド型リボザイムとヘアピン型リボザイムによる基質RNAの切断
基質RNAとリボザイムRNAの相互作用を示す。
矢印が基質RNAの反応点。これとワトソン-クリック型相補対をもつRNAがリボザイム。

Group I

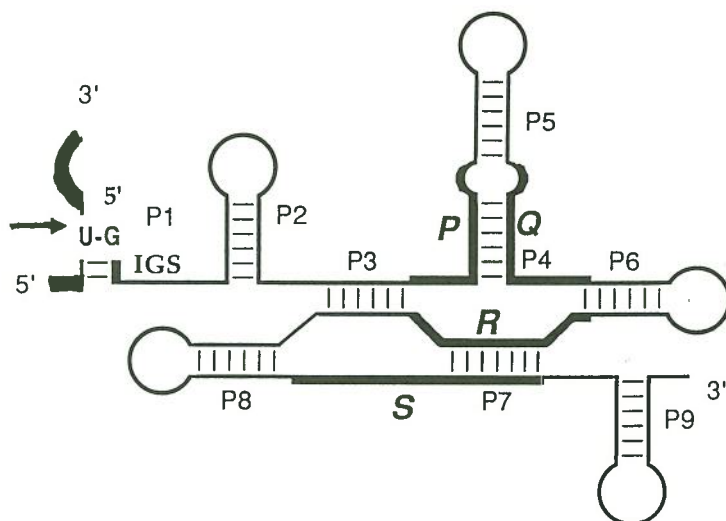


図2 グループ I イントロンによる基質 RNA の切断

基質である左端の RNA とグループ I イントロンの 5' 末端の IGS との相互作用を示す。矢印が基質 RNA の反応点。反応点の 5' 側のヌクレオチドは U、また対応する IGS のヌクレオチドは G。

このリボザイムの基質としては、切断部位の下流に GN(=U, CorA)N'(=AorC) をもつことが要求される。また、リボザイムとしての活性はハンマーヘッド型のものより高いと考えられている。

C. グループ I イントロン型リボザイム⁶⁾
(図2)

L-リボザイムの代表的なものであり、特にテトラヒメナの rRNA 前駆体に存在するものが、活性が高きさまざまな解析がなされてきた。このリボザイムも元来ワトソン-クリック型の塩基配列の対合により認識される切断点に、グアノシンを反応させることにより自己を切断する RNA である。そのため、S-リボザイムと同様に基質と酵素の二つの分子に分割が可能であり、切断面の 5' 側のヌクレオチドが U (または C) である以外には基質の塩基配列に制約がない。

D. P RNA (RNAaseP)⁷⁾ (図3)

tRNA 前駆体の 5' 末端を選択的に切断する RNA を活性中心にもつ酵素であり、原核生物、真核生物を問わず細胞内に存在する。この酵素の RNA 成分は L-リボザイムであり、一般的に P RNA とよばれている。細胞内で mRNA などを基質として P RNA を働かせるために、tRNA のアクセプターステムから D-ループへかけてのワトソン-クリ

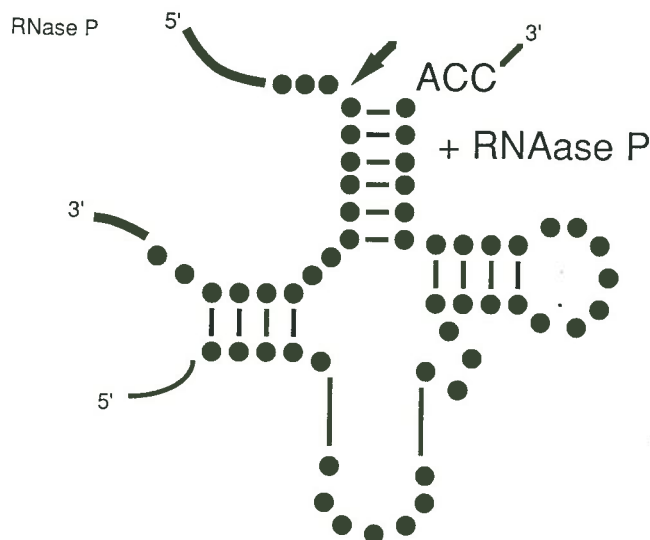


図3 RNAasePによる基質 RNA の切断

左の RNA が基質。これとワトソン-クリック型相補対により相互作用をする RNA は EGS とよばれる。EGS の 3' 端に ACC が要求されるが、これ以外の塩基配列に関する制約はない。これらが、tRNA 様の高次構造をとり基質として RNAaseP により認識され、矢印で示す反応点で切断される。

ック型の塩基配列の対合を基質と EGS とよばれるガイド RNA の二分子間につくらせ、これをリボザイムに認識させるという手法をもちいる。

これらのリボザイムの特徴を活かすように、ターゲットとなる RNA の特定の塩基配列を選んで反応点とするが、ターゲットとなる RNA とリボザイム双方に対合する部分で特殊な高次構造を取らせない設計が必要である。

4. 応用 (*in vivo*)

リボザイムは、生体内にもともと存在する核酸を成分とするため、安全性の面では問題がない。しかし、ある細胞内の特定の RNA の切断を目的としてデザインするには、RNA 酵素としての活性と基質選択性以外に、その細胞内での安定性(ヌクレアーゼ耐性など)、ウイルスなどのベクターやプロモーターなど発現システムの設定、目標となる細胞への輸送(ドラッグデリバリーシステム)などの問題を解決する必要がある。この手法は、抗ウイルス剤、または抗癌剤としての応用が期待されており⁸⁾、特にエイズに関する培養細胞をもちいた実験例が注目されている^{5, 9)}。アンチセンス法が適用されるシステムすべてに適用が可能のため世界中で数多くの試みがなされていると思われるが、特許上の問題などで公表されていないものが多いと思われる。また、今後、動物、植物を問わずジーンターゲット法への適用が困難な場合に、ターゲットとなる遺伝子の発現を転写産物のレベルで抑える手段として、リボザイムを用いる試みが活発になるものと考えられる。

5. 今 後

現段階では、リボザイムを真の意味で生物産業に応用するには、上記のさまざまな問題を克服する必要がある。しかし、最近、リボザイムを改変して活性を高めるため、また、あるリボザイムにとって最適の基質をデザインするために、*in vitro* RNA 選択法という逆転写と PCR を組み合わせた手法がみだされ、リボザイムによる反応の効率の向上が

図られ成功をおさめてきている^{10, 11)}。これは、タンパク質酵素の改良に際しては適用が不可能なりボザイムの場合にのみ適用できる方法であり、リボザイムの活性ばかりではなく、細胞内での安定性、発現、輸送の効率の向上などを図る上でも応用が可能な手法である。また、リボザイムの反応のメカニズム、立体構造などの問題も、近い将来に解明されることが期待されリボザイムに関する知見が蓄積されてくることが予想されるため、今後のそれらの成果の応用への適用が期待できる。

文 献

- 1) 大塚栄子ら (1993) 細胞工学 特集「リボザイムの機能と進化」12: 339-276
- 2) 横山一成ら (1994) 細胞工学 特集「アンチセンス核酸の分子構造と機能」13: 255-310
- 3) Ceck, T.R. (1993) *The RNA World* (Cold Spring Harbor Laboratory Press) 239-269
- 4) Haseloff, J. and Gerlach, W.I. (1988) *Nature* 334: 585-591
- 5) Yu, M., Ojiwang, J., Yamada, O., Hampel, A., Rapaport, J., Looney, D. and Wong-Staal, F. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6340-6344
- 6) Zaug, A.J., Been, M.D. and Cech, T.R. (1986) *Nature* 324: 429-433
- 7) Yuan, Y. and Altman, S. (1994) *Science* 263: 1269-1273
- 8) Sullenger, B.A. and Cech, T.R. (1994) *Science* 262: 1566-1569
- 9) Saver, S., Cantin, E.M., Chang, P.S., Zaia, J.A., Lande, P.A., Stephens, D.A. and Rossi, J.J. (1990) *Science* 247: 1222-1225
- 10) Szostak, J.W. (1992) *Trends Biochem. Sci.* 17: 89-93
- 11) Joyce, G.F. (1992) *Sci. Am.* 267: 90-97

海洋微細藻類による DHA 生産とその利用

東京農工大学 工学部
松永 是・岩本 香

1. はじめに

DHA (ドコサヘキサエン酸) は、炭素数22、不飽和結合6か所の ω 3系の高度不飽和脂肪酸の1種である。DHA は、脳の神経組織やヒトの網膜、心臓、精子、母乳中に多く含まれており、細胞膜の脂質二重膜に主にリン脂質として組み込まれている。DHA, EPA (エイコサペンタエン酸), GLA (γ -リノレン酸) などの高度不飽和脂肪酸は、生体の代謝生理に大きく関与し、ヒトの生体の正常な機能発現に重要な働きを有していると考えられている。近年高齢化が進むわが国において、食生活の欧米化にともない血栓症を基盤として発症する脳梗塞などの疾患が増えているが、それを予防する物質として、DHA, EPA が注目を浴びている¹⁾。DHA の薬理作用としてはコレステロール及び中性脂肪低下作用、制ガン作用、抗アレルギー作用、学習機能向上作用、健脳作用、更に老人性痴呆症などに対する効果も示されている¹⁾。これらの高度不飽和脂肪酸は、化学合成が困難なため天然物から摂取しなくてはならない。現在これらの高度不飽和脂肪酸の供給源は魚油であるが、その起源は魚の餌である微細藻類などの海洋微生物であることが知られている。現在、海洋微生物を利用した DHA 生産に関する研究が行われている。海洋微生物の中でも海洋微細藻類は、太陽エネルギーと海水中の栄養塩及び CO₂ で生育でき、その生育速度は大型藻類や魚介類などに比べて早く、大量培養が

可能であるため、これを用いた有用物質生産について研究が行われている。ここでは海洋微細藻類を利用した DHA の効率的な生産、及び、DHA 高含有微細藻類の水産用餌料への利用について述べる。

2. DHA 高含有微細藻類のスクリーニング

海洋微細藻類の脂質、脂肪酸に関しては、比較的多くの報告がある。そこで各地の微細藻類のカルチャーコレクションから比較的高度不飽和脂肪酸含量が高く DHA 生成が確認されている微細藻類の藻体中の含有量について比較を行った。その結果、藻体中の DHA 含量は *Isochrysis galbana* が最も高かった²⁾ (表1)。

脂肪酸が局在する脂質の種類は、その生理作用、利用法を考える上で重要である。*I. galbana* における含有脂質を薄層クロマトグラフィーで調べたところ、DHA は、主としてリン脂質中に局在し、その他中性脂質にも含有されていることが分った。

この *I. galbana* を用いて、フォトバイオリアクターによる DHA 生産を行うこととした。フォトバイオリアクターによる生産を行う上で重要なパラメーターである *I. galbana* の培養温度について調べた。培養温度10℃から35℃の範囲で、*I. galbana* の DHA 生産量を比較した。DHA 生産量は、藻体生産量及び藻体中の DHA 含有量から算出した。その結果、25℃で培養を行うことによって生産量が最大となった。

表1 各種海洋微細藻類の脂肪酸含量 (単位: mg/g乾燥藻体)

脂肪酸	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Pavlova lutheri</i>	<i>Cricosphaera carterae</i>	株 <i>Cryptomonas</i> sp.	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	<i>Chaetoceros gracilis</i>
C14以下	30.6	6.6	6.3	7.0	24.1	18.2
C16:0	18.6	9.7	26.4	15.3	17.5	31.4
C16:1	8.6	16.9	19.0	10.2	28.1	41.9
C17:0	2.8	—	8.4	0.7	6.7	0.6
C18:0	—	0.8	6.5	2.7	4.3	3.8
C18:1	36.3	7.7	31.7	26.8	3.2	3.9
C18:2	1.6	3.5	9.2	3.8	—	0.3
C18:3	—	0.1	—	—	—	0.2
C18:4	32.9	0.5	6.1	1.4	0.3	0.3
C20:0	9.6	0.1	6.6	4.4	—	—
C20:2	1.2	—	—	—	—	—
C20:3	—	—	—	0.3	—	0.1
C20:4	—	0.1	—	—	0.1	—
C20:5	0.2	3.0	0.4	0.7	4.3	5.1
C22:1	0.2	—	—	—	—	—
C22:6	5.4	2.7	1.5	0.6	0.4	0.2
C24:0	0.2	—	—	0.2	—	0.9
C24:1	—	0.3	—	—	—	—

3. フォトバイオリアクターによる DHA 生産

微細藻類の培養をコントロールする条件として光, CO₂, 温度, 培地成分がある。これらの要因を最適化することによって, その微細藻類がもつ光合成能力を発揮させることができる。中でも光は微細藻類の光合成に不可欠な唯一のエネルギー源であり, その供給方法は微細藻類の培養システムにおいて最も重要な因子である。藻体懸濁液に外部から光を照射すると, 藻体に光が遮られ, 培養液内部まで光が十分に供給されない。微細藻類を効率よく培養するためには, 培養液内部に十分に光を供給する必要がある。培養液内部の光強度を均一にし, かつ, 培養に必要な光を十分に供給することが可能なフォトバイオリアクターを用いた³⁾。このフォトバイオリアクターは, アクリル製カラム(70mm×900mm)を培養器とし, そこに外径1mmの側面から光が分散する処理をした光ファイバーが1mm間隔で661本挿入してある。培養液内の光環境を最適化したこのフォトバイオリアクターを用いることによって, 海洋ラン藻を10g/l以上の高密度まで培養できることが確認

されている⁴⁾。

このフォトバイオリアクターを用いて, *I. galbana* による DHA 生産量の増大を試みた²⁾。その結果, リアクター内に挿入した661本の光ファイバーの表面の光強度が $4.5 \mu \text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の時, 1日当たりの藻体増殖量は 0.36g/l と最大となった。これは, これまでの培養法による生産量の約3倍である。藻体中の DHA 含量は, ファイバー表面の光強度 $3.4 \mu \text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上の光強度で, 光強度の

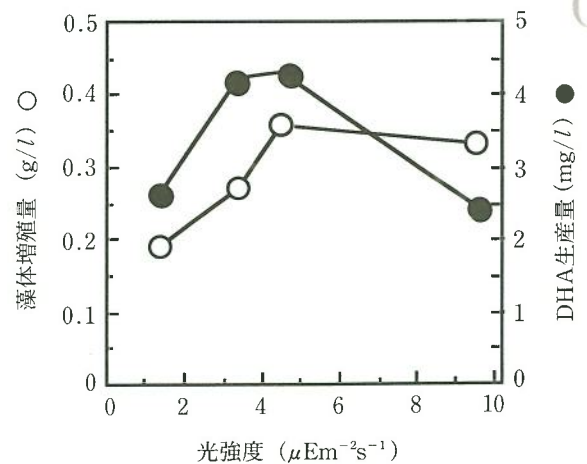


図1 藻体増殖量, DHA生産量に対する光強度の影響
初期細胞濃度: 0.72g/l
温度: 24°C
細胞はフォトバイオリアクターを用いEppley培地で1日間培養した。

増大と共に減少した。DHA 生産量は、ファイバー表面の光強度が $4.5 \mu E m^{-2} s^{-1}$ のとき最大となった (図1)。

培養液中の無機炭素濃度が減少すると、*I. galbana* 細胞への CO_2 の供給が律速となり生育速度が減少する。実際、フォトバイオリアクターで *I. galbana* を培養すると、培養液の pH は 9.5 にまで達する。この場合、リアクターへの CO_2 の供給は空気を 800 ml/min. の速度でバブリングすることによって行ったが、この程度の CO_2 供給では *I. galbana* が培養液から固定する CO_2 を補給できないことを示している。そこで、*I. galbana* の固定量に合わせて培地に CO_2 を供給するために、培地の pH の上昇を指標として CO_2 ガスを供給することとした。この方法によれば、過度の CO_2 の供給による培養液の pH の低下が起らずに、*I. galbana* の生育に適した pH 範囲で容易に制御することができる。このようなシステムを用いて pH 制御下で培養を行ったところ、DHA 生産量は pH 無制御の場合の 4.3 mg/l/day から 5.2 mg/l/day に増大した。

4. 暗処理・低温処理による藻体中 DHA 含有量の増加

微細藻類の脂肪酸組成は培養条件に左右されることが報告されている⁵⁻¹¹⁾。ラン藻 *Spirulina platensis* において培養液を一時的に暗所におくと、乾燥藻体 1 g 当たりの γ -リノレン酸の含量が増えたという報告がある¹²⁾。また、紅藻 *Polysiphonia coacta* において低温で培養すると、EPA の含量が増加したという報告がある¹³⁾。DHA の生産性を上げるためには、藻体増殖量、藻体中の DHA 含量を上げることが必要であるが、これらの報告をもとに、生育した細胞に対する各種の処理 (暗処理・低温処理) を試みた。その結果、低温 (15°C) 処理及び暗処理を同時に行うことによって、DHA 含有量を 12 時間の処理で 1.7 倍に増加させることができた (図2)。

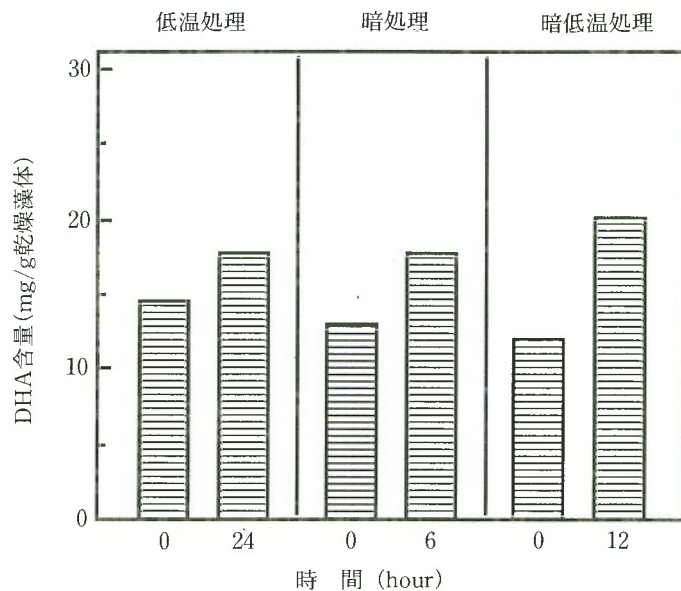


図2 DHA含量に対する低温, 暗処理の影響

5. *I. galbana* のワムシ餌料への応用

I. galbana は二枚貝の幼生や海産魚の稚魚の餌料として利用されている。ワムシは海産魚の種苗生産用初期餌料として広く使用されている。ワムシの培養には高度不飽和脂肪酸を多く含む餌料を必要とすることが分かっている。現在、ワムシの培養にはクロレラや酵母が使用されている。ここでは、DHA 含量の高い *I. galbana* のワムシ用餌料への応用を試みた。

I. galbana を二次培養に使用した場合の脂肪酸組成を調べた。*Chlorella regularis* でワムシを増殖させてから *I. galbana* をワムシに与えた。その結果 *I. galbana* を与えてから 24 時間後に DHA 含量が 4.3% になり *I. galbana* を二次培養に使用することにより効率よく餌料価値の高いワムシを生産することができた (表2)。

6. おわりに

DHA は、神経細胞の機能、特に記憶に関与していると考えられる。また、制ガン、コレステロール低下、血圧降下、抗炎症、抗アレルギー作用、視力低下を抑制する作用などの

表2 ワムシの脂肪酸量と脂肪酸組成

脂肪酸	一次培養した ワムシ		二次培養した ワムシ	
	(% TFA)	mg/g dry cells	(% TFA)	mg/g dry cells
C14:0	3.6	1.1	9.0	4.6
C16:0	23.9	7.0	16.1	8.1
C16:1	5.9	1.7	8.2	4.1
C16:2	—	—	1.4	0.7
C16:4	3.8	1.1	1.2	0.6
C18:0	—	—	1.9	1.0
C18:1	14.7	4.3	21.2	10.7
C18:2	26.5	7.8	7.1	3.6
C18:3 ω3	15.3	4.5	10.0	5.6
C18:4 ω3	—	—	9.1	4.6
C20:0	3.0	0.9	1.6	0.8
C20:5 ω3	3.3	1.0	6.0	3.0
C22:0	—	—	1.4	0.7
C22:6 ω3	—	—	4.3	2.2
Σ ω3	18.6	6.4	29.4	15.4
Σ ω3 HUFA	3.3	1.0	10.3	5.2

一次培養：Chlorella regularisで4日間培養

二次培養：Isochrysis galbanaで1日間培養

TFA：総脂肪酸

HUFA：高度不飽和脂肪酸

生理作用を有すると考えられており、健康食品や製薬原料として期待されている。魚類からの抽出物は、悪臭を有する交雑物が混在しやすく、精製に労力を要するという難点がある。微細藻類を利用することにより、これらの欠点を克服できる。

本研究では、フォトバイオリクターを用いることにより効率的にDHAの生産が行えることを示した。また、DHAを高含有するワムシに給餌した結果、餌料価値の高いワムシが得られたことから新規餌料としての可能性があることが示唆された。

文 献

1) 矢澤一良 (1992) *Petrotech.* 15(9) : 844-848

- 2) Burgess, J.G., Iwamoto, K., Miura, Y., Takano, H. and Matsunaga, T. (1993) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39 : 456-459
- 3) Matsunaga, T., Takeyama, H., Sudo, H., Oyama, N., Ariura, S., Takano, H., Hirano, M., Burgess, J.G., Sode, K. and Nakamura, N. (1991) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28/29 : 157-167
- 4) Takano, H., Takeyama, H., Nakamura, N., Sode, K., Burgess, J.G., Manabe, E., Hirano, M. and Matsunaga, T. (1992) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 34/35 : 449-458
- 5) Nichols, B.W. (1965) *Biochem. Biophys. Acta* 106 : 274-279
- 6) Pohl, P. and Wagner, H. (1972) *Z. Naturforsch.* 27 b : 53-61
- 7) Ackman, R.G., Tocher, C.S. and MacLacklan, J. (1968) *J. Fish. Res. Board Can.* 25 : 1603-1620
- 8) Baasch, K.H., Kohlhase, M. and Pohl, P. (1984) *Structure, Function and Metabolism of Plant Lipids*, Siegenthaler, P.A. and Eichenberger, W. eds, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 587-590
- 9) Piorreck, M. and Pohl, P. (1984) *Phytochemistry* 23:217-223
- 10) Piorreck, M., Baasch, K.H., and Pohl, P. (1964) *Phytochemistry* 23 : 207-216
- 11) Tuzuki, M., Ohnuma, E., Sato, N., Takaku, T. and Kawaguchi, A. (1990) *Plant Physiol.* 93 : 851-856
- 12) Hirano, M., Mori, H., Miura, Y., Matsunaga, N., Nakamura, N., Matsunaga, T. (1990) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24/25 : 183-191
- 13) Al-Hasan, R.H., Hantask, F.M., Radwan, S.S. (1991) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 35 : 530-535

ダニアレルゲン研究の現状

アサヒビール株式会社
奥村 康

1. はじめに

アレルゲンは、免疫応答の一つであるアレルギー症状を惹起させる抗原の総称であるが、その種類は多岐にわたっている。その中でも気管支喘息、アレルギー性鼻炎やアトピー性皮膚炎といったI型アレルギー疾患を引き起こす原因アレルゲンとして最も重要なものは室内塵（ハウスダスト）中のダニである（図1）。室内塵は多くの物質の混合物であり、その中のどの物質がアレルゲンとして重要であるかが明らかになったのは1960年代になってからであった。オランダのVoorhorstら¹⁾および日本の宮本ら²⁾によって、室内塵アレルゲンの本態はヒョウヒダニ属 (*Dermatophagoides*)のダニであることが明らかにされた。

ヒョウヒダニ属の中でアレルゲンとして重要な種はヤケヒョウヒダニ (*D. pteronyssinus*) とコナヒョウヒダニ (*D. farinae*) である。1980年代になってダニアレルゲンの分離精製と分析が開始され、多くのダニアレルゲンが報告されたが、主要ダニアレルゲンは主に2つのグループに属することが明らかになっている。

2. ダニアレルゲンについて

表1に、これまで明らかにされたダニアレルゲンを示す。この表に示すように *Der I* グループと *Der II* グループは、すでに遺伝子がクローニングされておりアミノ酸配列も解明されている。この表には記載していないが、分子量約60kDaのアミラーゼもアレルゲン

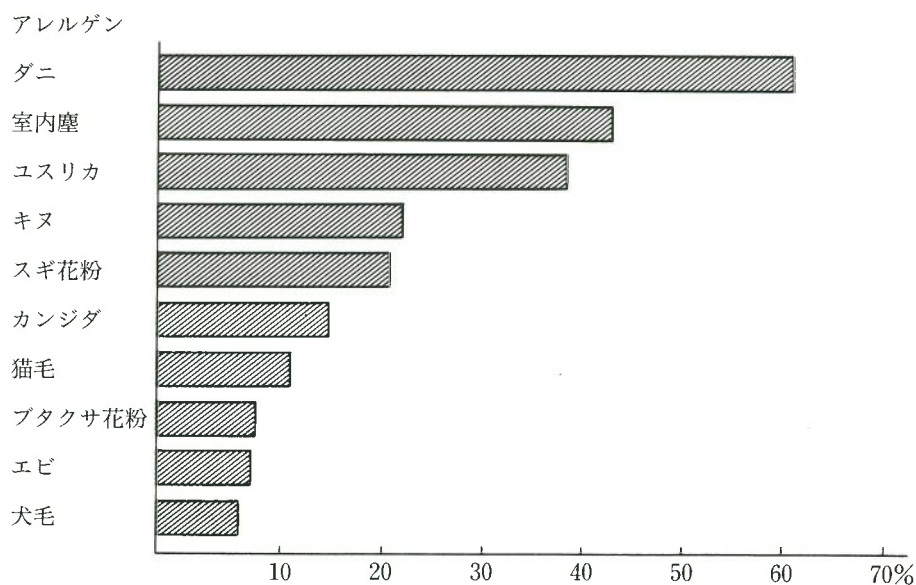


図1 喘息患者における皮膚テスト陽性率

表1 ダニアレルゲンの性質

グループ	アレルゲン名	分子量(kDa)	等電点	機能	糖鎖	遺伝子クローニング
I. Der I	<i>Der p</i> I	25	4.5-7.1	システインプロテアーゼ	有	済
	<i>Der f</i> I	25	4.7-7.2	同上	有	済
II. Der II	<i>Der p</i> II	14	7.6-8.5	不明	無	済
	<i>Der f</i> II	14	7.8-8.3	同上	無	済
III. Der III	<i>Der p</i> III	30	確定せず	セリンプロテアーゼ	不明	未
	<i>Der f</i> III	29	4.1-4.7	同上	不明	未

として認知されつつある。しかし、最も重要なアトピー性疾患の原因アレルゲンは *Der* I および *Der* II である。

Der I グループは、アミノ酸配列中に糖鎖が付加される部位 (Asn-X-Ser/Thr) が存在している。事実、虫体から精製した *Der f* I には糖鎖が検出されている。本アレルゲンはシステインプロテアーゼ活性を有し、ダニの消化管酵素と考えられている。また、プレプロ配列を持った形で翻訳されプロセッシングを受けて成熟型になるものと推定されている。

Der II グループは分子量 15kDa の単純タンパクで虫体における機能は解明されていない。*Der f* II 遺伝子は筆者らの研究室で3種分離した。この3種の間でダニアレルギー患者に対する反応性に差異はなかった。同じアレルゲンに対する遺伝子が複数存在する理由は、染色体 DNA の解析からダニ1個体に複数の遺伝子が存在するのではなく個体間の差であ

ることが明らかになっている。図2に *Der* II グループのアミノ酸配列を示す。

3. ダニアレルゲンの抗原決定基 (エピトープ)

アレルギー反応は、肥満細胞上に存在する抗原特異的な IgE 抗体と抗原、すなわちアレルゲンが結合した結果、肥満細胞からヒスタミンに代表される種々の化学伝達物質が放出されることによって引き起こされる。したがって、IgE 抗体の結合するアレルゲンの部位 (IgE エピトープ) を特定することは抗アレルギー薬の開発ならびにアレルギー発症機序の解明に重要と考えられる。しかし、これまではアレルゲンの全アミノ酸配列も不明であったし大量に純度の高いアレルゲンを調製することも困難であったため、IgE 抗体結合部位の特定は不可能な状態であった。近年になり分子生物学的手法によって、幾つかのアレル

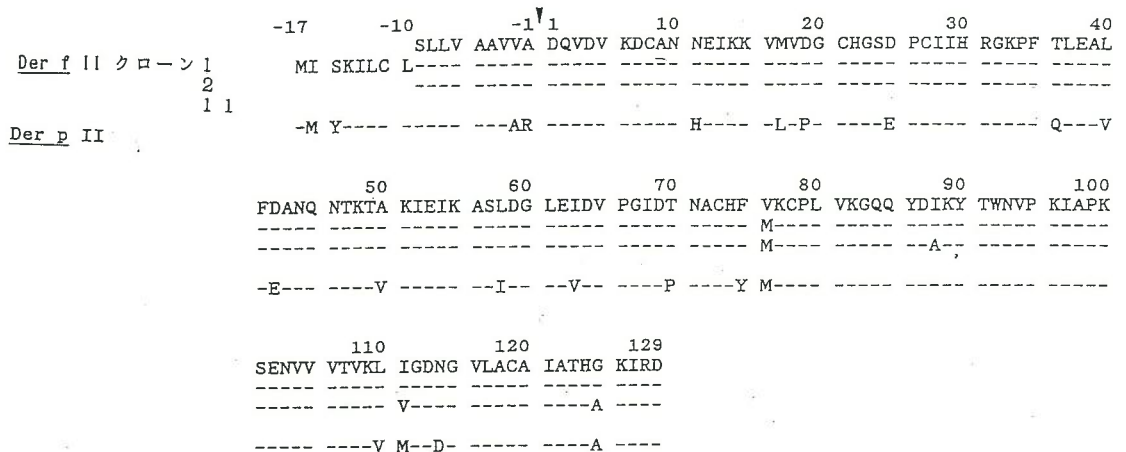


図2 *Der f* II および *Der p* II のアミノ酸配列
アミノ酸は全て一文字表示で示した。▼で示した位置から後が *Der* II アレルゲンとして存在する。

ゲンをコードする遺伝子が単離され全塩基配列および全アミノ酸配列が明らかとなった。特にダニアレルゲン *Der f* II の場合、筆者らの研究グループによって大腸菌を用いて大量調製が可能となっている³⁾。もちろん、遺伝子工学的に作製した *Der f* II とダニ虫体から精製した *Der f* II が同等でなければ意味がない。大腸菌で発現させた *Der f* II はN末端に

開始コドン由来のメチオニンが1残基余分に付加しているが、分子内ジスルフィド結合位置⁴⁾、ダニアレルギー患者IgE抗体との反応性および皮膚反応など全ての点で一致していた。純度の高い *Der f* II を大量に調製できるようになったことから、筆者らはダニアレルギー患者IgEエピトープの解析を開始した。

IgE などの抗体は、10アミノ酸程度のシー

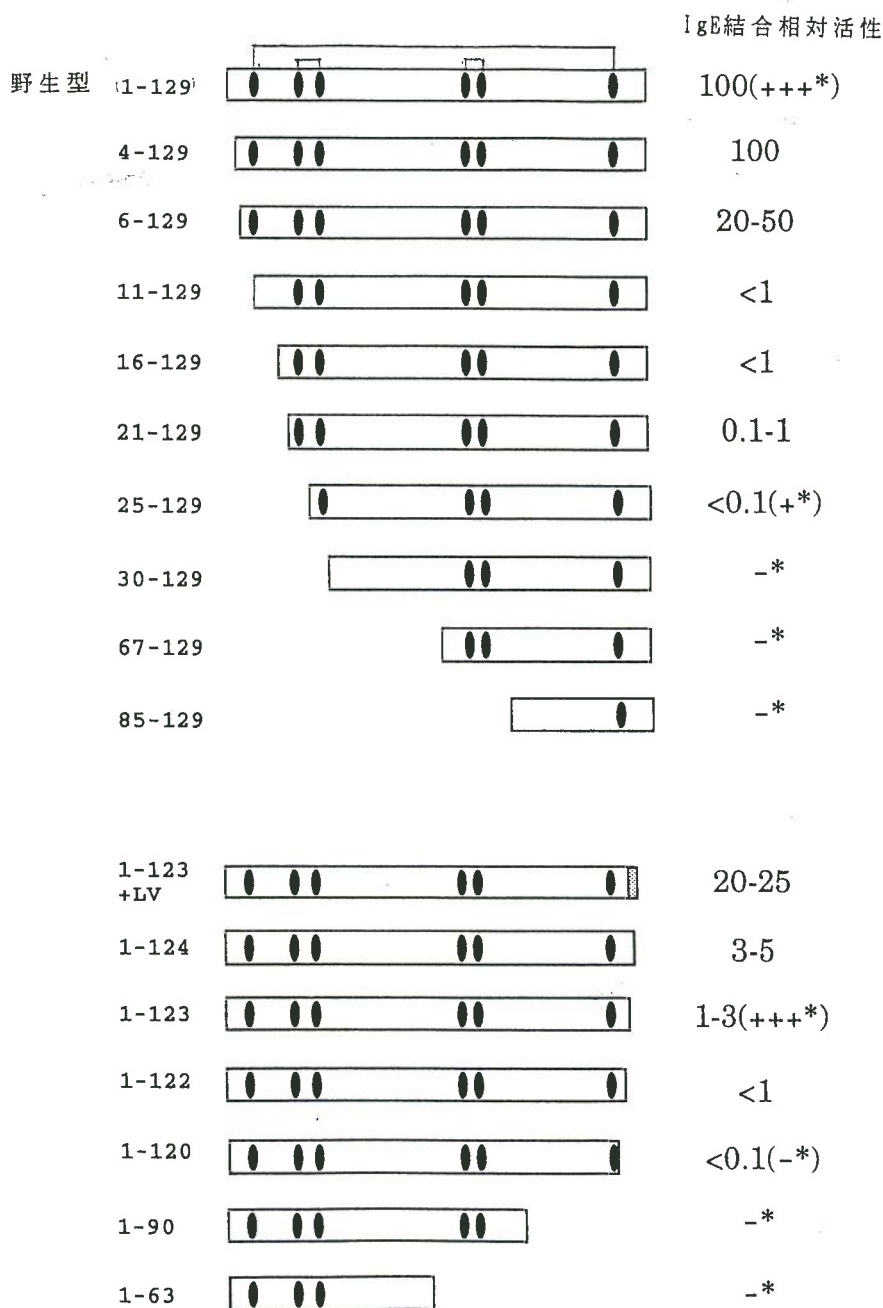


図3 *Der f* II欠失体のIgE結合活性

各欠失体の前に示した数字はN末端からのアミノ酸残基数を示す。

結合活性はRAST-EIA測定キットでの値の野生型に対する相対値で示す。

*：ウェスタンブロットによる判定。

●：システイン残基を示す。野生型のシステイン残基を結んだ線はジスルフィド結合を示す。

クエンシヤルなペプチドをエピトープとする T細胞とは異なり、抗原表面の立体構造を認識するといわれている。したがって、T細胞エピトープ探索で行われるアレルゲン分子のオーバーラッピングペプチドを合成しその結合活性を調べる方法は、IgE 抗体エピトープ探索には有効とはいえない。そこで遺伝子組換え技術で種々の改変体を作製して結合活性を比較することとした。

まず、*Der f*II 遺伝子を改変して程度の異なる欠失体を作製し、ダニアレルギー患者 IgE 抗体との結合活性を調べた。その結果、N 末端領域と C 末端領域が IgE 抗体結合に必要であることが明らかとなった (図 3)。また、図 3 に示したように 30~129 および 1~90 の欠失体ではオーバーラップした領域があるにも関わらず共に IgE 抗体結合活性を失っており、前述した通り抗体のエピトープは分子の高次構造の関与が大きいという考え方を支持している。N 末端と C 末端は 8 番目のシステイン残基と 119 番目のシステイン残基間のジスルフィド結合で接近しており、この S-S 結合で架橋されたアミノ酸の配列がエピトープであると推定した。事実、prick 試験で確認したところ 8 番目および 119 番目のシステインをセリンに置換しその位置のジスルフィド結合を形成しない変異体は、他の位置のジスルフィド結合を形成していない置換体がダニアレルギー患者に対する反応性を保持しているのに比べ有意に反応性を失っている。IgE 抗体が結合する部位をさらに絞り込むために、部位特異的変異を用いて N 末端および C 末端領域に存在するアミノ酸を 1 つずつ別のアミノ酸 (アラニン) に置換した変異体を作製し IgE 抗体との結合活性を調べている。その結果、N 末端側の 8 番目のシステインを中心とした 8~10 アミノ酸残基が IgE との結合に関与していることが明らかとなった。C 末端側については 119 番目のシステインを

中心とする領域にアラニン残基が多くこれまでのところあまりデータは得られていない。

4. おわりに

本稿では、ダニアレルゲン、特に詳細に解析が進んでいる *Der f*II を中心とした分子生物学的手法を用いた解析の概要を述べた。本稿で概観したようにアレルゲンの遺伝子を用いた解析および純粋なアレルゲンの大量調製が可能となったことで、これまで不可能と思われていた多くの解析が可能となっている。しかし、これまでに得られた結果だけではダニアレルギー発症機序は不明のままであるし有効な薬剤開発も難しい。IgE 抗体結合を論ずるためには分子全体の高次構造解明が不可欠である。そこで筆者らは、大腸菌を用いて *Der f*II のラベル体を作製し高分解能 NMR を用いた高次構造解析を東京都立臨床医学総合研究所と共同で開始している。エピトープの立体構造が明らかになれば、アレルギー診断に利用できるし類似の構造を持ったアナログを用いたアナフィラキシーの恐れが少ない免疫療法やアレルゲン特異的な IgE をブロックする薬剤開発も可能となると考えている。また、T 細胞と B 細胞との認識部位の違いも明確となりアレルギー発症機序の解明に役立つものと信じている。この分野の研究が大きく展開していくことを期待したい。

文 献

- 1) Voorhorst R., et al. (1967) *J. Allergy* 39 : 325
- 2) Miyamoto T., et al. (1968) *J. Allergy* 42 : 141
- 3) Yuuki T., et al. (1991) *Agric. Biol. Chem.* 55 : 1232
- 4) Nishiyama C., et al. (1993) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 101 : 159

遺伝子組換えによるナタネ種子成分の改良

植物工学研究所
村瀬淳子

1. はじめに¹⁻³⁾

ナタネはダイズや綿実と並んで重要な油糧作物の一つである。近年ファーストフード市場の躍進に伴って油脂の需要も急激に伸び、現在世界の油消費量の約14%をナタネが占めている。日本では古来からナタネは灯火用の油として広く栽培され、油を搾った後の搾り粕は肥料として利用されていた。しかし当時のナタネ油には、人体に有害なエルシン酸と呼ばれる長鎖不飽和脂肪酸が、また搾り粕にはグリコシノレートと呼ばれる家畜に対する栄養阻害因子が含まれていたため、ヒトや家畜の食用には用いられていなかった。その後カナダで交雑育種による品種改良が行われてこれらの二つの成分を持たないダブルゼロ品種が作られてから、ナタネ油も食用としてカナダ・ヨーロッパ等で広く栽培されるようになった。日本でも最近「脂っこくない」、「健康に良い」などの歌い文句で販売され、可食油の50%近くをナタネからとっている^{1,2)}。

ナタネ種子中には種子重量の約40%の脂質と、20%のタンパク質が含有されている³⁾。脂質には健康に良いとされるオレイン酸が65%ほど含まれている。これは他の油糧作物のオレイン酸含量よりも高いが、さらにこの割合を上げる努力がなされている。搾り粕に含まれるタンパク質には、ダイズの搾り粕と並んでシステインやメチオニン等の含硫アミノ酸含量の増加が望まれている。筆者らは、昨今遺伝子工学的手法の飛躍的な進歩に着目し、

ナタネの新品種を分子育種で作出するためにナタネ形質転換系を確立した。また、現在この系を用いて、ナタネ種子貯蔵タンパク質と貯蔵脂質の改良を始めとし、それら含量の増加や病害虫抵抗性の付与などに取り組んでいる。本稿ではアンチセンスを用いた種子貯蔵タンパク質の組成の改良について紹介する。

2. ナタネへの外来遺伝子導入系の確立

ナタネはプロトプラストからの再生や組織からの再生も可能な数少ない重要作物の一つであり、これらの系を利用して細胞融合や形質転換などの試みが広く行われるようになっている。当研究室でも、細胞融合でダイコンの細胞質雄性不稔性とその回復遺伝子をナタネに導入し、F1種子生産システムを作出した⁴⁾。また形質転換ではエレクトロポレーション法やアグロバクテリウムを用いた方法を開発した。前者は無菌で育てた植物の葉からプロトプラストを調製し、選抜マーカーとしてネオマイシン・フォスフォトランスフェラーゼII (NPT II) 遺伝子を含んだベクターと、導入したい遺伝子を含んだベクターと一緒に電圧400V/cm、電気容量600 μ F、時間10msecの減衰波で処理して形質転換を行う。培養一週間後から植物体が再生するまでの約3か月間10 μ g/lのカナマイシンを培地中に添して遺伝子の導入された植物を選抜する。また後者はアグロバクテリウムを利用する方法である。実際には無菌的に発芽させた10~20日の胚軸を2~5mmに切ったものに、導入したい遺伝子を持ったアグロバクテリウ

ムで2日間処理する。その後アグロバクテリウムを除菌するためのカルベニシリンと、遺伝子が組込まれた植物細胞を選抜するためのカナマイシンを含んだ培地で培養し、緑色のカルスを得て、そのカルスから植物体を再生させる(口絵)。この場合カナマイシンは30 $\mu\text{g/l}$ でアグロバクテリウム処理後1週間後から約1か月間だけ培地に添加する。両方法ともそれぞれ利点があるが、本稿の実験には形質転換効率がよく、早く形質転換体を得られるアグロバクテリウムを用いる方法でナタネの形質転換を行った。

3. 種子貯蔵タンパク質改良の現状⁵⁻¹⁰⁾

植物種子中に蓄積されるタンパク質は主にアルブミン、グロブリン、プロラミン、グルテリンに分類されるが、どの種類のタンパク質が蓄積するかは植物種によって異なっている。またそのタンパク質の呼びかたも様々である。例えば、ナタネ種子ではクルシフェリンと呼ばれる12Sグロブリンとナピンという2Sアルブミンが、トウモロコシではゼインというプロラミンが蓄積する。またこれらのタンパク質の蓄積する量比もそれぞれ決まっており、ナタネでは種子全タンパク質のおおよそ60%がクルシフェリンで20%がナピンである⁵⁾。

種子タンパク質をヒトや家畜の食用とする場合には、種子中のタンパク質含量のみならず種子タンパク質中の必須アミノ酸含量が問題となってくる。すなわち、ダイズはその重量の40%がタンパク質で高タンパク質ではあるが、システインやメチオニンなどの含硫アミノ酸量が少ないのが欠点とされている。主食として食べられているイネやコムギでもタンパク質中のリジン含量の増加が望まれている⁶⁾。

これまで、これら種子貯蔵タンパク質のアミノ酸組成改良には交雑育種や突然変異体の育種が主流であった。例えば良く知られているのはトウモロコシのOpaque 2 と呼ばれる突然変異体で、この変異体は含硫アミノ酸の

少ない α -ゼイン含量が普通のトウモロコシよりも減少しているため、全タンパク質中に占める含硫アミノ酸含量が相対的に高くなっている。しかし残念なことに、この変異体は全タンパク質含量が減少していたり、種子が機械的な刺激によって壊れやすいなどその他の育種形質が悪いため、広く栽培されるにはいたっていない⁷⁾。一方、ダイズの7Sグロブリン含量が減少した突然変異体は、その分11Sグロブリンが増加しており、全体のタンパク質含量は変化しないが、11Sグロブリンは7Sグロブリンよりも含硫アミノ酸含量が少ないため、この変異体の含硫アミノ酸含量は減少してしまっている⁸⁾。このように、種子貯蔵タンパク質の改良は各タンパク質の生合成制御が複雑に絡み合っているため従来の育種では難しいと思われる。

近年多くの植物で形質転換が成功するに伴って、必須アミノ酸含量の高いタンパク質をコードする遺伝子を導入する試みがされ始めている。それらの遺伝子は種子貯蔵タンパク質をコードするものでもいいし、既存の種子貯蔵タンパク質のアミノ酸組成を基に必須アミノ酸をコードする遺伝子配列を人工的に付加したものでもよい。前者には全タンパク質の30%がメチオニンであるブラジルナッツの2Sアルブミン遺伝子をナタネに導入した例があり⁹⁾、後者ではインゲンマメの種子タンパク質であるファゼオリン遺伝子にメチオニンの多い塩基配列を安定なタンパク質を作るように付加して作らせる試みがなされている(プロテインエンジニアリング)。インゲンマメはまだ形質転換の系が完全ではなく現在のところインゲンマメでこの人工のタンパク質は作られていない¹⁰⁾。以上のように外来遺伝子を導入してタンパク質を作らせる場合には、導入した遺伝子が種子特異的に発現し、翻訳されたタンパク質が安定して多量に種子中に蓄積することが重要となってくる。

4. アンチセンス遺伝子を用いたナタネ種子貯蔵タンパク質の改良^{11~13)}

筆者らは、ナタネの種子タンパク質改良のため種子貯蔵タンパク質をコードしている遺伝子のアンチセンスをアグロバクテリウム法でナタネに導入した。アンチセンス遺伝子はある目的のタンパク質量だけを減少させる時に用いられる手法で、目的のタンパク質をコードしている遺伝子の逆向きの配列を言う。このアンチセンスの正確な機構はわかっていないが、アンチセンスから読まれた mRNA は、目的の遺伝子から読まれた mRNA と相補的であるため、目的の遺伝子から読まれた mRNA がタンパク質に翻訳される時に、その効率を減少させることで、その目的のタンパク質を減少させると考えられている。

ナタネの種子貯蔵タンパク質であるナピンは一つの遺伝子にコードされている α 、 β の 2 つのサブユニットからなり、10~20個の遺伝子群を構成している。これらの遺伝子間には90%以上のホモロジーがある。また、もうひとつの貯蔵タンパク質のクルシフェリンは α 、 β のサブユニットが6個集まって出来ており、分子量によって4種類のサブユニットに大別され、ナピンと同様10~20個の遺伝子群を形成している。しかしクルシフェリンの場合は、これら4種類のサブユニット間のホモロジーは低く65%程度である¹¹⁾。

筆者らは、既に報告されているナピンとクルシフェリンの遺伝子配列 (napA¹²⁾, cruA¹³⁾) を基に、PCR を用いてそれぞれをコードする遺伝子配列を増幅させ、アンチセンスの形でナタネに導入した。この時、効率良く種子貯蔵タンパク質を減少させるためには、アンチセンスが種子貯蔵タンパク質と同時期に種子だけで発現することが必要である。そのため種子貯蔵タンパク質のプロモーターを用いるのが良いと考え、これまでの報告を基にナピンのプロモーターも同時に PCR を用いてクローニングした。この PCR で増幅させたプロモーター実際に種子特異的に、また

内在の種子貯蔵タンパク質遺伝子と同じ時期に発現するかどうかは、このプロモーターの下流に β -glucuronidase (GUS) 遺伝子をつないでナタネに導入し、その発現パターンで調べた。その結果、このプロモーターは内在の種子貯蔵タンパク質と同様、種子特異的・時期特異的な発現を示すことがわかった。

このプロモーターを用いて下流にナピン遺伝子またはクルシフェリン遺伝子のアンチセンスをつないでベクターを構築した (図1)。

これらのベクターをアグロバクテリウム法を用いてナタネに導入したところ、ナピンアンチセンスを持った植物が9個体、クルシフェリンアンチセンスを持った植物が3個体得られた。これらの植物は全て自殖で後代の種子をとることが出来た。得られたナタネ種子のナピンまたはクルシフェリン含量の減少は、成熟自殖種子1粒を半分に割ってその半分から全タンパク質を抽出し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で各タンパク質を分離し、クマシー染色して調べた。自殖種子では導入遺伝子を持っていない種子が分離してくるため、残りの半粒は発芽させてその芽生えから DNA を抽出し、導入したアンチセンス遺伝子があるかどうかを調べた。このようにしてアンチセンス遺伝子の存在と種子貯蔵タンパク質含量を調べると、アンチセンスを持った種子のみが、コントロールの種子に比べて減少したナピンやクルシフェリン含量を示していた (図2)。また、種子タンパク質を蓄積する時期の種子から RNA を抽出して種子貯蔵タンパク質の mRNA 量を調べると、やはりコントロールに比べて mRNA 含量が減少しており、種子貯蔵タンパク質の減少が導入したアンチセンスのためであると考えられた。しかしこれらの形質転換体は、トウモロコシの Opaque 2 変異体とは異なり種子全タンパク質含量は減少していなかった。これは、形質転換体の種子では減少した貯蔵タンパク質の代わりに、他の貯蔵タンパク質含量が増加してその減少分を補ったことを示している。実際にウェスタン解析でタンパク質含量を調べると、ナピンのアンチセンスを

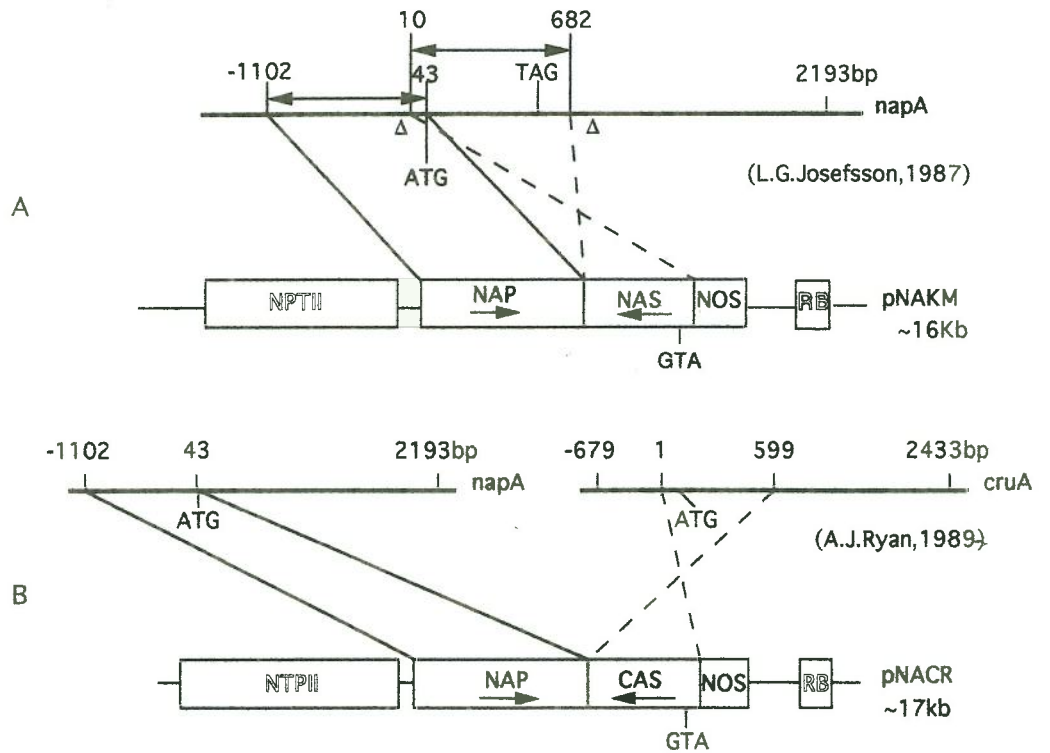


図1 アンチセンス遺伝子を含むベクターの構築

A: ナピン遺伝子のアンチセンス

B: クルシフェリン遺伝子のアンチセンス

NPTII(ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼII), NAP(ナピンプロモーター), NAS(ナピンアンチセンス遺伝子), NOS(ノバリンシンターゼターミネーター), RB(ライトボーター配列), CAS(クルシフェリンアンチセンス遺伝子)

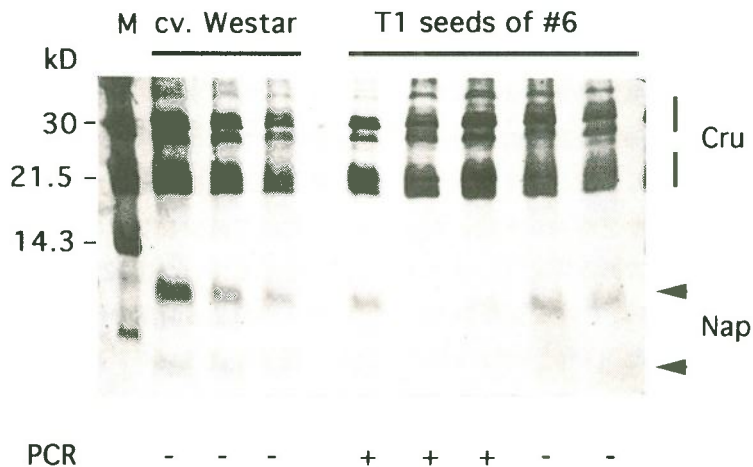


図2 種子タンパク質のSDS-PAGE解析

ナタネ種子からタンパク質を抽出し、電気泳動した後染色したもの。遺伝子の入った種子(+)ではナピン(Nap)が欠失し、その代わりにクルシフェリン(Cru)が増加している。(左から2~4レーンは普通のナタネ)

導入した種子ではクルシフェリンが、クルシフェリンのアンチセンスを導入した種子ではナピン含量が、それぞれコントロールの種子と比較して増加していた。これらの種子の氨基酸組成を調べると、ナピンのアンチセン

スを持った種子ではフェニールアラニンが、クルシフェリンのアンチセンスを持った種子ではシステイン、リジン、メチオニンの必須氨基酸含量が増加しており(表1)、種子貯蔵タンパク質のアンチセンスを導入するこ

表1 クルシフェリンアンチセンスを導入した種子の amino 酸形成 (pNACR#3)

	pNACR#3	Westar	(%)
Cys	10.8	8.3	132
Lys	5.3	4.8	110
Met	1.3	1.2	108
His	2.9	2.7	107
Pro	7.8	7.4	105
Val	6	5.8	103
Glx	17.9	17.6	102
Thr	4.5	4.5	100
Ser	4.4	4.5	98
Ile	3.7	3.9	95
Gly	7.5	8	94
Ala	6.7	7.1	94
Leu	6.9	7.4	93
Phe	3.2	3.6	89
Arg	4.5	5.1	88
Asx	6.3	7.7	82
Tyr	0.4	0.5	80

%: コントロール (Westar) の各アミノ酸含量に対する形質転換体のアミノ酸含量の値。アンチセンスをもった種子では、システイン (Cys), リジン (Lys), メチオニン (Met) などの必須アミノ酸含量が増加している。

とにより、全タンパク質量やその他の表現型を変えることなく必須アミノ酸含量を増加することが出来た。また、これらの性質はアンチセンス遺伝子とともに次代へ遺伝していた。

さらに、ナピンアンチセンスを導入した種子の脂質を調べると、全脂質含量は変化していないが脂肪酸組成でオレイン酸の代わりにリノール酸が増加しており、コントロールに比べて不飽和化が進行していた。またクルシフェリンのアンチセンス遺伝子を導入した種子では、ターゲットとしたサブユニットの種類とは別のサブユニットも減少していた。これらのことは、種子貯蔵物質である脂質とタンパク質の生合成には複雑な制御機構があることを示しており、これらの機構の解明は今後の研究を待たなければならない。

5. おわりに

最近の遺伝子工学の進歩につれて、様々な目的の遺伝子を限られた場所で限られた時期に発現させることが可能となり、従来の交雑育種は出来なかった品種も作られるに至って

いる。ナタネ種子貯蔵物質に限っても脂肪酸組成を変えたり、他の植物の種子貯蔵タンパク質を蓄積したりと枚挙に暇がない。今後はこれらの研究結果を基にして種子中の物質の生合成制御の機構を明らかにするとともに、有用な種子の開発を目指した研究を進めていくつもりである。

なお、本稿の研究を行うにあたり、小川桂さんには形質転換実験、村瀬誠氏には形質転換用のベクターと胚の写真の提供の協力をしていただいた。また、植工研の皆様には日頃から貴重なアドバイスをしていただいた、ここに感謝の意を表したい。

文 献

- 1) Thompson, K.F. et al. (1986) In: Oilseed rape, Scarisbrich C.H. et al. (eds) pp 32-82
- 2) 岡田史雄 (1922) 食品と開発 25 : 7-13
- 3) Finlayson, A.F. et al. (1976) In: The biology and chemistry of the Vaughan J.G. et al. (eds) Cruciferae. pp 279-306
- 4) Sakai, T. et al. (1990) *Theo. Appl. Genet.* 89 : 421-427
- 5) Crouch, M.L. et al. (1981) *Planta* 153 : 64-74
- 6) 高岩文男 (1991) 農業および園芸 66 : 982-986
- 7) Kodrzycki, R. et al. (1989) *Plant Cell* 1 : 105-114
- 8) Kitamura, K. (1993) *Trends Food Science and Technology* 4 : 64-67
- 9) Altenbach, S.B. et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18 : 235-245
- 10) Dyer, J.M. et al. (1993) XV International Botanical Congress Abstract, p 554, 8202
- 11) Rodin, J. et al. (1990) *Physiologia Plantarum* 79 : 421-426
- 12) Joseffson, L.G. et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262 : 12196-12201
- 13) Ryan, A.J. et al. (1989) *Nuc. Acids Res.* 17 : 3584

試験管内幼植物のビトリフィケーション回避法

日本たばこ産業(株) 植物開発研究所
佐藤正紀

1. はじめに

近年、植物の組織培養技術の著しい発展により、多くの作物においてウイルスフリー化、大量増殖による培養苗生産などが実用化されている。植物組織培養により植物体を再生させる時、しばしば発生する大きな問題の一つにビトリフィケーションという現象がある。ビトリフィケーションとは植物体の葉や茎の組織が半透明になりやや肥大し、正常な茎葉の持つしなやかさを失って固化する現象で、Debergh ら¹⁾によって命名され、ガラス化とも呼ばれている。ビトリフィケーションを引き起こした茎葉組織は正常な機能を失っており、このような培養植物は試験管の外に出すと生育を続けることができずに枯死に至ってしまうために、大量増殖を行う上では非常に大きな問題となる。この問題を解決するために様々な検討がなされているが、それらのほとんどはビトリフィケーションの発生の原因究明や発生抑制法についてである。これらの研究結果からビトリフィケーションの発生に影響を及ぼす要因としては、培地固化剤の種類と濃度²⁾、培養中の照明の強度³⁾や光周期⁴⁾、培地中に含まれる炭水化物の種類と濃度⁵⁾、培養容器の通気性⁶⁾等があげられ、これらの要因を調節することによりビトリフィケーションの発生を抑制することが可能であることが示されている。

しかしながら一旦ビトリフィケーションを起こした培養体を健全な状態に回復させる方

法についてはこれまでに報告はなかった。

我々もカーネーションの組織培養を行う中でこの問題に直面したため、ビトリフィケーションの回避法を検討した。その結果、一旦ビトリフィケーションを起こした培養シュート(苗条)を健全な状態に回復させる方法を見いだした⁷⁾ので以下に紹介する。

2. ビトリフィケーションの発生

植物の葉や茎等の組織から植物を再分化させてクローン植物を得る、いわゆる植物体再生系は、培養苗生産はもちろん、細胞融合や遺伝子導入を行う際にも欠くことのできない技術である。我々はカーネーション(品種スケニア)において各種器官からの植物体再生系を検討した結果、未熟な花弁を培養することによって効率的に再分化シュートを得ることができた。しかし、これらのシュートはすべてビトリフィケーションを引き起こしていたために試験管の外に出して順化を行ってもすべて枯死に至った。カーネーションの花弁組織からの再分化系の確立は、ビトリフィケーションの発生のために一時中断したわけである。

3. ビトリフィケーションを起こした培養シュートの回復

ところが、このビトリフィケーションを引き起こしたしたシュートの一部分を切りとり、ハイボネックス(N:P:K=6:6.5:19)2g/l、ショ糖30g/l、寒天8g/lを基本培地とし、これにペプトン(Bact-Peptone)3

SATO Seiki

g/l を添加した培地に移植して培養することにより、移植から約1か月後には新しく生育したシュートの80%が、正常なシュートへと回復していた。この回復したシュートを切りとり発根培地に移植して発根させた後、試験管の外へ出し、順化したところ90%以上が順化に成功し、その後も温室内で順調に生育を続けた。

ビトリフィケーションを起こしたシュートと回復したシュート、それから温室で栽培中のカーネーションの葉の表面構造を走査型電子顕微鏡により観察を行った。その結果、温室内で栽培しているカーネーションの葉の表面は多量のワックスで覆われていた (図1-1) が、ビトリフィケーションを起こしたシュートではワックスは全く認められなかった (図1-2)。それに対してビトリフィケーションから回復したシュートはワックスが形成されつつあるのが観察された (図1-3)。このことが

順化成功率が向上した原因の一つと考えられる。温室内で通常栽培されている植物に近づいたわけである。

4. ビトリフィケーションからの回復に有効な成分の探索

ビトリフィケーションの回復にはペプトンが有効であることを見いだしたのでペプトンを分子量の大きさによる分画と極性による分画を行うことにより、ビトリフィケーションからの回復に有効な成分の探索を行った。

ペプトン (Bact-Peptone) 水溶液を限外濾過を行うことにより、分子量1万以上と1万以下の画分に分離し、基本培地に添加した。この培地にビトリフィケーションを起こしたシュートを移植して回復効果を調べた。その結果、分子量1万以下の画分を添加した区では81.3%の回復率であったのに対して、分子

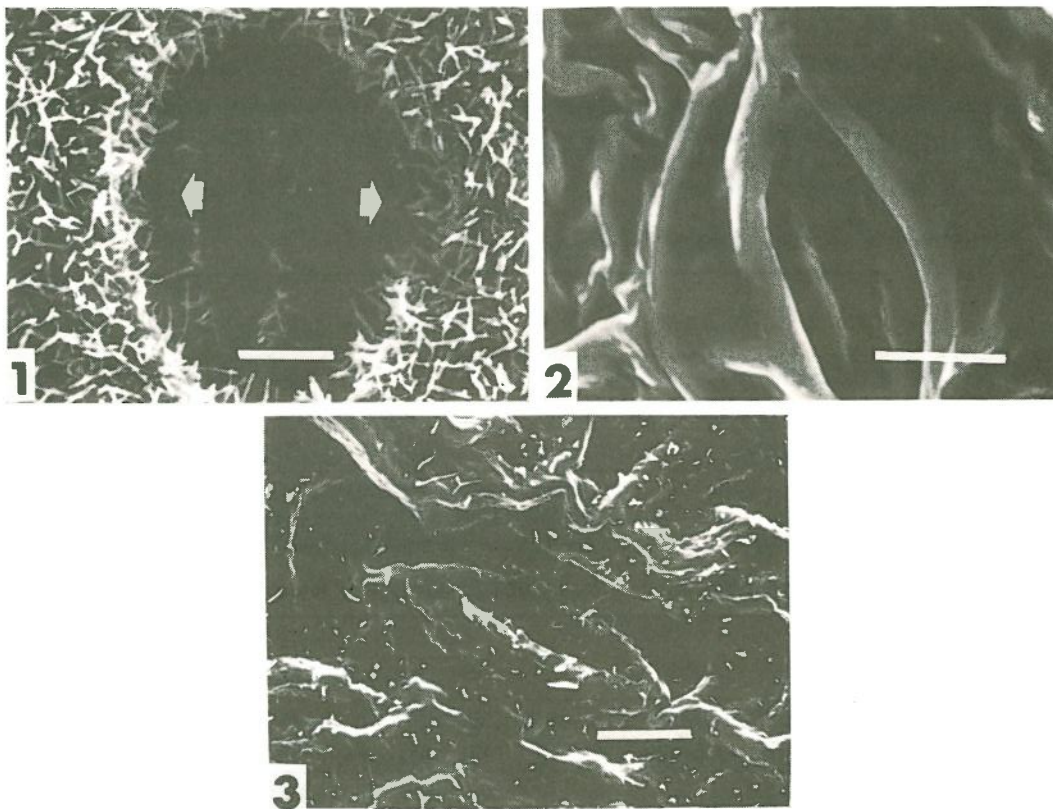


図1 カーネーション (*Dianthus caryophyllus* L. cv. Scania) の葉の背軸側表面の走査電子顕微鏡による観察 (スケールバー 5 μm)

- 1 : 温室で栽培した正常植物。矢印は表面のワックス構造を示す。
- 2 : ビトリフィケーションを起こした培養シュート。
- 3 : ビトリフィケーションから回復したシュート。

量1万以上の場合は、18.7%の回復率(表1)で、回復に有効な成分は分子量1万以下に存在していることが示唆された。

さらにペプトン水溶液をイオン交換樹脂によって塩基性画分、酸性画分、中性画分に分離して、基本培地に添加した培地を作成し同様にしてビトリフィケーションからの回復効果を調べた。その結果、塩基性画分を添加した場合に回復効果が高く(表2)、有効成分は塩基性画分にあることが示唆された。

5. 原料の異なるペプトンとカザミノ酸の効果

ペプトンとは種々のタンパクを酵素により

加水分解したものの総称で、原料とするタンパク質の種類により様々な製品が販売されている。Bact-Peptone はカゼインを原料とするペプトンと獣肉を原料とするペプトンの混合物である。ここでは、原料の違うペプトンでの回復効果、および製法の異なるタンパク質加水分解物の回復効果を調査した。

ペプトンとしては、獣肉、カゼイン、脱脂大豆、卵黄タンパクをそれぞれ原料としたペプトンを供試し、さらにカゼインを酸によって加水分解したカザミノ酸を供試した。これらを基本培地にそれぞれ3g/l添加した培地を用いてビトリフィケーションからの回復効果を調べたところ、獣肉を原料としたペプトンが最も回復効果が高く、以下カゼイン、脱

表1 ビトリフィケーションからの回復におけるバクトペプトン中の高分子量画分と低分子量画分の効果

	各画分の分子量	
	分子量10,000以上	分子量10,000以下
供試したビトリフィケーションシュート数	75	75
ビトリフィケーションから回復したシュート数	14	61
回復率 (%)	18.7	81.3

ビトリフィケーションを起こしたシュートを、バクトペプトンの高分子量画分または低分子量画分を含む培地に移植し培養した。各画分の添加量はバクトペプトン3.0g/l中に含まれている画分の濃度に相当する量である。観察は5週間後に行った。

表2 ビトリフィケーションからの回復におけるバクトペプトン中の酸性、塩基性、中性画分の効果

	添加したバクトペプトンの画分			
	バクトペプトン	酸性	塩基性	中性
供試したビトリフィケーションシュート数	150	150	150	150
ビトリフィケーションから回復したシュート数	85	11	87	15
回復率 (%)	56.3	7.3	58.3	10.0

ビトリフィケーションシュートは、酸性画分0.34g/l、塩基性画分2.52g/l、中性画分0.06g/lまたはバクトペプトン3.0g/lを含む培地に移植し5週間後に回復を調査した。各画分の添加量はバクトペプトン3.0g/lに含まれている量に相当する。

表3 ビトリフィケーションからの回復におけるペプトンの種類の効果

	添加したペプトンの種類(3.0g/l)					
	BP	PP	PP1	PPS	PPY	CA
供試したビトリフィケーションシュート数	30	30	30	30	30	30
ビトリフィケーションから回復したシュート数	19	14	21	10	6	1
回復率 (%)	63.3	46.7	70.0	33.3	20.0	3.3

BP : バクトペプトン 牛乳カゼインの酵素分解物と獣肉の酵素分解物の混合物
 PP : ポリペプトン 牛乳カゼインの酵素分解物
 PP1 : ポリペプトンP1 獣肉の酵素分解物
 PPS : ポリペプトンS 脱脂大豆の酵素分解物
 PPY : ポリペプトンY 卵黄タンパク質の酵素分解物
 CA : カザミノ酸 牛乳カゼインの酸化水分解物

脂大豆、卵黄タンパクの順に効果が高かった。しかしながらカザミノ酸はビトリフィケーションの回復には効果は認められなかった(表3)。

ペプトンの中にはポリペプチド、オリゴペプチド、またアミノ酸が含まれている。カザミノ酸にはペプトンと同様に多くのアミノ酸が含まれていることから、回復に有効な成分はアミノ酸ではないと考えられる。したがって、ペプトンの分画の結果と合わせるとビトリフィケーションからの回復に有効な成分は、塩基性のポリペプチドもしくはオリゴペプチドであることが推察された。

6. おわりに

本研究により、カーネーションにおいては、ビトリフィケーションを引き起こしたシュートは、ペプトンを含む培地で培養することにより、正常なシュートへと回復させることが可能であることが示された。この方法が他の作物においても、有効かどうかは今のところ不明であるが、検討の価値はあるであろう。

ビトリフィケーションを予防する方法は種々報告されているが、今回初めてビトリフィケーションを起こした培養シュートを正常化する方法を見出すことができた。今回報告したカーネーションの培養系のように、非常にビトリフィケーションが起こり易い場合も多く、実用上の意義は大きいと考えている。

文 献

- 1) Debergh, P., Harbaoui, Y., Lemeur, R. (1981) *Physiol. Plant* 53 : 181-187
- 2) Thomas, W.Z., Cobb, B.G. (1989) *Plant Cell Reports* 8 : 358-360
- 3) Sutter, E., Langhans, R.W. (1979) *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 104 : 493-496
- 4) Gimelli, F., Ginatta, G., Venturo, R., Positan, S., Buiatti, M. (1984) *Riv. Orti. Florofruttic* 68 : 107-121
- 5) Orlikowska, T. (1987) *Acta. Hort.* 212 : 237-244
- 6) Ziv, M., Meir, G., Halevy, A.H. (1983) *Plant Cell Tissue Organ Culture* 2 : 55-65
- 7) Sato, S., Hagimori, M., Iwai, S. (1993) *Plant Cell Reports* 12 : 370-374

国内情報

一村一品的“ソフトタイプチーズ”の開発

農林水産省畜産試験場 加工部
鈴木一郎

1. はじめに

最近の酪農界はあまり景気のいい話がない。潜在的な牛乳のダブツキのなかバブルの崩壊、昨年の冷夏とかなり痛めつけられたが、追い打ちをかけるように牛乳・乳製品の輸入自由化が迫っている。牛乳・乳製品が自由化されると多くの酪農家が廃業せざるを得ない事態

になるとの予測もなされているが、農林水産省では輸入自由化対策として国産の農産物の高品質化、新規の加工、流通分野の開拓を目指すプロジェクトを実施してきた。私どもの研究室では国産原料乳を用いた地域特産品のチーズ製造技術開発をテーマにこのプロジェクトに参加してきた。この程、5年間の研究開発の成果として純国産「ソフトタイプチーズ」を開発することができた。このチーズは高価な設備を必要とせず比較的簡単に製造できるため、酪農家が自分で生産した牛乳から

SUZUKI Ichirou

チーズを造りたいという願いが実現され易くなったと考えている。開発の経緯を簡単に紹介する。

2. カマンベールの様なチーズが白カビの助け無しで製造できるか

日本人はカマンベールタイプのチーズを好む傾向がある。私どもは一般消費者を対象にチーズの好みを調査したことがあるが、同じカビ熟成チーズでも青カビチーズのロックフォールやブルーチーズは嫌いな人が多かったのに対し、カマンベールチーズはほとんどの人が食べられる、好んで食べると答えている。その理由は柔らかかで口のなかでとろける感覚がいい、強烈な臭いがなくまろやかである、であった。どうも日本人には軟らかく滑らかで、淡白なチーズが好まれることが分かった。

話は飛躍するが、カマンベールのようなチーズを乳酸菌だけで造れないものだろうか。私どもの研究室ではカマンベールの軟化機構について長年研究してきた。従来の説は白カビのプロテアーゼがカゼインを分解し高次構造（マトリックス）が崩れ軟化するというものであった。しかし、白カビのプロテアーゼはカード中にせいぜい数ミリしか浸透しないという報告があり、別な軟化機構が存在するはずと考えられたからである。私どもの結論は、カマンベールの軟化は白カビが乳酸をエネルギーとして利用することによるカードpHの改善、及び白カビがカルシウムを選択的に吸収することによるカゼインの水溶化によってもたらされる、ということであった。

具体的には、チーズカード表面に接種された白カビの胞子は乳酸菌が生成した乳酸をエネルギーとして利用し、盛んに繁殖する。また、白カビはカード中のカルシウムを選択的に吸収する性質がある。白カビの繁殖はカードのpHの改善とカルシウムの減少をもたらす。カードを形成しているカゼインはマトリックスを形成しているがこのマトリックスはpHが低いと固く、リン酸カルシウムやカルシウムによって強度が保たれている。

pHが高くなりカルシウムが少なくなればカゼインは水溶化してマトリックスは崩壊し、滑らかなカードとなる。

乳酸菌は糖を発酵し乳酸を造るが、乳酸を利用できない。また、乳酸菌は白カビのようにカルシウムを大量に吸着できない。したがって乳酸菌だけでカマンベールのようなチーズは造れない。

3. チーズを軟化させる乳酸菌

しかし、私たちはある種の乳酸菌はチーズカードをかなり軟らかくすることを見つけた。なぜ軟らかくなるか、は今まで述べたチーズの軟化メカニズムで説明できた。その理由は(1)菌体のカルシウム吸着能が他の乳酸菌より高い、(2)クエン酸があると菌体がジュズ状に連鎖し菌体の周囲にひきがえるの卵のように高分子の粘質物が付着する、(3)熟成中でも生きた菌数が $10^8 \sim 10^9$ /gも確保されるためであることが分かった。普通、チーズ中の乳酸菌は熟成中に急激に死滅してしまうが、この菌のような例はきわめて珍しい。この性質がチーズの軟化に大きく貢献していると考えられる。また、この菌はクエン酸に対する性質が他の菌と著しく異なっている。一般に乳酸菌にとってクエン酸は生育に不都合な物質で図1に示すように0.5% (25mM)程度で生育が悪くなるが、CVTは平気で生育でき、しかも乾燥菌体重も3倍程度に増加する性質

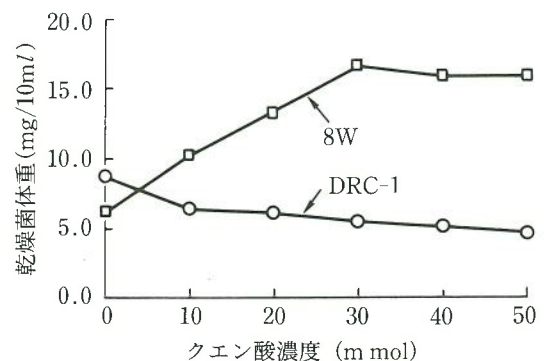


図1 チーズを軟化させる乳酸菌(8W)と既知の乳酸菌(DRC-1)の菌体重におよぼすクエン酸の影響

8Wは30mM程度のクエン酸濃度まで増加するが、DRC-1は減少する。

を持っている。また、クエン酸を分解する能力が今までの乳酸菌に比べ著しく高いのが特徴である(図2)。私どもはこのCVTを特許微生物として申請中である。

次のステップはチーズ製造に適しているかを検討することである。上記の性質を示す一群の乳酸菌のなかには軟らかくする能力はあってもチーズ製造に用いるとまずくて食べられないものが多いので、実際にチーズを造って味や香りを確かめるわけである。こうして、最終的に選ばれた、チーズを軟化させる乳酸菌をCVTと名付けた。CVTだけをスターターとしチーズを造ると熟成中に軟らかくなって元の格好が保てなくなり、扁平になってしまう(図3 CVTチーズ)。食べてみると柔らかで口のなかで溶けやすい特徴はあるが、困ったことにチーズらしい味がほとんどしない。ではどうすればチーズらしい風味をもたせることができるか。写真の712チーズを見ていただきたい。大きさが他のチーズと違って型詰め時のままである。つまり非常に固く、これでは商品とにならない。しかしこのチーズはチーズらしい香りを持っている。理想のチーズはCVTの柔らかさを持ち712の味を持ったチーズということになる。そこでCVTと712と一緒に加えてチーズを造ればどうなるかを検討した。CVTと712を別々に培養しておきチーズ製造時に一緒にスターターとして添加して製造したわけである

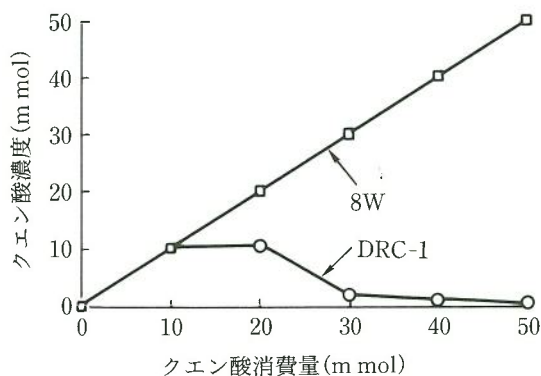


図2 チーズを軟化させる乳酸菌(8W)と既知乳酸菌(DRC-1)のクエン酸消費量の比較

培地に加えられたクエン酸を8Wは完全に分解してしまうが、DRC-1は10mM程度しか分解できない。チーズを軟化させる8Wはこのように今まで知られている菌には見られない著しい特徴をもっている。

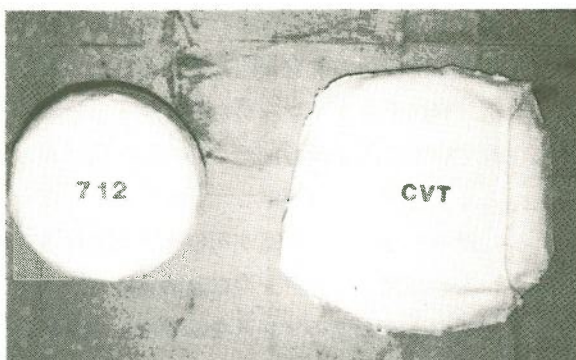


図3 チーズを軟化させる乳酸菌で造ったチーズ(CVT)と味はよいが固いチーズ(712)この両チーズの良いところをもった新製品を開発した。

が、出来上がったチーズはちょうど712チーズとCVTの中間の性質を持っていた。つまり、ある程度滑らかさがあり、チーズらしい風味もそこそこにある製品ができたわけである。私どもはこのCVTと組み合わせる乳酸菌をいろいろ替えてチーズを造り、新しいチーズスターターを造った。

4. チーズ製造上の特徴

次にこのスターターを用いたチーズの製造法を検討した。

チーズの製造法はチーズの種類により特殊な工程が必要な場合もあるが、基本工程は同じと考えていただきたい。牛乳に乳酸菌スターターを入れ、凝乳酵素のレンネットを加えて牛乳を固める。これをカードと呼ぶが、このカードを細切し、熱をかけてカードと乳清(ホエー)を分離する。ホエーを除いたカードを集めて型に詰め数か月間熟成させる。これでチーズができるが、我々はゴーダタイプの製法をイメージし、異常発酵(熟成中にチーズがガス発酵しチーズとならないこと)しない工夫を凝らした。具体的にはスターターを添加後3時間発酵させてからレンネットを加えて1時間カード形成させる。クッキング時、加熱温度が最高になった時点でホエーの一部を抜き取り、その半分量の温水を加えている。スターター添加から型詰めまでの時間はおおよそ5時間であるから乳酸菌は盛んに増殖をして乳酸を生成し、pHを低下させる。

こうすると牛乳中に含まれている異常発酵を起こす酪酸菌の生育が阻止される。この酪酸菌は発酵不良サイレージから汚染するといわれている。汚染の心配がない牛乳を用いればもっと発酵時間を短縮したpHの高い、さらに滑らかなチーズ製造が可能と考えられる。

次の特徴はカードを型に詰める際ゴーダチーズのような強いプレスをかけない点である。こうすると水分含量の多いチーズとなる。しかし水分含量が多いと熟成中にカード中の水分が遊離することがあるが、このチーズではその心配はない。この点は大きな特徴と考えている。

次は熟成温度である。従来 of チーズの場合、熟成温度は12~14℃であるが、本チーズは16~18℃を採用している。通常この温度では水分の遊離、不潔臭や蒸れ臭の発生を引き起こすが、本チーズではその心配はないと考えている。熟成温度が高ければ熟成は速まるのでこのチーズは2~3月で食べることができる。当然電気代の節約につながる。

このように書くともまるで魔法のチーズが開発されたように思われる方もあるかも知れないので、問題点も正直に書いておく。本チーズはカマンベールとは似ていない。ただ、柔らかさと滑らかさは他の乳酸菌熟成チーズより優れていると思う。食べたときの感じは、酸味が強くチーズらしさが希薄である。このことがクセのないという特徴でもある。賞味期間が短いのも特徴の一つである。2~3か月の熟成で食べられるが、もっと長い期間熟成すると発酵臭が強まる。

5. 自分の牛乳でチーズを

私たちはこのチーズを一村一品的なチーズ製造に普及できるようにと開発してきた。小規模生産に適していること、製法が簡単であること、製造コストが安価であること、原料乳の特徴が表現されること、などを盛り込んでいる。原料乳の特徴が表現されることについて説明する。本チーズは高水分を含んでいる。高水分を保持するにはチーズカードの構造がしっかりしていなければならない。カードを構成するカゼイン含量が少ない、カルシウム、リンなどのミネラルバランスが悪い原料乳からは良いカードは形成されない。具体的には乳房炎乳（潜在性乳房炎も含む）である。この牛乳にはカゼイン含量が少なく、ナトリウムが多くミネラルバランスが悪いため良好なカードが形成されず、収量も悪くなる。このカードの保水力は正常カードに比べ劣るが、型詰め時のプレスを強くすればある程度カバーできる。しかし、我々の開発したチーズはプレスをほとんど懸けないからカードの善し悪しが直接保水力に影響することになる。脂肪球の構造に欠陥がありチーズ製造中に皮膜が壊れてしまう牛乳も良くない。高温、高水分で熟成させるため脂肪の分解、ランシッド臭の発生が他のチーズより促進される。このように原料乳の善し悪しがチーズの品質に直接影響するわけで、乳質に自信を持っている酪農家の方々には魅力的なチーズではないかとひそかに自負している。

文献情報

Cosuppression は外被タンパク質を介したウイルス抵抗性の機構を説明できるか？

Sanford と Johnston により提唱された「pathogen-derived resistance (PDR)」の概念は、TMV の外被タンパク質遺伝子をタバコで発現させるとタバコがTMV 抵抗性を示した実験により実証され、これまで、種々のウイルスの外被タンパク質を用いて色々な植物で追試され成果を挙げてきた。

しかし、その抵抗性の機構は、多くの努力にもかかわらず不明なまま残されている。ウイルス RNA の接種に対する抵抗性の質的違いから、その抵抗性の機構は一つではなく、ウイルスによって違っていることが示唆されている。実際、著者らが指摘するように、ポチウイルスを使った実験では外被タンパク質の発現量と抵抗性の間に相関が認められない場合が多く、TMV のように、外被タンパク質の発現量が多ければ多いほど強い抵抗性を示すものとは様子が異なっている。

著者らは、ポチウイルスグループの一つである Tobacco Etch Virus (TEV) を用いて実験を進める中で、外被タンパク質を発現しているにもかかわらずウイルス感受性だった形質転換植物が、ウイルス接種後3~5週間目より展開した新しい葉にウイルス抵抗性を示すことを見いだした（彼らは、これを「recovery」と名付けた）。他のグループも同様の現象を観察し報告しているが、深く追求されることなく、その機構は不明のままであった。本論文では、この現象を分子レベルで解析し、興味深い一つの作業仮説を提示した。

「recovery」した若い葉では、外被タンパク質の mRNA や翻訳産物の量が明らかに低かった。しかし、run-off の実験結果からは、mRNA の合成量は十分高いことが示された。この抵抗性は、プロトプラストのレベルでも示され、また、TEV に対しては抵抗性を示

したが、核酸レベルで63%のホモロジーを持つPVY に対しては、感受性となった。次代も同様に「recovery」の性質を示した。また、接ぎ木を利用した実験よりシグナル様の物質の介在、即ち、「systemically acquired resistance」とは、異なる現象であることが示唆された。mRNA もタンパク質も少ない。しかし、mRNA の合成は十分である。このことを考えると、ここで紹介した現象は転写後の制御と考えられ、著者らは次のような作業仮説を提示した。異質RNAである外被タンパク質の mRNA を何等かの機構が認識し、これがトリガーとなって発現してくる未知物質の結合等により失活させる。同様の構造を有するウイルスが侵入した場合、この未知物質がゲノムRNAに作用し、その増殖を抑える。未知物質としては、RNA結合タンパク質やRNA polymeraseを介してできたアンチセンスRNAが考えられる。

しかし、ポチウイルスに特徴的な現象である理由やトリガーとしてウイルスの感染も必要である理由は十分に説明できておらず、これからの研究の発展が期待される。また、著者らは、この現象が β -1,3-glucanaseで観察されたcosuppressionの現象と似ていることを指摘している。無関係に見えたウイルスと植物の相互作用の機構が、植物の遺伝子発現の制御機構の一つとして観察されるcosuppressionの現象とよく似ていることは、これまで暗礁に乗り上げたかに見えたPDRの機構の解明に新たな道筋を与えてくれたと思われる。

(抄訳 早川孝彦—植工研)

(HAYAKAWA Takahiko)

Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implication of gene expression and virus resistance

Lindbo, J.A., L. Silva-Rosales, W.M. Proebsting and W.G. Dougherty
Plant Cell 5: 1749-1759 (1993)

文献情報

サリチル酸の関与する植物の全身獲得抵抗性には活性酸素が働いている

植物が病原体に感染する場合に、全身獲得抵抗性(systemic acquired resistance; SAR)と呼ばれる現象がある。これは植物が予め死性病斑を生じるような病原体に感染していると、その後の同種または異種病原体の感染を免れるというものであり、植物に抵抗性を付与する手段として古くから知られている。SARの発現には、サリチル酸(SA)がシグナル物質として働いていることが、SAを外から投与した場合に病原性関連タンパク質いわゆるPRタンパク質の発現が増高し、また抵抗性反応が生じることから明らかであった。さらに、最近になって細菌由来のSA加水分解酵素を導入した形質転換タバコでは、SARの発現が抑制されることが確認されたことで、SARの発現にはSAが必須であると認識されるようになった。

感染植物体内でのSAの働きを知ることを目的として、Klessigの研究グループではSA結合タンパク質(SABP)の同定と性状解析を精力的に行ってきた。その結果、57kDaのサブユニット及びその他のポリペプチドからなる240-280kDaのSABPをタバコの葉から精製することに成功し、SARの発現へのSABPの関連を検討していた。今回紹介する論文では、彼らはSABPをコードするcDNAクローンをタバコのcDNAライブラリーから同定し、その解析を行っている。SABP特異的なモノクローナル抗体を用いて得られたcDNAクローン λ CK1は、57kDaのタンパク質をコードするORFを有し、その塩基配列から予想されるアミノ酸配列は、既知のカタラーゼと非常によく似た(60~90%)配列であることが明らかになった。カタラーゼは過酸化水素を水と酸素とに分解する酵素であり、SABPの高純度標品がmg当たり3,000

~10,000ユニットの高いカタラーゼ活性を有していること、その活性がSABPに対するモノクローナル抗体により免疫沈降可能なこと、さらにSABPのサブユニット構成が既知のカタラーゼの構造と非常によく類似していることから、SABPの機能の少なくとも一つはカタラーゼであることが考えられた。つまり、SABPは病原体の感染のない状態ではカタラーゼ活性により植物体内の活性酸素種を解毒するように働いているが、病原体の感染によってSAが生じ、SABPと結合すると、SABPはカタラーゼ活性を失い、植物中で過酸化水素などの活性酸素が増加すると予想された。そこで、タバコの葉にSA、3-水酸化安息香酸(SAのアナログ、SARを誘導しない)、3-アミノ-1,2,4-トリアゾール(3AT、植物や動物のカタラーゼの阻害物質)を処理し、葉中の過酸化水素量の経時変化を調べた。3-水酸化安息香酸を処理した場合には、コントロールの水処理と同レベルの過酸化水素の生成が認められたが、SA及び3AT処理した葉では、処理後3時間目から過酸化水素量の増加が起こり、その後急増した。すなわち、*in vitro*で認められたSAのカタラーゼ活性の阻害が、*in vivo*でも認められた。またSARの誘導により生じる様々な遺伝子発現の中で、SAによるPRタンパク質の誘導は、タバコの葉にSAをインジェクションすることで再現されるが、同様に3ATや過酸化水素そのものをインジェクションした葉においてもPRタンパク質の発現が認められることから、SAとPRタンパク質の生成、さらにSARの発現とを結ぶセカンドメッセンジャーとして、過酸化水素が働いている可能性が示唆された。

動物においては、活性酸素はNF- κ BやAP-1などの転写因子による遺伝子発現を活性化させるセカンドメッセンジャーとして機能していることが知られている。SABPやSA阻害性のカタラーゼは、キュウリ、トマト、アラビドプシスなどの植物でも存在していることを筆者らはすでに明らかにしているが、動物では報告例がなく、植物に固有

なものであるのかもしれない。しかし SA の誘導体であるアスピリンが動物では様々な機能を持つことから、SA の果たす機能は SA BP との結合によるカタラーゼ活性の阻害にとどまらず、さらに多様な反応に関わるものであるのかもしれない。いずれにしても、SA が SAR を誘導する過程で活性酸素の生成が起こり、短期的にはその毒性が侵入微生物を妨害するように働き、長期的には膜タンパク質の cross-linking などにより植物の抵抗性の増高に働く経路の存在が予想され、今後それらの過程の詳細が明らかにされることが期待される。

(抄訳 柄澤 明一(東北大)
KARASAWA Akira)

Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid.

Chen, Z., H. Silva and D.F. Klessig
Science 262 : 1883-1886 (1993)

文献情報

イネいもち病菌の病原性 に関する遺伝子

病原体が植物に感染する過程や、植物が病原体に対する抵抗反応の機構は、分子レベルで病原性遺伝子や抵抗性遺伝子等について論じられるようになった。

Talbot らは病原性に関する遺伝子は、宿主感染葉中で優先的に発現する病原体の遺伝子と考え、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) を用いて differential cDNA screening を行い、病原性遺伝子の同定を試みた。まず、*M. grisea* 感染葉中から全 RNA を抽出し、分画した poly (A)⁺RNA から cDNA library を作製し、screening を行った。その結果、42個の cDNA クローンを選抜し、さらにそれらについて解析を行い、感染葉中で転写量が約60倍となる単一遺伝子を同定し、MPGI

と名付けた。

次に、MPGIの機能を検討するために、MPGIを置換した形質転換体を作出した。得られた形質転換体は、イネ葉上の病斑密度、付着器形成数とも、形質転換前の野生株に比べ、約20%に減少した。さらに、形質転換体の分生胞子は正常に発芽するものの、発芽管が異常をきたし付着器を形成できない。別の形質転換体では分生胞子形成数が野生株に比べ約1/100になっていた。このことより、MPGIは付着器と分生胞子の形態形成に重要な役割を果たしていることを示した。

MPGIの mRNA は、*M. grisea* を葉に接種してから12時間後に発現し、18時間後一旦消失し、葉に病徴が現れ始める72時間後に再び発現する。また、窒素もしくは炭素を欠乏させた培地で野生株を生育させると、MPGI mRNA が多量に発現した。完全培地上ではMPGI mRNA は発現しない。

さらにMPGIの機能を探るために、MPGIの構造解析を行ったところ、塩基配列中に336bpの読み取り枠が存在し、112アミノ酸残基からなる11.5kDaのタンパク質がコードされていた。本タンパク質のN末端にはシグナル配列が、さらに、8個のシステイン残基と疎水性ドメインが存在していた。この特徴的なアミノ酸配列は、糸状菌の疎水性タンパク質“hydrophobin”と完全に一致したことより、MPGIはhydrophobinをコードしていることが判明した。

また、hydrophobin RodA (*Aspergillus nidulans*), Eas (*Neurospora crassa*) の変異株は菌糸表面が“easily wettable”という疎水性が低下した表現型を示すことが知られている。MPGI変異株においても、同様な表現型を示すことから、*M. grisea* においてもhydrophobinは菌糸表面の疎水性にも関与していることが示唆された。

hydrophobinは最近さらにいくつかの糸状菌でも報告されている。例えば、elm diseaseを引き起こす *Ophiostoma ulmi* の毒素である cerato-ulmin も hydrophobin である。hydrophobin は分子量や一次構造が特

微的であるが、その機能は糸状菌によって異なっていると考えられる。*M. grisea*において、*MPG1*がコードする hydrophobin は付着器や分生胞子の形成に必須であり、宿主感染に必要であると考えられるが、*MPG1*が病原性に関与する遺伝子であると結論づけるには多少性急な感を受ける。事実、植物病原菌以外の糸状菌から多くの hydrophobin が検出されていることからもうかがえる。

(抄訳 宮坂 篤一(東北大))

(MIYASAKA Atsushi)

Identification and characterization of *MPG1*, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*

Talbot, N.J., D.J. Ebbole and J.E. Hamer
Plant Cell 5: 1575-1590 (1993)

文献情報

乳酸発酵能を導入したアルコール発酵酵母の育種

伝統的な酒類の醸造やアルコール発酵は解放発酵形式が多く微生物汚染の可能性が高いため、酸を利用した低 pH 環境の維持による有害細菌の増殖抑制や大量の酵母添加などによって微生物汚染防止対策がとられてきた。清酒製造ではスターターである酒母製造時に乳酸を 4 g/l 程度になるよう添加している。伝統技術では、最初に乳酸菌を増殖させ乳酸菌が生産する乳酸で有害細菌の増殖を抑制し、ついで酵母を増殖させる方法をとっているため、複数の微生物のコントロールが必要であった。

発酵食品分野では乳酸は乳酸菌による発酵で、またエタノールは酵母による発酵で主に生産されているが、ともに解糖系からピルビン酸を経て生成されるという共通性を持っている。最終ステップに関与する酵素は、乳酸発酵では乳酸脱水素酵素(LDH)でありエタノール発酵ではアルコール脱水素酵素(ADH)で、ともに NADH₂ を補酵素とする還元反応である。

筆者らはこのような両者の共通性に着目し、酵母に乳酸菌の乳酸脱水素酵素遺伝子を導入し、乳酸とアルコールを同時に発酵生産できる酵母の育種を試みた。

アルコール発酵酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、通常ミトコンドリア画分に存在する乳酸脱水素酵素により乳酸を生産するがその量は 0.2~0.4 mg/l とごくわずかである。筆者らはホモ発酵乳酸菌の *Lactobacillus casei* の L(+)-LDH の遺伝子をクローン化し、ついでこの遺伝子を酵母の ADH 遺伝子のプロモーターとターミネーターの間につなぎ、酵母で発現する多コピー型ベクターと単一コピー型ベクター(YCP型)に組み込んだ。両ベクターで酵母を形質転換し、L(+)-LDH の発現をウェスタンブロットで確認したところ *Lactobacillus casei* の酵素と同じ分子量の酵素タンパクが生産されていることが認められた。細胞抽出液中の酵素比活性は *Lactobacillus casei* の活性を 100 とした場合、多コピー型ベクターの形質転換体ではその 60%、YCP 型で 3%であった。

多コピー型ベクターの形質転換体酵母を用いて 5%濃度のグルコースを基質とした発酵試験を行ったところ、エタノールの生産と同時に乳酸も生産され、その量は 10~12 g/l に達し、グルコース消費量の約 20%に相当した。エタノールの生産量はその分低下し対照酵母による生産量の 80%程度となった。また発酵液の pH は乳酸が生産されたことにより、乳酸を生産しなかった対照酵母による発酵液の最終 pH が 4.3 であったのに比べ pH 3.3 まで低下した。

酵母の増殖とエタノールまたは乳酸の生産との関係では、エタノールが対数増殖期から定常期にかけてほぼ変わらず生産されるのに対して、乳酸は対数増殖期には生産されるが定常期に入ると生産されなくなっていた。酵素活性の変化は ADH と LDH でほとんど変わらないことから、両者の生産調節機構に違

いがあることが推定された。*L. casei*のL(+)-LDHはアロステリックな活性化因子として、解糖系の中間代謝物であるフルクトース1,6-ビスリン酸を必要とすることなどが関係しているのかもしれない。

多コピー型ベクターの形質転換体酵母において、乳酸が生産されたことによる影響を検討したところ、プラスミッドの安定性に関してはほとんど差がなかったが、酵母の増殖速度が対照の酵母に比べ20%程度低下し最終酵母量も20%程度低くなっていた。しかし単一微生物で乳酸の発酵生産とアルコール発酵を同時に行うことが可能になったことは確かである。またコピー数を変えたり種々のプロモーターを使用することにより乳酸の生産量を調節することも可能であると思われる。さらには、アルコール発酵細菌 (*Zymomonas*

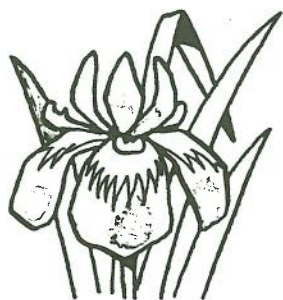
mobilis)に乳酸発酵性を導入し乳酸を副産物として同時に生産させたり、乳酸発酵微生物にアルコール発酵性を付与しアルコールを副産物として同時に生産させることも可能かと思われる。これらの微生物を、乳酸とアルコールが重要な風味となっている数多くの発酵食品、たとえば酒類、味噌、醤油、サワーパン、漬物などの製造に利用することも将来的には可能かもしれない。

(抄訳 秋田 修一 国税庁醸造試験所)

(AKITA Osamu)

Mixed lactic acid-alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Lactobacillus casei* L(+)-LDH

Dequin, S. and P. Barre
BIO/ Technology 12 : 173-177 (1994)



国際学会レポート

第2回国際昆虫分子生物学会に参加して

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所
田中良明

1. 会議の概要

フェニックスからジェットコースターのよ
うなスリルを味わえる小型プロペラ機に乗
って約30分、アリゾナ州フラグスタッフにある
北アリゾナ大学で1993年7月18~22日に行わ
れた第2回国際昆虫分子生物学会に、科技厅
重点基礎の国際集会派遣制度により参加す
ることができた。アリゾナ州という灼熱の砂
漠のイメージが強かったが、ここフラグスタ
ッフは標高がほぼ上高地と同じであるため日
中でもさほど暑くなく、また双耳峰が美しい
Mt. サンフランシスコを間近に望むという素
晴しい環境の下で会議が行われた。

そもそも昆虫では分子生物学の歴史がまだ
浅く、1989年にツーソンで開催された第1回
の本会議が昆虫の分子生物学としては初の国
際学会であった。今回はアリゾナ州立大学昆
虫科学センターとカナダのインセクトバイオ



写真1 講演がおこなわれた講堂前にて
ティーブレイクでくつろぐ参加者たち。

TANAKA Yoshiaki

テックが共催し、講演が29題(写真1)、ワ
ークショップが14題、そしてポスターセッシ
ョンは前回より100以上も多い約360題の発
表がされた。また、内容に関しても、前回は
昆虫の遺伝子発現や遺伝子構造に関する発表
が主だったが、今回はホルモンの生理作用や
遺伝子構造の解析、トランスジェニック昆虫、
生体防御機構、生体アミン、殺虫剤抵抗性、
バキュロウイルス、各種代謝酵素、受容体な
ど非常に多岐にわたっており、厳密な意味で
の分子生物学にはあまりこだわらないで発表
している印象を受けた。しかし、どの分野で
も第一線の研究が発表されており、自分の研
究している分野はもちろんのこと、それ以外
の分野の最新情報も得られることができ、た
いへん有意義であった。

2. 発表

私は「カイコの幼虫脱皮誘導におけるエク
ダイソンと20-ヒドロキシエクダイソンの
異なる作用」と題してポスター発表を行った
(本会議での一般発表は全てポスター発表)。
昆虫の脱皮ホルモンは総称してエクジステロ
イドと呼ばれているが、主要なものにはエク
ダイソンと20-ヒドロキシエクダイソンが
ある。特に、エクダイソン(エクジソンとも
呼ばれる)は最初に単離された昆虫ホルモン
として昆虫研究者以外の人にもよく知られて
いる。ところが、エクダイソンは20-ヒド
ロキシエクダイソンに比べて生物活性が著し
く低いこと、また体内で速やかに20-ヒド
ロキシエクダイソンに変換されることから、
ホルモンの前駆体であると考えられ、エクジ

ステロイドの研究には20-ヒドロキシエクダイソンのみが主に使われてきた。しかしながら、我々は飼料中のエクジステロイドがカイコの発育に及ぼす影響を研究している過程で、エクダイソンを人工飼料中に混ぜて孵化直後から投与すると、カイコが約2.5日毎に脱皮を繰り返して最大で11回幼虫脱皮することを発見した（超過剰幼虫脱皮）。この超過剰脱皮幼虫は体重の増加は遅いが、頭蓋の大きさは正常の終齢幼虫と同じ大きさになるまで脱皮を繰り返し、蛹化することなく死亡する（写真2）。

一方、生物活性の高いはずの20-ヒドロキシエクダイソンを同じように投与しても過剰脱皮は決して誘導されない。投与する濃度を様々に変えてみたが、低い濃度では発育に影響がなく、高い濃度では2齢ですべて死亡する。したがって、飼料に混ぜて経口的に投与した場合はエクダイソンは幼虫脱皮を、20-ヒドロキシエクダイソンは致死を誘導するというように発育に及ぼす作用が全く異なることが明らかになった。このように2つのホルモンの作用が全く異なる、特にエクダイソンの方が特異的な作用を示すというのは非常にまれな現象であり、この現象を解明することによってエクジステロイド作用機構に関する研究の新知見が得られることが期待される。

この超過剰脱皮幼虫は、血中のエクジステロイドが各齢とも摂食を開始して12時間後にはピークのレベルにまで達する。これは1つにはエクダイソンを食べた場合には体内でのエクジステロイド合成が急速に刺激され、その結果脱皮が連続しておこる可能性が考えられる。そこで、エクダイソンの主要な合成器官である前胸腺の活性変動を検討してみたが、エクダイソンを食べている幼虫では前胸腺は全く活性化されなかった。つまり、飼料から取り込まれたエクダイソンは、前胸腺を刺激するのではなく、直接標的器官に作用していることが推測された。一方、20-ヒドロキシエクダイソンを食べさせた場合、1回は脱皮が誘導されるが、脱皮を連続して誘導することはできない。この場合、1回目の脱皮の

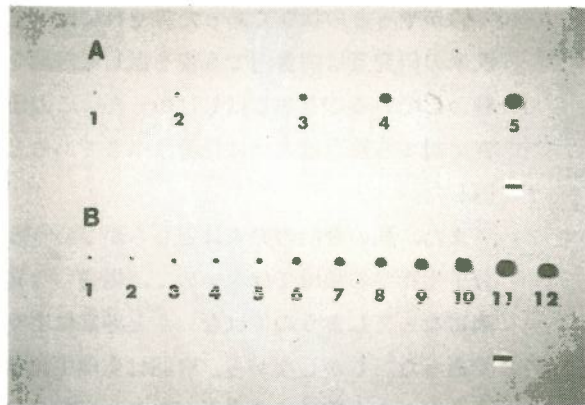


写真2 エクダイソンにより誘導された超過剰脱皮幼虫の頭蓋

A: 対照区, B: エクダイソン投与区

際には前胸腺の活性化がみられたが、次の齢では前胸腺は活性化されない。したがって、1回目の脱皮の際には体液中にエクダイソンが検出されるが、次の齢ではエクダイソンは検出されない。つまり、20-ヒドロキシエクダイソンを食べた場合でもエクダイソンが体液中に存在する場合には脱皮が誘導され、エクダイソンがない場合には脱皮が誘導されていないことが明らかになった。以上の結果から、エクダイソンあるいは20-ヒドロキシエクダイソン以外の代謝物が脱皮の誘導に重要な役割を果たしていることが示唆された。

この結果については、特にワシントン大学のRiddiford教授やオハイオ州立大学のDenlinger教授らと有意義な討論を重ねることができ、また、論文のコピーを配布することで多くの研究者に関心を持っていただいた。

3. 所 感

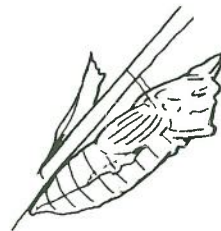
私にとって、外国で行われる国際学会へ出席するのは今回が初めてだったが、会議のスケジュールのハードさには驚かされた。会議は朝8時から夜8時半までは講演、ワークショップがぎっしり組まれ、その後夜9時から11時までポスターセッションを行うという非常にハードなスケジュールであった。特に私は時差ぼけとルームメイトのいびきと歯ぎしり（毎晩耳栓をして寝たが、それでもうるさかった）に悩まされて毎日寝不足についてゆ

くのがやっとの状態であった。それに比べて、欧米の研究者は宿舎内でも夜を徹して討論を戦わしていることがしばしばあった。この研究に対する熱意は大いに見習うべきであると感じた。

また、私の今回の発表はどちらかというと分子生物学の領域ではないので、場違いな発表になってしまうのではないかと非常に不安であった。しかしながら、今回は生理生化学の分野からも数多くの発表がなされており、

その点は杞憂に終わった。むしろ、自分のオリジナリティーを打ち出して研究をすれば、他の研究者に評価してもらえるということを実感した。

私が今回発表した現象はまだ他の昆虫では誰も発見していない。今後研究をさらに進めていくことによって、昆虫ホルモンの作用機構に新たな知見を加えることができればと期待している。



編集後記

本誌の情報収集のため、4月3～5日筑波大学で開催された日本植物病理学会平成6年度大会に出席しました。800名以上の参加者と317課題の発表があり、なかなかの盛況でした。この学会でも年々バイオテクノロジー関連の発表が増えていますが、今年は品種抵抗性遺伝子あるいは病原菌の病原性関連遺伝子の単離・クローニング、RFLP解析による

病原菌の種あるいは系統の類別の課題が目立ちました。病害防除関連では、生物防除とくに微生物による抵抗性誘導関連課題が大半を占めていましたが、いずれも基礎研究段階でした。薬剤防除関連の発表は16課題ありましたが、耐性菌関係が主で実際の防除については4課題だけでした。時代の流れとはいえやや物足りない感じがしました。(大畑記)

ブレイン テクノニュース (第43号)

平成6年5月15日発行

発行者 浜口 義 曠

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