

CODEN: BTEEEC

TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 49 号

BRAIN  
Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

MAY 15, 1995



中国系の梅山豚とヨーロッパ系のランドレースを組み合わせたキメラ豚  
(本文 8 ページ参照)

発行=生物系特定産業技術研究推進機構

## 総 説

佐々木卓治

イネゲノム研究の進展と成果…………… 1

## 国内情報

岡田吉美

エピトープを提示するタバコモザイクウイルス…………… 5

大西 彰

キメラ豚の作出およびキメラの判定…………… 8

杉本喜憲

和牛の DNA マーカーによる個体識別システムの開発……………12

荒木和男

魚類受精卵への新しい遺伝子導入法の開発……………15

山元大輔

ショウジョウバエの配偶行動を制御する遺伝子……………19

## 地域の先端研究

甲村浩之

アスパラガス優良株の多芽集塊，不定胚形成を利用した効率的苗生産……………23

## 文献情報

トラフグゲノムの解析：小さいことは良いことだ？……………27

微生物フィターゼによる子豚用飼料のリンの利用率改善……………28

乳酸菌 bacteriophage mv 4 の部位特異的組込要素の遺伝的解析と

*L. plantarum* への組込みベクターの構築……………29

## 海外便り

羽柴輝良

欧米バイテクの旅……………30

## イネゲノム研究の進展と成果

農林水産省 農業生物資源研究所 ゲノム研究チーム  
佐々木卓治

農林水産省主導のイネゲノム研究が本格的に開始されて約4年が経過した。農業上あるいは生物学上重要な遺伝子の単離を目指し、発現遺伝子のカタログ化、RFLP連鎖地図の作成および物理地図の構築を行っている。これまでに約2万個のcDNAクローンの部分塩基配列を決定し、約1600個のDNAマーカーをマップした連鎖地図を作成し、このうち約500個のマーカーによるYACライブラリーのスクリーニングを終了している。これらの結果はイネゲノム研究の基本データとなる。

### 1. はじめに

イネは東南アジア、アフリカに暮らす人類にとって最重要な食糧=コメを実らせる植物であり、そのゆえに古くから遺伝育種学の対象とされてきた。人々はメンデルが遺伝の法則を明らかにするよりはるか以前から必要にせまられ経験的に品質上あるいは栽培上好ましい形質を選抜する方法を知っていたようである。我が国においても明治以前から篤農家といわれる観察眼に優れ進取の気持ちをもった先達によって栽培上有利な形質をもつイネが選抜されてきた。しかし、系統的な近代交雑育種は明治政府が東京西ヶ原に農商務省管轄の試験場を開設した約100年前に始まったといえる。最初は食糧の安定的な確保をめざし、病気や害虫に対して抵抗性をもたせ、寒冷地などのきびしい環境下でも栽培を可能にし収量を増やしていくことから始めて、近年では食味のよいコメの育種が主流となっている感がある<sup>1)</sup>。しかし、育種法がこのままいかに発展しても好ましい形質を導入する基本になるのは交雑であり、任意の形質のみを導入して新しい品種を作出するには限界がある。この問題を解決する効率的な育種法はな

いものであろうか。1944年にエーブリーらにより「遺伝子」の本体がDNAであることが実証され、1953年にワトソンとクリックによりDNAの構造が「二重らせん」であることが解明されたことにより今日の分子生物学の発展が約束され、同時に新たな育種法の実現の可能性が示された。すなわち、ある形質を担う遺伝子をDNAとして単離同定し、本来それを持たない品種に導入する戦略がたてられたのである。ゲノム研究では発現形質レベルでの「遺伝子」をDNAレベルでの「遺伝子」として同定することを主たる目的のひとつとする。イネの場合、上述の農業上の重要性に加えてゲノムサイズが4億3千万塩基対で、植物遺伝学・分子生物学の材料としてよく知られているアラビドプシスの約3倍と比較的小さく、ゲノム研究対象生物としての要件を備えている。農林水産省では1991年より農業生物資源研究所を中心とし、(株)農林水産先端技術産業振興センターとの共同によりイネゲノム研究を本格的に開始した。この研究プログラムでは、(1)イネで発現している遺伝子のカタログ作成、(2)イネ高精度連鎖地図の作成、(3)イネゲノム物理地図の作成、を行うことにより農業上有利な形質を担う遺伝子の単離同定をめざしている。本総説では約4年間の研究成果を紹介し、今後の研究方向を展望する。

## 2. イネ遺伝子のカタログ作成

イネにはいったい何個の遺伝子が存在し、それぞれの組織、発生段階において発現し、イネという植物を定義しているのであろうか。この質問に答えるためには、まずイネにおける発現遺伝子を可能なかぎり捕捉することが要求される。植物においてはヒトを中心とした動物に比べてクローン化された遺伝子の総数が少なく迅速な研究推進のためには従来のクローニング法—機能既知の発現産物（タンパク質）に基づいてでは追いつかない。そこでランダムクローニングを行い、クローンの部分塩基配列を決定し、既知の塩基配列情報の中から類似の配列を探して発現産物の機能を推定する方法により、クローン化遺伝子数の増加を図った。具体的には mRNA を培養条件を種々変化させたカルス、幼苗、黄化幼苗、幼根などから単離し、プラスミドベクターを用いて cDNA ライブラリーを作製した。5'末端から 1 回の操作により決定できるだけの塩基配列（約 300bp）を決定し、アミノ酸配列に変換後、データベース PIR (Protein Identification Resource) に登録されたアミノ酸配列中に類似の配列を検索した<sup>2)</sup>。1995 年 2 月現在で解析を終了した総計約 2 万クローンの内訳を表 1 に示した。クローンの重複度は片端のみの配列情報に基づいてではある

表 1. 塩基配列解析を行った cDNA クローン内訳

cDNA ライブラリー	解析クローン数	1995年2月現在	
		機能を推定したクローン数 (%) <sup>1)</sup>	DDBJに登録したシーケンス数
カルス			
2, 4-D 存在 <sup>2)</sup>	2492	740 (29.7)	2447
BA 存在 <sup>3)</sup>	1915	472 (24.6)	608
NAA + BA 存在 <sup>4)</sup>	442	118 (26.7)	0
ヒートショック処理 <sup>5)</sup>	2673	581 (21.7)	0
幼根	1965	577 (26.0)	1849
幼苗	4759	1280 (26.9)	3431
黄化幼苗	4211	905 (21.5)	2654
その他	2511	567 (22.6)	0
総計	20968	5174 (24.7)	10989

1) FASTA アルゴリズムを用いて PIR に対して類似性検索を行い、最適化スコアが 2.00 以上の場合その cDNA がコードするタンパク質の機能が推定されたとみなした。

2) 1 ppm 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

3) 1 ppm 6-benzyladenine

4) 0.01 ppm 1-naphthaleneacetic acid, 0.1 ppm 6-benzyladenine

5) 25°C で 12 日間培養後、37°C で 3.5 時間培養

が約 40% と見積もられ、2 万クローンのうち 1 万 2 千クローンは独立な遺伝子由来と考えられた。各ライブラリーで得られた配列のうち 20~30% はかなりの確度で PIR 登録のタンパク質に類似性を示し、発現産物の機能を推定できた。残りは現在までにあらゆる生物を通じてクローン化されていない遺伝子である。推定された機能はライブラリーごとに特徴がみられ、例えば 2, 4-D 存在下カルスではタンパク質合成に関わる遺伝子が、幼苗では光合成に関わる遺伝子が、また幼根では細胞骨格や細胞膜に関わる遺伝子が他のライブラリーからよりも多種多数クローン化された。このように本方法により発現遺伝子カタログが迅速に作成できることが示されたが、これらの cDNA は次に述べる RFLP 連鎖解析のプロープとしても有効に利用されている。

## 3. イネ高精度連鎖地図の作成

連鎖解析はゲノム中のどの位置に注目する遺伝子が存在するかを他の遺伝子との相対的な位置関係から明らかにすることであり、従来は形質上の多型に基づいて組換え価を計算し、連鎖関係を求めていた。この方法では時間がかかるうえに使用できる多型に限りがあり精度のよい連鎖地図を作成することは困難であったが、制限酵素による切断断片長の多型 (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) がメンデルの法則に従って遺伝することが明らかにされて以来この性質が連鎖解析に多用されるようになった。われわれはより多くの RFLP を観察するために遺伝的に遠縁の日本型稲 (品種: 日本晴) とインド型稲 (品種: カサラス) の交雑後代 F<sub>2</sub> を作出した。その 186 個体より DNA を抽出し、8 種類の制限酵素 (*ApaI*, *BamHI*, *BglII*, *DraI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *KpnI*) それぞれで消化後、上述の cDNA クローンを主たるプロープとしたサザン解析により RFLP を検出、連鎖解析を行った。現在までにイネの 12 本の連鎖群 (= 染色体) 上に約 1350 個の RFLP の座位を決定している<sup>3)</sup>。塩

基配列に多型があっても RFLP として検出されるとは限らないので、10bp の長さのランダムな塩基配列のプライマーを用いた PCR による増幅断片長に多型を検出する方法 (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA) を併用し、約 150 個の座位を決定した<sup>4)</sup>。その他共同研究により交換入手したコムギ等の DNA プロブにより検出された座位を加えて合計 1626 個の DNA マーカーの座位の連鎖関係が明らかにされている。図 1 にこの連鎖地図を示した。計算された遺伝的距離の合計は 1590 センチモルガンであり、図 1 から明らかのようにマーカーの分布、すなわちゲノム中の組換え価には差があるものの各マーカー間の平均距離は 1 センチモルガンとなっている。連鎖解析に用いた個体数 186 ではイネのゲノムサイズを考慮すると分解能は 1 センチモルガン程度であり、この集団の連鎖地図精度はほぼ上限に達しているといえる。DNA マーカーに基づいた連鎖地図と形質に基づいた連鎖地図を対応づけ、DNA マーカーを DNA 断片に置き換える、つまりゲノムの物理地図を作成することが遺伝子単離にむけ必要になる。

#### 4. イネゲノム物理地図の作成

ゲノムを大きな断片にしてクローン化し、それを並べることによりゲノムを再構築することを物理地図作成という。例えていえば DNA マーカーが絵柄や形に、クローンが各ピースに相当するジグソーパズルといえる。イネ (品種: 日本晴) ゲノムのピースは酵母人工染色体, YAC (Yeast Artificial Chromosome) をベクターとしてクローン化している。ライブラリーには約 7000 クローンが含まれ、クローンの平均インサート長は 350kb である<sup>5)</sup>。つまりこのライブラリー全体でイネゲノムサイズの 5.5 倍量に相当するサイズをもつことになる。これらの YAC クローンをナイロンフィルターに高密度にプロットし、連鎖地図上の DNA マーカーをプローブとしてスクリーニングする。陽性クローンのゲノ

ム上の位置が使用した DNA マーカーの連鎖地図上の位置と対応するか否かを陽性クローン DNA を DNA マーカーが多型を示したと同一の制限酵素で切断後、このマーカーによるサザン解析を行って確認する。この一連の操作を図 2 に示した。現在までに約 500 マーカーによる一連の作業を終了し、このうち 90% で総計約 2300 個の陽性 YAC クローンを選抜した。これらのうち約 50% がイネ染色体の特定の領域に位置づけられている。残りの DNA マーカーによる YAC クローンの選抜を急ぎ行い、連鎖解析で形質と DNA マーカーの連鎖関係が明らかにされた後に直ちに対応する YAC クローンが取り出せるようにしておくことが望まれる。また、物理地図は将来イネゲノムの広領域塩基配列決定を行う際には必ず前提として必要になるものである。

#### 5. イネゲノムデータベースの構築

以上の結果はデータベースとしてまとめられて初めて有効に使われる。このために表形式のサーバークライアント型のデータベースを構築し、サーバには Sybase (Unix) を、クライアントには 4th-DIMENSION (Macintosh) を採用した。このデータベースは研究員の実験ノートの性格をもつ。もうひとつのデータベースとして小ゲノムサイズ

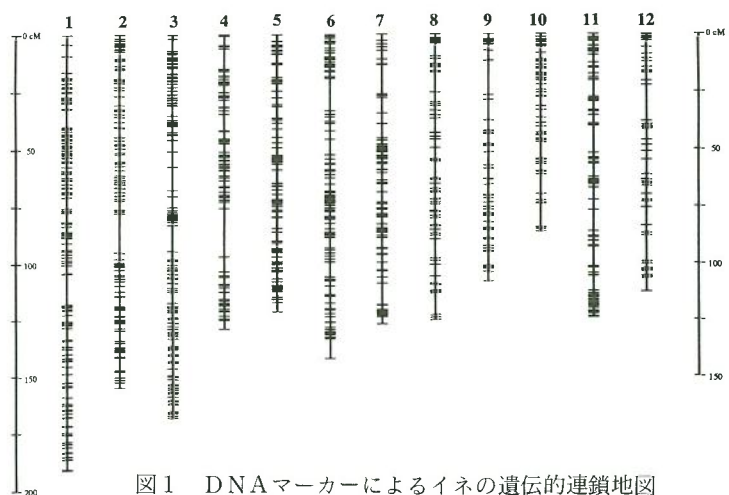


図 1 DNA マーカーによるイネの遺伝的連鎖地図  
12本の連鎖 (=染色体) に合計 1626 個のマーカーがマップされている。遺伝的距離の合計は 1590 センチモルガンである。

生物の場合によく使われる ACeDB を用いたデータベース (RiceDB) を構築中であり、将来インターネットを利用してアクセスできる予定である。

### 6. 遺伝子の単離にむけて

これまで述べた戦略は遺伝子単離のための基本ツールを揃えるためのものである。我々は以下に述べるマップベースクローニング (map-based cloning) 法によって遺伝子単離を試みる。まず単離しようとする標的形質領域のみについてヘテロであり、他の領域はホモとなっている系統 (同質遺伝子系統) を準備する。その F<sub>2</sub> では標的形質は分離するので、形質と連鎖し、その両側に位置する DNA マーカーを連鎖地図のなかから探すことができる。これらの DNA マーカーが存在する YAC クローンを物理地図から選択し、そのクローンをプローブとして標的形質が発現している植物組織の cDNA ライブラリーをスクリーニングすることで候補 cDNA を

得ることができる。これらの cDNA のなかから規模を拡大した分離集団を用いて更に形質と密に連鎖するクローンを選び、この cDNA が標的形質の発現と対応して転写されるか否かを検証する。また標的形質を持たない系統でのこの cDNA の発現の有無を調べることも欠かせない。もちろんこの cDNA およびこれをプローブにして選んだゲノミッククローン (ファージあるいはコスミドクローン) の塩基配列決定は候補遺伝子の基本情報を入手するために必要である。形質転換はイネの場合はやや困難を伴うが、後代まで導入形質を伝達できれば候補遺伝子の直接的証明法となる。いずれにしても(1)から(3)の方法で得た結果を遺伝学的に保証された系統に利用してはじめて遺伝子単離が約束されるのである。われわれは現在イネ白葉枯病抵抗性遺伝子 *Xa-1*, イネいもち病抵抗性遺伝子群, および出穂期制御遺伝子を単離標的として研究を進めている。

### 7. おわりに

以上述べてきた研究結果はプロジェクトを開始して約4年間で得られたものである。これらの結果は世界のイネゲノム研究をリードするものであり、今後も引き続きこの立場を維持するべく努力しなければならないが、世界の植物ゲノム研究は我々の予想をはるかに超えた速度で進展している。国内外の研究機関との情報交換や人的交流を有効に行ってイネゲノム研究を更に推進したいと考えている。

### 文 献

- 1) 蓬原雄三 (1990) イネの育種学, 東京大学出版会
- 2) Sasaki, T. *et al.* (1994) *Plant J.*, 6: 615-624
- 3) Kurata, N. *et al.* (1994) *Nature Genet.*, 8: 365-372
- 4) Monna, L. *et al.* (1994) *DNA Research*, 1: 139-148
- 5) Umehara, Y. *et al.* (1995) *Molecular Breeding*, 1: 79-89

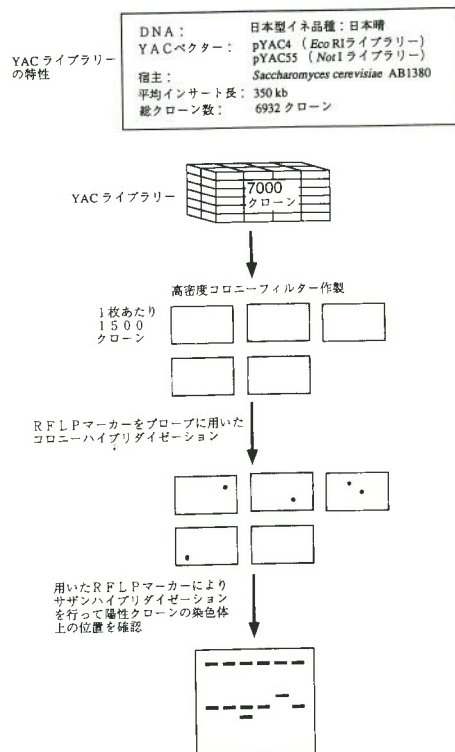


図2 イネYACライブラリーをフィルター上に高密度にプロットし、連鎖地図上DNAマーカーを含むYACクローンを探し出す手順を示した図

# エピトープを提示するタバコモザイクウイルス

帝京大学理工学部  
岡田吉美

我々はタバコモザイクウイルス (TMV) RNA を利用した全身感染性の新しいベクターを開発した。このベクターはコートタンパク質 (CP) と共に、CP の C 末端にペプチドを結合した融合 CP も発現することができ、さらに融合 CP もウイルス粒子に組込まれる。その結果ウイルス表面にペプチドを提示した TMV を作製することができる。我々はこの実験系を用いてエピトープを提示した TMV を種々作製することに成功した。

## 1. はじめに

主要な植物ウイルスはほとんど RNA ウィルスであり、その増殖能も極めて高い。たとえば TMV では感染葉 1kg から数 g のウィルスを調製することができる。したがって RNA ベクターが開発されれば、植物での物質生産に極めて有用であろうと考えられる。RNA ベクターの開発を可能にしたのは、cDNA を介した RNA の遺伝子操作系の確立であった。まずプロモモザイクウイルス (BMV) ベクターが作製され<sup>1)</sup>、続いて TMV ベクターが<sup>2)</sup>作製された。特に TMV ベクターでは、その後いくつかの改良が加えられ、最近ではエピトープをウイルス表面に提示した TMV の作製も可能になり<sup>3,4)</sup>、食べるワクチン開発への夢が期待されている。

## 2. TMV ベクター構築の戦略

TMV には 130K, 180K, 30K および CP の 4 種類のタンパク質がコードされている (図 1)。180K タンパク質は 130K タンパク質の終止コドンが部分的にサプレスされた、リードスルータンパク質である。30K タンパク質と CP はそれぞれのサブゲノム RNA

を鋳型にして翻訳される。

130K タンパク質と 180K タンパク質はゲノム RNA の複製を行う RNA ポリメラーゼである。30K タンパク質は TMV が感染細胞から隣の新感染細胞に広がる (細胞間移行) ために必要なタンパク質で、プラズモデスマータに局在してその径を広げる。またウイルスが感染葉から非感染葉へ広がる (遠距離移行) ためには、ウイルス粒子の形成が必要で、CP の欠損変異株やウイルス粒子を形成できない変異株は感染葉では広がるが、全身感染はできない。

このように TMV のゲノム RNA にはウイルスが植物体で増殖するための最少限の情報がコンパクトに詰め込まれており、いずれの遺伝子も全身感染に不可欠である。したがってウイルスをベクター化する場合、必要でない遺伝子領域を取り除き、代わりに外来遺伝子を挿入するという一般的な戦略は適用しにくい。そこで次善の策として、CP 遺伝子を取り除き、外来遺伝子と置換する方策がとられた (図 1 (A))。この形の TMV ベクターは全身感染はできないが、感染葉では増殖可能である。ベクターの有効性は CAT 遺伝子を挿入して確かめられた<sup>5)</sup>。

次に構築された TMV ベクターは、CP 遺伝子のあとに続けて外来ペプチド遺伝子を結合し、CP と外来ペプチドの融合タンパク質を発現させようという試みである。この場合

は、融合タンパク質から外来ペプチドを切離すことを考慮して、適当な配列、たとえばトリプシン分解のための Arg などを CP と外来ペプチドの間に挿入しておくことが望ましい (図 1 (B))。この形のベクターは、脳神経ペプチドの一つであるエンケファリンの発現でその有効性が確かめられた<sup>6)</sup>。このような短いペプチドを最初にしたのは、TMV 粒子の表面に CP の C 末端が出ていることを考慮し、この程度の長さのペプチドが C 末端について CP なら、あるいはウイルス粒子を形成できるのではないかと考えたからである。しかし残念ながらウイルス粒子の形成は見られず、全身感染はできなかったが、細胞レベルでは非常に効率よく融合タンパク質が合成された。

上に述べた技法で構築された TMV ベクターは、いずれもウイルス粒子を形成せず、細胞レベルまたは感染葉では効果的に働いたが、全身感染可能なベクターにはならなかった。植物体での発現を考える場合、すべての葉に噴霧器などで感染させればよいし、培養細胞での発現のためのベクターとしては有用であるとも考えられる。しかしこのままの形のベクターでは、実用化に大きな難点がある。それは感染に必要な充分量の TMV ベクターを調製することができないからである。

TMV ベクターは cDNA の形で構築され、それを試験管内で転写して調製される<sup>7)</sup>。鋳型 cDNA 1 $\mu$ g から転写される有効ベクター RNA は 50ng 程度で、1 回の実験に使える量は非常に限られている。1 回の試験管内転写でえられるベクター RNA の量が微量であっても、これがウイルス粒子を形成できるベクターであれば、一旦タバコで増殖させることによって多量の TMV ベクターを調製することができる。したがって実用化の観点に立てば、どうしてもウイルス粒子の形成可能な全身感染ベクターの構築が必要なのである。

我々の全身感染用 TMV ベクターは図 1 (B) の TMV ベクターの改良から生まれた。TMV の RNA ポリメラーゼ 180K タンパク質が、130K タンパク質遺伝子の終止コドン

のリードスルーで合成されることはすでに述べた。ではなぜ TMV ゲノムの中で 130K タンパク質遺伝子の終止コドンだけにリードスルーが起きるのだろうか。それは終止コドンのすぐあとに続く 6 塩基の配列が、リードスルーをするかしないかを決めていることが最近解明された<sup>8)</sup>。そこで我々はこの配列 (3' context sequence : 3'CS) を TMV の CP 遺伝子の終止コドンの次に挿入し、そのあとに外来遺伝子の配列をつなぐ方策を考えた (図 1 (C))。このような構成をとれば、CP 遺伝子の翻訳の大部分は本来の終止コドンで停止するが、3'CS のために一部はサプレッスされて、外来遺伝子との融合 CP も同時に合成されると考えたからである。そうすれば CP による粒子形成は可能になり、ベクターは接種葉だけでなく植物全体に広がるはずである。

このベクターの有効性は、血圧を下げる活性をもつアンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド (ACEI) の遺伝子を挿入したベクターで確かめられた<sup>9)</sup>。ベクターはタバコでもトマトでも植物全体に広がり、特にトマトの場合は果実でも ACEI を発現した。血圧をさげる機能をもったトマトがこのような方法で生まれるかも知れない。

この実験の過程で、我々は予想していなかった結果を発見した。TMV-ACEI ベクターを感染したタバコからベクター粒子を精製し、その CP を分析したところ、ベクター粒子には CP だけでなく、CP-ACEI も一緒に組込まれていた。ベクター粒子の中の CP : CP-ACEI の比は約 20 : 1 で、これは感染葉中の比とほぼ等しく、したがって合成された CP-ACEI は感染細胞で遊離して存在するのではなく、効率よくベクター粒子に組込まれているらしい。CP の C 末端が粒子表面に出ていることを考慮すると、ベクター粒子は図 2 のような形態、すなわち粒子表面に外来ペプチドを提示した形をとっていると推定される。ベクター粒子をトリプシン処理すると ACEI だけが粒子から分離することも図 2 のモデルを裏付けている。



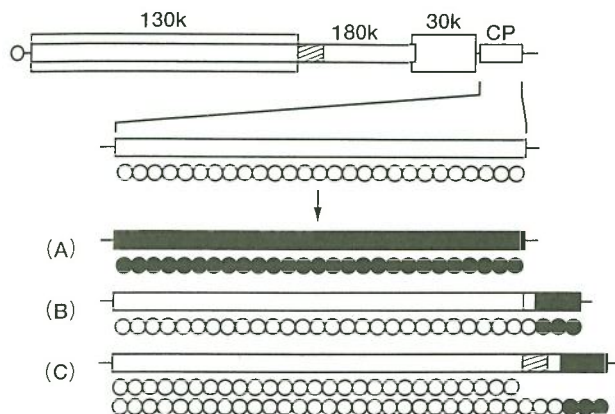


図1 TMVのゲノム構造と、コートタンパク質遺伝子を改変したTMVベクター

(A) CPの代わりに外来タンパク質を発現するベクター、  
 (B) CPと外来タンパク質の融合タンパク質を発現するベクター、  
 (C) CPとペプチドの融合タンパク質とCPの両方を発現する全身感染ベクター。  
 □: TMV遺伝子, ■: 外来遺伝子, ▨: 3' C.S.,  
 ○: TMVタンパク質, ●: 外来タンパク質

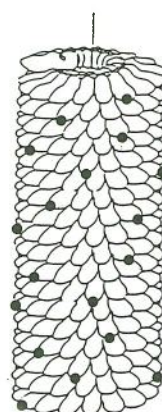


図2 エピトープをウイルス粒子表面に提示したTMV  
 ●: 融合タンパク質として発現しているエピトープ

### 3. エピトープをウイルス表面に提示するTMV

ペプチドをウイルス表面に提示した粒子を形成できるのはACEIだけなのか、あるいはほかのペプチドでも可能なかを調べるため、インフルエンザウイルスのHAタンパク質やHIVのgp120などのエピトープペプチドについて同様の実験を行った。その結果いずれの場合もベクターは全身感染し、ペプチドとCPの融合タンパク質は効率よくベクター粒子に組み込まれた<sup>3)</sup>。それぞれのTMV粒子はそれぞれの抗ペプチド抗体と特異的に反応した。実験に用いられたペプチドの最も大きいものは21アミノ酸残基である。したがって図1(C)の形のTMVベクターは、生理活性ペプチドやエピトープを粒子表面に提示したTMVを作製する一般的技法といえることができる。

このようなTMVベクターの複製能は、もとのTMVとほぼ同程度に高く、ベクター粒子は多量に植物体で発現されるから、将来食べるワクチンとして利用できる可能性がある。粒子表面に提示されるペプチドの数を

さらに増やすとか、どの程度の大きさのペプチドまでがこのような形の粒子を作れるかなどの課題は残っているが、ワクチンとしてのTMV、特にトマトなどに発現させた場合の食べるワクチンとしての夢が期待される。

### 文 献

- 1) French, R. *et al.* (1986) *Science*, 231: 1294-1297
- 2) Takamatsu, N. *et al.* (1987) *EMBO J.*, 6: 307-311
- 3) Sugiyama, Y. *et al.* (1995) *FEBS Lett.*, 359: 247-250
- 4) Turpen, T. H. *et al.* (1995) *Bio/Technology*, 13: 53-57
- 5) Takamatsu, N. *et al.* (1987) *EMBO J.*, 6: 307-311
- 6) Takamatsu, N. *et al.* (1990) *FEBS Letter*, 269: 73-76
- 7) Meshi, T. *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 5043-5047
- 8) Skuzecki, J. M. *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.*, 218: 365-373
- 9) Hamamoto, H. *et al.* (1993) *Bio/Technology*, 11: 930-932

## キメラ豚の作出およびキメラの判定

農林水産省 畜産試験場 育種部

大西 彰

中国系の梅山豚とヨーロッパ系のランドレースを組み合わせたキメラ豚を、注入法により作出した。また、ミトコンドリア DNA の制限酵素断片長多型 (RFLP) を利用した新しいキメラの判定法を開発した。さらに、後代検定から、作出したキメラの雌は、生殖細胞系のキメラであることが明らかになった。これらの結果は、豚の ES 細胞の判定および利用に応用できる。

### 1. はじめに

キメラとは、2個以上の受精卵の結合により生まれた、遺伝的に異なる細胞集団から身体が構成された動物を意味する。

哺乳類においては、キメラを用いた研究のほとんど全てが、マウスにより行われてきた。キメラマウスの最初の成功は、1960年代と早く、作出も比較的容易なことから、多くの研究成果がこれまでに報告されている。特に、細胞分化および性分化に関する研究は、キメラマウスなしにその発展はなかったといっても過言ではない<sup>1)</sup>。その後、キメラを用いた研究はややかげりを見せたが、1990年代になって再びキメラが注目されるようになった。キメラを再び表舞台に出した立役者は、胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell: ES 細胞) である。ES 細胞を用いて特定の遺伝子を改変した、いわゆるジーンタゲティングした動物を得る際に、キメラの作出が不可欠なのである<sup>2,3)</sup>。しかし、家畜においては、ES 細胞の樹立が困難なばかりか、キメラの作出技術さえ確立しているとはいえない現状にある。この事は、将来、家畜で ES 細胞を利用する際の大きな障害となることが予想される。そのため、筆者らは、家畜の中でもキメラに関する研究が最も遅れている豚について、キメ

ラの作出法およびキメラの判定法を確立することとした。

### 2. キメラの作出法

表 1 に、これまでに報告された家畜および実験動物の主なキメラをあげた。キメラの作出方法は、大きく凝集法と注入法に区別することができる。

凝集法には、主に 8 細胞期の胚を用いる。この時期の胚の周囲にある透明体というカプセルを取り除き、“裸”にした 2 個の胚を接触させると、胚の凝集が生じ、1 個の大きな胚盤胞を形成する。この胚盤胞を仮親の子宮に移植することにより、キメラが生まれる。この方法は、マウスでは大変に有効で容易にキメラを作ることができる。しかし、家畜においては、透明体の除去がその後の胚発生に悪影響を与えることが多く、そのまま応用できないことが多い。そのため、空の透明体を別に用意し、その中で胚の凝集を行う方法がよくとられる。

注入法には、胚盤胞を一般に用いる。この時期の胚の内部には、内部細胞塊と呼ばれる、将来の成体となる部分が存在する。この内部細胞塊を取りだし、別の胚盤胞に注入することによりキメラが得られる。注入操作は、顕微鏡下でマイクロマニピュレーターを用いて行われる。そのため、操作に熟練が要求されるが、透明体を除去する必要がなく、体外で

ONISHI Akira

胚を培養する時間が比較的短くてすむことから、体外培養系が完全に確立していない動物種でもキメラが作れる利点がある。

### 3. キメラ豚の作出

今回、筆者らが成功したキメラ豚は、注入法により作出した。図1にその概略を示した。キメラの組み合わせは、中国系品種である梅山豚とヨーロッパ系のランドレースを選んだ。梅山豚の毛色は黒色で、ランドレースの毛色は白色であるため、キメラにはその両色が現れることが予想され、外見上の識別が容易である。まず、妊娠6日目の梅山豚とランドレースの胚盤胞を、子宮角より採取した。次に、ランドレースの透明帯を酵素処理により取り除いた。さらに、内部細胞塊の周囲にある栄養芽細胞層を化学的に破壊して除き、内部細胞塊のみを取り出した。取り出した内部細胞塊は、酵素処理により個々の細胞に解離し、マイクロマニピュレーターを用いて梅山豚の胚盤胞内に注入した。注入した胚盤胞は、仮親の子宮角に移植した。3頭の仮親に移植した結果、その内の1腹から13匹の子豚が生まれ、その中に雌雄各1匹ずつのキメラが含まれていた。なお、豚の胚盤胞に細胞を注入する際、通常油圧式のマイクロマニピュレーター単独では、栄養芽細胞層を突き破ることが大変に困難であったが、ピエゾ式マイクロマニピュレーターとの併用により貫入操作が容易となることがわかった。

### 4. キメラの判定

キメラの判定は、毛色から外見上に行えるが、組織や臓器のキメラの判定には他の何らかの遺伝的なマーカーが必要となる。その目的のため、遺伝的な変異のある血清タンパクや酵素などの生化学的マーカーが広く利用されている。マウスでは、これまでに多くの近交系が樹立され、それぞれの系を特徴づける生化学的マーカーが明らかになっている。しかし、家畜では事情がかなり異なっている。

表1 家畜および実験動物における主なキメラの作出

動物種	作出方法	文献
ヒツジ	注入法	Tucker et al.(1974). <i>Immunology</i> , 26: 613.
	凝集法	Fehilly et al.(1984). <i>J. Reprod. Fert.</i> 70: 347.
	注入法	Butler et al.(1987). <i>J. Anim. Sci.</i> 65: 317.
ヒツジ-ヤギ	凝集法	Fehilly et al.(1984). <i>Nature</i> , 307: 634.
	注入法	Polzin et al.(1987). <i>J. Anim. Sci.</i> 65: 325.
	注入法	Roth et al.(1989). <i>Biol. Reprod.</i> 41: 675.
ウシ	注入法	Summers et al.(1983). <i>Anim. Reprod. Sci.</i> 6: 91.
	凝集法	Brem et al.(1984). <i>Theriogenology</i> . 22: 609.
	凝集法	Picard et al.(1990). <i>Mol. Reprod. Dev.</i> 27: 295.
	注入法	Williams et al.(1990). <i>Reprod. Fertil. Dev.</i> 2: 385.
ブタ	注入法	Kashiwazaki et al.(1992). <i>Vet. Rec.</i> 130: 186.
	注入法	Onishi et al.(1994). <i>Biol. Reprod.</i> 51: 1069.
マウス	凝集法	Tarkowski (1961). <i>Nature</i> . 190: 857.
	凝集法	Mintz (1962). <i>Amer. Zool.</i> 2: 432 (Abstr. 310).
	注入法	Gardner (1968). <i>Nature</i> . 220: 596.
	注入法	Rossant & Frels (1980). <i>Science</i> . 208: 419.
ラット	凝集法	Mayer & Fritz (1974). <i>J. Reprod. Fert.</i> 39: 1.
	凝集法	Mullen & LaVail (1976). <i>Science</i> . 192: 799.
ラット-マウス	注入法	Kajiwarra et al.(1988). <i>Dev. Biol.</i> 129: 586.
ウサギ	注入法	Gardner & Munro (1974). <i>Nature</i> . 250: 146.
	注入法	Moustafa (1974). <i>Proc. Soc. Exp. Biol. Med.</i> 147: 485.
	注入法	Yang & Foote (1988). <i>Gamate. Res.</i> 21: 345.
ハムスター	凝集法	Piedrahita et al.(1992). <i>Biol. Reprod.</i> 47: 347.

家畜においては、近交系の作出が困難なことから各品種が区別できるマーカーが必要となる。ところが、家畜の血液型やタンパク多型に関する研究がこれまで活発に行われてきたにもかかわらず、各品種を明確に識別できるマーカーはほとんど見つかっていない。この事が、家畜のキメラの解析を困難にしていた。

細胞質に存在するミトコンドリアは、独自のDNAを持つ。最近、ミトコンドリアDNAの制限酵素断片長多型(RFLP)が、中国系の豚とヨーロッパ系の豚の間で全く異なることが明らかになった。ミトコンドリアは、あらゆる細胞に存在するため、キメラのマーカーとしての利用が考えられた。そこで、ミトコンドリアDNAのキメラのマーカーとしての有効性を次に検討した。ミトコンドリア

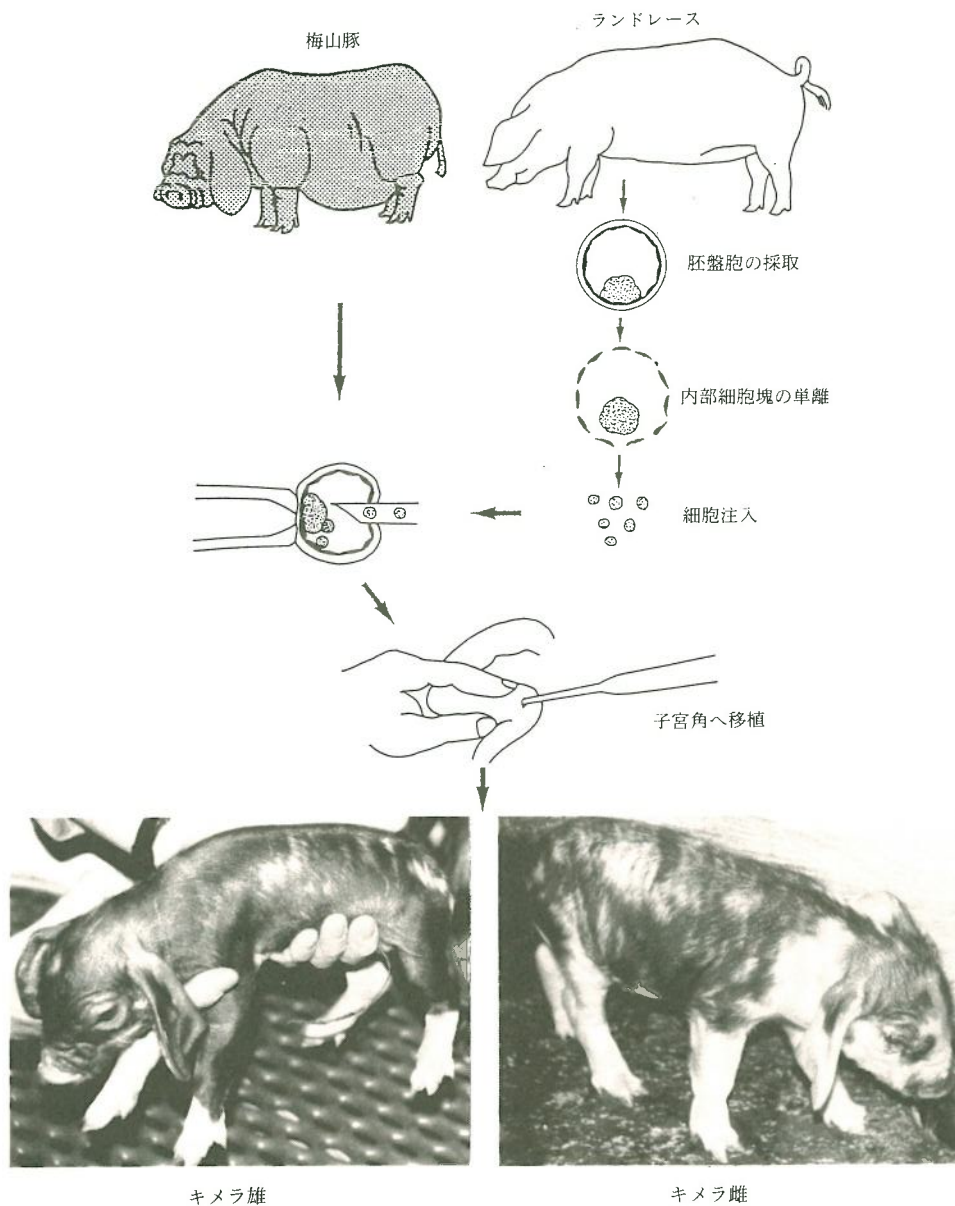


図1 キメラ豚の作出法

ア DNA の検出は、クローニングしたランドレースのミトコンドリア DNA をプローブに、サザンブロットハイブリダイゼーションにより行った。雄のキメラの各種臓器から抽出したゲノミック DNA を *Bgl* II 制限酵素で処理し、サザンブロットハイブリダイゼーションした結果、全ての臓器において、梅山豚由来の16.5kb のバンドとランドレース由来の4.4kb の2本のバンドが検出できた(図2)。同様な結果は、血液から分離した白血球においても得られた。これらの結果から、ミトコンドリア DNA がキメラのマーカーとして非常に有効であることが明らかになった。

### 5. 生殖細胞系のキメラの判定

キメラの精子あるいは卵子は、組み合わせに用いた系統あるいは品種由来の純粋な遺伝子型を持ち、雑種のように互いの遺伝子が混じり合うことはない。つまり、今回のキメラ豚では、梅山豚とランドレースのどちらか一方あるいは両方の生殖細胞を産することができる。また、ランドレースの白色の毛色は、梅山豚の黒色に対して遺伝的に優性で、ランドレースと梅山豚の雑種では、白色の毛色となる。この事を利用して、生殖細胞のキメラの

判定を行なった。すなわち、キメラの雌に梅山豚の雄を交配すると、キメラが梅山豚の卵子を産すれば黒色の子豚が、ランドレースの卵子を産すれば白色の子豚が生まれることとなる。

作出したキメラの雌は、3カ月齢から発情を示した。ランドレースが7カ月齢で性成熟に達するのに対し、梅山豚ではそれよりも約3カ月早いことが報告されている。交配は7カ月齢から実施した。その結果、初産では、白色と黒色の産子が4匹ずつ、2産では、白色の産子が6匹、黒色の産子が3匹得られた。現在さらに3産目を妊娠中である。もしも無事に3産目の分娩を終えたならば、このキメラ豚から1年間に3回の子取りができたこととなり、優秀な繁殖用の豚と同様な能力を持つこととなる。これらの結果から、今回のキメラ豚の雌は、ランドレースと梅山豚の正常な卵子を合わせ持つ生殖細胞系のキメラであることが明らかになった。

## 6. 今後の課題

ES細胞は、受精卵から得られる株化細胞で、正常な胚に注入することによりキメラとして分化し、個体となり、精子あるいは卵子として次世代に遺伝形質を伝えることができる。このES細胞を利用して特定の遺伝子のみを改変したマウスが、盛んに作られるようになってきた。家畜からES細胞を単離する研究は世界的に試みられているが、現在のところ、家畜のES細胞からキメラが得られた報告はない。今回、キメラ豚の作出、ミトコンドリアDNAによるキメラの判定および生

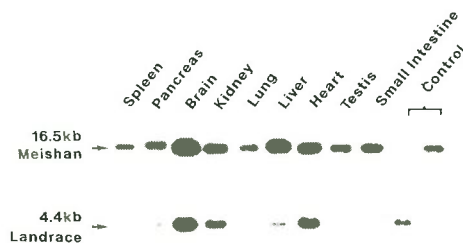


図2 ミトコンドリアDNAによる各種臓器のキメラの判定

殖細胞系のキメラの判定に成功したことから、豚のES細胞の判定および利用の手段が大きく前進したものと思われる。筆者らは、豚のES細胞を得る研究を同時に進めているため、今後は、豚のES細胞を用いたキメラの作出に取り組みたい。

## 7. おわりに

家畜を用いて研究を進めるのは、とても容易なことではない。この研究も、実に多くの人々に助けられて成功した。改めて感謝の意を表したい。

## 文 献

- 1) McLaren, A. (1976) Mammalian Chimaeras, Cambridge Univ. Press, Cambridge
- 2) Robertson, E. J. ed. (1987) Teratocarcinoma and Embryonic Stem Cells. A Practical Approach, IRL Press, Oxford
- 3) Joyner, A. L. ed. (1993) Gene Targeting. A Practical Approach, IRL Press, Oxford

## 国内情報

和牛の DNA マーカーによる  
個体識別システムの開発

畜産技術協会附属動物遺伝研究所

杉本喜憲

血液・精液や被毛・唾液などの微量な試料でも、多型性 DNA マーカーを利用すれば、高い正確さで個体識別できる。最近、和牛において産子の血統の不一致など問題が生じているが、私たちは、和牛から高い多型性を示すマイクロサテライト DNA マーカーを多数分離し、DNA マーカーによる個体識別法を開発した。この方法を基本として、今後、さらに改良を重ねて実用的なシステム化を図り、個体識別の正確さについての評価を加えていく必要がある。

## 1. はじめに

家畜の育種では、改良の目標を決めてその目標に近い形質を示す個体を選んで交配させ、生まれてきた子についても選抜を繰り返し、その形質の固定を図る。この数千年にわたって行われてきた伝統的な方法に、近年、数理統計学や集団遺伝学が応用され、育種改良の大幅な進展が図られてきた。しかしながら、親の遺伝資質の50%しか子に伝わらない上、生殖細胞の減数分裂時にランダムなゲノムの組換えが起こるため、どうしても多数の子を作り、それらの中から親達の優れた経済的形質をできるだけ多く継承したものを選ぶことが必要になってくる。この手法を確実なものにする基本条件は、正確な親子判定を行うことである。一方、和牛においては人工受精が一般化しており、また、血統による価格差が広がっているため、産子の血統の不一致は大きな問題となることが多い。さらに、受精卵移植の普及により全兄弟産子が同時に多数生産される機会が増えてきている。このため、多型性 DNA マーカーを利用して親子判定する必要性が生まれてきた。DNA の場合、血液だけでなく精液でも使え、PCR という方法で被毛や唾液など微量な試料でも問題なく

調べることができるという長所がある。既に、ヒトの親子判定や犯罪捜査では、血液型・指紋など従来のものに付け加わって、DNA マーカーが補完的に使われ始められ、その有効性についての検証が始まっている。ここでは、DNA マーカーを用いる和牛の個体識別システムの開発の現状と問題点などについて、私たちの仕事を中心に紹介する。

## 2. 個体識別用 DNA マーカーの分離

多型性 DNA マーカーは、図 1 ように RFLP マーカー、VNTR マーカー、散在性反復配列に分けられる。和牛の個体識別に適した DNA マーカーには、和牛で多型性が高い、多数存在している、データの記録が容易（数字で表わすことができる）、少量の DNA 試料で分析可能、自動化で多数の試料

- (1) RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) マーカー  
数千塩基対。 CmpG → TpG の変異が多い。  
(MspI, TaqI, PstI, PvuII, RsaI, BglIII, etc.)
- (2) VNTR (Variable Number of Tandem Repeat)  
ミニサテライト 数十塩基対の繰り返し。  
マイクロサテライト 2~10 塩基対の繰り返し。
- (3) 分散型反復配列  
種特異的。配列中の変異が見られる。

図 1 多型性 DNA マーカーの分類

SUGIMOTO Yoshikazu

が扱える、などの条件が要求される。これらの条件を満たすDNA マーカーは、VNTR マーカーのうち、CA/GT の2塩基繰り返し のマイクロサテライトだけである。私たちは 和牛のゲノム DNA ライブラリーを作成し、 CA/GT の12回以上の繰り返しの認められる マイクロサテライトを113種得、それらに DIK (Doubutu Iden Kenkyuusho) 番号を 付けた。これらのDIKについてPCR増幅 のためのプライマーを合成し、ランダムに選 んだ和牛40頭で調べたところ、42種に和牛で の有用性が確認された。図2に、マイクロサ テライトを用いた親子判定の例を示している。 片方のPCRプライマーを蛍光で標識し、 PCRを行うと、蛍光で標識されたPCR生成 物ができる。DIKの多型性は、CA/GTの 繰り返し数なのでPCR生成物のサイズは CA/GTの繰り返し数で決まってくる。 DNAシーケンサーにかけてサイズを測り、 対立遺伝子の型を調べる。この例で用いてい るDIK 008では、雌牛の試料から繰り返し数 20と21の対立遺伝子が、雄牛の試料から繰り 返し数13と18の対立遺伝子が認められ、子牛 の試料から繰り返し数18と21の対立遺伝子が 認められた。すなわち、子牛の繰り返し数18 は雄牛に由来し、子牛の21は雌牛に由来する ことが考えられ、このDIKに関しては親子 関係に矛盾はなかったことになる。このよう に対立遺伝子の型が両親ですべて異なるよう な多型性の高いマイクロサテライトを用いる と、個体識別の正確さは高くなる。

### 3. 個体識別用 DIK の牛染色体への マッピング

DIK マイクロサテライトは、メンデル遺 伝するため、個体識別で用いるためには、お 互い遺伝的連鎖関係があってはならない。そ こで、私たちは国際 BovMap グループのメン バーになり、国際 BovMap のリファレン スパネルのDNAを使って、DIKの染色体 へのマッピングを行っている。図3には、異 型接合率の高い順にDIKを並べ、12種組み 合わせた場合の個体識別の能力をまとめてい

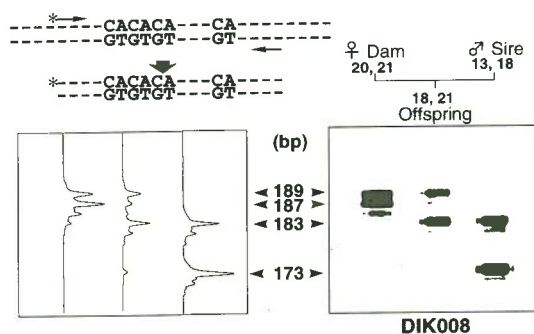


図2 マイクロサテライト (DIK008) を用いた 和牛の親子判定

Locus	Heterozygosity	Allele	Distinguishable Cattle with 12 Loci
12DIK97	0.90	10	<b>5.6 x 10<sup>7</sup> - 8.4 x 10<sup>7</sup></b>
28DIK68	0.88	9	
11DIK23	0.83	10	
9DIK96	0.83	5	
1DIK24	0.78	9	
24DIK21	0.75	7	
DIK90	0.75	6	
13DIK93	0.73	6	
10DIK20	0.70	9	
DIK106	0.70	5	
DIK51	0.68	4	
3DIK69	0.68	12	
8DIK74	0.68	6	5.6 x 10 <sup>7</sup>
15DIK102	0.68	12	
4DIK89	0.65	7	

図3 DNA マーカーによる個体識別能力

る。DIKの前の数字はマップされた染色体 の番号を表わし、数字の付いてないものはま だマップ中であることを示す。後の数字はも ともとの整理番号である。遺伝的連鎖関係を 最小にするため、同一染色体に位置するもの は異型接合率 (heterozygosity) が高いもの でも除いている。全国の和牛の総数は約150 万頭であるが、私たちのシステムでは、和牛 790万頭から2億3千万頭の識別が可能であ る。実際、鹿児島県の協力を得て、全兄弟8 組20頭の識別ができることを示した。図4に は、父性否定率の高い順にDIKを並べ、12 種組み合わせた場合の父親判定の能力をまと めている。この場合も、遺伝的連鎖関係を最 小にしている。現在、1,500頭といわれる黒 毛和種雄牛に対して、1万頭から3万6千 頭の判定能力が予想される。鹿児島県との共 同で、子牛20頭の父親を10頭の候補牛から推 定するブラインド実験を成功裡に行った。

Locus	PE	Distinguishable Sires with 12 Loci
<b>DIK106</b>	0.68	<b>15,000 - 25,000</b>
11DIK23	0.67	
15DIK102	0.62	
1DIK24	0.58	
12DIK97	0.58	
28DIK68	0.57	
23DIK10	0.56	
<b>DIK70</b>	0.56	
3DIK69	0.54	
13DIK54	0.48	
4DIK89	0.48	
8DIK74	0.45	
19DIK39	0.45	15,000
24DIK21	0.45	

図4 DNAマーカーによる父親判定能力

#### 4. 今後の目標：DNA型判定法の自動化

個体識別の手順としては、(1)和牛血液からのDNAの分離、(2)PCR反応、(3)DNAシーケンサーによる分離、(4)PCR生成物のサイズの判定、である。和牛の個体識別に必要な多型性DNAマーカーは既に用意されたので、今後は、できるだけ自動化されたシステムを開発していくつもりである。(1)では、少数の試料の場合は簡単な試薬キットを、多数の試料の場合はロボットを使えばよいだろう。(2)の場合、私たちは、PCR生成物のサイズを100から300塩基対付近に4種類に設定し、3種類の標識用色素を使って、DNAシーケンサーの1つのレーンで12種のDIK、すなわち、和牛1頭を解析するつもりである。12×8、96本のPCR反応液をロボットで調製し、PCRを行う。1プレートの調製に約30分かかるので、ロボット1台で日に14枚、112頭の和牛分のPCR反応を処理できるこ

とになる。さらに、組合わせを工夫すれば複数のDIKのPCR反応を1本の反応チューブで行わせることも可能だろう。DIKを用いるDNAの型判定が広く行われていけば、県毎の和牛閉鎖集団の中でのそれぞれのDIKの対立遺伝子型の頻度がわかり、その集団に適したより有効なDIKの選択ができるだろう。また、もっと強力な多型性の高いマイクロサテライトがあれば、個体識別に必要なDNAマーカーの数を少なくすることができよう。(3)では、将来的には、DNAシーケンサーの電気泳動の時間は改良されて短縮され、レーン数も現行の36から増えるだろう。(4)ではさらに使いやすいソフトが開発されると思う。このシステムでは様々な段階での改良が予想され、自動化・省力化された姿で実用化されることが期待される。

また、DNAマーカーを用いる個体識別システムの信頼性を証明する必要がある。そのためには、血液型やタンパク質の多型性に基づいている現行の方法との体系的な比較試験を行い、それぞれの方法の長所や問題点を明らかにすべきであろう。もし、DNAマーカーを使うことで個体識別の正確さが向上し、その結果、育種改良がさらに進展するのなら、望外の喜びである。

#### 5. 謝 辞

この研究は、(財)全国競馬・畜産振興会の援助により、農林水産省家畜改良センター、鹿児島県肉用牛改良研究所、(社)家畜改良事業団、(株)富士工業との共同で行われたものである。関係の方々に深謝する。



## 魚類受精卵への新しい遺伝子導入法の開発

農林水産省 養殖研究所 遺伝育種部 細胞工学研究室  
荒木和男

魚類の卵は巨大な卵黄を持ち、胚盤は小さくしかも不透明で強靱な卵膜に被われているため、マウスのように受精卵の雄性前核に遺伝子を注入することは極めて難しい。そのため、トランスジェニック魚が作出される確率はマウスに較べて低く、得られた場合でも多くの場合一部の細胞の染色体にのみ導入遺伝子が組み込まれたモザイクの状態になる。したがって、トランスジェニック魚を効率よく作出するためには新しい遺伝子導入法の開発に待つところが大きい。そこで、魚類の受精卵が囲卵腔へ吸水することを利用した方法ならびに精子をベクターとした遺伝子導入法の開発を行った。

### 1. はじめに

近年、魚類の生物学的特徴が目されるようになり、魚類が分子生物学の実験動物として使用されるようになってきた。特に、形態形成異常を持つ突然変異体が存在することからゼブラフィッシュやメダカの中樞神経系の分化誘導および形態形成に関与する遺伝子および魚類の性分化の特異性から性に関与する遺伝子がクローニングされ、その塩基配列および発現様式が解明されている<sup>1,2,3)</sup>。

しかし、魚類の場合、樹立されている培養細胞の種類が限られているため、遺伝子の発現調節領域の解析や機能の解析を行うためにはトランスジェニック魚を作出し、その発現様式を調べる必要がある<sup>4,6)</sup>。ところが、魚類の卵は巨大な卵黄を持ち、胚盤は小さくしかも不透明で強靱な卵膜に被われているため、マウスのように受精卵の雄性前核に遺伝子を注入することは極めて難しい。そのため、トランスジェニック魚が作出される確率はマウスに較べて低く、得られた場合でも多くの場合は一部の細胞の染色体にのみ導入遺伝子が組み込まれたモザイク状態になり、完全なトランスジェニック魚を得るにはF<sub>1</sub>を作出する必要がある<sup>5,7,8)</sup>。そのため、より効率良く

トランスジェニック魚を得るためには魚類の受精卵の特徴を利用した魚類の受精卵に適した新しい遺伝子の導入法の開発を行う必要がある。そこで、我々は魚類の受精卵が囲卵腔へ吸水することを利用した方法ならびに精子をベクターとした遺伝子導入法の開発を行った。また、トランスジェニック魚が得られる確率が低いいためその選別には膨大な時間と労力を必要とする。しかし、もし、導入した遺伝子の発現を胚体を生かした状態でリアルタイムに解析する系が存在すれば、トランスジェニック魚の選別が容易になるだけでなく、初期胚における遺伝子発現を解析する上で極めて有益である。そこで、我々はリポーター遺伝子にホタルのルシフェラーゼ遺伝子を用い、発現の解析に1光子の光をも同定できる超高感度カメラである浜松ホトニクス社のARGUS-50を使用することによって、このような系の開発を行った<sup>9)</sup>。このカメラは、これまで星の光のスペクトルの変化を観測する目的で探査衛星や大型天体望遠鏡に搭載されたり、カルシウムに結合する蛍光物質を利用した細胞内カルシウムの測定等に主に使用されてきたカメラである。

### 2. 吸水を利用した遺伝子導入法の開発

魚類の受精卵は受精直後に囲卵腔への吸水を行う。このことを利用して、遺伝子を囲卵

腔へ取り込ませることが可能かどうかをアマゴの受精卵を材料にして検討した。

受精直後のアマゴの卵を素早くリンゲル液で洗浄後、 $^{32}\text{P}$ で標識した発現ベクターである pSV2neo (SV40ウイルスのT遺伝子の発現調節領域と大腸菌のジェネシチン 418 耐性遺伝子を組み合わせた発現ベクター) を  $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で含む水溶液に浸し一定時間毎に受精卵を取り出し、 $^{32}\text{P}$ の量により囲卵腔に取り込まれた pSV2neo の量を推定した。図 1 の破線で示すように、受精直後のアマゴの卵を 5 分間吸水させることによって囲卵腔への pSV2neo の取り込みが始まり、20 分間吸水させることによって取り込まれる pSV2neo の量がほぼ定常状態になることが判明した。これに対して、受精後十分吸水させた卵を用いて囲卵腔への pSV2neo の取り込み実験を行った場合 (実線) も、量は少ないながらも囲卵腔内に pSV2neo の存在が確認された。しかしこれは一連の実験操作中に起こった pSV2neo の混入によるものと考えられる。よって、実際に囲卵腔に取り込まれた pSV2neo の量は両者の差によって示されると考えられる。

次に、フナの卵を受精後直ちに水洗いし、 $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$  の pSV2neo を含む水溶液中で 15 分

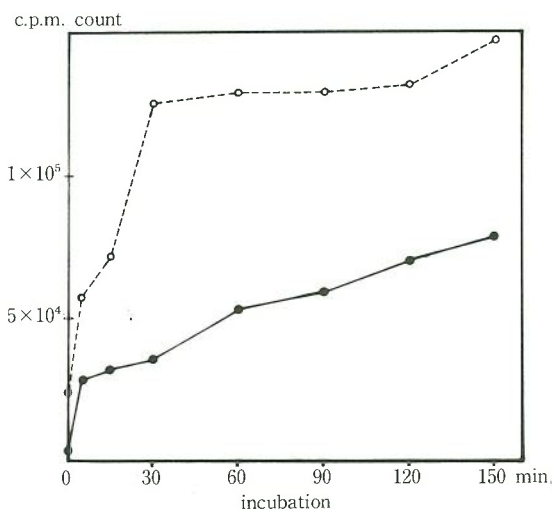


図 1 受精直後にアマゴの囲卵腔に取り込まれる遺伝子 (pSV2neo) の量

縦軸に 1 個の受精卵の囲卵腔に取り込まれた $^{32}\text{P}$ で標識した DNA 量 (c. p. m.), 横軸に受精卵を DNA 水溶液内に静置した時間を示す。

間吸水させた後、パルス巾  $50\ \mu\text{sec}$  で電圧  $600\ \text{V}/\text{cm}$  の電気パルスで 5 回処理することによって受精卵への導入を行った。孵化直後に DNA を抽出し、ドットハイブリダイゼーション法により導入した pSV2neo の検出を行ったところ、約 40% の孵化稚魚で pSV2neo の存在が確認された (図 2)。しかし、同様に遺伝子導入を行った受精卵を孵化後 2 週間目まで飼育した後に検出を行ったところ pSV2neo の存在が確認されなくなった。これは、導入された遺伝子が染色体に組み込まれることなく分解されたためと考えられる。

### 3. 精子をベクターとした遺伝子導入法の開発

精子を介在して遺伝子の導入を行うため、 $30\ \mu\text{g}$  の pSV2neo と BRL 社のリポフェクション試薬  $50\ \mu\text{l}$  を混合し、脂質 2 重膜からなるリポソームを形成させた。リポソーム同士の融合が起こる前に、直ちにフナの精子浮遊液と混合し、リポソームを精子と融合させることによって pSV2neo を取り込んだ精子を作成した。この精子を用いてフナの卵と受精することによって受精卵への遺伝子導入を行った。孵化直後および受精後 2 カ月目に稚魚より DNA を抽出し、ドットハイブリダイゼーションおよびサザンハイブリダイゼーション法によって pSV2neo の存在を検定した。その結果、約 2% の効率で pSV2neo の存在が確認された。この場合には孵化後 2 カ月間飼育した後も pSV2neo の存在が確認された。しかし、サザンハイブリダイゼーションで検出される pSV2neo のバンドの濃度が薄いことから、一部の細胞の染色体にのみ pSV2neo が組み込まれたモザイクの状態になっているものと考えられる (図 3)。そこで、pSV2neo の存在が確認された雄のフナの稚魚を 2 年間飼育した後、青森産のフナと交配を行い、 $F_1$  の作出を行った。その結果、約 18% の  $F_1$  で pSV2neo の存在が確認された。このことから、トランスジェニックフナの約 18% の精子が導入された pSV2neo を染色体内に持っていたものと考えられる。

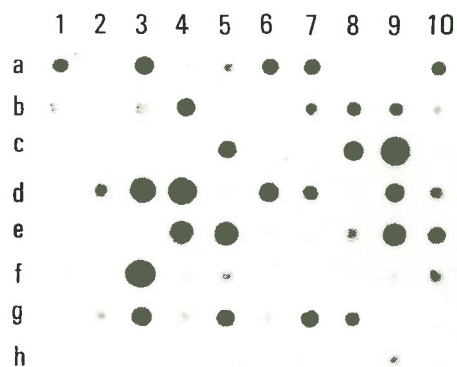


図2 導入した遺伝子を持つ稚魚を検出するためのドットハイブリダイゼーション

受精直後の吸水により遺伝子を困卵腔に取り込ませたフナの受精卵を電気パルス処理することによって遺伝子の導入を行った。遺伝子導入した孵化直後の稚魚よりDNAを抽出し、ドットハイブリダイゼーション法を用いて導入した遺伝子の存在を解析した。

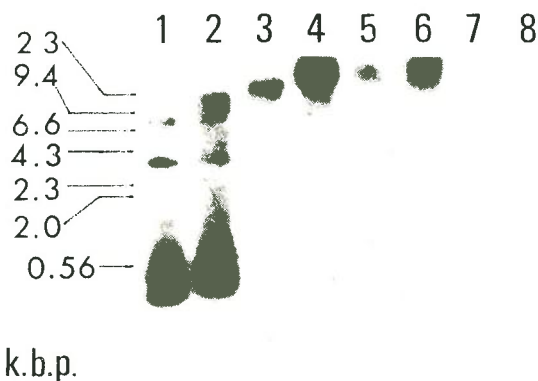


図4 受精卵に導入された遺伝子の追跡

マイクロインジェクション法によりフナの受精卵にpSV2neoを注入し、1日毎に5個の卵からDNAを抽出し、制限酵素で処理することなくアガロースゲル電気泳動を行い、サザンハイブリダイゼーション法により導入したpSV2neoの状態を解析した。

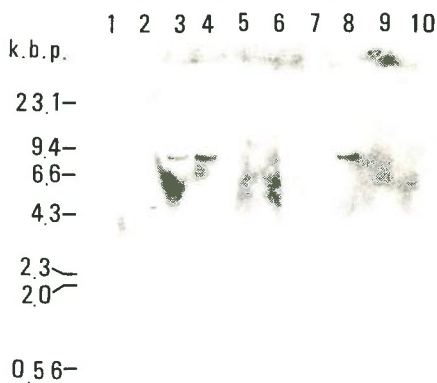


図3 精子をベクターとして遺伝子導入された受精後2カ月目の稚魚のサザンハイブリダイゼーションの結果

受精後2カ月の稚魚の尾ビレよりDNAを抽出し、*KpnI*で消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、ナイロン膜に転写後サザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、幾つかの個体で導入した遺伝子(pSV2neo)よりもサイズの大きい導入した遺伝子を含む8.2kb.p.のDNAバンドが検出された。

#### 4. 導入遺伝子の追跡

フナの受精卵に導入された発現ベクターpSV2neoのその後の状態を一定時間毎に観察するため、マイクロインジェクション法によりフナの受精卵にpSV2neoの注入を行った。1日毎に、確実に導入が行われたと思われる5個の胚あるいは稚魚からDNAを抽出し、サザンハイブリダイゼーション法により導入された遺伝子の状態を観察した(図4)。その結果、受精卵に導入された環状のpSV2neoは導入1日目でもかなりの分解を受けるが、その後、重合を繰り返し次第に高分子側に検出されるようになる。受精後6日目には染色

体内に組み込まれたかのように高分子DNAの位置に検出されるようになる。しかし、殆どの場合、卵黄吸収が進んだ受精後7日目の稚魚では導入したpSV2neoは検出されなくなる。このことから、導入されたpSV2neoは長時間にわたり重合しながら胚体および孵化稚魚内に留まるが、最後には染色体に組み込まれることなく分解されてしまうものと考えられる。

#### 5. 導入遺伝子の発現様式の解析

ゼブラフィッシュを28°Cの淡水で飼育し、明処理14時間、暗処理10時間の長日処理を行い、毎朝、受精卵を採集できるようにした。採集したゼブラフィッシュの受精卵は17°Cで3倍希釈のリンゲル液中に静置することによって、第一卵割を1時間程度遅らすことができる。室温を17°Cに設定した研究室で、50ng/ $\mu$ lの濃度のホタルのルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクター溶液50 $\mu$ lを全自動マイクロインジェクターおよびマイクロマニピュレーター(カールツァイス社、5242および5171)を用いてゼブラフィッシュの受精卵に注入した。導入後28°Cの3倍希釈のリンゲル液内で培養し、胚を一定時間ごとにホタルのルシフェラーゼの基質である0.1mg/mlのルシフェリン溶液に移し、基質とルシフェラーゼの反応によって発せられる光を浜



図5 孵化稚魚におけるルシフェラーゼ遺伝子の発現様式

その発現様式の解析から得られたトランスジェニック魚は、体の約1/2の組織で導入したルシフェラーゼ遺伝子を発現しているもの(A)、限られた組織でのみルシフェラーゼ遺伝子を発現しているもの(B)及び卵黄膜で発現しているもの(C)に大別される。

松ホトニクスの ARGUS-50 でフォトカウンティングすることによってルシフェラーゼ遺伝子の発現様式を胚体を生かした状態で解析した。その結果、胚体を生かした状態で遺伝子導入後6時間目からホタルのルシフェラーゼ遺伝子の発現を同定することができた。この時、遺伝子を導入した受精卵から発生した胚体の約15%でルシフェラーゼ遺伝子の発現が確認された。孵化直後にルシフェラーゼ遺伝子の発現様式を解析したところ、体の1/2の部分でルシフェラーゼ遺伝子を発現しているもの、体の一部の組織でルシフェラーゼ遺伝子を発現しているものおよび卵黄でルシフェラーゼ遺伝子を発現しているものに大別された(図5)。このことから、ルシフェラーゼ遺伝子の発現が認められるすべての孵化稚魚が一部の細胞の染色体にのみ導入遺伝子が組み込まれたモザイクの状態にあることが判明した。また、孵化後約1週間でエラおよび小腸でしか基質の吸収が起らなくなるため、エラおよび小腸の回りの組織でしかルシフェラーゼ遺伝子の発現が認められなくなる。しかし、この系を用いることによって生かした状態で初期胚および孵化稚魚における導入したルシフェラーゼ遺伝子の発現が解析できることが判明した。

#### 6. おわりに

我々は、魚類の卵の特徴である受精直後の吸水を利用した遺伝子の導入法および精子をベクターとした遺伝子導入法の開発を行った。これらの方法によってかなり効率的に受精卵の胚体の細胞質に遺伝子を導入することに成

功したが、導入された遺伝子が染色体内に組み込まれる確率はマウスの場合に較べて著しく低く、導入された遺伝子の多くは胚内に長時間留まるが、染色体に組み込まれることなく分解されてしまうことを確認することができた。また、トランスジェニック魚が得られた場合でも導入された遺伝子が一部の細胞の染色体にのみ組み込まれたモザイクの状態になっていた。よって、効率よくトランスジェニック魚を作出するためには今後、魚類の受精卵に導入した遺伝子が魚類の染色体内に効率よく組み込まれるための新しいベクターを開発する必要があると考えられる。

#### 文 献

- 1) Schultzer - Merker, S. *et al.* (1992) *Develop.*, 116 : 1021-1032
- 2) Strahle, U. *et al.* (1993) *Genes and Develop.*, 7 : 1436-1466
- 3) Krauss, S. *et al.* (1993) *Cell*, 75 : 1431-1444
- 4) Houdebine, L. M. and D. Chourrouc (1991) *Experientia*, 47 : 891-897
- 5) Shears, M. A. *et al.* (1991) *Mol. Mar. Bio. Biotechnol.*, 1(1) : 58-63
- 6) Westerfield, M. *et al.* (1992) *Genes and Develop.*, 6 : 591-598
- 7) Fletcher, G. L. and C. L. Hew (1988) *Can. J. Fish. aquat. Sci.*, 45 : 352-357
- 8) Chen, T. T. and D. A. Powers (1991) *Trends in Biothechnology*, 8 : 209-215
- 9) Mayerhofer, R. *et al.* (1994) *Proceedings of the 27th annual meeting of Japanese Society of Developmental Biologist*, p.74

## ショウジョウバエの配偶行動を制御する遺伝子

新技術事業団山元行動進化プロジェクト／(株)三菱化学生命科学研究所  
山元大輔

動物の行動を支配する遺伝子の実体をさぐるため、キイロショウジョウバエを材料に、性行動に異常の生ずる突然変異体を作成した。突然変異誘発には、P因子ベクターを単一コピーゲノムに挿入する方法を用いた。その結果、雄が雌に求愛せず他の雄に求愛する同性愛突然変異体、*satori* や、雌が極端に雄をさらい交尾をさせない突然変異体、*spinster* など、計7系統の分離に成功した。そしてこれらの変異体の一部については、原因遺伝子のクローニングや遺伝子産物の生体内発現様式が明らかになり、クローン化した野生型遺伝子を導入したトランスジェニックフライも作成された。こうした研究の積み重ねにより、行動をつくり出す細胞内分子メカニズムがやがて解明されるであろう。

### 1. はじめに

動物の行動はその大枠において遺伝子によって規定されている。行動をつくり出すのが脳神経系であり、この脳神経系の構築およびそのはたらきが遺伝子産物としてのタンパク質によって支えられている以上、これは自明のことである。にも拘わらず、行動を制御する遺伝子の実体を明らかにしようという研究は、従来ほとんどなされていない。

ヒトは哺乳動物の一員であり、したがって我々の行動自体も、その基本的部分は遺伝情報に沿って形づくられるわけである。近年、ヒトゲノムプロジェクトの進展に伴い、ヒト染色体DNA多型マーカーが多数知られるようになり、精神神経疾患を含む各種遺伝病の詳細な家系分析に利用されて、遺伝病の原因遺伝子のいくつかが特定されるに至っている。この成功は、ヒトの性指向、攻撃性、知能等にみられるヴァリエーションについて、その遺伝的素因をさぐる試みをうながすことにもなった。いわば50年にわたって封印されてきた「人間性の遺伝学」あるいは「人間行動の遺伝学」が今再び、今度はDNAのレベルで

興りつつあるというわけである。これはすでに、人文社会学者や市民運動家の間に敏感な反応を呼びおこしている。昨年、雑誌 *Science* が *Genes and Behavior* と題する特集号を組むに至った背景には、この分野の研究の新展開に加えて、こうした社会状況の変化がひそんでいると思われる。

人類遺伝学が遺伝子工学的手法を取り込んで飛躍をとげる兆しがあるとは言っても、その解析精度は現代生命科学のスタンダードから見ればなおも極めて低い。行動と遺伝子との間にひそむ因果関係を鮮明に描き出すことを直接的な目標とするならば、やはり突然変異を武器に使える材料に系を移して、精密な分析をおし進める必要がある。

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) はこうした研究を行う上で、最良の素材の一つである。ゲノムサイズがヒトの20分の1と小さく、突然変異誘発が容易で、既に多数分離されている突然変異や染色体異常の利用により新たな変異を染色体上に簡単にマッピングできる。形質転換法が確立しているので、クローニングした遺伝子の機能を、個体レベルで検証可能である<sup>1)</sup>。これまでにキイロショウジョウバエからクローニングされた遺伝子については、その多くがヒトを含む哺乳動物に相同遺伝子が発見されて

おり、種を越えた機能的互換性が証明された例も少なくない。つまり、キイロショウジョウバエを用いた研究を出発点として、高等哺乳動物に見られる相同な現象の解析に道がひらかれる可能性をもはらんでいるのである。

我々はこうした観点に立ち、キイロショウジョウバエの性行動を支配する遺伝子の分離、同定に着手した。本稿ではこれまでに得られた突然変異体の一部についてその表現型を紹介し、遺伝子レベルでの分析の現状を報告することとしたい。

## 2. キイロショウジョウバエの配偶行動のあらまし

キイロショウジョウバエの配偶行動は非常に定型である(図1)。まず雄が雌に向かって定位し追跡行動をとる。しばらく追跡した後、雄は雌の脇腹に頭を向けて片翅を上げ、それを震わせて特殊な音を発生させる。数秒後には雌の逆サイドに回り込み、もう一方の翅を使って音を出す。これがキイロショウジョウバエの雄の最も特徴的な求愛行動である。この音には種に固有のパターンがあり、雌はそのパターンを聞きわけて、同種の雄が発する音である場合に限り、頻繁に立ち止まるようになる。これは、雌の交尾に対する受容性が高まっている証拠と考えられている。雄が片翅で発するこの音はしたがって口説き文句に類するもので、ラブソングと呼ばれる。雌の動きが鈍化すると、雄は雌の背後から前肢を伸ばして雌の腹部を触ったり(touching)、吻で生殖口をなめたり(licking)する。続いて雄は雌の翅をつかんでマウントし交尾を試みる(attempted copulation)。うまく交尾がおこると、雄が雌にマウントした状態が約20分持続する。この一連の過程のうち、最初の定位追跡プロセスでは視覚と嗅覚が主役を演じ、ラブソングでは聴覚、touchingとlickingでは接触化学感覚(味覚)がシグナルのやりとりに用いられていると思われる。盲目の突然変異(例えば*eyes absent*)、嗅盲の変異体(*smell blind*など)、あるいは聴覚器を喪失した突然変異体(*aristaless*)の雌

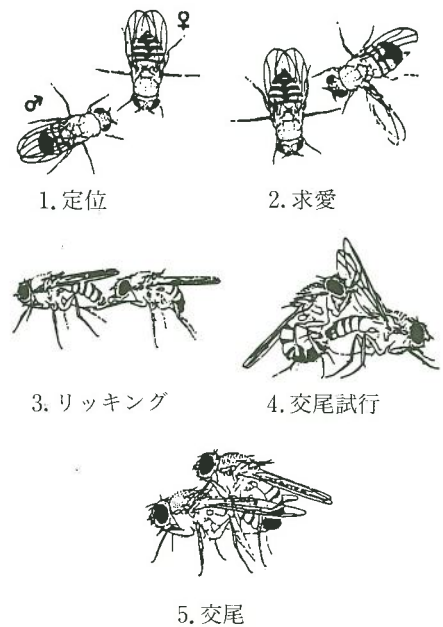


図1 キイロショウジョウバエの配偶行動パターン<sup>3)</sup>

や翅を切り取られた雄はいずれも交尾に手問どる。しかし最終的には交尾に至る。複数の障害を同時に持つ個体が交尾に達するにはさらに長い時間を要する。したがってキイロショウジョウバエの配偶行動においては、ある特定の感覚種類(たとえばフェロモンを介する嗅覚的コミュニケーションといったような)が特権的作用を発揮するというのではなく、ほとんど全てのタイプの感覚入力、行動の完遂のために利用されていることになる。

## 3. 突然変異誘発

前節に述べた定型的行動のどこかに異常を持つ単一遺伝子突然変異体を分離することができれば、その原因遺伝子をクローニングすることにより、問題の行動の制御に関わっているタンパク質が何であるのか知ることができる。またそのタンパク質の組織局在を調べ、更に発現部位の遺伝子型を操作する実験(モザイク解析)を行えば、行動をコントロールしている細胞を特定しうるであろう。

突然変異の誘発には、トランスポゾン的一种であるP因子を改造したベクターを利用し、これをゲノムに単一コピー挿入する方法で行

った。このP因子ベクター（ミューテーター因子）にはハエの眼色を変える *white*<sup>+</sup> 遺伝子がマーカーとして入っているほか、大腸菌内での増殖を保証し薬剤による選択を可能にするプラスミド配列が組み込まれている。さらにゲノムの挿入点付近で働いているエンハンサー配列の作用を検出する目的で、大腸菌の *lacZ* 遺伝子をレポーターとして組み入れたベクターも利用した。ミューテーター因子は転移に必要な酵素であるトランスポゼースを合成できないので、自分自身では身動きのとれない非自律的存在である。トランスポゼースの供給源として、別のP因子（ジャンプスターター因子）をその個体に導入すると、一定の確率でミューテーター因子の転移が誘導される。ミューテーターの新たな挿入がおこった部位に性行動を制御する遺伝子がたまたま存在していれば、挿入によってこの遺伝子の機能に障害が生じ、配偶行動異常突然変異体となるであろう。ジャンプスターター因子をとり除けばミューテーター因子はもはやその新たな挿入点から動くことはなく、突然変異は安定に保持される。以上に述べた全ての操作は、ショウジョウバエの個体レベルの交配、選択によって行うことができる（図2）<sup>2)</sup>。

#### 4. 新しい配偶行動異常突然変異体

上に述べた方法を実際に適用して、我々は約2000のP因子挿入系統を作出し、全系統の性行動の肉眼観察とラブソングの記録によって、新たな変異体7系統の分離に成功した<sup>3)</sup>。

*satori* 変異体は完全な雄性不妊である。その原因は、雄が全く雌に求愛せず、したがって交尾も決しておこらないことにある。この雄が突然変異により、性的動機づけを完全に喪失したものと考えて、「悟り」と命名したのであったが、その後の実験でこの「仮説」は見事に覆された。雄と雌のペアで行動を観察するかわりに2匹の雄を実験容器に入れて様子をみたところ、変異体の雄はもう一匹の雄に向かって片翅を上げてラブソングを歌い、

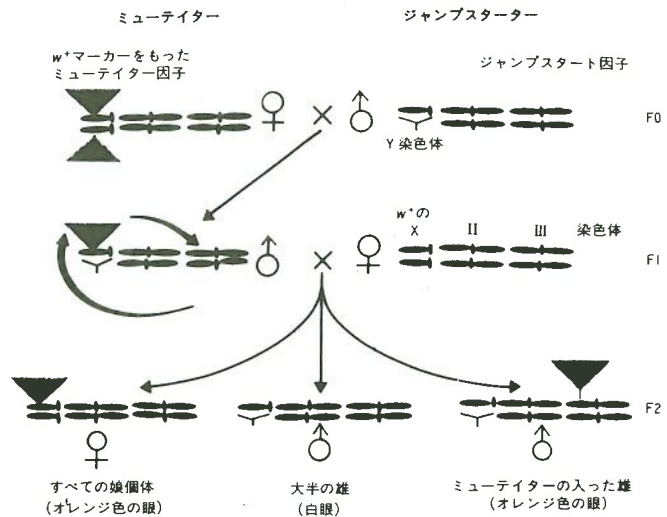


図2 ミューテーター因子を持つ系統（左）とジャンプスターター因子を持つ系統（右）を掛け合わせて新しいP因子挿入系統をつくる方法。<sup>3)</sup>

染色体の動きを模式的に示す。ミューテーター因子には *white*<sup>+</sup> 遺伝子が乗っているため、眼色を指標に挿入系統を分離できる。

さらに腹部を曲げて交尾を試みるものまで現れたのである。つまり *satori* の変異体の雄には間違いなく性的動機づけが認められる。ただそれが異性に対するものでなく、同性に対して向けられるものに変化していたのである。一言でいえば、*satori* は性指向が異性愛から同性愛に変化した単一遺伝子突然変異体なのである。

P因子ベクター中のレポーター遺伝子 *lacZ* は、変異の生じた遺伝子が本来発現する場所にβガラクトシダーゼを作り出す。そこで *satori* 変異体のどこにβガラクトシダーゼが存在しているかを調べれば、*satori* 野生型遺伝子の発現パターンを推定できる筈である。*satori* 成虫の脳神経系には確かにβガラクトシダーゼの発現がおこっており、酵素の活性染色を行うと、特に触角葉、食道下神経節に特徴的な細胞集塊が染め出される。これらの細胞の中に、異性愛—同性愛を方向付けるニューロンが存在するものと考えて、現在その特定を試みている。

*satori* が専ら雄の行動に影響する突然変異であるのに対して、*spinster* は雌側に働いて行動の変化をひきおこす変異である。我々の実験条件下では、野生型 (Canton-S 系統) の雌雄ペアの70%が1時間以内に交尾するが、雌を *spinster* に置き換えると、交尾達成率

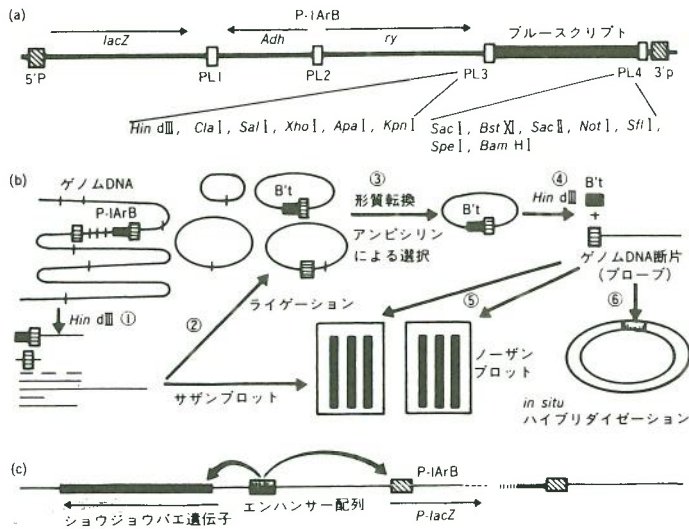


図3 P因子挿入変異体から出発して遺伝子をクローニングする際に用いられる一般的戦術<sup>3)</sup>

はわずか6%に落ち込む。これは *spinster* の雌が、盛んに求愛する雄を疎んじて逃げ出すばかりか、雄が接近した時には足蹴にし (fending)、マウントしてくる者に対してはころげ回って振りはらうといった行動をとるためである。こうした行動は羽化直後の未熟な雌がとる交尾拒否に類似している。*spinster* (結婚しない女) の名はこの表現型に因む。

*spinster* 変異体由来のDNAで大腸菌を形質転換すると、P因子ベクターの中のプラスミド配列とそれに隣接するゲノム断片のみが回収される(プラスミドレスキュー)(図3)。この回収断片をプローブとしてゲノムDNAライブラリーをスクリーニングし、*spinster* 座をクローン化した。さらにノーザンプロットによって変異の起きている転写産物を特定し、これに対応する完全長cDNAをヒートショックプロモーター下で *spinster* 変異個体に発現させて、表現型の部分的回復を確認した(トランスジェニック・フライにおける機能回復)。cDNAの塩基配列を解析したところ、*spinster* 遺伝子は膜貫通ドメインを複数もつ新規の膜タンパク質をコードすることがわかった。Spinsterタンパク質のアミノ酸配列の一部に、神経伝達物質輸送担体のドーパミントランスポータータンパク質と弱いホモロジーが見出されたが、その意味

は不明である。ただ、Spinsterタンパク質が細胞間情報伝達シグナルのトランスポーターあるいは受容体として機能して、雌の性行動を未熟型(拒否)から成熟型(受容)へと切り換えているとする推論は許されるかもしれない。Spinsterが関わる仮想的な情報伝達カスケードの上流因子、下流因子が特定できれば、その生化学的実体を明らかにできるだろう。そしてこうした因子の発見は、*spinster* 表現型を修飾するエンハンサーやサブレッサー変異の同定によって可能となる筈である。

*satori*, *spinster* の他に、我々は求愛歌パターンの異常を伴う *croaker*, 反復的に交尾を行う *fickle*, *okina*, *spinster* 様表現型を示す独立座位の変異 *chaste*, 交尾後分離困難に陥る *lingerer* などを分離しており(図4)、その一部については既にcDNAクローニング、シークエンス解析、形質転換体作出の段階に達している<sup>4,5)</sup>。

### 5. 行動遺伝学の展望

以上に紹介してきたように、我々は新しい性行動異常突然変異体の分離を足掛かりとし

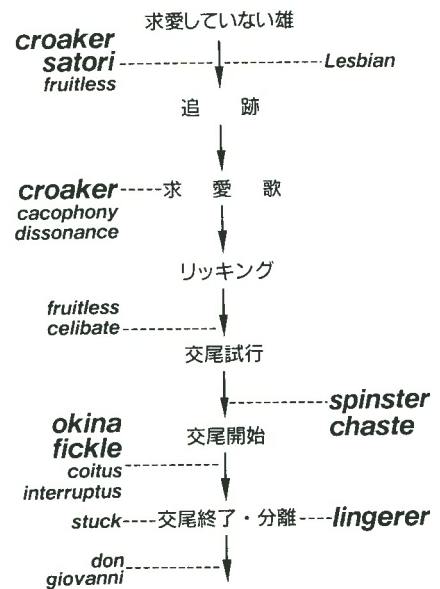


図4 現在までに得られているキロショウジョウバエの配偶行動異常突然変異体<sup>3)</sup> 中央は行動のステップ。左側に列記した変異体では主に雄に異常が現われ、右側の変異体では雌に現われる。大きな字体で示したものが我々の手によって分離された変異体。



て、行動制御遺伝子の実体解明を進めてきた。しかし言うまでもなく、一つの行動を構築するには夥しい数の遺伝子（産物）が必要であり、我々の手中にある変異体は、その「氷山の一角」のまた「一角」を代表するものに過ぎない。したがって今後、徹底した変異誘発と行動異常スクリーニングを継続的に推進する必要がある。また特定の行動エレメントに着目してその全体像を明らかにしようとする時には、既に述べた修飾変異の分離解析が有力な武器となろう。「行動制御遺伝子」は、特定の神経網の形成とその活動を支えることによって機能を発現するのである。したがって遺伝子の構造解析を自己目的化することなく、こうした特異的神経回路の同定とその機能メカニズムの解明にむけて解剖学的、生理学的研究を展開してゆかなければならない。今では突然変異個体に含まれる特定の細胞に

だけ当該野生型遺伝子を発現させたり、逆にそうした細胞に毒素遺伝子を発現させて特異的に除去する方法が確立している<sup>3)</sup>、古典的行動学が「行動中枢」の名で語った概念を、具体的な神経細胞ネットワークとして実体化できる日はそう遠くない。

#### 文 献

- 1) Rubin, G. (1988) *Science*, 240 : 1453-1459
- 2) Hall, J. C. (1994) *Science*, 264 : 1637-1816
- 3) 山元大輔 (1994) 本能の分子遺伝学, 羊土社, 東京
- 4) Yokokura, T., R. Ueda and D. Yamamoto (1995) *Jpn. J. Genet.*, 70 (in press)
- 5) 馬嶋景・上田龍・山元大輔 (1994) 第17回日本分子生物学会年会講演要旨集, p. 361

#### 地域の先端研究

## アスパラガス優良株の多芽集塊，不定胚形成を利用した効率的苗生産

広島県立農業技術センター 生物工学研究所  
甲村浩之

アスパラガス栽培には、優良形質の揃ったクローン雄株を利用することが有利である。そのため、不定胚形成を利用した大量増殖や保存技術を開発し、実用化のための改良を進めている。不定胚培養系では、変異の無い不定胚形成カルス (EC) を効率的に誘導するため、液体回転培養により若茎頂組織から誘導し、維持保存できる多芽集塊を材料として利用する方法を開発した。また、発芽率の高い成熟した不定胚の形成法、効率的移植・順化を可能とする植物体再生法、有用な培養組織の長期保存法等苗生産のための一連の技術を開発した。なお、本研究は農水省地域バイオテクノロジー研究開発促進事業による。

### 1. はじめに

アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) は雌雄異株の植物であり、雄株だけを栽培することが有利とされている。当初は腋芽培養による大量増殖法<sup>1)</sup>が開発され、苗生産に利

用されてきた。しかし、腋芽の分割移植作業に手間がかかること、発根率が低く安定しないこと等実用上の問題点が多かった。そのため広島県では、1986年から、農林水産省の助成事業である地域バイオテクに参画し、不定胚形成技術の開発を始めた。その結果、1987年にはアスパラガスの不定胚形成を報告し、順化活着のよい白色根の発生と速やかな植物体

再生が認められたことから、実用化に向けた研究を行ってきた。当初は広島県育成の収量が高い品種“セトグリーン”，“ヒロシマグリーン”に応用し、増殖を図ってきたが、国内市場における若茎の形状品質が厳しくなり、それに対応可能な優良株の選抜が必要となってきた。しかも、これらの苗は低価格で供給され、最終的には主力品種である“ウエルカム(UC157)”(米国から輸入しているF<sub>1</sub>種子品種)以上の収益性があることが要求される。そのため、県経済連や普及センターの協力により、県内の現地圃場から形状品質、収量性、耐病性等に優れた有望株を選抜した。これらは多芽集塊として保存し、不定胚形成を利用した増殖を行っている。ここでは、この培養系の有効性とこれまで開発した一連の苗生産システム(図1)について、コスト、培養変異の問題を踏まえて解説する。

2. 多芽集塊から EC を誘導する培養系<sup>2)</sup>

**多芽集塊の誘導法：**多芽集塊は、若茎茎頂組織から容易に誘導できるコンパクトな芽の集塊組織で、遺伝的な安定性と増殖効率がよい特性を持っている<sup>3)</sup>。そのため、優良株の保存と EC (不定胚形成カルス, Embryogenic callus の略) 誘導材料としての増殖を目的に誘導を試みた。生育中の若茎を採取し、無菌

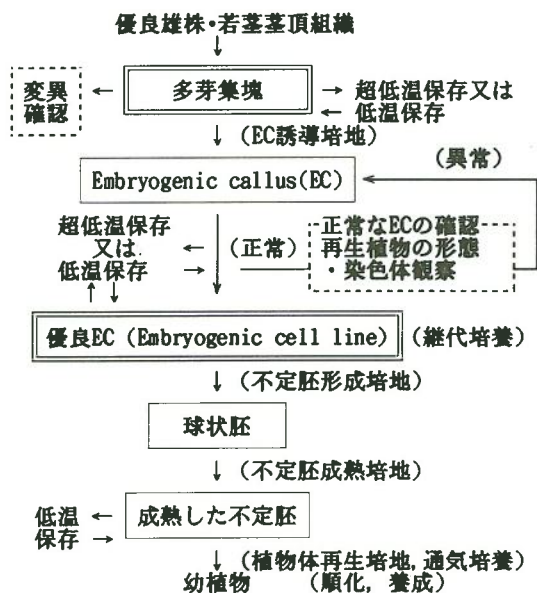


図1 アスパラカス優良雄株の大量増殖システム

条件下で茎頂組織を矮化剤アンシミドール10 mg/l を添加した Murashige & Skoog (MS) の液体培地(ショ糖3%, 径30mm×200mm 試験管, 培地量30ml)に移植した。これらは25°C, 5,000 lux 連続照明下で回転培養し、同組成の培地を用い、1カ月に芽の集塊部分を残して継代培養することで約3カ月後に径約1cmの球状の多芽集塊(図2-A)が得られた。

**ECの誘導法：**不定胚形成のために最も重要なECは、必要時にいつでも変異無く効率的に誘導されるることが望ましい。そのため、多芽集塊を材料としてEC誘導を行った。多芽集塊を2mm角片に分割し、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)を10<sup>-5</sup>M添加したMS寒天培地(ショ糖3%, 寒天8g/l, 培地量5ml)に移植し、25°C・3000 lux・16時間照明下で培養すると約60日以内でEC(黄白色でぼろぼろと崩れるようなカルス, 図2-B)が誘導できる。ECは同組成の培地で2週間毎に継代維持し、一方では生長調節剤無添加のMS培地で不定胚を形成させ、植物体再生能や変異性を確認する(図1)。変異が無いことが確認されたECは優良なEmbryogenic cell lineとして継代維持する。

**本培養系のメリット：**多芽集塊は、苗条原基の増殖や遺伝的な安定性<sup>4)</sup>に着目して誘導した組織であり、供試した殆どの優良株に適用できた。また、EC誘導に関しては、①多芽集塊継代中には、non-embryogenicなカルス形成が殆ど無く遺伝的に安定である。5年間の継代培養でも倍数性等の変異発生は認められない。②EC誘導材料となる活性の高い茎頂組織を圃場株若茎茎頂のように殺菌処理することなくいつでも大量に利用可能である。③EC誘導率が安定し、しかも誘導期間が短縮できる。④超低温保存<sup>5)</sup>や低温保存<sup>6)</sup>が容易で長期の保存が可能である。等の多くの長所を持っており、極めて有用な培養系であると考えている。

3. 不定胚形成と植物体再生の効率化

**不定胚形成：**移植作業や苗生産効率を向上

させるためには、不定胚の発達程度を同調化し、しかも水浸状でない発芽率の高い不定胚を得ることが有効である。そのため、本培養系では、継代培養2週間目のECをアンシミドールあるいはアブシジン酸を $10^{-5}M$ 添加したMS液体培地に移植し、2週間振盪培養する方法を用いることで不定胚形成を同調化している。次に、得られた細胞集塊約0.2~0.5gを寒天濃度2.5%のMS培地(不定胚成熟培地)に広げて移植すると、不定胚は球状胚から徐々に成熟胚へと発達し、水浸状でない発芽率の高い不定胚が得られるようになった(図2-C)。

**植物体再生と通気培養:** 順化が容易な植物体を得るためには通気培養が有効である。そのため、先の生育の揃った不定胚を容器の蓋に通気穴を設けたMS培地(ショ糖3%, ゲランガム0.2%)に移植し、 $25^{\circ}C \cdot 5,000 lux \cdot 16$ 時間照明で培養すると、再生植物の擬葉は無通気培養より早く展開し、表皮部にワックス量の多い植物体が養成できた。約1カ月で市販の園芸培土を入れた200穴セル成形成育苗箱を用いて、通常の育苗床で順化可能であり、現在、培養容器を大型化し、重ねてオートクレーブするなど培地作成や移植作業の効率化を図っている(図2-D)。

#### 4. クローン苗生産の有効性とコストの問題

これまで、クローン増殖株を栽培することで、収穫する若茎サイズが揃い、株当りの安定した収穫本数が認められている<sup>9)</sup>。また、不定胚増殖株でも、若茎品質(色・形)が揃うこと(図2-G)、長期採りを目的とした全期立茎栽培において揃った太さの茎を同時期に立てられること(図2-F)、雌株が混在しないことで茎枯病の温床となる落下種子実生の発生が無いこと等栽培管理に有効な形質を揃えられることを明らかにしている<sup>9)</sup>。そのため、市場評価の高い形質を持ち、収量も種子株より高い株を増殖できれば、アスパラガスは同じ株で5~10年は収穫できるため、苗の販売価格が若干高くなっても農家は購入す

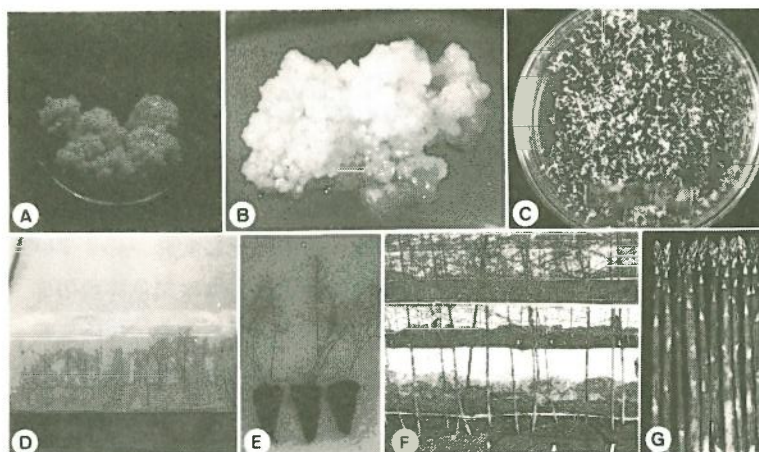


図2 A:多芽集塊, B:Embryogenic callus (EC:不定胚形成カルス), C:同調化した不定胚, D:大型容器での植物体再生, E:200穴セル成形成育苗箱に順化30日後の培養苗, F:全期立茎栽培での立茎径・生育の揃い, G:若茎品質の均一性

ると考えられる。現時点での試算では、1苗当たり60円程度の生産コスト(年4サイクルで、順化1カ月苗を20万本生産、植物体再生率、順化率各約80%とした)がかかり、販売価格は約80円程度と予想される。これは、種子苗の20~30円に比べるとまだかなり高い。また、不定胚移植から120日令の養成苗で種子苗と約50日の生育差が認められる(図3)ことから、農家の投資意欲を高めるためにも、順化後の生育促進等初期生育の改善とさらなる低コスト化を図る必要がある。今後も苗生産法の改良を進め、個々の選抜株の農業経営上の有利性を評価しながら品種育成まで行っていきたい。

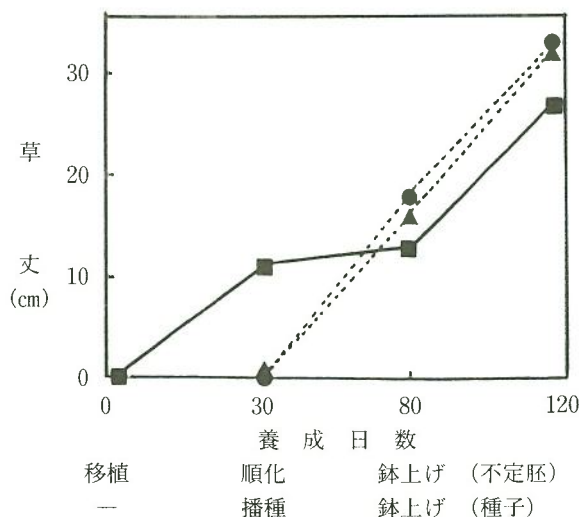


図3 不定胚再生株と種子株の生育差  
 ■:不定胚株(ウエルカム由来), ●:ウエルカム(種子), ▲:MW500W(種子)  
 不定胚は再生培養成30日後に96穴セル育苗箱に順化, 同日に種子播種, 50日後に9cm鉢に鉢上げ

### 5. 培養変異の問題と有用組織の長期保存

**培養変異の問題：**クローン苗生産では変異の発生が問題となる。これまでの腋芽培養法では殆ど変異は認められない<sup>10)</sup>が、筆者らは不定胚培養系の一部の系統に変異が起きていることを観察している。1つは染色体数の倍加変異であり、もう1つは高次の倍数性変異である。前者では再生植物の形態に異常は認められないが、後者では、苗条が水浸状化し、根が短く細根が少ない等が認められた。現在、植物体の形態と染色体観察が変異確認の最も有効な方法であるが、長期培養でも正常な系統も多く、ECのセルラインの選抜を行えば実用性は十分であると考えられる(図1)。

**有用組織の長期保存：**親植物の遺伝子を安定して維持できる多芽集塊や不定胚形成効率の高いECは、取り扱う系統の種類が多いため、継代培養されることなく長期保存されることが、苗生産システムの構築上有用である。そのため、多芽集塊では、最も簡便なPVS2液(植物ガラス化液の意)を用いたガラス化法<sup>11)</sup>による超低温保存技術を開発した<sup>5)</sup>。また、ECは普通作物の種苗管理と同様に原々種の保存が必要であり、ガラス化法により-152°C超低温フリーザーに保存している。現在、形質転換体を含めて約20系統を保存しており、変異発生や増殖率が低下した際の必要時にいつでも取り出せるようにしている。なお、これらは危険分散と現場での利用面を考慮して7°C低温による保存も行っており<sup>6)</sup>、この場合、多芽集塊では1年以上、ECでは2~4カ月に継代間隔を拡大できた。アスパラガスの場合、品種育成のためには特性検定期間が数年必要であり、有用組織を長期保存することが望ましい。今後超低温保存はクローン品種育成における重要なサポート技術として位置づけられると考えられる。

### 6. おわりに

アスパラガスの不定胚形成は、以上述べてきたような大量増殖、保存、順化の各技術をつなぎ合わせて、ようやく優良雄株の実用的

な苗生産に利用できる段階に入ってきた。国内では地域バイオテクで共に研究を続けている佐賀県やその他民間・大学を含めた多くの研究機関で先進的な技術が次々と開発されており、野菜関係では最も実用化の高いレベルに達している。また、本技術は苗生産だけでなく、育種や生理研究へも応用され始めている。当センターでも広島大学との共同研究により、パーティクルガン法で形質転換体を得ている(重本ら、未発表)。将来的には病害抵抗性などの有用遺伝子を導入した優良品種を育成し、環境に優しい農業を実現したいと考えている。また、生理関係では開花の基礎研究<sup>12)</sup>が行われており、農業分野でもクローンを使って栽培生理の解明をしたいという要望も出ている。近年は外国からの野菜輸入が脅威であり、本技術を早期に実用化して地域のアスパラガス生産に貢献したいと考える。

### 文 献

- 1) Yang, H. J. and W. J. Clore (1973) *Hort-Science*, 8: 141-143
- 2) Kohmura, H. *et al.* (1994) *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 63(1): 51-59
- 3) 長久逸 ら (1991) 広島農試報告54: 25-31
- 4) Tanaka, R. and H. Ikeda (1983) *Jpn. J. Genet.*, 58: 65-70
- 5) Kohmura, H. *et al.* (1992) *Plant Cell Rep.*, 11: 433-437
- 6) 甲村浩之・井本征史 (1993) 園学雑 62 別1: 198-199
- 7) 甲村浩之・井本征史 (1994) 広島農技セ研報, 60: 55-63
- 8) 小松史郎 (1991) 園芸学会アスパラガス研究小集会資料, 20-21
- 9) Kohmura, H. *et al.* (1994) Abst. 24th IHC in Kyoto, 87
- 10) Araki, H. *et al.* (1992) *Plant Tissue Culture Letters*, 9(3): 169-175
- 11) Sakai, A. *et al.* (1991) *J. Plant Physiol.*, 137: 465-470
- 12) 阿部知子ら (1994) 第4回植物組織培養コロキウム要旨, 74-75

## 文献情報

## トラフグゲノムの解析： 小さいことは良いことだ？

いささか季節外れの話で恐縮するが、トラフグは日本の冬の味覚としてなじみ深い魚である。今、この魚が世界の分子生物学者の注目を集めている。トラフグのゲノムを解析することで、ヒト染色体の遺伝子地図をある程度推測できる可能性が指摘され、ヒト染色体上での遺伝子の位置決定が容易になると期待されているのである。ヒトゲノムの解析ではマーカーから目的遺伝子に到達するまでに、遺伝情報の無い繰り返し配列等が障害となって解析に多くの時間が費やされている。ところがケンブリッジ大学医学部の Brenner 教授らによると、遺伝情報の濃縮されたトラフグゲノムを参照することで、作業の著しい短縮が望めるといっているのである。彼らは、トラフグゲノムの大きさの推定を目標にして、超音波破碎したトラフグゲノム断片（平均分子量 214bp）のクローンを 596 個シーケンスしたところ、10個の哺乳動物遺伝子（FGF レセプター遺伝子等合計 1,011bp に相当）と良く一致するものが見つかった。この 1,011bp [アミノ酸コード領域のみの合計（イントロンは除く）] は、シーケンスに供したトラフグの全 DNA 128kb の 0.791% に相当したが、相同性の確認された哺乳動物の遺伝子部分は、ヒト全ゲノムの 0.103% に相当する。このことから、両者のゲノムが同程度の数の遺伝子を含むとすると、トラフグゲノムの大きさはヒトのそれと比較して  $1/7.68$  ( $0.103/0.791$ ) 倍と推定される。それ故、ヒトゲノムの大きさが 3,000Mb であるので、トラフグのそれは 390Mb\* ( $3,000/7.68$ ) と推定されることになる。

同グループは別の方法でもゲノムの大きさを推定した。λ ファージを用いてゲノムライブラリー（平均挿入断片長 16.4kb）を作成し、上に述べた 10 個の哺乳動物遺伝子をプローブとして、ブランクハイブリダイゼーションした結果、 $1.379 \times 10^6$  クローン中に 56 クローン（24,625 クローンの中の 1 クローン）が陽性であった。このことから、トラフグ全ゲノムの大きさは 404Mb ( $24,625 \times 16.4$

kb) と推定され、先程の推定結果(\*)とよく一致した。

彼等は、シーケンスしたトラフグゲノムの非転写領域の繰り返し配列に着目し、2塩基繰り返し配列 GT-AC の間の距離についてトラフグの場合とヒトの場合を比較した結果、それぞれ 4.26 および 30 であった。すなわち、トラフグゲノムの非転写領域の長さは、ヒトのその  $1/7.05$  ( $4.26/30$ ) であり、前述した両者の全ゲノム長の比(\*)と近かった。トラフグゲノムでは遺伝子構成の複雑さを損なうことなく非転写領域が短縮し、ヒトゲノムと比較して遺伝情報が 7 倍濃縮されていると考えられた。また、トラフグゲノムをヒトゲノム研究に利用するためには、両者の遺伝子のゲノム中での並び方が同一であることが重要である。同グループは、トラフグジストロフィン遺伝子近傍に隣接する遺伝子を検討した結果、ヒトの該遺伝子近傍の順序とほぼ同じであったことより、両者の遺伝子の並び方にかなりの類似性があると推定できる結果を得た。以上の結果から、まず、トラフグゲノムを解析しヒトゲノム中の遺伝子の存在場所をある程度予測することで、ヒトゲノムプロジェクトでの目的遺伝子への到達が容易になるものと考えられているのである。

トラフグゲノムの非転写領域の長さが哺乳動物より短いことを先に述べたが、これは、進化の過程で遺伝子の複製に伴って起こる繰り返し配列の重複が何らかのメカニズムによって阻止されているためと推定される<sup>2)</sup>。トラフグ遺伝子の解析によってゲノム遺伝子の探索に拍車がかかるであろうし、さらには、脊椎動物の進化の過程での遺伝子の動態も探り出せるかもしれない。

以上、トラフグゲノム解析の海外での動向を述べた。一方、国内のトラフグに関連した研究に触れると、農林水産技術会議の推進する“中回遊魚の回帰特性の解明と資源管理技術の開発”で、トラフグの個体識別を目指したゲノム解析が計画されている。また、山口大学医学部中澤淳教授らのグループは、フグ自身の耐毒性メカニズムの探索を目的として、神経系の Na イオンチャンネルの解析を進めている<sup>3)</sup>。その結果、脳 cDNA ライブラリーよりテトロドトキシン耐性 Na イオンチャンネルであると推定されるクローンを得た。この研究によって、テトロドトキシン耐性の分子機構についての解析が進むものと期待され

る。今、トラフグが熱い!

(抄訳 玉井忠和 マルハ(株)中研  
(TAMAI Tadakazu)

1) **Characterization of the pufferfish (Fugu) genome as a compact model vertebrate genome**

Brenner, S., G. Elgare, R. Sandford, A. Macrac, B. Venkatesh and S. Aparicio  
*Nature*, 366 : 265, 18 November, 1993

2) **The pufferfish genome: Small is beautiful?**

Mileham, P. and S. D. M. Brown  
*Current Science* 66(9) : 627-628(1994)

3) **トラフグナトリウムチャンネル cDNA のクローニング**

川井元晴・山田守・M. Shahjahan, 永谷学・井上幸江・森松光紀・中澤淳  
平成6年度日本分子生物学会要旨集 p.424 (1994)

文献情報

微生物フィターゼによる子豚用飼料のリンの利用率改善

豚や鶏用配合飼料の主原料として用いられているトウモロコシおよび大豆粕に含まれているリン(P)は大部分がフィチン態リン(pP)で、豚や鶏はこれを消化する酵素フィターゼ(phytase)を持たないために、ほとんど利用されずに排泄される。このため特に土地が狭く、家畜の飼養密度の高い地域では過剰Pによる環境汚染が懸念されている。

最近、本論文の著者らは微生物(*Aspergillus niger*)からのフィターゼ製品(FINASE, PU(フィターゼ活性)190~550/g)および遺伝子組換えを行った*Asp. niger*からのフィターゼ製品(NATUPHOS, 5,000PU/g)が、トウモロコシと大豆粕を主体とする子豚用飼料のPの利用率を著しく改善することを明らかにした。その後、この2フィターゼ製品の効果については他の研究者によっても確認された。

著者らは今回、*Asp. niger*の野生株から得た、PU活性の低い(50PU/g)微生物フィターゼ製品を、子豚用飼料に添加し、そのPの利用性に及ぼす効果を、前述のフィターゼ製品のそれと比較検討した。

基礎飼料はトウモロコシと大豆粕を主体とするもので、試験1では総リン(TP)0.30%、有効リン(aP)0.05%の低P飼料に、リン酸二石灰によりPを0.2添加したP充足飼料と、低P飼料にフィターゼを500UP/kg添加したものを給与した。その結果、低P区はP充足区に比べて、子豚の飼育成績(増体量、飼料効率)および骨の強度が著しく劣った。低P飼料にフィターゼを添加すると、飼育成績および骨の強度は、P充足区と同程度にまで改善された。

試験2では低P飼料に無機Pまたはフィターゼを段階的に添加したものを子豚に給与し、Pの吸収、糞への排泄、飼育成績、骨の強度等に及ぼす影響を検討した。その結果、低P飼料に無機Pまたはフィターゼを段階的に添加すると、添加水準に比例して、子豚の飼育成績と骨の強度は直線的に改善された。TPおよびaPの摂取量と骨の強度より、低P飼料にフィターゼを250, 500, 1,000および2,000PU/kg添加した場合、飼料のPの生物学的利用率はそれぞれ25, 35, 40および70%改善された。また、摂取TPの糞への排泄率はフィターゼ無添加区では95%であったが、フィターゼの添加により82%(250PU/kg添加区)、67%(2,000PU/kg添加区)となり、添加量に比例して直線的に減少した。

以上の2回の試験結果より、フィターゼの活性がかなり低い微生物フィターゼ製剤を、子豚用飼料に添加しても、pPの生物学的利用率の改善に有効なことが明らかとなった。

最近、微生物フィターゼはわが国でも生産され、その製品の効果は、プロイラーおよび豚に対して、これまでに報告されているフィターゼ製品と同一の効果のあることが示されている。これらの国産フィターゼも近い将来飼料用として認可され、広く利用されるものと期待されている。

(抄訳 土黒定信一日科飼協)  
(HIJIKURD Sadanobu)

**Efficacy of low-activity, microbial phytase in improving the bioavailability of phosphorus in corn-soybean meal diets for pigs**

Cromwell G.L., R.D. Coffey, H.J. Monegue and J. H. Randolph  
*J. Animal Sci.*, 73 : 449-456(1995)

## 文献情報

## 乳酸菌 bacteriophage mv 4 の部位特異的組込要素の遺 伝学的解析と *L. plantarum* への組込みベクターの構築

テンペレートファージ mv4 は *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* と *L. delbruekii* subsp. *lactis* に感染する。その36kb長の環状遺伝子の制限酵素地図は既に報告されており、そのなかには宿主染色体との部位特異的な組換えに必要な接着部位、あるいは一連の組換えを触媒するインテグラーゼ遺伝子の存在が考えられている。本論文の著者らは、報告の少ないグラム陽性菌バイテリオファージのなかで *L. bulgaricus* バイテリオファージ mv 4 の、宿主細胞への組込みシステムについて遺伝子レベルの解析を行なった。また、ファージの組込みに必要な遺伝子を複製オリジンを欠失したベクターに連結し、*L. plantarum* 染色体への組込みを可能にした。

組込みに必須と考えられる mv 4 遺伝子内の *Sma* I から *Bam* HI 断片 2,284bp のシーケンスを行った結果、4 種の近接した ORF が確認された。また、1 番目と 2 番目の ORF の間には、組込みに必要と思われる相同性領域 (*aatP*: 0.5kb) が確認された。この可能性を確認するために溶原菌である LT 4 染色体 DNA を *Sal* I および *Cla* I で切断し、*aatP* 領域を含むプローブでサザンハイブリダイゼーションした結果、*Sal* I では 2.8kb と 8.0kb 断片に、*Cla* I では 7.0kb と 1.7kb の位置にそれぞれ反応した。この 1.7kb *Cla* I および 2.8kb *Sal* I 断片を PCR 法で増幅しクローン化ののちシーケンスした。その結果、この遺伝子断片の中には mv 4 ファージゲノム内 *aatP* 領域にも存在する 17bp の共通配列が存在した。この配列はファージの宿主染色体遺伝子との相同鎖置換反応において重要な役割をするものと考えられた。さらに明らかになった配列をデータベースを用いて検索したところ、tRNA<sup>ser</sup> 遺伝子と極めて高い相同性が観測された。これは tRNA<sup>ser</sup> 遺伝子を PCR 法で増幅したプローブでサザンハイブリダイゼーションを行うことでも確認された。

また、ファージの組込みに必要と考えられ

るインテグラーゼ (*int* 遺伝子産物) が *aatP* 領域の近傍に存在し、その分子量は 47,973 で pI は 10.6 と予測された。本酵素は C-末端に 2 つのドメインを有し、部位特異的組込みににおける DNA 認識に必要と考えられる。第 1 のドメインにはアルギニン残基、第 2 のドメインにはヒスチジン、アルギニンおよびチロシン残基が他の報告例との特徴的共通配列として確認された。

ところで、インテグラーゼ遺伝子および *aatP* 配列が存在すれば、*in vivo* における部位特異的組込みは可能なのだろうか？ このことを確かめるために、*int* 遺伝子および *aatP* 領域を含む 1.6kb *Pvu* II-*Eco* RI 断片を含み、グラム陽性菌複製オリジンを欠損させたプラスミドベクターを構築した。また比較のために *int* 遺伝子の一部を欠失させたものを準備した。これらのベクターをエレクトロポレーション法により *L. plantarum* に導入したところ、*aatP* 領域と *int* 遺伝子を含むものにおいてのみ形質転換体が得られた。さらに、これら形質転換体の組込み部位を探る目的でベクターをプローブにサザンハイブリダイゼーション解析を行ったところ、部位特異的と思われる単一シグナルが確認された。上記実験で得た *L. bulgaricus* tRNA<sup>ser</sup> 遺伝子をプローブにサザン解析したところ同じ位置のバンドに反応がみられた。以上の結果から、*L. plantarum* においても tRNA<sup>ser</sup> 遺伝子における部位特異的な組込みがインテグラーゼの存在下でおきたものと考察された。

他の乳酸菌群においても tRNA<sup>ser</sup> 遺伝子内での相同性が高ければ、このベクターを用いた広い宿主における部位特異的組込みが可能であり、今後、より有用な乳酸菌の育種、改良がこのような技術を基本として発展することを期待したい。

(抄訳 山本 直之

—カルピス研究開発センター)

(YAMAMOTO Naoyuki)

### Characterization of genetic elements required for site-specific integration of *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* bacteriophage mv4 and construction of an integration-proficient vector for *Lactobacillus plantarum*

Dupont, L., B. Boizet-Bonhoure, M. Coddeville, F. Auvray and P. Ritzenthaler  
*J. Bacteriology*, 177: 586-595 (1995)

海外便り

## 欧米バイテクの旅

東北大学農学部

羽柴輝良

1994年4月から8月までの5カ月間にわたって、欧米諸国の大学・研究機関を訪問する機会を文部省から与えられました。この期間を一時点としてとらえたとき、各国の置かれている状況が一つの線上におぼろげながらも見えて来ないだろうか。こんな気持ちから、各国の研究の内容に深入りすることはできるだけさけ、欧米の多くの研究者に接して、私がぼんやりと感じたことを主体に書かせていただくことにしました。

### 1. “君は形質転換ライスを食べるかね”

ドイツの某民間研究所ではバイテクに大変力を注いでおり、新しいイネをバイテクによって作出して、日本に輸出しようと目論んでいるようで、私に“もし、素晴らしいトランスジェニックイネができたなら、日本人は食べますか、そのような米を君自身食べるかね”と聞かれました。どうしてこのような質問が出されたのでしょうか。デンマークでは形質転換の研究が禁止されており、ドイツでは研究は認められているものの、圃場に出すことが禁止されています。このようなことから、大学の研究室でも微生物を形質転換して直接利用しようという考え方は取らず、微生物の機能を利用したバイオセンサー等の方向に研究を転換しようとしています。

### 2. 大学にみるアメリカの不況

カリフォルニア大学バークレー校の Panopoulos 博士は氷核細菌の研究で、同僚

---

HASHIBA Teruyoshi

の Lindow 博士と遺伝子操作によって氷核を作らせない細菌を作り出しました。ところが、野外実験をする段階になって、一般市民の反対にあい、許可されるまでに5カ年を要した、有名な話の持主です。このような先覚的な研究者でさえ、この伝統あるバークレー校を去り、ギリシヤ大学に移って行きました。不況のためにバークレー校の予算・定員を3割縮小すると発表され、植物病理関係のメインはデービス校に移っています。ウイスコンシン大学の Leong 女史はアメリカでも数少ない女性の教授ですが、この不況によって研究費の確保に大変苦勞しており、心労のために胃がいたみ、時々休むと言っておりました。世界をリードするカビの研究室ですが、電気泳動装置も全部手製で、不況の厳しさを目の当り見せられた感がします。

### 3. CEPRAP とは

カリフォルニア大デービス校で、私にとって忘れることができない人がおられます。7年前に不治の病で帰らぬ人になってしまった日系の Kosuge 先生です。先生は植物病理のバイテク分野で世界の第一人者でした。Bruening 博士をご存知でしょうか。氏は Kosuge 先生の弟子の一人で、先生の遺志を立派に継いで、現在 CEPRAP 研究所をデービス校の中に作り、プロジェクト・ディレクターの地位にあります。CEPRAP とは Center for Engineering Plants for Resistance Against Pathogens の頭文字を取ったもので、病原菌に対して抵抗性の植物を遺伝子操作で作出することを目指した研究センターです。1992年に国立科学研究基金とカリフォルニア



大によって設立され、5カ年間に100億円を投入し、11年間で行う大プロジェクトです。このプロジェクトの具体的な課題はトマトの病気に対する感受性、特異的抵抗性遺伝子の探索と、それを利用して抵抗性のトマトを作り出すことです。大変なプロジェクトが発足したものです。亡きKosuge先生の高弟が指揮を取り、約20名の研究員が一丸となって研究に当たっていました。“Bruening博士は大変多忙であるが、10分間だけ君に会う約束をしてくれたので是非会って行け。今後、君のためにきっと大切な人になるから”とKosuge先生の親友、DeVay先生が特別に取り計って下さいました。



ボイス・トンプソン研究所, Staples博士ご夫妻と筆者

#### 4. Boyce Thompson 氏の先見

コーネル大学の中に20年前に留学したBoyce Thompson 研究所があります。この研究所は第1次世界大戦の後、財閥であるBoyce Thompson氏が世界の食糧危機を救うためにと設立したもので、ちょうど、70周年を迎えておりました。食糧増産という目的から、環境生物学、植物分子生物学、植物生産学、植物保護学の4つの部門からなっています。この研究所を設立した時点で1つ注目すべきことがあります。食糧を増産するとかならず環境問題が生じ、この両者は表裏一体となっています。設立時点で、すでに環境生物学部門を設置していました。私が留学していた時にはオゾンと植物との関係について大規模な研究を開始していました。現在は野外に大規模施設を作り、野外実験に取り組んでい

ます。この研究所からは沢山の素晴らしい研究者が輩出しており、ここに勤めている人達はこれを誇りとしています。私の先生 Staples博士と私は留学したとき、40歳で所長の座につき、以来20年間その職にあったMcNew博士の家で生活を共にしました。この2人の偉大な先生とお世話いただいたお二人の奥様を忘れることはできません。

環境と言えば、オランダを抜きにすることはできません。水に囲まれた国オランダ、このような低地に家畜を放牧していると、排泄物等による汚染と土地の荒廃によって環境破壊が急速に進みます。ところが、オランダ政府は汚染を最少限に食い止めるために、一定面積当りに放牧する家畜の頭数を制限する、利用制限総量というものを定めています。一方、日本はどうでしょう。約90%の濃厚飼料を海外から輸入して、家畜を飼育しています。これによって排泄される糞尿の量は年間莫大なもので、そのまま日本に残ります。このままでは近い将来河川や湖沼、海の汚染が大きな問題になるでしょう。

#### 5. “アメリカの農業は馬鹿ではできないよ”

アーカンソー州の稲作だけでちょうど日本全体の稲作面積の2分の1に当たります。周辺の州を加えると80%、今注目されているカリフォルニア州は18%です。なんと、アメリカの稲作面積は日本の稲作面積とちょうど同じだということになります。この広大なアーカンソーのイネは地下水を汲み上げて栽培しています。これだけの水を地下水にたよっていると環境面で色々な弊害が生じて来ており、現に塩害が少しずつ現われております。

1993年、日本は大冷害に見舞われました。米の緊急輸入の問題が生じ、ここストットガルトにも日本から沢山の人が訪れています。この人達は広大な水田地帯を見てどのように感じたでしょう。

農業の経営面でも相当考えさせられるものがあります。各農家1戸1戸が1つの企業体です。アーカンソー州の1戸当りの栽培面積

は100ha以下が45%、100~200haが31%、200~400haが19%なのです。このように大規模農業ですから、自宅には何台もの電話を並べ、つねに米相場をにらんでいます。“アメリカの農業は馬鹿ではできないよ”とLee博士は言います。“私達は死にものぐるいで勉強しないと彼らに馬鹿にされてしまうよ”とも言っておりました。

#### 6. 主食を自給できない国は減びる

フィンランド、ドイツでも米食がよく出され、また、彼ら自身も米食を好んで食べます。このように米食が世界的に普及すると、日本で米が不足したとき、いくら金を積んでも米を売ってくれない時が来るのではないのでしょうか。“主食を自給できない国は減びる”と言われていました。ちなみに、日本の食糧自給率は47%以下、日本と最もよく似た境遇にあるイギリスでさえも73%、旧西ドイツは94%、アメリカ113%、フランスにいたっては、なんと143%です。先進国の中で50%を割っているのは日本だけです。フランス、ドイツはECの中にありながらも食糧に関しては一歩もゆずらず、自給率を互いに競い、高めています。さらに、両国はアメリカに対する対抗意識も高いと言われます。戦争によって経験した食糧危機を彼らは決して忘れないのです。

#### 7. 日本はイネの研究で後進国になりつつあるか

世界におけるイネの研究では日本がトップの座を守り続けて来ました。ところがここ数年の間にトップの座から引き降され、米を主食としない国、あるいは開発途上国がトップの座を奪おうとしています。開発途上国では設立35周年を迎えたフィリピンにある国際稲研究所 (IRRI)、現在は日本からの援助が予

算の4分の1を占めています。中国では浙江省の杭州に各国の援助によって4階建ての立派な水稲研究所が建設され、全国規模で研究者を集め、海外留学から帰った若手を中心に国際的な対応を考えて研究しています。最近ではアフリカの多くの国々が水稲栽培に力を注いでいます。アメリカではアーカンソー州にアーカンソー大の稲研究・普及センターがあります。ここに紹介したものは私がこれまでに訪れたイネだけを研究している研究所です。ところが、日本にはイネだけを研究している研究所はありません。

一方、イネの大敵、いもち病の研究はどうでしょうか。日本はもうアメリカに追いつけないかも知れない、と言う人もいます。 Wisconsin大学の Leong 女史は RFLP マップを200以上の遺伝子について確定し、また、デュボン社の Valent 女史は夫の Chumley 氏と2人3脚で、ここ10年間にいもち病菌の RFLP マップを作り、現在は Leong のグループと両者のマップのつき合せを行っています。はからずも、再びアーカンソー大学で一緒になったウインコンシン大学の Ellingboe 博士はいもち病の遺伝学的研究を精力的に行っています。アメリカでいもち病の重要性を早くから認めて、いもち病菌の病原性やイネの抵抗性の機作に関わる分子生物学に力を注いでいるのは何を意味しているのでしょうか。ある人は“これは1つの戦略である”ときっぱりと言いました。日本は、これからやって来る食糧危機について考えなくてもよいのでしょうか。この広大な水田地帯の中にボツンと置かれ、何か背筋に寒いものを感じないわけには行きません。

5カ月間に多数の国と研究機関を訪問しました。紙面の都合で研究の内容を詳細に紹介することができませんでしたが、訪問の先々で多くのものを感じ、また反省させられる旅でした。

#### 編集後記

どうしたら喜んでいただける情報をお届けできるか、原稿が集まるとどうレイアウトするか、印刷に入るとどうミス無くするか腐心しています。毎号こんな気持ちを繰り返しながらも、お蔭様で次号で50号を迎えることになりました。しかし、どの号をとっても、どこかに不満な点が残っています。今回こそは大丈夫と思って仕上げたつもりでも、あと

でミスが見付かると年がいもなく落込みます。本号でもお詫びと訂正を書く羽目になってしまいました。また、本号では予定の頁内に収めるために著者にご迷惑をかけたり、「文献情報」の行間を詰めさせていただいたりしました。お詫びするとともに読みづらい点はお許し下さい。  
(大畑記)

#### お詫びと訂正

前号（第48号）の1頁下欄外

誤

YUKI Jun

お詫びして訂正いたします。

正

YUKI Atsushi

#### ブレインテクノニュース（第49号）

平成7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

〒105 東京都港区虎ノ門3丁目18番19号 虎ノ門マリンビル10F

TEL. 03-3459-6565 FAX. 03-3459-6566

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