

CODEN: BTEEEC

TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

第 50 号

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

JULY 15, 1995

特集 生研機構出資の研究から



ミニデンファレの初花の開花状態

A, 桃紫色系統の選抜個体 B, 白色系統の選抜個体

(本文16ページ参照)

発行=生物系特定産業技術研究推進機構

総 説

小笠原長宏

植物の耐病性の仕組み…………… 1

国内情報

塚原正義・廣澤孝保・池田良一

イネ再分化培養における変異の発現と再分化能の遺伝様式…………… 5

遠藤 昇

循環選抜法によるイネの培養不稔発生の抑制…………… 8

趙 徹・猪熊千恵・今泉信之・金子誠二

遺伝子操作によるノシバ常緑性品種育成へのアプローチ……………12

地域の先端研究

唐澤耕司

ラン科植物の育種とその問題点……………16

鹿江貞夫

球根花卉類のバイオ育種と大量増殖技術の開発……………20

文献情報

微生物における利己的遺伝子……………24

カプトガニ血球に存在する (1→3)- β -D-グルカン感受因子 “G 因子” ……………25

豚胚の凍結保存……………26

サポニン無毒化酵素によって決められる植物病原菌の宿主範囲……………27

海外便り

蒲生卓磨

フランス、英国におけるヒトおよび植物ゲノム研究の現状と将来計画……………29

特別情報

志賀正和

自然と調和した害虫管理—E. F. ニプリング博士と BRAIN セミナー—……………32

植物の耐病性の仕組み

(株) 植物防御システム研究所

小笠原長宏

植物が微生物の感染を蒙ったとき、動物とは異なる独自で精巧な防御システムで感染に打ち勝っている。この植物の感染に対する抵抗性反応が防御システムであり、この防御システムの中で、抵抗性の真髄とでもいうべき動的抵抗性について述べるとともに、現時点ではまだ十分に固まっていないが、防御反応の発現に関する植物細胞内の動きについても述べる。

1. はじめに

高等動植物は自身の種を純粋に保ち、子孫を残すためにその長い進化の過程で、微生物の感染や寄生を原則的に排除する仕組みを作りあげた。動物の場合は病原菌に一度感染すると、その病原菌に対する免疫を獲得して再び同じ病気にかからないことはよく知られている。植物でも動物の免疫システムとは違った仕組みで病原菌感染に対する抵抗性を発揮している。この抵抗性の発現する仕組みが、植物の耐病性の仕組みということになる。

2. 植物病原菌

ここで植物の病原菌が本来なら植物に排除されるべきものであったにもかかわらず、どうして出現してきたのかということは、植物の病気を植物の側からだけでなく、微生物側からみることも必要と考えて簡単に述べる。地球上には現在約5万種の糸状菌、約1600種の細菌が生存しており、この他の微生物種を加えれば膨大な数の微生物が棲息している。しかし現時点で植物に病気を起こすものは、糸状菌が約8000種、細菌が約200種とされている。この病原菌以外の微生物は栄養摂取面からみると生物の残骸のような生命のない有機物から栄養を摂るいわゆる腐生の生活するのに対して、病原菌は生きて植物に寄生して栄養を摂って生活する寄生的適応を得た微生物である。これら病原菌には腐生性を併せもつものから生きた植物の細胞からのみ栄養

を摂取して生活する腐生性の全くみられない絶対寄生菌のように寄生性の進んだものまで存在する。この寄生的適応の獲得は、菌が侵すことのできる特定の宿主植物をもち、しかも宿主植物との接触の長い過程で宿主の抵抗性にうち勝つ能力を獲得することによって宿主特異性が決まり、栄養摂取面からみると病原菌は膨大な数の腐生菌との栄養摂取の生存競争から抜け出して、宿主依存の楽な生命維持能力を得たといえる。一方植物側にすれば、本来排除すべき異質の生物である病原菌の出現で、防衛対策を迫られて、病原菌との接触の過程でそれなりの防御の仕組みを構築して病原菌の侵入に対して効果的な抵抗性を発揮できるようなシステムを進化の過程を経て作りあげたと考えられる。ちなみに植物に被害を与えている主な病原菌は糸状菌で、病害の80パーセントはこの糸状菌類によるものといわれている。

3. 植物の病気に対する抵抗性

植物の病気に対する抵抗性の仕組みは、いろいろな基準によって分けて考えられているが、ここでは静的抵抗性と動的抵抗性に大別して考えることにする。

静的抵抗性とは、植物が病原体の感染を受ける以前からもっている性質による抵抗性のことで、植物固有の性質に由来する病原菌に対する障壁であって、物理的要因と化学的要因に分けられる。植物の細胞表層の硬さや厚さならびに構成成分、植物体の菌に対する栄

養成分, 先在的に植物体に含まれるフェノール系化合物などの抗生物質の作用が, その役割を担うことになる。

動的抵抗性とは, 植物の細胞あるいは組織が病原体の侵入を受けた後, その刺戟に積極的に反応して発揮する防御反応システムで, 誘導抵抗性ともいわれ, これが検出される範囲によって, 局所的あるいは全身的誘導抵抗性に分けられている。この動的抵抗性は植物の抵抗性の真髄というべきもので, 動物で具現される微生物などの異物の侵入に対する免疫システムをはじめとする動的な防御機構とは方法的に違っても, 侵入微生物に対応して積極的に植物独自の防御機構をもつということでは, 動物の場合と軌を一にするものといえよう。

4. 動的抵抗性 (耐病性の真髄)

病原菌の感染にさいして, 病原菌は植物に一連の防御反応を誘発するエリシターと呼ばれているシグナル物質を生成する。植物の細胞はこれを認識して, 細胞内や細胞間のシグナル伝達機構にこのシグナルを伝達する。その応答として植物は, パピラやリグニン, あるいは高ヒドロキシプロリン含有種タンパク質などを感染組織の細胞壁に蓄積させて物理的障壁を強固にしたり, 植物種で異なる低分子の抗菌性物質ファイトアレキシンやプロテアーゼインヒビターの合成, キチナーゼやグルカナーゼ (感染特異的タンパク質=PRタンパク質群に属する酵素) の誘導など多くの動的抵抗性発現に関連した事象が見出されている。しかしエリシターを認識して, そのシグナルを伝達するシステムの流れについてはなお不明の点が多い。以下この抵抗性に関連して生じる事象について略記する。

(1) パピラの形成

病原菌の侵入が始まると細胞壁と細胞膜の間にカロース, セルロース, リグニンなどのポリマーやCa, Siなどの無機成分が集積沈着してできたもので, 菌の侵入をくい止めているようにみえるが, 役割についてはなお不明である。光顕的には宿主細胞壁の内側が局部的に乳頭状に肥厚して見えるが, 外からの

物理的, 化学的刺戟でも, 刺戟個所に形成される。

(2) 感染組織のリグニン化と抵抗性

病原菌に感染すると, その付近の組織の細胞壁のリグニン化が起こる。リグニンは化学的に安定な物質であり, 菌侵入に対して障壁の役割を果すので, 動的抵抗性の重要な要素の一つである。浅田らによってべと病感染ダイコンのリグニン化機構が詳しく研究され, 感染の刺戟は宿主細胞内にリグニン誘導因子 (糖タンパク質) を生成し, これが遺伝子転写を活性化して感染細胞特有の塩基性パーオキシダーゼの産生となり, 健全植物細胞に含有されているリグニンとは化学的性質の異なる病態リグニンと命名されたリグニンが生成することを明らかにした。リグニン化は抵抗性植物では反応が速く, 病原菌の菌糸の伸長に先立って組織のリグニン化が起こるが罹病性の場合はこの逆となり障壁の役に立たない。

(3) 過敏反応による抵抗

侵入病原体に対して, 抵抗性宿主では細胞死が速やかに起こる。この現象は過敏細胞死と定義されている。富山らによりジャガイモ疫病菌と抵抗性ジャガイモを用いて詳しく研究された。抵抗性ジャガイモ細胞が非親和性疫病菌に感染すると, 付着器が形成され, 侵入が起こる前に宿主細胞の核が付着器部位に接近し, 原形質の流れが急速に高まる。その後原形質糸が消失し, ブラウン運動をする小粒体が出現し, これの増加で, 核が突然膨化すると細胞は死に至り, 細胞全体の顆粒化が始まる。このような強い抵抗性を示す場合は, 被侵入細胞は速やかに褐変して死に至り, 侵入菌系もその中に封じ込められて死ぬため, 植物全体としては発病を免れる。このような現象を過敏反応と呼ぶ。この反応は糸状菌のほか, 細菌やウイルスによる病害でも広く認められている。この反応の発現はエネルギー依存である。

(4) ファイトアレキシンの生成

Müllerら (1940) によって概念的に提唱された抗菌性物質群ファイトアレキシン (PAと略す) が実際に証明されたのは,

Cruickshank ら (1960) によってエンドウの PA としてピサンチが単離されたのが最初である。PA は現在では、微生物との接触時に生成、蓄積され、一般的な抗菌性をもつ植物成分ではなく、前駆物質の単純な化学変化により活性化にされるものでないという性質を備えた「微生物との接触によって植物体内で合成され蓄積される低分子の抗微生物物質」と1981年に定義された。PA は微生物との接触に限らず、ウイルスや線虫の感染、物理的あるいは化学的ストレスによっても生成が誘導される。現在まで20科の植物から約230種のPAが単離されており、化学構造的にはテルペノイド、イソフラボノイド、クマリン、その他のポリフェノール類に大別される。

PA 生成誘導因子は PA エリシターと呼ばれ、生物由来のエリシターは、病害抵抗性の発現の仕組みを知るうえで重要であり、現在まで微生物などから、ポリペプチド、多糖類、糖タンパク質、脂質などの高分子物質が多く分離されているが、低分子物質も僅かながら単離されている。PA エリシターの PA 生成の仕組みは十分に解っていない。これは植物の防御反応を活性化するエリシターシグナルの伝達機構の解明と密接に関連していることに起因しているが、得られている多くの研究成果から、次のように考えられている。植物には防御反応を発動させる遺伝子があるが、健全組織では働いていない。しかし微生物の攻撃を受けると、微生物の分泌するエリシターが直接または間接にシグナル伝達システムを刺戟する。この刺戟が健全植物で働いていなかった一連の防御反応を引き起こす遺伝子（防御遺伝子）を活性化させ、その結果としてPAが生成される。したがってPA生合成系の活性化をする制御機構の解明が鍵となる。PAの多くは二次代謝系の中間代謝産物であるのにこの段階で蓄積するのは、抵抗性発現機構との関連で注目される。

PAの役割は侵入菌の生育抑制にあるが、菌侵入に対応するPAとその後の病斑拡大に対する抑制に関わるPAと菌感染の時系列で異なるPAが生成し作用することもある。

(5) 過酸化反応関連物質の生成

菌感染などのストレスを受けた植物は抵抗性発現のために一連の防御反応（過敏反応）を引き起こし、前述の抗菌性をもつPAを生成する。さらにこの反応は脂質の過酸化をも伴っていることが、いもち病菌感染イネから遊離不飽和脂肪酸の過酸化物とそのエポキシおよびヒドロキシ誘導体が分離され、抵抗性品種には顕著に蓄積していることから明らかとなった。この過酸化反応に関与するリポキシゲナーゼ（LOXと略す）の挙動が植物の抵抗性の発現に密接に関係し、PA以外の抗菌性物質の生成、過敏感壊死などその関与が他の病原菌感染植物でも確かめられ、LOXが防御反応に密接に関連し、植物の膜脂質に作用しているとの推測がなされている。一方ジャガイモやイネにおいて、不親和性菌感染細胞では活性酸素（ O_2^- ）が速やかに、多量に生成することから、抵抗反応の誘導に関与するとされているが、この活性酸素の発生が一連の防御反応のシグナルスイッチではないかという示唆がされている。

(6) 感染特異的タンパク質

これは pathogenesis related protein (PRタンパク質) と呼ばれる、植物が病原菌やウイルスに感染すると特異的に誘導されてくるタンパク質の総称である。PRタンパク質はいくつかのグループに分けられるが、生化学的活性の解っているものは、 β -1,3グルカナーゼ、キチナーゼ、プロテアーゼインヒビター、エンドプロテアーゼの4つのグループである。これらの中で、キチナーゼ活性あるいは β -1,3グルカナーゼ活性をもつPRタンパク質が、細胞壁成分分解に伴う病原菌の生育抑制作用（抗菌性タンパク質）を有することから、農薬の開発、耐病性品種の育成などの応用面から注目されている。さらにPRタンパク質は菌感染以外にイネやタバコなどに存在するサルチル酸によって速やかに誘導されるので、サルチル酸はPRタンパク質のエリシターであるが、一方タバコモザイクウイルス(TMV)の感染で、病斑の形成・拡大に伴ってサルチル酸の生成が誘導され増加し

て、PR タンパク質の増加が認められた。サリチル酸は抵抗性反応のシグナル伝達物質としてPR タンパク質遺伝子の発現に働くとともに、病原体増殖を抑えているとされている。サリチル酸のような誘導能をもつ物質は植物体にも生成するエチレンのほか、安息香酸、アスピリン、アブシジン酸、ジャスモン酸、など多数認められている。

5. 微生物感染に対する植物の防御反応はいかにして発現するか

植物は感染、エリシター(EL と略す)処理、または傷害を受けると、過敏反応を起こして前述のような多様な防御反応を起こす(この顕著な応答はPAの生成)が、そのために植物独自の認識とシグナル伝達および防御遺伝子発現の一連の機構の存在することは高い確度で認められているが、その実体は十分に解明されているとはいえない。研究には、防御遺伝子の活性化の分子機構の解析に便利な実験系である植物培養細胞が多く使われている。

(1) 植物細胞の EL の認識

植物には病原菌細胞壁由来のオリゴ糖の構造を厳密に認識し、これと結合してEL の情報を細胞に伝えるレセプターが細胞膜上に存在すると想定している。(病原菌の中にはサブレッサーを持っており、エリシターより膜の結合部位に優先して結合するので、エリシターシグナルは伝達されず、したがってその植物は罹病することが実証されている。)

(2) 細胞膜上の初期反応とシグナル伝達

EL がレセプターに結合すると防御遺伝子の転写の活性化を誘導する一連の反応が引き起こされる。EL 結合レセプターからの初期反応が膜上で起こるが、いずれもEL 処理後極めて短時間(分)内に起こる一過性の次の諸現象が可能性のある初期反応として示されている。すなわち、活性酸素の生成、膜電位の脱分極、イオン流動(K^+ 流出・ H^+ 流入)とこれに基く細胞質のpH低下、 Ca^{2+} の増加などで、このほかに膜脂質からの過酸化物の生成が述べられている。

(3) 細胞膜から核へのシグナル伝達と核での遺伝情報の発現

培養細胞の植物種の違い、エリシターの構造と純度またはレセプター数の違いなどで差が想定されるが、EL 処理後インゲンのPAを誘導生成するフェニルプロパノイド代謝系酵素群の転写開始は数分であるという。このようなPA生成誘導系では認識から防御反応開始までのシグナル伝達系は簡単な段階しか介在しないと想定されている。エリシター処理後数分でmRNAを蓄積し、15分で最高に達する遺伝子の存在はシグナル伝達の初期に誘導されるものとして注目される。PA以外の抗菌性物質としてヒドロペルオキシドを生成するリポキシゲナーゼはEL 処理で誘導され、直接細胞膜に作用する可能性もあるという。

(4) 細胞間の伝達

これには膜電位の一過的变化、活性酸素の生成などが考えられている。またPR タンパク質生成のシグナルは細胞内に生成されるサリチル酸がその役割を果すとされている。

6. おわりに

エリシターと植物培養細胞を用いた多くの研究の成果をごく簡略に述べたが、防御反応活性化を中心とした分子生物学的探求は日々深まっていく現状である。感染に対する防御反応の様相は一部動物のそれと通じる要素を含んでいることは、微生物の感染という共通のストレスに由来するからであろうか。一方この耐病性の仕組みに基いて環境にやさしい農業の研究開発が進められている。

文 献

- 1) Oku, H. (1994) Plant Pathogenesis and Disease Control, Lewis Publishers
- 2) 西村正暁・大内成志編 (1990) 植物感染生理学, (文永堂)
- 3) 朽津和幸・渋谷直人 (1993) 組織培養, 19(10): 362~366
- 4) 近藤泰男 (1993) 化学と生物, 31: 495~497
- 5) Lamb, C. J. ら (竹内・旭訳) (1990) 植物細胞工学, 1, 2 Suppl.1: 399~412
- 6) 山口勇・関沢泰治 (1993) 植物防疫, 47(5): 22~25
- 7) 大橋祐子 (1992) 蛋白質 核酸 酵素, 37: 1229~1238
- 8) 古賀大三 (1994) 化学と生物, 32: 712~722

国内情報

イネ再分化培養における変異の 発現と再分化能の遺伝様式

(株)ナーサリーテクノロジー

塚原正義*・廣澤孝保**

農林水産省 農業研究センター

池田良一

組織培養技術を利用したクローン植物の大量増殖技術は、イネ F₁ 品種の普及に大きく貢献できると考えられる。品種「ササニシキ」をモデル材料に用いて再分化に影響する培養条件を調べ、効率的に再分化を誘導できる2つの培養系、すなわち固化培地を用いた静置培養系および液体培地を用いた懸濁培養系を開発した。これらの再分化系ではほぼ同等の効率で再生個体が得られるが、その至適培養条件はそれぞれで大きく異なっていた。また、再分化植物において認められる培養変異の出現頻度も2つの培養系の間で差が認められ、このことは大量増殖において課題となる培養変異の発生を再分化の培養条件によって制御できる可能性を示唆している。一方、再分化能には顕著な品種間差が認められた。高い再分化能を遺伝的に制御するための基礎的な知見を得る目的で14の品種を相互交配し得られた F₁ の再分化能を調べ、高再分化能を付与できる親品種候補などを把握できた。今後、再分化能の遺伝様式を一般化することが課題として残されている。

1. はじめに

イネ F₁ ハイブリッドは大幅な収量の増加が期待される反面、F₁ 種子の採種効率を高めるため、その両親に細胞質雄性不稔性や稔性回復遺伝子を導入する、開花期を揃えるなど多くの育種課題がある¹⁾。組織培養技術を利用したクローン植物の大量増殖は、これらの課題を回避でき、F₁ 品種開発年限の短縮に寄与できると考えられる。

(株)ナーサリーテクノロジーでは種子からのカルス誘導および増殖、再分化といった一連の培養技術、再分化植物の順化・育苗技術とその装置化、大型培養装置、自動培養制御システムといったハードとソフトの両面から総合的な大量増殖技術の開発を進めてきた²⁾。そして、実験室レベルでは高い効率で再分化クローン植物が得られる培養系が確立され^{3,4)}、効率は低下するものの実用規模である1kℓ培養槽での再分化も可能となった。しかし、実用化のためにはいくつかの技術的な課題、すなわち、再分化した植物で認められ

る変異の抑制、再分化効率の品種間差異の克服などが残されている。ここでは培養変異および再分化能の品種間差克服のためのアプローチについて紹介したい。

2. 再分化の培養条件

変異の発現および再分化能の遺伝様式を解析するために用いた培養系は(株)ナーサリーテクノロジーにおいて開発された2種類の再分化培養系、すなわち固化培地を用いた静置培養系および液体培地を用いた懸濁培養系を用いた。モデル材料として品種「ササニシキ」を用い、培養細胞の誘導・増殖までの過程および幼植物の馴化以降の過程は2つの再分化系とも共通で行った。これらの再分化系からはほぼ同等の頻度で植物が再分化してくるが、オーキシンやサイトカイニンなど再分化の頻度に重要な培養要因の至適濃度が固化培地と液体培地では大きく異なっていた(表1)。また、液体培地では至適濃度範囲が非常に狭くなっていた。以下にそれぞれの培養系の特徴的な培養要因の概要を述べる。

①固化培地を用いた静置培養系。培地の固化剤濃度を高める、細胞塊から再分化を誘導する際に細胞塊の脱水処理を行うことが再分化に促進的に働いた^{5,6)}。このような乾燥状

TSUKAHARA Masayoshi, HIROSAWA Takayasu,
IKEDA Ryoichi

* 現 キリンビール(株) 基盤技術研究所

** 現 キリンビール(株) 植物開発研究所

表1. 固化培地と液体培地での至適培養条件の比較

培地成分	至適濃度	
	固化培地	液体培地
オーキシシン (NAA)	0.5-5mg/l	0.1-0.5mg/l
サイトカイニン (kinetin)	0.5-2mg/l	0.1-0.5mg/l
硝酸塩	28-56mM	28-56mM
アンモニウム塩	10-40mM	3.5-7mM
スクロース	20-50g/l	7-13g/l
ソルビトール	30-60g/l	30-60g/l
培地固化剤 (gellan gum)	4-6g/l	-

態が再分化を促進するといった結果は液体培地中での再分化が同等の頻度で起こることと矛盾するようにも考えられる。

②液体培地を用いた懸濁培養系。固化培地では無機塩に糖（スクロース）を加えただけの培地でも再分化は認められたが、液体培地ではこれにソルビトールを添加することが必須であった⁷⁾。ソルビトールは異性体であるマンニトールと共に培地の浸透圧調節剤としてよく利用される糖アルコールである。しかし、今回用いた「ササニシキ」において、マンニトールは細胞増殖には影響を与えることなく、再分化に阻害的に働いた。また、培地中のソルビトール、マンニトール量を培養期間に沿って測定するとソルビトールのみ減少することから、ソルビトールは単に浸透圧調節剤として機能しているのではなく、炭素源としても代謝されていると考えられた。培地中のスクロースは再分化誘導後2週間程度で消失し、ソルビトールの減少はこの時期に始まる。同時期にスクロースを添加すると再分化が阻害されることから、再分化過程で炭素の供給源がスクロースからソルビトールへ

表2. 固化培地と液体培地での変異植物の出現頻度の比較

植物由来	出穂日		稈長		稔実率	
	7/30-8/5	その他	≥75cm	<75cm	≥78%	<78%
種子	100%	0%	100	0	100	0
固化培地	0	100	8	92	35	65
液体培地	65	35	57	43	65	35

表3. 固化培地での変異植物（稔実率78%未満）の出現頻度に対する各細胞培養期間の影響

稔実率	培養期間	
	6週間	24週間
≥78%	35%	0%
<78%	65	100

転換することが植物体の再生に必須であると推測された。

2つの培養系間でなぜこのような違いが生じるかは不明であるが、固化培地上での静置培養と液体培地中での懸濁培養では細胞の置かれている環境が異なり、培地成分の吸収や代謝といった生理的な状態が異なるためといったことが推測される。培養系の確立には試行錯誤によることが多いが、こういった現象の理解が進めば、多くの植物種で簡便に至適培養条件を見出すことが可能になると期待される。

3. 培養変異の発現

再分化植物で生理的・形態的な変異が認められることは多くの植物種で報告されている。イネでは農業形質の変異として早生化、短稈化、稔性の低下などが知られている⁸⁾。クローン苗の生産において変異の発生は極力抑制しなければならないが、一方で培養変異を育種に積極的に利用している場合もある。

我々は前述の2つの再分化系を用いて変異の発生の有無、再分化系間での変異の出現頻度の差を調べた結果、両再分化系由来植物とも上記のような種類の変異が認められた。しかし、同じ由来の細胞塊を用いた2つの培養系間で再分化の効率があまり変わらないのにも拘わらず、変異植物の出現頻度は液体培地由来植物で少なかった（表2）。細胞培養の期間が長くなるに従い変異が増加した（表3）ことから、一般に変異は培養細胞の誘導・増殖中に誘発かつ／または増幅されると考えられるが、この結果は再分化の過程においても変異の発現に影響を及ぼす要因が存在することを示している。その要因として、①再分化過程においても変異が誘発される、②再分化に伴い変異が回復する、③液体培地では変異を持つものは再分化しづらいなどが考えられる。その機構の解析は今後の課題であるが、これを理解することは変異制御の手法を得ることにつながるものと期待される。

2つの再分化系は培養条件が異なり、どのような違いが変異の出現と関連しているか調べることにより、直接的に変異を抑制する方

法が見いだせると考えられる。しかし、培養条件などを変えて再生個体を得て、圃場で稔性等への影響を調べることは、多大な労力と時間が必要であり、培養段階で容易に検出できる変異のマーカーが望まれる。そこで、我々は培養中に容易に検出できるアルビノの出現頻度を2つの再分化系間で比較した。アルビノの出現頻度も上記の変異と同様に液体培地では固地培地より低かったが、現在までのところ特定の培養要因との関連は見い出せてはいない。

農業形質の他にもサザン分析により種子由来植物と再分化変異植物のDNAの変異を比較した場合、多数の制限酵素断片長多型(RFLP)が認められた。特に、シトシンのメチル化に対し感受性の異なる2つの制限酵素を用いた解析から、再分化植物では脱メチル化によると考えられるRFLPが多く見られた。現在、この脱メチル化と形質の変異との関連、および培養条件との関連などについて解析を行っている。

4. 再分化能の遺伝様式

イネに限らず、再分化し易さ(再分化能)には品種間差があることが一般に知られている。2つの培養系ともモデル材料として用いた「ササニシキ」をはじめ日本型・インド型といった生態型に拘わらず多くの品種で再分化が認められたが、「コシヒカリ」や「あきたこまち」といった一部の品種ではほとんど再分化が認められなかった。優良な形質を持つF₁であっても再分化の効率が低くは実用化はできない。再分化能が遺伝的に制御されており、しかも比較的少数の遺伝子によるものであれば、F₁品種の育成過程で交配等により高再分化能を付与することも可能と考えられる。

これまでに再分化能は遺伝し、比較的少数の遺伝子(群)によって支配されていることが報告されている⁹⁾。筆者らは遺伝的背景の異なる14品種を相互に交配し得られた164組合せのF₁の再分化能を調べ、高い再分化能を付与できる可能性がある親としてインド型品種の「Kele」と「青二矮」を見いだした

(表4)。ここで「Kele」はそれ自身高い再分化能を示し、再分化能の低い他品種と交配したF₁も高い再分化能を示した。さらにいくつかのF₁では両親を大きく上回る高い再分化能が認められ、高再分化能の付与が比較的容易であり、再分化能に関してヘテロシスの発現が期待できると考えられた。

表4. 各品種の再分化能に対する組合せ能力

生態型	品種名	一般組合せ能力
日本型	アキヒカリ	-0.04
	日本晴	-0.23
	Ranffaelo	1.00
	Bomba 1	-1.79
ジャワ型	Ketan Nangka	-0.47
	Banten	1.34
	Lemont	-0.75
	CP 231	-2.41
インド型	IR 26	-0.04
	Jamuna	-0.41
	南京11号	0.62
	青二矮	1.96
	Dular	0.36
	Kele	2.66

一方、「青二矮」それ自身は全く再分化しないが、F₁では高い再分化能を示した。これは再分化が補足的な遺伝子(群)によって支配されていることを示すもので、実際「青二矮」と「Ketan Nangka」のF₂での再分化能の分離比から2つの補足的遺伝子(群)によって支配されていることが示唆された。

しかし、同じ両親のF₁であっても父母を逆転すると結果が異なるものも見られた。これは再分化能が母方の生理状態を反映する、また、細胞質遺伝子が関与するなどが考えられ、上で得られたような結果が他の品種の組合せにも一般に共通のものであるかはさらに世代を追って詳細な研究が必要と思われる。また、前に述べたように再分化の効率は培地成分などの培養条件によって大きく変化する。再分化しなかった品種でも培養条件を変えることで再分化することも考えられ、真の意味で再分化能を遺伝的に制御するためには、再分化に関与している遺伝子を取得し、その機能を解析するなどが必要であると考えられる。

5. おわりに

(株)ナーサリーテクノロジーでは共同研究を

含めると品種開発から流通までのイネ培養苗の大量増殖システムの開発を総合的に行ってきた。その結果、多くの成果が挙げられ、ここに紹介した以外にも現象面ではかなりの理解が進んだ。また、実用化するための課題も明確になった。しかし、その現象の原因やメカニズムの解析についてはほとんど未着手である。今後、こういった未解明の現象が理解され、解決のための手段が開発されることにより、実用化への道が開かれるものと期待される。

文 献

- 1) 池田良一 (1994) 農業技術, 49: 487-492
- 2) 長谷川康一 (1993) 技術と経済, 317: 22-27
- 3) 中園敦之ら (1992) BRAIN テクノニュース, 31: 15-16
- 4) 瀬古往子ら (1993) 第15回国際植物科学会議要旨集, pp.543
- 5) Tsukahara, M. and T. Hirose (1992) *Bot. Mag. Tokyo*, 105: 227-233
- 6) Tsukahara, M. and T. Hirose (1992) *Plant Cell Rep.* 11: 550-553
- 7) Tsukahara, M.ら (投稿中)
- 8) Oono, K. (1985) *Mol. Gen. Genet.* 198: 377-384
- 9) Abe, T. and Y. Futsuhara (1991) *Japan. J. Genet.* 66: 129-140

国内情報

循環選抜法によるイネの培養不稔発生の抑制

(株) ナーサリーテクノロジー
遠藤 昇

イネのカルス培養系で高頻度で発生した培養不稔は、収量低下となる重要な克服課題である。筆者らは、培養不稔現象が遺伝的な変異であることを確認したうえで、循環選抜法の適用を行い培養不稔発生の抑制効果を検討した。サイクリックな選抜により、無選抜の約半分に培養不稔が抑制されることが明かとなった。遺伝モデルを用いた解析と循環選抜の結果から、再分化集団の稔性頻度分布は不稔発生が抑制されて、中度稔性以下にピークを持つ二項分布となることが明かとなった。不稔原因には、花粉異常に起因するものと花粉以外に起因する不稔があることが示唆された。

1. はじめに

培養変異 (Somaclonal variation) という用語¹⁾は、培養に伴い観察される変異に対して用いられている。培養変異現象は、古くから組織培養研究者の間では一般的に観察される現象であった。遺伝学的には、必ずしもメンデル性の遺伝様式に従うわけではなく²⁾、培養再分化個体集団中に高頻度でホモの劣性遺伝子が出現する、遺伝様式が不安定であるなど、未知の問題も多い^{4,6)}。

ナーサリーテクノロジー (NUTEC) は、1987年に生物系特定産業技術研究推進機構のプロジェクトとして設立され、組織培養を利用したハイブリッドイネの大量増殖を目的に開発研究が行われてきた。NUTECでカルス培養の基本技術が確立した段階で、培養再分化個体に高頻度で発生する不稔現象を観察した。我々は、この問題を応用研究の立場から捉え、培養不稔を抑制する選抜法検討を開始した。ここでは、培養不稔抑制を目的に行った循環選抜法^{1,2)}の概要と、我々が観察したイネの培養変異 (不稔) 現象を中心に解説する。

ENDO Noboru
現 大成建設(株) 生物工学研究所

2. イネの培養変異（不稔）現象について

イネのカルス培養方法は、研究者により様々であるが、NUTECでは、ササニシキの種子胚盤から誘導したカルスを用いる方法を基本培養系としている^{3,5)}。この培養系をもちいて、不稔発生と培養条件との関連について検討した。その結果は、培養方法による差はなく、培養期間に比例して培養変異が増加することを示した（図1）。変異形質も、

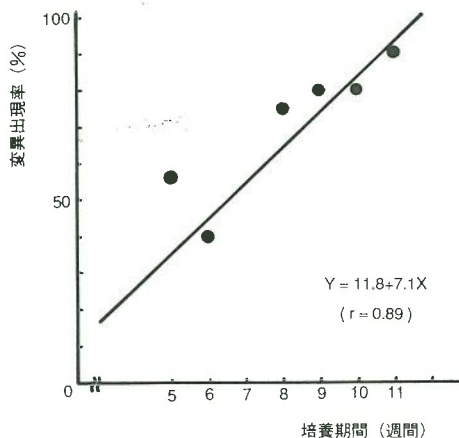


図1 R₀世代に出現する変異率と培養期間の関係

短稈化、稔性低下などが高頻度で観察され、10週間以上培養するとほとんどの個体にはなんらかの異常が観察された。これら培養変異が、遺伝性をもつDNA突然変異であることは、PCR分析を行った結果や、後代検定の結果から確認された。イネの培養不稔が遺伝的変異であることを示しながらも、高頻度で出現する培養不稔現象を説明するに十分な結果は得られていない。しかし、花粉稔性の調査結果は興味深い内容であった（図2）。不稔個体には、花粉稔性が低いことによる不稔群と、花粉稔性が高いにもかかわらず種子稔性が低い個体群があることが明らかとなり、少なくとも雄性以外の原因でおこる不稔が高頻度で混在していることを示していた。

3. 不稔抑制における循環選抜法の適用

培養再分化集団の稔性低下については、実用的な見地から検討を加える必要性があった。まず、ササニシキ種子胚盤由来のカルスから再分化させた再分化当代（C₀R₀）集団から稔性の高い個体を選び、再度培養系を通過させC₁R₀世代を作成し、この過程を1サイク

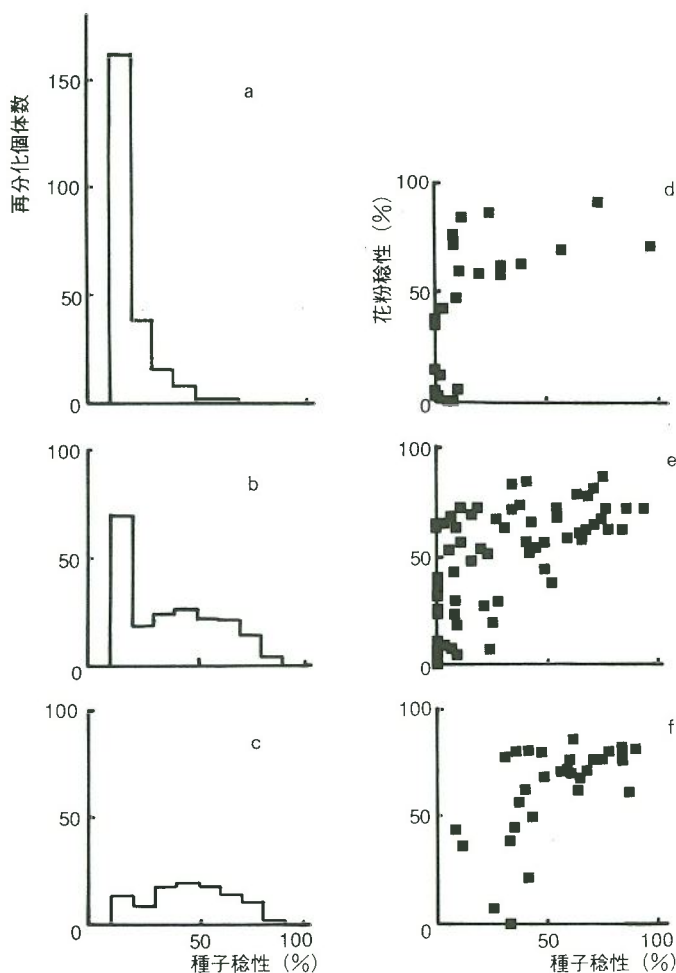
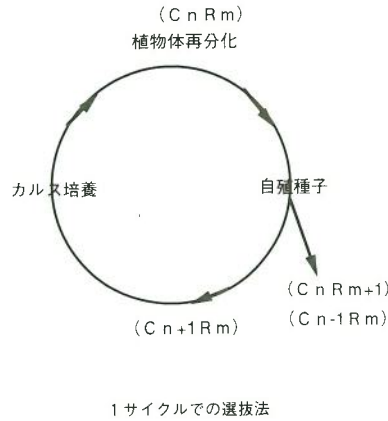


図2 典型的稔性頻度分布型と花粉稔性との関係

a~c: 稔性頻度分 d~f: 種子稔性と花粉稔性
 a: 低稔性単頂分布型 (K197) d: K197
 b: 二項分布型 (K119) e: K119
 c: 中度稔性単頂分布型 (K235) f: K235

ルとした再培養-再分化循環選抜法を考え、最高4サイクル（C₄）まで循環選抜を行った（図3）。稔性頻度分布の調査結果から、選抜効果のあることが窺われた。しかし、ササニシキ並の稔性を持つ選抜集団は得られず、低稔性のみピークを持つ単頂分布型、第2のピークを中度稔性を持つ二項分布型、中度稔性単頂分布型集団が得られた（図2、図4）。低稔性単頂分布型では、花粉異常以外の原因による種子稔性低下群が多く、この群が低稔性に重要な役割をもつことがわかる。C₃・C₄とサイクルが増加しても低稔性単頂分布型が増加し、選抜効果の限界が示唆された。これらの結果から、雄性以外の原因で種子稔性を低下する個体群が低稔性単頂分布型



- 1) R_m 再分化個体上の種子 (R_{m+1}) を選抜し2つに分ける
- 2) 数粒からカルス誘導し、カルス増殖良好な2粒を反復として再培養し、再分化集団を作成
- 3) 残りの種子を栽培し、稔性を調べる
- 4) 2)の培養集団の稔性を同時に栽培調査する
- 5) 3) 4)の比較から、良稔性集団を選び、培養集団系統とする
- 6) 選抜集団から、稔性の高い個体を選び再培養を行う。

図3 再培養一再分化・循環選抜方法

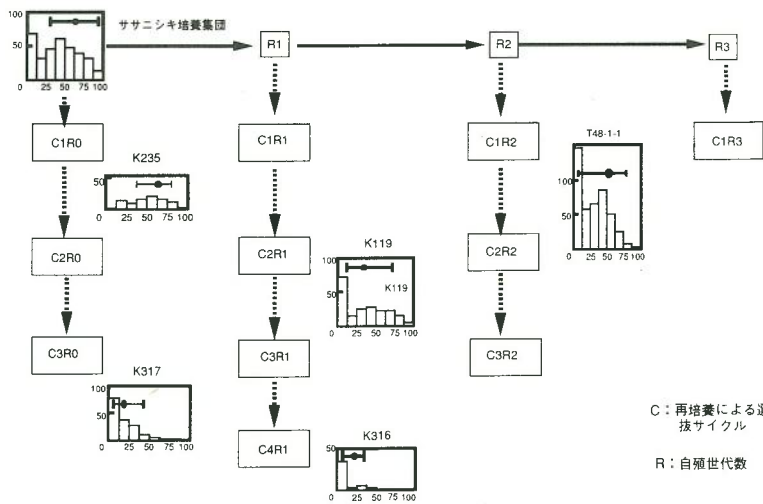


図4 再培養一再分化・循環選抜法による再培養集団の種子稔性変動

を形成していると考えられた。

4. 培養不稔率と循環選抜における遺伝モデル

稔性頻度分布が単頂分布型あるいは二項分布型に留まったので、この点について遺伝モデルを用いた検討を行った。突然変異モデルと選抜モデルを用いて循環選抜サイクルのモデルとした。遺伝モデル式の解説は、ここでは省略するが、 n 個の遺伝子が培養変異 ($A \rightarrow a$) によって不稔となり、この集団の

中から正常な表現型 ($AA + Aa$ 型) を選抜したとすると、培養変異による遺伝子頻度が変化する。再培養一再分化循環選抜法は、この過程を繰り返すことになるので、様々な培養変異率を代入し、 C_i サイクルまで遺伝子変化率を求め、図5に示した。その結果、見かけの変異率が0から1の間で変化すると、不稔遺伝子頻度は培養変異率 (u) の関数として0から0.5の値を取り、収束値は0.5であることが明らかとなった。無選抜の場合には収束値が1となるので、この理論値上の差が選抜効果として期待され、培養不稔変異率が0.8-0.9で不稔発生抑制効果は無選抜に比較して約2倍高いことになり、循環選抜で得られた二項分布集団に適用される。したがって、培養変異は、遺伝モデルで仮定したと同様に毎世代起こっていたと考えられ、培養過程そのものに変異源が存在すると考えられた。

次に、様々な培養変異率のもとでの二項分布・単頂分布出現の可能性を解析した。3遺伝子座2対立遺伝子モデルを用いて培養変異率を変化させてみたところ、低稔性単頂分布が出現するためには、変異率が異常に高い数字でなければ説明されないことがわかる(図6)。同様に見かけの変異率が0.5程度なければ、中度稔性の単頂分布も出現しないことが明らかとなった。二項分布が形成されるためには、この両者が合成されなければならない。同一の培養系において異なる培養変異率を生む機構がなければならないことになる。

5. 培養不稔出現機構の推定

遺伝モデルによる解析結果は、観察されたデータによく適合していたので、見かけの培養変異率 (u per se) から、カルス増殖期間に誘発される真の培養変異率 (u) の推定を試みた。中度稔性単頂分布、低稔性単頂分布が出現するには、異常に高い培養変異率 (u per se) が要求される。培養変異は、カルス培養期間に比例して増加した(図1)ので、培養期間中に誘発される真の培養変異 (u) が細胞増殖と共に増幅され、高い (u per se) が出現したことが考えられる。いま、細胞の平均重量増加は平均細胞数の増加に比例

しているとすると、再分化までの平均細胞増殖回数 n は、 $u \text{ per se} = 2^n \times u$ (average) (n : 平均細胞増殖回数) で表され、培養期間10週目では細胞は初期数から 2^{15} 倍に増幅されていることがわかる。例えば、見かけの不稔変異率0.5のとき、真の変異率は 10^{-5} ないしは 10^{-6} と推定され、この値は他の変異源に比較しても納得できる。しかし、正常細胞も($1-10^{-5}$)の頻度で存在するはずなので、再分化集団中の正常稔性個体の相対頻度も高く保たれるはずである。実際には、ササニシキ並の高稔性個体は少なかったため、なんらかの原因で正常細胞から不稔個体が直接発生しなければ、二項分布は生じない。正常細胞から不稔個体が発生するひとつの可能性は、培養変異に特徴的な劣性ホモ出現のメカニズムにあると考えられる。ホモの突然変異では遺伝子型変化($AA \rightarrow a$)が遺伝子頻度変化($A \rightarrow a$)に等しくなるので表現型における見かけの頻度はかなり高く観察され、正常細胞から直接ホモ不稔が発生すれば正常個体の相対頻度が減少した分不稔個体が増え、二項分布型は出現する。ホモ型の変異もしくはそれと同等の効果を生み出す未知の変異機構が、ヘテロ型の変異と独立に存在し、正常型から花粉稔性が高いのに不稔である型を生じると考えると、得られた結果がよく説明される。

6. おわりに

培養変異発生機構には、解明すべき課題が多い。最近の分子遺伝学の進歩により、培養変異発生の機構については、DNA-methylation⁷⁾、post-transcriptional な遺伝子発現変異⁹⁾、Transposon の発現¹⁰⁾であるなど基礎的な知見が蓄積されつつあり、培養変異の研究はようやく緒についた段階にあるといえる。本研究で、循環選抜に用いた培養期間は長期であり、見かけの培養変異率は0.8-0.9と低稔性単頂分布型が出現するほど高い淘汰圧の環境下にあった。その中で、イネの不稔発生を抑制した選抜法の検討からホモ型の不稔が雄性ではない不稔に関連していることが示された。培養変異の研究は、生物の発生進化に深く関連する領域でもある。今後の基礎研究

不稔遺伝子 (a) 頻度 q

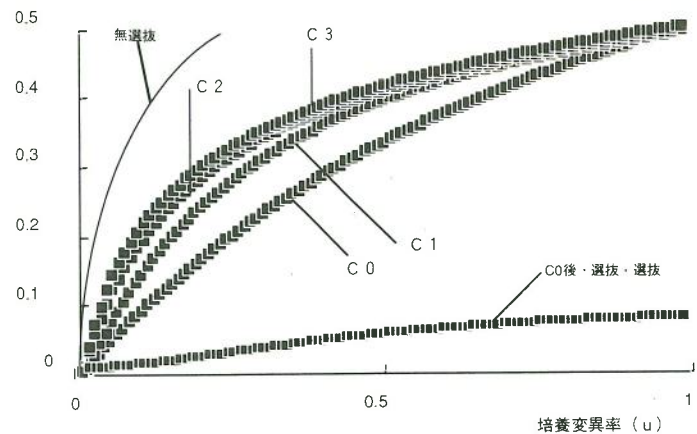


図5 培養不稔変異率変化と各循環選抜サイクルの培養不稔抑制効果

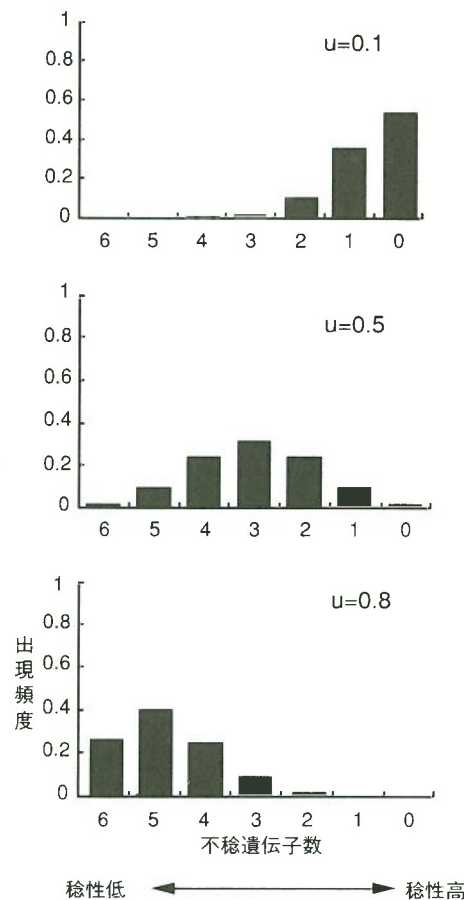


図6 培養変異率 (*per se*) の変化に伴う不稔個体の出現率変化 ($u =$ 見かけの培養変異率)

の進展が待たれる。

文 献

- 1) Falconer, D.S. (1981) *In* Introduction to Quantitative Genetics. 2nd ed. The Ronald Press Co., New York, USA, 22~45
- 2) Hallauer A. R. and J. B. Miranda FO

- (1981) *In Quantitative Genetics in Maiz Breeding*, Iowa State Univ. Press, USA
- 3) Hirosawa, T. (1992) *In International Symposium on Transplant Production Systems*, July 21 1992
- 4) Karp, A. (1991) *In Milfin B.J., ed, Oxford Surveys of Plant Molecular Cell Biology*, vol 7. Oxford University Press, London, 1-58
- 5) Kobayashi, H., M. Okii and T. Hirosawa (1992) *Japan. J. Breed.* 42 : 583-594
- 6) Larkin P. J., L. V. R. Scowcroft (1981) *Theor. Appl. Genet.* 60 : 197-204
- 7) Ngermpasirtsiri J., H. Kobayashi, T. Akazawa (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 4750-4754
- 8) Oono, K. (1985) *Mol. Gen. Genet.* 198 : 377-384
- 9) Paven, M.C.M., Y. Henry, J. D. Buyser, F. Corre, C. Hartmann and A. Rode (1992) *Theor. Appl. Genet.* 85 : 1-8
- 10) Peschke, V. M., R. L. Philips (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81 : 90-97

国内情報

遺伝子操作によるノシバ常緑性品種育成へのアプローチ

(株)ジャパントーフグラス

趙 徹・猪熊 千恵・今泉 信之・金子 誠二

古来より芝生として親しまれているノシバはC4植物に属し、冬には地上部を枯らし休眠する。遺伝子操作により常緑性のノシバを育成することを目的に、遺伝子組換え技術の確立と、休眠に関わる遺伝子の単離を試みた。その結果、プロトプラストへの直接遺伝子導入によるノシバの安定的な遺伝子組換え技術の確立に成功した。また、C4光合成の脱炭酸酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼが、ノシバの休眠に深く関わっていることを明らかにするとともに遺伝子の単離に成功した。

1. はじめに

ノシバ (*Zoysia japonica*) は日本の気候風土に適した草種で、古くから芝草として利用されてきた。今日では、レクリエーション、スポーツ、環境保全等に広く利用されている。近年、乾燥や踏圧等のストレスや病気にも比較的強いといったノシバの特性が海外でも注目されてきており、植栽面積の拡大が予想されている。

ノシバの育種目標としては、耐虫・耐病性の向上とともに地上被覆が速くクオリティーの高い品種の育成、緑葉期間の長い品種の育成などがあげられる。ノシバは暖地型芝草 (C4植物) に属し、光が強く気温の高い真夏に生育が旺盛となり、冬には地上部を枯ら

し休眠する。そのため、冬期に芝生の緑を維持する必要がある場合には、秋に暖地型芝草の上に寒地型芝草の種子を播種するオーバーシードという手法がとられている。

筆者らは常緑性ノシバの育成を第一目標に定め、遺伝資源の探索・収集、交雑を行なう一方で、ノシバの休眠と低温光合成との関係に着目して研究を行ってきた。その結果、国内登録品種第1号である緑葉期間の長いノシバ「みやこ」の育成と¹⁾、ノシバの低温光合成を律速している Key 酵素の特定²⁾、およびその遺伝子の塩基配列を明らかにすることに成功した³⁾。

本稿では、遺伝子操作により常緑性のノシバを作出することを主眼として、筆者らが行っている遺伝子組換えの状況と、ノシバ低温光合成に関与する酵素の性質および遺伝子の単離について紹介する。

CHO Chol, INOKUMA Chie,
IMAIZUMI Nobuyuki, KANEKO Seiji

2. ノシバの遺伝子組換え

洗浄・滅菌したノシバ（品種名；みやこ）ほふく茎の葉原基を含む生長点分裂組織より再分化能を有するカルス（embryogenic callus）を誘導した。カルスを液体培地で振とう培養し、得られた液体懸濁細胞からプロトプラストを単離した。プロトプラストの培養は、市販種子由来のノシバで著者らが以前に確立した方法を基本として行なった⁴⁾。ノシバの遺伝子組換えはこれまで例がなく、ノシバに適した導入方法、選抜用薬剤の選定を行った。ハイグロマイシン、G418、ピアラホス等の薬剤の検討と GUS 遺伝子を用いたトランジェントアッセイの結果から、選抜用薬剤としてはハイグロマイシンが、またプロトプラストへの遺伝子導入にはポリエチレングリコール（PEG）法が適していることが示唆された。以下に、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子（*hph*）と GUS 遺伝子の両方を含むプラスミド pBC1 を導入した、ノシバの遺伝子組換えについて紹介する⁵⁾。

遺伝子導入とそれに続く選抜培地での選抜、選抜されたカルスからの植物体再生、鉢上げといった一連の過程を経て数十個体の再生植物体を得られた。14個体について、*hph* 遺伝子の断片をプローブとしてサザン解析を行なったところ、全てにバンドが検出された（図1）。GUS 遺伝子の検出については PCR 法により行なったが、殆どの個体でバンドが認められた。

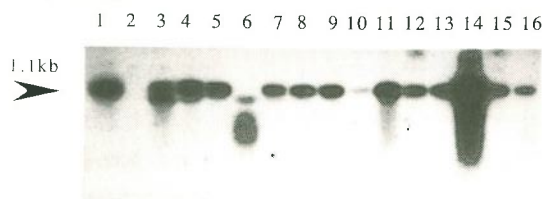


図1 サザン法による導入遺伝子の確認
レーン1：プラスミド DNA (*hph*)、レーン2：非形質転換体、レーン3～16：形質転換体

今回導入した GUS 遺伝子はトウモロコシアルコールデヒドロゲナーゼ (*Adh1*) のプロモーター領域とイントロン1によって発現が制御されているが、トウモロコシ *Adh1*

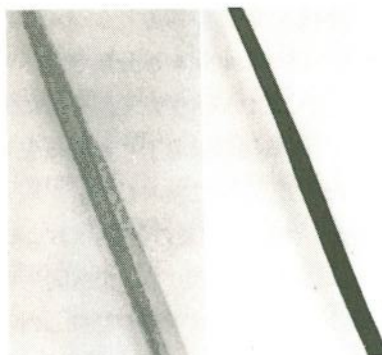


図2 GUS 遺伝子導入ノシバ葉の X-Gluc 染色
左：非形質転換体、右：形質転換体

のプロモーターはイネの葉では機能するがトウモロコシの葉では機能しないことが報告されている⁶⁾。図2に X-Gluc 染色により青く染まったノシバの葉の様子を示したが、この結果はイネと同様にノシバの葉にもトウモロコシ *Adh1* プロモーターを機能させるトランス因子が存在することを示唆している。

本実験から co-transformation の効率を論ずることはできないが、現在行なっている *hph* と耐虫性や耐病性等の遺伝子との co-transformation の結果では、80%以上という高い値を示している。また、形質転換体の作出効率についてもイネの系に近い値が得られており、種々の遺伝子組換え実験に用いるのに充分と考えている。C4植物では、双子葉植物の *Fraxia bidentis*⁷⁾ が比較的形質転換効率の高い植物とされているが、C4植物の大多数は単子葉植物であることを考えれば、C4植物の分子生物学的解析にも筆者らの系が役立つものと考えている。

3. 休眠と低温光合成

ノシバは上述したように C4植物であり、冬期には休眠し地上部は枯死する。ノシバが休眠する要因としては様々なことが考えられるが、筆者らは低温下における光合成の低下が休眠に深く関係しているのではないかと考え、ノシバの低温光合成の解析を行うとともに低温でも光合成を行い休眠しない C4植物の探索を行った。

イギリス北東部から北部の海岸地域に分布している *Spartina anglica* は冬でも緑を維持

し、低温に対して耐性であることが知られている。筆者らは *S. anglica* が分類学上、ノシバに近縁で同じ C4植物のサブタイプに属することから、両草種の低温下における生育と光合成（暗反応）を比較検討した。

温室で生育させた在来のノシバおよび *S. anglica* を人工気象室で 10°C、3 週間生育させたところ、ノシバの地上部が枯死したのに対し *S. anglica* の場合は一定の光合成を行い、生育は悪くなるが地上部の緑も保持された。そこで、いくつかの光合成関連酵素の温度反応性を調べた結果、脱炭酸酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（PCK）の温度反応性の違いが、C4植物の低温光合成に深く関与していることが判明した。図 3 にはノシバと *S. anglica* より精製した PCK の温度反応性をアレニウスプロットの形で示した。ノシバでは 15°C 付近で直線が折れ曲がっており、それ以下の温度域では活

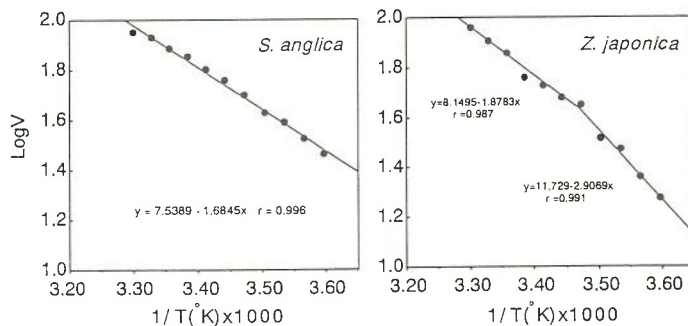


図 3 *S. anglica* (左) および在来のノシバ (右) より精製した PCK のアレニウスプロット
32.5°C の活性を 100 として計算した。

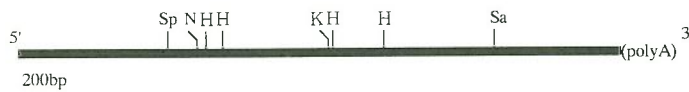


図 4 *S. anglica* より単離した PCK 遺伝子の制限酵素地図
Sp: *Sph* I, N: *Not* I, H: *Hinc* II, K: *Kpn* I, Sa: *Sac* I

<i>Spartina angli</i>	G	D	V	A	L	F	F	G	L	S	G	T	G	K	T	T	L	S	I	D	H	N	R	L	L	I	G	D	D	E	H
<i>Tripanosoma brucei</i>	G	D	V	T	V	F	F	G	L	S	G	T	G	K	T	T	L	S	A	D	P	R	R	N	L	I	G	D	D	E	H
<i>Tripanosoma cruzi</i>	G	D	V	T	V	F	F	G	L	S	G	T	G	K	T	T	L	S	A	D	P	H	R	N	L	I	G	D	D	E	H
<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	G	D	T	A	I	F	F	G	L	S	G	T	G	K	T	T	L	S	A	D	P	N	R	T	L	I	G	D	D	E	H
Yeast	G	D	V	T	L	F	F	G	L	S	G	T	G	K	T	T	L	S	A	D	P	H	R	L	L	I	G	D	D	E	H
<i>E. coli</i>	G	D	V	A	V	F	F	G	L	S	G	N	G	K	T	A	F	P	R	P	K	R	R	L	I	G	D	D	E	H	

図 5 ATP 結合部位周辺のアミノ酸配列の比較

性化エネルギーが上昇している。これは、15°C 付近を境に PCK の酵素活性が急激に低下することを示している。一方、*S. anglica* の場合は高温から低温にかけて低い活性化エネルギーとなっており、低温域でも反応が起こり易いことを示している⁸⁾。筆者らは以上のような結果を基に、ノシバの緑葉期間を延長させる一つの方法として *S. anglica* の低温耐性 PCK 遺伝子を単離してノシバに導入することにした。

4. PCK 遺伝子の単離

S. anglica および在来のノシバ緑葉より精製したポリ A+RNA から cDNA を合成し、λgt11ベクターに組み込んで cDNA ライブラリーを構築した。*S. anglica* PCK 遺伝子のクローニングは *Panicum maximum* の PCK タンパク質の抗体を用いたイムノスクリーニングによって行った。図 4 に単離した *S. anglica* PCK 遺伝子 (*pckSA1*) の制限酵素地図を示した。*pckSA1* は 2208bp からなり 658 個のアミノ酸をコードしていた。この分子量は 72,395 と計算され *S. anglica* より精製した PCK タンパク質の分子量とほぼ一致した。*pckSA1* の塩基配列から推定したアミノ酸の配列は、微生物から単離されている PCK と比較的高いホモロジー (50% 以上) を示し、ATP 結合部位周辺では非常に高いホモロジー (約 80%) を示した (図 5)。

次に、*S. anglica* とノシバの PCK における低温感受性の違いを遺伝子レベルで解析することを目的として、ノシバ PCK 遺伝子の単離を行った。*pckSA1* の 5' 側約 700bp をプローブとしてノシバ cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、目的とするクローンを単離し塩基配列を決定した。塩基配列から推定したアミノ酸の数は 653 個で *S. anglica* の PCK より 5 個少なかった (分子量 71,823)。ATP 結合部位周辺のアミノ酸配列は *S. anglica* と完全に一致していたが、全体のホモロジーは 89% であった。アミノ酸の数の違いや約 10% のホモロジーの違いが、低温感受性にどのように影響するのは今後の検討課題

である。

pckSA1 が単離されたことにより「みやこ」プロトプラストへの遺伝子導入が可能となった。C4植物の PCK は維管束鞘細胞に局在し、オキザロ酢酸の脱炭酸反応を触媒する酵素である。したがって、導入した遺伝子を維管束鞘細胞で効率良く発現させることが必要である。筆者らは、先に在来のノシバより単離した *rbcS* のプロモーター領域の下流に *pckSA1* をつないだ導入用のプラスミドベクターを構築し、*pckSA1* で形質転換した「みやこ」の作出に着手した。現在、ハイグロマイシン選抜を経て幼植物体がいくつか再生してきており、低温光合成と休眠との関係について興味深い知見が得られるものと期待している。

5. おわりに

緑葉期間の長いノシバを育成するということは、いいかえれば休眠期間の短いノシバを育成するということである。休眠にはアブジン酸等の植物ホルモンの関与が知られているが、どのような刺激によってホルモンのバランスが変動するのかは明確ではない。低温によって起こる生体内の生理・物理的变化としては、光合成の低下、生体膜流動性の低下、光障害、低温誘導性遺伝子の発現等が知られているが、生体内でのこれらの変化と休眠との関係を調べた研究は皆無といえる。おそらく、筆者らの研究が初めてと考えられるが、本稿で示したノシバにおける低温光合成と休眠との関係、特に低温光合成の律速酵素と考えている PCK と休眠との関係については、現在行っている組換え実験の結果から多くの知見が得られるものと期待している。

近年、遺伝子組換え植物作出に関する数多くの事例が報告されているが、本稿で筆者ら

が述べたような自分達で育成した品種に独自の遺伝子を導入する試みは稀なケースと思える。商品価値の高い遺伝子組換え植物が作出されるにつれ、導入する遺伝子はもちろんのこと、組換えの方法や遺伝子を導入する植物母材についても権利の問題が問われだしている。遺伝子のように自然界に存在するものの権利化については異論もあるが、研究には多くの資金と時間が投入され、そこから新たな経済的価値が生み出されている現実を考えると致し方のないことであろう。裁判官という第三者が客観的に評価しようとするシステムが人間社会の中に定着している限り、植物育種の中に権利の問題は避けて通れない。対象とする植物に対する‘こだわり’を含めて、今後の遺伝子組換え技術は独自性を高めていく方向に更に進むことであろう。

最後に、PCK の酵素および遺伝子の単離に当たりご助言をいただいた、農業生物資源研究所炭素代謝制御研究室 大杉立室長に感謝の意を表する。

文 献

- 1) 官報 (1995) 号外第43号
- 2) 松葉恭一ら (1994) 日本植物生理学会 1994年度年会講演要旨集, p112
- 3) 今泉信之ら (1994) 日本芝草学会平成3年度春期大会講演要旨集, p154~156
- 4) 大川原良次ら (1992) BRAIN テクノニュース, 28:12~13
- 5) 猪熊千恵ら (1993) 育種学雑誌, 43 (別冊2号): 24~25
- 6) Kyojuka, J. et al. (1990) *Maydica*, 35: 353-357
- 7) Chitty, J. et al. (1994) *Plant J.*, 6: 949-956
- 8) 大杉立 (1994) *Techno Innovation*, p34~39

ラン科植物の育種とその問題点

(株) 沖縄蘭研

唐澤耕司

洋ランの一般消費用の小中型品種の開発、単位面積当りの収益性の向上、低価格化を行うとともに、次の点を明らかにした。① *Phalaenopsis* の実生系の花の不揃いは親株が異数体であることに起因すると推測された。② *Paphiopedilum* の種子の難発芽の原因は種子構造に起因し、硬実種子は種皮を破碎することにより斉一な発芽がみられた。③ *Paphiopedilum* 交配種の不稔性と難発芽は染色体数が種によって異なることに起因している。

1. はじめに

洋ランは、昭和35年頃から農業生産の中にとり入れられるようになり、一般への普及がはかられはじめた。さらに組織培養の成功¹⁾がクローン増殖に応用されるに及んで、同一個体の増殖苗が大量に供給されるようになり、*Cymbidium* をはじめとして栽培が拡大されてきた。

しかし、組織培養のできない品種があること、変異を生ずる可能性、苗の価格、そして当然ながら一時に開花するため、価格保持や労働配分など問題は多い。固定された品種の実生苗の供給も必要である。

育種に関しては、多くは趣味栽培家の手法の延長のまま今日に至り、品評会での入賞花や単に外観の良い花を交配親に使用してきているにすぎず、育種遺伝学の手法を用いた、系統だった改良は殆ど行われていないのが現状である。

また、ランは今日まで贈答用の大型な高額商品の生産が殆どであり、中～小型の、使いやすい手頃な大きさで、誰もが手軽に入手できるような品種の開発は忘れ去られていた。この部分も目的別の育種の方向づけが必要である。

ランはかつては *Paphiopedilum*, *Cattleya*, *Dendrobium*, *Cymbidium* が主要4大属と呼ば

れた。近年急速に消費が伸びてきた *Phalaenopsis* と *Oncidium* を加えて今日、量的に栽培されているのはこれら6属とその近縁属である。これらの中で2, 3の育種の事例と問題点をあげてみる。

2. *Dendrobium* の場合

Dendrobium はアジア、熱帯を中心にヒマラヤからオーストラリアまで分布し、1,000種近い種を含む大属で、約40の節に分けられている。近縁な属間交配さえ可能なラン科の中でこの属は節間の交配が殆ど不可能である。

本属の中でニューギニア近辺に産する *D. phalaenopsis* を中心に近縁の数種を基に改良されてきた一群は「デンファレ」の愛称で呼ばれ、タイや沖縄で切花用として大量栽培されている。

デンファレは通常茎の長さ1m前後、上部の節より長い花茎を伸ばし、花卉の丸い花を2列につけ、花命が長い。これらはもっぱら切花用として改良され、大型で花茎を含めると高さ1mを超え、鉢物用には適さない。

贈答用品（寄せ植えされる）としては茎丈30cm前後の中型品種（更に30～40cm花茎が加わるので、高さ60～70cmとなる）、小型品種は茎丈5～10cmが適当であろう。デンファレ系の節内で草丈の低い種は *D. bigibbum* で、この種はニューギニアからオーストラリアまで分布し、変異に富み、南下するに従って低温と乾燥に適応して小型化し、

変種 *D. bigibbum* var. *compactum* として区別されている。

草丈の低い遺伝子を求め、より固定化するためにこの変種を自家受粉して育てると、草丈5cmから25cmくらいの変異幅がみられた。

また、これら複茎性のランは通常1年に1芽ずつ生じ、新茎に一本の花茎を生ずるのが、このセルフ系の草丈の低い個体では同時に2〜3芽を生じたり、1茎から2花茎を生ずる個体や、花茎第1花までが短く鉢物として釣合の良い個体など様々な有用形質を持つ個体などが得られた。これらを交配親として使用して芽吹きよく、花茎数の多い系統が作出できた。一方、フラスコから植え出して開花までに通常3年を要するが、フラスコ内50本の苗の中から生育の早いもの半数だけを育てることを繰り返して、この系統ではフラスコ出し、1〜1.5年で開花がみられるようになり、生産性は数倍向上した。表紙-A. は6cm鉢での初開花株の例である。

本系統の白色花は大型の *D. phalaenopsis* *alba* と中型の *D. dicuphum* から由来する。これらはいずれも長い花茎の先半分の花をつけ、切花には適するが鉢物としては釣合が悪い。第1花までを短くするため交配、選抜を続けてもなかなか短くするのが難しい。表紙-B. は過去に白色花が交配された花茎の短い紅色花同志を交配して花茎の短い、バランスの良い白色花を分離させたものである。さらに全く新しいタイプの品種作出には各節間の交配が望ましいが、節間の交配はゲノムが異なるため極くまれに少量の種子が得られるに過ぎず、まれに作出できても減数分裂のとき染色体の対合が不斉で正常な配偶子ができず、不稔で次代が得られない。これらは染色体を倍化して複2倍体を作成することによって稔性を回復することができる。

3. *Phalaenopsis* の場合

Phalaenopsis は約45種が *Dendrobium* とほぼ同じ地域に分布している。この属はコチヨウランの愛称で親しまれ、その鉢物生産は *Cymbidium* に次いで近年急速に量産化され

てきている。特に贈答用の高額商品は数本の寄せ植えが用いられる。この場合はメリクローン苗が望ましいが、今日まだ、組織培養の難易、変異の出現、あるいは苗の価格など問題は多い。今日生産の多くは実生苗に依存している。ところが実生苗の生産の場合、結果が未知の、新しい交配種を交配親に用いる場合が多く、常に何が咲くかわからない不安定要素を含んでいる。

表1（未発表）は導入した実生苗を多数開花させた中から外観的に良形質を備えた個体を選抜し、染色体を調査した結果の一部である。良形質と思われた個体でも殆どが異数体で交配親に適さないことが知られる。一般には染色体を調査することなく、見かけ上良個体とみた株を用いて交配がなされるので、その子孫は当然ながら変異株が多い。他の植物の場合と異なり1果実中に100万粒前後の種子を形成するランでは、3倍体や異数体を交配に用いてもしばしば相当量の苗が得られる。一般に3倍体品種は実用上優れていることはよく知られている。実生系はコルヒチン処理や交配によって正4倍体を作成し、安定して良形質を生む組み合わせを見出すことが大切である。表1中の原種の *P. aphrodite* と *P. equestris* は共に3倍体の子孫から出現した正4倍体である。

4. *Paphiopedilum* の場合

本属は70余種が東南アジアを中心にヒマラヤからブーゲンビル島まで分布している。花は地味であるが、鉢物として釣合よく、花命が長く見飽きない。ラン栽培の初期から多くの愛好者があるが大量生産されていない。それは完熟種子が多く得られず、発芽が困難なことに起因している。この難発芽種子の発芽の問題については、人工培地の改良が多くの人達^{1, 2, 8)}によってなされた。これらは発芽後の苗の生育を良好にしたが、安定して斉一な発芽率の向上とは直接関係がみられなかった。

稔性の良い原種の種子でも完熟種子をそのまま播種すると2年以上にわたってぼつりぼ

表1. ファレノプシス属およびその近縁属の染色体数

No	種 または交配種名	染色体	倍数性
Phalaenopsis (Phal.) ファレノプシス属			
原種			
RS-847	Phal. aphrodite x aphrodite	2n=38	2X
RS-848	//	2n=38	2X
RS-849	//	2n=76	4X
RS-1020	//	2n=38	2X
RS-1071	//	2n=38	2X
RS-1076	//	2n=38	2X
RS-1079	//	2n=38	2X
RS-1173	//	2n=38	2X
RS-1175	//	2n=38	2X
RS-1176	//	2n=76	4X
RS-1186	//	2n=38	2X
RS-1193	//	2n=38	2X
RS-1194	//	2n=38	2X
RS-134	Phal. equestris (yellow lip)	2n=38	2X
RS-1351	Phal. equestris 'Takagi' x self	2n=76	4X
TR-587-1	//	2n=56	3X-1
TR-587-2	//	2n=56	3X-1
TR-587-10	//	2n=76	4X
RS-1051	Phal. schilleriana x self	2n=38	2X
RS-1054	//	2n=38	2X
RS-1055	Phal. stuartiana	2n=57	3X
RS-1747	Phal. violacea 'Brother' x violacea 'Ponkan'	2n=38	2X
RS-1023	Phal. zebrina	2n=38	2X
交配種			
RH-2177	Phal. artemis	2n=38	2X
RH-2200	//	2n=57	3X
RH-2205	//	2n=56	3X-1
RH-2206	//	2n=38	2X
RH-2208	//	2n=38	2X
RH-2246	//	2n=38	2X
RH-2248	//	2n=38	2X
RH-955	Phal. Be Glad '#2' x Brother Rainow	2n=80	4-5X
RH-868	//	2n=78	4X+2
RH-1934	Phal. Brother Veil	2n=59	3X+2
RH-2046	//	2n=63	3-4X
RH-2057	//	2n=61	3-4X
RH-2088	//	2n=64	3-4X
RH-2098	//	2n=63	3-4X
RH-2124	//	2n=64	3-4X
RH-2125	//	2n=60	3X+3
RH-2128	//	2n=60	3X+3
RH-2209	//	2n=61	3-4X
RH-2261	//	2n=63	3-4X
RH-1306	Phal. Cassandra	2n=81	4-5X
RH-1721	//	2n=78	4X+2
RH-2233	//	2n=76	4X
RH-2234	//	2n=75	4X-1
RH-2236	//	2n=76	4X
RH-2238	//	2n=75	4X-1
RH-858	Phal. Crystal Veil x Crystal Snow	2n=87	4-5X
RH-979	//	2n=87	4-5X
RH-982	//	2n=92	5X-3
RH-984	//	2n=88	4-5X

表1.の続き

No	種 または交配種名	染色体	倍数性
RH-990	//	2n=85~90	4-5X
RH-992	//	2n=65	3-4X
RH-3326	Phal. Crystal Veil x equestris	2n=58	3X+1
RH-2041	Phal. Glad Lip	2n=77	4X+1
RH-2072	//	2n=76	4X
RH-935	Phal. Glad Veil	2n=84	4-5X
RH-2022	//	2n=83	4-5X
RH-2123	//	2n=80	4X+4
RH-2260	//	2n=84	4-5X
RH-1847	Phal. Grace Palm x Snow Parade	2n=77	4X+1
RH-863	Phal. Hohoemi x Suruga	2n=76	4X
RH-865	//	2n=78	4X+2
RH-912	Phal. Little Mary	2n=56	3X-1
RH-914	//	2n=57	3X
RH-918	//	2n=56	3X-1
RH-1684	//	2n=110	6X-4
RH-1686	//	2n=57	3X
RH-1709	//	2n=60	3X+3
RH-2192	//	2n=56	3X-1
RH-2550	//	2n=57	3X
RH-3478	//	2n=57	3X
RH-928	Phal. Little Steve	2n=59	3X+2
RH-1928	//	2n=58~60	3X+α
RH-1966	//	2n=60	3X+3
RH-2133	//	2n=58	3X+1
RH-2165	//	2n=80	4X+4
RH-2169	//	2n=60	3X+3
RH-2173	//	2n=56	3X-1
RH-240	Phal. Paper Moon x Morning Moon	2n=75	4X-1
RH-1973	Phal. Taisuco Bridian 'A78-3' x Taisuco	2n=76	4X
RH-2002	//	2n=76	4X
RH-2090	//	2n=77	4X+1
RH-3654	//	2n=76	4X
RH-2026	Phal. Taisuco Clouds	2n=76	4X
RH-3141	Phal. Equalacea	2n=38	2X
RH-1208	Phal. Wataboushi	2n=77	4X+1
RH-4352	Phal. Wedding March	2n=57	3X
RH-837	Phal. Yukimai	2n=78	4X+2
Doritis (Dor.) ドリティス属			
RS-1018	Dor. pulcherrima 'T-b-1' x pulcherrima	2n=38	2X
RS-1346	Dor. pulcherrima var. coerulea	2n=38	2X
RH-2628	Dor. pulcherrima 'Botan'	2n=38	2X
RH-3601	Dor. pulcherrima 'No. 1' x pulcherrima 'Superporm'	2n=38	2X
TR-511-2	Dor. pulcherrima x pulcherrima var. coerulea	2n=38	2X
Doritaenopsis (Dtps.) ドリテノプシス属			
RH-1993	Dtps. Lovely Akemi x Dtps. Lady Joyful	2n=74	4X-2
RH-4350	Dtps. Wedding Hall x Phal. equestris	2n=57	3X

つりと発芽し、斉一な発芽がみられない。これらのことから、発芽抑制物質の存在や種皮の疎水性（水分の不透過）などが想定され、未熟種子の播種や長時間の水洗などの方法が試みられ、それ相応の効果もみられたが、完熟種子の播種の方が作業は容易で、種子のロスも少ない。まだこれらの処理方法では交配種の発芽率の向上はみられない。そこで本属の基本的形質を知るために野生種（原種）の種子形態の観察と染色体の調査をして核型分析を行ったところ、本属は *Cattleya* や *Cymbidium* など（両属の各種はいずれも $2n=40$ ）と全く異なる染色体構成からなることが知られた^{3, 4, 5)}。本属の約半数の種では染色体数 $2n=26$ 個を算定し、これら染色体はいずれも4個の大型染色体と漸变的に小さくなっている22個の中部動原体的染色体（V字型染色体）とからなる2様相核型を示し、個々の種は動原体の位置、付随体の有無などによって明らかに区別される。残り約半数の種では $2n=28$ 個から $2n=42$ 個までの異なる数の染色体数が算定され、これら $2n=$

28~42の種では端部動原体的染色体（I字型染色体）の増加がみられる（図1）。このI字型染色体の増加は1対（2個）のV字型染色体が動原体部位で切断することにより、4個のI字型染色体を生ずることによると想定され、I字型染色体2個を1個のV字型染色体として換算すると、 $2n=32=20V+12I=26V$ 、 $2n=34=18V+16I=26V$ などいずれも $2n=26V$ となり、染色体の総量には変化のないことが知られる。

この事実は *P. insigne* $2n=26=26V$ と *P. callosum* $2n=32=20V+12I$ の染色体構成を有する種のCバンド分染法による対比と減数分裂における対合の観察から確かめられている⁶⁾。これら核形態と外部形態の観察から本属は6亜属に分類される⁷⁾が、これら原種の種子形態は亜属ごとに明らかに異なる（図2）。*Parvisepalum* 亜属や *Brachypetalum* 亜属（ $2n=26$ ）の種子は丸く硬い種皮で包まれ、染色体が動原体切断を起こしている *Sigmatopetalum* 亜属（ $2n=28\sim42$ ）の種子はカトレヤやシンビジウムのそれのように細長

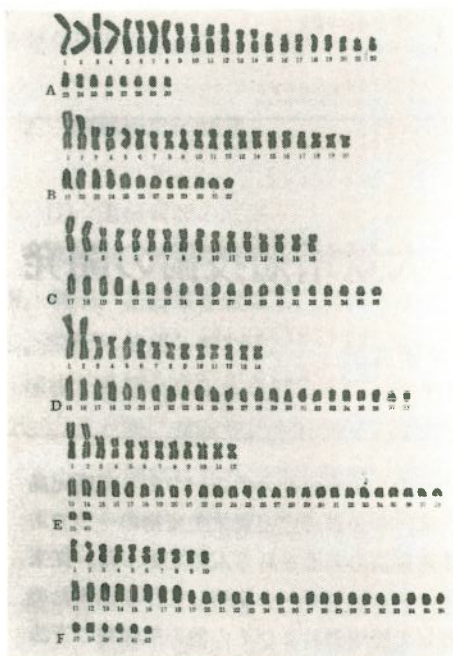


図1. パフィオペディルムにおける $2n=26V$ の動原体切断により生じた種
 A: *P. spicerianum*, B: *P. callosum*,
 C: *P. acmodontum*,
 D: *P. appletonianum*, E: *P. sukhakulii*,
 F: *P. celebesensis*,



図2. パフィオペディルムの種子形態
 A: *P. delenatii*, B: *P. bellatulum*, C: *P. concolor*, D: *P. godefroyae*, E: *P. philippinense*,
 F: *P. rothschildianum*, G: *P. haynaldianum*,
 H: *P. lowii*, I: *P. hirsutissimum*, J: *P. insigne*,
 K: *P. fairrieianum*, L: *P. druryi*, M: *P. ciliolare*,
 N: *P. acmodontum*, O: *P. venustum*,
 P: *P. liemianum* var. *primulinum*,

く透明な1層の種皮に包まれていて、本属の種子は亜属間で大きく相違する。

以上から難発芽といわれる本属の種子発芽には全く異なる2つの問題がうかがわれる。

1つには本属の種子の構造に起因する。厚く硬い種皮からなる硬実種子は、種皮を物理的または化学的処理によって破碎して播種すれば容易に吸水でき、一斉に発芽し大量に苗が得られる。

実際の処理としては超音波によるのが扱い易い。しかし前述のように種によって種子の構造に差がみられるので、それぞれに適する最適条件を見出す必要はある。これらの方法によって本属の遺伝的に発芽能力のある種子の発芽については問題は解決したことになる。他方、交配種については原種間交配の F_1 は作出できるが、染色体数の異なる種間の F_1 では当然ながら正常な配偶子を生ずる率が極めて低く、不稔であるか、極く少量の種子しか生じ得ない。また種子ができて遺伝的に正常でない場合が多く、一見難発芽と思われるのはこれら遺伝的な問題に起因する。事実、稔性の良い交配種の個体の染色体を調査すると、それらは2倍体か4倍体品種である¹⁰⁾。

ここでも染色体の調査、正4倍体の検出または作出、複2倍体作出による稔性の回復などの手だてがないと後代への育種の発展がないことが知られる。

文 献

- 1) Burgeff, H. (1936) G. Fischer, Jena. 312
- 2) 唐澤耕司 (1964) 日本蘭協会誌, 10: 20-24
- 3) Karasawa, K. (1978) *La Kromosomo*, II-9: 233-255
- 4) ————— (1979) *Bull. Hiroshima Bot. Gard.*, 2: 1-149
- 5) ————— and M. Aoyama (1980) *ibid* 3: 67-74
- 6) ————— and R. Tanaka (1980) *Cytologia*, 45: 97-102
- 7) ————— and K. Saito (1982) *Bull. Hiroshima Bot. Gard.* 5: 1-69
- 8) Liddle, R. (1953) *Am. Orchid Soc. Bull.*, 22: 195-197, 580-582
- 9) Morel, G. (1960) *Am. Orchid Soc. Bull.* 29: 495-497
- 10) 唐沢耕司 (1983) 広島市植物公園紀要, 6: 47-64

地域の先端研究

球根花卉類のバイオテック育種と大量増殖技術の開発

(株) 沖永良部球根バイオ研究所

鹿江貞夫

当社は昭和62年4月に、昭和61年度出資事業（第一回）の7事業会社の中の一つとして鹿児島県の南端部の沖永良部島に設立された。研究開発の目的は、この島の主要農業生産物の一つであるテッポウユリを中心に花卉類の生産を一層振興し、農業経済の発展を計るものであった。従来に交配法では作れなかったテッポウユリの新品種をバイオテクノロジーを使用して作り出すために遺伝資源の収集に努め、また、それらを使用して主として胚培養およびその他の数種類の方法で研究を進め、多くの新しい花を開花させた。また、当地で使用されている多数の球根花卉類のウィルスフリーの親球根を作ることに成功し、それぞれの培養条件を研究して苗を作り上げ、栽培して開花させた。また、これらおよび新品種の球根を地域へ急速に普及するための大量増殖装置として液体培養槽および鱗片自動植付装置を開発した。

SHIKAE Sadao

1. 開発の背景

テッポウユリは奄美群島や南西諸島に自生する日本固有のユリであるが、当社が所在する沖永良部島ではその球根を明治時代から栽培しており、近年には世界唯一の大生産地までに成長し、国内や外国の業者に供給してきた。そして、旺盛な開発意欲と温暖な気候により球根花卉類の切花栽培が盛んになり、現在では“花の島”と言われるほどに大量の花卉を生産し、出荷するまでになった。しかし、最近種々の問題が発生してきた。1つは、テッポウユリは他のユリと種間交配ができず新しい花が作れないので球根の需要が伸びないで減少傾向にあること、また、ウィルス病が激化したが、それを解消するためにウィルスフリー球根を安価に大量に増殖する必要があること等である。新品種のテッポウユリを作り出すことはオリジナリティを持ったこの地方の特産品を作ることであり、大量増殖技術は、新品種を作り出したとき、またはこの地方で栽培盛んなグラジオラスやフリージア等の球根に関するトラブルを解決する有効、必要な技術であった。

2. 試験研究の概要

(1) 遺伝資源の収集

品種改良の遺伝資源の各種類のユリは、球根、種子、花粉等を収集し、次の方法で保管し、交配に使用している。

球根 長期には生長点採取または無菌化した後、試験管に入れて25℃で培養し、短期には0～-2℃程度で氷結保管した。一部は試験圃場で継続して栽培している。

種子 シャーレに入れて、常温または15℃程度に保持した。

花粉 バイエル管に入れ、-20～-40℃に保つのが最も結果が良かった。

今までに採集した品種数は原種、変種や交雑種を含めて約100種類である。

交配に使用するときには温室や試験圃場で栽

表-1 テッポウユリの種類による受精率の差異 (交配数 2,563)

種類	ひのもと	ジョージア	慧 星	沖の白妙	平均
受精率 (%)	6.5	23.8	41.3	51.3	24.3

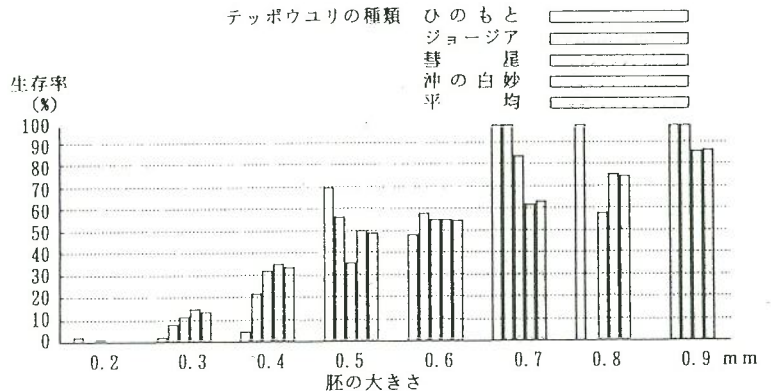


図-1 胚培養における胚の大きさと生存率 (胚培養数 3,264)

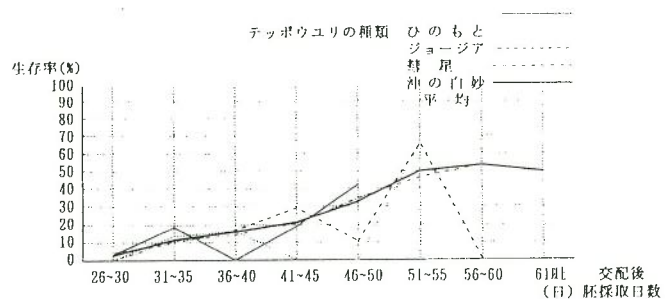


図-2 交配後胚採取日数による胚培養生存率 (胚採取数 3,264)

培し、花粉採取や当地での栽培特性や形質調査をした。

(2) 育 種

前述のようにテッポウユリは他のユリと品種間交配ができないので、次の種々の方法を試みた。育種には、色彩の導入、形態の改善、栽培性質の向上等を当面の目標とした。

(イ) 人工強制交配と胚培養

① 人工強制交配の方法は明道博と浅野義人¹⁻⁵⁾によって開発され、その後、国内や外国でも多くの研究が進められ、手法の改良や進歩があり、新しい品種のユリが作り出されている。当社でも同様の手法で交配と胚培養を行った。交配は母株に主としてテッポウユリを使用した。選抜・交配が進んでいるものほど良く受精した(表-1)。花粉親でも一般にスカシユリ等の交雑種が成績良く、原種ではアジアテック系が良く、オリエンタル系では原種・交雑種共に交配しにくかった。

② 胚培養では培地組成を改良して胚の生存率を高めた(例…MS 28%, 改良品48%)。

母株の選抜・交配度が高い程長期間生育し、胚も大きく生長し、生存率が向上した。(図-1, 2)

③ 交配から開花までの年別の成績を表-2に示す。

(ロ) コルヒチンによる4倍体の作成と2倍体との交配

(イ) 薬培養や花粉培養による半数体の作成とコルヒチンによるその倍数化および2倍体との交配

(ニ) プロトプラストの作成と細胞融合

(ホ) カルス経路による変異の誘起

(ハ) 放射線照射等による人工突然変異の発生

(ト) 野生種の採集と栽培種との交配

これ等の方法を実施しているが、(イ)や(ニ)ではまだ学会でも成功していないものもあり(最近、プロトプラストからの発育および栽培に成功した報文⁶⁾がある)、いずれも培養または栽培試験中である。

培養で球根を形成したものは、温室で栽培し、形状や性質を調査した後、優れた性質のものは品種登録の準備をすると共に増殖した(図-3)。また、染色体検査(プロトプラスト経由法が明瞭)や電気泳動によるアイソザイム測定を行い、交雑種の性質を調査している。

(3) ウィルスフリー原基の作出

ユリのウィルスフリー化を種々の方法で行った。

① 熱処理はユリが温度に弱いため(45°C, 1カ月培養で死滅)使用できなかった。

② カルス経路では再分化が非常にしにくく、変異発生のおそれがある。

③ 生長点採取が最も作業しやすく、結果も良かった。

フリージア、グラジオラス、アマリリス、ユーチャリス、その他の球根花卉類の生長点を採取し、効果的な培養手法を開発した。これらはいずれも栽培までに行い、生育させた。

(4) 大量増殖技術の開発

(イ) 培地組成の改良

MS培地はテッポウユリの培養に適さず、改良して使用した。液体培養では固体培養の成分濃度よりやや低めにする方が成績が良かった。

また、各成分の影響では、①必須なもの…NO₃, PO₄, オーキシン, ②殆ど影響しないもの…微量元素, ③吸収が大きいもの…NH₄, K, Na, SO₄, ④糖は蔗糖の4.5%前後が良く、ブドウ糖として吸収されるが、ブドウ糖添加または単独使用はあまり効果がないことなどが判明した。イノシトールは必要である。

(ロ) その他の培養条件の検討



図-3 胚培養で作ったユリの新品種

表-2 年別テッポウユリの強制交配と胚培養成績

	交 配		胚 培 養		栽 培	
	実施数		実施数		栽培球根数	
平成 1年	実施数	298	実施数	365	栽培球根数	25
	受精子房数	34	生存数	109	翌年開花数	0
	受精成功率	11.4%	生存率	29.9%		
平成 2年	実施数	2,084	実施数	5,593	栽培球根数	524
	受精子房数	775	生存数	1,867	翌年開花数	46
	受精成功率	37.2%	生存率	31.5%		
平成 3年	実施数	4,534	実施数	7,088	栽培球根数	780
	受精子房数	1,106	生存数	2,360	翌年開花数	300
	受精成功率	24.4%	生存率	33.3%		
平成 4年	実施数	2,563	実施数	3,264	栽培球根数	600
	受精子房数	622	生存数	1,103	翌年開花数	約 300
	受精成功率	24.3%	生存率	33.8%		
平成 5年	実施数	1,989	実施数	3,998	栽培球根数	502
	受精子房数	616	生存数	1,197	翌年開花数	約 250
	受精成功率	31.0%	生存率	29.9%		
平成 6年	実施数	2,592	実施数	4,986	栽培球根数	1,655
	受精子房数	833	生存数	1,973	翌年開花数	
	受精成功率	32.1%	生存率	39.6%		

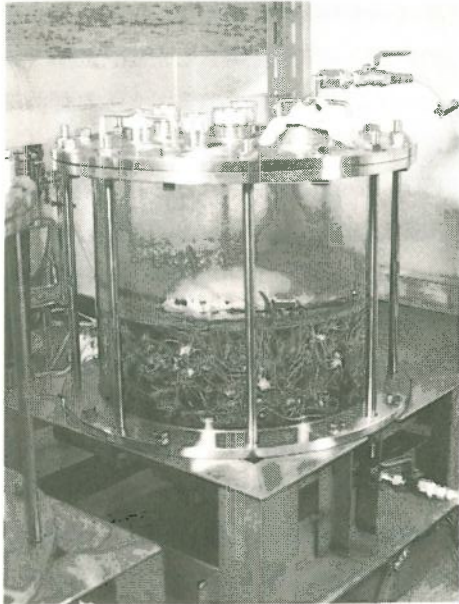


図-4 ユリ球根の液体培養槽

テッポウユリの培養では、温度は25°C、光は暗黒が球根肥大に効果があり、酸素は必須であるが濃度を増加しても固体・液体培養共に殆ど効果がなかった。物理的刺激（超音波・磁場・弱電流等）はカルスや奇形を発生させるが、他のユリでは効果あるものもあった。

(イ) 装置を使用する増殖法の開発

培養槽は各種の槽で試験した結果、①培養液中の鱗片の運動が生育に大きく影響するので空気吹込量や槽の構造が重要、②培養液の補充は効果がある、③光は葉を発生させるがこれは良くも悪くも影響する、④横型槽は鱗片が均一に分布せず不適當であることなどが判明した。培養槽による各種花卉球根の培養は効果が大きかった。テッポウユリ球根の培養状況を図-4に示す。振盪培養機と回転培養機は他のユリや各種花卉球根に効果あるものもあったが、テッポウユリには刺激が強すぎて不適當であった。

(ニ) 機械を使用する増殖法の開発

組織培養による増殖の手法をそのまま機械で行わせる装置を三菱重工業㈱と協

同で開発した。基礎研究は早稲田大学機械工学科が行った。装置は、①鱗片剥離部、②鱗片個別化部、③形状認識部、④取上・植付部、⑤培地供給部等からなる。装置の開発はプロトタイプ（早稲田大学作製）、1号機（全行程を連続して運転し、ユリ組織が球根まで成育することを確認）、2号機（「国際花と緑の博覧会」に展示、図-5）と作製した。以後の開発は、多額の費用が必要なので、改良部分の検討と試験だけを行っている。

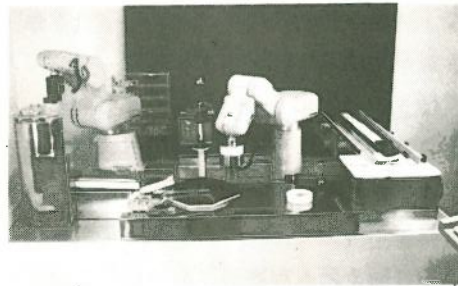


図-5 ユリのりん片自動植付装置

装置または機械による増殖法実用化の主な問題点は①無菌対策、②製作費の低減等である。

3. 出資終了後の事業開発

出資事業による試験研究期間は平成5年3月末日に終了したが、現地では有限会社えらぶバイオセンターを設立して、一部の試験研究の継続と今までの成果を応用した優良種苗および球根等の生産事業を行っている。

文 献

- 1) Myodo, H. (1962) *J.Facul. Agr., Hokkaido Univ.*, 52: 70-122
- 2) 浅野義人・明道博 (1977) 園学雑, 46(1): 59-65
- 3) 浅野義人・明道博 (1977) 園学雑, 46(2): 267-273
- 4) 浅野義人 (1978) 園学雑, 47: 401-414
- 5) 浅野義人 (1980) 園学雑, 49: 114-118
- 6) 杉浦広幸 (1993) 育雑, 43: 429-437

文献情報

微生物における利己的遺伝子

現在の遺伝子操作技術は、制限酵素 (restriction enzyme) の発見を契機に誕生した。制限酵素は、2本鎖DNA上のある特定の配列を認識し、その部分を切断する酵素である。この酵素を使うことにより、デザインされた形でDNAの切り出しが可能となった。

制限酵素は、現在までに微生物を主体として様々な由来のものが取得されており、それぞれ固有なDNA配列を認識し切断する。ところが、これら制限酵素の認識部位は、通常その制限酵素を生産する細胞の染色体遺伝子の中に何か所も存在し、自らの作り出すこれら酵素によって、細胞本体のDNAがバラバラに切断される危険性をはらんでいる。このような自殺行為を防ぐため、細胞には制限酵素という“毒”とともに、その“毒”を消すための仕組みがセットされている。制限酵素が認識する配列部分の塩基にメチル基を付加し、DNAを保護する修飾酵素 (modification enzyme) の存在がそれである。制限酵素と修飾酵素をコードする遺伝子は、通常隣り合わせに対 (ついで) の状態で存在する。

この制限酵素—修飾酵素対 (以下rmと略す) の存在は、ウイルスなどのような外来DNAによる感染から細胞を防御するためのシステムとの認識がなされてきた。しかし制限酵素の中には8塩基以上の配列を認識するものもあり、その配列がDNA上で出現する頻度の低さを考えると、“細胞防御仮説”では、これら制限酵素の進化を容易には説明できない。Naitoらは、それに代わるものとして、rm遺伝子対の進化はそれらの“利己的ふるまい”によるとの説を、それを裏付ける実験データとともに提出した。

研究は *E. coli* において、5'-CTCGAG-3'を認識切断する制限酵素 *PaeR7* をコードする遺伝子とそれに対応する修飾酵素遺伝子

の対 (r^+m^+) を持つプラスミド保有株に、他のプラスミドを導入した場合、第2のプラスミドが r^+m^+ プラスミドと入れ替わる頻度が非常に少ない、つまり r^+m^+ プラスミドが極めて安定に保持されるという観察結果より出発した。

Naitoらは、 r^+m^+ プラスミドの特異な安定性を検証するため、制限酵素能力の欠失した r^-m^+ 、さらに修飾酵素能力も欠失した r^-m^- プラスミドを作成し、それらプラスミド保有株を薬剤選択圧のない条件で継代培養し、プラスミドの安定性を調べた。その結果、選択圧のない培地では r^-m^+ 、 r^-m^- プラスミドが急速に脱落して行くのに対して、 r^+m^+ プラスミドは80世代を経た後もきわめて安定に保持されていた。

同氏は、この r^+m^+ プラスミドの安定性は、制限酵素とその修飾酵素の細胞内における活性消失の速度の違いによるのではないかと推測した。つまり、 r^+m^+ プラスミドが脱落した株においては、細胞内から制限酵素とその修飾酵素も消失していくが、修飾酵素活性の消失の方が制限酵素活性の消失より速いため、染色体遺伝子は修飾酵素による防御機能を先に失い、残存する制限酵素によって分解され、死に至る。この r^+m^+ プラスミドの消失が菌体を死に追いやることは、温度感受性の複製機能単位をもつプラスミドを利用することで検証された。温度シフトによりプラスミドの複製を停止させ、増殖中の菌体より意図的にプラスミド欠失を促した場合、はじめに r^+m^+ プラスミドを保有していた菌株では著しく増殖が阻害された。さらに、 r^+m^+ プラスミドの消失が実際に細胞内で染色体の分解を引き起こしていることが、パルスフィールドゲル電気泳動により実証された。

r^+m^+ 遺伝子対は、自身が細胞より追い出された場合、その報復として今までいた細胞を殺してしまう。結果として自己を細胞の中に保存させるこの遺伝子対の利己的で巧妙なふるまい「遺伝子や遺伝子プログラムは我々が生きていく上での忠実な部下ではなく、我々の体は、遺伝子が自らを乗せるために作

り上げた乗り物である」という、ドーキンスの「利己的遺伝子」説を裏付けるものとして、本実験は興味深い。

(抄訳 家藤治幸—醸造試験所)

(IEFUJI Haruyuki)

Selfish behavior of restriction-modification systems

Naito, T., K. Kasano and I. Kobayashi
Science, 267: 897-899 (1995)

文献情報

カプトガニ血球に存在する (1→3)-β-D-グルカン感受 因子“G因子”

カプトガニ血球抽出物はエンドトキシンに高感度に反応することが知られており、エンドトキシン検出試薬として70年代後半より実用化されているが、検出試薬として使用される過程でエンドトキシンにのみ特異的に感受するのではなく(1→3)-β-D-グルカンに対しても高感度に感受性を示すことが明らかにされた。このカプトガニ血球抽出物の(1→3)-β-D-グルカン感受性を応用した(1→3)-β-D-グルカン特異検出試薬はすでに実用化されているにもかかわらず、この詳細な反応機構はこれまで未解明であった。ここではカプトガニ血球抽出物中の(1→3)-β-D-グルカン感受因子を単離し、他の凝固因子との再構成実験により(1→3)-β-D-グルカン感受機構を分子レベルで解明した研究を紹介する。

113gのカプトガニ血球を材料とし、無菌条件下での三段階のクロマトグラフィーにより0.3mgの精製G因子を得た。このG因子は非共有結合で結合した72kDaのα鎖と37kDaのβ鎖からなる分子量110kDaのヘテロ二量体タンパク質であった。α鎖はβ-1,3-グルカンナーゼ様ドメイン、三つのキシラナーゼA様ドメインと二つのキシラナーゼZ様ドメインからなり、β鎖はセリンプロテアーゼ前駆体ドメインからなっていた。

G因子は(1→3)-β結合をもつさまざまな

グルガンにより活性化されアミダーゼ活性を示したが、エンドトキシンには感受性を示さなかった。最も強い活性化能を示したグルカンは直鎖の(1→3)-β-D-グルカンであるカードランで、カルボキシメチル化や、(1→4)-βあるいは(1→6)-βの分岐の存在により活性化能は低下した。構造の異なる各種のグルカンに対する感受性はすでに報告されている粗精製品での結果とよく一致していた。

G因子は(1→3)-β-D-グルカンによりα鎖、β鎖共に限定加水分解を受け活性G因子に変換される。さらに反応が進むと活性化時の分解部位とは異なる部位が加水分解されることによりアミダーゼ活性が低下するという活性抑制機構の存在も確認された。G因子の活性化メカニズムは、(1→3)-β-D-グルカンがα鎖の(1→3)-β-D-グルカン認識部位に結合することにより、β鎖中のアミダーゼ活性部位が分子表面に露出しβ鎖が活性化され、活性β鎖による分子間でのα鎖とβ鎖の限定分解により活性G因子へ変換されるという機構が予想される。

これまでに解明された他の凝固因子との再構成実験により(1→3)-β-D-グルカン依存性の凝固反応はG因子、凝固酵素前駆体、コアギュローゲンの全てが共存するときのみ認められ、この3成分が必須であることが確認された。また活性G因子は凝固酵素前駆体を直接に活性化するが、コアギュローゲンを直接に限定加水分解してゲル形成させることはできないことが確認された。これにより、(1→3)-β-D-グルカンがG因子を活性化し、活性化されたG因子が直接に凝固酵素前駆体を活性化し、凝固酵素がコアギュローゲンを限定分解しゲルを形成するという(1→3)-β-D-グルカン感受性のカプトガニ血液凝固機構のメカニズムが分子レベルで解明された。

真菌の主要細胞壁構成成分である(1→3)-β-D-グルカンによるカプトガニ血液凝固機構は、グラム陰性菌の細胞壁構成成分であるエンドトキシンによる凝固機構と同様、外来微生物を不溶性タンパクマトリックスで固定化することによるカプトガニ自身のもつ自己

防御機構である。G因子を利用した(1→3)-β-D-グルカンの高感度検出はヒトに対する真菌感染の診断にも有効であろう。またこの(1→3)-β-D-グルカン検出系はグルカンの刺激による生物学的な反応を解析する手段としても有効であろう。

(抄訳 北川剛史—マルハ(株) 中研)
(KITAGAWA Takeshi)

**Purified horseshoe crab factor G
Reconstitution and characterization of
the(1→3)-β-D-glucan-sensitive serine
protease cascade**

Muta, T., N. Seki, Y. Takaki, R. Hashimoto,
T. Oda, A. Iwanaga, F. Tokunaga and S.
Iwanaga

J. Biol. Chem., 270 : 892-897 (1995)

文献情報

豚胚の凍結保存

哺乳動物胚の凍結保存は、個々の個体の完全なゲノムを半永久的に保存できることから、貴重な遺伝資源の保存、輸送あるいは伝播などに重要な意義を有している。マウスをはじめとする実験動物では、系統保存を目的とした胚銀行 (Embryo Bank) の構想が提唱され、国際的な交流も活発に行われている。一方、家畜胚においても、牛、羊、馬では実用的な方向で技術開発が進められ、胚の凍結保存が家畜改良増殖に果たす役割は今後もより一層大きくなると思われる。しかし、これら動物種に比較して豚胚の凍結保存は困難を極め、液体窒素中に保存された胚からの産仔の作出の報告はあるものの、再現性は極めて低く実用段階には程遠い。言い換えれば、豚胚の凍結保存法の開発は、哺乳動物胚の凍結-融解によって生じる細胞傷害要因を解明するための有効な手掛かりを与える興味深い研究材料の一つといえる。

豚胚の凍結保存の困難さとして、低温に対

する著しく高い感受性があげられ、15°C以下という非凍結領域においてすでに低温傷害を受けており、これは凍結保護剤の存在とあまり関係が認められていない。このような高い低温感受性の理由の一つ(あるいはすべて?)は、豚胚の細胞内あるいは細胞膜に含まれる多量の脂質に起因し、低温時に不可逆的な細胞膜構造の変化を引き起こされるためと考えられている。豚胚に含まれる脂肪量には発生段階によって変動がみられ、発生初期(1~8-細胞期)では多く、後期(拡張~脱出胚盤胞)で少なくなっているという。事実、脱出胚盤胞における低温に対する感受性は低下しており、凍結-融解後に生存産仔が得られているのは発生後期に限られている。

本研究では、2~4-細胞期という初期卵割期胚を凍結保存することを目的として、豚胚を遠心分離後(12,500g×8分間)、細胞質内脂肪を除去し、凍結-融解後の生存性を体外培養(融解後96~120時間)と胚移植によって検討した。胚を遠心分離することは、マイクロインジェクション法で形質転換動物を作出する際に、前核期の雌雄両前核を見やすくするために家畜卵子でよく用いられるが(マウス卵子では細胞質内脂質が少なく、卵細胞質の透明度が高いので必要とされない—凍結保存がうまくいく要因?)、遠心分離後の胚の発生能力はほとんど損なわれない。本実験では、サイトカラシンBの存在下で遠心分離後、片方に寄せた脂肪層をマイクロピペットで吸引除去した。脂肪除去後、2~4-細胞期あるいは4~8-細胞期胚(14~18時間の体外培養後)を1.5M 1,2-プロパンジオールと0.1M シュークロースを用いた緩慢凍結法で凍結保存した。その結果、凍結しなかった脂肪除去胚の胚盤胞への発生率は77.8%であったのに対し、凍結-融解後の脂肪除去胚の生存率は55.6~90.6%であり、30.6~64.1%が胚盤胞にまで発生した。当然のことながら、脂肪除去していない未操作胚は凍結-融解後もまったく生存していなかった。胚移植実験では、凍結しなかった脂肪除去胚から10頭の産仔(うち2頭は死産)が、脂肪除去直後に凍

結した胚から3頭の産仔がそれぞれ得られ、これらの産仔は離乳時まで順調に発育した。本実験では脂肪除去後に胚を凍結するというやや乱暴とも思える操作を含むが、1-細胞期卵の脂肪除去後の低温感作を試みた前報 (*Biol. Reprod.*, 51:618-622, 1994) では部分的な脂肪除去よりも脂肪層全体を除去した胚の方がその後の生存率は高いことを報告している。

このように、本研究は細胞質内脂肪を除去した後の豚初期卵割期胚から、少数例ながらも凍結保存後に生存産仔が得られることを実証した意義は大きく、おそらく細胞質内に多量の脂質を含むであろう絶滅に瀕した野生動物の卵子や胚の凍結保存の新しい可能性を示す試みとしても期待できる。

(抄訳 板垣佳明・伊藤ハム, 中研)

ITAGAKI Yoshiaki

Cryopreservation of porcine embryos

Nagashima, H., N. Kashiwazaki, R. J. Ashman, C. G. Grupen and M. B. Nottle
Nature, 374:416, 30 March, 1995

文献情報

サポニン無毒化酵素によって決められる植物病原菌の宿主範囲

病原菌に対する植物の抵抗性の仕組みは、静的抵抗性すなわち菌の攻撃を受ける前からすでに持っている各種の性質による抵抗性と動的抵抗性すなわち菌の攻撃によりはじめて誘導される積極的な防御反応の2つに大別できる。サポニンは2次代謝産物として100属以上もの植物にその存在が認められている配糖体であるが、抗菌作用を持つものもあり、静的抵抗性の一因子である可能性が示唆されている。サポニンは病原菌の正常な膜形成を阻害するが、病原菌のなかには膜の組成上サポニンに対して抵抗性を備えているもの、積極的にサポニンを分解することでサポニンに対する抵抗性を発揮しているものがある。

Gaeumannomyces graminis var. *avenae* (*Gga*)はエンバクに存在するサポニン *avenacin A-1*に非感受性で、エンバクの根に感染できるが、*G.graminis* var. *tritici* (*Ggt*)は *avenacin A-1*に感受性でエンバクに感染することができない。*Avenacin A-1*を持たないエンバク (*Avena longiglumis*) およびサポニンを持たないコムギには *Ggt*, *Gga* ともに感染することができるため、*avenacin A-1*が病原菌の攻撃に対する植物の抵抗性決定因子である可能性が示唆される。*Avenacin A-1*は根の表皮細胞に局在しているため、*Ggt*のようなサポニン感受性菌の感染に対する防壁として機能しているのかもしれない。*Gga*が *Avenacin A-1*に非感受性なのはサポニン無毒化酵素、*avenacinase*を合成しているからである。そこで著者らは *avenacinase*をコードする遺伝子のクローニングを行い、さらにこの遺伝子を破壊することによりサポニン感受性変異体を作成し、病原性について検討を行った。

まず *Gga* の培養濾過中より *avenacinase*を精製し、ポリクローナル抗体を作製した。続いて *Gga* より抽出した mRNA より *lambda gt 11* を用いて cDNA 発現ライブラリーを作り、抗体により *avenacinase* 遺伝子のスクリーニングを行った。8つのポジティブクローンが得られたが、それらは互いにクロスハイブリダイズし、また同一の制限酵素断片を有していた。これらのクローンをプローブとし *Gga* の cDNA ライブラリーおよびゲノムライブラリーから *avenacinase* 遺伝子を含んでいると思われるクローン *pA312* および *pA3G1* をそれぞれ分離した。*pA312* をプローブとした *pA3G1* および *Gga* の全ゲノム DNA のサザンプロットハイブリダイゼーションの結果、*Gga* ゲノムには *avenacinase* 遺伝子が1コピーのみ存在していることが明らかとなった。またノザンプロットハイブリダイゼーションの結果 *Gga* 中に *pA312* にハイブリダイズする、約3kbのRNAの存在が確認された。

ゲノムクローン *pA3G1* が *avenacinase* を

コードしているか否かを, avenacin A-1に感受性を示し avenacinase 活性が認められない *Neurospora crassa* に *pA3G1* を形質転換することにより検討した。*N. crassa* の栄養要求性 (*pyr4*) 変異体に *pA3G1* と *pyr4⁺* 遺伝子を含む *pGM32* の両者を形質転換した。形質転換体を栄養要求性の形質から選抜した後, avenacin A-1に対する抵抗性を検定したところ, 30個体の *pyr4⁺* 形質転換体のうち4個体が avenacin A-1に対して抵抗性を示し, それらの個体で *pA3G1* の導入および avenacinase 活性が認められた。Avenacinase 抗体によるイミュノプロット分析を行った結果, avenacin A-1抵抗性の形質転換体中で avenacinase と思われるタンパク質が検出され, このタンパク質は非形質転換体の *N. crassa* および *pGM32* のみ形質転換した個体では検出されなかった。

Avenacinase 遺伝子の一部を組み込んだプラスミド *pAN7-812* を *Gga* に形質転換することにより avenacinase コード領域で相同的組換えを起こさせ遺伝子破壊することにより変異体を作出した。Avenacin A-1感受性の形質転換体が多数得られたが, サザンブロット分析の結果, これらの変異体では avenacinase 遺伝子が破壊されていることが明らかとなった。Avenacinase 遺伝子の内

部にプラスミドを挿入した形質転換体では avenacin A-1に対する感受性が野生型の8から10倍になり, avenacinase の抗体に反応するタンパク質は検出されず, また avenacinase 活性も認められなかった。一方 avenacinase 遺伝子の外部にプラスミドを挿入した形質転換体は野生型となら違いは認められなかった。また顕微鏡観察の結果, avenacinase 遺伝子が破壊された *Gga* 変異体はエンバクに侵入できないことが明らかとなり, avenacin A-1の無毒化が *Gga* のエンバクに対する病原性の発現に必要な不可欠であることが示された。一方でサポニンを持たないコムギに対する病原性は変わらなかったことから, サポニンを無毒化する病原菌の能力は病原性の発現には必ずしも必要なものではなく, 菌の宿主範囲を規定しているのではないかと考えられた。

(抄訳 小林晃一生物研)

KOBAYASHI Akira

Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme

Bowyer, P., B. R. Clarke, P. Lunness,
M. J. Daniels and A. E. Osbourn
Science, 267 : 371-374 (1995)

海外便り

フランス、英国におけるヒトおよび植物ゲノム研究の現状と将来計画

元農林水産省 農業生物資源研究所 分子育種部
蒲生卓磨

農林水産省のイネ・ゲノムに関するプロジェクト研究は5年目に入り、イネ遺伝子のマッピングや遺伝子単離に関する基盤的成果が得られてきた。一方、STAFF研究所と共同で行っているイネ・ゲノム解析研究も1,800以上のcDNAを中心としたDNAがマッピングされるとともに、YAC（酵母人工染色体）クローンの整列配列による物理地図作成が順調に進められ、マップベイスド・クローニングによる遺伝子の単離研究も進められている。

米国でのヒトゲノム研究については、わが国では比較的よく紹介されているが、ヨーロッパの研究機関が何を目標としてゲノム研究を進めているのかは明確でない。英・仏両国のヒトゲノム研究所および英国のジョインネス植物科学研究所を訪問したので、英・仏両国のゲノム研究の現状および将来計画の概要を述べたい。

1. 仏国 CEPH ヒトゲノム研究センター

(Human Polymorphism Study Center = CEPH)

所在地：27, rue Juliette Dodu, 75010,
Paris, France (所長：Daniel
Cohen)

応対者：Prof. Howard M. Cann

パリ東駅近くの地下鉄駅コロネル・ファビアンから徒歩5分のところにあり、サンルイ病院の北側の角にある5階建てのこじんまりとした研究所である（写真1）。

物理地図作成：CEPH研究所はYACを用いてヒトゲノムの物理地図の作成を主体に
GAMOO Takuma



写真1 仏国のCEPHヒトゲノム研究所（中央の建物）

研究しており、得られたクローンを世界の研究者へ提供していることで有名である。98%物理地図が完成したといわれていたが、その後の研究によりYACクローンにキメラのものがあり、さらに作成された物理地図には多くのホールがあり、これをつなぐための研究を現在実施している。YACとP1ファージの他、PCRによりこれらのギャップをつなぐ研究をしている。PCRは極めて有効な手段で、そのために長い距離のDNAを増幅できるPCRの技術開発研究も行っている。放射線を照射して染色体を適当なサイズに切断し、培養細胞を用いてクローン化したDNA断片もYACコンテイングにおけるギャップを埋めるのに用いられている。

遺伝子単離：得られた物理地図(YAC)を用いて、遺伝病患者の染色体の相同領域にコスミド・クローンによる整列配列（コンテイング）を作製して、ヒトの遺伝病遺伝子（特に、糖尿病）の単離を米国のベンチャー研究所と共同で実施している。CGAリポートおよびミニサテライトを用いた遺伝子のクローニングも実施している。cDNAのクローニングはヒトの心臓について行っている。シーケンスは5'側と3'側から行い、データベ

ス化している。

将来計画： YACによる物理地図上のホールをうめ、コスミド・コンティグを全染色体について完成させる。遺伝子単離は目的としていない。全シーケンスの計画もこの研究所では当面はない。仏国には、ジェネトン (GÉNÉTHON) と呼ばれるヒトゲノム研究所があり、恐らくこちらがシーケンスを担当しているようであるが、今回は訪問する機会がなく明確ではない (研究計画がしばしば変更するので)。

単離された cDNA および遺伝病遺伝子については、特許を取得するつもりはなく、論文発表とコンピューターへのインプットにより、成果を発表していくのを原則としている。

イネゲノム研究へのアドバイス： ①シーケンスは5'側と3'側について、行うのがよい。コンピューター検索で同定できない cDNA については、全シーケンスを決定し、カタログ化するのが望ましい。② cDNA による RFLP マッピング (遺伝地図) はこれ以上行う必要がないのではないか (YAC コンティング作製には十分すぎる)。③ cDNA 単離は特定の組織や器官を除いて、これ以上行っても新しいものは得られないのではないか (コンピューターのデータベースの範囲内である)。④ 今後は物理地図の完成とコスミド・コンティグの作成をめざすのがよい。

2. 英国ヒトゲノム研究所：サンガーセンター

(MRC, The Sanger Center)

所在地： Hinxton Hall, Hinxton,
Cambs CB10 1RQ, England,
UK (所長：John Sulston)

対応者： M.Berks, R.Durbin,
J. Rogers

ケンブリッジ市から車で30分程南へ下がったヒンクストンという小さな町のはずれにある。2階建ての赤レンガの真四角な建物である。2-3階建てが2棟隣接して建設中であった。500名規模の研究所に増員し、その一つは DNA のリソース・センター、もう一つ



写真2 英国サンガーセンター



写真3 英国サンガーセンター、増設中の新実験棟

はヒトゲノムのシーケンス棟になるとのこと。現在、シーケンサー (ABI; 800bp 型) が20台24時間フル稼働していたが、増設後はほぼ倍の規模になるとのことであった (写真2,3)。

研究内容： モデル動物としての線虫 (*C.eleganse*)、ヒトおよび酵母のゲノムについて、特定染色体の全シーケンスをめざしている。ヒトでは、当面の目標は第6染色体とのこと。線虫で得られたシーケンス・データをヒトゲノムの解析に用いるとのこと。YACおよびコスミドの整列配列による物理地図を作成してシーケンスを行っている。シーケンスした多くの DNA 断片を連結するためのコンピューターのソフトが間に合わないと言っていた。そのために、1000bp が一度にシーケンスできる Li-COR 社 (米国) のシーケンサーも将来は導入する計画とのこと。センターには、エレクトロニクスの技術者が数人おり、4-5台のシーケンス自動化ロボットを作製していた。既に部分的技術について特許を申請しており、将来完成すればロボットを発売することも考えているとのこと。

大規模のシーケンスによるヒトゲノムの全シーケンスが目標で、遺伝病遺伝子の単離は単独では行わない。得られた遺伝子については、同センターとしては特許申請は考えていない。増築が完成すれば、世界最大規模の国立ヒトゲノム・シーケンス研究所になるのではないかとの印象を受けた。

イネゲノム研究へのアドバイス：イネについても全シーケンス決定をめざすべきである。そのために、物理地図作成を望む。モデル植物であるアラビドプシスのゲノムデータを、イネゲノム研究へ利用したらどうか。

3. 英国ジョンインネス研究センター

(AFRC, John Innes Research Centre)

所在地：Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, UK

対応者：Mike Gale, Roger Hull, Tristan Dyer, Caroline Dean, Jill Harison, Graham Moore, Roy Dunford

ジョンインネス研究センターは、ジョンインネス研究所、ケンブリッジ・ラボラトリー、セインス・ベリー研究所よりなる農業食糧技術会議所属の植物科学研究所である。

イネ科作物間での遺伝子のシンテニー・マッピング：イネとコムギとのシンテニー・マッピングは日・英二国間共同研究で研究者が相互訪問して、遺伝子を持参して行われた。その成果は、一部既に Bio/Technology 誌に発表されている。

わが国のイネゲノム研究チームから提供されたマーカー DNA を用いたシンテニー・マッピングの研究が、多くのイネ科作物についてケンブリッジ・ラボの G. Moore 博士のグループにより進められ、各作物の染色体間で非常に高い相同性が示され、進化の考察に極めて有意義な成果が得られていた。英国では、現在イネ科牧草のマッピングへもこの研究を拡大しており、近い将来ヨーロッパ内で、アラビドプシスのゲノム研究のような共同研究体制の確立を計画していた。将来は米国、日本などを加えて国際植物ゲノム研究組織へと発展することを望んでいた。

他のゲノム研究：この研究センターでは、インサイト・ハイブリッド法によるマッピング研究がイネ科植物について進められている。また、アラビドプシスの物理地図作成とシーケンス研究をヨーロッパの中心機関として行っている。

4. おわりに

仏および英国のヒトおよび植物ゲノム研究機関を訪問し、研究の現状と将来計画を調査した結果、両国は共に特定遺伝子の単離にこだわらずゲノムの基本的解析と全シーケンスの完成をめざしており、米国が cDNA および有用遺伝子単離を当面の目標としていることと対称的であった。目先のことにとらわれずに、徹底した基礎研究を進めてこそ、将来有用遺伝子が容易に単離されるようになり、大きな成果につながるのではないかといえる。

特別情報

自然と調和した害虫管理

E.F.ニプリング博士と BRAIN セミナー

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所 生体情報部
志賀正和

1. はじめに

1995年(第11回)日本国際賞(Japan Prize ; 財団法人国際科学技術財団主宰)の、「環境保全重視の農林水産科学・技術」分野は、エドワード・フレッド・ニプリング博士の「不妊虫放飼法による害虫総合防除の開発に関する先駆的業績」に対して授与された。ニプリング博士の来日を機に、1995年4月28日、BRAIN セミナー「自然と調和した害虫管理」が開催された。セミナーでは、ニプリング博士の講演“Future Prospects of Sterile Insect Technique, Biorational Control, and Integrated Pest Management”(不妊虫放飼法、生物学的防除、及び総合的害虫管理の将来展望)を基調として、国内からは、1993年10月に達成された沖縄県全域のウリミバエの根絶に、事業開始時から22年間、第一線で携わってきた、沖縄県農業試験場垣花廣幸病虫部長の「日本における不妊虫放飼法適用の発展」、現場と理論の両面で総合的害虫管理(IPM)研究をリードしてきた、岡山大学農学部中筋房夫教授の「総合的害虫管理、その理念と実行」の2題の講演が加わった。

2. ニプリング博士の横顔

ニプリング博士は、1909年テキサス州に生まれ、永年アメリカ合衆国農務省(USDA)で昆虫部長として活躍、公職を離れた、86歳の今も、意欲的に害虫管理の理論の発展に取り組んでいる。今回も、連日の受賞記念行事

SHIGA Masakazu



図1. 講演するニプリング博士

の最終日、4時間の学術討論会の後、この2時間余のセミナーに参加して、終始積極的に発言された。ハードなスケジュールの中でのセミナー出席を快諾されただけでなく、事前の講演要旨送付の依頼には、直ちに20頁を超えるフルテキストで応えて主催者側を驚かせたという。自らの考えを提示し、広く意見や批判を受け、さらに発展させたいとの意欲が、当日の発言にも窺えた。あとで、博士とともに来日した身内のご婦人から、この数年、ペース・メーカーを使っていると聞いて、博士の意欲が、単にその大柄な体軀によるだけでなく、強い意志に根ざしていることを知った。西部魂とでもいふべきものを垣間みた気がする。

3. 不妊虫放飼法

不妊虫放飼法(Sterile Insect Technique, SIT)とは、ガンマ線などを照射して、精子に異常を生じさせた「不妊雄」を大量に野外に放飼して、野生の雌成虫と交尾させ、害虫個体群の増殖率を下げようというものである。不妊雄と交尾した野生の雌成虫は、受精卵を生むが、卵は胚発生途上で死亡するので孵化しない。このとき、不妊虫放飼の効果は、野

生雄の数に対する不妊雄の数の比率が高いほど高くなる。したがって、はじめにいた野生虫を減らすのに十分な数の不妊虫を繰り返し放し続けるならば、野生虫の世代の経過とともに不妊虫—野生虫比率が高まるから、効果が加速される。ニプリング博士は、この点に注目して、不妊虫放飼法が害虫密度を低下させる有効な手法であるだけでなく、害虫根絶の可能性を理論モデルで示した。この着想は、二つの点で極めて独創的である。第一は、不妊雄を使って害虫個体群を抑圧しようというそれまで誰も考えなかった着想であり、第二は、害虫の根絶である。広い地域にわたって、害虫を真にゼロにすることは、自然界で多様な生息場所に住んでいる害虫の分布様式を考えるなら、通常は不可能と言ってよいだろう。しかし、行動が正常で、精子にのみ異常を持った不妊雄が放されるなら、不妊雄自らが野生雌を探して交尾してくれる。

この不妊虫放飼法のアイデアは、1930年代はじめには、ニプリング博士の頭にあったという。当時、博士は合衆国南西部に侵入して牧畜業者を悩ませていたラセンウジバエ (screw worm) の対策を研究していた。この害虫は家畜の傷口に産卵し、幼虫 (蛆) が食い込んで家畜を衰弱させ、ついには殺してしまう。ときにはヒトにも産卵し、悲惨な蠅蛆症を引き起こすこともある。博士は、このハエが冬期にはごく低密度となり、分布域も著しく縮小することと、人工飼料で増殖する技術が開発されていたことに注目した。大量増殖した虫を不妊化するか、次世代に致死因子を伝えるように遺伝的に改変し (1930年代に!), 低密度時に放せば、この害虫を有効に抑圧し、根絶することさえ可能ではないかと考えたのである。共同研究者のブッシュランド博士—R.C. Bushland, このニプリング博士の永年の共同研究者であるだけでなく親しい友人は、今年2月に亡くなったという—との討論をとおして確信を得た。しかし、この着想を聞いた多くの研究者の反応は冷淡であった。野外で野生雄と張り合っただけで雌と交尾できる生存力と行動力を維持しつつ十分な不妊



図2. 総合討論

左2人目からニプリング博士、垣花博士、中筋博士、小山博士 (座長)

化をもたらす技術が見つからないまま、着想はニプリング博士の頭の中にとどまっていた。

1950年、著名な遺伝学者、H. J. ミュラー博士がショウジョバエに適量のX線を照射すると、正常の行動を保持しつつ不妊化されることを発見した。ミュラー博士はこの研究でノーベル賞を受けている。ミュラー博士に手紙を書き、激励されたニプリング博士は、ブッシュランド博士と研究を開始した。1954年、ベネズエラ沖のキュラソー島で行われた野外実験で、ラセンウジバエの根絶が達成された。ニプリング博士が永年抱いてきた着想は、理論的に整理され、1955年に至って公表された。

1972年、沖縄の本土復帰を機に、不妊虫放飼法による南西諸島のウリミバエの根絶事業が計画された。ラセンウジバエの根絶の後、マリアナ諸島のロタ島で、ウリミバエの根絶が不妊虫放飼法によって達成されている。しかし、他にも種々の害虫に対する不妊虫放飼法の試みがあった中で、根絶に成功した事例は、当時、ラセンウジバエとロタ島のウリミバエの二つを数えうるに過ぎなかった。しかも、後者は、小さな島で、大型の台風によって密度が極端に低下した際のものである。とは言え、前者は、キュラソー島の成功の後、合衆国南西部の広い地域で根絶に成功し、メキシコへと事業を拡大しつつあった。

不妊虫放飼法による害虫の根絶は、標的害虫の大量増殖、不妊化、放飼、効果の評価と不妊虫放飼戦術の決定にわたる、極めて高度な総合技術であり、また、その成功のためには多額の予算を要するとともに、予算担当者、

研究者および現地の作業従事者の緊密な連携が不可欠である。技術的には、根絶に必要な不妊虫数の推定と大量増殖施設的设计，生産され放飼された不妊虫が，野生雌と有効に交尾する能力を保持していることが基本となる。1977年に世界で3番目の根絶成功を達成した沖縄県久米島のウリミバエ根絶実験事業でも，不妊雄の野生雌に対する“性的競争力”は，人工条件下での累代飼育による増殖虫の“家畜化”によって，低下を免れえなかった。垣花氏は，さらに，宮古群島，沖縄群島，八重山群島と，順次ウリミバエ根絶を達成した20余年の間，つねに，不妊虫の品質管理を念頭に置きながら，最大時，2億匹のウリミバエを生産し，不妊化して放飼し続ける過程で，基礎生物学的研究の裏づけが重要であったことを強調した。ニプリング博士の着想は，日本におけるウリミバエ根絶事業成功の過程で，精密な実践技術へと発展をとげた。

4. 総合的害虫管理

ニプリング博士は，その着想の際立った独創性の故に，不妊虫放飼法の創始者として余りに著名である。しかし，それにとどまらず，永年にわたって，害虫管理の理論面で，独自の貢献を果たしてきたことも忘れてはならない。その理論は，1979年に出版された大著「総合防除の原理」（本セミナーの司会者，小山重郎氏と晴子夫人によって邦訳され，東海大学出版会から刊行されている）に詳しい。博士は，害虫の発生に対して対症療法的に防除手段をとるだけでなく，広域にわたって，害虫個体群密度を低く管理することを強調する。不妊虫放飼法はその有力な手法であるが，天敵の大量放飼，誘引剤の利用などとの組み合わせによって，相乗効果が期待される。この点は，理論モデルによって裏づけられる一方，大量増殖をはじめ，必要な技術の基本は，すでにわれわれの手中にある。

ニプリング博士が主張する広域的・予防的害虫管理は，今日でも，総合的害虫管理の実践場面では主流ではない。近年の天敵や性フェロモンの作用機構の精密な理論と実践研究の蓄積や，広域個体群動態研究との結合によって，大きな発展が期待される。

一方，中筋氏は，人口爆発，食糧危機が予想される今日，総合的害虫管理の早急な確立が必要なことを明快に示した。膨大な人口を支えうる食料の確保には，耕地面積の拡大か，単位面積収量の上昇を考えるが，前者は，熱帯林の消滅をはじめ，地球環境の危機を招く以上，既耕地の単位面積収量の上昇以外に道はない。ここで化石エネルギーの投入が生産される植物エネルギーを上廻る状況から脱却し，既耕地の生産を上昇させるとともに，農業の持続性を維持する方策が求められている。

総合的害虫管理 (Integrated Pest Management, IPM) は，1) 単独技術偏重から複数の防除技術の合理的複合，2) 経済的被害水準の設定，3) 害虫個体群のシステム管理，を基本概念とする。それは，従来合成殺虫剤を主体とする防除下で軽視されてきた害虫の自然制御機構，とくに天敵の潜在的な抑圧力を重視するが，単なる素朴な農業技術への回帰や農薬の排除を目的とするものではない。自然制御力を補う多くの副次的な手段の一つとして殺虫剤も重要な素材であり，それらの手段にまず求められるのは選択性である。IPMの具体像は，岡山県農業試験場で確立された露地ナス栽培のミナミキイロアザミウマの管理に見ることができる。

ニプリング博士の広域的予防的害虫管理理論と，中筋氏の食糧危機，農業の持続性を見据えたIPMの実践的な理論は，勿論，相反するものではないが，現時点では，容易に結合できるものではない。東京での日程を終えたニプリング博士は，自ら育てた苗が開花している沖縄を訪ねた。終始博士と行動を共にした小山氏からの便りに，小面積の中に種々の作物が複雑に入り混じる沖縄の耕地を見たニプリング博士の“とまどい”が記されている。86歳の老大家は，今回のセミナーを機に，さらに高い理論の構築へと新たな情熱を燃やしているに違いない。

編集後記

生研機構は主要な業務の一つとして、出資によって民間企業のバイオテック関連開発研究を支援しています。これまで36社に出資し、そのうち12社が終了、現在24社が継続中です。それぞれ興味ある成果が得られています。本

号では、50号を記念して、その成果を紹介するため特集を組みました。紙面の都合で一部の成果しか取り上げられなかった点はお許し下さい。また、改めてご紹介する機会があるかと存じますので、ご期待下さい。(大畑記)

ブレインテクノニュース (第50号)

平成7年7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